胃粘膜プロトンポンプ遺伝子と転写調節

前田正知

大阪大学薬学部, 〒565 大阪府吹田市山田丘 1-6

Genes for Gastric Proton Pump and Their Transcriptional Regulation

Masatomo MAEDA

Laboratory of Biochemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences,
Osaka University, Suita, Osaka 565, Japan

Division of Biological Science, the Institute of Scientific and
Industrial Research, Osaka University, Ibaraki,
Osaka 567, Japan

(Received November 1, 1995)

The highly differentiated gastric parietal cell has a characteristic morphology and plays a specialized role in the hydrochloric acid secretion into the stomach lumen. The major enzyme in this system is an ATP-driven proton pump, the H^+/K^+ -ATPase, which is responsible for proton translocation across the apical plasma membrane. The primary structures of the catalytic α and glycosylated β subunits, and their transmembrane topology are similar to those of the corresponding subunits of Na^+/K^+ -ATPase, suggesting that the reaction mechanism of both ATPases would be essentially the same if not identical. Most of the positions of introns in the H^+/K^+ -ATPase subunit genes are essentially the same as those in the corresponding Na^+/K^+ -ATPase subunit gene. These findings suggest that the α and β subunit genes, respectively, of the two ATPases were derived from the common ancestors. We found that a DNA sequence motif, (G/C)PuPu(G/C)NGAT(A/T)PuPy, was located in the upstream regions of both α and β subunit genes from human and rat. This motif may be a binding site for a positive transcriptional regulator that functions specifically in the parietal cells. cDNA cloning and *in situ* hybridization demonstrated that novel zinc finger proteins (GATA-GT1 and GATA-GT2) are present in the gastric parietal cells. These proteins bind to the (G/C)PuPu(G/C)NGAT(A/T)PuPy motif. Furthermore, they activate the transcription of the reporter gene with the 5'-upstream region of the α or β subunit gene. These results suggest that gastric GATA DNA-binding proteins play important roles in transcriptional activation of H^+/K^+ -ATPase genes in the parietal cells.

Key words—gastric parietal cell; proton pump; H^+/K^+ -ATPase; zinc finger; GATA factor; DNA binding protein

1. はじめに

胃の内部が酸性になっていることはよく知られているが、なぜ酸性化が起きるのかについて

本総説は平成7年度日本薬学会奨励賞の受賞業績を中心に記述したものである。

の分子的基盤が確立したのはごく最近のことである。¹⁾ 胃粘膜にはプロトンポンプ（胃酸分泌酵素）が発現しており、この酵素がATPの加水分解エネルギーを使ってプロトンを細胞内から細胞外（胃の内腔）へ輸送する。酵素は同時に逆向きに K^+ を輸送するので、 $H^+/K^+-ATPase$ とも呼んでいる。触媒反応（ATP水解）とベクトルのイオン輸送とを共役させている酵素には、一般にオスモエンザイムという名称が与えられている。胃粘膜のプロトンポンプに人々が注目する理由は、胃の酸性化を抑制する薬が胃潰瘍や十二指腸潰瘍の治療薬となるからである。実際後述するプロトンポンプインヒビターや H_2 ブロッカーは、それぞれ、直接・間接的にプロトンポンプを抑制するために使用されている。

胃にプロトンポンプが存在するのが明らかになったのは1970年代半ばである。²⁾ しかし、触媒サブユニット(α)に加え β サブユニットの存在が明確になったのは、1990年になってからである。³⁾ 著者らは1985年以来、胃粘膜のプロトンポンプの分子構造や調節機構に主眼をおいて研究を進め、この分野の発展に寄与してきた。本総説ではその研究成果を中心に述べるが、特に $Na^+/K^+-ATPase$ との類似性に注目してプロトンポンプの構造と遺伝子の構造を概説する。また、プロトンポンプの細胞特異的な転写調節に果たすGATA-DNA結合蛋白質の役割について考察する。プロトンポンプの構造についての記述は、本誌に以前述べた内容¹⁾とはなるべく重複しないように心掛けた。説明不足となってしまった部分については、適宜文献を参照して頂きたい。¹⁾

2. 胃粘膜の壁細胞と酸分泌

2-1. 胃粘膜の壁細胞 胃の粘膜には胃底腺が存在する。胃体部の胃底腺では、幹細胞は少なくとも5種の細胞〔表層粘液細胞、壁細胞、頸部粘液細胞（後に主細胞になる）、内分泌細胞〕に分化し得る (Fig. 1).⁴⁾ プロトンポンプが発現しているのは、壁細胞である。胃酸分泌は、ヒスタミン、アセチルコリンやガストリンなどが壁細胞の基底膜にある受容体に作用すると、細胞内情報伝達系が働き昂進する（ただしガストリンが直接作用しない可能性も報告されている）。また、酸分泌の昂進と抑制に伴い壁細胞の構造が大きく変わる。⁵⁾ 昂進時には管状小胞が細胞内分泌細管と融合し、分泌細管が発達する。抑制時には逆のことが起きる。すなわちプロトンポンプは管状小胞と細胞内分泌細管との間を行き来する (Fig. 2).

酸分泌の昂進には蛋白質リン酸化が深く関わっている。この点に関し、頂端膜に局在するエズリンという80k蛋白質がAキナーゼによりリン酸化されると、Fアクチン及びプロトンポンプと安定な複合体を形成し、その結果ポンプを頂端膜に保持するという説は興味深い。⁶⁾ このように、細胞構造の変化は細胞骨格系の構

Fig. 1. Gastric Gland and Differentiation Pathway of Its Constituent Cells

Gastric gland is schematically shown.⁴⁾ The differentiation of the constituent cells from stem cell is also indicated.

Fig. 2. Morphology of the Activated and Resting Parietal Cells

造及び細胞骨格と膜との相互作用の仕方の変化によって引き起こされると思われるが、まだ詳細は明らかではない。

壁細胞内で Fig. 2 に示したような特有の変化が可逆的に起きるためには、一連の遺伝子が細胞特異的に発現することが必要である。胃壁細胞特異的に発現する遺伝子の構造と転写調節機構を解明することは、胃壁細胞がどのようにして生じ、特異的機能を発揮するのか、理解を深めるのに役立つと考えられる。また、胃酸の分泌を遺伝子レベルで制御するという観点からも、有効な知見を与えられると思われる。

2-2. 酸分泌の抑制 酸分泌を間接的に抑制する手段として、ヒスタミン H₂ 受容体の拮抗薬が用いられている。⁷⁾ 受容体にヒスタミンが結合するとアデニル酸シクラーゼが活性化を受け細胞内 cAMP 濃度が上昇する。このため、A キナーゼを介した情報伝達系が働き結果的にプロトンポンプの活性化が起きる (Fig. 3)。シメチジンのような H₂ ブロッカーを投与すると、この細胞内情報伝達系の働きが抑制される。

一方、臨床的にも最近使用されるようになったオメプラゾールは、プロトンポンプに直接作用するため効率よく酸分泌を抑制することができる。⁸⁾ オメプラゾールの構造と、プロトン存在下に反応性のあるスルフェンアミドへ変化する機序をそれぞれ Fig. 4 と Fig. 5 に示した。胃内部の酸性条件下で反応しないようにコートし経口投与したオメプラゾールは、小腸から吸収され血流によって壁細胞へ到達する。オメプラゾールは pK_a が約 4 の弱塩基であるため、プロトンと結合しない状態では膜を通ることができる。酸性のコンパートメントではプロトンと結合するため濃縮がおきる。すなわち、酸分泌が促進している時には細胞質から細胞内分泌細管（細胞外）へ移動する。さらに細胞内分泌細管が酸性であるため、濃縮が起きるだけでなくスルフェンアミドに変化し、プロトンポンプの Cys 残基の SH 基と反応するようになる。オメプラゾールの類縁化合物（ランソプラゾールやパントプラゾール）も同様の機構で共有結合する阻害剤であるが、その他に、共有結合しないポンプ阻害剤 (SCH28080) も開発されつつある (Fig. 4)。⁹⁾ これら阻害剤の作用機構の理解とプロトンポンプの実体解明とは密接に係わって発展してきたことから分かるように、プロトンポンプの研究は基礎と応用とがうまく噛み合った好例であろう。

Fig. 3. Model of Parietal Cell

H, histamine; G, gastrin; A, acetylcholine; IP₃, inositol tri-phosphate. Acid secretion from parietal cells is regulated by extracellular signals such as histamine, gastrin and acetylcholine. The molecular mechanisms of the intracellular events evoked by these signals are not well known. However, it is hypothesized that the second messengers produced by receptor mediated information transfer activate protein kinases and phosphorylations of cytoplasmic proteins result in stimulation of acid secretion (black arrow). Movements of ions are indicated in the figure.

omeprazole

pantoprazole

lansoprazole

SCH28080

Fig. 4. Structures of Proton Pump Inhibitors

3. P型ATPaseとしてのプロトンポンプ

リン酸化中間体を形成するイオンポンプを, phosphorylated intermediate のPをとりP型ATPaseと呼んでいる.¹⁰⁾ この仲間には H^+ , K^+ , Ca^{2+} , Cd^{2+} , Mg^{2+} を輸送するものと, H^+ と K^+ を, また Na^+ と K^+ を交換輸送するものが知られている.^{1c)} 胃のプロトンポンプは H^+ / K^+ -ATPaseとも呼ばれているように, H^+ と K^+ を交換輸送する. 胃のプロトンポンプの α サブユニットは, Na^+ / K^+ -ATPaseの3種のアイソフォームと一次構造がよく保存されており, 約63%もの残基が一致している.¹¹⁾ 興味深いのは, 両者に β サブユニットが存在し30—40%の残基が保存されていることである.¹²⁾ このような事実は, プロトンポンプの膜における存在様式が Na^+ / K^+ -ATPaseと極めてよく似ていることを示唆している.

Fig. 5. Mechanism of Enzyme Inhibition by Omeplazole

gH/K	MG	KAENYE	LYQVE	LGP	GGDMA	AKMS	KK K	AGRGGG	KRKEK	LE N	MKK E ME
cH/K	M	R	RKTE	IYSVE	LNGTK	DVKPADQRDDKKFKGA			KNKD	LEPNKS	HEKEELKK EIIK
bH/K	MGT	EANS	DVYST	AINGIN	EIGYPD	K	EKEED	LGLE	VQKKKEKK	QKKKKGKNVDDLK	QE LD
N/K	MG	KG	VGRDK	Y	EP	AAVS	E H	GD	KK K A	K KER	DMDELKK E VS

Fig. 6. Comparison of the Amino Terminal Lysine-rich Sequences of H^+/K^+ - and Na^+/K^+ -ATPase α Subunits

Amino terminal Lys-rich regions of the gastric (gH/K), colon (cH/K) and toad bladder (bH/K) H^+/K^+ -ATPase α subunits are compared with those of Na^+/K^+ -ATPase α subunit.¹³⁻¹⁵ Conserved residues are indicated by the bold letters. Glycine cluster in gastric proton pump (gH/K) is shown by undelined bold letters.

最近カエルの膀胱に H^+/K^+ -ATPase が見つかり、やはり α と β サブユニットからなっていた。¹³⁾ 大腸にも H^+/K^+ -ATPase が存在するが、 β サブユニットが存在するのかどうかはまだ明らかではない。¹⁴⁾ これらの酵素のサブユニットは胃のプロトンポンプや Na^+/K^+ -ATPase のものとよく保存されており、P 型 ATPase の中で 1 つのサブファミリーをなしている。

Na^+/K^+ -ATPase や 3 種の H^+/K^+ -ATPase の α サブユニットについてアミノ末端部の約 50 残基に着目すると、¹³⁻¹⁵⁾ Lys 残基に富んでいることが分かる (Fig. 6)。この配列の正電荷が H^+ , Na^+ や K^+ の結合や輸送を調節している可能性がある。以前、胃のプロトンポンプのこの領域に存在する Gly 残基のクラスターが H^+ や K^+ の交換輸送に大事な配列ではないかということ述べたが、¹⁵⁾ 大腸や膀胱の酵素には存在しないのでそのような特別な意味はないと結論づけられる。一方胃のプロトンポンプの Tyr-7 と Tyr-10 が酵素標品中に共存する膜結合性の内在性のチロシンキナーゼとホスファターゼにより、それぞれリン酸化及び脱リン酸化されることが分かり、酵素活性の調節や細胞内ソーティングにどのように関係しているのか注目がなされている。¹⁶⁾

ここで、これまで報告のあった P 型 ATPase を著者なりに分類してみると、Fig. 7 のように

なる。Na⁺/K⁺-やH⁺/K⁺-ATPase 以外に2つのグループをまとめることができる。Ca²⁺-ATPase には細胞膜と筋小胞体に存在する2種があり、それらは異なった酵素である。しかしCa²⁺を輸送すること以外に、それぞれが複数の遺伝子を持ち、さらにそれらがスプライシングの違いにより複数のアイソフォームを発現する¹⁷⁾という類似性から1つにまとめることができる。またCu²⁺やCd²⁺を輸送するATPaseが最近相次いで見つかったが、それらは、アミノ末端に金属イオンを結合するCMTCX₂CX₁₂GVというモチーフがあることで特徴づけられる。¹⁸⁾

4. プロトンポンプの構造とプロトンポンプ阻害剤の作用部位

これまでの複数の知見を総合して、プロトンポンプのαサブユニットは膜を10回貫通していると考えるのが妥当である。これに対して、βサブユニットはアミノ末端側で1回膜を貫通している (Fig. 8).¹⁹⁾ ここでは、ブタの酵素をもとにして (αサブユニット; 1034 残基, βサブユニット; 290 残基) 残基番号を付している。βサブユニットには6ないし7個の糖鎖がAsn残基に結合している。αサブユニットの4番目と5番目の膜貫通領域の間の約400 残基からな

P-type

Fig. 7. Classification of the P-Type ATPases

Fig. 8. Transmembrane Topology of Gastric Proton Pump

The possible transmembrane orientation of pig gastric proton pump (H⁺/K⁺-ATPase) α and β subunits is shown. Dotted and hatched area indicate the amino terminal Lys-rich region and the domain necessary for the association with the β subunit, respectively. Possible disulfide bonds (-S-S-) and glycosylation sites (overlaid triangles) are indicated in the β subunit. The sites with closed triangles are conserved and glycosylated in the Na⁺/K⁺-ATPase β₁ subunit. The amino and carboxyl termini are shown by N and C, respectively. The binding sites for ATP analogues determined in other P-type ATPases are also conserved in gastric proton pump (see Fig. 3 of ref. 1c).

る親水性領域に触媒部位があり ATP を結合する。K⁺ や H⁺ がどの残基に結合して膜内を輸送されるかについての証拠はないが、膜貫通領域に存在し P 型 ATPase 間で保存された酸性アミノ酸残基 (Glu-344, Glu-796, Asp-825) に注目することができる。プロトンポンプに対する種々の薬剤による阻害を直接に見たい場合に、酵素標品を調製することが必要になるが、大量に得たい場合にはブタの胃粘膜を出発とする。この標品は表裏が細胞膜とは逆になった小胞をしており、適当な緩衝液中で ATP を加えると外側を向いた触媒部位で ATP が加水分解され H⁺ が小胞内部に取り込まれる。²¹⁾

プロトンポンプ阻害剤であるオメプラゾールが共有結合する Cys 残基は、 α サブユニットの Cys-814 (又は 823) と Cys-893 であると推定された。²²⁾ オメプラゾールの類似体であるランソプラゾールは Cys-322 にも結合する。パントプラゾールでは Cys-814 と Cys-823 に結合するが Cys-893 には結合しない。 α サブユニットに存在するこれら以外の 24 個の Cys 残基は、すべて細胞内もしくは推定膜貫通領域にあり、オメプラゾールなどのプロトンポンプ阻害剤とは反応しない。興味深いのは、プロトンポンプ阻害剤が修飾する Cys 残基は、大腸や膀胱の H⁺/K⁺-ATPase では保存されていないことである (Fig. 9)。このことから、プロトンポンプ阻害剤の特異性は高いことが分かる。一方、 β サブユニットの細胞外に出た部分には Cys 残基が 6 個存在するが、すべてジスルフィド結合を形成しているためやはりオメプラゾールなどとは反応しない。

SCH28080 の結合部位は、その類似体である光親和性標識試薬による修飾実験から、1 番目と 2 番目の膜貫通領域を結ぶループ部分であると結論されている。²²⁾ また、K⁺ はカルボキシ末端側の膜貫通領域に結合するという報告がある。²³⁾ SCH28080 と光親和性標識試薬による阻害は K⁺ と拮抗するので、²²⁾ K⁺ の結合部位はアミノ末端及びカルボキシ末端側の複数の膜貫通領域からできているものと思われる。

一方で Na⁺/K⁺-ATPase の β サブユニットの 127—152 残基領域は、K⁺ 結合に重要とされている。この部分をプロトンポンプの β サブユニットに対応する部分と置換すると、Na⁺/K⁺-ATPase 活性は失われる。しかし、この置換型 β サブユニットの Phe 残基を Na⁺/K⁺-ATPase で保存されている Arg 残基にすると、ATPase 活性が検出されるようになった。²⁴⁾ Na⁺/K⁺-ATPase の α サブユニットの K⁺ 結合部位形成に、 β サブユニットの Arg-148 が決定的な役割を果たしていたことは驚きでもある。プロトンポンプにおけるこの位置の残基 (Phe) の役割が興味深い。

5. プロトンポンプサブユニットの複合体形成

アフリカツメガエルの卵母細胞や動物培養細胞に α と β サブユニットを発現させる系を用いて、両サブユニットが複合体を形成するかどうか調べられている。²⁵⁾ それによれば、 β サブユニットが存在しないと α と β の複合体が膜に安定に分子集合しない。^{25a,b)} 一方、Na⁺/K⁺-と Ca²⁺-ATPase のキメラ蛋白質を作ると、Na⁺/K⁺-ATPase の 7 番目と 8 番目の膜貫通領域に挟まれた細胞外にある 26 残基の配列に対応する部分にもつ Ca²⁺-ATPase は、Na⁺/K⁺-ATPase 及びプロトンポンプの β サブユニットと分子集合した。²⁶⁾ この 26 残基の部分を Fig. 8 では斜線を引いているが、Na⁺/K⁺-ATPase と 3 種の H⁺/K⁺-ATPase で対応する領域を比較するとよく保存されていることが分かる (Fig. 9)。恐らく胃のプロトンポンプを始めとする H⁺/K⁺-ATPase でもこの領域が、 β サブユニットとの相互作用に重要な部分であると想像できる。

プロトンポンプを細胞膜に局在化させるシグナルは、 α サブユニットのアミノ末端側半分にあること、また β サブユニットは単独でも細胞膜へ移行するシグナルを持っていることが示さ

Fig. 9. Comparison of the H^+/K^+ - and Na^+/K^+ -ATPase α Subunit Sequences Important for the Association with the β Subunit

The extracellular 26 amino acid residues located between potential transmembrane segments M7 and M8 of Na^+/K^+ -ATPase α subunit are believed to be important for the association with the β subunit.²⁶⁾ These residues (N/K) are compared with those of the gastric (gH/K), colon (cH/K) and toad bladder (bH/K) H^+/K^+ -ATPase α subunits.¹³⁻¹⁵⁾

れている。これに反し、 Na^+/K^+ -ATPase の β サブユニットには局在化シグナルはないとされている。^{25c,d)}

6. プロトンポンプ遺伝子の構造

ヒトプロトンポンプの α サブユニット遺伝子には 21 個のイントロンが挿入されている。¹¹⁾ Na^+/K^+ -ATPase の 3 種のアイソフォームと比べると、このうちの 19 個までが完全に挿入位置が一致していた (Fig. 10)。 Na^+/K^+ -ATPase とは完全に一致していない 1 番目と 9 番目のイントロンの挿入位置について、ブタやラットのプロトンポンプ遺伝子で調べるとヒトの遺伝子と同じ位置に挿入されていた。²⁷⁾ プロトンポンプ遺伝子の異種動物間で対応するイントロンの塩基配列は 60% 以上保存されているが、塩基数は若干異なっていた。また Na^+/K^+ -ATPase の対応するイントロンは塩基配列のみならず長さも全く異なり、保存性は認められなかった。このことは、イントロン部分における塩基配列の変異速度がエキソン部分よりも速いことを示唆している。ラットのプロトンポンプ遺伝子でも、6 番目のエキソン部分にはイントロンが挿入されていないことを確認した。

プロトンポンプの β サブユニット及び Na^+/K^+ -ATPase の β_2 サブユニット遺伝子の 6 ヶ所あるイントロンの挿入位置は完全に一致していた。¹²⁾ β_1 サブユニットでは 3 ヶ所が一致していた (Fig. 11)。このような遺伝子構造とアミノ酸残基の保存性から、プロトンポンプ及び Na^+/K^+ -ATPase の 2 種のサブユニットがそれぞれ共通の祖先遺伝子から進化してきたことは間違いない。大腸や膀胱の H^+/K^+ -ATPase (プロトンポンプ) の遺伝子構造が、どの程度胃のプロトンポンプのサブユニット遺伝子と保存されているのか興味深い。

7. プロトンポンプサブユニット遺伝子の転写調節

α と β サブユニットからなるプロトンポンプは、胃壁細胞に多量にかつ特異的に発現している。²⁸⁾ ラットやマウスでは胎児が生まれ出る前 2—3 日にプロトンポンプが胃に検出できるので、その頃既に壁細胞が生じている。²⁹⁾ プロトンポンプが発現している細胞は、生後 10 日過ぎから 30 日にかけて増大する。さらに興味深いのは、 α と β サブユニットが協調的に発現してい

Fig. 10. Positions of Introns in the α Subunit Genes of Gastric Proton Pump and Na^+/K^+ -ATPase

The primary structures and positions of introns (open triangles with intron numbers) are indicated.⁴⁵⁾ HK α , human gastric proton pump (H^+/K^+ -ATPase) α subunit; NK α 2, human Na^+/K^+ -ATPase α 2 subunit; NK α 3, human Na^+/K^+ -ATPase α 3 subunit.

Fig. 11. Positions of Introns in the β Subunit Genes of Gastric Proton Pump and Na^+/K^+ -ATPases

The primary structures and positions of introns (open triangles with intron numbers) are indicated.⁴⁵⁾ HK β , rat gastric proton pump (H^+/K^+ -ATPase) β subunit; NK β 2, mouse Na^+/K^+ -ATPase β 2 subunit; NK β 1, human Na^+/K^+ -ATPase β 1 subunit. Positions of 3 S-S bridges identified in the Na^+/K^+ -ATPase β 1 subunit are also shown. The underline with M indicates the hypothetical transmembrane domain.

ることである。²⁸⁾ このような事実から、プロトンポンプのサブユニット遺伝子が細胞特異的な遺伝子の転写調節機構及び胃粘膜細胞の分化を研究するのに、よいマーカーとなり得ると考えている。 α サブユニット遺伝子上流配列は、臓器によって変化していないので、胃壁細胞に特異的な DNA 結合蛋白質がサブユニット遺伝子の転写を促進していることを強く示唆している。実際、 α サブユニット (ヒトとラット) と β サブユニット (ラット) の遺伝子上流の配列^{11,12,27)} に、ラットあるいはブタの胃粘膜の核蛋白質が結合した。これに対して、他の臓器からの核蛋白質は結合しなかった。^{12,30)}

核蛋白質は、 α サブユニットでは TAATCAGCTG 配列に、³⁰⁾ β サブユニットでは GATAGC 配列に結合した。¹²⁾ また、競合実験を行うことによって、同じ蛋白質が2つの配列を共通に認識していることが示された。³⁰⁾ それらの配列は TATA 配列の上流 30—60 塩基対のところであり、転写調節因子の結合部位となる条件を満たしている。同様に胃壁細胞に発現する H_2 受容体遺伝子についても調べたが、そのような配列は認められなかった。³¹⁾ H_2 受容体は他の臓器でも発現しているので、異なる調節様式で転写されているものと考えられる。

8. 胃粘膜に発現する GATA-DNA 結合蛋白質

2つのサブユニット遺伝子で推定した核蛋白質の結合配列と変異導入の結果を比べると、(G/C)PuPu(G/C)GAT(A/T)PuPy という共通配列が浮かんでくる (Fig. 12)。このなかの GAT (A/T) 配列は、造血系細胞で見つかった GATA-DNA 結合蛋白質³²⁾ の認識配列 [(A/T)GATA (A/G)] によく似ている。GATA 結合蛋白質の DNA 結合領域は、特徴的な亜鉛フィンガー構造 [(CX₂C)X₁₇(CX₂C)X₂₉(CX₂C)X₁₇(CX₂C)] をしている。このアミノ酸配列に着目し、胃の核蛋白質の DNA 結合領域にも同様の配列が保存されていることを予想した。ブタ胃粘膜の cDNA を用いて PCR により対応する部分の配列増幅を試みると、これまでに知られていない3種の GATA 結合蛋白質の配列 (GATA-GT1, GT2, GT3) が見つかった。それらをプローブにして、GATA-GT1 と GATA-GT2 の完全長の cDNA クローンをラットの胃のライブラリーから得ることができた。³³⁾ 推定アミノ酸配列を造血系細胞で見つかった GATA 結合蛋白質 (GATA-1, 2, 3) のものと比較しても、亜鉛フィンガー部分を除いて全く保存性がなく (Fig. 13)、新しい蛋白質であることが分かった。

GATA-GT1 は 391 残基 (Fig. 14), GATA-GT2 は 440 残基 (Fig. 15) から成っている。両者

Fig. 12. The Positions of the Gastric Motifs in the 5'-Upstream Regions of the Gastric Proton Pump α and β Subunit Genes

The α and β subunit gene sequences that bind gastric nuclear protein [gastric motif, (G/C)PuPu(G/C)NGAT(A/T)PuPy]³⁰⁾ are compared (left). The positions of the gastric motifs in the human α -, and rat α - and rat β -subunit genes are shown schematically together with TATA-boxes (right). Arrows indicate the transcription start sites. The GATA motif³²⁾ is also shown.

Fig. 13. Conservation of the Amino Acid Residues in the Amino Terminal, Zinc-Finger and Carboxyl Terminal Domains of Various GATA-Binding Proteins

Identical amino acid residues between each pair of GATA-binding protein domains (N, amino terminal domain; Zn, zinc-finger domain; C, carboxyl terminal domain) are indicated by percentage values.⁴¹⁾ 1, human GATA-1; 2, human GATA-2; 3, human GATA-3; GT1, rat GATA-GT1; GT2, rat GATA-GT2; 5, chicken GATA-5.

MLPGLPYLQ GAGSGPS NH AGGAGA HPGWPQASAD SPPY GGGGAAGGAAGPGGAGS ATAH 60
 ASARFPY SPSPPE MANGAARDPGGYV AAGGAGAGS V SGGGGS LAAMGGREHQYSSLSAARP 120
 LNGTY HHHHHH HPTYS SPY MGAPLTPAW PAGPF ET PVLI HSLQSR AGAP LPVPR GPSA DLLLE 180
 DLS ESRECVNCGSIQTPLWRRDGTGHYLCNACGLYSKMNGLSRPLIKPQKRVPSSRRLGL 240
SCANCHTTTTTLWRRNAEGEPVCNACGLYMKLHGVPRLAMKKEGIQTRKRKPKNINKSK 300
ACSGNSSVPMTP TSSSS NSDDCTKNT SPPT QSTASGVGASVMSAVGESANPENS DLKYS G 360
 QDGLYIGVSL SSPA EVTSSVRQDSWCALALA 391

Fig. 14. Amino Acid Sequence of Rat GATA-GT1

The amino acid sequence of rat GATA-GT1³³⁾ is shown. Zinc-finger domain and Zinc-finger motifs (CX₂C-X₁₇-CX₂C sequence) are underlined and dotted, respectively. Open boxes indicate Ala, Gly, Pro and Ser rich sequences. The His cluster is shown by dotted boxes. S(T)PXX motifs are doubly underlined.

MYQSLAMAANH GPPPGA YE AGGPGA FMH SAGAASSP VYVPT TPRV PSSVLGLSYLQ GGGSG 60
AASGA T SGGSSGAGPFGAGPFG TQQ GSPG WSQAGAEGAAY TPPP V SPRFS PPGTTGSL AAA 120
AAAAA RE AAA Y SSSGGAAGAG LAGREQYGRPGFAGSYSS SPY PAYMADV GASWAAAAAAS 180
 AGPFDSFVLHSLPGRANPARHPNLD MFDDFSEGRECVNCGAMST PLWRRDGTGHYLCNAC 240
 GLYHKMNGINRPLIKPQRRLSASRRVGLSCANCO TTTTTLWRRNAEGEPVCNACGLYMKL 300
HGVPRLAMRKEGIQTRKRKPKNLNKSKT PAGPPG ESL FPSSGASS NSSNAT SSSSSS EE 360
 MRPIKTEPGLSSHYGHSSSSMSQTFSTVSGHGSS IHPVLSALKL SPQGY SPVT QTSQASS 420
 KQDSWNSLVLADSHGDIITA 440

Fig. 15. Amino Acid Sequence of Rat GATA-GT2

The amino acid sequence of rat GATA-GT2³³⁾ is shown (see legend to Fig. 14). The Ala clusters are indicated by dotted boxes. Hydrophobic residues located at every seven residues of the carboxyl terminal region are shown by asterisks.

ともアミノ酸残基としてはSerとThrの和が20%, Proが10%と割合が高く, ペプチド鎖が動きやすい構造をしていると予想される。またSer(Thr)·Pro·X·X配列³⁴⁾があることも, 転写調節因子として機能し得ることを示唆している。GATA-GT1とGATA-GT2にはそれぞれHisとAlaに富んだ領域がある。GATA-GT2にはカルボキシ末端に7残基ごとに疎水性残基が現れ, Leuジッパー様の構造をとる可能性がある。これらの特徴ある構造は, 両蛋白質がDNAや

Fig. 16. Schematic Model of Gastric Specific Transcription

他の蛋白質と相互作用する上で重要と思われる。

GATA 蛋白質の間で保存された亜鉛フィンガー部分の役割について、以下のような知見が得られている。GATA-1 のカルボキシ末端側のフィンガーとそれに続く塩基性アミノ酸残基のクラスターが、DNA 配列 (A/T)GATA(A/G) の主溝と副溝にそれぞれ結合することが NMR によって明らかにされた。³⁵⁾ 一方、アミノ末端側のフィンガーは DNA 結合に対する親和性と安定性にしか寄与しないと思われていたが、(T/C)AAG 配列に結合する可能性が最近示されている。³⁶⁾

9. GATA-GT1 と GATA-GT2 の役割

GATA-GT1 と GATA-GT2 の mRNA はブタの胃粘膜に発現しており、筋層には存在しなかった。³³⁾ さらにラットの胃底腺のどの細胞に発現しているのかを、*in situ* ハイブリダイゼーションで調べると、胃壁細胞にシグナルが認められた。³⁷⁾ 以上の結果は、GATA-GT1 と GATA-GT2 が胃壁細胞において転写調節を担っている可能性を示唆している。

実際、大腸菌に発現させ精製した GATA-GT1 (Ser32—Ala391) と GATA-GT2 (Glu128—Gly369) のフラグメントは、 α と β サブユニット遺伝子上の Fig. 12 に示した認識配列に結合した。さらに、 α と β サブユニット遺伝子上流配列をルシフェラーゼ遺伝子上流に連結し、培養細胞に導入した。この時、GATA-GT1 や GATA-GT2 の発現プラスミドを共存させると、ルシフェラーゼ遺伝子の転写が促進された。³⁸⁾ これらの事実から、両 GATA 蛋白質が H^+/K^+ -ATPase のサブユニット遺伝子の転写促進にかかわっている可能性が高いと考えている (Fig. 16)。

GATA-1 では、亜鉛フィンガーの外側にある Ser 残基が赤血球系細胞でリン酸化されるが、その意味や情報伝達系との関連は不明である。³⁹⁾ 一方、GATA-2 は血液細胞の前駆細胞でリン酸化されるが、インターロイキン-3 による刺激でリン酸化が促進する。⁴⁰⁾ このことから、前駆細胞の増殖制御や細胞増殖因子に対する応答に、GATA-2 が MAP キナーゼを介して関与する可能性がでてきた。GATA-GT1 や GATA-GT2 についても著者らは蛋白質リン酸化酵素によってリン酸化され得る部位を指摘している。¹⁹⁾ それらの部位がどのような時にリン酸化されて、両 GATA 蛋白質の機能が制御されているのか興味深い。

10. 終わりに

胃酸分泌を行う酵素の実体を解明する目的で出発した研究が、遺伝子構造、さらに細胞特異的な転写調節の機構を明らかにする方向へと進展した。新たに発見した GATA-GT1 や GATA-GT2 を中心にして転写制御機構を知ることは、胃粘膜細胞を特徴づける様々な遺伝子の発現様式、胃粘膜を構成する細胞の分化機構などを研究する手掛かりを与えるに違いない。

GATA 蛋白質は、無脊椎動物（線虫）や昆虫（ショウジョウバエやカイコ）、さらに下等真核生物（酵母やカビ）にも現在では見つかった起源の古い転写制御因子である。⁴¹⁾ このことから、遺伝子発現の調節に係わる様々な場面で、GATA 蛋白質の役割を考慮することは大事であると考えている。

最近、GATA-GT2 が心臓の分化・形成に機能しているという報告がなされている。⁴²⁾ また胎児の肝臓にも GATA-GT2 が発現していることが報告された。⁴³⁾ GATA-GT2 を始めとする GATA 蛋白質が、各臓器でどのような蛋白質と相互作用し機能しているのか明らかにすることがこれから必要であろう。全一次構造がまだ決まっていない GATA-GT3 の構造と発現部位も、興味深い。³³⁾

本稿で述べてきたように、プロトンポンプのサブユニット以外に種々の壁細胞機能にかかわる蛋白質の構造や遺伝子の構造が明らかになったので、壁細胞の細胞生理学的研究も進展することが期待される。胃酸は塩酸なので Cl^- イオンの放出もプロトンと同時に起こさなければならないが、 Cl^- 輸送体の実体はまだ解明されていない。今までに知られている Cl^- 輸送体とどのように異なっているのか明らかにすることは大事である。

胃潰瘍や十二指腸潰瘍、また胃癌の原因として、胃におけるヘリコバクターの持続感染が現在大きく取り上げられてきている。⁴⁴⁾ 除菌剤の開発及びプロトンポンプ阻害剤との併用効果の検討は、精力的に行われていくと思われる。一方で、胃粘膜細胞機能及び遺伝子発現に視点をあてた研究は、胃酸分泌の制御のみならず、細胞損傷を防御する手段を与える上でも役立つことが期待され、この点を意識した研究も大切であろう。

謝辞 本総説を執筆するにあたり御助言を賜りました大阪大学・産業科学研究所・二井將光教授に感謝致します。また、本研究は同研究所生合成化学工業部門（現生体応答部門生体膜研究分野）において、二井將光教授並びに文献中に引用された大学院生諸氏との共同で行ったものであり、ここに改めて御指導、御鞭撻と御協力に深く感謝致します。

引用文献及び注

- 1) a) Maeda M., *Seikagaku*, **62**, 332 (1990); b) *Idem*, *ibid.*, **63**, 1037 (1991); c) *Idem*, *Yakugaku Zasshi*, **115**, 15 (1995).
- 2) a) Ganser A. L., Forte J. G., *Biochim. Biophys. Acta*, **307**, 169 (1973); b) Sachs G., Chang H.-H., Rabon E., Schackman R., Lewin M., Saccomani G., *J. Biol. Chem.*, **251**, 7690 (1976).
- 3) Chow D. C., Forte J. G., *J. Exp. Biol.*, **198**, 1 (1995).
- 4) Gordon J. I., Hermiston M. L., *Curr. Opin. Cell Biol.*, **6**, 795 (1994).
- 5) Wolosin J. M., Forte J. G., *J. Biol. Chem.*, **256**, 3149 (1981).
- 6) Urushidani T., Hanzel D. K., Forte J. G., *Am. J. Physiol.*, **256**, G1070 (1989).
- 7) Black J. W., Duncan W. A. M., Durant C. J., Ganellin C. R., Parsons M. E., *Nature* (London), **236**, 385 (1972).
- 8) Lorentzon P., Jackson R., Wallmark B., Sachs G., *Biochim. Biophys. Acta*, **897**, 41 (1987).
- 9) Wallmark B., Briving C., Fryklund J., Munson K., Jackson R., Mendlein J., Rabbon E., Sachs G., *J. Biol. Chem.*, **262**, 2077 (1987).
- 10) Pedersen P. L., Carafoli E., *Trends Biochem. Sci.*, **12**, 146 (1987).
- 11) Maeda M., Oshiman K., Tamura S., Futai M., *J. Biol. Chem.*, **265**, 9027 (1990).

- 12) Maeda M., Oshiman K., Tamura S., Kaya S., Mahmood S., Reuben M. A., Lasater L. A., Sachs G., Futai M., *J. Biol. Chem.*, **266**, 21584 (1991).
- 13) Jaisser F., Horisberger J.-D., Geering K., Rossier B. C., *J. Cell Biol.*, **123**, 1421 (1993).
- 14) Crowson M. S., Shull G. E., *J. Biol. Chem.*, **267**, 13740 (1992).
- 15) Maeda M., Ishizaki J., Futai M., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **157**, 203 (1988).
- 16) Togawa K., Ishiguro T., Kaya S., Shimada A., Imagawa T., Taniguchi K., *J. Biol. Chem.*, **270**, 15475 (1995).
- 17) a) Korczak B., Zarain-Herzberg A., Brandl C. J., Ingles C. J., Green N. M., MacLennan D. H., *J. Biol. Chem.*, **263**, 4813 (1988); b) Lytton J., MacLennan D. H., *ibid.*, **263**, 15024 (1988); c) Carafoli E., *ibid.*, **267**, 2115 (1992).
- 18) Solioz M., Odermatt A., Krapf R., *FEBS Lett.*, **346**, 44 (1994).
- 19) Maeda M., *J. Biochem.*, **115**, 6 (1994).
- 20) Maeda M., Tagaya M., Futai M., *J. Biol. Chem.*, **263**, 3652 (1988).
- 21) Hirschowitz B. I., Keeling D., Lewin M., Okabe S., Parsons M., Sewing K., Wallmark B., Sachs G., *Digest. Disease Sci.*, **40**, 3S (1995).
- 22) Munson K. I. B., Gutierrez C., Balaji V. N., Ramnarayan K., Sachs G., *J. Biol. Chem.*, **266**, 18976 (1991).
- 23) Rabon E. C., Smillie K., Seru V., Rabon R., *J. Biol. Chem.*, **268**, 8012 (1993).
- 24) Ueno S., Kusaba M., Takeda K., Maeda M., Futai M., Izumi F., Kawamura M., *J. Biochem.*, **117**, 591 (1995).
- 25) a) Horisberger J.-D., Jaunin P., Reuben M. A., Lasater L. S., Chow D. C., Forte J. G., Sachs G., Rossier B. C., Geering K., *J. Biol. Chem.*, **266**, 19131 (1991); b) Noguchi S., Maeda M., Futai M., Kawamura M., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **182**, 659 (1992); c) Gottardi C. J., Caplan M. J., *J. Biol. Chem.*, **268**, 14342 (1993); d) Gottardi C. J., Caplan M. J., *J. Cell Biol.*, **121**, 283 (1993).
- 26) Lemas M. V., Hamrick M., Takeyasu K., Fambrough D. M., *J. Biol. Chem.*, **269**, 8255 (1994).
- 27) Oshiman K., Motojima K., Mahmood S., Shimada A., Tamura S., Maeda M., Futai M., *FEBS Lett.*, **281**, 250 (1991).
- 28) Morley G. P., Callaghan J. M., Rose B. R., Toh B. H., Gleeson P. A., van Driel I. R., *J. Biol. Chem.*, **267**, 1165 (1992).
- 29) Mori Y., Fukuma K., Adachi Y., Shigeta K., Kannagi R., Tanaka H., Sakai M., Kuribayashi K., Uchino H., Masuda T., *Gastroenterology*, **97**, 364 (1989).
- 30) Tamura S., Oshiman K., Nishi T., Mori M., Maeda M., Futai M., *FEBS Lett.*, **298**, 137 (1992).
- 31) Nishi T., Koike T., Oka T., Maeda M., Futai M., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **210**, 616 (1995).
- 32) Orkin S. H., *Cell*, **63**, 665 (1990).
- 33) Tamura S., Wang X.-H., Maeda M., Futai M., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **90**, 10876 (1993).
- 34) Suzuki M., *J. Mol. Biol.*, **207**, 61 (1989).
- 35) Omichinski J. G., Clore G. M., Schaad O., Felsenfeld G., Trainor C., Appella E., Stahl S. J.,

- Gronenborn A. M., *Science*, **261**, 438, (1993).
- 36) Whyatt D. J., deBoer E., Grosveld F., *EMBO J.*, **12**, 4993 (1993).
- 37) Mushiaki S., Shimada S., Tohyama M., Hasebe M., Futai M., Maeda M., *FEBS Lett.*, **340**, 117 (1994).
- 38) Nishi T., Kubo K., Oka T., Maeda M., Futai M., 準備中.
- 39) Crossley M., Orkin S. H., *J. Biol. Chem.*, **269**, 16589 (1994).
- 40) Towatari M., May G. E., Marais R., Perkins G. R., Marshall C. J., Cowley S., Enver T., *J. Biol. Chem.*, **270**, 4101 (1995).
- 41) Maeda M., Nishi T., Kubo K., Futai M., *J. Exp. Biol.*, (1996) in press.
- 42) a) Arceci R. J., King A. A. J., Simon M. C., Orkin S. T., Wilson D. B., *Mol. Cell. Biol.*, **13**, 2235 (1993); b) IP H. S., Wilson D. B., Heikinheimo M., Tang Z., Ting C.-N., Simon M. C., Leiden J. M., Parmacek M. S., *ibid.*, **14**, 7517 (1994).
- 43) Matsuda K., Kobune Y., Noda C., Ichihara A., *FEBS Lett.*, **353**, 269 (1994).
- 44) Alper J., *Nature* (London), **262**, 1817 (1993).
- 45) Maeda M., "Cell Biology," ed. by Barry H. Hirst, Vol. 89, Springer-Verlag Heidelberg, 1994, p. 1.