



Title	Binding of an Intrinsic ATPase Inhibitor to the Interface between $\alpha$ -and $\beta$ -Subunits of F1Fo ATPase upon De-Energization of Mitochondria
Author(s)	三村, 治夫
Citation	大阪大学, 1993, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/38665">https://hdl.handle.net/11094/38665</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、<a href=" <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> ">大阪大学の博士論文について</a>をご参照ください。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

氏名	三村　はる夫
博士の専攻分野の名称	博士（医学）
学位記番号	第10923号
学位授与年月日	平成5年9月17日
学位授与の要件	学位規則第4項第2項該当
学位論文名	Binding of an Intrinsic ATPase Inhibitor to the Interface between $\alpha$ -and $\beta$ -Subunits of F <sub>1</sub> FoATPase upon De-Energization of Mitochondria (ミトコンドリア脱エネルギー時における内在性 ATPase インヒビターの F <sub>1</sub> FoATPase の $\alpha$ -サブユニットと $\beta$ -サブユニットの界面への結合)
論文審査委員	(主査) 教授 岡本 光弘 (副査) 教授 志賀 健 教授 谷口 直之

### 論文内容の要旨

#### 【目的】

内在性 ATPase インヒビターは、ミトコンドリア F<sub>1</sub>FoATPase へ 1 : 1 のモル比で結合し ATP 分解活性を完全に阻害する。また、亜ミトコンドリア粒子を用いた解析から、ATPase インヒビターはエネルギー依存的に F<sub>1</sub>FoATPase から解離することが知られている。しかし、ミトコンドリア脱エネルギー時における ATPase インヒビターの F<sub>1</sub>FoATPase への結合機構は明らかでない。我々は既に ATPase インヒビターと共同で作動する 2 種の蛋白（9K 蛋白と 15K 蛋白）を発見し、インヒビターを含めたこれらの活性調節因子をそれぞれ欠失したミトコンドリアをもつ変異株酵母を作成している。本研究は、各種変異株酵母から調製したミトコンドリアを用い、脱エネルギー時における ATPase インヒビターの F<sub>1</sub>への結合を 9K 蛋白と 15K 蛋白の作用をも含め明らかにしようとするものである。

#### 【方法】

##### (1) ミトコンドリアの ATP 分解反応の測定

ATP 分解速度 (25°C, pH6.5) は 1 mM ATP を含むミトコンドリア浮遊液の ATP, ADP, AMP 濃度の経時変化を HPLC で定量することにより求めた。

##### (2) 内在性 ATPase インヒビターの F<sub>1</sub>FoATPase への結合

呼吸時および脱エネルギー時のミトコンドリアを界面活性剤 (CHAPS, 0.3%) を加えて可溶化し遠心分離 (15,000 rpm, 10分) 後、ゼロオングストロームクロスリンカー (EEDQ, 1 mM) を加え10分間 (25°C) 反応させた。次に、抗 F<sub>1</sub>ATPase 抗体を加え F<sub>1</sub>FoATPase を沈殿させ、これを SDS-PAGE に供した後、抗 ATPase インヒビター抗体を用いたウエスタンプロットで分析した。

#### 【成績および考察】

##### (1) 各変異株酵母から調製したミトコンドリアの ATP 分解活性

野生株およびいずれの変異株においても、ミトコンドリアの ATP 合成速度にはほとんど差はみられなかった。脱共

役割添加あるいはバリノマイシンとカリウムイオンの組み合わせによりミトコンドリアを脱共役状態にすると、すべてのミトコンドリアにおいて強いATP分解活性の誘導が観察された。しかし、野生株ミトコンドリアにおいてはその分解活性の誘導は一過性で、ミトコンドリアは1分以内にATP分解活性を示さなくなった。ATPaseインヒビターを欠失したミトコンドリアではこの分解阻害はみられず、強いATP分解が持続した。9K蛋白あるいは15K蛋白を欠失したミトコンドリアでは分解は阻害されたが、阻害は不完全であり、阻害状態に至る時間も長くかかった。以上のこととは、酸化的リン酸化時にはATPaseインヒビターはF<sub>1</sub>FoATPaseの活性部位から解離していること、および脱エネルギー時にはATPaseインヒビターはF<sub>1</sub>に結合してATP分解を阻害し、9K蛋白と15K蛋白はこの結合を効率よく促進させる役割をもつことを示している。

## (2) ATPaseインヒビターの結合部位

脱共役状態になったミトコンドリアにCHAPSを加えF<sub>1</sub>FoATPaseを可溶化させたところ、ATPase活性を示さないF<sub>1</sub>FoATPaseが得られた。一方、呼吸状態のミトコンドリアからは、高いATP分解活性をもつF<sub>1</sub>FoATPaseが得られた。これらのF<sub>1</sub>FoATPaseにEEDQを加え架橋反応を行わせた後、抗ATPaseインヒビター抗体を用いたウェスタンプロットにより、ATPasesインヒビター蛋白の結合サブユニットを検索した。その結果、分子量68kDaと65kDaの2本のバンドが検出された。これら二つのバンドはそれぞれ抗α-サブユニットおよび抗β-サブユニット抗体と反応することから、ATPaseインヒビターはα-サブユニットとβ-サブユニットの両方に結合することが確認された。ATPaseインヒビターはF<sub>1</sub>1分子に対し1分子が結合するので、以上のことより、結合部位はα-サブユニットとβ-サブユニットの境界面であると結論される。

## 【総括】

ミトコンドリア脱エネルギー時におけるATPaseインヒビター、9K蛋白、15K蛋白の挙動について解析した結果、

- (1) 内在性ATPaseインヒビターは、ミトコンドリアの膜ポテンシャルが消失しATP合成ができなくなった時、F<sub>1</sub>FoATPase自体による非生産的なATP加水分解を阻害する。
- (2) 9K蛋白と15K蛋白は、ATPaseインヒビターのF<sub>1</sub>FoATPaseへの結合を効率よく促進させる。
- (3) ATPaseインヒビターは、ミトコンドリア脱エネルギー時にF<sub>1</sub>FoATPaseのα-サブユニットとβ-サブユニットの境界面に結合することが明らかとなった。

## 論文審査の結果の要旨

ミトコンドリアのF<sub>1</sub>FoATPaseは内在性ATPaseインヒビター、9K蛋白および15K蛋白により活性調節をうけている。本研究はミトコンドリアの膜ポテンシャルの増減によるF<sub>1</sub>FoATPaseの活性変化に対応して、ATPaseインヒビターとF<sub>1</sub>が解離、結合して活性調節を行うことを直接証明したものである。すなわち、ミトコンドリアの膜ポテンシャルが維持されATP合成が進行する状態ではATPaseインヒビターはF<sub>1</sub>から解離し、また膜ポテンシャル消失時には直接F<sub>1</sub>に結合してATP分解を停止させることを明らかにすると共に、9K、15K両蛋白はATPaseインヒビターのF<sub>1</sub>への結合を促進することを示した。さらに、ATPaseインヒビターは、F<sub>1</sub>のα-およびβ-サブユニットの両者と結合することを明確にした。これらの成果は、酸化的リン酸化機構の解明に大きな手がかりを与えるものであり、学位論文として価値あるものと認められる。