

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月 9日現在

機関番号：15401

研究種目：新学術領域研究

研究期間：2008～2012

課題番号：20118005

研究課題名（和文） ATPの合成と分解に関わる蛋白質の機能解析

研究課題名（英文） Studies on function of proteins synthesizing and hydrolyzing ATP

研究代表者 三本木至宏 (SAMBONGI YOSHIHIRO)

広島大学・大学院生物圏科学研究科・教授

研究者番号：10222027

研究成果の概要（和文）：極限環境微生物由来の蛋白質を対象に，ATP およびその関連化合物の結合・分解の分子機構の解明を目指した。具体的には，水和に影響する高塩濃度や高温・低温に生息する極限環境微生物のATPaseやその他の関連蛋白質を対象とした生化学・熱力学実験を行った。さらに理論系メンバーと連携して，水和の視点からATP等の結合・分解の分子機構に迫った。その結果，高塩菌や好熱菌由来のATPなどの分解に関わる蛋白質の機能を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：This study is aimed at elucidating the molecular mechanism of extremophilic proteins that bind and hydrolyze ATP and its related compounds. Specifically, biochemical and biophysical experimentations have been carried out using ATPase and its related proteins from extremophiles living in high salt concentrations and high and low temperatures, which seem to affect on the hydration conditions. In addition, collaborating with theoretical teams, molecular mechanisms for ATP binding and hydrolysis were investigated in the aspects of hydration. As a result, protein mechanisms have been clarified through ATP hydrolyzing proteins from halophiles and thermophiles.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,800,000	840,000	3,640,000
2009年度	7,000,000	2,100,000	9,100,000
2010年度	7,800,000	2,340,000	10,140,000
2011年度	6,300,000	1,890,000	8,190,000
2012年度	6,300,000	1,890,000	8,190,000
総計	30,200,000	9,060,000	39,260,000

研究分野：微生物学，蛋白質科学

科研費の分科・細目：

キーワード：ピロリン酸，エンタルピー，水分活性，極限環境微生物，ATP

## 1. 研究開始当初の背景

ATP関連化合物の代謝に関わる蛋白質は，ヌクレオチドの結合に伴って，その構造が大きく変化することが知られている。このことにより，ATP結合に伴い，自由エネルギーが変化し，水和状態も変化することが予想される。

## 2. 研究の目的

本研究は，ATP結合に伴う水和状態を反映する熱力学量である熱容量を測定し，それが蛋白質の構造にどのように影響するのかを明らかにすることを目的とする。特に本研究では，水和状態が標準状態とは大きく異なると考えられる高塩濃度下や高温・低温環境に生息微生物由来の酵素を対象とすること

を特色とする。得られる実験結果を、領域内の統計熱力学・溶液化学の理論家と共有し、ATP 関連蛋白質とヌクレオチドの相互作用機構における水の役割を明らかにする。

### 3. 研究の方法

(1) 高度好塩性古細菌 *Haloarcula japonica* による ATP およびピロリン酸 (PPi) 分解

- a) 高塩濃度下で *H. japonica* 膜画分を用いた ATP 分解活性測定系を構築する。
- b) 高塩濃度下で *H. japonica* 可溶性画分を用いた PPi 分解活性測定系を構築する。なお、PPi とは、ATP の高エネルギーリン酸結合を有するモデル化合物であり、理論研究の対象として精力的に研究がされている低分子化合物である。
- c) 等温滴定カロリメトリーにより、高塩濃度下での PPi 分解の反応熱を測定する実験系を構築する。

(2) 好冷好圧細菌 *Shewanella violacea* の ATPase とシトクロム *c*

- a) 高塩濃度下で *S. violacea* 膜画分の ATP 分解活性測定系を構築する
- b) *S. violacea* 膜画分から新規 ATPase を可溶化・精製する方法を確立する。
- c) *S. violacea* 可溶性シトクロム *c* の安定化機構を解明する。

2. 好熱性細菌 *Hydrogenophilus thermoluteolus* の ATP 合成酵素とシトクロム *c'*

- a) *H. thermoluteolus* 膜画分由来の ATP 合成酵素を精製し、高温で活性を持ち得るかどうかに明らかにする。
- b) *H. thermoluteolus* 可溶性画分由来のシトクロム *c'* を精製し、蛋白質とヘムとの結合様式を解明する。
- c) シトクロム *c'* の安定性を測定し、構造に関する知見をえる。

3. 各種シトクロム *c* に対する共溶媒効果

- a) 超好熱菌由来シトクロム *c* の折り畳み構造形成に関わる疎水性相互作用の効果とヘムの役割を明らかにする。
- b) 理論計算に基づく蛋白質安定化に資するファンデルワールス相互作用・静電相互作用・排除体積効果の影響と常温菌シトクロム *c* を用いた実験的検証を行う。

### 4. 研究成果

(1) 高度好塩性古細菌 *Haloarcula japonica* による ATP および PPi 分解

- d) *H. japonica* 膜画分の ATP 分解活性は、高塩濃度下 ( $\sim 3\text{M Na}_2\text{SO}_4$ ) で発現することを明らかにした。

e) *H. japonica* 可溶性画分の PPi 分解活性は高塩濃度下 ( $\sim 4\text{M NaCl}$ ) で発現することを明らかにした。

f) NaCl 存在下で PPi 分解の反応熱を測定したところ、NaCl によって水分活性が 1.0~0.8 の間で変化しても PPi 加水分解の反応熱は変化しないことを明らかにした。

4. 好冷好圧細菌 *Shewanella violacea* の ATPase とシトクロム *c*

a) *S. violacea* 膜画分の ATP 分解活性は、高塩濃度下 ( $\sim 2\text{M KCl}$ ) で最大となることを明らかにした。

b) *S. violacea* 膜画分から上記 ATPase を可溶化・精製したところ、本 ATPase は分子量 75kDa の新規酵素であることを明らかにした。

c) *S. violacea* 可溶性シトクロム *c* は、同属の常圧菌由来のものよりも、安定性が高いことを明らかにし、その機構としては、ヘムと蛋白質間の相互作用によることを突き止めた。

5. 好熱性細菌 *Hydrogenophilus thermoluteolus* の ATP 合成酵素とシトクロム *c'*

a) *H. thermoluteolus* 膜画分より ATP 合成酵素の精製に成功し、本酵素が高温 ( $\sim 65^\circ\text{C}$ ) での最大活性を示すことを明らかにした。

b) *H. thermoluteolus* 可溶性画分からシトクロム *c'* の精製に成功し、ヘム結合の機構が大腸菌遺伝学を駆使して特異であることを明らかにした。ヘムがなくても自発的に蛋白質が折り畳み構造を形成する可能性を示唆した。

c) 上記のシトクロム *c'* は、他の相同蛋白質に比べて、高い安定性を持つことを明らかにした。その原因として、本シトクロム *c'* が特異的に三量体構造を形成することを挙げた。

6. 各種シトクロム *c* に対する共溶媒効果

a) 超好熱菌由来のシトクロム *c* の折り畳み構造形成に関わる疎水性相互作用の原因となるアミノ酸残基を立体構造情報から特定し、それを変異導入実験で実証した。さらに、領域内の理論家である木下氏は、本シトクロム *c* の高い安定性を水のエン트로ピー利得によることを明らかにした。

b) 領域内の理論家である松林氏の計算に基づく蛋白質安定化に資するファンデルワールス相互作用・静電相互作用・排除体積効果の影響を、常温菌シトクロム *c* を用いた実験的検証で確かめることができた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 20 件 : すべて査読あり)

1. S. Fujii, M. Masanari, H. Inoue, M. Yamanaka, S. Wakai, H. Nishihara, Y. Sambongi High thermal stability and unique trimer formation of cytochrome *c'* from thermophilic *Hydrogenophilus thermoluteolus*. *Biosci. Biotech. Biochem.* in press (2013).
2. Y. Miyashita, T. Wazawa, G. Mogami, S. Takahashi, Y. Sambongi, and M. Suzuki Hydration state change of horse heart cytochrome *c* corresponding to trifluoroacetic-acid-induced unfolding *Biophys. J.* **103**, 163-172 (2013).
3. S. Wakai, M. Masanari, T. Ikeda, N. Yamaguchi, S. Ueshima, K. Watanabe, H. Nishihara, and Y. Sambongi Oxidative phosphorylation in a thermophilic, facultative chemoautotroph, *Hydrogenophilus thermoluteolus*, living prevalently in geothermal niches *Environ. Microbiol. Rep.* **5**, 235-242 (2013).
4. K. Kamagata, T. Kawaguchi, Y. Iwahashi, A. Baba, K. Fujimoto, T. Komatsuzaki, Y. Sambongi, Y. Goto, and S. Takahashi Long-term observation of fluorescence of free single molecules to explore protein-folding energy landscapes *J. Am. Chem. Soc.* **134**, 11525-11532 (2012).
5. M. Masanari, S. Wakai, H. Tamegai, T. Kurihara, C. Kato, and Y. Sambongi Thermal stability of cytochromes *c<sub>5</sub>* from pressure-sensitive *Shewanella livingstonensis* *Biosci. Biotech. Biochem.* **75**, 1856-1861 (2011).
6. H. Inoue, S. Wakai, H. Nishihara, and Y. Sambongi Heterologous synthesis of cytochrome *c'* by *Escherichia coli* is not dependent on the System I cytochrome *c* biogenesis machinery *FEBS J.* **278**, 2341-2348 (2011).
7. M. Yamanaka, M. Masanari, and Y. Sambongi Conferment of folding ability to a naturally unfolded apocytochrome *c* through introduction of hydrophobic amino acid residues *Biochemistry* **50**, 2313-2320 (2011).
8. K. Oda, R. Kodama, T. Yoshidome, M. Yamanaka, Y. Sambongi, and M. Kinoshita Effects of heme on the thermal stability of mesophilic and thermophilic cytochromes *c*: Comparison between experimental and theoretical results *J. Chem. Phys.* **134**, 025101 (9 pages) (2011).
9. T. Wazawa, T. Miyazaki, Y. Sambongi, and M. Suzuki Hydration analysis of

*Pseudomonas aeruginosa* cytochrome *c551* upon acid unfolding by dielectric relaxation spectroscopy *Biophys. Chem.* **151**, 160-169 (2010).

10. S. Takenaka, S. Wakai, H. Tamegai, S. Uchiyama, and Y. Sambongi Comparative analysis of highly homologous cytochromes *c<sub>5</sub>* for stability and function *Biosci. Biotech. Biochem.* **74**, 1079-1083 (2010).
11. R. Sano, M. Kameya, S. Wakai, H. Arai, Y. Igarashi, M. Ishii, and Y. Sambongi Thiosulfate oxidation by a thermo-neutrophilic hydrogen-oxidizing bacterium, *Hydrogenobacter thermophilus* *Biosci. Biotech. Biochem.* **74**, 892-894 (2010).
12. M. Yamanaka, H. Mita, Y. Yamamoto, and Y. Sambongi Heme is not required for *Aquifex aeolicus* cytochrome *c<sub>555</sub>* polypeptide folding *Biosci. Biotech. Biochem.* **73**, 2022-2025 (2009).
13. M. Obuchi, K. Kawahara, D. Motooka, S. Nakamura, M. Yamanaka, T. Takeda, S. Uchiyama, Y. Kobayashi, T. Kubo, and Y. Sambongi Hyperstability and crystal structure of cytochrome *c<sub>555</sub>* from hyperthermophilic *Aquifex aeolicus* *Acta Crystallogr. Section D: Biological Crystallography* **65**, 804-813 (2009).
14. Y. Kobayashi, T. Sonoyama, T. Takeda, and Y. Sambongi Effects of cysteine introduction into three homologous cytochromes *c* *Biosci. Biotech. Biochem.* **73**, 1227-1229 (2009).
15. T. Takeda, T. Sonoyama, S.J. Takayama, H. Mita, Y. Yamamoto, and Y. Sambongi Correlation between stability and redox potential of three homologous cytochromes *c* from two thermophiles and one mesophile *Biosci. Biotech. Biochem.* **73**, 366-371 (2009).
16. T. Sonoyama, J. Hasegawa, S. Uchiyama, S. Nakamura, Y. Kobayashi, and Y. Sambongi Stability enhancement of cytochrome *c* through heme deprotonation and mutations *Biophys. Chem.* **139**, 37-41 (2009).

その他 4 件は略

〔学会発表〕(計 30 件)

1. 若井暁, 安部晶大, 城所俊一, 仲宗根薫, 正木和夫, 三本木至宏, 高塩濃度下で機能する酵素の塩適応機構: 活性の塩依存性とカチオンの役割. 農芸化学会(仙台) 2013 年 3 月 24 日~27 日
2. 藤井創太郎, 井上寛基, 政成美沙, 若井暁, 三本木至宏. 好熱菌および常温菌由来シトクロム *c'* の熱安定性の比較研究. 第 3 5 回中四国支部講演会(例会: 高知) 2013 年 1 月 26 日
3. 政成美沙, 若井暁, 加藤千明, 栗原

達夫，為我井秀行，三本木至宏．深海性 *Shewanella* 属細菌由来 cytochrome *c* の安定化機構の解明．極限環境生物学会 2012（東京）2012 年 12 月 1 日，2 日

4. 若井暁，安部晶大，城所俊一，仲宗根薫，正木和夫，三本木至宏．高度好塩性菌 *Haloarcula japonica* のピロリン酸加水分解の熱力学的視点から見た塩適応．極限環境生物学会 2012（東京）2012 年 12 月 1 日，2 日

5. 若井暁，安部晶大，正木和夫，城所俊一，三本木至宏．高度好塩性菌 *Haloarcula japonica* の無細胞抽出液によるピロリン酸加水分解の反応熱．第 25 回日本 Archaea 研究（兵庫）2012 年 7 月 20～21 日

その他 25 件は略

〔図書〕（計 1 件）

1. 三本木至宏．食べ物も作る微生物たち．広島大学公開講座シリーズ 7「分子から見た生命の不思議」pp.60～81（深宮齊彦編著，広大生物圏出版会，2009 年 3 月 30 日発行）

〔その他〕

ホームページ等

[http://www.hiroshima-u.ac.jp/gsbs/kenkyu\\_syokai/sanbongi/](http://www.hiroshima-u.ac.jp/gsbs/kenkyu_syokai/sanbongi/)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

三本木 至宏 (SAMBONGI YOSHIHIRO)  
広島大学・大学院生物圏科学研究科・教授  
研究者番号：1 0 2 2 2 0 2 7

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：