The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Plasma Membrane H+ : ATPase under Control of Photosynthesis in Vallisneria gigantea Leaves-Its Regulation and Role
Author(s)	原田, 明子
Citation	大阪大学, 2001, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/43598
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

【6】

氏　　名	原　田　明　子（はら だ あき こ）
博士の専攻分野の名称	博　士（理　学）
学　位　記　番　号	第　16525　号
学位授与年月日	平成13年9月26日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 理学研究科生物科学専攻
学　位　論　文　名	Plasma Membrane H^+-ATPase under Control of Photosynthesis in *Vallisneria gigantea* Leaves－Its Regulation and Role－（光合成により制御されるオオセキショウモ葉の細胞膜 H^+-ATPase－その調節と役割－）
論　文　審　査　委　員	（主査） 教　授　寺島　一郎 （副査） 教　授　徳永　史生　　教　授　長谷　俊治　　講　師　高木　慎吾

論　文　内　容　の　要　旨

植物の細胞膜 H^+-ATPase は、細胞内から細胞外へと H^+ を放出し、細胞質、細胞壁の pH 調節に寄与している。また、膜を介した H^+ 駆動力を形成し、溶質の二次輸送を可能にしている。私は、淡水産単子葉植物オオセキショウモ（*Vallisneria gigantea*）葉において、光合成に依存して膜電位の過分極反応が起こること、その反応は、光合成に依存した細胞膜 H^+-ATPase の ATP に対する親和性の上昇によって起こっていることを示した。さらに、葉肉細胞では光により原形質流動が誘発されるが、その誘発には細胞膜 H^+-ATPase により形成された H^+ 駆動力が必要であることを示した。

1）光合成に依存して膜電位は過分極する

葉肉細胞における光による膜電位の過分極反応を、ガラス微小電極法により解析した。赤色光、青色光、青色光＋近赤外光のいずれの照射も過分極反応をひき起こした。光合成電子伝達阻害剤 DCMU、H^+ ポンプ阻害剤 DCCD、脱共役剤 CCCP は光による過分極反応を抑えた。葉肉細胞に光応答性細胞膜 H^+-ATPase が存在すること、その活性促進は光合成に依存して起こることが示唆された。

2）葉にはC末端自己阻害領域を持つ細胞膜 H^+-ATPase が存在する

葉から水性二層分配法で高純度の細胞膜小胞を単離し、界面活性剤 Brij58を加えて反転膜小胞を調製後、キナクリン蛍光消光法により、ATP に依存した H^+ 輸送活性を測定した。細胞膜小胞にトリプシン処理を施したところ、H^+ 輸送活性の ATP に対する K_m が減少し、V_{max} が上昇した。このとき細胞膜 H^+-ATPase の C 末端約 8 kD が切断されていることを、免疫ブロット解析により確認した。葉にはC末端自己阻害領域を持つ細胞膜 H^+-ATPase が存在すると結論した。

3）細胞膜 H^+-ATPase 活性の ATP に対する K_m は光合成に依存して減少する

暗順応させた葉、赤色光を照射した葉を液体窒素中で破砕後、ただちにバナジン酸感受性 ATP 加水分解活性を測定し、ATP に対する K_m、V_{max} を決定した。同様に処理した葉から細胞膜小胞を単離し、ATP に依存した H^+ 輸送活性を測定した。いずれの活性においても、ATP に対する K_m が赤色光照射に依存して減少した。V_{max} については有意な差は検出されなかった。葉を DCMU で処理しておくと、赤色光の効果は打ち消された。光合成に依存して細胞膜 H^+-ATPase 活性の ATP に対する親和性が上昇することが分かった。

4）無機リン酸（Pi）によるH^+輸送活性の阻害はC末端自己阻害領域を介している

Pi存在下では、H^+輸送活性のATPに対するK_mが上昇し、V_{max}が減少した。さらに、細胞膜小胞にトリプシン処理を施すとPiによる阻害が抑えられたので、Piによる活性阻害はC末端自己阻害領域を介していることが分かった。

H^+輸送活性のATPに対するK_mのPiに依存した上昇は、暗順応後および赤色光照射を施した葉から単離したいずれの細胞膜小胞においても確認されたが、赤色光によってひき起こされたK_mの減少は維持されたままだった。光合成に依存した細胞膜H^+-ATPase活性のATPに対するK_mの減少と、PiによるK_mの調節とは、独立の機構を介して起こると考えられる。

5）葉には複数の細胞膜H^+-ATPaseアイソフォームが存在する

RT－PCRにより、葉に発現する3種類の遺伝子断片*Vga1, 2, 7*を得た。また、単離細胞膜小胞の二次元電気泳動により、少なくとも2種類のアイソフォームの存在が示唆された。葉には複数の細胞膜H^+-ATPaseアイソフォームが発現していることが分かった。いずれのアイソフォームも、その発現量は赤色光照射によって変化しなかった。

6）原形質流動の光誘発には細胞膜を介したH^+駆動力が必要である

葉肉細胞を様々なpHのもとでDCCDなどの薬剤によって処理し、赤色光や青色光を照射して原形質流動が誘発されるかどうかを調べた。また、それぞれの条件において膜電位を測定し、細胞膜を介したH^+駆動力を見積もった。その結果、20kJ/mol以上のH^+駆動力が存在し、かつPfrが存在する条件の時にのみ原形質流動の光誘発が起こることがわかった。

単離反転細胞膜小胞において、Ca^{2+}/H^+交換輸送活性の検出に成功した。赤色光による原形質流動誘発時には、光合成に依存した細胞膜H^+-ATPaseの活性促進により形成されたH^+駆動力を利用して、細胞内から細胞外へCa^{2+}が放出されることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

原田明子さんは、淡水産単子葉植物オオセキショウモの葉を材料とし、光に依存した細胞膜プロトン駆動力の形成機構について解析した。プロトン駆動力の形成は光合成によってひき起こされること、葉に細胞膜プロトン輸送性ATPアーゼが発現していること、この酵素の活性が光合成に依存して分子内調節により促進されることなどを、電気生理学、生化学、分子生物学的手法を駆使して明らかにした。博士（理学）の学位論文として十分価値あるものと認める。