



Title	Regulatory Mechanism of the Mitochondrial ATP Synthase by an Intrinsic ATPase Inhibitor and Its Stabilizing Factors
Author(s)	市川, 直樹
Citation	大阪大学, 1991, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/37235
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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

【14】

氏名・(本籍)	いち 市	かわ 川	なお 直	き 樹
学位の種類	理	学	博	士
学位記番号	第	9 6 4 0	号	
学位授与の日付	平成 3 年 3 月 26 日			
学位授与の要件	理学研究科 生物化学専攻 学位規則第 5 条第 1 項該当			
学位論文題目	Regulatory Mechanism of the Mitochondrial ATP Synthase by an Intrinsic ATPase Inhibitor and Its Stabilizing Factors (ミトコンドリアATP合成酵素の活性調節蛋白とその作用機構)			
論文審査委員	(主査) 教授	田川 邦夫		
	(副査) 教授	松原 央	教授	二井 将光

論 文 内 容 の 要 旨

ミトコンドリアのATP合成酵素 (F_1F_0 -ATPase) は内在性のインヒビター蛋白とその安定化因子, 9 K蛋白, 15K蛋白によって活性調節がなされている。本研究では, これらの蛋白による活性調節のメカニズムを明らかにすることを目的とし, 酵母を実験材料にもちいて, ①インヒビター蛋白と9 K蛋白の欠損株の作成, ならびに②両蛋白の F_1 上の結合部位の同定を行なった。

まず欠損株作成のためにインヒビター蛋白の遺伝子 (*INH1*) を合成ヌクレオチドプローブをもちいてクローン化し, その一次構造を決定した。そしてこの蛋白の前駆体はN末端側に22アミノ酸残基からなるミトコンドリアへの移行シグナルをもつことを明らかにした。次にクローン化されたインヒビター蛋白と9 K蛋白の遺伝子を *in vitro* で破壊後, 酵母染色体上の正常な遺伝子と置換させ, これらの蛋白の欠損株を作成した。得られた欠損株はサザン法にて遺伝子の破壊を, イムノブロット法にてインヒビター蛋白と9 K蛋白の欠損を確認できた。いずれの欠損株も非発酵性培地で正常に生育し, また単離したミトコンドリアの酸化的リン酸化反応も正常なことから, インヒビター蛋白, 9 K蛋白ともにATP合成反応には直接関与しないことが明らかになった。しかし, インヒビター蛋白欠損株のミトコンドリアでは, 脱共役剤の添加によりATPが急速に分解されたことから, インヒビター蛋白はミトコンドリア内膜の電気化学ポテンシャル差が消失した時に F_1F_0 -ATPase に結合し, 酵素自体によるATPの浪費を抑制する作用をもつことが明らかになった。

つづいてインヒビター蛋白と9 K蛋白の結合部位を, 架橋剤である *N*-ethoxycarbonyl-2-ethoxy-1, 2-dihydroquinoline 及び 1-ethyl-3-(3-(dimethylamino) propyl)-3-ethyl-carbodiimide をもちいて F_1 上に位置づけた。インヒビター蛋白- F_1 複合体を架橋した後, イムノブロット法

にて解析したところ、インヒビター蛋白は F_1 の α および β サブユニットと架橋されることがわかり、インヒビターの結合部位は両サブユニットの境界面に存在することが示された。9 K蛋白についても同様な結果が得られ、両蛋白の結合部位は同一であることが示唆された。さらに β モノマー及びインヒビター蛋白を架橋した β を70%酸で分解後、ペプチドマッピングを行なったところ、 β サブユニットのPro 334-Asp363の領域がインヒビター蛋白と架橋されていることがわかった。この領域はATPアナログで修飾され、触媒部位近傍に位置するとされる残基を含んでおり、インヒビター蛋白は F_1 -ATPaseの触媒部位付近と相互作用することが示された。

論文審査の結果の要旨

ミトコンドリアの F_1F_0 -ATPaseの内在性インヒビター蛋白は1963年ウシ心筋から見いだされ、活性調節因子としての役割が示唆された。しかし、インヒビター蛋白は精製された F_1F_0 -ATPaseの標品にはふくまれず、細菌類の F_1F_0 -ATPaseにも同様な蛋白が存在しないことが示されたため、その*in situ*での作用については長らく疑問視されてきた。その後、種々の生物からのインヒビター蛋白の構造が決定されるとともに、インヒビター蛋白の作用を安定化する2つの因子、9 K蛋白と15 K蛋白が発見され、これらの因子を含めたATPaseの活性調節モデルが示されるなどの研究がつついたが、各因子の生体内での作用は依然未解決の問題であった。本研究では、インヒビター蛋白および9 K蛋白を欠損した酵母変異株を作成し、その性質を研究することにより各因子の生理的な作用を明確にしようとした。その結果、ATPaseインヒビターを欠損したミトコンドリアでは脱共役剤の添加により強いATP分解活性が誘導されることが示され、インヒビター蛋白はミトコンドリア内膜の電気化学ポテンシャル差が消失した時に F_1F_0 -ATPaseに作用し、同酵素によるATPの浪費を抑制する役割をもつことが明らかにされた。

インヒビター蛋白とその安定化因子による F_1F_0 -ATPaseの調節機構を知る上で、これら因子の結合部位の情報が重要である。本研究では架橋剤を用いてインヒビター蛋白と9 K蛋白の結合部位の同定が行なわれた。そして、両蛋白の結合部位はともに F_1 -ATPaseの α サブユニットと β サブユニットの間に存在すること、インヒビター蛋白の結合部位はATPaseの触媒部位付近にあることが示された。 F_1 -ATPaseによるATP分解反応は3つのステップからなり、ATPase上の3つの触媒部位が常にこの3ステップを位相をずらして反応を進行させているというBinding change説が提唱されている。この説によれば、反応の進行は、1つの触媒部位におけるATPの結合が隣の部位におけるADPの解離を促すというふうに、各触媒部位間の強い協調性に頼っている。本研究で得られた結果は、インヒビター蛋白がATPaseの触媒部位の1つを覆い、触媒部位の間の協調性を阻害する可能性を示しており、このBinding change説に強い指示を与えるとともにATP合成反応の機構の解明にも新しい手がかりを与えたと言える。

以上、本研究は F_1F_0 -ATPaseの活性調節機構に関し、新しい知見を加えたものとして意義深く、よって本論文を理学博士の学位論文として十分の価値のあるものと認める。