

生体膜で輝く分子を探求する旅路

A Long Journey into Research on Brilliant Membrane Proteins

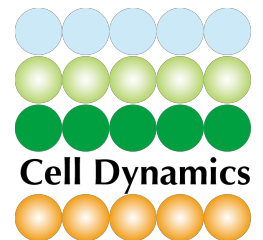
前島 正義

名古屋大学 生命農学研究科 細胞ダイナミクス研究室

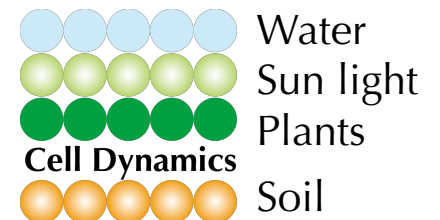
Masayoshi Maeshima

Laboratory of Cell Dynamics, Graduate School of Bioagricultural Sciences,

Nagoya University



- 1 大学運営の中で
- 2 研究と指導の視点
- 3 何ができたのか
- 4 伝えたいこと



大学運営の一端を担って

1984.12～1988.3	名古屋大学農学部	助手
1988.4～1994.3	北海道大学低温科学研究所	助手・助教授
1994.4～2001.6	名古屋大学生命農学研究科	助教授
2001.7～	名古屋大学生命農学研究科	教授

- ・ 安全保障委員会委員長 2005.4～ 2009.3、2014.4～ 2015.6
- ・ 原子力委員会委員長 2009.4～ 2013.3

2011.3.11 東日本大震災・東京電力原子炉事故

(学生・教職員を被曝から護る 事故対応への協力)

- ・ 生命農学研究科副研究科長・評議員 2011.4～ 2012.3
- ・ 生命農学研究科長 2012.4～ 2015.3
- ・ 副総長 2015.4～ 2019.3

評価・総合企画担当 (中期目標計画、年度実績報告)、IR 本部長、
リーディング大学院プログラム責任者 (3)・推進機構長、
博士課程教育推進機構長



2 研究と指導の視点

研究とは： 新しい分子を見出す
 新しい現象を見出す
 新しい概念を提案する

未知の分子をていねいに見る

分子から細胞と個体を見る



恩師 旭 正（助教授、教授：名古屋大学名誉教授）

泥臭い研究（やってみないと分からない研究）

→ 「私にふさわしい視点」

素人好みの研究、玄人好みの研究
流行の研究は自分のテーマとしない。

ウサギに免疫して抗体を得る方法：専門家を尋ねる

佐々木 實 名古屋市立大学教授

→ 研究室の卒論生・院生と共に、
国内外の専門家の門戸をたたく。



江上 不二夫 (1910-1982)

ひとに見えない山を見つけたら
ぼくは早く登りたい
そんな山があるかしら
ひとにも見える山に登るなら
ぼくはゆっくり登りたい
おもわぬ花や小石があるだろう
たのしみながら登りたい

笠井献一「科学者の卵たちに贈る言葉：江上不二夫がたえたかったこと」

岩波書店、p. 59



旅路のなかで見つめた「おもわぬ花や小石」

Cytochrome c oxidase Cytochrome bc_1 complex

Sporamin (sweet potato storage protein)

Alkaline lipase (glyoxysome)

Isocitrate lyase

H⁺-translocating pyrophosphatase

Vacuolar H⁺-ATPase

VM23 (vacuolar aquaporin, TIP)

Aquaporin (PIP, SIP)

Ca²⁺/H⁺ exchanger (CAX1)

Na⁺(K⁺)/H⁺ exchanger (NHX1)

Zn²⁺/H⁺ exchanger (MTP1, MTP12)

ABC type transporter (PDR8, ABCA9, ABCB1, ABCB14)

RVCaB (radish vacuolar Ca²⁺-binding protein)

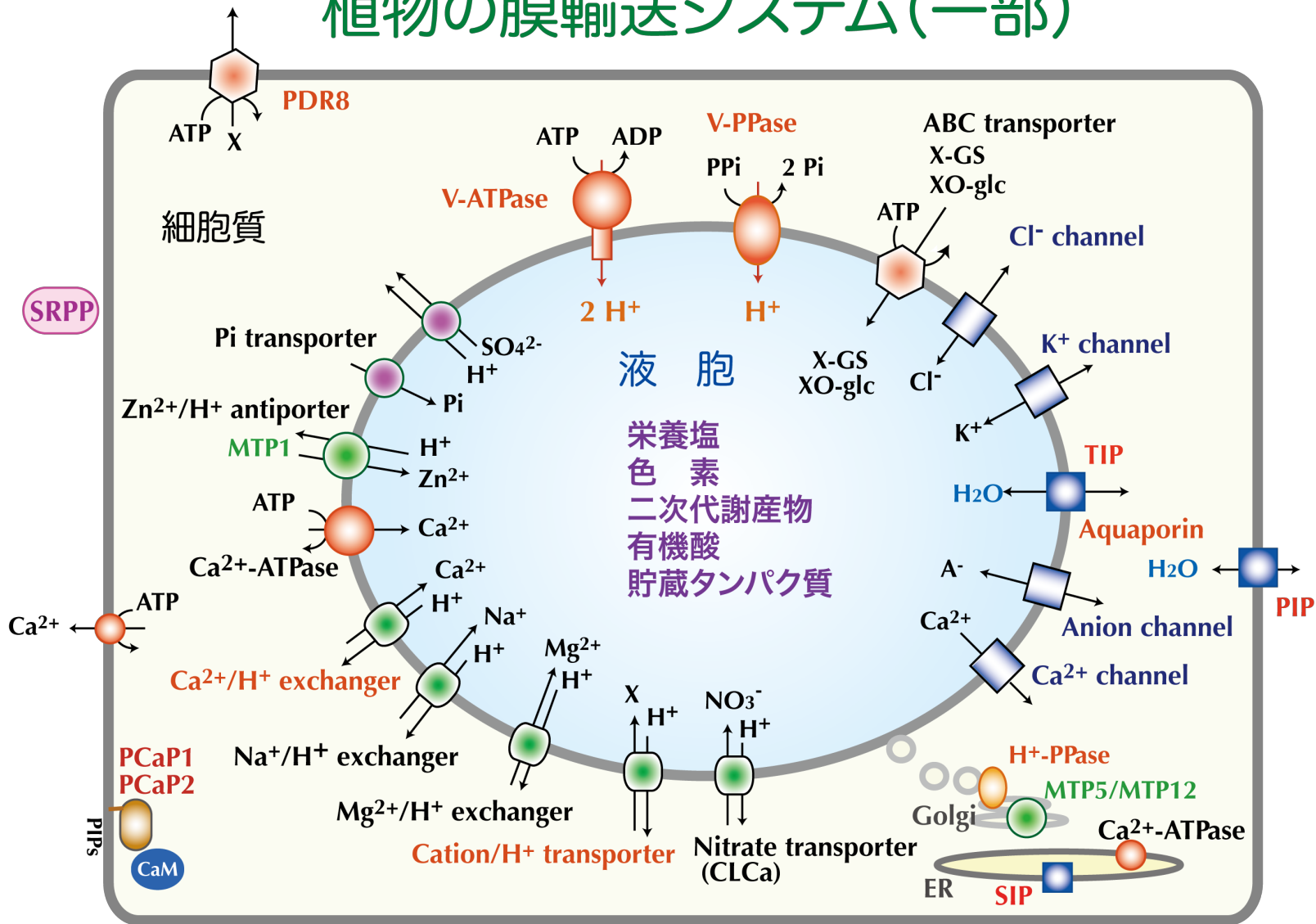
PCaP1, PCaP2 (Plasma membrane-associated Ca²⁺-binding protein)

SRPP (seed and root hair protective protein)

赤字: 分子に名付け



植物の膜輸送システム(一部)



液胞膜プロトンサーキット (H⁺循環)



研究室（生物化学 + 細胞ダイナミクス研究室）

卒論生：21 + 58 = 79名

修士課程修了生 2 + 12 + 44 = 58名

博士課程修了生 3 + 14 = 17名

北大博士 1 + 1 = 2名

研究室外の博士審査主査 3名

細胞ダイナミクス研究室教員

中西洋一 助教

河内美樹 高等研究院准教授

瀬上紹嗣 助教

田中奈月 YLC助教

博士研究員・学振PD・研究員

中西洋一、須賀しのぶ、三村久敏

神谷岳洋、広野めぐみ、小八重善裕

河内美樹、富岡利恵、藤原崇志、

佐藤世理

事務担当：山本洋子



個人研究情報 (個別 IR)

研究者人件費

実験機器

試薬、実験器具

国内外研究成果発表



英文原著論文 185編

平均引用度 60, h index = 61

投稿中論文 2編

英文総説・著書 15編

和文総説・解説 46編



研究者ネットワーク

313



競争的研究資金 778,000,000円

科研費
KAKENHI

科学研究費補助金：一般研究(C)、総合研究(A)、基盤研究(B)、基盤研究(A)、
重点領域研究、特別推進、特定領域研究、新学術領域研究

生研センター

民間財団研究費

民間企業研究費

A-STEP

POSTECH (韓国、客員教授)



共著者415名 (うち 海外研究者 123 名)

A	Tadashi Asahi Motoyuki Ashikari	Mariko Asaoka Takashi Aoyama	Keita Arakawa Elisa Azzarello	Reiko Akagi Andrés, Z	Kenji Aizawa	Marinela Anderca	Taro Akahori	Arifa Ahamed	Domingos Almeida	Takeshi Ario
B	Harry Beevers Büttner, M	M. Baltscheyfsky	Andrea Becker	Gwangbae Bak	J.-L. Bonnemanin	Sabine Brandt	Karla Billion	Lucien Bovet	Bo Burla	Aurélien Bailly
C	Kazuhiro Chiba Gap Chae Chung	Hervé Canut Giltso Choi	K. W. Cunningham Andrew J. Crofts	Kazuhiro Chiba Andrew J. Crofts	Yongwook Choi	Hyunju Choi	Hyung-Taeg Cho	José Hélio Costa	Zonghui Chen	Edgar B. Cahoon
D	J.-J. Drevon	Y. M. Drodowicz	Noriyuki Doke	Tomonori Doi	Drzewicka, K.					
E	Muneharu Esaka	Tatsuhiko Ezawa								
F	Ali Ferjani	Takashi Fujiwara	Yoichiro Fukao	Toru Fujiwara	Mayu Fukuda	Hidehiro Fukaki	Shiori Fujiwara	Natacha Fontes	Fernanda Fidalgo	Yumi Fujii
	P. Fleurat-Lessard Fink, F	Nathalie Frangne	Atsunori Fukuda	Takuya Furuichi	Masayuki Fujiwara	Keiko Fukushi	Masayuki Fujiwara	Jifí Friml	Dirce Fernandes de Melo	Masako Fukuda
G	Markus Geisler	Jrjolaine Girin	Hernâni Gerós	Tatsuaki Goh	Shizuka Gunji	H. Goto				
H	Tsukahō Hattori Megumi Hirono	Koji Hayashi Shin Hamamoto	I. Hara-Nishimura Kyohei Higashi	H.-P. Haschke Yuko T. Hanba	Giselbert Hinz Kohei Hamaji	Birgit Hoh Sei-ichiro Hasezawa	Tatsuji Higuchi Hidehiro Hayashi	Hiromoto Hisada Yoko Hattori	Hajime Hirata Goro Horiguchi	Shingo Hata Fumio Hayashi
	Kendal D. Hirschi	Jae-Ung Hwang	Sina Henrichs	Kaoyo Hashimoto	Seiichiro Hasezawa	Christopher A. Hamm	Hattori Momoko	Takumi Higaki	Tetsuya Higashiyama	Hell, R
I	Mikiko Ikeda Kazuki Ishikawa	Ikuko Iwasaki Masanori Ishida	Shino Imagawa Shuntaro Iida	Keiko Inoue Kozo Iwasaki	Yukimoto Iwasaki Shin-ichiro Inoue	Fumiyoishi Ishikawa	Yuki Ide	Jun Ishijima	Kazuei Igarashi	Satoru Ishikawa
J	Liwen Jiang	Byeongwook Jeon								
K	Takehiro Kamiya Kazuto Kobayashi Michie Kobayashi Mariko Kato	Minobu Kasai Tsuneo Kuwagata Kazuhito Kawakita Naoki Kato	Yoshihiro Kanayama Takehiro Kamiya Do-Young Kim Tetsu Kawazu	Naomi Kudo Hirosato Konishi Teruo Kuroda Rie Kurata	Y. Kanayama Yoshihiro Kobae Maki Katsuhara Sayaka Kogawa	N. Kurano Kawade, K. Takeshi Kawamura Ute Krämer	Taku Kashiyama Miki Kawachi Mariko Kura-Hotta Shin-ichiro Kato	Keiko Kawachi Maki Kondo Yu-Yoohg Kim Sangoo Kim	Yukio Kawamura Tadao Kondo Kiyoshi Katou Hanul Kim	Setsuko Komatsu Hirosato Konishi Yu-Young Kim Ria Kurata
	Natsumaro Kutsuna Yasushi Kawagoe	Yusuke Kikuchi Toshihiro Kumamaru	Tetsuya Kimura Krebs, M	Satoru Kinoshita Kinoshita, T.	Üner H. Kolukisaoglu	Kawade, K.	Md. Shahadat Hossain Khan	Yusuke Kimata	Takehide Kato	Daisuke Kurihara
L	Youngsook Lee	Ulrich Lüttge	Miyoung Lee	Eun-Jung Lee	Yuree Lee	He-sheng Li	Young Kounng Lee	Seong Hee Lee		
M	Makoto Matsuoka Tetsuro Mimura Miki Maeda Wataru Misuhashi Yukari Muto Nobutaka Mitsuda	Ken Matsuoka Enrico Martinoia Naoto Mitsuhashi Tetsuya Maruyama W. Allen Miller Mochizuki, A.	C. Matsuura-Endo Hisatoshi Mimura Shoshi Muto Philippe Michonneau Sakine Masuda Motchizuki, A	Yasuo Mukohata Shigeto Miyachi Mihoko Mori T. Matsunami Namiki Mitani Ai Miyake Miryo Morita	Chie Moritani Nao Matsuda Masahiro Mizutani Masashi Miyano Jian Feng Ma Chika Miwa Melchior, F.	Hideyo Muto Therese Mandel Masashi Miyano Junichiro Marui Haruki Mori Miki Miwa Mikio Nishimura	Miki Maeda Masanori Murakami Yasuo Mori Junichiro Marui Haruki Mori Miyo T. Morita Ryousuke Morimoto	Hideaki Matsumoto Mari Mimura Yoshiyuki Murata Naoko Miki Chikahiro Miyake	Gerard Marigo Mari Mimura Yoshiyuki Murata Shin-ichi Miyazawa Kazumi Momono Shigeru Morishima	Francis Marty Nao Matsuda Shin-ichi Miyazawa Kazumi Momono Shigeru Morishima
N	Kenzo Nakamura Shuji Nakagawa Tomoaki Niimi	Tsuyoshi Nakagawa Satoshi Niikura Ikuo Nishida	Yoichi Nakanishi H. E. Neuhaus Yukari Nakabayashi	Beston F. Nore Nahoko Nagasaki N. Nagasaki-Takeuchi	Pål Nyrén Chisako Nagata	Mikio Nishimura Hirosahi Nonami	Tomoko Nakajima Kiyoshi Nagasuga	Tadakiyo Nakamura Megumi Nagira	Tsuyoshi Nakayasu Akihiko Nakano	Atsuko Nakamura Yuka Nishimori
O	Yoshinori Ohsumi	Yoko Ohta	Masato Odaira	Yasunobu Okada	Yuko Ohshima	Miwa Ohnishi	Yoshiji Okazaki	Makoto Ojika	Yuya Ouchi	Masumi Okada
	Yoshihisa Oda	Shohei Okuda	Yoza Okazaki	Hirofumi Ono	Luciana Maia Nogueira de Oliveira	Masahiro Ogawa	Maria de Lourdes Oliveira	Thomas W. Okita	Okada, T.	Oikawa, A.
P	Natalia A. Pronina	Thomas E. Phillips	Jon K. Pittman	Sonia Plaza	Nadine Paris	soon Ju Park	Park, J.	Patir-Nebioglu		
Q	Filipa Queirós									
R	Raphael Ratajczak	David G. Robinson, Masa H. Satoh	Md. H. Rahman Sachiko Satoh	Philp A. Rea Yoko Sakai-Nore	Sally W. Rogers Toshiyuki Sato	Jon C. Rogers Yasushi Senoo	Ji Ye Rhee Katsuhiro Shiratake	Lawrence B. Smart	Hiroshi Sato	Shinichi Sawada
S	Shinobu Sata Ken-ichiro Shimazaki	Rachid Serraj	Takayuki Sasaki	Teruo Shimmen	Yasuo Suzuki	Maki Sasaki	Anton R. Schäffner	Takanori Saijo	Song, W.Y.	Toshiro Shigaki
	Burkhard Schulz Pauro Silva	Taisei Shimaoka Shingo Sakamoto	Takashi Sazuka Chihong Song	Takuji Sasaki Kazuki Saito	Kosuke Shimogawara Toshinobu Suzaki	Junko Sakurai Heven Sze	Tetsuro Sekino Alexander Schulz	Shoji Segami Donghwan Shim	Momoe Suito Kumi Sato-Nara	Yoshihito Shiono Yori Sato
	Katsuharu Saito Schuck, S.	Ryosuke Sato Schumacher, K	Seiji Sonobe	Yuki Shinzaki	Tomohiro Sato	Coimbatore S. Sreevidya	Mio Satoh-Cruz	Alana Cecília de Menezes Sobreira	aya Sugino	Stankovic-Valentin, N.
T	Atsuko Takeuchi Masao Tasaka Tomohiko Tsuge	Yoshiyuki Tanaka Ayako Tsuchihira	Yuka Takeuchi Yuma Takemoto	Ayako Takasu Hirokazu Tsukaya	Tomohiro Tsuchiya Natsuki Tanaka	Yoshie Tanimura Mari Takusagawa	Tomoko Tsujimura Takaaki Tomoyama	Ken-ichi Tomizawa Kazuki Takahashi	Rie Tomioka Hiromitsu Tabeta	Keitarou Tawaraya Mayuki Tanaka
U	Ikuzo Uritani	Kimiko Umami	H. Ueoka-Nakanishi	Tomohiro Uemura	Matsuo Uemura	Nobuyuki Uozumi	Daisei Ueno	Yumi Uenishi	Hiroshi Uno	Minako Ueda
V	Fakrieh Vojdani	Vincent Vincenzetti	Paramasivan Vijayapalani							
W	Thea A. Wilkins	Yoko Watanabe	Yoh Wada	S. Washitani-Nemoto	Satoshi Watanabe	Tadao Wagatsuma	Bangjun Wang	Liuying Wen	Haruhiko Washida	Isamu Yabe
Y	Hiroyuki Yokoi Akiho Yokota Hisakazu Yamane	Shizuo Yoshida Kumi Yoshida Yokota-Hirai, M.	Masasuke Yoshida Tomoya Yamaguchi momomi Yamada	Yoko Yamamoto Hirofumi Yoshioka	Shohei Yamaki Satomi Yoshimura	Tokiko Yamauchi Joo-Yeon Yoo	Keiichi Yamamoto Katsuhisa Yoshida	Koji Yuasa Naoki Yamaji	Shihai Yang Yusufujiang Yusuyin	Yasuyo Yamaoka
Z	Marta Zwiewka									



185 original papers (1978 - 2019)

高田 博厚 (1900-1987年：彫刻、翻訳、著述) 「分水嶺」 (1975年)

高村光太郎に勧められて彫刻家の道に進み、国際的な芸術家となった。オーギュスト・ロダン、ロマン・ロラン、ガンジー、日本の著名人の彫刻も製作した。26年間のフランス生活から帰国するとき、それまでの**二百以上の彫刻作品を次々と壊して**、身一つで帰国した。

「残せる作品はひとつもない・・・

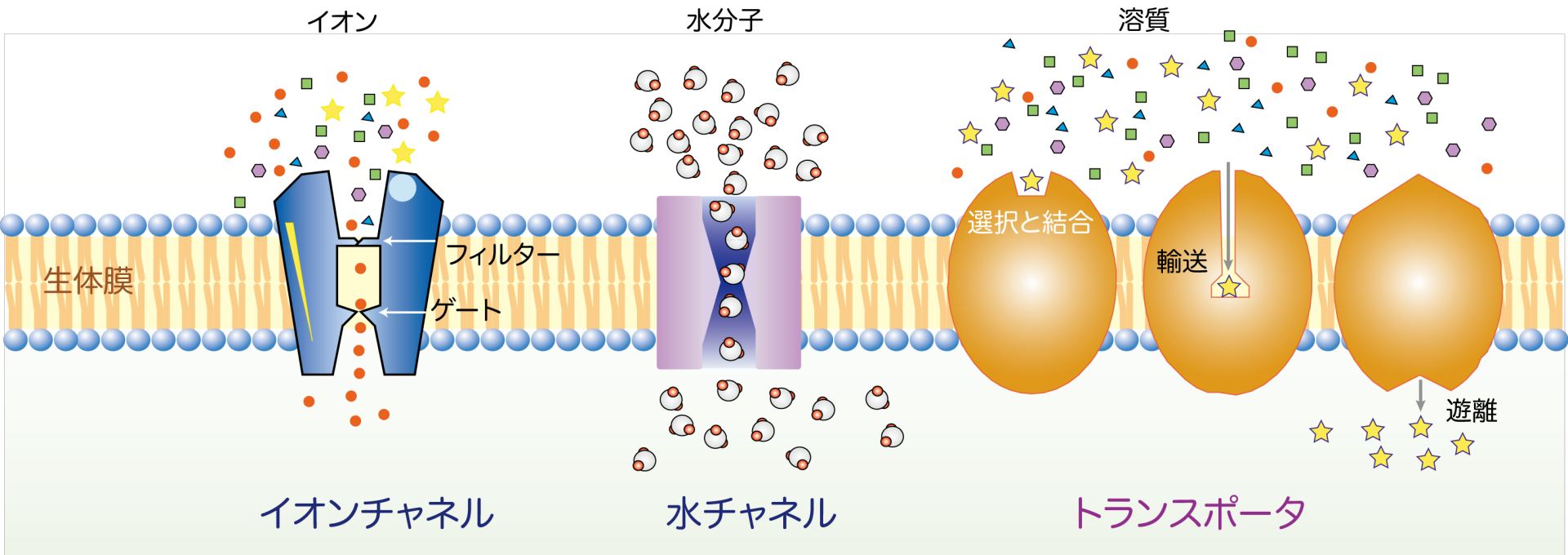
絶えず仕事したと思いつつ、自信は持てなかった」

研究者は：研究業績でポストを得、そして研究費を得る。

学生とともに成長。発表論文は研究ネットワークの土台。



生体膜ではたらく分子 (物質を運ぶタンパク質)



生化学研究者の卵としてのスタート

植物ミトコンドリアのシトクロムオキシダーゼ（膜タンパク質）
生物が消費する酸素の95%を使う。5種のタンパク質で構成されている。

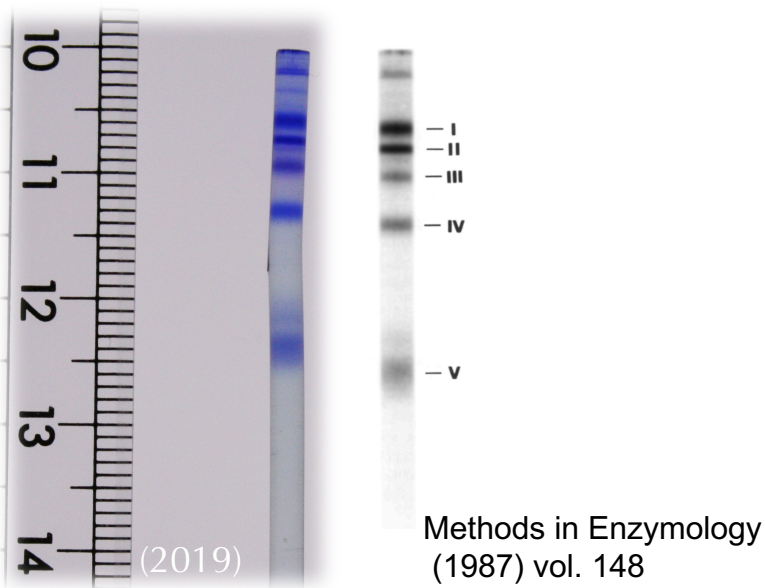
Arch. Biochem. Biophys., 187, 423–430 (1978)

Purification and Characterization of Sweet Potato Cytochrome c Oxidase

MASAYOSHI MAESHIMA AND TADASHI ASAHI

Laboratory of Biochemistry, Faculty of Agriculture, Nagoya University, Nagoya 464, Japan

Received October 12, 1977; Revised January 11, 1978



円柱式のSDS-PAGE 乾燥ゲル
研究者の卵の「へその緒」

426

MAESHIMA AND ASAHI

TABLE I

PURIFICATION OF SWEET POTATO CYTOCHROME c OXIDASE

Fraction	Total protein (mg)	Total units	Recovery (%)	Specific activity (units/mg of protein)	Purification (n-fold)
Submitochondrial particles ^a	144	466	100	3.24	1
Deoxycholate extract	11.5	292	62.7	25.4	7.8
First DEAE-cellulose eluate	3.70	337	72.3	91.1	28.1
Second DEAE-cellulose eluate	2.14	289	62.0	135	41.7
(NH ₄) ₂ SO ₄ fraction	1.46	214	45.9	147	45.4

^a The particles were prepared from 3.2 kg of sweet potato root tissue and stored at approximately -80°C until used.

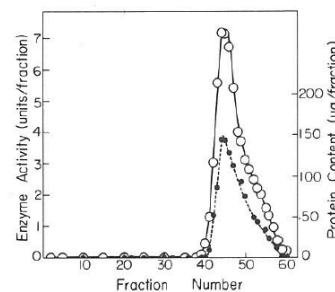


FIG. 2. Sephadex 6B column chromatography of a purified enzyme preparation. Enzyme solution (1.5 ml; 0.6 mg of protein/ml) from step 4 was placed on a Sephadex 6B column (1.56 × 70 cm) and then eluted as described under Materials and Methods. Fractions

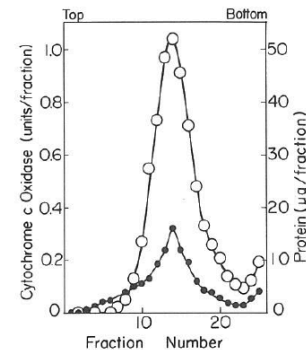


FIG. 3. Sucrose density gradient centrifugation of a purified enzyme preparation. The enzyme solution

H⁺-ATPase と H⁺-ピロホスファターゼが 同一膜上に局在

1988年 北大 低温科学研究所へ
ミトコンドリアから液胞の研究へ

代謝と組織形成
への影響



スクロース → グルコース
↑
光 合 成

解糖系と酸化的リン酸化

細胞での
エネルギー
利用

ATP

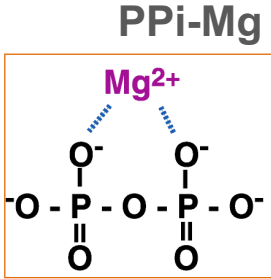
DNA, RNA, タンパク質
セルロースなどの合成
脂肪酸β酸化

ADP, Pi

ATP

PPi

PPi 利用酵素
可溶性PPase



PPi

2 Pi

H⁺-ATPase

H⁺-PPase

細胞質

液胞膜

液胞内

2 H⁺

H⁺



H⁺-PPase (プロトンポンプ) の研究

ヤエナリ実生：なぜ低温に弱いのか？

液胞型H⁺-ATPase：なぜ低温で失活するのか？



ヤエナリ実生 (胚軸 1.0 kg/日)



液胞膜 (30 mg)



精製H⁺-PPase (0.5 - 1 mg)



明日はきっとうまくいく

H⁺-PPaseの精製

液胞膜

膜可溶化画分

精製H⁺-PPase



73 kDa

この標品にはH⁺-ATPaseと
アクアポリンが混在

JBC (1989) 264: 20068-73

Purification and Properties of Vacuolar Membrane Proton-translocating Inorganic Pyrophosphatase from Mung Bean*

(Received for publication, April 17, 1989)

Masayoshi Maeshima† and Shizuo Yoshida

From the Institute of Low Temperature Science, Hokkaido University, Sapporo 060, Japan

北大着任2年目

Inorganic pyrophosphatase was purified from the vacuolar membrane of mung bean hypocotyl tissue by solubilization with lysophosphatidylcholine and QAE-Toyopearl chromatography. The molecular mass on sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis was 73,000 daltons. Among the amino-terminal first 30 amino acids are 25 nonpolar hydrophobic residues. For maximum activity, the purified pyrophosphatase required 1 mM Mg^{2+} and 50 mM K^+ . The enzyme reaction was stimulated by exogenous phospholipid in the presence of detergent. Excess pyrophosphate as well as excess magnesium inhibited the pyrophosphatase. The enzyme reaction was strongly inhibited by ATP, GTP, and CTP at 2 mM, and the inhibition was reversed by increasing the Mg^{2+} concentration. An antibody preparation raised in a rabbit against the purified enzyme inhibited both the reactions of pyrophosphate hydrolysis of the purified preparation and the pyrophosphate-dependent H^+ translocation in the tonoplast vesicles. *N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimide became bound to the purified pyrophosphatase and inhibited the reaction of pyrophosphate hydrolysis. It is concluded that the 73-kDa protein in vacuolar membrane functions as an H^+ -translocating inorganic pyrophosphatase.

結論: 73 kD の単一タンパク質は、
PPiの加水分解 と プロトン (H^+)能動
輸送の2つの機能を果たす。

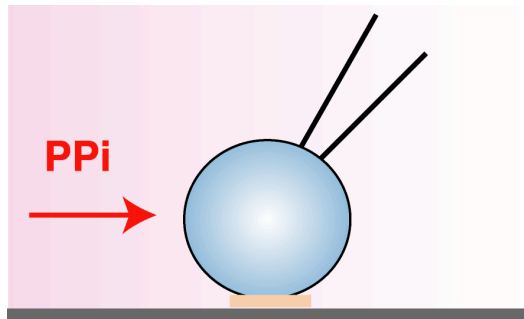
検証可能な物理化学的データを示す

1 10
NH₂-Gly-Ala-Ala-Ile-Leu-Pro-Asp-Leu-Gly-Thr-
20
Glu-Ile-Leu-Ile-Pro-Val-()-Ala-Val-Ile-Trp-
Cys Gly
30
Ile-Ala-Phe-Ala-Leu-Phe-Gln-Trp-Leu-

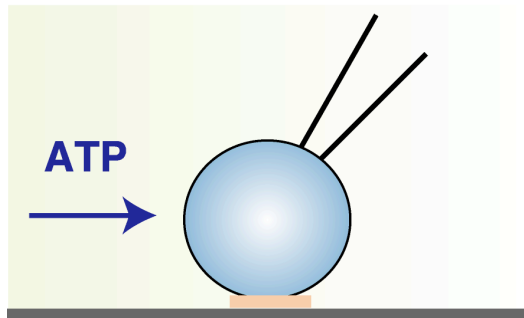
The 17th residue could not be determined. Nonpolar hydrophobic residues are underlined.



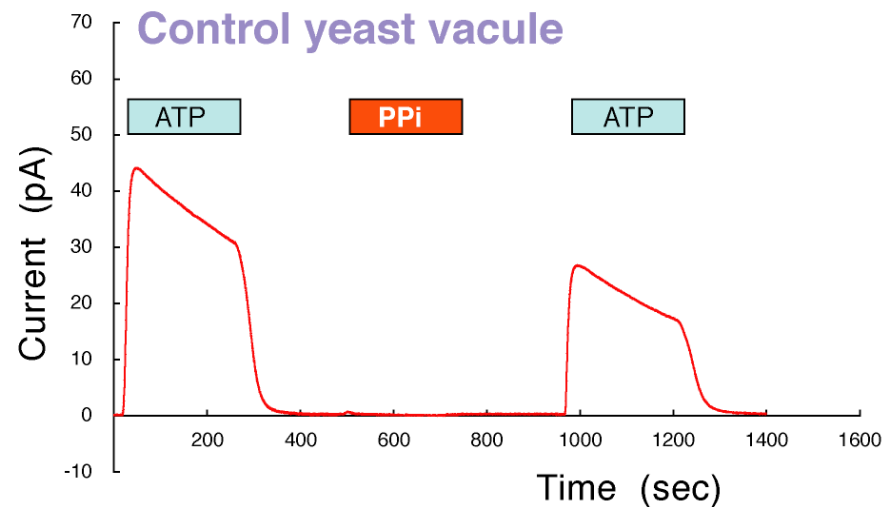
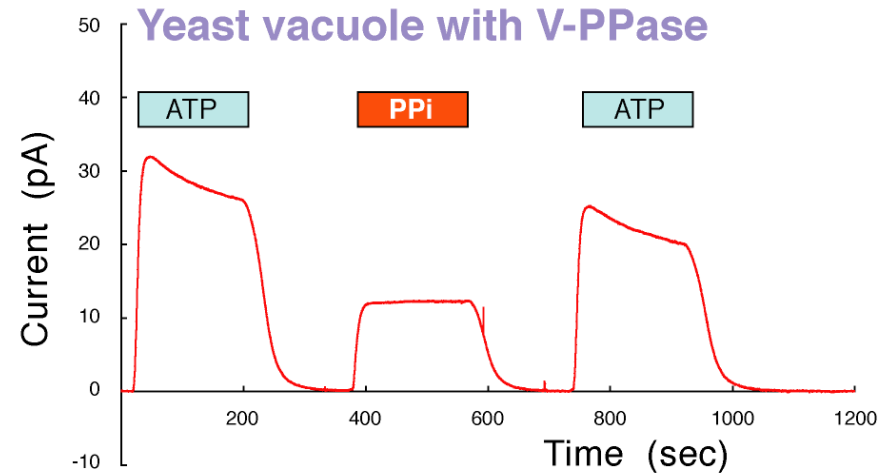
パッチクランプ解析：H⁺-PPaseのプロトンポンプ機能の実測



Bath buffer exchange



1. 酵母に植物のH⁺-PPaseを発現
2. 酵母の巨大化
3. 酵母から健全な液胞を単離
4. パッチクランプ解析



速さではなく、特異な機能をもつ分子の存在に意義がある

輸送速度は、輸送機構に依存する

輸送速度

水チャネル 10^9 分子/秒

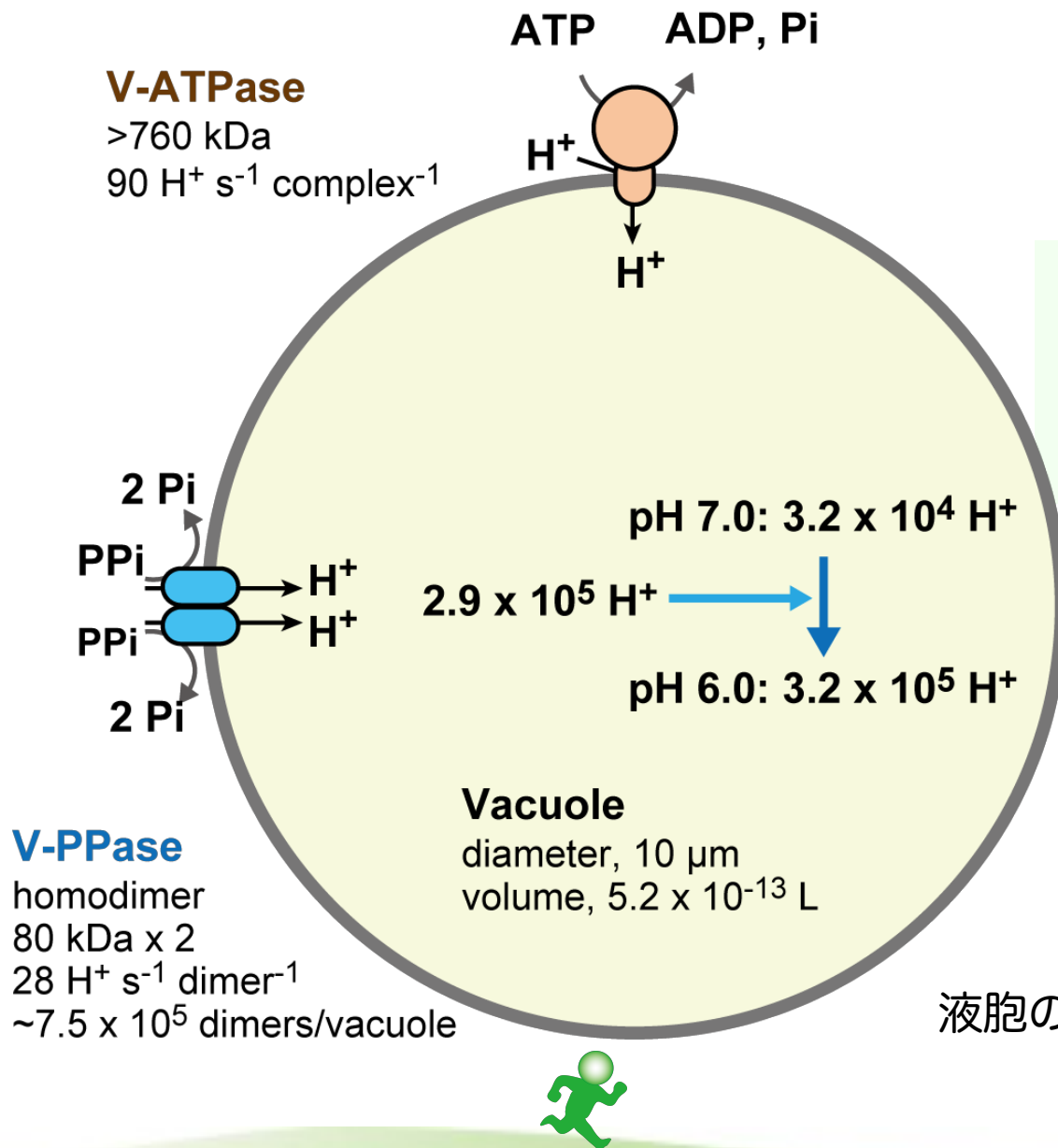
カリウムチャネル 10^7 K^+ /秒

グルコース輸送体 300 分子/秒

H^+ -ピロホスファターゼ 20 H^+ /秒



H⁺-PPase は、理論上 0.1 秒 で液胞を酸性化できる



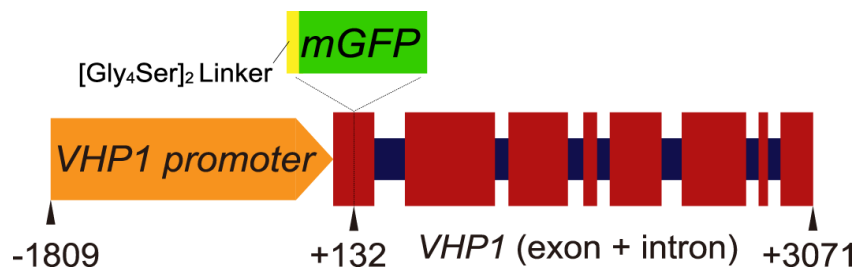
直径10 μmの液胞
pH 7.0 → pH 6.0
30万のH⁺を輸送

10万の H⁺-PPase (二量体) は
毎秒 280万のH⁺を輸送する
計算上、酸性化は0.1秒

液胞への二次能動輸送
をエネルギー面で支える

大量のH⁺-PPaseが
液胞の酸性維持を容易にしている

液胞膜に局在するH⁺-PPase を機能を維持しつつ可視化



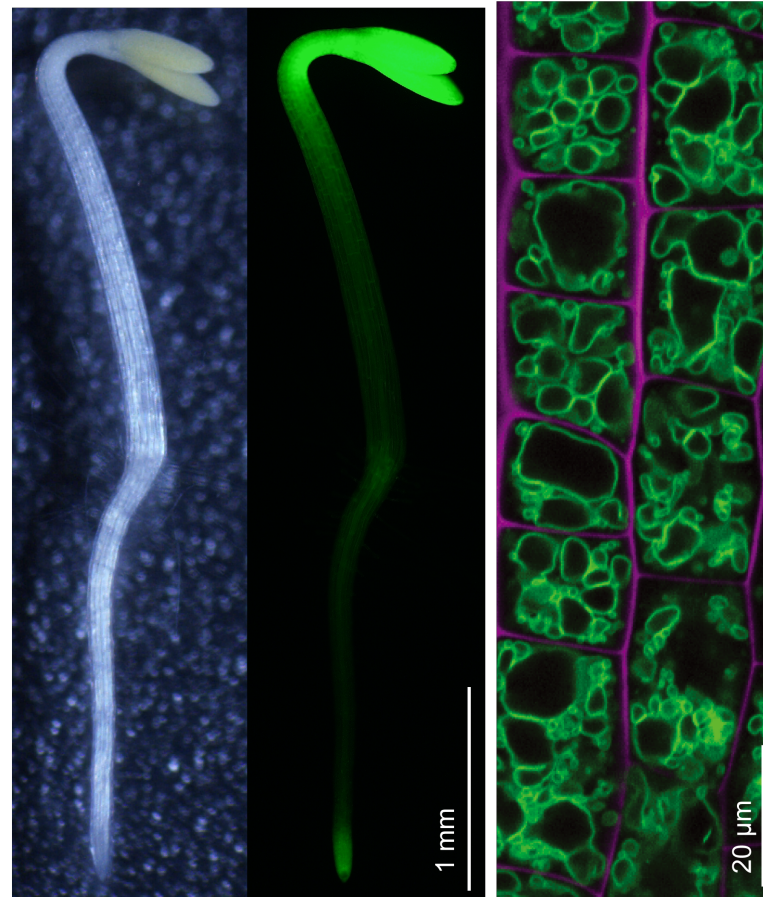
分子の可視化
単量体型GFPをH⁺-PPase分子に導入

あるがままの液胞の形状、
液胞の発達・融合過程を
明瞭に観察できる

Segami et al. (2014) *Plant Cell*
Segami et al. (2018) *Plant Cell*
Segami et al. (2018) *Plant & Cell Physiol.*
Kimata et al. (2019) *Pro. Natl. Acad. Sci.*

発芽後3.5日の芽生え
H⁺-PPase可視化植物

根の細胞
小さな液胞

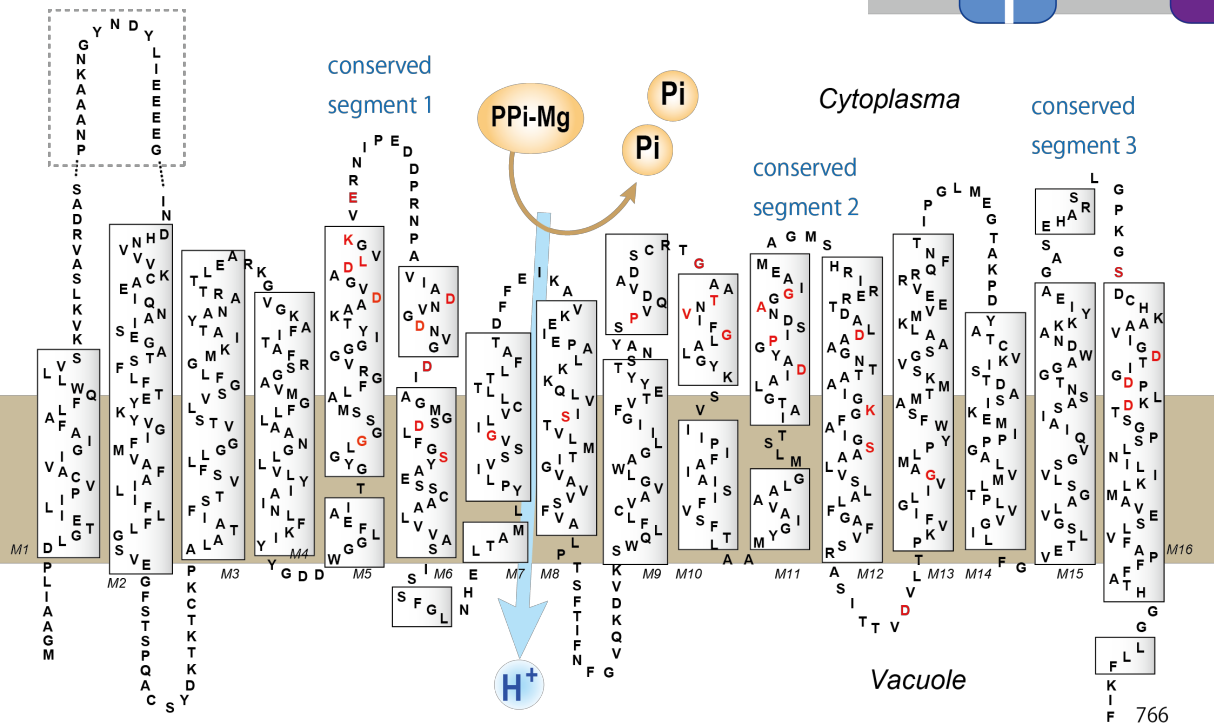
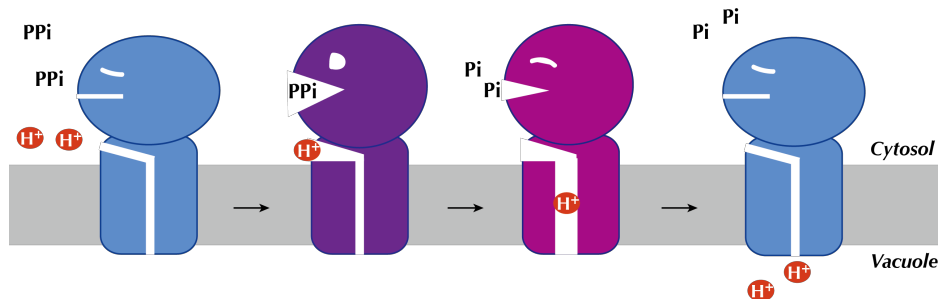


緑: mGFP-H⁺-PPase (液胞)
紫: 細胞膜



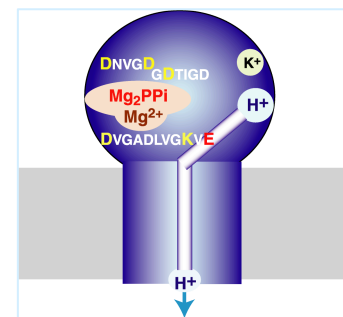
H⁺-PPaseの機能構造とエネルギー共役機構

PPiの加水分解 → H⁺の能動輸送
(反応の共役)



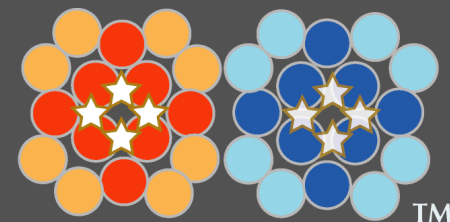
766 アミノ酸残基、16 膜貫通領域

Takasu *et al.* (1997), Maeshima (2000, 2001), Nakanishi *et al.* (2001), Mimura *et al.* (2004, 2005a, 2005b), Hirono *et al.* (2005, 2007a, 2007b, 2009), Segami *et al.* (2013, 2014, 2018), Asaoka *et al.* (2014, 2016) *etc.*



予想分子モデル2008

Homo dimer (sixteen TMs model)

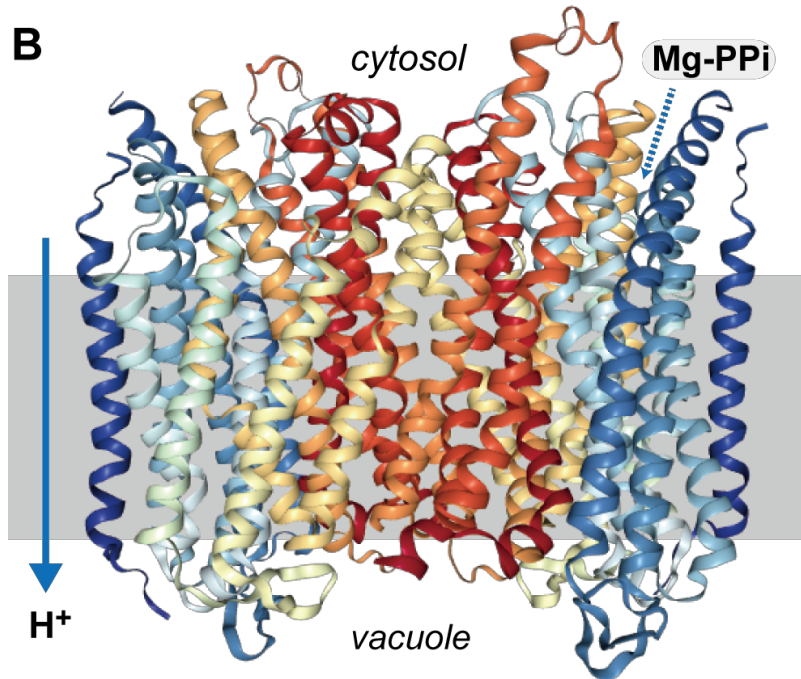
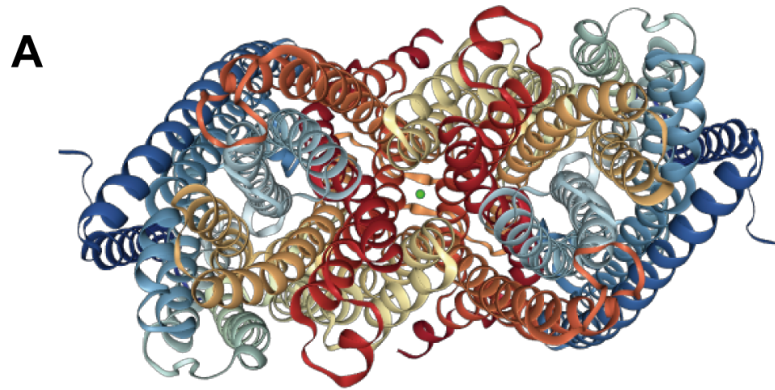


★ functional motif

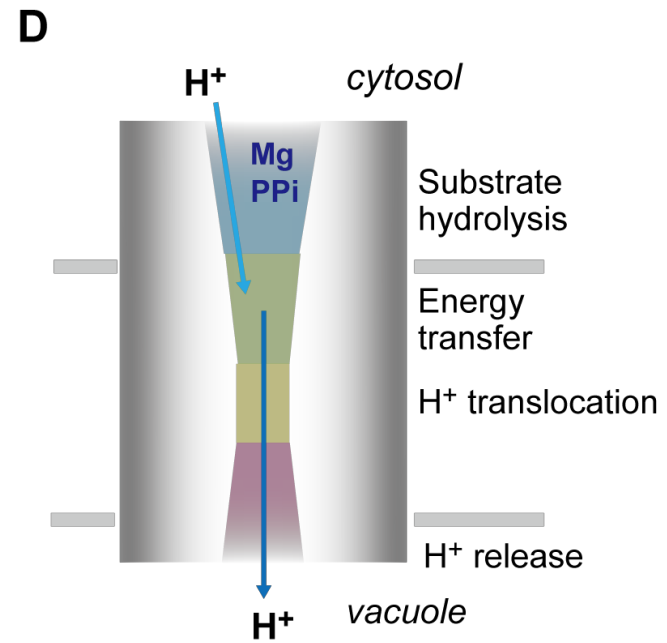
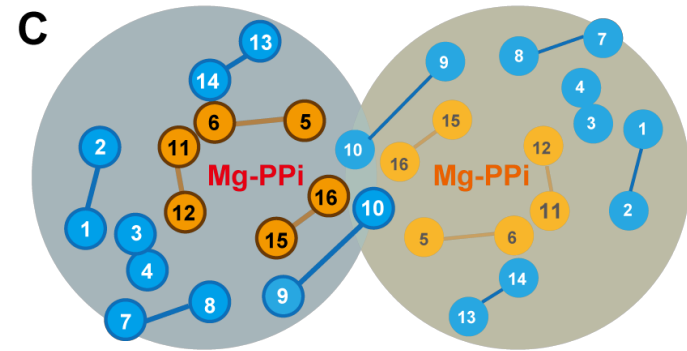
ホモ二量体分子モデル 2005



ホモ二量体としてのH⁺-PPase



Lin et al. (2012) *Nature* 484: 399–404
台湾チーム



Segami et al. (2018) *Plant Cell Physiol.*



H⁺-PPase: 第4のプロトンポンプの単離・同定と分子機能解明

F型 (ATP 合成酵素)

V型 (H⁺-ATPase)

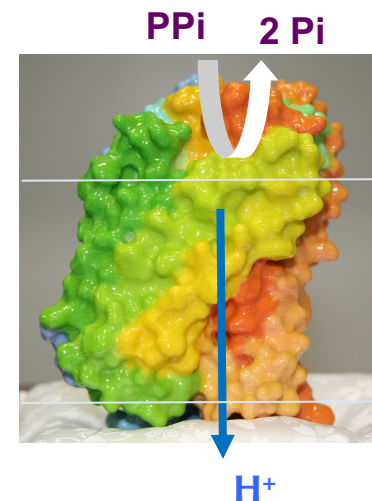
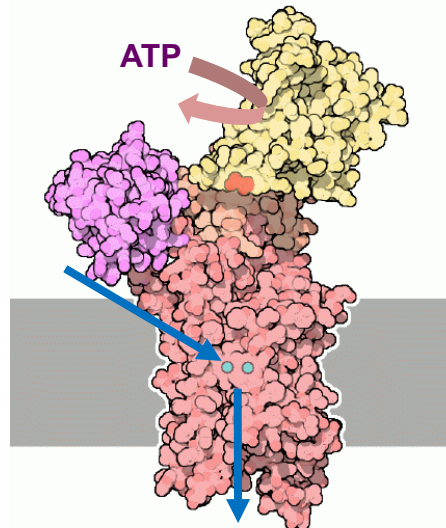
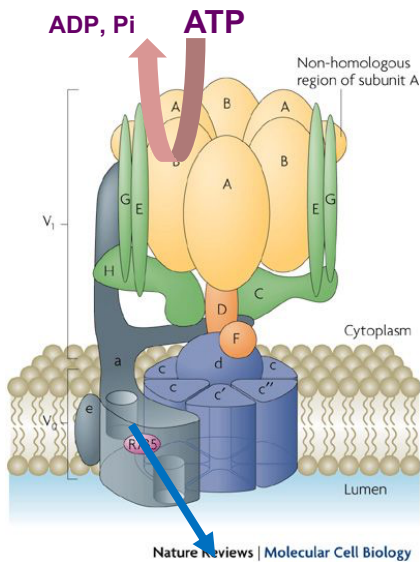
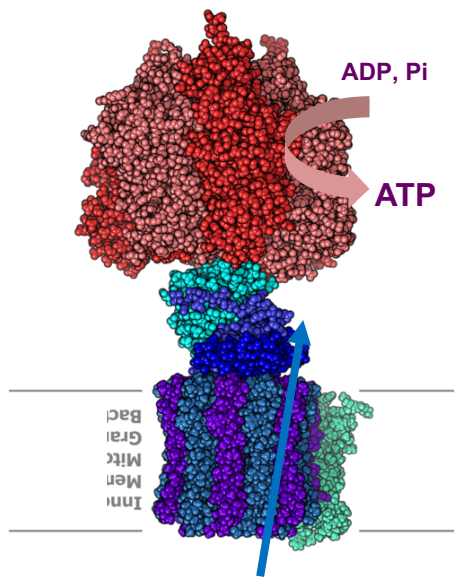
マリオネット型

ピストン型

回転型

P型 H⁺(Ca²⁺)-ATPase

H⁺-PPase



https://en.wikipedia.org/wiki/ATP_synthase 2019/06/17

<https://www.nature.com/articles/nrm2272> 2019/06/17

https://en.wikipedia.org/wiki/Calcium_ATPase 2019/06/17

10 種のタンパク質

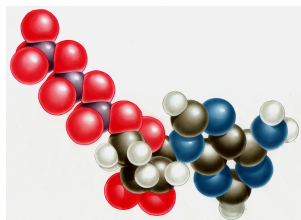
14種のタンパク質

単一タンパク質

単一タンパク質

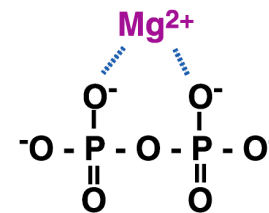
ATP

$\Delta G = -30.5 \text{ kJ/mol}$



PPI

$\Delta G = -19.2 \text{ kJ/mol}$

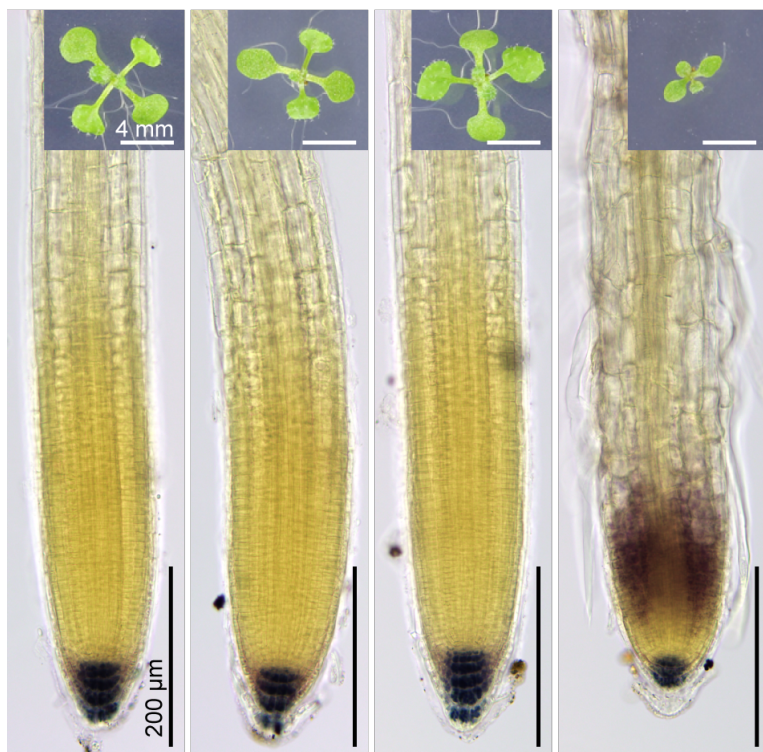


低コストポンプ



新しい展開 : PPI 濃度抑制の破綻がデンプン合成を誘導する

野生株 H⁺-PPase 欠失株 可溶性 PPase 欠失株 *ppa1-1* H⁺-PPase と 可溶性 PPase の 欠失株



H⁺-PPase と 可溶性 PPase の 欠失 (*fugu5 ppa1*)

→ 高濃度 PPI → デンプン合成

シヨ糖 → UDP-Glc + PPI → UTP + Glc-6P →
(Glc-6P → → ADP-Glc → デンプン)

PPIの濃度調節 = 代謝調節

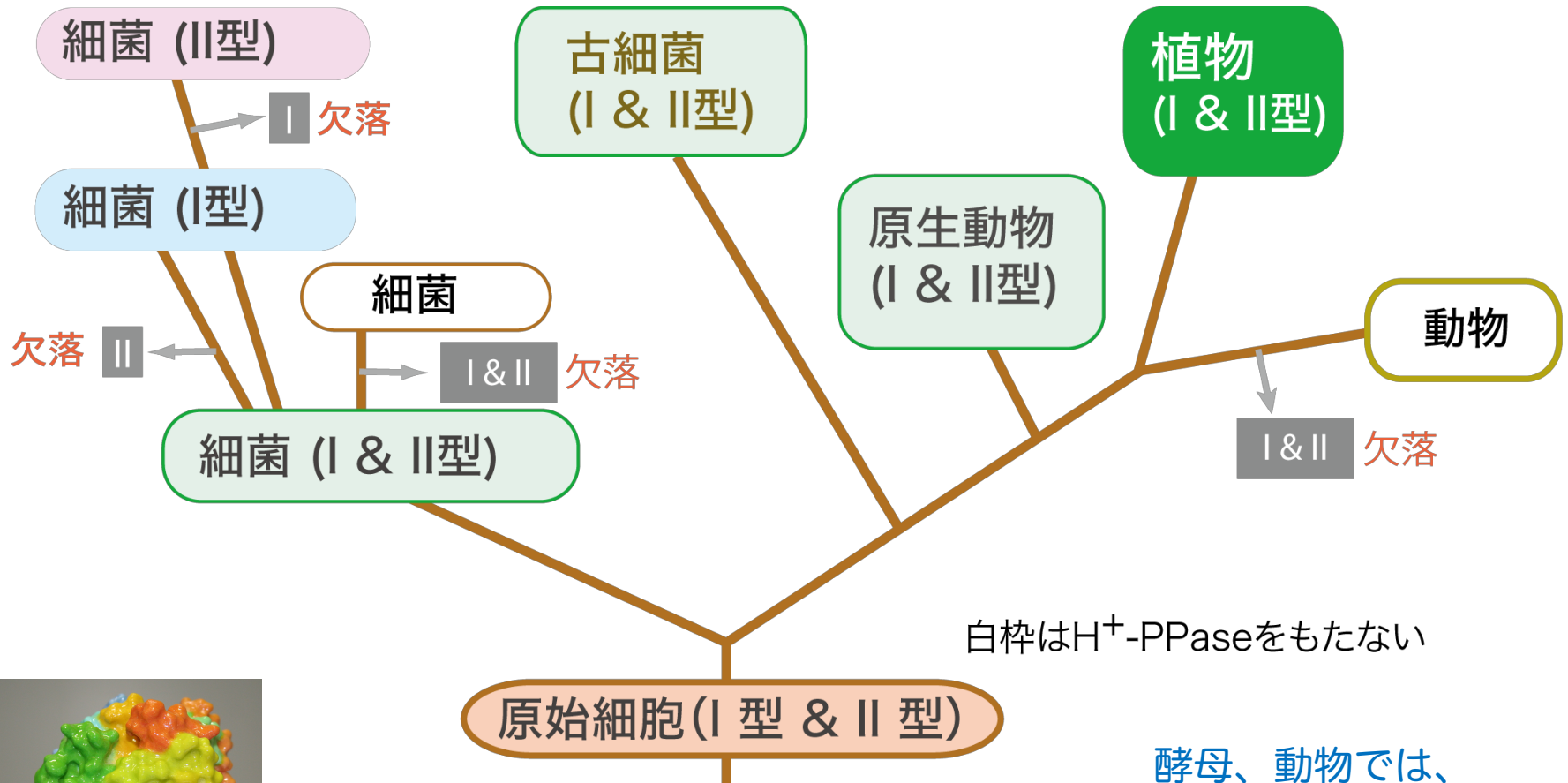
← デンプンの異常な蓄積

デンプン染色

Segami *et al.* (2018) *Plant Cell*
Kinoshita *et al.* unpublished



H⁺-PPase: 生物界にひろく分布する古代型酵素 (一部生物種で欠落)



分子モデル

酵母、動物では、
進化の過程で
H⁺-PPase 遺伝子
が欠落したと推定



旅路の時代

生物学：細胞分画法、オルガネラ（ペルオキシソーム、リソソームの発見）

Christian René de Duve（英国）1974年ノーベル生理学・医学賞

（ミトコンドリア、グリオキシソーム、液胞）

生化学 生体膜エネルギー変換酵素：（**H⁺-PPase** 分子同定 1989年）

Peter Mitchell（英国）ATP 合成の化学浸透圧説 1978年ノーベル化学賞

Paul Boyer（米国）、**John Walker**（英国）ATP 合成酵素 1997年

Jens Christian Skou（デンマーク）**Na⁺/K⁺-ATPase** ノーベル化学賞

チャネルの分子構造と機能：（植物水チャネル **TIP** 1992年）

Peter Agre（水チャネル）、**Roderick MacKinnon**（K⁺チャネル）

2003年ノーベル化学賞



植物の傷害応答としてのミトコンドリアの増殖の機構（学位研究）

分子レベルで解明 → Cytochrome c oxidase

→ 分子の実体、核DNAとミトコンドリアDNAの協調性の解明

脂肪種子の膜結合型リパーゼの単離と機能解明（UC Santa Cruz）

脂質顆粒とグリオキシソームの相互作用 発芽時の脂肪代謝の起点

液胞膜酵素（北大 低温科学研究所）植物の低温耐性・感受性

H⁺-ATPase 活性は低温で低下 → 複雑な構造が低温下で崩壊

H⁺-PPase 活性は低温下でも安定 → シンプルで堅固な構造

研究の土俵：Membrane Biology

膜タンパク質の精製、機能・作動機構、生理機能

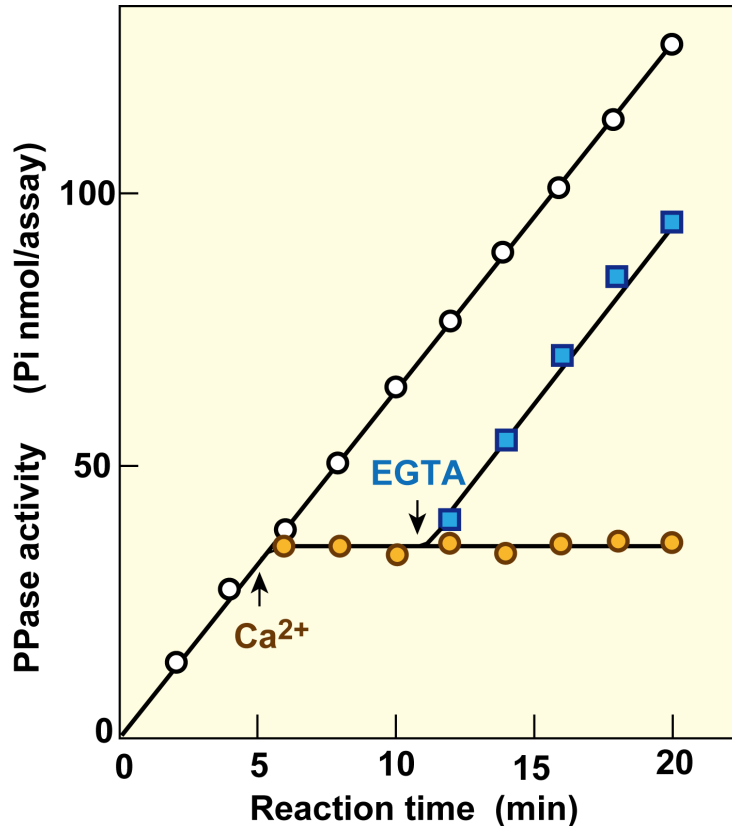
研究の過程で見出した「思わぬ花や小石」

それぞれの分子がおもしろい！



H⁺-PPaseの特性を解析する中で発見した Ca²⁺ 結合タンパク質

Ca²⁺は H⁺-PPase活性を阻害する
 → Ca²⁺はH⁺-PPaseに結合 (予測)

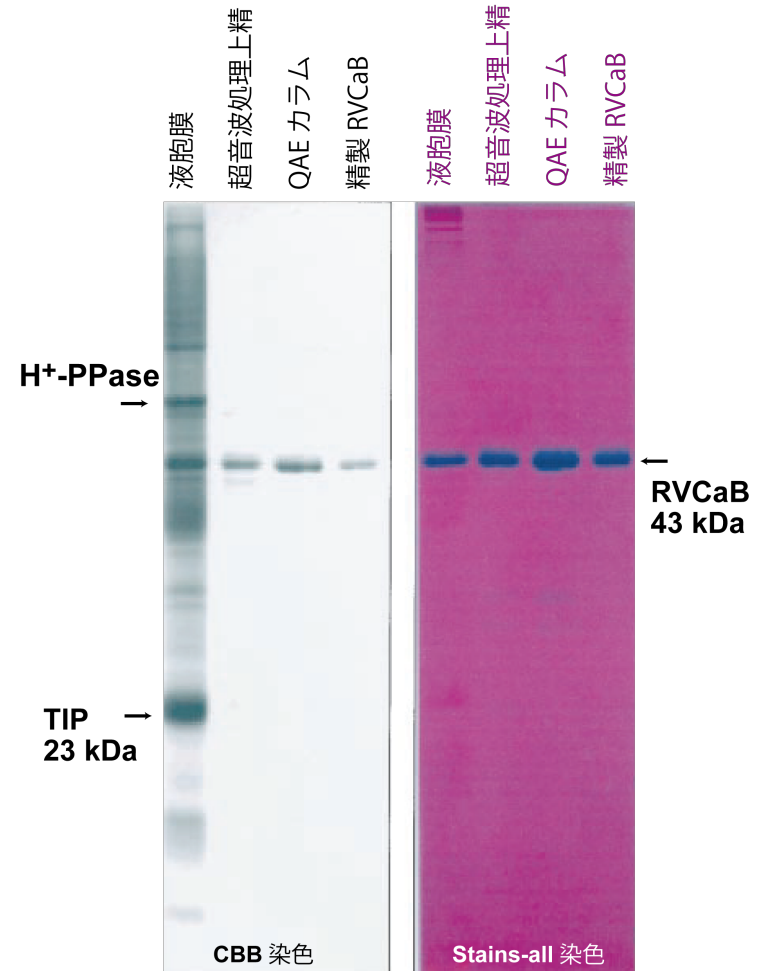


Maeshima (1991) *Eur. J. Biochem.* (1991)

Mg-PPi 反応する
 Ca-PPi 反応しない

Ca²⁺結合タンパク質を染めるStains-all
 (思わぬ分子が染まった)

RVCaB: Radish vacuolar Ca-binding protein



Yuasa et al. (2000) *Plant Physiol.*



RVCaB の類縁分子：PCaP と CCaP (シロイヌナズナ)



Myristoylation signal

PCaP1	-----MGYWNSKVVPKFKLFEKNSAKKAAAAEATKTFDESKETINKEIEEKKTE	50
RVCaB	MATADVEQVTPAAAEHVEVTPPKTVAPEETVAAAVVADSAPAPVTETETPVKETEETKTE	60
	-----* *-----* *-----**--**--**--**	
PCaP1	LQPKVVETYEATSAEVKALVRDPKVAGLKKNS----AAVQKYLEELVKIEFPGSKAVSEA	106
RVCaB	TEEIKKEEEAPVEVTTKDLPVEEAPAAVEEESKTEEVVEPKKEEVEETKTEETPAVVEE	120
	-----*-----* *-----*-----*-----**-----* *-----* *-----	
PCaP1	SSSFGAGYVAG----PVTFIFEKVSVFLPEEVKTKEIPVEEVKAEEPakteepaktegts	162
RVCaB	ESKTEEVVEPKKEEVEETKTEETPAVVEEESKAEDVVEPKKEEETPAVVEEESKTEEVV	180
	-----*-----*-----** *-----* *-----**--**--**	
PCaP1	GEKEE----IVEETKKGETPETAVVEEKKPEVEEKKEEATPAPAVVETPVKEPETTTTA	217
RVCaB	EPKKEEEAPVVVEEETKAEVEVKKTEETPAVVEEKKPEAEVEEKTTEVAAVQAAAAPAE	240
	-----* *-----***-----* *-----*-----****--**-----*-----	
PCaP1	PVAEPPKP	225
RVCaB	VAVEKADE	248
	-----*-----	

Ide et al. (2007) J. Exp. Bot.



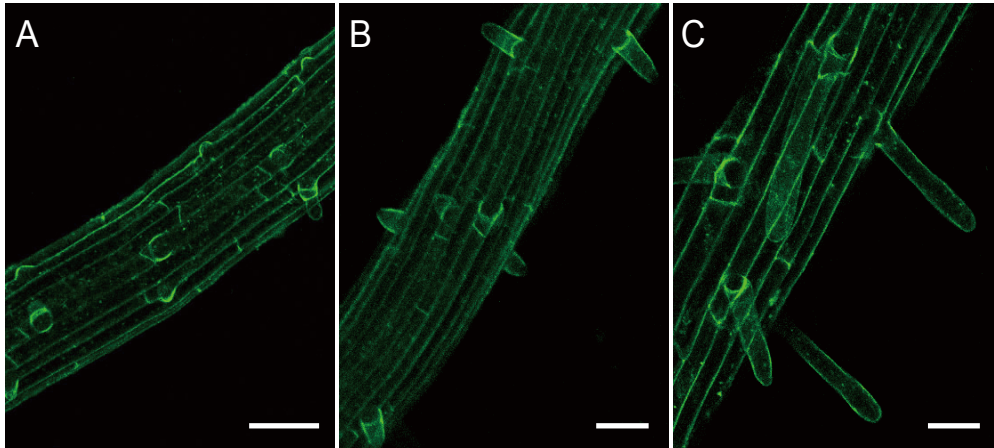
RVCaB の類縁分子：PCaP と CCaP (シロイヌナズナ)

RVCaB
ダイコン



- PCaP1** ほぼ全ての細胞の細胞膜に局在
気孔閉口・根屈水性・ウイルス移動に関与
- PCaP2** 根毛の細胞膜局在：根毛の伸長に不可欠
- CCaP** 細胞質、暗闇を感知する分子

PCaP2p::*PCaP2*-GFP

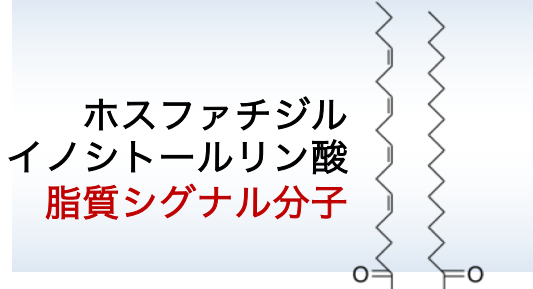


Ide et al. (2007) *J. Exp. Bot.*
Nagasaki et al. (2008) *FEBS J.*
Nagasaki et al. (2008) *J. Biochem.*
Kato et al. (2010) *Plant Cell Physiol.*
Kato et al. (2013) *Plant J.*
Kato et al. (2019) *Plant J.*
Tanaka et al. (2014) *J. Exp. Botany*
Tanaka et al. (2019) *Plant Cell Physiol*

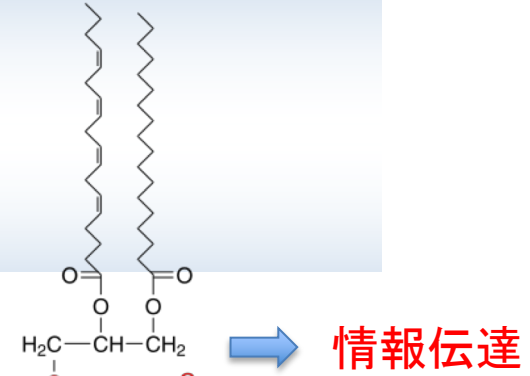
根毛の発達・伸長に不可欠なPCaP2



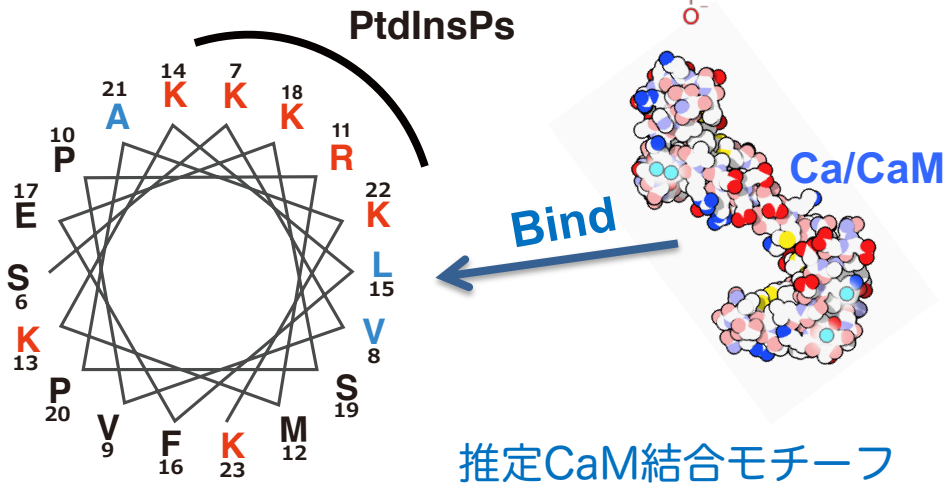
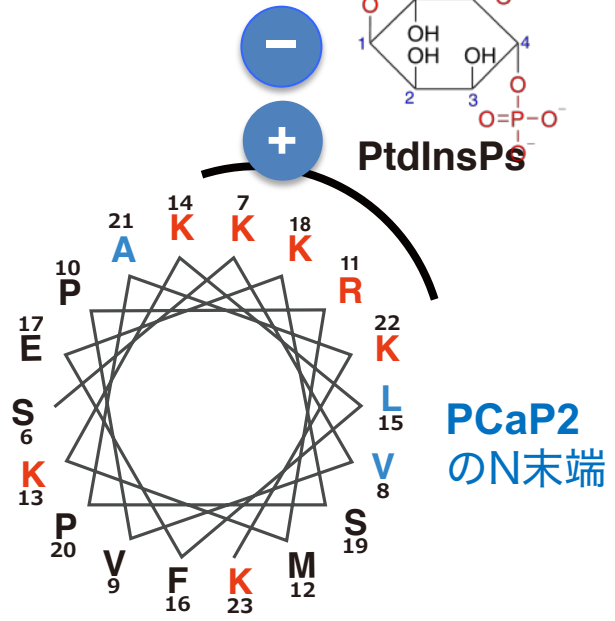
替 PtdInsPとCa/CaM は PCaPのN末端領域と競合的に結合する：情報の切替



Ca²⁺ シグナル → 脂質シグナル



PCaPからの遊離



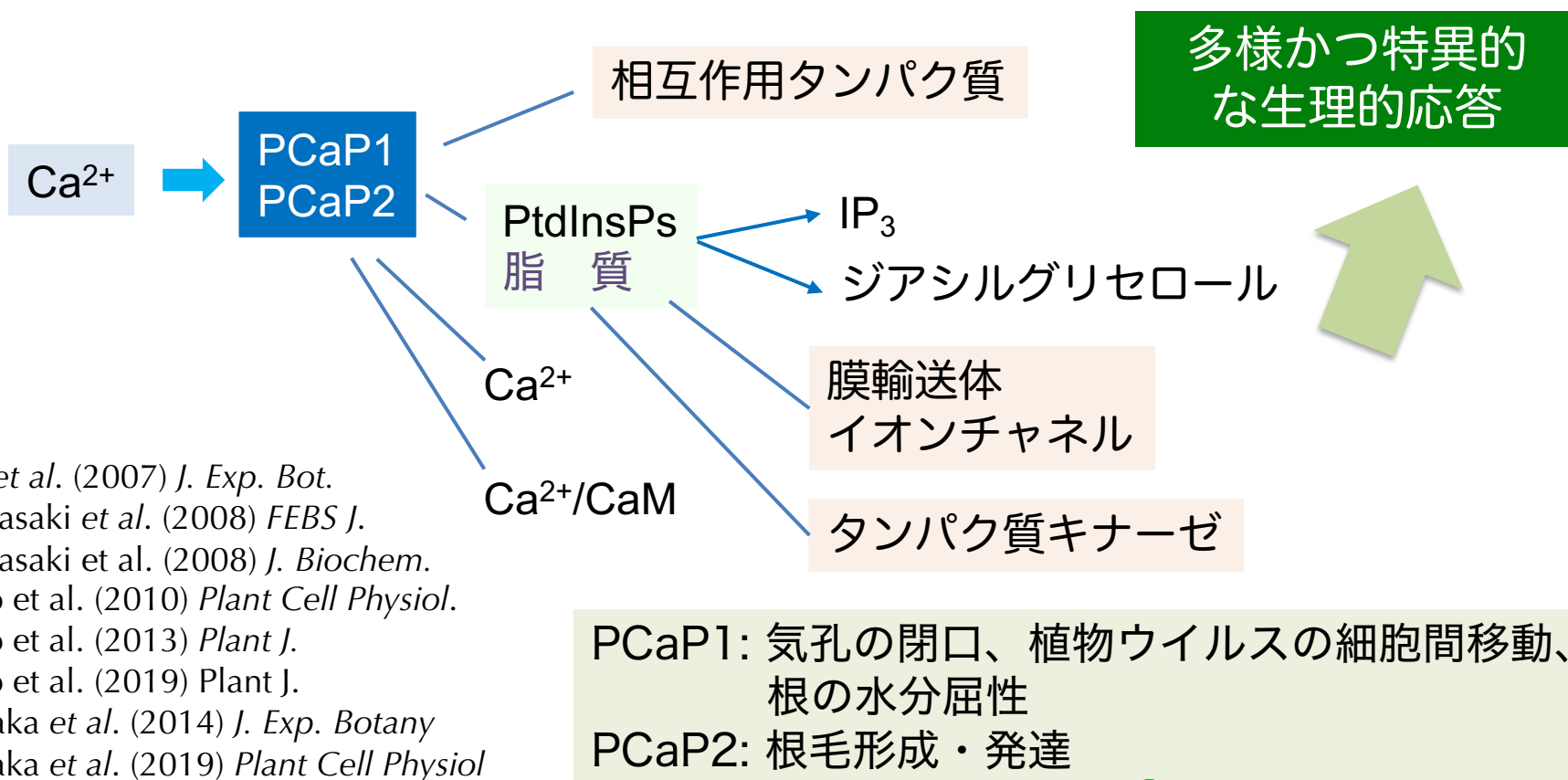
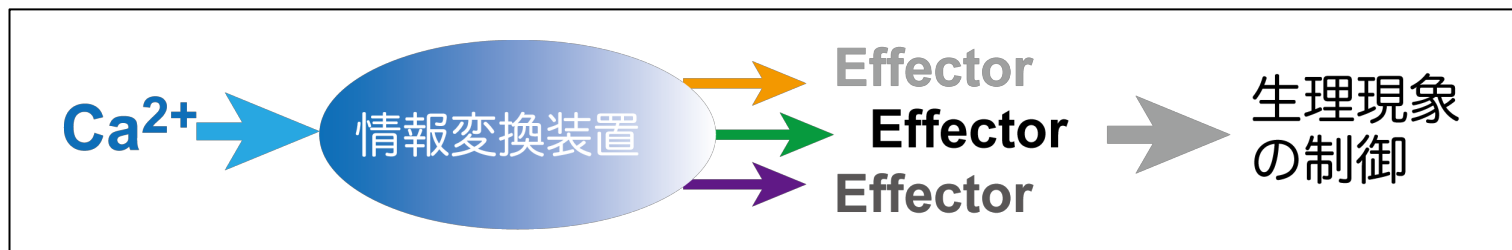
2 GYWKSK **V** V P R M K K **L** F E K S P **A** K K 23

1 8 14

Nagasaki et al. (2008) FEBS J, (2008) JB
Kato et al. (2013) Plant J., (2019) Plant J.



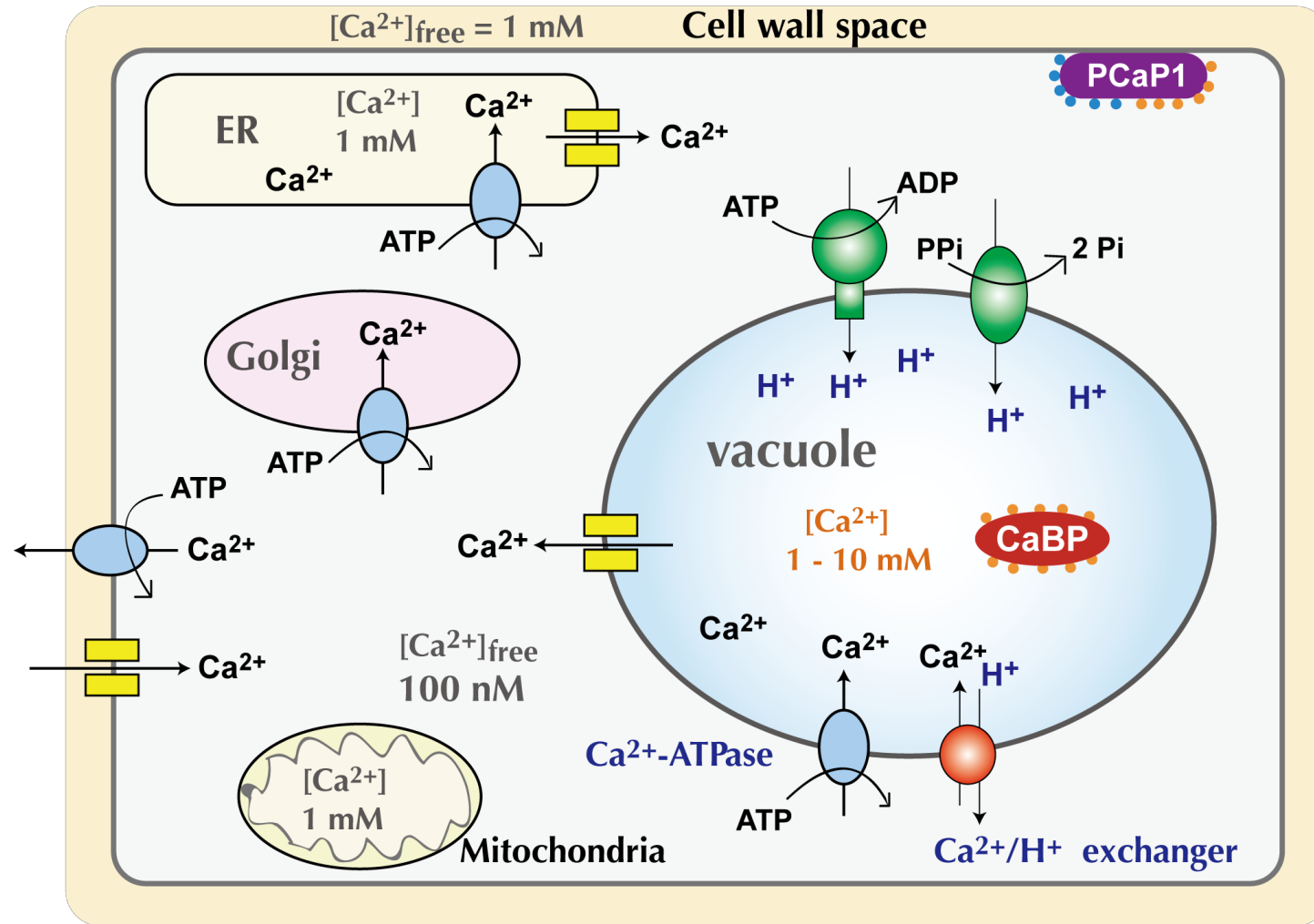
PCaP1とPCaP2は、カルシウムシグナリングの多様性を支える



Ide et al. (2007) *J. Exp. Bot.*
Nagasaki et al. (2008) *FEBS J.*
Nagasaki et al. (2008) *J. Biochem.*
Kato et al. (2010) *Plant Cell Physiol.*
Kato et al. (2013) *Plant J.*
Kato et al. (2019) *Plant J.*
Tanaka et al. (2014) *J. Exp. Botany*
Tanaka et al. (2019) *Plant Cell Physiol*



骨をもたない植物は カルシウムを液胞に貯める



Ca^{2+}/H^{+} 交換輸送体

Ueoka-Nakanishi et al.
(EJB 1999, EJB 2000, PCP 2000)

Kamiya et al. (JBC 2004,
PCP 2005, PCP 2006)

新 Ca^{2+} 結合タンパク質

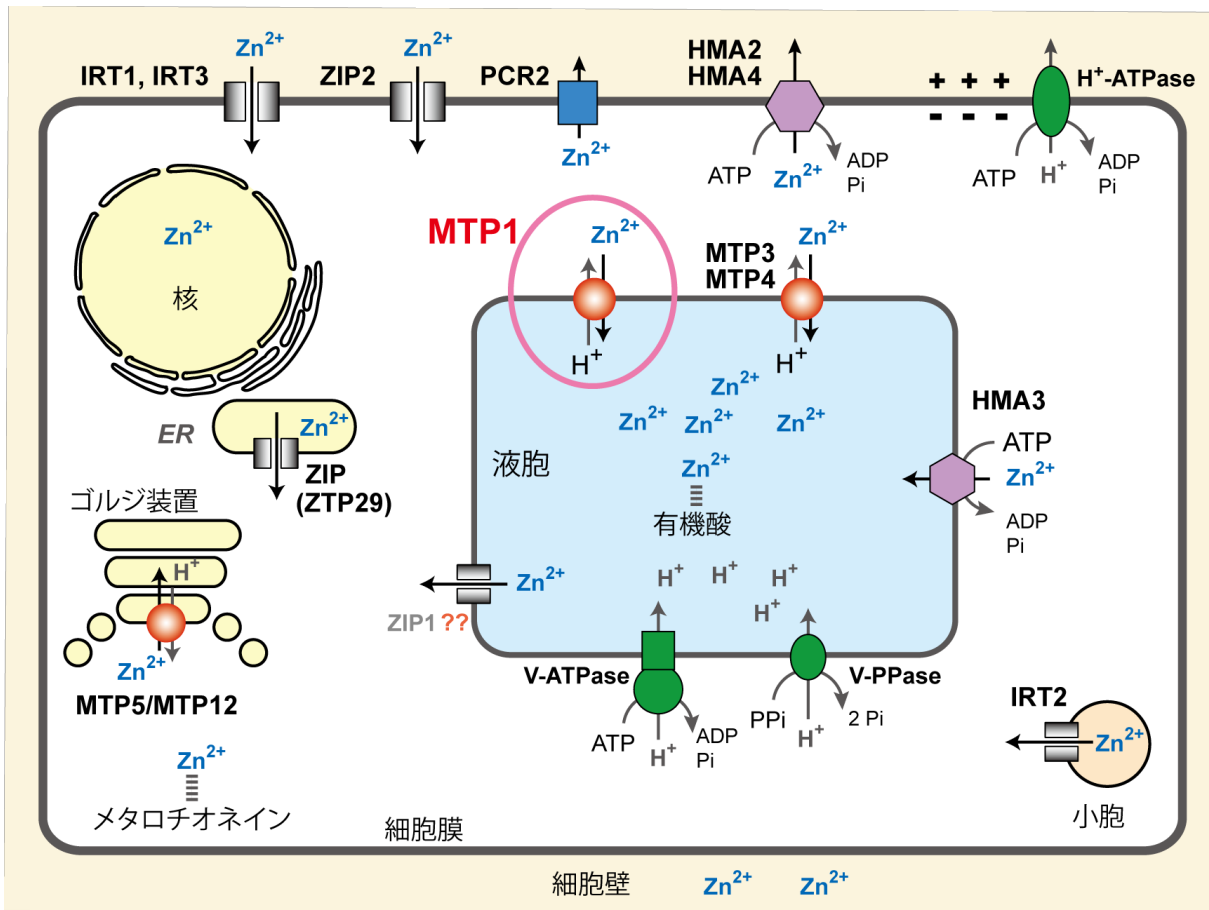
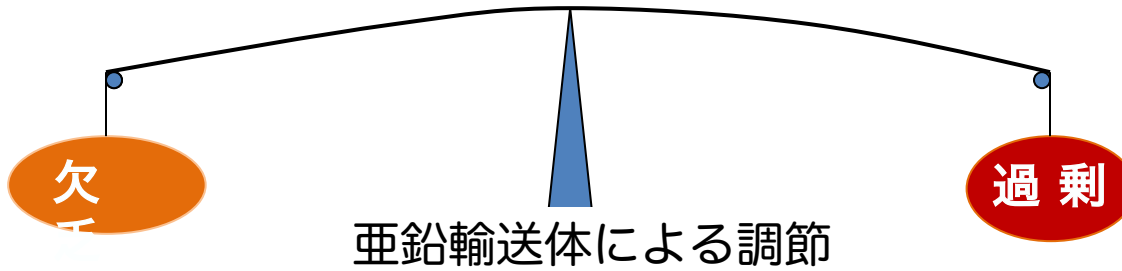
Yuasa et al. (Plant
Phys.2000, Plant Mol
Biol 2001, BBB 2002)

Ide et al. (PCP 2007,
J Exp Bot 2007)



細胞質の亜鉛濃度を調節し、亜鉛の供給と貯蔵量を規定する分子

Zn²⁺/H⁺交換輸送体



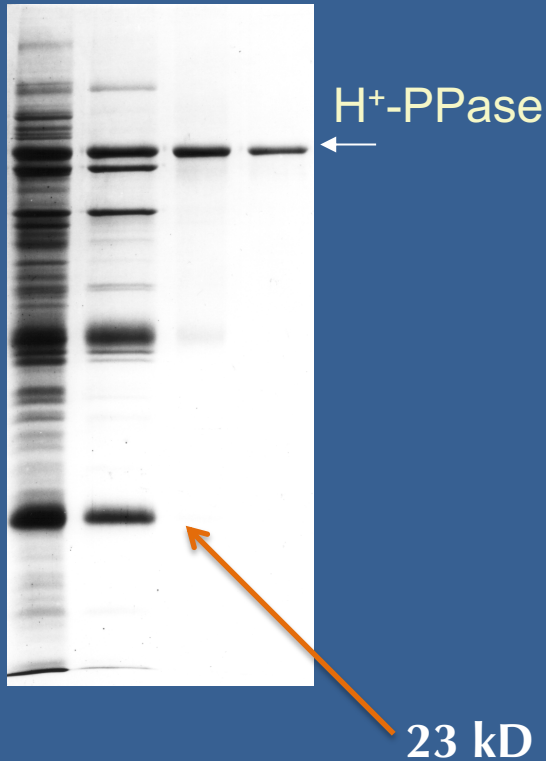
亜鉛ホメオスタシス

- Kobae et al. (2004) PCP
- Kawachi et al. (2008) J. Biol. Chem.
- Kawachi et al. (2009) PCP
- Kim et al. (2009) Plant J.
- Kawachi et al. (2012) FEBS J.
- Ueno et al. (2013) J. Exp. Bot.
- Tanaka et al. (2015) FEBS Open Bio
- Tanaka et al. (2015) PCP
- Fujiwara et al. (2015) FEBS J.



液胞膜水チャネル分子の発見：分子のゴミ（混入分子）

液胞膜からH⁺-PPaseを精製
混入するタンパク質は何？



1. 液胞膜主要タンパク質 (23 kD) は何か？
2. 液胞にシヨ糖を輸送する輸送体を見つけたい。
→ ダイコンとテンサイの液胞膜を比較
→ ダイコン液胞にも23 kD 分子存在
3. 液胞膜23 kD分子（水チャネル）を分析
→ 論文発表 1992 *Plant Physiol.*

Prof. M. Chrispeels

“Radish VM23 is an aquaporin”.

in 1992, @NIBB

”ゴミ分子”は無い → 生体膜で輝く分子

Maeshima, M., and Yoshida, S. (1989) Purification and properties of vacuolar membrane proton-translocating inorganic pyrophosphatase from mung bean. *J. Biol. Chem.*, 264, 20068-20073.



Appearance of Water Channels in *Xenopus* Oocytes Expressing Red Cell CHIP28 Protein

Gregory M. Preston, Tiziana Piazza Carroll,
William B. Guggino, Peter Agre*

赤血球アクアポリン
Science 1992

Water rapidly crosses the plasma membrane of red blood cells (RBCs) and renal tubules through specialized channels. Although selective for water, the molecular structure of these channels is unknown. The CHIP28 protein is an abundant integral membrane protein in mammalian RBCs and renal proximal tubules and belongs to a family of membrane proteins with unknown functions. Oocytes from *Xenopus laevis* microinjected with in vitro-transcribed CHIP28 RNA exhibited increased osmotic water permeability; this was

Plant Physiol. (1992) 98, 1248–1254
0032-0889/92/98/1248/07/\$01.00/0

Received for publication August 26, 1991
Accepted October 15, 1991

26 August 1991; accepted 15 October 1991

Characterization of the Major Integral Protein of Vacuolar Membrane¹

液胞膜アクアポリン
Plant Physiology 1992

Masayoshi Maeshima

Institute of Low Temperature Science, Hokkaido University, Sapporo 060, Japan

ABSTRACT

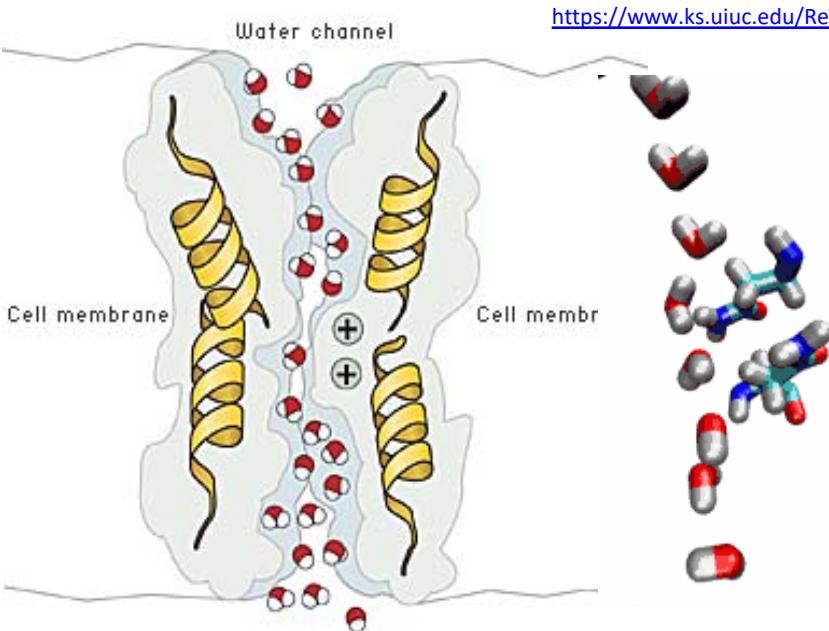
The vacuolar membrane of radish (*Raphanus sativus*) taproot contained a large quantity of a protein of 23 kilodaltons that accounted for more than 25% of the total membrane proteins. The protein, tentatively named VM 23, was purified and charac-

TIP² has been proposed to be involved in the transport of small molecules.

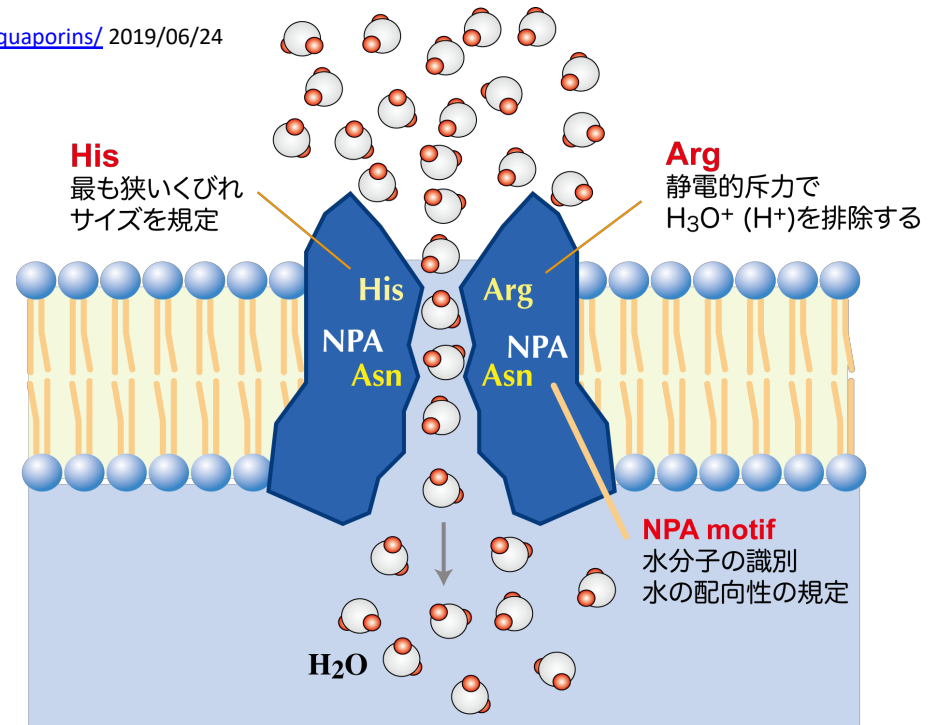
In the present work, a major protein in the vacuolar membranes of radish taproot was isolated and its antibody was prepared to make it available for future cloning and for



水チャネル：水循環を支える分子



<https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/2019/003/popular-information/> 2019/06/24



水チャネル：

浸透圧にしたがって水分子を膜輸送する
(エネルギー不要、受動輸送)

高分子構造の解明は藤吉好則博士の貢献大
P. Agre 博士のノーベル賞受賞に貢献

- ・ サイズで振り分ける
- ・ H^+ でないことを確認
- ・ 水分子間の水素結合を切る



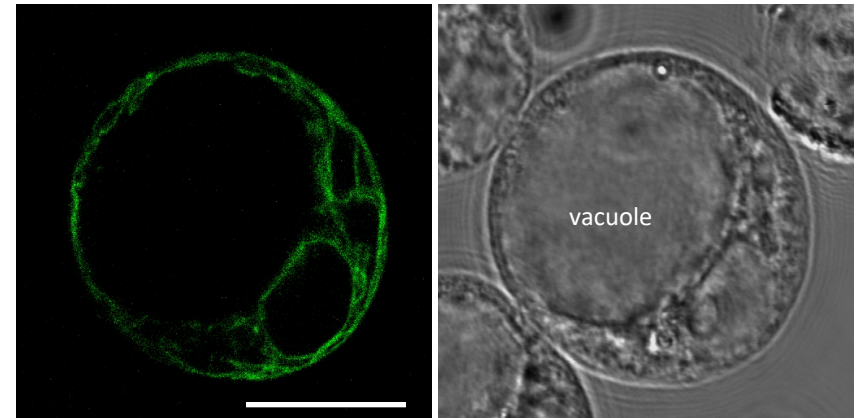
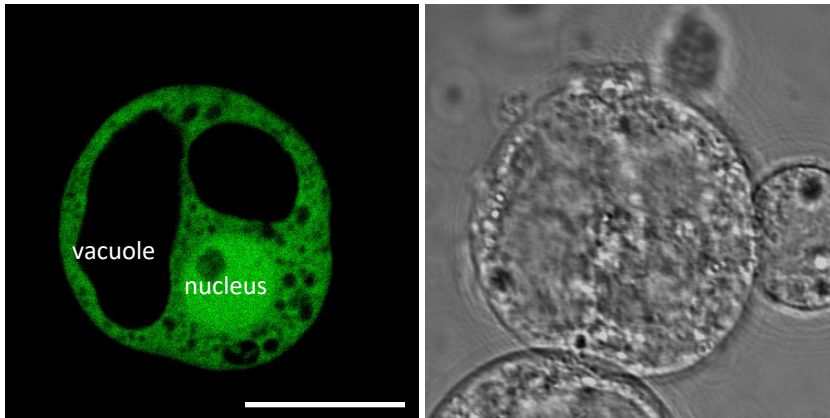
ユニークなアクアポリンSIPは小胞体 ER 膜に局在

緑色蛍光タンパク質を結合したSIP

シロイヌナズナ培養細胞

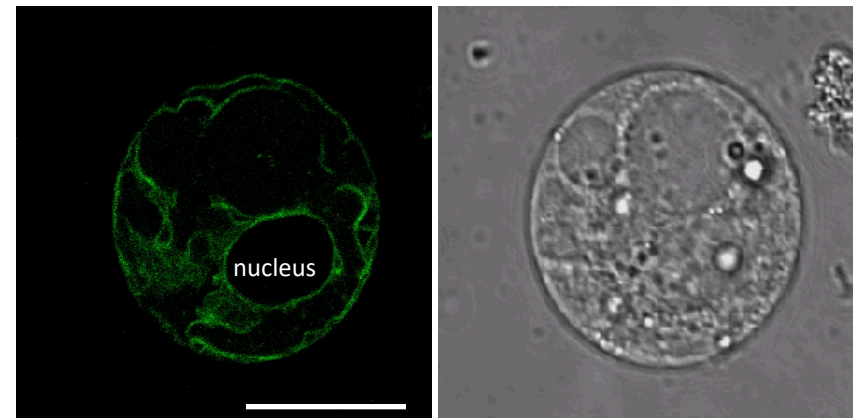
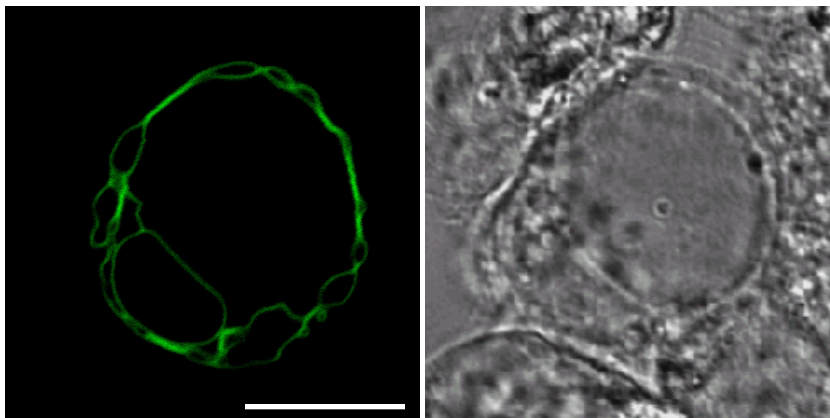
35S GFP

AtSec22 GFP (ER marker)



SIP1;1 GFP

GFP SIP1;1



bars = 10 μ m

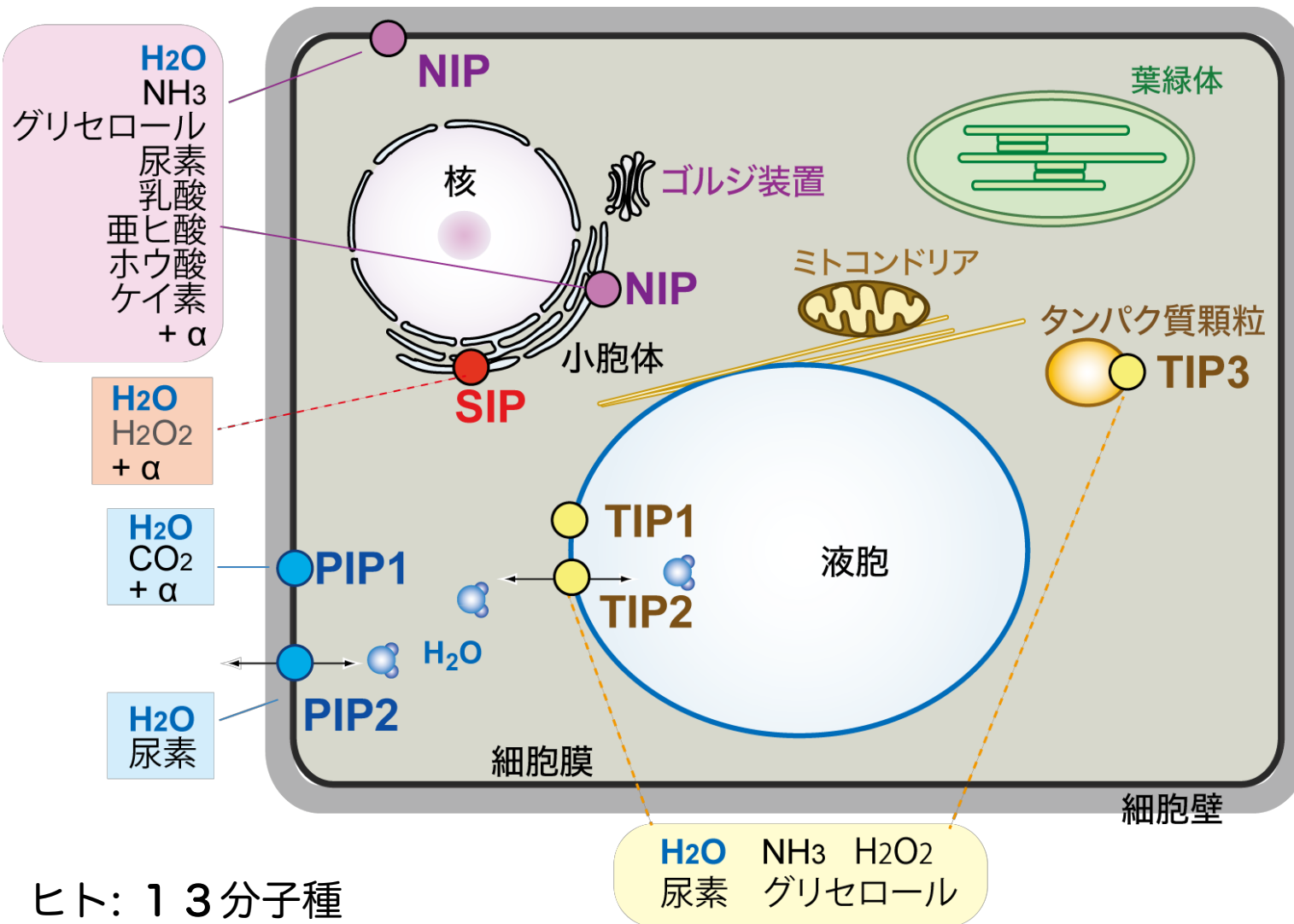
Ishikawa et al. (2004) FEBS Lett.



水チャネルの細胞内局在と輸送基質はさまざま

1992~2019

シロイヌナズナ 35、イネ 33、ヒト 13 分子種

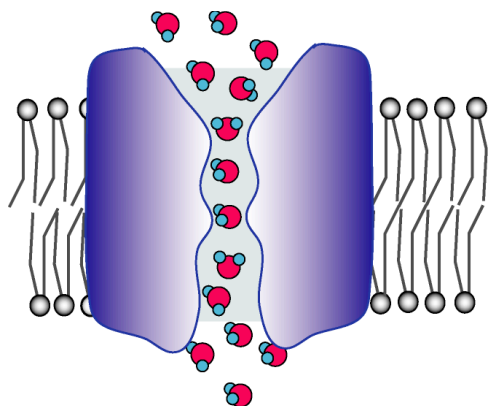


Higuchi
Tsuchiya
Murakami
Imagawa
Suga
Ohshima
Ishikawa
Mizutani
Tsuchihira
Miyamoto
Nara
Muto
Ashikari
Sato
Sakurai
Murai
Fleurat-Lessard
Serraji
Shiratake
Anderca
Kobae
Katsuhara
Miyake
Kamiya

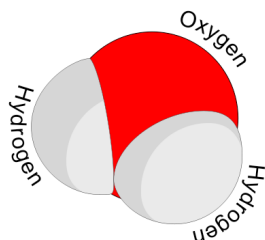
ヒト: 13 分子種



水チャネルが運ぶ分子

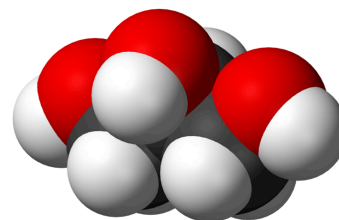
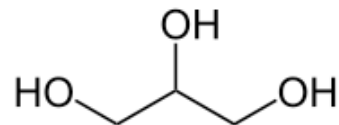


H₂O



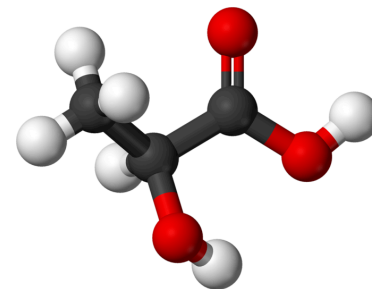
Higuchi et al. 1998
Ohshima et al. 2001
Suga et al. 2003, 2004
Sakurai et al. 2005

グリセロール

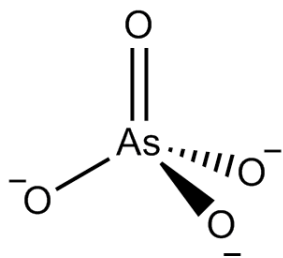


Anderca et al. 2004

乳酸

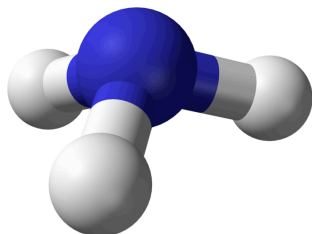
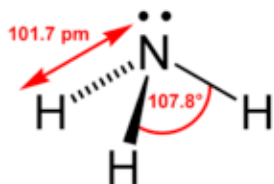


亜ヒ酸

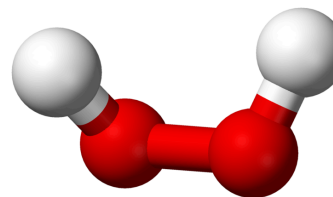
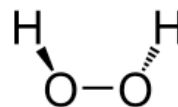


Kamiya et al. 2009 *JBC*

アンモニア

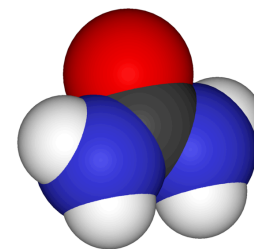
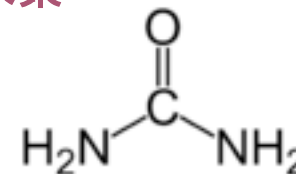


過酸化水素



Sato et al. 2019
submitted

尿素



芦田 淳 元名大総長 研究を通して人として成長する

瓜谷 郁三 名誉教授 農学の基礎学問を 異常から正常へ
研究あつての人生、人生あつての研究

旭 正 名誉教授 教育は忍耐
次はオルガネラと分子レベルの時代 1976
新しい役を引き受けたら新しいことに挑戦する

中村 研三 名誉教授 ゴールを早くつかむ実験を設計する

Harry Beevers UC名誉教授 研究は一人ではなくチームで進める

Enrico Martinoia Zürich大名誉教授 生まれ変わったらどの分野をやる？

手塚 修文 名誉教授 まず自分の年齢の数だけの論文を出しなさい



一つの分子にもたくさんの真実がある

一つの分子から見える全体像もある

「分子を見つめる、分子から生物を見る」

学生との共著論文作成は、双方の研究力の
位置エネルギーを上げる。

論文が採択されたら、それが一つ一つの表彰状。



共同研究の皆様（415名）

研究の支え

名古屋大学：旭正教授、瓜谷郁三教授、中村研三教授

University of California, Santa Cruz: **Prof. Harry Beevers & Prof. Lincoln Taiz**

北海道大学低温科学研究所：吉田静夫教授

H⁺-PPase is your baby. (1989)

重点領域研究、特定領域研究、新学術領域研究、特別推進 代表各位

名古屋大学 細胞ダイナミクス研究室 卒論生・大学院生・山本洋子

博士学位：（北大）松浦-遠藤千絵（吉田教授）、大平万里

（細胞ダイナミクス研究室）中西洋一、須賀しのぶ、中西華代、湯浅浩司、三村久敏、
神谷岳洋、広野めぐみ、小八重善裕、瀬上紹嗣、長崎菜穂子、河内美樹、土平絢子、
加藤真理子、浅岡真理子、田中奈月、福田茉由、佐藤良介# (Marinela Anderca)

Professors Enrico Martinoia, Youngsook Lee, Heven Sze, Marteen Chrispeels, Christoph
Maurel, Kendal Hirschi, Ulrich Lüttge, Pål Nyren, Russell L. Jones, Karin Schumacher,
Liam Dolan, Markus Geisler, Dr. Raphael Ratajczak, & Ali Ferjani



北海道大学
HOKKAIDO UNIVERSITY



NAGOYA
UNIVERSITY



17TH INTERNATIONAL WORKSHOP ON PLANT MEMBRANE BIOLOGY

June, 2016, Annapolis, Maryland



ゲーテの言葉

涙と共にパンを食べた者でなければ人生の味はわからない。

青年は教えられることよりも、刺激されることを欲する。



ありがとうございました。

Flowers will bloom

