

ATPase 活性の諸性質を指標としたニンジン根からの液胞膜小胞単離法の検討

山西 弘 恭・加藤 忠 司・青木 和 彦

(東北農業試験場)

Characterization of Tonoplast ATPase from Carrot Roots

Hiroyasu YAMANISHI, Tadashi KATO, and Kazuhiko AOKI

(Tohoku National Agricultural Experiment Station)

1 はじめに

近年、低温耐性にすぐれ、また低温条件下での栽培に適する作物開発のために、作物の養分吸収に及ぼす低温の影響を細胞レベルで解明することが必要とされてきている。遺伝子工学的手法を用い、葉緑体チラコイド膜のリン脂質組成を変化させることによって低温耐性を向上させることに成功した例も報告されている¹⁾。しかし、作物の地下部の低温適応性については葉緑体が存在しないため、原形質膜、液胞膜などの膜系の関与が考えられる。液胞膜のプロトン輸送性 ATPase は低温で失活しやすいことから低温障害の部位の一つと考えられる。この酵素は液胞内外に pH 勾配を形成しアミノ酸、糖、イオンなどの二次輸送のエネルギーを生み出す重要な働きをしているため、この酵素の失活は低温障害の引き金となりうる。ヤエナリ胚軸から精製した液胞膜 ATPase は活性の発現にリン脂質の添加を必要とし、活性の温度依存性は添加したリン脂質の相転移温度に影響される²⁾ことが報告されており、膜脂質と酵素蛋白質の相互作用が低温失活機構に関与をしていると推測される。ニンジンなどの根菜類でも液胞膜機能と温度適応性が関与していると考えられるため、液胞膜 ATPase の諸性質並びに低温の影響を調べた。

2 試 験 方 法

市販のニンジン根を約 2 mm 角に細切し、ポリトロンを用いて緩衝液中で磨砕後、低速遠心で残渣を除去し、上澄みから超遠心によってミクロゾーム膜画分を得た。ミクロゾーム膜画分をショ糖を含む緩衝液に懸濁後、ソルビトールを含む緩衝液を重層し、浮遊遠心法によってショ糖層とソルビトール層の中間に浮遊してくる液胞膜小胞に富む膜画分を単離した(図 1)。ショ糖濃度は 0.2~0.4 M までの 7 種類を用いた。液胞膜 ATPase の活性は単離した膜画分と ATP を pH 7.5, 37°C で 30 分間反応させ、ATP の分解によって生じる無機リンを定量して求めた。さまざまな阻害剤の影響から液胞膜の純度を推定した。液胞膜 ATPase に対する低温の影響は、0°C で 10~120 分間インキュベートした後、37°C で活性を測定し調べた。

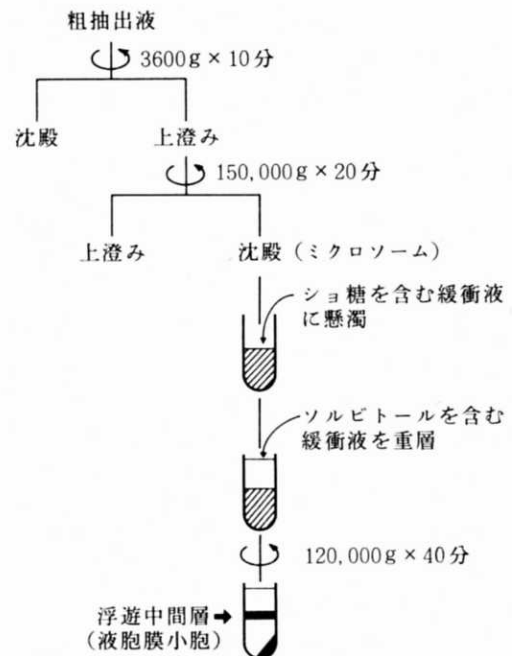


図 1 液胞膜小胞の単離方法

3 結果及び考察

0.2 から 0.4 M の 7 種類のショ糖濃度緩衝液にミクロソームを懸濁し、ショ糖密度浮遊遠心法で浮遊してくる膜画分の ATPase 活性を KNO_3 なし、及び 50 mM KNO_3 存在下で調べたところ、液胞膜に由来する硝酸感受性 ATPase の割合から判断して、いずれのショ糖濃度においてもミクロソームに比べ液胞膜の割合が増加し、またショ糖濃度が低いほど液胞膜の割合も増加すると推定された。一方 ATPase の総活性はショ糖濃度が低いほど低かった(表 1)。

表 1 さまざまなショ糖濃度の浮遊遠心法によって得られた膜画分の ATPase 活性 ($\mu\text{mole Pi}/30\text{min}/20\mu\text{l}$)

ショ糖濃度 (M)	- KNO_3 (a)	+ KNO_3 (b)	(a - b / a) %
0.200	0.15	0.08	47
0.250	0.15	0.08	47
0.275	0.37	0.20	46
0.300	0.32	0.18	44
0.325	0.32	0.19	41
0.350	0.43	0.28	35
0.400	0.43	0.28	35
ミクロソーム	1.18	1.10	7

0.3M のショ糖密度浮遊画分を用いて阻害剤の影響を調べると、1 mM アザイドによる阻害はほとんどなくミトコンドリア ATPase の混入はないと推定できたが、100 μ M バナジン酸で40%程度阻害され(図2)、原形質膜 ATPase の混入が推定された。同様の方法でヤエナリから単離した液胞膜画分はアザイド及びバナジン酸による阻害がほとんど認められず、超遠心によって得られる液胞膜画分の沈殿は乳白色である。これに対し、ニンジン根より単離した液胞膜に富む膜画分の沈殿は強い黄赤色を呈していた。これは、色素体より遊離した色素が、組織を磨砕する際に小胞化する液胞膜に取り込まれたためと考えられる。同様に色素を取り込み、比重の軽くなった原形質膜小胞が、液胞膜に富む膜画分に混入している可能性が考えられる。純度の高い液胞膜を単離するためには、より穏和な方法を用いる必要があると考えられる。

アニオンは $\text{SCN}^- > \text{NO}_3^- > \text{I}^-$ の順に強く阻害した(図3)。この傾向は、報告されている液胞膜のプロトン輸送性 ATPase とほぼ一致するが、阻害程度は100mMKSCN で約40%と低く、この結果からも原形質膜 ATPase の混入が推定された。

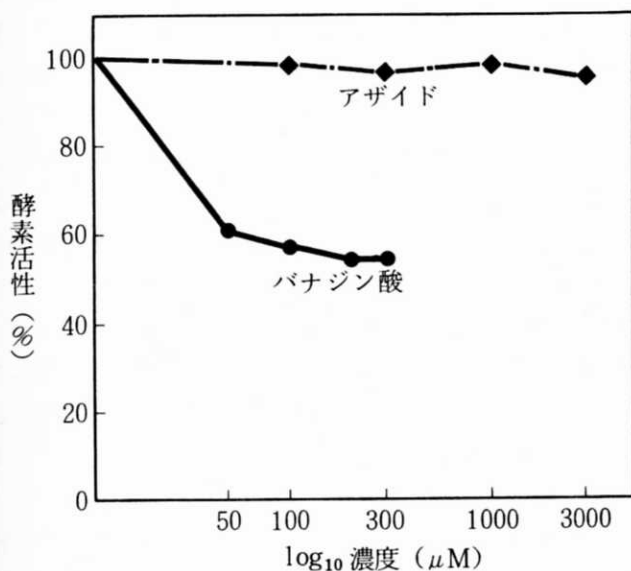


図2 ATPase 活性に対する阻害剤の影響

引用文献

- 1) Murata, N. Ishizaki-Nisshizawa, O. ; Higashi, S. ; Hayashi, O. ; Tasaka, Y. ; Nishida, I. 1992. Genetically engineered alteration in the chilling

液胞膜 ATPase の低温感受性は原形質膜 ATPase の影響を除外するため、100 μ M のバナジン酸を加えて原形質膜 ATPase の活性を抑えた条件下で調べた。0 $^{\circ}\text{C}$ でのインキュベーションの時間を長くするに従い、酵素は徐々に失活し、120分間のインキュベーションによって残存活性は40%以下となった(図4)。

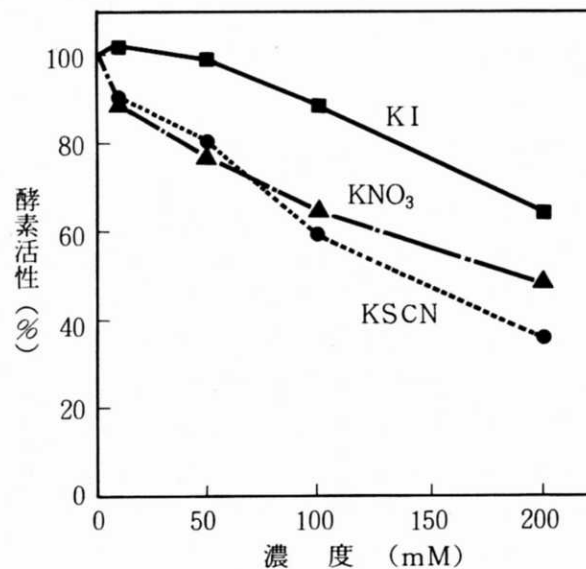


図3 ATPase 活性に対するアニオンの影響

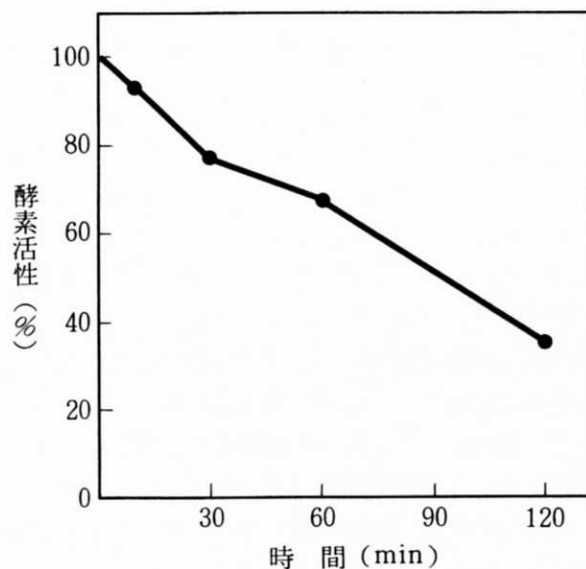


図4 ATPase 活性に対する低温の影響

sensitivity of plant Nature 356 : 710-713

- 2) Yamanishi, H. ; Kasamo, K. 1993. Modulation of the activity of purified tonoplast H^+ -ATPase from mung bean (*Vigna radiata* L.) hypocotyls by various lipids Plant Cell Physiol. 34 : 411-419