

胃酸分泌プロトンポンプの構造と機能

浅野真司¹, 森井孫俊²

胃 H^+ , K^+ -ATPase は胃酸分泌を行うプロトンポンプであり, 細胞内での ATP の加水分解と共役する形で, 細胞外の K^+ を細胞内に, 細胞内のプロトン を細胞外へ交換する形で能動輸送する. 最近, 胃 H^+ , K^+ -ATPase と同じ P 型 ATPase に属する骨格筋の Ca^{2+} -ATPase について結晶構造解析が行われ, 反応過程における五つの異なるコンホメーションの三次元構造が明らかにされた. 本稿では, Ca^{2+} -ATPase の構造をもとにしたホモロジーモデリングによって, 胃 H^+ , K^+ -ATPase の α 鎖の三次元構造モデルを構築し, 変異導入実験によって得られた結果と対照し, 胃 H^+ , K^+ -ATPase の構造と機能との相関について議論する.

1. はじめに

胃 H^+ , K^+ -ATPase は胃酸分泌を行うプロトンポンプであり, 胃底腺の壁細胞で特異的に発現して, 細胞内での ATP の加水分解と共役する形で, 細胞外の K^+ を細胞内に, 細胞内のプロトン を細胞外へと 1:1 の割合で非起電的に交換する形で能動輸送する. その結果, 胃管腔内の pH は 1 以下に達し, 細胞の外内に 400 万倍にも達するプロトンの濃度勾配が形成される¹⁾.

胃 H^+ , K^+ -ATPase は触媒鎖である α 鎖 (ATP4A) と, 非触媒鎖である β 鎖 (ATP4B) からなる. α 鎖は分子量が 114kDa の 10 回膜貫通型のタンパク質であり, ATP の結合部位や輸送されるプロトン, K^+ の結合部位や輸送路を含む²⁾. また, 後述するプロトンポンプ阻害剤の結合部位も α 鎖に存在する. α 鎖の一次構造は Na^+ , K^+ -ATPase の

α 鎖や骨格筋の Ca^{2+} -ATPase との間で相同性が高く, それぞれ約 60%, 30% のアミノ酸が同一である. 一方, β 鎖はタンパク質部分の分子量が 33kDa の 1 回膜貫通型 (アミノ末端が原形質側に存在するタイプ II) の糖タンパク質で, H^+ , K^+ -ATPase と Na^+ , K^+ -ATPase のみで見られる鎖である³⁾. β 鎖には直接の機能部位は存在しないが, H^+ , K^+ -ATPase の機能的な発現に必須であるだけでなく, 細胞表面への移行や安定化にとって重要な役割を果たす⁴⁾.

胃 H^+ , K^+ -ATPase は, その反応サイクルの中において酸性条件で安定なアシルリン酸化中間体を形成する P 型 ATPase のメンバーの一つと位置づけられている⁵⁾. このグループに属する ATPase は, その反応サイクルの中で, イオンの結合部位を原形質側に向けた E1 フォームと, 細胞外 (管腔) に向けた E2 フォームとに大別されるコンホメーションをとることが知られている. 前述した Na^+ , K^+ -ATPase や Ca^{2+} -ATPase のほか, 重金属を輸送する ATPase などこのグループに属する.

私たちは胃 H^+ , K^+ -ATPase の α , β 鎖の cDNA をヒト HEK-293 細胞に一過性, あるいは安定的に発現させて, 部位特異的に変異を導入した変異体と野生型との機能的な比較を行うことによって, 構造と機能との関連を明らかにした.

最近, 東京大学の豊島近教授のグループと, デンマークのオーフス大学の Sørensen らは, ウサギの筋小胞体の Ca^{2+} -ATPase の結晶構造解析を行い, 反応過程における五

¹ 立命館大学情報理工学部 (〒525-8577 草津市野路東 1-1-1)

² 富山大学大学院医学薬学研究部 (〒930-0194 富山市杉谷 2630)

Structure-function relationship of gastric proton pump

¹ Shinji Asano (College of Information Science and Engineering, Ritsumeikan University, 1-1-1 Noji-Higashi, Kusatsu-city, Shiga 525-8577 Japan)

² Magotoshi Morii (Graduate School of Medicine and Pharmaceutical Sciences, University of Toyama, 2630 Sugitani Toyama-city, Toyama 930-0194 Japan)

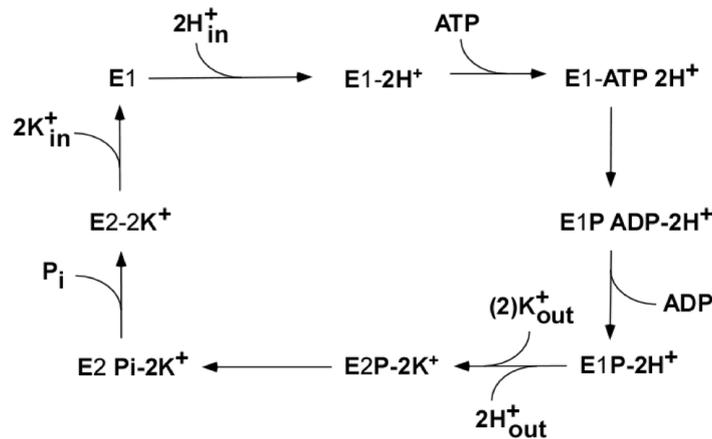


図1 胃 H^+ , K^+ -ATPase の反応スキーム

つの異なるコンホメーションについて三次元構造を明らかにした⁶⁻¹⁰⁾。本稿では、 Ca^{2+} -ATPase の構造をもとにしたホモロジーモデリングによって、胃 H^+ , K^+ -ATPase の α 鎖の三次元構造モデルを構築し、変異導入実験によって得られた結果と対照し、胃 H^+ , K^+ -ATPase の構造と機能との関連について議論したい。また、 β 鎖の果たす役割についても紹介したい。

2. 胃 H^+ , K^+ -ATPase の反応機構

胃 H^+ , K^+ -ATPase は ATP を加水分解してプロトンと K^+ とを輸送する過程で、いくつかの異なるコンホメーションをとる。それは筋小胞体の Ca^{2+} -ATPase の場合にならって図1のような反応スキームとして表される。(1) 酵素 (E として表現する) が細胞内のプロトンと反応して、 $E1-2H^+$ を形成する。(2) $E1-2H^+$ が ATP と反応して $E1-ATP\ 2H^+$ に変化する。(3) 酵素が ATP のリン酸基を受容してリン酸化中間体 $E1P\ ADP-2H^+$ に変化する。(4) 酵素が ADP を遊離して $E1P-2H^+$ に変化する。(5) $E1P-2H^+$ が管腔内にプロトンを遊離し、管腔内の K^+ と反応して、 $E2P-2K^+$ に変化する。(6) $E2P$ のリン酸エステル結合が切断されて $E2\ Pi-2K^+$ に変化する。(7) $E2\ Pi-2K^+$ が脱リン酸化を受けて $E2-2K^+$ に変化する。(8) 酵素が K^+ を管腔側から細胞質側に輸送して元の $E1$ へとコンホメーション変化する。このような部分反応、コンホメーション変化を経て、ATP の加水分解と共役したプロトンと K^+ の膜輸送が行われる。

胃 H^+ , K^+ -ATPase の α 鎖と筋小胞体の Ca^{2+} -ATPase との間では約 30% のアミノ酸が同一である。しかも、ATP の加水分解やイオンの結合に関わる部位など局所的にはさらに相同性が高い。こうした事実に基づき、 Ca^{2+} -ATPase の結晶構造を雛形としたホモロジーモデリングを行って、胃 H^+ , K^+ -ATPase の α 鎖の三次元構造を推測することができる。

3. 胃 H^+ , K^+ -ATPase の三次元構造

3-1. ATP との結合・加水分解にかかわる部位

胃 H^+ , K^+ -ATPase の α 鎖の原形質ドメインは、 Ca^{2+} -ATPase で報告されたように⁶⁾、N (ヌクレオチド結合)、P (リン酸化)、A (アクチユエーター) ドメインからなる (図2)。N、P ドメインは第4膜貫通ヘリックス (M4) 以下、第X膜貫通ヘリックスを MX (Xは数字) と表記し、M5 の間の大きな原形質ドメインからなり、A ドメインは M2 と M3 との間に存在する原形質ドメインとアミノ末端部分のドメインからなる。 Ca^{2+} -ATPase の $E1-2Ca^{2+}$ フォームに対応する H^+ , K^+ -ATPase の $E1-2H^+$ フォームでは、N、P、A ドメインはそれぞれ分離した形で存在する。 $E1-AMPPCP\ 2Ca^{2+}$ フォームに対応する H^+ , K^+ -ATPase の $E1-AMPPCP\ 2H^+$ フォームでは、ATP (結晶構造では非水解性の ATP アナログである AMPPCP) が N、P ドメインを架橋して両者を近づける。その後、P ドメインに存在する Asp-387 が ATP のリン酸基を受けてアシルリン酸化されて、 $E1P\ ADP-2H^+$ フォームが形成される。次に、ADP が酵素から解離し、その位置を埋めるように A ドメインが z 軸方向に大きく回転して N、P ドメインに割り込む形で接近し、酵素の脱リン酸化を促して $E2\ Pi-2K^+$ フォームを形成する。最後に A ドメインが傾斜して無機リン酸を遊離し、 $E2-2K^+$ フォームが形成される。実際に Asp-387 に変異を導入してアスパラギン、アラニンあるいはグルタミン酸に置換すると、リン酸化段階中間体が形成されず、 H^+ , K^+ -ATPase 活性が損なわれる¹¹⁾。

原形質側のドメインに対して ATP が結合して加水分解される過程では、上記のように N、P、A ドメインの構造や位置関係が変化するのみならず、これと連動した M1 から M6 の膜貫通領域のたわみ、折れ曲がり、膜に対して垂直方向の移動などダイナミックな構造変化が起こり、イオン結合部位の構造環境の変化や、イオン輸送ゲートの開放

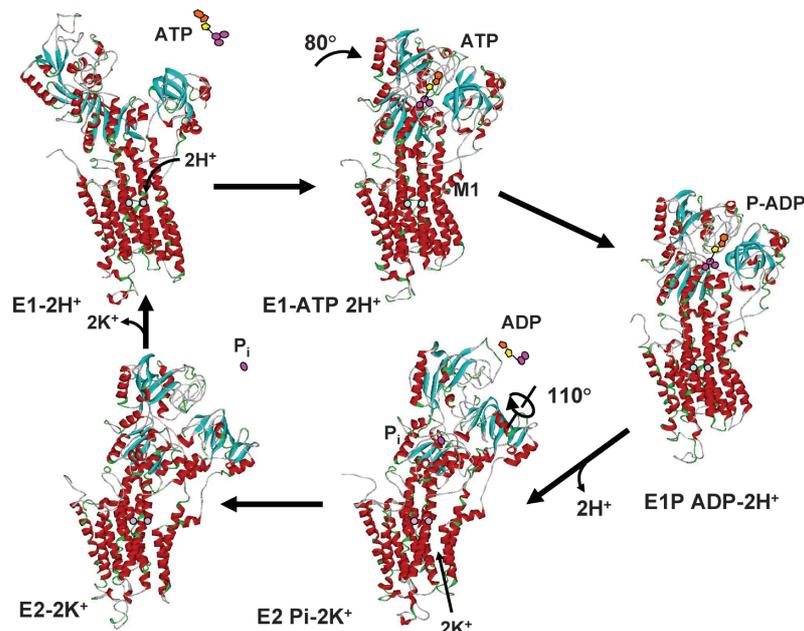


図2 胃 H^+ , K^+ -ATPase の反応過程での構造変化

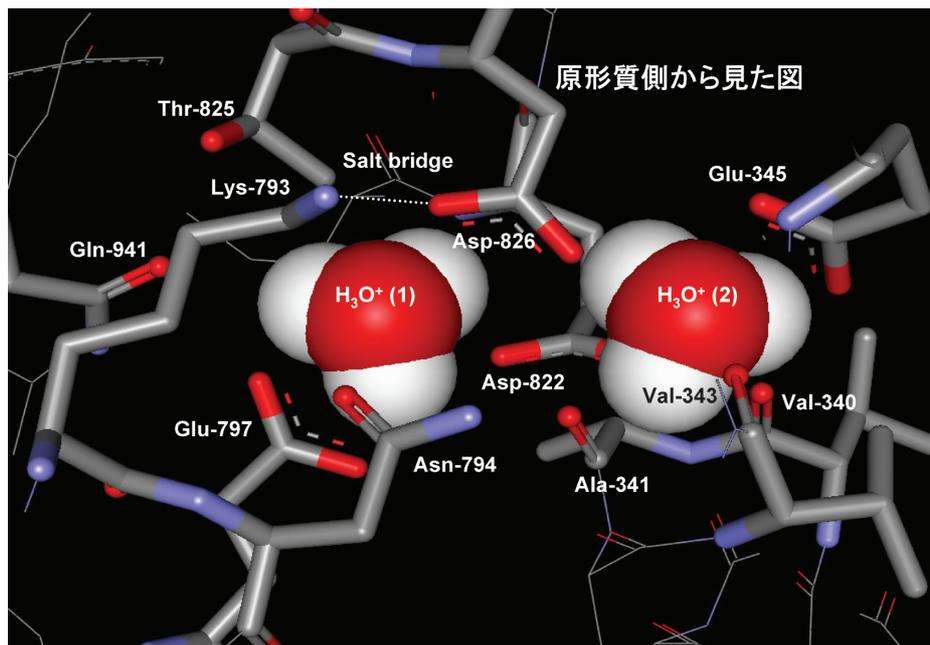


図3 胃 H^+ , K^+ -ATPase のプロトン (オキソニウムイオン) の結合部位

や閉鎖が起こるものと見られる。

3-2. 胃 H^+ , K^+ -ATPase の K^+ の結合部位

胃 H^+ , K^+ -ATPase の α 鎖は 10 本の膜貫通領域を持ち、M4, M5, M6, M8 には負電荷を持った酸性アミノ酸残基 (M4 の Glu-345, M5 の Glu-797, M6 の Glu-822, Asp-826, Glu-938) が存在する。これらのアミノ酸の多くのものは、 Na^+ , K^+ -ATPase の α 鎖や骨格筋の Ca^{2+} -ATPase に

おいても保存、または類似のアミノ酸によって置換されており、これらの側鎖が中心となってカチオンの認識部位を形成するものと考えられた。

ホモロジーモデリングによれば、E2-2 K^+ フォームには、 K^+ の結合部位が 2 箇所想定される。結合部位の一つは、M5 の Asn-794, Glu-797, M6 の Glu-822 の側鎖カルボニル酸素と、M4 の Val-340, Ala-341 の主鎖のカルボニル酸素によって形成される。もう 1 箇所は M4 の Glu-345, M6

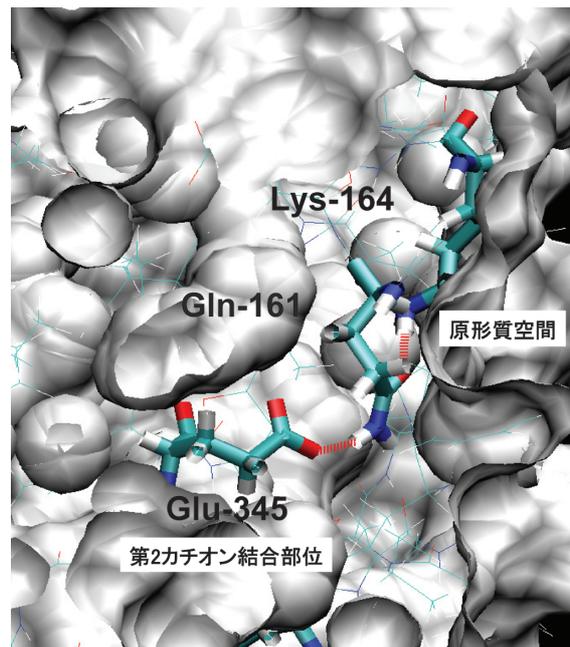


図4 胃 H^+ , K^+ -ATPase の膜中に見られる水素結合鎖

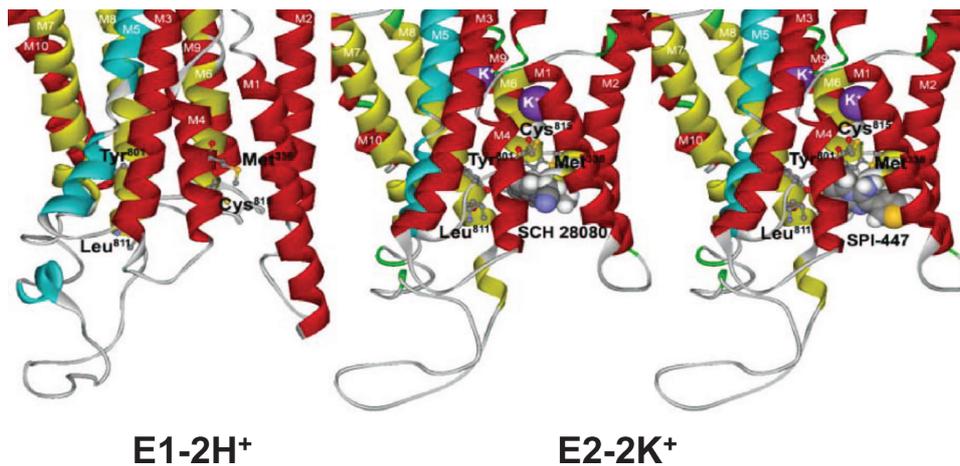


図5 胃 H^+ , K^+ -ATPase のAPA 結合部位

の Glu-822 の側鎖カルボニル酸素, M4 の Val-339, Val-343 の主鎖のカルボニル酸素, M1 の Met-115 側鎖の硫黄によって形成されると推測される¹²⁾。

これらの残基のうちで M4 の Glu-345 に変異を導入して変異体の酵素機能を解析したところ, グルタミン変異体 (E345Q) を除く変異体で H^+ , K^+ -ATPase の消失が認められた¹¹⁾。それらは ATP と反応して E1P-2H⁺ を経て E2P リン酸化中間体を形成するが, E2P は K⁺ の存在下でも脱リン酸化を受けず, E2P→E2K⁺ の段階での障害が見られた。E345Q 変異体では, H^+ , K^+ -ATPase 活性が部分的ながら保存されたが, K⁺ に対する親和性の低下が観察された。E345Q 変異体もまた ATP と反応してリン酸化され, 形成された E2P は K⁺ の存在下で脱リン酸化されたが, K⁺ に対

する親和性は野生型と比較しておよそ 10 分の 1 にまで低下した。これらの事実から, Glu-345 の側鎖は K⁺ の認識に重要であり, 側鎖の酸素原子が K⁺ との配位に関わることが考えられる¹³⁾。

M5 の Glu-797, M6 の Glu-822 の変異体もまた ATP と反応して E1P-2H⁺ を経て E2P リン酸化中間体を形成するが, E2P→E2K⁺ の段階が障害を受けることになる。また, Glu-797, Glu-822 の負電荷を中和するような変異を導入すると, K⁺ が存在しなくても, H^+ , K^+ -ATPase が活性化される。こうした事実から, これらの残基もまた K⁺ の認識に重要であり, 側鎖の酸素原子が K⁺ との配位に関わると見られる^{14~16)}。

3-3. 胃 H^+ , K^+ -ATPase によるプロトン輸送

膜タンパク質を介したプロトンの膜透過には、バクテリオロドプシンに見られるように荷電を持ったアミノ酸の間での電荷移動の形で起こるもの¹⁷⁾、プロトンが水分子とともにオキソニウムイオン (H_3O^+) として輸送される形態が考えられるが、 H^+ , K^+ -ATPase がどのような形でプロトンを輸送するのかについては明らかではなかった。

私たちはブタの胃粘膜のミクロソーム画分から調製した H^+ , K^+ -ATPase を含む膜小胞を用いて、 H^+ , K^+ -ATPase による ATP の加水分解、小胞内へのプロトンの輸送と同時に、 $[^{18}O]$ 標識された水が小胞内に取り込まれることを見出した。その化学量論比は ATP 1 mol の加水分解に対して $[^{18}O]$ 標識された水の取りこみが 1.8 mol であり、ATP とプロトンとの量比と一致すること、小胞内への $[^{18}O]$ 標識された水の取り込みは H^+ , K^+ -ATPase に対する特異的な阻害剤、SCH 28080 によって阻害されることから、 H^+ , K^+ -ATPase による ATP の加水分解と共役して小胞内への正味の水分子の移動が起こることが示された。したがって、 H^+ , K^+ -ATPase によるプロトン輸送の実体は H_3O^+ の膜輸送であるとみられる¹⁸⁾。実際、 H^+ , K^+ -ATPase の E1 フォームには、膜中に H_3O^+ の結合部位が 2 箇所想定される。ホモロジーモデリングによれば、結合部位は、 Ca^{2+} -ATPase における Ca^{2+} 結合部位 site 1, site 2 に対応し、site 1 は M5 の Glu-797, M6 の Asp-826, M8 の Gln-941 の側鎖カルボニル酸素によって、site 2 は M4 の Glu-345, M6 の Glu-822 の側鎖カルボニル酸素と、M4 の Val-340, Ala-341, Val-343 の主鎖カルボニル酸素によって形成されると推測される (図 3)。

M6 の Asp-826 をアラニン、アスパラギン、グルタミン酸に置換した変異体 (D826A, D826N, D826E) は ATP によるリン酸化中間体 (E1P-2H⁺) の形成段階で障害を受けて、 H^+ , K^+ -ATPase 活性を失う。Asp-826 が膜貫通領域にあることを考慮すると、リン酸化反応と共役したプロトンの認識や、これと関連した構造変化に関わることが考えられる¹⁵⁾。

筋小胞体 Ca^{2+} -ATPase の E1-2 Ca^{2+} フォームでは、原形質側の膜貫通領域 M1, M2 に繋がるいわゆる「ストーク部分」には沢山の負電荷を持った酸性アミノ酸が存在し、ここから膜貫通領域の Ca^{2+} 結合部位に繋がる構造が見られ、これが Ca^{2+} の細胞質からの取り入れにかかわる構造と考えられる。ところが、胃 H^+ , K^+ -ATPase の α 鎖では酸性アミノ酸は存在せず、この部分は閉じた構造をとる。一方、 H^+ , K^+ -ATPase の α 鎖の原形質側には、Lys-164 (M2 のストーク部分) から Gln-161 (M2) を経てカチオン結合部位、site 2 を作る Glu-345 (M4) までのアミノ酸側鎖の間で水素結合鎖が形成される可能性が考えられる (図 4)¹⁸⁾。そのうち、プロトンは水分子を介して、カチオン結合部

位、site 2 から site 1 に輸送される。site 1 では、Asp-826, Lys-793, Asn-794, Glu-797, Gln-941 のアミノ酸側鎖の間で salt bridge, 水素結合が形成され電荷移動が起こる可能性が考えられる。このうちで、M5 の Lys-793 は胃 H^+ , K^+ -ATPase と、そのアイソフォームである非胃型の H^+ , K^+ -ATPase のみで見られる特徴的な残基であり、 Na^+ , K^+ -ATPase, Ca^{2+} -ATPase ではこれと対応するアミノ酸はセリンである。胃 H^+ , K^+ -ATPase の Lys-793 をアラニンやセリンに置換すると、 H^+ , K^+ -ATPase 活性が大きく損なわれ、 K^+ に対する親和性も低下する¹⁹⁾。また、このリシン残基は、非起電性のイオン輸送 ATPase で特徴的に見られることから、膜内において固定的な正電荷を与えてイオン結合部位の電荷量を調節し、イオン輸送を非起電性としているものと考えられる²⁰⁾。こうした事実から、 H^+ , K^+ -ATPase の α 鎖の原形質側では、プロトンは上記のアミノ酸側鎖間でのいわゆる電荷移動で輸送されて、膜貫通部中央のイオン結合部位で水分子に伝達され、 H_3O^+ が形成されるものと思われる。

4. 胃 H^+ , K^+ -ATPase の阻害剤

胃酸は消化管上部疾患の攻撃因子の一つであり、胃 H^+ , K^+ -ATPase に対する阻害剤 (プロトンポンプインヒビター: PPI と呼ばれる) が消化性潰瘍や逆流性食道炎などの治療薬として用いられる。オメプラゾール、ランソプラゾール、ラベプラゾールなどが臨床的に用いられている PPI である。PPI は弱塩基性のベンズイミダゾール誘導体で、それ自体は阻害活性を持たないが、酸性環境に蓄積して平面四環構造を持ったスルフェナミド化合物に構造変換されるプロドラッグである。分泌管腔で生成したスルフェナミド化合物は、 H^+ , K^+ -ATPase の α 鎖の管腔側に存在するシステイン残基との間でジスルフィド結合を形成する²¹⁾。この阻害反応は不可逆的であるため、PPI による胃酸分泌阻害の持続時間は長く、新たなプロトンポンプが合成されるまで酸分泌は回復しない。また、*in vitro* の条件では、スルフェナミド化合物の生成速度が H^+ , K^+ -ATPase の阻害反応速度を決定する²²⁾。

H^+ , K^+ -ATPase に対する阻害剤としては、PPI とは別に胃酸分泌ポンプ拮抗薬 (acid pump antagonists: APAs) と呼ばれる一群の阻害剤がある。SCH 28080 を基本的な代表化合物とする APAs は現在、臨床利用に向けて開発段階にある²³⁾。APA もまた塩基性の化合物であり分泌管腔に集積してプロトン化を受けて活性化される。APA は PPI とは異なり、分泌管腔で大きく構造変化せず、それ自体が阻害作用を持つ。APA もまた H^+ , K^+ -ATPase の管腔側から作用して、 α 鎖の中に存在する cavity に結合して、 H^+ , K^+ -ATPase の構造を固定化してコンホメーション変化を妨げる。APA の作用は PPI とは異なり、可逆的でありジスル

フィド結合の形成を伴わない。また、APAの阻害は、管腔側の K^+ と競合するという興味深い挙動を示す。

5. 胃 H^+ , K^+ -ATPaseの阻害剤の結合部位

上述のようにPPIは管腔側から作用して構造変換を受けた後、 α 鎖のシステイン残基との間で共有結合を形成する。その結合部位としては、 α 鎖のM3, M4の間の細胞外ループ近傍に存在するCys-323, M6に存在するCys-815, Cys-824, M7, M8の間の細胞外ループに存在するCys-894が候補として挙げられた。Besanconらはブタ胃粘膜ミクロソーム由来の H^+ , K^+ -ATPase精製標品をPPIで標識し、ペプチド断片を分離してPPIの結合部位を解析した²⁴⁾。そして、Cys-815が異なる種類のPPIによっても共通に標識される結合部位であること、Cys-815のPPI修飾と H^+ , K^+ -ATPase活性の失活が相関性を持つことを確認した²⁴⁾。プロトンポンプの α 鎖についてホモロジーモデリングを行ったところ、Cys-815近傍に阻害剤の活性化体であるスルフェナミド化合物が結合しうるスペースが観察された。阻害剤がこのスペースに結合することによって α 鎖をE2フォームに固定してE1フォームへのコンホメーション変化を妨げるものと見られる。また、この空洞(スペース)はイオンの結合部位に対して管腔側に存在し、管腔側からの K^+ の結合を妨げる位置にある。

また、APAの代表化合物であるSCH 28080の結合部位は、M4に存在するAla-334, M5に存在するTyr-801, M5, M6の間の細胞外ループ近傍に存在するLeu-811を含むcavity構造であると考えられる。このcavity構造は膜中に存在する K^+ 結合部位よりも管腔側に見られる。ホモロジーモデリングを行ったところ、このcavity構造はSCH 28080が反応するE2-2 K^+ , E2Pフォームでは確認されるが(図5)、SCH 28080が反応しないE1-2 H^+ フォームでは薬物が反応できるサイズを持たない。 H^+ , K^+ -ATPaseのE2-2 K^+ , E2Pフォームに対してSCH 28080が結合すると、E1-2 H^+ フォームへのコンホメーション変化が妨げられ、 H^+ , K^+ -ATPaseの失活に繋がるものと考えられる^{12, 25)}。このcavity構造には別のAPAであるSPI-447もフィットする。

6. 胃 H^+ , K^+ -ATPaseの β 鎖の働き

β 鎖はタイプIIの1回膜貫通型糖タンパク質で、P型ATPaseの中で H^+ , K^+ -ATPaseと Na^+ , K^+ -ATPaseにのみ特徴的に見られる鎖である。 β 鎖は膜中で α 鎖と反応して安定化し、機能を保持したコンホメーションに保つものと見られる。実際、HEK-293細胞に α 鎖のみを発現させると、 α 鎖は細胞表面に発現することなく、ポリユビキチン化を受けて、プロテアソームによって分解される²⁶⁾。 H^+ , K^+ -ATPaseの α 鎖は、M7, M8間の細胞外領域で β 鎖の細胞

外領域と相互作用しており²⁷⁾、この付近の構造は β 鎖の影響を受けて Ca^{2+} -ATPaseとは異なることが推測される。

β 鎖は細胞外領域に三つのジスルフィド結合を含む。胃 H^+ , K^+ -ATPaseを高濃度の還元剤で処理すると活性が消失すること、 α 鎖はジスルフィド結合を含まないと見られること、還元剤の処理時に K^+ を共存させると活性が保存されることから、 β 鎖のジスルフィド結合は、 H^+ , K^+ -ATPaseの α 鎖を、酵素活性を保持した形で維持するために働くものと考えられた²⁸⁾。実際に、 β 鎖のジスルフィド結合を形成するCys残基に変異を導入して、各ジスルフィド結合を破壊したところ、 α 鎖との会合能が低下して、細胞表面への輸送や H^+ , K^+ -ATPase活性が失活することが観察された⁴⁾。

また、 β 鎖は細胞外領域に7本の糖鎖を含む。私たちは、 β 鎖のN型糖鎖の付加部位と見られるAsn残基に変異を導入して、糖鎖を段階的に除去した²⁹⁾。その結果、各糖鎖を一つだけ除いても、 α 鎖との会合能や H^+ , K^+ -ATPase活性には何ら影響が観察されなかった。しかしながら、複数の糖鎖を除いていくと、段階的に α 鎖との会合能が低下して、 H^+ , K^+ -ATPase活性の低下が観察され、すべての糖鎖を除くと、活性が完全に失われた。こうした事実から、個々の糖鎖は α 鎖の会合・安定化や H^+ , K^+ -ATPase活性には寄与しないものの、糖鎖自体は α 鎖の会合に関わる構造を保持するために必要であることが確認された。また、 β 鎖に対する糖鎖の付加・修飾は、 β 鎖の細胞表面への移行や、極性細胞における頂端膜での発現に重要な役割を果たすことが確認されている²⁹⁻³¹⁾。

7. おわりに

胃 H^+ , K^+ -ATPaseの α 鎖の構造と機能の相関については、ホモロジーモデリングと変異体の機能解析とを結びつけることによって具体的なイメージが構築された。一方、 H^+ , K^+ -ATPaseのプロトン輸送については、原形質側におけるアミノ酸側鎖の水素結合鎖を経由する電荷移動による輸送と、管腔側への H_3O^+ としての輸送が一体化した興味深いメカニズムが予想されるが、この点については更なる検証が必要である。胃 H^+ , K^+ -ATPase自体の三次元構造の解明が待たれるところである。また、これまで機能的な役割がはっきりしなかった β 鎖についても H^+ , K^+ -ATPaseの細胞内トラフィッキングや極性発現という観点から興味深い知見が得られている。今後の研究が待たれる。

本研究分野における著者らの研究活動に対してご助言、ご指導いただきました富山医科薬科大学名誉教授(元富山医科薬科大学副学長)竹口紀晃先生に御礼申し上げます。

文 献

- 1) Sachs, G., Chang, H.H., Rabon, E., Schackman, R., Lewin, M., & Saccomani, G. (1976) *J. Biol. Chem.*, **251**, 7690–7698.
- 2) Shull, G.E. & Lingrel, J.B. (1986) *J. Biol. Chem.*, **261**, 16788–16791.
- 3) Toh, B., Gleeson, P.A., Simpson, R.J., Moritz, R.L., Callaghan, J.M., Goldkorn, I., Jones, C.M., Martinelli, T.M., Mu, F., Humphris, D.C., Pettitt, J.M., Mori, Y., Masuda, T., Sobieszczuk, P., Weinstock, J., Mantamadiotis, T., & Baldwin, G.S. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 6418–6422.
- 4) Kimura, T., Tabuchi, Y., Takeguchi, N., & Asano, S. (2002) *J. Biol. Chem.*, **277**, 20671–20677.
- 5) Møller, J.V., Juul, B., & le Maire, M. (1996) *Biochim. Biophys. Acta*, **1286**, 1–51.
- 6) Toyoshima, C., Nakasako, M., Nomura, H., & Ogawa, H. (2000) *Nature*, **405**, 647–655.
- 7) Toyoshima, C. & Nomura, H. (2002) *Nature*, **418**, 605–611.
- 8) Toyoshima, C. & Mizutani, T. (2004) *Nature*, **430**, 529–535.
- 9) Toyoshima, C., Nomura, H., & Tsuda, T. (2004) *Nature*, **432**, 361–368.
- 10) Sørensen, T.L., Møller, J.V., & Nissen, P. (2004) *Science*, **304**, 1672–1675.
- 11) Asano, S., Tega, Y., Konishi, K., Fujioka, M., & Takeguchi, N. (1996) *J. Biol. Chem.*, **271**, 2740–2745.
- 12) Munson, K., Garcia, R., & Sachs, G. (2005) *Biochemistry*, **44**, 5267–5284.
- 13) Asano, S., Furumoto, R., Tega, Y., Matsuda, S., & Takeguchi, N. (2000) *J. Biochem.*, **127**, 993–1000.
- 14) Hermsen, H.P.H., Koenderink, J.B., Swarts, H.G.P., & DePont, J.J.H.H.M. (2000) *Biochemistry*, **39**, 1330–1337.
- 15) Asano, S., Matsuda, S., Tega, Y., Shimizu, K., Sakamoto, S., & Takeguchi, N. (1997) *J. Biol. Chem.*, **272**, 17668–17674.
- 16) Swarts, H.G.P., Hermsen, H.P.H., Koenderink, J.B., Stekhoven, F.M.A.H.S., & DePont, J.J.H.H.M. (1997) *EMBO J.*, **17**, 3029–3035.
- 17) Luecke, H., Schobert, B., Richter, H.T., Cartailier, J.P., & Lanyi, J.K. (1999) *Science*, **286**, 255–261.
- 18) Morii, M., Ichikawa, T., Sakai, H., Takeguchi, N., & Asano, S. (2005) *J. Gen. Physiol.*, **126**, 19a.
- 19) Koenderink, J.B., Swarts, H.G., Willems, P.H., Krieger, E., & DePont, J.J.H.H.M. (2004) *J. Biol. Chem.*, **279**, 16417–16424.
- 20) Burnay, M., Crambert, G., Kharoubi-Hess, S., Geering, K., & Horisberger, J-D. (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 19237–19244.
- 21) Lindberg, P., Nordberg, P., Alminger, T., Brändström, A., & Wallmark, B. (1986) *J. Med. Chem.*, **29**, 1327–1329.
- 22) Morii, M., Takata, H., Fujisaki, H., & Takeguchi, N. (1990) *Biochem. Pharmacol.*, **39**, 661–667.
- 23) Scott, C.K. & Sundel, E. (1985) *Eur. J. Pharmacol.*, **112**, 268–270.
- 24) Besancon, M., Simon, A., Sachs, G., & Shin, J.M. (1997) *J. Biol. Chem.*, **272**, 22438–22446.
- 25) Asano, S., Yoshida, A., Yashiro, H., Kobayashi, Y., Morisato, A., Ogawa, H., Takeguchi, N., & Morii, M. (2004) *J. Biol. Chem.*, **279**, 13968–13975.
- 26) Kimura, T., Ishizuka, H., Yoshida, A., Morii, M., Takeguchi, N., & Asano, S. (2003) *Biochemistry*, **42**, 4771–4779.
- 27) Melle-Milovanovic, D., Milovanovic, M., Nagpal, S., Sachs, G., & Shin, J.M. (1998) *J. Biol. Chem.*, **273**, 11075–11081.
- 28) Chow, D.C., Browning, C.M., & Forte, J.G. (1992) *Am. J. Physiol.*, **263**, C39–C46.
- 29) Asano, S., Kawada, K., Kimura, T., Grishin, A.V., Caplan, M. J., & Takeguchi, N. (2000) *J. Biol. Chem.*, **275**, 8324–8330.
- 30) Vagin, O., Denevich, S., & Sachs, G. (2003) *Am. J. Physiol.*, **285**, C968–C976.
- 31) Vagin, O., Turdikulova, S., & Sachs, G. (2004) *J. Biol. Chem.*, **279**, 39026–39034.