



Title	Identification of the functional regions of Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> antiporter NhaA involved in ion transport and pH sensing
Author(s)	坪井, 裕見
Citation	大阪大学, 2004, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/45114">https://hdl.handle.net/11094/45114</a>
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、<a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">大阪大学の博士論文について</a>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

氏名	坪井 裕見
博士の専攻分野の名称	博士(理学)
学位記番号	第 18407 号
学位授与年月日	平成 16 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 理学研究科生物科学専攻
学位論文名	Identification of the functional regions of $\text{Na}^+/\text{H}^+$ antiporter NhaA involved in ion transport and pH sensing ( $\text{Na}^+/\text{H}^+$ 交換輸送担体 NhaA のイオン輸送の分子機構と pH による活性制御機構の解析)
論文審査委員	(主査) 教授 金澤 浩 (副査) 教授 倉光 成紀 教授 福山 恵一 助教授 山本 泰望

## 論文内容の要旨

細胞は様々な細胞内外の変化に対して細胞内環境を一定に保ち、生命の最も重要な特徴の一つである恒常性を維持している。 $\text{Na}^+/\text{H}^+$  交換輸送担体は、細菌から高等動物まで多くの生物に存在する膜蛋白質であり、 $\text{Na}^+$  と  $\text{H}^+$  を交換輸送することにより細胞内 pH や  $\text{Na}^+$  濃度の調節に中心的な役割を果たしているが、そのイオン輸送の分子機構や活性制御機構については未だ十分に明らかとはなっていない。本研究では遺伝的解析が容易な大腸菌と *H. pylori* の  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  交換輸送担体 (NhaA) に注目した。

NhaA は 12 回膜貫通型蛋白質で、大腸菌 NhaA (EC NhaA) を含む既知の NhaA がアルカリ pH で活性化されるのに対して *H. pylori* NhaA (HP NhaA) は EC NhaA と分子全体にわたって高い相同性を示すものの、弱酸性 pH からアルカリ pH まで広く高い活性を示す。このように HP NhaA が EC NhaA とは機能的に異なる特徴を示したことから、これらの NhaA を比較解析することにより NhaA のイオン輸送機構や pH による活性制御機構を分子レベルで明らかにすることを目指した。

(1) EC NhaA と HP NhaA の pH 応答性の違いに関わる領域を明らかにするため、両 NhaA のキメラ蛋白質の解析を行った。その結果、NhaA の活性の pH 応答性には HP NhaA 特有の配列が存在する N 末端と Loop 8 領域は関与しておらず、これらの領域を除く比較的相同性の高い領域が重要であることが示唆された。

(2) NhaA の交換輸送活性に重要な領域を残基レベルで明らかとすることを目的とし、HP NhaA にランダムに変異を導入した変異体の解析を行った。その結果、NhaA には 3 つの機能的に重要な領域が存在することが明らかとなった。すなはち、第 4、5 と第 10、11 膜貫通領域はイオン輸送活性に重要であり、輸送路を形成していることが示唆された。また、Loop 7、第 8 膜貫通領域はアルカリ pH での活性化に寄与しており、この機構は NhaA 間で共通していることが示唆された。さらに、第 4、10 膜貫通領域はイオン輸送活性に加えて弱酸性 pH での活性にも寄与しており、この機構は HP NhaA に特有の機構であることが示唆された。さらに、第 10 膜貫通領域中の Lys 347 残基がイオン輸送活性とその pH 応答性、及び  $\text{Na}^+$  に対する親和性の全てに重要な残基であることが示唆された。

(3) 第 10 膜貫通領域について、その形質膜中における構造と機能残基を決定することを目指し、システイン走査変異

法により解析した。その結果、Lys 347 残基に加え、膜貫通領域中に周期的に存在する 4 つの Gly 残基が活性に重要なことが示された。Gly 残基が 3 残基おきに並ぶ G<sub>xxx</sub>G という配列は、いくつかの膜蛋白質で helix packing に重要な motif として報告されており、NhaA においてもこれらの配列がイオン輸送路の構造維持や活性に伴う構造変化に関与していることが考えられた。さらに、システイン修飾試薬 (NEM) との反応性から、第 10 膜貫通領域の一部が親水的な小孔、すなはちイオン輸送路に面していることが示唆された。また、Lys 347 残基が NEM と強く反応していたことから、この残基がイオン輸送路に面し、基質結合部位の一部を形成していることが強く示唆された。

#### 論文審査の結果の要旨

坪井裕見氏は、細胞内の pH、Na<sup>+</sup> 量の恒常性に主要な役割を果たしている Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> 交換輸送タンパク質におけるイオンのタンパク質内透過経路および 2 つのイオンの結合部位について胃潰瘍原因菌であるピロリ菌のものに注目して研究を行った。その結果、脂質 2 重層内に存在する膜内在性部分において膜を横切るイオン透過路を初めて発見するに至った。成果は、2 編の論文にすでに発表されており審査の結果、本論文は博士（理学）の学位論文として十分価値あるものと認める。