

## 29【P2】Ⅲ-256

胃プロトンポンプは  $\text{H}_3\text{O}^+$  を輸送する

○市川 友彦<sup>1</sup>, 森井 孫俊<sup>1</sup>, 竹口 紀晃<sup>1</sup> (1 富山医薬大薬)

【目的】胃  $\text{H}^+, \text{K}^+$ -ATPase は胃酸分泌の最終段階を担っているプロトンポンプで、ATP 加水分解エネルギーを用いて細胞質のプロトンと分泌側の  $\text{K}^+$  を交換輸送する。これまでプロトンが電荷移動で輸送されるのか、あるいは水にプロトンが付加したオキソニウムイオン ( $\text{H}_3\text{O}^+$ ) として輸送されるかは明らかでなかった。我々は、胃プロトンポンプが高濃度に含まれるブタ胃ベシクル膜の水輸送活性を酸素の安定同位元素からなる  $^{18}\text{O}$  水を用いて測定し、 $\text{H}_3\text{O}^+$  としてプロトンが水と共に輸送されるか調べた。さらに、プロトン輸送に関与すると予想される細胞質側の塩基性アミノ酸に部位特異的の変異を導入し、ATP 加水分解活性に対する影響を調べた。

【方法】胃ベシクル内腔に蓄積した  $^{18}\text{O}$  水を密閉容器内で加熱して  $\text{CO}_2$  と平衡化し、 $^{18}\text{O}$ - $\text{CO}_2$  を Mass Spectroscopy で定量することで水の輸送量を求めた。ポンプの  $\alpha$  鎖の細胞質側塩基性アミノ酸に部位特異的の変異を導入し、 $\beta$  鎖と共に HEK-293 細胞にトランスフェクトしマイクロゾーム画分の ATPase 活性を求めた。

【結果と考察】ATP 加水分解とカップルした胃ベシクル内腔への水の輸送は、プロトンポンプ特異的の阻害剤 SCH 28080 で阻害された。ATP 加水分解と水輸送の coupling ratio は約 1.8 で、プロトン輸送の理論的 coupling ratio 2 と非常に近い値であった。両 coupling ratio がほぼ一致することは、胃プロトンポンプは  $\text{H}_3\text{O}^+$  としてプロトンを輸送することを強く示している。細胞質側 M1 stalk の Lys<sup>164</sup> を Ala に置換すると、ATP 加水分解活性は約 50% 減少した。ホモロジーモデリングで得られたプロトン輸送 E<sub>1</sub> コンフォメーションの三次元構造の解析から、Lys<sup>164</sup> は細胞質側で塩基性アミノ酸からなる環状構造を構成し、プロトン ( $\text{H}_3\text{O}^+$ ) の細胞質側入口を形成している可能性が示唆された。