



Title	Solution NMR study on TF1-ATPase 360 kDa complex
Author(s)	小林, 真澄
Citation	大阪大学, 2008, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/48762">https://hdl.handle.net/11094/48762</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="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。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

氏名	小林 真澄
博士の専攻分野の名称	博士(理学)
学位記番号	第21765号
学位授与年月日	平成20年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 理学研究科生物科学専攻
学位論文名	Solution NMR study on $TF_1$ -ATPase 360 kDa complex ( $TF_1$ -ATPase 360 kDa 複合体の溶液NMRによる研究)
論文審査委員	(主査) 教授 相本 三郎 (副査) 教授 金澤 浩 招聘教授 阿久津秀雄 准教授 藤原 敏道 准教授 池上 貴久

### 論文内容の要旨

#### 【背景と目的】

F型ATP合成酵素(F-ATPsynthase)は、膜内在性のプロトンチャネルであるF<sub>o</sub>と、ATPの合成・加水分解を行うF<sub>1</sub>とからなる巨大な回転触媒酵素である。特に、膜から遊離したF<sub>1</sub>はATP加水分解能を保持し、エネルギー効率が100%に近い最小の分子モーターとして、その回転機構に興味が持たれている。1994年にミトコンドリアF<sub>1</sub>の結晶構造が報告され、1997年には一分子直接観測からF<sub>1</sub>の回転がATPの加水分解に伴って起きることが証明された。しかし未だに回転触媒機構の詳細については完全に解明されておらず、より自然状態に近い溶液中での、原子レベルの構造情報が期待されている。

溶液NMRはこれに適した手段であるが、信号の重なりや広幅化による分子量の壁が存在する。近年、巨大タンパク質測定に特化した測定法が開発され、非常に対称性の高い安定なタンパク質複合体では、1MDa程度の測定が可能になってきた。しかし、F<sub>1</sub>-ATPaseのような非対称かつコンフォメーション変化の大きなタンパク質を溶液NMRで観測するには、それだけでは不十分である。

本研究では、熱安定性と再構成の効率の点から、好熱菌Thermophilic *Bacillus* PS3由来F<sub>1</sub>-ATPase(TF<sub>1</sub>-ATPase)を用いて、溶液NMRにおけるより一般的な巨大分子測定法を確立し、そしてその手法を用いてF<sub>1</sub>-ATPaseにおける $\beta$ および $\epsilon$ サブユニットの構造と動的性質について検討する。最終的には、回転触媒機構のNMRによる研究への道を切り拓くことを目的とする。

#### 【結果および考察】

測定法の開発においては、より対称性の高い $\alpha_3\beta_3$ ヘキサマーを用いて検討を行った。観測対象となるのは、触媒部位をもち、ヌクレオチドの結合によって大きくコンフォメーションが変化する $\beta$ サブユニットである。 $\alpha$ と $\beta$ サブユニットを等量混合したサンプルで、通常の測定法と巨大分子用の測定法、重水素化、および<sup>15</sup>N均一標識とインティンを用いた区分標識をそれぞれ比較した。巨大分子用のCRINEPTパルス、両サブユニットの重水素化、区分標識を併用すると、319 kDaのヘキサマーのスペクトルが高分解能で得られた。スペクトルの解析から、複合体内での

運動性や隣接する  $\alpha$  サブユニットとの相互作用の強さが、 $\beta$  サブユニット N 末端と C 末端で異なることも明らかになった。

次にこの手法を、非対称で  $\beta$  サブユニットのコンフォメーションがそれぞれ異なる  $\alpha_3\beta_3\gamma$  複合体に適用した。 $\gamma$  サブユニットは疎水性が高く、複合体の濃度が 0.1 mM 程度でも凝集を起こして不安定であった。そこで  $\varepsilon$  サブユニットの N 末端ドメイン（1-90 残基；  $\varepsilon\Delta 90$ ）と 200 mM Arg を加えると、360 kDa の複合体として安定に観測することができた。

$\beta$  サブユニットの N 末端ドメインは、 $\alpha_3\beta_3$  ヘキサマーのときには運動性が見られなかつたが、 $\alpha_3\beta_3\gamma$  複合体では高い運動性に由来する信号が認められた。これらのほとんどは、N 末端ドメインのループ部分に見られた。また、C 末端ドメインでは多くの信号が  $\beta$  モノマーの open 型と似たような化学シフトを持ち、いくつかの残基では信号が多重に分裂していることが観察された。こうした残基は、複合体中での三つの  $\beta$  サブユニットのコンフォメーションの違いや  $\gamma$  サブユニットとの相互作用を反映しているものと考えられる。

また、 $\varepsilon\Delta 90$  を安定同位体標識したコンプレックスの測定と解析から、 $\varepsilon\Delta 90$  の  $\gamma$  サブユニットとの結合様式が判明した。

### 論文審査の結果の要旨

F型 ATP 合成酵素 (F-ATPsynthase) は、膜内在性のプロトンチャネルである F<sub>0</sub> と、ATP の合成・加水分解を行う F<sub>1</sub> とからなる巨大で複雑な回転触媒酵素である。学位申請者は、安定で再構成効率のよい好熱菌 Thermophilic *Bacillus* PS3 由来 F<sub>1</sub>-ATPase (TF<sub>1</sub>-ATPase) を用いて、回転触媒機構解明の第一歩として溶液 NMR による F<sub>1</sub>-ATPase  $\beta$  および  $\varepsilon$  サブユニットの構造と動的性質について研究した。F<sub>1</sub> は巨大構造体であり、NMR には分子量の壁があるため、まずは巨大構造体解析のための方法論の開発を行う必要があった。その結果、巨大分子用の CRINEPT パルス、 $\alpha$  および  $\beta$  サブユニットの重水素化、区分安定同位体標識を併用することにより 360 kDa 複合体の高分解能のスペクトルが得られることを示した。学位申請者は、さらにこの方法を非対称で  $\beta$  サブユニットのコンフォメーションがそれぞれ異なる  $\alpha_3\beta_3\gamma$   $\Delta$   $\varepsilon$  複合体に適用し、このような巨大構造体においても  $\beta$  及び  $\Delta$   $\varepsilon$  サブユニットについてアミノ酸の分解能の動的構造情報が得られることを示した。

この研究は F<sub>1</sub>-ATPase のような巨大で複雑な複合体を溶液中で NMR により解析できることを世界で初めて示し、サブユニット間の相互作用についての新しい知見を得た点で重要な成果である。よって、本論文は理学博士の学位論文として十分な価値があるものと認める。