

学 位 論 文 題 名

Tetraprotomeric Assembly of Gastric Proton Pump

～ Single-molecule observation and reaction mechanism of

pig gastric H/K-ATPase ～

（胃プロトンポンプの四量体構造

～ブタ胃 H/K-ATPase の一分子観察とその反応機構～）

学位論文内容の要旨

胃壁細胞に特異的に発現する H/K-ATPase は、プロトンポンプとも呼ばれ、胃酸分泌の直接の担い手となる膜タンパク質である。この酵素は、ATP 末端リン酸の加水分解によって得られる化学エネルギーを駆動力として H^+ と K^+ を細胞膜を隔てて対向輸送する。このポンプの駆動によって作り出される細胞内外での H^+ の濃度勾配は 100 万倍以上になり、食物消化時の胃腔内をタンパク質分解酵素 pepsin に至適な pH 1 付近にする。H/K-ATPase は触媒機能を持つ 10 回膜貫通の α サブユニット（1034 アミノ酸）と、酵素の細胞膜への配向や安定性に寄与する β サブユニット（290 アミノ酸）が 1 : 1 で結合した $\alpha\beta$ -protomer を基本的な構成単位とする。本酵素の ATP の加水分解反応は、活性中心のアスパラギン酸残基が自己リン酸化された中間体・EP を介して行われる。この特徴的な ATP 加水分解機構により、H/K-ATPase は一次配列の相同性が高く機能的にも類似した Na/K-ATPase、Ca-ATPase とともに P-type ATPase ファミリーに属する。

ATP と共役したイオン輸送のメカニズムは、これまで単量体（ $\alpha\beta$ -protomer）を想定した EP を経由して H^+ と K^+ を順に輸送するというモデルによって説明されてきた。しかしながら、様々な生化学的実験事実は酵素の多量体構造を示しており、これらの結果は単量体モデルでは説明出来ない。一方で、多量体を形成する必要性やその構造中における酵素の制御機構については不明な点が多い。このように P-type ATPase は $\alpha\beta$ -protomer 単量体として機能するのか、あるいは多量体を形成しているのかというのは議論の対象であり、未だ解決されていない問題である。申請者は、胃 H/K-ATPase を対象として、この酵素の多量体構造と各サブユニット間での相互作用およびその多量体構造に基づいた反応機構を明らかにすることを目的とした。本論文は、序章、3 章よりなる本章及び新規モデルを提唱する考察より構成される。

第1章では、酵素の反応中間体とリガンドの結合量の化学量論に注目し、多量体を想定した新しい反応機構の提示を目指した。ATP加水分解時に形成される最大EP形成量は、H/K-ATPase 1モルに対して約0.5モルであり (0.5 mol/mol α -subunit)、この量は無機リン酸 (P_i) を基質として形成した最大EP量、1 mol/mol α -subunit の約半分であった。また、高濃度のATP存在下において、H/K-ATPase が0.5モルのEPの他に、0.5モルのATPを結合しているEATP中間体を持つことを見出した。さらにEPとEATP中間体はほぼ同時に加水分解されて、それぞれが P_i を遊離することを明らかにした。これらの結果は、H/K-ATPase が最低でも二量体・ $(\alpha\beta)_2$ -diprotomer として機能し、半分のサブユニットがEPを、もう半分がEATPを形成した中間体 (EP:EATP 中間体) を経由してATPを加水分解することを示唆している。単量体を想定したこれまでの反応機構では、EP:EATP 中間体の存在を説明できないため、新規な反応機構の必要性が示された。

第2章では、全反射蛍光顕微鏡 (TIRFM) を用いた低背景光での蛍光一分子観察の手法を P-type ATPase の分野で初めて導入し、これによって Fluorescein 5'-isothiocyanate (FITC) で部位特異的に化学修飾した H/K-ATPase 分子 (FITC-H/K-ATPase) の多量体会合数の評価を実施した。Ar レーザー励起によって、界面活性剤を用いて可溶化された FITC-H/K-ATPase 標品中に明るさの異なる輝点が観察された。これらの輝点は励起光照射後数秒で段階的な退色を示し、その蛍光強度は酵素の会合数を反映すると考えられる量子的な分布を示した。このため観察された輝点の蛍光強度の分布を用いて、その標品中に存在する各多量体の分布を見積もった。得られた値は、ゲルろ過によって見積もった多量体の存在比とほぼ一致した。また、可溶化 H/K-ATPase 標品中に残存する ATPase 活性との比較を行ったところ、四量体分子 ($(\alpha\beta)_4$ -tetraprotomer) の存在比は残存活性に近い値を示した。このことは、四量体が活性分子種であることを強く示唆した。

第3章では、第2章で確立した一分子観察による多量体の同定法を用いて、基質に依存した四量体間での相互作用の変化を追跡した。様々な条件で可溶化された酵素標品の ATPase 活性に対する各種多量体の存在比は、四量体とのみ強い正の相関を見せた。さらに、可溶化時に共存する K^+ の濃度に依存して、残存する ATPase 活性および四量体の存在比が上昇することを見出した。この結果は、生理的基質である K^+ の結合によって誘起される三次構造の変化が四量体構造の安定性を変化させることを示唆した。

以上より、H/K-ATPase の活性発現には $(\alpha\beta)_4$ -tetraprotomer 四量体構造が必須であることが強く示唆された。H/K-ATPase は、『半分のサブユニットがEPを形成し、もう半分はATPを結合した反応中間体を経由してATPの加水分解反応を行う』という、四量体構造に基づく全く新しいモデルを提唱した。くわえて、生理的基質 K^+ によって、各サブユニット間での相互作用や四量体構造の安定性が増強されることを示唆した。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 坂 口 和 靖
副 査 教 授 矢 澤 道 生
副 査 教 授 菊 地 九 二 三
副 査 助 教 授 嘉 屋 俊 二

学 位 論 文 題 名

Tetraprotomeric Assembly of Gastric Proton Pump

～ Single-molecule observation and reaction mechanism of
pig gastric H/K-ATPase ～

(胃プロトンポンプの四量体構造

～ブタ胃 H/K-ATPase の一分子観察とその反応機構～)

P-型 ATPase ファミリーに分類される H/K-ATPase は、胃壁細胞に特異的に発現しており、胃酸分泌機能を担う膜輸送性 ATPase である。本酵素による ATP の加水分解と共役したイオン輸送のメカニズムは、特徴的な反応中間体の形成と分解に共役したイオン輸送のモデルによって説明されてきた。これまで、本酵素を含む P-型 ATPase の作用機構、特に単量体あるいは多量体のいずれの状態で機能するかどうかは依然として解決されていない問題である。申請者は、P-型 ATPase の作用機構を解明する目的で、ブタ胃 H/K-ATPase を対象として、酵素のサブユニット間での相互作用の解析を反応中間体と特異的なリガンドの結合量の化学量論から検討した。また、酵素分子の集合状態の評価を分子観察という実証的な方法論で検討した。さらに生理的リガンドによって多量体を形成している酵素分子の安定性の評価を検討した。

第一に、酵素の反応中間体とリガンドの結合量の化学量論から機能単位を明らかにした。ATP 加水分解時に形成されるリン酸中間体 (EP) 形成量は、H/K-ATPase 1 モルに対して約 0.5 モルであること、また、高濃度の ATP 存在下、0.5 モルの EP に加えて 0.5 モルの ATP を結合している EATP 中間体が存在することを見出した。また EP と EATP 中間体はほぼ同時に加水分解され、それぞれの中間体が無機リン酸を遊離することを明らかにした。これらの結果から、H/K-ATPase が少なくとも二量体として機能し、サブユニットの半数が EP を形成し、残りの半数は EATP という中間体を經由して ATP を加水分解する新しい反応機構を提示した。

第二に、全反射蛍光顕微鏡 (TIRFM) を用いた低背景光での蛍光一分子観察の手法を用い、多量体会合数の評価と活性分子種の同定を行った。部位特異的に蛍光化学修飾した H/K-ATPase 標品を界面活性剤にて可溶化し、TIRFM にて分子観察した。可溶化標品において観察された輝点の退色過程及び励起光照射直後の蛍光強度の分布、高速液体ゲルクロマトグラフィーによる分離との比較を行い、TIRFM による多量体の会合度を評価する系を確立した。種々の界面活性剤により得られた可溶化標品中の活性と多量体の分布の相関から、四量体分子が活性分子種である

ことを示した。

第三に、一分子観察による多量体の評価方法を用いて、基質に依存した四量体間での相互作用の変化を検討した。様々な条件で酵素標品を可溶化した後 ATPase 活性と多量体の存在比を検討し、ATPase 活性は四量体とのみ強い正の相関を見せること、可溶化時に共存させたりガンドの濃度に依存して ATPase 活性及び四量体の存在比が上昇することを見出した。酵素分子への生理的基質である K^+ の結合によって四量体構造の安定性が変化することを示した。

以上、申請者は H/K-ATPase の多量体構造の存在とその反応機構を明らかにし、本酵素の多量体構造に基づいた新しい反応機構モデルを提案した。これらの結果は、生物化学、特に膜輸送タンパク質の研究領域における、優れた業績として高く評価される。

よって申請者は、北海道大学博士（理学）の学位を授与される十分な資格を有するものと認める。