

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 21 日現在

機関番号：32663

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23770156

研究課題名(和文) 2成分K⁺/H⁺アンチポーターYhaTUの大量精製系の確立と作用機序の解明研究課題名(英文) Purification and functional analysis of YhaTU system, a two component K⁺/H⁺ antiporter from *Bacillus subtilis*

研究代表者

藤澤 誠 (Fujisawa, Makoto)

東洋大学・食環境科学部・准教授

研究者番号：70549641

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：枯草菌のK⁺/H⁺アンチポーターYhaTUは親水性タンパク質であるYhaTと膜タンパク質であるYhaUからなり、その機能からイオンチャンネルとトランスポーターの中間的な存在であることが推測されている。本研究ではYhaTUの大量調製系の確立と、yhaTU遺伝子への部位特異的変異の導入により、YhaTUの作用機序を解明するための基盤を形成することを目的とした。

大量精製系の確立のためにStrepTagIIとHisタグを導入した融合遺伝子を作製した。部位特異的変異の導入においては、56種類の変異の導入に成功した。以上のことから、YhaTUの機能を解析するための基盤を形成できたと考えている。

研究成果の概要(英文)： *Bacillus subtilis* YhaTU system is a K⁺/H⁺ antiporter which consists from two components, the hydrophilic ancillary protein YhaT and the membrane-embedded YhaU. The YhaTU system is not only a unique cation proton antiporter but also an interesting enzyme in respect of the evolution of ion antiporter from ion channel. In this study, purification of the YhaTU system and cloning the genes which have point mutations at the various points of the genes have been tried.

To purify the YhaTU complex, StrepTagII and His6 tags were introduced at N-terminal or C-terminal of the proteins. Fifty six mutations were also introduced into the genes to test the function of each amino acid residues. Now the basis to analyze the detail function of YhaTU has been constructed.

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：イオンチャンネル トランスポーター

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^+)やナトリウムイオン(Na^+)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、2007 年に申請者らは大腸菌の 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^+/H^+ アンチポーターと受動輸送体である K^+ 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 Na^+ や K^+ を細胞外に排出し、 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 K^+ チャネル(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、 K^+ チャ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 K^+ チャ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与するグルタチオン(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 K^+ を排出する。この K^+ の排出が未知の 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る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 K^+/H^+ アンチポート活性を持っていれば、この未知の 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* OF4 の AmhT はどちらも大腸菌の KefB と KefC のホモログであり、申請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 K^+ 排出系(K^+ チャネル)であると推定されていた。

これら 4 つの K^+ チャネル様の 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 K^+ 排出活性が変化することが報告されていた。そこで申請者らが K^+/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 K^+/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 K^+/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

推定上の 2 成分 K^+/H^+ アンチポーターに関して、次の 2 つの仮説が考えられた。

仮説(1) 膜タンパク質と親水性タンパク質の 2 つのタンパク質が相互作用している。

仮説(2) 親水性タンパク質の結合によって膜タンパク質の構造が変化し、 K^+ の流出が H^+ の流入と共役するようになる。つまり、 K^+ チャネルから K^+/H^+ アンチポーターへと変わる。

仮説(1)に関しては、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た。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 のチャネルの開閉が起こるというモデルを提唱した。しかしながら、このタンパク質は融合タンパク質であるため、生体内で KefC と KefF が相互作用しているという確証とはなっていない。また、KefC のヒンジの角度の変化がどのように KefC の立体構造と機能を変化させるのかは明らかとなっていない。

申請者は親水性タンパク質(KefF または YhaT)にペプチドタグのストレップタグ II を、また、膜タンパク質(KefC または YhaU)にヒスチジンタグを付与した遺伝子をクローニングし、相互作用の検出を試みた(平成 21~22 年 科学研究費補助金 若手研究(スタートアップ) 課題番号 21870035)。タグを付与した KefF-KefC の K^+/H^+ アンチポート活性は低下したが、タグを付与した YhaT-YhaU の K^+/H^+ アンチポート活性は正常であった。この YhaT-YhaU の相互作用をプルダウンアッセイ法によって確認したところ、YhaT が YhaU と共に溶出され、さらに YhaT-YhaU の複合体と思われるバンドがウェスタンブロッティング法で検出された。この結果は、このアンチポーターファミリーにおいて親水性タンパク質と膜タンパク質が生体内で直接相互作用していることを示す初めてのデータとなった。しかしながら、YhaT-YhaU の複合体のほか、YhaT や YhaU のモノマー、YhaU の

ダイマー、YhaT-YhaU のダイマーと思われるタンパク質も含まれており、これらのタンパク質のどれが K^+/H^+ アンチポート活性を保持しているのかは明らかになっていない。

以上のことから、本研究では、枯草菌の YhaT-YhaU システムにおいて以下の3点に焦点を絞って実験を行ない、仮説(2)の膜タンパク質の構造の変化を明らかにするための基盤を形成することを目的とした。

人工膜上に再構成したタンパク質の活性測定系の確立と機能性タンパク質の同定

タグを付加したタンパク質の大量精製系の構築

部位特異的なアミノ酸変異導入による K^+/H^+ アンチポート活性に重要なアミノ酸の同定

近年、受動輸送体であるイオンチャネルや2次能動輸送体であるカチオントランスポーターは多くの生化学的、構造学的研究がなされ、その作用機序が明らかになっている。そのような中で、本研究で対象としているタンパク質 YhaTU は受動輸送体から2次能動輸送体に変化するという特色のあるタンパク質であり、本研究はイオンチャネルやトランスポーターの機能の面においても進化の面においても特色のある研究といえる。また、親水性タンパク質の結合・解離によるチャネルとアンチポーターの切り替えという分子スイッチの機構が解明できれば、受動輸送体から2次能動輸送体への進化のミッシングリンクを繋ぐことができるだけでなく、環境に応じて機能を切り替えることができる環境適応型ナノデバイスの開発も期待できる。

3. 研究の方法

(1) 人工膜上に再構成したタンパク質の活性測定系の確立と機能性タンパク質の同定

(2) タグを付加したタンパク質の大量精製系の構築

初めにペプチドタグを付与したタンパク質 StrepTagII-YhaT と YhaU-His₆ を共発現させた大腸菌がインクルージョンボディを形成していないことを位相差顕微鏡下で確認した。

その大腸菌から細胞膜を調製し、目的タンパク質を可溶化するための界面活性剤の検討を行った。界面活性剤には、*n*-Decyl-*D*-maltopyranoside (DM)、*n*-Dodecyl-*D*-glucopyranoside (DDM)、*N,N*-Dimethyl dodecylamine-*N*-oxide (LDAO)、FOS-choline-16 (FOS)、Cymal 6 (Cy6)、*n*-Octyl-*D*-glucopyranoside (OG)、*n*-Nonyl-*D*-glucopyranoside (NG)を用いた。細胞膜を4で1時間可溶化後、SDS-PAGEでタンパク質を展開し、His6タグに対する抗体を用いてウェスタンブロット解析を行い、可溶化効率を調べた。

次に、可溶化に用いる界面活性剤の濃度を決定するため、0、0.075、0.1、0.15、0.2、0.3、0.4、0.75、1.0、1.25%の界面活性剤濃度で膜

タンパク質の可溶化を行い、同様の方法で可溶化効率を調べた。

界面活性剤の種類と濃度を決定後、AKTAexplorer システムを用いて Ni-NTA カラムを用いたアフィニティークロマトグラフィーを行った。タンパク質の溶出にはイミダゾール濃度を20 mMから250 mMに徐々に上げることで行った。各分画を濃縮後、SDS-PAGEにかけ、ウェスタンブロット解析を行った。

(3) 部位特異的なアミノ酸変異導入による K^+/H^+ アンチポート活性に重要なアミノ酸の同定

StrepTagII と His6 タグを付与した YhaTU システムは K^+/H^+ アンチポート活性を保持していたことから、これらのペプチドタグ融合遺伝子に部位特異的な変異を導入した。変異の導入にはインビトロジェンのジーンテラーシステムを用いた。合計で70個の部位特異的な変異の導入を試みた。

4. 研究成果

(1) 人工膜上に再構成したタンパク質の活性測定系の確立と機能性タンパク質の同定

(2) タグを付加したタンパク質の大量精製系の構築

まず、ペプチドタグを付与したタンパク質 StrepTagII-YhaT と YhaU-His₆ を共発現させた大腸菌がインクルージョンボディを形成していないことが確認できた。界面活性剤は試験したもののうち、OG と NG は可溶化効率が高くなかったが、それ以外の界面活性剤では十分に可溶化された。その結果をもとに以後の実験では DDM を使用した。可溶化に使用する DDM の濃度を検討したところ、0.3%以上の濃度で十分に可溶化できることが明らかとなった。そのため、以後の実験では1%DDM でサンプルを可溶化した。次に Ni-NTA カラムを用いてアフィニティークロマトグラフィーを行ったところ、StrepTagII-YhaT はイミダゾール濃度がおおよそ20~90 mM で溶出されたのに対し、YhaU-His₆ は80~250 mM で溶出された。このことは、YhaT と YhaU のタンパク質複合体が精製過程で解離してしまっていることを示唆した。そのため、本実験においては、YhaT と YhaU を別々に精製することも試みた。その結果、YhaT-His₆ を Ni-NTA カラムを用いたワンステップの精製で大量に取得することに成功した。また、YhaU-His₆ については濃度は低いものの Ni-NTA カラムでの精製は成功した。

YhaT と YhaU の複合体の精製についてはさらなる検討が必要であるが、それぞれ単独での精製は成功しているため、これらのタンパク質を用いて、複合体となるための条件の検討などを行うことが可能となった。

(3) 部位特異的なアミノ酸変異導入による K^+/H^+ アンチポート活性に重要なアミノ酸の

同定

変異の導入においては合計で 70 個の部位特異的変異の導入を試み、56 個の変異の導入に成功した(塩基配列が正しいことを確認済み)。

今後、これらの変異を導入したタンパク質が K^+/H^+ アンチポート活性を保持しているかどうかを確認する予定である。また、ブルーネイティブゲル電気泳動法により YhaT と YhaU が複合体を形成しているかどうかを確認する予定である。

本研究では、枯草菌の YhaT-YhaU システムを Ni-NTA カラムを用いて精製する過程で、YhaT と YhaU が解離してしまうという問題があったものの、個別での精製に成功した。また、YhaT-YhaU システムに目的の変異すべてを導入することはできなかったものの、多くの変異を導入することができた。これらのことから、YhaT-YhaU システムの作用機序を解明するための基盤の形成ができた。

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)

[学会発表](計 5 件)

Kentaro Kato, Yu Tanaami, Makoto Fujisawa, Purification of YhaTU system, a K^+/H^+ antiporter from *Bacillus subtilis*. The 35th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan. (福岡国際会議場、マリンメッセ福岡) 2012年12月11日 福岡

Makoto Fujisawa, Detection of YhaTU complex, a Two-Component K^+/H^+ Antiporter from *Bacillus subtilis*, by Pull-down Assay and Blue Native PAGE. 第9回 国際シンポジウム バイオ科学とナノテクノロジーの融合に向けて(東洋大学 川越キャンパス) 2011年12月10日 埼玉

藤澤 誠. 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枯草菌の K^+/H^+ アンチポーター-YhaTU システムの複合体の検出. 日本農芸化学会関東支部 2011 年度大会(東洋大学 板倉キャンパス) 2011年10月15日 群馬

Makoto Fujisawa, Detection of YhaTU complex, a Two-Component K^+/H^+ Antiporter from *Bacillus subtilis*, by Pull-down Assay and Blue Native PAGE. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress. (札幌コンベンションセンター) 2011年9月6日~10日 北海道

Makoto Fujisawa, Detection of interaction between subunits of a two-component K^+/H^+ .

Gordon Research Conference – Mechanisms of Membrane. (University of New England) 2011年6月19日~24日 米国 メイン州

[その他]
ホームページ等

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

藤澤 誠 (FUJISAWA, Makoto)
東洋大学・食環境科学部・准教授
研究者番号：70549641