ナトリウムポンプの構造と機能 — β サブユニットの役割 —

上野 晋¹・泉 太¹・川村 越²

産業医大 ¹薬理 ²生物 ☎ 807 北九州市八幡西区医生ヶ丘 1-1

Structure and Function of the Sodium Pump — The Role of the β subunit —

Susumu Ueno¹, Futoshi Izumi¹, Masaru Kawamura²

Departments of¹ Pharmacology and² Biology, School of Medicine,
University of Occupational and Environmental Health,
Kitakyushu 807, Japan

To investigate which regions of the Na,K-ATPase β subunit are required for the functional $\alpha\beta$ complex formation of the Na,K-ATPase, we constructed chimeric β subunits between the Na,K- and the H,K-ATPase β subunits, and expressed in *Xenopus* oocytes together with the Na,K-ATPase α subunit. The chimera, that was composed of N-terminal cytoplasmic region of the H,K-ATPase β subunit combined with transmembrane and extracellular region of the Na,K-ATPase β subunit, formed a functional enzyme with the Na,K-ATPase α subunit. This means that N-terminal cytoplasmic region of the β subunit is interchangeable between the Na,K- and H,K-ATPases. The chimeras, whose C-terminal extracellular domain was derived from H,K-ATPase β subunit, formed inactive enzyme in ATPase activity, suggesting that the extracellular domain was essential for the functional expression of the Na,K-ATPase.

The Cys127-Cys150 disulfide-bonded loop (L_1) located within the extracellular domain of the Na,K-ATPase β subunit was substituted with the corresponding loop of pig H,K-ATPase β subunit. The complex of the α subunit with this mutant β subunit was inactive in ATP hydrolysis. Phe148 within the L_1 of the pig H,K-ATPase β subunit-substituted mutant were back-mutated to Arg148. This mutation restored the ability of the mutant β subunit to form a functional complex with the α subunit. These results suggested that the Cys127-Cys150 loop of the Na,K-ATPase β subunit, especially Arg148, plays a critical role in the functional expression of the Na,K-ATPase.

Key words : Na,K-ATPase, H,K-ATPase, chimeric β subunit, disulfide bond, *Xenopus* oocyte

図1. Na,K-ATPase の模式図

Na,K-ATPaseは、 $\alpha \cdot \beta$ 2種のサブユニットより構成されている(A)。両サブユニットとも一次構造が決定されており、それから予測される膜トポロジーを示す(B)。NおよびCは、それぞれアミノ酸配列のN末端、C末端を示す。また、AはATP結合部位を、PはATP加水分解サイクル中にリン酸化を受ける部位を示す。

はじめに

生体膜を越えてイオンを輸送する、いわゆるイオン輸送性ATPaseの最も代表的な例は、動物細胞膜に存在するNa,K-ATPase(ナトリウムポンプ)である。1957年オランダのJ. C. Skouがカニのミクロソーム中にNa,K-ATPase活性を発見¹⁾して以来、多くの研究者がこの酵素の研究に従事し、膜酵素特有の困難に会いながらも多くの成果を上げてきた。日本からの貢献も多く、殿村雄二(阪大)の反応動力学的解析、中尾真(東京医科歯科大)による酵素の精製、沼正作(京

大)による一次構造の決定等をあげることができる。それらの成果を討論する場として国際規模の研究会が1975年以来、3年に一度の頻度で開催されている。最近では1993年にドイツで開催されたが²⁾、本稿はそこで発表した我々の研究成果を中心に、ナトリウムポンプの構造と機能、特に β サブユニットの機能について焦点を当てたものである。

1. Na,K-ATPase

動物細胞は外部と大きく異なった内部環境を維持している。例えば、 Na^+ は外部の方がイオン濃度が高く、逆に K^+ は内部の方が高い。この細胞内外の Na^+ 、 K^+ イオン濃度勾配を形成しているのが細胞膜に存在するナトリウムポンプ、すなわちNa,K-ATPaseである^{3~6)}。

Na,K-ATPaseは、ATPを分解し、その際遊離されるエネルギーと共役して Na^+ を細胞内から細胞外へ、 K^+ を逆に細胞外から細胞内へ、 $3\text{Na}^+/2\text{K}^+/1\text{ATP}$ の割合で能動輸送する。ATP加水分解の際に酵素がリン酸化され、酵素はいわゆるリン酸化中間体を形成する。このような反応サイクル中にリン酸化中間体を形成するイオン輸送性ATPaseをP型ATPaseと呼び、筋小胞体中の Ca^{2+} -ATPaseや、後述する胃のH,K-ATPaseなどもこれに属する。Na,K-ATPaseによって形成・維持される Na^+ の細胞内外の濃度勾配は、リン酸・アミノ酸・グルコースの取り込みや、 H^+ ・ Ca^{2+} の排出等の二次性能動輸送の駆動力となっている。このようにNa,K-ATPaseは、細胞内pH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、栄養の吸収という高度に分化した機能まで、様々な生理的作用を間接的に担っているものといえる。

Na,K-ATPaseは、分子量約100 kDaの α サブユニットと、分子量約60 kDaの糖タンパク質である β サブユニットの2種より構成されている⁶⁾(図1・A)。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ており、その一次構造が決定されている。また、分子量6.5 kDaの

図2. 胃酸分泌機構と H,K-ATPase

H,K-ATPase が存在する細管小胞は、休止期には大部分が壁細胞の細胞質に存在している。分泌刺激（特にヒスタミン）によって、細管小胞は分泌細管膜（頂端膜）と融合するため表面積が増大し、分泌細管は複雑な形態をとる（図左）。このため H,K-ATPase も頂端膜に動員され、この時 Cl^- , K^+ の透過性が亢進するため H,K-ATPase が活性化され酸分泌が亢進すると考えられている（図右）。

プロテオリピドを γ サブユニットと主張する研究者もあり、その一次構造も決定されたが⁷⁾、最近になって γ サブユニットは Na,K-ATPase の発現には必要でないことが報告された⁸⁾。

α サブユニットは触媒サブユニットとも呼ばれ、基質である ATP や特異的阻害剤であるウバインの結合部位、カチオンとの相互作用部位等はすべて α サブユニット上に存在する⁹⁾。 α サブユニットは、現在まで 3 種類のアイソフォーム ($\alpha_1 \cdot \alpha_2 \cdot \alpha_3$) が報告されている⁹⁾。予測される疎水性領域の分布や、部位特異的抗体を用いた解析により、N 末端・C 末端ともに細胞質側に存在

し、膜を 10 回貫通するという膜トポロジーが予測されている。また、膜貫通領域の 4 番目と 5 番目との間に大きな細胞質ドメインがあり、この細胞質ドメインに ATP 結合部位、および ATP 分解の過程でリン酸化を受けるリン酸化部位が存在する（図 1・B）。

β サブユニットについても 3 種類のアイソフォーム ($\beta_1 \cdot \beta_2 \cdot \beta_3$) が報告されている³⁾。特に β_2 アイソフォームは、細胞間接着因子の一種である AMOG (adhesion molecule on glia ; グリア細胞接着因子) と同一のものであることが報告された¹⁰⁾。すなわち AMOG/ β_2 は、Na,K-ATPase α サブユニットと機能的なポンプを形成するばかりでなく¹¹⁾、最近では AMOG/ β_2 を発現させた培養細胞のメディウム中に神経細胞を加えると神経細胞突起の伸長が認められ¹²⁾、実際に接着分子としても機能しているらしい。

β サブユニットには、一本の膜貫通領域と大きな細胞外領域があり、細胞外領域にはアイソフォーム間で保存性の高い 3 つの SS 結合が存在する³⁾。また、N 結合型糖鎖付加部位が $\beta_1 \cdot \beta_3$ アイソフォームで 3~4 ヲ所、 β_2 アイソフォームで 6~7 ヲ所存在している（図 1・B）。 β サブユニットの役割の 1 つとして、酵素の生合成の際に β サブユニットが α サブユニットの受容体として働くと考えられている^{13, 14)}。しかし、ポンプがイオンを輸送する過程で β サブユニットが果たす役割について未だ具体的に確認されたものはない。

2. H,K-ATPase

胃酸の分泌は、胃体部粘膜の胃底腺に存在する胃壁細胞によって行われており、ヒスタミン・ガストリン・アセチルコリン・ソマトスタチン・プロスタグランジン等の様々な神経性・体液性の因子によって調節されている。分泌過程の最終段階を担っているのがプロトンポンプ、すなわち H,K-ATPase と呼ばれるものである^{15~17)}。

H,K-ATPase は、壁細胞の頂端膜で機能する¹⁸⁾。非分泌状態では、H,K-ATPase は細胞

図3. キメラβサブユニットの模式図とαサブユニットの安定化作用

Torpedo Na,K-ATPase (白色) およびブタ H,K-ATPase (黒色) βサブユニット cDNA に対し、5 種類の制限酵素部位 (*Sna* BI, *Eco* RV, *Mun* I, *Sph* I, *Eco* T22I) を導入し、それらを野生型として用いた (wild N, wild H). 例えば HsN は *Sna* BI 部位によるキメラ体であり、*Sna* BI 部位をはさんで N 末端側が H, K-ATPase (H), C 末端側が Na,K-ATPase (N) の領域であることを示す. 同様に HvN・NvH は *Eco* RV 部位, HmN・NmH は *Mun* I 部位, HpN・NpH は *Sph* I 部位, HeN・NeH は *Eco* T22I 部位によるキメラ体を示す. また、▽・▼ はそれぞれ Na,K-ATPase βサブユニット, H,K-ATPase βサブユニットの N-結合型糖鎖付加部位を示す. wild N あるいは wild H のドット部は膜貫通領域を示す. 3 箇所の SS 結合も示してある. ○・●印はキメラ体が αサブユニットの安定化作用 (本文および図4 参照) を持つことを示す.

質内の細管小胞に存在する. ヒスタミン等の分泌刺激が加わると, cAMPや Ca^{2+} 等のセカンドメッセンジャーを介して H,K-ATPase の活性化すなわち細管小胞の頂端膜への融合が生じ, 頂端膜に動員された H, K-ATPase により細胞外へ H^+ が放出され, 同時に Cl^- も分泌されて胃酸が形成される. 分泌刺激が終われば, H,K-ATPase は頂端膜より脱融合をして小胞化し再び非分泌状態へと戻る (図 2). この H,K-ATPase の動員・活性化機構には, おそらく細胞骨格系が関与しているであろうが, 未だ不明な点が多い.

H,K-ATPase も Na,K-ATPase と同様に, 触媒サブユニットである α, および糖タンパク質である β の 2 種のサブユニットより構成されており, 両サブユニットともその一次構造が決定されている¹⁷⁾. αサブユニットは Na,K-ATPase の αサブユニットと約 70% の相同性があり, Na,K-ATPase と同様 10 回の膜貫通ドメインを持つと考えられている. 消化性潰瘍治療薬として臨床効果の高いオメプラゾールは H,K-ATPase の特

異的阻害剤であり, その作用部位は αサブユニット上に存在する. 一方 βサブユニットは, 全体的な構造は Na,K-ATPase βサブユニットと類似しているものの, 部分的に一次構造の相同性の低い領域が存在し, 相同性は 35% ほどである. βサブユニットの果たす具体的な役割については未だ明らかではない. Na,K-ATPase と同様に αサブユニットの安定化作用 (後述) が予想されている.

分泌刺激を受けた壁細胞の細管小胞は, 決して側基底膜とは融合せず頂端膜と融合する. その結果 H,K-ATPase は頂端膜に局在することになる. 一方, 壁細胞中の Na,K-ATPase は側基底膜側に局在している. 従って, 壁細胞では構造のよく似た 2 つのポンプが全く対称的な分布をしていることになり, この仕分けがどのように行われているのかという問題は非常に興味深い. 最近, 培養細胞を用いた実験により, H,K-ATPase βサブユニットは単独でも形質膜に挿入されること, さらに H,K-ATPase βサブユニット中にエ

図4. Na,K-ATPase α サブユニットとキメラ β サブユニットとの会合性および会合体中の α サブユニットのトリプシン抵抗性

Na,K-ATPase α サブユニットの cRNA (20 ng/oocyte) を単独, あるいはキメラ β サブユニット cRNA (20 ng/oocyte) とともに, *Xenopus* 卵母細胞に注射し, $[^{14}\text{C}]$ ロイシン存在下で3日間培養後, 膜分画を調製した. トリプシン処理はタンパク質重量当り 1/100 量のトリプシンにて 0°C , 1 時間で行った (レーン 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16). 反応は, トリプシンに対して 100 倍量のトリプシンインヒビターを加えることにより停止させた. 膜分画を抗 α サブユニット抗体にて免疫沈降し, 沈降物を SDS 電気泳動後, フルオログラムによる解析を行った. α は α サブユニットのバンドを示し, βc は高マンノース型糖鎖を持つ未成熟型の β サブユニットのバンドを示す. キメラ体の付加糖鎖の違いで, βc は 2 種類のバンドに分かれる. A はキメラ [H/N] β サブユニットシリーズ, B はキメラ [N/H] β サブユニットシリーズについての結果である.

ンドサイトーシスに關与する領域が存在する事が報告された¹⁹⁾。これらの結果は、H,K-ATPase β サブユニットが単に α サブユニットと複合体を形成するだけでなく、ポンプの頂端膜への融合・脱融合という細胞内ソーティングに關与している可能性を示唆している。H,K-ATPaseの動員・活性化機構における β サブユニットの役割が注目される。

3. Na,K-ATPase β サブユニットと H,K-ATPase β サブユニットとから構築したキメラ β サブユニットの性質

Na,K-ATPase, H,K-ATPase いずれについても、イオン輸送の過程で β サブユニットが果たす具体的な役割は不明であるが、 β サブユニットを欠くと機能的なポンプは形成されず、従って β サブユニットが両ポンプにとって必須成分であることは明らかである²⁰⁾。ところがNa,K-ATPase α サブユニットとH,K-ATPase β サブユニットとから構成された複合体(ハイブリッド)は、ハイブリッド中の α サブユニットは安定化(後述)しているもののATP分解活性を持たず、H,K-ATPase β サブユニットはNa,K-ATPase β サブユニットの肩代わりをすることができない。すなわち両サブユニットには機能的互換性が無い²¹⁾。これは、両サブユニットにそれぞれ特異的な構造が存在することを示唆している。そこで我々は、Na,K-ATPase β サブユニットと、H,K-ATPase β サブユニットとの間でキメラ体を構築し、これらとNa,K-ATPase α サブユニットとの複合体の性質を検討することによって、Na,K-ATPase β サブユニット上のあるいはH,K-ATPase β サブユニット上の特異的な領域を同定することを考えた。

アメリカ産シビレエイ (*Torpedo californica*) のNa,K-ATPase β サブユニット cDNA、及びブタ胃 H,K-ATPase β サブユニット cDNA にそれぞれ5種類の制限酵素部位を導入した。各々の制限酵素処理を行い、キメラ β サブユニット

cDNA を10種類構築した(図3)。これらのcRNAを *in vitro* で合成し、*T. californica* Na,K-ATPase α サブユニット cRNA とともに、アフリカツメガエル卵母細胞 (*Xenopus oocyte*) に注射した。まず発現産物の $\alpha\beta$ 会合性について検討した。cRNAを注射した卵母細胞を [¹⁴C] ロイシン存在下で3日間培養の後、合成されたタンパク質を *T. californica* Na,K-ATPase α サブユニットに対する特異的抗体により免疫沈降し、沈降物をSDS電気泳動後フルオログラフィーを行った。その結果、全てのキメラ体でNa,K-ATPase α サブユニットと β サブユニットの共沈降が認められた。即ち全てのキメラ β サブユニットは、Na,K-ATPase α サブユニットと複合体を形成していることがわかる(図4・A, Bの奇数レーン)。しかし、免疫沈降した複合体が必ずしも“きちんとした”構造をしている保証はない。そこで、複合体中の α サブユニットのトリプシン抵抗性について検討した。

Na,K-ATPase α サブユニットは β サブユニットがないと不安定な構造で、トリプシン等のプロテアーゼにより容易に分解される。ところが β サブユニットと“きちんとした”複合体を形成した α サブユニットは構造が安定し、トリプシンによる分解を受けにくくなる²²⁾(以後 α サブユニットがトリプシン抵抗性になり、“きちんとした”複合体を形成することを α サブユニットの安定化と呼ぶことにする)。そこで [¹⁴C] ロイシン存在下で培養した卵母細胞から膜分画を調製し、蛋白質重量当たり1/100量のトリプシンで処理した。その結果、キメラ [H/N] β サブユニットシリーズでは、HeN 以外のキメラ β サブユニットは α サブユニットをトリプシン抵抗性にした(図4・A, 偶数レーン)。一方、キメラ [N/H] β サブユニットシリーズではNsH, NvHのみが α サブユニットをトリプシン抵抗性にした(図4・B, 偶数レーン)。

キメラ [H/N] β サブユニットシリーズ、すなわち野生型Na,K-ATPase β サブユニットのN末端から順次H,K-ATPase β サブユニットで置き換えたキメラ β サブユニットシリーズでは、キ

図5. 発現産物の Na,K-ATPase 活性の K⁺ 依存性

Na,K-ATPase α サブユニット cRNA およびキメラ β サブユニット cRNA を同時に (10 ng/oocyte) *Xenopus* 卵母細胞に注射し, 3 日間の培養後, 膜分画を調製し, Na,K-ATPase 活性を K⁺ 濃度を変えて測定した. A はキメラ [H/N] β サブユニットシリーズ, B はキメラ [N/H] β サブユニットシリーズの結果である.

メラ HpN まではどのキメラ体も α サブユニットを安定化させる. ところが, いったんキメラ HeN でその能力を失うが全て H,K-ATPase で置き換えると, すなわち野生型 H,K-ATPase β サブユニットは, α サブユニットを安定化させるという一見矛盾した結果となった. このことは, キメラ [N/H] β サブユニットシリーズでも同様で, 野生型 H,K-ATPase β サブユニットの N 末端から順次 Na,K-ATPase β サブユニットで置換していくと, キメラ NvH までは α サブユニットを安定化させるがそれ以後のキメラ体にはその能力がない. ところが野生型 Na,K-ATPase β サブユニットは α サブユニットを安定化させる. このことは, Na,K-ATPase β サブユニットのつくる α サブユニットの“安定化”構造と, H,K-ATPase β サブユニットがつくる α サブユニットの“安定化”構造が異なると考えると説明がつく. すなわち Sph I 部位以降が Na,K-ATPase β サブユニット由来のキメラ体は, α サブユニットを

Na,K-ATPase 型安定化構造 (N 型, 図3の○) とし, Eco RV 以降を H, K-ATPase β サブユニット由来にすると, α サブユニットをこれとは別の安定化構造 (H 型, 図3の●) とする. どちらかの条件を満たさないキメラ体は安定な α サブユニット構造をつくることができないと考えるわけである. 実際, 野生型 Na,K-ATPase β サブユニットのつくる安定化 α サブユニット構造 (N 型) と野生型 H,K-ATPase β サブユニットのつくる H 型構造とは, トリプシン抵抗性に微妙な違いがあることがわかっており, 我々は現在他のプロテアーゼを用いて N 型, H 型 α サブユニットの存在を確認中である. 興味深いことは, それぞれの型の安定化作用を持つ β サブユニット (N 型では Na,K-ATPase β サブユニットの Sph I 部位~C 末端間, H 型では H,K-ATPase β サブユニットの Eco RV~C 末端間の領域を持つ) には, 各々のサブユニットに固有の 1 セットの糖鎖 (Na,K-ATPase β サブユニットでは 3 本,

H,K-ATPase β サブユニットでは6本)が完全に揃っていることである。固有の糖鎖が1本でも欠けると安定化能を失うように見える。 α サブユニットを安定化するのに糖鎖構造が一役買っている

図6. ループ1領域置換変異体 β サブユニットの模式図

A: *Torpedo* Na,K-ATPase β_1 サブユニット cDNA のループ1 (L_1) を形成する Cys127・Cys150 各々の部位に制限酵素部位 (*Mun* I・*Sph* I) を導入した ($T\beta$)。同様にラット Na,K-ATPase β_1 (ドット)・マウス Na,K-ATPase β_2 (灰色), およびブタ H,K-ATPase β サブユニット (黒) cDNA のループ1領域にも制限酵素部位を導入し、ループ1領域の置換を行った。

B: ループ1領域周辺のアミノ酸配列を示す。点線で囲まれた部分がループ1領域であり、制限酵素部位を導入したことにより置換したアミノ酸を太字で示す。N-結合型糖鎖付加部位を下線で示している。

る, という可能性も考えられる。

α サブユニットの安定化が認められた複合体について, Na,K-ATPase 活性を測定した。cRNA を注射した卵母細胞から膜分画を調製し, ウアビン感受性 ATP 分解活性を複合体の Na,K-ATPase 活性とした。何も注射しない卵母細胞の膜分画と比較して, 活性の明らかな上昇を示したのは, キメラ [H/N] β サブユニットシリーズの α /HsN 複合体のみであった (図5) ((キメラ [N/H] シリーズでは, 安定化した α サブユニットが上述のように H 型であるとする, 野生型 H,K-ATPase β サブユニットとの複合体に活性がないのと同様に, これらに ATP 分解活性は期待できず, 結果と一致している)。この結果は, Na, K-ATPase β サブユニットの細胞質内ドメインは, H, K-ATPase β サブユニットで置換可能であることを示す。そうすると, Na,K-ATPase β サブユニットが機能的であるための特異的な領域は細胞外領域に分布している可能性が考えられる。そのような領域の1つの候補として我々は最も N 末端側の SS 結合領域を考えた。

4. Na,K-ATPase 活性発現に関わる β サブユニット領域の同定

Na,K-ATPase β サブユニットと H,K-ATPase β サブユニットとの一次構造を比較すると,

表1 loop-1 領域置換変異体 β サブユニットと Na,K-ATPase α サブユニットとの複合体の Na,K-ATPase 活性 (その1)

Na,K-ATPase α サブユニット cRNA および loop-1 領域置換変異体 β サブユニット cRNA を同時に *Xenopus* 卵母細胞に注射 (10ng/oocyte) し, 発現産物の Na,K-ATPase 活性を測定した。括弧内は何も注射しない卵母細胞の活性の値を差し引いたものである。

cRNA β injected	Na,K-ATPase activity (μ molPi/mg/h)			
	exp. 1	exp. 2	exp. 3	exp. 4
$T\beta$	1.6 (1.4)	2.9 (2.5)	2.7 (2.1)	2.6 (2.4)
$T\beta[L1R\beta_1]$	1.0 (0.8)	ND	2.5 (1.9)	1.5 (1.3)
$T\beta[L1M\beta_2]$	ND	2.9 (2.5)	1.7 (1.1)	2.4 (2.2)
$T\beta[L1PHK\beta]$	0.0 (-0.2)	0.7 (0.3)	0.5 (-0.1)	0.3 (0.1)
uninjected	0.2	0.4	0.6	0.2

ND: not determined

表2 loop-1 領域置換変異体 β サブユニットと Na,K-ATPase α サブユニットとの複合体の Na,K-ATPase 活性 (その2)

cRNA β injected	Na,K-ATPase activity (μ mol Pi/mg/h)	
	exp. 1	exp. 2
T β	2.93 (2.71)	2.83 (2.68)
T β [L ₁ P _{HKβ}]	0.58 (0.36)	0.27 (0.12)
T β [L ₁ P _{HKβ}]/S131P	0.42 (0.20)	0.46 (0.31)
T β [L ₁ P _{HKβ}]/F148R	1.05 (0.83)	0.92 (0.77)
T β [L ₁ P _{HKβ}]/S131P,F148R	1.15 (0.93)	0.93 (0.78)
uninjected	0.22	0.15

相同性の極端に低い領域がいくつか存在する。そのひとつに、細胞外領域に存在する3本のSS結合のつくるループのうち、最もN末端側のループ(以下ループ1)領域がある。このループ1を形成するSS結合のみを切断したNa,K-ATPase β サブユニットは、Na,K-ATPase α サブユニットと安定な複合体を形成するもののその複合体にはNa,K-ATPase 活性がなく²³⁾、このループ1領域がNa,K-ATPase の機能的発現において重要な領域の1つであると考えられていた。そこで我々はこの1つの事実から、Na,K-ATPase α サブユニットとH,K-ATPase β サブユニットとのハイブリッドに活性が見られなかった原因の1つは、このループ1領域の一次構造の違いではないかと考え、シビレエイNa,K-ATPase β 1 サブユニットのループ1領域をH,K-ATPase β サブユニットのループ1領域と置換した変異体(T β [L₁P_{HK β}])を構築し、その性質を検討することにした(図6)。もしループ1領域がNa,K-ATPase の機能的発現に決定的な特異的領域の1つであるとする、T β [L₁P_{HK β}]は α サブユニットと機能的複合体を形成しないことになる。その結果、この変異体は $\alpha\beta$ 複合体の形成および α サブユニットの安定化作用を示したが、その複合体にはATP 分解活性がなかった(表1)。この時、Na,K-ATPase β サブユニットの他のアイソフォーム(ラット β_1 ・マウス β_2)のループ1領域と置換した変異体(T β [L₁R β_1], T β [L₁M β_2])では、複合体にATP 分解活性が見られた。従って、ループ1領域を置換したこと自体

には問題なく、これらの結果はNa,K-ATPase β サブユニットのループ1領域はH,K-ATPase のループ1領域で置換できず、Na,K-ATPase 活性発現に必須の領域であることを示している。

では、ループ1領域を構成するアミノ酸のいずれが重要なのであろうか。この点を探るために、ループ1領域でNa,K-ATPase β サブユニットのアイソフォーム間では保存的であるがH,K-ATPase β サブユニットでは異なるアミノ酸に注目した。該当するアミノ酸は2箇所認められた。シビレエイNa,K-ATPase β_1 サブユニットのPro131, Arg148であり、ブタH,K-ATPase β サブユニットの相当するアミノ酸はSer及びPheであった(図6・B, 矢印)。我々は置換体T β [L₁P_{HK β}]のループ1領域のこれらのアミノ酸に、Ser131→Pro, Phe148→Argの変異を導入しループ1領域のそれら2つのアミノ酸をNa,K-ATPase β サブユニット型に戻した。これらをNa,K-ATPase α サブユニットと共に発現させたところ、Ser 131→Pro 変異置換体と α サブユニットとの複合体は不活性であったが、Phe148→Argの変異置換体では部分的ではあるが活性の回復が見られた(表2)。このことは、Na,K-ATPase β サブユニットの148位が塩基性アミノ酸であることがNa,K-ATPase 活性発現に不可欠の条件の1つであることを示唆している。

最近、ループ1領域がNa,K-ATPase のK⁺ 感受性に関与しているとの報告があった²⁴⁾。ループ1領域が、細胞外からK⁺ が酵素の結合部位に接近する際のアクセスチャンネルの形成に関

与している可能性がある⁶⁾。

5. おわりに

分子生物学的手法の進歩によって、複数種のサブユニットから構成される膜酵素の各々のサブユニットの役割を調べることが可能となった。Na,K-ATPase や H,K-ATPase の β サブユニットは、不要であると考えられた時期もあったが、こうした手法によりこれらポンプの機能的な発現に必須な成分であることが明らかとなった。しかし具体的な機能については、未だ推定の域を脱していないことも否めない。同じ P 型イオン輸送性酵素に属し、Na,K-ATPase や H,K-ATPase α サブユニットと非常に相同性の高い筋小胞体 Ca^{2+} -ATPase が β サブユニットを欠くことは、 β サブユニットの機能を探る上で示唆的であるように思える。さらに前述したように、Na,K-ATPase β_2 サブユニットが細胞間接着因子と同一のものであることは、 β サブユニットが酵素の安定化以外にも独自の機能を持つ可能性を示唆するものである。 β サブユニットの機能の解析は我々以外に米国 (Fambrough, D. M., Baltimore) や、スイス (Geering, K., Lausanne) で行われている。彼らの結果は必ずしも我々の実験結果と一致するものではないが^{25, 26)}、まだまだ β サブユニットには重要な機能が存在していそうである。

謝 辞

本稿の執筆の機会を与えて頂いた、東京女子医科大学高桑雄一教授に感謝致します。

引用文献

- 1) Skou, J. C. : *Biochem. Biophys. Acta* **356**, 36-52 (1957)
- 2) The Sodium Pump : Structure Mechanism, Hormonal Control and its Role in Disease (Bamberg, E. & Schoner, W. eds.) Darmstadt : Steinkopff ; New York : Springer (1994)
- 3) Lingrel, J. B., Orlowski, J., Shull, M. M. & Price, E. M. : *Prog. Nucleic Acids Res. Mol. Biol.* **38**, 37-89 (1990)
- 4) Horisberger, J.-D., Lemas, V., Kraehenbühl, J.-P. & Rossier, B. C. : *Annu. Rev. Physiol.* **53**, 565-584 (1991)
- 5) Repke, K. R. H. & Schön, R. : *Biol. Rev.* **67**, 31-78 (1992)
- 6) Vasilets, L. A. & Schwarz, W. : *Biochem. Biophys. Acta* **1154**, 201-222 (1993)
- 7) Mercer, R. W., Biemesderfer, D., Bliss, D. P., Jr., Collins, J. H. & Forbush, B., III : *J. Cell Biol.* **121**, 579-586 (1993)
- 8) Scheiner-Bobis, G. & Farley, R. A. : *Biochem. Biophys. Acta* **1193**, 226-234 (1994)
- 9) Sweadner, K. J. : *Biochem. Biophys. Acta* **988**, 185-220 (1989)
- 10) Gloor, S., Antonicek, H., Sweadner, K. J., Pagliusi, S., Frank, R., Moos, M. & Schachner, M. : *J. Cell Biol.* **110**, 165-174 (1990)
- 11) Schmalzing, G., Kröner, S., Schachner, M. & Gloor, S. : *J. Biol. Chem.* **267**, 20212-20216 (1992)
- 12) Müller-Husmann, G., Gloor, S. & Schachner, M. : *J. Biol. Chem.* **268**, 26260-26267 (1993)
- 13) Sabatini, D., Colman, D., Sabban, E., Sherman, J., Morimoto, T., Kreibich, G. & Adesnik, M. : Cold Spring Harbor symp. *Quant. Biol.* **46**, 807-818 (1981)
- 14) Noguchi, S., Higashi, K. & Kawamura, M. : *Biochem. Biophys. Acta* **1023**, 247-253 (1990)
- 15) Rabon, E. C. & Reuben, M. A. : *Annu. Rev. Physiol.* **52**, 321-344 (1990)
- 16) 前田正知 : *生化学* **62** (5), 322-338 (1990)
- 17) Van Uem, T. J. F. & De Pont, J.J.H.H.M. In : *Molecular Aspects of Transport Proteins* (De Pont, J.J.H.H.M., ed.) 27-55, Elsevier Science Publishers B. V., The Netherlands (1992)
- 18) Forte, J. G., Hanzel, D. K., Okamoto, C., Chow, D. & Urushidani, T. : *J. Int. Med.* **228**, 17-26 (1990)
- 19) Gottardi, C. J. & Caplan, M. J. : *J. Cell Biol.* **121**, 283-293 (1993)
- 20) Noguchi, S., Mishina, M., Kawamura, M. & Numa, S. *FEBS Lett.* **225**, 27-32 (1987)
- 21) Noguchi, S., Maeda, M., Futai, M. & Kawamura, M. : *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **182**, 659-666
- 22) Noguchi, S., Higashi, K. & Kawamura, M. :

- J. Biol. Chem.* **265**, 15991-15995 (1990)
- 23) Noguchi, S., Mutoh, Y. & Kawamura, M. : *FEBS Lett.* **341**, 233-238 (1994)
- 24) Lutsenko, S. & Kaplan, J. H. : *Biochemistry* **32**, 6737-6743 (1993)
- 25) Jaunin, P., Jaisser, F., Beggah, A. T., Takeyasu, K., Mangeat, P., Rossier, B. C., Horisberger, J.-D. & Geering, K. : *J. Cell Biol.* **123**, 1751-1759 (1993)
- 26) Hamrick, M., Renaud, K. J. & Fambrough, D. M. : *J. Biol. Chem.* **268**, 24367-24373 (1993)
- (受付 1995 年 1 月 13 日)

＜学会だより＞

第 4 回イオン交換講習会

——初心のための「イオン交換」6 講——

主 催：日本イオン交換学会

協 賛：高分子学会，日本膜学会他

日 時：平成 7 年 6 月 29 日(木) 9：30～17：15

場 所：東京工業大学百年記念館フェライト会議室 東京都目黒区大岡山 2-12-1

講演題目：

I. イオン交換樹脂

9：30～10：40 (1) イオン交換樹脂の基礎 齊藤恭一 (千葉大学)

10：40～12：00 (2) イオン交換樹脂の性能評価法と使い方 板垣孝治 (三菱化学)

II. イオン交換膜

13：00～14：00 (1) イオン交換膜の性能評価法 谷岡明彦 (東京工業大学)

14：00～15：00 (2) イオン交換膜のプロセス実験法
川原拓夫 (旭硝子エンジニアリング)

III. 無機イオン交換体

15：15～16：15 (1) 無機イオン交換体のイオン交換除去特性
三宅道博 (群馬大学)

16：15～17：15 (2) 層状ケイ酸塩の取り扱いと利用 森川 豊 (東京工業大学)

参加費：会員 (協賛学会を含む) 10,000 円 学生 1,000 円，非会員 15,000 円
(テキスト代を含む)

予約申込締切：平成 7 年 6 月 22 日(木) (定員 100 名)

参加申込方法：B5 用紙に①氏名②会員番号 (本学会員) または所属学協会名 (協賛学協会会員)
③勤務先，職名④連絡先所在地，所属部課⑤連絡先電話番号，FAX 番号をお書きの上，
郵便または FAX にて下記までお送り下さい。

申込先：〒194 東京都町田市東玉川学園 3-3165，昭和薬科大学分析化学研究室内 イオン交換
講習会係
(TEL/FAX 0427-21-4510 (自動切替))

参加費支払方法：郵便振替 加入者番号：00100-6-705954，加入者名：イオン交換講習会係 (企
業の方は参加者の個人名を明記して下さい)