OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Molecular structure and formation of Na+/H+ antiporter (NhaA) : Importance of hydrophilic loops of NhaA for integration and assembly in membrane,and the functional implication of oligomer
Author(s)	唐沢, 暁
Citation	大阪大学, 2008, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/48744
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

氏　　名	唐沢　暁（からさわ　あきら）
博士の専攻分野の名称	博　士（理　学）
学 位 記 番 号	第　２１７６４　号
学位授与年月日	平成 20 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	Molecular structure and formation of Na^+/H^+ antiporter (NhaA) : Importance of hydrophilic loops of NhaA for integration and assembly in membrane, and the functional implication of oligomer （Na^+/H^+ 交換輸送蛋白質 NhaA の構造と機能発現機構：親水性ループの膜挿入・集合過程における重要性と多量体形成における機能的意義）
論 文 審 査 委 員	（主査） 教　授　金澤　　浩 （副査） 教　授　米崎　哲朗　　教　授　倉光　成紀

論　文　内　容　の　要　旨

［背景と目的］

細胞が生命を維持するためには、細胞内イオン環境を一定に保つことが必要不可欠である。Na^+/H^+ 交換輸送蛋白質は、細菌から高等動植物に至るまで広く存在する膜蛋白質である。細菌類の主要な Na^+/H^+ 交換輸送蛋白質 NhaA は呼吸鎖の形成する H^+ の電気化学的勾配を駆動力として、Na^+ や Li^+ を排出する。この機能により、これらのイオンの細胞内濃度を低く抑えるとともに、細胞内 pH の恒常性維持にも貢献している。我々が始めてクローニングしたピロリ菌 NhaA（HPNhaA）は 12 回膜貫通領域（TM）を持つ。その中で４つの膜貫通領域（TM4、5、10、11）がイオン輸送活性に重要であり、イオン輸送路の一部を形成している。一昨年 3.5Åの解像度で大腸菌 NhaA の結晶構造が解かれ、不活性状態における詳細な立体構造が報告された。これらの研究から、イオン輸送の分子機構は残基レベルで明らかになりつつある。しかし、NhaA 分子がどのように膜に組み込まれ、機能を有する構造を形成するのかについては全く不明である。また、大腸菌 NhaA では二量体を形成することが報告されたが、その機能的意味も不明であった。イオン輸送の際に起きると考えられる構造変化についても不明のままである。これらの未解明な問題について、TM の構造と機能の相関からの研究は進んでいるが、TM を結ぶ親水性ループの持つ意味については解明が進んでいない。そこで、本研究では次の二点を解明すべき中心課題とした。①構造形成過程における親水性ループの機能的意義。②ピロリ菌 NhaA の生体膜上での多量体形成に関する FRET 法による観測系の確立と、これを用いた NhaA のイオン輸送における動的変化の検出。

［結果と考察］

(1)親水性ループの構造形成過程における重要性

各 TM を結ぶ 11 個のループ（L1～L11）を切断し、N 末側と C 末側断片をコードする発現プラスミドを作製した。これらのプラスミドを NhaA 欠失大腸菌に導入し、各断片を共発現させた場合の輸送機能の回復を調べた。その結果 L2、8、11 で切断した場合のみ、各断片が集合し、高い輸送活性を持つ NhaA が再構成された。L2、8 で切断した各

断片は単独では膜に発現できないが、相補的な断片の共発現により安定的に発現した。一方、L1、3、4、5、6、7、9、10 で切断した場合は輸送機能が復帰しなかった。このうち L5 の場合は、共発現することによって両断片とも膜に挿入されるにも関わらず活性が検出できなかった。以上の結果から、機能する NhaA の形成には Loop1、3、4、5、6、7、9、10 によって隣り合った TM が連結されている必要があり、特に TM5-TM6 の連続性は膜挿入後の構造形成過程に必須であることが示唆された。一方 L2、8、11 による TM の連続性は構造形成過程に不要であることが明らかとなった。そこで、L2、L8 の二箇所を同時に切断した３つの断片を同じ大腸菌に発現させ、活性を測定したところ、有意な活性が検出された。次に、大腸菌の結晶構造を基にループ及び TM の最終的な位置と構造形成における各ループの重要性の相関を検討した。その結果構造形成に重要ではないループの前後の TM は離れた位置にあった。逆に重要であったループの前後の TM は非常に接近した配置を取る傾向にあることを発見した。以上の結果から、TM1-2, TM3-8、TM9-12 の各ドメインが膜に挿入された後部分構造を一時的に形成し、それらが集合することによって、最終的な構造が完成することが示唆された。

⑵FRET を用いたピロリ菌 NhaA の多量体化の検出系の確立と二量体相互作用部位の同定

ピロリ菌 NhaA の C 末に CFP と Venus を付加した融合蛋白質を同じ大腸菌に発現させ、膜画分及び生菌中において CFP と Venus の間の FRET による２量体形成の測定系を確立した。さらに、共免疫沈降実験や Blue Native PAGE により、NhaA 単量体間の物理的相互作用が検出された。これらのことから、ピロリ菌 NhaA は生体膜上で多量体化していることが明らかとなった。また、Loop1 に Cys 残基を導入した単一 Cys 変異体をいくつか作製し、それらを大腸菌膜に発現させた結果、Q58C 変異体のみ単量体間で架橋されることがわかり、Q58 残基近傍が二量体間の相互作用部位であることが同定された。

⑶ピロリ菌 NhaA２量体の構造変化と機能的相関

相互作用部位である Loop1 を欠失した変異体を作製したところ、この変異体は多量体化できないことが FRET を用いた実験によって明らかになった。さらに、この変異体の活性を測定したところ、膜画分での発現は見られるにも関わらず活性が全く検出されなかった。また、二量体間で架橋される Q58C 変異体の活性を測定したところ、活性は全く見られなかった。しかし、Q58C の架橋をβ-ME を用いて切断した結果、活性が復帰することを発見した。このことから、Q58C の架橋は輸送活性を阻害することが明らかとなり、Loop1 による２量体間の構造変化がイオン輸送に重要であることが考えられた。そこで、FRET の系を用いてイオン添加による NhaA 二量体間の構造変化の検出を試みた結果、Li 結合によって二量体間がわずかに構造変化を起こす結果が得られた。さらに、活性の低下した変異体と活性を全く持たない変異体を同じ大腸菌に発現させた結果、活性の低下した変異体の活性が活性を全く持たない変異体とヘテロ二量体を形成することによって、活性が上昇することが明らかになった。従って、HPNhaA の二量体間には機能的相互作用が存在し、Loop1 の構造変化が HPNhaA の活性に重要であることが示唆された。

［まとめ］

①HPNhaA の各親水性ループの持つ意味は不明であったが、構造形成という観点からループには２種類あることを明らかにした。即ち、ループは TM の連結が構造形成に必須であるものとそうではないものが存在する。さらに、構造形成に重要なループは最終的な構造において TM 間が接近しており、逆にそうではないループは離れている傾向があることが示された。②HPNhaA には Loop1 を介した二量体間の構造変化の伝達がイオン輸送活性発現に重要であることを見出した。これらは NhaA における機能と構造変化に関する重要な知見となろう。

論文審査の結果の要旨

博士学位申請者の唐沢　暁氏は、細菌界に広く存在する Na^+/H^+ 交換輸送膜蛋白質の構造と機能、分子構造の構築の機構などを中心に研究を行った。とくにピロリ菌の細胞膜に存在するこの輸送蛋白質を材料とし、この蛋白質の構造的特徴である、細胞膜の表面に突出する部分の機能的役割に注目して研究を行った。その結果、細胞膜内部に埋め込まれる輸送体分子内部分（膜横断部分）の脂質二重膜への挿入において、表面に突出する部分 12 カ所のうち、重要な役割をもつものと持たないものがあることを系統的に明らかにした。また、この輸送蛋白質は、細胞膜内では２量体を形成すること、この２量体を構成する単量体間で、輸送に伴うイオンの結合により、構造変化の転幡が起きることを初めて明らかにした。さらに２量体における単量体同士の接点が、膜表在性部分の特定部位にあることを明らかにした。この部位を人為的に結合させると、輸送機能がなくなることを発見し、単量体間で輸送機能発現に必要な構造的変化の転幡が存在することを突き止めた。以上の結果内容を米国生化学会誌（J. Bio. Chem.）と米国化学会誌（Biochemistry）に第一著者として論文を発表している。博士論文は、２月７日開催の公聴会で本人により発表され、上記の審査員を中心に審査を受けた。以上のことから、唐沢氏の博士論文は、博士（理学）の学位論文として十分価値のあるものと認める。