The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	大腸菌ATP合成酵素 : βサブユニットの触媒部位 Glycine-rich Sequence の遺伝生化学的解析
Author(s)	岩本, 昌子
Citation	大阪大学, 1992, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.11501/3087925
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

大腸菌ＡＴＰ合成酵素：βサブユニットの触媒部位 Glycine-rich Sequence の遺伝生化学的解析

大阪大学大学院工学研究科
醗酵工学専攻

岩本昌子

１９９１年度

目次

発表論文 ---------- 1
略号 ---------- 2
第 1 章　序論
第 1 節　ATP 合成酵素の役割 ---------- 3
第 2 節　F_0F_1-ATPase のサブユニット構成と遺伝子 ---------- 6
第 3 節　触媒部位の位置 ---------- 9
第 4 節　H^+ の輸送と、ATP の合成・分解との共役の機構 ---------- 10
第 5 節　本研究の目的 ---------- 12
第 6 節　要約 ---------- 12

第 2 章　F_0F_1 の大量発現株（DK8/pBWU13）の作製
第 1 節　緒論 ---------- 14
第 2 節　実験方法と試薬
1. 菌株と培養条件 ---------- 14
2. 用いた組換えプラスミド ---------- 15
3. pBMUD13-AdK の作製 ---------- 17
4. 野生型の F_0F_1 を発現するプラスミド pBWU13 の作製 ---------- 17
5. 大腸菌の反転膜小胞の調製、および ATPase 活性の測定 ---------- 19
6. 反転膜小胞への H^+ 輸送活性の測定 ---------- 20
7. その他の方法と試薬 ---------- 20
第 3 節　結果と考察
1. DK8/pBWU13 株の性状 ---------- 21
2. コハク酸培地における生育速度 ---------- 21
3. F_1 の部分精製 ---------- 25
第 4 節　まとめ ---------- 27

第 3 章　βサブユニットの glycine-rich sequence に含まれる βGly149、βGly150 と βSer174残基との相互作用
第 1 節　緒論 ---------- 28
第 2 節　実験方法
1. 菌株と培養条件 ---------- 29

2. 復帰変異株のβサブユニット遺伝子のクローン化 ---------- 29
3. 変異残基の同定 ---------- 31
4. βサブユニット遺伝子に変異を持つ
F_0F_1 発現プラスミドの構築 ---------- 31
5. その他の方法と試薬 ---------- 32
第 3 節　結果と考察
1. 復帰変異株 RE17 の、第二の変異部位の決定 ---------- 32
2. 復帰変異株 RE17 (βGly149/βPhe174) の性状 ---------- 35
3. F_0F_1 を発現するプラスミドを用いたβSer149/βPhe174、
およびβSer150/βPhe174 変異の解析 ---------- 35
4. βGly149、βGly150 および βSer174 残基の変異が、
ATPase活性の Mg^{2+}および Ca^{2+} 依存性に及ぼす効果 ---------- 39
5. 変異酵素および野生型酵素のアジ化ナトリウムに
対する感受性 ---------- 41
第 4 節　まとめ ---------- 43

第 4 章　ATP のリン酸基の近傍にあるβVal198 - βLys201 の領域
第 1 節　緒論 ---------- 44
第 2 節　実験方法
1. 菌株と培養条件 ---------- 45
2. 用いた組換えプラスミド ---------- 45
3. polymerase chain reaction (PCR) を用いた領域特異的な
変異導入 ---------- 45
4. 抑圧変異のスクリーニング ---------- 46
5. その他の方法と試薬 ---------- 46
第 3 節　結果と考察
1. βAla149、βCys149、βThr149 変異の
酵素活性に及ぼす効果 ---------- 47
2. βSer174→Phe 変異を抑圧する βGly149 の変異 ---------- 47
3. PCR による領域特異的な変異導入と、抑圧変異の
スクリーニング ---------- 51
4. 基質の結合に関与し得る残基と領域 ---------- 53
5. βサブユニットの高次構造予測 ---------- 55
第 4 節　まとめ ---------- 57

第 5 章　γサブユニットのカルボキシル末端領域（γGln269 - γVal286）の機能
第 1 節　緒論 ---------- 59
第 2 節　実験方法
1. 菌株と培養条件 ---------- 60
2. 野生型およびカルボキシル末端から 4、10、18 残基
欠失したγサブユニットを発現するプラスミド ---------- 60
3. γサブユニットのカルボキシル末端領域へのアミノ酸
置換変異およびフレームシフト変異の導入 ---------- 63
4. 酵素活性への DCCD の影響 ---------- 63
5. その他の方法と試薬 ---------- 64
第 3 節　結果と考察
1. カルボキシル末端より 4 残基、10 残基、18 残基が
欠失したγサブユニットをもつ F_0F_1 の活性 ---------- 64
2. 酸化的リン酸化（ATP 合成）活性に対するγサブユニット
変異の影響 ---------- 66
3. 変異γサブユニットを含む F_1 の分子集合 ---------- 66
4. γサブユニット変異による ATPase 活性の低下 ---------- 69
5. ATP 加水分解と H^+ 輸送の共役 ---------- 69
6. F_1 と F_0 の分子集合に対する変異γサブユニットの効果 ----- 72
7. γサブユニット変異がアジ化ナトリウム感受性に
及ぼす効果 ---------- 74
8. カルボキシル末端領域の二次構造予測 ---------- 74
第 4 節　まとめ ---------- 75

第 6 章　総括と展望 ---------- 77

参考文献 ---------- 82
謝辞 ---------- 92

発表論文（本研究の結果を発表した原著論文）

1. Atsuko Iwamoto, Junji Miki, Masatomo Maeda, and Masamitsu Futai (1990)

   H^+-ATPase γ subunit of *Escherichia coli*. Role of the conserved carboxyl-terminal region.

   J. Biol. Chem. **265**, 5043-5048

2. Naohiro Inohara, Atsuko Iwamoto, Yoshinori Moriyama, Shoji Shimomura, Masatomo Maeda, and Masamitsu Futai (1991)

   Two genes, *atpC1* and *atpC2*, for the γ subunit of *Arabidopsis thaliana* chloroplast ATP synthase.

   J. Biol. Chem. **266**, 7333-7338

3. Atsuko Iwamoto, Hiroshi Omote, Hironori Hanada, Nobuo Tomioka, Akiko Itai, Masatomo Maeda, and Masamitsu Futai (1991)

   Mutations in Ser^{174} and the glycine-rich sequence (Gly^{149}, Gly^{150} and Thr^{156}) in the β subunit of *Eschericha coli* H^+-ATPase.

   J. Biol. Chem. **266**, 16350-16355

4. Yoshinori Moriyama, Atsuko Iwamoto, Masatomo Maeda, and Masamitsu Futai (1991)

   One-step purification of *Escherichia coli* H^+-ATPase (F_0F_1) and its reconstitution into liposomes with neurotransmitter transporters.

   J. Biol. Chem. **266**, 22141-22146

略号

ADP	adenosine 5'-diphosphate
ATP	adenosine 5'-triphosphate
ATPase	adenosine triphosphatase
bp	base pairs
BSA	bovine serum albumin
CCCP	carbonylcyanide-m-chlorophenylhydrazone
DCCD	dicyclohexyl carbodiimide
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
kDa	kilo daltone
OD	optical density
SDS	sodium dodecyl sulfate
SSC	standard saline citrate
Tricine	Tris(hydroxymethyl)methylglycine
Tris	N,N'-tris(hydroxylmethyl)aminomethane

アミノ酸残基は 1 文字または 3 文字で以下のように記した。

glycine	G	Gly	glutamine	Q	Gln
alanine	A	Ala	lysine	K	Lys
valine	V	Val	arginine	R	Arg
leucine	L	Leu	cysteine	C	Cys
isoleucine	I	Ile	methionine	M	Met
serine	S	Ser	phenylalanine	F	Phe
threonine	T	Thr	tyrosine	Y	Tyr
aspartic acid	D	Asp	tryptophan	W	Trp
asparagine	N	Asn	histidine	H	His
glutamic acid	E	Glu	proline	P	Pro

第 1 章　序論

第 1 節　ATP 合成酵素の役割

ATP 合成酵素は、細菌では細胞膜に、真核生物ではミトコンドリアの内膜また植物の葉緑体チラコイド膜に存在しており、H^+ の電気化学的ポテンシャル差を駆動力とし、ADP と 無機リン酸（Pi）から ATP を合成している（1-3）。H^+ の電気化学的ポテンシャル差、$\Delta\tilde{\mu}H^+$ は、

$$\Delta\tilde{\mu}H^+ = F\Delta\psi - 2.3RT\Delta pH$$

（$\Delta\psi$，膜電位；ΔpH，膜内外の pH 差；F，ファラデー定数；R，気体定数；T，絶対温度）

で表わされる。細菌の場合には、細胞膜に存在する呼吸鎖が、NADH やコハク酸を酸化する過程で、H^+ を細胞膜の外側に輸送し$\Delta\tilde{\mu}H^+$ を形成する。 $\Delta\tilde{\mu}H^+$ は、ATP 合成酵素によって生体で利用しやすい ATP の形に変換される。NADH やコハク酸の酸化より ATP 合成に至る過程は、酸化的リン酸化と呼ばれている。ミトコンドリアの内膜でも同様の機構で酸化的リン酸化が行われている。また、植物は、光のエネルギーを利用して、チラコイドの内外に H^+ の電気化学的ポテンシャル差を作り出し ATP 合成の駆動力としている。この全過程は光リン酸化と呼ばれる。いずれの場合にも、最終的に $\Delta\tilde{\mu}H^+$ を駆動力として ADP と無機リン酸（Pi）から ATP を合成するのは、それぞれの膜系に存在する ATP 合成酵素である（図1-1）。 ATP 合成酵素は、反応の可逆性から F_0F_1-ATPase（または F_0F_1）とも呼ばれている。

酸化的リン酸化あるいは光リン酸化によって生産された ATP は、あらゆる生物のさまざまな細胞活動に使われている。 F_0F_1-ATPase は可逆的な酵素であり、ATP を加水分解したエネルギーによって H^+ を能動輸送することができる。そのために、H^+-ATPaseと呼ばれることもある。 呼吸鎖（電子伝達系）のない嫌気性菌 *Streptococcus lactis* では、細胞膜に存在する F_0F_1-ATPase が、ATP を加水分解して $\Delta\tilde{\mu}H^+$ を形成する（4，5）。これと共役して、栄養物質やイオンの取り込みなどの物質輸送、鞭毛の回転などが行われる。すなわち、このような菌では、F_0F_1-ATPase は H^+-ATPase としてのみ機能している。

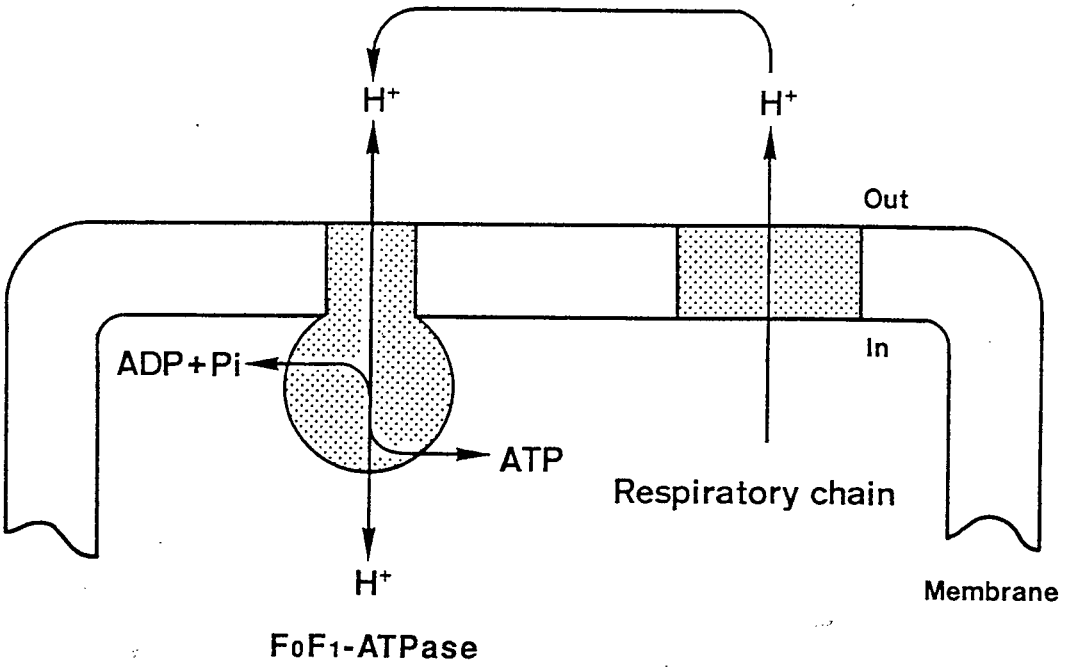


図 1-1　大腸菌細胞膜の模式図。

大腸菌細胞膜に存在する呼吸鎖によって、Δ $\tilde{\mu}$H+ が形成される。これを駆動力として、ATP 合成酵素（F_oF_1-ATPase）が、ADP と 無機リン酸（Pi）より ATP を合成する。この基本的な反応機構は、ミトコンドリア、葉緑体（チラコイド）においても見られる。

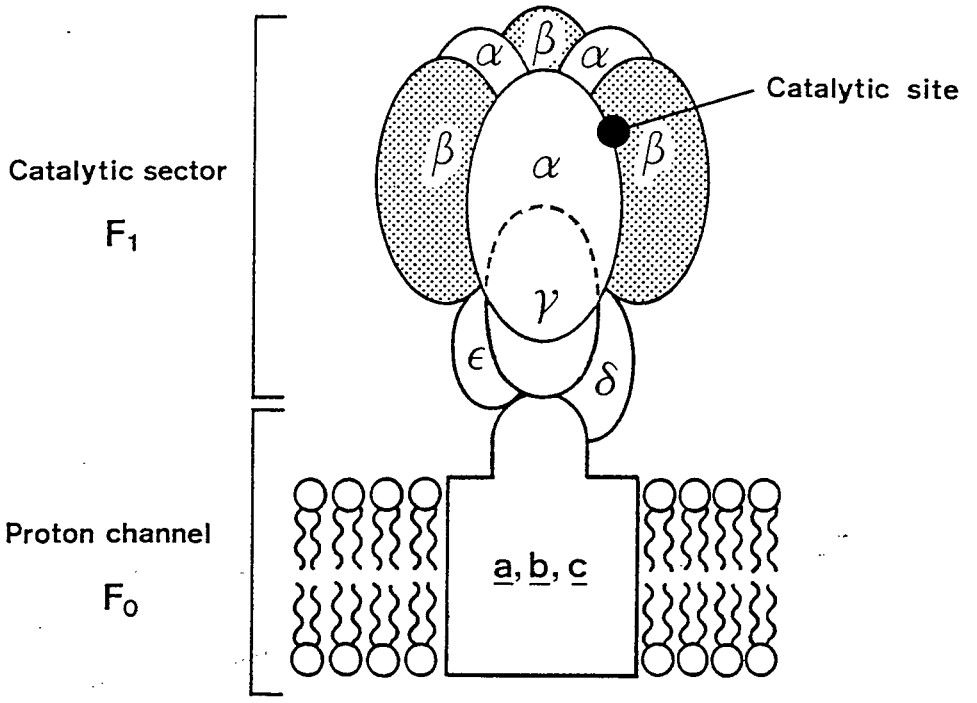


図 1-2　大腸菌 ATP 合成酵素の（F_0F_1-ATPase または F_0F_1）の模式図。

F_0F_1-ATPase は、膜に表在している F_1（α、β、γ、δ、ε）と、膜に内在している F_0（a、b、c）より構成されている。触媒部位は F_1 に 3 ヶ所存在する。電子顕微鏡で観察すると、F_1 の直径は 90 Å（96）で、長さ 45 Å のストーク部分によって F_0 に結合している（97）。ミトコンドリア および 葉緑体 F_0F_1-ATPase の基本構造は、ここに示したものと同じである。

第 2 節　F_0F_1-ATPase のサブユニット構成と遺伝子

F_0F_1-ATPase は、複雑なサブユニット構成を持つ膜酵素である（図1-2）。　大腸菌では、F_1 部分は、α、β、γ、δ、εの 5 種のサブユニットによって形成されており、サブユニット比は 3 : 3 : 1 : 1 : 1 と結論されている（6）。F_0 部分は、*a*、*b*、*c* の 3 種のサブユニットより形成されており、その比は 1 : 2 : 6-10 と考えられている。それぞれサブユニットが精製されており、精製したサブユニットから機能する酵素が再構成されている（7, 8）。葉緑体やミトコンドリア F_0F_1-ATPase のサブユニット構造は、基本的には大腸菌と同じと考えられる。葉緑体には、大腸菌の *a*、*b*、*c* サブユニットと相同な、サブユニット IV、I、III の他にサブユニット II が存在している。これは、サブユニット I と相同であり、同様の役割を持つサブユニットと考えられる。ミトコンドリアの場合にはさらに複雑で、活性を調節していると考えられているタンパク質が複数存在している（表1-1）。　動物のミトコンドリアの OSCP (oligomycin sensitivity conferring protein) と δサブユニットは、大腸菌ではδサブユニットとεサブユニットにそれぞれ対応する。ミトコンドリアには、F_0F_1 に結合して活性を調節するサブユニット（inhibitor）が報告されている。そのほかにも多くのタンパク質がサブユニットとして報告されているが、これらのなかにはサブユニットと考えるには難しいものもある。　F_0F_1-ATPase の基本的な構造と機能の解析には、単純なサブユニット構造を持つ大腸菌の酵素が、優れた材料であると考える。

大腸菌を材料とした研究が有利であるもう一つの理由は、大腸菌では遺伝学の基礎ができ上がっていることにある。大腸菌の F_0F_1-ATPase 遺伝子は、染色体の 84 分付近の *atp* オペロンに存在している。　F_0F_1-ATPase のサブユニットの遺伝子群は、従来 *unc* オペロンと呼ばれていたが、最近の遺伝子地図では *atp* オペロンに改められた（9）。それぞれのサブユニット遺伝子は、*atpB*（*a*）、*atpE*（*c*）、*atpF*（*b*）、*atpH*（δ）、*atpA*（α）、*atpG*（γ）、*atpD*（β）、　*atpC*（ε）の順序で並んでいる（図1-3）。 *atpB* の上流には分子量 14,000 (14 kDa) のタンパク質をコードする読み枠 *atpI* があるが、このタンパク質の機能は不明である。14 kDaタンパク質がなくても、機能する F_0F_1-ATPase が形成できることから、このタンパク質は F_0F_1 の機能には必要でないと考えられる。　プロモーターは、*atpI* 上流に 1 ヶ所、*atpI* の中に 2 ヶ所存在し、ターミネーターは、*atpC* の下流に存在している（図1-3）。　*atp* オペロンの全遺伝子配列は、当研究室の Kanazawa らによって報告されており、変異導入による構造の解析の基礎は確立している（10, 11）。

表 1-1　大腸菌、葉緑体、動物ミトコンドリアの F_0F_1-ATPase のサブユニット構造。

E. coli	Chloroplast	Mitochondria
α	α	α
β	β	β
γ	γ	γ
δ	δ	OSCP
ε	ε	δ
		ε
	subunit II	
a	subunit IV	subunit 6
b	subunit I	subunit 4
c	subunit III	subunit 9
		subunit 8 (A6L, *aap 1*)
		ATPase inhibiter
		9 kDa protein, 15 kDa protein
		factor B, F6, subunit d

大腸菌のサブユニットと、葉緑体および動物ミトコンドリアで、それぞれ対応するサブユニットを示した。

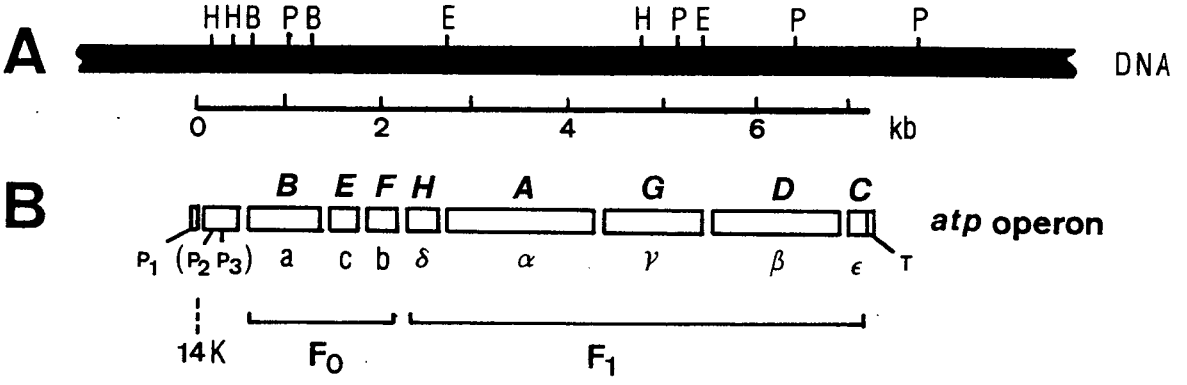


図 1-3 F_0F_1-ATPase の遺伝子（*atp* オペロン）構造。

F_0F_1-ATPase の遺伝子は、大腸菌染色体の 84 分付近に、約 7 kbp の *atp* オペロンを形成している。

A. 大腸菌染色体の制限酵素部位。E（*Eco*RI）、H（*Hin*dIII）、B（*Bam*HI）、P（*Pst*I）の認識部位を示す。

B. *atp* オペロン。上流にはプロモーター配列（P1, P2, P3）が、下流にはターミネーター配列（T）が存在する。

第 3 節　触媒部位の位置

精製した F_1 は、1 分子につきアデニンヌクレオチド（ATP, ADP）を 6 分子結合することができる（12-15）。 6 ヶ所のヌクレオチド結合部位のうち 3 ヶ所が、F_1 の触媒部位であると考えられている。ATP の触媒部位への結合には負の協同性が見られ、この部位に結合したヌクレオチドは、外液に加えた ATP と速やかに交換し得る。触媒部位には、グアニンヌクレオチド（GTP, GDP）やイノシンヌクレオチド（ITP, IDP）も結合することができる（16）。この部位へのヌクレオチドの結合には、Mg^{2+} が必須である（16）。一方、残りの 3 個の結合部位は、Mg^{2+}なしで、アデニンヌクレオチド（ATP, ADP）だけを結合し、外液の ATP とはほとんど交換しない。これらは、非触媒部位であると考えられている。このようにして区別できる 2 種のヌクレオチド結合部位のうち、触媒部位の性質は、精製したβサブユニットのヌクレオチド結合部位の性質に類似しており、非触媒部位の性質はαサブユニットの性質に類似していることから、βサブユニットのヌクレオチド結合部位が触媒部位であると考えられる（3）。

また、大腸菌の変異株より精製した酵素の性状や F_1 の化学修飾の結果からは、触媒部位は、βサブユニットあるいはαとβサブユニットの境界を接する部分に位置していると考えられる。大腸菌の F_0F_1-ATPase 変異株が同定されており、多くの場合βサブユニット、もしくはαサブユニットに含まれるアミノ酸残基が置換すると酵素活性が影響を受ける（1）。また、ATP の類似化合物を用いて化学修飾すると、βサブユニットが修飾される場合が多いが、adenosine triphosphopyridoxal（AP_3-PL）などの試薬は、αサブユニットとβサブユニットのいずれかに結合し、酵素活性を完全に失活させる（17-19）。

βサブユニット、あるいは、αとβサブユニットの境界面に存在すると考えられる触媒部位の構造を解明するために、変異の導入が容易で、変異酵素の精製も容易である大腸菌の F_0F_1 を用いることによって、活性中心を形成する残基を同定することが可能であると考えられる。

第 4 節　H^+ の輸送と、ATP の合成・分解との共役の機構

1 mol の ATP が加水分解（あるいは合成）されるとき、3 mol の H^+ が膜を横切って輸送されると見積もられている（20）。ATP の合成・分解に共役して H^+ が輸送されるには、F_0 のサブユニット *a*、*b*、*c* すべてが必要である。直接 H^+ の輸送に関わっている残基は、 *c* サブユニットの Asp61（21）、*a* サブユニットの Arg210、Glu219、His245（22）が同定されている。

H^+ の輸送活性は、反転膜小胞を用いて半定量的に測定することができる。 大腸菌を、フレンチプレスや超音波で処理すると、細胞膜の内側と外側が逆になった反転膜小胞が調製できる。　反転膜小胞では、F_1 は膜小胞の外側を向いているので、ATP を加えるとこれを加水分解して小胞内に H^+ を輸送する（図1-4）。反転膜小胞の懸濁液に、アクリジンオレンジなどの蛍光性アミンを加えておくと、H^+ の濃度勾配にともなって色素が小胞内に取り込まれて、蛍光の濃度消光が起きる。　このような方法によって、H^+ の輸送活性が間接的に測定できる。 膜を横切って H^+ が輸送されるのは、 触媒反応から H^+ が生成するためではない（23）。　ATP を分解したことによる F_1 の構造（conformation）の変化が F_0 に伝達され、F_0 が形成する H^+ のイオンチャンネルが開いた状態になると考えられる。最近、H^+ でなく Na^+ を輸送して ATP の合成および分解を行う F_0F_1 が *Propionigenium modestum* より見つかったことによって、このモデルがさらに確かなものになった（24）。　また、F_0 のコンフォメーションの変化が F_1 に伝わることは、F_0 に dicyclohexylcarbodiimide（DCCD）やオリゴマイシンが結合して H^+ 輸送路を阻害すると、F_1 部分による ATP の分解も阻害されることからも明かである。

F_1 と F_0 の間で、どのようにして構造（conformation）の変化が伝わるのかは、まったくわかっていないが、これを理解する手がかりは、F_1 のγサブユニットにあるかもしれない。すなわち、γサブユニットは、H^+ 輸送路のゲートの役割を持っていることが示唆されている（25）。F_1 部分がはずれて F_0 だけが膜小胞に存在しているとき、H^+ は受動的に輸送される。しかし、これに、精製した F_1 を結合させると、H^+ の受動的な輸送はみられなくなることから、H^+ 輸送路のゲート部分が F_1 に存在していることが示唆されている。 $\gamma\delta\varepsilon$サブユニットで H^+ の輸送路が塞げること（26）、また、葉緑体のγサブユニットは、コンフォメーションの変化によって、酵素の活性化と不活性化を調節していることが指摘されている（27-30）。したがって、F_0 と F_1 の間の情報の伝達、すなわち共役の機構を考える上で、γサブユニットの役割を知ることが重要であると考えられる。

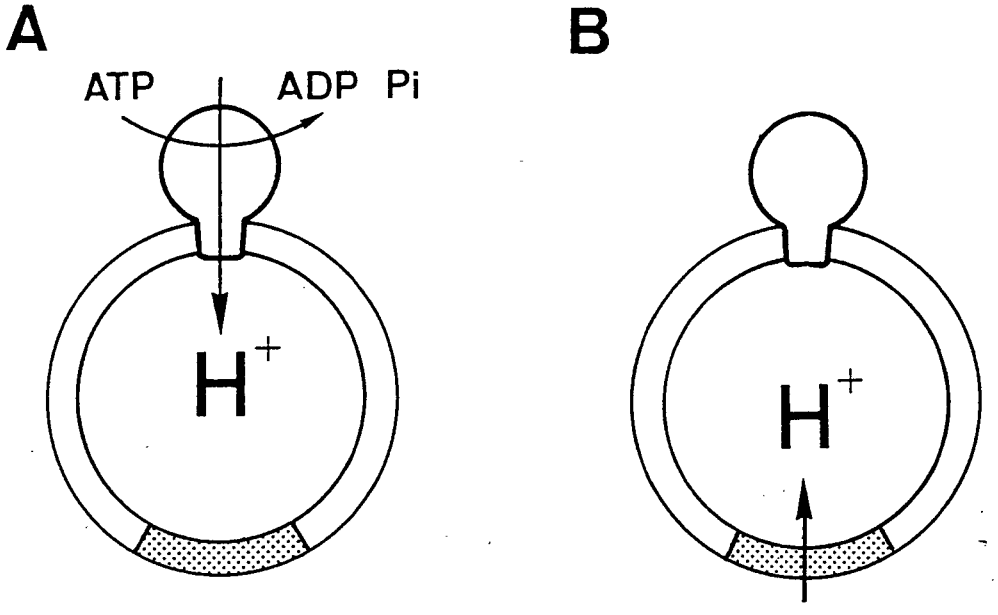


図 1-4　大腸菌の反転膜小胞内への H^+ の輸送。

大腸菌をフレンチプレスで破砕すると、内と外が反転した膜小胞が調製できる。ATP を加えると、F_0F_1-ATPase によって、H^+ が膜小胞のなかに能動輸送される（A）。また、D-乳酸 または NADH を加えると、呼吸鎖（図中の影の部分）によって、膜小胞内に H^+ が輸送される（B）。緩衝液中にアクリジンオレンジのような蛍光性アミンを加えておくと、A または B のいずれの場合にも、蛍光性アミンは、より酸性の膜小胞内に蓄積し、蛍光が濃度消光する。これによって H^+ の輸送を検知することができる。

第 5 節　本研究の目的

F_0F_1-ATPase による ATP 合成・分解の触媒機構については、この酵素の、現在最も注目を集めている点であり、多くの知見も得られている。しかし、F_1 が 3 ヶ所の基質結合部位を持ち、複雑なサブユニット構成を持つことから、触媒部位の構造に関する知見は、きわめて断片的である。また、ATP 合成・分解に共役して H^+ が輸送される機構、すなわち、活性中心と H^+ 輸送路の間の情報の伝達についてはまったくわかっていない。

そこで、本研究では、さまざまな生物の F_0F_1-ATPase の中で比較的単純なサブユニット構造を持ち、遺伝学的な解析が容易である大腸菌の酵素を材料として、触媒部位を構成する残基を同定することを第一の目的とした。　そのために、まず、変異の導入および変異酵素の精製が容易な F_0F_1 大量発現株を作製した。立体構造的に ATP のリン酸基に近い領域は、触媒機構に直接関わる残基を含んでいる可能性が高い。その構造を解明するために、 βサブユニットに存在する、 グリシン残基に富む配列（glycine-rich sequence）に焦点を当てた。他の多くのヌクレオチド結合タンパク質との比較から、この配列が触媒部位の一部を構成していると考えた。さらに、この領域の残基と機能的に相互作用し得る残基を、復帰変異を同定し検討した。

また、H^+ 輸送と ATP 合成・分解の共役の機構は、現在ほとんど明らかにされていない。本研究では、共役機構について分子レベルで明らかにすることを、第二の目的とした。そのために、H^+ 輸送路のゲートの役割を持つと考えられているγサブユニットの、カルボキシル末端領域に注目した。この領域に、部位特異的に変異を導入し、変異酵素の ATPの加水分解活性と H^+ 輸送活性の比較、また、それらと ATP 合成活性の比較を行った。

第 6 節　要約

本研究では、まず F_0F_1 の全遺伝子を持つ発現プラスミド pBWU13 を構築し、F_0F_1 遺伝子を欠損している DK8 株に導入して DK8/pBWU13 株 を作製した。F_0F_1 の発現量は、以前 Takeyama ら（31）によって構築されていた発現プラスミド pBWU1 を導入した場合に比べると約 3～4 倍、プラスミドを持たない通常の野生型大腸菌に比べると、実に、10 倍に及んだ。大量に発現した酵素は、細胞膜上に分子集合して正常に機能した。この株では、F_0F_1 はプラスミド由来に合成され

るため、プラスミドの F_0F_1 遺伝子に変異を導入すると、変異酵素の解析が容易であった。

活性中心を構成する残基、あるいはその近傍の残基を知るために、βサブユニットの βGly149 - βThr156 の配列（glycine-rich sequence）と相互作用し得る残基を同定した。βSer174 残基の変異の表現型が、glycine-rich sequence の βGly149 残基の変異によって抑圧され、また、βGly149 残基の変異の表現型は βSer174 残基の変異および βVal198 残基の変異によって抑圧された。以上より、βSer174 残基およびβVal198 残基は、立体構造的にβGly149 残基の近傍に位置していると結論した。これらのアミノ酸残基が触媒部位のどの位置を形成しているかをさらに検討した。βサブユニットの一次構造を、結晶構造の明かにされているヌクレオチド結合タンパク質の一つ、p21 *ras* タンパク質と比較すると、部分的にではあるが、保存性が認められた。前述の βSer174 および βVal 198 の二つの残基は、p21 *ras* タンパク質の基質 GTP のリン酸基の結合に重要な残基と一致した。さらに、βVal198 残基より 3 残基カルボキシル末端側に位置するβLys201 残基は、ATP 類似化合物を用いた化学修飾の結果から、立体構造上 ATP のγ位のリン酸基近傍に位置することが示唆されている。以上より、βサブユニットに存在する触媒部位の、ATP のリン酸基を結合する領域の構造が、一部推定できた。

また、H^+ 輸送路のゲートとしての役割を持つことが示唆されているγサブユニット（286 アミノ酸残基）の機能を分子レベルで理解し、他のイオン輸送性 ATPase との共通の問題である、触媒活性とイオン輸送の共役機構について知見を得ることを目的とした。さまざまな生物種のγサブユニットの間で一次構造がよく保存されている、カルボキシル末端の領域に注目した。γサブユニット遺伝子を持つ組換えプラスミドに部位特異的に変異を導入し、γサブユニット欠損株に導入した。この実験によって、触媒サブユニットではないと考えられるγサブユニットの変異が、酵素の触媒活性に影響を与えることを明らかにした。また、カルボキシル末端領域の変異が、ATP の加水分解と H^+ 輸送の共役機構にも影響を与えることを、はじめて残基レベルで明らかにした。共役機構の解明のために、γサブユニットの機能領域を検討することが有効であると示唆された。

第 2 章　F_0F_1 の大量発現株（DK8/pBWU13）の作製

第 1 節　緒論

前章で述べたように、触媒部位、H^+ 輸送路、また、それらの間の共役を司る調節部位の構造を知ることが、ATP合成酵素（F_0F_1）の機能を理解するために重要である。機能残基を同定するためには、現在、変異の導入および化学修飾といった方法が用いられている。効率よく変異を導入して解析するためには、何種類もの変異を各サブユニットの遺伝子に導入し、それぞれの変異酵素を迅速に精製することが必要となる。このため、遺伝子への変異導入が容易で、しかも酵素を大量に生産できる、プラスミドを含む株を作製することが必須であると言える。通常の大腸菌野生株において、F_0F_1 が全膜タンパク質に占める割合は、約 1-2% である。これまでに報告されているように、λファージを用いた大量発現株 KY7485 では、F_0F_1 が膜タンパク質の約 4% にまで増加し（32）、さらに、F_0F_1 の全遺伝子（*atp* オペロン）を持つ発現プラスミド pBWU1 を導入した場合には約 7% まで増加した（31）。

この発現量をさらに増加させることを目的として、本研究では F_0F_1 発現プラスミド pBWU1 を改良し、新たに、pBWU13 を構築した。pBWU13 を導入した大腸菌より調製した膜画分は、全タンパク質量の約 25% におよぶ F_0F_1 を含んでいた。しかも、大量に存在する酵素は、細胞膜上に正常に分子集合していた。

第 2 節　実験方法

1. 菌株と培養条件

本章で用いた菌株は、DK8（Δ*atpB-C, ilv*::Tn*10, thi*）（33）、KY7230（*asn, thi, thy, rpoB*）（34）、および、JM109（*relA1, supE44, endA1, hsdR17, gyra96, thi,* Δ(*lac-proAB*)/F'[*traD36, proAB*$^+$, *lacI*^{q}, *lacZ*Δ*M15*], *mcrA*$^-$, *mcrB*$^+$）（35）である。

DK8 株は、F_0F_1 のすべてのサブユニット遺伝子を欠失している変異株である。そのため、酸化的リン酸化による ATP合成ができず、呼吸基質であるコハク酸を単一の炭素源とする最小培地では生育することができない。しかし、グルコースを加えた培地では生育できる。本研究では、DK8 株を F_0F_1 発現プラスミドの宿

主として用いた。 一方、プラスミドを導入した株との比較に用いるため、染色体上に正常な F_0F_1 遺伝子を持つ KY7230 株を用いた。JM109 株はプラスミドの構築等の遺伝子操作に用いた。

これらの菌の培養には、栄養培地として L broth (10 g/l ポリペプトン, 5 g/l 酵母エキス, 5 g/l NaCl) (36) にチミン (50 μg/ml) を加え、また、必要に応じてアンピシリン (50 μg/ml または 100 μg/ml) を加えた。最小培地としては、Tanaka 培地 (34 mM KH_2PO_4, 64 mM K_2HPO_4, 20 mM $(NH_4)_2SO_4$, 0.3 mM $MgCl_2$, 10 μM $CaCl_2$, 1 μM $FeSO_4$, 1 μM $ZnCl_2$) (37) に イソロイシン (50 μg/ml)、バリン (50 μg/ml)、アスパラギン (50 μg/ml)、チミン (50 μg/ml)、チアミン (2 μg/ml) を加えて用いた。また、遺伝学的な解析を行う場合には、単一炭素限としてグルコース (7 mM) あるいは コハク酸ナトリウム (15 mM) を加え、膜画分の調製を行うときにはグリセロール (0.5%) を加えた。寒天平板は、上記の培地に 1.5% の寒天を加えて直径 8.5 cm のペトリ皿に作製した。

2. 用いた組換えプラスミド

本章で用いたプラスミドは、すでに当研究室で構築された pBWU1、および、pBMUD3-AdK である (31)。

pBWU1 (13,318 bp) は、*atp* オペロンの弱いプロモーター (P3) の支配下に、野生型の F_0F_1 の全サブユニット遺伝子 (*atpB, E, F, H, A, G, D, C*) を発現するプラスミドである。前述した F_0F_1 の欠失株 DK8 にこのプラスミドを導入すると、コハク酸培地で生育が可能になる。また、pBMUD3-AdK (13,321 bp) (図2-1) は、pBWU1 のβサブユニット遺伝子に、部位特異的に変異を導入して得られたものである (31)。すなわち、第 3 章および第 4 章で詳しく述べる βGly149～βThr156 の配列中に変異が導入されており、βAla151 残基が Val に、βVal153 残基が Ala に置換し、また、βLys155 残基と βThr156 残基の間に Gly 残基が挿入されている。 以上の変異によって F_0F_1 は機能しなくなるため、 DK8 株に pBMUD3-AdK を導入しても、コハク酸培地上では生育できない (31)。 また、このプラスミドでは、アミノ酸配列を変えずに、同一アミノ酸の別のコドンに置換することで、γサブユニット遺伝子の *Hin*dIII および *Stu*I 部位を欠失し、βサブユニット遺伝子には新たに *Stu*I 部位を付加してある (図2-1) (31)。

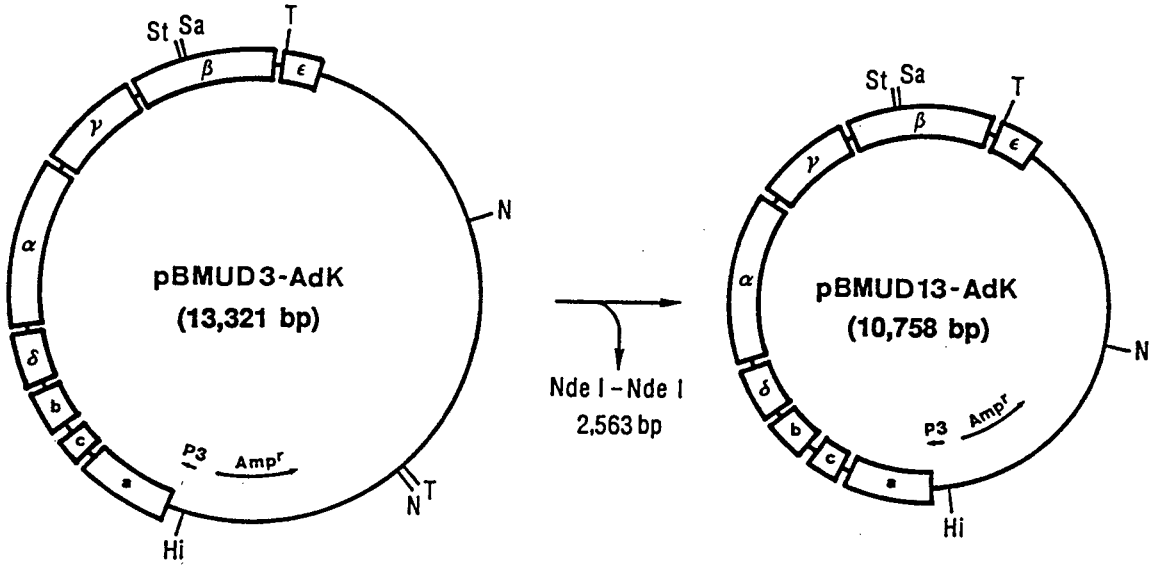


図 2-1 pBMUD13-AdK の構築。

pBMUD3-AdK では、*atp* オペロンを含む大腸菌の遺伝子が、pBR322 の *Hin*dIII 部位と *Bam*HI 部位の間に挿入されている。 また、このプラスミドのβサブユニット遺伝子の glycine-rich sequence (βGly149 - βThr156; Gly-Gly-Ala-Gly-Val-Gly-Lys-Thr) はアデニレートキナーゼの共通配列 (Gly-Gly-Pro-Gly-Ser-Gly-Lys-Gly-Thr) に置き換えてある。この配列置換によって βAla151 が Pro に、また βVal153 が Ser に置換し、βLys155 と βThr156 の間に Gly 残基が挿入されることになる。このプラスミドを導入した DK8 株はコハク酸培地では生育しない。 *Stu*I の認識配列は、変異導入を容易に行うために、アミノ酸配列を変えない形で新たに組み込まれたものである。 pBMUD3-AdK を *Nde*I 消化して、大腸菌染色体の遺伝子に由来する *Nde*I 部位から pBR322 に由来する*Nde*I 部位の間の 2,563 bp を除いた。残りの 10,758 bp を環状にして、pBMUD13-AdK を構築した。 制限酵素部位は、Hi (*Hin*dIII) 、N (*Nde*I) 、Sa (*Sac*I) 、St (*Stu*I) 、T (*Tth*111I) のように略号で示した。図中の P3 は *atp* オペロンの弱いプロモーター、また、Amp^r は アンピシリン耐性遺伝子を示す。

3. pBMUD13-AdK の作製

pBMUD3-AdK 5 μg を *Nde*I 消化し、0.5% アガロース・ゲル電気泳動により 10,758 bp の DNA 断片を 分離した。これを、フィルター(pore size, 0.45 μm) 付き遠心管 (UF-C3HV, Milipore 社製) に入れて DNA 断片を回収した。DNA 溶液中に混入しているアガロースを除くために、等容量のフェノール・クロロホルム (1:1) を加え、よく振とうした後に遠心した。水層の DNA をエタノール沈澱させ、乾燥した後、少量の TE 緩衝液 [10 mM Tris-HCl (pH8.0), 1 mM EDTA] に溶解した。この DNA 断片 1 μg を Takara Shuzo 社 Ligation Kit により環状にし、50 mM $CaCl_2$ 処理した JM109 株に導入した。アンピシリン耐性のコロニーより調製したプラスミドは、制限酵素地図によって、pBMUD3-AdK より、*atp* オペロン下流の大腸菌染色体由来の *Nde*I 配列から pBR322 由来の *Nde*I 配列までを欠失したものであることを確認し、pBMUD13-AdK とした (図2-1) 。

4. 野生型の F_0F_1 を発現するプラスミド pBWU13 の作製

野生型の F_0F_1 の配列を持つ組換えプラスミド pBWU13 は、pBMUD13-AdK から、βサブユニット遺伝子の変異部位を含む *Stu*I - *Sac*I 断片を切り出し、野生型のアミノ酸配列に対応する合成 2 本鎖 DNA で置き換えることによって作製した (図2-2) 。

*Sac*I および *Stu*I で消化した pBMUD13-AdK を 5% ポリアクリルアミドゲルで電気泳動し、*Stu*I - *Sac*I 断片 (46 bp) が分離されているのを確認してから、13,275 bp の DNA 断片をゲルから電気的に溶出し回収した。 オリゴヌクレオチドは、DNA 合成装置 (Applied Biosystems, Model 381A) によって合成した。TE 緩衝液中に溶解している 3.5 pmol/μl の sense 鎖と anti-sense 鎖の DNA を、90℃ の水浴にて 10分間加熱した後そのまま室温になるまで放置してアニーリングさせた。

この 2 本鎖 DNA 3.5 pmol と pBMUD13-AdK から得た 10,758 bp の *Stu*I - *Sac*I 断片 0.12 pmol とを ligase 処理し、これを *Kpn*I 消化してから 50 mM $CaCl_2$ 処理した DK8 株の受容菌に導入した。アンピシリン耐性で、かつ、コハク酸培地で生育できるコロニーを選択した。この菌からプラスミドを調製し、制限酵素地図と DNA 塩基配列を決定した上で、目的のプラスミド (pBWU13) であることを確認した。DNA 塩基配列は、文献に従い決定した (38, 39) 。このプラスミ

A

```
                146         149                                 156                     162
                Gly Leu Phe Gly Gly Ala Gly Val Gly Lys Thr Val Asn Met Met Glu Leu
Wild-type   5'-a ggC CTG TTC GGT GGT GCG GGT GTA GGT AAA ACC GTT AAC ATG ATG GAG CTc-3'
            3'-t ccG GAC AAG CCA CCA CGC CCA CAT CCA TTT TGG CAA TTG TAC TAC Ctc gag-5'
                Stu I                                           Hpa I           Sac I
```

B

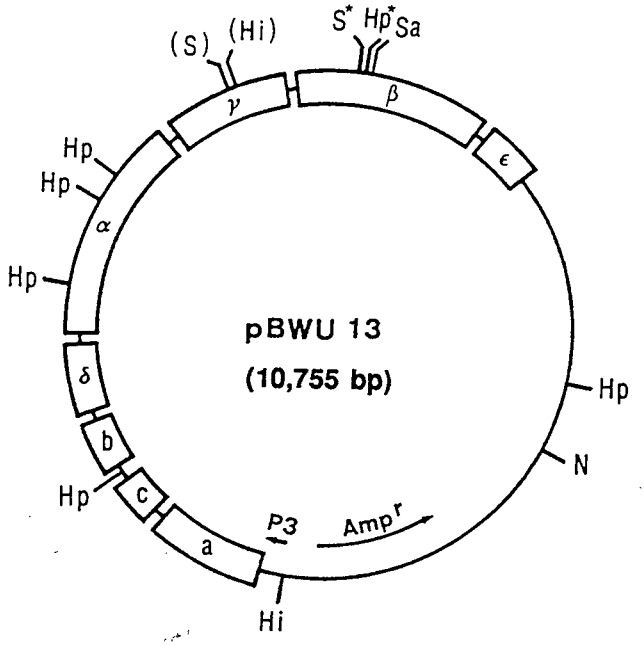


図 2-2　野生型の F_0F_1 を高発現する組換えプラスミド pBWU13 の構築。

pBMUD13-AdK の *Stu*I - *Sac*I 断片を、野生型のアミノ酸配列に置き換えて pBWU13 を構築した。

A，野生型のアミノ酸配列をコードする合成 DNA 断片。この合成 DNA 断片には、新たな *Hpa*I の認識配列を導入してある。

B，pBWU13 の構造。pBWU13 は 10,755 bp より成るプラスミドである。このプラスミドを、F_0F_1 遺伝子を欠失している DK8 株に導入すると、コハク酸培地で生育できるようになった。図中の制限酵素部位のうち、かっこで示したものは染色体 DNA には存在するが、プラスミドへの部位特異的な変異導入によって除いた部位。また、星印で示したものは、新たに導入した部位。いずれの場合にも、コードするアミノ酸配列は変わっていない。　制限酵素部位は、Hi（*Hin*dIII）、Hp（*Hpa*I）、N（*Nde*I）、S（*Stu*I）のように略号で示した。図中の P3 は *atp* オペロンの弱いプロモーター、また、Amp^r は アンピシリン耐性遺伝子を示す。

ドを DK8 株に導入し、コハク酸培地で生育可能な形質転換株を DK8/pBWU13 とした。

5. 大腸菌の反転膜小胞の調製、および ATPase 活性の測定

反転膜小胞の調製、EDTA 抽出画分の調製、および、ATPase 活性の測定は、Futai らの方法に従った (40)。

L broth 培地 5 ml で、一晩前培養した DK8/pBWU13 株および KY7230 株の菌液 0.5 ml を、グリセロールを単一炭素源とする 500 ml Tanaka 培地に植菌し、37℃、120 rpm で、対数増殖期 (OD_{650} = 0.6 程度) まで培養した。 以下の操作はすべて 4℃にて行った。 集菌後、200 ml の 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) と 40 mlの同じ緩衝液で二回洗った菌体を -70℃で一晩保存した。 翌日、これを速やかに融解し、菌体湿重量 (wet weight) 約 0.7 g を 10 ml の TKMG 緩衝液 [10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 140 mM KCl, 2 mM 2-mercaptoethanol, 10% glycerol] に懸濁した。French press (1,500 kgf/cm^2) によって細胞を破砕し、1,200 x *g* で 10分間遠心した上清を、120,000 x *g*、60分間遠心して、沈澱を反転膜小胞の分画とした。これを、もう一度 TKMG 緩衝液で洗った後、タンパク質濃度が 20 - 40 mg/ml になるよう少量の TKMG 緩衝液に懸濁し、等量のグリセロールを加えて -20℃で保存した。 反転膜小胞から、F_1 部分を可溶化させる場合には、グリセロールを加えていない 3.5 - 4.0 mg タンパク量の膜小胞懸濁液を 100,000 x *g* で30分間遠心し、 沈澱を 0.5 ml の depletion 用緩衝液 [1 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10 mM EDTA, 10% グリセロール] に懸濁した。 4℃、30分間放置した後に、350,000 x *g*、15分間遠心し上清 0.15 ml を得た。これを 可溶化 F_1を含む EDTA 抽出画分として、直ちに ATPase 活性を行い、残りを SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動の試料とした。

反転膜小胞、または、EDTA 抽出画分の ATPase活性は、4 mM ATP、2 mM $MgCl_2$、20 mM Tris-HCl (pH 8.0 at 37℃) 、37℃の反応条件下で、通常 10分間反応したときに遊離した無機リン酸を比色定量した。1 分間に 1 μmol の ATP を加水分解する酵素量を 1 unit とした。

6. 反転膜小胞内への H^+ 輸送活性の測定

反転膜小胞の F_0F_1 が、ATP を加水分解し、膜内に H^+ を能動輸送する活性は、Tsuchiya らの方法 (41) に従って、蛍光色素の濃度消光によって測定した。蛍光測定用セルに、蛍光色素であるアクリジンオレンジを含む測定用緩衝液 [10 mM Tricine-choline (pH 8.0 at 25℃), 140 mM KCl, 5 mM $MgCl_2$, 1 μg/ml アクリジンオレンジ] を 1 ml 加え、これに 10 - 100 μg タンパク量の膜標品および 1 μg/ml valinomycine を 1 μl 加えて速やかに攪拌した。100 mM ATP-Tris (pH 8.0) を 10 μl 加えて 25℃で反応を開始した。490 nm の励起光を当てたときの 530 nm の蛍光強度の変化を、蛍光分光光度計 (日立社製 F-3000) によって測定した。蛍光の消光が定常状態に達したところで、2 mM CCCP を 3 - 10 μl、または、1 M NH_4Clを 5 μl 加えた。

7. その他の方法と試薬

プラスミドは alkaline lysis 法 (42) により調製した。タンパク定量は Lowry らの方法 (43)、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動は Laemmli の方法 (44)、また、銀染色は Oakley らの方法 (45) に従った。

制限酵素は Nippon gene 社より、Sequenase kit は Takara Shuzo 社より、Ligation kit は Takara Shuzo 社より、ATP (ナトリウム塩) はオリエンタル酵母社より、ATP (Tris塩)、valinomycine、Tricine は Sigma 社より、その他の試薬は和光純薬社より購入した特級試薬を用いた。

第 3 節　結果と考察

1. DK8/pBWU13 株の性状

組換えプラスミド pBWU13 は、F_0F_1 サブユニットの全遺伝子（*atp B-C*）が、pBR322 の *Hin*dIIIと *Nde*I の間に挿入されている（図2-2）。 pBWU1 と比較すると、pBR322 の複製に関して負の制御を行う *rop* 遺伝子が欠失しているため、pBWU13のコピー数が増加していることが期待された（46, 47）。

F_0F_1 の遺伝子を欠失している DK8 に pBWU13 を導入した株、DK8/pBWU13 は、コハク酸培地上で生育した。この結果は、pBWU13 の *atp* オペロン由来に F_0F_1 が合成され、ATP 合成ができるようになったためである。DK8/pBWU13 を培養して反転膜小胞を調製し、その ATPase活性を測定した（表2-1）。グリセロールを単一炭素源として培養した DK8/pBWU13 より反転膜小胞を調製した場合、ATPase の比活性は 24 units/mg タンパク量となり、プラスミドを持たない野生株 KY7230 の約 10 倍、*rop* 遺伝子を持つ組換えプラスミド pBWU1 を導入した DK8 株の約 3 倍であった。 さらに、ATP の加水分解による H^+ の能動輸送を、DK8/pBWU13 株と KY7230 株の反転膜小胞について比較した（図2-3）。 加える反転小胞膜の量を変えて測定すると、DK8/pBWU13 株の場合には、1 ml の反応液中 10 μg タンパク量の条件で、H^+ の輸送を示す蛍光の消光が最大に達した。このときの消光の大きさは、KY7230 株の反転膜小胞 100 μg タンパク量を用いた場合とほぼ同程度であった。以上の結果は、DK8/pBWU13 株の反転膜小胞では、KY7230 株の場合の約10 倍にあたる、全膜タンパク質の約 20 - 25% が F_0F_1分子であること、また、H^+ 輸送路を形成する F_0 部分、触媒部分を形成する F_1 部分とも正常に分子集合して、機能的な ATP 合成酵素複合体を形成していることを示している。

2. コハク酸培地における生育速度

DK8/pBWU13 株と KY7230 株の、最小培地上における生育を比較した。コハク酸またはグルコースを単一の炭素源とする液体培地に各々を植菌し、37℃の好気条件下で培養した。グルコース培地では、最大の生育量、生育速度とも両者に差はなかったが、コハク酸培地では、DK8/pBWU13 株の世代時間が 6.5時間程度となり、KY7230 株の 1.8時間と比べると、3 倍以上遅かった （図2-4）。 この結果は、DK8/pBWU13 株では、細胞膜に F_0F_1 が大量に発現しているために、他の膜酵素

表 2-1　野生型 F_0F_1 発現プラスミドを持つ DK8/pBWU13 株と通常の野生株 KY7230 の、F_0F_1-ATPase 比活性の比較。

Strain	ATPase activity (units/mg)	
	Membranes	EDTA extract
DK8/pBWU13	24.7	104
KY7230	2.7	24

DK8/pBWU13 株および KY7230 株を、グリセロールを単一炭素源とする最小培地で培養し、反転膜小胞を調製した。 ATPase 活性を、4 mM ATP、2 mM $MgCl_2$、20 mM Tris-HCl、pH 8.0、37℃の反応条件で測定した。 DK8/pBWU13 株からは、KY7230 株の約 10 倍の比活性を持つ反転膜小胞が得られた。対数増殖期の中期、または、常定状態の初期の菌体から反転膜小胞を調製しても比活性はほとんど変わらなかった。反転膜小胞を、EDTA を含む低イオン強度の緩衝液で洗うと、F_1 部分が膜表面より遊離してくる（EDTA 抽出画分）。 DK8/pBWU13 株より調製した EDTA 抽出画分は、精製 F_1 の比活性（100 - 120 units/mg）とほとんど変わらなかった。

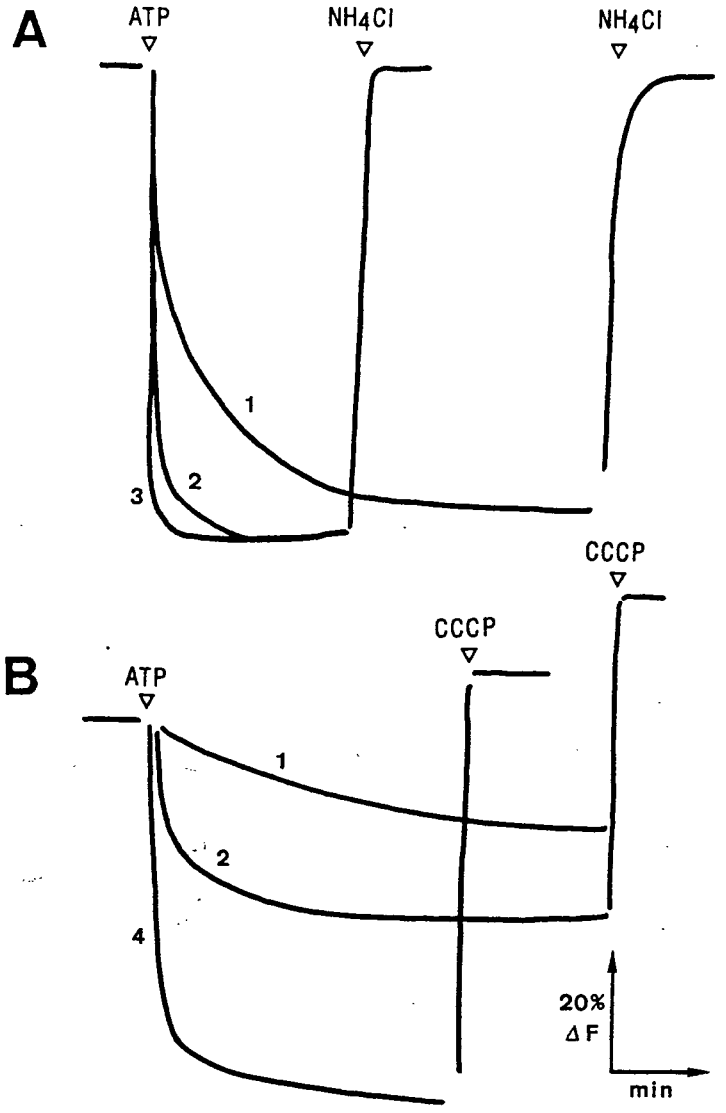


図 2-3 ATP の加水分解によって形成される H^+ の濃度勾配。プラスミドを持つ野生株 DK8/pBWU13 と持たない野生株 KY7230 の反転膜小胞による比較。

DK8/pBWU13 株 (A) あるいは KY7230 株 (B) の反転膜小胞を、1.0 ml の測定用緩衝液に懸濁した。この緩衝液は 10 mM Tricine-choline (pH 8.0 at 25℃)、140 mM KCl、5 mM $MgCl_2$、1 μg/ml valinomycin、1 μM アクリジンオレンジを含んでいる。25℃で、490 nm の励起光を照射して 530 nm の蛍光強度 (ΔF) を測定した。ATP (1 mM)、NH_4Cl (10 mM)、CCCP (1 μM) は、図中に示した時間に加えた。 反転膜小胞の量を、タンパク質量で 10 μg (trace 1)、30 μg (trace 2)、50 μg (trace 3)、100 μg (trace 4) に変えて測定した。

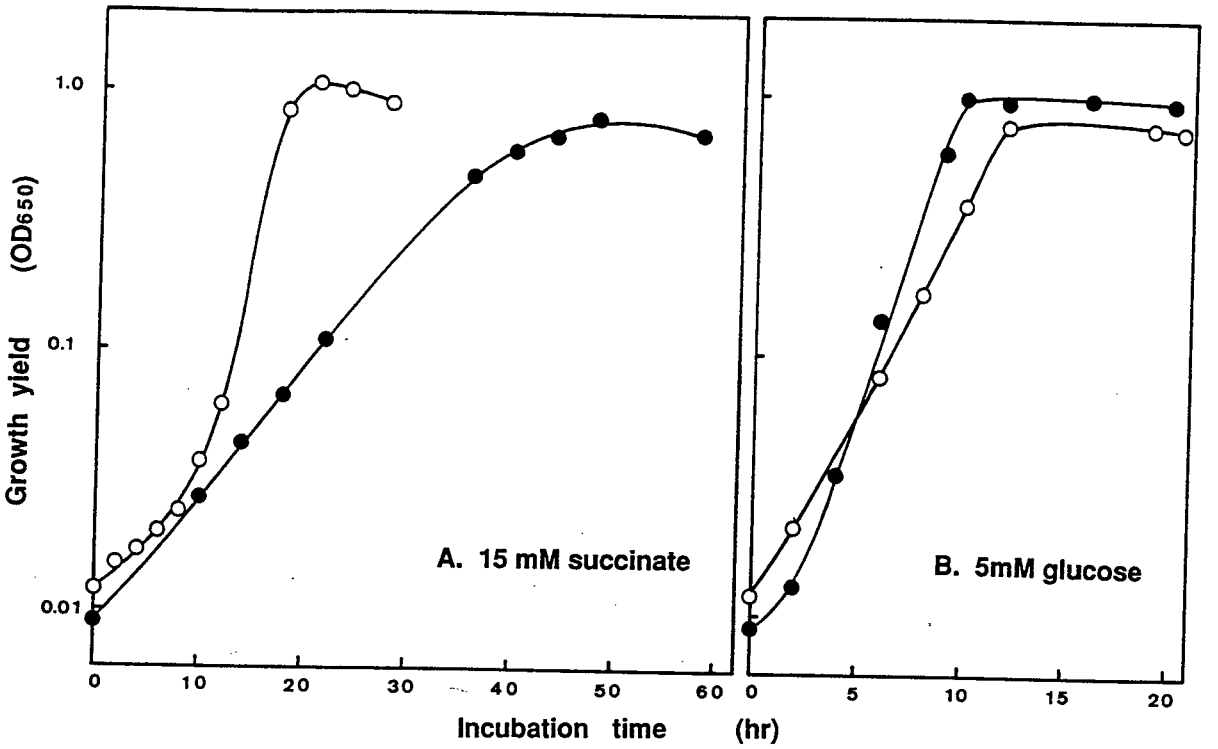


図 2-4　DK8/pBWU13 株と KY7230 株の生育速度の比較。

L broth 培地で 一晩培養した DK8/pBWU13 株（●）および KY7230 株（○）の菌体を生理食塩水で洗った後、OD_{650} が約 0.01 になるように、50 ml の最小培地に植菌した。 最小培地には、単一の炭素源として 15 mM コハク酸（A）、あるいは 5 mM グルコース（B）が添加されている。 37℃で好気的に培養し、OD_{650} を測定した。 DK8/pBWU13 株 および KY7230 株の対数増殖期の世代時間は、15 mM コハク酸培地ではそれぞれ 6.5 時間と 1.8 時間、また、5 mM グルコース培地ではそれぞれ 1.0 時間と 1.7 時間であった。生育が最大に達したときの OD_{650} は、DK8/pBWU13 株 および KY7230 株で、15 mM コハク酸培地ではそれぞれ 0.99 と 0.75、また、5 mM グルコース培地ではそれぞれ 0.79 と 1.1 であった。

（例えば 呼吸鎖を形成する酵素）の分子集合が阻害されている可能性を示唆している。

3．F_1 の部分精製

大腸菌の反転膜小胞を、EDTA を含む低イオン強度の緩衝液で洗うと、F_1 部分が遊離し、可溶性画分に抽出できる（EDTA 抽出画分）。DK8/pBWU13 株の反転小胞膜から調製した EDTA 抽出画分 は、比活性で 104 units/mg あった（表2-2）。精製した F_1 の比活性が通常 120 units/mg 程度であるから、EDTA を含む緩衝液で可溶化するだけで、純品に近い F_1 が得られるようになった。 DK8/pBWU13 株と KY7230 株の EDTA 抽出画分標品を、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって比較すると、DK8/pBWU13 株の標品には、 F_1 のサブユニット（α、β、γ、δ、ε）以外のものはほとんど含まれていなかった（図2-5）。

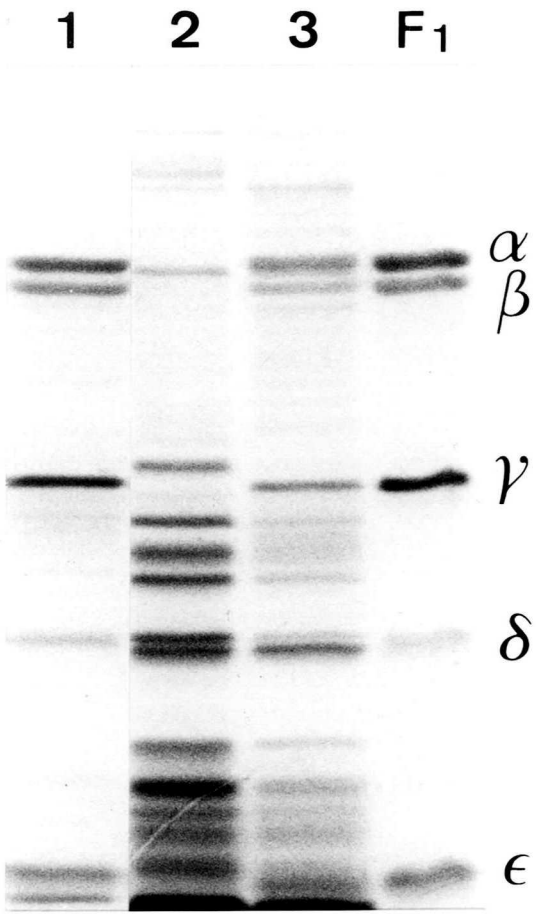


図 2-5 EDTA 抽出画分の SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動による分析。

グリセロールを単一の炭素源とする最小培地で菌を培養し、反転膜小胞を調製した。 ここから得られた EDTA 抽出画分を 0.1% の SDS を含む 12.5% のポリアクリルアミドゲルで電気泳動し銀染色を行った。 DK8/pBWU13 株 (lane 1)、DK8/pBR322 株 (lane 2)、KY7230 株 (lane 3) より調製した EDTA 抽出画分、および、精製した F_1 を、 それぞれ 2 μg (タンパク質量) ずつ電気泳動した。DK8/pBWU13 株より調製した EDTA 抽出画分は、ほとんど F_1 のサブユニット (α、β、γ、δ、εサブユニット) だけを含んでいた。

第 4 節　まとめ

本章で構築したプラスミド pBWU13 は、F_0F_1（ATP 合成酵素）の全サブユニット遺伝子を持ち、pBR322 由来の *rop* 遺伝子を欠失している 10,755 bp の組換えプラスミドである。このプラスミドを F_0F_1 欠失株に導入した形質転換株（DK8/pBWU13）では、F_0F_1 の発現量が増加した。これは、pBWU13 が *rop* 遺伝子を持たないために、プラスミドのコピー数が上昇したためと考えられる。反転膜小胞の ATPase 活性および H^+ 輸送活性を、プラスミドを持たない野生型の大腸菌株 KY7230 と比較すると、DK8/pBWU13 株には、約 10 倍量の F_0F_1 が正常に分子集合していることが示された。また、大量に F_0F_1 が存在しているために、DK8/pBWU13 株を用いると本酵素を精製することが容易になった。すなわち、反転膜小胞を低イオン強度の緩衝液で処理するだけで、触媒部分 F_1 を部分精製することができた。以下の、第 3 章と第 4 章では、このプラスミドに部位特異的に変異を導入し、変異酵素の性状を解析した。

第 3 章　βサブユニットの glycine-rich sequence に含まれる βGly149、βGly150 と βSer174 残基との相互作用

第 1 節　緒論

これまでに、変異酵素の解析や、ATP 類似化合物を用いた化学修飾実験（親和性標識実験）、また、他のヌクレオチド結合タンパク質との比較等から、触媒反応に重要と考えられるアミノ酸残基および領域が同定されている。

βサブユニットの βGly149 から βThr156 の 配列 (Gly-Gly-Ala-Gly-Val-Gly-Lys-Thr) は、glycine-rich sequence と呼ばれる配列に対応している。グリシン残基に富み、Gly-X-X-X-X-Gly-Lys-Thr/Serの共通配列を持つ glycine-rich sequence は、100 種類以上のアデニンヌクレオチドまたはグアニンヌクレオチドを結合するタンパク質に保存されている（48）。最近、当研究室の Takeyama らは、βサブユニットの glycine-rich sequence を、GTP 結合タンパク質である p21 *ras* タンパク質の共通配列（Gly-Ala-Gly-Gly-Val-Gly-Lys-Ser）で置き換えても、ATPase 活性が保持できることを報告した（31）。このことから、βサブユニットの配列が、p21 *ras* タンパク質と同様にヌクレオチド結合部位を形成している可能性が考えられる（31）。　実際に、βサブユニットの βGly149 から βThr156 の残基に変異を導入すると、ATPase 活性が大きく変化した。βAla151 残基を Val に置換すると、ATPase 活性は野生型の約 8% に低下し、Pro に置換すると約 2 倍に増加した（31, 49）。　また、βGly152、βGly154、βLys155、βThr156 残基を他のアミノ酸残基に置換すると、いずれも活性が低下あるいは増加した（50-55）。　さらに、ATP の類似化合物である adenosine triphospho-pyrydoxal (AP_3-PL) が、βLys155 に結合すると活性が消失した（17-19）。

一方、この glycine-rich sequence の βThr156 より 18 残基カルボキシル末端側に位置する βSer174 残基が、Phe に置換した変異株（KF11）は、酵素活性が野生型の約 10% に低下し、コハク酸培地では生育できない（56-58）。しかも興味深いことに、ATPase 活性の Mg^{2+} および Ca^{2+} 依存性は、野生型の酵素とはまったく異なる特徴を示す（56）。これらの結果から、βSer174 残基あるいはその近傍が、2 価カチオンの結合に関与していることが示唆された。ATPase 活性の基質は Mg・ATP であるから、βSer174 残基は、基質結合部位の Mg^{2+} 結合に関与する可能性がある。

触媒部位の構造を知るために、βSer174→Phe 変異を持つ KF11 株から復帰変異株を分離した。本章では、この復帰変異株の変異部位および性状を解析し、

βSer174 残基と βGly149 - βThr156 領域とが、触媒部位を形成している可能性を示した。

第 2 節　実験方法

前章までに述べた方法については詳細を省き、本章で新たに用いた実験方法についてのみ述べる。

1. 菌株と培養条件

本章で新たに用いた菌株は、KF11 (*thi, thy, atpD11*(βSer174→Phe)) (56-58)、RE10、RE17、RE18、RE20、および、C600 (*supE44, hsdR, thi-1, thr-1, leuB6, lacY1, tonA21, mcrA*$^-$, *mcrB*$^+$) (42) である。KF11 株は、当研究室において hydroxylamine を変異原として、以前に分離・同定され、解析された株である。βサブユニット遺伝子の変異 (βSer174→Phe) のためにコハク酸培地で生育できない (56-58)。　RE10、RE17、RE18、RE20 株は、KF11 株を ethyl-methanesulfonate で処理して得られた復帰変異株で、コハク酸培地で生育できる。培養の条件は、第 2 章と同様である。

2. 復帰変異株のβサブユニット遺伝子のクローン化

コロニー・ハイブリダイゼーション法 (42) によってスクリーニングを行い、復帰変異株のβサブユニット遺伝子をクローン化した。

復帰変異株の染色体 DNA は、 DNA 抽出装置 (Applied Biosystems 社製、Model 340A) により調製した。　*Hin*dIII と *Hpa*I で消化した DNA を、5% ポリアクリルアミドゲル電気泳動し、3.7 kbp 付近を電気的に抽出した。これを、*Hin*dIII と *Pvu*II で消化した pBR322 に組み込み (図3-1)、Hanahan の方法 (59) によって C600 株に導入した。アンピシリンを含む L broth 寒天平板上に形成したコロニーを、ナイロンフィルター (NEN Research Products 社製) に移し、コロニー・ハイブリダイゼーション を行った。 プローブは、F_0F_1 遺伝子を持つ pBWU1 から切り出した *Hin*dIII - *Tth*111I 断片 (1816 bp) をテンプレートとし、(α-^{32}P)CTP を用いた randum priming 法 (42) によって調製した。 こ

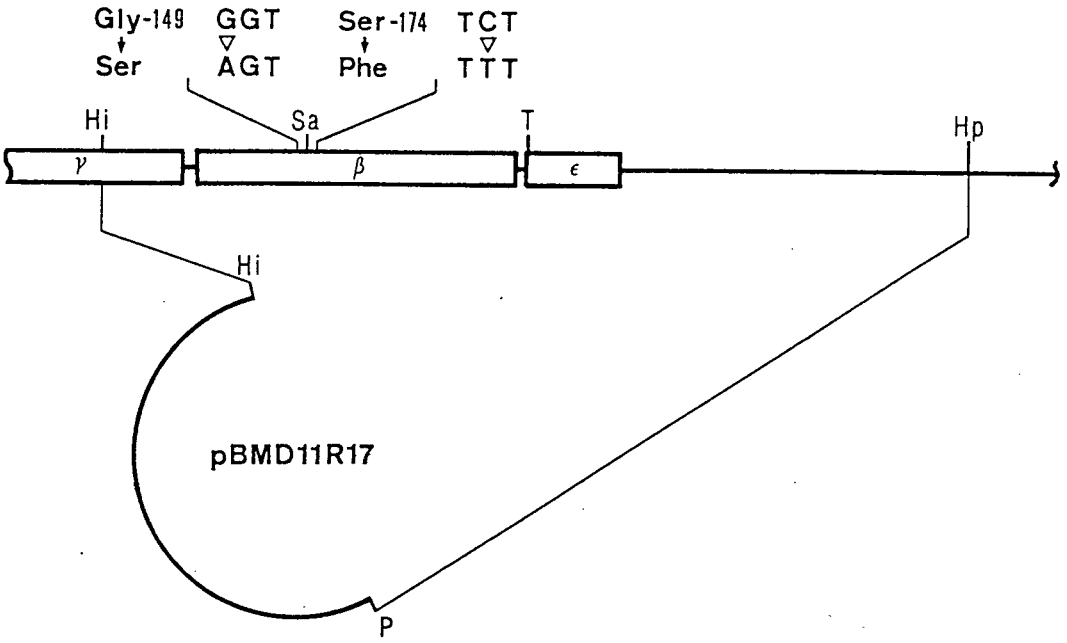


図 3-1　復帰変異株 RE17 の、βサブユニット遺伝子のクローン化と変異部位の決定。

復帰変異株の染色体 DNA より、βサブユニット遺伝子を含む領域をクローン化した。　3,692 bp の *Hin*dIII - *Hpa*I 断片は、γサブユニット遺伝子のカルボキシル末端側約半分と、βサブユニットおよびεサブユニット遺伝子のすべてを含んでいる。　この断片を、pBR322 の *Hin*dIII 部位から *Pvu*II 部位の間に挿入した（pBMD11R17）。 pBMD11R17 のβサブユニット遺伝子には、図に示したようにβSer174→Phe の変異の他にβGly149→Ser の変異が見つかった。 制限酵素部位は、 Hi（*Hin*dIII）、Hp（*Hpa*I）、Sa（*Sac*I）、P（*Pvu*II）、T（*Tth*111I）のように略号で示した。

の *Hin*dIII - *Tth*111I 断片は、γサブユニット遺伝子のカルボキシル末端側約半分とβサブユニット遺伝子全領域、εサブユニット遺伝子のアミノ末端側の一部を含んでいる。 ハイブリダイゼーションは、文献の方法に従って（42）、1 M NaCl、1% SDS、10% dextran sulfate、0.1 mg/ml サケ精子 DNA の存在下、65℃で行った。　ハイブリダイゼーションしたフィルターを、2 x SSC、0.1% SDS、65℃の条件で洗った後、さらに、0.1 x SSC、65℃で洗い、X 線フィルムを用いてオートラジオグラムを取った。陽性シグナルを与えるコロニーをかきとり、さらに、二次、三次のスクリーニングを行って、単一のクローンを得た。

3．変異残基の同定

陽性クローンより調製したプラスミドの塩基配列を決定して（38，39）、変異部位を同定した。 pBMD11R17 は、RE17 株より調製した *Hin*dIII - *Hpa*I 断片（3,692 bp）を持つ組換えプラスミドである。 合成 DNA のプライマーを用いて、βサブユニット遺伝子の、glycine-rich sequence（βGly149 - βThr156）からβSer174 をコードする領域の塩基配列を決定すると、二つのアミノ酸残基が置換していた（βGly149→Ser、βSer174→Phe）（図3-1）。

4．βサブユニット遺伝子に変異を持つ F_0F_1 発現プラスミドの構築

前章で述べたようにして、F_0F_1 プラスミド pBMUD13-AdK の *Sac*I - *Stu*I 断片を、合成 DNA のカセットで置き換え、βGly149 と βGly150 がそれぞれ Ser に変異したプラスミド（pBMUD13-G149S および pBMUD13-G150S）を構築した（図2-2）。　また、βSer174→Phe の変異を持つ pBMD11R17 の *Sac*I - *Tth*111I 断片（941 bp）を、pBWU13、pBMUD13-G149S、pBMUD13-G150S の同じ領域と置き換えた。これによって、βSer174→Phe、βGly149→Ser および βSer174→Phe、βGly150→Ser および βSer174→Phe の変異を持つ pBMUD13-S174F、pBMUD13-149SF、pBMUD13-150SF を構築した。導入した変異は、塩基配列を決定して確認した。

5. その他の方法と試薬

ATPase 活性の Mg^{2+} 依存性は、反応溶液に加える $MgCl_2$ の濃度を 0 から 8 mM まで変えて測定した。Ca^{2+} 依存性は、同様に $CaCl_2$ の濃度を変えて測定した。酵素のアジ化ナトリウム感受性は、0 - 100 mM のアジ化ナトリウムを含む反応溶液中に、6 μg タンパク量の反転膜小胞を加えて測定した。反転膜小胞の調製、タンパク質濃度の測定、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動は、第 2 章で述べた方法によって行った。

制限酵素は Nippon Gene 社、Takara Shuzo 社、Toyobo 社より購入した。Ligation kit は Takara Shuzo 社より、Sequenase kit は Takara Shuzo 社より (α-^{32}P)dCTP (>3,000 Ci/mmol) は Amersham 社より、その他の試薬は、和光純薬社より購入した特級試薬を用いた。

第 3 節　結果と考察

1. 復帰変異株 RE17 の、第二の変異部位の決定

酸化的リン酸化のできない変異株 KF11 (βSer174→Phe) は、当研究室の Kanazawa らにより分離され (56)、Noumi らによって変異アミノ酸残基が同定されたものである (57)。また、これらの論文が発表された後で、他の研究室でも同じ変異を持つ株を分離している (60)。この変異株から、当研究室で復帰変異株 RE10、RE17、RE18、RE20 が分離されていた。これらの株は、コハク酸を単一炭素源とする寒天平板上で、比較的小さいコロニーを形成した。

βサブユニットの、βSer174→Phe 変異の表現型を抑圧する原因となった第二の変異部位を決定するために、復帰変異株の染色体より、F_0F_1 の遺伝子 (*atp* オペロン) の一部を、*Hin*dIII と *Hpa*I で切り出した。この領域は、γサブユニット遺伝子の後半部分とβサブユニット遺伝子およびεサブユニット遺伝子すべてを含んでいる (図3-1)。 pBR322 に挿入してクローン化したβサブユニット遺伝子の、 glycine-rich sequence と呼ばれる領域周辺の塩基配列を決定したところ、RE17 株由来のクローンで、βGly149 のコドン GGT が Ser のコドンである AGT に変化していた (図3-1)。　このβサブユニット遺伝子には、元の変異であるβSer174→Phe が保存されており、これら二つのアミノ酸置換の他には変異は見

表 3-1　変異株 KF11（βSer174→Phe）と復帰変異株 RE17（βGly149→Ser/βSer174→Phe）の性状。

Strain	Mutation(s) in β subunit	Relative growth yield		Membrane ATPase
		15 mM succinate	5 mM glucose	
		%		units/mg (%)
KY7230	None(wild-type)	100	100	2.5 (100)
KF11	Ser174→Phe	< 2	54	0.33 (13)
RE17	Gly149→Ser Ser174→Phe	62	70	1.4 (56)

復帰変異株 RE17 は、変異株 KF11 より分離した。　また、KF11 株の親株は KY7230 株である。 コハク酸あるいはグルコースを単一の炭素源として培養し、生育（growth yield）を、野生株 KY7230 に対する割合で示した。 KY7230 株を 15 mM コハク酸培地で培養すると OD_{650} は最大 1.0 に、5 mM グルコース培地で培養すると最大 0.73 に達した。グリセロールを単一炭素源として培養した菌体から反転膜小胞を調製し 2 mM $MgCl_2$ 存在下で ATPase 活性を測定した。表には比活性および野生型酵素に対する相対活性を示した。

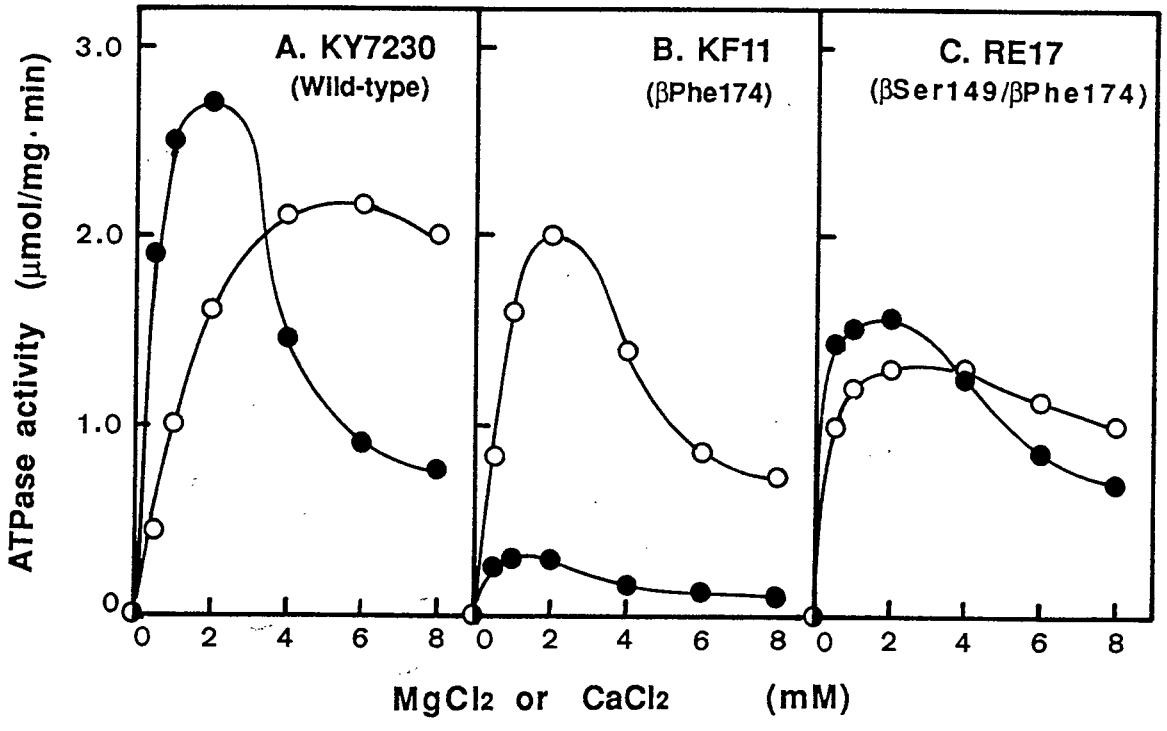


図 3-2 復帰変異株 RE17 の酵素の性状：ATPase 活性の、Mg^{2+} および Ca^{2+} 依存性。

野生株 KY7230 (A)、変異株 KF11 (B)、復帰変異株 RE17 (C) より調製した反転膜小胞の ATPase 活性を、$MgCl_2$ 濃度 (●) あるいは $CaCl_2$ 濃度 (○) を 0 - 8 mM に変えて測定した。ATP 濃度は 4 mM とした。

つからなかった。RE10、RE18、RE20 株の第二の変異は、glycine-rich sequence の周辺には存在しなかった。

2. 復帰変異株 RE17（βGly149/βPhe174） の性状

KF11 株は、コハク酸を単一炭素源とする培地ではほとんど生育できないが、復帰変異株 RE17 は、野生株 KY7230 の約 60% (growth yield) まで生育した（表3-1）。菌体から調製した反転膜小胞のATPase活性は、KF11 株の場合に、野生型の約 10% であるのに対して、RE17 株の場合には、野生型の約 60% に回復していた（表3-1）。 ATPase 活性の Mg^{2+}、Ca^{2+}依存性は、野生型および KF11 株の場合には以前の結果と一致していた（図3-2A,B）。 RE17 株では、Ca^{2+} 濃度に依存した ATPase 活性（Ca^{2+}-ATPase）は、KF11 株のものよりわずかに低下していたが、Mg^{2+} 濃度に依存した ATPase 活性（Mg^{2+}-ATPase）が著しく回復していた。（図3-2C）。これらの結果は、RE17 株では、F_0F_1 の Mg^{2+}-ATPase 活性が回復したために、コハク酸を単一炭素源にして生育できることを示している。

3. F_0F_1 を発現するプラスミドを用いた βSer149/βPhe174、および βSer150/βPhe174 変異の解析

βGly149→Ser の変異が、どのようにして βSer174→Phe 変異の表現型を抑圧したのかを、さらに詳細に検討した。そのために、第 1 章で述べた F_0F_1の 全サブユニットを発現するプラスミドを用いて、βSer174→Phe（βPhe174 変異）、βGly149→Ser（βSer149 変異）、 βSer174→Phe および βGly149→Ser（βSer149/βPhe174 変異）のそれぞれの変異を持つプラスミドを構築した（図3-3）。さらに、βGly149 の隣の Gly 残基である βGly150 を同様に置換して、βGly150→Ser（βSer150変異）、βSer174→Phe および βGly150→Ser（βSer150/βPhe174変異）の変異を持つ F_0F_1プラスミドを構築した（図3-3）。これらは、βGly149 の変異との比較に用いた。以上の変異プラスミドを、F_0F_1を欠失した DK8 株に導入して、変異酵素の性状を解析した。

まず、これらの変異酵素が、野生型と同様に反転膜小胞に存在していることを確認した。野生株および変異株より同じ方法で調製した反転膜小胞を、EDTA を含む低イオン強度の緩衝液で洗い、F_1 部分を可溶化した。 SDS を含むポリアクリ

```
                    146          149                          156                      162
                    Gly Leu Phe Gly Gly Ala Gly Val Gly Lys Thr Val Asn Met Met Glu Leu
                                Ser
Gly149  Ser  5'-a ggC CTG TTC TCC GGA GCG GGT GTA GGT AAA ACC GTT AAC ATG ATG GAG CTc-3'
             3'-t ccG GAC AAG AGG CCT CGC CCA CAT CCA TTT TGG CAA TTG TAC TAC Ctc gag-5'
                 Stu I        Mro I                                            Sac I

                                 Ser
Gly150  Ser  5'-a ggC CTG TTC GTT TCC GCG GGT GTA GGT AAA ACC GTT AAC ATG ATG GAG CTc-3'
             3'-t ccG GAC AAG CAA AGG CGC CCA CAT CCA TTT TGG CAA TTG TAC TAC Ctc gag-5'
                 Stu I                                        Hpa I            Sac I
```

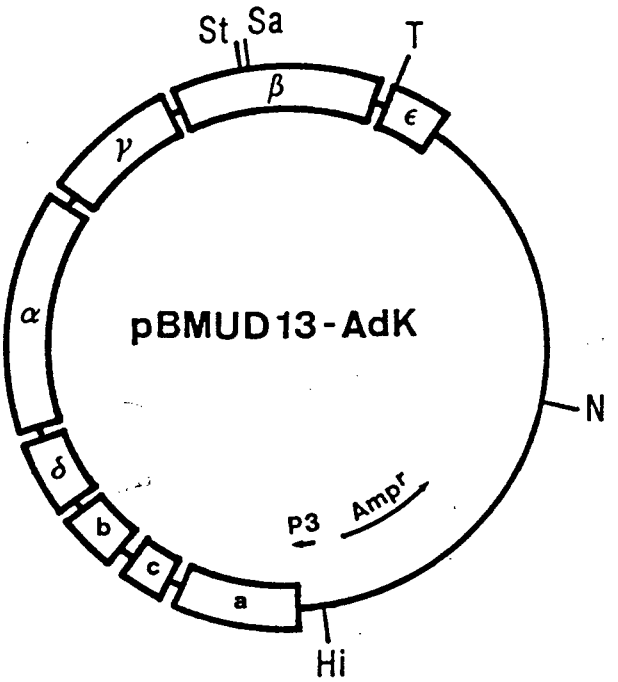


図 3-3 βサブユニット遺伝子に変異を持つ F_0F_1 発現プラスミドの構築。

pBMUD13-AdK の *Stu*I - *Sac* I 断片を、図のような合成 DNA のカセットで置き換えて、βGly149→Ser および βGly150→Serの置換変異を導入した（pBMUD13-G149S および pBMUD13-G150S）。 βSer174→Phe の変異を導入する場合には、pBWU13、pBMUD13-G149S、pBMUD13-G150S の *Sac*I - *Tth*111I 断片を、それぞれ、pBMD11R17 の同じ断片（図 3-1）と置き換えた。制限酵素部位は、Hi（*Hin*dIII）、N（*Nde*I）、Sa（*Sac*I）、St（*Stu*I）、T（*Tth*111I）のように略号で示した。*Hpa*I および *Mro*I 部位は DNA のカセットを合成する際に新たに導入した。

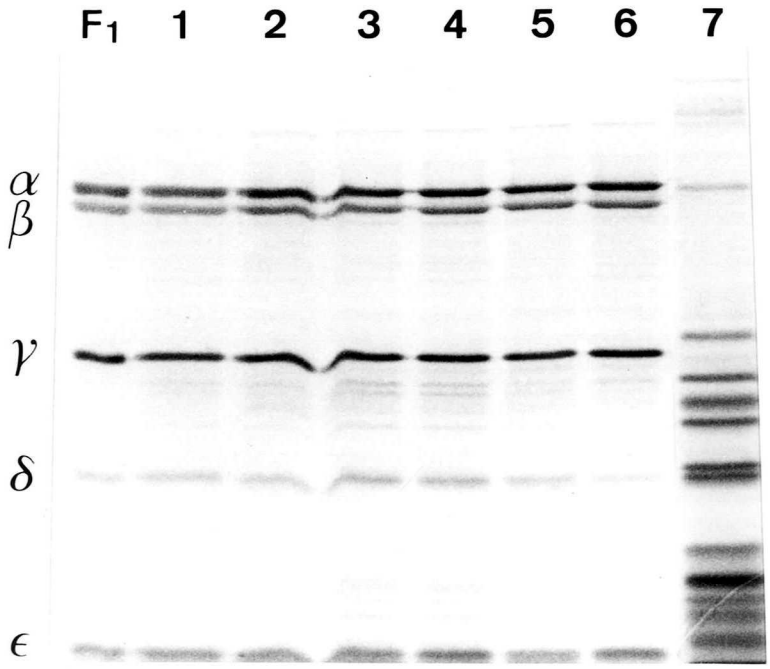


図 3-4　βSer149、βSer150、βPhe174 変異を導入した F_0F_1 発現プラスミドを持つ DK8 株より調製した EDTA 抽出画分の、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動による分析。

グリセロールを単一炭素源とした最小培地で菌を培養し、反転膜小胞を得た。これから調製した EDTA 抽出画分を 0.1% の SDS を含む 12.5% のポリアクリルアミドゲルで電気泳動後、銀染色を行った。　EDTA 抽出画分を調製するのに用いた菌は、DK8 株に、以下に示すような、野生型あるいはβサブユニットに変異を持つ F_0F_1 発現プラスミドを導入したものである。　導入されているプラスミドは pBWU13（野生型，lane 1）、 pBMUD13-S174F（βSer174→Phe，lane 2）、pBMUD13-149SF（βGly149→Ser/βSer174→Phe，lane 3）、 pBMUD13-G149S（βGly149→Ser，lane 4）、pBMUD13-150SF（βGly150→Ser/βSer174→Phe，lane 5）、pBMUD13-G150S（βGly150→Ser，lane 6）である。　また、比較のために pBR322（no F_0F_1，lane 7）を導入した DK8 株より、同様に EDTA 抽出画分を調製した。 精製 F_1 は 1 μg を、EDTA 抽出画分は 2 μg のタンパク質量を用いて電気泳動を行った。　βサブユニットに変異を導入したいずれの場合も、野生型と同様に、F_1 が可溶化されていた。

表 3-2 F_0F_1 発現プラスミドのβサブユニット遺伝子への変異導入。DK8 株で発現させたときの酸化的リン酸化活性と反転膜小胞の ATPase 活性。

Plasmid	Mutation(s) in β subunit	Growth on succinate	Membrane ATPase
		%	units/mg (%)
pBWU13	None (wild-type)	100	24.7 (100)
pBMUD13-S174F	Ser174→Phe	< 5	3.02 (12)
pBMUD13-149SF	Gly149→Ser/Ser174→Phe	85	9.92 (40)
pBMUD13-150SF	Gly150→Ser/Ser174→Phe	< 5	0.82 (3.3)
pBMUD13-G149S	Gly149→Ser	94	20.9 (85)
pBMUD13-G150S	Gly150→Ser	95	25.2 (102)

酸化的リン酸化の活性は、コハク酸を単一炭素源とした培地での生育（growth yield）を指標とした。野生型の F_0F_1 遺伝子を持つ pBWU13 を導入した場合、OD_{650} は最大 0.80 に達した。βサブユニット遺伝子に変異を持つ場合の生育は、野生型に対する割合で示した。プラスミドを持つ DK8 株を、グリセロールを単一炭素源として培養し、菌体から反転膜小胞を調製した。表 3-1 と同様に反転膜小胞の ATPase 活性を測定し、かっこのなかには野生型の活性に対する相対活性を示した。

ルアミドゲルで電気泳動した結果、F_1 の各サブユニットの量は、変異によって変わらなかった。したがって、いずれの変異酵素も膜上にほぼ等量存在していることが明らかになった（図3-4）。

導入した変異によって、酵素活性がどのように影響を受けたか、表 3-2 に結果を示した。βPhe174 変異だけを F_0F_1 プラスミドに導入すると、DK8 株はコハク酸培地で生育しなかったが、第二の変異として、βGly149→Ser を導入すると（βSer149/βPhe174変異）生育が回復した。また、βPhe174 変異の ATPase 活性が野生型の約 10% なのに対して、生育が回復したβSer149/βPhe174 変異では、野生型の 40% に上昇していた。以上の結果は、変異株 KF11 と復帰変異株 RE17 について得られた結果と一致しており、βPhe174 変異の表現型を抑圧したのはβSer149 変異であることを確認したことになる。一方、βSer150 を第二の変異として導入した場合には（βSer150/βPhe174 変異）、活性はまったく回復せず、抑圧の効果は、βSer149 変異に特異的であった。

βGly149→Ser（βPhe174変異）、あるいは、βGly150→Ser （βSer150 変異）を単独で導入すると、コハク酸培地での生育、および、反転膜小胞の ATPase 活性ともに野生型とほとんど変わらなかった。単独の変異では、活性にほとんど影響しないこれらの二つの変異のうち、なぜ、βSer149 変異だけが βPhe174 変異の表現型を抑圧できたのかをさらに検討した。

4. βGly149、βGly150 および βSer174 残基の変異が、ATPase活性の Mg^{2+} および Ca^{2+} 依存性に及ぼす効果

すでに報告されているように（56）KF11 株（βPhe174変異）の ATPase 活性の Mg^{2+} また Ca^{2+} 依存性は野生型とは大きく変化する（図3-2A,B）。そのため、βSer174 は、2 価 カチオン（Mg^{2+} あるいは Ca^{2+}）の結合部位あるいはその近傍に位置する残基であることが示唆された（56）。βSer174 残基の変異の表現型を βGly149 残基の変異が抑圧する機構を 分子レベルで明らかにするために、βSer174、βGly149、βGly150 残基に変異導入した酵素の、Mg^{2+}-ATPase 活性および Ca^{2+}-ATPase 活性を測定し比較した（図3-5）。RE17 株（βSer149/βPhe174 変異）では、Mg^{2+} 依存性の ATPase 活性が回復していた（図3-2C）。*In vivo* の酸化的リン酸化活性の回復が Mg^{2+}-ATPase 活性の回復と一致することは、プラスミドに変異を導入した結果からも確認できた。βSer149/βPhe174 変異では、Ca^{2+} ではなく、Mg^{2+}-ATPase 活性が回復していたが、βSer150/βPhe174 変

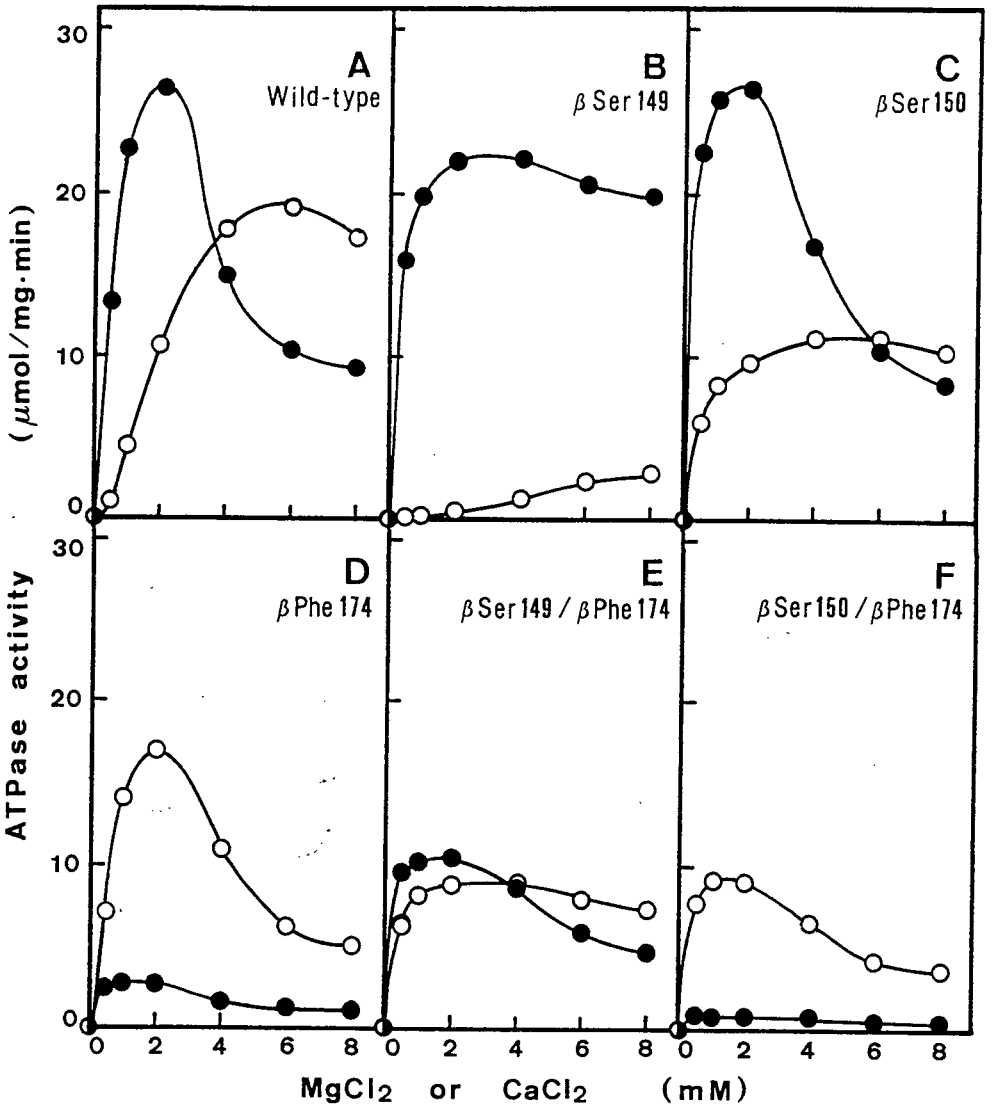


図 3-5 βGly149、βGly150 および βSer174 残基の変異が Mg^{2+} および Ca^{2+} 依存性 ATPase 活性に及ぼす効果

野生型（A）、および βSer149（B, βGly149→Ser）、βSer150（C, βGly150→Ser）、βPhe174（D, βSer174→Phe）、βSer149/βPhe174（E, βGly149→Ser/βSer174→Phe）、βSer150/βPhe174（F, βGly150→Ser/βSer174→Phe）の変異酵素が存在する反転膜小胞の ATPase 活性を、$MgCl_2$（●）または $CaCl_2$（○）濃度を変えて測定した。

異では、測定した $MgCl_2$ 濃度領域すべてにわたって、有意な Mg^{2+}-ATPase 活性は見られなかった（図3-5A,D-F）。

βSer150 変異の Mg^{2+}-ATPase 活性は、野生型と同様で 2 mM $MgCl_2$ のとき最大になり、これを越えると顕著に阻害された。8 mM $MgCl_2$ のときの βSer150 変異の活性は、2 mM のときの 32% に阻害されていた（図3-5A,C）。これに対してβSer149 変異の場合には、2 mM 以上の $MgCl_2$ を加えてもほとんど阻害は見られなかった。8 mM $MgCl_2$ を加えた場合にも 2 mM のときの 89% の活性が残っていた（図3-5B）。 Ca^{2+}-ATPase 活性も、βSer150 変異では野生型とほぼ同様であったのに対して βSer149 変異では 2 mM $CaCl_2$ 濃度まで、ほとんど有意な活性を示さないほど低下していた。 以上の結果は、βSer174 残基と同様、βGly 149 残基も、2 価カチオンの結合部位あるいはその近傍に位置していることを示唆している（56）。 したがって、βSer149/βPhe174 変異では、βPhe174 変異によって変化した活性中心の Mg^{2+}結合部位の構造が、βSer149 変異によって回復し、Mg^{2+}-ATPase 活性が上昇した可能性がある（図3-5E）。

5. 変異酵素および野生型酵素のアジ化ナトリウムに対する感受性

アジ化ナトリウムは本酵素の活性を特異的に強く阻害するということが知られている（61）。 この物質は、活性中心の近傍に結合すると考えられている。βSer149 および βSer150 の変異を持つ酵素は、アジ化ナトリウムに対する感受性が低下した（図3-6）。 Mg^{2+} 存在下で、ATPase活性を 50% 阻害するアジ化ナトリウム濃度は、野生型、βSer150 変異および βSer149 変異の場合、それぞれ、0.034 mM、0.13 mM、および 4.3 mM であった（図3-6A）。βSer149 変異の場合には野生型の酵素より、アジ化ナトリウム感受性が 100 倍以上低下していた。βPhe174 変異酵素は、野生型よりわずかに感受性が低下しており、以前の結果とよく一致した（58）。 これに、第二の変異として、βSer149、および、βSer 150を導入すると、さらに、アジ化ナトリウム感受性が低下した。 同様に、活性を 50% 阻害するのに必要な濃度は、βPhe174 変異、βSer150/βPhe174 変異および βSer149/βPhe174 変異の場合、 それぞれ 0.051 mM、1.8 mM および 1.6 mM であった。 Ca^{2+} 存在下で ATPase 活性を測定すると、上の結果と同様に、野生型の酵素 および βPhe174 変異酵素に、さらに βSer149 変異 または βSer150 変異を導入した場合にアジ化ナトリウム感受性が大きく低下した （図3-6B）。ただし、βSer150 の変異のみの場合には、野生型とほとんど変わらなか

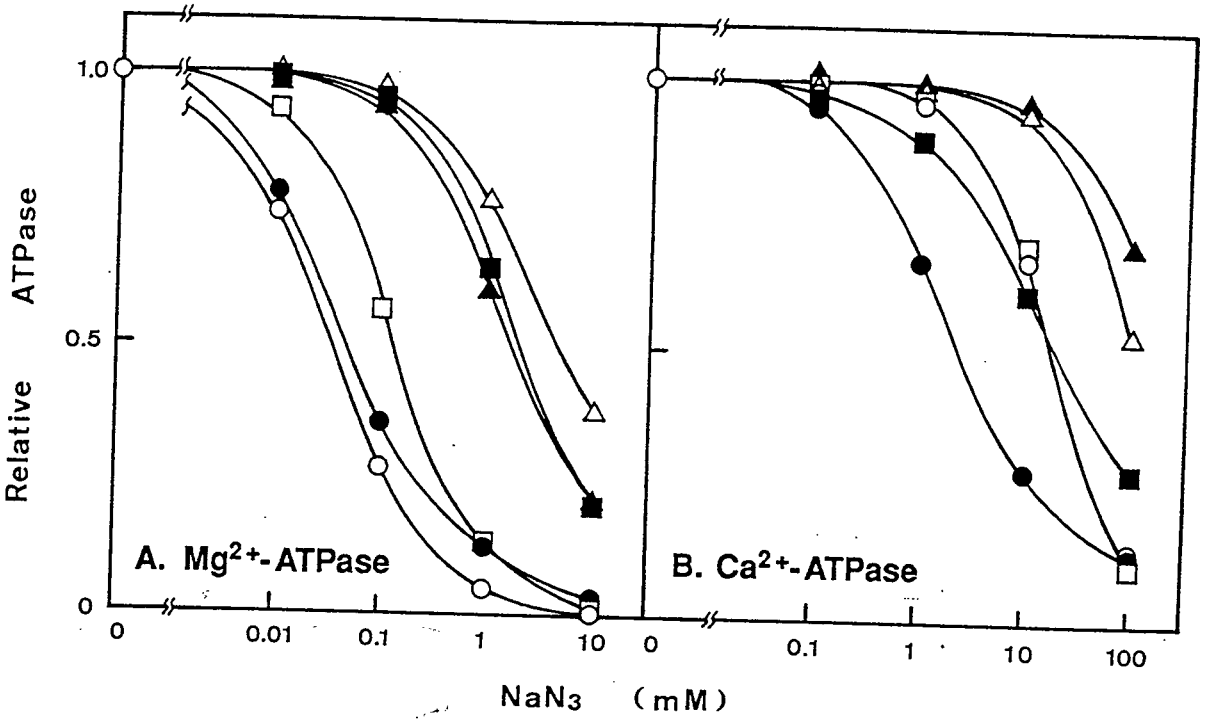


図 3-6 変異酵素の ATPase 活性に及ぼすアジ化ナトリウムの効果

反転膜小胞の、Mg^{2+}依存性 ATPase 活性（A）および Ca^{2+}依存性 ATPase 活性（B）を、アジ化ナトリウムの濃度を変えて測定した。野生型（○）、およびβサブユニットに変異を持つ酵素（βSer149,△；βSer150,□；βPhe174,●；βSer149/βPhe174,▲；βSer150/βPhe174,■）に、10 mM（または 100 mM）までのアジ化ナトリウムを加えて ATPase 活性を測定した。アジ化ナトリウムを加えないときの活性に対する相対活性で示した。 測定に使用した反転膜小胞の量は、6 μg（タンパク量）に揃えた。

った。

以上の結果は、βGly149 および βGly150 残基が、アジ化ナトリウムによるATPase 活性の阻害に重要であることを示している。すでに当研究室で分離・同定された変異株 KF43（βArg246→His）（62）や、他の研究室で分離されたαサブユニット変異株の復帰変異株（63）で、アジ化ナトリウムに対する感受性の低下が起きることが示されている。また、酵母のαサブユニットおよびβサブユニット変異株でも感受性が変化することが示されている（64，65）。これらのことから、アジ化ナトリウムによる阻害機構には、βGly149、βGly150、βArg246、また、まだ同定されていないαサブユニット上の残基が関与していると考えることができる。これらの残基の位置は、触媒部位の近傍である可能性がある。

第 4 節　まとめ

KF11 株は、βSer174 残基が Phe に置換して酵素活性を失っている。この株から分離した復帰変異株 RE17 株では、βSer174→Phe の変異の他に、glycine-rich sequence 中に位置する βGly149 残基が Ser に置換していた。これらの変異を F_0F_1 プラスミドに導入して詳しく検討した結果、βSer174→Phe の変異の効果は、βGly150 残基ではなく βGly149 残基が Ser に変異すると抑圧されることが明らかになった。また、βSer174→Phe、βGly149→Ser の変異が起きると、Mg^{2+}-ATPase 活性、Ca^{2+}-ATPase 活性が野生型とは異なってくることから、これらの残基が、活性中心の 2価カチオンの結合部位あるいはその近傍に存在することが示唆された。さらに、アジ化ナトリウムに対する感受性は、βGly149→Ser の変異によって著しく低下した。βGly150 残基が変異した場合にも、感受性はわずかに低下し、これらの残基は触媒部位の近傍に位置していることが示唆された。

第 4 章　ATP のリン酸基の近傍にある βVal198 - βLys201 の領域

第 1 節　緒論

前章で述べたように、βサブユニットの βSer174→Phe 変異の効果は、同じサブユニットの、βGly149 残基が Ser に置換すると抑圧された。この βGly149 は、glycine-rich sequence (βGly149 - βThr156) のアミノ末端側に位置している。 Glycine-rich sequence を持つ多くのヌクレオチド結合タンパク質のうち、アデニレート・キナーゼ (66) 、*ras* 遺伝子産物である p21 タンパク質 (67-69) 、elongation factor Tu (70) の 3 種類の高次構造が、現在、結晶の X 線解析によって明らかにされている (71-75) 。それらの構造を比較すると、どの glycine-rich sequence も、β-strand とα-helix の間をつなぐ loop の構造をとっている。この loop は、ヌクレオチドのリン酸基の結合部位を構成しているため、P-loop と呼ばれることもある (48) 。βサブユニットの βGly149 - βThr156 の領域は、触媒活性に重要な残基を多く含んでおり、同様な P-loop を形成していることが示唆されている。したがって、βGly149 - βThr156 の領域と相互作用する残基 (領域) は、活性中心を構成する残基あるいは活性中心近傍に存在する残基を含んでいる可能性がある。

本章では、まず、βSer174→Phe 変異を抑圧する機構を、さらに詳細に検討するために、βGly149 を Ala、Cys、Thr に置換した。 これらの変異は βSer174 →Phe 変異と共に F_0F_1 発現プラスミドに導入した。 また、βGly149 - βThr 156 の領域に起こった変異を抑圧する、βサブユニットの変異を得るために、polymerase chain reaction (PCR) を用いて領域特異的に変異を導入する方法を確立した。この方法によって、βGly149→Cys 変異を、βVal198→Ala 変異が抑圧することを明らかにした。

第 2 節　実験方法

前章までに述べた方法については詳細を省き、本章で新たに用いた実験方法についてのみ述べる。

1. 菌株と培養条件

本章で用いた菌株と培養条件については前章で述べた。

2.用いた組換えプラスミド

野生型あるいはβサブユニットに変異を持つ F_0F_1 を発現するプラスミド、pBWU13、pBMUD13-S174F は前章で述べた。後述する polymerase chain reaction (PCR) による領域特異的な変異導入のために、組換えプラスミド pUDSE709 (76) を用いた。 pUDSE709 はβサブユニットの βLeu162 - βArg398 をコードする *Sac*I - *Eco*47III の断片 (709 bp) を持っている。　DNA 断片は、あらかじめ *Eco*47III の認識配列を導入しておいた pUC18 の、multi-cloning site に導入されている。また、pUDSE709 のβサブユニット遺伝子には、合成 2 本鎖 DNA による cassette-mutagenesis によって、アミノ酸配列は変えないような形で、新たに *Cla*I、*Acc*III、*Xho*I の認識配列が、導入されている。

3. polymerase chain reaction (PCR) を用いた領域特異的な変異導入

pUDSE709 を template とし、pUC18 の multi-cloning site の上流および下流域に結合する二つのプライマーを用いて、Perkin Elmer Cetus 社製の AmpliTaq kit によって遺伝子を増幅した (77) 。1 ng の pUDSE709、20 pmol ずつのプライマーと 1 unit *Taq* polymerase を、10 mM Tris-HCl (pH 8.3 at 25℃)、 50 mM KCl、1.5 mM $MgCl_2$、0.001% ゼラチンと各種 dNTP を含む緩衝液中に加え、総容量 50 μl とした。　このとき、dTTP 濃度を 0.2 μM に限定し、dATP、dCTP、dGTP は 100 μM とする反応条件で 1サイクル (”94℃、2.5分” → ”55℃、2分” →”72℃、4分”) の反応を行った。その後、dTTP を 100μM になるように加えてから、”94℃、1分” → ”55℃、2分” → ”72℃、2分” の反応を 24サイクル行い、最後に 72℃、2分の反応を追加した。反応液の蒸発を防ぐために重層してあった

ミネラルオイルをピペットマンでできるだけ除き、等量のフェノール／クロロホルム（1:1）を加えてよく攪拌した後に水層を抽出した。水層の容量の 1/10量の 3 M 酢酸ナトリウム溶液(pH 5.2)と 2 倍量のエタノールを加えて -80℃で15分間静置した後遠心を行った。 DNA 沈澱はエタノールで洗ってから乾燥し、TE 緩衝液 [10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA] に溶解した。これを 5% ポリアクリルアミドゲルで電気泳動を行うと、約 790 bp のバンドが検出できた。 このDNA のバンドを電気的に抽出し、*Sac*I および *Eco*47III で消化した。

4. 抑圧変異のスクリーニング

*Sac*I と *Eco*47III で消化した上記の PCR 産物約 0.3 μg を、同様に *Sac*I および *Eco*47III で消化した約 0.7 μg の pBMUD13-G149C と合わせて ligase 処理を行った。 この後、エタノール沈澱を行って、DNA を 5 μl の 蒸留水に溶解した。 DK8 株を受容菌として、文献の方法によって electroporation による DNA 導入を行った（78, 79）。 コハク酸を単一炭素源とする寒天培地に、10^4 程度の形質転換コロニーが生えるように菌液を塗布し、37℃で 48時間 または 72時間放置した。直径約 0.5 mm 以上のコロニーを復帰変異株として選択し、プラスミドの 塩基配列を決定した。

5. その他の方法と試薬

本節で述べなかった方法は、第 2 章、第 3 章ですでに述べた。

制限酵素は、Nippon Gene 社、Takara Shuzo 社、Toyobo 社より、Ligation kit は Takara Shuzo 社より、Sequenase kit は Takara Shuzo 社より、(α^{32}-P)dCTP (>3,000 Ci/mmol)は Amersham 社より購入した。その他の試薬は和光純薬社より購入した特級試薬を用いた。

第 3 節　結果と考察

1. βAla149、βCys149、βThr149 変異の酵素活性に及ぼす効果

βGly149 残基を、合成 2 本鎖DNA を用いた cassette-mutagenesis によって、Ala、Cys、Thr に置換した（図4-1）。βGly149 を Ala に置換した場合には、コハク酸を単一炭素源とする液体培地で野生型と変わらず生育したが、Cys または Thr に置換した場合には、growth yield にして野生型の 5% に達せず、ほとんど生育しなかった（表4-1）。

各々の変異株より調製した反転膜小胞の ATPase 活性は、コハク酸培地での生育にほぼ一致していた。βAla149 変異の場合には、野生型と同様の活性が見られたが、βCys149 変異および βThr149 変異では、それぞれ野生型の 8.4% および 0.7% に低下していた。これらの反転膜小胞のタンパク質を SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分析したところ、どの変異酵素も、野生型の酵素とほぼ等量のサブユニットを有しているのが確認できた（図4-2, lane 1, 3-5）。

2. βSer174→Phe 変異を抑圧する βGly149 の変異

上述のようにして導入したβCys149、βAla149、βThr149 変異が βSer174→Phe 変異を抑圧するかどうかは興味深い。そこで、βPhe174 変異を持つ F_0F_1 発現プラスミド pBMUD13-S174F の、βGly149 を Ala、Cys、Thr に置換した（表4-1）。βAla149 変異を導入した場合には、βPhe174 変異を抑圧して、野生型と同様に生育した。βCys149 変異も、βPhe174 変異を抑圧し、野生型の 66% まで生育することができた。βThr149 変異を導入した場合には、まったく生育できなかった。

これらの変異を持つ菌より、反転膜小胞を調製し、ATPase 活性を測定すると、結果はコハク酸培地における生育とよく一致していた（表4-1）。βPhe174 変異に加えて、βGly149 が Ala、Cys に置換していると（βAla149/βPhe174 変異、βCys149/βPhe174 変異）、ATPase 活性は、それぞれ野生型の 117%、10%、となった。つまり、βPhe174 変異は、βGly149 残基を Ala に置換すると、完全に抑圧され、Cys に置換するとわずかながら抑圧された。また、Thr に置換すると（βThr149/βPhe174）活性は完全に失われた。これらの反転膜小胞を、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動したところ、βThr149/βPhe174 変異の場合、F_0F_1

```
                146         149                                                 162
                Gly Leu Phe Gly Gly Ala Gly Val Gly Lys Thr Val Asn Met Met Glu Leu

                            Ala
Gly149→Ala  5'-a ggC CTG TTC GCG GGT GCG GGT GTA GGT AAA ACC GTT AAC ATG ATG GAG CTc-3'
            3'-t ccG GAC AAG CGC CCA CGC CCA CAT CCA TTT TGG CAA TTG TAC TAC Ctc gag-5'
                Stu I                                           Hpa I           Sac I
                            Cys
Gly149→Cys  5'-a ggC CTG TTC TGT GGT GCG GGT GTA GGT AAA ACC GTT AAC ATG ATG GAG CTc-3'
            3'-t ccG GAC AAG ACA CCA CGC CCA CAT CCA TTT TGG CAA TTG TAC TAC Ctc gag-5'
                Stu I                                           Hpa I           Sac I
                            Thr
Gly149→Thr  5'-a ggC CTG TTC ACC GGT GCG GGT GTA GGT AAA ACC GTA AAC ATG ATG GAG CTc-3'
            3'-t ccG GAC AAG CGG CCA CGC CCA CAT CCA TTT TGG CAT TTG TAC TAC Ctc gag-5'
                Stu I       Cfr 10I                                             Sac I
```

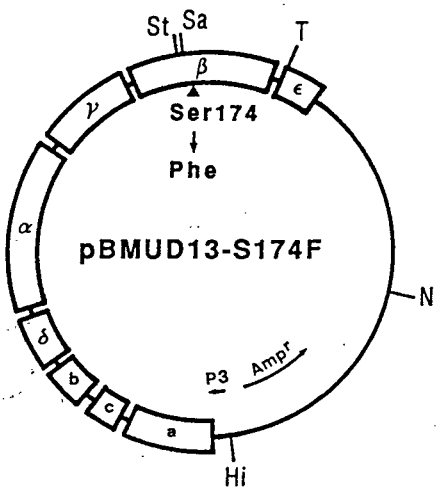


図 4-1 βGly149 残基の Ala、Cys、Thr への置換

βPhe174 変異が導入されている F_0F_1 発現プラスミド (pBMUD13-S174F) の *Stu*I - *Sac*I 断片を、 合成 2 本鎖 DNA で置き換えて βGly149 に第二の変異 (βAla149、βCys149、βThr149) を導入した。構築したプラスミドをpBMUD13-149AF、pBMUD13-149CF、pBMUD13-149TF と名づけた。 βAla149、βCys149、βThr149 変異をそれぞれ単独で導入し、 pBMUD13-G149A、pBMUD13-G149C、pBMUD13-G149T を構築する場合には、pBMUD13-AdK の *Stu*I - *Sac*I 断片を、上と同じ合成 2 本鎖 DNA 置き換えた。制限酵素部位は、H (*Hin*dIII) 、N (*Nde*I) 、Sa (*Sac*I) 、St (*Stu*I) 、T (*Tth*111I) のように略号で示した。*Hpa*I、*Cfr*10I 部位は DNA のカセットを合成する際に新たに導入した。

表 4-1 βSer174→Phe 変異の効果を抑圧する βGly149 残基の置換変異。

Plasmid	Mutation in βsubunit	Growth on succinate	Membrane ATPase
		%	units/mg (%)
pBWU13	None (wild-type)	100	22.2 (100)
pBMUD13-S174F	Ser174→Phe	< 5	1.77 (8.0)
pBMUD13-149AF	Gly149→Ala/Ser174→Phe	86	19.8 (89)
pBMUD13-149CF	Gly149→Cys/Ser174→Phe	66	2.30 (10)
pBMUD13-149TF	Gly149→Thr/Ser174→Phe	< 5	0.038 (0.17)
pBMUD13-G149A	Gly149→Ala	94	26.0 (117)
pBMUD13-G149C	Gly149→Cys	< 5	1.87 (8.4)
pBMUD13-G149T	Gly149→Thr	< 5	0.155 (0.7)

酸化的リン酸化の活性は、コハク酸を単一の炭素源とした最小培地での生育(growth yield)を指標とした。野生型の F_0F_1 遺伝子を持つ pBWU13 を導入した場合、OD_{650} は最大 0.82 に達した。プラスミドに変異を持つ場合の生育は、野生型に対する割合で示した。野生型あるいは変異を持つプラスミドを導入した DK8株をグリセロールを単一の炭素原とした最小培地で培養し、反転膜小胞を調製した。これを用いて ATPase 活性を測定した。かっこのなかには、野生型の活性に対する相対活性を示した。

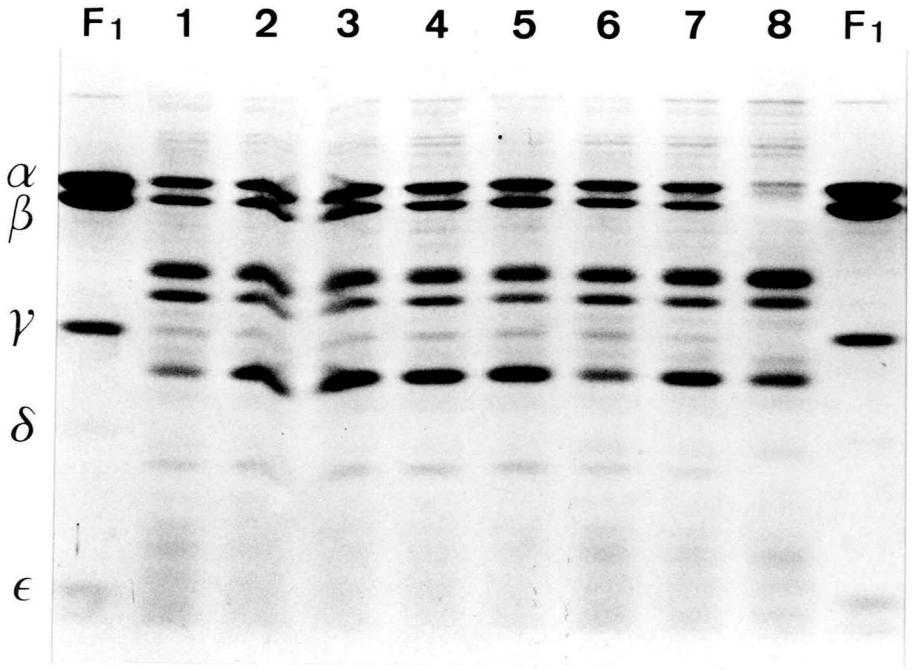


図 4-2　βGly149 残基 および βSer174 残基に変異導入した反転膜小胞の SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動

グリセロールを単一の炭素源として含む最小培地で、 F_0F_1 発現プラスミドを持つ DK8 株を培養し、反転膜小胞を調製した。　反転膜小胞 30 μg（タンパク量）を、0.1% SDS を含む 12.5% ポリアクリルアミドゲルで電気泳動した後、coomassie brilliant blue 染色した。野生型（lane 1）、βPhe174 変異（lane 2）、βAla149 変異（lane 3）、βCys149変異（lane 4）、βThr149 変異（lane 5）、βAla149/βPhe174 変異（lane 6）、βCys149/βPhe174 変異（lane 7）の各々の反転膜小胞には、同様に α、β、γ サブユニットが認められた。しかし、βThr149/βPhe174 変異の反転膜小胞には、いずれのサブユニットも認められなかった（lane 8）。　精製 F_1 は 4 μg（タンパク量）を用いた。

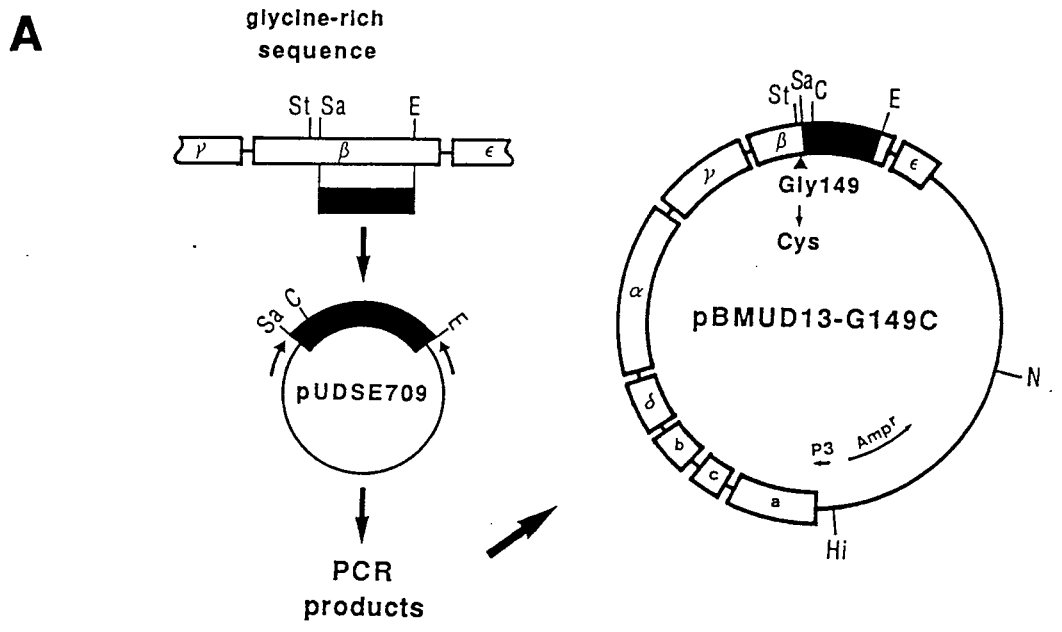
のサブユニットはまったく見られなかった。 これらの変異が一つずつではなく同時に導入されると、F_0F_1 の分子集合ができなくなることが示された（図4-2, lane 2,5,8）。他の変異酵素は、いずれも野生型とほぼ同じ量が、反転膜小胞上に存在していた（図4-2, lane 6,7）。

以上のことから、βPhe174 変異を抑圧するには、βGly149 残基の位置に Ala（残基体積 91.5 Å^3）、Ser（同 99.1Å^3）のような比較的小さい残基（80）を持つアミノ酸が必要であると考えた。 Ala 残基でも抑圧できたことは、βPhe174 変異の効果を抑圧するには、βGly149 残基の位置に水酸基の側鎖を持つアミノ酸が必要でないことを示している。Cys 残基（残基体積 105 Å^3）は、Ala、Ser よりわずかに大きく（80）、βCys149 変異が部分的にしか変異を抑圧できなかったことと一致する。さらに大きい Thr 残基（残基体積 115 Å^3）（80）は、F_1 の分子集合を妨げた。 さらに興味深いことに、βCys149 変異を単独で持つ菌は、前述のようにコハク酸培地で生育できなかった。しかし、これに加えて βSer174 残基が Phe に置換していると生育できるようになり、この場合には、βPhe174 変異が βCys149 変異を抑圧したと考えることができる。したがって、βGly149→Cys 変異を抑圧する他の領域の変異部位を同定することによって、活性中心の近傍の残基・領域が、さらに明らかになることが期待できる。

3. PCR による領域特異的な変異導入と、抑圧変異のスクリーニング

第 3 章で述べたように、glycine-rich sequence が活性中心の一部を構成していると考えると、さらに、この配列の周囲に存在する残基を同定することは重要である。そこで、βサブユニット遺伝子の glycine-rich sequence を除く領域に、様々な変異を導入し、その中から、βGly149→Cys 変異の効果を抑圧するものを選択することを考えた。

ここでは、変異原を用いることなく、PCR による領域特異的な変異導入の方法を検討した（図4-3）。 PCR の 最初のサイクルで、dTTP 濃度だけを *Taq* polymerase の Km 値以下に限定して反応を行なった。 *Taq* polymerase には塩基の取り込みの間違い（misincorporation）を修正する機能がないため（77）、dTTP の代わりに他のデオキシヌクレオチドが取り込まれると変異として固定されると考えた。βCys149 変異を持つ F_0F_1 プラスミド（pBMUD13-G149C）の glycine-rich sequence （βGly149 - βThr156）よりカルボキシル末端側、約 4/5 にあたる領域を、この PCR 産物で置き換え、DK8 株に導入した。2.8 x 10^4



B

```
      198          201
Asn Val Ile Asp Lys Val
-AAC GTT ATC GAC AAA GTA-
      ↓
      GCT
      Ala
```

図 4-3 βサブユニットへの領域特異的な変異導入によって βCys149 変異の抑制変異を分離する方法

A. βサブユニット遺伝子の *Sac*I - *Eco*47III 断片 (709 bp) をクローン化した。 このプラスミド (pUDSE709) (76) をテンプレートとして、*Sac*I - *Eco*47III 断片を含む領域を PCR によって増幅させた。このとき、dTTP の濃度を他のデオキシヌクレオチドの 1/500 に制限して 1 cycle の反応を行った。その後、dTTPを他と同じになるように加えて (100 μM) 、25 cycle 反応させた。PCR 産物を*Sac*I と *Eco*47III で消化して、同じく *Sac*I と *Eco*47III 消化した pBMUD13-G149C に挿入した。 これを、 DK8 株に導入し、酸化的リン酸化の回復したコロニーを、コハク酸を単一の炭素源とする寒天平板状で生育できることを指標に分離した。制限酵素部位は、C (*Cla*I) 、E (*Eco*47III) 、H (*Hin*dIII) 、N (*Nde*I) 、Sa (*Sac*I) 、St (*Stu*I) のように略号で示した。

B. 37℃で 48 あるいは 72 時間後に、直径 0.5 mm 程度以上に生育したコロニーを分離し、プラスミドを調製した。F_0F_1 プラスミドの塩基配列を決定したところ、βCys149 変異を保持し、さらに、βVal198 残基が Ala に置換していた。βLys201 残基は、AP_3-PL が結合するために ATP のγ位のリン酸基近傍に位置していると考えられる残基である。

個のアンピシリン耐性コロニーの中から、コハク酸培地で生育できる復帰変異株が 4 個出現した。 これらのコロニーからプラスミドを調製して塩基配列を決定したところ、すべてにおいて、βGly149→Cys 変異は保持されており、さらに、βVal198 のコドンが、GTT から、Ala をコードする GCT に変化していた（図4-3）。 βVal198→Ala が、βGly149→Cys の抑圧変異となったことは、βVal198→Ala 変異を含む *Sac*I - *Cla*I 断片（114 bp）を、新たに構築した pBMUD14-G149C の*Sac*I - *Cla*I 断片と置き換えて、コハク酸培地で生育が回復することから確認した。pBMUD14-G149C は、図4-1 で構築した pBMUD13-G149C の *Sac*I - *Eco*47III 断片を、pUDSE709 のものと置換することによって残基置換が起きないようにして新たな制限酵素部位を導入してある（76）。 βVal198 残基より 3 残基カルボキシル末端側の βLys201 残基は、adenosine triphosphopyridoxal（AP_3-PL）のピリドキサール基によって修飾される残基である（17-19）。 したがって、βVal198 残基は、実際に βGly149 残基に近いと考えてよいだろう。

4. 基質の結合に関与しうる残基と領域

Glycine-rich sequence と相互作用することが示唆された Ser174 残基および Val198 残基がどのような位置にあるのかを知るために、すでに高次構造が明らかになっている p21 *ras* タンパク質との比較が可能かどうかを検討した。そのために、459 アミノ酸残基から成る大腸菌 F_0F_1 のβサブユニットと 189 アミノ酸残基から成る p21 *ras* タンパク質のアミノ酸配列（69）を比較した（図4-4）。二つの配列の glycine-rich sequence が合うように並べて、二ヶ所にギャップを挿入し、より小さい *ras* タンパク質と重なった部分だけで相同性を計算すると 14 % にすぎない。つまり、全体の一次構造はほとんど似ていないと言える。しかし、*ras* タンパク質の結晶構造解析からヌクレオチドの結合に重要な役割を持つとされた残基・領域が、βサブユニットの一次構造においても保存されていることは注目すべき点である（図4-4）。 前述したように、リン酸基の結合部位を含む、*ras* タンパク質の Gly10 - Ser17 の glycine-rich sequence (Gly-Ala-Gly-Gly-Val-Gly-Lys-Ser) は、βサブユニットでは、活性に重要な残基を多く含んでいる βGly149 - βThr156 の配列 (Gly-Gly-Ala-Gly-Val-Gly-Lys-Thr) としてよく保存されていた。8 残基の配列のうち 5 残基は完全に保存されており、残りの 3 残基も保存的な置換（81）であった。

```
β subunit          ATGKIVQVI GAVVDVEFPQ DAVPRVYDAL EVQNGNERLV LEVQQQLGGG   49

β subunit          IVRTIAMGSS DGLRRGLDVK DLEHPIEVPV GKATLGRIMN VLGEPVDMKG   99

                                                                 *. . *
β subunit          EIGEEERWAI HRAAPSYEEL SNSQELLETG IKVIDLMCPF AKGGKVGLFG   149
                                                               MTEYKLVVVG   10

                   ..*****.   ..** *  ..     ..  .    .  .*.     .. *.
β subunit          GAGVGKTVNM MELIRNIAIE HSGYSVF-AG VGERTREGND FYHEMTDSNV   198
p21 ras protein    AGGVGKSALT IQLIQNHFVD EYDPTIEDSY RKQVVIDGET CLLDILDTAG   60
                        ▲                 △ ▲                        ▲

                    . * . *   ..   *  *    * .     . *. .   * .    .
β subunit          IDKVSLVYGQ MNEPPGNRLR VALTGLTMAE KFRDEGRDVL LFVDNIYRYT   248
p21 ras protein    QEEYSAMRDQ YMRTGEGFLC VFAINNTKSF EDIHQYREQI KRVKDSDDVP   110

                   .        * . .        **     .    **.**          .
β subunit          LAGTEVSALL GRMPSAVGYQ PTLAEEMGVL QERITSTKTG SITSVQAVYV   298
p21 ras protein    MVLVGNKCDL AARTVESRQA QDLA-RSYGI PYIETSAKTR QGVEDAFYTL   159

                    .          .   ..   .*
β subunit          PADDLTDPSP ATTFAHLDAT VVLSRQIASL GIYPAVDPLD STSRQLDPLV   348
p21 ras protein    VREIRQHKLR KLNPPDESGP GCMSCKCVLS                         189

β subunit          VGQEHYDTAR GVQSILQRYQ ELKDIIAILG MDELSEEDKL VVARARKIQR   398

β subunit          FLSQPFFVAE VFTGSPGKYV SLKDTIRGFK GIMEGEYDHL PEQAFYMVGS   448

β subunit          IEEAVEKAKK L                                             459
```

図 4-4　大腸菌βサブユニットと p21 *ras* タンパク質の一次構造の比較。

大腸菌βサブユニットと、ヒト H-*c*-*ras* p21 タンパク質の一次構造を、glycine-rich sequence（βサブユニットの Gly149 - Thr156、および、*ras* タンパク質の Gly10 - Ser17）が合うように並べた。それぞれの配列に 1 ヶ所のギャップを挿入した。二つの配列を比べて、一致していた残基は星印を、また、保存的置換残基は点をつけて示した。図中の box は、glycine-rich sequence を、示す。*ras* タンパク質の、Mg^{2+} と結合している残基の位置を▲または△で示した。▲は、βサブユニットでも保存（あるいは保存的置換）されている残基を、△は、保存されていない残基を示す。また、点線のアンダーラインは、*ras* タンパク質のグアニン環結合部位の一部を含む領域で、βサブユニットでも、化学修飾の結果からアデニン環の近傍に位置すると考えられる βArg281（84, 85）および βThr287 - βTyr297（83）に近い領域である。

保存的置換も含めて考えると、*ras* タンパク質において基質 Mg・GTP の、Mg イオンの結合に関与する Ser17、Asp33、Thr35、Asp57（72, 73, 82）のうち、βサブユニットでは、Asp33 を除く 3 残基が βThr156、βSer174、βAsp196 として保存されていた（図4-4）。さらに、*ras* タンパク質の Thr144 - Thr148 の領域（Thr-Ser-Ala-Lys-Thr）は、βサブユニットのβThr283 - βThr287 の領域（Thr-Ser-Thr-Lys-Thr）に保存されていた。*ras* タンパク質のこの配列は、GTP のグアニン環の結合部位を含んでいる（72, 73, 82）。βサブユニットでも、この領域は、近傍に位置するβThr287 - βTyr297 が 8-azido-ATP で修飾され（83）、βArg281 がフェニルグリオキサールで修飾されることから（84, 85）、アデニン環の近傍に位置すると考えられている。しかし、*ras* タンパク質で、やはりグアニン環の結合残基を含んでいる Asn116 - Asp119 の配列は、βサブユニットではまったく保存されていなかった。以上の比較から、*ras* タンパク質のヌクレオチド結合部位の構造は、一部を除いてβサブユニットでも保存されていると結論することができる。

βサブユニットの βSer174 および βVal198は、*ras* タンパク質の Thr35 および Gly60 の位置に一致する（図4-4）。 *ras* タンパク質の Thr35 は、前述したように Mg イオンの結合に関与する残基である（82）。前章で述べたように、*ras* タンパク質の Thr35 に対応しているβサブユニットのβSer174 が、2 価カチオンの結合部位あるいはその近傍に位置していると示唆されたことは興味深い。

また、*ras* タンパク質の Gly60 の主鎖のアミド基は、GTP のγ位のリン酸基と水素結合している残基であり（82）、βサブユニットのβVal198 残基も、同様の位置に存在する可能性がある。

5. βサブユニットの高次構造予測

以上の考察から、*ras* タンパク質の三次構造を基にして、βサブユニットの活性中心の、特にリン酸基を結合する構造の一部を、コンピューターシミュレーションによって予測した。推定された glycine-rich sequence（P-loop）の構造と、本章の復帰変異株の結果を合わせて、図4-5 に、構造を模式的に示した。

Glycine-rich sequence の loop 構造は、ATP のリン酸基をとりまくように位置していると予測された。したがって、βAla151 等の残基への変異導入は、ATP の結合に影響を与えると推定できる。 また、βThr156 は、基質 Mg・ATP の Mg イオンと水素結合できる位置にある。これは、Takeyamaらが（31）、βThr156 を

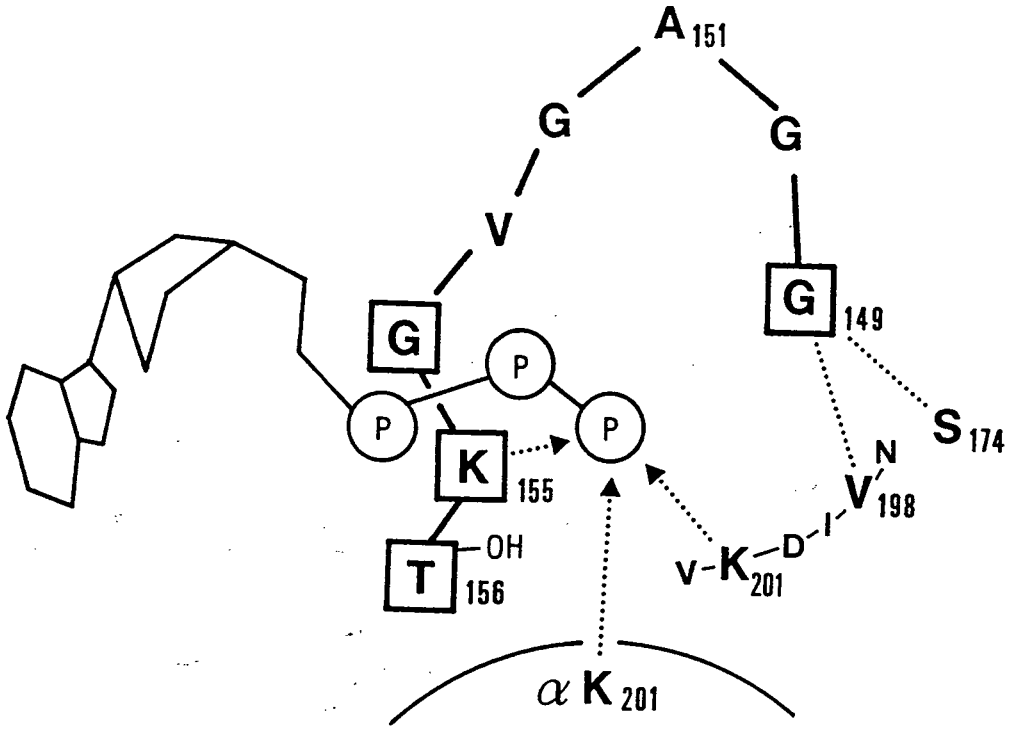


図 4-5　基質 ATP のリン酸基結合部位付近の構造モデル

これまでに得られた変異株、復帰変異株および化学修飾（親和性標識）の結果より、リン酸基結合部位あるいはその周辺であると予想された残基を図中に示した。

βLys155、βLys201 および αLys201 は、AP_3-PL で修飾されることから、ATP のγ位のリン酸基に近接すると予想された残基である（17-19）。最近、当研究室で部位特異的に変異を導入して、βLys155 および βThr156 は、本酵素の触媒活性において必須な残基であることを明らかにしている。βVal198から βLys 201 の周辺は、復帰変異株と化学修飾（親和性標識）の結果より、ATP のγ位のリン酸基を結合する領域であることが強く示唆された。βSer174 は、βGly149 と相互作用し得る残基であることから、お互いに近い位置にあると考えられる。βAla151 の変異は酵素活性に大きく影響することから、この残基の位置は触媒部位の近傍と予想される（31）。 glycine-rich sequence（βGly149 - βThr156）の構造と ATP の位置は、p21 *ras* タンパク質の構造をもとにコンピューターシミュレーションにより推定したものを参考にした。

触媒活性に重要な残基であると推定したこととよく一致する。 βLys155 と、glycine-rich sequence よりカルボキシル末端側の βLys201 また、 αサブユニットの αLys201 は、adenosine triphosphopyridoxal (AP_3-PL) によって修飾を受けることが知られている (17-19)。 したがって、これらの 3 つの残基も、ATP のγ位のリン酸基近傍に位置していると考えることができる。しかし、AP_3-PL は、Mg^{2+} を加えない条件のときにはαサブユニットに結合しやすいことから、αLys201 が、非触媒部位の ATP 結合部位に存在する残基である可能性も残っている (19)。

復帰変異の解析結果は、 βSer174 残基が、Mg^{2+} の結合部位の近傍で、βGly149 残基とも相互作用できる位置に存在することを示唆している。 一方、βVal198 残基は、βGly149 残基と ATP のγ位のリン酸基近傍に位置していると考えることができる。以上より、βVal198 から AP_3-PLで修飾される βLys201 を含む領域が、ATP のγ位のリン酸基に近接し、結合部位の一部を形成していると推察した。

第 4 節 まとめ

Glycine-rich sequence の βSer149 変異が、βPhe174 変異の効果を抑圧する機構を検討するために、βAla149、βCys149、βThr149 変異を導入した。その結果、βPhe174 変異の表現型は、βGly149 残基が Ala、Ser に置換すると抑圧され、Cys に置換しても部分的に抑圧された。しかし、Thr に置換した βThr149/βPhe174 変異酵素は、細胞膜に分子集合できなかった。変異効果を抑圧する機構には、149 の位置の残基の大きさが関わっていると結論した。また、βGly149→Cys の変異によって酵素活性が失われたが、この変異の効果は βSer174→Phe の変異によって抑圧された。 以上の結果は、βCys149 変異の表現型を抑圧する復帰変異を得れば、glycine-rich sequence の近傍に存在する残基の同定ができることを示している。 実際 そのような復帰変異株 (βVal198→Ala) を得ることができた。 *ras* タンパク質の高次構造を基にして、リン酸結合部位の構造を予測しモデルを考えた。以上の復帰変異株の解析、および以前の変異株や化学修飾の解析から、βサブユニットの触媒活性に重要と考えられている残基が、*ras* タンパク質の活性中心あるいはその近傍の残基と一致していることを指摘できた。βVal198 残基の位置は、*ras* タンパク質ではγ位のリン酸と水素結合している残基に相当していた。 βVal198 残基は、ATP 類似化合物である AP_3-PL によって修

飾される βLys201 の近傍の残基であることから、βVal198 - βLys201 の領域は、ATP のγ位のリン酸を結合する残基あるいはその近傍に位置していると考察した。

第 5 章　γサブユニットのカルボキシル末端領域（γGln269 - γVal286）の機能

第 1 節　緒論

大腸菌ではα、β、γサブユニットを混合すると、ATPase 活性を持つ$\alpha_3\beta_3\gamma$複合体が再構成できる（86）。$\alpha_3\beta_3\gamma$の活性、Km 値等は、精製 F_1 のものとほとんど変わらない。この結果は、完全な（正常な）F_1 の触媒部位を構成するためには、活性中心が存在しているβサブユニットおよびαサブユニットに加えてγサブユニットが必要なことを示唆している。好熱菌では、α、βサブユニットだけで ATPase 活性が再構成されると報告されているが、$\alpha_3\beta_3$よりなる複合体では、完全な F_1 の 20% の活性しか再構成できていない（87, 88）。したがって、この場合にも、F_1 が正常な触媒活性を持つためにはγサブユニットが必要であると考えられる。また、γサブユニットは、H^+ 輸送路のゲートの役割を持つことも示唆されている（25）。しかし、アミノ酸残基レベルでのγサブユニットの機能解析は、ほとんどなされていない。

当研究室の Kanazawa（89）および MiKi（90）らは、大腸菌変異株の解析を行った。γGln269→end の変異によって、カルボキシル末端から 18 残基が欠失すると ATPase 活性が失われること、γGln261→end の変異によって、さらに 8 残基が欠失すると F_1 部分が分子集合できなくなることが明らかにされている（89, 90）。また、アミノ末端に近い部分 γLys21 - γAla27 が欠失すると F_1 部分の分子集合が見られなくなる（91）。γサブユニットの一次構造は、これまでに13種で報告されており、これらの配列を比較すると相同性は比較的低い（10% 程度）。しかし、カルボキシル末端領域（大腸菌ではγAla237 - γGly254 およびγTyr 262 - γAla285）には保存残基が集中している。13 種のγサブユニットにおいて完全に保存されている 29 残基のうち、19 残基がこの二つの領域に位置している（92, 93）。

第 5 章では、γサブユニットの役割を明らかにするために、このサブユニットの機能領域を含んでいる可能性のあるカルボキシル末端領域［γGln269 - γVal 286(カルボキシル末端残基)］に注目した。すなわち、γサブユニット遺伝子を発現する組換えプラスミドを用いて部位特異的に変異を導入し、変異γサブユニットを持つ酵素の性状を解析した。

第 2 節　実験方法

前章までに述べた方法は詳細を省き、本章で新たに用いた方法についてのみ述べた。

1. 菌株と培養条件

本章で用いた菌株は、すでに当研究室で hydroxylamine を変異原として得られていたγサブユニット変異株 KF10rA [*thi, thy, recA1, atpG10*(γGln14→end)] (89, 90) と、遺伝子操作に用いた JM83 (*ara, Δlac-pro, strA, φ80γ, lacZΔM15*) (35) である。　菌の培養には、最小培地として Tanaka 培地 (37) を用い、　必要に応じて チミン (100 μg/ml) 、チアミン (2 μg/ml) を、また、炭素源として、7 mM グルコースまたは 15 mM コハク酸ナトリウムをそれぞれ加えた。反転膜小胞を調製する場合には 0.4% のグルコースを加えた。栄養培地としては L broth 培地にチミン (50 μg/ml) を加え、必要に応じて 50 μg/ml のアンピシリンまたは 20 μg/ml のテトラサイクリンを加えた。寒天平板の調製には、上の培地に 1.5% の寒天を加えた。いずれの場合も、37℃で好気的に培養した。

2. 野生型およびカルボキシル末端から 4、10、18 残基欠失したγサブユニットを発現するプラスミド

pBWG11 (図5-1A) は、アンピシリン耐性遺伝子のプロモーターの支配下に、野生型のγサブユニットを発現する組換えプラスミドである。　また、γサブユニット遺伝子のカルボキシル末端領域をコードしている部分 [γGln261 - γVal 286 (カルボキシル末端)] には、容易に変異が導入できるように、アミノ酸配列が変化しないような形で、各種の制限酵素部位を導入してある。このプラスミドを、酸化的リン酸化によって生育できないγサブユニット変異株 KF10rA に導入すると生育が回復する。　また、pBMG283e (γAla283→end) 、pBMG277e (γThr 277→end) 、pBMG269e (γGln269→end) からは、それぞれ、カルボキシル末端より 4 残基、10 残基、18 残基を欠失したγサブユニットが合成される (図5-1A, II -IV) 。これらのプラスミドは、当研究室の Miki によって構築された。

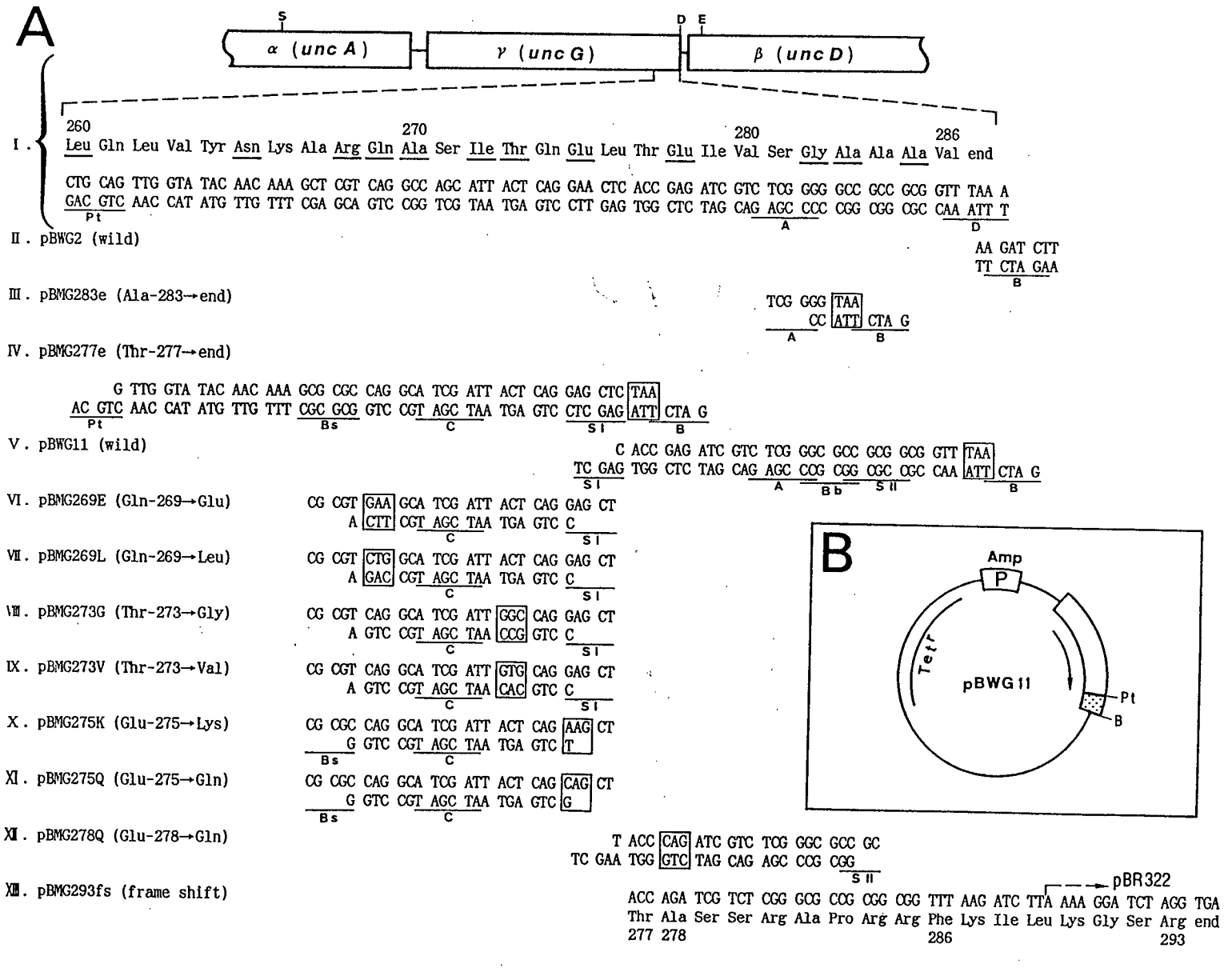


図 5-1 γサブユニット遺伝子に変異を持つプラスミドの作製

図 5-1　γサブユニット遺伝子に変異を持つプラスミドの構築

γサブユニットのカルボキシル末端領域の遺伝子配列とアミノ酸配列を示した（A, I）。異なる 13 種の一次構造を比較して完全に保存されていた残基をアンダーラインで示した。pBWG2 は、野生型γサブユニット遺伝子を持つ組換えプラスミド（pBWU1）の *Dra*I 部位に *Bgl*II linker を挿入したものである（A, II）。次に pBWG2 の一部を合成 DNA のカセットで置き換えて pBMG283e (Ala283→end)（A, III）、pBMG277e（A, IV）を構築した。また、pBMG277e の一部を合成 DNA で置き換えて pBWG11（野生型） を構築した（A, V; B）。いずれの場合も Amp^r 遺伝子のプロモーター（P）の下流にγサブユニット遺伝子が挿入されている（B）。アミノ酸の置換変異は、pBWG11 の *Bss*HII - *Sac*I または *Sac*I - *Sac*II 断片を合成 DNA で置き換えて導入した（A, VI - XII）。終止コドンまたはアミノ酸置換を導入した配列を box で示した。pBMG293fs は γAla278 残基以降がフレームシフトし、pBR322 由来の配列を含めて 293 残基の読み枠ができた（A, XIII）。制限酵素部位は以下のような略号で示した。 S (*Sma*I), D (*Dra*I), E (*Eco*RI), Pt (*Pst*I), A (*Ava*I), B (*Bgl*II), C (*Cla*I), SI (*Sac*I), Bs (*Bss*HII), Bb (*Bbe*I), SII (*Sac*II)。

3. γサブユニットのカルボキシル末端領域へのアミノ酸置換変異およびフレームシフト変異の導入

pBWG11 のγサブユニット遺伝子（*atpG*）の一部を、図5-1A に示す合成 DNA で置き換えて、アミノ酸置換変異およびフレームシフト変異を導入した。γGln269、γThr277、γGlu275 を置換する場合には *Bss*HII 部位から *Sac*I 部位の間を、また、γGlu278 を置換する場合には *Sac*I 部位から *Sac*II 部位の間を置き換えた。anti-sense鎖、sense鎖のオリゴヌクレオチドの合成、および、合成 DNA のアニーリングと pBWG11 への挿入は、第 2 章と同様に行った。導入した変異を確認するために、構築したプラスミドの *Pst*I - *Bgl*II 断片（83 bp）を、 pUC18 の *Pst*I 部位と *Bam*HI 部位の間に挿入した。この領域の塩基配列を決定して、目的の変異の他には変異部位のないことを確認した。　γGlu278 以降がフレームシフトしたプラスミド pBMG293fs は、γGlu278 に変異を導入するために、*Sac*I - *Ava*I の間を　TACCG(GATC)(GC)ATCGTC　の混合オリゴヌクレオチドで置き換えたものの中から分離した。 上の配列のアンダーラインの部分が γGlu278 のコドンにあたる。 pBMG293fs の塩基配列を決定したところ、一塩基対が欠失し、γGlu 278 のコドン GAG が AG になっていた。この欠失によって、γGlu278 以降の読み枠（フレーム）がずれ、278-ASSRAPRRFKILKGSR-293という、野生型とはアミノ酸残基も長さもまったく異なる配列がコードされていた。

変異γサブユニットの遺伝子を持つ組換えプラスミドを、KF10rA 株に導入した。プラスミド由来に合成されるγサブユニットと、染色体から合成される他のサブユニットによって F_0F_1 が構成され、変異γサブユニットを持つ酵素の性状を検討することができた。

4. 酵素活性への DCCD の影響

DCCD は、F_0 の *c* サブユニット Asp61 残基に結合して H^+ 輸送路を阻害する。この条件で変異γサブユニットを持つ菌の反転膜小胞を DCCD 処理し、ATPase 活性への影響を検討した。

150 μg/ml の反転膜小胞あるいは 50 μg/ml の精製した F_1 を、0 - 40 μM DCCD を含む 50 mM Tris-HCl、10 mM $MgCl_2$ 、pH 7.5、25℃の緩衝液中で、15分間処理し、ここから一部をとって ATPase 活性を測定した。 ATPase活性の測定は、DCCD 処理した反転膜小胞あるいは F_1 が、タンパク量で、それぞれ 45 μg/ml

あるいは 3.33 μg/ml になるように加えて、4 mM ATP、3 mM $MgCl_2$、35 mM Tris-HCl 存在下、pH 7.5、25℃の条件で行った。

5. その他の方法と試薬

反転膜小胞の調製、EDTA 抽出画分の調製、ATPase 活性の測定、H^+ 輸送活性の測定、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動と銀染色は、第 2 章と同様に行った。タンパク質の二次構造の予測は、Robson らの方法 (94) に従った。

制限酵素は、Nippon Gene社、Takara Shuzo社、Toyobo社、New England Biochemical社より購入した。T4 ligase は Takara shuzo社より購入した。(α-^{32}P) dCTP (>400 Ci/mmol)は Amersham 社より購入した。DCCD は、ペプチド研究所より、その他の試薬は和光純薬社より購入した特級品を用いた。

第 3 節　結果と考察

1. カルボキシル末端より 4 残基、10 残基、18 残基が欠失したγサブユニットをもつ F_oF_1 の活性

F_oF_1 のγサブユニットのカルボキシル末端側の役割を、まず大まかに検討するためにナンセンス変異を導入した。変異γサブユニットを持つ酵素の性状を検討し、結果を 表5-1 にまとめた。カルボキシル末端より、4 残基 (γAla283→end)、10 残基 (γThr277→end) を欠失させると、反転膜小胞の ATPase活性は、それぞれ野生型の約 63%、14%、と減少した。 18 残基が欠失すると (γGln269→end)、活性はほとんどなくなった。*In vivo* の酸化的リン酸化活性の指標であるコハク酸培地における生育 (growth yield) も、これとほぼ対応しながら減少し、10 残基の欠失では野生型の 20% まで生育したが、18 残基が欠失すると完全に生育しなかった。以上の結果から、γサブユニットのカルボキシル末端の領域は酵素活性に必要であり、とくに、γGln269 から γLeu276 の領域が、このサブユニットの機能に重要であると考えられる。そこで、以下の実験では、γサブユニットのカルボキシル末端領域の γGln269 - γLeu276 の保存残基にアミノ酸の置換変異を導入した。

表 5-1　γサブユニットのカルボキシル末端から 4 残基、10 残基、18 残基を欠失するナンセンス変異を導入したときの F_0F_1-ATPase の性状。

Plasmid	Mutation in γ subunit	Relative growth yield		Membrane ATPase	
		15 mM succinate	7mM glucose	Specific activity	Inhibition by NaN_3 apparent K_i
		%		units/mg (%)	μM
pBWG11	None (wild-type)	100	100	1.4 (100)	35
pBMG283e	Ala283→end (Δ4)	83	72	0.88 (63)	35
pBMG277e	Thr277→end (Δ10)	58	20	0.19 (14)	40
pBMG269e	Gln269→end (Δ18)	45	0	0.014 (1)	ND[a]

[a]ND, not determined.

野生型またはナンセンス変異を持つ γサブユニットの発現プラスミドを、γサブユニット欠損株（KF10rA 株）に導入した。15 mM コハク酸または 7 mM グルコースを単一の炭素源とする最小培地で、生育（growth yield）を比較した。野生型のプラスミドを含む KF10rA/pBWG11 株では、15 mM コハク酸培地で OD_{650} = 0.79 まで、7 mM グルコース培地では OD_{650} = 0.70 まで生育した。γサブユニット遺伝子に変異を導入した場合の生育は、野生型に対する割合で示した。グルコース培地で培養した菌より反転膜小胞を調製し、ATPase 活性を測定した。かっこのなかには、野生型のATPase 活性に対する割合を示した。アジ化ナトリウム（NaN_3）による ATPase 活性の阻害効果は、反転膜小胞に 0 - 10 mM のアジ化ナトリウムを加えて ATPase 活性を測定し、アジ化ナトリウム非存在下のATPase 活性を 50% 阻害する濃度で示した。

2. 酸化的リン酸化（ATP 合成）活性に対するγサブユニット変異の影響

γGln269 から γLeu276 の 7 アミノ酸残基の領域は保存度が高く、13 種のγサブユニットで γGln269、γAla270、γIle272、γThr273、γGlu275 が完全に保存されていた。このうち、親水性の残基に注目して、γGln269 を Glu と Leu に、γThr273 を Val と Gly に、γGlu275 を Lys と Gln に置換した。

これらの変異を導入した組換えプラスミドを、γサブユニット欠損株である KF10rA に導入し、コハク酸培地およびグルコース培地における生育（growth yield）を検討した（表5-2）。*In vivo* の酸化的リン酸化活性の指標となるコハク酸培地における生育は、γGlu269 および γThr273 を置換した場合に低下した。これに対して、γGlu275 および γGlu278 を置換した場合には、野生型とほぼ同様に生育できた。フレームシフト変異によって、野生型のγサブユニット（286 残基）より 7 アミノ酸残基だけ大きくなり（293 残基）、その上、278番目以降のアミノ酸配列が野生型とはまったく異なっている場合には、コハク酸培地ではまったく生育できなかった。

3. 変異γサブユニットを含む F_1 の分子集合

プラスミドを持つ KF10rA 株の菌体より反転膜小胞を調製し、γサブユニットに変異が導入された F_1 が、膜上に正常に分子集合していることを確認した。反転膜小胞を、EDTA を含む低イオン強度の緩衝液で洗うと、細胞膜に表在している F_1 部分は、膜に内在している F_0 部分より解離して可溶化する（EDTA 抽出画分）。この可溶化画分を SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけた後、銀染色を行った（図5-2）。γGln269→Glu の変異を除くいずれの場合も、野生型とほぼ同量の F_1 のサブユニットが認められた（図5-3, lane 1, 3-7）。したがって、これらの変異γサブユニットを持つ酵素は、反転膜小胞に正常に分子集合していると考えた。γGln269 が Glu に置換した場合には、サブユニット量がわずかに減少していた（図5-2, lane 2）。これは、酵素の分子集合が弱くなり、反転膜小胞を調製する間に、F_1 部分が一部遊離したためと考えられる。フレームシフト変異の場合は、分子量が大きくなったγサブユニットが認められ、変異 F_1 は正常に分子集合しているものと考えた（図5-3, lane 11）。

表 5-2　γサブユニットのγGln269、γThr273、γGlu275 および γGlu278 の置換変異とフレームシフト変異を導入した酵素の性状。

Plasmid	Mutation in γsubunit	Relative growth yield		Membrane ATPase	
		15 mM succinate	7mM glucose	Specific activity	Inhibition by NaN_3 apparent K_i
		%		units/mg (%)	μM
pBWG11	None (wild-type)	100	100	1.4 (100)	35
pBMG269E	Gln269→Glu	13	59	0.034 (2.4)	ND[a]
pBMG269L	Gln269→Leu	43	70	0.21 (15)	180
pBMG273V	Thr273→Val	8	61	0.077 (5.5)	ND
pBMG273G	Thr273→Gly	49	75	0.28 (20)	25
pBMG275K	Glu275→Lys	84	92	0.21 (15)	10
pBMG275Q	Glu275→Gln	99	100	0.57 (41)	10
pBMG278Q	Glu278→Gln	91	91	1.3 (93)	10
pBMG293fs	Frameshift	0	41	0.19 (14)	105
pBR322	(Control)	0	43	0.011 (0.8)	ND

[a]ND, not determined.

最小培地での生育、反転膜小胞の ATPase 活性は、表 5-1 と同様に測定した。アジ化ナトリウムの ATPase 活性に対する影響も表 5-1 と同様に測定し、活性を 50% 阻害する濃度で示した。

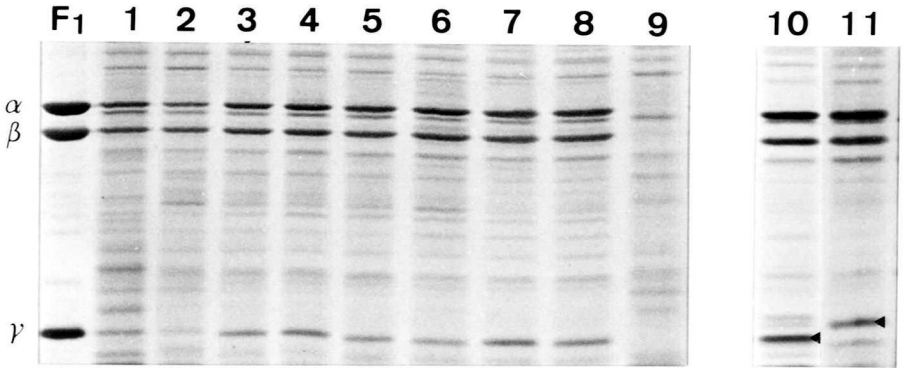


図 5-2　野生型および変異γサブユニット遺伝子を持つ組換えプラスミドを導入した KF10rA 株の、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動による分析

グルコースを単一の炭素源とする最小培地で、γサブユニットプラスミドを持つ KF10rA 株を培養し、反転膜小胞を調製した。野生型および変異γサブユニットを持つ反転膜小胞より、可溶化した F_1 部分を含む EDTA 抽出画分を調製した。2 μg（タンパク質量）を、 0.1% SDS を含む 12.5% ポリアクリルアミドゲルで電気泳動して銀染色した。 EDTA 抽出画分は、以下のプラスミドを導入した KF10rA 株より調製した。すなわち、 pBWG11 (lane 1, 10) 、pBMG269E (lane 2) 、pBMG269L (lane 3) 、 pBMG273G (lane 4) 、pBMG273V (lane 5) 、 pBMG275K (lane 6) 、 pBMG275Q (lane 7) 、pBMG278Q (lane 8) 、pBMG293fs (lane 11) 、および、γサブユニット遺伝子を持たない pBR322 (lane 9) である。 lane 10 および 11 ではγサブユニットの位置を矢印で示した。 精製 F_1 は、0.5 μg を用いた。

4. γサブユニット変異による ATPase 活性の低下

変異γサブユニットを持つ反転膜小胞の ATPase 活性を測定した（表5-2）。γGln269 から γLeu276 の領域に導入した変異（γGln269→Glu または Leu、γThr273→Val または Gly、γGlu275→Lys または Gln）によって、ATPase 活性は野生型の 2 - 41% に減少していた。したがって、これらの残基は ATPase 活性に重要であると結論した。とくに、γGln269→Glu および γThr273→Val の置換によって、ATPase 活性はそれぞれ野生型の 2% および 6% となり、酵素活性は著しい影響を受けた。これらの結果に対して、γGlu278 を Gln に置換した場合には、野生型とほとんど変わらない活性を示した。上述したように γThr277 に終止コドンを導入した場合には、ATPase 活性が野生型の 15% 程度残っていた（表5-1）。したがって、γGlu278 を含む、γThr277 よりカルボキシル末端側は、酵素活性には比較的重要でない領域と考えた。

In vivo の ATP 合成活性の指標であるコハク酸培地での生育は、ほとんどの変異の場合、反転膜小胞の ATPase 活性と対応しており、ATP の合成と分解が可逆的であることとよく一致した。しかし、ATPase活性（ATP 加水分解活性）が野生型の約 15% であった 4 つの変異、すなわち、フレームシフト変異、γGlu275→Lys 変異、γGln269→Leu 変異およびγThr277→end 変異を比較すると非常に興味深い結果が現れた。つまり、コハク酸培地における生育（*in vivo* の ATP 合成活性）は、γGln269→Leu と γThr277→end の変異で野生型の 43% であったのに対し、γGlu275→Lys では 84% に達した。また、フレームシフト変異では前述したようにまったく生育できなかった。したがって、γGlu275→Lys 変異とフレームシフト変異の二つは、ATP の合成と加水分解の活性が比例してないといえる。次に、H^+ の輸送活性と触媒活性は正常に共役しているかどうかを検討した。

5. ATP 加水分解と H^+ 輸送の共役

葉緑体のγサブユニットをトリプシン消化すると、ATP の分解に共役して H^+ をチラコイド内部に蓄積できなくなる（28）。したがって、γサブユニットに変異を導入すると、ATPの合成・分解と H^+ 輸送の共役が損なわれる可能性があると考えた。そこで、ATP の加水分解による H^+ の輸送活性を比較した（図5-3, AB）。ATP の加水分解によって H^+ が反転膜小胞の中に能動輸送されると、緩衝液に加えたアクリジンオレンジの蛍光が消光する。第 1 章で述べたようにアクリジンオ

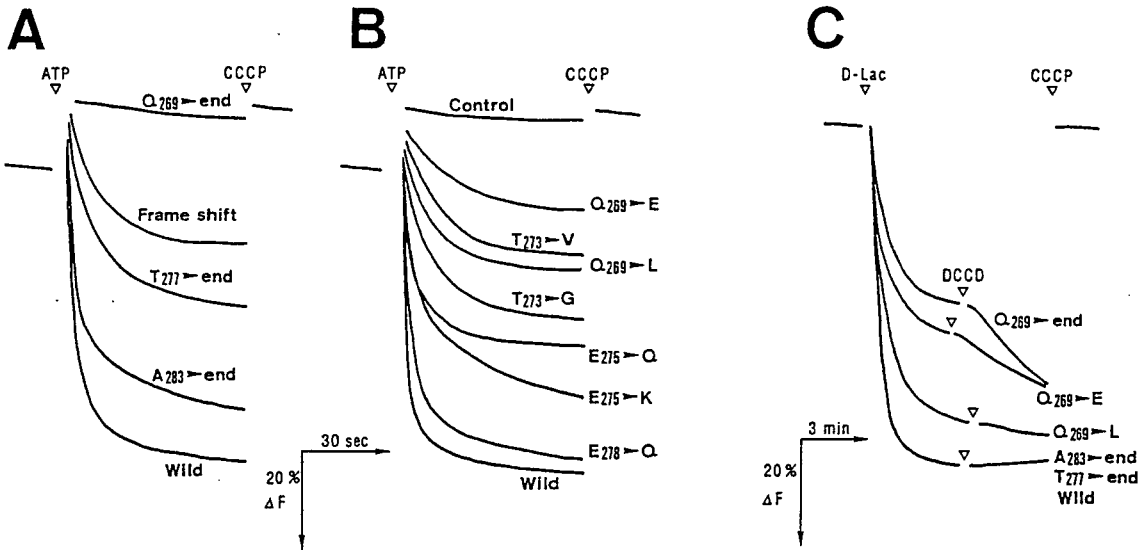


図 5-3　γサブユニット変異を持つ F_0F_1 により反転膜小胞の内外に形成される H^+ 濃度勾配

A および B. ATP を添加して F_0F_1 によって形成される H^+ の濃度勾配。γサブユニットに変異導入した菌の反転膜小胞 100 μg タンパク量を、蛍光色素であるアクリジンオレンジを含む 1 ml の測定用緩衝液 [10 mM Tricine-choline (pH 8.0 at 25℃), 140 mM KCl, 5 mM $MgCl_2$, 1 μg/ml valinomycin, 1 μM アクリジンオレンジ] に懸濁した。 25℃で、490 nm の励起光を照射して 530 nm の蛍光強度を測定した。図に示した時間に、1 mM ATP (Tris salt)あるいは 3 - 5 μM CCCPを加えた。 γサブユニット遺伝子を持たない pBR322 を導入した場合の結果を、図中に Control として示した。

C. D-乳酸を添加して呼吸鎖によって形成される H^+ の濃度勾配。 A, B で用いた反転膜小胞を、 蛍光色素キナクリンを含む測定用緩衝液 [10 mM Tricine-choline (pH 8.0 at 25℃), 140 mM choline chloride, 5 mM $MgCl_2$, 1 μg/ml valinomycin, 1 μM キナクリン] に懸濁した。 25℃で、420 nm の励起光を照射して 500 nm の蛍光強度を測定した。 図に示した時間で、10 mM D-乳酸、20 μM DCCD および 3 - 5 μM CCCP を加えた。図に示さなかったものは、野生型と同様の蛍光消光を示した。

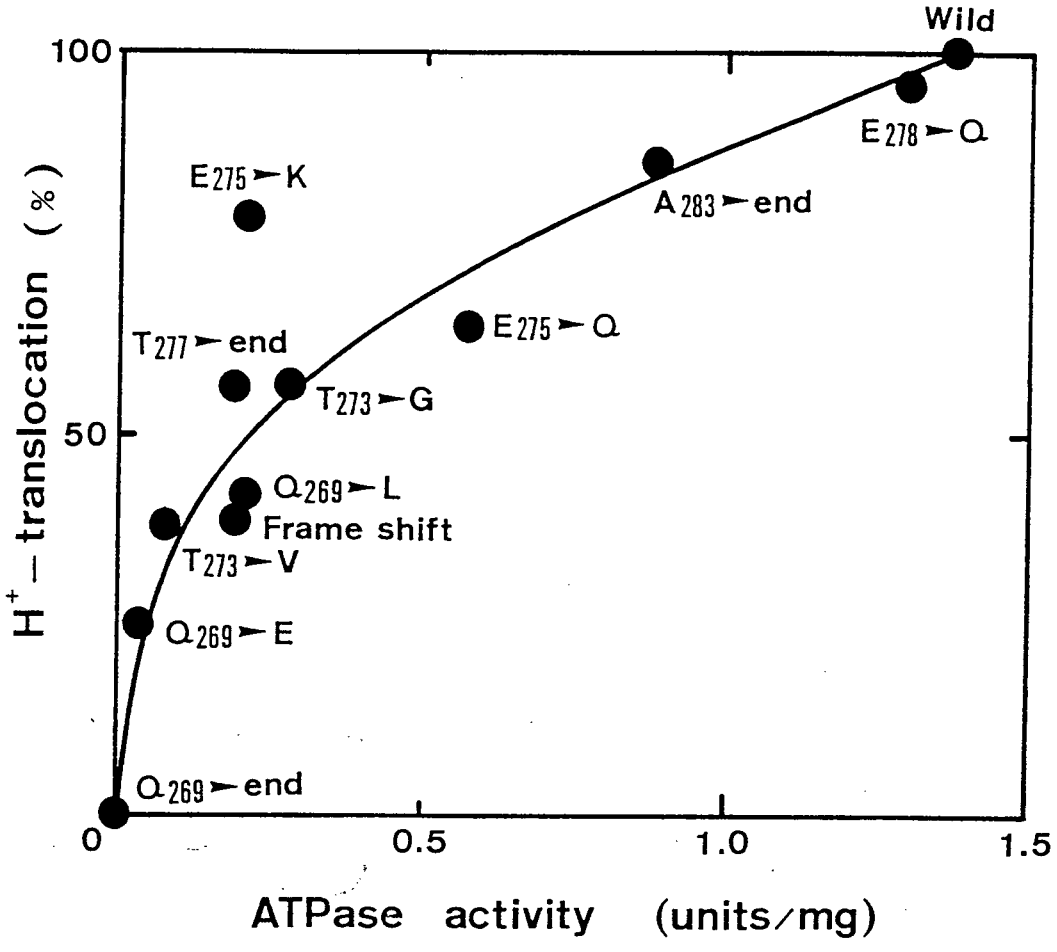


図 5-4 反転膜小胞の、ATPase 活性と H^+ 輸送活性の比較

表 5-1, 5-2 および 図 5-3A,B より、野生型あるいはγサブユニットに変異を持つ反転膜小胞について、ATPase 活性と H^+ 輸送活性を比較した。 H^+ 輸送活性は、蛍光消光の大きさを野生型に対する割合で示した。 ほとんどの変異酵素は、両者が対応して増減したが、 ATPase 活性が 0.21 units/mg の γGlu275→Lys は、0.83 units/mg の ATPase 活性を持つ γAla283→end と同程度の H^+ 輸送活性を示した。

レンジが、酸性になった反転膜小胞内に蓄積し濃度消光するためである。γサブユニット遺伝子を持たない菌の反転膜小胞に ATP を加えても、蛍光の消光は認められなかった。すなわち、F_0F_1 がないと H^+ は輸送されなかった。野生型 または γGlu278→Gln の場合には、ATPase 活性に対応した H^+ 輸送活性が見られた。ATPase 活性が低下していた他の変異酵素も、ほとんどの場合には活性の低下に対応した H^+ 輸送を示し、いずれも ATP の分解に共役して H^+ を輸送できることを示していた（図5-4）。フレームシフト変異の場合にも ATPase 活性と対応して H^+ が輸送された。すなわち、ATP の分解と H^+ 輸送は共役していた。この変異酵素の場合には、すでに述べたように ATP 合成がみられなかった。したがって、この酵素は可逆的な反応ができなくなったものであると結論した。γGlu275→Lys 変異の場合には、ATPase 活性は野生型の 15% 程度であり、フレームシフト、γGln269→Leu 、γThr277→end と同様であったが（表5-1, 5-2）、H^+ の輸送活性はそれらの変異酵素に比べて明らかに大きかった（図5-3, AB）。γGlu275→Lys の場合には、野生型の 40 - 60% の ATPase 活性を持つ変異酵素と同じ程度の H^+ 輸送を示した（図5-4）。したがって、γGlu275→Lys によって、ATP の加水分解と H^+輸送の共役に変化が起きていることが示唆された。

6. F_1 と F_0 の分子集合に対する変異γサブユニットの効果

フレームシフト変異、γGlu275→Lys 変異を持つ酵素が、反転膜小胞に正常に分子集合していることは、呼吸鎖の基質である乳酸を加えたとき、小胞内に H^+ が蓄積されることからも確認できた（図5-3C）。γGln269→Glu、γGln269→Leu および γGln269→end の変異では、乳酸による消光が小さく、DCCD を加えると消光が増加した。この試薬は F_0 の *c* サブユニットに結合して H^+ 輸送を阻害する。したがって、γGln269 残基の変異を持つ F_1 は、F_0 への結合が弱く、F_0 を通って H^+ が膜の外に洩れていたことが示唆された。γGln269→Glu（図5-3）、および、ここではデータは示さないがγGln269→end の場合は、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動の結果とも一致した。

H^+ 輸送路が正常で ATP の加水分解が H^+ 輸送に共役している場合には、ATPase 活性が DCCD によって阻害される。そこで、活性の低かったγGln269→Glu、γGln269→end を除いて、変異γサブユニットを持つ反転膜小胞を DCCD で処理した。いずれの場合も、野生型とほぼ同様の ATPase 活性の阻害がみられ、H^+輸送路が正常に形成されおり、しかも ATP の加水分解に共役して H^+ 輸送が起

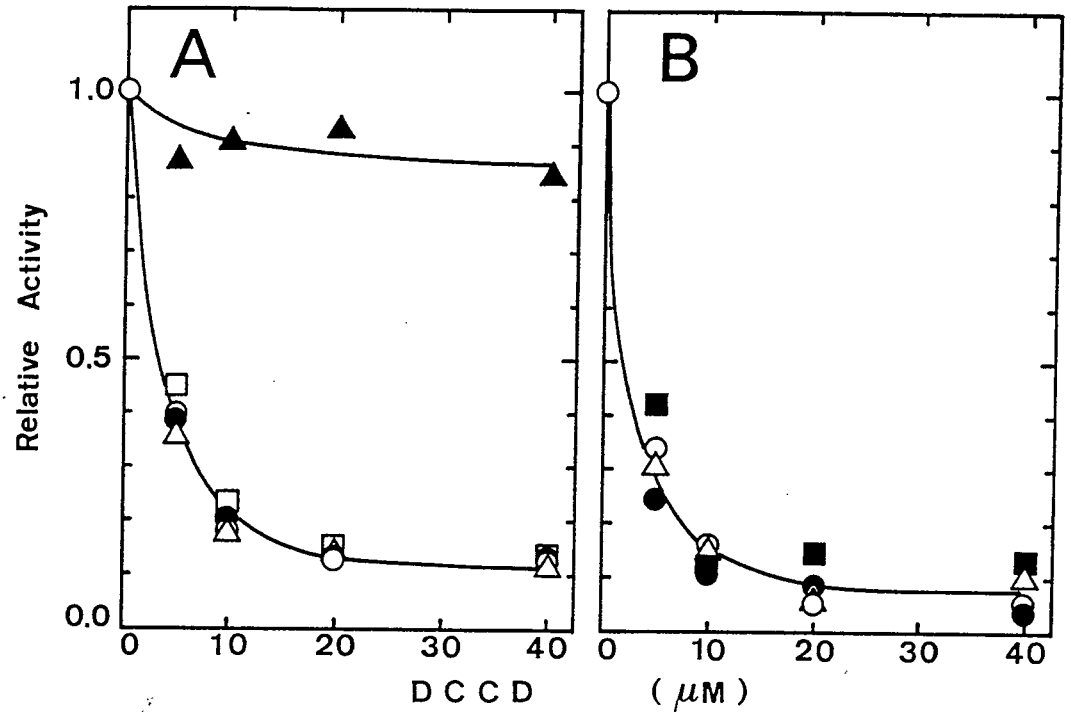


図 5-5 変異γサブユニットを持つ反転膜小胞の ATPase 活性に対する DCCD の影響

野生型あるいは変異γサブユニット遺伝子を持つ KF10rA 株より調製した反転膜小胞（150 μg タンパク量）を、50 mM Tris-HCl (pH 7.5)、10 mM $MgCl_2$ を含む 1.0 ml の緩衝液に懸濁した。10 μl の DCCD（エタノール溶液）を加えて、25℃、15分間、前処理した。ここから一部をとって、ATPase 活性を測定した。横軸の DCCD 濃度は、前処理に用いた濃度を示す。ATPase 活性は、DCCD を加えない緩衝液で前処理したときの活性に対する割合で示した。反転膜小胞は、以下のプラスミドを持つ KF10rA 株より調製した。

A. 図中のシンボルはそれぞれ、pBWG11（野生型，●）、pBMG283e（γAla283→end，□）、pBMG277e（γThr277→end，△）、pBMG293fs (frameshift，○）、および、精製 F_1 （▲）を示す。 精製 F_1 を用いると、活性はほとんど阻害されなかったことから、この処理条件では DCCD は、F_0 の *c*サブユニットに結合している。

B. 図中のシンボルはそれぞれ、pBMG269L（γGln269→Glu，■）、pBMG273G（γThr273→Gly，○）、pBMG273V（γThr273→Val，●）、pBMG275K（γGlu275→Lys，△）を示す。 また、pBMG275Q（γGlu275→Gln）、および、pBMG278Q（γGlu278→Gln）を導入した場合は、野生型とほとんど同じ結果であった。ATPase 活性が低かったγGln269→end、および、γGln269→Glu の場合は測定できなかった。

こっていることを示唆していた。γGlu275→Lys 変異の場合にも、共役は行われていると示された。また、反転膜小胞から変異γサブユニットを持つ F_1 部分を解離させ、F_0 部分だけが残った膜小胞を調製した。これに、精製した野生型 F_1 を結合させると、ここではデータを示さないが、ATP の添加によって野生型の反転膜小胞と同様の H^+ 輸送活性を示した。この結果は、F_0 の機能は、本研究で導入したγサブユニットの変異によって損なわれなかったことを示している。

7. γサブユニット変異がアジ化ナトリウム感受性に及ぼす効果

アジ化ナトリウムは、F_1 の阻害剤である（61）。第 3 章で述べたように、βサブユニットに変異を導入すると、酵素活性のアジ化ナトリウム感受性は大きく変化した。また、好熱菌の酵素を用いた再構成実験の結果、アジ化ナトリウムが酵素活性を阻害するにはγサブユニットが必要であると報告された（95）。これらのことから、γサブユニットの変異は、酵素のアジ化ナトリウム感受性に影響を与えるかどうか興味深かった。

活性の低かった γGln269→Glu、γThr273→Val、γGln269→end の変異を除いた他の変異酵素で、ATPase 活性に対するアジ化ナトリウムの阻害効果を調べた。ATPase 活性を 50% 阻害する濃度で、野生型と比較すると、γGln269→Leu、フレームシフト変異によって、感受性が約 3 - 6 倍低下し、γGlu275 またγGlu278 の変異では約 3 倍上昇していた。また、ナンセンス変異を導入した場合には、感受性はほとんど変わらなかった（表5-2）。このような、γサブユニットの変異によるアジ化ナトリウム感受性の変化は、第 3 章で述べたように、βサブユニットの変異によって感受性が約 100 倍低下したことに比較すると小さいものであった。しかし、γサブユニットのカルボキシル末端領域の変異が、酵素活性のアジ化ナトリウムの感受性に影響を与えることは興味深い。

8. カルボキシル末端領域の二次構造予測

変異の導入によってγサブユニットの高次構造がどのように変化したかを考えると、カルボキシル末端領域の機能を知る上で役にたつ可能性がある。そこで、γサブユニットの二次構造を、Robson らの方法（94）によって予測した。まず、これまでに一次構造が報告された 13 種のγサブユニットについて同様に予測し

て比較すると、中央部付近は完全に異なっていた。しかし、カルボキシル末端から約 30 残基の領域は、13 種のγサブユニットの内の 10 種で turn に続くα-helix の構造として共通に推定された。いずれのγサブユニットでも、turn の構造は、大腸菌の γVal263 から γArg268 に対応する領域に共通に出現した。

変異を導入した大腸菌γサブユニットの配列で同様に予測した。カルボキシル末端より 4、10、18残基が欠失した配列の構造は、10 残基までの欠失によって helix が短くなり、18残基の欠失では turn-helix 構造が完全に失われた。 アミノ酸の置換変異では、γGln269 を Glu または Leu に置換した配列および γThr273を Val に置換した配列は turn 構造をとれなかった。これらの 3 種の変異は、ATPase 活性あるいは分子集合に顕著な影響を及ぼしたものである（表5-1, 5-2, 図5-2, 5-3）。この他の変異によっては、helix の構造は必ずしも保存されていなかったが、turn の構造は保たれていた。この turn の構造が、γサブユニットの機能あるいは構造の安定化に重要であるのかもしれない。

一般に、タンパク質の一次構造より高次構造の推定を行うことは難しいが、異なる 10 種のγサブユニットの配列で共通に推定された turn 構造の保存性が、変異酵素の性状を解析した結果と対応したことは興味深い。

第 4 節　まとめ

γサブユニットは、H^+ 輸送路のゲートの機能を持つことが示唆されている。γサブユニットの機能を分子レベルで明かにするために、保存残基が多く含まれているカルボキシル末端領域に注目した。保存残基のうち γGln269、γThr273、γGlu275 および γGlu278 にアミノ酸置換変異を導入した。また、γGlu278 以降にフレームシフト変異を導入した。γGlu278 残基のアミノ酸置換を除くどの変異も、反転膜小胞の ATPase 活性を低下させたことから、これらの残基を含む領域が、γサブユニットの機能に重要な領域であると結論した。

導入した変異の中で、とくにフレームシフト変異と γGlu275→Lys 変異は、このサブユニットの機能を考える上で非常に興味深かった。フレームシフト変異を持つ酵素は、ATP の加水分解に共役して H^+ を輸送したが、逆反応の ATP 合成はまったくできなかった。一方、γGlu275→Lys 変異を持つ酵素は、野生型の 15% 程度の ATPase 活性しか持たないにもかかわらず、40 - 60% の ATPase 活性を持つ変異酵素と同様の H^+ 輸送を示した。また、ATP の合成活性は、野生型のもの

に近かった。このような性状を示す変異 ATP 合成酵素は、本研究においてはじめて得られたものであり、ATP 合成・水解と H^+ 輸送との共役機構において、γサブユニットが中心的な役割を持つ可能性を示すものである。

以上の結果から、γサブユニットのカルボキシル末端領域［γGln269 - γVal 286（カルボキシル末端）］は、F_1 における ATP の合成および分解の触媒作用と、F_0 を通って起こる H^+ 輸送が、正確に共役するために重要な役割を持っていることが示唆された。また、γサブユニットのカルボキシル末端領域の変異によって、ATP 合成と分解の触媒作用の可逆性が失われることが示唆された。

第 6 章　総括と展望

生体内のさまざまな活動にエネルギーを供給する ATP のほとんどが、ATP 合成酵素（F_0F_1-ATPase または F_0F_1）によって合成されている。本研究では、生物のエネルギー転換（代謝）において中心的な役割を担っている F_0F_1-ATPase の、触媒機構を理解する上で重要な、触媒部位の構造を知ることを究極の目的とした。また、触媒機構と H^+ 輸送の、共役の機構に重要な役割を持つサブユニットとその機能領域をを明らかにすることを目指した。

ATP 合成酵素は、大腸菌の細胞膜、ミトコンドリア内膜、あるいは、葉緑体チラコイド膜にいたるまで、基本的に共通の構造をしている。ATP 合成酵素の構造と機能を解析するために、本研究では、ミトコンドリアや葉緑体の ATP 合成酵素と比較すると単純なサブユニット構造をしており、しかも、遺伝的な解析が可能な大腸菌の酵素を材料として用いた。

ATP 合成酵素の大量発現株の作製

大腸菌 F_0F_1-ATPase の遺伝子に部位特異的に変異を導入し、変異酵素の性状を効率よく解析するために、まず、F_0F_1-ATPase の大量発現株を作製した。F_0F_1 の全サブユニットを発現するプラスミド pBWU13 を構築し、大腸菌変異株 DK8 に導入したところ、プラスミドの遺伝子由来に F_0F_1 が合成された。DK8/pBWU13 株では通常の大腸菌野生株の約 10 倍の酵素が、細胞膜上に正常に分子集合していると結論した。この大量発現株 DK8/pBWU13 の膜画分は、これまで報告されているうちで最も高濃度に ATP 合成酵素を持っていた。宿主とした大腸菌変異株 DK8 は、F_0F_1-ATPase 遺伝子をすべて欠失している。したがって、プラスミドに変異を導入し変異酵素を精製した後に性状を容易に解析する系を確立したと言える。このように大量に F_0F_1-ATPase を合成する菌が得られたことによって、生体エネルギー学における大きな breakthrough である F_0F_1-ATPase の結晶化、F_0 の結晶化に挑戦できると考えている。これはまったく誰も試みたことのないことであり、私の試みたい今後の目標の一つである。

触媒部位の構造に関するこれまでの知見

変異酵素の解析や基質アナログによる化学修飾実験の知見は、触媒部位が、β サブユニット、あるいは、α・β サブユニットの境界面に位置していることを示している。しかし、F_0F_1 は複雑なサブユニット構造を持つ大きな分子であるために、触媒の分子メカニズムを理解する上で必要不可欠な、触媒部位の立体構造に関する知見が得られていなかった。

Glycine-rich sequence と呼ばれる配列は、Gly-X-X-X-X-Gly-Lys-Thr/Ser の保存残基を含む配列で、多くのヌクレオチド結合タンパク質に見いだされている。これまでに結晶構造が解析されているアデニレートキナーゼ（71）、*ras* 遺伝子産物である p21 タンパク質（72, 73）、および elongation factor Tu（74, 75）では、この配列が、loop 構造をとってヌクレオチド結合部位の一部を形成することが明らかになっている。 F_0F_1 の αサブユニットと βサブユニットは、この glycine-rich sequence の共通配列を含んでおり、そのうち βサブユニットの配列（βGly149 - βThr156）にアミノ酸置換変異が起きると触媒活性が低下すること（31, 49, 50-55）、また、ATP類似化合物である adenosine triphospho-pyridoxal (AP_3-PL) が、βLys155 に結合するという知見が得られていた（17-19）。さらに、βサブユニットの共通配列を p21 *ras* タンパク質の配列で置き換えても活性が保たれることより、p21 *ras* タンパク質と同様に、βサブユニットにおいても触媒部位を形成している可能性があった。

復帰変異株の解析

本酵素の触媒部位の構造を知るために、glycine-rich sequence を手がかりにし、この配列の近傍に位置する残基を同定した。酵素タンパク質のある残基に変異（第一の変異）が起きたために低下した触媒活性が、他の部位に第二の変異が起きて回復した場合、変異の起きた二つの残基は、立体構造上近い位置に存在すると考えられる。Glycine-rich sequence の近傍に位置する残基は、活性中心あるいはその近傍の残基である可能性が高いと考えた。

KF11 株（βSer174→Phe）の復帰変異株が当研究室で分離されていた。これらのβサブユニット遺伝子の、glycine-rich sequence をコードする領域の塩基配列を決定すると、復帰変異株の一つ RE17 株は、もとの変異を保ったまま βGly149→Ser の変異を持っていた。すなわち βGly149→Ser の置換が、βSer174→Phe 変異の効果を抑圧した。

βGly149 残基の変異が βSer174 残基の変異の効果を特異的に抑圧する

変異の抑圧が特異的であることを確かめるために、F_0F_1 発現プラスミドに変異を導入して詳細に解析した。その結果、βGly149→Ser の置換変異はβSer174→Phe 変異の効果を抑圧し、酵素活性が回復したが、βGly150→Ser では抑圧できなかった。以上より、βGly149 残基は、βSer174 残基と立体構造的に相互作用し得る位置にあって、特異的にその変異の効果を抑圧したと考えられた。変異株 KF11（βSer174→Phe）の解析の結果より、βSer174 残基は 2 価カチオンの結合部位の近傍の残基であると示唆されていた。βGly149 の変異がどのようにしてβSer174 の変異効果を抑圧したか知るために、ATPase 活性の Mg^{2+} および Ca^{2+}

依存性を検討した。その結果、βGly149 残基の変異が βSer174 残基の変異と同様に、ATPase 活性の 2 価カチオン依存性に著しい影響を示した。F_0F_1-ATPase の基質は Mg・ATPであり、βGly149残基は Mg^{2+} 部位の近くに位置する残基であることが示唆された。

さらに、βSer174→Phe の変異は、βGly149 が Ser または Ala のような比較的小さい残基に置換すると抑圧されることが明らかになった。さらに大きい Cys に変異すると、活性は部分的に回復したが、Thr 残基への変異がβSer174→Phe 変異と共存すると、F_0F_1 の分子集合ができなくなった。

βGly149 のみが Ala、Ser に置換しても、酵素活性にはほとんど影響がなかったが、Cys に置換すると、*in vivo* の ATP 合成活性の指標となるコハク酸培地での生育ができなくなった。 前述したように、βGly149→Cys と βSer174→Phe 変異を持つ株がコハク酸培地で生育できたことは、βGly149 残基の変異効果がβSer174 残基の変異によって抑圧されたことを示していると言える。 したがって、glycine-rich sequence に含まれる残基の変異の効果を抑圧するような、他の領域の変異が得られる可能性が示された。

<u>βGly149→Cys 変異効果を抑圧する変異の同定</u>

βGly149→Cys の変異の効果を抑圧する他の変異を分離・同定するために、βサブユニット遺伝子に特異的に変異を導入する方法を検討した。4 種類のデオキシヌクレオチド濃度を等しくしない方法で polymerase chain reaction を行い、βサブユニットの遺伝子の一部を増幅した。その DNA 断片の中から、コハク酸培地での生育を指標にして βGly149→Cys 変異表現型を抑圧する変異を同定すると、βVal198 が Ala に置換していた。この残基の近傍のβLys201 残基は、AP_3-PL で修飾されるため、リン酸基に近いと予想されている残基である。βVal198 - βLys201 の周辺の領域は、リン酸基の結合部位の近傍であることが強く示唆された。

<u>リン酸基結合部位の構造</u>

以上の知見より、βサブユニットの触媒部位の一部である ATP のリン酸基を結合する部位を形成する残基が部分的に明らかになったと考える。しかし、触媒機構を理解するためには残基の立体的配置を明らかにする必要がある。そこで、βサブユニットの高次構造を *ras* タンパク質の構造を基にして推定することを考えた。

p21 *ras* タンパク質の一次構造を βサブユニットと比較すると、活性中心を形成している残基の位置が、βサブユニットでも保存されている場合があった。ATP のγ位のリン酸基の近傍であると示唆された βVal198 とβLys201 を含む領域に対応する *ras* タンパク質の配列は、GTP のγ位のリン酸基と水素結合する残

基を含んでいる。 また、βSer174 に相同な *ras* タンパク質の残基は、Mg^{2+} の結合部位である。以上より、βサブユニットのリン酸基結合部位は、*ras* タンパク質の構造と同様である可能性を示した。

ATP 合成酵素のように高次構造を直接解析することが難しい酵素でも、変異酵素の解析あるいは化学修飾などで得られた情報をもとに、高次構造の明かな他の酵素と比較することで、触媒部位の構造モデルが構築できる可能性を示した。これは本論文の大きな成果と考える。また、構造モデルより機能残基を類推し、部位特異的に変異を導入して解析した結果をフィードバックすることで、モデルの確からしさが確認できた。さらに、触媒活性を失わせる変異の抑圧変異を同定することで、触媒部位を構成する他の領域が明らかにできた。このように、一部の機能領域が同定できたので、次のステップとして部分ペプチドの結晶化を行って解析し、触媒部位の構造を立体的に明らかにできると考えている。本論文を提出した後に、このような方向に研究を進めることを考えている。このようなアプローチによって、他のイオン輸送 ATPase にも外挿し得る結果が得られものと確信している。

<u>γサブユニットのカルボキシル末端領域の機能</u>

他のイオン輸送性 ATPase とも共通の問題である、ATP 合成・分解 と イオン（H^+）輸送の共役のメカニズムを理解するために、H^+ 輸送路のゲートの役割を持つと考えられているγサブユニットの機能を検討した。 これまでに報告されているγサブユニットの一次構造を比較すると、カルボキシル末端領域に保存残基が多い。変異株の解析からも、機能領域を含んでいると考えられたため、カルボキシル末端領域に部位特異的に変異を導入して解析した。

γサブユニットの発現プラスミドにナンセンス変異を導入した結果から、 γGln269 - γLeu276 の領域が、とくに酵素活性に重要であると考えた。さらに、この領域の保存残基のうちγGln269、γThr273、γGlu275 を他のアミノ酸に置換した。 いずれの変異酵素でも活性は低下したが、γGln269→Glu および γThr273→Val は活性の低下が著しかった。また、γGln269→Glu および →Leu の変異によって、F_0F_1 の分子集合が弱くなった。これまでに報告されているγサブユニットの一次構造より、二次構造の予測を行うと、カルボキシル末端領域の推定構造はよく保存されており、上記 3 種の変異によって大きく変化した。すなわち、カルボキシル末端領域の構造が、酵素活性に重要である可能性を示した。

さらに、野生型と比べて、ほとんどの変異酵素は ATP の加水分解と H^+ 輸送の共役が対応して低下していたが、γGlu275→Lys 変異は、ATPase 活性の 3 - 4 倍高い H^+ 輸送活性を示した。また、フレームシフト変異によって、γGlu278 以

降のアミノ酸配列が野生型とまったく異なり、さらに 野生型の酵素よりも 9 アミノ酸残基が長くなった場合には、ATP の合成活性が完全に失われていたにもかかわらず、ATP の分解活性は認められた。このような性状を示す変異酵素は、本研究においてはじめて得られたものであり、γサブユニットが、ATP の合成および加水分解と共役した H^+ の輸送に重要な役割を果たしていることが強く示唆された。

γサブユニットは、異なる種の間で相同性は高くないが、カルボキシル末端領域とアミノ末端領域には、比較的相同性の高い領域がある。本研究では、最もカルボキシル末端側の保存領域に焦点を当てて解析したが、さらに、アミノ末端側の保存領域、また、カルボキシル末端領域のもうひとつの保存領域に対して分子レベルでの機能の解析を行うことは重要と考えられる。このようなアプローチは、さまざまなイオン輸送性の ATPase に共通の問題として残されている、ATP の加水分解とイオン輸送の共役、すなわち、ATP の分解という化学反応とイオンの輸送というベクトル反応の共役に解決の糸口を与えると考えている。

参考文献

1. Futai, M., Noumi, T., and Maeda, M.(1989)
   ATP synthase (H^+-ATPase): results by combined biochemical and molecular biological approaches.
   Annu. Rev. Biochem. 58, 111-136
2. Futai, M., and Kanazawa, H. (1983)
   Structure and function of proton-translocating adenosine triphosphatase(F_0F_1): biochemical and molecular biological approaches.
   Microbiol. Rev. 47, 285-312
3. Senior, A. E. (1988)
   ATP synthesis by oxidative phosphorylation.
   Physiol. Rev. 68, 177-231
4. Maloney, P. C., and Schattschneider, S. (1980)
   Voltage sensitivity of the proton-translocating adenosine 5'-triphosphatase in *Streptococcus lactis.*
   FEBS Lett. 110, 337-340
5. Maloney, P. C. (1982)
   Energy coupling to ATP synthesis by the proton-translocating ATPase.
   J. Memb. Biol. 67, 1-12
6. Foster, D. L., and Fillingame, R. H. (1982)
   Stoichiometry of subunits in the H^+-ATPase complex of *Escherichia coli.*
   J. Biol. Chem. 257, 2009-2015
7. Dunn, S. D., and Futai, M. (1980)
   Reconstitution of a functional coupling factor from the isolated subunits of *Escherichia coli* F_1ATPase.
   J. Biol. Chem. 255, 113-118
8. Schneider, E. and Altendorf, K. (1985)
   All three subunits are required for the reconstitution of an active proton channel (F_0) of *Escherichia coli* ATP synthase (F_1F_0).
   EMBO J. 4, 515-518
9. Bachmann, B. (1990)
   Linkage map of *Escherichia coli* K-12, edition 8.
   Microbiol. Rev. 54, 130-197
10. Kanazawa, H., Kayano, T., Mabuchi, K. and Futai, M. (1981)
    Nucleotide sequence of the genes coding for α, β and γ subunits of the proton-translocating ATPase of *Escherichia coli.*
    Biochem. Biophys. Res. Commun. 103, 604-612
11. Kanazawa, H., Mabuchi, K., Kayano, T., Noumi, T., Sekiya, T. and Futai, M. (1981)
    Nucleotide sequence of the genes for F_0 components of the proton-translocating ATPase from *Escherichia coli*: predictin of the primary structure of F_0 subunits.
    Biochem. Biophys. Res. Commun. 103, 613-620

12. Wise, J. G., Duncan, T. M., Latchney, L. R., Cox, D. N., and Senior, A. E. (1983)
Properties of F_1-ATPase from the *uncD412* mutant of *Escherichia coli*.
Biochem. J. **215**, 343-350
13. Issartel, J.-P., Lunardi, J., and Vignais, P. V. (1986)
Characterization of exchangeable and nonexchangeable bound adenine nucleotides in F_1-ATPase from *Escherichia coli*.
J. Biol. Chem. **261**, 895-901
14. Cross, R. L., and Nalin, C. M. (1982)
Adenine nucleotide binding sites on beef heart F_1-ATPase.
Evidence for three exchangeable sites that are distinct from three noncatalytic sites.
J. Biol. Chem. **257**, 2874-2881
15. Weber, J., Lucken, U., and Schafer, G. (1985)
Total number and differentiation of nucleotide binding sites on mitochondrial F_1-ATPase. An approach by photolabeling and equilibrium binding studies.
Eur. J. Biochem. **148**, 41-47
16. Perlin, D. S., Latchney, L. R., Wise, J. G., and Senior, A. E.(1984)
Specificity of the proton adenosinetriphosphatase of *Escherichia coli* for adenine, guanine, and inosine nucleotides in catalysis and binding.
Biochemistry **23**, 4998-5003
17. Tagaya, M., Noumi, T., Nakano, K., Futai, M., and Fukui, T. (1988)
Identification of α-subunit Lys^{201} and β-subunit Lys^{155} at the ATP-binding sites in *Escherichia coli* F_1-ATPase.
FEBS Lett. **233**, 347-351
18. Noumi, T., Tagaya, M., Miki-Takeda, K., Maeda, M., Fukui, T.,and Futai, M. (1987)
Loss of unisite and multisite catalyses by *Escherichia coli* F_1 through modification with adenosine tri- or tetraphosphopyridoxal.
J. Biol. Chem. **262**, 7686-7692
19. Ida, K., Noumi, T., Maeda, M., Fukui, T., and Futai, M. (1991)
Catalytic site of F_1-ATPase of *Escherichia coli*. Lys-155 and Lys-201 of the β subunit are located near the γ-phosphate group of ATP in the presence of Mg^{2+}.
J. Biol. Chem. **266**, 5424-5429
20. Berry, E. A., and Hinkle, P. C. (1983)
Measurement of the electrochemical proton gradient in sub-mitochondrial particles.
J. Biol. Chem. **258**, 1474-1486

21. Miller, M. J., Fraga, D., Paule, C. R., and Fillingame, R. H. (1989)
Mutations in the conserved proline 43 residue of the *uncE* protein (subunit *c*) of *Escherichia coli* F_1F_O-ATPase alter the coupling of F_1 to F_O.
J. Biol. Chem. **264**, 305-311
22. Eya, S., Maeda, M., and Futai, M. (1991)
Role of the carboxyl terminal region of H^+-ATPase (F_OF_1) *a* subunits from *Escherichia coli*.
Arch. Biochem. Biophys. **284**, 71-77
23. Mitchell, P. (1985)
Molecular mechanics of protonmotive F_OF_1ATPases. Rolling well and turnstile hypothesis.
FEBS Lett. **182**, 1-7
24. Laubinger, W., and Dimroth, P. (1988)
Characterization of the ATP synthase of *Propionigenium modestum* as a primary sodium pump.
Biochemistry **27**, 7531-7537
25. McCarty, R. E., and Moroney, J. V. (1985)
Functions of the subunits and regulation of chloroplast coupling factor 1.
The Enzymes of Biological Membranes (Martonosi, A.,ed) 2nd Ed, pp. 383-413, Plenum Press, New York
26. Yoshida, M., Okamoto, H., Sone, N., Hirata, H., and Kagawa, Y. (1977)
Reconstitution of thermostable ATPase capable of energy coupling from its purified subunits.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **74**, 936-940
27. Moroney, J. V., and McCarty, R. E. (1982)
Effect of proteolytic digestion on the Ca^{2+}-ATPase activity and subunits of latent and thiol-activated chloroplast coupling factor 1.
J. Biol. Chem. **257**, 5910-5914
28. Moroney, J. V., and McCarty, R. E. (1982)
Light-dependent cleavage of the γ subunit of coupling factor 1 by trypsin causes activation of Mg^{2+}-ATPase activity and uncoupling of photophosphorylation in spinach chloroplasts.
J. Biol. Chem. **257**, 5915-5920
29. Nalin, C. M., and McCarty, R. E.(1984)
Role of a disulfide bond in the γ subunit in activation of the ATPase of chloroplast coupling factor 1.
J. Biol. Chem. **259**, 7275-7280
30. Schumann, J., Richter, M. L., and McCarty, R. E.(1985)
Partial proteolysis as a probe of the conformation of the γ subunit in activated soluble and membrane-bound chloroplast coupling factor 1.
J. Biol. Chem. **260**, 11817-11823

31. Takeyama, M., Ihara, K., Moriyama, Y., Noumi, T., Ida, K., Tomioka, N., Itai, A., Maeda, M., and Futai, M. (1990)
The glycine-rich sequence of the β subunit of *Escherichia coli* H^+-ATPase is important for activity.
J. Biol. Chem. **265**, 21279-21284
32. Kanazawa, H., Miki, T., Tamura, F., Yura, T., and Futai, M. (1979)
Specialized transducing phage λ carrying the genes for coupling factor of oxidative phosphorylation of *Escherichia coli*: increased synthesis of coupling factor on induction of prophage λ *asn*.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **76**, 1126-1130
33. Klionsky, D. J., Brusilow, W. S. A., and Simoni, R. D. (1984)
In vivo evidence for the role of the ε subunit as an inhibitor of the proton-translocating ATPase of *Escherichia coli*.
J. Bacteriol. **160**, 1055-1060
34. Cedar, H., and Schwartz, J. H. (1969)
The asparagine synthetase of *Escherichia coli*.
I. Biosynthetic role of the enzyme, purification, and characterization of the reaction products.
J. Biol. Chem. **244**, 4112-4121
35. Yanisch-Perron, C., Vieira, J., and Messing, J. (1985)
Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors.
Gene. **33**, 103-119
36. Miller, J. H. (1972)
Experiments in Molecular Genetics. Cold Spring Harbor Labaratory, Cold Spring Harbor, New York
37. Tanaka, S., Lerner, S. A., and Lin, E. C. C. (1967)
Replacement of a phosphotransferase by a nicotinamide adenine dinucleotide-linked dehydrogenase.
J. Bacteriol. **93**, 642-648
38. Sanger, F., Coulson, A. R., Barrell, B. G., Smith, A. J. H., and Roe, B. A. (1980)
Cloning in single-stranded bacteriophage as an aid to rapid DNA sequencing.
J. Mol. Biol. **143**, 161-178
39. Mizusawa, S., Nishimura, S., and Seel, F.(1986)
Improvement of the dideoxy chain termination method of DNA sequencing by use of deoxy-7-deazaguanosine triphosphate in place of dGTP.
Nucleic Acids Res. **14**, 1319-1324
40. Futai, M., Sternweis, P. C., and Heppel, L. A. (1974)
Purification and properties of reconstitutively active and inactive adenosinetriphosphatase from *Escherichia coli*.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **71**, 2725-2729

41. Tsuchiya, T., and Rosen, B. P. (1975)
Energy transduction in *Escherichia coli*. The role of the Mg^{2+}ATPase.
J. Biol. Chem. **250**, 8409-8415
42. Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989)
Molecular Cloning. A Labratory Manual. 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
43. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J.(1951)
Protein measurement with the Folin phenol reagent.
J. Biol. Chem. **193**, 265-275
44. Laemmli, U. K. (1970)
Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4.
Nature **227**, 680-685
45. Oakley, B. R., Kirsch, D. R., and Morris, N. R. (1980)
A simplified ultrasensitive silver stain for detecting proteins in polyacrylamide gels.
Anal. Biochem. **105**, 361-363
46. Tomizawa, J., and Som, T. (1984)
Control of ColE1 plasmid replication: enhancement of binding of RNA I to the primer transcript by the Rom protein.
Cell **38**, 871-878
47. Cesareni, G., Muesing, M. A., and Polisky, B. (1982)
Control of ColE1 DNA replication: the *rop* gene product negatively affects transcription from the replication primer promorter.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **79**, 6313-6317
48. Saraste, M., Sibbald, P. R., and Wittinghofer, A. (1990)
The P-loop — a common motif in ATP- and GTP-binding proteins.
Trends Biochem. Sci. **15**, 430-434
49. Hsu, S.-Y., Noumi, T., Takeyama, M., Maeda, M., Ishibashi, S., and Futai, M. (1987)
β-subunit of *Escherichia coli* F_1-ATPase. An amino acid replacement within a conserved sequence (G-X-X-X-X-G-K-T/S) of nucleotide-binding proteins.
FEBS Lett. **218**, 222-226
50. Parsonage, D., Wilke-Mounts, S., and Senior, A. E. (1987)
Directed mutagenesis of the β-subunit of F_1-ATPase from *Escherichia coli*.
J. Biol. Chem. **262**, 8022-8026
51. Parsonage, D., Wilke-Mounts, S., and Senior, A. E. (1988)
E. coli F_1-ATPase: site-directed mutagenesis of the β-subunit.
FEBS Lett. **232**, 111-114

52. Parsonage, D., Al-Shawi, M. K., and Senior, A. E. (1988)
Directed mutations of the strongly conserved lysine 155 in the catalytic nucleotide-binding domain of β-subunit of F_1-ATPase from *Escherichia coli*.
J. Biol. Chem. **263**, 4740-4744
53. Yohda, M., Ohta, S., Hisabori, T., and Kagawa, Y. (1988)
Site-directed mutagenesis of stable adenosine triphosphate synthase.
Biochim. Biophys. Acta **933**, 156-164
54. Mueller, D. M. (1989)
A mutation altering the kinetic responses of the yeast mitochondrial F_1-ATPase.
J. Biol. Chem. **264**, 16552-16556
55. Mueller, D. M. (1989)
Site directed mutagenesis of the β-subunit of the yeast mitochondrial ATPase.
Biochem. Biophys. Res. Commun. **164**, 381-386
56. Kanazawa, H., Horiuchi, Y., Takagi, M., Ishino, Y., and Futai, M. (1980)
Coupling factor F_1 ATPase with defective β subunit from a mutant of *Escherichia coli*.
J. Biochem. **88**, 695-703
57. Noumi, T., Mosher, M. E., Natori, S., Futai, M., and Kanazawa, H. (1984)
A phenylalanine for serine substitution in the β subunit of *Escherichia coli* F_1-ATPase affects dependence of its activity on divalent cations.
J. Biol. Chem. **259**, 10071-10075
58. Takeda, K., Miki, J., Kanazawa, H., Tsuchiya, T., and Futai, M. (1985)
Change of inhibitor sensitivities of *Escherichia coli* F_1-ATPase due to a mutational substitution of Phe for Ser at residue 174 of the β subunit.
J. Biochem. **97**, 1401-1407
59. Hanahan, D. (1983)
Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids.
J. Mol. Biol. **166**, 557-580
60. Personage, D., Duncan, T. M., Wilke-Mounts, S., Kironde, F. A. S., Hatch, L., and Senior, A. E. (1987)
The defective proton-ATPase of *uncD* mutants of *Escherichia coli*. Identification by DNA sequencing of residues in the β-subunit which are essential for catalysis or normal assembly.
J. Biol. Chem. **262**, 6301-6307

61. Kobayashi, H., Maeda, M., and Anraku, Y. (1977)
Membrane-bound adenosine triphosphatase of *Escherichia coli*.
III. Effects of sodium azide on the enzyme functions.
J. Biochem. **81**, 1071-1077

62. Noumi, T., Taniai, M., Kanazawa, H., and Futai, M. (1986)
Replacement of arginine 246 by histidine in the β subunit of *Escherichia coli* H^+-ATPase resulted in loss of multi-site ATPase activity.
J. Biol. Chem. **261**, 9196-9201

63. Senior, A. E., Latchney, L. R., Ferguson, A. M., and Wise, J. G. (1984)
Purification of F_1-ATPase with impaired catalytic activity from partial revertants of *Escherichia coli uncA* mutant strains.
Arch. Biochem. Biophys. **228**, 49-53

64. Falson, P., Pietro, A. D., Darbouret, D., Jault, J. M., Gautheron, D. C., Boutry, M., and Goffeau, A. (1987)
Revertant of the yeast *Schizosaccharomyces pombe* with modified α subunits of mitochondrial ATPase - ATP synthase: impaired nucleotide interactions with soluble and membrane-bound enzyme.
Biochem. Bophys. Res. Commun. **148**, 1182-1188

65. Jault, J. M., Pietro, A. D., Falson, P., Gautheron, D. C., Boutry, M., and Goffeau, A. (1989)
A yeast strain with mutated β-subunits of mitochondrial ATPase-ATP synthase: High azide and bicarbonate sensitivity of the ATPase activity.
Biochem. Biophys. Res. Commun. **158**, 392-399

66. Heil, A., Muller, G., Noda, L., Pinder, T., Schirmer, H., Schirmer, I., and von Zabern, I. (1974)
The amino-acid sequence of porcine adenylate kinase from skeltal muscle.
Eur. J. Biochem. **43**, 131-144

67. Tabin, C. J., Bradley, S. M., Bargmann, C. I., Weinberg, R. A., Papageorge, A. G., Scolnick, E. M., Dhar, R., Lowy, D. R., and Chang, E. H. (1982)
Mechanism of activation of a human oncogene.
Nature **300**, 143-149

68. Reddy, E. P., Reynolds, R. K., Santos, E., and Barbacid, M. (1982)
A point mutation is responsible for the acquisition of transforming properties by the T24 human bladder carcinoma oncogene.
Nature **300**, 149-152

69. Capon, D. J., Chen, E. Y., Levinson, A. D., Seeburg, P. H., and Goeddel, D. V. (1983)
Complete nucleotide sequences of the T24 human bladder carcinoma oncogene and its normal homologue.
Nature **302**, 33-37

70. Jones, M. D., Petersen, T. E., Nielsen, K. M., Magnusson, S., Sottrup-Jensen, L., Gausing, K., and Clark, B. F. C. (1980)
The complete amino-acid sequence of elongation factor Tu from *Escherichia coli*.
Eur. J. Biochem. **108**, 507-526
71. Dreusicke, D., Karplus, P. A., and Schulz, G. E. (1988)
Refined structure of porcine cytosolic adenylate kinase at 2.1 Å resolution.
J. Mol. Biol. **199**, 359-371
72. Milburn, M. V., Tong, L., deVos, A. M., Brunger, A., Yamaizumi, Z., Nishimura, S., and Kim, S.-H. (1990)
Molecular switch for signal transduction: structural differences between active and inactive forms of protooncogenic *ras* proteins.
Science **247**, 939-945
73. Pai, E. F., Krengel, U., Petsko, G. A., Goody, R. S., Kabsch, W., and Wittinghofer, A. (1990)
Refind crystal structure of the triphosphate confomation of H-*ras* p21 at 1.35 Å resolution: implications for the mechamism of GTP hydrolysis.
EMBO J. **9**, 2351-2359
74. la Cour, T. F. M., Nyborg, J., and Clark, B. F. C. (1985)
Structural details of the binding of guanosine diphosphate to elongation factor Tu from *E. coli* as studied by X-ray crystallography.
EMBO J. **4**, 2385-2388
75 Jurnak, F. (1985)
Structure of the GDP domain of EF-Tu and location of the amino acids homologous to ras oncogene prateins.
Science **230**, 32-36
76. Park, M. -Y., Iwamoto, A., Maeda, M., and Futai, M.
in preperation.
77. Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J., and White, T. J. (1990)
PCR protocols. A guide to methods and applications.
Academic Press, Inc.
78. Dower, W. J., Miller, J. F., and Ragsdale, C. W. (1988)
High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation.
Nucleic Acids Res. **16**, 6127-6145
79. Taketo, A. (1988)
DNA transfection of *Escherichia coli* by electroporation.
Biochim. Biophys. Acta **949**, 318-324
80. Chothia, C. (1975)
Structural invariants in protein folding.
Nature **254**, 304-308

81. Dayhoff, M. O., Schwarts, R. M., and Orcutt, B. C. (1978)
Atras of Protein Sequence and Structure, (Dayhoff, M. O., ed)
vol. 5, Suppl. 3, pp. 345-352, National Biomedical Research Foundation, Silver Spring, MD
82. Wittinghofer, A. and Pai, E. F. (1991)
The structure of Ras protein: a model for a universal molecular switch.
Trends Biochem. Sci. **16**, 382-387
83. Hollemans, M., Runswick, M. J., Fearnley, I. M., and Walker, J. E. (1983)
The sites of labeling of the β-subunit of bovine mitochondrial F_1-ATPase with 8-azido-ATP.
J. Biol. Chem. **258**, 9307-9313
84. Viale, A. M., and Vallejos, R. H. (1985)
Identification of an essential arginine residue in the β subunit of the chloroplast ATPase.
J. Biol. Chem. **260**, 4958-4962
85. Mueller, D. M. (1988)
Arginine 328 of the β-subunit of the mitochondrial ATPase in yeast is essential for protein stability.
J. Biol. Chem. **263**, 5634-5639
86. Futai, M. (1977)
Reconstitution of ATPase activity from the isolated α, β, and γ subunits of the coupling factor, F_1, of *Escherichia coli*.
Biochem. Biophys. Res. Commun. **79**, 1231-1237
87. Kagawa, Y., Ohta, S., and Otawara-Hamamoto, Y. (1989)
$\alpha_3\beta_3$ comlex of thermophilic ATP synthase catalysis without the γ-subunit.
FEBS Lett. **249**, 67-69
88. Miwa, K., and Yoshida, M. (1989)
The $\alpha_3\beta_3$ complex, the catalytic core of F_1-ATPase.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **86**, 6484-6487
89. Kanazawa, H. Noumi, T., Futai, M., and Nitta, T. (1983)
Escherichia coli mutants in the γ subunit of proton-translocating ATPase: intracistronic mapping of the defective site and the biochemical properties of the mutants.
Arch. Biochem. Biophys. **223**, 521-532
90. Miki, J., Takeyama, M., Noumi, T., Kanazawa, H., Maeda, M., and Futai, M. (1986)
Escherichia coli H^+-ATPase: loss of the carboxyl terminal region of the γ subunit causes defective assembly of the F_1 portion.
Arch. Biochem. Biophys. **251**, 458-464

91. Kanazawa, H., Hama, H., Rosen, B., Futai, M. (1985)
Deletion of seven amino acid residues from the γ subunit of *Escherichia coli* H^+-ATPase causes total loss of F_1 assembly on membrane.
Arch. Biochem. Biophys. **241**, 364-370
92. Miki, J., Maeda, M., Mukohata, Y., and Futai, M. (1988)
The γ-subunit of ATP synthase from spinach chloroplasts. Primary structure deduced from the cloned cDNA sequence.
FEBS Lett. **232**, 221-226
93. Inohara, N., Iwamoto, A., Moriyama, Y., Shimomura, S., Maeda, M., and Futai, M. (1991)
Two genes, *atpC1* and *atpC2*, for the γ subunit of *Arabidopsis thaliana* chloroplast ATP synthase.
J. Biol. Chem. **266**, 7333-7338
94. Garnier, J., Osguthorpe, D. J., and Robson, B. (1978)
Analysis of the accuracy and implications of simple methods for predicting the secondary structure of globular proteins.
J. Mol. Biol. **120**, 97-120
95. Yoshida, M., Sone, N., Hirata, H., and Kagawa, Y. (1977)
Reconstitution of adenosine triphosphatase of thermophilic bacterium from purified individual subunits.
J. Biol. Chem. **252**, 3480-3485
96. Amzel, L. M., and Pedersen, P. L. (1983)
Proton ATPases: Structure and mechanism.
Ann. Rev. Biochem. **52**, 801-824
97. Gogol, E. P., Lucken, U., and Capaldi, R. A. (1987)
The stalk connecting the F_1 and F_0 domains of ATP synthase visualized by electron microscopy of unstained specimens.
FEBS Lett. **219**, 274-278

謝辞

本研究は、大阪大学産業科学研究所・二井研究室において 1988 年から 1991 年の間に行ったものであります。この稿を終えるにあたり、直接のご指導ならびにご教示を賜りました二井將光教授に心よりお礼を申し上げたいと思います。また、本論文の作製にあたり、貴重なご助言とご教示を賜りました、大阪大学工学部、今中忠行教授、山田靖宙教授、高野光男教授、大嶋泰治教授、菅健一教授、吉田敏臣教授に深く感謝いたします。

二井研究室の前田正知助教授ならびに森山芳則博士には、実験をご指導いただき終始有益なご助言を賜りました。三木順詞博士（現岡山大学工学部）には、第 5 章のγサブユニットの機能の解析についてご指導をいただきました。 花田裕典博士、田村茂彦先生、能見貴人助教授（現岡山大学工学部）ならびに竹山道康博士（現武田薬品）には、日々の実験について多くの有益なご助言をいただきました。東京大学の板井昭子助教授ならびに富岡伸夫博士にはβサブユニット glycine-rich sequence 周辺領域の三次構造をコンピューターシミュレーションにより推定していただきました。第 4 章のプラスミドの構築には朴　美連氏の協力をいただきました。以上の方々に、深く感謝いたします。

本研究は、二井研究室の方々の多くの研究成果を踏まえた上で行われたものです。心より感謝の意を述べたいと思います。