

機関番号 : 33101

研究種目 : 若手研究 (B)

研究期間 : 2007~2009

課題番号 : 19770116

研究課題名 (和文) 微生物の複合体型カチオン/プロトン対向輸送体の研究

研究課題名 (英文) Functional analysis of bacterial multi-subunit cation/H⁺ antiporter.

研究代表者

山口 利男 (YAMAGUCHI TOSHIO)

新潟薬科大学・薬学部・助教

研究者番号 : 50434452

研究成果の概要 (和文) :

pha 遺伝子群 (*phaAB - G*) は、根瘤菌 *Sinorhizobium meliloti* の細胞内寄生に必須の遺伝子群として同定され、変異体の表現型解析から K⁺/H⁺ antiporter をコードすると考えられていたが、直接的な証拠は提示されていなかった。本研究では、大腸菌を用いた異種発現系により Pha システムの詳細な輸送特性の解析を試み、Pha システムが確かに K⁺/H⁺ antiport 活性を持つこと、及び Na⁺ の輸送も行うことを見出した。さらに、Pha システムが pH によってそのイオン選択性を変化させる特異な輸送体である事を示す新規の知見を見出した。

研究成果の概要 (英文) :

The *phal* gene cluster (*phaIA' -G*) of *Sinorhizobium meliloti* had been characterized as a necessary component for proper invasion into plant root tissue. It has been suggested to encode a multi-subunit K⁺/H⁺ antiporter, since mutations in the *phal* region rendered *S. meliloti* cells K⁺ and alkaline sensitive. However, the detailed transport properties of the Phal system are yet to be determined. We have conducted the functional expression of the Phal system in *Escherichia coli* and the measurement of cation/H⁺ antiport activity, and showed that the Phal system is indeed a K⁺/H⁺ antiporter with a pH optimum at mildly alkaline conditions. Moreover, we found that the Phal system can transport Na⁺; this was unexpected based on previous phenotypical analyses of *phal* mutants. Furthermore, we demonstrated that the cation selectivity of the Phal system was altered when the pH was lowered from its optimum pH.

交付決定額

(金額単位 : 円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2007年度 | 1,100,000 | 0 | 1,100,000 |
| 2008年度 | 900,000 | 270,000 | 1,170,000 |
| 2009年度 | 900,000 | 270,000 | 1,170,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 2,900,000 | 540,000 | 3,440,000 |

研究分野 : 生物学

科研費の分科・細目 : 生物科学・機能生物化学

キーワード : 微生物、生体分子、膜蛋白質、イオン輸送、対向輸送体

1. 研究開始当初の背景

phaABI-GI 遺伝子群は、窒素固定細菌 (*Sinorhizobium meliloti*) が植物細胞内で増殖する際に必要な「Pha システム」をコードする遺伝子群として同定された。*pha* 変異体は K^+ およびアルカリ pH 感受性になることから、Pha システムは K^+ 排出および細胞内の pH 制御に関与する K^+/H^+ antiporter であると考えられていた。しかしながら、*S. meliloti* におけるイオン輸送の解析が技術的に困難であったため、実際に Pha システムが K^+ の輸送を行うことを示す直接的な証拠は無かった。その後、Pha システムに相同性が高い遺伝子群が枯草菌を始めとする他の細菌からも数種同定されたが、興味深いことにこれらは Na^+/H^+ antiporter であり、 K^+ の輸送能を持たないことを示唆する報告が複数なされていた。これらの複合体型 cation/ H^+ antiporter (CPA-3 family 輸送体) に関する知見は本研究開始当時非常に少なく、Pha システムと他の CPA-3 family 輸送体間におけるイオン選択性の差異が何に起因するのか全く不明であった。

2. 研究の目的

本研究では、Pha システムの輸送体としての性質を解明することを一つの目的とし、*S. meliloti* の代わりに、イオン輸送体についての研究が進んでいる大腸菌をホストとした発現系の確立、並びにこの発現系を用いた Pha システムの輸送活性の測定により、そのイオン選択性及び pH 依存性などの基本的な性質を明らかとすることを目指した。また、他の CPA-3 family 輸送体との違いが明白となった場合には、そうした差異が輸送体間のどのような違いに起因するのかについてを明らかとすることで、CPA-3 family 輸送体のイオン選択機構の解明に向けた基盤を構築することも目的の一つとした。

3. 研究の方法

1) 使用した大腸菌株、培地及び遺伝子クローニング

pha 遺伝子群の発現ホストには大腸菌 T0114 (*nhaA::Km^r*, *nhaB::Em^r*, *chaA::Cm^r*) を用いた。生育試験時における大腸菌の培養には LBK100 培地 (1% trypton, 0.5% yeast extract, 100 mM KCl) もしくは LBNa100 (1% trypton, 0.5% yeast extract, 100 mM NaCl) を使用した。生育実験においては上記の培地に 10 mM Bis-Tris propane を加え、HCl で pH を 6.5~9.0 にそれぞれ調整した。

pha 遺伝子群 (*phaABI-GI*) は pPP684 (Dr. Putnoky より供与) をテンプレートに PCR により増幅し、pTrcHis2C (Invitrogen) の *Bg*III 及び *Eco*RI 部位に挿入後 DH5 α 株に導入した。

得られたクローン (pTrcHis2C-*pha1*) の DNA 配列を確認した後、T0114 株に導入した (T0114/pTrcHis2C-*pha1*)。

2) 大腸菌 T0114 を用いた生育試験

T0114/pTrcHis2C-*pha1* 及び pTrcHis2C を T0114 株に導入した株 (T0114/pTrcHis2C) を LBK100 に植菌し、37°C で一晩震盪培養した後、一定数の菌体を 0.4 mM IPTG を含む LBK100 もしくは LBNa100 (pH 6.5~9.0) に移し、37°C で震盪培養した。一時間ごとに 660nm の吸光度を miniphoto 518R (TAITEC) を用いて測定した。

3) 大腸菌反転膜小胞を用いた cation/ H^+ antiport 活性の測定

T0114/pTrcHis2C-*pha1* もしくは T0114/pTrcHis2C を LBK100 培地中 1 時間震盪培養し、終濃度 0.4 mM の IPTG を加えてさらに $OD_{660}=0.9\sim 1.0$ となるまで震盪培養した。菌体を 10 ml の TCDS buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.0, 140 mM choline-Cl, 0.5 mM DTT, 250 mM sucrose) で洗浄後、9 ml の TCDS buffer に再懸濁し、フレンチプレス (4,000 psi) で二回処理した。菌体破砕液を 5,100 g で 15 分遠心分離し、上清をさらに 110,000 g で一時間遠心分離した。得られた沈殿を TCDS buffer に再懸濁し、使用時まで -80°C で凍結保存した。蛋白質濃度は BCA 法を用い、BSA を標準試料として測定した。

Cation/ H^+ antiport 活性は、蛍光 Δ pH 指示薬であるアクリジンオレンジを用い、反転膜小胞内外の H^+ の移動を指標に測定した。Assay buffer (10 mM Bis-Tris propane, 140 mM choline-Cl, 5 mM $MgCl_2$, pH 7.0~9.0) に 40 μ g protein 相当の膜画分及び終濃度 1.5 μ M アクリジンオレンジを総容量 2 ml となるように加え、終濃度 2 mM の Tris-DL-lactate (pH 9.0) を添加して反転膜小胞内外に pH 勾配を形成させた。次いで種々の濃度の NaCl もしくは KCl を加え、cation 依存的な pH 勾配の変化をアクリジンオレンジの蛍光 (励起波長: 492nm \pm 1.5nm, 蛍光波長: 525nm \pm 3.0nm) を指標に測定した。cation 依存的な pH 勾配の変化が安定した後、25mM NH_4Cl を加えて膜内外の pH 勾配を消失させた。この時の蛍光強度を pH 勾配の無い状態の基準値とし、Tris-DL-lactate 添加後との差を 100% とした際の cation 添加後の蛍光強度の復帰 (%) を反転膜小胞の cation/ H^+ antiport 活性とした。Pha システムの活性は、Pha 発現株で得られた値から T0114/pTrcHis2C 株で得られた値をバックグラウンドとして差し引いて計算した。なお、蛍光の測定には Shimadzu RF-5300PC を使用し、 V_{max} 、 K_m は Kaleidagraph (Synergy software) を用いて算出した。

4. 研究成果

1) 大腸菌 T0114 株の生育を指標とした Pha システムの cation/H⁺ antiport 活性の評価

大腸菌 T0114 株は、アルカリ pH 下における細胞内 pH 調節、及び Na⁺排出に主要な役割を果たす 3 つの cation/H⁺ antiporter (NhaA, NhaB, ChaA) の欠損株であり、アルカリ条件下および高濃度の Na⁺存在下での生育が著しく遅れることが知られている。そこで、この T0114 株に *pha* 遺伝子群を導入し、Pha システムが T0114 株のアルカリ感受性および Na⁺感受性を相補するか否かを検討した (Fig. 1)。100mM KCl を含む LBK100 培地を用い、pH 6.5 ~9.0 における Pha システム発現株 (T0114/pTrcHis2C-*pha1*) の生育を空ベクター導入株 (T0114/pTrcHis2C) と比較したところ、pH 9.0 において *pha* 遺伝子群導入株では空ベクター導入株よりも良好な生育が見られ、Pha システムが T0114 株のアルカリ感受性を相補することが明らかとなった。また、100mM NaCl 存在下 (LBNa100) では、T0114/pTrc が pH 6.5 でのみ生育が見られたのに対し、T0114/Pha は pH 8.0 以下全てにおいて良好な生育が観察された。

以上より、Pha システムは大腸菌 T0114 株のアルカリ感受性及び Na⁺感受性を相補することが確認され、大腸菌において Pha システムが K⁺ および Na⁺/H⁺ antiporter として機能することが示唆された。

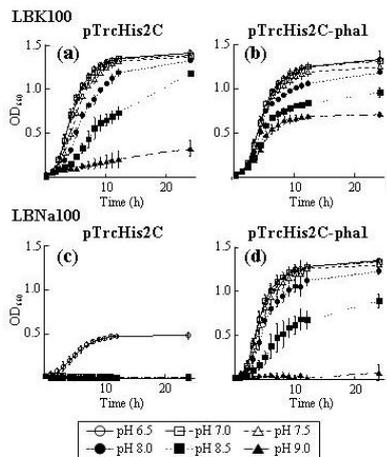


Fig. 1 相補試験による cation/H⁺ antiport 活性の評価 *pha1* を導入した T0114 株 (pTrcHis2C-*pha1*: b, d) 及び空ベクターを導入した T0114 株 (pTrcHis2C: a, c) を pH6.5~9.0 において LBK100 (a, b) 及び LBNa100 (c, d) で生育させ、一時間ごとに濁度 (OD₆₀₀) を測定した。なお、グラフの値は三回の独立した測定結果の平均値を表し、標準偏差をエラーバーで示した。

2) 反転膜小胞を用いた Pha システムの cation/H⁺ antiport 活性の解析

当時知られていた CPA-3 family 輸送体のほとんどは、Na⁺に高い選択性を示し、K⁺の輸送は行わないとされていた。一方 Pha システム

は K⁺輸送に関与するという知見が変異体の表現型解析から得られてはいるが、輸送活性の測定は行われていなかった。そこで、Pha システム発現株から反転膜小胞を調製し、H⁺対向輸送活性の測定に繁用されるアクリジンオレンジ消光法を用いて Na⁺および K⁺と H⁺の antiport 活性を測定した。アクリジンオレンジは H⁺勾配の蛍光指示薬であり、小胞内外の H⁺勾配が大きくなると、525 nm (励起波長 492 nm) の蛍光を失う特徴を持つため、蛍光強度を指標とした膜内外の H⁺の移動の測定が可能な試薬である。アクリジンオレンジ消光法は、まず乳酸を加えて電子伝達系を活性化し、反転膜小胞内外に H⁺勾配を形成させ、次いで特定のイオンを加え、そのイオン依存的な H⁺勾配の解消度合いを測定する方法である。空ベクター導入株および Pha システム発現株から調製した反転膜小胞を用い、pH 8.5 で 20mM の K⁺ もしくは Na⁺と H⁺との antiport 活性を測定したところ、いずれの場合でも Pha システム発現株由来の反転膜小胞で空ベクター導入株より顕著に強い活性が見られた (Fig. 2)。また、KCl 添加時の活性は NaCl 添加時より強く、pH 8.5 では Pha システムは Na⁺よりも K⁺に高い選択性を持つことが示唆された。以上より、Pha システムが実際に K⁺/H⁺ antiport 活性を持つことが明らかとなり、さらに当時まで考えられていなかった Na⁺/H⁺ antiport 活性も併せ持つ輸送体であることを初めて見出した。

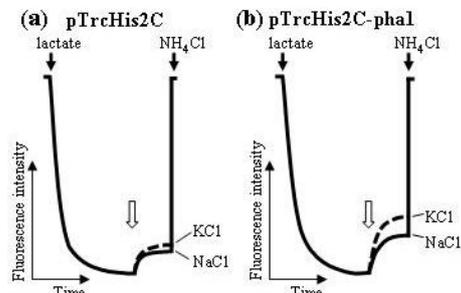


Fig. 2 Cation/H⁺ antiport 活性の測定

アクリジンオレンジ消光法を用いて、T0114/pTrcHis2C (a) 及び T0114/pTrcHis2C-*pha1* (b) から調製した反転膜小胞の cation/H⁺ antiport 活性を測定した。終濃度 20 mM の NaCl もしくは KCl を加え、Na⁺依存的な pH 勾配の変化をアクリジンオレンジの蛍光の変化を指標に測定した。なお、a, b いずれも三回以上の実験における典型的な測定結果を示した。

次に、Pha システムがアルカリ条件下での細胞内 pH 制御に関与すると考えられていたことから、輸送活性の pH 依存性についても検証した (Fig. 3)。pH 7.0~pH 9.0 の範囲において、10mM の NaCl もしくは KCl 添加時の cation/H⁺ antiport 活性を解析したところ、いずれの場合においてもアルカリ条件下で活性が高く、pH 8.5 で最大となることを見出した。一方、pH=7.0 以下ではほとんど活性は見られなかったことから、Pha システムは

アルカリ側の細胞内 pH で活性が増強される輸送体であることが明らかとなった。加えて、pH 7.5 では Na⁺と K⁺の輸送活性に差は無かったのに対し、pH 8.0 及び 8.5 では K⁺輸送活性の方が高いことも明らかとした。

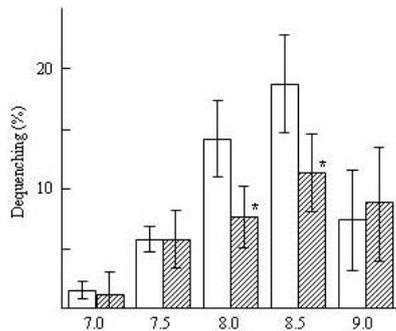


Fig. 3 Pha1 活性の pH 依存性の検討

Fig. 2 と同様の手法を用い、10 mM の KCl もしくは NaCl 添加時の K⁺/H⁺ antiport 活性 (白抜き) 及び Na⁺/H⁺ antiport 活性 (斜線) を pH 7.0~9.0 において測定した。いずれの値も三回以上の実験の平均値を表し、標準偏差をエラーバーで示した。なお、アスタリスク (*) は、同一 pH における K⁺/H⁺ antiport 活性と Na⁺/H⁺ antiport 活性との間に有意差が認められた事を示す (Student's *t* test, *P* < 0.05)

さらに、pH 8.5 および 7.5 における輸送活性の変化を詳細に検討すべく、Pha システムの kinetic property の解析を行った (Fig. 4)。2.5mM から 40mM までの KCl もしくは NaCl 存在下での輸送活性を測定した結果、pH 8.5 においては使用した全ての塩濃度で K⁺輸送が優位であること、また pH 7.5 においては 10mM 以下では Na⁺輸送が、それ以上では K⁺輸送が優位となることが明らかとなった。興味深いことに、pH 8.5 (Pha1 の至適 pH) と 7.5 での K⁺に対する V_{max} はそれぞれ 30% と 35.2% と大きな差は見られなかったが、K_m はそれぞれ 8.23 mM と 63.2 mM と大幅な変化が認められた。一方で、Na⁺に対する V_{max} と K_m は pH 8.5 で 19.1% と 5.47 mM、pH 7.5 では 7.85% と 4.06 mM であり、いずれの K_m にも変化がなかったのに対し、V_{max} は pH 8.5 から 7.5 の間で約半分ほどに減少する事が明らかとなった。以上の知見は、Pha システムが pH の変動によってその輸送活性を大きく変化させる輸送体であることを強く示唆している。また、本研究で明らかとなった Pha システムの Na⁺及び K⁺に対する見かけの V_{max}、K_m の値は、一般的な細胞内 K⁺ 濃度が数百 mM、Na⁺濃度が数 mM 程度であることを考慮すると、Pha システムがアルカリ条件下では主に K⁺の輸送体として働き、中性から弱アルカリ性程度では両方の輸送体として細胞内 pH 制御に寄与する輸送体であることを示すものであると考えられる。なお、以上の研究成果は 2009 年に Microbiology 誌に掲載された。

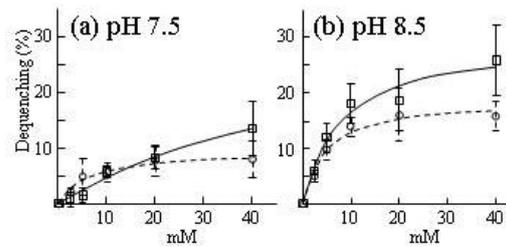


Fig. 4 pH 7.5 及び 8.5 における Pha の kinetic property
pH 7.5 及び pH 8.5 における Pha1 の cation/H⁺ antiport 活性をそれぞれ種々の濃度の KCl (□) もしくは NaCl (○) を用いて測定し、Pha1 の K⁺及び Na⁺輸送における kinetic parameter を求めた。いずれの値も 4 回以上の実験から得られた平均値であり、標準偏差をエラーバーで示した。

3) 個々の Pha1 サブユニットの機能同定に向けた解析条件の検討

本研究申請直後の 2007 年に、他のグループが枯草菌の Mrp 及び好塩基細菌 *B. pseudofirmis* OF4 の Bs-OF4Mrp を含む 3 種の CPA-3 family 輸送体についての詳細な輸送活性の解析について報告しており、これらの輸送体がいずれも K⁺の輸送能はほとんど持たず、また Na⁺に対する見かけの K_m が数百 μM と、Pha システムよりも 10 倍程度高い親和性を示すことが明らかとされた。その一方で、このような違いが生じる機構については全く不明であった。そこで、Na⁺に極めて選択性の高い Mrp と Pha システムの間でサブユニットを一つずつ置換し、その輸送体の活性特性を解析する事で、Pha システムの K⁺に対する選択性がいずれかのサブユニットに起因する可能性についての検証を試みる事とした。Bp-OF4Mrp のいずれか一つのサブユニットを欠く遺伝子群 (*Bp-OF4mrp* ΔA~ΔG、東洋大学伊藤准教授より供与) を T0114 株に導入し、欠損している *Bp-OF4Mrp* 複合体のサブユニット (*Bp-OF4MrpA*~G)、もしくは対応する Pha1 のサブユニット (PhaA1~G1) を共発現させ、サブユニットの違いにより Na⁺及びアルカリ感受性が変化するか否かについて検証した。その結果、高濃度の Na⁺存在下においては、いずれか一つでもサブユニットを欠いた輸送体を発現する株 (T0114/ΔA~ΔG) はほとんど生育しなかったが、欠けているサブユニットを共発現させた株 (ΔA/MrpA~ΔG/MrpG) では顕著な生育の回復が認められた。ただし、これらの株の生育は Bp-OF4Mrp 全サブユニットを発現させた株よりも低かった。一方、対応する Pha1 のサブユニットを共発現させた株 (ΔA/PhaA1~ΔG/PhaG1) では、いずれの株においても顕著な生育の回復は認められなかった。また、Na⁺を除いた培地 (LBK100) を用い、アルカリ感受性の相補試験も行ったが、いずれのサブユニット置換株においても顕著な生育の回復は認められなかった (data not shown)。また、上述の全て

の株について、反転膜小胞を用いたアクリジンオレンジ消光法により pH に依存的な K⁺ または Na⁺ と H⁺ の antiport 活性の測定を試みたが、いずれの活性も対照との間に有意な差は認められなかった (data not shown)。今回の検討において活性の検出に至らなかった原因については現在のところ不明であるが、Bp-OF4Mrp ΔA~ΔG と共発現させた各サブユニットの発現量が活性の検出限界よりも低かった可能性、あるいは Bp-OF4Mrp と Pha システムのサブユニット同士が複合体を形成しない可能性が考えられる。今後はより効率的な共発現系の構築等を継続し、これらの可能性について検討していく予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

① 山口利男、堤文範、Peter Putnoky、福原正博、中村辰之介、pH-dependent regulation of the multi-subunit cation/proton antiporter Pha1 system from *Sinorhizobium meliloti*. *Microbiology*, 査読有、2009、155 巻、2750 ~ 2756

[学会発表] (計 5 件)

① 山口利男、堤文範、高村アキ、宝輪紀之、廣井真、福原正博、中村辰之介、*Sinorhizobium meliloti* の複合体型 cation/H⁺ antiporter のイオン選択性に関する解析」第 50 回日本植物生理学会年会、2009 年 3 月、愛知

② 山口利男、堤文範、佐藤弘樹、福原正博、中村辰之介、根瘤菌の複合体型 K⁺/H⁺ antiporter (Pha システム) の機能解析、日本薬学会第 128 年会、2008 年 3 月、横浜

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山口利男 (YAMAGUCHI TOSHIO)
新潟薬科大学・薬学部・助教
研究者番号：50434452

(2) 研究分担者

なし
研究者番号：

(3) 連携研究者

なし
研究者番号：