

1Cp08

ヤエナリ液胞膜ピロホスファターゼの精製と性質

○前島正義、吉田静夫 (北大、低温研)

【目的】 高等植物の液胞膜にはプロトンATPaseとは別に、プロトン輸送能をもつピロホスファターゼ (Inorganic pyrophosphatase) の存在が知られている。これら二つのプロトン輸送性酵素の作動により液胞の酸性状態が維持され、膜内外の H^+ 駆動力が形成される。ピロホスファターゼは無機ピロリン酸を加水分解し、その時放出されるエネルギーを利用して H^+ を液胞内へ能動的に輸送すると考えられている。したがってこのエネルギー転換酵素は、活発な物質輸送を行なう液胞機能の重要な担い手と見なされるが、これまで精製例はなく酵素分子そのものの性質は明らかでない。ATPase とピロホスファターゼの生理学上の機能分担の仕組みも判然としない。そこで本研究では、先ず酵素分子の実体をとらえ酵素学的性質を解明することを目的として、ヤエナリ (Mung bean) 下胚軸の液胞膜からピロホスファターゼを可溶化・精製した。

【方法と結果】 3.5日間暗所で発芽生育させたヤエナリ芽生えの下胚軸から、分画遠心と浮遊遠心法によって高純度の液胞膜画分を得た。この膜画分から2段階の可溶化処理によりピロホスファターゼを選択的に可溶化した。すなわち50 mM KCl 存在下でのデオキシコール酸処理によって膜に弱く結合しているタンパク質を除去し、次にリゾレシチン (lysophosphatidylcholine) によってピロホスファターゼを可溶化した。得られた可溶化画分を QAE-Toyopearl カラムクロマトグラフィーにかけて目的の酵素を分離精製した。酵素活性を保持し可溶化状態を保つために、可溶化以降のステップではグリセロールと Mg^{2+} Triton Xを共存させた。精製酵素標品はSDS/ポリアクリルアミドゲル電気泳動上で73 kDaの単一バンドを示した。非変性状態での分子サイズを知る目的でグリセロール密度勾配遠心を行なったところ、ピロホスファターゼはカタラーゼ (230 kDa) より遅く、牛血清アルブミン (67 kDa) より少し速く沈降した。界面活性剤が酵素に結合しているため単量体と断言することはできないが、液胞膜ATPase (380 kDa) よりかなり小さいことが推定された。

精製標品を用いて二、三の酵素学的性質を検討した。ピロホスファターゼはATP、ADP、NADPなどは加水分解せず、無機ピロリン酸のみを基質とした。至適pHは6.5 - 7.5 の範囲にあった。酵素反応は Mg^{2+} を必須とし、 K^+ により促進された。精製酵素の活性発現には低濃度の界面活性剤とリン脂質ミセルの添加が必要であった。 KNO_3 、 Na_2MoO_4 、 NaN_3 などは酵素反応に影響を与えず、2 mMの Na_3VO_4 と5 mMのKFは反応を50%阻害した。

この酵素のプロトン輸送能は最も興味ある点であるが、これに関して次の知見を得た。①精製酵素に対する抗体はピロリン酸加水分解反応だけでなく、液胞膜小胞でのピロリン酸依存性 H^+ 輸送活性も抑制した。②DCCDはピロリン酸加水分解反応を阻害した。③ $[^{14}C]$ -DCCDは精製ピロホスファターゼに結合した。これらの結果は今回得た精製標品がプロトン輸送性のピロホスファターゼであることを示していると判断した。