

Title	FoF1-ATP合成酵素の固定子一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、 〈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

【70】

氏名	谷川原 瑞 恵
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 ₀ F ₁ -ATP合成酵素の固定子一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 ₀ F 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

F₀F₁-ATP合成酵素(F₀F₁)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。F₀F₁はF₀とF₁、2つのモータータンパク質から成る。細胞質ドメインのF₁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F₀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F₁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α₃β₃γ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(BC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。BC末とγの相互作用さえ残っていればF₁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、BC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BC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BC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BC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_0 の回転トルクに与える影響を調べるため F_0 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_0 への H^+ の結合が非常に速いため野生型 F_0F_1 では F_0 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_0F_1 を用い、 Li^+ 濃度を変化させ F_0 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_0F_1 でステップ状の回転が確認できた。一方、 F_0F_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_0 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_0/V_0 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_0 のステップ検出に成功し、 F_0F_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_0F_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、 β C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 β C末のアミノ酸残基を全てアラニンやグリシンに置換し、 $\beta-\gamma$ 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、 β C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 β C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。