

9734 液胞型ナトリウムポンプの耐塩性における生理作用とその遺伝子発現制御

助成研究者：柿沼 喜己 (千葉大学 薬学部)
 共同研究者：山登 一郎 (東京理科大学 基礎工学部)
 目黒 俊幸 (東京理科大学 基礎工学部)

申請者らは、腸内連鎖球菌 *Enterococcus hirae* には液胞型のナトリウムポンプ (Vacuolar Na⁺-ATPase) が機能していることを、生化学的・分子生物学的解析により明らかにした。Na⁺-ATPaseは約11 kbの大きさを10個のシストロンから構成されるオペロン *ntpFIKECGABD(H)*によってコードされている。一方、高アルカリpH(pH 11)や高塩濃度 (6.5% NaCl) に対して顕著な耐性を示すことが、連鎖球菌の中での本菌の分類学的特徴として知られている。*ntp*オペロンが本菌の高塩・高アルカリ環境での細胞内Na⁺、K⁺濃度調節系の中核として機能する可能性を検討した。

プロトンの電気化学的ポテンシャル差 (Proton motive force) の形成を抑えるためにプロトノフォアであるCCCPを添加すると、Proton motive forceに駆動される細胞内へのK⁺の蓄積が行われず、本菌の生育が損なわれた。このCCCP存在下にNaClを添加することにより生育の回復が観察された。生育のNa⁺依存性はH⁺-ATPase欠損変異株をCCCP非存在下で培養した場合においても顕著に観察された。培地のNa⁺濃度の上昇に従って細胞内K⁺レベルが上昇しており、K⁺蓄積におけるNa⁺依存性が明らかとなった。さらにProton motive force非形成下における生育のNa⁺依存性は、Na⁺-ATPaseの各サブユニット遺伝子の破壊株、さらにはオペロン末端のProton motive forceに依存しないK⁺輸送系KtrIIをコードする*ntp*遺伝子の破壊株では観察されず、Na⁺-ATPase及びKtrII系の両機能が重要であることを示している。CATをレポーターとした*ntp*プロモーター発現プラスミッドをNa⁺排出活性が完全に欠損している変異株に導入し、培地Na⁺濃度等の影響を調べた。比較的低濃度のNa⁺に対してプロモーター活性の著しい上昇が観察された。*ntp*プロモーターはNa⁺に特異的であり、Li⁺に対して全くレスポンスを示さなかった。

以上の結果は、Na⁺-ATPase及び*ntp*オペロンの働きは、耐塩性及び耐アルカリ性が中心であるが、Proton motive forceが形成されない条件ではNa⁺に対して特異的に誘導されるこのオペロンがK⁺の蓄積など本菌の生理に極めて重要な働きをしていること示している。

9734 液胞型ナトリウムポンプの耐塩性における生理作用とその遺伝子発現制御

助成研究者：柿沼 喜己 (千葉大学 薬学部)
 共同研究者：山登 一郎 (東京理科大学 基礎工学部)
 目黒 俊幸 (東京理科大学 基礎工学部)

1. 研究目的

*Enterococcus hirae*は、日和見感染など深刻な病理的問題を引き起こす腸内連鎖球菌である。申請者は、この真正細菌に液胞型のナトリウムポンプ (Vacuolar Na⁺-ATPase) が機能していることを、生化学的・分子生物学的解析により明らかにした。液胞型ATPaseは動物細胞等の各種酸性オルガネラに分布し、プロトンポンプとして機能するATPaseであり、ナトリウムポンプの液胞ATPaseは世界で最初の発見である。Na⁺-ATPaseは約11 kbの大きさと10個のシストロンから構成されるオペロン*ntpFIKECGABD(H)*によってコードされていた。一方、高アルカリpH(pH 11)や高塩濃度(6.5% NaCl)に対して顕著な耐性を示すことが、本菌の分類学的特徴として知られている。申請者は、このような環境下で細胞内Na⁺濃度調節を行うことが液胞Na⁺-ATPaseの生理的役割の一つであると考えている。さらに、本酵素オペロン末端遺伝子*ntpJ*が、K⁺能動輸送系KtrIIの膜たんぱく質をコードしていることを示し、この*ntp*オペロンが本菌の高塩・高アルカリ環境での細胞内Na⁺、K⁺濃度調節系の中核であることを明らかにしつつある。Na⁺-ATPaseの活性発現に関する特徴として、本酵素はconstitutiveではなくinducibleであり、その酵素量が培地のNa⁺濃度・pHなどに影響を受けることを、精製Na⁺-ATPaseに対する抗体を用いたウエスタンブロット法、ノーザンブロット法等により見い出している。

本研究は腸内連鎖球菌の耐塩性に密接に関連するNa⁺-ATPase(*ntp*)オペロンの生理作用とそのNa⁺濃度等による発現制御メカニズムを解明することを目的とする。

2. 研究方法

2.1 生物材料

腸内連鎖球菌*Enterococcus hirae* ATCC9790株及びこの菌株を親株とする各種変異株、WD4 (NapA Na⁺/H⁺ antiporter遺伝子の破壊株)、Nak1 (Na⁺-ATPaseのAサブユニット遺伝子に対するpoint mutant)、AS25 (F₀F₁H⁺-ATPaseのpoint mutant) JEM2 (*ntp*オペロン末端の*ntp*遺伝子の破壊株)、7683 (Na⁺-ATPaseとNapA Na⁺/H⁺ antiporter両遺伝子のdouble mutant)を用いた。

2.2 培養

栄養培地であるNaTY培地 (10g of Bacto tryptone, 5g of Bacto yeast extract, 8.5g of Na₂HPO₄ and 10g of glucose, per liter) 及びKTY培地 (NaTY培地のNa₂HPO₄の代わりに

10g of K_2HPO_4 を加えたもの)、完全合成培地であるTrisM培地(1)を用いた。菌の生育は540nmの吸収によりその濁度を測定した。

2.3 Na^+ 輸送活性の測定

それぞれの培地で培養した菌を対数増殖中期で集菌し、2mM $MgSO_4$ で2回洗浄した。その後、400 mM KClを含む緩衝液に懸濁し、20 mM $^{22}NaCl$ を添加して、室温で少なくとも1時間以上incubateすることにより細胞内に $^{22}Na^+$ を負荷した。10mM グルコースを添加することにより輸送反応を開始し、一定の時間間隔でサンプリングし、菌の懸濁液をフィルター(酢酸セルロースフィルター; ポアサイズ0.45 μ m)上に集め、菌の懸濁液に用いた緩衝液で2回フィルターを洗浄した。フィルター上の ^{22}Na 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。イオノフォアなどを添加する場合は、グルコース添加する5分前に添加した。

2.4 CATをレポーターとした ntp プロモーター発現プラスミッドの作製

全 ntp オペロンを有するコスミッドpKAZ119より、プロモーター領域Pntpから初発遺伝子である $ntpF$ 領域を含むEcoRI/HindIII 500 bp断片を切り出し、pHY300PLK(大腸菌とenterococciとのシャトルベクター)に導入した(5.3 kb pHEex)。Pntpの下流にあるBamHI、XbaI部位にレポーターとしてCAT(Chloramphenicol acetyltransferase)遺伝子を導入するためにBamHI、XbaI部位を入れたCAT遺伝子をPCR法により増幅し、pHEexに連結した(pHEexCAT)。このプラスミッドを Na^+ 排出活性の完全に欠損している株7683にelectroporation法によって導入した。を法により測定した。Pntpの発現は、細胞粗抽出画分中のCAT活性及び精製 Na^+ -ATPaseに対して作製した抗体により免疫化学的に確認した。

3. 研究結果

3.1 Na^+ 排出における Na^+ -ATPaseの役割

本菌の Na^+ 排出系としては、 Na^+ -ATPaseだけではなく Na^+/H^+ antiporterも存在することをすでに示しており、その遺伝子もクローニングされている。 Na^+/H^+ antiporterは細胞膜を介するプロトンの電気化学的ポテンシャル差(いわゆるProton motive force)を駆動力として Na^+ を細胞外へ排出する。本菌は呼吸系が機能していない発酵性の細菌であり、好気的細菌においてATP合成酵素として働く $F_0F_1H^+$ -ATPaseがプロトンポンプとして機能し、細胞内のプロトンを排出してProton motive forceを形成する。注目すべきはこのプロトンポンプは至適pHが酸性側にあり、酸性環境のみで機能することである。pH 9-10などの高アルカリ環境ではProton motive forceが充分には形成されないことをすでに明らかにしている。従って、本菌の耐塩性、すなわち Na^+ の排出は酸性環境では Na^+/H^+ antiporterによる働き、高アルカリ環境では Na^+ -ATPaseによる分別された生理機能が推定される。 Na^+/H^+ antiporterをコードする $napA$ 遺伝子の破壊株WD4株の生育に及ぼす培地pHによる影響を調べた(Fig. 1)。培地は約100 mM Na^+ を含む培地である。親株であるATCC 9790

株がpH5から10に至る広いpH領域で生育するのに対して、WD4株も全体に生育速度は遅いものの、酸性条件でも充分生育可能であることがわかった。同様の生育速度はWD4をNa⁺欠乏培地で培養した場合にも観察され、このことはNapA antiporterは本菌の耐塩性に必ずしも必須ではないことを示している。*Escherichia coli*あるいは*Bacilli*において複数のNa⁺/H⁺ antiporterが機能していることが明らかにされており、NapAに代替するantiporterが酸性条件で機能している可能性が考えられた。そこでNa⁺欠乏培地で培養した場合、すなわちNa⁺-ATPaseの発現が抑制されている条件におけるNa⁺の排出活性を観察した(Fig. 2)。親株の9790で観察されるNa⁺/H⁺ antiporterによるNa⁺排出活性(Proton motive forceの形成をプロトノフォア添加などで抑えると阻害されるNa⁺排出)が観察されるのに対して(Fig. 2A)、WD4株ではNa⁺排出はほとんど観察されなかった(Fig. 2B)。一方、酸性条件下でわずかながら培地のNa⁺濃度(10mM程度)を上昇させた場合、野生株9790においてProton motive forceに依存しないNa⁺排出活性、すなわちNa⁺-ATPaseによるNa⁺排出が観察された(Fig. 2C)。以上の結果は、本菌にはNa⁺/H⁺ antiporterが複数機能しているわけではなく、またNapAが機能的に存在するにもかかわらず、Na⁺-ATPaseの誘導により、本菌ではNa⁺排出が優先的に行われることを示している。一方Na⁺-ATPaseの欠損変異株Nak1(Na⁺-ATPaseのAサブユニット遺伝子のpoint mutant)は高アルカリ条件では生育できないが(Fig. 1)、酸性環境では500 mM NaClの高塩条件でも生育が可能であり(2)、この場合細胞内のNa⁺濃度レベルはNa⁺/H⁺ antiporterの働きによって維持されていることがわかる。以上の結果は本菌の耐塩性に関わるNa⁺の排出はNa⁺-ATPaseを中心に行われており、Na⁺/H⁺ antiporterはあくまで補助的な役割を担っていることを示している(3)。

3.2 *ntp*オペロンの生理作用

本菌はNa⁺欠乏培地(1 mM以下)の条件でも生育可能であり、Na⁺が必ずしも本菌の生理に必須ではないことが指摘されている。しかしながら注目されるのはNa⁺-ATPase operonはその末端シストロンとしてProton motive forceに依存しないK⁺輸送系KtrIIの輸送たんぱく質をコードする*ntpJ*を含んでいることである。このことはNa⁺-ATPaseオペロンの発現は単にNa⁺の排出、耐塩性に関与してだけでなく、細胞内K⁺濃度調節にも密接に関連していると考えられる。Na⁺-ATPaseの欠損株はアルカリ条件では、培地Na⁺濃度の高い条件では生育できない。このことは駆動力としてのProton motive forceの形成との関わり合いが予想され、*ntp*オペロンはProton motive forceが充分形成されない条件下でのNa⁺、K⁺濃度調節系としての働きが推定される。Na⁺欠乏の完全合成培地を用いて、生育のNa⁺依存性を調べた(Fig. 3)。野生株は1mM以下のNa⁺、低濃度K⁺(10 mM)条件でも細胞内に約400 mM程度のK⁺を蓄積し、充分生育が見られた。Proton motive forceの形成を抑えるためにプロトノフォアであるCCCPを添加すると、細胞内へのK⁺の蓄積が抑えられ、生育が損なわれた(Fig. 3A)。このCCCP存在下にNaClを添加することにより本菌の生育の回復が観

察された。Proton motive forceが形成されない条件下での生育のNa⁺依存性はH⁺-ATPase欠損変異株をCCCP非存在下で培養した場合においても顕著に観察された (Fig. 3B)。培地のNa⁺濃度の上昇に従って細胞内K⁺レベルが上昇しており、K⁺蓄積における培地Na⁺依存性が明らかである (Fig. 3C)。さらにProton motive force非形成下における生育のNa⁺依存性は、Na⁺-ATPaseの各サブユニット遺伝子の破壊株、さらには*ntpJ*(KtrII) 遺伝子の破壊株では観察されず、Na⁺-ATPase及びKtrI系の働きが重要であることを示している (Fig. 4)。いずれの場合も、培地に高濃度のK⁺を添加することにより生育は回復した。

以上の結果は、Proton motive force形成下でのNa⁺-ATPaseオペロンの働きが耐塩性及び耐アルカリ性にに基づくNa⁺排出が中心であるのに対して、Proton motive forceが形成されない条件下では細胞内のK⁺濃度の調節にあり、*ntp*オペロンが極めて本菌の生理に重要な働きをしていること示している。

3.3 *ntp*オペロン発現調節

環境適応機構として ntp オペロンの発現調節がどのような仕組みで行われているかを明らかにする手始めとして、CAT活性を指標として ntp プロモーター活性に対する外部環境の影響を調べた。特に細胞内のNa⁺の作用が重要と考えられ、pHEexCATをNa⁺排出活性が完全に欠損している変異株7683に導入し、培地Na⁺濃度等の影響を調べた。結果として、培地Na⁺に対しては比較的低濃度の条件でプロモーター活性の著しい上昇が観察された。しかしながらLi⁺に対して全くレスポンスを示さず、予想以上にNa⁺に特異的であることがわかった (Fig. 5)。

4. 考察

NapA遺伝子の発現も培養条件により影響され、Na⁺、Li⁺濃度の高い条件でその発現が著しいことがNorthern blottingなどによって知られている。しかしながら以上の結果は、Na⁺/H⁺ antiporter遺伝子の発現よりもNa⁺-ATPaseオペロン遺伝子の発現の方がNa⁺濃度変化により好感度に対応しており、細胞内Na⁺に対する好感度のセンサーが働いている可能性を示している。Na⁺-ATPaseは輸送イオンとしてNa⁺及びLi⁺に対して同様の親和性を有することを、精製酵素標品によるATP加水分解活性、及びその輸送活性より明らかにしている。輸送系本体がNa⁺/Li⁺いずれにも特異性を有するのにも、その遺伝子の発現に関してはNa⁺に特異的であることは、Na⁺よりもむしろLi⁺のほうが細胞毒性が高い事実を考えると興味深い。一方、Na⁺イオンが共役イオンとして他の多くの輸送系と連関して循環する生理作用が期待されるのに対して、毒性の高いLi⁺は共役イオンとしての働きは考えにくいことを反映しているのかもしれない(4)。

5. 今後の課題

*ntp*オペロン発現に関わる調節遺伝子、Na⁺センサーたんぱく質をコードする遺伝子のクローニングが急務の課題である。上述の結果、すなわち*ntp*オペロンの発現がNa⁺に対して特異的であることは、アルカリ環境ではLi⁺に対する毒性がオペロンが発現しない限り回避できないことを示している。逆に言えば、Li⁺毒性を回避できる変異株の中にはセンサー蛋白のイオン特異性が変化したものが含まれることが予想される。センサー蛋白の変異株の単離を期待して、現在Na⁺-ATPaseの発現量をウェスタンブロットで確認しながら現在Li⁺耐性株の単離を試みている。一方、プロモーター上流の転写制御に関わるDNA配列に対するアフィニティーカラムクロマトグラフィーやSouthwestern法等により、直接調節に関わるDNA結合蛋白質の同定・精製を試みる予定である。

6. 文献

- (1) Kawano, M., Igarashi, K., and Y. Kakinuma (1998) The Na⁺-Responsive *ntp* Operon is Indispensable for Homeostasis of K⁺ and Na⁺ in *Enterococcus hirae* at Limited Proton Potential. J. Bacteriol. in press.
- (2) Kakinuma, Y., and K. Igarashi (1990) Mutants of *Streptococcus faecalis* sensitive to alkaline pH lack Na⁺-ATPase. J. Bacteriol. 172: 1732-1735.
- (3) Kawano, M., Igarashi, K., Solioz, M., and Y. Kakinuma (1998) NapA Na⁺/H⁺ Antiporter as the Supplementary Sodium Extrusion System of the Vacuolar Na⁺-ATPase in *Enterococcus hirae*. submitted.
- (4) Kakinuma, Y. (1998) Inorganic cation transport and energy transduction in *Enterococcus hirae* and other streptococci. Microbiology and Molecular Biology Reviews in press.

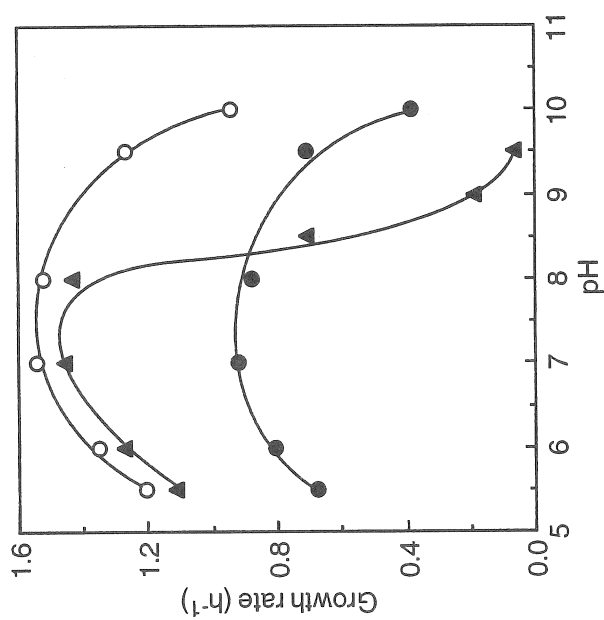


Fig. 1. Effect of medium pH on the growth rates of some *E. hirae* strains. Cells were grown at 37 °C on NaTY complex medium, and growth rates were determined as described in text. Symbols: ○, 9790; ▲, Nak1 (Na⁺-ATPase mutant); ●, WD4 (napA-disrupted mutant).

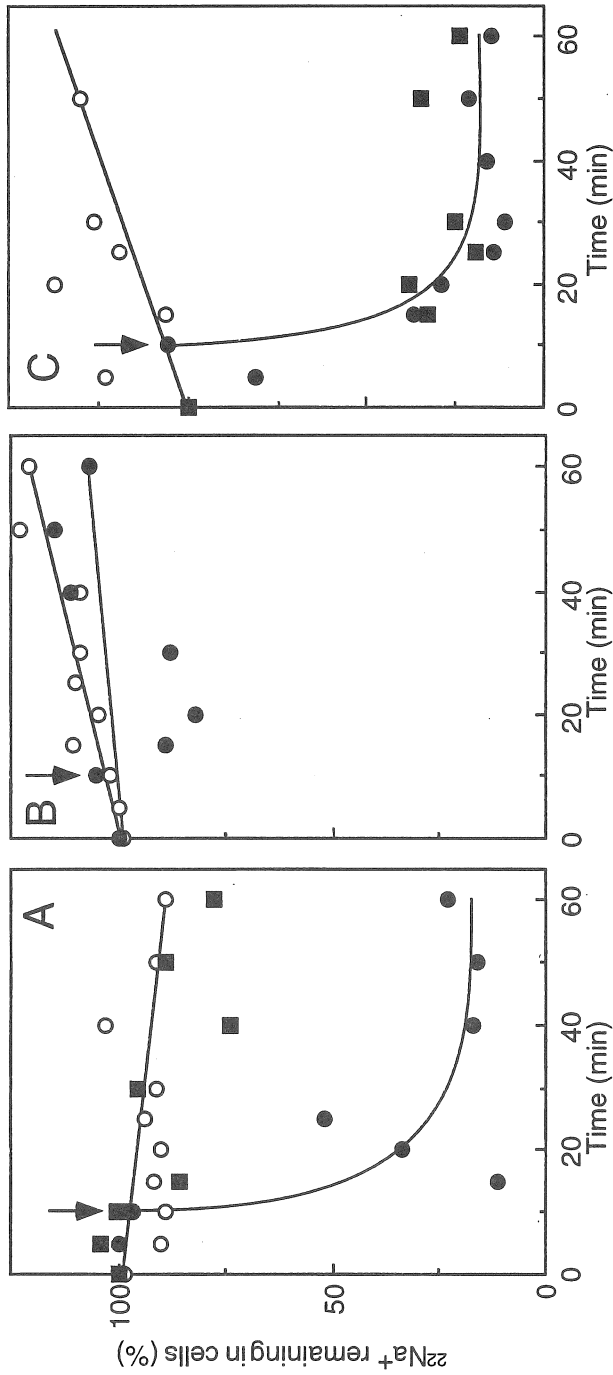


Fig. 2. Sodium extrusion from the *E. hirae* cells. Washed cells were suspended at 2 mg protein per ml in 50 mM Tris-maleate buffer (pH 7.5) containing 200 mM KCl. 20 mM $^{22}\text{NaCl}$ (34 GBq/mol) was then added and the suspension was incubated at 25 °C for 60 min. The suspension was divided into aliquots with additions as follows; ○, without glucose; ●, 10 mM glucose at 10 min; ■, 10 μM CCCP and 10 μM valinomycin at 0 min and glucose at 10 min. A, 9790 grown in Na^+ -deficient medium; B, WD4 grown in Na^+ -deficient medium; C, 9790 grown in low Na^+ (10mM) medium.

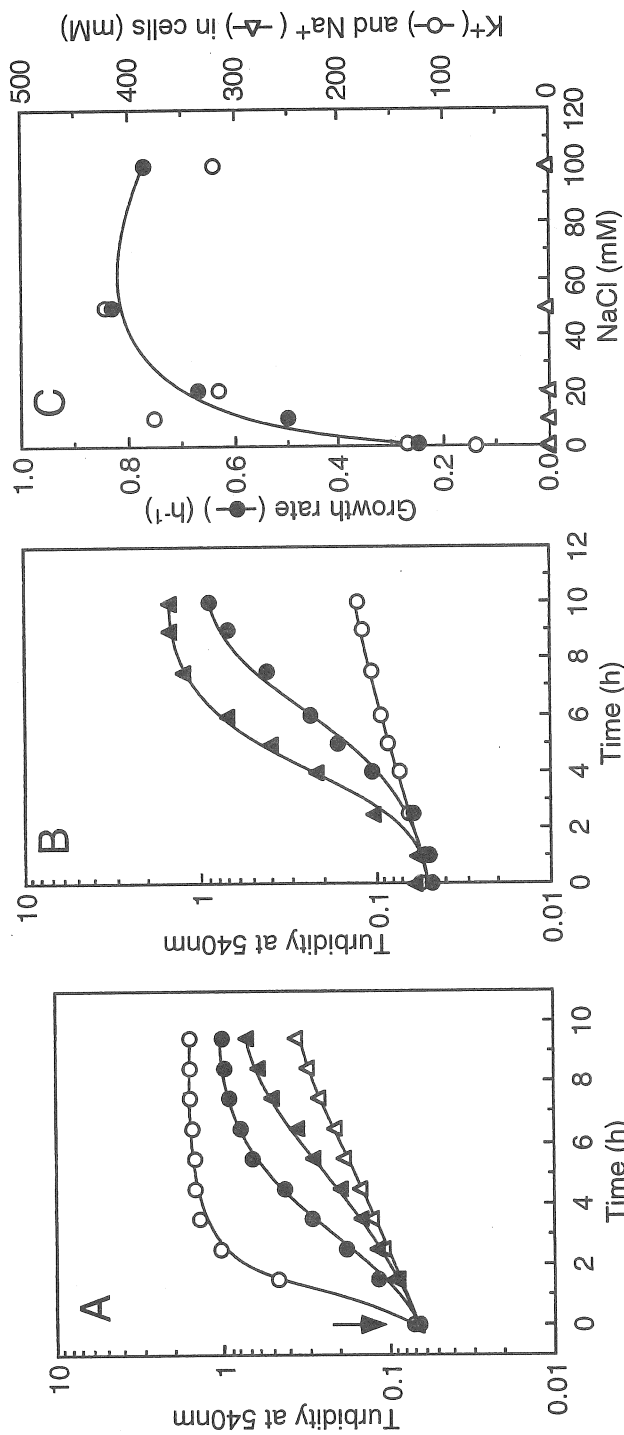


Fig. 3. Growth of *E. hirae* in a defined medium. A. Effect of CCCP on the growth of 9790 in TrisM medium. CCCP (50 μ M), KCl (200 mM) and/or NaCl (200 mM) was added to cell culture at $OD_{540}=0.1$, and cell growth was monitored by the optical density at 540 nm. Symbols: ○, control; ▲, plus CCCP; ●, plus CCCP and KCl; ▲, plus CCCP and NaCl. B. Effect of KCl or NaCl on the growth of AS25. KCl (200 mM) or NaCl (200 mM) was added to cell culture at $OD_{540}=0.05$, and cell growth was monitored. Symbols: ○, control; ●, plus KCl; ▲, plus NaCl. C. Effect of NaCl on the growth rates (l) and the internal levels of K⁺ (m) and Na⁺ (Δ) of AS25. Cells were harvested at middle logarithmic phase and washed, and the contents of K⁺ and Na⁺ was then determined by atomic absorption spectrophotometer.

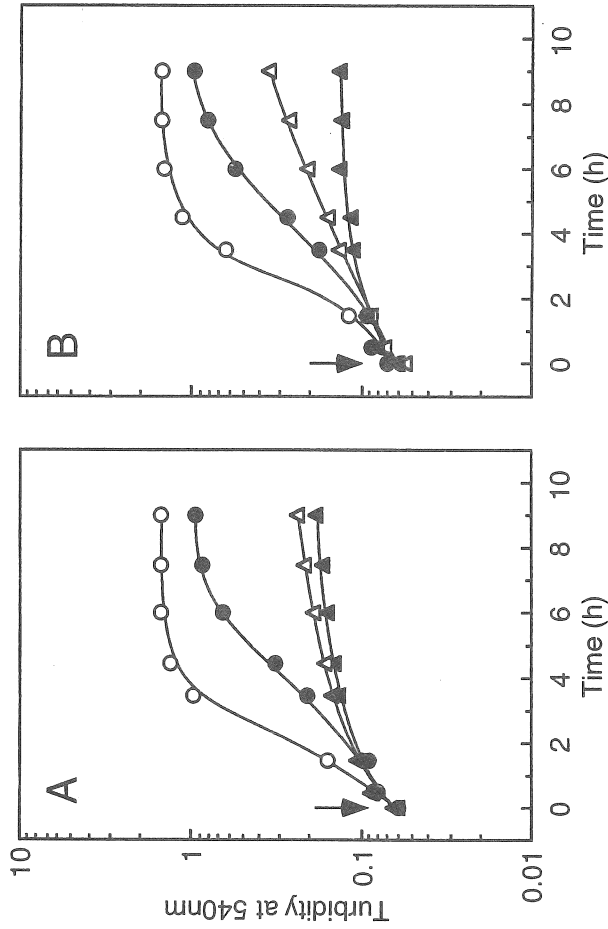


Fig. 4. Effect of CCCP on the growth of strain JEM2 (A) and Nak1 (B) in TrisM medium. CCCP (50 μ M), KCl (200 mM) and/or NaCl (200 mM) was added to cell culture at $OD_{540}=0.1$. Symbols: O, control; Δ , plus CCCP; \bullet , plus CCCP and KCl; \blacktriangle , plus CCCP and NaCl.

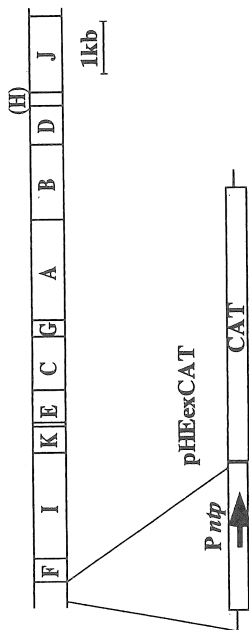
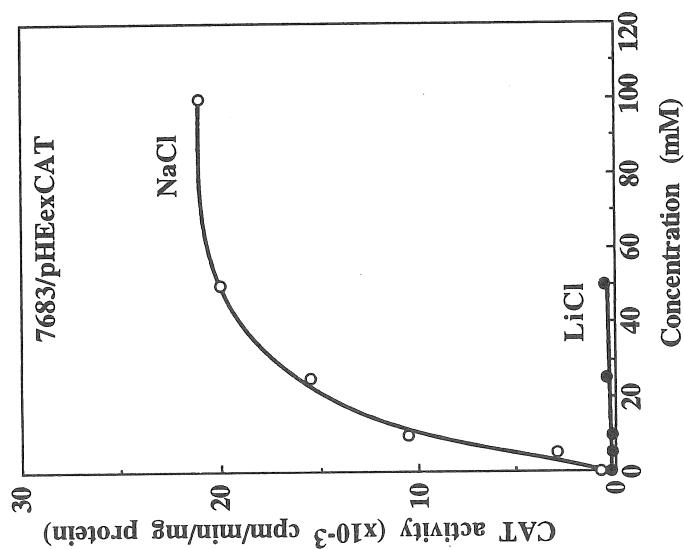


Fig. 5. Sodium-specific response of the *ntp* promoter activity. Strain 7683/pHEexCAT was grown in TrisM synthetic medium supplemented with various concentrations of NaCl or LiCl. Cells were harvested at late logarithmic phase, and the CAT activity of total cell lysates was measured as described elsewhere.

Physiology and regulation of vacuolar sodium pump of *Enterococcus hirae*

Yoshimi Kakinuma

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chiba University

Ichiro Yamato and Toshiyuko Meguro

Department of Biological Science and Technology, Science University of
Tokyo

Our biochemical and molecular biological studies have revealed that a vacuolar sodium-translocating ATPase functions in *Enterococcus hirae*. The sodium ATPase is encoded by an 11-kb *ntp* operon: *ntpFIKECGABD(H)J*. Enterococci are extremely tolerant to high pH and high salt among streptococci. We here examined the significance of the *ntp* operon in homeostasis of Na⁺ and K⁺ ions of this bacterium under these severe environments. Potassium accumulation via the proton motive force-dependent potassium transport system KtrI was inhibited by a protonophore such as CCCP. The growth of this bacterium was also inhibited by CCCP in a K⁺-limited medium. However, even in the presence of CCCP, the cell growth was recovered by addition of NaCl in media. Sodium-dependent growth was also observed by the F₀F₁, H⁺-ATPase mutant AS25 in the absence of CCCP, and the internal K⁺ level was recovered by increasing the external Na⁺, suggesting that Na⁺ circulation is important for K⁺ accumulation of this bacterium at the limited proton motive force. Sodium-dependent growth was not observed by the mutants defective in the Na⁺-ATPase subunits or the NtpJ K⁺ transporter KtrII which is independent of the proton motive force. Finally, the promoter activity of the *ntp* operon was examined in various culture conditions with a plasmid harboring the fragment of the *ntp* promoter region linked with the CAT gene as reporter. The *ntp* promoter is specifically responsive to Na⁺ but not Li⁺ ions. The *ntp* operon is an important one, containing genes that encode transport systems of Na⁺ and K⁺ ions. Functional expression of the *ntp* operon is indispensable for physiology of this bacterium, especially coping with severe external environment.