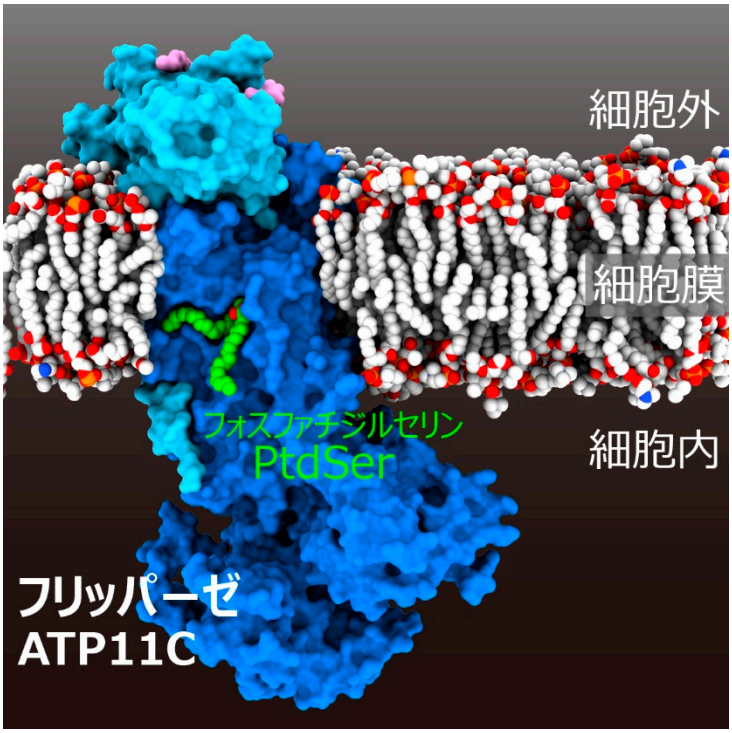
18　物質不均衡を司る能動輸送体の構造解析と創薬	阿部　一啓

【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



18. 物質不均衡を司る能動輸送体の構造解析と創薬

阿部　一啓

名古屋大学 細胞生理学研究センター

Key words：能動輸送，X 線結晶学，Cryo-EM，P-type ATPase

緒　言

細胞膜を隔てた様々な物質の不均衡分布は生命の根幹である。この物質不均衡分布は、P-type ATPase に代表される一次能動輸送体によって形成される。従って P-type ATPase の作動機構の理解は、生命を分子レベルで理解する為に欠くことができないピースであり、故にこのファミリータンパク質の中には創薬ターゲットとしても重要なものが多い。P-type ATPase は、ATP の加水分解と共役した、主としてイオンの能動輸送を触媒する膜タンパクの一群であるが、本研究では、この中でも特に特徴的かつ生理的に重要な 2 つの分子に注目した。

1. 胃プロトンポンプ H^+, K^+-ATPase

胃プロトンポンプは胃酸分泌時の胃内腔を pH 1 もの強酸性に保つ。この生理現象は食物消化にとって重要であり、またこの分子が巨大なマーケットを持つ潰瘍治療薬の標的となる理由である（胃酸抑制剤の世界市場規模は 2 兆円とも言われる）[1]。フェノタイプスクリーニングによって見出されてきた現行の薬剤の改良、および新規薬剤の創製には、ターゲットとの結合構造に基づいた論理的な薬剤設計が求められる。本研究では、結合構造未知の薬剤と H^+, K^+-ATPase の結合状態を構造解析によって明らかにすることを目的とした。

2.『細胞死を司るポンプ』ATP11C 脂質フリッパーゼ

細胞がアポトーシスによって自発的な死を迎えると、細胞表面にはフォスファチジルセリン（PtdSer）が露出する。これがいわゆる『Eat me』シグナルとなり、死細胞はマクロファージによって貪食される。この現象は発生や組織の形成維持だけでなく、ガン化した細胞のクリアランスにも関与する重要な機構である。PtdSer は生きた細胞では細胞膜内葉にのみ分布するが、これは ATP11C が常に PtdSer を細胞膜外葉から内葉へとフリップしているのが理由である［2］。アポトーシス時に ATP11C が caspase によって切断、失活することで、PtdSer を内葉へとフリップする活性が失われ、結果として PtdSer は細胞表面へと露出、貪食のトリガーとなる［3］。その生理的重要性もさることながら、主にイオンを輸送する P-type ATPase にあって、巨大な脂質を輸送する分子メカニズムに興味が持たれる。

上記 2 つのタンパク質を対照して、その作動機構及び基質の認識機構を理解する為に、構造機能解析による研究を推進した。胃プロトンポンプに関しては、近年韓国で上市された新しいクラスの薬剤である tegoprazan［4］との複合体の構造解析に成功し、その結合状態を明確に規定できた。脂質フリッパーゼに関しては、結晶構造と、複数の中間体の CryoEM 構造の取得に成功しており、その作動機構の理解及び PtdSer を特異的に認識する機構について理解することができた［5，6］。

方　法

1. ヒト由来培養細胞によるターゲットタンパク質の大量発現

ヒト培養細胞での目的タンパク質の大量発現は BacMam システム［7］を利用した。宿主細胞の糖鎖プロセスに関わる遺伝子 *GnT1* を KO した株（*GnT1*$^-$）を用いることでタンパク質の糖鎖がすべて high-mannose type になり、これは精製後に endoglycosidase によって容易に切断することができる。N 末端から順に Flag-tag、6×His、EGFP、TEV protease site を付加した H^+, K^+-ATPase 及び ATP11C を、それぞれの補助サブユニットと共発現した。浮遊培養細胞

を破砕、膜画分を界面活性剤 $C_{12}E_8$で可溶化し、Anti-Flag M2 affinity resin によって目的タンパク質を精製した。TEV プロテアーゼによってタグを切断、EndoH によって糖鎖を切断した後、ゲルろ過クロマトグラフィーによってさらに目的物を精製した。ピークフラクションを 10 mg/ml 程度まで濃縮し、結晶化及び Cryo-EM による撮影に供した。

2. 三次元結晶

乾固した Dioleoylphosphatidylcholine（DOPC）に界面活性剤を含む濃縮サンプルを添加することで、脂質とタンパク質を混合し、ハンギングドロップ法によって三次元結晶化を作製した。H^+, K^+-ATPase は tegoprazan 共存下での結晶化を行った。ATP11C は PtdSer 共存下での結晶を得た。得られた単結晶を凍結、SPring-8 BL32XU、BL41XU、BL45XU にて回折データを取得した。H^+, K^+-ATPase は（$P3_1\ 2_1$, a,b,c= 105,105,370 Å）、分子置換によって 3.0 Å 分解能での構造が得られた。ATP11C は単結晶から得られる分解能が制限されていた為、複数の結晶（≒1,500 個）の単結晶から回折データを取得し（$P2_1\ 2_1\ 2_1$, a,b,c= 100,232,498 Å）、これらをマージすることで 3.9 Å 分解能の構造を得た［5］。

3. CryoEM による構造解析

ATP11C は CryoEM によって構造解析を行った。異なるコンフォメーションにタンパク質を固定する為に、基質アナログや輸送脂質を加えインキュベート後、Vitrobot（FEI）によって薄い氷に包埋した。撮影は電子線直接検出カメラ Gatan K3Summit を装備した電子顕微鏡 Titan Krios G3i（Thermo）によって行い、それぞれの条件で約 3,000 枚の電子顕微鏡ムービーを撮影した。画像データ Relion3.0 によって解析し、三次元構造を得た［6］。

結果および考察

1. 胃プロトンポンプ H^+,K^+-ATPase と胃酸抑制剤の結合構造

ラクオリア創薬が開発した tegoprazan［4］は、H^+, K^+-ATPase に高い親和性で K^+競争的に作用する P-CAB（K^+-competitive acid blocker）に分類される薬剤である。*In vitro* での H^+, K^+-ATPase 活性測定から算出した tegoprazan の阻害定数（K_i）は 193 nM であり、この値は P-CAB のプロトタイプ化合物である SCH28080（K_i＝150 nM）と遜色のないものであった。これまで vonoprazan と SCH28080 の結合構造が明らかになっているが［8］、tegoprazan の結合構造は未知であった。H^+, K^+-ATPase と tegoprazan の共結晶を作製することで、その結合状態を明らかにした（図 1）。他の P-CAB と同様に tegoprazan は胃内腔に向けて開口したイオンの通り道を塞ぐ形で結合していた。化学骨格が近い SCH28080 に近い結合様式であったが、tegoprazan に特有の化学構造である複素環構造部分が TM1 と TM3 の間に入り込むことで、SCH28080 と比べてより広い疎水的な結合面を有していた。この結合面に存在する V331 への変異導入は、SCH28080 の結合には大きく影響しないが、tegoprazan の結合親和性を大きく低下させ、結晶構造の結合状態を機能的に裏付けるものであった。

2. 脂質フリッパーゼ ATP11C の結晶構造と機能解析

ヒト ATP11C/CDC50A 複合体の結晶構造解析に始めて成功した。得られた結晶構造は、リン酸アナログ BeF が細胞質側の自己リン酸化部位に結合し、脂質輸送経路が外葉側に開いた状態（E2P state）であった。輸送基質である PtdSer は、膜貫通領域中央部分に位置する、ファミリーで保存された PVSM 配列（この位置で TM4 へリックスが解けている）の近傍に結合していた（図 2）。細胞外と PtdSer 結合部位は、縦方向に長く伸びた「クレバス」によって繋がっており、PtdSer の親水的な頭部はこのクレバスを通って結合部位に導入されることが示唆された。事実、このクレバスに面した V349 をかさ高い Phe に変異させると、ATPase 活性、脂質輸送活性共に大きく低下した。これら結晶構造と機能解析の結果は、脂質フリッパーゼの輸送経路を明確に定義した［5］。

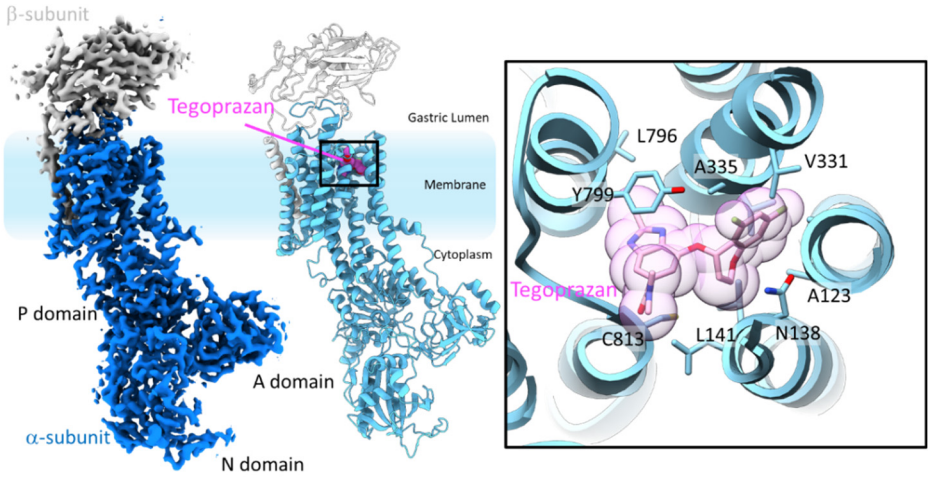


図 1. 胃酸抑制剤 Tegoprazan が結合した胃プロトンポンプの結晶構造

結晶構造解析によって得られた電子密度と、これに基づいて構築されたアミノ酸モデルを左側に示す。触媒機能を有するα-subunitは青、補助的な役割を持つβ-subunitをグレー、胃内腔に面した窪みに結合したtegoprazanをピンクで表示した。

右側四角内にはtegoprazanの結合部位の拡大図を示す。図は胃内腔側から見たモデルを表示している。薬剤の結合に重要ないくつかのアミノ酸をstickで表示した。

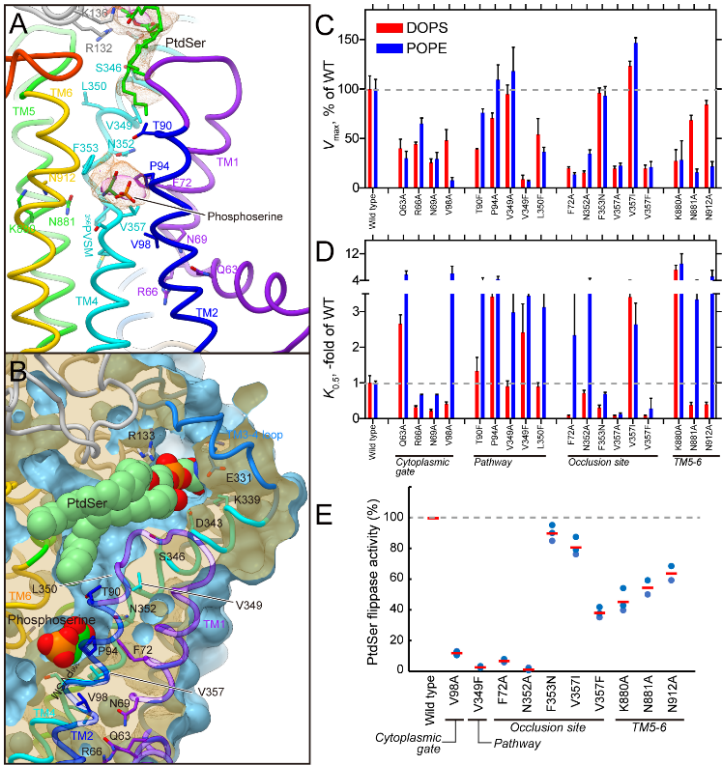


図2. 脂質フリッパーゼATP11Cの結晶構造と変異体解析

A、B）膜貫通領域の拡大図。モデルをribbon（A）およびsurfaceで表示した。結合したPtdSerをstick（A）およびsphere（B）で表示した。

C、D）野生型及び変異体のPtdSer依存性ATPase活性を測定し、そのV_{max}（C）及び$K_{0.5}$（D）を示した。

E）　示した変異体のPtdSer輸送活性を示した。

3. 脂質フリッパーゼ ATP11C の Cryo-EM による反応中間体の構造解析

P-type ATPase は大きな構造変化を伴った幾つかの中間体を遷移することで、能動輸送を達成する。従って輸送メカニズムを理解するためには、複数の中間体の構造解析が必要である。精製した ATP11C を様々なリン酸アナログや輸送基質とインキュベートし、Cryo-EM によって構造解析することで、3 つの脂質結合構造を含む 5 つの異なる反応中間体の立体構造が合計 6 つ得られた（図 3）。

得られた構造の比較、変異体による機能解析の結果を総合的に判断することで、ATP の加水分解がどのような構造変化を誘起し、輸送される PtdSer がどのように細胞膜外葉から導入され、これが閉塞されるのか、その鍵となる分子メカニズムを明らかにした。また、PtdSer および PtdEtn の結合、閉塞構造から、リン脂質の親水頭部を認識するメカニズムを明らかにした。

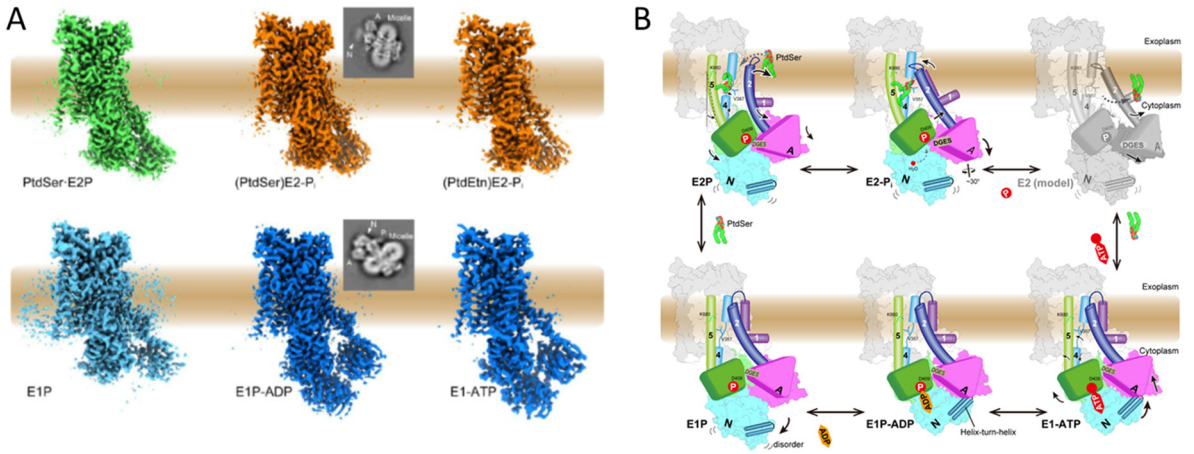


図3. 脂質フリッパーゼATP11CのCryo-EM構造

A）異なる反応中間体の Cryo-EM 構造。

B）リン脂質輸送モデル。

共同研究者・謝辞

H^+, K^+-ATPase に関する研究は、ラクオリア創薬株式会社の森田幹雄博士との共同研究である。ATP11C に関する研究は、大阪大学 IFReC の長田重一博士、瀬川勝盛博士、東京大学大学院理学研究科の西澤知宏博士、濡木理博士、東京医科歯科大学高等研究院卓越研究部門の藤吉好則博士との共同研究である。

文　献

1） Shin JM, Sachs G, Pharmacology of proton pump inhibitors. Curr Gastroenterol Rep. 2008 Dec;10(6):528-34, doi: 10.1007/s11894-008-0098-4, PMID: 19006606

2） López-Marqués RL, Gourdon P, Günther Pomorski T, Palmgren M. The transport mechanism of P4 ATPase lipid flippases. Biochem J. 2020 Oct 16;477(19):3769-3790. doi: 10.1042/BCJ20200249, PMID: 33045059

3） Segawa K, Kurata S, Yanagihashi Y, Brummelkamp TR, Matsuda F, Nagata S. Caspase-mediated cleavage of phospholipid flippase for apoptotic phosphatidylserine exposure. Science. 2014 Jun 6;344(6188):1164-8. doi: 10.1126/science.1252809, PMID: 24904167

4） Takahashi N, Take Y. Tegoprazan, a Novel Potassium-Competitive Acid Blocker to Control Gastric Acid Secretion and Motility. J Pharmacol Exp Ther. 2018 Feb;364(2):275-286. doi: 10.1124/jpet.117.244202, PMID: 29180359

5) Nakanishi H, Irie K, Segawa K, Hasegawa K, Fujiyoshi Y, Nagata S, Abe K. Crystal structure of a human plasma membrane phospholipid flippase. J Biol Chem. 2020 Jul 24;295(30):10180-10194. doi: 10.1074/jbc.RA120.014144, PMID: 32493773
6) Nakanishi H, Nishizawa T, Segawa K, Nureki O, Fujiyoshi Y, Nagata S, Abe K. Transport Cycle of Plasma Membrane Flippase ATP11C by Cryo-EM. Cell Rep. 2020 Sep 29;32(13):108208. doi: 10.1016/j.celrep.2020.108208, PMID: 32997992
7) Goehring A, Lee CH, Wang KH, Michel JC, Claxton DP, Baconguis I, Althoff T, Fischer S, Garcia KC, Gouaux E. Screening and large-scale expression of membrane proteins in mammalian cells for structural studies. Nat Protoc. 2014 Nov;9(11):2574-85. doi: 10.1038/nprot.2014.173, PMID: 25299155
8) Abe K, Irie K, Nakanishi H, Suzuki H, Fujiyoshi Y. Crystal structures of the gastric proton pump. Nature. 2018 Apr;556(7700):214-218. doi: 10.1038/s41586-018-0003-8, PMID: 29618813