

## 特集：膜輸送ナノマシンの構造・作動機構と制御

イオン輸送ポンプの分子活性と四量体構造との相関  
～胃  $H^+$ ,  $K^+$ -ATPase の一分子蛍光観察を中心として～阿部 一啓<sup>1</sup>, 嘉屋 俊二<sup>2</sup>

P型 ATPase スーパーファミリーは生体膜を隔てた陽イオンの能動輸送に特化した分子群である。これらのイオンポンプが触媒するイオンの能動輸送は ATP の加水分解と共役した機構で作動する (Post-Albers 機構)。近年、カルシウムポンプの X 線構造解析を始めとする原子モデルの提出により、単量体イオンポンプ分子内での作動機序は原子レベルでの理解が進んでいる。一方で様々な生化学的実験事実は、P型 ATPase が多量体で機能することを示唆しており、生体膜中でのイオンポンプの四次構造は未解決の研究課題である。本稿では主に胃プロトンポンプ ( $H^+$ ,  $K^+$ -ATPase) を対象とした一分子蛍光観察の結果を踏まえ、この分子の多量体構造と分子活性の関係について考察すると共にナトリウムポンプ ( $Na^+$ ,  $K^+$ -ATPase) の最近の多量体構造に関する研究にも触れる。

## 1. はじめに

## 1-1. P型 ATPase

P型 ATPase は生体膜を隔てたイオンの能動輸送を行う膜タンパク質のファミリーである<sup>1-3)</sup>。膜内外での電気化学ポテンシャルに逆らったイオン輸送は ATP の加水分解と共役して達成される。この過程で酵素の活性中心に存在するファミリー間で普遍的に保存された DKTG 配列中のアスパラギン酸残基が自己リン酸化 (phosphorylation) される (リン酸化中間体, EP, 文献 4)。これが P型 ATPase が  $F_0F_1$ -ATPase,  $V_0V_1$ -ATPase, ABC トランスポーター等の

他の ATP 共役型能動輸送ポンプと区別される特徴である。P型 ATPase が輸送するイオンは、そのアイソフォーム (type  $P_1 \sim P_5$ ) によって様々であり、プロトンを輸送するものから重金属イオンを輸送するもの、さらにはリン脂質のフリッパーゼとして機能することが示唆されるもの等が存在する<sup>1)</sup>。中でもその作動機構が最もよく理解されているのは type  $P_2$  のグループであろう。1957年 Jens C. Skou による  $Na^+$ ,  $K^+$ -ATPase の発見以来<sup>5)</sup>、近縁のイオンポンプ ( $Ca^{2+}$ -ATPase<sup>6)</sup>,  $H^+$ ,  $K^+$ -ATPase<sup>7)</sup> 等) が次々と同定され、その作動機序が精力的に研究されてきた。現在ではこれらイオンポンプはイオン輸送サイクル中に大きな構造変化を伴って機能することが知られており<sup>8-10)</sup>、その反応機構は E1, E2 と呼ばれる基質に対して異なる親和性を示す幾つかの中間体を經由した逐次イオン輸送モデルとして広く受け入れられている (図 1, 文献 11-13)。要約すると、細胞内から細胞外へ輸送されるイオンの結合、閉塞に伴って細胞内の ATP を基質として EP を形成し、細胞外から細胞内へと輸送されるイオンの結合によって EP が脱リン酸化されるというサイクルを繰り返すモデルである。

1-2. 胃プロトンポンプとして働く  $H^+$ ,  $K^+$ -ATPase

$H^+$ ,  $K^+$ -ATPase (プロトンポンプ) は胃壁細胞に特異的

<sup>1</sup> 京都大学大学院理学研究科生物物理学教室 (〒606-8502 京都市左京区北白川追分町)

<sup>2</sup> 北海道大学大学院理学研究院化学部門生物化学研究室 (〒060-0810 札幌市北区北 10 条西 8 丁目)

Relationship between activity and tetraprotomeric structure of ion-transporting ATPases

<sup>1</sup> Kazuhiro Abe (Department of Biophysics, Graduate School of Science, Kyoto University, Oiwake, Kitashirakawa, Sakyo-ku, Kyoto, 606-8502, Japan)

<sup>2</sup> Shunji Kaya (Biological Chemistry, Division of Chemistry, Faculty of Science, Hokkaido University, Kita-ku Kita10, Nishi8, Sapporo 060-0810, Japan)

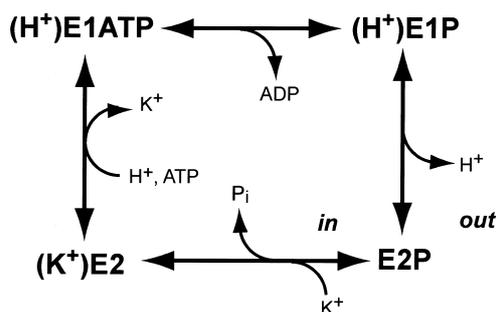


図1 P型ATPaseの反応機構

$H^+$ ,  $K^+$ -ATPaseの単量体モデルによる反応機構 ( $Na^+$ ,  $K^+$ -ATPaseに対するPost-Albers機構に基づく)。細胞内のATPと $H^+$ に対して高い親和性を示すE1中間体がATPとイオンを結合し、これは $Mg^{2+}$ 存在下において加水分解され酵素の活性中心が自己リン酸化された( $H^+$ )E1Pを形成する。これがE2Pへと変換される過程で $H^+$ が細胞外へ排出される。E2状態は細胞外の $K^+$ に対して高い親和性を示し、E2Pは $K^+$ の結合によって脱リン酸化され無機リン酸(Pi)を遊離し $K^+$ を閉塞した( $K^+$ )E2へと移行する。高濃度のATPによって $K^+$ は細胞内へと遊離され、サイクルが繰り返される。1 molのATPを消費することで、2 molの $H^+$ ,  $K^+$ を対向輸送するとされている。反応経路はすべて可逆的である。 $Na^+$ ,  $K^+$ -ATPaseでは $Na^+(\times 3)$ ,  $K^+(\times 2)$ ,  $Ca^{2+}$ -ATPaseでは $Ca^{2+}(\times 2)$ ,  $H^+(\times 2)$ が、 $H^+$ ,  $K^+$ -ATPaseに対する $H^+(\times 2)$ ,  $K^+(\times 2)$ に対応する。

に高発現しており、ATPの加水分解と共役して胃内腔に $H^+$ が、細胞内に $K^+$ が対向輸送される<sup>13,14</sup>。食物消化時の胃内腔のpHは1以下となり(細胞内外のプロトン濃度勾配として約100万倍)タンパク質分解酵素ペプシンに至適環境を作り出している<sup>15</sup>。

$H^+$ ,  $K^+$ -ATPaseは、触媒機能を有する $\alpha$ サブユニットと、酵素の安定性や細胞内での局在を司るとされる $\beta$ サブユニットから構成される $\alpha\beta$ プロトマーを基本的な単位とする<sup>16-18</sup>。分子量約100kDaの $\alpha$ サブユニットはイオン閉塞部位<sup>19,20</sup>、阻害剤結合部位<sup>21</sup>を持つ10回膜貫通領域とATP結合部位<sup>22</sup>やリン酸化部位<sup>23</sup>が存在する細胞内領域を有する。 $\beta$ サブユニットは1回膜貫通型の膜タンパク質で、細胞外部位に三つのジスルフィド結合<sup>24</sup>と七つの糖鎖付加部位<sup>25</sup>を持つ。一次配列から推定される分子量は約35kDaであるが糖鎖付加のため実際は60~80kDaほどになる。

### 1-3. 多量体構造

2000年以降次々と報告された $Ca^{2+}$ -TAPaseの様々な反応中間体での原子モデルは<sup>26-33</sup>、P型ATPase研究の分野に非常に大きなインパクトを与えた。これによると $Ca^{2+}$ -ATPaseはイオン結合部位を含む10回膜貫通ドメインに加え、細胞質領域に存在するN(nucleotide binding)ドメイン、P(phosphorylation)ドメイン、さらにA(actuator)ドメインから構成される。一次配列や機能の相同性からも、他のtype P<sub>2</sub>に属するATPaseも類似した構造であると推測

されている<sup>21,34</sup>。この結晶格子中での非対称ユニットは単量体であり、一分子内にイオン輸送やATP加水分解に必要な構造がすべて備わっている。しかしながら、これまで様々な生化学的実験結果はイオンポンプの多量体構造を示唆してきた<sup>35</sup>。酵素化学的研究<sup>36,37</sup>、基質結合量の化学量論<sup>38-40</sup>、2種の異なるタグを付加した変異体の解析<sup>41</sup>、化学架橋<sup>42,43</sup>や可溶性酵素のゲルろ過クロマトグラフィーによる分離<sup>44,45</sup>、電子顕微鏡観察<sup>38</sup>等はイオンポンプが、二量体( $(\alpha\beta)_2$ ダイプロトマー)又は四量体( $(\alpha\beta)_4$ テトラプロトマー)として機能することを示唆している。一方で、イオンポンプの作動には、単量体で十分であるとする報告もなされており<sup>46,47</sup>、イオンポンプの四次構造は未解決の研究課題である。本稿では胃プロトンポンプを対象とした多量体構造を支持するいくつかの実験結果を紹介する。

## 2. リガンド結合の化学量論によるアプローチ

ブタ胃から調整された膜結合 $H^+$ ,  $K^+$ -ATPase標品を用いて、酵素とそのリン酸化中間体(EP)形成量、ATP結合量の化学量論を比較した(図2、文献48)。 $K^+$ 非存在下で $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATPを基質とした最大EP形成量は、1 mol  $H^+$ ,  $K^+$ -ATPase当たり約0.5 molであり( $K_{0.5}=0.5\mu\text{M}$ )、この値は無機リン酸( $^{32}\text{P}_i$ )を基質とした場合のEP形成量(約1 mol)の半分であった( $K_{0.5}=0.22\text{mM}$ )。EPの定量は酸変性した酵素のPドメインに存在するDKTG配列中のアスパラギン酸残基への $^{32}\text{P}$ の共有結合を測定しているため、非変性状態でのATPの結合量を測定したところ、 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ ATPを基質として用いた場合約0.5 mol ( $K_{0.5}=0.12\text{mM}$ )、 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATPでは約1 molであった( $K_{0.5}=0.15\text{mM}$ )。これらの結果は少なくとも2n量体である $H^+$ ,  $K^+$ -ATPaseの半分の $\alpha\beta$ プロトマーがEPを形成し、もう半分の $\alpha\beta$ プロトマーがATPを結合した状態(EP:EATP)であること

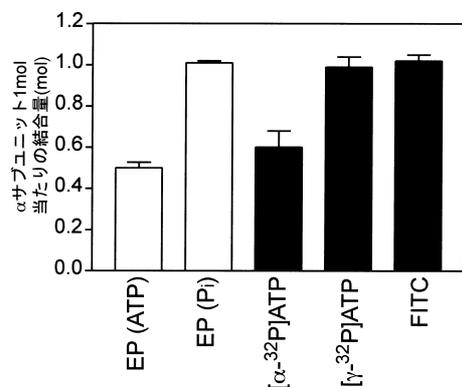


図2 基質結合量の化学量論

ATP, P<sub>i</sub>を基質としたリン酸化中間体形成量(酸変性状態での共有結合(□)、非変性状態(■))での $[\alpha\text{-}, \gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ の結合量、FITCの結合量を $\alpha$ サブユニット1 mol当りの値として比較した。

を示している。さらに  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$  ATP を用いたトレーサー実験の結果から 1 mol の  $\text{E}^{32}\text{P}$  と 1 mol の  $\text{EAT}^{32}\text{P}$  の加水分解の結果 2 mol の  $^{32}\text{P}_i$  が遊離することが示唆された<sup>48)</sup>。最近の報告では  $\text{K}^+$  競合阻害剤である imidazonaphthyridine の結合量が 1 mol  $\text{H}^+, \text{K}^+$ -ATPase 当たり約 0.5 mol であると報告されており<sup>49)</sup>、これらの結果を考え合わせると、 $\text{H}^+, \text{K}^+$ -ATPase はその酵素反応中に多量体間でクロストークすることによってハーフサイトでのリン酸化と ATP の結合を維持し、それぞれが ATP の加水分解を行うように見える。

### 3. 一分子蛍光観察による多量体の解析

#### 3-1. $\text{H}^+, \text{K}^+$ -ATPase の $\text{C}_{12}\text{E}_8$ による可溶化

前述の酵素化学的実験によって機能的な側面からの多量体構造の必然性が示唆されたが、機能単位としての  $\alpha\beta$  プロトマーの会合数を明確に決定するには至らなかった。これまで、P 型 ATPase の会合数に関する検討は可溶化した標品の超遠心による分析またはゲルろ過クロマトグラフィーによって行われていたが<sup>50-53)</sup>、酵素化学的実験も含めてこれらは平衡状態の解析結果であり、個々の分子（またはその会合体）の平均値を捉えていることになる。そこで一分子蛍光観察<sup>54,55)</sup>の手法を用いて個々の機能単位をより直接的に検出し多量体の会合数を決定することを計画した。蛍光プローブ fluorescein 5'-isothiocyanate (FITC) によって  $\text{H}^+, \text{K}^+$ -ATPase は部位特異的に 1:1 の化学量論で標識されることが知られており<sup>56)</sup>、一つの  $\alpha\beta$  プロトマーの目印としてこれを採用した。FITC 標識した  $\text{H}^+, \text{K}^+$ -ATPase 膜画分は高密度の  $\text{H}^+, \text{K}^+$ -ATPase を含むため、個々の機能単位を分離した輝点として認識できなかつたので、界面活性剤によって可溶化後カバーガラス上に分散させ一分子蛍光観察を行うこととした<sup>57)</sup>。

基質非存在下において  $\text{H}^+, \text{K}^+$ -ATPase を octaethylene

glycol dodecylether ( $\text{C}_{12}\text{E}_8$ ) で可溶化すると、回収された  $\text{H}^+, \text{K}^+$ -ATPase は殆ど失活し膜標品に比べて約 5% 程度の比活性しか示さなかつた。しかし輸送基質である  $\text{K}^+$  存在下で可溶化することによって、 $\text{K}^+$  濃度に依存して上清の比活性は上昇し、最大で約 41% (ATPase 活性)、51% (pNPPase 活性) に達した (図 3A)。

FITC による  $\text{H}^+, \text{K}^+$ -ATPase の標識は ATP 結合部位に存在する Lys518 に特異的な反応であり、その結合量は 1 mol の  $\alpha\beta$  プロトマーに対して約 1 mol である (図 2, 文献 54)。この修飾によって ATP の結合能を失うため ATPase 活性は検出されなくなるが、ATP と比べて低分子量のリン酸化化合物である *p*-nitrophenyl phosphate (pNPP) を加水分解する活性 (pNPPase 活性) は影響を受けない。FITC 修飾された  $\text{H}^+, \text{K}^+$ -ATPase (FITC- $\text{H}^+, \text{K}^+$ -ATPase) を  $\text{C}_{12}\text{E}_8$  によって可溶化した場合も、非修飾  $\text{H}^+, \text{K}^+$ -ATPase と同様に  $\text{K}^+$  存在下において最大約 56% の pNPPase 活性を示した (図 3A)。また  $\text{K}^+$  による可溶化時の活性の保護効果は他の一価陽イオン ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{Li}^+$ , choline<sup>+</sup>) では置き換えられず、 $\text{K}^+$  とその同族体である  $\text{Rb}^+$  に特異的であり、加える陰イオン (Hayashi, Y. personal communication) においても有意な差は見られなかつた (図 3B)。

#### 3-2. 全反射蛍光顕微鏡 (Total Internal Reflection Fluorescence Microscope, TIRFM) による FITC- $\text{H}^+, \text{K}^+$ -ATPase の観察

FITC- $\text{H}^+, \text{K}^+$ -ATPase を可溶化しカバーガラス表面に吸着した分子を全反射蛍光顕微鏡 (TIRFM) によって観察した。TIRFM はエバネッセント光を利用して蛍光物質の励起を行うため、カバーガラスと溶液の界面近傍 (~200 nm) に存在する蛍光物質のみが励起され、溶液中に存在する大部分の蛍光物質は励起されない。この照明法によっ

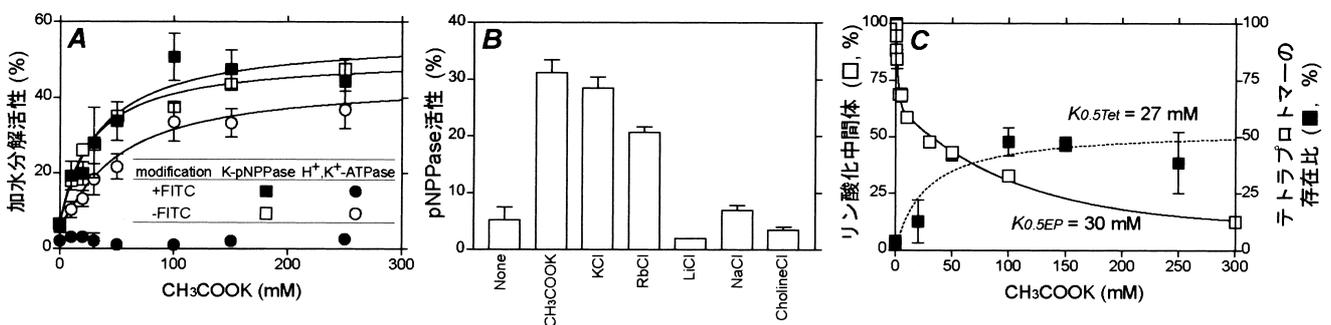


図3  $\text{C}_{12}\text{E}_8$  可溶化  $\text{H}^+, \text{K}^+$ -ATPase の活性の  $\text{K}^+$  濃度依存性

(A) 種々の濃度の  $\text{K}^+$  存在下において  $\text{C}_{12}\text{E}_8$  によって可溶化した FITC 修飾 (●, ■) 非修飾 (○, □)  $\text{H}^+, \text{K}^+$ -ATPase の ATPase 活性 (●, ○) pNPPase 活性 (■, □) を示した。各標品の比活性は膜結合標品の比活性を 100% として算出した。FITC 修飾  $\text{H}^+, \text{K}^+$ -ATPase 標品は ATPase 活性が殆ど検出されないため、非修飾膜標品の活性を 100% としてプロットした。

(B) 図中に示した塩の存在下 (100mM)、非存在下において  $\text{C}_{12}\text{E}_8$  によって可溶化した FITC- $\text{H}^+, \text{K}^+$ -ATPase の pNPPase 活性。値は膜結合標品の pNPPase 活性を 100% として表示した。(C) 定常状態での EP 形成量の  $\text{K}^+$  濃度依存性 (□)、TIRFM によって見積もったテトラプロトマーの存在比 (■) を比較のために表示した。

て通常の蛍光顕微鏡と比べてバックグラウンドが強く抑えられ、一分子の発する微弱な蛍光を観察することが可能になった<sup>58)</sup>。一分子の発する蛍光の特徴として、蛍光強度が量子的な分布を示すこと、蛍光の消光が段階的に起こることが挙げられる。つまり一つの蛍光物質の発する蛍光強度は一定であり、それが励起光の照射によって消光するときには、序々にではなくあるとき突然消光する。FITC 標識  $H^+, K^+$ -ATPase においてもこの特徴が観察された (図 4C-F)。

$C_{12}E_8$  可溶化 FITC- $H^+, K^+$ -ATPase をカバーガラス上に分散させ TIRFM を用いて観察すると、明るさの異なる輝点として観察される (図 4A, B) ここで  $H^+, K^+$ -ATPase 分子が多量体として会合していたとしても、光学顕微鏡の分解能ではそれを個々の輝点として分離できない。そこで一つの輝点の励起光照射直後の輝度 (初期輝度) と、その蛍

光の消光する軌跡を基準として、会合数を評価することとした。

FITC- $H^+, K^+$ -ATPase を SDS によって可溶化すると、酵素活性は完全に消失し、 $\alpha\beta$  プロトマーは  $\alpha$  サブユニットと  $\beta$  サブユニットにまで分離される。TIRFM で観察された蛍光スポットは、ほとんどすべてが一分子蛍光に特有の一段階の消光パターンを示した (図 4C)。初期輝度の分布は約 11.2 A.U. を中央値とした 1 成分のガウス分布を示した (図 5A) すなわちこの明るさが一分子の FITC から発せられる蛍光強度と言える。また FITC による同一分子内での二重標識はほとんどないことがわかる。

$K^+$  非存在下において  $C_{12}E_8$  により可溶化された FITC- $H^+, K^+$ -ATPase の TIRFM による蛍光観察では、SDS で可溶化された標品とほぼ同じ強度の位置に大部分の蛍光スポットの初期輝度が分布し、加えてこれの約 2 倍の強度に

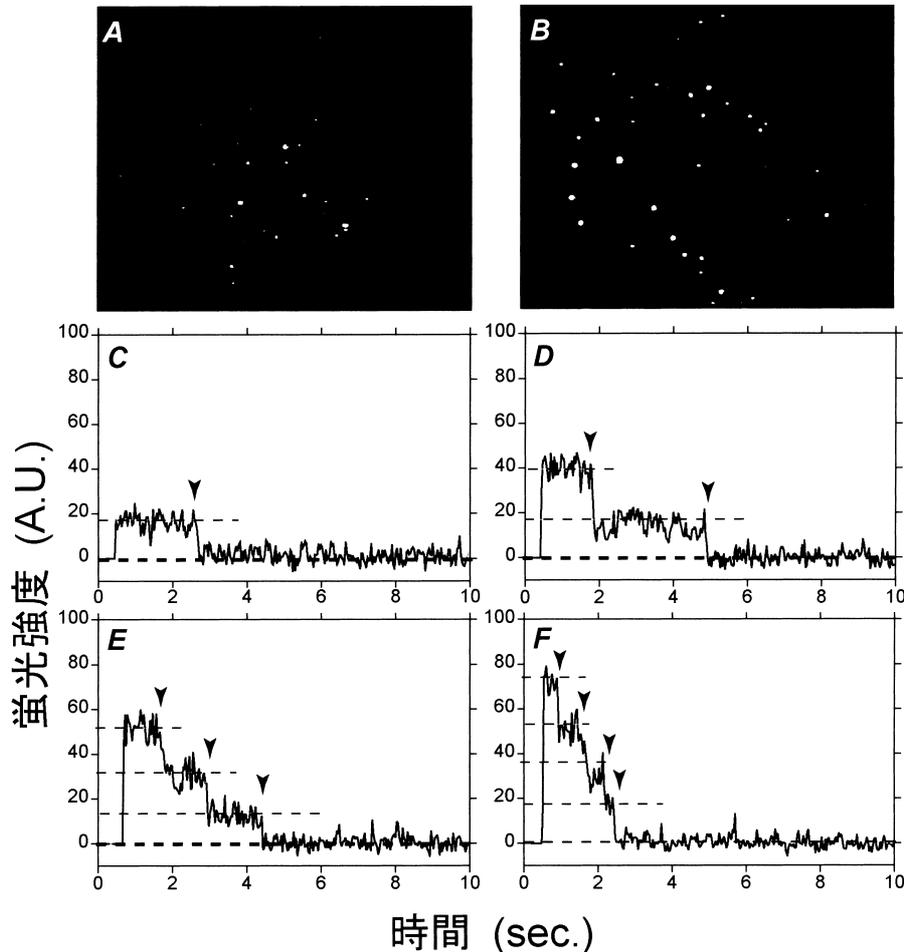


図 4 全反射蛍光顕微鏡 (TIRFM) による FITC- $H^+, K^+$ -ATPase の一分子蛍光観察  
TIRFM によって  $K^+$  非存在下 (A), 100mM  $CH_3COOK$  存在下 (B) において  $C_{12}E_8$  で可溶化した FITC- $H^+, K^+$ -ATPase をカバーガラス上に分散させ、励起光照射直後からの各単一蛍光スポットの蛍光強度の経時変化を追跡した (C-F)。一分子蛍光観察に特徴的な 1 段階 (C) や数 (2-4) 段階 (D-F) の消光の典型的な観察例。量子的な退色が矢印で示した時点で起こっているのが分かる。

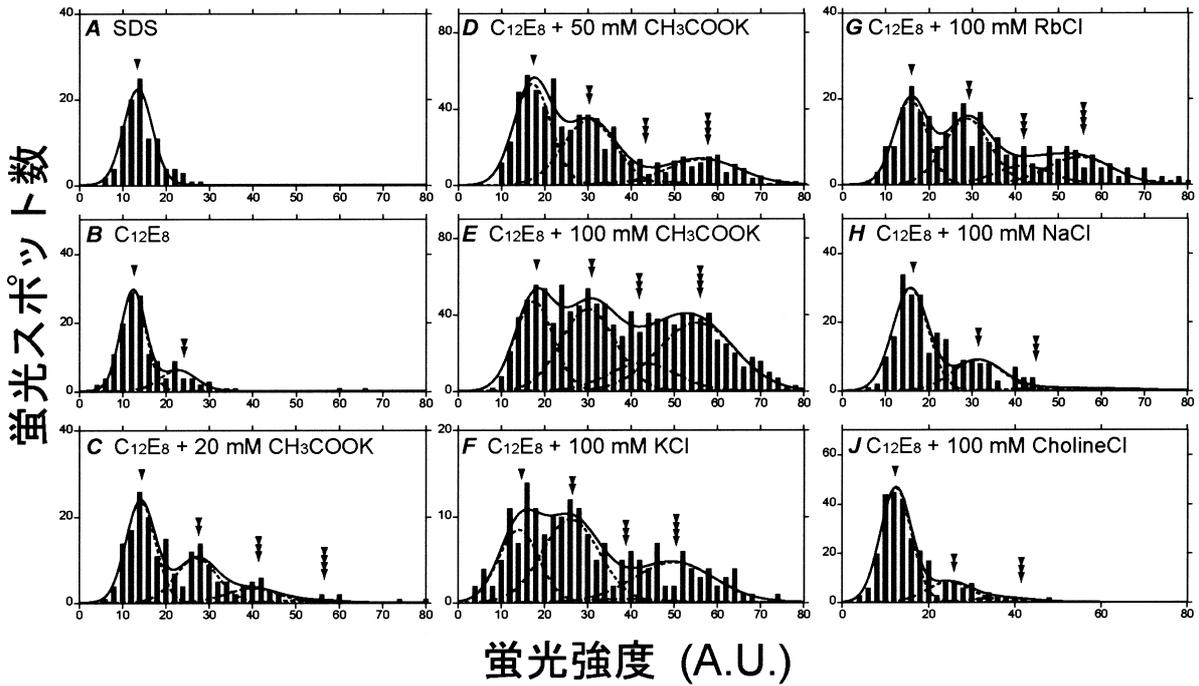


図5 蛍光スポット初期輝度のヒストグラム

(A) 一分子のFITCが発する蛍光強度の標準として、SDSで可溶化したFITC-H<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPaseの初期輝度分布を示した。ガウス分布によってフィットされた中央値はバックグラウンドを除くと11.2 A.U.であった。(B-I) 図中に示した条件下でC<sub>12</sub>E<sub>8</sub>によって可溶化されたFITC-H<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPaseの蛍光強度分布。4成分のガウス分布によってフィットした(実線は4成分の和。破線が各成分のガウス分布)。1-4個のFITCに対応する蛍光強度の値をそれぞれの個数の矢尻で示した。

当たる位置にもマイナーピークが見られた(図4A, 図5B)。それぞれのピークはプロトマーとダイプロトマーに対応すると考えられる。可溶化時のK<sup>+</sup>濃度を上昇させた標品の蛍光観察では、初期輝度の高い蛍光スポットの割合が増加してきた。これら明るい輝点は多段階の消光を示すことが多く、数分子が会合したものと考えられる(図4B, 図5C-E)。

### 3-3. 可溶化標品中の多量体の存在比と残存酵素活性の相関

多量体の分布とC<sub>12</sub>E<sub>8</sub>可溶化標品中のpNPPase活性とを比較するために、同様に処理した標品に含まれる多量体の存在比のK<sup>+</sup>濃度依存性について検討した。分子の会合数の決定は、その輝点の初期輝度の分布から求めた。TIRFMで観察された輝点の数をその初期輝度に対するヒストグラムとして表示、サンプル毎に得られるヒストグラムを4成分のガウス分布でフィッティングし、存在する多量体の割合を算出した。共存するK<sup>+</sup>濃度に依存してプロトマーの明るさ(図5中矢尻)の約4倍の位置に現れるピークの量(図5中4重矢尻)、すなわちテトラプロトマーの存在比が上昇しているのがわかる(図5B-E)。各種多量体の存在比は、初期輝度のヒストグラムの各ガウス成分の面積に、そのフラクションに含まれる分子数を掛けて求め

た。これは、1個の輝点を含むαβプロトマーが多量体の場合一つではなく、たとえば1個のテトラプロトマーに対応する輝点は4個のプロトマーを含むためである。

K<sup>+</sup>としてKClを用いた場合や(図5F)、K<sup>+</sup>の同族体であるRb<sup>+</sup>を用いた場合でも(図5G)テトラプロトマーの存在を示すピークが認められるが、Na<sup>+</sup>(図5H)やcholine<sup>+</sup>(図5J)ではプロトマーやダイプロトマーが大部分を占めることが分かる。

C<sub>12</sub>E<sub>8</sub>可溶化FITC-H<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPaseの残存活性と各種多量体との関係を検討するために、様々な濃度のK<sup>+</sup>存在下で可溶化した標品のpNPPase活性とTIRFMによる蛍光観察で見積もった多量体の存在比を比較した(図6)。プロトマー(相関係数r=-0.93)、ダイプロトマー(r=-0.42)、トリプロトマー(r=-0.12)、がそれぞれ負の相関、もしくは相関関係を示さないのに対し、テトラプロトマー(r=0.93)のみが強い正の相関を示した。また相関を示す直線の傾きが1に近いことから、膜標品に対する残存pNPPase活性の割合とテトラプロトマーの存在比が非常に近いことが分かる。FITCによる標識を行わなかったC<sub>12</sub>E<sub>8</sub>可溶化H<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase標品においても、pNPPase、ATPase活性はFITC-H<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPaseのpNPPase活性と非常に近い値を示す(図3A)。自ずと、これら非修飾標品のATPase活性と、TIRFMによって見積もられた各種多量体の存在

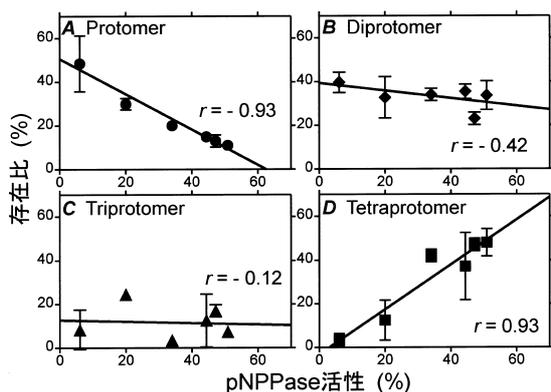


図6 多量体の存在比と残存活性の相関

種々の濃度の  $K^+$  存在下において  $C_{12}E_8$  で可溶化した FITC- $H^+$ ,  $K^+$ -ATPase 標品中のプロトマー (A) ダイプロトマー (B) トライプロトマー (C) テトラプロトマー (D) の存在比を, 対応する pNPPase 活性に対してプロットした. 相関係数 ( $r$ ) は図中に記した. 各種多量体の存在比は [図5におけるガウス分布の面積] と [その多量体を含むプロトマーの個数] の積としてプロットした (本文参照).

比 (FITC- $H^+$ ,  $K^+$ -ATPase) との相関関係は, FITC- $H^+$ ,  $K^+$ -ATPase の pNPPase 活性との相関と近い値を示した (テトラプロトマーとの相関係数  $r=0.85$ ). これらの結果は,  $C_{12}E_8$  によって可溶化された  $H^+$ ,  $K^+$ -ATPase のテトラプロトマーが酵素活性を保持していることを示唆している.

### 3-4. 輸送基質 $K^+$ がもたらす活性と四次構造保護の効果

テトラプロトマーが活性発現に重要な多量体であるとする結果は, octyl glucoside で可溶化した  $H^+$ ,  $K^+$ -ATPase の多量体の存在比を TIRFM やゲルろ過クロマトグラフィーで見積もった以前の報告<sup>59)</sup>とも合致する. この報告においてもプロトマーとトライプロトマーの存在比は非常に低く, 今回観察された  $K^+$  濃度に依存したテトラプロトマーの上昇 (図6D) と, これに反したダイプロトマー, プロトマーの存在比の減少 (図6A, B), また  $K^+$  濃度に関係なく常に低いトライプロトマーの存在比 (図6C) を考え合わせると, テトラプロトマーの界面活性剤による解離はダイプロトマーを経由して起こることが考えられる.

膜タンパク質の可溶化はその活性保護のためにしばしば基質存在下で行われる.  $H^+$ ,  $K^+$ -ATPase は  $K^+$  の結合によって構造変化し ( $K^+$ )E2 状態に遷移する (図1). EP 形成量の  $K^+$  添加による減少は  $E2P \rightarrow (K^+)E2$  への中間体の遷移を反映しており, この EP 量減少の  $K^+$  に対する親和性は  $K_{0.5EP} = 30\text{mM}$  であった. 一方でテトラプロトマーの存在比の上昇の  $K^+$  濃度依存性は  $K_{0.5tet} = 27\text{mM}$  であり, 両者は非常に近い値を示す (図3C). このことは  $K^+$  による活性発現とテトラプロトマーの保護効果は, 基質結合部位の保護というより, むしろ膜中での酵素の三次構造変化によるものであることを示唆している. 膜結合  $H^+$ ,  $K^+$ -

ATPase をトリプシンによって切断した後も  $Rb^+$  が閉塞されたままであるという報告<sup>60)</sup>からも,  $K^+$  の膜貫通ドメインにおける結合は酵素の三次構造を安定化するのに寄与していることが考えられる. このような基質結合に依存した構造変化によって, テトラプロトマー内におけるプロトマー間でのインターフェースの環境を変化させ, 結果として疎水的な面や結合しているリン脂質への界面活性剤のアクセシビリティが変化するのかもしれない. Kv チャンネルの T1 ドメインの折りたたみとテトラマー形成が共役しているという報告<sup>61)</sup>がなされており, 多量体を形成する膜タンパク質の三次-四次構造の共役というのは共通の特徴なのかもしれない.

### 4. $Na^+$ , $K^+$ -ATPase 多量体構造に関する最新の知見

ブタ腎臓より精製した  $Na^+$ ,  $K^+$ -ATPase 膜標品を用いた, ATP, pNPP 共存下における両基質の加水分解活性, ならびに EP 形成量, ATP 結合量の詳細な結果が報告された. 飽和濃度の pNPP 存在下での  $Na^+$ -pNPPase 活性は, 低濃度の ATP の添加によって活性化された. この  $Na^+$ -pNPPase 活性の亢進 (ATP 非存在下の約 1.7 倍) に対する ATP の親和性 ( $0.37\mu\text{M}$ ) は, ATP からの EP 形成に対する親和性 ( $0.33\mu\text{M}$ ) と非常に近い値であった. また, この  $Na^+$ -pNPPase 活性亢進の効果は ATP に特異的であり, 他の ATP 類似体 (ADP, AMPPCP) やアセチルリン酸 ( $Na^+$  に依存した EP 形成を行う) では観察されなかった. これらの結果は EP 形成に先立って起こる ATP 結合によって引き起こされる構造変化が, 隣接するプロトマーの酵素活性に影響を及ぼし pNPPase 活性の促進を誘導したことを示唆しており, プロトマー間での相互作用を介して四量体ポンプが機能する反応モデルが提示されている<sup>62)</sup>.

林らのグループはイヌ腎臓より高度に精製された  $C_{12}E_8$  可溶性  $Na^+$ ,  $K^+$ -ATPase 標品を用いて, 存在するイオンやリン脂質 (phosphatidylserine) によってプロトマー (P), ダイプロトマー (D) 及びテトラプロトマー (T) の存在比が変化すること<sup>63)</sup>,  $Na^+$ ,  $K^+$ -ATPase 活性が  $P:D:T=13:11:8$  であり, プロトマー当たりの高親和性の ATP 結合量が  $P:D:T=1:1:0.5$  であること<sup>45)</sup>, さらに阻害剤 ouabain の結合量が  $P:D:T=1:1:0.75$  であることを<sup>64)</sup>, ゲルろ過クロマトグラフィーを用いた研究によって示している. 著者らは膜結合標品との活性の比較からテトラプロトマーが膜中での主たる成分であると結論しており<sup>45)</sup>, 四量体構造の維持は活性発現を抑制的に制御している可能性が示された.

以前から  $Na^+$ ,  $K^+$ -ATPase が EP 形成条件下において, システイン架橋試薬  $Cu^{2+}$ -phenanthroline によって  $\alpha$ - $\alpha$  間でのダイマーを形成することが知られている<sup>65)</sup>. 細胞内ドメインに存在するシステイン残基をセリンに変異させた実験で

は、NドメインのATP結合部位の裏側の領域に存在するC456S, C457S変異体においてダイマー間での架橋が著しく減少したことから、この部位がダイマーの境界に存在する可能性がある<sup>66)</sup>。また、異なるタグを付加したNa<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPaseの細胞内ドメインを用いたpull-down assayや<sup>67)</sup>、野生型とATP結合ドメイン欠損変異体を用いた<sup>41)</sup>結果から、細胞内ドメイン同士での相互作用が示唆された。このように多量体の相互作用にATPの結合や、自己リン酸化といった触媒反応を司る細胞内ドメインが寄与しているという実験結果は、EP形成をハーフサイトに止めるという<sup>35)</sup>多量体内での相互作用による活性制御機構の理解に繋がるかもしれない。

## 5. おわりに

以上本稿では、H<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPaseを対象として行った多量体モデルを想定した酵素化学的研究結果、及び多量体の蛍光による直接観察の結果を取り上げた。豊島らによるCa<sup>2+</sup>-ATPaseのX線結晶解析によって、P型ATPase研究はポストストラクチャーの段階に突入しつつある。今後P型ATPaseの多量体による活性制御機構の理解のためには、更なる酵素化学的研究とともに、原子レベルでの構造-機能の理解が不可欠である。

最後に、ここに紹介した一連の研究に関わった共同研究者である北海道大学大学院理学研究院化学部門 坂口和靖先生、今川敏明先生、北海道大学名誉教授 谷口和弥先生、杏林大学医学部 林雄太郎先生、通信総合研究所 大岩和弘先生に深謝いたします。

## 文 献

- Axelsen, K.B. & Palmgren, M.G. (1998) *J. Mol. Evol.*, **46**, 84-101.
- Lutsenko, S. & Kaplan, J.H. (1995) *Biochemistry*, **34**, 15607-15612.
- Kuhlbrant, W. (2004) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **5**, 282-295.
- Post, R.L. & Kume, S. (1973) *J. Biol. Chem.*, **248**, 6993-7000.
- Skou, J.C. (1957) *Biocim, Biophys. Acta*, **23**, 394-401.
- Hasselbach, W. & Makinose, M. (1961) *Eur. J. Biochem.*, **333**, 518-528.
- Ganser, A.L. & Forte, J.G. (1973) *Biochim. Biophys. Acta*, **307**, 169-180.
- Jørgensen, P.L. & Andersen, J.P. (1988) *J. Membr. Biol.*, **103**, 95-120.
- Taniguchi, K., Suzuki, K., & Iida, S. (1982) *J. Biol. Chem.*, **257**, 10659-10667.
- Helmich-de Jong, M.L., Van Ermst-De Vries, S.E., & De Pont, J.J.H.H.M. (1987) *Biochim. Biophys. Acta*, **905**, 358-370.
- Post, R.L., Kume, S., Tobin, T., Orcutt, B., & Sen, A.K. (1969) *J. Gen. Physiol.*, **54**, 306S-326S.
- Albers, R.W. (1976) in *The Enzymes of Biological Membranes* (Martonossi, A., ed.), Vol. 3, pp. 35-114, Plenum Publishing Corp.
- Rabon, E.G. & Reuben, M.A. (1990) *Annu. Rev. Physiol.*, **52**, 321-344.
- Klaassen, C.H.W. & De Pont, J.J.H.H.M. (1994) *Cell. Physiol. Biochem.*, **4**, 115-134.
- Forte, J.D., Machen, T.E., & Obrink, K.J. (1980) *Annu. Rev. Physiol.*, **42**, 111-126.
- Asano, S., Tega, Y., Konishi, K., Fujioka, M., & Takeguchi, N. (1996) *J. Biol. Chem.*, **271**, 2740-2745.
- Asano, S., Matsuda, S., Tega, Y., Shimizu, K., Sakamoto, S., & Takeguchi, N. (1997) *J. Biol. Chem.*, **272**, 17668-17674.
- Hermens, H.P., Swarts, H.G., Koenderink, J.B., & De Pont, J.J.H.H.M. (1998) *Biochem. J.*, **331**, 465-472.
- Beascon, M., Simon, A., Sachs, G., & Shin, J.M. (1997) *J. Biol. Chem.*, **272**, 22438-22446.
- Koenderink, J.B., Swarts, H.G., Willems, P.H., Krieger, E., & De Pont, J.J.H.H.M. (2004) *J. Biol. Chem.*, **279**, 16417-16424.
- Munson, K., Garcia, R., & Sachs, G. (2005) *Biochemistry*, **44**, 5267-5284.
- Tamura, S., Tagaya, M., Maeda, M., & Futai, M. (1989) *J. Biol. Chem.*, **264**, 8580-8584.
- Walderhang, M.O., Post, R.L., Saccomani, G., Leonard, R.T., & Briskin, D.P. (1985) *J. Biol. Chem.*, **260**, 3852-3859.
- Chow, D.C., Browning, C.M., & Forte, J.G. (1992) *Am. J. Physiol.*, **263**, C39-46.
- Chow, D.C. & Forte, J.G. (1993) *Am. J. Physiol.*, **265**, C1562-1570.
- Toyoshima, C., Nakasako, M., Nomura, H., & Ogawa, H. (2000) *Nature*, **405**, 647-655.
- Toyoshima, C. & Nomura, M. (2002) *Nature*, **418**, 605-611.
- Sørensen, T.L., Møller, J.V., & Nissen, P. (2004) *Science*, **304**, 1672-1675.
- Toyoshima, C. & Mizutani, T. (2004) *Nature*, **430**, 529-535.
- Toyoshima, C., Nomura, H., & Tsuda, T. (2004) *Nature*, **432**, 361-368.
- Olsen, C., Sørensen, T.L., Nielsen, R.G., Møller, J.V., & Nissen, P. (2004) *Science*, **306**, 2251-2255.
- Obara, K., Miyashita, N., Xu, C., Toyoshima, I., Sugita, Y., Inesi, G., & Toyoshima, C. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 14489-14496.
- Jensen, A.L., Sørensen, T.L., Olesen, C., Møller, J.V., & Nissen, P. (2006) *EMBO J.*, **25**, 2305-2314.
- Ogawa, H. & Toyoshima, C. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 15977-15982.
- Taniguchi, K., Kaya, S., Abe, K., & Mårdh, S. (2001) *J. Biochem. (Tokyo)*, **129**, 335-342.
- Nakamura, J., Tajima, G., Sato, C., Furukohri, T., & Konishi, K. (2002) *J. Biol. Chem.*, **277**, 24180-24190.
- Tsuda, T., Kaya, S., Yokoyama, T., Hayashi, Y., & Taniguchi, K. (1998) *J. Biol. Chem.*, **273**, 24334-24338.
- Yokoyama, T., Kaya, S., Abe, K., Taniguchi, K., Katoh, T., Yazawa, M., Hayashi, Y., & Mårdh, S. (1999) *J. Biol. Chem.*, **274**, 31792-31796.
- Morii, M., Hayata, Y., Mizoguchi, K., & Takeguchi, N. (1996) *J. Biol. Chem.*, **271**, 4068-4072.
- Eguchi, H., Kaya, S., & Taniguchi, K. (1993) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **196**, 294-300.
- Langhery, M., Todd, M., & Kaplan, J.H. (2004) *J. Biol. Chem.*, **279**, 36339-36348.
- Ivanov, A.V., Modyanov, N.N., & Askari, A. (2002) *Biochem.*

- J.*, 364, 293–299.
- 43) Shin, J.M. & Sachs, G. (1996) *J. Biol. Chem.*, **271**, 1904–1908.
- 44) Lacapere, J.J., Robert, J.C., & Soumarmon, A.T. (2000) *Biochem. J.*, **345**, 239–245.
- 45) Hayashi, Y., Shinji, N., Tahara, Y., Hagiwara, E., & Takenaka, H. (2003) *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **986**, 232–234.
- 46) Martin, D.W., Marecek, J., Scarlata, S., & Sachs, J.R. (2000) *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **97**, 3195–3200.
- 47) Craig, W.S. (1982) *Biochemistry*, **21**, 5707–5717.
- 48) Abe, K., Kaya, S., Imagawa, T., & Taniguchi, K. (2002) *Biochemistry*, **41**, 2438–2445.
- 49) Shin, J.M., Grundler, G., Senn-Bilfinger, J., Simon, W.A., & Sachs, G. (2005) *Biochemistry*, **44**, 16321–16332.
- 50) Brotherus, J.R., Jacobsen, L., & Jørgensen, P.L. (1983) *Biochim. Biophys. Acta*, **731**, 290–303.
- 51) Andersen, J.P., Møller, J.V., & Jørgensen, P.L. (1982) *J. Biol. Chem.*, **257**, 8300–8307.
- 52) Hayashi, Y., Mimura, K., Matsui, H., & Takagi, T. (1989) *Biochim. Biophys. Acta*, **983**, 217–229.
- 53) Hayashi, Y., Takagi, T., Maezawa, S., & Matsui, H. (1983) *Biochim. Biophys. Acta*, **748**, 153–167.
- 54) Funatsu, Y., Harada, Y., Tokunaga, M., & Yanagida, T. (1995) *Nature*, **374**, 555–559.
- 55) Oiwa, K., Eccleston, J.F., Anson, M., Kikumoto, M., Davis, C. T., Reid, G.P., Ferenczi, M.A., Corrie, J.E.T., Yamada, A., Nakayama, H., & Trentham, D.R. (2000) *Biophys. J.*, **78**, 3048–3071.
- 56) Jackson, R.J., Mendlein, J., & Sachs, G. (1983) *Biochim. Biophys. Acta*, **731**, 9–15.
- 57) Abe, K., Kaya, S., Taniguchi, K., Hayashi, Y., Imagawa, T., Kikumoto, M., Oiwa, K., & Sakaguchi, K. (2005) *J. Biochem. (Tokyo)*, **138**, 293–301.
- 58) Gill, C., Brockwell, D., & Smith, A. (2006) *Handbook of Single Molecule Fluorescence Spectroscopy*, Oxford University Press Inc., New York.
- 59) Abe, K., Kaya, S., Hayashi, Y., Imagawa, T., Kikumoto, M., Oiwa, K., Katoh, T., Yazawa, M., & Taniguchi, K. (2004) *Biochemistry*, **42**, 15132–15138.
- 60) Rabon, E.C., Smillie, K., Seru, V., & Rabon, R. (1993) *J. Biol. Chem.*, **268**, 8012–8018.
- 61) Robinson, J.M. & Deutsch, C. (2005) *Neuron*, **45**, 223–232.
- 62) Tanoue, K., Kaya, S., Hayashi, Y., Abe, K., Imagawa, T., Taniguchi, K., & Sakaguchi, K. (2006) *J. Biochem. (Tokyo)*, **140**, 599–607.
- 63) Shinji, N., Tahara, Y., Hagiwara, E., Kobayashi, T., Mimura, K., Takenaka, H., & Hayashi, Y. (2003) *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **986**, 235–237.
- 64) Hayashi, Y., Shinji, N., Tahara, Y., Hagiwara, E., & Takenaka, H. (2005) *J. Gen. Physiol.*, **126**, 36a.
- 65) Askari, A. (2000) in *Na/K-ATPase and related ATPases* (Taniguchi, K. & Kaya, S. eds.), pp. 17–26, Elsevier Science, Amsterdam, Netherlands.
- 66) Kaya, S., Imagawa, T., Sakaguchi, K., & Taniguchi, K. (2005) *J. Gen. Physiol.*, **126**, 36a–37a.
- 67) Costa, C.J., Gatto, C., & Kaplan, J.H. (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 9176–9184.
-