生体膜におけるNa⁺ポンプのメカニズム

原 諭 吉

東京医科歯科大学医学部 〒113 東京都文京区湯島1-5-45

第39回膜研究会 昭和59年6月9日 東京大学薬学部にて講演

Mechanism of the Sodium Pump

Yukichi HARA

Dept. of Biochem., Tokyo Medical and Dental University School of Medicine,
Yushima, Bunkyo-ku, Tokyo 113

The sodium pump consists of two processes which are ATP hydrolysis and the ion-translocation across the cell membrane. There are still some questions regarding the mechanism of the coupling between the two processes, though the mechanism of Na⁺, K⁺-ATPase has been fairly well established. In 1972 Post et al. suggested that K⁺ ions or K⁺-congeners were occluded in Na⁺, K⁺-ATPase. Recently, direct evidences for the existence of occluded-ion forms of the enzyme were obtained from measurements of the off-rate of Rb⁺ ion or Na⁺ ion from the enzyme. As the occluded-ion forms appear to be intermediates in the process of the ion-translocation, studies on the ion-occlusions might be important to understand the coupling of the processes mentioned above. The K⁺-occlusion and Na⁺-occlusion were reviewed as well as some general properties of Na⁺, K⁺-ATPase.

Key words: Na⁺, K⁺-ATPase, Occluded-ion form, Sodium pump, Active transport, Sodium ion, Potassium ion

今日は膜の専門家の方々に、私達の仕事を聞いていただけるとの事で大変光栄です。お分かり難いことがありましたら、どうぞ途中で質問をお願いします。

「生体膜におけるNa⁺ポンプのメカニズム」という大変漠然とした題名ですが、特にイオンの結合、しかもその中でイオンの occlusion という現象についての話をいたします。occlusion は trap と非常に似たことです。日本語では閉塞と訳しておりますが、閉塞という言葉は、閉塞性黄疸とか、腸閉塞と言うように細い管が詰まるというニュアンスがありまして誤解を招きますので、ここでは occlusion,あるいは occluded form という英語をそのまま使わせていただきます。これはどういうことかと言いますと、ナトリウムポンプの本体でありますNa⁺, K⁺-ATPaseとイオン、すなわちカリウムイオンやその同族体との結合が非常に強固でなかなか外れてこない状態のことです。これを最初に提唱したのはR. L. Postで、1972年にEP中間体の動力学的解析から occlusion が起こり得ることを発表しました。それが1979年になりまして、放射性アイソトープを使い実証されました。現在カリウムイオンの occlusion は、非常に確かなものと考えられております。一方、Na⁺-ポンプ

で運ばれますもう一つのイオンのナトリウムについても、そういう状態があるかもしれないということで、私達も調べまして、昨年ですが、occlusionらしいものを見つけました¹⁰⁾。そのことをお話ししたいと思います。もう一つは、occlusionの概念が最初は、イオンと酵素との結合は速いが離れるのは非常に遅いということだったのですが、次第に別の意味が附与されるようになりました。その辺の経緯もお話ししたいと思います。

初めに、よく理解していただくために、Na⁺, K⁺-ATPase全般についての簡単な話をします。2番目にPostの実験を少し整理して話します。3番目には、⁸⁶Rb⁺の occlusionの実験を紹介します。と言うのは、それと非常に似た方法で、私達もNa⁺-occlusionを調べましたので、参考になると思います。最後に、私達の実験をお見せしようと思います。スライドをお願いします。

これは細胞膜を表わしております、ここにNa⁺, K⁺-ATPaseという酵素が埋まっている (Fig. 1)。左側は細胞の内側、右側は細胞の外側であります。ナトリウムを細胞の内から外へ、カリウムを外から内へ3:2という比で、ATP 1分子の加水分解に伴って輸送する。こういう酵素がすべての動物細胞膜に存在することが知られ

Fig.1 ナトリウムポンプの役割

ております。この Na^+ , K^+ -ATPase の研究は、主に 2 つの方向から今までなされてきました。一つはこのままの条件すなわち細胞を丸ごと扱い、イオンの輸送量からポンプ機構を解析しようという方法です。もう一つは、膜を細かく刻んで、しかも膜についている他のタンパク質をなるべく除いて、これを一つの酵素として扱う。後者の場合には、試験管の中で膜の内、外は全く均一になってしまいますけれども、酵素反応として扱う場合には、その方が都合が良いわけです。むしろ後者の実験がここ 20 年くらい主流を占めており、いろいろな反応中間体が見出され、ATPase 反応のメカニズムがかなり明らかになったのですが、それとイオンの輸送機構との関係はいまだにわからないところがたくさんあります。そこで、イオンの輸送現象と、ATPase 反応との共役を調べようというのが私達の目的なのですが、これからお話するイオン occlusion がその共役メカニズムを解く鍵となるのかもしれないと考えております。

Fig.2 は私達の使っている酵素標品の SDS-ポリアクリルアミド電気泳動の図であります。主に二つのタンパク質から出来ております。これは α 、 β と名前がついておりまして、 α -サブユニットは 10 万ダルトン前後、 β -サ

Fig.2 ブタ腎 SDS 酵素標品の SDS-PAGE
 α -サブユニットは 98,000 ダルトン、 β サブユニットは 58,000 ダルトン

Fig.3 Na^+ , K^+ -ATPase のイオン要求性

a) $[\text{K}^+]$ を 14mM に固定し、 $[\text{Na}^+]$ を変化させた場合、その他のイオン組成は 5mM MgCl_2 , 3mM ATP (Tris), 0.5mM EDTA, 20mM Tris (HCl) pH 7.6.
 b) $[\text{Na}^+]$ を 140mM に固定し、 $[\text{K}^+]$ を変化させた場合、他の条件は a) と同じ。

ブユニットがおおよそ 6 万ダルトンで糖鎖を持っております。このような二種のポリペプチドから構成されております。

次に ATPase の酵素としての性質を少しお話しします。この酵素はナトリウムとカリウムイオンを要求するために、 Na^+ , K^+ -依存性 ATPase と呼ばれているのですが、そのイオン要求性がどんなものかをざっとお見せいたします。この活性発現には、ATP とマグネシウム、ナトリウムとカリウムの 4 つが必要です。Fig.3b ではナトリウム濃度を固定しておきまして、カリウム濃度を増加させていく。例えば、40°C のところをみますと、こんなふうに活性が増加している。そのカリウムに対する $K_{0.5}$ は約 1mM です。

逆にカリウム濃度を固定してナトリウム濃度を増加しますと、活性は飽和曲線を示します (Fig.3a)。このように Na^+ と K^+ の 2 つのイオンがある比で共存する時に、

Fig. 4 Na^+ , K^+ -ATPase の反応スキーム

I と O は細胞の内・外を表す。結合する Na^+ と K^+ の個数は表示していない。また Mg^{++} の役割も省略した。図中の点線は細胞膜を表し、各中間体のイオン結合部位が細胞膜の内側（図中の上）、外側（図中の下）あるいは内部にあることを示す。本文参照

非常に高い活性を持つという酵素です。

この酵素の現在知られております反応スキームは、およそこのように書くことができます (Fig. 4)。 Na^+ , K^+ -ATPase は、 E_1 と E_2 、あるいは $\text{E}_1\text{-P}$ 、 $\text{E}_2\text{-P}$ という 2 つのコンホメーションをとることが知られております。この 2 つのコンホメーションはタンパク構造が違わしく、いろいろな分光学的な測定、あるいはタンパク分解酵素による消化のされ方からも推測されております。それ自体大変おもしろい問題ですが今はむしろ他の側面が非常に重要であります。と申しますのは、 E_1 というタイプはナトリウムに対して非常に高い親和性を持っています。一方、 E_2 型はカリウムに対して非常に高い親和性を持っているのです。イオンを結合していない酵素は事実上存在しませんので、細胞の中では、おそらく E_1 は $\text{E}_1 \cdot \text{Na}$ あるいは $\text{E}_1\text{P} \cdot \text{Na}$ という Na^+ 結合型で存在している。ナトリウムとカリウムを運ぶ際、イオンを結合し、あるいは細胞膜の反対側でそのイオンを放したりという場合に、 E_1 と E_2 のコンホメーション変化をすることによって、イオンに対する親和性が変わると、現在考えられております。およそのメカニズムは、 E_1 と Na^+ と ATP とでコンプレックスが出来まして、そこから ATP がはずれて、リン酸化中間体 $\text{E}_1\text{P} \cdot \text{Na}$ というものが出来ます。この E_1P は、ATP の γ 位の P がタンパク質のある側鎖（アスパラギン酸）につきまして、リン酸化した形で、非常に高いエネルギーを持った中間体であります。次にこれが E_2P という別の型のリン酸化中間体になる時に、ナトリウムに対する親和性が非常に下がり、細胞の外側でナトリウムを放出します。 E_2P はカリウムに対する親和性が高いので、細胞の外のカリウムと結合

Fig. 5 CDТА添加後のリン酸化中間体の分解過程

し $\text{E}_2\text{P} \cdot \text{K}$ になりますが、加水分解によってただちに脱リン酸化して E_2K になります。この E_2K はまた E_1 にもどり、細胞の内側でカリウムを放出します。 E_2K から E_1K になる、このステップが ATP で促進されます。この促進に関わる ATP の結合部位は低親和性 ATP 結合部位と呼ばれ、基質としての ATP 結合部位である高親和性 ATP 結合部位とは区別されて扱われます。しかし、異なる実体か否かはわかっておりません。低親和性 ATP 結合部位は、ATP 以外のヌクレオチドでも代用可能でありまして、ADP とかリン酸化能のない AMP-PCP, AMP-PNP といった ATP 類似体でも代用できます。

ナトリウムの occlusion の時にリン酸化中間体が関与しますので、リン酸化中間体の性質について少し述べておきます。前のスライドで E_1P と E_2P という 2 つのリン酸化中間体が存在すると申しました。今、ATP とナトリウムとマグネシウムと酵素を一緒にしますと、カリウムイオンがないためにリン酸化中間体がたまってきます。そこへ CDТАを加えますと、マグネシウムイオン濃度が急速に低下するために、今まで生じていたリン酸化反応はそこで停止します。その後は、もっぱらリン酸化中間体が分解するだけになります。Fig. 5 を見ていただきます。いろいろな Na^+ 濃度を用いてリン酸化した例を示しています。仮に、100 mM のナトリウムを使ってリン酸化した場合に、0 秒で CDТАを加えると、このように脱

Fig. 6 ADPとCDTAを添加後のEPの分解過程¹⁾表示した Na^+ 濃度はリン酸化時のもの

リン酸化が起こっていく。縦軸が残存 EP レベル、横軸が秒ですから、だいたい $0.07 \sim 0.08 / \text{sec}$ の速度で分解してゆきます。 K^+ の無い場合のこの様な脱リン酸化は、主に E_2P が自然分解するためと考えられております。

次に、CDTAを加えてリン酸化を止めるとともに、ADPを加えます。ADPは $\text{E}_1\text{P} \cdot \text{Na}$ 合成に先立って酵素からはずれますから、ADPを加えると、 $\text{E}_1\text{P} \cdot \text{Na}$ は急に逆方向に引っぱられ、ATPの合成が起こります。すなわち、 E_1P と E_2P の相互の変換速度に比べ、充分量のADP存在下での $\text{E}_1\text{P} \cdot \text{Na}$ から E^+ATP への変換速度は数倍早いのです。したがって、 E_1P と E_2P が両方混じっている系にADPを加えると、 E_1P だけが非常に速く分解し、残りの E_2P はゆっくり分解していくことになります。そこで、ADPを加えたあとのEPの時間経過は2相性になるはずです。

一方カリウムをCDTAとともに加えますと、 E_2P の脱リン酸化はカリウムで促進されますが、 $\text{E}_1\text{P} \cdot \text{Na}$ は直接はカリウムで分解しません。したがって、 E_2P が速く分解し、残り $\text{E}_1\text{P} \cdot \text{Na}$ は、いったん E_2P になってからカリウムイオンで分解されるため、ゆっくり分解していくことになります。そこで、 K^+ を加えたあとのEPの時間経過も2相性になります。このようにして、2つのリン酸化中間体を動力学的に分別することができます。

Fig. 7 KClとCDTAを添加後のEPの分解過程¹⁾リン酸化時に用いた Na^+ 濃度を表示した。

Fig. 8 リン酸化時の Na^+ 濃度と E_1P 量¹⁾
○はFig. 6から求めた E_1P 量。
●はFig. 7から求めた E_2P 量を全EP量から引いた値。

経過も2相性になります。このようにして、2つのリン酸化中間体を動力学的に分別することができます。

今のことを図で示しますと、Fig. 6がCDTAと一緒にADPを加えた場合です。例えば、リン酸化時のナトリウムが111mMの場合、ADP + CDTAの添加直後EPレベルがちょっと落ちて、それから後ゆっくりした

脱リン酸化に移ります。ちょっとの落ちとは、 $E_1P \cdot Na$ が ADP により急激に分解したためです。もっと極端な場合、 Na^+ が 1390mM の場合は、大部分の EP が ADP 添加で急速に消失してしまいます。ゆっくりした相を 0 秒に外挿して、急激に低下した分を見積ると、1390mM Na^+ で作られた EP の 95% が E_1P ということです。

Fig.7 は、さきほどとはことなり、CDTA と一しょにカリウムを加えます。例えばリン酸化時の NaCl が 100 mM の場合には、大部分の EP が K^+ + CDTA で急速に分解してしまい、わずかな残りの EP がゆっくり分解してゆきます。この場合は、88% が E_2P であると見積ることができます。全体に前の図に比べて傾きがゆるいのは、観測し易くするために、脱リン酸化時の Na^+ 濃度を高めてあるからです。

今お話しした方法で、 E_1P と E_2P レベルを調べた例です。白丸(○)は ADP 感受性、つまり ADP を加えて急激に分解する分、すなわち E_1P レベルを表わしています。黒丸(●)は、カリウムを加えて急におちる分を 1 から減じた値です。横軸にリン酸化に使ったナトリウム濃度をとりますと、○、●はほとんど同じカーブに乗ります。ということは、 E_1P と E_2P は両方加えると約 1 ということです。 E_1P と E_2P 以外の EP、すなわち、ADP にも K^+ にも感受性を持たない EP は、たとえ存在しても事実上無視し得るとも言えます。こういう方法で、 E_1P と E_2P 量を測定することができます。

リン酸化の際の Na^+ 濃度が上がると E_1P が段々増えていく。これは、今日は詳しくお話しませんが、 E_1P と E_2P の間で Na^+ が放出されるので、もしリン酸化の時の Na^+ 濃度を上げれば、 E_1P — E_2P 平衡が E_1P に傾き、 E_1P がたまっていくことを示しています。逆に低い濃度でリン酸化した場合には、大部分の EP が E_2P になります。なお、先にお見せした反応スキームでは、 $E_2P \cdot Na$ という中間体が $E_1P \cdot Na$ と E_2P の間に書いてありました。しかし、 E_2P は Na^+ に対して親和性が低いので、この中間体のレベルは非常に低く、ここでは無視しております。

今までは、後で述べる実験の前置きでありまして、これから、このイオンの occlusion の話です。1972 年、occlusion について Post が初めて記載しました²⁾。それまでは、私達の分野でこの言葉は使われていませんでした。

Post は、どういふ実験から occluded State の存在を

Fig.9 Li^+ あるいは Rb^+ の EP レベルへの影響²⁾
0 秒で Li^+ あるいは Rb^+ + CDTA を加えた。

知ったかということでもあります。

8mM の Na^+ の存在下でリン酸化をしますと、主として E_2P ができます。そこに CDTA と一緒に、カリウムの同族体であるリチウムイオンやルビジウムイオンを加えます。このリチウムイオンやルビジウムイオンは、ナトリウムポンプにおいてカリウムのかわりに働くことが知られております。ATPase 反応も、ナトリウムイオンとルビジウムイオンで、ナトリウムイオンとカリウムイオンの場合と全く同じような活性を示します。ただし、 K_m は違います。Post は、EP に CDTA と一緒にルビジウムまたはリチウムを加えて、脱リン酸化の時間経過を調べました (Fig.9)。用いたリチウムまたはルビジウムの濃度は、その脱リン酸化速度が同じになるようにしてあります (---△---, ---○---)。次に、CDTA を省いて、ルビジウム (—●—)、あるいはリチウム (---△---) だけを EP に加えました。CDTA を添加した場合には、リン酸化反応が止まりますが、ルビジウムあるいはリチウムだけを加えた場合には、 Mg^{++} が CDTA に取られませんので ATPase 反応は進みます。つまり、反応系には ATP と Na^+ と Mg^{++} が入っていて、そこにリチウムあるいはルビジウムが入り、ATPase 反応が促進されます。その時の Steady state の EP 中間体レベルは、図からリチウムのとき 78%、ルビジウムのときは 38% で、中間体の量がこの 2 つで大幅に違うことがわかります。リチウムやルビジウムは脱リン酸化を促進しますが、その脱リン酸化速度は同じはずで、それにもかかわらず、中間体のレベルが違うのは何故か。理由はいくつか考えられますが、一番には、リン酸化の速度が、ルビジウムやリチウムなどで影響を受けるかもしれないということです。

Fig. 10 高濃度 NaCl 添加後の再リン酸化過程²⁾ Fig. 11 Na^+ , K^+ -ATPase の反応スキーム²⁾
 $\text{K} \cdot \text{E}_2$ からの K^+ の遊離が遅いことを点線で示す。

ところがその可能性はほとんどない。そうしますと、他のステップでリチウムとルビジウムが異なる働きをするという可能性です。その辺が議論になります。この中間体の定常状態レベルが、他の同族体を使うとどうなるか数字で示します。例えば、カリウムの場合は49%, ルビジウムは38%, リチウムは78%, タリウムは25%で、これらのイオンは、同じ脱リン酸化速度を与える濃度で用いております。これらのことから、中間体のレベルが K^+ 同族体で随分影響を受けることがわかりました。

次に、リン酸化中間体を低濃度の Na^+ 存在下で作ри、CDTA 添加後6秒の点でルビジウムを加えます (Fig. 10)。リン酸化中間体は脱リン酸化して、定常状態レベルまで低下します。そこに、高濃度のナトリウムを添加しますと、EP レベルが再び増加しはじめます。この再び始まるリン酸化と、最初のリン酸化のカーブを比べると随分速度が違います。二度目のリン酸化が非常にゆっくりしています。これは何故か。それから、いろいろな試薬の

再リン酸化のカーブへの影響を調べました。テトラフェニールボロンという、カリウムあるいはその同族体と結合する試薬を使うと非常に速く再リン酸化がみられます。一方、フロリジンを加えると再リン酸化は遅くなりました。

以上の事から Post は次のように考えました。ATPase 反応では $\text{E}_2\text{K}^+ \rightarrow \text{E}_1 + \text{K}^+$ が律速段階である。それは E_2K からの K^+ の遊離速度が小さいためである。 K^+ のかわりに Rb^+ や Li^+ を用いると、その遊離速度は各々異なるため酵素回転速度も異なり、定常状態の EP レベルも異なる。テトラフェニールボロンは K^+ あるいは Rb^+ , Li^+ などと結合し、そのイオン濃度を低下させるので、 $\text{E}_2\text{K} \leftrightarrow \text{E}_1 + \text{K}^+$ の平衡が右にずれ、 E_2K から E_1 への変換速度が早くなる。一方、フロリジンは E_2K を安定化して、 E_1 への変換速度を下げ、再リン酸化を遅くする。これは、卓越した推論でした。

E_2K が安定な型ということで、occluded form という言葉を、Post らは提唱しました。更に、ATP の濃度が高い場合には、ATP が低親和性 ATP 結合部位に働き、 E_2K からの K^+ の遊離が促進されます。Post らは、kinetical な仕事で occluded form の存在を推測しましたが、このような中間体が本当に存在するかどうかは、興味ある問題でした。

また別の人達ですが、Glynn らは、カリウムのかわりに ^{86}Rb というアイソトープを用いて、非常に巧みな実験をして、occluded form の存在を直接に調べました³⁾。Fig. 12 のようにツベルクリンの注射筒を利用します。こ

Fig. 12 Rb^+ occlusion の検出法

1mM ツベルクリン注射筒に0.5mlのダウエックス 50×8をつめ、酵素50~100 μg , $^{86}\text{RbCl}$ 0.1~1mM, 100mM Tris (HCl) pH 7.5, 0.1mM EDTA, 0.5ml を一定速度で通し、溶出液の ^{86}Rb を測定した。

の中に陽イオン交換樹脂, 100mM トリスー塩酸バッファーで平衡化したダウェックス 50 をつめておきます。イオン交換層の上には, よく洗った砂を置き, 酵素液とダウェックスとが内筒を押すまでは混ざらないようにします。レジンの上には, 酵素と塩化ルビジウムを入れておきます。さらにその上に少し空気層を置き, 内筒をつけて, 一定速度で押す装置によって上から押します。溶出される ^{86}Rb のカウントを調べます。その原理は, 酵素とルビジウムイオンは Fig. 12 のように平衡になっております。これが, イオン交換樹脂層の中に入りますとルビジウムイオンは樹脂に吸着され, トリスあるいはプロトンに置き換わります。遊離のルビジウムイオン濃度が極端に下がりますと, この反応 $\text{E} + \text{Rb}^+ \rightarrow \text{E} \cdot \text{Rb}^+$ は進行しなくなり, 樹脂の中では $\text{E} \cdot \text{Rb}^+ \rightarrow \text{E} + \text{Rb}^+$ 反応のみが起きます。溶出されるカウントは $\text{E} \cdot ^{86}\text{Rb}^+$ ですが, したがって, カラム通過後に残っている酵素-ルビジウム複合体の量を知ることができます。イオン交換樹脂と酵素との接触する時間をいろいろ変えて, 溶出する ^{86}Rb 量を調べると, E_2Rb からの Rb^+ の解離の速度を知ることができます。

横軸が, カラム内での酵素の滞在期間で, 秒で表わしています。黒丸(●)が今お話ししている実験です(Fig. 13)。縦軸は, 溶出された Rb^+ 量です。タンパク質はレジンの吸着することがありますので, 溶出液のタンパク量を測定して, タンパク当りの放射活性を出し, これをプロットします。白丸(○)は Mg^{++} が入っていて, 今は関係がありませんので省きます。この図から計算される Rb^+ の解

Fig. 13 E_2Rb からの Rb^+ の遊離速度⁴⁾
 カラムの流速を変える事により E_2Rb のカラム内滞在時間を変え, 溶出される ^{86}Rb を測定した。
 ●は Mg^{++} なし, ○は Mg^{++} 2mM 存在下。

離速度は約 0.12/sec. この実験は室温で行っていますが, イオンと酵素との結合ですから, イオンがはずれていく速度として, 0.12/sec というのは非常に遅いことがわかります。何か特別な事情がない限り, こういうことは起こらないだろうと考えられます。先程の実験で, 低親和性の ATP 結合部位に, ATP あるいは ADP や他のヌクレオチドが付くと, Rb^+ の解離速度が速くなると申しましたが, それをイオン交換カラムの実験で調べてみます。酵素と Rb^+ の混合液が, イオン交換樹脂に入る直前で ADP を加えますと, 加えた ADP 濃度に比例して溶出される ^{86}Rb のカウントが減少します。ADP 200 μM では, ADP 無しの場合の 30% でした。これは, ADP 濃度が上がると, Rb^+ の解離速度が速くなるためと考えられます。

Fig. 14 は, Rb^+ 濃度をいろいろと変え, 溶出される ^{86}Rb 量をプロットしたものです。このような S 字曲線ができます。ただし, n が 2 か 3 かは, なかなか決め難く, どちらにも合うようです。

E_1K^+ と E_2K^+ というのは, コンホメーションの変化に違いがありまして, いろいろな測定で区別できると先程述べました。彼らは, ATPase 分子のトリプトファンの蛍光, あるいは酵素に結合したエオシンの蛍光が, E_1 と E_2 で異なることを利用して E_2 から E_1 への転換速度を調べました。その結果, E_2 から E_1 への転換速度はちょうど 0.1~0.2/sec であり, 見掛け上, Rb^+ の解離速度と非常に似ていることがわかりました。また, ADP などのヌクレオチドによる解離速度の増加と, $\text{E}_2 \rightarrow \text{E}_1$ の転換速度の増加も平行しておりました。したがって, ルビジウムの occlusion というのは, 実は, ルビジウムイオンがはずれてくるのが遅いのではなくて, 酵素にはイオンがはずれない型とはずれる型とがあり, はずれるような状態に変換するのが非常に遅いと考えた方がよいと思われます。

E_2P から E_2 になると, Pi がはずれコンホメーションの変化を生じます。それならば, E_2K に Pi を加え, 逆反応で E_2P を形成すれば Rb^+ のはずれるのが速くなるかもしれないと予想できます。すなわち, 逆反応によって別の酵素型にするわけです。これについては, $\text{Rb}^+ \cdot \text{E}_2$ に無機リンを加えても, Rb^+ の解離速度がやはり速くなることが見出されており, この $\text{E}_2 \cdot \text{Rb}^+$ というのは, それ自体の形からは Rb^+ の解離速度は非常に小さいが, 反応が正反応・逆反応のどちらの向きに進んでも, Rb^+ の解離速度は速くなる。すなわち, $\text{E}_2 \cdot \text{Rb}^+$ はなかなかイオ

Fig. 14 Rb^+ occlusion への Rb^+ 濃度の影響 ⁴⁾

Fig. 15 E_2K が occluded form である事の説明
 $\text{E}_2\text{K} \rightarrow \text{E}_1\text{K}$ になるか、 $\text{E}_2\text{K} + \text{Pi} \rightarrow \text{E}_2\text{PK}$
 になるかしないかぎり、酵素から K^+ は遊離しない。
 点線は反応速度が著しく遅い事を示す。

Na-Na exchange

Fig. 16 Na: Na 交換反応の経路
 Na^+ は 3 個はこばれるが個数は表示していない。

ンがはずれない状態、であることがわかってきました。そういうわけで、現在これを occluded form と呼んでいます。occluded form の概念は、以前は、単にそのイオンがはずれるのが遅いということだったのですが、今は 2 つのコンホメーションの変化にはさまれた型であって、その型からは直接イオンははずれない。けれども、イオンがはずれるような型に変化するのが非常に遅い、そういう状態を occluded form と呼んでいます。

同じような occluded form が、 Na^+ の方にもあるかどうかは非常に興味があります。それでは一体、どの中間体が occluded form かを考えてみます。

Fig. 16 は、 Na^+ - Na^+ 交換という反応をみています。赤血球を用いて、外液は NaCl のみを含みます。内側には、 ATP 、 ADP 、 Mg^{++} が存在します。この場合、細胞内外の Na^+ の交換が起こることがわかっております。しかも、 ATP の加水分解は伴いません。これは次の反応を経由すると考えられます。 E_1 から $\text{E}_1 \cdot \text{ATP}$ になり、

その時に細胞の内側の Na^+ を結合する。それから、 $\text{E}_1\text{P} \cdot \text{Na}^+$ を経て E_2P になり、 Na^+ を細胞の外に放出します。外側に Na^+ があって、 K^+ がいないため、 E_2P より先へは進み難くなっております。ADP が存在するので、 E_1 から E_2P までの反応経路が平衡状態になり、行ったり来たりするために、細胞外の Na^+ と細胞内の Na^+ とが交換をする。したがって、この経路の中を動く限り ATP の加水分解は起こりません。 K^+ の occluded form の場合からの類推ですが、イオンがはずれ難い型とは、膜の中にイオンが埋まっている状態、すなわち膜を横切る時に生じる型であろうと考えられます。図示した経路のどこかで、 Na^+ は膜を横切るはずですから、もし occluded Na^+

formがあるとしたら、そこに occluded form があるに違いない。現在知られている酵素中間体の内では、それは $E_1P \cdot Na^+$ かもしれない。この点を調べてみます。

$E_2P \cdot K^+ \xrightarrow{k_2} E_1K \xrightarrow{K^+} E_1$ の反応では、 k_2 が ATP または ADP 濃度に依存し、ヌクレオチド濃度が低い場合には、 k_2 は非常に遅く (0.1/sec), また $E_2K \rightarrow E_2P$ への逆反応は無機リンが無い場合には進行しないので、 E_2K を安定に試験管内で得ることができ、 K^+ の occluded form が検出できました。一方、 Na^+ の occluded form を検出する場合には、 E_1P の分解の速度がどれ程か知っておく必要があります。私も、EP 中間体の生成・分解の動力学的解析から、 $E_1P \rightarrow E_2P$ 変換速度 (k_1) を求めました¹⁾。 k_1 は、 $0^\circ C$ で Na^+ が 120mM の時だいたい 0.5/sec でした。0.5/sec というのは、カリウムあるいはルビジウムイオンの occluded form の解離速度よりもはるかに速いものですから、もし Na^+ の遊離速度が K^+ や Rb^+ と同じであれば、 Na^+ occluded form はとても検出できません。しかもこれは $0^\circ C$ です。

ですから、この E_1P と E_2P の間を何らかの方法でブロックしておかないと、 E_1P と Na^+ との結合を測定するのは不可能です。

この間をブロックする試薬はいくつか知られております。NEM, oligomycin, α -chymotrypsin 処理などです。NEM は SH 阻害剤ですが、この阻害は $E_1P \rightarrow E_2P$ 変換に特異的ではありません。これで処理しますと、他のステップも阻害するらしく、ATPase 活性は確かに低下しますが、リン酸化の量も低下するという欠点があります。それ由、NEM はあまり良くありません。次に oligomycin を使いますと、これは $E_1P \xrightarrow{Na^+} E_2P$ ステップでの Na^+ の K_d を低下させるという様式で働きます。ですから、非常に低い Na^+ 濃度を用いた場合には、oligomycin の作用はほとんど出てまいりません。それはリン酸化を促進する Na^+ サイトでも全く同じ作用を示すのですが、oligomycin が存在すると、 K_d は約 1/10 程に下がります。 $E_1P \xrightarrow{Na^+} E_2P$ ステップの Na^+ の K_d は、oligomycin が無い場合は 0.4M で、oligomycin 存在下でそれが 0.04M になったとしても、 K_d が 40mM ですから、 $E_1P \rightarrow E_2P$ 変換を完全に止めるためには、その数倍の濃度の NaCl が必要です。ところが Na^+ のアイソトープ、 ^{22}Na を使いますので、何 10mM のアイソトープはまず使えません。故に、これは駄目です。残るのは α -chymotrypsin 処理です。

酵素をある条件で、 α -chymotrypsin 処理しますと、

Fig. 17 プロテアーゼの作用部位⁵⁾

() はその処理の際のイオン条件を表す
TRY はトリプシン, CHY は α -キモトリプシン。

ATPase 活性は期待どおり低下し、60 分で 1% 以下になり、EP は 1 時間後でも 60~70% 保たれていました。ですから、非常に特異的に脱リン酸化、あるいは $E_1P \rightarrow E_2P$ 変換をブロックすると思われます。この処理をした後のリン酸化中間体の E_1P , E_2P 量を、ADP 感受性と K^+ 感受性を基に、先に述べた方法で測定します。CDTA だけと、CDTA と KCl を加えた場合で、脱リン酸化の時間経過が同じであることから、カリウム感受性が全くないと考えられます。一方、ADP を CDTA と共に加えますと、直ちにほとんど 0 になってしまいました。ほぼ 100% ADP 感受性でした。ですから、chymotrypsin 処理をした標品は、 $E_1P \rightarrow E_2P$ がブロックされて E_1P で止まることがわかりました。

Fig. 17 は α -サブユニットの消化のされ方を示します。chymotrypsin で一カ所だけが切れ、20,000 と 78,000 という 2 つのフラグメントに分れます。 α -サブユニットに関しては、酵素が生きている限りはそれ以上は切れないので、この処理は非常に使いやすいものです。ウワバインの存在ですと、もう 1 つ別の部位が切れることが知られております。

Fig. 18 に、 Na^+ の occluded form を測定する条件とその実験装置を示します。20 μM ATP, 50 μM ~ 1mM $^{22}NaCl$, 1.1mM $MgCl_2$, 50 μg 酵素, 0.1mM EDTA と 100mM Tris-HCl の反応液中で、 $0^\circ C$ 40 秒間リン酸化をします。それをダウエクスレジンに載せます。イオン交換樹脂は、先程と同じようなツベルクリンの注射筒につめ、周囲は $0^\circ C$ に冷やしてあります。これに内筒をつけ、一定速度で押します。流出速度が 0.2ml/sec, この条件ではこのレジンの外側の容積から計算して、0.86sec だけ各酵素はこのレジジンと接触することになります。

Fig. 18 Na⁺ occlusionの検出法
 ツベルクリン注射筒に陽イオン交換樹脂をつめカラムとし、図左の組成の液を、0°C 40秒反応後、一定速度で通過させる。溶出液の²²Naのカウントを測定した。原理は次図と本文を参照。

Fig. 19 Na⁺ occlusion実験の原理
 上は反応中、下はカラムに入ってから状態を表わす。カラムの中、および、通過後は[Na⁺]が低下するため、Na⁺遊離の方向のみにすべての反応が進行する。

Fig. 19の上の図は、レジンに通す前の条件です。即ち、酵素にNa⁺とATPがランダムに結合して、ターナリーコンプレックスができます。それが、Mg²⁺の存在下でリン酸化されてE₁P・Naができる。Na⁺と各中間体との間には平衡が存在しています。ところが、イオン交換樹脂の中に入りますと、Na⁺やMg²⁺などのカチオンが取られ、リン酸化が止まると共に、Na⁺がはずれる方向に平衡がずれる。したがって、イオン交換樹脂の中では、下のスキームの様になります。もしE₁P・Naがoccluded formであれば、E₁P・NaからのNa⁺の遊離が遅いはずですが、レジンと0.86秒接触した後でも、E₁P・²²Naは残っているかもしれない。しかし、E₁Na→E₁+Na⁺な

Fig. 20 EPへの²²Na結合量⁶⁾

どの反応はすみやかに進行するので、カラム下端ではE₁²²Naは残っていないと期待されます。

Fig. 20は、²²Naの酵素への結合を測定したものです。ATPを加えた場合、カラムから溶出される²²Na量は5nmol Na⁺/mg prot.です。そのコントロール実験として、基質にならない種類のヌクレオチドを加えた場合、あるいは、又ヌクレオチドを全く入れない時は、3.8nmol Na⁺/mg prot.です。この差は、ATPに依存したNa⁺の結合量になります。右端は酵素を加えない場合です。即ち、どれくらいこのカラムが交換容量を持っているかを示しています。この溶出量は、最初に加えた²²Naの0.0007%ですが、やはりこれだけはバックグラウンドがです。ATPに依存したNa⁺の結合は、1.4nmol Na⁺/mg prot.です。CDTAを充分量加えますと、このATP依存性の²²Na結合は失われます。したがって、ATP依存性の²²Na結合にはMg²⁺が必要です。

ATPあるいはADPを加えた場合の実験を繰り返しました (Table 1)。確かに、ATPとADPの間にはNa⁺の結合量に差があります。実験によりこの値は変動しますが、それは使った酵素の比活性によります。

温度を20°Cに上げると (Expt. 640), Na⁺の結合量は0°Cで1.4nmol Na⁺/mg prot. 前後の値が0.32nmol Na⁺/mg prot.に減少しました。温度を上げることで、(1)脱リン酸化速度の増加によりE₁P・Na⁺レベルが減少する。(2)E₁P・NaからのNa⁺の遊離速度自身も増加する。という2つの可能性が考えられます。しかし、温度上昇に伴ってリン酸化速度も増加し、定常状態のEPレベルは大きくは変わらないので、主として後者の理由によるものと思われます。

α-キモトリプシン処理をしない酵素標品を用いた場合

Table 1 種々の条件での ^{22}Na occlusion ⁶⁾

Expt.	[Na] in enzyme suspension (mM)	Nucleotide in enzyme suspension	Na in effluent (nmol (mg enzyme protein) ⁻¹)	Occluded Na (nmol (mg enzyme protein) ⁻¹)	Comments
677	1	ATP	5.21 ± 0.21	1.39 ± 0.27	Note lack of effect of ADP
		ADP	3.82 ± 0.17	—	
		None	3.70 ± 0.18	—	
637	1	ATP	3.31 ± 0.09	1.43 ± 0.09	
		ADP	1.65 ± 0.02	—	
644	1	ATP	3.71 ± 0.10	1.32 ± 0.14	
		ADP	2.39 ± 0.10	—	
650	1	ATP	3.72 ± 0.08	1.28 ± 0.08	
		ADP	2.44 ± 0.01	—	
654	1	ATP	2.25 ± 0.02	0.76 ± 0.03	
		ADP	1.49 ± 0.02	—	
659	1	ATP	2.75 ± 0.08	1.19 ± 0.12	
		ADP	1.56 ± 0.09	—	
665	1	ATP	5.08 ± 0.25	1.97 ± 0.35	
		ADP	3.11 ± 0.25	—	
671	1	ATP	6.47 ± 0.30	1.91 ± 0.57	
		ADP	4.56 ± 0.49	—	
673	1	ATP	5.96 ± 0.14	1.70 ± 0.18	
		ADP	4.26 ± 0.11	—	
675	1	ATP	4.27 ± 0.14	1.46 ± 0.14	
		ADP	2.81 ± 0.03	—	
681	1	ATP	4.23 ± 0.08	1.44 ± 0.11	
		ADP	2.73 ± 0.07	—	
686	1	ATP	4.86 ± 0.19	1.13 ± 0.28	
		ADP	3.73 ± 0.20	—	
640	1	ATP	1.06 ± 0.04	0.32 ± 0.04	This expt. was at 20°C
		ADP	0.73 ± 0.01	—	
632	0.2	ATP	1.31 ± 0.06	0.40 ± 0.07	
		ADP	0.90 ± 0.04	—	
756	0.2	ATP	1.34 ± 0.03	0.69 ± 0.03	
		ADP	0.65 ± 0.01	—	
711	0.1	ATP	0.84 ± 0.06	0.19 ± 0.08	
		ADP	0.65 ± 0.06	—	
679	1	ATP	2.17 ± 0.09	-0.09 ± 0.19	Native enzyme exposed to α -chymotrypsin for only 40s at 1.5°C
		ADP	2.26 ± 0.17	—	

(Expt. 679) は、ATP 依存性の ^{22}Na 結合は見られません。未処理の酵素の EP は大部分 E_2P になります。したがって、定常状態での $\text{E}_2\text{P} \cdot \text{Na}^+$ レベルが小さいか、または、 $\text{E}_2\text{P} \cdot \text{Na}^+$ からの Na^+ の解離速度が早いことを示唆しています。

すでに述べました様に、リン酸化中間体 E_1P は ADP 感受性を持ちますので、 E_1P が Na^+ を結合しているので

あれば、 Na^+ の結合も ADP 感受性を示すことが予想されます。ADP 感受性を調べるためには、 Na^+ 存在下で ATP によりリン酸化された酵素が、ダウエックス層に入る直前に ADP + CDTA と混ぜ合わせる必要があります。その混合のために、ADP + CDTA を含むセファデックスをレジジン層の上にのせ、リン酸化した酵素がセファデックス層を通過し、続けてダウエックスに入る様にして

Table 2 E₁P 当りの occluded Na⁺量⁶⁾

additions from Sephadex	Na in effluent nmol/mg	Bound Na nmol/mg	Effluent P precipitated by PCA	E ₁ P	Moles of Na bound per mole of EP
CDTA	4.33 ± 0.11	1.30 ± 0.13	0.54 ± 0.02	0.46 ± 0.02	2.83 ± 0.31
CDTA ADP	3.03 ± 0.06		0.08 ± 0.01		
CDTA	5.50 ± 0.11	2.27 ± 0.18	0.94 ± 0.04	0.86 ± 0.04	2.84 ± 0.27
CDTA ADP	3.23 ± 0.14		0.14 ± 0.01

Fig. 21 Na⁺ occlusion に対する Na⁺濃度の影響⁶⁾

あります。これは一種のラピッドミキシング装置であります。ADPを加えると、1.16nmol Na⁺/mg prot.から0.04nmol Na⁺/mg prot.までの結合の低下が見られました。したがって、ADP感受性のNa⁺結合が存在することがわかりました。Na⁺結合はATP依存性かつ、Mg²⁺が必要なので、これ等のことを考え合わせると、このNa⁺はE₁Pに結合していると結論することができます。

ルビジウム occlusion の場合と全く同じように、カラム滞在時間を横軸にとり、Na⁺の遊離速度を調べてみると、およそ0.2/secでした。これは0°Cの結果です。したがって、この速度では、0.86秒のカラム接触時間の間におよそ15%のE₁P・²²Naが解離し、その分だけ²²Na結合量を低く見積ることになりますが、大勢には影響ありません。

またNa⁺の濃度を変えて、結合するNa⁺を調べてみると、S字曲線が得られます (Fig. 21)。カーブは、

$$Y = \frac{(Na)^3}{(\beta + Na)^3} \cdot \alpha$$

に乘ります。最大結合量 (α) は3.1nmol/mg prot.

Fig. 22 ²²Na⁺ と E₁P の化学量論を測定する方法

K_d (β) はおよそ180 μ M で、この値は、脱リン酸化酵素へのNa⁺の結合のK_d 値と^{7,8)} とほぼ同じです。

今までは²²Naの結合を測定していましたが、実際にリン酸化中間体はどれくらい出来ているかを調べてみます (Fig. 22)。それには [³²P] ATP を cold ATP のかわりに使い、しかしNa⁺はアイソトープである必要はありません。酵素をリン酸化後、ダウエックスカラムを通します。なおカラムには、ラピッドミキシングのためファデックス層がついています。セファデックス層にADPが含まれている場合はE₁Pだけが壊れますので、ADPがない時とある時の差がE₁Pに相当します。また²²Naの結合では、やはりADPがある時とない時の差を見ることによって、E₁Pに依存した結合かどうかを調べることができます。この様にして、ADP感受性のEPとADP感受性の²²Na結合の比を調べることによって、EP当りの²²Na量を求めることができます。このような実験で調べたのが次の結果です (Table 2)。その比は2.83 ± 0.31で、また別の実験では2.84 ± 0.27です。誤差の範囲から考えまして、その比は3と思われます。したがって、ATP当りの輸送されるNa⁺量⁹⁾、あるいはウワバイ

ン当りの脱リン酸化型酵素へのNa⁺結合量⁷⁾と一致します。

以上の結果を繰り返しますと (Fig. 4), E₁P・Naがたまっている場合に、これからのNa⁺の遊離が非常に遅い。もしここにADPを加えようと、たちまちE₁・Na⁺+ATPになります。²² Na⁺の遊離もADPで促進されることから、E₁P・NaからのNa⁺の遊離速度は小さいが、E₁Naからは大きいと考えられます。このことは、先程のK⁺の場合と非常に似ています。即ち、コンホメーション変化を起こさせるか (E₂K→E₁K)あるいは無機リンを加えて逆反応をさせるか (E₂K→E₂P・K)をして、初めてカリウムが見掛け上はずれやすくなるわけです (Fig. 15)。ナトリウムの場合も全く同じで、E₁P・NaからE₂P・Naになるか、あるいはADPを加えて、逆反応でATPを合成させるかしない限りは、非常にゆっくりしかNa⁺がはずれてこないと考えられます。ただし、E₂P・NaからのNa遊離速度が本当に早いかどうかは直接的な証拠はまだ得られておりません。

以上の結果、容易にイオンがはずれる型と、はずれない型の酵素が存在することが示唆されました。そのはずれない型とは、イオン結合部位が、細胞膜の中に埋まった状態になっているのではなからうか。E₂KとかE₁P・Naというのは、ひょっとするとイオン結合部位が膜を

通り抜ける輸送中間体なのかもしれない。と言うのが、私どもの予想であり、期待でもあります。もしこれらが輸送中間体であれば、それらの生成・分解過程の解析から、イオンの膜内移動のメカニズムに接近できるはずです。これから、そういう方向を志向して研究を進めたいと考えております。有難うございました。

文 献

- 1) Y. Hara, M. Nakao: *J. Biochem.*, **90**, 923 (1981)
- 2) R. L. Post, C. Hegyvary, S. Kume: *J. Biol. Chem.*, **247**, 6530 (1972)
- 3) L. A. Beaugé, I. M. Glynn: *Nature* (London), **280**, 510 (1979)
- 4) I. M. Glynn, D. E. Richards: *J. Physiol.*, **330**, 17 (1982)
- 5) P. L. Jørgensen, E. Skriver: *Ann. New York Acad. Sci.*, **402**, 207 (1982)
- 6) I. M. Glynn, Y. Hara, D. E. Richards: *J. Physiol.*, **351**, 531 (1984)
- 7) H. Matsui, H. Homareda: *J. Biochem.*, **92**, 193 (1982)
- 8) T. Yamaguchi, Y. Tonomura: *J. Biochem.*, **88**, 1387 (1980)
- 9) A. K. Sen, R. L. Post: *J. Biol. Chem.*, **239**, 343 (1960)
- 10) I. M. Glynn, Y. Hara, D. E. Richards: *J. Physiol.*, **339**, 56P (1983)

Highlights in Receptor Chemistry

eds. by C. Melchiorre and M. Giannella

1984, viii+306 pages, ¥21000.-, Elsevier, Amsterdam, The Netherlands

細胞の反応性を規定する重要な要素である受容体に關する研究が急速に進んだのは、1878年にJ. N. Langleyが認識特異性は薬物と受容体との相互作用により生じるとの概念を発表してから、ここ100年位のことであろう。受容体に関する研究は、近年特に注目され、化学、生化学、薬理学、生物物理学、生理学など非常に広い分野の研究者の興味を集めてきた。このような広範囲の研究により調べられたことにより受容体の構造と機能に対する理解が急速に深まったと考えられるが、この中でも大きな比重を占める2大分野である化学と薬理学の研究は伝統的にあまり相互に話し合うことが少ないようである。1983年9月5-8日イタリアのCamerinoで開催されたシンポジウム“2nd Camerino Symposium on Recent Advances in Receptor”は、これら両分野の研究を一堂に会させて話し合わせることが一つの目的であった。本書は、このシンポジウムの参加者による報告

を集めたものである。内容としては、受容体の理念、アドレナリン作動性受容体、オピオイド受容体、アデニル酸シクラーゼへの受容体のCoupling、イオンチャネルの生化学的研究、定量的な構造活性相関、薬物と受容体の関係を理論化するためのコンピューターの利用法など受容体の研究における最も有望な分野の最近のデータが示されており、受容体に関して興味のある研究者にとっては、啓蒙的な内容を含んでいる。また、受容体の研究で重要な点は、特異な認識と、受容体が細胞の構成成分としてどのような動的役割を担うか、いいかえれば、ある刺激を認識した受容体がいかにして生物学的な反応を進行させてシグナルを発現するかということである。本書の内容は、正に、このような点が考慮されていることでも非常に参考になると考えられ、薬理学者、生化学者、分子生物学者、医化学者等広範な分野の研究者にとって有益な書といえよう。(東京大学・薬学部 豊島 總)