

論文の内容の要旨

論文題目：Structural insights into the mechanisms behind the maintenance of cellular homeostasis by membrane transport proteins via ATP.

(ATP を利用する膜タンパク質による細胞内恒常性維持機構の構造基盤の解明)

富田 篤弘

ATP は生体分子の機能調節や代謝・物質輸送の駆動力など多様な役割を持つ生体に必須の分子である。本研究では、ATP を利用する膜輸送タンパク質に着目し、その分子機構の解明を目指して機能・構造解析を行った。

Mg²⁺チャネル MgtE に対する ATP の調節作用の解明

Mg²⁺は生体内に最も多量に存在する 2 価カチオンであり、生体膜の安定化や酵素の活性化など多くの生命活動に関与する。そのような重要性から、Mg²⁺の恒常性の維持は生物にとって必須である。

MgtE は原核生物から真核生物まで広く保存された Mg²⁺チャネルであり、生体内の Mg²⁺恒常性の維持に関わっている。MgtE は N 及び CBS ドメインからなる細胞質ドメインと膜貫通ドメインから構成されており、先行研究での MgtE の全長構造からダイマーとして機能することが知られている。Mg²⁺存在下・非存在下での構造比較から、MgtE の細胞質ドメインは細胞内 Mg²⁺センサーとして働き、細胞内の Mg²⁺恒常性を維持することが示唆された(図 1)。続く電気生理解析では、確かに MgtE のイオン透過孔は細胞質側の Mg²⁺濃度が 0-5 mM の低濃度で開いており、5-10 mM の高濃度で閉じていた。しかし、生体内の Mg²⁺濃度は 1-2 mM であり、維持すべき Mg²⁺濃度と電気生理解析の結果との間に乖離が見られた。そのため、MgtE による Mg²⁺恒常性の維持には他の因子の存在が示唆された。そこで本研究では、MgtE のイオン透過孔開閉制御に関わる調節因子を同定し、MgtE との複合体の機能・構造解析を行い Mg²⁺恒常性維持機構の解明を目指した。

調節因子の候補を特定するために、等温滴定型熱量測定(ITC)を用いて MgtE との結合熱を測定したところ、ATP が生理的な濃度(5-10 mM)で MgtE に結合することが明らかになった。そこで、電気生理解析(共同研究)を行ったところ、ATP 存在下で MgtE は 1-2 mM の生理的な Mg²⁺濃度でイオン透過孔を閉じることが明らかになった。以上から ATP が MgtE の調節因子であることが明らかになった。

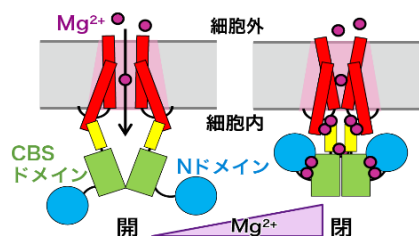


図 1 MgtE による Mg²⁺ 感知機構

ATP の MgtE に対する調節機構を解明するために、MgtE-ATP 複合体の結晶構造解析を行った。精製した MgtE を ATP と混合して蒸気拡散法による結晶化を行い、良質な結晶を得ることに成功した。続いて大型放射光施設 SPring-8 にて結晶からデータ収集を行い、解析することで 3.6 Å 分解能での構造決定に成功した。結晶構造において、MgtE は Mg^{2+} の結合に由来する閉状態を取っており、ATP は CBS ドメインの Mg^{2+} 結合部位近傍に結合していた(図 2)。ATP のアデニン環は F227 とのスタッキング相互作用、リボース環は D188 との水素結合、リン酸基は R187 との水素結合で安定化されていた。

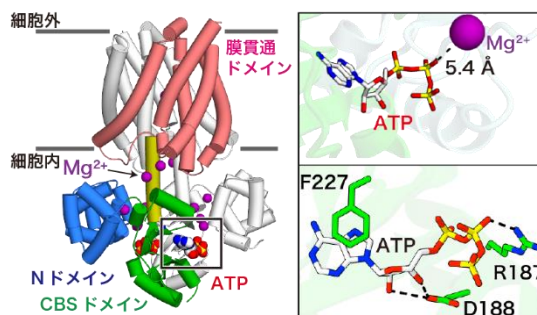


図 2 MgtE-ATP 複合体の構造と ATP 認識部位

結晶構造中で ATP の結合に関与するアミノ酸残基の変異体を作成し、電気生理解析(共同研究)・生化学解析によって点変異が MgtE のイオン透過孔開閉に及ぼす影響を確認した。その結果、R187 の電荷を反転させて ATP 結合能を下げることを意図した R187E 変異体では予想外の結果が得られた。R187E 変異体では ATP 非存在下でも、野生型の ATP 存在下と同様に低い Mg^{2+} 濃度でイオン過孔の開閉確率が下がっていた。R187E 変異体は ATP のリン酸基が位置する場所に負電荷を導入した変異体であるため、ATP による MgtE イオン透過孔開閉の調節には、ATP 結合部位へのリン酸基に由来した負電荷の導入が重要であると考えられた。

以上から、MgtE に結合した ATP は、CBS ドメインに負電荷を導入して Mg^{2+} に対する親和性を高めることによって、MgtE の Mg^{2+} センサーの機能を生理的な Mg^{2+} 濃度に調整していることが明らかになった(図 3)。

本研究では、MgtE-ATP 複合体の結晶構造解析・電気生理解析・生化学解析を行い、MgtE の調節因子として ATP を同定して、MgtE のイオン透過孔の開閉制御に対する ATP の調節作用の分子機構を解明した。

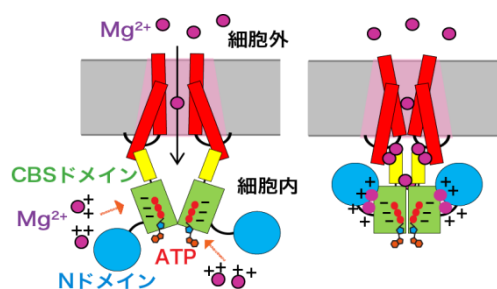


図 3 ATP による MgtE のイオン透過孔開閉の調節機構

クライオ電子顕微鏡と分子動力学法を用いた ATP13A2 のポリアミン輸送機構の解明

ポリアミンは多くの生命現象に関与しており、生命に必須な化合物である。中でもポリアミンの一種であるスペルミン(SPM)は転写活性の調節・活性酸素(ROS)や有害物質からの細胞の保護など重要な役割を担っているため、細胞内の SPM 恒常性の維持は生物にとって必須である。

細胞内への SPM 取り込みはエンドサイトーシス経路を介して行われ、SPM はリソソーム内腔へと運ばれる。近年、ATP13A2 がリソソーム内腔から細胞質への SPM 輸送の役割を担っていることが報告された(図 4)。ATP13A2 は P 型 ATPase ファミリーに属しており、パーキンソン病に関与する遺伝子 PARK9 としても知られている。従来の P 型 ATPase ファミリーは金属イオンや脂質を基質としており、機能・構造解析から金属イオンや脂質の認識機構・輸送機構がよく知られている。しかし SPM は正に帯電したアミノ基を 4 つ持つ親水性の化合物であり、単原子からなる金属イオンや疎水性の脂質とは化学的性質が大きく異なるため、ATP13A2 は従来の P 型 ATPase とは異なる認識機構・輸送機構を持つと考えられた。

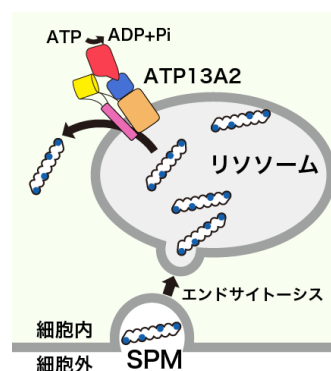


図 4 細胞内への SPM 輸送経路

そこで本研究では、ATP13A2 による SPM の認識機構および SPM の輸送機構の解明を目指した。

ATP13A2 による SPM 認識機構を明らかにするために、SPM 結合状態(後述の E2P(SPM)状態)で ATP13A2 の構造解析を行った。発現・精製方法を検討することで、ヒト由来の ATP13A2 の精製に成功した。精製した ATP13A2 を SPM と阻害剤と混合した後、グリッド上で凍結させて電子顕微鏡で凍結試料を撮影した。得られた画像を解析した結果、3.9 Å 分解能の密度マップを得て立体構造の決定に成功した(図 5)。ATP13A2 は、P 型 ATPase に共通した N, P, A ドメインからなる ATPase ドメインと膜貫通ドメイン(M1-M10 の 10 本のヘリックス)に加えて、特徴的な N 末端ドメイン(NTD)と C 末端ドメイン(CTD)を持っていた。SPM はその直鎖構造に合わせて M1-M6 ヘリックスで形成された広く細長いポケットに埋め込まれ、アミン部位が酸性アミノ酸と芳香族アミノ酸で認識されていた。他の P 型 ATPase と比較すると、ATP13A2 で見られた基質結合ポケットはより大きく、基質はポケットを形成する多くのアミノ酸で広く認識されていることが明らかになった。

P 型 ATPase は共通した輸送サイクルを持ち、ATPase ドメインが ATP の加水分解に共役したリン酸化と脱リン酸化を受けて、基質選択性の異なる E1 状態と E2 状態を遷移することで基質の輸送を行う。ATP13A2 も同様の輸送サイクルに従い、SPM 低親和性の E1 状態と SPM 高親和性の E2 状態を遷移することで SPM 輸送を行うと考えられた。そこで他の P 型 ATPase の輸送中間体の構造解析を参考にして、ATP 結合状態を模倣する AMPPCP、リン酸化状態を模倣する AlF_4^- や BeF_3^- などの阻害剤を用いて、SPM 輸送における中間体の構造解析を行った。その結果、E1-ATP, E1P-ADP, E2P(SPM), E2Pi(SPM) の 4 状態の構造決定に成功した。さらに、ATP13A2 の高い柔軟性のために構造決定が困難であった E1(apo), E2P 状態について、分子動力学(MD)シミュレーションを用いて補完することによって輸送サイクルの全体像を得ることに成功した(図 6)。輸送サイクル全体において、基質認識に関わっていた M1-2 ヘリックス(図中で紫色で表示)が重要な役割を果たしていた。E1 状態と E2 状態の構造比較を比較すると、E2 状態ではリン酸化に伴う構造変化で M1-2 ヘリックスが上側へ移動していた。この M1-2 ヘリックスの上側への移動がリソソーム内腔側に基質結合ポケットを形成して、SPM 高親和性の E2 状態が形成されることが明らかになった。さらに、SPM が基質結合ポケットに結合すると M1-2 ヘリックスを固定することで脱リン酸化反応を促進する中間体(E2P(SPM)-E2Pi(SPM))が形成され、SPM の結合と共役した脱リン酸化が起こることで輸送サイクルが進み、E1 状態に戻るといふ輸送サイクルを今回提唱した。

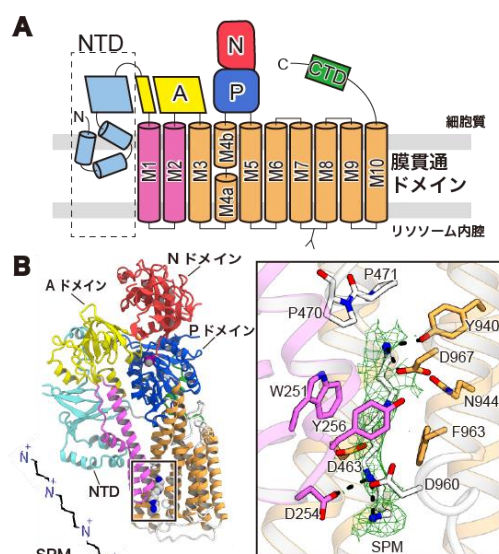


図 5 ATP13A2 のトポロジー図 (A) と全体構造・SPM 認識部位 (B)

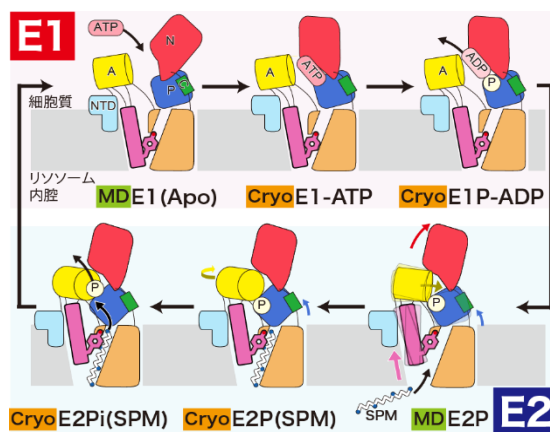


図 6 ATP13A2 による SPM の輸送サイクル

本研究では、クライオ電子顕微鏡を用いて基質結合状態の ATP13A2 の立体構造を明らかにし、

その SPM 認識機構を解明した。さらに、SPM 輸送における各中間体の構造解析と MD シミュレーションを組み合わせることで、SPM 輸送機構を解明した。以上の知見は、P 型 ATPase による基質認識・輸送機構の理解を深めるだけでなく、ポリアミン恒常性の維持やパーキンソン病のさらなる理解にもつながると期待される。