

H-7

液胞内灌流法による車軸藻液胞膜の単離

竹重 一彦^{1,2}, A. Hager² (東大、理、植物、
Institut für Biologie 1 der Universität Tübingen²)

近年植物細胞においてピロリン酸 (PP_i) をエネルギー源として用いる新種の H^+ 輸送機構が発見された。

この H^+ 輸送性ピロフォスファターゼ (H^+PPase) の細胞内の局在について、新免は巨大単細胞車軸藻類の一種、*Nitella translucens* より調整した脱原形質膜モデル細胞を用い直接に液胞膜上にその活性の存在を示した。高等植物においては密度勾配遠心により分離された液胞膜、ゴルジ体を豊富に含む膜分画を用いて、各々の分画に H^+PPase の活性の存在が示された。しかしながら両分画への他の細胞内小器官由来膜小胞の混在、あるいは信頼に足る液胞膜標識酵素の欠如などのため、 H^+PPase の細胞内局在を完全に決定し酵素活性を正確に測定することは今なお困難な部分を残している。

今回我々は液胞膜のショ糖密度勾配上の局在を知り、また液胞膜分画への他の膜系からの混入を可能な限り少くするため *Chara corallina* を用い細胞内灌流の技法により液胞膜を単離した。図1に示すように細胞の両端を切除した後、細胞液を除去するため細胞内灌流液を導入する。この最初の灌流により $PPase$ 活性測定を著しく困難にする酸性フォスファターゼを大部分除去することができる。引き続き二回目の細胞内灌流を EGTA を含む灌流液により両方向に行う。この操作により液胞膜は破れ自ら小胞を形成し、一部はその内部に原形質を取り込む。原形質ゾルはくずれ落ち細胞外へ流れ出されてくる。

液胞膜のショ糖密度勾配上の局在を知るために、最初の細胞内灌流を $300\mu g/ml$ の FITC-ConA を含む液で行い液胞膜を標識した。未結合の FITC-ConA は引き続いて細胞内灌流を行って除去した。FITC-ConA と共に 125 mM の α -methyl-D-mannoside を灌流液に加えておくこと FITC-ConA の液胞膜への特異的な結合は阻害された。二回目の灌流により得た分画を直接 $15\%-45\%$ のショ糖密度勾配の上に載せ $80,000\times g$ で 15 時間遠心を行った。FITC の蛍光はショ糖濃度約 17% 及び 25% の位置で極大となる。 25% の極大値は他の液胞膜標識酵素である KNO_3 感受性 ATPase の極大値と一致するが大部分は小胞体の分画とも重なる。

液胞膜を単離するにあたっては、別にバーコールによる不連続密度勾配遠心を行った。二回目の灌流の後この分画のバーコール濃度を 10% に調整し、更に上層に 3% のバーコールを含む細胞内灌流液を載せる。 $1,000\times g$ にて 15 分遠心しパスツールピペットによって上層に浮いてきた液胞膜を採集する。この分画にはゴルジ体の標識酵素である latent IDPase、あるいはミトコンドリアの内膜の標識酵素である Cytochrome c 酸化酵素の活性は見い出せなかった。二回目の灌流の後にも細胞壁、原形質膜、葉緑体は細胞側に残っており、この液胞膜分画に混入することはない。液胞膜分画は ATP 及び PP_i に依存した

H^+ ポンプ活性を持つ。 H^+PPase は pH 8.5 付近にて活性が最大となり KF により活性阻害を受ける ($K_i = 0.5-0.8\text{ mM}$)、また強力な ATPase の阻害剤である DCCD に対しては比較的感受性が低い。また硝酸イオンにより活性阻害を受けないことなど ATPase とは多くの点で異なった性質を持つ。このことは PP_i に依存した H^+ ポンプ活性は、 $H^+ATPase$ によるのではなく、別個の H^+ 輸送性酵素によるものであることを示すものである。

