

44. 神経変性疾患に関わるポリアミン輸送体の構造解析

西澤 知宏

横浜市立大学 生命医科学研究科

Key words : P型ATPase, 輸送体, ポリアミン, 神経変性疾患, クライオ電子顕微鏡

緒言

ATP13A2 (PARK9) は P 型 ATPase に属する輸送体であり、Kufor-Rakeb 症候群や早期発症パーキンソン病などを含む一連の神経変性疾患の原因遺伝子として特定された。P 型 ATPase には金属カチオンの輸送体が多く含まれることから、ATP13A2 も類似の仕組みを持つ重金属輸送体ではないかと考えられていたが、近年の研究によって、ATP13A2 は後期エンドソームではたらくポリアミン輸送体であり、細胞外から取り込んだポリアミンをリソソームから細胞質へと放出する輸送体であることが明らかとなってきた [1]。ポリアミンは生体にとって必須な因子であり、遺伝子発現 (転写)、重金属や活性酸素による毒性抑制など重要な役割を持つため、様々な因子によって制御されている。特に加齢に伴って細胞内で合成されるポリアミン量は低下するため、細胞外からの取り込み経路の重要性が相対的に高くなることから、この ATP13A2 が種々の神経変性疾患の要因となっている。

ATP13A2 の属する P 型 ATPase は ATP を用いて能動的に輸送を行う一次輸送体 (ポンプ) のファミリーである。P 型輸送体は、保存されたアスパラギン酸がリン酸化・脱リン酸化されることで、基質に対する親和性の異なる二つの状態 (E1 および E2) を相互に遷移することで輸送を行う。P 型 ATPase は、配列保存性や輸送基質の違いによって 1~5 型までのサブファミリーに分類されており、1~3 型は金属カチオンを輸送するイオンポンプである。一方で、4、5 型に属する輸送体はカチオンとは大きく異なる基質を持つことがわかってきている。特に 4 型の輸送体 (P4-ATPase) は、脂質二重膜における二つの層の間で脂質分子の輸送を行うフリッパーゼであることから注目を集めており、筆者らは最近その複数状態の構造を報告して、脂質輸送に関する理解を大きく進めることとなった [2]。その一方で ATP13A2 を含む 5 型の輸送体 (P5-ATPase) は、その基質がポリアミンであることが特定されたのもごく最近のことであり、本研究の開始当時には構造情報も報告されていなかった。そのため輸送基質であるポリアミンの認識機構や輸送サイクルに関する理解はほとんど進んでいなかった。本研究では、クライオ電子顕微鏡による構造解析によって、P5-ATPase に属する ATP13A2 の複数状態の構造を明らかにすることで、その独自の基質認識機構や輸送機構を明らかにした [3]。

方法

1. クライオ電子顕微鏡による ATP13A2 の構造解析

P5-ATPase の持つ独自の輸送機構を明らかにするために、ヒト由来の ATP13A2 (以下 hATP13A2) に着目して、クライオ電子顕微鏡による構造解析を行った。はじめに、哺乳類細胞を用いた発現系の構築を行った。発現には BacMam と呼ばれるバキュロウイルスを利用した遺伝子導入法を用いた。hATP13A2 の C 末端に HRV3C プロテアーゼの切斷配列を挟んで GFP を付加したベクターを作製して、Bac-to-Bac システム (invitrogen 社) を利用してバキュロウイルスの作製を行った。調製したウイルス液を浮遊培養した HEK293 細胞に添加して hATP13A2 を一過的に発現させた。発現後の細胞を超音波によって破碎した後に超遠心で膜画分を回収して、コレステロール誘導体である CHS (ヘミコハク酸コレステリル) を添加した DDM (ドデシルマルトシド) によって可溶化した後に、GFP に結合するナノボディ (重鎖のみからなる単鎖抗体) を利用したアフィニティクロマトグラフィによって精製を行った。この際に GDN (Glyco-Diosgenin, Anatrace 社) と呼ばれる界面活性剤に置換することでタンパク質の安定性を向上させ

た。GFP切断後のhATP13A2をゲルろ過カラムで精製した後に約10 mg/mL程度にまで濃縮して、ATP非加水分解アナログ (AMPPCP)、リン酸アナログ (BeF_x、AlF_x)、あるいはADPとAlF_xを添加した状態でvitrobot MarkIV (Thermo Fisher Scientific社)を使用して液体エタンによる急速凍結を行い、クライオ電子顕微鏡観察の観察試料を作製した。この試料を用いて、電子線直接検出カメラであるK3を搭載したクライオ電子顕微鏡KriosG4 (Thermo Fisher Scientific社)にてデータ収集を行い、単粒子解析プログラムRELIONによる解析を行った。一般的な解析の流れと同様に、粒子ピックアップ、二次元、三次元クラス分けによって粒子を選別した後に、三次元精密化を行ったが、膜貫通ヘリックスの密度が弱く、モデリングが困難であった。そこで、ポリッシング (ベイズ統計に基づいた粒子の動き補正)、CTF精密化などを行った後にミセルに相当する密度の差し引き (subtraction)を行い、その後三次元精密化を行ったところ、最終的にAMPPCP結合型 (E1-ATP)、ADP-AlF_x結合型 (E1P-ATP)、BeF_xとスペルミン (SPM)結合型 (E2-P(SPM))、AlF_xとSPM結合型 (E2-Pi(SPM))の構造を3.5~3.9Å分解能で決定した。

2. 変異体解析によるATP13A2のポリアミン輸送機構の解明

二種類のリン酸アナログによって安定化されたSPM結合型では、細胞質側にSPMに相当する密度が観察されており、この部位がSPMの結合・輸送に関わると予想された。そこで、旭川医大の大保博士との共同研究によって変異体解析を行うことで、ATP13A2によるポリアミン輸送機構の検証を行った。具体的には、野生型、および変異体のhATP13A2をHEK293細胞で一過的に発現させ、ホモジェナイザーで破砕して調製した小胞膜を用いて、SPM依存的なATP13A2のATPase活性を測定することで、変異導入による影響を調べた。これらの結果は次章にまとめて示す。

結果および考察

1. ATP13A2の全体構造

hATP13A2は、10本の膜貫通ヘリックスを持ち、細胞質側にATPaseに関わるNドメイン (Nucleotide-binding domain)、Pドメイン (Phosphorylation domain)、Aドメイン (Actuator domain)を持つという、P型ATPaseにおける共通のドメイン構成に加えてN、C末端にそれぞれNTD (N-terminal domain)とCTD (C-terminal domain)と名付けたATP13A2に特有のドメインを持つことが分かった (図1a、b)。特にNTDは脂質膜に部分的に突き刺さるような特徴的な構造をしており、NTDにはPIP₂などの脂質結合に関わると特定された残基が複数存在することから、脂質膜との相互作用に重要であることが示された。

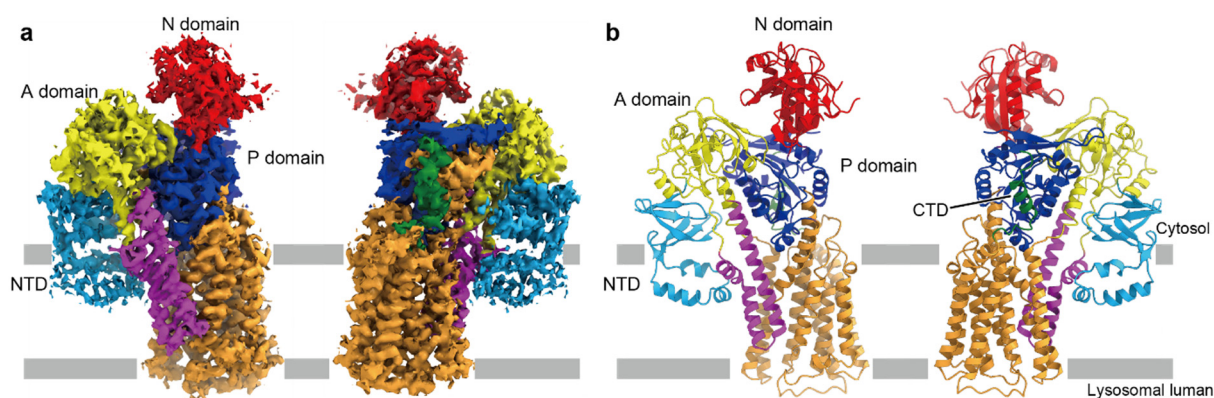


図1. ATP13A2の全体構造

- humanATP13A2のクライオ電子顕微鏡単粒子構造解析によって得られた密度マップ。
- humanATP13A2の原子構造モデル。

P型ATPaseにおける輸送サイクルはPost-Albersモデルと呼ばれる模式的なモデルによってあらわされる。このモデルでは輸送基質に対する親和性の異なるE1/E2と呼ばれる二つの状態を持ち、リン酸化(EP:リン酸化された状態)によってこれらの状態間の遷移が促進されるというモデルである(図2a)。AMPPCPによって捉えられたE1・ATP構造、およびAlF_x-ADPによって捉えられたE1P・ADP構造は、結合したATPからのリン酸転移反応が起こる前後の構造に相当するため、実質的には大きな違いがない(図2a、赤四角)。これらの構造では、いずれもNドメインとPドメインとが結合したAMPPCP、あるいはAlF_x-ADPによって連結することで、安定化させられた構造をとっている。このE1の構造では、リソソーム内腔における基質であるポリアミンに対して親和性の低い状態であると考えられており、実際に構造的にもリソソーム内腔側のゲート(いわゆる「luminal gate」)が「閉じた」状態となっており、ポリアミンが結合できない状態となっていた。一方で、リン酸アナログであるAlF_xとBeF_xはポリアミンに対する親和性の高いE2状態を捉えることができると考えられており、実際にこれらの二つの阻害剤の結合した状態では、luminal gateが大きく開いてトンネル状の溝が形成され、そこに基質であるSPMが結合していた(図2b、c)。今回用いた二つのリン酸アナログは、それぞれ異なる配位様式を持ち、BeF_xは共有結合でつながったリン酸化状態(E2P)、AlF_xはその後の加水分解中間体(E2Pi)に相当する反応中間体をそれぞれ捉えることができると考えられているが、今回の構造解析において、これらの阻害剤によって得られた二つの構造に実質的な違いは見られなかった(図2a、青四角)。いずれも基質であるスペルミンの結合によって、ほぼ同等の構造(E2P・SPM)とE2Pi・SPM)に安定化されたためであると考えられる。

これらの構造比較から、ATP13A2のリン酸化に伴って生じる構造変化が明らかになった(図2b)。まず細胞質側ではPドメイン上のAsp残基がリン酸化を受けると、Aドメインに保存されたTGESモチーフがリン酸を配位するように大きく動く。さらに、このAドメインの動きに伴って、M1-2の二本の膜貫通ヘリックスが大きく動いて、luminal gateが開くようにしてトンネル状の溝が形成される(図2c)。このような構造変化は、P型輸送体に共通ではあるが、ATP13A2ではいくつかの点で特徴的な点が見られた。一つは、スペルミンの結合部位である。通常P型輸送体では脱リン酸化反応はluminal gateが再度閉じて「基質閉塞(occluded)状態」とよばれる状態へ移行するような動きと共役して起こる。今回得られた構造では、TGESモチーフのGlu残基はリン酸に対してアクセス可能な位置にあり、いわゆる加水分解中間体に相当するが、luminal gateはいまだに開いたままで、スペルミンは内腔側の溶液にアクセス可能な状態となっていた。したがって、hATP13A2は、この点でやや他のP型輸送体と異なる仕組みを持つようである。もう一つは、AドメインにつながったNTDの示す状態依存的な違いである。E1の状態ではNTDの密度はほとんど見えていないのに対して、E2Pでは明確な密度として観察されていた。このことは、NTDがE1ではフレキシブルに動いているのに対して、E2Pの状態ではオーダーした状態にある。すなわち、NTDがE2P状態を安定化していることを示唆している(図2b)。NTDにはPIP₂などの脂質結合ドメインを持ち、ATP13A2は脂質結合によってE1PとE2Pの平衡状態に影響を与えるという報告がある。今回見られた構造的な違いも、それを支持する結果であるといえる。これらの特徴はいずれもhATP13A2が行うポリアミン輸送に適した仕組みを独自に獲得したのであろうと考えられるが、今後のさらなる研究が必要である。

2. ポリアミン輸送経路の解析

E2P・SPM、およびE2Pi・SPMで形成されていた細胞質側のトンネル状の溝は、複数の負電荷アミノ酸(Asp、Glu)および芳香族アミノ酸によって囲まれており、スペルミンは伸長した状態でこの溝にはまり込むように結合することが明らかになった。そこで、ポケットを形成するアミノ酸の変異体を作製し、その活性測定を行うことで、hATP13A2におけるポリアミンの認識・輸送機構に関して考察を行った。すると、試した変異体のほとんどがスペルミン依存的なATPaseの活性を大きく下げることが分かった(図2c)。基質であるスペルミンとの相互作用は、特定のアミノ酸によってというよりは、トンネル全体にわたって広範囲に形成されていることが明らかになった。hATP13A2はスペルミンだけではなくスペルミジンを含む分子量が100~200程度の幅広いポリアミンを輸送することが知られている。今回明らかになった認識機構はそのような「緩やか」な選択性に非常によく合致するものであった。

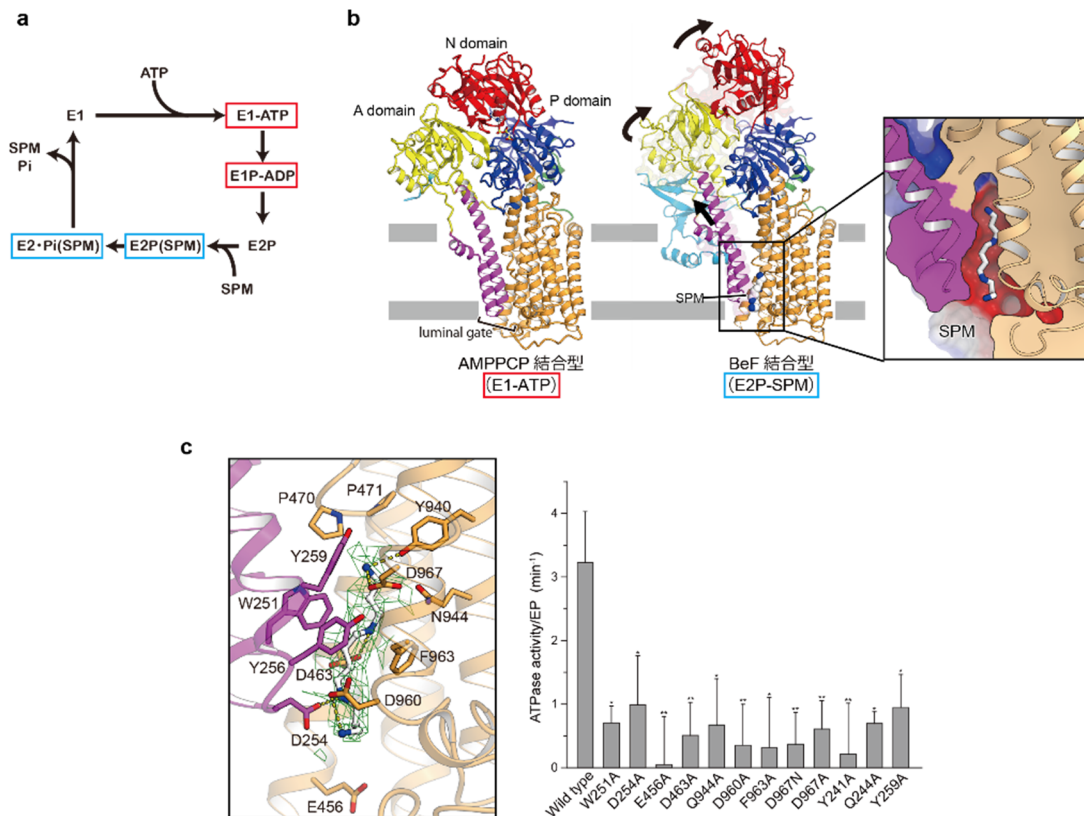


図 2. ATP13A2 の輸送サイクル中の構造変化とポリアミン結合ポケット

- humanATP13A2 の輸送サイクル、構造解析によって明らかになった状態を示した。
- E1 から E2 への構造変化、リソソーム内腔側に負電荷のトンネル状の溝が形成される。
- スペルミン結合ポケットの構成アミノ酸と変異体解析の結果（野生型と比較した統計的有意性を示す。two sided test、* $p < 0.05$ 、** $p < 0.005$ 。

3. まとめ

本研究によって、P 型輸送体の中でも独自の輸送機構を持つ P5-ATPase の輸送体の仕組みに関してその分子機構を明らかにした。今回構造解析の対象とした hATP13A2 は老化に関連した様々な神経疾患に関わっており、たとえば ATP13A2 の輸送活性を向上させることによって、これらの病気の発症を防ぐような試みもされている。本研究成果から明らかになった hATP13A2 の輸送機構は、このような試みを実現するための重要な礎となると期待される。

共同研究者

本研究の共同研究者は、東京大学大学院理学系研究科濡木研究室の富田篤弘、濡木理、旭川医科大学の大保貴嗣である。

文献

- van Veen S, Martin S, Van den Haute C, Benoy V, Lyons J, Vanhoutte R, Kahler JP, Decuypere JP, Gelders G, Lambie E, Zielich J, Swinnen JV, Annaert W, Agostinis P, Ghesquière B, Verhelst S, Baekelandt V, Eggermont J, Vangheluwe P. ATP13A2 deficiency disrupts lysosomal polyamine export. *Nature*. 2020 Feb;578(7795):419-424. Epub 2020 Jan 29. PMID: 31996848 DOI: 10.1038/s41586-020-1968-7

- 2) Hiraizumi, M., Yamashita, K., Nishizawa, T. & Nureki, O. Cryo-EM structures capture the transport cycle of the P4-ATPase flippase. *Science*. 2019 Sep 13;365(6458):1149-1155. Epub 2019 Aug 15 PMID: 31416931 DOI: 10.1126/science.aay3353.
- 3) Tomita A, Daiho T, Kusakizako T, Yamashita K, Ogasawara S, Murata T, Nishizawa T, Nureki O. Cryo-EM reveals mechanistic insights into lipid-facilitated polyamine export by human ATP13A2. *Mol. Cell* 2021 Dec 2;81(23):4799-4809.e5. Epub 2021 Nov 18. PMID: 34612442 DOI: 10.1016/j.molcel.2021.11.001