



Title	Binding of an Intrinsic ATPase Inhibitor to the Interface between α -and β -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	https://hdl.handle.net/11094/38665
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏 名 三 村 治 夫

博士の専攻分野の名称 博 士 (医 学)

学 位 記 番 号 第 1 0 9 2 3 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
 α -and β -Subunits of F_1F_0 ATPase 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_1F_0 ATPase の α -サブユニットと β -サブユニットの境界面への結合)

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_1F_0 ATPase 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、垂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_1F_0 ATPase 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_1F_0 ATPase 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 (9 K 蛋白と 15 K 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_1 への結合を 9 K 蛋白と 15 K 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_1F_0 ATPase 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_1 ATPase 抗体を加え F_1F_0 ATPase を沈澱させ、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ェスタンブロットで分析した。

【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

野生株およびいづれの変異株においても、ミトコンドリアの ATP 合成速度に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。9 K 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。以上のことは、酸化的リン酸化時には ATPase インヒビターは F_1F_o ATPase 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_1 に結合して ATP 分解を阻害し、9 K 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_1F_o ATPase を可溶化させたところ、ATPase 活性を示さない F_1F_o ATPase 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_1F_o ATPase が得られた。これらの F_1F_o ATPase 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ブロットにより、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 68 kDa と 65 kDa 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_1 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、9 K 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_1F_o ATPase 自体による非生産的な ATP 加水分解を阻害する。
- (2) 9 K 蛋白と 15K 蛋白は、ATPase インヒビターの F_1F_o ATPase 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_1F_o ATPase 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_1F_o ATPase は内在性 ATPase インヒビター、9 K 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_1F_o ATPase の活性変化に対応して、ATPase インヒビターと F_1 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_1 から解離し、また膜ポテンシャル消失時には直接 F_1 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、9 K、15K 両蛋白は ATPase インヒビターの F_1 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_1 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。