

**【目的】** 細胞膜を隔てた物質不均衡分布の形成を担う P-type ATPase の中でも、特徴的かつ生理的に重要な胃プロトンポンプと脂質フリッパーゼについて、その作動機構や基質認識機構を明らかにし、これらをターゲットとした創薬に資することを目的とした。

**【方法】** ヒト由来培養細胞により標的タンパク質を大量発現した。界面活性剤によって可溶化、抗体カラム、ゲルろ過カラムによって精製した。濃縮した精製標品を脂質と混合し三次元結晶化に供した。結晶化条件を最適化、得られた良質な三次元結晶のみを大型放射光施設 SPring-8 BL41XU、BL45UX にてマイクロフォーカスビームによる回折データを取得した。胃プロトンポンプは単結晶から 3.0 Å、脂質フリッパーゼに関しては 1,500 個以上の単結晶からのデータをマージすることで結晶構造 (3.9 Å) を得た。脂質フリッパーゼの CryoEM による構造解析は、精製サンプルをグリッドにアプライし、液化エタンを用いて急速凍結したものを、低温電子顕微鏡 (Titan Krios) によって観察した。粒子像は Gatan K3Summit によって撮影した。得られた電子顕微鏡画像は Relion 3.0 ソフトウェアによって解析し 3.0~4.0 Å 分解能において複数の構造を得た。

**【結果】** 1. 胃プロトンポンプの薬剤結合構造：韓国で上市された胃酸抑制剤 Tegoprazan の結合構造を 3.0 Å 分解能で解析し、その結合様式を初めて明らかにした。2. 脂質フリッパーゼの結晶構造：アポトーシスの際に死細胞が提示する Eat me シグナル、フォスファチジルセリン (PtdSer) の輸送を担う脂質フリッパーゼ ATP11C の結晶構造解析に始めて成功した。得られた構造は、細胞膜外葉から PtdSer を取り込む状態であった。変異体による機能解析と併せて、ATP11C が PtdSer を輸送する経路を明らかにした。3. 脂質フリッパーゼの Cryo-EM 構造：輸送基質である PtdSer もしくは PE が結合した三つの構造を含む、脂質輸送サイクルにおける五つの中間体、合計六つの構造を解析した。ATP 加水分解と共役した脂質の細胞膜外葉からの取り込み、閉塞に関する一連の分子メカニズムと、特異的な脂質認識機構を明らかにした。

脂質フリッパーゼ ATP11C の CryoEM 構造

