

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：55501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2015

課題番号：23770160

研究課題名(和文)ナトリウムイオン輸送型ATP合成酵素のイオン輸送機構の解析

研究課題名(英文)Analysis of ion transporting mechanism of sodium transporting ATP synthase

研究代表者

三留 規誉(Mitome, Noriyo)

宇部工業高等専門学校・物質工学科・准教授

研究者番号：90431981

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ATP合成酵素のFoのイオン輸送に関わる部位をアミノ酸残基レベルで解明する。ナトリウム輸送型のATP合成酵素のイオン輸送に関わるaサブユニットの膜貫通ヘリックスにシステイン残基を導入したATP合成酵素を化学修飾し、イオンの輸送に伴うATP合成活性とATP加水分解に伴うプロトン輸送活性の阻害から、イオンチャネルを形成するアミノ酸残基を調べた。その結果、ナトリウムイオン輸送型ATP合成酵素の2つのハーフチャネルはaサブユニットに存在することが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：The a subunit of the Na<sup>+</sup>-transporting FoF1 ATP synthase plays a key role in Na<sup>+</sup> transport. It forms half channels that allow Na<sup>+</sup> to enter and leave the carboxyl group on c subunits. The essential R226, which faces the carboxyl group of c subunits in the middle of transmembrane helix of the a subunit, separates the cytoplasmic and periplasmic half-channels. To elucidate contributions of other amino acid residues of the transmembrane helix using hybrid FoF1 (Fo from *Propionigenium modestum* and F1 from thermophilic *Bacillus PS3*), 25 residues were individually mutated to Cys, and effects of modification with the SH-modifying agent N-ethylmaleimide (NEM) on ATP synthesis and hydrolysis activity were analyzed. NEM inhibited ATP synthesis and hydrolysis activities of A214C, G215C, A218C, I223C and N230C mutants and inhibited ATP synthesis activity of the K219C mutant. Thus, these residues contribute to the integrity of the Na<sup>+</sup> half channel, and both half channels are present in the a subunit.

研究分野：生物化学

キーワード：イオンチャネル ATP合成酵素 イオン輸送

## 様式 C - 19、F - 19、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATP 合成酵素は、ミトコンドリア、葉緑体、細菌の膜に存在し、膜内外のイオン(H<sup>+</sup>またはNa<sup>+</sup>)の電気化学的ポテンシャル差を利用してADPとリン酸からATPを合成する酵素である。そのF<sub>0</sub>部分は、膜を介したイオンの輸送に伴い回転するイオンチャンネルとして働く。このイオンチャンネルでは、イオンがaサブユニットとcサブユニットを通る際に、cサブユニットから成るcリングがab<sub>2</sub>サブユニットに対して回転する。F<sub>0</sub>のイオンチャンネルは、膜中央に位置するcリングのグルタミン酸とcytoplasm側およびperiplasm側へ通じる2つのハーフチャンネルから成ると考えられている。*E. coli*のH<sup>+</sup>輸送型F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>では、cytoplasm側とperiplasm側のH<sup>+</sup>チャンネルは共にaサブユニットにあると報告されている。一方、Na<sup>+</sup>輸送型F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>のNa<sup>+</sup>チャンネルはcリングの立体構造が明らかとなっていないがaサブユニットの構造は未だわかっておらず、Na<sup>+</sup>チャンネルを形成するアミノ酸についてははっきりと結論が出ていない。

### 2. 研究の目的

本研究では、*Propionigenium modestum* 由来のNa<sup>+</sup>輸送型F<sub>0</sub>とThermophilic *Bacillus* PS3由来のF<sub>1</sub>からなるハイブリッドF<sub>0</sub>F<sub>1</sub>の発現系を用いて、Na<sup>+</sup>チャンネルを形成する残基を同定することで、Na<sup>+</sup>輸送型F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>のイオン輸送機構を調べた。

### 3. 研究の方法

Na<sup>+</sup>輸送型F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>のcytoplasm側とperiplasm側のNa<sup>+</sup>チャンネルはH<sup>+</sup>チャンネルと同様にaサブユニットにあると予測した。そこで、aR226(aサブユニットとcサブユニットの間にある重要残基)の前後のaI211からaV236にそれぞれCys残基を導入した変異F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>を作製した。この変異F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>の反転膜を用いてCys残基をSH基修飾試薬であるN-ethylmaleimide(NEM)で修飾した際のATP合成活性、ATP加水分解活性、ATP駆動のプロトン輸送活性の障害を調べ、cytoplasm側とperiplasm側のNa<sup>+</sup>

チャンネルがaサブユニットにあるか否かを調べた。

### 4. 研究成果

ATP合成活性測定の結果、Na<sup>+</sup>輸送によるATP合成活性では、A214C、G215C、A218C、K219C、I223CとN230CがNEMによって活性に障害を示した。特にG215C、K219C、I223CとN230Cは、40%程度の障害を示した(Fig.1)。

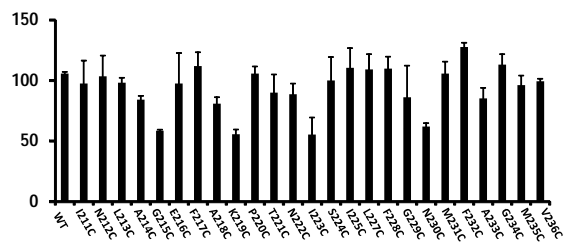


Fig.1 NEM 処理後のNa<sup>+</sup>輸送駆動のATP合成活性 (%)

H<sup>+</sup>輸送によるATP合成活性では、A214C、G215C、E216C、A218C、K219C、I223CとN230CがNEMによって活性に障害を示した。特にA214C、G215C、E216C、A218C、I223CとN230Cは、40%程度の障害を示した。ATP加水分解活性測定の結果、A214C、G215C、A218C、I223C、N230CとM231CがNEMによってATP加水分解活性に障害を示した。特にG215C、A218C、I223CとN230Cは20%程度の障害を示した。H<sup>+</sup>輸送活性測定の結果、A214C、G215C、A218C、I223CとN230CがNEMによってH<sup>+</sup>輸送活性に障害を示した。特に、G215C、A218CとN230Cは40%程度の障害を示した(Fig.2)。

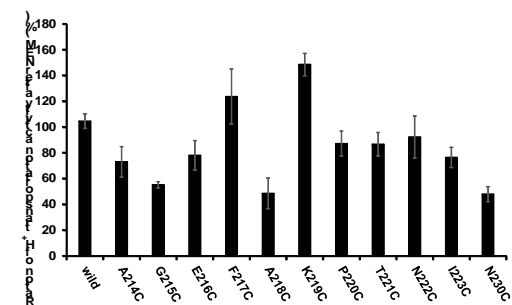


Fig.2 NEM 処理後のATP輸送駆動のH<sup>+</sup>輸送活性 (%)

【考察】各活性測定の結果より、H<sup>+</sup>輸送型 ATP 合成酵素と同様にNa<sup>+</sup>輸送型ATP 合成酵素のcytoplasm側とperiplasm側のイオンチャンネルもaサブユニットに存在することがいえる。特にどの測定においても強い活性阻害を示した位置にあるA214, G215、A218、I223とN230のアミノ酸残基はイオンチャンネルにおいて重要な残基であることが考えられる。K219C はATP合成活性を阻害するが、ATP加水分解活性とH<sup>+</sup>輸送活性は阻害されなかった結果から、cytoplasm 側のイオンチャンネルの構造は、ATP合成時とATP加水分解時で構造が変化していることが示唆された。

#### 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 0 件)

〔学会発表〕(計 26 件)

- 1) 三留規 誉 Biochemical analysis of a rotary molecular motor in FoF<sub>1</sub>-ATP synthase 台湾聯合大学 2016 年 3 月 24 日 招待講演
- 2) 三留 規 誉 Biochemical analysis of F<sub>o</sub> motor in F<sub>o</sub>F<sub>1</sub>-ATP synthase Nanyang Technological University School of Biological Sciences (Singapore) 2015 年 10 月 27 日 招待講演
- 3) 三留 規 誉, Jeffrey Seng and Saji George Isolation of outer membrane protein(OMP) of *T. maritimum* (*T.mar*) for Use in Fish Vaccination Nanyang Polytechnic 2015 年 10 月 28 日
- 4) 豊田遥己、室由梨香、林田直樹、三留 規 誉 c<sub>10</sub>-a 融合変異体を用いた F<sub>o</sub>F<sub>1</sub>ATP 合成酵素の F<sub>o</sub> の精製 第 18 回化学工学会学生発表会(福岡大会) 2016 年 3 月 5 日(土)福岡大学
- 5) 重藤優斗、若林十雲、三留 規 誉 10 量体融合 c サブユニットを用いた F<sub>o</sub> のプロトン輸送機構の解析 第 18 回化学工学会学生発表会(福岡大会)2016 年 3 月 5 日(土)福岡大学
- 6) 原田世津那、富山泰至、三留 規 誉 F<sub>o</sub>F<sub>1</sub>ATP 合成酵素の H<sup>+</sup>の受け渡しに  
関与する c リング中の F<sub>oc</sub> の特定 第 18 回化学工学会学生発表会(福岡大会) 2016 年 3 月 5 日(土)福岡大学
- 7) 渡部菜摘、若林十雲、ダラ リズキ イスナイニアルマダニ、植木紀子、若林憲一、藤田和孝、島袋勝弥、三留 規 誉 ボルボックスの遊泳速度解析 第 18 回化学工学会学生発表会(福岡大会) 2016 年 3 月 5 日(土)福岡大学
- 8) 富山泰至、佐藤宏樹、鈴木俊治、松西拓哉、濱田康平、吉田賢右、三留 規 誉 Na<sup>+</sup>輸送型 F<sub>o</sub>F<sub>1</sub>-ATP 合成酵素の H<sup>+</sup>輸送活性によるイオンチャンネル解析第 18 回化学工学会学生発表会(福岡大会) 2016 年 3 月 5 日(土)福岡大学
- 9) 富山泰至、佐藤宏樹、鈴木俊治、松西拓哉、濱田康平、吉田賢右、三留 規 誉 Na<sup>+</sup>輸送型 F<sub>o</sub>F<sub>1</sub>-ATP 合成酵素のイオンチャンネル解析 日本生体エネルギー研究会 第 41 回討論会 2015 年 12 月 22 日
- 10) ダラリズキイスナイニアルマダニ、亀山翔太、富山泰至、島袋勝弥、藤田和孝、三留 規 誉 光合成運動微生物の走光性の解析 第 17 回化学工学会学生発表会(徳島大会)2015 年 3 月 7 日(土)徳島大学常三島キャンパス
- 11) 林田直樹、室由梨佳、平田実果子、三留 規 誉 ATP 合成酵素の F<sub>o</sub> の精製と b サブユニット抗体の結合性の評価 第 17 回化学工学会学生発表会(徳島大会) 2015 年 3 月 7 日(土)徳島大学常三島キャンパス
- 12) 藤野一矢、富山泰至、筒井雅美、三留 規 誉 10 量体 c サブユニットを用いた ATP 合成酵素の回転の制御 第 17 回化学工学会学 生発表会(徳島大会) 2015 年 3 月 7 日(土)徳島大学常三島キャンパス
- 13) 寺岡祐希、若林十雲、金子瞳、島袋勝弥、三留 規 誉 F<sub>1</sub>ATPase の ATP 加水分解活性の pH 依存性と触媒部位への変異の影響 第 17 回化学工学会学生発表会(徳島大会) 2015 年 3 月 7 日(土)徳島大学常三島キャンパス
- 14) 富山泰至、佐藤宏樹、鈴木俊治、吉田賢右、三留 規 誉 ナトリウム輸送性 ATP 合成酵素の ATP 合成活性とチャンネルの解析 第 17 回化学工学会学生発表会(徳島大会) 2015 年 3 月 7 日(土)徳島大学常三島キャンパス
- 15) 若林十雲、佐藤宏樹、濱田康平、松西拓哉、鈴木俊治、吉田賢右、三留 規 誉

- ATP 合成酵素の Fo の変異による H<sup>+</sup> 輸送活性と イオン輸送機構の解析 第 17 回化学工学会学生発表会 (徳島大会) 2015 年 3 月 7 日 (土) 徳島大学常三島キャンパス
- 16) 三留規誉、島袋勝弥、藤田和孝 運動光合成微生物を利用したモーターの研究開発 平成 26 年度宇部高専 SEEDS & NEEDS シンポジウム 2014 年 11 月 19 日 講演
- 17) 三留規誉 融合変異を利用した ATP 合成酵素の Fo の構造制御と機能解析 東京大学大学院理学系研究科 第 997 回生物科学セミナー 東京大学 理学部 3 号館 招待講演 2014 年 09 月 12 日 (Fri)
- 18) 三留規誉、室由梨佳 ATP 合成酵素の精製における界面活性剤の検討と変異を利用した Fo の精製法 第 18 回日本技術士会 生物工学部会業績発表会 2014 年 6 月 14 日 東京大学農学部
- 19) 若林十雲、島袋勝弥、三留規誉:“F1-ATPase の触媒部位の 6E190D 変異の ATP 加水分解活性の影響”, 第 16 回化学工学会学生発表会 [堺大会 (西日本地区)] 2014 年 3 月 1 日, 大阪府立大学中百舌鳥キャンパス
- 20) 金子瞳、島袋勝弥、三留規誉:“ F1-ATPase の触媒部位への変異の ATP 加水分解の ADP 阻害への影響” 第 16 回化学工学会学生発表会 [堺大会 (西日本地区)] 2014 年 3 月 1 日, 大阪府立大学中百舌鳥キャンパス
- 21) 濱田康平、三留規誉:“ Na イオン輸送型 ATP 合成酵素の化学修飾によるイオンチャネルの分析” 第 16 回化学工学会学生発表会 [堺大会 (西日本地区)] 2014 年 3 月 1 日, 大阪府立大学中百舌鳥キャンパス
- 22) 筒井雅美、三留規誉:“FoF1ATP 合成酵素の精製とリボソームへの再構成” 第 16 回化学工学会学生発表会 [堺大会 (西日本地区)] 2014 年 3 月 1 日, 大阪府立大学中百舌鳥キャンパス
- 23) 平田実果子、三留規誉:“ATP 合成酵素の ab2 サブユニットのモノクローナル抗体の結合性の評価”, 第 16 回化学工学会学生発表会 [堺大会 (西日本地区)] 2014 年 3 月 1 日, 大阪府立大学中百舌鳥キャンパス
- 24) 室由梨佳、三留規誉:“ c リングと a サブユニットを連結した ATP 合成酵素

の Fo の精製” 第 16 回化学工学会学生発表会 [堺大会 (西日本地区)] 2014 年 3 月 1 日, 大阪府立大学中百舌鳥キャンパス

- 25) 三留規誉:“分子モーターのスイッチ導入とリボソームのイオン濃度制御” 高専—技科大 新技術説明会 2014 年 2 月 4 日, JST 東京別館ホール
- 26) 三留規誉、鈴木俊治、吉田賢右:“ATP 合成酵素および ab2 サブ複合体の精製における界面活性剤の検討”, 第 86 回日本生化学会 大会 2013 年 9 月 12 日, パシフィコ横浜

〔図書〕(計 1 件)

新バイオの扉 - 未来を拓く生物工学の世界 - 三留規誉 (担当:共著, 範囲:第 26 章) 袁華房 2013 年 6 月 ISBN:9784785352257

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況 (計 1 件)

名称: FoF1 - ATP 合成酵素を脂質二重膜に再構成したリボソーム  
発明者: 三留規誉  
権利者: 独立行政法人とうとう専門学校機構  
種類: 特許  
番号: 特開 2014113103 号  
取得年月日: 2014 年 6 月 26 日  
国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三留規誉 (MITOME, Noriyo)  
宇部工業高等専門学校・物質工学科・准教授  
研究者番号: 90431981