

## 第4節 材料および方法

### 1. 菌株および培養条件

本章ではATPase機能欠損変異株を単離するために $\beta$ サブユニット遺伝子欠失変異株JP17 ( $\Delta uncD, argH, pyrE, entA, recA::Tn10$ )<sup>79)</sup>を用いた。栄養培地としてL-broth、最小培地としてTanaka培地<sup>80)</sup>を用いた。Tanaka培地に必要な栄養素 (50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  チミン、2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  チアミン、20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  アデニン、22.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  ウラシル、6  $\mu\text{g}/\text{ml}$  2,3-デヒドロキシ安息香酸、50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  アルギニン) および炭素源を加えた。炭素源として0.4% コハク酸ナトリウム、0.2% グルコースを、反転膜小胞を調製する場合には0.5% グリセロールを用いた。培養温度は37°Cとした。

### 2. 組換えプラスミドの調製とDNAの細胞への導入

$\beta$ サブユニット発現プラスミドpYB21 (M. Yabuki 作製<sup>115)</sup>、図. 4-12)を用いた。このプラスミドは、pST03  $\beta$ <sup>81)</sup>のuncプロモーターを組み換え、 $\beta$ サブユニット遺伝子上の252残基領域にKpn I、372残基領域にEcoR Vを導入している。pST03  $\beta$ のプロモーターは $\beta$ サブユニット遺伝子に対し逆方向だったのでpYB21では正方向になっている。制限酵素で切断したベクター調製用プラスミド、変異導入DNAは5%ポリアクリルアミドゲル電気泳動したのち、エチジウムブロマイドに浸した。UVランプによる紫外線照射によってDNAバンドを確認しDNAを含むゲル部分を切り出した。このゲルから電氣的にDNAを溶出し、組換えプラスミド作製に用いた。組換えプラスミドによる形質転換法は電気穿孔法を用いた。

### 3. $\beta$ サブユニットの252から372残基領域へのランダムな変異導入法

基質を制限したPCR法を用いて、 $\beta$ の252から372残基領域にランダムな変異導入を行った。1st PCRのプライマーはBF2、BER-C2を、鋳型にはpYB21を用い、Tth DNA ポリメラーゼ (東洋紡) を用いた。1st PCRは熱変性を95°C、5min、アニーリングを55°C、2min、伸長反応を70°C、2minを1サイクルとし、基質を制限した状態 (ACGTの基質の内1つは0.4  $\mu\text{M}$ 、残りの3つは200  $\mu\text{M}$ ) で5サイクル行った後、基質を補充した条件で25サイクル行った。2nd PCRでは1st PCR産物を鋳型としBF6、BR7をプライマーとして用いた。各プライマーの塩基配列を表. 4-8に示した。1サイクルの反応条件はPfu DNA ポリメラーゼを用いた事以外は上記と同じくし7サイクル行った。



#### 4. ATPase機能欠損変異株の単離

野生形の $\beta$ サブユニットを発現するpYB21をJP17に導入するとコハク酸プレートで生育する事ができる。そこでコハク酸培地の資化能を指標に変異株を単離した。組換えプラスミドを導入したJP17をLB (L-broth) 培地プレート (50 $\mu$ g/mlアンピシリン) に塗布し培養した。形質転換株をそれぞれコハク酸とグルコースを含んだTanakaプレートにレプリカした。72時間後コハク酸プレートで生えずグルコースプレートでのみ生育し、プラスミドを持つことが確認されたものをATPase機能欠損変異株とした。

#### 5. 変異した塩基の同定

得られた変異株の内、 $\beta$ サブユニットの252から372残基の領域以外に変異がある株、あるいはこの領域内にナンセンス変異が導入され正常なサイズの $\beta$ が発現されない株を除外するため、 $\beta$ に対するモノクローナル抗体を用い各変異株内での $\beta$ サブユニットの発現を調べた。まず、変異株をO.D.600の値が0.8になるまで培養し、集菌後O.D.600の値が4.0になるように生理食塩水 (0.8%塩化ナトリウム) で希釈した。等量のSDS-サンプルバッファーで懸濁し100 $^{\circ}$ C、10分間処理しSDS-PAGE法により細胞成分を分離した。ゲルから蛋白質をポリビニリデンジフロライドフィルター (GVHD フィルター, Millipore Co.) に電気的 (2mA/cm<sup>2</sup>, 80mA) に転写した。その後、ABC法を利用した免疫染色法により正常なサイズの $\beta$ サブユニット蛋白質の同定を行った。1次抗体として抗 $\beta$ モノクローナル抗体 $\beta$ 31<sup>116)</sup>、2次抗体としてビオチン化抗マウスIgG抗体を用いた。さらに必要に応じて、254から294アミノ酸残基領域にのみ変異を有する株をSSCP法を用いて選別した。PCR法に用いた鋳型DNAは変異株から調製したプラスミド、酵素はTth DNAポリメラーゼである。PCR法に用いたプライマーを表4-9に示す。PCR法は変異導入時と同じ反応条件で行った。最終的に選択した変異株から調製したプラスミドを再びJP17に導入し、コハク酸資化能を欠損していることを確認した変異株をその後の実験に用いた。この変異株からプラスミドを調製しジデオキシ法によってDNAの塩基配列を決定した。



## 6. 抗体を用いたウェスタンブローディング法によるサブユニット量の検討

膜画分を適当量調製し等量のSDS-サンプルバッファーで懸濁し100℃、10分間処理した。βサブユニットの量の測定には膜画分を蛋白量にして1 μg、α、γサブユニットでは2 μg、εでは5 μg用いた。調製したサンプルをSDS-PAGE法によって分離した後、ゲルから蛋白質をGVHDフィルターに電気的に転写した。その後、ABC法を利用した免疫染色法により各サブユニット蛋白の同定を行った。α、βを認識する1次抗体はそれぞれモノクローナル抗体α108<sup>119)</sup>、β31<sup>116)</sup>を用い、γ<sup>117)</sup>、ε<sup>118)</sup>はそれぞれ抗血清を用いた。α、βにたいする2次抗体としてビオチン化抗マウスIgG抗体を、γ、εはビオチン化抗ウサギIgG抗体を用いた。

## 7. その他の方法

### 1) 反転膜小胞の調製<sup>82)</sup>

変異を持つpYB21で形質転換したJP17をグリセロールを炭素源とするTanaka培地400mlで対数増殖基後期まで培養し、洗浄液(10mM Tris-HCl pH8.0, 140mM 塩化カリウム) 200mlおよび30mlで洗浄し集菌した。菌体をTKMGバッファー(10mM Tris-HCl pH8.0, 140mM 塩化カリウム, 2mM β-ME, 10% グリセロール) 20mlに懸濁し、フレンチプレス(1500kgf/cm<sup>2</sup>)により破碎した。細胞破碎液から遠心分離(15krpm, 10min)により細胞残渣を除いた後、上清から超遠心分離(40krpm, 1hr)により膜画分を得た。この膜画分をTKMG バッファー20mlで洗浄した後、適当量のTKMG バッファー(O.D.650 x 0.3ml)で懸濁しさらに等量の100%グリセロールを加えた。これを反転膜小胞とし解析に用いた。

### 2) ATPase活性測定

ATPase活性の測定は第2章と同じ方法を用いた。蛋白定量にはLowry法<sup>83)</sup>を用いた。ATPase活性の測定には反転膜小胞を50-100倍希釈し、活性が低いときには10倍希釈とした。蛋白定量には10倍希釈したサンプルを用いた。

### 3) 免疫染色法

蛋白を転写したフィルターをブロッッキングバッファー(5% スキムミルク)中に浸して、4℃で8hr以上静置し、抗体の非特異的な結合を抑えた。次に1次抗体をそれぞれ指定の倍率に希釈したブロッッキングバッファーと交換し、37℃で2時間反応させた(モノクローナル抗体は1/700希釈、抗血清は1/20希釈)。この時、



抗血清はより特異性を上げるためDK 8 (第6章参照)の細胞破碎液と1次抗体をブロッキングバッファーで予め37℃で1時間反応させておいた。続いて、2  $\mu$ g/mlの2次抗体を加えて37℃で2時間反応させた。そしてベクタステインABC試薬(アビジンとビオチン化ペルオキシダーゼの複合体、Vector Lab., Inc.)を加えて、室温で30分間反応させた後、3, 3'-ジアミノベンジジン四塩酸塩(DAB) 20mgと30%過酸化水素水20  $\mu$ lを含む20mM Tris-HCl pH 7.6を加えて発色させた。

#### 4) DKB 細胞破碎液作製

DKBを11のL-broth (20  $\mu$ g/ml テトラサイクリン)に植菌し、37℃で12hr培養した。集菌後蒸留水10mlに懸濁し、100℃で30分間処理し菌体を破碎した。これを細胞破碎液とした。

#### 5) 電気穿孔法による形質転換<sup>84)</sup>

菌をL-brothで前培養した後、250mlのL-brothに前培養液を加えた。O.D600=0.5まで培養後集菌し、250ml、150ml、5mlの10%グリセロールで3回洗浄した後、0.5mlの10%グリセロールに懸濁した。40  $\mu$ lずつ分注し液体窒素で凍らせてから-80℃で保存し、使用時に氷上で溶解させた。これに適当量のDNA、プラスミド溶液を加え、GTE-10により静電容量1  $\mu$ F、電圧1kVの電気をかけた。その後1mlのL-brothを加え1時間培養し、薬剤を含むプレートに塗布したのち、適当な時間培養し形質転換株を得た。



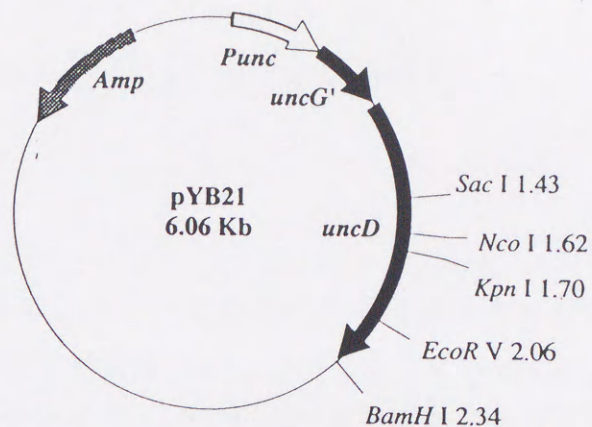


図.4-12  $\beta$  発現プラスミド pYB21

変異株調製に用いた pYB21 を示した。unc D 中の Kpn I、EcoR V 認識部位は、サイレント変異として部位特異的に導入されたものである。

プライマー	方向	塩基配列	位置
		5' <span style="float: right;">3'</span>	
BF2	5' → 3'	T' GCGGGTGTAGGTA AAAACCG	3481
BER-C2	3' → 5'	TACTGGAT' CCGATTAAGGCGTTAAAG	4424
BF6	5' → 3'	T' TGCTCTGACCGGTCTGACC	3687
BR7	3' → 5'	G' AATGCTCGTGCGCGATGGT	4216

表.4-8 ランダムな変異導入のために行った PCR 反応に用いたプライマー

ランダムな変異導入のため、PCR法に用いたプライマーの塩基配列を示した。5'、3'はそれぞれ DNAの5'末端、3'末端を示している。右端のカラムの<位置>は、塩基配列中の'で印した塩基の unc オペロン遺伝子内の位置を示している。<位置>の1に相当するのは unc オペロン遺伝子内の  $\delta$  サブユニットの翻訳開始点である。図.2-5に $\delta$  サブユニットの翻訳開始点以降の unc オペロン遺伝子の塩基配列を示した。



## 第5章 変異を導入した $\delta$ サブユニットの部分ペプチドを用いた結合部位の解析

### 表4-9 プライマー

第4章で述べたように、ペプチドを用いた再構成顕微鏡実験により、254から294残基領域が結合部位を形成するのに必要であると決定した。第4章で、261から269残基のプロリンリッチループとその周辺領域がサブユニット間相互作用に

プライマー	方向	塩基配列	位置
BF6	5' → 3'	T' GCTCTGACCGGTCTGACC	3687
BEX7-R	3' → 5'	CCTTGGATCCTAC' TGTACGGAGGTGATAG	3913
BEX8-F	5' → 3'	TACTCCATGG' CAGTATACGTACCTGC	3914
BEX8-R	3' → 5'	CCTTGGATCCTAT' TGCAGGATGGACTGAA	4126

表4-9 変異部位のマッピングのため行ったSSCP法に用いたプライマー

SSCP法を用いた変異部位のマッピングのため、PCR法に用いたプライマーの塩基配列を示した。5'、3'はそれぞれDNAの5'末端、3'末端を示している。右端のカラムの<位置>は、塩基配列中の'で印した塩基のunc オペロン遺伝子内での位置を示している。<位置>の1に相当するのはunc オペロン遺伝子内の $\delta$ サブユニットの翻訳開始点である。図2-5に $\delta$ サブユニットの翻訳開始点以降のunc オペロン遺伝子の塩基配列を示した。



## 第5章 変異を導入した $\beta$ サブユニットの部分ペプチドを用いた結合部位の解析

### 第1節 緒言

第3章で述べたように、ペプチドを用いた再構成阻害実験により $\beta$ の254から294残基領域が結合部位を形成するのに必要であると推定した。第4章で $\beta$ の261から269残基のプロリンリッチループとその周辺構造がサブユニット間相互作用に参与していることを示し、X線結晶構造解析の結果との考察からプロリンリッチループが直接サブユニット間相互作用に参与している事を示唆した。これらの知見は、プロリンリッチループ(261から269残基)が $\beta$ の254から294残基領域の結合部位を形成するのに必要である事を示唆している。又、サブユニットとの結合能を有する $\beta$ の部分ペプチド内の結合にプロリンリッチループが必要であることを示唆している。一方、第4章ではHis314がサブユニット間相互作用に重要であることも述べた。結合能を有するペプチド( $\beta$  226-365残基、254-459残基ペプチド)中にHis314は含まれており、結合能に参与している可能性もある。ペプチドの結合能にはプロリンリッチループが関与する結合部位だけではなく、他の結合部位が参与しているかどうか明らかにするため、本章では第2、3章で構築したペプチドを用いたサブユニット間相互作用解析法を応用した2つの方法を用いた。まずプロリンリッチループ上に同定した分子集合異常を、 $\alpha_3\beta_3\gamma$ 複合体の再構成を強く阻害した $\beta$  226-365残基ペプチドに導入した。この変異導入によるペプチドの阻害能への影響を調べ、プロリンリッチループが関与する結合部位以外にペプチドの結合能に参与する他の結合部位の存在について検討した。また、プロリンリッチループ領域(261から269残基)を含む261から280アミノ酸残基からなるオリゴペプチドを $\alpha_3\beta_3\gamma$ 複合体再構成系に導入し、プロリンリッチループ単独でのサブユニット間相互作用について検討した。また、従来の再構成法を用いた場合、透析中にオリゴペプチドは透析チューブを通過してしまい、再構成バッファー内に拡散してしまう。そこで透析法を用いない再構成系の確立も目指した。



## 第2節 結果

### 1. 変異導入した $\beta$ 226-365残基ペプチドの大量発現と精製

Gln268Lys、Gln268Argの変異を導入した $\beta$  226-365残基ペプチドは、第3章と同じくpET発現系を用いて大量発現させ、SDS-PAGE法によって精製した(図.5-1)。変異導入していないペプチド、Gln268Lys、Gln268Argの変異を導入したペプチドはそれぞれ湿菌重量2gの菌体から0.49mg、0.43mg、0.70mg得られた。

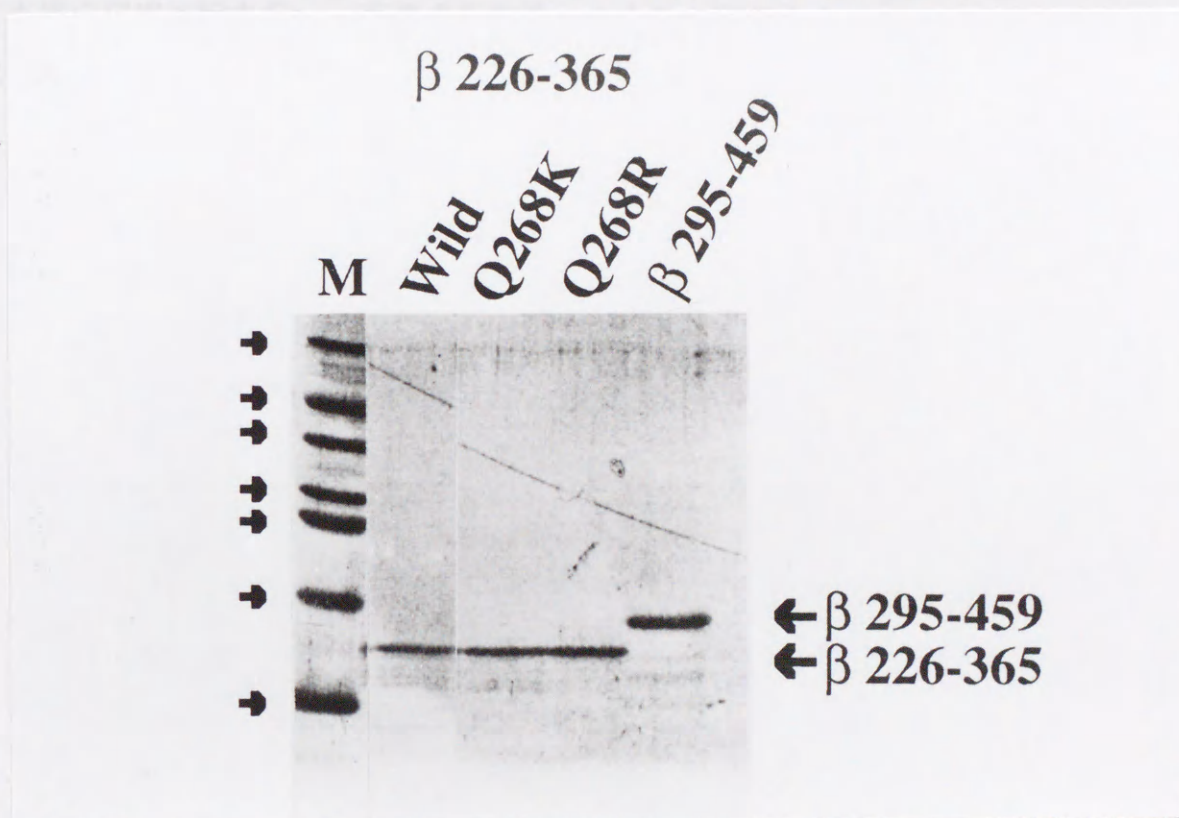


図.5-1 精製した変異ペプチド

Gln268Lys、Gln268Argの変異導入ペプチドを不溶性画分からSDS-PAGE法を用いて精製した結果を示した。各レーンには1 $\mu$ gの試料をアプライした。対照として用いる変異導入していない $\beta$  226-365、295-459残基ペプチドも同時に精製し、SDS-PAGE法により確認した。Mは分子量マーカーで、 $\rightarrow$ で示されたバンドは上からそれぞれ66000、45000、36000、29000、24000、20100、14200Daを示している。



2.  $\beta$ サブユニットの部分ペプチド ( $\beta$  226-365残基ペプチド) への変異導入が再構成阻害能に及ぼす影響の検討

再構成阻害実験から  $\beta$  の226から365残基ペプチドに結合部位が存在する事を示した。このペプチドにはプロリンリッチループの関与する結合部位のみが存在する場合は、 $\beta$  Gln268Lys、あるいは  $\beta$  Gln268Argの変異を導入することによって、ペプチドのサブユニットとの結合能が変化すると考えられる (図. 5-2)。そこで  $\beta$  Gln268Lys、および  $\beta$  Gln268Argの変異を導入した  $\beta$  226-365残基ペプチドを用いて再構成阻害実験を行い、再構成阻害能への変異の影響からペプチドの結合能の変化を検討した。

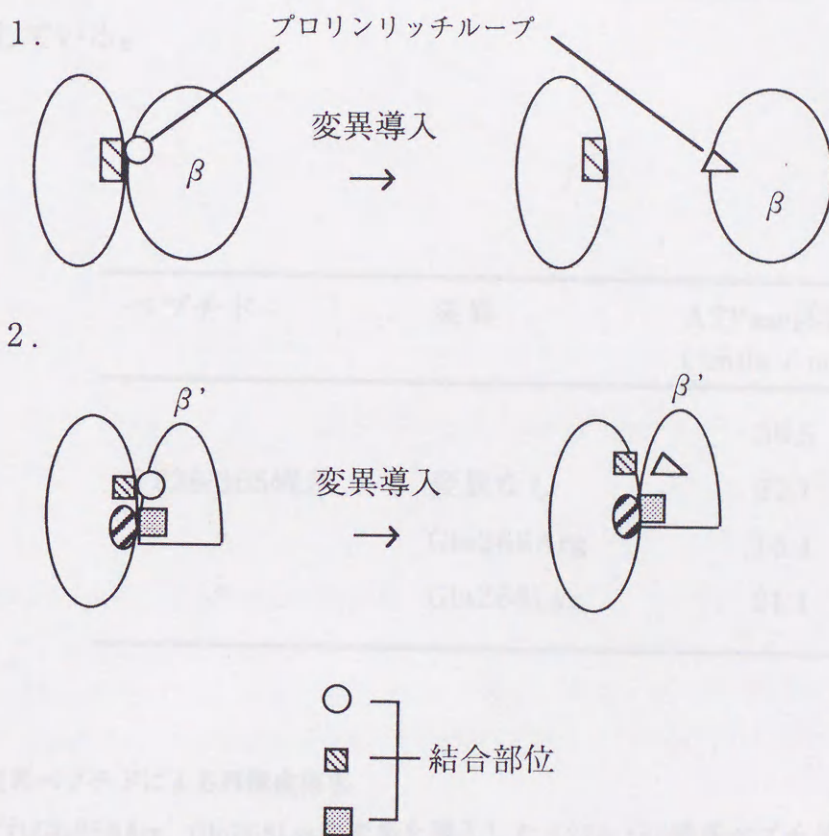


図. 5-2 断片化していない  $\beta$  サブユニットと断片化した  $\beta$  の部分ペプチドでの変異導入の影響

1. プロリンリッチループが関与する結合部位 (○) のみが部分ペプチド内に存在する場合は、変異導入によってペプチドの結合能は失われると考えられた。2. 複数の結合部位を持つ場合は、1つの結合部位が機能しなくても他の結合部位によってペプチドは結合能を失わないと考えられた。



F<sub>1</sub>-ATPaseの分子集合異常変異Gln268Lys、Gln268Argを導入した変異ペプチドを再構成系に導入し、各試料の再構成したATPase活性を測定し再構成の及ぼす効果を調べた。その結果を図. 5-3、表. 5-1に示した。Gln268Lys、Gln268Argの変異ペプチドを5倍量導入したとき（表. 5-1）、再構成活性はペプチドを導入していない試料の53%、42%を示し、変異のないペプチドを導入した試料とほぼ同じ（56%）であった。相互作用能を持たないβの295から459残基ペプチドを用いた場合、再構成活性は殆ど減少（90%）しなかった。又、Gln268Argの変異ペプチドを10倍量導入した場合（図. 5-3）にも、再構成活性は36%まで減少し、変異のないペプチドを10倍量導入した場合（28%）と殆ど差はなかった。この結果は、プロリンリッチループへの変異導入が部分ペプチドの再構成阻害能に影響を与えないことを示している。

ペプチド	変異	ATPase活性 ( units / mg )
-		39.5
β 226-365残基	変異なし	22.1
〃	Gln268Arg	16.4
〃	Gln268Lys	21.1

表. 5-1 変異ペプチドによる再構成阻害

それぞれGln268Arg、Gln268Lysの変異を導入したβ 226-365残基ペプチドを再構成に導入したときのATPase活性の値を示した。ペプチドは、再構成に用いたβサブユニット1mol当たり5molになるよう導入した。



### 3. 透析法を用いない試験管内での $\alpha$ サブユニットの再構成法

従来の再構成法を用いた場合、透析中にオリゴペプチドは透析チューブを通過してしまい、再構成反応管内に拡散してしまう。オリゴペプチドを用いた再構成阻害実験を行うには、再構成試料中からのオリゴペプチドの減少を防ぐ必要がある。そこで透析法を用いない再構成系の確立を目標とした。精製した $\alpha$ サブユニットを用いてニッペンドルフチューブ内で再構成した。

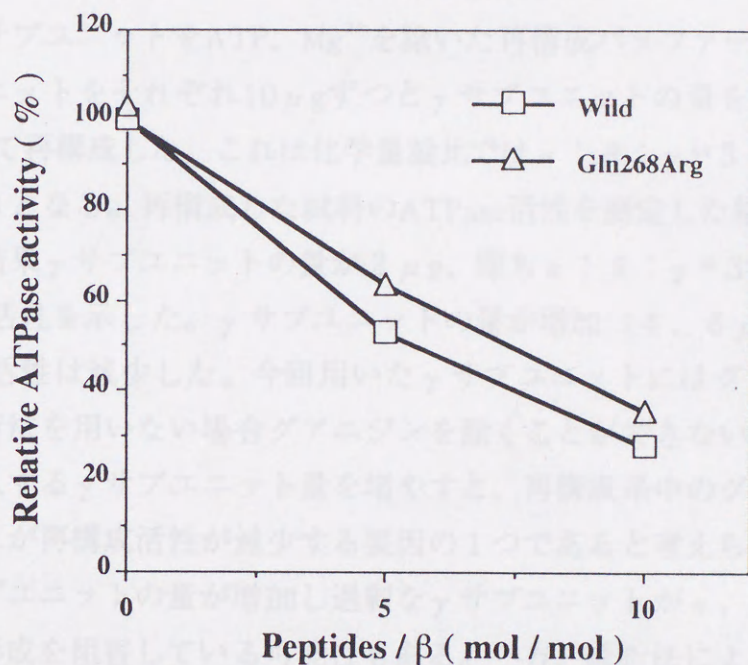


図.5-3 変異ペプチドによる再構成活性阻害

横軸は $\beta$  1 molあたり導入した変異ペプチドの量 (mol)、縦軸は、ペプチドを導入していないサンプルのATPase活性 (74.1 units / mg) を100%とし、各サンプルの相対活性の値を示した。変異 (Gln268Arg) ペプチドは変異導入していないペプチドと同程度の阻害を示した。



### 3. 透析法を用いない試験管内での $\alpha_3\beta_3\gamma$ 複合体の再構成法

従来の再構成法を用いた場合、透析中にオリゴペプチドは透析チューブを通過してしまい、再構成バッファー内に拡散してしまう。オリゴペプチドを用いた再構成阻害実験を行うには、再構成試料中からのオリゴペプチドの減少を防ぐ必要がある。そこで透析法を用いない再構成系の確立を目指した。精製した $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ サブユニットを用いてエッペンドルフチューブ内で再構成した。

$\alpha$ 、 $\beta$ サブユニットをATP、 $Mg^{2+}$ を除いた再構成バッファーで透析した後、 $\alpha$ 、 $\beta$ サブユニットをそれぞれ $10\mu g$ ずつと $\gamma$ サブユニットの量を0、1、2、4、6 $\mu g$ と変えて再構成した。これは化学量論比では $\alpha : \beta : \gamma = 3 : 3 : 0$ および0.5、1、2、3となる。再構成した試料のATPase活性を測定した結果を図.5-4に示した。その結果 $\gamma$ サブユニットの量が2 $\mu g$ 、即ち $\alpha : \beta : \gamma = 3 : 3 : 1$ の時最も高いATPase活性を示した。 $\gamma$ サブユニットの量が増加(4、6 $\mu g$ )すると再構成したATPase活性は減少した。今回用いた $\gamma$ サブユニットにはグアニジンが含まれており、透析法を用いない場合グアニジンを除くことができないと考えられる。再構成系に導入する $\gamma$ サブユニット量を増やすと、再構成系中のグアニジン濃度が上昇する。これが再構成活性が減少する要因の1つであると考えられる。又、再構成系中の $\gamma$ サブユニットの量が増加し過剰な $\gamma$ サブユニットが $\alpha$ 、 $\beta$ と結合し $\alpha_3\beta_3\gamma$ 複合体の形成を阻害している可能性もある。一方、透析法による再構成では、 $\alpha : \beta : \gamma = 3 : 3 : 1$ の時ATPase活性は44.1units / mgであった。透析法を用いなかった場合ATPase活性が1/3に減少する理由の一つとしてグアニジンによる影響が考えられる。又、予め $\beta$ サブユニットを透析すると $\beta$ サブユニットは凝集し、再構成可能な $\beta$ サブユニット量が減少している可能性も考えられる。



4. オリゴペプチドを用いた再構成阻害実験

透析法を用いない試管内での $\alpha\beta\gamma$ 複合体の再構成系に、アロサンリポソーム (261-280残基) を含むオリゴペプチド #261-280を導入し、再構成阻害実験を行った結果を図 1-4 に示した。対照として #170-189 のオリゴペプチドを用いた。X線結晶構造解析の結果、 $\beta$  の 170 から 189 残基領域のアミノ酸は殆ど $\alpha$ サブユニットの分子内にあること、 $\gamma$ サブユニットは $\alpha\beta$ 複合体とは異なる構造を形成していると考えられる。さらに、 $\alpha$ サブユニットにも再構成に導入した #10、50、250 位置を導入した時、再構成阻害作用を示さないことが示唆されている。活性が上昇した (110-130%) の $\alpha$ サブユニットは、 $\beta$ サブユニットの再構成に有利な影響を与えていると考えられる。

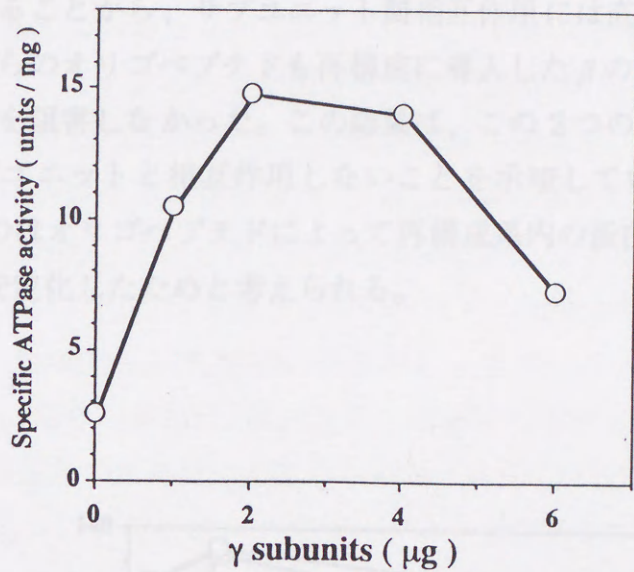


図.5-4 ATPase活性の再構成への $\gamma$ サブユニットの影響

精製した $\alpha$ 、 $\beta$ サブユニットと再生処理した $\gamma$ サブユニットを用いてATPase活性の再構成を行った。10 $\mu\text{g}$ の $\alpha$ 、 $\beta$ サブユニットと0、2、4、6、8 $\mu\text{g}$ の $\gamma$ サブユニットを混合し、透析法を用いず再構成を行った。

図.5-5 オリゴペプチドによる再構成阻害実験

図.5-5は、オリゴペプチドによる再構成阻害実験の結果を示している。図.5-4と同様に、オリゴペプチド #10、50、250 を含むオリゴペプチドを導入した時、再構成阻害作用を示さないことが示唆されている。一方、オリゴペプチド #170-189 を導入した時、再構成阻害作用を示していることが示唆されている。



#### 4. オリゴペプチドを用いた再構成阻害実験

透析法を用いない試験管内での $\alpha_3\beta_3\gamma$ 複合体の再構成系に、プロリンリッチループ(261-280残基)を含むオリゴペプチド $\beta$  261-280を導入し、再構成阻害実験を行った結果を図. 3-4に示した。対照として $\beta$  170-189のオリゴペプチドを用いた。X線結晶構造解析の結果、 $\beta$ の170から189残基領域のアミノ酸は殆ど $\beta$ サブユニットの分子内にあることから、サブユニット間相互作用には直接関与していないと考えられる。どちらのオリゴペプチドも再構成に導入した $\beta$ の10、50、250倍量導入した時、再構成を阻害しなかった。この結果は、この2つのオリゴペプチドは再構成に用いたサブユニットと相互作用しないことを示唆している。活性が上昇した(110-130%)のはオリゴペプチドによって再構成系内の蛋白質濃度が上昇し、 $\alpha_3\beta_3\gamma$ 複合体が安定化したためと考えられる。

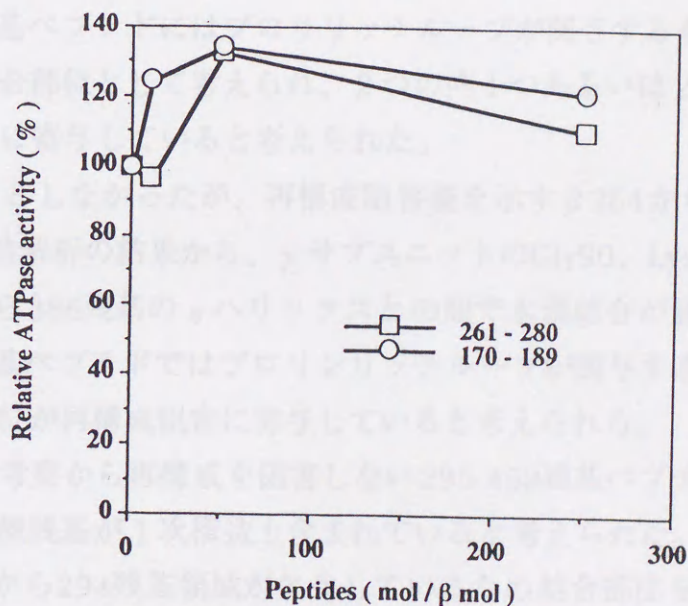


図. 5-5 オリゴペプチドによる再構成活性阻害

横軸は $\beta$  1 molあたり導入したオリゴペプチドの量 (mol)、縦軸は、オリゴペプチドを導入していないサンプルのATPase活性 (11.0units/mg) を100%とし、各サンプルの相対活性の値を示した。オリゴペプチドは阻害を示さなかった。



### 第3節 要約と考察

サブユニット間相互作用異常の原因となるプロリンリッチループ上の変異 Gln268Lys、Gln268Arg を  $\beta$  226-365 残基ペプチドに導入した。この変異ペプチドを用いた再構成阻害実験の結果、ペプチドの再構成阻害能に Gln268Lys、Gln268Arg の変異導入は影響を与えなかった。この結果は  $\beta$  の 226 から 365 残基ペプチド内にはプロリンリッチループが関与する結合部位以外にも他の結合部位があることを示唆した (図. 5-2、2.)。この結合部位の候補を、第4章で示した分子集合異常変異株の解析結果と、報告されたX線結晶構造解析の結果から考察した。第1の候補は、第4章の分子集合異常変異株の解析からサブユニット間相互作用に関与する事が示唆された His314 を含む  $\alpha$  ヘリックス (306 から 314 残基) である。この  $\alpha$  ヘリックスはX線結晶構造解析の結果から  $\alpha$  サブユニットに近接していることが示されている。第2の候補はX線結晶構造解析の結果から、 $\gamma$  サブユニットの Arg269、Gln270 残基との水素結合が認められる  $\beta$  の 302 から 305 残基のループである。 $\beta$  226-365 残基ペプチドにはプロリンリッチループが関与するもの以外にも、この2つの候補が結合部位として考えられ、2つの内1つあるいは2つの結合部位がペプチドの結合能に寄与していると考えられた。

又、今回は対象としなかったが、再構成阻害能を示す  $\beta$  254 から 459 残基ペプチドにもX線結晶構造解析の結果から、 $\gamma$  サブユニットの Gly90、Lys97 および Leu100 残基と  $\beta$  の 380 から 386 残基の  $\alpha$  ヘリックスとの間で水素結合が認められる。おそらく  $\beta$  254-459 残基ペプチドではプロリンリッチループが関与する結合部位以外にも、複数の結合部位が再構成阻害に寄与していると考えられる。

一方、これらの考察から再構成を阻害しない 295-459 残基ペプチドにも結合部位を構成するアミノ酸残基が1次構造上含まれていると考えられた。しかしこのペプチドでは  $\beta$  の 254 から 294 残基領域が欠失しているため結合部位を形成する事ができないと考えられた。

プロリンリッチループ ( $\beta$  の 261 から 269 残基) を含む  $\beta$  の 261 から 280 残基のオリゴペプチドを用いた再構成阻害実験の結果、このオリゴペプチドは再構成阻害能を示さなかった。この結果、プロリンリッチループ及びこれに続く  $\alpha$  ヘリックスを含む  $\beta$  の 261 から 280 残基領域のアミノ酸残基がファイブロネクチンの RGD 配列のように単独で他のサブユニットと相互作用しないことが示された。現在、再構成阻害能を示す最小のペプチドは  $\beta$  226-365 残基ペプチドであり、プロリンリッチループ



プが形成する結合部位形成には現在のところ226から365残基の領域が必要であると考えられた。

### 1. 菌体および培養条件

菌体および培養条件は第3章の方法に従った。

### 2. 発現プラスミドの調製

第4章で同定した分子集合異常変異をp226-365残基ペプチドに導入するため、PCR法を用いた。プライマーは、第3章でp226-363残基ペプチドを増殖したときに用いた、HEX5-F、HEX5-Rを用いた。鋳型DNAは第4章で得たpYB31に変異が導入されているものを用いた。変異はGln268Lys、Gln268Argの2種であった。PCR法の反応条件は第3章の部分ペプチド増殖時と同じものとし、Pfu DNAポリメラーゼを用いた。Pfu DNAポリメラーゼは3'-5'エキソヌクレオチラーゼ活性が高いことからTth DNAポリメラーゼより正確にDNA合成を行う。PCR法を用いて増殖した産物のpET3aへの組み込みも第3章の方法に従った。

### 3. 変異ペプチドの大量発現と精製

変異ペプチドの大量発現と精製は第3章の方法（部分ペプチドの大量発現と精製）に従った。変異ペプチドは、部分ペプチド同様、異菌分から成るPAGE法によって精製した。標置分子から10mgをSDS-ポリアクリルアミドゲルで電気泳動をした後、ゲルを2M酢酸ナトリウムに浸し、各蛋白質のバンドを切り出しゲルから電気的に蛋白質を溶出した。2M酢酸ナトリウムに浸しても目的の蛋白質のバンドが見えないときは、CBB染色法によってバンドの位置を確定した。

### 4. サブユニット変異ペプチドを用いた再構成阻害実験

再構成時に変異ペプチドを過剰量に加え、第3章の再構成阻害実験と同じ条件で遊離を行った。この試料を回収しATPase活性の測定、蛋白定量を行った。

### 5. オリゴペプチドを用いた再構成阻害実験

#### 1) オリゴペプチドの調製

pサブユニットの261から286アミノ酸残基領域、178から189アミノ酸残基領域のオリゴペプチドは山之内製薬株式会社とシガーで合成された。



## 第4節 材料および方法

### 1. 菌株および培養条件

菌株および培養条件は第3章の方法に従った。

### 2. 発現プラスミドの調製

第4章で同定した分子集合異常変異を $\beta$ 226-365残基ペプチドに導入するため、PCR法を用いた。プライマーは、第3章で $\beta$ 226-365残基ペプチドを増幅したときに用いた、BEX6-F、BEX8-Rを用いた。鋳型DNAは第4章で得たpYB21に変異が導入されているものを用いた。変異はGln268Lys、Gln268Argの2種であった。PCR法の反応条件は第3章の部分ペプチド増幅時と同じものとし、Pfu DNA ポリメラーゼを用いた。Pfu DNA ポリメラーゼは3'→5'エキソヌクレアーゼ活性が高いことからTth DNA ポリメラーゼより正確にDNA合成を行う。PCR法を用いて増幅した遺伝子のpET3dへの組み込みも第3章の方法に従った。

### 3. 変異ペプチドの大量発現と精製

変異ペプチドの大量発現と精製は第3章の方法（部分ペプチドの大量発現と精製）に従った。変異ペプチドは、部分ペプチド同様、膜画分からSDS-PAGE法によって精製した。膜画分5から10mgをSDS-ポリアクリルアミドゲルで電気泳動をした後、ゲルを2M酢酸ナトリウムに浸し、各蛋白質のバンドを切り出しゲルから電氣的に蛋白質を溶出した。2M酢酸ナトリウムに浸しても目的の蛋白質のバンドが見えないときは、CBB染色法によってバンドの位置を確認した。

### 4. $\beta$ サブユニット変異ペプチドを用いた再構成阻害実験

再構成時に変異ペプチドを適量加え、第3章の再構成阻害実験と同じ条件で透析を行った。この試料を回収しATPase活性の測定、蛋白定量を行った。

### 5. オリゴペプチドを用いた再構成阻害実験

#### 1) オリゴペプチドの調製

$\beta$ サブユニットの261から280アミノ酸残基領域、170から189アミノ酸残基領域のオリゴペプチドは山之内製薬筑波研究センターで合成された。



## 2) 透析法を用いない試験管内での $\alpha_3\beta_3\gamma$ 複合体の再構成法

精製した $\alpha$ 、 $\beta$ サブユニットをATP、 $Mg^{2+}$ を除いた再構成バッファーであらかじめ透析した。透析後 $\alpha$ 、 $\beta$ サブユニットを $10\mu g$ ずつ、 $\gamma$ サブユニットを適当な量論比で1.5mlのエッペンドルフチューブ内にて混合した。混合した試料は $26^\circ C$ で12時間静置した。

## 3) オリゴペプチドを用いた再構成阻害実験

2) で定めた条件で再構成を行うとき、オリゴペプチドを導入した。オリゴペプチドは再構成系に用いた $\beta$ サブユニットの10、50、250倍になるよう導入した。

## 6. ATPase活性の測定、蛋白定量法

ATPase活性の測定、蛋白定量法は第2章の方法に従った。



## 第6章 $\beta$ Gln268Arg変異によるF<sub>1</sub>-ATPaseの分子集合異常を相補する抑圧変異を有する戻り変異株の分離

### 第1節 緒言

前章までに明らかにしたように、F<sub>1</sub>-ATPaseの $\beta$ サブユニット上の変異Ser255Pro、Ser263Pro、Gln268Arg、Gln268Lys、Leu271Pro、Gln279Arg、His314Arg、Pro332GlnはF<sub>1</sub>-ATPaseの分子集合異常の原因となる。Pro332Glnを除くこれらの変異はX線結晶構造解析の結果から $\beta$ サブユニットの分子表面に存在し、 $\alpha$ あるいは $\gamma$ サブユニットとの境界面に存在することが明らかになった。これらの結果は変異部位のアミノ酸残基がサブユニット間相互作用に重要な役割を果たしており、この変異がサブユニット間相互作用能を失わせていることを示唆している。

これまでにサブユニットの変異によって相互作用が異常となった時、相互作用する相手方のサブユニット上に変異が導入され、相互作用が回復する<sup>85)・88)</sup>ことが知られている。この結果から相互作用を形成する結合部位の構造や結合の形態に関する知見が得られている。そこで $\beta$ サブユニットの変異を抑圧する変異を $\alpha$ あるいは $\gamma$ サブユニットさらには $\delta$ や $\epsilon$ サブユニット内に得る目的で、コハク酸での生育を指標に戻り変異株の分離を行った。この戻り変異株の解析から $\beta$ サブユニットの第一の変異部位と相互作用するサブユニットの同定、結合に関与するアミノ酸残基の特定を行うと考えた。



## 第2節 結果

### 1. *unc* 発現プラスミド pKM11 への変異導入

F1-ATPaseの $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 、 $\delta$ 、 $\epsilon$ サブユニット遺伝子に変異を導入し、 $\beta$ サブユニットの分子集合異常変異を抑圧する変異をもつ戻り変異株を得るために、F1Fo-ATPase遺伝子オペロン (*unc* オペロン) を有する*unc* 発現プラスミドを用いた。 $\beta$ サブユニット上の252、372残基に*Kpn* I、*Eco*R V、 $\gamma$ サブユニットの276残基に*Nhe* I 認識部位を導入し、 $\alpha$ サブユニットの残基の*Bgl* II 認識部位にサイレント変異を導入したpKM11 (図. 6-1) を作製した。第4章で得た $\beta$ サブユニット上の分子集合異常変異をpKM11に導入した。

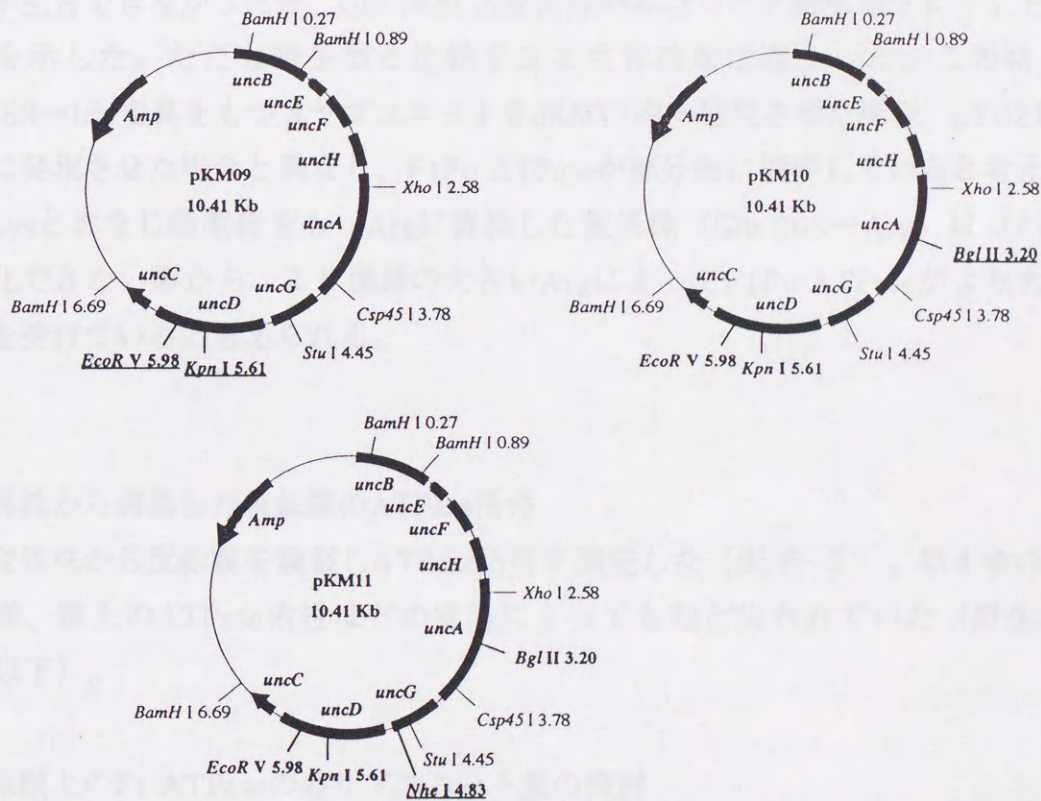


図. 6-1 戻り変異株調製時に用いたプラスミド

pKM02、pKM09、pKM10、pKM11は*unc* オペロンの発現プラスミドである。pKM09には*unc D*中に*Kpn* I、*Eco*R V 認識部位を部位特異的に導入している。pKM10はpKM09の*unc A*中に2つ存在した*Bgl* II 認識部位のうち1つ (3.49Kb) を部位特異的変異導入によって欠失している。pKM11はpKM10の*unc G*中に*Nhe* I 認識部位を部位特異的に導入している。導入した全ての変異はアミノ酸置換を伴わないサイレント変異である。



## 2. 変異pKM11を導入したunc オペロン欠失株DK 8の生化学的解析

第4章では $\beta$ 以外のF<sub>1</sub>F<sub>o</sub>-ATPaseサブユニットはゲノム遺伝子から発現し、 $\beta$ のみがプラスミドから発現する実験系を用いていた。本章では戻り変異株調製のため、第4章で同定した変異を、 $\beta$ 発現プラスミドからunc発現プラスミドpKM11に組み換え、uncオペロン欠失株DK 8に導入した。この結果、全サブユニットがプラスミドから発現することとなった。この系の変化が、変異によるF<sub>1</sub>F<sub>o</sub>-ATPaseの分子集合異常に変化を与えるかどうか確認した。

### 1) 変異pKM11をもつunc オペロン欠失株DK 8のコハク酸培地での生育能

変異遺伝子を有するpKM11をuncオペロン欠失株DK 8に導入した。この形質転換株のコハク酸培地での生育能を検討した(表. 6-1)。第4章の系と同様殆どの変異株が生育できなかったが、Gln-268Lys変異株のみはコハク酸培地プレート上での生育を示した。ただし野生型と比較すると生育速度は遅かった。この結果はGln-268→Lys変異をもつ $\beta$ サブユニットをpKM11内で発現させた場合、pYB21から単独に発現させた場合と異なり、F<sub>1</sub>F<sub>o</sub>-ATPaseが部分的に機能していると考えられる。Lysとおなじ陽電荷をもつArgに置換した変異株(Gln-268→Arg)はコハク酸を資化できない事から、より側鎖の大きいArgによってF<sub>1</sub>F<sub>o</sub>-ATPaseがより大きな影響を受けていると考えられる。

### 2) 変異株から調製した反転膜のATPase活性

各変異株から反転膜を調製しATPase活性を測定した(表. 6-2)。第4章の結果と同様、膜上のATPase活性はどの変異によっても殆ど失われていた(野生型の1.1%以下)。

### 3) 反転膜上のF<sub>1</sub>-ATPaseの各サブユニット量の検討

各変異株の反転膜を調製しSDS-PAGE法により蛋白質を分離したのち、ウェスタンブロッティング法およびペルオキシダーゼを用いた発色法によりF<sub>1</sub>-ATPaseの各サブユニット量を検討した。 $\alpha$ 、 $\beta$ サブユニットに対する抗体としてそれぞれモノクローナル抗体 $\alpha$  108<sup>119)</sup>と $\beta$  31<sup>116)</sup>、 $\gamma$ <sup>117)</sup>、 $\delta$ <sup>118)</sup>、 $\epsilon$ <sup>118)</sup>に対する抗体としてそれぞれの抗血清を用いた。その結果(図. 6-2)、第4章の結果と同様、全ての変異でF<sub>1</sub>-ATPaseのサブユニットの減少が見られ、これら変異によってF<sub>1</sub>-ATPaseの



分子集合が異常になることが示された (Gln-268Arg、Gln-268Lysの変異株では  $\alpha$ 、 $\beta$  サブユニットが野生型の30-40%存在していた。一方  $\gamma$ 、 $\delta$ 、 $\epsilon$  サブユニットは野生型の10%以下であった。この2例以外の変異株では、 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 、 $\delta$ 、 $\epsilon$  サブユニットは全て野生型の10%以下であった)。これら変異株では、JP17-pYB21系とは異なり、 $\beta$  サブユニット量も減少していた。これは今回用いたDK8-pKM11系での $\beta$ の発現量が比較的少ないためと考えられた。

変異	コハク酸培地での生育 宿主・プラスミド	
	DK8-pKM11	JP17-pYB21
Wild	+	+
Gln268Lys	+/-	.
Gln268Arg	.	.
Gln279Arg	.	.
His314Arg	.	.
Ser255Pro	.	.
Ser263Pro	.	.
Leu271Pro	.	.
Pro332Gln	.	.
pBR322	.	.

表.6-1 分子集合異常変異株のコハク酸資化能

分子集合異常を示す変異をpKM11に組み込み、DK8 ( $\Delta unc$ )に導入した場合のコハク酸培地での生育を検討した。+は野生型と同程度の生育した株、+/-は野生型より遅いが生育した株、-は生育しなかった株を示す。pKM11Q268Kを除く殆ど全ての変異株はプラスミド及び宿主に関わらずコハク酸プレート上で生育できなかった。Q268Kの変異はJP17-pYB21系ではコハク酸プレート上で生育できないが、DK8-pKM11系では野生型より遅いがコハク酸プレート上で生育した。



変異	ATPase活性	
	( units / mg )	( % )
Wild	4.60	100
Gln268Lys	0.05	1.1
Gln268Arg	0.05	1.1
His314Arg	0.05	1.1
Ser255Pro	0.04	0.9
Ser263Pro	0.03	0.7
Leu271Pro	0.05	1.1
Pro332Gln	0.05	1.1
pBR322	0.05	1.1

表.6-2 分子集合異常変異株から調製した反転膜のATPase活性

変異を組み込んだpKM11をもつDK8から反転膜を調製しATPase活性を測定した。変異を組み込んだ株の反転膜のATPase活性は、変異を持たないpKM11の約1%であった。pBR322はunc オペロンをもたないプラスミドで対照とした。



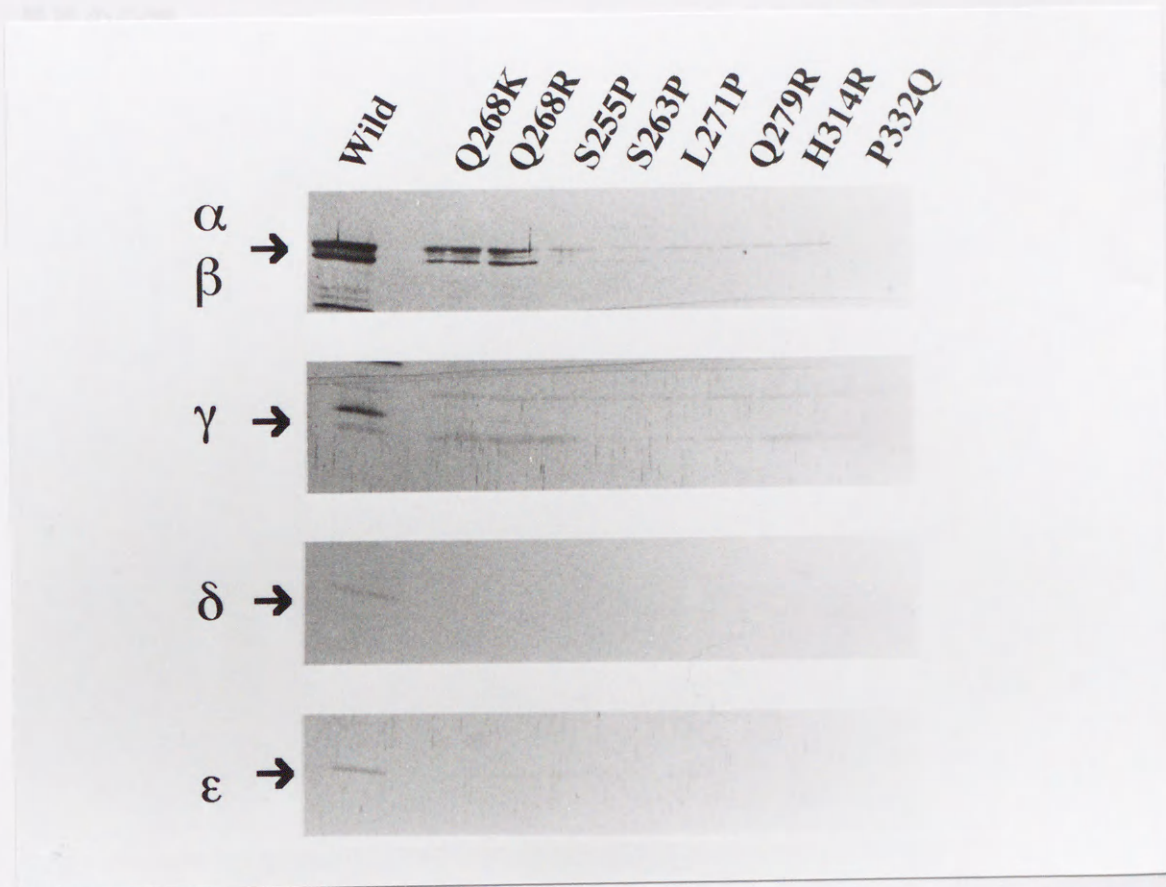


図.6-2 各変異株から調製した反転膜上の各サブユニット量

変異株の反転膜上の各サブユニット量をウェスタンブロッティング法で調べた。

反転膜サンプルをSDS-PAGE法によって分離しフィルターに電氣的に転写した後、抗体を用いてサブユニットの量を検討した。 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ サブユニット量を検出する為に用いた反転膜サンプルは $2\mu\text{g}$ 、 $\delta$ サブユニットは $5\mu\text{g}$ 、 $\epsilon$ サブユニットは $8\mu\text{g}$ であった。一次抗体としてそれぞれモノクローナル抗体mAb $\alpha$  108、mAb  $\beta$  31、抗 $\gamma$ 血清、抗 $\delta$ 血清、抗 $\epsilon$ 血清を用いた。この結果、全ての変異株で膜上のサブユニット量が減少していた。Gln268Arg、Gln268Lysの変異株では、 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ サブユニットの減少量が他の変異株と異なっていた。



### 3. Gln268Argの変異を有するpKM11 (pKM11Q268R) を導入したDK 8からの戻り変異株の分離

コハク酸を資化できない変異株の内、プロリンリッチループ上に変異があるのはSer263Pro、Gln268Argである。Ser263Pro変異株ではProへの置換のためループ構造に大きな影響を与えていると考えられ、他のサブユニットの変異がこれを相補するのは困難であると考えた。そこでGln268Argの変異による影響を抑圧する変異を持つ戻り変異株の分離を行った。図.6-3に概要を示した。まずpKM11Q268RにPCR法を用いたランダムな変異導入を行った。pKM11Q268R内の*unc H-unc C*の領域を4つに分割し、ランダムに変異導入を行った経過を図.6-4に示した。変異導入したpKM11Q268RをDK8に導入し、コハク酸資化能を回復した戻り変異株を分離した(表.6-3)。コハク酸プレートで生育を確認できたのは領域(1) ( $\delta$ 49残基から $\alpha$ 351残基)に変異を導入した形質転換株から22株、領域(2) ( $\alpha$ 351残基から $\gamma$ 74残基)では12株、領域(3) ( $\gamma$ 74残基から $\beta$ 252残基)では213株であった。一方領域(4) ( $\beta$ 372残基から $\epsilon$ 138残基)ではコハク酸で生育する株を得られなかった。これらの戻り変異株からプラスミドを調製し、DK8に再び導入しコハク酸資化能を有するか再度確認した。その結果、領域(1)では5株、領域(2)では5株、領域(3)では11株の戻り変異株を得た。次にコハク酸資化能の回復の原因を明らかにするため、まず第一の変異 $\beta$ Gln268Argが自然発生的な変異によりGln268に復帰しているかを確認した。戻り変異株からプラスミドを調製し、塩基配列の決定を行った。その結果、全てのプラスミドでGln268への復帰変異が認められた。これは分離した戻り変異株ではGln268Argの変異はGlnへの復帰変異となり、F<sub>1</sub>F<sub>o</sub>-ATPaseが正常に分子集合し機能する事を示している。



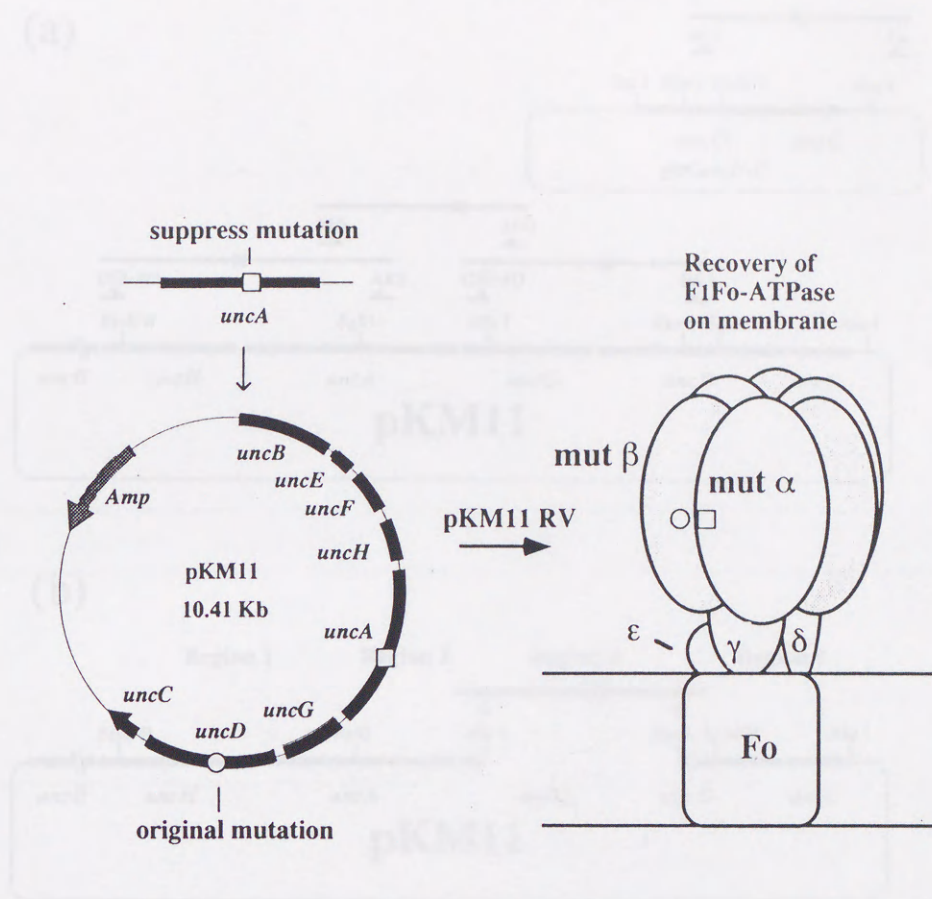
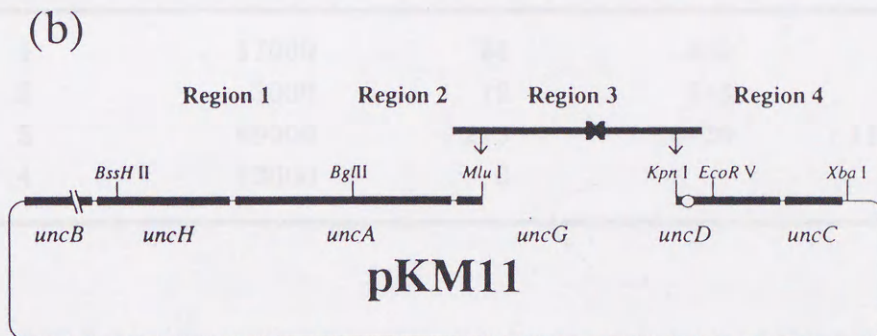
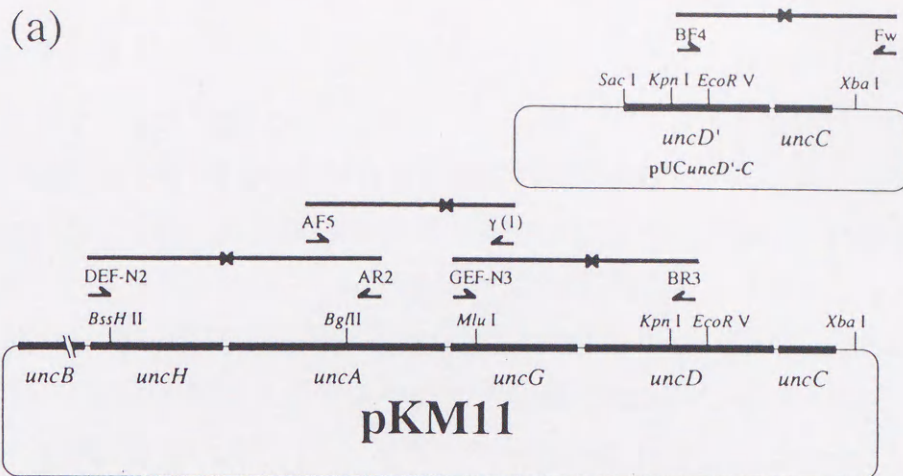


図.6-3 戻り変異株のモデル図

変異 $\beta$ サブユニットを発現する菌体内で、変異の影響を抑圧する変異を持つサブユニットが発現し、活性あるF<sub>1</sub>F<sub>o</sub>-ATPaseを形成する。





Region 1 : *Bss H II* - *Bgl II* ( $\delta$  49 -  $\alpha$  351 a.a)

Region 2 : *Bgl II* - *Mlu I* ( $\alpha$  351 -  $\gamma$  74 a.a)

Region 3 : *Mlu I* - *Kpn I* ( $\gamma$  74 -  $\beta$  252 a.a)

Region 4 : *Eco R V* - *Xba I* ( $\beta$  372 -  $\epsilon$  138 a.a)

図.6-4 戻り変異株分離のためのランダムな変異導入

$\alpha, \beta, \gamma, \delta, \epsilon$  の各領域にランダムに変異を導入するため、*unc H* から *unc C* までを4つの領域に分けPCR法を用いた変異導入を行った。

(a) 基質を制限したPCRによるランダムな変異導入

$\alpha, \beta, \gamma, \delta, \epsilon$  の各領域にランダムに変異を導入するため、*unc H* から *unc C* までを4つの領域に分けPCRを行った。pKM11、pUC*unc D'*-Cを鋳型に4種類のヌクレオチド基質のうち1つを1/500に制限しPCRを行うことによってTth DNA ポリメラーゼに誤りを起こさせ変異を導入した。制限した状態で94℃, 1min、40℃, 2min、72℃, 2minを5サイクル行い、制限した基質を加えた後、同じ条件で25サイクル行った。さらに、Pfu DNA ポリメラーゼを用い7サイクルPCRを行った。

(b) 変異導入したDNA断片のpKM11への組み込み

変異導入したPCR断片を制限酵素で切断し、 $\beta$ サブユニット遺伝子に変異を持つpKM11に組み込みDK8に導入した。コハク酸プレートで生育可能になった株、あるいは野生型と同程度の生育を示す株を戻り変異株として単離した。各DNA断片を領域1, 2, 3, 4とし、各断片が含む領域を示した。



1. pKM11Q268Argを導入したDK8からの戻り変異株の分離

DK8とunc-発現プラスミドpKM06を用いた戻り変異株の分離は、Mikiらによって行われており、サブユニットLeu40Proの変異を相補するサブユニットの変異としてLeu111Gln、Leu237Glnが単独に得られている<sup>24)</sup>。また、Dackeらによって同様な系を用いて、サブユニットの変異をそれぞれ、サブユニットの変異が相補している事が示された<sup>25)</sup>。これらの結果はこの系を用いたサブユニット間

領域 (Region)	形質転換株	1次候補	2次候補	戻り変異株
1	57000	22	8/9	5/8
2	3000	12	6/6	5/6
3	69000	213	20/20	11/20
4	13000	0		

表.6-3 コハク酸培地上で得られた戻り変異株。

Gln268Argの変異から得た戻り変異株の株数を示した。一番左の列には変異を導入した領域を示した(図.6-4参照)。変異導入したプラスミドをDK8 ( $\Delta unc$ ) に導入し1/10量をLB-Ampプレートに塗布し、残りをTanaka-コハク酸プレートに塗布した。LB-Ampプレート上のコロニー数を10倍し形質転換株の総数とした。コハク酸プレートでの生育が確認されたものを戻り変異株の1次候補とした。1次候補の株からプラスミドを調製し、pKM11の存在を確認した株を戻り変異株の2次候補とした。2次候補の株からプラスミドを調製し、再度DK8に導入しコハク酸資化能を有するものを最終的に戻り変異株とした。



### 第3節 要約と考察

#### 1. pKM11Q268Rを導入したDK 8からの戻り変異株の分離

DK8と *unc* 発現プラスミド pKM06 を用いた戻り変異株の分離は J. Miki らによって行われており、 $\beta$  サブユニット Leu40Pro の変異を相補する  $\alpha$  サブユニットの変異として Leu111Gln、Leu237Gln が単独に得られている<sup>85, 86)</sup>。又、Omote らによって同様な系を用いて  $\beta$ 、 $\gamma$  サブユニットの変異をそれぞれ  $\alpha$ 、 $\beta$  サブユニットの変異が相補している事が示された<sup>87, 88)</sup>。これらの結果はこの系を用いたサブユニット間相互作用の研究が有効であることを示している。本研究では  $\beta$  サブユニットの変異による機能欠損を相補する他のサブユニット内の変異を得るため、戻り変異株の分離を行った。しかしながら、分離した戻り変異株では、第一の変異である Gln268Arg が Gln268 に復帰していた。Gln268Arg を含む領域には PCR 法を用いた変異導入を行っていない事から、この復帰変異は自然発生的なものである。戻り変異株分離の効率は領域 (1) に変異を導入したときが約  $1/10^4$ 、領域 (2) の時は約  $1/10^3$ 、領域 (3) の時は約  $1/10^2$  となっており、自然発生的な変異が発生する確率  $10^{8\sim 9}$  に比して高い。野生形 DNA の混入の可能性はコントロール実験によって排除されていることから、DK8 と pKM11 を用いた系では、 $\beta$  サブユニットの変異を相補する他のサブユニット内の変異を得るためには改良が必要と思われる。一つの方法として復帰変異を抑制するため、元来 Gln (CAG) 268 から Arg (CGG) への変異を部位特異的変異法を用いて Arg (CGG) を Arg (CGC) あるいは Arg (CGT) に変換する方法がある。Arg (CGC)、Arg (CGT) は 1 塩基の置換では Gln に復帰できないので Gln への復帰変異の確率は減少すると思われる。

#### 2. 変異 pKM11 を導入した *unc* オペロン欠失株 DK 8 の生化学的性状

今回、戻り変異株調製のため *unc* 発現プラスミド pKM11 に変異を組み込んだ。その結果、全ての変異株で分子集合異常が確認され、JP17 に変異 pYB21 を導入した形質転換株と同様の効果がこの系でも変異によって現れていることを示した。しかしながら Gln268Lys をもつ変異株はコハク酸プレートで生育可能であり、コハク酸培地中でゆるやかながらも増殖を続ける。これは JP17 に Gln268Lys 変異をもつ pYB21 を導入した形質転換株では見られなかったことでありこの系でのみ観察された。これはおそらく JP17-変異 pYB21 の系では、 $\beta$  サブユニットの発現が他のサブユニットと同調していないため  $\beta$  サブユニットが F1-ATPase に組み込まれにくくなっている



ると考えた。一方DK8-pKM11の系では変異 $\beta$ サブユニットはF1-ATPaseに組み込まれATP合成能を示す。しかし、F1-ATPaseの膜への分子集合に異常が見られ、ATPase活性もないことから、変異のためF1-ATPaseが不安定化しており反転膜の調製中に壊れてしまうのではないかと考えた。

## 2. 組換えプラスミドの調製

変異体株調製のための $\text{me}^s$ オペロン発現プラスミドpKM11を用いた。cAMP依存性プロモータープラスミドpKM11は以下のように作製した。三野によって作製されたpKM04 (図 6-1) に第3章で得た変異を組み込むため、 $\beta$ の552, 372残基にKpn I/Sac II V認識部位を導入した (pKM09, 図 6-1)。さらに変異体の変異をマッピングするため $\beta$ の353残基のBgl IIを消去し273残基のBgl II siteを単一認識部位 (pKM10, 図 6-1) とし、 $\beta$ の残基には $\text{me}^s$  I認識部位を導入した。このプラスミドをpKM11 (図 6-1) とし、第3章で得た5種のI塩基置換を導入した。この変異プラスミドをDK8に導入した。

## 3. 変異pKM11を導入したDK8変異株の生化学的解析

### 1) コハク酸培養での生育

0.4% コハク酸ナトリウムを唯一炭素源とする最小培養プレートに $\text{me}^s$ プレート上の形質転換株を塗布し、培養温度30°Cとし18時間後のプレート上での生育を検討した。

### 2) そのほかの方法

反転膜小胞の調製およびATPase活性測定、蛋白質定量、抗体を用いたサブユニット量の定量は第4章の方法に従った。サブユニット量の検出には免疫検試料を5  $\mu\text{g}$ 用い、一次抗体として抗 $\beta$ 血清<sup>14</sup>、二次抗体としてビオチン化抗ウサギIgG抗体を用いた。



#### 第4節 材料および方法

##### 1. 菌株および培養条件

本章では *unc* オペロン欠失変異株 DK 8 (*bglR*, *THI-1*, *rel-1*,  $\Delta uncB-C$ , *ilv::Tn10*)<sup>89)</sup> を用いた。栄養培地として L-broth、最小培地として Tanaka 培地を用いた。Tanaka 培地には必要な栄養素 (50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  チミン、2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  チアミン、100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  イソロイシン、100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  バリン) および炭素源を加えた。炭素源として 0.4% コハク酸ナトリウム、0.2% グルコースを、反転膜小胞を調製する場合には 0.5% グリセロールを用いた。培養温度は 37°C とした。

##### 2. 組換えプラスミドの調製

戻り変異株調製のため *unc* オペロン発現プラスミド pKM11 を用いた。*unc* オペロン発現プラスミド pKM11 は以下のように作製した。三野によって作製された pKM02 (図. 6-1) に第3章で得た変異を組み込むため、 $\beta$  の 252, 372 残基に *Kpn* I, *EcoR* V 認識部位を導入した (pKM09、図. 6-1)。さらに戻り変異株の変異をマッピングするため  $\alpha$  の 353 残基の *Bgl* II を消去し 273 残基の *Bgl* II site を単一認識部位 (pKM10、図. 6-1) とし、 $\gamma$  の残基には *Nhe* I 認識部位を導入した。このプラスミドを pKM11 (図. 6-1) とし、第3章で得た 8 種の 1 塩基置換を導入した。この変異プラスミドを DK8 に導入した。

##### 3. 変異 pKM11 を導入した DK 8 変異株の生化学的解析

###### 1) コハク酸培地での生育

0.4% コハク酸ナトリウムを単一炭素源とする最小培地プレートに L-broth プレート上の形質転換株を塗布し、培養温度を 37°C とし 48 時間後のプレート上での生育を検討した。

###### 2) そのほかの方法

反転膜小胞の調製および ATPase 活性測定、蛋白定量、抗体を用いたサブユニット量の定量は第4章の方法に従った。 $\delta$  サブユニット量の検討には反転膜試料を 5  $\mu\text{g}$  用い、一次抗体として抗  $\delta$  血清<sup>118)</sup>、2 次抗体としてビオチン化抗ウサギ IgG 抗体を用いた。



#### 4. Gln268Arg変異をもつpKM11 (pKM11Q268R) への変異導入

基質を制限したPCR法を用いて、pKM11Q268Rにランダムな変異導入を行った。PCR法に用いたプライマーを表.6-4に示した。PCR法は第4章と同じ条件を用いた。鋳型DNAはpKM11、 $\beta$ サブユニットの一部と $\epsilon$ サブユニットの遺伝子を持つpUCunc D'-Cを用いた。変異導入したDNAのpKM11Q268Rへの組換えの概要は図.6-3に示した。

#### 5. 戻り変異株の分離と変異の同定

変異導入したpKM11Q268Rを電気穿孔法によってDK8に導入した。戻り変異株の候補はコハク酸プレート上で生育することを指標に分離した。コハク酸資化能をレプリカ法によって確認し、プラスミドの存在を確認した。調製したプラスミドを再度DK8に導入し、変異プラスミドによってコハク酸資化能の回復が顕著な株を戻り変異株とした。戻り変異株からプラスミドを調製し、塩基配列を決定し変異の同定を行った。塩基配列決定法は第4章の方法に従った。

#### 表 6-4 PCR法に用いたプライマー

ランダムな変異導入のため、本表に用いたプライマーの塩基配列を示した。左は鋳型DNAの塩基配列、右は変異導入したDNAの塩基配列を示している。右側のプライマーは、鋳型DNAの塩基配列で設計した塩基配列と変異導入したDNAの塩基配列との間に存在する塩基配列の相違点を検出するためのプライマーである。図.6-3に $\beta$ サブユニットの塩基配列を示している。この塩基配列は、pKM11Q268Rの塩基配列と一致している。







## 第7章 グルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) と融合した $\delta$ および $\epsilon$ サブユニットの精製と $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ サブユニットとの再構成

### 第1節 緒言

第2章で述べたように $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ サブユニットを単離する系を本研究で確立し、 $\alpha_3\beta_3\gamma$ 複合体のin vitroでの再構成が簡便に行えるようになった。しかし、本来F<sub>1</sub>-ATPaseにはこのほかに $\delta$ 、 $\epsilon$ サブユニットが存在しており、近年この2つのサブユニットに関する研究が活発に行われている。 $\epsilon$ サブユニットは $\beta$ 、 $\gamma$ サブユニットと相互作用しF<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATPaseのATP合成能に関与している事が示された。さらにF<sub>0</sub>のcサブユニットと相互作用しH<sup>+</sup>輸送とATP合成の共役に関与している事が示されている。この共役機構はF<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATPaseの研究において最も重要なテーマであり $\epsilon$ サブユニットの研究が活発に行われている。 $\delta$ サブユニットはbサブユニットと相互作用し、F<sub>1</sub>とF<sub>0</sub>の結合に関与して事が示されている。しかし、この2つのサブユニットはF<sub>1</sub>-ATPase内での空間的位置、立体構造はX線結晶構造解析の結果から明らかになっていない。そこでこの2つのサブユニットを含めたよりF<sub>1</sub>-ATPaseに近い $\alpha_3\beta_3\gamma\delta$ 、 $\alpha_3\beta_3\gamma\epsilon$ 複合体を再構成し、 $\delta$ 、 $\epsilon$ サブユニットに関する研究を行うことにした。まず $\delta$ 、 $\epsilon$ サブユニットをグルタチオン-S-トランスフェラーゼとの融合蛋白質として発現するプラスミドを作製し、この2つの蛋白質の精製を簡便化した。さらにこの融合蛋白質が $\delta$ 、 $\epsilon$ サブユニットの本来の機能を有するか調べるために、 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ サブユニットと再構成を行い、再構成複合体の性状を調べた。



## 第2節 結果

### 1. グルタチオン-S-トランスフェラーゼと融合した $\delta$ (GST- $\delta$ ) および $\epsilon$ (GST- $\epsilon$ ) サブユニットの精製

$\delta$ 、 $\epsilon$ サブユニットを簡便に調製するため、それぞれグルタチオン-S-トランスフェラーゼとの融合蛋白質として発現するプラスミドを作製した。このプラスミドをBL21 (DE3) pLysEに導入し、IPTGによる菌体内での発現誘導を行った。GST- $\delta$ 、GST- $\epsilon$ を発現している菌体の湿重量はそれぞれ4.2g、2.6gであった。この菌体を破砕した後超遠心 (105000x g, 1 hr) を行い、上清 (可溶性画分) から各融合蛋白質をアフィニティカラムクロマトグラフィーを用いて精製した。図. 7-1にSDS-PAGE法を用いてGST- $\delta$ 、GST- $\epsilon$ の精製過程を示した。最終的に得たGST- $\delta$ は41.8mg (濃度は0.69mg / ml)、GST- $\epsilon$ は49.9mg (濃度は0.79mg / ml) であった。

### 2. *In vitro* での $\alpha 3 \beta 3 \gamma$ GST- $\delta$ 、 $\alpha 3 \beta 3 \gamma$ GST- $\epsilon$ 複合体の再構成

再構成したサンプルのATPase活性と蛋白定量を行い、ATPase比活性の値を検討した。各サンプルのATPase比活性の値を表. 7-1に示した。コントロールとして $\alpha 3 \beta 3 \gamma$  複合体の再構成も行った。 $\alpha 3 \beta 3 \gamma$  複合体のATPase比活性の値は22.8units / mg、 $\alpha 3 \beta 3 \gamma$  GST- $\delta$  複合体は28.7units / mg、 $\alpha 3 \beta 3 \gamma$  GST- $\epsilon$  複合体は11.1units / mgであった。即ちGST- $\delta$ は $\alpha 3 \beta 3 \gamma$  複合体のATPase活性を上昇させ、GST- $\epsilon$ は減少させていた。この結果はGST- $\delta$ およびGST- $\epsilon$ は $\alpha 3 \beta 3 \gamma$  複合体と結合能を有していることを示唆している。またGST- $\delta$ およびGST- $\epsilon$ はそれぞれ $\alpha 3 \beta 3 \gamma$  複合体のATPase活性を調節していると考えられる。

### 3. アフィニティカラムクロマトグラフィーを用いた $\alpha 3 \beta 3 \gamma$ GST- $\delta$ 、 $\alpha 3 \beta 3 \gamma$ GST- $\epsilon$ 複合体の精製

$\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ サブユニットとそれぞれGST- $\delta$ 、GST- $\epsilon$ を*In vitro*で再構成を行った結果、活性に変化が見られ、 $\alpha 3 \beta 3 \gamma$  GST- $\delta$ 、 $\alpha 3 \beta 3 \gamma$  GST- $\epsilon$ 複合体の形成が示唆された。実際にこれらの複合体が形成されていることを確認するため、アフィニティカラムクロマトグラフィーを用いた $\alpha 3 \beta 3 \gamma$  GST- $\delta$ 、 $\alpha 3 \beta 3 \gamma$  GST- $\epsilon$ 複合体の精製を行った。再構成した試料をカラムにアプライし、洗浄した後グルタチオンによって溶出した。図. 7-2はカラムクロマトグラフィーにより得た各フラクションのATPase活性の値を示した。それぞれGST- $\delta$ およびGST- $\epsilon$ と $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ サブユ



ニットを再構成した試料では、グルタチオンによってATPase活性が溶出された。特にGST- $\delta$ と $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ サブユニットを再構成した試料ではGST- $\epsilon$ より高い値を示し、ピーク（フラクション番号7）の比活性は88.8 units / mgであった。一方、GSTと $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ サブユニットを再構成した試料では、グルタチオンによるATPase活性の溶出は見られなかった。この結果は $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ サブユニットとそれぞれGST- $\delta$ 、GST- $\epsilon$ を*In vitro*で再構成した結果、 $\alpha_3\beta_3\gamma$  GST- $\delta$ 、 $\alpha_3\beta_3\gamma$  GST- $\epsilon$ 複合体が形成されていることを示している。

GST融合蛋白質	ATPase活性 (units / mg)
-	22.8
GST- $\delta$	28.7
GST- $\epsilon$	11.1

表.7-1 GST- $\delta$ 、GST- $\epsilon$ が再構成に及ぼす影響

それぞれGST- $\delta$ 、GST- $\epsilon$ を $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ サブユニットの再構成系に導入したときのATPase活性の値を示した。再構成の手順は第4節に示した。



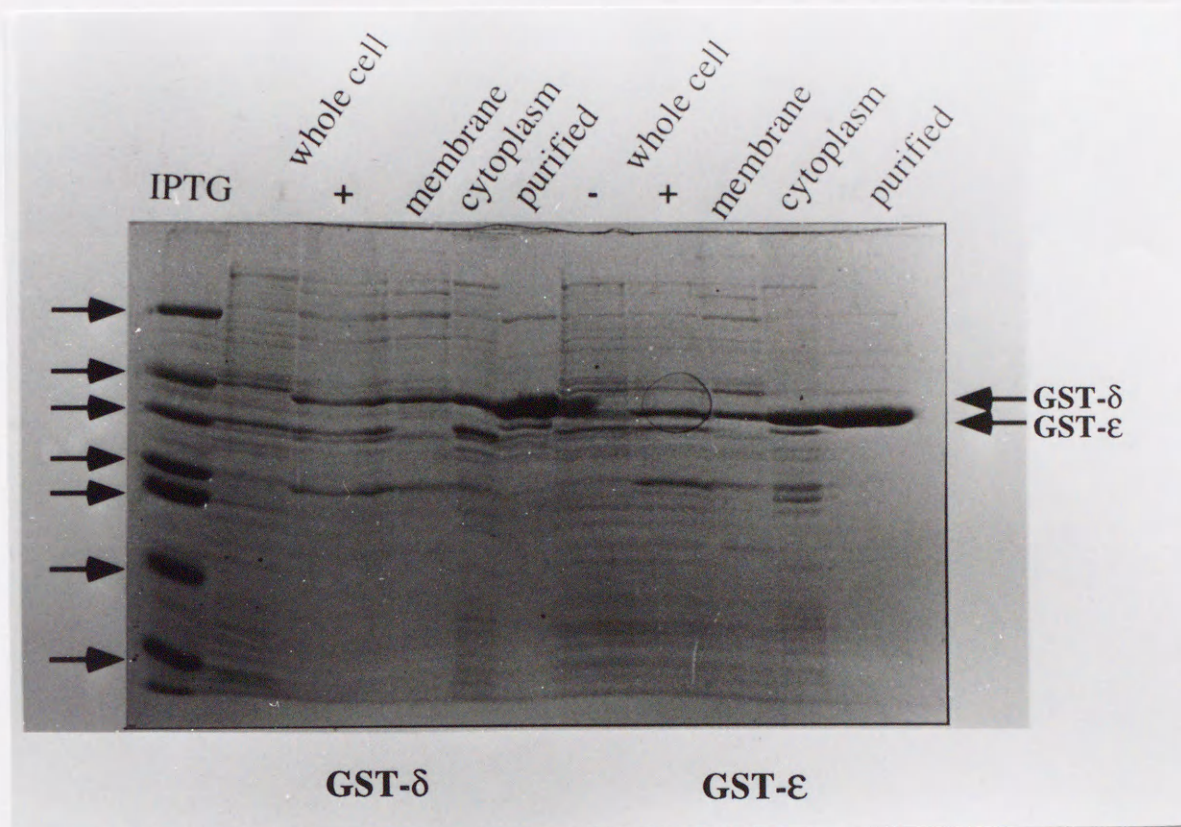


図.7-1 GST- $\delta$ 、GST- $\epsilon$ の発現と精製過程

IPTGによる菌体内でのGST- $\delta$ 、GST- $\epsilon$ の発現と細胞内での分布をSDS-PAGE法を用いて確認した。その結果、IPTGによるGST- $\delta$ 、GST- $\epsilon$ の菌体内での発現が確認された (+ whole cell)。発現したGST- $\delta$ 、GST- $\epsilon$ が菌破碎後、超遠心によって (105000x g、60min)、上清画分 (cytoplasm) により多く事が示された (沈殿画分 (membrane))。上清画分からアフィニティーカラムクロマトグラフィーを用いて精製したGST- $\delta$ 、GST- $\epsilon$ も同時に示した (purified)。各レーンには5  $\mu$ gの試料をアプライした。→で示されたバンドは上からそれぞれ66000、45000、36000、29000、24000、20100、14200Daを示している。



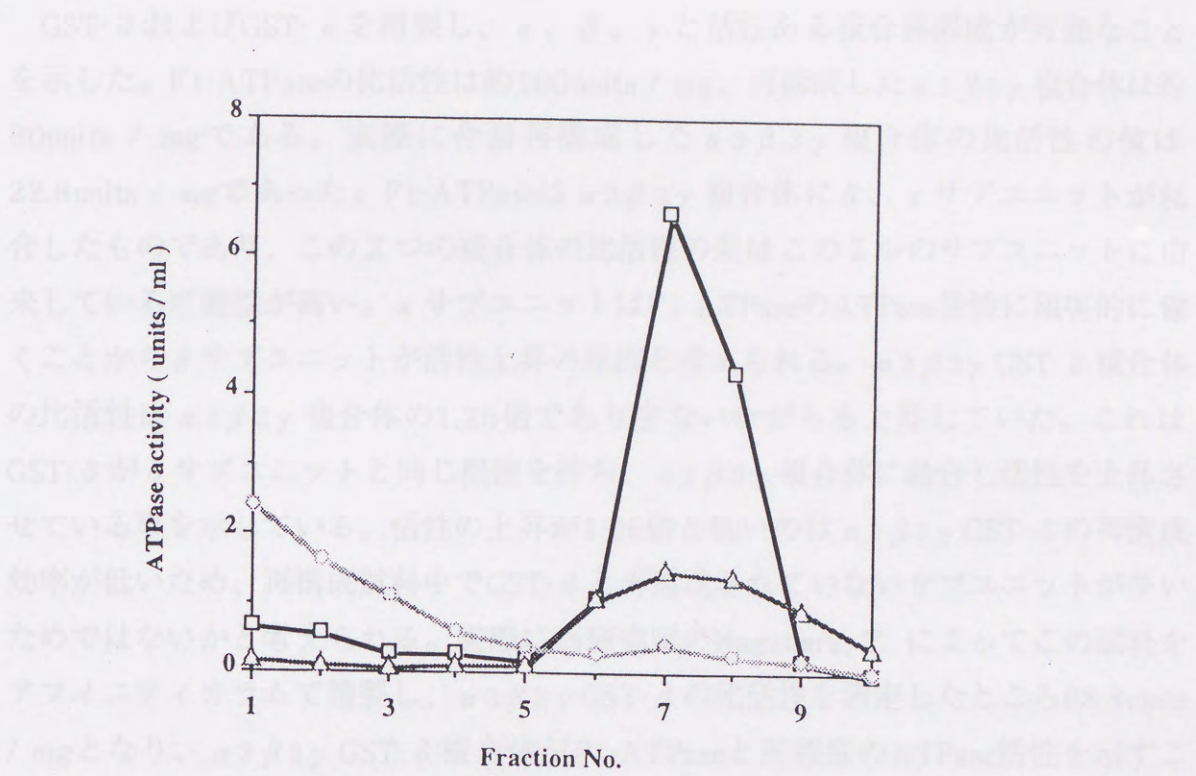


図.7-2 GST- $\delta$ 、GST- $\epsilon$ を用いた再構成複合体のアフィニティークロマトグラフィーと各フラクションのATPase活性

$\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ サブユニットとGST- $\delta$ 、GST- $\epsilon$ をそれぞれ再構成 (表.7-1) した試料を、グルタチオンセファロースカラムにアプライした。各フラクションは $500\mu\text{l}$ とし、ATPase活性を測定した。グルタチオンを加えたのはフラクション番号 (Fraction No.) 6の時であった。□はGST- $\delta$ と $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ サブユニットと再構成した試料を用いた結果を示した。△はGST- $\epsilon$ 、○はGSTを用いた時の結果を示した。



### 第3節 要約と考察

GST- $\delta$ およびGST- $\epsilon$ を精製し、 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ と活性ある複合体形成が可能なことを示した。F1-ATPaseの比活性は約100units / mg、再構成した $\alpha_3\beta_3\gamma$ 複合体は約30units / mgである。実際に今回再構成した $\alpha_3\beta_3\gamma$ 複合体の比活性の値は22.8units / mgであった。F1-ATPaseは $\alpha_3\beta_3\gamma$ 複合体に $\delta$ 、 $\epsilon$ サブユニットが結合したものであり、この2つの複合体の比活性の差はこの2つのサブユニットに由来している可能性が高い。 $\epsilon$ サブユニットはF1-ATPaseのATPase活性に阻害的に働くことから $\delta$ サブユニットが活性上昇の原因と考えられる。 $\alpha_3\beta_3\gamma$  GST- $\delta$ 複合体の比活性は $\alpha_3\beta_3\gamma$ 複合体の1.25倍であり少ないながらも上昇していた。これはGST- $\delta$ が $\delta$ サブユニットと同じ機能を持ち、 $\alpha_3\beta_3\gamma$ 複合体に結合し活性を上昇させている事を示している。活性の上昇が1.25倍と低いのは $\alpha_3\beta_3\gamma$  GST- $\delta$ の再構成効率が低いため、再構成試料中でGST- $\delta$ と再構成されていないサブユニットが多いためではないかと考えられる。実際に当研究室のNagakura, T. によってこの試料をアフィニティカラムで精製し、 $\alpha_3\beta_3\gamma$  GST- $\delta$ の比活性を測定したところ88.8units / mgとなり、 $\alpha_3\beta_3\gamma$  GST- $\delta$ 複合体がF1-ATPaseと同程度のATPase活性を示すことが明らかとなった。一方 $\alpha_3\beta_3\gamma$  GST- $\epsilon$ 複合体の比活性は $\alpha_3\beta_3\gamma$ 複合体の50%以下となり、GST- $\epsilon$ がATPase活性に阻害的に働く事を示している。この結果はGST- $\epsilon$ が $\epsilon$ サブユニットと同じ機能を持つことを示している。このGST- $\delta$ 、GST- $\epsilon$ はスロンピンを用いることによりGSTと分離でき、 $\alpha_3\beta_3\gamma$  GST- $\delta$ あるいは $\alpha_3\beta_3\gamma$  GST- $\epsilon$ を再構成する事が可能であると考えられる。この2つの複合体の再構成系と本研究で構築した新たなサブユニット間相互作用の解析法を組み合わせることによって、F1-ATPaseのサブユニット間相互作用に関与する結合部位の解明に役立つと考えられる。



## 第4節 材料および方法

### 1. 菌株および培養条件

本章では宿主細胞としてプラスミド調製時にはJM103を、目的蛋白質の発現時にはBL21 ( DE3 ) pLysEを用いた。栄養培地としてL-brothを用いた。融合蛋白質の大量発現を行う時にはM9ZB培地を用いた。プレートはLBプレートを用い、アンピシリン (  $50 \mu\text{g} / \text{ml}$  ) を添加した。培養温度は $37^\circ\text{C}$ とした。

### 2. 融合蛋白質発現プラスミドの調製

$\delta$ 、 $\epsilon$ サブユニットタンパク質をグルタチオン-S-トランスフェラーゼ ( GST ) との融合蛋白質として発現させるため、pGEX-2T ( 図.7-3 ) に導入した。各サブユニット遺伝子は制限酵素サイトを含むプライマーを用いPCR法で増幅した。PCR法は以下のような条件で行った。熱変性を $95^\circ\text{C}$ 、5min、アニーリングを $55^\circ\text{C}$ 、2min、伸長反応を $70^\circ\text{C}$ 、2minを1サイクルとし、計30サイクル行った後に伸長反応を7分間行った。酵素はTth DNA ポリメラーゼ ( 東洋紡社製 ) を用いた。PCR法に用いたプライマーおよび鋳型DNAを表.7-2に示す。プライマーの塩基配列、制限酵素認識部位を表.7-3に示す。 $\delta$ サブユニット遺伝子を増幅するときに、鋳型DNAとして用いたKM230ゲノムDNAの調製は文献<sup>70)</sup>に従った。 $\epsilon$ サブユニット遺伝子を増幅するときに、鋳型DNAとして用いたpRM22の構造を図.7-4に示した。増幅した遺伝子およびpGEX-2Tを制限酵素 ( *Bam*HI ) で切断した。T4 DNAリガーゼにより各遺伝子のpGEX-2Tへの組み込みを行った。 $\delta$ 、 $\epsilon$ サブユニットはGSTのカルボキシ末端側に導入された形で発現する。

### 3. 融合蛋白質GST- $\delta$ 、GST- $\epsilon$ の発現と精製

#### 1) 発現

融合蛋白質GST- $\delta$ 、GST- $\epsilon$ の発現は次の手順で行った。各発現プラスミドにより形質転換した菌をM9ZB培地10mlに植菌し $37^\circ\text{C}$ で振盪培養した。これを前培養液として11のM9ZB培地に加え培養し、O.D600 = 0.9~1.0の時、終濃度が0.4mMになるようにIPTGを加えた。さらに3時間振盪培養し集菌 ( 4krpm, 10min ) した。



## 2) 精製方法

融合蛋白質GST- $\delta$ 、GST- $\epsilon$ の精製はグルタチオンを用いたアフィニティーカラムを用いた。集菌した菌体の湿重量はGST- $\delta$ が4.2g、GST- $\epsilon$ が2.6gであった。菌体を適量のPBSに懸濁しFrench press (1500kgf / cm<sup>2</sup>)を用いた加圧減圧処理あるいはソニケーターによる超音波破碎法で破碎した。菌体破碎液を105000x g、60分間の遠心によって可溶性画分と膜画分に分画した。可溶性画分からそれぞれ融合蛋白質をグルタチオンセファロース4B (ファルマシアバイオテク社製)を用いたアフィニティーカラムクロマトグラフィーによって精製した。

## 4. 融合蛋白質GST- $\delta$ 、GST- $\epsilon$ を用いた*In vitro*での $\alpha 3\beta 3\gamma$ GST- $\delta$ 、 $\alpha 3\beta 3\gamma$ GST- $\epsilon$ 複合体の再構成

再構成はM. Futaiの方法に従った。 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ サブユニットタンパク質および各融合蛋白質を混合しエッペンドルフチューブに加え、さらに再構成緩衝液を全液量の20%になるように混合した。各蛋白質のモル比は $\alpha : \beta : \gamma : \text{GST-}\delta$  ( $\text{GST-}\epsilon$ ) = 3 : 3 : 3 : 2とした。このサンプルを透析チューブに入れ、再構成緩衝液 (50mM コハク酸-Tris (pH 6.0), 10% グリセロール, 1mM DTT, 0.5mM EDTA, 5mM ATP, 5mM 塩化マグネシウム) 中で12時間、26℃の恒温室内で透析した。透析後ATPase活性の測定、蛋白定量を行った。

## 5. アフィニティーカラムクロマトグラフィーによる $\alpha 3\beta 3\gamma$ GST- $\delta$ 、 $\alpha 3\beta 3\gamma$ GST- $\epsilon$ 複合体の精製

4.の方法により再構成した試料をアフィニティーカラムクロマトグラフィーにより精製した。精製法は3.2)の方法に従った。



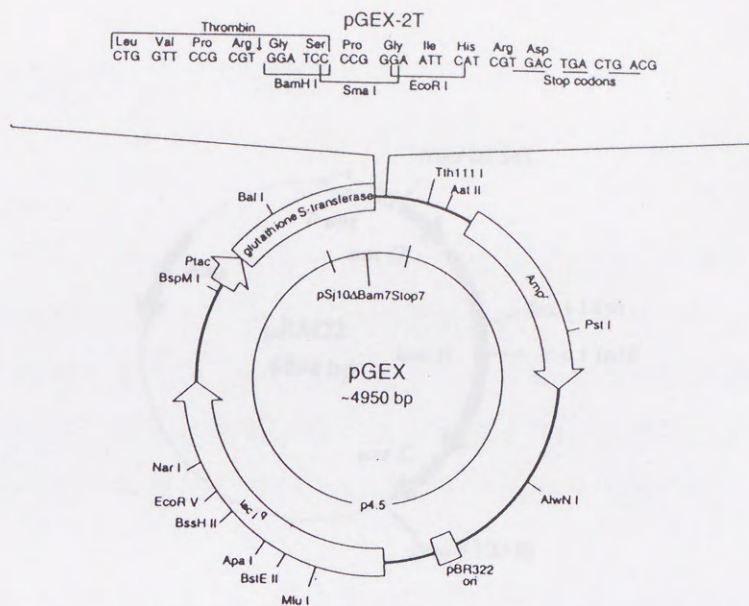


図.7-3 GSTとの融合蛋白質を発現するために用いたプラスミドpGEX-2T  
(ファルマシア社、バイオテック分子生物学研究用カタログより転載)

サブユニット遺伝子	鋳型DNA	プライマー	
		5'	3'
δサブユニット	KM230ゲノムDNA	DEF-N2	DER-C1
εサブユニット	pRM22	EEF-N2	EER-C1

表.7-2 δ、εサブユニットの遺伝子を増幅するためのプライマー (I)

δ、εサブユニットの遺伝子を増幅するため、PCR法に用いたプライマーの組み合わせ、鋳型DNAを示した。



## 第8章 総括および展望

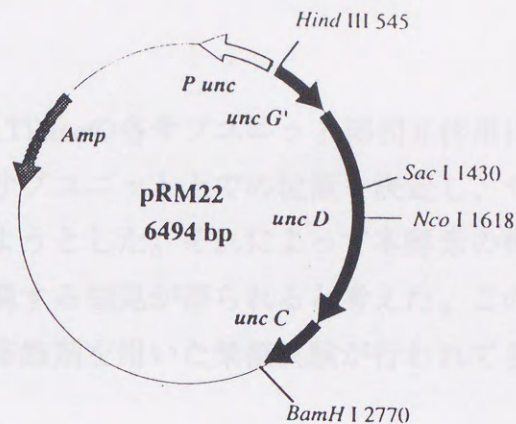


図.7-4 鋳型DNAに用いたpRM22

ε サブユニット遺伝子の増幅時鋳型DNAとして用いた。

プライマー	方向	塩基配列	位置
		5' <span style="float: right;">3'</span>	
DEF-N2	5' → 3'	TTTTGGATCCA' TGTCTGAATTTATTACGGTA	1
DER-C1	3' → 5'	CCTTGGAT' CCCCTTAAGACTGCAA	539
EEF-N2	5' → 3'	TTTTGGATCCA' TGGCAATGACTTACCACCTG	4432
EER-C1	3' → 5'	CCTTGGATC' CGGTGTTACATCGCTT	4857

表.7-3 δ、ε サブユニットの遺伝子を増幅するためのプライマー (II)

δ、ε サブユニットの遺伝子を増幅するため、PCR法に用いたプライマーの塩基配列を示した。5'、3'はそれぞれDNAの5'末端、3'末端を示している。下線は制限酵素の認識部位を示している。GGATCCはBamH I 認識部位を示している。右端のカラムの<位置>は、塩基配列中の'で印した塩基のunc オペロン遺伝子内での位置を示している。<位置>の1に相当するのはunc オペロン遺伝子内のδサブユニットの翻訳開始点である。図.2-5にδサブユニットの翻訳開始点以降のunc オペロン遺伝子の塩基配列を示した。



## 第8章 総括および展望

### 1. 本研究の総括

本研究では、F1Fo-ATPaseの各サブユニット間相互作用に寄与する結合部位を想定し、この結合部位のサブユニット上での位置を決定し、サブユニット間相互作用に関する知見を集積しようとした。それによって本酵素の機能発現に必須なサブユニット間の相互作用に関する知見が得られると考えた。この問題に対しこれまで突然変異株の解析や化学修飾剤を用いた架橋実験が行われてきたが、その知見は断片的であった。

そこで本研究では遺伝子工学、生化学を組み合わせ、結合部位を系統的に解析する手法を構築しようとした。まずサブユニット蛋白質を断片化した部分ペプチドを調製し、結合部位を形成するのに必要な領域を明らかにする事を目指した。この部分ペプチドの結合能を検出する系として $\alpha_3\beta_3\gamma$ 複合体の再構成系を用いた。この $\alpha_3\beta_3\gamma$ 複合体の再構成を容易にするため、 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ サブユニットの単独発現系を構築し各サブユニットの調製を行った。 $\alpha$ 、 $\gamma$ サブユニットの単独発現に関する報告はなされておらず、本研究で $\alpha$ 、 $\gamma$ サブユニットの単独発現系が構築された。この $\gamma$ サブユニットは封入体として不活性な形で得られ、グアニジン塩酸によって変性後再生し活性ある形として得ることができた。又、 $\beta$ サブユニットも本研究で確立した単独発現系によって、従来より効率よく調製することが可能となった。(第2章)。

この再構成系に導入する部分ペプチドは、 $\beta$ サブユニットを遺伝子工学的手法によって任意の領域に断片化したものを用いた。これらの部分ペプチドを用いた再構成阻害実験により、 $\beta$ の226から365残基、254から459残基、1から201残基の領域中に結合部位が含まれている事を示した。特に $\beta$ の254から294残基、147から201残基の領域にサブユニットとの結合部位があると推測した(第3章)。

さらに $\beta$ サブユニットの254から294残基の領域を含む $\beta$ の252から372残基領域に変異を導入した結果、 $\beta$ のプロリンリッチループ( $\beta$ の26から269残基)を含む255から279残基領域、314残基のHis、332残基のProの変異によってF1の分子集合に異常が見られた。即ちこれら変異残基がサブユニット間相互作用に関与していると考えられる(第4章)。

分子集合異常の原因となった変異を $\beta$ 226-365残基ペプチドに導入し、再構成阻



害実験を行った。その結果、プロリンリッチループ上の変異Gln268Lys、Gln268Argの導入によってサブユニット間相互作用に影響が見られるのは、 $\beta$ を断片化していない場合のみであることが示唆された。His314Argへの変異導入によっても同様の結果が得られた。プロリンリッチループ ( $\beta$ の261から269残基) を含んだ $\beta$  261から280残基のオリゴペプチドを用いた再構成阻害実験からも、プロリンリッチループがファイブプロネクチンのRGD配列のように単独で他のサブユニットと相互作用しないことを示した。即ち、 $\beta$ の261から269残基からなるプロリンリッチループ、 $\beta$ の314残基のHisは、断片化されてない $\beta$ サブユニット内でその構造が安定化され、F<sub>1</sub>の分子集合に寄与していると考えられた(第5章)。

## 2. 本研究の結果とX線結晶構造解析の結果からの考察

1994年8月に $\alpha$ 、 $\beta$ と $\gamma$ の一部の構造がX線結晶構造解析によって明らかになり、 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ の一部の3次構造およびそれらの空間的位置関係も明らかになった。これらのサブユニットのアミノ酸配列は種を超えて保存されており、X線結晶構造解析によって示されたモデルはF<sub>1</sub>-ATPaseにおいて共通であると考えられる。この結果から $\beta$ の261から269残基のプロリンリッチループは $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ サブユニットの界面に、 $\beta$ の270から281残基の $\alpha$ ヘリックス、His314を含む $\alpha$ ヘリックスは $\alpha$ 、 $\beta$ サブユニットの界面に存在し、サブユニット間相互作用に関与している可能性が高いことが示されている。特にプロリンリッチループはこの報告から提唱された回転モデルでは、軸となる $\gamma$ サブユニットを支える役割を果たしており、注目される領域である。 $\beta$  226-365残基ペプチドの結合能はX線結晶構造解析の結果から、 $\beta$ の302から305残基のループと $\gamma$ サブユニットの269、270残基残基との水素結合に由来していると考えられる。変異導入実験から $\beta$ の302から305残基のループ上に変異が同定されたのは、Leu303Ser、Asp305Tyrの2重変異の1株のみであった。一方、 $\beta$ の261から269残基のプロリンリッチループ上に変異が同定されたのは、1塩基置換の変異株のみで6株、 $\beta$ の270から281残基の $\alpha$ ヘリックス上には4株得られている。これは実際のF<sub>1</sub>の分子集合には $\beta$ の302から305残基のループよりプロリンリッチループや270-281残基の $\alpha$ ヘリックスの方がより重要であることを示唆している。

このように本研究でF<sub>1</sub>の分子集合に寄与しているが示された $\beta$ のプロリンリッチループ、 $\beta$ の270から281残基の $\alpha$ ヘリックス、306から314残基の $\alpha$ ヘリックスは、X線結晶構造解析の結果からはサブユニット間相互作用に寄与しているかどうかは判断することができない。X線結晶構造解析は多くの情報をもたらすが、それだけ



ではサブユニット間相互作用に寄与する結合部位をすべて明らかにすることはできないことを、これらの結果は示している。

### 3. 本研究の今後の発展

#### 1) $\beta$ の261から269残基のプロリンリッチループが関与するサブユニット間相互作用の解析

第4章で示したように $\beta$ の261から269残基のプロリンリッチループが $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ サブユニット間の相互作用に関与している事が示された。プロリンリッチループが関与するサブユニット間相互作用の分子機構を明らかにするには、部位特異的変異導入法によってプロリンリッチループ上のアミノ酸残基を置換し、生化学的手法によりサブユニット間相互作用に必須なアミノ酸残基を同定することが有効であると考えられる。また、プロリンリッチループが相互作用するサブユニットの特定と結合するアミノ酸残基を明らかにすることが、サブユニット間相互作用の分子機構の解明に有効であると考えられる。第6章ではプロリンリッチループ上の変異による影響を抑圧する変異を、 $\beta$ 以外のサブユニット内に有する戻り変異株の分離を試みたが、未だ目的の株は得られていない。今後、 $\beta$ 以外のサブユニットに抑圧変異を有する戻り変異株の効率よい調製法を確立することが、サブユニット間相互作用の分子機構の解明に役立つと考えられる。

#### 2) 本研究で構築した結合部位解析法の改良

本研究では、 $\alpha_3\beta_3\gamma$ 複合体の再構成系を用いた解析と $\beta$ 252から372残基の領域への変異導入により得た変異株の解析からF1F0の分子集合即ちサブユニット間相互作用に関わる領域を明らかにした。特にこの2つの解析から、X線結晶構造解析からは示されなかった、サブユニット間相互作用に寄与する結合部位と考えられる領域を示すことができた。今回調製した $\beta$ サブユニットの部分ペプチドはすべて100アミノ酸残基以上であり、50残基以下のペプチドは今回採用した精製法では得ることができなかった。結合部位を含むペプチドを選別するときには、50残基以下のペプチドを用いるのがより有効であると考えられる。現在GSTとの融合蛋白質としてこれらペプチドの発現を行っており、簡便に精製することができると考えている。これらのペプチドを用いて結合部位を含む領域を限定すれば、結合部位を形成するアミノ酸残基をより詳しく解析することが可能である。今回これを用いた研究は行えなかったが、今後このペプチドは、未だ明らかになっていないサブユニット



間相互作用に寄与する結合部位を明らかにするのに有効であると考えられる。

### 3) GST- $\delta$ およびGST- $\epsilon$ サブユニットを用いたサブユニット間相互作用研究

現在、 $H^+$ 輸送とATP合成の共役の機構に関与していることが示唆された $\epsilon$ サブユニット、F1とF<sub>0</sub>部分の結合に関与している $\delta$ サブユニットが注目されている。 $\delta$ 、 $\epsilon$ サブユニットに関する研究を行うため、この2つのサブユニットをGSTと融合させ簡便に調製する方法を確立した。この融合蛋白が $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ サブユニットと再構成可能なことから、この再構成系と各サブユニットの部分ペプチドを用いた遺伝生化学的手法により、 $\delta$ 、 $\epsilon$ を含めたサブユニット間相互作用の分子機構の解明が可能である。また、このGST- $\delta$ 、GST- $\epsilon$ はスロンピンを用いることによりGSTと分離でき、 $\alpha_3\beta_3\gamma\epsilon$  GST- $\delta$ あるいは $\alpha_3\beta_3\gamma\delta$  GST- $\epsilon$ を再構成する事が可能であると考えられる。この複合体の再構成系は、F1-ATPase全体のサブユニット間相互作用の解明に有効であると考えられる。

### 4. 今後のF1F<sub>0</sub>-ATPase研究における本研究の寄与

X線結晶構造解析の結果示されたモデルから、 $\alpha$ 、 $\beta$ サブユニットと $\gamma$ サブユニットの一部の各アミノ酸残基の空間的位置がわかり、これまで手探りで行っていたアミノ酸残基レベルの研究に大きな変化をもたらす事となった。特に変異株の解析から明らかになっていた活性中心に関わるアミノ酸残基<sup>90)・93)</sup>について、ATPの $\gamma$ 位のリン酸との結合に関与するグリシンリッチループや等が実際にATPと立体構造上近接していることがX線結晶構造解析の結果から示された。又、サブユニット間の相互作用についても $\alpha$ - $\beta$ 間、 $\beta$ - $\gamma$ 間で水素結合しているアミノ酸残基を明らかにした。さらに、触媒部位を形成する構造の非対称性が示され、本酵素の3つある触媒部位が協同的に働くというモデルを支持するが得られた。これに伴い $\gamma$ サブユニットが $\alpha_3\beta_3$ の6量体からなるシリンダー様構造の内部に存在し、 $\alpha\beta$ 界面の触媒部位に結合するヌクレオチドの違い即ちATP、ADPあるいはヌクレオチドが結合していない状態を認識して結合していることが示された。そしてこれらの結果から $\gamma$ サブユニットに対して $\alpha$ 、 $\beta$ サブユニットが回転しているという仮説が提出された。しかし、X線結晶構造解析の結果のみでは酵素の動的な状態を見ることができず、実際の酵素の反応機構は未だ明らかになっていない。又、サブユニット間相互作用についても全て明らかになったわけではなく、反応に伴って変化するサブユニット間相互作用については明らかでない。特に本酵素の最も重要な機能であるF<sub>0</sub>部分に



よるH<sup>+</sup>輸送とF<sub>1</sub>部分によるATP合成の共役の機構についてはX線結晶構造解析によって明らかになっていない部分があることから、未だ明らかになってはいない。従ってX線結晶構造解析の結果が報告された後も、本研究で構築したペプチドを用いた結合部位の解析法は有用であり、部位特異的変異法を用いたアミノ酸残基レベルの解析を併用することにより詳細な解析が可能であると考えられる。同時に、X線結晶構造解析の結果を参考に部位特異的変異導入法を用いた変異株の解析や架橋剤を用いたクロスリンク実験などの解析を行う必要があると考えられる。また、本研究から調製された、GSTと $\delta$ および $\epsilon$ サブユニットとの融合蛋白質GST- $\delta$  GST- $\epsilon$ は $\alpha$ 3 $\beta$ 3 $\gamma$   $\epsilon$  GST- $\delta$ あるいは $\alpha$ 3 $\beta$ 3 $\gamma$   $\delta$  GST- $\epsilon$ を再構成する事が可能であると考えられる。このF<sub>1</sub>-ATPaseとGSTとの複合体はグルタチオンを介して固定化する事が可能であり、 $\gamma$ サブユニットに対して $\alpha$ 、 $\beta$ サブユニットが回転するというモデルを含めた本酵素の動的な挙動をとらえることができると考えられる。

Membrane-bound adenosine triphosphatase of *Escherichia coli*. I. Purification and properties.

J. Biochem. vol. 74, 387-399

6) Yoshida, M., Sano, H., Nishio, H. and Kagami, T. (1979)

A highly soluble adenosine triphosphatase from a microsporidic bacterium

J. Biol. Chem. vol. 254, 7919-7926

7) Klingenberg, F. R. (1981)

Mechanism and properties of bacterial F<sub>1</sub>-stimulating ATPase

Curr. Top. Membr. vol. 14, 35-56

8) Fiedl, M., Nishio, T., and Nishio, H. (1986)

ATP synthase (F<sub>1</sub>-ATPase) from *Escherichia coli* and its structure in lipid bilayers

Ann. Rev. Biochem. vol. 55, 311-336

9) Klingenberg, F. and Fiedl, M. (1982)

Structure and function of F<sub>1</sub>-ATPase. What we have learned from *Escherichia coli* F<sub>1</sub>-ATPase

Ann. N. Y. Acad. Sci.

10) Fiedl, M., Hagen, J., Oestling, H. P., Mielert, G., von Meyendorp, R., and Scholze, H. U. (1983)

Membrane integration and function of the F<sub>1</sub>F<sub>0</sub> subunit of the ATP synthase of *Escherichia coli* F<sub>1</sub>

EMBO J. vol. 2, 379-387

11) Schneider, J., and Altstapel, K. (1984)

All three subunits are required for the recognition of an active protein domain (F<sub>1</sub>) of *Escherichia coli* ATP synthase (F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>)

EMBO J. vol. 3, 515-518

12) Klingenberg, F., Kagami, T., Fiedl, M., and Fiedl, M. (1984)

Hydrolytic activity of the protein coding for  $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$  subunits of proton-translocating ATPase of *Escherichia coli*

Biochem. Biophys. Res. Comm. vol. 103, 604-612



## Reference

- 1) Mitchell, P. (1961)  
Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism.  
Nature, vol. 191, 144-148
- 2) Racker, E. (1976)  
A New Look at Mechanisms in Bioenergetics.  
Academic Press, New York
- 3) Penefsky, H. S., Pullman, M. E., Datta, A., and Racker, E.  
Partial resolution of the enzyme catalyzing oxidative phosphorylation: II. Participation of a soluble adenosine triphosphatase in oxidative phosphorylation.
- 4) Baird, B. A. and Hammes, G. G. (1979)  
Structure of oxidative- and photophosphorylation coupling factor complexes.  
Biochim. Biophys. Acta. vol. 549 31-53
- 5) Kobayashi, H. and Anraku, Y. (1972)  
Membrane-bound adenosine triphosphatase of *Escherichia coli*: I. Partial purification and properties.  
J. Biochem. vol. 71, 387-399
- 6) Yoshida, M., Sone, N., Hirata, H. and Kagawa, Y. (1975)  
A highly stable adenosine triphosphatase from a thermophilic bacterium.  
J. Biol. Chem. vol. 250, 7910-7916
- 7) Fillingame, R. H. (1981)  
Biochemistry and genetics of bacterial H<sup>+</sup>-translocating ATPase.  
Curr. Top. Bioenerg. vol. 11 35-106
- 8) Futai, M., Noumi, T., and Maeda, M. (1989)  
ATP synthase (H<sup>+</sup>-ATPase): Results by combined biochemical and molecular biological approaches.  
Ann. Rev. Biochem. vol. 58, 111-136
- 9) Kanazawa, H. and Futai, M. (1982)  
Structure and function of H<sup>+</sup>-ATPase: What we have learned from *Escherichia coli* H<sup>+</sup>-ATPase.  
Ann. N. Y. Acad. Sci
- 10) Friedl, M., Hoppe, J., Gunsalus, R. P., Michelsen, O., von Meyenburg, K., and Schairer, H. U. (1983)  
Membrane integration and function of the three Fo subunits of the ATP synthase of *Escherichia coli* K12.  
EMBO J. vol. 2, 99-103
- 11) Schneider, E., and Altendorf, K. (1985)  
All three subunits are required for the reconstitution of an active proton channel (Fo) of *Escherichia coli* ATP synthase (F<sub>1</sub>F<sub>o</sub>).  
EMBO J. vol. 4, 515-518
- 12) Kanazawa, H., Kayano, T., Mabuchi, K. and Futai, M. (1981)  
Nucleotide sequence of the genes coding for  $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$  subunit of proton-translocating ATPase of *Escherichia coli*.  
Biochem. Biophys. Res. Comm. vol. 103, 604-612



- 13) Futai, M. and Kanazawa, H. (1983)  
Structure and function of proton-translocating adenosine triphosphatase. (FoF<sub>1</sub>) : Biochemical and molecular biological approaches.  
Micro. biol. Rev., vol. 47, 285-312
- 14) Futai, M., and Kanazawa, H. (1983)  
Stoichiometry of subunits in the H<sup>+</sup>-ATPase complex of *Escherichia coli*.  
J. Biol. Chem. vol. 257, 2009-2015
- 15) Tybulewics, V. L. J., Falk, G., and Walker, J. E. (1984)  
*Rhodospseudomonas blastica* *atp* operon : Nucleotide sequence and transcription.  
J. Mol. Biol. vol. 179, 185-214
- 16) Falk, G., Hampe A. and Walker, J. E. (1985)  
Nucleotide sequence of *Rhodospseudomonas blastica atp* operon.  
Biochem. J. vol. 228, 391-407
- 17) Cozens, A. L. and Walker, J. E. (1987)  
The organization and sequence of the genes for ATP synthase subunits in the cyanobacterium *Synechococcus* 6301 : Support for an endosymbiotic origin of chloroplasts.  
J. Mol. Biol. vol. 194, 359-383
- 18) McCarn, D. F., Whitaler, R. A., Alam, J., Vrba, J. M., and Curtis, S. E. (1988)  
Genes encoding the alpha, gamma, delta, and four Fo subunits of ATP synthase constitute an operon in the cyanobacterium *Anabaena sp.* strain PCC7120.  
J. Bacteriol. vol. 170, 3448-3458
- 19) Walker, J. E., Fearley, I. M., Gay, N. J., Gibson, B. W., Nothrop, F. D., Powell, S. J., Runswick, M. J., Saraste, M., and Tyblewicz, V. L. J. (1985)  
Primary structure and subunit stoichiometry of F<sub>1</sub>-ATPase from bovine mitochondria.  
J. Mol. Biol. vol. 184, 677-701
- 20) Saraste, M., Gay, N. J., Eberle, A., Runswick, M. J., and Walker, J. E. (1981)  
The *atp* operon : Nucleotide sequence of the genes for the  $\gamma$ ,  $\beta$  and  $\epsilon$  subunits of *Escherichia coli* ATP synthase.  
Nucleic Acids Res. vol. 9, 5287-5296
- 21) Ohta, S., Yohda, M., Ishizuka, M., Hirata, H., Hamamoto, T., Otawara-Hamamoto, Y., Matsuda, K., and Kagawa, Y. (1988)  
Sequence and over-production of subunits of adenosine triphosphate synthase in thermophilic bacterium PS3.  
Biochim. Biophys. Acta. vol. 933, 141-155
- 22) Negrin, R. S., Foster, D. L. and Fillingame, R. H. (1980)  
Energytransducing H<sup>+</sup>-ATPase of *Escherichia coli*.: Reconstitution of proton translocation activity of the intrinsic membrane sector.  
J. Biol. Chem. vol. 255 5643-5648
- 23) Friedl, D., Friedl, C. and Schairer, H. U. (1979)  
The ATP synthase of *Escherichia coli* K12: Purification of the enzyme and reconstitution of energy-transducing activities.  
Eur. J. B. vol. 100 175-180



- 24) Sone, N., Yoshida, M., Hirata, H. and Kagawa, Y. (1977)  
Adenosine triphosphate synthesis by electrochemical proton gradient in vesicle reconstituted from purified adenosine triphosphatase and phospholipids of thermophilic bacterium.  
J. Biol. Chem. vol. 255 2956-2960
- 25) Yoshida, M., Sone, N., Hirata, H., Kagawa, Y. (1977)  
Reconstitution of Adenosine Triphosphatase of Thermophilic Bacterium from purified individual subunits.  
J. Biol. Chem. vol. 252 No. 10 3480-3485
- 26) Yoshida, M., Okamoto, H., Sone, N., Hirata, H., and Kagawa Y. (1977)  
Reconstitution of thermostable ATPase capable of energy coupling from its purified subunits.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA. vol. 74, 936-940
- 27) Futai, M. (1977)  
Reconstitution of ATPase activity from the isolated  $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$  subunits of the coupling factor, F<sub>1</sub>, of *Escherichia coli*.  
Biochem. Biophys. Res. Comm. vol. 79 1231-1237
- 28) Dunn, S. D., and Futai M. (1980)  
Reconstitution of a functional coupling factor from the isolated subunits of *Escherichia coli* F<sub>1</sub>-ATPase.  
J. Biol. Chem. vol. 255, 113-118
- 29) Hsu, S. -Y., Senda, M., Kanazawa H., Tsuchiya, T., and Futai, M. (1984)  
Comparison of F<sub>1</sub>'s of oxidative phosphorylation from *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* and demonstration of interchangeability of their subunits.  
Biochemistry vol. 23, 988-993
- 30) Hirano, H., Takeda, K., Kanazawa, H. and Futai, M. (1984)  
Detection of ATP-dependent conformational change in the F<sub>1</sub> portion and  $\beta$  subunit of *Escherichia coli* H<sup>+</sup>-ATPase using.  
Biochemistry vol. 23 1652-1656
- 31) Ohta, S., Tsuboi, M., Oshima, T., Yoshida, M. and Kagawa, Y. (1980)  
Nucleotide binding to isolated  $\alpha$  and  $\beta$  subunits of proton translocating adenosine triphosphatase studied with circular dichroism.  
J. Biochem vol. 87 1604-1617
- 32) Shin, K., Nakamoto, R. K., Maeda, M. (1992)  
F<sub>1</sub>F<sub>o</sub>-ATPase  $\gamma$  subunit Mutation Perturb the coupling between catalysis and Transport.  
J. Biol. Chem. vol. 267 20835-20839
- 33) Nakamoto, R. K., Maeda, M., and Futai, M. (1993)  
The  $\gamma$  subunit of the *Escherichia coli* ATP synthase.  
J. Biol. Chem, vol. 268, 867-872
- 34) Nakamoto, R. K., and Al-Shawi, M. K., Masamitsu Futai (1995)  
The ATP synthase  $\gamma$  subunit  
J. Biol. Chem, vol. 270, 14042-14046



- 35) Engelbrecht, S., and Junge, W. (1987)  
Fragmentation of chloroplast coupling factor in dependence of bound nucleotides : Preparation of a reconstitutionally active form of subunit  $\delta$ .  
FEBS Lett. vol. 219, 321-325
- 36) Engelbrecht, S., Lill, H., and Junge, W. (1986)  
Reconstitution of CF1-depleted thylakoid membranes with complete and fragmented chloroplast ATPase : The role of the  $\delta$  subunit for proton conduction through CFo.  
Eur. J. Biochem. vol. 160, 635-643
- 37) Richter, M. L., Patrie, W. J., and McCarty, R. E. (1984)  
Preparation of the  $\epsilon$  subunit and  $\epsilon$  subunit-deficient chloroplast coupling factor 1 in reconstitutionally active forms.  
J. Biol. Chem. vol. 259, 7371-7373
- 38) Hazard, A. L. and Senior, A. E. (1994)  
Defective energy coupling in  $\delta$ -subunit mutants of *Escherichia coli* F<sub>1</sub>F<sub>o</sub>-ATP synthase.  
J. Biol. Chem. vol. 269, 427-432
- 39) Xiong, H., Vik, S. B. (1995)  
Alanine-scanning mutagenesis of the  $\epsilon$  subunit of the F<sub>1</sub>-F<sub>o</sub> ATP synthase from *Escherichia coli* reveals two classes of mutants.  
J. Biol. Chem. vol. 270, 23300-23304
- 40) Zhang, Y. and Fillingame, R. H. (1995)  
Subunits coupling H<sup>+</sup> transport and ATP synthesis in the *Escherichia coli* ATP synthase.  
J. Biol. Chem. vol. 270, 24609-24614
- 41) Zhang, Y., Oldenburg, M., and Fillingame, R. H. (1994)  
Suppressor mutations in F<sub>1</sub> subunit  $\epsilon$  recouple ATP-driven H<sup>+</sup> translocation in uncoupled Q42E subunit c mutant of *Escherichia coli* F<sub>1</sub>F<sub>o</sub> ATP synthase.  
J. Biol. Chem. vol. 269, 10221-10224
- 42) Cross, R. L., and Nalin, C. M. (1982)  
Adenine nucleotide binding sites on beef heart F<sub>1</sub>-ATPase : Evidence for three exchangeable sites that are distinct from three noncatalytic sites.  
J. Biol. Chem. vol. 257, 2874-2881
- 43) Weber, J., Lucke, U., and Schafer, G. (1985)  
Total number and differentiation of nucleotide binding sites on mitochondrial F<sub>1</sub>-ATPase : An approach by photolabeling and equilibrium binding studies.  
Eur. J. Biochem. vol. 148, 41-47
- 44) Wise, J. G., Duncan, T. M., Latchney, L. R., Cox, D. N., and Senior, A. E. (1983)  
Properties of F<sub>1</sub>-ATPase from the uncD412 mutant of *Escherichia coli*.  
Biochem. J. vol. 215 343-350
- 45) Issartel, J. -P., Lunardi, J., and Vignais, P. D. (1986)  
Characterization of exchangeable and nonexchangeable bound nucleotides in F<sub>1</sub>-ATPase from *Escherichia coli*.  
J. Biol. Chem. vol. 261, 895-901
- 46) Grubmeyer, C., and Penefsky, H. S. (1981)  
The presence of two hydrolytic sites on beef heart mitochondrial adenosine triphosphatase.  
J. Biol. Chem. vol. 256, 3718-3727



- 47) Grubmeyer, C., and Penefsky, H. S. (1981)  
Cooperativity between catalytic sites in the mechanism of action of beef heart mitochondrial adenosine triphosphatase.  
J. Biol. Chem. vol. 256, 3728-3734
- 48) Gresser, M. J., Myers, J. A., and Boyer, P. D. (1982)  
Catalytic site cooperativity of beef heart mitochondrial F<sub>1</sub> adenosine triphosphatase.  
J. Biol. Chem. vol. 257, 12030-12038
- 49) Cross, R. L., Grubmeyer, C., and Penefsky, H. S. (1982)  
Mechanism of ATP hydrolysis is by beef mitochondrial ATPase : Rate enhancements resulting from cooperative interactions between multiple catalytic sites.  
J. Biol. Chem. vol. 257, 12101-12105
- 50) Khananshvil, D., and Gromet-Elhanan, Z. (1984)  
Demonstration of two binding sites for ADP on the isolated  $\beta$  subunit of *Rhodospirillum rubrum* R1FoF<sub>1</sub>-ATP synthase.  
FEBS Lett. vol. 178, 10-14
- 51) Williams, N. and Coleman, P. S. (1982)  
Exploring the adenine nucleotide binding sites on mitochondrial F<sub>1</sub>-ATPase with a new photoaffinity probe, 3'-*o*-(4-benzoyl)adenosine 5'-triphosphate.  
J. Biol. Chem. vol. 257, 2834-2841
- 52) Lubben, M., Luchen, U., Weber, J., and Schafer, G. (1984)  
Azidonaphthoyl-ADP : a specific photolabel for the high-affinity nucleotide-binding sites of F<sub>1</sub>-ATPase.  
Eur. J. Biochem. vol. 143, 483-490
- 53) Noumi, T., Tagaya, M., Miki-Takeda, K., Maeda, M., and Futai, M. (1981)  
Loss of unisite and multisite catalysis by *Escherichia coli* F<sub>1</sub> through modification with adenosine tri- or tetraphosphopyridoxal.  
J. Biol. Chem. vol. 262, 7686-7692
- 54) Abrahams, J. P., Leslie, A. G. W., Lutter, R., and Walker, J. E. (1994)  
Structure at 2.8Å resolution of F<sub>1</sub>-ATPase from bovine heart mitochondria.  
Nature, vol. 370, 621-628
- 55) Boyer, P. D. (1979)  
The binding-change mechanism of ATP synthesis.  
in : Membrane Bioenergetics, ed. Lee, C. P., Schatz, G., and Ernster, L., pp. 461-479  
Addison-Wesley Publishing Co. Inc., Reading, Mass.
- 56) Maggio, M. B., Pagan, J., Parsonage, D., Hatch, L., and Senior, A. E. (1987)  
The defective proton -ATPase of *unca* mutants of *Escherichia coli* : Identification by DNA sequencing of residues in the  $\alpha$  subunit which are essential for catalysis or normal assembly.  
J. Biol. Chem. vol. 262, 8981-8984
- 57) Noumi, T., Futai, M., and Kanazawa, H. (1984)  
Replacement of serine 373 by phenylalanine in the  $\alpha$  subunit of *Escherichia coli* F<sub>1</sub>-ATPase results in loss of steady-state catalysis by the enzyme.  
J. Biol. Chem. vol. 259, 10076-10079



- 58) Soga, S., Noumi, T., Takeyama, M., Maeda M., and Futai, M. (1989)  
 Mutational replacements of conserved amino acid residues in the  $\alpha$  subunit change the catalytic properties of *Escherichia coli* F<sub>1</sub>-ATPase.  
 Arch. Biochem. Biophys. vol. 268, 643-648
- 59) Parsonage, D., Duncan, T. M., Wilke-Mounts, S., Kironde, F. A. S., Hatch, L., and Senior, A. E. (1987)  
 The defective proton-ATPase of *uncD* mutants of *Escherichia coli* : which are essential for catalysis or normal assembly.  
 J. Biol. Chem. vol. 262, 6301-6307
- 60) Duncan, T. M., and Senior, A. E. (1985)  
 The defective proton-ATPase of *uncD* mutants of *Escherichia coli* : Two mutations which affect the catalytic mechanism.  
 J. Biol. Chem. vol. 260, 4901-4907
- 61) Noumi, T., Azuma, M., Shimomura, S., Futai, M. (1987)  
*Escherichia coli* H<sup>+</sup>-ATPase.  
 J. Biol. Chem. vol. 262 No. 31 14978-14982
- 62) Noumi, T., Oka, N., Kanazawa, H., and Futai, M. (1986)  
 Mutational Replacements of conserved Amino Acid Residues in the  $\beta$  subunit Resulted in Defective Assembly of H<sup>+</sup>-translocating ATPase (F<sub>1</sub>F<sub>o</sub>) in *Escherichia coli*.  
 J. Biol. Chem. vol. 261 No. 15 7070-7075
- 63) Maggio, M. B., Parsonage, D., and Senior, A. E. (1988)  
 A mutation in the  $\alpha$  subunit of F<sub>1</sub>-ATPase from *Escherichia coli* affects the binding of F<sub>1</sub> to the membrane.  
 J. Biol. Chem. vol. 263, 4619-4623
- 64) Kanazawa, H., Hama, H., Rosen, B. P. and Futai, M. (1985)  
 Deletion of seven amino acid residues from the  $\gamma$  subunit of *Escherichia coli* H<sup>+</sup>-ATPase causes total loss of F<sub>1</sub> assembly on membranes.  
 Arch. Biochem. Biophys. vol. 241, 364-370
- 65) Duun, S. D., Heppel, L. A. and Fullmer, C. S.  
 The NH<sub>2</sub>-terminal portion of the  $\alpha$  subunit of *Escherichia coli* F<sub>1</sub>-ATPase is required for binding the  $\delta$  subunit.  
 J. Biol. Chem. vol. 255 No. 14 6891-6896
- 66) Dallmann, H. G., Flynn, T. G., and Dunn, S. D. (1992)  
 Determination of the 1-Ethyl-3-[(3-dimethylamino)propyl]-carbodiimide induced cross-link Between the  $\beta$  and  $\epsilon$  subunits of *Escherichia coli* F<sub>1</sub>-ATPase.  
 J. Biol. Chem. vol. 267 No. 20 18953-18960
- 67) Aggeler, R. and Capaldi, R. A. (1992)  
 Crosslinking of the  $\delta$  subunit of the *Escherichia coli* ATPase (ECF<sub>1</sub>) via cysteines introduced by site-directed mutagenesis.  
 J. Biol. Chem. vol. 267 21355-21359



- 68) Studier, F. W., Rosenberg A. H., Dunn J. J., and Dubbedorf, J. W. (1990)  
 Use of T7 RNA Polymerase to Direct the Expression of cloned genes.  
*in Methods in Enzymology*, vol. 185, pp. 60-89, Academic Press, San Diego.
- 69) Miller, J. H. (1972) in "Experiments in Molecular Genetics"  
 Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY
- 70) Marmer, J. (1960)  
 A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganism.  
*J. Mol. Biol.*, vol. 3, 208-218
- 71) 石井 一行、安藤 俊夫  
 SDSポリアクリルアミドゲルからの酵素蛋白質の溶出と酵素活性の復活法.  
*生化学*56 第1号 50-52
- 72) Fuati, M., Sternweis, P. C. and Heppel, L. A. (1974)  
 Purification and properties of reconstitutively active and inactive adenosinetriphosphatase from *Escherichia coli* .  
*Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 77, 2725-2729
- 73) Bradford, M. M. (1972)  
 A rapid and sensitive method quantitation of microgram quantitatives of Protein utilizing principle of protein-dye binding.  
*Anal. Biochem.*, vol. 72, 248-254
- 74) Leumli, U. K. (1970)  
 Cleavage of structural porotein during the assembly of the head of bacteriophage T4.  
*Nature*, vol. 227, 680-685
- 75) Chung, C. T., Niemela, S. H. and Miller, R. H. (1989)  
 One-step preparation of competent *Escherichia coli* : Transformation and storge of bacterial cell in the same method.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 86, 2172-2175
- 76) Sanger, F., Coulson, A. R., Barrell, B. G., Smith, A. J. H. and Roe, B. A. (1981)  
 Cloning in single stranded bacteriophage as an aid to rapid DNA sequencing.  
*J. Mol. Biol.*, vol. 143, 161-178
- 77) Birnboim and Doly (1979). and Ish-Horowitz and Barke (1981).  
 modification method in "Molecular Cloning (Laboratory Manual)" (1989) second edition.  
 Cold Spring Harbor laboratory press
- 78) Ohta, S., Tomura, H., Matsuda, K. and Kagawa, Y. (1987)  
 Gene structure of the human mitochondrial adenosine triphosphate synthase  $\beta$  subunit.  
*J. Biol. Chem.* vol. 263 No. 23 11257-11262
- 79) Lee, R. S-F., Pagan, J., Wilke-Mounts, S., Senior, A. E. (1991)  
 Characterization of *Escherichia coli* ATP synthase  $\beta$ -subunit mutation using a chromosomal deletion strain.  
*Biochemistry*, vol. 30, 6842-6847
- 80) Tanaka, S., Lerner, S. A. and Lin, E. C. C. (1967)  
 Replacement of a phosphotransferase by a nicotinamide adenosine dinucleotide linked to dehydrogenase for the utilization of mannitol.  
*J. Bacteriol.*, vol. 93, 642-648



- 81) Miki, J., Kusuki, H., Sadamu Tsugumi, and Hiroshi Kanazawa (1994)  
Amino acid replacements at binding sites of monoclonal antibody in the F<sub>1</sub>-ATPase  $\beta$  subunit from *Escherichia coli* caused altered subunit interactions  
J. Biol. Chem. 269, 4227-4232
- 82) Tsuchiya, T., and Rosen, B. P. (1975)  
Characterization of an active transport system for calcium in inverted membrane vesicles of *Escherichia coli*.  
J. Biol. Chem., vol. 250, 7687-7692
- 83) Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. (1951)  
Protein measurement with the Folin Phenol reagent.  
J. Biol. Chem., vol. 197, 265-275
- 84) Dower, W. J., Miller, K. F. and Ragsdale, C. W. (1988)  
Nucleic. Acid. Res., vol. 16, 6127-6145
- 85) Miki, J., Tsugumi, S., Ikeda, H., Kanazawa, H. (1994)  
Intergenic suppression in a  $\beta$  subunit mutant with defective assembly in *Escherichia coli* F<sub>1</sub>-ATPase.  
FEBS Letters, vol. 344, 187-190
- 86) Ikeda, H. (1994)  
岡山大学大学院 工学研究科 修士論文
- 87) Omote, H., Park, M., Maeda, M., and Futai, M. (1994)  
The  $\alpha / \beta$  subunit interaction in H<sup>+</sup>-ATPase (ATP synthase).  
J. Biol. Chem., vol. 269, 10265-10269
- 88) Beukelear, C. J., Omote, H., Iwamoto-Kihara, A., Maeda, M., and Futai, M. (1995)  
 $\beta - \gamma$  subunit interaction is required for catalysis by H<sup>+</sup>-ATPase (ATP synthase).  
J. Biol. Chem., vol. 270, 22850-22854
- 89) Klionsky, D. J., Brusilow, W. S. A., and Simoni, R. D. (1984)  
J. Bacteriol., vol. 160, 1055-1060
- 90) Senior, A. E. and Al-Shawi, M. K. (1992)  
Further Examination of Seventeen Mutations in *Escherichia coli* F<sub>1</sub>-ATPase  $\beta$  subunit.  
J. Biol. Chem. vol. 267 21471-21478
- 91) Iwamoto, A., Omote, H., Hanada, H., Tomioka, N., Itai, A., Maeda, M., and Futai, M. (1992)  
Mutations in Ser<sup>174</sup> and the Glycine-rich sequence (Gly<sup>149</sup>, Gly<sup>150</sup>, and Thr<sup>156</sup>) in the  $\beta$  subunit of *Escherichia coli* H<sup>+</sup>-ATPase.  
J. Biol. Chem. vol. 266 16350-16355
- 92) Omote, H., Maeda, M., and Futai, M. (1992)  
Effects of Mutation of conserved Lys-155 and Thr-156 Residues in the phosphate-binding Glycine rich sequence of the F<sub>1</sub>-ATPase  $\beta$  subunit of *Escherichia coli*.  
J. Biol. Chem. vol. 267 20571-20576
- 93) Ida, K., Noumi, T., Maeda, M., Fukui, T. and Futai, M.  
Catalytic site of F<sub>1</sub>-ATPase of *Escherichia coli*.  
J. Biol. Chem. vol. 266, 5424-5429
- 94) Boyer, P. D., Chance, B., Ernster, S., Mitchell, P., Racker, E., & Slater, E. C. (1977)  
Ann. Rev. Biochem. vol. 46, 955-1026



- 95) Kagawa, Y. (1978)  
 Biochim. Biophys. Acta., vol. 505, 45-93
- 96) Downie, J. A., Gibson, F., & Cox, G. B. (1979)  
 Annu. Rev. Biochem. vol. 48, 103-131
- 97) Futai, M. & Kanazawa, H. (1980)  
 Curr. Top. Bioenerg. vol. 10, 181-215
- 98) Dunn, S. D. & Heppel, L. A. (1981)  
 Arch. Biochem. Biophys. vol. 210, 421-436
- 99) Senior, A. E., & Wise, J. G. (1983)  
 J. Memb. Biol. vol. 73, 105-124
- 100) Dmitriev, O. Y., Altendorf, K. and Fillingame, R. H. (1995)  
 Reconstitution of the Fo complex of *Escherichia coli* ATP synthase from isolated subunits.  
 Eur. J. Biochem. vol. 233, 478-483
- 101) Sternweis, P. C. (1978)  
 J. Biol. Chem. vol. 253, 3123-3128
- 102) Vik, S. B. and Antonio, B. J. (1994)  
 A mechanism of proton translocation by F<sub>1</sub>F<sub>o</sub> ATP synthase suggested by double mutants of the a subunit.  
 J. Biol. Chem. vol. 269, 30364-30369
- 103) Dunn, S. D. (1992)  
 The polar domain of the b subunit of *Escherichia coli* F<sub>1</sub>F<sub>o</sub> ATPase forms an elongated dimer that interacts with the F<sub>1</sub> Sector.  
 J. Biol. Chem. vol. 267, 7630-7636
- 104) Senior, A. E. (1990)  
 The proton-translocating ATPase of *Escherichia coli*  
 Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem. vol. 19, 7-41
- 105) Boyer, P. D. (1989)  
 FASEB J. vol. 3, 2164-2178
- 106) Laubinger, W., Dimroth, P. (1988)  
 Biochemistry vol. 27, 7531-7537
- 107) Laubinger, W., Deckers-Hebestreit, G., Altendorf, K. and Dimroth, Peter D. (1990)  
 A hybrid adenosinetriphosphatase composed of F<sub>1</sub> of *Escherichia coli* and Fo of *Propionigenium modestum* Is a functional sodium ion pump.  
 Biochemistry vol. 29, 5458-5463
- 108) Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J. D. (1995)  
 Molecular biology of the cell : third edition  
 Kyouikusha



- 109) 郷 信広 他 (1994)  
蛋白質の時代  
蛋白質 核酸 酵素 vol. 39, 1001-1398
- 110) Lindschulz, w. H. et al (1988)  
Science vol. 240, 1759-1764
- 111) Ren, R., Mayer, B. J., Cicchetti, P. and Baltimore, D. (1993)  
Identification of a ten-amino acid proline-rich SH3 binding site.  
Science vol. 259, 1157-1161
- 112) Ono and Kuwano  
J. M. B. vol. 129, 343-357
- 113) Fudemoto, T. (1993)  
岡山大学大学院 工学研究科 修士論文
- 114) Watson, J. D., Hopkins, N. H., Roberts, J. W., Steiz, J. A., Weiner, A. W. (1990)  
Molecular Biology of the gene, Fourth edition
- 115) Yabuki, M. (1994)  
岡山大学大学院 工学研究科 修士論文
- 116) Miki, J., Matsuda, T., Kariya, H., Ohmori, H., Tsuchiya, T., Futai, M. and Kanazawa, H. (1992)  
Mapping of antigenic sites to monoclonal antibodies on the primary structure of the F<sub>1</sub>-ATPase  $\beta$  subunit from *Escherichia coli* : concealed amino-terminal region of the subunit in the F<sub>1</sub>.  
A. B. B. vol. 294, 373-381
- 117) Sawada, K. (1994)  
岡山大学大学院 工学研究科 修士論文
- 118) Nagakura, T. (1996)  
岡山大学大学院 工学研究科 修士論文
- 119) Kanazawa, H., Yabuki, M., Miki, J., Fudemoto, T., Ikeda, H., Noumi, T., and Shin, Y. (1995)  
Enhancements of *Escherichia coli* H<sup>+</sup>-ATPase caused by binding of monoclonal antibodies is attributed to structural changes of Leu-456 and Ser-440 in the  $\alpha$  subunit.  
A. B. B. vol. 317, 348-356
- 120) Walker, J. E., Fearnley, I. M., Gay, N. J., Gibson, B. W., Northrop, F. D., Powell, S. J., Runswick, M. J., Saraste, M. and Tybulewicz, V. L. J. (1985)  
Primary structure and subunit stoichiometry of F<sub>1</sub>-ATPase from bovine mitochondria.  
J. Mol. Biol vol. 184, 677-701
- 121) Orita, M., Iwahana, H., Kanazawa, H., Hayashi, K., and T. Sekiya (1989)  
Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformational polymorphisms.  
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. vol. 86, 2766-2770
- 122) Kanazawa, H., Noumi, T. and Futai, M. (1989)  
Methods Enzymol. vol.126, 595-603
- 123) Mino, K. (1994)  
岡山大学 工学部 卒業論文



## 謝辞

本研究は岡山大学工学部生物応用工学科生物反応制御化学研究室において行ったものであります。本稿を終えるにあたり、6年間にわたって直接の御指導ならびに御教示を賜りました金沢浩教授に深く感謝致します。

また能見貴人助教授、守谷智恵助手には実験の御指導および多くの貴重な御助言を頂きました。前助手三木順詞博士（現山之内製薬）にも、御指導および貴重なご助言を頂きました。本学薬学部微生物薬品化学教室の土屋友房教授にも貴重な御助言を頂きました。以上の先生方に深く感謝致します。

沢田研修士にはサブユニット蛋白質、部分ペプチドの調製、再構成系の構築に協力をいただきました。藤井康行学士にはSRPM法を用いた変異株の調製および解析に協力を頂きました。宮永政光修士、長倉廷学士には $\delta$ 、 $\epsilon$ サブユニットの調製に協力を頂きました。黒田希さんには戻り変異株の調製に協力を頂きました。本研究で用いたオリゴペプチドは山之内製薬つくば研究所所長 増保安彦先生に合成して頂いた。記して深く感謝いたします。

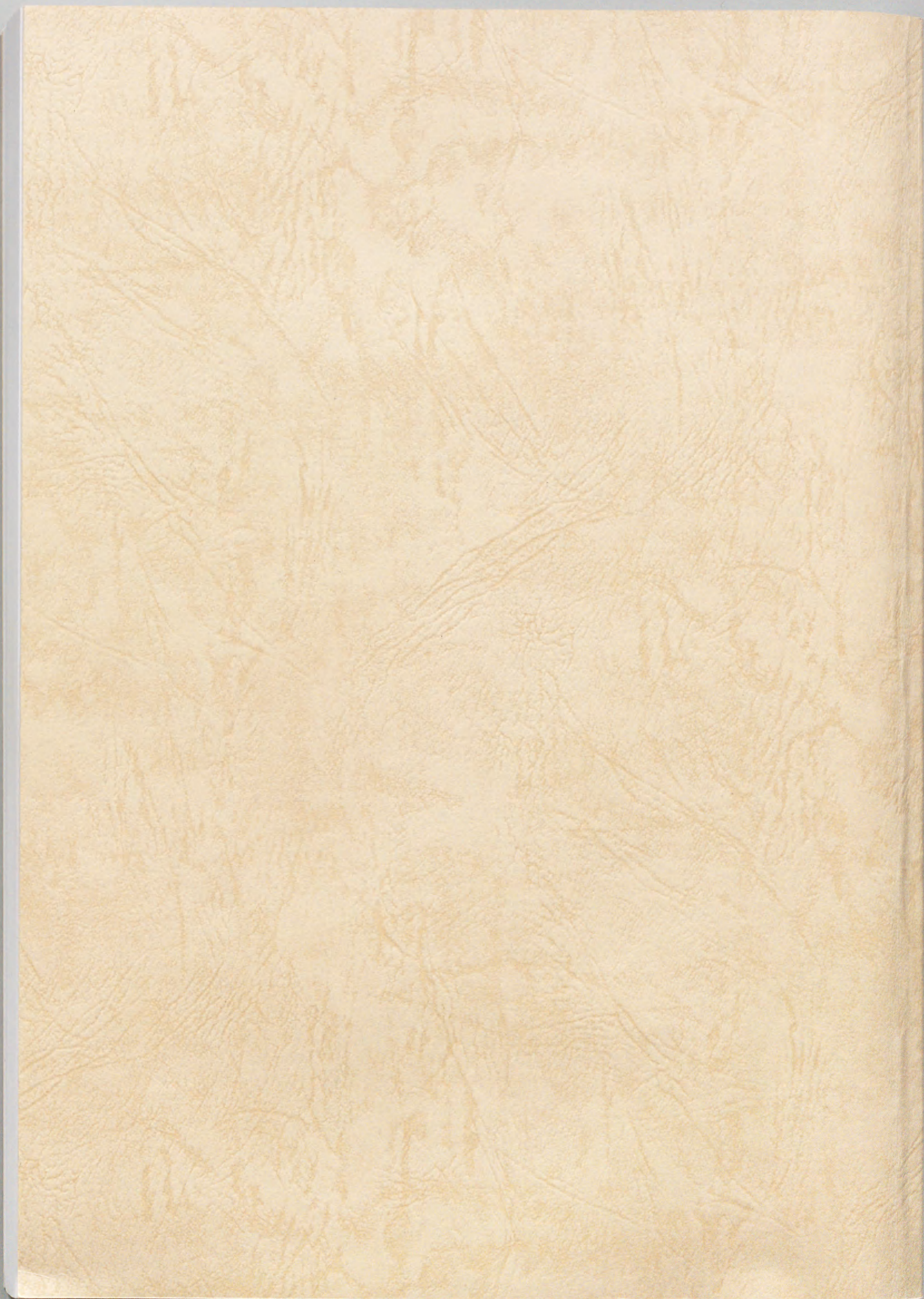
研究を盛り上げて下さいました本研究室の卒業生ならびに現教室員の皆様に、心から感謝致します。



発表論文

1. Shin, Y., Sawada, K., Nagakura, T., Miyanaga, M., Moritani, C., Noumi, T., Tsuchiya, T., Kanazawa, H.  
Reconstitution of the F<sub>1</sub>-ATPase activity from purified  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  and  $\delta$  or  $\epsilon$  subunits with glutathione S-transferase fused at their amino termini  
Biochimica et Biophysica Acta Bioenergetics, (1996) vol.1273, pp. 62-70
2. Kanazawa, H., Yabuki, M., Miki, J., Fudemoto, T., Ikeda, H., Noumi, T., and Shin, Y.  
Enhancement of *Escherichia coli* H<sup>+</sup>-ATPase caused by binding of monoclonal antibodies is attributed to structural changes of Leu-456 and Ser-440 in the  $\alpha$  subunit  
Archives of Biochemistry and Biophysics, (1995) vol.317, No. 2, pp.348-356
3. Moritani, C., Sawada, K., Takemoto, K., Shin, Y., Nemoto, S., Noumi, T., and Kanazawa, H.  
Interactions of the F<sub>1</sub>-ATPase subunits from *Escherichia coli* detected by the yeast two-hybrid system  
Biochimica et Biophysica Acta Bioenergetics, (1996) ( in press )
4. Shin, Y., Sawada, K., Moritani, C., Noumi, T., and Kanazawa, H.  
Subunit interactions of F<sub>1</sub>-ATPase from *Escherichia coli* : Inhibitory peptides of the  $\beta$  and  $\gamma$  subunits on *in vitro* reconstitution of the ATPase activity (投稿中)
5. Shin, Y., Fujii, Y., Moritani, C., Noumi, T., and Kanazawa, H.  
Efficient isolation of H<sup>+</sup>-ATPase mutants defective in a loop region of the  $\beta$  subunit : Application of single strand conformational polymorphisms (投稿準備中)







Inches 1 2 3 4 5 6 7 8  
cm 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19

# Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TM: Kodak



# Kodak Gray Scale



© Kodak, 2007 TM: Kodak

A 1 2 3 4 5 6 M 8 9 10 11 12 13 14 15 B 17 18 19

