(Na, K)ATPase の構造形成と β サブユニットの役割

野 口 俊 介・川 村 越*

1. はじめに

動物細胞は、外部環境と大きく異なるイオン環境をその内部に維持している。たとえば Na^+ 、 Ca^{2+} は外部よりも低く、 K^+ は外部よりも高く保たれている。このような内部イオン環境を維持するうえで、最も基本的な役割を果たしているのが、ナトリウムポンプとして知られる (Na, K)ATPase である¹⁾。

(Na, K)ATPase はほとんどの動物細胞細胞膜に存在するが、イヌやウシの赤血球のように二次的に欠くものもある。またふつう細胞膜上に一様に分布するが、小腸上皮細胞のように微絨毛側[刷子縁]には存在せず、側部や基底部に局在する場合もある。(Na, K)ATPase は ATP 1 分子の加水分解に共役して、3 個の Na^+ を細胞外へ、2 個の K^+ を細胞内へ、それらイオンの濃度勾配にさからって輸送する(図 1 a)。こうして形成・維持される Na^+ の細胞内外の濃度勾配は、様々な二次性能動輸送[りん酸、アミノ酸、グルコースの取り込み、 H^+ 、 Ca^{2+} の排出等]の駆動力となっている。こうして (Na, K)ATPase は細胞内 pH の調節や細胞体積の調節のような基本的な作用から、神経の興奮性の維持、栄養の吸収などの高度に分化した機能まで、様々な生理的な働きを間接的に担っていることになる。

(Na, K)ATPase は分子量約 100kDa の α サブユニットと、分子量 60kDa の糖蛋白質である β サブユニット[蛋白質部分の分子量は約 35kDa]の 2 種類の膜内在性のサブユニットからなる²⁾。両サブユニットとも数種の動物、組織から遺伝子が単離され、その一次構造が決定されている³⁾。分子量 10kDa 程度のプロテオリピドを γ サブユニットと主張する研究者もいるが⁴⁾、これが (Na, K)ATPase の構造や機能に直接関与することを示した報告はこれまで全く無い。

α サブユニットは触媒サブユニットともよばれ ATPase 反応やイオン輸送で主要な役割を果たす。基質である ATP や Na^+ および K^+ あるいはこの酵素の特異的阻害剤であるウワバイン等、これまでに知られているすべてのリガンドの結合部位は α サブユニットに存在する⁵⁾。遺伝子から推定された一次構造から、 α サブユニットは 6~8 本の膜貫通セグメントと大きな細胞質ドメインを持ち、この細胞質ドメインには ATP の結合部位や ATP 分解の過程でりん酸化を受けるりん酸化部位が存在する⁶⁾。(図 1 b)。N-末端が細胞質側に存在することは間違いないが、C-末端がいずれの側に存在するのか未だ決定的な根拠は見いだされていない。C-末端が細胞外側に存在すると膜貫通セグメントは 7 本となる。 β サブユニットは 1 本の膜貫通セグメントと大きな細胞外側領域をもち、この細胞外側領域には 3 本の S-S 結合と 3~4 ヶ所 N-結合型糖鎖付加部位が存在する^{3, 7)}(図 1 c)。 β サブユニットに存在する S-S 結合の還元が酵素の失活を引き起こし、また Na^+ 、 K^+ でこの還元が保護されることが示されていた^{8, 9)}。しかし β サブユニットの具体的機能については明らかにされたものではなく、わずかにこの酵素の生合成の際に α サブユニットの受容体として働く可能性が議論されているのみであった¹⁰⁾。

複数種のサブユニットからなる酵素のそれぞれのサブユニットの役割を探るには、それぞれのサブユニットを単離精製しそれら単独の性質を調べ、さらにそれらから酵素を再構成するという手法が有効である。ところが (Na, K)ATPase の場合、 α β 間の結合は非常に強固で、SDS のような蛋白質の立体構造を破壊するような強力な変性剤をもちいないかぎり、両サブユニットを解離するのは不可能である。

*Shunsuke NOGUCHI & Masaru KAWAMURA, 産業医科大学生物化学教室(〒807 北九州市八幡西区医生ヶ丘 1-1)

図1 (Na, K) ATPaseの模式図 (Na, K) ATPaseは2種の膜貫通蛋白質(α , β)からなる(a)。生体内では $\alpha_2\beta_2$ 構造をとっていると考えられているが、異論と唱える研究者もいる。両サブユニットとも一次構造がcDNA塩基配列から推定されており、それから予測される α サブユニット(b), β サブユニット(c)のメンブレントポロジー(membrane topology)が示してある。Rossier 他¹⁾の原図¹⁾を一部改変して用いた。

このため α β 両サブユニットを機能を保ったまま単離することはできず、再構成に成功した例はなかった。

我々は、これに変わる方法としてそれぞれの遺伝子を発現させることができれば、各サブユニットの機能やそれらの相互作用を解明できるのではないかと考えた。この方法により機能的な(Na, K) ATPaseの形成で β サブユニットが果たす役割について、いくつか解明することができたので、ここではそれらについて紹介する。

2. アフリカツメガエル卵母細胞による外来(Na, K) ATPase遺伝子の発現¹¹⁾

シビレエイや電気ウナギの発電器官はイオンチャンネルに富む器官であり、アメリカ産シビレエイ(*Torpedo californica*)の発電器官は従来からアセチルコリンリセプターなどのクローニングの材料と

して使われていた。(Na, K) ATPaseも多量に含まれ、従って α , β 両サブユニットのクローニングの材料として用いるには好適である[(Na, K) ATPaseの研究では腎臓、塩腺などの排出器官や脳がよく用いられている]。そこで我々は*T. californica*の発電器官から(Na, K) ATPase α , β 両サブユニットのcDNAクローニングを行なった¹²⁾。

つぎにこれらのcDNAから機能的な(Na, K) ATPaseの発現を試みた¹¹⁾。発現系としてアフリカツメガエル卵母細胞を用いた。

cDNAクローンから*in vitro*で合成したmRNAをアフリカツメガエルの卵巣から取り出した卵母細胞にマイクロインジェクションした。まず各サブユニット蛋白質の合成について検討した。この目的には1サンプル当たり100個程度の卵母細胞にインジェクトすれば良い。["C]ロイシン存在下で3日間培

図2 (Na, K)ATPase サブユニットの卵母細胞での発現 mRNA α (レーン 1, 4, 7)あるいは mRNA β (レーン 2, 5, 8)を単独で、あるいは同時に (レーン 3, 6, 9)アフリカツメガエル卵母細胞にインジェクトした ^{14}C ロイシン存在下で3日間培養後、抗 α 抗血清 (レーン 4~6), 抗 β 抗血清 (レーン 7~9)および両抗血清の混合物 (レーン 1~3)で免疫沈降し、沈降物を SDS 電気泳動後フルオログラフィーを行なった。

図3 発現産物の (Na, K)ATPase 活性 mRNA α および mRNA β を同時に (●: 10ng/卵母細胞, ○: 2 ng/卵母細胞), あるいは mRNA α のみ (▲: 60ng/卵母細胞), mRNA β のみ (△: 60ng/卵母細胞) 卵母細胞にインジェクトした。3日間培養後ホモジェナイズして膜画分を調整し、(Na, K)ATPase 活性を測定した。何もインジェクトしていない卵母細胞の場合 (×) も示してある。

養の後、合成された蛋白質をそれぞれのサブユニットに対する特異的抗体で免疫沈降し SDS 電気泳動で分析した。 α サブユニット mRNA (mRNA α) をインジェクトしたものでは分子量 100 kDa のバンドが、 β サブユニット mRNA (mRNA β) をインジェクトしたものでは 60 kDa の幅広いバンドと 40 kDa

のバンドが見られた (図 2)。両 mRNA 同時にインジェクトしたものではこれらの 3 本のバンドが見られ、また α サブユニットのバンドの濃さは mRNA β を同時にインジェクションすることにより大幅に増加した [この点については後に考察する]。これらのバンドはいずれも組織から精製した α または β サ

ブユニットで吸収操作した抗血清を用いて免疫沈降を行なうと沈降しないことから、mRNA α 、mRNA β の翻訳産物であると結論できた。mRNA β 由来の60kDaと40kDaの蛋白質は、エンドグリコシダーゼFで処理すると両方とも β サブユニットの蛋白質部分の分子量に相当する35kDaのバンドを生じることから、これらは付加糖鎖の状態のことなるもの[40kDaはコア糖鎖のついた未成熟型(βc)、60kDaはそれがゴルジ体を経て加工された成熟型(βm)]と考えられる。

つぎに翻訳されたサブユニットが機能的な酵素を形成しているか否かについて検討した。このためには各サンプルにつき500個ほどの卵母細胞にインジェクトする必要がある、したがって1シリーズの実験には3000~4000個用いる必要がありとても面倒な仕事になる。卵母細胞からミクロソーム画分を調製し(Na, K)ATPase活性を測定すると、何もインジェクトしないコントロールに比べmRNA α とmRNA β を同時にインジェクトしたものではmRNA量に依存して(Na, K)ATPase活性の上昇が見られた。ところがmRNA α 、mRNA β いずれか一方のみを単独でインジェクションした卵母細胞では活性の上昇が見られなかった(図3)。また、これらの卵母細胞のRb⁺取り込み、したがってK⁺の輸送活性および、細胞表面へのウバイン結合も同様に、mRNA α 、mRNA β を同時にインジェクトしたときのみコントロールに比べ値の上昇が見られた。これら結果は機能的な(Na, K)ATPaseが細胞表面に発現するためにはmRNA α だけでなくmRNA β も必須であることを示している。

3. 機能的な(Na, K)ATPaseの形成における β サブユニットの役割¹³⁾

α サブユニットを単独で発現させると β サブユニットと共に発現させた場合に比べ、免疫沈降する α サブユニットの量は非常に少ない(図2、図4。図4では、フルオログラム上の各バンドを鮮明にするため、それぞれ単独でインジェクトする場合はmRNAの量は両方同時にインジェクトする場合の6倍量多く用いてある)。この原因を探るためそれぞれ単独であるいは同時に発現させた場合の生成物の性質を詳しく調べてみた。

mRNAをインジェクトし、[¹⁴C]ロイシン存在下で培養した卵母細胞をホモジェナイズして160000 g×30分遠心すると膜画分はペレットに回収される。

α 、 β 両サブユニットmRNAを同時にインジェクトした場合、発現した蛋白質は α 、 β サブユニットともほとんどがこのペレットに回収される(図4)。 β サブユニットを単独で発現させた場合も同時にペレットに回収されるが、 α サブユニットを単独で発現させた場合は発現量が少ないだけでなく、発現した蛋白質の約40%は上清に回収される。これはさらに強い遠心をかけても沈澱せず、膜に組み込まれずに細胞質中に存在すると考えられる。一方膜画分に回収された60%の α サブユニットは、pH11のアルカリで処理しても膜から遊離せず、膜に挿入されているらしい。しかしこの膜画分をトリプシン処理すると α 、 β 両サブユニットを同時に発現させた際の α サブユニットに比べ、トリプシンで容易に分解されてしまう。したがって単独で発現させた α サブユニットは、たとえ膜に挿入されたとしても α β 複合体を形成した機能的な α サブユニットとは異なる立体構造をとっていると考えられる。 β サブユニットは単独で発現させても、 α サブユニットと共に発現させてもきちんと膜に挿入され、アルカリ耐性やトリプシン耐性には両方の場合で違いがない。

これらの結果は、 α サブユニットは β サブユニットと複合体を形成した場合のみ膜内で安定化され、機能的な立体構造を形成できることを示しているようである。実際インジェクションの際にmRNA α の量を一定とし、mRNA β とmRNA α のモル比を0~2まで変えたところ、 β サブユニットの発現量の増加と共に α サブユニットの発現量および(Na, K)ATPase活性、すなわち機能的な酵素の量が増加した(図5)。菅田晴夫らは α サブユニット遺伝子を細断化してそれぞれを*in vitro*で発現させ、発現産物の膜への挿入状況から、 α サブユニットの大きな細胞質ドメインが構造を完成しないと、それに続くC-末端側の膜貫通セグメントは膜に挿入されないと推測している¹⁴⁾。 β サブユニットは α サブユニットのC-末端側半分の膜への挿入に関与しているのかもしれない。Geeringは¹⁵⁾、 α サブユニットだけで膜にはいると主張していたが、挿入された α サブユニットの量、質とも異常であることがわかり、最近では積極的な β サブユニットの役割を論じている¹⁶⁾。

4. α 、 β 両サブユニットの逐次的発現¹⁷⁾

アフリカツメガエル卵母細胞の発現系では、 α 、 β 両サブユニットをそれぞれ単独で発現させること

図4 発現産物の膜への挿入

mRNA α と mRNA β を同時に(レーン 1～4),あるいは mRNA α (レーン 5～8)あるいは mRNA β (レーン 9～12)を単独で卵母細胞に注射した。3日間培養後卵母細胞をホモジェナイズし,ホモジェネート(homogenate)、その超遠心ペレット(ppt1)、および得られた上清の再超遠心ペレット(ppt2)、再上清(sup2)を免疫沈降した。mRNA を単独でインジェクトした場合は、同時にインジェクトした場合の mRNA α , mRNA β とも 6 倍量用いた。

図5 発現量の mRNA β 依存性

インジェクトする mRNA α を一定(10ng/卵母細胞)とし、同時にインジェクトする mRNA β の量を変えた。発現した α サブユニット(Δ), β サブユニット($\blacktriangle$)の量および (Na, K)ATPase 活性($\circ$)が示してある。(Na, K)ATPase 活性は何もインジェクトしていない場合の値を差し引いてプロットしてある。

ができる。これを利用して二つのサブユニットを順番に卵母細胞中で逐次的に発現させて、実際 β サブユニットは α サブユニットの安定化因子として働くのか、あるいは一旦単独で挿入された異常な α サブユニットは β サブユニットにより再生されるのか、

などの点について検討してみた。すなわちまず mRNA β をインジェクトし β サブユニットを発現させ、次に mRNA α をインジェクトして α サブユニットを発現させる、あるいはその逆を行なってみる。もし先に β サブユニットを発現させた時のみ機

図6 mRNA α , mRNA β の逐次発現 mRNA α およびmRNA β を1つの卵母細胞中で順番に発現させた。先にインジェクトしたmRNAの翻訳はアンチセンスオリゴDNA (anti. oligo.) をインジェクトすることにより停止させた。逐次発現のタイムスケジュールが(a)に、発現産物のフルオログラムが(b)に示してある。卵母細胞の $[^{14}\text{C}]$ ロイシンによるラベルは(a)の実線の期間に実施した。(a)の左側の数字は、(b)の各レーン番号に対応している。

能的な酵素が形成されれば、これは β サブユニットが α サブユニットの安定化因子あるいは受容体として働くことの有力な証拠となる。

ここで問題となるのは先にインジェクトしたサブユニットの mRNA の翻訳を、後でインジェクトする mRNA が翻訳される以前にどうして止めるかということである。もしこの発現の停止が完全でないと両サブユニットを同時に発現させたときと同じことになってしまう。我々はこれを解決するためにアンチセンス DNA を用いた。

アフリカツメガエル卵母細胞では外来、あるいは内在性 mRNA を、その mRNA の一部と相補的な塩基配列をもつ一本鎖の DNA 断片 (アンチセンス DNA) をインジェクトすることにより、選択的に分解できることが知られている¹⁰⁾。これは両者がハイブリッドを形成し、卵母細胞に内在する RNase H がそれを分解することによる。

そこでこの性質を利用して mRNA α または mRNA β をインジェクトして α または β サブユニットを発現させた後、アンチセンス DNA α またはアンチセンス DNA β をインジェクトして先にインジェクトした mRNA を完全に分解する。その後もう一方の mRNA をインジェクトしてこのサブユニットを発現させる。このようにして α 、 β 両サブユニットを逐次的に発現させると、 α サブユニットを先に発現させた場合は α 、 β 複合体の形成は起こらなかった (図 6)。 $[\alpha\beta$ 複合体の形成は、免疫沈降させる際抗 β 抗血清で α サブユニットが沈降することを指標にして判定した。] また、この場合 (K_a, K) ATPase 活性、ウバイン結合量とも何もインジェクトしないコントロールと差は見られなかった (表 1)。一方、 β サブユニットを先に発現させた場合は、後から発現させた α サブユニットの発現量は mRNA α を単独でインジェクトした場合よりも大幅に増加し、さらに抗 β 抗血清による α サブユニットの沈降も見られた。したがって $\alpha\beta$ 複合体が形成されていることは明らかである。さらにこの場合は (Na, K) ATPase 活性、ウバイン結合量とも、 α 、 β 両サブユニットを同時に発現させた場合よりは低いが、コントロールに比べると明らかな上昇が見られた。

以上の結果は、 β サブユニットを先に発現させた場合、小胞体膜上の β サブユニットが、後から発現させた α サブユニットと複合体を形成し、機能的な $\alpha\beta$ 複合体として細胞表面まで輸送されていることを示している。[ウバインは細胞表面に存在する

機能的 (Na, K) ATPase とのみ結合し、したがってウバイン結合量の増加が観察されたことは、機能的な酵素が細胞膜に発現したことを意味している。]
 α サブユニットを先に発現させた場合に $\alpha\beta$ 複合体の形成が起こらないことから、一旦形成された異常な α サブユニットは β サブユニットにより救出されることはないこと、また α サブユニットが β サブユニットと機能的な会合体を形成するには、 α サブユニットは合成の途中、またはその直後に β サブユニットと出会わなくてはならないことを意味していると考えられる。 β サブユニットに出会うことができないと、不完全な α サブユニットはおそらく分解されてしまうのであろう。これらのことは酵素の生合成時に β サブユニットが α サブユニットの受容体として働く可能性を強く示唆している。

5. β サブユニットの糖鎖の役割¹⁰⁾

β サブユニットは多量の糖鎖を含む糖蛋白質であるが、この糖鎖は何か役割を担っているのであろうか。糖鎖の付加は糖鎖の前駆体であるドリコールリン酸の合成を阻害するツニカマイシンにより阻害できる。

ツニカマイシン存在下で前培養した卵母細胞に mRNA α 、mRNA β を同時にインジェクトし、引き続きツニカマイシン存在下で培養する。発現した蛋白質を電気泳動により分析すると、 α サブユニットはツニカマイシンの有無に関係なく 100kDa のバンドとして検出されたが、 β サブユニットはツニカマイシン存在下では 35kDa のバンド一本となった (図 7)。この分子量はアミノ酸配列から計算した β サブユニットの分子量に等しく、したがって糖鎖の付加は完全に阻害されていることを示している。(Na, K) ATPase を発現させた卵母細胞を細胞外からよう素ラベルすると、ツニカマイシン非存在下では 60kDa の成熟型糖鎖を含む β サブユニット (β m) のバンドのみがラベルされ、ツニカマイシン存在下では 35kDa バンド (β o) がラベルされた。[α サブユニットはいずれの場合もほとんどラベルされないが、これは α サブユニットの細胞外領域に、よう素が結合するチロシン残基が少ないことによる。] すなわち、成熟型糖鎖をもつ β サブユニットはもちろんのこと、糖鎖がなくても、 $\alpha\beta$ 複合体は細胞膜まで輸送されていることを示唆している。[β c は細胞内輸送の過程で β m へ変換され、したがって β c のままで細胞膜まで出てくるとはならないと考え

表1 α 、 β サブユニットの逐次発現

	ATPase activity μ mol Pi/mg/h	Ouabain-binding fmol/oocyte
1. mRNA α $\rightarrow$ anti- α oligo. $\rightarrow$ mRNA β	2.56 ± 0.35	19.1 ± 3.7
2. mRNA α $\rightarrow$ anti- β oligo. $\rightarrow$ mRNA α	3.71 ± 0.84	25.8 ± 3.1
3. mRNA α + mRNA β	4.65 ± 0.09	40.5 ± 12.1
4. non injected	2.28 ± 0.19	17.2 ± 3.4

表2 (Na, K)ATPase の発現におよぼすツニカマイシンの影響

	ATPase activity μ mol Pi/mg/h	Ouabain-binding fmol/oocyte	$^{86}\text{Rb}^+$ transporting activity pmol/min/oocyte
mRNAs non-injected	2.9 (n=2)	19 (n=4)	49 (n=4)
mRNAs injected			
- Tunicamycin	7.3 (n=3)	119 (n=4)	172 (n=4)
+ Tunicamycin	7.4 (n=3)	114 (n=4)	122 (n=2)

図7 発現に対する糖鎖の影響 N-結合型糖鎖の付加を阻害するツニカマイシン(Tm)存在下で α 、 β 両サブユニットを発現させた。左側2本のレーンは ^{14}C ロイシンで発現産物をラベルし免疫沈降した。右側3本のレーンは3日間培養後、卵母細胞表面の蛋白質を細胞外側から放射性ヨウ素でラベルし免疫沈降を行なった。 β_m 、 β_c 、 β_o はそれぞれ成熟型糖鎖、コア糖鎖をもつ β サブユニットおよび糖鎖を欠く β サブユニットを示す。

られる。]さらに(Na, K)ATPaseの活性、 Rb^+ 輸送活性、ウバイン結合量ともにツニカマイシンとは無関係に、何もインジェクトしないコントロールよりも上昇していた(表2)。

これらの結果は(Na, K)ATPaseの場合は、糖鎖の有無に関わりなく機能的な酵素が形成され、細胞の表面まで輸送されていることを示している。

6. おわりに

1950年代末にSkouが²⁰⁾(Na, K)ATPaseを発見して以来、Jorgensenが^{21, 22)}酵素の精製法を確立するまで、(Na, K)ATPaseの研究は速度論的解析が主流を占め、構造やそのサブユニット組成は明らかではなかった。 α サブユニットはATPによりりん酸化される中間体を形成するため、分子量100kDa

の成分として、未精製標品でも比較的早くからオートラジオグラム上でその存在が知られていた。ところが β サブユニットは、1970年代初めに酵素の精製法が確立し、精製標品中にその存在が認められてもなお(Na, K)ATPaseの成分であることについて疑問を抱く人は少なくなかった。これは、それまでに知られていた(Na, K)ATPaseに特異的な現象はすべて α サブユニットに結びついていたこと、また(Na, K)ATPaseと類似のイオン輸送性ATPaseである筋小胞体のCa-ATPaseや、胃の(H, K)ATPaseでは β サブユニットのような小サブユニットをもたないと考えられていたことなどによる。

我々はアフリカツメガエル卵母細胞の発現系を用いた研究により、 β サブユニットが少なくとも機能的な(Na, K)ATPaseの発現に必須の成分であり、酵素の生合成時に α サブユニットの安定化受容体として働く可能性を示唆することができた。しかしながら細胞膜上の(Na, K)ATPaseの一方の成分として果たす役割は、依然として不明のままである。

最近(H, K)ATPaseにも(Na, K)ATPaseの β サブユニットに類似した小サブユニットが存在することが報告されており^{23, 24)}、 β サブユニットが酸素の細胞内輸送に関与する可能性が議論されている。小胞体で合成された酵素が、細胞膜に選別、輸送される過程に β サブユニットが関与しているというものである。このことは筋小胞体のCa-ATPaseは小胞体に局在し、小サブユニットを持たないことともよくつじつまが合う²⁵⁾。また(Na, K)ATPaseの β サブユニットには数種のサブタイプが存在するが、その一つがグリア細胞間接着因子(AMOG)と同一であることが報告された²⁶⁾。 β サブユニットがイオン輸送とは直接関係のない細胞間相互作用に関与している可能性が示唆されたことは、 β サブユニットの機能を探るうえで、画期的なことであった。さらに興味がある事実は、生理的環境下で β サブユニットが単独で発現している例が示されたことである。良く知られているように腸管上皮細胞の微絨毛側には(Na, K)ATPaseは存在しない。ところがラット大腸後半部では、抗 α 抗血清で染めると期待どおり微絨毛側は全く染まらないが、抗 β 抗血清では側部や基底部だけでなく微絨毛もくっきりと染まったのである²⁷⁾。大腸前半部や小腸ではこうした像は観察されず、 α サブユニットと複合体を形成していない β サブユニットが、大腸後半部の微絨毛にのみ存在することになる。もちろんこれが、抗 α 抗血清と

は反応しない別の蛋白質との複合体である可能性は否定できないが、 β サブユニットの機能を探る有効な手段を提供してくれそうである。

文 献

- 1) Rossier, B. C., Geering, K. & Kraehenbuhl, J. P.: Trends Biochem. Sci., 12, 483-487 (1987)
- 2) Cantley, L. C.: Curr. Top. Bioenerg., 2, 201-237 (1981)
- 3) Broude, N. E., Modyanov, N. N., Monastyrskaya, G. S. & Sverdov, E. D.: FEBS Lett., 257, 1-9 (1989)
- 4) Collins, J. H. & Leszyk, J.: Biochemistry, 26, 8665-8668 (1987)
- 5) Jorgensen, P. L.: Biochim. Biophys. Acta, 694, 27-68 (1982)
- 6) Jorgensen, P. T. & Andersen, J. P.: J. Membr. Biol., 103, 95-120 (1988)
- 7) Kirley, T. L.: J. Biol. Chem., 264, 7185-7192 (1989)
- 8) Kawamura, M., & Nagano, K.: Biochim. Biophys. Acta, 774, 188-192 (1984)
- 9) Kawamura, M., Ohmizo, K., Morohashi, M. & Nagano, K.: Biochim. Biophys. Acta, 821, 115-120 (1985)
- 10) Sabatini, D., Colman, D., Sabban, E., Sherman, J., Morimoto, T., Kreibich, G. & Adesnik, M.: Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 46, 807-818 (1981)
- 11) Noguchi, S., Mishina, M., Kawamura, M. & Numa, S.: FEBS Lett., 225, 27-32 (1987)
- 12) Noguchi, S., Noda, M., Takahashi, H., Kawakami, K., Ohta, T., Nagano, K., Hirose, T., Inayama, S., Kawamura, M. & Numa, S.: FEBS Lett., 196, 315-320 (1986)
- 13) Noguchi, S., Higashi, K. & Kawamura, M.: J. Biol. Chem., 265, 15991-15995 (1990)
- 14) Homareda, H., Kawakami, K., Nagano, K. & Matsui, H.: Molecular and Cellular Biol., 9, 5742-5745 (1989)
- 15) Geering, K., Meyer, D. I., Paccolat, M. -P., Kraehenbuhl, J. -P. & Rossier, B. C.: J. Biol. Chem., 260, 5154-5160 (1985)
- 16) Ackermann, U. & Geering, K.: FEBS Lett., 269, 105-108 (1990)
- 17) Noguchi, S., Higashi, K. & Kawamura, M.: Biochim. Biophys. Acta, 1023, 247-253 (1990)
- 18) Dash, P., Lotan, I., Knapp, M., Kandel, E. R. & Goelet, P.: Proc. Natl. Acad. Sci, USA, 84, 7896-7900 (1987)
- 19) Takeda, K., Noguchi, S., Sugino, A. & Kawamura, M.: FEBS Lett., 238, 201-204 (1988)
- 20) Skou, J. C.: Biochim. Biophys. Acta, 23, 394-401 (1957)
- 21) Jorgensen, P. L. & Skou, J. C.: Biochim. Biophys. Acta, 233, 366-380 (1971)
- 22) Jorgensen, P. L.: Biochim. Biophys. Acta, 356, 36-52 (1974)
- 23) Okamoto, C. T., Karpilow, J. W., Smolka, A. & Forts, J. G.: Biochim. Biophys. Acta, 1037, 360-372 (1990)
- 24) Hall, K., Perez, G., Anderson, D., Gutierrez, C., Munson, K., Hersey, S. J., Kaplan, J. H. & Sachs, G.: Biochemistry, 29, 701-706 (1990)
- 25) Leberer, E., Caruk, J. M. H., Clarke, D. M., Green, N. M., Zubrzycka-Gaarn, E. & MacLennan, D. H.: J. Biol. Chem., 264, 3484-3493 (1989)
- 26) Gloor, S., Antonicek, H., Sweadner, K. J., Pagliusi, S., Frank, R., Moos, M. & Schachner, M.: J. Cell Biol., 110, 165-174 (1990)
- 27) Marxer, A., Stieger, B., Quaroni, A., Kashgarian, M. & Hauri, H. -P.: J. Cell Biol., 109, 1057-1069 (1989)