

## 論文審査の結果の要旨および担当者

報告番号	※	第	号
------	---	---	---

氏 名 浅岡 真理子

論文題目

液胞膜 H<sup>+</sup>-pyrophosphatase の分子作動機構と植物における生理機能の解明

論文審査担当者

主査	名古屋大学教授	前島	正義
委員	名古屋大学教授	小俣	達男
委員	名古屋大学准教授	藤田	祐一
委員	東京学芸大学准教授	Ali	FERJANI
委員	名古屋大学助教	中西	洋一
委員	名古屋大学特任助教	瀬上	紹嗣

浅岡真理子は、植物生体膜エネルギー変換酵素としてのプロトン輸送性ピロホスファターゼ ( $H^+$ -pyrophosphatase、以下  $H^+$ -PPase と記す。) に注目した。 $H^+$ -PPase は、分子サイズ約 73 kDa の単一分子であり、植物細胞の液胞膜に二量体として局在し、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もつ。浅岡は、この酵素の2つの機能を支える機能アミノ酸側鎖レベルで、構造-機能協関を解明し、さらに PPi 加水分解と液胞へのプロトン輸送の2つの機能の生理学的意義を解明にすることを目標とした。具体的には、第1の課題である構造-機能協関の解明について、マメ亜科ヤエナリの  $H^+$ -PPase を対象として、機能上重要と推定されるアミノ酸残基を推定し、アミノ酸置換変異を導入する方法により、個別アミノ酸残基の機能評価を実施し、多数の機能残基を同定した。第2の課題である酵素機能の二面性に関する生理学的研究を、 $H^+$ -PPase 機能欠失株、 $H^+$ -PPase 過剰発現株、変異型  $H^+$ -PPase 導入株の成長を比較することで評価し、新しい機能残基を特定した。以下、それぞれを述べる。

#### (1) ヤエナリ $H^+$ -PPase の変異導入による新規機能残基の解明

ヤエナリの  $H^+$ -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。生物種間で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、ヤエナリ酵素において結晶構造が解明され (Lin et al. *Nature*, 2011)、 $H^+$ 輸送経路が 16 個のヘリックスのうちの 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。結晶構造がスナップ写真になぞらえられるように、それだけでは作用機序は解明されたとは言えない。構造-機能協関の理解には、個々の部位あるいはアミノ酸残基の個別機能評価が必要である。そこで、X線結晶構造解析結果を参照しつつ、特定アミノ酸 17 残基それぞれの部位特異的アミノ酸置換変異型分子 26 種を作製し、酵母細胞で異種発現させ、それぞれの酵母から液胞膜を調製し、これを試料として PPi 加水分解活性、PPi 依存性プロトンポンプ活性を測定し、個別アミノ酸の役割を評価した。具体的に、(i) 基質結合部位に位置するアミノ酸残基について、新たに Thr249、Asp269、Asp507、Asn534 が酵素機能に必須であること、(ii)  $H^+$ の透過孔推定されている分子内部に位置する残基 (Ile545、Leu555、Asn738、Val746、Leu749) の置換では基質加水分解活性は軽度の減少であり、プロトンポンプ活性は完全に失われており、これらの残基が PPi 加水分解と  $H^+$ 輸送の共役に関与すること、(iii) 液胞内腔側のループに位置する残基 (Tyr126、Asp218) および M15 ヘリックスの酸性残基 (Glu663、Glu698、Glu703) が基質加水分解活

性とプロトンポンプ活性の共役に関わること、(iv) 分子内ジスルフィド結合を形成する Cys124 と Cys132 に変異を導入しても酵素活性への影響はなく、分子内架橋が酵素機能には影響しないことを明らかにした。これらの知見を結晶構造に基づいて酵素の作動機構を考察した。

## (2) H<sup>+</sup>-PPase の植物細胞における生理機能の解明

H<sup>+</sup>-PPase の2つの機能、すなわち、基質 PPi の加水分解とその反応に共役したプロトン能動輸送のいずれに生理学的な意義があるのかを明らかにすることを目的とした。浅岡は、発現量の異なる3種類の新規の H<sup>+</sup>-PPase 過剰発現株を作成し、H<sup>+</sup>-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<sup>+</sup>-PPase 過剰発現株は栄養成長期を通して高い H<sup>+</sup>-PPase 活性を示し、H<sup>+</sup>-PPase の過剰発現は液胞膜型 H<sup>+</sup>-ATPase の活性には影響しないことを確認した。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、過剰発現株は野生株と比較して有意な変化を示さず、酵素の過剰発現は栄養成長初期には効果的ではないことを明らかにした。栄養成長後期では、活性の高い過剰発現株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* 株に対して44%の新鮮重量の増加を示し、生育を促進することを明らかにした。この現象に関連し、過剰発現株ではロゼット葉の細胞数が増え、葉面積が増加することを明らかにした。

さらに、課題1で得た脱共役型の H<sup>+</sup>-PPase 変異酵素 (Ile549Ala 型、Leu749Ala 型: 基質分解は正常であるがプロトンポンプ機能をもたない) を *fugu5* 株に導入し、その効果を解析した。栄養成長後期に *fugu5-3* でみられる生育障害は、脱共役型 H<sup>+</sup>-PPase 導入株であっても、正常 H<sup>+</sup>-PPase の導入株と同様に回復することを確認した。本研究により、H<sup>+</sup>-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で、H<sup>+</sup>-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<sup>+</sup>-PPase の生理機能を総合的に考察した。

H<sup>+</sup>-PPase に関する上記の研究は、注目度の高い H<sup>+</sup>-PPase の作動機構の理解を深め、やや混乱気味の H<sup>+</sup>-PPase の生理機能について明確に決定づける情報をもたらすこととなった。このように浅岡真理子は、新しいタイプのプロトンポンプ H<sup>+</sup>-PPase に注目し、生化学および植物生理学における貢献度の高い、新規な知見を提供した。本審査委員会は本論文の内容が博士(農学)の学位を授与するに十分な価値を有するものと認め、合格と判定した。

性とプロトンポンプ活性の共役に関わること、(iv) 分子内ジスルフィド結合を形成する Cys124 と Cys132 に変異を導入しても酵素活性への影響はなく、分子内架橋が酵素機能には影響しないことを明らかにした。これらの知見を結晶構造に基づいて酵素の作動機構を考察した。

## (2) H<sup>+</sup>-PPase の植物細胞における生理機能の解明

H<sup>+</sup>-PPase の2つの機能、すなわち、基質 PPi の加水分解とその反応に共役したプロトン能動輸送のいずれに生理学的な意義があるのかを明らかにすることを目的とした。浅岡は、発現量の異なる3種類の新規の H<sup>+</sup>-PPase 過剰発現株を作成し、H<sup>+</sup>-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<sup>+</sup>-PPase 過剰発現株は栄養成長期を通して高い H<sup>+</sup>-PPase 活性を示し、H<sup>+</sup>-PPase の過剰発現は液胞膜型 H<sup>+</sup>-ATPase の活性には影響しないことを確認した。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、過剰発現株は野生株と比較して有意な変化を示さず、酵素の過剰発現は栄養成長初期には効果的ではないことを明らかにした。栄養成長後期では、活性の高い過剰発現株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* 株に対して44%の新鮮重量の増加を示し、生育を促進することを明らかにした。この現象に関連し、過剰発現株ではロゼット葉の細胞数が増え、葉面積が増加することを明らかにした。

さらに、課題1で得た脱共役型の H<sup>+</sup>-PPase 変異酵素 (Ile549Ala 型、Leu749Ala 型: 基質分解は正常であるがプロトンポンプ機能をもたない) を *fugu5* 株に導入し、その効果を解析した。栄養成長後期に *fugu5-3* でみられる生育障害は、脱共役型 H<sup>+</sup>-PPase 導入株であっても、正常 H<sup>+</sup>-PPase の導入株と同様に回復することを確認した。本研究により、H<sup>+</sup>-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で、H<sup>+</sup>-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<sup>+</sup>-PPase の生理機能を総合的に考察した。

H<sup>+</sup>-PPase に関する上記の研究は、注目度の高い H<sup>+</sup>-PPase の作動機構の理解を深め、やや混乱気味の H<sup>+</sup>-PPase の生理機能について明確に決定づける情報をもたらすこととなった。このように浅岡真理子は、新しいタイプのプロトンポンプ H<sup>+</sup>-PPase に注目し、生化学および植物生理学における貢献度の高い、新規な知見を提供した。本審査委員会は本論文の内容が博士(農学)の学位を授与するに十分な価値を有するものと認め、合格と判定した。