

## 別紙 4

報告番号	※ 甲 第 号
------	---------

## 主 論 文 の 要 旨

論文題目 植物の細胞膜プロトンポンプの活性制御機構の解析

氏 名 林 優 紀

## 論 文 内 容 の 要 旨

植物の細胞膜に存在する細胞膜  $H^+$ -ATPase は、ATP 加水分解エネルギーを利用して細胞外へ  $H^+$  を能動輸送し、細胞膜を挟んだ  $H^+$  の電気化学ポテンシャル勾配を形成することで様々な二次輸送体を介した物質輸送を駆動し、細胞膜電位や細胞内外の pH 調節など植物細胞の恒常性維持に関与している。これまでの研究により、 $H^+$ -ATPase の C 末端から 2 番目のスレオニン (Thr) 残基のリン酸化とリン酸化 C 末端への 14-3-3 タンパク質の結合が、植物細胞に共通した主要な  $H^+$ -ATPase の活性化機構であることが明らかとなっている。しかしながら、C 末端 Thr 残基のリン酸化・脱リン酸化に関わるプロテインキナーゼやホスファターゼは未だ同定されておらず、その生化学的性質についても不明であった。

本研究では、シロイヌナズナ黄化芽生えより単離した細胞膜における *in vitro* での  $H^+$ -ATPase 脱リン酸化反応系を確立し、明らかにしたホスファターゼの生化学的性質に基づきホスファターゼの同定を目指した。解析の結果、 $H^+$ -ATPase が細胞膜画分中で脱リン酸化され、脱リン酸化は 2 価カチオンキレート剤である EDTA によって特異的に阻害された。さらに、脱リン酸化は  $Mg^{2+}$  または  $Mn^{2+}$  依存性を示したことから、 $H^+$ -ATPase の脱リン酸化には、細胞膜に局在するタイプ 2C プロテインホスファターゼ (PP2C) が関与することが示唆された。また、脱リン酸化は、細胞膜を界面活性剤 (1% Triton X-100) 処理した不溶性画分においても観察されることから、 $H^+$ -ATPase とホスファターゼは複合体を形成していることが示唆された。そこで、 $H^+$ -ATPase 特異的抗体を用いて免疫沈降を行い、いくつかの共同沈降タンパク質と共に  $H^+$ -ATPase 複合体を精製することに成功した。さらに、逆遺伝学的手法により、シロイヌナズナに存在する 76 の PP2C 遺伝子から、細胞膜局在と発現パターンを指標に絞り込みを行い、7 遺伝子の候補を得た。続いて、候補 PP2C の  $H^+$ -ATPase に対する脱リン酸化活性を調べるため、 $H^+$ -ATPase を発現させた酵母を用いた実験系を確立した。解析の結果、候補 PP2C のうち At1g22280、At1g34750、At4g31750、At5g10740 が *in vitro* において  $H^+$ -ATPase を脱リン酸化することを見出した。そこで、T-DNA 挿入株が入手可能だった At4g31750 と At5g10740 についてさらに解析を行った。入手した変異体に加えて、過剰発現株を作成して  $H^+$ -ATPase のリン酸化レベルや気孔の表現型を解析したが、野生株や背景植物と比べて顕著な差は観察されなかった。本研究により、植物

細胞内において候補 PP2C が  $H^+$ -ATPase を脱リン酸化しているかは明らかにできなかったものの、 $H^+$ -ATPase を直接脱リン酸化するホスファターゼを初めて見出すことに成功した。今後は、更なる解析によりホスファターゼの同定を進めていきたい。

ところで、植物ホルモン・アブシジン酸 (ABA) は植物の成長や細胞増殖、細胞伸長の制御など植物において様々な生理現象を制御している。ホスファターゼ分子の探索を進める過程で、ABA によって黄化芽生えの胚軸伸長が抑制されていること、この抑制は  $H^+$ -ATPase C 末端 Thr 残基の脱リン酸化を介して行われていることを新たに見出した。ABA による胚軸伸長抑制と  $H^+$ -ATPase の脱リン酸化は、非感受性変異体 *abil-1* では観察されなかったことから、ABA シグナル伝達初期応答因子 ABI1 が ABA による胚軸伸長阻害と ABA 誘導性の  $H^+$ -ATPase 脱リン酸化を調節していることが示唆された。

近年の研究により、花成ホルモンとして同定された *FLOWERING LOCUS T* (*FT*) が  $H^+$ -ATPase の活性化を介して気孔開口を調節している可能性が示唆されていた。そこで、維管束や葉肉細胞といった孔辺細胞以外の細胞が大部分を占めるロゼット葉を用いて解析を行った結果、*FT* 過剰発現株の葉では野生株と比べ  $H^+$ -ATPase リン酸化レベルが高まっており、一方、*FT* 機能欠損変異体の葉では低下していることを見出した。そこで、ロゼット葉の横断切片の免疫染色により局在を調べた結果、 $H^+$ -ATPase は *FT* の発現部位である篩部伴細胞に多く存在することが明らかとなった。篩部伴細胞において  $H^+$ -ATPase は光合成産物の輸送を駆動していることが知られていることから、*FT* は葉の維管束の篩部伴細胞において  $H^+$ -ATPase を活性化し、光合成産物の転流を活性化する働きも担っているのかもしれない。これまで、茎頂分裂組織で花成ホルモンとして働く *FT* が葉で発現し、篩管流に乗って輸送される生理的意味は不明であったが、本結果は、*FT* が花成誘導において、花芽の形成のみならず光合成産物の転流促進も行うことで、栄養成長から生殖成長への転換を統合的に制御している可能性を示唆している。