

腸球菌  $\text{Na}^+$  共役型 V-ATPase 及び関連する  $\text{K}^+$  輸送体の  
構造と機能に関する研究

2003 年

河野美幸

腸球菌 Na<sup>+</sup>共役型 V-ATPase 及び関連する K<sup>+</sup>輸送体の  
構造と機能に関する研究

2003 年

河野美幸

## 目次

第1章 序論	2
第2章 NtpJ K <sup>+</sup> 輸送体による Na <sup>+</sup> 輸送及びそのイオン輸送機構	
方法	10
結果	14
考察	17
第3章 Na <sup>+</sup> 共役型 V-ATPase によるイオン輸送機構	
方法	30
結果	36
考察	40
第4章 総括	56
略号	60
参考文献	62
論文目録	69

## 第1章 序論

グラム陽性の連鎖球菌属は自然界に広く分布し、病原性細菌である肺炎球菌、溶血性連鎖球菌やヒトの正常細菌叢の構成菌種などを含む多様な細菌群である (Fig. 1)。連鎖球菌属の多くは高  $\text{Na}^+$  濃度、アルカリ条件では生育できないが、これらのうち腸球菌は特徴的に耐塩性、耐アルカリ性を示す。腸球菌は本来高等脊椎動物の腸管常在菌である。しかし、各種抗生物質に対する耐性菌が多く、特に近年、日本でもバンコマイシン耐性腸球菌 (VRE) の広がりが懸念されており、院内感染症の原因菌として注目されている。このうちの *Enterococcus hirae* を対象として、そのイオン輸送系についての研究を行った。

### 腸球菌における $\text{Na}^+$ 及び $\text{K}^+$ 輸送

細胞内の恒常性維持は、原核生物から真核生物に至るまで全ての細胞において重要である。そのために各種物質の輸送体が細胞膜上に存在し、その細胞内における濃度を巧妙に調節している。 $\text{K}^+$  は細胞内の主要なカチオンであり、 $\text{K}^+$  取り込み系が複数存在する [1]。また、積極的に  $\text{Na}^+$  を排出し、 $\text{Na}^+$  濃度勾配を形成する能動的輸送体が存在し、細胞膜を介した  $\text{Na}^+$  循環が行われている [2-4]。動物細胞において、 $\text{Na}^+$  排出及び  $\text{K}^+$  取り込みは主に  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase により行われ、形成される  $\text{Na}^+$  濃度勾配は糖など様々な物質の輸送に利用される。原核細胞では  $\text{Na}^+$  及び  $\text{K}^+$  の輸送は個別の輸送系により行われている。 $\text{Na}^+$  排出は能動的排出系によるが、動物細胞のそれとは機構が異なる。細菌における主要な  $\text{Na}^+$  排出系としては、secondary  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporter が広く分布している [5]。ある種の細菌においては、脱炭酸との化学的な共役 [6]、電子伝達 [7]、もしくは ATP 加水分解 [8] に共役した primary な  $\text{Na}^+$  排出系も存在する。一方、 $\text{Na}^+$  の細胞内への再取り込み系としては  $\text{Na}^+$  との secondary co transporter が主要な経路と考えられる [9]。また、 $\text{Na}^+$  濃度勾配は ATP 合成 [6] やべん毛運動 [10] に利用される場合もある。

Fig. 2 に腸球菌における  $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$  の循環図を示した [11]。*Enterococcus hirae* は呼吸鎖を持たない発酵性細菌であり、 $\text{H}^+$  の電気化学的勾配は  $\text{H}^+$  共役型  $\text{F}_0\text{F}_1$ -ATPase (F-ATPase) により形成される [12]。本菌には 2 種類の  $\text{Na}^+$  排出系、NapA  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporter [13, 14] 及び  $\text{Na}^+$  共役型 V-ATPase [15] が存在する。F-ATPase の至適 pH は pH 6.5 付近であるため、F-ATPase により形成されるプロトン駆動力は酸性条件が最大である [16]。したがって、 $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporter による  $\text{Na}^+$  排出は酸性から中性条件において行われ、アルカリ条件のようにプロトン駆動力形成の少ない条件では、主に  $\text{Na}^+$ -ATPase により  $\text{Na}^+$  が排出される [16]。一方  $\text{K}^+$  取り込み系としては KtrI と KtrII が存在する。KtrI は  $\text{K}^+$ 、 $\text{Rb}^+$  を同様に認識 ( $K_m=0.2 \text{ mM}$ ) し、構成的に発現していると考えられる。KtrI による  $\text{K}^+$  取り込みには ATP とプロトン駆動力が必要とされ [17]、その至適 pH は pH 6-6.5 である [18]。一方 KtrII は  $\text{K}^+$  に特異的な系であり、その  $K_m$  値は約 0.5 mM であり、至適 pH は pH 9-10 である。また KtrII はプロトン駆動力非依存的な系である [18, 19]。筆

者らのグループは Na<sup>+</sup>共役型 V-ATPase のオペロン遺伝子、*ntp* オペロンの末端に存在する *ntpJ* 遺伝子が、KtrII K<sup>+</sup>輸送系の本体であることを明らかにした (Fig. 3) [20]。 *ntp* オペロンにコードされる Na<sup>+</sup>-ATPase 及び NtpJ はアルカリ条件での生育に必須であることがわかっており、このような輸送体が一つのオペロンを形成していることは、その発現調節の面からも興味深い。

### イオン輸送性 ATPase

生体の重要なエネルギー変換系であるイオン輸送性 ATPase については、その機能が細胞活動を大きく左右するため、その反応機構、阻害剤の作用機作などの解明が望まれている。イオン輸送性 ATPase は構造・機能・生化学的性質から P 型、F 型、V 型の 3 種に分類される (Table I)。

P-type ATPase は動物細胞形質膜の Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase [21]、筋小胞体の Ca<sup>2+</sup>-ATPase [22]、胃粘膜細胞の H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase [23]、及び *E. coli* Kdp K<sup>+</sup>輸送系 [24]などに代表される。反応過程でリン酸化中間体 (E-P) を形成するために P-type と呼ばれ、 $\alpha_2\beta_2$  の 4 量体として機能すると考えられている。

F-type ATPase は F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATPase、ATP 合成酵素とも呼ばれ、ミトコンドリア内膜、葉緑体チラコイド膜、細菌細胞膜などに存在し、イオンの電気化学的勾配を利用して ATP を合成する [25, 26]。この膜を介したエネルギー伝達は Mitchell の化学浸透圧論 [27]により説明される。電子伝達系による H<sup>+</sup>排出により、H<sup>+</sup>の電気化学的勾配 ( $\Delta\mu_{H^+} = F\Delta\psi - 2.3RT\Delta pH$ , F: ファラデー定数,  $\Delta\psi$ : 膜電位, R: 気体定数, T: 絶対温度) が形成される。これがプロトン駆動力 ( $\Delta p = \Delta\mu_{H^+}/F = \Delta\psi - Z\Delta pH$ ) として蓄えられ、ATP 合成酵素による ATP 合成に利用される。また、ATP 合成酵素は F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATPase とも呼ばれるように、細菌の細胞膜において ATP 加水分解に共役したイオン輸送を行う。また、プロトン駆動力は H<sup>+</sup>共役型の様々な物質輸送、べん毛運動などにも利用される [28]。F-ATPase は 1960 年、Racker らにより酸化的リン酸化の共役因子 (factor 1, F<sub>1</sub>) としてウシ心筋ミトコンドリアから精製された [29]。 *E. coli* においてもそのオペロン遺伝子 (*atp*, *unc*) がクローニングされ [30, 31]、その解析により F-ATPase のサブユニット構造などが明らかにされた。さらに F-ATPase については様々な生化学的・分子生物学的研究により、各サブユニットの機能やその相互作用、重要なアミノ酸残基についての研究が進んでいる [32, 33]。詳細については第 3 章で述べるが、F-ATPase 反応では ATP 合成/加水分解が、酵素分子中心軸の回転を介してイオン輸送と共役している。これは Boyer が回転触媒説 [34, 35]として提唱したものだが、Walker らによる F<sub>1</sub>-ATPase の結晶構造の決定 [36]や、酵素中心軸 ( $\gamma$ サブユニット) の回転の直接観察により F<sub>1</sub>-ATPase が回転する分子モーターであることが立証され [37]、1997 年には Boyer 並びに Walker にノーベル化学賞が授与されている。膜内在性の F<sub>0</sub> 部分についても様々な生化学的研究及び回転観察 [38-43]から、c サブユニットが構成するリングが、 $\gamma$ サブユニットと共に回転することが分かっている。しかし現在のところ、この回転がどのようにイオン輸送と共役しているかが大きな疑問として残されている。

V-type ATPase (液胞型 ATPase, V-ATPase) は真核生物の細胞内膜系 (酸性小器官) や形質膜などに存在し、その内腔もしくは外部環境の酸性化により様々な生理機能を与える重要なプロトンポンプである [44-46]。破骨細胞の波状膜や内耳に存在する V-ATPase は、近年その機能不全が骨の形成不全 [47]やリンパ液の pH バランスの崩れに起因する難聴 [48]など、様々な疾患に関連することが明らかになってきている。また V-ATPase は F-ATPase と同様に、細菌の細胞膜において ATP 加水分解に伴うイオン輸送を行う [8, 49]。現在までに酵母液胞を始めとする様々なオルガネラから V-ATPase が精製され、その構造・生化学的研究が行われてきた [50-53]。V-ATPase は F-ATPase と類似の構造をもつ多量体酵素であり、その反応機構は本質的に同一であると考えられている (Fig. 4) [43, 45]。しかし、その存在が真核細胞に限られていたために F-ATPase に比べその分子機構の解明が遅れており、反応機構の詳細など未解明の部分が多く残されていた。

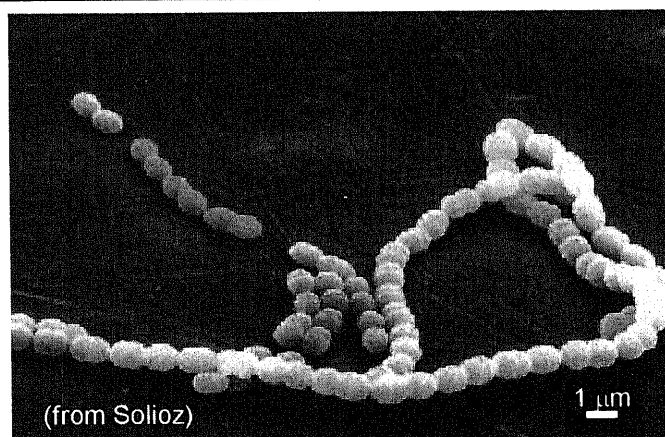
### 腸球菌 Na<sup>+</sup>共役型 V-ATPase

*E. hirae*におけるNa<sup>+</sup>ポンプの存在は1982年Haroldらにより報告され [8, 54, 55]、その後Kakinumaraらによりこの酵素がNa<sup>+</sup>輸送性のV-ATPaseであることが明らかにされた [16, 56]。*E. hirae* Na<sup>+</sup>-ATPaseは11の遺伝子から構成される*ntp*オペロンにコードされる。Na<sup>+</sup>-ATPaseはこのうち9つの遺伝子がコードするサブユニットにより構成され (Figs. 3, 4) [57]、現在*ntpH*遺伝子はORFではないと推測されている。また、本オペロンの発現は細胞内Na<sup>+</sup>及びpHにより転写レベルで調節されている [58, 59]。

F-type, V-type ATPaseによるイオン輸送には、膜内在性F<sub>0</sub>, V<sub>0</sub>部分のサブユニット (*E. hirae* NtpK<sub>67</sub>, *E. coli* c<sub>10-14</sub>) に保存された酸性残基 (*E. hirae* NtpK Glu-139, *E. coli* c Asp-61等) が必須である (Fig. 4) [60, 61]。この酸性残基は、特異的阻害剤DCCD (*N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide) の結合部位でもある。イオン輸送過程は、この酸性残基を中心とした結合部位へのイオン結合に始まり、結合部位からチャネル形成サブユニット (NtpI, a) へのイオンの受け渡し、イオンのチャネル内通過及び放出、などの段階が連動したものである。しかしF-type, V-type ATPaseの多くはH<sup>+</sup>共役型であるために、第一段階である基質 (H<sup>+</sup>) の結合を測定することが不可能であり、イオン輸送反応の詳細に関しては明らかにできていない。*E. hirae* V-ATPaseはNa<sup>+</sup>共役型であり、H<sup>+</sup>共役型では困難な、その輸送反応についての速度論的解析が比較的容易かつ詳細に行える。また、酵素に対するNa<sup>+</sup>の結合が高親和性 (*K<sub>d</sub>*値約20 μM) であるために、放射性同位元素 (<sup>22</sup>Na<sup>+</sup>) などを用いて酵素分子へのNa<sup>+</sup>の結合を直接測定することが可能であり、この系を利用して野生型酵素へのNa<sup>+</sup>結合の性質が詳細に解析されてきた [62]。

本研究では*ntp*オペロンにコードされる輸送体を対象とし、まずNtpJ K<sup>+</sup>輸送系によるNa<sup>+</sup>取り込みの性質及びそのメカニズムについて検討し、続いてNtpAからFにコードされるNa<sup>+</sup>-ATPaseによるイオン輸送機構についての解析を行った。

Strain	Growth at:			
	6.5% NaCl	pH 9.6	10 °C	45 °C
Pyogenic streptococci				
<i>S. pyogenes</i>	-	-	-	-
<i>S. pneumoniae</i>	-	-	-	-
Oral streptococci				
<i>S. sanguis</i>	-	-	-	-
<i>S. mutans</i>	-	-	-	-
Enterococci				
<i>E. faecalis</i>	+	+	+	+
<i>E. hirae</i>	+	+	+	+
Lactic streptococci				
<i>L. lactis</i>	-	-	+	-



**Fig. 1. Growth characteristics of the *Streptococci*.**

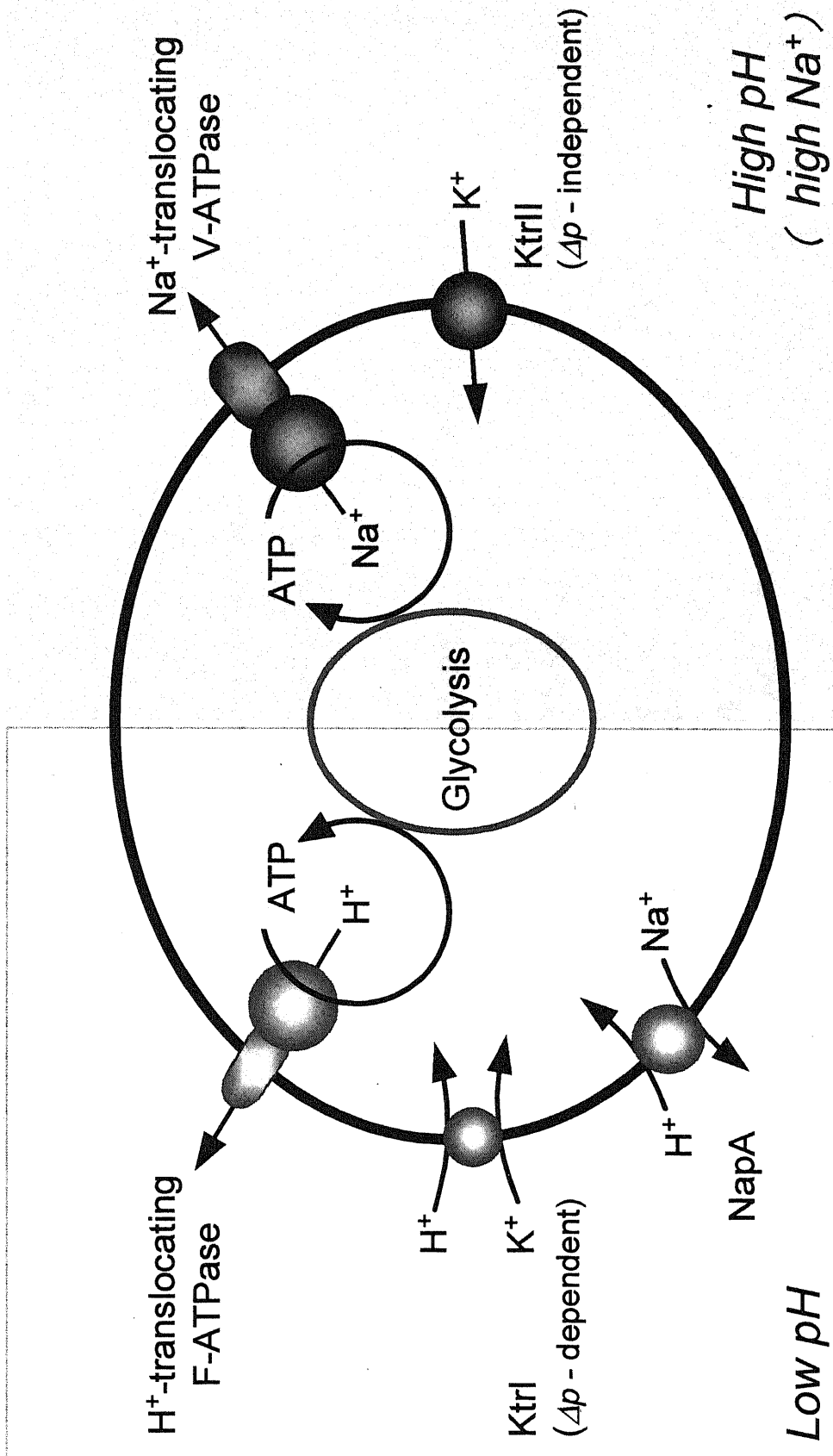


Fig. 2. Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> circulation of *Enterococcus hirae*. At low pH, Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> transport are performed by Δp - dependent KtrI K<sup>+</sup> transporter and NapA Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter. On the other hand, Na<sup>+</sup>-translocating V-ATPase and Δp - independent KtrII K<sup>+</sup> transporter (NtpJ) are functional at high pH.



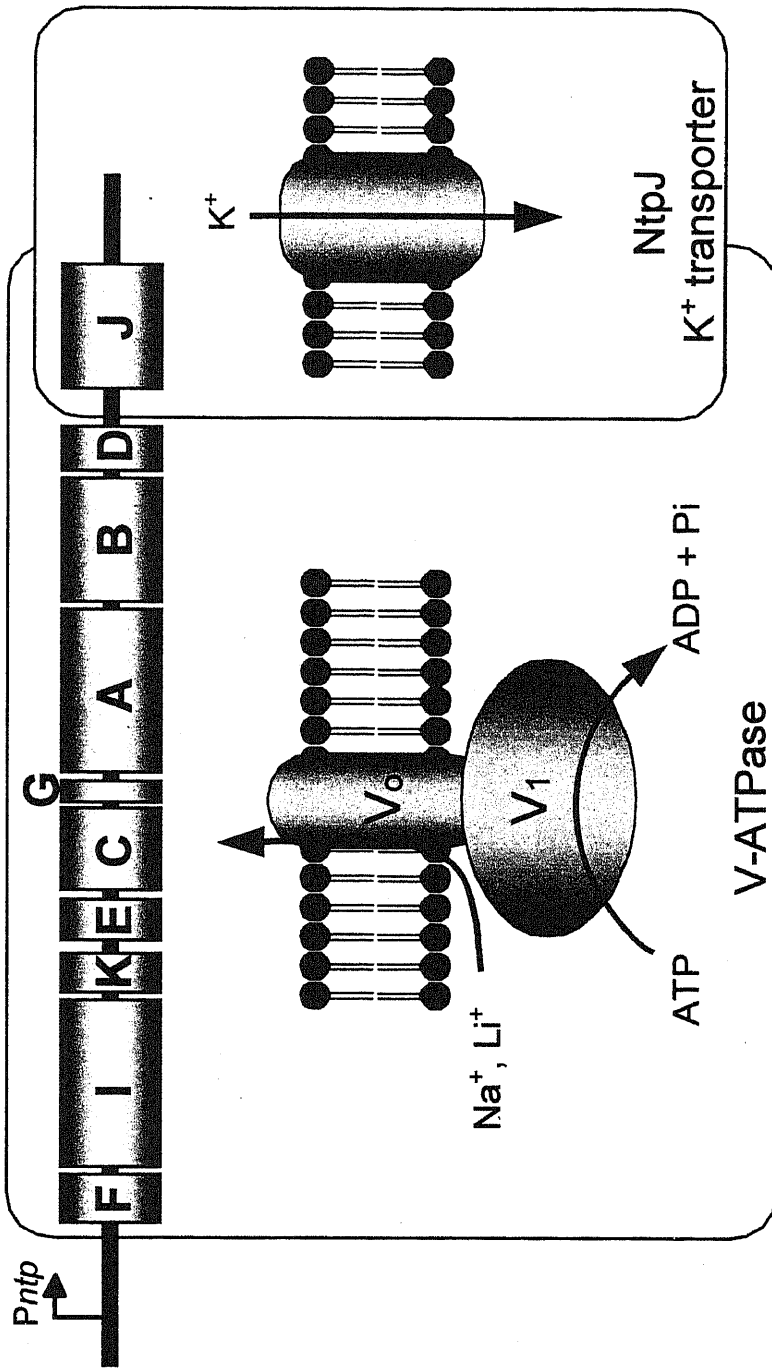


Fig. 3. Structure of the *ntp* operon for  $\text{Na}^+$ -ATPase and KtrII (NtpJ).

**Table I. Comparison of major classes of ATP-driven ion pumps.**

	<b>P-type</b>	<b>F-type</b>	<b>V-type</b>
subunits	$\alpha_2, \beta_2$	$F_1 (\alpha_3, \beta_3, \delta, \epsilon, \gamma)$ $F_o (a, c_{10-14})$	$V_1 (A_3, B_3, C, D, E, F, G)$ $V_o (a, c_{6?})$
substrates	$H^+, K^+, Na^+, Ca^{2+}$	$H^+, Na^+$	$H^+, Na^+$
location	Plasma membrane of plants, fungi, bacteria, eukaryotic cells	Bacterial plasma membranes Inner mitochondrial membrane Thylakoid membrane of chloroplast	Vacuolar membranes in plant, yeast, other fungi Endosomal and lysosomal membrane in animal cells Plasma membrane of certain acid-secreting animal cells and bacteria

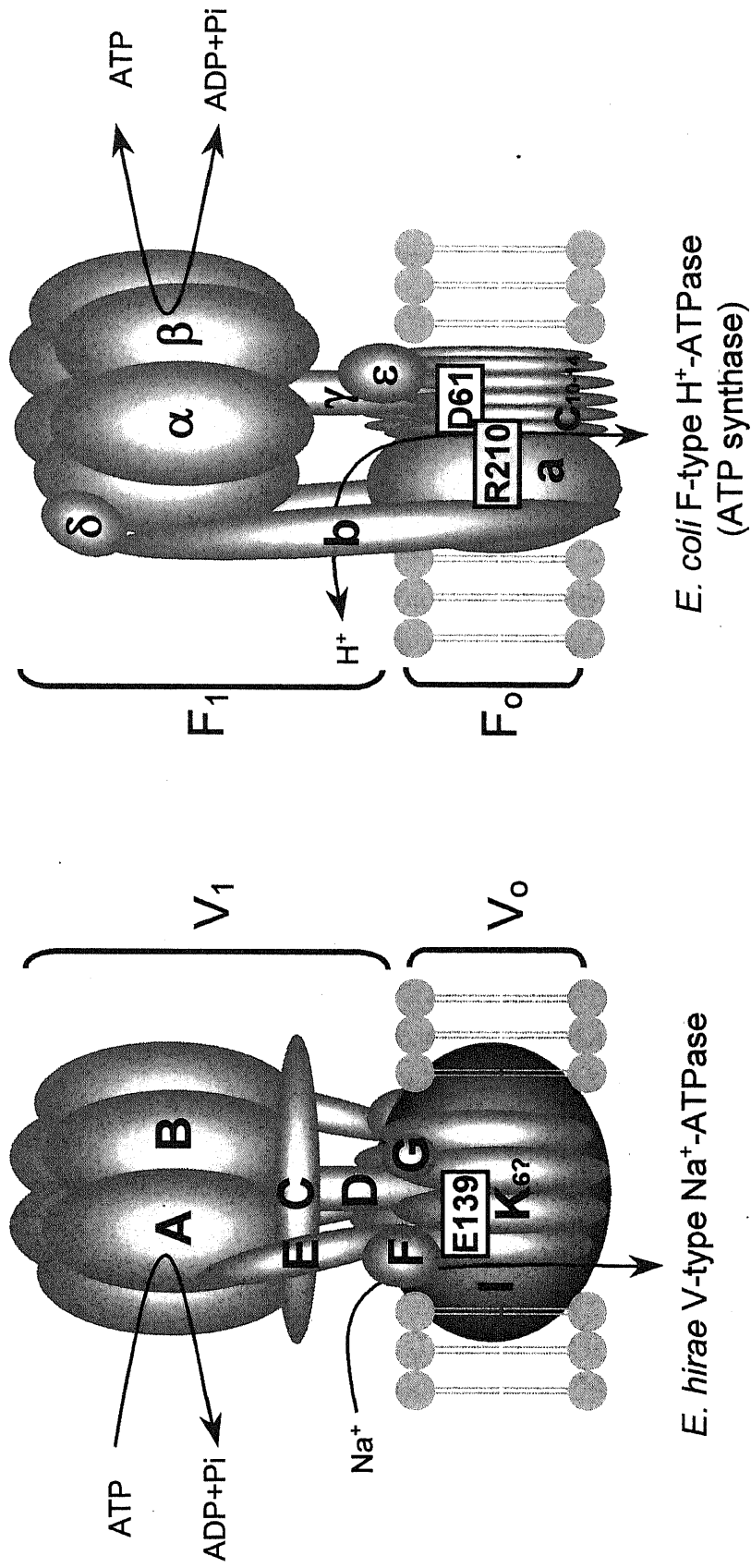


Fig. 4. Schematic model of F-type and V-type ATPases.

## 第2章 NtpJ K<sup>+</sup>輸送体による Na<sup>+</sup>輸送及びそのイオン輸送機構

### 2-1 緒言

細胞膜を介した Na<sup>+</sup>の循環は全ての細胞において行われている。この Na<sup>+</sup>循環は細胞内の Na<sup>+</sup>濃度と Na<sup>+</sup>濃度勾配を維持する役割を果たす、能動的な Na<sup>+</sup>排出系により行われている [2-4]。動物細胞では主に P-type Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase により Na<sup>+</sup>排出が行われるが、細菌では Na<sup>+</sup>排出と K<sup>+</sup>取り込みは別々の系で行われており、secondary Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter [5]をはじめ、ATP 加水分解 [8]、電子伝達 [7]や脱炭酸反応 [6]に共役した primary な Na<sup>+</sup>排出系の存在が知られている。さらに細胞外に排出された Na<sup>+</sup>は、Na<sup>+</sup>濃度勾配を消費する様々な経路により細胞内へ再度流入する。主な経路は Na<sup>+</sup>との共輸送体 [9]であるが、ATP 合成 [6]、べん毛運動 [10]などに Na<sup>+</sup>濃度勾配が使われる例もある。腸球菌 *Enterococcus hirae* に存在する 2 種類の Na<sup>+</sup>排出系のうち、*ntp* オペロンによりコードされる Na<sup>+</sup>-ATPase は 9 種類のサブユニットから構成される典型的な V-ATPase である(第 1 章、Fig. 4) [15, 57]。Na<sup>+</sup>-ATPase はアルカリ条件のように、プロトン駆動力の形成が限られた条件における重要な Na<sup>+</sup>排出系である。一方、本菌における Na<sup>+</sup>濃度勾配の消費系はほとんど明らかになっていない。したがって、本菌での Na<sup>+</sup>排出系の主要な役割は細胞外へ Na<sup>+</sup>を排出し、K<sup>+</sup>を蓄積するための細胞内容積を作ることだと考えられてきた [8, 63]。

*E. hirae* には 2 種類の高親和性 K<sup>+</sup>取り込み系、KtrI と KtrII が存在する(第 1 章、Fig. 2)。これらの K<sup>+</sup>輸送体の分子機構については明らかでない部分が多いが、*ntp* オペロン末端に存在する *ntpJ* 遺伝子は、KtrII K<sup>+</sup>取り込み系の輸送体をコードしている [20]。NtpJ は *Saccharomyces cerevisiae* Trk1p, Trk2p, *Escherichia coli* TrkG, TrkH, *Triticum aestivum* (wheat) HKT1 などの様々な K<sup>+</sup>輸送体と相同性を示す [57]。これら K<sup>+</sup>輸送体の共役イオンについては様々な解析が行われているが、その分子機構については明らかでない部分が多い。*ntp* オペロンの発現は転写レベルで細胞内 Na<sup>+</sup>により調節されていることから、KtrII による K<sup>+</sup>取り込みには Na<sup>+</sup>-ATPase により形成される Na<sup>+</sup>濃度勾配が関与していると考えられる。

本章では、NtpJ のイオン輸送機構を解明する目的で、NtpJ を介する Na<sup>+</sup>透過の有無、及びそのメカニズム、さらに関連する K<sup>+</sup>取り込み系についての解析を行った。

### 2-2 方法

#### 使用菌株・培地

腸球菌 *Enterococcus hirae* 野生株 ATCC9790

9790 を親株とした以下の変異株を使用した。

JEM2; *ntpJ* 遺伝子をエリスロマイシン耐性遺伝子の挿入により破壊した *ntpJ* 遺伝子破壊株 [20]

Nak1; Na<sup>+</sup>-ATPase 欠損株 [64]

細胞は 37°C、栄養培地中で静置培養した [19]。

NaTY (1% Bacto tryptone, 0.5% Bacto Yeast Extract, 1% glucose, and 0.85% Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>)

NaTY の Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>濃度はそれぞれ、120 mM 及び 15 mM である。

KTY (1% Bacto tryptone, 0.5% Bacto Yeast Extract, 1% glucose, and 1% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>)

KTY の Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>濃度はそれぞれ、15 mM 及び 120 mM である。

M17 (Bacto M17 BROTH dehydrated 3.73 g, 20% lactose 25 ml in 1.0 liter) [65]

必要に応じて、Yeast Extract を 0.025% とした、低 K<sup>+</sup>濃度 NaTY (mNaTY) を使用した。mNaTY の K<sup>+</sup>濃度は約 1 mM 以下である [66]。

必要に応じて培地の pH を Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 添加により約 pH 10 に調整した。

JEM2 の培養に際しては 10 µg/ml のエリスロマイシン、JEM2 形質転換株の培養時には 10 µg/ml のエリスロマイシン、5 µg/ml のクロラムフェニコールを添加した。

寒天培地の作製には 1.5% の寒天末を加えた。細胞の生育は OD-540 nm にて測定した。

#### pLK132 プラスミドの構築

wild-type の *ntpJ* 遺伝子を含むプラスミドとして、*E. coli* - *B. subtilis* シャトルベクター pHY300PLK (TAKARA BIO INC.) の *BglII* site に、pKAZ132 [20] の *BglII*-*BglII* 2.2 kbp フラグメントを挿入した pLK132 を作製した。sequencing によりテトラサイクリン耐性遺伝子の下流に *ntpJ* 遺伝子が挿入されていることを確認した。

#### 部位特異的変異導入

部位特異的変異導入は、変異(下線部)を含んだプライマーを用いた PCR 法によって行った。用いたプライマーは以下に示した。

ntpJ-G276A: 5'-GA ACA GCA GCA TAT TAC TCT ATT GAT TAT TTA CAG ATG AGT CAT GC-3'

ntpJ-E383Q: 5'-ATT GCG TTT CAA GTC TTT TCC GCT TTT GGG-3'

#### *E. hirae* の形質転換

Soliz らの方法を参考に行った [65]。M17 培地 100 ml 中で一晚培養後、集菌した細胞を 500 ml の滅菌水で 2 回洗浄し、最終的に 1.0 ml の滅菌水に懸濁した細胞 ( $1 \times 10^{10}$  cells/ml) を competent cell として使用した。competent cell は -80 °C で保存可能であり、解凍後に滅菌水で 2 回洗浄して使用した。competent cell 60 µl に 1~3 ng のプラスミド DNA を加えてよく混合したものを 0.1 cm キュベットに入れ、Gene Pulser (BioRad) でパルス (1.4 kV, 3000 Ω, 250 µF) をかけた。直ちに M17 培地を 300 µl 加え、37 °C で 2.5 時間以上インキュベーションした後、薬剤耐性に応じた抗生物質を含む KTY 寒天培地に 300 µl 全て塗布し、37 °C でインキュベーションした。この条件での形質転換効率は約  $10^5$  transformants/µg DNA である。

### E. hiraeからのプラスミド DNA の調製

プラスミド DNA の調製は Frere の方法を参考にした [67]。0.5% glycine を含む KTY 培地で一晚培養、集菌し、solution A (50 mM Tris-HCl, 0.1 M glucose, 10 mM EDTA, pH 8.0) に懸濁した後、グラスビーズを適量加えて vortex mixer で 1~2 分間よく混合した。その後は *E. coli* と同様にアルカリ法でプラスミドの抽出を行った。

### 輸送活性の測定

<K<sup>+</sup>取り込み活性の測定> 対数増殖期で集菌した細胞を、2,4-dinitrophenol を用いて Na<sup>+</sup>負荷細胞とし [17]、約 1 mg/ml となるように 0.1 M Na<sup>+</sup>-2-(cyclohexylamine)ethanesulfonic acid (CHES; pH 10) に懸濁した。懸濁液に 10 mM glucose を加えて 10 分間インキュベートした後、2 mM KCl 添加により反応を開始した。サンプル (0.3 ml) は各時点で Nucleopore polycarbonate filter (pore size, 0.4 μm; Costar Scientific Co., Cambridge, Mass.) を用いてろ過し、2 mM MgSO<sub>4</sub> で 2 回洗浄した。細胞内 K<sup>+</sup>含量は、フィルター上に捕集した細胞から Hot TCA 処理で抽出後、原子吸光法により定量した。

<Rb<sup>+</sup>取り込み活性の測定> <sup>86</sup>Rb<sup>+</sup>の取り込み活性は、K<sup>+</sup>取り込みの場合と同様に細胞懸濁液を調整し、各濃度の <sup>86</sup>RbCl (0.37 MBq/mmol) を添加して反応を開始した。各時点でサンプルを cellulose acetate membrane filter (pore size, 0.45 μm; Toyo Roshi Co., Tokyo, Japan) を用いてろ過し、2 mM MgSO<sub>4</sub> で洗浄した。細胞内の <sup>86</sup>Rb<sup>+</sup>放射活性を液体シンチレーションカウンターで測定した。

<Downhill の Na<sup>+</sup>取り込み活性の測定> 2,4-dinitrophenol 法により K<sup>+</sup>負荷細胞を作製し、5 mg/ml となるように 2 mM MgSO<sub>4</sub> に懸濁した。Na<sup>+</sup>取り込みは、0.2 ml の細胞懸濁液を 2 ml の各種バッファーに加えることにより開始した。K<sup>+</sup>取り込みの場合と同様にサンプルを採取し、各時点での細胞内 Na<sup>+</sup>含量を原子吸光法により定量した。

<膜電位依存性の Na<sup>+</sup>, Li<sup>+</sup>取り込み活性の測定> 2,4-dinitrophenol 法により K<sup>+</sup>負荷細胞を作製し、バッファー (50 mM *N*-methylglucamine-CHES, 2 mM MgSO<sub>4</sub>, pH 10) に 0.8 mg/ml となるように懸濁した。懸濁液に 2 mM NaCl (LiCl) を添加し、5 分後に 30 μM valinomycin の添加により反応を開始した。K<sup>+</sup>取り込みの場合と同様にサンプルを採取し、各時点での Na<sup>+</sup>, Li<sup>+</sup>細胞内含量を原子吸光法により定量した。

### 膜電位の測定

膜電位の形成は、3,3'-dihexyloxycarbocyanine iodide [DiOC<sub>6</sub>(3)] の蛍光クエンチングにより測定した [68, 69]。NaTY pH 10 で培養後、Na<sup>+</sup>を負荷し、バッファー (0.1 M Na<sup>+</sup>-CHES, 2 mM MgSO<sub>4</sub>, pH 10) に 0.5 mg protein/ml となるように懸濁し、1 μM DiOC<sub>6</sub>(3) を添加して 25 °C、10 分間インキュベーションした。蛍光強度を励起波長 470 nm、蛍光波長 510 nm でモニターした (model MPF-4; Hitachi Co.)。形成された膜電位は、30 μM valinomycin 存在下での K<sup>+</sup>, Rb<sup>+</sup>の分布平衡から算出した [69]。

### 膜分画の調整

細胞膜分画の調整は Murata らの方法 [54, 71] に従った。NaTY もしくは NaTY+0.2 M NaCl 培地中で対数増殖後期まで培養し、集菌した細胞を 2 mM MgSO<sub>4</sub> で 2 回洗浄後、0.1 g wet weight / ml となるように 2 mM MgSO<sub>4</sub> / 0.5 M glycylglycine-KOH (pH 7.2) に懸濁した。N-Acetylmuramidase SG (SEIKAGAKU Co., Tokyo) を終濃度 20 µg/ml で添加し、37 °C で 10~20 分間インキュベーションした。14,000 rpm、20 分、4 °C の遠心後、沈殿に 1/8 volume の buffer A (50 mM Tris-HCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10% glycerol, 20 µM FUT175 [72], 1 mM β-mercaptoethanol, pH 7.5) 及び 10 µg/ml DNaseI を加え、氷上でよくホモジネートし、French Press (10,000 psi×3) により細胞を破碎した。Buffer A' (0% glycerol buffer A) を等量加え、14,000 rpm、20 分、4 °C の遠心後、上清を 50,000 rpm (約 100,000×g)、60 分、4 °C で遠心して膜分画を沈殿させた。これを buffer AA' (5% glycerol) で 2 回洗浄後、適量の buffer A に懸濁し、-80 °C で保存した。

### 膜分画の ATP 加水分解活性の測定 (比色法)

600 µl の反応系で測定した。20 mM Tris-HCl (pH 8.8) に各濃度の NaCl, 2 mM MgSO<sub>4</sub>、膜分画を加えた後、0.5 mM DCCD を添加して 37 °C で 5 分間インキュベーションした。続いて 2 mM ATP-Tris (pH < 6.9) を加え、10~30 分後に 10% SDS 400 µl を添加して反応を停止させた (total 1.0 ml となる)。ここに Pi-reagent (FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1 g, Am-Mo solution 2 ml in 20 ml) (Am-Mo solution; ammonium molybdate 8 g dissolved in 10 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 50 ml) を 500 µl 加えて 37 °C で 30 秒インキュベーションし、生成した無機リン酸-モリブデン酸錯体を 740 nm における吸光度により比色定量した。標準液には 10 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> を用いた [73]。

### その他

生育中の細胞の細胞内 Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>濃度の定量は以下の方法で行った [74]。対数中期の細胞をフィルター [Nucleopore polycarbonate filter (pore size, 0.4 µm; Costar Scientific Co., Cambridge, Mass.)] 上に集菌し、2 mM MgSO<sub>4</sub> で 2 回洗浄後、Hot TCA で細胞内イオンを抽出し、原子吸光法で定量した。*E. hirae* 9790 及び JEM2 の細胞内容積は、[<sup>14</sup>C]inulin [70] を用いて測定したところそれぞれ 2.0 µl 及び 2.1 µl であった。イオンの細胞内濃度の計算にはこれらの値を使用した。タンパク質定量は Lowry ら [75]、SDS ポリアクリルアミド電気泳動は Laemmli の方法 [76] に従って行った。Western blotting は Nielsen らの方法 [77] により行い、タンパク質の検出には alkaline phosphatase-conjugated goat anti-rabbit IgG system を使用した。

<sup>86</sup>RbCl は NEN Life Science Products, Inc. より購入した。DiOC<sub>6</sub>(3) は Sigma-Aldrich Co. より購入した。その他の試薬は全て特級を用いた。

## 2-3 結果

### *E. hirae* NtpJ K<sup>+</sup>輸送体による Na<sup>+</sup>輸送及びそのイオン輸送機構

#### 2-3-1 K<sup>+</sup>取り込みに対するバリノマイシンの影響

アルカリ条件下、2 mM KCl 添加により観察されるグルコース依存性の K<sup>+</sup>取り込み活性は、KtrII による K<sup>+</sup>取り込み活性である [19]。野生株 ATCC9790 では 2 mM KCl 添加により KtrII による K<sup>+</sup>取り込み活性が観察される (Fig. 5A)。低濃度のバリノマイシンはその条件で形成されている膜電位の指標となることから [69]、バリノマイシンを添加したところ 9790 による K<sup>+</sup>取り込みは強く阻害された (Fig. 5A)。このことから、以前に指摘されていた通り、KtrII による K<sup>+</sup>取り込みが膜電位に依存した uniport ではないことがわかる [16]。一方、NtpJ 欠損株 JEM2 においては、同条件下 KtrII による K<sup>+</sup>取り込みは観察されない。しかし、バリノマイシン添加により、野生株とは異なり顕著な K<sup>+</sup>取り込みが観察された (Fig. 5B)。このときの JEM2 における K<sup>+</sup>蓄積量は親株の約 10 倍であった。

また、低 K<sup>+</sup>濃度 (1 mM K<sup>+</sup>以下)、高 Na<sup>+</sup>濃度における 9790 及び JEM2 の生育に対するバリノマイシンの影響を調べた (data not shown)。野生株 9790 は、pH 10 においても中性条件とほぼ同様の生育速度で生育する。9790 の生育は、K<sup>+</sup>取り込み活性と同様にバリノマイシン添加により阻害された。これに対して、JEM2 はアルカリ条件下低 K<sup>+</sup>濃度培地では生育できない。しかし、K<sup>+</sup>取り込み活性と同様に、バリノマイシン添加により JEM2 の生育が回復した。これらの結果は、JEM2 における膜電位の過形成を示唆している。また、バリノマイシン非存在下においても、20 mM 程度の KCl 添加により JEM2 の低 K<sup>+</sup>濃度培地での生育が回復する。このときの JEM2 の細胞内 K<sup>+</sup>含量は培地中の K<sup>+</sup>濃度よりも高く、何らかの低親和性 K<sup>+</sup>取り込み系が機能していると考えられる。この点については 2-3-5 以降に述べる。

#### 2-3-2 JEM2 における膜電位の過分極

野生株、JEM2 での膜電位の形成を蛍光試薬 DiOC<sub>6</sub>(3)を用いて観察した (Fig. 6)。Na<sup>+</sup>を負荷した野生株、JEM2 それぞれの細胞を Na<sup>+</sup>バッファーに懸濁し、DiOC<sub>6</sub>(3)を平衡化後、グルコース添加による蛍光強度の変化を測定した。野生株ではグルコース依存的に蛍光クエンチングが観察され、このクエンチングはバリノマイシン添加により影響を受けず、バリノマイシンに続いて 10 mM KCl を添加することにより抑制された (Fig. 6A, left)。グルコース依存性の蛍光クエンチングは JEM2 においてより顕著であり、これは野生株同様バリノマイシン添加に引き続く KCl 添加により抑制された (Fig. 6B, left)。野生株と JEM2 の細胞内容積は同程度であるので、この結果は JEM2 において野生株よりも高い膜電位が形成されていることを支持している。また野生株においては、KCl のみを添加しても蛍光クエンチングの抑制が観察された (Fig. 6A, right)。このことは NtpJ が electrogenic な K<sup>+</sup>輸送を行うことを示唆している。しかし、JEM2 においては KCl のみを添加した場合のクエンチングの抑制は非常に遅く、KCl に続いてバリノマイシンを添加することにより蛍光強度がほぼ完全に回復した (Fig. 6B, right)。JEM2 においてはバリノマイシンの存在により K<sup>+</sup>の影響が大きくなっていると言える。一方、Na<sup>+</sup>-ATPase 欠



損株である Nak1 [64]においてはグルコース依存的な蛍光クエンチングは観察されず (Fig. 6C)、*E. hirae* において、アルカリ条件では主に  $\text{Na}^+$ -ATPase による electrogenic な  $\text{Na}^+$  排出により膜電位が形成されることが示された。

野生株、JEM2 において形成された膜電位の大きさを、バリノマイシン存在下での  $\text{K}^+$ 、 $\text{Rb}^+$  の蓄積量から算出した [69]。バリノマイシン存在下、様々な濃度の KCl 添加による  $\text{K}^+$  蓄積量を調べたところ、10 mM 以上の KCl 添加では膜電位の形成が抑制された (data not shown)。よって、高濃度 KCl 存在下での  $\text{K}^+$  蓄積量は形成された膜電位を反映していないと考えられる。これはおそらく、ドナンの膜平衡に基づいた細胞内電荷の消費のために  $\text{K}^+$  が取り込まれたことが原因と考えられる。したがって、膜電位に対する  $\text{K}^+$  の影響がほとんどないと考えられる、0.5 mM KCl 以下の点をもって膜電位の算出を行った。その結果、 $\text{K}^+$  蓄積量から算出した膜電位は野生株、JEM2 それぞれ、 $-118 \pm 1$  mV 及び  $-160 \pm 2$  mV であった。 $\text{Rb}^+$  の蓄積量から算出した膜電位はそれぞれ  $-115$  mV 及び  $-165$  mV であり、 $\text{K}^+$  による結果とほぼ一致した。また、蛍光強度から見積もった膜電位の大きさはそれぞれ  $-110$  mV 及び  $-150$  mV であった [68, 69]。これらの結果から、NtpJ の欠失によりアルカリ条件下 *E. hirae* の膜電位が過分極していることが明らかになった。

### 2-3-3 NtpJ を介した $\text{Na}^+$ 透過について

JEM2 の膜電位の過分極は、 $\text{Na}^+$  バッファー中で、 $\text{Na}^+$ -ATPase による膜電位の形成が行われている条件で観察された。そのため過分極の原因としては、 $\text{Na}^+$ -ATPase の活性変化、もしくは細胞膜の  $\text{Na}^+$  に対する透過性の変化、あるいはその両方が考えられる。膜分画の  $\text{Na}^+$  依存性 ATP 加水分解活性は 9790、JEM2 それぞれ、0.14 及び 0.14  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  protein であった。さらに、cell lysate を用いた western blotting の結果から、両株の ATPase 発現量にはほとんど差は認められなかった。また、 $\text{Na}^+$ -ATPase による electrogenic な  $\text{Na}^+$  排出についてもほとんど変化がなかった。よって、 $\text{Na}^+$ -ATPase 活性の変動は JEM2 における膜電位の過分極にほとんど関与していないと考えられる。

次に、JEM2 における  $\text{Na}^+$  膜透過性の変化について検討した。NtpJ は KtrII  $\text{K}^+$  輸送体による  $\text{K}^+$  取り込みの本体であるが [20]、この系を介した  $\text{Na}^+$  など他のイオンの動きに関しては不明である。そこで、野生株 9790 及び JEM2 の pH 10 における  $\text{Na}^+$  輸送について検討した。まず、 $\text{K}^+$  負荷した細胞を各濃度の  $\text{Na}^+$  を含むバッファーに懸濁し、濃度勾配にしたがった受動的な  $\text{Na}^+$  流入について調べた。野生株と JEM2 両株において  $\text{Na}^+$  の流入はバッファーの  $\text{Na}^+$  濃度に依存し、200 mM  $\text{Na}^+$  のときの  $\text{Na}^+$  流入速度は両株ともに約 2 nmol/min/mg protein であった (data not shown)。

続いて濃度勾配に逆らった、uphill の  $\text{Na}^+$  流入について検討した (Fig. 7)。N-methylglucamine バッファーに懸濁した  $\text{K}^+$  負荷細胞に、バリノマイシン添加により膜電位 (inside negative) を人工的に負荷し、膜電位依存性の  $\text{Na}^+$  取り込みを見た。野生株 9790 においては、膜電位負荷により 35 nmol/min/mg protein と、downhill の場合よりも高い活性が観察され、steady-state においては約 100 倍の  $\text{Na}^+$  濃度勾配が形成されていた (Fig. 7A)。この膜電位依存性の  $\text{Na}^+$  取り込みの初速に対して

Lineweaver-Burk plots をとると直線となり、 $\text{Na}^+$ に対する  $K_m$  値は約 1.3 mM であった (Fig. 8)。一方、JEM2 では膜電位負荷による  $\text{Na}^+$ 取り込みは観察されなかった (Fig. 7B)。また、JEM2 に野生型の *ntpJ* 遺伝子を含むプラスミド (pLK132) を導入した株では、膜電位依存性の  $\text{Na}^+$ 取り込み活性が回復した (Fig. 7C)。以上の結果から、NtpJ が膜電位に依存した  $\text{Na}^+$ 透過に関与していることが明らかとなった。それと同時に、*ntpJ* 遺伝子破壊株における膜電位の過分極には、NtpJ  $\text{K}^+$ 輸送体を介した  $\text{Na}^+$ 流入の減少が関与していることが示唆された。

#### 2-3-4 $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ 取り込みに対する NtpJ 変異の影響

1997年に Mackinnonらにより放線菌の  $\text{K}^+$ チャネル (KcsA) の結晶構造が提出され [78]、イオンチャネルの輸送機構の研究は構造面から大きく進展した。NtpJ に類似した  $\text{K}^+$ 輸送体は生物界に広く分布するが、これら輸送体は2つの膜貫通部位と、それを連結するループからなる領域が4回繰り返された構造をとると考えられている (Fig. 9) [79-81]。その中でもイオン透過に関わると考えられる部分は、KcsA のイオン透過ポア (P-loop) と比較的類似性が高い [82]。他の  $\text{K}^+$ 輸送体との比較からイオン輸送に関わると推定される NtpJ のアミノ酸残基について変異体を作製し、その活性を測定した。その結果、G276A 変異体では  $\text{K}^+$ 取り込み活性が NtpJ 欠損株と同程度にまで低下し、この残基は  $\text{K}^+$ 輸送に関与することが示唆された (Fig. 10B)。一方、E383Q 変異体においては、膜電位依存性の  $\text{Na}^+$ 取り込み活性が野生型の約 40%に低下した (Fig. 10A)。この残基の変異は低  $\text{K}^+$ 濃度培地での生育にほとんど影響しなかったことから、Glu-383 は  $\text{Na}^+$ 輸送にのみ関わる可能性が考えられる。*Triticum aestivum* HKT1 や *Vibrio alginolyticus* KtrB においても、これらに相当する残基がイオン輸送に関わるとの報告がある [83, 84]。

#### *E. hirae* 低親和性 $\text{K}^+$ 輸送系の性質

##### 2-3-5 アルカリ条件における *E. hirae* の生育に対する $\text{K}^+$ , $\text{Rb}^+$ 濃度の影響

KtrII 活性欠損株 JEM2 の低  $\text{K}^+$ 濃度培地における生育が数 10 mM の KCl 添加により回復することから、*E. hirae* には低親和性の  $\text{K}^+$ 取り込み系が存在すると考えられる。2つの高親和性  $\text{K}^+$ 取り込み系 (KtrI, KtrII) 欠損株、JEMK1 [66]を用いて、アルカリ条件下、低  $\text{K}^+$ 濃度培地 (mNaTY;  $\text{Na}^+ \approx 200$  mM,  $\text{K}^+ \leq 1$  mM) における生育を調べた。野生株 9790 はこのような培地においても生育速度  $0.35 \text{ h}^{-1}$  で生育する。低濃度 (1-5 mM) の KCl もしくは RbCl においては、野生株の生育は RbCl よりも KCl 添加により促進された (Fig. 11A)。これは、低  $\text{K}^+$ 濃度、アルカリ条件では、 $\text{K}^+$ を特異的に認識する KtrII が主に機能していることを示唆している。高濃度 (10, 20 mM) においては、野生株の生育は KCl, RbCl により同程度に促進された。一方 JEMK1 は KtrII 活性が欠損しているため、アルカリ条件下低濃度の KCl または RbCl による生育の促進はほとんど観察されない。しかし高濃度においては、JEMK1 の生育が KCl, RbCl 添加により顕著に促進された (Fig. 11B)。このときの細胞内  $\text{K}^+$ ,  $\text{Rb}^+$ 含量は 850 mM 及び 600 mM であり、 $\text{K}^+$ ,  $\text{Rb}^+$ を取り込む低親和性の系が機能していることが示唆された。

### 2-3-6 pH 10 における低親和性の $K^+$ 取り込み

Fig. 12 に pH 10 における  $K^+$  取り込み活性を示した。当初、KtrI, KtrII 二重欠損株である JEMK1 においては  $K^+$  取り込み活性が完全に消失していると考えていた。JEMK1 では、至適 pH が pH6-6.5 である KtrI 活性が部分的に残存しているが、pH 10 においてはこの部分活性も観察されない [18, 19]。しかし、20 mM KCl 添加により顕著なグルコース依存性の  $K^+$  取り込み活性が観察され (Fig. 12B)、形成された  $K^+$  の濃度勾配は 50 倍であった。 $K^+$  取り込みの初速に対して Lineweaver-Burk plots をとると直線となり、 $K^+$  に対する  $K_m$  値は約 20 mM、 $V_{max}$  は 1.6  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg protein}$  であった (Fig. 12D)。野生株 9790 においては、2 mM, 20 mM KCl 添加時の  $K^+$  蓄積量にほとんど差はなかったが、初速はわずかに 20 mM KCl 添加時の方が高かった (Fig. 12A)。 $K^+$  取り込みの初速に対して Lineweaver-Burk plots をとると明確に二相性であり (Fig. 12C)、この条件での野生株の  $K^+$  取り込みには、 $K_m$  値 0.5 mM、 $V_{max}$  0.56  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg protein}$  と、 $K_m$  値 20 mM、 $V_{max}$  0.67  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg protein}$  の 2 種の成分が関わっていることが示唆された。 $K_m$  値 0.5 mM の成分はおそらく KtrII の活性であると考えられる。これらの結果から、アルカリ条件下、*E. hirae* には KtrI, KtrII に依存しない、高活性・低親和性の  $K^+$  取り込み系が存在することが示唆された。

さらに、JEMK1 において、20 mM RbCl 添加により顕著な  $Rb^+$  蓄積が観察された (Fig. 13A)。この  $Rb^+$  の取り込みは  $K^+$  もしくは  $Cs^+$  により阻害されたが、 $Cs^+$  の阻害効果は  $K^+$  に比較して弱いものであった。 $^{86}\text{Rb}^+$  取り込みの初速に対する Lineweaver-Burk plots をとると直線となり、 $K_m$  値は約 40 mM、 $V_{max}$  は 0.5  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg protein}$  であった。 $K^+$  は  $K_i$  値約 20 mM で  $Rb^+$  取り込みを競合的に阻害した (Fig. 13B)。この  $Rb^+$ 、 $K^+$  取り込みにバッファー中の  $\text{Na}^+$  濃度は影響しなかったため、この系のイオン特異性は  $K^+ > Rb^+ > Cs^+$  であることが示唆された。しかし、 $K^+$  に対する親和性が非常に低いため、この系の生理的条件での基質は  $K^+$  ではない可能性もある。実際に、酵母の変異グルコース輸送体 [85] や コリン輸送体 [86] が  $K^+$  輸送を仲介するという報告もある。しかし、20 mM KCl 添加による  $K^+$  取り込みは、それぞれ 20 mM の choline chloride, ammonium chloride, L-lysine chloride, betaine chloride,  $\text{CaCl}_2$  による阻害をほとんど受けなかった。また、バッファーから  $\text{Mg}^{2+}$  を除いた場合においても、 $K^+$  取り込みに影響はなかった。

### 2-4 考察

本章では、*E. hirae* におけるアルカリ条件下での  $\text{Na}^+$ 、 $K^+$  の循環についての検討を行った (Fig. 14)。*E. hirae*  $\text{H}^+$ -ATPase 欠損株において、アルカリ条件下  $\text{TPP}^+$  の蓄積から膜電位の形成があること、また、アルカリ条件下における膜電位の形成には、細胞内  $\text{Na}^+$  の存在が必要であることがわかっていて [87]。本章で、 $\text{Na}^+$ -ATPase 欠損株ではアルカリ条件下膜電位の形成が起こらないことを示した (Fig. 6C)。したがって *E. hirae* においては、 $\text{Na}^+$ -ATPase による  $\text{Na}^+$  排出がアルカリ条件下における膜電位形成の主

要な経路である。また、KtrII による  $K^+$  取り込みには  $Na^+$  濃度勾配が関与していることが推定されていた [20]。その理由として、i) KtrII  $K^+$  取り込み系の構成成分である NtpJ が、 $Na^+$ -ATPase をコードする *ntp* オペロンの末端に存在している [57]。ii) KtrII  $K^+$  取り込み系は、 $Na^+$ -ATPase と同様に高  $Na^+$  濃度もしくはアルカリ条件において機能している [74]。の2点があげられる。筆者らは、 $Na^+$ -ATPase により形成される膜電位が *ntpJ* 遺伝子破壊株において過分極しており、NtpJ 欠損株では膜電位依存性の  $Na^+$  取り込みが観察されないことを見出した (Figs. 5-7)。 *E. hirae* における膜電位依存性の  $Na^+$  取り込み活性はすでにその存在が示唆されていたが [54]、その経路は明らかになっていなかった。本研究で、少なくともアルカリ条件においては、膜電位依存性の  $Na^+$  取り込みは KtrII (NtpJ)  $K^+$  輸送体を介していることを示した。この輸送体の欠損は定常状態の膜電位の大きさに多大な影響を与える (Fig. 14B)。

間接的な膜電位の見積りの正確さについては議論すべき点もある [69]。たとえば野生株 9790 においては、中程度の濃度のバリノマイシン存在下においては能動的な  $K^+$  の取り込みが起こりうる。そのため細胞内  $K^+$  含量が高くなり、膜電位が低く見積られる可能性もある。しかし、 $K^+$  蓄積量から計算した  $-118$  mV という値は  $[^3H]TPP^+$  の蓄積から算出された値 ( $-110$  mV) と同程度であり [87]、実験条件における  $K^+$  の影響は排除できると考えられる。

近年様々な生物のゲノム配列が明らかとなってきたが、NtpJ と相同性を示す  $K^+$  輸送体は生物界に広く分布している (*E. coli* TrkG, TrkH [88]; *V. alginolyticus* KtrB [89]; *S. cerevisiae* Trk1p, Trk2p; *T. aestivum* HKT1 [83])。これら輸送体の中で、HKT は  $Na^+/K^+$  共輸送体であると考えられている [83]。HKT1 における部位特異的変異導入の結果から、Phe-382 及び Glu-464 が  $Na^+$  輸送活性に関わることが明らかであり、これらの残基は *E. hirae* NtpJ Phe-382 及び Glu-383 に相当する (Fig. 9)。また、*V. alginolyticus* KtrB についても  $Na^+$  依存性であることが報告された [84]。これらの事実に基づき、*E. hirae* NtpJ は  $Na^+/K^+$  共輸送体であると推測される (Fig. 14A)。今回膜電位依存性  $Na^+$  取り込み活性を測定した条件においては  $0.3$  mM 程度の  $K^+$  が contamination していると計算され (Fig. 7A)、この活性は  $Na^+$ - $K^+$  共輸送を反映していると考えられる。ただし、NtpJ を介した  $Na^+$  と  $K^+$  の動きがタイトに共役しているかは不明であり、この点については再構成系などを用いた更なる解析が必要である。

また、NtpJ は単純な  $Na^+/K^+$  共輸送体ではないと推定される。*V. alginolyticus* KtrB をコードする *ktrB* 遺伝子は、NAD 結合領域を持つと推定される *ktrA* 遺伝子と *ktrB-A* オペロンを形成しており、KtrAB  $K^+$  取り込み系として機能すると考えられている [89]。*E. hirae* 及び *E. faecalis* においても *ktrA* 類似遺伝子が存在しており、*E. hirae* NtpJ もまた、KtrAB  $K^+$  取り込み系ファミリーを構成していると考えられる (Fig. 14A)。

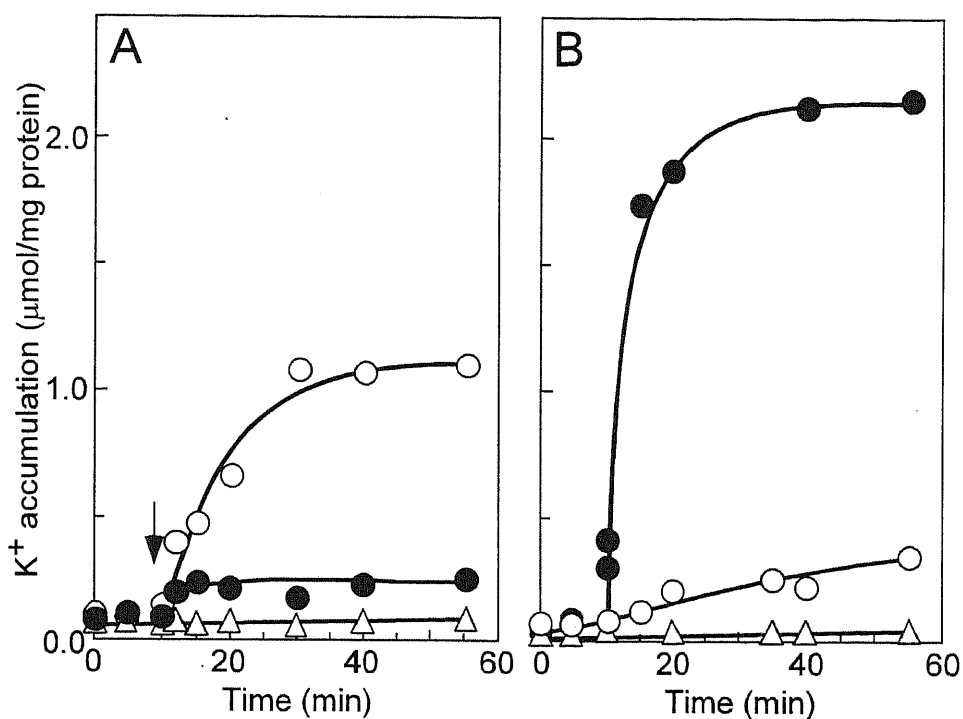
低親和性の  $K^+$  取り込みは、いくつかの生物種で報告されている [1]。*E. coli* においては、Krc (TrkF) が  $K_m$  値  $20-30$  mM、 $V_{max}$   $10-15$  nmol/min/mg dry weight of cells の  $K^+$  取り込みを行う。この系は  $K^+$ 、 $Rb^+$ 、 $Cs^+$  を同様に認識する [90]。しかし、この取り込み活性が非常に低いために、特異的な輸送系を介するものであるのか、それとも細胞膜を介した非特異的な  $K^+$  透過によるものであるのかは未だ議論

の残るところであり、この系をコードする遺伝子も同定されていない [90]。筆者らは *E. hirae* において、アルカリ条件で機能する低親和性ではあるが非常に活性の高い  $K^+$  取り込み活性を見出した。この低親和性  $K^+$  取り込み活性は KtrI, KtrII 二重欠損株において観察されたため、これらの系に依存しない新たな系による活性であると考えられる。この系はアルカリ金属に特異的であり、その特異性は  $K^+ > Rb^+ > Cs^+$  であった (Fig. 13)。また、pH 6 における取り込み活性はアルカリ条件よりも低く (0.1  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  protein)、主にアルカリ条件で機能している系であると考えられる。また、生理的条件下における基質は現在のところ  $K^+$  であると考えられるが、これについてはさらなる探索が必要とされる。

ここに示した結果により低親和性  $K^+$  取り込み系の輸送機構を解明することは困難であるが、この系の駆動力は  $Na^+$ -ATPase により形成される膜電位であると推測される。 $K^+$  取り込みは  $Na^+$ -ATPase の阻害剤 (DCCD) により阻害された (data not shown)。またこの活性はバッファー中の  $Na^+$  に影響を受けなかったため、この系による  $K^+$  取り込みに細胞内外の  $Na^+$  濃度差は関与しないと考えられる。さらに実験条件において、アンモニアなどの膜透過性アミンにより解消される pH 勾配 (inside acidic) [91] はアルカリ条件で働く  $K^+/\text{H}^+$  antiporter により形成されるが [92]、 $K^+$  取り込みが 20 mM ammonium chloride が  $K^+$  取り込みを阻害しなかったことから、pH 勾配はこの系による  $K^+$  取り込みに関与しないことが示唆された。前述のように、JEMK1 における膜電位の形成は 2 mM 以下の KCl による影響はほとんど受けない [93]。また、2 mM KCl 添加による  $K^+$  蓄積はバリノマイシン添加により顕著に促進される (Fig. 5)。したがって、 $K^+$  は他のイオンとの共輸送により取り込まれるのではないと考えられる。NtpJ 欠損株では膜電位が過分極しているため (Figs. 6, 7) [93]、低親和性の取り込み系が膜電位に駆動されると想定すると、20 mM KCl 添加時の JEMK1 における  $K^+$  蓄積量が野生株よりも多いことも受け入れられる (Figs. 12A, B)。

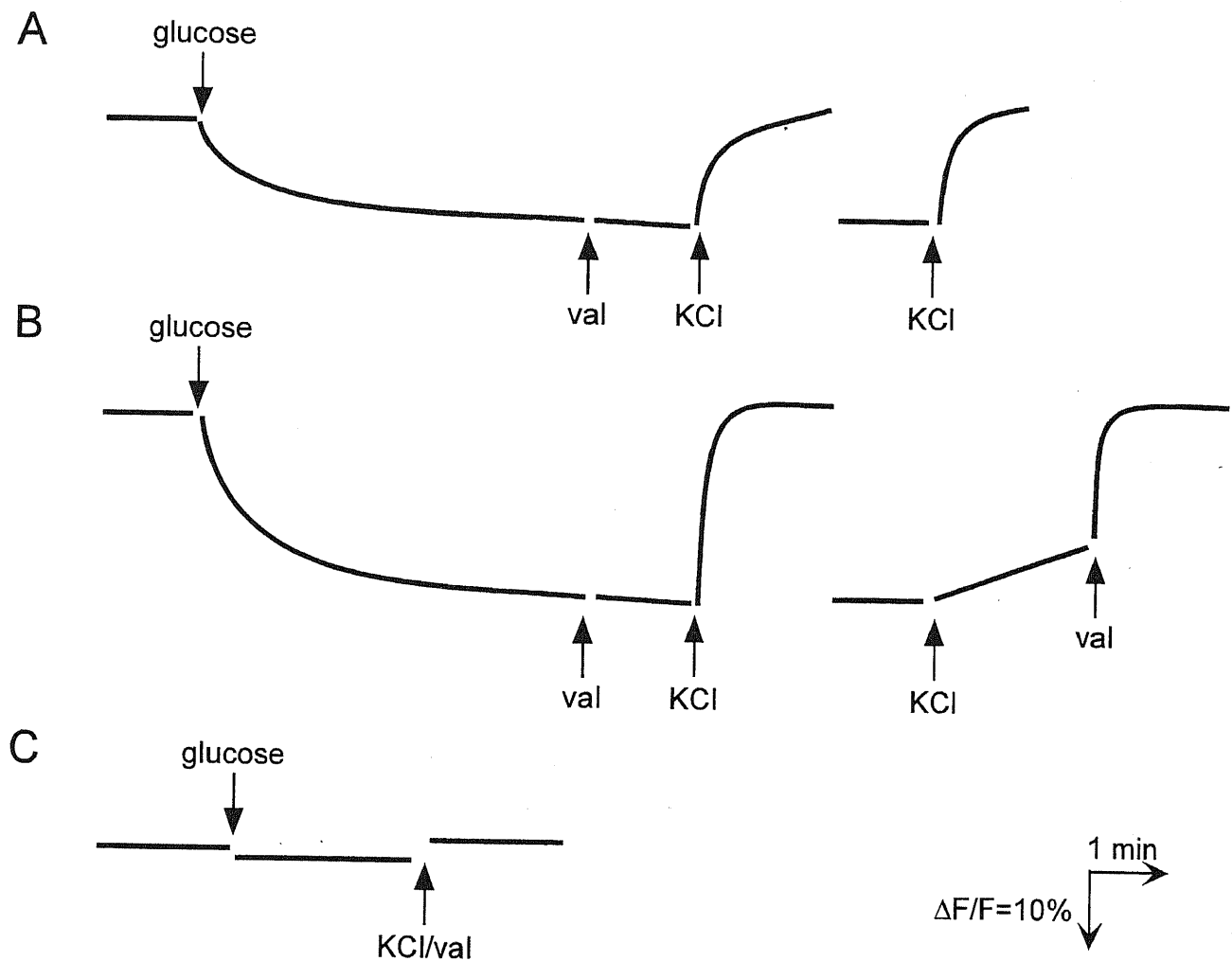
以上の結果から、低親和性の系による  $K^+$ ,  $Rb^+$  の取り込みは、高親和性の系の欠損・機能不全に対するサルベージ経路として働くことが示唆された。また、*E. hirae* において、細胞内  $K^+$  量は浸透圧や培地中の  $Na^+/\text{K}^+$  濃度に依存して、200 から 1000 mM まで変動する [17, 90, 94]。そのため、この系は本菌における  $K^+$  濃度恒常性維持において、補助的役割を果たす系としても重要である (Fig. 11)。ゲノム解析の結果からは、*Enterococcus faecalis* において、低親和性  $K^+$  取り込み系に相当すると考えられる遺伝子は見出されなかった。また、近縁の *Streptococcus pyogenes* においては、*E. coli* Kup  $K^+$  取り込み系に相同性のある遺伝子が存在するが、これが *E. hirae* にも存在するか、また Kup-like gene が低親和性の取り込み系に相当するかは不明である。この系の変異株の単離が遺伝子のクローニングにつながると考え、その候補となる変異株を単離し、その解析を行っている [95]。

本章では NtpJ が  $Na^+$  輸送能も保持していることを明らかにし、*E. hirae* における  $Na^+$  共役型輸送体である可能性を示した。本菌における  $Na^+$  排出の生理的意義は細胞質における  $K^+$  蓄積のための容積をつくることだけでなく、 $K^+$  取り込み、もしくは他の  $Na^+$  共役型輸送体の駆動力を供給することであると考えられる。アルカリ条件において、*E. hirae* ntp オペロンによりコードされる  $Na^+$ -ATPase 及び NtpJ は  $Na^+$ ,  $K^+$  循環の中核として機能している。

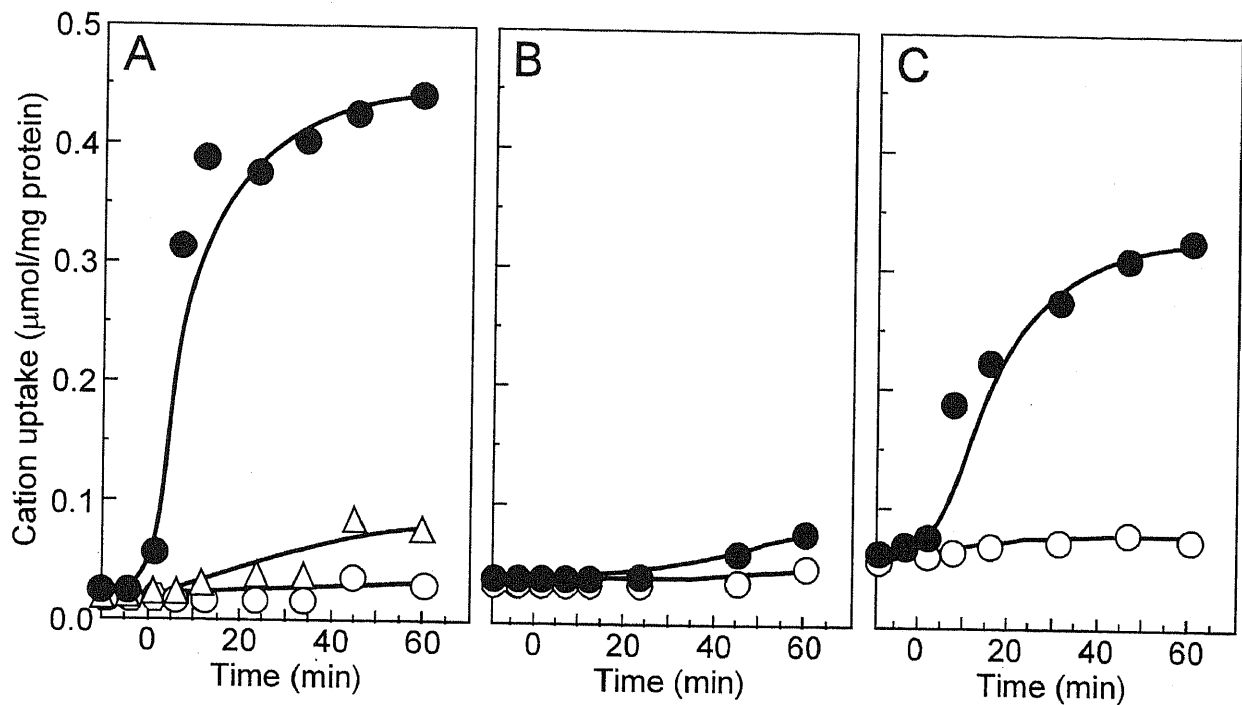


**Fig. 5. Effects of valinomycin on K<sup>+</sup> accumulation at pH 10.**

Strains ATCC9790 (A) and JEM2 (B) were grown in NaTY medium (pH 10), loaded with Na<sup>+</sup>, and suspended in 0.1 M Na<sup>+</sup>-CHES buffer (pH 10) at a cell density of 1 mg protein/ml. The suspension was (○, ●) or was not (△) supplemented with 10 mM glucose at 0 min. Valinomycin (30 μM) was added together with glucose at 0 min (●); K<sup>+</sup> uptake was initiated by addition of 2 mM KCl at 10 min. The cellular K<sup>+</sup> contents were determined by flame photometry.



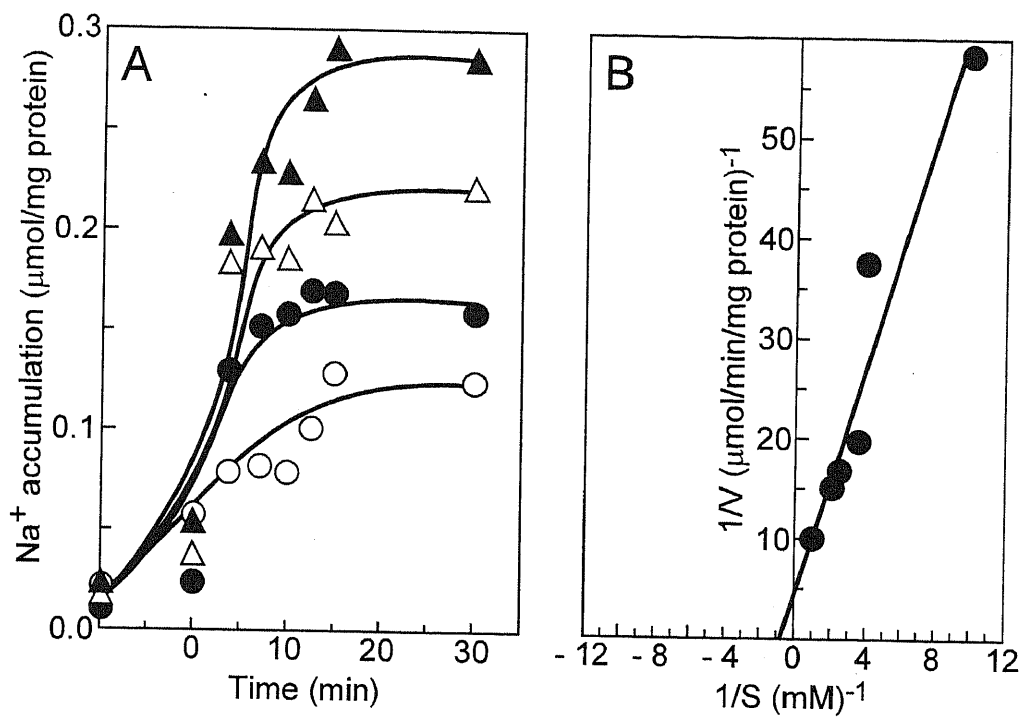
**Fig. 6. Time course of changes in DiOC<sub>6</sub>(3) fluorescence in *E. hirae*.** Sodium-loaded cells of ATCC9790 (A), JEM2 (B), and Nak1 (C) were incubated at a density of 0.5 mg protein/ml in 0.1 M Na<sup>+</sup>-CHES (pH 10) with 1 mM DiOC<sub>6</sub>(3). Fluorescence quenching was initiated by addition of 10 mM glucose followed by addition of valinomycin (val; 30 μM) and KCl (10 mM). In the experiment shown in panel C, valinomycin and KCl were added simultaneously.



**Fig. 7. Membrane potential-driven  $\text{Na}^+$  uptake at pH 10.**

Potassium-loaded cells of strains ATCC9790 (A), JEM2 (B), and JEM2/pLK132 (C) were suspended in 50 mM *N*-methylglucamine-CHES (pH 10) buffer containing 2 mM NaCl (●), 2 mM LiCl (△), or no addition (○) at -10 min, and sodium uptake was initiated by addition of 30 μM valinomycin at 0 min. The cellular  $\text{Na}^+$  or  $\text{Li}^+$  contents in cells were determined by flame photometry.





**Fig. 8. Na<sup>+</sup> uptake by 9790 at pH 10.**

Time course of Na<sup>+</sup> accumulation (A) and double reciprocal plots of the initial uptake rates (B) by 9790. Potassium loaded cells were in 50 mM *N*-methylglucamine-CHES (pH 10) buffer containing 0.1 mM (○), 0.2 mM (●), 0.5 mM (△), or 1.0 mM (▲) NaCl at -10 min. Sodium uptake was initiated by addition of 30 μM valinomycin at 0 min.

```

NtpJ  ERNGLILVKGIFTERLANIFEM-SVIPRPA GYYSIDYIQSHAGLILIMFIMYIGGTSST-----
KtrB  RHENIMGSLITGGQMLAAFEQ-SASARPA GENSDILTFIQPALLIMIVIMLIGAGSTST-----
HK11  DAINSSVFDGLSSYQKIVNAFEM-VNARHS GENSDICSLMSPAIIIVFTVMMLPSSATFA-----
Trk1p DFGSTVKSLSKGYRVLVGLFQ-SVSTRPA GFSVVDLSQLHPSIQVSYMMYVSVLPLAISIRRTNVYEEQSILGLY
TrkG  -----MIDLHGSFIHSFFLA SSMILDNGLATIQYASWPIHTIVFLLISSFFGGCIGST-----

NtpJ  -----AGGLKTTTLGILLI IQMHAMFKGKTRAEAFGRIT I-----
KtrB  -----GGGIKVS TF AVAFMATWTF LRQKKHVVMFKRTV-----
HK11  -----PPSGDTKT TN-----ENTKGKVKRGSLLVQ-----
Trk1p GEMGGPEDTDTEEDGDCDEDDNEEEESH EGGSSQRGKSKKETKKKKRKENENPNEESTKS-----
TrkG  -----CGGIKSLRFLILFKQSKHEINQLSHPRALLSVN-----

NtpJ  ROAAVLRALTLFEVTL SLCVVAIMVLSVTEI PKTSGI-----EYIAFEVFSAFGTVGLIMGLIT-----
KtrB  NWPTVTKSLAIIVVSGAILTAMFLMLTEKASF-----DKVMFE TISAFATVGLTAGLIT-----
HK11  NLAFSPLGCNIIFVMVACITERRRLRNDP LNFST-----LNMIF FVISAYGNAGLSTGYS-----CSRLL
Trk1p FIGAHLRRQLSFDLWFLGLFIICICERDKIDIQPENFNVFTILFF IVSAYGTVGLSLGYPTNQSF SR
TrkG  VGGKLVDRVMRSVWSFFLYTLFVFFLIVNGM-----YDFLTSFATVAACINNMGILG-----F

NtpJ  FDLTLIGKLVILISIMYIGRVGIMVVL SLLVKANRAFANYKVPESIMLG-----
KtrB  AELSEPKYIMVIMIGRIIGPLIAYLARPE-----PTLIRKVEDTVLIG-----
HK11  HOLHPELIQDKPYSFSGWMSDGGKFVLLIMLYGRKAFATLAI GKSMKV-----
Trk1p QLTTL SKLIIIAMLIRGNRGLPYSILDRAILLPSRL EHDHIEDLKLKROA-----
TrkG  GATASSFGVINDIAKIMCIAMIIGRL EIPYVILLFSGFNRS-----

```

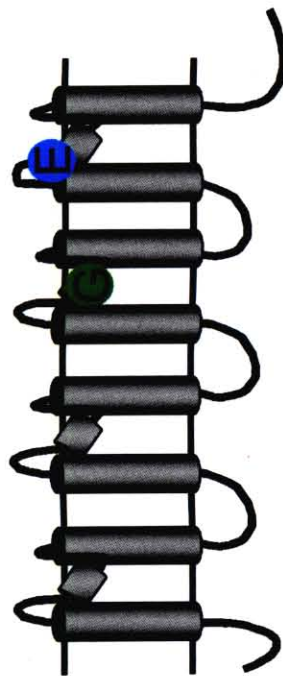
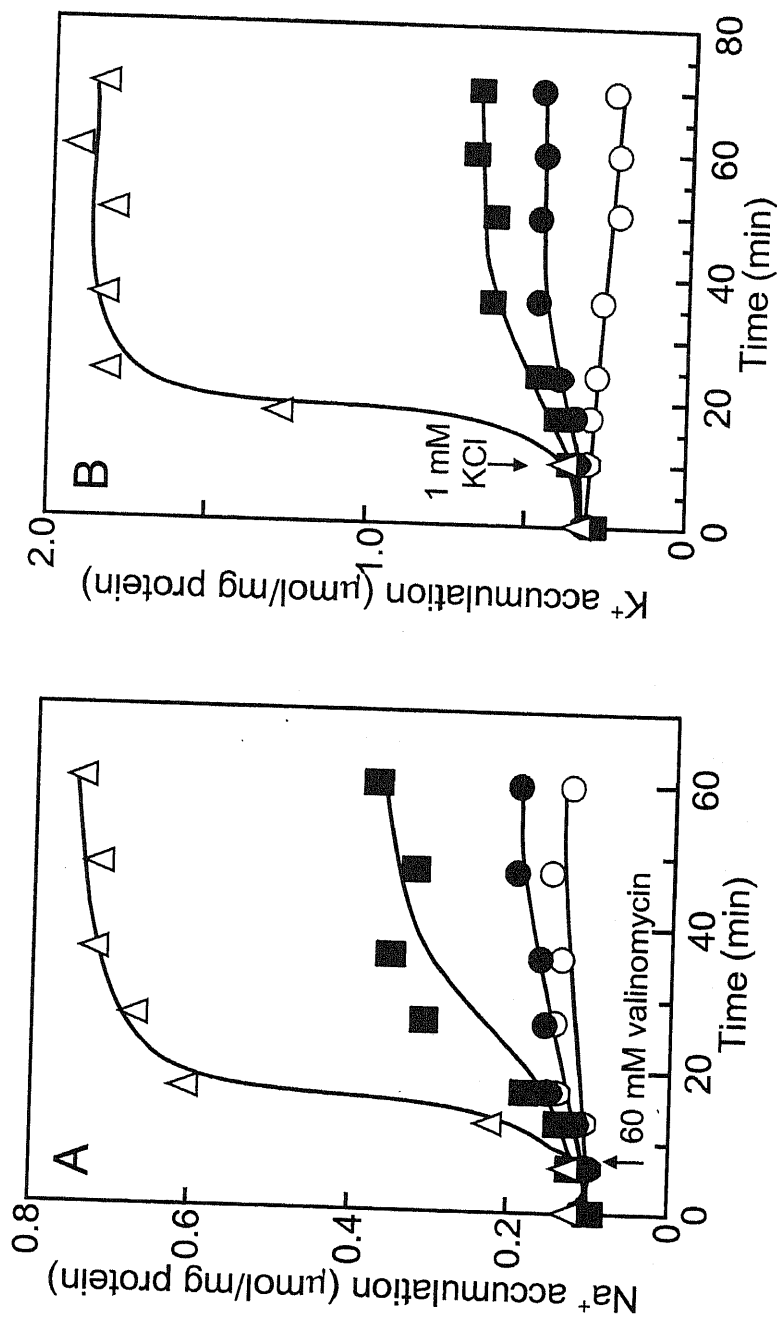
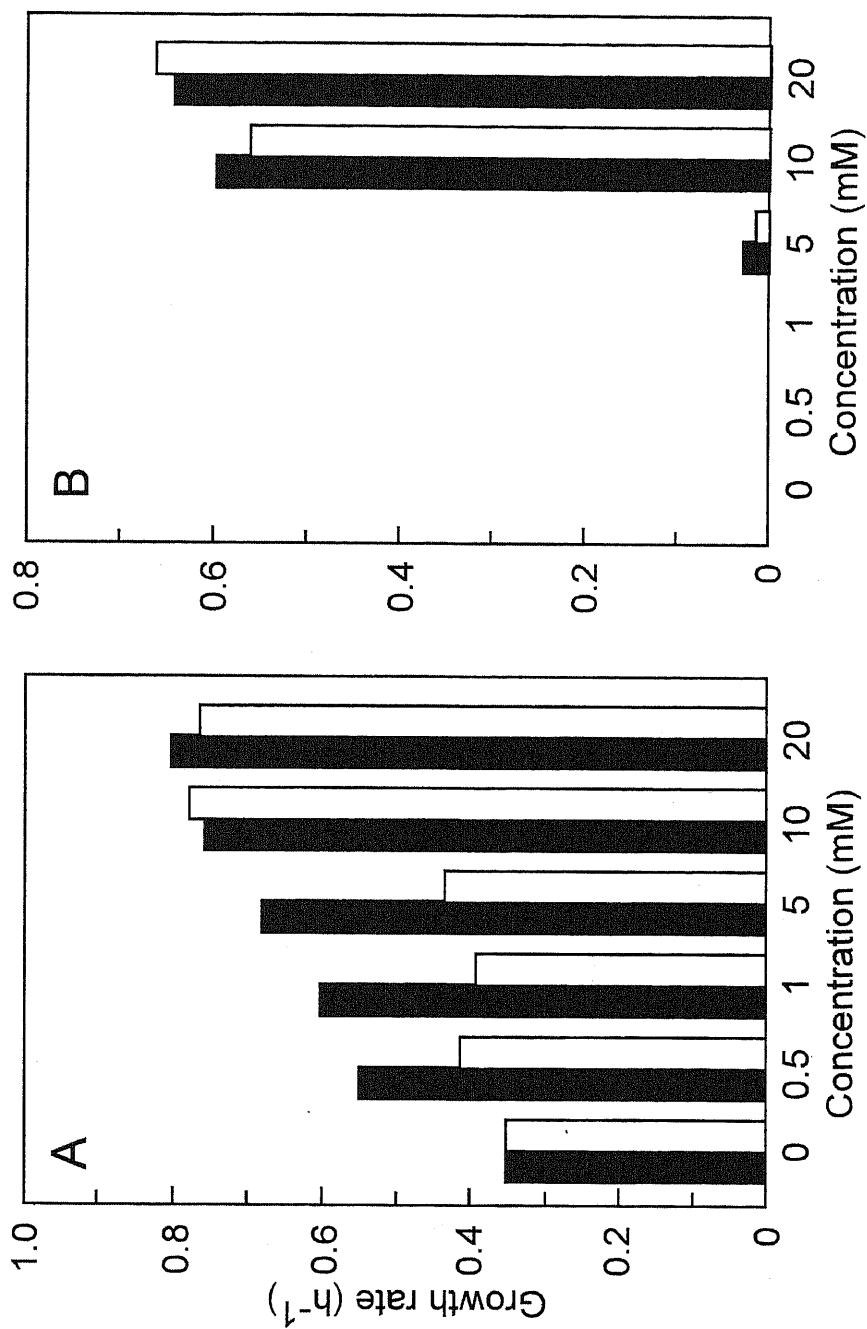


Fig. 9. Alignment of amino acid sequences of NtpJ homologues and KcsA-like topology model of the NtpJ. The amino acid sequence of *E. hirae* NtpJ COOH terminal region with those of the other K<sup>+</sup> transporters: *V. alginolyticus* KtrB, *Triticum aestivum* HK11, *S. cerevisiae* Trk1p, *E. coli* TrkG. The residues considerable to participate in ion translocation are shown in blue and green.

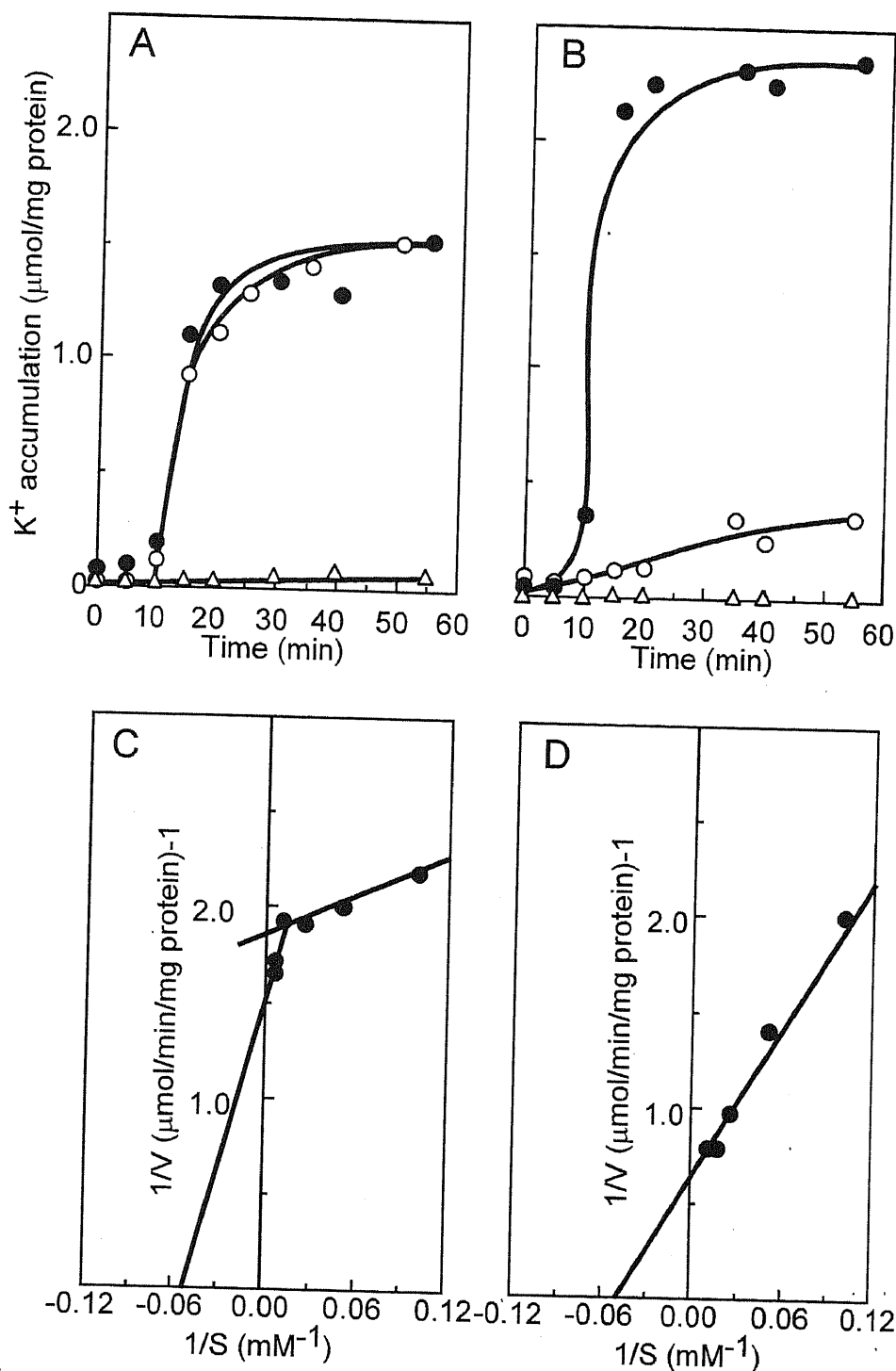


**Fig. 10. Effect of NtpJ mutations on Na<sup>+</sup> or K<sup>+</sup> uptake at pH 10.**

A: Membrane potential driven-Na<sup>+</sup> uptake. Potassium-loaded cells of strains JEM2/pLK132 (△), JEM2 (●), and JEM2/pLK132-E383Q (■) were suspended in 50 mM *N*-methylglucamine-CHES (pH 10) buffer containing 2 mM NaCl at -10 min, and sodium uptake was initiated by addition of 30 μM valinomycin (●, ■, △) at 0 min. B: K<sup>+</sup> uptake. Strains JEM2/pLK132 (△), JEM2 (●), and JEM2/pLK132-G276A (■) were grown in NaTY medium (pH 10), loaded with Na<sup>+</sup>, and suspended in 0.1 M Na<sup>+</sup>-CHES buffer (pH 10) at a cell density of 1 mg protein/ml. The suspension was (●, ■, △) or was not (○) supplemented with 10 mM glucose at 0 min. K<sup>+</sup> uptake was initiated by addition of 1 mM KCl at 10 min. The cellular Na<sup>+</sup> or K<sup>+</sup> contents were determined by flame photometry.

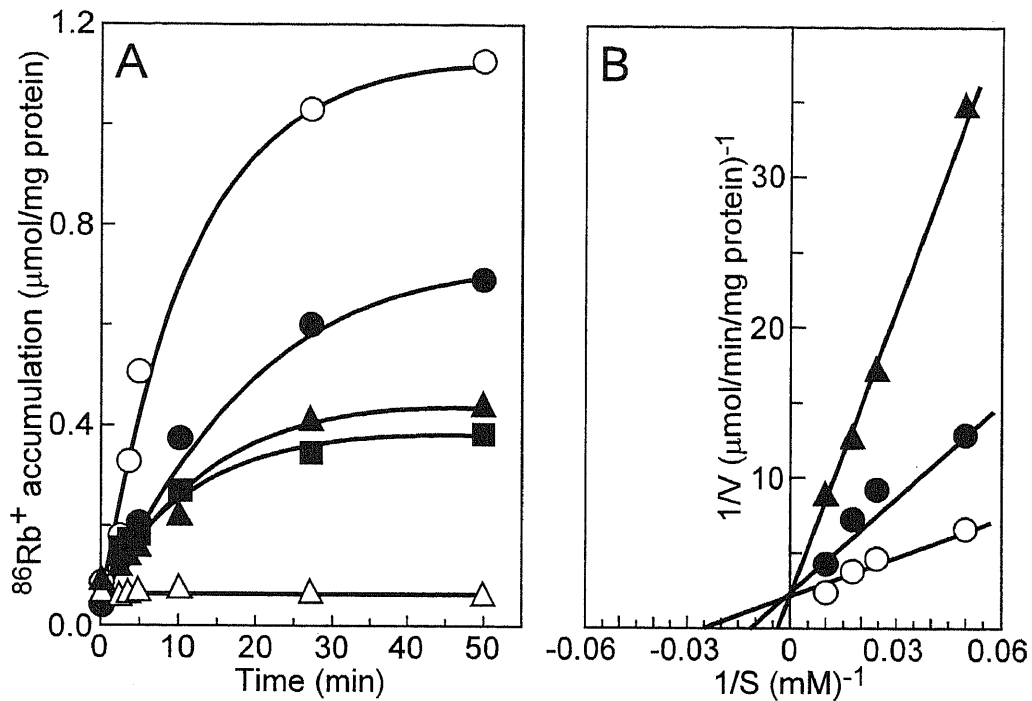


**Fig. 11. Effect of KCl or RbCl on the growth rate of wild-type 9790 (A) and mutant JEMK1 (B) at pH 10.** Cells grown overnight in NaTY medium (pH 7.8) were washed and inoculated in mNaTY medium (pH 7.8). At an  $OD_{540} = 0.08$ , the medium pH was shifted to pH 10 by addition of 80 mM  $Na_2CO_3$ , and KCl (closed bars) or RbCl (open bars) was added at various concentrations. The growth rates were determined between optical densities of 0.1 and 0.2.



**Fig. 12. Potassium uptake at pH 10.**

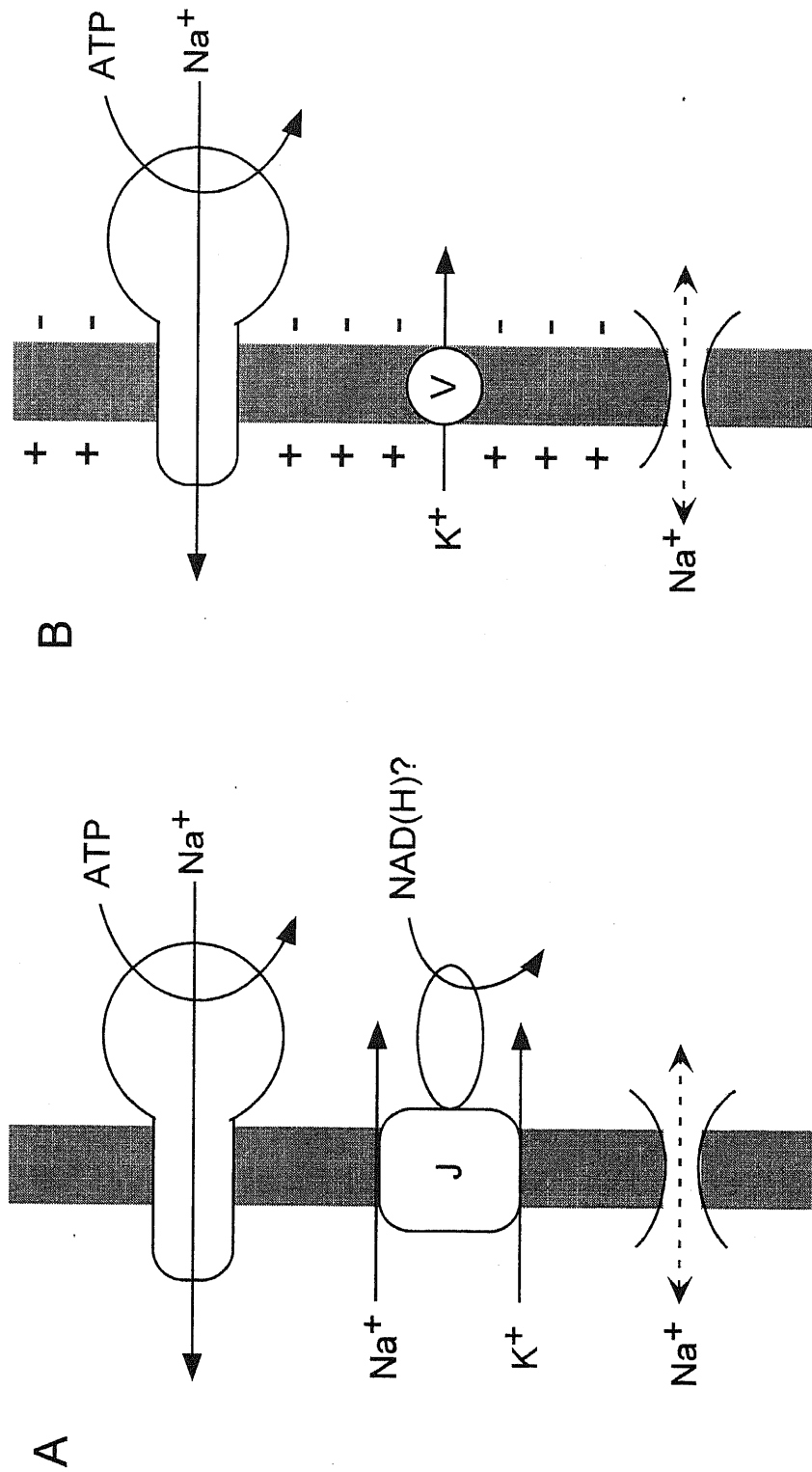
**A, B:** Time course of  $K^+$  uptake. Sodium-loaded cells of strains ATCC9790 (A) and mutant JEMK1 (B) were suspended in 0.1 M  $\text{Na}^+$ -CHES (pH 10) buffer at a cell density of 1 mg protein/ml. The suspension was supplemented with ( $\circ$ ,  $\bullet$ ) or without ( $\triangle$ ) 10 mM glucose at 0 min. Potassium uptake was initiated by addition of 2 mM KCl ( $\circ$ ) or 20 mM KCl ( $\bullet$ ) at 10 min. **C, D:** Lineweaver-Burk plots of initial rates of  $K^+$  uptake by 9790 (C) and JEMK1 (D). The initial rates of  $K^+$  uptake were measured within 5 min.



**Fig. 13. Rubidium uptake at pH10 by mutant JEMK1.**

**A:** Effects of  $\text{K}^+$  or  $\text{Cs}^+$  on  $\text{Rb}^+$  uptake. The uptake experiment was performed with  $\text{Na}^+$ -loaded JEMK1 cells as described in the legend of Fig. 12. The suspension was supplemented with ( $\circ$ ,  $\bullet$ ,  $\blacktriangle$ ,  $\blacksquare$ ) or without ( $\triangle$ ) 10 mM glucose at -10 min:  $\text{Rb}^+$  uptake was initiated by addition of 10 mM  $^{86}\text{Rb}^+$  (0.37 MBq/mmol) at 0 min.  $\text{CsCl}$  or  $\text{KCl}$  was added together with  $\text{RbCl}$ .  $\circ$ ,  $\triangle$  control;  $\bullet$  10 mM  $\text{CsCl}$ ;  $\blacktriangle$  50 mM  $\text{CsCl}$ ;  $\blacksquare$  10 mM  $\text{KCl}$ .

**B:** Lineweaver-Burk plots of initial rates of  $\text{Rb}^+$  uptake in the presence of  $\text{KCl}$ . The initial rates of  $\text{Rb}^+$  uptake were measured within 5 min.  $\circ$  control;  $\bullet$  20 mM  $\text{KCl}$ ;  $\blacktriangle$  50 mM  $\text{KCl}$ .



**Fig. 14. Sodium circulation and potassium accumulation in *E. hirae* at a high pH; an interpretation.**

A: wild type. Elements shown are the  $\text{Na}^+$ -translocating V-ATPase; the KtrII (NtpJ) (J) system for electrogenic accumulation of  $\text{K}^+$  as well as  $\text{Na}^+$  (cotransport ?), which presumably interacts with a KtrA-like component modulated by NAD(H); and a leaky pathway for  $\text{Na}^+$ . B: NtpJ mutant. Valinomycin (V) - mediated  $\text{K}^+$  accumulation was monitored. The low-affinity  $\text{K}^+$  transport system described in the text was omitted.

### 第3章 腸球菌 Na<sup>+</sup>共役型 V-ATPase によるイオン輸送機構

#### 3-1 緒言

液胞型 ATPase (V-ATPase) は原核から真核生物に至るまで広く分布し、細胞内酸性小器官内腔や、細胞外の酸性化などに働くプロトンポンプである [44-46]。筆者らのグループは、腸球菌 *Enterococcus hirae* に Na<sup>+</sup> 及び Li<sup>+</sup> を特異的に輸送する V-ATPase を真正細菌において初めて発見した [56]。V-ATPase は ATP 合成酵素 (F-ATPase) と同様に、ATP 合成/加水分解触媒部位を持つ親水性の V<sub>1</sub> 部分と、イオン輸送を行う膜内在性の V<sub>0</sub> 部分から構成される (Fig. 4)。*E. hirae* においては、V<sub>1</sub> 部分は ATP 加水分解触媒部位を持つ NtpA をはじめとする 7 種のサブユニット (NtpA, B, C, D, E, F, G)、V<sub>0</sub> 部分は 2 種のサブユニット、Na<sup>+</sup> 結合部位を持つ 16kDa の NtpK (6 量体) と、固定子及びイオンを放出するチャネルを形成する 76kDa の NtpI から構成されると考えられている (Fig. 4) [57, 96]。

ATP 合成酵素 (F-ATPase) の反応機構は、F<sub>1</sub> 部分における ATP 加水分解の化学的エネルギーが、酵素分子中央の  $\gamma$ ,  $\epsilon$  サブユニットの物理的回転に変換される「回転触媒説」で説明される [34, 35]。この説は 1997 年に行われた F<sub>1</sub>-ATPase の回転の直接観察 [37] などにより実証されてきた。F<sub>0</sub> 部分においては、c サブユニットが構成するリングが、F<sub>1</sub> 及び a サブユニットに対して  $\gamma$ ,  $\epsilon$  サブユニットと共に回転しており、この回転を介して ATP 加水分解/合成とイオン輸送が共役していると考えられている。現在までに、サブユニット間の架橋実験や回転観察などにより c サブユニットも回転ローター成分であることが明らかとなってきた [38-43]。

*Escherichia coli* F-ATPase においては、F<sub>0</sub> a サブユニットの第 4 膜貫通部位に存在するアルギニン残基 (Arg-210) がイオン輸送に必須であることが明らかになっている。このアルギニン残基は、c サブユニット第 2 膜貫通部位にあるイオン結合部位 (Asp-61) と相互作用し、イオン輸送に関わると考えられている (Fig. 16) [41-43, 97]。

*E. hirae* NtpI と *E. coli* F-ATPase a サブユニットとの相同性は高くないが、NtpI は F-ATPase の a サブユニットと同様に、NtpK のイオン結合部位 (Glu-139) [62] と共同してイオン輸送に関わると考えられる (Fig. 16)。本研究では *E. hirae* V-ATPase NtpI を対象とし、部位特異的変異導入法によりイオン輸送に関わるアミノ酸残基の同定を試み、NtpI のイオン輸送における役割について検討した。

#### 3-2 方法

##### 使用菌株・培地

*Enterococcus hirae* 野生株 ATCC9790

9790 を親株とした以下の変異株



Nak1;*ntpA* 遺伝子ナンセンス変異株 [64]

NID; *ntpI* 遺伝子を *CAT* 遺伝子で置換した *ntpI* 欠失変異株 [98]

37 °C、栄養培地中で培養した。

NaTY (1% Bacto tryptone, 0.5% Bacto Yeast Extract, 1% glucosé, and 0.85% Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) [19]

必要に応じて培地の pH を Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 添加により約 pH 10 に調整した。

NID の培養に際しては終濃度 5 µg/ml のクロラムフェニコールを培地に添加した。

NID 形質転換株の培養時は終濃度 5 µg/ml のクロラムフェニコール及び 10 µg/ml のエリスロマイシンを培地に添加した。

### pHEexI' プラスミドの構築

シャトルベクター pHEex [61] に野生型の *ntpI* 遺伝子を挿入したプラスミド (pHEexI) を鋳型とし、コードするアミノ酸を変化させずに PCR により *Bam*HI site (斜体部分) を導入した pHEexI' を作製した。用いたプライマーを下に示した。pHEexI' は、*Bam*HI-*Eco*RI で切断することにより *ntpI* 3' 側約 0.5 kb を、*Xba*I-*Eco*RI で切断することにより *ntpI* 遺伝子全長約 2 kb を回収可能である。

*ntpI*-*Bam*HI : 5'-GCT TGG CAA TGG *ATC CTG* CTT GGT ATC ATT CTG-3'

本章では野生型 *ntpI* 遺伝子を含むプラスミドとして pHEexI' を使用した。

### 部位特異的変異導入

部位特異的変異導入は変異を含むプライマーを用いた PCR 法により行った。PCR の鋳型には pHEexI' を用いた。用いたプライマーは Table II に示した。作製した変異プラスミドの塩基配列は 4×4 personal sequencing system (Amersham Biosciences) を用いた DNA sequencing により確認した。変異を導入したプラスミドは *Bam*HI-*Eco*RI で切断し、pHEexI' にサブクローニングした。最終産物のプラスミドで NID を形質転換し、5 µg/ml クロラムフェニコール及び 10 µg/ml エリスロマイシンを含む培地で形質転換株を選択した。

### NtpI C 末端への Histidine - tag の導入

pHEexI' を鋳型とし、以下のプライマーを用いて PCR により *ntpI* 遺伝子を増幅した。

*ntpI*-*Bam*HI : 5'-GCT TGG CAA TGG *ATC CTG* CTT GGT ATC ATT CTG-3'

Primer2 5'-G CCG *GAA TTC* CTA ATG ATG ATG ATG ATG TTT TTT CTT ATG ATT GAT GTT GAC G-3'

結果として *ntpI* 遺伝子産物の C 末端 (終止コドン直前) に 6 個の His 残基 (下線部分) が付加される。増幅した DNA 断片を *Bam*HI-*Eco*RI (斜体部分) で切断し、pHEexI' にサブクローニングし、pHEexI'-His を作製した。His-tagged Arg-573 変異体の作製には、pHEexI'-His を PCR の

鋳型として用い、前述の方法で変異を導入した。

#### Cys-less ntpI-His プラスミドの構築

上記と同様の方法により、pHEexI'-His を PCR の鋳型として *ntpI* の Cys-259 及び Cys-535 をそれぞれ Ser に置換した。DNA sequencing により塩基配列を確認し、*XbaI-BamHI* もしくは *BamHI-EcoRI* で切断し、pHEexI' にサブクローニングし、pHEexI'ΔCys-His を作製した。この Cys-less プラスミドを鋳型とし、Table II に示したプライマーを用いてラベル実験のための各種 Cys 置換変異プラスミドを作製した。

#### [ $\gamma$ - $^{32}$ P]ATP を用いた ATP 加水分解活性の測定

[ $\gamma$ - $^{32}$ P]ATP (30-100 MBq/ $\mu$ mol, Institute of Isotopes Co. Ltd., Hungary) からの radioactive な遊離 orthophosphate の定量は、Lill らの方法にしたがった [99]。 [ $\gamma$ - $^{32}$ P]ATP から遊離した [ $^{32}$ P]orthophosphate はモリブデン酸と錯体を作り、酢酸イソプロピルで抽出される。酢酸イソプロピル層の放射活性を測定した。反応は 20 mM Tris-HCl (pH 8.8) 中で、各濃度の  $Mg^{2+}$ -[ $\gamma$ - $^{32}$ P]ATP と 0.01 mg の反転膜小胞を用いて行った。反転膜小胞は、あらかじめ 25 mM NaCl 存在下で DCCD 処理し、F-ATPase の活性のみを阻害したものを用いた。実験条件においては、通常 5  $\mu$ M  $Na^+$  が contamination として存在している。反応系 90  $\mu$ l (20 mM Tris-HCl,  $Mg^{2+}$ -ATP,  $\pm$ NaCl, pH8.8) に反転膜小胞を 10  $\mu$ l 加えて反応を開始させ、直ちに 37 °C でインキュベーションを行った。10 分間反応させた後、0.63 ml 1 N PCA/1 mM  $NaH_2PO_4$  を加えて反応を停止させ、さらに 1.4 ml 20 mM ammonium molybdate、1.6 ml 酢酸イソプロピルを加えた。各溶液を加えた後は vortex mixer で反応液を十分に攪拌し、3,000 rpm、15 分の遠心により上層 (酢酸イソプロピル層、1.6 ml) を分離し、このうち 0.8 ml を回収した。これに 3 ml の Toluene-Triton シンチレーターを加えよく攪拌し、その放射活性を液体シンチレーションカウンターで測定した。

#### 生細胞からの $Na^+$ 排出活性の測定

$Na^+$ -ATPase が誘導される、高  $Na^+$  濃度培地 (NaTY) で一晚培養した細胞 [19] を集菌、洗浄後、1.0 mg protein/ml となるように 200 mM KCl を含む 50 mM  $Na^+$ -CHES (pH 10) に懸濁した。20  $\mu$ M valinomycin 及び 20  $\mu$ M CCCP を添加した後、10 mM glucose 添加により  $Na^+$  排出を開始させた。各時点で、サンプル (0.2 ml) をフィルター (pore size 0.4  $\mu$ m; Nucleopore Polycarbonate Membrane, Whatman) を通してろ過し、2 mM  $MgSO_4$  で 2 回洗浄した。細胞内  $Na^+$  含量は、フィルターにトラップした細胞から Hot 5% TCA 処理により抽出したものを原子吸光法により測定した。

#### 膜分画の調整

French Press を使用する方法は第 2 章を参照

超音波により細胞を破砕する場合は、*N*-Acetylmuramidase 処理をした後、10  $\mu\text{g/ml}$  の DNaseI を添加し、氷上で 10 秒間のソニケーションを 4-5 回繰り返して細胞を破砕し、15,000 rpm、15 分、4  $^{\circ}\text{C}$  で遠心後、上清を 100,000 $\times g$ 、60 分、4  $^{\circ}\text{C}$  で遠心し、膜分画を回収した。

#### Stripped membrane 及び EDTA extract の調製

French Press 法により調製した ATCC9790 または変異株の膜小胞を、EDTA 存在下一晩透析した [100]。透析した膜小胞を 100,000 $\times g$ 、60 分の遠心により沈殿させ、バッファー (10 mM Tris-HCl, 3 mM  $\text{MgSO}_4$ , 1 mM  $\beta$ -mercaptoethanol, 10  $\mu\text{M}$  FUT175, pH 7.5) に懸濁し、stripped membrane とした。透析した Nak1 の膜小胞の遠心後上清 (EDTA extract) は  $V_1$  部分を含有せず、 $F_1$  部分のみを含む。これを stripped membrane と共に後述の再構成実験に使用した。

#### $F_0F_1$ -ATPase 再構成膜小胞による ATP-driven $^{22}\text{Na}^+$ 取り込み活性の測定

$F_0F_1$ -ATPase の再構成は Kakinuma らの方法を参考に行った [100]。3 mg の ATCC9790 もしくは変異株の stripped membrane を、1 ml のバッファー (10 mM Tris-HCl, 3 mM  $\text{MgSO}_4$ , 10  $\mu\text{M}$  FUT175, 1 mM  $\beta$ -mercaptoethanol, 10% glycerol, pH 7.5) 中で Nak1 EDTA extract 4.5 mg と 37  $^{\circ}\text{C}$ 、30 分間インキュベーションした。再構成膜は 100,000 $\times g$ 、60 分の遠心により回収し、同じバッファーに懸濁した。

$^{22}\text{Na}^+$  取り込み活性は、Waser らの方法に従って測定した [14]。膜小胞を洗浄し、アッセイバッファー (0.2 M KOH-maleate, 5 mM  $\text{MgSO}_4$ , 1 mM  $\beta$ -mercaptoethanol, 10  $\mu\text{M}$  FUT175, 10% glycerol, pH 7.5) に懸濁した。バッファーに 10  $\mu\text{M}$   $^{22}\text{NaCl}$  (10 GBq/nmol) 及び 5 mM  $\text{Mg}^{2+}$ -ATP を添加し、室温に置いたあと、0.2 mg/ml となるように膜小胞を加えることにより反応を開始させた。0.2 ml のサンプルを各時点で Cellulose nitrate filter (pore size 0.45  $\mu\text{m}$ , ADVANTEC, Tokyo) を通してろ過し、3 ml のバッファーで洗浄した。フィルター上の放射活性を  $\gamma$ -シンチレーションカウンターで測定した。必要に応じて、20  $\mu\text{M}$  CCCP を反応液中に加えた。

#### $V_0V_1$ -ATPase の小スケール精製

NtpI 欠損株 NID に His-tagged NtpI を発現させ、膜小胞を超音波破砕法により調製した。0.1 mg の反転膜小胞を 0.4 ml の extraction buffer (50 mM Tris-HCl, 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 20  $\mu\text{M}$  FUT175, 1 mM  $\beta$ -mercaptoethanol, 10 mM imidazole, pH 7.5) に懸濁し、His-tagged NtpI を含む  $\text{Na}^+$ -ATPase を膜小胞から 2.5% *n*-dodecyl  $\alpha$ -D-maltoside (Calbiochem-Novabiochem) と室温で 10 分インキュベーションすることにより可溶化し、100,000 $\times g$ 、60 分、4  $^{\circ}\text{C}$  の遠心により上清として回収した [101]。上清にあらかじめ extraction buffer で平衡化した 0.4 ml Ni-NTA resin (QUIAGEN) を加えて混合し、45 分間室温で振とうした。16,000 $\times g$ 、30 秒の遠心により resin を沈殿させ、1 ml

の wash buffer (extraction buffer : 0.2 M Tris-HCl (pH 7.5) = 1 : 1) で 3 回洗淨した後、0.25 ml の elution buffer (extraction buffer containing 1 M imidazole) を加えて 5 分室温でインキュベーションした。16,000×g、30 秒の遠心後、精製 Na<sup>+</sup>-ATPase (約 0.01 mg) を上清に回収した [102]。

#### SH 基反応性試薬によるラベル実験

NaTY + 0.2 M NaCl 培地 300 ml で培養した Cys 置換変異株を OD<sub>540</sub>=1.2 で集菌、洗淨し、labeling buffer (50 mM Tris-HCl, 5 mM MgSO<sub>4</sub>, 20 μM FUT175, 10% glycerol, pH 7.5) 500 μl に懸濁し、2 本の tube に分割した。片方の tube には 1.5 mM AMS を加え、control には H<sub>2</sub>O を同量加えて 30 °C、30 分間インキュベーションした。続いて両方の tube に 150 μM MPB を添加し 30 °C、15 分間インキュベーションした後、15 mM β-mercaptoethanol を含む labeling buffer 2.4 ml をそれぞれの tube に加えて反応を停止させた [102-104]。

MPB によるラベルの後、遠心により集菌し、超音波破碎法により膜分画を調整し、前述の方法で His-tagged NtpI を精製した。5-10 μg の精製 His-tagged NtpI について 8.5% SDS polyacrylamide gel を用いて電気泳動を行い、Cellulose nitrate membrane (ADVANTEC, Tokyo) に 4 °C、16 V、20 時間でブロッティングした。5% skim milk/TBS (20 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, pH 7.5) で membrane をブロッッキングした後、1000 倍希釈した avidin-conjugated alkaline phosphatase (BIO-RAD) と室温で 2 時間インキュベーションした。Membrane を TBS/Tween 20 で洗淨後、alkaline phosphatase キットを使用して発色させた。

MPB [<sup>N</sup>-(3-maleimidylpropionyl)biocytin], AMS (4-acetamido-4'-maleimidylstilbene-2,2'-disulfonic acid) は Molecular Probes, Inc. より購入した。その他の試薬には全て特級を用いた。

**Table II Primer sequences used in this study.**

*primers used for site-directed mutagenesis*

(Sequences of the forward primers are indicated. Complement sequences of forward primers are used as reverse primers.)

R573E	5'-C AGC TAT ACA <u>GAA</u> CTA ATG GCA CTG-3'
R573K	5'-GTC AGC TAT ACA <u>AAA</u> CTA ATG GCA CTG GGA ATC TCT GG-3'
R573L	5'-C AGC TAT ACA <u>TTA</u> CTA ATG GCA CTG-3'
R573Q	5'-GTC AGC TAT ACA <u>CAA</u> CTA ATG GCA CTG GGA ATC TCT GG-3'
R573I	5'-C TTA GTC AGC TAT ACA <u>ATC</u> CTA ATG GCA C-3'
R573N	5'-C TTA GTC AGC TAT ACA <u>AAT</u> CTA ATG GCA C-3'
D384N	5'-G GTG GCG <u>AAT</u> ATC GGG TAT GGG-3'
S570C	5'-C TTA GTC <u>TGC</u> TAT ACA CGA CTA ATG-3'
Y571L	5'-C TTA GTC AGC <u>TTA</u> ACA CGA CTA ATG-3'
L574R	5'-GC TAT ACA CGA <u>CGT</u> ATG GCA CTG GG-3'
L574R/R573L	5'-GTC AGC TAT ACA <u>CTT CGA</u> ATG GCA CTG GG-3'
A576V	5'-CGA CTA ATG <u>GTA</u> CTG GGA ATC TC-3'
L577F	5'-CTA ATG GCA <u>TTT</u> GGA ATC TCT GG-3'
L577R	5'-CTA ATG GCA <u>CGT</u> GGA ATC TCT GG-3'
L577R/R573L	5'-GC TAT ACA <u>CTT</u> CTA ATG GCA <u>CGT</u> GGA ATC-3'
R600L	5'-CT CCA GCT GCT <u>CTT</u> TTT AGT G-3'
R600Q	5'-CT CCA GCT GCT <u>CAA</u> TTT AGT G-3'
I608R	5'-GTC GGA ATT TTA TTG <u>CGT</u> ATT GTC CTA C-3'
Q612R	5'-G ATC ATT GTC CTA <u>CGT</u> GCT TTG AAT ATG-3'
N615R	5'-GTC CTA CAG GCT TTG <u>CGT</u> ATG TTC TTA AC-3'
H626R	5'-GCC TAT GTA <u>CGT</u> GGC GCA CGA TTA C-3'
R629Q	5'-GCC TAT GTA CAT GGC GCA <u>CAA</u> TTA CAA TAT GTA G-3'
E634K	5'-CAA TAT GTA <u>AAA</u> TTT TTT GGA AAG-3'
E634Q	5'-CAA TAT GTA <u>CAA</u> TTT TTT GGA AAG-3'
C259S	5'-CA GCC ATT GGA GCT <u>TCT</u> AGT GGG TAT ATC-3'
C535S	5'-CTT TCA GCC GTA <u>TCT</u> ATT TTG ATC ATT CC-3'
S546C	5'-C CAA TCT TCT <u>TGC</u> AAA GCC AAG G-3'
A598C	5'-G CCT CCA <u>TGT</u> GCT CGT TTT AGT G-3'
I659C	5'-GAG AAA TAC GTC AAC <u>TGC</u> AAT CAT AAG-3'
<i>primers used for sequencing (by 4×4)</i>	
IN770	5'-GTT TAC AGG AAA TCA AGG AC-3'
IN1100	5'-CGC TCC TTT TGA GAT GTT AAC GG-3'
IN1280	5'-CAA AAC GTT GCA TTC CCC GTG-3'

### 3-3 結果

#### 3-3-1 NtpI ホモログのアミノ酸配列の比較

V-ATPase は真核細胞だけでなく、様々な細菌にも分布することが明らかとなってきた [105-109]。76kDa の NtpI タンパク質は、親水性のアミノ末端側半分と、疎水性のカルボキシル末端側半分の、2つの領域から構成される [57]。NtpI のトポロジーは確定されていないが、いくつかのハイドロパシー分析から7回膜貫通型と考えられる。Fig. 15には細菌型 V-ATPase NtpI について、C末端側2つの膜貫通領域に相当する部分のアミノ酸配列を示した。この領域は細菌型 V-ATPase NtpI において高く保存されている。NtpI C末端側には3つの保存されたアルギニン残基が存在し、その中の一つ、Arg-573は第6膜貫通領域に存在すると考えられる。

NtpI はそのカルボキシル末端半分が F-ATPase の a サブユニットと同一の役割（固定子及びイオン透過のための孔）を果たすと考えられている。アミノ酸配列の相同性から、Arg-573 残基が F-ATPase a サブユニットのイオン輸送に必須のアルギニン残基 (Arg-210) (Fig. 16) [41, 43] に相当することを見出した。この残基は Na<sup>+</sup>共役型の F-ATPase (Fig. 16, *P. modestum*) 及び *S. cerevisiae* Vph1 においても保存されていた (Fig. 16)。Arg-573 は *E. hirae* V-ATPase において Na<sup>+</sup>輸送に関わる可能性がある。そこで、Arg-573 に関して部位特異的に変異体を作製し、その影響を検討した。

#### 3-3-2 NtpI Arg-573 変異の Na<sup>+</sup>-ATPase 活性に対する影響

まず、生育に対する Arg-573 変異の影響を調べた。V-ATPase はアルカリ条件下、*E. hirae* の細胞内イオン濃度の恒常性維持及び生育に必須である [64]。野生株 9790 は高 Na<sup>+</sup>濃度、アルカリ培地 (pH 10) においても中性条件と同様に生育可能である。しかし、*ntpI* 遺伝子欠失株 NID はこのようなアルカリ培地では生育できず、野生型の *ntpI* 遺伝子を含むプラスミド、pHEexI を導入することによりその生育が回復する。Arg-573 の Glu, Leu, Gln への変異体は NID と同様、高 Na<sup>+</sup>濃度、アルカリ培地で生育不能であった。一方、R573K 変異体は同培地で野生株より生育速度は非常に遅いながらも生育可能であった (Table III)。膜分画の Na<sup>+</sup>依存性 ATP 加水分解活性については、NID/pHEexI では野生株 9790 と同程度の活性が観察されたが、NID/pHEex (vector) では検出限界以下の活性であった。R573E, R573L, R573Q 変異体では、Na<sup>+</sup>依存性 ATP 加水分解活性がほとんど観察されなかったが、R573K 変異体においては部分的な活性が観察された (Table III)。

#### 3-3-3 NtpI Arg-573 変異の NtpI 発現量及び Na<sup>+</sup>-ATPase 複合体形成に対する影響

NtpI 及び V<sub>1</sub> 部分に対する抗体を用いた western blotting を行った。その結果、NtpI 及び V<sub>1</sub> の主要なサブユニットである NtpA, NtpB の発現量は野生株と同程度であった (Fig. 17A)。続いて NtpI Arg-573 変異を含む V-ATPase 複合体が正常に形成されているかを確認するために、ア

フィニティー樹脂 (Ni-NTA resin) を用いて His-tagged NtpI を含む  $\text{Na}^+$ -ATPase 複合体の精製を試みた。His-tagged NtpI を発現させた場合の whole cell からの  $\text{Na}^+$ 排出、及び膜分画の  $\text{Na}^+$ 依存性 ATP 加水分解活性は野生型の約 60–70%であった (data not shown)。野生型 His-tagged NtpI の場合、 $\text{Na}^+$ -ATPase 以外の別種タンパク質が混在しているが、9 種全ての ATPase サブユニットが SDS-PAGE で確認された (Fig. 17B, lane 2)。NID にベクターのみを導入した NID/pHEex では ATPase のサブユニットは検出されなかったが (Fig. 17B, lane 1)、Arg-573 変異体では野生型と同様、全てのサブユニットが検出された (Fig. 17B, lanes 3-6)。さらに、これら ATPase 複合体中の NtpI サブユニットの量に差は見られなかった (data not shown)。これらの結果から、本章で作製した Arg-573 の変異は ATPase サブユニットの発現量及び ATPase 複合体形成に影響を与えないことが示された。

#### 3-3-4 NtpI Arg-573 変異の $\text{Na}^+$ 排出活性に対する影響

Fig. 18 は Arg-573 各変異体による  $\text{Na}^+$ 排出活性を調べたものである。生育・ATP 加水分解活性と同様の傾向で、プロトン駆動力に依存しない  $\text{Na}^+$ 排出活性は野生株及び NID/pHEexI において観察され、R573E, R573L, R573Q 変異体ではほとんど観察されなかった。また、R573K 変異体では部分的な活性が観察された。

NtpI C 末端側領域には、細菌型 V-ATPase 間で保存されたアルギニン残基が Arg-573 の他に 2 つ存在する (Fig. 15)。しかしこれらアルギニン残基 (Arg-600, Arg-629) の変異による影響はほとんど観察されなかった (data not shown)。さらに、*S. cerevisiae* Vph1 と *E. hirae* NtpI の相同性は低い [110]Arg-573 を含む C 末端側領域は比較的保存されており (Fig. 16)、また最近、*S. cerevisiae* Vph1 Arg-735 が  $\text{H}^+$ 輸送に必須であるとの報告がなされている [111]。

以上の結果から、NtpI Arg-573 が *E. coli* や *Propionigenium modestum* の F-ATPase a サブユニットにおけるイオン輸送に必須のアルギニン残基 (Fig. 16) に相当し、*E. hirae* V-ATPase による  $\text{Na}^+$ 輸送に必須の残基であることが明らかとなった。

#### 3-3-5 *E. hirae* $\text{V}_0$ 部分の受動的な $\text{Na}^+$ チャネル活性について

*E. coli* F-ATPase の必須アルギニン残基の変異体 (R210A) では、ATP 依存性の  $\text{H}^+$ 輸送活性は消失しているが、 $\text{F}_0$  を介した受動的な  $\text{H}^+$ チャネル活性は保持しているとの報告がある [112]。一方 V-ATPase においては、 $\text{V}_0$  部分のみでは受動的な  $\text{H}^+$ チャネル活性は無いと示唆されている [113]。そこで、*E. hirae*  $\text{V}_0$  部分が受動的な  $\text{Na}^+$ チャネルとして機能するか検討した。 $\text{F}_0\text{F}_1$ -及び  $\text{V}_0\text{V}_1$ -ATPase では、EDTA 処理により  $\text{F}_1$ ,  $\text{V}_1$  部分が容易に膜から解離する。また、 $\text{Mg}^{2+}$  存在下に  $\text{F}_1$ ,  $\text{V}_1$  部分 (EDTA extract) と  $\text{F}_0$ ,  $\text{V}_0$  部分のみを含む膜小胞 (stripped membrane) をインキュベーションすることにより、 $\text{F}_0\text{F}_1$ ,  $\text{V}_0\text{V}_1$ -ATPase の再構成が可能である。

*E. hirae* には 2 種の  $\text{Na}^+$ 排出系、 $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporter [14]及び  $\text{Na}^+$ -ATPase が存在する (Fig. 2)。

Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter により形成される Na<sup>+</sup>の電気化学的勾配に対する、free の V<sub>0</sub> 部分の影響を検討した。ATCC9790, NID, 及び R573L 変異体から調製した stripped membrane と、F<sub>1</sub> 部分のみを含む Nak1 の EDTA extract を用いた再構成実験により、F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATPase と free の V<sub>0</sub> 部分を含む膜小胞を作製した。F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATPase の再構成と free V<sub>0</sub> 部分の存在は western blotting により確認した (Fig. 19A)。Fig. 19B には V<sub>1</sub>-stripped, F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-reconstituted 反転膜小胞を用いた <sup>22</sup>Na<sup>+</sup>の取り込み活性を示した。Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter による ATP 依存性 Na<sup>+</sup>取り込みは 9790, NID, R573L 変異体全てにおいて観察された。この Na<sup>+</sup>取り込みはプロトノフォアである CCCP の添加により阻害された。膜小胞内への <sup>22</sup>Na<sup>+</sup>蓄積量はほぼ同程度であり、antiporter により形成される Na<sup>+</sup>の濃度勾配は、機能的な V<sub>0</sub> の存在に影響されないことが示唆された。よって、*E. hirae* Na<sup>+</sup>-ATPase の V<sub>0</sub> 部分は、受動的 Na<sup>+</sup>チャンネルとしては機能していない可能性がある。また少なくとも、R573L 変異は V<sub>0</sub> 部分の受動的な Na<sup>+</sup>透過性に影響しないことが示された。

### 3-3-6 Na<sup>+</sup>依存性 ATP 加水分解活性に対する Arg-573 変異の影響

*E. hirae* Na<sup>+</sup>-ATPase による ATP 加水分解反応は Na<sup>+</sup>依存性である (Fig. 20A)。本酵素において、Na<sup>+</sup>の作用部位は V<sub>0</sub> 部分の Na<sup>+</sup>結合部位 (NtpK Glu-139) のみである [61, 62]。よって、V<sub>1</sub> 部分における ATP 加水分解に対する Na<sup>+</sup>の影響は、V<sub>0</sub> 部分への Na<sup>+</sup>の作用を反映しているといえる。この ATP 加水分解反応において、Na<sup>+</sup>に対する Hill plot をとると  $n_H=0.25$  となり、本酵素が Na<sup>+</sup>に対して負の協同性を示すことが確認された (Fig. 20B) [114]。これは、親和性の異なる Na<sup>+</sup>の作用部位が複数あることを示している。また、Hill 係数は ATP 濃度の低下にともない 1 に近づき、協同性が弱まっていく (Fig. 21B, 25) [114]。

この点について、Arg-573 変異の影響を検討した。Fig. 21 には、野生株と R573K 変異株から調整した反転膜小胞の ATP 加水分解活性に対する Na<sup>+</sup>の影響を示した。野生株の膜小胞において、Na<sup>+</sup>に対する親和性は精製酵素と同様に二相性を示し (Fig. 20)、K<sub>m</sub> 値はそれぞれ 20±4 μM と 5 mM であった [71, 101]。0.05-10 mM NaCl の範囲での様々な ATP 濃度における Hill 係数を Fig. 21B に示した。2 mM ATP における野生株の Hill 係数は  $n_H=0.22±0.03$  であったが、R573K 変異体では  $n_H=0.40±0.05$  と、野生株と比較して高い Hill 係数を示した。また R573K 変異体では、Na<sup>+</sup>に対する K<sub>m</sub> 値としては 33±7 μM のみが算出された。また低濃度 ATP (0.01-0.1 mM) 存在下においては、両株ともにその Hill 係数が 1 に近づいた。測定を行った全ての ATP 濃度において、R573K 変異株は野生株よりも高い Hill 係数を示した (Fig. 21B)。以上の結果は、R573K 変異により本酵素の Na<sup>+</sup>に対する協同性が弱められていることを示唆しており、NtpI Arg-573 は *E. hirae* V-ATPase の示す協同性に必須であることが示された。

### 3-3-7 Na<sup>+</sup>-ATPase 反応に関わるアミノ酸残基の同定

原核・真核生物の NtpI ホモログについて、C 末端部分のアミノ酸配列を Fig. 22 に示した。Arg-573 の周辺を含め、この領域は各生物種 V-ATPase 間で非常によく保存されていることがわかる。この中で、



Arg-573 と共にイオン輸送に関わるアミノ酸残基を同定するために、特に真核細胞型の NtpI ホモログとも保存性の高い残基から部位特異的変異導入を行った。その結果、Y571L, L574R, L577R, E634K 変異体では、Na<sup>+</sup>-ATPase 活性がほとんど観察されなかった。また、L577F, H626R, E634Q 変異体では著しい活性低下が見られた (Table IV)。H626R, E634Q については、Na<sup>+</sup>排出活性、ATP 加水分解活性共に野生株の約 20%に低下した (Fig. 23)。また、NtpI の V-ATPase 間で保存された荷電性アミノ酸残基を Fig. 24 に示したが、そのほとんどは親水性ループ領域に存在する。この中で第 1 膜貫通部位に存在すると考えられる Asp-384 の変異 (D384N) はほとんど活性に影響しなかった。

*E. coli* a サブユニットにおいては、必須アルギニン残基 (Arg-210) の変異体に対してその近傍の残基のアルギニンへの置換が部分的な抑圧変異となる [115]。そこで、*E. hirae* NtpI においてアルギニン残基の位置を 573 (第 6 膜貫通部位) から対面のヘリックス (第 7 膜貫通部位) に移動させた変異体 (R573I/I608R, R573Q/Q612R, R573N/N615R) を作製したが、これらの変異による活性の回復は観察されなかった。また、これらの残基の単一変異体 (I608R, Q612R, N615R) は、野生型とほぼ同程度の活性を示した (Table IV)。

以上の結果から、Arg-573 を含む NtpI C 末端領域は V-ATPase 間で非常に高く保存されており、V-ATPase によるイオン輸送において重要な役割を果たしていることが示唆された。

### 3-3-8 NtpI のトポロジーについて

ハイドロパシープロファイルからは、NtpI は 7 回膜貫通型 (Fig. 24B) であると考えられているが、それを確認するためにラベル実験を行った。NtpI に本来存在する 2 個の cysteine (Cys-259, Cys-535) を serine に置換した Cys-less NtpI を作製し、それを基に、まず Arg-573 及び活性に関わる残基を含む、NtpI C 末端側 2 つの膜貫通部位を中心に Cys 置換変異体を作製した。これらに対して、膜透過性・非透過性の 2 種類の試薬を反応させ、Cys 残基の SH 基に結合した膜透過性試薬 MPB [ $N^{\alpha}$ -(3-maleimidylpropionyl)biocytin] を avidin-conjugated alkaline phosphatase で検出した。MPB は NEM (*N*-ethylmaleimide) と同様に、SH 基との反応に H<sub>2</sub>O 分子を必要とするため、膜貫通領域などの疎水性の高い部分に存在する Cys 残基とは反応しにくい。よって whole cell での実験においては、疎水性・膜透過性の MPB は細胞内・細胞外両方のループに存在する Cys 残基と反応するが、親水性・膜非透過性の AMS は、細胞外に存在する Cys 残基とのみ反応する。したがって、AMS の前処理により MPB の結合が阻害された時、その残基は細胞外ループにあると考えられる [102-104]。結果として、S546C 及び I659C は膜透過性 SH 試薬である MPB によりラベルされたが、これは親水性試薬 AMS の前処理によりほぼ完全に阻害された。一方、A598C においては AMS による阻害は観察されなかった (Fig. 24A)。これらの結果から S546, I659 は細胞外、A598 は細胞質側のループ領域に存在していることが示唆され、Arg-573 及びイオン輸送に関わる重要な残基が C 末端側 2 つの膜貫通部位に位置することがわかった (Fig. 24B)。

以上の結果から、NtpI Arg-573 は F<sub>1</sub>、V-ATPase 間で保存されており、V<sub>0</sub> ローター成分 (NtpK) の回転に影響を与える、Na<sup>+</sup>-ATPase 反応に必須のアルギニン残基であることが明らかになった。また、Arg-573 を含む NtpI C 末端側領域は V-ATPase 間で保存性が高く、V-ATPase によるイオン輸送において重要な役割を果たしていることが示唆された。この領域は、NtpK のイオン結合部位 (Glu-139) と共同してイオン輸送に関わる可能性があると考えられる。

### 3-4 考察

#### *NtpI* Arg-573 変異の ATPase 複合体形成に対する影響

*S. cerevisiae* Vph1 では *E. hirae* NtpI Arg-573 に相当する残基の変異 (R735L) により Na<sup>+</sup>-ATPase 複合体が不安定になるとの報告がある [111]。しかし、*E. hirae* V-ATPase の場合、Arg-573 の変異は NtpI の安定性や V<sub>0</sub>V<sub>1</sub> 複合体形成には影響を与えなかった (Fig. 17)。また、NtpI 欠損株 NID/pHEex (vector) において、V<sub>1</sub> の主要なサブユニットである NtpA, B が膜分画に検出された (Fig. 17A, lane 2)。これは V-ATPase 複合体の形成と何らかの関与があると考えられるが、理由は明らかではない。この点に関しては、観察された NtpA, B サブユニットが安定な V<sub>1</sub> 複合体を形成しているかについてまず確認する必要がある。

#### *E. hirae* V-ATPase が示す Na<sup>+</sup> に対する負の協同性について

Fig. 20 に示したように、本酵素による ATP 加水分解反応は Na<sup>+</sup> 依存性である。Na<sup>+</sup> の作用部位は V<sub>0</sub> 部分に存在するため (Na<sup>+</sup> 結合部位、NtpK Glu-139) [61, 62]、V<sub>1</sub> 部分における ATP 加水分解に対する Na<sup>+</sup> の影響は V<sub>0</sub> への Na<sup>+</sup> の作用を反映していると考えられる。また、ATP 加水分解反応において Na<sup>+</sup> に対する負の協同性を示す [114] ことから、親和性の異なる Na<sup>+</sup> の作用部位が複数あることが示唆される。さらに、Hill 係数は ATP 濃度の低下にともない 1 に近づき、協同性が弱まる (Figs. 21, 25) [114]。親和性の異なる Na<sup>+</sup> の作用部位が複数存在することと、それが ATP 濃度に依存することを考え、筆者らはこれを以下のような「Na<sup>+</sup> 結合部位の ATP 依存性親和性変化モデル」で説明できると考えている (Fig. 25) [114]。i) NtpK 上の Na<sup>+</sup> 結合部位に、高い親和性で Na<sup>+</sup> が結合する ( $Kd_{(Na^+)} = 15 \pm 5 \mu M$ ) [62]。ii) ATP 加水分解により NtpK ローターが回転し、結合部位が NtpI と NtpK の境界面に入ると、Na<sup>+</sup> 結合部位の構造変化が起きる。その結果結合部位の Na<sup>+</sup> に対する親和性が低下し、Na<sup>+</sup> が結合部位から離れ、NtpI が形成するチャンネルを通して放出される。iii) 更なる回転により結合部位が境界面から離れると、その構造はもとの高親和性型に戻る。このイオン結合部位の構造変化には一定の時間が必要であると推測される。高濃度の ATP が存在する場合、つまり NtpK ローターの回転が速い場合においては、残存している低親和性型の結合部位 (低親和性の中間状態) に次の Na<sup>+</sup> が結合する。この、低親和性の中間状態への Na<sup>+</sup> の作用があるために、Na<sup>+</sup> に対する負の協同性が観察されると考えられる [114]。これに対して、ATP が低濃度の場合には NtpK ローターの回転が遅く、

結合部位が高親和性型に戻るために十分な時間が与えられる（中間状態の出現が減る）。このため負の協同性が減弱すると考えられる。また Fig. 25 は NtpK が 360° 回転することを前提に作製しているが、仮に完全な回転ではなく、NtpI に対して NtpK がある振幅で左右に運動する（ずれる）としても、この親和性変化モデルは同様に適用できると考えている。

R573K 変異体についての Na<sup>+</sup>依存性 ATP 加水分解活性の測定 (Fig. 21) から、R573K 変異体は ATP 加水分解反応において、Na<sup>+</sup>に対して野生株よりも高い Hill 係数を示すことがわかった。定常状態である 25 mM NaCl 存在下での ATP に対する Km 値は野生株、R573K 変異株それぞれ 0.7mM 及び 0.8 mM であり、Arg-573 の変異は ATP に対する親和性に影響を与えなかった (data not shown)。また、ATP 加水分解における Na<sup>+</sup>に対する Km 値が野生株、変異株同様に低い（高親和性である）ことから、NtpK への Na<sup>+</sup>の結合に対する影響も無視できる程度であると考えられる。したがって、R573K 変異により本酵素の Na<sup>+</sup>に対する協同性が弱められていることが示された。前述のモデルより、これは R573K 変異が NtpK ローターの回転速度を遅くし、構造変化に十分な時間を供給しているためであると考えられる。

#### Na<sup>+</sup>-ATPase 反応に関わるアミノ酸残基について

変異導入の結果明らかとなった Na<sup>+</sup>-ATPase 活性に関わるアミノ酸残基は、Arg-573 周辺に存在していた (Fig. 24)。Tyr-571 は Leu への変異により活性が消失したが、この残基は  $\alpha$ -ヘリックス上で Arg-573 のほぼ反対面に位置するため、イオン輸送過程に直接関与するとは考えにくい。Y571L における活性低下は、Tyr の芳香族性の大きな側鎖が他のヘリックスとの相互作用に必要とされていたためであると考えられる。また L574, L577 のアルギニンへの変異体においても活性が消失していた。これらは Arg-573 周辺に positive charge が増加したことが原因であると考えられる。

*E. coli* F-ATPase a サブユニットにおいては、Arg-210 と共に Glu-219 及び His-245 が活性に重要であることが分かっている [41, 112]。また、*S. cerevisiae* Vph1 においても同様に、His 及び Glu 残基が活性に関わる [111, 116]。しかしアミノ酸配列のアライメントからは、*E. hirae* NtpI のこれらに相当する位置に His 及び Glu 残基は存在しない (Fig. 26)。また、部位特異的変異導入の結果から、*E. hirae* においては NtpI His-626 及び Glu-634 が活性に必須であった。しかし MPB によるラベル実験から、これら荷電残基は C 末端親水性領域に存在すると考えられる (Fig. 24)。*S. cerevisiae* Vph1 での相当する His, Glu 残基の変異についてはまだ報告がないが、これら残基は、*E. coli* F-ATPase a サブユニットにおける Glu-219 及び His-245 等の役割とは異なり、NtpI チャネルの開口部に位置してイオンの放出・解離過程に関わると推測される。

本章では、イオン輸送には Arg-573 を含むヘリックス部分が中心として関わることを示した。Oster らが提唱している F-ATPase のイオン輸送メカニズムでは、F<sub>0</sub> 固定子の positive charge (*E. coli* aR210, *P. modestum* aR227) がイオン輸送を行う上で必須である [117-119]。NtpI サブユニットの Arg-573 残基は固定子 NtpI に存在する機能的に必須の残基 (positive charge) であり、この部位は NtpK ローター上のイオン結合部位と共同してイオン輸送に関与していると考えられる。



\*  
 Pm 209 MFPINLAGEFAKPTNISFR<sup>209</sup>LFGNMFAGMVI<sup>210</sup>LGLLYKAAPVLI<sup>211</sup>PAPLHLYFDL<sup>212</sup>FSG---  
 Ec 192 NLIILEGVSLLSKPVSLGL<sup>192</sup>RFGNMYAGEL<sup>193</sup>FILLIAGLLPWSQWI<sup>194</sup>LNVPWAI<sup>195</sup>F<sup>216</sup>HILLII  
 Eh 555 AYNLYGLTGYIGDLVSYTR<sup>555</sup>RMALGI<sup>556</sup>SGGSA<sup>557</sup>AAAFNMLVA<sup>558</sup>FMP<sup>559</sup>PAARF<sup>560</sup>SVGILLII<sup>561</sup>V<sup>243</sup>LQ  
 Sc 718 IHTIEFC<sup>718</sup>NCVSH<sup>719</sup>TASYLR<sup>720</sup>LWALS<sup>721</sup>LA<sup>722</sup>HAQL<sup>723</sup>SSVL<sup>724</sup>WTMTIQIA<sup>725</sup>FGFRG<sup>726</sup>FVGV<sup>727</sup>FMTV<sup>728</sup>ALF  
  
 Pm 264 VVQSFVIMLTMVYIQGSI<sup>264</sup>GDAEYLED  
 Ec 250 TLQAFIF-----M<sup>250</sup>LTIVYLSMASEEH-----  
 Eh 613 ALNMFLT-----LL<sup>613</sup>SAYVHGARLQ<sup>614</sup>YVEFFG<sup>615</sup>KFYTG<sup>616</sup>GRSFK<sup>617</sup>PLK<sup>618</sup>TV<sup>619</sup>EK<sup>620</sup>YV<sup>621</sup>NIN<sup>622</sup>HKKK-----  
 Sc 774 AMWFALTCAVLVLM<sup>774</sup>EGT<sup>775</sup>SAM<sup>776</sup>LHSL<sup>777</sup>RL<sup>778</sup>HV<sup>779</sup>ESMS<sup>780</sup>KFFV<sup>781</sup>GEG<sup>782</sup>LPYEP<sup>783</sup>FAFE<sup>784</sup>YK<sup>785</sup>DME<sup>786</sup>VAV<sup>787</sup>ASASS<sup>788</sup>ASS

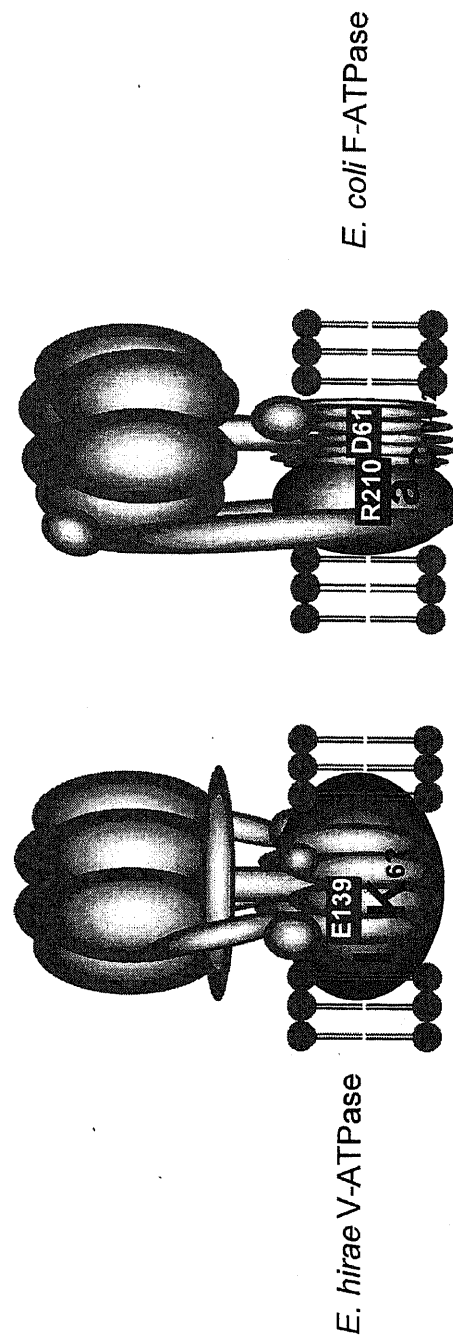


Fig. 16. Alignment of the COOH terminal region of F-type and V-type ATPase a subunits.

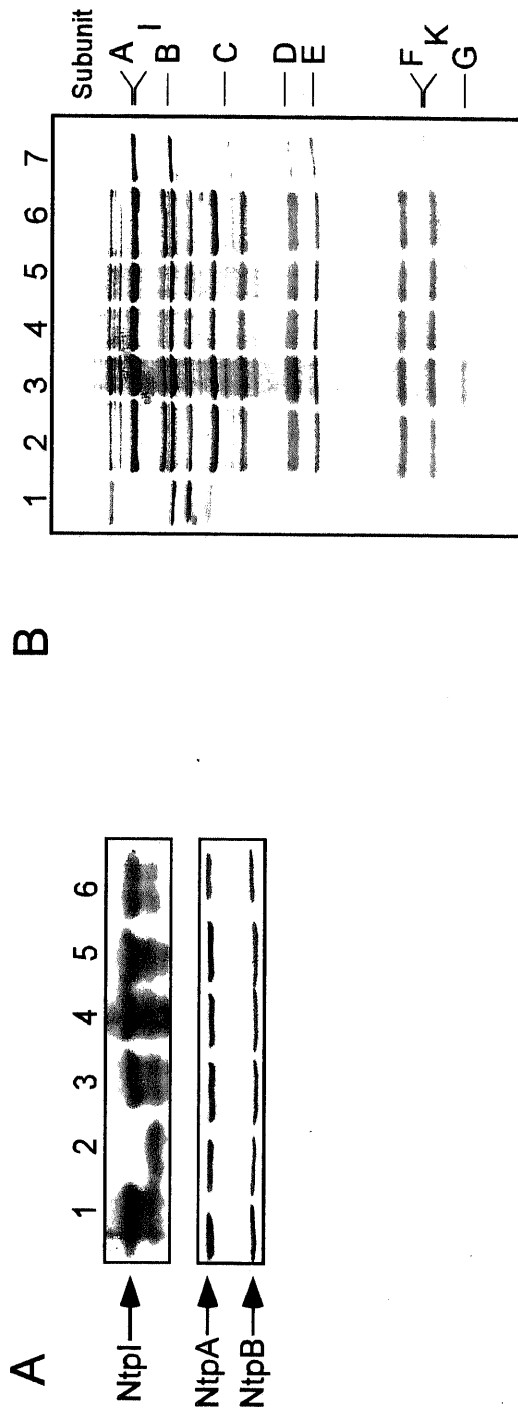
Table III

Effect of NtpI Arg-573 mutation on growth rate and Na<sup>+</sup>-ATPase activity of membrane vesicles.

Arg573 mutation	Growth rate <sup>a</sup> (h) <sup>-1</sup>	ATPase activity <sup>b</sup>
wild	0.59	114 ± 9.5 (3)
vector	0.05	0
R573E	0.03	0
R573K	0.14	24 ± 9.7 (4)
R573L	0.04	0
R573Q	0.03	0

<sup>a</sup> Growth rates were determined between the optical densities of 0.1 and 0.2, in NaTY medium (pH 10). There was no significant change in the medium pH during this period.

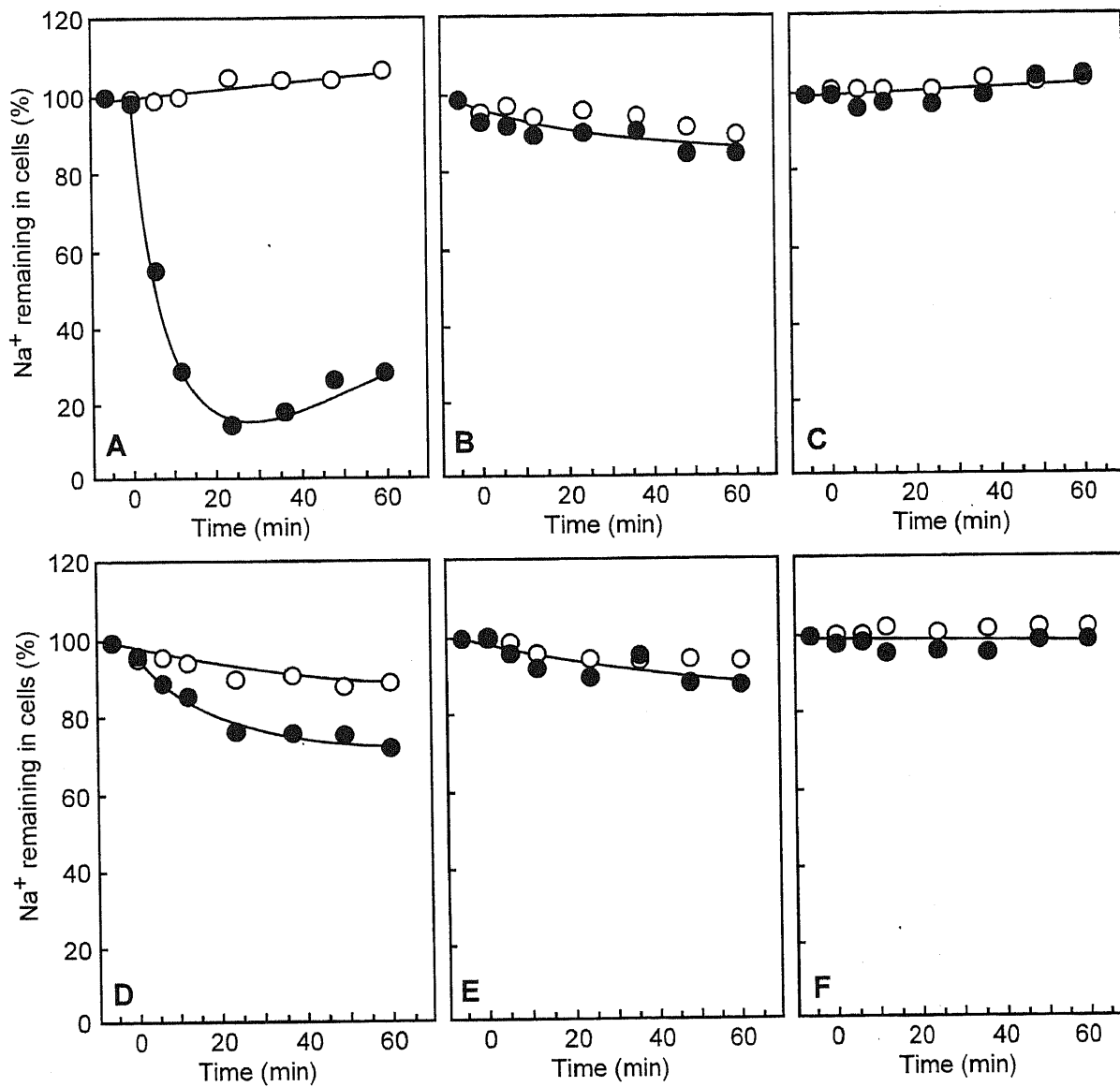
<sup>b</sup> Na<sup>+</sup>-ATPase activity was determined in the presence of 20 mM NaCl as described in the *Experimental procedures*, and the activities shown were subtracted by the activities of each strain at 0 mM NaCl. The activities shown are Na<sup>+</sup>-stimulated ATPase activity (nmol/min/mg protein) ± standard deviation and (n) number of measurements.



**Fig. 17. Effect of NtpI Arg-573 mutations on assembly of the *E. hirae* V-ATPase.**

A: Western blotting of membranes. Membrane vesicles (30  $\mu$ g protein) were electrophoresed on 7.5% or 13.5% gel, and western blotting was performed with antisera raised against the oligopeptides for the NtpI (upper panel) or the purified V<sub>1</sub> (lower panel), respectively. Spots were visualized using goat anti-rabbit IgG conjugated to alkaline phosphatase: lane1, NID/pHEexI (wild); lane2, NID/pHEex (vector); lane3, R573E; lane4, R573K; lane5, R573L; lane6, R573Q.

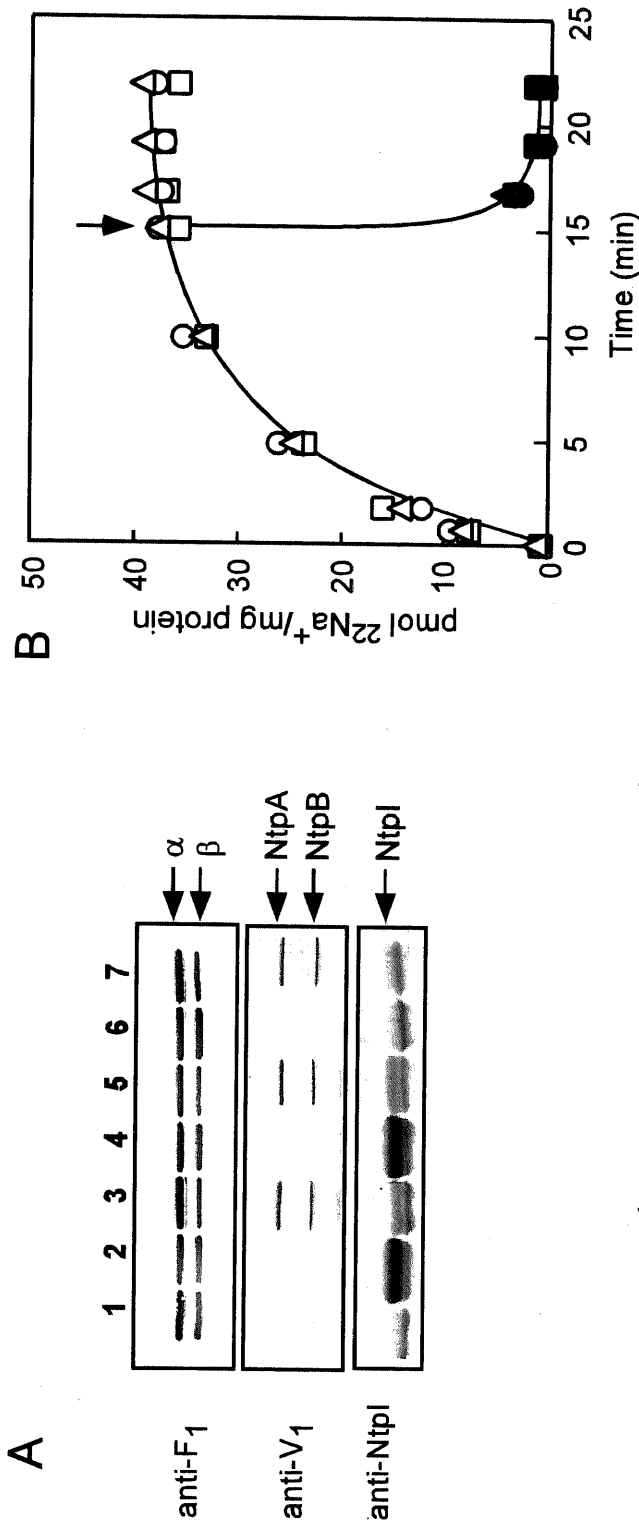
B: SDS-PAGE of V-ATPase complex containing His-tagged NtpI. The ATPase was purified by the procedure using Ni-NTA resin. The samples (2.5  $\mu$ g protein for lanes2-6 and 1  $\mu$ g for lanes1 and 7) were electrophoresed on 13.5% gel, and stained by Coomassie Brilliant Blue R-250: lane1, NID/pHEex (vector); lane2, NID/pHEexI-His (wild); lane3, R573E-His; lane4, R573K-His; lane5, R573L-His; lane6, R573Q-His; lane7, purified V<sub>0</sub> V<sub>1</sub>-ATPase.



**Fig. 18. Sodium extrusion activity of NtpI Arg-573 mutants.**

The sodium extrusion activity was measured with (●) or without (○) addition of 10 mM glucose at 0 min as described in *Experimental procedures*: A, NID/pHEexI (wild); B, NID/pHEex (vector); C, R573E; D, R573K; E, R573L; F, R573Q.

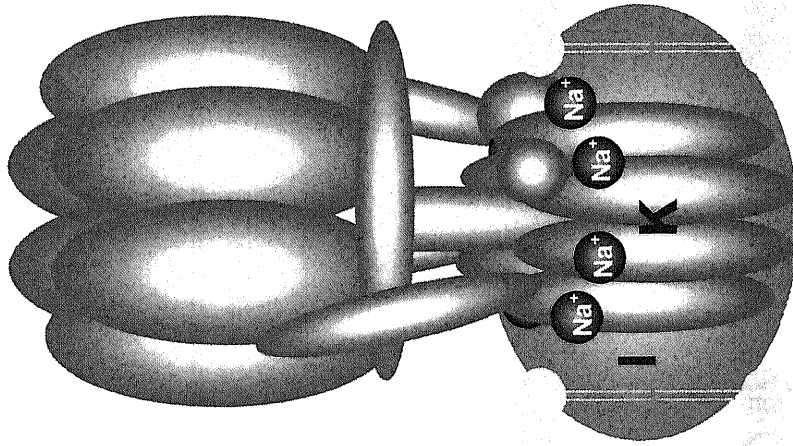
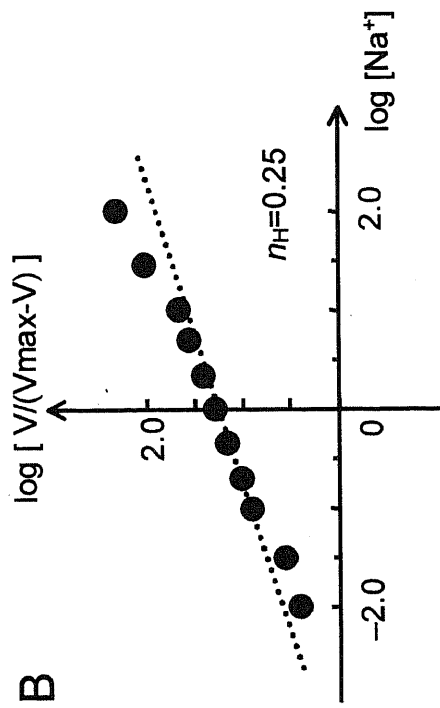
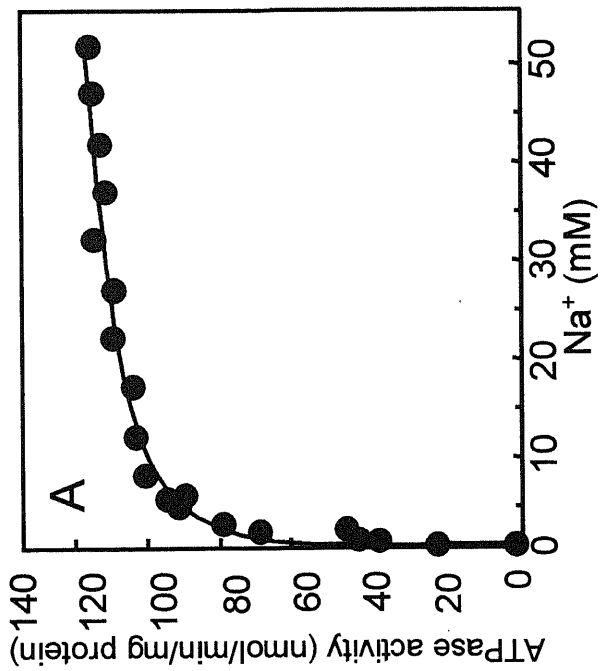




**Fig. 19.**  $^{22}\text{Na}^+$  accumulation by the  $V_1$ -stripped,  $F_0F_1$ -reconstituted membrane vesicles.

**A:** Western blotting of original membrane vesicles and the stripped membranes,  $F_0F_1$ -reconstituted membrane vesicles were performed as described in *Experimental procedures*. Western blotting was performed with antisera raised against the oligopeptides for the NtpI, the purified  $F_1$ , or  $V_1$ , and spots were visualized using goat anti-rabbit IgG conjugated alkaline phosphatase: lane1, Nak1 original membrane; lane2, ATCC9790 reconstituted membrane; lane3, ATCC9790 original membrane; lane4, R573L reconstituted membrane; lane5, R573L original membrane; lane6, NID reconstituted membrane; lane7, NID original membrane.

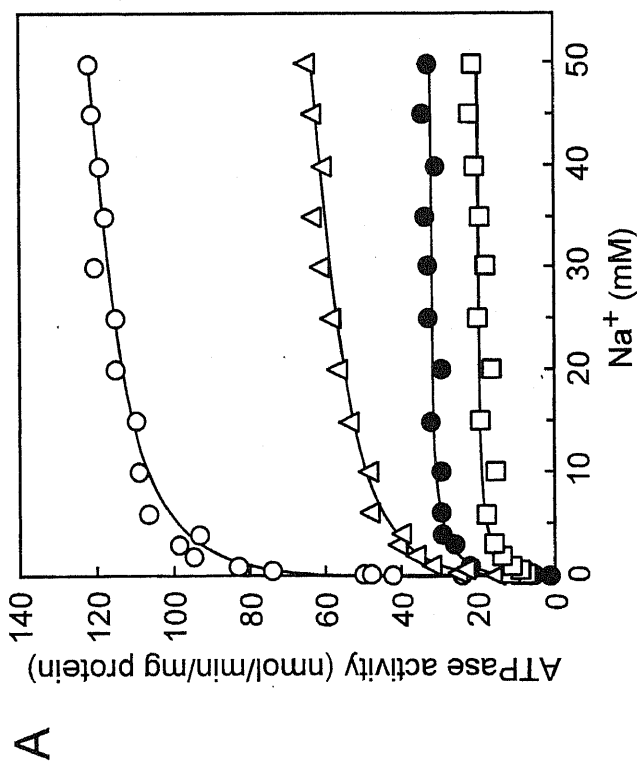
**B:** ATP-driven  $^{22}\text{Na}^+$  uptake by  $F_0F_1$ -reconstituted membrane vesicles. Uptake was initiated at 0 min by addition of the vesicles of ATCC9790 (○), NID (△), or R573L (□), and 20  $\mu\text{M}$  CCCP was added at indicated by the arrow (closed symbols).



**Fig. 20. *E. hirae* Na<sup>+</sup>-ATPase shows negative cooperativity for Na<sup>+</sup> in ATP hydrolysis.**

A: Na<sup>+</sup> concentration dependence of ATPase activity of *E. hirae* Na<sup>+</sup>-ATPase at pH 8.8.

B: Hill plots.



**B**

ATP ( $\mu\text{M}$ )	Hill coefficient ( $n_H$ )	
	wild	R573K
2000	$0.22 \pm 0.03$ (3)	$0.40 \pm 0.05$ (4)
100	$0.33 \pm 0.04$ (4)	$0.60 \pm 0.10$ (6)
50	$0.65 \pm 0.01$ (4)	$0.85 \pm 0.23$ (6)
10	$0.80 \pm 0.52$ (6)	$0.90 \pm 0.55$ (6)

**Fig. 21. The dependence of Na<sup>+</sup>-ATPase activity of membranes from NtpI R573K mutant on Na<sup>+</sup> concentration.**

**A:** ATP hydrolyzing activities. The activities of wild type (open symbols) or R573K (closed symbols) were measured at various ATP concentrations (○, ●, 2000  $\mu\text{M}$ ; △, □, 100  $\mu\text{M}$ ; □, 50  $\mu\text{M}$ ) as described in *Experimental procedures*.

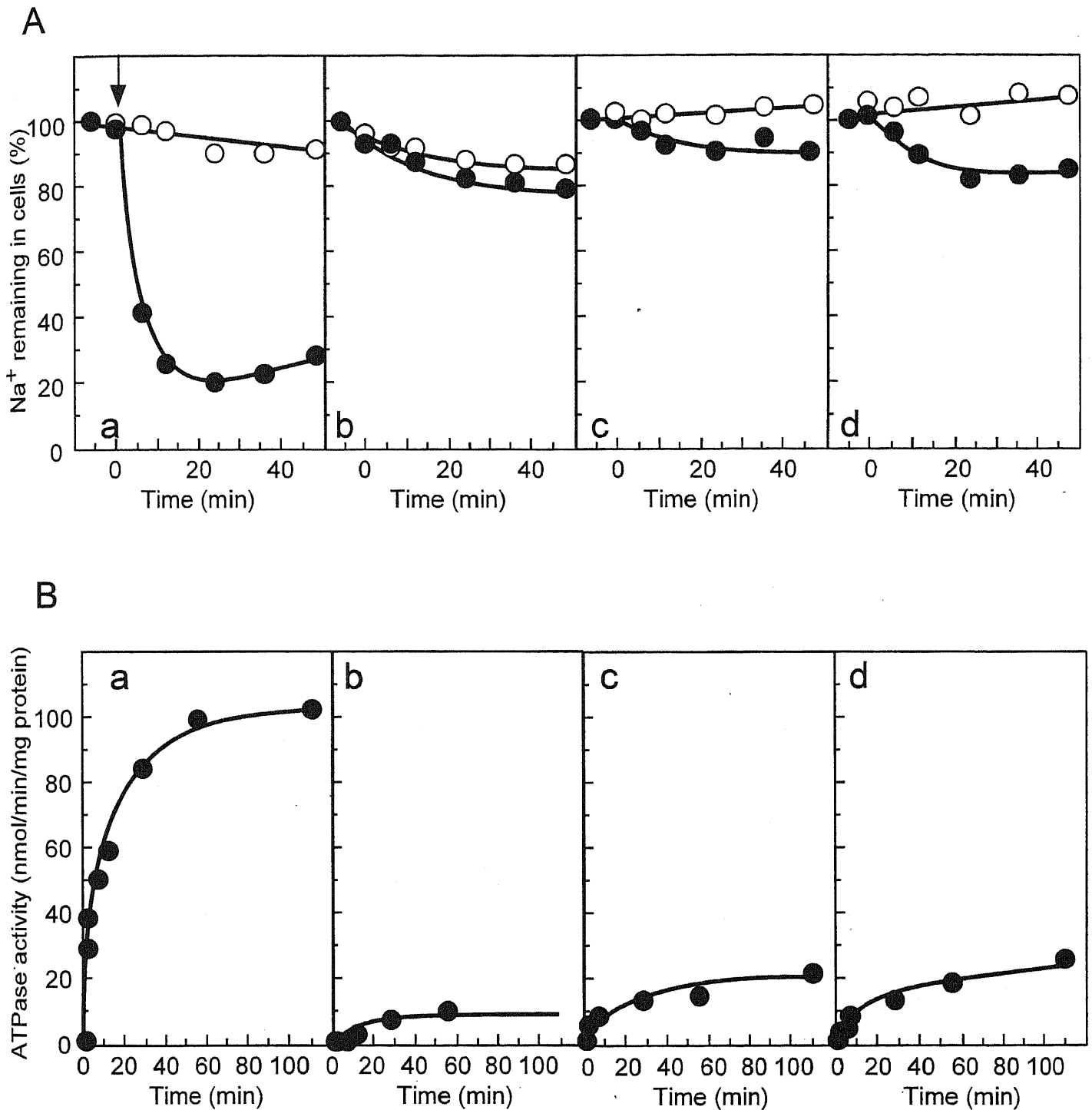
**B:** Hill coefficient ( $n_H$ ). The  $n_H$  at various ATP concentrations were calculated using data from more than 3 experiments as indicated in parentheses.

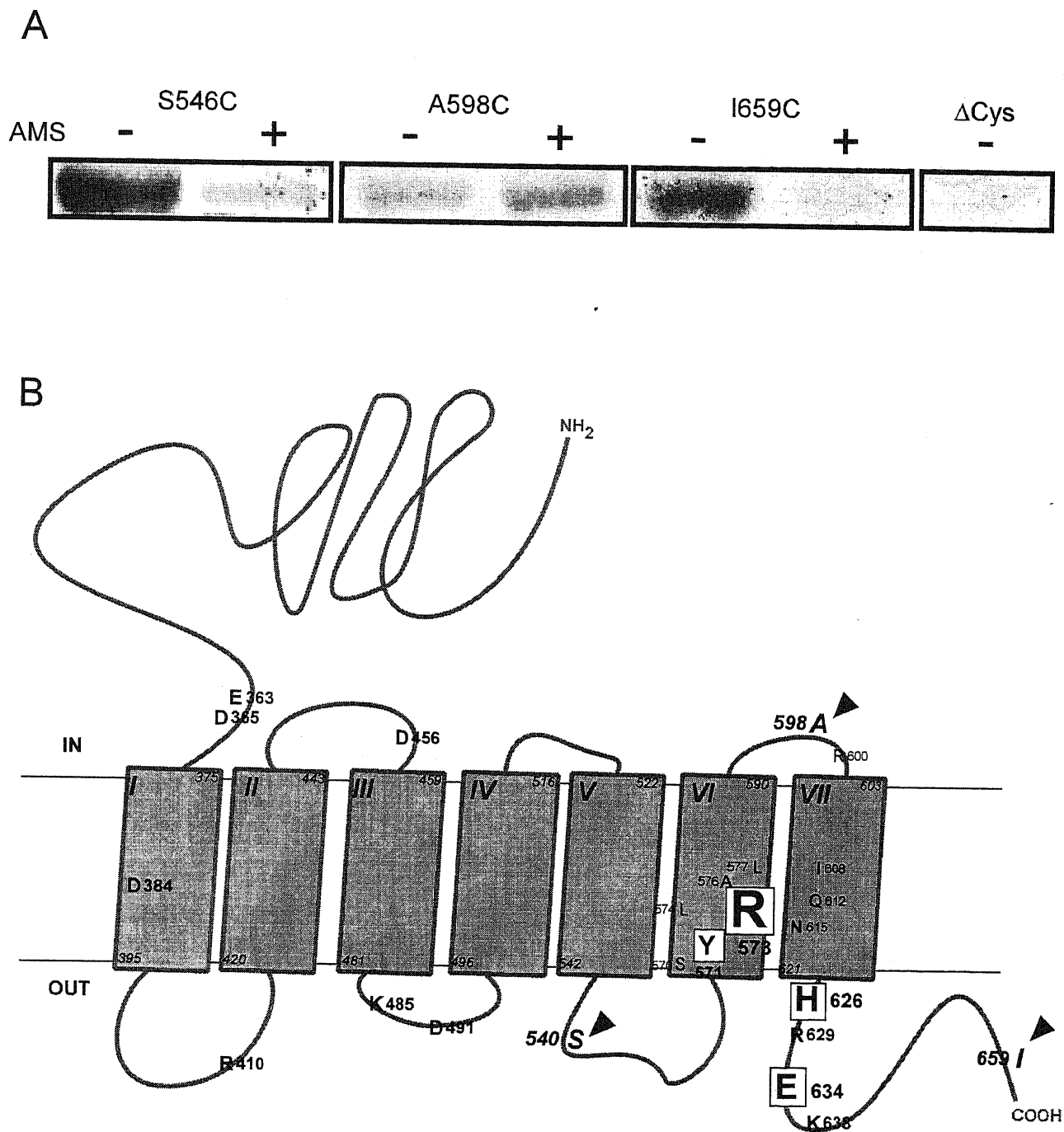


**Table IV Properties of *E. hirae* NtpI mutants.**

Strain	Growth	Na <sup>+</sup> extrusion	ATPase activity
9790 (parent)	+++	+++	+++
NID ( <i>ntpI::CAT</i> )	-	-	-
pHEexI (wild)	+++	+++	+++
NID/pHEex (vector)	-	-	-
D384N	+++	+++	+++
S570C	+++	+++	+++
Y571L	-	-	-
L574R	-	-	-
L574R/R573L	-	-	-
A576V	++	+++	+++
L577F	+	+	+
L577R	-	-	-
L577R/R573L	-	-	-
R600L	+++	+++	+++
I608R	+++	+++	ND
I608R/R573I	-	-	-
Q612R	+++	+++	ND
Q612R/R573Q	-	-	-
N615R	+++	+++	ND
N615R/R573N	-	-	-
H626R	+	+	+
R629Q	+++	+++	+++
E634Q	+	+	+
E634K	-	-	-

Assessment of growth is shown relative to that of wild type strain in NaTY medium at pH 10. Na<sup>+</sup>- stimulated ATPase activity of the membrane vesicles was assayed by measuring the released inorganic phosphate at 37 °C in 20 mM Tris-HCl (pH 8.8), in the presence of 0.5 mM DCCD with 2 mM ATP as substrate. The sodium extrusion activity was measured with addition of 10 mM glucose as described in *Experimental procedures*. The relative Na<sup>+</sup>- ATPase activities were as follows; +++, > 71% of wild type strain; ++, 26-70%; +, 6-25%; -, < 5%; ND, not determined.





**Fig. 24. Chemical labeling of whole cells of NtpI cysteine mutants by sulfhydryl reagents.**

Samples were incubated with 1.5 mM AMS or the same volume of DDW for 30 min at 30 °C, prior to labeling with 150  $\mu$ M MPB for 15 min at 30 °C. In case of A598C, samples were labeled with 300  $\mu$ M MPB. Labeled NtpI were solubilized from membranes, purified by Ni-NTA agarose, electrophoresed, transferred to nitrocellulose, probed with avidin-conjugated alkaline phosphatase, and developed for color.

ATP ( $\mu\text{M}$ )	Hill coefficient ( $n_H$ )
2000	0.22
100	0.33
50	0.65
10	0.80
0	1*

ATP依存性のNa<sup>+</sup>親和性変化モデル

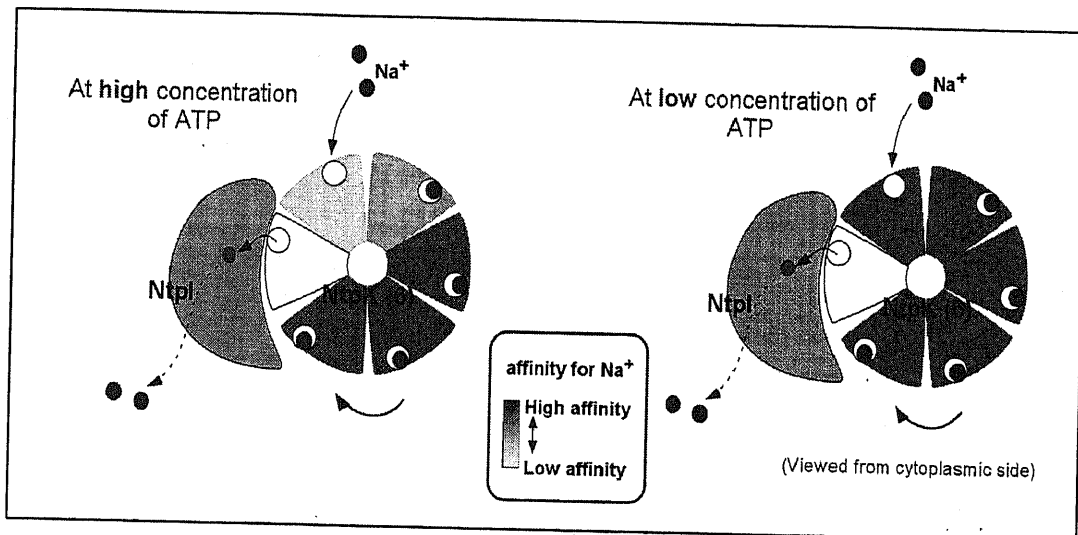


Fig. 25. ATP-dependent affinity change model of Na<sup>+</sup> binding sites.



**A**

\* Pm 209 MFPINLAGEFAKPTNISFR<sup>237</sup>IFGNMFAGMVI<sup>245</sup>LGLLYKAAPVLI<sup>245</sup>PAPLHLYFDLFSG---

Ec 192 NLIILEGVSLLSKPVSLGLR<sup>219</sup>IFGNMYAGEL<sup>245</sup>IFILIAGLLPWWSQWILNVPWAI<sup>245</sup>FHILII

Eh 555 AYNLYGLTYIGDLVSYTR<sup>575</sup>IMALGISC<sup>575</sup>GSIAAFAFNMLVA<sup>575</sup>FMPAARF<sup>575</sup>SVGLIIIVLQ

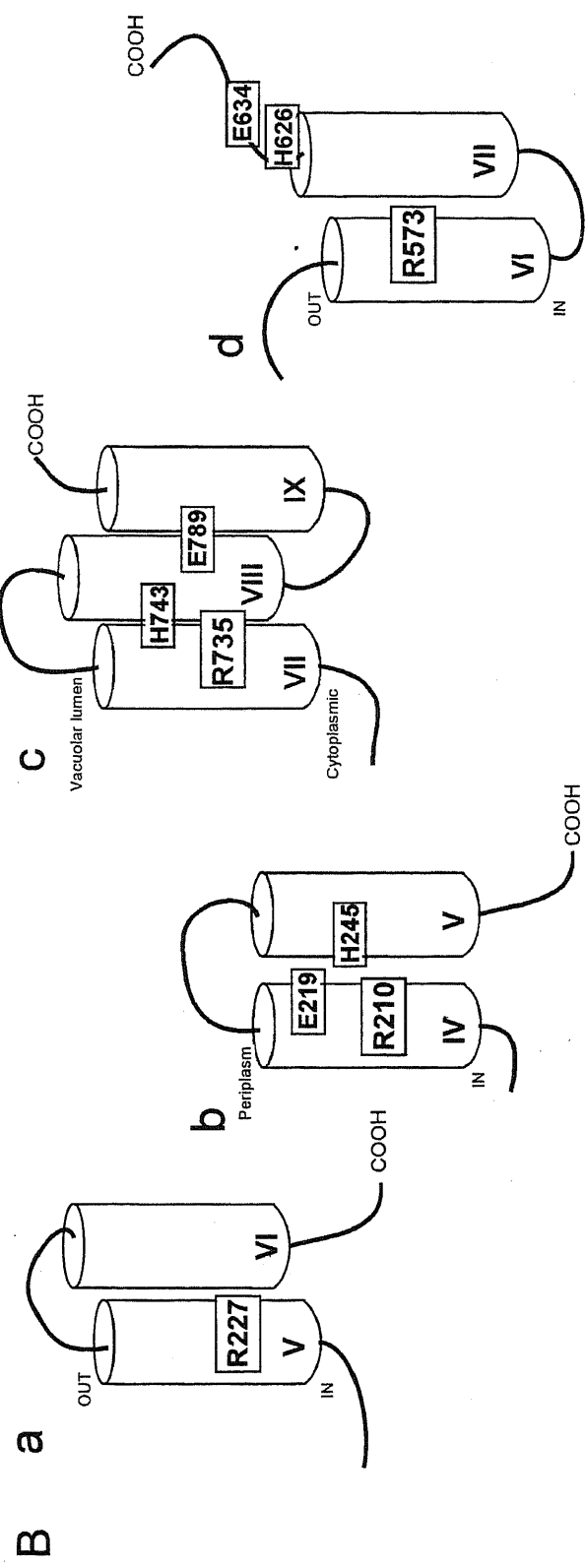
Sc 718 IHTIEFCLNCVSH<sup>735</sup>TASYLR<sup>735</sup>LWALS<sup>735</sup>LAHA<sup>735</sup>QLSSVLTMTTIQIAFG<sup>735</sup>RG<sup>735</sup>EV<sup>735</sup>GV<sup>735</sup>FMTVALF

Pm 264 VVQSEFVIMLTMVYIQGSI<sup>275</sup>GDAEYLED

Ec 250 TLQAFIF-----MVLITIVYLSMASEEH-----

Eh 613 ALNMF<sup>626</sup>LT-----LLSAYVHGARLQYVE<sup>626</sup>FFGK<sup>626</sup>FYTGG<sup>626</sup>RSFK<sup>626</sup>PLK<sup>626</sup>TV<sup>626</sup>EKY<sup>626</sup>VN<sup>626</sup>IN<sup>626</sup>HK<sup>626</sup>KK-----

Sc 774 AMWFAL<sup>789</sup>TCAV<sup>789</sup>LVLM<sup>789</sup>EGT<sup>789</sup>SAM<sup>789</sup>LH<sup>789</sup>SL<sup>789</sup>RL<sup>789</sup>HW<sup>789</sup>VES<sup>789</sup>MS<sup>789</sup>K<sup>789</sup>FV<sup>789</sup>GE<sup>789</sup>GL<sup>789</sup>PY<sup>789</sup>EP<sup>789</sup>FA<sup>789</sup>F<sup>789</sup>EY<sup>789</sup>KD<sup>789</sup>ME<sup>789</sup>VAV<sup>789</sup>AS<sup>789</sup>SS<sup>789</sup>ASS



**Fig. 26. Alignment and topology model of the COOH terminal region of the *E. hirae* NtpI and the a subunits of other ATPase.**  
**A:** Alignment of the COOH terminal region of the F-type or V-type ATPase a subunits. The amino acid residues that are identical to *E. hirae* NtpI are shown in shaded boxes. **B:** Topology model of the COOH terminal region of F-type or V-type ATPase a subunits. The critical arginine residue (Arg-573) and the residues essential for ion transport are also indicated in the squares: a, *P. modestum* a subunit; b, *E. coli* a subunit; c, *S. cerevisiae* Vph1; d, *E. hirae* NtpI.

## 第4章 総括

### *Enterococcus hirae* NtpJ K<sup>+</sup>輸送体による Na<sup>+</sup>輸送及びそのイオン輸送機構

KtrII 活性が観察されない *ntpJ* 遺伝子破壊株 (JEM2) において、バリノマイシン添加により顕著な K<sup>+</sup> 取り込みがあることを見出し、その解析から JEM2 では野生株よりも高い膜電位が形成されていることを明らかにした。アルカリ条件では主に Na<sup>+</sup>-ATPase により膜電位が形成されるが、野生株と JEM2 においては Na<sup>+</sup>-ATPase 活性に有意な差は認められなかった。しかし、JEM2 では野生株で観察された膜電位依存性の Na<sup>+</sup>取り込み活性が消失していた。よって、膜電位の過分極の原因は、NtpJ 欠失による細胞内への Na<sup>+</sup>再取り込みの減少であることが示された。NtpJ は KtrII K<sup>+</sup>取り込み系の構成成分であるが、Na<sup>+</sup>透過にも関与していることがわかった。

NtpJ に類似する K<sup>+</sup>輸送体は、植物から細菌に至るまで生物界に広く分布していた (Fig. 27)。これら輸送体のメカニズムについては不明な点が多いが、イオン透過部位には放線菌の K<sup>+</sup>チャネル (KcsA) のイオン透過孔と類似の構造を持つと推定され、これらは K<sup>+</sup>チャネルを共通の祖先として分化したイオン輸送体ファミリーであると考えられる。

### 腸球菌 Na<sup>+</sup>輸送性液胞型 ATPase の構造と機能

筆者らのグループは腸球菌 *Enterococcus hirae* Na<sup>+</sup>-ATPase のオペロン遺伝子をクローニングし、本酵素が真核細胞型の典型的な液胞型 ATPase (V-ATPase) であることを明らかにしてきた。本研究では、Na<sup>+</sup>-ATPase V<sub>0</sub> 部分のサブユニットである NtpI が *E. coli* F-ATPase などの a サブユニットに相当することを見出し、NtpI Arg-573 が F-type, V-type ATPase において保存された、イオン輸送に必須のアルギニン残基であることを明らかにした。また、Arg-573 と共にイオン輸送に関わる残基を部位特異的変異導入法により同定し、化学修飾試薬を用いたラベル実験により、Arg-573 周辺の膜貫通領域のトポロジーを決定した。変異により Na<sup>+</sup>-ATPase 活性に影響を与える残基は Arg-573 周辺に存在しており、この部位は NtpK ローター上のイオン結合部位 (Glu-139) と共同してイオン輸送に関与していると考えられる。

Na<sup>+</sup>共役型の V-ATPase の存在はこれまであまり知られていなかったが、近年 *Clostridium perfringens* をはじめ様々な細菌に Na<sup>+</sup>共役型 V-ATPase が存在することがわかってきた。連鎖球菌属においても V-ATPase は複数の種に分布している (Fig. 28)。Na<sup>+</sup>-ATPase の分布と耐塩性・耐アルカリ性などの性質とは直接関連するものではないが、その一因となりうるものであり、これら細菌の生態を理解する上で重要な情報であると考えられる。

以上のように、本研究により *E. hirae* Na<sup>+</sup>共役型 V-ATPase 及び NtpJ Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>輸送体の研究に、分子生物学的手法による構造・機能の解析法を導入することができた。特に Na<sup>+</sup>-ATPase については、現在結晶化構造解析などが進められており、*E. hirae* V-ATPase は、F-type, V-type ATPase における

エネルギー共役の仕組みの解明に構造・機能の両面から貢献できる系であると考え。本実験系を用いて、Na<sup>+</sup>共役型であるという特性を生かした V-ATPase イオン輸送機構の研究のさらなる進展が期待される。

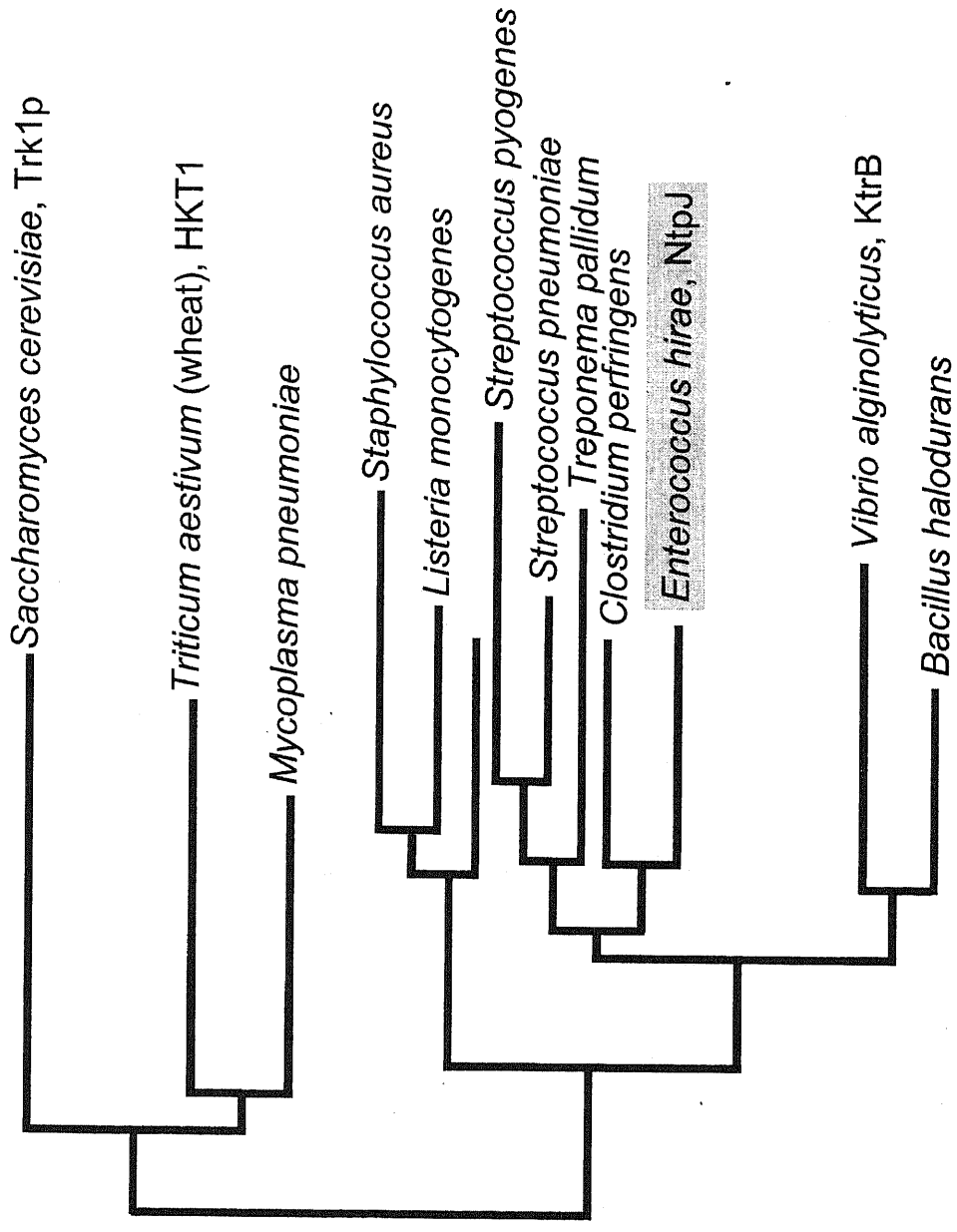
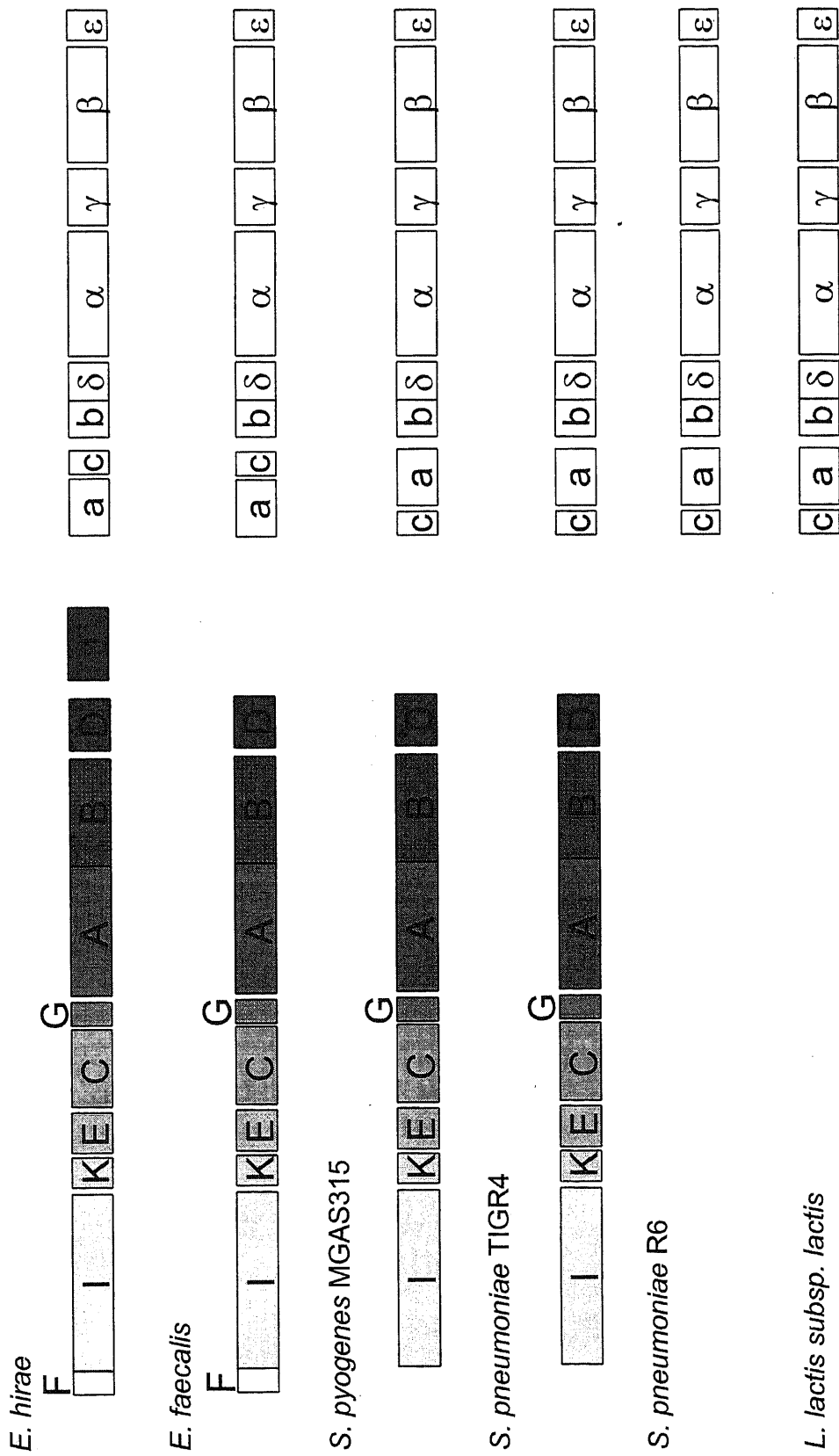


Fig. 27. Phylogenetic tree of the K<sup>+</sup> transporter family.



V-ATPase

F-ATPase

Fig. 28. Distribution of the *ntp* operon in the *Streptococci*.

## 略号

AMS	4-acetamido-4'-maleimidylstilbene-2, 2'-disulfonic acid
ATPase	adenosine triphosphatase
CCCP	carbonyl cyanide <i>m</i> -chlorophenylhydrazone
CHES	<i>N</i> -cyclohexyl-2-aminoethanesulfonic acid
DCCD	<i>N, N'</i> -dicyclohexylcarbodiimide
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
FUT-175	6-amino-2-naphthyl-1, 4-guanisinobenzoate
MPB	<i>N</i> <sup>α</sup> -(3-maleimidylpropionyl) biocytin
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
PCR	polymerase chain reaction
SDS	sodium dodecyl sulfate
TCA	trichloroacetic acid
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethane

## 謝辞

本研究を遂行するにあたり、終始御懇切なる御指導、御鞭撻を賜りました千葉大学大学院薬学  
研究院 五十嵐一衛教授、室蘭工業大学工学部 柿沼喜己教授に心より深謝致します。

また、数々の適切な御助言を頂きました、柏木敬子助教授、西村和洋助手に感謝致します。

本研究を行うにあたりご協力を頂きました病態生化学研究室の皆様心より感謝致します。

最後に、全てにおいて私の支えとなってくれた家族に心から感謝致します。

## 参考文献

1. Bakker, E.P., *Alkali cation transport systems in prokaryotes*. Boca Raton, FL: CRC.(1993)
2. Padan, E. and S. Schuldiner, *Na<sup>+</sup> transport systems in prokaryotes*. Alkali cation transport systems in prokaryotes, ed. E.P. Bakker. Boca Raton, FL: CRC. 3-24.(1993)
3. Rosen, B.P.: *Recent advances in bacterial ion transport*. Annu Rev Microbiol, **40**, 263-86 (1986)
4. Skulachev, V.P., *Membrane bioenergetics*. Berlin, Germany: Springer-Verlag. (1988)
5. Padan, E. and S. Schuldiner: *Molecular physiology of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporters, key transporters in circulation of Na<sup>+</sup> and H<sup>+</sup> in cells*. Biochim. Biophys. Acta, **1185**, 129-151 (1994)
6. Dimroth, P.: *Sodium ion transport decarboxylases and other aspects of sodium ion cycling in bacteria*. Microbiol Rev, **51**, 320-40. (1987)
7. Tokuda, H. and T. Unemoto: *Characterization of the respiration-dependent Na<sup>+</sup> pump in the marine bacterium Vibrio alginolyticus*. J. Biol. Chem., **257**, 10007-14. (1982)
8. Heefner, D.L. and F.M. Harold: *ATP-driven sodium pump in Streptococcus faecalis*. Proc Natl Acad Sci U S A, **79**, 2798-802. (1982)
9. Yamato, I. and Y. Anraku, *Na<sup>+</sup>/substrate symport in prokaryotes*. Alkali cation transport systems in prokaryotes, ed. Bakker. E. P. Boca Raton, FL: CRC. 53-76.(1993)
10. Imae, Y. and T. Atsumi: *Na<sup>+</sup>-driven bacterial flagellar motors*. J Bioenerg Biomembr, **21**, 705-16. (1989)
11. Kakinuma, Y.: *Inorganic cation transport and energy transduction in Enterococcus hirae and other streptococci*. Microbiol Mol Biol Rev, **62**, 1021-45. (1998)
12. Abrams, A., *The proton-translocating ATPase (F<sub>1</sub>F<sub>o</sub>) in Streptococcus faecalis*. Enzymes in biological membranes, 2nd ed., ed. A.N. Martonosi. Vol. 4. New York, NY: Plenum Press. 177-193.(1985)
13. Kakinuma, Y.: *Sodium/proton antiporter in Streptococcus faecalis*. J Bacteriol, **169**, 3886-90. (1987)
14. Waser, M., et al.: *Cloning and disruption of a putative NaH-antiporter gene of Enterococcus hirae*. J. Biol. Chem., **267**, 5396-400. (1992)
15. Kakinuma, Y., I. Yamato, and T. Murata: *Structure and function of vacuolar Na<sup>+</sup>-translocating ATPase in Enterococcus hirae*. J Bioenerg Biomembr, **31**, 7-14. (1999)
16. Kakinuma, Y. and K. Igarashi: *Sodium-translocating adenosine triphosphatase in Streptococcus faecalis*. J Bioenerg Biomembr, **21**, 679-92. (1989)
17. Bakker, E.P. and F.M. Harold: *Energy coupling to potassium transport in Streptococcus faecalis. Interplay of ATP and the protonmotive force*. J. Biol. Chem., **255**, 433-40. (1980)
18. Kobayashi, H.: *Second system for potassium transport in Streptococcus faecalis*. J Bacteriol, **150**, 506-11. (1982)
19. Kakinuma, Y. and F.M. Harold: *ATP-driven exchange of Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> ions by Streptococcus faecalis*. J. Biol. Chem., **260**, 2086-91. (1985)
20. Murata, T., et al.: *The ntpJ gene in the Enterococcus hirae ntp operon encodes a component of KtrII potassium transport system functionally independent of vacuolar Na<sup>+</sup>-ATPase*. J. Biol. Chem., **271**, 10042-7. (1996)



21. Jorgensen, P.L.: *Mechanism of the Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> pump. Protein structure and conformations of the pure (Na<sup>+</sup> K<sup>+</sup>)-ATPase.* Biochim Biophys Acta, **694**, 27-68. (1982)
22. Hidalgo, C.: *Lipid-protein interactions and the function of the Ca<sup>2+</sup>-ATPase of sarcoplasmic reticulum.* CRC Crit Rev Biochem, **21**, 319-47 (1987)
23. Sachs, G., et al.: *A nonelectrogenic H<sup>+</sup> pump in plasma membranes of hog stomach.* J. Biol. Chem., **251**, 7690-8. (1976)
24. Epstein, W., V. Whitelaw, and J. Hesse: *A K<sup>+</sup> transport ATPase in Escherichia coli.* J. Biol. Chem., **253**, 6666-8. (1978)
25. Futai, M., T. Noumi, and M. Maeda: *ATP synthase (H<sup>+</sup>-ATPase): results by combined biochemical and molecular biological approaches.* Annu Rev Biochem, **58**, 111-36 (1989)
26. Senior, A.E.: *The proton-translocating ATPase of Escherichia coli.* Annu Rev Biophys Biophys Chem, **19**, 7-41 (1990)
27. Mitchell, P.: *Coupling of phosphorylation of electron and hydrogen transfer by chemi-osmotic type of mechanism.* Nature, **191**, 144-148 (1961)
28. Harold, F.M., *A study of bioenergetics.* New York: Freeman. (1986)
29. Penefsky, H.S., et al.: *Partial resolution of the enzymes catalyzing oxidative phosphorylation.* J. Biol. Chem., **235**, 3330 (1960)
30. Kanazawa, H., et al.: *Specialized transducing phage lambda carrying the genes for coupling factor of oxidative phosphorylation of Escherichia coli: increased synthesis of coupling factor on induction of prophage lambda asn.* Proc Natl Acad Sci U S A, **76**, 1126-30. (1979)
31. Kanazawa, H., et al.: *Organization of unc gene cluster of Escherichia coli coding for proton-translocating ATPase of oxidative phosphorylation.* Proc Natl Acad Sci U S A, **77**, 7005-9. (1980)
32. Senior, A.E., S. Nadanaciva, and J. Weber: *The molecular mechanism of ATP synthesis by F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP synthase.* Biochim Biophys Acta, **1553**, 188-211. (2002)
33. Fillingame, R.H.: *Coupling H<sup>+</sup> transport and ATP synthesis in F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP synthases: glimpses of interacting parts in a dynamic molecular machine.* J Exp Biol, **200**, 217-24. (1997)
34. Boyer, P.D.: *A perspective of the binding change mechanism for ATP synthesis.* Faseb J, **3**, 2164-78. (1989)
35. Boyer, P.D.: *The binding change mechanism for ATP synthase--some probabilities and possibilities.* Biochim Biophys Acta, **1140**, 215-50. (1993)
36. Abrahams, J.P., et al.: *Structure at 2.8 Å resolution of F<sub>1</sub>-ATPase from bovine heart mitochondria.* Nature, **370**, 621-8. (1994)
37. Noji, H., et al.: *Direct observation of the rotation of F<sub>1</sub>-ATPase.* Nature, **386**, 299-302. (1997)
38. Hutcheon, M.L., et al.: *Energy-driven subunit rotation at the interface between subunit a and the c oligomer in the F<sub>0</sub> sector of Escherichia coli ATP synthase.* Proc Natl Acad Sci U S A, **98**, 8519-24. (2001)
39. Nishio, K., et al.: *Subunit rotation of ATP synthase embedded in membranes: a or beta subunit rotation relative to the c subunit ring.* Proc Natl Acad Sci U S A, **99**, 13448-52. (2002)

40. Kaim, G., U. Matthey, and P. Dimroth: *Mode of interaction of the single a subunit with the multimeric c subunits during the translocation of the coupling ions by F<sub>1</sub>F<sub>0</sub> ATPases.* EMBO J, **17**, 688-95. (1998)
41. Vik, S.B. and B.J. Antonio: *A mechanism of proton translocation by F<sub>1</sub>F<sub>0</sub> ATP synthases suggested by double mutants of the a subunit.* J. Biol. Chem., **269**, 30364-9. (1994)
42. Fillingame, R.H., W. Jiang, and O.Y. Dmitriev: *Coupling H<sup>+</sup> transport to rotary catalysis in F-type ATP synthases: structure and organization of the transmembrane rotary motor.* J Exp Biol, **203 Pt 1**, 9-17. (2000)
43. Dimroth, P., *et al.*: *Energy transduction in the sodium F-ATPase of Propionigenium modestum.* Proc Natl Acad Sci U S A, **96**, 4924-9. (1999)
44. Nelson, N. and L. Taiz: *The evolution of H<sup>+</sup>-ATPases.* Trends Biochem Sci, **14**, 113-6. (1989)
45. Nelson, N.: *Evolution of organellar proton-ATPases.* Biocim. Biophys. Acta, **1100**, 109-124 (1992)
46. Stevens, T.H. and M. Forgac: *Structure, function and regulation of the vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase.* Annu Rev Cell Dev Biol, **13**, 779-808 (1997)
47. Li, Y.P., *et al.*: *Atp6i-deficient mice exhibit severe osteopetrosis due to loss of osteoclast-mediated extracellular acidification.* Nat Genet, **23**, 447-51. (1999)
48. Karet, F.E., *et al.*: *Mutations in the gene encoding B1 subunit of H<sup>+</sup>-ATPase cause renal tubular acidosis with sensorineural deafness.* Nat Genet, **21**, 84-90. (1999)
49. Yokoyama, K., T. Oshima, and M. Yoshida: *Thermus thermophilus membrane-associated ATPase. Indication of a eubacterial V-type ATPase.* J. Biol. Chem., **265**, 21946-50. (1990)
50. Bowman, E.J., K. Tenney, and B.J. Bowman: *Isolation of genes encoding the Neurospora vacuolar ATPase. Analysis of vma-1 encoding the 67-kDa subunit reveals homology to other ATPases.* J. Biol. Chem., **263**, 13994-4001. (1988)
51. Parry, R.V., J.C. Turner, and P.A. Rea: *High purity preparations of higher plant vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase reveal additional subunits. Revised subunit composition.* J. Biol. Chem., **264**, 20025-32. (1989)
52. Moriyama, Y. and M. Futai: *H<sup>+</sup>-ATPase, a primary pump for accumulation of neurotransmitters, is a major constituent of brain synaptic vesicles.* Biochem Biophys Res Commun, **173**, 443-8. (1990)
53. Uchida, E., Y. Ohsumi, and Y. Anraku: *Purification and properties of H<sup>+</sup>-translocating, Mg<sup>2+</sup>-adenosine triphosphatase from vacuolar membranes of Saccharomyces cerevisiae.* J. Biol. Chem., **260**, 1090-5. (1985)
54. Heefner, D.L., H. Kobayashi, and F.M. Harold: *ATP-linked sodium transport in Streptococcus faecalis. II. Energy coupling in everted membrane vesicles.* J. Biol. Chem., **255**, 11403-7. (1980)
55. Heefner, D.L. and F.M. Harold: *ATP-linked sodium transport in Streptococcus faecalis. I. The sodium circulation.* J. Biol. Chem., **255**, 11396-402. (1980)
56. Kakinuma, Y. and K. Igarashi: *Some features of the Streptococcus faecalis Na<sup>+</sup>-ATPase resemble those of the vacuolar-type ATPases.* FEBS Lett, **271**, 97-101. (1990)
57. Takase, K., *et al.*: *Sequencing and characterization of the ntp gene cluster for vacuolar-type Na<sup>+</sup>-translocating ATPase of Enterococcus hirae.* J. Biol. Chem., **269**, 11037-44. (1994)
58. Ikegami, M., *et al.*: *Enterococcus hirae vacuolar ATPase is expressed in response to pH as well as*

- sodium. FEBS Lett, **454**, 67-70. (1999)
59. Murata, T., *et al.*: Intracellular Na<sup>+</sup> regulates transcription of the *ntp* operon encoding a vacuolar-type Na<sup>+</sup>-translocating ATPase in *Enterococcus hirae*. J. Biol. Chem., **271**, 23661-6. (1996)
  60. Fillingame, R.H., *Molecular mechanics of ATP synthesis by the F<sub>1</sub>F<sub>0</sub> type H<sup>+</sup> transporting ATP synthases*. The Bacteria. Vol. 12. 345-391.(1990)
  61. Takase, K., *et al.*: Indispensable glutamic acid residue-139 of NtpK proteolipid in the reaction of vacuolar Na<sup>+</sup>-translocating ATPase in *Enterococcus hirae*. Biosci Biotechnol Biochem, **63**, 1125-9. (1999)
  62. Murata, T., *et al.*: Na<sup>+</sup> binding of V-type Na<sup>+</sup>-ATPase in *Enterococcus hirae*. J. Biol. Chem., **275**, 13415-9. (2000)
  63. Harold, F.M. and Y. Kakinuma: Primary and secondary transport of cations in bacteria. Ann N Y Acad Sci, **456**, 375-83 (1985)
  64. Kakinuma, Y. and K. Igarashi: Mutants of *Streptococcus faecalis* sensitive to alkaline pH lack Na<sup>+</sup>-ATPase. J Bacteriol, **172**, 1732-5. (1990)
  65. Solioz, M. and M. Waser: Efficient electrotransformation of *Enterococcus hirae* with a new *Enterococcus-Escherichia coli* shuttle vector. Biochimie, **72**, 279-83. (1990)
  66. Kawano, M., K. Igarashi, and Y. Kakinuma: Two major potassium uptake systems, *KtrI* and *KtrII*, in *Enterococcus hirae*. FEMS Microbiol Lett, **176**, 449-453 (1999)
  67. Frere, J.: Simple method for extracting plasmid DNA from lactic acid bacteria. Lett Appl Microbiol, **18**, 227-9. (1994)
  68. Bakker, E.P.: Accumulation of thallos ions (Tl<sup>+</sup>) as a measure of the electrical potential difference across the cytoplasmic membrane of bacteria. Biochemistry, **17**, 2899-904. (1978)
  69. Kashket, E.R.: The proton motive force in bacteria: a critical assessment of methods. Annu Rev Microbiol, **39**, 219-42 (1985)
  70. Stock, J.B., B. Rauch, and S. Roseman: Periplasmic space in *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*. J. Biol. Chem., **252**, 7850-61. (1977)
  71. Murata, T., *et al.*: Purification and reconstitution of Na<sup>+</sup>-translocating vacuolar ATPase from *Enterococcus hirae*. J. Biol. Chem., **272**, 24885-90. (1997)
  72. Nakayama, T., *et al.*: Synthesis and structure-activity study of protease inhibitors. V. Chemical modification of 6-amidino-2-naphthyl 4-guanidinobenzoate. Chem Pharm Bull (Tokyo), **41**, 117-25. (1993)
  73. Futai, M., P.C. Sternweis, and L.A. Heppel: Purification and properties of reconstitutively active and inactive adenosinetriphosphatase from *Escherichia coli*. Proc Natl Acad Sci U S A, **71**, 2725-9. (1974)
  74. Kawano, M., K. Igarashi, and Y. Kakinuma: The Na<sup>+</sup>-responsive *ntp* operon is indispensable for homeostatis of K<sup>+</sup> and Na<sup>+</sup> in *Enterococcus hirae* at limited proton potential. J Bacteriol, **180**, 4942-5. (1998)
  75. Lowry, O.H.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem., **193**, 265-275 (1951)
  76. Laemmli, U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.

- Nature, **227**, 680-5. (1970)
77. Nielsen, P.J., *et al.*: *The phosphorylation of ribosomal protein S6 in rat tissues following cycloheximide injection, in diabetes, and after denervation of diaphragm. A simple immunological determination of the extent of S6 phosphorylation on protein blots.* J. Biol. Chem., **257**, 12316-21. (1982)
  78. Doyle, D.A., *et al.*: *The structure of the potassium channel: molecular basis of K<sup>+</sup> conduction and selectivity.* Science, **280**, 69-77. (1998)
  79. Kato, Y., *et al.*: *Evidence in support of a four transmembrane-pore-transmembrane topology model for the Arabidopsis thaliana Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> translocating AtHKT1 protein, a member of the superfamily of K<sup>+</sup> transporters.* Proc Natl Acad Sci U S A, **98**, 6488-93. (2001)
  80. Durell, S.R. and H.R. Guy: *Structural models of the KtrB, TrkH, and Trk1,2 symporters based on the structure of the KcsA K<sup>+</sup> channel.* Biophys J, **77**, 789-807. (1999)
  81. Durell, S.R., *et al.*: *Evolutionary relationship between K<sup>+</sup> channels and symporters.* Biophys J, **77**, 775-88. (1999)
  82. Durell, S.R., E.P. Bakker, and H.R. Guy: *Does the KdpA subunit from the high affinity K<sup>+</sup>-translocating P-type KDP-ATPase have a structure similar to that of K<sup>+</sup> channels?* Biophys J, **78**, 188-99. (2000)
  83. Diatloff, E., R. Kumar, and D.P. Schachtman: *Site directed mutagenesis reduces the Na<sup>+</sup> affinity of HKT1, an Na<sup>+</sup> energized high affinity K<sup>+</sup> transporter.* FEBS Lett, **432**, 31-6. (1998)
  84. Tholema, N., *et al.*: *Change to alanine of one out of four selectivity filter glycines in KtrB causes a two orders of magnitude decrease in the affinities for both K<sup>+</sup> and Na<sup>+</sup> of the Na<sup>+</sup> dependent K<sup>+</sup> uptake system KtrAB from Vibrio alginolyticus.* FEBS Lett, **450**, 217-20. (1999)
  85. Liang, H., *et al.*: *Trinucleotide insertions, deletions, and point mutations in glucose transporters confer K<sup>+</sup> uptake in Saccharomyces cerevisiae.* Mol Cell Biol, **18**, 926-35. (1998)
  86. Madrid, R., *et al.*: *Ectopic potassium uptake in trk1 trk2 mutants of Saccharomyces cerevisiae correlates with a highly hyperpolarized membrane potential.* J. Biol. Chem., **273**, 14838-44. (1998)
  87. Kakinuma, Y. and K. Igarashi: *Electrogenic Na<sup>+</sup> transport by Enterococcus hirae Na<sup>+</sup>-ATPase.* FEBS Lett, **359**, 255-8. (1995)
  88. Bakker, E.P., *et al.*: *Evidence for multiple K<sup>+</sup> export systems in Escherichia coli.* J Bacteriol, **169**, 3743-9. (1987)
  89. Nakamura, T., *et al.*: *KtrAB, a new type of bacterial K<sup>+</sup>-uptake system from Vibrio alginolyticus.* J Bacteriol, **180**, 3491-4. (1998)
  90. Bakker, E.P., *Low-affinity K<sup>+</sup> uptake systems.* Alkali cation transport systems in prokaryotes., ed. E.P. Bakker. Boca Raton, FL: CRC. 253-276.(1993)
  91. Kakinuma, Y. and K. Igarashi: *Potassium/proton antiport system of growing Enterococcus hirae at high pH.* J Bacteriol, **177**, 2227-9. (1995)
  92. Kakinuma, Y. and K. Igarashi: *Active potassium extrusion regulated by intracellular pH in Streptococcus faecalis.* J. Biol. Chem., **263**, 14166-70. (1988)
  93. Kawano, M., *et al.*: *Evidence for Na<sup>+</sup> influx via the NtpJ protein of the KtrII K<sup>+</sup> uptake system in Enterococcus hirae.* J Bacteriol, **182**, 2507-12. (2000)

94. Kakinuma, Y., *K<sup>+</sup> transport in Enterococcus hirae*. Alkali cation transport systems in prokaryotes, ed. E.P. Bakker. Boca Raton, FL: CRC. 277-290.(1993)
95. Kawano, M., K. Igarashi, and Y. Kakinuma: *Isolation of Enterococcus hirae mutant deficient in low-affinity potassium uptake at alkaline pH*. Biosci Biotechnol Biochem, **66**, 1597-600. (2002)
96. Kakinuma, Y., *et al.*: *A gene encoding the 16-kDa proteolipid subunit of Enterococcus hirae Na<sup>+</sup>-ATPase complex*. Biochem Biophys Res Commun, **195**, 1063-9. (1993)
97. Angevine, C.M. and R.H. Fillingame: *Aqueous access channels in subunit a of rotary ATP synthase*. J. Biol. Chem., **6**, 6 (2002)
98. Takase, K., *et al.*: Abstracts of the 71st Annual Meeting of the Japan Biochemical Society, Nagoya, Japan, October 14-17, 1999 (1998)
99. Lill, R., *et al.*: *SecA protein hydrolyzes ATP and is an essential component of the protein translocation ATPase of Escherichia coli*. EMBO J, **8**, 961-6. (1989)
100. Kakinuma, Y. and K. Igarashi: *Release of the component of Streptococcus faecalis Na<sup>+</sup>-ATPase from the membranes*. FEBS Lett, **271**, 102-5. (1990)
101. Murata, T., *et al.*: *Properties of the V<sub>0</sub>V<sub>1</sub> Na<sup>+</sup>-ATPase from Enterococcus hirae and its V<sub>0</sub> moiety*. J Biochem (Tokyo), **125**, 414-21. (1999)
102. Long, J.C., S. Wang, and S.B. Vik: *Membrane topology of subunit a of the F<sub>1</sub>F<sub>0</sub> ATP synthase as determined by labeling of unique cysteine residues*. J. Biol. Chem., **273**, 16235-40. (1998)
103. Wada, T., *et al.*: *A novel labeling approach supports the five-transmembrane model of subunit a of the Escherichia coli ATP synthase*. J. Biol. Chem., **274**, 17353-7. (1999)
104. Leng, X.H., T. Nishi, and M. Forgac: *Transmembrane topography of the 100-kDa a subunit (Vph1p) of the yeast vacuolar proton-translocating ATPase*. J. Biol. Chem., **274**, 14655-61. (1999)
105. Ferretti, J.J., *et al.*: *Complete genome sequence of an M1 strain of Streptococcus pyogenes*. Proc Natl Acad Sci U S A, **98**, 4658-63. (2001)
106. Tettelin, H., *et al.*: *Complete genome sequence of a virulent isolate of Streptococcus pneumoniae*. Science, **293**, 498-506. (2001)
107. Bult, C.J., *et al.*: *Complete genome sequence of the methanogenic archaeon, Methanococcus jannaschii*. Science, **273**, 1058-73. (1996)
108. Smith, D.R., *et al.*: *Complete genome sequence of Methanobacterium thermoautotrophicum deltaH: functional analysis and comparative genomics*. J Bacteriol, **179**, 7135-55. (1997)
109. Honer zu Bentrup, K., *et al.*: *An Na<sup>+</sup>-pumping V<sub>1</sub>V<sub>0</sub>-ATPase complex in the thermophilic bacterium Clostridium fervidus*. J Bacteriol, **179**, 1274-9. (1997)
110. Manolson, M.F., *et al.*: *The VPH1 gene encodes a 95-kDa integral membrane polypeptide required for in vivo assembly and activity of the yeast vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase*. J. Biol. Chem., **267**, 14294-303. (1992)
111. Kawasaki-Nishi, S., T. Nishi, and M. Forgac: *Arg-735 of the 100-kDa subunit a of the yeast V-ATPase is essential for proton translocation*. Proc Natl Acad Sci U S A, **98**, 12397-402. (2001)
112. Valiyaveetil, F.I. and R.H. Fillingame: *On the role of Arg-210 and Glu-219 of subunit a in proton translocation by the Escherichia coli F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATP synthase*. J. Biol. Chem., **272**, 32635-41. (1997)

113. Zhang, J., M. Myers, and M. Forgac: *Characterization of the  $V_0$  domain of the coated vesicle  $H^+$ -ATPase*. J. Biol. Chem., **267**, 9773-8. (1992)
114. Murata, T., Y. Kakinuma, and I. Yamato: *ATP-dependent affinity change of  $Na^+$ -binding sites of  $V$ -ATPase*. J. Biol. Chem., **276**, 48337-40. (2001)
115. Hatch, L.P., G.B. Cox, and S.M. Howitt: *The essential arginine residue at position 210 in the alpha subunit of the Escherichia coli ATP synthase can be transferred to position 252 with partial retention of activity*. J. Biol. Chem., **270**, 29407-12. (1995)
116. Dimroth, P.: *Operation of the  $F_0$  motor of the ATP synthase*. Biochim Biophys Acta, **1458**, 374-86. (2000)
117. Oster, G., H. Wang, and M. Grabe: *How  $F_0$ -ATPase generates rotary torque*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, **355**, 523-8. (2000)
118. Oster, G. and H. Wang: *Reverse engineering a protein: the mechanochemistry of ATP synthase*. Biochim Biophys Acta, **1458**, 482-510. (2000)

## 主論文目録

本学位論文内容は下記の発表論文による。

1. Kawano, M., Abuki, R., Igarashi, K., and Kakinuma, Y.  
Evidence for Na<sup>+</sup> influx via the NtpJ protein of the KtrII K<sup>+</sup> uptake system in *Enterococcus hirae*.  
*J. Bacteriol.* 182, 2507-2512 (2000)
2. Kawano, M., Abuki, R., Igarashi, K., and Kakinuma, Y.  
Potassium uptake with low affinity and high rate in *Enterococcus hirae* at alkaline pH. *Arch. Microbiol.* 175, 41-45 (2001)
3. Kawano, M., Igarashi, K., Yamato, I., and Kakinuma, Y.  
Arginine residue at position 573 in *Enterococcus hirae* vacuolar-type ATPase NtpI subunit plays a crucial role in Na<sup>+</sup> translocation. *J. Biol. Chem.* 277, 24405-24410 (2002)

本学位論文の審査は千葉大学大学院薬学研究院で指名された下記の審査委員により行われた。

主査	千葉大学教授 (薬学研究院)	薬学博士	五十嵐一衛
副査	千葉大学教授 (薬学研究院)	薬学博士	小林弘
副査	千葉大学教授 (薬学研究院)	薬学博士	斎藤和季
副査	千葉大学教授 (薬学研究院)	薬学博士	山口直人
副査	千葉大学教授 (薬学研究院)	医学博士・薬学博士	山本友子