

AMCoR

Asahikawa Medical College Repository <http://amcor.asahikawa-med.ac.jp/>

蛋白質・核酸・酵素 (1982.11) 27巻15号:2365～2376.

骨格筋小胞体のCa²⁺-ATPase

金沢 徹

骨格筋小胞体のCa²⁺-ATPase

金沢 徹*

ここで述べる Ca²⁺-ATPase は骨格筋小胞体の膜蛋白質の大部分を占める酵素で、Ca²⁺ と Mg²⁺ の共存下に ATP を加水分解する。このとき、放出されるエネルギーを用いて Ca²⁺ の能動輸送を行なうが、その際 ATPase 分子自体が Ca²⁺ を結合して膜内を輸送する Ca²⁺ 担体としての働きをする。

Ca²⁺-ATPase による ATP 分解と Ca²⁺ 輸送はかたく共役していて、ATP 分解の各素反応と Ca²⁺ 輸送の各素過程の間には厳密な対応がある。本稿では、まず骨格筋小胞体の Ca²⁺-ATPase による Ca²⁺ 輸送の一般的性質について述べる。次に、Ca²⁺-ATPase の反応機構と Ca²⁺ の輸送機構について各素反応にわたり基本的性質を述べる。最後に、骨格筋小胞体のカルモデュリン-Ca²⁺ 依存性プロテインキナーゼ系と Ca²⁺-ATPase (および Ca²⁺ 輸送) との関連について最近の知見を紹介する。

I. はじめに

骨格筋小胞体は筋原繊維をとりまく袋状の細胞内膜系で、もっぱら Ca²⁺ の輸送と貯蔵を行なっている。筋小胞体に貯えられた Ca²⁺ は筋繊維の興奮に際し筋形質に放出されトロポニンと結合して筋繊維の収縮をひき起こすが、放出された Ca²⁺ は再び小胞内に取り込まれる。この取り込みによって筋原繊維周辺の Ca²⁺ 濃度が低下しトロポニンから Ca²⁺ が解離して筋弛緩が起こる。

筋小胞体による Ca²⁺ の取り込みは ATP 分解に共役した能動輸送であるが、この Ca²⁺ 輸送を担うのが筋小胞体膜に存在する Ca²⁺-ATPase である^{1,2)}。心筋小胞体^{3,4)}や赤血球膜⁵⁻⁷⁾、心筋形質膜^{8,9)}でも骨格筋小胞体とよく似た Ca²⁺-ATPase が存在し Ca²⁺ の能動輸送を行なっているが、これらの場合はカルモデュリンが ATPase 活性や Ca²⁺ 輸送を活性化している。これに対して骨格筋小胞体の場合は Ca²⁺-ATPase の機能にカルモデュリンが関与していることを示す証拠は得られていない。最近の報告^{10,11)}は後述するようにむしろこの可能性について否定的である。しかし骨格筋小胞体の Ca²⁺-ATPase の反応機構や Ca²⁺ 輸送との共役機構は

※ Tohru Kanazawa, 旭川医科大学学生化学第二講座, (〒078-11 旭川市西神楽 4 線 5 号 3-11), [Department of Biochemistry, Asahikawa Medical College, Nishikagura, Asahikawa 078-11, Japan]

Ca²⁺-ATPase of sarcoplasmic reticulum from skeletal muscle

他の膜系の Ca²⁺-ATPase と基本的に一致しているし、分子機構の面では骨格筋小胞体のほうが他の膜系に比べてはるかに研究が進んでいるので、ここでは骨格筋小胞体の Ca²⁺-ATPase をとりあげ、その基本的性質を述べることにしたい。

II. Ca²⁺-ATPase による Ca²⁺ 輸送

Ca²⁺-ATPase は筋小胞体の膜蛋白質の 60~70% を占める。この酵素は Ca²⁺ と Mg²⁺ の共存下で ATP を加水分解するが、同時に酵素分子自体が担体として Ca²⁺ を結合し膜を通してそれを輸送する^{1,2)}。

この ATPase の分子機構は主に筋肉のホモジネートからマイクロゾーム分画として分離した筋小胞体を用いて

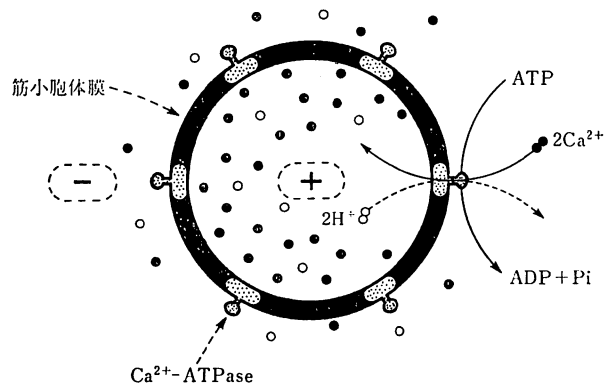


図 1. Ca²⁺-ATPase による Ca²⁺ の能動的取り込み (骨格筋から分離した筋小胞体)

調べられてきた。この標品は直径 $0.1\sim 0.2\ \mu\text{m}$ の膜小胞からなっていて（小胞外液は筋形質側に相当する）、その懸濁液に Ca^{2+} と Mg^{2+} の共存下で ATP を加えると図 1 に示したように ATP を加水分解するとともに外液の Ca^{2+} を小胞内に取り込む。この Ca^{2+} の取り込みと ATP の加水分解は緊密に共役して、ATP 1 分子に対し常温では 2 個（低温では 1 個）の Ca^{2+} が輸送される。その結果、小胞内の遊離 Ca^{2+} の濃度は外液の 5,000 倍以上に達し、小胞内外に大きな Ca^{2+} の濃度勾配ができる。このように Ca^{2+} -ATPase を主体とする輸送系は Ca^{2+} の濃度勾配（正確には電気化学的勾配）に逆らって輸送する働きをもつので Ca^{2+} ポンプと呼ばれている。なお、小胞の内側には高親和性 Ca^{2+} 結合蛋白質（分子量約 55,000）¹² と低親和性 Ca^{2+} 結合蛋白質（分子量約 63,000）¹¹⁻¹³ が存在していて、取り込まれた Ca^{2+} の 80% 以上はこれらと結合した状態で小胞内に蓄えられると考えられている。

筋小胞体の Ca^{2+} ポンプのエネルギー効率は生理的条件のもとで約 70% である。このようにエネルギー効率がきわめて高いので Ca^{2+} の濃度勾配に基づく浸透的エネルギーを ATP の加水分解のエネルギーより大きくしてポンプを逆回転させ ATP を合成することができる。すなわち、図 2 に示したように、あらかじめ小胞内に高濃度の Ca^{2+} を負荷してから、ADP, Pi, Mg^{2+} 存在下で外液に大過剰の EGTA (Ca^{2+} キレート剤) を加え外液の遊離 Ca^{2+} の濃度を急激に下げると、小胞内外に Ca^{2+} の大きな濃度差ができる。その浸透的エネルギーによってポンプは逆回転し Ca^{2+} が小胞から流出するとともに ADP と Pi から ATP が合成される^{14,15}。このとき流出する Ca^{2+} と合成される ATP の間には、 Ca^{2+} 取り込みの場合と同じように、2:1 のモル比が成り立つ。

筋小胞体から精製した Ca^{2+} -ATPase をダイズその他から抽出したリン脂質のリポソームに埋め込むと、ATP

分解に共役して Ca^{2+} を能動的に取り込むことのできる膜小胞が再構成される¹⁶⁻¹⁹。精製した Ca^{2+} -ATPase は筋小胞体とはほぼ同じ組成の脂質を含んでいるが、再構成にあたって精製 Ca^{2+} -ATPase の内源性脂質を完全に合成リン脂質で置き換えても Ca^{2+} を輸送できる膜小胞が再構成される^{19,20}。したがって、 Ca^{2+} の能動輸送系は Ca^{2+} -ATPase の酵素蛋白質とリン脂質だけから構成できることになる。

Ca^{2+} 輸送に際し他の陽イオンが逆輸送されるか否かは輸送機構を明らかにするうえで重要な問題である。かつて Mg^{2+} と K^+ が Ca^{2+} の counter ion として輸送される可能性が考えられたが²¹、その後これは明確に否定された²²⁻²⁴。最近いくつかの研究室で、 Ca^{2+} の取り込みに伴い H^+ が小胞内から外液へ放出される現象が見いだされている^{23,25-27}。このとき Ca^{2+} の取り込みと H^+ の放出のモル比はほぼ 1:1 である。また、人為的に小胞内外に H^+ の濃度勾配（内液の H^+ 濃度を高くする）をつくと、ATP 分解に共役した Ca^{2+} 取り込みの促進が認められる²⁸。これらの結果から、 Ca^{2+} の counter ion として、図 1, 2 に示したように、 H^+ が逆輸送されると現在推定されている。

上記のように H^+ が Ca^{2+} と 1:1 のモル比で逆輸送されるとすると、 Ca^{2+} の取り込みに際し正電荷が小胞内にもち込まれることになる。事実、精製した Ca^{2+} -ATPase と卵黄のリン脂質から再構成した膜小胞を用いて Ca^{2+} の能動的取り込みを行なわせると、50~60 mV（小胞内が正）の膜電位が生じる²⁹。また、 K^+ -バリノマイシン系を用いて小胞内が小胞外に対して負になるように膜電位をかけると、 Ca^{2+} の能動的取り込みが促進される。さらに、再構成膜小胞にかぎらず、骨格筋から分離した筋小胞体をそのまま用いた場合でも、 Ca^{2+} の能動的取り込みに際し膜電位（小胞内が正の方向）の発生することが確かめられている^{30,31}。これらの結果から筋小胞体の Ca^{2+} ポンプは、図 1, 2 に示したように

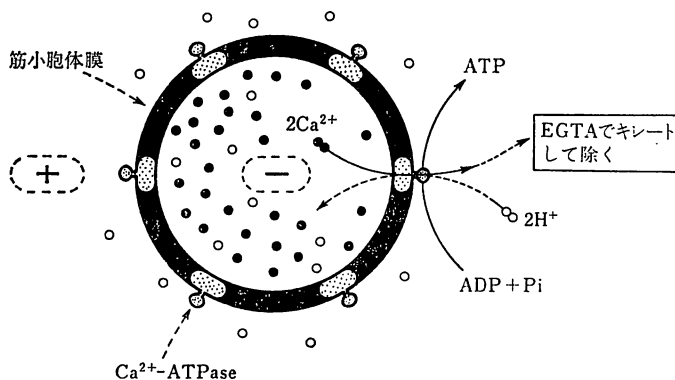


図 2. Ca^{2+} ポンプの逆回転による Ca^{2+} 放出と ATP 合成（骨格筋から分離した筋小胞体）

electrogenic であると考えられている。

III. Ca^{2+} -ATPase の構造

筋小胞体の Ca^{2+} -ATPase は高度に精製されていて SDS-ゲル電気泳動でほぼ単一のバンドを与える³²⁾。この精製 ATPase はなお筋小胞体とはほぼ同じ組成のリン脂質を含んでいるが³³⁾、このうちとくにホスファチジルコリンが ATPase の活性発現に重要な役割を果たしている³⁴⁻³⁶⁾。筋小胞体の膜内では、ATPase 1 分子をリン脂質 30 分子からなるいわゆる annular lipids がとりかこんでいて酵素蛋白質と直接相互作用をしている³⁷⁾。表面活性剤を用いて筋小胞体膜の脂質をすだいに取り除いていくと、この 30 分子の annular lipids が残存している間は酵素は全活性を維持しているが、annular lipids まで取り除くと不可逆的に失活する。したがって annular lipids は ATPase 活性の発現に必要な酵素蛋白質のコンホメーションを保持する働きがあると考えられる。しかしこの結果は必ずしも酵素活性の発現にリン脂質が必須であることを意味するわけではない。ATPase のもつ脂質を適当な表面活性剤で完全に置き換えても酵素活性は十分維持される³⁸⁻⁴⁰⁾。

Ca^{2+} -ATPase の分子量は 102,000~105,000 で、1 分子当たり 1 個の親和性の高い ATP 結合部位 (結合定数 $K=0.25 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$) をもっている。筋小胞体をトリプシンに短時間暴露すると、ATPase 分子は活性部位をもつ分子量 55,000 のフラグメントと活性部位をもたない分子量 45,000 のフラグメントに分かれる⁴²⁾。このようなトリプシン処理をしたあとでも ATPase 活性は保持される。さらにトリプシン分解をつづけると分子量 55,000 のフラグメントは分子量 30,000 と 20,000 の 2 つのサブフラグメントに分かれる。ATPase の活性部位はこのうち分子量 30,000 のサブフラグメントに存在する。また分子量 20,000 のサブフラグメントは Ca^{2+} イオノホア活性を示す。各フラグメントの抗体に対する反応性から、活性部位をもつ分子量 55,000 のフラグメントは大部分、膜の外側表面に露出しているのに対し、イオノホア活性をもつ分子量 20,000 のサブフラグメントは一部だけ外液に露出しており、活性部位も Ca^{2+} イオノホア活性をもたない分子量 45,000 のフラグメントは大部分、膜内部に埋もれていることが示唆されている。このような結果から、分子量 20,000 のサブフラグメントは実際の Ca^{2+} 輸送に際し Ca^{2+} イオノホアとして機能すると推定されている。

最近 Ca^{2+} -ATPase の一次構造の研究が進み、リン酸化部位 (後述) を含む 562 個のアミノ酸残基からなる蛋白質部分のアミノ酸配列が決定された⁴³⁻⁴⁵⁾。この部分は親水性が強く、酵素蛋白質のうち外液に露出した部分

を構成すると考えられている。 Ca^{2+} -ATPase のシステイン残基の大部分は酵素が native な状態でも反応性を示すが^{49,50)}、事実これらのシステイン残基はすべてこの親水性部分に含まれている。残りの約 500 個のアミノ酸残基からなる部分はきわめて疎水性が強く、酵素蛋白質のうち膜内に埋め込まれている部分であると考えられる。この疎水性ペプチドのアミノ酸配列はごく一部しか明らかにされていないが、 Ca^{2+} -ATPase のトリプトファン残基のうち 1 個を除いた残りすべてがこれに含まれている。

逆染色法を用いて筋小胞体の膜表面の微細構造をみると、膜の外側表面に直径約 4 nm の粒子が多数認められる (図 1, 2, 6 参照)^{51,52)}、この粒子は直径 2 nm の短い柄で膜表面に結合しているが、これは ATPase 分子のうち活性部位を含む親水性の部分が膜の外側表面に露出したものである。他方、凍結切断法を用いて膜内部の微細構造をみると、膜内の outer leaflet に直径 8~9 nm の粒子が多数認められる⁵¹⁻⁵³⁾。しかしこれは inner leaflet にはわずかしみられない。この粒子は ATPase 分子のうち膜内部に埋もれた部分を表わしている。このように、 Ca^{2+} -ATPase の膜内分布にはいちじるしい非対称性が認められるが、同じような蛋白質の非対称性分布は X線解析によっても明らかにされている⁵⁴⁻⁵⁶⁾。

骨格筋から分離した intact な筋小胞体を用いた場合、 Ca^{2+} -ATPase のアミノ基の 30% がフルオレスカミンによって標識されるのに対し、精製した Ca^{2+} -ATPase からつくった leaky な小胞を用いたときには、ATPase のアミノ基の 72% がこの試薬で標識される⁵⁷⁾。この結果は ATPase 分子が筋小胞体膜の内側表面にも露出していることを示唆すると考えられている。

筋小胞体の Ca^{2+} ポンプとしての機能単位が Ca^{2+} -ATPase のオリゴマーであることを示唆する結果がこれまで多数報告されている。そのうちいくつかをあげると、① Ca^{2+} -ATPase の表面粒子 (直径 4 nm の粒子) の密度が膜内粒子 (直径 8~9 nm の粒子) の密度より 3~4 倍高い^{52,53)}。これは膜内粒子が Ca^{2+} -ATPase のオリゴマーであることを示唆している、②表面活性剤を用いて適当な条件で溶かした Ca^{2+} -ATPase の分子量を沈降速度法やゲル濾過法で測定すると $n \times 100,000$ ($n \geq 2$) になる^{38,39,59)}、③種々の架橋剤で筋小胞体の Ca^{2+} -ATPase を処理すると、分子量 $n \times 100,000$ ($6 \leq n < 2$) の粒子が分離される⁶⁰⁻⁶³⁾、④蛍光プローブで標識した Ca^{2+} -ATPase のモノマーとリン脂質を混ぜてプロテオリゾームをつくと、ATPase はリゾソームの膜内でオリゴマーを形成していることが蛍光プローブ間のエネルギー転移の測定から明らかにされている⁶⁴⁾。さらに最近、筋小胞体による Ca^{2+} の取り込みと酵素のリン酸化

(後述)の初期相の解析から, Ca^{2+} -ATPase のオリゴマーが flip-flop 機構で Ca^{2+} を輸送することを強く示唆する結果が報告されている^{65,66}。

IV. Ca^{2+} -ATPase の基質特異性とカチオン要求性

ATP, ITP, GTP, CTP, UTP などのヌクレオチド三リン酸はいずれも Ca^{2+} -ATPase の基質となり Ca^{2+} ポンプを駆動することができる⁶⁷⁻⁶⁹。これらの基質を加水分解し Ca^{2+} を輸送する速度は $\text{ATP}(1.0) > \text{ITP}(0.8) > \text{GTP}(0.7) > \text{CTP}(0.55) > \text{UTP}(0.25)$ (カッコ内は相対速度) の順である⁶⁸。このうち ATP については, 真の基質は Mg ATP であって遊離の ATP ではない⁷⁰⁻⁷²。ATP に対する Ca^{2+} -ATPase の親和性はきわめて高く, その見かけのミカエリス定数 K_m は $4 \sim 5 \mu\text{M}$ である^{70,71,73}。ヌクレオチド三リン酸以外に アセチルリン酸⁷⁴⁻⁷⁷, カルバミルリン酸⁷⁷, パラニトロフェニルリン酸⁷⁹⁻⁸¹, methylumbelliferylphosphate⁸¹, furylacryloylphosphate⁸¹⁻⁸³ も Ca^{2+} -ATPase により加水分解され Ca^{2+} を輸送することができる。ATP 以外の基質の酵素に対する親和性は ATP に比べてはるかに低く 1/10 以下である^{74,81,84,85}。

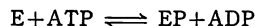
Ca^{2+} -ATPase による ATP 分解には Ca^{2+} と Mg^{2+} の両者が必要である。この酵素には少なくとも 2 種類の Ca^{2+} 結合部位が存在する。そのうち一方は Ca^{2+} に対して高い親和性 (pH 7.0 で $K=0.3 \sim 0.5 \mu\text{M}$) を示す。この高親和性 Ca^{2+} 結合部位は ATPase 1 分子に 2 個存在し, 常温では 2 個の Ca^{2+} を協同的に結合する^{21,70,71,73,86-90}。この部位に Ca^{2+} が結合すると ATPase が活性化され ATP を加水分解する。それに伴って, この部位に結合した Ca^{2+} が膜を通し輸送される。したがって, この高親和性 Ca^{2+} 結合部位は ATPase の活性化部位 (activation site) であるとともに Ca^{2+} の輸送部位 (transport site) でもある。 Ca^{2+} による ATPase の活性化の Hill 係数は約 2.0 になるが^{21,71,88}, この値は ATP 1 分子の加水分解に対し Ca^{2+} が 2 個輸送される事実と一致している。ATPase の活性化に必要な Ca^{2+} は Sr^{2+} ^{87,91} または Mn^{2+} ²³ によって置き換えることができるが, この場合は, それぞれ Sr^{2+} または Mn^{2+} が Ca^{2+} の代わりに輸送される。 Ca^{2+} -ATPase には上記の高親和性 Ca^{2+} 結合部位のほか Ca^{2+} に対して親和性の低い結合部位 ($K=1 \text{ mM}$) が存在する⁹⁰。この結合部位は高濃度 Ca^{2+} による ATPase 活性の阻害に関与している。

Mg^{2+} は, 基質 (Mg ATP) の構成要素としての役割をもつのみでなく, ATP 分解とそれに共役した Ca^{2+} 輸送のいくつかのステップで, 重要な機能を果たしている^{21,24,72,92-94}。また, K^+ も Ca^{2+} -ATPase の活性化

に関与している^{95,96}。その詳細については後述する。

V. Ca^{2+} -ATPase のリン酸化

骨格筋から分離した筋小胞体が Ca^{2+} と Mg^{2+} の存在下で $\text{ATP} \rightleftharpoons \text{ADP}$ 交換反応を触媒することは早くから知られていた^{96,97}。この交換反応は ATPase 活性と同じ Ca^{2+} 濃度依存性を示した。このような交換反応が起こることから, ATP が Ca^{2+} -ATPase を次のように可逆的にリン酸化し高エネルギー型リン酸化酵素 (EP) をつくるであろうと推定された。その後実際に Ca^{2+} に



依存して $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ から ^{32}P が酵素蛋白質に転移することが示され, ATP による酵素のリン酸化が直接証明された^{73,98-102}。

酸変性したリン酸化酵素が酸性領域で比較的安定であるのに対し, アルカリ性領域できわめて不安定であることおよびヒドロキシルアミンと反応して速やかにヒドロキサマートを作ることから, 酵素のリン酸化部位はカルボキシル基であると推定された^{73,100,101}。次に $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ でリン酸化した酵素から ^{32}P で標識されたトリペプチド [(Ser または Thr)-Asp-Lys] が分離され, アミノ酸配列が調べられた¹⁰³。最後に, リン酸化酵素のアシルリン酸結合を $[\text{H}]\text{borohydride}$ で還元分解し, さらにそれを加水分解したのから ^3H で標識されたホモセリンが分離された¹⁰⁴。これによって, Ca^{2+} -ATPase のリン酸化部位が図 3 に示したようにアスパラギン酸残基の側鎖の β -カルボキシル基であることが確定した。

Ca^{2+} -ATPase のリン酸化の Ca^{2+} 濃度依存性は ATP の加水分解や Ca^{2+} 輸送とよく一致する。またリン酸化に際し ATP から酵素蛋白質に転移するリン酸基の最大量は ATPase 1 mol 当たり約 1 mol である^{41,105}。これらの事実とリン酸化酵素の形成, 分解の速度論的解析^{21,100} から, このリン酸化酵素が Ca^{2+} -ATPase の反応中間体であることが明らかにされている。

VI. Ca^{2+} -ATPase の反応機構と Ca^{2+} 輸送

Ca^{2+} -ATPase による ATP 分解と Ca^{2+} 輸送はかた

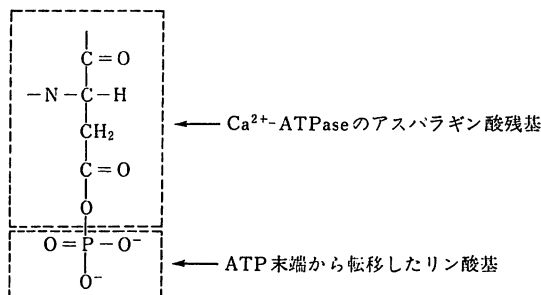


図 3. Ca^{2+} -ATPase のリン酸化酵素中間体

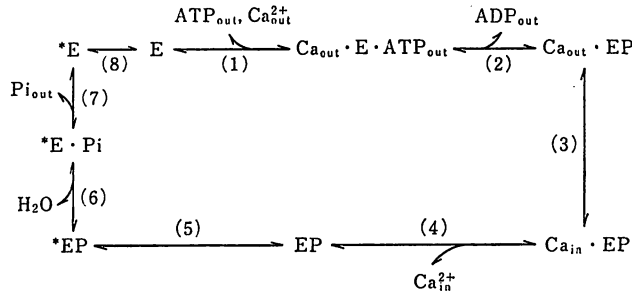


図 4. Ca²⁺-ATPase の反応機構

く共役して、ATP 分解の各素反応と Ca²⁺ 輸送の各素過程の間には厳密な対応がある。図 4 は多くの実験結果^{21,24,58,92,94,106-108}から導かれた Ca²⁺-ATPase の反応機構 (Ca²⁺ 輸送機構) である。この図式で、“out” および “in” はそれぞれ骨格筋から分離した筋小胞体の外液側 (筋形質側) と内液側をさす。すでに述べたように、常温では ATP 1 分子の加水分解によって 2 個の Ca²⁺ が輸送されるのに対し低温では 1 個の Ca²⁺ しか輸送されない^{65,66,90,107,109}、この図式では簡単にするため ATP 1 分子当たり 1 個の Ca²⁺ が輸送されるものとして表わした。以下この図式に従い反応の各ステップについて述べよう。

1. ステップ (1)

反応のはじめに外液の ATP と Ca²⁺ がそれぞれ外液に露出した酵素の特異的結合部位に結合し、酵素-基質複合体 (Ca_{out} · E · ATP_{out}) を形成する。この反応は図 5 に示したように random sequence で起こる²¹。この場合、すでに述べたように反応の真の基質は遊離の ATP ではなく Mg ATP であるが、図式には簡単にするため ATP と表示しておく。

2. ステップ (2)

酵素に結合した ATP の末端リン酸基が酵素蛋白質に

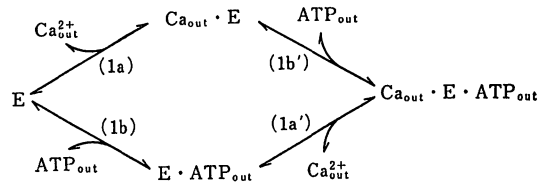


図 5. 初期反応における酵素-基質複合体の形成

転移してリン酸化酵素 (Ca_{out} · EP) を生じ、ADP を外液に遊離する²¹。この反応は可逆的で、外液に ADP を加えると Ca_{out} · EP と ADP から逆に正味の ATP 合成が起こる^{21,110}。この意味で Ca_{out} · EP は高エネルギー型であり、また ADP 感受性であるといえる。

ステップ (2) の逆反応 (ATP 合成) の基質は遊離の ADP であって Mg ADP ではない^{70,72}。正反応で酵素がリン酸化されるとき基質 (Mg ATP) に含まれる Mg²⁺ は酵素に結合したままとどまると考えられている。ステップ (2) で起こる上記の可逆的な transphosphorylation (リン酸基転移反応) は Mg ATP 由来の Mg²⁺ とは別の Mg²⁺ が直接、酵素に結合することによって著明に促進される (図 6 参照)^{72,92-94}。

酵素がこのステップでリン酸化されても、図 6 に示し

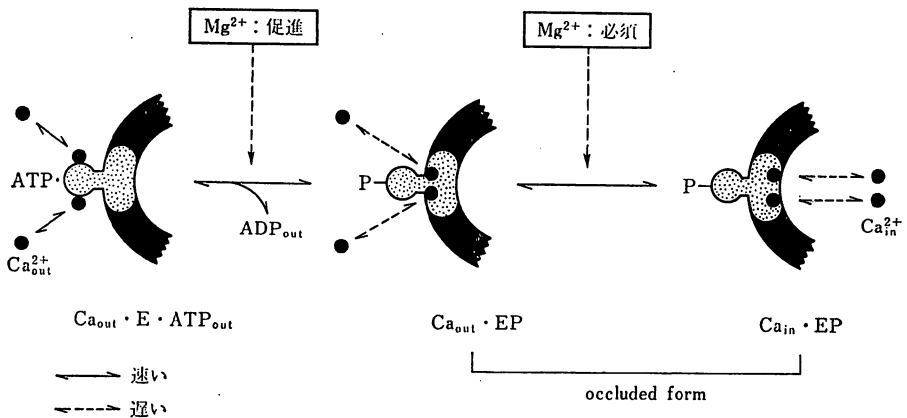


図 6. ATP による酵素のリン酸化と Ca²⁺ 転移

たように、 Ca^{2+} 結合部位はなお膜の外液側にとどまっています。内液とは遮断された状態にある^{92,94,107})。また Ca^{2+} に対する親和性も高いまま維持されている (pH 7.0 で $K=0.3 \mu\text{M}$)¹⁰⁷)。

$\text{Ca}_{\text{out}} \cdot \text{E} \cdot \text{ATP}_{\text{out}}$ から Ca^{2+} と ATP が外液に解離する速度 (ステップ (1) の逆反応) は 0.1 M KCl が存在する生理的条件下では十分速く、0°C でも ATP については 0.05 秒以内、 Ca^{2+} については 0.5 秒以内に完全に解離する^{24,92,107,111})。しかし酵素がいったんリン酸化されると、酵素から Ca^{2+} が解離する速度はいちじるしく遅くなり、0°C では完全に解離するために約 10 秒を必要とするようになる^{24,111})。この結果は酵素がステップ (2) でリン酸化されると、図 6 のように、 Ca^{2+} の結合部位が外液から部分的に遮断された状態 (occluded form) になることを示している。occluded form の形成は Ca^{2+} が膜内部を通過して輸送される一過程を表わしていると考えられる。酵素のリン酸化に伴うこのような occluded form の形成はその後いくつかの研究室でも確かめられている^{112,113})。

なお、KCl を加えない条件では、いわゆる tightly-bound ATP (酵素からきわめて緩慢に解離する ATP) をもつ酵素-基質複合体がリン酸化酵素の前駆体として存在することが最近明らかにされた¹¹⁴)。

3. ステップ (3), (4)

リン酸化酵素の Ca^{2+} 結合部位が外液側から膜の

diffusion barrier を越えて内液側に露出するためには、図 6 にみられるように、Mg ATP 由来の Mg^{2+} とは別の Mg^{2+} が酵素に直接結合しなければならない^{92,94})。外液に存在する遊離 Mg^{2+} の濃度が低くてこの結合部位に Mg^{2+} が結合できない場合は、たとえ Mg ATP を基質として用いても反応は $\text{Ca}_{\text{out}} \cdot \text{EP}$ でとどまりステップ (3) は起きない。したがってこの場合は、外液と内液の間で Ca^{2+} -ATPase を仲介とした $\text{Ca}^{2+} \rightleftharpoons \text{Ca}^{2+}$ 交換反応¹¹⁵)は生じない。しかし外液の遊離 Mg^{2+} 濃度をあげていくと、図 7 に示したように、外液と内液の間で著明な $\text{Ca}^{2+} \rightleftharpoons \text{Ca}^{2+}$ 交換反応が起こるようになる (図 6 参照)^{92,94})。これは酵素に結合した Mg^{2+} によってステップ (3) が誘起され、その結果ステップ (1) からステップ (4) に至る反応の dynamic reversal (正逆両方向の反応が同時に起こること) が起こるためである。

4. ステップ (5)

Ca^{2+} が膜の内側へ輸送されたあと (または膜の内側へ輸送されると同時に)、リン酸化酵素の Ca^{2+} 結合部位の親和性が低下し、 Ca^{2+} は内液へ切り離される。その結果、内液の遊離 Ca^{2+} 濃度は 10^{-3} M 以上に達する。 Ca^{2+} 結合部位の親和性がこのように変化することは多くの実験事実によって支持されている。たとえば、①筋小胞体を用いて逆反応による Pi と ADP からの ATP 合成や $\text{ATP} \rightleftharpoons \text{Pi}$ 交換反応をひき起こすためには、

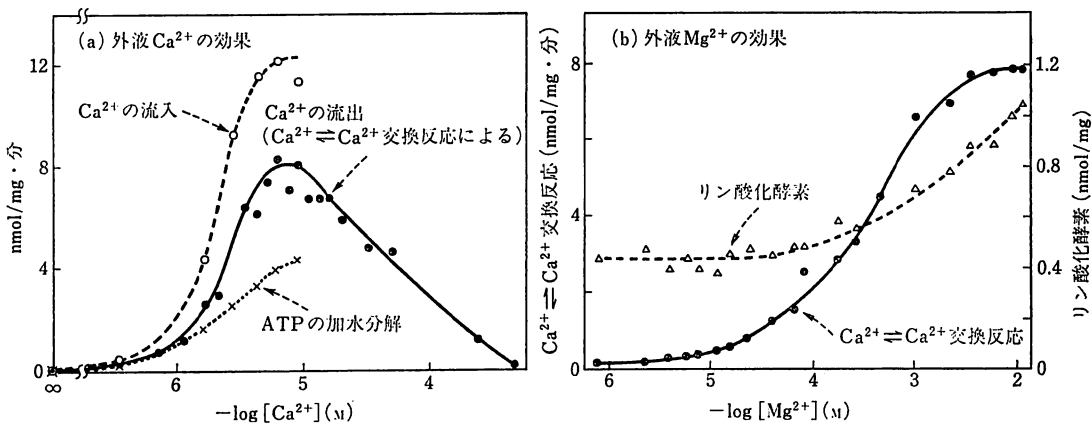


図 7. $\text{Ca}^{2+} \rightleftharpoons \text{Ca}^{2+}$ 交換反応に対する外液 Ca^{2+} と外液 Mg^{2+} の効果⁹⁴

(a) 外液 Ca^{2+} の効果、骨格筋から分離した筋小胞体に Ca^{2+} (または $^{45}\text{Ca}^{2+}$) を負荷したのち、0.1 mM ATP (または $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}] \text{ATP}$)、0.1 mM ADP、1 mM MgCl_2 、種々の濃度の CaCl_2 (または $^{45}\text{CaCl}_2$)、0.5 mM EGTA、100 mM KCl、20 mM トリス-マレイン酸緩衝液 (pH 6.5) を含む反応液 (0°C) でインキュベートした。 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 流入の速度 (○, unidirectional Ca^{2+} influx), $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 流出の速度 (●, unidirectional Ca^{2+} efflux), および Ca^{2+} 依存性 ATP 加水分解の速度 (×) を測定した。 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 流出の速度は $\text{Ca}^{2+} \rightleftharpoons \text{Ca}^{2+}$ 交換反応の速度を表わす。 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 流入の速度は $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 流出の速度と ATP 分解に共役した $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 流入の速度 (×) の和に等しい。(b) 外液 Mg^{2+} の効果、(a) とほぼ同じ条件のもとに $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 流出の速度 (●, unidirectional Ca^{2+} efflux) を種々の外液 Mg^{2+} 濃度で測定した。0.3 mM CaCl_2 、0.5 mM EGTA。同時にリン酸化酵素の定常レベル (△) を測定した。 Mg^{2+} 濃度を上げていくと、リン酸化酵素の定常レベルがほとんど上昇しないうちに $\text{Ca}^{2+} \rightleftharpoons \text{Ca}^{2+}$ 交換反応の速度は著明に増大した。これは Mg^{2+} の結合によってステップ (3) の進行が可能になるためである。

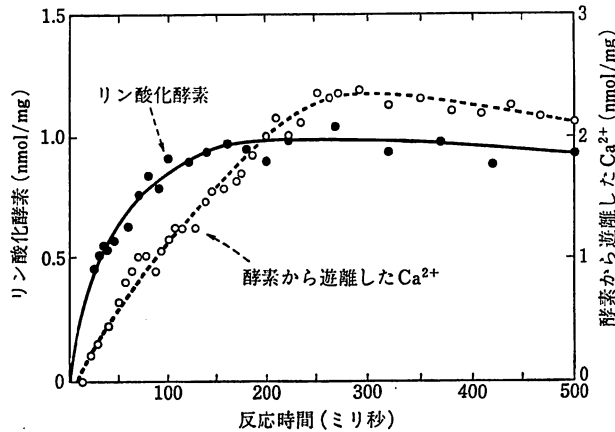


図 8. 酵素のリン酸化と酵素からの Ca^{2+} 遊離の時間経過の比較¹²¹⁾

1 mg/ml 精製 Ca^{2+} -ATPase, 1.42 μM Ca^{2+} , 5 μM ATP, 0.1 mM MgCl_2 , 100 mM KCl, pH 7.0, 22°C. Ca^{2+} 遊離の時間経過はアルゼナソ III を Ca^{2+} 指示薬として追跡した。

ステップ (4) と (5) の逆行を可能にするため小胞に高濃度 Ca^{2+} を負荷しておかなければならない^{116,117)}, ②筋小胞体に Ca^{2+} を負荷しなくてもステップ (6) と (7) の逆反応によって Pi からリン酸化酵素をつくることはできるが^{106,118,119)}, 高濃度 Ca^{2+} を負荷した筋小胞体を用いたほうがはるかに多くの酵素が Pi によってリン酸化される^{15,120)} [負荷 Ca^{2+} によってステップ (4) と (5) が右に移動するため], ③精製 Ca^{2+} -ATPase に Ca^{2+} と Mg^{2+} の存在下で ATP を加え, リン酸化酵素の生成する時間経過と酵素から Ca^{2+} の遊離する時間経過を比較すると, 図 8 に示したように, リン酸化酵素の形成が ATP 添加後ただちにはじまるのに対し, Ca^{2+} の遊離はそれよりかなりおくれて進行する [ステップ (5) に時間がかかるためリン酸化酵素から Ca^{2+} の解離がおくれることを示唆する]¹²¹⁾。

5. ステップ (6), (7)

リン酸化酵素の加水分解は Mg^{2+} によって活性化される^{21,102,122,123)}。また K^+ も加水分解に必要である⁹⁵⁾。この K^+ は Na^+ , Rb^+ , NH_4^+ , Cs^+ によって置き換えられるが, Mg^{2+} を Mn^{2+} , Zn^{2+} などの 2 価カチオンで置き換えられるか否かについては報告が一致していない^{23,124,125)}。

リン酸化酵素の加水分解を活性化する Mg^{2+} は Mg ATP (基質) に由来する Mg^{2+} とは別のもので, 直接酵素の特異的部位に結合して活性化を行なう²⁴⁾。この結合部位は筋小胞体膜の外液側に露出している²⁴⁾。また, Ca^{2+} 輸送部位とはまったく別個のものである^{24,126)}。外液に十分な濃度の Mg^{2+} が存在する場合は, リン酸化酵素の Ca^{2+} 輸送部位から Ca^{2+} が内液に解離する前にすでにこの Mg^{2+} 結合部位に Mg^{2+} が結合している²⁴⁾。

しかしこのように Mg^{2+} が結合していても, Ca^{2+} が輸送部位から内液に解離してはじめてリン酸化酵素の加水分解が起こる。つまり, 輸送部位に Ca^{2+} が結合していると, Mg^{2+} の加水分解活性化作用は抑制されて発現しない²⁴⁾。なお酵素がリン酸化されるとこの部位に結合していた Mg^{2+} は解離できない状態になる^{24,126)}。

Mg^{2+} の作用を受けて加水分解されるリン酸化酵素 (*EP) はアシルリン酸型であるにもかかわらず, 後述のようにエネルギー水準はすでに低く, 加水分解に際し自由エネルギーの放出はほとんどみられない¹¹⁹⁾。また, ADP と直接反応して ATP をつくることもできない。すなわち, 低エネルギー型で ADP 非感受性である。

6. ステップ (8)

Ca^{2+} -ATPase には Ca^{2+} に対して親和性の異なる 2 種類のコンホメーションが存在する。一方, E は Ca^{2+} に対して親和性が高く, ATP と反応して高エネルギー型リン酸化酵素 (EP) をつくる (ステップ (1)(2))。他方 *E は Ca^{2+} に対して親和性が低く, Pi と反応して低エネルギー型リン酸化酵素 (*EP) をつくる [ステップ (7) (6)]。このような 2 種類のコンホメーションが存在し相互に変換する機構 [ステップ (8)] は, $\text{Pi} \rightleftharpoons \text{H}_2\text{O}$ 交換反応 [ステップ (6) と (7) の dynamic reversal による, 後述] の Mg^{2+} による活性化が Ca^{2+} によって拮抗的に阻害される (Ca^{2+} 阻害) ことを示す実験結果からはじめて提唱された (この結果はステップ (1a) が Ca^{2+} により右に移動するため Ca^{2+} 阻害が起こることを示唆する)¹⁰⁶⁾。この機構はその後, ① $\text{Pi} \rightleftharpoons \text{H}_2\text{O}$ 交換反応の Ca^{2+} 抑制に対する NTP 効果の解析¹²⁷⁾, ② $\text{NTP} \rightleftharpoons \text{Pi}$ 交換反応の解析¹⁰⁸⁾, ③ リン酸化酵素形成の初期相の解析¹²⁸⁻¹³⁰⁾ など, 多くの実験によって支持されている。

また、*E→E 転移が ATP によっていちじるしく促進されることおよび Pi によって強く抑制されることが現在明らかとなっている^{108,127,130}。

7. 部分反応に関与する SH 基^{131,132}

Ca²⁺-ATPase の SH 基は機能的な面から 3 種類に分けられる。第 1 は Ca²⁺ 輸送や ATPase 活性に関与していないもので、この種の SH 基を *N*-エチルマレイミド (NEM) で修飾しても筋小胞体の Ca²⁺ 輸送能力や ATPase 活性は影響を受けない。第 2 の SH 基(ATPase 1 mol 当たり 1 mol) はリン酸化酵素の加水分解に関してのもので、これを NEM で修飾するとリン酸化酵素の加水分解が抑制される。しかし酵素のリン酸化は影響されない。この SH 基の NEM に対する反応性は高親和性 Ca²⁺ 結合部位に Ca²⁺ が結合すると変化する。これはこの Ca²⁺ 結合によって酵素のコンホメーションが変化することを示唆している。第 3 の SH 基(ATPase 1 mol 当たり 1 mol) は酵素のリン酸化に関与しているもので、これを NEM で修飾するとリン酸化が阻害される。

VII. Ca²⁺-ATPase による交換反応

1. ATP ⇌ ADP 交換反応

Ca²⁺-ATPase は Ca²⁺ と Mg²⁺ の存在下で ATP ⇌ ADP 交換反応^{67,96,97}および NTP ⇌ NDP 交換反応⁶⁹を触媒する。これらの反応はステップ (1) と (2) の dynamic reversal によって起こる。すでに述べたように、この交換反応の正反応の基質は Mg ATP であるが、逆反応の基質は遊離の ADP である^{70,72}。またこの交換反応は Mg ATP 由来の Mg²⁺ とは別の Mg²⁺ が直接酵素に結合することによって著明に促進される (図 6 参照)^{72,92-94}。

2. Ca²⁺ ⇌ Ca²⁺ 交換反応

Ca²⁺ を負荷した筋小胞体は、ATP (または ITP) と ADP の存在下で内液 Ca²⁺ と外液 Ca²⁺ の交換を触媒する^{92,94,115}。この Ca²⁺ ⇌ Ca²⁺ 交換反応はステップ (1)~(4) の dynamic reversal によって起こる。この反応の大部分は ADP に依存しているが、これはステップ (1) と (2) の速度がきわめて速いのに対して、Ca_{out}·EP から Ca²⁺ が直接外液へ解離する速度は比較

的遅いためである (図 6 参照)^{107,111}。この交換反応には外液の Mg²⁺ が必要である。この Mg²⁺ の役割についてはすでに図 7 で述べた。

3. Pi ⇌ H₂O 交換反応と Pi による酵素のリン酸化

Pi, Mg²⁺ および EGTA を含む反応液で筋小胞体をインキュベートすると、水の酸素原子が Pi に速やかに取り込まれる (Pi ⇌ H₂O 交換反応)¹⁰⁶。この反応はステップ (6) と (7) の dynamic reversal によって起こる^{106,127,133}。事実、Pi ⇌ H₂O 交換反応と同じ条件で、Pi による酵素のリン酸化が起こる^{106,118}。このリン酸化反応の標準自由エネルギー変化 (ΔG°) はほとんどゼロに近いが標準エントロピー変化 (ΔS°) は大きな正の値を示す^{119,134-136}。この結果は、Pi による酵素のリン酸化がエントロピーによって駆動されること、換言すれば *EP がエントロピーの増大によって熱力学的に安定化されていることを示している。

Pi ⇌ H₂O 交換反応および Pi による酵素のリン酸化はともに低濃度 (10⁻⁶ M) の Ca²⁺ によって強く抑制される^{106,119}。これはステップ (1a) で Ca²⁺ が結合するとステップ (1a) と (8) が右に移動し、その結果 Pi と反応できる *E が減少するためである。

Pi ⇌ H₂O 交換反応と Pi による酵素のリン酸化には Mg²⁺ が必要である^{106,118,119}。この Mg²⁺ は、図 9 に示したように、直接、酵素に結合してリン酸化反応を活性化する¹³⁷。またリン酸化の真の基質は遊離の Pi であって Mg·Pi ではない。この反応でリン酸化酵素 (Mg_{out}·*EP) の直接の前駆体は Mg_{out}·*E·Pi_{out} 複合体であるが、この複合体は図 9 にみられるように酵素 (*E) に外液の Pi と Mg²⁺ が random sequence で結合することにより形成される^{93,137-141}。このとき、酵素に対する Pi と Mg²⁺ の結合は相互に影響を与え、一方の結合は他方に対する酵素の親和性を増大させる¹³⁸。

4. ATP ⇌ Pi 交換反応

Ca²⁺ を負荷した筋小胞体¹¹⁶や可溶化した精製 Ca²⁺-ATPase^{16,18} は ATP ⇌ Pi 交換反応を触媒する。この反応はステップ (1)~(7) の dynamic reversal によって起こる。Ca²⁺ を負荷した筋小胞体を用いた場合は、外液の Ca²⁺ 濃度が低い (1~10 μM) ときでも交換反応が起こるが¹¹⁶、可溶化した Ca²⁺-ATPase や leaky な

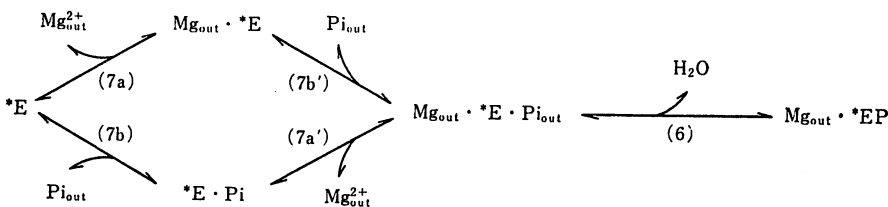


図 9. Pi による酵素のリン酸化とリン酸化の Mg²⁺ による活性化

筋小胞体を用いた場合は反応液に高濃度 Ca²⁺ (1~5 mM) の存在することが必要である^{108,142,143})。これはステップ (4) と (5) の逆行を可能にするためである。

VIII. おわりに

これまで骨格筋小胞体の Ca²⁺-ATPase の基本的性質について述べてきた。はじめにふれたように、カルモデュリンが骨格筋小胞体の Ca²⁺-ATPase に直接関与していることを示す証拠は得られていない。しかしカルモデュリンが骨格筋小胞体の機能を調節するうえでなんらかの働きをしていることを示唆する結果が最近報告されているので、それを紹介して稿を終わりたい。

骨格筋小胞体には膜蛋白質 1 mg 当たり 0.5~1.0 μg のカルモデュリンと Ca²⁺ 依存性プロテインキナーゼが膜にかたく結合した状態で存在する^{10,11})。このカルモデュリン-Ca²⁺ 依存性プロテインキナーゼ系によって筋小胞体の蛋白質のいくつかがリン酸化される。この系はカルモデュリンで飽和されていないので、カルモデュリンを加えると膜蛋白質のリン酸化レベルが著明に上昇する。しかしこれによって筋小胞体の Ca²⁺ 取り込み能力や Ca²⁺-ATPase 活性が上昇することはない¹⁰)。また Ca²⁺-ATPase はカルモデュリンのアフィニティクロマトグラフィーカラムを素通りするので、カルモデュリンと Ca²⁺-ATPase の間に直接的な結合は起きないとおもわれる。このような事実から、骨格筋小胞体では Ca²⁺ 輸送に直接カルモデュリンは関与していないと現在のところ考えられている。

他方、骨格筋小胞体による Ca²⁺ 輸送と Ca²⁺-ATPase 活性はトリフルオペラジンによって強く抑制される¹⁰)。この抑制は主に Ca²⁺-ATPase の Ca²⁺ 輸送部位 (高親和性 Ca²⁺ 結合部位) の親和性が低下することによって起こる。筋小胞体には分子量 53,000 の糖蛋白質が Ca²⁺-ATPase 1 mol 当たり約 1 mol 存在するが^{10,11,144,145})、筋小胞体の蛋白質のうちトリフルオペラジンのアフィニティクロマトグラフィーカラムと結合するのはカルモデュリンとこの糖蛋白質のみである¹⁰)。これらの事実からトリフルオペラジンによる抑制はこの糖蛋白質を介して起こると考えられている。

筋小胞体のカルモデュリン-Ca²⁺ 依存性プロテインキナーゼ系によって膜に存在する分子量 60,000 の蛋白質がリン酸化される¹¹)。筋小胞体を EGTA で洗い内在性のカルモデュリンを除くと、このリン酸化が抑えられる。同時に、筋小胞体が蓄積できる最大 Ca²⁺ 量の著明な低下が起こる。しかし至適条件でもこの蛋白質のリン酸化量は膜蛋白質 1 mg 当たりわずか 55 pmol である。この量は膜に存在する Ca²⁺-ATPase の 1/60 にすぎない。また、カルモデュリン-Ca²⁺ 依存性プロテインキ

ナーゼ系を取り除いた精製 Ca²⁺-ATPase とリボゾームから Ca²⁺ 輸送能力のある膜小胞が再構成できる。これらの結果からみて、分子量 60,000 の蛋白質のリン酸化が Ca²⁺-ATPase による Ca²⁺ 輸送の調節に直接関与しているとはおもえない。一つの可能性として、この蛋白質のカルモデュリン依存性リン酸化が筋小胞体の Ca²⁺ 放出チャンネルの機能に関係しているのではないかと推定されている¹¹)。

文 献

(文献番号を太字にしたものは特に重要な文献であることを示す)

- 1] Yamamoto, T., Takisawa, H., Tonomura, Y.: in *Current Topics in Bioenergetics* (ed. Sanadi, D. R.), IX, p.179, Academic Press Inc., New York (1979)
- 2] de Meis, L.: *The Sarcoplasmic Reticulum*, John Wiley & Sons, Inc., New York (1981)
- 3] Kirchberger, M. A., Tada, M.: *J. Biol. Chem.*, **251**, 725 (1976)
- 4] Le Peuch, C. J., Haiech, J., Demaille, J. G.: *Biochemistry*, **18**, 5150 (1979)
- 5] Gopinath, R. M., Vincenzi, F. F.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **77**, 1203 (1977)
- 6] Jarret, H. W., Penniston, J. T.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **77**, 1210 (1977)
- 7] Niggli, V., Penniston, J. T., Carafoli, E.: *J. Biol. Chem.*, **254**, 9955 (1979)
- 8] Caroni, P., Carafoli, E.: *J. Biol. Chem.*, **256**, 3263 (1981)
- 9] Kuwayama, H., Kanazawa, T.: *J. Biochem.*, **91**, 1419 (1982)
- 10] Chiesi, M., Carafoli, E.: *J. Biol. Chem.*, **257**, 984 (1982)
- 11] Campbell, K. P., MacLennan, D. H.: *J. Biol. Chem.*, **257**, 1238 (1982)
- 12] Ostwald, T. J., MacLennan, D. H.: *J. Biol. Chem.*, **249**, 974 (1974)
- 13] MacLennan, D. H., Wong, P. T. S.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **68**, 1231 (1971)
- 14] Barlogie, B., Hasselbach, W., Makinose, M.: *FEBS Lett.*, **12**, 267 (1971)
- 15] Yamada, S., Sumida, M., Tonomura, Y.: *J. Biochem.*, **72**, 1537 (1972)
- 16] Racker, E.: *J. Biol. Chem.*, **247**, 8198 (1972)
- 17] Meissner, G., Fleischer, S.: *J. Biol. Chem.*, **249**, 302 (1974)
- 18] Knowles, A. F., Racker, E.: *J. Biol. Chem.*, **250**, 3538 (1975)
- 19] Warren, G. B., Toon, P. A., Birdsall, N. J. M., Lee, A. G., Metcalfe, J. C.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **71**, 622 (1974)
- 20] Warren, G. B., Toon, P. A., Birdsall, N. J. M., Lee, A. G., Metcalfe, J. C.: *Biochemistry*, **13**, 5501 (1974)
- 21] Kanazawa, T., Yamada, S., Yamamoto, T., To-

- nomura, Y.: *J. Biochem.*, **70**, 95 (1971)
- 22) Ueno, T., Sekine, T.: *J. Biochem.*, **84**, 787 (1978)
- 23] Chiesi, M., Inesi, G.: *Biochemistry*, **19**, 2912 (1980)
- 24) Takakuwa, Y., Kanazawa, T.: *J. Biol. Chem.*, **257**, 426 (1982)
- 25) Madeira, V. M. C.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **185**, 316 (1978)
- 26) Madeira, V. M. C.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **193**, 22 (1979)
- 27) Ueno, T., Sekine, T.: *J. Biochem.*, **89**, 1247 (1981)
- 28) Ueno, T., Sekine, T.: *J. Biochem.*, **89**, 1239 (1981)
- 29] Zimniak, P., Racker, E.: *J. Biol. Chem.*, **253**, 4631 (1978)
- 30) Åkerman, K. E. O., Wolff, C. H. J.: *FEBS Lett.*, **100**, 291 (1979)
- 31) Garret, C., Brethes, D., Chevallier, J.: *FEBS Lett.*, **136**, 216 (1981)
- 32] MacLennan, D. H.: in *Methods in Enzymology* (eds. Fleischer, S., Packer, L.), **XXXII**, p. 291, Academic Press Inc., New York (1974)
- 33) Owens, K., Ruth, R. C., Weglicki, W. B.: *Biochim. Biophys. Acta*, **288**, 479 (1972)
- 34) Martonosi, A., Donley, J., Halpin, R. A.: *J. Biol. Chem.*, **243**, 61 (1968)
- 35) Fiehn, W., Hasselbach, W.: *Eur. J. Biochem.*, **13**, 510 (1970)
- 36) Knowles, A. F., Eytan, E., Racker, E.: *J. Biol. Chem.*, **251**, 5161 (1976)
- 37] Hesketh, T. R., Smith, G. A., Houslay, M. D., McGill, K. A., Birdsall, N. J. M., Metcalfe, J. C., Warren, G. B.: *Biochemistry*, **15**, 4145 (1976)
- 38) le Maire, M., Møller, J. V., Tanford, C.: *Biochemistry*, **15**, 2336 (1976)
- 39) Dean, W. L., Tanford, C.: *J. Biol. Chem.*, **252**, 3551 (1977)
- 40) Dean, W. L., Tanford, C.: *Biochemistry*, **17**, 1683 (1978)
- 41) MacLennan, D. H., Seeman, P., Iles, G. H., Yip, C. C.: *J. Biol. Chem.*, **246**, 2702 (1971)
- 42] Stewart, P. S., MacLennan, D. H., Shamoo, A. E.: *J. Biol. Chem.*, **251**, 712 (1976)
- 43) Allen, G., Green, N. M.: *FEBS Lett.*, **63**, 188 (1976)
- 44) Allen, G., Green, N. M.: *Biochem. J.*, **173**, 393 (1978)
- 45) Allen, G.: *Biochem. J.*, **187**, 545 (1980)
- 46) Allen, G.: *Biochem. J.*, **187**, 565 (1980)
- 47) Allen, G., Bottomley, R. C., Trinnaman, B. J.: *Biochem. J.*, **187**, 577 (1980)
- 48] Allen, G., Trinnaman, B. J., Green, N. M.: *Biochem. J.*, **187**, 591 (1980)
- 49) Thorley-Lawson, D. A., Green, N. M.: *Biochem. J.*, **167**, 739 (1977)
- 50) Murphy, A. J.: *Biochemistry*, **15**, 4492 (1976)
- 51] Stewart, P. S., MacLennan, D. H.: *J. Biol. Chem.*, **249**, 985 (1974)
- 52) Jilka, R. L., Martonosi, A. N., Tillack, T. W.: *J. Biol. Chem.*, **250**, 7511 (1975)
- 53) Deamer, D. W., Baskin, R. J.: *J. Cell Biol.*, **42**, 296 (1969)
- 54) Dupont, Y., Harrison, S. C., Hasselbach, W.: *Nature*, **244**, 555 (1973)
- 55) Dupont, Y., Hasselbach, W.: *Nature*, **246**, 41 (1973)
- 56) Worthington, C. R., Liu, S. C.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **157**, 573 (1973)
- 57) Hidalgo, C., Ikemoto, N.: *J. Biol. Chem.*, **252**, 8446 (1977)
- 58) Scales, D., Inesi, G.: *Biophys. J.*, **16**, 735 (1976)
- 59) Møller, J. V., Lind, K. E., Andersen, J. P.: *J. Biol. Chem.*, **255**, 1912 (1980)
- 60) Murphy, A. J.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **70**, 160 (1976)
- 61) Louis, C. F., Saunders, M. J., Holroyd, J. A.: *Biochim. Biophys. Acta*, **493**, 78 (1977)
- 62) Louis, C. F., Holroyd, J. A.: *Biochim. Biophys. Acta*, **535**, 222 (1978)
- 63) Bailin, G.: *Biochim. Biophys. Acta*, **624**, 511 (1980)
- 64) Vanderkooi, J. M., Ierokomas, A., Nakamura, H., Martonosi, A.: *Biochemistry*, **16**, 1262 (1977)
- 65] Ikemoto, N., Garcia, A. M., Kurobe, Y., Scott, T. L.: *J. Biol. Chem.*, **256**, 8593 (1981)
- 66) Ikemoto, N., Miyao, A., Kurobe, Y.: *J. Biol. Chem.*, **256**, 10809 (1981)
- 67) Hasselbach, W.: *Progr. Biophys. Mol. Biol.*, **14**, 167 (1964)
- 68) Makinose, M., The, R.: *Biochem. Z.*, **343**, 383 (1965)
- 69) Makinose, M.: *Biochem. Z.*, **345**, 80 (1966)
- 70) Meissner, G.: *Biochim. Biophys. Acta*, **298**, 906 (1973)
- 71) Vianna, A. L.: *Biochim. Biophys. Acta*, **410**, 389 (1975)
- 72] Makinose, M., Boll, W.: in *Cation Flux across Biomembranes* (eds. Mukohata, Y. and Packer, L.), p. 89, Academic Press Inc., New York (1979)
- 73) Yamamoto, T., Tonomura, Y.: *J. Biochem.*, **62**, 558 (1967)
- 74) de Meis, L.: *J. Biol. Chem.*, **244**, 3733 (1969)
- 75) de Meis, L.: *Biochim. Biophys. Acta*, **172**, 343 (1969)
- 76) Friedman, Z., Makinose, M.: *FEBS Lett.*, **11**, 69 (1970)
- 77) Pucell, A. G., Martonosi, A.: *J. Biol. Chem.*, **246**, 3389 (1971)
- 78) de Meis, L., Hasselbach, W.: *J. Biol. Chem.*,

- 246, 4759 (1971)
- 79) Inesi, G.: *Science*, **171**, 901 (1971)
- 80) Nakamura, Y., Tonomura, Y.: *J. Biochem.*, **83**, 571 (1978)
- 81) Rossi, B., Leone, F. A., Gache, C., Lazdunski, M.: *J. Biol. Chem.*, **254**, 2302 (1979)
- 82) Kurzmack, M., Inesi, G., Bernhard, S. A.: *Biophys. J.*, **25**, 109 a (1979)
- 83) Kurzmack, M., Inesi, G., Tal, N., Bernhard, S. A.: *Biochemistry*, **20**, 486 (1981)
- 84) de Meis, L., de Mello, M. C. F.: *J. Biol. Chem.*, **248**, 3691 (1973)
- 85) Verjovski-Almeida, S., Kurzmack, M., Inesi, G.: *Biochemistry*, **17**, 5006 (1978)
- 86) Makinose, M., Hasselbach, W.: *Biochem. Z.*, **343**, 360 (1965)
- 87) Weber, A., Herz, R., Reiss, I.: *Biochem. Z.*, **345**, 329 (1966)
- 88) The, R., Hasselbach, W.: *Eur. J. Biochem.*, **28**, 357 (1972)
- 89) Meissner, G., Conner, G. E., Fleischer, S.: *Biochim. Biophys. Acta*, **298**, 246 (1973)
- 90) Ikemoto, N.: *J. Biol. Chem.*, **250**, 7219 (1975)
- 91) Mermier, P., Hasselbach, W.: *Eur. J. Biochem.*, **69**, 79 (1976)
- 92) Takakuwa, Y., Kanazawa, T.: *J. Biol. Chem.*, **256**, 2696 (1981)
- 93) Hasselbach, W., Fassold, E., Migala, A., Rauch, B.: *Federation Proc.*, **40**, 2657 (1981)
- 94) Takakuwa, Y., Kanazawa, T.: *J. Biol. Chem.*, **257**, 10770 (1982)
- 95) Shigekawa, M., Pearl, L. J.: *J. Biol. Chem.*, **251**, 6947 (1976)
- 96) Ebashi, S., Lipmann, F.: *J. Cell Biol.*, **14**, 389 (1962)
- 97) Hasselbach, W., Makinose, M.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **7**, 132 (1962)
- 98) Makinose, M.: *Pflugers Arch.*, **294**, R 82 (1967)
- 99) Martonosi, A.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **29**, 753 (1967)
- 100) Yamamoto, T., Tonomura, Y.: *J. Biochem.*, **64**, 137 (1968)
- 101) Makinose, M.: *Eur. J. Biochem.*, **10**, 74 (1969)
- 102) Martonosi, A.: *J. Biol. Chem.*, **244**, 613 (1969)
- 103) Bastide, F., Meissner, G., Fleischer, S., Post, R. L.: *J. Biol. Chem.*, **248**, 8385 (1973)
- 104) Degani, C., Boyer, P. D.: *J. Biol. Chem.*, **248**, 8222 (1973)
- 105) Meissner, G., Fleischer, S.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **52**, 913 (1973)
- 106) Kanazawa, T., Boyer, P. D.: *J. Biol. Chem.*, **248**, 3163 (1973)
- 107) Takakuwa, Y., Kanazawa, T.: *J. Biol. Chem.*, **256**, 2691 (1981)
- 108) Carvalho, M. G. C., Souza, D. G., de Meis, L.: *J. Biol. Chem.*, **251**, 3629 (1976)
- 109) Sumida, M., Tonomura, Y.: *J. Biochem.*, **75**, 283 (1974)
- 110) Kanazawa, T., Yamada, S., Tonomura, Y.: *J. Biochem.*, **68**, 593 (1970)
- 111) Takakuwa, Y., Kanazawa, T.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **88**, 1209 (1979)
- 112) Takisawa, H., Makinose, M.: *Nature*, **290**, 271 (1981)
- 113) Nakamura, Y., Tonomura, Y.: *J. Biochem.*, **91**, 449 (1982)
- 114) Shigekawa, M., Kanazawa, T.: *J. Biol. Chem.*, **257**, 7657 (1982)
- 115) Makinose, M.: *FEBS Lett.*, **37**, 140 (1973)
- 116) Makinose, M.: *FEBS Lett.*, **12**, 269 (1971)
- 117) Makinose, M., Hasselbach, W.: *FEBS Lett.*, **12**, 271 (1971)
- 118) Masuda, H., de Meis, L.: *Biochemistry*, **23**, 4581 (1973)
- 119) Kanazawa, T.: *J. Biol. Chem.*, **250**, 113 (1975)
- 120) Makinose, M.: *FEBS Lett.*, **25**, 113 (1972)
- 121) Ikemoto, N.: *J. Biol. Chem.*, **251**, 7275 (1976)
- 122) Inesi, G., Maring, E., Murphy, A. J., McFarland, B. H.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **138**, 285 (1970)
- 123) Panet, R., Pick, U., Selinger, Z.: *J. Biol. Chem.*, **246**, 7349 (1971)
- 124) Martonosi, A., Feretos, R.: *J. Biol. Chem.*, **239**, 648 (1964)
- 125) Yamada, S., Tonomura, Y.: *J. Biochem.*, **72**, 417 (1972)
- 126) Garrahan, P. J., Rega, A. F., Alonso, G. L.: *Biochim. Biophys. Acta*, **448**, 121 (1976)
- 127) de Meis, L., Boyer, P. D.: *J. Biol. Chem.*, **253**, 1556 (1978)
- 128) Sumida, M., Wang, T., Mandel, F., Froehlich, J. P., Schwartz, A.: *J. Biol. Chem.*, **253**, 8772 (1978)
- 129) Takisawa, H., Tonomura, Y.: *J. Biochem.*, **83**, 1275, (1978)
- 130) Vieyra, A., Scofano, H. M., Guimaraes-motta, H., Tume, R. K., de Meis, L.: *Biochim. Biophys. Acta*, **568**, 437 (1979)
- 131) Yamada, S., Ikemoto, N.: *J. Biol. Chem.*, **253**, 6801 (1978)
- 132) Kawakita, M., Yasuoka, K., Kaziro, Y.: *J. Biochem.*, **87**, 609 (1980)
- 133) Boyer, P. D., de Meis, L., Carvalho, M. G. C., Hackney, D. D.: *Biochemistry*, **16**, 136 (1977)
- 134) Kanazawa, T., Takakuwa, Y., Katabami, F.: in *Cation Flux across Biomembranes* (eds. Mukohata, Y., Packer, L.), p.127, Academic Press Inc., New York (1979)
- 135) Martin, D. W., Tanford, C.: *Biochemistry*, **20**, 4597 (1981)

- 136) de Meis, L., Otero, A. S., Martins, O. B., Alves, E. W.: *J. Biol. Chem.*, **257**, 4993 (1982)
- 137) Kolassa, N., Punzengruber, C., Suko, J., Maki-nose, M.: *FEBS Lett.*, **108**, 495 (1979)
- 138) Punzengruber, C., Prager, R., Kolassa, N., Winkler, F., Suko, J.: *Eur. J. Biochem.*, **92**, 349 (1978)
- 139) Suko, J., Plank, B., Preis, P., Kolassa, N., Hell-mann, G., Conca, W.: *Eur. J. Biochem.*, **119**, 225 (1981)
- 140) Lacapère, J., Gingold, M. P., Champeil, P., Guillain, F.: *J. Biol. Chem.*, **256**, 2302 (1981)
- 141) Loomis, C. R., Martin, D. W., McCaslin, D. R., Tanford, C.: *Biochemistry*, **21**, 151 (1982)
- 142) de Meis, L., Carvalho, M. G. C.: *Biochemistry*, **13**, 5032 (1974)
- 143) de Meis, L., Sorenson, M. M.: *Biochemistry*, **14**, 2739 (1975)
- 144) Michalak, M., Campbell, K. P., MacLennan, D. H.: *J. Biol. Chem.*, **255**, 1317 (1980)
- 145) Campbell, K. P., MacLennan, D. H.: *J. Biol. Chem.*, **256**, 4626 (1981)

