



Title	Ion Transport Mechanism of Na <sup>+</sup> / H <sup>+</sup> antiporter (NhaA)
Author(s)	桑原, 直之
Citation	大阪大学, 2007, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/47676">https://hdl.handle.net/11094/47676</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">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</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	くわ ばら なお ゆき 桑 原 直 之
博士の専攻分野の名称	博 士 (理 学)
学位記番号	第 20876 号
学位授与年月日	平成 19 年 3 月 23 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	Ion Transport Mechanism of Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> antiporter (NhaA) (Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> 交換輸送担体 (NhaA) のイオン輸送機構)
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

### 論 文 内 容 の 要 旨

#### 【背景と目的】

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。その恒常性の維持には生物に幅広く存在する Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> 交換輸送担体が極めて重要な役割を果たしており、Na<sup>+</sup> と H<sup>+</sup> を交換輸送することにより細胞内 pH や細胞内 Na<sup>+</sup> 濃度の調節を行っている。しかし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解明な部分が多い。

NhaA は 12 回膜貫通構造をもつ Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> 交換輸送担体で、H<sup>+</sup> の電気化学的勾配を利用して細胞内の Na<sup>+</sup> もしくは Li<sup>+</sup> を排出する活性を持つ。*E. coli* NhaA を含む既知の NhaA はアルカリ pH で活性化されるという pH により制御された活性を示す。これに対して *H. pylori* NhaA は *E. coli* 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。*H. pylori* NhaA が他の NhaA に比べて高い活性を持つことから機能解析に適していると考えられ、さらに *E. coli* NhaA と比較解析することで pH による活性制御機構を明らかにできるのではないかと考えた。その目的でこれまで我々は *H. pylori* NhaA の解析から膜貫通領域 (TM) 4、5、10、11 が輸送活性に重要であり、その 4 つの TM がイオン輸送路を形成していると考えている。そこで私は TM4、5、10、11 及びその近傍の残基の全 133 残基を対象に各残基の機能と構造の両面に対して系統的に解析を行うことで、イオン輸送機構や pH による活性制御機構の解明を目指した。

#### 【方法】

イオン輸送機構を解明するには、各残基の機能及び構造、そして反応過程における構造変化を知ることが大変重要である。そのような情報を得る一つ的手段としてシステイン走査変異法による解析法がある。システイン走査変異法とは対象の領域の各残基をそれぞれ Cys 残基に置換する変異法である。作製した Cys 置換体の活性から各残基の機能を推定することができ、Cys 残基特異的修飾試薬 (*N*-ethylmaleimide, NEM) との反応性を比較することで導入した Cys 残基の周りの環境 (親水性または疎水性) を知ることができる。つまりシステイン走査変異法により、対象領域の機能、構造、構造変化に関して系統的な解析を行うことができる。

#### 【結果と考察】

それぞれの残基の活性と NEM との反応性を調べた結果、膜貫通領域内に存在する極性残基である Thr-140、

Asp-141、Asp-171、Asp-172 及び Lys-347 が活性に大変重要であることを明らかにした。The-140 及び Asp-141 は TM4 に存在し、NEM との反応性から推定される細胞質内から伸びている孔の最奥に位置し、変異体では Na<sup>+</sup> や Li<sup>+</sup> に対する親和性が著しく低下していることからそれらの基質結合部位の一部を形成していることが示唆された。さらに TM11 に存在する残基の変異体で TM4 の残基の変異体と同様の表現型が見られたことからこの二つの TM は Na<sup>+</sup> や Li<sup>+</sup> の輸送に関与していると推定された。一方 TM5 や TM10 の変異体 D171C、D172C、K347C では活性を失っており、特にこの二つの Asp 残基はこれまでに活性に必須な残基であることが示されていることから H<sup>+</sup> の結合部位であることが推定されている。このことは D172C が NEM との反応性などから細胞外に向けた孔に面していることから H<sup>+</sup> の結合に関与していることが示唆された。さらにこの解析法によりイオン輸送に伴う構造変化は基質結合部位周辺の限られた領域でのみ起こっていることが示唆された。本研究により NhaA のイオン輸送機構の全体像の解明に大きく貢献できたと考えている。さらにこのような解析はイオン輸送性の膜タンパクで初めて行われたことである。

### 論文審査の結果の要旨

申請者は、細菌細胞質膜にはほぼ不偏的に存在する Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> 交換輸送担体のイオン輸送に関わる分子内構造を、遺伝生化学的手法を用いて解析した。具体的には、胃潰瘍原因菌ピロリ菌の本蛋白質に注目し、遺伝子工学的手法により、イオン輸送に関与する4つの膜貫通ドメインのアミノ酸残基を系統的にシステインに置換し、残基の置換による機能の変換、およびシステインに対する化学修飾剤の修飾能を指標に、各残基のイオン輸送における機能、構造変化、膜内トポロジーを解析した。その結果、イオン輸送には本蛋白質の有する12の独立の膜貫通ドメインのうち、4、5、10、11番目の膜貫通ドメインの内部にある特定の残基が、イオン結合に関わること、またそれらを含む膜ドメインのすべての残基の膜内トポロジーを明らかにすることができた。この結果、このイオン交換輸送担体内部の、イオン輸送路、イオン結合部位の立体的配置と機能との相関に新規な知見を得ることができた。また、不明であったこの蛋白質の作動機構解明へ新たな糸口を見いだすことができた。発表内容は、2つの国際的な生化学の雑誌 (J. Biol. Chem. 誌, Biochemistry 誌) に第一著者として発表している。また、口頭発表を公開で行っている。

よって、本論文は博士 (理学) の学位論文として十分な価値のあるものと認める。