

主論文の要約

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

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。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PPi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、PPi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PPi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、PPi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で、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。