

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25年 6月 20日現在

機関番号：33101
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22770132
 研究課題名（和文） ビブリオ属由来 NhaB 様輸送体の pH 依存的活性制御における分子機構の解明
 研究課題名（英文） Analysis on molecular mechanisms of pH-dependent regulation of VaNhaB from *Vibrio alginolyticus*.
 研究代表者
 山口 利男（TOSHIO YAMAGUCHI）
 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）：

本研究では、顕著な pH 依存性を示す *Vibrio alginolyticus* の NhaB 様輸送体(VaNhaB)について、pH 比依存的な大腸菌の NhaB 様輸送体(EcNhaB)との間でドメインスワッピング解析を行い、pH センサー領域の特定を試みた。その結果、VaNhaB の E373-D434 領域が pH 感受性に主要な役割を果たすことを見出し、またこの領域が pH センサーとして機能しうることを初めて明らかとした。

研究成果の概要（英文）：

We have conducted a series of domain swapping analysis between pH-sensitive NhaB-like antiporter from *Vibrio alginolyticus* (VaNhaB) and pH-insensitive NhaB-like antiporter from *Escherichia coli* (EcNhaB) in order to identify domains or regions that play critical roles in the pH-sensitivity of VaNhaB. Our results revealed the significant importance of the E373-D434 region of VaNhaB in the pH-dependent regulation of its Na^+/H^+ antiport activity. Furthermore, we demonstrated that E373-D434 region of VaNhaB was able to confer some degree of pH-sensitivity on our pH-insensitive chimeric antiporters that is mainly composed of EcNhaB except for first seven amino acid residues from N-terminal end, which strongly suggest that this region is able to act, at least partially, as a machinery that modifies the activity of NhaB-like antiporter in a pH-dependent manner.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合 計
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総 計	3,200,000	960,000	4,160,000

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：膜輸送と輸送蛋白質、イオン輸送体

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

1. 研究開始当初の背景

細菌の pH 制御機構を理解する上で、実際に H⁺輸送に関わる蛋白質自体の活性制御機構の理解は極めて重要であるが、その詳細が解明されている輸送体は数少ない。NhaB 型輸送体は、細菌のアルカリ条件下での細胞内 pH 制御に主要な役割を果たすと考えられている cation/H⁺ antiporter の一つであり、特に大腸菌の EcNhaB は、塩基性領域から酸性領域の広い範囲において細胞内 pH の維持に貢献する pH 非依存性の輸送体であると考えられていた。その一方で、pH 依存性の NhaB 様輸送体の存在も知られており、*Vibrio* 属の *Vibrio alginolyticus* の NhaB (VaNhaB) は、中性以下の pH で活性が著しく低下する pH 感受性の輸送体であることが示されていた。しかしながら、これらの輸送体間における pH 応答の差異の原因に関する報告例は無く、VaNhaB で見られたような pH 依存性の活性制御の分子機構についても全く不明であった。

2. 研究の目的

本研究では、NhaB 様輸送体の pH 依存性の活性制御機構の解明に向けた基盤の形成を目的とし、強い pH 感受性を示す VaNhaB と pH 非依存性の EcNhaB 間においてドメインスワッピング解析を行い、VaNhaB の pH 感受性に必須の領域の探索を行った。

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

nhaB 様遺伝子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。大腸菌の培養には LBK 培地 (1% trypton, 0.5% yeast extract, 0.5% KCl) を使用した。*EcNhaB* と *VaNhaB* のキメラ遺伝子は、各遺伝子をテンプレートに fusion PCR 法により作成し、配列を確認後 pHG165 の XmaI/SalI サイトに挿入し、T0114 株に導入した。

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

nhaB 様遺伝子を導入した T0114 株を LBK 培地中 OD₆₆₀=0.5~0.7 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 10,000 g で 15 分遠心分離し、上清をさらに 100,000 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℃ 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。

Na⁺/H⁺ antiport 活性は、蛍光 ΔpH 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 MgCl₂ pH 7.0~9.0) に 40 μg protein 相当の膜画分及び終濃度 1.5 μM の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 を加え、Na⁺依存性の pH 勾配の変化をアクリジンオレンジの蛍光 (励起波長: 492nm ± 1.5nm, 蛍光波長: 525nm ± 3.0nm) を指標に測定した。pH 勾配の変化が安定した後、25mM NH₄Cl 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 (%) を各 NhaB 様輸送体の Na⁺/H⁺ antiport 活性とした。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) VaNhaB の pH 感受性に必須の領域の探索

VaNhaB の pH 感受性に必須のアミノ酸領域の推定を目的として、pH 非感受性の EcNhaB を基に、N-末端側より段階的に VaNhaB と置換したキメラ変異体を複数作成し、個々の pH 応答性を解析した (Fig. 1)。このうち、N-末端側の 8 残基のみを VaNhaB と置換した変異体 (VE8) は EcNhaB と同様の pH 応答を示し、pH の低下に伴う急激な活性の低下は認められなかった。また、より広い領域を VaNhaB と置換した VE72、VE119、VE244、VE388、および VE426 変異体は EcNhaB と VaNhaB の中間程度の pH 応答を示したが、一方で 9 番目の親水性領域 (loop 9) の半分程度まで置換した VE434、および 9 番目の膜貫通領域 (TM9) までは VaNhaB と置換した VE500 変異体は VaNhaB とほぼ同様の pH 応答を示すことが明らかとなった (Fig. 1)。以上より、VaNhaB は 427 番目のロイシンから 434 番目のアスパラギン酸までの配列 (L427-D434) を失うと pH 感受性が部分的に損なわれることが示され、従ってこの領域が pH 感受性に大きく関与することが明らかとなった。ただし、VaNhaB の L427-D434 を EcNhaB の相当する領域と置換した変異体 (VaS) の pH 応答が VaNhaB とほぼ同様であったこと (データ示さず)、および上

述の VE72~VE426 が中程度の pH 応答性を示していたことから、VaNhaB の配列上には、L427-D434 以外にも pH 依存性に寄与する配列が存在する可能性が示唆された。

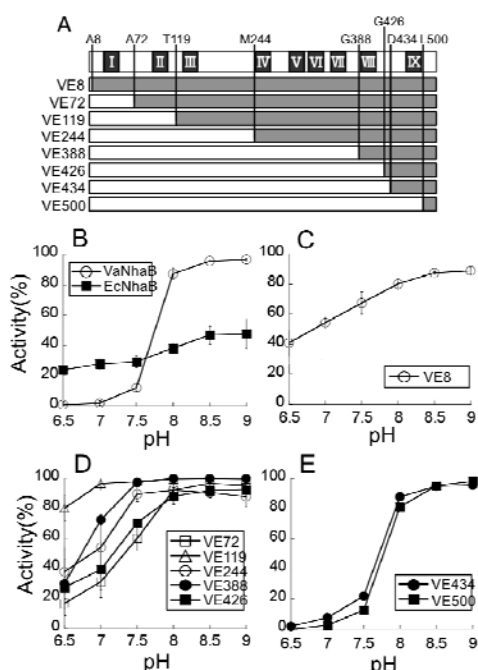


Fig. 1 VaNhaB/EcNhaB キメラ蛋白質の pH 応答
A. 作成したキメラ蛋白質の概略図。EcNhaB、VaNhaB 由来の領域をそれぞれ白塗り、黒塗りで示した。B~E. T0114 株に発現させた VaNhaB、EcNhaB、および各キメラ蛋白質の種々の pH における Na^+/H^+ antiport 活性。実験結果は全て 3 回以上の独立の実験の平均値を表し、標準偏差をバーで示した。

(2) VaNhaB の pH 感受性に関与する L427-D434 以外の領域の探索

次いで、VaNhaB の pH 感受性に関与する L427-D434 以外の領域について探索することとした。VaS 置換変異体をベースとして、他の領域を一部ずつ EcNhaB の相当する配列と置換した変異体を複数作成し、置換により pH 応答が低下する領域を探索した (Fig. 2)。その結果、ほとんどの置換変異体が VaNhaB と同様の pH 応答を示したのに対し、VaS(1-40Ec)、VaS(266-321Ec)、および VaS(373-426Ec)の核変異体が VaNhaB と異なる pH 応答を示すことが明らかとなった。これらのうち VaS(1-40Ec) および VaS(266-321Ec)については、活性の低下が起こる pH が VaNhaB と比較してアルカリ側にシフトしていたことから、これらの変異体では pH 依存性が増強されている可能性が示唆された。一方で VaS(373-426Ec) 変異体においては、pH の低下に伴う活性の減衰が VaNhaB と比較して緩やかとなり、pH 応答性の低下が認められた (Fig. 2)。従って、VaNhaB の pH 感受性には、前項で同定した L427-D434 領域を含む領域 (373 番目のグルタミン酸から 434 番目の

アスパラギン酸までの領域、以下 E373-D434 領域と表記) が重要な役割を果たすことが明らかとなった。

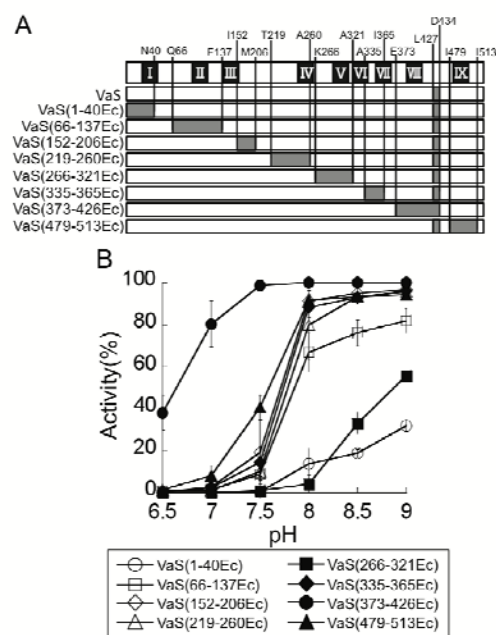


Fig. 2 一部置換 VaS 変異体の pH 応答
A. 作成した一部置換 VaS 変異体の概略図。凡例は Fig. 1 に準じた。B. 各一部置換変異体の種々の pH における Na^+/H^+ antiport 活性。実験結果は全て 3 回以上の独立の実験の平均値を表し、標準偏差をバーで示した。

(3) VaNhaB E373-D434 領域の「pH センサー」としての機能評価

前項で同定された VaNhaB の E373-D434 領域に関して、この領域が pH の感知および輸送体の活性制御を司る「pH センサー」として機能するか否かについて検証した。当初、EcNhaB 上で上述の領域に相当する部位 (Q371-E431) を VaNhaB の E373-D434 と置換した変異体を作成し、その pH 依存性の検証を試みたが、変異体の発現量が低く、また輸送活性も低かったため結論を得るに至らなかった (データ示さず)。そこで、上述で作成したキメラ変異体のうち、VaNhaB と同等の発現が見られ、かつ pH 依存性を示さないことが明らかとなっていた VE8 変異体 (Fig. 1) をベースに用い、VaNhaB の E373-D434 領域を導入することで、この領域の機能について検証を行うこととした。その結果、作成したキメラ変異体 [VE8(371-431Va)] の活性が pH 7.5 以下で急激に低下することが明らかとなり、VaNhaB の E373-D434 領域が pH 非依存性の NhaB 様輸送体においても pH センサーとして機能していることが示された (Fig. 3)。ただしこの変異体における pH 依存的な活性低下の程度が VaNhaB と比較して小さかったことか

ら、VaNhaB の pH 感受性における E373-D434 の役割は限定的であることも明らかとなった。従って VaNhaB の pH 感受性には、この領域以外の別の領域が必要であることが再度示唆された。なお、E373-D434 領域の詳細構造、および pH 依存的な構造変化の有無について検討すべく、VaNhaB の当該領域の膜トポロジーについてシステインスキanning法を用いた解析を試みたが、解析条件設定の段階で技術上の問題が生じたため、現在も解析条件の検討を継続している。

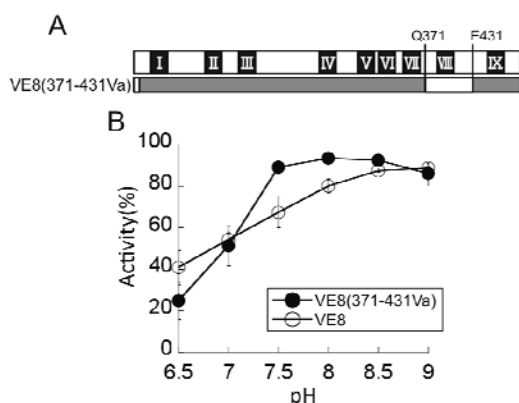


Fig. 3 VE8(371-431)変異体の pH 応答性

A. VE8(371-431Va)の概略図。凡例はFig. 1に準じた。B. VE8(371-431Va)の pH 応答性。比較のため VE8 の pH 応答パターンを再掲した。実験結果は全て 3 回以上の独立の実験の平均値を表し、標準偏差をバーで示した。

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 1 件)

桐山和可子、中村辰之介、福原正博、山口利男、Critical involvement of the E373-D434 region in the acid sensitivity of a NhaB-type Na^+/H^+ antiporter from *Vibrio alginolyticus*, Biochemistry, 査読有、2012 年、51 巻、7766-7774

〔学会発表〕(計 3 件)

①桐山和可子、重松亨、井口晃徳、福原正博、中村辰之介、山口利男、pH感受性型・非感受性型NhaB様輸送体の細菌界における分布と進化的起源、第 85 回日本生化学会大会年会、2012 年 12 月、福岡

②桐山和可子、福原正博、中村辰之介、山口利男、*V. alginolyticus* 由来 VaNhaB 輸送体の 373E-434D 領域 における pH 感受性決定因子の探索、第 84 回日本生化学会大会、2011 年 9 月、京都

③桐山和可子、福原正博、中村辰之介、山口利男、部分置換体を用いた *V. alginolyticus* 由来 Na^+/H^+ antiporter VaNhaB (VaNhaB) の pH

感受性決定因子の探索、第 83 回日本生化学会大会、2010 年 12 月、兵庫

④桐山和可子、福原正博、中村辰之介、山口利男、*V. alginolyticus* 由来 Na^+/H^+ antiporter VaNhaB の pH 感受性に関与する領域の探索、第 54 回日本薬学会関東支部大会、2010 年 10 月、東京

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

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：