

枯草菌のホメオスタシスにおけるアルカリカチオン輸送系の役

●伊藤 政博

東洋大学生命科学部

＜研究の目的と進め方＞

アルカリカチオンとその輸送系は細菌細胞の様々な生理現象に影響を与えている。例えば、細胞内pHの制御、浸透圧適応と細胞体積の制御、求電子試薬への耐性の付与、胞子形成、胞子発芽などがある。

枯草菌におけるホメオスタシスに関与するアルカリカチオン輸送系の研究は、全ゲノムが明らかになったことがきっかけとなり解明が進んでいる。枯草菌では、ナトリウムイオン (Na⁺) またはカリウムイオン (K⁺) を細胞内のpH調節、物質輸送の共役イオン、膨圧の維持などに利用する。Na⁺に関しては、我々の研究グループが、枯草菌のNa⁺耐性やアルカリ環境での細胞内の中性化に関与するNa⁺/H⁺アンチポーターとNa⁺ポンプを、これまでに4種類 (NhaC、Mrp、TetA、NatAB) 同定した。一方、K⁺に関しては、2002年にアメリカ・マウントサイナイ医科大学Krulwich教授らの研究グループがK⁺の取込みに関与するczcO-czcD遺伝子産物の解析とドイツ・フリップス大学のBremer教授らのグループからK⁺取り込みに関与するKtrABとKtrCDに関する報告がなされた。この他に枯草菌では環境ストレスや胞子形成に関わるシグマ因子欠損株を利用したDNAアレイ解析などの論文が多数報告され、その中に我々の研究している機能未同定タンパク質のデータも網羅的解析の一つとして報告されている。DNAアレイ関連のデータは、私が本研究テーマを遂行する上で有用な知見を与えてくれるものとなっている。私と同様に枯草菌におけるホメオスタシスに関与するアルカリカチオン輸送系の研究に関心がある研究グループは、ドイツ・フリップス大学のBremer教授らのグループ、ドイツ・Bayreuth大学のSchumann教授らのグループなど国内外に複数存在し競合している状況である。私は特定領域研究の公募研究代表者として平成13年度から本研究テーマで研究をスタートし、いくつかのアルカリカチオン輸送系に関わる機能未同定タンパク質自身の働きを解明した。これと既知のデータをまとめると枯草菌には、少なくとも5種類のNa⁺ (K⁺) /H⁺アンチポーターとNa⁺ポンプ、3種類のK⁺取り込み系、2種類の細胞内外のK⁺調節系輸送タンパク質、その他複数のチャンネルタンパク質が存在することが明らかになってきた。

本研究では代表的なグラム陽性細菌である枯草菌のポストゲノムシークエンス研究の一端として、アルカリカチオン輸送系に関与する遺伝子群を網羅的に同定し、枯草菌細胞における機能未同定タンパク質の生理的性質の解明を行い、各候補タンパク質の遺伝子レベルでの発現制御機構と既知の遺伝子産物との相互関係を考慮しながらゲノム研究の基軸生物の一つである枯草菌におけるアルカリカチオンの循環機構を網羅的に解明することを目的とした。この研究を推進することにより、ポストゲノム研究の基軸微生物として取り上げられた枯草菌が様々な環境で生育するためのホメオスタシスに関わるアルカリカチオン輸送タンパク質の役割が明かとなり、枯草菌細胞の環境適応戦略機構の理解に貢献することが期待された。

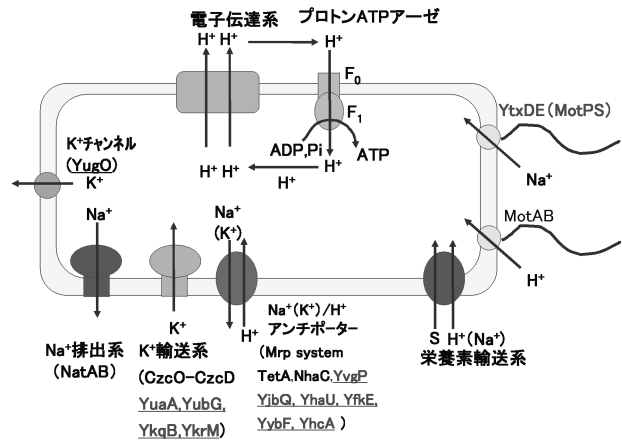


図1. 枯草菌におけるアルカリカチオン輸送に関わるタンパク質 (Yで始まるタンパク質は、各輸送系の候補タンパク質を指す)

＜研究開始時の研究計画＞

枯草菌には機能が解明されているタンパク質とゲノム情報から、少なくとも7つのK⁺輸送系が存在した。既にK⁺の取り込みに関わる事が知られているタンパク質の1つはTetA(L)で、テトラサイクリン-メタル (Co²⁺, Mn²⁺, Mg²⁺) /H⁺アンチポーターのほか、Na⁺(K⁺)/H⁺アンチポーター、Na⁺(K⁺)/H⁺(K⁺)アンチポーターとしても働く。CzcDは2価のカチオンであるCd²⁺、Zn²⁺、Co²⁺を排出し、H⁺とK⁺を細胞内に取り込むことが報告されている。K⁺の排出には7つの疎水性サブユニットからなると推定されるMrpシステムが関与している。そのほか機能未同定のタンパク質として、Vibrio alginolyticusのK⁺取り込み系であるKtrABシステムのホモログが2セット (YuaA-YubGおよびYkqBとYkrM) とK⁺チャンネルの候補が2つ (MscS, MscL) 存在していた。

Na⁺の排出系として、枯草菌には4つのNa⁺/H⁺アンチポート活性を保持するタンパク質 (Mrpシステム、TetA(L)、NhaC、MleN) と1つのNa⁺-ATPase (NatAB) が報告されている。機能未同定のタンパク質には、Na⁺/H⁺アンチポーターの候補としてMonovalent Cation:Proton Antiporter-1 (CPA1)ファミリーに属するYvgP、Monovalent Cation:Proton Antiporter-2 (CPA2)ファミリーに属するYhaUおよびYjbQ、Ca²⁺:Cation Antiporter (CaCA)ファミリーに属するYfkE、MFSファミリーに属するYhcAとYybFが存在していた。また、Na⁺-ATPaseの候補としてYfiLMNが存在していた。

Na⁺排出系によって作られたNa⁺勾配はアミノ酸などの栄養物との共輸送として利用される。枯草菌ではCitrate:Cation Symporter (CCS)ファミリーに属するMaeN (以前はYufR) がL-リンゴ酸とNa⁺を共輸送することが報告されている。また、枯草菌にはNa⁺を共役イオンとして利用する可能性のある機能未同定のアミノ酸輸送系が多数存在していた。

そこで本研究では機能未同定タンパク質であるYuaA、YubG、YkqB、YkrM、YfkED、YhaSTU、YhcA、YjbQ、

YrvCD, YvgP, YybF, ytxDE, を解析の対象とした。ここでYrvDはyhaUとオペロンを形成していると考えられたyhaTのパラログであるyrvCとオペロンを形成している膜タンパク質であると予測されたため、同時に解析することにした。また、K⁺チャネルの候補であるMscS、MscLおよびNa⁺-ATPaseの候補であるYfiLMN、Na⁺とアミノ酸の共輸送系の各候補は (i)本研究のアプローチでは解析できないと予想される、(ii)アルカリカチオンを輸送する可能性が低い、(iii)輸送したとしても少量であると予測されるなどの理由で、本研究では取り扱わなかった。

本研究では、初めに塩基配列と推定されるアミノ酸配列のコンピューター解析を行ない、遺伝子のクローニング領域を決定した。次にPCR法によって目的遺伝子を増幅し、発現ベクターにクローニングした。クローニングしたプラスミドを用いてアルカリカチオン輸送系に欠損をもつ各種大腸菌変異株の相補実験を行ない、候補タンパク質の機能を推定した。これにより、アルカリカチオンを排出していると推定されたものに関してはH⁺とのアンチポート活性があるかを調べた。H⁺とのアンチポート活性がないタンパク質および相補実験でアルカリカチオンを取り込むと推定されたタンパク質は、細胞内のアルカリカチオン濃度を測定することでアルカリカチオンを輸送するかを調べた。

機能解析の結果を踏まえた上で、各タンパク質の生理的な役割を同定するために、まず各遺伝子の転写解析を行なった。転写解析は枯草菌のpMUTIN破壊株を用いて、転写融合されたβ-ガラクトシダーゼ遺伝子の遺伝子産物の活性を測定することで行なった。転写解析の結果から、変異株のいくつかに関してはさまざまな培養条件をふるることによりその生育を調べ、その生理的役割を解析した。

〈研究期間の成果〉

本研究で明らかとなった研究成果を各遺伝子に分けて報告する。

本研究で行なったヌクレオチド配列のコンピューター解析から、yhaUは上流のyhaS、yhaTとオペロンを形成していることが推定された。したがって、初めにyhaUのみとyhaSTUでクローニングを行なった。K⁺取り込み系を欠損した大腸菌TK2420株の相補実験から、YhaUはK⁺を排出することが示唆された。また、YhaUはYhaSと、もしくはYhaTに抑制されることが推定された。そこで次にyhaSUおよびyhaTUをクローニングし、同様の実験を行なった。この結果から、YhaUはYhaSとYhaTのそれぞれに部分的に抑制されることが明らかになった。さらに同様の実験系で、YhaSのN末端側疎水性領域とC末端側親水性領域を別々に発現させたところ、YhaSのC末端側親水性領域がYhaUの活性の制御に重要であることが示唆された。また、YhaSのN末端側疎水性領域はYhaUを活性化することが示唆された。これらのTK2420株の形質転換体の細胞内のK⁺濃度を測定したところ、相補実験の結果を裏付ける結果が得られた。この結果から、yhaSTUの転写解析では高濃度の塩の存在とアルカリpHによって転写が増加することが明らかになった。また、yhaUの転写は塩ショック後20分から転写量が増加し、60分で定常状態に達することから高浸透圧への適応に関与することが示唆された (1)。

一般に、枯草菌は、プロトン (H⁺) 駆動力を利用してべん毛を回転させると考えられてきた。この時のモーター固定子としてはH⁺チャネルであるMotABが利用される。枯草菌ゲノムを調べると枯草菌は好アルカリ性バチルス属細菌のもつMotPSの相同タンパク質 (YtxDE)

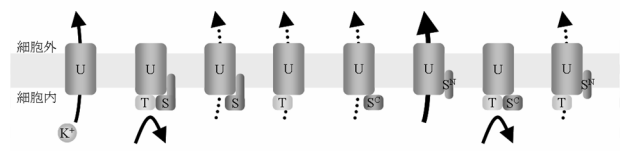


図2. YhaS, YhaT, YhaUの組み合わせによるK⁺排出モデル 矢印は、K⁺排出の程度を示している。

を持っている。これまでmotABを欠損した枯草菌は運動性を失うが、ytxDE (motPS) を欠損しても運動性を保持していることが報告されていた。ゆえにytxDEは、運動性には関与しない機能未同定遺伝子と考えられていた。私は、枯草菌のmotABを欠損した株から運動性の回復した変異株の取得に成功した。この変異株の解析の結果、枯草菌中でふだん発現が抑制されているmotPSが発現し、枯草菌べん毛モーター固定子として機能したためであることがわかった。また、MotPS型のべん毛回転運動は、軟寒天培地中のNa⁺濃度の増加に伴い運動性が活発になり、アミロライドで阻害を受けた。このことは、枯草菌のMotPSもNa⁺を輸送するタイプであることが示された。おそらく枯草菌にとってプロトン駆動力が利用しにくいような高アルカリ性環境などの特殊な環境にさらされた場合、MotPSを固定子として利用してNa⁺駆動力でべん毛モーターを回転させて泳ぐためにMotPSは必要なのではないかと考えている (2, 3)。

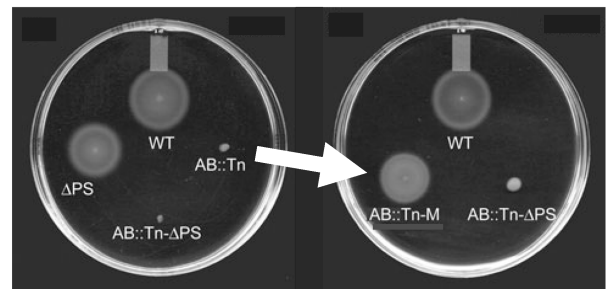


図3. MotAB欠損株(AB::Tn)から運動性回復株(AB::Tn-M)を分離することに成功した。

また、最近、枯草菌の2つの固定子MotABとMotPSを欠損させた株を用いてMotABとMotPS、そして、2種類のハイブリッド固定子MotASとMotPBをそれぞれひとつずつ発現させ運動性を保持した株を構築し、各サブユニットの機能的な役割について検討した。その結果、1回膜貫通タンパク質のMotBやMotSサブユニット側が共役カチオン (MotBサブユニットならばH⁺、MotSサブユニットならばNa⁺を利用) を決定すること、MotPサブユニットを持った株では培地の粘性を上げると運動性が良くなることなど、枯草菌の固定子に関して新たな知見を得ることができた (4)

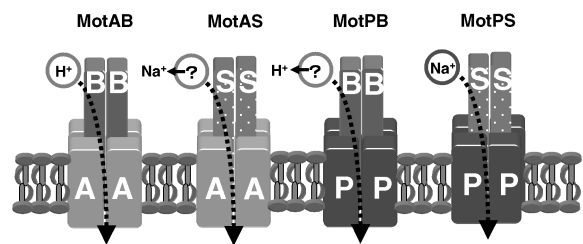


図4. 枯草菌べん毛モーター固定子のハイブリッド化とそのイオン選択性に関する概略図

YvgPはアミノ酸配列のコンピューター解析からN末端が疎水的でC末端側が親水的なタンパク質であることが分かった。YvgPのN末端側の疎水性領域は他のCPA1ファミリーのメンバーと同程度の長さを持ち、相同性も高いが、C末端側親水性領域は他の原核生物のCPA1ファミリーのメンバーが持つC末端側親水性領域よりもいくぶん長く、重要な相同性は示さなかった。E. coli変異株を用いた機能解析の結果、YvgPはNa⁺(K⁺, Li⁺, Rb⁺)/H⁺アンチポーターであることが明らかになった。原核生物のCPA1ファミリーのメンバーとしては初めてK⁺(Rb⁺)/H⁺アンチポーター活性が見出された。また、Mg²⁺、Ca²⁺、Mn²⁺はYvgPの基質にはならず、むしろ阻害物質となった。YvgPの見かけのKm値の算出によって、YvgPはアルカリ側で活性の高いタンパク質であることが分かった。また、pH 8.5においてさえ、YvgPのNa⁺に対するKm値は他のCPA1ファミリーのメンバーと比較しても非常に低親和性であり、生理条件下ではむしろ阻害物質として働くことが推察された。この仮説を裏付けるように、yvgPの転写解析ではTTM培地に500 mM NaClを添加したときよりも500 mM KClを添加したときのほうが、転写量が増加することが明らかになった。このことから、yvgPは塩ショック時のNa⁺耐性に関与しているか、アルカリpHで細胞内の酸性化に寄与している可能性が示唆された(5)。

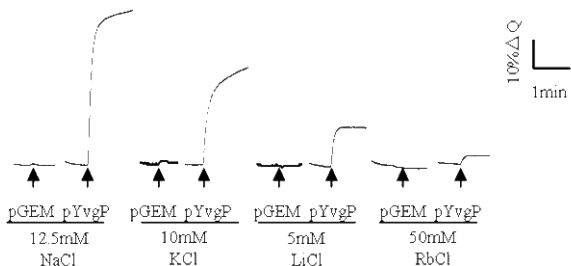


図5. pGEMベクター又はpYvgPを保持したKNabc株から調製した反転膜小胞を用いたアンチポーター活性の測定。YvgPは、Na⁺、K⁺、Li⁺、Rb⁺/H⁺アンチポーター活性があった。大腸菌KNabc株は、主要なNa⁺/H⁺アンチポーターを欠損している。

YjbQはE. coli TK2420株の相補実験から、外環境のK⁺濃度が低いときK⁺を取り込み、高いときにはK⁺を排出すると推定された。また、YjbQのC末端側親水性領域がYjbQの機能を制御していると推定された。また、寒天培地上でのβ-ガラクトシダーゼ活性の確認実験から、yjbQは0.5 M NaClを含むpH 7.0のTTM培地において転写量が増加していることが示唆された。このことから、YjbQはNaCl耐性に関わることが推察された。

YhcAはMFSの系統解析、ハイドロパシープロファイル、膜貫通領域の予測からDHA14ファミリーに属すると推定された。主要なNa⁺/H⁺アンチポーターを欠損したE. coli KNabc株の相補実験からはYhcAはNa⁺を取り込むことが推定された。また、E. coli TK2420株の相補実験からYhcAは外環境のK⁺濃度が低いときにK⁺を取り込み、高いときにはK⁺を排出すると推定された。しかしpYhcAを保持したKNabc株の反転膜小胞上にはK⁺/H⁺アンチポーター活性はなかった。

TK2420株の相補実験から、YubGは高親和性、YkrMは低親和性のK⁺取り込み系の膜成分であり、膜表面タンパク質であるYuaAもしくはYkqBのどちらかがあれば活性を示すことが明らかになった。ykqB、yuaA、yubGの転写解析からは、500 mM NaClの添加によって転写量が増加することが示唆された。これらのタンパク質の機能は

2003年にHoltmannらによって報告され、K⁺に対する親和性は本研究の結果と一致していた。しかし、Holtmannらは遺伝子欠損株の生育実験からYauA-YubG、YkqB-YkrMの組み合わせでのみで機能すると結論付けている点で本研究の結果と異なっていた。

YfkEは高親和性のCa²⁺/H⁺アンチポーター活性を持つが、Na⁺/H⁺アンチポーター活性は保持していないことが明らかにされた。また、YfkEのCa²⁺の親和性はアルカリpHでより高く、その活性はMg²⁺によって阻害されることが明らかにされた。転写解析から、yfkEは一般的なストレス応答に関わるσBもしくはそのレギュロンに依存していることが分かった。また、胞子形成期に特異的に働くσGもしくはそのレギュロンに依存していることも明らかになった。

この他に、既知のNa⁺/H⁺アンチポーターとの関連性を明らかにすることや多重欠損変異株を構築してその生理的な機能の解明を行った(6-8)。

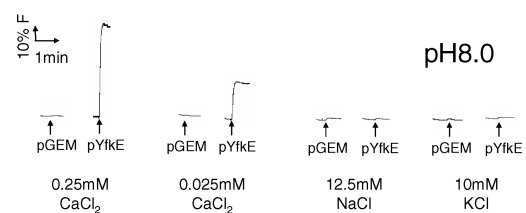


図6. pGEMベクター又はpYfkEを保持したKNabc株から調製した反転膜小胞を用いたアンチポーター活性の測定。YfkEは、Ca²⁺/H⁺アンチポーター活性があったがNa⁺とK⁺は、基質とならなかった。大腸菌KNabc株は、主要なNa⁺/H⁺アンチポーターを欠損している。

〈国内外での成果の位置づけ〉

枯草菌では、Na⁺またはK⁺を細胞内のpH調節、物質輸送の共役イオン、膨圧の維持などに利用する。Na⁺に関しては、私とマウントサイナイ医科大学のKrulwich教授の研究グループが、枯草菌のNa⁺耐性やアルカリ環境での細胞内の中性化に関与するNa⁺/H⁺アンチポーターとNa⁺ポンプを、これまでに4種類(NhaC、Mrp、TetA、NatAB)同定した。一方、K⁺に関しては、K⁺の取込みに関与するtrkA-czcD遺伝子が同定されている以外に、2003年2月にktrABおよびktrCDに関する報告がドイツのグループからなされた。アルカリカチオン輸送系に関わる枯草菌機能未同定タンパク質の研究は、今後ますます外国との競争が激しくなることが予想され、いかに研究手法で優位性をもてるかが重要であると考えている。

全体を振り返ると、アルカリカチオン輸送系に関する機能未同定タンパク質の機能解明というテーマに対して、数多くの新しい知見を得ることに成功したと考えている。特に、本研究によって、枯草菌の新規な低親和性のK⁺/H⁺アンチポーターが同定されたことや、枯草菌がNa⁺を共役イオンとしてべん毛モーターを駆動するという微生物の教科書での記述を変更させるような新発見をすることができた。このことは、枯草菌におけるポストゲノム研究として、一定の成果を出すことができたと考えている。

〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

目的遺伝子破壊株を利用したDNAチップ解析をすることができなかった。理由としては、各機能未同定遺伝子の生理機能解析を詳細に検討する時間を確保するためと多重欠損株を構築しているのに時間を費やしたためである。しかし、今後、準備が整い次第、DNAチップ解析を行い

たいと考えている。また、機能未同定タンパク質の機能を明らかにするには、様々なアプローチの方法が提案されているが、すべてがその方法で問題解決できるわけではなく、全く手がかりのないタンパク質に対しては、研究者の経験や勘が大切であることが改めて実感させられた

〈今後の課題〉

本研究プロジェクトに参加したことにより、枯草菌におけるアルカリカチオン輸送に関わる各候補遺伝子の個々の機能は明らかにすることができた。しかし、それらの発現パターンと発現調節機構に関わる遺伝子群の網羅的なつながりの解明は、今後に残された課題である。今後、これを精力的に推し進めていき、枯草菌細胞全体でのNa⁺とK⁺の循環機構を明らかにすると共に、枯草菌での知見に対するその他の細胞に関して、普遍性や多様性について明らかにすることが非常に重要ではないかと考えている。一日も早く枯草菌染色体上の全ての遺伝子の機能が明らかになることを期待するし、私も微力ながら貢献していきたいと考えている。

〈研究期間の全成果公表リスト〉

1) 論文／プロシーディング

1. 403031959

Fujisawa, M., wada, Y., and Ito, M., Modulation of the K⁺ efflux activity of *Bacillus subtilis* YhaU by YhaT and the C-terminal region of YhaS., *FEMS Microbiology Letters*, 231(2), 211-217 (2004)

2. 0407101210

Ito, M., Xu, H., Guffanti, A.A., Wei, Y., Zvi, L., Clapham, D.E., and Krulwich, T.A., The voltage-gated Na⁺ channel NavBP has a role in motility, chemotaxis, and pH homeostasis of an alkaliphilic *Bacillus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101(29), 10566-10571 (2004)

3. 0408161711

Ito, M., Hicks, D.B., Henkin, T.M., Guffanti, A.A., Powers, B., Zvi, L., Uematsu, K., and Krulwich, T.A., MotPS is the stator-force generator for motility of alkaliphilic *Bacillus* and its homologue is a second functional Mot in *Bacillus subtilis*., *Molecular Microbiology*, 53(4), 1035-1049 (2004)

4. 0602022056

Ito, M., Terahara, N., Fujinami, S., and Krulwich, T.A., Properties of Motility in *Bacillus subtilis* Powered by the H⁺-Coupled MotAB Flagellar Stator, Na⁺-Coupled MotPS or Hybrid Stators MotAS or MotPB. *Journal of Molecular Biology*, 352(2), 396-408 (2005)

5. 0602022049

Fujisawa, M., Kusumoto, A., Wada, Y., Tsuchiya, T., and Ito, M., NhaK, a novel monovalent cation/H⁺ antiporter of *Bacillus subtilis*. *Archives of Microbiology*, 183(6), 411-420 (2005)

6. 310091824

Yi, W., Southworth, T.W., Kloster, H., Ito, M., Guffanti, A. A., Moir, A., and Krulwich, T.A., *Journal of Bacteriology*, 185(17), 5133-5147 (2003)

7. 0502081853

Swartz TH, Ito M., Hicks D.B., Nuqui M., Guffanti A.A., and Krulwich T.A. The Mrp Na⁺/H⁺ antiporter increases the activity of the malate:quinone oxidoreductase of an

Escherichia coli respiratory mutant. *Journal of Bacteriology*, 187(1), 388-391 (2005)

8. 0602022115

Swartz, T.H., Ikewada, S., Ishikawa, O., Ito, M., and Krulwich, T.A., The Mrp System: A Giant Among Monovalent Cation/Proton Antiporters. *Extremophiles*, 9, 345-354 (2005)

2) データベース／ソフトウェア
特になし

3) 特許など
特になし

4) その他顕著なもの