

## 9 6 3 7 極性上皮細胞でのナトリウムポンプの側基底膜局在化の分子機構

助成研究者：川村 越(産業医科大学 医学部)  
 共同研究者：竹田 和夫(産業医科大学 医学部)  
 北澤 高司(産業医科大学 医学部)  
 野本 実(産業医科大学 医学部)  
 上野 晋(産業医科大学 医学部)

## 研究目的

小腸上皮細胞、腎尿細管上皮細胞や、胃の壁細胞等は、物質を一方に輸送する輸送性上皮細胞であり、こうした極性細胞ではナトリウムポンプはbaso-lateral側に局在している。ナトリウムポンプの局在化はどのような機構によりもたらされるのであろうか。ナトリウムポンプもプロトンポンプも $\alpha$ 、 $\beta$ の2種のサブユニットから成り立つ。両 $\alpha$ 鎖間、両 $\beta$ 鎖間の相同性は高く、予想される膜トポロジーや立体構造も酷似している。ところが極性細胞ではナトリウムポンプはbaso-lateral側に、プロトンポンプはapical側に全く逆方向に局在する。いずれのポンプも細胞膜へ輸送されるには $\beta$ 鎖が必須であり、選別輸送に $\beta$ 鎖が関与している可能性が高い。本研究ではナトリウムポンプ $\beta$ 鎖とプロトンポンプ $\beta$ 鎖との間でキメラ体を構築し、両 $\beta$ 鎖にそれぞれ特異的な領域を抽出することにより、 $\beta$ 鎖に含まれるであろう輸送選別シグナルを探ることを目的とした。

## 研究方法

シビレエイ (*Torpedo californica*) ナトリウムポンプ $\beta$ 鎖cDNA、およびブタ胃壁細胞プロトンポンプ $\beta$ 鎖cDNAのそれぞれ相当する位置に、新たに5種の制限酵素部位を導入し、ナトリウムポンプ $\beta$ 鎖のN-末端側からプロトンポンプ $\beta$ 鎖で置き換えたキメラ体(HxNシリーズ)を5種、C-末端側から置換したキメラ体(NxHシリーズ)を5種、合計10種のキメラ体を構築し、それらcDNAからcRNAを合成し、シビレエイナトリウムポンプ $\alpha$ 鎖cRNAと共にアフリカツメガエル卵母細胞に注射し発現させた。発現産物を、免疫沈降法、トリプシン限定分解、ATP分解活性およびポンプ電流の発生について分析した。

## 研究結果

キメラ体cRNAと $\alpha$ 鎖cRNA(cRNA $\alpha$ )を卵母細胞に注射し、 $[^{14}\text{C}]$ -ロイシン存在下で3日間19°Cで保温した。ミクロソーム画分を調製し、キメラ体 $\beta$ 鎖と $\alpha$ 鎖との複合体のトリプシン抵抗性を調べた。HxNシリーズでは、HsNのみが $\alpha$ 鎖を安定化し、HvNでは $\alpha$ 鎖のトリプシン抵抗性が極端に減少し、HeNでは $\alpha$ 鎖のトリプシン抵抗性はほとんど消滅した。NxHシリーズのキメラ体 $\beta$ 鎖の $\alpha$ 鎖安定化能はHxNシリーズのものより低いが、NsH、NvH、NmHは、NxHシリーズの中では、トリプシン抵抗性が高かった。

次にキメラ $\beta$ 鎖と $\alpha$ 鎖との複合体が機能的であるか否かをATP分解活性、ポンプ電流の発生について調べた。活性を示したキメラはHsNのみであった。

これらの結果から、ナトリウムポンプ $\beta$ 鎖のSnaBI-EcoRV間、およびEcoT22I-C末端間、それぞれ特異的領域の1つである可能性が示唆された。我々はさらに $\beta$ 鎖の最もN-末端側の(-S-S-)ループが特異的領域を形成することを報告している。これら特異的領域の中に選別輸送のシグナルが存在することは十分考えられる。



## 9 6 3 7 極性上皮細胞でのナトリウムポンプの側基底膜局在化の分子機構

助成研究者：川村 越 (産業医科大学 医学部)  
 共同研究者：竹田 和夫 (産業医科大学 医学部)  
 北澤 高司 (産業医科大学 医学部)  
 野本 実 (産業医科大学 医学部)  
 上野 晋 (産業医科大学 医学部)

## 研究目的

物質の吸収にあずかる小腸上皮細胞,あるいは物質の再吸収にあずかる腎尿細管上皮細胞や,酸の分泌を担う胃の壁細胞等は、物質を一方向に輸送する輸送性上皮細胞であり、それら細胞の細胞膜は特徴的な微絨毛の存在するapical (先端)側と、体液に接するbaso-lateral (側基底)側に、形態的・機能的に分化している。こうした極性細胞ではナトリウムポンプはbaso-lateral側に局在し、このことがNa<sup>+</sup>の吸収や物質の吸収等の一方向性輸送を可能にしている。ナトリウムポンプの局在化はどのような機構によりもたらされるのであろうか。この問題にはナトリウムポンプと胃壁細胞プロトンポンプと比較することで接近できる。ナトリウムポンプもプロトンポンプも $\alpha$ ,  $\beta$ の2種のサブユニットから成り立つ(1)。両 $\alpha$ 鎖間,両 $\beta$ 鎖間の相同性は高く、予想される膜トポロジーや立体構造も酷似している。ところが極性細胞ではナトリウムポンプはbaso-lateral側に、プロトンポンプはapical側に全く逆方向に局在する。いずれのポンプも細胞膜へ輸送されるには $\beta$ 鎖が必須であり(2-4)、選別輸送に $\beta$ 鎖が関与している可能性が高い。本研究ではナトリウムポンプ $\beta$ 鎖とプロトンポンプ $\beta$ 鎖との間でキメラ体を構築し、両 $\beta$ 鎖にそれぞれ特異的な領域を抽出することにより、 $\beta$ 鎖に含まれるであろう輸送選別シグナルを探ることを目的とするものである。

## 研究方法

シビレエイ (*Torpedo californica*) ナトリウムポンプ $\beta$ 鎖cDNA,およびブタ胃壁細胞プロトンポンプ $\beta$ 鎖cDNAのそれぞれ相当する位置に、新たに5種の制限酵素部位を導入し (Fig. 1), それらをキメラ体構築のための継点として用いた。ナトリウムポンプ $\beta$ 鎖のN-末端側からプロトンポンプ $\beta$ 鎖で置き換えたキメラ体 (HxNシリーズ)を5種, C-末端側から置換したキメラ体 (NxHシリーズ)を5種, 合計10種のキメラ体を構築し (Fig. 2), それらcDNAからcRNAを合成し, シビレエイナトリウムポンプ $\alpha$ 鎖cRNAと共にアフリカツメガエル卵母細胞に注射し発現させた。発現産物を, 免疫沈降法, トリプシン限定分解, ATP分解活性およびポンプ電流の発生について分析した (5)。

	<i>Sna</i> BI	<i>Eco</i> RV	<i>Mun</i> I	<i>Sph</i> I	<i>Eco</i> T22I
<i>T.californica</i> NaKB	40	89	126	149	176
	Phe Tyr Leu	Glu Ile Ser	Glu Asp Cys	Arg Val Cys	Pro Cys Ile
	TTC TAC TTG	GAG ATA AGC	GAG GAT TGT	AGA GTA TGC	CCC TGC ATC
	↓	↓	↓	↓	↓
	TTC <b>TAC</b> <b>GTA</b>	GAG <b>ATA</b> <b>TCC</b>	GAC <b>AAT</b> <b>TGT</b>	AGA <b>GCA</b> <b>TGC</b>	CCA <b>TGC</b> <b>ATC</b>
	Phe Tyr Val	Glu Ile Ser	Asp Asn Cys	Arg Ala Cys	Pro Cys Ile
pig HKB	55	96	131	151	178
	Tyr Tyr Val	Asp Ile Ser	Ile Asn Cys	Phe Ser Cys	Pro Cys Phe
	TAC TAC GTG	GAC ATT TCC	ATC AAC TGC	TTC TCC TGC	CCG TGT TTC
	↓	↓	↓	↓	↓
	TTC <b>TAC</b> <b>GTA</b>	GAG <b>ATA</b> <b>TCC</b>	<b>ATC</b> <b>AAT</b> <b>TGC</b>	TTC <b>GCA</b> <b>TGC</b>	CCA <b>TGC</b> <b>ATC</b>
	Tyr Tyr Val	Glu Ile Ser	Ile Asn Cys	Phe Ala Cys	Pro Cys Ile

Fig. 1. Site-directed mutagenesis to create restriction sites. The nucleotides of the cDNA coding for *T. californica* Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>- and pig H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase β-subunits were changed to create the restriction sites (underlined). The replaced amino-acids after mutations are also shown (bold letters). The β-subunits containing all the created restriction sites (modified β-subunits) were used as parents to construct chimeric β-subunits and as controls of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>- or H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase subunit.

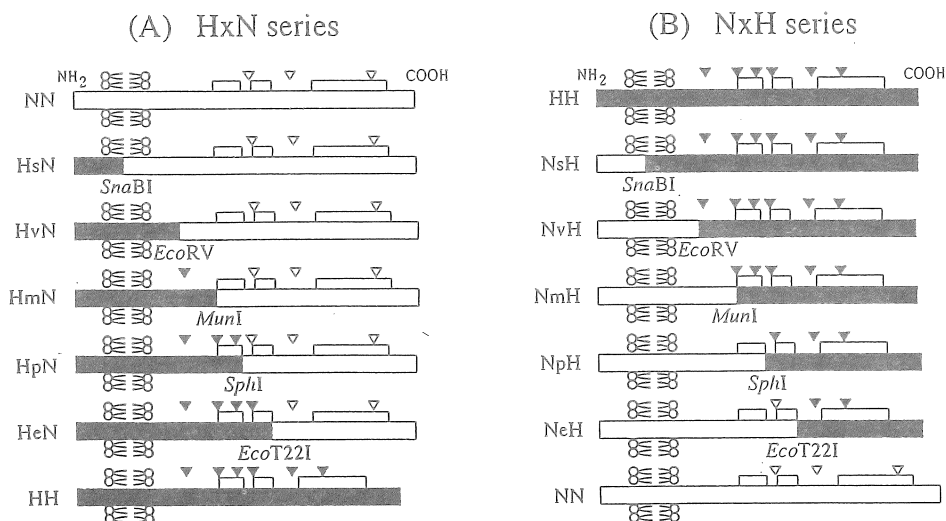


Fig. 2. Construction of chimeric Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase and H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase β-subunits. Schematic representations of chimeras of HxN series (A) and NxH series (B) are shown. These constructions are shown as two capitals and one small letter. The capital letters N and H represent fragments of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase and H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase β-subunits, respectively. Small letters are from the restriction sites used as the joining points for chimera construction; s, v, m, p and e represent *Sna*BI, *Eco*RV, *Mun*I, *Sph*I and *Eco*T22I sites, respectively. Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase (open bars), H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase (closed bars) and their membrane spanning regions are shown schematically. Glycosylation sites are shown as triangles (open triangles, Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase; closed triangles, H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase). Disulfide-bonded loops are also shown as .

## 研究結果

1.  $\alpha\beta$ 複合体の安定性

キメラ体cRNAと $\alpha$ 鎖cRNA (cRNA $\alpha$ )を卵母細胞に注射し、 $[^{14}\text{C}]$ -ロイシン存在下で3日間19°Cで保温した。ミクロソーム画分を調製し、抗 $\alpha$ 鎖抗血清による免疫沈降を行い、 $\alpha$ 鎖の発現量と $\alpha\beta$ 複合体形成について調べた。抗 $\alpha$ 鎖抗血清での沈降にも関わらずいずれの $\beta$ 鎖も共沈し (Fig. 3), どのキメラ体 $\beta$ 鎖も $\alpha$ 鎖と複合体を形成できることがわかった。

膜に存在する機能的なナトリウムポンプはトリプシン抵抗性があり、適当な条件下ではトリプシンにより限定分解を受けない(6)。従って、トリプシン抵抗性は、 $\alpha\beta$ 複合体が“きちんとした”構造を膜内でとっているか否かを調べる指標とすることができる。そこで、キメラ $\beta$ 鎖と $\alpha$ 鎖との複合体をトリプシン処理し、残った $\alpha$ 鎖の量をFuji BAS 2000で定量した (Fig. 4)。HxNシリーズでは、HsNのみが $\alpha$ 鎖を安定化し、HvNでは $\alpha$ 鎖のトリプシン抵抗性が極端に減少し、HeNでは $\alpha$ 鎖のトリプシン抵抗性はほとんど消滅した。NxHシリーズのキメラ体 $\beta$ 鎖の $\alpha$ 鎖安定化能はHxNシリーズのものより低いが、NsH, NvH, NmHは、NxHシリーズの中では、トリプシン抵抗性が高かった。

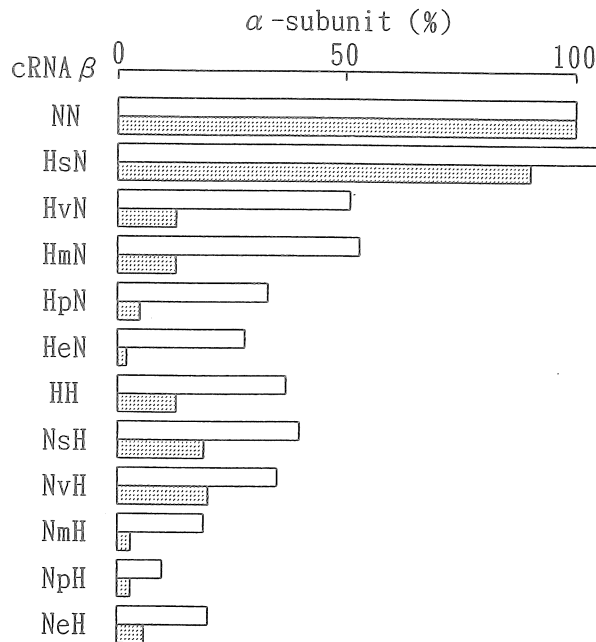


Fig. 4. Trypsin-resistance of the  $\alpha$ -subunit in the complex with chimeric  $\beta$ -subunit. The amounts of the  $\alpha$ -subunit shown in Fig. 3 were quantified by using Fuji BAS 2000. Data are the average from three sets of experiments and are normalized to the values obtained for NN. Shaded and open bar represent the  $\alpha$ -subunit with and without trypsin treatment, respectively.

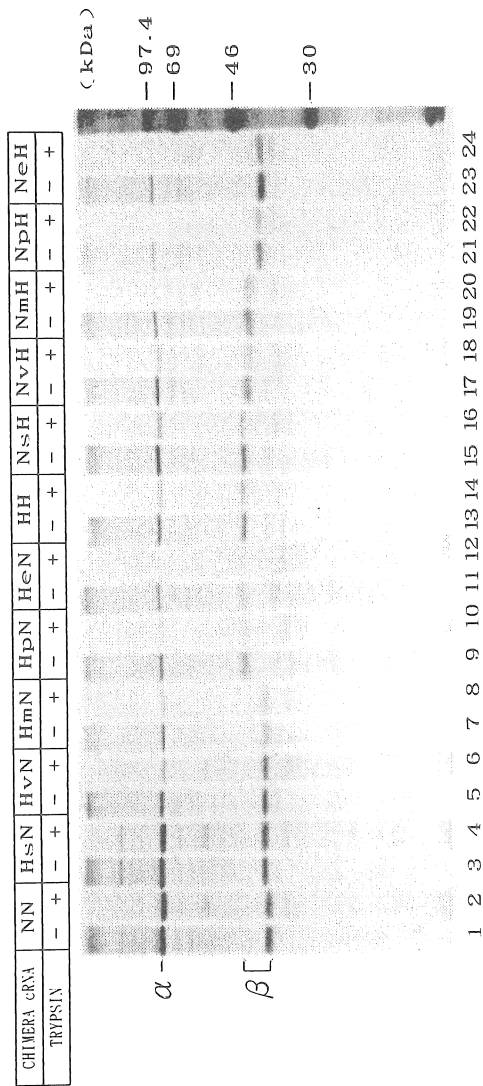


Fig. 3. Fluorographs of microsomes from oocytes injected with cRNAs. Oocytes were injected with cRNA $\beta$  as shown at the top of each panel together with cRNA $\alpha$ . Microsomal fractions from cRNA-injected oocytes, which had been incubated for three days with [ $^{14}$ C]leucine, were incubated for 60 min on ice with (even-numbered lanes) or without (odd-numbered lanes) trypsin. The digestion was stopped with soybean trypsin inhibitor at an inhibitor: trypsin ratio (w/w) of 100. Microsomes were analyzed by immunoprecipitation with anti  $\alpha$ -subunit antiserum, followed by gel electrophoresis and fluorography.

2.  $\alpha\beta$ 複合体の機能

次にキメラ $\beta$ 鎖と $\alpha$ 鎖との複合体が機能的であるか否かをATP分解活性, ポンプ電流の発生について調べた。表1にATP分解活性の結果が示してある。複合体の安定性の結果と一致して, 活性を示したキメラはHsNのみであった。プロトンポンプ $\beta$ 鎖やNsH, NvH, NmHはやや安定な複合体を形成したが (Fig. 4), これらにはATP分解活性は観察されなかった。

$\beta$ 鎖はナトリウムポンプの $K^+$ 感受性に影響すると言う報告がある (7-9)。キメラ $\beta$ 鎖との複合体にATP分解活性が観察されていないのは, 指摘 $K^+$ 濃度が変化したこと起因する可能性がある。そこで,  $K^+$ 濃度を換えてATP分解活性を観察した (Fig. 5) が, やはりHsN以外活性は観察されなかった。

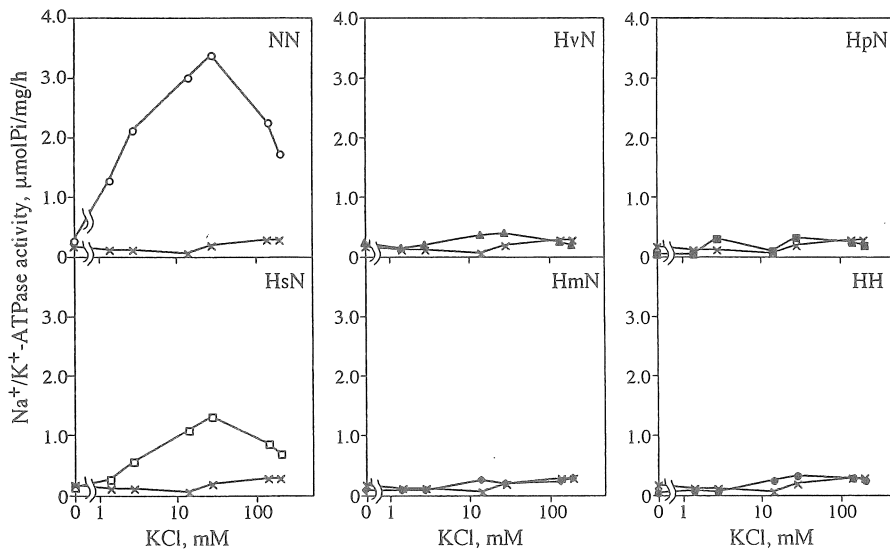


Fig. 5.  $K^+$  concentration dependence of the  $Na^+/K^+$ -ATPase activity in microsomes from cRNA-injected oocytes. Oocytes were injected with the cRNA $\beta$  shown in each panel together with cRNA $\alpha_{OR}$ . Microsomes were prepared and  $Na^+/K^+$ -ATPase activity was assayed. Microsomes from uninjected oocytes (cross) were assayed in parallel.

ナトリウムポンプは1分子のATPの消費に伴い $3Na^+$ を細胞外へ,  $2K^+$ を細胞内へ輸送し, したがって細胞内から細胞外へ向かう電流が観察される。ナトリウムポンプ $\beta$ 鎖, プロトンポンプ $\beta$ 鎖, およびATP分解活性を示したNsH, と $\alpha$ 鎖との複合体のポンプ電流を測定した (Fig. 6)。ATP分解活性の結果と一致し, プロトンポンプ $\beta$ 鎖とナトリウムポンプ $\alpha$ 鎖との複合体は不活性であった。

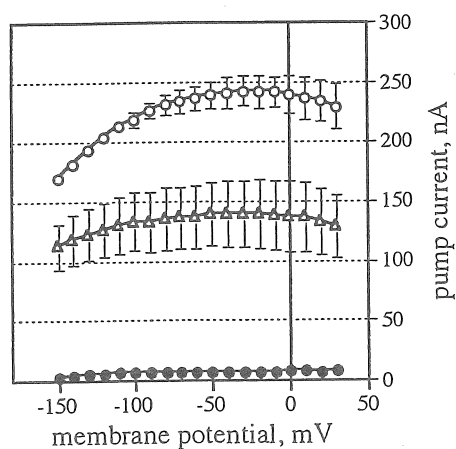


Fig. 6. Voltage dependence of the pump current in cRNA-injected oocytes. Oocytes were injected with cRNA  $\alpha_{OR}$  together with cRNA $\beta$  of  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase (open circle),  $\text{H}^+/\text{K}^+$ -ATPase (closed circle) or chimera HsN (triangle). Currents were measured with  $5\mu\text{M}$  ouabain at a KCl concentration of 2mM.

### 考察

H<sub>x</sub>Nシリーズのキメラβ鎖とα鎖複合体のトリプシン抵抗性は、H<sub>s</sub>NからH<sub>v</sub>Nの間で急激に減少した。これは、ナトリウムポンプβ鎖のSnaBI部位からEcoRV部位の間の領域は、プロトンポンプの相当する領域では置換できないことを意味し、この領域がナトリウムポンプβ鎖の特異的領域の1つであると考えられる。ところがこの領域がナトリウムポンプ由来であるNeHは安定な複合体を形成せず、これはこの領域以外にも安定な複合体形成に関与する特異的領域が存在することを示唆している。NeHの結果から判断して、EcoT22IからC末端までの領域にその様な領域の存在することが期待される。

ナトリウムポンプβ鎖に特異的なSnaBI部位からEcoRV部位の間の領域内に、特異性に関与する特定なアミノ酸残基の存在する可能性は十分考えられる。そこでその様なアミノ酸残基の候補として、ナトリウムポンプβ鎖間では保存的だが、プロトンポンプβ鎖では異なるアミノ酸残基を検索したところ、Arg72とAla74が考えられた。そこでArg72をGlnに、Ala74をLysに変異させ(それぞれプロトンポンプの相当するアミノ酸へ変えた)、それらをα鎖と共に発現させた。両変異体とも安定な複合体を形成し、十分なATP分解活性が観察された。したがって、これらアミノ酸残基がナトリウムポンプβ鎖に特異的と言う訳ではない。

プロトンポンプβ鎖やNsH, NvHはやや安定な複合体を形成するが活性は無く、これら複合体の構造は、ナトリウムポンプβ鎖やH<sub>s</sub>Nとの複合体とは異なっていると考えられる。プロトンポンプβ鎖はナトリウムポンプβ鎖と機能的互換性があるという報告があるが(10),



我々の結果はそれを指示するものではなかった。この矛盾を解くにはナトリウムポンプβ鎖がプロトンポンプα鎖と機能的複合体を形成するか否かを調べる必要がある。

#### 今後の課題

本研究においてナトリウムポンプβ鎖の*Sna*BI-*Eco*RV間、および*Eco*T22I-C末端間が、それぞれ特異的領域の1つである可能性が示唆された。我々はさらにβ鎖の最もN-末端側の(-S-S-)ループが特異的領域を形成することを報告している(11)。これら特異的領域の中に選別輸送のシグナルが存在することは十分考えられる。そのことを検証するには、これらキメラ体を*Caco*<sub>2</sub>等の極性細胞中に発現させ、生化学的・形態学的にキメラ体の発現部位を観察するのが最も都合がよい。そこで、まずナトリウムポンプ、プロトンポンプβ鎖で*Caco*<sub>2</sub>を形質転換し、共焦点レーザー顕微鏡で追跡したが、明確な発現や局在性を観察することはできなかった。最近ナトリウムポンプβ鎖の発現は極性細胞では制限されるという報告があり(12)、我々の結果はこのことに関連しているのかもしれない。キメラ体を用いれば、どの領域がこの制限に関与しているのかを知ることができ、そのことを手がかりに極性細胞での発現、ひいては選別輸送シグナルを決定したい。

#### 文献

1. Vasilets, L.A. and Schwarz, W. (1993) *Biochim. Biophys. Acta* 1154, 201-222
2. Hiatt, A., McDonough, A.A., and Edelman, I.S. (1984) *J. Biol. Chem.* 259, 2629-2635
3. Geering, K., Kraehenbuhl, J.P., and Rossier, B.C. (1987) *J. Cell Biol.* 105, 2613-2619
4. Noguchi, S., Higashi, K., and Kawamura, M. (1990) *Biochim. Biophys. Acta* 1023, 247-253
5. Noguchi, S., Higashi, K., and Kawamura, M. (1990) *J. Biol. Chem.* 265, 15991-15995
6. Noguchi, S., Maeda, M., Futai, M., and Kawamura, M. (1992) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 182, 659-666
7. Chow, D.C., Browning, C.M., and Forte, J.G. (1992) *Am. J. Physiol.* 263, C39-C46
8. Lutsenko, S., and Kaplan, J.H. (1993) *Biochemistry* 32, 6737-6743
9. Eakle, K.A., Lyyu, R.-M., and Farley, R.A. (1995) *J. Biol. Chem.* 270, 13937-13947
10. Horisberger, J.-D., Jaunin, P., Reuben, M.A., Lasater, L.S., Chow, D.C., Forte, J.G., Sachs, G., Rossier, B.C., and Geering, J. (1991) *J. Biol. Chem.* 266, 19131-19134
11. Ueno, S., Kusaba, M., Takeda, K., Maeda, M., Futai, M., Izumi, F., and Kawamura, M. (1995) *J. Biochem.* 117, 591-596.
12. Grindstaff, K.K., Balanco, G., and Mercer, R.W. (1996) *J. Biol. Chem.* 271, 23211-23221.

Targeting of Sodium Pumps to Basolateral Membranes in Polarized Cells

- Analysis of  $\beta$ -subunit chimeras -

Masaru Kawamura, Kazuo Takeda, Takashi Kitazawa, Minoru Nomoto\* and Susumu Ueno\*\*

Departments of Biology, Molecular Biology\* and Pharmacology\*\*,

University of Occupational and Environmental Health

Summary

Two sets of chimeric  $\beta$ -subunits were constructed from subunits of *Torpedo californica*  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase and pig gastric  $\text{H}^+/\text{K}^+$ -ATPase. Five unique restriction sites (*Sna*BI, *Eco*RV, *Mun*I, *Sph*I and *Eco*T22I) were created at equivalent positions of the respective cDNAs and were used as joining points for the construction. One set of chimeras (HxN series) was made by exchanging the 5' portion of  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase  $\beta$ -subunit cDNA with the corresponding portion of the  $\text{H}^+/\text{K}^+$ -ATPase  $\beta$ -subunit cDNA at the respective joining point. Complementary constructs were also prepared (NxH series).

In the HxN series, the chimera joined at the *Sna*BI site formed a stable trypsin resistant complex with the  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase  $\alpha$ -subunit, which was functional with respect to ATP hydrolysis and pump current generation, although the activities were less than those of the complex with the  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase  $\beta$ -subunit. Trypsin resistance decreased for the complex of the chimera joined at the *Eco*RV site. In the NxH series, the chimeras joined at the *Sna*BI site and the *Eco*RV site formed rather trypsin-resistant complexes, but the expressions of the  $\alpha$ -subunits were below 50% of the control. The chimera joined at the *Eco*T22I site formed a complex susceptible to tryptic digestion. None of the chimeras in the NxH series were functional.

These results suggest that at least two regions of the  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase  $\beta$ -subunit (*Sna*BI site to *Eco*RV site and *Eco*T22I site to C-terminus) are involved in stable assembly with the  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase  $\alpha$ -subunit and that the cytoplasmic domain (N-terminus to *Sna*BI site) is functionally replaceable with the corresponding domain of the  $\text{H}^+/\text{K}^+$ -ATPase  $\beta$ -subunit.