

イオン輸送体

魚住 信之

生物化学の教科書に掲載されている3個のNa⁺を排出して2個のK⁺を細胞内に取り込むNa⁺/K⁺-ATPaseは、微生物や植物にはない。動物の細胞膜にのみ存在する。Na⁺は動物の必須元素であるが、一部の例外を除けば植物には不必要的元素である。それどころか、塩害をもたらす生育阻害物質とみなされている。太古の昔、生物が海から陸に上がった際、動物は海水を体内に保持したが、多くの微生物や植物は海水に頼らない環境を選んで、独自の輸送体を発達させた名残である。

アルカリ金属（1族）は解離度が比較的大きく、単独でふるまう傾向にある。このため、酵素などの補欠分子族や転写や翻訳の補助因子や調節因子の役割とともに、細胞内の浸透圧や膜電位形成の主要構成成分として機能する。本稿では、陽イオンの輸送体に関して解説する。

膜駆動力

生体膜によって空間が二つに分割されると、内側と外側の粒子（元素や分子）の濃度に差が生じる。さらに、その粒子が電荷をもつ場合には、濃度差に加えて電気的な差も生じる。この時、もし生体膜に粒子の通路ができれば、平衡に達するまでその粒子は移動する。粒子の移動は生体膜にエネルギーの差が生じていることを示している。これが、電気的成分と濃度差成分の和で表される電気化学的ポテンシャルである。

このポテンシャルは生体膜の駆動力（motive force）を生み出すエネルギーである。電気化学的ポテンシャルを示す式を微分すると駆動力を表す式となる。ミトコンドリア内膜と葉緑体（プラスチド）チラコイド膜の電子伝達系によってプロトン（H⁺）駆動力が形成され、共役系のATP合成装置によりADPがATPに変換される¹⁾。

プロトン駆動力は、生体膜を挟んだH⁺の濃度勾配と膜電位の和の式で示される。膜電位はH⁺以外の共存する電荷も関係する。一価の元素のみに着目した式として、Goldman-Hodgkin-Katz（GHK）式が知られている。Ψは膜電位、Pはイオンの透過係数を示す。

$$\Delta\Psi = \frac{RT}{F} \ln \frac{P_K [K^+]_o + P_{Na} [Na^+]_o + P_{Cl} [Cl^-]_i + etc}{P_K [K^+]_i + P_{Na} [Na^+]_i + P_{Cl} [Cl^-]_o + etc}$$

理想的かつ単純な組成の液であればGHK式は有効に利用できる。しかし、実際の細胞では、多種類の粒子が異なる濃度で存在し、その粒子を透過する個別の輸送体が異なる数で生体膜に存在する。また、輸送体のイオン透過孔は開閉を繰り返すことから、イオン輸送体の開閉（開口確率）も考慮する必要がある。このような混沌とした場合には、計算ではなく膜電位を実測することが現実的である。

細胞内外には、元素以外にも有機酸や糖などさまざまな分子が存在し、それぞれの粒子が生体膜を通り抜けようとしている。細胞の恒常性を保つために、生体膜には、必要な物質の吸収や、不要な物質の排出を行う輸送体がある。輸送体は、チャネル、トランスポーター、ポンプ、キャリア、トランスロケーター、パーミアーゼなどの名称がつけられてきた。

イオン輸送体

電荷をもつ元素を透過するイオン輸送体の代表はイオンチャネルやイオントランスポーターである。一般的にチャネルは、単位時間当たりのイオンの透過量が大きい輸送体の名称である。チャネルと名付けられている輸送体は、水チャネル、K⁺チャネル、Na⁺チャネル、Ca²⁺チャネル、Cl⁻チャネルである（俗称も含む）。しかし、輸送体の名称は、後年の研究成果によってその性能や性質を反映していないことがある。したがって、名称に惑わされずに、最新の研究情報に従って個々の輸送体の実体を把握することが必要となる。

イオン輸送体の遺伝子の同定は、1980年代に沿らによって精力的に行われた。Na⁺チャネル、アセチルコリン受容体、Ca²⁺チャネル、Ca²⁺放出チャネル（リアノジン受容体）、cGMP作動性チャネルなど、主だったイオンチャネルの構造遺伝子が単離された。一方、K⁺チャネルは、“shake”する（震える）表現型を示すショウジョウバエの変異株の原因遺伝子（Shaker）として単離された²⁾。これらの輸送体の遺伝子単離とイオン輸送体の機能の解析は、パッチクランプ測定やアフリカツメガエル卵母細胞の輸送体発現系を用いた二本電極を用いた電気生理測定によって行われた。

イオン選択孔

K^+ チャネルのイオン透過孔 (pore) は、二つの膜貫通領域とその間の膜内に半分埋没したループ領域で構成される³⁾。四つのMPM (membrane-pore-membrane) 構造の分子が90度ずつ受け持つて、一つのチャネル孔を形成する (四量体)。 K^+ チャネルのポアには、Gly-Tyr(Phe)-Gly(GYG) モチーフがあり、この配列は K^+ の透過とイオン選択 (フィルター) を構成する。通常、 K^+ は水和しているので、イオン選択を行う領域 (フィルター) を抜けるときには K^+ を取り囲んでいる“水のジャケットを脱いで、通過後に再び水和する”作業が必要である⁴⁾。この脱水和エネルギーが小さくなるように、ペプチド鎖の酸素分子が K^+ の水和水の酸素を模すようにアミノ酸が配置されているために、滑らかな K^+ の移動が可能になることが分かっている。 K^+ とは性質の異なる Na^+ や Ca^{2+} の輸送体 (Na^+ チャネルと Ca^{2+} チャネル) のフィルターでは、 K^+ チャネルのGYGと異なるアミノ酸がそれぞれ配置されている。

膜電位依存性チャネル

生体膜には電位差が生じている。この電位の変化に応じて、孔の開閉がなされる膜電位依存性イオンチャネルが存在する。膜電位センサーは四つの膜貫通領域 (S1-S4) で構成される³⁾。この膜電位センサー領域が、イオン透過孔 (MPM, S5-P-S6) のN末側に付加したもののが膜電位依存性チャネルである。このため、膜電位依存性チャネルは6回の膜貫通構造 (S1-S6) である (図1)。動物や酵母の環境変化を感知する輸送体 transient receptor potential (TRP) チャネルも、膜電位センサーはないものの、膜電位依存性 K^+ チャネルと同じ6回膜貫通構造であり、共通の先祖から進化したようである。

膜電位センサーのS2に負電荷アミノ酸が2個、S3には1個配置され、S4に数個の正電荷残基が存在する。この電荷アミノ酸は生物の種類に関係なく保存されている。膜貫通領域は通常疎水性が高いが、S4は数個の正電荷アミノ酸があるため比較的その膜貫通領域の疎水度は低い。一般的に、タンパク質の組込みでは、N末端側の疎水性領域が順序良く生体膜 (真核細胞ではER膜や原核細胞では細胞膜) に挿入される。しかし、膜電位センサー領域のように親水性残基の多い配列では特殊な様式で生体膜に挿入される (図1)。C末端側のS4がN末端側のS3の膜挿入を補助したり、S3とS4が相互作用をして同時に生体膜へ挿入される様式が報告されている⁵⁾。

動物には、静止電位の状況から、細胞内の電位が大きくなる (脱分極する) と開孔する外向き整流性の膜電位

依存性チャネルが多数存在する。一方、植物には、細胞内の電位が小さくなる (過分極) ことによって開孔する内向き整流性チャネルが存在する。 K^+ の輸送方向の違いを指標に、内向き整流性 (KAT1, KAT2, AKT1, AKT2)・外向き整流性 (SKOR, GORK)・両方向性 (AKT2/3) の3タイプが存在する。Cyclic nucleotide gatedチャネル (CNGC) のように核酸分子と結合する領域をもつ膜電位依存性チャネルも存在する。動物細胞の Na^+ チャネルと Ca^{2+} チャネルは、四つの膜電位依存性 K^+ チャネルが連結した一次構造をとる。 Na^+ , K^+ , Ca^{2+} チャネルは互いの構造に共通性があることから、遺伝子重複により同じ先祖分子から進化した産物と考えられている (図2)。

膜電位センサーの作動

膜電位センサー (S1-S4) は生体膜を貫通し、S2, S3 の負電荷アミノ酸とS4の正電荷アミノ酸が塩橋を形成している (図1)。膜電位が変化するとS4の正電荷アミノ酸が電気的に引っ張られてねじれながら上下に移動すると考えられている。この動作によってイオン選択孔が開閉する。このモデルは数多くのデータによって支持されてきた。このような状況の中で、2003年にその従来のモデルとはまったく異なる膜電位センサーのX線結晶構造が報告された^{6,7)}。微生物の膜電位依存性 K^+ チャネル (KvAP) の膜電位センサーを形成する膜貫通領域のS3とS4が一体となり、膜電位の変化に応じて疎水性の膜内を大きく移動するというモデルであった (paddle モデルと名付けられた)。通常は、結晶構造は決定的なデー

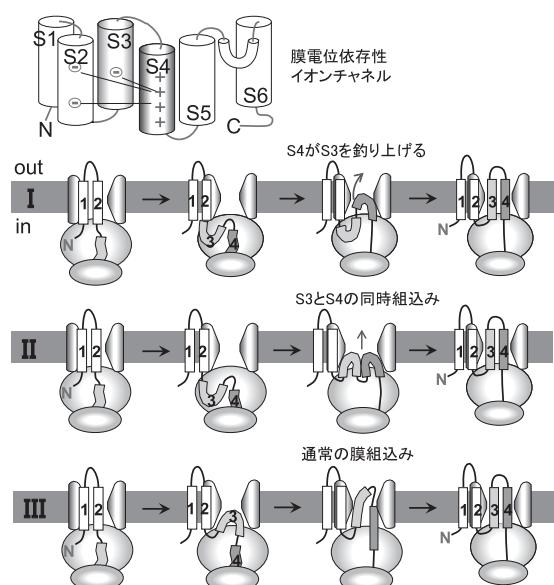


図1. 膜電位依存性イオンチャネルと膜電位センサーのさまざまな膜組込み様式

タとなるはずである。しかし、この新規なpaddleモデルに対して批判的なコメントリーや論文が報告された。このモデルを報告したグループは、結晶構造解析を改めて行い、先の論文報告から2年後に膜電位センサーの構造を報告した⁸⁾。この構造は基本的に従来の膜電位センサーの構造と同じであった。この混沌とした時期があつたことは、動的な膜電位センサーの構造決定の難しさを物語っている。2004年にGuyらは緻密な膜電位センサーの分子配置を行い、結晶構造だけでは解くのが難しい膜電位センサーの作動モデルを報告している⁹⁾。

2005年に岡村らは、膜電位センサーのみをもつタンパク質と、膜電位センサーに酵素が融合したタンパク質を発見している¹⁰⁾。1993年に久保らは、MPMのみを有するK⁺チャネル(ICK1)を初めて報告した¹¹⁾。これらは膜電位依存性イオンチャネルは、膜電位センサーとイオン透過孔が進化の過程で融合した産物であることを示している。

K⁺チャネルとK⁺トランスポーターの構造の共通性

K⁺チャネルは動物細胞で初めて見いだされたが、K⁺トランスポーターは大腸菌で最初に明らかにされた(表1)。大腸菌には、K⁺チャネルホモログ遺伝子の他に3種類のK⁺トランスポーターの遺伝子が存在する。この3種類のK⁺トランスポーターのホモログは微生物や植物にも存在する。以下に3種類のK⁺トランスポーターを概説する³⁾。

Kdpトランスポーター Kdpは細胞外の低濃度のK⁺を、ATPを使って取り込むポンプである。大腸菌Kdp系の構造遺伝子はポリシストロニックな発現様式をとり、この複数のKdp構成タンパク質の機能はAltendorfらによって長年にわたって解析された。また、水野らは、Kdpを構成する複数のタンパク質が二成分制御系(two component system)により誘導生産されることを示した¹²⁾。Kdpの膜貫通構造は、4量体を形成するK⁺チャネルと類似している(図2)。K⁺チャネルのGYGモチーフに匹敵するGlyはKdpのイオン選択孔にも保存されている。

Trk/Ktr/HKTトランスポーター 大腸菌にはTrkと呼ばれるK⁺トランスポーターが二つ(TrkGとTrkH)

表1. K⁺輸送体の種類

	トランスポーター			チャネル
原核生物	Kdp	Trk/Ktr	Kup/HAK	有
植物	無	HKT	KUP/HAK/KT	有
動物	無	無	無	有

存在する。両Trkの輸送体活性には水溶性タンパク質TrkAが必要である。出芽酵母(*S. cerevisiae*)にはTrk1, Trk2, 枯草菌や藍藻(*Synechocystis* sp. PCC 6803)にはKtrBまたはKtrDが存在する。また、植物にはHKTと名づけられたホモログが存在する¹³⁾。

Trk/Ktr/HKTトランスポーターの膜貫通構造は、一時、8回と10回の二つのモデルが報告されていた。眞の膜構造を実験的に明らかにするために、大腸菌、無細胞膜組込み系、動物培養細胞の3種類の発現解析系を用いて慎重にAtHKT1の膜貫通構造(トポロジー)が検討され、MPMが分子内で四つ繰り返された4×MPMモデルの8回膜貫通構造であることが実験的に証明された¹⁴⁾。

決定された膜貫通構造を用いて、イオン選択孔に関する実験的な検証がなされた。K⁺輸送活性をもつTaHKT1とK⁺輸送活性をもたないAtHKT1の二つのK⁺透過性の差を利用して、キメラ輸送体によりイオン選択性に重要なアミノ酸が特定され、K⁺チャネルのGYGモチーフのGlyに相当するアミノ酸の存在が明らかになった。

K⁺チャネル、Trk/Ktr/HKT系トランスポーターとKdpトランスポーターの一次構造上の相同意性はない。しかし、この3種類のK⁺輸送体の膜貫通構造(4×MPM)は同じであり、イオン選択孔にはイオン選択に関与するGlyが保存されている。この3種類の輸送体は同じ先祖から分子進化したものと考えられる(図2)。

Kup/HAK/KTトランスポーター 大腸菌にはKupと呼ばれる別のK⁺輸送体が存在している。1980年代にはKupはTrkの構成因子とみなされていたが、1989年にBakkerらがTrk以外の独立したK⁺の取り込みを行う輸送体として改めて同定した。Kupは、他のK⁺輸送体と

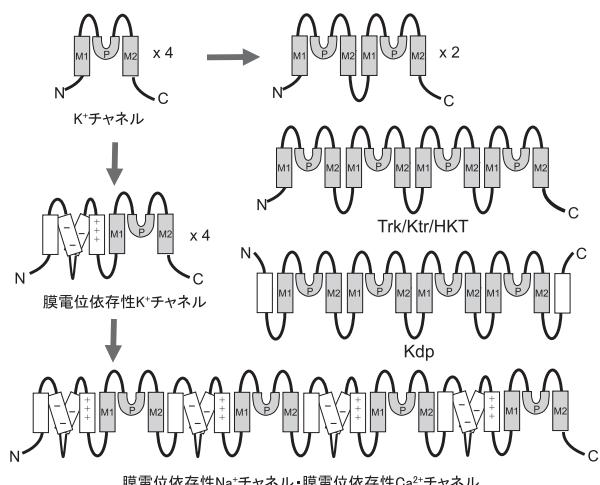


図2. K⁺チャネルから進化したK⁺トランスポーター(Trk/Ktr/HKT系とKdp系)とNa⁺チャネル・Ca²⁺チャネル。基本構造としてMPM構造を有する。

異なり Rb^+ や Cs^+ も透過する。実際に、 Cs^+ は *Kup* を通じて大腸菌内に蓄積する^{15,16}。糸状菌や植物の *Kup* ホモログである *Kup/HAK/KT* 輸送体も K^+ の他に Cs^+ の輸送活性をもつものが多い。*Kup* 輸送体の同定から約30年経つが、*Kup* の構造解析は進んでいない。2014年に12回膜貫通構造であることが確認され、疎水性の膜貫通領域内に輸送活性に必要な負電荷アミノ酸が同定された。これまでにいくつかの論文において、*Kup/HAK/KT* 輸送体は H^+ と K^+ を同方向に輸送するシンポーターであると記述されている。しかし、 K^+ の輸送様式に関しては、一つの研究グループのみが実験的にシンポーター活性を報告しているに過ぎない状況であることから、*Kup/HAK/KT* 輸送体のイオン輸送に関する性質の解析は今後の課題となっている。

Na^+ , Rb^+ , Cs^+ を透過する K^+ 輸送体

微生物や植物の細胞内的主要陽イオンは K^+ であり、それ以外の1族元素は細胞内に必要ではないために、 Na^+ , Rb^+ , Cs^+ を吸収する輸送体は必要ないと考えられている。しかし、先に示したように、 K^+ 輸送体の中には、 Na^+ , Rb^+ , Cs^+ を透過する輸送体がある。*Kup/HAK/KT* 輸送体は、 K^+ の他に Rb^+ や Cs^+ の輸送が可能である。大腸菌に K^+ の代わりに Rb^+ を与えると、*Kup* 輸送体によって Rb^+ を取り込む。さらに K^+ の代わりに Rb^+ を用いて大腸菌は増殖できる¹⁶。一方、大腸菌に K^+ の代わりに Cs^+ を与えると増殖速度は大きく低下する。ところが、わずかな量の K^+ を培地に添加すると細胞増殖はほぼ完全に回復する。これは高 K^+ 親和性の *Kdp* が細胞内に K^+ を吸収し、細胞内に最低限の K^+ を保つためであると考えられている(図3)。

Trk/Ktr/HKT 輸送体の中には Na^+ 透過性をもつ輸送体

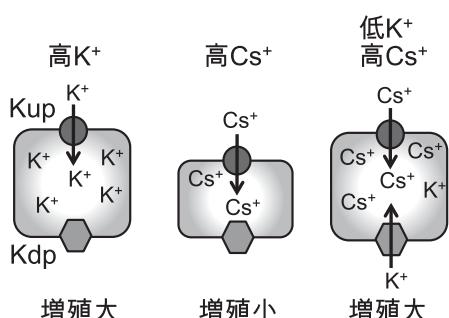


図3. Cs^+ 吸収する *Kup* と低濃度 K^+ を吸収する *Kdp* の共同作業。 Cs^+ 培地では K^+ の代替元素として Cs^+ を取込む。その時細胞の生存維持のために、*Kdp* が環境中の低濃度の K^+ を吸収して、細胞内に最少量の K^+ を確保する¹⁶。

がある。2000年に Na^+ を透過するシロイヌナズナの *AtHKT1* が単離された。この変異株 (*athkt1* 株) は、高濃度の Na^+ 培地において、野生株と比較して高い感受性を示す。高塩濃度の環境において道管に Na^+ が貯まるのを防ぐために、あえて細胞内に Na^+ を取り込んで外界との浸透圧の差を適切に調節する適応機構に *AtHKT1* がかかわっていると考えられる¹⁴。

環境変化が起きた時、細胞は生き延びるしくみを持っている。原核・真核生物の細胞内の主要イオンとして K^+ を利用できるように K^+ 輸送体は現在の形に進化した。一方、 K^+ 輸送体の中には、 K^+ の欠乏する環境にさらされても、細胞の生存を維持するために、非栄養元素を細胞内に吸収できるものも存在している。細胞の柔軟な生存戦略を K^+ 輸送体から読み取ることができる。

おわりに

特殊性や多様性よりも、共通性に着目してイオン輸送体を眺めてみると、祖先からの分子進化、自然淘汰されたイオン選択性と透過度、細胞における根源的な生理的役割に気づかされる。適応と進化を経て、現在の精緻で美しい構造と巧みな機能をイオン輸送体は獲得した。イオン輸送体は細胞の内と外を仕切る生体膜に機能を授ける重要な分子装置の一つである。外界とのインターフェイスであるイオン輸送体を理解することにより、細胞や個体の環境適応、エネルギー変換と蓄積、成長と分化の調節に関する分子レベルの解明がすすむことが期待される。

文 献

- 1) Hill, B.: *Ion Channels of Excitable Membranes* 3rd ed., Sinauer Associates (2001).
- 2) Tempel, B. L. et al.: *Science*, **237**, 770 (1987).
- 3) Uozumi, N. and Dreyer, I.: *Comprehensive Biophysics Volume 6 - Channel Proteins*, p. 234, Elsevier (2012).
- 4) Doyle, D. A. et al.: *Science*, **280**, 69 (1998).
- 5) Mishima, E. et al.: *Biochem. J.*, **473**, 4361 (2016).
- 6) Jiang, Y. et al.: *Nature*, **423**, 33 (2003).
- 7) Jiang, Y. et al.: *Nature*, **423**, 42 (2003).
- 8) Lee, S. Y. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 15441 (2005).
- 9) Stewart, R. et al.: *Biophys. J.*, **87**, 2116 (2004).
- 10) Murata, Y. et al.: *Nature*, **453**, 1239 (2005).
- 11) Kubo, Y. et al.: *Nature*, **362**, 127 (1993).
- 12) Nakashima, K. et al.: *Mol. Microbiol.*, **6**, 1777 (1992).
- 13) Hamamoto, S. et al.: *Curr. Opin. Biotechnol.*, **32**, 113 (2015).
- 14) Kato, Y. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 6488 (2001).
- 15) Kato, S. et al.: *Sci. Rep.*, **7**, 1965 (2017).
- 16) Tanudjaja, E. et al.: *Sci. Rep.*, **7**, 2122 (2017).