薬 学 雑 誌
YAKUGAKU ZASSHI
103 (10) 1007-1014 (1983)

大腸菌における Na^+ と共役した糖の能動輸送系の解析

土屋友房

岡山大学薬学部, 〒700 岡山市津島中 1-1-1

Active Transport of Sugars Coupled to Na^+ in *Escherichia coli*

TOMOFUSA TSUCHIYA

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Okayama University,
Tsushima-naka, Okayama, 700, Japan

Cation-nutrient cotransport is ubiquitous in nature. For cotransport, coupling between H^+ and substrate is common in microbial cells, and that between Na^+ and substrate is common in animal cells. We have reported that the melibiose transport system of *Escherichia coli* could utilize Na^+ as a coupling cation. This is the first example of Na^+ -substrate cotransport found in microbial cells. Versatility in the combination between cation and substrate was revealed. This system seems to be a suitable model system for the analysis of cation-substrate cotransport systems. Physiological, biochemical and genetical properties of this system are summarized.

Keywords—active transport; Na^+ ; melibiose; coupling; physiology; biochemistry; genetics

1. は じ め に

細胞膜における輸送は, 細胞にとって必要な栄養やイオンの吸収, 不要となった物の排出などの意味で重要であるが, 更に, イオンの輸送によるエネルギーの転換, 浸透圧や細胞内外 pH の調節などの意味を持っている。すなわち, 輸送は, 細胞の活動にとって好ましい内部条件の形成や維持を行うという役割りを担っている。また, 薬物の吸収や排出も, ほとんどの場合, 輸送系によって行われている。我々は, 栄養, イオン, 薬物等が, どのようなメカニズムで, かつどのような調節を受けて輸送されるのかを明らかにしたいと考え, 細胞膜における輸送の研究を進めている。

細胞膜における輸送の種類は, Table I に示すように分類することができる。^{1,2)} これらのうちで, 溶質の濃度勾配に逆らって輸送が進行する能動輸送が, 細胞生理上, 特に重要である。能動輸送は, adenosine triphosphate (ATP) や nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) などの化学エネルギーあるいは光エネルギー等を利用して駆動される一次的能動輸送系と, 一次的能動輸送の結果形成されるカチオンの電気化学的ポテンシャル差を利用して駆動される二次的能動輸送系とに分けられる。一次的能動輸送系では, H^+ , Na^+ , K^+ , Ca^{2+} 等のカチオンや, 糖, アミノ酸等が輸送される。細胞質膜における H^+ や Na^+ の輸送は, 二次的能動輸送系のエネルギー源ともなるので, 特に重要である。すなわち, 一次的能動輸送系において H^+ や Na^+ が輸送され

TABLE I. Classification of Transport Systems

Type of transport	Carrier	Energy supply
Passive transport		
1) Simple diffusion	—	—
2) Facilitated diffusion	+	—
Active transport		
1) Primary active transport	+	+
2) Secondary active transport	+	+
a) Cotransport		
b) Antiport		
c) Uniport		
Group translocation	+	+

本総説は, 昭和 58 年度日本薬学会奨励賞の受賞業績を中心に記述したものである。

る結果、細胞質膜を介して、これらカチオンの電気化学的ポテンシャル差が形成される。そして、これが二次的能動輸送系を駆動する力となる。例えば共輸送系においては、ポテンシャル差に従うカチオンの流れと共に基質が輸送されることになる。二次的能動輸送系でも、多くの糖、アミノ酸やイオン等が輸送される。特に栄養等の輸送においては、二次的能動輸送系が、広く生物界に見られる一般的輸送系である。

二次的能動輸送系において共役するカチオンは、微生物細胞膜では H^+ が一般的であり、動物細胞膜では Na^+ が一般的である。³⁾ このことは、微生物細胞膜には H^+ -輸送性 ATPase や H^+ を輸送する呼吸鎖があり、動物細胞膜には Na^+ と K^+ の輸送を行う ATPase があり、それぞれ、 H^+ 、 Na^+ の電気化学的ポテンシャル差がつくられることと、よく対応している。

ところで、簡単な微生物細胞の膜において、 H^+ および Na^+ と共役しうるような輸送系があれば、それは微生物細胞膜から動物細胞膜にまで適用できる、輸送系の 1 つのモデルシステムとなるのではなかろうか。このような観点から、生理学的、生化学的および遺伝学的に最も良く解析されている大腸菌を用いて、 H^+ および Na^+ と共役するような輸送系を検索した。その結果、メリビオース輸送系が H^+ と Na^+ と共役できることがわかった。他にも Na^+ と共役する輸送系を見つけたが、ここでは割愛させていただき、以下メリビオース輸送系について述べる。

2. メリビオース輸送系の性質

大腸菌のメリビオース輸送系は、1965 年に発見された。⁴⁾ この系は誘導性であり、K12 株では $37^\circ C$ で失活するという温度感受性を示す。この温度感受性という性質は、これまで知られている輸送系の中で、メリビオース輸送系のみに見られる特徴である。したがって、ある現象がこの系を介して行われたのか、他の系を介して行われたのかを区別するのに、この温度感受性という性質が利用できる。なお、メリビオースやメチルチオガラクトシド (TMG) を基質として用いると、これらを輸送するもう 1 つの系があるため、解釈が複雑になる。そのため、以下の実験では、特にことわらない限り、もう 1 つの系 (すなわちラクトース輸送系) を欠く変異株を用いている。

最初に、メリビオース輸送系を介する基質の輸送が、どのようなカチオンと共役するのかを調べた実験について記す。エネルギー代謝を抑えた状態の細胞に対し、外液に輸送基質を高濃度に加える。この時、そこに存在するカチオンと加えた基質との共輸送が起これば、起電的な輸送となるため、細胞内がプラスの膜電位が形成されることになる。このような条件下で細胞外液の pH を追跡することにより、輸送されるカチオンの種類を知ることができる。すなわち、基質と H^+ との共輸送があるなら外液の H^+ 濃度は減少し、pH は上昇するし、例えば Na^+ との共輸送があるなら、測定液中に Na^+ が存在する場合にのみ、内側がプラスの膜電位が形成され H^+ は外側に排出されることになり、外液の pH は下降する。なお、 Na^+ と基質の共輸送がある場合には、 Na^+ 電極を用いることにより、直接 Na^+ の動きを測定することができる。このような測定の原理を Fig. 1 に示した。輸送基質としては、代謝されることのない TMG を用いるのが便利である。実際、細胞懸濁液に TMG

Fig. 1. Principle for the Determination of Cations which Couple to Substrate Transport

を 10 mM となるように加えたところ、 Na^+ または Li^+ が存在する場合にのみ、pH の下降、すなわち細胞からの H^+ の排出が見られた (Fig. 2).^{5,6)} TMG を加えることによって引き起こされる H^+ の排出は、上記の原理に従えば二次的なものであり、膜電位を消すことによって見られなくなるはずである。実際、膜電位を打ち消す SCN^- を共存させることにより、このような H^+ の排出は見られなくなった。⁶⁾ 以上の結果から、 Na^+ -TMG および Li^+ -TMG 共輸送があること、および、 H^+ と TMG の共輸送はないことが示唆された。ところが、メリビオース輸送系の他の基質について同様の実験を行ったところ、メリビオースとメチル- α -ガラクトシドでは H^+ との共輸送があることがわかった。⁶⁾ また、

Fig. 2. Effect of Cations on the TMG-Induced Proton Movement⁶⁾

Proton movement was measured in the presence of 10 mM of the salts indicated. A downward deflection indicates a fall in pH of the medium.

Fig. 3. Measurement of Na^+ Entry into Cells Induced by TMG Influx⁶⁾

a: Cells were induced with melibiose at 30°C .

b: Uninduced cells.

c: Cells were induced with melibiose at 37°C .

At the time indicated by the arrow, TMG was added to the cell suspension. An upward deflection of the record indicates a fall in Na^+ concentration in the incubation medium.

TABLE II. Cation Specificity for Galactosides Transport in the Melibiose Transport System of Parent and Mutants of *E. coli*

Substrates	Cations	Strains		
		W3133-2 (Parent)	W3133-2S (Mutant)	W3133-2T (Mutant)
Melibiose	H^+	+	—	—
	Na^+	+	+	+
	Li^+	—	+	+
TMG	H^+	—	—	—
	Na^+	+	+	+
	Li^+	+	—	—
Methyl- α -galactoside	H^+	+	—	—
	Na^+	+	+	+
	Li^+	+	+	+

メリビオースと Na^+ との共輸送, メチル- α -ガラクトシドと Na^+ および Li^+ との共輸送があることが示唆された。このように, 1つの輸送系で, 輸送される基質によって共役するカチオンが変わるという例は他に知られておらず, 大変興味深い。次に, Na^+ と基質との共輸送を直接測定することを試みた。 Na^+ 選択性電極 (Radiometer 社) を用い, 前述の場合と同様の実験を行った。確かに, TMG によって Na^+ の細胞内への取り込みが引き起こされることがわかった (Fig. 3).⁶⁾ この Na^+ と TMG の共輸送が, メリビオース輸送系を介して行われるものであることは, 前述の, この系の誘導性と温度感受性という2つの性質を利用して確かめられた。すなわち, 誘導していない細胞, および 37°C で誘導した細胞では, Na^+ の取り込みは見られなかった (Fig. 3)。極く最近, 我々は Li^+ 選択性電極を作製し, Li^+ と基質の共輸送を測定することに成功した。⁷⁾ そして前述の実験で間接的に示唆された Li^+ -基質の共輸送を, 直接証明することができた。

一方で, Na^+ や Li^+ の人工的電気化学的ポテンシャル差による基質の取り込みを測定することができた。^{5,8)} それらの実験では, 細胞をエネルギー欠乏状態にして置き, Na^+ や Li^+ の濃度勾配と, イオンの拡散電位を, 単独または一緒に人工的に与え, ^{14}C -TMG の取り込みを調べた。実際 Na^+ や Li^+ の濃度勾配と, CCCP (カルボニルシアニドクロロフェニルヒドラゾン) 存在下で H^+ の拡散電位をかけた場合, 取り込みが見られた。^{5,8)}

以上の結果から, メリビオース輸送系を介する基質の輸送は, H^+ , Na^+ および Li^+ と共役して行われること, および, 基質とカチオンの組み合わせは, 基質によって異なることが明らかになった。その組み合わせの多様性の例を Table II に示した。

大腸菌のみならず、ネズミチフス菌のメリビオース輸送系においても、 Na^+ や Li^+ と基質の共輸送が見られる。^{9,10)}

3. カチオン共役変異株の分離と解析

メリビオース輸送系におけるカチオン共役機構、輸送機構を解析するために、いくつかの方向からのアプローチを進めている。その1つが、カチオン共役変異株を分離し、その輸送担体の性質を明らかにすることである。

一般には、カチオン共役変異株を分離することはほぼ不可能に近い。しかしながら、メリビオース輸送系には、大変興味深い特徴があり、その特徴を利用することにより、カチオン共役変異株の分離ができるように思われた。メリビオース輸送系におけるメリビオースの輸送は、 Li^+ によって阻害される。¹¹⁾ 言い換えると、 Li^+ とメリビオースの共輸送は、ほとんど進行しない、あるいはほんの少ししか進行しない。これは、輸送担体のカチオン結合部位に Li^+ が結合すると、メリビオースを基質として輸送することができなくなるためと考えられる。つまり、 Li^+ 存在下では、細胞は十分量のメリビオースを取り入れることができないことになる。したがって、 Li^+ 存在下でメリビオースを唯一の炭素源とすると、細胞はほとんど生育できない。大腸菌を変異剤で処理し、このような条件下でも生育できるものを得れば、それらのメリビオース輸送担体のカチオン結合部位は変化していると期待される。実際このようにして、我々は多数のカチオン共役変異株を分離した。それらの中で、特に興味深い性質の変異株について述べたい。変異株 W3133-2S と W3133-2T は、メリビオースを唯一の炭素源とした時、 Li^+ に依存して生育することができる (Fig. 4).¹²⁾ これは、親株 W3133-2 が Li^+ によって生育を完全に阻害されるのと全く逆の性質である。これらの変異株におけるカチオン共役様式を、各基質について調べたところ、これらの株のメリビオース輸送担体は、基質が何であれ、 H^+ と共役する能力を失っていた (Table II)。反面、親株ではほんの少ししか見られなかった Li^+ -メリビオース共輸送の能力を獲得しているように思われた。¹²⁾ 実際この点は、後に Li^+ 選択性電極によって確かめられた。⁷⁾ これらの株の遺伝学的解析の結果、変異は確かにメリビオース輸送担体の構造遺伝子 *melB* に起こっていることがわかった。また、正常な *melB* を持つプラスミドを変異株に入れてやることにより、親の性質にもどることも確かめられた。¹²⁾ 一方これら変異株から復帰株を分離し、その解析も行った。¹⁸⁾ 復帰株は、 Li^+ 非存在下でもメリビオースを唯一の炭素源として生育できるコロニーとして得た。復帰株の出現頻度は約 10^{-6} であった。このことは、変異株の *melB* 上の変異は単一の塩基の置換によるものであること、すなわち、変異株のメリビオース輸送担体では、親株のそれに比べ、1つのアミノ酸が置換していることを示している。たった1つのアミノ酸の置換により、上記のようにカチオン共役が変化したことになる。なお、復帰株のメリビオース輸送担体の性質は、完全に親株と同じであった。

Fig. 4. Effect of Li^+ on the Growth of Wild Type (W3133-2) and Mutant (W3133-2S)¹²⁾

Cells were grown in a medium containing melibiose as a sole source of carbon, in the absence or in the presence (+ Li^+) of 10 mM LiCl .

ミノ酸が置換していることを示している。たった1つのアミノ酸の置換により、上記のようにカチオン共役が変化したことになる。なお、復帰株のメリビオース輸送担体の性質は、完全に親株と同じであった。

これらの変異株における輸送担体上のアミノ酸の変化を一次構造上で明らかにすることができれば、カチオン共役の機構を分子のレベルで明らかにすることができるはずである。我々は現在多くのこのような変異株について、後に述べる遺伝子操作の手法を用いて、変異をアミノ酸配列のレベルで解析することを進めている。

ここに述べた変異株の他にも多くのカチオン共役変異株が得られており、それらの生化学的、遺伝学的解析も、現在進められている。

4. メリビオース輸送担体の可溶化と再構成

輸送系の生化学的解析には、輸送担体を精製することが大切となる。現在までに、大腸菌の能動輸送担体が精製された例はたった1つしかない。このことは、輸送担体を失活させずに可溶化、精製すること

Fig. 5. Procedure for Solubilization and Reconstitution of the Melibiose Transport Carrier

との難しさを物語っている。成功した例はラクトース輸送系であり、¹⁴⁾ 成功に導いた最大の理由は界面活性剤としてオクチルグルコンドを用いたことにある。¹⁵⁾

我々もオクチルグルコンドを用い、メリビオース輸送担体の可溶化・精製を目指した。この実験に際し、2つの点を工夫した。1つは、メリビオース輸送系の天然の基質であり最も輸送されやすいと考えられるメリビオースにアイソトープラベルしたものをつくることであった。これは、市販されている放射性ラフィノースを、インペルターゼで分解してメリビオースとフルクトースにし、ゲル濾過によってメリビオースを単離するという方法で成功した。¹⁶⁾ こうして、放射性メリビオースの輸送を測定することが可能となった。もう1つは、遺伝子操作の手法により、メリビオース輸送担体を大量に合成する株を得ることであった。すでに、大腸菌の遺伝子コレクションができていたので、¹⁷⁾ その中からメリビオースオペロンを含むハイブリッドプラスミドを捜した。そして、同定されたプラスミドを、我々がメリビオース輸送の解析に用いている株に入れた。このようなプラスミドを入れた株では、入れる前に比べ8倍程度のメリビオース輸送活性の上昇が見られたことから、輸送担体がかかなり増産されていると考えられた。このような株を用い、輸送担体の可溶化と再構成を行った。その方法の概略を Fig. 5 に示した。フレンチプレス法で調製した膜小胞を、オクチルグルコンドで処理して膜蛋白質を可溶化する。超遠心分離により、可溶化されたものと膜に残っているものを分ける。一方で大腸菌の脂質を調製し、リポソームをつくる。可溶化した蛋白質とリポソームを混合し、オクチルグルコンド希釈法¹⁸⁾によって再構成する。再構成標品の活性は、カウンターフロー法あるいは人工的駆動力による放射性メリビオースの取り込みで測定する。このような方法で、メリビオース輸送担体がリポソームに組み込まれ、再構成プロテオリポソームのメリビオース輸送活性が測定された (Fig. 6)。¹⁹⁾ 一般には、カウンターフロー法の方が、人工的駆動力 (Na^+ の濃度勾配等) をかける方法よりも、大きな取り込みが見られる。この取り込みは、*p*-ニトロフェニル- α -ガラクトシドによって阻害され、かつ予めメリビオースを保持させなかった場合には見られなくなる。また、メリビオースで誘導していない細胞を出発材料とした場合にも、見られなくなる。したがって、確かにメリビオース輸送系の活性を見ているということになる。なお、再構成したプロテオリポソームは、脂質二重層一重膜から成る、直径約 80 nm のものであることが、電子顕微鏡で明らかにされている。²⁰⁾ この再構成したプロテオリポソームを用いて、メリビオース輸送担体を同定することを試みた。メリビオース輸送活性を有し、したがってメリビオース輸送担体を有すると考えられる再構成標品と、前述の、メリビオースで誘導していない細胞を出発材料として得たプロテオリポソーム、すなわちメリビオース輸送担体を持っていない標品、の両者について、存在する蛋白質をドデシル

Fig. 6. Melibiose Counterflow by Reconstituted Proteoliposomes¹⁹⁾

Melibiose uptake was measured in the absence (●) or in the presence (■) of 10 mM PNPG (*p*-nitrophenyl- α -galactoside).

5. メリビオース輸送担体遺伝子の構造解析と輸送担体のアミノ酸配列

蛋白質の担う機能の分子機構を理解する上で、その構造を知ることが大変重要となる。蛋白質分子の高次構造を解析することはもちろん大切であるが、その前に、一次構造すなわちアミノ酸配列を決定することが必要である。また、アミノ酸配列がわかれば、その蛋白質のいくつかの性質も明らかになる。

アミノ酸配列の決定には2つの方法がある。1つは、精製した蛋白質について、順番にアミノ酸の並びを調べていく方法である。もう1つは、蛋白質に対応する構造遺伝子を取り、ヌクレオチド配列を決定して、それからアミノ酸配列を決める方法である。現在では後者の方法の方が簡単にできる。しかも、後者の方法は当該蛋白質が精製されていなくても可能である。そこで我々は、後者の方法によって、メリビオース輸送担体遺伝子のヌクレオチド配列を決定し、担体のアミノ酸配列を知ることを目指した。

すでに述べたように、我々はメリビオースオペロンを有するプラスミドを持っていた。このプラスミド pLC 25-33 を出発材料として以下の実験を進めた。このプラスミドは薬剤耐性マーカーを持たないため、やや扱いにくい。そこでまず、このプラスミドのメリビオースオペロンを含む DNA 断片を、クローニングベクターである pBR 322 に組換えた。こうして得たプラスミド pSTY 3 を用いて、メリビオースオペロン領域の、物理地図、遺伝地図をつくることを試みた。まず、種々の制限酵素を用いて、それぞれの切断点がどこに存在するのかを決定した (物理地図)。また種々の制限酵素切断片を用いて、各領域のサブクローニングを行った。次に、各遺伝子が DNA 上のどのあたりに存在するのかを決定した (遺伝地図)。メリビオースオペロンには、少なくとも、 α -ガラクトシダーゼに対応する *mel A* 遺伝子と、メリビオース輸送担体に対応する *mel B* 遺伝子の2つが存在することが知られている。^{26,27)} *mel A*⁻ および *mel B*⁻ の変異株と、サブクローニングしたプラスミドを用いて、遺伝学的相補性試験や組換え体出現試験を行い、プロモーター、*mel A*、*mel B* のおよその位置を決めた (Fig. 7)。我々の興味の対象である *mel B* 遺伝子の位置と長さをもっと正確に知るために、いくつかの *mel B* 変異株について同様の試験を行った。その結果、Fig. 7 に示した *Bam* HI—*Bam* HI 領域に *mel B* の大部分が存在すること、および、*mel B* の先頭部分は左側の *Bam* HI 部位より更に左に出ていることがわかった。²⁸⁾ そこで、このあたりの DNA 領域について、ヌクレオチド配列を決定することを試みた。ヌクレオチド配列の決定は Maxam-Gilbert 法²⁹⁾ によった。現在までに、目指す領域の配列はほぼ完全に決定している。³⁰⁾ この領域には、長いオープンリーディングフレームが1つだけ存在する。このフレームの開始コドンと思われる ATG の少

硫酸ナトリウム (SDS)-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法により分析した。その結果、30本程度の濃い蛋白質バンドのうち、1本のみに両方で差があることがわかった。そのバンドは、見かけの分子量約 30000 に相当し、メリビオース輸送担体を含むはずの標品には存在し、メリビオース輸送担体を含まないはずの標品には存在しなかった。²¹⁾ このことから、メリビオース輸送担体は、SDS-ポリアクリルアミドゲル中では見かけの分子量約 30000 として表われる蛋白質であると考えられる。この点は、後に別の方面の実験結果からも支持された。

現在、この蛋白質の精製を進めているが、使用している界面活性剤が高価であるため、やや困難をきたしている。そこで、オクチルグルコシドに代る非イオン性界面活性剤を検討中であるが、デカノイルメチルグルカミド^{22,23)} で代用できそうである。なお、オクチルグルコシド²⁴⁾ やデカノイルメチルグルカミドは、多くの膜蛋白質を失活させずに可溶化することができるので、その利用範囲は広いと思われる。

し先に、リボソームの結合部位と考えられる Shine-Dalgarno 配列³¹⁾が存在する。この ATG から終止コドンまでは約 1400 ヌクレオチドであり、これに対応する蛋白質は約 470 アミノ酸残基に相当する。ここに含まれるアミノ酸は、非極性のものが約 70% を占める。つまり、このフレームに由来する蛋白質は疎水性の蛋白質ということであり、メリビオース輸送担体が疎水性の膜蛋白質であるということと良く一致する。アミノ酸配列から計算される分子量は約 52000 となる。もしこれが正しいとすると、メリ

ビオース輸送担体の分子量は約 52000 ということになる。ところが、前述のように、輸送担体の可溶化、再構成実験から、SDS-ポリアクリルアミドゲル上で、メリビオース輸送担体の見かけの分子量は約 30000 と算出された。更に、Maxicell 法³²⁾による *mel B* 遺伝子産物の SDS-ポリアクリルアミドゲル分析でも、メリビオース輸送担体の見かけの分子量は約 31000 と計算された。²⁸⁾ このように、アミノ酸配列から求められた分子量と SDS-ポリアクリルアミドゲルで求められた分子量の値には大変大きな差がある。しかし、これは膜蛋白質のような疎水性蛋白質ではおこりうることである。実際、ラクトース輸送担体の場合にも、SDS-ポリアクリルアミドゲル上では分子量約 30000 と計算されたが、³³⁾ DNA のヌクレオチド配列から推定されたアミノ酸配列を基に計算された値は、46500 であった。³⁴⁾ そして後に、SDS-ポリアクリルアミドゲルによる分析値は、実際の値よりもかなり小さく出ていたことがわかった。^{14,35)} これは、疎水性蛋白質には、分子量に比して過剰量の SDS が結合し、マイナス荷電が大きくなりすぎ、ゲル中を速く移動しすぎるためと考えられる。したがって、メリビオース輸送担体の場合も、配列から計算された値、分子量約 52000 というのが真の値に近いものと考えられる。

以上のように推定されたメリビオース輸送担体の一次構造を基に、今後、担体の機能をアミノ酸と対応づけて論じたいと考えている。特に、カチオン共役変異株の輸送担体のアミノ酸配列も明らかにすることができれば、カチオン共役機構を、担体の構成アミノ酸レベルで知ることができる。また、基質である糖に対する親和性が変化している変異株も得られているので、やがて、基質の認識部位についても、輸送担体のアミノ酸レベルで論ずることができるであろう。

6. おわりに

大腸菌のメリビオース輸送系について、生理学的、生化学的、遺伝学的および分子生物学的な面からの解析について述べた。この輸送系は、本論で述べたように、微生物細胞から動物細胞に至るまでの、カチオンと基質の共輸送系のモデルシステムとなり得るのではないかと考えられる。この系における輸送の分子機構や輸送の制御機構を知ることは、それ自体大変興味深い。他の輸送系、特に動物細胞における栄養や薬物の輸送機構、制御機構を知る上で大きな助けになるであろう。

メリビオース輸送系は、もう1つの観点からも大変興味深い。すでに述べたように、共輸送系における共役カチオンは、一般に、微生物細胞膜では H^+ であり、動物細胞では Na^+ である。このことから、進化の過程で、共役カチオンが H^+ から Na^+ に変化していったものと考えられる。³⁶⁾ この考えが正しいければ、 H^+ と共役でき Na^+ と共役できる大腸菌のメリビオース輸送系は、カチオン共役の進化の中間段階に位置することになる。我々は、簡単な変異によって、 H^+ との共役能を失った株を得た。これは、カチオン共役が中間型から動物型に変化したものに対応する。逆に、簡単な変異により、中間型から微生物型にもどった株も得られると考えられる。現在、このような変異株の分離も試みている。種々の変異株が得られ、それらの変異が DNA 上のヌクレオチドレベルで明らかになれば、カチオン共役における進化の様子も明らかになってくるのではなかろうか。

謝辞

本研究の遂行にあたり終始暖い御援助をいただきました二井将光教授に深く感謝致します。本研究は、主として、岡山大学薬学部において、塩田（旧姓新谷）澄子修士、森山芳則修士、上山絹恵修士、武田佳子技官、田中一三修士、花谷満也君、八重裕通君、および教室員の方々との共同研究によって行われたものであり、これらの方々に感謝します。また有益な助言をいただきました金沢浩博士および岡山大学薬学部の先生方に

Fig. 7. Physical Map and Gene Organization of the Melibiose Operon of *E. coli*

Restriction sites are: E, *Eco* RI; P, *Pst* I; B, *Bam* HI.

感謝致します。更に、常に御指導いただきました、恩師、水野伝一先生、名取俊二先生、Thomas H. Wilson 先生に感謝致します。なお研究費の一部は、文部省科学研究費〔一般 (C), 特定研究 (生体膜・生体膜におけるエネルギー転換機構)〕によった。

引用文献および注

- 1) 山登一郎, 安楽泰宏, “細胞生物学,” 理工学社, 東京, 1978, p. 203.
- 2) 土屋友房, 代謝, **19**, 651 (1982).
- 3) T. H. Wilson, T. Tsuchiya, J. Lopilato, K. Ottina, *Annals New York Acad. Sci.*, **341**, 465 (1980).
- 4) L. S. Prestidge, A. B. Pardee, *Biochem. Biophys. Acta*, **100**, 591 (1965).
- 5) T. Tsuchiya J. Raven, T. H. Wilson, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **76**, 26 (1977).
- 6) T. Tsuchiya, T. H. Wilson, *Membr. Biochem.*, **2**, 63 (1978).
- 7) T. Tsuchiya, M. Oho, S. Shiota-Niiya, *J. Biol. Chem.*, 印刷中.
- 8) J. Lopilato, T. Tsuchiya, T. H. Wilson, *J. Bacteriol.*, **134**, 147 (1978).
- 9) H. Tokuda, H. R. Kaback, *Biochemistry*, **16**, 2130 (1977).
- 10) S. Niiya, Y. Moriyama, M. Futai, T. Tsuchiya, *J. Bacteriol.*, **144**, 192 (1980).
- 11) T. Tsuchiya, J. Lopilato, T. H. Wilson, *J. Membr. Biol.*, **42**, 45 (1978).
- 12) S. Niiya, K. Yamasaki, T. H. Wilson, T. Tsuchiya, *J. Biol. Chem.*, **257**, 8902 (1982).
- 13) 塩田 (旧姓新谷) 澄子, 土屋友房, 生化学, **54**, 571 (1982).
- 14) M. J. Newman, D. L. Foster, T. H. Wilson, H. R. Kaback, *J. Biol. Chem.*, **256**, 11808 (1981).
- 15) M. J. Newman, T. H. Wilson, *J. Biol. Chem.*, **255**, 10583 (1980).
- 16) K. Tanaka, S. Niiya, T. Tsuchiya, *J. Bacteriol.*, **141**, 1031 (1980).
- 17) L. Clarke, J. Carbon, *Cell*, **9**, 91 (1976).
- 18) E. Racker, B. Violand, S. O'Neal, M. Alfonzo, J. Telford, *Arch. Biochem. Biophys.*, **198**, 470 (1979).
- 19) T. Tsuchiya, K. Ottina, Y. Moriyama, M. J. Newman, T. H. Wilson, *J. Biol. Chem.*, **257**, 5125 (1982).
- 20) D. M. Wilson, K. Ottina, M. J. Newman, T. Tsuchiya, S. Ito, T. H. Wilson, *Membr. Biochem.*, 印刷中.
- 21) 塩田 (旧姓新谷) 澄子, 岡山大学大学院薬学研究科修士論文, 1982.
- 22) 花谷満也, 西藤佳子, 二井将光, 土屋友房, 第 56 回日本生化学会で発表.
- 23) デカノイルメチルグルカミドは, 国内では, 同仁化学研究所 (熊本) で試作されており, 入手可能である.
- 24) T. Tsuchiya, A. Misawa, Y. Miyake, K. Yamasaki, S. Niiya, *FEBS Lett.*, **142**, 231 (1982).
- 25) 塩田 (旧姓新谷) 澄子, 八重裕通, 森山芳則, 土屋友房, 第 6 回微生物をめぐる分子生物学とその薬学領域における応用面シンポジウムで発表, 1982.
- 26) R. Schmitt, *J. Bacteriol.*, **96**, 462 (1968).
- 27) B. J. Backmann, *Microbiol. Rev.*, **47**, 180 (1983).
- 28) M. Hanatani, H. Yazyu, S. Shiota-Niiya, Y. Moriyama, H. Kanazawa, M. Futai, T. Tsuchiya, *J. Biol. Chem.*, 印刷中.
- 29) A. Maxam, W. Gilbert, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **74**, 560 (1977).
- 30) 八重裕通, 花谷満也, 塩田 (旧姓新谷) 澄子, 金沢 浩, 二井将光, 土屋友房, 第 56 回日本生化学会大会で発表.
- 31) J. Shine, L. Dalgarno, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **71**, 1342 (1974).
- 32) A. Sancar, A. M. Hack, W. O. Rupp, *J. Bacteriol.*, **137**, 692 (1979).
- 33) T. H. Jones, E. P. Kennedy, *J. Biol. Chem.*, **244**, 5981 (1969).
- 34) D. E. Büchel, B. Gronenborn, B. Müller-Hill, *Nature (London)*, **283**, 541 (1980).
- 35) K. Beyreuther, B. Bieseler, R. Ehrling, H. Griesser, M. Mieschendahl, B. Müller-Hill, I. Triesch, *Biochem. Soc. Transactions*, **8**, 675 (1980).
- 36) T. H. Wilson, E. C. C. Lin, *J. Supramol. Struct.*, **13**, 421 (1980).