The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	大腸菌に於けるナトリウム・水素イオン対向輸送系の研究
Author(s)	小田, 紀子
Citation	大阪大学, 1985, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/34702
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

【35】

氏名・（本籍）	小田紀子（おだ のりこ）
学位の種類	工学博士
学位記番号	第 6888 号
学位授与の日付	昭和60年3月25日
学位授与の要件	基礎工学研究科 物理系専攻 学位規則第5条第1項該当
学位論文題目	**大腸菌に於けるナトリウム・水素イオン対向輸送系の研究**
論文審査委員	（主査） 教授 大沢 文夫 （副査） 教授 塚原 仲晃 教授 葛西 道生

論文内容の要旨

生きている細胞では細胞質内のナトリウムイオン濃度（Na^+濃度）は，外液の濃度より低く保たれており，Na^+の電気化学ポテンシャル差に逆らってこれを細胞外に排出する輸送系の存在が必須である。大腸菌には，ATP依存性のNa^+輸送系が存在せず，ナトリウム・水素イオン対向輸送系（以下NHA系と略す。）がNa^+の排出を行っている可能性がある。本申請者は，大腸菌内膜の反転膜小胞を用いて，NHA系によるイオン輸送現象を測定し，NHA系に対するいくつかの阻害剤を見出し，これらを用いて，イオン輸送の動力学的解析を行なった。反転膜小胞は，呼吸鎖の電子伝達系を有し，呼吸基質の添加により内側酸性のPH勾配が形成される。このとき外液にNaClを加えると，NHA系が駆動され，Na^+が小胞内に流入するとともにH^+が流出してPH勾配が減少すると考えられる。そこでPH勾配の大きさに従って蛍光強度が変わる色素（アクリジンオレンジ）の蛍光強度変化を測定することにより，NHA系によるH^+輸送活性を見積った。その結果，NHA系のNa^+に対する結合定数は$1.25\times10^3M^{-1}$（0.8mM），小胞外液（生菌では細胞質内液にあたる。）の至適PHは7.5付近にあることが示された。更に，今まで細菌のNHA系に対する阻害剤は知られていなかったが，本研究で，反応速度論的機構の異なる3種類の阻害剤が見出された。第1は，Na^+と拮抗的にNHA系と相互作用するアミロライドである。阻害定数は$2.5\times10^4M^{-1}$（40μM）であった。アミロライドの阻害作用はMg^{2+}，Ca^{2+}の存在により，強められた。第2のグループは，一連のポリアミンとアミノグリコシド系抗生物質，及びポリミキシンである。コントロールに対する50％阻害濃度から，その強さは，ポリミキシン≫スペルミン＞ストレプトマイシン＞ネオマイシンの順であった。ストレプトマイシンの阻害の動力学的解析の結果，“反拮抗型”阻害であることが示された。これを説明するため，2つの可能なモデルについて反応速度

論的考察を行い，どちらの場合も，外液のストレプトマイシンが輸送体の構造変化を妨げるように結合するとした場合に反拮抗型阻害がおこることが示された。第3に，ランタン系列の3価カチオン（La^{3+} Gd^{3+}, Tb^{3+}）が，NHA系に対し，“非拮抗型”阻害を示すことが見出された。Tb^{3+}による阻害のHill係数は1.90で正の協同性があった。Mg^{2+}, Ca^{2+}の存在下では，これらの阻害効果は減少し，協同性も失なわれた。芳香族アミノ酸残基からのエネルギー移動によるTb^{3+}の蛍光測定から，Tb^{3+}の膜への結合に正の協同性があること，Mg^{2+}, Ca^{2+}によって結合が減少し，協同性も失なわれることが示された。以上の結果から，NHAのイオン輸送機構について考察を行った。第1，2グループの阻害剤は1価カチオンチャンネルの阻害剤でもあり，阻害度の序列は，1価カチオンチャンネルに対する序列によく一致する。また，NHA系は膜の流動性の影響をうけにくいことが示されたので，膜を貫通した構造を持つことが示唆された。そこで，NHA系の阻害機構について以下のモデルを提出した。NHA系は，Na^{+}とH^{+}を結合して構造変化を起こす“carrier center”を内部に持つチャンネル型輸送体である。H^{+}あるいはNa^{+}の電気化学ポテンシャル差によって駆動され，輸送は方向に対して可逆的である。アミロライドは，Na^{+}とcarrier centerとの結合を阻害する。ストレプトマイシンは，Na^{+}と結合したcarrier centerの構造変化あるいは間接的にH^{+}との結合を妨げる。また，ランタン系列3価カチオンは，Na^{+}, H^{+}と結合しうるcarrier centerの数を減少させる，と結論された。

論文の審査結果の要旨

多くの細胞はその膜にHイオンの流入と入れ代りに，Naイオンを汲み出すAntiporter（対向輸送系）と呼ばれる蛋白質系をもつ。これは細胞内のNaイオンの濃度を低く保つため，あるいは，また細胞内のpHを調節するための系であるといわれる。しかし，この系の構造及びそのはたらきのメカニズムはほとんどわかっていない。

本論文は，大腸菌内膜の反転膜小胞を用いて，そのNaイオン，Hイオン対向輸送系の性質をしらべたものである。小胞内にHイオンをとりこませておき，外液にNaイオンを与えて対向輸送系を働かせ，内からのHイオンの流出を，蛍光色素を用いてpH変化を追跡することによって測定した。その結果，対向輸送系のNaイオンに対する結合定数が定められ，小胞の外液（細胞では内液に当たる）のpHの影響が明らかにされた。また系の活性は膜の流動性と直接の関係をもたないことが示された。

次にこの対向輸送系に対する3種類の阻害剤が見出された。阻害の様式の解析から，第1のアミロライドは輸送系へのNaイオンの結合を拮抗的に阻害し，第2のグループ，ストレプトマイシンなどはNaイオンを結合した輸送系の構造変化を阻害し，第3のグループ3価カチオンは輸送系に結合し，非拮抗的にNaイオンの結合を弱くすると推論された。第1，第2のグループは1価カチオンチャネルの阻害剤でもあり，対向輸送系とチャネルとの類似性を示唆するものである。

以上，本論文はまだ阻害剤の知られていなかった細菌のNaイオン，Hイオン対向輸送系について，いくつかの阻害剤を見出すとともに，この対向輸送系の性質に関する重要な知見を与えたものであって

博士論文として価値あるものと認める。