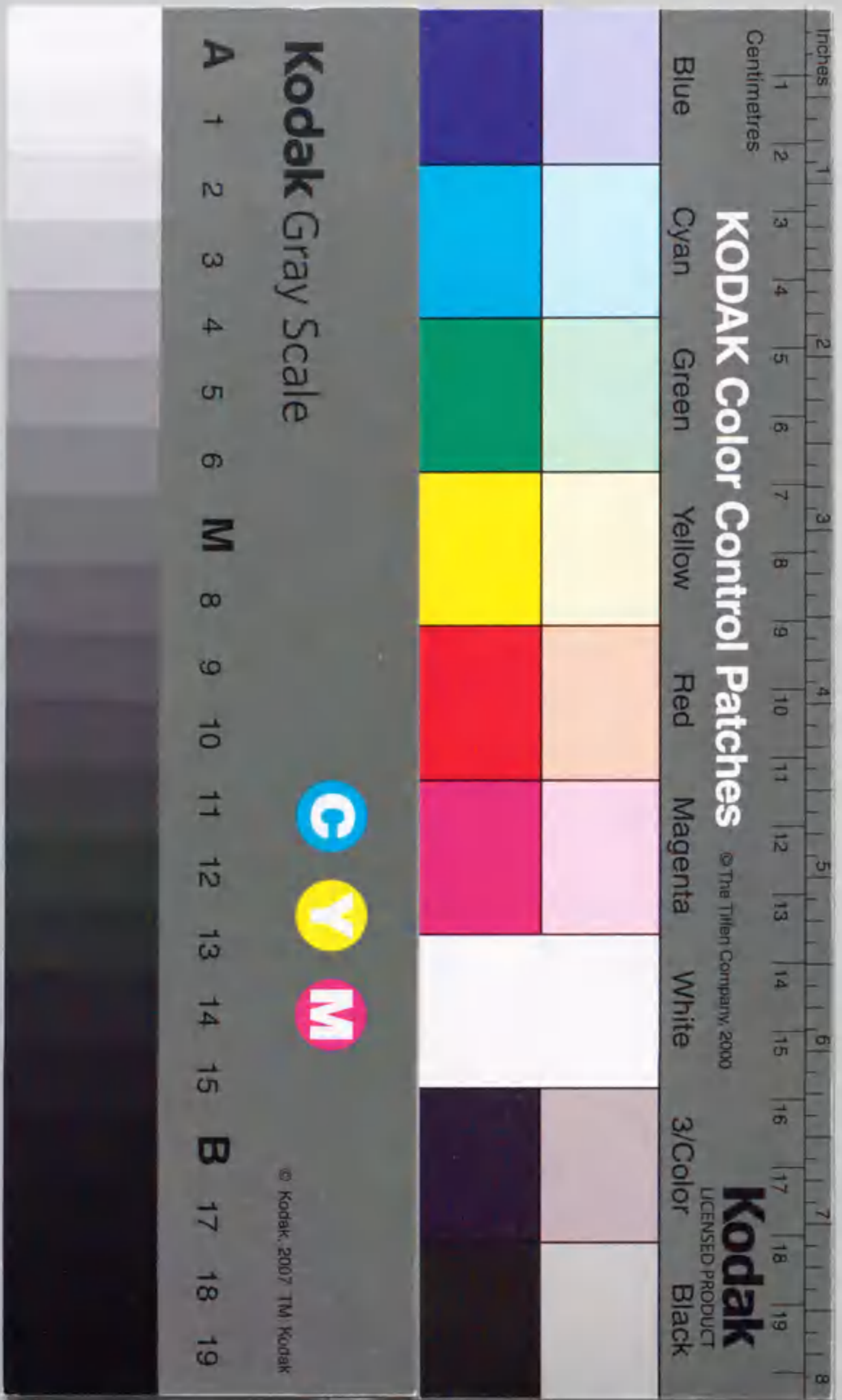


高等植物の膜結合ATPaseの構造に関する研究

木村哲哉



報告書 乙 4152号

①

# 高等植物の膜結合ATPaseの構造に関する研究

木村哲哉

#### Abbreviations

ATP	:	adenosine 5'triphosphate
BSA	:	bovine serum albumin
CDNA	:	complementary deoxyribonucleic acid
dATP	:	deoxyadenosine 5'triphosphate
dCTP	:	deoxycytidine 5'triphosphate
dGTP	:	deoxyguanosine 5'triphosphate
DTT	:	dithiothreitol
dTTP	:	deoxythymidine 5'triphosphate
EDTA	:	ethylenediaminetetraacetic acid
RNA	:	ribonucleic acid
SDS	:	sodium dodecylsulfate
Tris	:	tris(hydroxymethyl)aminomethane
DCCD	:	decylchlorocarbodiimide
DES	:	diethylstilbestrol
DOC	:	deoxycholic acid
MES	:	2-(N-morpholino) ethane sulfonic acid, monohydrate
NADPH	:	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
TCA	:	trichloroacetic acid
TDAB	:	tetradecyltrimethyl ammonium bromide
UDPG	:	uridine diphosphoglucose
CaMV	:	cauliflower mosaic virus
CAT	:	chloramphenicol acetyltransferase
2,4-D	:	2,4-dichlorophenoxyacetic acid
NPTII	:	neomycin phosphotransferase II
PCR	:	polymerase chain reaction
X-gluc	:	5-bromo-4-chloro-3-indolylglucuronide

【目次】

	ページ
第1章 序論	1
図表	8
第2章 高等植物の原形質膜ATPaseに関する研究	
1. はじめに	12
2. 実験方法及び材料	15
3. 結果	22
4. 考察	31
図表	37
第3章 高等植物F <sub>1</sub> ATPaseに関する研究	
1. 高等植物のF <sub>1</sub> ATPaseにサブユニット構成について	
1-1 はじめに	61
1-2 実験方法及び材料	65
1-3 結果	67
1-4 考察	70

2. サツマイモF<sub>1</sub>ATPase $\delta$ のcDNA単離と一次構造について

2-1	はじめに	73
2-2	実験方法及び材料	75
2-3	結果と考察	81

3. 形質転換植物を用いた $\delta$ サブユニット前駆体のミトコンドリア輸送シグナルの解析

3-1	はじめに	87
3-2	実験方法及び材料	92
3-3	結果	97
3-4	考察	104

4. まとめ	108
図表	111

第4章. まとめ	161
----------	-----

文献	166
----	-----

謝辞	173
----	-----

## 第 1 章

### 序 論

細胞はATPを合成したり、分解したりすることにより、生命活動に必要なエネルギーを蓄積あるいは利用している。ATPaseは、このようなエネルギー変換系においてきわめて重要な役割を果たしている酵素群である。ATPaseとは、一般にATPの $\gamma$ 位のリン酸を $Mg^{2+}$ または $Ca^{2+}$ 存在下にADPと無機リン酸に加水分解する酵素のことである。これらATPaseは現在その構造より3つのグループに分類されている<sup>(1)</sup> (図1-1, 1-2)。ひとつめはP型ATPaseとよばれ、代表的なものに腎臓などの $Na^{+}/K^{+}$ -ATPase、原形質膜・筋小胞体膜 $Ca^{2+}$ -ATPase、胃上皮細胞原形質膜 $H^{+}/K^{+}$ -ATPase、酵母・アカパンカビ・植物・大腸菌原形質膜 $H^{+}$ -ATPaseなどがある。これら酵素は分子量100K前後の単量体よりなる膜内在性のタンパク質であるが、ATPを加水分解する際に活性中心のアスパラギン酸残基にATPの $\gamma$ 位のリン酸が一時的に共有結合することが特徴である。生理的役割はそれぞれ異なるが、細胞の内外の濃度勾配に逆らった物質の輸送に中心的役割を担っている。ふたつめはF型ATPaseとよばれるもので、ミトコンドリア内膜、葉緑体のチラコイド膜、原核生物の原形質膜に存在している。通常、膜内外に形成されたプロトンの濃度勾配を利用してADPと無機リン酸からATPを合成する働きを持つ酵素で複雑なサブユニット構造を持つことが知られている。この酵素は膜表在性で、ATPase活性を持つ $F_1$ 部分と膜内在性でプロトンチャンネル活性を有する $F_0$ 部分に分けられる。三つめは最近になりその構造や性質が分かってきたタイプで、V型ATPaseと呼ばれている。これは真核細胞の内膜系に存在する

H<sup>+</sup>-ATPaseで、最初に精製されたのが酵母の液胞 (Vacuole) からであるためこうよばれている。このような分類が提唱された時点ではV型ATPaseの一次構造は全くわかっておらず、特有な阻害剤に対する感受性と液胞膜に存在することから第三番目のATPaseとして分類された<sup>(2)</sup>。しかし、最近になり細胞内膜系に存在するATPaseがこのタイプに属することが示され<sup>(1)</sup>、さらに古細菌の原形質膜に存在するATPaseがこのタイプに属する可能性がしめされている<sup>(2)</sup>。これらATPaseの構造を中心に以下にまとめる。

#### 【P型ATPase】

細胞は細胞膜を隔てて外部と仕切られているが、細胞内の恒常性を維持するために外部環境との間で物質の濃度差を維持しなければならない。つまり生体膜は物質の出し入れができなければならない。そのために選択的に物質を運ぶ選択輸送のメカニズムが生体膜に存在するが、濃度勾配に沿った受動輸送と濃度勾配に逆らう能動輸送に分けられる。イオンを中心とする細胞内液の維持とその輸送は能動輸送系に依存しており、生体膜機能の重要な部分を占めている。その輸送をつかさどる本体は濃度差に逆らって無機イオンを輸送する広義のポンプであって、イオン輸送性ATPaseと呼ばれる。物質の輸送には多くのエネルギーを必要とし、ATPaseはATPの加水分解のエネルギーをイオン輸送のエネルギーに変換してこの仕事をしている。原形質膜上でこのはたらきをしているのがカチオン輸送性ATPase (P型ATPase) で、様々な細胞に存在し、重要な生理的役割を演じている。神経繊維の興奮や心筋の活動電位はすべて細胞内外のNa<sup>+</sup>、K<sup>+</sup>やCa<sup>2+</sup>などのイオンの遍在によるものであるが、Na<sup>+</sup>とK<sup>+</sup>の交換輸送はNa<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaseによって行われている。またCa<sup>2+</sup>-ATPaseは筋肉の小胞体内にCa<sup>2+</sup>を取り込み、筋細胞原形質中のCa<sup>2+</sup>濃度を下げて筋弛緩



を引き起こす。胃壁から胃酸の分泌をさせる $H^+/K^+$ -ATPaseや大腸菌の原形質膜にある $K^+$ -ATPaseもこの仲間である。さらに酵母や植物の原形質膜に存在しプロトンの能動輸送をおこなう $H^+$ -ATPaseもこの中に入れられる。これらPタイプのATPaseの特徴として、分子量が100K前後の単量体で反応の過程でATPの $\gamma$ 位のリン酸が活性中心のアスパラギン酸残基に移り中間体を形成すること、バナジン酸で阻害を受けることがあげられる。

PタイプのATPaseについては動物細胞のATPaseを中心に酵素学的側面から詳細な研究がなされていたが、近年、分子生物学的手法の進歩により次々と遺伝子が単離され一次構造が明らかにされた<sup>(3)</sup>。それら一次構造の結果を、 $Na^+/K^+$ -ATPase（シビレエイの発電器官、ひつじ・ぶたの腎臓）の $\alpha$ サブユニット、 $Ca^{2+}$ -ATPase（心筋と白型骨格筋）、 $H^+$ -ATPase（酵母原形質膜）、 $K^+$ -ATPase（大腸菌原形質膜）で比較してみると、イオン特異性が異なるにも関わらず、相同性のきわめて高い領域が存在している。この結果とタンパク質化学的に示された結果とを比較すると、相同性の高い部位のうちリン酸化中間体を形成するアスパラギン酸近傍のアミノ酸配列やATP結合部位などがよく保存されていることが示された。一方、植物の原形質膜ATPaseは、早くからその生理的役割の重要性が多く植物生理学者らにより指摘されていたが、酵素精製の困難さからタンパク質化学的研究や遺伝子レベルでの制御などの解明は遅れていた。しかし、最近の遺伝子工学的手法の発達により、動物や酵母で得られた一次構造をもとに合成DNAプローブをもちいていくつかの植物より遺伝子も単離され、その一次構造が示された<sup>(4-7)</sup>。その結果、植物どうしのみならず他生物種との間にもいくつかの部分で相同性があることが示された。これらの結果より、このタイプのATPaseは、輸送イオンや生理的役割を異にしているが、その起源は同じにしていると考えられている。

#### 【FタイプATPase】

生体においてATP合成を担うエネルギー産生系の酵素は、ミトコンドリア、クロロプラストおよび細菌原形質膜に存在し、ATP合成酵素複合体または $F_1F_0$ ATPaseと呼ばれている。このATPaseは電子伝達系の働きによって膜内外に形成された電気化学ポテンシャルを利用して、ADPと無機リン酸からATPの合成を触媒する。ATPase活性は $F_1$ 部分に存在し、 $F_0$ 部分にはプロトンチャンネルが存在する。

細菌や菌類、動物の $F_1$ 部 ( $F_1$ ATPaseと呼ばれている。以後 $F_1$ と略す) は5つのサブユニット ( $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 、 $\delta$ 、 $\epsilon$ ) から構成されている。葉緑体に存在する $CF_1$ も同じように5つのサブユニットから構成されている。これらのサブユニットについて、大腸菌を中心に詳細な研究がなされそれぞれの役割もかなり解明されつつあり<sup>(8)</sup>、また後で述べるように、F型の $\alpha$ と $\beta$ サブユニットについてはV型ATPaseのサブユニットとの関係も示されつつある。一方、植物のミトコンドリア $F_1$ は種によって5つあるいは6つのサブユニットより構成されており、他生物種あるいは葉緑体 $F_1F_0$ ATPaseの $F_1$ 部 ( $CF_1$ ) のサブユニットとの相関は $\alpha$ 、 $\beta$ サブユニットを除いてははっきりしていない。

ミトコンドリアは独自の遺伝子を持ちいくつかの構成タンパク質を自らの遺伝子にコードしている。菌類や動物細胞の場合 $F_1$ の全てのサブユニットは核遺伝子にコードされているが<sup>(9)</sup>、植物では、 $\alpha$ サブユニットがミトコンドリア遺伝子にコードされている<sup>(10, 11)</sup>。一方、葉緑体も独自の遺伝子を持っている。 $CF_1$ は $\gamma$ と $\delta$ サブユニットが核遺伝子に支配され、残りは葉緑体遺伝子に支配されている<sup>(12)</sup>。核に支配されているサブユニットは分子量の大きな前駆体として細胞質中で合成され、そののち、N末端側についたシグナル配列 (ミトコンドリア) またはトランジット配列 (葉緑体) により各オルガネラに輸送され

る。細胞内に2種類のFタイプのATPaseが存在し、このように複雑な遺伝子支配が存在することはFタイプのATPaseの分子進化を考える上で興味深い。

#### 【VタイプATPase】

真核細胞中には、ミトコンドリアや葉緑体などの二重膜オルガネラ以外に、数多くの一重膜小胞系が存在しており、大部分の小胞系は内部が酸性となっている。この酸性化はこれら小胞系の細胞内における生理的役割において重要と考えられ、酸性化をおこす本体は膜に存在する $H^+$ -ATPaseによるものと考えられる。このようなATPaseのなかで最初に精製されたのが酵母の液胞膜ATPaseである<sup>(13)</sup>。このサブユニット組成や性質がFタイプやPタイプと異なっていたことから新しいタイプのATPaseとして分類された。酵素的特徴として $F_1F_0$ タイプの阻害剤であるアジ化ナトリウムやオリゴマイシンでは阻害されず、またPタイプの阻害剤であるバナジン酸でも阻害されなかったが硝酸イオンにより強く阻害され(表1-1)、また、チオール修飾剤であるNEM (N-ethylmaleimide)により阻害されるという特徴を有していた。その後、クラスリン被覆小胞<sup>(14, 15)</sup>、クロマフィン顆粒<sup>(16, 17)</sup>、植物<sup>(18-22)</sup>やアカバシカビ<sup>(23)</sup>や酵母<sup>(24, 25)</sup>の液胞、腎原形質膜<sup>(26)</sup>よりこのタイプのATPaseが単離精製されそのサブユニット構造や性質が調べられた。精製されたATPaseは複数のサブユニットより構成されており、その組成はそれぞれ精製のされかたやとられた器官により少し異なっているが、FタイプATPaseのように5つ以上のサブユニット構成をしていることが示されている。これらサブユニットのうち全てのATPaseに共通するサブユニットが存在する。分子量が約70K (aサブユニット)、60K (bサブユニット)、17Kの3つのサブユニットはどの小器官においても共通に存在しており、このタイプの

A T P aseの活性発現に必須なサブユニットであることが推測されている。実際に70 Kサブユニットについては、阻害剤であるNEMやNBD-Cl (7-chloro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol) によりA T P ase活性が阻害されることと放射性ラベル実験から触媒部位がこのサブユニットにあることが示された<sup>(27)</sup>。また17 KサブユニットはDCCD (dicyclohexylcarbodiimide) によりラベルされることからプロトンチャンネルを形成している可能性が示された<sup>(15)</sup>。その後、V型A T P aseのいくつかのサブユニットがクローニングされ、そのアミノ酸配列が明らかになった。その結果、他のクラスのA T P aseとの相同性が見つかり(表1-1) 進化的側面からも興味深い知見が得られている。70 Kや60 Kのサブユニットが植物<sup>(28, 29)</sup>、アカパンカビ<sup>(30, 31)</sup>、酵母<sup>(32)</sup>でつぎつぎにクローニングされた。解析の結果、70 Kサブユニットは60%以上、60 Kサブユニットはアミノ酸レベルで約70%の相同性が認められた。また、ウシ腎臓(クロマフィン顆粒)<sup>(33)</sup>、酵母<sup>(34)</sup>、植物<sup>(28, 29)</sup>、ショウジョウバエ<sup>(36)</sup>、シビレエイ<sup>(37)</sup>、ラット小脳<sup>(38)</sup>のV型A T P aseのDCCD結合タンパク質(17 K)にも高い相同性が認められた。さらにこれらV型A T P aseとF型A T P aseのサブユニットの一次構造を比較したところ、70 KサブユニットはF<sub>1</sub>タイプのβサブユニットに、60 Kサブユニットはαサブユニットにそれぞれ活性部位と思われる部分を中心にして相同性の高い部分が存在していた。また、DCCD結合タンパク質についても、酵母や葉緑体のF<sub>1</sub>F<sub>0</sub>A T P aseのcサブユニット(F<sub>0</sub>部分のサブユニット)と相同性があり、分子量の違いを考慮すると進化の過程でF型DCCD結合サブユニットが複製してV型になったと考えられる結果が得られている<sup>(33)</sup>。これらの結果とサブユニット構成を考慮すると、V型とF型はよく似た高次構造と反応機構をしていることが推測される(図1-3)。実際にそのような結果も示されている<sup>(22)</sup>。これらのことからV型とF型A T P aseは共通の起源をもとに進化した可能性が高い。

さらに近年、古細菌の原形質膜に存在するATPase (A型) が単離精製され、その性質とサブユニット構成が明らかとなった<sup>(39-43)</sup>。驚くべきことにこれらATPaseはF型とは性質を異にし、むしろV型ATPaseに近いものであることが示された。また免疫交叉反応でもV型との相関が示された<sup>(44, 45)</sup>。最近になり、A型ATPaseのうちいくつかの種類でサブユニットの遺伝子がクローニングされ一次構造が明らかとなった<sup>(46-48)</sup>。その結果も上述の結果とよく一致し、V型のaとbがA型の $\alpha$ と $\beta$ にそれぞれ対応し、どちらも相同性が50%~60%あった。また、F型とは全体では25%と相同性は低いが、活性部位と考えられる付近にはよく保存された配列が認められた<sup>(47)</sup>。

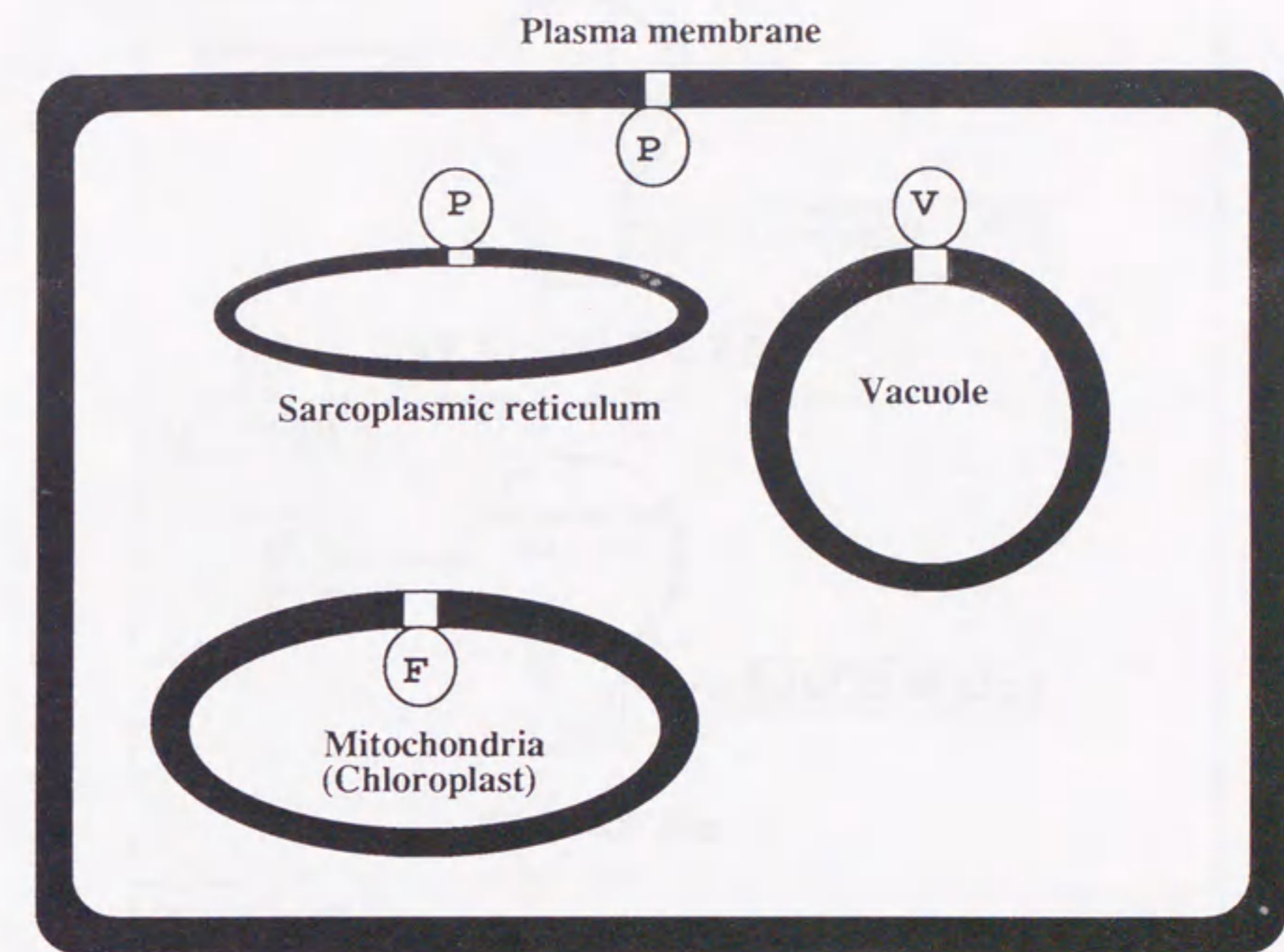
以上で述べたことをまとめると、V型とA型はタンパク質化学的に近縁関係にあるものと考えられ、共通の起源より進化したものとも考えられる。さらに、F型も含めて一次構造上は相同性が低くても立体構造、反応機構は同じ形式を踏襲している可能性が高い。A型ATPaseはATP合成を行っていることが示されているが<sup>(49)</sup>、V型ATPaseではATPの合成が行われうるという実験的な証拠は得られていない。F型ATPaseはおもにATPの合成にはたらくが、プロトンポンプとしてもはたらきうることが示されている。P型ATPaseについてはATPase特有のATP結合サイト以外では他のタイプとの相同性は見つかっていないが、さらに研究が進むにつれその進化的な面が明らかにされてくるものと思われる。同じ起源と考えられるATPaseが異なった働きをする方向へ分子進化したと考えると、現在までに知られているATPaseの細胞内局在性が、生物種や器官において異なっていたりあるいは未同定のATPaseが存在することも推測される。さらなる研究の発展が一酵素の分子進化のみならず真核、原核細胞の進化の解明につながるものと期待される。

Table 1-4  
Properties of various ATPases

	inhibitor	DCCD binding subunit	phosphorylated intermediate	ATP binding site	
				I	II
F type ATPase	azide	+	-	+	+ IT(T/S) TKXGSIT
V type ATPase	nitrate	+	-	+	?
A type ATPase	?	?	-	+	?
P type ATPase	vanadate	+	+	-	+ (I/L) CSDKTGILLT (phosphorylated)

I : GXXXXGK (T/S)

II : (L/I) X (T/S) KXG (T/S) (I/L) T



P: P type ATPase    V: V type ATPase    F: F type ATPase

Fig. 1-1 Various ion motive ATPases

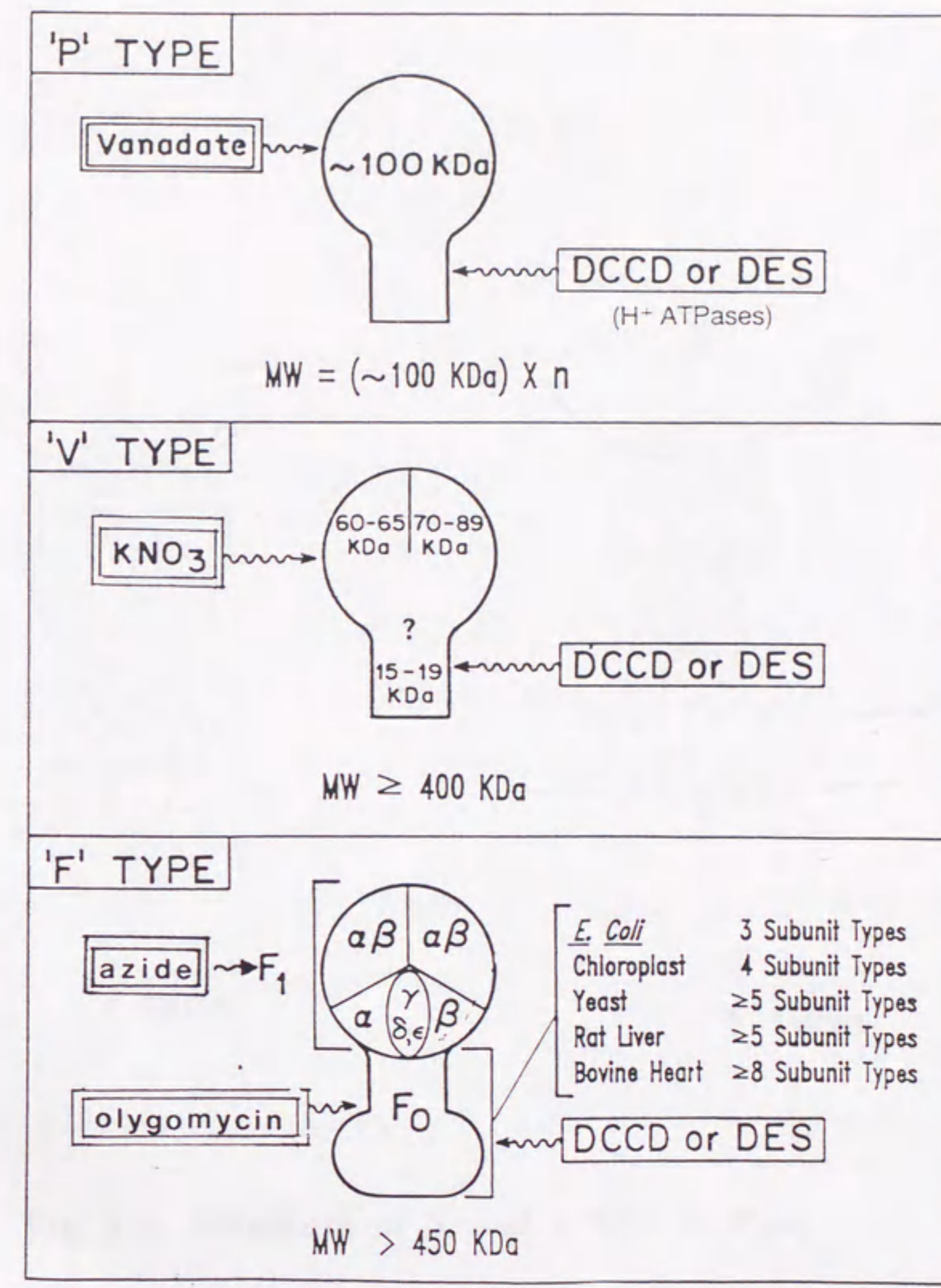


Fig. 1-2 Structural and inhibitor similarities, and differences among the P, V and F type ATPases



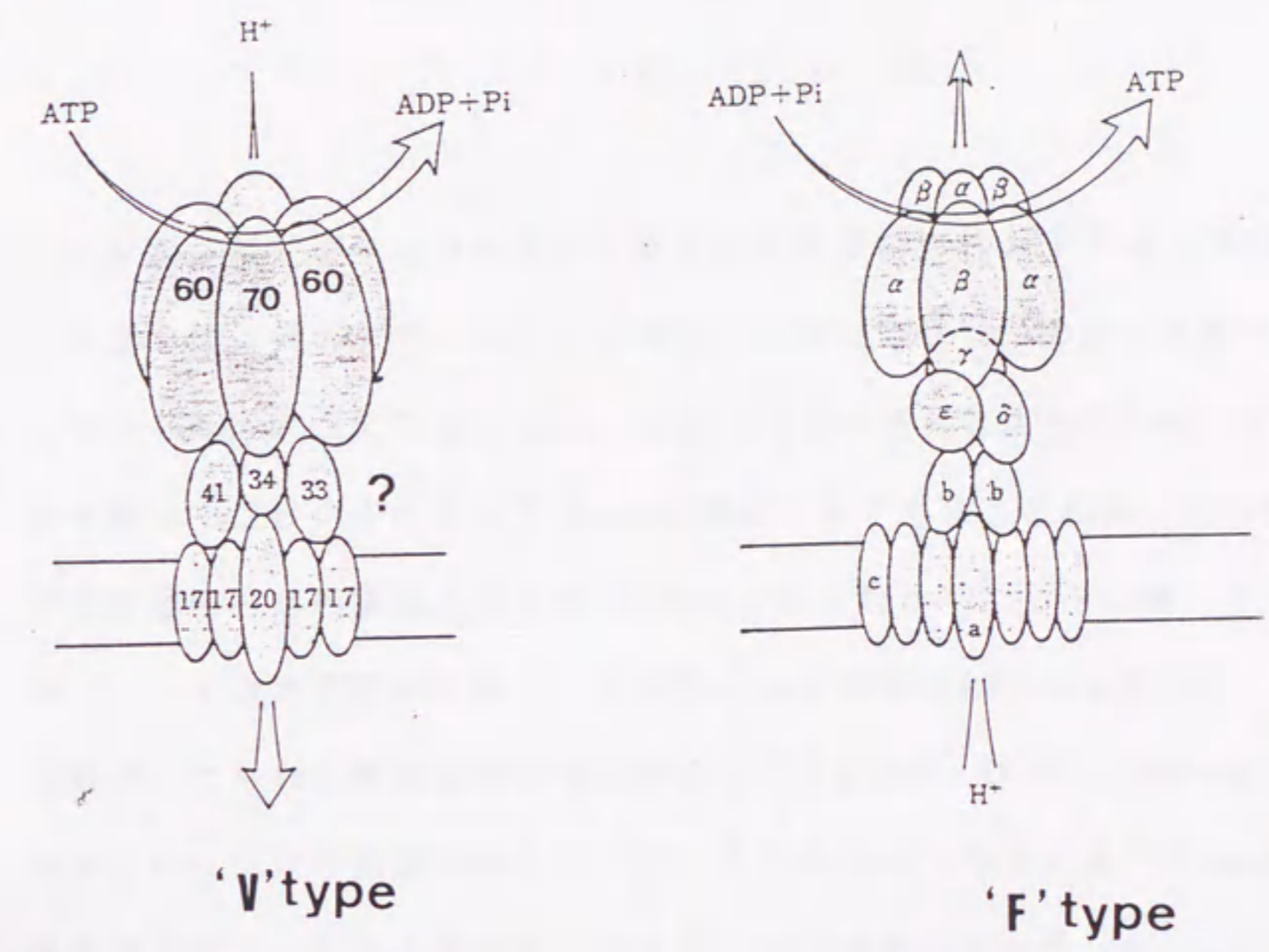


Fig. 1-3 Structure of V and F type ATPase

## 第2章

### 高等植物原形質膜ATPase

#### に関する研究

##### 1. はじめに

1960年代後半より出発した高等植物の膜結合性ATPaseの研究は、1970年代後半まで、カチオン輸送性と結びつけたものが大多数であった。1972年、トウモロコシの根から原形質膜小胞と考えられる画分に、カリウムイオンで活性化されるATPaseが濃縮されてくることが見いだされ、はじめて高等植物の原形質膜ATPaseの存在が示された<sup>(50)</sup>。その後、オートムギ根<sup>(51)</sup>、アカカブ貯蔵組織<sup>(52)</sup>を材料にして同様の報告がなされた。これらの組織よりとられた原形質膜に存在するATPaseは、バナジン酸で活性が阻害されるという共通の特徴を有していた。またミトコンドリアATPaseの阻害剤であるアジ化ナトリウムやオリゴマイシンでは阻害されなかった。これらの研究より、高等植物の原形質膜ATPaseも他の生物種のATPaseと類似の性質を有していることが示唆された。

こうした原形質膜結合型ATPaseの研究が進む一方、1980年、ミクロソーム画分にイオノフォアで活性が促進されるATPaseが存在することが報告された<sup>(53)</sup>。それ以来、膜小胞を用いたATP依存性イオン輸送活性の研究が進められた。当初ミクロソーム画分中の原形質膜に由来するプロトンポンプ活性を検出することはできなかったが、1983年、アカカブ貯蔵組織から調製された原形質膜小胞にバナジン酸感受性のプロトン輸送活性が存在することが見いだされ<sup>(54)</sup>、原形質膜ATPaseがATP加水分解のエネルギーを用いてプ

ロトンの輸送をおこなっていることが示唆された。

高等植物原形質膜に存在するATPaseがプロトン輸送性であることを立証し、その構造や反応機構を生化学的に解析するためには、ATPaseを完全に純化し、適当なりボソーム膜に埋め込み、プロトンポンプ活性を再構成することが必要である。しかし、この酵素は膜内在性であるため可溶化と精製は困難を究め、他生物の同じ酵素類に比べ研究が遅れていた。1984年、Serrano はオートムギ根よりはじめて原形質膜ATPaseを精製し、電気泳動的に均一な分子量100Kの標品を得た<sup>(55)</sup>。この精製標品を用いて再構成系構築の報告をしている。その後、トマト<sup>(56)</sup>やトウモロコシの根<sup>(57)</sup>より原形質膜ATPaseが精製され、いずれもSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動（以下SDS-PAGEと略す）上で分子量約100Kのポリペプチドが観察されたとの報告がなされた<sup>(58)</sup>。さらに、酵母の原形質膜ATPaseに対して得られた抗体を用い、トウモロコシ胚軸にも分子量100KのATPaseが存在することが示された。その他多くの植物材料においても数多くの生化学的研究がなされ、高等植物の原形質膜ATPaseも他の生物種のATPaseと類似していることが示されている<sup>(59)</sup>。

このようなATPaseの構造研究と共にその生理的役割についても研究が進められ、その重要性が示されつつある。植物細胞においては $H^+$ -ATPaseは一次能動輸送の担い手であり、この $H^+$ -ATPaseにより形成された電気化学ポテンシャルが細胞内外の様々な生理的変化や二次能動輸送に影響を与えている。研究の初期より唱えられていた細胞の伸長と細胞壁合成を促進すること<sup>(60, 61)</sup>を始め、葉からの有機化合物の輸送や根からの無機養分の吸収輸送<sup>(62-64)</sup>、気孔の開閉<sup>(65-67)</sup>などに深く関与していることが報告されている。さらに $H^+$ -ATPase活性を直接、間接に調節していると思われる様々な要因についても興味深い報告がなされている。現在までにATPase活性を促進したり抑えた

りする要因として報告されているものに光や傷害など環境変化によるもの<sup>(68-70)</sup>、オーキシン<sup>(63, 71-73)</sup>、サイトカイニン<sup>(63)</sup>、アブシジン酸<sup>(63, 74)</sup>など植物ホルモンによるもの、シリゴマイシン<sup>(75, 76)</sup>、フジコクシン<sup>(63)</sup>などの植物毒素によるものなどがある。これらの要因がATPase活性を調節する仕組みは正確には解明されていないが、植物細胞内に存在するタンパク質リン酸化酵素が、直接あるいは間接的にATPaseをリン酸化してその活性を調節しているのではないかと示唆されている<sup>(77)</sup>。他生物種においてはこのようなタンパク質のリン酸化が細胞の重要な生理的調節に関与していることが示されており、植物においてもこのような機構がATPase活性発現に関与していることは十分に考えられる。

原形質膜ATPaseの研究が進展する一方で、植物細胞に存在するもうひとつのH<sup>+</sup>-ATPaseである液胞膜のATPase研究が進み、その構造と性質が原形質膜のものとは大きく異なることが報告されてきた<sup>(78)</sup>。最近になり、分子生物学的手法の発達により、両ATPaseの一次構造が次々と決定され、その比較がなされたのは前章で述べた通りである。

本章では、ヤエナリ下胚軸を材料としてその原形質膜画分に存在するATPaseを単離精製し、その性質や構造について他生物や他植物の原形質膜ATPaseと比較した結果、異なった構造をした2種類のATPaseの存在が示唆されたことを報告する。

## 2. 実験材料及び方法

### (1) 原形質膜の単離

#### ① 実験材料

株式会社二和商（愛知県名古屋市）にて7日間25°C暗所で発芽させたヤエナリ(mung bean, *Phaseolus mungo*) 幼植物を、使用直前まで4°Cで保存した。これから下胚軸のみを分離し、水道水、脱イオン水でそれぞれ3回洗浄し、これを実験材料とした。

#### ② 原形質膜画分の調製方法

約1.6kgのヤエナリ下胚軸を、0.25M ショ糖、2mM EDTA、12mM  $\beta$ メルカプトエタノールを含む20mM リン酸カリウム緩衝液3.2リットル中でワーリングブレンダーにより毎分10,000回転で1分間磨砕した。得られた磨砕液を二重に重ねたナイロンガーゼでこし、10,000×gで10分間遠心した。その上清を100,000×gで30分間遠心し、この沈澱を0.5M ショ糖を含む10mM リン酸カリウム緩衝液(pH7.8) 48mlに懸濁し、-80°Cで保存した。この粗ミクロソーム画分48mlを336gの水性二相分配系（最終濃度として6% (w/v) デキストランT500、6% (w/v) ポリエチレングリコール4000、0.25M ショ糖、30mM NaCl、10mM リン酸カリウム緩衝液、pH7.8)に加え、上下に20回静かに攪拌した。その後、500×gで15分間遠心し、上層のポリエチレングリコール層と下層のデキストラン層とに分けた。この上層に、サンプルの代わりに上記の懸濁に用いた緩衝液を加えて二相に分けた水性二相分配系の下層を加え、再び上下に攪拌後、遠心して二相に分けた。この上層を抽出液で約2倍に希釈し、80,000×gで1時間遠心し

た。得られた沈澱を0.25M ショ糖、1mM EDTAを含む10mM Tris-HCl緩衝液 (pH7.5) 3mlに懸濁し、-80°Cで保存した。

## (2) 原形質膜ATPaseの可溶化

### ① ATPaseの Zwittergent 3-14 による可溶化

原形質膜画分 (タンパク質濃度 4mg/ml) に等量のDOC溶液 (10mg/ml デオキシコール酸、2mM EDTA、2mM DTT、0.5M ショ糖を含む10mM Tris-HCl緩衝液、pH7.5) を加え、20kHzで30秒間超音波処理をした。これを100,000×gで90分間遠心し、得られた沈澱を、タンパク質の1.5倍量の重量のZwittergent 3-14、25% (v/v) グリセロール、2mM EDTA、2mM DTTを含む10mM Tris-HCl緩衝液 (pH7.5) に懸濁し、23°Cで15分間インキュベートした。これを100,000×gで90分間遠心し得られた上清を可溶化ATPase画分とした。

### ② ATPaseの Lysolecithin による可溶化

原形質膜画分 (タンパク質濃度 4mg/ml) に Triton-X100 溶液 (Triton X-100 4mg/ml、0.5M KCl、1mM EDTA、1mM DTT、0.5M ショ糖を含む10mM リン酸カリウム緩衝液、pH7.8) を等量加え、10分間インキュベートした。この画分を100,000×gで60分間遠心した。その沈澱を25% (v/v) グリセロール、1mM EDTA、1mM DTTを含む10mM Tris-HCl緩衝液 (pH7.5) にタンパク質の最終濃度が2mg/mlとなるように懸濁し、これにlysolecithinを最終濃度が20mg/mlとなるように加えて15分間インキュベートした。これを100,000×gで90分間遠心し、その上清を可溶化ATPase画分とした。

### (3) 原形質膜 ATPaseの精製

#### ① グリセロール密度勾配遠心による精製

Zwittergent可溶化ATPase画分を、27~50% (v/v) の連続グリセロール密度勾配溶液 (総容量12ml、グリセロール溶液は0.2M KClと0.005% Zwittergentを含む) の上端に乗せ、日立RPS40Tローターを用い38,000rpm (100,000×g) で18時間遠心した。遠心後密度勾配を0.5mlずつに分画し (以上の操作は4°Cで行った)、280nmの吸光度とATPase活性を測定した。

#### ② グリセロール密度勾配遠心による精製

lysolecithin可溶化ATPase画分2.5mlを9mlの27~50% (v/v) 連続グリセロール密度勾配 (1mM EDTA、1mM DTT、10mM Tris-HCl緩衝液、pH7.5) にのせ、日立RPV-45Tローターで20°C、42,000rpmで11時間遠心した。この時、スローアクセルスターターを用い加速し、減速はブレーキを用いなかった。その後、チューブの底より、注射針 (テルモG-21) にて1mlずつ分画回収し、各フラクションについてATPase活性、タンパク質量をそれぞれ測定した。以上の操作は20°Cで行った。

### (4) リン酸化中間体の検出

基本的にはAmoriらの方法<sup>(79)</sup>に従って行った。反応液1mlは50mM Tris-MES (pH6.5)、50mM KCl、0.1mM  $\gamma$ -[<sup>32</sup>P]-ATP (0.2Ci/mM) 及び0.1mM MgSO<sub>4</sub>を含んでいた。原形質膜 (タンパク質量として100 $\mu$ g) を加えることにより反応を開始し、30秒間室温でインキュベートした。これに0.05mlの50% TCAを加え反応を止めた。また、あるものは0.025mlの250mM MgATPを加え5秒チェイスした

後、反応を止めた。反応停止後、0.3M ATPと0.3M MgCl<sub>2</sub>を含む溶液0.05mlを加え 80,000×gで15分間遠心し、得られた沈澱を洗浄液（10% TCA及び30mM ATPを含む30mM リン酸カリウム緩衝液）で3回洗った。さらに50mM リン酸カリウム緩衝液（pH4.0）で1回洗った後、これを解離液（0.25M ショ糖、1.56% マラカイトグリーンと35mM TDABを含む100mM リン酸カリウム緩衝液、pH4.0）50 μlに溶解し、TDAB酸性ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離した。泳動後、ゲルを1%（v/v）グリセロール中で5分間インキュベートした後、濾紙上で乾燥し、オートラジオグラフィーにかけた。以上の操作は特に示していない限り氷上で行った。

#### TDAB酸性ポリアクリルアミドゲル電気泳動

Raymond らの方法<sup>(80)</sup>にしたがって行った。分離ゲルは、10%（w/v）ポリアクリルアミド、0.26%（w/v）N,N'-メチレンビスアクリルアミド、75mM リン酸カリウム（pH2.0）及び23mM TDABから成っていた。また濃縮ゲルは4%ポリアクリルアミド、2.3mM TDAB及び126mM リン酸カリウム（pH4.0）よりなっていた。泳動液は75mM グリシンと0.125% TDABを含んでおり、リン酸でpH3.0に調製したものをを用いた。

#### (5) [<sup>14</sup>C]-DCCDによるラベル実験

[<sup>14</sup>C]-DCCDのトルエン溶液（0.5 μCi）0.01mlをガラスチューブに移し、窒素ガスによってトルエンを蒸発させた。これに0.01mlのエタノールを加えてDCCDを溶かし、最終濃度で Tris-HCl が10mM、ショ糖が0.25M及びDCCDが30 μMになるように加えた。ここにグリセロール密度勾配中の画分6のタンパク質約50 μgを加え、室温で30分間反応させた後、最終濃度が10%（w/v）となるようTCAを加え、氷上で20分間放置した。その後、17,000×gで10分間遠心し、得ら



れた沈澱を10mM トリス塩酸緩衝液で2回洗浄し、SDS-PAGEにかけた。ラベルされたポリペプチドはフルオログラフィーで検出した。

#### (6) SDS-PAGEからの67kDと55kDポリペプチドの分離

原形質膜画分から(2)①で述べた方法によりATPaseを可溶化した(ただしZwittergent濃度は5mg/ml)。この画分に最終濃度が10%(w/v)となるようにTCAを加え、水中で30分間放置した後、遠心してタンパク質を回収し、エタノール:エーテル(1:1)の溶液で1回洗浄した。エーテル、エタノールを除いた後、タンパク質溶解用緩衝液で溶解し、70°Cで30分間インキュベートし、そこに最終濃度が8Mとなるよう尿素を加えて1時間放置した。これをSDS-PAGEにかけた後、4M酢酸ナトリウムにゲルを浸してポリペプチドを染色した。目的のバンドの部分を細かく切断し、この断片より電氣的にポリペプチドを回収し、透析後、凍結乾燥して濃縮した。得られた試料をSDS-PAGEにかけ、BSAを標準にして、クマシーブリリアントブルーRによる染色度からタンパク質量を推定した。

#### (7) 一般的実験方法

##### ① ATPase活性の測定

反応液(0.1ml)は、3mM ATP、30mM Tris-MES緩衝液(pH6.5)、3mM MgSO<sub>4</sub>及び50mM KClを含んでいた。37°Cで30分間インキュベートした。5%(w/v) SDS、0.833%(w/v) モリブデン酸アンモニウム及び1.67N 硫酸を含む停止液2mlをくわえて反応を止め、直ちに0.15%(w/v) 1-アミノ-2-ナフトール-4-スルホン酸、0.92%(w/v) 亜硫酸ナトリウムを含む発色液0.4mlを加えて35分間発

色させ、660nmの吸光度を測定した。一分間に1 pmolのリン酸を生ずる活性を1単位とした。

#### ② チトクロームcオキシダーゼ活性の測定

前島と旭の方法<sup>(81)</sup>を改良して測定した。反応液(0.3ml)は20mMリン酸カリウム緩衝液(pH7.2)、0.1mg還元型チトクロームc及び0.05%(v/v) Triton X-100を含んでいた。そして25°Cで550nmの吸光度の減少を測定した。

#### ③ NADPH-チトクロームcレダクターゼ

反応液(0.3ml)は50mMリン酸カリウム緩衝液(pH7.8)、0.1mM EDTA、2mM NaN<sub>3</sub>、0.35mM NADPHおよび0.6mg酸化型チトクロームcを含んでいた。そして25°Cでその550nmの吸光度の増加を測定した。

#### ④ グルカンシンターゼII

反応液(0.14ml)は50mM Tris-HCl緩衝液(pH8.0)と0.5mM [<sup>14</sup>C]-UDPG(17.5nCi)を含んでいた。基質を加えることにより反応を開始し、25°Cで15分間インキュベートした。これに70%(v/v)エタノールを1ml、50mM MgCl<sub>2</sub>を0.05mlと煮沸ミクロソーム画分を0.15ml(約200μgタンパク質)を加え、直ちに1分間煮沸した。4°Cで一晩放置した後、1,000×gで5分間遠心し、沈澱を70%エタノールで4回洗い、沈澱に取り込まれている放射活性をプレイシンチレーター5mlで測定した。

#### ⑤ タンパク質の定量

トリクロロ酢酸で沈澱させた後、ウシ血清アルブミンを標準にしてLowryらの方法<sup>(82)</sup>で測定した。

⑥ SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動

Laemmliの方法<sup>(83)</sup>にしたがって行った。ただしゲル中には0.1% (w/v) SDSを含ませておいた。

⑦ 免疫ブロッティング

電気泳動後のゲルをニトロセルロースフィルター(東洋濾紙)と重ね合わせ、20%メタノール、0.1% SDS及び20mM Tris-190mM グリシン (pH8.3)を含む溶液中で30V、2時間電氣的にトランスファーを行った。ついで、このフィルターを室温で30分間、3% BSAをふくむTBS (0.14M NaCl-20mM Tris-HCl緩衝液、pH7.5)中に浸して振盪した。次に、抗体を含むTBS中で1時間振盪し、0.05% Triton X-100を含むTBSで10分間、3回洗浄した。その後<sup>125</sup>I-Protein A (0.02%、0.2 $\mu$ Ci、Amersham)で検出するか、あるいは、Horse Radish Peroxidase-Protein Aで目的のポリペプチドを検出した。

(8) 各種試薬

$\gamma$ -[<sup>32</sup>P]-ATP、[<sup>14</sup>C]-DCCD及び[<sup>14</sup>C]-UDPGは、Amersham International社のものを用いた。チトクロームcはBoeringer Mannheim社のものを用いた。またATPは同社のものをDowex 50W-X8イオン交換樹脂を用いてTris塩に転換して使用した。NADPH及びlysolecithin (Type I)はSigma社製を用いた。他の試薬は市販の特級または1級試薬を用いた。

### 3. 結果

#### (1) 原形質膜の単離

高純度の原形質膜画分を容易に得るためWiedell<sup>(84)</sup>、吉田ら<sup>(53)</sup>により開発された水性二相分配法を用いた。この方法は膜表面の性質にもとづく分離方法であり、密度勾配による方法に比べ他の膜系の混入が少なく、大量処理が可能であることから酵素の精製には適していると考えられる。図2-1は水性二相分配の操作を示した図である。分配を2回繰り返して、得られたポリエチレングリコール層を遠心し、原形質膜画分を得た。ヤエナリ下胚軸1.6 kg当り約24 mgのタンパク質を含む原形質膜画分が得られた。表2-1に種々の細胞内膜系の膜指標酵素の活性をしめした。ミトコンドリアの指標酵素であるチトクロームcオキシダーゼの比活性は、原形質膜画分では粗マイクロソーム画分の1/13に減少していた。また小胞体の指標酵素であるNADPHチトクロームcレダクターゼの比活性も同じように1/6に減少していた。一方原形質膜の指標酵素であるグルカンシンターゼIIの比活性は3倍に上昇していた。このように、他の膜系の指標酵素の比活性が粗マイクロソーム画分に比べ原形質膜画分で減少しているのに対し、原形質膜の指標酵素の活性は上昇していた。高等植物の液胞膜やゴルジ体に関しては、信頼すべき指標酵素がなく、これらの膜系がどの程度本実験で得られた原形質膜画分に混入しているかは定かではない。しかし、この原形質膜画分中の膜はショ糖密度勾配遠心で密度 $1.16 \text{ g/cm}^3$ の単一なピークを示した(データは示してない)。これはオートムギ( $1.14 \sim 1.19 \text{ g/cm}^3$ )<sup>(50)</sup>、タバコ葉( $1.17 \text{ g/cm}^3$ )<sup>(85)</sup>、アラスカエンドウ上胚軸( $1.18 \sim 1.19 \text{ g/cm}^3$ )<sup>(86)</sup>、トウモロコシ葉( $1.14 \sim 1.19 \text{ g/cm}^3$ )<sup>(87)</sup>といった報告と

も一致している。以上の結果から、本実験により得た膜画分のほとんどの成分は原形質膜由来であると結論した。

表2-2はこの画分に存在するATPase活性への阻害剤の影響を調べた結果である。このATPase活性はミトコンドリア $F_1$ ATPaseの阻害剤であるアジ化ナトリウムでは阻害されず、原形質膜ATPaseの阻害剤であるバナジン酸、DESにより強く阻害された。また近年報告されている液胞膜ATPaseの阻害剤である硝酸イオンによる阻害は、僅かであった。一方多くの報告がカリウムイオンによりATPaseが活性化することを示しているが、本実験で単離した原形質膜ATPaseはカリウムイオンにより僅かしか活性化されなかった。しかし、カリウムイオンによる活性化については、異論も存在することから、<sup>(59, 88)</sup>必ずしもカリウムによる活性化が原形質膜ATPaseの指標とはなっていない。またこのATPaseは、MgATPを基質としていた。以上のことは本画分に存在するATPaseは従来報告されている原形質膜ATPaseの性質と一致していることを示している。

## (2) 原形質膜ATPaseの可溶化

原形質膜ATPaseは、膜内在性タンパク質であり、以前より可溶化が困難であることが指摘されていた。膜タンパク質の可溶化においてよく使用されるTriton X-100やDOCで可溶化することはできなかった。しかし、原形質膜をTriton X-100またはDOCで処理することにより、膜中のATPaseが活性化された。図2-2は横軸に示した濃度のDOCまたはTriton X-100で原形質膜を処理した後、 $100,000 \times g$ で遠心したときの沈澱膜画分中のATPase活性の上昇を示した。活性は約3~4倍に上昇した。これら界面活性剤処理により約半分のタンパク質を除くことができ、比活性を4~6倍上げることができた

め、A T P aseの精製過程にこの操作を加えることにした。

ヤエナリ原形質膜A T P aseの可溶化には、膜内在性タンパク質の可溶化において近年よく用いられるようになった両イオン性の界面活性剤Zwittergent 3-14とlysolecithinを用いた。いずれもSerranoによりオートムギ根原形質膜A T P aseの可溶化に有効であることが報告されている<sup>(55)</sup>。図2-3は、Triton X-100あるいはD O Cで処理した後の膜からlysolecithinあるいはZwittergent 3-14でA T P aseが可溶化されてくる様子を示したものである。Zwittergentによる可溶化は、タンパク質に対する界面活性剤の量をきわめて微妙に調節する必要があり、界面活性剤の量が過剰になると酵素の急激な失活を招いた。最大で30%ぐらいの活性を可溶化することができた(図2-3A)。一方、lysolecithinによる可溶化では界面活性剤の量を増やしてもA T P aseが安定であることが示された(図2-3B)。しかし、A T P aseを完全に可溶化することはできなかった。このことはオートムギ根<sup>(55)</sup>、トウモロコシ胚軸<sup>(58)</sup>、トウモロコシ根<sup>(57)</sup>、トマト根<sup>(56)</sup>を材料にした場合と一致している。また、図2-4に示すようにD O C、Triton X-100処理後の膜画分、Zwittergent およびlysolecithin可溶化画分のタンパク質にはS D S - P A G E上ではいずれも大きな差はみられなかった。さらに、可溶化されてくるA T P aseの阻害剤に対する感受性にも差はみられなかった(データは示していない)。このことから、どちらの界面活性剤を用いても可溶化されてくるA T P aseは同じものであると考えられる。ZwittergentはA T P aseを失活させる傾向にあるが、低温下でも使用可能である。一方、lysolecithinはA T P aseの安定化には有利であるが、低温では凝集してしまうため、以後の操作を室温で行う必要がある。そこで、両方の界面活性剤で可溶化された画分をそれぞれ適した方法で精製することにした。

(3) Zwittergent可溶化画分のグリセロール密度勾配遠心による分画

図2-5Aは、Zwittergentで可溶化したATPase画分を27~50%の連続グリセロール密度勾配遠心で分離した後のATPase活性分布と280nmの吸収を示したものである。ATPase活性は、大きく分けて、遠心管上部に残るピーク画分と中部に沈降する画分、遠心管の底に沈澱してしまう画分とに分かれた。遠心管中部と底部まで沈降する画分は他の大部分のタンパク質とよく分かれたが、上部のピーク画分は他の大部分のタンパク質と重複する位置に沈降していた。表2-3は、原形質膜ATPaseのDOC処理、Zwittergentによる可溶化およびグリセロール密度勾配遠心によって部分精製した結果を示したものである。密度勾配の中部が最も高い比活性(4.1単位/mgタンパク質)を示した。

図2-6は部分精製標品のATPase活性に対するバナジン酸と硝酸イオンの影響を示したものである。密度勾配上部及び中部の両画分とも(中部画分に関しては示していない)低濃度のバナジン酸で強く阻害されたが、硝酸イオンではほとんど阻害されなかった。このことは今回精製されたATPaseが原形質膜タイプのATPaseであることを示している。

図2-5Bはグリセロール密度勾配遠心後の各画分をSDS-PAGEで解析したものである。Lane 1、2、3はグリセロール密度勾配の11、12、13画分を、Lane 4は14~25番の画分を濃縮したものを、Lane 5は遠心管底部の沈澱を電気泳動にかけた結果である。いずれの画分でも、分子量が67,000(67kDポリペプチド)と55,000(55kDポリペプチド)の2本の主バンドが観察された。また分子量が41,000、34,000および28,000の薄いバンドが検出されたが、従来報告されているような分子量100Kのバンドは検出されなかった。

#### (4) ATPaseのリン酸化中間体の検出

原形質膜ATPaseの特徴は、既に述べたようにバナジン酸感受性である。これは、基質のATP末端 $\gamma$ 位のリン酸が、この酵素のアスパラギン酸残基の側鎖の $\beta$ カルボキシル基に転移してアシルリン酸型の間体を形成するという反応機構のためである。そこで、この反応機構上の特徴を利用し、原形質膜ATPaseを $\gamma$ -[ $^{32}\text{P}$ ]-ATPによりラベルし、サブユニットの検索を行うことが動物、酵母などで行われてきた<sup>(79)</sup>。前述の部分精製画分には分子量が67,000と55,000のポリペプチドがおもに存在していたことから、これらがATPaseのサブユニットであるかどうかを調べるため原形質膜画分でこの中間体を捉えることを試みた。図2-7に示すようにおもに分子量70,000から40,000にかけてラベルが入った。またこのラベルは、短時間のチェイスで消失した。このことから、この分子量付近にターンオーバーの早いリン酸化中間体を形成するポリペプチドが存在することが示唆された。またこのポリペプチドは、根、胚軸の両方の場合に観察され、胚軸と根から一緒に抽出した原形質膜にも検察された。根または胚軸と根から抽出した原形質膜は、わずかではあるが分子量9万付近にラベルされチェイスされるバンドが観察された。

T D A B酸性ゲルは、タンパク質の移動度がLaemmliのSDS-PAGE法と大きく異なり、特に分子量が70,000から40,000にかけてポリペプチドが集中する傾向となった(図2-7 Lane 7, 8)。従って、このゲルシステムでラベルされた中間体の正確な分子量を知ることは困難であった。



(5) 切り出しによる67kDと55kDポリペプチドの単離と抗体の調製

A TPaseのサブユニットと考えられる67kDと55kDのポリペプチドについて、さらに生化学的解析を行うため抗体の調製を試みた。Zwittergent可溶化画分を、SDS-PAGEにかけ、67kDと55kDのポリペプチドを切り出して電氣的に回収した。その結果、約25.6kgの胚軸よりそれぞれ150 $\mu$ gのポリペプチドが回収された。このポリペプチドは、電気泳動的に十分に純化されていることが示された(図2-9)。このうち100 $\mu$ gをウサギ(New-zealand White)に注射し、一ヶ月後に50 $\mu$ g追加免疫を行った後、血清を得た。これらの血清を用いて、可溶化A TPase画分をSDS-PAGEにかけた後ウエスタンブロッティングを行った結果、抗67kD抗体は67kDのポリペプチドと反応したが(図2-10 Lane 1)、抗55kD抗体は反応するポリペプチドがなかった(図2-10 Lane 2)。また、分子量43,000付近にバンドがみられたが、全てのレーンに見られたことから非特異的な吸着ではないかと考えられた。抗67kD抗体が可溶化されたA TPase活性を阻害するかどうか調べてみたが、反応液中に抗体を加えると沈澱が生じてしまい吸光度を測定できず、正確な解析ができなかった。

(6) lysolecithinにより可溶化されたA TPaseの部分精製とその性質及び抗体によるサブユニットの検索

高等植物原形質膜A TPaseの精製に関しては、既に述べたようにオートムギ根原形質膜よりlysolecithinで可溶化し、垂直ローターを用いたグリセロール密度勾配遠心で精製され、ほぼ電気泳動的に単一なポリペプチドが検出されて

いる。その後、トマトや、トウモロコシの根より同じ方法で分子量が100KのATPaseが精製されている。しかしヤエナリ胚軸からは、前述したとおり、分子量が67,000と55,000のポリペプチドが観察されたのみであった。そこで、ヤエナリ胚軸でもlysolecithinを用いて可溶化し、垂直ローターでグリセロール密度勾配遠心にかけて精製を試みた。

#### ① 密度勾配遠心による分画

図2-12Aのように、大部分のタンパク質がATPase活性のピークからはずれ、lysolecithinによる可溶化はATPaseの精製に有効であろうと思われた。しかし、ATPase活性は、他の報告<sup>(55)</sup>にあるような鋭いピークを描かずに、比較的密度勾配中広範囲に分布した。一方、オートムギ根のように、ATPase活性は反応液に0.1mg/mlのlysolecithinを加えると促進された。しかし、活性ピーク全域ではなく、密度勾配中域から下部にかけての画分のみが活性化され、lysolecithinが存在する場合と存在しない場合のATPase活性のピークは一致しなかった。さらに、原形質膜ATPaseの特徴とされているカリウムイオンによる活性化は全画分で起こらなかった(データは示していない)。カリウムイオンの感受性についてはいくつかの報告<sup>(53, 66)</sup>で疑問の声も上がっており、現在のところはっきりしていない。

#### ② 部分精製されたATPaseの性質

図2-14と表2-4は、グリセロール密度勾配遠心後の画分6について、各種イオン及び阻害剤のATPase活性に与える影響について調べたものである。これを見る限り、ヤエナリ原形質膜ATPaseは、従来のものと同じ性質を有しているといえる。また比活性も、最も高い画分5で、6.2単位/mgタンパク質であった。この値は、他の植物よりの精製例と比較して大きな差はなかった。

### ③ 免疫ブロットニングによる解析

各画分をSDS-PAGEにかけ、タンパク質染色を行ったところ、ATPase活性のピーク画分付近においても、従来報告されているような分子量100K前後のポリペプチドは観察されなかった。そこで本当に100kDのATPaseが存在しないかどうか調べるため、トウモロコシ根原形質膜ATPaseに対して調製された抗体<sup>(57)</sup>(名古屋大学農学部植物栄養学研究室で調製されたもの)を用いて免疫ブロットニングを行った。その結果、ATPaseのピークより少しずれた密度勾配下方に、この抗体と反応する93kDのポリペプチドが観察された(図2-12B)。またこのポリペプチドは、精製されるにしたがって濃縮されてゆくことから(図2-11)、確かにヤエナリ下胚軸原形質膜にも従来報告されているような100kDタイプのATPaseが存在するが、その量は他の報告と比べかなり少ないことがわかった。一方、抗67kD抗体を用いて免疫ブロットニングを行いその分布を調べたところ、100kDよりやや上方の画分にピークとなって存在していることが観察された(図2-12B)。このピークはlysolecithinによって活性化されないATPaseの活性ピークと一致していた。これらのデータは、密度勾配中に二種類のATPaseが混在していることを示唆するものである。

### (7) [<sup>14</sup>C]-DCCDによるATPaseのラベル

ミトコンドリアのF<sub>0</sub>F<sub>1</sub>ATPaseやチトクロームc<sub>c</sub>オキシダーゼなどはDCCD結合サブユニットをもち、DCCDによりATPase活性やプロトンポンプ活性が阻害される。これは、これらサブユニットのグルタミン酸にDCCDが結合してプロトンの輸送を阻害するためである。ヤエナリ原形質膜

A T P a s e も D C C D により A T P a s e 活性が阻害されることから放射性的  
D C C D をもちいて結合サブユニットを検索した。リン酸化中間体の検索に比  
べて S D S - P A G E 上で解析が可能である利点がある。グリセロール密度勾  
配後の N o . 6 画分を用いてラベル実験を行った結果、図 2-13 のように、20  
k D から 14 k D の分子量マーカーの間に泳動されるペプチドがおもにラベル  
され、さらに 93 k D 付近にも弱くラベルされるペプチドが観察された。この  
ことも (6) で述べたように二種類の A T P a s e の存在を示唆している。

#### 4. 考 察

植物における物質輸送の機構を探る上で原形質膜のイオン輸送性ATPaseの性質を理解することは重要な課題である。そのためには、まず原形質膜のATPaseを単離精製し、構造と性質を調べることが必要である。現在までに原形質膜ATPaseの精製が試みられたのは、オートムギ根<sup>(55)</sup>、トマト根<sup>(56)</sup>、トウモロコシ根<sup>(57)</sup>等からであった。これらの報告はほとんどが根を実験材料に用いている。物質輸送を考える時、根のみならず、胚軸などの果たす役割もまた重要である。このように、植物体の物質輸送という面において、胚軸など根以外の原形質膜ATPaseを生化学的に解析することは意義深いものと考えられる。本研究ではヤエナリの下胚軸を材料にして原形質膜ATPaseの解析を試みた。

酵素精製を考えるとき、どういう材料を選ぶかということが重要となる。本研究では、常に一定の生育条件で大量の材料が得易いという点からヤエナリ幼植物（市販名もやし）を材料にして研究を始めた。既に述べたように、植物の生長には原形質膜ATPaseが重要な役割をしていることが示唆されている。従って、この材料を用いることは種子発芽時のヤエナリ胚軸の伸長の速さから考えて、実験材料として優れていると考えられた。

ATPaseの精製には原形質膜小胞画分をできるだけ高純度で、しかも大量処理で容易に得られる方法が必要である。本研究では、既に北海道大学の吉田らがヤエナリ原形質膜画分調製に用いていた水性二相分配法を用いた。この方法の利点は大量処理が可能であると同時に、膜表面の性質による分離を行うため、従来の密度による分離に較べて他の膜系の混入が少ないことである。この方法で得られたヤエナリ原形質画分に存在するATPaseは、表2-2に示したように、

バナジン酸で阻害されたが、F<sub>1</sub>型ATPaseの阻害剤であるアジ化ナトリウムや液胞型ATPaseの阻害剤である硝酸イオンでは阻害を受けなかった。また、原形質膜の指標酵素であるグルカンシンターゼIIが濃縮されてくることから、この画分は原形質膜を高純度で含んでいるものと推定した。

植物原形質膜ATPaseの可溶化と精製は、既に多くの研究者達が取り組んできたが、おそらくその特有な膜内在性の構造ゆえ、困難を伴っていた。そして一部の例外を除き、DOCやTriton X-100のような界面活性剤では可溶化されないことが報告されていた。1982年、VeraとSerrano<sup>(89)</sup>は、Zwittergent 3-14をもちいてオートムギ根原形質膜よりATPaseを可溶化することに成功した。当初本研究でもZwittergent 3-14による可溶化を試みた。この界面活性剤は、ATPaseの失活をもたらす傾向があったが、低温下での操作が可能なことなど有利な点もあった。また、多くの研究者がZwittergent 3-14を用いてATPaseの可溶化に成功している。これらの報告では、一度Triton X-100やDOCにより表在タンパク質を除いてから、可溶化を試みている。これは、膜タンパク質を可溶化し精製を行うためによく用いられる選択的可溶化の効果を狙ったものであり、このような処理は本酵素精製には有効であると思われた。この処理により、図2-2のようにATPase活性が2~3倍に上昇した。このような活性化は他でも報告されている。これは、単離された原形質膜小胞の大多数がATPaseの活性中心が膜の内側に存在するright-side-outの小胞となっており、これら小胞が強固に閉じているため、そのままではATPが活性中心に近づくにくくなっているためと考えられる。そしてこの小胞が界面活性剤により破壊されると、ATPが近づくやすくなるので活性が上昇するという可能性が強い。また別の可能性として、なんらかの活性調節をする因子が原形質膜からはずれ、ATPaseが活性化されることも考えられる。既に述べたように、ATPaseは様々な調節を受けていることから、この可能性も十分に考えられる。

このような処理が、ATPaseのサブユニット構成を変えている可能性も否定できないが、活性のあるATPaseをより比活性の高い状態で精製を行うために、この方法を採用することにした。

ATPaseは、一般に密度勾配遠心にかけると、他のタンパク質より速く沈降することがいくつか示され<sup>(55-57)</sup>、精製の有力な方法として用いられている。ヤエナリの場合でも、Zwittergent 3-14可溶性ATPaseをグリセロール密度勾配遠心にかけると、速く沈降する画分と遅く沈降する画分に分かれた。しかし、密度勾配全体に分布する傾向がみられ、きれいな単一のピークとはならない傾向があった。これらのことは、ATPaseの分子量が不均一でいくつかの酵素が重合し易い性質を持っていると推論される。実際に原形質膜上では多量体として存在していることを示した報告もある<sup>(89)</sup>。

密度勾配遠心後の各画分をSDS-PAGEにかけたところ、図2-5のように全体にわたり67kDと55kDのポリペプチドが存在しており、特にATPase活性のピーク画分に多量に分布している傾向が観察された。しかし、従来報告されているような100kDのバンドは観察されなかった。この67kDと55kDのポリペプチドは、近年報告されている<sup>(18-22)</sup>液胞膜など細胞内酸性コンパートメントの膜結合プロトン輸送性ATPaseの活性サブユニットと分子量的に似ている。しかし、その性質はバナジン酸感受性で硝酸イオンでは阻害されない原形質膜タイプである。従って、おそらくこの酵素は新しいタイプのATPaseであると思われる。しかし、このことを確実にするためには、更に詳細な生化学的解析が必要であるかも知れない。

1985年、Serranoは、Zwittergent 3-14にかわってlysolecithinを用いることにより、ATPase活性の失活を防ぐことができ、以後の精製にも有利であることも発見した。さらに、グリセロール密度勾配遠心を垂直ローターを用いることで分離をよくすることを発見した<sup>(55)</sup>。この方法により、オートムギ

根より電気泳動的に単一な分子量100Kのポリペプチドのみを含む標品を得たのは既に述べた通りである。そこで、本研究でも同じ方法を用いて結果を比較することを試みた。この精製の結果については既に述べた通りである。本実験の結果をまとめると、1. リン酸化中間体を形成するATPaseが100kDタイプのみでなく70~40kD付近にも存在する。2. グリセロール密度勾配遠心でATPase活性が広く分布し、そのピークは100kDのピークとは一致しない。また、lysolecithinで活性化されるATPaseのピークは100kDのピークと一致する。もし、この100kDポリペプチドがこの画分の全てのATPase活性を示しているとする、他の報告と較べて<sup>(56, 57)</sup>比活性が高過ぎる。3. 低分子のDCCD結合サブユニットが存在し、67kDのポリペプチドと挙動をともにしている。4. 100kDタイプATPaseは、67kDポリペプチドや55kDポリペプチドとは免疫学的に異なる、といった点である。これらのことを総合して判断すると、ヤエナリ胚軸より単離した原形質膜画分には、構造は異なるが性質のきわめて類似した2種類のATPaseが存在している可能性が強い。しかも、両ATPaseの存在比は、生理的条件や組織によって違っていることも考えられよう。本研究でその存在が示唆された新しいタイプと思われるATPaseは、少なくとも67kD、55kDおよび19kDの3つのサブユニットを持っているものと推論される。このうち、直接ATPase活性に関わっているサブユニットが67kDポリペプチドなのかそれとも55kDポリペプチドなのかは決定できなかったが、19kDポリペプチドはプロトンチャンネルを形成しているものと推察される。本研究では両ATPaseを完全に分けることができなかったため、そのプロトンポンプ活性まで確認することはできなかった。このようなATPaseの存在は今のところ他植物では報告されていないが、笠毛らは同じヤエナリの根から原形質膜ATPaseを精製し、100kDタイプATPaseの他に67kDと55



kDのポリペプチドの存在を報告している<sup>90)</sup>。またダイコンの原形質膜画分に、ショ糖密度勾配遠心で2つに分かれるATPaseが存在することが報告されている<sup>91)</sup>。このように植物原形質膜には2種類のATPaseが存在しているとすれば、それぞれの役割がどう違うのか興味深い。しかしながら、植物においては原形質膜ATPaseを完全精製した例はほとんどなく、また使用した原形質膜が限られた生理的条件のもとで限られた組織からのものであり、いまだ不明な点が数多いといっても過言ではない。

最近になり、原形質膜ATPase (Pタイプ)<sup>4-7)</sup>や液胞膜ATPase (Vタイプ)<sup>28, 29)</sup>のcDNAが単離され、その一次構造が次々と明らかにされて、分子進化上の関連性が検討されている<sup>2, 3)</sup>。こうした検討から、その活性部位がいくつか推定され、共通構造も見いだされている。こうした報告によると、特にVタイプATPaseの活性サブユニット(70kD)はFタイプATPaseの活性サブユニットβのATP結合部位のいくつかと相同性があり、その中のいくつかのアミノ酸配列はよく保存されているという。この保存されたアミノ酸配列の中にPタイプATPaseのATP結合部位と思われる部分と相同性のあることが指摘されている。そして、Pタイプにおいては、この部分にアスパラギン酸が存在し、このカルボキシル基がリン酸化中間体を形成するときに関与しているものと考えられている。しかしFタイプとVタイプのATPaseにおいては、このアスパラギン酸が別のアミノ酸に置換されており、このことがリン酸化中間体を形成しない(バナジン酸に非感受性)の原因になっている可能性が示されている。最近になり、古細菌の中の *Methanococcus voltae* の原形質膜に、構造的にはVタイプATPaseに近いが、PタイプATPaseのようにリン酸化中間体を形成するものが報告された<sup>92)</sup>。この酵素のサブユニットには、ATP結合サイトにアスパラギン酸が存在することも示されている。さらに植物 (*Acer pseudoplatanus*) の液胞膜ATPaseが、硝酸イオン感受性でVタイ

... (faint text) ...

ブの構造をしているにも関わらず、バナジン酸に感受性を示すことが報告されている<sup>(93)</sup>。また動物の原形質膜には、VタイプのATPaseが存在していることが示されている<sup>(94-98)</sup>。これらの報告を総合して考えると、植物の原形質膜にも、今までに示されている3タイプのATPase (F, V, P) 以外に、その中間型のようなATPaseが存在する可能性がある。あるいはまた、3タイプのATPaseが今までとは異なった細胞内局在性をとっていることも十分考えられよう。



## Polymer Two Phase Partition

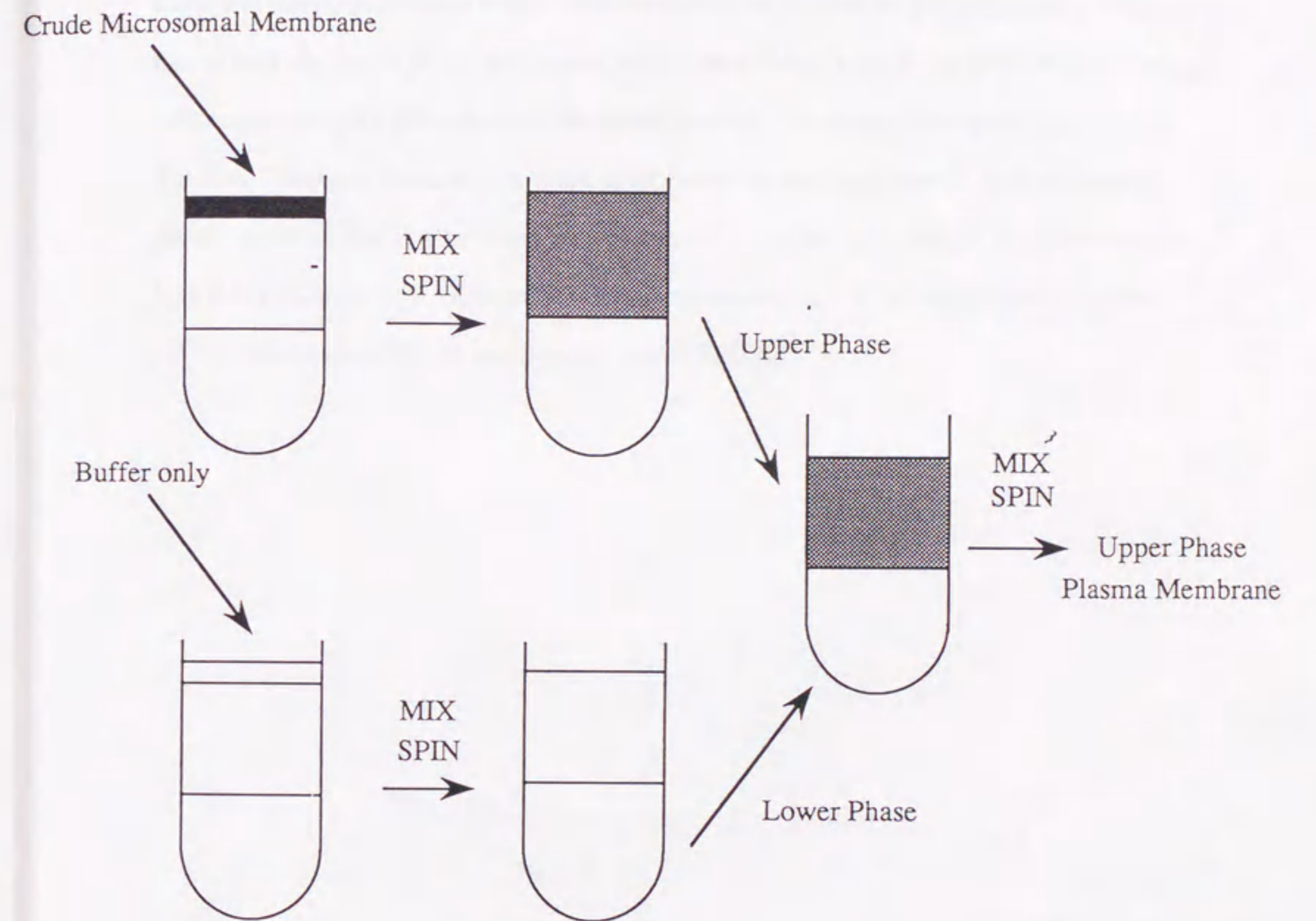
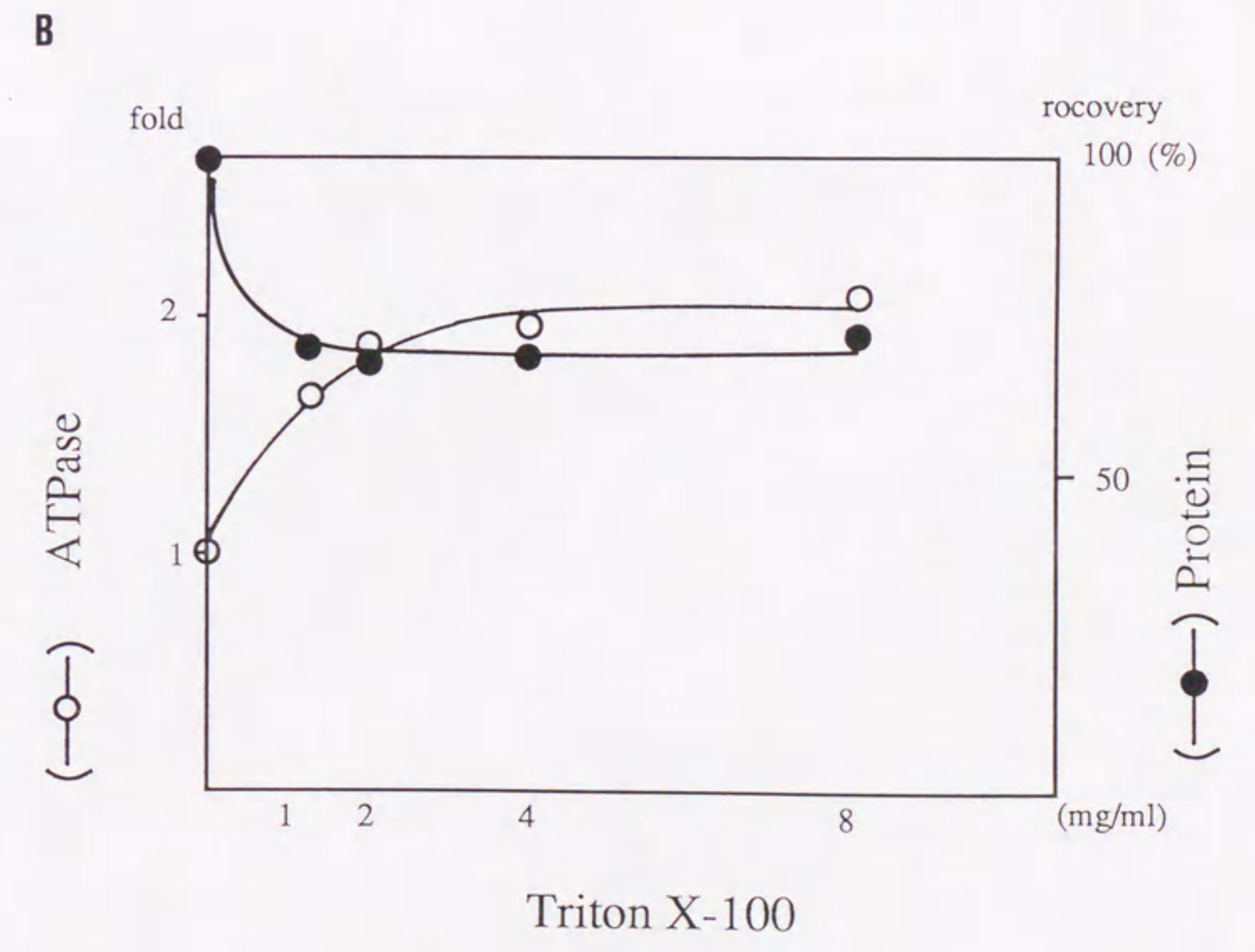
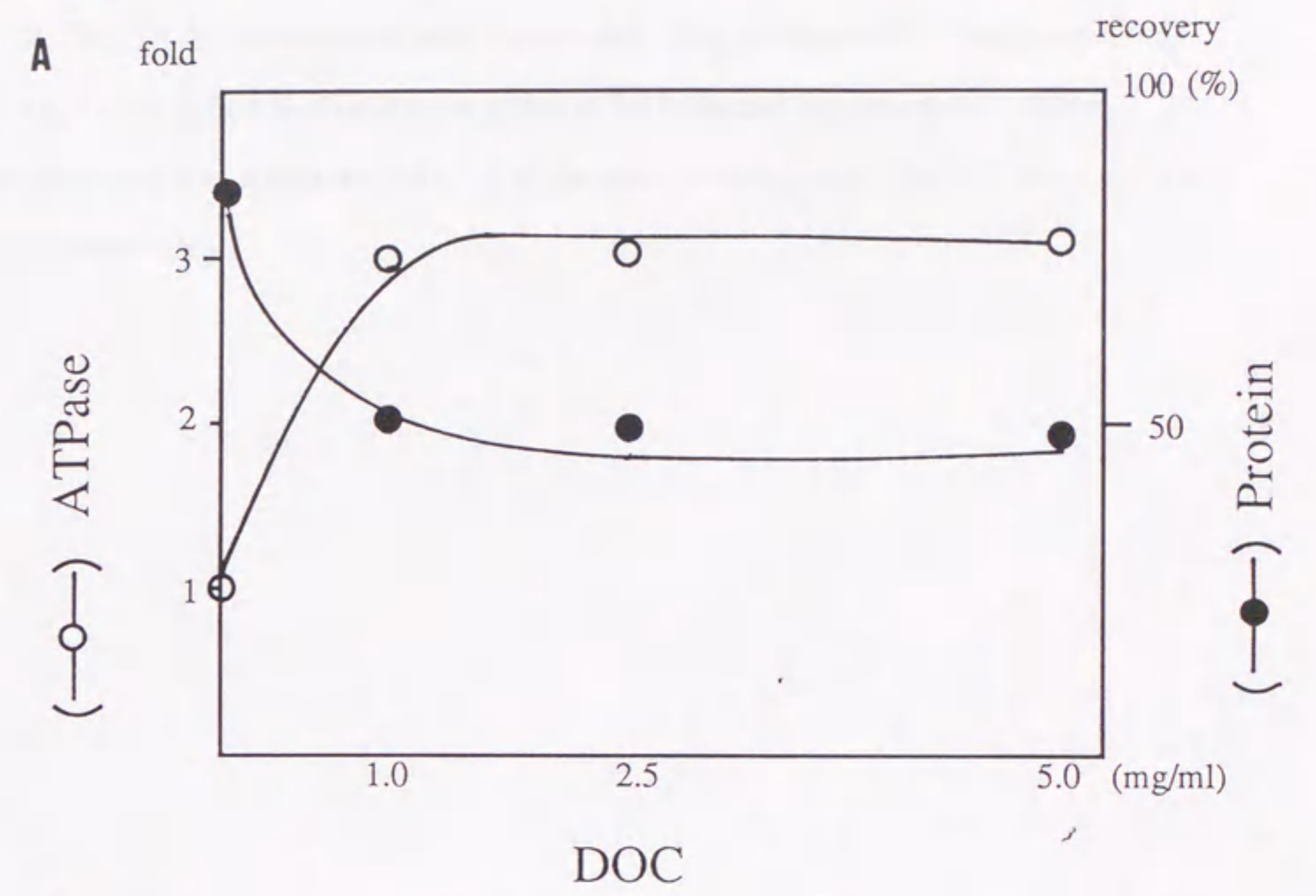


Fig. 2-1

Fig. 2-1 Batch partition procedure for isolation of mung bean hypocotyl plasma membrane fraction from the crude microsomal fraction in a PEG 4000 / dextran T 500 two phase system. Twelve millilitres of the microsomal fraction was added to a phase mixture to yield 96g of a phase system with a final composition of 6.0%(w/w) PEG 4000, 6.0%(w/w) dextran T 500, 30mM NaCl, and 10mM potassium - phosphate, pH 7.8. After the phase system was mixed by 20 inversion of the tube and centrifuged at 500 x g for 10 min, the upper phase was mixed with a new phase, which was prepared by mixing and centrifuging the phase system described above but containing no crude microsomal fraction. The new phase system were centrifuged as described above, then the upper phase was diluted with four times the volume of homogenizing medium and centrifuged at 100,000 x g for 30 min. The pellet was suspended in 1 ml of 10 mM Tris-HCl buffer , pH 7.5, containing 0.25 M sucrose and 1 mM EDTA.

Fig. 2-2



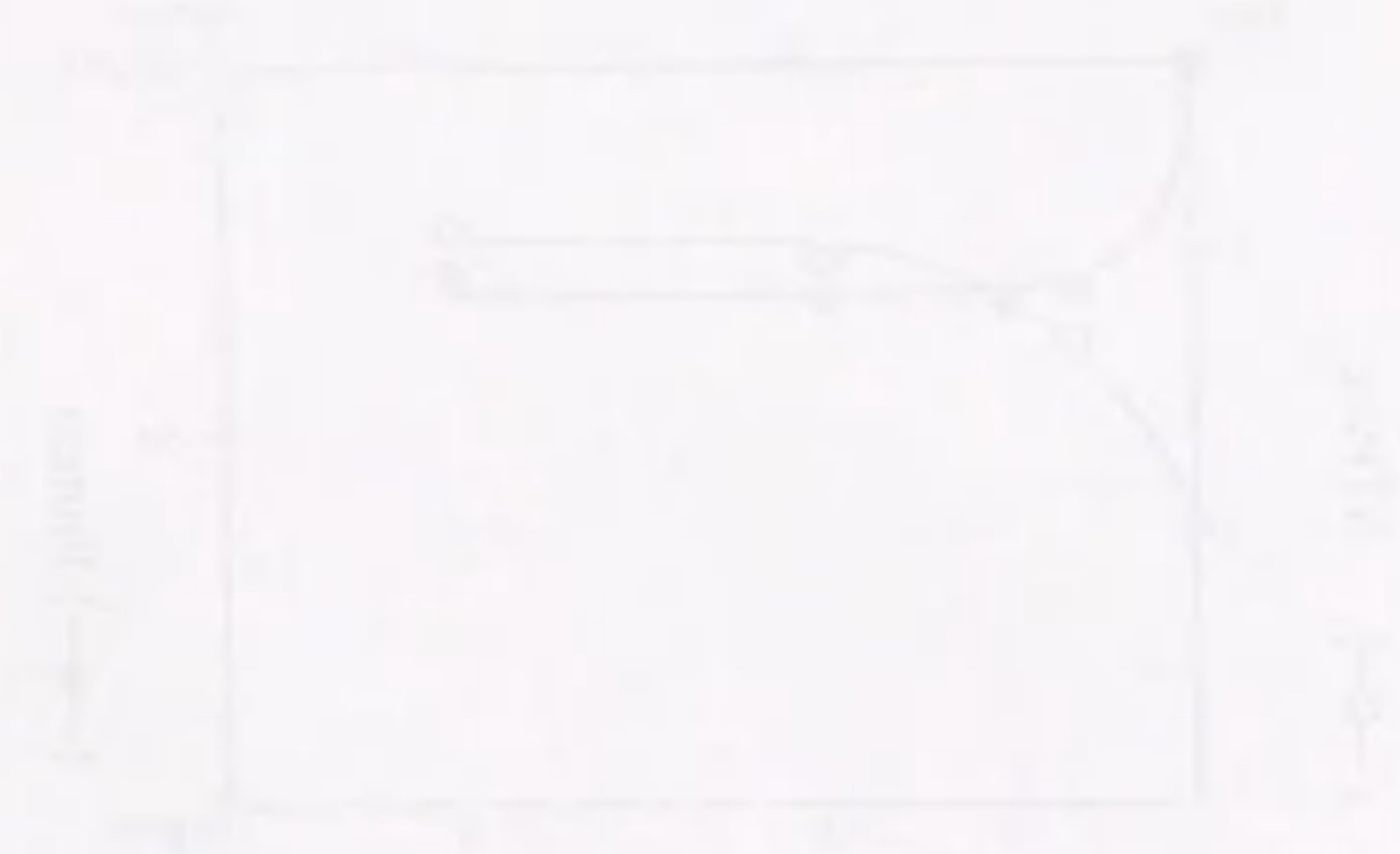


Fig. 2-2 Activation of ATPase in the plasma membrane fraction by DOC (A) or Triton X-100 (B). To the plasma membrane fraction (A; 2 mg protein/ml, B; 2 mg protein/ml) DOC (A) or Triton X-100 (B) was added at the indicated concentrations. After centrifugation at 100,000 x g for 1.5 h, the pellets were assayed for ATPase activity (○) and protein (●).

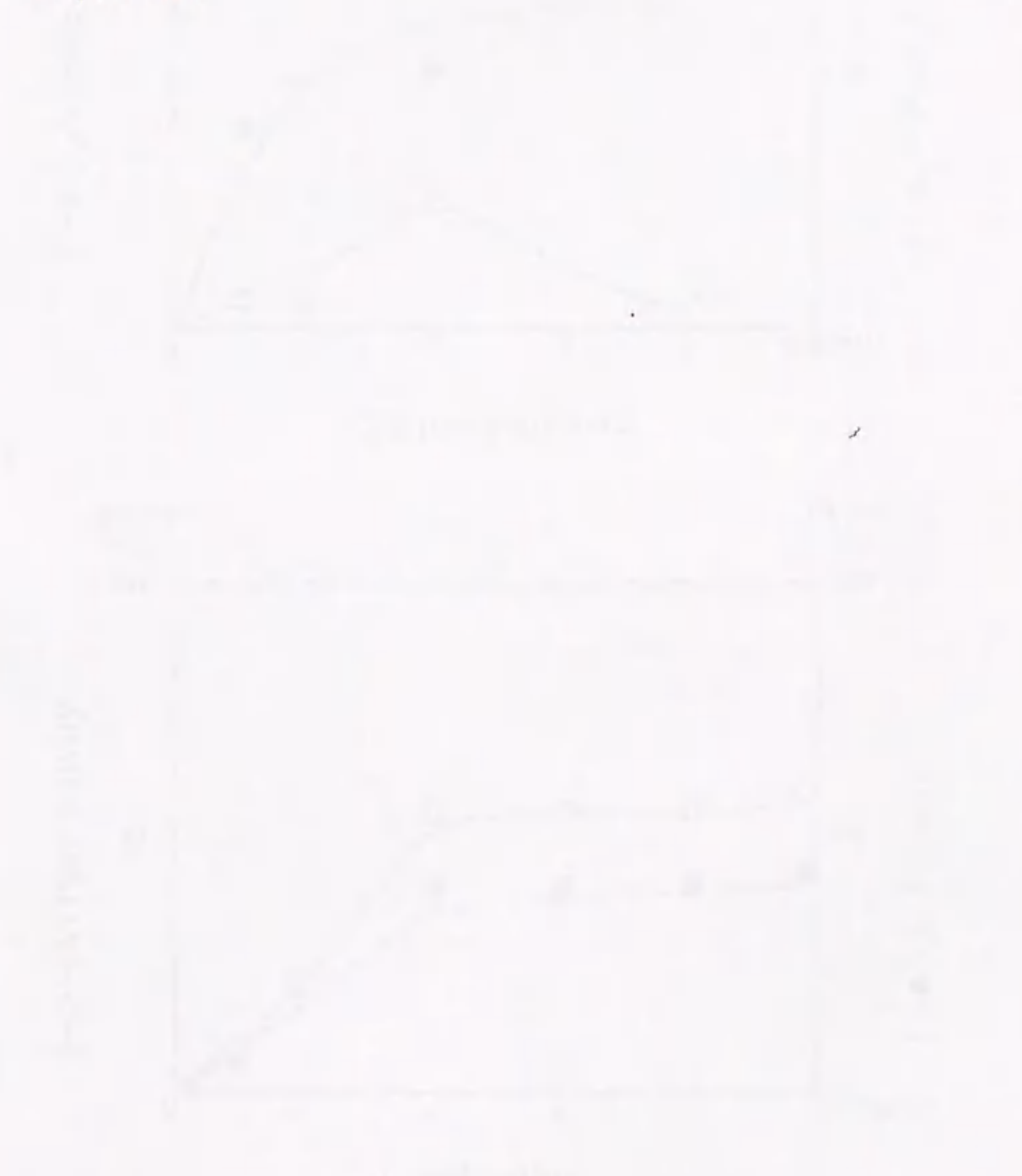
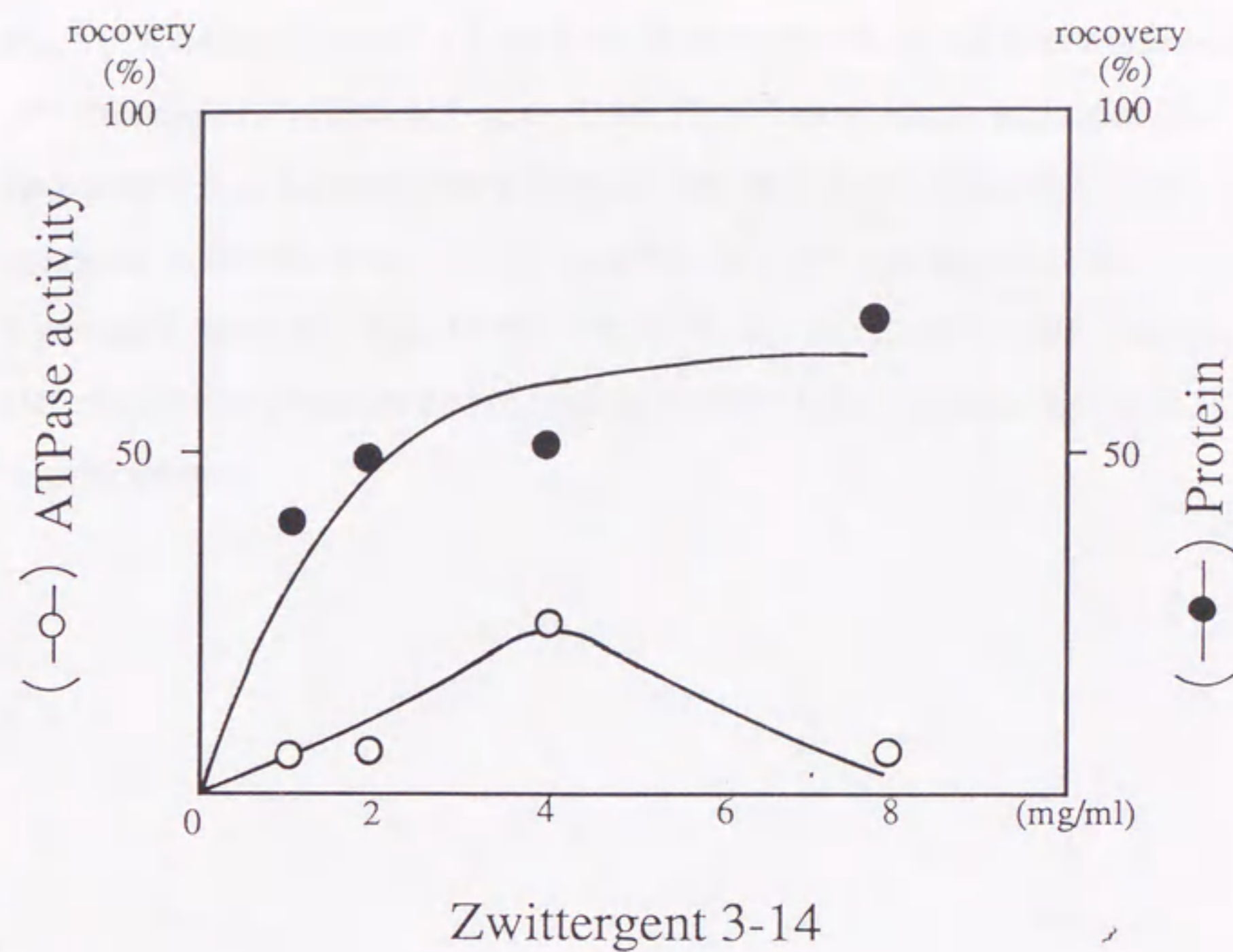
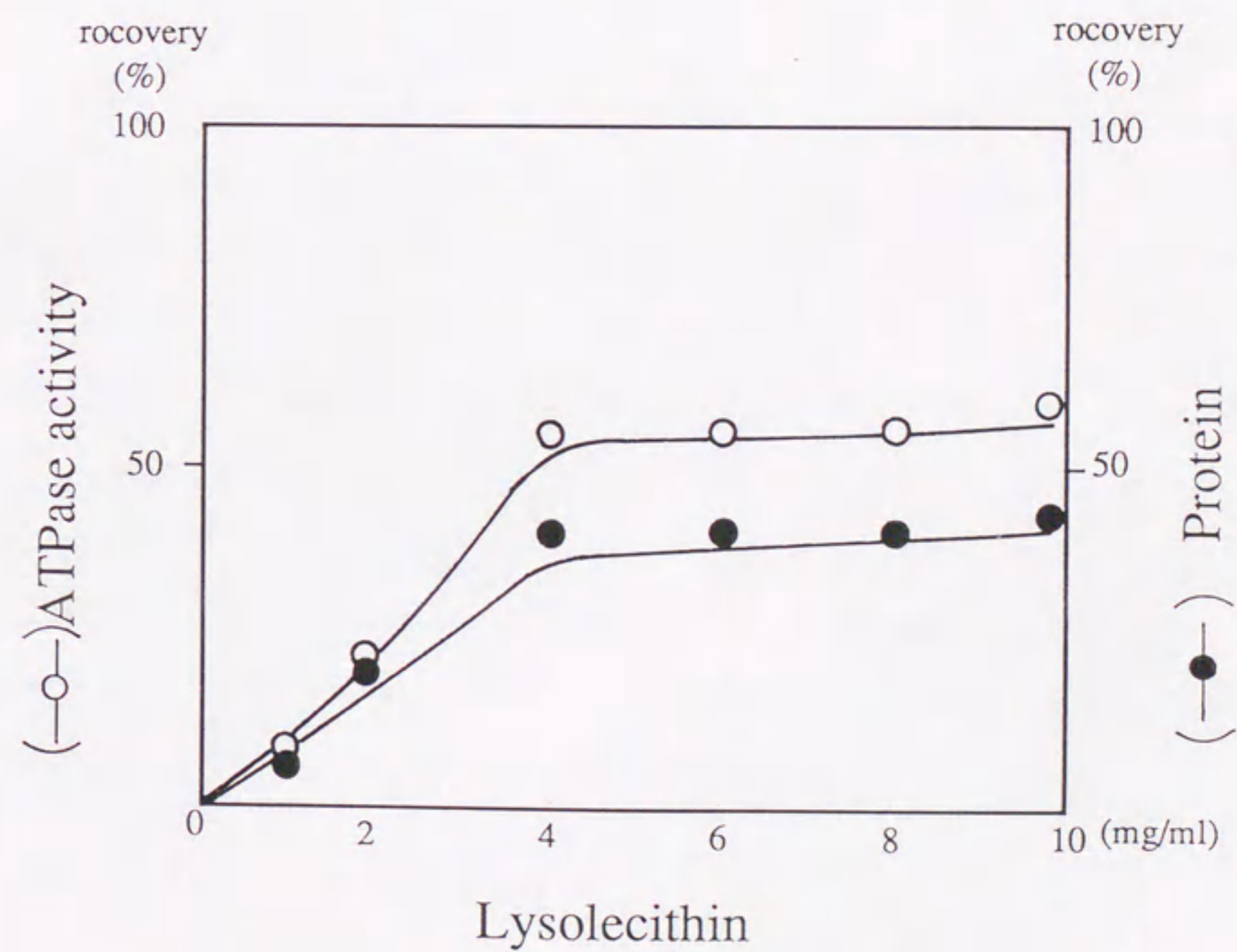


Fig. 2-3

A



B



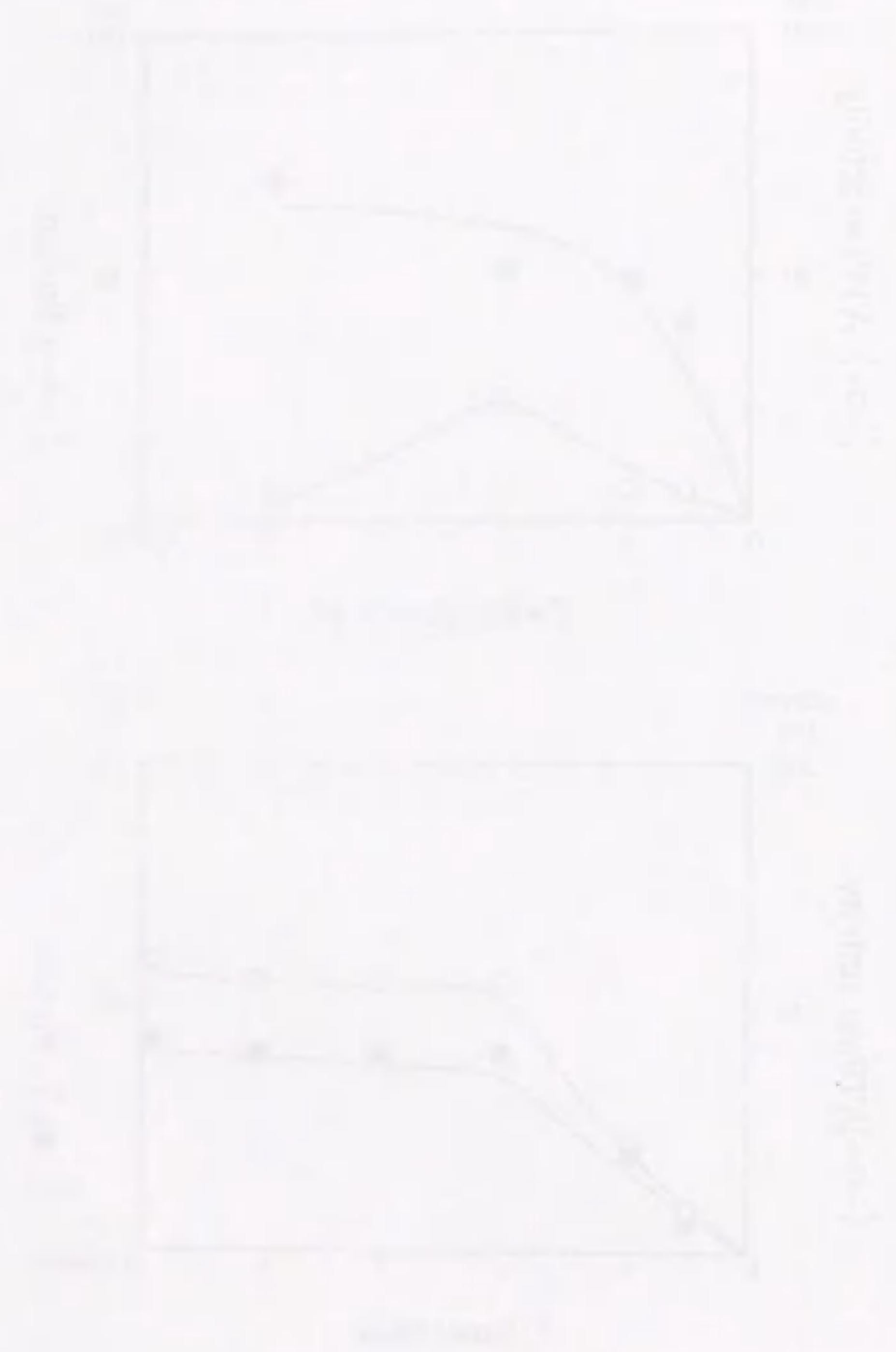


Fig. 2-3 Solubilization of the enzyme from the deoxycholate-treated plasma membrane with Zwittergnet 3-14 ( A ) or from the Triton X-100-treated plasma membrane with lysolecithin ( B ). The membrane was treated with the indicated concentrations of detergents and centrifuged at 100,000 x g for 1.5 hs. After centrifugation, the supernatants were assayed for ATPase activity (○) and protein content (●). The activity and content are expressed as the percentages relative to the respective values in the original materials.



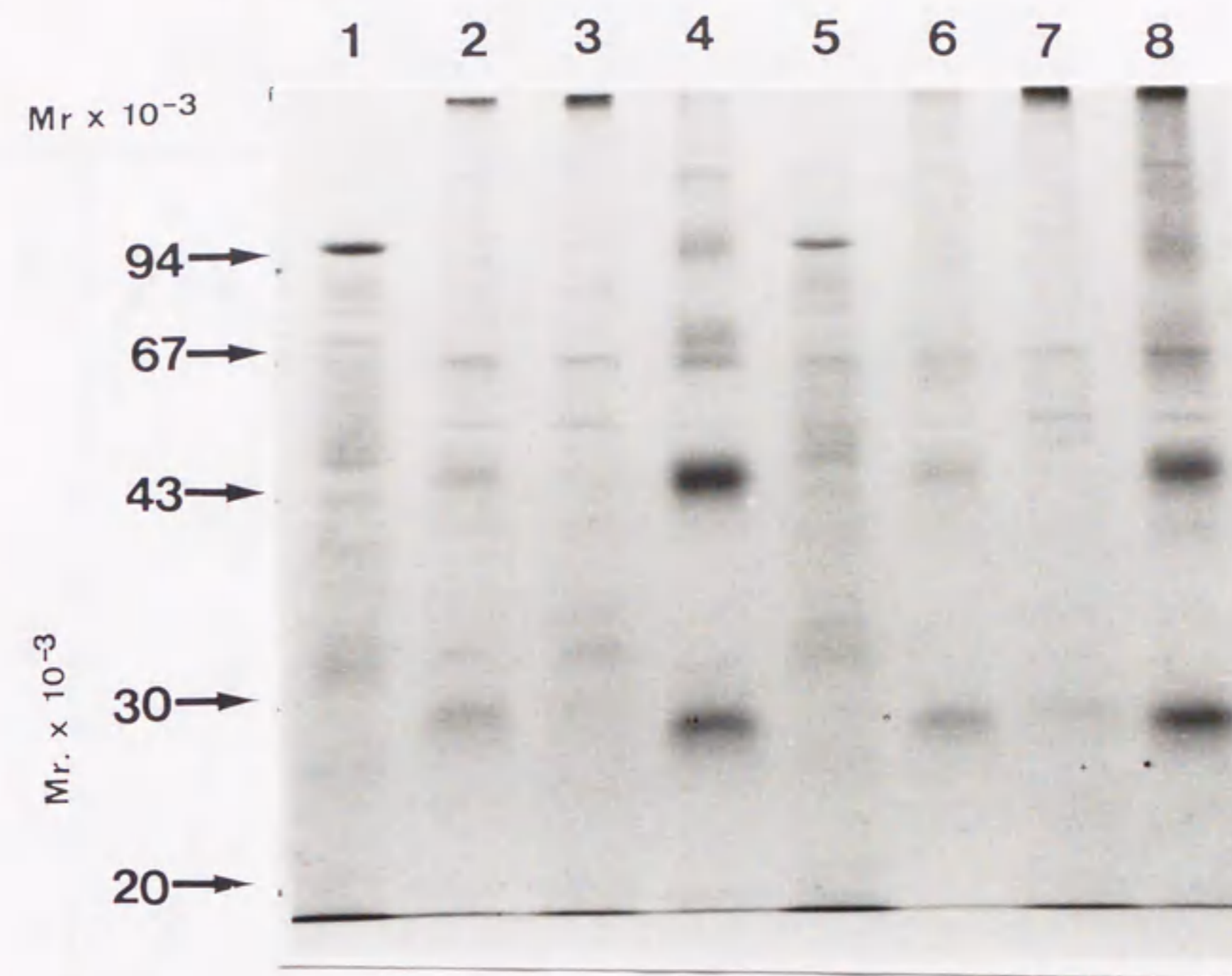


Fig. 2-4 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of proteins in the plasma membrane treated with detergents and the solubilized fractions. The plasma membrane were treated with deoxycholate or Triton X-100, then solubilized with Zwittergent 3-14 or lysolecithin as described in Materials and Methods. Polypeptides (about 50  $\mu$ g) were precipitated with 10% (w/w) TCA and washed once with an ethanol:ether (1:1) mixture, followed by dissociation and electrophoresis on a 10% (w/v) polyacrylamide gel. Lane 1 and 5, plasma membrane; lane 2, deoxycholate-treated membrane; lane 3, Zwittergent - solubilized fraction; lane 4, membrane fraction after solubilization with Zwittergent; lane 6, Triton X-100-treated membrane; lane 7, lysolecithin- solubilized fraction; lane 8, membrane fraction after solubilization with lysolecithin

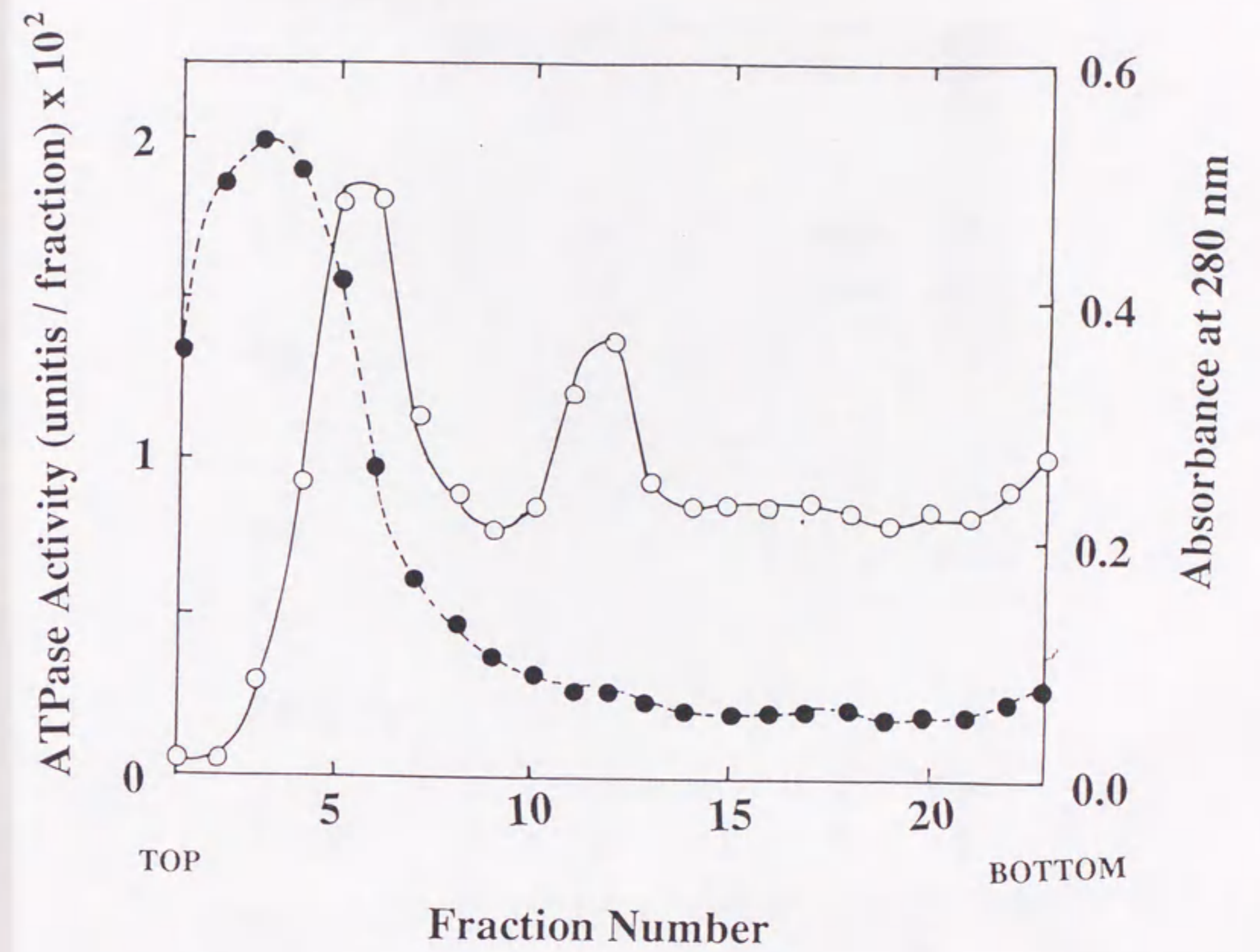


Fig. 2-5 (A) Distribution of ATPase activity after glycerol density gradient centrifugation of the solubilized fraction from 400g of mung bean hypocotyls. ATPase activity (O); Absorbance at 280 nm (●).

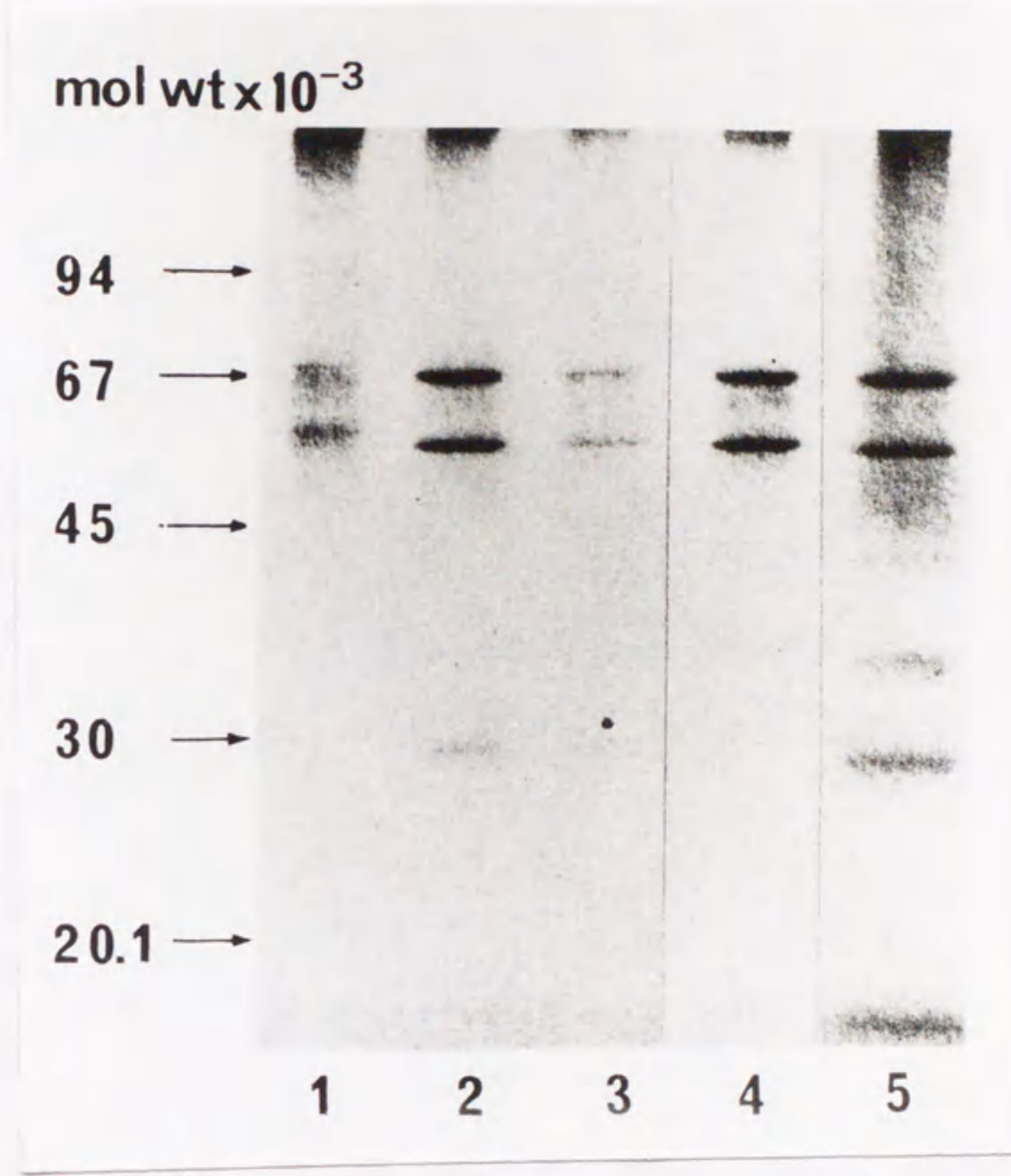


Fig. 2-5 (B) SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of active fractions after glycerol density gradient centrifugation of the solubilized fraction. Trichloroacetic acid was added at a final concentration of 10% to the fractions No. 11 (lane 1), 12 (lane 2), 13 (lane 3), 14-22 (lane 4) as well as to the plellet (lane 5) after glycerol density gradient centrifugation, and the precipitates were electrophoresed on the gel. After electrophoresis, the gel was stained with Coomassie brilliant blue R.

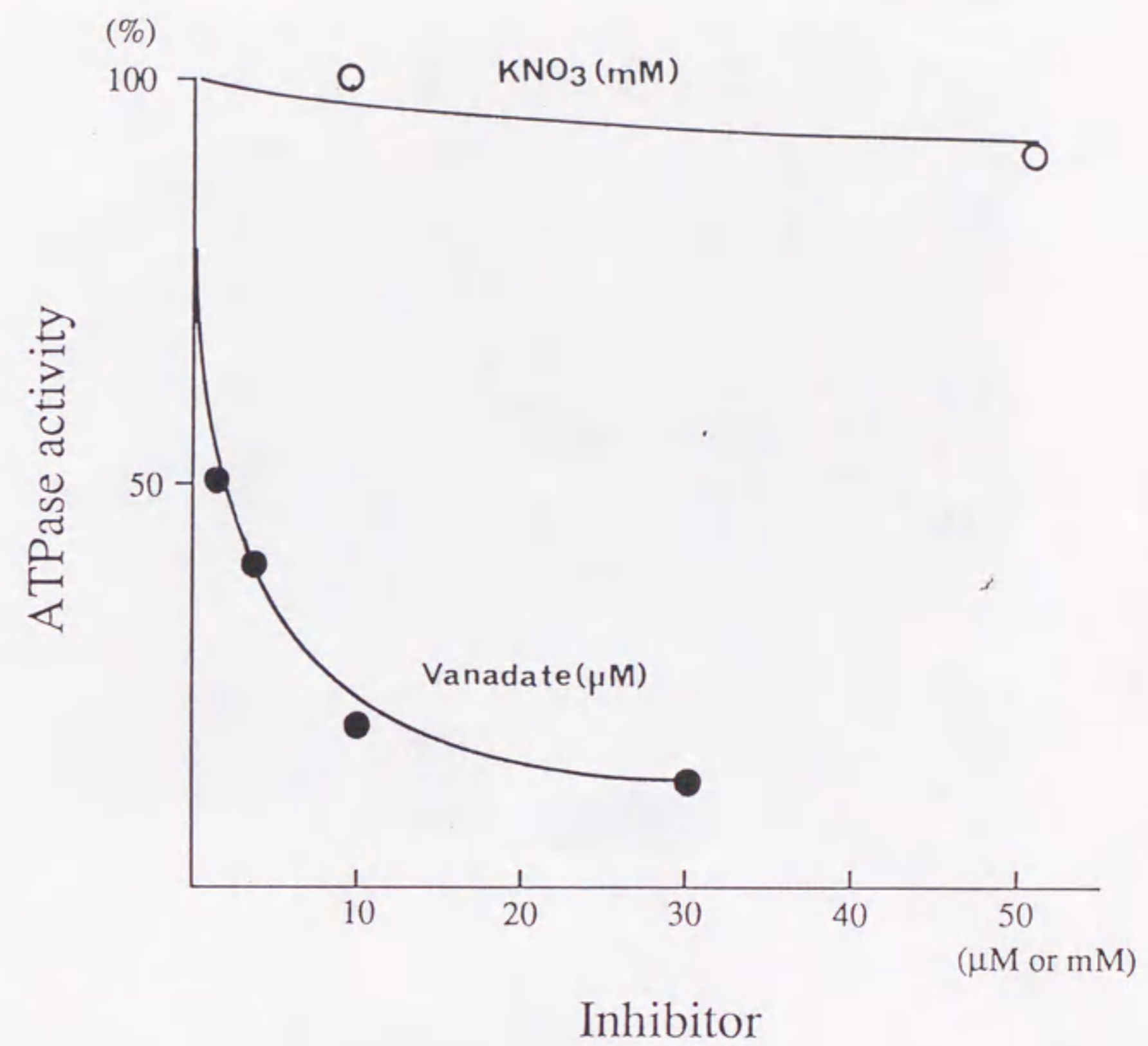


Fig. 2-6 Effects of vanadate and nitrate on the purified ATPase. The upper fractions after glycerol density gradient centrifugation was assayed for ATPase activity in the presence of vanadate (●) or nitrate (○). The activity is expressed as the percentage relative to that in the absence of vanadate and nitrate.

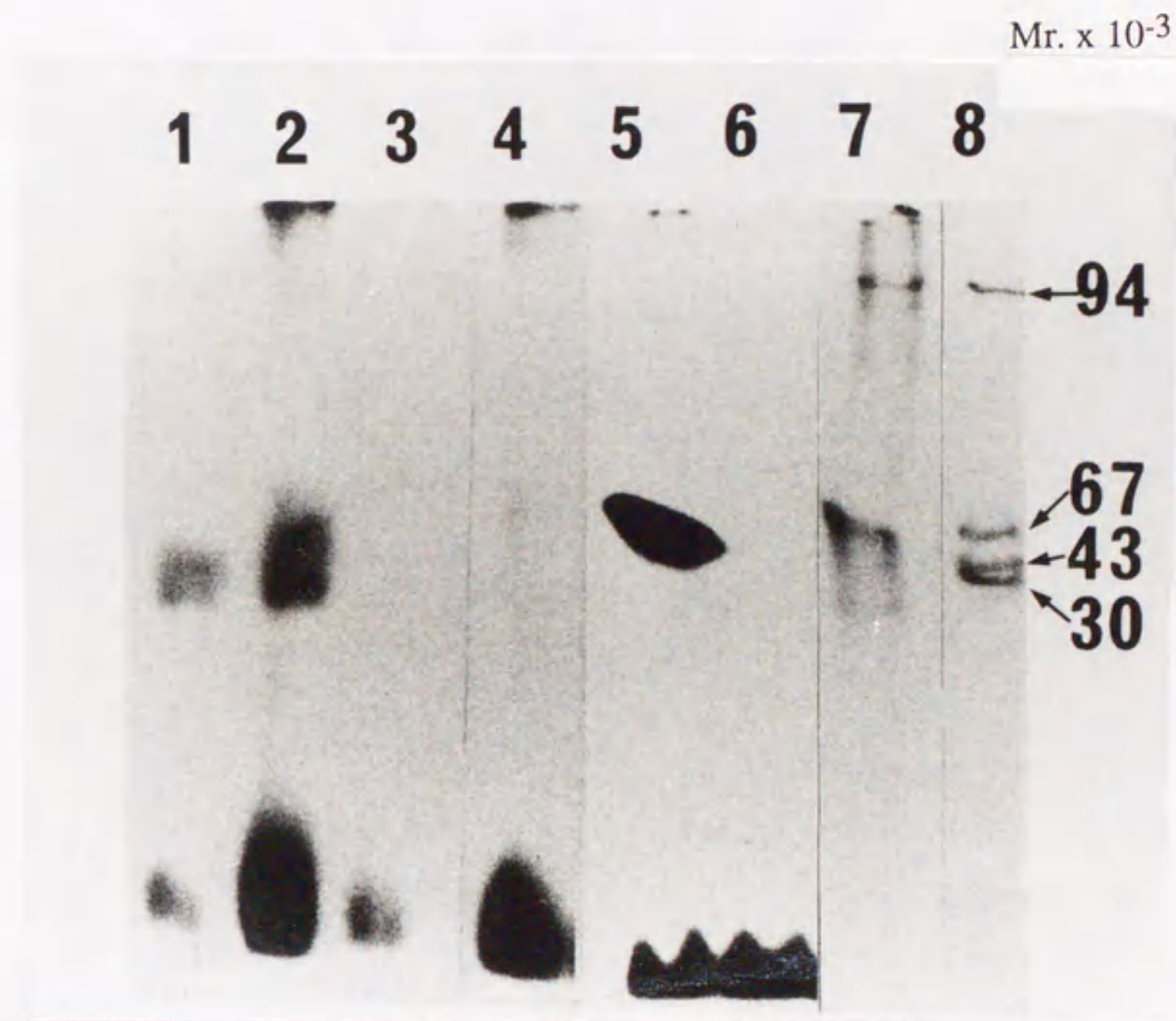


Fig. 2-7 Electrophoresis of [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-ATP labeled polypeptide(s) on the TDAB-polyacrylamide gel. The polypeptides were labeled and electrophoresed as described in Materials and Methods and made visible by autoradiography. Lanes 1 and 4, labeled for 30 s; lanes 2 and 5, labeled for 3 min; lanes 3 and 6, chased for 5 s after labeling for 3 min. Lanes 1-3, the plasma membrane fraction prepared as described in Materials and Methods; lanes 5-7, the plasma membrane fraction prepared in the presence of 1 mM PMSF in the homogenizing medium; lane 7, stained with Coomassie brilliant blue R; lane 8, molecular weight markers.

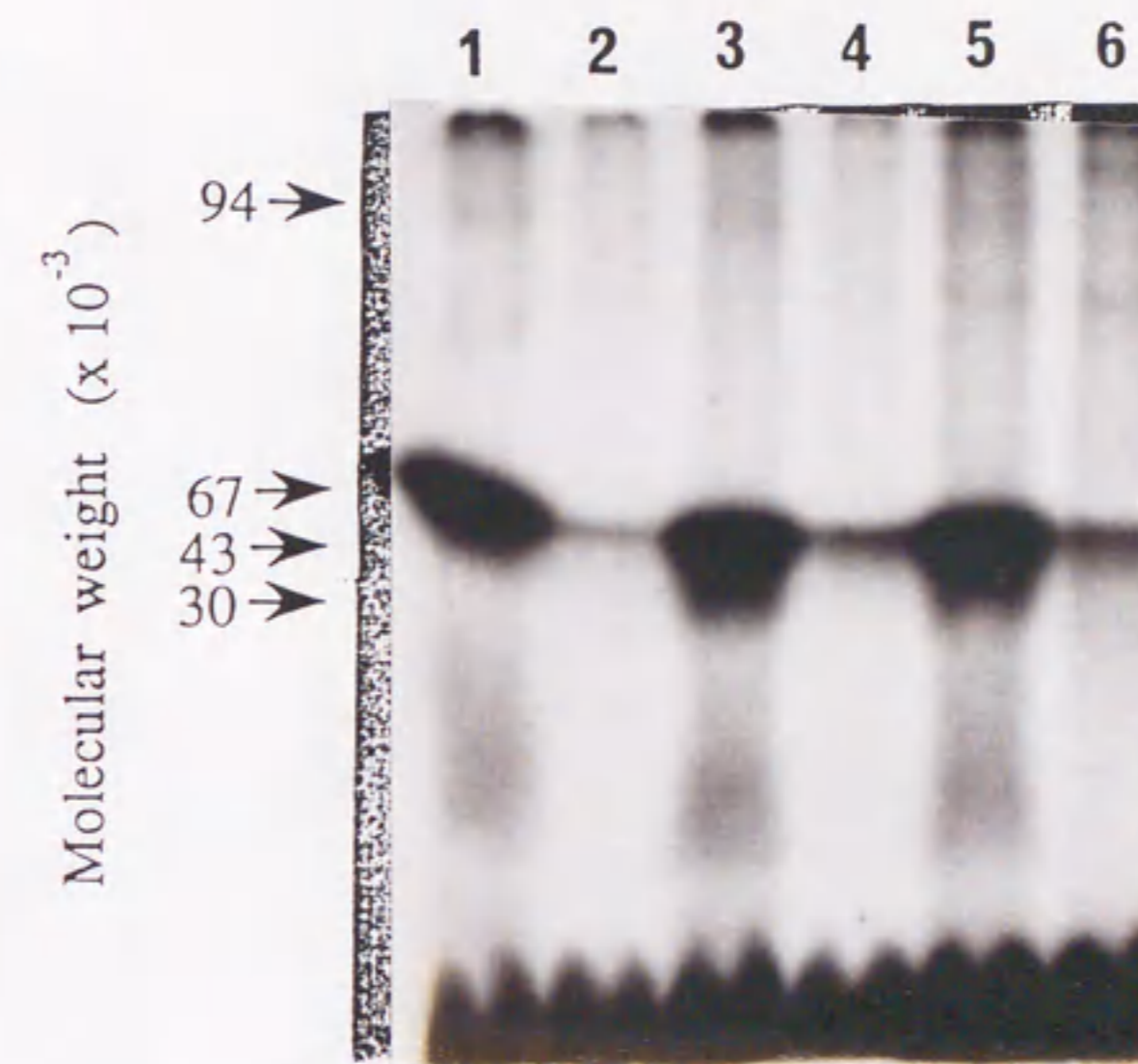


Fig. 2-8 Electrophoresis of polypeptide(s) labeled with  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$  on the TDAB-polyacrylamide gel. The polypeptides in the plasma membranes from mung bean roots (lanes 1 and 2), roots and hypocotyls (lanes 3 and 4) and hypocotyls (lanes 5 and 6) were labeled and electrophoresed as described in Materials and Methods. They were **visualized** by autoradiography. Lanes 1, 3 and 5, labeled for 30 s; lanes 2, 4 and 6, chased for 5 s after labeling for 30 s.

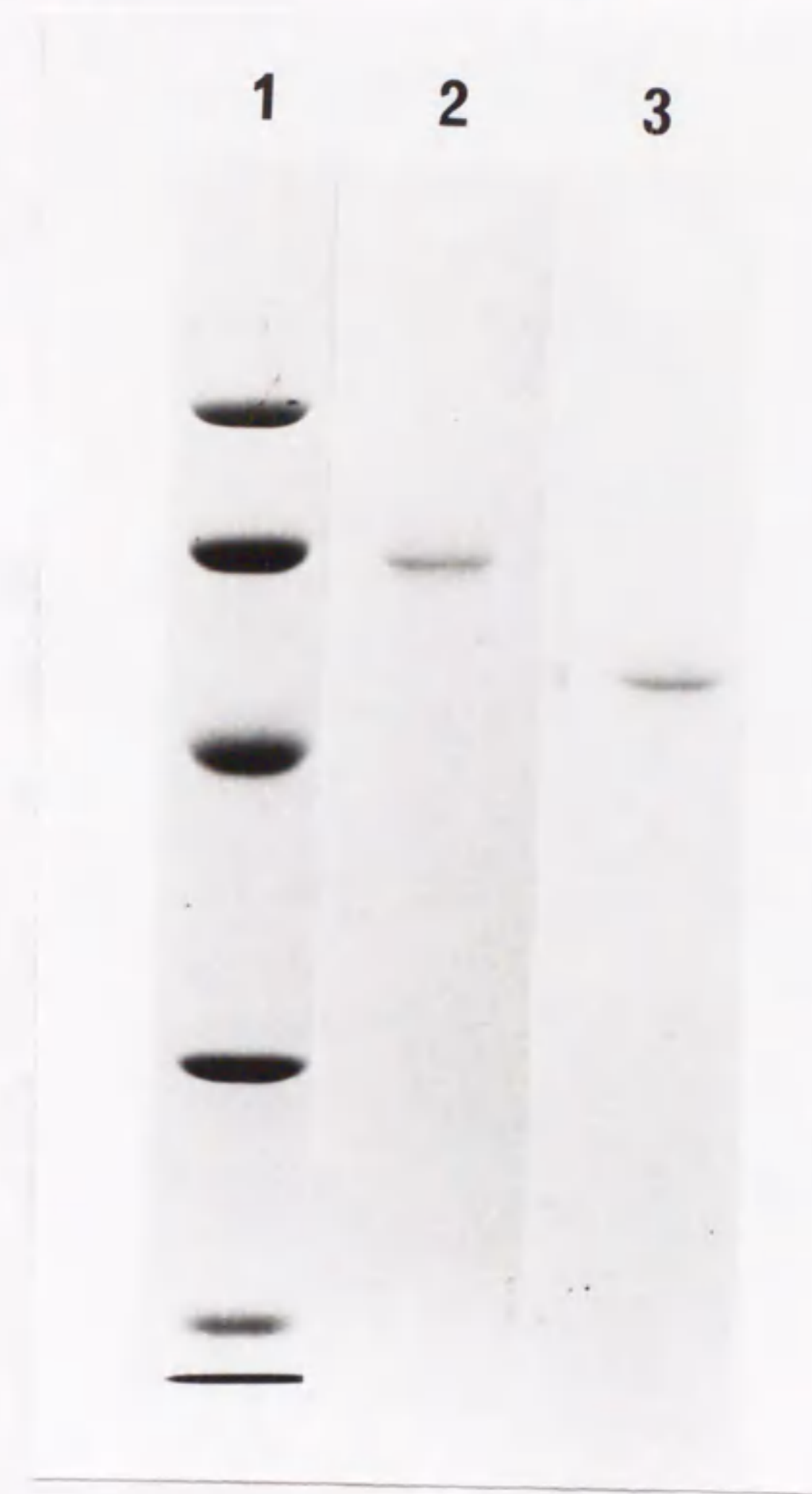


Fig. 2-9 SDS-poyacrylamide gel electrophoresis of isolated 55-kD and 67-kD polypeptides. The polypeptides were isolated from the Zwittergent-solubilized fraction as described in Materials and Methods. Lane 2, 67-kD polypeptide; lane 3, 55-kD polypeptide; lane 1, molecular weight markers (phosphorylase b, 94kD; bovine serum albumin, 67kD; ovalbumin, 43kD; carbonic anhydrase, 30kD).

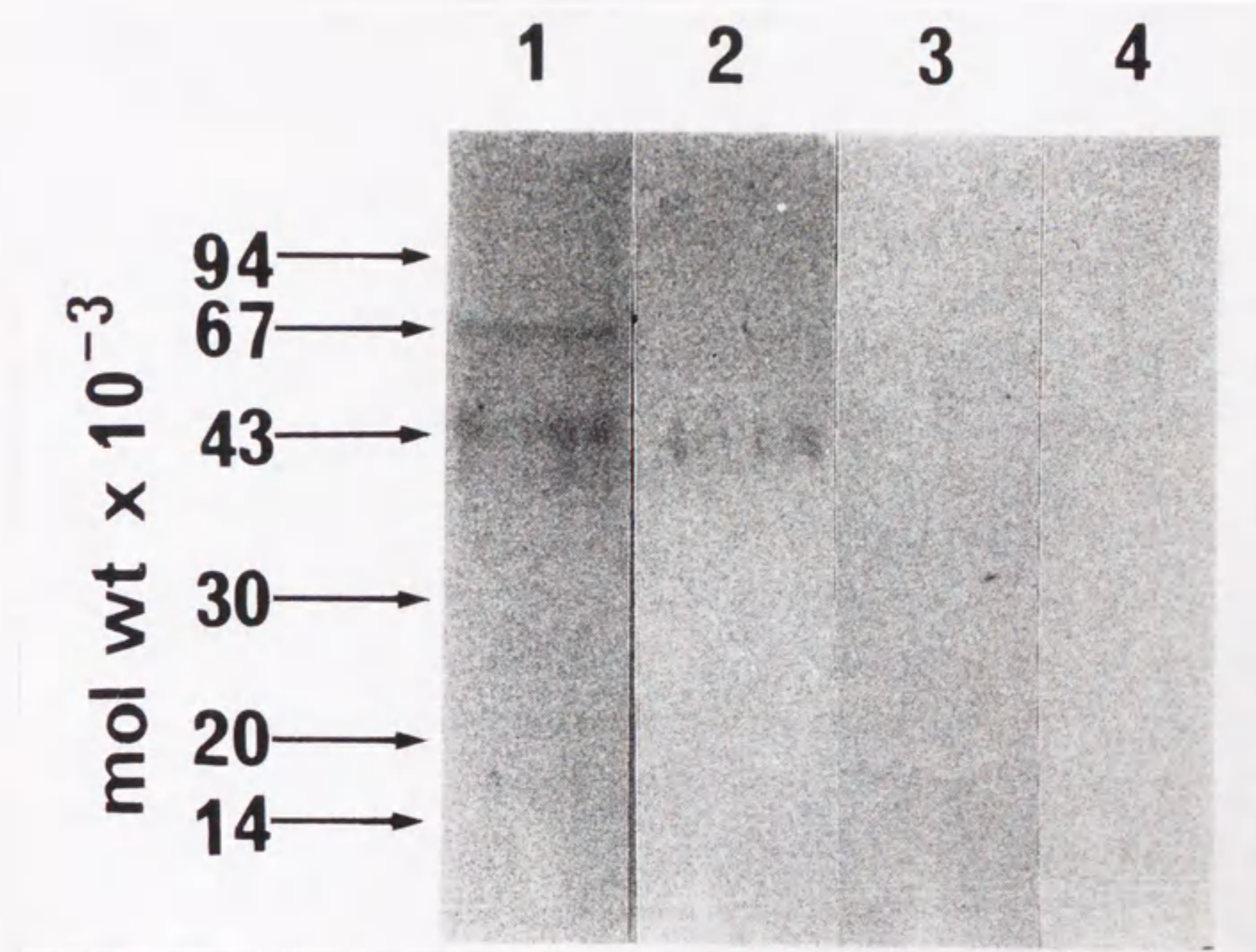


Fig. 2-10 Immunoblot analysis of the reactivity of antisera. The most purified fraction (5  $\mu$ l of fraction No.6 after glycerol density gradient centrifugation; cf. Fig. 2-12A) was electrophoresed on SDS-polyacrylamide gels and the gels were subjected to immunoblot analysis using the antisera (diluted 100-fold) to the 67-kD polypeptide (lane 1), to the 55-kD polypeptide (lane 2), to maize root plasma membrane ATPase (lane 3) or non-immune serum (lane 4).



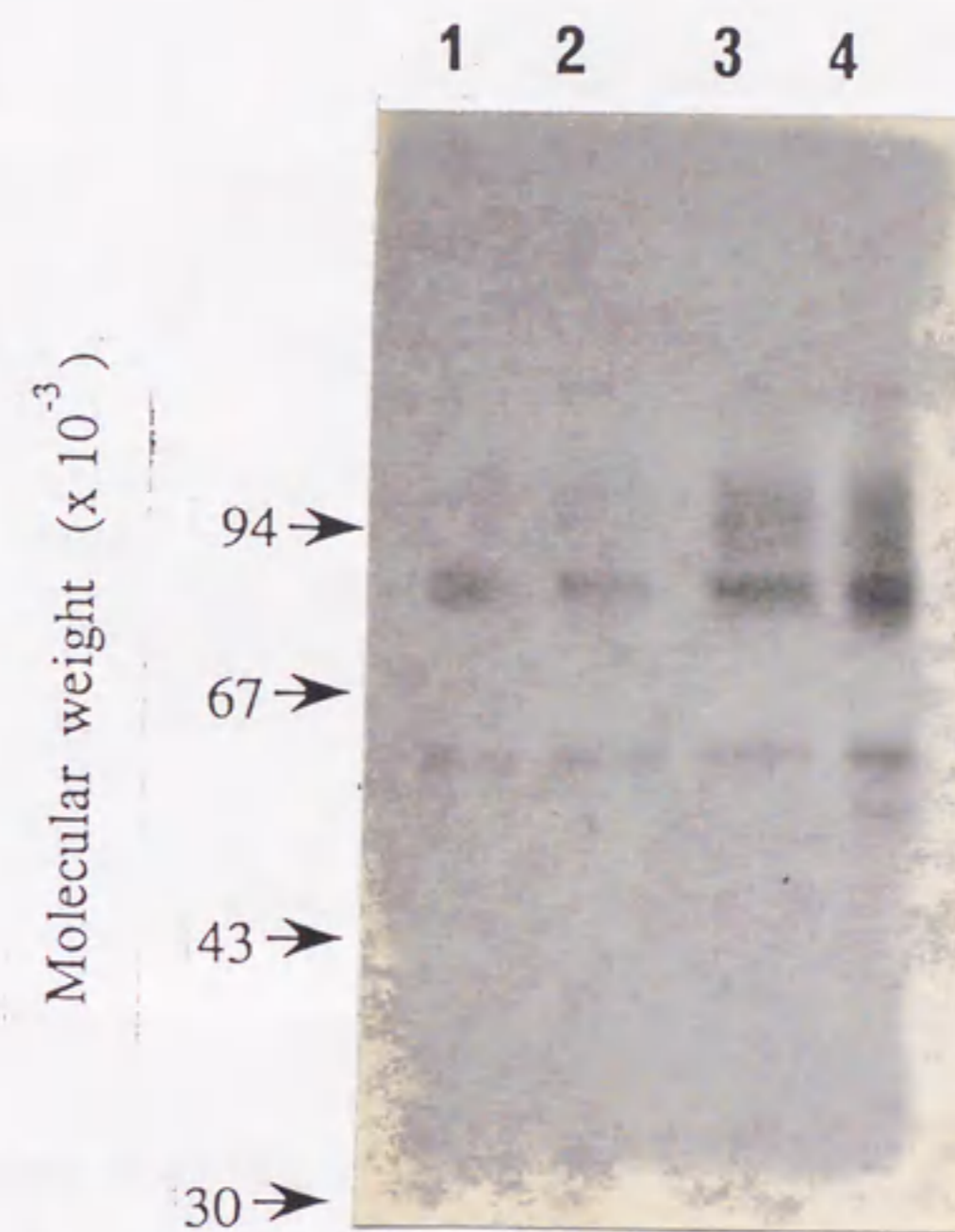


Fig. 2-11 Immunoblot analysis of the preparation after each step of purification. About 50  $\mu$ g of proteins was electrophoresed on the SDS-polyacrylamide gel and the gel was immunoblotted as described in Materials and Methods. Lane 1, plasma membrane; lane 2, Triton X-100-treated membrane; lane 3, lysolecithin-solubilized fraction; lane 4, fraction No.6 after glycerol density gradient centrifugation.

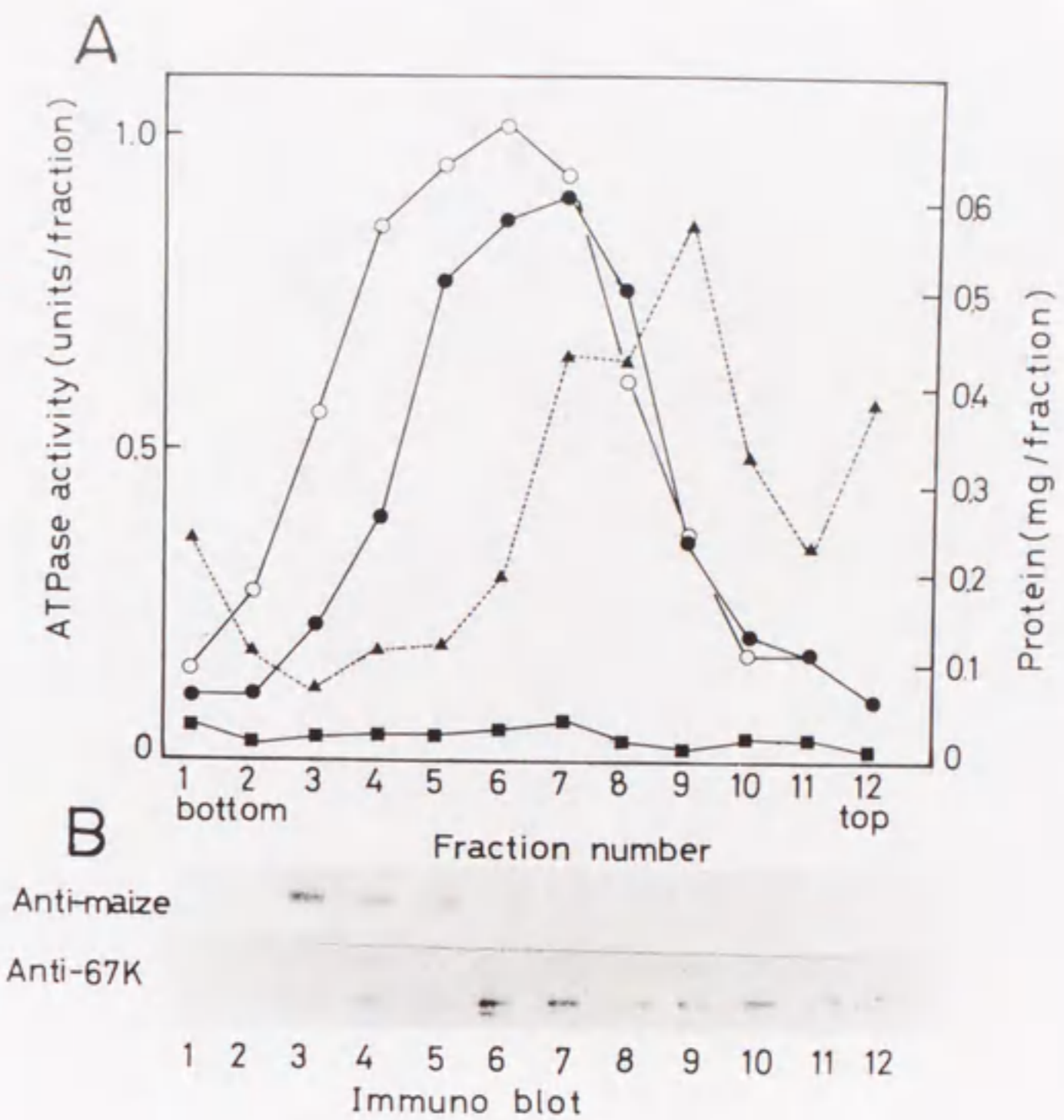


Fig. 2-12 Distributions of ATPase activity and immunoreactive polypeptides after glycerol density gradient centrifugation of the lysolecithin-solubilized fraction from 600 g of hypocotyls. A: Distributions of ATPase activity and protein; ●, activity in the absence of lysolecithin; ○, activity in the presence of 0.1mg/ml lysolecithin; ■, activity in the presence of 0.1 mM vanadate and in the absence of lysolecithin; ▲, protein. B: Distributions of immunoreactive polypeptides. Upper panel, a 100kD polypeptide immunoreactive with antibody to maize root plasma membrane ATPase ( the polypeptide was visualized with  $^{125}\text{I}$ -protein A and autoradiography); lower panel, a 67kD polypeptide immunoreactive with antibody to the 67kD polypeptide ( the polypeptide was visualized with horse radish peroxidase-linked protein A and enzyme activity staining).

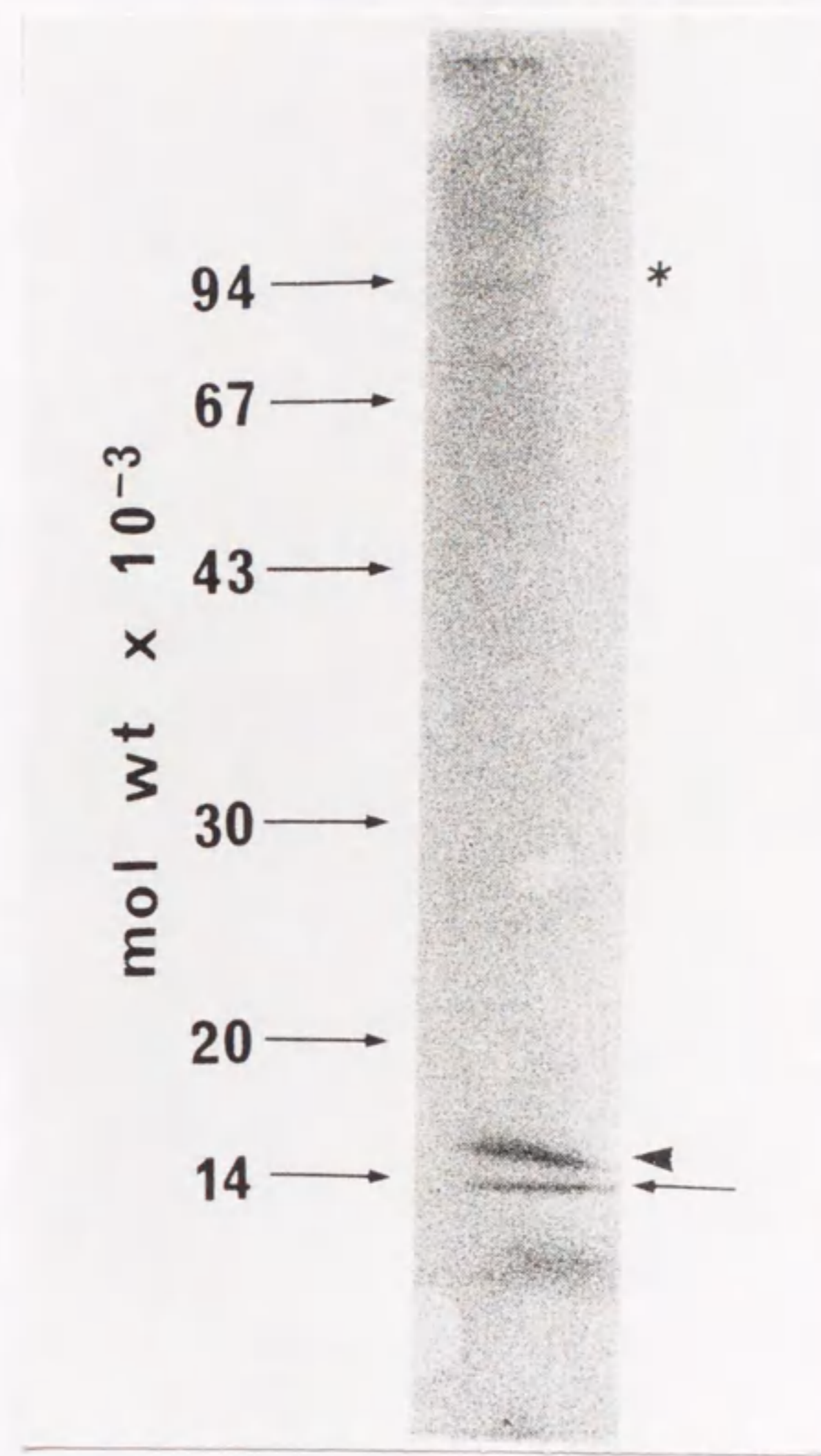


Fig. 2-13 Electrophoresis of DCCD-binding polypeptides on SDS-polyacrylamide gel. The most purified fraction was incubated with [<sup>14</sup>C]-DCCD and electrophoresed on an SDS-polyacrylamide gel as described under Materials and Methods and the DCCD binding polypeptides were visualized by fluorography. Arrowhead, major DCCD-binding polypeptide; asterisk, minor DCCD-binding polypeptide; arrow, dye front.

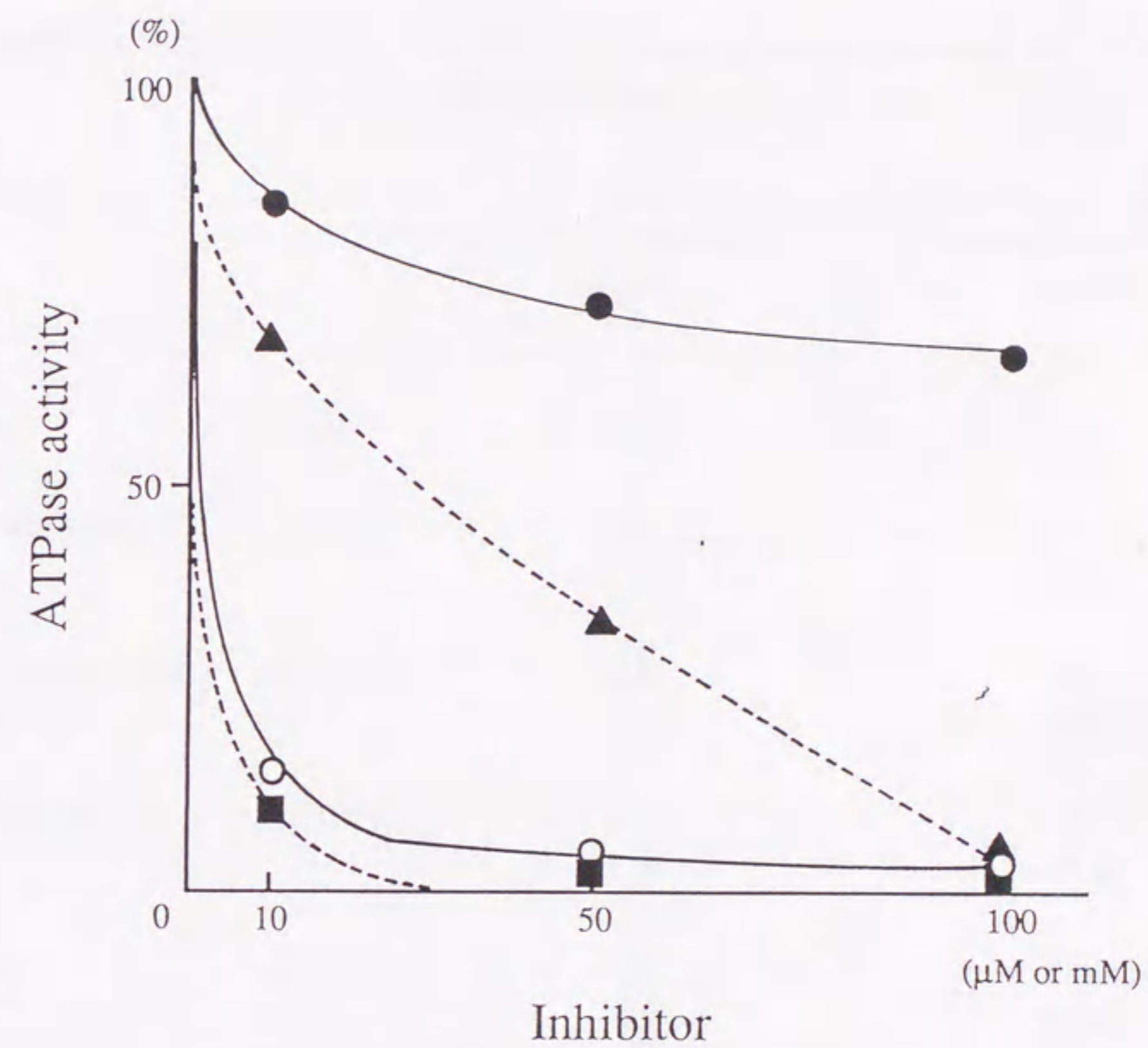


Fig. 2-14 Effects of various inhibitors on the partially purified ATPase. Fraction No. 6 after glycerol density gradient centrifugation were assayed for ATPase activity in the presence of vanadate (O), DES (■), DCCD (▲) or KNO<sub>3</sub> (●) at the indicated concentrations; μM for vanadate, DES and DCCD and mM for KNO<sub>3</sub>.



Table 2-1

Recovery of protein and marker enzyme activities after purification of plasma membrane fraction from crude microsomal fraction

		Crude microsomal fraction	Plasma membrane fraction
Protein	(mg)	27.6	2.16
Cytochrome <u>c</u> oxidase	(nmol / min)	9,081 (329)	82 (24)
NADPH-cytochrome <u>c</u> reductase	(nmol / min)	1,942 (70)	26 (12)
Glucan synthase II	(pmol / min)	72 (2.6)	17 (7.8)
ATPase	( $\mu$ mol / min)	7.16 (0.26)	0.74 (0.34)

Table 2-2

Effects of ions and inhibitors on ATPase activity in isolated plasma membrane  
from mung bean hypocotyl

	Plasma membrane fraction (%)	Crude microsomal fraction (%)
Control	100	100
+Azide (1mM)	98	78
+DCCD (50 $\mu$ M)	64	63
+DES (1mM)	51	63
+Vanadate (10 $\mu$ M)	28	31
-KCl	92	87
-MgSO <sub>4</sub>	26	50

Table 2-3

Purification of mung bean hypocotyl plasma membrane ATPase solubilized with Zwittergent 3-14

Fraction	total		specific		purification			
	protein (mg)	activity (units)	activity (units/mg protein)	grade (fold)				
Plasma membrane fraction	4.32	1.46	0.34		1			
Zwittergent 3-14 extract	1.08	1.69	1.56		4.6			
Fractions after glycerol density gradient centrifugation	Top	Middle	Top	Middle	Top	Middle		
	0.42	0.11	0.46	0.45	1.10	4.10	0.7	2.6

Table 2-4

Partial purification of mung bean plasma membrane ATPase solubilized with lysolecithin

Fraction	total protein (mg)	total activity (units)	specific activity (units/mg protein)	purification grade (fold)
Plasma membrane	8.89	1.91	0.22	1.0
Lysolecithin extract	1.37	6.51	4.75	22
Fraction No.6 after glycerol density gradient centrifugation	0.13	0.78	6.22	29



Table 2-5

Effects of ions and inhibitors on partially purified ATPase solubilized with lysolecithin

	concentration (mM)	relative ATPase activity (%)
Control	----	100
-KCl	----	96
-MgSO <sub>4</sub>	----	4
+Azide	0.5	92
+Vanadate	10	14
+KNO <sub>3</sub>	100	66

Table 2-6  
Subunit structure and specific activity of ATPase from different sources

	Number of subunits	Molecular weights of subunits x 10 <sup>-3</sup>	Specific activity (units/mg protein)	Reference
Dog kidney Na <sup>+</sup> -K <sup>+</sup> -ATPase	2-3	100 32 11	32	99
Dog gastric mucosa H <sup>+</sup> -ATPase	1	100	1.8	100
Sarcoplasmic reticulum Ca <sup>2+</sup> -ATPase	1	100	4.0	101
Neurospora plasma membrane H <sup>+</sup> -ATPase	1	100	98	102
Saccaromyces cerevisiae H <sup>+</sup> -ATPase	1	100	4.0	103
Oat root plasma membrane H <sup>+</sup> -ATPase	1	100	6.0	55
Tomato root plasma membrane H <sup>+</sup> -ATPase	1	93	17.6	56
Corn root plasma membrane H <sup>+</sup> -ATPase	1	93	4.7	57
Corn shoot plasma membrane H <sup>+</sup> -ATPase	1(?)	93(?)	2.5	58
Mung bean root plasma membrane H <sup>+</sup> -ATPase	1(?)	100 (67) (55)	2.7	90
Mung bean hypocotyl plasma membrane H <sup>+</sup> -ATPase	1 and 3(?)	93, 67 55·19	6.7	This study