

機関番号：32663

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2009～2010

課題番号：21870035

研究課題名（和文）大腸菌と枯草菌で見つかった新規 2 成分 K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> アンチポーターの作用機序の解明研究課題名（英文）Elucidation of the functional mechanism of the novel 2-component K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporters found in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*.

研究代表者

藤澤 誠 (FUJISAWA MAKOTO)

東洋大学・生命科学部・助教

研究者番号：70549641

研究成果の概要（和文）:

大腸菌と枯草菌で新規に発見された膜タンパク質と親水性タンパク質の 2 成分で機能する K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> アンチポーターの作用機序を解明するため、タンパク質間の相互作用の検出系の確立と相互作用に関与するアミノ酸の同定を試みた。各タンパク質にペプチドタグを付与し、プルダウンアッセイ法とブルーネイティブゲル電気泳動法を行ったところ、枯草菌の親水性タンパク質 YhaT と膜タンパク質 YhaU との間の相互作用を検出することに成功した。

研究成果の概要（英文）:

To elucidate the functional mechanism of the novel 2-component K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporters composed from a membrane protein and a peripheral protein found in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*, the detection systems of its interaction was established. Peptide tags were introduced into the proteins and the interaction between the proteins from *B. subtilis* was successfully detected by both pull-down assay and blue-native PAGE.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,110,000	333,000	1,443,000
2010年度	1,010,000	303,000	1,313,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,120,000	636,000	2,756,000

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：カリウムイオン、アンチポーター、大腸菌、枯草菌、分子生物学

## 1. 研究開始当初の背景

すべての生物は生きるために細胞の内外で物質を交換しなければならない。カリウムイオン (K<sup>+</sup>) やナトリウムイオン (Na<sup>+</sup>) などの無機イオンは DNA やタンパク質の構造に影響を与える重要な要素であり、それらのイオンを細胞内外に輸送し、細胞内のイオン濃度を調節することは生命活動の維持に重要である。生物は 1 次能動輸送体、2 次能動輸送体、受動輸送体という 3 種類の輸送体を駆使して、

細胞内のイオン濃度を調節している。2 次能動輸送体は、機能や構造がより単純な受動輸送体から進化したものであると考えられているが、それらの中間的な性質を示すイオン輸送体は見つかってこなかった。しかし、研究代表者らは大腸菌の KefF-KefC システムと枯草菌の YhaT-YhaU システムが 2 次能動輸送体である K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> アンチポーターと受動輸送体である K<sup>+</sup> チャネルの中間的な性質を示すことを世界で初めて発見した。

細菌の 1 価カチオン/プロトンアンチポーターは  $\text{Na}^+$  や  $\text{K}^+$  を細胞外に排出し、 $\text{H}^+$  を取り込むことで、高濃度で毒性を示すカチオンへの耐性や細胞内 pH の維持に寄与している。細菌の 1 価カチオン/プロトンアンチポーターファミリーは多数存在し、NhaB、NhaC、NhaD、CPA1、CPA2、CPA3 ファミリーなどに分類されている。これらのファミリーの中で唯一、CPA2 ファミリーが  $\text{K}^+$  チャンネル(受動輸送体)と考えられているいくつかのタンパク質を含んでいた。

大腸菌の KefB と KefC タンパク質は最もよく研究された CPA2 ファミリーのメンバーであり、 $\text{K}^+$  チャンネルとの一次構造の類似性やイオンの輸送速度などの機能の特性から  $\text{K}^+$  チャンネルであると考えられていた。通常、KefB と KefC は細胞内の酸化還元状態に関するグルタチオン(GSH)によって抑制されているが、大腸菌がメチルグリオキサールや *N*-エチルマレイミドなどの求電子試薬に曝されたとき、KefB と KefC はその制御から開放されて  $\text{K}^+$  を排出する。この  $\text{K}^+$  の排出が未知の  $\text{H}^+$  の取り込み系を刺激し、細胞内が酸性化されることで求電子試薬に対する耐性が得られことがスコットランドの Ian Booth 教授らによって提案されていた。しかしながら、もし、KefB や KefC が  $\text{K}^+/\text{H}^+$  アンチポート活性を持っていれば、この未知の  $\text{H}^+$  の取り込み系は KefB もしくは KefC 自身であることが考えられた。また、枯草菌の YhaU と好アルカリ性 *Bacillus pseudofirmus* QF4 の AmhT はどちらも大腸菌の KefB と KefC のホモログであり、研究代表者のグループとアメリカの Terry Krulwich 教授らのグループによって  $\text{K}^+$  排出系( $\text{K}^+$  チャンネル)であると推定されていた。

これら 4 つの  $\text{K}^+$  チャンネル様の KefB、KefC、YhaU、AmhT は、その他の CPA2 ファミリーに属する機能が同定されたアンチポーターとは異なり、それぞれ同じオペロン内にコードされた親水性タンパク質 KefG、KefF、YhaT、AmhM によって  $\text{K}^+$  排出活性が変化することが報告されていた。そこで研究代表者らが  $\text{K}^+/\text{H}^+$  アンチポート活性を測定したところ、KefC と YhaU は単独では活性がなく、それぞれ KefF と YhaT の共発現によって活性を示すことが明らかとなった。また、AmhT は単独でも  $\text{K}^+/\text{H}^+$  アンチポート活性を示したが、AmhM との共発現により、活性が高くなった。

以上のことから、これらの 2 成分からなる  $\text{K}^+/\text{H}^+$  アンチポーターは受動輸送体と 2 次能動輸送体の中間的存在であることが示唆された。

## 2. 研究の目的

研究の背景で述べたように、大腸菌の KefF-KefC と枯草菌の YhaT-YhaU は膜タンパク質(KefC, YhaU)のみでは  $\text{K}^+$  チャンネルとして機能するが、親水性タンパク質(KefF, YhaT) と共発現させると  $\text{K}^+/\text{H}^+$  アンチポート活性が観察された。このことから、親水性タンパク質と膜タンパク質が相互作用していることが示唆された。しかしながら、これらのタンパク質間での相互作用は実験的に証明されていなかった。そこで、本研究では大腸菌と枯草菌で発見された膜タンパク質と親水性タンパク質の 2 成分で機能する新規  $\text{K}^+/\text{H}^+$  アンチポーターの作用機序を解明するため、これらのタンパク質間の相互作用の検出系を確立し、相互作用に関与するアミノ酸を同定することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) ペプチドタグを付与したタンパク質の遺伝子のクローニング

プラスミドベクターとして pKK223-3 ベクターを、遺伝子クローニング用の宿主として大腸菌 XL-1 Blue MRF' 株を用いた。培地には LB 培地を用いた。親水性タンパク質である KefF と YhaT には N 末端側に StrepTagII を付与し、膜タンパク質である KefC と YhaU には C 末端側に His<sub>6</sub> タグを付与した遺伝子をそれぞれ pKK223-3 ベクター中にクローニングした。クローニングした遺伝子の塩基配列が正しいことをシーケンシング解析によって確認した。

### (2) 形質転換と反転膜小胞の調製

解析用の宿主としては、3 つの主要な  $\text{Na}^+(\text{K}^+)/\text{H}^+$  アンチポーターを欠損した大腸菌 KNabc 株を用いた。KNabc 株はナトリウムイオン濃度が高いと生育できないため、培地には LB 培地の塩化ナトリウムの代わりに塩化カリウムを添加した LBK 培地を用いた。作製したプラスミドを用いて KNabc 株を形質転換し、得られた形質転換体からフレンチプレス法によって細胞膜(反転膜小胞)を調製した。

### (3) ウェスタンブロットング解析

調製した反転膜小胞中のペプチドタグを付与した目的タンパク質の発現量を調べるため、ペプチドタグに対する抗体を用いてウェスタンブロットング解析を行った。また、目的タンパク質の可溶性効率を調べるため、反転膜小胞を様々な界面活性剤で可溶化し、超遠心分離後の可溶性画分を SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離し、ウェスタンブロットング法で解析した。

### (4) $\text{K}^+/\text{H}^+$ アンチポート活性の測定

ペプチドタグを付与した 2 成分 K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> アンチポーターが活性を保持していることを、細胞膜を介して形成される pH の蛍光プローブであるアクリジンオレンジを用いた蛍光消光法によって確認した。

#### (5) 相互作用の解析

相互作用の解析は、ブルダウンアッセイとブルーネイティブゲル電気泳動法の 2 通りで行った。

##### ブルダウンアッセイ

ブルダウンアッセイでは、Ni-NTA カラムを用いて His<sub>6</sub> タグを付与した膜タンパク質をカラムに結合させたときに、StrepTagII を付与した親水性タンパク質が共溶出されるかを調べた。また、逆に StrepTactin カラムに StrepTagII を付与した親水性タンパク質を結合させたときに、His<sub>6</sub> タグを付与した膜タンパク質が共溶出されるかも調べた。

##### ブルーネイティブゲル電気泳動

ブルーネイティブゲル電気泳動法では、まず StrepTagII を付与した親水性タンパク質と His<sub>6</sub> タグを付与した膜タンパク質を共発現させた大腸菌から細胞膜を調製した。細胞膜は可溶化したのち、電気泳動に供し、PVDF 膜に転写してウェスタンブロットング解析を行った。ウェスタンブロットング解析では StrepTagII 抗体と His<sub>6</sub> 抗体を用い、親水性タンパク質と膜タンパク質をそれぞれ検出した。各バンドが同一サイズの位置に検出されることを確認することで、複合体が形成されているかを調べた。

#### (6) 部位特異的アミノ酸変異の導入

親水性タンパク質と膜タンパク質のそれぞれにペプチドタグを付与した遺伝子をクローニングしたプラスミドを用いて、インビトロジェンのジーンテイル変異導入システムによって、部位特異的アミノ酸変異の導入を行った。

## 4. 研究成果

### (1) ペプチドタグを付与した 2 成分 K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> アンチポーターの活性と発現解析

StrepTagII を付与した親水性タンパク質 (KefF と YhaT) の遺伝子と、His<sub>6</sub> タグを付与した膜タンパク質 (KefC と YhaU) の遺伝子を保持したプラスミドを構築した。これらのプラスミドを保持した大腸菌 KNabc 株から細胞膜を調製し、K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> アンチポート活性を測定したところ、ペプチドタグを付与した KefF-KefC システムは活性のほとんどが失われていた。一方、YhaT-YhaU システムではタグを付与していない YhaT-YhaU システムと同等の K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>

アンチポート活性を保持していることが分かった。また、ウェスタンブロットング解析から、StrepTagII-YhaT と YhaU-His<sub>6</sub> のどちらも大腸菌 KNabc 株中で発現していることが確認できた。

### (2) 親水性タンパク質 YhaT と膜タンパク質 YhaU 間の相互作用の検出

タンパク質の発現が確認できた枯草菌の YhaT-YhaU システムに関して、ブルダウンアッセイとブルーネイティブゲル電気泳動法によるタンパク質間相互作用の検出を試みた。

##### ブルダウンアッセイ

Ni-NTA カラムを用いたブルダウンアッセイには KNabc/pKK223-3、KNabc/pKK223-3-StrepTagII-YhaT, YhaU、KNabc/pKK223-3-StrepTagII-YhaT, YhaU-His<sub>6</sub> から調製した細胞膜を DDM で可溶化したものをサンプルとして用いた。ベクターのみを保持したサンプルと YhaU に His<sub>6</sub> タグが付与していないサンプルでは、溶出画分注に StrepTagII-YhaT が検出できなかった。一方、His<sub>6</sub> タグを付与した YhaU を保持している場合、溶出画分に StrepTagII-YhaT が検出された。この結果は YhaT と YhaU が相互作用していることを示唆した。また、StrepTactin カラムを用いた実験においても同様の結果が得られた。

##### ブルーネイティブゲル電気泳動法

KNabc/pKK223-3 株と KNabc/pKK223-3-StrepTagII-YhaT, YhaU-His<sub>6</sub> 株から調製した細胞膜をそれぞれ DDM で可溶化し、ブルーネイティブゲル電気泳動法で分離後、ウェスタンブロットング法で目的タンパク質を検出したところ、抗 StrepTagII 抗体で検出されたバンドと抗 His<sub>6</sub> 抗体で検出されたバンドはどちらもおよそ 250 kDa と同じサイズであった。このことは、StrepTagII-YhaT と YhaU-His<sub>6</sub> が複合体を形成していることを示唆した。また、YhaT と YhaU のどちらか又は両方とも 2 量体以上のオリゴマーとなっていることが示唆された。

以上のように、枯草菌の YhaT-YhaU システムにおいて、YhaT と YhaU 間の相互作用の検出系を構築することができた。本研究では、大腸菌の KefF-KefC システムはペプチドタグの導入により相互作用の検出系を構築できなかった。しかしながら、2009 年に Ian Booth 教授らによって、ヒスチジンタグを付与した KefC の C 末端側親水性領域と KefF の融合タンパク質の立体構造が報告された。それによると、KefC の C 末端領域は 2 量体を形成してヒンジを形成し、同じく 2 量体を形成した KefF がそのヒンジ部位に結合している。この

構造から、BoothらはKefFがKefCのヒンジ部位に結合することで、ヒンジの角度が変化し、KefCのチャンネルの開閉が起こるというモデルを提唱した。ただし、このタンパク質は融合タンパク質であるため、KefFとKefCが相互作用しているという確証とはなっていない。したがって、本研究の成果はCPA2ファミリーの2成分 $K^+/H^+$ アンチポーターの親水性タンパク質と膜タンパク質が相互作用をしていることを示した最初の成果であるといえる。

### (3) 部位特異的アミノ酸変異の導入

pKK223-3-StrepTagII-YhaT, YhaU-His<sub>6</sub>をテンプレートとし、インピトロジェンのジーンテイル変異導入システムによって、部位特異的なアミノ酸変異の導入を行った。これまでに70種類の変異導入を試み、その全てでポジティブクローンを取得済みである。現在全てのクローンの塩基配列を確認中であるが、8つについては塩基配列が正しいことを確認済みである。今後はこれらのプラスミドを用い、本研究で構築したYhaT-YhaU間の相互作用の検出系を利用して、YhaTとYhaU間の相互作用に重要なアミノ酸を同定する予定である。

## 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)

[学会発表](計2件)

Makoto Fujisawa. Detection of the interaction between membrane protein YhaU and hydrophilic protein YhaT of the 2-component  $K^+/H^+$  antiporter from *Bacillus subtilis*. 8<sup>th</sup> International Symposium on Biocscience and Nanotechnology. 2010年12月17日・18日(東洋大学(東京都))

藤澤 誠. CPA2ファミリーに属する2成分 $K^+/H^+$ アンチポーターのサブユニット間の相互作用の検出. 第33回日本分子生物学会・第83回日本生化学会 合同大会. 2010年12月6日~10日(神戸ポートアイランド(兵庫県))

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

藤澤 誠 (FUJISAWA MAKOTO)  
東洋大学・生命科学部・助教  
研究者番号: 70549641

### (2) 研究分担者(0)

### (3) 連携研究者(0)