

学位論文題名

Biochemical Study on the Vacuolar
 H^+ – translocating ATPase in Relation
to the Modulation of ATP – hydrolyzing
and Proton – pumping Activities by Lipids

(ATP 加水分解とプロトン輸送活性の脂質による調節に関する
液胞膜プロトン輸送性 ATPase の生化学的研究)

学位論文内容の要旨

液胞は成熟した植物細胞では細胞容積の80~90%を占める細胞内小器官の一つであり、代謝産物の貯蔵以外に、細胞質との活発な物質交換により細胞質の恒常性の維持に大きな役割を果たしている。近年、液胞膜を介しての選択的、能動的なイオン、代謝産物の輸送現象が明らかにされつつあり、その機構が注目されている。液胞膜には H^+ -ATPaseと H^+ -PPaseの二種類の H^+ 輸送ポンプの存在が知られており、これらのポンプはATPやPPiの高エネルギー化合物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と輸送する。この輸送系の働きで生じた液胞膜を介しての H^+ の濃度勾配はアミノ酸、イオン、糖などの二次輸送系の駆動力となる。

液胞膜 H^+ -ATPaseのサブユニット構造については酵母の遺伝子欠損株を用いた研究により、多くの知見が得られているが、この酵素タンパク質が機能する場である生体膜中における脂質成分と酵素タンパク質の相互作用についてはほとんど研究されていなかった。本研究は、液胞膜 H^+ -ATPaseを脱脂・精製し、脂質成分が液胞膜 H^+ -ATPaseの機能に与える作用について解析及び考察したものである。

H^+ -ATPaseはヤエナリ (*Vigna radiata* L.) の黄化胚軸より単離した液胞膜小胞を界面活性剤で処理した後、リゾレシチンで可溶化し、イオン交換カラムによって精製した。精製酵素画分について脂質成分を分析した結果、リン脂質は検出されず、精製酵素はATP加水分解活性を失っていたが、大豆より抽出したリン脂質混合物であるアゾレク

チンを添加することにより再活性化された。再活性化された精製酵素のpH依存性、基質及び阻害剤に対する特異性、アニオン感受性などの酵素学的性質、ならびにSDS-ポリアクリルアミド電気泳動法によって調べたサブユニット構成は、酵母や動・植物でこれまでに報告されていた液胞型H⁺-ATPaseのものとはほぼ一致していた。以上の事実から、本方法で精製した酵素は脂質成分による液胞膜H⁺-ATPaseの活性化機構研究の目的に使用可能な程度にまで脱脂・精製された標品であると判断された。

ATPの類似化合物、7-chloro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole(NBD-Cl)の化学修飾によるATP加水分解活性の阻害様式を反応速度論的に調べた。阻害はNBD-Clの濃度と時間に依存して擬一次的に進行し、一分子のATPaseの阻害には一分子のNBD-Clの結合が関与していることが示された。また、¹⁴C]NBD-Clの取り込みから、68-kDaサブユニットに基質結合部位が存在することが確認された。NBD修飾酵素は418nmに吸収極大をもち、この吸収は還元剤であるジチオスレイトールの添加で消失し、同時にATP加水分解活性も回復する。また修飾酵素は515nmの蛍光を発することから、NBD-Clは基質結合部位の近傍に存在するシステイン残基を修飾するという結論を得た。この結論は様々な生物の液胞型H⁺-ATPaseの68-kDaサブユニットのcDNAシーケンスから推定される基質結合部位近傍のアミノ酸配列とも整合するものであった。さらにこの結論は、酵母の液胞膜H⁺-ATPaseについての以前の報告ではNBD-Clがチロシン残基を修飾し、活性を阻害するとされていたものを変更するものであった。

精製酵素の脂質要求性を詳しく検討するため、様々な脂質及び脂質構成成分を加えて、ATP加水分解活性への影響を調べた。脂肪酸類、中性脂肪類、ステロール類、糖脂質類は精製酵素を活性化せず、リン脂質のみが再活性化した。リン脂質のうち最も活性化程度の強かったのはホスファチジルコリン(PC)であった。そこでPC分子種の酵素活性への影響を調べた。相転移温度が高く、活性測定温度ではゲル状態にあると考えられるジステアロイルPC等、二本のアシル鎖がいずれも長鎖飽和脂肪酸のPC分子種は酵素を活性化せず、二本のアシル鎖がいずれも短鎖飽和脂肪酸であり相転移温度が活性測定温度より低く、液晶状態にあると考えられるジミリストイルPCは酵素を活性化した。相転移温度がさらに低い飽和脂肪酸と不飽和脂肪酸のアシル鎖構成をもつパルミトオレイルPC等は高い活性化を起こした。

添加したリン脂質の相状態が酵素の活性化に関係していることを立証するため、相転移温度を異にするリン脂質を添加し、活性測定温度を変化させて測定を行ったとこ

ろ、添加した脂質の相転移温度より高い温度で活性化が起こることが確認され、液胞膜 H⁺-ATPase の活性化には液晶状態にあるリン脂質が必須であるという結論を得た。

次に、H⁺輸送活性に対する脂質成分の影響を調べるため、精製酵素を様々な脂質構成からなるリポソームに取り込ませ、プロテオリポソームを人工的に再構成することにより H⁺輸送能の測定を行った。人工プロテオリポソームは精製酵素と脂質を混合し、界面活性剤を加えてミセル化した後、界面活性剤除去カラムを通して界面活性剤を除くことにより再構成した。

脂質成分としてアソレクチンを用いた場合、速やかな H⁺輸送が観察されたが、脂質二重層の内外に一端形成された H⁺濃度勾配は自発的に消失した。アソレクチンにコレステロールを様々な割合で混合して再構成したプロテオリポソームではコレステロールの重量混合比を増加させるに従い H⁺濃度勾配は減少し、10%で最低となるが、10%以上ではコレステロールの割合を増加させるに従い H⁺濃度勾配が大きくなった。アソレクチン単独でプロテオリポソームを再構成した場合に観察された自発的な H⁺濃度勾配の消失は、コレステロールを30%以上の割合にすると起こらず、H⁺濃度勾配は安定的に維持された。コレステロールはリン脂質二重層中で10%以下の濃度では混合しない固相を形成し、10%以上では共晶状態をとりイオン透過性を減少させることが知られており、膜の物性が H⁺輸送能におおきな影響を与えていると考察された。

糖脂質の一種であるセレブロシドは20%以下では液晶状態を保ち、20%以上の濃度ではリン脂質二重層中にクラスターを形成することが知られている。アソレクチンに20%以上のセレブロシドを混合した場合、形成される H⁺濃度勾配はアソレクチン単独でプロテオリポソームを再構成した場合の約 1/10 に減少した。以上の結果から H⁺輸送能の発現にも酵素を取り囲む脂質層が液晶状態にあることが必要であると考察された。

以上のように液胞膜 H⁺-ATPase の機能の発現には酵素タンパク質を取り囲む脂質成分の物理化学的性質が大きな影響をおよぼしていることが明らかとなった。生体膜は温度等の外部刺激に敏感に反応することが知られており、生体膜中の脂質とタンパク質の相互作用による調節機能は環境変動への植物の応答反応を理解する上でますます重要になってくると考えられる。人工プロテオリポソーム再構成の手法は生体膜機能の解析による植物の環境適応機構の研究に新しい展開をもたらすものと思われる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 吉 川 正 明
副 査 教 授 吉 田 静 夫
副 査 教 授 落 合 廣
副 査 助 教 授 福 永 典 之

学 位 論 文 題 名

Biochemical Study on the Vacuolar H^+ – translocating ATPase in Relation to the Modulation of ATP – hydrolyzing and Proton – pumping Activities by Lipids

(ATP 加水分解とプロトン輸送活性の脂質による調節に関する
液胞膜プロトン輸送性 ATPase の生化学的研究)

植物細胞の液胞は液胞膜を介して細胞質と活発な物質交換を行い、細胞質の恒常性の維持に重要な役割を果たしている。液胞膜 H^+ -ATPaseはATPの加水分解エネルギーを用いて液胞内に H^+ を輸送する。生じた H^+ 濃度勾配はアミノ酸、イオン、糖等の二次輸送系の駆動力となると考えられている。

申請者は液胞膜 H^+ -ATPaseの機能発現機構を解析する目的で、本酵素を脱脂・精製して内在性脂質の影響を除いた後、外部から与えた脂質が本酵素の機能に与える影響を調べた。得られた主要な成果は次の通りである。

- ① ヤエナリ (*Vigna radiata* L.) の液胞膜より精製した酵素画分について脂質成分を分析した結果、リン脂質は検出されず、精製酵素はATP加水分解活性を失っていたが、外部からリン脂質を添加することによって再活性化することができた。
- ② 外部からリン脂質を添加することによって再活性化した精製酵素の酵素学的諸性質並びにサブユニット構成はこれまでに報告されていた液胞型 H^+ -ATPaseとほぼ一致しており、酵素タンパク質そのものには変化がないことが確認された。

- ③ 基質類似化合物であるNBD-Clによる化学修飾の反応速度論及び修飾酵素の分光学的性質から基質結合部位は68-kDaサブユニットに存在し、NBD-Clは基質結合部位近傍のシステイン残基を修飾し、活性を阻害することを明らかにした。この結論は、酵母の液胞膜H⁺-ATPaseについての以前の報告ではNBD-Clがチロシン残基を修飾し、活性を阻害するとされていたものを変更するものであった。
- ④ 精製酵素のATP加水分解活性に対するリン脂質分子種添加の影響を調べた結果、活性測定温度で液晶状態にあるような分子種を添加した場合にのみ再活性化が起こることを明らかにした。
- ⑤ 相転移温度の異なるリン脂質分子種を添加し、活性測定温度を変えることによってリン脂質の相状態を変化させると、相転移温度以上の温度で再活性化が起こった。すなわち、添加したリン脂質がゲル状態から液晶状態へ相転移することにより再活性化が起こることを示した。
- ⑥ リン脂質に様々な割合のコレステロールまたはセレブロシドを加えることによって脂質組成を変化させたリポソームに精製酵素を取り込ませ、H⁺輸送能をもつ人工プロテオリポソームを作成した。
- ⑦ リン脂質に加えるコレステロールの割合を増加させるに従いプロテオリポソーム膜の内外に形成されるH⁺濃度勾配は減少し、10% (w/w) で最低となった。10%以上では濃度を上げるに従いH⁺濃度勾配は大きくなった。形成されるH⁺濃度勾配を最低にするようなコレステロールの濃度はリン脂質二重層中でコレステロールが混合しない固相から共晶状態へ移行すると考えられている濃度と一致していた。
- ⑧ 脂質成分としてリン脂質のみのプロテオリポソームを再構成した場合、一旦形成されたH⁺濃度勾配は自発的に消失するが、30%以上のコレステロールを加えるとH⁺濃度勾配は安定的に維持され、膜を安定化することを示した。
- ⑨ リン脂質に加えるセレブロシドの割合を変化させると、20% (w/w) 以上ではH⁺濃度勾配はほとんど形成されなかった。この濃度は液晶状態を保っていたセレブロシドがリン脂質二重層の中にクラスターを形成すると考えられている濃度と一致していた。すなわち、液胞膜H⁺-ATPaseの機能発現には酵素タンパク質を取り囲む脂質層がクラスターを形成しない液晶状態にあることが必要であることが強く示唆された。
- 本研究は、外部から与えた脂質によって液胞膜H⁺-ATPaseの機能を制御し得ることを

示したものであり、人工プロテオリポソーム再構成手法はH⁺輸送機能に及ぼす脂質の影響解明のみにとどまらず、生体膜の多様で複雑な機能を個々の要素に分けて生化学的に解明するうえで新しい展望を開いたものといえる。権威ある国際誌に英文で公表された論文を含め12編の参考論文があり、最終試験の結果も満足するべきものであった。審査員一同は申請者が博士（理学）の学位を受ける資格を有すると認めた。