



|              |   |
|--------------|---|
| Title        | REACTION MECHANISM OF F <sub>1</sub> -ATPASE  |
| Author(s)    | Matsuoka, Ichiro  |
| Citation     | 大阪大学, 1982, 博士論文  |
| Version Type | VoR   |
| URL          | <a href="https://hdl.handle.net/11094/27705">https://hdl.handle.net/11094/27705</a> |
| rights       |   |
| Note         |   |

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

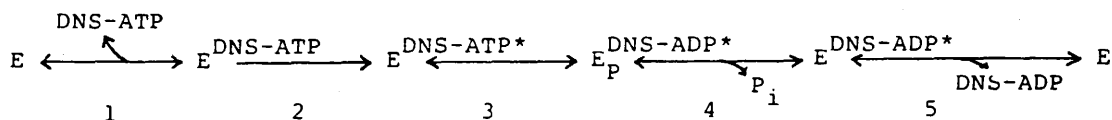
The University of Osaka

|         |                                      |         |         |         |
|---------|--------------------------------------|---------|---------|---------|
| 氏名・(本籍) | まつ<br>松                              | おか<br>岡 | いち<br>一 | ろう<br>郎 |
| 学位の種類   | 理                                    | 学       | 博       | 士       |
| 学位記番号   | 第                                    | 5       | 5       | 94号     |
| 学位授与の日付 | 昭和57年3月25日                           |         |         |         |
| 学位授与の要件 | 理学研究科 生物化学専攻<br>学位規則第5条第1項該当         |         |         |         |
| 学位論文題目  | F <sub>1</sub> -ATPase の反応機構         |         |         |         |
| 論文審査委員  | (主査)<br>教授 殿村 雄治<br>教授 松原 央 教授 堀尾 武一 |         |         |         |

## 論文内容の要旨

F<sub>1</sub>-F<sub>0</sub>複合体はミトコンドリア、葉緑体、あるいは細菌形質膜におけるATP合成の共役因子である。膜から容易に可溶化されるF<sub>1</sub>部分は $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ , および $\epsilon$ の5種のサブユニットから成り、ATP合成およびATP加水分解の活性中心を含んでいる。本研究の目的は、ATPの蛍光性アナログ、2'-(5-dimethylaminonaphthalene-1-sulfonyl) amino-2'-deoxyATP (DNS-ATP) を用いてF<sub>1</sub>-ATPaseの反応機構を明らかにすること、ならびにF<sub>1</sub>の各サブユニットのATPaseにおける役割を明らかにすることである。なお材料として牛心臓ミトコンドリアより精製したF<sub>1</sub> および大腸菌より精製したF<sub>1</sub> (EF<sub>1</sub>)を用いた。

Mg<sup>2+</sup>存在下で、2モルのDNS-ATPが1モルのF<sub>1</sub>に結合し520nmにおける蛍光強度は4.8倍に増大した。蛍光増大の初速度、V<sub>r</sub>のDNS-ATP濃度依存性はMichaelis-Menten式に従い、K<sub>f</sub>は3.3  $\mu$ M(step 1), V<sub>r</sub>は0.34s<sup>-1</sup> (step 2)であった。蛍光増大に続いてF<sub>1</sub>モルあたり2モルのTCA-Pi (反応をTCAで停止した時に生ずるPi)の初期突発が起こった(step 3)。これに遅れてF<sub>1</sub>よりのPi遊離が観察された(step 4)。蛍光強度の減少よりみたDNS-ADPの遊離は非常に遅かった。(step 5)。以上の結果より、DNS-ATPは次の機構で加水分解されると結論された：



この反応機構はミオシンATPaseのそれとよく似ている。

$F_1$ -DNS-ヌクレオチド複合体に過剰量の ATP などのヌクレオチドを加えると、TCA-Piの放出 (step 3), Piの遊離 (step 4), およびDNS-ADP の遊離 (step 5) が著しく促進された。このことは、ATP などのヌクレオチドは $F_1$ 上の低親和性制御部位に結合して高親和性触媒部位の構造変化を引き起こし上起の各反応ステップを促進することを示唆する。

$Mg^{2+}$ 存在下で、1モルの $EF_1$ は3モルのDNS-ATPを結合し、 $F_1$ の場合と同様なDNS-ATPの蛍光変化、加水分解、およびATPによるDNS-ヌクレオチドの遊離の促進が観察された。

Dicyclohexylcarbodiimide (DCCD) により $EF_1$ の $\beta$ サブユニットを化学修飾すると、ATP による $EF_1$ からのDNS-ヌクレオチドの遊離の促進および定常状態における $EF_1$ -ATPase が著しく阻害された。しかし、DCCDによる修飾によって、DNS-ATPの $EF_1$ への結合による蛍光強度増大およびDNS-ATP分解の1ターンオーバーはほとんど阻害されなかった。 $Mg^{2+}$ 存在下で、約1モルのDNS-ATPが $EF_1$ より単離された1モルの $\alpha$ サブユニットに解離定数、約 $0.1\mu M$ で結合した。結合に伴って520nmでのDNS-ATPの蛍光強度は1.55倍に増大した。しかし、 $\beta$ サブユニットはDNS-ATPの蛍光強度を変化させなかった。

$\alpha$ ,  $\beta$ , および $\gamma$ サブユニットより再構成される $EF_1$ -ATPaseとDNS-ATPとの反応による蛍光変化の速度論的性質はもとの $EF_1$ とDNS-ATPとの反応によるそれとよく似ていた。

これらの結果は、 $F_1$ にそれぞれ2, または3個存在する $\alpha$ および $\beta$ サブユニットのうち、 $\alpha$ サブユニットには高親和性触媒部位が、 $\beta$ サブユニットには低親和性制御部位がそれぞれ存在することを強く示唆する。

## 論文の審査結果の要旨

ミトコンドリア、葉緑体および細菌形質膜の $F_1$ - $F_0$ 複合体は、ATP合成の共役因子であり、その構造と機能についてはすでに数多くの研究がなされている。特に、膜から可溶化される $F_1$ はATP合成およびATP加水分解の活性中心を含んでおり、近年その構造解析が著しく進展した。しかし、 $F_1$ が触媒するATPaseの反応機構はほとんど明らかにされていなかった。松岡君の研究は蛍光性ATPアナログ、dansyl ATP, を用いて $F_1$ -ATPaseの素反応段階を明らかにし、さらに、ヌクレオチドによる $F_1$ -ATPase反応の調節機構を解明したものである。

すなわち、松岡君は $F_1$ とdansyl ATPの反応による蛍光増大、Piおよびdansyl ADPの遊離の時間経過を同時に測定し、looseな酵素-基質結合体がまず形成され、それがtightな結合体に変化した後、酵素-生成物結合体になり、それからPiとdansyl ADPが順次に遊離することを見出した。この反応機構は、興味あることに筋収縮に関与しているミオシンATPaseのそれと全く同じであった。次に松岡君は $F_1$ 上に存在する低親和性の部位に種々のヌクレオチドが結合することによって $F_1$ -ATPaseの触媒部位のコンホメーションが変化し、tightな酵素-基質結合体から生成物遊離に至る段階が著明な促進を受けることを示した。さらに、 $F_1$ を構成している種々のサブユニットとdansyl

ATPの反応を調べ、ATPaseの触媒部位は $\alpha$ サブユニットに、低親和性の調節部位は $\beta$ サブユニットに存在することを強く示唆する結果を得た。

以上のように、松岡君の業績は従来不明であった $F_1$ -ATPaseの素反応段階を明らかにし、ヌクレオチドによる調節機構について新しい知見を加え、触媒部位と調節部位のサブユニット上における局在を明らかにしたものであり、生体エネルギー論の分野に大きく貢献するものといえる。従って、理学博士の学位論文として十分に価値あるものと認める。