

立教大学学術推進特別重点資金 (立教 S F R)
 個人研究費
 2006 年度研究成果報告書

研究代表者	所属・職名	氏名
	理学部・講師	山田 康之 印
研究課題	ε サブユニットは、ATP 合成酵素における ATP 濃度センサーか？	
研究期間	2006 年度	
研究経費	500,000 円	

研究の概要 (200~300字で記入、図・グラフは使用しないこと)

本研究では、申請者が近年発見した、ATP 合成酵素の ε サブユニットへの ATP 結合が、ATP 合成酵素の活性調節に関与するものであるか否かを明らかにすることを目的とした。申請者らはこれまでに、ATP 結合能の変化した ε サブユニットの変異体を作製した。本研究では、これらの変異体の ATP 結合能を定量的に求めた。また、これらの変異体 ε サブユニットを含む ATP 合成酵素の部分複合体を調製し、その活性調節の様子を詳細に解析した。その結果、ε サブユニットへの ATP 結合と活性調節に相関関係があり、ε サブユニットが、ATP 合成酵素の活性調節の為の ATP 濃度センサーとしての役割を持つ事が明らかになった。

キーワード (研究内容をよく表しているものを3項目以内で記入。)

[活性調節] [ヌクレオチド結合] [生体エネルギー変換]

研究成果の概要 (図・グラフ等は使用しないこと。)

ϵ サブユニットへの ATP 結合が ATP 合成酵素複合体中でも起こる事を確認するために、 $\gamma \epsilon$ 部分複合体への ATP 結合を調べた実験について、追加実験を行った。 ϵ サブユニットは ATP 合成酵素複合体中で、主に γ サブユニットと相互作用している。この為、 $\gamma \epsilon$ 部分複合体中にある ϵ サブユニットに対して ATP 結合が見られれば、ATP 合成酵素のホロ酵素中にある ϵ サブユニットへも ATP が結合する可能性が高い。 ϵ サブユニットへの ATP 結合は、 $\gamma \epsilon$ 部分複合体上にある ϵ サブユニットに対しても、 ϵ サブユニット単体の場合と同様に観察された。この結果は、 ϵ サブユニットへの ATP 結合が ATP 合成酵素の活性調節に関与するものである事を示唆する。これは論文として発表した。

また、これまでに作成した 11 種の ϵ サブユニットのアラニン置換変異体のうち、ゲルろ過 HPLC による解析で ATP 結合能が著しく変化していた 5 種類の変異体について、107 番目のグルタミンをシステインに置換した変異体を作製した。これらの変異体の新たに導入されたシステイン残基に蛍光性マレイミドを反応させ、蛍光標識した。野生型 ϵ サブユニットにシステイン残基を導入したものでは、ATP 濃度を上げて行くと、その蛍光強度が増していく様子が観察された。蛍光変化から ATP 結合を定量的に測定する事が出来る。今回作成した変異体についても、野生型と同様に蛍光測定を行う事で、ATP 結合能を測定した。その結果、野生型の $1/10 \sim 1/1000$ 程度と、様々な程度の ATP 結合能を持つ変異体がある事が確認できた。興味深い事に、ここで取り上げた変異体でアラニンを導入した残基は全て、室温付近での ATP 結合能が TF_1 の ϵ サブユニットの $1/1000$ 程度である枯草菌 F_1 においても保存されている残基であった。

次にこれらの変異体 ϵ サブユニットを含む ATP 合成酵素の $\alpha_3 \beta_3 \gamma \epsilon$ 部分複合体を調製し、その ATPase 活性を測定した。 $\alpha_3 \beta_3 \gamma \epsilon$ 部分複合体は、ATP 合成酵素の ATPase 活性に対する ϵ サブユニットの効果を見る事が出来る最小単位の複合体である。高濃度の ATP 存在下では、いずれの変異体でも同程度の活性を示した。しかし ATP 濃度を下げていくと、ATP 結合能の低い変異体 ϵ サブユニットを含む複合体から順に活性の低下が見られた。1 種類の変異体を例外として、ATP 結合能が低ければ低いほど、より高い ATP 濃度においても ATPase 活性を阻害する傾向がある事が分かった。ATP 合成酵素には、ADP 阻害と呼ばれる ATP 加水分解反応の生成物である ADP によって、酵素が阻害状態に陥る現象が知られている。先の結果が ADP 阻害とは無関係である事を確認するために、ADP 阻害を解除する効果がある事が知られている、界面活性剤 LDAO 存在下でも ATPase 活性測定を行った。その結果 LDAO の有無によらず同様の結果が得られた事から、ここで観察された活性の差異は ϵ サブユニットによる調節の違いを反映したもので、ADP 阻害とは独立なものであると考えられる。

研究成果の概要 (つづき)

このように、 ϵ サブユニットへの ATP 結合と活性調節の間に関係がある事が明確に示された。さらにこれらの結果から、 ϵ サブユニットへの ATP 結合は、不活性状態から触媒部位 (β サブユニット) へのヌクレオチド結合に伴い活性化した分子に対して起こり、「不活性型 \longleftrightarrow 活性型」という平衡を活性型へ偏らせる働きがあるというモデルを提案した。

さらに本酵素の本来の働きである、ATP 合成反応における ϵ サブユニットへの ATP 結合の役割を検討するための準備も行った。ATP 合成活性を測定するためには、 $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$ ab₂c₁₀ からなる ATP 合成酵素のホロ酵素を調製する必要がある。このため、東京工業大学資源化学研究所 吉田賢右教授のグループから ATP 合成酵素の大量発現系の供与を受けた。この大量発現系に ATP 結合能の変化した ϵ サブユニット変異体の遺伝子を導入し、変異 ϵ サブユニットを含む ATP 合成酵素を発現する大腸菌を調製した。

研究発表 (研究によって得られた研究経過・成果を発表した①～④について、該当するものを記入してください。該当するものが多い場合は主要なものを抜粋してください。)

- ①雑誌論文 (著者名、論文標題、雑誌名、巻号、発行年、ページ)
- ②図書 (著者名、出版社、書名、発行年、総ページ数)
- ③シンポジウム・公開講演会等の開催 (会名、開催日、開催場所)
- ④その他 (学会発表、研究報告書の印刷等)

① 雑誌論文

Satoshi Iizuka, Shigeyuki Kato, Masasuke Yoshida and **Yasuyuki Kato-Yamada**
γε sub-complex of thermophilic ATP synthase has the ability to bind ATP.
Biochem. Biophys. Res. Commun. **349** (2006) 1368-1371.

④ その他

国際会議発表

Shigeyuki Kato, Nobumoto Kajiwara, Hideaki Tanaka, Hiromasa Yagi, Tomitake Tsukihara, Hideo Akutsu, Toshiharu Suzuki, Masasuke Yoshida and **Yasuyuki Kato-Yamada**

Role of the ATP binding to the ε subunit of thermophilic FoF₁-ATP synthase.
20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress (Kyoto, Japan, 19, June 2006)

研究会発表

加藤茂幸、梶原暢元、田中秀明、八木宏昌、月原富武、阿久津秀雄、鈴木俊治、吉田賢右、**山田康之**

「ATP合成酵素のεサブユニットへのATP結合と活性調節」

日本生体エネルギー研究会 第32回討論会 (東京工業大学大岡山キャンパス・デジタル多目的ホール、2006年12月14日)