

学 位 論 文 題 名

ATP-Induced Catalytic Subunit Interactions in Tetraprotomeric Na/K-ATPase

(四量体 Na/K-ATPase の ATP により誘導される
触媒サブユニット間相互作用に関する研究)

学位論文内容の要旨

細胞の恒常性を維持するためには、細胞内外のイオン濃度を適正に保持することが必須である。細胞膜を隔てて細胞内部は Na^+ は低濃度、 K^+ は高濃度に保たれており、対照的に外部は Na^+ 高濃度と K^+ 低濃度となっている。Na/K-ATPase は、細胞内外の Na^+ および K^+ のイオン濃度の維持のために細胞外へ Na^+ を細胞内に K^+ を能動輸送している。イオン濃度勾配に逆らってイオンを輸送することから、本酵素の駆動には高エネルギーリン酸化合物 ATP の加水分解が必要であり、1 mol の ATP 加水分解と共役して 3 mol の Na^+ を細胞外へ、2 mol の K^+ を細胞内に能動輸送する。Na/K-ATPase は、10 回の膜貫通領域を有し ATP 加水分解の触媒鎖である α 鎖と 1 回の膜貫通部位を持つ β 鎖から構成されている。Na/K-ATPase は、ATP 加水分解時にアスパラチルリン酸中間体 (EP) を経由することが大きな特徴の 1 つであり、胃壁細胞の H/K-ATPase や筋小胞体 Ca-ATPase とともに P 型 ATPase に分類されている。

近年、反応速度論的解析や電子顕微鏡観察などの研究から、Na/K-ATPase が $\alpha\beta$ -protomer を機能単位とするホモ二量体あるいは四量体として機能している可能性が示唆されている。また、リガンド結合の化学量論から、EP は α 鎖 1 mol あたり 0.5 mol のみ形成し、残り 0.5 mol はその活性中心に ATP が結合した EATP となっており、代謝回転中に EP : EATP 中間体が存在することが示されている。すなわち本酵素は “half site reactivity” と呼べる興味深い性質を示すことが明らかになってきた。これらの点より、Na/K-ATPase 反応機構の詳細な理解のためには、多量体構造に基づく新しい反応モデルの構築が必要である。そこで、本研究では酵素代謝回転中におけるサブユニット間相互作用の理解と多量体構造に基づく反応モデルの構築を目的とした。

多量体モデルの構築のためには、酵素代謝回転中において個々のサブユニットが隣接サブユニットにおよぼす効果を明らかにすることが不可欠である。このため基本構造の異なる 2 種の基質である pNPP および ATP 共存下での Na/K-ATPase の酵素活性を測定した。極めて興味深いことに、pNPP 加水分解 (pNPPase) 活性は低濃度の ATP 存在下では ATP による阻害を受けず、むしろ加水分解が促進することが明らかとなった。一

方、ATP 高濃度存在下においては、*p*NPPase 活性の阻害が観察された。*p*NPP は ATP と同様 EP を経由して加水分解されるため、Na/K-ATPase が単量体として機能しているのであればこのような ATP の促進効果は見られない。したがって、活性中心ならびに ATP 結合部位は α 鎖あたり 1 個であることを考慮すると、これらの結果は、Na/K-ATPase が多量体として機能しており、さらには ATP が結合したサブユニットの構造変化が隣接サブユニットの酵素活性に影響を及ぼして *p*NPPase 活性の促進を誘導したことを示唆している。加えて、*p*NPP と ATP の共存下での ATPase 活性および EP 量の ATP 濃度依存性は、いずれも 2 相性を示した。この結果は、Na/K-ATPase において EP 形成量の半量、すなわち 0.25 mol の α 鎖のリン酸化反応“quarter site reactivity”が存在することを示し、Na/K-ATPase が四量体構造をとって機能するモデルを支持した。

本研究より、Na/K-ATPase が四量体構造中の 1 個のサブユニットへの ATP の結合が隣接サブユニットの酵素活性に影響を及ぼし、サブユニット間の相互作用を行いながら酵素反応を行うモデルが初めて示された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 坂 口 和 靖
副 査 教 授 矢 澤 道 生
副 査 教 授 石 森 浩 一 郎
副 査 助 教 授 嘉 屋 俊 二

学 位 論 文 題 名

ATP-Induced Catalytic Subunit Interactions in Tetraprotomeric Na/K-ATPase

(四量体 Na/K-ATPase の ATP により誘導される
触媒サブユニット間相互作用に関する研究)

Na/K-ATPase は、細胞内の Na^+ および K^+ のイオン濃度を調節し細胞の恒常性を維持するために、 Na^+ を細胞外へ K^+ を細胞内に能動輸送している。本酵素による ATP の加水分解と共役したイオン輸送のメカニズムは、特徴的な反応中間体 EP の形成と分解に共役したイオン輸送のモデルによって説明されてきた。しかしながら、近年、反応速度論的解析や電子顕微鏡観察などの研究から、Na/K-ATPase が $\alpha\beta$ -protomer を機能単位とするホモ二量体あるいは四量体として機能している可能性が示唆されている。著者は、酵素代謝回転中におけるサブユニット間相互作用の理解と多量体構造に基づく反応モデルの構築を目的とし、基本骨格の異なる複数の基質存在下での、Na/K-ATPase に対する詳細な速度論的解析および中間体の化学量論分析を行った。

第一に、pNPP および ATP の 2 基質共存下での Na/K-ATPase の酵素活性を分析した。その結果、極めて興味深いことに低濃度の ATP によって pNPP 加水分解 (pNPPase) 活性が阻害ではなく、促進されることを発見した。一方、ATP 高濃度存在下においては、pNPPase 活性の阻害が見られた。この事実は、Na/K-ATPase の活性中心および ATP 結合部位は α 鎖あたり 1 個であることより、Na/K-ATPase が多量体として機能していることを示している。さらに、ATP の結合により、サブユニットの構造変化が隣接サブユニットの酵素活性に影響を及ぼして pNPPase 活性の促進を誘導したことを示唆した。

第二に、著者は、pNPP と ATP の共存下での ATPase 活性および EP 量の ATP 濃度依存性がいずれも 2 相性であることを示した。この結果は、Na/K-ATPase において 1/2 当量しか形成しない EP 量の半量、すなわち 1/4 当量の α 鎖リン酸化反応が存在することを示し、Na/K-ATPase が四量体構造をユニットとして機能することを示唆した。

以上、著者は、Na/K-ATPase が四量体構造中の 1 個のサブユニットへの ATP の結合が隣接サブユニットの酵素活性に影響を及ぼし、サブユニット間の相互作用を行いながら酵素反応を行うモデルを初めて提案した。これらの結果は、生物化学、特に膜輸送タンパク質の研究領域における、優れた業績として高く評価される。

よって著者は、北海道大学博士 (理学) の学位を授与される十分な資格を有するものと認める。