

## 学位授与記録簿（博士）

バイオサイエンス研究科

氏名	佐々木 由香
学位の種類	博士（バイオサイエンス）
授与年月日	2014年（平成26年）3月15日
学位授与の要件	本学学位規程第18条第1項該当者（学位規則第4条第1項）
学位論文の題名	<i>Streptococcus mutans</i> F型 H <sup>+</sup> -ATPase の大腸菌細胞膜における 発現と性状解析
審査委員	主査 教授 山本 章嗣 副査 教授 西 義介 副査 教授 水上 民夫

### 論文内容要旨

F 型 H<sup>+</sup>-ATPase (F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>) は、生物に普遍的な膜酵素であり、ミトコンドリア内膜、葉緑体のチラコイド膜、細菌の細胞膜などに局在する。本酵素は、H<sup>+</sup>の電気化学的ポテンシャル差による H<sup>+</sup>輸送と共役し、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 F<sub>0</sub>F<sub>1</sub> は 8 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 F<sub>1</sub> 部分 (α<sub>3</sub>β<sub>3</sub>γδε) と H<sup>+</sup>輸送路を形成する膜内在性の F<sub>0</sub> 部分 (a<sub>b</sub><sub>2</sub>c<sub>10-15</sub>) からなる。

う蝕の原因菌として知られる *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) の細胞膜にも F<sub>0</sub>F<sub>1</sub> が存在することが、そのゲノム配列より示唆されている。*S. mutans* 菌は口腔内の酸性環境で生育することから、*S. mutans* の F 型 H<sup>+</sup>-ATPase は、細胞から H<sup>+</sup>を能動的に排出し、菌の耐酸性に寄与しているのではないかと考えられている。しかし、*S. mutans* 細胞膜の F<sub>0</sub>F<sub>1</sub> が ATP で駆動される H<sup>+</sup>能動輸送能を持つか否かも含め、これまでに分子レベルの解析はなされていない。本研究では、*S. mutans* F 型 H<sup>+</sup>-ATPase を大腸菌に発現させ、その性状を明らかにし、*S. mutans* における本酵素の役割について考察した。

*S. mutans* の 8 種類のサブユニット遺伝子はクラスター（オペロン）を形成しているので、全長を 3 つの領域に分けて PCR で増幅クローン化した。これを IPTG 誘導できる発現プラスミドに組み込んで大腸菌の F<sub>0</sub>F<sub>1</sub> 欠失株に導入し、細胞膜画分を反転膜小胞として調製し、発現させた *S. mutans* F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>(SF<sub>0</sub>F<sub>1</sub>) の性状を解析した。

その結果、大腸菌 F<sub>0</sub>F<sub>1</sub> (EF<sub>0</sub>F<sub>1</sub>) の ATPase 活性はアルカリ側で高いが、SF<sub>0</sub>F<sub>1</sub> の場合には pH7.0 で最大となった。また、SF<sub>0</sub>F<sub>1</sub> が ATP 駆動性の H<sup>+</sup>能動輸送を有し、pH5.5 付近の酸性で H<sup>+</sup>輸送活性のピークを持つことを初めて明らかにした。さらに、SF<sub>0</sub>F<sub>1</sub> は ATP

合成酵素として働かないことを示すことができた。以上より、*S. mutans* 細胞膜に存在する  $F_0F_1$  が、ATP 合成酵素としてではなく、プロトン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 ( $SF_0EF_1$ ) を構築したところ、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  $F_0$  側にあると考えられた。

次に、 $SF_0F_1$  の  $c$  サブユニット遺伝子に部位特異的変異を導入し、さらに解析を行った。その結果、異種間の  $c$  サブユニットで保存性の高い Glu-53 とその近傍のアミノ酸残基が、 $SF_0F_1$  においても  $H^+$  輸送路形成に重要であることが示唆された。 $c$  サブユニットの Ser-17 と Glu-20 をそれぞれ大腸菌の 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ことが示唆された。

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、本研究は、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、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。

## 論文審査結果要旨

本研究は *S. mutans* 菌の保持する F 型  $H^+$ -ATPase の機能を明らかにすることを目的として、F 型  $H^+$ -ATPase を欠損させた大腸菌の細胞膜上に *S. mutans* 菌 F 型  $H^+$ -ATPase を発現させ、その反転小胞膜を調製し、本酵素の性状解析を行っている。その結果、1.  $F_0F_1$  の成分を全て大腸菌で発現させる事に成功したこと。2. ATP 合成能は認められなかったが、ATPase 活性とプロトン輸送能を持ち、その至適 pH が大腸菌の F 型  $H^+$ -ATPase に比べ、酸性側にシフトしていることなど、*S. mutans* の F 型  $H^+$ -ATPase の性質が大腸菌のそれと異なることを明確に示したこと。3. キメラタンパク質の構築により  $F_0$  部分に酸性でプロトンを輸送する機構があることを示唆したこと。4. これらの実験結果から、*S. mutans* 菌では、F 型  $H^+$ -ATPase が細胞外の酸性環境に対抗して細胞内 pH の恒常性を保つ機能を果たしているという仮説に対する有力な証拠を提出したことが高く評価できる。また、本論文著者は、細胞膜上に呼吸鎖を持たない *S. mutans* 菌が、なぜ、F 型  $H^+$ -ATPase を持つかというオリジナルな疑問を発展させ、*S. mutans* 菌の F 型  $H^+$ -ATPase 遺伝子を単離して、独自の実験系を構築している点も評価できる。本論文で得られた結果は J. Bac., BBRC に報告されている。よく計画された正確な実験に裏づけられおり、博士の学位に十分適うものであるとすべての審査委員の意見が一致した。質疑応答においても、わかりやすく適切に答えており、博士の学位にふさわしい学識を十分備えていると判断された。