

学 位 論 文 題 名

各種蛍光プローブによる H^+ , K^+ -ATPase の
構造変化に関する研究

学位論文内容の要旨

H^+ , K^+ -ATPase は胃粘膜壁細胞に存在し、胃酸分泌に直接関与するプロトンポンプである。本酵素の調節機構の異常は、胃潰瘍等を引き起こすことが知られている。従って、胃酸の分泌機構を分子レベルで解明することは生体におけるエネルギー変換機構の理解のためのみならず医学的側面からも重要である。

本酵素は、 Na^+ , K^+ -ATPase とほぼ同様の反応機構でカチオンを輸送すると考えられているが、本酵素が ATP 加水分解中いかなる構造変化を伴うかに関しては、ほとんど不明である。

内因性 Tryptophan 蛍光、蛍光 SH 試薬 N-[p-2- (benzimidazolyl) phenyl] maleimide (BIPM) や蛍光アミノ試薬 fluorescein 5'-isothiocyanate (FITC) は、 Na^+ , K^+ -ATPase の真時間での構造変化の研究に用いられ、反応機構の解明に重要な役割を果たしている。しかし、 H^+ , K^+ -ATPase に関するこの様な視点からの研究は、ほとんど行われていなかった。

本研究では、 H^+ , K^+ -ATPase のリン酸化および脱リン酸化に伴う真時間での構造変化を、各種の蛍光プローブを用いて解析した。

まず、内因性 tryptophan 残基の蛍光がリン酸化によって変化するか否かを検討した。

酵素の tryptophan 蛍光は、ATP によるリン酸化で増加、脱リン酸化で減少した。ATP より小分子のリン酸化基質 Acetyl phosphate (AcP) によるリン酸化に伴う蛍光の増加の程度は、ATP による変化に比べ約 50%低下した。この理由を確かめるために ATP と AcP から形成されるリン酸化酵素量を測定した。その結果、ATP からのリン酸化酵素量は、ATP の結合量および AcP からのリン酸化酵素量の約半分であることが示された。これらの結果その他は、 H^+ , K^+ -ATPase が二量体で機能していることを明白に示していた。

AcP から形成したリン酸化酵素の性質を調べるため、ATP の結合を阻止するとされる FITC を H^+ , K^+ -ATPase に導入した酵素標品と AcP を用いて、リン酸化に伴う酵素の構造変化を調べた。

修飾酵素の FITC 蛍光強度は、AcP による酵素のリン酸化に伴い増加し、 K^+ による脱リン酸化で減少した。また、AcP に対する修飾酵素の親和性が、酸性で著しく増加することが FITC 蛍光変化から示唆された。酸性における AcP と修飾酵素の親和性の変化を確かめるため、放射性 AcP を用いてリン酸化酵素形成反応を行った。AcP によって、濃度依存的にリン酸化酵素が形成され、AcP に対する修飾酵素の親和性は、酸

性で増加することが確かめられた。これら酵素と AcP の反応性は、本来の基質である ATP と類似しており、従来の報告に反して AcP でもプロトンが輸送されることが予想された。そこで、acridine orange と H^+, K^+ -ATPase 小胞を用いて、本酵素によるプロトン輸送を測定した。その結果、中性では K^+ 依存 phosphatase による分解が生じ、 H^+ 輸送は生じないが、pH 5.0 において AcP によって H^+ が輸送されることが初めて証明された。

以上の結果から、AcP は ATP と同様に正反応で E_2P を形成し、AcP によってプロトンが輸送されることが示唆された。

上記の結果から ATP と AcP の反応性が明らかとなったが、FITC プローブでは、本来の基質である ATP を用いた構造解析ができない。また、酵素内在性 tryptophan 蛍光は、ATP による構造変化の検出が可能だが蛍光変化量が微小である。そこで、ATP によって生じる構造変化を検出する蛍光プローブの導入を目的として、BIPM による H^+, K^+ -ATPase の修飾を試みた。

BIPM が約 1 分子導入された酵素標品は、ATPase 活性およびリン酸化酵素形成能を完全に保持していた。また、BIPM プローブは ATP によるリン酸化で蛍光減少、 K^+ の有無による脱リン酸化で増加を示した。蛍光強度変化を示す BIPM の結合部位を同定するため、TPCK-trypsin によって修飾酵素を分解した。単離した BIPM ペプチドのアミノ酸シーケンス分析から、BIPM プローブの結合部位は、二番目の細胞質領域中にある Cys 241 と同定した。

BIPM とは異なる部位の微小環境変化を検出し、BIPM の蛍光エネルギー移動の受容体となり得る蛍光プローブの導入を目的として、N-(1-anilinonaphtyl-4)maleimide (ANM) による H^+, K^+ -ATPase の修飾を試みた。

ANM が 1 分子導入された酵素標品は、ATPase 活性およびリン酸化酵素形成能を完全に保持していた。また、ANM プローブは ATP によるリン酸化で蛍光減少、 K^+ の有無による脱リン酸化で増加を示した。蛍光強度変化を示す ANM の結合部位を同定するため、各種プロテアーゼによって修飾酵素を分解したが、ANM 結合ペプチドは、いずれのプロテアーゼを用いても可溶化することができなかった。ANM 結合 α -subunit を 0.1% SDS 存在下 Achromobactor protease I で処理し、分解物を SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分析した結果、ANM 結合ペプチドの分子量は、5.7-14.3 KDa であった。以上の結果から、ANM の結合部位は膜貫通領域に存在する Cystein 残基に結合していると思われる。

以上の結果は、 H^+, K^+ -ATPase が二量体で機能していること、さらに、従来輸送基質とはならないとされていた AcP が、 H^+ の輸送を行うこと、また、ATP に依存した H^+, K^+ -ATPase 反応に伴う構造変化が、Cys 241 に導入した BIPM プローブその他によって追跡可能であることを初めて示したものである。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 谷 口 和 彌

副 査 教 授 盛 田 フ ミ

副 査 教 授 田 村 守

学 位 論 文 題 名

各種蛍光プローブによる H^+ , K^+ -ATPase の 構造変化に関する研究

H^+ , K^+ -ATPase は胃粘膜壁細胞に存在し、胃酸分泌に直接関与するプロトンポンプである。本酵素の調節機構の異常は、胃潰瘍等を引き起こすことが知られている。従って、胃酸の分泌機構を分子レベルで解明することは生体におけるエネルギー変換機構の理解のためのみならず医学的側面からも重要である。

本研究では、 H^+ , K^+ -ATPase のリン酸化および脱リン酸化に伴う真時間での構造変化を、各種の蛍光プローブを用いて解析した。

酵素の tryptophan 蛍光は、ATPによるリン酸化で増加、脱リン酸化で減少した。ATP より小分子のリン酸化基質 Acetyl phosphate (AcP)によるリン酸化に伴う蛍光の増加の程度は、ATP による変化に比べ約 50% 低下した。ATP と AcP から形成されるリン酸化酵素量を測定した、ATP からのリン酸化酵素量は、ATP の結合量および AcP からのリン酸化酵素量の約半分であることが示された。これらの結果その他は、 H^+ , K^+ -ATPase が二量体で機能していることを明白に示していた。

FITC を H^+ , K^+ -ATPase に導入した酵素標品の FITC 蛍光強度は、AcP による酵素のリン酸化に伴い増加し、 K^+ による脱リン酸化で減少した。また、AcP に対する修飾酵素の親和性が、酸性で著しく増加することが FITC 蛍光変化から示唆された。酸性における AcP と修飾酵素の親和性の変化を確かめるため、放射性 AcP を用いてリン酸化酵素形成反応を行った。AcP によって、濃度依存的にリン酸化酵素が形成され、AcP に対する修飾酵素の親和性は、酸性で増加することが確かめられた。そこで、acridine orange と H^+ , K^+ -ATPase 小胞を用いて、本酵素によるプロトン輸送を測定した。その結果、中性では K^+ 依存 phosphatase による分解が生じ、 H^+ 輸送は生じないが、pH 5.0 において AcP によって H^+ が輸送されることが初めて証明された。

以上の結果から、AcP は ATP と同様に正反応で E2P を形成し、AcP によってプロトンが輸送されることが示唆された。

上記の結果から ATP と AcP の反応性が明らかとなったが、FITCプローブでは、本来の基質である ATP を用いた構造解析ができない。そこで、ATP によって生じる構造変化を検出する蛍光プローブの導入を目的として、BIPM による H^+ , K^+ -ATPase の修飾を試みた。BIPM が約 1 分子導入された酵素標品は、ATPase 活性およびリン酸化酵素形成能を完全に保持していた。また、BIPM プローブは ATP によるリン酸化で蛍光減少、 K^+ の有無による脱リン酸化で増加を示した。蛍光強度変化を示す BIPM の結合部位を同定するため、TPCK-trypsin によって修飾酵素を分解した。単離した BIPM ペプチドのアミノ酸シーケンス分析から、BIPM プローブの結合部位は、二番目の細胞質領域中にある Cys 241 と同定した。

BIPM とは異なる部位の微小環境変化を検出し、BIPM の蛍光エネルギー移動の受容体となり得る蛍光プローブの導入を目的として、N-(1-anilinonaphtyl-4)maleimide (ANM) による H^+ , K^+ -ATPase の修飾を試みた。

ANM が1分子導入された酵素標品は、ATPase活性およびリン酸化酵素形成能を完全に保持していた。また、ANM プローブは ATP によるリン酸化で蛍光減少、 K^+ の有無による脱リン酸化で増加を示した。蛍光強度変化を示す ANM の結合部位を同定するため、各種プロテアーゼ

によって修飾酵素を分解したが、ANM 結合ペプチドは、いずれのプロテアーゼを用いても可溶化することができなかった。

本論文は、 H^+, K^+ -ATPase が二量体で機能していること、さらに、従来輸送基質とはならないとされていた AcP が、 H^+ の輸送を行うこと、また、ATP に依存した H^+, K^+ -ATPase 反応に伴う構造変化が、Cys 241 に導入した BIPM プローブその他によって追跡可能であることを初めて示したものであり、この分野に対して貢献すること大なるものがある。

よって、著者は北海道大学博士（理学）の学位を授与される資格あるものと認める。