

特集：膜輸送ナノマシンの構造・作動機構と制御

Na⁺/H⁺交換輸送タンパク質の作動機構と制御： 細菌からヒトまで

金澤 浩, 三井 慶治, 松下 昌史

Na⁺/H⁺交換輸送タンパク質は、細菌、酵母からヒトに至るまで広く生物界に存在し、細胞内のpH、Na⁺、Li⁺、K⁺イオン量の制御や細胞内浸透圧制御に重要な役割を有している。見かけ上同じ機能を持つこの交換輸送タンパク質の一次構造は生物種により大きく異なっている。いずれのアイソフォームにおいてもイオン輸送の分子機構は、不明である。異なるアイソフォームで分子内でのイオン輸送の機構は同じなのか、またその制御機構はどのような特徴を持つのか、問題が多く残されている。こうした疑問に答える基盤として、細菌、酵母、哺乳類のNa⁺/H⁺交換輸送体の構造・制御について、筆者らが分子レベルで明らかにしてきた点を中心に述べる。

1. はじめに

細胞内のpH、Na⁺、浸透圧の制御は、生命維持の基本的要件である。こうした細胞内のイオンの量や浸透圧の制御は、細胞質膜や細胞内小胞膜に存在するNa⁺/H⁺交換輸送タンパク質 (Na⁺/H⁺アンチポーターとも呼ばれる。Nha; Na⁺/H⁺ antiporter または NHE; Na⁺/H⁺ exchanger と省略) によって主として行われている¹⁻³⁾。細菌や酵母には、細胞膜に存在するH⁺輸送性ATPaseが形成する細胞内外のH⁺勾配により駆動されるNhaが存在する(図1A)。一方、哺乳類細胞では、細胞膜のNa⁺、K⁺交換輸送性ATPaseによって形成されるNa⁺勾配により駆動されるNHEが存在する。これまで、NhaやNHEは、多様な構造を有するアイソフォームから成る大きなファミリーを形成することが明らかになっている。構造上の多様性について

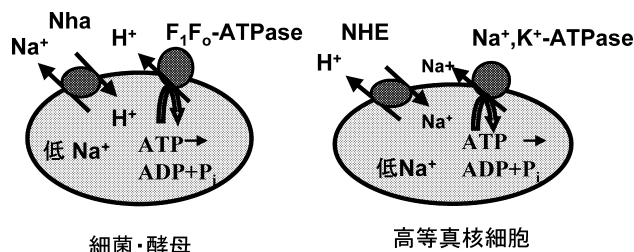


図1A 細菌・酵母、哺乳類細胞におけるNa⁺/H⁺交換輸送タンパク質とエネルギー共役。細胞内のNa⁺濃度は20 mM程度の低いレベルに保たれている。pHは通常7.2付近に保たれている。

は、例えば哺乳類NHEと細菌Nhaの間にはほとんど相同性がない点は注目に値する。このようにNa⁺/H⁺交換輸送という同じ機能を有するものが、なぜ多様な構造を有するのか、またそれぞれはどのような生理的な役割を有するのか、不明な点が多く残されている。また、こうしたNHEやNhaの制御についても、発現部位や構造の多様性から推測して、極めて多様な機構が存在すると考えられるが、全貌は明らかではない。NhaやNHEにおけるNa⁺/H⁺交換輸送の分子機構の解明は緒についたばかりであり、他の二次能動輸送タンパク質と同様に不明な点が多く残されている。ここに掲げたような問題を解明する試みは、現在世界的に進んでいる。本小論では、筆者らの数年にわたる研

大阪大学大学院理学研究科生物科学専攻 (〒560-0043 豊中市待兼山町1-1)

Na⁺/H⁺ antiporters from bacteria to human:
Ion transport mechanism and regulatory factors
Hiroshi Kanazawa, Keiji Mitusi, and Masafumi Matsushita
(Department of Biological Sciences, Graduate School of Science, Osaka University, 1-1 Machikaneyama-cho, Toyonaka City, Osaka 560-0043, Japan)

究成果を中心にこれらの問題のいくつかについて、研究の現状を紹介したい。

2. 哺乳類 NHE の多様性と機能

1989年にヒトのNHEの遺伝子がPouyssegurらによりクローン化されたのを初めとし⁴⁾、クロスハイブリダイゼーションやゲノム配列情報に基づくNHEファミリーを形成する遺伝子の検索が活発に行われてきた^{5,6)}。その結果現在までに、ヒトには9種の異なるNHEの存在が報告されている⁷⁾。また、より相同性が低いファミリーメンバーの存在も指摘されている⁸⁾。これらのNHEの特徴として、NHE1からNHE5までは形質膜に存在し、残りは細胞内小胞膜に存在する点が挙げられる(図1B)。また、形質膜に存在するNHEは組織特異性があるのに対して、細胞内小胞膜に存在するものは、発現は広範の組織で認められ、組織特異性は低い。細胞膜に存在するものは、細胞質内pHの中性付近での恒常性維持に必要である^{2,3)}。また、腎臓の尿管上皮ではNa⁺の再吸収に関与し、血圧の調節に重要な役割を果たしている⁹⁾。マウスではNHE1の機能欠損によりてんかんを発症することが報告されており¹⁰⁾、神経系での役割も重要である。NHE1は細胞外のマトリックス接着に関わる細胞膜部位(focal adhesion site)に多く存在し、細胞接着に関わる膜内アクチンによる構造体形成にも重要な役割を持つことが指摘されている¹¹⁾。

細胞内には多数の小胞が存在する。筆者らは、NHE 6, 7, 8, 9はこれらの小胞に存在することを明らかにし

た⁷⁾。また、それぞれが異なる小胞に存在することも示した。図1Bに示す細胞内の小胞は、それぞれ異なる酸性pH環境を持ち、V型ATPaseがこの酸性環境形成に必要であることが示されている¹²⁾。V-ATPaseのH⁺透過路を形成するcサブユニットの遺伝子欠失マウスでは、胎生致死になり、受精後子宮壁への着床が妨げられることを以前に筆者らは示した^{13,14)}。小胞内の酸性環境は、細胞増殖因子などのダウンレギュレーション、小胞の輸送など、さまざまな機構に必須な条件であることが考えられている。この環境の制御はV-ATPaseのみにより行われるのか否か、不明である。各小胞に特有のNHEを過剰発現させると、小胞pHはアルカリ側に変化した⁷⁾。小胞局在性のNHEの遺伝子ノックダウンなどの方法で、小胞pHを変化させ、エンドサイトーシスや小胞輸送にどのような影響がでるのか、今後いっそうの研究が必要である。小胞NHEの機能を考えるとき、細胞質にはNa⁺よりK⁺が多量にあることに注意する必要がある。そこで、小胞局在性NHE8を酵母で過剰発現後部分精製し、脂質小胞への再構成を行った。その結果、K⁺に対する親和性がNa⁺と同程度か若干高いことが明らかになった⁷⁾。このことから、小胞のNHEは、K⁺/H⁺交換輸送体として機能しているものと考えられる。

3. NHE の制御の分子機構

NHE分子は、疎水的な膜内在性部分と親水的な膜表面性部分がそれぞれ400残基程度からなる特徴ある構造を有

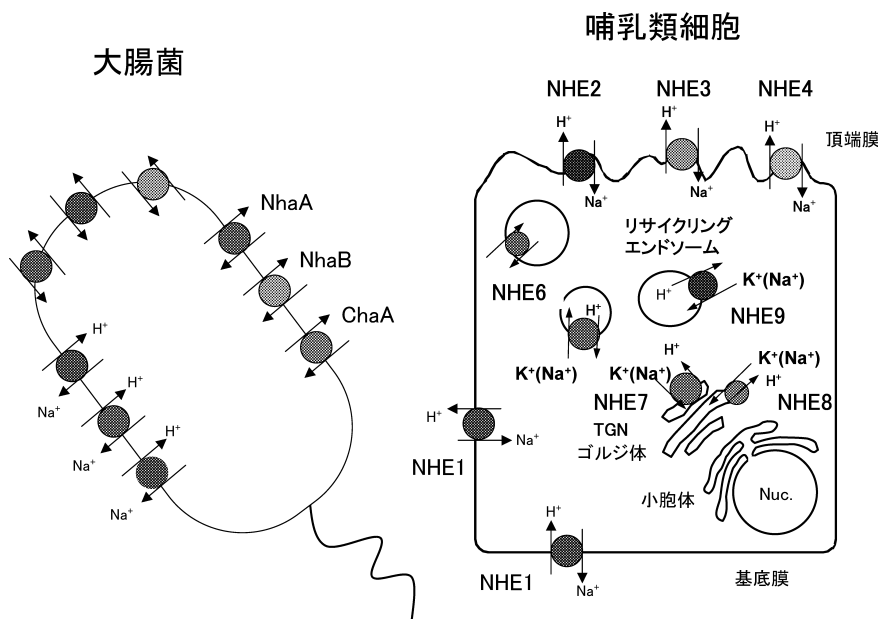


図1B 大腸菌と哺乳類細胞内のNa⁺/H⁺交換輸送体アイソフォーム。大腸菌にはNhaA, NhaB, ChaAが知られている。哺乳類NHEには、NHE1-5(形質膜)、NHE6/NHE9(リサイクリングエンドソーム)、NHE7(トランスゴルジネットワーク)、NHE8(ミッドゴルジ体)が存在する(文献7参照)。

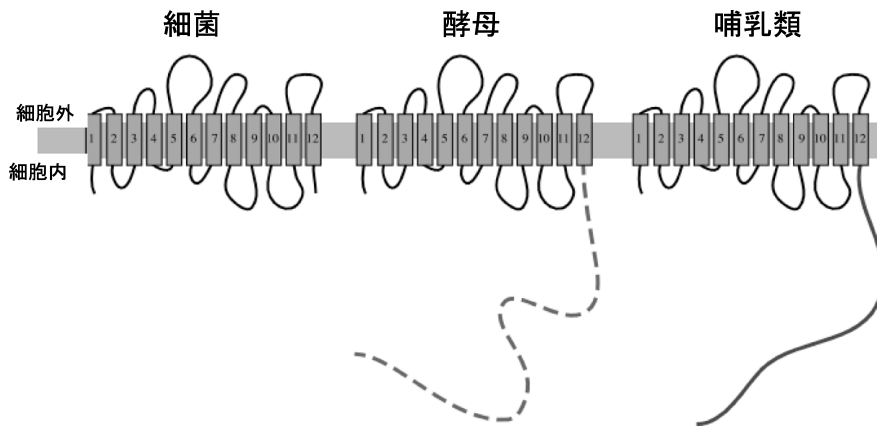


図 2A 細菌，酵母，哺乳類の Na^+/H^+ 交換輸送体の分子的特徴. 多くの場合 12 回の膜貫通ヘリックスを有する. 哺乳類では，親水性の形質膜型と細胞内膜型のいずれも親水性の膜表面部分を有する. 酵母では，親水性部分を有さない場合も一部あり，点線で示してある (文献 34 参照).

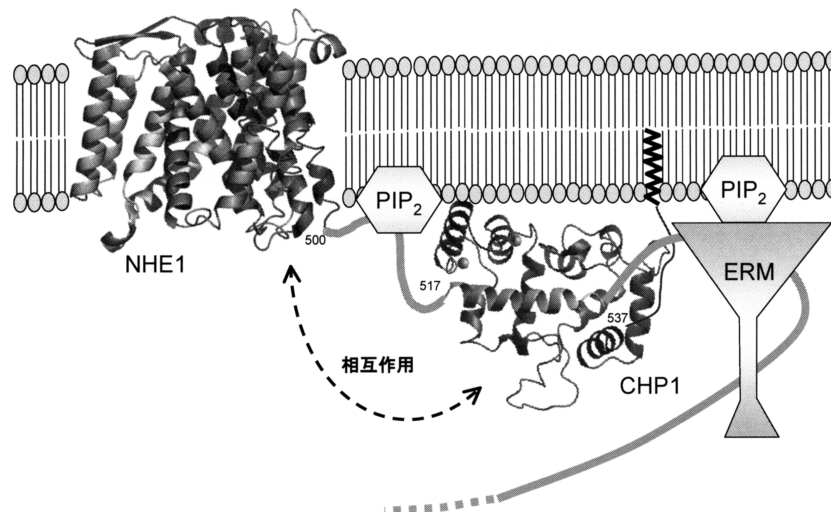


図 2B 哺乳類 NHE1 の膜外領域に結合する種々の因子と CHP. PIP₂, Phosphatidylinositol phosphate; ERM, エルムファミリータンパク質.

している (図 2A). 疎水的な部分はイオン輸送に関わり，親水的な部分は制御に関わるものと考えられている^{2,3)}. 実際，親水性部分を完全に欠失させると機能の大幅な低下が認められた^{2,3)}. そこで，この部分が果たす役割として，他の分子との相互作用による制御も考えられた. 筆者らは，1994年に親水性ドメインに結合する新規タンパク質を酵母 two-hybrid 法により見いだした^{15,16)}. このタンパク質は，リン酸化したタンパク質の脱リン酸化に関わるカルシニューリン (CN) の制御タンパク質 (CNB) に相同性が高く，現在 CHP (calcineurin-homologous protein) と呼ばれている¹⁷⁾ (図 2B). このタンパク質は Ca^{2+} 結合能を持ち，NHE1-5 に結合しイオン輸送機能に必須であることが，その後若林らによって示された¹⁸⁾. この際，NHE 内の CHP 結合に関わる部分を欠失した NHE を細胞に過剰発

現させたときに，機能を示さないにも関わらず形質膜には存在することから，CHP は形質膜への局在には関与しないと結論された. しかし，筆者らが最近 CHP 遺伝子の欠失細胞を樹立し調べたところ，この細胞では NHE1 は形質膜にはほとんど存在しないこと，CHP 遺伝子の再発現により膜への移行が回復することを見いだした¹⁹⁾ (図 3). さらに驚くことに，この CHP 遺伝子欠失細胞では NHE1 の細胞内の全量が 10% 程度に低下していた. これらのことは，CHP によって NHE1 の構造が安定化されること，またこの構造がなければ恐らく ER で NHE は壊されてしまうことを意味しており，形質膜への移行には CHP を結合した安定な構造が必要であることを示している. CHP1 の結晶構造を決定したところ，分子内に疎水性の溝が存在し，NHE がこの中に結合することが示唆された^{20,21)}. 膜タ

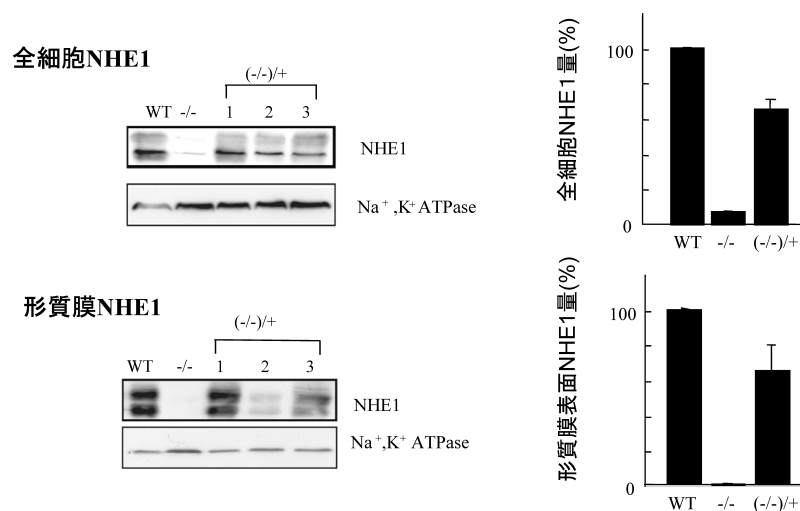


図3 CHP遺伝子欠失細胞におけるNHE1の発現の減少. 全細胞抽出液またはビオチン標識法を用いて細胞膜に存在するNHE1を遠心後沈殿分離し, ウェスタン法で調べた(文献19参照). -/-, 遺伝子欠失DT40細胞. (-/-) +/+, 遺伝子欠失細胞に遺伝子を再導入し発現させたDT40細胞.

ンパク質が形質膜に移行する際に, 別の分子の結合を必要とする例は他にも見つかりつつある²²⁾. こうしたタンパクがCHPのように本来必須サブユニットであるのか否か, 哺乳類の膜輸送タンパク質では生化学的な解析が遅れているために, はっきりとした結論が出ていない例が多い. 今後の一層の生化学的解析が必要である.

CHPには, CHP2とCHP3 (tescalcin)と名付けられたアイソフォームが存在する^{23~25)}. 筆者らは, CHP2は小腸でよく発現しその他の臓器ではほとんど発現していないことを見いだした²³⁾. CHP3についても, 臓器特異性があり, こうしたアイソフォームの機能的違いについては, 不明な点が残されている. CHPは, 当初CNBとよく似た構造を持つことから自身は酵素活性を持たず他のタンパク質の機能制御をしている可能性が考えられた. 実際, カルシニューリンの活性部位を有するAサブユニット²⁶⁾, タンパク質キナーゼDRAK2^{16, 27)}, キネシンKIF1B^{26, 27)}などにCHPは結合し, 機能を制御する可能性が示されている. さらに, 細胞内膜小胞輸送に必要とする報告もある³⁰⁾. このようにCHPは多機能性のCa²⁺結合性制御因子であることが示唆される³⁰⁾. CHPには核外排出シグナル配列が2箇所あり, 見かけ上細胞質に留まる機能を積極的に有することが示唆される³¹⁾. 多様な機能の中には, 核と細胞質を行き来することも含まれるものと考えられ, 今後その生理的役割を明らかにする必要がある.

NHEの細胞質領域に結合するタンパク質はCHPのみではなく, これまで多くのタンパク質因子の存在が報告されている(図2B).

4. 酵母の細胞膜アンチポーターNha1のイオン輸送と制御の機構

哺乳類のNHE1-9はいずれも細胞膜表在性の親水性の領域を有する構造を持つものに対して, 細菌のNhaAでは膜内構造のみから成り立っている(図2A). 真核単細胞である酵母では, 当初*Schizosaccharomyces pombe*³²⁾と*Zygosaccharomyces rouxii*³³⁾で見つかったNha1は, 前者では親水性領域がなく, 後者ではNHE同様に親水性領域が見いだされた. そこで, 筆者らはさらに数種の酵母のNha1をクローン化し構造を決定した. その結果, 一次構造は異なるにも関わらず, *S. pombe*以外では細胞内ドメインに加えて長大な親水性の細胞質ドメインをいずれも有しており(図2A), この点で哺乳類のものによく似た構造を持つことが明らかになった³⁴⁾. 細胞質内領域の役割についてはほとんど知見がなく, 見かけ上同じような分子構造を持つ哺乳類NHEとの機能制御の比較には興味を持たれた. 細胞質ドメインは種間での相同性が低いが, 一部に6箇所の保存された領域(C1-C6)が見いだされた³⁴⁾. そこでこの部分の構造を欠失したNhaを作成し機能を解析したところ, 興味深い事実が見いだされた. C5-C6部分を欠失した場合, 輸送機能が若干亢進し, この部分は本来輸送機能に抑制的な役割を持つものと推測された. また, C末端からC3までを欠失させても機能は低下しない. さらにC2部分までを欠失させると機能が低下したが, 形質膜への局在は観察された. 一方, C1までをすべてC末端から失うと, Nha1は形質膜へは局在せず, 輸送機能は失われた³⁵⁾. さらに, 最も細胞膜に近接したC1部分16残基は, Nha1

の細胞膜局在化に必須な部分とイオン輸送機能に必須な部分で構成されること、またC2部分に結合しイオン輸送を促進する新規膜タンパクCOS3が存在することが明らかになった³⁶⁾。COS3は、4回の膜貫通領域を持つタンパク質であり、CHPとはこの点では異なる。COS3の欠失体でもNhaAは形質膜へ移行するので、CHPとは異なり、Nha1の必須因子ではない。C1とC2は哺乳類のNHEとは構造的類似性がない。しかし、前項で述べたように、哺乳類NHEでも、分子内位置として酵母のC1、C2に相当する部分にCHPが結合することが見いだされている。CHPの結合によりNHE1が形質膜へ移行し機能が促進されることと比較し、見かけ上同じような機能的役割が、酵母のNha1の膜直下にあることは興味深い。

酵母Nha1については細菌との一次構造上の相同性はほとんど認められないが、遺伝学的解析から膜ドメイン中央にある三つのAsp残基が細菌のNhaAと同様にイオン輸送に必須であることを最近明らかにできた³⁷⁾。この部分とC1とC2部分の関係がイオン輸送経路形成において重要な点であると新たに指摘したい。

交換輸送活性を生化学的に測定することは遅れていたが、Nha1を含む細胞内小胞を取り出すことでこの問題はある程度解決されている。すなわち、Sec4-2変異株細胞を非許容温度下で処理すると、分泌経路の小胞が細胞内に蓄積する。この小胞を単離したところNa⁺/H⁺交換輸送活性を観測できた。この系を用いた解析から輸送の見かけのK_mは、Na⁺とK⁺を輸送基質とした場合、それぞれ12.7 mMと12.4 mMであった。このことから酵母Nha1は哺乳類NHEと同様にNa⁺と同じ位にK⁺に親和性が高いことが

明らかになった³⁸⁾。また、輸送は電位発生的 (electrogenic) であった。これは哺乳類NHEがelctroneutralであるのとは対照的に、細菌NhaAなどに近い性質を持つことを示している。架橋試薬で形質膜を処理すると、Nha1は、多量体特に二量体として検出された。1アミノ酸残基を置換し機能を欠失したNhaを作成し、野生株Nhaを有する細胞内に過剰に発現するとNhaの機能が失われドミナントネガティブ効果が観察された。これらのことから、Nha1の二量体構造は輸送機能発現に必須であることが、明らかになった³⁹⁾。なお、細菌Nhaや哺乳類NHEでも二量体の形成が機能に必須であることが示されている⁴⁰⁾。

酵母のNhaは見かけの分子構造の特徴に加えて、K⁺/H⁺交換輸送活性を持つこと、C末端親水性領域の膜直下部分に機能促進的な相互作用タンパク質を結合するなど、哺乳類NHEと共通する点が多く、今後も哺乳類NHEのモデルとしての重要性があろう。

5. 細菌NhaAをモデルとした構造と機能の遺伝生化学的解析

NHEやNhaにおけるイオン輸送の作動機構については、他の能動輸送タンパク質と同様に不明な点が多く残されている。一次構造が生物種間で多様であるのに対して見かけの対向輸送は同じである。そこで、作動機構は分子レベルにおいて多様なのか否かという点にも興味を持たれている。作動機構の理解の最終的な目標は、イオンの結合部位、イオン輸送路、Na⁺とH⁺の交換の仕組み、を分子内構造に基づいて理解することであると考えられる。細菌のNhaA (図4A)はこのような目的に対して、生化学的ある

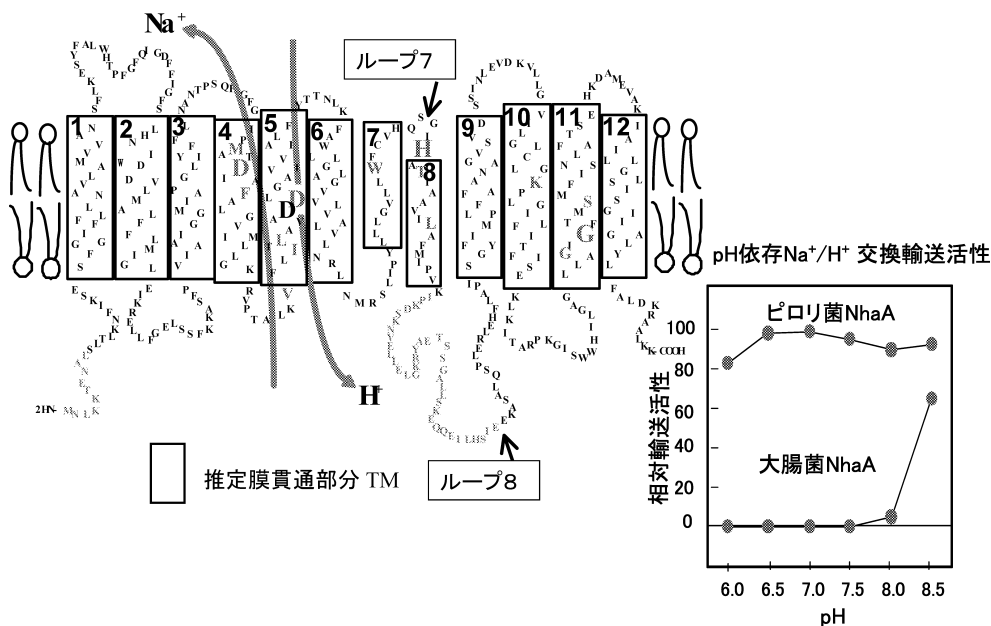


図4A ピロリ菌NhaAの推定二次構造とNa⁺/H⁺交換輸送のpH依存性 (文献1, 42参照)。

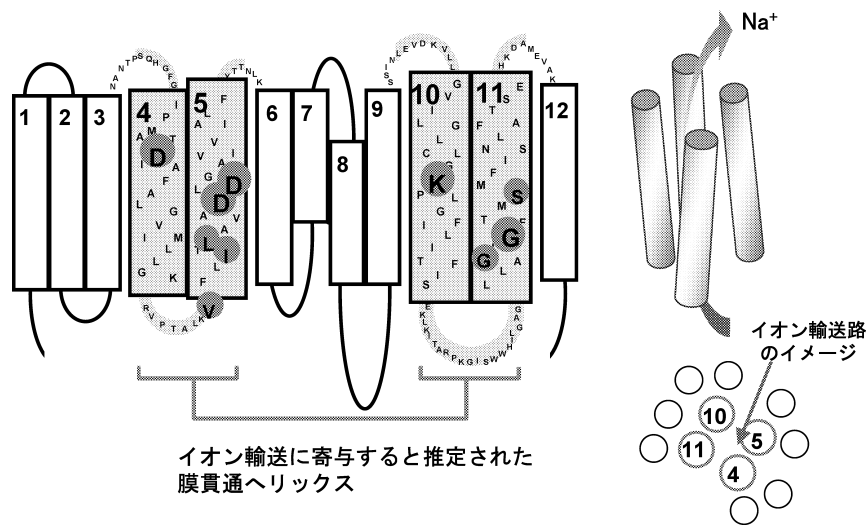


図 4B ピロリ菌 NhaA におけるイオン輸送に重要な残基と TM. ピロリ菌 NhaA 分子全体にランダムに一アミノ酸残基置換を導入し、輸送機能の低下した株を分離し、変異箇所を特定した。丸で囲んだ残基が輸送能発現に重要である (文献 45 参照)

いは分子生物学的なアプローチが容易でありよい研究材料である。これまで、アミノ酸残基の置換による機能変換体 NhaA の解析により、詳細なイオン結合部位やイオン輸送路について解析がなされている^{1,43)}。さらに一昨年、大腸菌の NhaA の結晶構造が解かれた⁴¹⁾。これらについて紹介する。

細菌には数種の異なる Na^+/H^+ 交換輸送タンパク質が存在する¹⁾。大腸菌では、3種の異なるものが知られている (図 1B) が、NhaA は欠失体の解析などから、最も活性が高く生理的に意味のあるものであり、交換輸送のモデルとしてあらゆる Na^+/H^+ 交換輸送タンパク質の中で最も構造と機能相関の解明が進んでいる。NhaA はこれまでゲノム構造が決定されている常温細菌の多くに存在し¹⁾、一次構造は良く保存されており、推定 12 回の膜貫通ドメインを有する (図 4A)。ただし、ピロリ菌では、例外的に N 末端と分子中央に他の種由来では認められない挿入配列があった⁴²⁾。またイオン輸送には大腸菌とピロリ菌で大きな特徴の違いがあった。大腸菌では、pH7 付近では輸送能がないのに対して、pH8 付近で 1,000 倍近い活性を示す。一方、ピロリ菌では、pH6 付近から pH8 まで広い範囲で活性が同程度ある⁴²⁾ (図 4A)。筆者らはこの両者を比較して、イオン輸送とその pH 制御の機構を明らかにすることを進めてきた。

大腸菌とピロリ菌 NhaA (ECNhaA, HPNhaA) の分子全体にランダムな変異を導入したり、酸性残基のみ特異的なアミノ酸置換を行い、輸送機能が低下したり pH 制御が変化したものを解析し、機能や制御に関わる残基を調べた^{43~45)}。図 4B に示すように、四つの膜貫通ドメイン (TM 4, 5, 10, 11) にイオン輸送に必要な残基が集中し、イオ

ン透過経路を形成していることが明らかになった。さらにアルカリ条件下の活性化調節には第 7 ループと TM8 の残基が関与することが明らかになり、ピロリ菌 NhaA に固有な挿入配列は、pH 依存の輸送制御には関係しないことも明らかにされた⁴⁵⁾。次に Cystein 走査変異法による系統的な解析を行った。まず HP NhaA の二つの Cys 残基を Ala に置換した Cys 残基を持たない変異体を作成したところ、この変異体は野生型と同様な輸送活性を持っていた⁴⁶⁾。そこで、この TM4, 5, 10, 11 のすべてのアミノ酸残基を一つずつ Cys に置換しその結果引き起こされる機能の変換と Cys に対する修飾剤の結合性を指標に、各残基の膜内での親水環境を調べた^{45~47)}。この一連の実験結果から、TM4 の Thr, Asp 残基、TM5 の二つの Asp 残基、TM10 の Lys 残基のみが、Cys 置換により見かけの基質イオン親和性が大幅に低下することから輸送基質イオン結合に関わるものと考えられた。特に、TM5 の二つの Asp は他のいずれのアミノ酸残基に変えても全く機能しないことから、側鎖の重要性が顕著であり、 H^+ の結合に関与すると考えられた。一方 TM4 の二つの残基は、 Na^+ や Li^+ の結合に関わるのではないかと考えられる。さらに、Cys 置換体の NEM に対する感受性を指標に、各残基の親水性環境を調べた。その結果、図 5A, B に示すように TM4, 5, 10 は、細胞質側に開口するチャンネル様構造に面し、TM11 は細胞外に開口するチャンネルに面することが推定された。これらの残基は各 TM の膜中央部付近に存在すること、さらにいずれの残基も想定される親水性チャンネルの辺縁部に存在することが明らかになった。これらのことを総合し、図 5B のようなイオン透過路と、イオン結合部位の概要が考えられた。

また、TM11の中央に位置するLys残基のように細胞外へ開口するチャンネルに面する残基の親水性環境も結晶構造とは異なる。このように、結晶構造とCys置換体解析の結果の比較から、チャンネルのH⁺結合部位周辺の環境は、活性化状態と不活性化状態で異なっていることが推察される(図6B)。一方、TM4, 5, 10, 11を構成する残基のほと

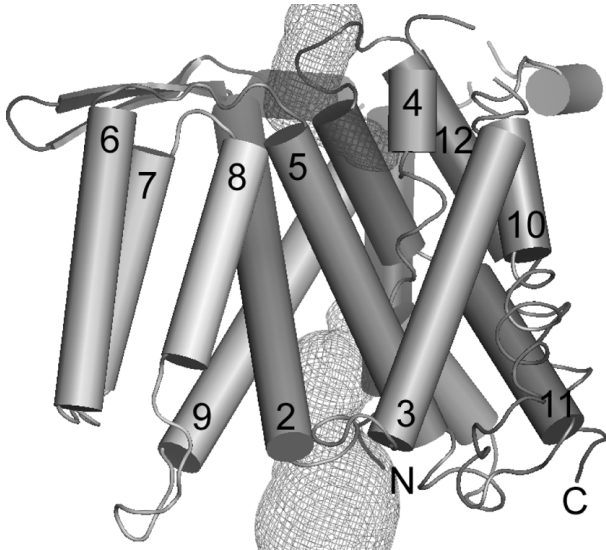


図6A 大腸菌 NhaA の結晶構造のスティックモデル。編み目状の部分にチャンネル様の構造が見られる。各番号は膜貫通ヘリックスの番号であり、図5のものに対応する。

んどの構造は結晶構造とCys置換解析結果の間で大きく異なる点も注目する必要がある。この成果に基づく必須残基とイオン結合部位のイメージの一部は図6Bに示したものである。すでにピロリ菌 NhaA の大量精製も行われ、その生化学的性質が検討され、結晶生成に向けた努力がなされている。活性化状態と不活性化状態を明らかにする上で、今後ピロリ菌の結晶構造を示すことは重要であろう。

イオン輸送に伴い NhaA には構造変化が起きることが想定される。これを捉える実験系の確立が今後必要となっているが、筆者らはFRET (fluorescence resonance energy transfer) 法を検討し今後の実験的アプローチの一つの方向性を見いだすのに成功している⁴⁹。HPNhaA のC末端にCFP (cyan fluorescent protein) とVenus (YFP, yellow fluorescent protein の誘導体) を結合した融合タンパク質分子を作成し、二量体形成にともなうFRETを、結合したCFPとVenusの蛍光によって観測することができた。二量体形成はすでに述べたように酵母 Nha で観察しており、NHEでの報告もあることからNa⁺/H⁺交換輸送体の一般的特徴であろう。このFRET観測の条件を用いて、輸送イオンであるLi⁺の存在下や異なるpHにおけるFRETの有意味な変化を観測した。低分子蛍光プローブを1分子の異なる部位に導入し、イオン輸送における分子内の局所的変化も捕らえることが、今後可能になるのではないかと考えている。

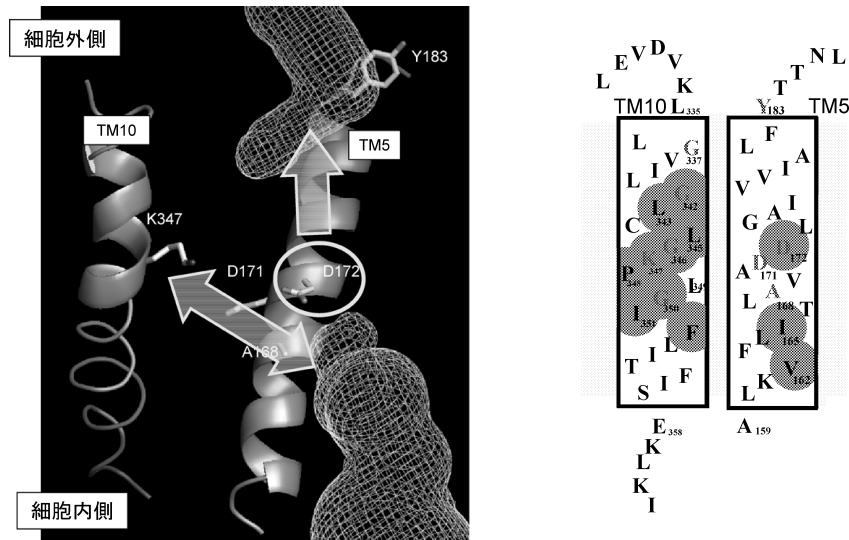


図6B TM4と5内のイオン輸送に関わるAsp残基。

ピロリ菌 NhaA の Asp-172 に対応する大腸菌 NhaA の Asp 残基は、結晶構造中では細胞質側からのチャンネル様構造に面している。一方、ピロリ菌のCys置換解析結果からはこの残基は細胞外に面している。活性化状態(ピロリ菌 NhaA)と大腸菌の結晶化条件であるpH4(不活性化状態)で、この残基やTM10のLys近傍の構造が異なると推定されている(文献47参照)。矢印の方向へ、チャンネル壁面全体または各主要残基が相対的に移動するかもしれない。

7. おわりに

細菌 NhaA の構造と機能相関に関する研究が最も進んでいるが、イオン輸送の機構はまだイオン結合部位を含めてほとんど解明できてはいない。さらに、他の細菌の Na^+/H^+ アンチポーターのアイソフォームや NHE では、生化学的解析はまだ緒についたばかりである。今後の研究の進捗が待たれる。

異なるアイソフォームにおけるイオン輸送の特徴を研究したこれまでの結果から、 Na^+/H^+ 交換輸送体は、 K^+/H^+ 交換輸送機能を持つものと、持たないものに分かれることが明らかになってきた。ここでは触れなかったが、酵母の Nha1 のサブタイプでは、 K^+/H^+ 交換輸送能を持つものと持たないものの2種類あることが、最近明らかになっている。また、細菌 NhaA は K^+ に親和性がないが、多くの NHE は K^+ に親和性がありそうである。また本論で述べたように、NhaA には親水性領域がないのに対して、哺乳類 NHE には親水性領域があり、酵母の Nha には、両タイプがある。 Na^+ (K^+) の輸送方向も、生理的には細菌と酵母では細胞内から細胞外へ向かい、NHE では細胞内へ向かう、という違いがある。輸送イオンの化学量論比も細菌・酵母では電位発生的 ($2\text{H}^+/1\text{Na}^+$) であるのに対して、NHE では電氣的に中性である。以上のような見かけの機能の違いが、分子構造のどのような違いにより支えられているのか、この分子の進化を知る上で、大変に興味深い今後の解明課題と考えられる。

謝辞：本論内で述べた筆者らの研究成果は、引用した筆者らの原著論文において共著者となった方々との共同研究によるものであり感謝したい。特に研究室に在籍した、能見貴人、大塚智恵、井上弘樹、中村徳弘の各博士の尽力により研究の展開が可能となった。記して感謝したい。CHP 結晶構造解析は、清水敏之博士（横浜市立大学）との共同研究による。

文 献

- 1) Padan, E., Venturi, M., Gerchman, Y., & Dover, N. (2001) *Biochim. Biophys. Acta*, 1185, 129–151.
- 2) Orłowski, J. & Grinstein, S. (1997) *J. Biol. Chem.*, 272, 22373–22376.
- 3) Counillon, L. & Pouyssegur, J. (2000) *J. Biol. Chem.*, 275, 1–4.
- 4) Sardet, C., Franchi, A., & Pouyssegur, J. (1989) *Cell*, 56, 271–280.
- 5) Orłowski, J., Kandasamy, R.A., & Shull, G.E. (1992) *J. Biol. Chem.*, 267, 9331–9339.
- 6) Baird, N.R., Orłowski, J., Szabo, E.Z., Zaun, H.C., Schultheis, P.J., Menon, A.G., & Shull, G.E. (1999) *J. Biol. Chem.*, 274, 4377–4382.
- 7) Nakamura, N., Tanaka, S., Teko, Y., & Kanazawa, H. (2005) *J. Biol. Chem.*, 280, 1561–1572.
- 8) Wang, D., King, S.M., Quill, T.A., Doolittle, L.K., & Garbers, D.L. (2003) *Nat. Cell Biol.*, 5, 1117–1122.
- 9) Azuma, K.K., Balkovetz, D.F., Magyar, C.E., Lescale-Matys, L., Zhang, Y., Chambrey, R., Warnock, D.G., & McDonough, A.A. (1996) *Am. J. Physiol.*, 270, 585–592.
- 10) Cox, G.A., Lutz, C.M., Yang, C.L., Biemesderfer, D., Bronson, R.T., Fu, A., Aronson, P.S., Noebels, J.L., & Frankel, W.N. (1997) *Cell*, 91, 139–148.
- 11) Denker, S.P., Huang, D.C., Orłowski, J., Furthmayr, H., & Barber, D.L. (2000) *Mol. Cell*, 6, 1425–1436.
- 12) Futai, M., Wada, Y., & Kaplan, J.H. eds. (2004) *Handbook of ATPases*, Wiley-VCH.
- 13) Inoue, H., Noumi, T., Nagata, M., Murakami, H., & Kanazawa, H. (1999) *Biochim. Biophys. Acta*, 1413, 130–138.
- 14) Sun-Wada, G.H., Murata, Y., Yamamoto, A., Kanazawa, H., Wada, Y., & Futai, M. (2000) *Dev. Biol.*, 228, 315–325.
- 15) 守谷智恵, 根本慎吾, 下窪大哉, 清水利郎, 能見貴人, 金澤 浩 (1995) *生化学*, 67, 8.
- 16) Matsumoto, M., Miyake, Y., Nagita, M., Inoue, H., Shitakubo, D., Takemoto, K., Ohtsuka, C., Nakamura, N., & Kanazawa, H. (2001) *J. Biochem.*, 130, 217–225.
- 17) Lin, X. & Barber, D.L. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93, 12631–12636.
- 18) Pang, T., Su, X., Wakabayashi, S., & Shigekawa, M. (2001) *J. Biol. Chem.*, 276, 17367–17372.
- 19) Matsushita, M., Sano, Y., Yokoyama, S., Takai, T., Inoue, H., Mitsui, K., Todo, K., Ohmori, H., & Kanazawa, H., (2007) *Am. J. Phys.*, 印刷中
- 20) Naoe, Y., Arita, K., Hashimoto, H., Kanazawa, H., Sato, M., & Shimizu, T. (2005) *J. Biol. Chem.*, 280, 32372–32378.
- 21) Ammar, Y.B., Takeda, S., Hisamitsu, T., Mori, H., & Wakabayashi, S. (2006) *EMBO J.*, 12, 1–11.
- 22) Kimura, T., Tabuchi, Y., Takeuchi, N., & Asano, S. (2002) *J. Biol. Chem.*, 277, 20671–20677.
- 23) Inoue, H., Nakamura, Y., Nagita, M., Takai, T., Masuda, M., Nakamura, N., & Kanazawa, H. (2003) *Biol. Pharm. Bull.*, 26, 148–155.
- 24) Pang, T., Wakabayashi, S., & Shigekawa, M. (2002) *J. Biol. Chem.*, 277, 43771–43777.
- 25) Mailander, J., Muller-Esterl, W., & Dedio, J. (2005) *FEBS Lett.*, 507, 331–335.
- 26) Lin, X., Sikkink, R.A., Rusnak, F., & Barber, D.L. (1999) *J. Biol. Chem.*, 274, 36125–36131.
- 27) Kuwahara, H., Kamei, J., Nakamura, N., Matsumoto, M., Inoue, H., & Kanazawa, H. (2003) *J. Biochem. (Tokyo)*, 134, 245–250.
- 28) Nakamura, N., Miyake, Y., Matsushita, M., Tanaka, S., Inoue, H., & Kanazawa, H. (2002) *J. Biochem. (Tokyo)*, 132, 483–491.
- 29) Matsushita, M., Tanaka, S., Nakamura, N., Inoue, H., & Kanazawa, H. (2004) *Traffic*, 5, 140–151.
- 30) Timm, S., Titus, B., Bernd, K., & Barroso, M. (1999) *Mol. Biol. Cell.*, 10, 3473–3488.
- 31) Nagita, M., Inoue, H., Nakamura, N., & Kanazawa, H. (2003) *J. Biochem. (Tokyo)*, 134, 919–925.
- 32) Jia, Z.P., McCullough, N., Martel, R., Hemmingsen, S., & Young, P.G. (1992) *EMBO J.*, 11, 1631–1640.
- 33) Watanabe, Y., Miwa, S., & Tamai, Y. (1995) *Yeast*, 11, 829–838.
- 34) Kamauchi, S., Mitsui, K., Ujike, S., Haga, M., Nakamura, N.,

- Inoue, H., Sakajo, S., Ueda, M., Tanaka, A., & Kanazawa, H. (2002) *J. Biochem. (Tokyo)*, **132**, 821–831.
- 35) Mitsui, K., Kamauchi, S., Nakamura, N., Inoue, H., & Kanazawa, H. (2004) *J. Biochem. (Tokyo)*, **135**, 139–148.
- 36) Mitsui, K., Ochi, F., Nakamura, N., Doi, Y., Inoue, H., & Kanazawa, H. (2004) *J. Biol. Chem.*, **279** (2004) 12438–12447.
- 37) Mitsui, K., Yasui, H., & Kanazawa, H. 投稿中
- 38) Ohgaki, R., Nakamura, N., Mitsui, K., & Kanazawa, H. (2005) *Biochim. Biophys. Acta*, **1712**, 185–196.
- 39) Mitsui, K., Yasui, H., Nakamura, N., & Kanazawa, H. (2005) *Biochim. Biophys. Acta*, **1720**, 125–136.
- 40) Gerchman, Y., Rimon, A., Venturi, M., & Padan, E. (2001) *Biochemistry*, **40**, 3403–3412.
- 41) Hunte, C., Screpanti, E., Venturi, M., Rimon, A., Padan, E., & Michel, H. (2005) *Nature*, **435**, 1197–1202.
- 42) Inoue, H., Sakurai, T., Ujike, S., Tsuchiya, T., Murakami, H., & Kanazawa, H. (1999) *FEBS Lett.*, **443**, 11–16.
- 43) Noumi, T., Inoue, H., Sakurai, T., Tsuchiya, T., & Kanazawa, H. (1997) *J. Biochem. (Tokyo)*, **121**, 661–670.
- 44) Inoue, H., Noumi, T., Shimomura, T., Takimoto, N., Tsuchiya, T., & Kanazawa, H. (1998) *Biol. Pharm. Bull.*, **21**, 1128–1133.
- 45) Tsuboi, Y., Inoue, H., Nakamura, N., & Kanazawa, H. (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 21467–21473.
- 46) Kuwabara, N., Inoue, H., Tsuboi, Y., Nakamura, N., & Kanazawa, H. (2004) *J. Biol. Chem.*, **279**, 40567–40575.
- 47) Kuwabara, N., Inoue, H., Tsuboi, Y., Mitsui, K., Matsushita, M., & Kanazawa, H. (2006) *Biochemistry*, **45**, 14834–14842.
- 48) Tsuboi, Y., Kuwabara, N., Inoue, H., & Kanazawa, H. 投稿中
- 49) Inoue, H., Tsuboi, Y., & Kanazawa, H. (2001) *J. Biochem. (Tokyo)*, **129**, 569–576.
- 50) Karasawa, A., Tsuboi, Y., Inoue, H., Kinoshita, R., Nakamura, N., & Kanazawa, H. (2005) *J. Biol. Chem.*, **280**, 41900–41911.
-