

自己評価報告書

平成 23 年 4 月 1 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） Function of ATP synthesizing and hydrolyzing proteins

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・准教授

研究者番号：10222027

研究分野：微生物学

科研費の分科・細目：

キーワード：ATP 合成酵素, 好熱菌, 好冷菌, 好塩環境

1. 研究計画の概要

(1) 好熱菌 *Hydrogenophilus thermoluteolus* 由来の F1-ATPase：本菌菌体より F1-ATPase が存在する膜画分を調製し、活性の最適条件を検討する。

(2) 好冷菌 *Shewanella violacea* 由来の F1-ATPase：本菌菌体より F1-ATPase が存在する膜画分を調製し、活性の最適条件を検討する。

(3) 好塩菌 *Haloarcula japonica* 由来の ATPase：本菌菌体より ATPase が存在する膜画分を調製し、活性の最適条件を検討する。

2. 研究の進捗状況

(1) 好熱菌 *Hydrogenophilus thermoluteolus* 由来の F1-ATPase：本菌菌体より F1-ATPase が存在する膜画分を調製し、活性の最適条件を検討した。その結果、本 ATPase 活性は 65°C で最大となり、二価カチオンとしてマグネシウムの他、カルシウムを必要とすることが明らかになった。さらに、C12E8 により膜から本酵素を可溶化し、各種カラムクロマトグラフィーにより精製することに成功した。

(2) 好冷菌 *Shewanella violacea* 由来の F1-ATPase：本菌菌体より F1-ATPase が存在する膜画分を調製し、活性の最適条件を検討した。その結果、本 ATPase 活性は 30°C で最大となり、二価カチオンとしてマグネシウムを必要とすることが明らかになった。さらに、C12E8 により膜から本酵素を可溶化し、各種カラムクロマトグラフィーにより精製度を 10 倍にすることに成功した。

(3) 好塩菌 *Haloarcula japonica* 由来の ATPase：本菌菌体より ATPase が存在する膜画分を調製し、活性の最適条件を検討した。その結果、本 ATPase 活性は、37°C において

2M の硫酸ナトリウム存在下で発現することが明らかになった。同条件下で ATP 分解に伴う熱測定を実施し、反応熱を約 30kJ/mol と見積もることができた。さらに、本菌可溶性画分にはピロフォスファターゼ活性があることを突き止めた。活性発現には 2M の塩化ナトリウムが必要であり、この条件下での活性の熱測定にも着手した。

3. 現在までの達成度

② おおむね順調に進展している。理由は、(1)～(3) の内容とも、計画通りに進んでいるからである。

4. 今後の研究の推進方策

今後は、各種極限環境微生物から ATPase 活性のある画分を調製し、F1-ATPase 酵素精製に取り組むとともに、城所俊一博士（長岡科学技術大学生物系）との共同により、ATPase 活性および関連するリン酸転移活性に伴う熱測定を実施する。

5. 代表的な研究成果

（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 11 件）

1. Takenaka, S., Wakai, S., Tamegai, H., Uchiyama, S., Sambongi, Y. Comparative analysis of highly homologous cytochromes c_5 for stability and function. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 74, 1079-1083 (2010). 査読あり
2. 三本木至宏, 山中優, 長谷川淳, 内山進. 熱安定性が異なるシトクロム c の構造と折り畳み. *熱測定*, 37, 9-16 (2010). 査読あり
3. 山中優, 三本木至宏. シトクロム c 合成システムの進化. *化学と生物*, 48,

- 375-377 (2010). 査読なし
4. Obuchi, M., Kawahara, K., Motooka, D., Nakamura, S., Yamanaka, M., Takeda, T., Uchiyama, S., Kobayashi, Y., Ohkubo, T., Sambongi, Y.
Hyperstability and crystal structure of cytochrome *c*₅₅₅ from hyperthermophilic *Aquifex aeolicus*. *Acta Crystal. Section D: Biological Crystallography*, 65, 804-813 (2009). 査読あり
 5. Yamanaka, M., Mita, H., Yamamoto, Y., Sambongi, Y. Heme is not required for *Aquifex aeolicus* cytochrome *c*₅₅₅ polypeptide folding. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 73, 2022-2025 (2009). 査読あり

〔学会発表〕 (計 15 件)

- 1) Effect of salts on ATP hydrolysis activity of extremely halophilic archaeon *Haloarcula japonica*
Satoshi Wakai, Kaoru Nakasone, and Yoshihiro Sambongi
International Society of Extremophiles, 8th International Congress of Extremophiles, 2010 年 9 月 13 日, Portugal
- 2) 高度好塩性古細菌による高塩環境下での ATP 加水分解
若井 暁, 三本木 至宏
特殊環境微生物セミナー, 2010 年 7 月 16 日, 京都
- 3) ATP hydrolysis activity under extremely high salt concentration
Satoshi Wakai, Kaoru Nakasone, and Yoshihiro Sambongi
Asian and Oceania Conference on Transcription, 2010 年 7 月 2 日, 沖縄
- 4) Effect of salts on ATP hydrolysis activity of extremely halophilic archaeon *Haloarcula japonica*.
Satoshi Wakai and Yoshihiro Sambongi
4th mini-symposium on liquid, 2010 年 6 月 26 日, 福岡
- 5) 高度好塩性アーキア由来塩依存性 ATP 加水分解活性に対するアニオンおよびカチオンの影響
若井 暁, 仲宗根 薫, 三本木 至宏
日本農芸化学会, 中四国支部第 27 回講演会, 2010 年 6 月 5 日, 広島

〔その他〕

ホームページ等