

氏名	澤 田 研
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1774号
学位授与の日付	平成10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)
学位論文題目	大腸菌ATP合成酵素におけるストーク領域の構造と機能
論文審査委員	教授 金澤 浩 教授 虎谷 哲夫 教授 中西 一弘 教授 尾坂 明義 教授 土屋 友房

### 学位論文内容の要旨

ATP合成酵素は、形質膜内外に形成された $H^+$ 濃度勾配を利用して生体エネルギー源であるATPを合成する。本酵素は、生体膜内に存在し $H^+$ 輸送活性を有する3種類のサブユニットa、b、cから成る $F_0$ と5種類のサブユニット $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 、 $\delta$ 、 $\epsilon$ から成り触媒活性をもつ $F_1$ から構成され、これら両活性は共役している。触媒部位は $F_1$ 内に3カ所あり、これら触媒部位は相互に働いている。この協同性の機構には $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ が重要な役割を果たすと考えられるが、その詳細は明らかではない。又、 $F_0F_1$ 部分の連結部分は、ストークと呼ばれている。この領域は $\gamma$ 、 $\delta$ 、 $\epsilon$ とbが関わりと考えられているが、3次元的配位置及び共役機構にどのように関わるのかは明らかではない。共役機構及び触媒部位の協同性は、これら機構に関わるサブユニット間の相互作用変化が重要な働きをすると考えられる。これら機構に関わるサブユニットの空間的配置とその相互作用部位と相互作用の触媒反応と機能との関わりを解析することで共役機構及び触媒部位の協同性を理解できると考えた。(実験1) 触媒部位間の協同性を理解するためにストーク領域に存在すると考えられ、触媒部位間の協同性においても必須である $\gamma$ に注目し、 $\alpha_3\beta_3\gamma$ 複合体における $\gamma$ の $\alpha$ 又は $\beta$ との結合部位の同定を行った。方法として、 $\gamma$ を遺伝子工学的手法を用いて3種類の部分ペプチドに断片化し、これらを精製し、この部分ペプチドによる $\alpha_3\beta_3\gamma$ 複合体再構成の阻害を調べる事により相互作用領域の同定を試みた。その結果、部分ペプチドが再構成を阻害することを明らかにした。再構成の阻害によって複合体の形成がなくなること又、これらペプチドと $\alpha$ 及び $\beta$ との結合も明らかにした。これらのことから $\alpha$ 及び $\beta$ との結合に関わる $\gamma$ の領域が同定できた。(実験2) 共役機構を解明するために酵母two-hybrid法を用いてストーク領域に存在すると考えられるサブユニット間相互作用の同定を行った。その結果、ストーク領域に存在すると考えられていた $\gamma$ と $\epsilon$ 及び $\delta$ とb間に結合が存在することを明らかに出来た。これら相互作用の実態を遺伝生化学的に解析した。先ず $\gamma$ と $\epsilon$ の場合、これらサブユニット間の親和性と活性発現には逆相関関係があることが示され、 $\gamma$ と $\epsilon$ サブユニット間相互作用がATPase活性の調節に関与していると考えられた(実験3)。 $\delta$ とbの場合、 $\delta$ とb間には相互作用が存在し、 $F_0F_1$ 部分の結合に関与していることが明らかになった(実験4)。

以上の成果から本酵素のストーク領域のサブユニット間相互佐用とその機能に新たな知見を得ることが出来た。又、ペプチドを用いた再構成阻害実験系及び酵母two-hybrid法が、サブユニット相互作用の解析に有効であることを本研究により示せた。今後、これらの知見と方法は、この分野の発展に貢献するものと考えられる。

## 論文審査結果の要旨

生物のエネルギー源として必須であるATPは、ATP合成酵素によって合成される。本酵素は、生体膜内に存在し $H^+$ 輸送活性を有する3種類のサブユニットa、b、cから成る $F_0$ 部分と触媒活性をもち5種類のサブユニット $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 、 $\delta$ 、 $\epsilon$ から成る $F_1$ 部分の2つのタンパク質複合体から構成される。また、 $F_0$ の $H^+$ の輸送と $F_1$ のATPの合成・分解触媒反応は共役している。この共役機構を明らかにすることは本酵素の分子機構を解明する上で最も重要な課題と考えられている。 $F_0$ と $F_1$ の連結部分は、形態的にストークと呼ばれ $\gamma$ 、 $\delta$ 、 $\epsilon$ とbが関わると考えられている。先に述べた共役機構においては、このストーク領域に存在するサブユニット間の相互作用変化が重要な働きをすると考えられている。しかし、この領域に存在するサブユニットの3次元的配置及び共役機構との関わりの実態は明らかではない。本研究では、ストーク領域に存在すると考えられるサブユニットに注目し、その空間的配置とサブユニットの相互作用部位と相互作用の触媒反応との関わりを明らかにし、共役機構の実態を明らかにする事を目的とした。相互作用部位は、アミノ酸残基レベルでの解析を目指し、それに必要な新たな方法の確立も目指した。

異なる2つのタンパク質の相互作用を検出する方法として報告されている酵母two-hybrid法を用いてストーク領域に存在すると考えられるサブユニット間相互作用の同定を行った。その結果、ストーク領域の構造として $\delta$ -b、 $\gamma$ - $\epsilon$ の相互作用が重要であることを初めて明らかにした。この方法を用いて検出した $\gamma$ - $\epsilon$ サブユニット間相互作用をアミノ酸残基レベルで明らかにするため $\gamma$ サブユニットの $\epsilon$ との相互作用異常変異株を単離し異常残基の決定により相互作用部位を見いだした。次に、明らかになった相互作用残基を部位特異的変異導入法を用いて様々なアミノ酸残基に置換し相互作用に関わる残基の性質を検討した。更にこれら変異が本酵素全体に及ぼす効果を解析し相互作用の機能的な実体を解明した。又、変異した $\gamma$ を単離しin vitro再構成系に導入しその相互作用の機能との関わりを解明した。以上の成果として、 $\gamma$ - $\epsilon$ は単なる複合体ではなくおそらく回転或いは触媒部位と連携して機能制御をしている可能性を初めて明らかにした。

以上のように本研究では新たな手法を導入してATP合成酵素の共役機構において重要な働きをするストーク領域に新知見をもたらした。研究成果は、190頁からなる博士論文としてまとめられ、その一部はすでに4編の英文論文として発表されている。よって、本審査会は本論文を博士(工学)の学位を授与するに値するものと認める。