

博士論文

Streptococcus mutans F 型 H⁺-ATPase の
大腸菌細胞膜における発現と性状解析

2014 年 3 月

長浜バイオ大学大学院 バイオサイエンス研究科
バイオサイエンス専攻
バイオ科学技術研究領域

佐々木 由香

目次

発表論文	1
要旨	3
略称	7
第一章 序論	
第一節 F 型 H ⁺ -ATPase (F ₀ F ₁) の構造と機能	
第一項 酵素の局在と細胞における役割	9
第二項 F ₀ F ₁ を構成するサブユニットの構造と機能	10
第三項 ATP 合成および分解の触媒機構	11
第四項 F ₀ 部位による H ⁺ 輸送	13
第二節 <i>Streptococcus mutans</i> の生育環境と F ₀ F ₁ の役割	
第一項 <i>Streptococcus mutans</i> とう蝕の発生	14
第二項 <i>S. mutans</i> の耐酸性機構	15
第三節 本研究の目的	16
表および図	19
第二章 <i>S. mutans</i> F ₀ F ₁ の大腸菌細胞膜における発現	
第一節 緒論	35
第二節 実験方法	
第一項 <i>S. mutans</i> F ₀ F ₁ 遺伝子のクローン化と 発現プラスミドの構築	36
第二項 <i>S. mutans</i> の SRP、FtsY、YidC1、YidC2 および SecYEG をコードする遺伝子のクローン化	37
第三項 菌株と培養条件	37
第四項 反転膜小胞の調製	38

第五項	ウェスタンブロッティングによるサブユニットの検出	----	39
第六項	その他の方法と試薬	-----	39
第三節 結果			
第一項	<i>S. mutans</i> F 型 H ⁺ -ATPase (F ₀ F ₁) 遺伝子の 大腸菌への導入	-----	40
第二項	<i>S. mutans</i> の SRP、FtsY、YidC1 および YidC2、 SecYEG の遺伝子導入による F ₀ F ₁ の分子集合への影響	----	40
第四節	考察	-----	41
表および図		-----	43

第三章 *S. mutans* 由来の F₀F₁ の性状解析

第一節	緒論	-----	63
第二節 実験方法			
第一項	用いたプラスミドと菌株、培養条件	-----	64
第二項	<i>S. mutans</i> の反転膜小胞の調製	-----	65
第三項	大腸菌の反転膜小胞および EDTA 抽出画分の調製	-----	66
第四項	ATPase 活性の測定	-----	66
第五項	ATPase 活性に対する阻害剤の効果	-----	67
第六項	H ⁺ 輸送の測定	-----	67
第七項	SF ₀ F ₁ または EF ₀ F ₁ 含む反転膜小胞の NADH 消費量 と ATP 合成活性の測定	-----	68
第八項	その他の方法と試薬	-----	68
第三節 結果			
第一項	大腸菌の細胞膜画分における SF ₀ F ₁ および EF ₀ F ₁ の分子集合	-----	69
第二項	SF ₀ EF ₁ を発現するプラスミドの構築と 大腸菌細胞膜での発現量	-----	69

第三項	膜画分 ATPase 活性の pH 依存性	70
第四項	ATPase 活性への阻害剤の影響	71
第五項	ATP 加水分解に伴う H ⁺ 輸送	72
第六項	SF ₀ F ₁ による ATP 合成活性の検討	73
第四節 考察		
第一項	SF ₀ F ₁ 触媒部位の大腸菌 ATP 合成酵素との違い	74
第二項	SF ₀ F ₁ による ATP 合成反応	75
第三項	SF ₀ F ₁ による ATP 加水分解に共役した H ⁺ 輸送	76
表および図		79

第四章 cサブユニットへ変異導入した SF₀F₁の解析

第一節	緒論	110
第二節 実験方法		
第一項	<i>S. mutans</i> F ₀ F ₁ cサブユニット遺伝子への アミノ酸変異の導入	110
第二項	<i>S. mutans</i> cサブユニットのホモロジーモデリング	110
第三項	その他の方法	110
第三節 結果		
第一項	cサブユニットに変異導入した SF ₀ F ₁ の 大腸菌における発現	111
第二項	ATP 加水分解に共役した H ⁺ 輸送	111
第三項	TM1 変異株の酸化的リン酸化による生育	112
第四項	TM1 変異酵素の ATPase 活性に対する DCCD の効果	112
第五項	予測した <i>S. mutans</i> cサブユニットの構造と 変異の効果	113
第四節	考察	113
表および図		117

第五章 総括、展望	-----	141
参考文献	-----	145
謝辞	-----	161

発表論文（本研究の結果を発表した原著論文）

1. Yuka Sasaki, Eri Nogami, Masatomo Maeda, Mayumi Nakanishi-Matsui, and Atsuko Iwamoto-Kihara (2014)

A unique F-type H⁺-ATPase from *Streptococcus mutans*: An active H⁺ pump at acidic pH.

Biochem. Biophys. Res. Commun., **443**, 677-682.

2. Makoto Araki, Kazuya Hoshi, Masasuke Fujiwara, Yuka Sasaki, Hideo Yonezawa, Hidenobu Senpuku, Atsuko Iwamoto-Kihara and Masatomo Maeda (2013)

Complementation of the Fo *c* subunit of *Escherichia coli* with that of *Streptococcus mutans* and properties of the hybrid FoF₁ ATP synthase.

J. Bacteriol., **195**, 4873-4878.

要旨

F 型 H⁺-ATPase (F₀F₁) は、ミトコンドリア内膜、葉緑体のチラコイド膜、細菌の細胞膜などの生物に普遍的に見つかる膜酵素である。本酵素は、電子伝達鎖により形成された H⁺の電気化学的ポテンシャル差を利用して、H⁺を輸送するのに共役して、ADP と無機リン酸から ATP を合成する ATP 合成酵素としてよく知られている。大腸菌などの細菌の F₀F₁ は八種類のサブユニットが約 500 kDa の複合体を形成しており、触媒部位を含む膜表在性の F₁ 部分 (α₃β₃γδε) と H⁺輸送路を形成する膜内在性の F₀ 部分 (ab₂c₁₀₋₁₅) より構成される。

ゲノム配列より、う蝕の原因菌として知られる *Streptococcus mutans* の細胞膜にも F₀F₁ が存在することは明らかである。この酵素は、口腔内の酸性環境で生育する *S. mutans* 細胞から H⁺を能動輸送により排出し、細胞の耐酸性に寄与していると思われる。しかし、これまでに分子レベルの解析は成されておらず、実際はよく分かっていなかった。そこで、本研究で *S. mutans* F 型 H⁺-ATPase の性状を明らかにすることで、生物界で広く ATP 合成酵素として知られた本酵素の役割について、新たな知見が得られると考えた。

S. mutans の八種類のサブユニット遺伝子はクラスター（オペロン）を形成しているため、全長を 3つの領域に分けて PCR で増幅し、クローン化した。IPTG 誘導できる発現プラスミドとして大腸菌の F₀F₁ 欠失株に導入したところ、反転膜小胞として調製した細胞膜画分に F₀F₁ のサブユニットが検出できた。*S. mutans* 由来の酵素 (SF₀F₁) が膜に分子集合していると示唆されたので、その機能を解析した。大腸菌 F₀F₁ (EF₀F₁) の ATPase 活性はアルカリ側で高いが、SF₀F₁ の場合には pH7.0 で最大となった。*S. mutans* 細胞膜の F₀F₁ が ATP で駆動される H⁺能動輸送をするかどうかはこれまで報告が無かったが、本研究で、pH5.5~6.5 の酸性で SF₀F₁ の H⁺輸送活性が高いことを初めて明らかにした。また、SF₀F₁ が ATP 合成酵素として働くかどうかを *in vivo* と *in vitro* で調べたところ、殆ど活性を示さなかった。以上より、*S. mutans* 細胞膜に存在

する F_0F_1 が、ATP 合成酵素としてでなく、酸性環境で生き延びるため H^+ 排出ポンプとしての役割を果たしていることが示唆された。 H^+ 輸送路側の F_0 のみを *S. mutans* 型としたハイブリッド酵素 (SF_0EF_1) も構築したところ、ATPase 活性は EF_0F_1 と、 H^+ 輸送活性は SF_0F_1 と同様になったため、酸性で H^+ 輸送をする機構は F_0 側にあると考えた。

本研究で構築された *S. mutans* F_0F_1 遺伝子クローンを用いた共同研究により、 F_0 の *c* サブユニットだけを *S. mutans* 型にした大腸菌は、pH 7.0 よりも pH 5.5 でよく生育することが分かった。そのため、 SF_0F_1 の *c* サブユニット遺伝子に部位特異的に変異を導入し、さらに解析を行った。その結果、保存性の高い Glu-53 とその近傍のアミノ酸残基は、本酵素においても H^+ 輸送路を形成することが示唆された。Ser-17 と Glu-20 をそれぞれ Ala と Ile に置換したところ、 H^+ 輸送の pH 依存性が変化し、大腸菌などと同様に pH7.0 で H^+ 輸送が見られるようになった。したがって、*S. mutans* F_0F_1 における酸性条件での H^+ 輸送には、少なくとも *c* サブユニットのアミノ酸が関わっており、Ser-17 と Glu-20 が関与する Glu-53 残基周辺の環境が本酵素の特性に重要であると示唆された。

本研究より、*S. mutans* の F_0F_1 は細胞内部が酸性化した時、ATP 加水分解に共役して H^+ を排出するポンプとして働くことが示唆された。これまでに、F 型 H^+ -ATPase は ATP 合成酵素としての役割を持つものがよく知られているが、様々な環境で生育する細菌に存在する F 型 H^+ -ATPase の中には、生理的に主に H^+ 排出ポンプとして働くものがあるという可能性を示している。

Abstract

The F-type H⁺-ATPase (F₀F₁) family includes ATP synthase found in membranes of bacteria, mitochondria and chloroplasts. An electrochemical proton gradient generated by an electron transfer chain is converted to the chemical energy currency ATP through F₀F₁. Plasma membranes of various bacteria contain the simplest version of the enzyme that consists of membrane embedded F₀ (ab₂c₁₀₋₁₅) and peripheral F₁ (α₃β₃γδε) portions.

Streptococcus mutans is one of oral bacteria that are responsible for dental caries. The F-type ATPase (F₀F₁) is thought to pump H⁺ coupled with ATP hydrolysis to survive in acidic environment. However, there isn't enough evidence that this enzymes functions as H⁺ efflux pump.

In this study, the entire *S. mutans* F₀F₁ genes were cloned and functionally expressed in *E. coli* membranes (SF₀F₁). Membrane SF₀F₁ ATPase showed optimum activity at pH 7, essentially the same as that the *S. mutans*, although the activity of *E. coli* F₀F₁ (EF₀F₁) was optimum at ≥9. The membranes showed detectable ATP dependent H⁺-translocation at pH 5.5-6.5, but not at neutral conditions (pH ≥ 7), consistent with the role of *S. mutans* F₀F₁ to pump H⁺ out of the acidic cytoplasm. A hybrid F₀F₁, consisting of F₀ and F₁ sectors from *S. mutans* and *E. coli* (SF₀EF₁), respectively, essentially showed the same pH profile as that of EF₀F₁ ATPase. However, ATP-driven H⁺ transport was similar to that by SF₀F₁, with activity at acidic pH. Replacement of the conserved *c* subunit Glu-53 in SF₀F₁ abolished H⁺-transport at pH 6 or 7, suggesting its role in H⁺ transport. Mutation in the SF₀F₁ *c* subunit, Ser-17→Ala or Glu-20→Ile, changed the pH dependency of H⁺ transport, and the F₀ could transport H⁺ at pH7, as the membranes with EF₀F₁. Ser-17, Glu-20, and their vicinity were suggested to be involved in H⁺-transport in *S. mutans* at acidic pH.

略称

ACMA	9-amino-6-chloro-2-methoxy acridine
BSA	bovine serum albumin
CCCP	carbonylcyanide- <i>m</i> -chlorophenylhydrazone
DCCD	<i>N,N'</i> -dicyclohexylcarbodiimide
DMSO	dimethyl sulfoxide
EDTA	ethylenediamine- <i>N,N,N',N'</i> -tetraacetic acid
DTT	dithiothreitol
IPTG	isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
MES	2-(<i>N</i> -morpholino)ethanesulfonic acid
MOPS	3-morpholinopropane-1-sulfonic acid
SDS	sodium dodecyl sulfate
SF6847	2,6-di- <i>t</i> -butyl-4-(2',2'-dicyanovinyl)phenol
TCA	trichloroacetic acid
Tris	<i>N, N'</i> -tris (hydroxymethyl) aminomethane

解析に用いた F₀F₁

SF ₀ F ₁	大腸菌 DK8 株に発現した <i>S. mutans</i> F ₀ F ₁
SF ₀ EF ₁	大腸菌 DK8 株に発現した <i>E. coli</i> F ₀ F ₁
EF ₀ F ₁	大腸菌 DK8 株に発現した <i>S. mutans</i> F ₀ と大腸菌 F ₁ から成る ハイブリッド F ₀ F ₁

第一章 序論

第一節 F 型 H⁺-ATPase (F₀F₁) の構造と機能

第一項 酵素の局在と細胞における役割

F 型 H⁺-ATPase は、ミトコンドリア内膜、葉緑体のチラコイド膜、細菌の細胞膜など、生物に普遍的に見つかる膜酵素である (図 1-1A) (Boyer 1997; Futai *et al.* 2003; Fillingame *et al.* 2004)。本酵素は、膜に内在して H⁺輸送路を形成する F₀ 部分と、膜から突き出た F₁ 部分より構成されることから、F₀F₁ とも呼ばれる (図 1-1B)。F₁ 部分に ATP 合成あるいは分解を行う触媒部位が含まれている。細菌の細胞膜に存在しているものでも、ミトコンドリアの酵素と同様に ATP 合成酵素としての役割がよく知られている。また、これまでに、自然界には H⁺輸送性と Na⁺輸送性のものが存在することが知られている (Dimroth and Cook 2004)。

細胞膜の電子伝達鎖が、異化経路で生じた NADH などの電子を伝達するのに伴って、細胞質側からペリプラズム側に H⁺を輸送すると、膜を介した H⁺の濃度差と電位差による電気化学的ポテンシャル差 ($\Delta\mu_{H^+}$) が形成される。これを利用して、F₀ の H⁺輸送路から H⁺を細胞質側へ輸送するのに共役して F₁ の触媒部位で ADP と無機リン酸より ATP が合成される (図 1-1A)。また、後述するように、本酵素は触媒反応と共に酵素内回転をするナノモーター酵素でもある。

細菌細胞膜にある F₀F₁ は、生体内でも可逆的に反応すると考えられる (図 1-1B) (Futai *et al.* 2004)。すなわち、ATP を ADP と無機リン酸に加水分解するのに共役して H⁺を細胞外に能動輸送すると、細胞膜内外に形成された $\Delta\mu_{H^+}$ は、アミノ酸やイオンなどの物質輸送の駆動力などとして利用されると考えられる。嫌気的な生育条件で生育できる *Streptococcus mutans* や *Lactococcus lactis* などの細胞膜には電子伝達鎖が存在しないため、F₀F₁ が $\Delta\mu_{H^+}$ を形成する

主な因子として働いている可能性がある。

第二項 F_0F_1 を構成するサブユニットの構造と機能

細菌の細胞膜にある酵素の F_1 部分は $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\varepsilon$ の五種類のサブユニットより、 F_0 部分は abc_{10-15} の三種類のサブユニットより構成されている (図 1-1B)。化学修飾や変異酵素の研究などより、本酵素の触媒部位は α および β サブユニットの境界面に存在し、 H^+ 輸送路は c および a サブユニットで形成されることが明らかになっている。 c サブユニットの数は種によって異なっており、その意義については議論されているところである (Preiss *et al.* 2013)。ミトコンドリアや葉緑体の酵素にも、細菌の八種類と相同なサブユニットは含まれているが、ミトコンドリア F_0F_1 は内膜のクリステにおいて二量体を形成するため、それに関わる約十種類のサブユニットがさらに含まれている (Arnold *et al.* 1998)。約 500 kDa の複合体を形成する細菌型の酵素は、よりシンプルで基本的な構成をしていると言える (図 1-1)。

これまでに、どの生物種においても F_0F_1 複合体 (ホロ酵素) の原子レベルでの構造は解明されていないが、ウシのミトコンドリア F_1 の結晶構造は様々な阻害剤と共に解かれてきた (Orriss *et al.* 1998; Braig *et al.* 2000; Bowler *et al.* 2006; Vollmar *et al.* 2009)。Abrahams らによって初めて解かれたものによると、 α および β サブユニットのそれぞれの三次構造は基本的によく似ており、それらが交互にリング状に並んだ六量体を形成していた (図 1-2A) (Abrahams *et al.* 1994)。また、その中央を、 γ サブユニットの N 末端領域および C 末端領域で構成されたコイルドコイル構造が貫いていた。最近、大腸菌 F_1 の結晶構造が明らかになり、 $\alpha_3\beta_3\gamma\varepsilon$ サブユニットの配置はミトコンドリアのものと同様であった (Cingolani and Duncan 2011)。

F_1 の構造が詳細に解明されているのに対して、膜を貫通する F_0 部分の構造は明らかとなっていない。 H^+ 輸送路の一部である c サブユニット (8 kDa) の単量体構造は以前に NMR によって解かれており、N 末端側と C 末端側のヘリック

スがヘアピン構造をとっていた (Girvin *et al.* 1998)。最近、様々な種に由来する *c* サブユニットのオリゴマー構造が X 線結晶構造の解析より明らかになり、それらによると、サブユニットが向きを揃えてリング状に集合している (図 1-3) (Meier *et al.* 2005; Pogoryelov *et al.* 2009; Preiss *et al.* 2010; Symersky *et al.* 2012)。この構造を *c*-リングと呼ぶことがある。*b* サブユニットは、N 末端側の 20 アミノ酸余りが膜に内在していることが一次構造などから予想されており、*c* および *a* サブユニットと膜内で相互作用していると考えられる (Fillingame *et al.* 2000)。*b* サブユニットの部分構造を発現させたポリペプチドの結晶化によって、膜から出ている領域は長いヘリックス構造の二量体をとることが予想されている (Del Rizzo *et al.* 2002)。

ところで、*c* サブユニットと共に H⁺ 輸送に必須である *a* サブユニットの構造については、疎水性の五回膜貫通領域を持つことが一次構造や他の実験により示唆されているが (Wada *et al.* 1999)、原子レベルでは全く分かっていない。大腸菌酵素に変異を導入した解析、構造予測、抗体を用いた解析などから、*a* サブユニットは膜貫通ヘリックスの二番から五番 (TM2~5) が近接して東になっていることが予想されている (Angevine *et al.* 2003)。

F₀ の複合体構造は不明であるが、最近、細菌の一種である *Ilyobacter tartaricus* F₀ の低温電子顕微鏡や高速原子間力顕微鏡による解析で 7 Å の解像度の像が得られており、それによると、*c*-リングと近接した位置に *a* および *b* サブユニットと思われる構造体が見えている (Hakulinen *et al.* 2012)。

第三項 ATP 合成および分解の触媒機構

前述のウシのミトコンドリア F₁ の結晶構造によると (Abrahams *et al.* 1994)、 α および β サブユニットの境界面には異なるリガンドが結合しており、ATP 合成/分解の触媒部位と考えられた (図 1-2)。一つ目の部位には、非分解性の ATP 類似化合物である 5'-adenylyl-imidodiphosphate (AMP-PNP)、二つ目には ADP、三つ目にはリン酸だけが結合していた (図 1-2)。3 つの β サブユニットの構造

には違いが見られ、それぞれ、 β_{TP} (ATP 結合型)、 β_{DP} (ADP 結合型)、 β_E (empty) と名付けられた (図 1-2, B~D)。また、精製 F_1 を用いた詳細な速度論的解析によって、ヌクレオチドに対する親和性が 3 つの触媒部位で異なることが以前より明らかになっており (Weber *et al.* 1993; Boyer 1997)、構造の違いは解析結果を裏付けるものであった。

触媒部位の構造は順に変化すると考えられている。すなわち、Boyer により提出された **binding change mechanism** (交代結合説) によると、ATP 合成が起こるとき、ある一つの触媒部位のヌクレオチド親和性は、低→高→中と変化し、ATP 遊離→ADP 結合→ATP 合成が連続的に起こるとされた (Boyer 1989)。 γ サブユニットのコイルドコイル構造が $\alpha_3\beta_3$ リングに対して非対称に傾いていたことで (図 1-2)、回転により β サブユニットの構造変化が連続的に引き起こされることが予想された。その後、実際に、 $\alpha_3\beta_3$ 複合体を基盤に固定化し、 γ サブユニットが ATP の加水分解に伴って一方向に連続回転していることが示された (Noji *et al.* 1997)。蛍光アクチン繊維をプローブとし、顕微鏡で F_1 一分子ごとの運動を観察した実験では、プローブの回転で生じる粘性抵抗が大きいため、本当の回転速度は分からなかったが、ナノサイズの金ビーズをプローブとした一分子回転観察により、大腸菌 F_1 は 1 秒間で 200 回転するモーター分子であることが示された (Nakanishi-Matsui *et al.* 2006)。また、大腸菌の F_0F_1 (ホロ酵素) を用いた同様の観察により、 $\alpha_3\beta_3\gamma\delta ab_2$ の固定子複合体に対して $\gamma\epsilon c_{10}$ 複合体が回転していることが示された (図 1-4A) (Sambongi *et al.* 1999; Tanabe *et al.* 2001)。ナノサイズのプローブを用いると、 F_1 と同様に 1 秒当たり平均して 200 回転することが明らかになった (図 1-4B) (Oka *et al.* データ未発表)。酵素内のサブユニット複合体の回転は、ATP 合成/分解の触媒反応が連続的に起こることと密接に結びついていると示されている。また、触媒反応とイオン輸送が共役して起こるのにも重要であると考えられている (Omote *et al.* 1999; Hosokawa *et al.* 2005)。

第四項 F₀ 部位による H⁺ 輸送

F₀ でリング構造を形成している *c* サブユニットの一次構造を比較すると、第二膜貫通ヘリックス (TM2) に Glu または Asp として必ず保存されているアミノ酸残基が存在する (Arechaga and Jones 2001; Maeda 2008)。この残基は、変異酵素の解析より H⁺ 輸送に必須であることが明らかとなり、カルボキシル側鎖がプロトン化と脱プロトン化されることが示唆されている (図 1-3) (Hoppe and Sebald 1984)。大腸菌酵素の *a* サブユニットに対する変異導入により H⁺ 輸送に関与すると思われるアミノ酸残基がいくつか示唆されてきたが、第四膜貫通ヘリックス (TM4) の Arg-210 残基は様々な種で完全に保存されており、H⁺ 輸送に必須であると考えられた (Lightowlers *et al.* 1987; Cain and Simoni 1989; Wada *et al.* 1999)。*b* サブユニットは H⁺ 輸送路の形成には直接関わっていないが、酵素が機能的な H⁺ 輸送路を形成するためには必要である (Steffens *et al.* 1988)。

Oster と Wang によって、*c* -リングが *a* サブユニットに対して回転すると共に、細菌細胞膜の厚さの約半分まで到達する二つの輸送路 (半チャンネル) をイオンが移動するモデルが提唱された (Oster and Wang 1999)。二つの半チャンネルの片方は細胞質側に、もう一つは細胞外部に開口している (図 1-5)。このモデルによると、H⁺ の電気化学的ポテンシャル差によって細胞の外側に開口した片方の半チャンネルから H⁺ が流入すると、*c* サブユニットの Asp または Glu 残基 (大腸菌では Asp-61) のカルボキシル側鎖がプロトン化される。その後に *c* -リングが *a* サブユニットに対して回転し、もう一つの半チャンネルに到達した所でカルボキシル基から H⁺ が脱離して細胞質側へ放出される (図 1-5)。また、*c* -リングが回転することで γ および ϵ サブユニットも同時に回転するため (図 1-4)、 β サブユニットの触媒部位の構造変化が引き起こされて ATP の合成と遊離が起きると考えられる。酵素が ATP を分解する時は *c* -リングの回転が逆向きに起きることになり、細胞質側から細胞外部へと H⁺ が輸送されると考えられる。このモデルで考えられている半チャンネルの存在は、変異導入と化学修飾、あるいは、

構造の予測から認められつつある。すなわち、Fillingame らのグループによる *a* および *c* サブユニットの膜貫通領域への多数の Cys 置換変異の導入と、Ag⁺ による H⁺ 輸送の阻害実験を組み合わせたアミノ酸残基のマッピングにより、*a* および *c* のサブユニット境界面にある細胞質側の半チャネルと、*a* サブユニットの TM2~5 で形成される細胞外部へ開口した半チャネルの存在が示唆された (Fillingame *et al.* 2003)。ハウレン草の *c*₁₄ リングで解明された X 線結晶構造を元に、リン脂質膜中での分子動力的なシミュレーションを行ったグループは、水に満たされた親水性の半チャネルが存在しうることを示唆している (Gohlke *et al.* 2012)。

第二節 *Streptococcus mutans* の生育環境と F₀F₁ の役割

第一項 *Streptococcus mutans* とう蝕の発生

Streptococcus mutans は、ヒトのう蝕の部位より見つかる口腔連鎖球菌の一種である。スクロースを基質として、グルコシルトランスフェラーゼにより不溶性のグルカンを形成して歯牙表面に付着し、プラークにおける酸性環境で *Streptococcus sobrinus* や *Lactobacillus* 属の細菌などと共に生育している (Loesche *et al.* 1986; Beighton *et al.* 2008)。*S. mutans* はスクロースやグルコースなどの糖を細胞内部に取り込み、解糖系で代謝して乳酸を生成する (図 1-6)。乳酸は、細胞膜にある乳酸トランスポーターより細胞外部へ排出されるため、口腔内が酸性化する (Dashper *et al.* 1996)。pH5.5 以下になると歯のエナメル質が脱灰し、う蝕が引き起こされる (Loesche 1986)。また、血液中に *S. mutans* が侵入すると、感染性心内膜炎を引き起こす原因となることが知られている (Douglas *et al.* 1993)。

第二項 *S. mutans* の耐酸性機構

S. mutans が酸性環境で生育するために、DNA やタンパク質の損傷を防ぐ機構や、細胞内の酸性化を抑制する機構が存在していると考えられてきた (Matsui and Cvitkovitch 2010)。pH7.0 と pH5.0 で培養した細菌のプロテオーム解析より、酸性条件において、DNA 修復、転写、翻訳、タンパク質の折りたたみおよび分解に関わる様々なタンパク質の発現量が増加したことが示された (Len *et al.* 2004)。分子シャペロンとして働く DnaK の遺伝子を欠失した細菌は、pH5.0 の培地で生育できなくなる (Lemos *et al.* 2007)。また、酸性環境では脂質代謝が変化し、細胞膜に含まれる一不飽和脂肪酸と長鎖脂肪酸の含量が増加することも示唆されている (Fozo and Quivey 2004)。このことから、膜の脂質成分の変化によって、細胞内部への H⁺流入を減少させている可能性が考えられる。

重要な耐酸性機構の一つとして、細胞膜にある F₀F₁ が、H⁺を排出するポンプとしての役割を持つと考えられてきた (Quivey *et al.* 2001)。*S. mutans* の生育と ATPase 活性の pH 依存性を、他の口腔細菌である *S. sobrinus* や *Lactobacillus casei* と共に調べたところ、それぞれの細菌において生育と活性の至適 pH がほぼ一致していたためである (Bender *et al.* 1986)。さらに、本酵素遺伝子のプロモーター活性は、細胞を pH 5.0 で培養したときに pH 7.0 のときよりも約 2 倍上昇することが報告されている (Kuhnert *et al.* 2004)。プロテオーム解析でも、本酵素の α および ε サブユニットの pH 5 における検出量が、それぞれ、pH 7 の 3 倍および 8 倍に増加していた (Len *et al.* 2004)。これらのことから、F₀F₁ は酸性環境で発現が誘導される酵素であると考えられる。また、*S. mutans* 細胞内部の pH を [¹⁴C] benzoic acid の取り込み量より測定すると、細胞を F₀F₁ の阻害剤である *N,N'*ジシクロヘキシルカルボジイミド (DCCD) で処理した場合に、処理しないものに比べて低下している (酸性化している) ことが観察された (ΔpH = 0.6) (Dashper *et al.* 1992)。以上のような知見から、*S. mutans* の細胞膜には F₀F₁ があって、酸性環境での H⁺排出に関

わることが示唆されていたが、分子レベルで本酵素の機能を調べた実験結果はこれまで殆ど報告されておらず、細胞における役割もはっきりと示されていなかった。

S. mutans のゲノム配列は既に解読されている (Ajdić *et al.* 2002)。それによると、細胞膜を介した H⁺ポンプとして働く電子伝達鎖のタンパク質遺伝子に相同なものは見つからない。また、TCA 回路の一部の酵素遺伝子は存在しないため、酸化的リン酸化による ATP 合成のために *S. mutans* の F₀F₁ が働いているとは考えにくい。細胞膜で H⁺を Na⁺と交換輸送する膜タンパク質として知られている Na⁺/H⁺交換輸送体や、F 型 ATPase と共通の祖先をもつ V 型 ATPase の相同遺伝子も見つからなかった。Ca²⁺-、Cd²⁺-、Cu²⁺-ATPase と予想されている P 型 ATPase の相同遺伝子は四種類見つかっているが、この酵素が *S. mutans* の H⁺排出ポンプとして働くという有力な証拠はない。

S. mutans の F₀F₁ の各サブユニットのアミノ酸配列を様々な生物のものと比較したところ、触媒部位を形成する α サブユニットおよび β サブユニットは、それぞれ、53~86 % および 65~92 % と比較的高い相同性が見られた (表 1-1)。その他のサブユニットの一次構造は保存性が低く、F₀ のサブユニットでは、H⁺輸送路を形成している a および c サブユニットでも、同じく口腔内に常在する *S. sanguinis* や酸性環境に棲む *L. casei* および *Lactococcus lactis* でも、60% を超えることはなかった。生理的に ATP 合成酵素として働くと思われる大腸菌とは、22~26 % の相同性だった。相同性の違いからも、*S. mutans* の F₀F₁ にはどのような特徴があるのか興味深い。

第三節 本研究の目的

これまでに、様々な環境で生育する細菌の細胞膜に F₀F₁ が見つかっている。通常は ATP 合成酵素としての役割を担うと考えられる本酵素であるが、それぞれの細菌の生育環境に応じた特性を持っているかについては、検討が始まったばかりである。たとえば、*Propionigenium modestum* や *I. tartaricus* の F

型 ATPase は、*c* サブユニットのイオン結合部位の構造のわずかな違いで輸送イオンが変わり、 Na^+ による電気化学的ポテンシャル差を ATP 合成に利用できる (Laubinger and Dimroth 1988; Neumann *et al.* 1998)。また、*c*-リングに含まれるサブユニット数は、真核生物の場合を含めて、生物が ATP 合成に利用できる電気化学的ポテンシャル差に依存して進化的に変化してきた可能性が示されている (Pogoryelov *et al.* 2012; Preiss *et al.* 2013)。また、類縁の V 型 ATPase では、真核細胞のオルガネラ酸性化に関わる H^+ -ATPase がよく知られているが、古細菌では ATP 合成酵素として働くものも存在する (Becher and Müller 1994; Nishi and Forgac 2002)。しかしながら、F 型 ATPase の中に、生理的に主に H^+ 排出ポンプとして働くものがあるかどうかはこれまでに報告されていなかった。

そこで、*S. mutans* の F_0F_1 がイオン排出ポンプとして働く F 型 H^+ -ATPase であることを、酵素の性状を初めて分子レベルで解析し、明らかにしようと考えた。そのために、本研究では *S. mutans* の F_0F_1 遺伝子をクローン化して、大腸菌細胞膜に発現させた (第二章)。様々な条件で酵素活性の測定を行い、酸性の条件で H^+ 輸送を行う酵素であることを明らかにした (第三章)。また、 H^+ 輸送路のサブユニットに対して変異導入を行い、 H^+ 輸送の pH 依存性を決定しているアミノ酸残基を明らかにした (第四章)。

表 1-1 *S. mutans* と様々な種由来の F₀F₁ サブユニットの相同性比較

S. mutans F₀F₁ の八種類のサブユニットのアミノ酸配列を、*Streptococcus sanguinis*、*Lactobacillus casei*、*Lactococcus lactis*、*Escherichia coli*、*Bos taurus*、*Spinacia oleracea*、*Homo sapiens* の相同な配列と、それぞれ比較した。*S. mutans* との間で一致したアミノ酸残基の数から相同性を求めた。

Sources	Homology (%)							
	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>c</i>	α	β	γ	δ	ϵ
<i>Streptococcus sanguinis</i>	58	51	58	86	92	69	35	72
<i>Lactobacillus casei</i>	46	39	39	79	84	55	27	36
<i>Lactococcus lactis</i>	50	48	52	85	88	63	32	64
<i>Escherichia coli</i>	26	26	22	53	67	34	32	26
<i>Spinacia oleracea</i>	33	17	37	62	67	21	12	28
<i>Homo sapiens</i>	25	18	22	56	65	28	19	22

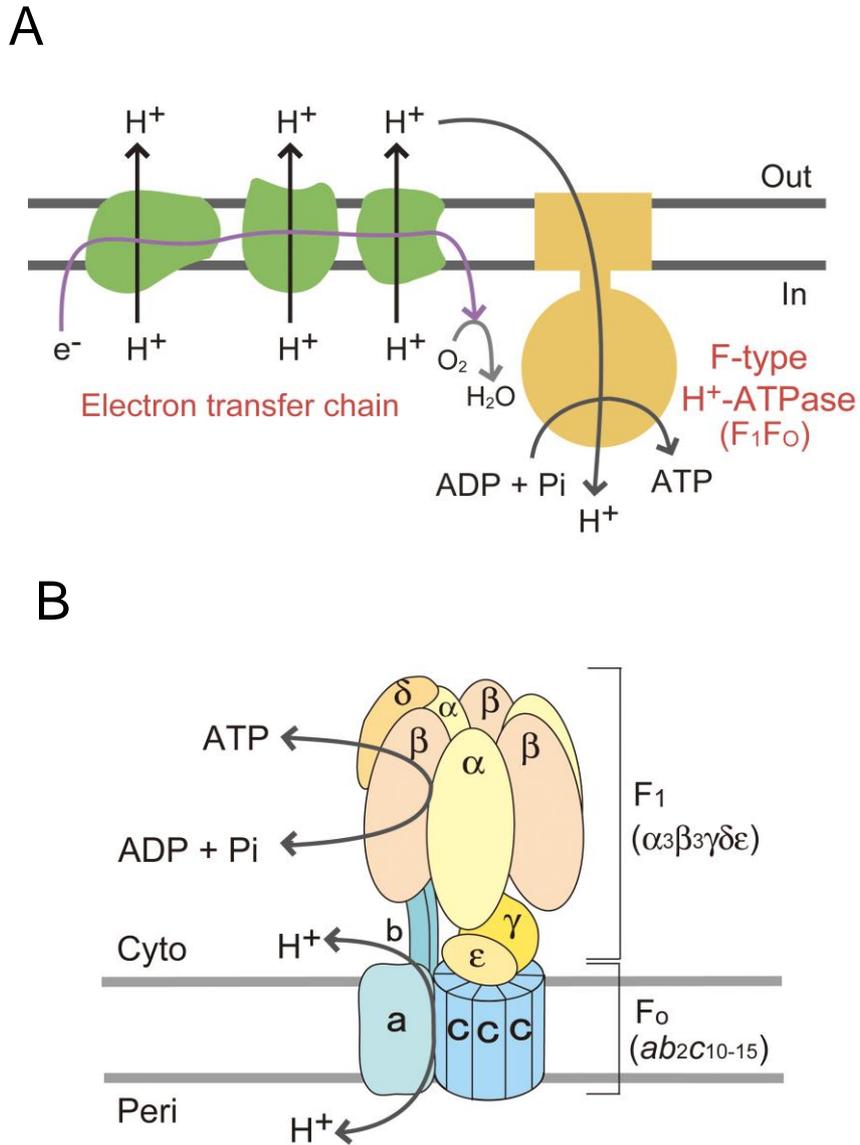


図 1-1 膜に存在する F 型 H^+ -ATPase (F_0F_1) の働き

(A) ミトコンドリアなどと同様に、細菌細胞膜にある電子伝達鎖が NADH やコハク酸を酸化する過程で H^+ を輸送し、 H^+ の電気化学的ポテンシャル差が形成される。それを利用して、 F_0F_1 により ATP 合成が行われる。

(B) 細菌細胞膜に存在する F 型 H^+ -ATPase は、膜内在性の F_0 で H^+ を輸送すると、それと共役して、 F_1 で ATP 合成が起こる。反応は可逆的であると考えられ、ATP を分解してイオンを能動輸送することができる。

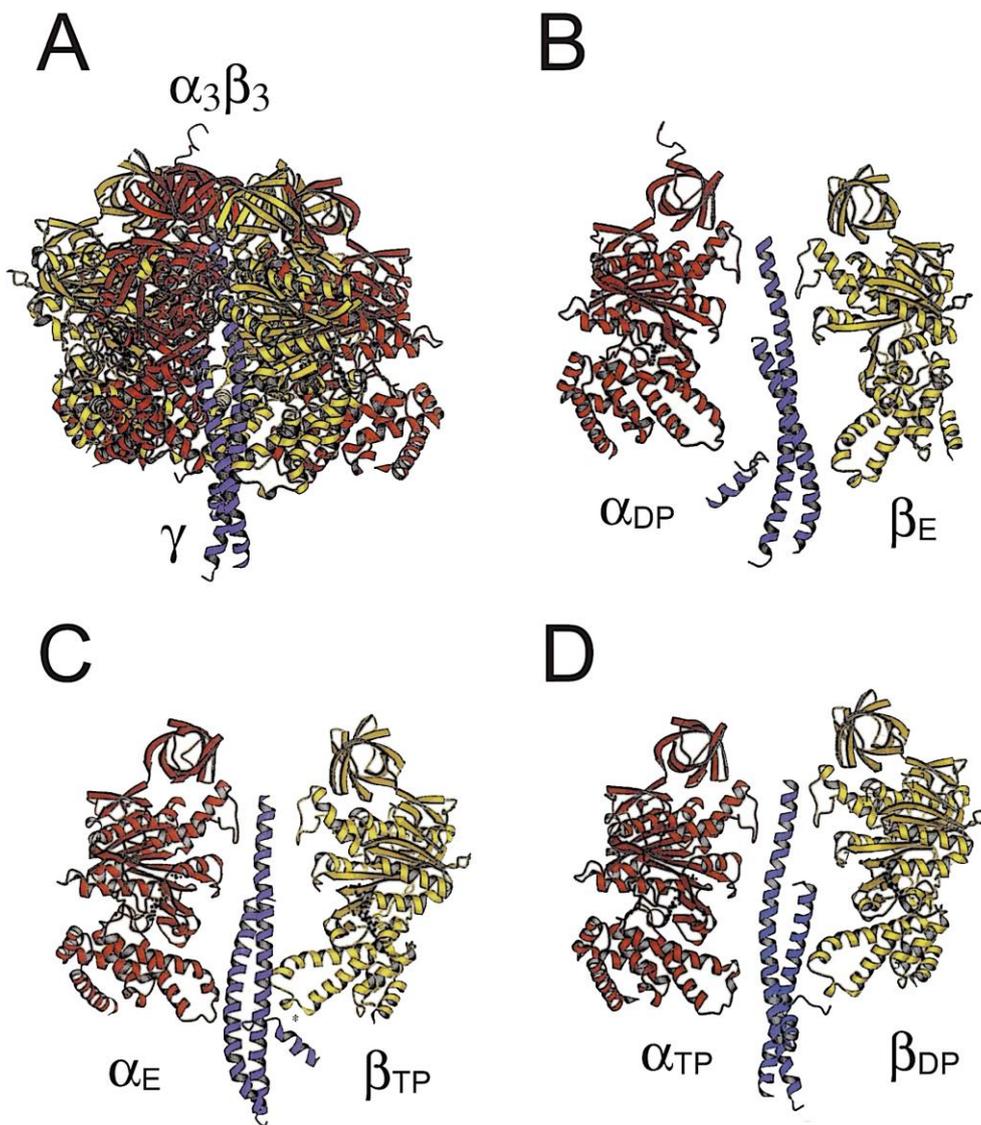


図 1-2 F_1 の構造と触媒サブユニットの構造変化

(A) Abrahams らによって明らかにされたウシミトコンドリア F_1 の結晶構造。 α サブユニット (赤色) および β サブユニット (黄色) が交互に配置して、 $\alpha_3\beta_3$ の六量体を形成している。その中央を、 γ サブユニットの一部 (紫色) が貫いている。

(B~D) 向かい合う α および β サブユニットを、異なる組み合わせで抜き出し、 γ サブユニットと共に示した。 α と β の境界面には触媒部位が存在し、異なるリガンドが結合している。異なる構造の β サブユニットは、それぞれ、(つづく)

リン酸が結合している β_E (B)、AMP-PNP を結合した β_{TP} (C)、ADP を結合した β_{DP} (D) と名付けられた。3つの β サブユニットは、 γ サブユニットの回転と共に構造を変化させ、基質に対する親和性を順に変化させると考えられている (Binding change mechanism)。すなわち、 $\beta_E \rightarrow \beta_{DP} \rightarrow \beta_{TP}$ と構造が変化すると、ATP が合成され、次の β_E で ATP の遊離が起こる。(図は、Abrahams *et al.* 1994 より改変)。

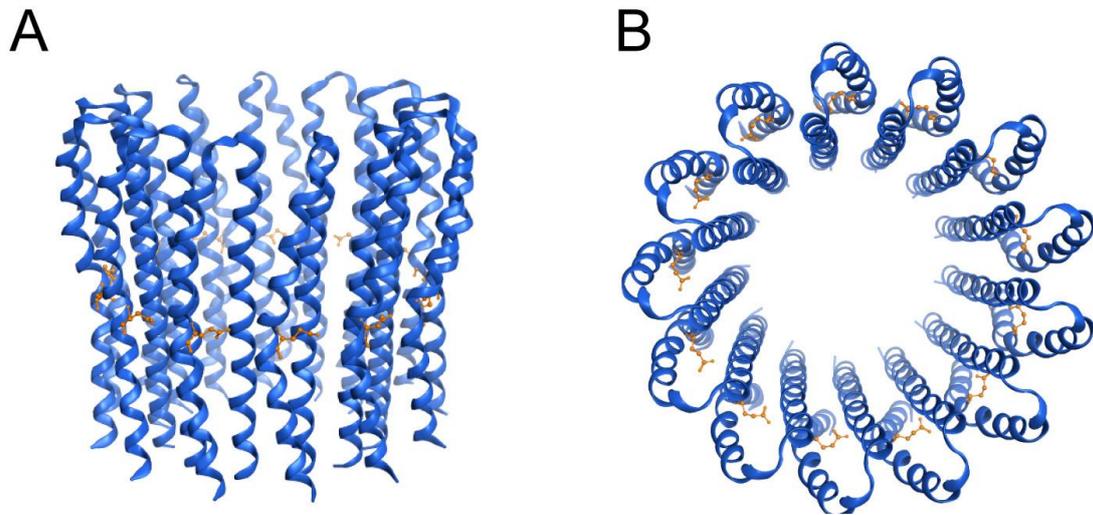


図 1-3 *c*サブユニットリングの結晶構造

好アルカリ性細菌である *Bacillus pseudofirmus* OF4 の c_{13} リングの結晶構造 (PDB ID; 2X2V) を示した。解像度は 2.5 Å である (Preiss *et al.* 2010)。(A) は側面図、(B) は *c*サブユニットリングを細胞質側から見たときの像である。二本のヘリックスがヘアピン構造をとり、13 個が集合してリングを形成している。二番目の膜貫通ヘリックス (TM2) にある Glu 残基 (オレンジ色のボールアンドスティックモデル) は、様々な生物で Glu または Asp として保存されており、大腸菌を含むいくつかの生物において H^+ 輸送に重要な残基であることが知られている。TM2 はリングの外側に位置しており、*a* サブユニットと相互作用すると考えられている。

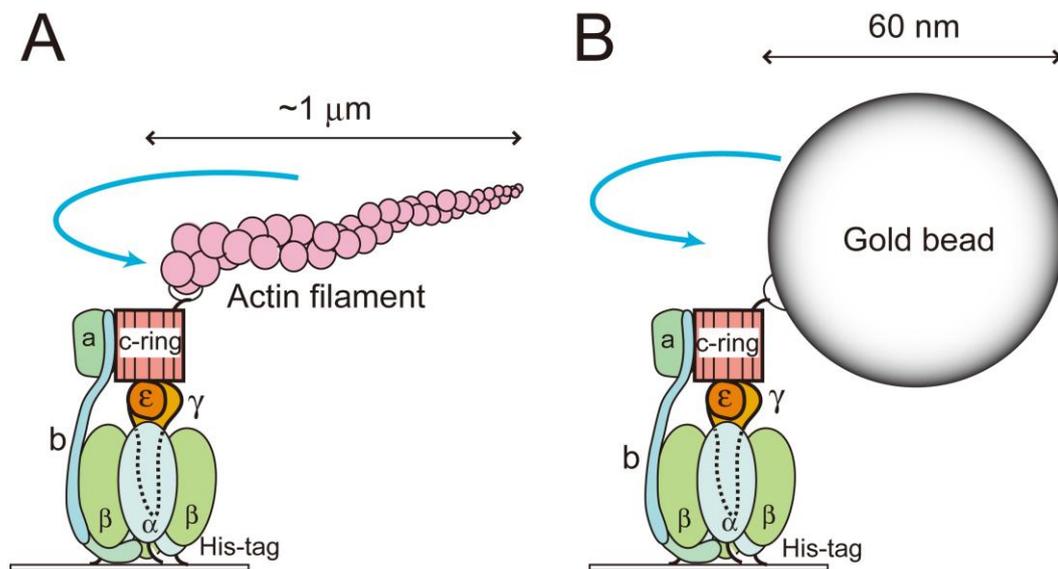


図 1-4 F_0F_1 の一分子回転観察

大腸菌 F_0F_1 は、ニッケルコートしたガラス板に、 α サブユニットまたは c サブユニットに導入された His タグを介して固定化された (Sambongi *et al.* 1999; Tanabe *et al.* 2001; Oka *et al. in preparation*)。 c サブユニットをビオチン化し、ストレプトアビジンを介してアクチン繊維 (約 1 μm) (A) または金ビーズ (60 nm) (B) が結合されている。ローダミン標識されたアクチン繊維、または、金ビーズをプローブとして、顕微鏡で観察することにより、本酵素の回転が観察された。その結果、 $\alpha_3\beta_3\gamma\delta ab_2$ の固定子複合体に対して $\gamma\epsilon c_{10}$ 複合体が回転していることが示された。反対に、 c サブユニットをガラス板に固定化して β サブユニットにプローブを結合すると、 $\gamma\epsilon c_{10}$ 複合体に対して $\alpha_3\beta_3\gamma\delta ab_2$ が回転することも観察されている。

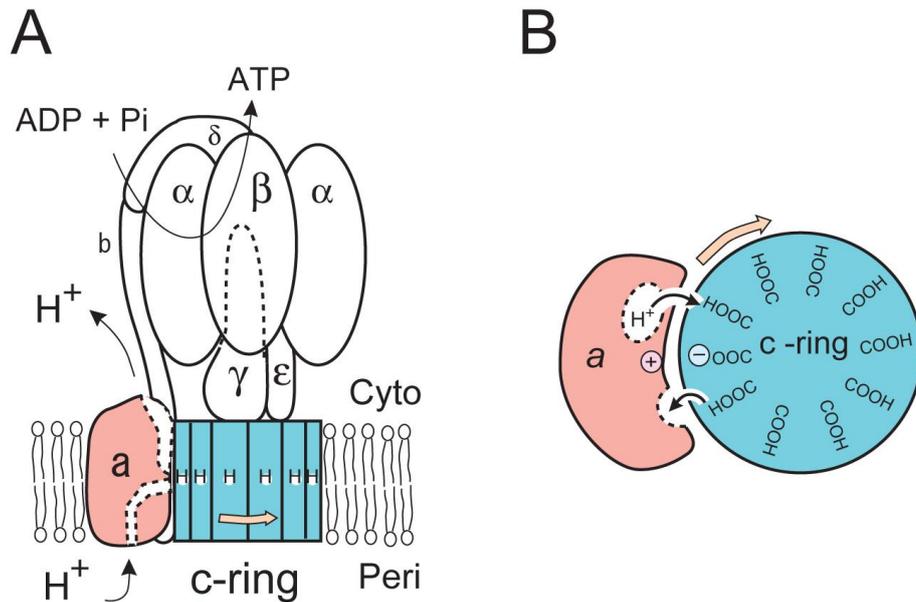


図 1-5 2つの半チャンネルと回転する *c*-リングを介する H^+ 輸送モデル

F_0F_1 の H^+ 輸送路は *a* サブユニット (オレンジ色) および *c*-リング (水色) より形成される。(A) は F_0F_1 の全体の模式図、(B) は *c* および *a* サブユニットを抜き出して、細胞質側から見た時の模式図として示している。大腸菌酵素において、細胞質側とペリプラズム側に開口した 2 つの親水性のチャンネル (半チャンネル) が形成されることが、変異酵素の解析や構造計算より予測されている。*a* サブユニットの TM2~5 はペリプラズム側の半チャンネル形成し、 H^+ は、*c* サブユニットの Asp-61 残基のカルボキシル基 (COO^-) に受け渡される。*c*-リングが *a* サブユニットに対して回転すると、別の Asp-61 残基のカルボキシル基から H^+ が遊離し、*a* および *c* サブユニットの境界面に形成された細胞質側の半チャンネルに放出される。ここを通過して、 H^+ は細胞質に輸送されることになる。酵素内回転を伴って連続的に起こる *c* サブユニットのプロトン化/脱プロトン化には、*a* サブユニットの Arg-210 残基 (+) が重要であることが示唆されている。

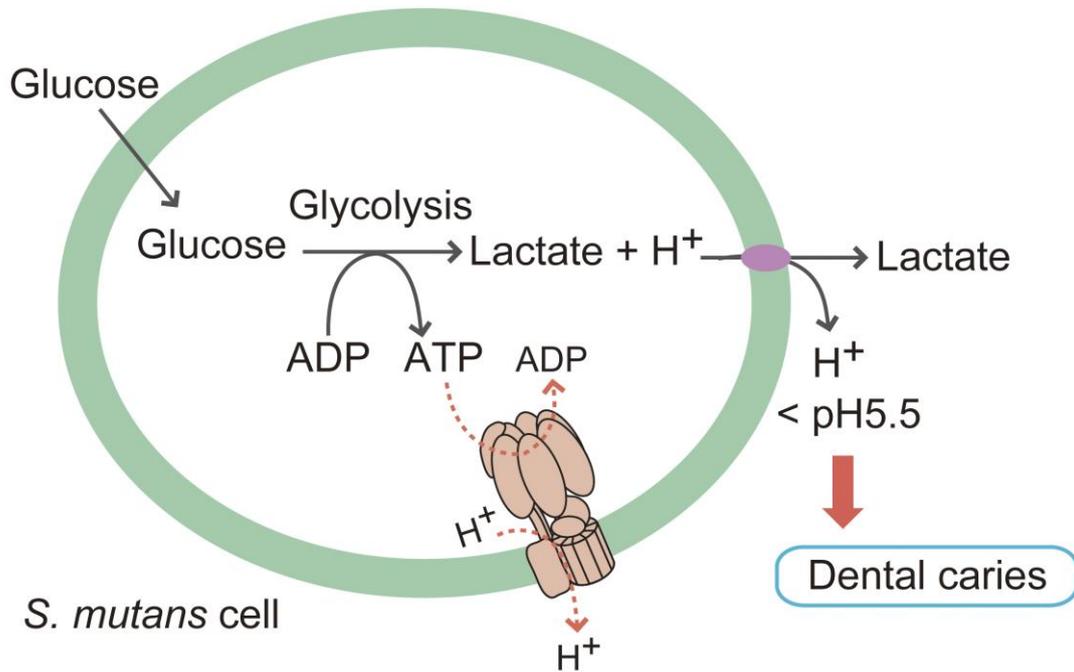


図 1-6 酸性環境で生育する *S. mutans* と F_0F_1

S. mutans が解糖系により乳酸を生成して細胞外部へ排出すると、口腔内 pH が低下する。pH 5.5 以下になると、歯のエナメル質が脱灰して、う蝕が引き起こされる。細胞膜に存在する F_0F_1 は、解糖系で得られた ATP を加水分解するのに共役して H^+ を細胞外に汲み出すと考えられているが、本酵素の詳細な解析はされておらず細胞における役割はよく分かっていない。

第二章 *S. mutans* F₀F₁の大腸菌細胞膜における発現

第一節 緒論

*S. mutans*の細胞膜にある F₀F₁は、細胞内部の pH の維持に関わる H⁺能動輸送酵素と考えられているが、これまでにそれを示す十分な知見は得られていない。本研究では、酸性環境に生育する *S. mutans* 細胞で本酵素が H⁺排出ポンプとしての役割を担っているのか明らかにするために、その性状を詳細に解析することにした。そのためには、本酵素を発現した膜画分を簡便に得ること、そして変異導入による機能領域の解析を行うことが必要であると考えた。そこで、大腸菌 F₀F₁ 欠損株の細胞膜に *S. mutans* 由来の F₀F₁ を発現させることを目的とし、オペロンを形成している八種類のサブユニット遺伝子のクローン化と発現プラスミドの構築を行った (図 2-1)。

細菌の細胞膜に発現するタンパク質は、翻訳途中のペプチドが認識されて膜に運ばれ、エネルギーを使って膜透過をされると考えられている (図 2-2A) (de Gier *et al.* 2003)。また、膜タンパク質が複合体を形成するとき、その分子集合を助ける因子も見つかっている (Kol *et al.* 2008)。これまでに、*S. mutans* の染色体 DNA より、新生タンパク質の膜透過と分子集合に関わると考えられている Ffh タンパク質とシグナル認識粒子 [SRP; Ffh および small cytoplasmic RNA (scRNA) から成る]、FtsY および YidC2 の遺伝子をそれぞれ欠損させた時、細胞膜画分の ATPase 活性が 40~80%に低下することが報告されていた (Hasona *et al.* 2005)。したがって、*S. mutans* の F₀F₁ のサブユニットが機能を持つ複合体として膜に分子集合するために、新生膜タンパク質の膜透過と分子集合に関わる *S. mutans* 由来の因子が必要かどうか検討する必要があると思われる。そこで、Ffh、scRNA、FtsY、YidC2 と、YidC2 に相同な YidC1 の遺伝子と SecYEG をそれぞれクローン化し、F₀F₁ の遺伝子と共に、大腸菌の F₀F₁

(ATP 合成酵素) 欠失株に導入することにした。

第二節 実験方法

第一項 *S. mutans* F₀F₁ 遺伝子のクローン化と発現プラスミドの構築

S. mutans UA159 株の全ゲノム配列は既に明らかとなっており、F₀F₁ の八種類のサブユニット遺伝子は約 6.3 kb のオペロンを形成していた (図 2-1A) (Ajdić *et al.* 2002; Smith *et al.* 1996)。そこで、塩基配列の情報を元にして、オペロンを 3 つの領域に分けて増幅するための特異的な PCR プライマーを作製した (表 2-1)。0.4 μM ずつの二種類のプライマー (組み合わせは、SM1F と SM1R、SM2F と SM2R または SM3F と SM3R)、200 μM dNTP、3.5 units DNA ポリメラーゼ [Expand Long Range (Roche 社製) または Pyrobest (Takara 社製)] を含む 20 μl の反応液に、*S. mutans* 染色体 DNA (前田 正知教授より分与) 7.5 ng を加えて、92°C で 10 秒、50°C で 20 秒、68°C で 3 分 20 秒の反応を 25 サイクル行った。部分的に重複するように増幅した 3.5 kb、1.5 kb、2.5 kb の断片を、pT7 Blue T-Vector (Novagen 社製) の *EcoRV* 部位に挿入し、それぞれ pTSM1、pTSM2、pTSM3 とした (図 2-1B)。クローン化した DNA 断片の塩基配列が報告されているものとすべて同一であることは、塩基配列決定によって確認した。

3 つの断片の連結は、以下のように行った (図 2-1B)。pTSM2 を *EcoRI* と *EcoT22I* で処理し、γ サブユニット遺伝子を含む 1,372 bp の DNA 断片を得た。pTSM3 を同じ酵素で消化して得られた 4,796 bp と結合し、pTSM4 (6,168 bp) を構築した。次にこれを *BsaHI* と *EcoRI* で処理して分離した 5,075 bp の断片と、pTSM1 を同じ酵素で処理して得られた *c* サブユニット遺伝子から α サブユニット遺伝子の一部までを含む DNA 断片 (4,343 bp) とを結合し、pTSM5 (9,418 bp) を得た。このプラスミドにはすべてのサブユニット遺伝子が含まれるが、*atpE* (*c* サブユニット遺伝子) の翻訳に必要なリボソーム結合配列 (SD

配列) が欠落していた。そこで、SMSDs および SMSDas から成る合成オリゴヌクレオチドの二本鎖 (表 2-1) を pTSM5 の *EcoRI*–*EcoRI* 領域 (81 bp) と置き換え、SD 配列を再生すると同時に新規の *SalI* 部位を挿入した (図 2-1B)。構築された pTSM7 の F₀F₁ 遺伝子全長を二ヶ所の *SalI* 部位で取り出し、ベクタープラスミド pTrc99A の *trc* プロモーターの下流に組み込んだ (図 2-1B)。pRSM1 と名付けたプラスミドは、*S. mutans* 由来の F₀F₁ 遺伝子を IPTG で発現誘導できる。これとは別に、大腸菌 F₀F₁ 遺伝子の弱いプロモーター (P₃) の下流に *S. mutans* F₀F₁ 遺伝子をすべて含む *SalI* 断片を結合し、pBSMP3 も構築した (図 2-1B)。pBSMP3 の α サブユニットおよび β サブユニット遺伝子の N 末端または C 末端に、myc タグ (EQKLISEEDL) または FLAG タグ (DTKDDDDDK) を、PCR 法を用いてそれぞれ導入し、七種類のプラスミドを構築した。表 2-2 に、それらのタグを導入するために用いたプライマーの配列を示した。

第二項 *S. mutans* の SRP、FtsY、YidC1、YidC2 および SecYEG をコードする遺伝子のクローン化

新生膜タンパク質の発現に関わる Ffh、scRNA、FtsY、YidC1、YidC2 および SecYEG の遺伝子をクローン化するため、それぞれの遺伝子に特異的なプライマーを作製して PCR で増幅した (表 2-3、図 2-2B)。どの遺伝子も、自身の持つプロモーター領域が含まれるように、上流の遺伝子の読み枠を一部含む形で増幅している。それぞれの遺伝子は、単独または組み合わせて、ベクタープラスミド pACYC177 に挿入した (図 2-2C)。複数の遺伝子をもつプラスミドは、pASRP が *ffh*、scRNA および *ftsY* を、pAyidC12 が *yidC1* および *yidC2* を、pAsecYEG が *secY*、*secE* および *secG* を含むように構築した。

第三項 菌株と培養条件

S. mutans の F₀F₁ 遺伝子を持つプラスミドは、これと相同な F₀F₁ 遺伝子をすべて欠失した大腸菌 DK8 株 (Δatp B-C, *ilv*::Tn10, *thi*) に導入した

(Klionsky *et al.* 1984)。大腸菌 F₀F₁ (ATP 合成酵素) の八種類のサブユニット遺伝子を持つプラスミド pBWU13.X (9,075 bp) は、pBWU13 (Moriyama *et al.* 1991) を改変して当研究室で作られたものを用いた。対照実験のため、これも同じ大腸菌株に導入した。

大腸菌の培養には、栄養培地として L-broth を用いた。必要に応じて 100 µg/ml アンピシリンを加えた。*S. mutans* F₀F₁ を発現誘導するとき用いた最少培地は、炭素源として 0.5 % グリセロールおよび 0.2 % グルコースを含む Tanaka 培地 [34 mM KH₂PO₄, 64 mM K₂HPO₄, 20 mM (NH₄)₂SO₄, 0.3 mM MgSO₄, 1 µM FeSO₄, 1 µM ZnCl₂, 10 µM CaCl₂, pH 7.0] に、宿主株の栄養要求性に応じて 40 µg/ml バリン、40 µg/ml イソロイシン、2 µg/ml チアミンを加えて用いた。50 µg/ml アンピシリンおよび 40 µg/ml カナマイシンは必要に応じて添加した。25°C で培養を行い、対数増殖期 (OD₆₅₀ = 0.4 付近) で 1 mM IPTG を添加したら、さらに 5 時間培養した。IPTG 濃度を 0.1 mM に減らしても、F₀F₁ の発現量はほとんど変わらないことが確認されている (野上、2012 卒業論文)。DK8/pBWU13.X は、同じ培地に 1 mM IPTG を添加せず、37°C で培養した。

第四項 反転膜小胞の調製

以下の操作は、全て 4°C で行った。培養液を 8,000×g で 10 分間遠心分離し、得られた沈殿を 40 ml の 50 mM Tris-HCl (pH8.0 at 25°C) に懸濁した。さらに 5,040×g の遠心分離を 10 分間行い、沈殿した菌体は使用するまで -80°C で保存した。

大腸菌細胞の反転膜小胞は、以前に報告された方法を改変して調製した (Iwamoto, 1991)。すなわち、緩衝液 A [10 mM MOPS-NaOH (pH7.0 at 25°C), 140 mM KCl, 0.5 mM DTT, 10% (v/v) グリセロール] に菌体を懸濁し、フレンチプレス (120 kPa/cm²) に通して破砕した。18,000×g で遠心分離して未破砕菌を除いたら、上清を 150,000×g で超遠心して反転膜小胞の画分を沈殿として分離した。それを緩衝液 A に懸濁後、同じ条件で遠心して洗浄した。沈殿を、集菌時の菌体量に応じて緩衝液 A に懸濁し (OD₆₅₀ × 300 µl)、液体窒素で凍結

した。膜画分は、使用するまで -80°C で保存した。*S. mutans*の F_0F_1 を発現させた反転膜小胞は、3日以内に使用した。大腸菌 F_0F_1 を発現させた膜は、1ヶ月以内に使用した。

第五項 ウェスタンブロッティングによるサブユニットの検出

反転膜小胞にそれぞれの F_0F_1 が存在しているかを調べるために、膜タンパク質を、0.2% SDSを含む10%または15%ポリアクリルアミドゲル電気泳動より分離し(Laemmli 1970)、ニトロセルロース膜またはフッ化ビニリデン(PVDF)膜に転写した(Towbin *et al.* 1979)。一次抗体には、*S. mutans*の α サブユニットのC末端領域(TTYIGKKVNIDTKGN)および β サブユニットのN末端領域(STGKIAQVVGPVVPV)を抗原として作成したペプチド抗体(オペロンバイオテクノロジー社製)を用いた。また、抗myc抗体(Bethyl Laboratories社製)および大腸菌 F_1 に対するウサギ抗血清も用いた。二次抗体は、ヤギ由来のIgG-HRP結合抗ウサギ抗体(GE Healthcare社製)を用いた。抗体に反応したタンパク質をChemi-lumi oneまたはChemi-lumi one super(ナカライテスク社製)で化学発光により可視化し、LAS-3000(富士フィルム社製)で撮影した。

第六項 その他の方法と試薬

反転膜小胞のタンパク質定量は、Lowry法により、ウシ血清アルブミンを標準試料として用いて行った(Lowry *et al.* 1951)。

第三節 結果

第一項 *S. mutans* F 型 H⁺-ATPase (F₀F₁) 遺伝子の大腸菌への導入

S. mutans の F₀F₁ の性状を大腸菌で発現させて調べるため、八種類のサブユニットを含む約 6.4 kb の *atp* オペロンをクローン化した (図 2-1)。*trc* プロモーター (P_{*trc*}) の下流に F₀F₁ 遺伝子をつないだ pRSM1 を構築し、内在性の F₀F₁ 遺伝子を欠失した大腸菌 DK8 株に導入した (DK8/pRSM1)。IPTG を加えて培養すると、細胞膜画分に、*S. mutans* の *a* および β サブユニットに対する抗体と反応するバンドが現れた (図 2-3、レーン 1)。それぞれ約 25 kDa と 50 kDa のタンパク質であり、分子量から *S. mutans* F₀F₁ の *a* および β サブユニットであると思われた。以前に報告されている大腸菌変異株の解析によって、八種類のサブユニットが一つでも欠失していると、F₀F₁ 複合体は細胞膜へ十分に分子集合できないことが示唆されている (Futai *et al.* 1989)。このことから、F₀ の *a* サブユニットおよび F₁ の β サブユニットは、残りすべてのサブユニットと分子集合して、大腸菌の細胞膜に発現したと考えた。

F₀F₁ の遺伝子を弱いプロモーターに結合した pBSMP3 を導入した株の場合 (DK8/pBSMP3) (表 2-4、実験 1 および 2)、その膜画分には、ウェスタンブロッティングによって β および *a* サブユニットは殆ど検出されなかった (データ未掲載)。それらのサブユニットの N 末端に FLAG タグまたは myc タグを導入した場合も、また、タグの位置を N 末端から C 末端に変えた場合でも (表 2-4、実験 3~8) 同様であった (データ未掲載)。これらの反転膜小胞では ATPase 活性も検出されなかった (< 0.07 $\mu\text{mol}/\text{mg} \cdot \text{min}$)。

第二項 *S. mutans* の SRP、FtsY、YidC1、YidC2 および SecYEG の遺伝子導入による F₀F₁ の分子集合への影響

S. mutans の染色体 DNA より、八種類の遺伝子 (*ffh*、*scRNA*、*ftsY*、*yidC1*、*yidC2*、*sec Y*、*sec E*、*sec G*) をそれぞれクローン化した (図 2-2B および C)。

これらの遺伝子を持つプラスミドを pRSM1 (前述; IPTG 誘導により *S. mutans* F₀F₁ の遺伝子を発現する) と共に大腸菌 DK8 株に導入して反転膜小胞を調製し、ウェスタンブロッティングを行った。しかし、どの場合にも β サブユニットと α サブユニットは増加しなかった (図 2-3)。むしろ、YidC1 の遺伝子を導入した場合には、両方のサブユニットが共に検出されなくなった (図 2-3、レーン 4)。pBSMP3 (前述 ; *S. mutans* F₀F₁ の遺伝子上流に弱いプロモーターを持つ) と共に大腸菌 DK8 株に導入した場合にも (表 2-4、実験 9~22)、α サブユニットも β サブユニットも殆ど検出されなかった (データ未掲載)。したがって、*S. mutans* の F₀F₁ は、大腸菌の新生膜タンパク質の細胞膜への挿入経路を利用して、細胞膜に分子集合したものと考えた。これ以降の章では、pRSM1 のみを大腸菌 DK8 株に導入したものを培養し、実験に用いることとした。

第四節 考察

本章では、*S. mutans* の F₀F₁ の性状を詳細に解析するために、大腸菌の F₀F₁ 欠損株 (DK8) の細胞膜に本酵素を発現させることを目的とし、遺伝子のクローニングと発現プラスミドの構築を行った。グラム陽性細菌である *S. mutans* は、厚いペプチドグリカン層をもつために細胞の破碎が不十分となりやすい。ペプチドグリカン層の薄い、グラム陰性細菌の大腸菌で発現させることで細胞膜面分を容易に得て、酵素の性状が解析できると考えた。また、遺伝子をプラスミドに乗せることで、部位特異的な変異の導入が行えるようになると考えた。実際に、*Aphanothece halophytica*、*I. tartaricus* など、異種の細菌由来の F₀F₁ を大腸菌で発現させ、性質を詳しく調べた複数の研究が報告されている (Soontharapirakkul *et al.* 2011; Hakulinen *et al.* 2012)。

S. mutans の F₀F₁ 遺伝子を誘導性の *trc* プロモーターの下流に結合した発現プラスミド (pRSM1) を大腸菌 DK8 株に導入した。IPTG を添加すると、細胞膜面分に F₀F₁ が発現した (図 2-3)。α サブユニットおよび β サブユニットの

開始コドンは、一般的でない TTG であったが、タンパク質の翻訳は開始されたということを示している。一方、弱いプロモーター (P_3) を用いた場合、 F_0F_1 は発現しなかった。すなわち、本酵素遺伝子が大腸菌細胞膜へ発現できたのは、*trc* プロモーターによる高い転写量のためだったと考えた。これは、以前の研究で、大腸菌 F_0F_1 を転写活性の高いプロモーターから発現させられなかったこととは対照的な結果であった (Moriyama *et al.* 1991)。大腸菌にとって異種の *S. mutans* のタンパク質は、翻訳または膜への組み込み過程が遅いこと、あるいは、タンパク質の分解効率が高いことによって、十分な発現のために mRNA を大量に必要とするのかもしれない。しかしながら、それらを確認する実験は行っていない。

これまでに、大腸菌 F_0F_1 の膜内在性の *a* サブユニットおよび *b* サブユニットが膜に局在化するには、Sec 依存性の経路が関与すると示唆されてきた (Kol *et al.* 2009; Yi *et al.* 2004) (図 2-2A)。ペプチドを膜に組込む膜タンパク質輸送経路では、SRP がリボソームで合成されている新生ポリペプチド鎖を認識すると、細胞膜に存在する FtsY を介して SecYEG 複合体 (トランスロコン) に標的化されると考えられている (Buskiewicz *et al.* 2004; Kol *et al.* 2008)。YidC はこの複合体と相互作用すると考えられているが (Mori *et al.* 2001) (図 2-2A)、 F_0 の *c* サブユニットの膜への組み込みには、YidC が単独で関与することが示唆されている (Kol *et al.* 2006)。大腸菌と *S. mutans* の膜タンパク質の分子集合の機構がどの程度保存されているのか詳細は分からないが、*S. mutans* 細胞膜への F_0F_1 の分子集合には、少なくとも SRP、FtsY および YidC2 の関与が示唆されている (Hasona *et al.* 2005)。また、大腸菌の YidC 欠損株に *S. mutans* 由来の YidC2 遺伝子を導入したところ、大腸菌 F_0F_1 の *a* サブユニットおよび *c* サブユニットが膜へ局在化できることが示されている (Dong *et al.* 2008)。本研究で、*S. mutans* 由来の因子が無くても *S. mutans* F_0F_1 が大腸菌細胞膜に分子集合したことは明らかだった。すなわち、*S. mutans* の新生ペプチドは、大腸菌の膜タンパク質組み込み機構を利用したということが示唆された。

表 2-1 *S. mutans* F₀F₁ 遺伝子のクローン化に用いたプライマー

Primers	Sequences
SM1F	5' acaaacctgcaaaataggac 3'
SM1R	5' ttctggaagatctttcgttg 3'
SM2F	5' aacttgaagcctttacacag 3'
SM2R	5' taaaccatcagttgactcca 3'
SM3F	5' actagcctttgaattacgtg 3'
SM3R	5' cttagttttcgcaaagtgga 3'
SMSDs	5' aatcgtcgacgaaggagaag 3'
SMSDas	5' cttctccttcgtcgacgaatt 3'

表 2-2 *S. mutans* の α サブユニットおよび β サブユニットへの FLAG タグおよび myc タグの導入に用いたプライマー

以下のプライマーを用い、pBSMP3 を鋳型として PCR を行った。増幅した DNA 断片を F₀F₁ の発現プラスミドの相当する領域に置き換え、*S. mutans* の α サブユニットおよび β サブユニットの N 末端または C 末端に、FLAG タグまたは myc タグを導入した。下線部は FLAG タグおよび myc タグをコードする配列を示している。

Subunits	Tags	Primers	Sequences (5' → 3')
α	N-FLAG	Fwflag	<u>gattataaagatgatgatgataaag</u> aaaaacaataaaatccaacggtt
		Rvflag	tttatcatcatctttataatccaactctaattcccccttttc
	C-FLAG	FwSaflag-C	<u>gattataaagatgatgatgataaata</u> aagaaaggagcagtgattt
		RvSaflag-C	tttatcatcatctttataatcattgccttttagtatcaatat
	N-myc	FwSamyc-N	<u>gaacaaaaacttattagcgaagatctt</u> gaaaaacaataaaatccaac
		RvSamyc-N	aagatcttcttcgctaataagtttttgttccaactctaattccccctttt
C-myc	FwSamyc-C	<u>gaacaaaaacttattagcgaagatctt</u> taagaaaggagcagtgattt	
	RvSamyc-C	aagatcttcttcgctaataagtttttgttccattgccttttagtatcaatat	
β	N-myc	FwSMbeta-myc	<u>gaacaaaaacttattagcgaagaagatctt</u> gctactggaaagattgtc
		RvSMbeta-myc	aagatcttcttcgctaataagtttttgttccattttttctcctttta

表 2-3 *S. mutans* の SRP、FtsY、YidC1、YidC2 および SecYEG をコードする遺伝子のクローン化に用いたプライマー

Primers	Sequences
FwscRNA2	5' gtcttaagttggcagttt 3'
RvscRNA	5' acaggaatggctattatcag 3'
FwftsY	5' cggtttgagtactgcaatggcaaagtgtgc 3'
RvftsY	5' tctaggtacagtaaacatgtatc 3'
Fwffh	5' tgtattctgactacgtcgtc 3'
Rvffh	5' acgataatgacaatgatgga 3'
FwSecY	5' aagactgcagcgcgcggacaaaaagggcaaaaagctc 3'
RvSecY	5' ttattggatgcccttgagca 3'
FwSecE	5' atgcagtgatttcaacagaa 3'
RvSecE	5' atccatgatttacctccatt 3'
FwSecG	5' taatctgcagtgttcacattgtggcagtaaa 3'
RvSecG	5' aatcggaacagcctacttca 3'
FwyidC1	5' ggaaatgctgcagttagaGCtCcgattaaacgaaaattgctc 3'
RvyidC1	5' tagaagcagtggtgctgccgat 3'
FwyidC2	5' ctcagtcagataatgctgaa 3'
RvyidC2	5' aggtggatccgttgataacaggtaccgtttagtcaatgagacgat 3'

表 2-4 F₀F₁サブユニットのタグの位置と SRP、FtsY、YidC1 および 2、SecYEG の遺伝子を持つプラスミドを大腸菌に導入した組み合わせ

弱いプロモーターを持つ *S. mutans* F₀F₁ のプラスミド (pBSMP3) の α サブユニットおよび β サブユニットの N 末端または C 末端に、myc タグまたは FLAG タグを様々な組み合わせで導入した。それらの F₀F₁ 遺伝子と共に YidC1、YidC2、SRP、FtsY、Sec YEG の遺伝子を持つプラスミド (図 2-2C) を組み合わせて大腸菌 DK8 株に導入した。

No.	subunit α		subunit β	Plasmids
	myc	FLAG	myc (N-terminal)	
1	—	—	—	—
2	—	—	+	—
3	—	N	—	—
4	—	N	+	—
5	—	C	—	—
6	—	C	+	—
7	N	—	—	—
8	N	—	+	—
9	N	—	+	pAydC1
10	N	—	+	pAydC2
11	N	—	+	pAydC12
12	N	—	+	pASRP
13	N	—	+	pAsecYEG
14	N	—	+	pASRP/SecYEG/YidC
15	C	—	—	—
16	C	—	+	—
17	C	—	+	pAydC1
18	C	—	+	pAydC2
19	C	—	+	pAydC12
20	C	—	+	pASRP
21	C	—	+	pAsecYEG
22	C	—	+	pASRP/SecYEG/YidC

N および C は、タグを導入した末端を示している。+はタグを導入したもの、—は導入していないものを示している。

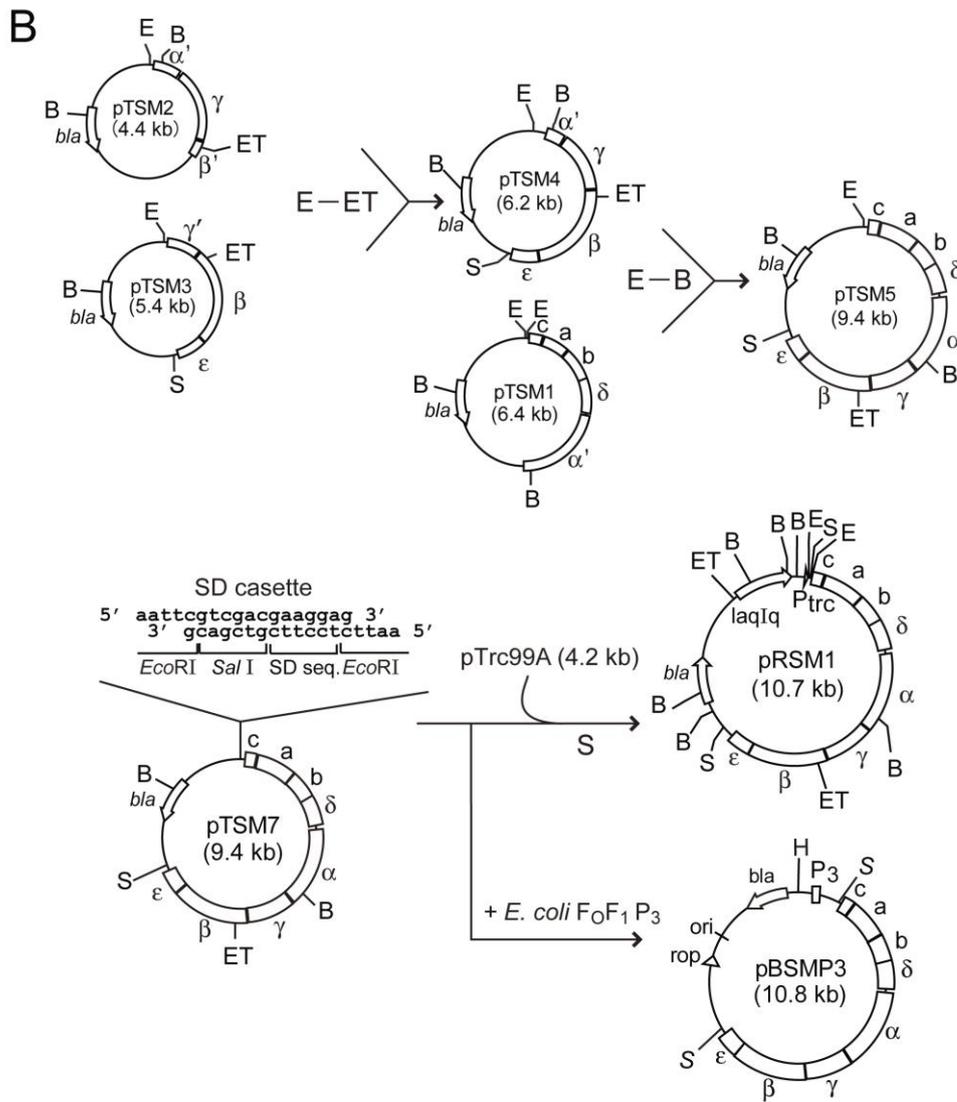
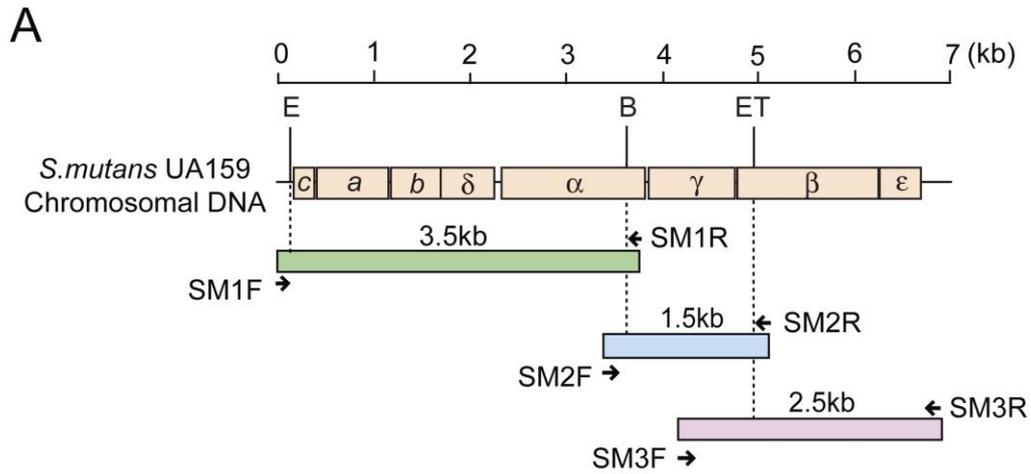


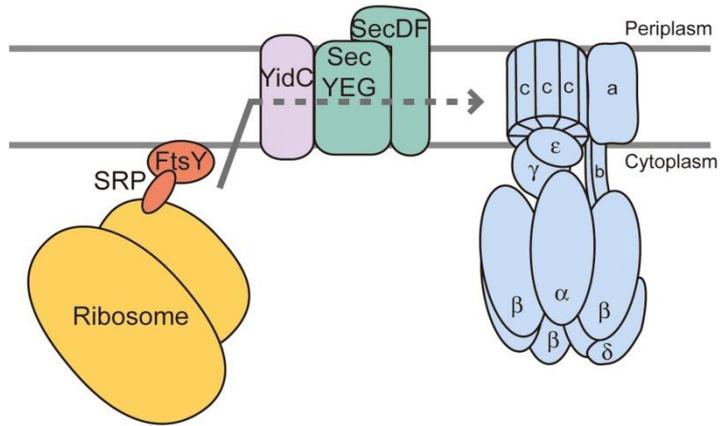
図 2-1 *S. mutans* F₀F₁ 遺伝子のクローン化と発現プラスミドの構築 (つづく)

(A) PCRによる *S. mutans* F₀F₁ 遺伝子領域の増幅。 *S. mutans* の遺伝子は八種類のサブユニットがオペロンを形成している。 *S. mutans* UA159 株の染色体 DNA を鋳型として、SM1F-SM1R、SM2F-SM2R、SM3F-SM3R のプライマーの組み合わせで PCR を行い、それぞれ、3.5 kb、1.5 kb、2.5 kb の DNA 断片を増幅した。

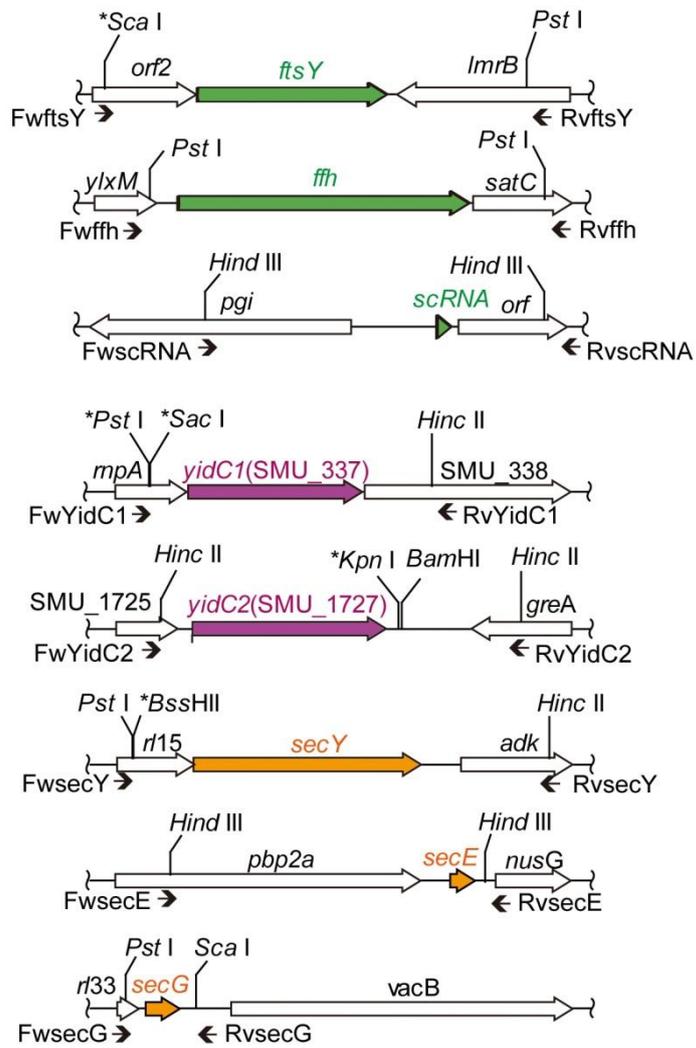
(B) *S. mutans* F₀F₁ 遺伝子の発現プラスミドの構築。増幅した DNA 断片を pT7 Blue-T vector (Novagen 社製) の *EcoRV* 部位に挿入し、それぞれ、pTSM1、pTSM2、pTSM3 とした。pTSM1、pTSM2 および pTSM3 の各部分を順につなぎ合わせて pTSM5 とした。 *c* サブユニット遺伝子上流にの *EcoRI* 部位に、リボソーム結合配列と *SalI* 部位を形成する二本鎖のオリゴヌクレオチドカセット (SMSDs および SMSDas) を組み込み、pTSM7 を構築した。 *Sal I* で処理して取り出した全長の酵素遺伝子は、IPTG 誘導性の P_{trc} および大腸菌 F₀F₁ の弱いプロモーター (P₃) の下流に結合し、それぞれ pRSM1 および pBSMP3 とした。

(B, *Bsa* HI; E, *Eco* RI; ET, *Eco* T22I; S, *Sal* I)

A



B



C

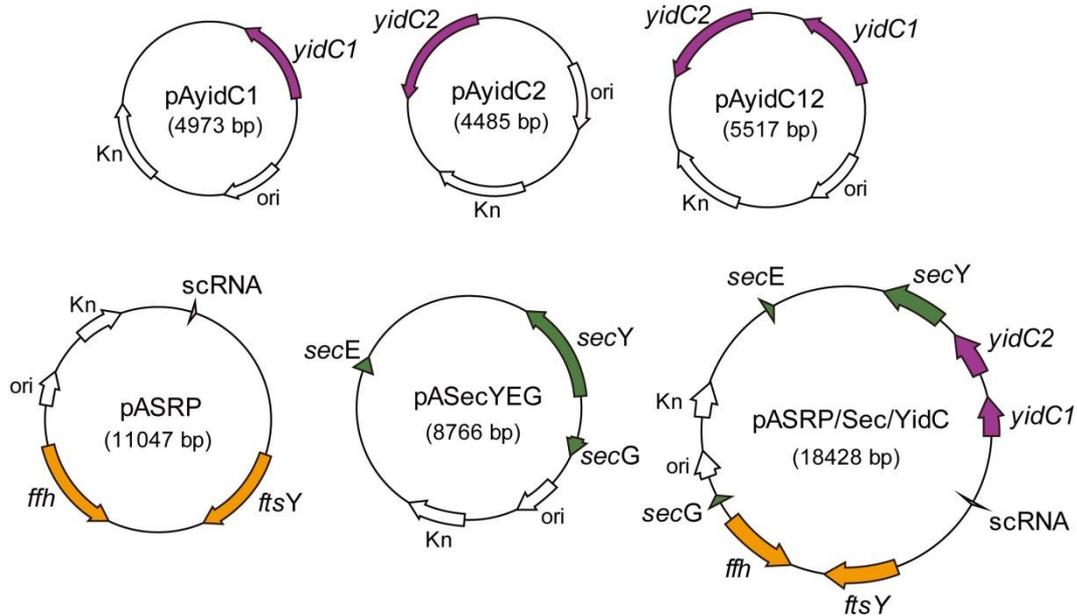


図 2-2 *S. mutans* の新生膜タンパク質の膜へ組み込みに関わる遺伝子のクローン化

(A) 大腸菌における膜タンパク質の細胞膜への標的化、挿入および分子集合に関わる Sec 依存性の経路。一般的に考えられている細菌の Sec 依存性の膜挿入経路を示した (du Plessis *et al.* 2011)。この経路では Ffh および scRNA からなる SRP が、新生ポリペプチド鎖を認識して細胞膜に存在する FtsY に結合すると、新生膜タンパク質が Sec 輸送体に標的化されることが考えられている。Sec 輸送体は、SecYEG チャンネルと SecDFYajC 複合体から成り、この複合体と YidC が相互作用してタンパク質の膜への組み込みを行うと考えられる。大腸菌 ATP 合成酵素の *a* サブユニットの膜挿入には、SRP、SecYEG、SecDF および YidC、*b* サブユニットの膜挿入には SRP、SecDF および YidC が関与することが示唆されている (Yi *et al.* 2004)。また、*c* サブユニットは YidC が単独で関与することが示唆されており、Sec 非依存性の経路で膜挿入されることが考えられている。

(つづく)

(B) *ffh*, *scRNA*, *ftsY*, *yidC1*, *yidC2*, *secYEG* 遺伝子のクローン化。*S. mutans* UA159 株の *ffh*, *scRNA*, *ftsY*, *yidC1*, *yidC2*, *secYEG* 遺伝子は、染色体 DNA の異なる領域に位置している。図には、それらの遺伝子を、前後の遺伝子と共に示した。また、それぞれの遺伝子を増幅するのに使ったプライマーの結合位置を示した (矢印)。染色体 DNA を鋳型とした PCR によって、上記の各遺伝子の全長とそのプロモーターを含んだ領域を増幅し、クローン化した。

(C) SRP, FtsY, YidC1 および 2, SecYEG の遺伝子を含むプラスミドの構築。増幅した各遺伝子は、それぞれ pACYC177 ベクターに組み込んで、pAyidC1、pAyidC2、pAyidC12、pASRP、pASecYEG および pASRP/Sec/YidC を構築した。

第三章 *S. mutans* 由来の F_0F_1 の性状解析

第一節 緒論

第二章で述べたように、クローン化した *S. mutans* F_0F_1 のサブユニット遺伝子を IPTG 誘導によって転写させると、大腸菌細胞の膜面分に発現して複合体 (SF_0F_1) を形成することができた。これによって、本酵素の性状を分子レベルで明らかにする端緒を開いたと考える。まず、酸性環境で生存する *S. mutans* の酵素の特性を明らかにするため、様々な pH で反転膜小胞の ATPase 活性および H^+ 輸送を検討した。*S. mutans* 由来の *c* サブユニットが大腸菌の残りの七種類のサブユニットと共にハイブリッド複合体を形成できることが、Araki らにより報告されている (Araki *et al.* 2013)。大腸菌細胞は *c* サブユニット-ハイブリッド酵素で ATP 合成を行って生育することができたが、pH 7.5 では pH 5.5 より生育が遅かった。したがって、*S. mutans* 酵素の活性は大腸菌とは異なる pH 依存性を示す可能性があると考えた。

F_0F_1 の阻害剤として、アジ化物イオンおよび *N,N'*-ジシクロヘキシルカルボジイミド (DCCD) がしばしば用いられる (Kobayashi *et al.* 1977; Hermolin *et al.* 1989)。これらの化合物は、結晶構造もしくは放射性同位体を用いた化学修飾実験により、それぞれ結合部位が明らかになっている (図 3-1) (Symersky *et al.* 2012; Sebald *et al.* 1980; Bowler *et al.* 2006)。アジ化物イオンは、触媒部位近傍に結合して ADP の遊離を阻害するため ATPase 活性を低下させる。DCCD の結合部位は触媒部位ではなく、*c* サブユニット膜貫通領域の保存された Asp または Glu 残基である。大腸菌では、 H^+ 輸送に必須な Asp-61 残基にあたる。この残基に DCCD が結合すると H^+ 輸送が阻害されるだけでなく、おそらく立体障害によって酵素内のサブユニット複合体の回転を阻害するため、

ATP 合成／分解の触媒反応が連続して起こらず活性が低下することになる。大腸菌の F_0F_1 ではこれらの阻害剤に対する感受性がよく調べられているので、 SF_0F_1 の特性を知る手がかりとして、阻害効果が大腸菌酵素 (EF_0F_1) と比較した。

これまで *S. mutans* 細胞膜の ATP 依存的な H^+ 輸送 (能動輸送) については、明確な観察結果が全くなかった。 F_0 部分にある H^+ 輸送路の性質を詳しく調べるために、*S. mutans* 由来の F_0 と大腸菌由来の F_1 から成るハイブリッド酵素 (EF_0SF_1) の遺伝子を構築することにした。 F_0 と F_1 のサブユニット遺伝子は、それぞれクラスターを形成している (図 3-2A)。 EF_0SF_1 を発現した大腸菌の膜画分の性質についても、 SF_0F_1 および EF_0F_1 と同時に解析した。

第二節 実験方法

第一項 用いたプラスミドと菌株、培養条件

本研究で構築した *S. mutans* の F_0F_1 遺伝子を持つ pRSM1、および以前に構築されていた大腸菌の F_0F_1 遺伝子を持つ pBWU13.X については、すでに第二章で述べた (表 3-1)。

S. mutans の F_0 部位と大腸菌の F_1 部位のサブユニット遺伝子を結合した発現プラスミドを構築するため、pRSM1 および pBWU13.X を鋳型として組換え PCR を行った。このとき、二種の遺伝子は *b* サブユニットの遺伝子の途中で組換えることにした (表 3-1)。すなわち、構築された pTrec-cab'SE1 の *a* および *c* サブユニット遺伝子に加えて *b* サブユニット遺伝子の Met-1~Ala-53 をコードする領域までは pRSM1 と同じであるが、それより C 末端側の Glu-54~Ala-165 (C 末端) をコードする領域は、大腸菌サブユニットの相同な領域 (Glu-48~Leu-156) で置き換えた (図 3-2A、図 3-3A)。

第 2 章と同様に、プラスミドの宿主として大腸菌 DK8 株 ($\Delta atp B-C, ilv::Tn10$,

thi) (Klionsky *et al.* 1984) を用いた。また、大腸菌の KY7230 株 (*asn, thi, thy, rpoB*) (Cedar and Schwartz 1969) は野生型の F₀F₁ 遺伝子 (*atp B-C*) をすべて含んでいる。

栄養培地と最少培地は、第二章と同じものを用いた。1.5%の寒天を含む最少培地にて異なる F₀F₁ 遺伝子を持つ大腸菌の生育を比較する場合には、単一の炭素源として 0.2% グルコースもしくは 0.4% コハク酸ナトリウムを用いた。また、0.1 M リン酸緩衝液は、培地の pH を変えるために pH 5.0~7.0 に調整して用いた。IPTG 濃度は 0~1mM の様々な濃度になるように寒天培地に塗布し、25°C で 72 時間まで培養した。ただし、KY7230 の培養には IPTG を加えなかった。

S. mutans GS-5 株は、0.2% グルコースを含む Heart infusion broth (HIB) (Becton Dickinson 社製) で、対数増殖期の後期まで 37°C にて培養した。集菌する直前、培地の pH は約 5 になっていた。

第二項 *S. mutans* の反転膜小胞の調製

S. mutans 細胞より膜小胞を調製する方法は、Hasona らの方法を一部改変して用いた (Hasona *et al.* 2007)。*S. mutans* 培養液を 8,000×g で 10 分間遠心分離して集菌し、得られた沈殿を 40 ml の 50 mM Tris-HCl (pH 7.0 at 25°C) に懸濁した。5,040×g の遠心分離を 10 分間行い、沈殿の菌体を使用するまで -80°C で保存した。

S. mutans 細胞は、2 mg/ml lysozyme を含む緩衝液 A [20% (w/v) ショ糖, 10 mM MgCl₂, 20 mM Tris-HCl (pH 7.0 at 25°C)] に懸濁して、37°C で 3 時間インキュベーションした。5,040×g で 10 分間の遠心分離により集菌した細胞は、緩衝液 B [10 mM MOPS-NaOH (pH 7.0 at 25°C), 140 mM KCl, 0.5 mM DTT, 10% (v/v) グリセロール] に再懸濁し、フレンチプレス (120 kPa/cm²) に 2 回通して破碎した。18,000×g で 15 分間遠心して未破碎菌を除いた後、さらに 150,000×g で 1 時間の超遠心を行って、膜画分を分離した。緩衝液 B に再懸濁

し、同条件で遠心分離して洗浄したら、沈殿（反転膜小胞）を少量の緩衝液 B で懸濁した。液体窒素で凍結した膜画分は、使用するまで -80°C で保存した。

S. mutans の反転膜小胞は、3 日以内に使用した。

第三項 大腸菌の反転膜小胞および EDTA 抽出画分の調製

大腸菌細胞から反転膜小胞を調製する方法は、第二章で述べた。 F_0F_1 を持つ反転膜小胞を低イオン強度の緩衝液で洗うと、膜から F_1 部位が遊離することが知られている (Futai *et al.* 1974)。 F_1 部位を分離するために、大腸菌の反転膜小胞を 0.5 mM EDTA、10 % (v/v) グリセロールを含む 1 mM MOPS-NaOH (pH 7.0 at 25°C) に懸濁して氷上で 30 分間静置した。 $125,000 \times g$ で一時間遠心分離して得られた上清を、 F_1 を含む EDTA 抽出画分として用いた。

第四項 ATPase 活性の測定

ATPase 活性は、反転膜小胞および EDTA 抽出画分に含まれる酵素が、ATP を加水分解して遊離するリン酸量を測定することにより調べた (Futai *et al.* 1974)。反応は、2 mM MgCl_2 、4 mM ATP、140 mM KCl、2 $\mu\text{g/ml}$ ウシ血清アルブミン (BSA) 存在下で 37°C にて行った。様々な pH で ATPase 活性を測定するためには、反応液に MES-NaOH (pH 4.0~6.0)、MOPS-NaOH (pH 7.0 または 7.5) または Tris-HCl (pH 8.0 または pH 9.0) を終濃度 20 mM になるように加えた。

酵素活性に対する、異なる pH によるインキュベーションの効果調べた。140 mM KCl、2 $\mu\text{g/ml}$ BSA を含む pH 5.5~8.0 の上と同じ 20 mM の緩衝液に、大腸菌の細胞膜画分を 0.3 mg/ml になるように添加し、 37°C にて 0~10 時間インキュベーションした。サンプルの一部を採取して、上記の方法で pH 7.0 における ATPase 活性を測定した。

第五項 ATPase 活性に対する阻害剤の効果

アジ化ナトリウムは、反転膜小胞を 10 mM MgCl₂、5 mM ATP を含む 50 mM MES-NaOH (pH 6.0 at 37°C) の溶液中に懸濁したところへ、終濃度 0~100 mM になるように添加した。直ちに ATPase 活性を測定した (Sutton *et al.* 1987)。

DCCD の ATPase 活性に対する影響を調べる場合には、0~1 mM DCCD および 6.7 mM MgCl₂ を含む 50 mM MOPS-NaOH (pH 7.5 at 25°C) または MES-NaOH (pH 6.0 at 25°C) の緩衝液に、反転膜小胞または EDTA 抽出画分を添加して、25°C で 15 分間インキュベーションした。その一部を分取して、5.6 mM ATP、3 mM MgCl₂、20 mM MOPS-NaOH (pH 7.5 at 25°C) または MES-NaOH (pH 6.0 at 25°C) の存在下で ATPase 活性を測定した。

また、DCCD とインキュベーション中に膜画分から F₁ が遊離していないことを確認するため、反転膜小胞 150 µg タンパク分を pH 6.0 および 7.0 の反応の条件でインキュベーションした後、125,000×g で 30 分間の遠心分離を行った。沈殿のタンパク質を SDS-PAGE で分離し、第二章で述べたのと同じ方法でウェスタンブロッティングを行った。

第六項 H⁺輸送の測定

ATP 加水分解に共役した H⁺輸送は、蛍光性のアミンである 9-amino-6-chloro-2-methoxyacridine (ACMA) の蛍光強度を指標として測定した (Zhang *et al.* 1994)。能動輸送された H⁺の濃度が反転膜小胞内で上昇すると、ACMA はそれと共に小胞内に蓄積し、濃度消光を起こす。

まず、140 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 1 µM ACMA を含む 10 mM MES-NaOH (pH 5.0~6.5 at 25 °C) または MOPS-NaOH (pH 7.0 または 7.5 at 25 °C) の緩衝液 2.0 ml に、反転膜小胞 300 µg を懸濁した。ACMA はジメチルスルホキシド (DMSO) に可溶化して、測定の直前に緩衝液に加えた。1 mM ATP を添加することにより反応を開始し、410 nm の励起波長により生じる 490 nm の蛍

光強度の変化を、蛍光分光光度計 (F-2000、日立工機社製) によって観察した。脱共役剤である 2,6-di-*t*butyl-4-(2',2'-dicyanovinyl) phenol (SF6847) を 1 μ M になるよう添加し、観察を終了した。測定は 25 $^{\circ}$ Cにて行った。測定条件は 0~300 mM KCl、5~20 mM MgCl₂ 存在下で 25~37 $^{\circ}$ Cにて検討し、上記の条件が濃度消光の最も大きい条件であることを確かめている。

第七項 SF₀F₁または EF₀F₁ 含む反転膜小胞の NADH 消費量と ATP 合成活性の測定

反転膜小胞の ATP 合成活性を測定するにあたり、まず、それぞれの膜の電子伝達鎖が活性を持っているかを NADH の消費速度によって調べた (Jones 2001)。反転膜小胞 1.5 μ g を、0.6 mM ADP、6 mM 無機リン酸、5 mM MgCl₂ を含む 50 mM MOPS-NaOH (pH 7.0 at 25 $^{\circ}$ C) に懸濁し、0.1 mM NADH を添加した。NADH の酸化速度は 340 nm の吸光度の減少速度より算出した。

SF₀F₁または EF₀F₁ 含む反転膜小胞の ATP 合成活性は、電子伝達鎖によって形成された H⁺の電気化学的ポテンシャル差を利用して駆動し、生成した ATP の量はルシフェリンの化学発光によって測定した (Suzuki *et al.* 2007; Tomashek *et al.* 2004)。すなわち、0.1~1.0 mM ADP, 1~10 mM 無機リン酸, 5 mM MgCl₂, 2.1 mM NADH, 50 mM MOPS-NaOH (pH 7.0 at 25 $^{\circ}$ C) の反応液に 30 μ g の反転膜小胞を添加し、25 $^{\circ}$ Cにて ATP 合成反応を開始した。トリクロロ酢酸 (TCA) を 0.4 N になるよう添加して反応を終えたら、0.46 M Tris 溶液を添加して反応停止液の pH を 8.0 に戻した。この溶液 50 μ l に等量のルシフェリン/ルシフェラーゼ試薬 (ATP Bioluminescence assay kit CLSII, Roche 社製) を混合し、ルミノメーター (Centro LB960, ベルトールド社製) により発光量を測定した。ATP 合成活性は、反転膜小胞を調製した当日中に測定した。

第八項 その他の方法と試薬

反転膜小胞のタンパク質定量は第 2 章と同様に行った。ウェスタンブロッテ

イングも第二章と同様に行ったが、大腸菌 F_0F_1 のサブユニットを検出するためには抗大腸菌 F_1 抗体を用いた。

第三節 結果

第一項 大腸菌の細胞膜画分における SF_0F_1 および EF_0F_1 の分子集合

大腸菌細胞で発現させた *S. mutans* 由来の F_0F_1 (SF_0F_1) の性状を詳細に調べるにあたって、まず、*S. mutans* の細胞膜にある F_0F_1 と比較した。それぞれ反転膜小胞を調製し、ウエスタンブロッティングを行ったところ、 SF_0F_1 の a サブユニットおよび β サブユニットが、同じ位置に見られた (図 3-2B、レーン 1 および 2)。ウエスタンブロッティングのバンド強度は、 SF_0F_1 を含む大腸菌膜 2 μg を用いたときと、*S. mutans* から調製した膜画分 30 μg を用いた場合がほぼ同じであった。そのため、大腸菌の膜に含まれる SF_0F_1 の量は、*S. mutans* の膜に含まれる F_0F_1 の約 15 倍であると考えられた。 SF_0F_1 を含む大腸菌膜画分と *S. mutans* 細胞膜画分の ATPase 活性 (pH 7.0) は、それぞれ 4.5 $\mu\text{mol}/\text{mg} \cdot \text{min}$ および 0.31 $\mu\text{mol}/\text{mg} \cdot \text{min}$ であり、 β サブユニットの存在比と大体一致していた (図 3-4)。

第二項 SF_0EF_1 を発現するプラスミドの構築と大腸菌細胞膜での発現量

SF_0F_1 の F_1 部位 (SF_1) を大腸菌由来の F_1 (EF_1) で置き換えるよう遺伝子を連結したプラスミドを構築し、大腸菌 DK8 株に導入した (表 3-1、図 3-2)。ただし、 F_0 の b サブユニットは、 F_1 のサブユニットとも相互作用している。アミノ末端側から順に、膜貫通ドメイン、つなぎ領域、二量体形成ドメイン、 δ サブユニット結合ドメインを形成していることが大腸菌のサブユニットで示唆されており (図 3-3A) (Revington, 1999)、膜貫通ドメインは a サブユニットと、 δ サブユニット結合ドメインは膜表在性のサブユニットと相互作用している

(Weber 2006; Brandt *et al.* 2013)。そこで、二種類の細菌のアミノ酸配列を比較し、他のサブユニットとは相互作用しないと思われるつなぎ領域で *b* サブユニット遺伝子を結合した (図 3-2A、図 3-3)。

IPTG で発現誘導した大腸菌細胞の反転膜小胞には、*S. mutans* の *a* サブユニットと共に大腸菌の α および β サブユニットが抗体によって検出できたことから (図 3-2B、レーン 3)、*S. mutans* の F_0 と大腸菌の F_1 から成るハイブリッド F_0F_1 (SF_0EF_1) が大腸菌の細胞膜に発現したと考えた (図 3-3B)。 α および β サブユニットの量は、大腸菌の F_0F_1 (EF_0F_1) を発現した膜とほぼ同様だった (図 3-2B、レーン 3 および 4)。また、*a* サブユニットの量は SF_0F_1 発現株と同様だった (図 3-2B、レーン 2 および 3)。したがって、 SF_0F_1 、 SF_0EF_1 、 EF_0F_1 の三種類の酵素は、それぞれ大腸菌の細胞膜に同程度に発現していると考えた。

第三項 膜画分 ATPase 活性の pH 依存性

SF_0F_1 と比較するため、初めに、*S. mutans* 細胞より調製した膜画分を用いて、ATPase 活性の pH 依存性を調べた (図 3-4A)。ATPase 活性の至適 pH は 7.0 であり、精製した F_1 で測定されていた結果と一致していた (Sutton *et al.* 1987)。*S. mutans* は P 型 ATPase の遺伝子を持っており、また、細胞膜に H^+ を輸送する P 型 ATPase が存在する可能性を論じた報告があった (Magalhães *et al.* 2004)。そのため、P 型 ATPase の阻害剤であるバナジン酸で膜画分を処理したが、活性は全く阻害されなかった (データ未掲載)。他の可能性が低いことから、本研究の *S. mutans* 細胞膜画分で検出される ATPase 活性は、ほぼ F 型 ATPase によるものであると考えた。大腸菌 KY7230 株 (F_0F_1 野生株) の反転膜小胞では、既に報告されている結果と同じように pH 9.0 で活性が最大になっており (Evans Jr 1969)、*S. mutans* のものとは異なっていた (図 3-4A)。

SF_0F_1 、 SF_0EF_1 および EF_0F_1 を含む大腸菌の反転膜小胞をそれぞれ用いて、同様に ATPase 活性に対する pH の影響を調べた (図 3-4B)。 EF_0F_1 の ATPase 活性は pH 9.0 のときに $8.0 \mu\text{mol}/\text{mg} \cdot \text{min}$ で最大となったが、 SF_0F_1 は pH 7.0

のときに $4.5 \mu\text{mol}/\text{mg} \cdot \text{min}$ で最大となった。 SF_0F_1 の活性は pH 5.5 でも最大値の約 40%は残っており、pH 7.0 以下では EF_0F_1 よりも高い活性を示すことが明らかになった (図 3-4B)。 SF_0EF_1 の場合には、ATPase 活性の pH 依存性は EF_0F_1 とよく似ており、触媒部位のある F_1 の性質が反映されていると思われた(図 3-4B)。

SF_0F_1 の活性が EF_0F_1 より酸性 pH で高かったため、酸性環境での酵素タンパク質の安定性を調べた。 SF_0F_1 と EF_0F_1 を含む反転膜小胞を pH 6.0~8.0 の緩衝液で 10 時間までインキュベーションし、それぞれの膜の ATPase 活性を中性 pH で測定したところ、pH 6.0 では EF_0F_1 の活性はほとんど減少していなかったが、 SF_0F_1 では約 80%に減少した (図 3-5)。

第四項 ATPase 活性への阻害剤の影響

前述したように、アジ化物イオンは F_1 の触媒部位の近傍に結合して ATPase 活性を阻害する (図 3-1) (Bald *et al.* 1998; Bowler *et al.* 2006)。これまでに報告されているように、 EF_0F_1 の活性は 10 mM ではほぼ完全に阻害された (図 3-6) (Iwamoto *et al.* 1991)。見かけの K_i 値は $110 \mu\text{M}$ だった。大腸菌の F_1 部位を持つ SF_0EF_1 の場合、アジ化物イオンに対する感受性は EF_0F_1 よりわずかに高く、見かけの K_i 値は $65 \mu\text{M}$ であった。ところで、 SF_0F_1 の ATPase 活性は 0.1 mM 以上のアジ化ナトリウムによって阻害されたが、10 mM 以上加えても 25%近くは阻害されずに残った (図 3-6)。*S. mutans* の膜画分を用いても同様だった。触媒部位が *S. mutans* 由来の酵素は、アジ化物イオンによる阻害を受けにくいと思われた。

DCCD は $\text{F}_0 c$ サブユニットのカルボキシル基に共有結合して H^+ 輸送を阻害し、同時に、それと共役した ATPase 活性を阻害することがよく知られている (図 3-1) (Hermolin *et al.* 1989)。しかし、pH を酸性にした条件では、同じ試薬が $\text{F}_1 \beta$ サブユニットの触媒部位の近傍に結合して活性を阻害する (Yoshida *et al.* 1982)。本研究において EF_0F_1 を含む反転膜小胞を pH 6.0 と 7.5 で DCCD

処理すると ATPase 活性はよく阻害されたが、 F_1 の活性は pH 6.0 のときだけ阻害されていた (図 3-7A)。したがって、pH 7.5 では DCCD は殆ど H^+ 輸送路に結合して ATPase を阻害していると思われた。一方、 SF_0F_1 の ATPase 活性は pH 7.5 でまったく阻害されなかった (図 3-7B)。pH 6.0 では、0.1 mM DCCD が F_1 -ATPase を殆ど阻害しないことから、このときは F_0 に結合して約 32 % が阻害されるようになったと考える。 SF_0EF_1 を用いた実験でも、上と矛盾のない結果が得られた (図 3-7C)。すなわち、pH 7.5 では活性はあまり阻害されず、ハイブリッドの SF_0 と EF_1 のどちらにも DCCD は効果を及ぼさないと思われたが、pH 6.0 にすると EF_1 側に結合して ATPase 活性を阻害した。

反転膜小胞を DCCD が含まれた緩衝液でインキュベーションしている間も、 F_1 部位は膜からはずれていないということを確認した (図 3-8)。DCCD 処理した反転膜小胞の反応液を沈殿させてウェスタンブロッティングを行ったところ、 SF_0F_1 および SF_0EF_1 の F_1 のサブユニットは未処理の試料と変わらず検出された (図 3-8)。アジ化物イオンと DCCD の阻害効果の違いは、触媒部位と H^+ 輸送路の構造が、大腸菌と *S. mutans* で局所的に異なっている可能性を示している。

第五項 ATP 加水分解に伴う H^+ 輸送

酸性の環境で生育する *S. mutans* 細胞において、 F_0F_1 が H^+ 排出ポンプとして働くと考えられているにも関わらず、これまでに本酵素が ATP 依存的に H^+ 輸送をすることは示されていなかった。そこで、ACMA の蛍光消光を指標として、反転膜小胞の内部への H^+ 輸送を pH 5.0~7.5 の間で調べた (図 3-9)。*S. mutans* の細胞膜画分を用いると pH 5.5~6.5 の時に ATP 添加後の蛍光消光が観察され、ATP 分解に伴う H^+ 輸送が起こっていると思われた (図 3-9A ; pH 6.5 の結果は未掲載)。しかし、pH 7.0 および 7.5 では H^+ 輸送は見られなかった (図 3-9A; pH 7.5 の結果は未掲載)。大腸菌細胞膜に発現した SF_0F_1 でも同様に、pH 5.5~6.5 のときに H^+ 輸送が見られた (図 3-9B および E)。このとき、反転膜小胞の内側の pH を 6~8 に変えても H^+ 輸送は変化しなかった (図 3-10)。

SF₀EF₁のH⁺輸送を調べたところ、H⁺輸送はpH 5.5~6.5の間で見られたがpH 6.0のときに最も大きかった(図3-9CおよびE)。H⁺輸送の至適pHがSF₀F₁とは異なるのは、pH 5.5におけるSF₀EF₁のATPase活性がSF₀F₁の21%に低下していたためと思われる(図3-4B)。したがって、F₀部位が*S. mutans*由来の場合に、酸性側でH⁺輸送をすることが明らかであった。一方、EF₀F₁の場合には、pH 7付近がH⁺輸送の至適pHと思われた(図3-9DおよびE)。

SF₀F₁のH⁺輸送がpH 7.0で減少したのは、膜からF₁部位が遊離したためでないことを確かめた(図3-11)。SF₀F₁を含む膜をpH 7.0およびpH 6.0の緩衝液でインキュベーションした後に遠心により回収し、ウェスタンブロッティングしたところ、F₁のサブユニット量はインキュベーション前と変わらなかった。

第六項 SF₀F₁によるATP合成活性の検討

SF₀F₁は、酸性条件でATP加水分解に共役してH⁺を輸送することが示された。しかし、生物界の多くのF₀F₁がATP合成酵素としての役割を果たしていることから、SF₀F₁がATP合成を行う可能性を調べた。大腸菌の細胞膜には電子伝達鎖(呼吸鎖)が存在しているため、初めに、SF₀F₁を発現した大腸菌が酸化的リン酸化によるATP合成を行って生育できるかを調べた(表3-1)。しかし、SF₀F₁を持つ大腸菌は、コハク酸を単一の炭素源とした最少培地では生育できなかった。培地のpHを5~7にしても、IPTG濃度を0~1 mMに変えても生育は見られなかった(データ未掲載)。SF₀EF₁を持つ大腸菌も、ほぼ同じ結果だった。これに対して、EF₀F₁を持つ株はコハク酸を炭素源として生育しており、酸化的リン酸化により大腸菌のF₀F₁がATP合成したことを示していた(表3-1)。

SF₀F₁は、それを発現している大腸菌細胞を生育させるほどのATPを合成できなかったと思われたことから、反転膜小胞を用いて*in vitro*でATPが合成できるかどうかを測定することにした。膜面分の電子伝達鎖が形成するH⁺の電気化学的ポテンシャル差を利用することができるかどうか、まず、反転膜小胞のNADHの酸化活性を調べたところ、SF₀F₁を持つ膜面分では

0.85 $\mu\text{mol}/\text{mg}\cdot\text{min}$ で、 EF_0F_1 を持つものと同程度だった (表 3-1) (Jones 2001)。そこで、ATP 合成ができる対照実験として、 EF_0F_1 の ATP 合成活性を調べた (図 3-12)。反応時間ごとに ATP 生成が見られ、しかも、阻害剤である DCCD および脱共役剤のカルボニルシアニド-*m*-クロロフェニルヒドラゾン(CCCP)によって阻害された (図 3-12A)。したがって、 H^+ の電気化学的勾配によって F_0F_1 が駆動され、酸化的リン酸化による ATP 合成が起こったことを確認された。0.3~1.0 mM ADP および 1~10 mM 無機リン酸の濃度範囲で、11.3~16.1 $\text{nmol}/\text{mg}\cdot\text{min}$ の活性が測定できた (図 3-12B)。これは以前に報告された値 (40 $\text{nmol}/\text{mg}\cdot\text{min}$) とあまり変わらなかった (Jones 2001)。

ところが、 SF_0F_1 および SF_0EF_1 を持つ膜画分では ATP が殆ど合成できず、*in vivo* の結果と同じになった (図 3-13)。 SF_0EF_1 を持つ膜画分の場合には、電子伝達鎖の活性が EF_0F_1 を持つ膜の 16% に低下しており (表 3-1)、ATP 合成が検出されなかったのはこのためかもしれない。

第四節 考察

第一項 SF_0F_1 触媒部位の大腸菌 ATP 合成酵素との違い

大腸菌細胞膜で SF_0F_1 を発現させることができるようになったので、その性状を詳しく調べた。ATPase 活性の至適 pH は 7 付近であり、アルカリ性側で活性が最大となる EF_0F_1 とは異なっていた (図 3-4B)。触媒部位の構造が ATPase 活性の pH 依存性を決めていると思われたが、 β サブユニットの活性中心のアミノ酸は大腸菌でも *S. mutans* においてもよく保存されており、どこが pH 依存性に関わるのかは単純には分からなかった。ATPase 活性の pH 依存性は、細胞における F_0F_1 の役割と密接に結びついている可能性があるため、触媒部位の近傍のどの残基 (または領域) が反応の pH 依存性を決めているのか明らかにするのは、次の重要な課題である。

阻害剤を用いた実験結果からも、触媒部位近傍の環境が *S. mutans* と大腸菌では異なると考えられた。ミトコンドリア F_1 の結晶構造や酵素化学的な解析によると、アジ化物イオン (N_3^-) は β サブユニットに結合した ADP と相互作用し、その遊離を妨げると考えられている (Bowler *et al.* 2006)。 SF_0F_1 の ATPase 活性がアジ化物イオンによって完全には阻害されなかったということは、ADP の親和性が、大腸菌などの ATP 合成酵素より低い可能性がある (図 3-6)。これについては、今後の検討が必要である。また、pH 6.5 以下の酸性では、DCCD は大腸菌 F_1 の β サブユニットのリン酸結合部位に近い Glu-192 に共有結合して ATPase を阻害する。この Glu 残基は *S. mutans* でも Glu-198 として保存されているにも関わらず、EDTA 抽出液に含まれる SF_1 -ATPase 活性は pH 6.0 であまり阻害されなかった (図 3-7B)。DCCD 結合が起こらなかったか、または、結合しても活性を阻害しなかったと考えられる。すなわち、少なくともリン酸基結合部位の周囲の微小構造は二つの酵素で異なっていると示唆された。

第二項 SF_0F_1 による ATP 合成反応

ゲノム情報によると、*S. mutans* は TCA 回路のほとんどの酵素と電子伝達呼吸鎖の構成タンパク質を持たない。したがって、 F_0F_1 は生理的には酸化的リン酸化による ATP 合成には関わらないと考えられる。pH 7 でインキュベーションした *S. mutans* 細胞を pH 3 の緩衝液に入れると一時的に細胞の ATP 量が上昇することが示されており、細胞膜において ATP の合成が可能だと示唆されている (Sheng *et al.* 2006)。しかし、*S. mutans* の生育環境でそのようなことが起こるかは疑問である。本研究では、大腸菌の細胞膜の SF_0F_1 は、*in vivo* でも *in vitro* でも ATP 合成できないことを示した (表 3-1、図 3-13)。これまでに、大腸菌の F_0F_1 とリン脂質から成るプロテオリポソームを用いて、約 130 mV の膜電位によって ATP 合成が起こることが示されているが (Kaim and Dimroth 1998)、*S. mutans* と同じく酸性環境に生育する *L. lactis* では、同様の実験により 200 mV の電位差が ATP 合成に必要なことが示されている (Maloney

1977)。すなわち、 F_0F_1 の種類によって ATP 合成方向へ酵素内回転を引き起こす駆動力の閾値が異なっている可能性が示されている。 SF_0F_1 を精製してプロテオリソームに組み込むことができれば、本酵素でも確かめることができるはずである。

第三項 SF_0F_1 による ATP 加水分解に共役した H^+ 輸送

本研究では、大腸菌細胞膜で発現させた SF_0F_1 を用いて、*S. mutans* の F_0F_1 が ATP の加水分解に共役した H^+ 輸送を pH5.5~6.5 の酸性条件で行うということを初めて示した (図 3-9)。実験に用いた反転膜小胞の外側は、細菌の細胞では細胞質側にあたる。したがって、膜小胞を懸濁している緩衝液の pH が酸性の時に H^+ を輸送したということは、*S. mutans* の F_0F_1 が、細胞質が酸性の時に H^+ 排出ポンプとして働くことを示唆している。 H^+ 輸送は膜小胞内部 (細胞にとっては細胞外) の pH には依存しなかった (図 3-10)。 SF_0EF_1 でも酸性条件でよく H^+ を輸送したことから、*S. mutans* 由来の F_0 部分に酸性で H^+ 輸送するのに重要な領域が含まれることが示唆された。

大腸菌 F_0F_1 の H^+ 輸送では、*c* サブユニットの Asp-61 残基の側鎖が H^+ 化および脱プロトン化される過程が必須であり、*S. mutans* において同じ位置に保存されている Glu-53 残基は H^+ 輸送路に必須であると考えられる。中性 pH で H^+ 輸送が見られなかったことから、Glu-53 のプロトン化とそれに続く脱プロトン化は、さらに酸性側で起こる可能性がある。

pH 7.0 の時、 SF_0F_1 の ATPase 活性は高いが、 H^+ 輸送は非常に低下していた (図 3-4B、図 3-9)。もし、細胞内部が中性の時に無駄に ATP を分解してしまうとしたら奇妙なことであるが、第一章で述べたように *S. mutans* F_0F_1 遺伝子の転写と翻訳の量は中性 pH では低下するため、細胞膜の F_0F_1 量も減少して ATP の浪費は抑えられるのかもしれない。ウシのミトコンドリアにおいて H^+ の電気化学的ポテンシャル差が一時的に低下したとき、 F_1 -ATPase 活性を阻害する IF_1 (inhibitor of F_1) というタンパク質が知られている (Fujikawa *et al.* 2012)。

S. mutans 細胞にも ATP 分解を阻害する因子が働く可能性もあるが、細菌の F_0F_1 では、外因性の阻害因子はこれまで報告されていない。

表 3-1 発現プラスミドとして *S. mutans* と大腸菌の F_0F_1 サブユニット遺伝子を持つ大腸菌の生育と反転膜小胞の性状

Plasmids	Subunits		Growth		ATPase activity ($\mu\text{mol}/\text{mg} \cdot \text{min}$)	NADH oxidation ($\mu\text{mol}/\text{mg} \cdot \text{min}$)	Abbreviation
	<i>S. mutans</i>	<i>E. coli</i>	Glc	Suc			
pRSM1	c,a,b, δ , α , γ , β , ϵ	—	+	—	4.5	0.85	SF $_0$ F $_1$
pTrc-cab'SE1	c,a,b ₁₋₅₃	b ₄₈₋₁₅₆ , δ , α , γ , β , ϵ	+	—	1.9	0.11	SF $_0$ EF $_1$
pBWU13.X	—	a,c,b, δ , α , γ , β , ϵ	+	+	3.3	0.69	EF $_0$ F $_1$
pTrc99A	—	—	+	—	0.02	1.55	None

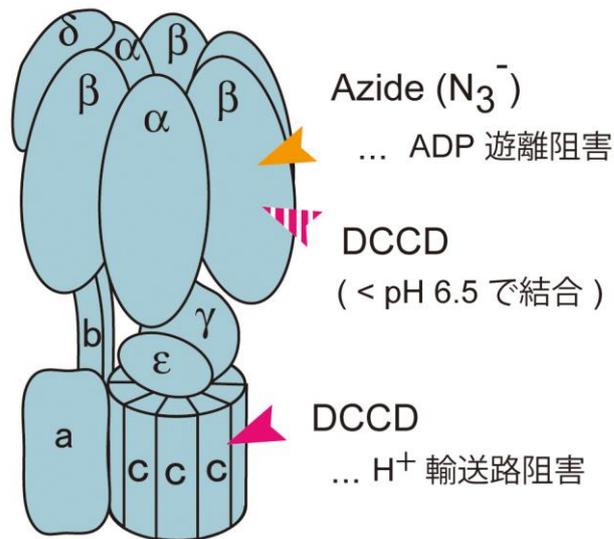


図 3-1 F_0F_1 の阻害剤であるアジ化物イオンおよび DCCD の結合部位

アジ化物イオンは、 β サブユニットの触媒部位の近傍に結合し、ADP の遊離を阻害することによって ATPase 活性を低下させる。DCCD は、 c サブユニットの保存残基である Glu/Asp 残基（種によって異なる）に結合し、 H^+ 輸送を阻害する。また、イオン輸送と共役した触媒活性も阻害する。大腸菌 F_0F_1 では、 $\text{pH } 6.5$ 以下では、 β サブユニットにも結合して ATPase 活性を阻害する。

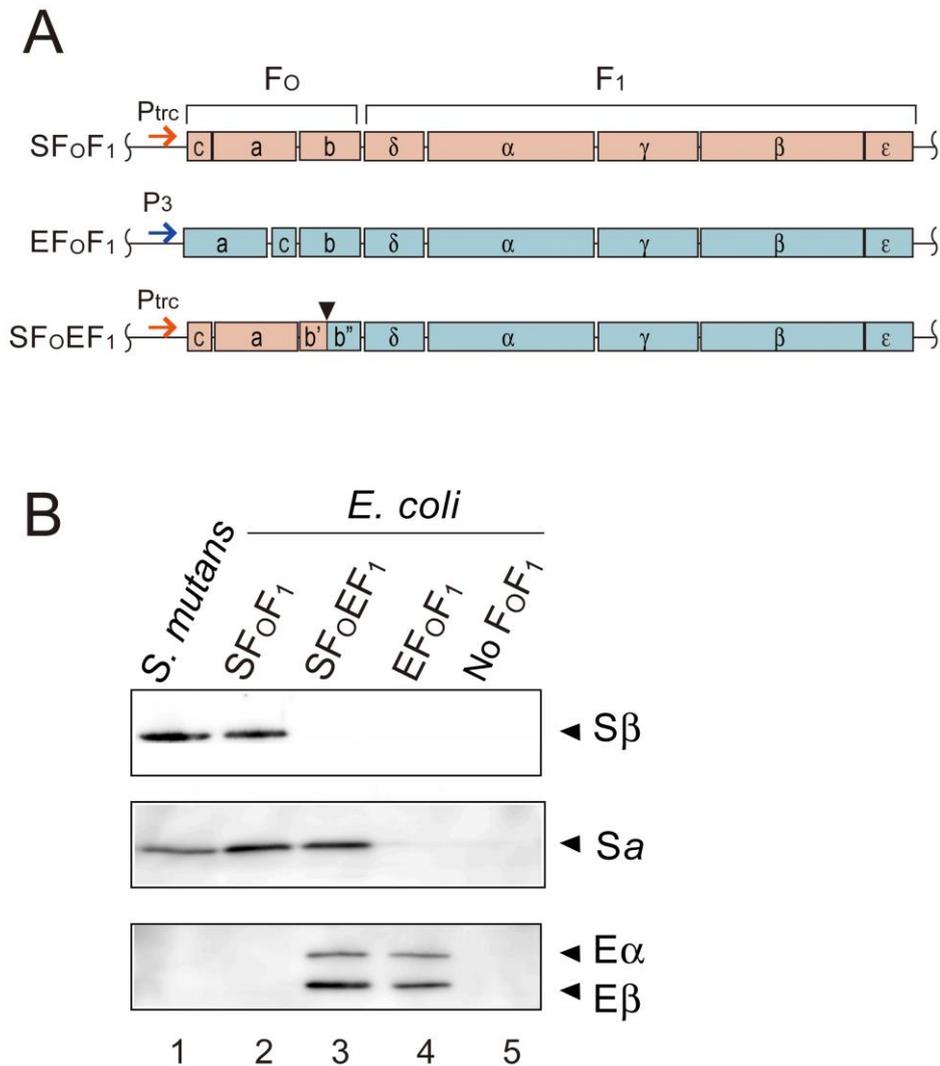


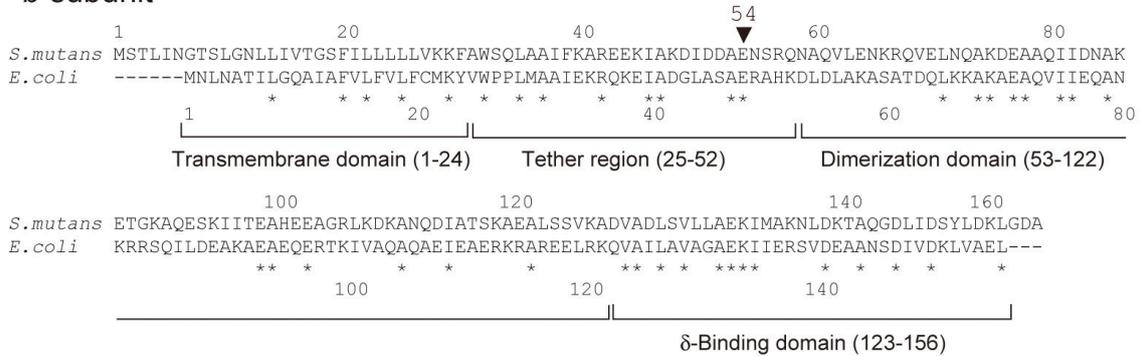
図 3-2 *S. mutans* F₀F₁ の大腸菌における発現

(A) *S. mutans* F₀F₁ (SF₀F₁)、大腸菌 F₀F₁ (EF₀F₁)、F₀ 部位が *S. mutans* で F₁ 部位が大腸菌のハイブリッド F₀F₁ (SF₀EF₁) の遺伝子構造。SF₀F₁ および SF₀EF₁ の *atp* オペロンの上流に *trc* プロモーターを結合した。EF₀F₁ の *atp* オペロンの上流には、大腸菌 F₀F₁ の内在性の弱いプロモーター (P₃) が存在する。SF₀EF₁ の酵素遺伝子は、*S. mutans* の *c*、*a* および *b* サブユニットの Met-1～Ala-53 (*b'*) の遺伝子を大腸菌の *b* サブユニットの Glu-48～Leu-156 (*b''*) および F₁ サブユニット遺伝子と結合して構築されている。遺伝子の入れ換えを行った位置を▼で示した。(つづく)

(B) *S. mutans* の細胞膜および (A) の遺伝子を導入した大腸菌の細胞膜を用いてウェスタンブロッティングを行った。抗血清は、抗 *S. mutans* β サブユニット (上段)、抗 *S. mutans a* サブユニット (中段)、抗 *E. coli* F₁ (下段) を用いた。*S. mutans* の細胞膜画分は 30 μ g を、SF₀F₁、SF₀EF₁、EF₀F₁ を含む大腸菌膜画分は、それぞれ 2 μ g ずつを用いた。

A

b subunit



B

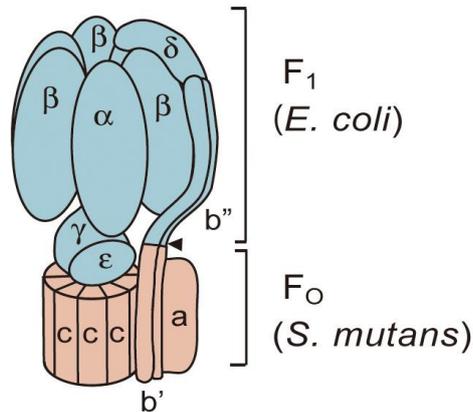


図 3-3 *S. mutans* および大腸菌 *b* サブユニットの融合

(A) *S. mutans* と大腸菌酵素の *b* サブユニットのアミノ酸配列の比較。大腸菌の *b* サブユニットは、アミノ末端から、膜貫通ドメイン、つなぎ領域、二量体化ドメイン、 δ サブユニット結合ドメインの四領域から成ると考えられる。他のサブユニットと相互作用しないと思われるつなぎ領域 (tether region) で、*S. mutans* と大腸菌の遺伝子を組換えた。繋いだ位置のアミノ酸残基を▼で示した。

(B) SF₀EF₁ のモデル図。膜内在性部分が *S. mutans* (オレンジ)、膜表在性部分が大腸菌 (青) の組み合わせとなったハイブリッド酵素の模式図。

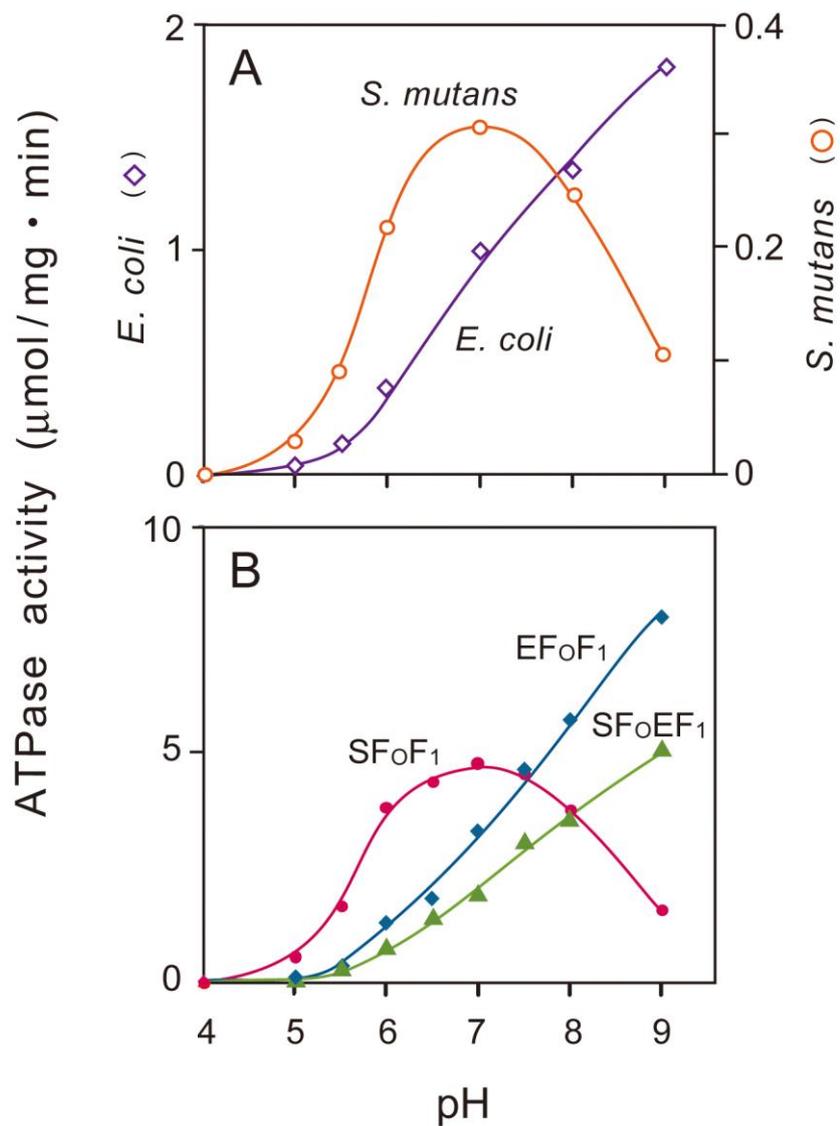


図 3-4 反転膜小胞の ATPase 活性の pH 依存性

(A) *S. mutans* GS-5 株 (○) および *E. coli* KY7230 株 (◇) より調製した反転膜小胞を用いて、pH 4.0~9.0 の間で、37°Cにて ATPase 活性を測定した。

(B) SFoF₁ (●)、SFoEF₁ (◆)、EFoF₁ (▲)を発現した大腸菌の反転膜小胞を用いて、ATPase 活性を調べた。

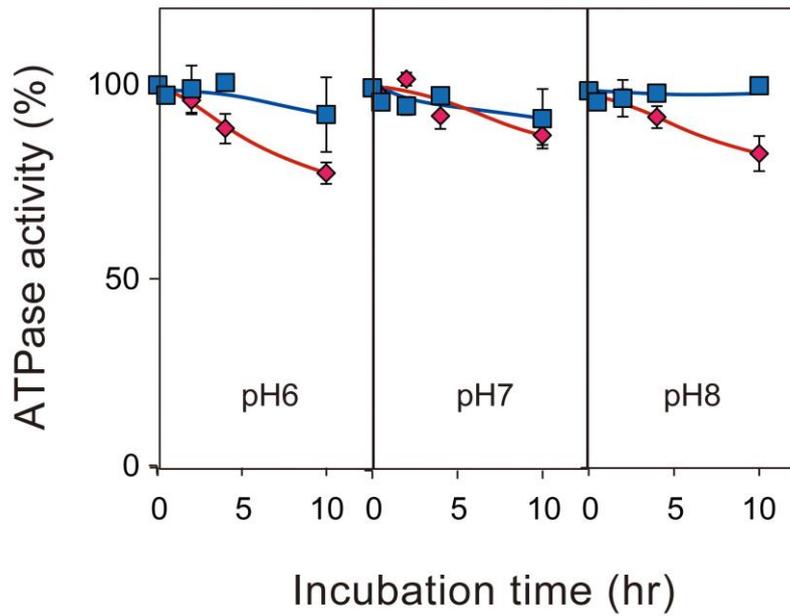


図 3-5 *S. mutans* F₀F₁ の ATPase 活性の pH 安定性

SF₀F₁ および EF₀F₁ を含む反転膜小胞は、140 mM KCl および 1 μg/ml BSA を含む pH 6.0~8.0 の緩衝液に 0~10 時間インキュベーションした。その後、pH 7.0 にて ATPase 活性を測定した。赤色のひし形は SF₀F₁、青色の四角は EF₀F₁ を含む膜の結果を示している。

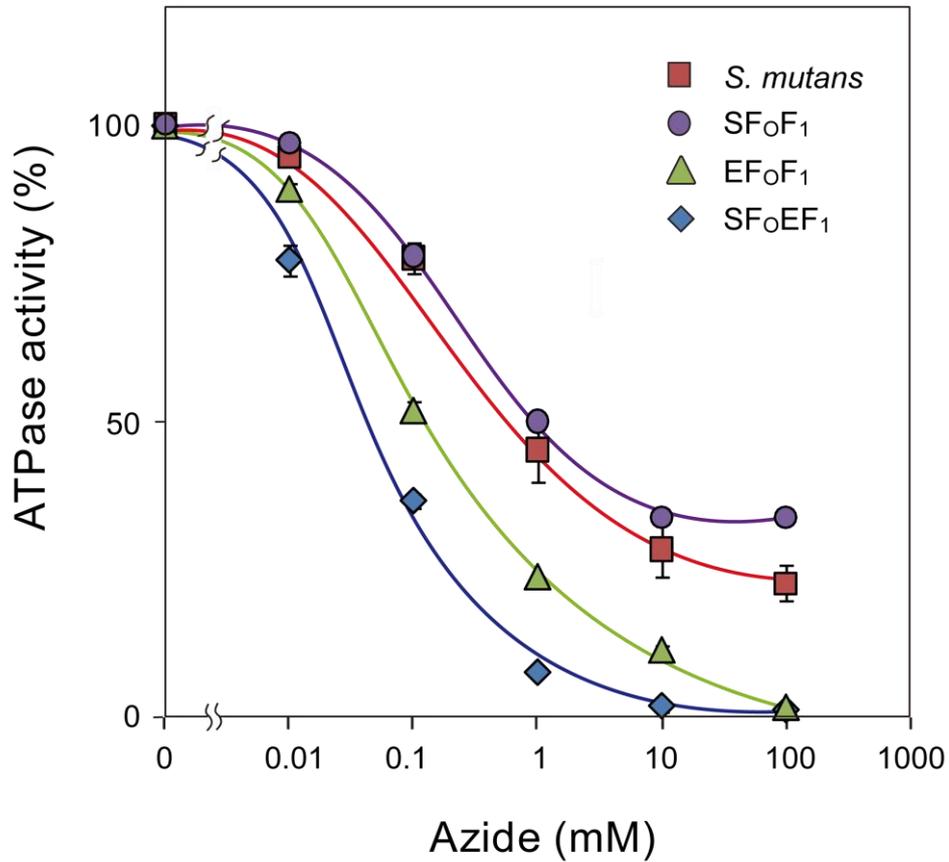


図 3-6 ATPase 活性のアジ化物イオンに対する影響

S. mutans 細胞の膜画分または SF₀F₁、SF₀EF₁、EF₀F₁ をそれぞれ含む大腸菌膜を、10 mM MgCl₂、5 mM ATP を含む 50 mM MES-NaOH (pH 6.0 at 37°C) の溶液に懸濁し、0~100 mM アジ化ナトリウム存在下で ATPase 活性を測定した。活性は、膜画分にアジ化ナトリウムを加えない時の活性に対して、割合で示した。

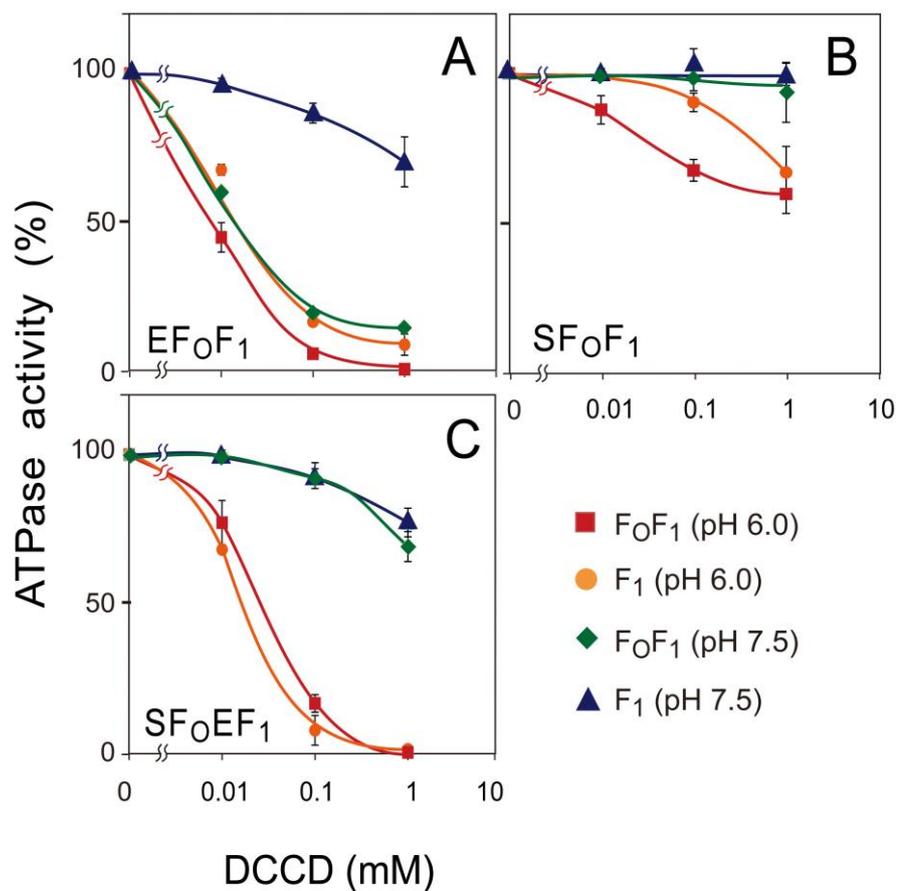


図 3-7 ATPase 活性の DCCD 感受性

EF₀F₁ (A)、SF₀F₁ (B) および SF₀EF₁ (C) を含む反転膜小胞 (■、◆) または EDTA extract (F₁ 画分) (●、▲) は、0~10 mM DCCD を含む pH 7.5 (▲、◆) または 6.0 (■、●) の緩衝液 (6.7 mM MgCl₂, 50 mM MOPS-NaOH, pH 7.5 または 50 mM MES-NaOH, pH 6.0) で 25°C にて 15 分間インキュベーションした。その後、一部を採取して ATPase 活性を測定した。

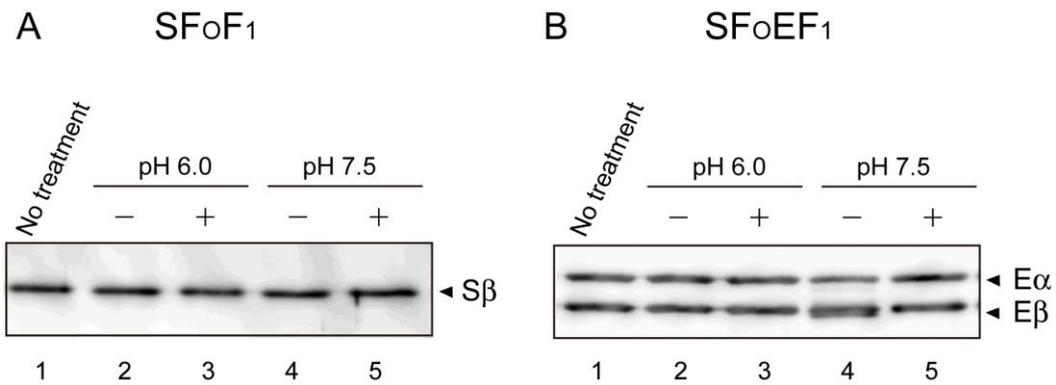


図 3-8 DCCD 処理した反転膜小胞における F₁ の存在

SF₀F₁ (A) または SF₀EF₁ (B) の反転膜小胞 150 μg 分を、2 mM MgCl₂、4 mM ATP、140 mM KCl、2 μg/ml BSA を含む pH 6.0 または 7.5 の緩衝液 1 ml に懸濁し、0.1 mM DCCD の有無によって 15 分間インキュベーションした。DCCD を加えないときは、溶媒のエタノールを 1% になるように加えた。超遠心で沈殿した反転膜小胞のウェスタンブロッティングを行った。抗血清は、抗 *S. mutans* βサブユニット (A)、抗 *E. coli* F₁ (B) を用いた。

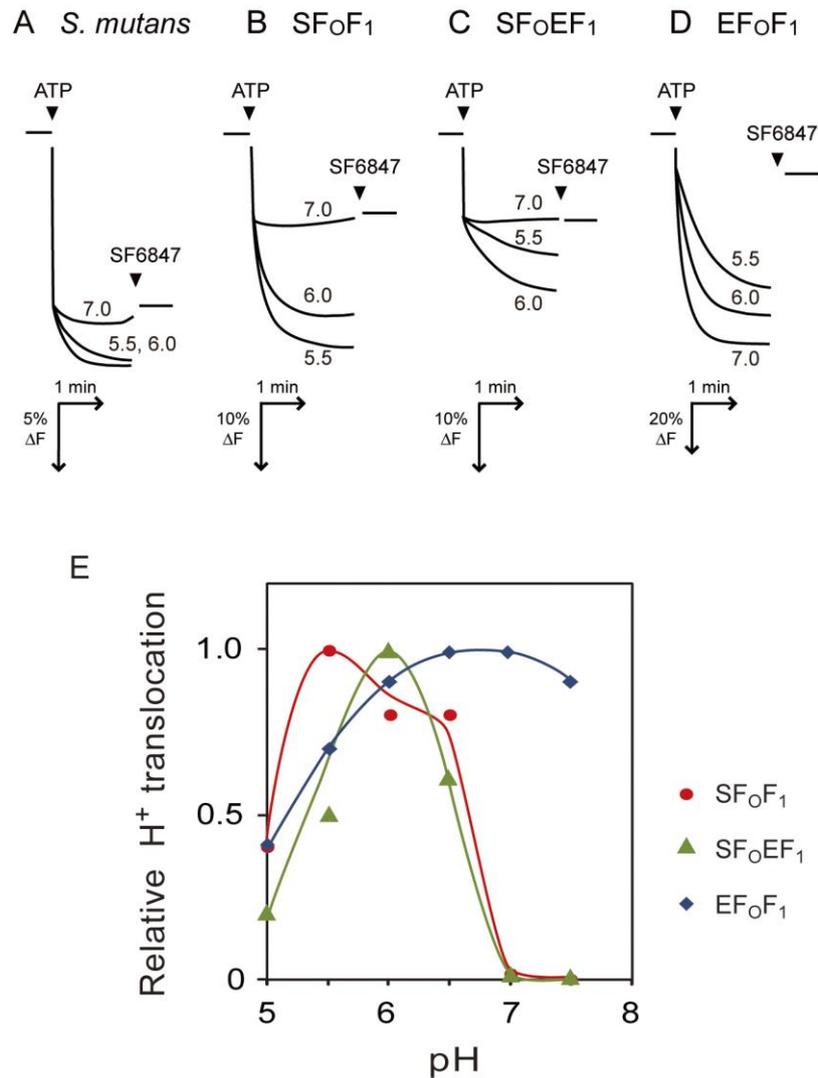


図 3-9 SF₀F₁、SF₀EF₁、EF₀F₁による、様々な pH における ATP 加水分解に共役した H⁺輸送

(A~D) *S. mutans* 細胞膜画分 (A)、SF₀F₁ (B)、SF₀EF₁ (C) または EF₀F₁ (D) の反転膜小胞 300 μg を、1 μM ACMA、140 mM KCl、10 mM MgCl₂ を含む pH5.0~7.5 の緩衝液 2 ml に懸濁した。1 mM ATP と脱共役剤の SF6847 は ▼ 印の位置で添加した。

(E) SF₀F₁ は pH 5.5、SF₀EF₁ は pH 6.0、EF₀F₁ は pH 7.0 のときに、蛍光消光が最大となった。この蛍光強度に対して、各 pH で観察された蛍光消光の割合を相対値として示した。

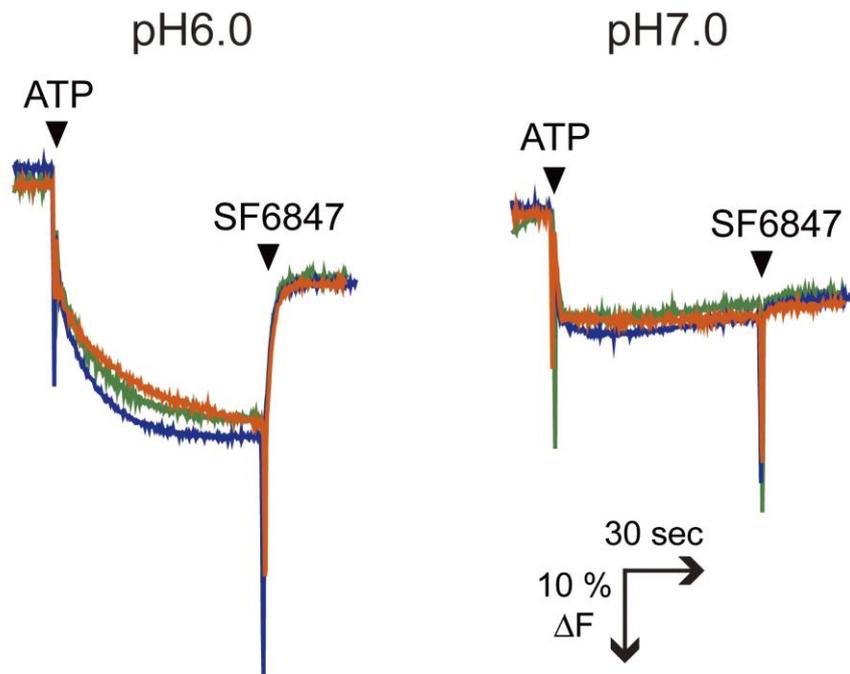


図 3-10 SF₀F₁を含む異なる内部 pH の反転膜小胞による H⁺輸送

SF₀F₁を発現した大腸菌を、pH 6.0 (青色)、7.0 (緑色) または 8.0 (オレンジ色) の緩衝液を用いて破碎し、小胞内部の pH を変えた反転膜小胞を調製した。ATP 添加に伴う ACMA の蛍光消光を、pH 6.0 または 7.0 の緩衝液中で測定した。小胞内部の pH によらず、緩衝液 (小胞外部) の pH が 6.0 のときに H⁺輸送が観察された。

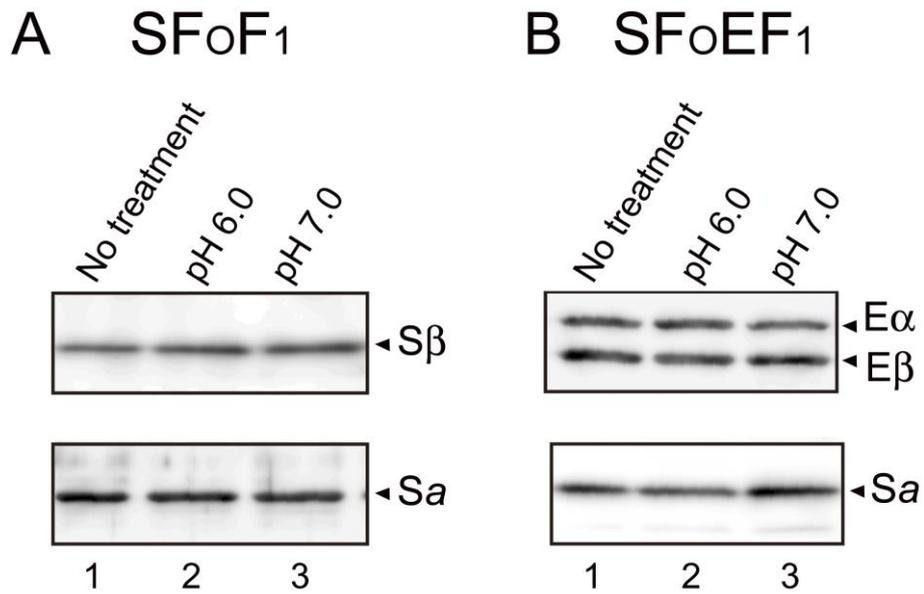


図 3-11 H⁺輸送測定に用いた膜画分における F₁ の存在量

SF₀F₁ (A) または SF₀EF₁ (B) の反転膜小胞 150 μg 分を、H⁺輸送を測定する時に用いた 140 mM KCl、10 mM MgCl₂ を含む pH 6.0 または 7.0 の緩衝液 1 ml 中で 15 分間インキュベーションした。その後、超遠心で沈殿した反転膜小胞を用いて、ウェスタンブロッティングを行った。抗血清は、(A) 抗 *S. mutans* β サブユニット (上段) および 抗 *S. mutans* a サブユニット (下段)、または、(B) 抗 *E. coli* F₁ (上段) および 抗 *S. mutans* a サブユニット (下段) を用いた。

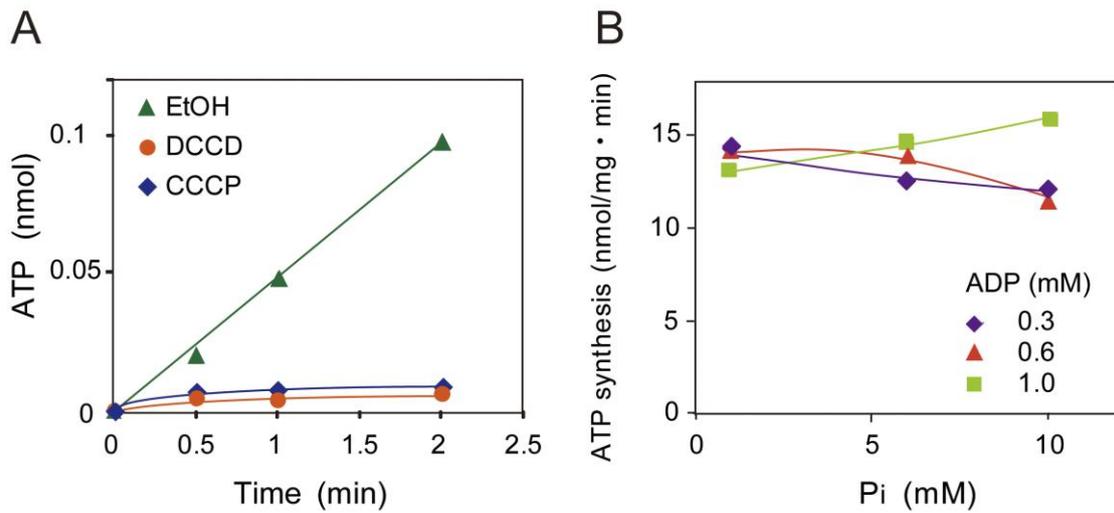


図 3-12 EF_0F_1 の ATP 合成活性の測定

EF_0F_1 を含む大腸菌の反転膜小胞を用いて、ATP 合成活性を測定した。(A) 反転膜小胞 30 μg を用いて、0.6 mM ADP, 6 mM 無機リン酸, 5 mM MgCl_2 , 2.1 mM NADH, 50 mM MOPS-NaOH (pH 7.0 at 25°C) の存在下で、25°Cにて ATP 合成反応を行った。DCCD および CCCP の溶媒であるエタノールは、0.4% になるよう添加した。生成した ATP は、ルシフェリンの化学発光により測定した。 F_0F_1 の阻害剤である DCCD (●) または脱共役剤の CCCP (◆) で処理すると、合成活性は検出されなかった。(B) 基質濃度を、0.3~1.0 mM ADP、1~10 mM 無機リン酸 (Pi) に変えて、ATP 合成を測定した。

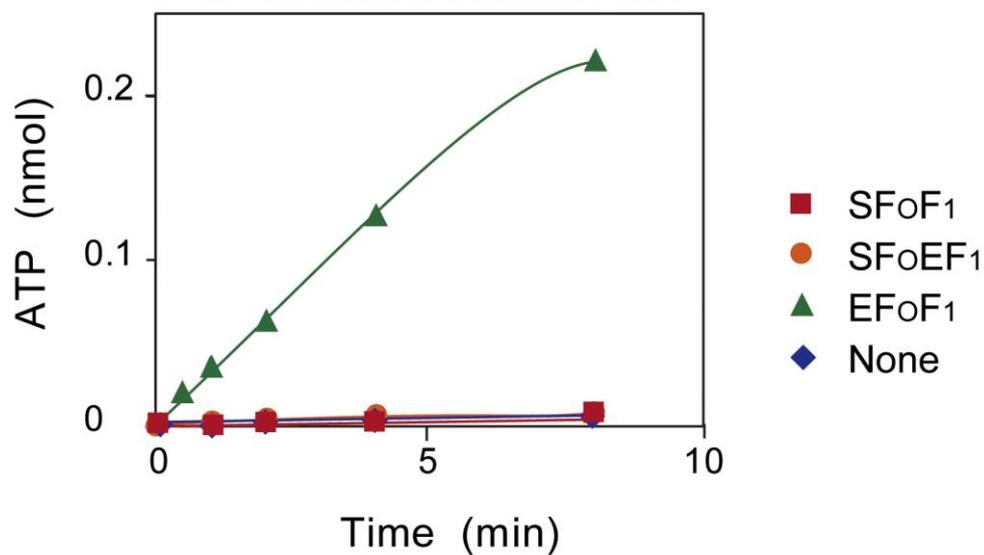


図 3-13 SF_oF₁ および SF_oEF₁ による ATP 合成の検討

SF_oF₁ (■) および SF_oEF₁ (●) の反転膜小胞を用いて、0.6 mM ADP、6 mM 無機リン酸の存在下で、ATP 合成活性を測定した。対照実験として、EF_oF₁ を含む膜 (▲) と F_oF₁ の無い膜 (◆) も用いた。SF_oF₁ および SF_oEF₁ の活性は、図 3-12B と同様、0.3~1.0 mM ADP、1~10 mM 無機リン酸の存在下でも測定したが、合成活性はほとんど検出されなかった。

第四章 *c*サブユニットへ変異導入した SF₀F₁ の解析

第一節 緒論

大腸菌から調製した反転膜小胞に存在する SF₀F₁ は、酸性の緩衝液中で ATP 加水分解し、それと共役して膜を介した H⁺ 輸送を行うということを第三章で明らかにした。このことは、*S. mutans* の細胞膜にある F₀F₁ は、細胞が酸性化した時に H⁺ を細胞外に汲み出す能動輸送ポンプであることを示唆している。また、*S. mutans* 由来の H⁺ 輸送路と大腸菌由来の触媒部位を持つハイブリッド SF₀EF₁ を用いた解析によって、SF₀ の H⁺ 輸送路が、pH に依存してイオンを輸送する性質を備えていると思われた。本研究では、イオン輸送路を構成している *c* サブユニットに、H⁺ 輸送の pH 依存性を決定づけているアミノ酸残基や領域が存在しているのではないかと着目した。

c サブユニットは、塩基配列から予想される一次構造によると、約 7 kDa の疎水性の高いタンパク質である (図 4-1)。これまでに解析されている他の種由来のサブユニットと同様に、膜貫通ヘリックスを 2 本含んでいると考えられる。また、H⁺ 輸送の過程で細胞質側と細胞の外部へとそれぞれ開口した半チャンネルの間をつなぐ役目を持つ Asp 残基または Glu 残基を含んでいると考えられ、他と比べて保存されている Glu-53 がその候補残基であると考えた (図 4-1A)。

そこで、SF₀F₁ が酸性環境でイオン輸送をする機構を明らかにする第一歩として、*c* サブユニット遺伝子に様々なアミノ酸置換変異を導入した。配列の比較により第二膜貫通ヘリックス (TM2) に位置すると思われる Glu-53 残基とその周辺のアミノ酸を、H⁺ 輸送の至適 pH が中性である大腸菌の相同な位置のアミノ酸と置換した。また、立体構造の上では Glu-53 の近傍と思われた第一膜貫通ヘリックス (TM1) のアミノ酸残基を同様に大腸菌の相同な位置のものと置き換えた (図 4-1B)。その結果、SF₀F₁ が酸性 pH でイオンを輸送する機構の一部

を明らかにした。

第二節 実験方法

第一項 *S. mutans* F₀F₁ *c* サブユニット遺伝子へのアミノ酸変異の導入

SF₀F₁ の *c* サブユニット遺伝子にアミノ酸置換変異を部位特異的に導入した。すなわち、発現プラスミド pRSM1 を鋳型とし、表 4-1 の変異導入用プライマーを用いて PCR を行った。塩基置換の起きた約 1.8 kb の DNA 断片は、*c* サブユニット上流の *Nco*I サイトと δ サブユニットの中にある *Afl*II サイトで切断し、同じ酵素で消化した pRSM1 の同じ領域と置き換えた。13 種類のプラスミドを構築した。

第二項 *S. mutans c* サブユニットのホモロジーモデリング

S. mutans c サブユニットの構造は明らかとなっていないことから、本研究では、これまでに解明されている H⁺輸送性 F₀F₁ の *c* サブユニット多量体の結晶構造を鋳型として、MOE (菱化システム社製) を用いてホモロジーモデリングすることにより構造予測を行った。鋳型に用いた構造は、*Spirulina platensis* (PDB : 2WIE)、*Saccharomyces cerevisiae* (PDB ID : 3U2F, 3U32)、*Bacillus pseudofirmus* (PDB ID : 2X2V)、*Spinachia oleracea* (PDB ID : 2W5J) の五種類である。構築した分子構造は、分子力場パラメーターとして Amber 99 を用いてエネルギー極小化計算を行った。

第三項 その他の方法

大腸菌の培養、反転膜小胞の調製、ATPase 活性、H⁺輸送の測定、SDS-PAGE およびウェスタンブロッティングは、第三章と同様に行った。

第三節 結果

第一項 *c*サブユニットに変異導入した SF₀F₁の大腸菌における発現

第三章で、SF₀F₁および SF₀EF₁は pH5.5~6.5 の酸性のときによく H⁺を輸送したことから、*S. mutans* の F₀ 部位には酸性で H⁺輸送するために重要な残基または領域が含まれることが示唆された。その領域を明らかにするために、*a*サブユニットと共に H⁺輸送路を形成する *c*サブユニットに着目した。その保存性から必須残基と予想した Glu-53 を含む Val-49~Val-58 を、大腸菌サブユニットの相同な位置のアミノ酸にそれぞれ置換した (表 4-2、図 4-1)。また、TM2にある Glu-53 の向い側に位置すると思われる TM1 の Val-16~Glu-20 の 5 アミノ酸領域と Ser-17 および Glu-20 のそれぞれを、大腸菌の同じ領域あるいは残基で置換した。全部で 13 種類の変異を含む発現プラスミドは、それぞれ、大腸菌 DK8 株に導入した。反転膜小胞を用いてウェスタンブロッティングを行ったところ、全ての変異株で F₁ の β サブユニットおよび F₀ の *a* サブユニットが同程度検出された (図 4-2)。pH 6.0 および 7.0 での ATPase 活性は、変異導入していない SF₀F₁ の 89~131 %だった (表 4-2、図 4-3)。pH6.0 で見られた変異酵素の活性は、それぞれ、pH7.0 の場合の約 80%であり、ATPase 活性の pH 依存性は、*c*サブユニットへの変異導入では変わらないものと考えた。

第二項 ATP 加水分解に共役した H⁺輸送

変異導入した SF₀F₁ を持つ反転膜小胞を用いて、ATP 加水分解に共役した H⁺輸送を調べた (図 4-4)。変異を導入していない SF₀F₁ の場合、pH6.0 の時に輸送が見られても pH7.0 で低下するのは、第三章で述べた結果と同じである (図 4-4; *None*)。TM2 の Glu-53 残基を Asp 残基に置換すると、SF₀F₁ の H⁺輸送は pH6.0 と 7.0 の両方で見られなくなった。この近くの Ala-50、Ile-52、Thr-55 および Phe-56 を、大腸菌で同じ位置にあたる Gly、Val、Ile および Pro 残基にそれぞれ置換した場合も、pH6.0 および 7.0 の両方で H⁺輸送は見られなくなっ

た (表 4-2、図 4-4)。SF₀F₁ の Glu-53 残基は、これまでに調べられている保存された Asp 残基あるいは Glu 残基と同様に、その周辺の残基と共に H⁺輸送路の形成に関わっている可能性が高い。

一方、興味深いことに TM1 の Val-16~Glu-20 の 5 アミノ酸領域を置換すると、pH6.0 だけでなく 7.0 でも H⁺輸送が見られるようになった (図 4-3; 16-20)。そこで、Ser-17 および Glu-20 をそれぞれ大腸菌の Ala および Ile 残基に置換すると、同様に、pH7.0 で H⁺輸送が見られるようになった。TM1 のこれらの残基は、H⁺輸送の pH 依存性に関与していることが示された。

第三項 TM1 変異株の酸化的リン酸化による生育

pH7.0 のときに H⁺輸送できるようになった V¹⁶SLGE²⁰→AAIGI、Ser-17→Ala、Glu-20→Ile の置換変異を持つ 3 種類の SF₀F₁ が *in vivo* で ATP 合成できるのかどうかを調べた。これらの SF₀F₁ を発現している大腸菌が、酸化的リン酸化により生育できるのかを調べたところ、コハク酸を炭素源とした最少培地で生育できなかった (データ未掲載)。0~1 mM の IPTG 存在下でも、pH5.0~7.0 の培地を用いても同様であった。

第四項 TM1 変異酵素の ATPase 活性に対する DCCD の効果

DCCD は、*c* サブユニットの TM2 の Glu-53 残基のプロトン化したカルボキシル側鎖 (-COOH) に結合して、イオン輸送を阻害すると共に ATPase 活性を阻害すると考えられる。V¹⁶SLGE²⁰→AAIGI、Ser-17→Ala、Glu-20→Ile の変異を持つ SF₀F₁ が中性で H⁺を輸送したことから、酸性の環境でプロトン化していた H⁺輸送路のカルボキシル基が、中性でもプロトン化されるようになった可能性があるとするれば、同じ条件で DCCD が結合できるようになっていると考えた。そこで、TM1 に変異導入した SF₀F₁-ATPase 活性の DCCD 感受性を調べた (表 4-3)。Ser-17→Ala 変異酵素を持つ反転膜小胞を pH 7.0 で DCCD 処理した場合には、ATPase 活性はわずかに活性が阻害されたが (14%)、Glu-20→Ile

および V¹⁶SLGE²⁰→AAIGI 変異を持つ株の膜画分を用いた場合には、SF₀F₁と同様に全く阻害されなかった。DCCD の結合量を直接に測定してはいないが、H⁺輸送路の Glu 残基に DCCD が結合しても、ATPase が阻害されていないのかもしれない。すなわち、*c*-リングを含む回転子複合体の回転が停止しなければ、ATP を分解するβサブユニットの触媒反応は停止しないと考えられる。したがって、大腸菌酵素とは構造的な差異があると考えられる。F₀ から F₁ が遊離していないことは、ウェスタンブロッティングにより確認した (図 4-5)。

第五項 予測した *S. mutans* *c*サブユニットの構造と変異の効果

S. mutans の *c* サブユニットの構造モデルを、*S. platensis* の構造を鋳型として予測した (図 4-1B)。これによると、Glu-20 と Glu-53 の側鎖のカルボキシル炭素の距離は 5.4~5.7 Å の近接した位置にあった (表 4-4)。*S. cerevisiae*、*B. pseudofirmus*、*S. oleracea* の構造を鋳型とした場合でも、5.5~7.4 Å だった (表 4-4)。これらのカルボキシル炭素の距離は、Ser-17 を Ala に置換したモデルでも変わらなかった。また、好アルカリ性細菌の *B. pseudofirmus* 以外の四種を鋳型としたモデルの場合には、Ser-17 残基側鎖の OH 基は、Val-13 の主鎖との間で水素結合を形成していた。

第三節 考察

SF₀F₁ *c*サブユニットのアミノ酸の一部を、中性側に H⁺輸送の至適 pH を持つ大腸菌の残基と置換することにより、*S. mutans* が酸性で H⁺排出をするために重要と思われる領域を調べた。*c*サブユニットのアミノ酸配列を二種の細菌で比較したとき、保存性は 22 % と低いことは第一章で述べた (表 1-1)。しかし、大腸菌の必須残基である Asp-61 残基は *S. mutans* の Glu-53 残基と一致していた (図 4-1A)。

SF₀F₁ の Glu-53 を Asp に置換すると pH6.0 でも H⁺輸送が見られなくなり (図 4-4)、大腸菌 Asp-61 残基と同じように、H⁺輸送路の一部として機能していることが示唆された。大腸菌の Asp-61 残基を Glu に置換したときも、H⁺輸送は見られなくなる (Miller *et al.* 1990)。したがって、*S. mutans* の Glu-53 残基は、大腸菌の Asp-61 残基と同様に、プロトン化/脱プロトン化をすることで H⁺輸送に関わる残基であると示唆された。また、大腸菌 F₀F₁ において、Asp-61 周囲の TM2 の残基も H⁺輸送路の形成に関わることが示唆されており、変異導入によって H⁺輸送が検出されなくなった Ala-50、Ile-52、Thr-55 および Phe-56 残基も *S. mutans* 酵素の H⁺輸送路の形成に関わっているのかもしれない (図 4-4B)。膜に存在する SF₀F₁ の量は変異を導入しても変わらなかったことから (図 4-2)、*c* サブユニットに大きな構造変化が起こったのではなく、アミノ酸置換による H⁺輸送路周辺の微小な構造あるいは環境の変化でイオン輸送路が機能しなくなったと考える。

第三章で明らかにしたように、SF₀F₁ が、pH 7.0 ではなく pH 6.0 のときに H⁺を輸送したということは、電離していた Glu-53 残基の側鎖は、pH が 6.0 かそれより低いときに H⁺輸送のためにプロトン化されることを示唆している。このことは、*S. mutans* の細胞内部が酸性化するにしがって本酵素が H⁺を排出するポンプとして働くという予想と一致している。これまでに、大腸菌の Asp-61 側鎖の *pK_a* は約 7 であることが実験的に示されている (Assadi-Porter and Fillingame 1995)。*S. mutans* の Glu-53 側鎖の *pK_a* は、それよりも低く、pH6 かそれ以下の可能性がある。

TM1 の Ser-17 および Glu-20 をそれぞれ Ala および Ile に置換した場合、H⁺輸送は pH 6.0 と 7.0 の両方で見られるようになった (図 4-4)。すなわち、Glu-53 側鎖のプロトン化/脱プロトン化が中性でも起こるようになったことを示しており、少なくとも、Ser-17 および Glu-20 が酸性における SF₀F₁ の H⁺輸送に重要な残基であることを示唆した。以前、大腸菌 TM1 の Ala-24 と Ile-28 をそれぞれ Asp と Glu に置換すると、pH 8.0 での H⁺輸送が低下することが報告され

た (Zhang and Fillingame 1994; Jones 2001)。TM1 に導入した酸性アミノ酸によって、Asp-61 残基のプロトン化/脱プロトン化が pH の影響を受けるようになることが示唆されていた。*S. mutans* では、大腸菌 Ile-28 にあたる位置の残基は Glu-20 であり、この位置の酸性残基は、必須な Glu 残基の pK_a に関与していると思われる。

c サブユニットの構造モデルによると、Glu-20 残基は側鎖を Glu-53 の方向に向けて近接していた (図 4-1B および図 4-6)。すると、Glu-20 残基のカルボキシル基との相互作用によって、Glu-53 側鎖の pK_a が大腸菌よりも低下している可能性がある。*c* サブユニットのみ *S. mutans* 由来 (残りのサブユニットは大腸菌由来) の *c* サブユニット-ハイブリッド F₀F₁ を発現した大腸菌が、酸性条件でよく生育することは前述したが、これの Glu-20 を Gln に置換すると、pH7.0 でも、pH5.5 の培地と同様によく生育するようになった (Araki *et al.* 2013)。この結果も、Glu-20 の負電荷が、H⁺ 輸送能に密接に関与することを示唆している。

Ser-17 残基が Glu-53 側鎖の pK_a に関与しているかどうかは単純には分からないが、予測した構造によると、Ser-17 側鎖の水酸基は Val-13 主鎖と水素結合を形成していた (図 4-6)。Ser-17→Ala 置換によってこの結合が形成されなくなった結果、ヘリックス構造に局所的な変化が起こり、Glu-20 側鎖が Glu-53 から離れた可能性を考えている。大腸菌の *c* サブユニットにおいて、*S. mutans* の Ser-17 残基と相同な位置にあるのは Ala-25 残基である (図 4-1A)。この残基が Ser になると大腸菌酵素の pH 依存性が酸性側にシフトするかどうか、EF₀F₁ の Ala-25 を Ser に置換した実験を行った。しかし、H⁺ 輸送の性質は変化しなかった (データ未掲載)。したがって、*S. mutans* の Ser-17 残基は、単独で Glu-53 側鎖の pK_a を決定しているのではないと考える。

TM1 への変異導入を行った SF₀F₁ は、pH 7.0 で H⁺ を輸送したにも関わらず、DCCD による ATPase 阻害はほとんど見られなかった (表 4-3)。大腸菌 *c* サブユニットにおいて Ala-24→Ser、Ile-28→Thr または Val の置換を行うと、ATPase 活性の DCCD 感受性が低下することが報告されている

(Fillingame *et al.* 1991)。すなわち、本研究の結果は、*S. mutans* の DCCD 結合部位の周囲の構造が大腸菌とはわずかに異なり、DCCD が結合しても酵素内の回転が十分に停止しないという可能性を示している。大腸菌や好熱菌などの F_0F_1 において、DCCD は ATPase 活性と H^+ 輸送の共役の程度を図る指標として用いられてきたが、*S. mutans* のような一部の細菌ではそのような指標にはならないかもしれない。

表 4-1 *S. mutans c* サブユニットへのアミノ酸変異の導入に用いたプライマー
c サブユニットのアミノ酸を置換するために用いた、変異部位を含む PCR プライマーの配列を示した。小文字は、置換した塩基配列を示している。

Primers	Sequences
FwcS16-20E-2	5' GcTgcgaTcGGTatcGGAATTTTAGTTGCTAAT 3'
RvcS16-20E-2	5' aAagatTTTaGCActGCCTAAAAACAGCAATCCCA 3'
FwS17A	5' TAGGCGTTgcCCTTGGTGAAGGAATT 3'
RvS17A	5' TCACCAAGCgcAACGCCTAAAAACAGCA 3'
FwcE20I	5' GCCTTGGTatAGGAATTTTAGTTGCT 3'
RvcE20I	5' TAAAAATTCCTatACCAAGGCTAACGCCT 3'
FwcV49M	5' TTATGGGTatgGCCTTTATTGAAGGTAC 3'
RvcV49M	5' ATAAAGGCcAtACCCATAATCATGAG 3'
FwcA50P	5' TGGGTGTTccgTTTATTGAAGGTACCT 3'
RvcA50P	5' TCAATAAAcGgAACACCCATAATCATGA 3'
FwcF51L	5' GTGTTGCCcTcATTGAAGGTACCTTTTTTC 3'
RvcF51L	5' ACCTTCAATgAgGGCAACACCCATAATC 3'
FwcI52V	5' GTTGCCTTTgTgGAAGGTACCTTTTTTCG 3'
RvcI52V	5' GTACCTTccAcAAAGGCAACACCCATAATC 3'
FwcE53D	5' CTTTATTGAtGGTACCTTTTTTCGTGC 3'
RvcE53D	5' AAGGTACCcTCAATAAAGGCAACACC 3'
FwcG54A	5' TATTGAAGcTACCTTTTTTCGTGCTTC 3'
RvcG54A	5' AAAAGGTAgCTTCAATAAAGGCAAC 3'
FwcT55I	5' TGAAGGTAtCTTTTTTCGTGCTTCTTG 3'
RvcT55I	5' CGAAAAAGaTACCTTCAATAAAGGCA 3'
FwcF56P	5' AAGGTACCccTTTCGTGCTTCTTGCTTCA 3'
RvcF56P	5' GCACGAAAggGGTACCTTCAATAAAG 3'
FwcF57M	5' GTACCTTTaTgGTGCTTCTTGCTTCAAC 3'
RvcF57M	5' AGAAGCACcAtAAAGGTACCTTCAATAAAG 3'
FwcV58I	5' CCTTTTTCaTcCTTCTTGCTTCAACATTC 3'
RvcV58I	5' AGCAAGAAGgAtGAAAAAGGTACCTTCAAT 3'

表 4-2 SF₀F₁ cサブユニットに導入した置換変異の ATPase 活性および H⁺輸送への影響

SF₀F₁ の cサブユニットに 13 種類の置換変異を導入し、反転膜小胞の ATPase 活性および H⁺輸送を、pH6.0 および 7.0 で測定した。None は、変異を持たない SF₀F₁ を示している。

Mutations in the c subunit	ATPase (μmol/mg · min)		H ⁺ translocation	
	pH6.0	pH7.0	pH6.0	pH7.0
None	3.5	4.5	+	—
V ¹⁶ SLGE ²⁰ → A ¹⁶ AIGI ²⁰	3.8	4.7	+	+
S17 → A	3.3	4.0	+	+
E20 → I	3.8	4.8	+	+
V49 → M	4.6	5.5	+	—
A50 → P	4.5	5.4	—	—
F51 → L	4.2	5.6	+	—
I52 → V	4.5	5.3	—	—
E53 → D	3.7	4.7	—	—
G54 → A	3.8	5.1	+	—
T55 → I	3.2	4.0	—	—
F56 → P	4.1	5.0	—	—
F57 → M	4.2	5.3	+	—
V58 → I	3.8	5.2	+	—

表 4-3 TM1 に変異導入した SF₀F₁-ATPase の DCCD 感受性

反転膜小胞は、0.1 mM DCCD を含む pH6.0~7.5 の緩衝液中で 25°C にて 15 分インキュベーションし、ATPase 活性を測定した。未処理の ATPase 活性に対して、DCCD で阻害された活性の割合を示している。

Mutations in the <i>c</i> subunit	Inhibition (%)		
	pH 6.0	pH 7.0	pH 7.5
None	29	<5	<5
V ¹⁶ SLGE ²⁰ → A ¹⁶ AIGI ²⁰	19	0	0
S17 → A	28	14	7
E20 → I	19	<5	<5

表 4-4 *S. mutans* の *c* サブユニットのホモロジーモデリング

S. cerevisiae、*B. pseudofirmus*、*S. platensis*、*S. oleracea* は H⁺ 輸送性の F₀F₁ を持っており、*c* サブユニット・オリゴマーの結晶構造が解かれている。それによると、*c* サブユニットモノマーの数は種によって異なる。*S. mutans* の *c* サブユニットの構造はまだ解かれておらず、その数は分かっていない。五種類の構造を元に、*S. mutans* *c* サブユニットの四量体をホモロジーモデリングした。内側に位置する 2 つの分子を用いて、TM1 の Glu-20 と TM2 の Glu-53 の側鎖のカルボキシル炭素の距離を測定した。

Species	PDB ID	Number of <i>c</i> subunit	Distances (Å)	
			1	2
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3U2F	10	6.7	7.4
	3U32		5.5	5.9
<i>Bacillus pseudofirmus</i>	2X2V	13	6.9	6.8
<i>Spinacia oleracea</i>	2W5J	14	6.3	7.2
<i>Spirulina platensis</i>	2WIE	15	5.4	5.7

(A) *c*サブユニットのアミノ酸配列の相同性。*S. mutans* *c*サブユニットの一次構造を、他の H⁺輸送性 F₀F₁のサブユニットと比較した。これらと *S. mutans* の相同性は 22~30 %と低い、*S. mutans* では Glu-53 の位置にあるアミノ酸は、Glu または Asp 残基としてすべてで保存されていた。四角で囲んで示した *S. mutans* の Val-49~Val-58 および Val-16~Glu-20 の残基を、大腸菌の同じ位置の残基に置換した。六種すべてで保存されている残基はアスタリスクで示した。(Sm, *S. mutans*; Ec, *E. coli*; Bp, *Bacillus pseudofirmus*; Sc, *Saccharomyces cerevisiae*; So, *Spinacia oleracea*; Sp, *Spirulina platensis*)

(B) *S. mutans* *c*サブユニットのホモロジーモデリング。*S. mutans* の *c*サブユニットの構造を、*S. platensis* の *c*サブユニット・リング構造 (PDB ID: 2WIE) を基に予測した。Ser-17、Glu-20、Glu-53 残基は、それぞれボールアンドスティックモデルで示した。変異を導入した領域は、黄色で示した。

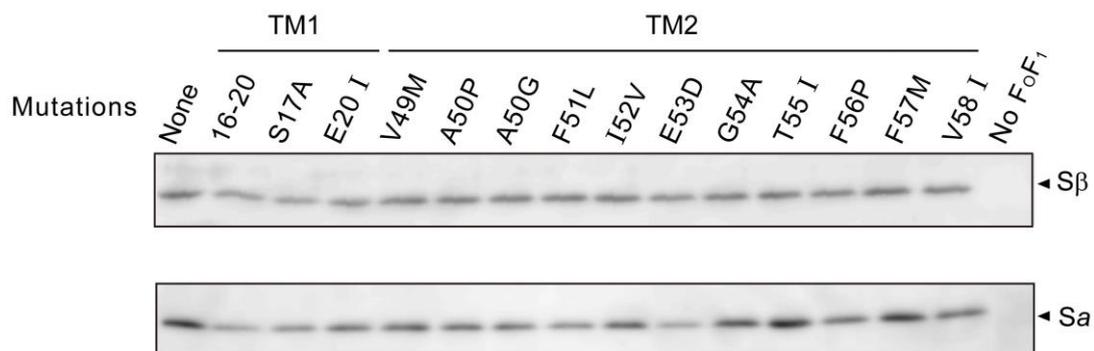


図 4-2 反転膜小胞における *S. mutans* β および α サブユニットの検出

SF₀F₁の c サブユニットに13種類の置換変異を導入した。それぞれ反転膜小胞を調製して、ウェスタンブロッティングを行った。抗血清は、抗 *S. mutans* β サブユニット（上段）、および抗 *S. mutans* α サブユニット（下段）を用いた。*None*は、変異を導入していないSF₀F₁を示している。1レーンあたり2 μ g分の膜タンパク質を用いた。

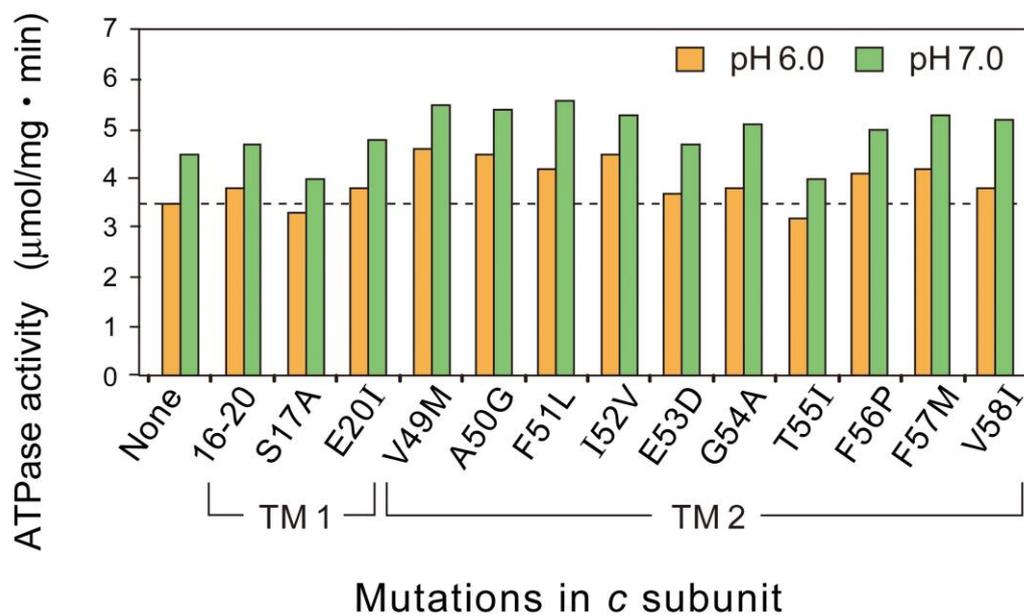
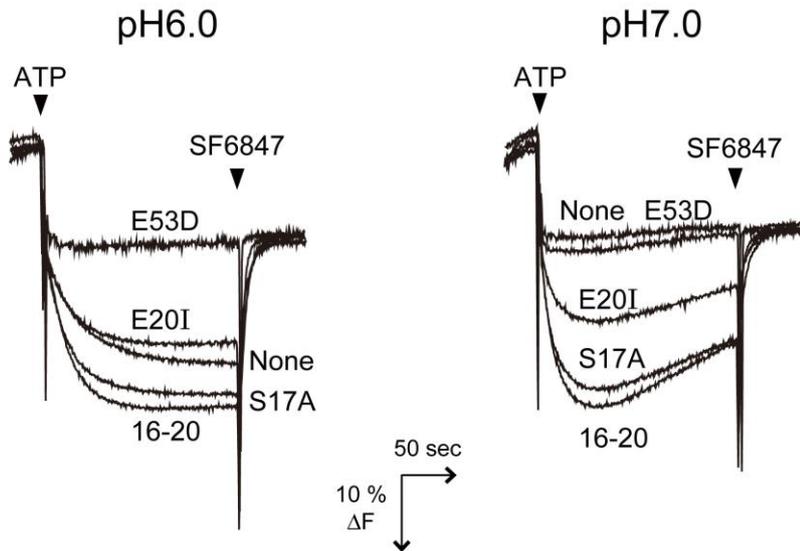


図 4-3 *c*サブユニットに置換変異を導入した SF₀F₁ の ATPase 活性

反転膜小胞の ATPase 活性は pH 6.0 または 7.0 で測定し、それぞれ、オレンジまたは緑色の棒グラフで示した。*None* は、変異を導入していない SF₀F₁ を示しており、pH6.0 のときの活性を点線で示した。

A



B

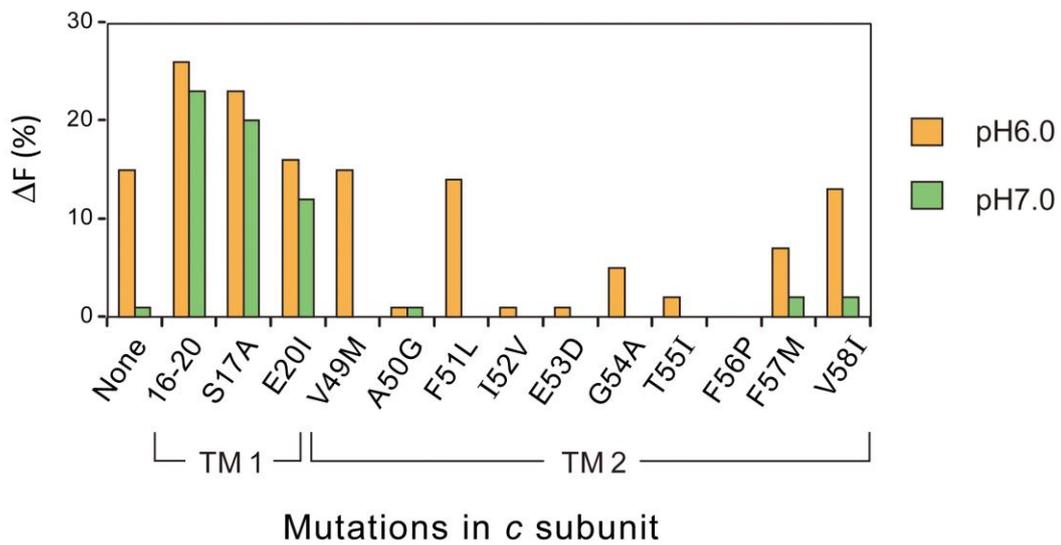


図 4-4 *c*サブユニットに置換変異を導入した SF₀F₁ の H⁺輸送

(A) 反転膜小胞を ACMA を含む pH 6.0 と 7.0 の緩衝液に懸濁し、ATP で駆動される H⁺輸送を、ACMA の蛍光消光によって測定した。脱共役剤である SF6847 を加えて終了した。(つづく)

(B) pH 6.0 および 7.0 で測定した各変異 SF₀F₁ の H⁺輸送を、それぞれ、オレンジ色および緑色のバーで示した。None は、変異を導入していない SF₀F₁ を示しており、pH 6.0 のときの輸送を点線で示した。

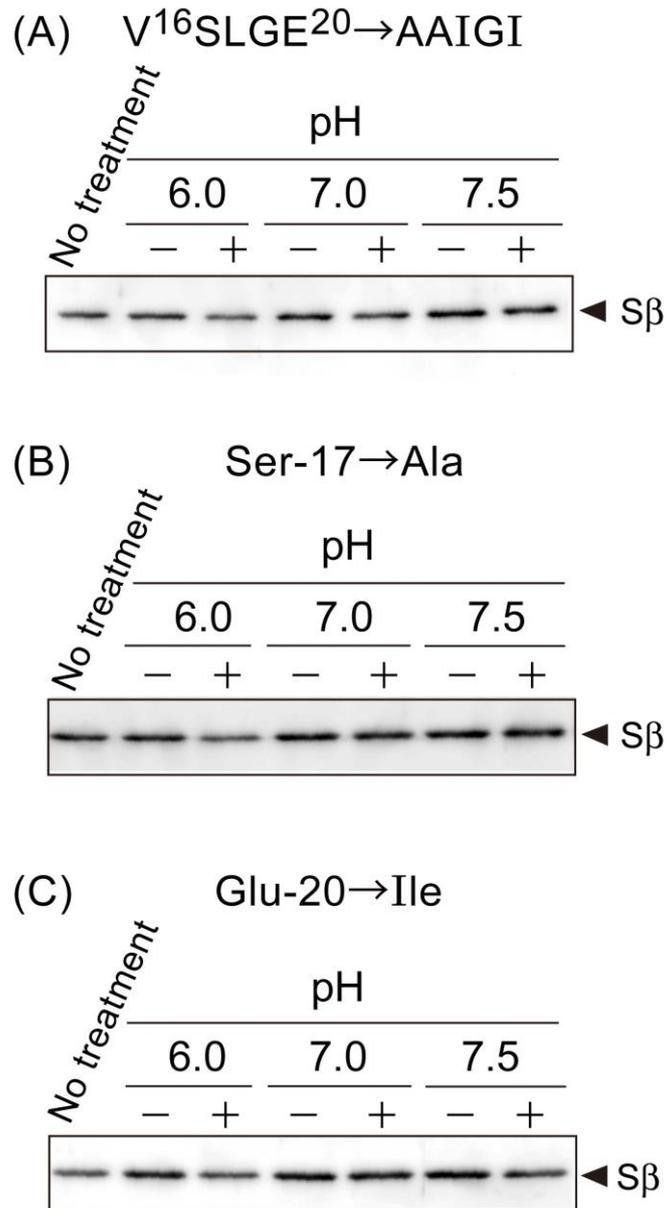


図 4-5 DCCD で処理した反転膜小胞における F₁ の検出

cサブユニットに、V¹⁶SLGE²⁰→AAIGI (A)、Ser-17→Ala (B)、Glu-20→Ile (C) の変異を持つ SF₀F₁ の反転膜小胞を、異なる pH の緩衝液で、0.1 mM DCCD の有無によってインキュベーションした。DCCD を加えないものには、溶媒のエタノールを 1% になるよう加えた。超遠心で沈殿した反転膜小胞を用いてウェスタンブロッティングを行った。抗血清は、抗 *S. mutans* βサブユニットを用いた。

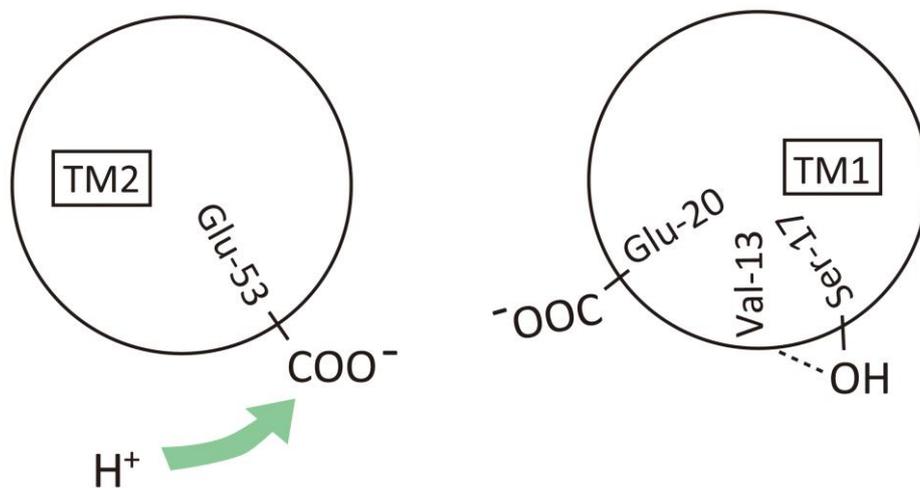


図 4-6 *S. mutans* cサブユニットの H⁺輸送に関わる領域のモデル

cサブユニットの TM1 と TM2 の断面の模式図を示した。Glu-53 残基は、半チャンネルから H⁺が輸送されるとプロトン化される必須残基であると考えられる。サブユニット構造のホモロジーモデリングの結果、Glu-20 残基と Glu-53 残基のカルボキシル基 (COO⁻) は、5.4~7.4 Å と近接した位置にあると予測された。また、Ser-17 残基の水酸基は、Val-13 の主鎖の酸素原子と水素結合を形成していた。

第五章 総括と展望

F 型 ATPase (F₀F₁) のイオンポンプとしての役割

本研究では、細菌細胞質の酸性化を抑制するため、H⁺能動輸送酵素として働く F 型 ATPase (F₀F₁) が存在する可能性を示した。すなわち、*S. mutans* の F₀F₁ の八種類のサブユニット遺伝子を大腸菌の細胞膜に発現させ、本酵素が、大腸菌 F₀F₁ と同じ条件では ATP 合成活性を示さないこと、pH5.5~6.5 で ATP 駆動によって H⁺を輸送することを示した。それによって、本酵素が、口腔内の酸性環境で生存する *S. mutans* の耐酸性に寄与するということを示唆した。F 型 H⁺-ATPase は原核生物から真核生物まで普遍的に存在し、これまで、生理的には主に ATP を合成する役割を果たすと考えられてきた。本研究により、様々な環境で生育する細菌には、H⁺排出ポンプの役割を果たす F 型 H⁺-ATPase が存在している可能性が示された。酸性環境で生育する他の *Streptococcus* 属や *Lactobacillus* 属などでも、ATPase 活性の至適 pH が酸性側にあることが示唆されており、*S. mutans* 酵素と同様に H⁺排出ポンプの役割を果たしていると推測される。

F 型 ATPase と近縁の V 型 ATPase は、真核細胞では酸性オルガネラを維持する役割がよく知られているが、一部の細菌が持つ相同酵素には ATP 合成酵素として機能するものがあり、生物は、V 型 ATPase を ATP 合成または H⁺能動輸送酵素として使い分けてきたと考えられている (Forgac 2007; Grüber and Marshansky 2008)。本研究によって、F 型 ATPase にも、二つの役割があることが示唆された。

S. mutans F₀F₁ における酵素内回転の方向

生体膜に存在する F₀F₁ 分子が、H⁺の電気化学的ポテンシャル差を駆動力とし

た ATP 合成酵素として機能するには、*c*-リングを一定方向に回転させることで触媒部位を ATP 合成反応が起きるように連続的に構造変化させている。酵素内の回転子が固定子に対して 1 回転する毎に 3 個の ATP が合成される。しかし、これを果たすために運ばれる H⁺の数は、種によって様々であると考えられる。すなわち、それぞれの *c* サブユニットには H⁺結合部位が一つずつあるが、細菌の *c*-リングに含まれるサブユニット数は種によって異なっているからである。大腸菌や好熱性 *Bacillus* は *c*₁₀-リングを持つことが示唆されているが (Jiang *et al.* 2001; Mitome *et al.* 2004)、好アルカリ性細菌の *B. pseudofirmus* およびラン藻の *S. platensis* では、それぞれ、*c*₁₃-および *c*₁₅-リングであることが分かっている。これらは、*c* サブユニットの数が多く、比較的小さな電気化学的ポテンシャル差を利用して回転のステップを合成方向へ進めることができるように見える。これに対して、H⁺ポンプとして働く酵母液胞の V 型 ATPase では、6 から 7 個の *c* サブユニットが含まれている可能性があり、ATP 合成を行う *c*-リング回転を進めるには、より大きなポテンシャル差が必要であると考えられる (Saroussi and Nelson 2009)。本研究で、*S. mutans* 由来の SF₀F₁ が ATP 合成を示さなかったことから、本分子に含まれる *c* サブユニットの数がいくつなのかは興味深い。

ATP 合成酵素分子の回転を直接観察していると、ATP 分解による酵素内回転がしばしば中断される (Nakanishi-Matsui and Futai 2009)。理由の一つは、触媒部位の構造が一時的に変化し、ATP 加水分解の生成物である ADP を遊離しない「ADP 阻害状態」が生じるためである。この機構の意義は議論のあるところであるが、細胞膜の電気化学的ポテンシャル差が減少したとき、細胞の ATP 分解が進むのを抑制するとも考えられている (Feniouk *et al.* 2007)。また、アジ化物イオンは、ADP 阻害状態を安定化させると言われる。SF₀F₁ においてアジ化物イオンの感受性が低下していたのは、*S. mutans* 酵素の ADP 阻害状態が不安定なためかもしれない。*S. mutans* の F₀F₁ は、H⁺排出ポンプとして働くために ATP 分解方向への回転を止めない酵素である可能性があり、実際に、本研

究で構築した SF₀F₁ の回転を一分子で観察したいと考えている。

***S. mutans* の F₀F₁ が薬剤標的になりうる可能性**

最近、F₀F₁ 分子が、新たな薬剤の標的になりうることが報告されている。肺炎双球菌である *Streptococcus pneumoniae* には、抗マラリア薬として知られる Mefloquine が、結核菌の *Mycobacterium tuberculosis* には、最近、米国で多剤耐性結核治療薬として認可された Bedaquiline が、F₀F₁ 特異的な阻害剤として知られている (Martín-Galiano *et al.* 2002; Palomino and Martin 2013)。それぞれ薬剤の耐性菌が単離されており、Mefloquine 耐性菌は *c* および *a* サブユニットに、Bedaquiline 耐性菌は *c* サブユニットにアミノ酸置換が見つかった。したがって、これらの薬剤は、F₀F₁ の H⁺ 輸送路を特異的に阻害して病原菌の ATP 産生を妨げると考えられる。

c サブユニットのアミノ酸配列の相同性は種間であまり高くなく、ヒトと *S. mutans* の間では 22% である (第一章、表 1-1)。本研究で、H⁺ 輸送の阻害剤である DCCD によって ATPase 活性が殆ど阻害されなかったことも、*S. mutans* の H⁺ 輸送路構造が ATP 合成酵素とは異なる可能性を示していると考えられる。よって、*S. mutans* の *c* サブユニットに特異的な阻害剤を見つけることができれば、ヒトのう蝕や、感染性心内膜炎を予防する薬剤となる可能性があると考えられる。

参考文献

Abrahams, J. P., Leslie, A. G. W., Lutter, R., and Walker, J. E. (1994)
Structure at 2.8 Å resolution of F₁-ATPase from bovine heart mitochondria.
Nature, **370**, 621-628.

Ajdić, D., McShan, W. M., McLaughlin, R. E., Savić, G., Chang, J., Carson, M. B., Primeaux, C., Tian, R., Kenton, S., Jia, H., Lin, S., Qian, Y., Li, S., Zhu, H., Najar, F., Lai, H., White, J., Roe, B. A., and Ferretti J. J., (2002)
Genome sequence of *Streptococcus mutans* UA159, a cariogenic dental pathogen., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **99**, 14434-14439.

Angevine, C. M., Herold, K. A., and Fillingame, R. H. (2003)
Aqueous access pathways in subunit a of rotary ATP synthase extend to both sides of the membrane.
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., **100**, 13179-13183.

Araki, M., Hoshi, K., Fujiwara, M., Sasaki, Y., Yonezawa, H., Senpuku, H., Iwamoto-Kihara, A., and Maeda, M. (2013)
Complementation of the F₀ c subunit of *Escherichia coli* with that of *Streptococcus mutans* and properties of the hybrid F₀F₁ ATP synthase.
J. Bacteriol., **195**, 4873-4878.

Arechaga, I., and Jones, P. C. (2001)
The rotor in the membrane of the ATP synthase and relatives.
FEBS Lett., **494**, 1-5.

Arnold, I., Pfeiffer, K., Neupert, W., Stuart, R. A., and Schägger, H. (1998)
Yeast mitochondrial F₁F₀-ATP synthase exists as a dimer: identification of three dimer-specific subunits.
EMBO J., **17**, 7170-7178.

Assadi-Porter, F. M., and Fillingame, R. H. (1995)
Proton-translocating carboxyl of subunit c of F₁F₀ H⁺-ATP synthase: the unique environment., *Biochemistry*, **34**, 16186-16193.

Bald, D., Amano, T., Muneyuki, E., Pitard, B., Rigaud, J. L., Kruij, J., Hisabori, T., Yoshida, M., and Shibata, M. (1998)

ATP synthesis by F₀F₁-ATP synthase independent of noncatalytic nucleotide binding sites and insensitive to azide inhibition.

J. Biol. Chem., **273**, 865–870.

Becher, B., and Müller, V. (1994)

Delta mu Na⁺ drives the synthesis of ATP via an delta mu Na⁺-translocating F₁F₀-ATP synthase in membrane vesicles of the archaeon *Methanosarcina mazei* Gö1.

J. Bacteriol., **176**, 2543-2550.

Beighton, D., Gilbert, S. C., Clark, D., Mantzourani, M., Al-Haboubi, M., Ali, F., Ransome, E., Hodson, N., Fenlon, M., Zoitopoulos, L., and Gallagher, J. (2008) Isolation and identification of bifidobacteriaceae from human saliva. *Appl. Environ. Microbiol.*, **74**, 6457-6460.

Bender, G. R., Sutton, S. V., and Marquis, R. E. (1986)

Acid tolerance, proton permeabilities, and membrane ATPases of oral streptococci., *Infect. Immun.*, **53**, 331-338.

Boyer, P. D. (1989)

A perspective of the binding change mechanism for ATP synthesis.

FASEB J., **3**, 2164-2178.

Boyer, P. D. (1997)

The ATP synthase--a splendid molecular machine.

Annu. Rev. Biochem., **66**, 717-749.

Bowler, M. W., Montgomery, M. G., Leslie, A. G., and Walker, J. E., (2006) How azide inhibits ATP hydrolysis by the F⁻ATPases.

Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., **103**, 8646-8649

Braig, K., Menz, R. I., Montgomery, M. G., Leslie, A. G., and Walker, J. E. (2000) Structure of bovine mitochondrial F(1)-ATPase inhibited by Mg²⁺ ADP and aluminium fluoride., *Structure*, **8**, 567-573.

Brandt, K., Maiwald, S., Herkenhoff-Hesselmann, B., Gnirss, K., Greie, J. C., Dunn, S. D., and Deckers-Hebestreit, G. (2013) Individual interactions of the *b* subunits within the stator of the *Escherichia coli* ATP Synthase. *J. Biol. Chem.*, **288**, 24465-24479.

Buskiewicz, I., Deuerling, E., Gu, S., Jockel, J., Rodnina, M. V., Bukau, B., and Wintermeyer, W. (2004)

Trigger factor binds to ribosome-signal-recognition particle (SRP) complexes and is excluded by binding of the SRP receptor.

Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **101**, 7902-7906.

Cain, B. D., and Simoni, R. D. (1989)

Proton translocation by the F₁F₀ATPase of *Escherichia coli*. Mutagenic analysis of the *a* subunit.

J. Biol. Chem., **264**, 3292-3300.

Cedar, H., and Schwartz, J. H. (1969)

The asparagine synthetase of *Escherichia coli*. I. Biosynthetic role of the enzyme, purification, and characterization of the reaction products.

J. Biol. Chem., **244**, 4112-4121.

Cingolani, G., and Duncan, T. M. (2011)

Structure of the ATP synthase catalytic complex (F₁) from *Escherichia coli* in an autoinhibited conformation.

Nat. Struct. Mol. Biol., **18**, 701-707.

Dashper, S. G., and Reynolds, E. C. (1992)

pH regulation by *Streptococcus mutans*.

J. Dent. Res., **71**, 1159-1165.

Dashper, S. G., and Reynolds, E. C. (1996)

Lactic acid excretion by *Streptococcus mutans*.

Microbiology, **142**, 33-39.

de Gier, J. W., and Luirink, J. (2003)

The ribosome and YidC. New insights into the biogenesis of *Escherichia coli* inner membrane proteins.

EMBO Rep., **4**, 939-943.

Del Rizzo, P. A., Bi, Y., Dunn, S. D., and Shilton, B. H. (2002)

The "second stalk" of *Escherichia coli* ATP synthase: structure of the isolated dimerization domain.

Biochemistry, **41**, 6875-6884.

Dimroth, P., and Cook, G. M. (2004)

Bacterial Na⁺- or H⁺-coupled ATP synthases operating at low electrochemical potential., *Adv. Microb. Physiol.*, **49**, 175-218.

Dong, Y., Palmer, S. R., Hasona, A., Nagamori, S., Kaback, H. R., Dalbey, R. E., and Brady, L. J. (2008)

Functional overlap but lack of complete cross-complementation of *Streptococcus mutans* and *Escherichia coli* YidC orthologs.

J. Bacteriol., **190**, 2458-2469.

Douglas, C. W., Heath, J., Hampton, K. K., and Preston, F. E. (1993)

Identity of viridans *streptococci* isolated from cases of infective endocarditis.

J. Med. Microbiol., **39**, 179-182.

du Plessis, D. J., Nouwen, N., and Driessen, A. J. (2011)

The Sec translocase.

Biochim. Biophys. Acta., **1808**, 851-865.

Evans Jr, D. J. (1969)

Membrane adenosine triphosphatase of *Escherichia coli* : activation by calcium ion and inhibition by monovalent cations.

J. Bacteriol., **100**, 914-922.

Feniouk, B. A., Suzuki, T., and Yoshida, M. (2007)

Regulatory interplay between proton motive force, ADP, phosphate, and subunit epsilon in bacterial ATP synthase., *J. Biol. Chem.*, **282**, 764-772.

- Fillingame, R. H., Angevine, C. M., and Dmitriev, O. Y. (2003)
Mechanics of coupling proton movements to *c*-ring rotation in ATP synthase.
FEBS Lett., **555**, 29-34.
- Fillingame, R. H., Jiang, W., and Dmitriev, O. Y. (2000)
Coupling H⁺ transport to rotary catalysis in F⁻-type ATP synthases: structure and organization of the transmembrane rotary motor.
J. Exp. Biol., **203**, 9-17.
- Fillingame, R. H., Oldenburg, M., and Fraga, D. (1991)
Escherichia coli F₁F₀-ATP synthase reduces reactivity of aspartyl 61 with dicyclohexylcarbodiimide., *J. Biol. Chem.*, **266**, 20934-20939.
- Forgac, M. (2007)
Vacuolar ATPases: rotary proton pumps in physiology and pathophysiology.
Nat. Rev. Mol. Cell. Biol., **8**, 917-929.
- Fozo, E. M., and Quivey, R. G. Jr. (2004)
The *fabM* gene product of *Streptococcus mutans* is responsible for the synthesis of monounsaturated fatty acids and is necessary for survival at low pH., *J. Bacteriol.*, **186**, 4152-4158.
- Fujikawa, M., Imamura, H., Nakamura, J., and Yoshida, M. (2012)
Assessing actual contribution of IF₁, inhibitor of mitochondrial FoF₁, to ATP homeostasis, cell growth, mitochondrial morphology, and cell viability.
J. Biol. Chem., **287**, 18781-18787.
- Futai, M., Noumi, T., and Maeda, M. (1989)
ATP synthase (H⁺-ATPase): results by combined biochemical and molecular biological approaches., *Annu. Rev. Biochem.* **58**, 111-136.
- Futai, M., Sternweis, P. C., and Heppel, L. A. (1974)
Purification and properties of reconstitutively active and inactive adenosinetriphosphatase from *Escherichia coli*.
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., **71**, 2725-2729.

- Futai, M., Sun-Wada, G. H., and Wada, Y. (2004)
Proton translocating ATPase: including unique enzymes coupling catalysis and proton translocation through mechanical rotation. in Handbook of ATPases: Biochemistry, Cell Biology, Pathophysiology, (edited by Futai, M. Wada, Y. and Kaplan, J. H.), Wiley-VCH Verlag, Weinheim Germany, pp. 237–260.
- Girvin, M. E., Rastogi, V. K., Abildgaard, F., Markley, J. L., and Fillingame, R. H. (1998)
Solution structure of the transmembrane H⁺-transporting subunit *c* of the F₁F₀ ATP synthase.
Biochemistry, **37**, 8817-8824.
- Gohlke, H., Schlieper, D., and Groth, G. (2012)
Resolving the negative potential side (n-side) water-accessible proton pathway of F-type ATP synthase by molecular dynamics simulations.
J. Biol. Chem., **287**, 36536-36543.
- Hakulinen, J. K., Klyszejko, A. L., Hoffmann, J., Eckhardt-Strelau, L., Brutschy, B., Vonck, J., and Meier, T. (2012)
Structural study on the architecture of the bacterial ATP synthase Fo motor.
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., **109**, E2050-E2056.
- Hasona, A., Zuobi-Hasona, K., Crowley, P. J., Abranches, J., Ruelf, M. A., Bleiweis, A. S., and Brady, L. J. (2007)
Membrane composition changes and physiological adaptation by *Streptococcus mutans* signal recognition particle pathway mutants.
J. Bacteriol., **189**, 1219-1230.
- Hasona, A., Crowley, P. J., Levesque, C. M., Mair, R. W., Cvitkovitch, D. G., Bleiweis, A. S., and Brady, L. J. (2005)
Streptococcal viability and diminished stress tolerance in mutants lacking the signal recognition particle pathway or YidC2.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **102**, 17466-17471.

- Hermolin, J., and Fillingame, R. H. (1989)
H⁺-ATPase activity of *Escherichia coli* F₁F₀ is blocked after reaction of dicyclohexylcarbodiimide with a single proteolipid (subunit *c*) of the F₀ complex.
J. Biol. Chem., **264**, 6896-3903.
- Hoppe, J., and Sebald, W. (1984)
The proton conducting F₀-part of bacterial ATP synthases.
Biochim. Biophys. Acta., **768**, 1-27.
- Hosokawa, H., Nakanishi-Matsui, M., Kashiwagi, S., Fujii-Taira, I., Hayashi, K., Iwamoto-Kihara, A., Wada, Y., and Futai, M. (2005)
ATP-dependent rotation of mutant ATP synthases defective in proton transport.
J. Biol. Chem., **280**, 23797-23801.
- Iwamoto, A., Omote, H., Hanada, H., Tomioka, N., Itai, A., Maeda, M., and Futai, M. (1991)
Mutations in Ser174 and the glycine-rich sequence (Gly149, Gly150, and Thr156) in the beta subunit of *Escherichia coli* H⁺-ATPase.
J. Biol. Chem., **266**, 16350-16355.
- Jiang, W., Hermolin, J., and Fillingame, R. H. (2001)
The preferred stoichiometry of *c* subunits in the rotary motor sector of *Escherichia coli* ATP synthase is 10.
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., **98**, 4966-4971.
- Jones, P. C., (2001)
Introduction of a carboxyl group in the first transmembrane helix of *Escherichia coli* F₁F₀ ATPase subunit *c* and cytoplasmic pH regulation.
J. Bacteriol., **183**, 1524-1530.
- Kaim, G. and Dimroth, P. (1998)
ATP synthesis by the F₁F₀ ATP synthase of *Escherichia coli* is obligatorily dependent on the electric potential.
FEBS Lett. **434**, 57-60.

- Klionsky, D. J., Brusilow, W. S., Simoni, R. D. (1984)
In vivo evidence for the role of the ϵ subunit as an inhibitor of the proton-translocating ATPase of *Escherichia coli*.
J. Bacteriol., **160**, 1055-1060.
- Kobayashi, H. and Anraku, Y. (1972)
Membrane-bound adenosine triphosphatase of *Escherichia coli*. I. Partial purification and properties.
J. Biochem., **71**, 387-399.
- Kobayashi, H., Maeda, M., and Anraku, Y. (1977)
Membrane-bound adenosine triphosphatase of *Escherichia coli*. III. Effects of sodium azide on the enzyme functions.
J. Biochem., **81**, 1071-1077.
- Kol, S., Nouwen, N., and Driessen, A. J. (2008)
Mechanisms of YidC-mediated insertion and assembly of multimeric membrane protein complexes.
J. Biol. Chem., **283**, 31269-31273.
- Kol, S., Turrell, B., de Keyzer, J., van der Laan, M., Nouwen, N., and Driessen, A. J. (2006)
YidC-mediated membrane insertion of assembly mutants of subunit *c* of the F_0F_1 ATPase.
J. Biol. Chem. **281**, 29762-29768.
- Kol, S., Majczak, W., Heerlien, R., van der Berg, J. P., Nouwen, N., and Driessen, A. J. M. (2009)
Subunit *a* of the F_1F_0 ATP synthase requires YidC and SecYEG for membrane insertion.
J. Mol. Biol. **390**, 893-901.
- Kuhnert, W. L., Zheng, G., Faustoferri, R. C., and Quivey, R. G. Jr. (2004)
The F-ATPase operon promoter of *Streptococcus mutans* is transcriptionally regulated in response to external pH.
J. Bacteriol., **186**, 8524-8528.

- Laemmli, U. K. (1970)
Cleavage of structural proteins during the assembly of the bacteriophage.
Nature, **227**, 680-685.
- Laubinger, W., and Dimroth, P. (1988)
Characterization of the ATP synthase of *Propionigenium modestum* as a primary sodium pump.
Biochemistry, **27**, 7531-7537.
- Lemos, J. A., Luzardo, Y., and Burne, R. A. (2007)
Physiologic effects of forced down-regulation of *dnaK* and *groEL* expression in *Streptococcus mutans*.
J. Bacteriol., **189**, 1582-1588.
- Len, A. C., Harty, D. W., and Jacques, N. A. (2004)
Stress-responsive proteins are upregulated in *Streptococcus mutans* during acid tolerance.
Microbiology, **150**, 1339-1351
- Lightowers, R. N., Howitt, S. M., Hatch, L., Gibson, F., and Cox, G. B. (1987)
The proton pore in the *Escherichia coli* F₀F₁-ATPase: a requirement for arginine at position 210 of the *a*-subunit.
Biochim. Biophys. Acta., **894**, 399-406.
- Loesche, W. J. (1986)
Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay.
Microbiol. Rev., **50**, 353-380.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A.L., and Randall, R.J. (1951)
Protein measurement with the Folin phenol reagent.
J. Biol. Chem. **193**, 265-275.
- Maeda, M. (2008)
ATP synthases: bioinformatic based insights into how their electrochemically driven motor comprised of subunits *a* and *c* might serve as a drug target.
J. Bioenerg. Biomembr., **40**, 117-121.

Magalhães, P. P., Paulino, T. P., Thedei, G. Jr., Larson, R. E., and Ciancaglini, P. (2003), A 100 kDa vanadate and lanzoprazole-sensitive ATPase from *Streptococcus mutans* membrane., *Arch. Oral. Biol.*, **48**, 815-824.

Maloney, P. C. (1977)

Obligatory coupling between proton entry and the synthesis of adenosine 5'-triphosphate in *Streptococcus lactis*.

J. Bacteriol. **132**, 564-575.

Matsui, R., and Cvitkovitch, D. (2010)

Acid tolerance mechanisms utilized by *Streptococcus mutans*.

Future Microbiol., **5**, 403-417.

Maeda, M. (2008)

ATP synthases: bioinformatic based insights into how their electrochemically driven motor comprised of subunit *a* and *c* might serve as a drug target.

J. Bioenerg. Biomembr., **40**, 117-121.

Martín-Galiano, A. J., Gorgojo, B., Kunin, C. M., and de la Campa, A. G. (2002), Mefloquine and new related compounds target the F₀ complex of the F₀F₁ H⁺-ATPase of *Streptococcus pneumoniae*.

Antimicrob. Agents. Chemother., **46**, 1680-1687.

Meier, T., Polzer, P., Diederichs, K., Welte, W., and Dimroth, P. (2005)

Structure of the rotor ring of F⁻Type Na⁺-ATPase from *Ilyobacter tartaricus*.

Science, **308**, 659-662.

Miller, M. J., Oldenburg, M., and Fillingame, R. H. (1990)

The essential carboxyl group in subunit *c* of the F₁F₀ ATP synthase can be moved and H⁺-translocating function retained.

Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., **87**, 4900-4904.

Mitome, N., Ono, S., Sato, H., Suzuki, T., Sone, N., and Yoshida, M. (2010)

Essential arginine residue of the Fo-*a* subunit in FoF₁-ATP synthase has a role to prevent the proton shortcut without *c*-ring rotation in the Fo proton channel., *Biochem. J.*, **430**, 171-177.

- Mitome, N., Suzuki, T., Hayashi, S., and Yoshida, M. (2004)
Thermophilic ATP synthase has a decamer *c*-ring: indication of noninteger 10:3 H⁺/ATP ratio and permissive elastic coupling.
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., **101**, 12159-12164.
- Mori, H. and Ito, K. (2001)
The Sec protein-translocation pathway.
Trends. Microbiol., **9**, 494-500.
- Moriyama, Y., Iwamoto, A., Hanada, H., Maeda, M., and Futai, M., (1991)
One-step purification of *Escherichia coli* H⁺-ATPase (F₀F₁) and its reconstitution into liposomes with neurotransmitter transporters.
J. Biol. Chem., **266**, 22141-22146.
- Nakanishi-Matsui, M., and Futai, M. (2008)
Stochastic rotational catalysis of proton pumping F⁻-ATPase.
Philos. Trans. R Soc. Lond. B Biol. Sci., **363**, 2135-2142.
- Nakanishi-Matsui, M., Kashiwagi, S., Hosokawa, H., Cipriano, D. J., Dunn, S. D., Wada, Y., and Futai, M. (2006)
Stochastic high-speed rotation of *Escherichia coli* ATP synthase F₁ sector: the epsilon subunit-sensitive rotation.
J. Biol. Chem., **281**, 4126-4131.
- Neumann, S., Matthey, U., Kaim, G., and Dimroth, P. (1998)
Purification and properties of the F₁F₀ ATPase of *Ilyobacter tartaricus*, a sodium ion pump., *J. Bacteriol.*, **180**, 3312-3316.
- Nishi, T., and Forgac, M. (2002)
The vacuolar (H⁺)-ATPases--nature's most versatile proton pumps.
Nat. Rev. Mol. Cell. Biol., **3**, 94-103.
- Noji, H., Yasuda, R., Yoshida, M., and Kinoshita, K. Jr. (1997)
Direct observation of the rotation of F₁-ATPase.
Nature, **386**, 299-302.

Omote, H., Sambonmatsu, N., Saito, K., Sambongi, Y., Iwamoto-Kihara, A., Yanagida, T., Wada, Y., and Futai, M. (1999)

The gamma-subunit rotation and torque generation in F₁-ATPase from wild-type or uncoupled mutant *Escherichia coli*.

Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., **96**, 7780-7784.

Orriss, G. L., Leslie, A. G., Braig, K., and Walker, J. E. (1998)

Bovine F₁-ATPase covalently inhibited with 4-chloro-7-nitrobenzofurazan: the structure provides further support for a rotary catalytic mechanism.

Structure, **6**, 831-837.

Oster, G., and Wang, H. (1999)

ATP synthase: two motors, two fuels.

Structure, **7**, R67-R72.

Palomino, J. C., and Martin, A. (2013)

TMC207 becomes bedaquiline, a new anti-TB drug.

Future. Microbiol., **8**, 1071-1080.

Pogoryelov, D., Yildiz, O., Faraldo-Gómez, J. D., and Meier, T. (2009)

High-resolution structure of the rotor ring of a proton-dependent ATP synthase.

Nat. Struct. Mol. Biol., **16**, 1068-1073.

Pogoryelov, D., Klyszejko, A. L., Krasnoselska, G. O., Heller, E. M., Leone, V., Langer, J. D., Vonck, J., Müller, D. J., Faraldo-Gómez, J. D., and Meier, T.

(2012), Engineering rotor ring stoichiometries in the ATP synthase.

Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., **109**, E1599-E1608.

Preiss, L., Klyszejko, A. L., Hicks, D. B., Liu, J., Fackelmayer, O. J., Yildiz, Ö., Krulwich, T. A., and Meier, T. (2013)

The *c*-ring stoichiometry of ATP synthase is adapted to cell physiological requirements of alkaliphilic *Bacillus pseudofirmus* OF4.

Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., **110**, 7874-7879.

- Preiss, L., Yildiz, O., Hicks, D.B., Krulwich, T.A., and Meier, T. (2010)
A new type of proton coordination in an F₁F₀-ATP synthase rotor ring.
PLoS Biol., **8**, e1000443.
- Quivey, R. G., Kuhnert, W. L., and Hahn, K., (2001)
Genetics of acid adaptation in oral *streptococci*.
Crit. Rev. Oral. Biol. Med., **12**, 301-314.
- Revington, M., McLachlin, D. T., Shaw, G. S., and Dunn, S. D. (1999)
The dimerization domain of the *b* subunit of the *Escherichia coli*
F₁F₀-ATPase., *J. Biol. Chem.*, **274**, 31094-31101.
- Sambongi, Y., Iko, Y., Tanabe, M., Omote, H., Iwamoto-Kihara, A., Ueda, I.,
Yanagida, T., Wada, Y., and Futai, M. (1999)
Mechanical rotation of the *c* subunit oligomer in ATP synthase (F₀F₁): direct
observation., *Science*, **286**, 1722-1724.
- Saroussi, S., and Nelson, N. (2009)
The little we know on the structure and machinery of V-ATPase.
J. Exp. Biol., **212**, 1604-1610.
- Sebald, W., Machleidt, W., and Wachter, E. (1980)
N,N'-dicyclohexylcarbodiimide binds specifically to a single glutamyl residue
of the proteolipid subunit of the mitochondrial adenosinetriphosphatases
from *Neurospora crassa* and *Saccharomyces cerevisiae*.
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., **77**, 785-789.
- Sheng, J. and Marquis, R., E. (2006)
Enhanced acid resistance of oral *streptococci* at lethal pH values associated
with acid-tolerant catabolism and with ATP synthase activity.
FEMS Microbiol. Lett., **262**, 93-98.
- Smith, A. J., Quivey, R. G. Jr., and Faustoferri, R. C. (1996)
Cloning and nucleotide sequence analysis of the *Streptococcus mutans*
membrane-bound, proton-translocating ATPase operon.
Gene, **183**, 87-96.

- Soontharapirakkul, K., Promden, W., Yamada, N., Kageyama, H., Incharoensakdi, A., Iwamoto-Kihara, A., and Takabe, T. (2011)
Halotolerant cyanobacterium *Aphanothece halophytica* contains an Na⁺-dependent F₁F₀-ATP synthase with a potential role in salt-stress tolerance., *J. Biol. Chem.*, **286**, 10169-10176.
- Steffens, K., Hoppe, J., and Altendorf, K. (1988)
F₀ part of the ATP synthase from *Escherichia coli*. Influence of subunits *a*, and *b*, on the structure of subunit *c*.
Eur. J. Biochem., **170**, 627-630.
- Sutton, S. V. W., and Marquis, R. E. (1987)
Membrane-associated and solubilized ATPases of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguis*.
J. Dent. Res., **66**, 1095-1098.
- Suzuki, T., Ozaki, Y., Sone, N., Feniouk, B. A., and Yoshida, M. (2007)
The product of *uncI* gene in F₁F₀-ATP synthase operon plays a chaperone-like role to assist *c*-ring assembly.
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., **104**, 20776-20781.
- Symersky, J., Pagadala, V., Osowski, D., Krah, A., Meier, T., Faraldo-Gómez, J. D., and Mueller, D. M. (2012)
Structure of the *c*₁₀ ring of the yeast mitochondrial ATP synthase in the open conformation.
Nat. Struct. Mol. Biol., **19**, 485-491
- Tanabe, M., Nishio, K., Iko, Y., Sambongi, Y., Iwamoto-Kihara, A., Wada, Y., and Futai, M. (2001)
Rotation of a complex of the gamma subunit and *c* ring of *Escherichia coli* ATP synthase. The rotor and stator are interchangeable.
J. Biol. Chem., **276**, 15269-15274.
- Tomashek, J. J., Glagoleva, O. B., and Brusilow, W. S. (2004)
The *Escherichia coli* F₁F₀ ATP synthase displays biphasic synthesis kinetics.
J. Biol. Chem. **279**, 4465-4470.

- Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J., (1979)
Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications.
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., **76**, 4350-4354.
- Vollmar, M., Schlieper, D., Winn, M., Buechner, C., and Groth, G. (2009)
Structure of the c_{14} rotor ring of the proton translocating chloroplast ATP synthase.
J. Biol. Chem., **284**, 18228-18235.
- Wada, T., Long, J. C., Zhang, D., and Vik, S. B. (1999)
A novel labeling approach supports the five-transmembrane model of subunit *a* of the *Escherichia coli* ATP synthase.
J. Biol. Chem., **274**, 17353-17357.
- Weber, J. (2006)
ATP synthase: subunit-subunit interactions in the stator stalk.
Biochim. Biophys. Acta., **1757**, 1162-1170.
- Weber, J., Wilke-Mounts, S., Lee, R. S., Grell, E., and Senior, A. E. (1993)
Specific placement of tryptophan in the catalytic sites of *Escherichia coli* F_1 -ATPase provides a direct probe of nucleotide binding: maximal ATP hydrolysis occurs with three sites occupied.
J. Biol. Chem., **268**, 20126-20133.
- Yi, L., Celebi, N., Chen, M., and Dalbey, R. E. (2004)
Sec/SRP requirements and energetics of membrane insertion of subunits *a*, *b*, and *c* of the *Escherichia coli* F_1F_0 ATP synthase.
J. Biol. Chem. **279**, 39260-39267.
- Yoshida, M., Allison, W. S., Esch, F. S., and Futai, M. (1982)
The specificity of carboxyl group modification during the inactivation of the *Escherichia coli* F_1 -ATPase with dicyclohexyl [14 C] carbodiimide.
J. Biol. Chem., **257**, 10033-10037.

Zhang, R.H., and Fillingame, (1994)

Essential aspartate in subunit *c* of F_1F_0 ATP synthase. Effect of position 61 substitutions in helix-2 on function of Asp24 in helix-1.

J. Biol. Chem., **269**, 5473-5479.

謝辞

本研究は、長浜バイオ大学大学院 細胞機能学研究室で行われたものです。

本研究を遂行し、博士論文を作製するにあたり、直接の御指導ならびに御教示を賜りました岩本（木原）昌子先生に、心より感謝申し上げます。研究の議論に貴重な時間を惜しみなく割いてくださり、数々の御助言や激励を頂きましたことに、重ねて深く感謝致します。

前田正知先生（岩手医科大学）には、実験材料である *S. mutans* UA159 株の染色体 DNA を分与して頂きました。心よりお礼申し上げます。

また、本論文を作製するにあたり、有益な御助言ならびに御指導を賜りました三輪正直先生、山本章嗣先生、西義介先生、水上民夫先生にも深く感謝致します。

高橋健一先生には、第四章の *S. mutans* の *c* サブユニットのホモロジーモデリングを行うために MOE の使用法について、御指導および御助言を賜りました。深く感謝致します。

最後に、日々の研究を進めるにあたり、様々な議論や貴重な御助言を下さいました細胞機能学研究室の皆様にも心より感謝致します。