膜輸送 ATPase のチャンネル形成残基の探索

徳島大学薬学部 生物薬品化学 福 嶋 義 博
萬有製薬株式会社 中央研究所 高 田 準 治

This short article focussed on several recent experiments about modification of the potassium ion pathway of sodium/potassium-transport ATPase of animal cell membranes. Hydrophobic pyridin derivative, AU-1421 is a fluorescent probe and is expected to bring about much information from its binding site.

ion-transport ATPase/potassium site/AU-1421

はじめに

膜輸送 ATPase の一つである P-タイプ ATPase は、反応サイクル中で、リン酸化中間体 (EP) の生成と分解を繰り返しながら、チャンネル構造の膜配向性と親和性の変化を伴うコンホメーション変化により、ATP 水解とカチオン輸送を共役させていると考えられている。このような輸送ポンプには、カチオン特異性を越えた共通の構造が存在する。すなわち、EP 形成部位のアミノ酸配列は同一であり、cDNA から推定された一次構造には高い相同性がある。それにもかかわらず、ポンプの立体構造、カチオン結合サイトや輸送チャンネル、反応過程における動的構造変化、あるいは、カチオン輸送と ATP 水解とのエネルギー共役機構に関する知見は乏しい。構造と機能との関連を明らかにする上で、現在、最も要求される情報は、一次構造上のどの残基あるいは領域が、カチオンの認識および輸送に関わっているかを明らかにすることである。ここでは、代表的な P-タイプ ATPase である Na^+/K^+ -ATPase を中心に取り上げ、 K^+ 輸送サイトを同定するために現在おこなわれているアプローチについて概説する。

I. 親和性標識

1) 有機カチオンアナログ

Investigation of Ion Binding Residues in Transport ATPases

Yoshihiro FUKUSHIMA, Junji TAKADA

Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of Tokushima
and Central Research Laboratories, Banyu Pharmaceutical Co., Ltd.

Na^+/K^+ -ポンプの K^+ 輸送過程では、 K^+ がポンプ分子内に取り込まれ、細胞内液および外液から隔離された「閉塞状態」が存在する。この K^+ 閉塞型、 $\text{E}_2(\text{K})$ の形成には2つのルートがある (図1)。一つは、リン酸化中間体 E_2P に細胞外 K^+ が高親和性で結合すると、リン酸結合 (Asp369) の水解が促進され新たに形成される非リン酸化型酵素 E_2 で K^+ は閉塞される。もう一つは、生理的ルートの逆反応で、非リン酸化型酵素 E_1 に細胞の内側 (K^+ 遊離孔) から K^+ が結合することにより E_1 から E_2 への構造変化が生じ、 $\text{E}_2(\text{K})$ が形成される。ATP の低親和性部位への結合は、 $\text{E}_2(\text{K})$ の構造変化 ($\text{E}_2 \rightarrow \text{E}_1$) を引き起こし、 K^+ を細胞内へ遊離させる。そこで、この K^+ 輸送過程において、 K^+ 輸送サイトを高親和性かつ選択的に認識する輸送カチオンアナログを見いだすことができれば、その有機カチオンは、親和性標識プローブ探索・合成の際に親化合物として役立つ。今までに、 Na^+/K^+ -ATPase および H^+/K^+ -ATPase の K^+ 輸送サイトに対する多くのカチオンアナログが報告されている。親和性や特異性は低いがトリスやテトラプロビルアミンのような親水性アミンも Na^+/K^+ -ATPase の細胞外高親和性 K^+ サイトを認識する¹⁾。トリスは SDS などの蛋白構造不安定化剤の共存下では、酵素分子内非水領域に存在するとされる K^+ 閉塞部位に結合することが示唆されている²⁾。エチレンジアミンは単独で K^+ 閉塞部位を認識する可能性が指摘されているが、ATP によるリン酸化を Na^+ と拮抗的に阻害すること、およびエチレンジアミン結合酵素は、 K^+ 結合型コンホメーション E_2 ではなく Na^+ 結合型 E_1 であることから、 K^+ 部位よりむしろ Na^+ 部位を認識

すると考えられる³⁾。いずれにしても、 Na^+/K^+ -ATPase の K^+ サイトプローブとして充分な化合物は見いだされていない。

一方、 H^+/K^+ -ATPase においてもヴェラバミル、フェノチアジン等の3級アミンが、 K^+ と拮抗的に作用することが報告されている。とりわけ性質が明らかにされているのは、ピリジル 1, 2a イミダゾール誘導体、SCH28080 である⁴⁾。SCH28080 は強力で可逆的な H^+/K^+ -ATPase 阻害剤であり、ATP 水解、及び K^+ 依存性の脱リン酸化を K^+ と拮抗的に阻害し ($\text{Ki} \approx 10\text{nM}$)、 E_2 型を安定化する。最近、アジド基を有する光親和性誘導体が合成され、 K^+ サイトを標識することが試みられた⁵⁾。トリプシン消化後、標識されたペプチド断片 (7kDa) を SDS ゲルで精製し、N 末端のアミノ酸配列を求めると、 H^+/K^+ -ATPase の α 鎖の Leu854 から始まる配列と一致した。これは、膜貫通領域 M5 と M6 の間で細胞外側に位置すると推定されるループに対応する。 Na^+/K^+ -ATPase と H^+/K^+ -ATPase とは、イオン輸送性 ATPase の中で、全アミノ酸の相同性が 62% と最も高く、類似した反応機構により K^+ を輸送するにもかかわらず、SCH28080 は H^+/K^+ -ATPase に特異的なため、 Na^+/K^+ -ATPase の K^+ 部位探索のプローブとしては用いることができない。

2) K^+ サイトのプローブとしての AU-1421

これまでに報告されたアミン化合物の中で、 Na^+/K^+ -ATPase に最も高親和性を示す化合物は AU-1421 (図 1) である⁶⁾。AU-1421 は、高い疎水性 ($\log P = 5.5$) を有する弱塩基性 ($\text{pK}_a = 7.5$) のピリジン誘導体である⁷⁾。AU-1421 は前述の 2 つの $\text{E}_2(\text{K})$ 形成過程 (図 1 参照) において、 K^+ と拮抗的に作用する。すなわち、AU-1421 は K^+ 感受性リン酸化中間体 (E_2P) の反応性を可逆的に阻害し、 K^+ と単純拮抗を示し

た⁸⁾。この K^+ との拮抗関係から算出した AU-1421 の親和性 (Ki) は $7.2\text{ }\mu\text{M}$ であった (0°C)。一方、非リン酸化型酵素における K^+ 閉塞に対して AU-1421 は拮抗関係にあった⁶⁾。ただし、この場合は、AU-1421 の K^+ 閉塞部位への結合は 0°C では見られず、 37°C で分単位の処理を必要とした。このことは、細胞外 K^+ に対し高親和性である E_2P と比べ、 E_2 の K^+ 部位は外液と隔離された閉塞状態であるという事実と一致する。実際、酵素と AU-1421 の複合体は、 $\text{E}_2(\text{K})$ 同様、非常に安定である。このことは、AU-1421 が酵素分子内に取り込まれ閉塞状態にあることを想像させる。さらに AU-1421 の取り込みが E_1 型で促進されることは、AU-1421 が K^+ 同様、細胞質側の K^+ 遊離孔から結合することを意味すると考えられる。この作用様式は、 Ca^{2+} の K^+ 閉塞部位への結合と非常に類似しており、事実、AU-1421 の結合は Ca^{2+} によっても拮抗された³⁾。以上のように、AU-1421 は Na^+/K^+ -ATPase の K^+ 輸送チャンネルを高い親和性で認識することが明らかになった唯一の化合物である。

K^+ サイトプローブとして AU-1421 がユニークな点は、 H^+/K^+ -ATPase および筋小胞体 Ca^{2+} -ATPase の K^+ 部位をも認識する点である⁹⁾。AU-1421 の H^+/K^+ -ATPase 阻害様式は、前述の SCH28080 と非常に類似している。ところが、 K^+ の閉塞という現象は、 H^+/K^+ -ATPase においては容易に検出されないことと対応するのか、AU-1421 と非リン酸化型 H^+/K^+ -ATPase の結合は Na^+/K^+ -ATPase とのそのような安定性をもたない。両 ATPase と AU-1421 との結合の強さは、 K^+ 部位近傍の疎水的環境の程度の差をかなり反映するようである。一方、AU-1421 は、 Ca^{2+} -ATPase の E_2P に対しては、 K^+ 同様促進的に作用した⁹⁾。 Na^+/K^+ -ATPase 及び H^+/K^+ -ATPase と異なり、 Ca^{2+} -ATPase においては、 K^+ は輸送基質ではなく、 E_2P 分解の単なる促進因子である。このような K^+ の作用の違いが AU-1421 の作用様式にも反映していると考えられる。

今後、AU-1421 は Na^+/K^+ -ATPase の K^+ 輸送サイトに対する光親和性標識をデザインするための出発点になりうると考えられる。AU-1421 誘導体を用い、 Na^+/K^+ -ATPase の細胞外に開いた K^+ 結合サイト⁸⁾ と K^+ チャンネル内の閉塞部位⁶⁾ をそれぞれ標識することが可能であれば、 K^+ 輸送過程の動的構造変化についての知見が得られるであろう。さらに、AU-1421 は蛍光物質 (Ex. 330nm, Em. 415nm) であるから、3 つの P-タイプ ATPase の K^+ 結合サイト近傍の微細な構造変化の検出など、幅広い応用が期待できる。

図 1. Na^+/K^+ -ATPase の K^+ -サイトと AU-1421 の拮抗。
i: inside の略, o: outside の略

II. 化学修飾

カチオンが最も結合しそうな残基はカルボキシルだろうとの予想の下で、疎水性カルボジイミド DCCD による修飾が試みられたが、結果は多様である。DCCD による Na^+/K^+ -ATPase の阻害 (Na^+ や K^+ で酵素は保護される) は、カルボキシルとアミノ基間の分子内架橋形成その他の複雑な反応の結果である可能性が高い。この欠点を克服するために、ジアゾメタン誘導体を用いて、カルボキシル基と単純なエステル化反応を進行させる試みもある¹⁰⁾。他方、 Na^+/K^+ -ATPase のトリプシン消化産物、C 末端側 19KDa 断片が特異的 $^{86}\text{Rb}^+$ 閉塞能を保持していることから、このペプチド領域が、 K^+ 閉塞部位を含んでいると予測された¹¹⁾。 Na^+/K^+ -ATPase 1 分子当り 2 モルの [^{14}C] DCCD が Rb^+ 抑制的に結合するが、そのうちの 1 つは、この 19KDa 断片に入る。これらの結果に基づき、19KDa ペプチド中の Glu953 と 954 が K^+ の結合に関わっているとの推定が提出されている (図 2)¹¹⁾。この領域は、 H^+/K^+ -ATPase の SCH28080 標識化領域 (C 末端側 7 KDa) の N 末端側のアミノ酸配列と類似している。両 ATPase の K^+ 部位は C 末端寄りの膜貫通部分に存在するのかもしれない。

カルボキシル基以外に、 K^+ の結合に関与する残基の可能性として、アミノ基が報告されている¹²⁾。ATP の存在下で Na^+/K^+ -ATPase とグルコースを NaCNBH_3 で還元処理して Schiff 塩基を形成させると、酵素 1 モル当り 0.8 モルのグルコースが導入され K^+ の閉塞が観察されなくなる。このアミノ基は、トリプシン消化断片の C 末端側 77KDa ペプチド中に存在する。化学修飾の結果は特異性に関して、心配が付きまとうが、現時点においては、酵素分子の C 末端寄りの領域が K^+ 結合にとって重要であることを意味している。

図 2. Na^+/K^+ -ATPase のトリプシン消化によって生ずる 19KDa ペプチド中のグルタミン酸残基。

III. 部位特異的変異

高血圧症と Na^+/K^+ -ポンプ活性に関連して興味深い報告がある¹³⁾。Dahl ラットには食塩高感受性と抵抗性の 2 種の形質がある。高感受性の方の Na^+/K^+ -ATPase では、ただ一つ Gln276 が Leu に変化していた。この置換により K^+ の取り込みが減少する故、 K^+ 輸送に大切な領域に Gln276 が存在するようだ。しかし、前述の化学修飾の結果と直接対応づけることはできない。この置換により、 E_1 , E_2 コンホメーション変化の際大きな影響を受ける部分の疎水性指標が、親水性から疎水性へと変わる。このことは、1 残基の変異が、酵素分子全体のコンホメーションに変化をきたしそれが K^+ 輸送に反映していることを意味する。あるいは、 K^+ 輸送にとって、276 残基領域と C 末端側に存在する K^+ チャンネル部分との相互作用が必要なのかもしれない。イオン輸送とドメイン間相互作用は強くカップリングしているため、こうした場合の解析は非常に難しい。

ATPase のイオン輸送機構をアミノ酸残基のレベルで解くために、部位特異的変異あるいは P-タイプ ATPase 間のキメラ分子の作成は強力な方法であるが、それらを行う標的残基に関する情報が乏しい。AU-1421 結合残基を明らかにすることができれば、 K^+ 結合に関して、一つの標的候補を提出することができる。

文 献

- 1) Fukushima, Y. (1987) *J. Biol. Chem.*, **262**, 11000-11005.
- 2) Fukushima, Y. (1990) *Biomed. Res.*, **11**, 345-352.
- 3) Takada, J., Hioki, Y., Yano, M. (1990) *Biochim. Biophys. Acta*, **1041**, 123-128.
- 4) Mndlein, J., Sachs, G. (1990) *J. Biol. Chem.*, **265**, 5030-5036.
- 5) Rabon, E., Sachs, G., Bassilian, S., Leach, C., Keeling, D. (1991) *J. Biol. Chem.*, **266**, 12395-12401.
- 6) Takada, J., Hioki, Y., Yano, M., Fukushima, Y. (1990) *Biochim. Biophys. Acta*, **1037**, 373-379.
- 7) Hioki, Y., Takada, J., Hidaka, Y., Takeshita, H., Hosoi, M., Yano, M. (1990) *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.*, **305**, 32-44.
- 8) Takada, J., Fukushima, Y. (1991) *Biochim. Biophys. Acta*, **1065**, 153-159.
- 9) Fukushima, Y., Asano, S., Takada, J. (1991) *Biochim. Biophys. Acta*, 印刷中.
- 10) Arguello, J. M., Kaplan, J. H. (1991) *J. Biol. Chem.*, **266**, 14627-14635.
- 11) Karlisch, S. J. D., Goldshleger, R., Tal, M. D., Stein, W. D. (1991) in *The Sodium Pump: Structure, Mechanism, and*

- Regulation, (Eds., Kaplan, J. H., De Weer, P.), pp. 265, 15058-15066.
 129-141., The Rockefeller University Press, New York. 13) Herrera, V.L.M., Ruiz-Opazo, N. (1990) *Science*, 249, 1023-1026.
 12) Garnet, M. H., Bahador, A., Sachs, G. (1990) *J. Biol. Chem.*

ふくしま よしひろ

1944年北海道生まれ。北海道大学理学部卒業。大阪大学大学院博士課程修了後、米国ヴァンダービルト大学 (Dr. Post), 東京医科歯科大学, 生理学研究所, 小児医療研究センターを経て, 1991年4月より徳島大学勤務。今回の原稿は, 枚数が厳しい制限となり, 引用その他の点で, 言をつくしていない箇所が多くなってしまった。
 連絡先 〒770 徳島市庄町1-78 徳島大学薬学部生物薬品化学教室
 ☎0886-31-3111 内線6256

たかだ じゅんじ

1959年愛知県生まれ。京都薬科大学薬学部生物薬学科卒業。名古屋市立大学大学院修士課程修了 (1984年) 後, 萬有製薬(株)中央研究所勤務, 現在に至る。薬博。会社ではなかなかベーシックな研究ができないのが悩みの種です。現在は主にエンドセリンのプロセシング酵素の研究に取り組んでいます。趣味は, ドライブ, 音楽鑑賞。
 連絡先 〒153 目黒区下目黒2-9-3 萬有製薬(株)中央研究所
 ☎03-3492-4111 内線431

■吉岡書店出版事業部より■

「自費出版」のご案内—印刷した立派な本が簡単につくれます—

記念論文集 / 予稿集 / リプリント / 旅行記 / 回顧録 / 詩歌句集

遺稿・追悼集 / 画・写真集 / その他

字くばり・印刷・製本・用紙・装丁・あらゆるご相談に応じます

案内書お送りします

■京都市左京区田中門前町87

郵便番号606 / 振替京都3-4624

■TEL-075-(781)4747

吉岡書店出版事業部