

ATP 結合蛋白質としての Na⁺/H⁺ 交換輸送体 NHE1：脂質結合ドメインを介する活性制御

若林繁夫 (国立循環器病研究センター)

能動輸送など多くの生体機能は ATP 加水分解のエネルギーを必要としている。しかし最近、ATP が高エネルギー分子としてではなく、活性制御因子として直接膜蛋白質に結合する例が報告されるようになった。確かに細胞内には 1~10 mM という高濃度の ATP が存在し、多くの膜蛋白質を制御する可能性があるにも関わらず、そうした低親和性の ATP 結合部位は、実験の難しさゆえか、ほとんど無視されてきた。細胞内 pH や Na⁺ 濃度の制御を担う形質膜 Na⁺/H⁺ 交換輸送体 NHE1 は二次性能動輸送体ファミリーに属し、その活性には ATP 加水分解のエネルギーを必要としない。しかし奇妙なことに、細胞を代謝阻害剤で処理して ATP を枯渇させると、生理的な中性 pH 付近での活性は完全に消失する。ところが、NHE1 には P-loop モチーフなどの典型的な ATP 結合モチーフは存在せず、NHE1 活性になぜ ATP が必要なのかは未だに解明されていない。そこで、NHE1 が ATP 結合蛋白質であるかどうかを検討した。

NHE1 および細胞内の必須サブユニット CHP1 にそれぞれ Strep および His の精製用タグを付加し、SF9 昆虫細胞から NHE1/CHP1 複合体を精製した。ATP 結合は、光親和性架橋試薬 8-azido-ATP-biotin による光架橋で検出した。この試薬を

使えば、biotin への ExtraAvidin 結合によって架橋された蛋白質を検出できる (図 1A)。紫外線 (UV) 照射により 8-azido-ATP-biotin と NHE1 との光親和性架橋が起こった (図 1B)。この架橋は NHE1 サブユニット CHP1 では起こらないので、ATP は NHE1 に親和性があると考えられる。この光架橋は competitor である種々の非標識ヌクレオチド (10 mM) で抑制された。特に ATP は最も強く光架橋を阻害し (図 1C)、NHE1 は ATP 結合蛋白質であることが強く示唆された [1]。ATP の親和性は約 1-2 mM であり、それは ATP による NHE1 活性化の濃度域に一致した。また、ADP の親和性は低いので (図 1C)、NHE1 に結合した ATP は代謝阻害剤によって細胞内の ATP プールのほとんどすべてが ADP へ変換するのに伴って NHE1 から解離すると考えられる。

ATP は NHE1 制御にとって最重要ドメインである脂質結合ドメイン (LID) に結合する。LID には典型的な ATP 結合モチーフはないが、ATP 結合蛋白質で頻繁に見られる (R/K) (X₂₃) (R/K) という配列が存在する。このドメインには PIP₂ などの酸性リン脂質が結合することが知られている。私たちは以前に、リセプター刺激で遊離するジアシルグリセロール (DAG) が LID に結合し、このドメインの形質膜への親和性を増加させ、何らかの構造変化を伴って NHE1 を活性させるという説を発表した [2]。また LID には ATP との競合で蛋白質リン酸化酵素を阻害することが知られ

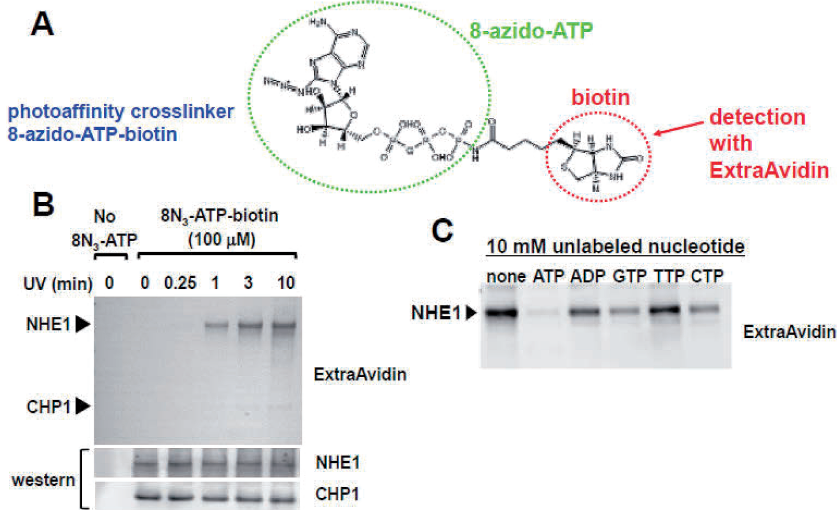


図 1. (A) 光親和性架橋試薬の構造. (B) 精製した NHE1/CHP1 複合体の UV 照射による光親和性架橋. CHP1 ではなく、NHE1 がラベルされる. (C) 架橋に対する各種非標識ヌクレオチドの阻害効果.

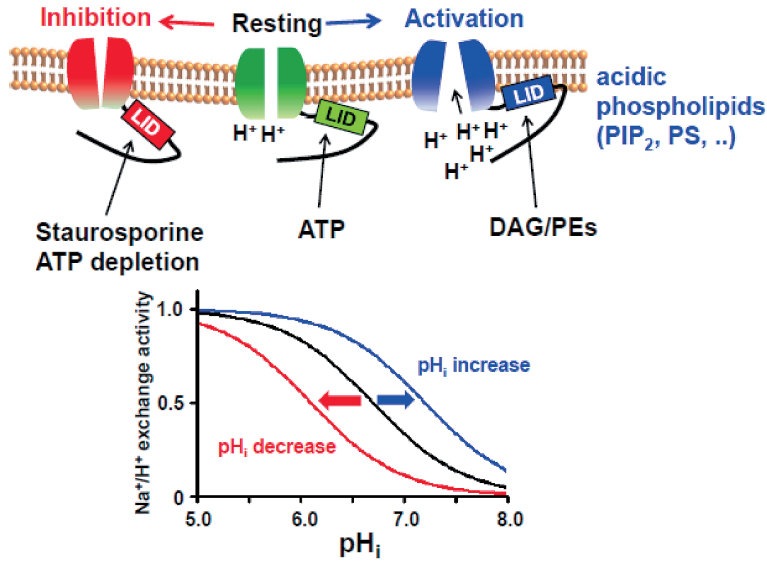


図2. NHE1 制御メカニズムの仮説.

る staurosporine が結合し、NHE1 活性を阻害することもわかった [3].

これらすべての情報に基づいて、現時点での NHE1 活性制御のメカニズムを次のように考えることができる (図2). 刺激がないとき、ATP は定常的に LID に結合し、比較的高い NHE1 活性を保持する. リセプター刺激によって遊離する DAG (あるいはその強力なアナログであるホルボールエステル, PEs) が LID に結合すると構造変化を起こし、LID と形質膜内層の PS などの酸性リン脂質との親和性が増加し、細胞内 H⁺ 親和性を増加させるような NHE1 の構造変化を起こすと考えられる. この際、ATP から酸性リン脂質へのスイッチが起これらと思われる. 逆に代謝阻害剤で ATP が解離するか、ATP の競合阻害剤である staurosporine の結合によって、LID は形質膜との親和性を失い、NHE1 活性は強く阻害される. 構造的な裏付けはまだないが、変異導入や阻害剤の効果などの結果はこの仮説を強く示唆している. 本シンポジウムでは、ATP 加水分解のエネルギーを必要とせず、典型的な ATP 結合モチーフも持たない、意外な ATP 結合蛋白質の例として NHE1 について発表させて頂きました.

本研究に関して利益相反はありません.

1. Shimada-Shimizu N et al: FEBS J **280**: 1430-1442, 2013
2. Wakabayashi S et al: J Biol Chem **285**: 26652-26661, 2010

3. Shimada-Shimizu N et al: Mol Pharmacol **85**: 18-28, 2014

K_{ATP} チャネル変異と高インスリン血症

下村健寿 (自治医科大学生理学講座統合生理部門)

K_{ATP} チャネルの生理的役割

K_{ATP} チャネルの生理的機能として最も知られているのは膵β細胞におけるインスリン分泌調節である. 食事に伴う血糖値の上昇は随伴する細胞内での解糖系の亢進による ATP の増加を促す. この ATP の増加は結果的にβ細胞膜に存在する K_{ATP} チャネルの閉鎖を引き起こす. K_{ATP} チャネルの閉鎖は細胞膜の脱分極, 電位依存性カルシウムチャネルの開口, 細胞内カルシウムの上昇さらにはインスリン分泌を惹起する.

膵β細胞 K_{ATP} チャネルはチャネルポアである4つの Kir6.2 サブユニットと調節サブユニットである4つの SUR1 サブユニットからなるヘテロ8量体で構成されている. さきに K_{ATP} チャネルは ATP によってその開閉が制御されていると記したが, 正確には ATP は Kir6.2 に対してチャネルを閉鎖する方向に働き, MgATP・MgADP は SUR1 に作用した場合にはチャネルを開口する方向で作用する.

E1506K 変異について

今回, 糖代謝異常を呈する SUR1 サブユニットの E1506K 変異の解析を行った. E1506K 変異を

有する患者は誕生後、比較的軽微な低血糖を発症する。この場合、低血糖は K_{ATP} チャネル開口剤であるジアゾキサイドによって治療が可能である。この低血糖症状は成長とともに消失する場合が多い。しかし患者は成人以降に糖尿病発症のリスクが高まることが知られている。生誕直後には低血糖でありながら成長とともに正反対の症状である高血糖傾向を呈する背景に潜む病態を今回、トランスジェニックマウスを用いて細胞レベルから生体レベルにいたるまで解析した。トランスジェニックマウス (E1506KTg マウス) の解析

まず膵臓の組織学的検討では E1506K 変異はランゲルハンス氏島の数や β 細胞の増殖能に有意な影響は与えていなかった。しかしランゲルハンス氏島から単離した β 細胞においてはまず K_{ATP} チャネルの MgATP に対する感受性が高まっているのが確認された。さらに細かい解析を行うと E1506K 変異を有する K_{ATP} チャネルは MgADP によるチャネル活性化作用が欠如している。

さらに生誕直後には低血糖を呈するが、成人後に高血糖を発症するメカニズムを検討すべく若年マウス (8 週) と老齢マウス (24 週) で検討を行った。

まず経口グルコース負荷試験 (OGTT) を行ったところコントロールに比べ E1506KTg マウスはホモ、ヘテロともに血糖値の変化に有意な差は認められなかった。しかし、生後 24 週の老齢マウスにおいてはホモ E1506KTg マウスにおいて有意な血糖の上昇が認められた。この原因についてコントロールマウス、ヘテロ、ホモのトランスジェニックマウスから単離したランゲルハンス氏島を用いてインスリン分泌能の検討を行った。その結果、8 週齢のマウスではコントロールマウスとくらべてトランスジェニックマウスのランゲルハンス氏島からのグルコース応答性インスリン分泌 (GSIS) の増加が認められた。しかし、24 週齢のマウスから単離されたランゲルハンス氏島からの GSIS はホモ E1506K マウスでは有意に低下していることが確認された。この原因を探るためにそれぞれのマウスのランゲルハンス氏島のインスリン含量を測定した結果、24 週齢のホモ E1506K マウスから単離したランゲルハンス氏島のインスリン含量が残りの 2 種類のマウスに比べて有意に低下していることがわかった。つまり、インスリン含量の低下が 24 週齢ホモ E1506K マウスにおける GSIS の低下さらには血糖値の上昇の病態機序として考えられることが明らかとなった。

これらのマウスを使った検討結果は実際の

E1506K 変異を有する患者の症状と一致しており、今後の治療において重要な情報であると考えられる。

24 週齢のホモ E1506K トランスジェニックマウスにおいてインスリン含量が低下していた背景には K_{ATP} チャネルの継続的な閉鎖に基づく 2 次的な作用なのか、それとも E1506K 変異そのものが影響しているのか、明確な回答はない。今後の研究課題としていきたい。

本研究に関して利益相反はありません。

L 型 Cav1.2 Ca^{2+} チャネルの ATP による調節

亀山正樹¹, 封 瑞^{1,2}, 劉 書源^{1,2}, 襄部悦子¹, 徐 建軍¹, 亀山亜砂子, 郝 麗英² (鹿兒島大院・医歯総研・神経筋生理,²中国医科大・薬学院・薬理毒理)

電位依存性 Ca^{2+} チャネルは、主サブユニットの $\alpha 1$ サブユニット (10 種類) と補助サブユニットの β , $\alpha 2/\delta$, γ (それぞれ複数の遺伝子がある) の組合せから成るファミリーを形成しているが、電気生理学的性質から低閾値型 (T 型) と高閾値型に別れ、後者は更に L 型と non-L 型 (N 型, P/Q 型, R 型) に細分化される。この中で L 型 Cav1.2 Ca^{2+} チャネルは、神経系や心筋、平滑筋、分泌細胞などに広く分布し、心筋や平滑筋においては興奮収縮連関や遺伝子発現調節などの細胞内 Ca^{2+} シグナリングに深く関与している。Cav1.2 Ca^{2+} チャネルの活性 (脱分極時の開口確率) は、蛋白質酸化、 Ca^{2+} /カルモジュリン (CaM) の結合、チャネル蛋白の酸化・還元状態など細胞内の様々な修飾因子により調節を受けることが知られている。同チャネルの活性は、細胞内 ATP の濃度によっても影響を受けることが、1980 年代より知られていたが (EC_{50} は 0.3~1 mM), その機序の詳細は不明であった [1]。今回、我々は ATP が Cav1.2 Ca^{2+} チャネルの活性を修飾する機序を調べた [2]。

実験は、モルモット心室筋由来の単離心筋細胞を用いたパッチクランプと、同組織由来 Cav1.2 Ca^{2+} チャネル蛋白およびリコンビナントの同チャネル $\alpha 1$ サブユニット断片ペプチドを用いた ATP の光親和性ラベルから成っていた。

ATP を光親和性ラベルしたタンパクを検出する方法として、ビオチンを結合させた ATP で蛋白をラベルし、それをタグとした HRP ラベルしたストレプトアビジンによる enhanced chemiluminescence (ECL) 法を用いることとし、ATP のどの部位にビオチンを結合させると対チャネル作用が保たれるか調べた。ビオチンを ATP の

ボースに結合させた 2'/3'-O-(2-aminoethyl-carbamoyl)-ATP-biotin ([EDA-ATP]-biotin) と γ リン酸に結合させた γ -(6-aminoethyl)-ATP-biotin ([6AH-ATP]-biotin) の両者の内、前者のみが ATP の対チャンネル作用を保持していた。この結果は、ATP のリン酸基が対チャンネル作用の発現に重要であることを示唆している。この結果を受けて、[EDA-ATP]-biotin のアデニン塩基部分にアジド基を付加した 8-azido-[EDA-ATP]-biotin による Cav1.2 Ca^{2+} チャンネルの光親和性ラベルを行ったところ、チャンネル $\alpha 1$ サブユニットの N 末端側と C 末端側の細胞内部分が濃度依存的にラベルされることが判明した。さらに、この ATP ラベリングは、細胞内 Ca^{2+} 濃度とカルモジュリン濃度に影響を受けることから、 Ca^{2+} やカルモジュリンのチャンネル結合によって起こるチャンネルの立体構造変化に依存することが示唆された。これらの結果は、細胞内 ATP が Ca^{2+} チャンネルの $\alpha 1$ サブユニットに直接結合してチャンネル活性を調節するという仮説を支持している。しかし、 $\alpha 1$ サブユニットのアミノ酸配列には既知の ATP 結合コンセンサス配列は存在せず、結合部位については更なる検証が必要である。

本研究に関して申告すべき COI はない。

1. Irisawa H et al: Modulation by intracellular ATP and cyclic AMP of the slow inward current in isolated single ventricular cells of the guinea-pig. *J Physiol (Lond)* **338**: 321-337, 1983
2. Feng R et al: Adenosine triphosphate regulates the activity of guinea pig Cav1.2 channel by direct binding to the channel in a dose-dependent manner. *Am J Physiol Cell Physiol* **306**: C856-C863, 2014

イオンチャンネル型細胞外 ATP 受容体のリガンド認識機構および活性化機構

服部素之^{1,2} (1東京大学大学院理学系研究科生物化学専攻, 2科学技術振興機構さきがけ) 序文

ATP (アデノシン三リン酸) は、細胞内のエネルギー通貨として、生合成系、能動輸送、代謝系をはじめとする様々な生理現象において重要な役割を担っている。それに対し、約 20 年前のイオンチャンネル型の P2X [1] および G タンパク質共役型の P2Y [2] それぞれの細胞外 ATP 受容体の分子クローニングをきっかけとして、近年、細胞外シグナル分子としての ATP の生理機能に注目が集まっている。

P2X 受容体は、細胞外ドメインへの ATP 結合

により活性化される陽イオンチャンネルであり、ナトリウムイオンやカルシウムイオンなどの陽イオンを非選択的に透過することが知られている [3]。P2X1 から P2X7 までの 7 つのサブタイプから構成され、その生体内における幅広い発現分布に伴って、筋収縮、炎症反応、神経性疼痛、味覚伝達、血栓形成をはじめとして、多様な生命現象と関与することが明らかになってきている [4]。

その一方で、その構造解析の困難さゆえに、その詳細な立体構造情報としては、最近まで、ゼブラフィッシュ由来の P2X4 受容体のアポ型閉状態の X 線結晶構造のみが明らかとなっていた [5]。よって、P2X 受容体の ATP 結合メカニズムやそのチャンネル活性メカニズムの詳細な解明に必須といえる、ATP 結合型 P2X 受容体の高分解能構造は未知であった。

ATP 結合型開状態における P2X 受容体の立体構造

ATP 結合型 P2X 受容体の立体構造を解明すべく、筆者らのグループは、ゼブラフィッシュ由来 P2X4 受容体に対して、生化学的および電気生理学的解析を用い、発現系の改良および ATP 下における結晶化を進め、最終的に、2.8Å 分解能での X 線結晶構造解析を行った [6]。

P2X 受容体は、250 残基程度の細胞外ドメインと 2 回の膜貫通ドメインからなり、ホモ三量体形成により機能的なチャンネルを形作っている (図 1a)。三量体形成における単一サブユニットは、イルカのような形状をしており (図 2a)、立体構造の解説、特に活性化メカニズムの説明にはこのイルカモデルを用いて説明する。

P2X 受容体の構造中では、各サブユニットのインターフェイスにおいて ATP が一分子ずつ、合計三個分子の ATP 結合がみられ、この ATP 結合部位を構成する残基は、以前の変異体解析の結果ともよく一致していた [7]。この ATP 結合部位における際立った特徴として、 β リン酸と γ リン酸がそれぞれアデニン環に向かうことで、ATP は U 字状の構造を形成していた (図 1b)。他の ATP 結合タンパク質の立体構造において、ATP のリン酸基が直鎖上に伸びた構造を形成していることを考慮すると、きわめて特徴的な形状であるといえる。

また、アポ型閉状態の P2X 受容体の結晶構造中では、イオン透過孔が狭く閉じていたのに対し、ATP 結合型の P2X 受容体の構造中では、部分的に水和したイオン透過が可能に大きさに開いた形状となっていた (図 1c)。さらに、イオン透過に関わる残基についても、以前の変異体解析の結果とも非常に一致しており [8]、今回の ATP 結合型

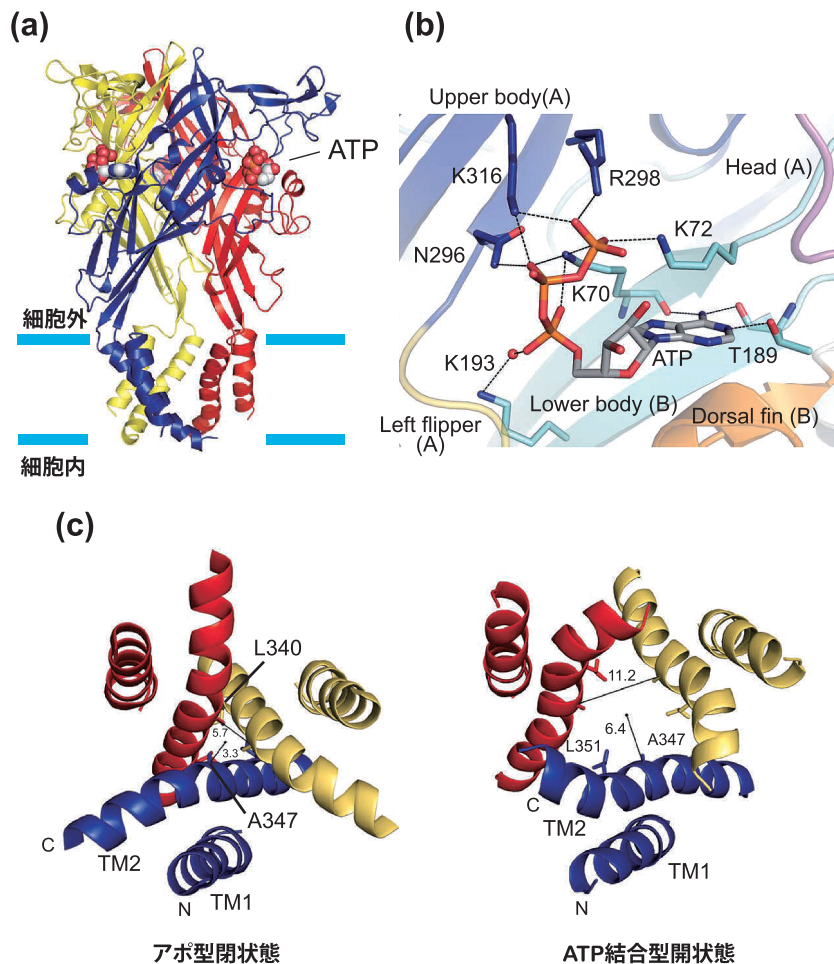


図1. ATP 結合型開状態の P2X 受容体の X 線結晶構造

a, 脂質二重膜と平行な向きから見た際の P2X 受容体構造. 各サブユニットは異なる色で示されており, ATP についてはボール表示となっている. b, ATP 結合部位近傍の拡大図. 各アミノ酸算基をスティック表示しており, 各アミノ残基と ATP 間の水素結合を点線で示した. c, 細胞内側からみた膜貫通ドメインの X 線結晶構造. 各数字は, Ala347 間もしくは Ala347 とイオン透過孔の中心からの距離 (Å) を示している.

P2X 受容体の結晶構造は, いわゆる「開状態」を反映したものであると考えられる.

チャネル活性化メカニズム

アポ型閉状態および ATP 結合型開状態の構造の比較に基づき, P2X 受容体における ATP 依存的なチャネル活性化メカニズムを提唱する (図 2b).

まず, ATP 結合に伴い, 隣りあうサブユニット (A, B) において, ATP 結合部位を囲む「Head」

ドメイン (A) および「Dorsal Fin」(B) がお互いに近寄るような構造変化を示す (図 2b). それとは反対に, 同じく ATP 結合部位における「Left Flipper」は, ATP 結合部位から遠ざかるような構造変化を示す. これらの「Dorsal Fin」および「Left Flipper」といったドメインの構造変化により, これらのドメインと直接的につながっている β シートからなる「Body」ドメインは外側に拡大するような構造変化を示す (図 2b).

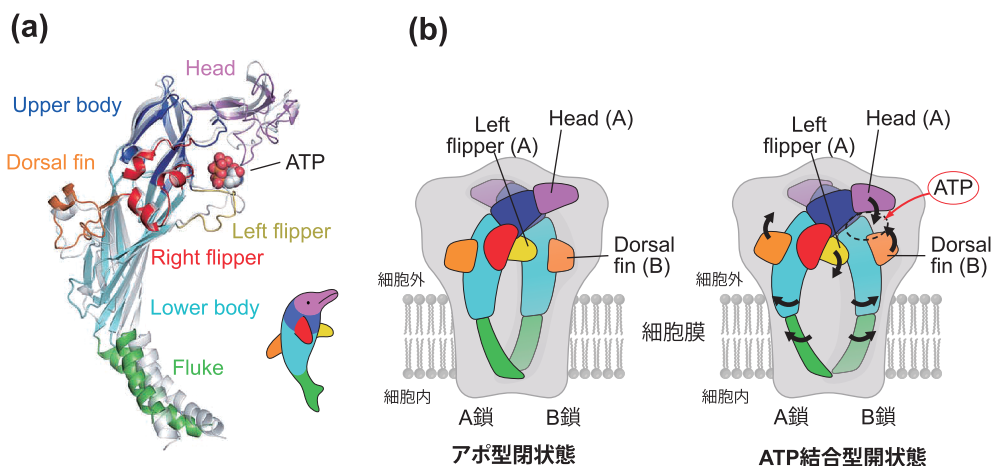


図2. チャネル活性化メカニズム

a. ATP 結合型開状態の P2X 受容体構造の単一サブユニットを「イルカ」モデルに基づき着色している。また、開状態および閉状態の各三量体構造の重ねあわせをした際のアポ型閉状態の構造の単一サブユニットを灰色で示している。b. チャネル活性化メカニズムの模式図。ATP 結合に伴う閉状態から開状態への構造変化を矢印で示している。

さらに、この「Body」ドメインの構造変化は、「Body」と膜貫通ドメインとの構造的共役に基づき、イオン透過孔の拡大、つまりチャネルの閉状態から開状態への構造変化を引き起こす(図1c)。ATP 結合に伴うこれら一連の構造変化については、筆者らのグループの発表後、複数のグループからこれらの構造変化を支持する報告がなされている [9, 10]。

以上、筆者らのグループの構造に基づく、P2X 受容体の ATP 認識メカニズム、チャネル活性化メカニズムをはじめとする様々な知見は、P2X 受容体の分子機構の詳細に関する理解を大きく進展させるものであり、今後さらなる P2X 受容体の立体構造解析が待ち望まれる。

「利益相反 なし (あるいは、申告済み)」

1. Valera S et al: Nature **371**: 516-519, 1994

2. Webb TE et al: FEBS Lett **324**: 219-225, 1993
3. Jarvis MF et al: Neuropharmacology **56**: 208-215, 2009
4. Surprenant A et al: Annu Rev Physiol **71**: 333-359, 2009
5. Kawate T et al: Nature **460**: 592-598, 2009
6. Hattori M et al: Nature **485**: 207-212, 2012
7. Jiang LH et al: J Biol Chem **275**: 34190-34196, 2000
8. Li M et al: Nat Neurosci **11**: 883-887, 2008
9. Lorinczi E et al: Proc Natl Acad Sci U S A **109**: 11396-11401, 2012
10. Stelmashenko O et al: J Biol Chem **289**: 9909-9917, 2014