

学 位 論 文 題 名

Na, K-ATPase の反応機構に関する研究 － 2 種の蛍光プローブを用いた構造変化の解析と 酵素の四量体構造におけるリガンドの結合－

学位論文内容の要旨

動物細胞の形質膜を隔てた Na と K の電気化学的勾配の維持は Na, K-ATPase によってなされる。この酵素は ATP を加水分解と共役し、3 個の Na を細胞外部へ、2 個の K を細胞内部へ輸送する Na ポンプである。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。本酵素が $\alpha\beta$ や $(\alpha\beta)_2$ で機能しているかについては様々な報告があるが、我々の研究から $(\alpha\beta)_4$ で機能していることが示唆された。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-type ATPase に属する。その反応様式として、Na 結合型酵素 (NaE1) が 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 へと移行する Post-Albers 機構が知られている。

しかし、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、また、サブユニット間の相互作用がイオン輸送とどのように共役しているかについての知見は少ない。これらの疑問に対して我々の研究室では、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、反応中間体形成量やリガンドの結合量を測定し、酵素の構造変化の解析を行っている。

構造変化の解析を行うために酵素への様々な化学修飾が行われているが、中でも FITC、AP2PL に代表されるような、ATP 結合部位への親和標識試薬では本来の ATPase 活性を失ってしまい、ATP で引き起こされるイオン輸送に伴う酵素の構造変化についての知見は得られない。本研究では酵素標品への導入後も ATPase 活性に影響を与えない、BIPM および RH-421 を用いることで、各反応中間体形成時の両プローブの蛍光強度変化、EP 形成及び K の同族体である Rb による分解、Rb の閉塞の時間経過を比較する事により、ATP で引き起こされる酵素内のイオン輸送と構造変化の関連について追跡した。

また、Post-Albers 機構で示される各反応中間体形成時の ATP を含めた各種リガンドの結合量を測定した。特に ATP に関して、反応を厳密にコントロール可能な条件で測定出来る、二重膜フィルトレーション法による測定系を再構築し、リン酸標識部位の異なる ATP を用いることにより、反応サイクル中の ATP の結合量を測定した。本論文の要旨は

1 E1P が形成する条件で RH-421、BIPM プローブ蛍光強度変化を測定したところ、RH-421 蛍光強度は BIPM 蛍光強度変化や EP 形成よりも速く減少した。Na を酵素へ閉塞状態にすることが可能な oligomycin を用いると RH-421 蛍光強度変化は消失し、BIPM 蛍光強度変化は変化量が小さくなり、変化の速度は上昇した。E2P が形成する条件では E1P 形成と同様な両プローブ蛍光強度の減少が起こり、EP 形成の後に増加した。また、RH-421、BIPM 蛍光強度変化の比より、これらの反応では両プローブ蛍光強度変化は異なる事象を反映することが示された。

これらのことから、EP 形成の段階では RH-421 蛍光強度変化は Na の閉塞状態を、BIPM 蛍光強度変化は Na の閉塞状態と Na-Mg-ATP 酵素複合体の形成を反映することが示唆された。また、両プローブは E2P 形成後のリガンドの結合状態をモニター出来ることが示された。

2 RbE2 が形成する条件で RH-421、BIPM プローブ蛍光強度変化を測定したところ、Rb は E2P までの反応に影響を及ぼさなかった。Rb 添加時に両プローブの蛍光強度変化の減少、E2P の分解、Rb の閉塞とは同様の経時変化を示した。RbE2 が分解される段階では Rb の脱閉塞と両プローブ蛍光強度変化の減少とは同様の経時変化を示したが、低濃度の ATP を同時に添加すると Rb の脱閉塞には影響を及ぼさなかったが、両プローブ蛍光強度は ATP 濃度に応じて反応開始のレベルを保持した後、減少した。

これらのことから、EP 分解の段階では RH-421、BIPM 蛍光強度変化は Rb の閉塞状態を反映するのではないことが示唆された。従って、この段階では両プローブ蛍光は Na、Mg、Pi などの結合状態の変化を反映すると考えられる。

3 二価カチオン非存在下、酵素が ES 複合体を形成している条件 (2 M NaCl、10 mM CDTA)、では従来の遠心法、及び本研究において再構築した測定系である二重膜フィルトレーション法では ATP の結合量はほぼ同じ値を示し、本測定法が酵素と ATP の結合の測定において有効であることが示された。

二価カチオン存在下では従来の遠心法では遠心分離に要する時間中に ATP が加水分解を受けるため、有意な ATP の結合は検出されていなかった。二重膜フィルトレーション法により、反応時間等の条件を制御することで、Mg 存在下でも ATP 濃度に依存した酵素への ATP の結合が検出された。また、EP 形成量と Na-ATPase 活性を測定したところ、EP 形成量は低濃度の ATP で飽和したが、Na-ATPase 活性は ATP 濃度に依存して活性化された。

RbE2 が形成する条件 (16 mM NaCl、1984 mM choline-Cl、1 mM CaCl_2 、320 μM RbCl) では、Rb 非存在下に比べ EP 形成量は減少し、その減少量に対応して、2 倍の Rb の閉塞が観察された。しかし、ATP の結合は Rb の有無に関わらず一定の値を示した。

これらのことから EP を形成しないサブユニットには反応サイクル中で常に ATP が結合しており、この ATP の結合は ATPase 反応を促進することが示唆された。

以上の知見から酵素が形質膜上では $(\alpha\beta)_4$ というオリゴマー構造をとって機能しており、2 つのサブユニットの EP 形成とは相をずらしてイオンの輸送が起こり、EP を形成しない 2 つのサブユニットには ATP が結合しており、それによって ATPase 反応を促進していることが示唆された。

BIPM、RH-421 プローブはそれぞれ膜貫通部位に存在し、イオンの結合状態を反映することが示唆された。特に、BIPM は α 鎖 1 mol 当たり 1 mol が Cys-964 に結合することから、ATP によって引き起こされる、個々のサブユニットの構造変化の情報を得ることが出来ると考えられる。両プローブはイオン輸送、酵素の構造変化、サブユニット間相互作用を結びつける上で極めて有効であると考えられる。

これらの結果は、従来まで広く受け入れられてきた Post-Albers 機構だけでは説明できず、Na,K-ATPase がオリゴマー構造をとっており、サブユニット同士が EP 形成状態と ATP 結合状態で相互作用しながら働いていることを初めて直接示したことになる。

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

Na, K-ATPase の反応機構に関する研究 － 2 種の蛍光プローブを用いた構造変化の解析と 酵素の四量体構造におけるリガンドの結合－

動物細胞の形質膜を隔てたNaとKの電気化学的勾配の維持はNa,K-ATPaseによってなされる。この酵素のNa結合型酵素 (NaE1) はATPによりリン酸化され、ADP感受性のリン酸化酵素 (E1P)、ついでK感受性のリン酸化酵素 (E2P) を経て、脱リン酸化されK結合酵素 (KE2) を形成後、Naと反応して、再びNaE1へと移行し、この反応と共役して3個のNaを細胞外部へ、2個のKを細胞内部に輸送する。しかし、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、また、サブユニットの役割についての知見は少なかった。これらを理解するため申請者は各反応中間体形成時の蛍光プローブの蛍光強度変化、EP形成及びKの同族体であるRbによる分解、Rbの閉塞の時間経過を比較した。また各反応中間体形成時のATPとRbの結合量を測定した。その結果NaE1からATP結合に伴うNaの分子内への閉塞に伴い、RH-421蛍光、次にBIPM蛍光の減少が生じ、次にEP形成が生じ、その後、緩慢なBIPMとRH-421蛍光の増加が観察された。以上の結果は従来のRH-421蛍光変化がEP形成を反映するとした結果を明確に否定し、両プローブがむしろ輸送される、イオンのポンプ分子内部における移動を認識することを示している。又ATPase反応中の ^{32}P と ^{86}Rb の結合測定系を構築した結果、ポンプが4分の1、2分の1、4分の3及び1の反応性を Rb^+ の結合量、EP形態、ATP結合量、及び酸に不安定なADPとPiの酵素への結合、及びウアビン結合量から示すことができた。これはポンプが4量体プロトマーとして機能していることを意味している。さらにリン酸化酵素E1PとE2Pの非リン酸化サブユニットに酸に不安定なADPとPiが、及びRb閉塞酵素、RbE2の非閉塞サブユニットにも同様にADPとPiが結合していることが示された。以上の結果は低ATP濃度では従来のPost-Albers機構に従ってE1P, E2P, KE2を順に経過してATP加水分解が生じるが、より生理的濃度のATP存在下では、これら中間体がいずれもADPとPiを結合した中間体としてATP加水分解を行うことを明白に示していた。以上の結果はNa輸送

ポンプ分野の研究のみならず、H,K及びCa,H-輸送ATPases、さらに非輸送ATPases研究一般にも大きなインパクトを与えるものである。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。