

博士學位論文

内容の要旨及び審査結果の要旨

第41号

2016年9月

京都産業大学

は し が き

本号は、学位規則（昭和 28 年 4 月 1 日文部省令第 9 号）第 8 条の規定による公表を目的とし、平成 28 年 9 月 17 日に本学において博士の学位を授与した者の論文内容の要旨及び論文審査結果の要旨を収録したものである。

学位番号に付した甲は学位規則第 4 条第 1 項によるもの（いわゆる課程博士）であり、乙は同条第 2 項によるもの（いわゆる論文博士）である。

目 次

論文博士

1. 中西 温子〔博士（生物工学）〕	1
--------------------------	---

氏名（本籍）	中西 温子（岐阜県）
学位の種類	博士（生物工学）
学位記番号	乙工第8号
学位授与年月日	平成28年9月17日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
論文題目	好熱菌 <i>Thermus thermophilus</i> 由来 VoV1 の分子機構
論文審査委員	主 査 横山 謙 教授
	副 査 津下 英明 教授
	〃 千葉 志信 教授

論文内容の要旨

本論文は、好熱菌 *Thermus thermophilus* 由来の液胞型 ATPase (V_0V_1) の分子機構について検討したものである。

液胞型 ATPase は、真核生物のゴルジ体やリソゾームなどの空胞系オルガネラの膜に存在するプロトンポンプで、水素イオン（プロトン）を空胞内に送り込むことで内部を酸性化し、それぞれの酸性オルガネラで起こるタンパク質の修飾や、分解などを支えている。可溶性で ATP の分解・合成を担う V_1 部分と、膜内在性でプロトンの膜横断的な移動を担う V_0 部分が中心にある回転軸の回転によりエネルギー共役している。 V_0V_1 は、一部の原核生物にも存在し、イオンポンプもしくは ATP 合成酵素として働いている。原核生物由来の V_0V_1 を材料につかうことによりその分子機構の理解は進んだが、 V_0V_1 の活性調節機構や V_0V_1 に特徴的な中心回転軸の役割、またその分子機構解明に必要な全体構造決定は、取り組むべき課題として残されている。

本論文では、 V_0V_1 の分子機構の解明に必要な課題に取り組み、以下の成果を得た。

(1) V_0V_1 は ATP の分解もしくは合成を触媒する可逆的な回転分子である。その方向性を決める仕組みの1つとして、ADP 阻害という現象がある。ADP 阻害に陥った V_1 では、A サブユニットにあるヌクレオチド結合ドメインに ADP が堅く結合し、新たな ATP の結合が妨げられることにより、ATP の加水分解が阻害されている。そのため、ヌクレオチド結合ドメインでの ADP に対する親和性が、ADP 阻害への感受性に関係すると考えられてきた。本研究では、ADP 阻害への感受性を決め

る要因を明らかにするために、ADP 阻害になりやすい V_1 と、なり難い V_1 由来の A サブユニットのドメインを交換したドメインキメラ V_1 を構築した。各ドメインキメラ V_1 の性質を多分子系、および 1 分子観察実験で調べたところ、ヌクレオチド結合ドメインそのものの性質よりは、ドメイン間の相互作用の違いにより ADP 阻害感受性が決められることがわかった。また、キメラ V_1 と V_0 から再構成されたキメラ V_0V_1 の ATP 合成活性を調べることで、ADP 阻害感受性とリン酸に対する親和性との間に相関があることがわかった。ドメイン間の相互作用の様式の違いにより、 V_1 のリン酸に対する親和性が低下し、それにより ADP 阻害に対する感受性が高くなることが示された。

(2) 真核生物の V_0V_1 では、 V_0 と V_1 間の可逆的な解離機構が存在する。 V_0V_1 の中心回転軸にはおわん型をした V_0 -C サブユニットが存在し、 V_1 の回転子である DF と、 V_0 に存在する回転リングを接続している。 V_0 から V_1 が解離すると V_0 -C と DF 間の結合がなくなる。一方で V_0 と V_1 間でエネルギー共役するためには、 V_0 -C と DF 間での強い結合が必要とされる。本研究では、 V_0 と V_1 の再構成実験により、このことを検証した。その結果、回転力が V_1 と V_0 間で伝達されるのにも関わらず V_0 -C と DF の結合力が弱いことが明らかになった。結合力が弱いにも関わらず回転力が伝わる仕組みが必要である。DF の末端にある短いヘリクスが、 V_0 -C の溝にはまり込むことで上下方向にははずれやすいが、回転力を伝えることが可能な、ドライバーとネジの関係が中心回転軸に存在することが提唱された。

(3) 回転機構によるプロトン輸送を担う V_0 部分の構造を、クライオ電子顕微鏡を用いた単粒子解析で明らかにした。 V_1 部分で 5 Å 程度、 V_0 部分で 8 Å 程度の分解能の構造が決定された。解析する単粒子の数を増やすことにより、原子分解能での構造決定を可能にする道筋がついた。

論文審査結果の要旨

本研究では、好熱菌 *Thermus thermophilus* 由来の V_0V_1 を材料とし、その分子機構解明につながる3つの課題に取り組んでいる。

V_0V_1 は、ATP を分解してプロトンを生体膜横断的に輸送する、もしくは膜間のプロトン移動により ATP を合成する可逆的な回転分子モーターである。ATP の分解もしくは合成を触媒する親水的な V_1 と、プロトンの移動を担う疎水的な V_0 から構成される。 V_1 単独でも ATP を加水分解することから V_1 -ATPase と呼ばれる。 V_0V_1 は、生理的にはどちらかの反応を触媒しており、 V_0V_1 に本来備わっている可逆性を制限する機構があると考えられる。*T. thermophilus* V_0V_1 は ATP 合成酵素として機能しており、腸球菌の *E. hi* V_0V_1 は連続的に ATP を分解することでイオンポンプとして働く。*T. thermophilus* V_1 -ATPase が ATP を加水分解する過程で、ADP が触媒サイトに留まることにより阻害型になることがある。これを ADP 阻害と呼ぶ。*T. thermophilus* V_1 は、この阻害によってほぼ不可逆的に不活性化するが、腸球菌由来の V_1 は、この阻害に陥らず連続的に ATP を分解する。アミノ酸配列の相同性が 70%以上と高く、構造もほぼ同じであり、この違いがどこに起因するかは未解明であった。そこで、好熱菌の V_1 に *Ehi* V_1 のドメインをはめ込んだキメラ型 V_1 を作成し、それぞれのキメラ V_1 の ADP 阻害への感受性を調べた。ADP が結合するヌクレオチド結合ドメイン (NB ドメイン) が重要であることが予想されたが、以外なことに NB ドメインだけでは ADP 阻害に対する感受性は決まらず、NB ドメインと C 末ドメインとの組み合わせにより ADP 阻害に対する感受性が決まることが明らかにされた。さらに ATP 合成実験により、ADP 阻害感受性低下と、ATP 合成反応でのリン酸に対する親和性の上昇 との関連が明らかにされた。 V_0V_1 が触媒する反応の方向性 (ATP の加水分解か合成) を決める上で重要な機構である ADP 阻害の分子機構を明らかにした点は大いに評価できる。従来の生化学的なアッセイに加え、1 分子回転観察、再構成体による ATP 合成実験を複合的に組み合わせることにより得られた結論は説得力がある。質量ともに十分な研究成果といえる。

V_0V_1 は、ATP を分解する親水性の膜外ドメインである V_1 と、プロトン移動を担う膜内在性の V_0 部分が中心回転軸の回転により高効率にエネルギー共役している。従って中心回転軸自体は固い棒であることが望ましい。一方で 真核生物の V_0V_1 では、 V_1 部分が V_0 部分から可逆的に外れる現象が報告されている。その時、中止回転軸も V_0 -C と V_1 -DF の境界で2つに分離する。 V_0 -C と V_1 -DF 間で外れやすいが、一方で回転力を伝える機構が中心回転軸に備わっているはずである。本研究では、 V_0 と V_1 をそれぞれ単離し、その後再構成させることで V_0 と V_1 間の会合に必要な領域を特定した。その結果、中心回転軸を構成する V_0 -C サブユニットと V_1 -DF 間の結合力が弱いことが示された。さらに DF の末端に存

在する短いヘリクスが V_0 -C の溝にはまり込むことで回転力が伝達されることが示唆された。

以上の実験結果から、ねじとドライバーの関係に例えられる、外れやすいがまわす事ができる仕組みが提案されている。 V_0V_1 に特徴的な中心回転軸の構造の役割は不明であったが、これが外れやすくかつ回転力を伝えることができる巧妙な仕組みとして働いていることが示された意義は大きい。

V_0V_1 の分子機構を明らかにするには、 V_0 部分を含む全体の構造情報が必要である。本研究では、結晶作成による構造解析、およびクライオ電子顕微鏡による単粒子解析により V_0V_1 全体構造の解明を試みている。 V_0V_1 の結晶作成には成功しているが、構造決定に必要な回折データが得られておらず結晶構造の決定に至っていない。一方、クライオ電顕による単粒子解析により、平均で 7.5 Å 分解能の V_0V_1 全体構造が得られた。 V_0 部分でのプロトン輸送機構を議論するに十分な分解能の構造ではないが、今後単粒子の数を増やすことにより原子分解能近い構造情報が得られる可能性がある。だれもがなし得なかった V_0V_1 の高分解能全体構造決定の道筋がついたことは意義深い。 V_0 部分の原子分解能構造が決定されれば、プロトンの通り道、 V_0 にある回転リングが回転することによるトルク発生機構など、 V_0V_1 の核心部といえる分子機構が明らかにされることが期待される。

公聴会では、以上の研究内容を滞りなく発表することができた。その後の質疑応答では、うまく答えられない場面もあったが、質問の意図を十分理解できなかったことが原因と思われる。

総括すると、生化学解析、1分子観察、FRET 解析、構造解析等の多様な手法を駆使して得られた結果はいずれも新規で意義のあるものであり、結論を裏付けるデータの質・量とも十分である。そのため、本研究は学位論文として十分なものであるとの共通認識を主査、副査間で得た。一方で、公聴会で明確に答えられなかった箇所を本論文に書き足し、よりわかりやすくしたほうが良い、との指摘を副査から受けた。指摘された点を加筆・修正した論文を主査、副査間で確認し、最終的に博士学位授与に値するものであるとの結論に至った。