

報告番号	※	第	号
------	---	---	---

主論文の要旨

論文題目 液胞膜 H^+ -pyrophosphatase の分子作動機構と植物における生理機能の解明

氏名 浅岡真理子

論文内容の要旨

H^+ -Pyrophosphatase (以下 H^+ -PPase)は植物細胞の液胞膜に局在し、細胞質のピロリン酸 (PPi) を加水分解する反応と共役して、プロトン (H^+) を液胞内に輸送する機能を持つ。 H^+ -PPase は高等植物に広く保存されており、緑藻、放線菌、古細菌での存在も確認されているが、酵母、大腸菌には存在しない。酵素機能への K^+ 要求性の違いにより H^+ -PPase は 2 タイプに分類されている。シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) では、 K^+ 要求性である I 型分子は液胞膜、 K^+ 非要求性である II 型はゴルジ体・TGN (トランスゴルジネットワーク) への局在を示し、I 型分子がタンパク質量として大部分を占めていることが確認されている。本研究では液胞膜局在の I 型 H^+ -PPase に焦点を当てている。 H^+ -PPase は 1989 年にヤエナリ (*Vigna radiata*) 液胞膜から単離精製され、約 73 kDa の単一のタンパク質が PPi の加水分解と H^+ の輸送の機能を兼ね揃えることが証明されて以来、生化学的・生理学的な両面において精力的な解析がなされてきた。本論文では H^+ -PPase の分子作動機構と、植物細胞における生理機能に関連した研究について、全五章に分けて述べる。第 1 章の H^+ -PPase とそれに関連する分子、生命機能についての「序論」に続き、第 2 章は「ヤエナリ H^+ -PPase の変異導入による新規機能残基の解析」、第 3 章には「 H^+ -PPase の植物細胞における生理機能の解明」という題目で研究成果を記している。これら 2 つの研究に関して以下に要約をまとめた。第 4 章では実験に用いた材料と方法を、第 5 章では研究成果の総合的な討論と今後の課題について「研究展望」としてまとめている。

ヤエナリ H^+ -PPase の変異導入による新規機能残基の解析

ヤエナリの液胞局在型 H^+ -PPase は 766 アミノ酸残基で構成され、16 個の膜貫通型領域をもつ。現在まで、生物種を超えてよく保存されている領域を中心に機能アミノ酸残基の研究が進み、その構造基盤の解析が進んできた。とくに、ヤエナリ H^+ -PPase

において結晶構造が解明され、分子構造とその触媒部位が決定されたことの意義は大きい (Lin et al., *Nature*, 2011)。結晶構造では H⁺輸送経路は、16 個のヘリックスのうち 6 個の膜貫通構造 (M5, M6, M11, M12, M15, M16) により構成され、基質結合部位はこれら 6 個のヘリックスおよびそれらの細胞質側ループにより形成されることが明らかとなった。本研究では結晶構造情報を元にその重要性が推測されるアミノ酸残基について、酵素機能への寄与の評価を試みた。実験としては、対象としたアミノ酸残基を Ala に置換した変異 H⁺-PPase を酵母に形質転換し、そのタンパク質発現、酵素活性を測定した。H⁺-PPase は P_i 加水分解と H⁺輸送を 1:1 の共役比で機能していることが示されており、アミノ酸の置換がそれらの共役に与える影響についても着目した。

生物間で極めて保存性の高い基質結合部位に位置するアミノ酸残基について、新たに T249、D269、D507、N534 が酵素機能に必須であることを示した。H⁺の透過孔と推定されている分子内部に位置するアミノ酸残基 (I545、L555、N738、V746、L749) の置換では、P_i 加水分解活性は軽度の減少であったが、H⁺ポンプ活性は完全に失われた。これらの変異酵素では P_i 加水分解と H⁺輸送の共役が破綻しているといえる。分子内ジスルフィド結合を形成する C124 と C132 に変異を導入しても、酵素活性への大きな影響はみられなかった。また、液胞内腔側のループに位置するアミノ酸残基や M15 ヘリックスの酸性残基の置換による酵素活性の阻害は比較的軽度であるが、P_i 加水分解活性と H⁺ポンプ活性の共役に影響することが分かった。これらの変異酵素の活性測定結果に基づき、結晶構造から得られる情報と合わせて各アミノ酸残基の機能的な役割について考察した。

H⁺-PPase の植物細胞における生理機能の解明

作物を含む様々な植物において H⁺-PPase の過剰発現は生育の向上をもたらすことが報告されている。一方、シロイヌナズナの H⁺-PPase 機能欠失株 (*fugu5*) では発芽初期に生育障害がみられる。H⁺-PPase の生理的重要性をさらに明確にするために、本研究では発現量の異なる 3 種類の新規の H⁺-PPase 過剰発現株を作成し、H⁺-PPase 機能欠失株 *fugu5-3* と共に成長段階ごとの成長特性の解析を試みた。

粗膜画分あたりの酵素活性を測定したところ、H⁺-PPase 過剰発現株は栄養成長期を通して高い H⁺-PPase 活性を示すことを確認した。H⁺-PPase の過剰発現は液胞膜上の別の H⁺-ポンプである V-ATPase の活性には影響しなかった。黄化芽生えや若い実生の成長、子葉の細胞形態、発芽時の糖新生におけるスクロース合成量の解析において、H⁺-PPase 過剰発現株は野生株と比較して有用な形質はみられず、H⁺-PPase の過剰発現は栄養成長初期には効果的ではないと分かった。一方、栄養成長後期には H⁺-PPase 過剰発現株は活性の高いラインほど生育の顕著な向上をみせ、最も活性の高いラインでは野生株に対して 24%、*fugu5-3* に対して 44% の新鮮重量の増加を示した。この結果に関連して、過剰発現株ではロゼット葉の表面面積も増加し、細胞数も野生株と比較して 30% 増加した。

H⁺-PPase は PPi 加水分解機能により細胞質の PPi を除去すること、H⁺ポンプ機能により液胞を酸性化することの二つの生理機能をもつと考えている。これら二つの生化学的な機能が、植物細胞においてどのような意味をもつのかを理解することを目的に、変異型酵素を用いた研究も展開した。「ヤエナリ H⁺-PPase の変異導入による新規機能残基の解析」(第2章)において見出した、PPi 加水分解活性を示すが H⁺輸送能をもたない脱共役型の変異をシロイヌナズナ H⁺-PPase にも対応させた (I549A、L749A)。それぞれを *fugu5-3* に形質転換し、H⁺-PPase の PPi 加水分解活性のみをもつ株を作出した。これらの株の解析において、栄養成長後期に *fugu5-3* でみられる生育障害は、通常型の H⁺-PPase を形質転換した際と同様に、脱共役型 H⁺-PPase 導入株も野生型レベルまで回復することを確認した。

以上の結果より、H⁺-PPase の過剰発現は栄養成長後期に生育向上につながることに、H⁺-ポンプ活性よりも PPi 加水分解活性が植物の栄養成長における正常成長に必須であることを明らかにし、H⁺-PPase の生理機能を総合的に考察した。