

立教大学学術推進特別重点資金(立教SFR)
 個人研究費
 2008年度研究成果報告書

| | | |
|-------|--|---------|
| 研究代表者 | 所属・職名 | 氏名 |
| | 理学部・准教授 | 山田 康之 印 |
| 研究課題 | 枯草菌 ATP 合成酵素の ϵ サブユニットによる活性調節 | |
| 研究期間 | 2008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)

ATP 合成酵素の ϵ サブユニットによる活性調節の分子機構の研究は、これまで申請者らによって好熱菌 *Bacillus PS3* 由来の ATP 合成酵素を材料として行われてきた。それにより、 ϵ サブユニットによる活性調節の分子機構に対する理解が深まってきた事から、その生理的な役割の解明が重要な課題となってきた。

そこで、将来的に変異株を用いた生理学的な実験を行う事を視野に入れ、本研究では、枯草菌 *Bacillus subtilis* 由来の ATP 合成酵素の精製、活性測定の実験系を確立し、精製 ATP 合成酵素における ϵ サブユニットによる活性調節機構を調べる事を目的とした。

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。)

[生体エネルギー変換] [阻害] [グラム陽性菌]

研究成果の概要 (図・グラフ等は使用しないこと。)

まず、枯草菌からの ATP 合成酵素の部分複合体 (F_1 -ATPase、 $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$) の精製の為の条件を検討した。通常の方法で培養した枯草菌から、好熱菌や大腸菌からの F_1 -ATPase 精製の条件を参考に、反転膜小胞の調製、反転膜小胞からの F_1 -ATPase の遊離、精製を試みた。しかしながら電気泳動で確認したところ、これらの条件では枯草菌反転膜小胞からの F_1 -ATPase の遊離は確認出来なかった。

一方、大腸菌を宿主とした枯草菌 F_1 -ATPase の $\alpha_3\beta_3\gamma$ 複合体の大量発現系が構築出来たので、これを用いて枯草菌 F_1 -ATPase の $\alpha_3\beta_3\gamma$ 複合体の調製を試みた。通常の方法で大腸菌を培養し、適当な時期に $\alpha_3\beta_3\gamma$ 複合体の発現を誘導するために、IPTG を添加した。添加後さらに 2 時間培養し、遠心分離により集菌した。得られた菌体を SDS-PAGE により分析したところ、枯草菌 F_1 -ATPase の α 、 β 、 γ サブユニットとみられるバンドを確認する事が出来た。 β サブユニットの N 末端に導入した His-tag を用いて、Ni アフィニティークロマトグラフィーにより、枯草菌 F_1 -ATPase の $\alpha_3\beta_3\gamma$ 複合体を精製する事が出来た。得られた $\alpha_3\beta_3\gamma$ 複合体の ATPase 活性を測定したところ、大腸菌や好熱菌由来のものと比較して比活性は 1 / 10 以下であった。また、ADP 阻害を解除する働きがある事が知られている界面活性剤、LDAO の添加により 10 倍程度の活性化が見られた事から、枯草菌 F_1 -ATPase は強い ADP 阻害を受けている可能性が示唆された。

次に、この $\alpha_3\beta_3\gamma$ 複合体と ϵ サブユニットの再構成を試みた。それぞれの溶液を 1:10 程度のモル比で混合し、ATPase 活性の変化を見たところ、 ϵ サブユニットの有無で違いは見られなかった。

ϵ サブユニットと $\alpha_3\beta_3\gamma$ 複合体が結合していない可能性を考え、これらの混合物をゲルろ過 HPLC により分析した。その結果、 $\alpha_3\beta_3\gamma$ 複合体または $\alpha_3\beta_3\gamma\epsilon$ 複合体の溶出位置である分子量 35 万程度のピークは見られず、単量体 α サブユニットまたは β サブユニットと考えられる分子量 5 万程度のピークが観察された。この結果からは、「枯草菌 F_1 -ATPase は不安定であり、ゲルろ過により壊れてしまっている。」、「精製標品は $\alpha_3\beta_3\gamma$ 複合体ではなく、より不安定な $\alpha_3\beta_3$ 複合体であった。」等の可能性が考えられる。現在は培養、発現誘導条件の検討などを行っており、より大量の $\alpha_3\beta_3\gamma$ 複合体を調製しこれらの可能性を検討し、問題を解決したいと考えている。

研究成果の概要 (つづき)

一方、枯草菌の反転膜小胞を用いて、膜上にある ATP 合成酵素の活性を直接測定するための実験条件の検討も行った。フレンチプレスによって菌体を破碎した後、数回の超遠心により洗浄した反転膜小胞を用いて実験を行った。

反転膜小胞の ATPase 活性を測定したところ、過剰の Mg イオンによる強い阻害が見られ、F₁-ATPase で見られたのと同様に、強い ADP 阻害を受けている事がわかった。

この反転膜小胞を用いて、ATP 駆動の H⁺ 輸送活性の測定を試みた。pH 指示薬により小胞内の酸性化を見たが、有意な変化は観察出来なかった。呼吸基質により呼吸鎖を駆動した場合にもごく弱い酸性化しか見られなかったことから、反転膜小胞の調製方法に問題があったものと考えられる。菌体破碎条件、溶液組成等を検討し、H⁺ の漏洩のない反転膜小胞を調製し、測定を行いたいと考えている。