

乳酸菌 *Tetragenococcus halophilus* 由来 Aspartate : Alanine  
交換輸送体 AspT の基質輸送メカニズムに関する研究

鈴木 聡美

# —目次—

凡例	5-6
<b>第一章 序論</b>	<b>7-14</b>
<b>第一節 背景</b>	<b>7</b>
1-1. 微生物を利用した物質生産とトランスポーターとの関わり	7
1-2. トランスポーターの分類	8
1-3. 脱炭酸共役輸送	8
1-4. Aspartate : Alanine 交換輸送体 AspT	9
1-5. AspT の研究成果及び本論文における目的	9
<b>第二章 蛍光修飾試薬を用いた基質依存的構造変化の解析</b>	<b>15-46</b>
<b>第一節 緒言</b>	<b>15</b>
<b>第二節 方法</b>	<b>17</b>
<b>第 1 部 AspT の蛍光修飾</b>	<b>17</b>
2-1-1. AspT の発現	17
2-1-2. 発現プラスミド	17
2-1-3. コンピテントセル	18
2-1-4. 形質転換	18
2-1-5. AspT の発現	19
2-1-6. 膜画分取得	19
2-1-7. 蛍光修飾	20
2-1-8. 可溶化	22
2-1-9. TALON <sup>®</sup> Metal Affinity Resin の平衡化	22
2-1-10. AspT の Resin への吸着	23
2-1-11. AspT の溶出 (精製)	22
2-1-12. SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法 (SDS-PAGE) による蛍光検出	24

第 2 部	プロテオリポソーム再構成	26
2-2-1.	<i>E. coli</i> lipid の超音波破碎	27
2-2-2.	再構成	28
第 3 部	アナログ基質による Exchange reaction	31
2-3-1.	Exchange reaction	32
第 4 部	SDS-PAGE を用いたプロテオリポソーム再構成後 AspT 蛋白質 定量	33
2-4-1.	再構成後蛋白質定量	34
2-4-2.	輸送能の算出	36
第三節	結果	37
第 1 部	L-aspartate、L-alanine 共存下での影響	37
2-1-1.	L-aspartate、L-alanine 共存下での基質依存的 AspT の蛍光修飾	37
第 2 部	各種アナログ基質存在下での影響	37
2-2-1.	D-aspartate、D-alanine、L-serine の Exchange reaction	37
2-2-2.	D-aspartate、D-alanine、L-serine 存在下での基質依存的 AspT の蛍光修飾	38
第四節	考察	42
第三章	TM3 GxxxG モチーフ内アルギニン残基の機能解析	47-65
第一節	緒言	47
第二節	方法	50
第 1 部	R76 変異体の発現・培養・精製	50
3-1-1.	形質転換	50
3-1-2.	AspT の発現	51
3-1-3.	集菌	51
3-1-4.	菌体破碎	51
3-1-5.	可溶化	52
3-1-6.	TALON <sup>®</sup> Metal Affinity Resin の平衡化	52

3-1-7. AspT の Resin への吸着	53
3-1-8. AspT の溶出 (精製)	53
3-1-9. 精製画分の蛋白質定量	54
<b>第 2 部 プロテオリポソーム再構成-2</b>	54
3-2-1. 薄膜形成法に用よる脂質調製	54
3-2-2. サイジング	55
3-2-3. 再構成	56
<b>第 3 部 輸送能解析</b>	56
3-3-1. 初速 1 分間における輸送能解析	56
3-3-2. 再構成後蛋白質定量	57
<b>第三節 結果</b>	58
<b>第四節 考察</b>	63
<b>第四章 総合討議</b>	66-67
Supplemental Figure	68-70
引用文献	71-74
謝辞	75

—凡例—

ADP	adenosine 5'-diphosphate
APS	ammonium peroxodisulphate
AspD	Aspartate- $\beta$ -decarboxylase
AspT	Aspartate : Alanine exchange protein
ATP	adenosine 5'-triphosphate
Bp	base pair
BPB	bromophenol blue
Bq	Becquerel
BSA	bovine serum albumin
CAPS	N-cyclohexyl-3-aminopropanesulfonic acid
Da	Dalton
D-Ala	D-alanine
D-Asp	D-aspartate
DDM	n-Dodecyl- $\beta$ -D-maltoside
dpm	disintegration/min
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
HEPES	N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-ethanesulphonic acid
IPTG	isopropyl 1-thio- $\beta$ -D-galactoside
$K_D$	Dissociation constant
$K_i$	Inhibition constant
$K_m$	Michaelis constant
LB	Luria Bertani
L-Ala	L-alanine
L-Asp	L-aspartate

L-Ser	L-serine
O. D.	optial density
OG	n-octyl- $\beta$ -D-gulcoside
OGM	Oregon Green 488 Maleimide
PBS	phosphate buffered saline
pmf	proton motive force
SDS	sodium dodecylsulphate
SDS-PAGE	SDS-polyacrylamide gel electrophoresis
<i>T. halophilus</i>	<i>Tetragenococcus halophilus</i>
TEMED	N,N,N',N'-tetrametythylenediamine
Tris	tris hydroxymethyl aminomethane
Triton X-100	polyoxyethylene (10) octylphenyl ether
Tween 20	polyoxyethylene sorbitan monolaurate
UV	ultra violet
$V_{\max}$	maximum velocity

その他、アミノ酸表記、一般化学物質は通例に従った。

# 第一章 序論

## 第一節

### 1-1. 微生物を利用した物質生産とトランスポーターとの関わり

微生物を利用した物質生産は、古来より人類が生活の中で生み出した生産技術である。日本国内では清酒・味噌・醤油等に代表される発酵醸造の基盤的技術として知られている。国外においてはヨーグルトやチーズ等の乳製品に始まり、パン、ウイスキー等、日常的に多くの人に好まれる食品づくりに欠かせない。近年では、微生物学や解析技術の発達により、食品にとどまらず、医薬品や化成品等、多くの有用化合物の原料が微生物を利用して生産されるようになった。それらはアミノ酸発酵、クエン酸発酵、乳酸発酵、アルコール発酵等、微生物の代謝を利用したものである。そのため、これら微生物を利用した物質生産及びその生産量改善手法は、菌量そのものを増やす大量培養系の確立は勿論のこと、既知の微生物細胞内代謝の強化や改変、あるいは新規代謝経路の探索が主となる。しかし、極端な代謝制御は、細胞内エネルギーレベルを低下させ、物質生産効率化の低下に繋がる恐れがある。そこで代謝反応の初期段階にあたる基質の菌体内への輸送、最終段階にあたる生産物の菌体外への輸送というプロセスが注目された。この一連の物質輸送を担うのが“輸送体 (トランスポーター)” という膜蛋白質である<sup>1,2)</sup>。

トランスポーターは脂質二重膜内に存在する。脂質二重膜は外壁のごとく、細胞内環境を外部環境から隔離しており、そのままでは水溶性物質を透過できない。そこで、トランスポーターが強固な外壁の関所として、細胞に栄養を届ける、老廃物を排出する機能を担う。このように、微生物における物質輸送は、酸性環境下等の厳しい環境から身を守り、ホメオスタシスを維持するために厳密にコントロールされており、不要な物質の取り込み及び排出は起こらないと考えられる。すなわち、トランスポーターの改変は、代謝反応の初期・最終段階にあたる取り込みや排出能を向上させ、物質生産体系の強化に繋がると期待される<sup>3)</sup>。微生物を利用した発酵産業界において、トランスポーターを改変し、生産効率化に成功した報告例は未だない。本研究室では、産業利用されている乳酸菌から単離したトランスポーターを用い、その基本的な輸送メカニズムや輸送機能について解析を進めてきた<sup>4-8)</sup>。基質特異性の幅、基質認識や基質輸送に関与する部位、

輸送速度制御部位が明らかになれば、他の産業微生物由来のトランスポーターへの応用も広がり、本研究が将来の産業界にもたらす期待は大きいと考えられる。

## 1-2. トランスポーターの分類

真核及び原核生物のゲノム解析が進み、全蛋白質の中でトランスポーター含む輸送蛋白質が 30% を占め、それらの多くが必須蛋白質であることが報告されている。Milton Saier Lab Bioinformatics グループが運営する Transporter Classification Database (TCDB) では、輸送蛋白質を 5 種類に分類している (<http://www.tcdb.org/>)<sup>9,10)</sup>。すなわち、1) エネルギーを必要としない受動拡散をするチャンネル、ポア、2) ATP を消費する一次性輸送体、3) 電気化学ポテンシャル駆動型の二次性輸送体、4) PEP (phosphoenolpyruvate) 依存性リン酸基転移駆動型輸送体、5) 電子輸送担体 (Transmembrane Electron Carrier) である。3) の二次性輸送体には、一次エネルギーを消費することなく 1 種類の基質を輸送するユニポーター、2 種類以上の基質を対向輸送するアンチポーター、2 種類以上の基質を同方向に輸送するシンポーターが含まれる。本論文では 3) の二次性輸送体について議論を展開する。

## 1-3. 脱炭酸共役輸送

乳酸菌の中には、種々のアミノ酸や有機酸を脱炭酸し、脱炭酸反応と共役して生産物を排出する性質を有するものがある<sup>5)</sup> (Table 1)。例えばワイン醸造の過程では、リンゴ酸 (malate) を乳酸 (lactate) に脱炭酸し、細胞外へ排出することで、香味を改善したり、雑菌の繁殖を防いだりするのに役立っている。一方、脱炭酸反応によるガスの発生が産業上問題になることもある。例えば *Lactobacillus* subsp. M3 株は、細胞内で Aspartate を Alanine に脱炭酸する際に発生する CO<sub>2</sub> で減塩醤油の発泡汚染を招いている<sup>4)</sup>。しかし、醤油醸造で使われる *Tetragenococcus halophilus* D10 株でも、同じ Aspartate : Alanine 脱炭酸反応が見いだされたが<sup>5)</sup>、この菌においては、酸味のある aspartate を甘みのある alanine に脱炭酸し、細胞外へ排出することで香味改善としての機能を持っており、産業的価値が高い。

#### 1-4. Aspartate : Alanine 交換輸送体 AspT

本博士研究で扱ったトランスポーターは、1-3. で述べた醤油醸造時に用いられる乳酸菌 *T. halophilus* D10 株より単離された、Aspartate : Alanine 交換輸送体 AspT という膜蛋白質である<sup>4)</sup>。AspT は二次性輸送体で、細胞内外の alanine 濃度差を駆動力に、aspartate を細胞内へ取り込み、alanine を細胞外へ排出するアンチポーターである (Fig. 1)。具体的には、AspT によって細胞内に取り込まれた aspartate が、AspT とオペロンを形成するアスパラギン酸脱炭酸酵素 Aspartate- $\beta$ -decarboxylase (AspD) によって alanine へと脱炭酸され、再び AspT によって排出される。この一連の輸送過程で、proton-motive force (PMF) が生じる。すなわち、脱炭酸反応により細胞内  $H^+$  が alanine に付加した状態で細胞外へ輸送されることで、膜を介したプロトン濃度勾配 ( $\Delta pH$ ) が生じ、電荷 -1 の aspartate と電荷 0 の alanine が 1 : 1 で交換されることで、膜電位 ( $\Delta \Psi$ ) が生じる。これら PMF を ATPase によってエネルギー (ATP) へと変換し、菌は酸性環境下での生存に利用していると考えられている<sup>4,5)</sup>。

AspT は、反応は輸送体蛋白質 AspT と脱炭酸酵素 AspD のみのシンプルな系で完結すること、脱炭酸反応によって発生する  $CO_2$  が膜を通過し拡散していくため反応は不可逆的であること、そして反応系は他の代謝系とは独立して起こるという特徴は、解析において利点となる。

また、AspT のように脱炭酸及びエネルギー生産共役反応を行うトランスポーターは、菌体内のエネルギーレベルを低下させずに物質生産と輸送を維持できることから、産業対象として有益と考えられる。また AspT はグルタミン酸やコハク酸など<sup>11)</sup>、産業上有用なアミノ酸、有機酸を輸送するトランスポーターが多く保存されている Aspartate : Alanine Exchanger (AAEx) family のメンバーである (TC# 2.A.81) (Fig. 2)<sup>9,10)</sup>。AAEx family の構成メンバーで、その機能が解明された膜蛋白質は少なく、AspT の輸送メカニズムの解明は産業的にも学術的にも重要な位置づけにあると考えられる。

#### 1-5. AspT の研究成果及び本論文における目的

AspT は 10 の膜貫通領域 (transmembrane domain ; TM) から成る (Fig. 3)<sup>7)</sup>。このうち、第 3 膜貫通領域 (TM3) は AAEx family 間で保存性が高く、脂質二重膜内という

疎水的環境にありながら、基質が作用できる親水性領域や、荷電性アミノ酸残基の存在が確認されており、基質の透過経路と推察されている (Fig. 3)<sup>7)</sup>。また、AspT は L-aspartate と L-alanine とで異なる結合部位を有することも推察されている<sup>8)</sup>。しかし、AspT の基質結合に伴う構造変化と基質輸送との関係は明らかにされていない。

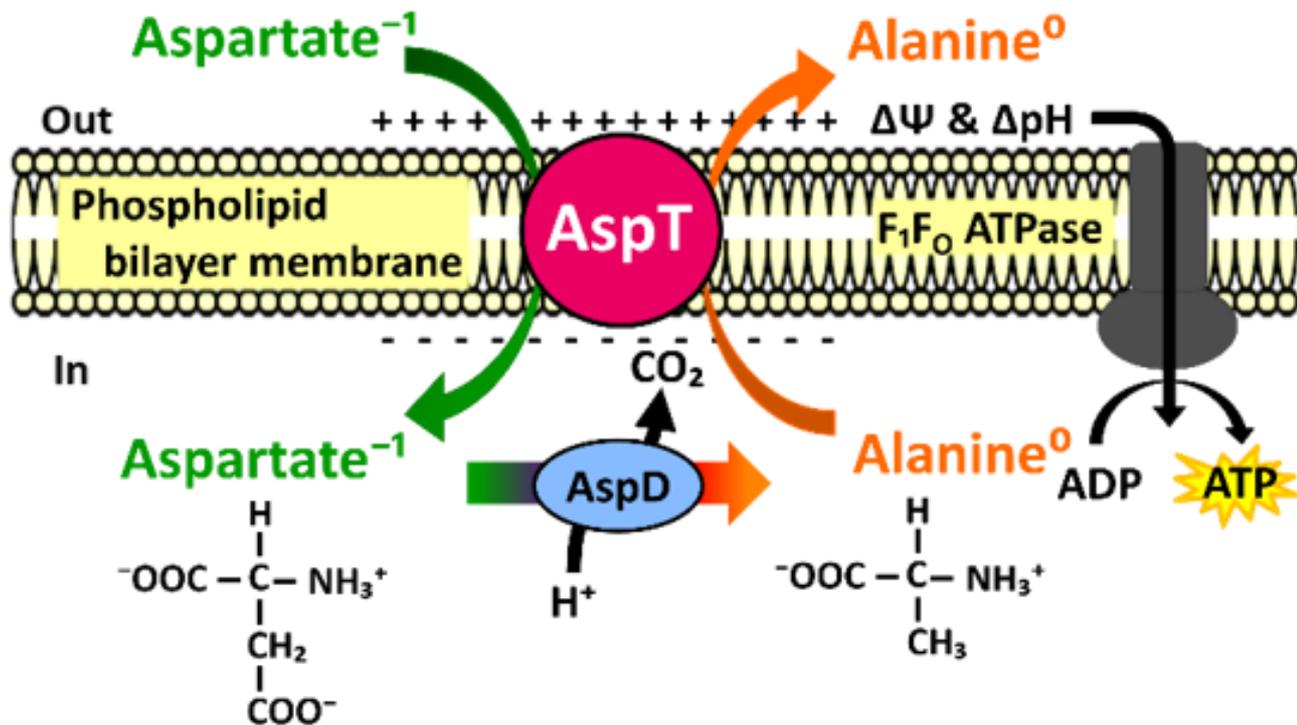
輸送を達成するためのトランスポーターの共通概念として、1960年代に“交互アクセスモデル”が提唱された<sup>12-14)</sup>。これは、外向き開口構造をとるトランスポーターに細胞外から基質が入り込み、基質結合型として閉口状態をとった後、内向き開口構造をとって細胞内へ排出される (その逆もしかり) という、交互に開閉を繰り返すモデルである。近年、解析が困難とされる膜蛋白質でも立体構造解析が進み、トランスポーターの多様な輸送形態が解明されつつある。AspT ではどのような機構で交互アクセスを達成するのだろうか。本博士論文では、AspT の輸送モデルを考察するため、以下の研究に取り組んだ。

第二章で、SH 基に特異的に結合する蛍光修飾試薬を用いて、基質依存的な AspT の構造変化を解明し、キネティクスパラメータと共に、一連の基質輸送メカニズムに関して考察した。

第三章で、TM3 の特徴的モチーフ GxxxG motif 内の arginine (R76) 残基に焦点をあて、R76 を様々なアミノ酸残基に置換し、人工脂質二重膜小胞 (プロテオリポソーム) 再構成系を用いた輸送活性の解析から、輸送における R76 の機能を考察した。

Table 1 Decarboxylation example.

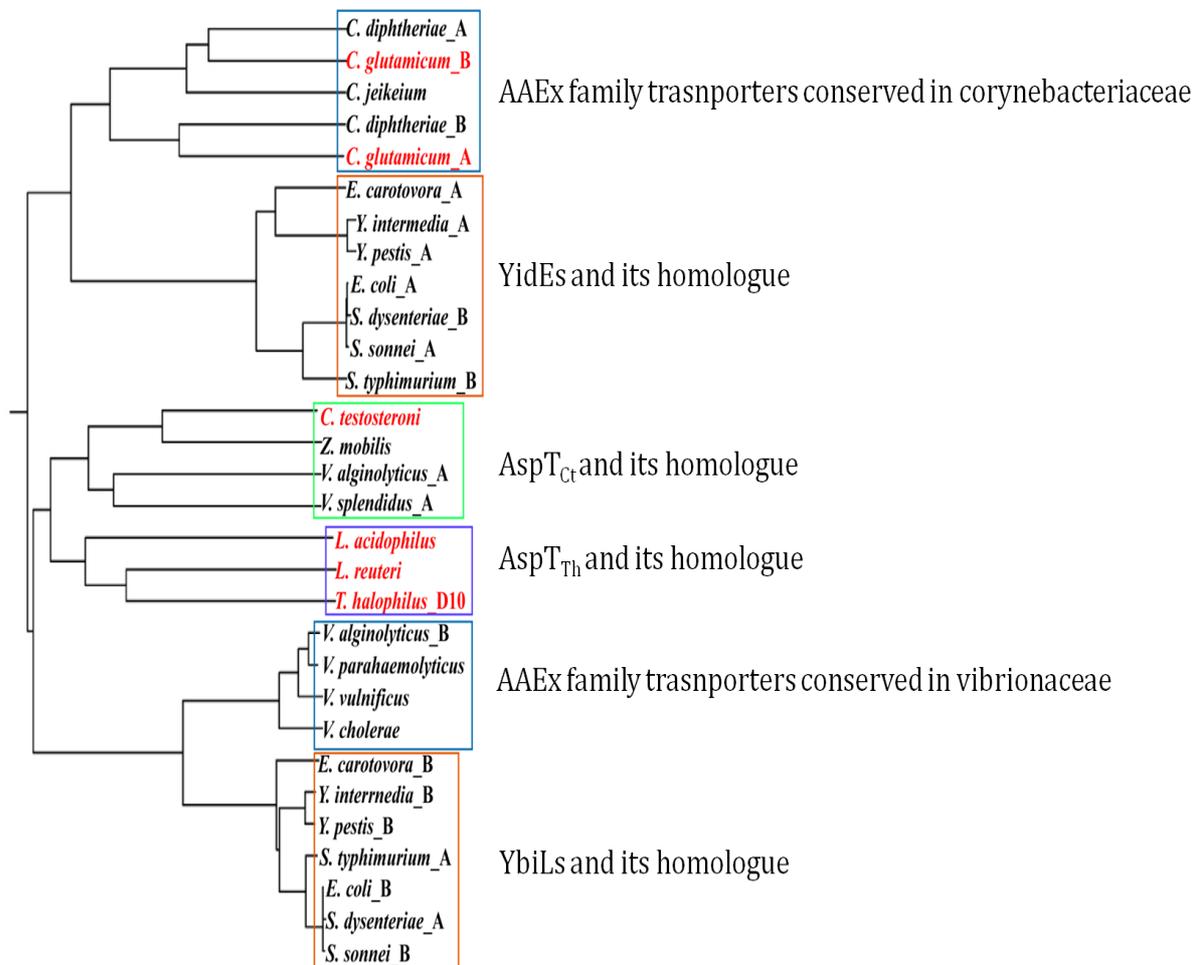
<b>Precursor : Product</b>	<b><i>Organism (genera)</i></b>
<b>Aspartate : Alanine</b>	<i>Lactobacillus sp.</i> <i>Tetragenococcus halophilus</i>
<b>Arginine : Ornithine</b>	<i>Lactococcus lactis</i> <i>Lactobacillus sake</i>
<b>Arginine : Agmatine</b>	<i>Escherichia coli</i>
<b>Glutamate : GABA</b>	<i>Lactobacillus sp.</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Listeria monocytogenes</i>
<b>Histidine : Histamine</b>	<i>Lactobacillus buchneri</i>
<b>Lysine : Cadaverine</b>	<i>Escherichia coli</i>
<b>Phenylalanine : Phenylamine</b>	<i>Lactobacillus buchneri</i>
<b>Tyrosine : Tyramine</b>	<i>Lactobacillus buchneri</i>
<b>Oxalate : Formate</b>	<i>Oxalobacter</i>
<b>Malate : Lactate</b>	<i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Oenococcus oeni</i> <i>Lactococcus lactis</i>
<b>Citrate : Lactate</b>	<i>Oenococcus oeni</i> <i>Leuconostoc mesenteroides</i> <i>Lactococcus lactis</i>



[Abe, K., et al. (1996) J Biol Chem. 271:3079-3084.]

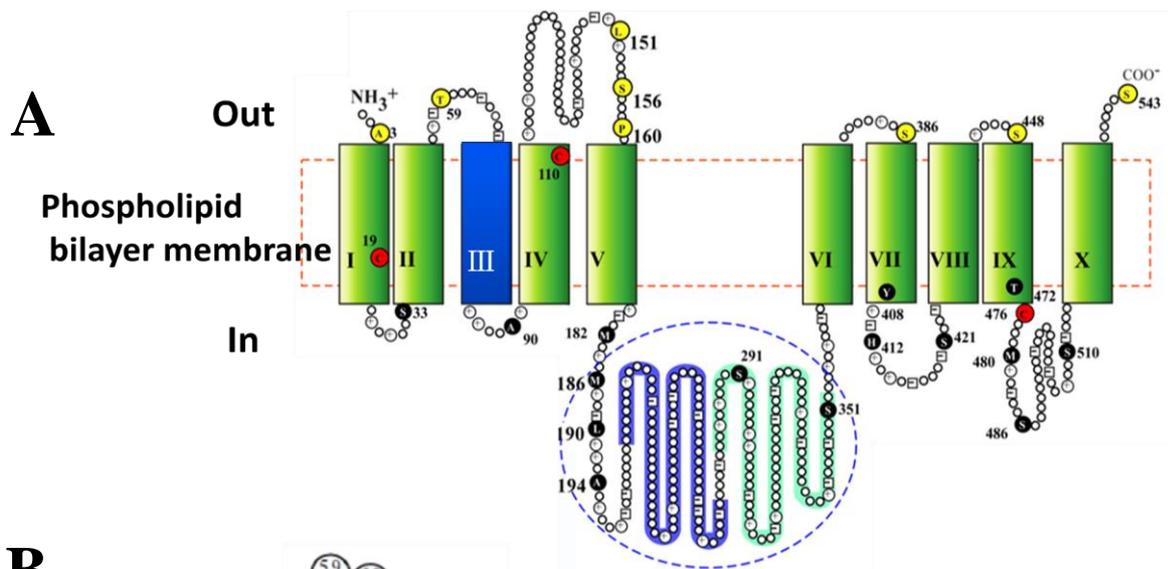
**Fig. 1 L-aspartate : L-alanine exchange reaction.**

AspT imports extracellular L-aspartate into the cell and releases intracellular L-alanine to the extracellular milieu. AspT acts in conjunction with aspartate decarboxylase (AspD) to create a proton concentration gradient and a potential across the cell membrane, contributing to ATP synthesis by  $\text{F}_1\text{F}_0$ -ATPase.

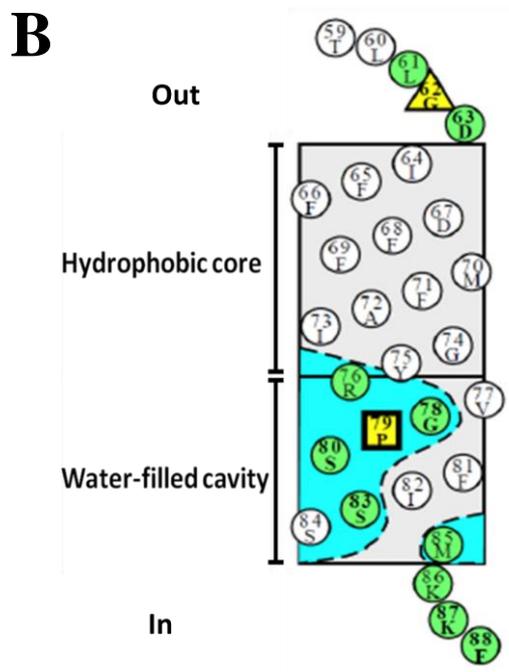


**Fig. 2 Dendrogram of putative Aspartate : Alanine Exchanger (AAEx) family transporters.**

This diagram represents AAEx family. AAEx family contains industrially important transporters, aspartate : alanine antiporter, succinic acid exporter and glutamate exporter and so on.



[Nanatani, K., et al. (2007) J Bacteriol. 189:7089-7097]



[Nanatani, K., et al. (2009) J Bacteriol. 191:2122-2132]

**Fig. 3 Membrane topology of AspT (A) and TM3 model (B).**

(A) The predicted topology of AspT. The residues replaced by a cysteine residue for labeling experiment are depicted as letters enclosed in circles, with numbers indicating the positions. The three cysteine residues (cysteine 19, 110 and 476) that were replaced by alanine are depicted as letters in red circles. The large hydrophilic loop region is surrounded by a dashed circle.

(B) The site-directed fluorescence labeling experiment data of TM3. Green is represented labeled mutants regardless of the presence or absence of L-aspartate, yellow is labeled mutants either presence or absence of aspartate and white is not labeled mutants.

## 第二章 蛍光修飾試薬を用いた基質依存的構造変化の解析

### 第一節 緒言

本研究室ではこれまで、AspT の輸送機能を明らかにすべく、多くの酵素学的解析を進めてきた。これまでの成果を以下に簡単に記した。

初めに AspT の輸送に関する成果から説明する。前任者である笹原は、AspT の輸送機能を明らかにするため、精製 AspT を人工二重膜小胞に再構成したプロテオリポソームを用いて輸送活性測定を行い、ミカエリス定数  $K_m$ 、最大速度  $V_{max}$ 、解離定数  $K_D$  等の各種輸送パラメータの算出や基質特異性の解析を行った<sup>8)</sup>。その結果、L-aspartate 自己交換輸送における L-aspartate の  $K_m$  は 0.35 mM、L-alanine 自己交換輸送における L-alanine の  $K_m$  は 26 mM と算出され、 $V_{max}$  に大差はないものの、L-aspartate の方が L-alanine よりも AspT への結合親和性が高いことが明らかとなった<sup>8)</sup>。また L-aspartate、L-alanine 各自己交換輸送において、様々な基質 (アミノ酸、有機酸) の取り込み阻害を確認した結果、L-aspartate、L-alanine の輸送を特異的に阻害する基質が存在し、それらの L-aspartate、L-alanine に対する阻害定数  $K_i$  は異なることが明らかとなった<sup>8)</sup>。L-aspartate と L-alanine とで結合部位が同一であるならば、L-aspartate に対する  $K_m$  と  $K_i$ 、または L-alanine に対する  $K_m$  と  $K_i$  は同程度の値を示すはずである。これらのことから、AspT は L-aspartate、L-alanine とで異なる結合部位を有することが推察された<sup>8)</sup>。これを受け、自身の修士論文研究では、同じくプロテオリポソームを用いて、L-aspartate と L-alanine 共存下での L-alanine 自己交換輸送に対する L-aspartate の阻害、L-aspartate 自己交換輸送に対する L-alanine の阻害を確認した。その結果、L-alanine 自己交換輸送における L-aspartate の  $K_i$  は 10.9 mM、L-aspartate 自己交換輸送における L-alanine の  $K_i$  は 128.5 mM と算出された。これらの数値はいずれも笹原が算出した  $K_m$  に比べて 30 倍以上高くなり、各基質は他方の基質の輸送を弱いながら阻害することがわかった (鈴木 修士論文 2013, Supplemental Fig. 1)。結合部位が異なるにも関わらず、互いの輸送を阻害するという結果について、次に構造に関する成果と合わせて説明する。

AspT の二次構造は、前任者七谷が行った  $\beta$ -lactamase (BlaM) fusion 法及び Cysteine scanning 法の組み合わせにより決定した<sup>9)</sup>。10 の膜貫通領域のうち、AAEx ファミリー

間で保存性が高い TM3 に注目して解析を進めたところ、TM3 は基質が作用できる親水性領域と作用できない (作用しにくい) 疎水性領域に分かれており、輸送基質である L-aspartate の存在の有無で、周辺の親水・疎水環境が変化するアミノ酸残基が存在することが明らかとなった。これらのことから TM3 は基質の透過経路を形成することが推察された<sup>7)</sup>。そこで木村は L-aspartate 存在下で周辺環境を変化した TM3 内の 3 つのアミノ酸残基 glycine 62 (G62)、Proline 79 (P79)、Serine 83 (S83) を用い、基質の種類や濃度を変えることで、より詳細に基質依存的な構造変化を追った (木村 修士論文 2012)。方法は本章で述べる cysteine 置換変異体と SH 基修飾蛍光試薬を用いた解析と同じであるため、詳細については第二部 方法以降を参照されたい。解析の結果、G62C では L-aspartate、L-alanine 共に濃度依存的に蛍光修飾効率が減少した。P79C では L-aspartate 濃度依存的に蛍光修飾効率が上昇した一方、L-alanine では蛍光修飾効率に変化は見られなかった。S83C では L-aspartate、L-alanine 共に常に蛍光を発し、基質濃度依存的な蛍光修飾効率の変化は確認できなかった。これらのことから、L-aspartate、L-alanine の存在が AspT の異なるコンフォメーション変化を生むと推察された (木村 修士論文 2012, Supplemental Fig. 2)。すなわち、笹原の基質特異性解析、自身の修士論文時の成果である L-aspartate、L-alanine 相互阻害キネティクス解析、そして木村の蛍光修飾解析結果から、AspT は L-aspartate と L-alanine とで異なる結合部位を有し、かつ異なる結合コンフォメーションをとることが推察された (鈴木 修士論文 2013, Supplemental Fig. 1)。

本章では L-aspartate、L-alanine 共存時の構造変化を解析することで、生理的状态ではどのような構造をとって輸送が進んでいるのか考察すると共に、相互阻害キネティクスで得られた“弱い阻害”の意味を探る。また、各種アナログ基質 (D-aspartate、D-alanine、L-serine) 結合時の構造変化も解析し、新たな AspT の基質輸送モデルを提示する。

## 第二節 方法

### 第 1 部 AspT の蛍光修飾

蛍光修飾試薬として Oregon Green 488 Maleimide (OGM) (ThermoFisher SCIENTIFIC) を用いた。OGM は親水性領域に露出した SH 基を特異的に修飾し、蛍光を発する試薬であり、疎水性領域に存在する SH 基には反応しない<sup>6,7,15)</sup>。この性質を利用して、基質結合により変化する AspT の構造を確認した。以下に示したのは AspT 発現から精製までの基本的な操作及び蛍光修飾の方法である。

#### 2-1-1. AspT の発現

AspT の発現には、大腸菌発現ベクター pTrc99A に *aspD* 及び *aspT* から成る *asp* operon をサブクローニングした pTrc-*aspD/T* を用いた。本発現系において、*aspD* 及び *aspT* 両遺伝子は、*trc* プロモーターによって発現を制御され、IPTG 添加によって両遺伝子は共発現する。本発現系を用いた大腸菌を宿主とした *asp* operon の発現は、誘導菌体により培地中の aspartate が脱炭酸の変換反応により alanine へと変換されるのを定量的に調べることによって確認された<sup>5)</sup>。また *aspD* も発現させることで *aspT* の発現効率が良くなることも知られており、本研究では、後述のように既に確立されている方法に従って発現から培養までを行うこととした。

#### 2-1-2. 発現プラスミド

AspT の発現には *Escherichia coli* XL 1-blue 株 (*recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F'proAB lacI<sup>q</sup>Z/M15 Tn10 (Tet<sup>r</sup>)]*) を用いた。XL3 は *E. coli* XL1 blue 株に pMS421 (*Spec<sup>r</sup>, lacI<sup>q</sup>*) を保持させた菌株である<sup>16)</sup>。AspT の発現用ベクターは pTrc99A を使用した。(i) N 末端側に Histidine-tag を持つ野生型 AspT、(ii) 中央親水性 big-loop に His-tag を持ち (Leu 331 と Lys 332 との間)、内在性 cysteine を全て alanine に置換した Cysless 体 AspT において、TM3 の各アミノ酸残基を cysteine に置換した (single-cysteine) 変異体シリーズ、以上 2 種の構造体の AspT を発現する pTrc99A プラスミドを用いて *E. coli* XL3 を形質転換し、以降の実験に用いた (Fig. 4)。

### 2-1-3. コンピテントセル

コンピテントセルは以下の要領で調製したものをを用いた。まず *E. coli* XL3 の前培養液を 100 mL の LB 培地に 1 mL 添加し、 $O.D._{650} \approx 0.5$  になるまで 18°C で培養した。その後、培養液を氷上で 30 分間冷却した。2,500×g、4°C、15 分間遠心し、上清を除去し、菌体を 0°C で冷却した 16 mL の TB で穏やかに懸濁、洗浄する操作を 2 回繰り返した。上清除去後、ペレットを 0°C で冷却した 4 mL の TB (Transfer buffer) で懸濁した。さらに 0.3 mL の DMSO (7%) を添加し、氷上で 10 分間静置した。これを 0.1 mL ずつ分注、液体窒素で瞬間凍結後、-80°C で保存した。以下に培地、緩衝液の組成を示した。表記は全て終濃度で示した。

<LB (Luria-Bertani) medium (/ liter)>

Trypton . . . . . 10 g

Yeast Extract . . . . . 5 g

NaCl . . . . . 5 g

<TB (/ liter)>

10 mM PIPES . . . . . 3 g

15 mM CaCl<sub>2</sub> . . . . . 2.2 g

250 mM KCl . . . . . 18.6 g

NaOH で pH 6.7 に調整

55 mM MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O . . . . 10.9 g

### 2-1-4. 形質転換

形質転換には 2-1-1 の *E. coli* XL3 株と pTrcAspT 各プラスミド (N-His6 AspT (WT)、Cysless 体、TM3 変異体シリーズ) を用いた。各プラスミド溶液 (100-200 ng/μL) を *E. coli* XL3 株コンピテントセル懸濁液 (20 μL) に添加し、混和した後、5 分間氷上に静置した。その後、滅菌 MQ を 180 μL 添加し、total 量を 200 μL とした。これを LB agar プレート (30 mM D-glucose、30 μg/mL Carbenicillin または Ampicillin、30 μg/mL

Spectinomycin) に全量播種し、37°C、約 24 時間培養を行った。形質転換体の生育したプレートは、4°C で保存し 1 か月の使用にとどめた。

#### 2-1-5. AspT の発現

pTrc AspT 保持 *E. coli* XL3 株を 2-1-3 のプレートに生育したコロニーより釣菌し、5 mL の 2×LB 液体培地 (30 mM D-glucose、30 µg/mL Carbenicillin、30 µg/mL Spectinomycin) に懸濁し、125 rpm、30°C、25 時間振盪培養した。この前培養液 5 mL 全量を 250 mL の LB 液体培地 (30 mM D-glucose、30 µg/mL Carbenicillin、30 µg/mL Spectinomycin) に添加し、160 rpm、37°C で O. D.<sub>660</sub>=0.5~0.6 に達するまで回転振盪培養した。上記 O. D.<sub>660</sub> に達したところで、250 mL の LB 液体培地 (30 mM D-glucose、30 µg/mL Carbenicillin、30 µg/mL Spectinomycin、1 mM Pyridoxal-5'-phosphate、50 mM Asp-K [pH 7.0]) を追加し、37°C で O. D.<sub>660</sub>≒0.4 になるまで約 1 時間静置培養した。上記 O. D.<sub>660</sub> に達したところで終濃度 0.2 mM となるよう 1 M IPTG を添加し、37°C、12 時間静置培養した。

#### 2-1-6. 膜画分取得

本培養菌液を 5,470×g、10 分、4°C 遠心し (5,950 rpm, 本体 ; himac CR20G II, ローター ; R14A (Hitachi))、集菌した。菌体は 0.1 M K-Pi buffer [pH 7.0] で懸濁し、全菌液を 50 mL 容量ファルコンチューブに移し、40 mL にフィルアップした。そこに終濃度 1 mM となるよう 300 mM (飽和) PMSF を 133.3 µL 添加した。以下で添加する PMSF は、全て終濃度 1 mM になるよう添加した。懸濁菌液は 4,500×g、10 分、4°C 遠心し (5,970 rpm, 本体 ; himac CR20G II, ローター ; RPR-16 (Hitachi)) 洗浄した。上清を除去し、再度 0.1 M K-Pi buffer [pH 7.0] に懸濁、40 mL にフィルアップ後、300 mM PMSF を 133.3 µL 添加し同条件で再度洗浄操作を行った。洗浄した菌体のペレットを 1 フラスコ当たり 5 mL の割合になるよう Lysis solution で懸濁し、浸透圧法により菌体を破碎した<sup>7)</sup>。50 mL 容ファルコンチューブに 5 mL ずつ分注し、ウォーターバスで 10 分、37°C インキュベートした。10 分後、300 mM PMSF を 16.7 µL 添加し、ボルテックスで十分混合した後、再び 10 分、37°C インキュベートした。冷 MQ (あらかじめ凍

らせ、半解した氷冷 MQ を使用した) で 40 mL にフィルアップし、300 mM PMSF を 133.3  $\mu$ L 添加した。10,000 $\times$ g、20 分、4 $^{\circ}$ C 遠心し (8,900 rpm, 本体 ; himac CR20G II, ローター ; RPR-16 (Hitachi))、膜画分を取得した。膜画分は再び冷 MQ で懸濁、40 mL にフィルアップし、300 mM PMSF を 133.3  $\mu$ L 添加した。この洗浄操作を合計 4 回繰り返した。

#### <300 mM Phenylmethylsulfonyl Fluoride (PMSF)>

PMSF を 100% EtOH に溶解させた。

以降全ての PMSF は要時調製した。

#### <Lysis solution>

(濃度表記は全て、“ $\leftarrow$ ” より左側が終濃度、右側がストック濃度となっている。“ $\leftarrow$ ” が  
ないものは数値自体がストック濃度を表している。)

##### 【Stock (250 mL)】

10 mM Tris  $\cdot \cdot \cdot \cdot \cdot \cdot \cdot \cdot \cdot$  0.303 g

HCl で pH 7.5 に調整

5 mM EDTA  $\cdot \cdot \cdot \cdot \cdot \cdot \cdot \cdot \cdot$  0.466 g

Total                    250 mL (MQ で Fill up)

4 $^{\circ}$ C で保存した。

##### 【使用時 (5 mL あたり) (必要に応じて液量は調製した)】

300  $\mu$ g/mL Lysozome  $\cdot \cdot \cdot \cdot \cdot$  0.0015 g

1 mM $\leftarrow$ 300 mM PMSF  $\cdot \cdot \cdot \cdot \cdot$  16.7  $\mu$ l

上記を stock 5 mL に添加し、Lysis solution として用いた。

### 2-1-7. 蛍光修飾

十分洗浄した膜画分を 5 mL の 20 mM K-Pi buffer [pH 8.0] で懸濁した。2 本分の膜画分懸濁液をひとまとめに回収、12 mL にフィルアップし、300 mM PMSF を 40  $\mu$ L 添

加した。これらを再び 2 mL ずつ 15 mL 容量ファルコンチューブに分注し、各ファルコンチューブに反応基質を目的の濃度になるよう添加し、20 mM K-Pi buffer [pH 8.0] を用いて全量を 5 mL とした。濃度条件は、以下表のとおりである。

**Table 2 Density condition.**

①L-alanine 固定 vs L-aspartate	L-alanine ; 0、150、500 mM それぞれに対し、 L-aspartate ; 0、1、5、10、25、50 mM
②L-aspartate 固定 vs L-alanine	L-aspartate ; 10 mM に対し、 L-alanine ; 0、10、50、100、250、500 mM
③D-aspartate	0、1、5、10、25、50 mM
④D-alanine	0、10、50、100、250、500 mM
⑤L-serine	0、10、50、100、250、500 mM

そこに 300 mM PMSF を 16.7  $\mu$ L 添加し、ウォーターバスで 25°C、10 分インキュベートした。10 分後、終濃度 40  $\mu$ M となるよう 2 mM OGM を 100.3  $\mu$ L 添加した。OGM の消光を防ぐため、以下の操作は全てアルミホイルや段ボールを使って遮光しながら行った。300 mM PMSF を 17.1  $\mu$ L 添加し、ウォーターバスで 25°C、20 分インキュベートした。20 分後、終濃度 6 mM となるよう 600 mM  $\beta$ -mercaptoethanol を 51.3  $\mu$ L 添加し、未反応の OGM の反応を停止した。300 mM PMSF を 17.3  $\mu$ L 添加し、2,900 $\times$ g、20 分、4°C 遠心し (4,000 rpm, 本体 ; himac CF16RX, ローター; T4SS31 (日立工機))、z 上清の反応基質溶液を除去することで、OGM 反応膜画分を回収した。回収した膜画分は 1 mL の冷 MQ で懸濁し、1.6 mL 容量エッペンドルフチューブに移した。300 mM PMSF を 3.3  $\mu$ L 添加し、17,400 $\times$ g、20 分、4°C 遠心した (13,380 rpm, 本体 ; KUBOTA3700, ローター ; KUBOTA AF-2536A (久保田製作所))。ペレットを 1 mL の冷 MQ で懸濁、300 mM PMSF を 3.3  $\mu$ L 添加し、同条件で遠心した。この洗浄操作を計 4 回行った。

<2 mM OGM>

Oregon Green 488 Maleimide (MW 463.35)

0.005 g を N, N-dimethylformamide (DMF) 5.39 mL で溶解させた。200  $\mu$ L 容量エッペンドルフチューブに分注して、遮光用袋に入れ、-20°C で保存した。

### 2-1-8. 可溶化

2-1-7. で洗浄した蛍光修飾後膜画分のペレットを、1 mL の Solubilization buffer で懸濁し、2 時間、4°C ローテーターを用いて転倒攪拌した<sup>18)</sup>。アルミホイールで覆ったエッペンドルフチューブを使用し、可溶化中は更にローテーターにアルミホイールをかぶせて遮光を徹底した。可溶化液は微量遠心機を用いて 200,000 $\times$ g、30 分、4°C 超遠心した (74,000 rpm, 本体 ; himac CS100EX, ローター ; ST20AT2 (日立工機))。

<Soubilization buffer (30 mL/sample)>

(濃度表記は全て、“←” より左側が終濃度、右側がストック濃度となっている。)

20 mM←1000 mM K-Pi [pH 7.0]	0.6 mL
20%←50% Glycerol	12 mL
1 mM←300 mM PMSF	0.1 mL
1.5%←10% DDM	4.5 mL
<u>MQ</u>	<u>12.8 mL</u>
Total	30 mL

### 2-1-9. TALON® Metal Affinity Resin の平衡化

可溶化中に、蛋白質吸着に用いる TALON® Metal Affinity Resin の平衡化を行った。Resin を 1.6 mL 容量エッペンドルフチューブに 50  $\mu$ L 分注し、MQ 1 mL を添加、ボルテックスで混合した。1,000 $\times$ g、3 分、4°C 遠心し (3,210 rpm, 本体 ; KUBOTA3700, ローター ; KUBOTA AF-2536A (久保田製作所))、Resin を回収した。上清はピペットマンを用いて除去し、再び MQ を 1mL 添加、混合し、遠心する洗浄操作を 2 回行った。計 3 回の MQ 洗浄後、Wash buffer を 1 mL 添加し、MQ 同様の操作を 2 回行った。

2 回の置換操作終了後、Resin に Wash buffer を 1mL に添加、混合し、ローテーターを用いて 1 時間以上、4°C で攪拌した (平衡化)。

<Wash buffer>

(濃度表記は全て “←” より左側が終濃度、右側がストック濃度となっている。)

20 mM←1 M K-Pi [pH 7.0]

20%←50% Glycerol

1 mM←300 mM PMSF

0.01%←10% DDM

MQ

#### 2-1-10. AspT の Resin への吸着

平衡化した Resin を 1,000×g、3 分、4°C 遠心し (3,210 rpm, 本体 ; KUBOTA3700, ローター ; KUBOTA AF-2536A (久保田製作所)), 上清を除去した。可溶化液を平衡化 Resin 50 μL に添加し、2 時間、4°C ローターを用いて転倒攪拌した。可溶化時同様、エッペンドルフチューブ及びローテーターをアルミホイールで覆い、十分遮光した。

#### 2-1-11. AspT の溶出 (精製)

吸着後、1,000×g、3 分、4°C 遠心し (3,210 rpm, 本体 ; KUBOTA3700, ローター ; KUBOTA AF-2536A (久保田製作所)), 上清はピペットマンで除去した。1 mL の Wash buffer で Resin を懸濁し、数回転倒混和した。同条件で遠心し、Resin の洗浄と回収を計 4 回行った。Resin 50 μL あたり 50 μL の Elution buffer を添加し、10 分、4°C ローターを用いて遮光しながら転倒攪拌した。1,000×g、3 分、4°C 遠心し (3,210 rpm, 本体 ; KUBOTA3700, ローター ; KUBOTA AF-2536A (久保田製作所)), 精製画分として上清を回収した。精製画分は 5 μL ずつ 200 μL 容量エッペンドルフチューブに分注し、アルミホイールや遮光袋で十分遮光し、液体窒素で瞬間凍結後、-80°C で凍結した。

<Elution buffer>

(濃度表記は全て、“←”より左側が終濃度、右側がストック濃度となっている。)

20 mM←1 M K-Pi [pH 7.0]

20%←50% Glycerol

1 mM←300 mM PMSF

0.01%←10% DDM

250 mM←1 M Imidazole

MQ

**2-1-12. SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法 (SDS-PAGE) による蛍光検出**

SDS-PAGE は Laemmli の方法に従った。ゲル板 (10×10.5×0.1 cm) に 10% 分離ゲルを流し込み、室温でゲルが固まった後、3% 濃縮ゲルを流し込み固めた。以下に示した濃度表記は全て、“←”より左側が終濃度、右側がストック濃度となっている。“←”がないものは数値自体がストック濃度を表している。

<10% 分離ゲル>

Acrylamide . . . . . 2.66 mL

0.75 M←1.5 M Tris-HCl [pH 8.8] . . . . . 2 mL

0.1%←10% SDS . . . . . 0.08 mL

MQ . . . . . 3.22 mL

0.003 M←0.80 M Ammonium Persulfate (APS) . . . . . 0.032 mL

TEMED . . . . . 0.012 mL

Total 8 mL

<3% 濃縮ゲル>

Acrylamide	0.66 mL
0.125 M←0.5 M Tris-HCl [pH 6.8]	1 mL
0.1%←10% SDS	0.04 mL
MQ	2.27 mL
0.003 M←0.80 M APS	0.016 mL
<u>TEMED</u>	<u>0.006 mL</u>
Total	4 mL

<10×泳動用緩衝液 (使用時は 1×にして用いた)>

0.25 M Tris	30.29 g
HCl で [pH 8.3] に調整	
1.92 M Glycine	144.1 g
<u>1% SDS</u>	<u>10 g</u>
Total	1 L (MQ で fill up)

泳動は 2 回行い、いずれも泳動サンプルは変異体、条件ごとにそれぞれ 10  $\mu$ L 調製した。1 回目の泳動はバンド強度から蛋白質量を揃えることを目的とした。まず、600  $\mu$ L 容量エッペンドルフチューブに、精製画分 3  $\mu$ L と精製時に用いた Elution buffer 7  $\mu$ L を添加し、ボルテックスを用いて十分混合した。そこに 2-mercaptoethanol 含有 5× SAB を 2.5  $\mu$ L 添加し、ボルテックスで混合した。ウォーターバスを用いて 37°C、30 分間 SDS 化した。この際もアルミホイルを被せ、遮光を徹底した。SDS 化終了後、全 12.5  $\mu$ L を上記条件で作製した 10% ポリアクリルアミドゲルに添加した。4°C 条件下で、200 V 定電圧、45 分程度泳動を行った。泳動の際も、泳動装置に段ボール箱を被せて遮光した。泳動後ゲルは MQ で 60 rpm、30°C、5 分間 (MULTISHAKER MMS-3010 (EYELA 東京理化学機器)) で往復振盪し、SDS を洗浄する操作を 3 回行った。ゲルの入ったタッパーにはアルミホイルを被せた (以下同)。洗浄後、染色液 CBB Stain One Super (nacalai tesque) を用いて、60 rpm、30°C、30 分 (MULTISHAKER MMS-3010

(EYELA 東京理化機器)) で往復振盪しながら染色した。25% メタノール水で 60 rpm、30°C、60 分 (MULTISHAKER MMS-3010 (EYELA 東京理化機器)) で往復振盪し脱色した。軽く MQ でゲルを洗浄後、スキャナーを用いてゲル画像を取り込んだ。画像は Image J software (US National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA; <http://imagej.nih.gov/ij/>, 1997–2014)<sup>18, 19)</sup> でバンド強度を算出した。算出値をもとに、“S83C 基質無” のバンド強度、すなわち蛋白質量 (蛋白質液量としては 3  $\mu$ L 分) と同程度になるよう、他のサンプルの蛋白質液量を算出した。2 回目の泳動では、全サンプルの蛋白質量が揃うよう、精製画分と Elution buffer の量を調製した (全量 10  $\mu$ L)。2.5  $\mu$ L の 5 $\times$ SAB を添加し、1 回目同様、SDS 化、泳動、洗浄を行い、LAS-4000 imaging system (FUJIFILM) で蛍光検出を行った (条件 ; Method ; Fluorescence : SYBR Green, Bright ; Blue, Filter ; Y515Di, Exposure Type ; Increment, Interval Time ; 10 sec, Sensitivity/Resolution ; Standard)。検出後のゲルは、1 回目同様の条件で、染色、脱色し、スキャナーで画像を取り込んだ。蛍光検出した画像及び染色した画像は、それぞれ Image J software でバンド強度を算出した。サンプルごとに、算出した蛍光強度を 2 回目の染色強度で割り、蛋白質量当たりの蛍光修飾率を測定した。測定値を用いて、“S83C 基質無” の修飾効率を 1 とした時の、各サンプルの修飾効率を求め、グラフ化した。(1 回目の泳動後、精製したサンプルが蛍光修飾できているか確認するため、染色前に LAS-4000 imaging system で一度蛍光検出しておくことと安心である。)

## 第 2 部 プロテオリポソーム再構成

輸送活性測定にはプロテオリポソームを用いる。このプロテオリポソームを作製する際、脂質二重膜小胞 (以下リポソーム) に膜蛋白質を組み込むことを再構成という。可溶化などで用いた界面活性剤は、リン脂質二重層を不安定にさせる。このことから、再構成の際には、蛋白質可溶化液中に存在する大部分の界面活性剤を除去し、界面活性剤の臨界ミセル濃度 (CMC) 以下にする必要がある。界面活性剤除去法の中にはゲル濾過、イオンクロマトグラフィーによる吸着法、透析による透析法、ポリスチレンビーズにより除去する方法 (これは主に Triton X-100 を除去する方法である) 等がある。今回は希

積法によってプロテオリポソームの作製を行った。以下に希釈法の説明をする。

まず、可溶化精製した AspT と超音波処理したリン脂質とを混合し、界面活性剤で可溶化した。次にこの混合液を、基質を含む Loading buffer に希釈することで、界面活性剤の濃度を臨界ミセル濃度 (CMC) 以下に下げた。界面活性剤は CMC 以下の濃度になると、熱力学的に安定していた非共有結合が崩れ、ミセルを形成することができなくなる。その性質を利用することで、用いた界面活性剤が CMC 以下にまで希釈されると、膜蛋白質とリン脂質は可溶化状態にとどめておくことができなくなり、両親媒性のリン脂質は疎水性のテール部分でリポソームを形成し、その際に膜蛋白質も一緒に再構成される。これが再構成の一連の流れである。

### 2-2-1. *E. coli* lipid の超音波処理

liposome の再構成に用いる lipid は、バスタイプのソニケーターを用いて超音波処理を行った。まず 5% lipid を調製するために、*E. coli* lipid (*E. coli* Total Lipid Extract (Powder) (Avanti® POLAR LIPIDS, INC.)) 1 g を ファルコンチューブに入れ、MQ 水を 20 mL まで添加し、ヘッドスペースを窒素置換後、ボルテックスまたは転倒攪拌によって *E. coli* lipid の橙色の粒子が完全になくなるまで溶解・混和した。調製した lipid はエッペンドルフチューブに分注し、チューブ内の空気を窒素置換した後、液体窒素で瞬間凍結し、使用時まで -80°C に保存した。使用時は室温で融解させた。試験管 (リム無し, 18×180 mm, 旭テクノグラス) に融解した 5% lipid 溶液と 10 分の 1 量の 0.1 M K-Pi buffer [pH 7.0] を添加し、よく懸濁した。酸化防止のため試験管内部の空気を窒素置換し、シールテープ及びビニールテープも用いてシリコン栓で密栓した。Special Ultrasonic Cleaner (Laboratory Supplies Co., Inc.) の water tank に 0.02% Triton X100 (Polyoxyethylene (10) Octyl Phenyl Ether) 溶液を入れ、使用前は水で十分に氷冷した。使用時は、タンク内の水が超音波で最も良く跳ねるよう (水滴が周囲に飛び散り、液面には白く霧ができる)、シリンジを使って強度を適宜調節した。次に lipid 溶液が試験管の上端まで跳ねるよう、試験管の底が水面に触れる程度の位置と角度にセットした。あまり水面深くにセットすると試験管が割れる恐れがある。また、試験管の底に傷が付いていると、強力な超音波によって割れる恐れがあるので、使用前には試験管が無傷であることを十分確認

した上で行った。超音波処理は 5 分行った後、2 分間止め、また 5 分超音波処理し、10 分間止めるというサイクルを 3~4 回行った。2 分間の休止時には、試験管は氷上に置き、処理時に発生した熱を十分冷却した。また 10 分間の休止時には、試験管を同様に氷上に置き、タンク内にも氷を入れて十分冷却した。このようにして超音波処理した lipid は、処理前の黄濁色に比べて粘性が無く、半透明の黄色になる。タンク内の 0.02% Triton X100 溶液は 10 日前後で交換した。

### 2-2-2. 再構成

精製時に用いた界面活性剤 DDM を活性測定時に用いる界面活性剤 n-Octyl- $\beta$ -D-glucoside (OG) に置換するために、界面活性剤置換 buffer を調製した。界面活性剤置換 buffer は、MQ、終濃度 20% (v/v) Glycerol、0.1 M K-Pi buffer [pH 7.0]、0.42% *E. coli* lipid (not sonic)、1.25% OG になるよう全量 1 mL 容量で調製したものである。添加順は上記のとおりで、lipid を添加する前にはよくボルテックスにかけ、OG 添加後は穏やかにピペッティング及び転倒攪拌を行った。OG を添加することで lipid がミセルで覆われ可溶化、白濁から透明色になる。この界面活性剤置換 buffer と sonicated lipid を 21,880 $\times$ g、15 分、4 $^{\circ}$ C 遠心し (15,000 rpm, 本体 ; TOMY MX-100, ローター ; TOMY TMP-11 (TOMY))、遠心後上清を以下の反応系の調整に用いた。再構成する精製蛋白質あたりの蛋白質溶液量を  $x$   $\mu$ L とすると、界面活性剤置換 buffer 730  $\mu$ L、精製時に用いた Elution buffer (70-x)  $\mu$ L を混合して全量 800  $\mu$ L とした。このようにして可溶化させた精製 AspT を可溶化サンプルと呼ぶこととする。反応系の調整では、ストック濃度 0.1 M K-Pi buffer [pH 7.0] を 58.5  $\mu$ L、15% OG 18  $\mu$ L、超音波破碎した lipid 130  $\mu$ L、可溶化サンプル 800  $\mu$ L を混合し、氷上で 20 分間静置した。その後、予め 25 $^{\circ}$ C に保温していた Loading buffer 20 mL に調整した反応系を勢いよくピペットマンで添加し、25 $^{\circ}$ C の恒温槽で 20 分間インキュベートした。この間、lipid を分散させると共に、希釈法により OG を CMC 以下にすることでプロテオリポソームを形成させ、安定化させた。145,250 $\times$ g (40,000 rpm, 本体 ; XL-90, ローター ; 50.2Ti (Beckman))、4 $^{\circ}$ C、1 時間超遠心した。超遠心後に形成された黄色のペレットがプロテオリポソームの集合体である。これら内部に基質を封入したプロテオリポソームは、

次にプロテオリポソーム内外で濃度勾配を形成するため、Assay buffer への置換を行った。すなわち、超遠心管内部の水分を綿棒などで完全に除去し、プロテオリポソームのペレットを 1 mL の Assay buffer で懸濁した。この懸濁の際にはテルモノンベベル針 (18G×1½", 1.20×38 mm, TERUMO®)を用いた。懸濁後、更に Assay buffer を 20 mL 追加した。再度同条件で超遠心及び水分除去を行った後、300 µL の Assay buffer を用いてペレットを懸濁し、エッペンドルフチューブに移して活性測定時まで氷上に置き、再構成を終えた。以下の濃度表記は全て、“←”より左側が終濃度、右側がストック濃度となっている。“←”がないものは数値自体がストック濃度を表している。なお、Loading buffer 及び Assay buffer の液量は適宜変更して実験を行った。いずれも使用前にフィルターろ過 (MEMBRANE FILTER MIXED CELLULOSE ESTER, 細孔 ; 0.2 µm, 直径 47 mm (ADVANTEC®)) したものをを用いた。

#### <5% (w/v) *E. coli* lipid 溶液>

5% (w/v) になるよう *E. coli* lipid (*E. coli* Total Lipid Extract (Powder) (Avanti® POLAR LIPIDS, INC.)) と MQ をファルコンチューブに入れて窒素置換後、ローテーター及びボルテックスを用いて懸濁した。懸濁後、MQ で 20 mL に合わせた。エッペンドルフチューブに分注し、ヘッドスペースを窒素置換後、液体窒素で瞬間凍結し、-80°C で凍結保存した。

#### <Octyl-β-D-glucopyranoside (OG) 溶液>

15% (w/v) の濃度になるよう、OG を MQ で 4°C、ローテーターを用いて溶解した。エッペンドルフチューブに分注し、ヘッドスペースを窒素置換後、液体窒素で瞬間凍結し、-80°C で凍結保存した。OG は用事調整した (1 週間程度なら冷凍保存可)。

<界面活性剤置換 buffer>

MQ	333 $\mu$ L
20%←50% (v/v) Glycerol	400 $\mu$ L
100 mM←1000 mM K-Pi buffer	100 $\mu$ L
0.42%←5% <i>E.coli</i> lipid (not sonicated)	84 $\mu$ L
<u>1.25%←15% (w/v) OG</u>	<u>83 <math>\mu</math>L</u>
Total	1000 $\mu$ L

<可溶化サンプル>

界面活性剤置換 buffer	730 $\mu$ L
Elution buffer	(70-x) $\mu$ L
<u>精製 AspT</u>	<u>x <math>\mu</math>L</u>
Total	800 $\mu$ L

<再構成時反応系>

100 mM K-Pi [pH 7.0]	58.5 $\mu$ L
15% OG	18 $\mu$ L
Sonicated lipid	130 $\mu$ L
<u>可溶化サンプル</u>	<u>800 <math>\mu</math>L</u>
Total	1006.5 $\mu$ L

**【L-aspartate 自己交換輸送】**

<Loading buffer (遠心管 1 本あたり 20 mL)>

50 mM←100 mM K-Pi buffer [pH 7.0]

100 mM←1 M L-Asp-K [pH 7.0]

MQ

1 mM←300 mM PMSF

< Assay buffer >

50 mM←100 mM K-Pi buffer [pH 7.0]

100 mM←400 mM K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

MQ

【L-alanine 自己交換輸送】

< Loading buffer (遠心管 1 本あたり 20 mL) >

50 mM←100 mM K-Pi buffer [pH 7.0]

100 mM←1 M L-Ala-K [pH 7.0]

MQ

1 mM←300 mM PMSF

< Assay buffer >

50 mM←100 mM K-Pi buffer [pH 7.0]

50 mM←400 mM K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

MQ

### 第 3 部 アナログ基質による Exchange reaction

精製 AspT が L-aspartate 及び L-alanine の輸送活性を維持している、すなわちトランスポーターとしての機能を維持しているかを確認するための方法として、Counterflow 及び Exchange reaction がある<sup>4)</sup>。Counterflow とは、放射性標識された基質が、化学的濃度勾配に逆らってプロテオリポソーム外部から内部へ取り込まれる、一方向の流れのみを計測した方法である。プロテオリポソーム内には高濃度の基質を封入してあり、外部と濃度勾配を形成するよう buffer の組成を調整している。AspT が基質を輸送する場合、プロテオリポソームの外側から内側へと濃度勾配に逆らった輸送が起こる。そのため、プロテオリポソーム内部に取り込まれた放射線量を測定することで、基質の取り込みを測定することができる。

一方、Exchange reaction は排出を確認する方法である。Counterflow で基質の取り込みが見かけ上定常状態に達したところで、外部に高濃度の非放射性基質を添加する。この基質が輸送基質として認識された場合、トランスポーターを介してプロテオリポソーム内部に非放射性基質が徐々に取り込まれる。その際、トランスポーターを介した交換反応により既に内部に輸送されていた放射性基質が外側に排出される。そのため、プロテオリポソーム内部に残存する放射線量を測定することで、トランスポーターとして取り込みと排出の機能を維持していることが確認できる。

### 2-3-1. Exchange reaction

活性測定に用いるメンブレン (セルロース混合エステルメンブレン 低水抽出 Triton® フリータイプ, 孔径 0.22  $\mu\text{m}$ , 直径 25 mm (MILLIPORE)) は Assay buffer に 15 分以上浸して平衡化した。また、一部 Assay buffer と放射性基質含有溶液は 25°C にセットした恒温槽で保温した。Assay buffer 425  $\mu\text{L}$  とプロテオリポソーム (またはリポソーム) 25  $\mu\text{L}$  を試験管 (DISPOSABLE CULTURE TUBE, 16×100 mm (旭テクノグラス)) に添加し、25°C に設定した恒温槽でプレインキュベートした。3 分後、放射性・非放射性基質混合溶液を 50  $\mu\text{L}$  加え、反応開始とした。一定時間経過後、反応液から 50  $\mu\text{L}$  を取り出し、フィルターマニフォールド (Hoefer FH 225V (Pharmacia Biotech 社)) にセットしたメンブレンに吸引しながらゆっくりと滴下しサンプリングを行った。サンプルが完全に吸引された後、3 mL の Assay buffer で洗浄を 2 回を行い、反応を完全に停止させた<sup>20)</sup>。L-aspartate 自己交換反応では、放射性・非放射性基質混合液添加後、1、3、5、7 分後に、L-alanine 自己交換反応では混合液添加後、1、5、10、20 分後に反応を停止した。更に、L-aspartate 自己交換反応では 7 分目、L-alanine 自己交換反応では 20 分目のサンプリング終了後、試験管内に終濃度 50 mM になるよう 500 mM の各非放射性基質を 33.3  $\mu\text{L}$  添加し、(非放射性基質添加前と同じ量リポソームが膜に固定されるよう) ニトロセルロース膜に 55.6  $\mu\text{L}$  ずつ添加した。L-aspartate 自己交換反応では放射性・非放射性基質添加 7.5、8、9 分後に、L-alanine 自己交換反応では 20.5、21、22 分後に反応を停止した。メンブレンをプラスチックバイアル (HDPE Scintillation Vial, 7 mL (Fisher Scientific)) に入れて液体シンチレーション溶液 (FILTER COUNT™

(PerkinElmer®) を 6 mL 添加し、よく転倒攪拌した。翌日、液体シンチレーションカウンタ (LIQUID SCINTILLATION COUNTER LSC-5100 (Aloka 社)) で 1 サンプル当たり 2 分間の測定を行い、その平均値を dpm として算出した。以下に示した濃度表記は全て、“←” より左側が終濃度、右側がストック濃度を表している。

**【L-aspartate 自己交換輸送】**

<放射性・非放射性基質混合溶液>

最終外部基質濃度 0.1 mM (反応時 10 倍希釈される為ここでは 1 mM に調整)

L-[2,3-<sup>3</sup>H] aspartic acid . . . . . 12.5 μL

1 mM←10 mM L-Asp-K [pH 7.0] . . . . . 100 μL

Assay B. . . . . 887.5 μL

Total 1000 μL

**【L-alanine 自己交換輸送】**

<放射性・非放射性基質混合溶液>

最終外部基質濃度 0.1 mM (反応時 10 倍希釈される為ここでは 1 mM に調整)

L-[2,3-<sup>3</sup>H] alanine . . . . . 200 μL

1 mM←10 mM L-Ala-K [pH 7.0] . . . . . 100 μL

Assay B. . . . . 700 μL

Total 1000 μL

<非放射性基質溶液>

KOH で pH 7.0 に調整した 1 M stock 溶液を各基質 (L-aspartate, L-alanine, D-aspartate, D-alanine, L-serine) 調製し、それを Assay B. で 500 mM に希釈したものをを用いた。

**第 4 部 SDS-PAGE を用いたプロテオリポソーム再構成後 AspT 蛋白質定量**

プロテオリポソーム定量にあたり、考慮しなければならないのが脂質の存在である。

より正確に測定するため、これまで定量法の検討を行ってきた。これまでの検討の経緯を簡単に記載する。初めに、純粹に蛋白質のみを定量するためには脱脂操作が必要かを検討した。その結果、脱脂の有無で定量結果に大きな差は見られなかった。そこで、脱脂操作で脂質と共に定量すべき蛋白質まで除去される恐れがあるため、脱脂は不要と判断した。次に調製器具の材質を検討した。サンプル調製からゲル添加までの間に、脂質がエッペンドルフチューブに吸着し、蛋白質が調製した分量通りに正確にゲルへ添加できない可能性があるためである。検討には、これまで使用していたプラスチック製のエッペンドルフチューブの他、ガラス製の NEG サンプルチューブ (日電理化硝子 (株)) を用いた。その結果、こちらでも定量結果に大差がなかったため、使い慣れているエッペンドルフチューブで実験を続けることにした。次に、定量サンプルに合わせて標準曲線用サンプルにも脂質剤を添加することにしたが、超音波破砕しただけの脂質が適しているか、リポソームが適しているか、またどの程度の量を添加すれば定量サンプルと同程度の脂質を含むようになるかを検討した。その結果、リポソーム添加が適しており、混合する量は 4  $\mu$ L 以下が最適と判断した (これ以上添加すると検量線の直線性が低下した)。また、検量線作成範囲についても検討した。その結果、0~20 ng の範囲であれば、直線性高く検量線を作成できることがわかった。ng オーダーの定量をするためには、脂質存在下でも定量可能と謳う高感度蛍光染色液 Lumitein™ Protein Gel Stain (Biotium) を使用した。この染色液は 3 回まで使用可能であるが、徐々に染色効率が低下するため、より正確に定量するためには 2 回までの使用が好ましいと判断した。この染色液は高感度検出が可能ゆえ、微細なごみや不純物もバンドと共に検出されてしまう。一度使用した染色液はゲルの切れ端が混在することもあるが、それらを除去するためにフィルターを通すことは回避すべきである。フィルターに蛍光物質が吸着し、染色効率が低下してしまうためである。それゆえ、染色液以外の buffer 類はフィルター濾過を、器具は洗浄を徹底させ、少しでも不純物を除去する工夫が必要である。この他、SDS 化後の遠心の有無や染色・脱色時の温度、内部標準の有無も検討したが、以下に示したものが、現時点で最適な方法である。

### 2-4-1. 再構成後蛋白質定量

標準曲線用サンプルは 0~20 ng の範囲で作製し、精製 AspT にリポソームを 3.75  $\mu\text{L}$  添加した (Table 3 に調製量の一例を示した)。定量サンプルはプロテオリポソームを 3.75  $\mu\text{L}$  使用した。全量 10  $\mu\text{L}$  になるよう Assay buffer で調整し、2-mercaptoethanol 含有 5 $\times$ SAB を 2.5  $\mu\text{L}$  添加した。ボルテックスで軽く混合し、37 $^{\circ}\text{C}$  の恒温槽で 30 分間 SDS 化した。調製量 12.5  $\mu\text{L}$  の内 10  $\mu\text{L}$  をプレキャストゲルの Criterion TGX 10% ゲル (nacalai tesque) (または自作の 10% ポリアクリルアミドゲル) に添加した。200 V (定電圧)、4 $^{\circ}\text{C}$ 、45 分間泳動した。泳動後のゲルは Lumitein<sup>TM</sup> Protein Gel Stain (Biotium) で、30 $^{\circ}\text{C}$ 、60 rpm (MULTI SHAKER MMS-3010 (EYELA 東京理化機器))、染色液 1 回目使用時は 90 分間、2 回目使用時は 180 分間、アルミホイールで遮光しながら染色を行った (ゲルサイズに合わせて染色液量は変更した。)。MQ で 60 rpm (MULTI SHAKER MMS-3010 (EYELA 東京理化機器))、30 $^{\circ}\text{C}$ 、30 分間、遮光条件下で脱色した。ゲルは LAS-4000 imaging system (FUJIFILM) で蛍光検出した (条件 : Sypro Ruby, Method ; Fluorescence : SYBR Green, Bright ; Blue (460 nm EPI), Filter ; Y515-Di, Iris ; 0.85, Exposure Type ; Increment, Interval Time ; 10 sec, Sensitivity/Resolution ; Standard)。Image J software を用いて蛍光強度を定量した。

**Table 3 Example of the quantity of preparation (total 10  $\mu\text{L}$ )**

	0 ng	6.25 ng	12.5 ng	15.6 ng	18.8 ng	25 ng	Proteoliposome
	→0 ng	→5 ng	→10 ng	→12.5 ng	→15 ng	→20 ng	
4 ng/ $\mu\text{L}$ Purified AspT ( $\mu\text{L}$ )	0	1.56	3.13	3.91	4.69	6.25	0
Liposome ( $\mu\text{L}$ )	3.75	3.75	3.75	3.75	3.75	3.75	0
$\times\text{X}$ Proteoliposome ( $\mu\text{L}$ )	0	0	0	0	0	0	3.75
Assay B. ( $\mu\text{L}$ )	6.25	4.69	3.12	2.34	1.56	0	6.25

## 2-4-2. 輸送能の算出

L-aspartate の取り込み量を例に輸送活性の算出法を示した。

例) <放射性非放射性混合溶液 (反応時外部基質濃度  $1/10V_{\max}=0.039$  mM L-aspartate)>

L-[2, 3- <sup>3</sup> H] aspartic acid (37 MBq ; American Radiolabeled Chemicals Inc.)	3 $\mu$ L
0.39 mM ← 1 mM Asp-K [pH 7.0]	117 $\mu$ L
<u>Assay buffer</u>	<u>180 <math>\mu</math>L</u>
Total	300 $\mu$ L

L-[2, 3-<sup>3</sup>H] aspartic acid

Specific Activity ; 40 Ci/mmol

Radioactive concentration ; 1.0 mCi/mL

上記 Specific Activity 及び Radioactive concentration より、RI 中の L-aspartate 濃度は 0.025 nmol/ $\mu$ L である。放射性基質含有溶液に L-aspartate は、放射性標識されたものが 3  $\mu$ L、非放射性標識の 1 mM Aspartate が 117  $\mu$ L 含まれている。すなわちこの溶液中の全 L-aspartate 量は 117.075 nmol 含まれていることになる。放射線量は Radioactive concentration より 1.0  $\mu$ L = 1  $\mu$ Ci なので、今回用いた <sup>3</sup>H L-aspartate は 3  $\mu$ Ci である。また、1  $\mu$ Ci =  $2.22 \times 10^6$  dpm なので 3  $\mu$ Ci では  $6.66 \times 10^6$  dpm となる。Total L-aspartate の量あたり <sup>3</sup>H L-aspartate が 3  $\mu$ Ci 含まれているので 117.075 nmol =  $6.66 \times 10^6$  dpm、すなわち 1 dpm =  $17.579 \times 10^{-9}$   $\mu$ mol となる。この値をシンチレーションカウンターにより算出された dpm 値にかけることで、各条件での L-aspartate のモル数が算出できる。この後、定量した再構成後の蛋白質濃度から、メンブレンあたりの AspT 量を算出し、上記 L-aspartate モル数を割ると、1 mg AspT あたりが輸送した放射性基質量 ( $\mu$ mol/mg protein) が算出できる。

本研究で用いた L-[2, 3-<sup>3</sup>H] aspartic acid の Specific Activity は全て 40 Ci/mmol、Radioactive concentration は 1.0 mCi/mL であり、L-[2, 3-<sup>3</sup>H] alanine の Specific Activity、Radioactive concentration は全て、それぞれ 60 Ci/mmol、1.0 mCi/mL である。

### 第三節 結果

#### 第 1 部 L-aspartate、L-alanine 共存下での影響

##### 2-1-1. L-aspartate、L-alanine 共存下での基質依存的 AspT の蛍光修飾

TM3 に位置し、L-aspartate 存在下で OGM による修飾効率が上昇し、L-alanine 存在下で修飾効率が減少する P79C 変異体 (2012 木村 修士論文, Supplemental Fig. 2) を用いて、L-aspartate、L-alanine 共存下での構造変化の解析を行った。その結果、L-alanine 濃度を固定し、L-aspartate 濃度を上昇させた場合、L-aspartate 濃度依存的に P79C の OGM 修飾効率が上昇した (Fig. 4A, 4B)。また、固定する L-alanine の濃度を高くすると、修飾効率は L-aspartate 依存性を残しながらも、L-alanine 濃度依存的に抑制されていた (Fig. 4A, 4B)。反対に、L-aspartate 濃度を固定した場合は、L-alanine 濃度依存的に P79C の修飾効率が減少した (Fig. 4C, 4D)。

#### 第 2 部 各種アナログ基質存在下での影響

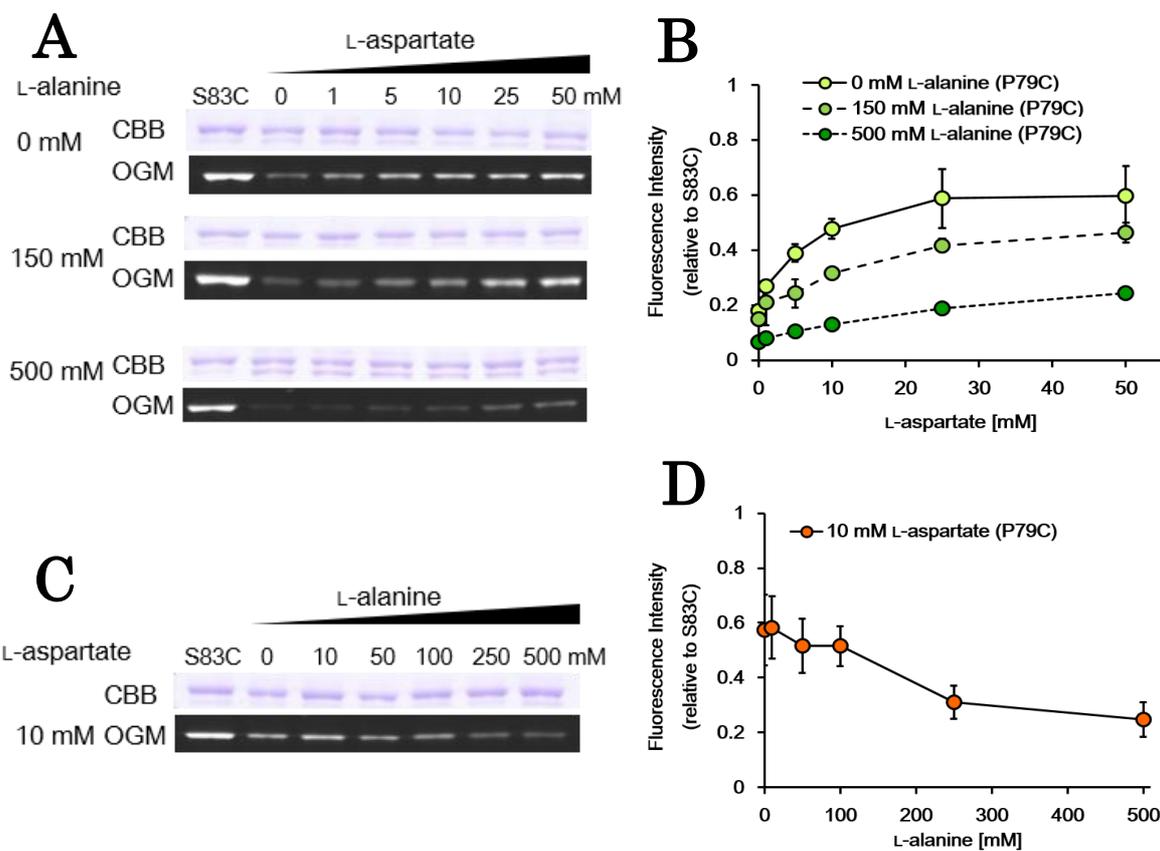
##### 2-2-1. D-aspartate、D-alanine、L-serine の Exchange reaction

L-aspartate のアナログ基質である D-aspartate、L-alanine のアナログ基質である D-alanine、L-serine は、各放射性標識した基質を用いた Counterflow 解析から、これらのアナログは AspT の輸送基質となることが示されている<sup>8)</sup>。前任者笹原は、各アナログ基質に関して Counterflow は行っていたが、Exchange reaction までは確認していなかった。そこで本研究では、プロテオリポソームに再構成した AspT を用いて、L-aspartate、L-alanine 各自己交換輸送における各種アナログ基質との Exchange reaction を観察した。その結果、L-aspartate 自己交換輸送において、L-aspartate 輸送が定常状態に達したところでプロテオリポソーム外部に高濃度非放射性 L-aspartate、D-aspartate を添加すると、Counterflow によりプロテオリポソーム内部に輸送された <sup>3</sup>H L-aspartate の迅速なプロテオリポソーム外部への排出が確認できた (Fig. 5A)。同様に、L-alanine 自己交換輸送において、L-alanine 輸送が定常状態に達したところでプロテオリポソーム外部に高濃度非放射性 L-alanine、D-alanine、L-serine を添加すると、<sup>3</sup>H L-alanine の迅速なプロテオリポソーム外部への排出が確認できた (Fig. 5B)。以上のことから、L-aspartate アナログ

基質は L-aspartate の、L-alanine アナログ基質は L-alanine の輸送を選択的に阻害し、ヘテロ交換輸送基質となることが示された。

### 2-2-2. D-aspartate、D-alanine、L-serine 存在下での基質依存的 AspT の蛍光修飾

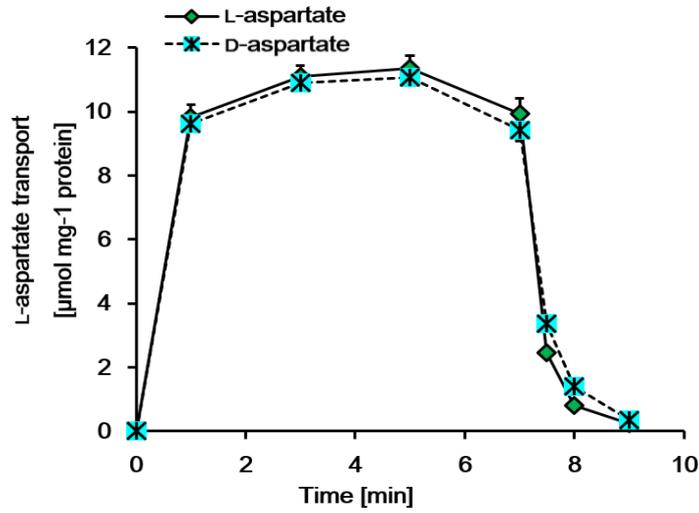
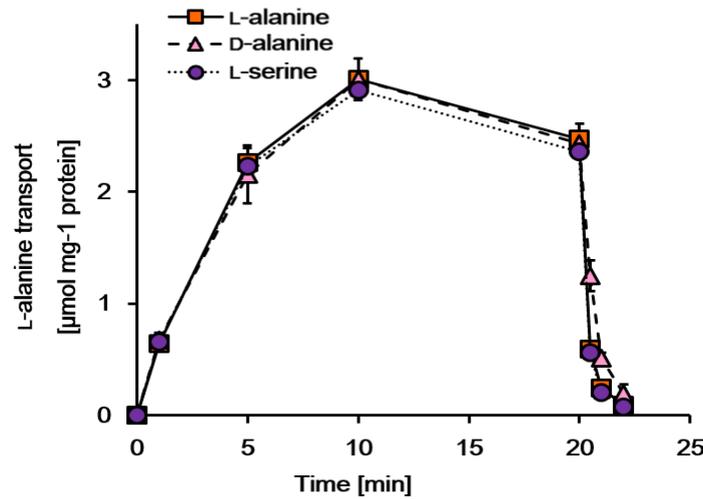
Counterflow 及び Exchange reaction の結果から、いずれのアナログ基質も AspT に認識され、輸送されることが明らかになったため、次に、これら各アナログ基質がどのような構造変化をとり、輸送に至るのか調べることにした。本解析では、P79C に加え、L-aspartate、L-alanine 存在下で修飾効率が減少する G62C を用いた。その結果、D-aspartate は、基質濃度依存的に G62C で修飾効率が減少する一方 (Fig. 6A)、P79C では修飾効率が上昇した (Fig. 6B)。これは L-aspartate と同様の変化であった (Fig. 4, 木村 修士論文 2012, Supplemental Fig. 2)。また D-alanine 及び L-serine も同様に解析すると、G62C は基質濃度依存的な修飾効率の減少がみられた (Fig. 6C, 6E) 一方、P79C は蛍光を発しないことが確認できた (Fig. 6D, 6F)。これは L-alanine と同様の変化であった (木村 修士論文 2012, Supplemental Fig. 2)。



[Suzuki, S., et al. J Biol Chem. (under revision)]

**Fig. 4 Effects of two native substrates on Oregon Green maleimide (OGM) labeling.**

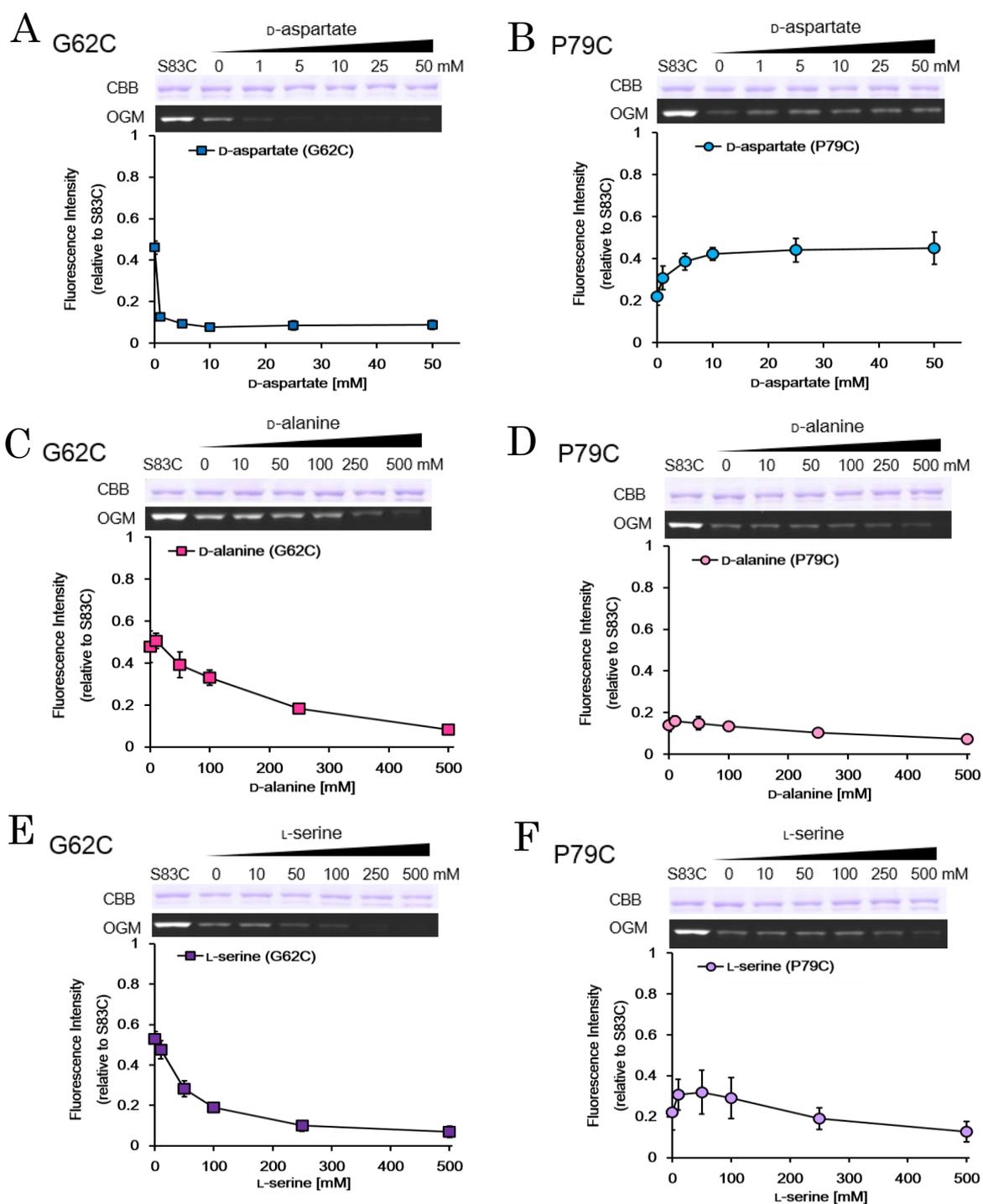
P79C was OGM labeling under conditions in which two native substrates were present. *E. coli* cells that expressed P79C were exposed to OGM in the presence of (A and B) various concentrations of L-aspartate with fixed L-alanine concentrations (0 mM ; ●, 150 mM ; ●, 500 mM ; ●) or (C and D) various concentrations of L-alanine with fixed L-aspartate concentration (10 mM ; ●). Purified proteins from OGM-exposed *E. coli* cells were analyzed by using non-reducing SDS-PAGE. The levels of fluorescence intensities and CBB staining under non-reducing SDS-PAGE were normalized against the corresponding levels of the S83C variant. The labeling efficiency of cysteine in P79C variant is shown as a ratio of the normalized level of fluorescence intensity and CBB staining.

**A****B**

[Suzuki, S., et al. J Biol Chem. (under revision)]

**Fig. 5 Substrate and inhibitor exchange reactions using AspT-reconstituted proteoliposomes.**

Proteoliposomes were loaded with 50 mM L-aspartate (A) or L-alanine (B) plus 50 mM potassium phosphate (pH 7) and then washed and resuspended as described in the Experimental Procedures. Proteoliposomes were placed in 50 mM K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> plus 50 mM potassium phosphate (pH 7) at 10 mg of protein/mL, at which point 0.025 mM L-[<sup>3</sup>H] aspartate (A) or 0.017 mM L-[<sup>3</sup>H] alanine (B) was added. To estimate substrate transport, aliquots were taken for filtration and washing at the times indicated. Arrow denotes the addition of buffer, 50 mM unlabeled L-aspartate (◆) and D-aspartate (\*), L-alanine (■), D-alanien (△), or L-serine (●).



[Suzuki, S., et al. J Biol Chem. (under revision)]

**Fig. 6 Conformational changes induced by competitive inhibitors.**

G62C (A, C, E) and P79C (B, D, F) were exposed to OGM in the absence or presence of D-aspartate (A and B), D-alanine (C and D), or L-serine (E and F). Purified proteins from OGM-exposed *E. coli* cells were analyzed by using non-reducing SDS-PAGE.

#### 第四節 考察

L-aspartate、L-alanine 共存下での解析結果から、AspT 輸送メカニズムについて考察する。笹原による反応動学的解析により、AspT の L-aspartate と L-alanine の結合部位は異なり、かつ異なる結合コンフォメーションをとることが推察されている<sup>8)</sup>。もし完全に結合部位が独立しているとすれば、L-aspartate と L-alanine はランダムに結合できる可能性がある。しかし、生理的状态においては、L-aspartate の取り込みは L-alanine の排出と共役し、その反応は 1:1 で起こっているとされる<sup>4)</sup>。修士論文研究では、基質共存下での AspT の輸送形態を明らかにするため、相互阻害キネティクス解析を行った。その結果、L-alanine 自己交換輸送における L-aspartate の  $K_i$  値は  $10.9 \pm 8.5$  mM、L-aspartate 自己交換輸送における L-alanine の  $K_i$  値は  $128.5 \pm 119.5$  mM と算出された(鈴木 修士論文 2013, Supplemental Fig. 1)。これらの値は、いずれも各自己交換輸送における  $K_m$  値に比べ 30 倍以上高い値を示していた。また Dixon-plot で作成したグラフの傾向から、弱いながら競合阻害が確認できた(鈴木 修士論文 2013, Supplemental Fig. 1)。この競合阻害は異なる結合コンフォメーションの競合によるものと推察されたが、本博士論文研究では、構造の観点からこの推察を結論付けるため、L-aspartate、L-alanine 二基質による競合を、基質との結合により OGM 蛍光修飾の効率が変化する変異体 P79C を用いて解析した。その結果、両基質が競合的に AspT に結合することを示唆する修飾効率の変化を示した (Fig. 4)。これは、基質濃度に依存して、L-aspartate 結合型、L-alanine 結合型コンフォメーションをとる割合が変化したことを示す。相互阻害キネティクス解析では、プロテオリポソーム内部の基質濃度が 100 mM であり、外部基質濃度に比べ高い設定になっている。つまり、内部基質に依存した結合型をとる AspT の割合が多いと推測される。そのため、他の基質が結合可能な基質遊離型(基質非結合型)をとる AspT の割合が少なく、結果的に、外部に阻害剤として他方の基質を添加しても、外部添加基質(阻害剤)の結合型をとる AspT 量が少ないため、弱い阻害を示したと考えられる。すなわち、 $K_m$  と  $K_i$  の間に生じた大きな差は、一方の基質結合が誘導した AspT 構造変化が、他の基質結合の親和性を低下させることに起因すると推察された。

次にアナログ基質を用いた解析から AspT 輸送メカニズムを考察する。使用したア

ナログ基質は、笹原によって AspT に基質認識されると確認されている D-aspartate、D-alanine、L-serine である<sup>8)</sup>。L-aspartate または L-alanine 自己交換輸送において、各種アナログ基質を添加したところ、D-aspartate は L-aspartate 自己交換輸送において <sup>3</sup>H L-aspartate の排出が確認できた (Fig. 5A)。同様に、D-alanine 及び L-serine は L-alanine 自己交換輸送において <sup>3</sup>H L-alanine の排出が確認できた (Fig. 5B)。以上の Exchange reaction から、上記アナログ基質は AspT によりヘテロ交換可能な基質であることが明らかとなった。これらのアナログ基質が輸送される際、L-aspartate、L-alanine 輸送時と同様の構造変化を経るのか、異なる構造変化を引き起こすのかを確認するため、G62C、P79C を用いて OGM 蛍光修飾反応を行った。AspT は L-aspartate と L-alanine とで異なる結合コンフォメーションを誘導する (木村 修士論文 2012, Supplemental Fig. 2)。解析の結果、D-aspartate は L-aspartate と、D-alanine、L-serine は L-alanine と同様の修飾効率の変化を示した (Fig. 6)。このことから、D-aspartate は L-aspartate と、D-alanine 及び L-serine は L-alanine と同様の構造変化をして輸送されると推察された。以上の Exchange reaction 及び蛍光修飾反応の結果から、AspT は L-aspartate : L-alanine ヘテロ交換輸送経路だけでなく、互いの基質結合型を経由せずに輸送を達成できる“独立したホモ交換輸送経路”を有すると推察された。

蛍光修飾の結果をアナログ基質同士で比較すると、L-aspartate と D-aspartate とでは、D-aspartate の方が濃度当たりの消光度合いが高い等、それぞれで修飾効率の変化度合いに差が見られることがわかった (Fig. 6, 木村 修士論文 2012, Supplemental Fig. 2)。しかし、笹原が算出した輸送パラメータ<sup>8)</sup>との相関関係は見られず、結合親和性が高いほど、輸送速度が速くなるわけではないことが示唆された<sup>8)</sup>。また、蛍光修飾実験が、基質と AspT と 20 分間反応させた上での平衡状態を見たものである一方、輸送解析は 1 分以下の反応でキネティクスパラメータを算出している。これら実験条件の違いからも、厳密に AspT の状態を比較できるものではないことが考えられた。

これまでの研究成果から、新たに AspT の推定輸送モデルを考察した (Fig. 7)。AspT は基質非結合型のアポ型 (i, iii)、L-aspartate 結合型 (ii)、L-alanine 結合型 (iv) コンフォメーション、少なくとも 3 種類の構造を有し、各結合型は競合する。同時に異なる結合型コンフォメーションは取れないため、一方の結合型から他方の結合型へコンフォメ

ーションを移行する際は、一度アポ型を経由するか、同時結合型をとると推測される。そこで、図中には現在の解析系では未確認の L-aspartate—L-alanine 同時結合型 (v) も記載した。確認できていないということは、起こり得ない結合型であるか、起こり得ても構造的な安定性が低く、同時結合型を維持する時間が非常に短いかのいずれかが考えられる。存在可能性はゼロではない。同時結合の有無を確認する方法の一つとして等温滴定型カロリメトリー (ITC) 等の熱力学的解析が挙げられる。基質単独及び、基質共存下での、それぞれ AspT と基質の結合に伴う特異的な熱量の変化をリアルタイムで測定し、単独存在下では見られない基質特異的な熱量の変化が基質共存下で見られれば、同時結合が起こっている可能性が高いと考えられる。

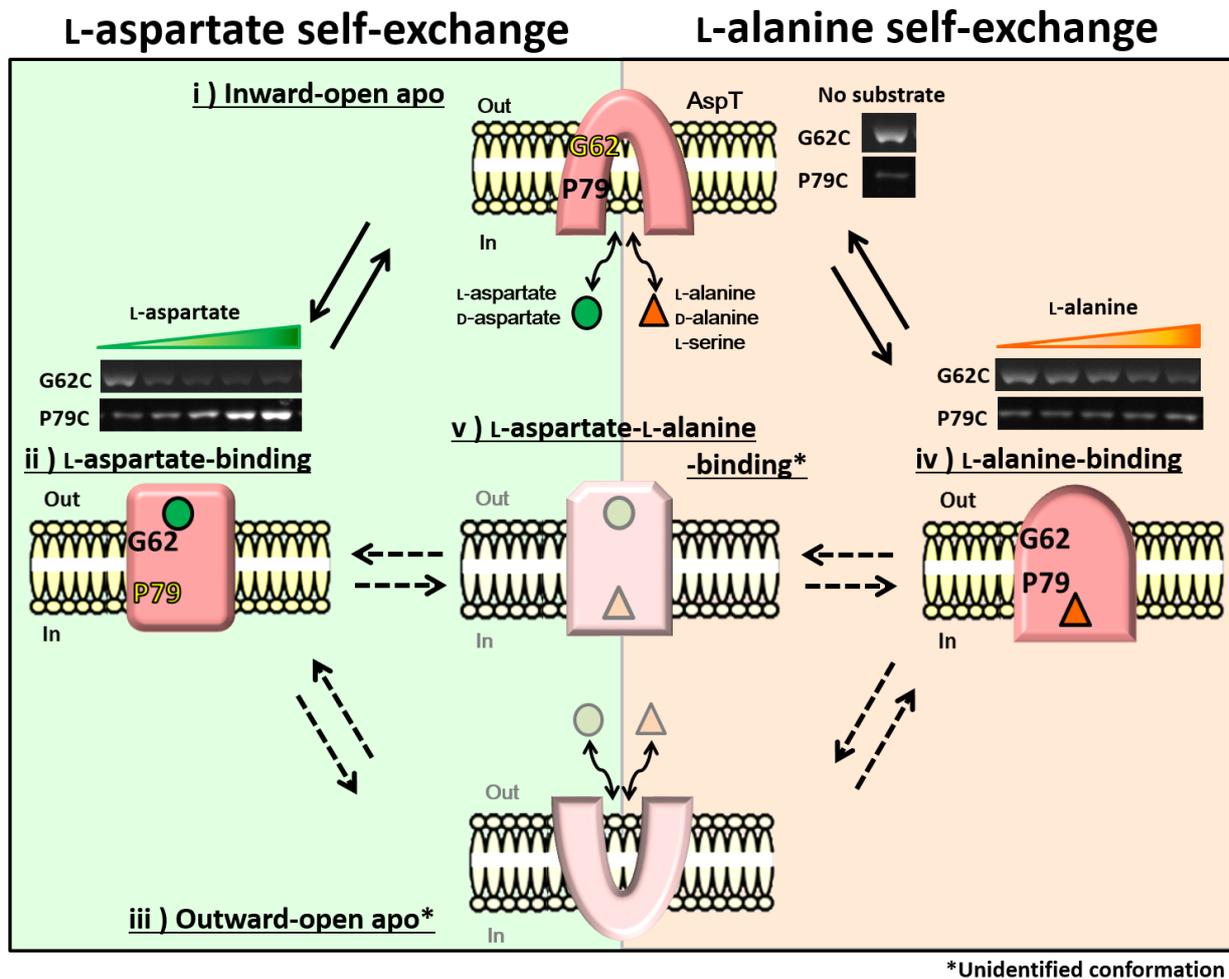
また、ヘテロ交換輸送における  $K_m$  及び  $V_{max}$  は、ホモ交換輸送における  $K_m$  及び  $V_{max}$  とは異なる可能性がある。現在、ヘテロ交換輸送において、二基質の輸送を同時に観測しているところだが、一方の基質濃度依存的に他方の輸送量の減少が確認できた (Supplemental Fig. 3)。このことから、ホモ交換輸送からヘテロ交換輸送へと切り替わっていると推察された。また、ホモ交換輸送に比べ、ヘテロ交換輸送時の方が、基質の輸送速度が速いことも推察された (Supplemental Fig. 3)。これは、これまで観察してきた基質非結合のアポ型、基質を放出する直前と直後の構造は異なっており、この間に一方の基質への親和性を上昇している可能性がある。更に、ホモよりもヘテロ交換輸送が優先的に起こることは、生理的環境においてはエネルギー確保に繋がるため、理に適っているといえる。今後は更に条件を詰め、ヘテロ交換輸送におけるキネティクスパラメータの算出を試みる予定である。

同時結合の有無に関して、いくつかのトランスポーターの例を紹介する。Arginine ( $\text{Arg}^+$ ) : Agmatine ( $\text{Agm}^{2+}$ ) アンチポーター (AdiC) は AspT 同様、脱炭酸共役輸送を行う。AdiC では  $\text{Arg}^+$  と  $\text{Agm}^{2+}$  が交互に独立した結合部位に結合し、交換反応を達成する。基質結合時及び基質放出時はペリプラズム側あるいはサイトプラズム側どちら一方の輸送ゲートしか開口しないことも報告されている<sup>21-23)</sup>。L-carnitine :  $\gamma$ -butyrobetaine antiporter (CaiT) は、輸送基質の交互結合の他、レギュレータードメインとして L-carnitine 結合部位を有しており、ある種同時結合が可能なトランスポーターである<sup>24)</sup>。一方、sodium/calcium ( $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ ) exchanger (NCX) は同時結合が可能なトランスポー

ターで、交換反応の間、同時に異なる結合部位に二基質が結合する<sup>26)</sup>。これらアンチポーターのいずれかに AspT の輸送モデルも相当すると考えられるが、現時点で最も参考になるのは同じく脱炭酸共役輸送反応を行う AdiC と考えている。

また、AspT とは異なり、同方向に基質輸送を行うシンポーターの中には、ラクトースパーミアーゼ (LacY)<sup>27-30)</sup> や betaine : Na<sup>+</sup> symporter (BetP)<sup>31)</sup> 等、同時に独立した基質結合部位に結合するトランスポーターが存在する。LacY に関しては結晶構造から基質輸送の様子が報告されている<sup>27-30)</sup>。すなわち、M. Gregor Madej らによると、LacY は (i) プロトン結合した内向き (サイトプラズム側) 開口アポ型をとると、(ii) サイトプラズム側にプロトンを放出し、(iii) 一度閉口型をとる。その後 (iv) 外向き (ペリプラズム側) 開口型をとり、(v) 再びペリプラズム側からプロトンを取り込み結合する。プロトン化した LacY は (vi) 同じくペリプラズム側から基質を取り込み結合し、(vii) 閉鎖型をとり、(viii) 内向き開口をとって基質をサイトプラズム側へ輸送する。

これらの例は、いずれも結晶構造がとられ、中には結合型だけでなく、外向きや内向き開口や閉口型等、詳細な構造が確認できているトランスポーターもある。新たに提示した AspT 輸送モデルにおいても、内向き・外向きのアポ型を示した (Fig. (i, iii))。しかし、現在の解析系では内向き・外向きのアポ状態の割合は不明である。また、結合型においても、G62C を用いた蛍光修飾反応では、内向き・外向き、開口・閉口の状態や安定性は議論できない。結晶構造を得ることは重要であり、すでに AspT は結晶化に臨める高濃度発現系を確立済み (宮本 学位論文 2015) だが、早急に手に入れることは難しい。そこで、今回解析に用いたアミノ酸残基以外のアミノ酸残基で蛍光修飾反応をみるのが簡易で確実な手段と考えられる。また、キネティクス解析も重要であり、上述した通り、現在は二種類の放射性基質を用いて二基質の輸送を同時に解析しているところである。更にヘテロ交換輸送時における  $K_m$ 、 $V_{max}$  算出にも挑んでいる。これまでは基質共存時でも一方の基質の動きしか観測できなかったため、二基質の動きを把握できることでヘテロ交換の理解を深めることができると期待している。



[Suzuki, S., et al. J Biol Chem. (under revision)]

**Fig. 7 Schematic representation of the AspT substrate transport cycle.**

(Left-hand column) Schematic representation of the L-aspartate self-exchange reaction. L- or D-aspartate is indicated by filled circles (●). Conformational changes are shown from the inward-open apo state (i) or the outward-open apo-state (iii) to the L-aspartate binding state (ii), and from the occluded (ii) to the postulated open apo state and release of substrate. G62C is exposed to Oregon Green maleimide (OGM) only in the apo state (i or iii), and P79C is exposed to OGM in the L-aspartate binding-state (ii).

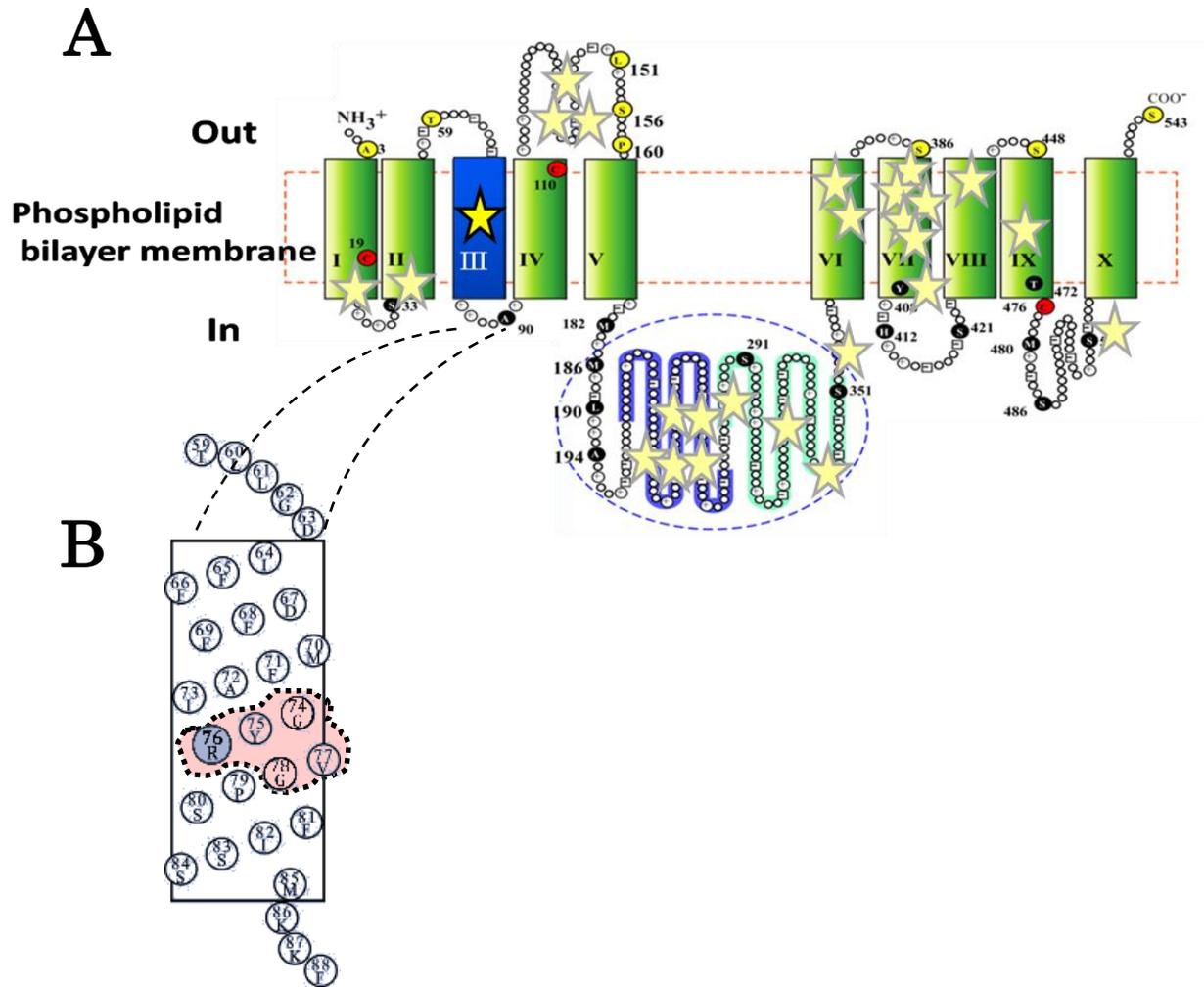
(Right-hand column) Schematic representation of the L-alanine self-exchange reaction. L- or D-alanine, or L-serine is indicated by the gray triangles (▲). Binding of L-alanine induces the occluded state (iv), in which neither G62 nor P79C is exposed to OGM. (v) represents the simultaneous binding state.

### 第三章 TM3 GxxxG モチーフ内アルギニン残基の機能解析

#### 第一節 緒言

膜蛋白質には GxxxG というモチーフが頻繁に見られる。このモチーフは、あるヘリックスの glycine (G) 残基と他のヘリックスの glycine 残基とが水素結合を介してオリゴマー形成をすることで (ヘリックスパッキング)、構造の安定化に関与するものである<sup>32)</sup>。glycine 残基によって 3 つのアミノ酸残基を挟む形態をとるが、glycine の代わりに、alanine (A) や serine (S) の残基でも同様の機能を保持することが知られている<sup>33)</sup>。AspT にも TM4、TM5、TM10 以外の膜貫通領域、及び TM4 から TM5 の間のループ 4、TM5 から TM6 の間にある巨大な親水性ループ、TM9 から TM10 の間のループ 9、全 26 箇所 GxxxG (/A/S) モチーフが存在する (Fig. 8)<sup>6)</sup>。本研究では基質の推定透過経路である TM3 の 74 から 78 番目までの残基で構成される GxxxG モチーフに注目した。この領域は AspT ホモログである AAEx ファミリー間で高く保存されている<sup>14)</sup> (Fig. 9)。しかし、モチーフ中央の 76 番目に位置する荷電性アミノ酸残基 arginine (R) は保存性が低い (Fig. 9 ★)。モチーフ内で唯一保存性が低く、膜内という疎水的環境にありながら電荷を有するアミノ酸が保持されている特徴から、R76 が AspT の基質輸送に寄与している可能性が推測された。修士論文では、TM3 構成アミノ酸残基を cysteine 残基に置換した全 24 変異体を用いて、L-aspartate、L-alanine 自己交換輸送における各変異体の輸送能の変化を報告した (鈴木 修士論文 2013, Supplemental Fig. 4)。その結果、GxxxG モチーフは他の領域に比べ、L-aspartate、L-alanine 輸送共に輸送能が低下しており (鈴木 修士論文 2013, Supplemental Fig. 4)、このことから R76 の機能を明らかにする意義は大きい。

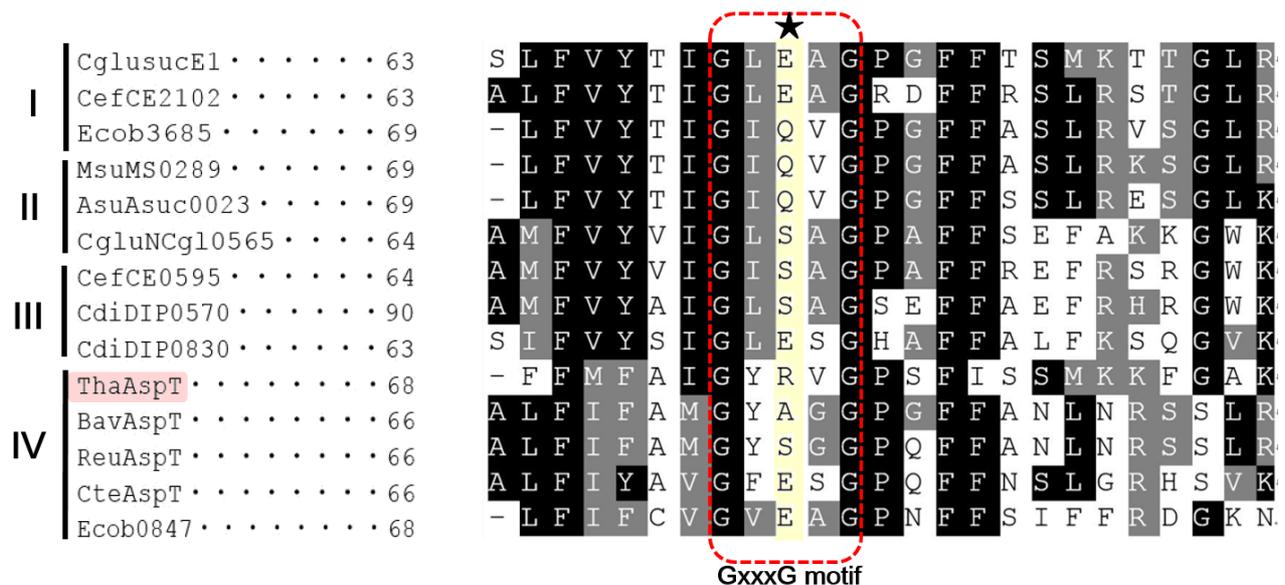
本章では、R76 を中性アミノ酸残基の alanine (A)、glutamine (Q)、塩基性アミノ酸残基の histidine (H)、lysine (K)、酸性アミノ酸残基の aspartate (D)、glutamate (E) にそれぞれ置換した変異体を作製し、プロテオリポソーム再構成法を用いて各変異体の輸送能を解析し、R76 の電荷と基質輸送の関係を探ることとした。



**Fig. 8 26 GxxxG motif of AspT.**

(A) AspT has 26 GxxxG motifs which helps to stabilize their structure via helix-helix interactions in TM1, TM2, TM3, TM6, TM7, TM8, TM9, reentrant loop 4 between TM4 and TM5, loop 5 between TM5 and TM6, and loop9 between TM9 and TM10 (★ or ★).

(B) There is R76C in the center of the GxxxG motif of TM3 (★).



[Suzuki, S., et al. BBB. (2015) 10.1080/09168451.2015.1123609]

**Fig. 9 Multiple sequence alignment of members of the AAEEx family of transporters.**

An alignment of multiple sequences was generated with ClustalW. The chosen matrix was BLOSUM, with penalties of 10 (gap open) or 0.05 (gap extension). The resulting alignment was optically improved with the Boxshade program. Conserved residues are highlighted in black (identical to consensus) or gray (similar to consensus). Clusters I and II are sets of orthologous corynebacterial proteins. Cluster III is the set of orthologous  $\gamma$ -proteobacterial proteins. Cluster IV is the set of AspT homologs.

## 第二節 方法

### 第 1 部 R76 変異体の発現・培養・精製

#### 3-1-1. 形質転換

AspT-WT (R76)、R76A、R76Q、R76H、R76K、R76D、R76E の発現には大腸菌 C43 ( $F^- ompT hsdSB (rB^- mB^-) gal dcm$  (DE3)) を用いた。氷上でコンピテントセル C43 ( $F^- ompT hsdSB (rB^- mB^-) gal dcm$  (DE3)) 50  $\mu$ L を 0.6 mL 容量エッペンドルフチューブに移し、R76 各変異体を約 0.5  $\mu$ g 分チューブに添加した。氷上で 30 分間静置後、37°C、90 秒間ヒートショック (Dry Bath Incubator (major science)) を与えた。氷上で再び 5 分間静置した。菌体全量を、予め 30°C に加温しておいた SOC 培地に添加し、回復培養した。200  $\mu$ L を LB agar プレート (30  $\mu$ g/mL Carb) にガラスビーズを用いて播種した。残りは 5,200 $\times$ g (7,500 rpm, 本体 ; centrifuge 5415D, ローター ; F45-24-11 (eppendorf))、4°C、1 分間遠心し、上清 650  $\mu$ L 分を除去、沈殿をピペッティングし懸濁した。LB agar プレート (30  $\mu$ g/mL Carb) にガラスビーズを用いて全量播種した。2 種の方法で播種したプレートを 30°C でオーバーナイト (14~16 時間) 培養した。プレートは回収し、4°C で保存した。以下の濃度表記は全て、“ $\leftarrow$ ” より左側が終濃度、右側がストック濃度、“ $\leftarrow$ ” がないものは数値自体が終濃度を表している。

<SOC 培地 (SOB 培地 + 20 mM Glc)>

2% Trypton . . . . . 2 g  
0.5% Yeast Extract . . . . . 0.5 g  
0.058% NaCl . . . . . 0.058 g  
2.5 mM $\leftarrow$ 1 M KCl . . . . . 0.25 mL  
Total (MQ でフィルアップ) 100 mL

オートクレーブ滅菌後、

10 mM $\leftarrow$ 2 M  $Mg^{2+}$  . . . . . 1 mL  
20 mM $\leftarrow$ 1 M Glc . . . . . 2 mL

をクリーンベンチ内で SOB 培地に混合し、1.5 mL 容エッペンドルフチューブに 1 mL ずつ分注した。液体窒素で瞬間凍結し、-80°C で保存した。

### 3-1-2. AspT の発現

3-1-1 のプレートに生育したコロニーを釣菌し、5 mL の 2×LB 液体培地 (30 mM D-glucose、30 µg/mL Carbenicillin) に懸濁し、150 rpm、30°C、25 時間振盪培養した。この前培養液 5 mL 全量を 250 mL の LB 液体培地 (30 mM D-glucose、30 µg/mL Carbenicillin) に植菌し、160 rpm、37°C で  $O.D._{660}=0.5\sim 0.6$  に達するまで回転振盪培養した。上記  $O.D._{660}$  に達したところで (約 90 分)、250 mL の LB 液体培地 (30 mM D-glucose、30 µg/mL Carbenicillin、1 mM Pyridoxal-5'-phosphate、50 mM Aspartate-K [pH 7.0]) を追加し、37°C で  $O.D._{660}\doteq 0.4$  になるまで静置培養した (約 20 分)。上記  $O.D._{660}$  に達したところで終濃度 0.2 mM となるよう 1 M IPTG を 100 µL 添加し、37°C、80 rpm で  $O.D._{660}\doteq 0.9$  になるまで回転振盪培養した。

### 3-1-3. 集菌

上記  $O.D._{660}$  に達したところで、本培養菌液を 3,220×g (4,000 rpm, 本体 ; centrifuge 5810R, ローター ; A-4-81 (ependorf))、4°C、15 分遠心し、集菌した。0.1 M K-Pi buffer [pH 7.0] で菌体を懸濁し、全菌液を 50 mL 容量ファルコンチューブに移して 30 mL にフィルアップし、終濃度 1 mM となるよう 300 mM (飽和) PMSF を 100 µL 添加した (以下 PMSF を添加する際は全て終濃度 1 mM になるよう添加した)。8,801×g、10 分、4°C 遠心し (8,000 rpm, 本体 ; centrifuge 5810R, ローター ; FA-45-6-30 (ependorf)) 洗浄した。上清を除去し、再度 0.1 M K-Pi buffer [pH 7.0] で懸濁し 30 mL にフィルアップ後、300 mM PMSF を 100 µL 添加した。同条件 (8,801×g、10 分、4°C (8,000 rpm, 本体 ; centrifuge 5810R, ローター ; FA-45-6-30 (ependorf)) で洗浄した。上清を除去し、菌体を液体窒素で瞬間凍結し、-80°C で保存した。

### 3-1-4. 菌体破碎

凍結菌体を 0.1 M K-Pi buffer [pH 7.0] で懸濁し 10 mL にフィルアップ後、300 mM PMSF を 33.3 µL 添加した。高圧ホモジェナイザー EmulsiFlex-B15 (Avestin) を用いて 12,000 psi×4 回、4 °C で菌体破碎を行った。破碎効率は約 80% である。0.1 M K-Pi buffer [pH 7.0] で 15 mL にフィルアップ後、300 mM PMSF を 50 µL 添加し、10,300×g、

4°C、20 分遠心し (8,655 rpm, 本体 ; centrifuge 5810R, ローター ; FA-45-6-30 (eppendorf)) 未破碎菌体を除去した。上清を同条件 (10,300×g、4°C、20 分 (8,655 rpm, 本体 ; centrifuge 5810R, ローター ; FA-45-6-30 (eppendorf)) で遠心した。上清を超遠心管 (PC ボトルアセンブリ, 25×89 mm (Beckman))に移し 16 mL にフィルアップ後 (最少容量 16 mL のため)、300 mM PMSF を 53.3 μL 添加し、184,048×g、4°C、1 時間 (45,000 rpm, 本体 ; XL-90, ローター ; Type 50.2Ti (Beckman)) で超遠心した。上清 (水分) を十分除去した後、0.02 M K-Pi buffer [pH 7.0] を 1 mL 添加し、ペレットを懸濁した。1.5 mL 容量エッペンドルフチューブに懸濁液を回収し、窒素置換後、液体窒素で瞬間凍結し -80°C で保存した。

以降の可溶化から精製までの操作は第二章と同じであるため、Buffer の組成は省略する。

### 3-1-5. 可溶化

氷上融解したサンプルを 30 mL の Solubilization buffer に懸濁した。ローテーターを用いて 4°C、3 時間転倒攪拌し、可溶化した。可溶化液を半量 (15 mL) ずつ超遠心管 (PC ボトルアセンブリ, 25×89 mm (Beckman)) に移し 16 mL に solubilization buffer でフィルアップ後 (最少容量 16 mL のため)、300 mM PMSF を終濃度 1 mM になるよう 53.3 μL 添加し、184,048×g、4°C、1 時間 (45,000 rpm, 本体 ; XL-90, ローター ; Type 50.2Ti (Beckman)) 超遠心した。

### 3-1-6. TALON® Metal Affinity Resin の平衡化

Resin 500 μL/sample をファルコンチューブに取り、10 mL になるまで MQ を添加し、よく転倒攪拌した。100×g、4°C、3 分 (740 rpm, 本体 ; himac CF 16RX, ローター ; T4SS31 (日立工機)) 遠心し、上清を除去した。再度 MQ で同様に洗浄した。上清除去後、Wash buffer を 5 mL になるまで添加し、よく転倒攪拌した。100×g、4°C、3 分 (740 rpm, 本体 ; himac CF 16RX, ローター ; T4SS31 (日立工機)) 遠心し、上清を除去した。再度 Wash buffer で同様に洗浄した。上清除去後、Wash buffer を 10 mL になるまで添加し、ローテーターを用いて 30 分以上、4°C で転倒攪拌した。可溶化液の超遠心終了に合わせ、100×g、4°C、3 分 (740 rpm, 本体 ; himac CF 16RX, ローター ; T4SS31 (日立

工機)) 遠心し、上清を除去した。

### 3-1-7. AspT の吸着

超遠心後上清 (可溶化 AspT) を平衡化した Resin 500  $\mu$ L 中に懸濁し、300 mM PMSF を 100  $\mu$ L 添加した。ローテーターを用いて 4°C、3 時間転倒攪拌し、AspT の His-tag を Resin の  $\text{Co}^{2+}$  に吸着させた。100  $\times$ g、4°C、3 分 (740 rpm, 本体 ; himac CF 16RX, ローター ; T4SS31 (日立工機)) 遠心し、上清を除去した。少量の Wash buffer で Resin を懸濁、新しいファルコンチューブに移し、液量が 10 mL になるまでこの洗浄操作を繰り返した。300 mM PMSF を 33.3  $\mu$ L 添加し、ローテーターで 4°C、10 分攪拌した。100  $\times$ g、4°C、3 分 (740 rpm, 本体 ; himac CF 16RX, ローター ; T4SS31 (日立工機)) 遠心し、上清を除去した。10 mL になるまで Wash buffer を添加、更に 300 mM PMSF を 33.3  $\mu$ L 添加し、再度ローテーターで 4°C、10 分攪拌した。100  $\times$ g、4°C、3 分 (740 rpm, 本体 ; himac CF 16RX, ローター ; T4SS31 (日立工機)) 遠心し、上清を除去した。

### 3-1-8. AspT の溶出 (精製)

1 mL の Wash buffer で Resin を懸濁し、空の Poly-Plep Chromatography column (Biorad) に添加した。Wash buffer でファルコンチューブを十分洗浄し、Resin を上記カラムに全量移した。Wash buffer をバッチ法で溶出させた後、50  $\times$ g、4°C、1 分 (530 rpm, 本体 ; himac CF 16RX, ローター ; T4SS31 (日立工機)) 遠心し、溶出口に残った Wash buffer を出し切った。カラム溶出口にキャップを装着し、Resin 500  $\mu$ L に対し 300  $\mu$ L の Elution buffer を添加、よく懸濁後、15 分静置した。キャップを外し溶出した。50  $\times$ g、4°C、1 分 (530 rpm, 本体 ; himac CF 16RX, ローター ; T4SS31 (日立工機)) 遠心し、溶出口に残った溶出液も回収した。回収した溶出液を再度 Resin に懸濁し、同様の操作 (15 分静置、溶出、50  $\times$ g、4°C、1 分遠心) で溶出液を回収した (E1 画分)。新たに Elution buffer 300  $\mu$ L をカラムに添加、よく懸濁し、15 分静置後、溶出を行った。50  $\times$ g、4°C、1 分 (530 rpm, 本体 ; himac CF 16RX, ローター ; T4SS31 (日立工機)) 遠心し、溶出口に残った溶出液も回収した (E2 画分)。E1、E2 画分をひとまとめにし、液体窒素で瞬間凍結後、-80°C に保存した。

### 3-1-9. 精製画分の蛋白質定量

標準曲線は、0~0.5  $\mu\text{g}$  の範囲に収まるよう、BSA で作製した。Elution buffer を用いて、標準曲線用及び定量用サンプルをそれぞれ 10  $\mu\text{L}$  調製した。5 $\times$ SAB (2-mercaptoethanol 含有) を 2.5  $\mu\text{L}$  ずつ添加し、軽くボルテックスをかけた後、恒温槽を用いて、37 $^{\circ}\text{C}$ 、30 分間 SDS 化した。10% ポリアクリルアミドゲルに各サンプルを 10  $\mu\text{L}$  ずつ添加した。200 V 定電圧、4 $^{\circ}\text{C}$  条件下で 45 分間泳動した。泳動後ゲルは MQ で 5 分間、30  $^{\circ}\text{C}$ 、60 rpm (MULTI SHAKER MMS-3010 (EYELA 東京理化機器), 以下同) 条件下で往復振盪し洗浄した。この洗浄操作を 3 回繰り返した。CBB Stain One Super (nacalai tesque) をゲルが浸るくらい (50 mL) 添加し、30 分、30 $^{\circ}\text{C}$ 、60 rpm 条件下で往復振盪し染色した。25% メタノール水で 60 分、30 $^{\circ}\text{C}$ 、60 rpm 条件下で往復振盪して脱色した。軽く MQ でゲルを洗浄したのち、スキャナーで画像を取り込み、ImageJ でバンド強度を定量した。

## 第 2 部 プロテオリポソーム再構成-2

第二章では超音波破碎により脂質を調製していたが、第三章ではボルテックスを用いた薄膜形成法により、脂質調製を試みた。超音波破碎法は破碎に使うタンクの後継機がないということ、実験者によって破碎効率が異なり、技術が要することが問題として挙げられる。そこで代替法として薄膜形成による脂質調製を行うこととした。薄膜形成法は三重大学大学院工学研究科 特任/名誉教授、株式会社リポソーム工学研究所 代表取締役である吉村哲郎先生にご教授いただいた。吉村先生は多様なサイズのリポソームを簡易に作製する技術を考案されている<sup>34)</sup>。本研究で作製する脂質薄膜は 50 nm~100  $\mu\text{m}$  のサイズの多重層・単層混在リポソーム MLV (Multilamellar vesicle) である。作製した薄膜はその後 1.0  $\mu\text{m}$  の細孔のフィルターに通し、サイズを均一化すると共に、凝集したリポソームを除去することで、安定した再構成率と活性値算出に繋げることにした。

### 3-2-1. 薄膜形成法による脂質調製<sup>34)</sup>

窒素置換した試験管に 5% (w/v) になるよう *E. coli* Total lipid Extract (#100500C

(Avanti® PLLAR LIPIDS, INC.)) を 0.05 g 測りとり、クロロホルム 1 mL で溶解した。ロータリーエバポレーターの圧力弁を閉じ、試験管をボルテックスにセットした。試験管の半分くらいまで溶液が跳ねるようボルテックスの強度を調節した。徐々に減圧して真空状態にした。クロロホルムが揮発したらボルテックスを止め、20~30 分静置し、完全にクロロホルムを除去した。窒素ガスを入れ、真空状態を解除した。試験管に MQ : 0.1 mM K-Pi buffer [pH 7.0] = 10 : 1 の混合溶液を 1.1 mL 添加した。1 分間ボルテックスにかけ、ピペッティングも交えつつ脂質薄膜を懸濁した。この操作を繰り返すほど、形成されるリポソームサイズが小さくなる。そこで MLV サイズにとどめるためにボルテックス・ピペッティング操作は最大 5 回までとした。

### 3-2-2. サイジング

Mini-Extruder (Avanti® PLLAR LIPIDS, INC.) 内の Internal Membrane Support に MQ : 0.1 M K-Pi [pH 7.0] = 10 : 1 の混合溶液 50  $\mu$ L 程度を添加し、その上に保護フィルター (Filter Supports (#610014) (Avanti® PLLAR LIPIDS, INC.)) を 1 枚置いた。溶液がフィルターに浸透したら、その上にメンブレン (PC Membranes 19 mm 1.0  $\mu$ m (#610010) (Avanti® PLLAR LIPIDS, INC.)) を 1 枚置いた。溶液がメンブレンに浸透したらその上に再度保護フィルター (同上) を 1 枚置き、溶液の浸透を確認した。Mini-Extruder を組立て、混合溶液 1 mL をハミルトンシリンジ (1000  $\mu$ l Syringe (#610017) (Avanti® PLLAR LIPIDS, INC.)) に吸い取り、Mini-Extruder 内を一方向に通過させ、サイジングを行う前に使用 buffer で経路内を洗浄した。洗浄溶液は捨て、往路側のシリンジで脂質懸濁液を吸い取り、両方向に計 19 回 (9 往復と 1 回) ゆっくりと濾過した (強く、かつ速くシリンジを往復させるとフィルターが破れてしまう。濾過途中でシリンジの動きがスムーズになった場合はフィルターが破れた可能性があるので注意する。)。19 回濾過し終わったら、復路側のシリンジから濾過液を採取した。サイジング後の MLV は 600  $\mu$ L 容量エッペンドルフチューブに分注し、窒素置換後、パラフィルムで蓋を密閉し、遮光用袋に入れて 4°C で保存した (1 か月は形が崩れないとのことである。活性測定の結果、1 か月前に調製した MLV でも安定した値を示していた)。

### 3-2-3. 再構成

再構成には 5 µg 分の精製蛋白質を用いた。方法は第二章と同じである。ただし、反応系調製時の脂質は、超音波破碎脂質から薄膜形成法で作製した 1 µm サイジング MLV に変更し、L-alanine 自己交換輸送時の Loading buffer の組成を下記の組成に変更した。それ以外は全て同じである。液量は適宜変更した。

以下の濃度表記は“←”より左側が終濃度、右側がストック濃度を表している。

#### 【L-alanine 自己交換輸送】

<Loading buffer (超遠心管 1 本あたり 20 mL)>

50 mM←100 mM K-Pi Buffer [pH 7.0]

50 mM←1 M L-Ala-K [pH 7.0]

MQ

1 mM←300 mM PMSF

## 第 3 部 輸送能解析

### 3-3-1. 初速 1 分間における輸送能解析

試験管内に Assay buffer 425 µL とプロテオリポソーム 25 µL を添加、混合した。25°C、3 分プレインキュベート後、25°C 保温の放射性・非放射性基質混合溶液 50 µL を添加した。50 µL ニトロセルロース膜にアプライし、混合液添加 1 分後に Assay Buffer 3 mL で 2 回洗浄し、反応を止めた。液体シンチレーション 6 mL を添加し、シンチレーションカウンターでプロテオリポソーム内部へ取り込まれた <sup>3</sup>H を測定した。

以下の濃度表記は全て、“←”より左側が終濃度、右側がストック濃度を表している。

**【L-aspartate 自己交換輸送】**

<放射性・非放射性基質混合溶液>

最終外部基質濃度 0.1 mM (反応時 10 倍希釈される為ここでは 1 mM に調整)

L-[2,3- <sup>3</sup> H] aspartic acid	15 $\mu$ L
1 mM←10 mM L-Asp-K [pH 7.0]	150 $\mu$ L
<u>Assay B.</u>	<u>1335 <math>\mu</math>L</u>
Total	1500 $\mu$ L

**【L-alanine 自己交換輸送】**

<放射性・非放射性基質混合溶液>

最終外部基質濃度 0.1 mM (反応時 10 倍希釈される為ここでは 1 mM に調整)

L-[2,3- <sup>3</sup> H] alanine	300 $\mu$ L
1 mM←10 mM L-Ala-K	150 $\mu$ L
<u>Assay B.</u>	<u>1050 <math>\mu</math>L</u>
Total	1500 $\mu$ L

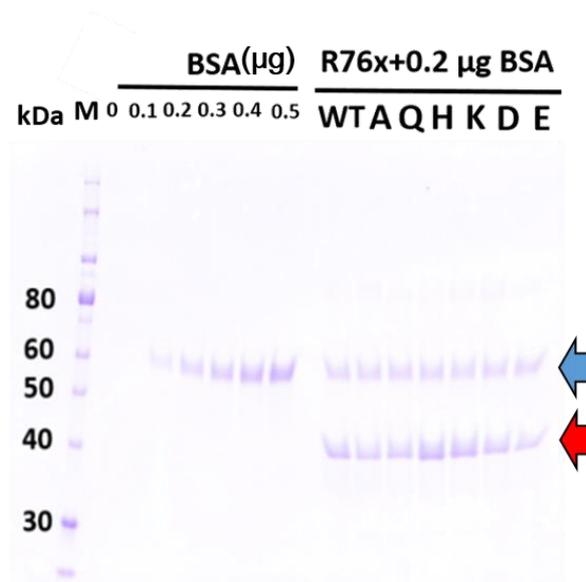
**3-3-2. 再構成後蛋白質定量**

第二章同様の反応系で、プロテオリポソームに再構成した蛋白質量を定量した。定量には Criterion TGX Precast Gels (10%) (Bio-Rad Laboratories, Inc., Berkeley, CA)、染色には Lumitein Protein Gel Stain (Biotium, Inc., Hayward, CA) を用いた。ゲルは LAS-4000 imaging system (FUJIFILM) を用いて検出し、Image J software で定量した。定量結果をもとに、R76 変異体 1 mg が 1 分間に取り込んだ基質の物質質量 ( $\mu$ mol/mg protein/min) を算出した。

### 第三節 結果

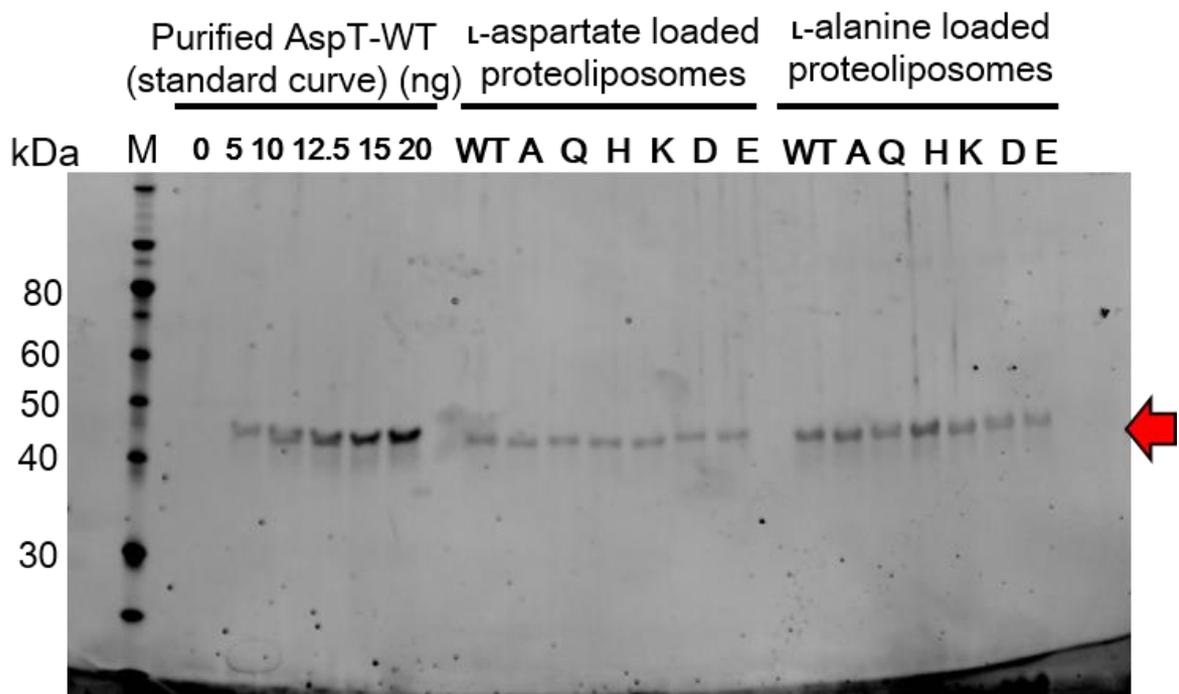
R76 を中性アミノ酸残基の A、Q、塩基性アミノ酸残基の H、K、酸性アミノ酸残基の D、E にそれぞれ置換した変異体が大腸菌に発現させ、細胞膜より変異体を精製し、各精製画分を SDS-PAGE に供した。45 kDa 付近にシングルバンドが得られた (Fig. 10)。AspT モノマーの分子量は 57.4 kDa であり、それに比べると低い位置での検出となった。これは疎水性の高い膜蛋白質の性質に依存する。すなわち、一般的な水溶性蛋白質は蛋白質 1 g あたり SDS が 1.4 g の割合で結合するが<sup>35)</sup>、疎水性の高い膜蛋白質は SDS が通常より多く結合し負電荷量を増す。そのため、膜蛋白質は、陽極方向すなわち低分子量側へと泳動されやすくなる。膜蛋白質によっては SDS 化によって完全に変性しきらず、蛋白質-SDS 複合体が非常にコンパクトになることで、泳動の移動度が増すものもあるようだが、AspT に関しては恐らく前者の原理によって理論値よりも低くバンドが検出されてしまったと考えられる。AspT では WT においても常にみられる現象であるため、変異に起因するものではない。単一精製ができていることを確認したので、続いて Image J software を用いて精製蛋白質濃度を定量した。その結果、変異体ごとに得られる蛋白質量に違いがあった (Table 4)。最も濃度が低い R76E と最も濃度が高い R76K の間では約 2 倍の濃度差が見られ、変異体ごとに AspT の発現量が異なっていると推定された。定量結果を元に、5  $\mu$ g 分の精製変異体をプロテオリポソームに再構成した。プロテオリポソームに再構成された蛋白質量を算出するため、プロテオリポソームの一部 (3  $\mu$ L) を SDS-PAGE に供し、再構成された蛋白質の定量を行うと共に、再構成後もシングルバンドであることを確認した (Fig. 11)。

各 R76 変異体を再構成したプロテオリポソームを用いて、L-aspartate または L-alanine 自己交換輸送の初速 1 分間におけるプロテオリポソーム内部への <sup>3</sup>H L-aspartate または <sup>3</sup>H L-alanine の取り込み量を確認した。グラフは、WT の輸送能 ( $\mu$ mol/mg protein/min) を 100% とした時の各 R76 変異体の輸送能を相対値で表した (Fig. 12)。その結果、L-aspartate、L-alanine どちらの自己交換輸送においても、各 R76 変異体の輸送能の増減は類似した傾向を示した。特に塩基性アミノ酸残基 K に置換した R76K は WT に比べ 2 倍近く高い活性を示し、酸性アミノ酸残基 D 及び E に置換した R76D 及び R76E は WT に比べて約 3 分の 1 の低い活性を示した。



**Fig. 10 SDS-PAGE profiles of R76 variants in purification steps.**

SDS-PAGE analysis with a 10% polyacrylamide gel. A red arrow represents AspT and a blue arrow represents internal standard BSA (66 kDa). The putative AspT's molecular mass is 57.2 kDa.



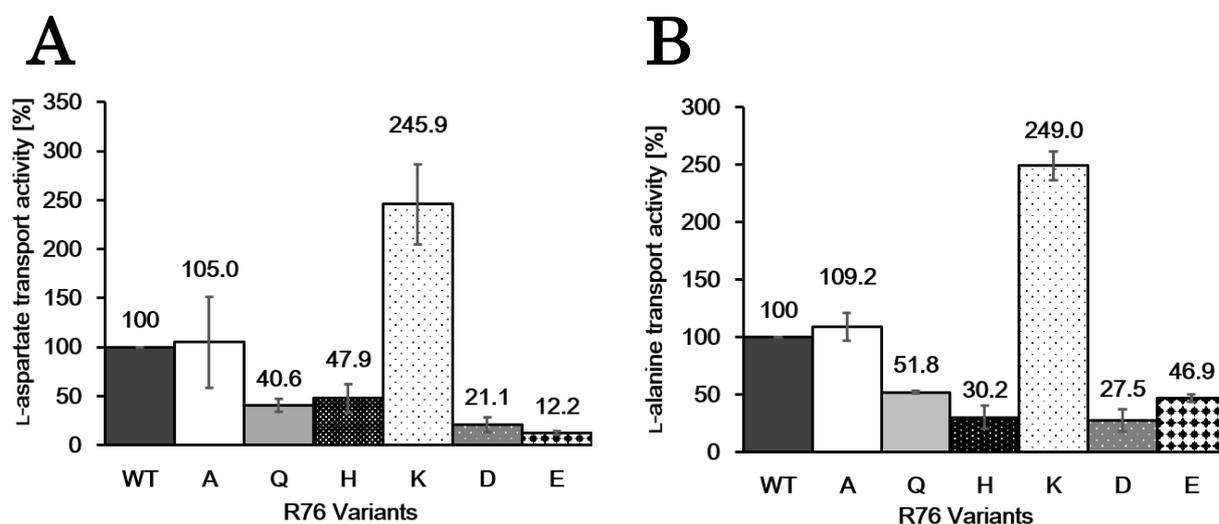
**Fig. 11 SDS-PAGE profiles of R76 variants reconstituted into proteoliposomes.**  
 SDS-PAGE analysis with a 10% Criterion TGX gel. A red arrow represents AspT.

**Table 4 Concentrations of purified R76 variants.**

<b>Variants</b>	<b>Concentration (<math>\mu\text{g}/\text{mL}</math>)</b>
<b>WT (R76)</b>	<b>201.47</b>
<b>R76A</b>	<b>143.94</b>
<b>R76Q</b>	<b>262.01</b>
<b>R76H</b>	<b>178.42</b>
<b>R76K</b>	<b>272.96</b>
<b>R76D</b>	<b>174.00</b>
<b>R76E</b>	<b>137.19</b>

[Suzuki, S., et al. BBB. (2015) 10.1080/09168451.2015.1123609]

The protein concentration of each R76 variant was quantified by using SDS-PAGE. Aliquots of 6  $\mu\text{l}$  of purified protein (as described in Materials and Methods) were passed through a Criterion TGX gel 10% (BIORAD) and stained with CBB Stain One Super (nacalai tesque), and quantitation was carried out by using Image J software (US National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA; <http://imagej.nih.gov/ij/>, 1997–2014).



[Suzuki, S., et al. BBB. (2015) 10.1080/09168451.2015.1123609]

**Fig. 12 Analysis of the L-aspartate (A) or L-alanine (B) transport capacity of R76 variants.**

Proteoliposomes were loaded with 100 mM L-aspartate (A) or 50 mM L-alanine (B), and their uptake of  $^3\text{H}$  L-aspartate (A) or L-alanine (B) during a 1 minute reaction was measured using the R76 variants reconstituted into the proteoliposomes. The uptake reaction was terminated after 1 minute by use of filtration and washing. The ordinate shows the transport activity ( $\mu\text{mol mg protein}^{-1}$ ) as a percentage of the WT activity.

#### 第四節 考察

R76 変異体を用いた輸送能解析の結果、置換アミノ酸ごとに輸送能は変化した。これら輸送能の差を生み出す原因として、変異体の有する性質の他、変異を入れたことによって活性構造が失われた影響が考えられた。GxxxG モチーフを cysteine 残基にそれぞれ置換した変異体を、サイズ排除ゲル濾過クロマトグラフィーに供した。その際検出されたピーク位置やピーク形状は、内在性 cysteine 残基を全て alanine に置換した Cysless 体と差が見られず、活性も維持されていた (Data not shown)。本研究においては R76 変異体をゲル濾過クロマトグラフィーに供していないが、GxxxG モチーフ領域ではパッキングが強固に行われているため、一アミノ酸の変異を入れても活性構造は維持されていると推測している。すなわち、本研究で得られた変異体間の輸送能の差は、基質との親和性の違い、もしくは基質結合から輸送に至る遷移速度の違いによるものとして議論を進める。

R76 変異体を用いた輸送能解析から、塩基性残基に置換した R76K の輸送能が最も高く、酸性残基に置換した R76D、R76E の輸送能が低くなっていることが示された (Fig. 12)。このことから、電荷の違いが基質輸送と速度に何らかの影響を及ぼしている可能性が考えられた。しかし、L-aspartate 輸送と L-alanine 輸送のどちらの輸送においても活性の増減が類似の傾向を示したことから、R の陽電荷が輸送基質である L-aspartate の負電荷と直接相互作用し輸送反応が起こるわけではないと推察された。R76 は、AspT を構成する他の陰性アミノ酸残基と塩橋を形成する等して相互作用し<sup>36)</sup>、構造の安定化に寄与している可能性が推察された。R76 が含まれる GxxxG モチーフは、ヘリックスパッキングによって構造の安定化やオリゴマー形成に関与するため<sup>32)</sup>、基質の透過経路の一部として、基質との相互作用よりも構造の安定化に R76 部位が一役を担っている可能性は高い。AspT は TM3 以外にも多くの GxxxG/A/S モチーフを有しているため、TM3 の R76 の他、他の TM の GxxxG/A/S のアミノ酸に変異を入れた二重変異体を作製し、同様に輸送能解析を実施することで、何番目の TM のアミノ酸残基が相互作用をし、活性構造の安定化を図っているか調べることができる<sup>37,38)</sup>。また、相互作用部位が TM3 同士であった場合は、AspT がモノマーでファンクショナルユニットを形成し、輸送機能を保持していることを示す。Fig. 9 に挙げた AAEx ファ

ミリー の全長でシーケンスアライメントを行った結果、TM4-5 間にあるリエントラン  
プ内の G123-G127、G127-S131、TM6 内の G371-S375、S375-G379、TM7 内の G387-  
A391、A391-G395、G393-A397、G394-S398、S398-G402、G402-S406、TM8 内の G439-  
A443 は全クラスターにおいて高度に保存されていることがわかった (Data not shown)。  
この中でも、Aspartate : Alanine 輸送に関与するクラスター IV は (Fig. 9)<sup>11)</sup>、TM6 の  
S375-G379、TM7 の G393-A397、G402-S406、及び TM8 の G439-A443 で特に保存性  
が高くなっていた。クラスター IV 間で保存性が高いモチーフに関しては、TM3 と相  
互作用している可能性も高いため、今後解析を進めるうえで参考となる部位になる。こ  
のように、相互作用部位の探索は、AspT の細部に亘る輸送機能を知るだけでなく、AspT  
全体の機能を知る手掛かりに繋がると期待される。

また、AspT が帰属する AAEx ファミリーにおいて、TM3 のシーケンスアライメン  
トをとった結果<sup>11)</sup>、本研究で使用した *T. halophilus* AspT の R76 に相当する残基は  
GxxxG モチーフの中でも特に保存性が低く、多くのホモログが極性アミノ酸を保持し  
ていることがわかった (Fig. 9)。アミノ酸の相同性は低いものの、膜内という疎水的環  
境において極性アミノ酸残基が保持されていることから、R76 相当部位は基質輸送に  
関与する可能性が高い。

アーキア、真正細菌、真核生物に見られる 7 回膜貫通型の光受容型膜蛋白質・微生  
物型ロドプシンには、H<sup>+</sup>、Na<sup>+</sup>、Cl<sup>-</sup>、3 種のポンプの存在が報告されている<sup>39,40)</sup>。これ  
らの各光駆動型イオンポンプが、それぞれのポンプに適したイオンを輸送するには、  
TM3 内の 85、89、96 番目の 3 つのアミノ酸残基が重要とされている<sup>39,40)</sup>。すなわち、  
H<sup>+</sup> を輸送するポンプでは、Asp-Thr-Asp または Asp-Thr-Glu (DTD (E) モチーフ)、Na<sup>+</sup>  
を輸送するポンプでは Asn-Asp-Gln (NDQ モチーフ)、Cl<sup>-</sup> を輸送するポンプでは Asn-  
Thr-Gln (NTQ モチーフ) から構成される。このように、微生物型ロドプシン全体でみる  
と、3 つのアミノ酸残基は多様性に富んでいるが、輸送するイオン種ごとに各ロドプシ  
ンを分類すると、3 つのアミノ酸残基は高度に保存されていることがわかった<sup>39,40)</sup>。

AspT に関しても、保存性の高い領域の中での R76 相当部位の極端な保存性の低さ  
は、輸送基質の選択性への関与が期待される。輸送能解析の結果、置換アミノ酸が変化  
するごとに輸送能も大きく変化しており (Fig. 12)、今回の輸送能解析で最も輸送能が低

かった E を R76 相当残基に保持するホモログも存在する (Fig. 9) ことから、R76 相当部位が基質の選択性に関与している可能性も推察された。R76 変異体に関して、本研究で用いた L-aspartate、L-alanine 以外の基質でも輸送能解析をし、基質間で輸送能に変化が出れば、より基質選択性への関与を裏付けることができる。

近年、*Corynebacterium glutamicum* を用いたグルタミン酸生産に排出チャネル (NCgl1221 mechanosensitive channel) が重要な役割を果たすことが報告され<sup>1)</sup>、さらに酵母のエタノール生産においても基質を取り込むインポーターが重要な機能を果たすことが報告されている<sup>2)</sup>。このように、微生物を用いた物質生産において、基質の取り込みや生産物の排出を担うトランスポーターの重要性が認められつつあり、テクノロジーとしての利用へ向けた研究が進められている<sup>3)</sup>。本研究で、R76K が WT と比較して 2 倍近い輸送能を示したことは (Fig. 12)、一アミノ酸置換によりトランスポーターの輸送速度を加速させたことを意味する。また R76K に関しては、WT や他の変異体に比べ、得られる蛋白質量が高かったことから (Table 4)、将来、微生物による発酵産業において、物質生産の効率化にトランスポーターの改変が有効であることを期待させる結果となった。しかし一方で、本成果の一アミノ酸置換による輸送速度の加速は、あくまで“取り込み”時点においてである。有用物質生産としては、原料となる基質の“取り込み”だけでなく生産物の“排出”も重要である。そこで、本博士論文研究で行った取り込み初速の解析だけでなく、今後は R76 変異体を用いたキネティクス解析を行う必要がある。この他にも、基質の透過経路を形成するとされる TM3 を中心に、解析するアミノ酸残基の範囲を広げ、同様にアミノ酸置換変異体を用いた輸送能解析を進めることで、基質認識・結合・速度制御部位を明らかにし、産業応用への糸口となることを期待したい。

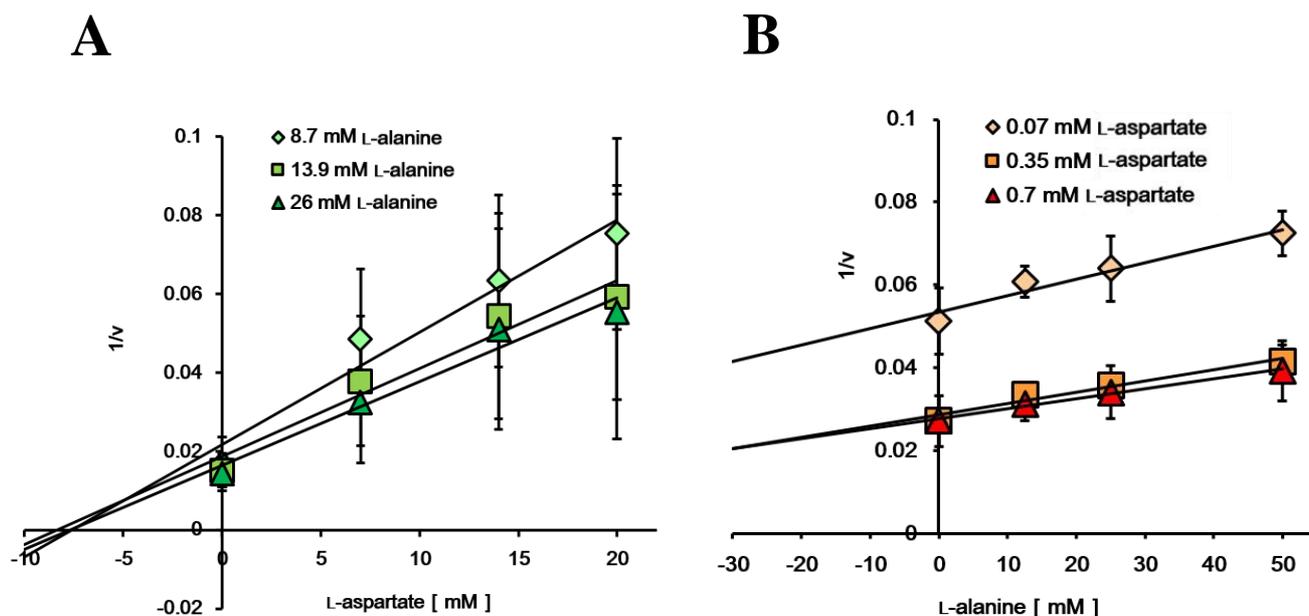
## 第四章 総合論議

AspT はこれまでに、TM3 が基質の推定透過経路を形成すること、基質結合部位が異なることが推察されてきた。本博士論文では、OGM 蛍光修飾実験及びプロテオリポソーム再構成系を用いた輸送活性測定を通じて AspT の基質結合とそれに伴う構造変化を調べることで、輸送メカニズムの一端を解明することができた (Fig. 4-7)。すなわち、輸送基質である L-aspartate と L-alanine は異なる結合型コンフォメーションをとり、一方の結合により誘導される構造変化は、他方の基質結合の親和性を低下させること、そして L-aspartate と L-alanine は独立した輸送経路を有することを示した (Fig. 7)。生理的環境において、*T. halophilus* は脱炭酸反応共役的な aspartate:alanine 交換輸送反応を行い、それにより生じる膜電位を使ってエネルギーを生産している<sup>4)</sup>。本研究で明らかになった、基質結合型コンフォメーション間の競合は、エネルギー生産と回収という点で、生理的に重要なメカニズムと推察される。現在検討を進めている“ヘテロ交換輸送における二基質同時観測”から、ホモ交換輸送よりもヘテロ交換輸送の方が優先して起きている可能性が推察された (Supplemental Fig. 3)。このことから、現時点での同時結合型の存在は不明だが、仮に同時結合が起こったとしても、一方の基質が枯渇する前にヘテロ交換輸送からホモ交換輸送に切り替わって膜電位を発生しなくなる、という事態は回避できると推測される。この点に関して、AspT ヘテロ交換輸送時、すなわち、L-aspartate 封入プロテオリポソームにおいて外部基質を L-alanine とした際の L-alanine 輸送の  $K_m$ 、 $V_{max}$ 、あるいは L-alanine 封入プロテオリポソームにおいて外部基質を L-aspartate とした際の L-aspartate 輸送の  $K_m$ 、 $V_{max}$  を測定することで、生理的環境における AspT の輸送の意義をより深く知ることができると期待している。

GxxxG モチーフの R76 に焦点をあてた輸送能解析では、R の陽性電荷が陰性電荷を有するアミノ酸残基と相互作用し、構造の安定化に寄与する可能性、及び基質の選択性に関与する可能性が推察された (Fig. 12)。GxxxG モチーフは TM3 以外にも複数個所存在する (Fig. 8)<sup>6)</sup>。GxxxG モチーフを介してモノマー間、あるいはオリゴマー間で相互作用していると推察されることから、R76 の相互作用部位含め、GxxxG モチーフが AspT の活性構造の維持にどのように関与しているかを明らかにすることは今後の課題である。異なるヘリックスの GxxxG モチーフ間で二重変異体を作製し、輸送能解

析を進めることが AspT 全容解明のためにも重要である。結晶構造によって、より視覚的に相互作用部位を確認することも必要であろう。R76 の基質選択性に関しては、L-aspartate や L-alanine 以外の基質を用いて輸送能解析を実施し、基質ごとに輸送能の差が見られれば、基質選択性への関与を裏付けられる可能性がある。また、R76K が WT の約 2 倍の輸送能を示したことは、一アミノ酸置換によって AspT の輸送速度の上昇、すなわち分子比活性の上昇に繋がったことを意味している (Fig. 12)。R76K は WT や他の変異体に比べて発現量が高かったことから、トランスポーターへの変異導入による機能強化が可能である事を示した。これは微生物による発酵産業において、トランスポーターの改変による物質生産の効率化を期待させる結果となった。

トランスポーター研究の進展は、膜蛋白質の高い疎水性に起因する発現量の低さ、精製及び結晶化の困難さ、エキスポーターの著しい  $K_m$  の高さとそれに伴う輸送反応解析系の設計の難しさ等から、可溶性蛋白質に比べると遅れている。それゆえ物質生産の点において、トランスポーターは産業応用するまでに達していない。このような中で、輸送とエネルギー生産の両方を達成でき、産業上有用と考えられる AAEx family のプロトタイプである AspT の基盤的研究は、産業的意義が大きいと考えられる。本博士論文研究で、輸送のキネティクス解析と輸送体蛋白質の蛍光修飾解析を組み合わせることで、基質結合による AspT のコンフォメーション変化というトランスポーターの動的一面を捉え、新たに AspT の基質輸送反応モデルを考察するに至った (Fig. 7)。そしてトランスポーターの産業応用への礎として、機能改変による機能強化の可能性も示すことができた。これらのことは、学術的にも産業的にも重要な知見であったと考えている。今後は解析する手法や領域の幅を広げ、AspT の更なる機能解明と、それを筆頭とした他のトランスポーター研究の発展に期待したい。

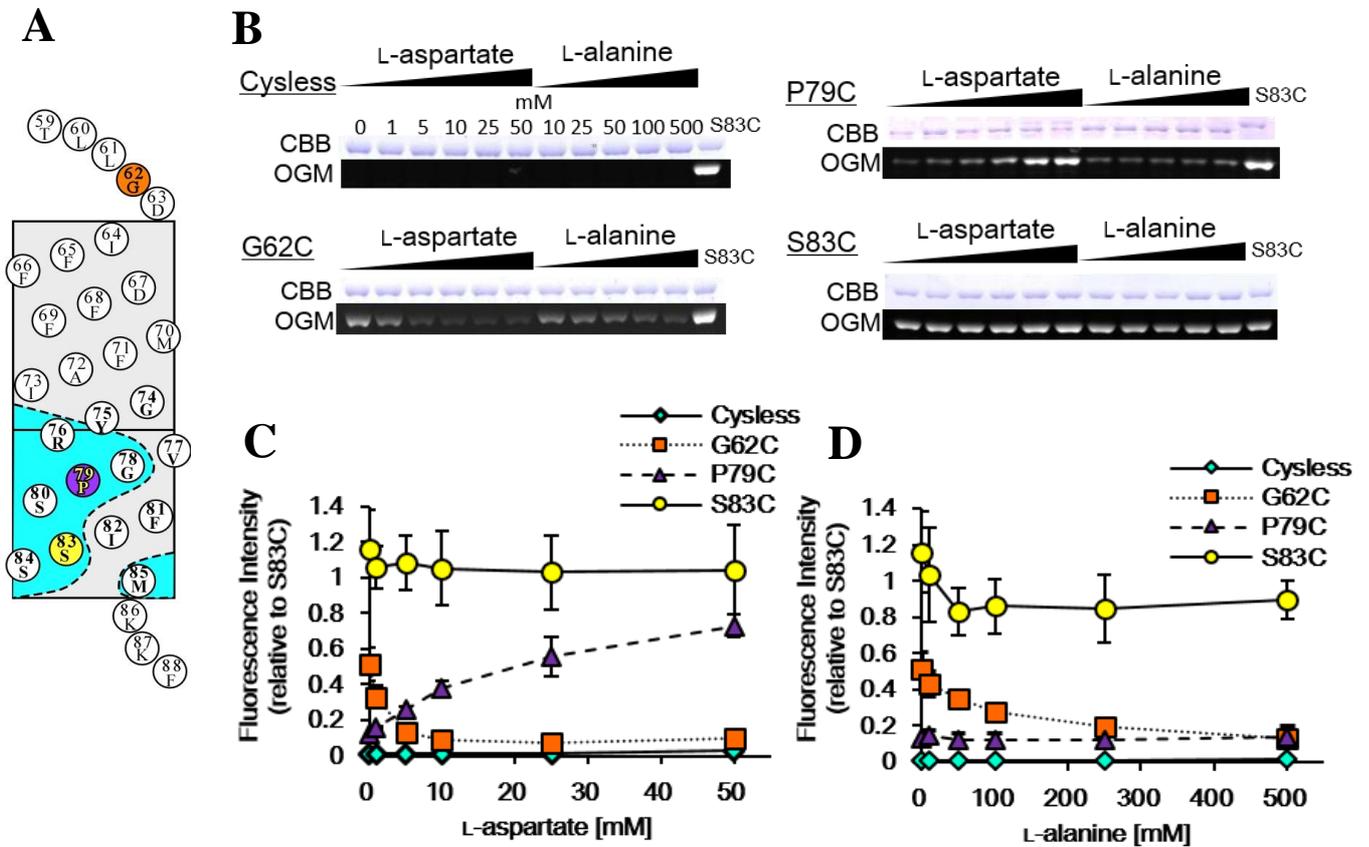


[鈴木 修士論文 2013]

[Suzuki, S., et al. J Biol Chem. (under revision)]

### Supplemental Fig. 1 Competitive inhibition of counter-flow reactions with two native substrates.

Dixon-plot analysis, relying on samples filtered after a 30-seconds reaction to estimate initial velocities. The initial rates of uptake in AspT-reconstituted proteoliposomes were measured in the presence of (A) 8.7 mM (◆), 13.9 mM (■), or 26 mM (▲) L-alanine or (B) 0.07 mM (◆), 0.35 mM (■), or 0.7 mM (▲) L-aspartate. The reciprocal value of the rate was plotted versus the concentration of L-aspartate (A) or L-alanine (B). For L-aspartate and L-alanine, straight-line plots were obtained that intersected at a common point ( $-K_i$ ), indicating that these substrates competitively inhibited L-aspartate and L-alanine uptake each other.  $K_i$  values for the other inhibitors were similarly obtained.

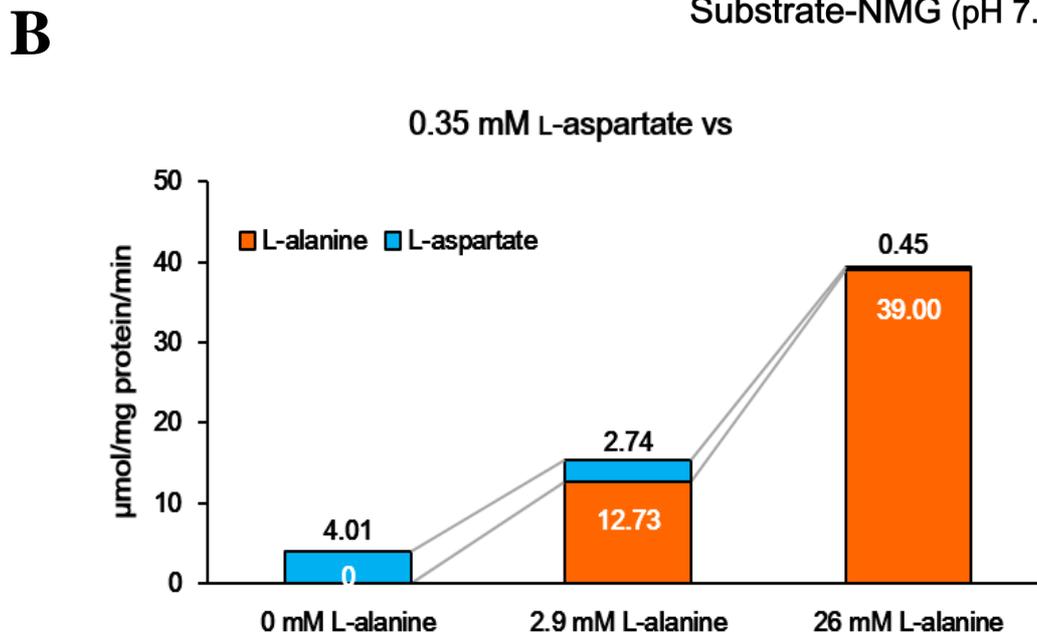
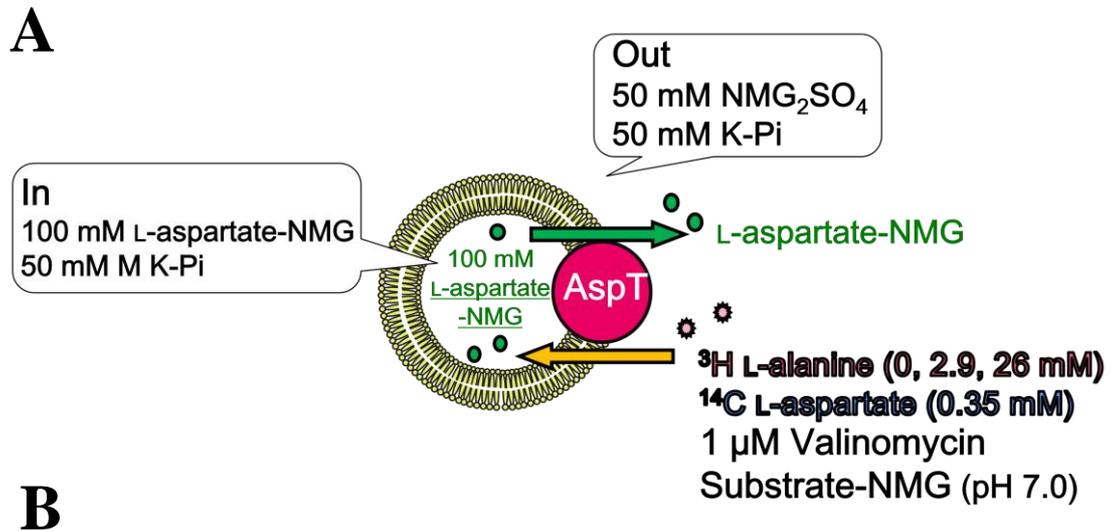


[木村 修士論文 2012]

[Suzuki, S., et al. J Biol Chem. (under revision)]

**Supplemental Fig. 2 Substrate concentration dependence of Oregon Green maleimide (OGM) labeling efficiency on TM3 as applied to four single cysteine variants.**

Membrane ghosts of each variant were exposed to OGM in the absence or presence of various concentrations of L-aspartate or L-alanine before protein solubilization and purification. Purified samples were analyzed by using non-reducing SDS-PAGE (10% polyacrylamide gel matrix). (A) TM3 topology mode. (B) A single gel containing all of the samples was used to record the fluorescence signal with a LAS-4000 imaging system (bottom panel) before it was stained with CBB to visualize protein (upper panel). (C, D) Levels of fluorescence intensity and CBB staining under non-reducing SDS-PAGE were normalized against the corresponding levels of the S83C variant. The labeling efficiency of cysteine in each variant (cysless;  $\blacklozenge$ , G62C;  $\blacksquare$ , P79C;  $\blacktriangle$ , S83C;  $\bullet$ ) is shown as a ratio of the normalized level of fluorescence intensity and CBB staining (C; presence of L-aspartate, D; presence of L-alanine).



**Supplymnetal Fig. 3 Double chase of  $^{14}\text{C}$  L-aspartate and  $^3\text{H}$  L-alanine transport into proteoliposomes loaded with 100 mM L-aspartate in the presence of two external substrates [0.35 mM ( $K_m$ )  $^{14}\text{C}$  L-aspartate vs 0, 2.9 ( $1/10V_{\text{max}}$ ) - 26 ( $K_m$ ) mM  $^3\text{H}$  L-alanine].**

(A) The schematic drawings.

(B) The bar graph shows that the counterflow of single substrate species is shifted to heterologous exchange between L-aspartate : L-alanine under coexistence of the two substrates. Blue represents L-aspartate transport activities and orange represents L-alanine transport activities.

## —引用文献—

1. Nakamura, J., Hirano, S., Ito, H., and Wachi, M. Mutations of the *Corynebacterium glutamicum* NCgl1221 gene, encoding a mechanosensitive channel homolog, induce L-glutamic acid production. *Appl Environ Microbiol.* 2007;73:4491-4498.
2. Enquist-Newman, M., Faust, AM., Bravo, DD., Santos, CN., Raisner, RM., Hanel, A., Sarvabhowman, P., Le, C., Regitsky, DD., Cooper, SR., Peereboom, L., Clark, A., Martinez, Y., Goldsmith, J., Cho, MY., Donohoue, PD., Luo, L., Lamberson, B., Tamrakar, P., Kim, EJ., Villari, JL., Gill, A., Tripathi, SA., Karamchedu, P., Paredes, CJ., Rajgarhia, V., Kotlar, HK., Bailey, RB., Miller, DJ., Ohler, NL., Swimmer, C., and Yoshikuni, Y. Efficient ethanol production from brown macroalgae sugars by a synthetic yeast platform. *Nature.* 2014;505:239-243.
3. Yamashita, C., Hashimoto, K., Kumagai, K., Maeda, T., Takada, A., Yabe, I., Kawasaki, H., and Wachi, M. L-Glutamate secretion by the N-terminal domain of the *Corynebacterium glutamicum* NCgl1221 mechanosensitive channel. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2013;77:1008-1013.
4. Abe, K., Hayashi, H., and Maloney, PC. Exchange of aspartate and D-alanine. Mechanism for development of a proton-motive force in bacteria. *J Biol Chem.* 1996;271:3079-3084.
5. Abe, K., Ohnishi, F., Yagi, K., Nakajima, T., Higuchi, T., Sano, M., Machida, M., Sarker, RI., and Maloney, PC. Plasmid-encoded *asp operon* confers a proton motive metabolic cycle catalyzed by an aspartate-alanine exchange reaction. *J Bacteriol.* 2002;184:2906-2913.
6. Nanatani, K., Fujiki, T., Kanou, K., Takeda-Shitaka, M., Umeyama, H., Ye, L., Wang, X., Nakajima, T., Uchida, T., Maloney, PC., and Abe, K. Topology of AspT, the aspartate:alanine antiporter of *Tetragenococcus halophilus*, determined by site-directed fluorescence labeling. *J Bacteriol.* 2007;189:7089-709.
7. Nanatani, K., Maloney, PC., and Abe, K. Structural and functional importance of transmembrane domain 3 (TM3) in the aspartate:alanine antiporter AspT: topology and function of the residues of TM3 and oligomerization of AspT. *J Bacteriol.* 2009;191:2122-2132.
8. Sasahara, A., Nanatani, K., Enomoto, M., Kuwahara, S., and Abe, K. Substrate specificity of the aspartate:alanine antiporter (AspT) of *Tetragenococcus halophilus* in reconstituted liposomes.

J Biol Chem. 2011; 286:29044-29052.

9. Saier, M. H., Jr., Tran, C. V., and Barabote, R. D. TCDB: the Transporter Classification Database for membrane transport protein analyses and information. *Nucleic Acids Res.* 2006;34:D181-186.

10. Saier, M. H., Jr., Yen, M. R., Noto, K., Tamang, D. G., and Elkan, C. The Transporter Classification Database: recent advances. *Nucleic Acids Res.* 2009;37:D274-278.

11. Fukui, K., Koseki, C., Yamamoto, Y., Nakamura, J., Sasahara, A., Yuji, R., Hashiguchi, K., Usuda, Y., Matsui, K., Kojima, H., and Abe, K. Identification of succinate exporter in *Corynebacterium glutamicum* and its physiological roles under anaerobic conditions. *J Biotechnol.* 2011;154:25-34.

12. Shimamura, T., Weyand, S., Beckstein, O., Rutherford, NG., Hadden, JM., Sharples, D., Sansom, MS., Iwata, S., Henderson, PJ., and Cameron, AD. Molecular basis of alternating access membrane transport by the sodium-hydanotin transporter Mhp1. *Science.* 2010;328:470-473.

13. Oldham, M.L., Davidson, A.L., and Chen, J. Structural insights into ABC transporter mechanism. *Curr Opin Struct Biol.* 2008;18:726–733.

14. Dawson, R.J., Hollenstein, K., and Locher, K.P. Uptake or extrusion: crystal structures of full ABC transporters suggest a common mechanism. *Mol Microbiol.* 2007;65:250–257.

15. Ye, L., Jia, Z., Jung, T., and Maloney, P. C. Topology of OxIT, the oxalate transporter of *Oxalobacter formigenes*, determined by site-directed fluorescence labeling. *J Bacteriol.* 2001;183:2490-2496.

16. Abe, K., Ruan, Z. S., and Maloney, P. C. Cloning, sequencing, and expression in *Escherichia coli* of OxIT, the oxalate:formate exchange protein of *Oxalobacter formigenes*. *J Biol Chem.* 1996;271:6789-6793.

17. Anantharam, V., Allison, M. J., and Maloney, P. C. Oxalate:formate exchange. The basis for energy coupling in *Oxalobacter*. *J Biol Chem.* 1989;264:7244-7250.

18. Schneider, C. A., Rasband, W. S., and Eliceiri, K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods.* 2012;9:671-675

19. Abramoff, M. D., Magalhaes, P. J., and Ram, S. J. Image Processing with ImageJ.

Biophotonics International. 2004;11:36-42

20. Ambudkar, S. V., and Maloney, P. C. Bacterial anion exchange. Use of osmolytes during solubilization and reconstitution of phosphate-linked antiport from *Streptococcus lactis*. J Biol Chem. 1986;261:10079-10086.
21. Gao, X., Zhou, L., Jiao, X., Lu, F., Yan, C., Zeng, X., Wang, J., and Shi, Y. Mechanism of substrate recognition and transport by an amino acid antiporter. Nature. 2010;463:828-832.
22. Kowalczyk, L., Ratera, M., Paladino, A., Bartoccioni, P., Errasti-Murugarren, E., Valencia, E., Portella, G., Bial, S., Zorzano, A., Fita, I., Orozco, M., Carpena, X., Vazquez-Ibar, J. L., and Palacin, M. Molecular basis of substrate-induced permeation by an amino acid antiporter. Proc Natl Acad Sci U S A. 2011;108:3935-3940.
23. Tsai, M. F., Fang, Y., and Miller, C. Sided functions of an arginine-agsmatine antiporter oriented in liposomes. Biochemistry. 2012;51:1577-1585.
24. Schulze, S., Koster, S., Geldmacher, U., Terwisscha van Scheltinga, A. C., and Kuhlbrandt, W. Structural basis of Na<sup>+</sup>-independent and cooperative substrate/product antiport in CaiT. Nature. 2010;467:233-236.
25. Kalayil, S., Schulze, S., and Kuhlbrandt, W. Arginine oscillation explains Na<sup>+</sup> independence in the substrate/product antiporter CaiT. Proc Natl Acad Sci U S A. 2013;110:17296-17301.
26. Liao, J., Li, H., Zeng, W., Sauer, D. B., Belmares, R., and Jiang, Y. Structural insight into the ion-exchange mechanism of the sodium/calcium exchanger. Science. 2012;335:686-690.
27. Madej, M. G., Soro, S. N., and Kaback, H. R. Apo-intermediate in the transport cycle of lactose permease (LacY). Proc Natl Acad Sci U S A. 2012;109:E2970-2978.
28. Madej, M. G., and Kaback, H. R. Evolutionary mix-and-match with MFS transporters II. Proc Natl Acad Sci U S A. 2013;110:E4831-4838.
29. Serdiuk, T., Madej, M. G., Sugihara, J., Kawamura, S., Mari, S. A., Kaback, H. R., and Muller, D. J. Substrate-induced changes in the structural properties of LacY. Proc Natl Acad Sci U S A. 2014;111:E1571-1580.
30. Kaback, H. R. A chemiosmotic mechanism of symport. Proc. Natl Acad Sci U S A. 2015;112:1259-1264.

31. Perez, C., Koshy, C., Yildiz, O., and Ziegler, C. Alternating-access mechanism in conformationally asymmetric trimers of the betaine transporter BetP. *Nature*. 2012;490:126-130c.
32. Russ, WP., and Engelman, DM. The GxxxG motif: a framework for transmembrane helix-helix association. *J Mol Biol*. 2000;296:911-919.
33. Kleiger, G., and Eisenberg, D. GXXXG and GXXXA motifs stabilize FAD and NAD(P)-binding Rossmann folds through C(alpha)-H...O hydrogen bonds and van der waals interactions. *J Mol Biol*. 2002;323:69-76.
34. Fukushima, H., Mizutani, M., Imamura, K., Morino, K., Kobayashi, J., Okumura, K., Tsumoto, K., and Yoshimura, T. Development of a novel preparation method of recombinant proteoliposomes using baculovirus gene expression systems. *J Biochem*. 2008;144:763-770.
35. Reynolds, JA., and Tanford, C. Binding of dodecyl sulfate to proteins at high binding ratios. Possible implications for the state of proteins in biological membranes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1970;66:1002-1007.
36. Walther, TH., and Ulrich, AS. Transmembrane helix assembly and the role of salt bridges. *Curr Opin Struct Biol*. 2014;27:63-68.
37. Overton, MC., Chinault, SL., and Blumer, KJ. Oligomerization, biogenesis, and signaling is promoted by a glycoporphin A-like dimerization motif in transmembrane domain 1 of a yeast G protein-coupled receptor. *J Biol Chem*. 2003;278:49369-49377.
38. Kohlway, A., Pirakitikulr, N., Barrera, FN., Potapova, O., Engelman, DM., Pyle, AM., and Lindenbach, BD. Hepatitis C virus RNA replication and virus particle assembly require specific dimerization of the NS4A protein transmembrane domain. *J Virol*. 2014;88:628-642.
39. Inoue, K., Kato, Y., and Kandori, H. Light-driven ion-translocating rhodopsins in marine bacteria. *Trends Microbiol. Review*. 2015;23:91-98.
40. Inoue, K., Ono, H., Abe-Yoshizumi, R., Yoshizawa, S., Ito, H., Kogure, K., and Kandori, H. A light-driven sodium ion pump in marine bacteria. *Nat Commun*. 2013;4:1678. doi: 10.1038/ncomms2689.

## —謝辞—

本修士論文を作成するにあたり、日頃よりご指導賜りました東北大学大学院農学研究科応用微生物学分野の阿部敬悦教授、金子淳准教授、阿部直樹助手に厚く御礼申し上げます。AspT 研究の先輩であり、多くの実験アドバイスを賜りました東北大学大学院農学研究科微生物資源学分野の七谷圭助教にも厚く御礼申し上げます。

同じく AspT 研究に力を注いでくださった先輩方にも感謝申し上げます。先輩方の土台があったからこそ、新たに輸送モデルを提示することができました。

また、私の研究において放射性同位元素実験棟での実験は不可欠でした。放射性基質や検出器に関して、質問をすればお時間をとって調査・報告してくださった管理室の日尾氏、井上氏にもこの場を借りて感謝申し上げます。

常に気にかけて、生物工学会飛翔賞に推薦してくださった遺伝子情報システム学分野の五味勝也教授、トランスポーター研究において鋭く熱いアドバイスと議論をしてくださった動物微生物学分野の米山裕准教授、リポソーム調整のため、実験アドバイスは勿論のこと、実験室や器具までお貸しくくださった分子酵素学分野の二井勇人准教授、そして脂質薄膜形成技術をご教授くださったリポソーム工学研究所の吉村哲郎先生。研究機関を超えて多くの先生方に支えられ、本当に幸せな身分でした。ありがとうございました。

6年に及ぶ研究生活は長くもあり、あっという間でもあり、名残惜しいやらすがるしいやら、一言では簡単に表せません。春からはいよいよ社会人です。世の中では、これまで学んだことはちっぽけなことに過ぎないかもしれません。しかし、必ず生かせる技術・思考・人間力があると信じています。皆様からのご恩をお返しすべく、世の中に役立つ研究者・社会人を目指したいと思います。

最後に、辛い時も嬉しい時も、どんな時でも傍に寄り添い、気遣い、味方だった家族に心から感謝と愛を送ります。ありがとう。

平成 28 年 2 月 26 日

応用微生物学分野 博士後期課程 3 年

鈴木 聡美