極限環境微生物学会研究奨励賞受賞研究

好アルカリ性因子として見いだされたマルチ遺伝子型 Na^+/H^+ 対向輸送体と細菌の pH/塩環境適応に関する研究

独立行政法人理化学研究所 古園 さおり

微生物が極限的な環境や変動する外環境に適応するためには、「細胞内の恒常性をいかに維持するか？」が重要な戦略の一つとなる。特に、pH や塩環境への適応では、異なる細胞内・外の環境を隔てる細胞表層（細胞壁・細胞膜）が重要な役割を持つ。私は、細菌の一価カチオン恒常性を支配するマルチ遺伝子型対向輸送体（アンチポーター）を中心に、細菌の pH/塩環境適応について研究を進めてきた。本稿では、マルチ遺伝子型対向輸送体（Sha 輸送体、他に Mrp, Pha, Mnh, Sno の名称があるがここでは Sha とさせていただきます）に関するこれまでの研究成果の概要を述べる。

「好アルカリ性因子」として発見された Sha 輸送体

極限環境微生物に属する好アルカリ性細菌は、pH 10-12 のアルカリ環境で良好に生育する(5)。好アルカリ性細菌の菌体内は pH 8.5 付近に維持されており、アルカリである外環境に対し菌体内をより中性な環境に維持するために、能動的な H^+ 取り込み系が必要となる。一般に、 Na^+/H^+ 対向輸送体は細菌の pH ホメオスタシスに重要であることが知られている。当研究室では、好アルカリ性 *Bacillus halodurans* C125 株よりアルカリ感受性変異株を取得し、これを宿主として好アルカリ性に関わる Na^+/H^+ 対向輸送体の遺伝子クローニングが行われた(3)。こうして発見されたのが Sha 輸送体である。当時 ORF1 と呼ばれた遺伝子(*shaA* に相当)は、膜電位依存性の Na^+/H^+ 対向輸送活性を担っており、アルカリ環境での生育に必須な pH ホメオスタシス機能を担うと考えられた(3)。ORF1 にコードされる遺伝子産物は既知の Na^+/H^+ 対向輸送体とは相同性がなく、新規な対向輸送体と考えられた。後に *B. halodurans* C125 株の全ゲノム配列が決定されると、ORF1 は 7 遺伝子クラスターを構成する 1 遺伝子であることが明らかとなった(16)。

Sha 輸送体へユニークなマルチ遺伝子型 Na^+/H^+ 対向輸送体

現在 Sha 輸送体は、Monovalent cation:proton antiporter (CPA)-3 ファミリーに属するマルチ遺伝子型の一価カチオン/ H^+ 対向輸送体として認識されている(15)。このファミリーの特徴は、保存された 7

遺伝子（AB 遺伝子が融合している場合は 6 遺伝子）にコードされる点であり、このような一価カチオン/ H^+ 対向輸送体は他に例がない。

B. halodurans と同じ *Bacillus* 属であり、遺伝学的解析が容易な枯草菌(*B. subtilis*)において、Sha 輸送体の詳細な解析が行われている。枯草菌 Sha 輸送体は *mrp(sha)ABCDEFG* にコードされ、いずれの遺伝子産物も疎水性が高く膜タンパク質であると予想される。*mrp(sha)ABCDEFG* のうちどの遺伝子を欠失させても著しい NaCl 感受性をもたらすことから、*mrp(sha)ABCDEFG* 遺伝子産物は Na^+ 排出に関わる輸送複合体を形成すると予想されていた(4, 6, 17)。最近私たちは、*mrp(sha)ABCDEFG* 遺伝子産物が実際に 1 つの膜タンパク質複合体を形成することを明らかにした(7)。ShaA と ShaD は互いに相同な比較的大きなサブユニットであり、それ以外は 10~20 kDa の小さなサブユニットである。ShaA, ShaC, ShaD は H^+ 輸送性の一次トランスポーターである NADH : ユビキノ酸化還元酵素(Nuo)や膜結合型ヒドロゲナーゼ(Mbh)の疎水性サブユニットと相同性がある。マルチ遺伝子にコードされる点やタンパク質配列において、Sha 輸送体は酸化還元エネルギーにより駆動される一次トランスポーターに似た特徴を有するが、Sha 輸送体が一次輸送活性を持つことは今のところ明らかにされていない。イオン輸送における各サブユニットの役割は何か、どのサブユニットがイオン輸送通路を形成しているのか、1 遺伝子型アンチポーターとは異なる輸送メカニズムを有するのかなど、Sha 輸送体について解明すべきことが多く残されている。

枯草菌 Sha 輸送体の機能解析— Na^+ ホメオスタシスと孢子形成

1995 年に枯草菌の全ゲノム配列が報告され、中性菌の代表である枯草菌に Sha 輸送体ホモログが存在することが明らかとなった。1998 年には根粒菌(*Sinorhizobium meliloti*)の感染因子として Sha 輸送体ホモログ(Pha)が報告され(14)、また黄色ブドウ球菌(*Staphylococcus aureus*)から Sha 輸送体ホモログ(Mnh)遺伝子のクローニングが報告された(4)。こうして見ると、Sha 輸送体は好アルカリ性菌に特有の

因子ではなさそうである。「好アルカリ性でない細菌における Sha 輸送体の生物学的意義は何か？」を明らかにするため、枯草菌や緑膿菌における Sha 輸送体の機能解析を進めた。

まず枯草菌を対象に Sha 輸送体欠損株を作成し、生育に及ぼす塩や pH の影響を調べた。Sha 欠損株は NaCl に対して強い感受性を示す。一方で、NaCl を 1 mM 以下に制限すると、枯草菌にとっては十分アルカリといえる pH 8 付近で Sha 欠損株の生育は野生株と変わらない(12)。以上のことから、枯草菌における Sha 輸送体の役割は、pH ホメオスタシスよりは寧ろ Na⁺ホメオスタシスの維持であると結論した(12)。Sha 欠損株は LB 培地に含まれる塩濃度(約 0.17 M NaCl)で生育できないことから、“essential genes”として報告されている(9)。

次に孢子形成への関与を調べたところ、Sha 輸送体は孢子形成過程にも重要な役割を持つことを見いだした(13)。増殖に影響を与えない低濃度 NaCl 条件で、Sha 欠損株の孢子形成はほぼ完全に阻害される。孢子形成阻害は対数増殖期後の NaCl 添加でも認められ、阻害をもたらす NaCl 添加時期はいわゆる「遷移期」に限定されることが明らかとなった。このことは、孢子形成過程におけるこの時期に Na⁺の影響を受けやすい分子メカニズムが存在することを示唆する。その後の解析から、Sha 欠損株では、孢子形成開始期に誘導される特異的シグマ因子(SigH や SigB)の活性化が NaCl 依存的に阻害されることを明らかにした(10, 13)。シグマ因子活性化のどの部分が Na⁺の影響を受けているかは明らかではないが、転写後レベルに作用点があるようである。Sha 輸送体が担う Na⁺ホメオスタシスの維持は、定常期シグマ因子の活性化を含め、定常期移行が正常に進行するために必要と考えられた。

緑膿菌 Sha 輸送体の機能解析～病原性への関与

Sha 輸送体の根粒菌ホモログである Pha 輸送体は、共生植物への感染に必要であることが報告されている(14)。Sha 輸送体が担う高いホメオスタシス能力は、細菌の感染、ひいては病原性に重要かもしれないと考え、日和見感染菌である緑膿菌(*Pseudomonas aeruginosa*)を対象に、Sha 輸送体と病原性との関連を調べた。

緑膿菌 Sha 欠損株もまた著しい NaCl 感受性を示したことから、Na⁺ホメオスタシスの中心的機能を担うと考えられた(11)。Sha 欠損株と野生株を用いてマウス感染実験を行ったところ、Sha 欠損株は野生株よりも低い病原性と感染臓器における定着性を示した(11)。この結果は、緑膿菌が感染の際に受けると予想される Na⁺濃度変化への適応能力に Sha 輸送体が寄与していると解釈することができる。

ところで、緑膿菌の病原性遺伝子は定常期に誘導されるものが多く、その誘導には定常期シグマ因子

RpoS やクオラムセンシングが関与する。枯草菌では Sha 輸送体が定常期移行に関連した事実を考慮して、現在 Sha 輸送体が病原性に関わるメカニズムを探っている。緑膿菌でも Sha 輸送体欠損により定常期移行が阻害され病原性遺伝子の発現が低下している可能性が考えられ、実際にそのことを支持するデータが得られつつある。Sha 輸送体は、定常期移行を阻害し病原性遺伝子の発現を抑制するための分子標的になりうるかもしれない。また一見関連がないように見える孢子形成と病原性における Sha 輸送体の役割が、いずれも「定常期移行」という観点から説明できるかもしれないと考えている。

Sha 輸送体の多機能性

現在、Sha 輸送体はゲノム配列が明らかにされている細菌の約 1/3 に見つかっており、そこには様々な環境に生息する菌が含まれる。一方、大腸菌を初めとする腸内細菌にはあまり見いだされない。Sha 輸送体の欠損は、他の輸送体欠損では見られないような著しい pH もしくは塩感受性をもたらすことが多い。このことから、Sha 輸送体は一価カチオン恒常性の中心的役割を担っており、細菌の pH/塩環境への適応に大きく寄与していることが考えられる。

「好アルカリ性因子」として最初発見された Sha 輸送体が、pH/塩環境適応に関わる普遍的な因子として再発見されつつあるように思う。

近年、抗菌物質への感受性(1)、亜ヒ酸酸化(8)、光合成(2)にも Sha 輸送体が関与することが報告されており、Sha 輸送体が担う pH/Na⁺ホメオスタシス機能は好アルカリ性を越えて多様な生物学的意義を持つことが明らかになりつつある。孢子形成や感染性・病原性を含め、一見相互に関連がないように見える多様な性質に Sha 輸送体がどのように関わっているのか、興味を持たれるところである。今後は Sha 輸送体が持つ多様な生物学的意義の解明を中心に、細菌の pH/塩環境適応機構における新たな展開を目指したいと考えている。

最後に、栄誉ある極限環境微生物学会奨励賞受賞にあたり、大島泰郎先生を初めとする選考委員の諸先生方、またご指導いただきました工藤俊章先生、並びに環境分子生物学研究室の皆様にご心より感謝の意を表します。

引用文献

1. Bayer, A. S., P. McNamara, M. R. Yeaman, N. Lucindo, T. Jones, A. L. Cheung, H. G. Sahl, and R. A. Proctor. 2006. Transposon disruption of the complex I NADH oxidoreductase gene (*snoD*) in *Staphylococcus aureus* is associated with reduced susceptibility to the microbicidal activity of

- thrombin-induced platelet microbicidal protein 1. *J. Bacteriol.* **188**:211-22.
2. **Blanco-Rivero, A., F. Leganes, E. Fernandez-Valiente, P. Calle, and F. Fernandez-Pinas.** 2005. *mrpA*, a gene with roles in resistance to Na⁺ and adaptation to alkaline pH in the cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC7120. *Microbiology* **151**:1671-82.
 3. **Hamamoto, T., M. Hashimoto, M. Hino, M. Kitada, Y. Seto, T. Kudo, and K. Horikoshi.** 1994. Characterization of a gene responsible for the Na⁺/H⁺ antiporter system of alkaliphilic *Bacillus* species strain C-125. *Mol. Microbiol.* **14**:939-946.
 4. **Hiramatsu, T., K. Kodama, T. Kuroda, T. Mizushima, and T. Tsuchiya.** 1998. A putative multisubunit Na⁺/H⁺ antiporter from *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **180**:6642-6648.
 5. **Horikoshi, K.** 1999. Alkaliphiles: Some applications of their products for biotechnology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **63**:735-750.
 6. **Ito, M., A. A. Guffanti, W. Wang, and T. A. Krulwich.** 2000. Effects of nonpolar mutations in each of the seven *Bacillus subtilis* *mrp* genes suggest complex interactions among the gene products in support of Na⁺ and alkali but cholate resistance. *J. Bacteriol.* **182**:5663-5670.
 7. **Kajiyama, Y., M. Otagiri, J. Sekiguchi, S. Kosono, and T. Kudo.** 2007. Complex formation by the *mrpABCDEFG* gene products, which constitute a principal Na⁺/H⁺ antiporter in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **189**:7511-7514.
 8. **Kashyap, D. R., L. M. Botero, C. Lehr, D. J. Hassett, and T. R. McDermott.** 2006. A Na⁺:H⁺ antiporter and a molybdate transporter are essential for arsenite oxidation in *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Bacteriol.* **188**:1577-84.
 9. **Kobayashi, K., S. D. Ehrlich, A. Albertini, G. Amati, K. K. Andersen, M. Arnaud, K. Asai, S. Ashikaga, S. Aymerich, P. Bessieres, F. Boland, S. C. Brignell, S. Bron, K. Bunai, J. Chapuis, L. C. Christiansen, A. Danchin, M. Debarbouille, E. Dervyn, E. Deuerling, K. Devine, S. K. Devine, O. Dreesen, J. Errington, S. Fillinger, S. J. Foster, Y. Fujita, A. Galizzi, R. Gardan, C. Eschevins, T. Fukushima, K. Haga, C. R. Harwood, M. Hecker, D. Hosoya, M. F. Hullo, H. Kakeshita, D. Karamata, Y. Kasahara, F. Kawamura, K. Koga, P. Koski, R. Kuwana, D. Imamura, M. Ishimaru, S. Ishikawa, I. Ishio, D. Le Coq, A. Masson, C. Mauel, R. Meima, R. P. Mellado, A. Moir, S. Moriya, E. Nagakawa, H. Nanamiya, S. Nakai, P. Nygaard, M. Ogura, T. Ohanan, M. O'Reilly, M. O'Rourke, Z. Pragai, H. M. Pooley, G. Rapoport, J. P. Rawlins, L. A. Rivas, C. Rivolta, A. Sadaie, Y. Sadaie, M. Sarvas, T. Sato, H. H. Saxild, E. Scanlan, W. Schumann, J. F. Seegers, J. Sekiguchi, A. Sekowska, S. J. Seror, M. Simon, P. Stragier, R. Studer, H. Takamatsu, T. Tanaka, M. Takeuchi, H. B. Thomaides, V. Vagner, J. M. van Dijl, K. Watabe, A. Wipat, H. Yamamoto, M. Yamamoto, Y. Yamamoto, K. Yamane, K. Yata, K. Yoshida, H. Yoshikawa, U. Zuber, and N. Ogasawara.** 2003. Essential *Bacillus subtilis* genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**:4678-83.
 10. **Kosono, S., K. Asai, Y. Sadaie, and T. Kudo.** 2004. Altered gene expression in the transition phase by disruption of a Na⁺/H⁺ antiporter gene (*shaA*) in *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol. Lett.* **232**:93-99.
 11. **Kosono, S., K. Haga, R. Tomizawa, Y. Kajiyama, K. Hatano, S. Takeda, Y. Wakai, M. Hino, and T. Kudo.** 2005. Characterization of a multigene-encoded sodium/hydrogen antiporter (Sha) from *Pseudomonas aeruginosa*: its involvement in pathogenesis. *J. Bacteriol.* **187**:5242-5248.
 12. **Kosono, S., S. Morotomi, M. Kitada, and T. Kudo.** 1999. Analyses of a *Bacillus subtilis* homologue of the Na⁺/H⁺ antiporter gene which is important for pH homeostasis of alkaliphilic *Bacillus* sp. C-125. *Biochim. Biophys. Acta* **1409**:171-175.
 13. **Kosono, S., Y. Ohashi, F. Kawamura, M. Kitada, and T. Kudo.** 2000. Function of a principal Na⁺/H⁺ antiporter, ShaA, is required for initiation of sporulation in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **182**:898-904.
 14. **Putnoky, P., A. Kereszt, T. Nakamura, G. Endre, E. Grosskopf, P. Kiss, and A. Kondorosi.** 1998. The *pha* gene cluster of *Rhizobium meliloti* involved in pH adaptation and symbiosis encodes a novel type of K⁺ efflux system. *Mol. Microbiol.* **28**:1091-1101.
 15. **Saier, M. H., Jr.** 2000. A functional-phylogenetic classification system for transmembrane solute transporters.

16. Microbiol. Mol. Biol. Rev. **64**:354-411.
Takami, H., K. Nakasone, Y. Takaki, G. Maeno, R. Sasaki, N. Masui, F. Fuji, C. Hirama, Y. Nakamura, N. Ogasawara, S. Kuhara, and K. Horikoshi. 2000. Complete genome sequence of the alkaliphilic bacterium *Bacillus halodurans* and genomic sequence comparison with *Bacillus subtilis*. Nucleic Acids Res. **28**:4317-4331.
17. **Yoshinaka, T., H. Takasu, R. Tomizawa, S. Kosono, and T. Kudo.** 2003. A *shaE* deletion mutant showed lower Na⁺ sensitivity compared to other deletion mutants in the *Bacillus subtilis* sodium/hydrogen antiporter (Sha) system. J. Biosci. Bioeng. **95**:306-309.