



Title	Ion transport mechanism and regulation of Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> exchangers
Author(s)	大垣, 隆一
Citation	大阪大学, 2007, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/48808">https://hdl.handle.net/11094/48808</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	おお 大 がき 垣 りゅう 隆 いち 一
博士の専攻分野の名称	博 士 (理 学)
学 位 記 番 号	第 2 1 5 4 7 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 19 年 9 月 26 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 and regulation of $\text{Na}^+/\text{H}^+$ exchangers ( $\text{Na}^+/\text{H}^+$ 交換輸送体のイオン輸送の仕組みとその調節)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 金 澤 浩 (副査) 教 授 河 村 悟 教 授 荻 原 哲

## 論 文 内 容 の 要 旨

### 研究の背景と目的

真核生物の細胞質やオルガネラは特有のイオン環境を維持している。このことは増殖やシグナル伝達などの生命現象と密接に関わっている。イオン環境の調節において分子基盤となるのはイオン輸送性膜タンパク質である。私は細胞内  $\text{Na}^+$  濃度や pH の制御に関わる  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  交換輸送体を対象として機能解析をおこなってきた。イオン輸送体の生体内での機能を本質的に理解するためには輸送活性の生化学的データから分子レベルの機能を理解し、そして生体内でどのような因子との相互作用によって、調節を受けているのかを解明する必要がある。 $\text{Na}^+/\text{H}^+$  交換輸送体についてはどちらの側面においても不明な点が多く残されている。本論文では以下に示した 2 つのテーマに沿って解析をおこなった。

### [1]. 出芽酵母 *S. cerevisiae* の $\text{Na}^+/\text{H}^+$ 交換輸送体 (Nha1p) のイオン輸送活性の測定

出芽酵母の Nha1p は細胞膜に存在し、 $\text{Na}^+$  の排出によって耐塩性の獲得に寄与している。真核生物の  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  交換輸送体のモデル分子として Nha1p に注目し、精製した分泌小胞を用いてイオン輸送活性測定系の確立を試みた。アルカリカチオンの添加依存的に見られる小胞内 pH の変化を指標に、小胞上のイオン輸送活性を測定することに成功した。Nha1p は広い基質特異性を示し、 $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ 、 $\text{Rb}^+$ 、 $\text{Li}^+$  に対して輸送活性を示すことを明らかにした。また、Nha1p が起電性の輸送をおこなうことを示唆するデータを得た。さらに、これまでの解析で重要性が示唆されてきたアミノ酸残基の置換体を作製して活性を測定した。その結果、 $\text{Na}^+$  と  $\text{K}^+$  では部分的に共通しながらも異なった認識・輸送の仕組みが存在することを示唆するデータを得た。今後、基質特異性や起電性が分子内のどの領域によって決定されているのかを明らかにすることで、 $\text{Na}^+/\text{H}^+$  交換輸送の分子メカニズムに対する理解が深まるものと期待される。

### [2]. 高等動物オルガネラ膜 $\text{Na}^+/\text{H}^+$ 交換輸送体の新規結合因子の探索と機能解析

高等動物では 9 つの  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  交換輸送体 (NHE) が同定されている。NHE1-NHE5 は細胞膜、NHE6-NHE9 はオルガネラ膜に局在している。オルガネラ膜 NHE の活性とオルガネラ pH の調節、細胞内小胞輸送との関連が報告

されているが、その調節の仕組みは殆ど明らかにされていない。本研究では、NHE9 の C 末端に相互作用する因子の探索を酵母 two-hybrid 法によりおこなった。その結果、RACK1 (Receptor for activated c-kinase 1) を単離した。機能解析の結果、RACK1 が NHE6 の細胞膜とオルガネラ膜の量比の調節に関与していることを示し、またオルガネラ pH がイオン輸送体の細胞膜とオルガネラ膜間の分配により制御されているという新たな可能性を示唆するデータを得た。今後、RACK1 の機能が他のオルガネラ NHE にも共通するのか、また、RACK1 の結合が細胞内局在だけではなく NHE6 のイオン輸送活性そのものに影響しているのかどうか明らかにしていきたいと考えている。

## 論文審査の結果の要旨

申請者は、細胞の生存に不可欠な細胞内の pH 調節や  $\text{Na}^+$  調節、また浸透圧調節の制御に関わる生体膜に組み込まれた  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  交換輸送担体蛋白質の機能と制御について分子生物学や生化学的手法を用いた研究を行った。研究の前半では、酵母を材料とし、酵母の細胞質膜に存在する  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  交換輸送体 (Nha1p) のイオン輸送を生化学的に解析するために、蛋白質の分泌経路を阻害した突然変異細胞をもちいて人工的に細胞内の小胞に Nha1p を蓄積させることに成功した。この小胞を用いてイオン輸送を測定し、Nha1p のイオンに対する親和性や共役イオン間の化学量論比を測定することに初めて成功した。この成果は国際誌に発表され高い評価を得ている。

後半は、哺乳類細胞を材料とし、細胞内小胞に局在することが示されている  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  交換輸送蛋白質 (NHE と省略) の 6、9 に注目し研究を行った。これらの NHE の生理的役割は不明であり、局在化の仕組みや制御についても全く知見がなかった。本研究では、NHE6 と NHE9 の分子の特定部分に結合する蛋白質を同定したところ、これまでいくつかの異なる蛋白質に結合することが知られていた RACK1 と呼ばれる蛋白質であった。この蛋白質の細胞内での発現を抑制すると細胞内のリサイクリングエンドソーム内の pH がアルカリ化することを発見した。また、NHE6 は 20%程度が細胞質膜に存在し、残りが細胞内小胞に存在することを見いだした。RACK1 の発現抑制時には NHE6 の細胞質膜の量は半減した。これらのことから、NHE6 の細胞内小胞と細胞質膜間の移行に RACK1 が関与することが初めて示された。細胞内膜小胞の pH 調節は極めて重要な制御であるが、その仕組みは不明な点が多く、申請者の発見は重要な知見となる。

上記の研究成果について、7月6日に非公開の予備審査、8月10日に公開の口頭発表と審査を行い合格と判定された。よって、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。