

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年6月18日現在

機関番号：33101  
 研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：平成20年度～平成23年度  
 課題番号：20570141  
 研究課題名（和文） 細菌のカチオン輸送系の構造と機能の研究  
 研究課題名（英文） Research for structure and function of bacterial cation transport systems  
 研究代表者  
 中村 辰之介（NAKAMURA TATSUNOSUKE）  
 新潟薬科大学・薬学部・教授  
 研究者番号：20114308

研究成果の概要（和文）：*Vibrio* のゲノムに書き込まれた数多くの機能未知の膜タンパク質の役割はなんであるのか。*Vibrio* の細胞内 pH 調節を行っている  $K^+/H^+$  antiporter をコードする遺伝子はなんなのか。*Vibrio* の細胞内  $Ca^{2+}$  濃度は低く保たれているのか。低く保たれているならば、その仕組みはなんなのか。*Vibrio* の Pha システム、NhaP2、Fku、Trk、Ktr はどのような機能と役割を *Vibrio* の中で担っているのか。このような疑問に対して答えを探し、その一端が明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：What is the function of many membrane proteins written in the genome of *Vibrio*? Which is the gene that code  $K^+/H^+$  antiporter function for internal pH regulation in *Vibrio*? Does internal  $Ca^{2+}$  concentration be maintained low? If so, what kind of transporter does the task. What kind of real functions of Pha system, NhaP2, Fku, Trk and Ktr in *Vibrio* cells? We looked forward such queries and found some answers.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：機能生物化学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：カチオン輸送、交換輸送系、膜タンパク質、細胞内イオン調節

## 1. 研究開始当初の背景

人間は、およそ 60 兆もの細胞からなる社会を構成し、社会に存在するカチオン ( $H^+$ ,  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Ca^{2+}$  など) の濃度を厳密に調整してい

る。ヒトの細胞内のカチオン濃度調節は、体液のカチオン濃度が調節されているので、比較的単純である。体液のカチオン濃度の調節は、消化器系から摂取され上昇するカ

チオンを、主に腎臓から排出することで調節されている。細菌の場合は、細胞膜の外は、カチオン濃度の変動が激しい外界であるので、細胞内カチオン濃度を調節するためには多数のカチオン輸送系が必要である。実際、細菌のゲノムにはカチオン輸送系と想定できる膜タンパク質をコードする数多くの遺伝子が存在する。ところが、それらの遺伝子がコードするタンパク質が本当に発現して、機能を持つのか、知られていないことが多い。次に、全塩基配列が決まっている *Vibrio parahaemolyticus*、あるいは *Vibrio alginolyticus* のカチオン輸送系に関して、研究開始当初にわかっていなかったことをリストアップする。

1) 既に他の細菌で機能が報告されている Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter と相同性がある *Vibrio* の膜タンパク質をコードする遺伝子は、本当に Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter をコードしているのか？

2) *Vibrio* の細胞内 pH を調節している K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter をコードする遺伝子は何であるのか？

3) *Vibrio* の Pha システムはどのような機能があるのか。

4) K<sup>+</sup> 存在下 (Na<sup>+</sup> 非存在下)、低浸透圧ストレスに弱い *Vibrio* の機械刺激受容チャネルはどのような構造と機能を持っているのか。

5) K<sup>+</sup> 取り込み系である Trk 系、Kup 系、Fku 系の *Vibrio* における K<sup>+</sup> 取り込みの役割分担はどのようになっているのか。

6) *Vibrio* の細胞内 Ca<sup>2+</sup> 濃度は低いのか。低いなら、Ca<sup>2+</sup> の排出を行っているのは何か。

7) *Vibrio* の NhaP2 は、大腸菌の変異株で VpNhaP2 を発現して得られている活性を本来の菌でも示すか。VpNhaP2 の *Vibrio* における役割はなんであるのか。

8) Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter における、H<sup>+</sup> 感受性の制御機構は何であるか。大腸菌の NhaB と *Vibrio* の NhaB の H<sup>+</sup> 感受性の違いはどのようにおきるのか。

9) Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter における膜貫通領域に存在する酸性アミノ酸はイオン輸送の結合部位として働いているのか。もしそうであるならば、ひとつの酸性アミノ酸が Na<sup>+</sup> と H<sup>+</sup> の両方に共通する結合部位になっているのか、それとも異なるアミノ酸/タンパク

質の異なる部分が Na<sup>+</sup> あるいは H<sup>+</sup> どちらかだけの結合部位となっているのか。

## 2. 研究の目的

研究の背景に書いた疑問を明らかにする目的で実験を行った。

## 3. 研究の方法

基本的に、遺伝子操作実験を行った。遺伝子をプラスミドにクローニングし、関連遺伝子を持たない細菌に導入して、その遺伝子がコードするタンパク質の活性を測定した。

## 4. 研究成果

VpnhaP2 遺伝子をノックアウトした変異株を作成し、VpNhaP2 が *Vibrio* にとっても、アルカリ条件で高濃度の K<sup>+</sup> が存在する時の生育を助けることがわかった。

Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter は様々あるが、その1つである ChaA の場合でも、膜貫通領域に存在する酸性アミノ酸がカチオン輸送活性に必要であることがわかった。

*Vibrio* の Pha システムは K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter 活性があることがわかった。

## 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9件)

1) Identification and characterization of the *Streptomyces globisporus* 1912 regulatory gene *IndYR* that affects sporulation and antibiotic production Ostash B, Rebets Y, Myronovskyy M, Tsypik O, Ostash I, Kulachkovskyy O, Datsuk Y, Nakamura T, Walker S, Fedorenko V. *Microbiology* 157 (1240-1249) 2011.

2) Characterization and analysis of the regulatory network involved in control of lipomycin biosynthesis in *Streptomyces aureofaciens* Tü117.

Horbal L, Rebets Y, Rabyk M, Luzhetskyy A, Ostash B, Welle E, Nakamura T, Fedorenko V, Bechthold A.

*Appl Microbiol Biotechnol.* 85 (1069-1079) 2010.

3) Glutamate 85 is involved in the sodium/proton exchange activity of the *Escherichia coli* ChaA.

Fukaya F, Tanaka K, Waditee R, Tanaka Y, Nakamura T, Takabe T.

Biosci Biotechnol Biochem. 74 (1116-1119) 2010.

4) The implication of YggT of *Escherichia coli* in osmotic regulation.  
Ito T, Uozumi N, Nakamura T, Takayama S, Matsuda N, Aiba H, Hemmi H, Yoshimura T. Biosci Biotechnol Biochem. 73 (2698-2704) 2009.

5) An Mrp-like cluster in the halotolerant cyanobacterium *Aphanothece halophytica* functions as a Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter.  
Fukaya F, Promden W, Hibino T, Tanaka Y, Nakamura T, Takabe T. Appl Environ Microbiol. 75 (6626-6629) 2009.

6) pH-dependent regulation of the multi-subunit cation/proton antiporter PhaI system from *Sinorhizobium meliloti*.  
Yamaguchi T, Tsutsumi F, Putnoky P, Fukuhara M, Nakamura T. Microbiology. 155 (2750-2756) 2009.

7) Identification and characterization of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter NhaS3 from the thylakoid membrane of *Synechocystis* sp. PCC 6803  
Tsunekawab K, Shijukua T, Hayashimotoa M, Kojimac Y, Onai K, Morishita M, Ishiura M, Kuroda T, Nakamura T, Kobayashi H, Sato M, Toyooka K, Matsuokai K, Omata T, Uozumia N. Journal of Biological Chemistry 284 (16513-16521) 2009.

8) An ABC transporter encoding gene *IndW* confers resistance to landomycin E.  
Ostash I, Rebets Y, Ostash B, Kobylyanskyy A, Myronovskyy M, Nakamura T, Walker S, Fedorenko V. Arch Microbiol. 190 (105-109) 2008.

9) Function of *IanI* in regulation of landomycin A biosynthesis in *Streptomyces cyanogenus* S136 and cross-complementation studies with Streptomyces antibiotic regulatory proteins encoding genes.  
Rebets Y, Dutko L, Ostash B, Luzhetskyy A, Kulachkovskyy O, Yamaguchi T, Nakamura T, Bechthold A, Fedorenko V. Arch Microbiol. 189 (111-120) 2008.

〔学会発表〕（計5件）

〔図書〕（計0件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況（計0件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

中村 辰之介 (NAKAMURA TATSUNOSUKE)  
新潟薬科大学・薬学部・教授  
研究者番号：20114308