Osaka University Knowledge Archive

Title	FoF1-ATP合成酵素の固定子ー回転子間の力伝達機構に関する研究
Author(s)	谷川原, 瑞恵
Citation	大阪大学, 2012, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/59355
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。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

【70】

氏　　名	谷川原（たにがわら）　瑞（みづ）　恵（え）
博士の専攻分野の名称	博　士（工学）
学　位　記　番　号	第　２５４６１　号
学位授与年月日	平成24年３月22日
学位授与の要件	学位規則第４条第１項該当 生命機能研究科生命機能専攻
学　位　論　文　名	F_oF_1-ATP合成酵素の固定子－回転子間の力伝達機構に関する研究 (Study on the force transmission mechanism between stator and rotor part of F_oF_1-ATP synthase)
論文審査委員	(主査) 教　授　野地　博行 (副査) 教　授　難波　啓一　　教　授　上田　昌宏　　准教授　池上　貴久

論文内容の要旨

F_oF_1-ATP合成酵素（F_oF_1）は細胞内のエネルギー源であるATPを合成しているタンパク質である。F_oF_1はF_oとF_1、2つのモータータンパク質から成る。細胞質ドメインのF_1は単体でATPを加水分解し、反時計回りに回転する回転分子モーターである。一方膜タンパク質であるF_oは膜を介したプロトン（H^+）の電気化学的ポテンシャルを駆動力として時計回りに回転する。

本論文第二章ではF_1の回転トルクがどのように発生しているのかを知ることを目的とした。分子モーターとして機能する最小ユニットは$\alpha_3\beta_3\gamma$であり、各βサブユニットが触媒能を有する。βサブユニットのC末端ドメイン（βC末）はATPの結合により大きく構造変化する。その構造変化が回転子であるγサブユニットに伝わり、力が伝達されると考えられている。βC末とγの相互作用さえ残っていればF_1は回転することが報告されているものの（古池ら）、その相互作用のうち静電相互作用や疎水性相互作用といった特異的な相互作用がトルク発生に必須なのかどうかは明らかになっていなかった。そこでこの領域におけるどの相互作用がトルク発生に必須であるのかを明らかにするために、βC末に大幅なアミノ酸置換を導入した。γとの界面に存在するβC末の残基を全てアラニンに置換した*Ala*変異体は特異的な相互作用を全て失っているにも関わらず、野生型と遜色ないキネティクスパラメータ、トルクを保持していた。この結果からβC末とγの特異的な相互作用は一方向の回転を生み出すには必要ないことが明らかとなった。またβC末の構造的な堅さを取り除くため、この領域の残基を全てグリシンに置換した*Gly*変異体の回転観察を行った。*Gly*変異体は野生型とほぼ同じキネティクスパラメータを

有するものの、トルクの値は野生型の約半分に減少していた。*Gly*変異体の停止中における揺らぎを測定したところ、グリシンに置換したことによってBC末の堅さが失われたこと明らかとなった。また、分子動力学計算結果からヘリックス構造を失っていることも示唆された。以上の結果より、βからγに力を伝えるためには特異的な相互作用は必須ではなく、BC末の堅いヘリックス構造が必要であることが明らかとなった。

次にイオン結合がF_oの回転トルクに与える影響を調べるためF_oへのイオンの結合に伴ったステップの検出を試みた（第三章前半）。F_oへのH^+の結合が非常に速いため野生型F_oF_1ではF_o由来のステップの観察には至っていない（上野ら）。そこで私はLi^+感受性変異を導入したF_oF_1を用い、Li^+濃度を変化させF_oが律速となった回転を検出することを試みた。この変異体を用いた解析では、膜に再構成したF_oF_1でステップ状の回転が確認できた。一方、F_oF_1のホモログであるNa^+型V-ATPaseはH^+ではなくNa^+を輸送するV型ATPaseである。これまで1分子回転観察は行われていないものの、生化学的な実験からNa^+濃度変化に応じて劇的に活性が変化することが報告されている（村田ら）。つまりNa^+濃度変化によってV_oのステップが検出できると期待される。本研究ではまずこの酵素の1分子回転観察系を確立し、Na^+濃度を変化させることによってNa^+濃度依存的な回転を確認した（第三章後半）。また、36°刻みのステップが観察されることもあった。さらなる検証が必要であるものの、これらの結果はF_o/V_oへのイオン結合の素過程が可視化できたことを示唆するものである。

以上のように本研究ではF_1におけるトルク発生機構の解明及びF_oのステップ検出に成功し、F_oF_1におけるATP合成メカニズムの解明に貢献する知見を得ることができた。

論文審査の結果の要旨

F_1-ATPaseはF_oF_1-ATP合成酵素の一部で、ATPの加水分解エネルギーを駆動力として反時計回りに回転する。触媒サブユニットであるβサブユニットのC末端ドメインはATPの結合により大きく構造変化する。その構造変化がγに伝わり、γを回転させていると考えられているが、βC末とγのどの様な相互作用がトルク発生に必須なのかは明らかになっていなかった。そこで申請者はγと接触しているβC末のアミノ酸残基を全てアラニンやグリシンに置換し、β－γ間の相互作用を完全に取り除いた変異体を作製した。アラニン変異体は特異的な相互作用を全て失っているにも関わらず野生型と遜色ないキネティクス、トルクを保持していたため、βC末とγの特異的な相互作用は一方向の回転を生み出すには必要ないことが明らかとなった。一方、グリシン変異体のトルクは野生型の約半分に減少していた。揺らぎの測定とMDシミュレーション結果から、グリシン置換によってβC末の堅さが失われていることが示唆された。このことから、接触部位のヘリックス構造がもつ堅さがトルクを効率的に伝達するために重要であることが示された。

以上を鑑み、本論文は十分に学位に値すると判断される。