

- S., Kojima, S., Hashimoto, Y., Marth, J.D., Paulson, J.C., & Taniguchi, N. (2010) *J. Biol. Chem.*, 285, 6515–6521.
- 7) Suzuki, T. & Nakaya, T. (2008) *J. Biol. Chem.*, 283, 29633–29637.
- 8) Tomita, S., Kirino, Y., & Suzuki, T. (1998) *J. Biol. Chem.*, 273, 6277–6284.
- 9) Sato, Y., Liu, C., Wojczyk, B.S., Kobata, A., Spitalnik, S.L., & Endo, T. (1999) *Biochim. Biophys. Acta*, 1472, 344–358.
- 10) Perdivara, I., Petrovich, R., Allinquant, B., Deterding, L.J., Tomer, K.B., & Przybylski, M. (2009) *J. Proteome Res.*, 8, 631–642.
- 11) Gerken, T.A., Jamison, O., Perrine, C.L., Collette, J.C., Moynova, H., Ravi, L., Markowitz, S.D., Shen, W., Patel, H., & Tabak, L.A. (2011) *J. Biol. Chem.*, 286, 14493–14507.
- 12) Nakagawa, K., Kitazume, S., Oka, R., Maruyama, K., Saido, T. C., Sato, Y., Endo, T., & Hashimoto, Y. (2006) *J. Neurochem.*, 96, 924–933.
- 13) Akasaka-Manya, K., Manya, H., Sakurai, Y., Wojczyk, B.S., Kozutsumi, Y., Saito, Y., Taniguchi, N., Murayama, S., Spitalnik, S.L., & Endo, T. (2010) *Glycobiology*, 20, 99–106.
- 14) Akasaka-Manya, K., Manya, H., Sakurai, Y., Wojczyk, B.S., Spitalnik, S.L., & Endo, T. (2008) *Glycoconj. J.*, 25, 775–786.
- 15) Fiala, M., Liu, P.T., Espinosa-Jeffrey, A., Rosenthal, M.J., Bernard, G., Ringman, J.M., Sayre, J., Zhang, L., Zaghi, J., Dejbakhsh, S., Chiang, B., Hui, J., Mahanian, M., Baghaee, A., Hong, P., & Cashman, J. (2007) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104, 12849–12854.

北爪 しのぶ

(理化学研究所基幹研究所疾患糖鎖研究チーム)

How does glycosylation affect the metabolism of amyloid β precursor protein?

Shinobu Kitazume (Disease Glycomics Team, RIKEN Advanced Science Institute, 2-1 Hirosawa, Wako, Saitama 351-0198, Japan)

胃 H^+ , K^+ -ATPase のユニークな性質と P 型 ATPase 間で保存された構造変化

1. はじめに

H^+ , K^+ -ATPase は胃プロトンポンプとして知られ, H^+ と K^+ の対向輸送によって胃酸分泌の最終段階を担う。同じ P 型 ATPase ファミリーに属する Na^+ , K^+ -ATPase や筋小胞体 Ca^{2+} -ATPase (SERCA) とはアミノ酸配列の 60%, 30% 以上がそれぞれ同一であり, まさに兄弟, 従兄といった関係にある。しかしながら, このプロトンポンプは非常に困難な使命を果たさねばならない—ヒトの食物消化時の胃内腔は約 pH 1 という強酸性状態に曝されるが, これは細胞

内がほぼ中性であることを考えると, H^+ , K^+ -ATPase は細胞膜を隔てて約 100 万倍 (10^6) もの H^+ 濃度勾配を形成していることになる。なぜ H^+ , K^+ -ATPase は他のイオンポンプ (Na^+ は 10 倍程度, Ca^{2+} では 1,000~1 万倍) が達成できないような非常に大きな H^+ の濃度勾配を作り出すことができるのか? 何が H^+ , K^+ -ATPase に特別に備わっていて, 基本的な作動原理はどこまで保存されているのか? 本稿では H^+ , K^+ -ATPase の構造解析の例を中心として, P 型 ATPase のメンバーそれぞれが持つユニークな側面とファミリー間での類似性について紹介する。

2. P 型 ATPase ファミリー

P 型 ATPase は, ATP の加水分解と共役した主として陽イオンの能動輸送を行うイオンポンプとして, 様々な生命現象に密接に関わっている。ATP 加水分解反応が活性中心の自己リン酸化 (Auto-Phosphorylation) を伴う為に P 型と呼ばれるようになったこのファミリーは, P1 から P5 までのサブタイプに分類される¹⁾。中でも P2-type に分類されるイオンポンプは古くから研究されており, 細胞内外での Na^+ 濃度勾配を作り出す Na^+ , K^+ -ATPase の発見²⁾ に対して 1997 年に Jens C Skou がノーベル化学賞を与えられた。2000 年にはこの P 型 ATPase として初めて SERCA の X 線結晶構造が³⁾, 2007 年には Na^+ , K^+ -ATPase の構造⁴⁾ が報告された。現在 SERCA の様々な反応中間体も含めて 40 以上の構造が報告されており, その反応機構の分子レベルでの理解が進んでいる。

P 型 ATPase が行うイオン輸送は, Na^+ , K^+ -ATPase に対する Post-Albers 機構に代表されるモデルによって酵素化学的に説明される (図 1A)。P 型 ATPase は主として $E1$, $E2$ という状態をサイクルすることで能動輸送を達成する。 H^+ , K^+ -ATPase を例に説明すると, $E1$ 状態においてイオン結合サイトは細胞内に向けられ H^+ に対して高親和性を示す。次に H^+ を結合した酵素が ATP を加水分解し自己リン酸化された中間体 $E1P$ を形成する。 $E1P$ は H^+ を閉塞した状態にあり, これが H^+ を能動的に細胞外へと放出することで, $E2P$ へと遷移する。 $E2P$ 状態ではイオン結合部位が細胞外に向けられ, K^+ に対して高い親和性を示すように変化している。 $E2P$ は次に K^+ の結合によって脱リン酸化を促進され, K^+ を閉塞した $E2$ 状態へと移行する。続いて $E2$ が ATP の結合によって $E1$ へと変換される過程で K^+ が細胞内へと輸送される。イオン輸送の化学量論は $ATP : H^+ : K^+ = 1 : 2 : 2$ とされるが, これは胃内部が酸性状態では $1 : 1 : 1$ に変化すると考えられている。

3. 胃 H^+, K^+ -ATPase のラチェット機構

上記の Post-Albers 機構に依れば, H^+ は EIP から $E2P$ へと遷移する過程で胃内腔へと放出される. 各部分反応は単純な化学平衡と考えることが出来るので, 高濃度の H^+ は反応を逆向きに進行させる強い圧力となって $EIP/E2P$ の平衡を EIP 側へと遷移させるはずである. しかし H^+, K^+ -ATPase の場合, 他の P2-type ATPase と異なり EIP への蓄積が殆ど起こらないということが知られていた. 従ってこの $E2P$ を好む偏った平衡状態 ($E2P$ -preference) は, 胃内部からの H^+ の逆流を防ぐことでその濃度勾配を維持する為の性質であろう (図 1A, 破線矢印). 我々は H^+, K^+ -ATPase の立体構造を明らかにすることで, この $E2P$ -preference を説明する一つの構造的特徴を見出した⁵⁾.

極低温電子顕微鏡を用いた電子線結晶学によって 6.5 Å 分解能で決定された H^+, K^+ -ATPase の $E2P$ 状態の構造 (図 1B) は, SERCA や Na^+, K^+ -ATPase と非常によく似たものであった. 触媒機能を有する α サブユニットの細胞質側には, N (Nucleotide-binding), P (Phosphorylation), A (Actuator) ドメインが十分に解像されている. また, α サブユニットの 10 本の膜貫通 (TM, TransMembrane) ヘルックス (M1-M10) や 1 回膜貫通型の β サブユニットは, Na^+, K^+ -ATPase の構造に基づいたホモロジーモデルによって矛盾なく説明される.

注目すべき構造は, β サブユニットの N 末端 (βNt) が P ドメインに直接結合している点である (図 1C, 矢尻). この P ドメインは EIP から $E2P$ への遷移によって大きく動くことが SERCA の構造解析から明らかになっている (図 1C, リボンモデル (薄緑) で EIP 状態での P ドメインの位置を図示した). P ドメインはイオン結合サイトの一部を形成する M4, M5 と繋がっており, このドメインの動きは即ち輸送されるイオンの親和性と連動している.

図 1 H^+, K^+ -ATPase のラチェット機構

(A) Post-Albers 機構に基づいた H^+, K^+ -ATPase の反応機構 (本文参照). 各部分反応は可逆的であるが, ここでは正方向を矢印で示した. (B) 電子線結晶学による H^+, K^+ -ATPase の構造 (サーフェイス) とホモロジーモデル (リボン). (C) ラチェット機構. H^+, K^+ -ATPase は $E2P$ 状態において, P ドメイン (緑) と β サブユニット N 末端 (赤) が相互作用することで (矢尻), 逆反応による EIP (薄緑) の形成を抑える (赤矢印).

図 2 H^+, K^+ -ATPase と SERCA において共通した構造変化

(A) 阻害剤の結合によって誘起される H^+, K^+ -ATPase (左) の構造変化を SERCA (右, PDB code 3B9B) と比較して示した (本文参照). (B) 細胞質ドメイン (A, 青破線部) の構造変化. 阻害剤が結合した構造をカラーで, 非結合状態の構造をグレーで表示した. (C) 阻害剤の結合部位 (A, 赤破線部) の断面を示す. 阻害剤が結合した構造モデルをマゼンタで, 阻害剤非結合状態をグレーで示す. 断面の contour level (1~5 σ) をパネル右下に示したスペクトルで表示した. B, C において, 阻害剤の結合によって誘起される構造変化を矢印で示す.

H^+, K^+ -ATPase の構造では, βNt が P ドメインを $E2P$ 形成に有利な位置に繋ぎ止め, 高濃度の H^+ によって誘起される逆反応での EIP 形成を抑制しているように見られた (図 1C, 赤矢印). 実際に βNt 欠損変異体を作成したところ, EIP 中間体が形成され⁵⁾, $EIP/E2P$ の平衡状態が EIP 側へとシフトする⁶⁾ことが検証された.

これらの結果は, βNt があたかも “ラチェット” のように振る舞うことで逆反応である EIP の形成を抑えていることを示している. SERCA は基本的に触媒サブユニットのみで機能するし, 同様に β サブユニットを持つ Na^+, K^+ -ATPase の構造では βNt 部分が明らかに H^+, K^+ -ATPase のそれとは異なる方向に突き出ている, P ドメインやほかのどの部分とも接触していない^{4,7)}. 実際に H^+, K^+ -ATPase と同様の N 末端欠損変異体を作成しても, 野生型と比べて $EIP/E2P$ の平衡状態に有意な差は見られなかった⁶⁾. それ故 “ラチェット” は H^+, K^+ -ATPase に特異的であると言える. イオン輸送サイクルを逆回転させる強い圧力となる 100 万倍もの H^+ 濃度勾配に対抗する為に, H^+, K^+ -ATPase はその分子内にラチェットを獲得し, サイクルが正方向にのみ進行するように保証されていると考えられる.

4. P2-type ATPase で保存された構造変化

胃酸や胃粘膜分泌のバランスが崩れると, 胃潰瘍や逆流性食道炎などが引き起こされる. これらの治療には H^+, K^+ -ATPase の特異的阻害剤が用いられる. 我々は阻害剤との複合体の 7 Å 分解能での構造を得た (図 2A 左). 阻害剤は胃内腔に向かって開かれた K^+ の通り道を塞ぐように結合しており, これは K^+ 競争的な阻害様式や, 過去に報告された幾つかの変異体実験の結果を説明するものであった. しかしながらより注目に値するのは, 阻害剤の H^+, K^+ -ATPase への結合が単なる “鍵と鍵穴” の関係ではなくて, 阻害剤の結合そのものが分子全体に渡る構造変化

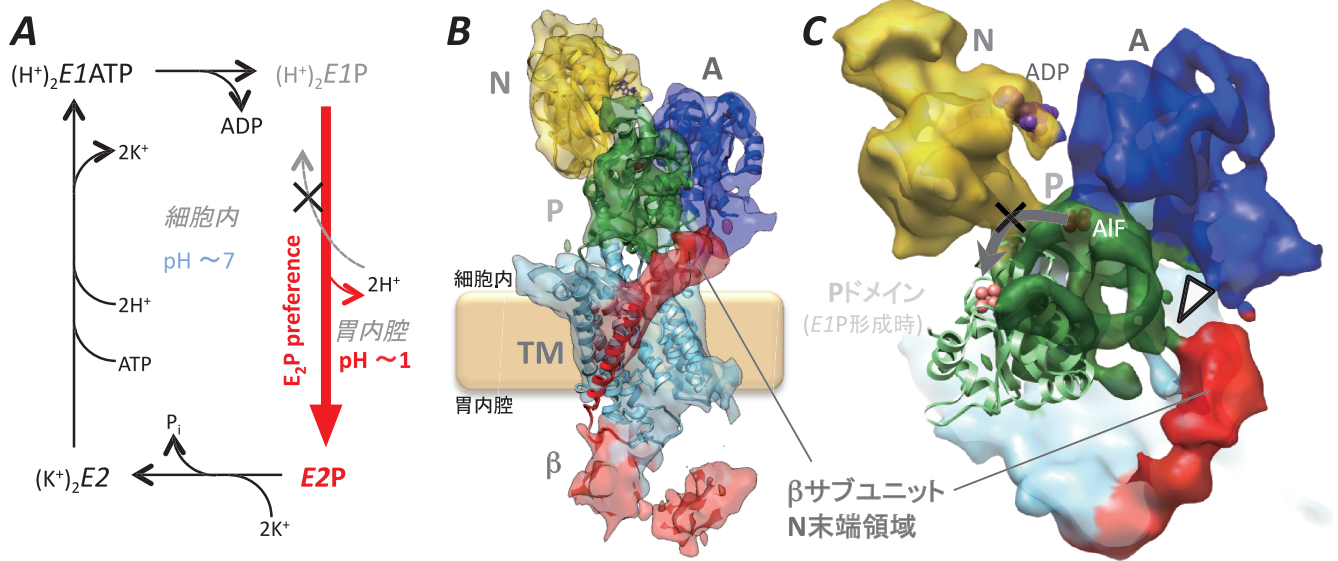


図1

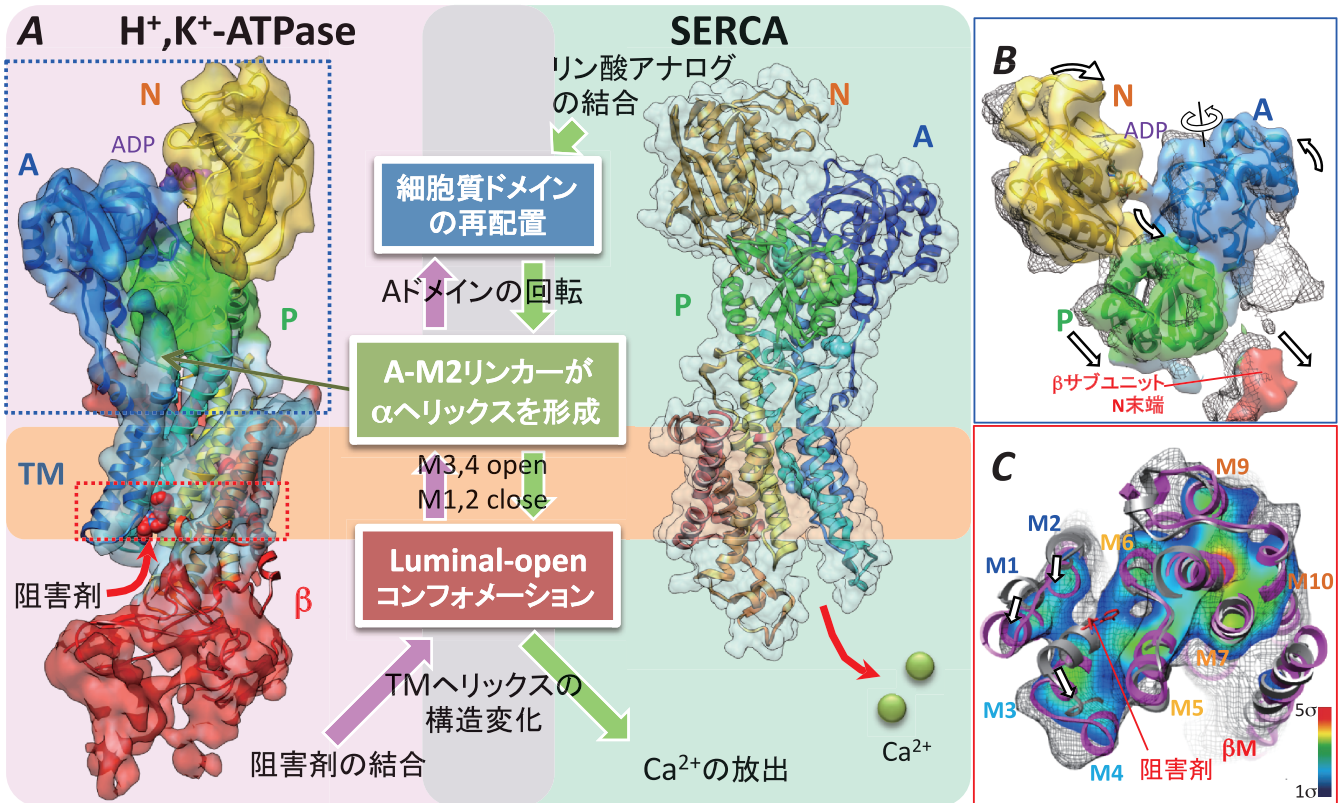


図2

を誘起するという点である⁸⁾。

阻害剤の結合によって、TMヘリックスは胃内腔側が大きく開いた Luminal-open コンフォメーションになる (図 2C)。これは M3, M4 が外側に開いて、M1, M2 が内側へ動くと同時に細胞質側へと上がることで達成される。このような TMヘリックスの再配置は、次に細胞質ドメインへと伝わり、M2 と Aドメインを繋ぐリンカー部分の構造を一続きの α ヘリックスへと変化させる (図 2A, 緑矢印)。この変化は次に Aドメインを回転させ、その動きに沿って他の細胞質ドメインの再配置を促す (図 2B)。このような一連の構造変化の結果、 H^+, K^+ -ATPase の分子全体のコンフォメーションは SERCA における E2P ground state のそれと酷似したものとなる (図 2A 右)。SERCA の場合、リン酸アナログが Pドメインに結合することで、細胞質ドメインの相対位置が変化する。これによって Aドメインが回転し、M2 へと繋がるリンカーの構造が α ヘリックスになる。この構造変化が M1, M2 を細胞質側に引き上げ、連動して M3, M4 が外側に開き、 Ca^{2+} を小胞体内部にリリースする為の Luminal-open コンフォメーションとなる⁹⁾。

以上のように構造変化を誘起する原因は両者で異なるものの、同じような Luminal-open コンフォメーションを形成する為に必要な要素が驚くほど保存されていることが判明した。また、 H^+, K^+ -ATPase で観察された構造変化は、 Na^+, K^+ -ATPase においても予測されており¹⁰⁾、また低分解能ながら実証されている⁷⁾。強調されるべきは、過去の生化学的実験や SERCA の様々な状態での構造解析から明らかになってきたように^{3,9)}、50Å以上も離れたイオン結合部位と ATP加水分解部位が高度に共役していることを改めて示す結果であるということである。このような構造変化としての類似性は、恐らく他のサブタイプにおいても保存されており、P型 ATPase の基本的な作動原理を保証するものであると考えられる。

5. 他の P 型 ATPase に見られるユニークな制御機構

構造の類似性と、ユニークな制御機構という観点から見ると、他のイオンポンプにも興味深い性質が報告されている。

H^+ -ATPase は P3-type に分類される植物のプロトンポンプである。この分子は C 末端に自己阻害領域を持つ。電子線結晶学による構造では、この C 末端部分が Nドメインに結合していて、このドメインの動きを制限しているように見られた。C 末端部分の合成ペプチドの添加によって

活性が上昇することから、この部位が活性調節に重要であることが示唆されている¹¹⁾。

構造解析の進んでいる SERCA (1a) と近縁の SERCA2b は C 末端にもう一つ TMヘリックス TM11 を持つ。この部分の変異体解析等により、TM11 が Ca^{2+} の親和性を調節することが報告されている¹²⁾。興味深いことに、TM11 は TM7 と TM10 の外側に位置し、また C 末端が M7-8 ループと相互作用することが示唆されており、これは Na^+, K^+ -ATPase の β サブユニットの結合様式と非常によく一致する⁴⁾。

P4-type は、イオンポンプとしてではなく lipid flippase として機能することからして既にユニークであると言えるが、これら P4-type に分類されるグループは触媒サブユニット以外に、Cdc50 ファミリータンパク質と複合体を形成することがわかってきた。この Cdc50 ファミリーは二回膜貫通型の膜タンパク質であり、そのトポロジーや触媒サブユニットとの相互作用解析から、 Na^+, K^+ -ATPase の β サブユニットと γ サブユニットを繋いだような構造になっているのではないかと推測されている¹³⁾。さらに興味深いことに CDC50A (ヒトのホモログ) の N 末端領域が P4-ATPase の E2P 状態を安定化することが示唆されており¹⁴⁾、これは前述した H^+, K^+ -ATPase における β サブユニット N 末端の役割を連想させる。

6. おわりに

Na^+, K^+ -ATPase は起電的な Na^+/K^+ の対向輸送によって様々な二次輸送体へ駆動力を提供し、また神経活動の源となる膜電位を形成する。SERCA は細胞内の Ca^{2+} 濃度を低く保つことによって筋肉の収縮弛緩を制御し、また Ca^{2+} シグナルが適切に細胞活動を調節する環境を与える。 H^+, K^+ -ATPase は胃内部に強酸性環境を作り出すことで消化を促し、また外部からのバクテリアやウイルス等の侵入を防ぐ。このようにそれぞれのイオンポンプが生体内で果たすべき役割はユニークであり、それ故個々の分子はイオンポンプとしての基本的な仕組みを保存したまま、輸送される基質に対する特異性に加えて、それぞれの活性を適切に調節するユニークな仕組みを備えているということが明らかになりつつある。

謝辞

本稿に記した H^+, K^+ -ATPase に関する研究は、京都大学において行った研究に基づいています。特に藤吉好則、谷一寿、西澤知宏 各博士のご尽力により研究の展開が可能

になりましたことを記して感謝致します。また北海道大学の谷口和弥博士には、本研究発足時から通じて数多くの有用な助言を頂きましたことに感謝致します。

- 1) Axelsen, K.B. & Palmgren, M.G. (1998) *J. Mol. Evol.*, **46**, 84-101.
- 2) Skou, J.C. (1957) *Biochim. Biophys. Acta*, **1000**, 439-446.
- 3) Toyoshima, C., Nakasako, M., Nomura, H., & Ogawa, H. (2000) *Nature*, **405**, 647-655.
- 4) Morth, J.P., Pedersen, B.P., Toustrup-Jensen, M.S., Sørensen, T.L.-M., Petersen, J., Andersen, J.P., Vilsen, B., & Nissen, P. (2007) *Nature*, **450**, 1043-1049.
- 5) Abe, K., Tani, K., Nishizawa, T., & Fujiyoshi, Y. (2009) *EMBO J.*, **28**, 1637-1643.
- 6) Dürr, K., Abe, K., Tavraz, N.N., & Friedrich, T. (2009) *J. Biol. Chem.*, **284**, 20147-20154.
- 7) Yatime, L., Laursen, M., Morth, J.P., Esmann, M., Nissen, P., & Fedosova, N.U. (2011) *J. Struct. Biol.*, **174**, 296-306.
- 8) Abe, K., Tani, K., & Fujiyoshi, Y. (2011) *Nat. Commun.*, **2**, 155.
- 9) Toyoshima, C., Norimatsu, Y., Iwasawa, S., Tsuda, T., & Ogawa, H. (2007) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **104**, 19831-19836.
- 10) Ogawa, H., Shinoda, T., Cornelius, F., & Toyoshima, C. (2009) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **106**, 13742-13747.
- 11) Kühlbrant, W., Zeelen, J., & Dietrich, J. (2002) *Science*, **297**, 1692-1696.
- 12) Vandecaetsbeek, I., Trekels, M., De Maeyer, M., Ceulemans, H., Lescrinier, E., Raeymaekers, L., Wuytack, F., & Vangheluwe, P. (2009) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **106**, 18533-18538.
- 13) Puts, C.F. & Holthuis, J.C.M. (2009) *Biochim. Biophys. Acta*, **1791**, 603-611.
- 14) Coleman, J.A. & Molday, R.S. (2011) *J. Biol. Chem.*, **286**, 17205-17216.

阿部 一啓

(京都大学大学院理学研究科生物物理学教室)

Unique properties of gastric H^+ , K^+ -ATPase and conserved conformational changes among P-type ATPases
Kazuhiro Abe (Department of Biophysics, Faculty of Science, Kyoto University, Japan, Oiwake, Kitashirakawa, Sakyo-ku, Kyoto 606-0852, Japan)

中心小体複製の分子機構

はじめに

中心体研究の歴史は古く、中心体の存在は細胞分裂期の

紡錘体形成中心として一世紀以上前に Theodor Boveri により発見されている。中心体は間期において微小管形成中心として機能し、分裂期においては複製されて二つになった中心体が二極化した紡錘体を形成する。よって、一細胞周期における中心体複製回数の制御は娘細胞への均等な染色体分配に重要である。実際、中心体の過剰複製が誘発する染色体不安定化の細胞がん化への関与が指摘されている¹⁾。中心体の詳細な内部構造に関してはしばらく不明であったが、電子顕微鏡の発達に伴い、約半世紀前には中心体内部にシリンダー型の微小な構造体である中心小体が存在していることが明らかになった。二つ一組の中心小体がお互いに垂直な位置でL字型に結合し、その周囲にPCM (pericentriolar material) を集積させることで中心体を形成している。また、中心小体は精子鞭毛や繊毛の形成を調節しており中心小体が正常に機能しないと鞭毛や繊毛が形成されず、様々な疾病が起きることが報告されている (ciliopathy, 男性不妊症など)¹⁾。中心小体は9回対称性を有した円筒状の特徴的な構造体で、細胞周期ごとに一度だけ複製するよう厳密に制御されている²⁾。染色体複製と異なり、この複雑な構造体がどのように巧妙に自己複製するのかという問いは長い間多くの研究者達を魅了し続けてきた。

中心小体は幾つかの段階を経て構築される (図 1A)。初期過程においては中心小体の基底部分であり、その9回対称性を規定するカートホイール構造が形成され (図 1B)、その後伸長及び成熟過程を経てその構築が完了する²⁾。各過程は細胞周期に同調して進行するが、どのような分子間相互作用を介して中心小体が段階的に構築されていくかは不明な点が多い。

近年、線虫初期胚、シヨウジョウバエ培養細胞などをモデルとし、RNAi を利用したゲノムワイドスクリーニングにより中心小体複製に必須の因子群の同定が行われた。特に先駆的な仕事として挙げられるのが RNAi 黎明期に行われた線虫初期胚をモデルとしたスクリーニングである^{3,4)}。Open Reading Frame と推定された遺伝子を RNAi 法により網羅的に発現抑制し、中心小体複製の異常から細胞分裂に支障をきたす表現系に注目し、その原因遺伝子の機能解析が行われた。これらの中で、中心体に局在するタンパク質に特徴的なモチーフであるコイルドコイルドメインを有するものが Spindle ASsembly abnormal protein family (SAS family) と命名された。この因子群は進化上良く保存されており、他のモデル生物を用いた同様のスクリーニングにおいても、これらの相同体が中心小体複製に必須であるこ