

氏名	鎌内 慎也
授与した学位	博士
専攻分野の名称	工学
学位授与番号	博甲第2209号
学位授与の日付	平成13年 3月25日
学位授与の要件	自然科学研究科生物資源科学専攻 (学位規則第4条第1項該当)
学位論文の題目	細胞膜におけるイオン輸送性タンパク質の構造・機能制御の分子機構： 大腸菌 H ⁺ 輸送性 F ₁ F ₀ ATPase および酵母 Na ⁺ / H ⁺ 交換輸送担体について
論文審査委員	教授 虎谷哲夫 教授 山田秀徳 教授 金澤浩

学位論文内容の要旨

本研究では、大腸菌 H⁺ 輸送性 F₁F₀ ATPase と酵母 Na⁺ / H⁺ 交換輸送担体を対象としてイオン輸送性タンパク質の構造と機能相関の解明を目指した。1) 大腸菌 H⁺ 輸送性 F₁F₀ ATPase は、8 つのサブユニットが複雑に分子集合して機能複合体を形成する。触媒機構には分子の回転という動的な要素が含まれており、この動的な触媒機構を解明するにはサブユニット間相互作用の実体を理解する必要がある。そこでモノクローナル抗体を用いた新たな分子表面残基の探索法を開発し、触媒部位を持つβサブユニットについて解析を行った。2 種の抗体のエピトープ残基を同定し、このうち His 110, Arg 111 の置換により分子集合に異常が見られた。牛心筋ミトコンドリア F₁ の X 線結晶解析により明らかにされたアミノ酸残基の配置は今回の結果と矛盾しておらず、同定したアミノ酸残基は確かに分子表面に位置していた。さらに表面残基の変異による酵素機能への影響を調べることによって、その領域の機能の推測が可能であり、実際に分子集合が異常になる変異残基が同定することができた。本酵素の他のサブユニットや他のオリゴマータンパク質にも適用することでサブユニット間相互作用のアミノ酸残基レベルでの解析に役立つと考えられた。2) 分子構造に不明な点が多かった酵母の Na⁺ / H⁺ 交換輸送担体 (NHA) について新たな酵母種 (*S. cerevisiae*, *C. tropicalis*) から遺伝子をクローン化し構造比較を行った。膜貫通領域での高い相同性に対し親水性領域では相同性は低かった。しかし、この親水性領域内に比較的保存性の高い領域が認められた。この保存領域は新たに NHA 遺伝子をクローン化することで見出すことができた。この保存領域は活性調節等の共通の分子機構に重要であるかもしれない。2種の酵母 NHA で親水性領域の欠失変異体を構築し、*S. cerevisiae* の NHA 遺伝子破壊株に与える耐塩性を見ると親水性領域の2/3 の領域を欠失すると野生株より高い耐性を付与した。このことから、欠失した領域を介した活性抑制機構の存在が示唆された。

論文審査結果の要旨

本研究では、その疎水的性質から機能構造相関を明らかにすることが難しい生体膜蛋白質に注目し、機能解明の新たな方法論開発を含む研究を行った。モデル系として大腸菌H⁺輸送性F₁F₀ ATPaseと酵母Na⁺/H⁺交換輸送担体に注目し、イオン輸送性タンパク質の構造と機能相関の解明を目指した。1) 大腸菌 H⁺輸送性 F₁F₀ ATPaseは、8つのサブユニットが複雑に分子集合して機能複合体を形成する。触媒機構には分子の回転という動的な要素が含まれており、この動的な触媒機構を解明するにはサブユニット間相互作用の実体を理解する必要がある。そこでモノクローナル抗体を用いた新たな分子表面残基の探索法を開発し、触媒部位を持つβサブユニットについて解析を行った。2種の抗体のエピトープ残基を同定し、このうちHis110, Arg111の置換により分子集合に異常が見られた。牛心筋ミトコンドリアF₁のX線結晶解析により明らかにされたアミノ酸残基の配置は今回の結果と矛盾しておらず、同定したアミノ酸残基は確かに分子表面に位置していた。さらに表面残基の変異による酵素機能への影響を調べることによって、その領域の機能の推測が可能であり、実際に分子集合が異常になる変異残基が同定することができた。本研究で用いた新規な方法は、本酵素の他のサブユニットや他のオリゴマータンパク質にも適用することでサブユニット間相互作用のアミノ酸残基レベルでの解析に役立つと考えられた。2) 分子構造に不明な点が多かった酵母のNa⁺/H⁺交換輸送担体 (NHA) について新たな酵母種 (*Saccharomyces cerevisiae*, *Candida tropicalis*) から遺伝子をクローン化し構造比較を行った。膜貫通領域での高い相同性に対し親水性領域では相同性は低かった。しかし、この親水性領域内に比較的保存性の高い領域が新たに見いだされた。この保存領域は新たにNHA遺伝子をクローン化することで初めて見出すことができた。この保存領域は活性調節等の共通の分子機構に重要であるかもしれない。2種の酵母NHAで親水性領域の欠失変異体を構築し、*S. cerevisiae* のNHA遺伝子破壊株に与える耐塩性を見ると親水性領域の2/3 の領域を欠失すると野生株より高い耐性を付与した。このことから、欠失した領域を介した活性抑制機構の存在が示唆された。

以上のように本研究では、大腸菌H⁺輸送性F₁F₀ ATPaseおよびNa⁺/H⁺交換輸送担体に関して重要かつ独創的な新知見が得られている。よって、本論文は博士(工学)の学位に値するものと認める。