

胃プロトンポンプの生化学と電子線結晶構造解析

阿部 一啓^{1,2}

胃プロトンポンプとして知られる H^+, K^+ -ATPase は、ATP の加水分解と共役した H^+/K^+ の起電性を伴わない対向輸送を触媒する。このイオンポンプの駆動によって、食物消化時の胃内部は pH 1 という強い酸性環境にさらされる。このとき形成される細胞膜を隔てた H^+ 濃度勾配は、pH 差にして 6 ユニット、すなわち 100 万倍にも達する。なぜ H^+, K^+ -ATPase は、限られた ATP 加水分解エネルギーを使って、このような急峻な H^+ 濃度勾配を作り出し、また維持することができるのか？ 本稿では、電子線結晶学による構造解析と、生化学的機能解析の結果から、現在までに理解できた H^+, K^+ -ATPase の作動機構について紹介する。

1. はじめに

不快な胃痛や胸焼けに悩まされて初めて気がつくのが、我々の胃が強い酸性環境にさらされているという事実である。重篤な場合には、胃潰瘍や逆流性食道炎と診断され、これらは直ちに生命を脅かすものではないが、患者の健康を著しく害する大変不快な症状を伴う。このような症状は、食物消化時における我々の胃が、pH 1 という非常に酸性度の高い環境にさらされているために、胃酸と胃粘膜分泌のバランスが崩れることで、胃酸が自身を傷つけてしまうことに起因する。したがって、これらの疾患は胃酸分泌そのものを抑制することによって効率的に治療することができる¹⁾。一方でこの強酸性環境は、胃が担う食物（タンパク質）の消化という生理現象に本質的に重要である。胃酸は消化酵素ペプシンに至適環境を提供し、同時に食物中のタンパク質を変性させ切断を容易にする。また強酸性ゆえに細菌の繁殖を抑え、咀嚼された富栄養物を約 37°C の体温下で胃内部にとどまる 2~3 時間の間に腐敗させないことにも寄与している。これは、胃潰瘍発症の主要原因とされているピロリ菌²⁾（自身でウレアーゼによってアンモニアを産生し周囲の強酸性環境を中和することができる）を例外として、病原体が体内に侵入するのを防ぐ最初のバリアとしても機能する。

このような胃酸分泌の「酸」すなわち「 H^+ 」の輸送を担うのが、胃酸抑制剤の標的分子、胃プロトンポンプとして知られる膜タンパク質 H^+, K^+ -ATPase^{3,4)} である（図 1）。 H^+, K^+ -ATPase は P 型 ATPase ファミリーに分類される膜タンパク質であり、輸送活性を担う α サブユニットと補助的な β サブユニットが 1:1 で会合したヘテロ二量体を基本的な構成単位とする（図 1B）。触媒する反応はアデノシン 5'-三リン酸（adenosine 5'-triphosphate: ATP）の加水分解と共役した起電性を伴わない H^+ と K^+ の対向輸送である。 H^+, K^+ -ATPase は胃壁細胞（parietal cell）の分泌細管（secretory canaliculus）に特異的かつ大量に発現している。胃酸分泌休止時には管腔内は細胞外液から隔離されているが、細胞外からのヒスタミンによる刺激が H_2 受容体を介して壁細胞内でのシグナルカスケードを誘起することで、分泌細管が細胞膜と融合し、胃酸分泌すなわち H^+ の輸送が開始される（図 1A）。細胞内から胃内腔へ排出される大量の H^+ は、静脈血由来の二酸化炭素からカルボニックアンヒドラーゼによって供給される。細胞内へと過剰に流入した K^+ は、壁細胞に特異的かつ高い発現が認められる K^+ チャネル（KCNQ1-KCNE2）を介して排出される。同時に Cl^- が Clc6 をはじめとする Cl^- チャネルによって排出されることで、胃内部が 160 mM HCl（pH 0.8）にも相当する高濃度の塩酸で満たされた状態になる⁵⁾。この状況は、細胞内の pH がほぼ中性であることを考えると、細胞膜を隔てて pH 差にして 6 ユニット、つまり 100 万倍の H^+ 濃度勾配が形成されている計算になる。これほど急峻なイオン濃度勾配は、数ある能動輸送体を作り出す濃度勾配の中でも最大級といえる。このことは H^+, K^+ -ATPase が何らかの特殊なメカニズムを用いていることを想像させるが、それがどのようなものかは長い間明らかにされていない。本稿では、 H^+, K^+ -ATPase の電子線結晶学による構造解析と、生化学的、酵素化学的手法を用いた機能解析によって、こ

名古屋大学 ¹細胞生理学研究センター、²大学院創薬科学研究科（〒464-8601 愛知県名古屋市千種区不老町）

Biochemical and electron crystallographic studies of gastric proton pump

Kazuhiro Abe (¹Cellular and Structural Physiology Institute (CeSPI), ²Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Nagoya University, Furo-cho, Chikusa-ku, Nagoya, Aichi 464-8601, Japan)

本総説は 2013 年度奨励賞を受賞した。

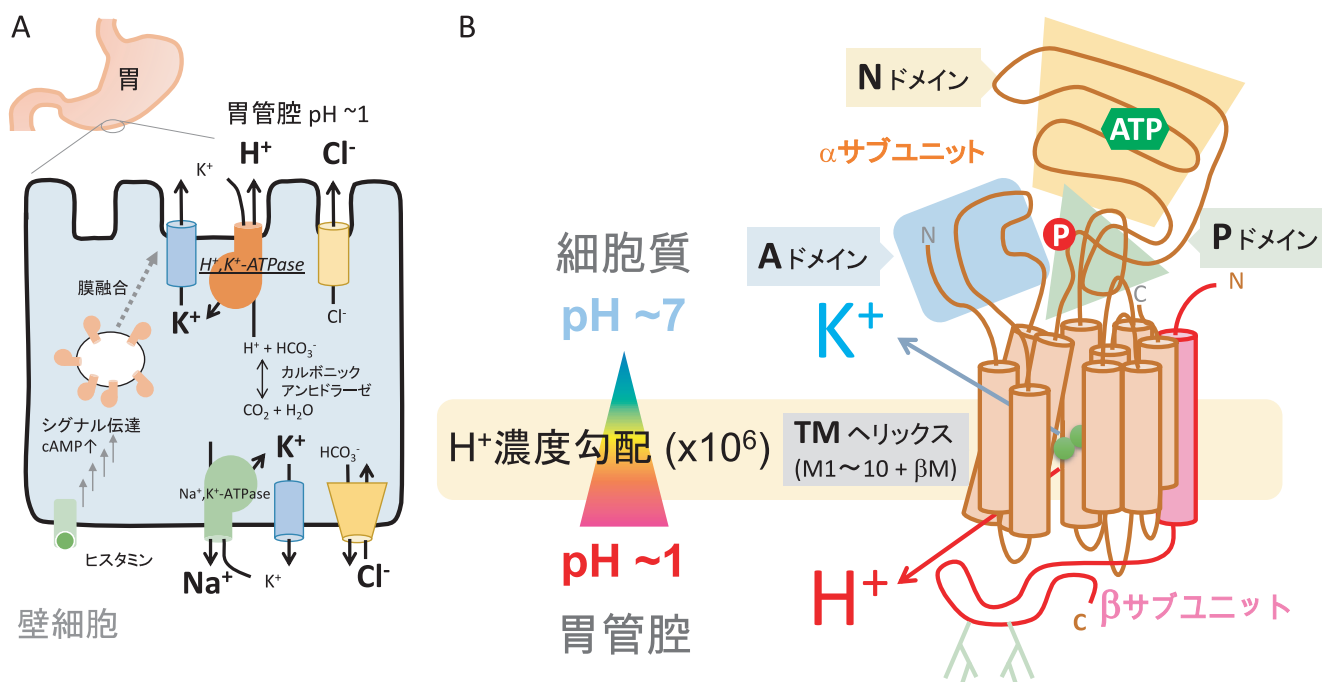


図1 壁細胞による胃酸分泌と H^+,K^+ -ATPase

(A) 胃基底膜に存在する壁細胞の模式図。酸分泌休止時には小胞内部にとどまっている H^+,K^+ -ATPase は、小胞膜の K^+ 透過性が低いために休止状態にある。細胞外からのヒスタミン刺激によって小胞膜が壁細胞頂端膜に融合し、胃酸分泌が開始される。頂端膜においては K^+ チャネルや Cl^- チャネルが発現しており、 H^+,K^+ -ATPase の駆動によって収支として HCl (塩酸) が胃内腔に分泌されることになる。(B) H^+,K^+ -ATPase のトポロジー。 H^+,K^+ -ATPase は 10 回膜貫通型で細胞内に三つのドメイン (A, P, N ドメイン) を持った α サブユニットと、1 回膜貫通型の β サブユニットが 1:1 で会合したヘテロ二量体を基本的な構成単位とする。イオン結合部位は膜貫通 (TM) 領域に存在し、等量の H^+ と K^+ が対向輸送されるために、起電性はない。詳しくは本文を参照されたい。

れまでに理解できたことを紹介する。

2. 二次元結晶の電子線結晶学による構造解析

本稿で紹介する立体構造は、電子線結晶学⁶⁾と呼ばれる手法によって求められた。電子顕微鏡による膜タンパク質の構造解析、すなわち電子線結晶学は、X 線結晶構造解析に必要とされる三次元結晶ではなく、結晶格子が文字どおり二次元平面上に配列した二次元結晶を用いる。方法論の詳しい解説は参考文献^{7,8)}に譲るが、良質な結晶があれば、液体ヘリウムによって試料を 4K にまで冷却することで電子線照射によるダメージを抑え⁹⁾、システムとしては十分に原子分解能を達成できる。また、 H^+,K^+ -ATPase の例のように比較的分解能の低い結晶であっても、電子顕微鏡像から構造因子を直接抽出することで分解能に応じた構造を得ることができる。二次元結晶は一般に、透析による界面活性剤の除去を結晶化の駆動力として、可溶化した膜タンパク質が脂質二分子膜に再構成されることで得られる。したがって、界面活性剤に対し比較的安定な分子でも結晶形成が可能であり、何よりも膜タンパク質が本来あるべき脂質中での構造解析を行うことができるのが特徴といえる。

ブタの胃より精製した H^+,K^+ -ATPase 標品をさまざまな溶液条件下で透析することで、いくつかの特徴的な形態を

持った二次元結晶が得られる (図 2A~C)。酢酸ウランによる負染色は、その強い固定化力や高いコントラストのために二次元結晶のスクリーニングにとってなくてはならない手法ではあるが、タンパク質を覆った重金属を観察することになるので、インタクトな構造は失われ分解能も 20Å 程度に制限される¹⁰⁾。タンパク質のインタクトな (染色固定しない状態) 構造を電子顕微鏡の高真空中で観察するためには、二次元結晶を十分に薄い水の中に閉じ込める必要がある。通常二次元結晶は、薄いカーボン膜を張ったモリブデン製のグリッド上に包埋剤とともに乗せてから、濾紙によって水溶液を除くことで溶液を薄くし、液体窒素や液体エタンを用いて急速凍結させる。しかしこの氷包埋の過程で結晶が壊れることがしばしば起こる (図 2D, H)。 H^+,K^+ -ATPase は親水性部分が多く、結晶内での分子間の接触は親水性ドメインどうしで形成されていることから、氷を薄くする過程に起こる乾燥や、これに伴う塩濃度の変化によって、結晶が容易に崩壊する。これを防ぐために有効であったのが、トレハロース溶液に包埋することと、薄いカーボン膜でグリッドの両面を覆うこと (カーボンサンドウィッチ法、図 2E) によって急激な乾燥を防ぐことであった¹¹⁾。トレハロースはタンパク質の保湿に優れた糖で、二次元結晶の包埋剤としても実績があるが¹²⁾、この方法では分解能が 10Å 程度に制限されていた (図 2D, F, I)。しかし、後者のカーボンサンドウィッチ法を適応すること

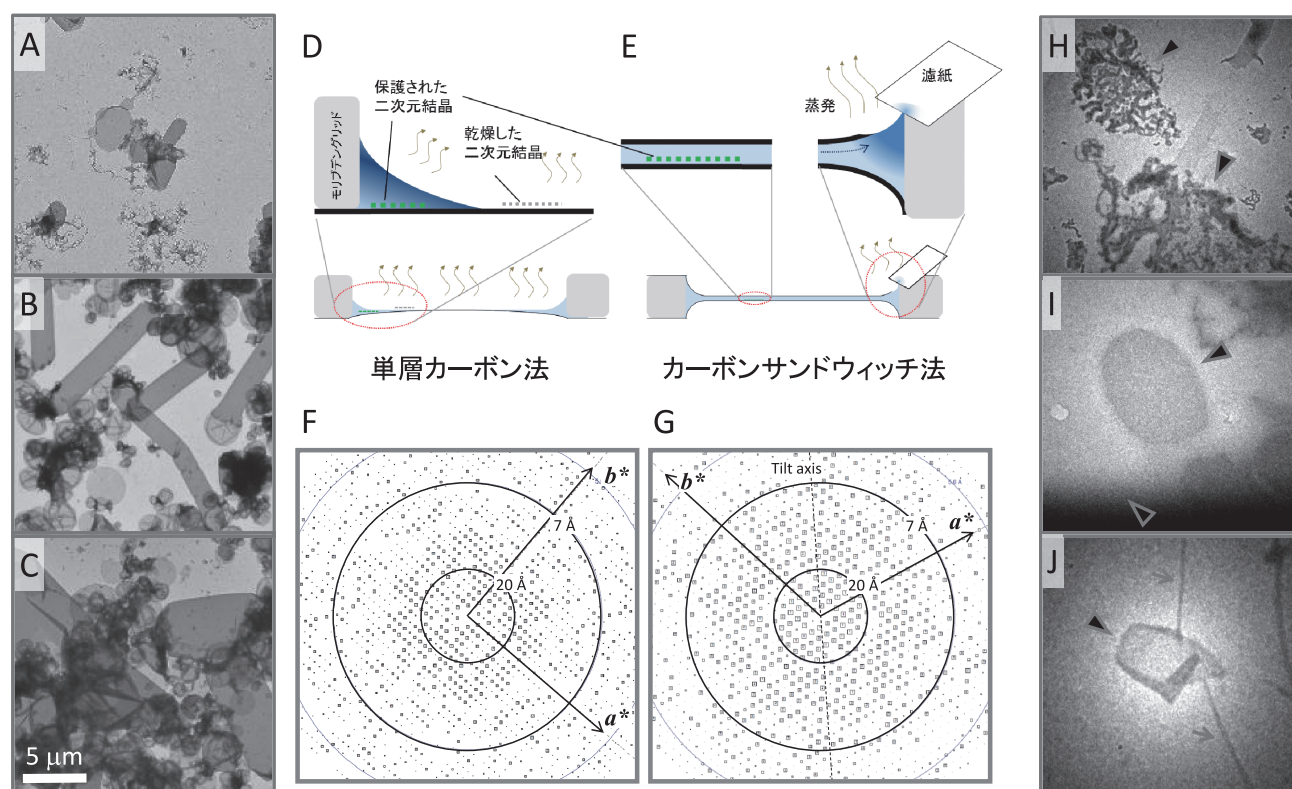


図2 カarbonサンドウィッチ法による二次元結晶の分解能向上

(A~C) H^+,K^+ -ATPase 二次元結晶の負染色像。界面活性剤や基質によって、シート状 (A) チューブ状 (B) ベシクル状 (C) といった特徴的な形態を示す。(D, E) 極低温電子顕微鏡用グリッドの模式図。氷包埋の過程で起こる乾燥や、それに伴う塩濃度の変化によって、単層のカーボン膜を用いた場合 (D)、結晶が崩壊する (H)。比較的厚い氷に覆われた場合であっても (I)、分解能は 10 Å 程度に制限される (F)。カーボンサンドウィッチ法 (E) を適用することで、溶液表面からの乾燥が抑えられ (J)、分解能は 7 Å 程度まで向上する (G)。(F, G) 単層カーボンおよびカーボンサンドウィッチ法によって調製された二次元結晶の画像解析から得られた IQ プロット (F, 非傾斜, G, 45° 傾斜)。(H~J) 低倍率で撮影した氷包埋状態の二次元結晶。矢尻が二次元結晶を示す。カーボンサンドウィッチ法で調製した場合、結晶が包み込まれるためにカーボン膜のシワが寄る (矢印)。

で最高で 6.5 Å までの大幅な分解能の改善がみられ (図2 E, F, J), H^+,K^+ -ATPase のように親水性領域を多く含む膜タンパク質の二次元結晶の保護に対しても有効に働くことが示された¹³⁾。また、元来開発の目的であった傾斜像撮影時に起こる charge-induced beam shift という現象を軽減することによって、定法と比較してデータ収集効率が飛躍的に向上した。これらの要因が、以下に紹介する複数のコンホメーションの立体構造解析に必要不可欠であった。

3. P型ATPase ファミリータンパク質

P型ATPase ファミリー¹⁴⁾は、ATPの加水分解と共役した主としてカチオンの能動輸送を仲介する膜タンパク質として、さまざまな生命現象に密接に関わっている。このファミリーに特徴的なのは、ATPの加水分解時に末端のリン酸がタンパク質の活性中心 (アスパラギン酸) に転移した自己リン酸化中間体 (phosphoenzyme intermediate: EP) を介した反応機構であり¹⁵⁾、これが「P」型ATPaseという呼称の由来である。このファミリーは、配列の保存性や輸送基質の特異性等から P1~P5 までのサブファミリーに分類される。最もよく知られているのが P2 タイプで、本稿

で紹介する H^+,K^+ -ATPase のほかにも、細胞内外に Na^+ と K^+ の電気化学ポテンシャルを形成する Na^+,K^+ -ATPase¹⁶⁾ や、筋肉の適切な収縮弛緩に重要な Ca^{2+} の筋小胞体への輸送をつかさどる Ca^{2+} -ATPase¹⁷⁾ [sarco (endo) plasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase 1a: SERCA] 等があげられる。これらのほかにも、重金属を輸送するもの (P1 タイプ) や、植物の H^+ 濃度勾配を作り出すもの (P3 タイプ)、イオンではなくリン脂質を基質としたフリッパーゼ活性を有するもの (P4 タイプ) や輸送基質が判明していないもの (P5 タイプ) まで、非常に多様なメンバーがすべての生物界において広く分布している。中でも P2 タイプに属するイオンポンプの研究は古く、1957 年の Na^+,K^+ -ATPase の発見¹⁸⁾ 以来、詳細な生化学的研究がなされ、その反応機構は生化学的によく理解されている。2000 年には P 型 ATPase として初めて SERCA の X 線結晶構造¹⁹⁾ が、2007 年には Na^+,K^+ -ATPase の構造²⁰⁾ が報告された。現在 SERCA のさまざまな反応中間体の構造も含めて 50 以上の立体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^{21, 22)}。

P 型 ATPase が行うイオン輸送反応は、 Na^+,K^+ -ATPase に対する Post-Albers 機構^{23, 24)} に代表されるモデルによって酵素化学的に説明される。ATP の加水分解と共役した、異

なる2種類のイオンの能動輸送は、酵素〔E〕と省略される)がE1, E2という2種類の輸送イオンに対して異なる親和性を示すコンホメーションと、これらがそれぞれ自己リン酸化されたE1P, E2Pという、主に四状態をサイクルすることで達成される。本稿で紹介するH⁺,K⁺-ATPaseを例として説明すると(図3), H⁺に対して高い親和性を示すE1が細胞内側からH⁺を結合し, ATPを加水分解することでその末端のリン酸が活性中心に転移した自己リン酸化中間体E1Pを形成する。これがE2Pへと遷移する過程でイオン結合部位が細胞外(胃内腔側)に向けられ, H⁺が細胞外へと排出される。続いてK⁺に高い親和性を示すE2Pがこれを結合することで脱リン酸化され, K⁺を閉塞した(K⁺)E2中間体を形成する。閉塞されたK⁺は, 高濃度のATP存在下, 細胞内へ向けて脱閉塞, 遊離する。再び細胞内側からH⁺が結合することによってE1中間体が形成される…という具合に, 反応スキーム時計回りの方向で能動輸送サイクルが進行する⁴⁾。H⁺,K⁺-ATPaseの場合, ATP1分子の加水分解と共役して, 二つのH⁺と二つのK⁺が対向輸送されるとされている^{25, 26)}, これは胃内部が酸性化するに伴って変化するという仮説が提唱されている(後述)。

4. 逆反応防止機構(ラチェットモデル)

先に述べたとおり, H⁺,K⁺-ATPaseの駆動によって100万倍のH⁺濃度勾配が形成される。輸送機構によれば(図3), H⁺はE1PからE2Pへの変換の過程で胃内腔に放出される。輸送機構における各部分反応は可逆的な化学平衡であるから, 細胞外における高濃度のH⁺は反応を逆向きに進行させる強い圧力となってE1P-E2Pの平衡をE1P側に大きく傾けるはずである。しかしH⁺,K⁺-ATPaseの場合, 逆反応によるE1P形成が比較的容易に起こるほかの

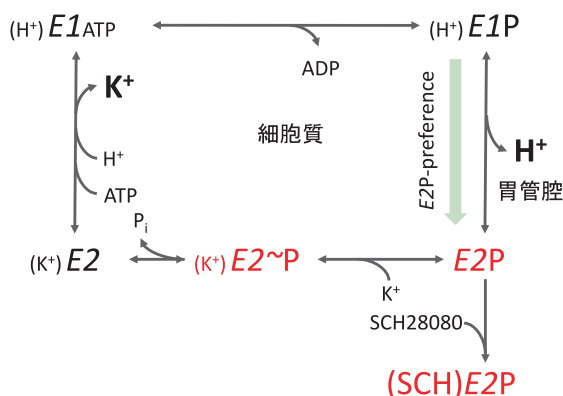


図3 H⁺,K⁺-ATPaseのイオン輸送機構

ATP加水分解と共役したイオンの能動対向輸送機構を示す。反応が時計回りに進行することで能動輸送反応が達成される。各部分反応は基本的に可逆的であるが, H⁺,K⁺-ATPaseはE1P-E2P遷移平衡がE2P側へ大きく偏っており, E1P形成がほとんど起こらないことが知られている(E2P-preference)。本稿で紹介する中間体を赤字で示す。サイクルの内側が細胞内, 外側が胃内腔を表す。詳しくは本文を参照。

P2タイプのATPaseと比較して, E1P-E2Pの平衡が大きくE2P側に偏っていて, 逆反応によるE1P形成がほとんど起こらないことが知られていた^{27, 28)}。このE2Pを好む性質(図3, E2P-preference)は, したがって, 胃内腔側からのH⁺の逆流を防ぐことで, その濃度勾配を維持するための性質であることが考えられる。では, 一体何が, ほかのP2タイプにはみられない性質を生み出しているのだろうか? 我々はH⁺,K⁺-ATPaseの構造解析によって, このE2P-preferenceを説明しうる興味深い構造的特徴を見いだした。

極低温電子顕微鏡を用いた電子線結晶学によって, H⁺,K⁺-ATPaseの立体構造を6.5Å分解能で決定した²⁹⁾(図4)。得られたH⁺,K⁺-ATPaseの立体構造は, 触媒サブユニットの相同性がそれぞれ約30%, 60%であるSERCA(触媒サブユニットのみ)やNa⁺,K⁺-ATPase(αβγ複合体)と非常によく似たものであった^{19, 20)}(図4A)。αサブユニットの細胞質側には, ATPを結合するN(nucleotide-binding)ドメイン, 自己リン酸化の起こるP(phosphorylation)ドメイン, ATPの加水分解とイオンのゲーティングの共役をつかさどるA(actuator)ドメインが十分に解像してみえている。膜貫通(trans-membrane: TM)領域は, αサブユニットの10本のTMヘリックス(M1~M10)と, 1回膜貫通型であるβサブユニット³⁰⁾のTMヘリックス(βM)によって構成されていることがわかる(図4A, 図1B参照)。細胞外領域には, 七つの糖鎖付加部位と三つの分子内ジスルフィド結合を含むβサブユニットのC末端ドメインがNa⁺,K⁺-ATPaseと同様に, 細胞外側へのイオン輸送ゲートに覆いかぶさるように存在していた。Na⁺,K⁺-ATPaseの原子モデル²⁰⁾を鋳型として作成したホモロジーモデルと比較することで, 6.5Åの電子線結晶学によって求めた密度図が, αヘリックスやβシートといった二次構造やNドメインに結合したADPを解像していることがわかる(図4B)。

結晶化はリン酸アナログ³¹⁾として結合することでATPase活性を阻害するフッ化アルミニウム(AIF)とADPの共存下で行われた。したがってPドメインに普遍的に保存された自己リン酸化部位(Asp386)に観察される強い密度は, 結合したAIFによるものと考えられる(図4B)。このリン酸化部位は, Aドメインの外縁に位置する保存されたTGE-loopと呼ばれる構造によって保護されており, Nドメインに結合したADPがアクセスできない配置になっている。このような細胞質ドメインの位置関係は, H⁺,K⁺-ATPaseがADP感受性を示すE1PではなくE2Pを模倣した状態(E2AIF)にあることを示している(図4B)。結晶化条件と同様の溶液条件における分子のコンホメーションをトリプシン限定分解によって検討したところ³²⁾, E2AIFはMgATP存在下形成されるE2P状態と同様の分解パターンを与え, E1およびE1P-ADP状態とは明確に区別できることがわかり, 結晶中においてもE2P状態に近いコンホメーションであることが示唆された²⁹⁾。

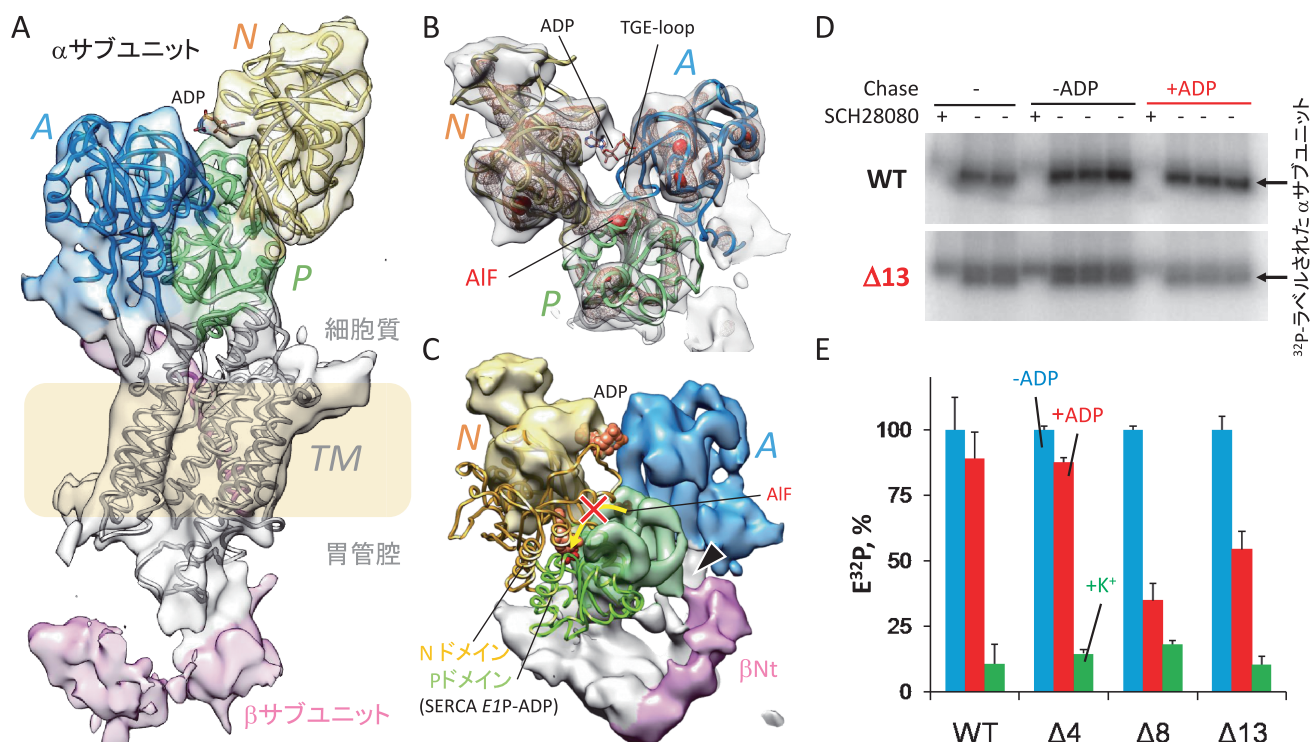


図4 $E2AIF$ 状態の立体構造と「ラチェット」モデル

(A) $H^+K^+-ATPase$ $E2AIF$ 状態の立体構造 (6.5 Å分解能)。サーフェスが電子線結晶学によって求めた構造 (1 σ contour level), リボンはホモロジーモデルを表す。 α サブユニットの細胞質ドメイン, 膜貫通領域 (TM) および β サブユニットを図中に示したとおり色分けして表示する。(B) 細胞質領域の拡大図, contour level (構造中における密度の等高面) が 1 σ , 3 σ および 5 σ のマップを, それぞれグレーサーフェス, 赤メッシュおよびサーフェスで示す。結合した ADP, AIF および TGE-loop の位置を図中に示す。(C) ラチェットモデル。 $H^+K^+-ATPase$ $E2P$ 状態 (サーフェス) において, β サブユニットの N 末端 (β Nt, ピンク) が P ドメイン (緑) と結合することで (矢尻) $E2P$ 状態を安定化し, 逆反応によって $E1P$ 状態 [リボンモデル, SERCA $E1P$ -ADP 状態の P (緑) N (黄色) ドメインのみを示す] が形成されるのを防いでいる (黄色矢印)。(D, E) $E^{32}P$ のパルスチェイス実験 (本文参照)。 $E1P$ は ADP に対して感受性があるため, この添加によって脱リン酸化される。図は野生型および N 末端 13 残基欠損変異体を用いたオートラジオグラフ (D) と, その他の変異体の結果を併せてノーマライズしたグラフ (E)。

最も注目すべき構造的特徴は, 約 30 アミノ酸からなる β サブユニットの N 末端細胞質領域 (β Nt) に見いだされた (図 4C)。この部分は, $Na^+K^+-ATPase$ $E2P$ 状態の結晶構造中ではディスオーダーしており, ほかのどの部分とも相互作用していない²⁰⁾。これとは対照的に $H^+K^+-ATPase$ の構造では, ATP 加水分解反応において非常に重要な役割を果たす P ドメインと β Nt が直接結合していた (図 4C, 矢尻)。SERCA の $E1P$, $E2P$ 状態の構造を比較すると, P ドメインを含む細胞内ドメインの相対的な配置が, それぞれの中間体の性質を決定する要因であることがわかる。 $E1P$ -ADP 状態において³³⁾, SERCA の P ドメインは N ドメインに結合した ADP と相互作用している (図 4C, リボンモデル)。これが $E2P$ 状態に移行すると, A ドメインの TGE-loop がリン酸化部位に配位するために, N ドメインと P ドメインは解離し, $H^+K^+-ATPase$ の構造とよく似たコンホメーションになる (図 4C, サーフェイス)。P ドメインはイオン結合部位の一部を形成する M4, M5 ヘリックスとつながっているため, この動きはすなわち輸送イオンに対する親和性 ($E1/E2$) と連動している³⁴⁾。 $H^+K^+-ATPase$ $E2P$ 状態の構造をみると, β Nt が P ドメインを $E2P$ 形成に有利な位置につなぎ止めることで, 逆反応による

$E1P$ 形成に伴う P ドメインの動きを抑制しているように見受けられた (図 4C, 矢尻)。もしそうであれば, β Nt の構造が失われた場合, P ドメインが自由に動けるようになり, 結果として逆反応による $E1P$ が形成できるようになるはずである。

上述の仮説を検証するために, いくつかの β Nt 欠損変異体を α サブユニットと共発現させ, $[\gamma\text{-}^{32}P]\text{ATP}$ による EP 形成のパルスチェイス実験を行った。 $E1P$, $E2P$ は, それぞれ基質に対する感受性が大きく異なる。 $E1P$ は ADP 感受性, つまり ADP の添加によって脱リン酸化され ATP を合成できる, いわば高エネルギーの EP である。逆に $E2P$ は ADP に対して感受性を示さず, K^+ の結合によって反応サイクルが正方向に進行し, 脱リン酸化を促進される。したがって, それぞれの変異体における ADP 感受性の EP 量を見積もることで, 系に存在する $E1P/E2P$ の分布を知ることができる。放射性 $[\gamma\text{-}^{32}P]\text{ATP}$ によって $E^{32}P$ を形成後, 過剰量の非放射性 ATP を ADP もしくは K^+ と同時に添加することで, その時点で蓄積している $E1P/E2P$ の量を見積もった (図 4D)。野生型および 4 残基欠損変異体ではほとんど検出されなかった ADP 感受性が, 8 残基以上の欠損変異体において有意に $E^{32}P$ 量の減少

として観測された (図 4E)。これらの実験結果は、 βNt の構造を欠失した $\text{H}^+, \text{K}^+\text{-ATPase}$ は、逆反応により E1P を形成できるようになったことを示しており、上述の仮説を支持する。

これら構造-機能解析の結果は、これまで触媒機構には直接関与せず、補助的なサブユニットと考えられていた β サブユニットが、その N 末端を介して P ドメインを E2P 形成に有利な位置につなぎ止めることで、逆反応である E1P の形成を抑える、あたかも「ラチェット」として機能していることを示唆している (図 4C, 黄色矢印)。欠損変異体では、この「ラチェット」の構造が失われるので、P ドメインが自由に動けるようになり、 E1P の形成が可能になったのではないかと考えられる。胃壁細胞膜を隔てた急峻な H^+ 濃度勾配は、 $\text{H}^+, \text{K}^+\text{-ATPase}$ の行う輸送反応を逆回転させる強い圧力になる。逆反応は効率的なイオン輸送の妨げになるだけでなく、 H^+ の細胞内への逆流を伴う。 $\text{H}^+, \text{K}^+\text{-ATPase}$ はラチェットを備えることで逆反応を防止し、100 万倍もの H^+ 濃度勾配にあってこれに抗うことができると考えられる²⁹⁾。

同様の βNt 欠損変異体は、アフリカツメガエル卵母細胞発現系による voltage-clamp fluorometry によっても検証された³⁵⁾。この報告では $\text{H}^+, \text{K}^+\text{-ATPase}$ βNt 欠損変異体において E1P-E2P の平衡が E1P 側にシフトすることが示され、*in vivo* においても同様の機構が働いていることが示された。興味深いことに、同様の βNt 欠損変異は、 $\text{Na}^+, \text{K}^+\text{-ATPase}$ の E1P-E2P 平衡状態および活性にはまったく影響を及ぼさなかった。このことから、 βNt の「ラチェット」としての機能は $\text{H}^+, \text{K}^+\text{-ATPase}$ に特徴的であるといえる。

5. 輸送化学量論

上述のラチェット機構は、100 万倍の濃度勾配に「抗う」ためのメカニズムである。しかしそもそも、 $\text{H}^+, \text{K}^+\text{-ATPase}$ はなぜ 100 万倍もの濃度勾配を「形成」できるのであろうか。これにはエネルギーの問題が関係してくる。1982 年に E. Rabon らは、 $\text{H}^+, \text{K}^+\text{-ATPase}$ 膜小胞を用いて、このイオンポンプの輸送化学量論を決定した²⁶⁾。この中性条件 (pH 6.1) における *in vitro* の実験によって、 $\text{H}^+, \text{K}^+\text{-ATPase}$

は 1 分子の ATP 加水分解あたり二つの H^+ を輸送することが示された。 $\text{H}^+, \text{K}^+\text{-ATPase}$ の輸送反応に起電性はないので、同時に等量の K^+ が対向輸送されていることになる ($\text{ATP} : \text{H}^+ : \text{K}^+ = 1 : 2 : 2$)。この注意深い生化学実験の結果は、P 型 ATPase の分野において広く受け入れられ、また近年報告された $\text{Na}^+, \text{K}^+\text{-ATPase}$ のイオン結合部位に二つの K^+ イオンが結合していた結果とも符合する。しかしながら、生理的条件下、つまり胃内部が pH 1 の状況では、以下の理由からこの輸送化学量論は成立しえない²⁵⁾。

今、胃壁細胞における ATP 加水分解によって得られる自由エネルギー (ΔG_{ATP}) を文献値³⁶⁻³⁸⁾ によって約 13 kcal/mol とする。 $\text{H}^+, \text{K}^+\text{-ATPase}$ の起電性のない輸送は膜電位に寄与しないので、単純化して自由エネルギーがすべて H^+ 濃度勾配 (ΔpH) に変換されると仮定すると、次式が成り立つ²⁶⁾。

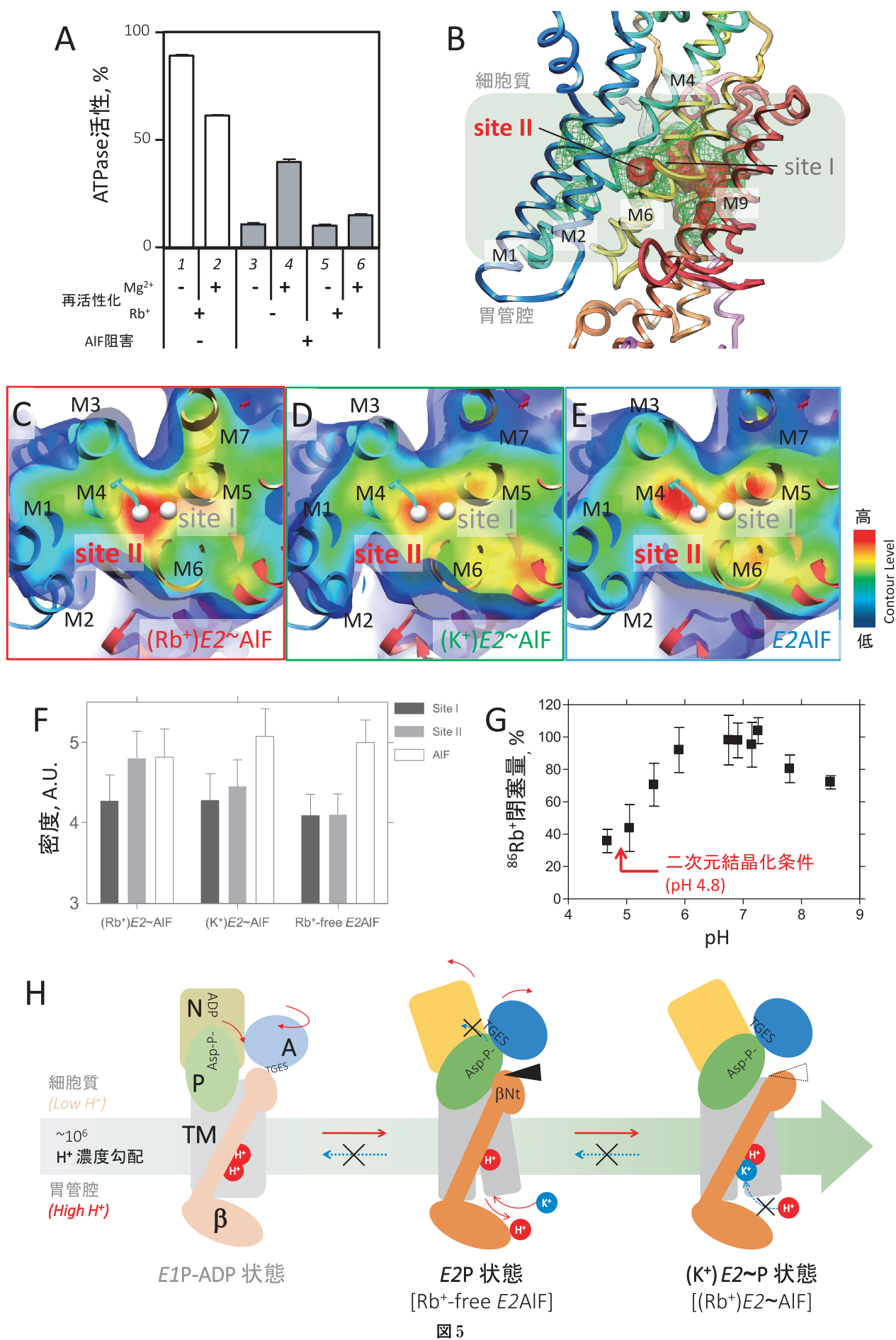
$$\Delta G_{\text{ATP}} = \frac{2 \cdot 3nRT}{F} \Delta\text{pH}$$

Rabon らの測定結果に基づき、二つの H^+ が同時に輸送される場合 ($n=2$) を想定すると、作り出される ΔpH は多く見積もっても 4.7 ユニットであり、胃壁細胞における ΔpH 6 に及ばない。つまり胃の内部に pH 1 という環境を作り出すことは、熱力学的に不可能な反応であるということになる。仮に一つの H^+ が輸送される ($n=1$) と仮定した場合、 ΔpH 9.6 となり、十分に ΔpH 6 を達成できる計算になる。したがって、酸性条件下において、イオン輸送化学量論は $\text{ATP} : \text{H}^+ : \text{K}^+ = 1 : 2 : 2$ から $1 : 1 : 1$ へと変化するのではないかと考えられてきたが^{25, 26)}、実験上の制約から 30 年以上経った現在でも検証されていない。この問題に対して、我々は輸送イオンである K^+ と、その同族体である Rb^+ を用いて、構造解析によるアプローチを行った (図 5)。

P 型 ATPase の構造解析において、基質やそのアナログは、活性阻害効果によるタンパク質の構造安定化とともに、その立体構造の反応中間体を規定する上でも重要である³¹⁾。そのような観点から、リン酸アナログ AIF の阻害様式は非常に興味深いものであった (図 5A)。AIF を単独で作用させた場合、 $\text{H}^+, \text{K}^+\text{-ATPase}$ は前述の構造解析が示すとおり E2AIF (E2P 状態のアナログ) 状態に安定化され、酵素活性は直ちに阻害される。しかしながらこの活性阻害

図 5 (Rb⁺) $\text{E2} \sim \text{AIF}$ 状態の立体構造と輸送化学量論の変化

(A) AIF による $\text{H}^+, \text{K}^+\text{-ATPase}$ 活性の阻害と Mg^{2+} および Rb^+ の影響。 $\text{H}^+, \text{K}^+\text{-ATPase}$ 活性は AIF の添加により強く阻害される (3) が、 Mg^{2+} の添加によって回復する (4)。しかしながら AIF と Rb^+ を同時に添加すると (6) Mg^{2+} による活性の回復はみられなくなる。(B) (Rb⁺) $\text{E2} \sim \text{AIF}$ 構造の膜貫通領域拡大図。電子顕微鏡のマップを緑 (4 σ) および赤 (5 σ) で示す。リボンは $\text{Na}^+, \text{K}^+\text{-ATPase}$ の (Rb⁺) E2MgF 状態の構造を元にしたホモロジーモデルを表し、結合していた Rb^+ の位置を二つの球 (site I, site II) によって示す。(C~E) イオン結合部位近傍の $\text{H}^+, \text{K}^+\text{-ATPase}$ 電子顕微鏡マップ。図は Rb^+ 結合状態 (C)、 K^+ 結合状態 (D) および両者の非存在下 (E) における二次元結晶構造の膜部分のスライスを、細胞内側から観察した状態を示す。断面の contour level を図右に示すスペクトルに従って表示した。(F) site I, site II および AIF 結合部位の contour level を数値化しプロットした。(G) 精製膜標品を用いた Rb^+ 閉塞量の pH 依存性。(H) $\text{H}^+, \text{K}^+\text{-ATPase}$ E2P 状態における一方向性のイオン輸送モデル。 H^+ を結合した E1P 状態から E2P 状態に移移することで、一つの H^+ が胃内腔へ放出される。この時点において βNt は P ドメインに結合し (黒矢印) E1P の再形成を阻害する (破線矢印)。次に K^+ が一つだけ結合し、 βNt が P ドメインから解離する (白矢印) が、この時点では K^+ が結合しているので H^+ の再結合が抑えられ、逆反応は抑制されている (破線矢印)。



は、高濃度の Mg^{2+} の添加によって回復する可逆的なものであることがわかった³⁹⁾。これは、おそらく活性中心に結合した AIF が Mg^{2+} に置換されるために起こると考えられる。さらに興味深いのは、AIF を結合した H^+, K^+ -ATPase に Rb^+ (K^+ も同様) を添加すると、 Mg^{2+} による ATPase 活性の回復がみられなくなるということである⁴⁰⁾。このことは、 $E2AIF$ 状態に Rb^+ が結合できることを、そして H^+, K^+ -ATPase が AIF 単独で形成される $E2AIF$ 状態とは酵素化学的に区別できる状態に蓄積していることを示している。 Rb^+ は K^+ と同様に $E2P$ の脱リン酸化を促進し反応を正方向に進める輸送基質として作用するので、これらの結果は H^+, K^+ -ATPase が AIF と Rb^+ 共存下において、 Rb^+ を閉塞した $E2P$ 脱リン酸化の遷移状態、 $(Rb^+)E2 \sim AIF$ 状態に蓄積していることを示唆している。実際に膜結合標品を用いて放射性 $^{86}Rb^+$ の閉塞が計測されることも、この結論を支持する⁴⁰⁾。

そこで AIF, Rb^+ 共存下において二次元結晶を作成し、 $8 \text{ \AA}$ 分解能で構造解析を行った⁴⁰⁾。得られた $(Rb^+)E2 \sim AIF$ 状態の構造は、分子全体のコンホメーションとしては前述の $E2AIF$ ²⁹⁾ とほとんど変化がなかった。しかしながら、 $(Rb^+)E2 \sim AIF$ の膜貫通領域に存在するイオン結合部位には、 $E2AIF$ ではみられない非常に強い密度が存在した (図 5B)。 Rb^+ を二つ結合した Na^+, K^+ -ATPase $(Rb^+)_2E2MgF$ 状態の X 線結晶構造⁴¹⁾ を元にしたホモロジーモデルと比較すると、 H^+, K^+ -ATPase の電子線結晶学によって求めた立体構造における強い密度は、二つ存在するイオン結合部位 (site I, site II) のうちの片方、site II に重心を持った位置に観察され、結合した Rb^+ によるものであると考えられた。この点を検証するために、 Rb^+ の代わりに K^+ を用いて、同様に二次元結晶化および構造解析を行い、 K^+ および Rb^+ 非存在下で結晶化した前述の $E2AIF$ 状態の構造と併せて比較した (図 5C~E)。 $(Rb^+)E2 \sim AIF$ 状態の構造では、非常に強い密度が site II に重心を持って存在するのに対し (図 5C)、 $(K^+)E2 \sim AIF$ 状態の構造では、 $(Rb^+)E2 \sim AIF$ 状態と比較して若干弱くはあるが site II の位置に重心を持った密度が認められた (図 5D)。この強度の違いは K^+ と Rb^+ の原子番号の差に起因するものであろう。 $E2AIF$ 状態では、強い密度は site II 上から外れた、M4 上に存在していた (図 5E)。これら三つの構造での密度をブートストラップという統計処理によって数値化した上で比較すると、site II の値だけが大きく異なり、site I や比較対象のための AIF の密度に大きな差はなかった (図 5F)。したがって、 $(Rb^+)E2 \sim AIF$ 状態では、site II に高い占有率で Rb^+ が結合していることが示唆された。

二次元結晶は弱酸性条件下 (pH 4.8) で形成されるので、このような一つだけ Rb^+ が結合した状態は H^+, K^+ -ATPase が酸性条件下において $ATP : H^+ : K^+ = 1 : 1 : 1$ の輸送を行う状態を捉えていると考えられる。実際に $^{86}Rb^+$ の閉塞量の pH 依存性を測定すると、中性条件下に比べて、二次元結晶化と同様の条件では約半分量の Rb^+ が閉塞されてい

た (図 5G)。ここで前述の輸送化学量論を思い出してほしい。中性条件では $2H^+ / 2Rb^+$ が輸送²⁶⁾ されるので、弱酸性の結晶化条件における約半分の $^{86}Rb^+$ 閉塞量は、 Rb^+ が一つだけ閉塞された状態であることを示唆しており、 $(Rb^+)E2 \sim AIF$ 状態の構造解析の結果を支持する。

以上の構造-機能解析の結果は、酸性条件下において H^+, K^+ -ATPase の輸送化学量論が pH によって変化するという仮説を支持する、初めての実験結果であるといえる。ATP の加水分解エネルギーを効率的に利用するために、 H^+, K^+ -ATPase は胃内腔が酸性化するにつれてその輸送化学量論を $ATP : H^+ : K^+ = 1 : 2 : 2$ から $1 : 1 : 1$ へと変化させることで、100 万倍の濃度勾配を達成できると考えられる⁴⁰⁾。pH の変化と連動した輸送化学量論の調節は Na^+ や Ca^{2+} には適応できないので、このような仕組みは H^+, K^+ -ATPase に特有のものであろう。

では、実際に分子レベルではどのようなことが行われているのであろうか？ アミノ酸の 60% 以上が同一である Na^+, K^+ -ATPase との配列比較によると、イオン結合部位にはいくつかの酸性アミノ酸を含む親水性アミノ酸が保存されている。変異体の解析から、 Na^+, K^+ -ATPase, H^+, K^+ -ATPase とともに、 Na^+ や H^+ の排出には M4, M6 ヘリックスに存在する酸性アミノ酸のカルボキシ基の重要性が指摘されており^{42, 43)}、輸送イオンの結合に関与することが予想されている。したがって、 H^+, K^+ -ATPase が溶液の pH に応じて放出する H^+ の量を変化させるためには、 H^+ が結合すると想定されるカルボキシ基の pK_a が 2 種類存在することが必要となるであろう。溶液中における一般的なカルボキシ基の pK_a が 3~5 付近であることを考えると、pH 1 の溶媒に H^+ を放出することは不可能であるから、少なくとも一つの結合部位の pK_a は 1 付近に調節されている必要がある。この場合 $E2P$ 状態において、 pK_a が低く調節された方の部位が一つだけ H^+ を放出し、空いた部位に一つの Rb^+ が結合できるのであろう。これがおそらく、電子線結晶学によって求められた $(Rb^+)E2 \sim AIF$ 構造⁴⁰⁾ が置かれた状態であると考えられる。したがって結晶化の行われた弱酸性条件下では、 pK_a が高い方の部位からは H^+ を放出できず結合したままになっているために、二つ目の Rb^+ が結合できないと考えられる。

以前から、このようなイオン結合部位の pK_a 調節には、 H^+, K^+ -ATPase のイオン結合部位近傍に唯一存在する塩基性アミノ酸である Lys791 の関与が指摘されている^{44, 45)}。 Na^+, K^+ -ATPase の対応するアミノ酸は Ser であり、これは Na^+ および K^+ の結合に重要な役割を果たす^{41, 46)}。変異体の解析から、Lys 残基を介した静電相互作用が $E2$ 状態の安定化とこれに伴う逆反応の防止に重要であることが示唆されている。また分子動力学によるシミュレーションによって、 $E1P \sim E2P$ 状態遷移の過程で起こる M5, M6 ヘリックスの構造変化に伴って、側鎖の NH_3^+ 基がイオン結合部位に近づくことで、実効的な pK_a を下げ、 H^+ を放出するというモデルが提唱されている⁴⁴⁾。

この Lys 残基に関しての興味深い知見が、カエル non-gastric type の H^+, K^+ -ATPase について報告されている⁴⁷⁾。この non-gastric type は X, K -ATPase と呼ばれ、 H^+ 以外にも Na^+ を輸送する。阻害剤の選択性としても gastric type の特異的阻害剤である SCH28080 に対する親和性が低く、 Na^+, K^+ -ATPase の阻害剤 ouabain に対して高い親和性を示すことから、 Na^+, K^+ -ATPase に近いといえる。しかしながら、 Na^+, K^+ -ATPase が起電性を伴った $3Na^+/2K^+$ の対向輸送を仲介するのに対し、non-gastric H^+, K^+ -ATPase は gastric type 同様イオン輸送に起電性がない。先述の Lys 残基は non-gastric type においても保存されており、これを Ala に変異することでポジティブな膜電流が観測される。逆にカエルの Na^+, K^+ -ATPase において対応する Ser を Arg に置換することでポンプ電流が消失することから、Lys 残基の輸送化学量論に対する関与も指摘されている。

6. $E2P$ 脱リン酸化のステップにおける H^+, K^+ -ATPase の一方向性輸送機構

Rb^+ 結合構造でもう一つ注目に値するのが、前述した βNt と P ドメインとのサブユニット間相互作用である²⁹⁾。 Rb^+ 非存在下において結合していた両者は、 Rb^+ 結合構造において解離していた⁴⁰⁾。 $E2P$ 状態におけるイオン結合部位は H^+ を遊離した状態なので、胃内部の酸性環境から H^+ が再結合することによって、反応が逆向き ($E1P$ 側) に進行してしまう。したがって「ラチェット」は、この状態において P ドメインを $E2P$ 状態に安定化する役割を担う (図 5H)。しかしながら、「ラチェット」が $E2P$ 状態を安定化したままでは、反応サイクルを次の状態に進めることができない自己阻害のような状態に陥ってしまうと考えられるため、 βNt は反応の進行に伴って P ドメインから解離する必要がある。 $E2P$ は次に、反応サイクルを正方向に促進する K^+ (もしくは Rb^+) を結合し脱リン酸化を促進される。この $E2P$ 脱リン酸化の遷移状態 (K^+) $E2 \sim P$ においては、 K^+ がイオン結合部位を占有しているので、 H^+ の再結合に対するリスクは軽減されるであろう (図 5H)。したがって、(Rb^+) $E2 \sim AIF$ 状態で βNt が P ドメインから解離する、すなわち「ラチェット」が外れることは理に適っており、これによって P ドメインが自由になり、引き起こる (K^+) $E2$ 状態や $E1$ 状態への遷移に伴う構造変化がスムーズに行われるようになると考えられる。このように、 H^+, K^+ -ATPase に特有の構造的特徴をタイムリーに制御することが、100 万倍の H^+ 濃度勾配の維持にとって重要であると考えられる。

7. 胃酸抑制剤の結合構造

胃潰瘍や逆流性食道炎といった胃酸に関連する疾患の治療には、胃酸抑制剤が用いられる。1977 年から導入された H_2 受容体拮抗薬⁴⁸⁾ は、ヒスタミン刺激による cAMP を

介した胃壁細胞の形態変化を伴う胃酸分泌をブロックすることで近代の胃潰瘍治療に大きく貢献した。しかしながら、ガストリンやアセチルコリンといった、その他の胃酸分泌シグナル経路を止められないことや、低血圧や頭痛等の副作用を伴う場合がある。その後 1989 年から、オメプラゾールに代表される H^+, K^+ -ATPase の阻害剤、PPI (プロトンポンプインヒビター) と呼ばれるクラスの薬剤が用いられるようになった⁴⁹⁾。これら PPI は、そのままでは阻害効果を示さず、胃酸による酸性環境において分子構造が変化し活性体となることで、 H^+, K^+ -ATPase に保存された、輸送イオンの通り道に存在するシステイン残基とジスルフィド結合を形成することで H^+, K^+ -ATPase 活性を阻害する⁵⁰⁾。薬剤活性化に胃酸を必要とする特徴的な薬理動態が、PPI の副作用の少ない特異的な作用を実現し、非常に効率的な治療を実現する。PPI の世界市場規模は 2011 年において 2 兆円にも達し、人類の健康維持になくはならない薬剤として用いられている。現在ではより迅速で確実な治療を目指して、胃酸による活性化の必要がない、それ自体が直接 H^+, K^+ -ATPase を K^+ 競合的に阻害する新しいクラスの薬剤 (P-CABs: Potassium-competitive acid blockers) が開発中である⁵¹⁾。以前から *in vitro* における H^+, K^+ -ATPase の特異的阻害剤として利用されてきた SCH28080 という化合物⁵²⁾ は、P-CAB の基本骨格を有し、新薬開発のテンプレートを提供してきた。我々は、SCH28080 と H^+, K^+ -ATPase の複合体を構造解析することで、その作用機序が理解できると考えた⁵³⁾。

H^+, K^+ -ATPase をリン酸アナログであるフッ化ベリリウム (BeF) と SCH28080 共存下において透析することで、非常に大きなチューブ状結晶が得られ、構造解析の結果 7 Å 分解能の構造を得た (図 6A)。得られた (SCH) $E2BeF$ 状態の立体構造は、しかしながら、以前報告した $E2BeF$ の構造³⁹⁾ とは大きく異なり、阻害剤の結合が単なる鍵と鍵穴の関係ではなく、阻害剤の結合それ自体が分子全体にわたる構造変化を誘起していることが明らかになった。

阻害剤は胃内腔側へ向けられた輸送イオンのゲート部分に結合していることがわかり、これは過去の変異実験や生化学実験と矛盾しない結果であった (図 6B)。ホモロジーモデルを用いたドッキングシミュレーションによって求めた結合部位も、電子顕微鏡の構造によって同定された位置とよい一致を見せた。この (SCH) $E2BeF$ 状態における薬剤結合部位は、阻害剤非存在下の構造 ($E2BeF$ 状態) において TM ヘリックスによって占有されており、これらの構造比較から、TM ヘリックスが胃管腔側に大きく開いた状態 (luminal-open) に変化することが薬剤の結合部位形成に必要であることがわかった。これは M3, M4 が外側に大きく動き、これと連動して M1, M2 が内側に動くことで達成される (図 6C)。

このような TM ヘリックスの再編成は、次にリンカー部分を通して細胞質ドメインへと伝達していく。これは主に M2 と A ドメインをつなぐ AM2 リンカーを介して行われ

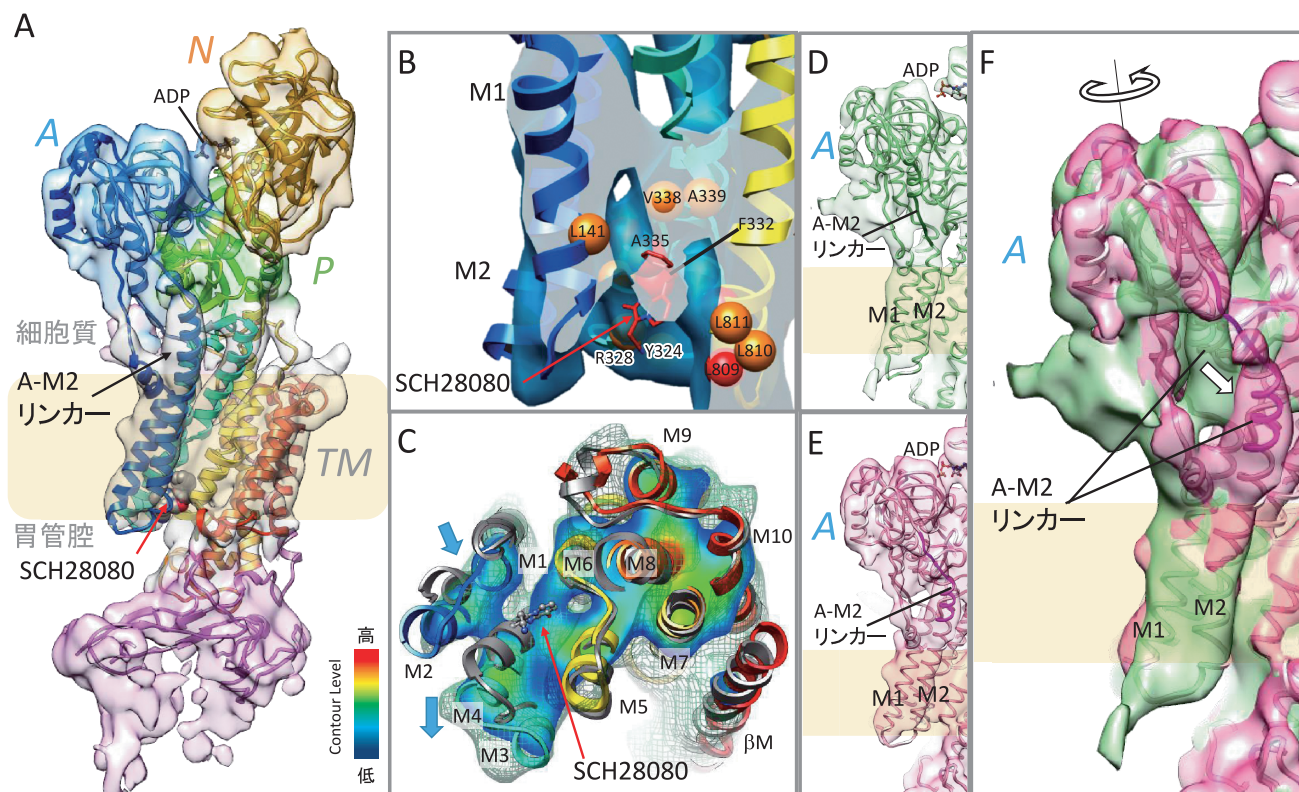


図6 SCH28080 結合構造と引き起こされる構造変化

(A) H⁺,K⁺-ATPase (SCH)E2BeF 状態の立体構造 (サーフェス, 7 Å 分解能). (B) SCH28080 結合部位近傍の断面. 阻害剤 (スティック) の結合親和性に影響するアミノ酸を示した. (C) SCH28080 の結合に伴う TM ヘリックスの構造変化. 阻害剤が結合した構造モデルをカラー, 非結合状態をグレーで示した. 断面の contour level をパネル左に示したスペクトルで表示した. 阻害剤の結合によって誘起された構造変化を矢印で示す. 図は胃内腔側より断面を観察した状態である. (D~F) A-M2 linker の構造変化. 阻害剤非結合 (D, E2BeF), 結合構造 [E, (SCH)E2BeF] およびこれらの比較 (F) を示す. 両者の構造において, 図示した A-M2 linker のコンホメーションが大きく異なり, これと連動して A ドメインが回転しているのがわかる. 矢印は E2BeF から (SCH)E2BeF への構造変化を示す.

る (図 6D~F). 阻害剤非存在下の構造では, AM2 リンカーはループ様構造であるが (図 6D), 阻害剤が結合した構造では M2 を含めて一続きの α ヘリックス構造になっているようすがわかる (図 6E). このヘリックス形成は脂質膜中に存在する M2 と A ドメインの距離を縮めるように働くので, A ドメインが膜方向に引き下げられる結果となる. これが A ドメインを回転させ, 細胞質ドメインの相対位置を変化させる (図 6F).

これら一連の構造変化の結果, 阻害剤が結合した H⁺,K⁺-ATPase の (SCH)E2BeF 状態⁵³⁾は, イオン輸送ゲートが大きく開いた SERCA の E2BeF 状態と非常によく似た luminal-open コンホメーションになっていることがわかった^{54,55)}. 注目すべきは, SERCA の場合においても, イオンゲートの開いた luminal-open (E2BeF) とゲートの閉じた luminal-closed (E2AIF) コンホメーション間の遷移において, 今回 H⁺,K⁺-ATPase において観察されたものと同様の構造変化が起きていることである. SERCA の場合, 結合するリン酸アナログの配位状態の違いによって A ドメインが回転し, これが AM2 リンカーの二次構造を変化させ, M1, M2 および M3, M4 ヘリックスの構造変化を通して, ゲートの開閉を行う^{21,54)}. このように, 構造変化を

誘起する原因は H⁺,K⁺-ATPase と SERCA の両者で異なるものの, 同様のコンホメーションを形成するため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, 今回観察された薬剤の結合に伴って起こる H⁺,K⁺-ATPase の構造変化は, Na⁺,K⁺-ATPase における ouabain の結合に対しても予測されており⁵⁶⁾, MgPi と ouabain が結合した状態の高分解能構造解析によって実証されている⁵⁷⁾. 実際に H⁺,K⁺-ATPase の阻害剤結合部位近傍の 7 残基を Na⁺,K⁺-ATPase のアミノ酸に置換することで, ouabain に対して Na⁺,K⁺-ATPase とほとんど変わらない親和性を有する変異体が作製されることから⁵⁸⁾, 阻害剤結合によって引き起こされる構造変化が非常によく似ているという結果と符合する. これら三つの ATPase に共通していえることは, 50 Å 以上離れたイオン結合部位の存在する TM 領域と, ATP の加水分解を担う細胞内ドメインが高度に共役して働いているということである. つまりどちらかが動かされるともう一方も連動して動いてしまうという, この構造変化における共役機構が, ATP 加水分解をエネルギー源としてイオン輸送を達成する P 型 ATPase の基本的な作動原理を保障するものなのであろう.

8. おわりに

本稿で紹介した構造-機能解析に基づいて、我々はなぜ H^+, K^+ -ATPase が胃内部に pH 1 という環境を実現できるかという問題を一部説明しうる以下のモデルを提示した。

・「ラチェット」のように βNt が逆反応を抑えることで、100 万倍の濃度勾配にあっても H^+ を逆流させない。

・輸送化学量論を pH に応じて 2 から 1 へと変化させることで、限られた ATP 加水分解エネルギーを用いて急峻な pH 勾配を作り出す。

P 型 ATPase は、生命の根幹ともいえる物質不均衡を作り出す能動輸送体として、我々の体中においてもさまざまな部位で活躍している。たとえば、神経活動の源となる膜電位の形成、および二次輸送体への駆動力の供与は、 Na^+, K^+ -ATPase による非対称なイオン輸送の結果生み出される。この場合作り出される Na^+ 濃度勾配は 10 倍程度であり起電性を伴うが、発現部位に応じた非常に細やかな濃度勾配の調節が要求される。一方で H^+, K^+ -ATPase に要求されるのは、胃壁細胞内外における急峻な H^+ 濃度勾配の形成と、この濃度勾配を維持するための機構である。このように、それぞれのイオンポンプが担う役割はユニークであり、これらの生理現象を説明するためには、輸送イオンの選択性を理解するだけでは不十分である。P 型 ATPase は、「ATP 加水分解とイオン輸送の共役」という本質的な作動原理を保存したうえで、それぞれが作り出す環境に適した調節機能を獲得し、非常に多様な機能を発現していることが明らかになりつつある。

謝辞

本稿に記した H^+, K^+ -ATPase に関する結果は、京都大学生物物理学教室および名古屋大学細胞生理学研究センター藤吉グループにおいて行った研究に基づいています。同センターの藤吉好則、谷一寿、西澤知宏（現東京大学理学研究科）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。北海道大学の谷口和弥博士には、プロジェクトの発足時から通して数多くの有用な助言を賜りましたことに感謝致します。

文 献

- Sachs, G., Shin, J.M., Vagin, O., Lambrecht, N., Yakubov, I., & Munson, K. (2007) *J. Clin. Gastroenterol.*, **41**, S226-S242.
- Marshall, B.J. & Warren, J.R. (1984) *Lancet*, **1**, 1383-1401.
- Ganser, A.L. & Forte, J.G. (1973) *Biochim. Biophys. Acta*, **307**, 169-180.
- Rabon, E.C. & Reuben, M.A. (1990) *Annu. Rev. Physiol.*, **52**, 321-344.
- Shin, J.M., Munson, K., & Sachs, G. (2009) *Eur. J. Physiol.*, **457**, 609-622.
- Henderson, R. & Unwin, P.N. (1975) *Nature*, **257**, 28-32.
- Fujiyoshi, Y. (1998) *Adv. Biophys.*, **35**, 25-80.
- Henderson, R., Baldwin, J.M., Downing, K.H., Lepault, J., & Zemlin, F. (1986) *Ultramicroscopy*, **19**, 147-178.
- Fujiyoshi, Y., Mizusaki, T., Morikawa, K., Yamagishi, H., Aoki, Y., Kihara, H., & Harada, Y. (1991) *Ultramicroscopy*, **38**, 241-251.
- Cheng, Y. & Walz, T. (2009) *Annu. Rev. Biochem.*, **78**, 723-742.
- Gyobu, N., et al. (2004) *J. Struct. Biol.*, **146**, 325-333.
- Chiu, P.-L., Kelly, D.F., & Walz, T. (2012) *Micron*, **42**, 762-772.
- Yang, F., Abe, K., Tani, K., & Fujiyoshi, Y. (2013) *Microscopy*, **62**, 597-606.
- Palmgren, M.G. & Axelsen, K.B. (1998) *Biochim. Biophys. Acta*, **1365**, 37-45.
- Post, R.L. & Kume, S. (1973) *J. Biol. Chem.*, **248**, 6993-7000.
- Jørgensen, P.L., Håkansson, K.O., & Karlisch S.J.D. (2003) *Annu. Rev. Phys.*, **65**, 817-849.
- Møller, J.V., Olesen, C., Winther, A.-M.L., & Nissen, P. (2010) *Q. Rev. Biophys.*, **43**, 501-566.
- Skou, J.C. (1957) *Biochim. Biophys. Acta*, **1000**, 439-446.
- Toyoshima, C., Nakasako, M., Nomura, H., & Ogawa, H. (2000) *Nature*, **405**, 647-655.
- Morth, J.P., Pedersen, B.P., Toustrup-Jensen, M.S., Sørensen, T.L., Petersen, J., Andersen, J.P., Vilsen, B., & Nissen, P. (2007) *Nature*, **450**, 1043-1049.
- Toyoshima, C. (2008) *Arch. Biochem. Biophys.*, **476**, 3-11.
- Toyoshima, C. & Cornelius, F. (2013) *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **23**, 507-514.
- Post, R.L., Hegyvary, C., & Kume, S. (1972) *J. Biol. Chem.*, **247**, 6530-6540.
- Albers, R.W. (1967) *Annu. Rev. Biochem.*, **36**, 727-756.
- Reenstra, W.W. & Forte, J.G. (1981) *J. Membr. Biol.*, **61**, 55-60.
- Rabon, E.C., McFall, T. L., & Sachs, G. (1982) *J. Biol. Chem.*, **257**, 6296-6299.
- Rabon, E., Sachs, G., Mårdh, S., & Wallmark, B. (1982) *Biochim. Biophys. Acta*, **688**, 515-524.
- Helmich-de Jong, M.L., van Emst-de Vries, S.E., De Pont, J.J., Schuurmans Stekhoven, F.M., & Bonting, S.L. (1985) *Biochim. Biophys. Acta*, **821**, 377-383.
- Abe, K., Tani, K., Nishizawa, T., & Fujiyoshi, Y. (2009) *EMBO J.*, **28**, 1637-1643.
- Chow, D.C. & Forte, J.G. (1995) *J. Exp. Biol.*, **198**, 1-17.
- Danko, S., Yamasaki, K., Daiho, T., & Suzuki, H. (2004) *J. Biol. Chem.*, **279**, 14991-14998.
- Nishizawa, T., Abe, K., Tani, K., & Fujiyoshi, Y. (2008) *J. Struct. Biol.*, **162**, 219-228.
- Toyoshima, C., Nomura, H., & Tsuda, T. (2004) *Nature*, **432**, 361-368.
- Toyoshima, C. & Nomura, H. (2002) *Nature*, **418**, 605-611.
- Dürr, K., Abe, K., Tavrız, N.N., & Friedrich, T. (2009) *J. Biol. Chem.*, **284**, 20147-20154.
- Durbin, R.P., Michelangeli, F., & Nickel, A. (1974) *Biochim. Biophys. Acta*, **367**, 177-189.
- Forte, J.G., Adams, P.H., & Davies, R.E. (1963) *Nature*, **197**, 874-876.
- Guynn, R.W. & Veech, R.L. (1973) *J. Biol. Chem.*, **248**, 6966-6972.
- Abe, K., Tani, K., & Fujiyoshi, Y. (2010) *J. Struct. Biol.*, **170**, 60-68.
- Abe, K., Tani, K., Friedrich, T., & Fujiyoshi, Y. (2012) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**, 18401-18406.
- Shinoda, T., Ogawa, H., Cornelius, F., & Toyoshima, C. (2009) *Nature*, **459**, 446-450.
- Swarts, H.G.P., Hermesen, H.P.H., Koenderink, J.B., Stekhoven, F.M.A.H.S., & De Pont, J.J.H.H.M. (1998) *EMBO J.*, **17**, 3029-3035.

- 43) Swarts, H.G.P., Koenderink, J.B., Hermesen, H.P.H., Willems, P.H.G.M., & De Pont, J.J.H.H.M. (2001) *J. Biol. Chem.*, **276**, 36909–36916.
- 44) Munson, K., Garcia, R., & Sachs, G. (2005) *Biochemistry*, **44**, 5267–5284.
- 45) Dürr, K., Seuffert, I., & Friedrich, T. (2010) *J. Biol. Chem.*, **285**, 39366–39379.
- 46) Kanai, R., Ogawa, H., Vilsen, B., Cornelius, F., & Toyoshima, C. (2013) *Nature*, **502**, 201–206.
- 47) Burnay, M., Crambert, G., Kharoubi-Hess, S., Geering, K., & Horisberger, J.D. (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 19237–19244.
- 48) Black, J.W., Duncan, W.A.M., Durant, C.J., *et al.* (1972) *Nature*, **236**, 385–390.
- 49) Fellenius, E., Berglindh, T., Sachs, G., *et al.* (1981) *Nature*, **290**, 159–161.
- 50) Shin, J.M., Cho, Y.M., & Sachs, G. (2004) *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 7800–7811.
- 51) Senn-Bilfinger, J., Ferguson, J.R., Holmes, M.A., Lumbard, K. W., Huber, R., Zech, K., Hummel, R.P., & Zimmermann, P.J. (2006) *Tetrahedron Lett.*, **47**, 3321–3323.
- 52) Wallmark, B., Briving, C., Fryklund, J., Munson, K., Jackson, R., Mendlein, J., Rabon, E., & Sachs, G. (1987) *J. Biol. Chem.*, **262**, 2077–2084.
- 53) Abe, K., Tani, K., & Fujiyoshi, F. (2011) *Nat. Commun.*, **2**, 155.
- 54) Toyoshima, C., Norimatsu, Y., Iwasawa, S., Tsuda, T., & Ogawa, H. (2007) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **104**, 19831–19836.
- 55) Olesen, C., Picard, M., Winther, A.M., Gyru, C., Morth, J.P., Oxvig, C., Møller, J.V., & Nissen, P. (2007) *Nature*, **450**, 1036–1042.
- 56) Ogawa, H., Shinoda, T., Cornelius, F., & Toyoshima, C. (2009) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **106**, 13742–13747.
- 57) Laursen, M., Yatime, L., Nissen, P., & Fedosova, N.U. (2013) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **110**, 10958–10963.
- 58) Qui, L.Y., Krieger, E., Schaftenaar, G., Swarts, H.G.P., Willems, P.H.G.M., De Pont, J.J.H.H.M., & Koenderink, J.B. (2005) *J. Biol. Chem.*, **280**, 32349–32355.

著者寸描

●阿部 一啓 (あべ かずひろ)

京都大学大学院理学研究科特定研究員. 博士 (理学).
 他は本誌第 84 巻 2 号 (2012), p. 140 をご参照ください.