

Title	大腸菌ATP合成酵素の β サブユニット : Glycine-rich配列の下流に存在する触媒残基の同定
Author(s)	朴, 美連
Citation	大阪大学, 1994, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/38794
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名	朴 美 連
博士の専攻分野の名称	博士(工学)
学位記番号	第 11348 号
学位授与年月日	平成6年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 工学研究科醗酵工学専攻
学位論文名	大腸菌ATP合成酵素のβサブユニット; Glycine-rich 配列の下流に 存在する触媒残基の同定
論文審査委員	(主査) 教授 二井 将光 教授 大嶋 泰治 教授 高野 光男 教授 卜部 格 教授 今中 忠行 教授 山田 靖宙 教授 新名 惇彦 教授 菅 健一 教授 吉田 敏臣

論文内容の要旨

ATPは生体においてエネルギー貨幣とされている重要な物質である。ATPはミトコンドリアの内膜、葉緑体のチラコイド膜および細菌膜において電子伝達鎖の形成するプロトンの電気化学ポテンシャル差(プロトン勾配と膜電位)と共役してATP合成酵素によって合成されている。本論文は、ATP合成酵素の触媒部位の構造を明らかにすることを目的とし、大腸菌(*Escherichia coli*)のATP合成酵素のβサブユニットに存在するGlycine-rich配列の下流領域(Glu-161~Lys-201)に合計41の変異を導入し、変異F₁を精製し、反応速度論的な解析を行っている。

第1章は序論であり、ATP合成酵素に関する過去の研究をまとめ、分子生物学的手法を用いた本研究の背景と意義について述べている。さらにGlu-161~Lys-201領域に注目した理由について述べている。

第2章では、ATP合成酵素のβサブユニットに系統的に変異を導入するためにβサブユニット遺伝子を持つ新たな組換えプラスミドpBWU14を構築している。これを用いGlu-161~Lys-201領域に合計41の変異を導入している。その結果、Glu-181, Arg-182, Glu-185残基に変異を導入すると変異株のATP合成活性およびATPase活性が完全になくなることから、触媒反応に重要であることを示唆している。同時にこの領域の他の親水性保存残基に変異を導入しても、同様の結果は得られないことを確認している。これらの結果は、Glu-181, Arg-182, Glu-185のみがGlu-161~Lys-201領域の必須残基であることを示している。

第3章では、βサブユニットのアミノ酸配列がガン遺伝子産物であるp21rasタンパクの配列と似ている領域Glu-185~Ile-199およびGlu-280~Val-296のアミノ酸配列をp21ras型に置換している。その結果は、少なくとも、部分的にはβサブユニットとp21rasタンパクが似ていることを示唆している。

第4章では、第1章で触媒反応における重要性が明らかになった残基Glu-181, Arg-182, Glu-185残基に変異を持つF₁(ATP合成酵素の触媒部位を持つ複合体)を精製し、これを用いて詳細な反応速度論的解析を行っている。特にF₁と基質が1:1で結合した時に見られる反応(uni-site反応)、基質が大過剰にある時に見られる反応(定常状態の反応)に注目している。その結果、Glu-181, Glu-185残基のカルボキシル基と、Arg-182残基のグアニジノ基が触媒反応に重要な役割を果たしていることと結論している。

第5章では、本研究で得られた結果を高次構造が明らかになっているp21rasタンパクおよびrecAタンパクなどと比較しながら、βサブユニットの高次構造を推定し、反応機構を考察している。すなわち、本酵素の逆反応であるATPase反応においては、ATPはLys-155, Thr-156, Glu-181, Arg-182, Glu-185等よりなる触媒部位に結合し、

ATPの β/γ 位のリン酸基には Mg^{2+} が結合していると考えている。Glu-181残基が基質ATPの γ 位のリン酸基の近傍の水分子を活性化させ、さらに、活性化された水分子が γ 位のリン酸基を攻撃することにより、 β 位と γ 位のリン酸基を結ぶエステル結合が加水分解されることを考察している。

論文審査の結果の要旨

ATP合成酵素は電子伝達鎖の形成するプロトンの勾配と膜電位を駆動力として、ADPとリン酸からATPを合成するという化学反応を行うオスモエンザイムである。イオンの輸送という物理的過程を化学反応に共役させる酵素であるという見地からATP合成酵素は注目されている。

本論文は大腸菌のATP合成酵素の β サブユニットに系統的に変異を導入し、酵素の性状を解析し、ATP合成酵素の触媒反応に関与するアミノ酸残基を同定したものである。得られた主な結果を要約すると以下のとおりである。

- (1) 本酵素の β サブユニットに系統的に合計41の変異を導入し、全変異酵素の速度論的性状を詳細に解析している。その結果、Glu-181, Arg-182, Glu-185の3残基が触媒反応に重要であることを見出している。
- (2) β サブユニットとp21rasタンパクの配列の類似に注目し、変異を導入し解析している。その結果、この2つのタンパクの少なくとも一部の構造は似ていると考えられる。
- (3) Glu-181, Arg-182, Glu-185に変異を持つATP合成酵素(Glu-181→Gln, Glu-181→Asp, Glu-181→Ala; Arg-182→Lys, Arg-182→Gln; Glu-185→Gln, Glu-185→Asp)の触媒部位を形成している複合体 F_1 を精製し、定常状態と非定常状態において詳細な反応速度論的な解析を行っている。その結果、Glu-181とGlu-185のカルボキシル基、Arg-182のグアニジン基が触媒反応に重要であることを実証している。
- (4) 速論的解析と変異導入の結果を踏まえて、ATP合成酵素の反応機構を提案している。特に、Glu-181残基が水分子を活性化するという機構は本論文における重要な提案と考えられる。

以上のように本論文はATP合成酵素の反応機構に関して新しい基礎知見を示したものであり、生物学、生物化学、微生物学の分野で貢献するところが大きい。よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。