

胃プロトンポンプの結晶構造解析によって明らかになった H^+ 排出機構

阿部一啓

名古屋大学細胞生理学研究中心 大学院創薬科学研究科 〒464-8601 名古屋市千種区不老町

要旨 胃プロトンポンプ (H^+ , K^+ -ATPase) は胃の内部を酸性化する P 型 ATPase に分類される膜タンパク質であり、それゆえ胃酸に関連する疾患のドラッグターゲットである。我々は H^+ , K^+ -ATPase と vonoprazan もしくは SCH28080 がそれぞれ結合し、胃内腔側にゲートが開いた状態の 2.8 Å 分解能結晶構造 2 つについて報告する。2 種類の薬剤の結合部位は、部分的にオーバーラップはしているもののそれぞれ明確に区別される形で、イオン結合サイトから胃内腔へと繋がるイオンの通道の真ん中に結合し、まさにこれをブロックしていた。結晶構造から、イオン結合サイトにおいて保存されたリジン残基が、2 つの近接するグルタミン酸に向けて結合する様子が観察された。この特徴的な荷電アミノ酸の配置によって Glu820 の pK_a 値が低下し、胃の内部の pH 1 という強酸性環境に向けてであっても H^+ を遊離できることが示唆された。

1. はじめに

食物消化時に我々の胃の内部は pH 1 もの強酸性環境に曝される。これはタンパク質の消化や外部からの病原体に対するバリアとして生理的に重要である。しかしながら、胃酸過多は胃潰瘍や逆流性食道炎といった症状を引き起こす。また、胃癌のリスクファクターであるピロリ菌の除菌には、抗生物質と共に胃酸抑制剤が用いられる。Omeprazole 等に代表される PPIs (Proton Pump Inhibitors) や、最近開発された新しいクラスの薬剤、vonoprazan を含む P-CABs (Potassium (K^+)-Competitive Acid Blockers) は、どちらも胃酸に関連する病態の治療に用いられている。胃 H^+ , K^+ -ATPase は、過度の胃酸分泌治療薬の分子ターゲットである。

H^+ , K^+ -ATPase が行うイオン輸送反応 (Fig. 1) は、他の P 型 ATPase 同様、Post-Albers タイプの反応機構¹⁾、

すなわち E1, E2 およびそれぞれが自己リン酸化された E1P, E2P という異なるコンフォメーションを遷移することで達成される。ATP によって駆動される細胞外 (胃内腔) への H^+ の放出および細胞内への K^+ の輸送における化学量論は、中性状態では 1 分子の ATP 加水分解当たり $2H^+ : 2K^+$ であるが、胃内部の酸性化に伴って $1H^+ : 1K^+$ へと変化すると考えられている²⁾。

H^+ , K^+ -ATPase は、2 つのサブユニットから構成されている。触媒機能を持った α -subunit は、類縁の P2-type ATPase である Na^+ , K^+ -ATPase³⁾ や sarco(endo)plasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase (SERCA, ref. 4) と高い相同性を持つ。この α -subunit はイオン結合サイトを内包する 10 本の膜貫通ヘリックス (M1-M10) と、3 つのドメイン—Actuator (A), Phosphorylation (P), Nucleotide-binding (N) ドメイン—からなる細胞質領域で構成されている。これに加え、 H^+ , K^+ -ATPase は β -subunit を必要とし、これらが 1:1 で会合した α - β 複合体として機能発現する。

H^+ , K^+ -ATPase は、中性の細胞質溶液 (pH 7) から胃内部の酸性溶液 (pH 1) へと H^+ を輸送するが、これは 100 万倍の H^+ 濃度差に相当する。特に pH 1 の溶液へと H^+ を放出するのは、アミノ酸だけで構成されるタンパク質としてはかなりチャレンジングな仕事である。なぜなら、 H^+ の結合や解離に関わる酸性アミノ酸の酸解離定数 (pK_a) は通常 3~5 程度であり、これは pH 1 の溶液への H^+ の放出が殆ど起こらないことを意味するからである。この問題は、今から 40 年以上前にこの分子が発見⁵⁾されて以来、長い間の謎であった。

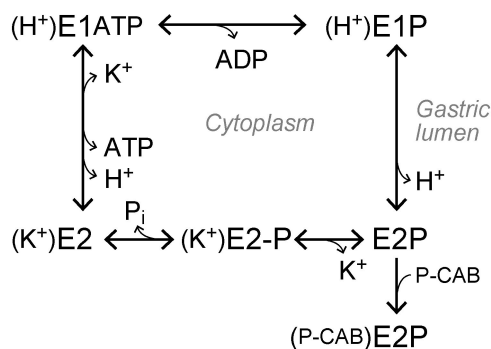


Fig. 1 Transport cycle of the gastric H^+ , K^+ -ATPase.

2. 三次元結晶化

2.1 二次元結晶から分子パッキングを考える

これまで著者は、ブタの胃袋から精製したタンパク質標品を用いて二次元結晶を作製、電子線結晶学によって H^+ , K^+ -ATPase の構造解析を行い、 H^+ , K^+ -ATPase の生理的に重要な機能を幾つか明らかにしてきた⁶⁻⁸⁾。しかしながら、これらの立体構造は、最も良い場合でも 6.5 Å 分解能であり、カチオン輸送メカニズムの詳細を理解する為には不十分であった。電子線結晶学（電子顕微鏡）は、アクアポリンやアセチルコリン受容体の原子分解能での構造解析^{9,10)}や、また近年の単粒子解析の爆発的な普及¹¹⁾からもわかるように、アミノ酸が判別できる程度の分解能の構造情報を十分抽出できるはずである。にもかかわらず、 H^+ , K^+ -ATPase の二次元結晶が高分解能に届かなかったのはなぜだろうか？ 二次元結晶のパッキングを見ると、そのヒントが隠されていた (Fig. 2a)。 H^+ , K^+ -ATPase の二次元結晶は、1 層の脂質膜に H^+ , K^+ -ATPase が再構成されており、この膜が上下さかさまに重なり、お互いの細胞質領域のみで結晶コンタクトを形成している (Fig. 2a, 矢尻)。一方で脂質膜中および細胞外領域に結晶コンタクトは皆無である。このようなルーズなパッキング

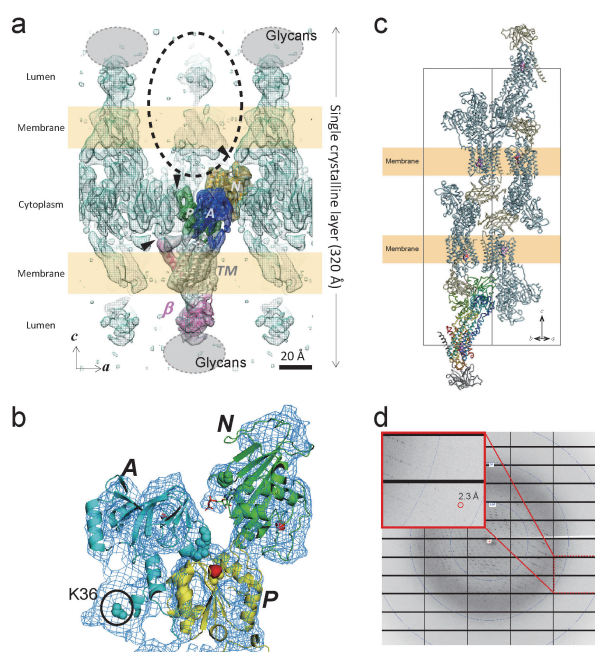


Fig. 2 (Color online) Learned from 2D crystal structures. **a**, Cryo-EM map of H^+ , K^+ -ATPase 2D crystal in BYK99-bound E2P state¹⁵⁾. Gray circles indicate expected volume of glycans at the ecto-domain of the β -subunit. Dotted circle indicates the empty space between H^+ , K^+ -ATPase molecules. **b**, Cryo-EM map of the H^+ , K^+ -ATPase cytoplasmic domains. Circle indicates the position of N-terminal Lys36 in the superimposed homology model⁶⁾. **c**, Molecular packing of the H^+ , K^+ -ATPase in its 3D crystal. **d**, X-ray diffraction of the vonoprazan-bound crystal.

では、高分解能の回折点を与えるに十分な結晶性を得るのは難しいであろう。より密な結晶パッキングを達成する為には、他の P 型 ATPase の三次元結晶に見られるように、脂質膜にもう一つ分子をさかさまに入れてやるのが理想的であろう (Fig. 2a, 破線)。しかしながら、この段階ではそれは難しかった。ベータサブユニットの細胞外ドメインには、6 か所の糖鎖付加サイトがあり、天然物 (ブタ胃) から調製した標品では、 β -subunit の core weight が約 35 kDa であるにも関わらず、SDS-PAGE 上では 70–90 kDa の位置にブロードなバンドを与えるほど大量の糖鎖付加を受けている。さらに悪いことに、この糖鎖構造は胃の内部に面していることもあり非常に強固な構造物を形成しており、タンパク質が未変性の状態では、試した限りではあるがエンドグリコシダーゼ等の酵素によって全く切断されない。つまり、図示した位置に大きな構造物がある為に (Fig. 2a, Glycans)、タイトなパッキング、さらには三次元結晶へと積層することが出来ないと考えられた。

2.2 BacMam システムによる組み替え体の大量発現

この問題を解決する為には、豚胃タンパク質標品ではなく、培養細胞で発現した組み替え体を利用した。まず始めに膜タンパク質の構造解析に実績のある昆虫細胞による発現を試みたが、発現量は非常に低いものであった (Fig. 3b, Sf9)。哺乳類の P 型 ATPase は活性発現にコレステロールを要求するものがあり、 H^+ , K^+ -ATPase はコレステロールを持たない昆虫細胞では上手くフォールディングできないと考えられた。そこで、哺乳動物由来の培養細胞を宿主として、改変したバキュロウイルスを媒介して目的タンパク質を発現させる BacMam システム¹²⁾ (Fig. 3a) による発現を検討したところ、大幅な発現量の増加が認められた (Fig. 3b)。肝心の β -subunit の糖鎖修飾の問題は、糖鎖の成熟過程に必要な酵素 GnT1 を欠損した株 (HEK293細胞 GnT1⁻株) を使用することで解決した。この細胞株では、発現するすべてのタンパク質に付加された糖鎖がすべて high-mannose 型となる為、標品にエンドグリコシダーゼ (EndoH) を添加することで容易に切断できる¹³⁾。

上記の発現系を用いて、精製に利用するアフィニティタグや β -subunit に 6 か所ある N 型糖鎖を除去した精製標品を、1 L の培養スケールあたり、約 0.3 mg 得ることができた。結晶化は、10 mg/ml 程度まで濃縮したサンプルを、あらかじめガラスチューブの壁にフィルム状に乾固させたリン脂質 (DOPC) と一晚攪拌混合したものを用いることで¹⁴⁾、他の P 型 ATPase と同様に Type I (二次元結晶が三次元方向に積層したもの) の三次元結晶を得た (Fig. 2c)。

2.3 結晶の改善

始めのうちは野生型の H^+ , K^+ -ATPase を用いることで

針状結晶が得られたが、分解能は針状結晶の長軸方向で最も良く 5 Å 程度であり、これと垂直な方向は 20 Å 程度の非常に異方性の強い回折を与えた。溶液条件のリファインメントを繰り返したが、分解能および結晶の形状に大幅な改善は見られなかった。ここで、再び二次元結晶の構造に学ぶことになる。6.5 Å の電子顕微鏡のマップ⁶⁾では、36 番目より N 末端側がディスオーダーしていた (Fig. 2b)。この部分の構造が不定形な為に結晶の一方が極端に悪いという可能性を考慮し、N 末端の欠損変異体をいくつか作成した。検討の結果、12 残基、24 残基欠損ではあまり変化がないが、36 残基および 48 残基を欠損した変異体を用いることで、六角柱に近い形状の、野生型の針状結晶と比較して大きな結晶が得られ、大幅な分解能の改善が見られた。比較的大きくなったとはいえ、初期に得られた結晶サイズは長い方で 100 μm 程度、厚さ方向は 10–20 μm 程度であり、SPring-8 の BL32XU, BL41XU のマイクロフォーカスビームを用いたヘリカルスキャンによってデータ収集を行った。若干の異方性は残すものの、48 残基欠損変異体は分解能の良い方向で 2.3 Å の回折点を観察できる程度まで改善することができた (Fig. 2d)。位相付けは、以前に電子顕微鏡の構造に基づいて作成したホモロジーモ

デル¹⁵⁾をサーチモデルとした分子置換によって行い、最終的に 2.8 Å 分解能 ($R_w = 23.7$, $R_f = 28.8$) の構造を得ることができた¹⁶⁾。

3. H⁺, K⁺-ATPase の結晶構造

H⁺, K⁺-ATPase の全体構造 (Fig. 4) は、一次配列の相同性が 60% 以上である Na⁺, K⁺-ATPase と非常に良く似ていた。細胞質側には ATP の加水分解に関わる 3 つの大きなドメイン (A, P, N ドメイン) が存在し、膜貫通領域には α-subunit から 10 本、β-subunit からは 1 本の膜貫通ヘリックス、細胞外領域 (胃内腔側) には β-subunit の Ecto ドメインが存在する。6 つある N 型糖鎖付加サイトのうち 3 つに N-アセチルグルコサミン (GlcNAc) をモデルすることができた。また、膜貫通領域には 2 つのリン脂質 (DOPC) と 1 つの界面活性剤 (C12E8) と思われる密度が観察された。結晶パッキング (Fig. 2c) からも推定される通り、H⁺, K⁺-ATPase は結晶の bc 面方向で脂質層に再構成されており、これが重なるように三次元結晶を形成している。

この結晶は、リン酸アナログであるフッ化ベリリウム (BeF₃⁻) と P-CAB (vonoprazan, SCH28080 を別々に結晶化) 存在下で生成したので、胃酸抑制剤が最も高い親和性で結合する E2P 状態 (それぞれ (von) E2BeF, (SCH) E2BeF と表記する) であると考えられた (Fig. 1)。結晶構造には、P ドメインの活性中心に BeF₃⁻ が結合しており、膜貫通領域に存在するカチオン結合サイトと胃内腔を繋ぐカチオンの通路部分には P-CAB が結合していた。細胞質ドメインの相対位置や、カチオン輸送のゲートが胃内腔 (細胞外) に向けて開かれていることから、この構造はプ

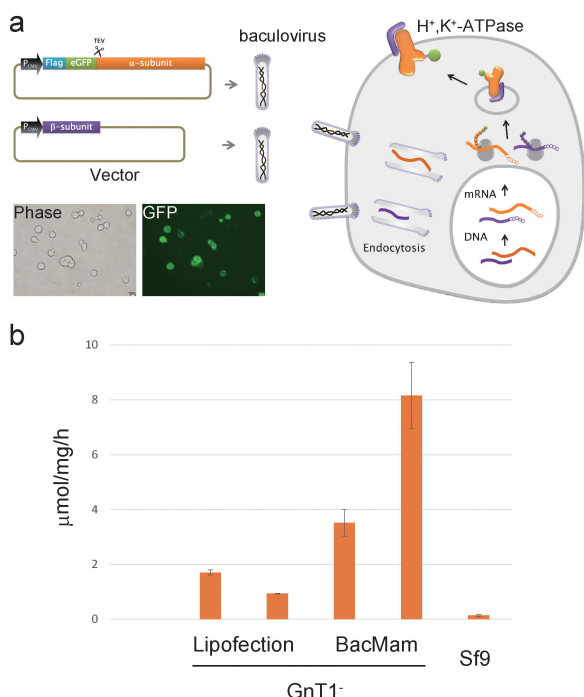


Fig. 3 (Color online) BacMam expression system. **a**, Schematics of the BacMam expression system. Flag-tag and eGFP followed by a TEV protease recognition sequence, were attached to the amino-terminal of the α-subunit of H⁺, K⁺-ATPase, and cloned into a custom-made vector based on previous report. The αβ-complex of H⁺, K⁺-ATPase was successfully expressed in the plasma membrane using baculovirus-mediated transduction of mammalian HEK293S GnT1⁻ cells. **b**, Specific ATPase activities in the crude membrane fractions from indicated expression trials.

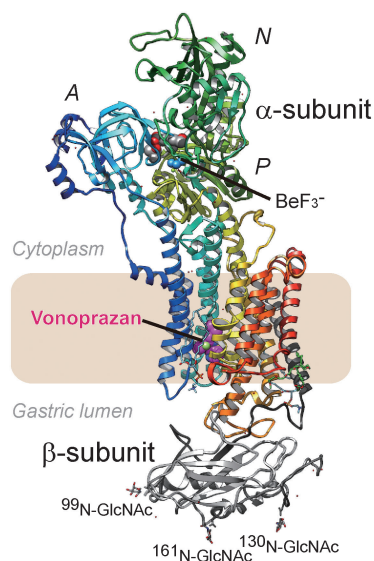


Fig. 4 (Color online) Crystal structure of the gastric proton pump¹⁶⁾. **a**, Overall structure of the H⁺, K⁺-ATPase (von)E2BeF state (PDB code: 5YLU).

ロトンを吐き出した直後の luminal-open E2P 状態に相当することが分かった。

4. P-CAB 結合部位

今回構造解析した 2 種類の P-CAB^{17,18)}は、どちらも胃内腔に向けて口を開けた輸送カチオンの通り道の中ほどに、部分的にはオーバーラップしているものの明確に区別できる形で結合していた。このカチオンの通り道を塞ぐような結合様式は、これらの阻害剤による K⁺ 競合的な阻害様式をよく説明するものである (Fig. 4)。

電子密度図は、これら化合物の官能基の位置や配向を特定するのに十分な解像度を持っていた。それぞれの P-CAB の結合に対し共通して重要なアミノ酸や、片方の結合にだけ重要なものがいくつか見つかり、これは変異体による P-CAB の親和性測定によって裏付けられた (Fig. 5)。例えば Tyr799 を Ala に変異させると両方の化合物に対する親和性を著しく低下させたが¹⁹⁾、TM2 に存在する Asn138 を、よりかさ高い Phe に変異させた場合、この側鎖付近に官能基が結合している SCH28080 に対する親和性を著しく低下させたが¹⁵⁾、vonoprazan に対する親和性には殆ど影響しなかった¹⁶⁾。薬剤と H⁺, K⁺-ATPase との結合は、どちらの場合も殆ど疎水的なものであった。タンパク質部分の結合サイトにすっぽりとはまり込むことで (Fig. 5cd)、薬剤の周囲から水が排除され、薬剤の結合にとって好ましいエントロピーの上昇を与える。このような結合様式は、殆どの酸性アミノ酸が電荷を持たないと考えられる pH 1 という溶液中においてリーズナブルである。

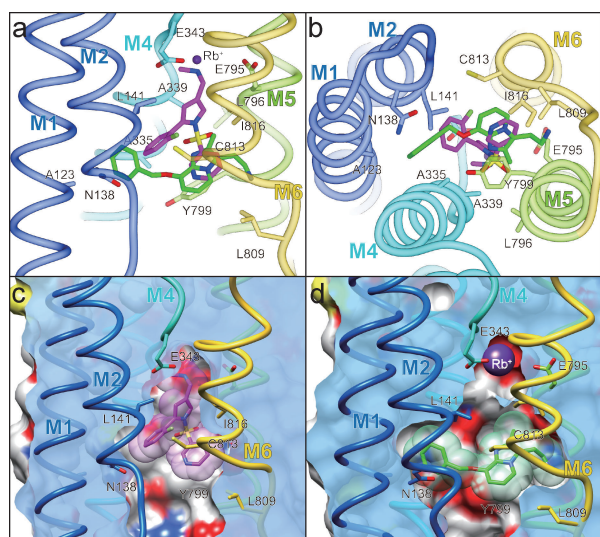


Fig. 5 (Color online) P-CAB binding to the H⁺, K⁺-ATPase. Vonoprazan-bound structure (magenta) is shown with superimposed SCH28080 (green), viewed from approximately parallel to the membrane plane (a) or perpendicular to the membrane plane from the luminal side (b). Cross sections of the P-CAB-binding sites (c, vonoprazan, d, SCH28080) perpendicular to the membrane plane.

5. ゲーティングを司る留め金 (latch)

他の P 型 ATPase や、H⁺, K⁺-ATPase の電子線結晶学による構造解析から、胃内腔 (細胞外) への輸送イオンのゲーティングの際に引き起こされる構造変化はよく理解されている^{20,21)}。胃内腔へ開いたゲートから対向輸送イオンである K⁺ が侵入、カチオン結合サイトに結合することで端を発し、M1-2 および M3-4 のヘリックスが動くことでゲートは閉じられる。M1-2 は A ドメインへと繋がっており、TM 領域での構造変化が細胞内の A ドメインに伝わることで、このドメインが P ドメインに対して相対的に回転し、P ドメインに結合したリン酸が加水分解される。このようなゲートを閉じる一連のアロステリックな過程において鍵となるのは、M1-2 ヘリックスの上下運動である。ゲートが開いているときに、M1-2 は細胞質側に存在しているが、ゲートが閉じるときには胃内腔側へとスライドする。今回構造解析された、胃内腔側のゲートが開いた状態である薬剤結合構造では、M1 の Ile119 が、ちょうど留め金のように、M4 に存在する Met334 と折り重なるようにして存在し、TM1-2 ヘリックスが胃内腔側へとスライドするのを防いでいるように見えた (Fig. 6ab)。もしそうであれば、これらの側鎖のうちのどちらかをより小さな Ala に置換することで、M1-2 ヘリックスが細胞質側に留まることが出来ずに胃内腔側へと自発的にスライドし、細胞外側へのゲートは閉じるはずである。ゲートが閉じると、上述の通りそのシグナルは A ドメインへと伝播し、最終的には脱リン酸化が誘起される。野生型においてこの脱リン酸化反応は、K⁺ が結合することで引き起こされるので (Fig. 1)、野生型の場合、ATPase 活性は K⁺ 非存在下では非常に低く、K⁺ 濃度に依存して上昇していく

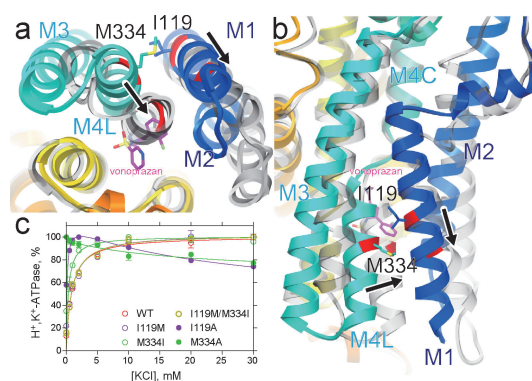


Fig. 6 (Color online) A gating latch. Comparison of the luminal-open E2P ((von)E2BeF) and luminal-closed E2P (E2AIF, determined by cryo-EM). Ile119 and Met334 are shown as sticks. Arrows indicate the displacement of the Ile119 and Met334 from the luminal-open to the luminal-closed forms, viewed from the luminal side (a) and parallel to the membrane plane (b). c, K⁺-dependent ATPase activities of the wild-type and indicated mutant enzymes.

(Fig. 5c)。これとは対照的に、Met334Ala や Ile119Ala 変異体では K⁺ 濃度に依存しない constitutive-active な ATPase 活性が観測された (Fig. 6c)。一方で、Ile119Met や Met334Ile 及び双方を入れ替えた変異体では、野生型と同様の K⁺ に依存した ATPase 活性の上昇が見られた。これらの結果は、Ile119 と Met334 の疎水的な相互作用が、M1-2 ヘリックスの胃内腔側へのスライドを防ぐ『留め金』(latch) のような機能を果たし、ゲーティングと脱リン酸化の共役に重要な役割を担っていることを示している。従って、上記のような相互作用が観測された今回の立体構造は、決して薬剤の結合によって誘発された人工的なコンフォメーションではなく、多くのタンパク質の薬剤結合構造がそうであるように、薬剤の結合がそのタンパク質が生体内で取りうる一状態に結合しこれを安定化することで得られた、胃内腔側へのゲートが開いた状態を捉えていると考えられる。

6. H⁺ を吐き出すメカニズム

Post-Albers 機構によれば (Fig. 1), luminal-open E2P 状態は、H⁺ を胃内腔へと輸送した直後、細胞外から対向輸送イオンの K⁺ が結合する直前の状態ということになる。事実、カチオン結合サイトは、仮に構造中に結合している P-CAB を取り除くと、通路を介して胃内腔の溶液と繋がっている。胃から調製した小胞を用いた H⁺ 輸送に関する過去の報告によれば、H⁺, K⁺-ATPase は中性状態において、1 分子の ATP 加水分解と共役して、2 つの H⁺ と 2 つの K⁺ を対向輸送する。しかしながら、ATP の加水分解から得られる自由エネルギーによる制限から、胃の内部が pH 3 以下の酸性条件下では、対向輸送される H⁺/K⁺ の数はそれぞれ 1 つにならざるを得ない²⁾。このように輸送化学量論が細胞外の pH によって変化する為には、pK_a の異なる 2 つの H⁺ 結合サイトが必要であるが、詳細は一切不明であった。

H⁺, K⁺-ATPase や Na⁺, K⁺-ATPase を対象とした過去の変異体解析から、M4, M6 に存在する幾つかの酸性アミノ酸がカチオンの輸送に関わることが知られていたが、この他に M5 のリジンの関与が指摘されていた (Fig. 7a)。このリジン (Lys791) は、H⁺, K⁺-ATPase にのみ普遍的に保存されており、Na⁺, K⁺-ATPase や SERCA ではセリンに置換されている。カチオン輸送サイトに存在する唯一の塩基性アミノ酸として、Lys791 は H⁺, K⁺-ATPase の H⁺ 輸送等重要な性質に関わることが指摘されてきた⁹⁾。

カチオン結合サイトの構造 (Fig. 7bc) で、まず目を引くのは、非常に近接した 2 つのグルタミン酸、Glu795 と Glu820 である (距離 2.5 Å)。これら酸性アミノ酸は通常負に帯電しているため、両者の近接構造は少なくともどちらか 1 つがプロトン化されていることを意味する。Glu795Gln 変異体は野生型とほぼ変わらない活性プロファイルを示すことから (Fig. 7d)、この場合 Glu795 が H⁺

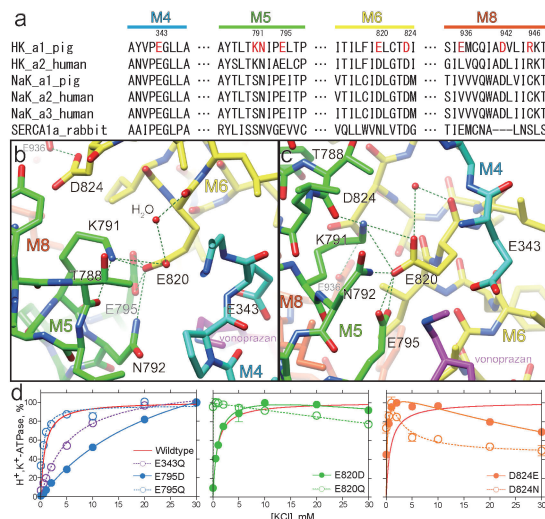


Fig. 7 (Color online) Cation binding site.

a, Sequence alignment of the indicated transmembrane helices among related P2-type ATPases. b, c, Close-up of the cation-binding site in H⁺, K⁺-ATPase (von) E2BeF in stick representation, viewed approximately perpendicular to the membrane from the cytoplasmic side (b) and parallel to the membrane from the TM4 side (c). Dotted lines are shown between residues within 3.5 Å between neighboring atoms, presumably making hydrogen bonds or an electrostatic interaction (Lys791-Glu820). d, K⁺-dependence of the specific activities of indicated mutants.

を結合した状態であると考えてよいであろう。従って Glu820 は Glu795 と水素結合を形成している。この他にも、Glu820 は Asn792 や近傍の水と水素結合を形成しており、Glu820 を中心とした水素結合ネットワークが形成されている。これに加えて、Lys791 のアミノ基が、Glu820 と塩橋を形成できる距離 (3.1 Å) に存在していた。このように、周りから多くの極性相互作用を受けている Glu820 のカルボキシル基が置かれる特異な環境によって、この pK_a 値が大きく下がる (つまり H⁺ が解離しやすくなる) ことが示唆され、Glu820 は H⁺ を放出するサイトの有力な候補と言える。

このような酸性アミノ酸の近接構造は、多くの酵素の活性中心に見られる。H⁺, K⁺-ATPase 同様胃で働くタンパク質、消化酵素ペプシンもその一つである。ペプシンの場合、活性中心に存在する 2 つのアスパラギン酸が 2.5 Å の距離にあり、互いの pK_a を大きく変化させることで触媒機能を発揮する (実験的に求められた pK_a 値が、それぞれ 4.5, 1.2 である)。また、ペプシンの外側に存在する酸性側鎖のいくつかは、多くの水素結合や塩橋によって、胃の中の酸性環境でも電離状態を保つことで、ペプシンが水和した状態に寄与していると考えられている²²⁾。

もう一つのグルタミン酸、Glu343 であるが、こちらも P2-type ATPase では高度に保存されており、カチオン輸送への関与が報告されている。構造を見ると、Glu343 は Lys791 (7.4 Å) や他のグルタミン酸 (Glu795 と Glu820

との距離がそれぞれ5.7 Åと4.7 Å)と、離れた位置にあり、従って胃の内部が酸性の場合にはH⁺を解離せず、弱酸性～中性状態のときにのみH⁺を放出できると考えられる。

これらのグルタミン酸 (Glu343, Glu795, Glu820) は、H⁺, K⁺-ATPase に普遍的に保存されているが、Glu820は、Na⁺, K⁺-ATPase や non-gastric H⁺, K⁺-ATPase (α2 isoform, H⁺と同様にNa⁺を輸送するとも言われている) においては、これより短いアスパラギン酸に置換されている。より長いグルタミン酸であることが、H⁺の親和性を下げるために周りの極性基と相互作用するという点で有利なのかもしれないし、またH⁺とNa⁺の特異性にも関わる可能性がある。

7. Rb⁺ 結合構造

H⁺を排出した後、H⁺, K⁺-ATPaseは細胞外(胃内腔側)から対向輸送イオンであるK⁺(もしくはその同族体であるRb⁺)をカチオン結合サイトに取り込み、これがE2Pの脱リン酸化を促進することで輸送反応サイクルが進行する。今回の結晶化条件(200 mM RbCl, pH 6.5)においては、過去の報告に基づくならば2つのH⁺と交換する形で2つのRb⁺が結合することが期待される。しかしながら、SCH28080結合構造には、カチオン結合部位近傍にRb⁺が1つだけ結合していた(Fig. 8ab)。結合したRb⁺は主鎖のカルボニル基を含む幾つかの酸素原子によって配位されているが、その配位状態はどちらかというとな非対称的であり、Na⁺, K⁺-ATPaseのK⁺閉塞構造(K⁺)₂E2-Pで見られるような理想的な6~8配位とは対照的であった²³⁾。H⁺, K⁺-ATPaseの構造に基づいて計算したpartial valence (Rb⁺結合位置において想定される価数, 0.41)はNa⁺, K⁺-ATPaseのK⁺閉塞構造における値(site I: 1.04, site II: 0.70)と比較して有意に低く、H⁺, K⁺-ATPaseの(SCH)E2BeF構造におけるRb⁺の親和性は、本来Rb⁺を閉塞するコンフォメーション(例えば(Rb⁺)E2-Pや(Rb⁺)E2等)と比較して低いことが想定される。

Na⁺, K⁺-ATPaseのK⁺閉塞構造²³⁾との比較によると(Fig. 8cd), H⁺, K⁺-ATPase (SCH)E2BeFにおけるRb⁺結合位置は1.3 Å程度ずれている。これは主に、二つの構造におけるM4の位置の違いが影響している。Na⁺, K⁺-ATPaseの構造ではluminal gateに相当するM4がゲートを閉じるように動くことでK⁺を閉塞している。しかしながら、H⁺, K⁺-ATPaseの場合、本来であればRb⁺の結合によってゲートが閉じるべきところを、SCH28080がM4の動くべき位置に結合している為にゲートを閉じることができない。この為にRb⁺が本来閉塞されるべきコンフォメーションをとることが出来ないと考えられる。従って、H⁺, K⁺-ATPase (SCH)E2BeF構造は、H⁺排出後にRb⁺が結合した直後、閉塞状態を誘起するpriming state

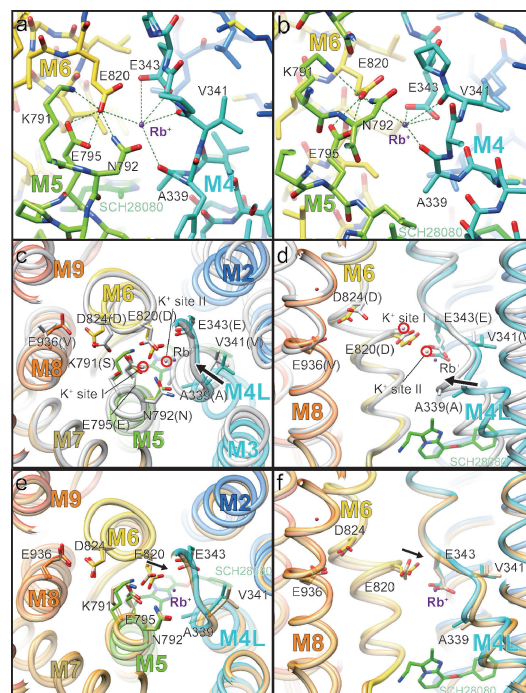


Fig. 8 (Color online) Rb⁺-bound (SCH)E2BeF structure. **a, b**, Close-up view of the cation-binding site in H⁺, K⁺-ATPase (SCH)E2BeF viewed perpendicular to the membrane from the cytoplasmic side (**a**) and parallel to the membrane from TM4 side (**b**). Bound Rb⁺ (purple) and water molecules (red) are indicated. **c, d**, K⁺-occluded (K⁺)₂E2-MgF state of Na⁺, K⁺-ATPase²³⁾ (light grey, PDB code: 2ZXE) is superimposed on the Rb⁺-bound (SCH)E2BeF state of H⁺, K⁺-ATPase (PDB code: 5YLV, color ribbons). Pink spheres (site I and II) indicate bound K⁺ in the Na⁺, K⁺-ATPase structure. Arrows indicate displacement of the TM4 luminal portion from the luminal-open to the luminal-closed form. **e, f**, Comparison of the cation-binding site between Rb⁺-bound (SCH)E2BeF (color ribbons) and (von)E2BeF (wheat), showing the inclination of Glu820 side chain towards Rb⁺ accompanied by Rb⁺ binding (arrow).

を模倣していると考えられる。

それでは、Rb⁺の結合が、この後にどのような分子イベントを引き起こすのであろうか? Rb⁺が結合していない、(von)E2BeFとの比較によると(Fig. 8ef), Rb⁺の結合によってGlu820がRb⁺に向けて傾く様子が見られる。過去の報告によれば、グルタミン酸の電荷を中和した変異体Glu820Glnにおいて、K⁺に依存しないATPase活性を示す表現型が報告されている²⁴⁾(Fig. 7d)。この解釈は、Glu820Gln変異体が、K⁺の正電荷によってGlu820の負電荷が中和される状態、つまり常にK⁺が結合した状態を模倣する為である、とされている。これらの結果から、H⁺, K⁺-ATPaseのRb⁺閉塞構造では、Rb⁺がGlu820側へ動いた位置に閉塞されることで、Glu820とLys791の塩橋が分断されるのではないかと推測される。では、余剰の正電荷であるLys791の側鎖はどうなるのであろうか。カチオン結合サイトにおいて、Lys791を

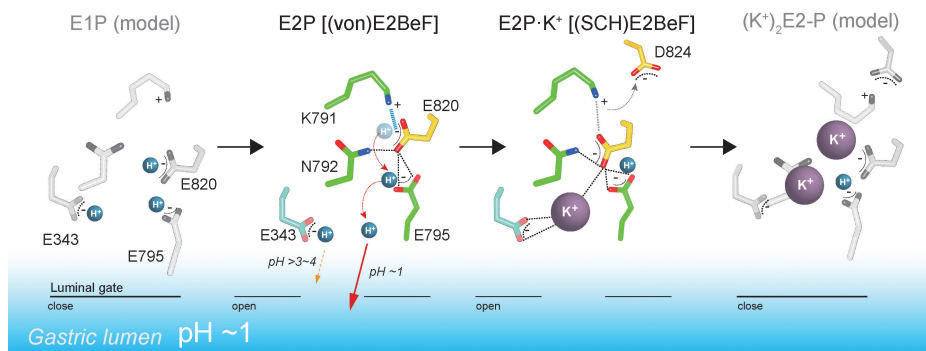


Fig. 9 (Color online) A model for H⁺ extrusion by the gastric proton pump.

挟んで Glu820のちょうど反対側に Asp824が存在する。この側鎖の電荷を中和した変異体 Asp824Asnの活性を測定すると、Glu820Gln 同様に K⁺ に依存しない ATPase 活性が観測された (Fig. 7d)。この結果は Asp824の負電荷が Lys791の正電荷によって中和された状態を模倣していると解釈できる。この仮説は、しかしながら K⁺ 閉塞状態の構造解析によって検証されるべきであるが、上述の H⁺ を押し出すという重要な働き以外にも、Lys791は K⁺ の結合を関知して反応サイクルを次に進めるという役割をも担っている可能性がある。

8. H⁺ 排出モデル

細胞内から取り込まれた H⁺ を閉塞した E1P 状態において、カチオン結合サイトに存在する3つのグルタミン酸はすべて H⁺ を結合した状態にあると考えられる (Fig. 9a)。これが構造変化によって E2P 状態、すなわち細胞外 (胃内腔側) にゲートを開いた状態になると (Fig. 9b), Glu820に Glu795が近接し pK_a 値を低下させる。これに加えて正電荷を持つ Lys791のアミノ基が相互作用することで、もはや Glu820は H⁺ を保持することができず、外部溶液の pH に関わらず、H⁺ が解離する。Glu795はイオン輸送経路の壁に露出しており、Glu820から押し出された H⁺ が、おそらく水素結合を経て、ちょうどビリヤードの玉が押し出されるように1つだけ遊離する。Glu343は、それ自身の pK_a (3~4) に依存してプロトンを1つ解離する。このメカニズムは、胃内腔が酸性になるにつれてイオン輸送化学量論が2個から1個へと変化するという仮説²⁾と矛盾しない。H⁺ を排出した後、H⁺, K⁺-ATPase は K⁺ を結合することで、反応サイクルが進行する。K⁺ が Glu820に配位することで (Fig. 9c), Lys791との塩橋が解離し、閉塞状態 (Fig. 9d) へと移行すると考えられる。

9. おわりに

『H⁺, K⁺-ATPase がどのようにして pH 1の胃酸に対して H⁺ を放出するのか?』という長年の謎に対して、構造的な証拠を示すことができた。この間に多くの研究者が必死に積み重ねてきた機能解析のデータや、阻害剤として働

く胃酸抑制剤、そして近縁の P 型 ATPase の多くの結晶構造がなければ、今回の結論は決して導き出されない。改めて、これまでの研究データの含蓄に感嘆するとともに、この結論に近いものを予測した G. Sachs や K. Munson の慧眼²⁵⁾に畏敬の念を禁じ得ない。結晶構造は道の終わりでは決してないが、道の終わりにたどり着くために『マップ』が非常に有用であるのも事実である。細胞膜を隔てた100万倍の H⁺ 濃度勾配を分子レベルで理解するためには、どのように H⁺ が押し出されるか、だけでは不十分である。押し出される仕組みが理解できたことで、今度は『どのように中性の (H⁺ 濃度の薄い) 溶液から H⁺ だけを汲み上げるのか?』という逆の疑問が浮上してくる。ダイナミックに構造変化する胃プロトンポンプ作動機構の理解には、まだまだ残されたピースが多い。

謝辞

本研究の遂行に当たりご尽力頂きました、名古屋大学細胞生理学センターの入江克雅博士、中西華代博士、藤吉好則博士、谷口真由美氏、ロックフェラー大学の鈴木博視博士に感謝致します。本稿で使用した図の一部は中西華代博士より提供頂きました。本研究の開始初期からご尽力頂きました北海道大学の谷口和彌博士に感謝致します。

参考文献

- 1) R. L. Post *et al.*: J. Gen. Physiol. **54**, 306S (1969).
- 2) E. C. Rabon, T. L. McFall and G. Sachs: J. Biol. Chem. **257**, 6296 (1982).
- 3) J. P. Morth *et al.*: Nature **450**, 1043 (2007).
- 4) C. Toyoshima *et al.*: Nature **405**, 647 (2000).
- 5) A. Ganser and J. G. Forte: Biochim. Biophys. Acta **307**, 169 (1973).
- 6) K. Abe, K. Tani, T. Nishizawa and Y. Fujiyoshi: EMBO J. **28**, 1637 (2009).
- 7) K. Abe, K. Tani and Y. Fujiyoshi: Nat. Commun. **2**, 155 (2011).
- 8) K. Abe, K. Tani, T. Friedrich and Y. Fujiyoshi: Proc. Natl. Acad. Sci. USA **109**, 18401 (2012).
- 9) T. Walz *et al.*: Nature **387**, 624 (1997).
- 10) A. Miyazawa, Y. Fujiyoshi and N. Unwin: Nature **423**, 949 (2003).

- 11) Y. Cheng, N. Grigorieff, P. A. Penczek and T. Walz: *Cell* **161**, 438 (2015).
- 12) A. Dukkipati *et al.*: *Protein Expr. Purif.* **62**, 160 (2008).
- 13) A. Goehring *et al.*: *Nat. Protocols* **9**, 2574 (2014).
- 14) P. Gourdon *et al.*: *Cryst. Growth Des.* **11**, 2098 (2011).
- 15) K. Abe *et al.*: *Sci. Rep.* **7**, 6632 (2017).
- 16) K. Abe, K. Irie, H. Nakanishi, H. Suzuki and Y. Fujiyoshi: *Nature* **556**, 215 (2018).
- 17) K. Otake *et al.*: *Adv. Ther.* **33**, 1140 (2016).
- 18) J. J. Kaminski *et al.*: *J. Med. Chem.* **34**, 533 (1991).
- 19) S. Asano *et al.*: *J. Biol. Chem.* **279**, 13968 (2004).
- 20) C. Toyoshima *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**, 19831 (2007).
- 21) K. Abe, K. Tani and Y. Fujiyoshi: *J. Biol. Chem.* **289**, 30590 (2014).
- 22) A. R. Sielecki *et al.*: *J. Mol. Biol.* **214**, 143 (1990).
- 23) T. Shinoda *et al.*: *Nature* **459**, 446 (2009).
- 24) J. B. Koenderink *et al.*: *J. Biol. Chem.* **279**, 16417 (2004).
- 25) K. Munson, R. Garcia and G. Sachs: *Biochemistry* **44**, 5267 (2005).

著者紹介



阿部一啓

名古屋大学細胞生理学研究所/大学院創薬科学研究科 准教授

E-mail: kabe@cespi.nagoya-u.ac.jp

専門: 生化学, P型ATPase, 膜輸送体

【略歴】

2004年 北海道大学大学院理学研究科化学専攻博士後期課程 修了, 2003-2009年 日本学術振興会特別研究員 (DC2, PD 京都大学大学院理学研究科), 2009-2012年 社団法人バイオ産業情報化コンソーシアム 特別研究員, 2012年 京都大学特定研究員, 2013-2016年 名古屋大学細胞生理学研究所/大学院創薬科学研究科 助教, 2016年より同所属 准教授。

The H⁺ extrusion mechanism revealed by crystal structures of the gastric proton pump

Kazuhiro ABE^{1,2} ¹Cellular and Structural Physiology Institute (CeSPI), ²Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Nagoya University, Nagoya 464-8601, Japan

Abstract Gastric proton pump, H⁺, K⁺-ATPase, is a P-type ATPase responsible for the gastric acidification, and is thus an important drug target for treating gastric acid-related diseases. We present the crystal structures of the H⁺, K⁺-ATPase in complex with two acid blockers, vonoprazan and SCH28080, in the luminal-open E2P state. These drugs have partially overlapped, but clearly distinguishable binding modes, which are defined in the middle of a conduit running from the gastric lumen to the cation-binding site. The crystal structures also revealed a conserved lysine residue that points to the juxtaposed carboxyl residues in the cation-binding site. The unusual configuration of the cation-binding site enables the extrusion of a single proton into the pH1 solution of the stomach, which corresponds to a million-fold proton gradient across the membrane, the highest known cation gradient in any mammalian tissue.