

学 位 論 文 題 名

Low temperature-induced inactivation
of vacuolar H^+ -ATPase
with reference to chilling injury in plants.

(植物の低温傷害に関わる液胞膜 H^+ -ATPaseの低温失活)

学位論文内容の要旨

熱帯や亜熱帯に由来する植物は低温に敏感で、 $0-12^{\circ}\text{C}$ の低温にさらされると様々な生理的傷害を受けやがて枯死する。この現象は低温傷害(chilling injury)と呼ばれ、古くから研究が行われてきた。細胞の低温に対する初発的応答として、生体膜脂質の相転移(Lyons & Raison, 1970)が有力視され、葉緑体やミトコンドリアの機能と膜脂質の役割を中心に活発な研究が展開されてきたが、低温傷害のすべての現象を説明するには至っていない。低温傷害の機構を明らかにするため、東南アジア原産のヤエナリ(*Vigna radiata* L.)の黄化実生を実験材料として、低温傷害の過程を現象論的に詳しく調べるとともに、細胞の低温に対する生化学的な初期応答について詳しい解析を行った。

26°C 暗黒で育てたヤエナリ黄化実生を 0°C で処理したときの低温傷害は、可逆的な初期過程(0°C 24時間以内)と不可逆的な過程(0°C 48時間以降)の二つの段階で起こる。低温傷害の初期過程で細胞内に引き起こされる生化学的な変化とその細胞内局在性を明らかにするため、生体膜の主な指標酵素の活性変動を中心に解析を行った。 0°C に冷やされた黄化実生の下胚軸から経時的に各種生体膜を遠心分離法により調製し、指標酵素の活性を測定したところ、細胞膜 H^+ -ATPase, ER小胞NADH Cyt c reductase, ミトコンドリアのCyt c oxidaseの活性は傷害の初期過程(0°C 24時間以内)では変化がみられないが、不可逆的な傷害過程(0°C 48時間以降)ではじめて低下することが解った。一方、液胞膜 H^+ -ATPaseは可逆的な初期過程において、その基質分解活性および

H⁺輸送活性が低下することが解った。また、低温処理した下胚軸から経時的に粗膜画分を調製して、ショ糖連続密度勾配遠心にて各生体膜の結合酵素活性および密度の変化を調べたところ、24時間以降、ゴルジ体膜のUDPase活性の分布が変化し、48時間以降ではより高密度側に移行することが解り、低温傷害初期過程でゴルジ体機能も低下することが示唆された。ヤエナリ下胚軸では、組織呼吸活性、タンパク質・脂質合成活性、エチレン形成活性などが低温処理24時間以内に可逆的に低下するが、今回得られた結果と合わせて考察すると、低温傷害の初期過程におけるこれらの生理活性の低下は低温による細胞質環境の変化が原因と推測される。液胞膜H⁺-ATPaseはATPの加水分解によって得られるエネルギーを利用してH⁺を細胞質から液胞内へ輸送し、これにより形成されるpH勾配は各種イオンや二次代謝産物の能動輸送に利用される。したがって、この酵素は物質の細胞内区画と、細胞内環境の恒常性維持に重要な役割を持っている。本研究で得られた、低温傷害初期過程での液胞膜H⁺-ATPaseの失活は、細胞質中のpH、Ca²⁺濃度などのイオン環境の変化を引き起こすことが推察され、低温に対する細胞の初期応答において重要な役割を持つことが示唆された。

液胞膜H⁺-ATPaseの失活の機構を明らかにするために、本酵素の精製を試みその特性を調べた。本酵素の精製では、高純度に調製した液胞膜画分を用い、まずトリトンX-100処理で膜にゆるく結合したATPase以外のタンパク質を除去後、リゾレチンで可溶化し、陰イオン交換体(QAE-トヨパール)カラムクロマトグラフィーにて精製する方法が有効であることが解った。精製酵素のサブユニット構成を、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS/PAGE)法で解析したところ、これまで報告されてきた3種に、新たに加えて6種、合計9種(68, 57, 44, 38, 37, 32, 16, 13, 12 kDa)から構成されていることが解った。68kDa, 57kDaサブユニットのN末端アミノ酸配列の解析、及び特異抗体による活性阻害の結果から、68kDaサブユニットは活性触媒サブユニットであり、57kDaサブユニットは活性調節サブユニットであることが示唆された。また、32kDaサブユニットの特異抗体は、68kDaサブユニットの特異抗体と同程度に加水分解活性、H⁺輸送活性を阻害したことから、32kDaサブユニットがH⁺輸送機能に重要な役割を持つことが示唆された。68kDa, 57kDaの特異抗体は、ラット肝臓及び腎臓のライソソームの膜タンパク質と交叉反応し、アミノ酸配列の相同性、酵素学的性質の類似性からも、本酵素が真核生物に共通のV-タイプATPaseであることが明らかになっ

た。さらに本酵素の液胞膜上での立体構築についてカオトロピックアニオン処理で調べたところ、9種のサブユニットのうち、膜疎水性領域に結合しているDCCD結合性の16kDaサブユニットを除く8種のサブユニットは膜表在性領域にあることが示唆された。これらの知見をもとに、低温傷害初期過程における液胞膜 H^+ -ATPaseの活性低下の機構を酵素分子レベルで解析した。低温処理した下胚軸から経時的に液胞膜画分を高純度に調製して、液胞膜ATPaseの量を構成サブユニットの特異抗体を用いて調べたところ、液胞膜から本酵素の膜表在性サブユニットが他のタンパク質に先行して選択的に消失することが解った。さらに、精製酵素についての解析から、低温処理による、32kDaサブユニットの減少と33kDaポリペプチドの出現が明らかとなった。これらの結果から、低温傷害初期過程での本酵素の膜表在性サブユニットの選択的遊離と、32kDaサブユニットの特異的な解離をもたらす酵素分子の構造変化が、本酵素の機能低下を誘発するものと推察される。低温による本酵素の細胞質から液胞内への H^+ のくみ出し機能の喪失が、その後の不可逆的な細胞傷害を誘導する重要な要因であることが示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 吉 田 静 夫

副 査 教 授 石 川 鑛

副 査 助 教 授 前 島 正 義

学 位 論 文 題 名

LOW TEMPERATURE-INDUCED INACTIVATION OF VACUOLAR H^+ -ATPase
WITH REFERENCE TO CHILLING INJURY IN MUNG BEAN

(ヤエナリの低温傷害における液胞膜 H^+ -ATPaseの失活)

熱帯や亜熱帯に由来する植物は低温感受性が高く、 $0-12^{\circ}C$ の低温にさらされると生育が著しく阻害され致命的な傷害(低温傷害)を受けることも希でない。低温による生体膜脂質の液晶状態からゲル状態への相転移が低温傷害の初発的な要因と考えられているが、現象の全てを説明するには至っていない。申請者は低温傷害の機構を明らかにするため、亜熱帯原産のヤエナリ(*Vigna radiata* L.)の黄化実生を実験材料として傷害の初期過程を現象論的に詳しく調べると共に、低温に対する生化学的な細胞初期応答について解析を行った。

$26^{\circ}C$ 暗黒で育てたヤエナリ黄化実生を $0^{\circ}C$ で処理したときの低温傷害は、可逆的な初期過程($0^{\circ}C$ 24時間)と不可逆的な過程($0^{\circ}C$ 48時間以降)の二つの段階で起こる。低温傷害の初期過程で細胞内に引き起こされる生化学的な変化とその細胞内局在性を明らかにする為、生体膜の主な指標酵素の活性変動を中心に解析した。 $0^{\circ}C$ に冷やされた黄化実生の下胚軸から経時的に各種生体膜を遠心分離法により調製し、指標酵素の活性を測定すると、細胞膜 H^+ -ATPase, ER NADH cyt c reductase, ミトコンドリア Cyt c oxidaseの活性は傷害初期過程では変化しないが、不可逆的な傷害過程で始めて低下することが明らかにされた。一方、液胞膜 H^+ -ATPaseは可逆的な初期過程で基質分解活性およびプロトン輸送活性が共に低下することが明らかにされた。ヤエナリ下胚軸の呼吸活性、タンパク質合成活性、脂質合成活性、エチレン形成活性はいずれも傷害初期過程で可逆的に低下することを考えあわせると、液胞膜 H^+ -ATPaseの低温による失活が低温傷害の初期要因と推察される。本酵素はATPの加水分解で得られるエネルギーを利用してプロトンを液胞内部へ輸送し、形成されるpH勾配は各種イオンや代謝産物の二次輸送に利用される。従って、本酵素は物質の細胞内区画化と細胞内環境の恒常性維持に重要な役割を持っている。

液胞膜 H^+ -ATPaseの低温による失活の機構を明らかにする為、申請者は本酵素の精製を試み、その構造特性を調べた。高純度に調製された液胞膜画分をTriton X-100処理

でATPase以外のタンパク質を除去後、リゾレシチンで可溶化し、陰イオン交換体（QAE Toyopearl）カラムクロマトグラフィーで高度に精製された。精製酵素のサブユニット構成をSDSポリアクリルアミド電気泳動で解析すると、合計9種（68,57,44,38,37,32,16,13,12 kDa）から構成されていることが明になった。68kDa、57kDaサブユニットのN末端アミノ酸配列の解析と特異抗体による活性阻害から、前者は活性触媒サブユニットで後者は活性調節サブユニットであることが確定された。また、32kDaの特異抗体は、68kDa特異抗体と同程度に触媒活性ならびにプロトン輸送活性を阻害することから、このサブユニットはプロトン輸送の調節に重要な役割を持つ可能性が示唆された。本酵素の液胞膜上での立体構築についてChaotropic anionを用いて調べたところ、9種のサブユニットのうち、疎水性領域に結合しているDCCD結合性の16kDaサブユニットを除く8種のサブユニットは膜表在性領域に位置することが明かとなった。

これらの知見をもとに低温傷害初期過程における液胞膜 H^+ -ATPaseの活性低下の機構を酵素分子レベルで解析した。低温処理した下胚軸から経時的に液胞膜を分離し H^+ -ATPaseの量的変化を構成サブユニットの特異抗体を用いて調べると、膜表在性サブユニットが液胞膜から選択的に消失することが明らかにされた。さらに、精製酵素についての解析から、低温処理により32kDaサブユニットが減少することが明かとなった。これらの結果から、低温傷害初期過程における本酵素の失活は膜表在性サブユニットの遊離と32kDaサブユニットの特異的な解離が原因であることが明かとなった。

以上の結果は権威ある国際学術誌に発表され、低温傷害の機構に新しい知見をもたらしたものとして高い評価を得ている。7月21日に口頭発表で行われた最終試験の成績も勘案し、審査員一同は申請者が博士（理学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認めた。