2SE1

Foは回っているか？

Tsunoda P. Satoshi^{1,2}, ○吉田 賢右¹, Capaldi Roderick² (¹ 東工大・資源研、² オレゴン大)

ATP合成酵素は、生物界の大部分のATPを供給する酵素で、プロトン（水素イオン）の下り坂の流れのエネルギーでATPを作る。逆反応では、ATPの加水分解でプロトンを運ぶ。ATP合成酵素は、膜内部分でプロトンの輸送を行うFoと、膜外部分でATP合成分解を行うF1に、可逆的に分離できる。ATP合成酵素の最小構成は、F1($\alpha 3 \beta 3 \gamma \delta \epsilon$)+Fo(ab2c10-14?)の8種22～26個のサブユニットである。 $\alpha 3 \beta 3$ 、および、Fo-cはリング状に並んでいる。ATP合成酵素は回転するモーターである。モーターには回転子と固定子が必ずある。それでは、ATP合成酵素のサブユニットのいずれが回転子か。 γ と ϵ は回転子である。これは証明された。Fo-cサブユニットはどうか。これも回転子だろうと予想されている。しかし、いまのところ、exclusive evidenceはない。界面活性剤の悪影響によってFo-cの特異的阻害剤DCCDが効かなくなってしまった少し壊れたATP合成酵素なら、回っているのが見える。DCCDの効く健全なATP合成酵素の回転はまだ実証されていない。さて、本当はどのようなか？

S.P.Tsunoda, M. Yoshida, R. Capaldi : Is Fo rotating?

2SE3

Na⁺とH⁺駆動型べん毛間におけるキメラやハイブリッドモーター蛋白質の性質

○本間 道夫、浅井 友香子（名大・院理・生命理学）

細菌のべん毛モーターは、膜を介したイオンの流入を回転力に変換できる唯一の運動器官である。その共役イオンとしては、H⁺とNa⁺が用いられ、どちらか一方のイオンの流入によりモーターは駆動される。H⁺駆動型モーターでは、エネルギー変換に必要な膜蛋白質として同定されているMotA、MotBが、複合体としてイオンチャネルを形成していると考えられている。一方、Na⁺駆動型べん毛モーターでは、PomA、PomB、MotX、MotYが、ビブリオ菌で同定されている。このうち、PomAとPomBは、H⁺駆動型べん毛モーター蛋白質MotAとMotBに相同である。

Na⁺駆動型モーターとH⁺型駆動モーターにはどのような違いがあるのだろうか？エネルギー変換の際に、イオンの違いは関係するのだろうか？Na⁺駆動型モーター因子とH⁺駆動型のものを入れ換えても機能するのかなどという疑問が出てきた。そこで、光合成細菌*R. sphaeroides*のプロトン駆動型のMotAとMotBが、ビブリオ菌のものと相溶性が最も高いことから、ビブリオ菌の*pomAB*欠損株に、光合成細菌のRsMotAとビブリオ菌のVaPomBを発現させた。すると、このハイブリッドモーターは、ナトリウムイオンに依存した運動能を示した。部品どうしの交換ができなかったBサブユニットについては、キメラタンパク質を作成して調べた結果、膜貫通領域がプロトンモーター型由来でも、Na⁺駆動型として働くことが示された。そして、最近、大腸菌MotABをビブリオ菌で発現させ、極べん毛モーターをハイブリッドモーターにすると、H⁺駆動型になるらしいという結果が得られた。以上、H⁺駆動型とNa⁺駆動型の蛋白質間でキメラやハイブリッドモーターを作成して調べたことをもとにして、べん毛モーターのイオン特異性とエネルギー変換ついて議論したい。

M. Homma & Y. Asai : Characterization of the chimeric or hybrid motors between H⁺-driven and Na⁺-driven type flagella.

2SE2

腸内連鎖球菌V-ATPaseのイオン選択性とその結合反応

村田 武士¹, 山登 一郎¹, ○柿沼 喜己² (¹ 東理大・基礎工、² 千葉大・薬)

プロトンポンプとして生体内のさまざまな膜系で機能している液胞型ATPase (V-ATPase) は、基本構造の上でATP合成酵素 (F-ATPase) に類似している。F-ATPaseはH⁺輸送に共役してATP合成を行う回転モーター分子であることが実験的に示されており、V-ATPaseも同じくH⁺輸送性回転分子モーターとして、ATP分解に共役してH⁺輸送を行うものと推定されている。これらイオン輸送性分子モーターの仕組みを理解するためには、イオンそのものの動きを把握することが必要であるが、H⁺の動きを追跡することは容易ではない。我々は、腸内連鎖球菌に真核生物型V-ATPaseのプロトタイプともいえるATPaseを発見し、遺伝子のクローニングとともにその精製法を確立した。腸球菌V-ATPaseはNa⁺とLi⁺を選択的に輸送し、そのATP加水分解活性にはNa⁺やLi⁺が必須であった。これらのイオンに対する親和性は極めて高く、K_mは約20～40 μ Mと計算された。精製酵素標品に対する²²Na⁺の結合を調べたところ、低Na⁺濃度で特異的な結合が観察され、V-ATPase一分子当たり約6個のNa⁺が、高い親和性（約20 μ MのK_dNa⁺）で結合すると見積もられた。以上の結果は、V-ATPaseにおいてイオンの結合・輸送に関わる16 kDaのプロテオリビドが6量体のローターを形成し、それぞれが一つのイオン結合部位を有する可能性を示唆している。腸球菌V-ATPaseの酵素的な性質にもとづいて、そのイオン輸送性回転分子モーターとしてのはたらきを考えてみたい。

T. Murata, I. Yamato and Y. Kakinuma : Ion selectivity and its binding of *Enterococcus hirae* V-ATPase

2SE4

巨大化微生物細胞を用いたイオン輸送系の新しい解析法の提案

○矢部 勇¹、黒田 照夫² (¹ 東大・分生研、² 岡大・遺伝子)

遺伝子操作が容易な大腸菌細胞はイオン輸送系の分子機能の解析に適しているが、パッチクランプ法を用いた電気生理学的な研究を行うためには、細胞膜のみからなる巨大な膜系の調整が必須である。最近、我々は、細胞膜のみからなるプロトプラストとして大腸菌細胞を直径20 μ m程度に巨大化させるSI (Spheroplast incubation) 法を開発することに成功し、更に、細胞が巨大化する時のみ出現する巨大な液胞様構造体 (provacuole) は細胞膜が反転した膜系であることを形態的・生化学的に証明した。細胞膜の配向が正常な巨大な膜系 (プロトプラスト) と反転した巨大な膜系 (provacuole) にパッチクランプ法を適用し、両者を使い分けることにより、イオン輸送体の反応部位・調整部位の局在部位に関わらず、分子機能を電気生理学的に解析する新しいイオン輸送体解析方法を開発した。同法により好氣的呼吸鎖複合体の働きを検討し、NDH1 (複合体I)、NDHII、末端酸化酵素 (Cyt. *bo* と Cyt. *bd*) の活性を電気生理学的に分離して解析できることが可能となった。更に、Cyt. *bo* によるUQ₁H₂誘導電流のV-I curveを求めたところ、形成されるH⁺の電気化学的ポテンシャル勾配は、190mVであり、十分にATP合成が可能であることを示した。同アッセイ法の開発は、分子生物学的手法の開発、各種分光法の適用、結晶構造決定と相まって、呼吸鎖の反応機構の詳細な解明に向けた、力強い歩みを促すだろう。【参考文献】 1) JBC, 273:16897, (1998), 2) 蛋白質核酸酵素,44:2582,(1999), 3) JBC, 274:34903, (1999)

I. Yabe, and T. Kuroda : Novel analytical method with ion transport which uses giant microorganisms