



Title	Structure and Function of Membrane-Bound ATPase from Methanosa
Author(s)	稻富, 健一
Citation	大阪大学, 1990, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/36786">https://hdl.handle.net/11094/36786</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">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> 大阪大学の博士論文について

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

氏名・(本籍)	いな 稻	とみ 富	けん 健	いち 一
学位の種類	工	学	博	士
学位記番号	第	8 9 8 4	号	
学位授与の日付	平成 2 年 2 月 28 日			
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 2 項該当			
学位論文題目	Structure and Function of Membrane-Bound ATPase from <i>Methanosarcina barkeri</i> ( <i>Methanosarcina barkeri</i> 膜結合 ATPase の構造と機能)			
(主査)				
論文審査委員 教授	二井 将光			
教 授 吉田 敏臣		教 授 岡田 弘輔		教 授 今中 忠行
教 授 大嶋 泰治		教 授 菅 健一		教 教 山田 靖宙
教 授 高野 光男				

### 論文内容の要旨

メタン細菌は環境処理微生物として重要な役割を果たしている絶対嫌気性の独立栄養細菌であり、高度好塩菌や好熱・好酸菌とともに古細菌に分類されている。メタン細菌 *Methanosarcina barkeri* の懸濁液の pH を人工的にシフトさせることにより合成される ATP は、ATP 合成酵素 ( $F_0 F_1$ -ATPase) の特異的阻害剤ジシクロヘキシカルボジイミド (DCCD) によって阻害される。従って、*M. barkeri* 細胞膜には、ミトコンドリア、大腸菌細胞膜等と同様の  $F_0 F_1$ -ATPase が存在すると考えられていた。本研究の開始以前には、メタン細菌の膜画分に存在する ATPase 活性の詳細な解析、酵素の精製や構造についての研究は皆無であった。本研究では初めてメタン細菌から膜結合 ATPase を精製しそのサブユニット組成を明らかにした。さらに主要サブユニットの遺伝子をクローニングし、DNA の塩基配列を決定し、サブユニット蛋白の一次構造を推定した。加えて、メタン細菌の ATPase を他の ATPase と詳細に比較した。本論文は以上の研究をまとめたものであり、六章から成っている。

第一章では古細菌、メタン細菌、 $H^+$ -ATPase について現在までの知見をまとめた。

第二章では *M. barkeri* の膜画分に存在する ATPase の性質を検討し膜表在性部分の ATPase を精製してそのサブユニット組成を解析した。その結果、膜画分の ATPase 活性は  $F_0 F_1$ -ATPase と同じく DCCD で阻害されること、精製した ATPase は  $\alpha$  (62 kDa) と  $\beta$  (49 kDa) の二つのサブユニットから構成されており、 $F_0 F_1$ -ATPase と比較して簡単な構造をもっていることが明らかになった。

第三章では界面活性剤によって膜内在性部分も含めた ATPase 複合体を可溶化精製した。その結果、精製酵素は  $\alpha$  と  $\beta$  サブユニットに加えて 40, 27, 23, 6 kDa の蛋白を含んでおり、この中の 6 kDa が DCCD を結合するサブユニットであることを同定した。

第四章では、触媒活性を持つ膜表在性部分 ( $\alpha\beta$ 複合体) の  $\alpha$  と  $\beta$  サブユニットをそれぞれ単離し、両サブユニット及び  $\alpha\beta$  複合体をヌクレオチド存在下にトリプシンで分解し、トリプシン感受性に対するヌクレオチドの影響を解析した。その結果、 $\alpha$  サブユニットにヌクレオチド結合部位が存在することが示唆された。

第五章では *M. barkeri* の遺伝子ライブラリーを作製し、 $\alpha$  と  $\beta$  サブユニットの遺伝子 (*atp A* と *atp B*) をクローニングし DNA 塩基配列を決定し両サブユニットの一次構造を明らかにした。その結果、 $\alpha$  サブユニットには、他のヌクレオチド結合蛋白によく保存されている共通配列 (GXXXXGKT/S) が存在し、 $\alpha$  サブユニットに触媒部位が存在することが示唆された。さらに両サブユニットのアミノ酸配列を他の ATPase と比較した結果、メタン細菌の ATPase は  $F_0F_1$ -ATPase よりむしろ真核生物の液胞膜 ATPase と類似した構造を持つことが明らかになった。

第六章ではメタン細菌 ATPase の性質や構造を他の ATPase と比較し、 $H^+$  を輸送する ATPase の進化について考察した。その結果メタン細菌 ATPase、液胞膜 ATPase 及び  $F_0F_1$ -ATPase が共通の祖先蛋白から進化してきたことが示唆された。これらの結果をもとに  $H^+$ -ATPase の進化系統樹を提案した。

## 論文の審査結果の要旨

本論文は、古細菌に分類されているメタン細菌 *Methanosaerina barkeri* の ATP合成酵素 (ATPase) について系統的に研究を行ったものであり、メタン細菌の遺伝子工学的研究の先鞭をつけたものである。主な成果を要約すると以下のとおりである。

- (1) *M. barkeri* の細胞膜に存在する ATPase の性質を検討した後、膜表在性部分を精製し、 $\alpha$  と  $\beta$  の 2 種のサブユニットからなること、 $\alpha$  サブユニットにヌクレオチド結合部位があることを明らかにしている。
- (2) *M. barkeri* の細胞膜より、膜内在性部分をもつ ATPase 複合体を可溶化、精製している。これにより膜内在性サブユニットを明らかにしている。
- (3) *M. barkeri* の遺伝子ライブラリーを作製し、 $\alpha$  と  $\beta$  サブユニットの遺伝子をクローニングし、全塩基配列を決定し、両サブユニットの一次構造を明らかにしている。その結果、*M. barkeri* ATPase は真核細胞液胞膜 ATPase によく似ていることを示している。さらに、ATPase の進化に対し有力な仮説を提出している。

以上の成果は、メタン細菌のエネルギー転換機構についての重要な発見であり、この菌の進化と ATPase の起源に対して全く新しい考え方を示したものである。環境処理微生物として重要な細菌であるメタン細菌におけるこの発見は、先駆性の高いものである。したがって、本論文は博士論文として価値あるものと認める。