



ミトコンドリアATP合成酵素の活性調節機構および 内在性ATPaseインヒビターの生理的役割についての 研究

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2013-05-16 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 岩月, 宏之 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10258/2085

博士学位論文

ミトコンドリア ATP 合成酵素の活性調
節機構および内在性 ATPase インヒビ
ターの生理的役割についての研究

平成 12 年 12 月

岩月 宏之

ミトコンドリア ATP 合成酵素の活性調節機構および内在性 ATPase インヒビターの生理的役割についての研究

平成 12 年 12 月 20 日

岩月 宏之

目 次

第1章 序章	・・・1
1-1 緒言にかえて	・・・2
1-2 酸化的リン酸化	・・・4
1-2-1 電子伝達系	・・・4
1-2-2 ATP 合成酵素	・・・6
1-3 ATPase インヒビタータンパク	・・・8
1-4 酵母 F1FoATPase の活性調節因子	・・・11
1-4-1 9K タンパクの働き	・・・11
1-4-2 15K タンパクの働き	・・・13
1-5 化学浸透圧説に対する論争点	・・・13
1-6 ATPase インヒビターがこの矛盾を解くカギになるか	・・・14
第2章 ATP 合成と膜ポテンシャルの関係	・・・16
2-1 はじめに	・・・17
2-1-1 本論文で使用する酵母菌種	・・・17
2-1-2 各酵母ミトコンドリアの酸化的リン酸化能および呼吸調節能	・・・17
2-1-3 ミトコンドリアの膜ポテンシャル測定	・・・21
2-2 野生株酵母ミトコンドリアの ATP 合成と膜ポテンシャル	・・・22
2-3 ATPase インヒビター欠失株酵母ミトコンドリアの ATP 合成	・・・25
2-4 ATP 合成中の ATPase インヒビターの結合	・・・28
2-4-1 ATPase 活性からみる ATPase インヒビター結合	・・・28
2-4-2 F1Fo と ATPase インヒビターのクロスリンク	・・・31
2-5 種々の変異酵母ミトコンドリアの ATPase 活性	・・・34
2-6 DCCD 添加による F1Fo の阻害と膜ポテンシャルの上昇	・・・36
2-7 まとめ	・・・38
第3章 呼吸停止時の ATP 分解による膜ポテンシャルの回復	・・・39
3-1 はじめに	・・・40
3-2 ATP 分解時の膜ポテンシャル	・・・40
3-3 ATP 添加による膜ポテンシャルの回復	・・・42
3-4 ATPase インヒビター解離の factor は何か	・・・42
3-5 まとめ	・・・45
第4章 貧栄養条件下での細胞レベルにおける観察	・・・47

4-1	はじめに	・・・48
4-2	貧栄養条件下での生存率および RD 変異体の発生	・・・48
4-3	貧栄養条件下での細胞内 ATP 含量変化	・・・52
4-4	まとめ	・・・52
第5章	結言	・・・55
	謝辞	・・・58
	参考文献	・・・59

第1章 序章

1-1 緒言にかえて

第1章

序章

ATP 合成酵素 (F₁F₀ATPase) はミトコンドリア内膜、葉緑体の
チクロイド膜、光合成菌の細胞膜などに普遍に存在する膜タンパク質であり、
細胞の消費する ATP の大部分を合成している。この ATP 合成のメカニズムは
近頃よく知られており、1961 年、Mitchell によりあらわに提議が発表された。す
なわち、電子伝達系がプロトン (H⁺) を膜内から膜外へ輸送し、膜内外に H⁺ の濃
度差および電位差 (プロトンの電気的ポテンシャル) が形成され、このポ
テンシャルが駆力の原動力となり、H⁺ の膜内への流入と ATP 合成が偶発するとい
うものであった。この説は化学浸透圧説と呼ばれ、今日では広く一般的に
認知されているが、当時は、自然の膜内外のイオンのポテンシャルを利用して
のみエネルギーに倣って進むための化学反応を進行させてしまうという考えになら
なかった。この仮説が実際に採用される契機となったのは、ローランド
氏らで葉緑体膜でも ATP を合成できること、Legg 氏の提議であった
が、また Kagawa と Racker は、ミトコンドリアから ATP 加水分解能を持
つ膜タンパク質複合体を分離してミソゾーム膜に組み込み、ATP の加水分解に
より H⁺ が輸送されることを示した。そして、Mitchell の仮説は検証され、
彼は 1978 年度のノーベル化学賞を受賞した。そして、ATP の合成/加水分解
と膜を隔ちた H⁺ の移動を偶発させる現象として ATP 合成酵素は注目された。
しかし、Mitchell の説は ATP 合成の原理を述べたもので、酵素の分子学的機
質にまで及ぼしたものでなかった。このため、化学浸透圧説が承認されたあ
と ATP 合成の分子学的原理についてその謎と矛盾をなすというデータが多くの研
究者から出された。動力学的研究においては酵素の構造、酵素と、酵素と膜
など多くの問題が検討されなければならないのは当然であるが、結果から言
えばこうした点が検討されないままにそのデータが勝手に解釈され誤解を生じ
たといえる (後述)。本論文は葉緑体ミトコンドリアを使って ATP 合成酵素の機
能を科学的に調べた結果、Mitchell 説に必要とせざるべき点がないことを確認
した上でミトコンドリアの ATP 合成機構についてあらたにいくつかの発見をな
すものである (第 2、3 章)。この ATP 合成機構は F₁F₀ATPase インター
タンパク質の複合体複合体の構造において明らかとなっており、ATPase イン
タータンパク質は ATP 合成には関与しないことが明らかにされたが、細胞レベルでその
生理的意義が見えてきたので (第 4 章)、それもあわせて取り上げる。

第1章 序章

1-1 緒言にかえて

ATP 合成酵素 (F₁F₀ATPase) は真核生物のミトコンドリア内膜、葉緑体のチラコイド膜、原核生物の細胞膜などに普遍的に存在する膜タンパク質であり、細胞の消費する ATP の大部分を合成している。この ATP 合成のメカニズム (酸化的リン酸化) について、1961 年、Mitchell によりある仮説が提案された。すなわち、電子伝達系がプロトン(H⁺)を膜内から膜外へ輸送し、膜内外に H⁺の濃度差および電位差 (プロトンの電気化学的ポテンシャル) が形成され、このポテンシャルが直接の駆動力となり、H⁺の膜内への流入と ATP 合成が共役するというものである (1)。この説は化学浸透圧説と呼ばれ、今日では広く一般的に認知されているが、当時は、酵素が膜内外のイオンのポテンシャルを利用してエネルギー的にみて進みにくい化学反応を進行させてしまうという考えになじみがなかった。この仮説が真剣に検討される契機となったのは、酸-アルカリ変化で葉緑体が暗所でも ATP を合成できるという Jagendorf の実験であった (2)。また Kagawa と Racker は、ミトコンドリアから ATP 加水分解活性を持つ膜タンパク質複合体を分画してリポソーム膜に組み込み、ATP の加水分解により H⁺が輸送されることを示した (3)。こうして、Mitchell の仮説は実証され、彼は 1978 年度のノーベル化学賞を受賞した。そして、ATP の合成/加水分解と膜を横切る H⁺の移動を共役させる酵素として ATP 合成酵素は注目された。

しかし、Mitchell の説は ATP 合成の原理を述べたもので、酵素の動力学的性質にまで言及したものではなかった。このため、化学浸透圧説が承認されたあと ATP 合成の動力学的問題についてその説と矛盾するというデータが多く研究者から出された。動力学的研究においては酵素の性質、酵素量、活性調節機構など多くの問題が検討されなければならないのは当然であるが、結論から言えばこうした点が検討されないままに生のデータが勝手に解釈され混乱を生じたといえる (後述)。本論文は酵母ミトコンドリアを使って ATP 合成酵素の性質等を丹念に調べた結果、Mitchell 説には変更を加える必要がないことを確認した上でミトコンドリアの ATP 合成機構についてあらたにいくつかの知見を与えるものである (第 2, 3 章)。この ATP 合成機構は内在性 ATPase インヒビタータンパクの活性制御機構の研究において得られたものであり、ATPase インヒビターは ATP 合成には関与しないことが明らかになったが、細胞レベルでその生理的役割が見えてきたので (第 4 章)、それも含めそれらを簡潔に述べる。

- (1) ミトコンドリアでは呼吸量の増減に対応して F₁F_o 分子がそれに対応した ATP 合成をするが, F₁F_o 分子は呼吸酵素に比べて大量に存在し, 実験室レベルの呼吸量では休止している分子が存在する。呼吸の変化に対応して変化するのは F₁F_o 自体のターンオーバー数ではなく ATP 合成に参加する F₁F_o の分子数である。
- (2) F₁F_o は可逆的な酵素で, 膜ポテンシャルが一定のレベル存在すると ATP を合成し, 膜ポテンシャルが閾値以下になると ATP の加水分解側に反応を進行させ膜ポテンシャルを回復する。閾値は 160~170 mV 付近にある。
- (3) 呼吸が増加すれば膜ポテンシャルが上昇する傾向になるが, この傾向はそれまで休止していた F₁F_o が ATP 合成に参加することにより解消される。呼吸が減少すると膜ポテンシャルが低下する傾向になるが, この傾向はそれまで活動していた F₁F_o が ATP 合成を停止させることにより解消される。このため, ミトコンドリアは呼吸量に関係なく一定の膜ポテンシャル (160~170 mV) を維持すると説明できる。
- (4) 呼吸が半減して ATP 合成が半減するケースで膜ポテンシャルが変化しないことから Mitchell の化学浸透圧説が誤っているという Sorgato の主張は正しくない。膜ポテンシャルが変化しないのは ATP 合成に参加する F₁F_o が半減したためであり, 単位 F₁F_o あたりの ATP 合成量は不変である。
- (5) ATPase インヒビターは ATP 合成についての休止型 F₁F_o に結合する。休止型 F₁F_o は ATPase インヒビターが結合していれば膜ポテンシャルが何らかの原因で閾値以下になった場合でも ATP を分解することはない。
- (6) ATPase インヒビターの存在により, 呼吸停止時の ATP 分解が抑えられた。それにより膜ポテンシャルの回復は見込めない。この作用はミトコンドリアレベルではなく, 細胞レベルにおいて膜ポテンシャルの維持を犠牲にしてまでもミトコンドリア内 ATP を保存することにより生存率の向上, さらに呼吸欠損変異発生を抑える働きをもつ。

1-2 酸化リン酸化

生物が摂取したグルコースは解糖およびクエン酸サイクルの酵素で完全酸化される。ここで生じる 12 対の電子は直接 O_2 の還元には使われない。解糖およびクエン酸サイクルの諸酵素の反応で NAD^+ 、 FAD の補酵素に与えられ、 $NADH_2$ と $FADH_2$ を生成する。この $NADH_2$ と $FADH_2$ は電子伝達系に入り再酸化され、そこで生じた電子は電子伝達系を経て O_2 を H_2O に還元する。この過程で H^+ はミトコンドリアからくみ出され、その結果生じた H^+ の電気化学的ポテンシャルを利用して ATP 合成酵素が $ADP + Pi$ から ATP を合成する (Fig. 1)。

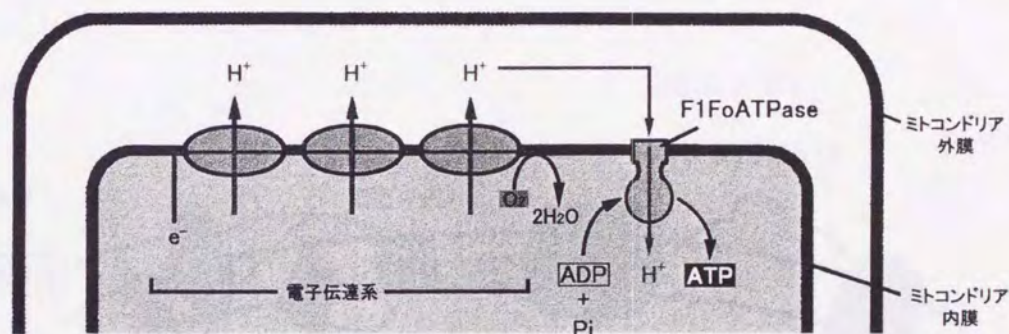


Fig.1. 酸化リン酸化の一般的なモデル

1-2-1 電子伝達系

ATP 生産に必要なエネルギーは $NADH_2$ と $FADH_2$ を電子伝達系で酸化することにより得られる。電子伝達系路は 4 種の呼吸鎖複合体および補酵素 Q (CoQ, ユビキノン), シトクロム c より構成されている (Fig. 2)。呼吸基質として $NADH$ を用いた場合、複合体 I ($NADH-CoQ$ レダクターゼ) によりまず酸化される。これにより生じる電子は $CoQ \rightarrow$ 複合体 III (CoQ -シトクロム c レダクターゼ, シトクロム bc_1 複合体) $\rightarrow$ シトクロム c $\rightarrow$ 複合体 IV (シトクロム c オキシダーゼ, シトクロム aa_3) の順に受け渡され、最終的に O_2 を H_2O に還元する。呼

吸基質にコハク酸を用いた場合，クエン酸サイクルのコハク酸デヒドロゲナーゼによって酸化され，その際生じた電子は FAD に渡され FADH₂を生じる。この FADH₂から複合体 II（コハク酸-CoQ レダクターゼ）によって CoQ へ電子が渡され，以下，NADH 呼吸と同じ経路をとる。なお，酵母の電子伝達系には複合体 I が存在せず，2 種類の NADH デヒドロゲナーゼが存在し，NADH 呼吸ではミトコンドリア内膜の外側に突出している NADH デヒドロゲナーゼによって電子が授受され，エタノール呼吸では内膜の内側に突出している NADH デヒドロゲナーゼによって電子が受け渡しされることがわかっている（4）。電子伝達系を電子が流れる際，H⁺がミトコンドリア内から外へくみ出され，ATP 合成酵素が駆動する。

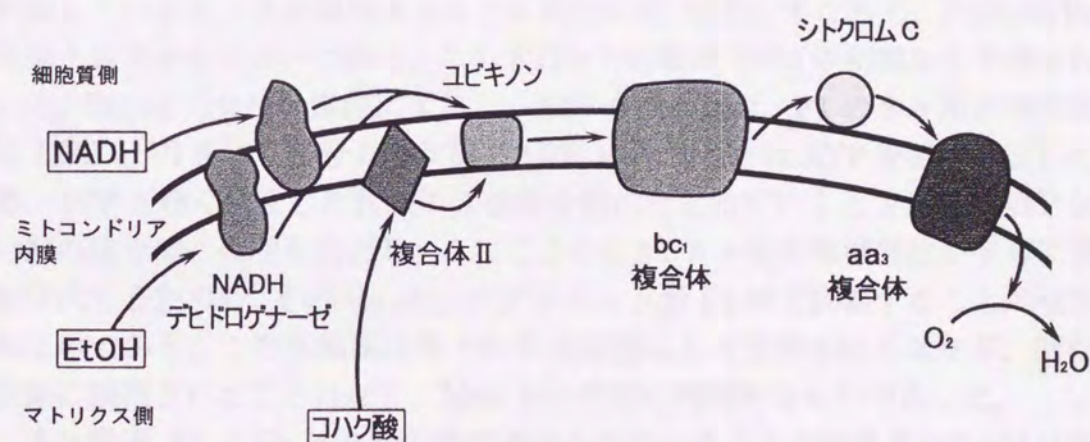


Fig. 2. 電子伝達系における呼吸鎖複合体と電子の流れ。電子の流れを矢印で示す。

1-2-2 ATP 合成酵素

ATP 合成酵素は分子量約 50 万の巨大膜タンパク複合体であり、膜中に存在する Fo 部分と膜の外に突出している F1 部分からなる。このことから、ATP 合成酵素は F1FoATPase とも呼ばれる (Fig. 3)。

F1 部分は ATP 合成/加水分解の触媒部位であり、分子量は約 38 万、Fo から分離するとそれ自体 ATPase 活性を示す。F1 は化学量論的に $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$ の 5 つのサブユニットで構成されており、 γ の周囲を α と β が交互にオレンジの房のように取り囲んだ形をとる。また、3 ヲ所の α と β の境界面にヌクレオチド結合触媒部位が存在する。

Fo は分子量約 10 万の膜貫通タンパク複合体であり、プロトンチャンネルとして機能している。基本的な大腸菌の Fo は化学量論的に ab_2c_{10} の 3 つのサブユニットで構成されている。ミトコンドリアの Fo はもう少し複雑であり、F6 タンパク (5)、オリゴマイシン感受性タンパク (OSCP) (6)、サブユニット d, f (7), h (8), j (9), A6L (7) などが存在する。

1997 年、Noji らは F1 が γ サブユニットを中心に触媒反応に伴って物理的に回転しているところを観察することに成功した (10)。すなわち、F1FoATPase は地上最小のモーターである。この F1Fo の回転は 1980 年初期から予想されていた。Boyer の交代触媒説によると、ATP 合成の場合、F1 の 3 ヲ所の触媒部位は ADP と Pi を弱く結合した状態、ADP + Pi あるいは ATP を強く結合した状態、ATP を弱く結合した状態の 3 状態を順にたどっていくとされた。ATP 加水分解の場合はこの逆をたどる。そしてこのとき、3 ヲ所の触媒部位が平等に役割を交代するために、その中心の γ サブユニットが F1 中で回転することが仮定されたのである。この回転説は数々の状況証拠により支持されてきたが、回転が実際に観察されたことはなく、Noji らの研究は画期的なものであった。

また最近、F1 と Fo は 2 つの軸で連結されていることが報告された (11, 12)。主軸は γ と ϵ で構成され、 $\alpha - \beta$ の六量体の中心を回転しており、第二の軸は b と δ で構成され、a と関連して $\alpha - \beta$ 六量体を支えた形をとっている (13, 14)。さらに *in vivo* では F1Fo が二量体として存在している可能性が指摘され (15)、その二量体サブユニットとして e (16, 17), g (18), k (15) などが報告されている。

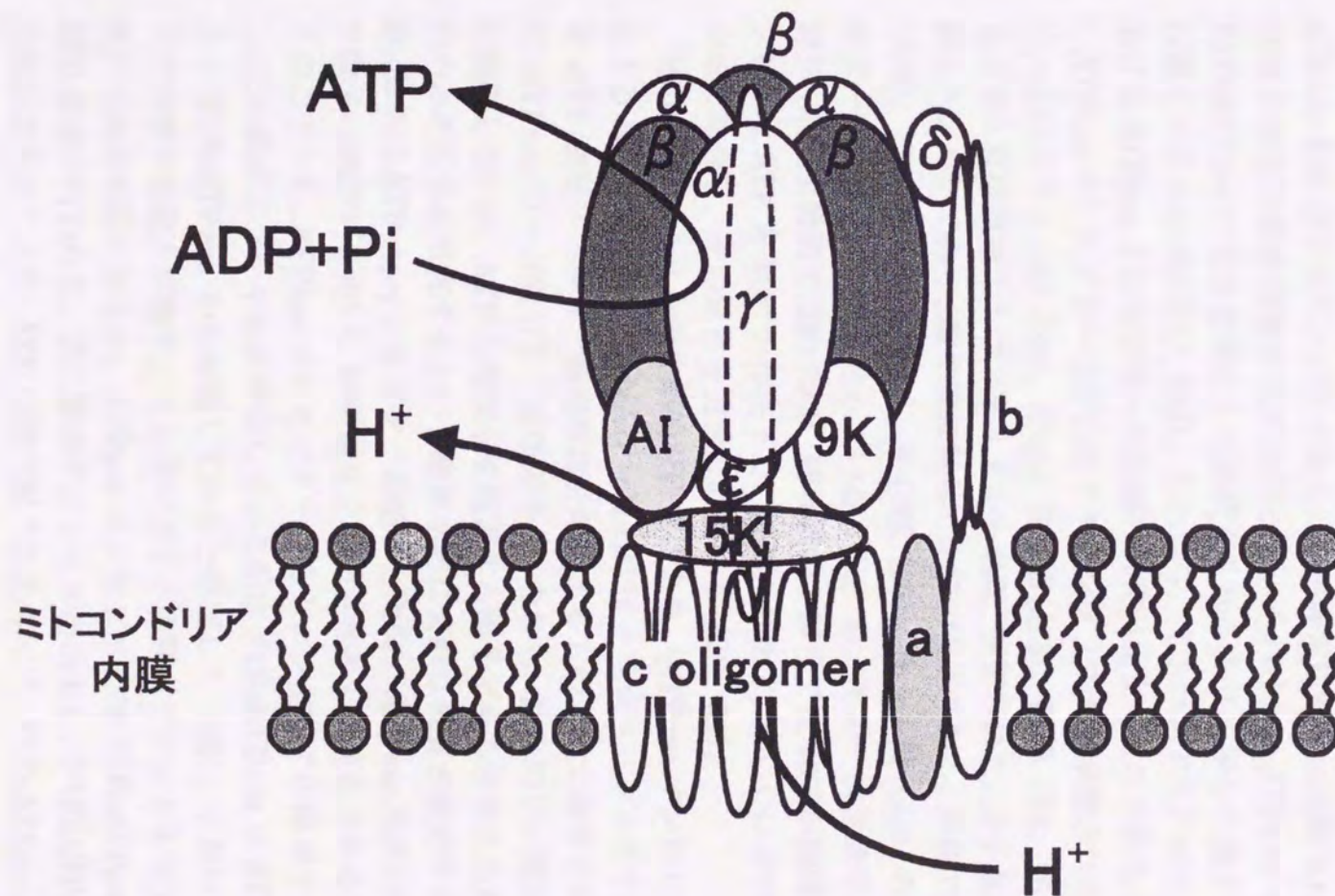


Fig. 3. 酵母ミトコンドリア F1FoATPase の構造. 現時点でその所在場所が不明確なサブユニットは省略した
AI は ATPase インヒビタータンパクの略.

1-3 ATPase インヒビタータンパク

ATPase インヒビタータンパクは、1963 年 Pullman と Monroy によって牛心筋ミトコンドリアから初めて単離された (19)。当時の生化学者は酸化的リン酸化と、次々に発見される酵素複合体の触媒作用を関連づける研究に着手したばかりであったため、ATPase インヒビターの発見は、1963 年当時ではそれほど重要視されていなかった。この新しく発見された ATPase インヒビターは ATPase を阻害するタンパクであることが非常に簡単な実験でわかったため、それほど生化学者を刺激するには至らず、それゆえ、ATPase インヒビターが F₁F₀ATPase の基本要素として再調査されるまで 7 年もの歳月を費やしたことは驚くべきことではない (20)。それから、ミトコンドリアのエネルギー転換における ATPase インヒビターの役割の研究が始まったのである (21)。

ATPase インヒビターは牛心筋ミトコンドリアから単離された (19) のを契機に、その後ラット肝 (22)、ラット骨格筋 (23)、酵母 (24, 25, 26) などのさまざまな真核細胞ミトコンドリアから単離、精製された。分子量は約 7~12 kDa の小タンパクであり、酸や熱に対して比較的安定である。現在では *S. cerevisiae* (27)、*Candida utilis* (28)、牛心筋 (29)、ラット肝 (30) の ATPase インヒビターの一次構造が決定されている (Fig. 4)。その一次構造はよく保存されており、哺乳動物間では約 70%、哺乳動物と酵母では 40% が相同である。このタンパクは ATP と Mg²⁺ の存在下で、精製された F₁ もしくは F₁F₀ と 1 : 1 のモル比で結合し、その活性を完全に阻害する (26, 31)。

1970 年、Asami らの先駆的な研究により、ATPase インヒビターはコハク酸による NAD⁺還元反応や、NAD⁺→NADPH トランスヒドロゲナーゼ反応のような ATP 依存エネルギー輸送反応を阻害するものとして報告された。それゆえ、F₁-ATPase の一方向のみの調節因子、すなわち、酸化的リン酸化の間 ATP 合成は阻害しないが、ATP 分解反応を阻害する因子であると考えられた (21)。一方向のみの反応を阻害するという酵素学的に奇妙な性質を説明するため、Van de Stadt らは ATPase インヒビターの結合した弱い ATPase 活性の亜ミトコンドリア粒子 (SMP) を用い、呼吸速度を上昇させると活性化されることを発見し、このことから、ATPase インヒビターはミトコンドリアの膜ポテンシャルを感知し、この膜ポテンシャルが存在している間は F₁F₀ATPase が ATP を合成できるよう F₁F₀ATPase から解離していると提案した (32)。すなわち、ミトコンドリアの電子伝達系が働き、ミトコンドリアの膜ポテンシャルが上昇し、ATP 合成が可能な電位になると、ATPase インヒビターは F₁F₀ATPase から解離し、ATP 合成が行われる。逆に膜ポテンシャルが消失し、F₁F₀ATPase による ATP 合成ができなくなり、ATP 分解が起こる条件では、F₁F₀ATPase に結合し、ATP

の無駄な分解を阻害するというのである。

実際 ATPase インヒビターの F1FoATPase からの解離機構については数多くの研究がなされており、あらかじめ外部から ATPase インヒビターを添加しておいた SMP は酸化的リン酸化が可能であること (33) や、放射ラベルした ATPase インヒビターをもつ SMP を活性化させると、ATPase インヒビターの解離と ATPase 活性が平行して増大したこと (33, 34) などから、Van de Stadt の仮説は直接的観察によって確かめられた。また、F1 と ATPase インヒビターの親和性は膜ポテンシャルに依存しており、ATPase インヒビターが F1FoATPase から解離しているときのみ F1FoATPase は ATP 合成／分解のどちらにも機能することが報告されている (35)。しかし、これらの実験で用いられた SMP には内在性の ATPase インヒビターが含まれており、行われた実験条件下では、SMP を活性化しても多量の ATPase インヒビターが解離せず膜に結合したままであること (35) など、ATPase インヒビターの作用は明快に説明されたわけではなかった。また脱共役剤で膜ポテンシャルを完全に消失させるまでは ATPase 活性は最大に活性化しない (33)。このように、膜ポテンシャルが存在し、ATP 合成が十分可能な状態での ATPase インヒビターの行動についてはいまだ決定的に解明された段階には至っていないのである。

	10	20	30	40
<i>Bovine</i>	GSESGDNVRSSAGAVRDAGGA—FGKREQAEEERYFRARAQEQLA			
<i>Rat</i>	GSDSSESMDSGAGSIREAGGA—FGKREKAEEDRYFREKTREQLA			
<i>C. utilis</i>	TAGATGATRQDGSTDAFEKREKAQEDLYIRQHEKEQLE			
<i>S. cerevisiae</i>	SEGSTGTPRGSGSEDSFVKRERATEDFFVRQREKEQLR			
	10	20	30	
	50	60	70	80 84
<i>Bovine</i>	ALKKHHENEISHHAKEIERLQKEIERHKQSIKKLKQSEDDD			
<i>Rat</i>	ALKKHHEDI DHHSKEIERLQKQIERHKKKIKYLNSEH			
<i>C. utilis</i>	ALKESLK—————KQK—KSLDDLEBKIDDLTK			
<i>S. cerevisiae</i>	HLKEQLE—————KQR—KKIDSLENKIDSM TK			
	40	50	60	63

Fig. 4. 牛心筋, ラット肝, *C. utilis*, および *S. cerevisiae* の ATPase インヒビターのアミノ酸一次配列.

1-4 酵母 F1FoATPase の活性調節因子

F1-ATPase と ATPase インヒビターは ATP と Mg^{2+} 存在下で結合可能であると同時に, ATP と Mg^{2+} を除くと徐々に解離する。これとは対照的に, ミトコンドリア膜に存在したままの F1FoATPase は不活性であり, ATP と Mg^{2+} を除いても活性化されない。すなわち, F1FoATPase と ATPase インヒビターは常に結合しており, さらに, この複合体を安定化させる別の因子の存在が示唆される。Hashimoto らは実際に酵母ミトコンドリアから ATPase インヒビターと F1FoATPase を安定化させるが, F1 との複合体は安定化させない 2 つの因子を発見した (36)。これらは, 電気泳動による分子量の違いから 9K タンパク, 15K タンパクと名づけられた (37)。この 2 つのタンパクは F1 のサブユニットである δ および ϵ と全く違うことが証明され, 決定されたアミノ酸配列によっても区別されることが判明した (38)。ATPase インヒビターと 9K および 15K タンパクのアミノ酸配列は相同性が高い (39, 40)。特に酵母の ATPase インヒビターと 9K タンパクはともに 63 アミノ酸残基からなり, そのうち 31 残基が相同であり, 二次構造も非常によく似ている (41)。また 15K タンパクとも C 末端領域で特に相同性が高い (Fig. 5)。ATPase インヒビターと 9K および 15K タンパクはミトコンドリア内の F1 と F1 : ATPase インヒビター : 9K : 15K = 1 : 1 : 1 : 1 のモル比で存在し, ミトコンドリア膜において F1FoATPase と複合体を形成していると考えられている (38)。

1-4-1 9K タンパクの働き

9K タンパクは ATP と Mg^{2+} の存在下, *in vitro* で F1 と 1 : 1 で結合でき (42), みかけの解離定数は 3.7×10^{-6} M であり, ATPase インヒビターとは区別できる (4.2×10^{-6} M)。ATPase インヒビターは F1 の活性を完全に阻害するのに対し, 9K タンパクは ATPase インヒビターの約 60% 程しか阻害しない。興味深いことに, 9K タンパクと ATPase インヒビターは競合的に F1 の同じ部位へ結合し, また, 最初に結合したものは他のものには置き換わらない。すなわち, F1 と 9K タンパクの複合体は ATPase 活性が残っているが, そこに ATPase インヒビターを添加しても ATPase 活性は阻害されない。逆に ATPase インヒビターの結合で完全に阻害された ATPase 活性は, 9K タンパクの添加でも活性化されない。このことは, 9K タンパクが ATPase インヒビターと F1 の結合安定化因子であることに矛盾するように見えるが, 15K タンパクの働きを考慮するとこの問題は解ける。

	1	10	20
ATPase inhibitor	SEGSTGTPRGSGSEDSF—VKRER—ATEDFF		
9K protein	SDGPLGGAGPGNPQDIF—IKRER—AKEDYY		
15K protein	TRTNKWTEREGKADPKYFSHTGNYGESPNHIKKQGSKGKNWG		
	1	10	20
	30	40	50
ATPase inhibitor	VRQREKEQLRHLKEQLEKQR—KKIDSLEN—KIDSMTK		
9K protein	ARQQEREQLAHVKEQLKEHK—KKLENLEN—KINNLSK		
15K protein	KPGDEIDDLIDNGEIPPVFKKDRRGSNLQSHEQKFENVQKE		
	50	60	70
			80

Fig. 5. 酵母 *S. cerevisiae* の ATPase インヒビター, 9K タンパクおよび 15K タンパクのアミノ酸一次配列.

1-4-2 15K タンパクの働き

15K タンパクは F1FoATPase とは結合するが F1 には結合しない。また、F1FoATPase と 15K タンパクの結合は 1 : 1 のモル比であり、その解離定数は $1.4 \times 10^{-5} \text{ M}$ である (43)。15K タンパクは F1FoATPase に結合するが阻害活性はない。ATPase インヒビターと 9K タンパクは F1FoATPase へ競合的に結合するが、15K タンパクの存在で両タンパクとも結合できるようになる。しかし、複合体の ATPase 活性は先に結合した方の ATPase 活性が反映される。すなわち、F1FoATPase の触媒部位には ATPase インヒビター、9K タンパクどちらも結合でき、15K タンパクは結合しなかった方のタンパクをつなぎとめておく機能を持つと考えられている。

1-5 化学浸透圧説に対する論争点

1980 年、Sorgato らが牛心筋ミトコンドリアを用いた実験で興味あるデータを示した (44)。ミトコンドリアのコハク酸呼吸を、その競合阻害剤であるマロン酸添加により呼吸量を約半分に低下させた。その際の ATP 合成活性は呼吸量に依存して約半分にまで低下したが、膜ポテンシャルの値は変化しなかったというのである (Table I)。Mitchell の化学浸透圧説によると、膜ポテンシャルが ATP 合成の直接の駆動力であると仮定されているため、ATP 合成値と膜ポテンシャル値が平行しない事実は矛盾するということである。そして、酸化的リン酸化のメカニズムにおける化学浸透圧説の訂正を求めたのである。

この矛盾を解くためのいくつかの研究が報告されている。Mitchell の化学浸透圧説が発表されたのと同時期に全く別の酸化的リン酸化の機構が Williams によ

Table I 呼吸速度とATP合成, 膜ポテンシャルの関係

マロン酸	呼吸阻害度 (%)	ATP合成 ($\mu \text{ mol/min/mg prot.}$)	膜ポテンシャル (mV)
—	—	0.083	185
+	44	0.041	185

Sorgato, M.C. *et al.* *Biochem. J.* 188, 945-948 (1980)

って発表されている (45)。これによると、電子伝達系で産生された H^+ が膜外へ輸送されず、膜内で局在化しており、これが直接 ATP 合成に関わるという。この説は、プロトン局在化説 (proton localized theory) として知られている (Fig. 6)。また、ATP 合成が膜ポテンシャルとは関係なく呼吸速度によって直接調節されているという研究もなされている (46)。しかし、これらの説も Sorgato のデータと化学浸透圧説の矛盾を解明するには実証的根拠に乏しく、データをそのように解釈すればよいという程度のものであり、本質的な点での解決を見ないまま今日に至っている。

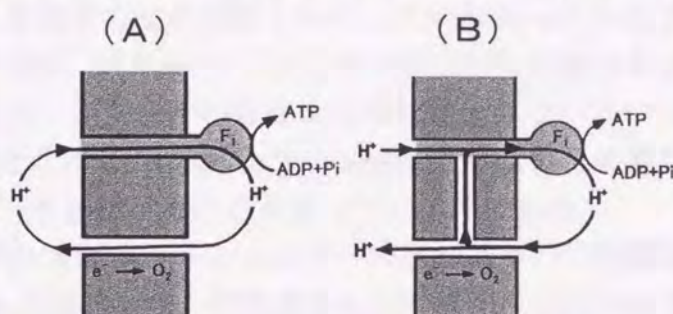


Fig. 6. 化学浸透圧説 (A) とプロトン局在化説 (B) のモデル

1-6 ATPase インヒビターがこの矛盾を解くカギになるか

Sorgato らの研究では、ATP 合成中のミトコンドリア内では F_1F_0 が全て活性型、すなわち膜ポテンシャルが存在する間はミトコンドリア内の全ての F_1F_0 が ATP を合成している状態にあることが前提となっている。この考えは当然のこととして受け止められ今日まで異論がなかったが、これが実際に実験的に確かめられたという事実はない。もし ATP 合成に参加する F_1F_0 の量が呼吸量に応じて変化するならば、一定の膜ポテンシャルにおける ATP 合成量の低下という Sorgato の報告が化学浸透圧説との矛盾なしに説明できる。この活動型 F_1F_0 量を制御している factor として ATPase インヒビターがもっともよい候補になるところであるが、過去の研究者により、ATPase インヒビターは ATP 合成は阻害せず、膜ポテンシャルが消失するまでは F_1F_0 に結合しないと報告されている (21, 32, 33, 47)。それゆえ、このことをそのまま受け入れるならば ATPase インヒビターが酸化リン酸化中 (これを state 3 状態という)、活動型 F_1F_0 量を調節していると考えるのは困難となる。ところが 1982 年、Sanchez-Bustamante らは次のような報告を提出した (48)。彼らは ATP 合成中のミトコンドリアから F_1F_0 を抽出し、その ATP 分解活性を測定したところ、約 50% の F_1F_0 は ATPase インヒビターを結合していること、また、ADP から ATP を合成し尽くし、なおかつ呼吸基質が存在して膜ポテンシャルが高レベルで維持されている state 4 状態に移行しても、ATPase インヒビターを結合している F_1F_0 は約 20% 残存しているというのである。すなわち、このことは、ATPase

インヒビターがミトコンドリアの膜ポテンシャルが消失して初めて F1Fo に結合するのではなく、正常に活動しているミトコンドリアにも一部は F1Fo に結合していることを意味している。これまでミトコンドリアの膜ポテンシャルが失われてから ATPase インヒビターが結合するようになされたのは、脱共役剤を用いて完全に膜ポテンシャルを消失させる実験しか行っていなかったからである。膜ポテンシャルが消失した時に ATPase インヒビターが F1Fo に結合するのは事実だが、このことから膜ポテンシャルが存在する間は結合しないという考えは強引な結論であった。残念ながら Sanchez-Bustamante らは彼らの発見の本質に気付かず、ただ実験データを述べるにとどまっているのである。

このことから、ATP 合成中の ATPase インヒビターの挙動について再調査する必要性が起こった。Sorgato の実験では、呼吸量を半分に低下させたのみであったが、本研究ではマロン酸添加量を広範囲で変化させることにより呼吸量を段階的に減少させ、その際の ATP 合成能、膜ポテンシャル値および ATP 分解能を調査した。ATPase インヒビターの役割をはっきりさせるため、2つの安定化因子 9K, 15K タンパクを含めた 3 因子を全部、あるいはその組み合わせで遺伝子的に欠失させた変異酵母を作製した。そして、リン酸化能を野生株と比較することにした。本論文では、その結果提案される F1Fo の 2 つの型の存在、および ATPase インヒビターの生理的役割、さらに種によって異なる ATPase インヒビターの存在意義について言及する。

ATP 合成と膜ポテンシャルの関係

第2章 ATP合成と膜ポテンシャルの関係

2-1 はじめに

2-1-1 本論文で使用する酵母菌種

酵母ミトコンドリアの ATPase インヒビター, 9K タンパクおよび 15K タンパクの遺伝子は核の DNA にコードされており, 相同的組み換え法により欠失させることが容易に行える (49, 50)。本実験で用いた野生株および活性調節 3 因子を欠失させた酵母の遺伝子型を表記しておく。

野生株 : DKD-5D (*a trp1 leu2 his3*)

3 因子欠失株 : T₁ (*a trp1 leu2 his3 inh1::TRP1 stf1::LEU2 stf2::HIS3*)

また, 同様の手法により作製された, ATPase インヒビターと 9K タンパクを欠失させた酵母 W1, ATPase インヒビターのみを欠失させた酵母 D26, 9K タンパクのみを欠失させた酵母 905-L1, 9K タンパクと 15K タンパクを欠失させた酵母 905-1 も比較として用いた。

これらの酵母は, グルコース培地 (1% Yeast extract, 1% Polypepton, 1% Dextrose), 乳酸培地 (1% Yeast extract, 1% Polypepton, 2% Lactate-Na, pH 4.0) およびガラクトース培地 (1% Yeast extract, 1% Polypepton, 1% D-(+)-Galactose) での成長に差異がみられないことがすでに確認されている (49)。

2-1-2 各酵母ミトコンドリアの酸化的リン酸化能および呼吸調節能

乳酸培地を用い, 対数増殖期で成長している酵母細胞から, Daum らの方法 (51) によりミトコンドリアを調製した。この方法により, 酵母細胞約 20 g からミトコンドリア約 50 mg が調製可能である。得られたミトコンドリアは 0.6 M ソルビトール溶液 (pH 7.4) に分散し, Lowry らの方法 (52) でタンパク定量を行い 10 mg/ml に調整後, 液量が 1 cm 以上厚くならないようにして 0°C 保存した。なお, 長期間保存するとミトコンドリアの呼吸活性等が著しく低下し, 実験中に性質が変わって正確な比較が困難になることが考えられるため, 調整後は 15 時間以内で実験を完了させた。

ATPase インヒビター, 9K タンパク, 15K タンパクの欠失によるミトコンド

Table II 各種酵母ミトコンドリアのATP合成, P/O, RCR値比較

	ATP synthesis	P/O	RCR
	$\mu\text{ mol/min/mg prot.}$		
Wild-type	0.61 ± 0.19 (n=9)	1.18 ± 0.13 (n=9)	3.79 ± 1.04 (n=7)
T ₁	0.60 ± 0.05 (n=8)	1.16 ± 0.08 (n=9)	2.53 ± 0.26 (n=8)
D26	0.53 ± 0.04 (n=2)	1.20 ± 0.03 (n=2)	3.48 ± 0.48 (n=2)
905-1	0.46	1.50	3.32

リアの酸化的リン酸化への影響を調べる目的で, ATP 合成活性, P/O 比および RCR を測定し, Table II に示した。P/O 比とは, リン酸化の効率を示すものであり, state 3 中に消費された ADP (合成された ATP) の分子数と, この間に消費された酸素の原子数との比として計算される。RCR (respiration control ratio) とは, 呼吸調節能のことであり, ATP を合成している state 3 の呼吸速度と, ATP を合成し尽くした state 4 の呼吸速度との比で表される。測定方法として, ATP 合成活性は, コハク酸呼吸でミトコンドリアが ATP を合成している反応液中のアデニンヌクレオチド (ATP, ADP, AMP) 濃度変化測定により計算された (53)。その分析には逆相の高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いた。HPLC によるアデニンヌクレオチドの検出トレースの例を Fig. 7 に示す。P/O 比および RCR 測定は, クラーク型酸素電極装置を用いて測定される呼吸速度と, その間に合成された ATP 量から算出した。クラーク型酸素電極装置の模式図と, 得られた呼吸速度の記録トレースの例を Fig. 8 に示す。

Table II から, 3 因子欠失による酸化的リン酸化への影響がほとんどないことがわかる。コハク酸を呼吸基質としたときの酸化的リン酸化では, 簡略すると
 $\text{コハク酸} + 2\text{ADP} + 2\text{Pi} + 1/2\text{O}_2 \rightarrow \text{フマル酸} + 2\text{ATP} + \text{H}_2\text{O}$
 の反応で ATP が合成されるため, 理論的な P/O 比は 2 となるはずである。本実験で用いたミトコンドリアの P/O 比はそれに比べ若干低い値となったが, 野生株との差はみられず, ATP 合成も野生株と同様に行われたことから, 以降の実験の問題はなく, 酸化的リン酸化におけるコハク酸呼吸と ATP 合成が共役しているといえる。RCR は T₁ ミトコンドリアでも 2.53 という値を示した。いままでにこれ程高い RCR 値を示す酵母ミトコンドリアが調整されたという報告はない。本研究で使用したミトコンドリアはどの研究室で調整されているミトコンドリアよりも状態が良好であるといえる。すなわち, ミトコンドリアは state 3 呼吸と state 4 呼吸が非常によく調節されており, 以後の実験結果は十分信頼できるものである。

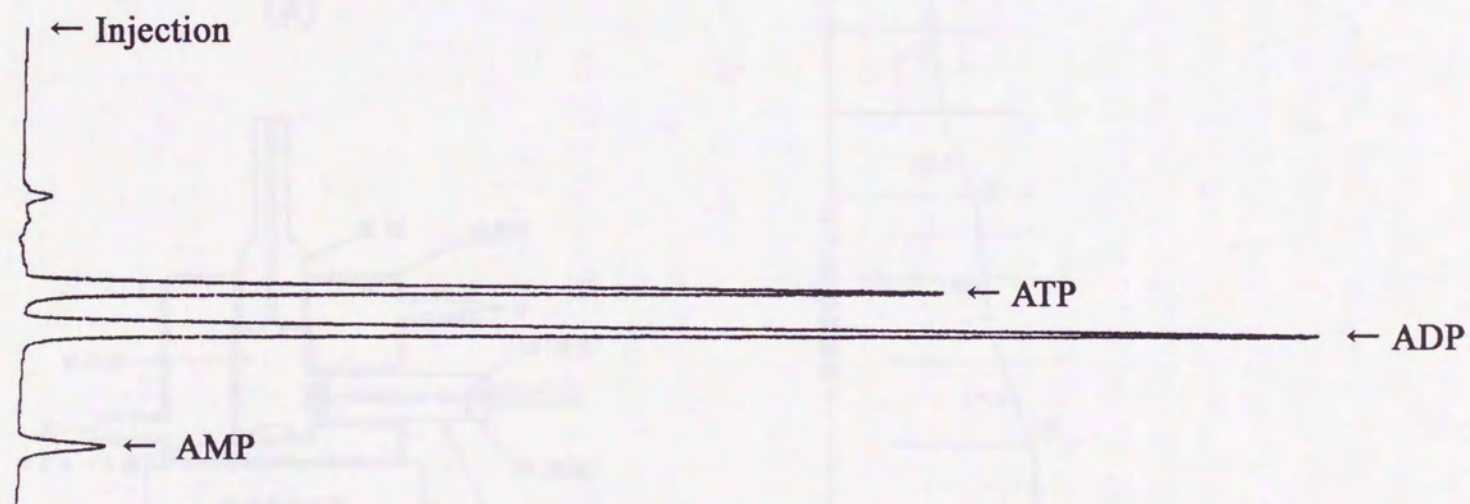


Fig. 7. アデニンヌクレオチド分析の HPLC 検出トレースの例.

移動相 : 4 % メタノールを含む 50 mM Na-Pi (pH 6.0)

カラム : Shim-pack CLC-ODS

流速 : 0.7 ml/min

$\lambda = 254 \text{ nm}$

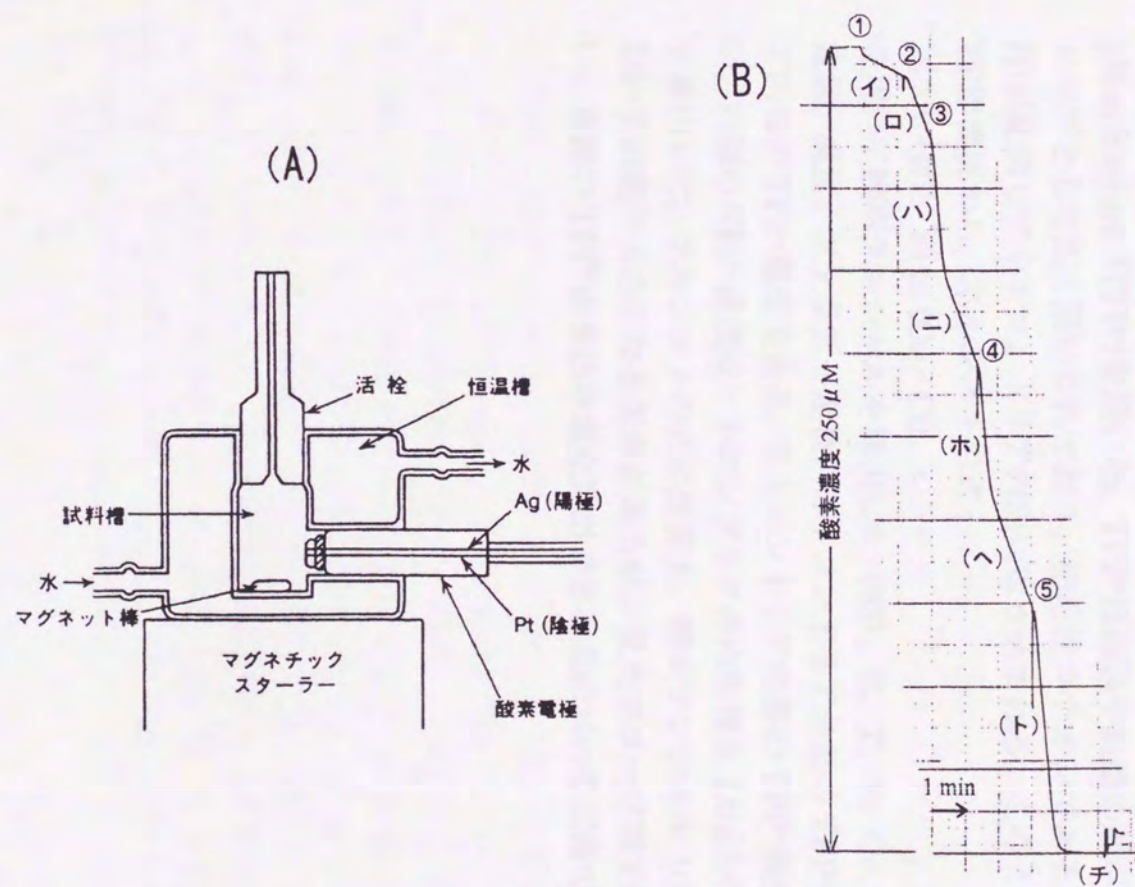


Fig. 8. 酸素電極装置の模式図 (A) と呼吸速度測定記録トレースの例 (B).

(B) : 反応液 (0.6 M マニトール, 50 mM MOPS (pH 6.5), 5 mM K-Pi (pH 6.5), 0.1% BSA) 中へ, ①ミトコンドリア 60 μ l (10 mg/ml) 添加。(イ) は内部呼吸。②コハク酸を 10 mM になるよう添加。③④で ADP を 0.1 mM 添加。⑤は ADP を 1 mM 添加。(ロ) (ニ) (ヘ) は state 4 呼吸。(ハ) (ホ) (ト) は state 3 呼吸。(チ) で無酸素状態。1.7 ml 系, 25°C。

2-1-3 ミトコンドリアの膜ポテンシャル測定

ミトコンドリアは呼吸基質の存在下、電子伝達系の働きにより H^+ を内側から外側へくみ出す。 H^+ はミトコンドリアの内膜を自由に通過することができないため、膜内外に濃度勾配および電位差（膜ポテンシャル）が形成される。膜ポテンシャルの測定法として、バリノマイシン存在下の K^+ 輸送測定や、ポテンシャル感受性の蛍光プローブ 3, 3'-diethylthiacarbocyanine iodide (DiSC₂(5)) の蛍光測定があるが、本実験では脂溶性カチオンである tetraphenyl phosphonium (TPP⁺) を用いた。TPP⁺ は細胞や組織の膜ポテンシャル測定用プローブとして広く用いられており、脂溶性カチオンであるため、くみ出された H^+ に比例してミトコンドリア内部に取り込まれる。このミトコンドリア内外の TPP⁺ 濃度から、ネルンストの式；

$$\Delta\phi = (RT/F) \ln (C_e/C_i)$$

を用いて膜ポテンシャルを算出した (53)。R, T, F, C_e , C_i はそれぞれ気体定数、温度、ファラデー定数、ミトコンドリア外部の TPP⁺ 濃度、ミトコンドリア内部の TPP⁺ 濃度である。ミトコンドリア外部の TPP⁺ 濃度測定は HPLC を用い、内部の TPP⁺ 濃度はミトコンドリアの内容積を $1.0 \mu\text{l}/\text{mg prot.}$ (54) として算出した。ネルンストの式の性質上、膜ポテンシャル 100 mV 以下の算出において誤差が大きくなる欠点があるが、蛍光プローブ等での間接的測定法と違い、実際の TPP⁺ 取り込み量を算出できる点において正確である。

2-2 野生株酵母ミトコンドリアの ATP 合成と膜ポテンシャル

ATPase インヒビターが ATP 合成に参加する F₁F_o 量を積極的に調整しているのならば, Mitchell の化学浸透圧説と Sorgato のデータとの矛盾を解く糸口になるかもしれない。そこで, 本実験では Sorgato の実験をもう少し詳しく追試した。Sorgato らは, 呼吸量を半減させた場合のみしか測定を行っていないが, 本研究ではマロン酸の添加量を段階的に増量させることにより, ミトコンドリアのコハク酸呼吸量を広範囲で変化させた。その際の ATP 合成活性と膜ポテンシャル変化を観察した (Fig. 9)。この結果から, 野生株ミトコンドリアの ATP 合成活性は呼吸速度の減少に平行して低下し, その間 P/O 比は一定に保たれた。ところが, 膜ポテンシャルは呼吸速度の減少に関係なく, 160~170 mV を維持した。F₁F_o による ATP 合成は呼吸速度に依存しており, その間膜ポテンシャルは変化しなかったという実験結果は, F₁F_o には ATP 合成に参加しているものと, ATPase インヒビターにより ATP 合成が阻害されているものが存在していると仮定することにより説明ができる。すなわち, 呼吸量の増減で ATPase インヒビターの結合, 解離がおこり, ATP 合成を行う F₁F_o 量を調節しているのではないかという考えである。この考えによると, 例えば呼吸量が増大した場合, 一時的に膜ポテンシャルが上昇するが, それに伴い ATPase インヒビターが F₁F_o から解離し, ATP 合成に参加する F₁F_o 量が増える。そのため, H⁺ のミトコンドリア内部への流入も増えて膜ポテンシャルは一定に保たれる。逆に呼吸量が減少した場合, H⁺ のミトコンドリア外部への輸送能がおち, 膜ポテンシャルが一時的に低下するが, ATPase インヒビターが F₁F_o に結合し, ATP 合成を行う F₁F_o 量が制限されるため, 膜ポテンシャルは同様に保たれる。呼吸量の増減で変化するのは ATPase インヒビターの結合量の増減であり, それに伴う F₁F_o の ATP 合成に参加するポピュレーション変化である。この考えによれば, ATP 合成量は呼吸量にともない減少するが, 膜ポテンシャルが維持されるメカニズムが Mitchell の化学浸透圧説の訂正なしに説明できる。さらに, それによって保たれる膜ポテンシャル 160~170 mV は ATP 合成を行っている state 3 での閾値であるとも考えられる。これらのことをまとめてモデル的に示すと Fig. 10 のようになる。なお, ATPase インヒビター結合量変化の調査は 2-4 に後述する。

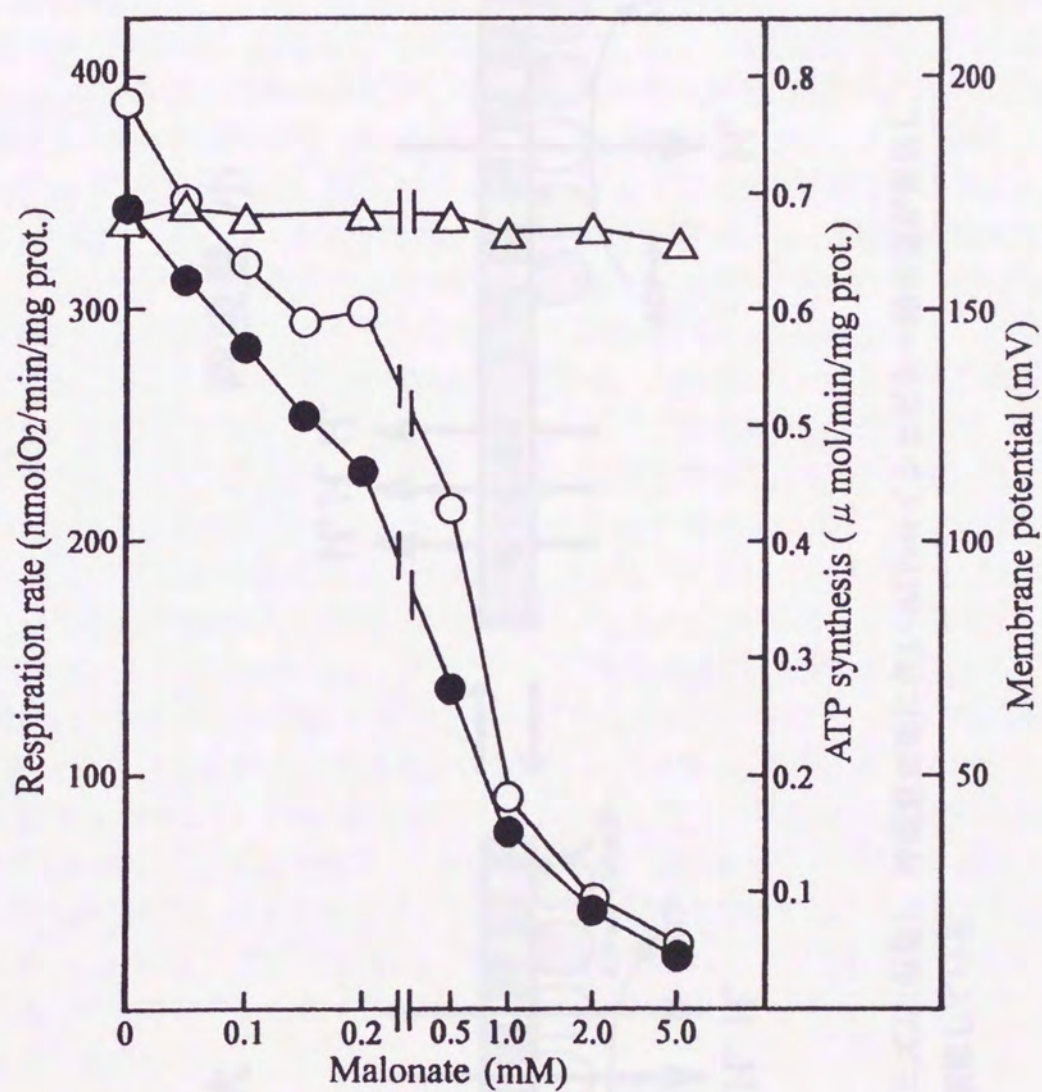


Fig. 9. 野生株酵母ミトコンドリアの呼吸速度, ATP 合成活性および膜ポテンシャル (state 3). ●: 呼吸速度, ○: ATP 合成活性, △: 膜ポテンシャル.

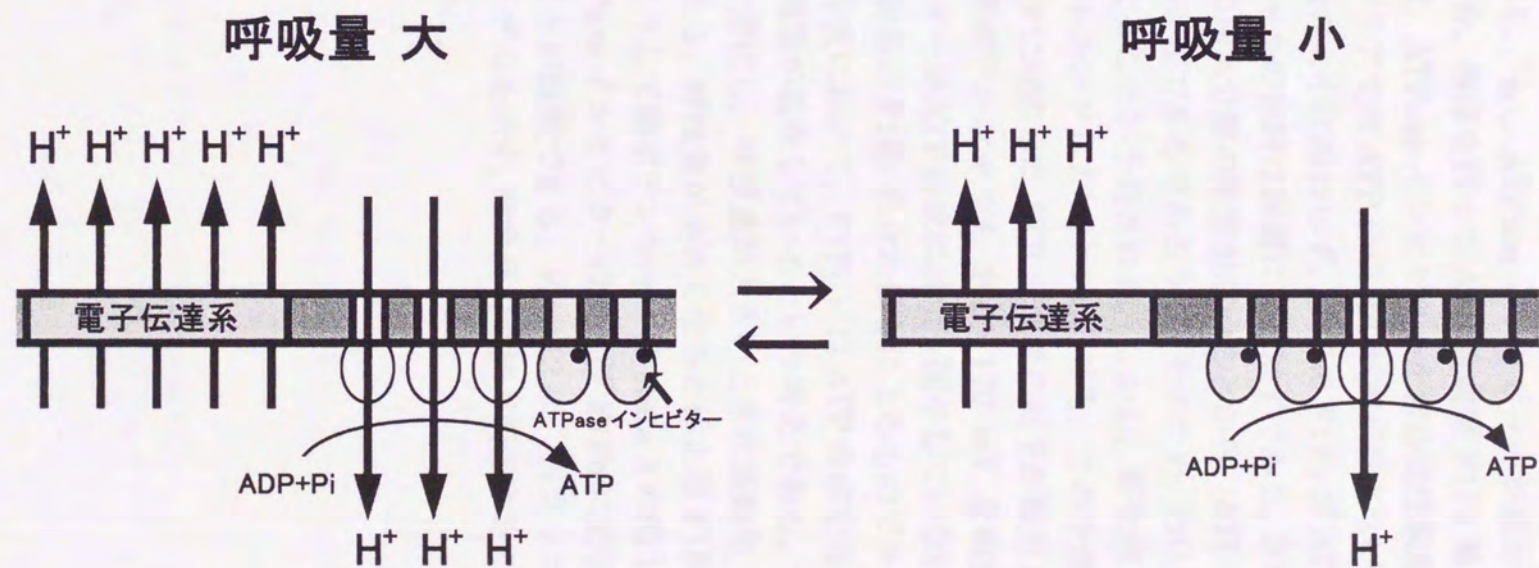


Fig. 10. ATP合成のメカニズム(仮定). 呼吸量変化に伴い ATPase インヒビター結合量が変化し, ATP 合成量を調節している.

2-3 ATPase インヒビター欠失株酵母ミトコンドリアの ATP 合成

先程述べたように、もし ATPase インヒビターが膜ポテンシャル変化を感知し、F₁F₀ への結合、解離を行って ATP 合成型 F₁F₀ 量を調節するという仮定が正しいのならば、ATPase インヒビターを含む活性調節 3 因子を欠失した T₁ 株酵母ミトコンドリアでは ATP 合成量の制御が行えないということになる。そうすると、呼吸量の大小に関わらず、全ての F₁F₀ が ATP を合成できることになり、膜ポテンシャルの保持は困難になるはずである。さらに、F₁F₀ の逆反応、すなわち、ATP の加水分解の阻害がないことから、ATP 合成中でも分解方向に回転する F₁F₀ が存在できるであろうし、そのため、P/O 比も野生株ミトコンドリアに比べ低くなることが予想される。しかし、野生株ミトコンドリアと同様の実験を T₁ 株ミトコンドリアで行ったところ、この予想が全て覆された (Fig. 11)。呼吸量の減少に対応した ATP 合成量の低下が観察され、その間 P/O 比は保たれた。また膜ポテンシャルも 160~170 mV を維持した。この結果は、ATPase インヒビターが ATP 合成には全く関与していないことを示すと同時に、その ATP 合成の調節が F₁F₀ 自身の働きによるものであることを示唆する。すなわち、state 3 呼吸において、F₁F₀ には ATP 合成を行う活動型と合成していない休止型の 2 種類が混在しているという考えである。活動型-休止型の割合は呼吸量の増減で変化し、呼吸量が大きいときは活動型 F₁F₀ の量が増大して ATP 合成量が増える。呼吸量が小さくなると休止型 F₁F₀ が増え、ATP 合成量が抑えられる。こうして膜ポテンシャルは state 3 の間 160~170 mV が保たれるのである。ATPase インヒビターは休止型 F₁F₀ に結合することで ATP 合成へは関与しないことが説明できる。Fig. 12 に、T₁ ミトコンドリアでの ATP 合成メカニズムのモデルを示す。呼吸量の増減で変化するのは F₁F₀ の活動型-休止型の比率である。

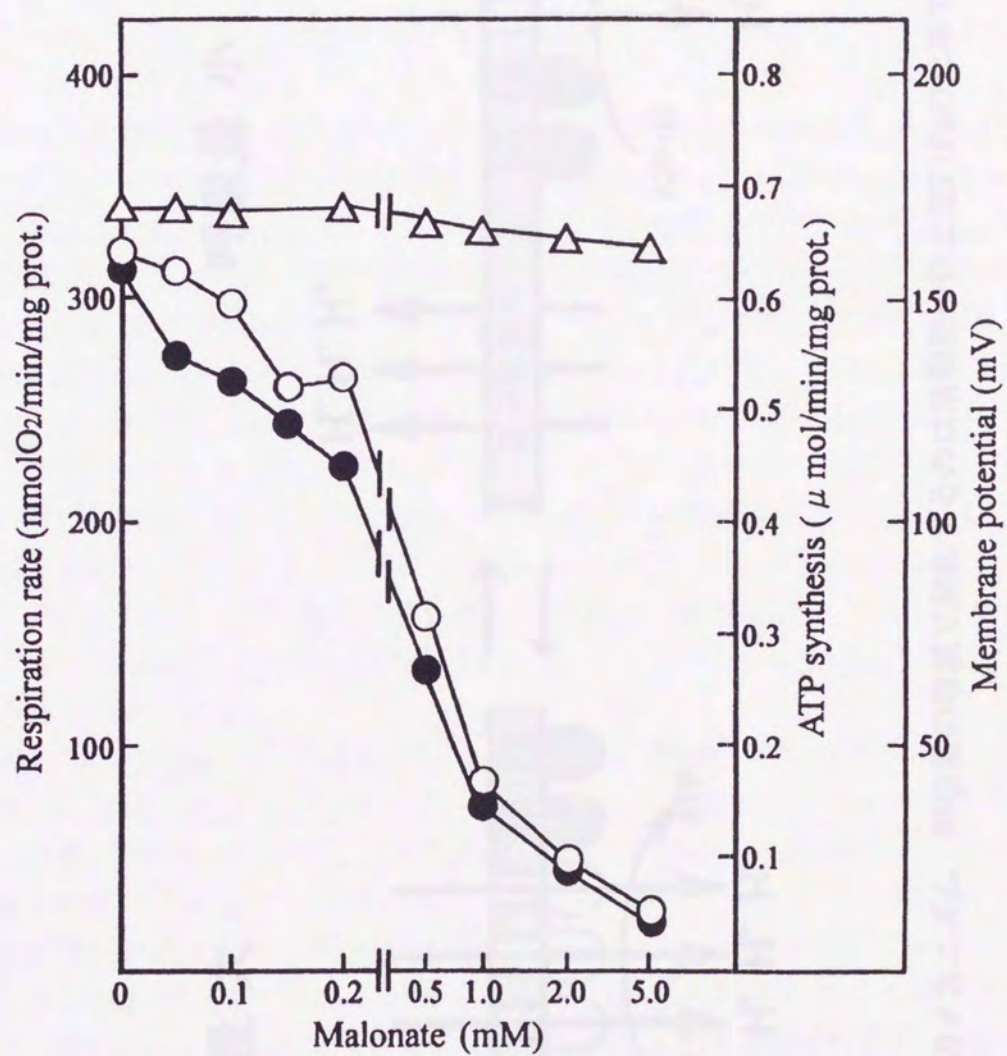


Fig. 11. T₁ 株酵母ミトコンドリアの呼吸速度, ATP 合成活性および膜ポテンシャル (state 3). ●, ○, △は Fig. 9 と同じ.

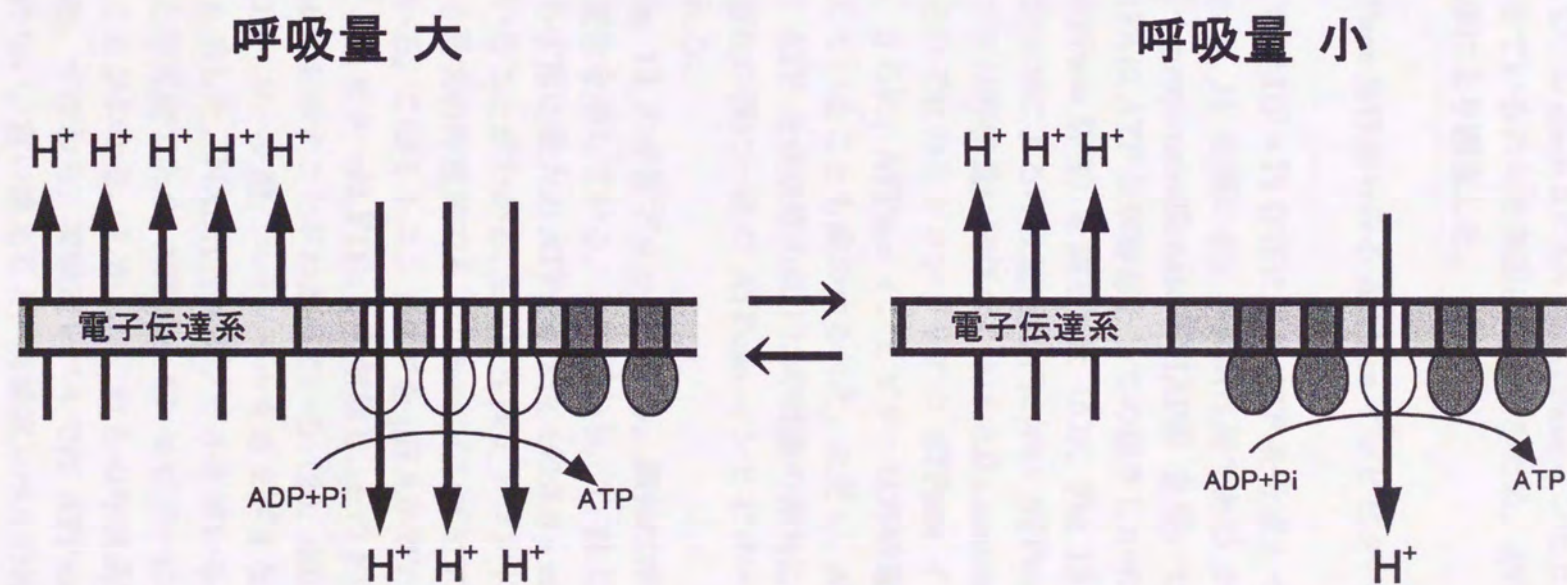


Fig. 12. ATP合成のメカニズム. 呼吸量の増減で変化するのは活動型-休止型F₁F₀の比率である.

2-4 ATP 合成中の ATPase インヒビターの結合

ATP を合成している state 3 において ATPase インヒビターが呼吸量に応じて結合量を変化させているのかを実際に確かめるため、ATP 分解活性およびウェスタンブロット法により調査した。

2-4-1 ATPase 活性からみる ATPase インヒビター結合

コハク酸呼吸下、ADP + Pi 存在により ATP を合成しつつある state 3 のミトコンドリア (Fig. 9, 11 参照) を、界面活性剤である 3-[(3-cholamidopropyl)-dimethylaminol]-1-propanesulfonate (CHAPS) を用いて可溶化させた。可溶化して得られた F1Fo は ATP 分解酵素としての働きしか示さなくなる。この ATP 加水分解活性 (ATPase 活性) を測定した (53)。Fig. 13 より、野生株ミトコンドリアはマロン酸添加による呼吸速度低下に伴い ATPase 活性は減少した。T₁ 株ミトコンドリアでは呼吸量に関係なくほぼ 3.0 μ mol/min/mg prot. を保持した。この違いはそれぞれのミトコンドリアの ATPase インヒビターの有無を如実に表しており、さらに、ATPase インヒビターは呼吸量の低下に伴い F1Fo への結合量が増大していることも確かめられた。ただし、ATPase インヒビターの結合量の増加と、ATP 合成活性の低下は呼吸量の非常に小さいところで比例しない。これは可溶化の際に一部の ATPase インヒビターが外れてしまったことによると考えられる。

Fig. 14 は Fig. 13 の逆数プロットである。横軸は呼吸速度の逆数、縦軸は ATPase 活性の逆数を示している。この図から、T₁ 株ミトコンドリアの F1Fo は呼吸量に関わらず常に最大の ATPase 活性 (約 3.0 μ mol/min/mg prot.) を示す能力を持っていることがわかる。また野生株ミトコンドリアの F1Fo にはコハク酸呼吸で賄える最大の呼吸量でも ATPase インヒビターは一部結合していることが示されている。このミトコンドリアを pH 8.0 でアルカリ処理することにより、ATPase インヒビターは F1Fo から解離し、その F1Fo は最大活性 (2.9 μ mol/min/mg prot.) を示すことがわかっている (20, 55)。なお、図中には呼吸基質として NADH、コハク酸、エタノールをさまざまな組み合わせで用いた際の ATPase 活性も示した。NADH やエタノールを用いることにより、呼吸速度を上昇させることが可能であり、ATPase インヒビターは呼吸量の増加で解離する量も増加することがわかる。しかし、これらの呼吸基質を用いても最大活性にはならなかった。すなわち、実験室レベルでは ATPase インヒビターがすべて解離することはない。言い換えると、実験室レベルの呼吸量では休止型 F1Fo がすべて活動型になることはない。

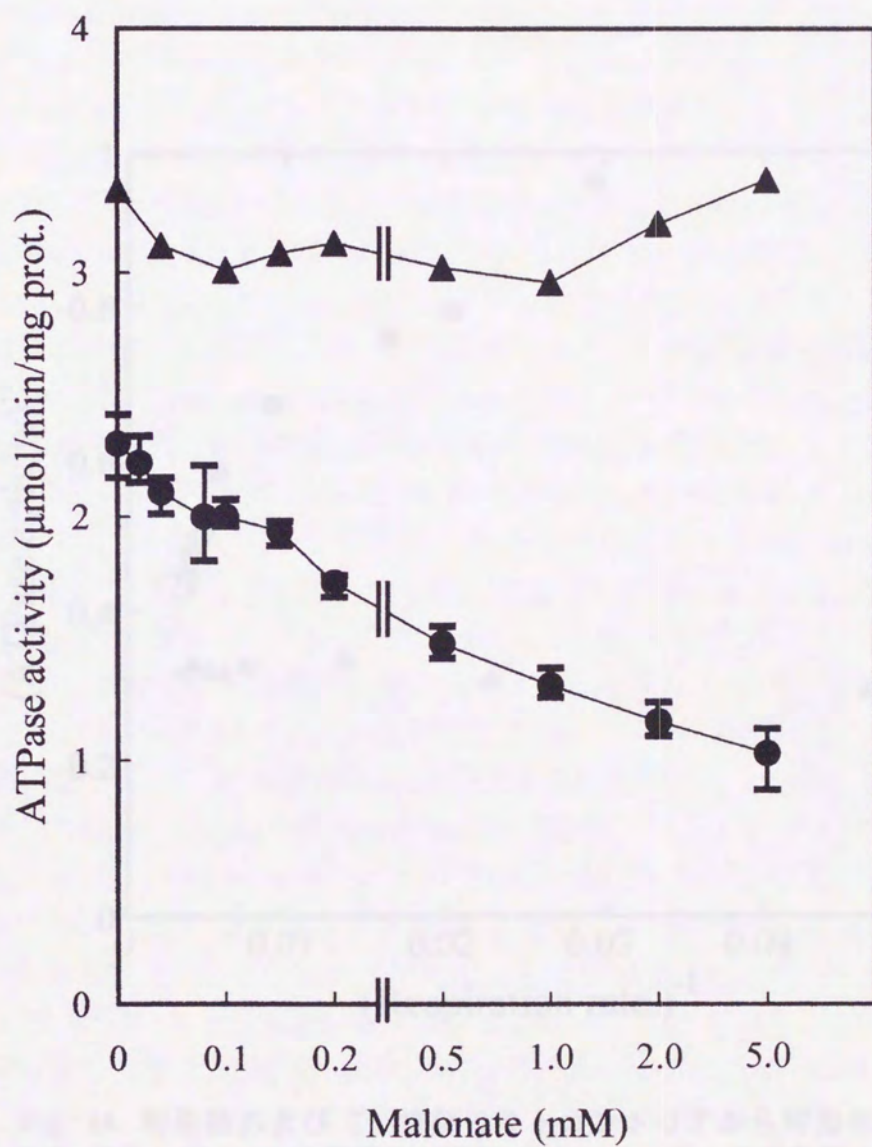


Fig. 13. 野生株およびT₁株酵母ミトコンドリアから可溶化したF₁F₀ATPaseのATP分解活性. ● : 野生株(n=3), ▲ : T₁株

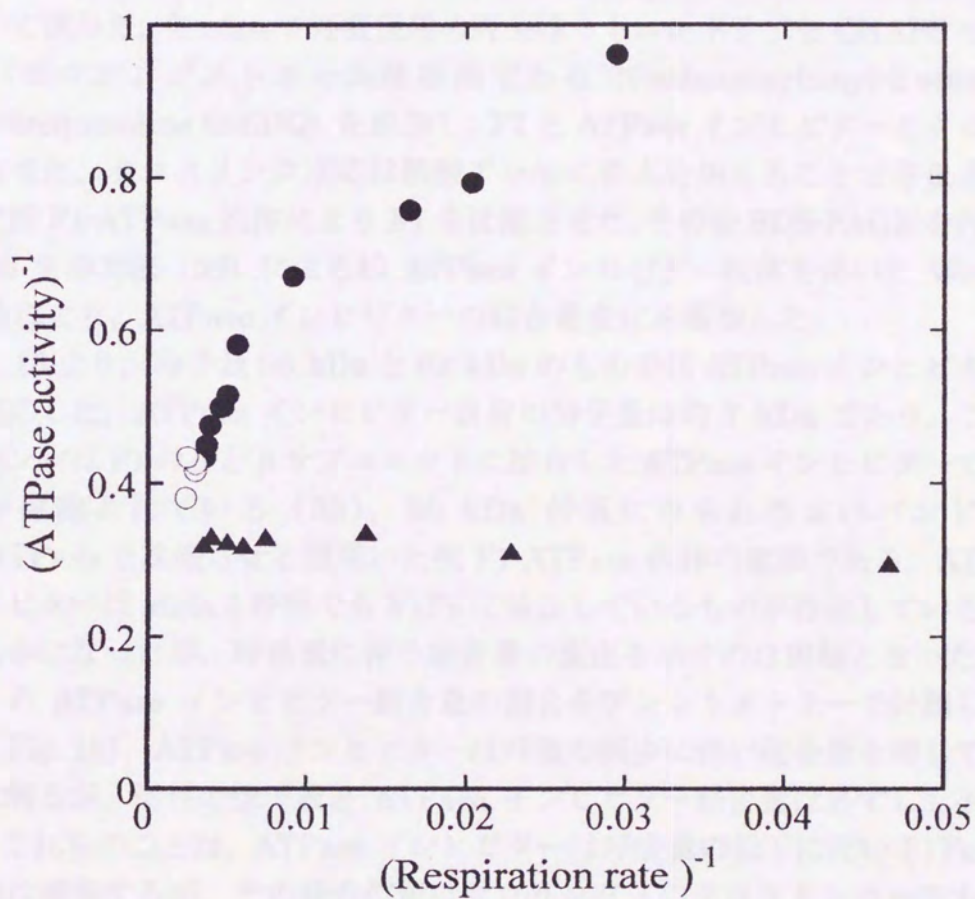
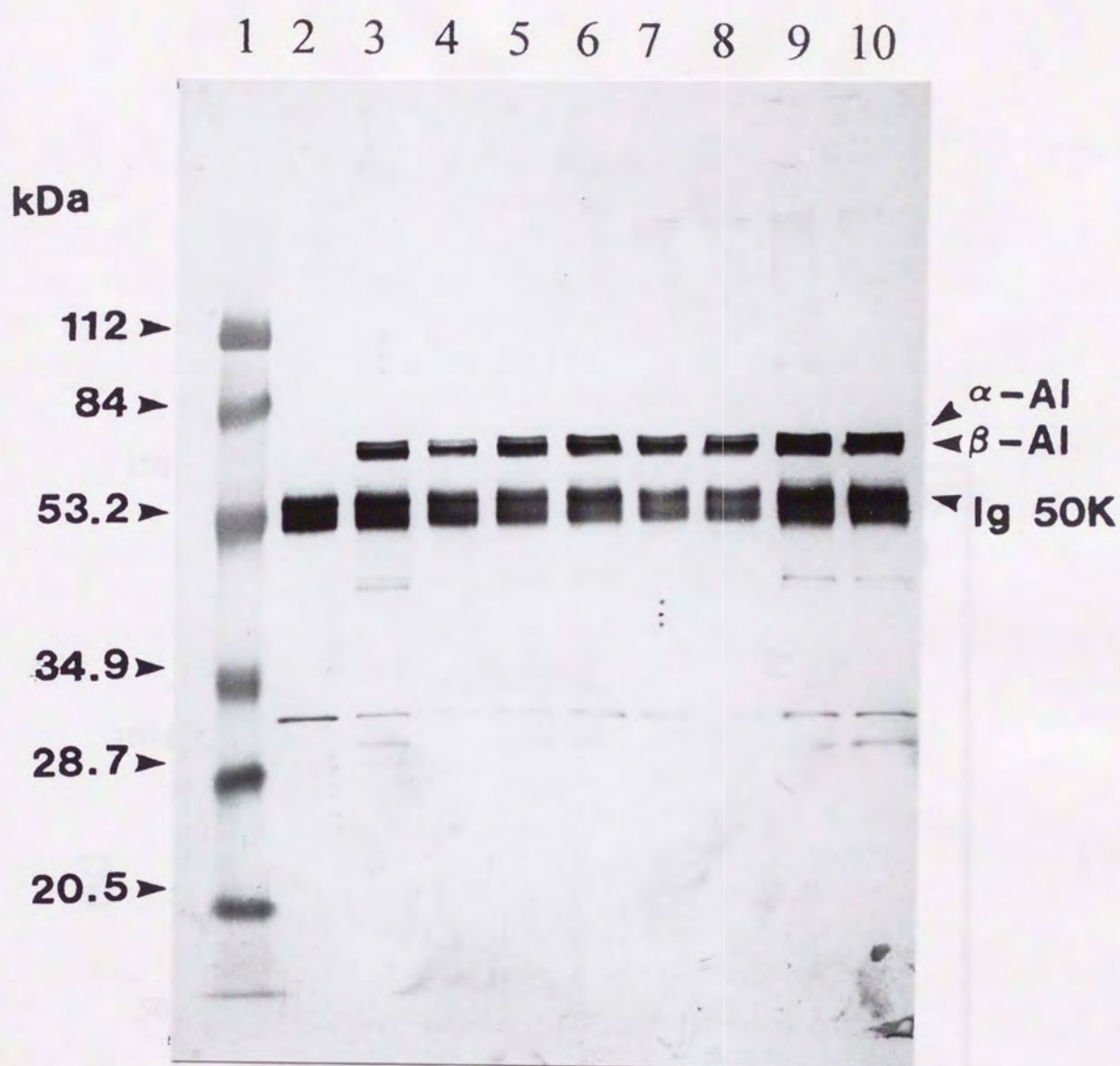


Fig. 14. 野生株および T₁ 株酵母ミトコンドリアから可溶化した F₁F₀ATPase の ATP 分解活性 (逆数プロット). ○: 呼吸基質として NADH (1 mM), コハク酸 (10 mM), エタノール (80 mM) をさまざまな組み合わせで用いた際の野生株ミトコンドリア F₁F₀ATPase の ATPase 活性. その他は Fig. 13. に同じ.

2-4-2 F1Fo と ATPase インヒビターのクロスリンク

単離精製された ATPase インヒビターと F1 を用いた *in vitro* の研究により, ATPase インヒビターは ATP と Mg^{2+} の存在下, F1 と等モルで結合し (26), またその結合部位は F1 の β サブユニットであるとの報告や (56, 57), *in vivo* の研究で α と β の界面であるとの報告 (58) がある。本研究では state 3 での呼吸量変化に伴う ATPase インヒビターの結合量変化の測定を, Western Blot 法を用いて試みた。各 state 3 呼吸段階の野生株ミトコンドリアを CHAPS で可溶化後, ゼロオングストローム架橋剤である N-ethoxycarbonyl-2-ethoxy-1, 2-dihydroquinoline (EEDQ) を添加し, F1 と ATPase インヒビターをクロスリンクさせた。クロスリンク反応は酢酸アンモニウムを加えることで停止させ, ついで抗 F1-ATPase 抗体により F1 を沈殿させた。その後 SDS-PAGE を行い, Towbin らの方法 (59) による抗 ATPase インヒビター抗体を用いた Western Blot 法により, ATPase インヒビターの結合量変化を観察した。

Fig. 15 より, 分子量 66 kDa と 62 kDa のものが抗 ATPase インヒビター抗体と反応した。ATPase インヒビター自身の分子量は約 7 kDa であり, この 2 つのバンドは F1 の α と β サブユニットに結合した ATPase インヒビターであることが確認されている (58)。50 kDa 付近にみられる太いバンドは, F1FoATPase を沈殿させる際用いた抗 F1-ATPase 抗体の重鎖である。ATPase インヒビターは state 3 呼吸でも F1Fo に結合しているものが存在していることは明らかになったが, 呼吸量に伴う結合量の変化を示すのは困難となった。F1 あたりの ATPase インヒビター結合量の割合をデンストメトリーで計測したところ (Fig. 16), ATPase インヒビターは呼吸の減少に伴い結合量を増していることは解るが, 活性の低下量と ATPase インヒビター結合量は必ずしも平行しない。これらのことは, ATPase インヒビターは呼吸量の低下に伴い F1Fo への結合量は増加するが, その結合位置はゼロリングスのクロスリンカーでも区別し難いほどの位置変化である可能性を示している。さらに, ATPase インヒビターは F1 へ結合/解離をするのではなく, F1 の活性を阻害する型と阻害しない型を持って常に F1 近傍に存在しているとも考えられる。



- レーン 1 : 分子量マーカー
 レーン 2 : クロスリンク反応なし
 レーン 3 : 呼吸阻害なし
 レーン 4 : マロン酸添加 (0.05 mM) による呼吸阻害
 レーン 5 : (0.1 mM)
 レーン 6 : (0.2 mM)
 レーン 7 : (0.5 mM)
 レーン 8 : (1.0 mM)
 レーン 9 : (2.0 mM)
 レーン 10 : Antimycin A による呼吸阻害

Fig. 15. ATPase インヒビターと F1FoATPase のクロスリンク (State 3, コハク酸呼吸).

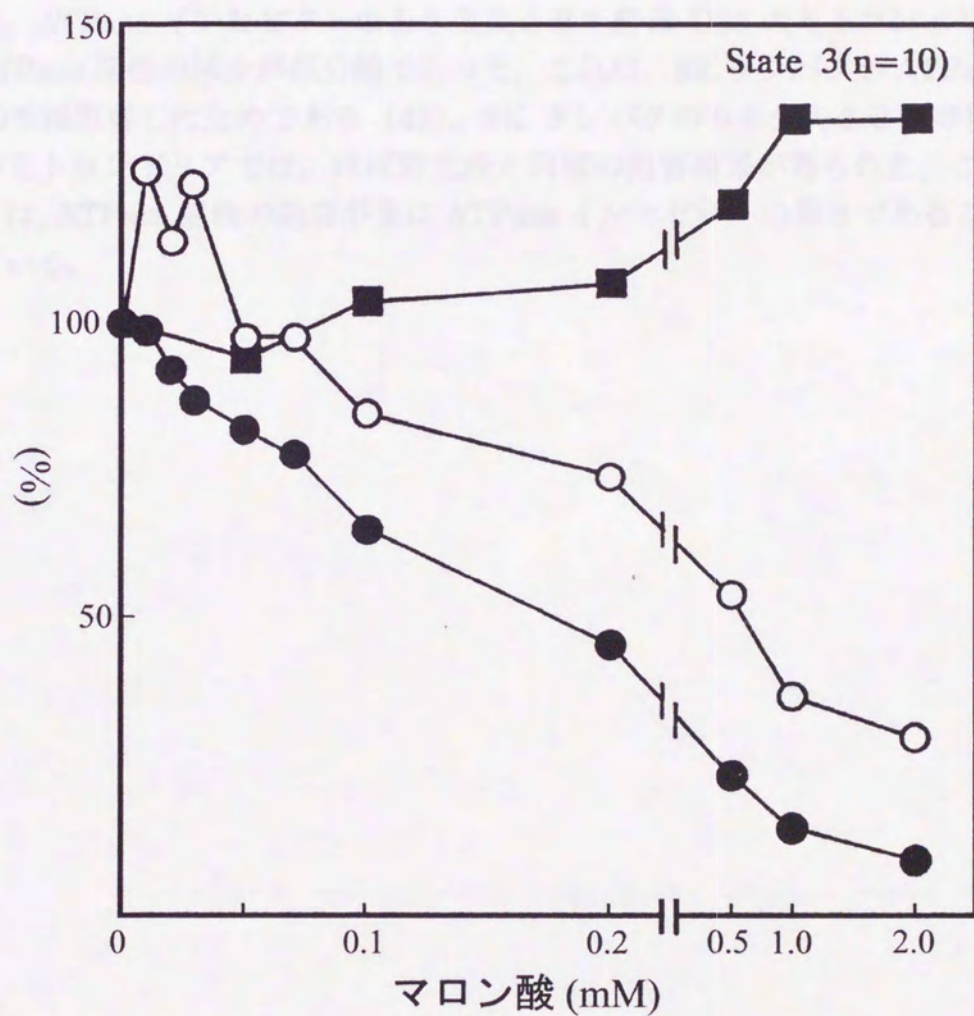


Fig. 16. ATPase インヒビターのクロスリンク量と呼吸速度および ATPase 活性. ■ : クロスリンク量, ○ : ATPase 活性, ● : 呼吸速度.

2-5 種々の変異酵母ミトコンドリアの ATPase 活性

酵母ミトコンドリアには F₁F₀ の活性を調節する因子として ATPase インヒビターのほかに 9K タンパク、15K タンパクが存在する。これらをいろいろな組み合わせで欠失させた酵母ミトコンドリアの ATPase 活性を調査した (Fig. 17)。ATPase インヒビターと 9K タンパクを欠失させた酵母 W1 のミトコンドリアでは、T₁ 株ミトコンドリアと同様、呼吸速度に関わらず高い ATPase 活性を示した。ATPase インヒビターのみを欠失させた酵母 D26 のミトコンドリアでは、ATPase 活性の減少が部分的であった。これは、9K タンパクが ATPase 活性を 40% 程阻害したためである (42)。9K タンパクのみを欠失させた酵母 905-L1 のミトコンドリアでは、ほぼ野生株と同様の阻害結果が得られた。これらのことは、ATPase 活性の阻害が主に ATPase インヒビターの働きであることを示している。



Fig. 17. 種々の変異酵母ミトコンドリア中の ATPase 活性。T₁ 株、D26 株、W1 株、905-L1 株のミトコンドリアを用いて、ATPase 活性を測定した。T₁ 株は野生株、D26 株は ATPase インヒビターのみを欠失させた株、W1 株は ATPase インヒビターと 9K タンパクを欠失させた株、905-L1 株は 9K タンパクのみを欠失させた株である。

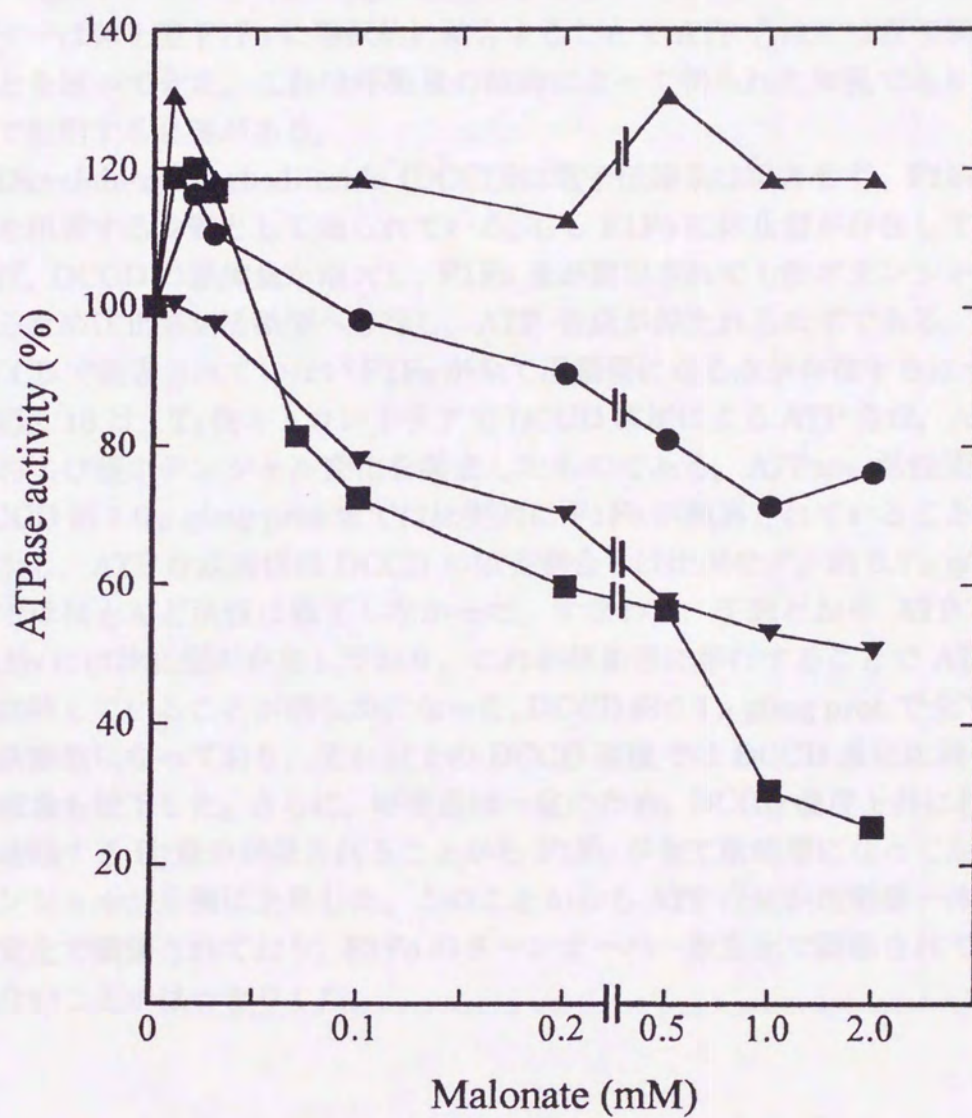


Fig. 17. 種々の変異酵母ミトコンドリアF1FoのATPase活性. ■, ▼, ●, ▲はそれぞれ野生株, 905-L1, D26, W1 ミトコンドリアから可溶化したF1FoのATPase活性を示す.

2-6 DCCD 添加による F₁F_o の阻害と膜ポテンシャルの上昇

これまでの結果から、F₁F_o による ATP 合成の調節は、呼吸量の増減に対応して活動型と休止型の比率を変化させることにより行われており、それによりその間膜ポテンシャルが一定に保たれることを示した。そして ATPase インヒビターは休止型 F₁F_o に選択的に結合することで ATP 合成には直接関与しないことを述べてきた。これは呼吸量の制御によって得られた知見であり、別の方法で証明する必要がある。

Dicyclohexyl carbodiimide (DCCD) は電子伝達系は阻害せず、F₁F_o の H⁺ 輸送を阻害する物質として知られている。もし F₁F_o に休止型が存在しているのならば、DCCD の添加量が増大し、F₁F_o 量が制限されても膜ポテンシャルが存在するため休止型が活動型へ移行し、ATP 合成が保たれるはずである。そして、DCCD で阻害されていない F₁F_o が全て活動型になる点が存在するはずである。

Fig. 18 は、T₁ 株ミトコンドリアで DCCD 添加による ATP 合成、ATPase 活性および膜ポテンシャル変化を調査したものである。ATPase 活性変化から、DCCD 約 1.0 μ g/mg prot. までは比例的に F₁F_o が阻害されていることがわかる。しかし、ATP 合成活性は DCCD の阻害割合とは比例せず、約 0.7 μ g/mg prot. まではほとんど活性は低下しなかった。すなわち、予想どおり ATP 合成中の F₁F_o には休止型が存在しており、これが活動型に移行することで ATP 合成量を維持していることが明らかになった。DCCD 約 0.7 μ g/mg prot. で全ての F₁F_o が活動型になっており、それ以上の DCCD 濃度では DCCD 量に比例して ATP 合成量も低下した。さらに、呼吸量は一定のため、DCCD 濃度上昇に伴い F₁F_o を通過する H⁺ 量が制限されることから F₁F_o が全て活動型になってからは膜ポテンシャルが急激に上昇した。このことから ATP 合成が活動型-休止型の比率変化で調節されており、F₁F_o のターンオーバー数変化で調節されているのではないことがはっきりした。

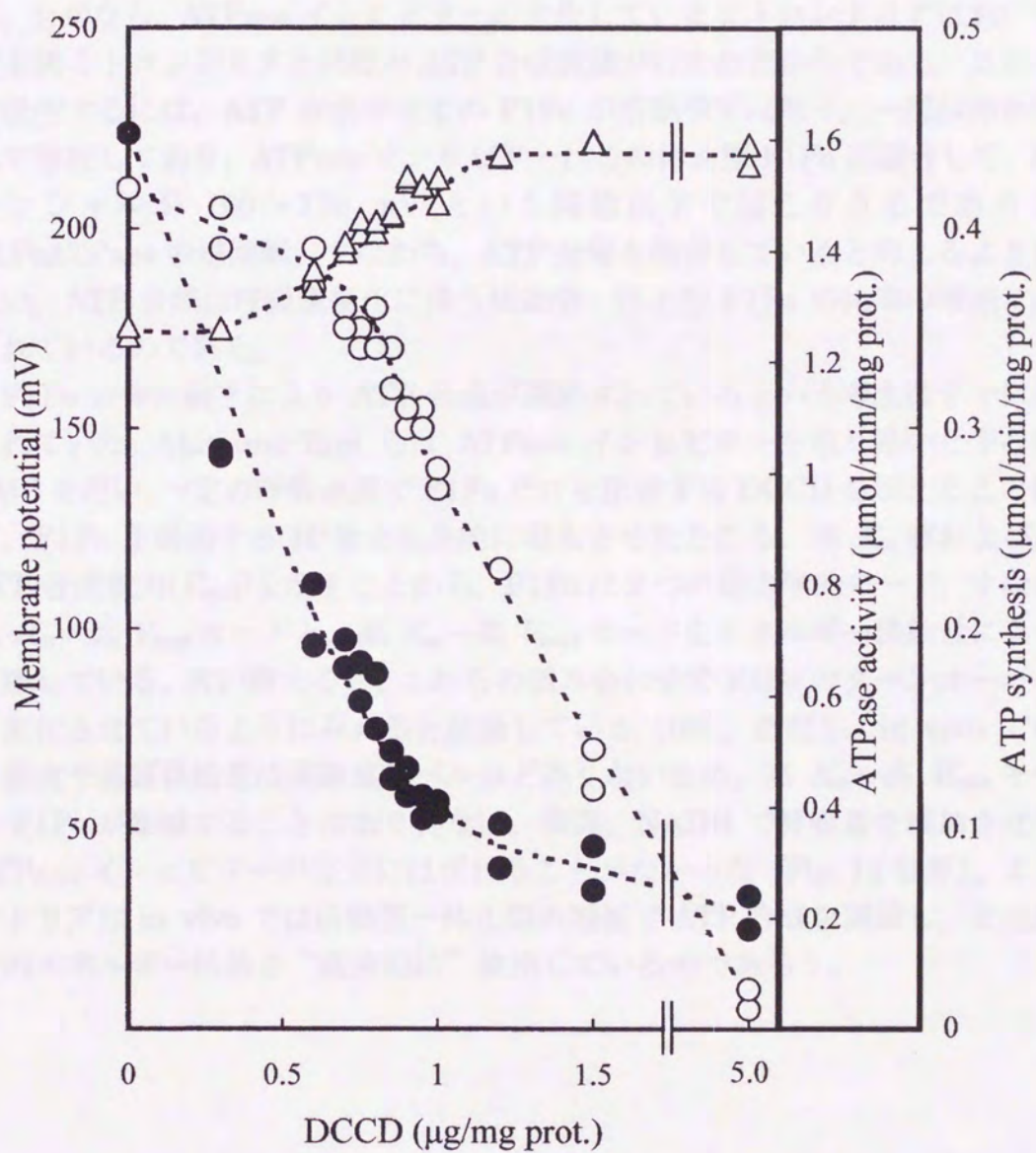


Fig. 18. DCCD添加によるT₁株ミトコンドリアの膜ポテンシャル, ATP合成活性および可溶化されたF₁F₀のATPase活性.
 Δ : 膜ポテンシャル, O : ATP合成活性, $\bullet$: ATPase活性

2-7 まとめ

野生株ミトコンドリアは ATP 合成中でも呼吸速度の低下に伴い ATPase インヒビターの結合量が増加する。しかし、この結合は ATP 合成には影響していない。なぜなら、ATPase インヒビターの欠失しているミトコンドリアにおいても野生株ミトコンドリアと同様の ATP 合成調節が行われたからである。このことを説明するには、ATP 合成中全ての F1Fo が活動型ではなく、一部は休止型として存在しており、ATPase インヒビターはこの休止型 F1Fo に結合して、膜ポテンシャルが 160~170 mV という閾値以下で起こりうるであろう、F1FoATPase の逆回転、すなわち、ATP 分解を阻害していると考えよりほかない。ATP 合成は呼吸量変化に伴う活動型-休止型 F1Fo の比率の増減で調節されているのである。

F1Fo 自体の働きにより ATP 合成が調節されているという考えはすでに提出されていた。Matsuno-Yagi らは ATPase インヒビターを取り除いた牛心筋の SMP を用い、一定の呼吸速度で F1Fo だけを阻害する DCCD を加えることにより、F1Fo を通過する H^+ 量を人為的に増大させたところ、高 K_m 値および高い ATP 合成能力(V_{max})を示すことから、F1Fo は 2 つの動力的モード、すなわち低 K_m -低 V_{max} モードと、高 K_m -高 V_{max} モードをエネルギー供給量によって互換している。言い換えると、これらの組み合わせで F1Fo のターンオーバー数を変化させているようにみえると結論している (60)。ただし、in vivo では酸素濃度や基質供給量は実験室レベルほど高くないため、高 K_m -高 V_{max} モードで F1Fo が駆動することはあり得ない。実際、NADH で呼吸量を増加させても ATPase インヒビターが完全にはずれることがなかった (Fig. 14 参照)。ミトコンドリアは in vivo では活動型-休止型の増減で ATP 合成を調節し、その段階でのエネルギー供給を“経済的に”使用しているのであろう。

第3章 呼吸停止時のATP分解による膜ポテンシャルの回復

3-1 はじめに

第3章

呼吸停止時のATP分解による膜ポテンシャルの回復

呼吸停止時、このATP分解による膜ポテンシャルの回復は、また、この膜ポテンシャルとATPaseインヒビターとの関係も明らかである。

3-2 ATP分解時の膜ポテンシャル

ミトコンドリアは十分呼吸品質の呼吸を、呼吸停止時にADPが全てATPに合成し尽くされた状態を、呼吸停止時にATPを合成する状態がないのでミトコンドリアは呼吸停止状態である。ミトコンドリア内へ取り込まれることがない。呼吸停止時に膜ポテンシャルは呼吸停止時に低い値 (約 200 mV) を維持する。この呼吸停止時にミトコンドリアに電子伝達系の電子伝達系であるcytochrome cを添加した。呼吸停止時に呼吸停止時に膜ポテンシャルは低下し、呼吸停止時にATP分解で膜ポテンシャルを回復しようとするが、呼吸停止時に呼吸停止時にミトコンドリアどちらにもその低下は約 100 mVまでであり、呼吸停止時にその値を維持し、(Fig. 100)。この値はATPを合成する膜ポテンシャルとはほぼ等しい (Fig. 100)。このことから、ATP合成時の膜ポテンシャルとATP分解時の膜ポテンシャルはほとんど等しいと推定されることである。このことからミトコンドリアのATP分解は呼吸停止時に起こる。呼吸停止時にミトコンドリアは約 100 mV/mg prot. であり、呼吸停止時にミトコンドリアは約 100 mV/mg prot. と、非常に高いATP分解を示した。呼吸停止時にATP分解で膜ポテンシャルを160~170 mVに維持していることである。呼吸停止時にミトコンドリアはATPを呼吸停止時に分解していることである。ATPaseインヒビターは呼吸停止時にATP分解を阻害していると考えられる。

第3章 呼吸停止時のATP分解による膜ポテンシャルの回復

3-1 はじめに

F₁F₀ATPase は可逆的な酵素であり, ATP を分解することにより H⁺を膜の外へ放出し, 膜ポテンシャルを形成することも可能である。F₁F₀ による反応がどちらの方向に進むかは, H⁺の移動と, ATP の合成という共役している反応全体の正味の自由エネルギー変化 ΔG によって決まると考えられる。すなわち, F₁F₀ が ATP を合成するか分解するかは, 膜ポテンシャルの大きさによると考えてもよい。ならば, ミトコンドリアの state 3 呼吸を停止させ, 膜ポテンシャル形成能を消失させると F₁F₀ は ATP を分解する方向に回転し, H⁺を膜外へ輸送するはずである。この ATP 分解による膜ポテンシャルはどこまで回復するのか。また, この回復能と ATPase インヒビターの関係はいかなるものか。

3-2 ATP 分解時の膜ポテンシャル

ミトコンドリアに十分呼吸基質が存在し, なおかつ ADP が全て ATP に合成し尽くされた状態を state 4 と呼ぶ。State 4 では ATP を合成する必要がないのでミトコンドリアは休止状態である。よって H⁺は膜内へ取り込まれることがない, 言い換えると膜ポテンシャルは使用されないので高い値 (約 200 mV) を維持する。この state 4 であるミトコンドリアに電子伝達系の阻害剤である antimycin A を添加した。呼吸を阻害されることで膜ポテンシャルは低下し, F₁F₀ による ATP 分解で膜ポテンシャルを形成しようとするが, 野生株および T₁株ミトコンドリアどちらもその低下は約 160 mV までであり, 時間を経てもその値を維持した (Fig. 19)。この値は ATP 合成時の膜ポテンシャルとほぼ等しくなり (Fig. 9, 11 参照), このことから, ATP 合成中の膜ポテンシャルと ATP 分解で回復できる膜ポテンシャルはほとんど同じであることがわかる。このときのミトコンドリアの ATP 分解活性を計測したところ, 野生株ミトコンドリアは 0.01 μ mol/min/mg prot. であったのに対し, T₁株ミトコンドリアは 0.93 μ mol/min/mg prot. と, 非常に高い ATP 分解能を示した。野生株ほどの ATP 分解能で膜ポテンシャル 160~170 mV を維持できるのであるから, T₁株ミトコンドリアは ATP を無駄に分解しているのである。ATPase インヒビターはこの無駄な ATP 分解を阻害していると考えられる。

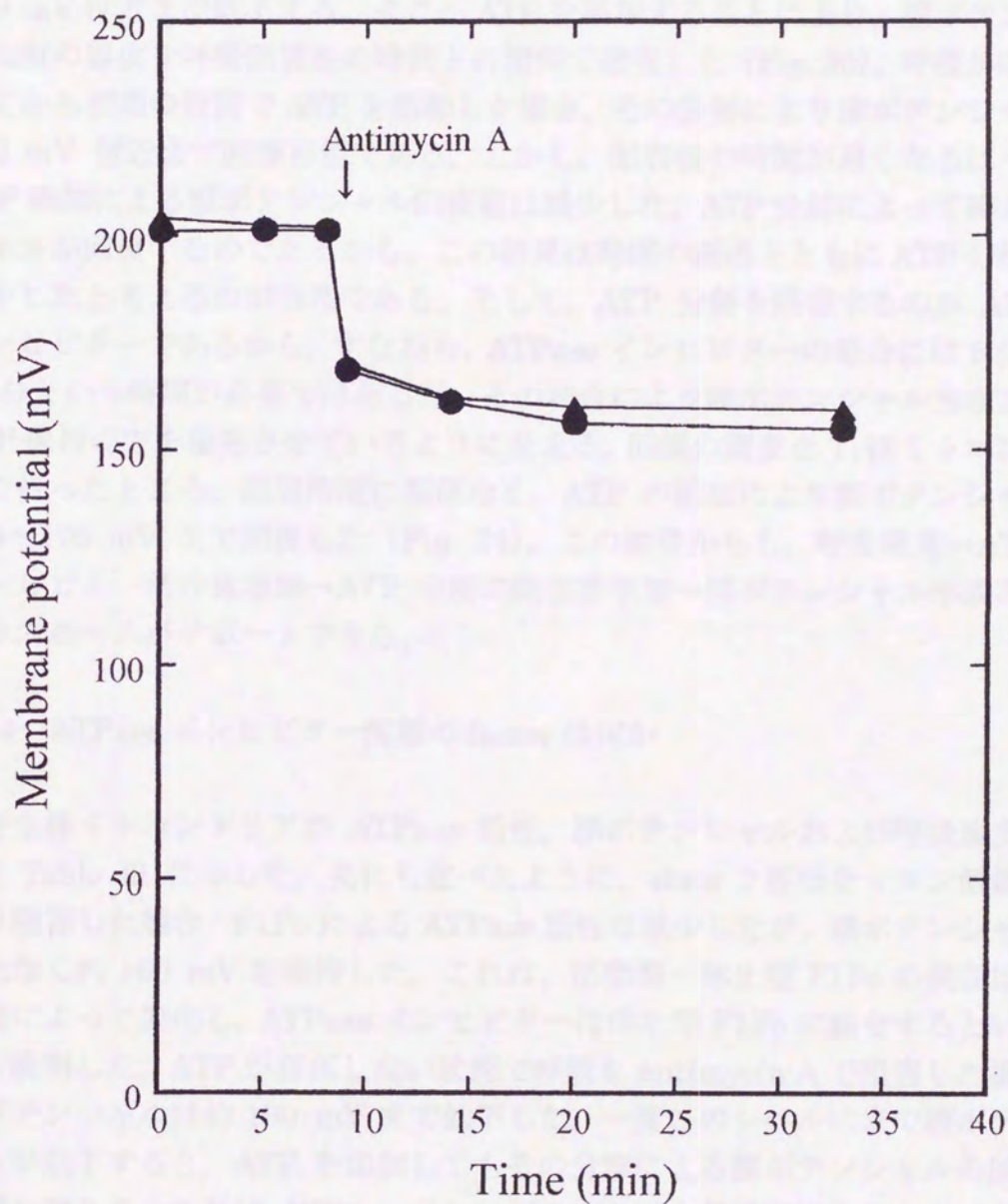


Fig. 19. 野生株および T₁ 株酵母ミトコンドリアにおける, 呼吸停止時の膜ポテンシャル変化 (ATP 存在下). 矢印で antimycin A (4 μ M) 添加. ●: 野生株, ▲: T₁ 株.

3-3 ATP 添加による膜ポテンシャルの回復

野生株ミトコンドリアに ATP を添加せず、呼吸を antimycin A で阻害した。ATP が存在しないため F₁F_o による ATP 分解が行われず、膜ポテンシャルは 100 mV 付近まで低下する。そこへ ATP を添加することにより、膜ポテンシャル回復の程度を呼吸阻害後の時間との関係で調査した (Fig. 20)。呼吸が阻害されてから初期の段階で ATP を添加した場合、その分解により膜ポテンシャルは 160 mV 付近まで回復可能である。しかし、阻害後の時間が遅くなるにつれ、ATP 添加による膜ポテンシャル回復能は減少した。ATP 分解によって膜ポテンシャルが回復するのであるから、この結果は時間の経過とともに ATP 分解能が減少したと考えるのが当然である。そして、ATP 分解を阻害するのが ATPase インヒビターであるから、すなわち、ATPase インヒビターの結合には 5 分から 10 分という時間が必要ではあるが、その結合により膜ポテンシャル形成よりも ATP 保持の方を優先させているように見える。同様の調査を T₁ 株ミトコンドリアで行ったところ、阻害時間に関係なく、ATP の添加により膜ポテンシャルは 160~170 mV まで回復した (Fig. 21)。この結果からも、呼吸阻害→ATPase インヒビター結合量増加→ATP 分解の阻害度増加→膜ポテンシャル形成不利というスキームがサポートできる。

3-4 ATPase インヒビター解離の factor は何か

野生株ミトコンドリアの ATPase 活性、膜ポテンシャルおよび呼吸速度の関係を Table III に示した。先にも述べたように、state 3 呼吸をマロン酸添加により阻害した場合、F₁F_o による ATPase 活性は減少したが、膜ポテンシャルは変化なく約 160 mV を維持した。これは、活動型-休止型 F₁F_o の混在比が呼吸量によって変化し、ATPase インヒビターは休止型 F₁F_o に結合するという考えで説明した。ATP が存在しない状態で呼吸を antimycin A で阻害した場合、膜ポテンシャルは約 100 mV まで低下した。一度このレベルにまで膜ポテンシャルが低下すると、ATP を添加してもその分解による膜ポテンシャルの回復はわずかである。これは ATPase インヒビターの結合量増加によるものであり、このレベルで一旦結合した ATPase インヒビターは、ATP で解離させることはできないことが解る。しかし、そこへアスコルビン酸と *N,N,N',N'*-tetramethyl-*p*-phenylenediamine (TMPD) を添加して呼吸を回復させてみた。アスコルビン酸+TMPD 呼吸では、電子伝達系のシトクロム c へ直接電子が渡されるため、複合体 III を阻害する antimycin A が存在しても呼吸を回復することができる。こうして呼吸を回復させたところ、膜ポテンシャルは回復し、

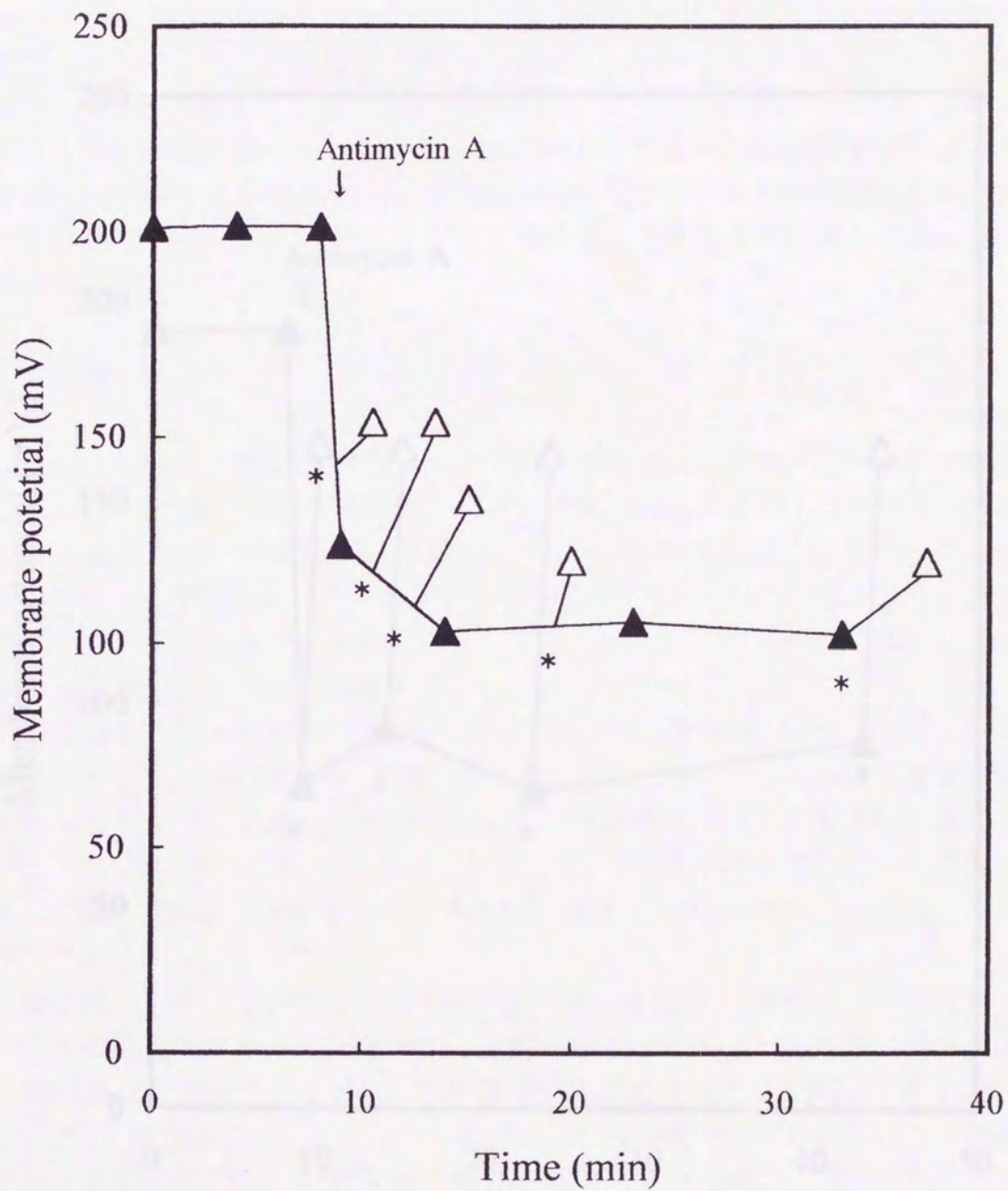


Fig. 20. ATP 非存在下, 野生株酵母ミトコンドリアにおける ATP 添加による膜ポテンシャル変化. *で ATP (2 mM)添加. ▲: ATP なし, △: ATP 添加後の膜ポテンシャル.

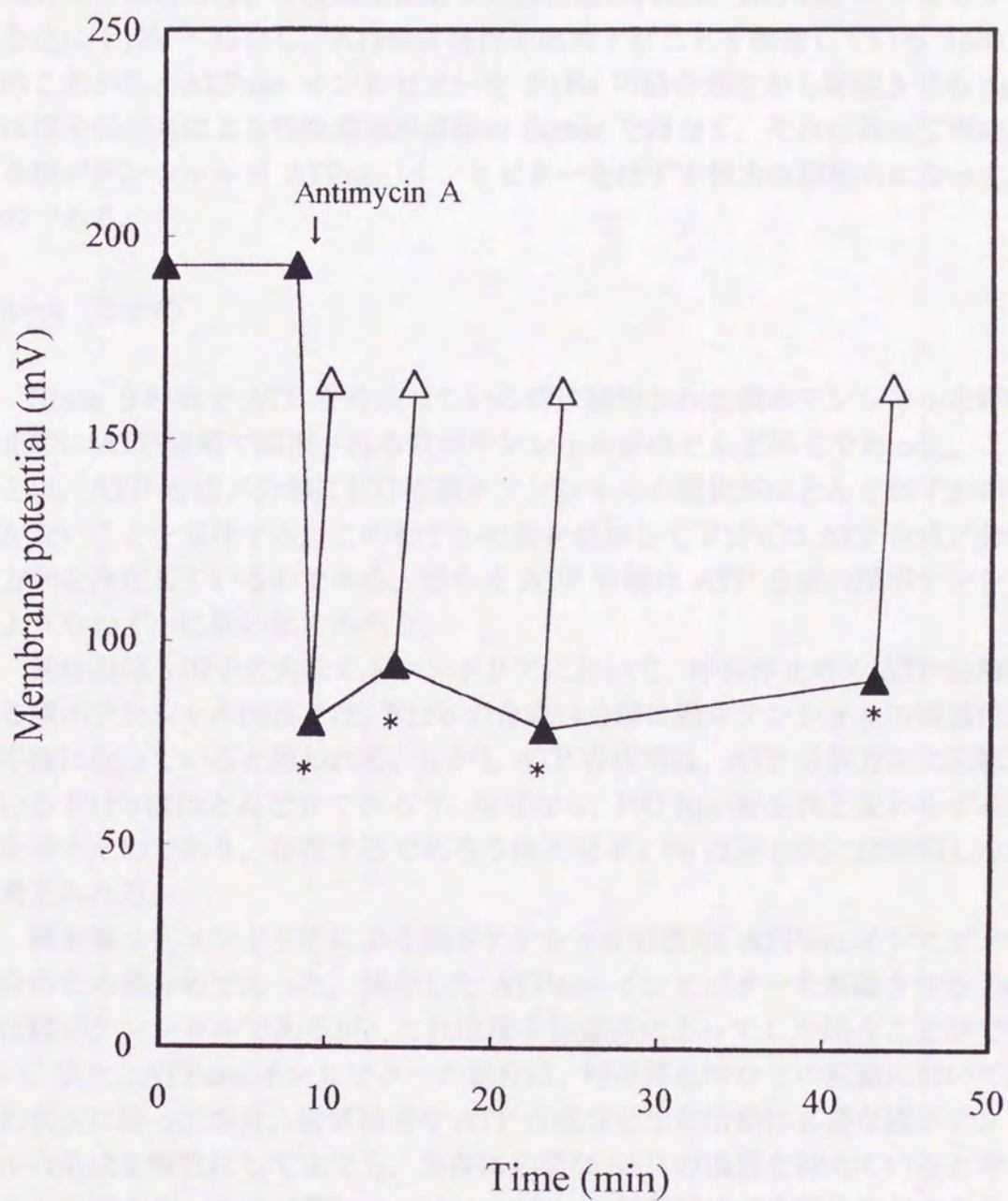


Fig. 21. ATP 非存在下, T₁ 株酵母ミトコンドリアにおける, ATP 添加による膜ポテンシャルの回復. 記号は Fig. 18 に同じ.

ATPase 活性もそれに伴い回復した。ATPase 活性が回復するという事は、ATPase インヒビターが F1Fo の結合部位からはずれたことを意味する。Mimura らは以前、state 3 呼吸のミトコンドリアへ脱共役剤である carbonyl cyanide *m*-chlorophenylhydrazone (CCCP)を添加し、膜ポテンシャルを完全に消失させたところ、呼吸速度は最大に活性化されたが ATPase インヒビターは急速に F1Fo へ結合し、ATPase 活性を阻害することを報告している (58)。このことから、ATPase インヒビターを F1Fo の結合部位から解離させる factor は電子伝達系による呼吸増加が直接の factor ではなく、それに伴って形成される膜ポテンシャルが ATPase インヒビターをはずす強力な駆動力になっているのである。

3-5 まとめ

State 3 呼吸で ATP を合成している時に維持された膜ポテンシャルと呼吸停止時に ATP 分解で回復される膜ポテンシャルがほとんど同じであった。このことは、ATP 合成/分解における膜ポテンシャルの閾値がほとんどわずかの差しかないことを意味する。このわずかの差を感知して F1Fo は ATP 合成/分解の方向を決定しているのである。恐らく ATP 分解は ATP 合成の膜ポテンシャルよりもわずかに低い値であろう。

活性調節 3 因子欠失株ミトコンドリアにおいて、呼吸停止時の ATP 分解による膜ポテンシャル回復では、F1Fo の合成⇄分解は膜ポテンシャルの閾値付近で平衡になっていると思われる。しかし ATP 合成時は、ATP 分解方向に回転している F1Fo はほとんど 0 であろう。なぜなら、P/O 比が野生株と変わらず高い値を示すためであり、存在するであろう休止型 F1Fo は逆方向には回転しないと考えられる。

野生株ミトコンドリアによる膜ポテンシャル回復は、ATPase インヒビター結合のため部分的であった。結合した ATPase インヒビターを解離させる factor は膜ポテンシャルであるが、これは電子伝達系によってしか賄うことができない。また、ATPase インヒビターの結合は、呼吸停止時などの組織において危機的状況に陥った場合、物質輸送や ATP 合成など生命活動に必要な膜ポテンシャルの形成を犠牲にしてまでも、生存に必要な ATP の浪費を抑えていると考えることもできる。この ATPase インヒビターの制御機作が生理的にどのような意味を持つのか。これを調査するにはミトコンドリアレベルではなく細胞レベルでの観察が必須となる。

Table III 呼吸速度の回復による膜ポテンシャルの上昇, ATPaseインヒビターの解離. Exp. 1は, state 3呼吸. Exp. 2は, マロン酸添加 (5 mM)でstate 3呼吸を阻害後10 minで測定. Exp. 3は, Antimycin A (4 μ M)添加後10 min で測定. Exp. 4は, Antimycin Aを添加してから20 min後, ATP (2 mM)を添加. Exp. 5は, Antimycin Aを添加してから20 min後, ADP (2 mM), アスコルビン酸 (10 mM), TMPD (0.1 mM)を添加.

Experiment No.	Addition			Respiration rate	ATPase activity of solubilized	Membrane potential
	1st	2nd	3rd	nmolO ₂ /min/mg prot.	μ mol/min/mg prot.	mV
1	ADP	—	—	355	2.30	161
2	ADP	Malonate	—	23	1.04	162
3	Antimycin A	—	—	1	0.24	100
4	Antimycin A	ATP	—	2	0.28	114
5	Antimycin A	ADP	Ascorbate + TMPD	353	0.90	164

47

第4章 貧栄養条件下での細胞レベルにおける観察

4-1 はじめに

ATP を合成している state 3 呼吸でのミトコンドリアには活動型と休止型の F₁F₀ が混在し、ATPase インヒビターは休止型 F₁F₀ へ選択的に結合することを第2章で述べた。さらに、呼吸停止状態では ATPase インヒビターは F₁F₀ による ATP の無駄な浪費を阻害し、膜ポテンシャルの形成を犠牲にしているような挙動を示すことを第3章で述べた。休止状態の F₁F₀ やミトコンドリアの呼吸停止状態に ATPase インヒビターは結合することを考えると、細胞が休止状態、すなわち無酸素条件や貧栄養条件（蒸留水中）に晒された場合、ATPase インヒビター欠失による効果は何らかの形で観察されることが期待される。動物細胞を長期間そのような状態に置くことは困難であるが、酵母細胞は滅菌水中に置かれても比較的長期間生存可能である。

4-2 貧栄養条件下での生存率および RD 変異体の発生

野生株および T₁ 株酵母細胞を乳酸培地で対数増殖中期まで培養し、その後貧栄養条件を作るため、集菌、洗浄したのち滅菌水へ移し変えた。これを長期間好氣的に放置し、その際の生菌数変化を調査した。生菌数は経時的に採取したサンプルをプレートにまき、形成されたコロニー数計測により算出した。Fig. 22 に生菌数変化の推移を示した。野生株酵母は比較的生存率が保たれたが、T₁ 株酵母は早期に生存率が低下した。さらに、T₁ 株酵母において、細胞集団の中から呼吸欠損 (respiration deficient, RD) 変異細胞が高頻度で出現することを偶然発見した。RD 変異は 1940 年代にはすでにその存在が知られており、自然条件下でも数%の確率で発生することがわかっている。1960 年代にはミトコンドリア DNA の変異、特に電子伝達系のシトクロム aa₃ や b の DNA に変異が起こり、タンパク合成ができないことがわかった (61)。言い換えると、呼吸能力がなくなっているが、酵母は発酵のみで生育できるため、プレート上で小さなコロニー (petite colony) しか作れないのである。RD 変異は、アクリフラビンなどの化学物質や紫外線照射で人為的に発生させることは可能であるが、自然に発生するそのメカニズムはまだ解明されていない。

長期保存で発生した RD 変異株を任意に取り出し、そのミトコンドリア DNA を制限酵素 *Eco* R I で切断した。同様に、正常ミトコンドリアおよび自然発生した RD 変異株ミトコンドリア DNA も *Eco* R I で切断し、その電気泳動パターン

を比較した (Fig. 23)。その結果, RD 変異株ミトコンドリアは正常ミトコンドリアと比べ, 電気泳動パターンが異なっていた。このことから, RD 変異株のミトコンドリア DNA は変異もしくは欠損していることが確かめられたことになる。また自然発生した RD 変異株と貧栄養条件下で発生した RD 変異株のミトコンドリア DNA の泳動パターンが同じことから, 両者の発生メカニズムは同じであることが示唆される。

ATPase インヒビターの欠失により, 貧栄養条件という細胞にとって重篤な状況下で RD 変異, すなわち細胞の表現型 (phenotype) に影響を与えたのである。これは ATPase インヒビターが細胞レベルで何らかの異常を防ぐ重要な factor であることを意味しており, ミトコンドリアの膜ポテンシャル保持よりも ATP 含量保持を優先させているのではないかという考えと重大な関連が示唆される。



Fig. 23. Growth of RD mutant cells in a minimal medium. ○, Optical density; △, pH. The growth of RD mutant cells in a minimal medium was monitored by measuring the optical density and pH of the culture medium. The optical density increased steadily over 12 days, while the pH decreased steadily over the same period.

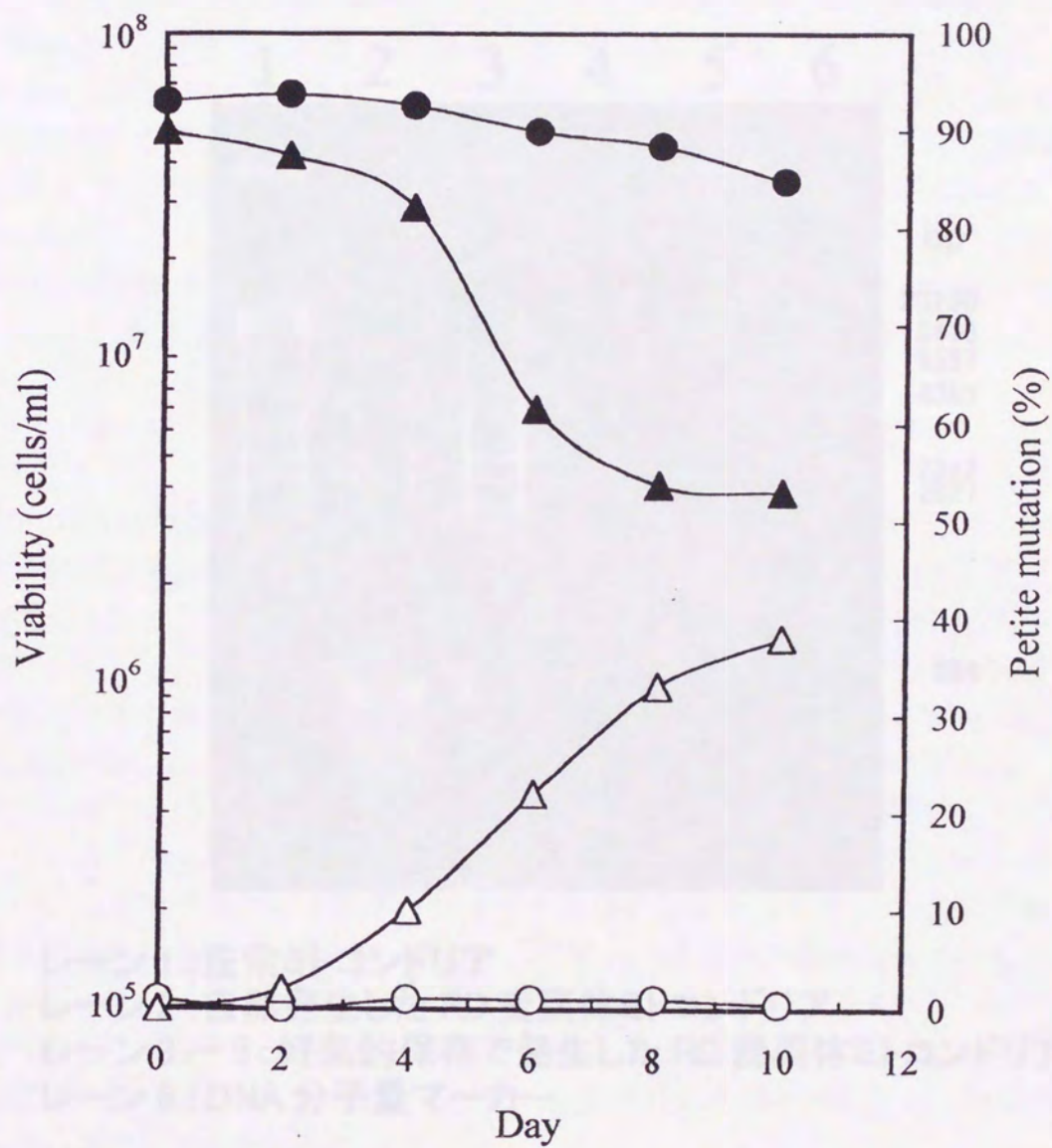
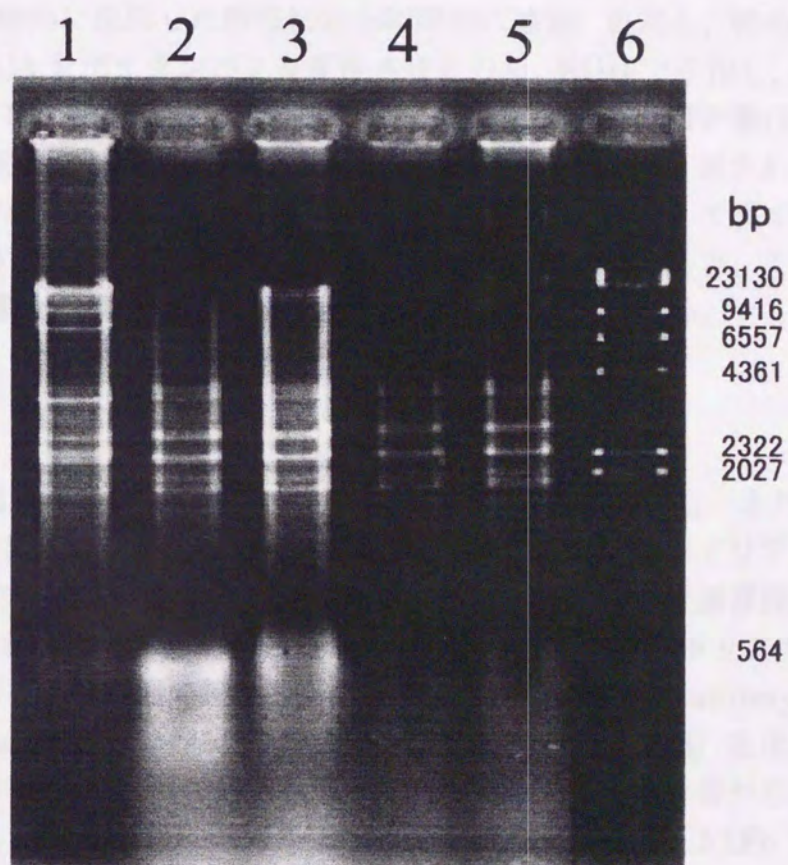


Fig. 22. 貧栄養条件における生存率および RD 変異発生率. ●, ○は野生株酵母の生存率および RD 変異発生率. ▲, △は T₁ 株酵母の生存率および RD 変異発生率.



レーン 1: 正常ミトコンドリア

レーン 2: 自然発生した RD 変異体ミトコンドリア

レーン 3 - 5: 好氣的保存で発生した RD 変異体ミトコンドリア

レーン 6: DNA 分子量マーカー

Fig. 23. ミトコンドリア DNA の *Eco* R I による切断.

4-3 貧栄養条件下での細胞内 ATP 含量変化

ATPase インヒビターがミトコンドリアレベルで膜ポテンシャル保持よりも ATP 含量保持を優先させるのではないかという考えによれば、ATP をほとんど合成できない貧栄養条件下で細胞内 ATP 量に影響を与えるはずである。そのため、滅菌水中で長期間好氣的に放置された酵母細胞中の ATP 含量を測定した (Fig. 24)。経時的に採取した酵母細胞を瞬間的に凍結、乾燥し、得られた乾燥酵母に 60% PCA を加えタンパクを変性させたのち、KOH で中和し、抽出された ATP を HPLC で測定した。この結果、 T_1 株酵母細胞内の ATP 量は滅菌水保持後 1 日目で急激に減少したのに対し、野生株ではほぼ完全に保たれた。このことから、ATPase インヒビターは、休止状態の F_1F_o に結合して膜ポテンシャルの形成を阻害してまでも ATP の分解を防ぐ働き、言い換えると、ミトコンドリア内 ATP 含量を保持する生理的役割を持つことが推察される。

4-4 まとめ

T_1 株酵母は貧栄養条件で放置すると細胞内 ATP 含量が低下し、また、RD 変異が高頻度で出現することを発見した。RD 変異酵母のミトコンドリアは変異を起こしていた。データは示していないが、この DNA の変異は窒素雰囲気中でも発生するため、活性酸素の影響によるものではなく、ミトコンドリア内 ATP が枯渇したあと何らかの原因で起こるものと考えられる。酵母に antimycin A と bongkreikic acid (ミトコンドリアの ATP/ADP 交換体の阻害剤) を添加し、ミトコンドリア内 ATP を枯渇させると RD 変異が発生することは昔からよく知られている (62)。また、ATPase インヒビターの遺伝子以外の、 F_1F_o を構成するいくつかのサブユニットをコードする遺伝子を破壊しても RD 変異が発生することも報告されている (63, 64)。このメカニズムはまだ解明されていないが、 F_1F_o のサブユニットが欠失することでミトコンドリアの膜ポテンシャルが保存できなくなるため、ATP 合成は当然起こらなくなる。ミトコンドリアで ATP が合成されなければミトコンドリア DNA の複製にも障害が起きることから RD 変異が発生してもおかしくはない。

細胞が生存するためには ATP が必要である。無酸素や飢餓などの危機的条件では、新たに ATP を合成することよりも (膜ポテンシャルの形成を犠牲にしても) その段階で存在している細胞内 ATP 消費を極力抑え、生存ぎりぎりの ATP を保持して延命を図っているのかもしれない。

ATPase インヒビターと F_1F_o は *in vivo* では 1:1 のモル比で結合する。しかし、ミトコンドリア内において ATPase インヒビターが F_1F_o ATPase に対して

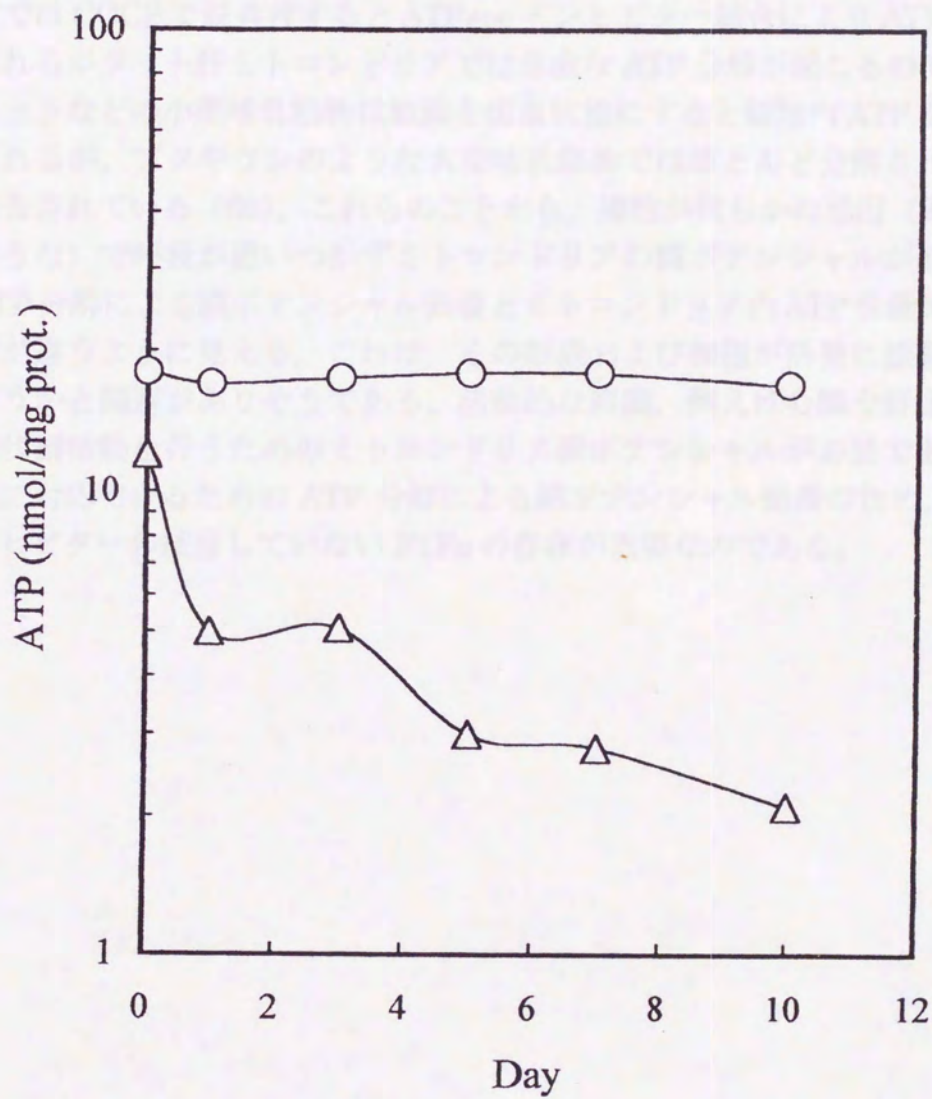


Fig. 24. 貧栄養条件における細胞内 ATP 含量変化. ○は野生株酵母, △は T1 株酵母の ATP 含量.

1 : 1 のモル比で存在しているかは別の問題である。Rouslin らは様々な哺乳動物のミトコンドリア内 ATPase インヒビター量を調べ、ラット肝ミトコンドリアでは F1 に対してモル比で約 0.6, ラットやマウスの心筋ミトコンドリアでは F1 に対し 0.2 ないし 0.3 のモル比しか ATPase インヒビターが存在していないと報告している (65)。すなわち, ATPase インヒビターを結合していない裸の F1FoATPase がもともと存在しているのである。そのため, 酵母ミトコンドリアでは CCCP で脱共役すると ATPase インヒビター結合により ATP 分解が阻害されるがラット肝ミトコンドリアでは急激な ATP 分解が起こるのである。また, ラットなどの小型哺乳動物は組織を虚血状態にすると細胞内 ATP が急激に分解されるが, ブタやウシのような大型哺乳動物ではほとんど分解されないことも報告されている (66)。これらのことから, 細胞が何らかの原因 (例えば虚血のような) で呼吸が追いつかずミトコンドリアの膜ポテンシャルが低下した際, ATP 分解による膜ポテンシャル回復とミトコンドリア内 ATP 含量保持の優先順位が違うように見える。これは, その組織および細胞が活発に活動しているかどうかと関連がありそうである。活動的な組織, 例えば心臓や肝臓などでは常に代謝活動を行うためのミトコンドリア膜ポテンシャルが必要であり, 緊急事態に対応できるための ATP 分解による膜ポテンシャル維持のため, ATPase インヒビターの結合していない F1Fo の存在が重要なのである。

第5章

結言

第5章 結言

本論文は、野生株および活性調節 3 因子を欠失させた酵母のミトコンドリアを用い、F₁F₀ATPase の ATP 合成における ATPase インヒビターの活性制御機構を研究する過程で、F₁F₀ATPase の性質を丹念に調べた結果、ミトコンドリアの ATP 合成機構について新たにいくつかの知見を与えたものである。さらに ATPase インヒビターの細胞レベルでの生理的役割が見えてきた。

ATPase インヒビターはこれまでの報告で ATP 合成は阻害せず、F₁F₀ATPase の逆反応、すなわち膜ポテンシャル消失時に起こる ATP 加水分解反応を阻害する因子として知られてきたが、ATP 合成に参加する F₁F₀ 分子数を ATPase インヒビターが制御するならば、ATPase インヒビターの ATP 合成への関連および F₁F₀ の ATP 合成メカニズムが解明できると考えた。結果として、野生株酵母ミトコンドリアと ATPase インヒビター欠失株酵母ミトコンドリアの呼吸阻害時における ATP 合成パターンに差はみられず、ATPase インヒビターは ATP 合成には関与していないことが明らかになったが、ATPase インヒビターの F₁F₀ への結合量が増加していることが明らかにされた。このことから ATP 合成中の F₁F₀ には ATP 合成に参加している活動型と、ATP 合成を行っていない休止型の 2 種類が混在しており、ATPase インヒビターは選択的に休止型 F₁F₀ に結合していることを明らかにした。この考えによれば、化学浸透圧説の変更なしに、さまざまな矛盾を説明できる。呼吸が半減して ATP 合成が半減するケースで膜ポテンシャルが変化しないことから Mitchell の化学浸透圧説が誤っているという Sorgato らの主張は、呼吸の半減に伴い ATP 合成に参加する F₁F₀ が半減することで説明できる。酸化的リン酸化におけるプロトン局在化説等の奇妙な構造は考える必要はない。

呼吸が増加すれば膜ポテンシャルが上昇する傾向になるが、この傾向はそれまで休止していた F₁F₀ が ATP 合成に参加することにより解消される。呼吸が減少すると膜ポテンシャルが低下する傾向になるが、この傾向はそれまで活動していた F₁F₀ が ATP 合成を停止させることにより解消される。このため、ミトコンドリアは呼吸量に関係なく一定の膜ポテンシャル (160~170 mV) を維持することが説明できる。さらに、F₁F₀ は可逆的な酵素であり、ATP を分解することにより膜ポテンシャルを形成することも可能であるが、この回復値も 160~170 mV であった。このことは、ATP 合成/分解の膜ポテンシャルには閾値が存在することを示し、ミトコンドリア F₁F₀ は閾値付近の膜ポテンシャルで ATP 合成を行っていることも明らかになった。

しかし ATPase インヒビターの存在により、膜ポテンシャルが何らかの原因

で閾値以下になった場合、F₁F_oを阻害し、ATPの分解が起こらず、膜ポテンシャルが回復しない。すなわち、膜ポテンシャルの形成を犠牲にしてもATP量を保持するように働く。このことは、ミトコンドリアレベルではなく、細胞レベルにおいて、生存率の向上、さらに呼吸欠損変異発生を抑えるという生理的役割を持つ重要な因子であることを意味している。

以上のように、本研究は酸化的リン酸化システムにおけるF₁F_oATPaseの制御機構に重要な新知見を与えるものと考えられ、その制御機構の解明に寄与するところが大きく、酵素化学上興味ある結果である。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、指導教官である室蘭工業大学創成機能科学専攻教授 橋本忠雄博士には研究の方向性や関連する研究について忍耐強く御助言、御示唆をいただき、心より敬意と感謝の意を捧げます。

当博士論文の主査である室蘭工業大学物質工学専攻教授 小幡英二博士、副査である同大創成機能科学専攻教授 岡本洋博士、同大応用化学専攻助教授 長谷川靖博士にも、本論文を纏めるにあたって懇切に御指導戴き、また研究に対する有益なご助言をいただくだけでなく、これからの人生における多大な御鞭撻を戴き、深謝申し上げます。

室蘭工業大学応用化学専攻 安居光國講師には日頃の実験においてお世話になったことはもちろん、多くの場面で支えて戴き、また大阪市立大学生活科学部 市川直樹講師には、本実験で用いた酵母菌を譲渡していただいた他に、論文作成や学会発表において御協力を戴き、深く感謝いたします。

室蘭工業大学応用化学科微生物工学研究室において、本実験の遂行に協力してくれた陸益民、宮澤賢一郎、山口恒、野脇賢一の各氏をはじめ、研究室の方々には、研究の他にも精神的に叱咤激励していただきました。この支えがなければこの研究がこうして形になるのがさらに困難になっていたかもしれません。深く感謝の意を表します。

最後に、博士課程入学という私個人の我儘を受け入れ、大学生活9年間いつも精神的金銭的に支えてくれた両親にこの場を借りて感謝いたします。

参考文献

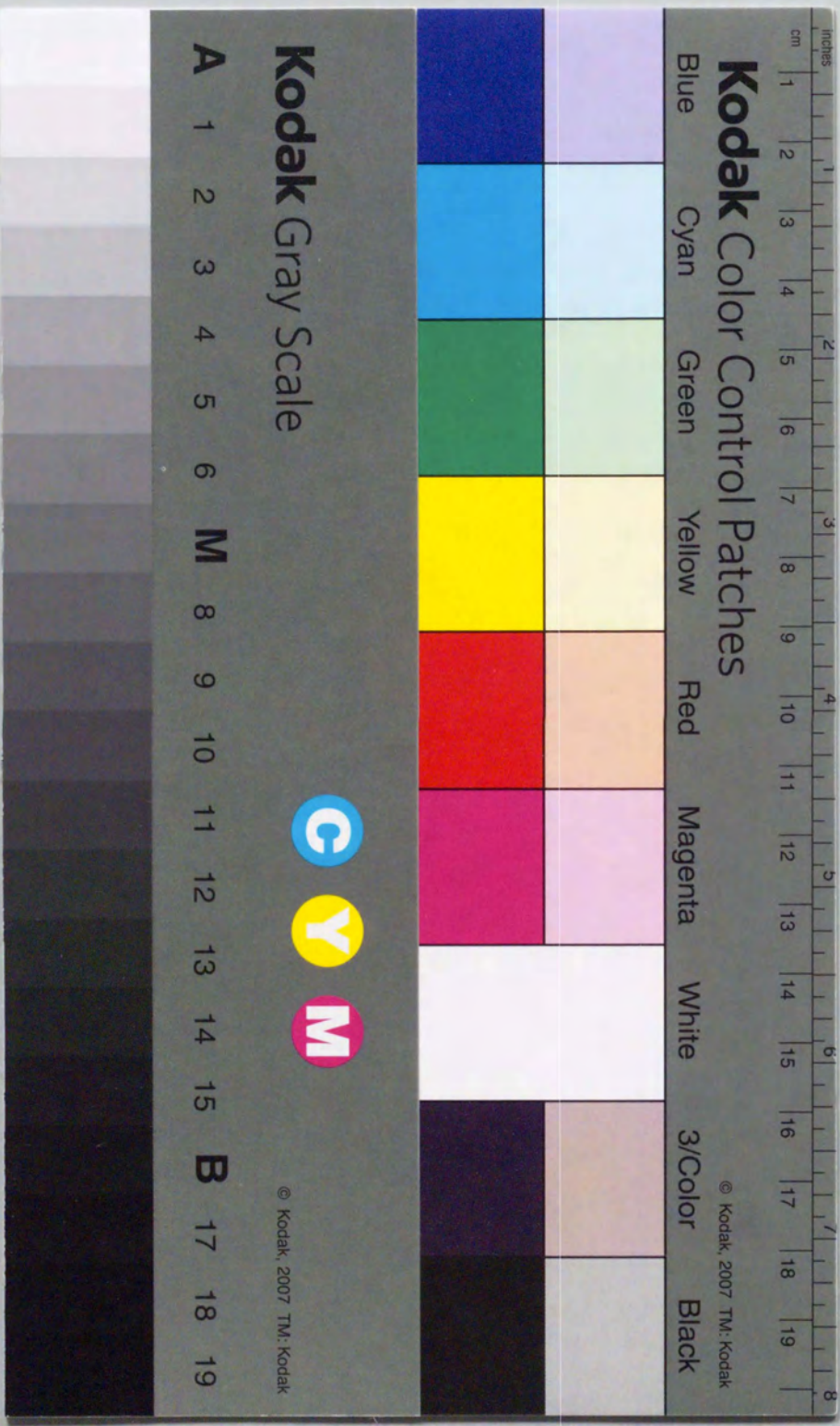
- (1) Mitchell, P. (1961) *Nature* **191**, 144-148
- (2) Jagendorf, A.T. and Uribe, E. (1966) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **55**, 170
- (3) Kagawa, Y. and Racker, E. (1971) *J. Biol. Chem.* **246**, 5477
- (4) De Vries, S. and Marres, C.A.M. (1987) *Biochim. Biophys. Acta* **895**, 205-239
- (5) Kanner, B.I., Serrano, R., Kandrach, M.A., and Racker, E. (1976) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **69**, 1650-1656
- (6) MacLennan, D.H. and Tzagoloff, A. (1968) *Biochemistry* **7**, 1603-1607
- (7) Collinson, I.R., Runswick, M.J., Buchanan, S.K., Fearnley, I.M., Skehel, J.M., Van Raaij, M.J., Griffiths, D.E., and Walker, J.E. (1994) *Biochemistry* **33**, 7971-7978
- (8) Arselin, G., Vaillier, J., Graves, P.V., and Velours, J. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 20284-20290
- (9) Arnold, I., Pfeiffer, K., Neupert, W., Stuart, R.A., and Shägger, H. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 36-40
- (10) Noji, H., Yashuda, R., Yoshida, M., and Kinoshita, K., Jr. (1997) *Nature* **386**, 299-302
- (11) Wilkens, S. and Capaldi, R.A. (1998) *Biochim. Biophys. Acta* **1365**, 93-97
- (12) Böttcher, B., Schwarz, L., and Gräber, P.J. (1998) *J. Mol. Biol.* **281**, 757-762
- (13) Sabbert, D., Engelbrecht, S., and Junge, W. (1996) *Nature* **381**, 623-625
- (14) Bulygin, V.V., Duncan, T.M., and Cross, R.L. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 31765-31769
- (15) Arnold, I., Pfeiffer, K., Neupert, W., Stuart, R.A., and Shägger, H. (1998) *EMBO J.* **17**, 7170-7178
- (16) Tokatlidis, K., Junne, T., Moes, S., Schatz, G., Glick, B.S., and Kronidou, N. (1996) *Nature* **384**, 585-588
- (17) Arnold, I., Bauer, M.F., Brunner, M., Neupert, W., and Stuart, R.A. (1997) *FEBS Lett.* **411**, 195-200
- (18) Prescott, M., Boyle, G., Lourbakous, A., Nagely, P., and Devenish, R.J. (1997) *Yeast* **134**, s137
- (19) Pullman, M.E. and Monroy, G.C. (1963) *J. Biol. Chem.* **238**, 3762-3769
- (20) Horstman, L.L. and Racker, E. (1970) *J. Biol. Chem.* **245**, 1336-1344
- (21) Asami, K., Juntti, R., and Ernster, L. (1970) *Biochim. Biophys. Acta* **205**, 307-311

- (22) Cintron, N.M. and Pedersen, P.L. (1979) *J. Biol. Chem.* **254**, 3439-3443
- (23) Yamada, E.W., Shiffman, F.H., and Huzel, N.J. (1980) *J. Biol. Chem.* **255**, 267-273
- (24) Satre, M., de Jerphanion, M.B., Huet, J., and Vignais, P.V. (1975) *Biochim. Biophys. Acta* **387**, 241-255
- (25) Ebner, E. and Maier, K.L. (1970) *J. Biol. Chem.* **252**, 671-676
- (26) Hashimoto, T., Negawa, Y., and Tagawa, K. (1981) *J. Biochem.* **90**, 1151-1157
- (27) Matsubara, H., Hase, T., Hashimoto, T., and Tagawa, K. (1981) *J. Biochem.* **90**, 1159-1165
- (28) Dianoux, A.C. and Hoppe, J. (1987) *Eur. J. Biochem.* **163**, 155-160
- (29) Frangione, B., Rosenwasser, E., Penefsky, H.S., and Pullman, M.E. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**, 7403-7407
- (30) Lebowitz, M.S. and Pedersen, P.L. (1993) *Arch. Biochem. Biophys.* **301**, 64-70
- (31) Gómez-Fernandez, J.C. and Harris, D.A. (1978) *Biochem. J.* **176**, 967-975
- (32) Van de Stadt, R.J., de Boer, B.L., and Van Dam, K. (1973) *Biochim. Biophys. Acta* **292**, 338-349
- (33) Schwerzman, K. and Pedersen, P.L. (1981) *Biochemistry* **20**, 6305-6311
- (34) Lippe, G., Sorgato, M.C., and Harris, D.A. (1988) *Biochim. Biophys. Acta* **933**, 1-11
- (35) Schwerzman, K. and Pedersen, P.L. (1986) *Arch. Biochem. Biophys.* **250**, 1-18
- (36) Hashimoto, T., Yoshida, Y., and Tagawa, K. (1983) *J. Biochem.* **94**, 715-720
- (37) Hashimoto, T., Yoshida, Y., and Tagawa, K. (1984) *J. Biochem.* **95**, 131-136
- (38) Okada, Y., Hashimoto, T., Yoshida, Y., and Tagawa, K. (1986) *J. Biochem.* **99**, 251-256
- (39) Matsubara, H., Inoue, K., Hashimoto, T., Yoshida, Y., and Tagawa, K. (1983) *J. Biochem.* **94**, 315-318
- (40) Yoshida, Y., Wakabayashi, S., Matsubara, H., Hashimoto, T., and Tagawa, K. (1984) *FEBS Lett.* **170**, 135-138
- (41) Tagawa, K., Hashimoto, T., and Yoshida, Y. (1986) *In Methods in Enzymology* (Fleisher, S. and Fleisher, B. eds.) vol. 126, pp. 504-512, Academic Press, New York
- (42) Hashimoto, T., Yoshida, Y., and Tagawa, K. (1987) *J. Biochem.* **102**, 685-692
- (43) Hashimoto, T., Yoshida, Y., and Tagawa, K. (1990) *J. Biochem.* **108**, 17-20

- (44) Sorgato, M.C., Branca, D., and Ferguson, S.J. (1980) *Biochem. J.* **188**, 945-948
- (45) Williams, R.J.P. (1961) *J. Theor. Biol.* **1**, 1-13
- (46) Paden, E. and Rottenberg, H. (1973) *Eur. J. Biochem.* **40**, 431-437
- (47) Rouslin, W. and Pullman, M.E. (1987) *J. Mol. Cell Cardiol.* **19**, 661-668
- (48) Sanchez-Bustamante, V.J., Darzon, A., and Gomez-Puyou, A. (1982) *Eur. J. Biochem.* **126**, 611-616
- (49) Ichikawa, N., Yoshida, Y., Hashimoto, T., Ogasawara, N., Yoshikawa, H., Imamoto, F., and Tagawa, K. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 6274-6278
- (50) Yoshida, Y., Sato, T., Hashimoto, T., Ichikawa, N., Nakai, S., Yoshikawa, H., Imamoto, F., and Tagawa, K. (1990) *Eur. J. Biochem.* **192**, 49-53
- (51) Daum, G., Böhn, P.C., and Schatz, G. (1982) *J. Biol. Chem.* **257**, 13028-13033
- (52) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J. (1951) *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275
- (53) Iwatsuki, H., Lu, Y-M., Yamaguchi, K., Ichikawa, N., and Hashimoto, T. (2000) *J. Biochem.* **128**, 553-558
- (54) Dupont, C.H., Mazat, J.P., and Guelin, B. (1985) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **132**, 1116-1123
- (55) Fujii, S., Hashimoto, T., Yoshida, Y., Miura, R., Yamano, T., and Tagawa, K. (1983) *J. Biochem.* **93**, 189-196
- (56) Klein, G., Satre, M., Dianoux, A.C., and Vignais, P.V. (1980) *Biochemistry* **19**, 2919-2928
- (57) Harris, D.A., Husain, I., Jackson, P.J., Lunsdorf, H., Schafer, G., and Tiedge, H. (1986) *Eur. J. Biochem.* **157**, 181-186
- (58) Mimura, H., Hashimoto, T., Yoshida, Y., Ichikawa, N., and Tagawa, K. (1993) *J. Biochem.* **113**, 350-354
- (59) Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, B. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 4350-4354
- (60) Matsuno-Yagi, A. and Hatefi, Y. (1986) *J. Biol. Chem.* **261**, 14031-14038
- (61) Yanagishima, N., Simoda, C., Kamisaka, S., and Takahashi, T. (1968) *Plant. Cell Physiol.* **9**, 323-331
- (62) Gbelská, Y., Šubík, J., Svoboda, A., Goffeau, A., and Kováč, L. (1983) *Eur. J. Biochem.* **130**, 281-286
- (63) Paul, M.F., Velours, J., Arselin de Chateaubodeau, G., Aigle, M., and Guerin, B. (1989) *Eur. J. Biochem.* **185**, 163-171

- (64) Giraud, M.F. and Velours, J. (1997) *Eur. J. Biochem.* **245**, 813-818
- (65) Rouslin, W., Frank, G.D., and Broge, C.W. (1995) *J. Bioenerg. Biomembr.* **27**, 117-125
- (66) Rouslin, W. (1988) *J. Mol. Cell Cardiol.* **20**, 999-1007





Kodak Color Control Patches

Blue Cyan Green Yellow Red Magenta White 3/Color Black

Kodak Gray Scale

A 1 2 3 4 5 6 **M** 8 9 10 11 12 13 14 15 **B** 17 18 19



© Kodak, 2007 TM: Kodak