

氏名	辛 英 哲
授与した学位	博 士
専攻分野の名称	工 学
学位授与番号	博甲第1495号
学位授与の日付	平成8年3月25日
学位授与の要件	自然科学研究科生物資源科学専攻 (学位規則第4条第1項該当)
学位論文題目	大腸菌ATP合成酵素構成サブユニット間における相互作用に 関与する構造の解析：新たな遺伝生化学的手法を用いた β サブユニット内の相互作用領域の同定
論文審査委員	教授 金澤 浩 教授 虎谷 哲夫 教授 山田 秀徳 教授 尾坂 明義 教授 土屋 友房

学位論文内容の要旨

(目的) H^+ 輸送性ATP合成酵素は生物界に普遍的に存在し、複雑なサブユニット構造を持つ膜結型酵素である。本研究では本酵素の機能発現の分子機構を明らかにする基礎として機能発現に必須なサブユニット間相互作用を明らかにする新たな遺伝生化学的手法の確立と、 α 、 β 、 γ サブユニット間の相互作用に関与する β サブユニットの相互作用領域のアミノ酸残基レベルでの解析を目指した。

(方法) 1. 遺伝子工学的手法を用いて、 α 、 β 、 γ サブユニットの単独発現及び精製方法を確立し、従来より簡便に活性の最小単位である $\alpha_3\beta_3\gamma$ 複合体の再構成を可能とした。
2. 遺伝子工学的手法によりいくつかの領域に断片化した β の部分ペプチドを調製し、このペプチドを $\alpha_3\beta_3\gamma$ 複合体の再構成系に導入し、再構成活性に及ぼす影響を調べた。この結果、 β の部分ペプチドのうち、阻害能を有するものを見出し、相互作用領域を推定した。
3. 新たな変異遺伝子濃縮法を用いて、上記2.で推定した相互作用領域を中心に変異を導入し、分子集合異常を示す突然変異株を分離、解析した。

(結果と考察) サブユニット間相互作用の解析法及び相互作用領域について本研究で得られた成果のうち、最も重要な点は β の254から294アミノ酸残基領域が β サブユニットにおけるサブユニット間相互作用に関わる領域であることが示された事にある。特に種を越えて保存されている β の261から269のアミノ酸残基からなるプロリンリッチループが相互作用に寄与していることが示された。本研究で確立したサブユニット間相互作用を明らかにする新たな遺伝生化学的手法により、従来の生化学的あるいは遺伝学的アプローチのみでは得られなかった新しい知見を得ることができた。今後、この手法はATP合成酵素の機能発現に必須なサブユニット間相互作用の解明に有用と考えられる。

論文審査結果の要旨

本研究では、生体内の普遍的なエネルギー源物質であるATPを合成するATP合成酵素の構造と機能について分子レベルでの解明を目指した。特に、本酵素が有する複雑なサブユニット構造と機能の相関を明らかにする基礎として、活性中心を有するベータサブユニットに注目し、このサブユニットと他のサブユニットとの相互作用部位を系統的に明らかにすることを中心課題としている。また、その際新たな遺伝生化学上の方法論の確立を研究目的の一方の中心に据えている。研究計画の概略は、以下の4点から成立している。(1) ベータサブユニット中の他のサブユニットとの相互作用部位を明らかにするために、このサブユニットとともに活性中心形成に必須なアルファ、ガンマサブユニットに注目する。(2) これらのサブユニットから $\alpha\beta\gamma$ 複合体を再構成し、ベータの部分ペプチドの導入による再構成阻害実験から相互作用部位を推定する。(3) 推定した相互作用部位の中に変異を導入し、アミノ酸残基レベルで相互作用に重要な部分を同定する。(4) 一連の研究過程に於いて、サブユニット蛋白質の遺伝子工学を用いた新たな大量精製法の確立、変異遺伝子の高効率分離の新方法の確立、の2点に於いて新規方法を開発する。

以上の研究計画に基づき、ベータサブユニット中央部254残基から294残基の構造がベータサブユニットのアルファもしくはガンマサブユニットとの相互作用に重要な部分であることを明らかにした。これまでサブユニット相互作用の研究は遺伝学的あるいは生化学的のいずれかの方法で断片的に行われており、本研究のように両方法を駆使した系統的研究はない。また、計画(4)に基づく新規方法の開発にも成功した。これらの成果はATP合成酵素の構造と機能を解明するうえで大きな貢献となるとともに、研究方法自体が新規な内容を有しており、生体内に存在する多くのオリゴメリック蛋白質や情報伝達に関わる蛋白質の相互作用機構の解明にも貢献するものと考えられる。

以上の内容は144ページからなる博士論文に詳細に記載されている。またその内容は既報の3編と、現在投稿中の1編、執筆中の1編の英文論文として報告されることになっている。

本論文の審査会による詳細な吟味の結果、本論文は博士論文になりうるものと判断した。