

1Bp-5

トウモロコシ根細胞質膜 H^+ -ATPase の精製と抗体調製

○長尾敏弘、笹川英夫、杉山達夫（名大・農・農化）

高等植物の細胞質膜に存在する H^+ -translocating ATPase は、細胞内 pH の調節、物質輸送等に重要な働きをしている。今回、我々はこの酵素の構造・機能を解明することを目的に、トウモロコシ幼根の細胞質膜から H^+ -translocating ATPase を精製しその諸性質を明らかにするとともに、この酵素の研究に有効な手段となり得る特異抗体を調製したので報告する。

〔方法と結果〕暗所 27°C で 3 日間生育させたトウモロコシ（品種 Golden Cross Bantam T51）幼根の磨砕液から得たミクロソーム画分より、ポリエチレングリコール 3350 とデキストラン T500 の水性二相分配法により、細胞質膜画分を調製した。この画分を Triton X-100 で洗浄後、リゾレシチンで処理したところ、効率よく ATPase が可溶化された。可溶化された ATPase を 25-50% グリセロール密度勾配遠心で分離し、最も比活性の高かったフラクションについて SDS-PAGE を行くと、分子量 90,000 の位置に主要ポリペプチドのバンドが検出され、ATPase が高度に精製されたことが明らかとなった。この精製標品の比活性は細胞質膜画分のその約 15 倍に高められた。精製された ATPase の諸性質を調べたところ、リゾレシチンによる活性化、至適 pH、阻害剤の影響など従来報告されている植物細胞質膜 ATPase の性質にほぼ一致した。一価のカチオンが活性発現のために必須であること、また高濃度 (200 mM) の KNO_3 によっても活性が阻害されるなど若干の性質の異なる点も認められた。

可溶化画分の SDS-PAGE での主要バンドである分子量 90,000 のポリペプチドを溶出し、それを抗原としてウサギ抗体を調製した。得られた抗体は免疫二重拡散により抗原ポリペプチドと単一の沈降線を形成した。さらに免疫滴定により ATPase 活性は抗体の濃度に依存し阻害された。また、Western-blotting により分子量 90,000 のポリペプチドに特異的に結合することが明らかになった。この抗体を用い、フロライン A - 金コロイド法により分子量 90,000 ポリペプチドのトウモロコシ根細胞内局在性を調べたところ、細胞質膜に特異的に反応し、他のオルガネラ内及びオルガネラ膜には特異的吸着が認められなかった。

以上の結果より、トウモロコシ根細胞質膜の H^+ -translocating ATPase がリゾレシチンで効率よく可溶化されグリセロール密度勾配遠心で高度に精製されること、一価のカチオンが活性発現に必須であることなど、この酵素の部分性質が明らかとなった。また、この酵素は分子量 90,000 のポリペプチドをもち、調製された抗体が ATPase のポリペプチドに対する特異抗体であることが明らかとなった。