

平成 30 年 5 月 24 日現在

機関番号：32663

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07012

研究課題名(和文) Mrp型Na⁺/H⁺アンチポーターのイオン選択透過機構とイオン輸送経路の解明研究課題名(英文) The elucidation of the mechanisms of ion selectivity and ion transport pathway of Mrp type Na⁺/H⁺ antiporter

研究代表者

伊藤 政博 (Ito, Masairo)

東洋大学・生命科学部・教授

研究者番号：80297738

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではMrp型Na⁺/H⁺アンチポーターのイオン輸送経路を解明することを目的とした。近年、この酵素の相同タンパク質の中にNa⁺やK⁺以外にもCa²⁺を輸送するものが報告された。そこで、輸送するイオンの異なる3種類のMrpホモログを利用することにより、本研究の目的の解明を試みた。成果として、本酵素の共役カチオン輸送経路が2つのサブユニット間の境界面であるMrpAの5番目の膜貫通領域とMrpDの12番目の膜貫通領域で形成されていることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：In this study, clarification of the ion transport route of Mrp type Na⁺/H⁺ antiporter was carried out. It has been reported that Ca²⁺ is transported in addition to Na⁺ and K⁺ among homologous proteins of this enzyme. Therefore, we attempted to elucidate the purpose of this research by using three different Mrp homologs of cations to be transported. As a result, it was revealed that the coupling cation transport route of this enzyme was formed at the fifth transmembrane segment of MrpA and the twelfth transmembrane segment of MrpD which are the interface between the two subunits.

研究分野：極限環境微生物学

キーワード：アンチポーター Mrp イオン選択性 好アルカリ性細菌 pHホメオスタシス Bacillus カルシウムイオン ナトリウムイオン

1. 研究開始当初の背景

(1) Na^+/H^+ アンチポーターは、細胞内への H^+ の再取込み経路の一つとして、また、細胞内へ流入する Na^+ の排出経路としてもアルカリ性環境適応に不可欠な膜内在性タンパク質として知られている。 Na^+/H^+ アンチポーターの交換輸送はプロトン駆動力に共役しており、大腸菌の Na^+/H^+ アンチポーターである NhaA では $1\text{Na}^+/2\text{H}^+$ の交換比率で輸送が行われる。このように、より多くの H^+ を輸送することでアルカリ性環境においても膜電位依存的に Na^+ を能動輸送することができると考えられている。また、 Na^+/H^+ アンチポーターはどの生物種においても普遍的に存在するタンパク質であり、細胞内ホメオスタシスにとって重要な役割を担っている。特に好アルカリ性 *Bacillus* 属細菌においては、Mrp (マープ; Multiple Resistance and pH adaptation) と呼ばれる Na^+/H^+ アンチポーターが高アルカリ性環境適応において中心的な役割を担っている。

(2) Mrp は、好アルカリ性細菌 *Bacillus halodurans* C-125 株のアルカリ感受性変異株を相補する遺伝子として発見された。一般的に Na^+/H^+ アンチポーターの多くは一遺伝子から発現し、単量体もしくはホモ二量体として機能しているものが多い。しかし、Mrp はオペロン構造をとる 7 つの遺伝子 (*mrpABCDEFG*) から発現し、その Na^+/H^+ アンチポート活性には、すべての遺伝子産物を必要とする。*mrp* 遺伝子にコードされたタンパク質はすべて疎水性タンパク質であり、それら遺伝子産物は膜タンパク質複合体を形成している。Mrp は、好アルカリ性細菌に特異的ではなく広く真正細菌や古細菌にその相同タンパク質が存在する。それらホモログの *mrp* 遺伝子クラスターの構造は多様性がある。2012 年に研究代表者のグループは、米国イエローストーン国立公園の Ca^{2+} が豊富な温泉から単離さ

れた *Thermomicrobium roseum* の Mrp ホモログを研究し、この Mrp が、 Na^+/H^+ アンチポート活性がなく、 $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ アンチポート活性のみを有することを報告した。

(3) Mrp に関する研究は、1990 年以降、日本や米国、ヨーロッパの研究グループによって、その生理的機能や複合体構造などが明らかとなり、2014 年に研究代表者のグループが精製した Mrp をリポソームに再構成し、活性のあるプロテオリポソームの調製に初めて成功した。Mrp の特徴の一つとして、MrpA と MrpD サブユニットが呼吸鎖複合体の複合体 I (NADH 酸化還元酵素) のプロトン輸送サブユニットである NuoL、NuoM、NuoN と相同性があり、同じ祖先タンパク質から進化したと考えられている。複合体 I の NuoL、NuoM、NuoN は、“アンチポート”サブユニットとも呼ばれており、2013 年に Baradaran と Sazanov らの結晶構造解析によりその詳細な H^+ 輸送経路が明らかになった。MrpA、MrpD、NuoL、NuoM、NuoN は、共通の NDH-I ドメインを持ち、イオン輸送にかかわると推定される荷電アミノ酸残基も高度に保存されている。これにより、近年、Mrp のイオン輸送経路を複合体のイオン輸送経路を参考に議論することができるようになってきた。

2. 研究の目的

(1) トランスポーターやチャネルは、様々なイオンを輸送する。電位駆動型チャネルではイオンの選択透過を規定するフィルター領域の研究が分子レベルで詳細に明らかになっているものが多い。しかし、トランスポーターにおけるイオン選択透過の研究は、結晶構造が解かれた一部のタンパク質を除き不明な点が多い。本研究では多くの微生物が普遍的に持ち、感染症や多剤耐性菌予防のターゲットタンパク質としても注目される Mrp 型 Na^+/H^+ アンチポーターを

研究対象とする。

(2) 近年、この酵素の相同タンパク質の中に Na^+ や K^+ 以外にも Ca^{2+} を輸送するものが報告された。そこで、本研究では、輸送するイオンの異なる Mrp ホモログを利用することにより、この酵素のイオン選択透過機構とイオン輸送経路を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 本研究では、Mrp 型 Na^+/H^+ アンチポーターのイオン選択透過機構とイオン輸送経路の解明を目指した。そのために、Mrp 型アンチポーターにおいて輸送するイオンが異なる Na^+/H^+ アンチポート型 (Na^+/H^+ 型)、 K^+/H^+ アンチポート型 (K^+/H^+ 型)、

$\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ アンチポート型 ($\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ 型) の 3 種類に着目して研究を行った。まず 3 種類の Mrp アンチポーター間の同一サブユニットを交換することによってイオン選択性が変化するかを調べた。実際には、複合体 I の H^+ 輸送サブユニットと相同性がある MrpA と MrpD を検討対象とした。

(2) 上記の結果と 3 種類のアンチポーターのアライメント解析、更に Na^+/H^+ 型でこれまで研究代表者のグループや他の研究グループによって行われた変異導入実験の結果をもとに Na^+ 輸送部位に関与すると推定される候補領域を選抜した。その後、 Na^+/H^+ 型遺伝子に $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ 型の推定イオン選択候補領域のアミノ酸残基を部位特異的変異導入法で導入し、キメラ型 Mrp を作成した。

(3) 大腸菌の主要な Na^+/H^+ アンチポーターを欠損しているため 100mM-NaCl が添加された培地で生育できない Na^+ 感受性株 (KNabc 株) にキメラ型 Mrp を発現させ、反転膜小胞を調製し、 $\text{Na}^+(\text{Ca}^{2+})/\text{H}^+$ アンチポート活性を測定することで輸送するイオンを同定した。候補領域がイオン選択透過機構に関与するかを輸送するイオン変化によ

り判断した。

(4) これまでの研究成果結果と今回の結果、それと複合体 I のプロトン輸送経路情報を利用して Mrp 型アンチポーターのイオン輸送経路のモデルを提唱した。

4. 研究成果

(1) MrpA、MrpD 置換型 Mrp アンチポーターにおける生理学的機能解析

MrpA 置換型 Mrp アンチポーターでは $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ 型 Mrp アンチポーターの *mrpA* 遺伝子を置換したキメラ型 Mrp は、僅かな Na^+ 耐性を示した。また、 Na^+/H^+ 型の約 25% の Na^+/H^+ アンチポート活性と、 $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ 型の約 60% の $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ アンチポート活性を示し、かつ MrpABCDEFG 複合体の形成が Blue-Native PAGE (BN-PAGE) によって確認できた。しかしながら、MrpD を $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ 型に置換したキメラ型 Mrp は Na^+ 耐性が持たず、ほとんど Na^+/H^+ アンチポート活性を示さなかった。また、BN-PAGE の結果、MrpD を $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ 型に置換したキメラ型 Mrp が MrpABCD サブ複合体しか形成していないことが分かった。これより MrpD 置換型 Mrp アンチポーターでは機能的なアンチポーター複合体が形成できないことが分かった。これらの実験結果より、 $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ 型 Mrp アンチポーターの *mrpA* 遺伝子を置換したキメラ型 Mrp では、 $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ アンチポート活性のみを示すものにはならないことが分かった。～ の結果、Mrp アンチポーターにおけるカチオン選択性の決定には MrpA と MrpD サブユニット両方が関与していることが示唆された。

(2) MrpA+MrpD 置換型 Mrp アンチポーターにおける生理学的解析

Na^+/H^+ 型 Mrp アンチポーターから $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ 型由来の MrpA と MrpD に置換したキメラ型 Mrp アンチポーターは Na^+ 耐性を持たず、 $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ 型の約 60% の $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ アンチポート活性のみを示す Mrp アンチポーターであることが示された。これら結果より、Mrp アンチポーターでは MrpA と MrpD サブユニットの両方がイオン輸送とカチオン選択性の決定に関与することが示唆された。

(3) アミノ酸置換変異であるにもかかわらず Na^+/H^+ 型 Mrp が $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ 型に共役イ

オン選択性が変化するアミノ酸部位を3か所同定することに成功した。このことは、本酵素のイオン輸送経路が MrpA の5番目の膜貫通領域と MrpD の12番目の膜貫通領域で形成されていることが明らかとなった。イオン輸送モデルとしては MrpA、MrpD サブユニットが H⁺輸送経路として機能し、両サブユニットの境界面でカチオンを輸送するイオン輸送体系をとっている可能性が示された。また、本研究の知見はこれまでに提唱されてきた、MrpA がカチオン、MrpD が H⁺の輸送経路として機能しているモデルと MrpA だけで Na⁺/H⁺アンチポーターとして機能するモデルを否定する結果となった。

2つのサブユニット間の境界面でイオン輸送経路を作っていることはとてもユニークであり、今後、Mrp 型アンチポーターの阻害剤探索研究でも有用な知見が得られたと考えている。

< 引用文献 >

- Kudo et al, *J. Bacteriol.*, 1990
Swartz et al, *Extremophiles*, 2005
Morino & Ito, *FEMS Microbiol. Lett.*, 2012
Morino et al, *J. Bacteriol.*, 2014
Mathiesen & Hagerhall, *BBA*, 2002
Baradaran et al, *Nature*, 2013
Kosono et al, *BBA*, 2006
Morino et al, *J. Bacteriol.*, 2008
Kajiyama et al, *Microbiology*, 2009
Morino et al, *JBC*, 2010

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2件)

Ito M, Morino M, Krulwich TA, Mrp Antiporters Have Important Roles in Diverse Bacteria and Archaea. *Frontiers in Microbiology*, 8, 2017, 2325 (12 pages). DOI: 10.3389/fmicb.2017.02325 (査読有)

Morino M, Ogo S, Krulwich TA, Ito M,

Differences in the phenotypic effects of mutations in homologous MrpA and MrpD subunits of the multi-subunit Mrp-type Na⁺/H⁺ antiporter, *Extremophiles*, 21(1), 2017, 51-64. DOI: 10.1007/s00792-016-0877-z (査読有)

[学会発表] (計7件)

Masahiro Ito, Mitsue Matsui: Elucidation of a Substrate Transport Pathway in the Multi-subunit Mrp-type Cation/Proton Antiporter by Heterologous Subunit Replacement, ASM Microbe 2017, June 3, 2017, New Orleans, USA

Masahiro Ito: Elucidation of ion selectivity and identification of ion transport subunits in the multi-subunit Mrp-type Na⁺/H⁺ antiporter, 9th ASME (Asian Symposium on Microbial Ecology, April 28, 2017, Pusan, South Korea

松井光恵、伊藤政博: マルチサブユニット型カチオン/H⁺アンチポーターにおけるイオン輸送サブユニットの同定、日本農芸化学会 2017 年度大会、京都女子大学、2017 年 3 月 17 日~20 日

Mitsue Matsui, Masahiro Ito: Elucidation of ion selectivity and identification of ion transport subunits in the Mrp type antiporter, 1st International Conference on Applied Microbiology (ICAM-VN 2016), December 7-10, 2016, the VNUHCM-University of Science, Ho chi minh city, Vietnam

松井光恵、伊藤政博: マルチサブユニット型 Mrp アンチポーターのイオン選択性と輸送経路の解明、極限環境生物学会 2016 年度 (第 17 回) 年会、東京工業大学・すずかけ台キャンパス、2016 年 11 月 25 日~26 日

松井光恵、伊藤政博 : Mrp アンチポーターにおけるイオン選択性と輸送サブユニットの解明、日本農芸化学会関東支部 2016 年度支部大会、日本獣医生命科学大学、2016 年 10 月 15 日

松井光恵、伊藤政博 : Elucidation of ion selectivity and ion transport mechanism in Mrp antiporter、日本農芸化学会 2016 年度大会、札幌コンベンションセンター、2016 年 3 月 27 日~30 日

[図書] (計 0 件)

[産業財産権] (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://www2.toyo.ac.jp/~ito1107/>

1. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 政博 (MASAHIRO, Ito)
東洋大学・生命科学部・教授
研究者番号 8 0 2 9 7 7 3 8

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし