HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Na, K-ATPase の反応機構とNa, K-ATPase をターゲットとする薬物
Author(s)	鈴木, 邦明
Citation	北海道歯学雑誌, 38(1), 16-27
Issue Date	2017-09
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/67303
Type	journal article
File Information	38_01_02_Suzuki.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

北海道歯誌　38：16−27，2017.

特　集

Na, K-ATPaseの反応機構とNa, K-ATPaseをターゲットとする薬物

Na, K-ATPase as a target of drugs and its reaction mechanism

北海道大学大学院歯学研究院　口腔病態学分野　細胞分子薬理学教室
鈴木　邦明

Na, K-ATPaseはNa-ポンプあるいはNa,K-ポンプと呼ばれる生理機能を担う酵素である．ほぼすべての動物細胞の形質膜に存在し，ATPの加水分解エネルギーを用いてNa^+とK^+の能動輸送をおこなう．その結果，細胞内外のNa^+とK^+の濃度勾配および電位差の維持を担い，細胞レベルでは細胞の容積や浸透圧の維持に関与する．特殊化した機能としては，神経や筋肉細胞の興奮性の維持，腎臓での水やNa^+の再吸収に関与する．また，Na, K-ATPaseの形成したNa^+の濃度勾配を利用して，小腸における糖やアミノ酸の吸収が行われる．その消費エネルギーは，安静時の代謝エネルギーの３割，神経系においては７割を占めるとされる．

Na-ポンプ機能の実体がNa, K-ATPaseであると認められた頃から，ATPの持つ化学エネルギーを，どのようにNa^+とK^+の能動輸送という物理的なエネルギーに変換するのか，その機構の解明がNa, K-ATPase研究の焦点の一つであり，Na, K-ATPaseの反応機構の解明が進められた．20世紀後半には，Na,K-ATPaseの反応機構はほぼ確立され，その解析に大きな貢献のあった二人の研究者の名前をとってPost-Albersの反応機構と呼ばれる．この反応機構は，ATP加水分解中にATPの末端のリン酸を結合したリン酸化反応中間体（EP）を形成するのが特徴である．この反応機構では，EPの分子構造変化を中心に据えて，ATPの加水分解による，細胞内から細胞外へのNa^+，細胞外から細胞内へのK^+の輸送，すなわちNa-ポンプ機能をきれいに説明することができる．Na, K-ATPaseはEPを形成することからP型ATPaseと呼ばれる．Post-Albersの反応機構は，同じくP型ATPaseである筋小胞体や細胞の形質膜に存在するCa -ATPase，また，胃粘膜において胃酸分泌を担うH, K-ATPaseの反応機構の解析に大きな影響を与えた．

強心配糖体であるジギタリス（digitalis）やウアバイン（ouabain）がNa-ポンプ機能を抑制することが知られていたが，これらの薬物はその実体であるNa, K-ATPase活性を抑制する．Na, K-ATPaseの研究においてはouabainを使用することが多く，ouabainはNa, K-ATPaseの特異的な阻害薬とされる．Na, K-ATPaseの反応機構の研究過程で，ouabainが不可逆的にEPに結合してNa, K-ATPase活性を抑制することが明らかにされ，強心配糖体による強心作用もNa, K-ATPase活性の抑制をもとに説明された．Na, K-ATPaseが全身の細胞に存在し重要な機能を担っているわりには，20世紀末の段階では，Na, K-ATPaseを標的とする重要な薬物は強心配糖体以外には知られていなかった．また，Na, K-ATPaseの反応機構に関する研究も終了した感があった．

しかし，21世紀に入り，ここ20年くらいの間にNa, K-ATPaseとouabainを巡って大きな研究の進展があった．それまで，Na, K-ATPaseの機能はNa^+とK^+の濃度勾配形成の結果に基づくものであったが，その機構とは別に，Na, K-ATPaseが細胞内情報伝達系に作用することが明らかになり，高血圧症や発癌との関係で新たな展開があった．また，生体内にouabainあるいは類似した物質が存在することが明らかになった．これら内在性のouabain関連物質は，ホルモンとしてNa, K-ATPase活性を調節することにより高血圧症や発癌に関与する．また，強心作用薬であるouabainは，現在では，抗がん薬としても期待されている．

本特集では，Na, K-ATPaseおよび関連する薬物の現状と，筆者らが行ってきた研究を紹介したい．

キーワード：Na, K-ATPase，Post-Albersの反応機構，リン酸化反応中間体，分子構造変化，ウアバイン，シスプラチン

〒060−8586 札幌市北区北13条西７丁目
北海道大学大学院歯学研究院　口腔病態学分野　細胞分子薬理学教室

1．Na, K-ATPaseとは

多くの動物細胞では，K^+の細胞内濃度は細胞外に比べて高く，逆にNa^+の細胞内濃度は細胞外に比べて低い．このNa^+とK^+の濃度勾配を維持する機構として，Na-ポンプあるいはNa-K-ポンプという能動輸送系の概念が提唱された．ポンプの実体の解明に関心が集まるなか，1957年にJ. C. Skouがカニ神経の細胞膜の断片を材料として，Na^+とK^+およびMg^{2+}の存在下でATPを加水分解するNa, K-ATPaseがNa-ポンプの実体であると報告した[1]．その後，Na-ポンプとNa, K-ATPaseの性質及び機能の類似性について多くの研究が積み重ねられた結果，細胞の形質膜に存在する酵素Na, K-ATPaseがATPの加水分解エネルギーを利用してNa-ポンプ機能を担うことが実証された．Na, K-ATPaseの発見者であるSkouは1997年のノーベル医学生理学賞を受賞している．

Na, K-ATPaseは高等動物細胞の形質膜に広く存在する[2]．細菌，植物，単細胞生物では確認されていなかったが，ミドリムシにNa, K-ATPase様の遺伝子が存在することが報告されている．動物の組織ではほぼすべての細胞に存在するが，脳，腎臓，筋肉などに多く，脳や腎臓はNa, K-ATPaseの精製材料として利用されている．赤血球はNa-ポンプとしてのイオンの輸送実験に使用される．また，電気ウナギの発電器官，サメの直腸腺，水鳥の塩腺などNa-ポンプ機能の活発な組織にも多い．

2．Na, K-ATPaseの生理機能[3-5)]

Na, K-ATPaseは，細胞内のATP1分子の加水分解に伴って，３分子のNa^+を細胞内から細胞外へ，２分子のK^+を細胞外から細胞内へそれぞれ濃度勾配に逆らって輸送する（図１）．その結果，細胞内外のNa^+とK^+の濃度勾配を形成するが，同時に，細胞内からの３個の正電荷の放出に対して２個の正電荷しか取り込まないので，電気的勾配（電位）も形成する．静止膜電位の形成にも関与することから起電性であるといわれる．

Na, K-ATPaseのイオン輸送によって，細胞レベルでは細胞の体積，細胞内の浸透圧とpHなどの基本的な機能が調節される．また，細胞内外のK^+の濃度勾配の維持は細胞活動にとって重要である．体内のK^+の98%は細胞内に存在して細胞の生理機能維持に関与し，細胞外液には２％しか存在しない．血漿のK^+濃度が増加すると，アドレナリン，インスリン，アルドステロンなどのホルモンがNa, K-ATPaseを活性化してK^+の細胞内への取り込みを促進し，生命の維持にとって危険な高カリウム血症を防止する．

神経や筋肉などの興奮性の細胞においては，Na^+チャネルが開き細胞外からNa^+が流入して脱分極した後，K^+チャネルが開いて細胞外へのK^+の流出がおこる．Na, K-ATPaseは，細胞内のNa^+を細胞外へくみ出し，細胞外のK^+を細胞内へ取り込むことによりNa^+とK^+の濃度勾配を回復して細胞の興奮性を維持する．

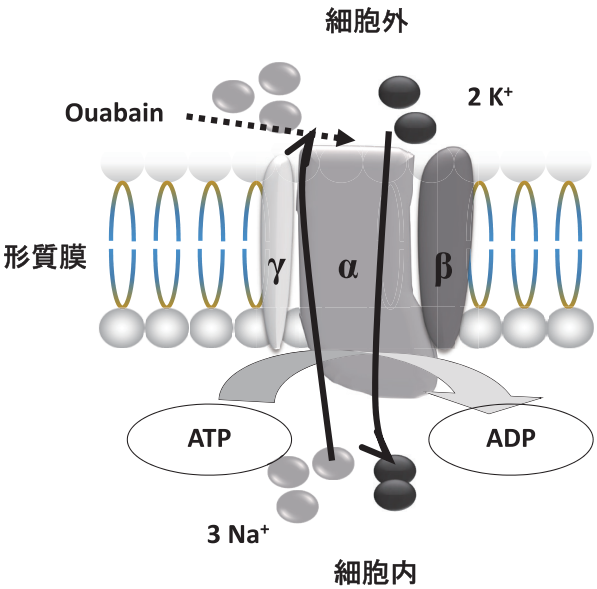


図１　Na -ポンプの実体としてのNa,K-ATPase
Na, K-ATPaseは，細胞内の１分子のATPの加水分解に共役して，３分子のNa^+を細胞内から細胞外へ，２分子のK^+を細胞外から細胞内へ，それぞれ濃度勾配に逆らって輸送する．ウアバインなどの強心配糖体は，細胞外からNa, K-ATPaseに結合して，そのATPase活性とイオン輸送を阻害する．

Na, K-ATPaseの一次能動輸送によって形成されるNa^+の濃度勾配は，種々の二次能動輸送の駆動力を提供する．小腸の絨毛上皮細胞によるグルコースやガラクトース，一部のアミノ酸などの吸収は，小腸管腔からのNa^+の流入に伴う共輸送であり，上皮細胞の外側基底膜に存在するNa, K-ATPaseが形成するNa^+の濃度勾配を利用する．腎臓においても尿中のNa^+やアミノ酸の再吸収に必要なNa^+の濃度勾配を形成し，水の再吸収を促進する．

Na, K-ATPaseは以上のような重要な生体機能の維持に関与しており，静止状態の動物では，その消費エネルギーは安静時の代謝エネルギーの３割を占め，神経系においては７割を占めるとされる．

Na, K-ATPaseは骨芽細胞や破骨細胞にも存在するが，硬組織代謝に直接関連する報告は少ない[6)]．細胞の基本的な機能の維持に必要だと推測される．

20世紀末までのNa, K-ATPaseの機能に関する理解は，上記のイオン輸送の結果を基にする機能であったが，この20年で細胞内の情報伝達系を介した機能が注目されており，後述する．

3．Na, K-ATPaseの構造[2-5, 7)]

Na, K-ATPaseはα（分子量約100-112 kD），β（35 kD，糖タンパク質としては45-55 kD）およびFXYDタンパク質（6.5-10 kD以下）の３種類のサブユニットから構成されて

いる．

触媒サブユニットであるα鎖は，イオン結合部位を持ち10回形質膜を貫通する．ATP結合部位とリン酸化部位（EP形成部位）は細胞質側に存在する．一方，digitalisやouabainなどの強心配糖体は，細胞の外側から結合してATPase活性とイオン輸送を抑制する．αサブユニットは，腎臓をはじめ広範な組織に存在するα1，骨格筋や脳に多いα2，脳に多いα3，さらに精巣に多いα4の少なくとも４種のアイソフォームが知られている．互いに85％以上のホモロジーを示すが，ouabainに対する感受性などが異なる．げっ歯類のα1はouabainに低感受性であり，α2と3は高感受性である．しかし，ウサギ，ブタ，イヌ，ヒトのα1は比較的ouabain感受性である．αサブユニットのouabainの結合部位は保存されている．後述するように，生体内にはouabain様の物質が存在することから，生理的な機能を担っていると考えられる．

調節サブユニットであるβ鎖は糖タンパク質であり，１本の膜貫通ヘリックスを持つ．Na, K-ATPaseの形質膜への組み込みに関与するとされ，輸送活性に必須と考えられているが，詳細は不明な点が多い．βサブユニットもβ1からβ3の３種のアイソフォームが知られている．

ゲル電気泳動などの結果から，Na, K-ATPaseには，分子量数千の小さなサブユニットが存在すると報告され，γサブユニットと呼ばれていたが，Na, K-ATPaseの精製が困難であったこともあり，長くその存在は確定されなかった．しかし，20年くらい前から，γサブユニットに類似したタンパク質が７種存在することが明らかにされ，共通構造をもとにFXYDタンパク質ファミリーと名付けられた[8]．FXYD1-7のうち，FXYD2がγサブユニットに相当することも明らかになった．FXYD1-7は形質膜を１回貫通するタンパク質である．αおよびβサブユニットとの存在比率などまだ不明な点が多いが，FXYD1-7は組織特異的にNa, K-ATPase活性を調節していることが明らかになった．

Na, K-ATPaseを構成する各サブユニットの形質膜中での機能単位には多くの議論がある．αおよびβサブユニットの存在比が１：１であることは確定しているが，$\alpha\beta$プロトマーが最小単位であるとする説から，$(\alpha\beta)_2$さらには$(\alpha\beta)_4$説などがある[9]．

Na, K-ATPaseは，筋小胞体あるいは形質膜に存在するCa -ATPaseや，胃粘膜に存在して胃酸分泌に関わるH, K-ATPaseなどと一次構造の相同性が高く，いずれもATPの加水分解過程でリン酸化反応中間体（EP）を形成するため，P型ATPaseと呼ばれている[6]．

４．Na, K-ATPaseの反応機構[1-7]

Na-ポンプの実体をNa, K-ATPaseとするSkouの報告[1]のあと，酵素であるNa, K-ATPaseが，どのようにATPの加水分解に共役してNa^+とK^+の輸送をおこなうのかに関心が集まり，その反応機構に関して多くの研究が積み重ねられた．現在では，ATPの加水分解の過程でリン酸化反応中間体（EP）を形成するPost-Albersの反応機構で説明される（図２）[10, 11]．

酵素はATPの加水分解に伴うNa^+とK^+の輸送の過程で，その分子構造とNa^+とK^+に対する親和性を変化させる．Na^+あるいはATPと親和性の高い状態をE1，K^+あるいは無機リンと親和性の高い状態をE2と表記している．また，括弧内に書かれたNaやKは，形質膜を通過する輸送の過程で，形質膜内に取り込まれて外液とは容易には交換できない（occluded）状態であることを示している．なお，ATPase活性にはMg^{2+}の存在が不可欠であるが，反応中間体に対するMg^{2+}の結合や解離の段階が明らかではないため，Mg^{2+}は反応機構に記載しないのが一般的である．

反応の前半ではNa^+が中心でありEPが形成される．まず細胞内において，Mg^{2+}存在下でATPと３分子のNa^+がNa, K-ATPase（E）に結合する．ATPが加水分解されると，生じたADPは細胞内に遊離され，Na, K-ATPaseのアスパラギン酸残基の側鎖にATPのγ位のリン酸が結合したEPが形成される．EP形成実験ではATPに対する親和性は高く，数十μMのATPで飽和する．EPは少なくとも２種類存在し，最初に，Na^+を結合しておりADPと反応してATPを合成しうるE1Pが形成される．E1Pから細胞外にNa^+が

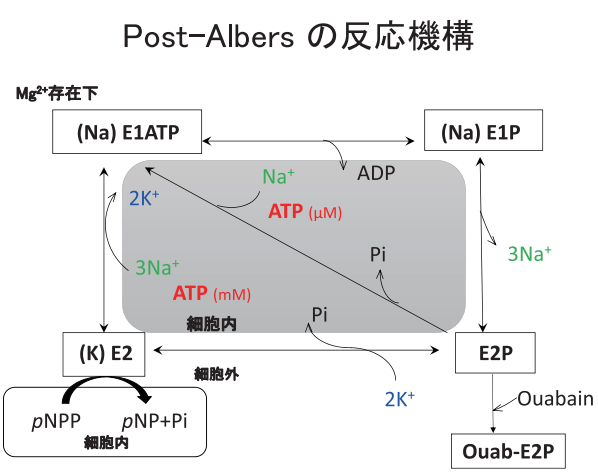


図２　Na,K-ATPaseの反応機構（Post-Albersの反応機構）
Na, K-ATPaseは，Mg^{2+}存在下で細胞内のNa^+とATPを結合した後，ATPのγ位のリン酸を結合したリン酸化酵素EPを形成し，ADPを細胞内に遊離する．まず，ADPと反応してATPを合成しうるE1Pが形成される．E1Pが分子構造変化を伴ってNa^+を細胞外に遊離すると，E2PとなりADPとの反応性を失う．E2Pに細胞外からK^+が結合すると脱リン酸化が促進され，生じたK^+結合酵素（(K)E2）から，ATPとNa^+の結合によってK^+が遊離すると新たなサイクルが始まる．この反応サイクルにより，細胞内のATPの加水分解に共役した，細胞内から細胞外へのNa^+と，細胞外から細胞内へのK^+の輸送を説明することが出来る．ウアバイン（ouabain）はE2Pに結合して安定化し，脱リン酸化を阻害するので，結果としてNa, K-ATPase活性は抑制される．

遊離すると，もはやADPとは反応できないE2Pとなる．E1PとE2PはそのADPやK^+に対する反応性と分子構造が異なるだけで，リン酸化されている部位は同じである．

反応の後半ではK^+が中心である．細胞の外側からE2Pに結合して脱リン酸化を促進し，生じた無機リンは細胞内に遊離される．K^+結合酵素（(K)E2）からK^+を細胞内に遊離すると新たな反応サイクルに入るが，(K)E2からのK^+の遊離を促進するATPは低親和性であり数mMの濃度を必要とする．

Na, K-ATPaseによるATP加水分解活性はNa^+とK^+の両者が適当な比率で存在する時に最大となり，Na^+とK^+の濃度比に依存している．K^+が存在しない場合には，図２の対角線で示したようにE2Pのゆっくりした自然加水分解が起こり，無機リンを遊離する．この活性はNa, K-ATPaseの示す部分反応であり，Na-ATPase活性と呼ばれる．強心配糖体のouabainはE2Pに親和性が高く，結合するとE2Pを安定化して脱リン酸化を阻害し，結果としてATPase活性を抑制する．

Post-Albersの反応機構はNa, K-ATPaseあるいはNa-ポンプに関するほとんどの実験結果と一致し，細胞内のATPの加水分解に伴って，細胞内のNa^+を細胞外へ，細胞外のK^+を細胞内へ輸送するNa-ポンプの機能を説明することができる．Post-Albersの反応機構は，Na, K-ATPaseばかりでなく，H, K-ATPaseや筋小胞体および形質膜のCa-ATPaseなど，他のP型ATPaseの反応機構の研究にも大きな影響を与えた．しかし、実際にNa^+やK^+が形質膜を隔てて輸送されるときのNa,K-ATPaseの具体的な構造変化については，この頃はほとんどわかっていなかった．

５．ATP加水分解中の分子構造変化の検出

Post-Albersの反応機構は，Na, K-ATPaseがATPの加水分解を行ってEPを形成し，Na^+とK^+を順次結合して輸送する過程で，Na, K-ATPaseの分子構造が変化することを意味する．ATPの持つ化学エネルギーを，どのようにNa^+やK^+の輸送という物理的なエネルギーに変換するのかを明らかにするためには，分子構造変化を検出する必要があると考えられた．しかし分子構造変化を電子顕微鏡などで見ることはできず，形質膜結合酵素に対するX線結晶構造解析の技術もなかった．そのような状況で分子構造変化を検出しようとする様々な試みがなされた．

Na, K-ATPase精製の大家であるJorgensenは，当時最も純度が高いとされる精製酵素を使用して，Na^+あるいはK^+存在下でトリプシンによる切断を行った[12]．トリプシンによる切断の時間経過と，生じたペプチドの大きさをSDSゲル電気泳動により解析したところ，Na^+あるいはK^+存在下で，ペプチドの大きさとペプチドが生じる時間経過が異なることを見いだした．この結果を，JorgensenはNa^+結合酵素（NaE1）とK^+結合酵素（KE2）の分子構造の相違に基づくと説明した．Karlishらは，Na, K-ATPaseタンパク質のトリプトファンの蛍光強度変化から分子構造変化を検出して報告した[13]．この当時，同様の研究は多数行われた．しかし，ATPase反応中の“生きて動く酵素”の分子構造変化を十分に検出可能な実験系は存在しなかった．

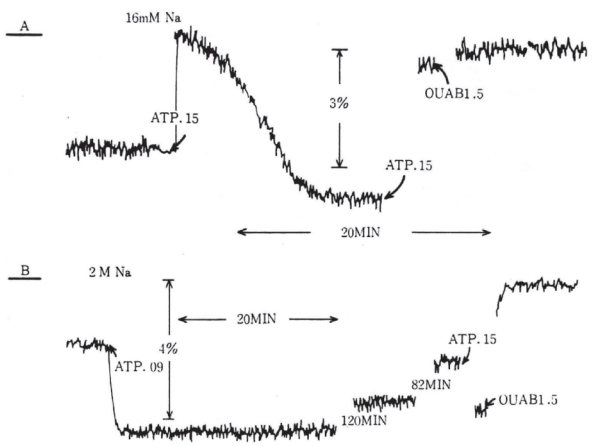
筆者らは，Na, K-ATPaseのシステインに，蛍光性のSH試薬であるN-[p-(2-benzimidazolyl)-phenyl]maleimide（BIPM）を結合させ，分子構造変化に伴うBIPM周囲の環境変化を観察して，ATP加水分解中の構造変化を解析することを試みた．BIPMの蛍光強度は疎水性の環境では増加し，親水性の環境では低下するので，BIPMが結合したシステイン残基周辺の疎水性の変化を指標に，Na, K-ATPaseの分子構造変化を検出する計画であった．

まず，ブタ腎臓から精製したNa, K-ATPaseに，ATPase活性を保持した状態でBIPMを結合させることを試みた．実験は単純で，条件を少しずつ変えながらNa, K-ATPaseとBIPMをインキュベーションしたのちに，Na, K-ATPaseを回収する．Na, K-ATPase活性を測定し，活性が残っていたら結合したBIPMの蛍光強度を測定して，NaClあるいはKClの添加による変化を調べるものである．実験を繰り返したが，不成功の連続であり，そろそろ方針転換しようかと考えていた頃に，Na^+とK^+に依存した蛍光強度の変化を見いだしたときの喜びは忘れようがない．結局は，これがすべてであった．筆者らは“生きて動くBIPMでラベルしたNa, K-ATPase”を手に入れた[14]．このNa, K-ATPaseを使用して一連の研究を行った．

はじめに，Na, K-ATPaseによるイオン輸送過程の，反応中間体の分子構造変化を蛍光強度の変化をもとに検出することを試みた．Post-Albersの反応機構が正しければ，Na^+を添加することによりNaE1，K^+を添加することによりKE2，Mg^{2+}非存在下でNa^+とATPを添加するとNaE1・ATP，そこでMg^{2+}を添加すると，高濃度のNa^+存在下ではE1P，低濃度のNa^+存在下ではE2Pが形成されると予想され，E2Pにouabainを添加するとouabain結合E2Pが形成されるはずである．そこで，Na^+，K^+，Mg^{2+}，ATPおよびouabainを，濃度と組み合わせを変えて添加したさいの蛍光強度の変化と，ATPase活性の測定，およびEP形成実験を組み合わせて，それぞれの反応中間体の相対的な蛍光強度を決定することができた[15]．EP形成量は放射性のγ-^{32}P-ATPを用いて^{32}P-EPを形成し，^{32}Pの放出するβ線量を液体シンチレーションカウンターで測定する方法で決定した．また，^{32}P-EPのADPあるいはK^+に対する反応性から，E1PあるいはE2Pと，形成されているEPの種類を決定した．筆者らのBIPM- Na, K-ATPaseの最大の利点は“生きている”ということである．ATPを添加してE2Pが形成されると蛍光強度が上がり，ATPの消費に伴ってE2P量が減少すると蛍光強度も低下した．そこで再びATPを添加するとE2Pが形成され，さらに阻害薬のouabainを添加

するとATPase反応が停止して，蛍光強度変化も停止するのを見たときは感動した（図３）．EPへのouabainの結合量は，^{3}Hラベルしたouabainを使用して決定した．このような実験から，筆者らはPost-Albersの反応機構のほぼすべての反応中間体の動的な変化を蛍光測定によって解析することができた[15-17]．また，すべての実験結果は，Post-Albersの反応機構で説明することができた．

上記の実験は，反応中間体を独立して検出する定常状態での実験であった．そこで，Na, K-ATPase反応が，Post-Albersの反応機構が示すE1Pの形成，分子構造変化によるE2Pへの転換，そして脱リン酸化による無機リンの放出と，連続して進行することを明らかにするための実験を計画した．蛍光強度変化と放射性同位元素でラベルしたEP量の変化を，10 m秒単位の時間レベルで測定する装置の作成を依頼して，実験を行った．その結果，Na, K-ATPase反応が，２種類のEPであるE1PとE2Pを経由して進行するという機構を直接証明した[18-20]．



E2P(A)とE1P(B)形成，およびATP消費に伴う蛍光強度変化

図３ E2PおよびE1Pの形成と分解に伴う蛍光強度変化

蛍光性のSH試薬であるBIPMでラベルしたNa, K-ATPaseを使用して，313 nmの波長の光でBIPMを励起し，363 nmの蛍光の経時変化を記録した．

（A）ATPの添加によりE2Pが形成されて蛍光強度が増加したのち，ATPの消費に伴って蛍光強度は減少し，ADPの結合した低い蛍光強度の中間体を形成して一定になる．再びATPを添加すると，E2Pが形成されて蛍光は増加するが，直後にouabainを添加するとouabain-E2Pが形成されてATPase活性は停止し，ATPの消費にともなう蛍光強度変化も停止した．（B）2Mの高濃度Na^{+}存在下では，E1PからE2Pへの転換が律速段階となり，ATPの添加によって低い蛍光強度のE1Pが形成される．ATPの消費にも長時間を要するが，ouabainの添加によって高い蛍光強度のouabain-E2Pが形成され，ATPase活性も停止した．

筆者らはBIPMを313 nmの波長で励起し，365 nmの蛍光を測定して上記の実験を行ったが，313 nmで励起して，同じ313 nmの散乱光を測定しても分子構造変化の情報を得られることに気づいた．そこで，Na, K-ATPaseの分子構造変化を光散乱の変化から検出する系を開発し，測定を分単位の定常状態と10 m秒単位の迅速反応の系で行った。その結果，２種類のEPのうち最初に出現するE1Pは従来１種類の分子と考えられていたが，３種の異なった状態で順次出現すること，抗生物質であるオリゴマイシンがその過程を抑制することを明らかにした[21]．

Post-Albers の反応機構では，EP形成は数十μMのATPで飽和し，(K)E2からのK^{+}の遊離にはmMのATPを必要とするので，見かけ上２種類のATP結合部位が存在することになる．これらATP結合部位が，触媒部位および調節部位のATP結合として独立して存在するのか，高濃度でK^{+}を遊離したあとATPはそのまま活性中心に結合してEP形成に使われるのかについて，Post-Albersの反応機構では説明がされていなかった．そこで筆者らは，蛍光強度変化から検出される反応中間体と，EP形成量およびNa, K-ATPase活性に対する，ATP，ADPおよびATPアナログであるAMP-PNPの効果を検討した．その結果，ATPの結合部位は同時に２か所存在し，高親和性部位にはATPのみが結合すること，低親和性のK^{+}の遊離を促進する部位においては，ADPやATPアナログであるAMP-PNPでもATPの機能を代行しうることを明らかにした[22, 23]．

筆者らの一連の研究の結論は，Na, K-ATPaseのATP加水分解およびNa^{+}とK^{+}の輸送は，Post-Albersの反応機構が包含するNa, K-ATPaseの分子構造変化とNa^{+}とK^{+}に対する親和性の変化により進行するということであった．しかし，形質膜を通過するNa^{+}とK^{+}の通路に関しては，情報を得ることはできなかった．

その後，2000年にNa, K-ATPaseと同じP型ATPaseであるCa-ATPaseのX線結晶構造解析がなされた．結晶化の困難であるNa, K-ATPaseの最初の構造解析の結果は2009年に報告され，その後数年でPost-Albersの反応機構に登場するほぼすべての反応中間体の結晶化と構造解析が行われて，現在に至っている[24-26]．

６．Na, K-ATPase活性（Na-ポンプ機能）の調節

１）イオンによる調節

Na, K-ATPaseがNa-ポンプの実体であると報告したSkouの論文では，ATPase活性の測定において，Na^{+}あるいはK^{+}の一方の濃度を増加すると，もう一方の濃度も増加しないと活性はむしろ低下する，つまり，最大活性を得るにはNa^{+}とK^{+}の量比が重要であることを示している[1]．この結果は，形質膜に存在するNa, K-ATPase 活性は，細胞内外のNa^{+}とK^{+}の量比によって調節されることを示唆する．また，Na, K-ATPase活性にとって，Na^{+}の存在は不可欠であるが，K^{+}についてはCs^{+}，Rb^{+}などの同族イオンでも代替可能であることが明らかになっている[3]ので，これらのイオンも活性調節に関与する．さらに，エネルギー源である細胞内のATP濃度や，その加水分解産物であるADP濃度によっても調節される．

筆者がPost研究室に留学した頃，Postは，Na, K-ATPaseは輸送イオンであるNa^+，K^+，Cs^+，Rb^+だけでなく，他の種々の陽・陰イオンによっても活性が調節されると考えていた．

上述のように，Post-Albersの反応機構において，E1PとE2Pはその核心に位置する．それまで，E1PとE2Pの平衡と形成・分解速度には，主にNa^+およびK^+が影響すると考えられていたので，筆者らはNa, K-ATPase活性およびE1PとE2Pの平衡と形成・分解速度に対する種々の陽・陰イオンの影響を検討した．その結果，ほぼすべての陽，陰イオンがE1PとE2Pの平衡と形成・分解速度に影響し，その強さはHofmeisterの系列の順序に従うことを明らかにした．また，ATPase反応におけるNa^+の新たな役割を発見した[27-29]．

2）リン酸化・脱リン酸化による調節

プロテインキナーゼとホスファターゼによる，セリン，スレオニン，チロシンなどのリン酸化と脱リン酸化による酵素活性の調節機構はよく知られている．Na, K-ATPase活性の調節においても，プロテインキナーゼA，プロテインキナーゼCなどのリン酸化によりATPase活性，ポンプ機能，さらには細胞内での存在状態が変化するという報告がある[2]．

El-Beialyらは，Na, K-ATPase活性，α-およびβ-サブユニットのチロシンリン酸化レベルに対する，チロシンホスファターゼ阻害薬の作用を検討して，Na, K-ATPase活性はα-サブユニットのチロシンリン酸化によって調節されることを報告した[30]．

3）カテコラミンやホルモンによる調節

アドレナリン，ドパミン，インスリン，アルドステロンなどのカテコラミンやホルモンが，Na, K-ATPaseの調節に与することが知られている．アルドステロンは，腎臓尿細管細胞の基底側に存在するNa, K-ATPaseタンパク質量を増加し，ATPの合成量も増加するので，Na, K-ATPase活性が亢進する．その結果，尿細管細胞内のNa^+濃度が低下するので，尿中のNa^+再吸収が促進され，尿量が減少して血圧は上昇する．従って，Na, K-ATPaseは，アルドステロン拮抗作用を持つスピロノラクトンなどの利尿薬の作用点のひとつである．

4）内因性のouabain様物質による調節[31-33]

Digitalisをはじめ強心配糖体は植物を起源とするものが多い．動物細胞のNa, K-ATPaseが，どうして植物由来の物質によって特異的に阻害されるのかに大きな関心が寄せられていた．動物の生体内にはouabainやdigitalis様物質が存在するのではないかと推測され，Skouの論文[1]以来，長年にわたって研究されてきたが見つけられなかった．しかし，ここ20年くらいの間に，内因性のouabain様物質の存在が相次いで報告された．

Na, K-ATPaseのouabain結合部位は高度に保存されていることから，生体内のouabain様の物質は生理的な機能を担っていると考えられる．その血中量は塩分摂取量，アドレナリンや活性型アンジオテンシンなどによって調節されることも明らかになった．またNa, K-ATPase活性を調節するだけでなく、ホルモン様作用を示すことも明らかになってきた．機能としては，細胞増殖，心筋収縮力，ナトリウム尿，血管の緊張性，血圧の維持などに関与するとされ，高血圧との関連が注目されている．Lingrelは，強心作用の発現と同様に，生体内のouabain様物質によってNa, K-ATPase活性が抑制されると，Na/Ca交換系により細胞内Ca濃度が上昇して，血管が収縮し血圧が上がると推測している[32]．

7．Na, K-ATPaseと疾患

1）細胞内情報伝達系に対する作用と疾患

20年くらい前までは，Na, K-ATPaseの生理機能は，イオン輸送の結果に基づく機能がほとんどであった．Na, K-ATPaseと細胞内情報伝達系の関連については報告が少なかったが，次第に，Na, K-ATPaseとプロテインキナーゼ，MAPキナーゼおよびCa^{2+}シグナルなどの細胞内情報伝達系との関連を示す報告も増えてきた．Na, K-ATPaseとアポトーシス，ネクローシスなど，細胞死の形態に関する報告も増加している[33]．

Na, K-ATPaseの細胞に対する普遍的な機能，あるいは個々の器官での分化した多彩な機能を考えると，今後Na, K-ATPaseの関与する疾患についても報告が増え，薬物のターゲットとしても新たな展開があるのではないかと予想される．

2）腫瘍化とNa, K-ATPase

正常細胞と比較して，種々の腫瘍化した細胞ではNa, K-ATPaseのサブユニット発現が変化するという報告や，癌組織の種類によって過剰発現してくるNa, K-ATPaseのサブユニットの種類が異なるという報告がある．さらに，腫瘍化に伴ってNa, K-ATPase活性の増加あるいは減少が起こるという報告もある．内因性のdigitalis様物質の代謝やNa, K-ATPaseとの相関の変化が，癌の進展にも影響すると考えられるようになってきているが，まだ不明な点も多い．

8．Na, K-ATPaseに対する薬物の作用

1）強心配糖体（強心ステロイド）

(1)　強心作用薬としての強心配糖体

Na, K-ATPaseに対する薬物の作用では，最も重要でよく知られているのはdigitalisなどの強心配糖体である．Digitalis

は，イギリスでは，300年も前からうっ血性心不全の症状としてのむくみの特効薬として使用されていた．作用機構はずっと不明であったが，1940年頃には，Na-ポンプ機能を抑制することはわかっていた．さらに，Na-ポンプの実体がNa, K-ATPaseであることが明らかになると，ouabainなどの強心配糖体はNa, K-ATPaseの特異的な阻害薬であると呼ばれることになった．

強心配糖体は，うっ血性心不全および心房性不整脈の治療薬として臨床的に重要である．現在では，心筋の収縮力を増強する作用機序は，以下のように考えられている．強心配糖体がNa, K-ATPase活性を抑制すると，細胞内のNa^+濃度が上昇して細胞内外のNa^+の濃度勾配が小さくなる．その結果，Na^+の濃度勾配を利用してCa^{2+}を細胞外に輸送する，Na/Ca交換系によるCa^{2+}の排出が減少する．細胞内のCa^{2+}濃度が上昇して，心筋の収縮力が増大すると考えられている．Digitalisは心不全などの治療に使用されるが，安全域の極めて狭い薬物である．治療時の濃度では30％程度のNa, K-ATPase活性が抑制され，中毒症状の発現には60％以上の活性が抑制されると推測されている．

強心配糖体は多くの植物に含まれる．日本の植物で身近なところでは，ジギタリス，福寿草，スズランなどがあり，美しい花が多いが，見方を変えると有毒植物である．動物では，シナヒキガエルの皮脂腺に含まれるbufadienolidesがあり，漢方薬のセンソの成分である．BufadienolidesのNa, K-ATPase活性に対する報告は少ないので，現在，筆者の教室の中国からの大学院生である李が，研究を行っている．Bufadienolidesに属する，bufalin, cinobufalinおよびcinobufotalinはいずれもNa, K-ATPase活性を抑制し，bufalinの作用はouabainより強いことがわかっている．結果を学位論文として，公表予定である．

(2) 抗癌剤としての強心配糖体[34, 35]

比較的最近，疫学的な調査により，癌患者であって心不全の治療も受けている患者の死亡率が低いことが明らかになり，強心配糖体の抗がん剤としての使用に関心が向けられた．強心配糖体は，正常細胞に対しては作用しないか増殖を促進することもあるが，腫瘍細胞に対しては活性酸素の生成により選択的に細胞死を起こすという報告がある．また，Na, K-ATPase と腫瘍化との関連を示唆する報告もあることから，Na, K-ATPaseが抗がん剤のターゲットになりうるのではないかという推測もあるが，統一的な見解とはなっていない．

強心配糖体は安全域が狭いことが問題である．抗癌剤としての強心配糖体を考える際には，心臓に対する細胞毒性が低く，特異的なNa, K-ATPase阻害作用を示す薬物の開発が必要である．サブユニット特異的な強心作用薬あるいはNa, K-ATPase阻害薬を開発できると，抗がん剤として有用な可能性がある．

2）抗癌剤

(1) シスプラチン（cisplatin）[36-39]

Na, K-ATPaseによって形成されるNa^+の濃度勾配は，薬物の細胞内への取り込み，あるいは排出にも関与すると考えられている．白金系抗癌剤cisplatinの細胞内への取り込みあるいは排出能力とNa, K-ATPaseとの関係については，cisplatin耐性と抗癌作用の関連からも研究対象とされ，多くの報告があるが，結果は一致しない点も多い．

また，cisplatinは核内でDNAと結合することにより抗癌作用を発揮すると考えられるが，タンパク質のチオール基と結合してその機能に影響を与える作用もあり，強い副作用にも関連すると考えられる．Na, K-ATPaseはcisplatinの細胞内取り込みに関与すると同時に，cisplatinによって活性が抑制される．Cisplatinの投与量の重要な規制因子に腎毒性がある．Na, K-ATPaseは腎臓においてNa^+および水の再吸収に関与し，存在量も多いことから，cisplatinの腎毒性は，Na, K-ATPaseの阻害が原因である可能性もある．このような背景から，筆者らはNa, K-ATPaseに対するcisplatinの作用を詳細に検討した．

Sakakibaraらは培養歯肉癌細胞から，Zunaidらはウサギの脳からNa, K-ATPaseを精製してcisplatinの作用を詳細に調べた[40, 41]．その結果，cisplatinは作用時間とその濃度の両方に依存して，リン酸化反応中間体（EP）の形成を阻害することによってNa, K-ATPase活性を阻害した．またその阻害は，臨床的にも腎毒性の軽減に使用されているチオール化合物によって低下することを明らかにした．

さらに，Kitadaらは，白金系抗がん剤と腎毒性について検討することを目的に，ブタ腎臓から精製したNa, K-ATPaseとヒト由来近位尿細管細胞に対するcisplatin，ネダプラチン（nedaplatin）およびカルボプラチン（carboplatin）の作用を検討した[42]．その結果，白金系抗がん剤はNa, K-ATPaseを抑制し，細胞死を引き起こした．その作用の強さは，cisplatinが一番強く，nedaplatin，carboplatinの順であった．また，cisplatinの作用は，チオール化合物の共存によって軽減された．

Zunaidらは，cisplatinに対する感受性の異なる６種類の口腔扁平上皮癌細胞を用いて，細胞内へのcisplatin取り込み速度と，細胞からの排出速度，Na, K-ATPase活性およびCu-ATPase活性を比較した[43]．また，ウエスタンブロットによりNa, K-ATPaseのα-およびβ-サブユニット，P-糖タンパク質，およびCu-ATPaseタンパク質であるATP7AとATP7Bの発現量を比較した．その結果，cisplatinに最も感受性の高い細胞は，Na, K-ATPaseタンパク質の発現が多く，活性も高いこと，cisplatinの排出速度には他の細胞と顕著な差は見られないが，取り込み量が多いことを明らかにした．また，Na, K-ATPaseの阻害薬であるouabainの存在下では，cisplatinの取り込み量が低下することを確かめた．これらの結果から，用いた口腔扁平上皮癌細胞では，

Na,K-ATPaseがcisplatinの取り込み量と細胞のcisplatin感受性に関与していると結論した．

(2)　Cisplatinとouabain

Cisplatinに対する耐性の形成は，cisplatin療法において大きな障害となる．義達らは[44]，cisplatinの濃度を順次上げながら生存細胞を選択することによって確立された，cisplatin耐性株とその親株[45, 46]を使用して，耐性株と親株の相違点を明らかにすることを試みた．その結果，親株は低濃度のcisplatinによって細胞死を起こすが，中間濃度のcisplatinでは細胞死が軽減されること，すなわち２相性であることを示した．一方，耐性株では低濃度のcisplatinに対しては耐性化しているが，中間濃度のcisplatinで細胞死が軽減される親株の性質を失っていた．また，ouabainは，耐性株，親株ともに時間経過と濃度に依存して細胞死を引き起こした．親株では，cisplatinは濃度に依存してouabainによる細胞死を軽減した．しかし，耐性株は親株の示すcisplatinによる軽減作用を失っていた．現象は非常に複雑であり，現在，さらに検討中であるが，Na, K-ATPase活性の腫瘍化との関連，ouabainの抗癌剤としての作用，さらにはouabainとcisplatinの相互作用[47]なども報告されつつあり，今後大きく展開される可能性がある．現時点でのcisplatinとouabainのNa, K-ATPaseに関連したがん細胞に対する作用を，図４と５に示したが，さらなる検討が必要である．

３）フッ化物

う蝕予防に使用されるフッ化物はその毒性が問題とされるが，急性毒性の機構に関しては不明な点が多い．そこで，沖野らはNa, K-ATPaseに対するフッ素（F）の作用

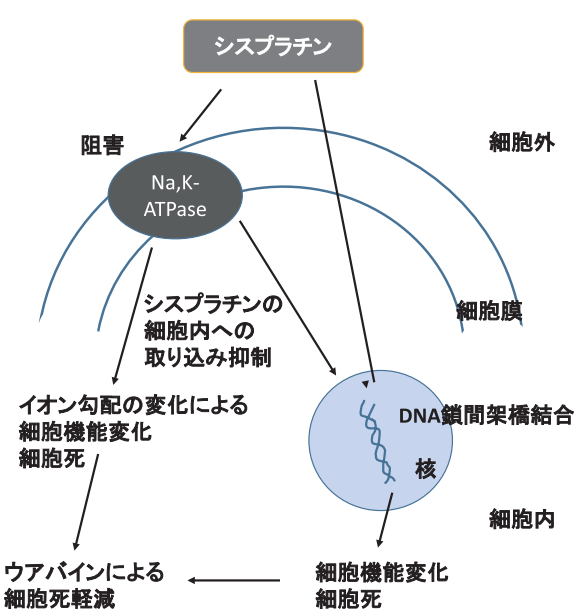


図４　シスプラチンのがん細胞に対する作用とウアバイン

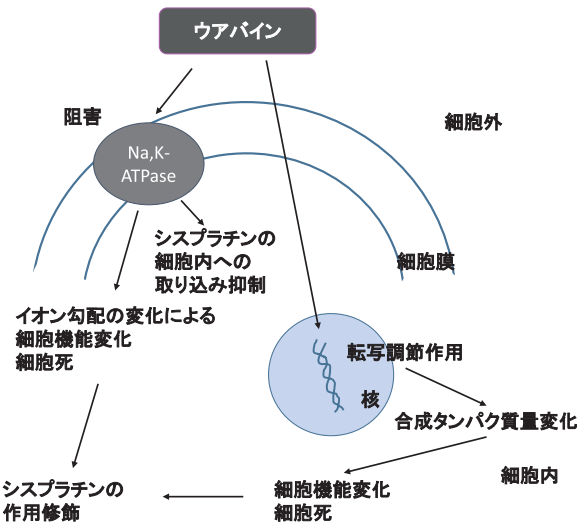


図５　ウアバインのがん細胞に対する作用とシスプラチン

を検討した[48]．その結果，FはNa, K-ATPase活性とその部分反応であるNa-ATPaseおよびK-*p*NPPase活性を濃度依存的に阻害した．また，アルミニウム（Al）がFと共存すると阻害が増強され，Al非存在下では可逆的であった阻害が，Alが共存すると不可逆的阻害となることが示された．さらに，EP形成量もF濃度に依存して減少した．Alが共存すると，EP形成抑制に必要なF濃度を低下するとともにEP量も減少させた。これらのAlによる作用は，Alのキレート作用を示すdeferoxamineによって低下することを確認した．

筆者らは，フッ素の生体毒性という観点から研究を開始したが，フッ化アルミニウム（AlF_4）はリン酸に極めて類似した構造であることを知った（図６）．また，GTP結合タンパク質を介した情報伝達系においては，AlF_4はGDPに結合してGTP様の構造となり，情報伝達系を活性化するという報告[49]があり驚いた．一方では，AlF_4がNa, K-ATPaseあるいはCa-ATPaseのEP様の構造を形成することを利用して，X線結晶構造解析に使用されている[50]．また，Na, K-ATPaseあるいはCa-ATPase活性の阻害も報告されていた[51-53]．

いずれにしても，フッ化物の生体に対する安全性という

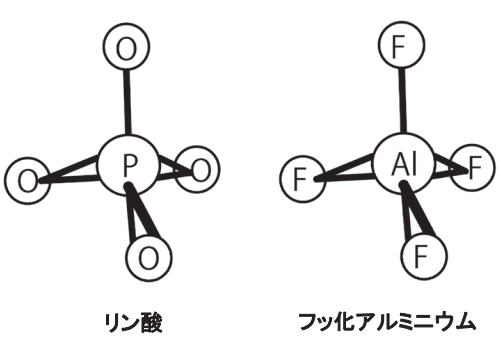


図６　リン酸とフッ化アルミニウムの分子構造のモデル

観点からは，生体中に存在するAlと結合してAlF_4となり，P型ATPaseの強力な阻害薬として毒性を発現すると考えられる．

4）エストロゲン

平沢らは，マウスマクロファージ様細胞であるRAW264.7細胞のNa, K-ATPase活性に対する17β-エストラジオール（E2）の作用と，エストロゲンの膜貫通Gタンパク質共役型受容体であるGPR30の関与を検討した[54]．その結果，E2は短時間作用と長時間作用の２相性に，異なった作用機構によりNa, K-ATPase活性を促進することを明らかにした．短時間作用によるNa, K-ATPase活性の促進は，細胞膜に存在するGPR30を介した細胞内情報伝達系の活性化であり，Erk1の活性化に依存したNa, K-ATPaseタンパク質の誘導とチロシンリン酸化によるものと示唆された．一方，E2の長時間作用によるNa, K-ATPase活性の増加は，fulvestrantによって抑制されたことから，細胞内のエストロゲン受容体を介した遺伝子発現による酵素活性の変化，すなわち，Na, K-ATPaseタンパク質の発現増加によるものと示唆された．エストロゲンは幅広い生理機能を保持している．Na, K-ATPaseが破骨細胞形成において細胞融合に関与するという報告もあることから，エストロゲンがその調節を行う可能性もあると考えられる．

5）Aplysiallene

(-)-Aplysialleneは1985年，Kurosawaらによって日本海に生息する紅藻*Laurencia Okamurai Yamada*より単離，構造決定された海洋天然物である（図７）．その構造的特徴として，中央にtrans,trans dioxabicyclo [3.3.0]octane（*trans, trans fused*-THF）骨格を持ち，その側鎖にブロモアレン骨格とブロモジエン構造を有する．本天然物は2001年，Okamotoらによってアメフラシ*Aplysia Kurodai*からも単離され，その際，IC_{50} = 0.7 mMのNa, K-ATPase阻害活性を有することが明らかとなった．その後，大阪大学薬学研究院の藤岡教授，有澤准教授のグループが，Na, K-ATPase活性を阻害する新規薬物の開発と大量合成法の確立を視野に，(-)-aplysialleneの構造を基に誘導体の化学合成を開始した．分子内ダブルブロモハロエーテル化反応を鍵反応とする(-)-aplysialleneとその類縁体の合成を行い（図８），大量合成を可能にすべく(-)-aplysialleneの新規合成法を開発した．

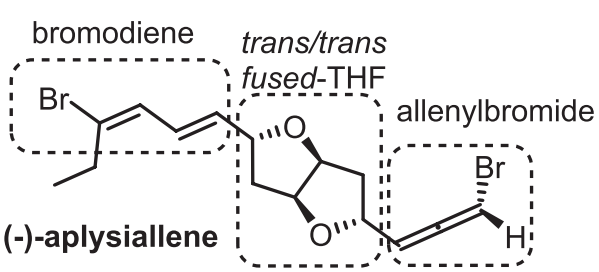


図７　天然型aplysiallenの基本構造

筆者は，藤岡研究室から合成品のNa, K-ATPase阻害活性評価を依頼され，共同研究を開始した．沖野がNa, K-ATPase活性を測定して，各種誘導体のIC_{50} 値を決定した．IC_{50} 値は，Okamotoらの報告した値の20分の1であり，阻害活性が強かった．筆者らのNa, K-ATPase活性評価の結果を含むYamakawaらの化学合成法の論文が公表されている[55]．

藤岡研究室ではさらに誘導体の化学合成を行っており，aplysiallene類のNa, K-ATPase活性阻害の構造活性相関と，Na, K-ATPase活性の阻害機構の解明を目的に共同研究を継続しており，現在は，中国からの研究生である蘇がNa, K-ATPase活性測定を行っている．

謝　　辞

この特集を書くために考え，振り返って，あらためて自分のNa, K-ATPaseに対する愛着の深さを実感しました．私自身は途中からNa, K-ATPase の反応機構の研究から離れ，薬物のターゲットとしてNa, K-ATPase を見るだけになりましたが，Na, K-ATPaseに出会えたことは幸せなことでした．Na, K-ATPaseと，その研究に携わってきたすべての研究者に感謝します．

また，大学院入学時にNa, K-ATPase研究を勧めてくださった飯田正一先生，初期にNa, K-ATPase研究をご指導いただいた谷口和弥先生，Post研究室への留学をお認めいただいた松本　章先生，アメリカ留学中にご指導いただいたRobert L Post先生には，心から感謝いたします．これらの先生がおられなかったら，現在のような，Na, K-ATPaseに対する私の関わりはありませんでした．また，一緒に研究を行ってきた教職員，大学院生，研究生の皆様に感謝申し上げます．

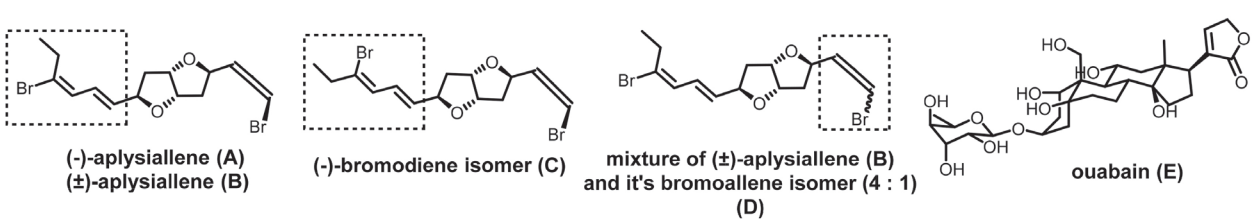


図８　各種合成aplysiallen類似体とouabainの構造

参 考 文 献

1) Skou JC : The influence of some cations on an adenosine triphosphatase from peripheral nerves. Biochim Biophys Acta 23 : 394-401, 1957.
2) Mobasheri A, Avila J, Cozar-Castellano I, Brownleader MD, Trevan M, Francis MJO, Lamb JF, Martin-Vasallo P : Na^+, K^+-ATPase isozyme diversity; Comparative Biochemistry and physiological implications of novel functional interactions. Bioscience Reports 20 : 51-91, 2000.
3) Glynn IM : The Na^+, K^+-transporting adenosine triphosphatase. in *The Enzymes of Biological Membranes* (Martonossi A, ed) Vol. 3, 35-114, Plenum Publishing Corp., New York, 1985.
4) Jorgensen PL, Hakansson KO, Karlish SJD : Structure and mechanism of Na, K-ATPase : Functional site and their interactions. Annu Rev Physiol 65 : 817-849, 2003.
5) Kaplan JH : Biochemistry of Na, K-ATPase. Annu Rev Biochem 71 : 511-535, 2002.
6) Francis MJO, Lees R, Trujillo E, Martin-Vasallo P, Heersche JNM, Mobasheri A : ATPase pumps in osteoclasts and osteoblasts. Int J Biochem Cell Biol 34 : 459-476, 2002.
7) Apell HJ : Structure-function relationship in P-type ATPases- a biophysical approach. Rev Physiol Biochem Pharmacol 150 : 1-35, 2003.
8) Geering K : Function of FXYD proteins, regulation of Na, K-ATPase. J Bioenerg Biomembr 37 : 387-392, 2005.
9) Taniguchi K, Kaya S, Abe K, Mardh S : The oligomeric nature of Na/K-ATPase. J Biochem 129 : 335-342, 2001.
10) Post RL, Kume S, Tobin T, Orcutt B, Sen AK : Flexibility of an active center in sodium-plus-potassium adenosine triphosphatase. J Gen Physiol 54 : 306s-326s, 1969.
11) Post RL, Hegyvary C, Kume S : Activation by adenosine triphosphate in the phosphorylation kinetics of sodium and potassium ion transport adenosine triphosphatase. J Biol Chem 247 : 6530-6540, 1972.
12) Jorgensen PL : Purification and characterization of (Na^+ + K^+)-ATPase. VI. Differential tryptic modification of catalytic functions of the purified enzyme in presence of NaCl and KCl. Biochim Biophys Acta 466 : 97-108, 1977.
13) Karlish SJD, Yates DW : Tryptophan fluorescence of (Na^+ + K^+)-ATPase as a tool for study of the enzyme mechanism. Biochim Biophys Acta 527 : 115-130, 1978.
14) Taniguchi K, Suzuki K, Shimizu J, Iida S : ATP dependent reversible conformational change of Na^+, K^+-ATPase modified with N-[p-(2-benzimidazolyl)-phenyl]-maleimide. J Biochem 88 : 609-612, 1980.
15) Taniguchi K, Suzuki K, Iida S : Conformational change accompanying transition of ADP-sensitive phosphoenzyme to potassium sensitive phosphoenzyme of Na^+, K^+-ATPase modified with N-[p-(2 benzimidazolyl)phenyl]maleimide. J Biol Chem 257 : 10659-10667, 1982.
16) 鈴木邦明, 谷口和弥, 飯田正一 : Na^+, K^+-ATPaseのコンフォーメーション変化から推定されるOuabainの結合様式. 日薬理誌 86 : 181-185, 1985.
17) Sakuraya M, Taniguchi K, Suzuki K, Kudo A, Nakamura S, Iida S : Changes in fluorescence energy transfer between sulfhydryl fluorescent residues during ouabain sensitive Na, K-ATP hydrolysis. Japn J Pharmacol 44 : 311-321, 1987.
18) Taniguchi K, Suzuki K, Iida S : Stopped flow measurement of conformational change induced by phosphorylation in Na^+, K^+-ATPase modified with N-[p-(2-benzimidazolyl)-phenyl]maleimide. J Biol Chem 258 : 6927-6931, 1983.
19) Taniguchi K, Suzuki K, Kai D, Matsuoka I, Tomita K, Iida S : Conformational change of sodium and potassium dependent adenosine triphosphatase. Conformational evidence for the Post-Albers mechanism in Na^+ and K^+ dependent hydrolysis of ATP. J Biol Chem 259 : 15228-15233, 1984.
20) Taniguchi K, Tosa H, Suzuki K, Kamo Y : Microenvironment of two different extrinsic fluorescence probes in Na, K-ATPase changes out of phase during sequential appearance of reaction intermediates. J Biol Chem 263 : 12943-12947, 1988.
21) Taniguchi K, Suzuki K, Sasaki T, Shimokobe H, Iida S : Reversible change in the light scattering following the formation of ADP-sensitive phosphoenzyme in Na^+, K^+-ATPase modified with N-[p-(2-benzimidazolyl)phenyl]maleimide. J Biol Chem 261 : 3272-3281, 1986.
22) Suzuki K, Taniguchi K, Iida S : The acceleration of Na^+, K^+-ATPase activity by ATP and ATP analogues. J Biol Chem 262 : 11752-11757, 1987.
23) Taniguchi K, Suzuki K, Sasaki T, Shimokobe H, Iida

S : Acceleration of the rate of fluorescence decrease by high concentration of ATP under the condition of accumulation of ADP-sensitive phosphoenzyme in Na^+, K^+-ATPase. J Biochem 100 : 1231-1239, 1986.

24) Shinoda T, Ogawa H, Cornelius F, Toyoshima C : Crystal structure of the sodium-potassium pump at 2.4 A resolution. Nature 459 : 446-450, 2009.

25) Toyoshima C, Kanai R, Cornelius F : First crystal structures of Na^+, K^+-ATPase : New light on the oldest ion pump. Structure 19 : 1732-1738, 2011.

26) Kanai R, Ogawa H, Vilsen B, Cornelius F, Toyoshima C : Crystal structure of a Na^+-bound Na^+, K^+-ATPase preceding the E1P state. Nature 502 : 201-207, 2013.

27) Suzuki K, Post RL : Slow and rapid components of dephosphorylation kinetics of Na, K-ATPase. The Sodium Pump : 375-378, 1991.

28) Post RL, Suzuki K : A Hofmeister effect on the phosphoenzyme of Na, K-ATPase. The Sodium Pump : 201-209, 1991.

29) Suzuki K, Post RL : Equilibrium of phosphointermediates of sodium and potassium ion transport adenosine triphosphatase - Action of sodium ion and Hofmeister effect. J Gen Physiol 109 : 537-554, 1997.

30) El-Beialy W, Galal N, Deyama Y, Yoshimura Y, Suzuki K, Tei K, Totsuka Y : Regulation of human and pig renal Na, K-ATPase activity by tyrosine phosphorylation of their α-1 subunits. J Membrane Biol 233 : 119-126, 2010.

31) Matchkov VV, Krivoi II : Specialized functional diversity and interactions of the Na, K-ATPase. Front Physiol 7, article 179 (21 pages), 2016.

32) Lingrel JB : The physiological significance of the cardiotonic steroid/ouabain-binding site of the Na, K-ATPase. Annu Rev Physiol 72 : 395-412, 2010.

33) Xie Z, Askari A : Na^+/K^+-ATPase as a signal transducer. Eur J Biochem 269 : 2434-2439, 2002.

34) Jun DW, Hwang M, Kim HJ, Hwang SK, Kim S, Lee CH : Ouabain, a cardiac glycoside, inhibits the Fanconi Anemia/BRCA pathway activated by DNA interstrand cross-linking agents. PLOS ONE 8 : e75905, 2013.

35) Mijatovic T, Van Quaquebeke E, Delest B, Debeir O, Darro F, Kiss R : Cardiotonic steroids on the road to anti-cancer therapy. Biochim. Biophys. Acta 1776 : 32-57, 2007.

36) Siddik ZH : Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. Oncogene 22 : 7264-7279, 2003.

37) Eljack ND, Ma HUM, Drucker J, Shen C, Hambley TW, New EJ, Friedrich T, Clarke RJ : Mechanisms of cell uptake and toxicity of the anticancer drug cisplatin. Metallomics 6 : 2126-2133, 2014.

38) Huliciak M, Reinhard L, Laursen M, Fedosova N, Nissen P, Kubala M : Crystals of Na^+/K^+-ATPase with bound cisplatin. Biochem Pharmacol 92 : 494-498, 2014.

39) Huliciak M, Vacek J, Sebela M, Oloninova E, Znaleziona J , Havlikova M, Kubala M : Covalent binding of cisplatin impairs the function of Na^+/K^+-ATPase by binding to its cytoplasmic part. Biochem Pharmacol 83 : 1507-1513, 2012.

40) Sakakibara N, Suzuki K, Kaneta H, Yoshimura Y, Deyama Y, Matsumoto A, Fukuda H : Inhibition of Na^+, K^+-ATPase by cisplatin and its recovery by 2-mercaptoethanol in human squamous cell carcinoma cells. Anti-Cancer Drugs 10 : 203-211, 1999.

41) Ahmed Z, Deyama Y, Yoshimura Y, Suzuki K : Cisplatin inhibits Na^+, K^+-ATPase activity depending on its concentration, preincubation time and temperature. Hokkaido J Dent Sci 29 : 78-86, 2008.

42) Kitada H, Suzuki K, Yamaoka M, Fukuda H, Kitagawa Y : The effects of platinum-containing anti-cancer drugs on Na^+, K^+-ATPase activity in pig kidney and human renal proximal tubule epithelial cells. Oral Ther Pharmacol 24 : 20-29, 2005.

43) Ahmed Z, Deyama Y, Yoshimura Y, Suzuki K : Cisplatin sensitivity of oral squamous carcinoma cells is regulated by Na(+), K(+)-ATPase activity rather than copper-transporting P-type ATPases, ATP7A and ATP7B. Cancer Chemother Pharmacol 63 : 643-650, 2009.

44) 義達理恵子，鈴木邦明，吉村善隆，南川 元，鄭 漢忠：口腔がん細胞のシスプラチン耐性化に伴う白金系抗がん剤及び強心配糖体に対する感受性の変化．北海道歯誌，印刷中

45) Nakamura M, Nakatani K, Uzawa K, Ono K, Uesugi H, Ogawara K, Shiiba M, Bukawa H, Yokoe H, Wada T, Fujita S, Tanzawa H : Establishment and characterization of a cisplatin-resistant oral squamous cell carcinoma cell line, H-1R. Oncol Rep 14 : 1281-1286, 2005.

46) Negoro K, Yamano Y, Fushimi K, Saito K, Nakatani K, Shiiba M, Yokoe H, Bukawa H, Uzawa K, Wada T, Tanzawa H, Fujita S : Establishment and characterization of a cisplatin-resistant cell line, KB-R, derived from oral carcinoma cell line, KB. Int J

Oncol 30 : 1325-1332, 2007.
47）Kulikov AV, Slobodkina EA, Alekseev AV, Gogvadze V, Zhivotovsky B : Contrasting effects of cardiac glycosides on cisplatin- and etoposide -induced cell death. Biol Chem 397 : 661-670, 2016.
48）沖野雄一郎，出山義昭，吉村善隆，鈴木邦明，本多丘人：Na, K-ATPase活性のフッ素による阻害．北海道歯誌，印刷中
49）Sternweis PC, Gilman AG : Aluminum: A requirement for activation of the regulatory component of adenylate cyclase by fluoride. Proc Natl Acad Sci USA 79 : 4888-4891, 1982.
50）Cornelius F, Mahmmoud YA, Toyoshima C : Metal fluoride complexes of Na, K-ATPase. Characterization of fluoride-stabilized phosphoenzyme analogues and their interaction with cardiotonic steroids. J Biol Chem 286 : 29882-29892, 2011.
51）Robinson JD, Davis RL, Steinberg M : Fluoride and beryllium interact with the (Na+K)-dependent ATPase as analogs of phosphate. J Bioenerg Biomembr 18 : 521-531, 1986.
52）Murphy AJ, Hoover JC : Inhibition of the Na, K-ATPase by fluoride. Parallels with its inhibition of the sarcoplasmic reticulum CaATPase. J Biol Chem 267 : 16995-17000, 1992.
53）Missiaen L, Wuytack F, Smedt HD, Vrolix M, Carteels R : AlF_4 reversibly inhibits 'P'-type cation-transport ATPases, possibly by interacting with the phosphate-binding site of the ATPase. Biochem J 253 : 827-833, 1988.
54）平沢宏太，出山義昭，平川　直，吉村善隆，野谷健二，鈴木邦明：マクロファージ様細胞におけるGPR30を介したNa, K-ATPaseの活性化．北海道歯誌，印刷中
55）Yamakawa M, Kurachi T, Yoshikawa Y, Arisawa M, Okino Y, Suzuki K, Fujioka H : Stereoselective construction of 2,7-disubstituted *fused*-bis Tetrahydrofurans skeletons : Biomimetic-type synthesis and biological studies of (±)-and (−)-aplysiallene and derivatives. J Org Chem 80 : 10261-10277, 2015.