



|              |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
|--------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Title        | 高度好塩菌ハロバクテリウムハロビウムのATPase                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| Author(s)    | 難波, 敏彦                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| Citation     | 大阪大学, 1985, 博士論文                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| Version Type |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| URL          | <a href="https://hdl.handle.net/11094/34606">https://hdl.handle.net/11094/34606</a>                                                                                                                                                                                                                                                         |
| rights       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| Note         | 著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">＜a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"&gt;https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> >大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">&lt;/a&gt;</a> をご参照ください。 |

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

|         |                                  |         |         |                 |
|---------|----------------------------------|---------|---------|-----------------|
| 氏名・（本籍） | なん<br>難                          | ば<br>波  | とし<br>敏 | ひと<br>彦         |
| 学位の種類   | 理                                | 学       | 博       | 士               |
| 学位記番号   | 第                                | 6 7 8 6 | 号       |                 |
| 学位授与の日付 | 昭和 60 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  | 高度好塩菌ハロバクテリウムハロビウムのATPase        |         |         |                 |
| 論文審査委員  | (主査)                             |         |         |                 |
|         | 教授 濱口 浩三                         |         |         |                 |
|         | (副査)                             |         |         |                 |
|         | 教授                               | 松原 央    | 教授      | 堀尾 武一 助教授 向畑 恭男 |

### 論文内容の要旨

*H. halobium* は 4 ~ 5 M NaCl 中で育成する細菌であり、バクテリオロドプシンおよびハロロドプシンを介し、緑色植物とは異なる特徴的な光エネルギー変換を行なっている。私は本菌が光照射時に行う ATP 合成反応を触媒しているであろう酵素を探索した。

F<sub>0</sub>-F<sub>1</sub> ATPase は従来知られている生物全てでの ATP 合成酵素であり、共通な構造、性質を持っている。しかし、膜タンパクの SDS-PAGE による分析、[<sup>14</sup>C] DCCD を用いた細胞膜の標識等の実験より本菌には F<sub>0</sub>-F<sub>1</sub> ATPase に共通なサブユニット構造を持つタンパクは存在しない事が示唆された。

一方、細胞膜を EDTA・アルカリ溶液で抽出した物の中には ATPase 活性が見い出され、これを (ATPase I と命名) を、全操作 1 M 以上の硫酸塩存在下に精製を行った。精製酵素は 8.6 万と 6.4 万の 2 種のサブユニットからなり、ネイティブ分子量は 32 万であり、2 種のサブユニット 2 対からなる四量体と想像される。活性の至適 pH は 5.8 で二価金属は Mn<sup>2+</sup> が最も効果的で、Mg<sup>2+</sup> はその 30% であった。飽和に近い Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> や Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> 中で活性は大きく、KCl や NaCl 中では低かった。硫酸塩中では酵素は安定であるが、4 M NaCl 中で特に低温では失活が早く、塩を含まない液にさらすとただちに活性は消失した。ADP は酵素を阻害し、その K<sub>i</sub> は 80 μM で ATP の K<sub>m</sub>, 1.5 mM に比べ小さかった。本酵素はサブユニット構造などで F<sub>1</sub> ATPase と異なる性質を持つものの、細胞膜の内側に局在する事、ATPase 反応時にリン酸化中間体が検出されない事を含め、その性質はよく F<sub>1</sub> ATPase に類似しており、*H. halobium* の細胞膜中で、F<sub>1</sub>-ATPase に同様な機能果している可能性が強い。

また、ATPase I の研究途上、他三種の ATP 加水分解酵素を同定し、その性質を調べた。それらは、細胞膜の外側に結合し、AMP, ADP, ATP を水解する 5'-ヌクレオチダーゼ、可溶性分画から得られる、

ADD, ATPを水解するアピラーゼ, そしてATPase Iとは異なる可溶性のATPase (ATPase IIと命名) であった。これらはATP合成酵素に合致する性質は持っていなかった。これらは, おのおのが活性および安定性に対し, 特徴的な一価塩の要求性を示した。

## 論文の審査結果の要旨

難波敏彦君は, 高度好塩菌*H. halobium*が光照射時に行なうATP合成反応を触媒していると考えられる酵素を単離し, その諸性質を検討した。

まず, *H. halobium* の細胞膜蛋白質を界面活性剤で分離後, SDS電気泳動で分析したが,  $F_1$  ATPase のサブユニットである $\alpha$ ,  $\beta$ に相当するバンドが見い出せなかった。

細胞膜からEDTAと含むアルカリ溶液で抽出されるもののなかにATPase活性が見い出され, すべての操作を1 M以上の硫酸塩の存在下でATPaseを精製することができた。えられた精製酵素は分子量86万と6.4万の2種のサブユニット2対から成る4量体であると推定された。活性の至適pHは5.8, 二価金属が活性に必須で,  $Mn^{2+}$  がもっとも効果的であった。また, 活性は飽和に近い $Na_2SO_3$ や $Na_2SO_4$ 中で高く,  $NaCl$ ,  $KCl$ 中では低く, 4 M  $NaCl$ 中でも低温では速く失活した。この失活はサブユニットへの解離によるものであった。また, このATPaseは細胞膜の内側に局在していることも示された。〔 $\gamma$ - $^{32}P$ ] ATPを用いた実験では, 本酵素は共有結合リン酸化中間体を検出することができなかった。

以上述べたように, 難波君の精製したATPaseはこれまで報告されている $F_0$ - $F_1$  ATP合成酵素とサブユニット構造は異なるが, 他の多くの点で $F_0$ - $F_1$  ATPaseに類似の性質をもつ珍しい酵素であり, この酵素が*H. halobium*細胞膜で $F_1$  ATPaseに相同な機能を果している可能性の大きいことを指摘したものであり, 理学博士の学位論文として十分価値あるものと認める。