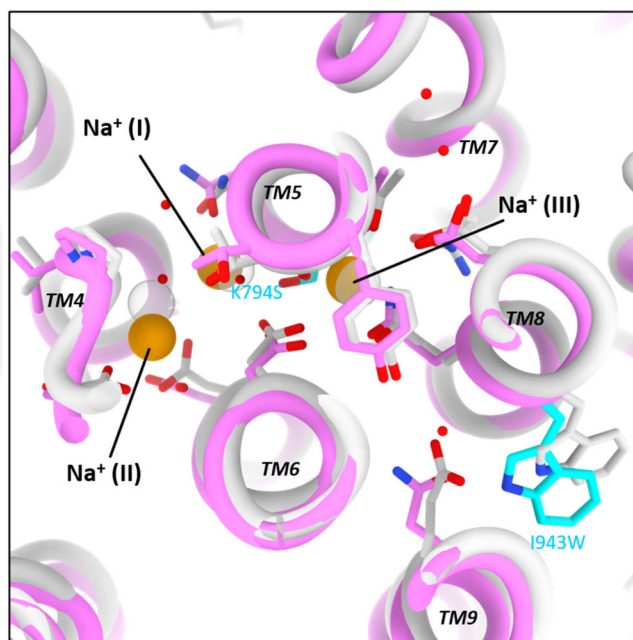
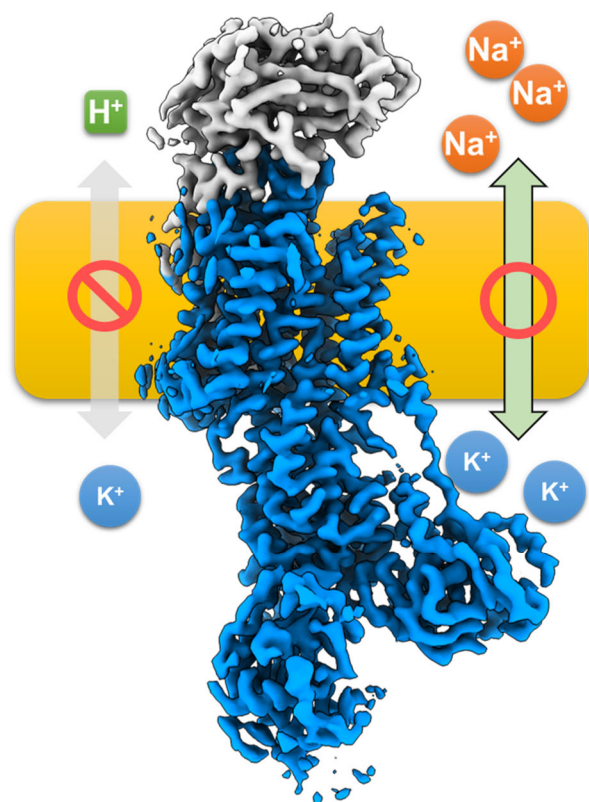




プロトンポンプ変異体
(≒ナトリウムポンプ)

ナトリウムポンプのつくりかた H⁺輸送タンパク質を Na⁺輸送タンパク質に改造!?

国立大学法人東海国立大学機構 名古屋大学細胞生理学研究センター/大学院創薬科学研究科の阿部 一啓 准教授は、アメリカ テキサス工科大学のパブロ アルティガス博士のグループと共に、H⁺を輸送する膜タンパク質（プロトンポンプ）を改造し、本来輸送することのない Na⁺を輸送させることに世界で初めて成功しました。この成果によって、膜能動輸送体によるイオンの認識機構に関して重要な知見が得られました。

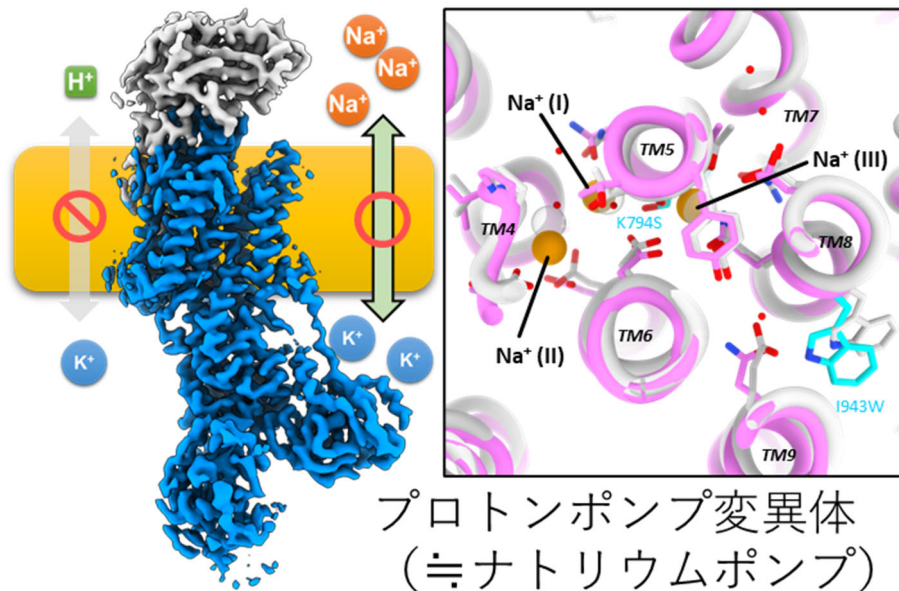
我々のからだの細胞には、ナトリウムイオン(Na⁺)を輸送する膜タンパク質「**ナトリウムポンプ**」と、水素イオン(H⁺: プロトン)を輸送する「**プロトンポンプ**」があります。この 2 つの膜タンパク質は非常によく似ているにも関わらず、それぞれが輸送するイオンは厳密に区別されており、この理由は長い間不明でした。

本研究では、まず「プロトンポンプ」の結晶構造を決定しました。これを「ナトリウムポンプ」の構造と比較することでイオンの選択性に関わる 4 つのアミノ酸を特定し、実際にこれら 4 つのアミノ酸を変異させることでプロトンポンプを「改造」し、Na⁺を輸送する「人工的なナトリウムポンプ」を創り出すことに世界で初めて成功しました。この事実はアフリカツメガエル卵母細胞を用いた電気生理学的解析によって検証され、またクライオ電子顕微鏡による構造解析によって Na⁺が結合した状態を捉えることにより証明されました。

本研究成果は、2022 年 9 月 9 日付国際科学誌「Nature Communications」に掲載されました。

【ポイント】

- ・ Non-gastric プロトンポンプの構造解析に世界で初めて成功し、胃プロトンポンプとは異なる H^+ 排出機構を発見。
- ・ プロトンポンプとナトリウムポンプの構造比較、それに基づいた変異体の機能解析から、 Na^+ の配位に直接/間接的に寄与する 4 つのアミノ酸を同定。
- ・ プロトンポンプを基にして人工的なナトリウムポンプを創り出すことに成功。



【研究背景】

細胞は、細胞膜を隔ててイオンの濃度が違う状態を作り出しています（図 1）。我々ヒトを含むすべての動物の細胞では、**ナトリウムイオン (Na^+)** は細胞外が高濃度、細胞内は低濃度です。逆に**カリウムイオン (K^+)** は細胞内が高くなっています。また、特定の組織、例えば胃では、食物消化の為に細胞外が強酸性 (H^+ 濃度が高い) 状態になっていて、気道上皮や結腸においても細胞外には弱酸性環境が作り出されています。このようなイオンの濃度勾配は、糖などの栄養を細胞内に取り込む際の駆動力となったり、神経細胞の活動電位の源になっていたり、細胞の生存、ひいては我々の生命活動の恒常性維持にとってなくてはならないものです。

イオンの濃度勾配は「**P 型 ATPase**」と呼ばれる膜タンパク質の一群が専ら作り出します。 Na^+ と K^+ の濃度勾配は、**ナトリウムポンプ (Na^+, K^+ -ATPase)** が、ATP のエネルギーを駆動力として細胞外に 3 つの Na^+ を、細胞内に 2 つの K^+ を輸送することで形成

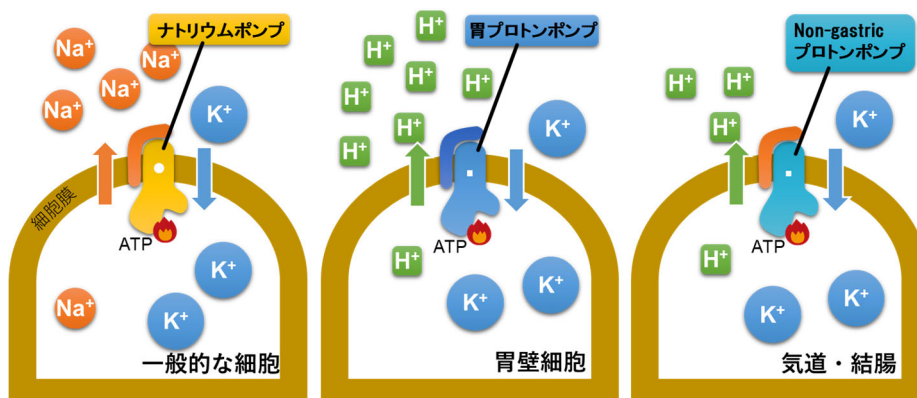


図 1 細胞膜を隔てたイオン濃度勾配

P 型 ATPase は ATP を燃料として特定のイオンを濃度勾配に逆らって輸送する膜タンパク質の一群です。動物細胞ではナトリウムポンプの働きにより細胞外の Na^+ 濃度が高い状態が作り出されています。胃や気道など、特定の組織ではプロトンポンプが H^+ を細胞外に輸送することで酸性環境を創り出しています。

します。このナトリウムポンプと非常によく似た（アミノ酸配列の同一性が約 70%）**プロトンポンプ($H^+, K^+-ATPase$)**は 2 種類あり、胃酸の分泌に関わる胃プロトンポンプと、これとは別に気道や腎臓、結腸に発現し、組織の酸性度や浸透圧の調節に関わる「**non-gastric プロトンポンプ**」が知られています。胃プロトンポンプに関しては、これまで多くの結晶構造が報告され、その輸送メカニズムはよく研究されていますが (Abe et al., 2018, *Nature*)、non-gastric プロトンポンプに関しては、どうして胃と比べて作り出す酸性度が低いのかというメカニズムも含めて、不明な点が多く残されていました。これらの 3 つのイオンポンプは、お互いに兄弟とも言える良く似た関係にありながら、その**輸送イオンの種類や個数は厳密に区別**されています。つまりナトリウムポンプはプロトンを輸送しませんし、その逆も真です。その厳密さはどのように制御されているのかは、イオンポンプが発見されて以来の大きな謎でした。

【Non-gastric プロトンポンプの構造解析】

研究グループはまず、non-gastric プロトンポンプの構造解析に着手しました。X 線結晶構造解析^{注1}によって、 K^+ が 1 つだけ結合した構造を決定し、このイオンポンプが $H^+:K^+ = 1:1$ の輸送を行うことを決定しました。また、胃の内部を pH 1 ($\equiv H^+$ 濃度の高い状態) もの強酸性にする胃プロトンポンプと比べ、弱酸性 (pH 6.5 程度) 環境を創り出す non-gastric プロトンポンプでは、**カチオン結合サイト近傍のアミノ酸の微妙な差異がサイトの構造の違いを生み出すことで、作り出す酸性環境に違いが出る**ことがわかりました (図 2)。Non-gastric プロトンポンプは**嚢胞性線維症**の予後の悪化に関連しており、今回の新規構造は新しい薬剤デザインの為のテンプレートとしても期待されます。

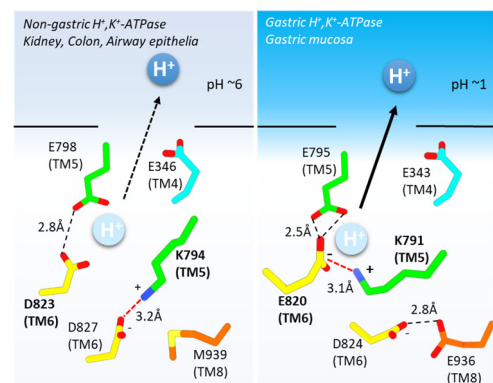


図 2 H^+ 排出機構

胃プロトンポンプ (右) では Lys791 が H^+ を押し出すことで胃内部に強酸性環境を作り出しているが、non-gastric プロトンポンプ (左) は、Lys794 が胃プロトンポンプとは違う位置にあることで、それほど強力に H^+ を押し出すことができないと考えられる。

【イオン結合部位の構造からナトリウムポンプをデザイン】

ナトリウムポンプとプロトンポンプでは、輸送するイオンの種類とその個数 ($3Na^+/2K^+$ と $1H^+/1K^+$) が異なります。これらは厳密に制御されており、ナトリウムポンプは一度に 3 つの Na^+ を輸送できますが H^+ は殆ど運びません。逆にプロトンポンプは Na^+ を輸送できませんし、一度に 1 つしか H^+ を輸送できません。両者とも共通して K^+ を細胞内へと輸送しますが、その個数はそれぞれ決まっています (図 3)。その理

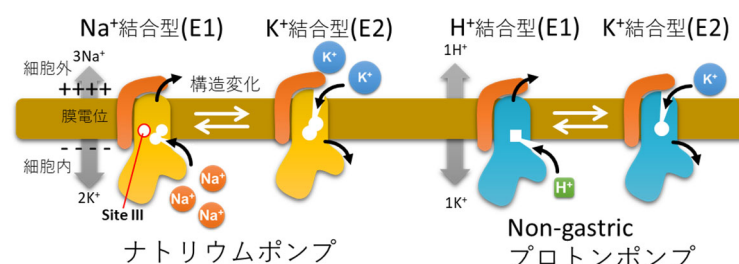


図 3 輸送イオンの違い

ナトリウムポンプ (左) は 3 つの Na^+ を結合し、構造変化によって細胞外に排出、次に細胞外から 2 つの K^+ を結合し細胞内に取り込みます。差し引き 1 価の正電荷が細胞外に移動するので細胞内が負に帯電した状態になります (起電的な輸送)。プロトンポンプ (右) は H^+ と K^+ を 1 つずつ輸送するので起電性はありません。両者の最も大きな違いは、 Na^+ だけを結合することができる site III (赤) の存在です。

由はイオン結合部位の構造にあると予想されるわけですが、イオンの配位に直接的に関わるアミノ酸配列は数個違う程度で、これらを変異させても機能の相互変換は出来ません。この問題はイオンポンプの発見以来数十年来にわたって未解決でした。

研究グループは、non-gastric プロトンポンプ (ngHKA) の構造をナトリウムポンプと比較し、ngHKA には存在しない「**3 つ目の Na⁺結合部位 (site III)**」を創り出す為に必要な変異を探索しました。単変異や複数変異を導入し、それぞれの変異体について Na⁺依存的な ATP 加水分解活性や、アフリカツメガエル卵母細胞に発現させ電流を測定する電気生理学的手法^{注2)}によって、ngHKA に Na⁺結合サイトを形成するには、イオン結合部位近傍の 4 つのアミノ酸の変異が必要であることを突き止めました。

【輸送カチオンの種類と個数を区別するメカニズム】

Non-gastric プロトンポンプをベースにした 4 重変異体 (SPWC 変異体) は、Na⁺と K⁺に依存した ATP 加水分解活性を示し、そのプロファイルはナトリウムポンプと酷似していました。また Na⁺非存在下では ATP の加水分解が殆ど起こらず、同様の条件下で活性化するプロトンポンプとは明確に異なる性質を示しました。卵母細胞による電流測定の結果では、細胞内の Na⁺と細胞外の K⁺に依存した外向きの電流が観測され、Na⁺と K⁺の非対称な能動輸送が行われていることが示されました。研究グループはさらに、輸送イオンの個数と、その配位状態を決定する為に、クライオ電子顕微鏡による単粒子解析^{注3)}によって、**3 つの Na⁺が結合した状態と、2 つの K⁺が結合した状態の構造決定に成功**しました。

4 つの変異アミノ酸のうち、K794S は site I の Na⁺および K⁺の結合に直接寄与しますが、その他のアミノ酸は、イオンを直接配位することなく、間接的にカチオン結合サイト、特に site III と呼ばれる位置に Na⁺を結合させる為に重要と考えられます。A797P は site III を形成するヘリックスの位置を整え、R949C は site III で Na⁺の配位に寄与する D945 との塩橋を除くことでこの酸性側鎖が負電荷を帯びることを助け、I943W は隣接するヘリックスに存在する Q974 と水素結合を形成することで、site III を形成する Y790 の位置を Q974 によって固定する効果があると考えられます。このように、一見すると Na⁺の配位にはまったく関係のない、イオン結合部位から離れたアミノ酸による間接的な効果が、site III の形成には重要であることがわかりました。

驚くべきことに、導入した変異は site III に影響するにも関わらず、変異体が他のサイト (site I, II) を含めて完全に Na⁺特異的に変化したことです。これは、site III への

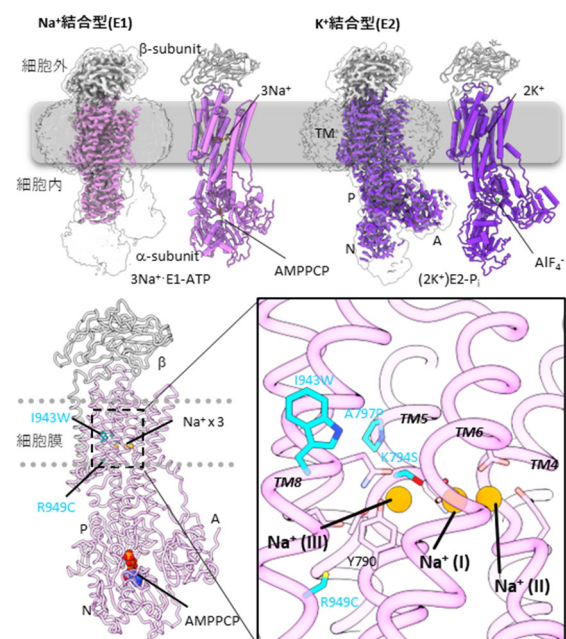


図 4 Non-gastric プロトンポンプ変異体
SPWC 変異体の Cryo-EM 構造とアミノ酸モデル (上)。Na⁺結合構造のリボンモデルに変異部位 (水色) を示した (下)。4 つの変異は Na⁺結合サイト (III) 付近に集中しており、このサイトの形成に直接/間接的に寄与する。

Na⁺の結合は、起電的な Na⁺の輸送だけでなく、協同的に他のサイトでのイオン選択性に影響を与えていることを示唆しています。

【成果の意義】

Non-gastric プロトンポンプの構造解析に始めて成功し、胃プロトンポンプとは異なる弱酸性環境の形成に適した H⁺排出機構が明らかになりました。また、嚢胞性線維症の予後悪化に対する新しい治療薬デザインの為の構造テンプレートが得られました。

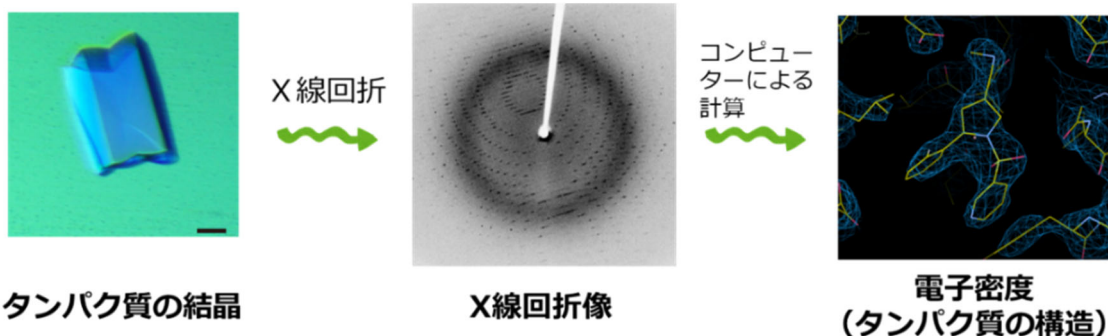
そして、プロトンポンプを改造してナトリウムポンプを創り出すことに世界で初めて成功しました。これを創り出したことによって、イオンポンプの輸送イオン特異性にとって重要な要素が理解できました。

本研究は、科学研究費補助金・基盤研究（21H02426）、AMED 創薬等ライフサイエンス研究支援基盤事業（BINDS）JP21am0101074、JP19am0101115j0003(1925)、武田科学振興財団、上原記念生命科学財団、内藤記念科学振興財団、小野医学研究財団、ノバルティス科学振興財団の支援のもとで行われたものです。

【用語説明】

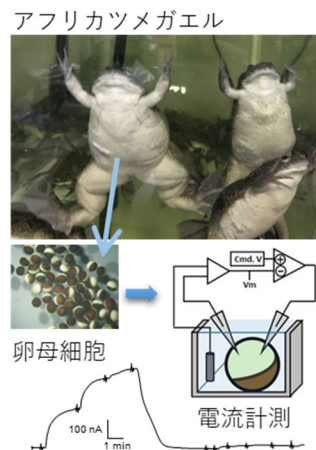
注 1) X 線結晶構造解析：

タンパク質の構造解析法の一つ。X 線をタンパク質の三次元結晶に照射して回折像を収集し、そのデータをコンピューターによって解析することで、タンパク質の立体構造を得る。



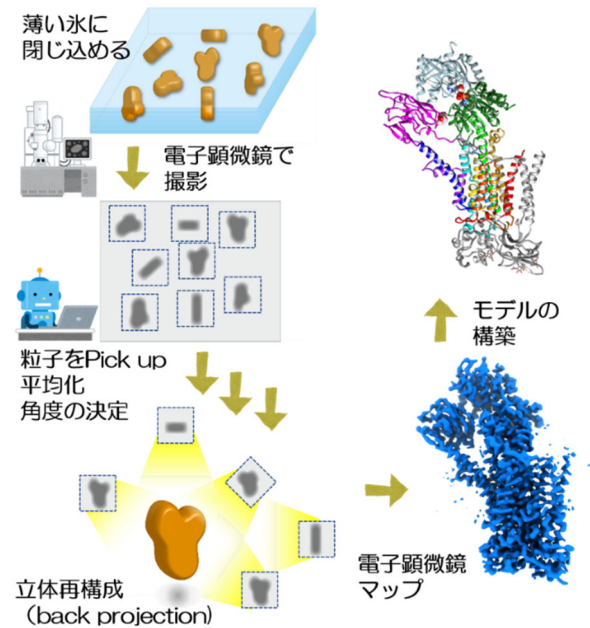
注 2) 電気生理学的手法：

アフリカツメガエルの卵母細胞に対象タンパク質をコードした RNA を導入して強制発現させた後、電極を細胞内外に設置することでイオンポンプを介して流れるイオンを電流として計測する。細胞内外に等量のイオンを輸送する場合電流は計測できないが、ナトリウムポンプのように非対称なイオン輸送（外向きに 3Na⁺/内向きに 2K⁺）の場合には起電的なフラクシオンを電流として計測することが可能である。



注 3) クライオ電子顕微鏡による単粒子解析 (Cryo-EM) :

タンパク質を薄い氷の中に閉じ込めて、**クライオ電子顕微鏡** (クライオ=低温という意味) で画像を撮影する。画像には、いろいろな方向を向いたタンパク質が映っているが、それ自体はノイズが多い。コンピューター上で同じ方向を向いている粒子を重ね合わせ、数十万粒子の画像から立体構造を構築することによって、高い解像度でタンパク質の立体構造が得られる。この方法の開発に貢献した 3 名の研究者が、2017 年にノーベル化学賞を受賞した。COVID-19 のスパイクタンパクをはじめ、様々なタンパク質の構造に基づいた創薬研究にも世界的に広く利用されている。



【論文情報】

雑誌名 : Nature Communications

論文タイトル : Structure and function of H⁺/K⁺ pump mutants reveal Na⁺/K⁺ pump mechanisms

著者 : ^{1†}Victoria C. Young, ^{2†}Hanayo Nakanishi, ¹Dylan J. Meyer, ³Tomohiro Nishizawa, ^{2,4,5}Atsunori Oshima, ^{1*}Pablo Artigas, ^{2,4*}Kazuhiro Abe

¹Department of Cell Physiology and Molecular Biophysics, Texas Tech University、²名古屋大学細胞生理学研究センター、³横浜市立大学大学院生命医科学研究科、⁴名古屋大学大学院創薬科学研究科、⁵名古屋大学糖鎖生命コア研究所、[†]共同第一著者、^{*}責任著者 (名古屋大学関係者に下線)

DOI: 10.1038/s41467-022-32793-0

URL: <https://www.nature.com/articles/s41467-022-32793-0>