

極低温電子顕微鏡による 胃プロトンポンプの立体構造解析

Structural Analysis of Gastric Proton Pump by Cryo-Electron Microscopy

阿部 一 啓

Kazuhiro Abe

京都大学大学院・理学研究科・生物物理学教室

要 旨 胃プロトンポンプ、 H^+,K^+ -ATPase は pH 1 という強酸性な環境を胃内腔に作り出す。このように極めて大きな H^+ の濃度勾配を生み出すメカニズムは、生化学上の重要な問題である。我々は極低温電子顕微鏡による電子線結晶学によって H^+,K^+ -ATPase の立体構造を明らかにした。ここでは得られた構造に基づき、胃酸分泌という生命現象に対する一つの分子モデルを紹介する。

キーワード：胃プロトンポンプ、 H^+,K^+ -ATPase、極低温電子顕微鏡、二次元結晶、膜タンパク質

1. はじめに

胃酸分泌の最終段階を担うプロトンポンプ、 H^+,K^+ -ATPase は、ATP の加水分解と共役した H^+ と K^+ の対抗輸送を触媒する膜タンパク質である (図 1A)¹⁾。このポンプの駆動によって、胃内腔には約 pH 1 という非常に酸性度の高い環境が作り出される。これはタンパク質分解酵素ペプシンに至適環境を提供することで、消化にとって必要不可欠であるとともに、外部からのバクテリアやウィルス等の侵入に対するバリアとしても機能する。一方で胃酸過多は消化性潰瘍や逆流性食道炎の主原因であることから、 H^+,K^+ -ATPase を薬剤によって阻害することで効率よく治療することが出来る²⁾。一体どのようなメカニズムで、胃壁細胞内外での pH 差にして約 6、 H^+ 濃度として 100 万倍以上の濃度勾配を、プロトンポンプは作り出すのであろうか。この問題に我々は極低温電子顕微鏡を用いた H^+,K^+ -ATPase の電子線結晶構造解析によってアプローチした。得られた三次元構造と機能解析から、胃酸分泌という重要な生命現象の一端を説明するモデルを紹介する³⁾。

2. 極低温電子顕微鏡による H^+,K^+ -ATPase の構造解析

電子線結晶学⁴⁾ に用いる二次元結晶は、膜タンパク質を界

面活性剤で可溶化、精製した後に、脂質と混合し、透析等によって界面活性剤を除去することで、膜タンパク質が本来あるべき脂質二分子膜中に再構成した状態で得られる。無論、結晶というからには様々な結晶化条件を検討する必要があるが、結晶化は 1 mg/ml 以下のタンパク質濃度で行われることが多く、精製度も三次元結晶化に要求されるほど高い必要はない。この為発現量の低いタンパク質でも検討する価値がある。透析によって界面活性剤が除去される為、界面活性剤に対し比較的不安定な分子でも構造解析できる可能性がある。二次元結晶とは文字通り、結晶格子が平面状に広がった、縦方向に繰り返す単位の無い結晶である。大抵の場合、数 μm 程度と三次元結晶より小さいので、解析には電子顕微鏡を用いる。液体ヘリウム温度 (4K) に冷却することで電子線による結晶サンプルへのダメージを極力軽減してデータ収集する⁵⁾。結晶性の良いものからは電子線回折図形が得られるが、実像のフーリエ変換から構造因子を直接抽出できるので、今回紹介するように中程度の分解能であっても、分解能に応じた構造を得ることが出来る。しかしながら原子モデルが決定できる分解能での構造も報告されており^{6,7)}、結晶の質さえ良ければ技術としては十分に高分解能を到達できるレベルにある。

豚の胃より H^+,K^+ -ATPase を多く含む壁細胞膜画分を調製し、これを界面活性剤で可溶化した。可溶化上清と合成脂質を混合し、酵素活性を阻害する為の阻害剤や基質アナログを含む様々な外液に対して透析することで、条件によって様々な形態の二次元結晶が得られる (図 1B)^{3,8,9)}。これを極低温電子顕微鏡で観察する為には、十分に薄い氷の中に包埋する必要があり、この氷包埋の過程で結晶が壊れることがしばしば起こる。これはカーボン膜への接触などの物理的な崩壊や、乾燥、それに伴う塩濃度の変化等、様々な原因がある。 H^+,K^+ -ATPase は親水的な部位が多く、結晶内での分子同士の接触は親水性ドメインによって形成されている為 (図 1E)、氷を薄くする過程での乾燥によって容易に結晶が崩壊した。これを防ぐ為に有効だったものが、トレハロース溶液に包埋することと、薄いカーボン膜でグリッドの両面を覆うこと¹⁰⁾ によって急激な乾燥を防ぐことであった。トレハロースは保湿に優れた糖で、二次元結晶の包埋剤としても実績⁵⁾ があるが、これだけでは不十分であり、分解能も 10 Å 程度に制限されていた。しかし、後者のカーボンサンド法¹⁰⁾ を併用することで、大幅な分解能の向上が見られた (図 1C, D)。元来、傾斜像撮影時に起こる charge-induced beam shift を軽減する目的で開発された手法ではあったが、今回の事例によって二次元結晶の保護にも大変有用であることが示された。このようにして氷包埋したサンプルから十分な量の傾斜像を撮影し、実像をフーリエ変換して結晶学的に解析することで、最終的には最大 70 度傾斜までのデータを含む 6.5 Å 分解能での立体構造を得ることが出来た (図 1E)。

〒606-0852 京都市左京区北白川追分町
TEL: 075-753-4214; FAX: 075-753-4218
E-mail: ikkei@em.biophys.kyoto-u.ac.jp
2010年8月7日受付

3. H⁺,K⁺-ATPase の E₂AIF 構造

H⁺,K⁺-ATPase は、近縁の Na⁺,K⁺-ATPase や筋小胞体 Ca²⁺-ATPase (SERCA) 等と共に P-type ATPase ファミリーに分類される¹¹⁾。これらのアイソフォームと同様、H⁺,K⁺-ATPase は大きなコンフォメーション変化を伴った、いくつかの中間体をサイクルすることで能動輸送を達成する (図 1A)¹²⁾。ATP の加水分解は、ファミリー間で普遍的に保存されたアスパラギン酸残基への自己リン酸化を介して行われる。これはリン酸化中間体 (E₁P, E₂P) と呼ばれ P-type ATPase の呼称の由来でもある。濃度勾配に逆らった H⁺ の胃内腔への遊離は E₁P → E₂P の過程で起こる。H⁺,K⁺-ATPase はこの素過程における逆反応、すなわち E₁P 形成が殆ど起こらないことが知られていた^{13,14)}。このような E₂P を好む性質 (E₂P-preference) は、生理的に好ましくない H⁺ の逆流を防ぐ為に、このアイソフォームが何か特殊な機構を備えていることを想像させる。これを明らかにする為に我々は H⁺,K⁺-ATPase の構造解析を行った³⁾。

二次元結晶より得られた 6.5 Å 分解能の構造 (Electron Microscopy Data Bank 5104) は、分子内の主要なドメインを十分に分離する解像度があった (図 2A)。触媒機能を有する α-subunit は 10 本の膜貫通ヘリックスからなり、細胞内に Nucleotide-binding (N), Phosphorylation (P), Actuator (A) ドメインを有する。補助的なサブユニットという位置づけであった β-subunit は、一本の膜貫通ヘリックス (βTM) と、大きな細胞外ドメイン、細胞質側の N 末端 (βN) を細胞内側に持つ。得られた構造はリン酸アナログであるフッ化アル

ミニウム (AIF) が P ドメインに結合し、E₂P 状態を模倣している (E₂AIF) ことが判った。

このように H⁺,K⁺-ATPase の全体構造は、SERCA¹⁵⁾ や特に相同性の高い Na⁺,K⁺-ATPase¹⁶⁾ と非常によく似た構造をしていた。しかしながら、このアイソフォームに特徴的な構造が細胞質側に存在する。βN は、βTM から伸びた一本の棒状の構造として見いだされ、その末端付近で P ドメインと結合していた (図 2A, C, arrowhead)。SERCA の E₁P-ADP と E₂P 状態の構造を比較すると、細胞内ドメインの配置が、それぞれの中体の性質を決定づけるカギになっていることがわかる¹⁵⁾。我々の H⁺,K⁺-ATPase の構造では、βN が P ドメインを E₂P 形成に適した位置に繋ぎ止めることで、逆反応による E₁P の形成を抑えているように見えた (図 2C)。そこで我々は、このサブユニット間相互作用こそが H⁺,K⁺-ATPase に特徴的な E₂P-preference を説明する構造であり、βN を欠損した場合、逆反応によって E₁P が形成されるのではないか、という仮説を立てた。

4. H⁺,K⁺-ATPase のラチェット機構

上記の仮説を裏付ける為に、幾つかの N 末端欠損体において逆反応が進行するか否かを検討した³⁾。結果 N 末端 8 残基以上欠損した変異体 (Δ8, Δ13) において、ADP の添加によって顕著に EP 量が減少し、逆反応の進行である ADP 感受性 E₁P の形成が確認された (図 2B)。これらの構造と機能に関する実験結果は、βN が P ドメインを E₂P 形成に有利な位置に繋ぎ留めることで、E₂P から E₁P への逆反応を防ぐ、いわば“ラチェット”として機能していることを示唆している。

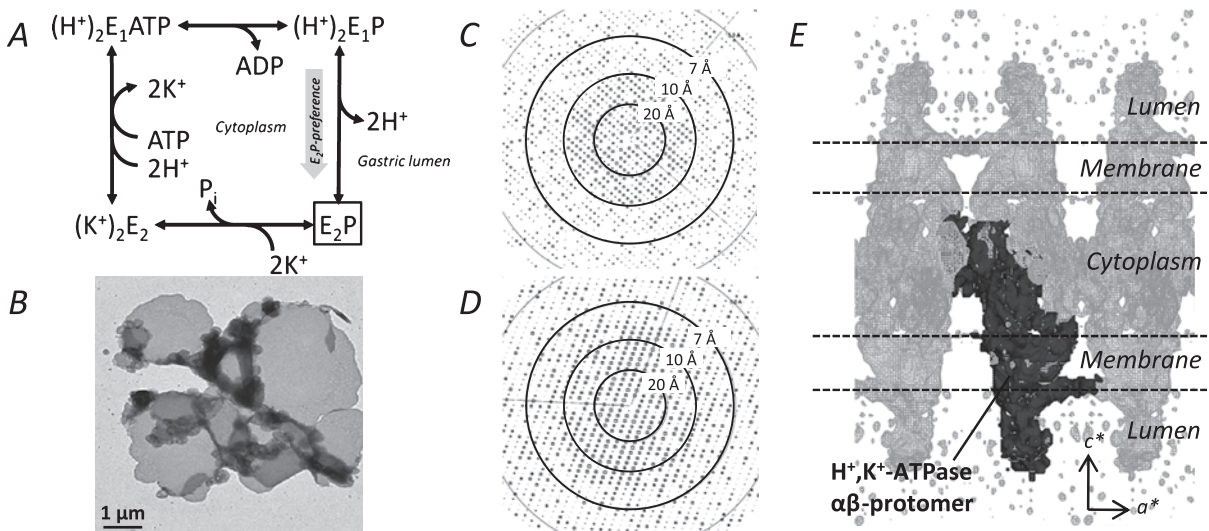


図 1 H⁺,K⁺-ATPase の二次元結晶

(A) H⁺,K⁺-ATPase の反応機構。反応サイクルの内側が細胞内 (Cytoplasm)、外側が細胞外すなわち胃内腔 (Gastric lumen) を表す。四角で示した E₂P が今回構造解析されたコンフォメーションである。(B) 二次元結晶の負染色像。(C) トレハロース包埋、(D) カーボンサンド法による試料調製によって得られた二次元結晶の IQ プロット (回折点の振幅強度の S/N 比を逆格子点上にプロットしたもの。四角が大きい程 S/N 比が高い。詳しくは文献 4 を参照)。D は 45 度傾斜像からの解析結果であるにも関わらず、C に比べて有意に分解能が高いことがわかる。(E) 三次元構造。黒く示した部分が H⁺,K⁺-ATPase の機能単位。二次元結晶は一枚のシートのように見えたが (A) 実際には二層の脂質二分子膜から構成される。それぞれの層に分子が同じ配向で再構成され、これらの層が細胞質ドメイン同士で結晶を形成している。

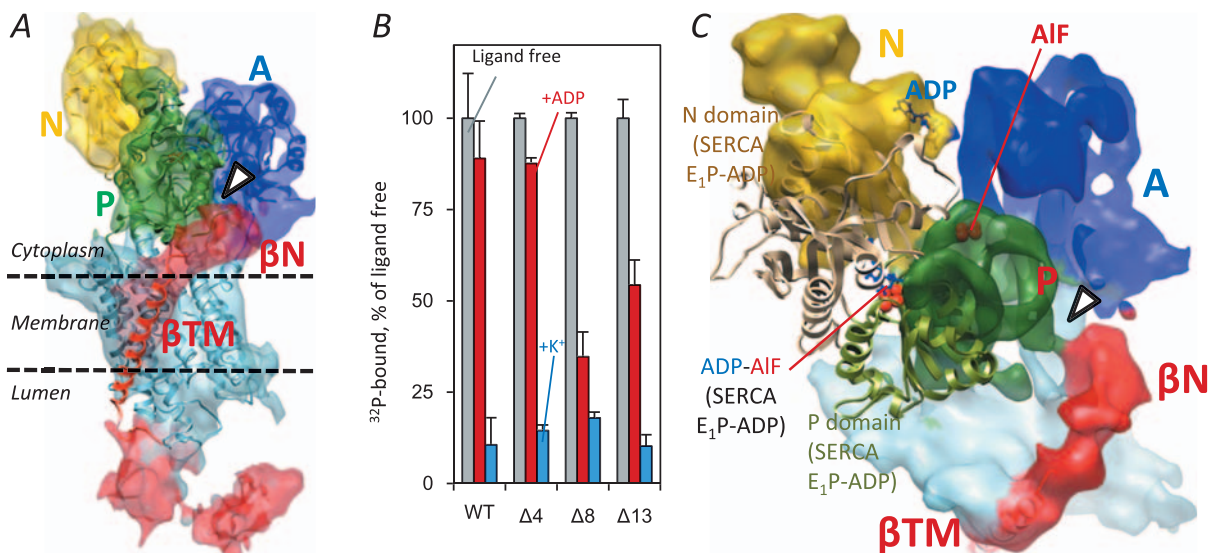


図2 分解能 6.5 Å での H⁺,K⁺-ATPase の構造

(A) H⁺,K⁺-ATPase の全体構造。電子顕微鏡によるマップ (surface 表示) に対して、H⁺,K⁺-ATPase のホモロジーモデルを重ね合わせた (リボンモデル, PDB ID: 3IXZ)。細胞質ドメインや β-subunit が十分な解像度で見えている (本文参照)。(B) N 末端欠損変異体の EP 形成量。8 残基以上の欠損 (Δ8, Δ13) において、ADP の添加による顕著な EP 量の減少が観察される (赤)。この結果が逆反応の進行を示す E₁P の形成を示している (図 1A 参照)。(C) ラチェットモデル。今回解析された H⁺,K⁺-ATPase E₂P 構造 (surface 表示) では、P ドメインが βN に繋ぎとめられている (arrowhead)、E₁P 状態 (リボンモデル) への構造変化が抑制されている。

図 2C に示したように H⁺,K⁺-ATPase の E₂P 状態の構造 (surface 表示) を、SERCA E₁P-ADP 状態の原子モデル (リボンモデル, PDB code, 2ZBD) と比較すると、E₁P/E₂P 状態の遷移に伴って、P ドメインが大きく動いていることがわかる。今回の E₂P 構造で見出された βN と P ドメインの相互作用は、P ドメインを繋ぎ止めることで、H⁺,K⁺-ATPase が E₁P を再形成できないようにしていると考えられる。したがってこの構造を欠損させた場合、P ドメインが自由に動けるようになり、E₁P の形成が可能になった訳である。この性質は *Xenopus oocyte* の発現系を用いてさらに詳細に検討され¹⁷⁾、*in vivo* においても我々のモデルを裏付けるものとなった。また、興味深いことに、Na⁺,K⁺-ATPase での βN 欠損変異体の解析結果は、野生型と有意な差を示さなかったことから、βN のラチェットとしての機能は H⁺,K⁺-ATPase 特異的であることも示された¹⁷⁾。

5. 異なるリン酸アナログによる構造解析

上記の構造解析に用いられた AIF の他にも、フッ化ベリリウム (BeF) やフッ化マグネシウム (MgF) はリン酸アナログとして様々な酵素を阻害することが知られている。SERCA の X 線結晶構造解析や機能解析から、これらのフッ化物はそれぞれが模倣するリン酸の電子配位状態から、同じ E₂P でも少しずつ異なる状態を誘導することが示唆されている。これらが H⁺,K⁺-ATPase に及ぼす影響を理解し、二次元結晶化による構造解析に応用することで、アイソフォーム間での構造変化の違いを知ることが出来ると考え、BeF 存在下での二次元結晶化を行った⁹⁾。以前の AIF 存在下での二次元

結晶と違い、太いチューブ状の結晶が得られた (図 3A)。その為、この投影像には上下の結晶格子が重なって映ることになるが、これらはフーリエ変換によって容易に分離することが出来るので (図 3B)、独立な結晶として解析した。得ら

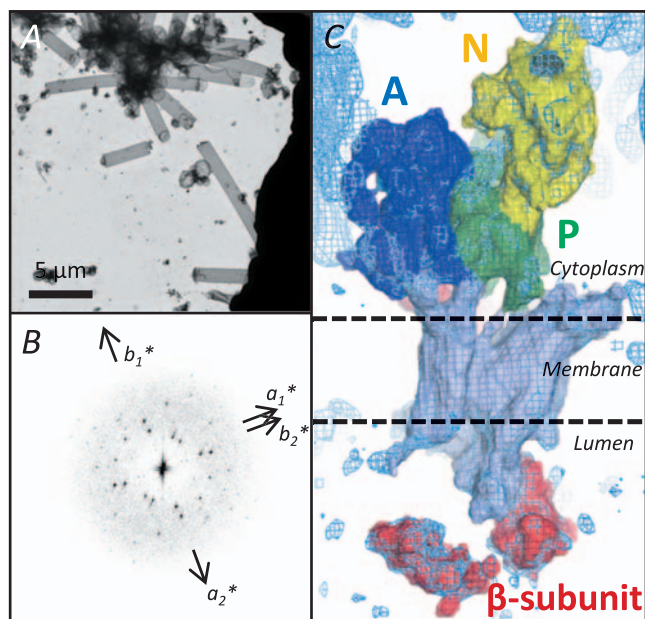


図3 E₂BeF 状態での構造解析

(A) E₂BeF 状態の二次元結晶の負染色像と、(B) そのフーリエ変換。E₂AIF の二次元結晶 (図 1B) と異なり、太いチューブ状結晶が得られた。(C) 8 Å 分解能での E₂BeF (メッシュ表示) と E₂AIF (surface 表示, 図 2 参照) の密度図。ドメインの配置やヘリックスの位置に有意な差は殆ど認められなかった。

れた立体構造はしかしながら、前述の E₂AlF 構造と殆ど同じものであった (図 3C)。従って SERCA で観察されたような、イオン結合サイトが管腔側に開いた E₂BeF 構造¹⁵⁾とは違い、H⁺,K⁺-ATPase では安定に存在し得るコンフォメーションが異なることが考えられた。これはそれぞれのアイソフォームが作り出すイオン濃度勾配と関係しているように思われる (詳しくは文献 9 を参照)。一方で、異なる二次元結晶から独立に解析された E₂AlF, E₂BeF の構造がほぼ同一であることは、電子線結晶学による構造解析技術の高い信頼性を裏付けるものである。

6. おわりに

以上の構造と機能的な解析結果から、我々は何故 H⁺,K⁺-ATPase が胃内腔と細胞内との間に 100 万倍ものプロトン濃度勾配を形成できるのかを説明するラチェットモデルを提唱する³⁾。胃壁細胞膜を隔てた大きなプロトン濃度勾配は、イオン輸送サイクルを逆行させる強い圧力となる。この逆反応は、効率的なイオン輸送の妨げになるだけでなく、プロトンの逆流を伴う。それ故 H⁺,K⁺-ATPase はその分子内に“ラチェット”を備えており、生理的に好ましくない逆反応を抑え、イオン輸送サイクルが順方向にのみ進行するように制御されているものと考えられる。

7. 謝 辞

本研究は藤吉好則博士、谷一寿博士、西澤知宏博士との共同研究として京都大学理学研究科藤吉研究室で行われたものです。電子顕微鏡は小林一美氏 (JEOL) にご協力頂きました。卵母細胞による機能解析は Thomas Friedrich 博士、Katharina Dürr 博士 (Technical University of Berlin) との共同研究です。研究の立ち上げから通じて谷口和弥博士 (北海道大学) には有用な助言を頂いています。ここに感謝の意を表します。

- 1) Ganser, A.L. and Forte, J.G.: *Biochim. Biophys. Acta*, 307, 169–180 (1973)
- 2) Sachs, G., Shin, J.M., Vagin, O., Lambrecht, N., Yakubov, I. and Munson, K.: *J. Clin. Gastroenterol.*, 41, S226–S242 (2007)
- 3) Abe, K., Tani, K., Nishizawa, T. and Fujiyoshi, Y.: *EMBO J.*, 28, 1637–1643 (2009)
- 4) Henderson, R., Baldwin, J., Downing, K., Lepault, J. and Zemlin, F.: *Ultramicroscopy*, 19, 147–178 (1986)
- 5) Fujiyoshi, Y.: *Adv. Biophys.*, 35, 25–80 (1998)
- 6) Miyazawa, A., Fujiyoshi, Y. and Unwin, N.: *Nature*, 423, 949–955 (2003)
- 7) Gonen, T., Cheng, Y., Sliz, P., Hiroaki, Y. and Fujiyoshi, Y.: *Nature*, 438, 633–638 (2005)
- 8) Nishizawa, T., Abe, K., Tani, K. and Fujiyoshi, Y.: *J. Struct. Biol.*, 162, 219–228 (2008)
- 9) Abe, K., Tani, T. and Fujiyoshi, Y.: *J. Struct. Biol.*, 170, 60–68 (2010)
- 10) Gyobu, N., Tani, K., Hiroaki, Y., Kamegawa, A., Mitsuoka, K. and Fujiyoshi, Y.: *J. Struct. Biol.*, 146, 325–333 (2004)
- 11) Palmgren, M.G. and Axelsen, K.B.: *Biochim. Biophys. Acta*, 1365, 37–45 (1998)
- 12) Rabon, E.C. and Reuben, M.A.: *Annu. Rev. Physiol.*, 52, 321–344 (1990)
- 13) Helmich-de Jong, M.L., van Emst-de Vries, S.E., De Pont, J.J., Schuurmans Stekhoven, F.M. and Bonting, S.L.: *Biochim. Biophys. Acta*, 821, 377–383 (1985)
- 14) Rabon, E., Sachs, G., Mårdh, S. and Wallmark, B.: *Biochim. Biophys. Acta*, 688, 515–524 (1982)
- 15) Olesen, C., Picard, M., Winther, A.M., Gyrupe, C., Morth, J.P., Oxvig, C., Møller, J.V. and Nissen, P.: *Nature*, 450, 1036–1042 (2007)
- 16) Morth, J.P., Poulsen, H., Toustrup-Jensen, M.S., Schack, V.R., Egebjerg, J., Andersen, J.P., Vilsen, B. and Nissen, P.: *Nature*, 450, 1043–1049 (2007)
- 17) Dürr, K.L., Abe, K., Tavraz, N.N. and Friedrich, T.: *J. Biol. Chem.*, 284, 20147–20154 (2009)