

電子線結晶学によって明かされた胃  $H^+,K^+$ -ATPase のラチェット機構

阿部一啓,\* 谷 一寿, 西澤知宏, 藤吉好則

A Novel Ratchet Mechanism of Gastric  $H^+,K^+$ -ATPase Revealed by Electron Crystallography of Two-dimensional Crystals

Kazuhiro ABE,\* Kazutoshi TANI, Tomohiro NISHIZAWA, and Yoshinori FUJIYOSHI

*Department of Biophysics, Faculty of Science, Kyoto University, Oiwake, Kitashirakawa, Sakyo-ku, Kyoto 606-0852, Japan*

(Received September 1, 2009)

Acid secretion by the stomach results in a pH of about 1. This highly acidic environment is essential for digestion and also acts as a first barrier against bacterial and viral infections. Conversely, too much acid secretion causes gastric ulcer. The mechanism by which this massive proton gradient is generated is of considerable biomedical interest. In this review, we introduce the first molecular model for this remarkable biological phenomenon. The structure of  $H^+,K^+$ -ATPase at 6.5 Å resolution was determined by electron crystallography of two-dimensional crystals. The structure shows the catalytic  $\alpha$ -subunit and the non-catalytic  $\beta$ -subunit in a pseudo- $E_2P$  conformation. Different from  $Na^+,K^+$ -ATPase, the N-terminal tail of the  $\beta$ -subunit is in direct contact with the phosphorylation domain of the  $\alpha$ -subunit. This interaction may hold the phosphorylation domain in place, thus stabilizing the enzyme conformation and preventing the reverse reaction of the transport cycle. Indeed, truncation of the  $\beta$ -subunit N-terminus allowed the reverse reaction to occur. These results suggest that the N-terminal tail of the  $\beta$ -subunit functions as a “ratchet”, preventing inefficient transport and reverse-flow of protons. We can thus provide a mechanistic explanation for how the  $H^+,K^+$ -ATPase can generate a million-fold proton gradient across the gastric parietal cell membrane, the highest cation gradient known in any mammalian tissue.

**Key words**—gastric proton pump;  $H^+,K^+$ -ATPase; cryo-electron microscopy; two-dimensional crystal; membrane protein structure; P-type ATPase

## 1. はじめに

ヒトの食物消化時の胃内腔の pH は約 1 にもなる。この強酸性の環境は、消化にとって必要不可欠であるとともに、外部からのバクテリアやウイルスの侵入に対する最初のバリアとしても重要である。逆に、胃酸過多は消化性潰瘍の原因でもある。 $H^+,K^+$ -ATPase (プロトンポンプ) は、この強酸性環境を作り出している実体である。<sup>1,2)</sup> この膜タンパク質は ATP の化学エネルギーを利用した  $H^+$  (細胞内から外へ) と  $K^+$  (細胞外から内へ) の能動輸送を行う (Fig. 1)。ATP の加水分解は、ファミリー間で普遍的に保存されたアスパラギン酸残基への自

己リン酸化を介して行われる。これはリン酸化中間体 (Phosphoenzyme intermediate, EP) と呼ばれ、P-type ATPase ファミリーという呼称の由来となっている。

$H^+,K^+$ -ATPase は 2 種類のサブユニットから構成される。触媒機能を担う  $\alpha$  鎖 (MW 110 kDa) は、近縁の P-type ATPase 例えば  $Na^+,K^+$ -ATPase や  $Ca^{2+}$ -ATPase (SERCA) と高い相同性を持ち、ATP 結合部位、リン酸化部位、イオン結合部位等を備え、触媒機能を直接担うサブユニットである。SERCA などは基本的に触媒サブユニットのみで機能するが、 $H^+,K^+$ -ATPase と  $Na^+,K^+$ -ATPase は  $\beta$  鎖 (MW 35 kDa) を必要とする。このサブユニットは一回膜貫通型で N 末端約 32 残基を細胞質側に、複数の N 型糖鎖付加サイトと 3 つの分子内ジスルフィド結合を細胞外に持ち、複合体の安定な発現や膜輸送に係わるとされている。<sup>3)</sup>

京都大学大学院理学研究科生物物理学教室 (〒606-0852 京都市左京区北白川追分町)

\*e-mail: ikkei@em.biophys.kyoto-u.ac.jp

本総説は、日本薬学会第 129 年会シンポジウム S27 で発表したものを中心に記述したものである。

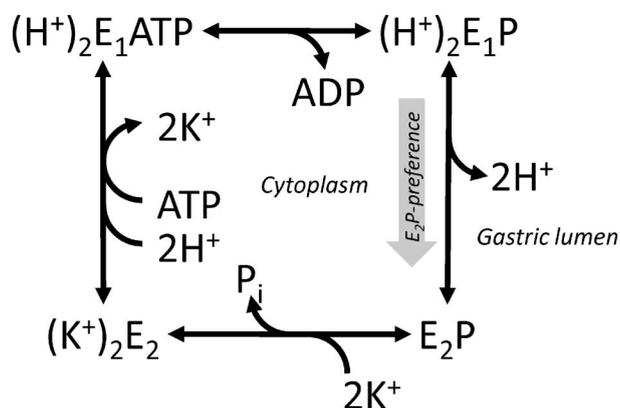


Fig. 1. Reaction Scheme of the Transport Cycle by  $H^+, K^+$ -ATPase

Cation transport and ATP hydrolysis are coupled to the cyclic conversion of the enzyme (abbreviated as "E") between two conformations,  $E_1$  and  $E_2$ , and their phosphorylated intermediates ( $E_1P$ ,  $E_2P$ ). The equilibrium between  $E_1P$  and  $E_2P$  states of the  $H^+, K^+$ -ATPase is largely shifted towards the  $E_2P$  state ( $E_2P$ -preference).

$H^+, K^+$ -ATPase の行うイオン輸送と ATP 加水分解反応機構は、古くからの酵素化学的研究によって非常によく理解されている (Fig. 1).<sup>4,5)</sup> この酵素によるイオン輸送は、大きな構造変化を伴った、主として 2 種類のコンフォメーション ( $E_1$ ,  $E_2$ ) をサイクルすることで行われる。イオン結合サイトを細胞内へ向けた  $E_1$  と、細胞外に開いた  $E_2$  は、それぞれ  $H^+$  と  $K^+$  に対して高親和性を示す。細胞内の  $H^+$  に対して高い親和性を示す  $E_1$  状態の酵素が ATP を結合し、 $Mg^{2+}$  存在下で ATP が加水分解され、リン酸化された  $E_1P$  中間体を形成する。この中間体は ADP に対して感受性、つまり逆反応によって ATP を合成する能力を持った、いわば高エネルギー中間体である。これが  $E_2P$  へと変換される過程で  $H^+$  が細胞外へ排出される。 $E_2P$  状態ではイオン結合サイトが細胞外に面しており、 $K^+$  の結合によって脱リン酸化され、 $K^+$  を閉塞した  $KE_2$  状態になる。低親和性の ATP の結合によって  $K^+$  の細胞内への輸送が促進され、反応サイクルが進行する。1 分子の ATP が加水分解されることで、それぞれ 2 分子の  $H^+$  と  $K^+$  が対抗輸送される。反応サイクルの各素反応は基本的に可逆的な化学平衡であるが、 $H^+, K^+$ -ATPase において特徴的なのは、 $E_1P/E_2P$  の平衡反応が大きく  $E_2P$  側に偏っていて、逆反応による  $E_1P$  の形成がほとんど起こらないことである。<sup>6,7)</sup>  $E_1P$  から  $E_2P$  への異性化は  $H^+$  が胃内腔へと輸送される重要な過程であることから、このよう

な  $E_2P$  を好む性質 (Fig. 1,  $E_2P$ -preference) は、生理的に好ましくない  $H^+$  の逆流を防ぐために、このアイソフォームがなにか特殊な機構を備えていることを想像させる。

細胞内と胃内部は pH 差にして 6 であるから、細胞膜を隔てて 100 万倍 ( $\times 10^6$ ) もの  $H^+$  濃度勾配が形成されていることになる。 $H^+, K^+$ -ATPase は一体どのような仕組みを使って、このように大きなイオン濃度勾配を作り出すことができるのであろうか？ この問題に対して、われわれは極低温電子顕微鏡を用いた構造解析というアプローチで臨んだ。変異体を用いた酵素化学的な機能解析の結果と併せて、われわれは胃酸分泌という顕著な生命現象をある程度説明するモデルを提示する。<sup>8)</sup>

## 2. 二次元結晶の電子線結晶学による構造解析

電子顕微鏡による膜タンパク質の結晶構造解析、すなわち電子線結晶学<sup>9)</sup>は、X 線結晶構造解析に必要とされる三次元結晶ではなく、結晶格子が文字通り二次元の平面状に広がった二次元結晶を用いる。方法論の詳しい解説は参考文献<sup>10,11)</sup>に譲るが、良質な二次元結晶さえあれば、液体ヘリウム温度 (4 K) まで試料を冷却し電子線によるダメージを低減することによって、<sup>10)</sup> システムとしては十分に原子分解能を達成できるレベルにある。<sup>12)</sup> また電子顕微鏡で撮影された実像が得られるために、今回のように比較的分解能の低い結晶であっても構造が得られるという利点がある。二次元結晶は一般に、透析等による界面活性剤の除去を結晶形成の駆動力として膜タンパク質が脂質二分子膜に再構成された状態で形成される。このため界面活性剤に対して比較的不安定な分子であっても結晶形成が可能であること、また何よりも膜タンパク質にとって極めて自然な状態に近いということが特徴と言えるであろう。

豚の胃より精製、界面活性剤で可溶化した  $H^+, K^+$ -ATPase 標品を用いて、二次元結晶を作成することに成功した。酢酸ウランによる負染色像を見る限りでは一層のシート状に見えるが、構造解析の結果一枚のシートは二層の脂質二分子膜から形成されており、 $H^+, K^+$ -ATPase を含むそれぞれの脂質膜が分子の細胞質部分を介して上下に接触した  $p22_1$  symmetry を持つ二次元結晶であることがわかった。この二層から構成される結晶は、厚さ ( $c$  軸方向の長さ) が約 320 Å 程度あり、結晶中での分子

間相互作用がすべて可溶性ドメインに存在することから、氷包埋時に起こる試料の乾燥によって容易に破壊される。そのため試料調製はすべてカーボンサンド法<sup>13)</sup>を用いて行った。この試料調製法は元来、傾斜像撮影時にしばしば起こる、不均一な荷電によるビームシフトを軽減するために開発されたが、結晶が乾燥から保護されることによって分解能の向上にもつながった。また同法の効果により、70°傾斜像を含む立体構造を構築することに成功した。

### 3. H<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase の 6.5 Å 分解能での立体構造

6.5 Å 分解能で得られた H<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase の立体構造 (Electron Microscopy Data Bank code 5104) は SERCA<sup>14)</sup> や、特に相同性の高い Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase<sup>15)</sup> と非常によく似たものであった [Fig. 2(A)]. 細胞質側には N (Nucleotide-binding) ドメイン, P (Phosphorylation) ドメイン, A (Actuator) ドメインが十分な解像度で見えている。また  $\alpha$  鎖の 10 本の TM (Trans-Membrane) ヘリックス (M1-M10) や  $\beta$  鎖の TM ヘリックス ( $\beta$ TM) は、Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase の原子モデルを鋳型として作成したホモロジーモデル (Protein Data Bank code 3IXZ) によって矛盾なく説明できる。TM と垂直な方向に突き出した構造 [Fig. 2(A), arrowheads] は、タンパク質周辺に結合した脂質二分子膜表面の構造であると考えられる。

二次元結晶化はリン酸のアナログであるフッ化アルミニウム (AIF) と ADP 共存下で行われた。この基質の組み合わせは SERCA での E<sub>1</sub>P-ADP 中間体の構造解析に用いられており、<sup>16)</sup> 当初われわれもこの中間体が形成されると考えていた。しかし、細胞質部分の各ドメインの位置関係 [Fig. 2(B)] から、この構造は E<sub>2</sub>P 状態であることがわかった。P ドメインの普遍的に保存されたアスパラギン酸残基の位置にみられる非常に強い密度 [Fig. 2(B), red sphere, contoured at 5.5  $\sigma$ ] は、リン酸アナログとして結合した AIF によるものと考えられる。N ドメインには ADP と思われる密度が観察された [Fig. 2(B), blue stick model]。AIF と ADP は十分に離れた位置にあり、また A ドメインに存在する高度に保存された TGES モチーフ [Fig. 2(B), green spheres] によって、AIF は外部からアクセスできないように遮蔽されている。このような構造上の特徴は、H<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase が E<sub>2</sub>P 状態にあることを示している。

また、トリプシンによる限定分解によって、結晶中での分子のコンフォメーションが E<sub>2</sub>P であることは、別途確認した。<sup>8,17)</sup>

膜貫通領域には、細胞外に向けて大きく開口した構造がみられた [Fig. 2(C), indicated by arrow]。この構造は主として M4, M5, M8 と M5-6 間の細胞外ループによって取り囲まれている。図中に示したいくつかの残基は阻害剤 (SCH28080) の結合に重要であり、<sup>18,19)</sup> 特に Cys813 は胃酸抑制剤として用いられる omeprazole が共有結合する残基として同定されている [Fig. 2(C), magenta spheres]。<sup>18)</sup> これらの阻害剤は K<sup>+</sup> [Fig. 2(C), red spheres] と競争的に働くことから、このキャビティーは阻害剤の結合サイトであると同時に、K<sup>+</sup> の入り口に当たることが考えられる。

$\beta$  鎖の TM ヘリックス ( $\beta$ TM) は M7 と M10 に隣接している [Fig. 2(A), blue surface, Fig. 2(C) black tube]。また細胞外ドメイン [Figs. 2(A) and (C), blue surface] は M7-M8 間の細胞外ループと一体化した密度を与えた。この部分には  $\alpha\beta$  鎖間の結合に必須であるとされる SYGQ モチーフが存在し [Fig. 2(C)]、 $\beta$  鎖の細胞外ドメインと強固に結合していると思われる。細胞外ドメインの一次配列は Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase と比較して 30% 程度の相同性しかないにもかかわらず、構造的にはよく似ている。<sup>15)</sup> H<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase は胃という過酷な環境にさらされながらも、細胞外からのタンパク質分解酵素や強酸性環境に対する抵抗性を示すことから、高度に糖鎖付加された細胞外ドメインが  $\alpha$  鎖の細胞外ループを覆うような構造が重要であるのかもしれない。

このように H<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>,ATPase の全体構造は、SERCA (触媒サブユニットのみ) や特に相同性の高い (~70%) Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase と非常によく似た構造をしていた。しかしながら、このアイソフォームに特徴的な構造が細胞質側に存在する。 $\beta$  鎖 N 末端部分 ( $\beta$ N, 約 32 残基) は、 $\beta$ TM から伸びた一本の棒状の構造として見い出され、その末端付近で P ドメインと結合していた [Figs. 3(A) and (C), arrowhead]。SERCA の E<sub>1</sub>P-ADP と E<sub>2</sub>P 状態の構造を比較すると、細胞内ドメインの配置が、それぞれの中間体の性質を決定づけるカギになっていることがわかる。<sup>20)</sup> われわれの H<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase の構造

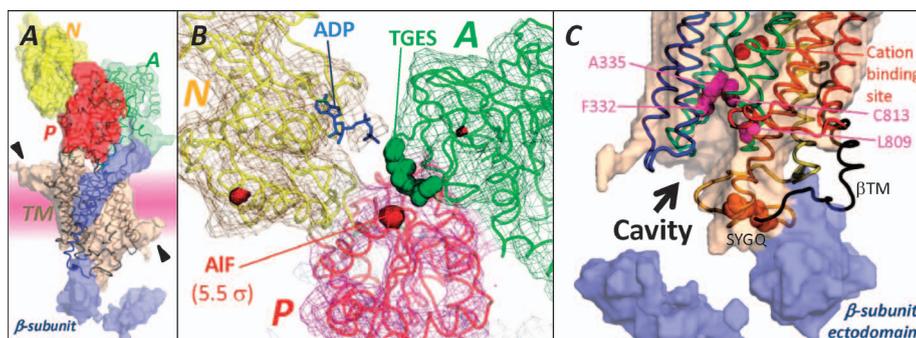


Fig. 2. Cryo-EM Structure of Gastric  $H^+,K^+$ -ATPase at 6.5 Å Resolution

A) Surface representation of the  $H^+,K^+$ -ATPase  $\alpha\beta$ -protomer (EM data bank code 5104, showing cytoplasmic side-up) with the fit homology model in tube model (PDB code 3IXZ). Color code of the density map: N domain, yellow; P domain, red; A domain, green; TM domain of the  $\alpha$ -subunit, wheat;  $\beta$ -subunit, blue. B) Relative orientation of the cytoplasmic domains. A spherical density contoured at the 5.5  $\sigma$  level (red) shows the position of bound AIF complex to the invariant Asp385, which is covered by highly conserved  $^{228}TGES$  motif (green spheres). The ADP molecule (stick representation) was fitted into the extra density found at the surface of the N domain. In this figure, the enzyme is shown from a viewpoint on the cytoplasmic side. C) A close-up view of the TM domain (from the opposite side of panel A) shows a large cavity structure (indicated by arrow) with surrounding several of amino acids important for inhibitor binding (highlighted as magenta spheres) found in the luminal side. The TM helices of the homology model of the  $\alpha$ -subunit [color changes gradually from M1 (blue) to M10 (red)] and the  $\beta$ -subunit (black) are shown as tube model. The red spheres indicate the positions that correspond to bound  $Rb^+$  in the  $Na^+,K^+$ -ATPase structure,<sup>15</sup> showing approximate locations of the cation binding sites in the  $H^+,K^+$ -ATPase. The conserved SYGQ sequence, which is critical for the assembly of the  $\alpha\beta$ -protomer, is shown as yellow spheres.

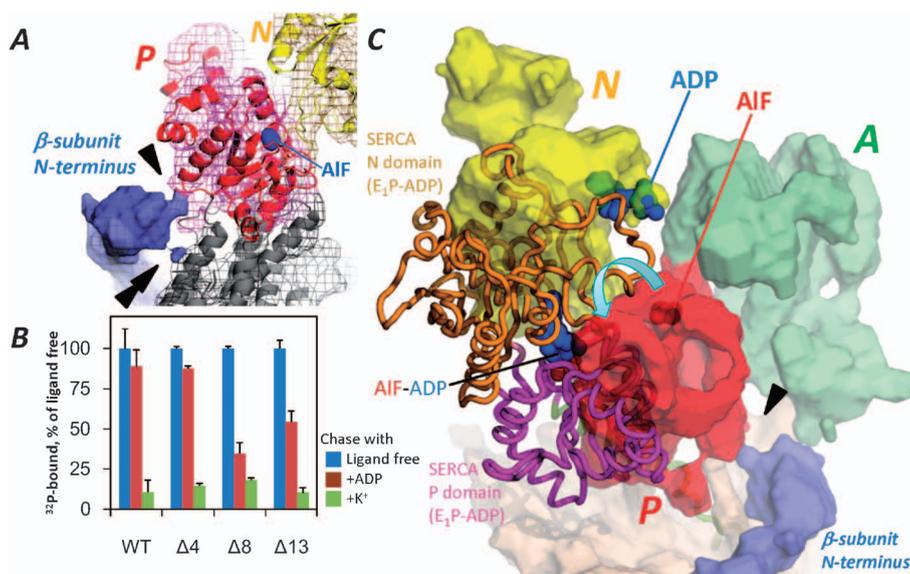


Fig. 3. The N-terminal Tail of the  $\beta$ -subunit Functions as a Ratchet

A) Interaction between the  $\alpha$ - and  $\beta$ -subunit. The single and double arrowheads indicate the position where the N-terminal tail of the  $\beta$ -subunit contacts the P domain and M3, respectively. B) ADP or  $K^+$  sensitivity of the EP formed by  $\beta N$  deletion mutants. To measure dephosphorylation, the  $E^{32}P$  formed with [ $\gamma$ - $^{32}P$ ]ATP was chased with an excess of cold ATP to terminate phosphorylation, without (ligand free, blue) or with 1 mM ADP (+ADP, red) or 10 mM  $K^+$  (+ $K^+$ , green), followed by acid quenching. For each mutant, the phosphorylation level of the 'ligand free' condition was assigned to 100%. C) Comparison of the  $H^+,K^+$ -ATPase in the  $E_2P$  state (surface) with SERCA in the  $E_1P$ -ADP state (tube model, the A and TM domains are not shown for clarity). Arrowhead indicates interaction between  $\beta N$  and the P domain.

では、 $\beta N$ がPドメインを $E_2P$ 形成に適した位置につなぎ止めることで、逆反応による $E_1P$ の形成を抑えているようにみえた。そこでわれわれは、このサブユニット間相互作用こそが $H^+,K^+$ -ATPaseに特徴的な $E_2P$ -preferenceを説明する構造であり、 $\beta N$ を欠損した場合、逆反応によって $E_1P$ が形成され得るのではないか、という仮説を立てた。

#### 4. N末端欠損変異体による逆反応の進行

上記の仮説を裏付けるために、いくつかのN末端欠損 $\beta$ 鎖( $\Delta 4$ ,  $\Delta 8$ ,  $\Delta 13$ )を $\alpha$ 鎖とHEK-293細胞に共発現させた。得られた細胞膜画分には野生型(WT)と同程度の比活性を示す $H^+,K^+$ -ATPaseが発現していた。放射性 [ $\gamma$ - $^{32}P$ ]-ATPを用いた $E^{32}P$ のパルス-チェイス実験では、これらの変異体が

WTの $H^+,K^+$ -ATPaseと比べて異なる $E_1P/E_2P$ 分布を示した[Fig. 3(B)].  $E_1P$ と $E_2P$ では、基質に対する感受性が大きく異なる(Fig. 1).  $E_1P$ は、 $H^+$ を閉塞した状態(細胞外へ排出する前)であり、ADPに対して感受性がある。つまりADPの添加によって $E_1P$ は脱リン酸化される。この逆反応によってATPが合成されるため、 $E_1P$ はいわば高エネルギーの中間体であると言える。対照的に $E_2P$ はADPに対して不感受性であり、イオン結合部位への $K^+$ の結合によって脱リン酸化反応が促進される。であるから、ADPに対する $E^{32}P$ の感受性を見積もることで、系に存在する $E_1P$ の分布を知ることができる。放射性ATPによってラベルされた $E^{32}P$ を形成後、非放射性的ATPをADPや $K^+$ とともに添加し、残存する $E^{32}P$ 量を定量した。N末端のアミノ酸を8残基以上欠損した変異体( $\Delta 8$ ,  $\Delta 13$ )はADPの添加によって顕著にEP量が減少した[Fig. 3(B)]. これに対しWTと $\Delta 4$ は、 $H^+,K^+$ -ATPaseにおいて $E_1P$ がほとんど検出されないという過去の報告の通り,<sup>6,7)</sup>ほとんどADP感受性を示さなかった。これらの実験結果は、 $\beta N$ の構造を欠失した $H^+,K^+$ -ATPaseはその $E_2P$ -preferenceを失って $E_1P$ 中間体を形成できるようになり、通常抑えられている逆反応( $E_2P \rightarrow E_1P + ADP \rightarrow E_1 + ATP$ )が進行したことを示している。一方ですべての変異体が $K^+$ に対して感受性を示した。これは、 $H^+,K^+$ -ATPaseが $E_1P/E_2P$ 平衡の定常状態にあるためだと考えられる。つまり、すべての $E_1P$ は速やかに $E_2P$ に移行するために、 $K^+$ によって次々と脱リン酸化を受けるということである。この結果はまた、 $\beta N$ の欠損が $E_2P$ を不安定化することで、正反応の速度( $E_1P \rightarrow E_2P$ )には影響を与えず、逆反応( $E_2P \rightarrow E_1P$ )にのみ影響を与えていることを示唆する。

### 5. $H^+,K^+$ -ATPaseのラチェット機構

以上の構造と機能に関する実験結果は、これまで積極的に酵素反応に関与しないと考えられていた $\beta$ 鎖が、触媒機能を担う $\alpha$ 鎖に作用することで酵素活性を制御することを示している。つまり $\beta N$ はPドメインを $E_2P$ 形成に有利な位置につなぎ留めることで、 $E_2P$ から $E_1P$ への逆反応を防ぐ、いわば“ラチェット”として機能していると言える。Figure 3(C)は $H^+,K^+$ -ATPaseの $E_2P$ 状態の構造

(surface)を、SERCA  $E_1P$ -ADP状態の原子モデル(tube model, PDB code, 2ZBD)と比較したものであるが、 $E_1P/E_2P$ 状態の遷移において、Pドメインが大きく動いていることがわかる。Pドメインに存在するリン酸化部位は、 $E_2P$ 状態ではNドメインから大きく離れてAドメインによって覆い隠されている。ところがADP感受性を示す $E_1P$ 状態においては、図中左方向に傾くことで $\beta N$ から離れて、リン酸化部位がNドメインに結合しているADPの末端リン酸に対して露出していることがわかる[Fig. 3(C), arrow]. 今回 $E_2P$ 構造で見いだされた $\beta N$ とPドメインの相互作用は、上記のようなPドメインの動きを相殺して、 $H^+,K^+$ -ATPaseが $E_1P$ を再形成できないようにしていると考えられる。したがってこの構造を欠損させた場合、Pドメインが自由に動けるようになり、ADPとリン酸からATPを合成するという逆反応の進行が可能になったと考えられる。

$H^+,K^+$ -ATPase  $\beta N$ 欠損変異体の性質は、Dürrらによってさらに詳細に検討された。<sup>21)</sup> *Xenopus* oocyteに $\alpha$ 鎖と共発現させた $\beta N$ 欠損変異体の機能解析から得られた結果は、 $\beta N$ 欠損変異体における $E_1P/E_2P$ 平衡状態が野生型と比較して顕著に $E_1P$ 側に遷移することを示し、*in vivo*においてもわれわれのモデルを裏付けるものとなった。また、興味深いことに、 $Na^+,K^+$ -ATPaseを用いて行った $\beta N$ 欠損変異体の解析結果は、野生型と有意な差を示さなかったことから、 $\beta N$ のラチェットとしての機能は $H^+,K^+$ -ATPase特異的であることが示された。

Pドメインのほかに、 $\beta N$ はM3ヘリックスとも接触している。AドメインとM3をつなぐリンカーの長さがSERCAの $E_1P/E_2P$ 平衡に影響を与えるという報告もあり、<sup>22)</sup>  $\beta N$ がPドメインとM3ヘリックスの両方と相互作用して $E_2P$ の安定性を調節している可能性は否定できない。 $\beta N$ は約32アミノ酸で構成されているが、今回の構造で観察された $\beta N$ の密度は、一本の $\alpha$ -ヘリックスであると仮定した場合、約19アミノ酸分の長さしかなく、恐らく最末端部分では単純な $\alpha$ -ヘリックスではなく、複雑に折りたたまれた構造をしていると考えられる。興味深いことに、Dürrらによる*Xenopus* oocyteでの実験では、N末端13残基の欠損でみられた顕著な $E_1P$ への平衡遷移が、29残基の欠損で弱まると

いう結果を示した。<sup>21)</sup> A ドメインに存在する高度に保存された TGES モチーフは、E<sub>2</sub>P 状態でのリン酸基を外部から遮蔽し、また引き続き起こる脱リン酸化反応において重要な役割を果たす。したがって、βN の構造ほとんどすべてが欠損した場合、P ドメインと M3 が同時に自由になり、P ドメインのリン酸基が A ドメインによって遮蔽された E<sub>2</sub>P 構造を形成し易くなることは可能であろう。6.5 Å 分解能の立体構造はしかしながら、それぞれのアミノ酸を分離するには不十分であり、今後の分解能向上と点変異導入などによる機能解析が、この部分で行われているサブユニット間相互作用の更なる理解につながるであろう。

## 6. おわりに

以上の構造と機能的な解析結果から、われわれはなぜ H<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase が胃内腔と細胞内との間に 100 万倍ものプロトン濃度勾配を形成できるのかを説明するラチェットモデルを提唱する。胃壁細胞膜を隔てた大きなプロトン濃度勾配は、イオン輸送サイクルを逆行させる強い圧力となる。この逆反応は、効率的なイオン輸送の妨げになるだけでなく、プロトンの逆流を伴う。それゆえ H<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase はその分子内に“ラチェット”を備えており、生理的に好ましくない逆反応を抑え、イオン輸送サイクルが順方向にのみ進行するように制御されているものと考えられる。

**謝辞** 本研究の遂行にあたり、電子顕微鏡に関して技術的な助力を頂きました小林一美氏 (JEOL DATUM)、H<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase の cDNA を譲渡して頂きました今川敏明博士に感謝致します。N 末端欠損変異体の *Xenopus* oocyte での機能解析に関する共同研究を遂行して頂いた Katharina Dürr 博士、Thomas Friedrich 博士に感謝致します。本研究開始時から通して有用な助言を頂きました谷口和弥博士に感謝致します。

## REFERENCES

- 1) Ganser A. L., Forte J. G., *Biochim. Biophys. Acta*, **307**, 169–180 (1973).
- 2) Sachs G., Shin J. M., Vagin O., Lambrecht N., Yakubov I., Munson K., *J. Clin. Gastroenterol.*, **41**, S226–S242 (2007).
- 3) Chow D. C., Forte J. G., *J. Exp. Biol.*, **198**,

- 1–17 (1995).
- 4) Post R. L., Kume S., Tobin T., Orcutt B., Sen A. K., *J. Gen. Physiol.*, **248**, 6993–7000 (1973).
- 5) Rabon E. C., Reuben M. A., *Annu. Rev. Physiol.*, **52**, 321–344 (1990).
- 6) Helmich-de Jong M. L., van Emst-de Vries S. E., De Pont J. J., Schuurmans Stekhoven F. M., Bonting S. L., *Biochim. Biophys. Acta*, **821**, 377–383 (1985).
- 7) Rabon E., Sachs G., Mardh S., Wallmark B., *Biochim. Biophys. Acta*, **688**, 515–524 (1982).
- 8) Abe K., Tani K., Nishizawa T., Fujiyoshi Y., *EMBO J.*, **28**, 1637–1643 (2009).
- 9) Henderson R., Baldwin J., Downing K., Lepault J., Zemlin F., *Ultramicroscopy*, **19**, 147–178 (1986).
- 10) Fujiyoshi Y., Mizusaki T., Morikawa K., Yamagishi H., Aoki Y., Kihara H., Harada Y., *Ultramicroscopy*, **38**, 241–251 (1991).
- 11) Fujiyoshi Y., Kimura Y., *Tanpakushitsu Kakusan Koso*, **39**, 1289–1297 (1994).
- 12) Tani K., Mitsuma T., Hiroaki Y., Kamegawa A., Nishikawa K., Tanimura Y., Fujiyoshi Y., *J. Mol. Biol.*, **389**, 694–706 (2009).
- 13) Gyobu N., Tani K., Hiroaki Y., Kamegawa A., Mitsuoka K., Fujiyoshi Y., *J. Struct. Biol.*, **146**, 325–333 (2004).
- 14) Toyoshima C., Nakasako M., Nomura H., Ogawa H., *Nature*, **405**, 647–655 (2000).
- 15) Morth J. P., Poulsen H., Toustrup-Jensen M. S., Schack V. R., Egebjerg J., Andersen J. P., Vilsen B., Nissen P., *Nature*, **450**, 1043–1049 (2007).
- 16) Toyoshima C., Nomura H., Tsuda T., *Nature*, **432**, 361–368 (2004).
- 17) Nishizawa T., Abe K., Tani K., Fujiyoshi Y., *J. Struct. Biol.*, **162**, 219–228 (2008).
- 18) Vagin O., Denevich S., Munson K., Sachs G., *Biochemistry*, **41**, 12755–12762 (2002).
- 19) Munson K., Garcia R., Sachs G., *Biochemistry*, **44**, 5267–5284 (2005).
- 20) Olesen C., Picard M., Winther A. M., Gyrop C., Morth J. P., Oxvig C., Møller J. V., Nissen P., *Nature*, **450**, 1036–1042 (2007).
- 21) Dürr K. L., Abe K., Tavraz N. N., Friedrich T., *J. Biol. Chem.*, **284**, 20147–20154 (2009).
- 22) Holdensen A. N., Andersen J. P., *J. Biol. Chem.*, **284**, 12258–12265 (2009).