

学位論文題名

Fluorescence Probes at Lys-480 and Lys-501 in α -Chain
of Na^+, K^+ -ATPase Can Sense the Multiple ATP Binding
Induced Conformational Changes— Oligomeric Nature of Na^+, K^+ -ATPase —

(Na^+, K^+ -ATPase α 鎖のリジン480とリジン501に結合した蛍光プローブによる多様な ATP 結合で引き起こされる構造変化の感知 Na^+, K^+ -ATPase のオリゴマー性質)

学位論文内容の要旨

細胞内外の Na^+ と K^+ の濃度勾配は、 Na^+, K^+ -ATPaseがATP加水分解に伴い細胞外へ Na^+ を細胞内へ K^+ を能動輸送することにより形成される。 Na^+, K^+ -ATPaseは加水分解及びイオン輸送能を担う分子量約11万の α 鎖と糖鎖を含む分子量約3.5万の β 鎖からなる。 α β のみのプロトマーで活性を発現する、あるいは、 $(\alpha \beta)_2$ のダイプロトマーまたはそれ以上のオリゴマーとして機能し反応サイクル中に α 鎖間に相互作用が生じる、等の酵素の機能単位に関する報告が多数されている。反応サイクル中にATPの γ 位のリン酸基が α 鎖のAsp369に転移されたリン酸化酵素中間体(EP)を形成することから本酵素はP型ATPaseに属する。その反応様式として、 Na^+ 結合型酵素(NaE1)のATPからのリン酸化により、ADP感受性のリン酸化酵素中間体(E1P)、ついで K^+ 感受性のリン酸化酵素中間体(E2P)を経て、脱リン酸化され K^+ 結合型酵素(KE2)を形成後 Na^+ と反応して、再びNaE1へ移行するPost-Albers機構が知られている。しかし、ATPのエネルギーのイオン輸送エネルギーへの変換機構についての知見は少ない。これらの疑問に対して私たちの研究室では、蛍光プローブを Na^+, K^+ -ATPaseに導入して、反応中間体形成に伴う蛍光プローブ周辺の微小環境変化を反映した蛍光強度変化を測定し、酵素の動的な構造変化の解析を行っている。

ピリドキサルリン酸(PLP)やPLP分子にAMPをリン酸エステル結合し合成された AP_2PL は、ATPを必要とする蛋白質のATP結合部位への親和標識試薬として用いられている。 Na^+, K^+ -ATPaseをピリドキサル化合物で処理すると、それらプローブは α 鎖のLys480に結合し、ATPase活性やATPからのEP形成能を低下させるが小分子リン酸化基質であるアセチルリン酸(AcP)からのEP形成能は保持している。この様な諸活性への影響は、 α 鎖のLys501にフルオレセインイソチオシアネート(FITC)の導入によっても観察される。P型ATPaseでそれらLys残基前後のアミノ酸配列は保存されており、それらLys残基周辺はATP結合部位であると考えられていた。FITCプローブは酵素の構造変化を感知する蛍光プローブとして使用されてきたが、P型ATPaseにおいてピリドキサルプローブをそのように蛍光プローブとして使用された例はない。

本研究では、ピリドキサル蛍光を測定する事により、各反応中間体形成に伴う酵素の構造変化を検出できるのかを検討した。さらに、 α 鎖当たりのATPから形成される最大のEP量の見積もりも検討した。本論文の要旨は以下の3点である。

1 PLPやAP₂PLが α 鎖1mol当たり0.5mol結合するまでは、ATPase活性は50%まで低下しそれらプローブはLys480に優先的に結合するが、 α 鎖にそれ以上結合してもさらなるATPase活性の低下とLys480への結合は観察されない。また、EP形成量がATPase分子の半分にあるいは全てに起きるのか、研究室間の測定法などにより様々な見解がなされていたが、酵素標品の精製方法や比活性に関わらずATPから形成される最大のEP量は、 α 鎖1mol当たり0.5molである事を示した。

つまり、ピリドキサルプローブの結合量やEP形成量を α 鎖を分離し見積もる事により、膜結合型Na⁺,K⁺-ATPaseがダイプロトマー以上の構造で機能していることを明らかにした。

2 Lys480に結合したAP₂PLプローブは、AcPからのE2P形成後の構造変化を蛍光強度の増加として感知することを示した。ATPを添加しても、AP₂PL処理によりEP形成能が低下したにも関わらずAcPで観察されたような蛍光の増加が起きた。AP₂PL修飾酵素をさらにFITCで処理するとFITCは α 鎖1mol当たり0.9mol Lys501に結合し、ATPからのEP形成能のみ数%レベルまで低下するが、AcPやATPで引き起こされるAP₂PL蛍光の増加には影響しない。一方、AP₂PL-FITC修飾酵素のFITCプローブはATP添加による蛍光変化を生じない。また、E2Pと阻害剤であるouabainとの複合体であるouabain-E2Pの構造状態の違いをAP₂PLプローブにより初めて検出できた。

ピリドキサルプローブがAcPからのE2P形成後、さらにFITCプローブでは観察されないATPによるEP形成以前の構造変化をモニターできることを明らかにした。

3 反応サイクル中にATPは、NaE1へのEP形成に関わる μ Mオーダーのhigh affinity siteとKE2からNaE1への転移を促進するmMオーダーのlow affinity siteへの2つの反応ステップに関わると報告されている。ATPからのEP形成能を失ったAP₂PL-FITC修飾酵素を用い、AP₂PL蛍光でhigh affinity siteへのATPの結合による2種類の構造変化を、両蛍光でlow affinity siteへのATPの作用を観察できた。これは、AP₂PLやFITC処理後もKE2からNaE1への転移を促進するATPの作用が残存し、かつその効果を両蛍光変化としてモニターできることを示した。

FITC修飾酵素のAcPからのE2P形成による蛍光変化量に比べ、AP₂PL-FITC修飾酵素のそれは約半分の値を示した。このことはAP₂PLが結合した α 鎖上のFITCプローブは蛍光変化せず、残りの半分の α 鎖に結合したFITCのみの蛍光が変化すると考えられる。AP₂PLとFITC蛍光をモニターすることにより、ATPの結合で引き起こされるオリゴマー内の異なる α 鎖で起きる様々な構造変化を同時に検出できることを示唆している。

AP₂PLやFITC処理によりATPの結合が阻害されATPase活性やATPからのEP形成を低下すると考えられていたが、それらプローブで処理後もATPの結合能は保持していることを [α -³²P]ATPを用い遠心法にて直接結合量を見積もることにより示した。

今までATP結合部位への親和標識試薬としてのみ用いられてきたAP₂PLやFITCプローブ

ブで、ATPで引き起こされる酵素の構造変化をモニターする蛍光プローブとして利用できることを初めて示した。以上の結果から、膜結合型 Na^+, K^+ -ATPaseが $(\alpha \beta)_2$ のダイプロトマー以上で働き、その反応サイクル中にATPが α 鎖に相をずらして結合ついでリン酸化し、イオンを輸送していると考えられる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 谷 口 和 彌
副 査 教 授 矢 澤 道 生
副 査 教 授 菊 池 九 二 三
副 査 教 授 田 村 守

学 位 論 文 題 名

Fluorescence Probes at Lys-480 and Lys-501 in α -Chain of Na^+, K^+ -ATPase Can Sense the Multiple ATP Binding Induced Conformational Changes

— Oligomeric Nature of Na^+, K^+ -ATPase —

(Na^+, K^+ -ATPase α 鎖のリジン480とリジン501に結合した蛍光プローブによる多様な ATP 結合で引き起こされる構造変化の感知 Na^+, K^+ -ATPase のオリゴマー性質)

細胞内外の Na^+ と K^+ の濃度勾配は、 Na^+, K^+ -ATPase が ATP 加水分解に伴い細胞外へ Na^+ を細胞内へ K^+ を能動輸送することにより形成される。ATP の化学エネルギーのイオン輸送エネルギーへの変換機構についての知見を得るため蛍光プローブを Na^+, K^+ -ATPase に導入して、反応中間体形成に伴う酵素の動的な構造変化の解析を試みた。

1 ピリドキサルリン酸(PLP)や PLP 分子に AMP をリン酸エステル結合し合成された AP_2PL は Na^+, K^+ -ATPase の α 鎖の Lys480 に 1mol 当たり 0.5mol 結合し ATPase 活性を 50% まで低下した。しかし Lys480 へのそれ以上の結合と ATPase 活性の低下は観察されなかった。また、ATP から形成される最大のリン酸化中間体、EP 量は、 α 鎖 1mol 当たり 0.5mol である事を初めて直接証明した。

2 AP_2PL 処理により EP 形成能が低下したにも関わらず Lys480 に結合した AP_2PL プローブ蛍光は、ATP を添加すると、AcP で観察されたような蛍光の増加を示した。 AP_2PL 修飾酵素をさらに FITC で処理すると FITC は α 鎖 1mol 当たり 0.9mol Lys501 に結合し、ATP からの EP 形成能を数%レベルまで低下したが、AcP や ATP で引き起こされる AP_2PL 蛍光の増加には影響を与えなかった。又 AP_2PL プローブ蛍光により、E2P と阻害剤である ouabain との複合体である ouabain-E2P の構造状態の違いが明らかにされた。

3 ATP からの EP 形成能を失った AP_2PL -FITC 修飾酵素を用い、 AP_2PL 蛍光で high affinity site への ATP の結合による 2 種類の構造変化を、両蛍光で low affinity site への ATP の作用を観察できた。事実これらの標品が ATP の結合能は保持していることを [α - ^{32}P]ATP を用い遠心法にて直接結合量を測定し示した。

以上の結果から、膜結合型 Na^+, K^+ -ATPase が $(\alpha\beta)_2$ のダイプロトマー以上で働き、その反応サイクル中に ATP が α 鎖に相をずらして結合ついでリン酸化し、イオンを輸送しているとする仮説を提出した。従来の研究でこのような観点からオリゴマー構造の存在を示唆した研究はみられず、本分野の研究の進展に寄与することは明白である。よって申請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。