



# 植物細胞液胞膜におけるリン酸輸送機構と液胞膜プロテオーム解析

大西, 美輪

---

(Degree)

博士 (理学)

(Date of Degree)

2007-03-09

(Date of Publication)

2014-12-05

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙2937

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2002937>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



神戸大学 博士論文

植物細胞液胞膜におけるリン酸輸送機構と  
液胞膜プロテオーム解析

平成 19 年 1 月

大 西 美 輪

## 目 次

要 旨	.....	i
序 論	.....	1
植物とリン		1
液胞による細胞質リン酸ホメオスタシス		1
液胞とは		2
液胞におけるイオン輸送機構		3
植物細胞からの液胞の単離について		5
1 章 液胞におけるリン酸輸送機構	.....	6
序	.....	6
材料と方法	.....	9
植物材料と培養条件		9
リン酸含有量の測定		9
ニチニチソウ培養細胞からのプロトプラストと液胞の単離		10
ニチニチソウ液胞へのリン酸取り込みの測定		11
液胞膜画分の調製		11
プロトンポンプ活性の測定		12
プロトンポンプのタンパク質量の比較		12
プロトンポンプ基質としての ATP と PPi の測定		12
シロイヌナズナ培養細胞からのプロトプラストと液胞の単離		13

	シロイヌナズナ液胞へのリン酸取り込みの測定	14
<b>結 果</b>	.....	19
	異なるリン酸条件下で培養したニチニチソウ細胞の成長と細胞内外のリン酸量の変化	19
	異なるリン酸条件下で培養したニチニチソウ液胞におけるリン酸の取り込み	19
	異なるリン酸条件下での液胞膜プロトンポンプ活性	20
	異なるリン酸条件下での液胞膜プロトンポンプのタンパク質量の変化	20
	プロトンポンプ基質としての ATP と PPi の含有量	21
	シロイヌナズナ単離液胞におけるリン酸の取り込み	21
<b>考 察</b>	.....	23
	ニチニチソウにおける異なるリン酸条件の設定	23
	液胞へのリン酸取り込みの活性化機構	23
	液胞膜におけるプロトンポンプの活性	24
	生体内での液胞膜を介したリン酸輸送	25
	シロイヌナズナ液胞単離で工夫した点	26
	シロイヌナズナにおける液胞膜を介したリン酸輸送機構	27
<b>2 章 液胞膜リン酸輸送体の探索</b>	.....	38
<b>序</b>	.....	38
	液胞膜のリン酸輸送体はまだみつからない	38

	リン酸輸送体同定のためのアプローチ – 阻害剤探索とトラン	
	スクリプトーム解析 –	38
方 法	.....	41
	Biotin-Sufo-OSU とリン酸の競合実験	41
	液胞膜の調製	41
	Biotin-Sufo-OSU によるリン酸輸送体候補の標識	41
	異なるリン酸条件下でのトランスクリプトーム解析	42
結果と考察	.....	44
	Biotin-Sufo-OSU によるリン酸取り込みの阻害	44
	Biotin-Sufo-OSU によるリン酸輸送体候補の標識	44
	異なるリン酸条件下でのトランスクリプトーム解析	45
<b>3 章 液胞膜プロテオーム解析</b>	.....	<b>52</b>
序	.....	52
	オルガネラのプロテオーム解析	52
	液胞膜のプロテオーム解析	52
方 法	.....	54
	液胞膜標識酵素の活性とタンパク質量	54
	プロテオーム解析用液胞膜の調製	54
	液胞膜のプロテオーム解析	55
	GFP 融合タンパク質の細胞内局在の確認	56
結果と考察	.....	59

液胞膜の純度	59
プロテオーム解析用液胞膜の調製	60
液胞膜に存在するタンパク質	61
同定されたタンパク質の分類	61
プロトンポンプ	62
トランスポーター	63
2つ以上膜貫通領域を持ち、機能の推定されているタンパク質	64
膜貫通領域を持たないまたは1つ持つ機能既知タンパク質	65
液胞膜局在新規タンパク質	66
液胞膜リン酸輸送体候補タンパク質	66
まとめ	84
参考文献	85
謝辞	102

## 要 旨

植物培養細胞から単離した **intact** 液胞を用い、液胞膜におけるリン酸輸送機構の解明とリン酸輸送体の同定を目的として研究を進めた。

細胞外のリン酸栄養条件を変え、液胞へのリン酸の取り込み活性と、液胞へのリン酸の取り込みに関与することが知られている液胞膜プロトンポンプ活性を測定した。次に、液胞におけるリン酸輸送体を同定するため、タンパク質、遺伝子の両方向からの探索を試みた。生理学的解析には、ニチニチソウ培養細胞から単離した液胞が適していたが、遺伝子レベルの解析にはゲノム情報が充実しているシロイヌナズナが有利である。そこで、シロイヌナズナ培養細胞から **intact** 液胞を単離する方法を確立した。リン酸輸送体の同定を含め、液胞膜に存在するタンパク質を網羅的に解析するため、シロイヌナズナ培養細胞から単離した純度の高い液胞を用いて、液胞膜プロテオーム解析を行った。

第 1 章では、液胞のリン酸輸送機構について、ニチニチソウ培養細胞から単離した **intact** 液胞を用いた解析について述べる。異なるリン酸栄養条件で培養した細胞から単離した **intact** 液胞の液胞膜を介した無機リン酸 ( $\text{Pi}$ ) の取り込みを測定した。高濃度 (11.25 mM) のリン酸存在下で培養した細胞に比べて、低濃度 (1.25 mM) で培養した細胞では、液胞へのリン酸の取り込みが高い活性がみられた。液胞膜を介したリン酸の取り込みはプロトンポンプ活性と共役していることがすでに明らかになっているため、異なるリン酸栄養条件におけるプロトンポンプ活性に注目した。その結果、液胞膜のプロトンポンプである液胞膜型  $\text{H}^+$ -ATPase と  $\text{H}^+$ -PPase のプロトン輸送と酵素活性が共に、低リン酸条件で増加していることを見いだした。プロトン輸送活性の増加にも

かかわらず、ウェスタンブロット解析によるプロトンポンプのタンパク質の発現量には明らかな差はみられなかった。

また、リン酸輸送体を分子レベルで解析するために、シロイヌナズナ培養細胞からの液胞単離方法を確立した。シロイヌナズナの液胞におけるリン酸取り込みにおいても、ニチニチソウと同様の結果が得られた。低リン酸条件下における植物液胞へのリン酸取り込みの活性化機構について議論した。

第2章では、液胞膜におけるリン酸輸送体探索について述べる。液胞膜におけるリン酸輸送体を標識するため、共有結合型のリン酸輸送阻害剤を探したところ、**Biotin-Sulfo-OSu** がリン酸輸送を阻害することが示された。そこで **Biotin-Sulfo-OSu** を標識として、リン酸輸送に関わるタンパク質候補の検出を試みた。その結果、リン酸輸送体の候補タンパク質は約 60 kDa または約 100 kDa の分子量を持つことが示唆された。もう1つのアプローチとして、トランスクリプトーム解析を試みた。第1章の実験より液胞へのリン酸の取り込みは、高リン酸条件に比べ、低リン酸条件でより活性化される現象であることが示された。リン酸の取り込みに関わる遺伝子の発現が、高リン酸条件に比べ、低リン酸条件で増加していることを期待し、2つの条件間でトランスクリプトーム解析を行い、リン酸輸送に関わる遺伝子を探索することとした。その結果、低リン酸条件下で2倍以上発現が増加する遺伝子として 670 遺伝子、そのうち2つ以上の膜貫通領域を持つ膜タンパク質が 62 個見いだされ、機能未知タンパク質も複数含まれていた。

第3章では、第2章で標識したリン酸輸送体の同定を目指して行った、液胞膜の網羅的なプロテオーム解析について述べる。第1章で単離方法を確立したシロイヌナズナ培養細胞からの純度の高い **intact** 液胞には、ウェスタンブロット解析の結果、細胞膜

マーカーである細胞膜型  $H^+$ -ATPase は検出されず、ゴルジ体や ER 由来のタンパク質もほとんど見いだされなかった。SDS-PAGE による単離液胞膜タンパク質の分画と LC-MS/MS による包括的なプロテオーム解析によって、163 個のタンパク質を同定することができた。液胞型  $H^+$ -ATPase や  $H^+$ -PPase といった主要な液胞膜タンパク質の多くのサブユニットとともに、種々のトランスポーターが見いだされた。膜貫通領域を全く持たないかまたは 1 つ持つタンパク質も多く同定され、それらの中にも、液胞に関連した機能を持つと推定されるものが含まれていた。また、膜貫通領域を持つ機能未知タンパク質も複数同定された。他のオルガネラ由来のタンパク質がほとんど検出されなかったことは、これまでに報告されていた液胞膜プロテオーム解析に対し、大きく前進したといえる。

本研究により、異なるリン酸栄養条件で培養された細胞における、植物液胞のリン酸取り込み機構について新たな知見が得られた。また、植物液胞の解析を進める上で重要な実験技術である、シロイヌナズナ培養細胞からの液胞単離方法を確立した。さらに、この液胞を用いた液胞膜プロテオーム解析の結果、これまでに知られていた液胞膜タンパク質に加え、新規膜タンパク質を多数同定することができた。

## 序 論

### 植物とリン

リンは生物にとって、最も基礎的な元素の一つである。遺伝子の本体である核酸、細胞膜を構成するリン脂質、代謝反応の中心物質であるヌクレオチドや糖リン酸など、いずれも生体内に存在するリン酸化合物は細胞の主要構成要素である。また、タンパク質のリン酸化-脱リン酸化による機能制御など、生理反応の調節においてもきわめて重要な働きをしている。地球上の動植物すべてに含まれるリンは、植物が土壌から吸収した正リン酸 ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) に負っている。植物が利用できる土壌や水圏のリン酸濃度は数  $\mu\text{M}$  かそれ以下であり、自然界において、植物は恒常的にリン酸欠乏状態にある。こうした低リン酸濃度環境に対して、植物はさまざまな生理反応を発達させている (三村 1999, 柴田 1999)。外界のリン酸濃度が下がると、細胞のリン酸取り込み活性が上昇する。限られた土壌中のリン酸を吸収するために、植物は根の形態を変化させ、リン酸吸収に必要な根の表面積を増加させる。リンゴ酸、クエン酸といった有機酸やホスファターゼを根から外部に放出することで、Fe や Al と結合した難溶性のリン酸化合物や有機リン酸化合物から植物が吸収できる正リン酸を遊離し、土壌のリン酸を有効利用している。また、多くの植物は菌根菌との共生により、糖などの有機物を与える代わりに、土壌中に張りめぐらされた菌糸によって集められたリン酸などの栄養塩を濃縮して受け取っている。さらに生体内での転流機構を発達させることで、取り込んだリン酸の有効利用を進めている。また、次世代へ貴重なリン酸の受け渡しを行うために、種子に大量のリン酸化合物 (主にフィチン) を蓄積する。細胞内のリン酸濃度の変動に対応して、酵素活性や代謝速度、あるいは代謝経路が変化することもよく知られている。このようにリンの吸収、生体内でのリンの利用から種子へのリンの蓄積に至るまで、あらゆる点で、取り込んだリンの効率的な利用を進めるようにプログラムされている。

### 液胞による細胞質リン酸ホメオスタシス

植物は根の細胞膜で発現しているリン酸輸送体を通して土壌のリン酸を吸収している。細胞膜のリン酸輸送機構の詳細は明らかになっており、詳しくは第1章の序で述べる。細胞内に取り込まれた正リン酸は主に、各オルガネラに運び込まれて、それぞれの代謝系の中に組み込まれるもの、細胞質にそのまま留まり代謝系との間でダイナミックな平衡状態に置かれるもの、液胞に運び込まれて細胞質のリン酸環境を安定に維持するために貯蔵されるものに分かれる（三村ら 2003, 2007）。

特に重要なこととして、リン酸の栄養条件に関わらず、基礎的な代謝反応の場である細胞質のリン酸濃度は約 10 mM とほぼ一定に保たれていると考えられている。これをリン酸のホメオスタシスとよんでいる。逆に液胞内のリン酸は、リン酸欠乏下での 0 mM から過剰にリン酸が与えられた場合の 100 mM 近い高濃度まで広範囲に変化する。植物が穏和なリン酸欠乏状態に置かれたときには、液胞に貯められているリン酸が細胞質に放出されることで、細胞質のリン酸濃度を一定に保つと考えられている。よほど極端な場合を除き、リン酸については過剰の害が出にくい。これは、液胞の緩衝作用により細胞質のリン酸濃度が一定に保たれるからである。液胞へのリン酸の蓄積として、細菌類の菌体、あるいは菌類や藻類の液胞ではポリリン酸が貯まることが知られている（Urech K et al. 1978）。ポリリン酸は、正リン酸の直鎖重合体で、浸透圧を上げずにリン酸を高濃度に蓄積することができる。また、高等植物の種子では、次世代へ貴重なリンを受け渡すために、貯蔵型液胞の中に、有機リン酸化合物であるフィチン（イノシトール 6-リン酸の金属塩）を結晶状態で蓄積することが知られている（Otegui et al. 2002）。どちらのリン酸の蓄積機構も不明であり、これまでに、液胞膜リン酸輸送活性を測定した仕事は少ない。植物のリン酸応答において最も重要な生理反応の1つである細胞質のリン酸ホメオスタシスを明らかにするためには、液胞へのリン酸取り込みと液胞からのリン酸放出に関与する液胞膜リン酸輸送機構の理解が必須である。

## 液胞とは

液胞は成熟した植物細胞において大部分を占めるオルガネラである。液胞は一層の単

液胞膜（液胞膜）で囲まれており、液胞中には、無機イオン、有機酸、炭水化物、タンパク質、アミノ酸のほかに、配糖体、アルカロイドなどが含まれている。液胞は、これらの二次代謝物や老廃物などの蓄積の場として、またこの蓄積の結果生じる浸透圧により、植物細胞の膨圧の形成や空間充填に重要な役割を果たしていることが知られている。また、単離された液胞の中には多量の酸性加水分解酵素が含まれており（Nishimura and Beevers 1978, Boller and Kende 1979）、内在タンパク質の分解が起こることから（Nishimura and Beevers 1979）、液胞が細胞内の分解系として働いていることも確認されている。液胞は種子の形成時には貯蔵タンパク質を蓄積し、発芽時にはそのタンパク質を分解するという機能の転換を行っていることから、液胞が植物の生活環において大きく変動するオルガネラであることも示されている。このような代謝産物の移動および細胞内成分の分解といった面から、液胞が植物細胞の恒常性の維持に重要な働きをしていることは明らかである。しかしながら、液胞が細胞体積の大部分を占めるにもかかわらず、液胞膜の構造や機能の研究は、これまでそれほど容易なものではなかった。

### 液胞におけるイオン輸送機構

液胞が無機イオンの貯蔵庫としてイオンバランスに果たす役割は大きい。シカモアの液体培養細胞を用いた実験で、NMR 分析により（Rebeille et al. 1983, 1985）、液胞がリンのホメオスタシスを維持するのに鍵となるオルガネラであることが示されている。液胞の無機イオンの透過と蓄積、浸透圧調節の面から、液胞はきわめてダイナミックな機能をもっており、その液胞の機能から液胞膜には多くの輸送体が存在すると考えられる。これまでに、液胞膜を介した、さまざまなイオンの輸送について報告されてきている。例えば  $H^+$ -ATPase と  $H^+$ -PPase は  $H^+$  を能動的に液胞内へ輸送するポンプであり、液胞内の酸性を維持すると同時に液胞膜をエネルギー化している。液胞膜に形成されたプロトン駆動力が他のイオンの二次的な能動輸送を支えている。液胞膜型  $Na^+/H^+$  対向輸送体は、酵母と植物で報告されており、先ほど述べた液胞膜のプロトンポンプにより形成された液胞膜を介したプロトンの電気化学的ポテンシャル勾配を利用して、液胞内

に  $\text{Na}^+$  を能動的に輸送している。高塩環境下において細胞質に流入してきた有害な  $\text{Na}^+$  を液胞内に隔離し、さらに液胞の浸透圧を高めることにより高浸透圧環境に対処すると考えられている。 $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (自己阻害タイプ) と  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$  アンチポーター (CAX1, CAX2) は液胞膜の  $\text{Ca}^{2+}$  能動輸送を担っており、対向輸送については液胞膜に局在することがシロイヌナズナにおいて報告されている (Hirschi et al. 1996)。 $\text{K}^+$  の輸送体はシロイヌナズナにおいて多数知られているが、 $\text{K}^+$  チャネルとして KCO1 は液胞膜で発現しており、細胞質の  $\text{Ca}^{2+}$  で活性化される外向き整流性チャネルであると報告されている (Czempinski et al. 1997, 2002, Schonknecht et al. 2002)。また、AtTPK/KCO ファミリーの AtTPK1,2,3,5 と AtKCO3 が液胞膜に局在することも報告されている (Voelker et al. 2006)。 $\text{SO}_4^{2-}$  は負の電荷を持つため、液胞の膜電位差 (内側正) を利用して、チャネル様分子を介して電気泳動的に液胞に入ると想定されている。このチャネル分子は同定されていないが、液胞膜型として同定された Sultr4:1 と Sultr4:2 は液胞に蓄積した  $\text{SO}_4^{2-}$  を細胞質に排出する役割を担っていると想定されている (Kataoka et al. 2004)。 $\text{NO}_3^-$  の液胞への蓄積には  $\text{NO}_3^-$  トランスポーター (NRT) が関与していると考えられるが、実際は不明な点が多い。 $\text{Cl}^-$  チャネルは、動物でみつかった CLC family のホモログとしてシロイヌナズナやタバコなどで遺伝子が見いだされており、そのうち、シロイヌナズナの  $\text{Cl}^-$  チャネルとして単離された AtCLCa は液胞膜に局在し、 $\text{Cl}^-$  よりも  $\text{NO}_3^-$  を特異的に液胞内へ輸送する  $\text{NO}_3^-/\text{H}^+$  対向輸送体として報告されている (Angeli et al. 2006)。一方、 $\text{Cl}^-$  チャネルが液胞膜に存在することがシャジクモのパッチクランプを用いた実験で確認されている (Berecki et al. 1999)。ソラマメでは気孔の開口時に液胞に貯められる  $\text{Cl}^-$  は  $\text{Ca}^{2+}$  依存性のプロテインキナーゼによって活性化される  $\text{Cl}^-$  チャネルの働きよるものと示唆されている (Pei et al. 1996)。しかし、 $\text{Cl}^-$  チャネルの分子実体の報告はほとんどなされていない。光合成や浸透圧調節に関わるリンゴ酸 ( $\text{Mal}^{2-}$ ) を液胞へ輸送するトランスポーターがシロイヌナズナにおいて報告されている (Emmerlich et al. 2003)。このように近年、いくつか輸送体分子の同定が報告されてきているが、リン酸を含め、その他の重要な生体分子 (二次代謝産物、糖、アミノ酸な

ど) の輸送体についてはほとんど報告がなされていない。

### 植物細胞からの液胞の単離について

液胞の機能を解析するにあたり、植物細胞からの液胞の単離は重要な実験技術である。これまで植物細胞から膜画分として精製した液胞膜を用いた研究も活発に行われてきた (Geisler et al. 2004, Kobae et al. 2004)。しかし、この方法では、どうしても他のオルガネラ膜の混入が避けられないため、活性の低い液胞膜の機能を追跡するには十分ではない。そのため、液胞膜本来の機能を調べるには、より純度が高く、膜の機能が保持された intact 液胞の単離が望まれる。単位膜で囲まれた大きなオルガネラである液胞は破壊されやすく、その調製には格別の配慮が必要である。ここに液胞の研究が容易に進まない理由がある。1975年 Wagner と Siegelman が高等植物細胞 (アマリリス花弁細胞) から初めて液胞を調製して以来、種々の組織から液胞が単離されてきている。ほとんどの場合、プロトプラストを出発材料として用いている。そのため、プロトプラストの穏和な条件下での破壊と、残存プロトプラストと液胞の分離が intact 液胞調製の重要なステップとなる。プロトプラストの破壊方法は、調製しようとする植物材料に応じて工夫する必要がある。液胞の分離にはプロトプラストと液胞の密度の違いに着目して、密度勾配遠心が用いられている。しかし、用いる植物材料によって液胞の密度が異なるので、密度勾配遠心の条件も、植物材料によって大きく異なってくる。今回、ニチニチソウ培養細胞で確立している方法をもとに、モデル植物であるシロイヌナズナの培養細胞から液胞を単離することに成功した。これまでにシロイヌナズナ培養細胞 (Frangne et al. 2002) とシロイヌナズナ葉肉細胞 (Carter et al. 2004) からの液胞の単離が我々とほぼ同時期に報告されている。

本研究では、液胞膜におけるリン酸輸送の調節機構とその分子の実体を明らかにするために、単離液胞を用いた生理解析を行うとともに、トランスクリプトーム解析、プロテオーム解析を行い、リン酸輸送を中心に植物細胞の液胞機能における液胞膜の役割について検討を進めた。

## 1 章 液胞におけるリン酸輸送機構

### 序

植物によって土壌から吸収されることが知られているリン酸化合物は、正リン酸のみである。植物細胞が正リン酸イオンを吸収する機構の詳細は明らかになっている。一般に土壌中の正リン酸濃度は数  $\mu\text{M}$  以下ときわめて低い。細胞質の正リン酸濃度は、通常 10 mM 程度と予想されているので、細胞膜を介して 1000~10000 倍の濃縮が行われていることになる。この正リン酸の能動輸送を支える機構としてプロトンとの共輸送機構が知られている。植物の細胞膜には  $\text{H}^+$ -ATPase が存在し、ATP のエネルギーを使って、 $\text{H}^+$  を細胞外に運び出す。この結果、 $\text{H}^+$  の濃度勾配と膜電位差（電気化学ポテンシャル勾配）が生じ、 $\text{H}^+$  は電気化学ポテンシャル勾配に従って細胞の外から中へ流れ込む。正リン酸イオンは、この  $\text{H}^+$  の細胞外から中への流れを利用して  $\text{H}^+$  との共輸送体であるリン酸トランスポーターにより細胞内に取り込まれる (Mimura 1995a)。 $\text{H}^+$  との共輸送という機構は、プロトンポンプの阻害剤を加えて、 $\text{H}^+$  濃度勾配を消すと、リン酸吸収機構は起こらなくなることや、細胞内外の pH 変化を測定した実験からも支持されている。植物細胞膜のリン酸輸送体分子の同定は、酵母から単離されたリン酸トランスポーター遺伝子 *PHO84* の研究が端緒となっている (Bun-ya et al. 1991)。リン酸欠乏時に強く発現する高親和性リン酸輸送体 *PHO84* と相同性を示す遺伝子が、複数の植物から単離され、その活性測定から、これらの遺伝子にコードされているタンパク質が高等植物の細胞膜で機能している高親和性リン酸輸送体として考えられている。シロイヌナズナ (Muchhal et al. 1996, Smith et al. 1997, Mitsukawa et al. 1997) をはじめ、現在では多くの植物でこの高親和性リン酸輸送体が同定されている。この輸送体は  $\text{H}^+$  共輸送体として PHS (phosphate/ $\text{H}^+$  symporter) ファミリーに属し、12 回膜貫通型の膜タンパク質である。両側 6 回膜貫通領域の中間、細胞質側にやや大きめの親水性領域もっている。シロイヌナズナのリン酸輸送体には、タンパク質リン酸化や糖鎖付加領域が見いだされているが、輸送活性の調節機構はまったく研究が進んでいない (Smith et

al. 1997, Mimura 1999)。シロイヌナズナの細胞膜  $H^+$ 共輸送体は、*PHT1* ファミリーとして 9 つ存在する。それぞれの分子によって、発現部位、発現状況が異なるが、多くがリン酸欠乏下で強く発現することが報告されている。ノックアウト変異体の解析から、根におけるリン酸輸送では *AtPHT1;1* と *AtPHT1;4* がリン酸の取り込みに重要な働きをしていることが推定されている (Rausch and Bucher 2002, Bucher and Poirier 2002, Shin et al. 2004)。

リン酸は植物の構造や生理の多くの面で鍵となる重要な役割を果たしているため、細胞質の無機リン酸 (Pi) の濃度は厳密な制御下にあるとされている (Mimura 1995a, 1999, Mimura et al. 1996)。細胞質のリン酸濃度の恒常的な調節は細胞膜に存在するリン酸トランスポーター、液胞の緩衝作用、細胞質のリン酸代謝活性の変化の組み合わせにより成し遂げられている。これらの過程のうち、細胞膜のリン酸トランスポーター (Rausch and Bucher 2002) とリン酸に依存した代謝の調節 (Plaxton. 1999) については、分子レベルで広く研究されてきた。リン酸濃度の変動に対して、細胞質のリン酸濃度をある程度一定に保つ液胞の機能は、液胞からのリン酸の取り込みや放出を変えることによってもたらされる (Mimura et al. 1996)。それゆえ、液胞膜を介したリン酸の輸送は、植物細胞のリン酸代謝にとって非常に重要な役割を果たしているにちがいない。

すでに述べたように、細胞膜のリン酸吸収機構について研究が進んでいるにもかかわらず、液胞を介したリン酸の輸送についての報告は少ない。酵母の intact 液胞と  $^{32}P$ i を用いて液胞のリン酸輸送について報告はなされているが (Kulakovskaya and Kulaev 1997, Booth and Guidotti 1997)、その詳細な機構や分子レベルでの解明は進んでいない。報告が少ない理由として、液胞膜のリン酸輸送活性が細胞膜などに比べてきわめて低いということがあげられる。実際に大麦の葉肉細胞では、プロトプラストから単離した intact 液胞を  $^{32}P$ i の存在下に置いておくと、時間依存的に、液胞の中に放射性物質が蓄積していった (Mimura et al. 1990)。これらの実験では、液胞のリン酸輸送活性はとても低く、大麦の液胞へのリン酸吸収機構について詳しく調べることはで

きなかった (Mimura personal communication)。数年前、Massonneau らはニチニチソウの培養細胞から純度の高い液胞を単離することに成功した (Massonneau et al. 2000)。ニチニチソウ培養細胞は、細胞膜と液胞膜の両者において、高いリン酸輸送活性を持つことが NMR の測定などから確認されている (Sakano 1990, Sakano et al. 1992, 1995)。ニチニチソウ細胞から単離した液胞の実験結果から、液胞へのリン酸の取り込みは、液胞膜型  $H^+$ -ATPase または  $H^+$ -PPase の働きにより液胞内が正の電荷を帯びることに依存しており、リン酸取り込みの  $K_m$  値は約 5 mM であった。また、リン酸の取り込みは陰イオン輸送の阻害剤である DIDS により阻害されることが示された (Massonneau et al. 2000)。

細胞膜を介したリン酸の取り込みは、細胞質のリン酸のホメオスタシスを維持するためリン酸欠乏下で活性化される (Mimura 1999)。それは、トランスポーターの新たな発現やリン酸輸送機構の活性化によってもたらされる (Rausch and Bucher 2002)。一方で、細胞質のリン酸濃度が液胞内外へのリン酸の流れにより調節されていることも理にかなっている。本章では、intact 液胞の液胞膜を介したリン酸輸送に対して、細胞のリン酸状態がどのように影響するかについて検討した。

## 材料と方法

### 植物材料と培養条件

ニチニチソウ *Cathranthus roses* (L.) G. Don 培養細胞 (図 1-1) は網野真一博士 (北海道東海大学) より譲り受けた。培養には 4.5  $\mu\text{M}$  2,4-D、3%ショ糖、ビタミンなど (Nicotinic acid, Pyridoxin hydrochloride, Thiamine hydrochloride, Glycine) を添加した MS 培地 (Sakano et al. 1992) を用いた。培養前の MS 培地には 1.25 mM のリン酸が含まれている。7 日ごとに培養瓶に入れた新しい培地 20 ml に 2 ml の培養細胞を植えついで。細胞は約 130 rpm、26°C で振とう培養した。細胞の生重量を測定する際は、ブフナ漏斗とアスピレーターで培地を除き、回収した細胞の重さを測定した。

上記の条件で培養すると、7 日目の細胞のリン酸含有量は極めて低くなるので、細胞は低リン酸状態にある。細胞のリン酸濃度を制御するために、3 日目と 5 日目に最終濃度が 5 mM、つまり高リン酸状態になるよう、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  を通常の MS 培地に加えた。

シロイヌナズナの培養細胞 (*Arabidopsis Col-0 cell suspension*) (図 1-2) は梅田正明博士 (東京大学 現奈良先端大学院大学) より分与していただいた (Mathur et al. 1998)。細胞は MS 培地に 4.5  $\mu\text{M}$  2,4-D と 3%ショ糖、0.02% myo-Inositol、2.5 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、ビタミン (Nicotinic acid, Pyridoxin hydrochloride, Thiamine hydrochloride) を加えたもので培養した。7 日ごとに新しい培地 20 ml に 2~3 ml の培養細胞を植えついで。細胞は約 130 rpm、26°C、暗黒下で振とう培養した。

異なるリン酸条件での実験においては、細胞のリン酸濃度を制御するために、通常のニチニチソウ培地を低リン酸状態とし、高リン酸状態にするために、3 日目と 5 日目に最終濃度が 7.5 mM になるよう、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH 6.0 with KOH) を通常のニチニチソウ培地に加えて培養した。

### リン酸含有量の測定

生重量の測定のために回収したサンプルの一部をエッペンチューブの中に入れ、液体

窒素で凍らせた。解凍後、適当量の水を加え、プラスチック棒ですりつぶし、5,000 g で遠心分離した。上清を 98°C で 7 分間加熱し、0.45  $\mu\text{m}$  のフィルターを通した。濾液のリン酸濃度を細胞内リン酸濃度とした。細胞あたりのリン酸量は生重量当たりで算出した。

培養液中のリン酸濃度を測定するため、0.4 ml の培養細胞を 5  $\mu\text{m}$  PVDF メンブレンフィルター付きのエッペンチューブ (Ultrafree-MC Cat No. UFC30SV00, Millipore, MA, USA) に入れ、遠心分離した。濾液のリン酸濃度を細胞外のリン酸濃度とした。それぞれのサンプルのリン酸濃度はサプレッサーを備えた陰イオン交換イオンクロマトグラフィー (IC-7000S, YOKOGAWA, Tokyo) で測定した。リン酸の検出限界は約 0.1  $\text{mmol m}^{-3}$  であった。

#### ニチニチソウ培養細胞からのプロトプラストと液胞の単離 (図 1-3)

プロトプラストと液胞の単離は Massonneau らの方法 (2000) に従った (図 1-3)。培養 7 日目の細胞をブフナ漏斗とアスピレーターで濾過して集め、1% Cellulase Y-C (Seishin Pharmaceutical Co, Tokyo, Japan)、0.05% Pectolyase Y-23 (Seishin Pharmaceutical Co) を含む溶液 P (500 mM sorbitol, 10 mM Mes, 1 mM  $\text{CaCl}_2$ , pH 6.0 (Tris)) に再懸濁し、31°C、120-180 分間、120 rpm で振とうし、プロトプラストを得た。プロトプラストと酵素液を 50 ml のプラスチックチューブに移し、プロトプラストの破壊を防ぐため、溶液 V (30 mM HEPES, 30 mM K-gluconate, 2 mM  $\text{MgCl}_2$ , 2 mM EGTA, pH 7.2 (Tris)) に 400 mM sucrose を加えた溶液 Vc- I を底にしき、遠心分離 (4°C, 180 g, 10 分) してプロトプラストを集めた。沈殿したプロトプラストを適当量の溶液 Vc- I に懸濁し、溶液 Vc- II (溶液 V に 400 mM sorbitol を含むもの) と溶液 Vc- III (溶液 V に 400 mM betaine monohydrate を含むもの) を重層することで、密度勾配を作製した。遠心分離後 (180 g, 2 分, 1,610 g, 8 分) 精製されたプロトプラストは溶液 Vc- I と溶液 Vc- II の界面または溶液 Vc- II と溶液 Vc- III の界面に得られる。後者を取り除くことで、液胞画分へのプロトプラストの混入を避けた。残ったプロトプラ

ストを等量の溶液 V と混ぜ合わせ氷上に 5 分間静置することでプロトプラストを低浸透圧にさらし、さらに注射針 (1.10×90 mm) を通して物理的ショックを与えることで細胞膜を壊し、液胞を遊離させた。液胞の遊離を顕微鏡で確認後、等量の溶液 Vc-III を加え、底に溶液 Vc-I をひき、遠心分離 (180 g, 2 分, 1,610 g, 8 分) した。上清を取り除き、液胞と破砕物(プロトプラストも含む)が混じった沈殿を、ガラス試験管(1.2×10.5 cm)に移し、適当量の溶液 Vc- I を加えて懸濁し、溶液 Vc-IV (溶液 Vc- I :溶液 Vc- II =1:2)、溶液 Vc- II、溶液 Vc-III を重層することで密度勾配を作製した。遠心分離後 (180 g, 2 分, 1,610 g, 8 分)、intact 液胞は溶液 Vc- II と溶液 Vc-III の界面に得られる。

#### ニチニチソウ液胞へのリン酸取り込みの測定

液胞へのリン酸の取り込みについても Massonneau らの方法 (2000) に従った。30  $\mu$ l の単離液胞を 70  $\mu$ l の uptake medium (1 % bovine serum albumin, 35% percoll,  $^{32}$ Pi,  $^3$ H $_2$ O and solute) に加えた。すぐにサンプルの上に 200  $\mu$ l のシリコンオイル (SH550, Dow Corning Toray Co.,Ltd., Tokyo; AR1000, Fluka, Neu-Ulm) と 60  $\mu$ l の水を重層した。インキュベーション後、10,000 g、15 秒の遠心で反応を終了した。遠心後、水層部分を採取し、この層にきた液胞が取り込んでいた  $^{32}$ Pi と  $^3$ H $_2$ O を液体シンチレーションカウンター (LS6500, Beckman Coulter, Tokyo, Japan) で測定し、液胞内の  $^{32}$ Pi と  $^3$ H $_2$ O の量を算出した。液胞内外の水の移動は瞬時に起こると想定して、 $^3$ H $_2$ O の量を液胞の体積とみなすことができる。液胞内の  $^{32}$ Pi を  $^3$ H $_2$ O 当たりに換算することで、液胞体積あたりのリン酸取り込み量を算出することができる。

#### 液胞膜画分の調製

液胞膜を多く含むミクロソーム画分の単離は Dietz らの方法 (1998) に従った。細胞を溶液 M (250 mM sucrose, 50 mM Tris, 10 mM EDTA, 4mM dithiothreitol, pH 8.0 (HCl)) を加えてすりつぶし、8,000 g、10 分の遠心を 2 回繰り返した。上清をさらに 25,000 g で 30 分遠心し、沈殿を溶液 S (250 mM sucrose, 5 mM Pipes-KOH (pH

7.2) , 0.5 mM dithiothreitol) に懸濁した。さらに溶液 S に 30, 35% sucrose を加えた 2つの溶液で層を作り、その上にサンプルを重層した。45,000 g で 2時間遠心後、液胞膜に富んだ膜画分を 30, 35% sucrose の境界から回収した。

### プロトンポンプ活性の測定

液胞型  $H^+$ -ATPase の活性として、Dietz ら (1998) の方法に従い、bafilomycin 感受性の ATP 加水分解活性を測定した。 $H^+$ -PPase の活性は  $K^+/Na^+$  依存の PPi 加水分解活性を測定した。基質の加水分解により生じたリン酸は Bencini ら (1983) の方法により測定した。

液胞膜小胞の  $H^+$  輸送の測定には、蛍光試薬である quinacrine を用いた。液胞膜小胞内に集積した quinacrine は小胞の酸性化にともなって蛍光が消失するため、この蛍光の変化を追跡することで液胞膜小胞の  $H^+$  輸送活性を測定することができる。膜小胞と quinacrine 測定溶液を混合し、1.5 mM ATP または PPi (pH 7.0 with NaOH) を与えることで  $H^+$  の輸送を開始させた。測定溶液の組成は 1.2  $\mu$ M quinacrine, 0.2 mM vanadate, 1 mM DTT, 25 mM Tricine, 250 mM sucrose, 100 mM KCl, 4 mM  $MgCl_2$ , pH 8.0 (Tris) である。蛍光変化は蛍光分光計 (F-2000, Hitachi, Tokyo) を用いて測定した。

### プロトンポンプのタンパク質量の比較

液胞膜タンパク質を抽出するため、細胞に homogenizing buffer (250 mM sucrose, 10 mM Tricine, 2 mM dithiothreitol, 5 mM mercaptoethanol, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 100 mM leupeptin, 5 mM EGTA, pH 7.8 with KOH) を加え、氷上で乳鉢・乳棒ですりつぶし、4°C、10,000 g で 15 分間遠心し、上清を再度、4°C、40,000 g で 35 分間遠心した。沈殿を 250 mM sucrose, 10 mM Tricine, pH7.8 (KOH) に懸濁したものを膜画分とした。膜画分の 1 次元電気泳動は 7.5% のアクリルアミドゲルで行った。ウェスタンブロット解析は液胞型  $H^+$ -ATPase に対する抗体

(Matsuura-Endo et al. 1992) と H<sup>+</sup>-PPase に対する抗体 (Takasu et al. 1997) を用いて行った。それぞれの抗体は前島正義博士 (名古屋大学) より分与していただいた。

#### プロトンポンプ基質としての ATP と P<sub>i</sub> の測定

培養 7 日目の細胞を 1.2% HCl ですりつぶし、7 分間加熱した後、4°C、20,000 g で 10 分間遠心した。上清を 0.45 μm フィルター (Ekicro-disc AcroLC, Gelman Science, Tokyo) に通し、水で希釈後 25 μl をイオンクロマトグラフィー (DX-500 ion chromatography system, Dionex, Osaka) で測定した。分離カラムは Dionex IonPac AS11 (2 mm I.D.×250 mm) と Dionex IonPac AG11 (2 mm I.D.×50 mm) を用いた。P<sub>i</sub> と ATP は電気伝導度をみることで、同じサンプルから同時に検出することができた。細胞質の体積を細胞全体の 10%とするならば、細胞質の ATP と P<sub>i</sub> の濃度は細胞の濃度を 10 倍することで見積もることができる。

#### シロイヌナズナ培養細胞からのプロトプラストと液胞の単離 (図 1-4)

プロトプラストと液胞の単離はニチニチソウと同様、Massonneau らの方法 (Massonneau et al. 2000) に従った。培養 7 日目の細胞をブフナ漏斗で集め、1% Cellulase Y-C と 0.1% Pectolyase Y-23 を含む溶液 P (500 mM sorbitol, 10 mM MES, pH 6.0 with Tris, 1mM CaCl<sub>2</sub>) に再懸濁し、31°C、120-180 分間、120 rpm で振とうしプロトプラストを得た。プロトプラストと酵素液を 50 ml のプラスチックチューブに移し、プロトプラストの破壊を防ぐため、溶液 V (30 mM HEPES, 30 mM K-gluconate, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM EGTA, pH 7.2 (Tris)) に 400 mM sorbitol と 50% Percoll を加えた溶液 Va-I を底にしき、遠心分離 (4°C, 180 g, 10 分) してプロトプラストを集めた。沈殿したプロトプラストを適量の溶液 Va-I に懸濁し、溶液 Va-II (溶液 V に 400 mM sorbitol と 7.5% Percoll を含むもの) と 溶液 Va-III (溶液 V に 400 mM sorbitol を含むもの) を重層することで、密度勾配を作製した。遠心後 (180 g, 2 分, 1610 g, 8 分)、精製されたプロトプラストは溶液 Va-I と溶液 Va-II の界面または溶液 Va-II と溶液 Va-

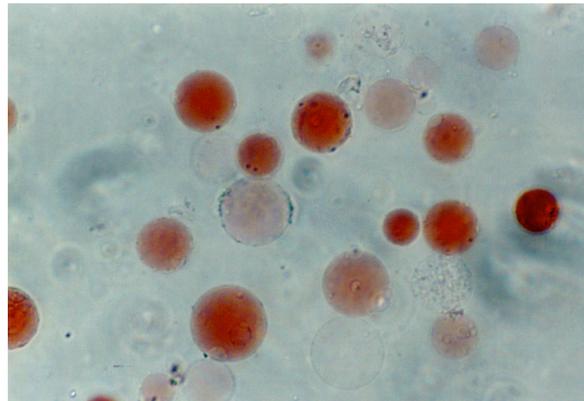
IIIの界面に得られる。後者を取り除くことで、液胞画分へのプロトプラストの混入を避けた。残ったプロトプラストを等量の溶液 V と混ぜ合わせ 5 分間氷上に静置することで低浸透圧にさらし、細胞膜を壊し、液胞を遊離させた。液胞の遊離を顕微鏡で確認後、プロトプラストの懸濁液、つまり液胞と破砕物をガラス試験管 (1.2×10.5 cm) に移し、適当量の溶液 Va-IV (溶液 V に 200 mM sorbitol と 25% Percoll を含むもの) に懸濁し、溶液 Va-V (溶液 V に 200 mM sorbitol と 7.5% Percoll を含むもの)、溶液 Va-VI (溶液 V に 200 mM sorbitol と 5% Percoll を含むもの)、溶液 Va-VII (溶液 V に 200 mM sorbitol と 2.5% Percoll を含むもの)、溶液 Va-VIII (溶液 V に 200 mM sorbitol を含むもの) を重層することで密度勾配を作製した。遠心後 (180 g, 2 分, 1,610 g, 8 分)、液胞は溶液 Va-VII と溶液 Va-VIII の界面に得られる。

#### シロイヌナズナ液胞へのリン酸の取り込みの測定

ニチニチソウと同様、液胞へのリン酸の取り込みについても Massonneau ら (2000) の方法に従った。30  $\mu$ l の単離液胞を 70  $\mu$ l の uptake medium (1% bovine serum albumin, 40% percoll,  $^{32}$ Pi,  $^3$ H<sub>2</sub>O and solute) に加えた。すぐにそのサンプルの上に 200  $\mu$ l のシリコンオイル (AR1000, Fluka, Neu-Ulm, Germany) と 60  $\mu$ l の水を重層した。インキュベーション後、10,000 g、15 秒の遠心で反応を終了した。液胞によって取り込まれた  $^{32}$ Pi と  $^3$ H<sub>2</sub>O は、液体シンチレーションで測定した。リン酸の取り込みは  $^3$ H<sub>2</sub>O と  $^{32}$ Pi から算出した。

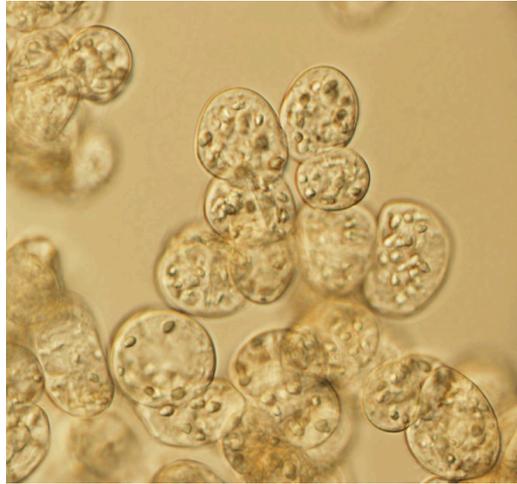


**Intact cell**

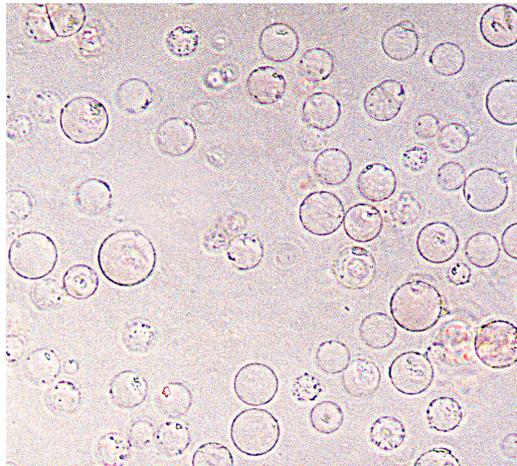


**Isolated vacuoles**

図 1-1 ニチニチソウ培養細胞と intact 液胞



**Intact cell**



**Isolated vacuoles**

図1-2 シロイヌナズナ培養細胞細胞とintact液胞

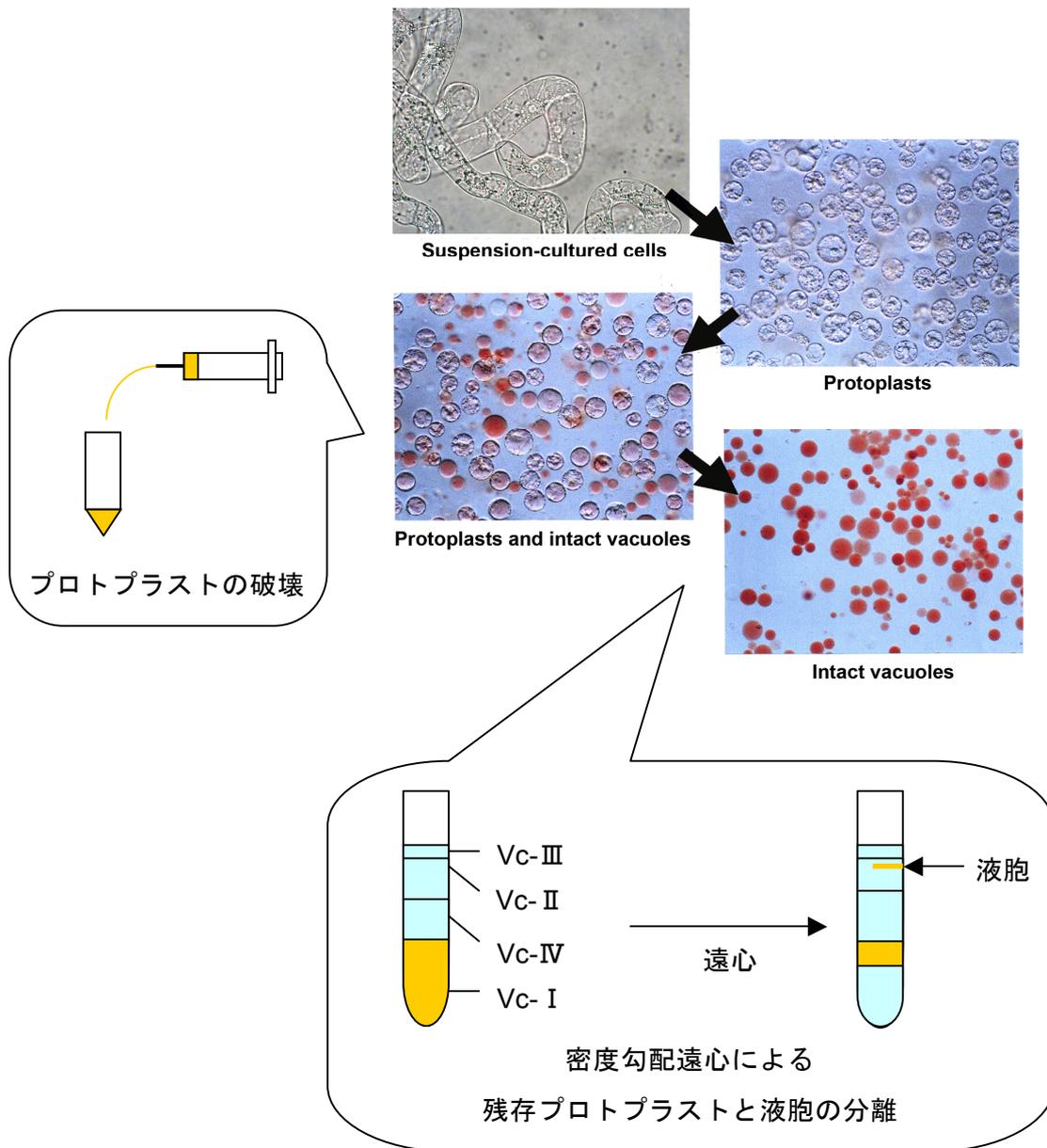


図1-3 ニチニチソウ培養細胞からの液胞単離

酵素処理によりプロトプラストを得る。プロトプラストを浸透圧ショックまたは注射針を通すことで、おだやかに破碎すると、ニュートラルレッドで染まったintact液胞が放出される。プロトプラストとintact液胞の混在したものから密度勾配遠心で、intact液胞だけを分離する。

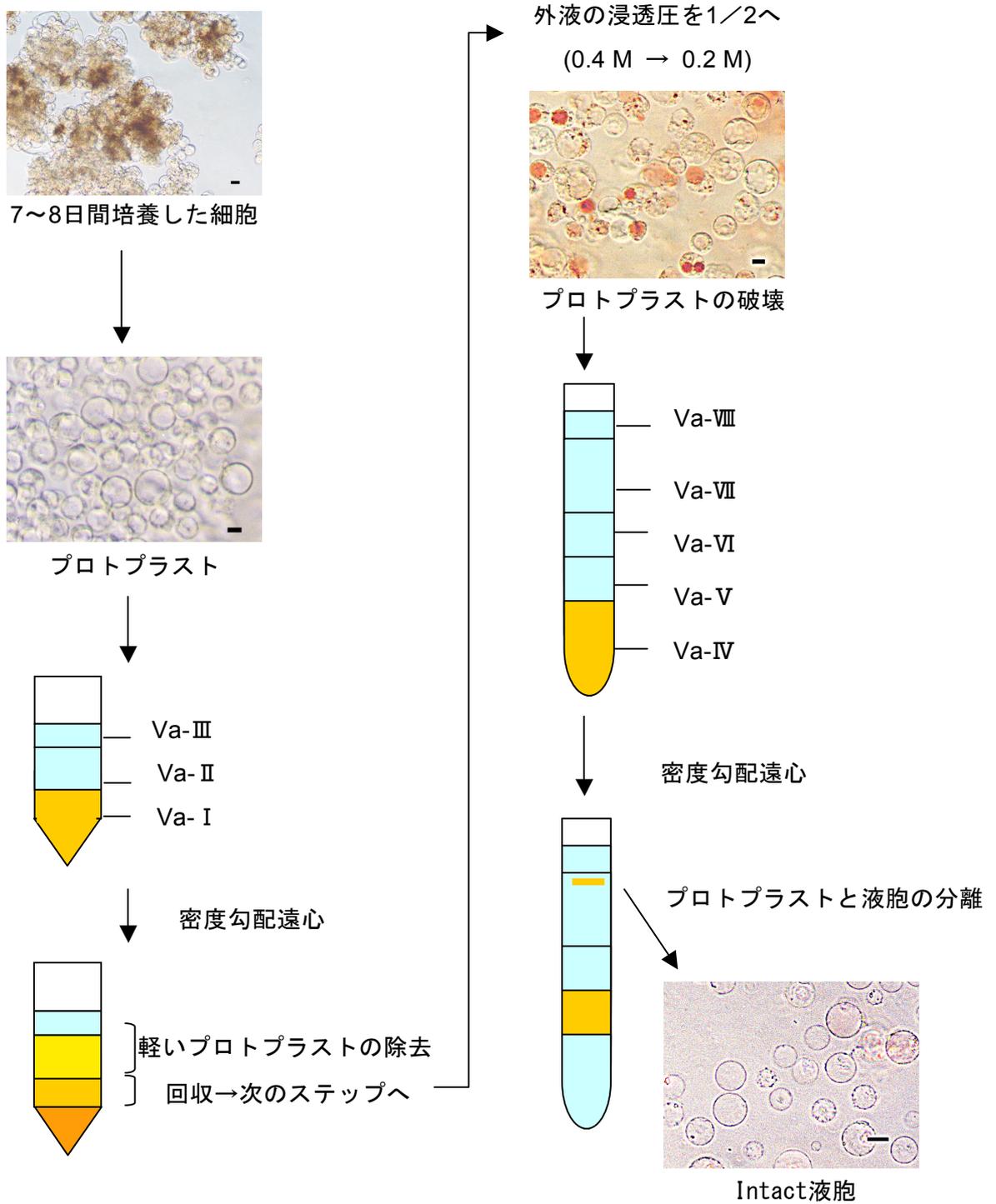


図 1-4 シロイヌナズナ培養細胞からの液胞単離

写真の bar は 10 $\mu$ m。

## 結 果

### 異なるリン酸条件下で培養した細胞の成長と細胞内外のリン酸量の変化

図 1-5 は低・高リン酸条件下で培養した細胞の生重量と細胞内外のリン酸量の経時的変化を示す。高リン酸条件では、培地に植え継ぎ後 3 日目と 5 日目にそれぞれ最終濃度が 5 mM になるようリン酸を加えた (図 1 矢印)。培地に加えたリン酸は最終的に 11.25 mM になる。植え継ぎ後 1 日以内に、両条件下において培地のリン酸量は激減した (図 1-5a)。この結果はニチニチソウ細胞内のリン酸量の増加に反映されていた (図 1-5c)。この急速な細胞内へのリン酸の取り込みについてはすでに報告されている (Sakano 1990)。両条件下において培養とともに細胞の生重量は増し、高リン酸条件ではリン酸添加後の 5 日目、7 日目において、低リン酸条件に比べ、より多い生重量の増加が見られた (図 1-5b)。低リン酸条件では、細胞の増殖とリン酸代謝のため、培地のリン酸量の激減に従って、細胞内のリン酸量も下り始める (図 1-5c)。一方、高リン酸条件では、3 日目のリン酸添加により細胞内のリン酸量が増加し、この増加は 5 日目に再度リン酸を添加するまで続いた (図 1-5c)。

### 異なるリン酸条件下で培養したニチニチソウ液胞におけるリン酸の取り込み

表 1-1 は低・高リン酸条件で育てた細胞より単離した intact 液胞へのリン酸の取り込みを示す。リン酸の取り込みは、0.7 mM リン酸の存在下に 1.4 mM の ATP または PPi を添加して測定を行った。高リン酸条件では、PPi を加えたときのリン酸の取り込みは ATP を加えた時の約 50%であった。一方、低リン酸条件では、両者とも同じように効果的にリン酸が取り込まれた。低リン酸条件の細胞から単離された液胞のリン酸取り込みは、高リン酸条件の液胞に比べて著しく増加した。実際、低リン酸条件下で、ATP 依存のリン酸の取り込みは高リン酸条件下の約 4 倍、PPi 依存の取り込みは 7 倍以上を示した。

### 異なるリン酸条件下での液胞膜プロトンポンプ活性

高リン酸条件に比べ、低リン酸条件の細胞から精製した液胞のリン酸取り込みが増加した理由として、液胞膜に存在すると推定されるリン酸トランスポーターの発現量の増加、または液胞膜に存在するプロトンポンプによるリン酸取り込みの駆動力の増加が考えられる。残念ながら、液胞膜のリン酸トランスポーターは分子同定できていないので、前者の可能性を調べることはできない。ここでは、プロトンポンプによるリン酸取り込みの駆動力の違いについて調べた。

液胞膜を介したリン酸の取り込みは、膜の電位差により駆動される (Massonneau et al. 2000) ので、リン酸の取り込みはプロトンポンプと直接的に共役する。そこで、液胞膜のプロトンポンプである  $H^+$ -ATPase と  $H^+$ -PPase による基質の加水分解速度を測定した結果、低リン酸条件で両者の基質分解活性が著しく増加した (表 1-2)。

また、ポンプによる液胞内へのプロトンの輸送活性を調べるため、液胞膜小胞を用いてquinacrine蛍光の消失を追跡した (図1-6)。 $H^+$ の輸送により液胞膜小胞内が酸性化するとquinacrine蛍光が消失する。これを利用して、プロトンの輸送活性を測定した。蛍光の消失を定量化したものを表1-3に示す。基質の加水分解の結果と同様、低リン酸条件下で液胞膜の両タイプのプロトンポンプ活性が大きく増加した。特に、低リン酸条件下における、PPi依存のプロトンポンプ活性は、ATP依存のポンプ活性に比べ著しく高かった (図1-6, 表1-3)。

### 異なるリン酸条件下での液胞膜プロトンポンプのタンパク質量の変化

$H^+$ -ATPase と  $H^+$ -PPase の活性の増加がそれぞれの酵素量の増加によるものか調べるため、 $H^+$ -ATPase と  $H^+$ -PPase に対する抗体でウェスタンブロット解析を行い、液胞膜のタンパク質構成を調べた。図 1-7a は液胞膜画分を銀染色したものを示し、図 1-7b はウェスタンブロット解析による  $H^+$ -ATPase と  $H^+$ -PPase の発現量を示す。銀染色の結果、リン酸の添加により機能が知られていない膜タンパク質の増減がみられた (図 1-7a)。しかしながら、 $H^+$ -ATPase と  $H^+$ -PPase の量は細胞のリン酸量の状態によって

ほとんど変化しなかった。液胞膜画分は部分的に他のオルガネラ膜の混入が考えられるので、このコンタミによるあいまいさをなくすため、intact 液胞から精製した液胞膜を用いたウェスタンブロット解析も行った結果、逆に高リン酸条件で、やや増加しているように見えた。

### プロトンポンプ基質としての ATP と PPi の含有量

低・高リン酸条件で育てた細胞内の ATP と PPi の量をイオンクロマトグラフィーを用いて測定した。低リン酸条件では、高リン酸条件に比べ、細胞内の ATP と PPi は大きく減少しており、同様にリン酸の量も劇的に減少していた（表 1-4）。細胞質の量が細胞全体の 10%の体積を占めるとすると、細胞質の ATP と PPi の濃度は細胞内の濃度を 10 倍した値に近いと考えられる。したがって、高リン酸条件では ATP はわずかに 1 mM を超え、低リン酸条件では約 0.5 mM まで減少していた。同様に細胞質の PPi の濃度は高リン酸条件で約 650  $\mu$ M、低リン酸条件で 300  $\mu$ M であった。これらの値はこれまでの報告と同様のものではあった（Ashihara and Ukaji 1986, Mimura et al. 1995b, Maeshima 2000, Costa dos Santos et al. 2003）。

### シロイヌナズナ単離液胞におけるリン酸の取り込み

ニチニチソウと同様、シロイヌナズナの培養細胞から液胞を単離し、液胞へのリン酸の取り込みを測定した。リン酸の取り込みは、0.7 mM リン酸の存在下に 1.4 mM の ATP または PPi を添加して測定を行った結果、時間依存的、ATP または PPi 依存的なリン酸取り込みの増加がみられた（図 1-8）。また、uptake medium に加えるリン酸の量を 1 mM, 3 mM, 5 mM, 10 mM と変えた場合、リン酸濃度依存的にリン酸の取り込みが増加した（図 1-9）。

また、表 1-5 は低・高リン酸条件で育てたシロイヌナズナの培養細胞より液胞を単離した intact 液胞へのリン酸の取り込みを示す。高リン酸条件では、ATP と PPi を加えたときには、リン酸の取り込みはほとんどみられなかったが、低リン酸条件では、両者

ともリン酸の取り込みがみられた。つまり、高リン酸条件に比べて、低リン酸条件から単離された液胞でリン酸取り込みの増加がみられた。実際、低リン酸条件下で、ATP依存のリン酸の取り込みは約**2**倍であった。

## 考 察

### ニチニチソウにおける低・高リン酸条件の設定

ニチニチソウ培養細胞はリン酸の取り込み能力が高いことが知られている (Sakano 1990, Sakano et al. 1995)。通常の培養条件では (1.25 mM Pi)、培地のリン酸は植え継ぎ後 1 日目ではほぼなくなるので、ほとんどのリン酸は液胞に貯められていると考えられる。培養 7 日後、液胞に貯められたリン酸のすべてが、細胞の増殖に再分配され、細胞のリン酸欠乏と成長の速度低下がみられた (図 1-5b, 1-5c)。3 日目と 5 日目にリン酸が追加された培地では、細胞内のリン酸濃度は高い値を示し、急速な成長が続いた。ニチニチソウ培養細胞はリン酸に依存したさまざまな代謝研究の実験材料として使われている (Ashihara and Ukaji 1986, Li and Ashihara 1990, Nagano and Ashihara 1993, Nagano et al. 1994)。これらの研究では、核酸、糖リン酸などといった細胞内の有機リン酸化合物が培地のリン酸量に依存して劇的に変化していた。図 1-5 の結果から判断して、低リン酸条件で 7 日間培養した細胞は、リン酸欠乏であり、高リン酸条件で培養した細胞はリン酸が十分ある状態だと考えられる。

### 液胞へのリン酸取り込みの活性化機構

異なるリン酸条件の細胞から単離した intact 液胞へのリン酸の取り込みの測定はリン酸欠乏状態がリン酸の取り込みを活性化することを示した (表 1-1)。この活性化は特定のプロトンポンプには依存せず、低リン酸の条件から精製した液胞で、両方のポンプがともに高い活性を示した (表 1-2, 1-3)。リン酸の取り込みを活性化すると考えられる 3 つの可能性として、1 つは液胞膜に存在すると推定されるリン酸トランスポーターの発現が増加すること。2 つめはリン酸の取り込みを駆動するプロトンポンプの活性化。3 つめは液胞膜を介したリン酸に対する電気化学ポテンシャル勾配の変化である。すでに言及したように、液胞膜を介したリン酸の輸送に関わるトランスポーターはまだみつかっていない。

液胞内のリン酸の濃度は測定していないが、細胞全体のリン酸濃度の測定（図 1-5, 表 1-4）から、細胞質のリン酸濃度を約 10 mM と仮定すると、低リン酸条件での液胞のリン酸はほぼゼロであり、高リン酸条件では約 30 mM となると考えられる。単離液胞のリン酸の取り込みを測定するのに用いた溶液のリン酸濃度は 0.7 mM であった。低・高リン酸条件の細胞から単離した液胞が同じ膜電位差を持つならば、リン酸欠乏の液胞は細胞内のリン酸濃度が低いため、リン酸を取り込むための電気化学的な駆動力がより強くなるのかもしれない。これは異なるリン酸条件の細胞から単離した液胞へのリン酸の取り込みで観察された違いを、一部説明している可能性がある。これを確かめるためには、液胞膜小胞を使い、膜の両サイドのリン酸の濃度を調節することで、リン酸の取り込みを測定する必要がある。我々は液胞膜小胞へのリン酸の取り込みを測定することを試みたが、有意な取り込みを見いだすことができなかった。

#### 液胞膜におけるプロトンポンプの活性

低リン酸条件でのリン酸の取り込みの効果を説明する 3 つめの可能性として、プロトンポンプ活性の増加があげられる。低リン酸条件では、液胞膜の液胞膜型  $H^+$ -ATPase と  $H^+$ -PPase が著しく活性化された（表 1-2, 表 1-3, 図 1-6）。低リン酸条件下での  $H^+$ -PPase の活性化は Palma ら（2000）により、すでに報告されている。彼らによれば  $H^+$ -PPase の活性化は、低リン酸条件下でリン酸のリサイクルを行うための救済システムとしてもたらされているとある。しかしながら、彼らの材料であるアブラナ属では、 $H^+$ -PPase の総量はプロトンの輸送活性に比例して増加し、 $H^+$ -ATPase の酵素活性とプロトンポンプ活性はどちらも変化しなかった。一方、Kasai ら（1998）は、ライ麦を用い、培地のすべての栄養塩を希釈して、一般的な栄養欠乏状態にさらした場合、今回の結果と同様、 $H^+$ -ATPase と  $H^+$ -PPase の両者の活性は増加したが、プロトンポンプの総量は両者ともに変わらなかった。Kasai ら（1998）の実験における栄養の制限が低リン酸条件をもたらすならば、我々の実験結果と一致する。

得られた結果からは、どのようにして液胞膜のプロトンポンプが低リン酸状態に応答

しているかはわからない。それゆえ、低リン酸状態がプロトンポンプのタンパク質総量を変えることなく、基質の加水分解とプロトンの輸送活性を変化させるということは興味深い（表 1-2, 1-3）。液胞膜型の  $H^+$ -ATPase は酸化還元の状態変化または他のタンパク質との相互作用によって制御されることが知られている (Tavakoli et al. 2001, Lu et al. 2004)。酵母と動物細胞では、液胞膜型の  $H^+$ -ATPase のサブユニット構成の変化が酵素活性の変化をもたらすことが報告されている (Kawasaki-nishi et al. 2003, Sun-Wada et al. 2004)。それゆえ、確認されたプロトンの輸送活性の変化は酵素のサブユニット構造の再配置によりもたらされた可能性がある。

ATP の存在下で、リン酸の取り込み活性、ATP の加水分解、ATP に依存したプロトンの輸送が低リン酸状態において同じ割合で（高リン酸状態に比べて約 3-4 倍）増加したことは注目すべきである（表 1-1, 表 1-2, 表 1-3, 図 1-6）。PPi の場合、リン酸の取り込みと PPi に依存したプロトンの輸送は同様に活性化されたが（高リン酸状態に比べて約 5-7 倍）、PPi の加水分解の活性は少なかった（高リン酸状態に比べて約 2 倍）。これは液胞膜型の  $H^+$ -ATPase と  $H^+$ -PPase の調節メカニズムが異なる可能性を示唆している。

### 生体内での液胞膜を介したリン酸輸送

リン酸欠乏下では細胞質のリン酸ホメオスタシスを保つために液胞からリン酸が放出されるはずだが、なぜ液胞のリン酸取り込み能力が上がるのか？といった疑問はまだ残る。しかし、今回の報告から低リン酸条件に対するさまざまな液胞の応答についていくつかの知見が得られた。低リン酸条件が、ATP 量と PPi 量の減少をもたらすと、通常、液胞へのリン酸の取り込みが減少すると予測される。しかしながら、以前の報告で、ラベルされたリン酸を大麦のプロトプラストに与えた実験では、リン酸が十分ある条件に比べて、リン酸が欠乏した条件において、より急速に、ラベルされたリン酸が液胞内に現れた (Mimura et al. 1990)。このように、低リン酸条件での液胞へのリン酸の取り込みの増加は生体内でも起こることが示唆されている。リン酸取り込み能力の増加は、

細胞質のリン酸のホメオスタシスを確保するために、液胞から細胞質へのより多い流出とのバランスを保つためかもしれない。さらに詳細を調べるためには、液胞からのリン酸の流出を測定する実験システムの開発が必要である。

#### シロイヌナズナ液胞単離で工夫した点

はじめに、ニチニチソウと同様の溶液を用いて、シロイヌナズナの培養細胞から液胞の単離を試みた。しかし、密度勾配遠心の後、ニチニチソウでは液胞が集まる界面に、プロトプラストの混入が多くみられた。まず、ニチニチソウの液胞とシロイヌナズナの液胞の比重の違いが考えられるので、ニチニチソウに用いた密度勾配よりさらに細かい勾配を作製することにした。また、シロイヌナズナの細胞はニチニチソウの細胞に比べて、細胞質が密である（図 1-2）。プロトプラストが混入しているシロイヌナズナの液胞の層を観察すると、液胞の周囲に、細胞質の付着がみられた。おそらく、プロトプラストが割れて液胞が放出された際に、同様に出てきた粘性の高い細胞質が液胞の周りに吸着し、そこに結合したプロトプラストが液胞と共に、同じ層に運ばれてしまうためだと考えられる。そこで、液胞への細胞質の付着を防ぐため、まず細胞あたりの溶液の体積を増やし、また細胞質が高分子物質に付着することを期待し、溶液に **Percoll** を加えることにした。**Percoll** は高分子なので、浸透圧を変えることなく、比重を変えることができる物質である。これを用いて、ニチニチソウよりさらに細かい密度勾配を作製することで、プロトプラストと液胞を分離することに成功した。我々と独立にシロイヌナズナから液胞単離を成功させた **Frangne** ら（2002）もシロイヌナズナの培養細胞から液胞を単離する際に、高分子である **Ficoll** を用いている。このことから、シロイヌナズナの培養細胞から液胞を単離する際には、高分子の存在が必要と考えられる。モデル植物であるシロイヌナズナの液胞単離方法の確立は、植物液胞の解析を大きく前進させるものと期待され、実際、ここで開発した手法は硫酸トランスポーターや亜鉛トランスポーターの同定に用いられた（**Kataoka et al. 2004, Kobae et al. 2004**）。

### シロイヌナズナにおける液胞膜を介したリン酸輸送機構

シロイヌナズナの液胞へのリン酸の取り込みが、時間依存的、ATP または PPi 依存的、リン酸濃度依存的に増加していることが示された (図 1-8, 1-9)。これはニチニチソウの液胞で行われた実験と同様の結果であった (Massonneau et al. 2000)。また、ニチニチソウでの実験と同様、低リン酸条件で育てた細胞から単離した液胞において、高リン酸条件から単離した液胞より、リン酸の取り込みが上昇していた (表 1-5)。このことから、シロイヌナズナにおいても、ニチニチソウと同様のリン酸取り込み機構が働いていると考えられる。第 2 章で行ったシロイヌナズナのトランスクリプトーム解析において、低リン酸条件下において、プロトンポンプの有意な発現の増加はみられなかった。ただし、ポンプのプロモーター解析を行ったところ、H<sup>+</sup>-ATPase において、V<sub>1</sub> セクターで 1 つ、V<sub>0</sub> セクターで 6 つのサブユニットがリン酸欠乏に応答して発現が上がる遺伝子に特異的にみられる配列 (PHR 1 binding motif) をもっており、H<sup>+</sup>-PPase のうち AVP1 が同じ配列をプロモーター領域に持っていた。

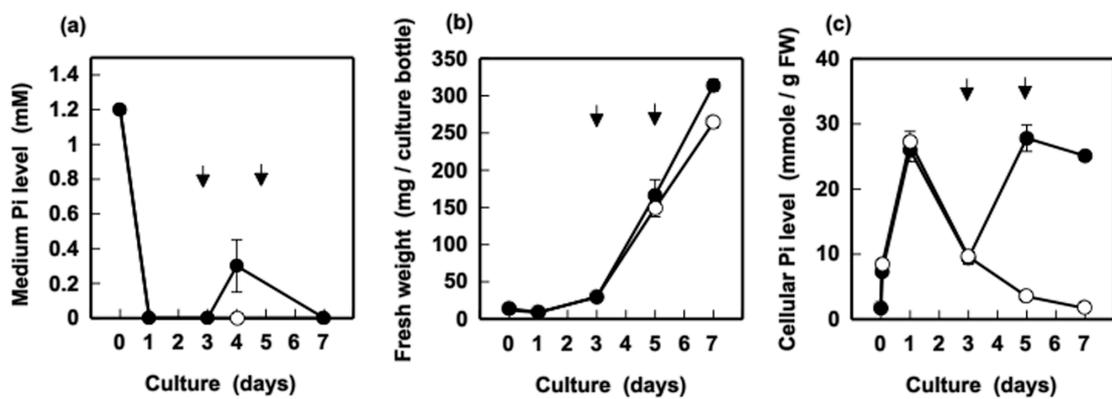


図1-5 ニチニチソウ培養細胞の培地中のリン酸濃度、細胞の生重量、細胞内のリン酸量の経時的変化

ニチニチソウ培養細胞を異なるリン酸条件で育てた場合の培地中のリン酸濃度 (a)、細胞の生重量 (b)、細胞内のリン酸量 (c) の経時的変化を示す。低リン酸条件 (○)、高リン酸条件 (●)。高リン酸条件では、植え継ぎ後3日目と5日目 (矢印) にそれぞれ最終濃度が5 mMになるよう培地にリン酸を加えた。細胞の生重量はフラスコ1本あたり、細胞内のリン酸量は生重量あたりを示す (n=4)。

表 1-1 異なるリン酸栄養条件で育てたニチニチソウ培養細胞から単離した液胞のリン酸の取り込み

Pi uptake (nmol / $\mu$ l vacuole / hr)			
High Pi cells		Low Pi cells	
+ATP	+PPi	+ATP	+PPi
0.59 $\pm$ 0.31	0.30 $\pm$ 0.23	2.27 $\pm$ 0.41	2.21 $\pm$ 0.63
(n = 6)	(n = 3)	(n = 8)	(n = 4)

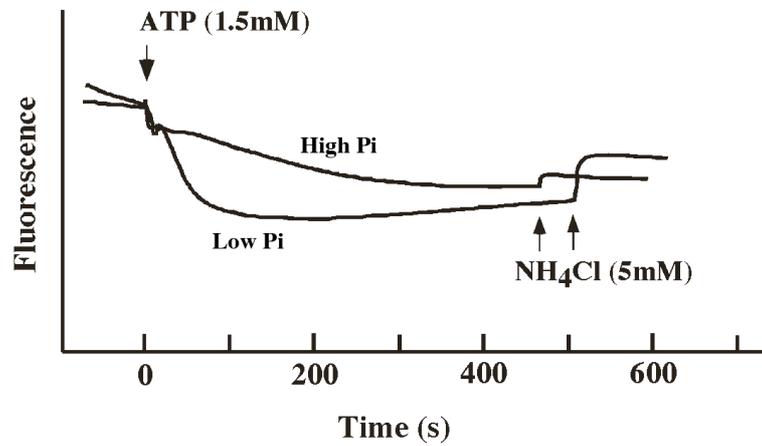
測定溶液中に 0.7 mM  $\text{KH}_2^{32}\text{PO}_4$  と 1.4 mM ATP または 1.4 mM PPi を添加して、リン酸の取り込みを測定した。高リン酸条件では、植え継ぎ後 3 日目と 5 日目にそれぞれ最終濃度が 5 mM になるよう培地にリン酸を加えた。

表 1-2 異なるリン酸栄養条件における液胞膜プロトンポンプの酵素活性

	Activity	
	(nmol Pi / mg Protein / min)	
	High Pi cells	Low Pi cells
Bafilomycin-sensitive ATPase	9.7 ± 1.2 (n = 10)	34.3 ± 2.3 (n = 10)
K <sup>+</sup> / Na <sup>+</sup> -dependent PPase	79.0 ± 3.5 (n = 8)	177.8 ± 2.0 (n = 6)

液胞膜のプロトンポンプであるH<sup>+</sup>-ATPaseとH<sup>+</sup>-PPaseによる基質の加水分解速度を測定した。高リン酸条件では、植え継ぎ後3日目と5日目にそれぞれ最終濃度が5 mMになるよう培地にリン酸を加えた。

a)  $H^+$ -ATPase



b)  $H^+$ -PPase

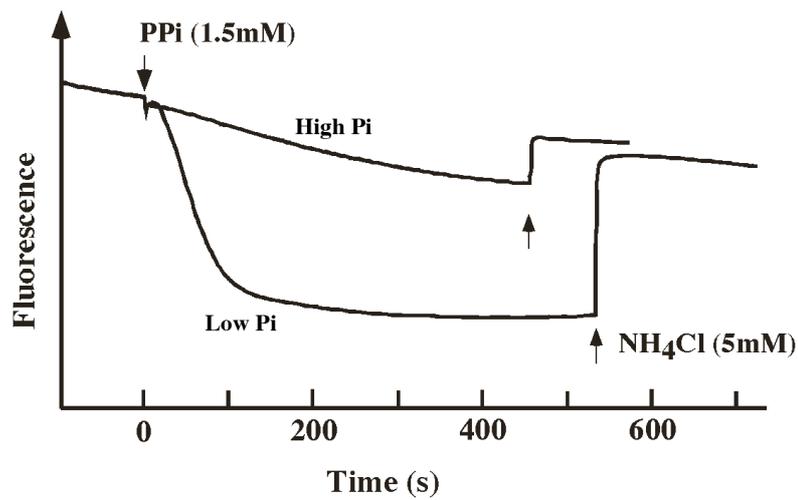


図1-6 異なるリン酸栄養条件の細胞から精製した液胞膜小胞の $H^+$ -ATPaseと $H^+$ -PPaseのプロトン輸送活性

液胞膜小胞内のquinacrine蛍光の消失を追跡することで、(a)  $H^+$ -ATPaseと (b)  $H^+$ -PPaseのプロトン輸送活性を測定した。 $H^+$ -ATPaseには基質として1.5 mM ATPを、 $H^+$ -PPaseには1.5 mM PPiを与えて、測定を開始し、5 mM  $NH_4Cl$  (脱共役剤) を加えて反応を止めた。

表1-3 異なるリン酸栄養条件における液胞膜小胞のプロトンポンプ輸送活性

	Normalized activity	
	( $\Delta F_{500nm} / \text{mg Protein} / \text{min}$ )	
	High Pi cells	Low Pi cells
ATP-dependent H <sup>+</sup> transport	3.4 $\pm$ 0.2 (n = 6)	13.4 $\pm$ 1.6 (n = 6)
PPi-dependent H <sup>+</sup> transport	4.3 $\pm$ 0.5 (n = 6)	22.5 $\pm$ 1.8 (n = 6)

図1-6における基質を与える前後の蛍光の変化量を数値化した結果。過剰な基質を与えることで、蛍光の変化を測定することができた。高リン酸条件では、植え継ぎ後3日目と5日目にそれぞれ最終濃度が5 mMになるよう培地にリン酸を加えた。

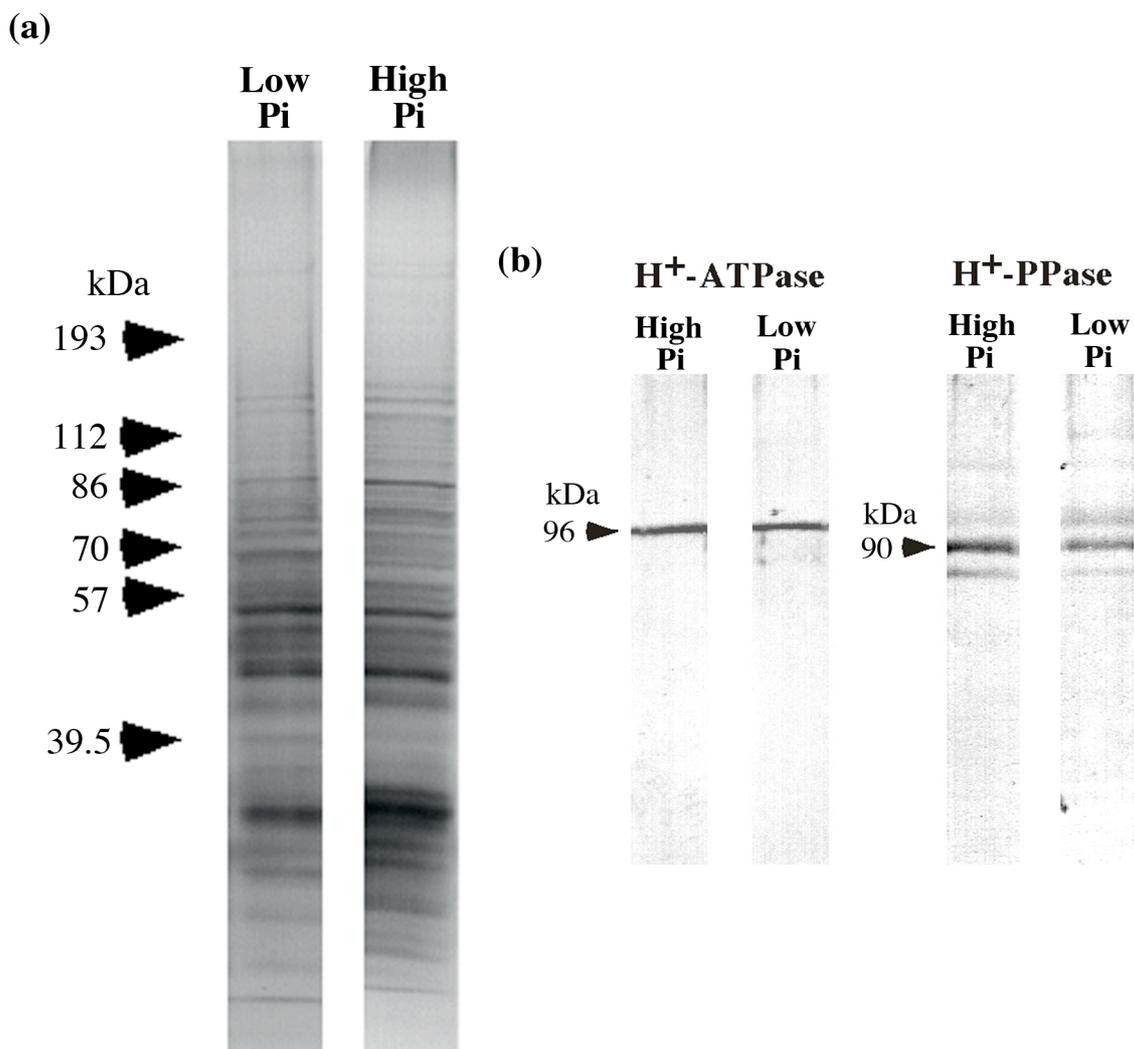


図1-7 異なるリン酸栄養条件における液胞膜タンパク質の泳動像とプロトンポンプ量

異なるリン酸栄養条件における (a) 液胞膜タンパク質の泳動像と (b) プロトンポンプ量を示す。高リン酸条件では、植え継ぎ後 3 日目と 5 日目にそれぞれ最終濃度が 5 mM になるよう培地にリン酸を加えた。各レーン、10  $\mu$ g のタンパク質を泳動し、銀染色をした。液胞型 H<sup>+</sup>-ATPase (Matsuura-Endo et al. 1992) と H<sup>+</sup>-PPase (Takasu et al. 1997) の抗体でウェスタン解析を行った。

表 1-4 異なるリン酸栄養条件で育てたニチニチソウ培養細胞における ATP、PPi、Pi の含有量

Cellular Levels		
(μM for ATP and PPi, mM for Pi)		
	High Pi cells	Low Pi cells
ATP	116.9 ± 8.6 (n = 6)	46.6 ± 2.5 (n = 6)
PPi	64.9 ± 6.4 (n = 6)	30.0 ± 1.0 (n = 6)
Pi	25.1 ± 1.7 (n = 4)	0.36 ± 0.02 (n = 6)

高リン酸条件では、植え継ぎ後3日目と5日目にそれぞれ最終濃度が5 mMになるよう培地にリン酸を加えた。値は生重量あたりを示す。

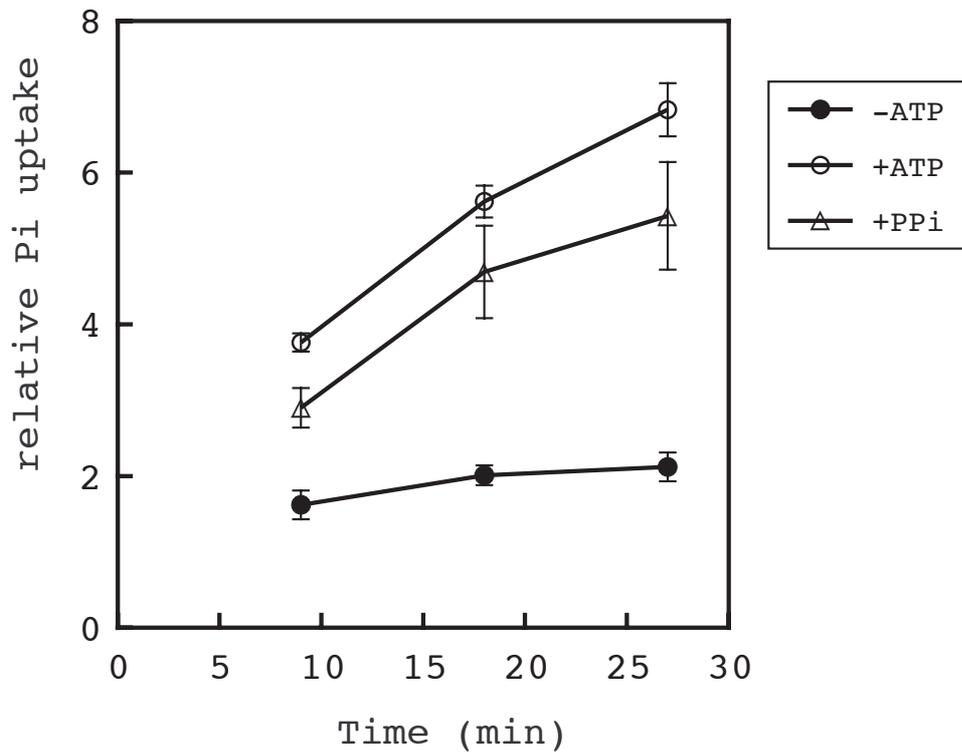


図1-8 シロイヌナズナの培養細胞から単離したintact液胞の経時的リン酸の取り込み

測定溶液中に0.7 mM  $\text{KH}_2^{32}\text{PO}_4$ が添加してあり、1.4 mM ATP(O)、1.4 mM PPI(△)、基質なし(●)でリン酸の取り込みを測定した。

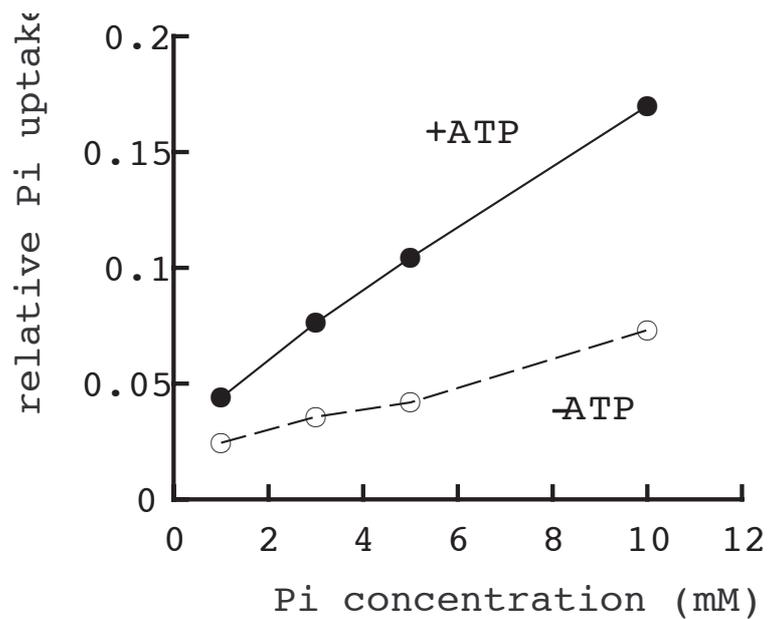


図1-9 シロイヌナズナの培養細胞から単離したintact液胞の濃度依存的なリン酸の取り込み

1.4 mM ATPを添加した場合（●）、ATPを添加しなかった場合（○）におけるリン酸の取り込みを測定した。測定溶液中のリン酸の濃度は1 mM, 3 mM, 5 mM, 10 mMと変化させた。

表 1-5 異なるリン酸栄養条件で育てたシロイヌナズナ培養細胞から単離した液胞のリン酸の取り込み

Pi uptake (nmole / $\mu$ l vacuole / hr)			
High Pi cells		Low Pi cells	
+ATP	+PPi	+ATP	+PPi
0.07 $\pm$ 0.02 (n = 3)	0 (n = 3)	0.14 $\pm$ 0.03 (n = 3)	0.11 $\pm$ 0.05 (n = 3)

測定溶液中に0.7 mM  $\text{KH}_2^{32}\text{PO}_4$ と1.4 mM ATPまたは1.4 mM PPiを添加して、リン酸の取り込みを測定した。高リン酸条件では、植え継ぎ3日目と5日目にそれぞれ最終濃度が7.5 mMになるよう培地にリン酸を加えた。

## 2章 液胞膜リン酸輸送体の探索

### 序

#### 液胞膜のリン酸輸送体はまだみつからない

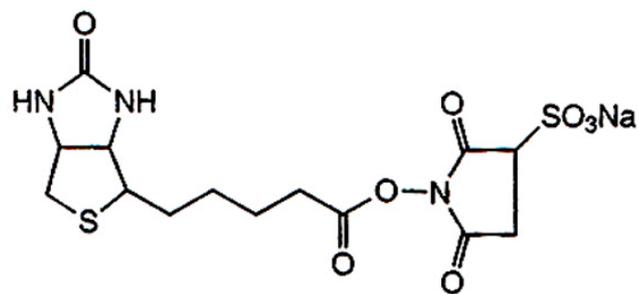
液胞の機能から液胞膜には多くの輸送体が存在すると考えられる。近年、液胞膜において、いくつかの輸送体が同定されてきているが、リン酸の輸送体はまだみつからない。すでに同定されている細胞膜のリン酸輸送体の配列と相同性を示すものが見つからないこと、また、酵母を含めた他のモデル生物の液胞におけるリン酸輸送体もまだ同定されていないことから、遺伝子配列からのアプローチは成功していない。

#### リン酸輸送体同定のためのアプローチ —阻害剤探索とトランスクリプトーム解析—

そこで、リン酸輸送体を同定するため他のアプローチを考えた。1つ目は、タンパク質レベルでの探索である。リン酸輸送に関わる液胞膜タンパク質を探し出すため、液胞へのリン酸輸送を阻害する物質を探し出し、この阻害剤を用いて、リン酸輸送に関わる液胞膜タンパク質を標識することを試みた。Massonneauらはニチニチソウ培養細胞において、液胞へのリン酸取り込み機構について解析するため、さまざまな阻害剤を試した結果、 $K_2CrO_4$ とDIDS (4, 4-Diisothiocyanostilbene-2, 2'-disulfonic acid) を与えた場合に、リン酸の取り込みが強く阻害されたと報告している (Massonneau et al. 2000)。 $CrO_4^{2-}$ は分子構造の類似性から競合的にリン酸の取り込みを阻害していると考えられ、クロム酸塩は液胞への硫酸輸送の強力な阻害剤であることが報告されている (Mornet et al. 1997)。DIDSは陰イオントランスポーターの阻害剤で、アミノ酸残基を化学的に修飾することが知られている。おそらく、本来陰イオンが結合するトランスポーターのリジン残基にDIDSが結合してしまうため、イオンの取り込みが阻害されると考えられる。そこで、ラベル化されたDIDSを用いて、リン酸輸送に関わるタンパク質を標識することを考えたが、ラベル化されたDIDSの入手が困難であることが判明した。そこで、

DIDSに代わる阻害剤として、リジン残基に結合することが知られている Biotin-Sulfo-OSU (DOJINDO, Kumamoto) (図2-1) に注目してみた。ビオチンはそれ自身に化学修飾を施すことにより抗体などのタンパク質の官能基に結合させることが可能である。今回注目したBiotin-Sulfo-OSU (Sulfosuccinimidyl *D*-biotin) は分子内に活性エステルを持つため、リジンの  $\epsilon$ -アミノ基などの遊離のアミノ基と結合する。アビジンはビオチンに対して極めて高い親和性をもつので、標識されたアビジンを用いることで、アビジン-ビオチンの結合により、ビオチンが結合した物質を検出することができる。Biotin-Sulfo-OSUは抗体や酵素の活性を消失することなく標識することが可能であり、また、スペーサーの存在により、アビジンとビオチンとの結合阻害が起こりにくく、タンパク質のラベル化に適している。

2つ目は遺伝子の発現レベルからの探索である。第1章より、低リン酸条件下では高リン酸条件下に比べて、液胞へのリン酸の取り込みの増加がみられた。つまり、液胞のリン酸の取り込みはリン酸欠乏に応答した現象としてとらえることができる。このことから、液胞へのリン酸の輸送に関わる遺伝子が、リン酸欠乏により、発現が増加していることが期待される。マイクロアレイの解析に適したシロイヌナズナ培養細胞を用いて、低リン酸と高リン酸条件でトランスクリプトーム解析を行うことで、リン酸輸送に関わる遺伝子の探索を試みた。



**Biotin Sulfo-OSu**  $C_{14}H_{18}N_3NaO_8S_2 = 443.43$

図2-1 Biotin Sulfo-OSUの構造

Biotin-sulfo-OSU (Sulfosuccinimidyl *D*-biotin) は分子内に活性エステルを持つため、リジンの  $\epsilon$ -アミノ基などの遊離のアミノ基と結合する。また、スペーサーの存在により、アビジンとビオチンとの結合障害が起こりにくいため、タンパク質のラベル化に適している。

## 方 法

### Biotin-Sulfo-OSu とリン酸の競合実験

方法は第 1 章で示したニチニチソウ単離液胞のリン酸の取り込みの測定に従い、ビオチンとリン酸を競合させるため、uptake medium に 200  $\mu$ M Biotin-Sulfo-OSu を添加して測定を行った。

### 液胞膜の調製

膜表在タンパク質を除去するため、単離した液胞に最終濃度が 150 mM KCl、0.05% Deoxycholate になるようにそれぞれを加え、十分混合した後、氷上に 10 分間静置した。液胞を破壊するため、 $-80^{\circ}\text{C}$  で 10 分間静置、解凍後、溶液 1 (250 mM Sucrose, 5 mM PIPES, pH7.2 (KOH)) を適量加え、120,000 $\times$ g、 $4^{\circ}\text{C}$ 、75 min で遠心分離し、沈殿を溶液 1 に溶解したものを液胞膜として、上清を液胞 sap として回収した。タンパク質定量を行った結果、1 回の実験において生重量 12 g の培養細胞から、約 12  $\mu$ g の液胞膜が得られた。

### Biotin-Sulfo-OSu によるリン酸輸送体候補の標識

Biotin-Sulfo-OSu は活性部位でリン酸と競合すると考えられる。精製したシロイヌナズナの液胞膜 20  $\mu$ g に「リン酸有り」のサンプルとして、50 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  を添加したものと、「リン酸無し」のサンプルとして、リン酸の代わりに 50 mM KCl を添加したものにそれぞれ 0.1 mM Biotin-Sulfo-OSu を加えて、室温に 30 分間静置した。さらに DIDS による効果をみる場合は、リン酸有無のサンプルに 50  $\mu$ M DIDS を添加して同様に Biotin-Sulfo-OSu と反応させた。その後、SDS-PAGE を行い、PVDF メンブレンに転写し、ブロッキング後、20% Streptavidin-Alkaline Phosphatase (Oncogene, MA, USA) 溶液中で一晩振とうし、アルカリフォスファターゼ反応でビオチンと結合したタンパク質を検出した。

## 異なるリン酸条件下でのトランスクリプトーム解析

シロイヌナズナの培養細胞を7日間培養細胞したものから、RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) を用いて RNA の抽出を行った。培養3日目と5日目に最終濃度が 7.5 mM になるよう MS 培地に  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH 6.0 with KOH) を加えたものを高リン酸条件とし、かわりに等量の滅菌水を加えたものを低リン酸条件とした。ラベル化 cRNA は Low RNA Input Fluorescent Linear Amplification Kit (Agilent Technologies, CA, USA) を用いて合成した。それぞれ抽出した RNA の純度の確認 (RNA 6000 Nano Lab Chip, Agilent Technologies) と定量 (ND-1000 Spectrophotometer, NanoDrop Technologies, DE, USA) を行った後、oligo dT-T7 promoter primer と MMLV-RT を用いて、逆転写反応を行い、さらに得られた cDNA から T7 RNA polymerase を用いて、Cyanine 3-CTP (Cy3) または Cyanine 5-CTP (Cy5) (PerkinElmer, MA, USA) を取り込ませ、ラベル化 cRNA を合成した。得られたラベル化 cRNA は RNeasy Mini Kit (Qiagen) を用いて精製後、ラベル化前と同様に純度の確認と定量を行った。In situ Hybridization Kit Plus (Agilent Technologies) を用いて、ラベル化 cRNA を等量ずつ混合したハイブリダイゼーション溶液を調製し、マイクロアレイ (Arabidopsis 2 Oligo Microarray Kit, Agilent Technologies) と 60°C で 17 時間、ハイブリダイズさせた。その後、SSC 溶液でスライドガラスを洗浄し、窒素ガスを用いて乾燥させた。Cy3 と Cy5 の組み合わせを逆転したダイスワップ実験により、ハイブリダイゼーションにおける人為的誤差を除いた。

アレイスライド上の Cy3 および Cy5 の蛍光強度を Agilent Microarray Scanner (Agilent Technologies) により検出した。スポット解析には Feature Extraction Software (Agilent Technologies) を用い、フィーチャの検出とバックグラウンド補正、色素補正を行い、スポットを数値化した。データの解析には Microsoft Excel (Microsoft, Redmond, WA) を用い、得られた数値化データから、コントロールスポット、サチュレーションスポット、バックグラウンドと有意差がないシグナルスポット、ある閾値より

も低いシグナルスポット、およびフラグ (Feature Extraction Software を用いたスポット解析の結果、ノイズが高く、複数あるスポット間でばらつきが大きいと判定されたもの) を除いた。発現差については、Feature Extraction Software による補正後のシグナル値を用いて  $\text{LogRatio} = \text{Log}_{10} (\text{Cy5 シグナル強度} / \text{Cy3 シグナル強度})$  の解析を行い、ダイスワップ実験において、低・高リン酸条件間で、2 倍以上のシグナル強度差があり、P 値 (各フィーチャの LogRatio の有意確率) が 0.01 以下であるスポットについて有意な発現差があるとした。発現差がみられた遺伝子について、データベースを利用して、遺伝子の機能について確認した。マイクロアレイ実験は基礎生物学研究所で行った。

## 結果と考察

### Biotin-Sulfo-OSU によるリン酸取り込みの阻害

ニチニチソウを用いた実験では DIDS が液胞膜へのリン酸輸送を阻害することが示された (Massonneau et al. 2000)。DIDS は陰イオントランスポーターの阻害剤で、本来陰イオンが結合するトランスポーターのリジン残基に DIDS が共有結合してしまうため、イオンの取り込みが阻害されると考えられている。つまり、リン酸もこのリジン残基に結合して取り込まれていると示唆される。ラベル化された DIDS を用いて、リン酸輸送に関わるタンパク質を標識することを考えたが、ラベル化された DIDS の入手が困難であることが判明した。そこで、別の阻害剤を探すため、リジン残基に結合することが知られている Biotin-Sulfo-OSU に注目した。Biotin-Sulfo-OSU の存在下で、ニチニチソウ単離液胞のリン酸の取り込みを測定したところ、表 2-1 に示す通り、Biotin-Sulfo-OSU が液胞へのリン酸輸送活性を阻害することが確認できた。ビオチンはアビジンと結合でき、またこの Biotin-Sulfo-OSU はリンカー部分を持つため、タンパク質と結合しても、アビジンとの結合が阻害されることがなく、タンパク質の標識に有効である。

### Biotin-Sulfo-OSU によるリン酸輸送体候補の標識

前述の通り、液胞へのリン酸の取り込みが Biotin-Sulfo-OSU により阻害されることがわかったので、この Biotin-Sulfo-OSU を用いて、リン酸輸送に関わるタンパク質の標識を試みた。実際にはリン酸と Biotin-Sulfo-OSU の競合実験を行った。模式図に示す通り (図 2-2)、リン酸が十分に存在すると、Biotin-Sulfo-OSU はリン酸輸送体タンパク質のリジン残基に結合できないが、リン酸がなければ Biotin-Sulfo-OSU がリジン残基に結合できると想定される。そして、Biotin-Sulfo-OSU が結合したタンパク質はアビジンで検出することが可能である。

約 60 kDa 付近にリン酸無し (-P) では検出できるが、リン酸有り (+P) で、消えるバンドがいくつか検出された (図 2-3)。また、リン酸有り (+P) と同様、リン酸無し (-P) に DIDS を加えた場合にもバンドが消えることが確認された。ニチニチソウの液胞膜では約 60 kDa と約 100 kDa 付近にリン酸有り (+P) で消えるバンドが検出された。これらのバンドに含まれるタンパク質がリン酸輸送に関わっていることが期待される。次にこれらのタンパク質を同定するため、プロテオーム解析を行った結果は第 3 章で述べる。

### 異なるリン酸条件下でのトランスクリプトーム解析

第 1 章より、低・高リン酸条件で育てた細胞からそれぞれ液胞を単離し、リン酸の取り込みを比較すると、低リン酸条件から単離した液胞でリン酸の取り込み活性が高いことが示された (表 1-5)。このことから、液胞へのリン酸の取り込みはリン酸欠乏に応答する現象としてとらえることができる。そこで、低リン酸条件において、液胞へのリン酸の取り込みが増加することから、液胞膜のリン酸トランスポーターの発現量も増加しているのではないかと考え、低・高リン酸条件でトランスクリプトーム解析を行った。その結果、835 遺伝子において発現差がみられた。このうち、2 つ以上の膜貫通領域を持つタンパク質は 170 個であった。高リン酸条件で増加した遺伝子は 165 個、低リン酸条件で発現が増加したものが 670 個あり、この中にリン酸欠乏で発現が増えることが知られている細胞膜に存在するリン酸トランスポーター (Pht1;2, Pht1;3, Pht1;4) も含まれていた。また、プロトンポンプにおいて、有意な発現差はみられなかった。

液胞膜のリン酸トランスポーター候補を探すため、低リン酸条件下で発現が増加し、膜貫通領域を 2 つ以上持つものに注目してみたところ、62 遺伝子が見いだされた (表 2-2)。そのうち、過半数のものについては、機能はよくわかっていない。輸送に関わると推定されるものもいくつかみられるが、リン酸輸送に関わる遺伝子かどうかはさらに詳細な解析が必要である。また、逆に低リン酸条件下で発現が減少するものについてまとめてみたところ (表 2-3)、根の表層で発現する硫酸トランスポーター Sultr1;2 と、

液胞からの硫酸の排出を担っている硫酸トランスポーターSultr4;2 の発現が減少していた。

表 2-1 Biotin-Sulfo-OSU によるリン酸取り込みの阻害

Pi uptake of isolated vacuoles (nmol / $\mu$ L vacuole / hr)	
Control	+Biotin (200 $\mu$ M)
2.28 $\pm$ 0.42 (n = 7)	0.42 $\pm$ 0.48 (n = 5)

測定溶液中に 0.7 mM  $\text{KH}_2^{32}\text{PO}_4$  と 1.4 mM を添加して、リン酸の取り込みを測定した。+Biotin は単離した液胞を 200  $\mu$ M Biotin-Sulfo-OSU で 20 分間反応させた後に測定した。

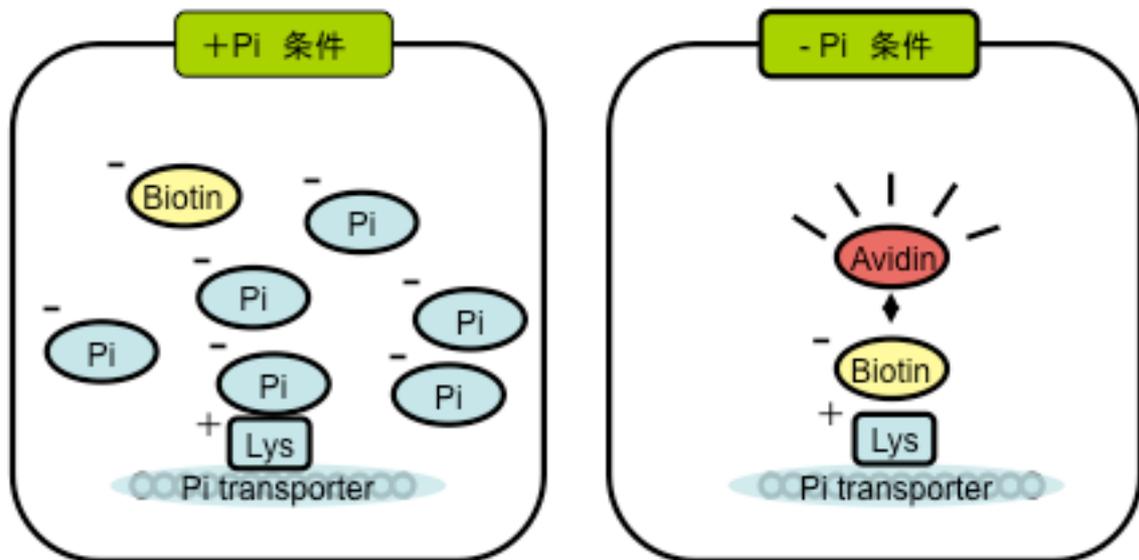


図 2-2 Biotin-Sulfo-OSU によるリン酸輸送体候補タンパク質の標識（模式図）

リン酸が十分存在すると、Biotin-Sulfo-OSU はリン酸輸送体タンパク質のリジン残基に結合できないが、リン酸がなければ Biotin-Sulfo-OSU がリジン残基に結合することができる。Biotin-Sulfo-OSU が結合したタンパク質はアビジンで検出することができる。

*Arabidopsis thaliana*

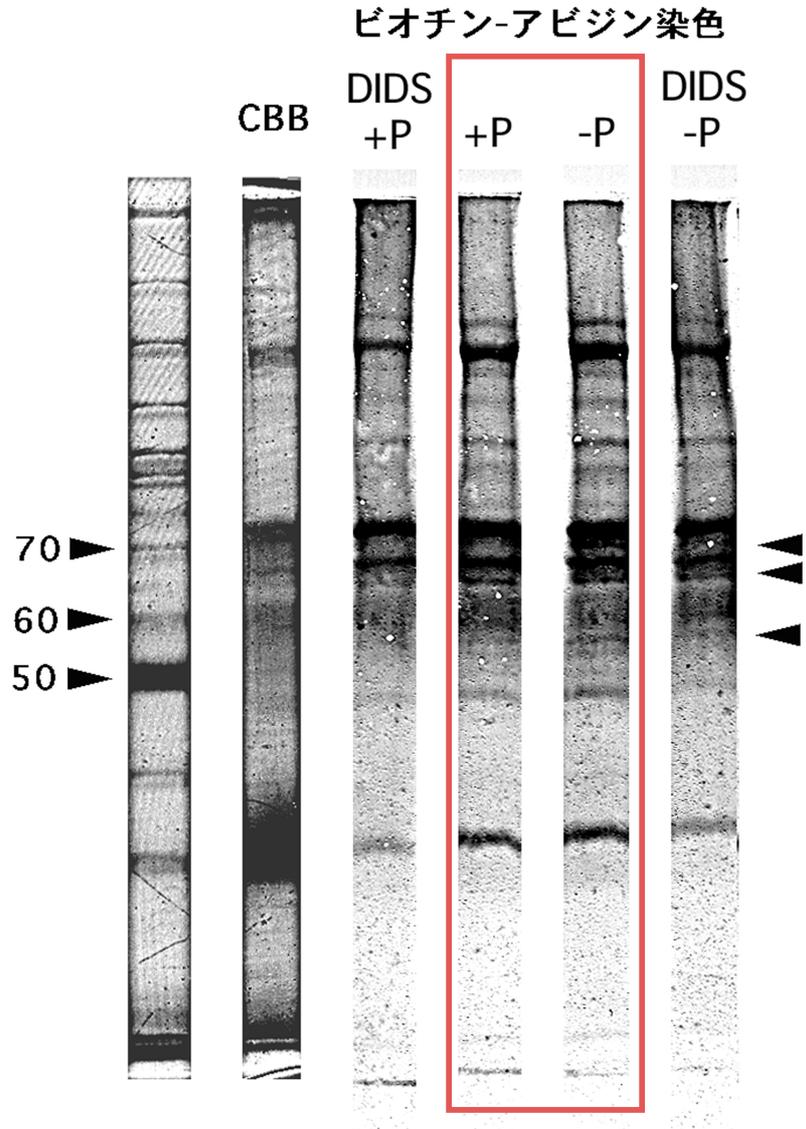


図 2-3 Biotin-Sulfo-OSU によるリン酸輸送体候補の標識

約 60 kDa 付近にリン酸無し (-P) では検出できるが、リン酸有り (+P) で、消えるバンドがいくつか検出された。リン酸無し (-P) に DIDS を加えた場合にもバンドが消えることが確認された。

表 2-2 低・高リン酸条件下でのトランスクリプトーム解析

GeneName	Description	MW	TMD	- P/+ P
At2g38940	phosphate transporter (PT2), identical to phosphate transporter (AtPT2)	58600	11	44.55
At5g43360	inorganic phosphate transporter (PHT3)	57258	12	11.51
At3g47420	glycerol-3-phosphate transporter	56310	12	10.85
At3g16240	delta tonoplast integral protein (delta-TIP)	25027	6	8.40
At4g34950	nodulin family protein, similar to nodulin-like protein	60863	7	8.24
At2g45400	dihydroflavonol 4-reductase family / dihydrokaempferol 4-reductase family	40261	2	7.79
At4g15540	nodulin-related, low similarity to MtN21 (Medicago truncatula)	29421	8	5.53
At3g51860	cation exchanger, putative (CAX3), similar to high affinity calcium antiporter CAX1	49852	11	4.75
At4g18210	purine permease family protein, similar to purine permease	43478	10	4.66
At3g08040	MATE efflux family protein	55947	11	4.60
At5g24600	expressed protein	27838	4	4.45
At2g21560	expressed protein	31770	2	4.32
At1g57990	purine permease-related, low similarity to purine permease	44182	10	4.24
At1g75500	nodulin MtN21 family protein	42571	10	4.02
At3g09340	amino acid transporter family protein	57453	11	3.92
At5g24290	integral membrane family protein	61046	4	3.78
At2g44500	expressed protein	64586	2	3.76
At3g52310	ABC transporter family protein	81772	6	3.75
At2g20142	expressed protein	18366	3	3.61
At3g48850	mitochondrial phosphate transporter	39025	2	3.58
At4g30440	NAD-dependent epimerase/dehydratase family protein	47459	2	3.51
At1g01120	fatty acid elongase 3-ketoacyl-CoA synthase 1 (KCS1)	59277	2	3.43
At5g45380	sodium:solute symporter family protein	74962	14	3.40
At5g24030	C4-dicarboxylate transporter/malic acid transport family protein	72340	9	3.34
At5g17980	C2 domain-containing protein	117932	2	3.27
At4g27730	oligopeptide transporter OPT family protein	82362	14	3.23
At2g23790	expressed protein	38178	2	3.17
At2g18690	expressed protein	36040	6	3.02
At1g60960	metal transporter, putative (IRT3)	45090	7	3.00
At4g17790	expressed protein	28927	5	2.98
At4g39030	enhanced disease susceptibility 5 (EDS5) / salicylic acid induction deficient 1 (SID1)	59529	10	2.97
At4g27860	integral membrane family protein	68170	5	2.90
At1g12950	MATE efflux family protein	56907	12	2.82
At5g35735	auxin-responsive family protein, similar to auxin-induced protein AIR12	43868	5	2.77
At2g19110	ATPase E1-E2 type family protein /	127210	7	2.74
At4g10380	Essential for efficient Boron uptake and plant development under boron limitation	31493	6	2.71
At1g67600	expressed protein	17600	3	2.69
At3g21080	ABC transporter-related, contains 4 transmembrane domains	28970	4	2.62
At3g28180	glycosyl transferase family 2 protein, similar to beta-(1-3)-glucosyl transferase	77516	6	2.61
At4g36820	expressed protein	39007	2	2.61
At4g36850	PQ-loop repeat family protein / transmembrane family protein	42455	6	2.60
At3g05150	sugar transporter family protein	51025	12	2.60
At4g30430	Member of TETRASPANIN family	31064	3	2.57
At3g21240	4-coumarate--CoA ligase 2 / 4-coumaroyl-CoA synthase 2 (4CL2)	60843	2	2.45
At1g19770	purine permease-related, low similarity to purine permease	44064	10	2.44
At5g66675	expressed protein	46372	2	2.39
At3g15530	expressed protein	32089	2	2.38
At4g12090	cornichon family protein	15961	2	2.38
At2g16660	nodulin family protein, similar to nodulin-like protein	58978	12	2.36
At5g41800	amino acid transporter family protein, similar to amino acid permease 1	49857	11	2.36
At3g26590	MATE efflux family protein	54322	10	2.28
At2g35710	glycogenin glucosyltransferase (glycogenin)-related	56799	6	2.27
At5g03570	iron-responsive transporter-related,	57095	10	2.27
At1g15210	ABC transporter family protein	162572	13	2.25
At5g43370	inorganic phosphate transporter (PHT2)	57645	12	2.22
At4g00300	fringe-related protein, + weak similarity to Fringe (Schistocerca gregaria)	88862	2	2.20
At2g17480	seven transmembrane MLO family protein / MLO-like protein 8 (MLO8)	67213	7	2.19
At1g13210	aloacid dehalogenase-like hydrolase family protein	136585	10	2.12
At2g47800	glutathione-conjugate transporter (MRP4), identical to AtMRP4	169082	16	2.12
At1g44100	amino acid permease 5, putative (AAP5)	52539	10	2.11
At5g16010	3-oxo-5-alpha-steroid 4-dehydrogenase family protein	30127	5	2.11
At3g59700	lectin protein kinase, putative, similar to receptor lectin kinase 3	74437	2	2.06

高リン酸条件下に比べて低リン酸条件下で発現が Log 比で 2 倍以上増加し、膜貫通域を 2 つ以上持つものを示す。TMD : データベース ARAMEMNON から得られた膜貫通領域の数, MW : データベース Tair で得られた分子量

表 2-3 低・高リン酸条件下でのトランスクリプトーム解析

GeneName	Description	MW	TMD	+P/-P
At1g78000	sulfate transporter (Sultr1;2), identical to sulfate transporter Sultr1;2	71708	10	6.56
At3g12520	sulfate transporter family protein, similar to sulfate transporter Sultr4;2	74663	12	4.06
At1g01620	aquaporin PIP1;3	30633	6	4.05
At5g56100	glycine-rich protein / oleosin	15723	2	4.05
At1g71880	sucrose transporter / sucrose-proton symporter (SUC1)	54859	12	3.01
At2g35460	harpin-induced family protein	26825	2	2.95
At4g37030	similar to expressed protein	63338	5	2.91
At2g39010	aquaporin, putative, similar to plasma membrane aquaporin	31050	6	2.69
At3g05400	sugar transporter, putative, similar to sugar-porter family proteins 1 and 2	50603	11	2.41
At1g29910	chlorophyll A-B binding protein 2	28227	2	2.29
At1g73190	Moves to the Protein Storage Vacuole in a golgi independent manner	28308	6	2.27
At2g35750	expressed protein	6705	2	2.13
At1g55670	Encodes subunit G of photosystem I	17085	2	2.10

低リン酸条件下に比べて高リン酸条件下で発現が Log 比で 2 倍以上増加し、膜貫通領域を 2 つ以上持つものを示す。つまり、低リン酸条件下で発現が下がったもの。TMD : データベース ARAMEMNON から得られた膜貫通領域の数, MW : データベース Tair で得られた分子量

### 3 章 液胞膜プロテオーム解析

#### 序

#### オルガネラのプロテオーム解析

近年、植物細胞のさまざまなプロテオーム解析が報告されている (Santoni et al. 1998, Prime et al. 2000, Ferro et al. 2002, Fukao et al. 2002, Peltier et al. 2002, Schubert et al. 2002, Ferro et al. 2003, Heazlewood et al. 2003)。特に、葉緑体は植物にとって、重要なオルガネラであることと、比較的純度の高い葉緑体が単離できるため、もっとも解析が進んでいる (Ferro et al. 2002, Peltier et al. 2002, Schubert et al. 2002, Ferro et al. 2003)。これらの仕事から、機能が同定されていなかったさまざまなタンパク質の葉緑体局在が見いだされている。ミトコンドリア (Heazlewood et al. 2004)、ペルオキシソーム (Fukao et al. 2002, 2003)、細胞膜 (Prime et al. 2000, Alexandersson et al. 2004) のプロテオーム解析も試みられている。信頼度の高いプロテオーム解析を行うためには、まず、いかに純度の高いオルガネラを単離するかが、重要である。

#### 液胞膜のプロテオーム解析

液胞が植物細胞の生理機能において、重要な役割を果たしていることが証明されてきているが (Matsuura-Endo et al. 1992, Takasu et al. 1997, Dietz et al. 1998, Massonneau et al. 2000, Frangne et al. 2002)、液胞内や液胞膜上で起こっている多くの活動について、特に分子レベルで、これらの活動がどのように制御されているのかはまだよくわかっていない (Maeshima 2001)。液胞における分子レベルでの解析が少ない理由として、まず、液胞の機能に関する遺伝子の突然変異体が少ないため (Gogarten et al. 1992, Schumacher et al. 1999, Gaxiola et al. 2002)、液胞の機能解析が十分に進められていないことがあげられる。つまり、液胞のタンパク質をコードする遺伝子の情報が少ないため、逆遺伝学的な手法を用いることができない。また、液胞のタンパク質

量は少なく、タンパク質の活性（輸送活性など）のレベルも低く、生理学的な検出が難しいため、1つのタンパク質をターゲットにすることは非常に困難である。そこで、プロテオーム解析ならば、一度に多数のタンパク質を同定することができるため、液胞の機能を担っている分子の解析を進める上で、有効な手段であると考えられる。

第1章で述べた、シロイヌナズナの培養細胞から *intact* 液胞を単離する方法を確立することで、プロテオーム解析を行うにあたって、他のオルガネラの混入が少ない十分に純度の高い液胞膜画分を得ることができた。また膜タンパク質プロテオーム解析の難しさとして、膜タンパク質の分離があげられる。葉緑体やミトコンドリアはタンパク質は多いが、疎水性が低いのに比べ、液胞膜は疎水性が高く、2次元電気泳動による分離が難しい。今回は、液胞膜タンパク質の分離においても工夫を行った。その上で、リン酸輸送体の同定も目指し、液胞膜に存在するタンパク質を網羅的に解析するため、液胞膜のプロテオーム解析を行った。

## 方 法

### 液胞膜標識酵素の活性とタンパク質量

液胞膜型 H<sup>+</sup>-ATPase を液胞膜の標識酵素として用い、Bafilomycine により阻害される ATP の加水分解活性を液胞膜の H<sup>+</sup>-ATPase の活性として、Dietz らの方法 (1998) に従って測定した。液胞膜タンパク質 2 μg を測定に用いた。細胞膜の標識酵素として、細胞膜型 H<sup>+</sup>-ATPase を用い、Vanadate により阻害される ATP の加水分解活性を細胞膜型 H<sup>+</sup>-ATPase の活性として測定した。測定溶液の組成は、次の通りである。25 mM MES, 50 mM KCl, 2 mM NaMoO<sub>4</sub>, 2 mM MgSO<sub>4</sub>, 1 mM NaN<sub>3</sub>, 0.05% Brij 58, 1 μM Bafilomycine または 1 μM Sodium Vanadate, pH 6.5 (Tris)。ゴルジ体の標識酵素として latent IDPase を用い、その活性を測定した。測定溶液の組成は、次の通りである。25 mM Tricine, 50 mM KCl, 2 mM NaMoO<sub>4</sub>, 3 mM MgSO<sub>4</sub>, 1mM NaN<sub>3</sub>, 0.05% Brij 58, pH 7.5 (Tris)。10 μg のプロトプラストを用いて、細胞膜型 H<sup>+</sup>-ATPase と latent IDPase の測定を行った。すべての測定において、基質から生じた無機リン酸は Bencini の方法で測定した (Bencini et al. 1983)。

液胞膜の 1 次元電気泳動は、7.5%アクリルアミドゲルを用いた。ウェスタンブロット解析では、液胞膜型 H<sup>+</sup>-ATPase a subunit (Matsuura-Endo et al. 1992)、H<sup>+</sup>-PPase (Takasu et al. 1997)、細胞膜型 H<sup>+</sup>-ATPase (Kinoshita and Shimazaki 1999)、Binding Protein 70 (BiP; heat-shock 70 family のメンバー, immunoglobulin heavy chain-binding protein) (Hatano et al. 1997) に対する抗体を用いた。細胞膜型 H<sup>+</sup>-ATPase の抗体は島崎研一郎博士 (九州大学)、BiP の抗体は西村いくこ博士 (京都大学) にそれぞれ分与していただいた。

### プロテオーム解析用液胞膜の調製

第 1 章で示した方法でシロイヌナズナの培養細胞から単離した液胞を、第 2 章で示した方法で液胞膜の精製を行った後、さらに膜内在タンパク質と膜表在タンパク質に分離

する操作を行った。精製した液胞膜を 100 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> と 500 mM KSCN の溶液に混合し、4°C で 30 分間放置後、120,000 × g、4°C、75 min で遠心分離した。沈殿を膜内在タンパク質として、上清を膜表在タンパク質として回収した。

### 液胞膜のプロテオーム解析 (図 3-1)

精製した液胞膜タンパク質 50 μg または 100 μg を 1 次元電気泳動した後、SYPRO Ruby で染色し、バンドを切り出した。染色が不鮮明な部分は、1 mm ずつ切り出した。切り出されたゲルは Shevchenko らの方法 (1996) に従って、洗浄、還元、アルキル化した後、トリプシン (Promega, WI, USA) で消化した。ペプチドは 5% (v/v) のギ酸溶液とアセトニトリルで抽出した。約 10 μl まで濃縮したペプチド溶液に 0.1% (v/v) のギ酸を加えて総量を 20 μl にした。サンプルは Agilent 1100 capillary HPLC system (Agilent Technologies, CA, USA) にインジェクトされた。ペプチドの分離は 75 μm i.d. × 50 mm HiQ sil C18V column (KYA Technologies Co., Tokyo, Japan) を用い、溶液 A (10%アセトニトリル:90%水:0.1%ギ酸) から溶液 B (90%アセトニトリル:10%水:0.1%ギ酸) までの勾配を作製し、200 nl/min の速度で 70 分以上流して行った。

LC システムは PicoTip (New Objectives, MA, USA) を介して、Q·TOF Ultima mass spectrometer (Waters Co., Milford, MA, USA) と直接、連結させた。MS と MS/MS のデータは MassLynx 4.0 software (Waters Co., Milford, MA, USA) により取得され、自動的に処理された。スペクトルは (Glu1) -fibrinopeptide B (Sigma-aldrich, Saint Louis, MO, USA) の断片を用いて計算された。データベースの探索は MASCOT (Matrix Science, UK) を用いて行なった。TIGR 4.0 のシロイヌナズナのタンパク質のデータベースと、ミトコンドリアと葉緑体のゲノムがデータベースの探索に用いられた。タンパク質の同定のため、ペプチド配列は手動で調べた。実際の測定は地球環境産業技術研究機構 (RITE) で行われた。

## GFP 融合タンパク質の細胞内局在の確認

プロテオーム解析で見い出されたタンパク質の液胞膜での存在を確認するために、シロイヌナズナ培養細胞中で GFP 融合タンパク質を発現させた。GFP 融合タンパク質を発現させるコンストラクトを作製するため、導入する遺伝子を理化学研究所バイオリソースセンター（茨城）より cDNA クローンとして入手した。この cDNA クローンを鋳型とした PCR 産物を Gateway vector pUGW5 または pUGW6（中川強博士（島根大学）より分与していただいた）に Gateway system（Invitrogen, CA, USA）を用いて導入した。エントリーベクターの作成に用いたプライマーの配列は次の通りである。

AtSUC1;

pda04389attB1FP

(5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTAATGGGAGCCTATGAAACAGAA-3')

pda04389attB2RP

(5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTAGTGGAATCCTCCCATGGTCGT-3')

At1g61890;

pda01061attB1FP

(5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTAATGAATTCAGAATCGCTAGAAAAT-3')

pda01061attB2RPstop

(5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTTTATTGCTTCAAAGCGGCTC-3')

At3g21690;

pda08799attB1FP

(5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCTATGGACTCGTCTCCAAACGAC-3')

pda08799attB2RP

(5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTTTTCAGGAACAACCTTCTTGTTTCTT-3')

At3g01930;

pda09392attB1FP

(5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCTATGTGTATCCTCATTTTTGTTGGG-3')

pda09392attB2RP

(5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTAGTTGCGGGTTTTGCCGTAGAGATT-3')

At1g76520;

pda08858attB1FP

(5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCGATGGTGAAGCTTTTGGAGCTGTTC-3')

pda08858attB2RPstop

(5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTCTAAGCTACAAGCCACATGAAGAA-3')

シロイヌナズナ培養細胞への一過的な形質転換は従来の方法 (Ueda et al. 2001, Uemura et al. 2004) に改良を加えて行った。シロイヌナズナの培養細胞を酵素液 (400 mM mannitol, 5 mM EGTA, 1% Cellulase Y-C, 0.05% Pectolyase Y-23) により、プロトプラスト化し、ナイロンメッシュ (120  $\mu\text{m}$ ) を通過したものを遠心 (500 g, 10 分, 室温) で回収した。プロトプラストとプラスミドを混合し、一晚 23°C で浸透培養した後、蛍光顕微鏡 (BX51WI, OLYMPUS, Tokyo) で観察を行った。

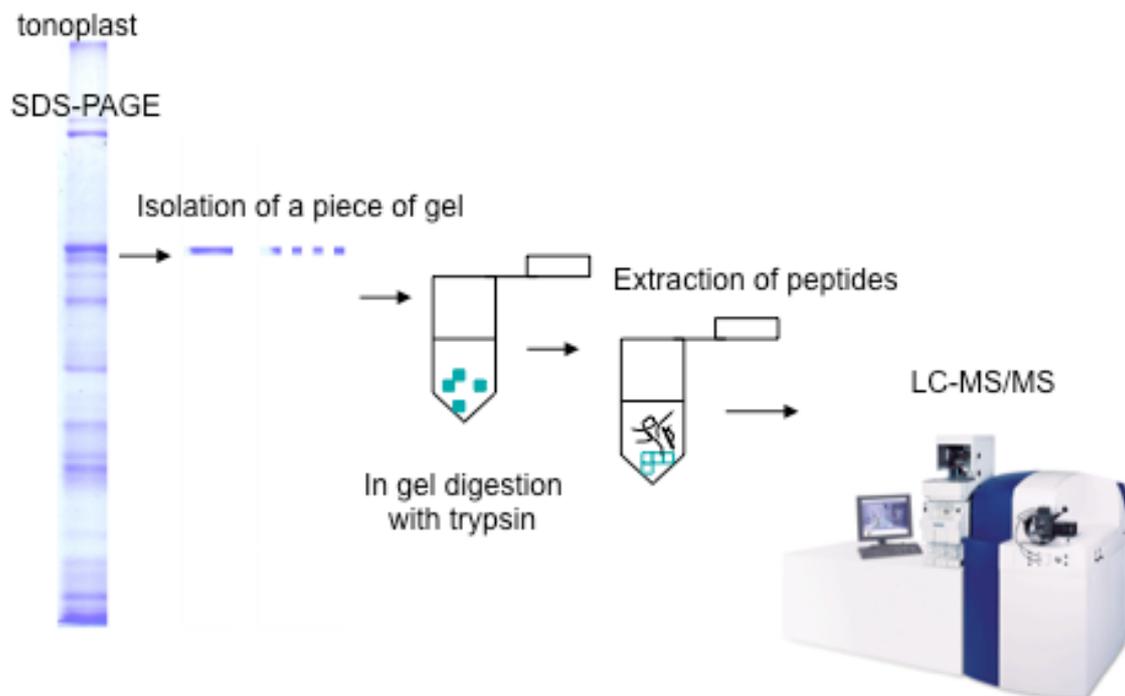


図 3-1 液胞膜プロテオーム解析の流れ

精製した液胞膜タンパク質を1次元電気泳動し、染色後、1 mm ずつ切り出した。切り出されたゲルは洗浄、還元、アルキル化した後、トリプシンで消化した。ペプチドはギ酸溶液とアセトニトリルで抽出、濃縮後、LC-MS/MS (HPLC-Q-TOF) により解析した。

## 結果と考察

現在までに、我々も含めて液胞膜のプロテオーム解析結果がいくつか報告されている (Sazuka et al. 2004, Szponarski et al. 2004, Carter et al. 2004, Endler et al. 2006)。材料としてシロイヌナズナと大麦が使用されており、シロイヌナズナはゲノム情報からタンパク質の同定が進められる点で、解析に有利である。それぞれ、葉や培養細胞から intact 液胞または液胞膜画分を用いて、プロテオーム解析を行っている。Sazuka ら (2004) や Szponarski ら (2004) は、糖の密度勾配遠心により単離したシロイヌナズナの液胞膜画分をクロマトグラフィーで分離している。残念ながら、他の膜の混入が検出されていた。我々と同時期に Carter らはシロイヌナズナの葉肉細胞のプロトプラストから、Endler らは大麦の葉肉細胞のプロトプラストから intact 液胞を単離後、純度の高い液胞膜を精製し、1次元電気泳動で分離した後、LC-MS/MS 解析にてタンパク質の同定を行っている (Carter et al. 2004, Endler et al. 2006, Mimura et al. 2007)。

### 液胞膜の純度

これまで単離した intact 液胞が、液胞へのリン酸の取り込みやニュートラルレッドの取り込みから、単離した後も液胞膜の機能を維持していることは明らかである。これらの機能を支持するプロトンポンプの存在を確認した上で、第2章で示したように、液胞膜として精製を行った。

単離精製した液胞膜の SDS-PAGE を行った結果を図 3-2a に示す。プロトプラストや液胞 Sap と比べるとバンドパターンが異なることがわかる。

調製した液胞膜がプロテオーム解析に十分な純度をもつか、検討するため、まず、液胞、ゴルジ体、細胞膜の標識酵素の活性について調べてみた。表 3-1 はそれぞれの酵素の加水分解により生じたリン酸の濃度を示している。Latent IDPase と細胞膜型 H<sup>+</sup>-ATPase の活性はいずれのサンプルにおいても活性が低い。液胞膜についてみると、液胞型 H<sup>+</sup>-ATPase の活性は高い値を示すのに比べ、Latent IDPase と細胞膜型

H<sup>+</sup>-ATPase の活性はいくらか検出されるものの、非常に低くなっていた。プロトプラストでは、いずれの活性も同程度検出されるのに比べると、液胞膜は十分に濃縮され、細胞質や細胞膜の混入が少ないと考えられる。

また、図 3-2b はウェスタンブロットにより純度の検定を行った結果を示す。抗体は液胞のマーカーとして液胞型 H<sup>+</sup>-ATPase a サブユニット、ER のマーカーとして BiP、細胞膜のマーカーとして細胞膜型 H<sup>+</sup>-ATPase を用いた。液胞膜では、約 68 kDa の液胞型 H<sup>+</sup>-ATPase のバンドが濃く検出され、BiP はわずかにバンドが検出されるが、細胞膜型 H<sup>+</sup>-ATPase のバンドはほとんど検出されなかった。一方、プロトプラストでは、約 73 kDa の BiP の太いバンドと約 100 kDa の細胞膜型 H<sup>+</sup>-ATPase のバンドが検出された。このことから、液胞膜は十分に濃縮されており、ER や細胞膜といった他のオルガネラの混入がとても少ないことが示された。

#### プロテオーム解析用液胞膜の調製

最初の LC-MS/MS の解析結果からは、60 個のタンパク質しか同定することができなかった。原因は、液胞膜には図 3-2b で示されたように液胞型 H<sup>+</sup>-ATPase が多量に存在しているため、他のタンパク質の同定を邪魔していた。そこで、液胞型 H<sup>+</sup>-ATPase の V<sub>1</sub>セクターのような膜に表在しているタンパク質を H<sup>+</sup>-PPase のような膜内在性のタンパク質から分離することを試みた。Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> と KSCN で液胞膜を洗浄した結果、液胞型 H<sup>+</sup>-ATPase の V<sub>1</sub>セクターが膜タンパク質の画分から減少した (図 3-3)。一方、H<sup>+</sup>-PPase は膜タンパク質の画分に十分残っている (図 3-3)。実際に質量分析に用いるサンプルとして、精製過程での損失を考え、泳動に用いるタンパク質量 (約 50 μg) の 10 倍量を Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> と KSCN で処理した。1 回の液胞単離の操作で約 12 g の細胞から約 12 μg の液胞膜が回収されるので、1 回のサンプルの調製に、約 3 ヶ月を要した。

### 液胞膜に存在するタンパク質

上記の方法で処理したサンプルを LC-MS/MS にかけた結果、膜表在タンパク質として 91 個、膜内在性のタンパク質として、102 個のタンパク質が同定された。いくつかのタンパク質は両標品で検出された。複数回の測定の結果、最終的に 163 個のタンパク質が同定された (表 3-2~3-6)。同定されたタンパク質の中に、細胞膜やその他の既知のオルガネラタンパク質はほとんど検出されなかったことから、液胞膜のサンプルに細胞膜を含む他のオルガネラの混入が少ないことが示された。46 個のタンパク質が 2 つ以上の膜貫通領域を持ち、他の 117 のタンパク質は膜貫通領域を全く持たないか 1 つ持つものであった (図 3-4)。

### 同定されたタンパク質の分類

膜貫通領域を 1 つまたは全く持たないタンパク質のいくつかは、液胞型  $H^+$ -ATPase の  $V_1$  セクターのような、膜貫通型のタンパク質の複合体のサブユニットであった。シロイヌナズナのタンパク質のデータベースから 129 個のタンパク質について、その機能を推測することができた (表 3-2~3-5)。残りの 34 のタンパク質については機能がわかっていない (表 3-6)。129 個のタンパク質には、液胞膜のタンパク質としてすでに知られている液胞型  $H^+$ -ATPase や  $H^+$ -PPase が含まれており、これらは液胞膜においてもっとも豊富に存在するタンパク質である。分子レベルで液胞膜に局在することが知られていない膜タンパク質もみつかった (表 3-3)。ミトコンドリアや葉緑体に局在することが知られているタンパク質もいくつか検出された (表 3-5)。これが明らかなオルガネラの混入ならば、 $F_1F_0$ -ATPase のような主要なタンパク質が検出されるはずだが、検出されていない。現在のところ、他のオルガネラ由来と思われるタンパク質の人為的混入なのか、何か他の理由で (例えば、分解途中といった) 液胞と関係のあるタンパク質なのかは判断することができない。ゴルジ体や ER 由来のタンパク質もいくつか同定されている (表 3-5)。可溶性のタンパク質も多く見いだされた (表 3-5)。

## プロトンポンプ

これまでの研究から、液胞膜の主なタンパク質として、液胞型 H<sup>+</sup>-ATPase、液胞型 H<sup>+</sup>-PPase、アクアポリンが知られている (Maeshima 2001)。液胞型 H<sup>+</sup>-ATPase のほとんどのサブユニットと液胞型 H<sup>+</sup>-PPase がみつまっているのに対して、アクアポリンは検出されなかった。最近、シロイヌナズナでは、植物体に比べて液体培養細胞ではアクアポリンが強く発現していないという報告がなされており、今回の結果を支持するものである (Kobae et al. 2006)。

液胞型 H<sup>+</sup>-ATPase は V<sub>1</sub>セクターと V<sub>0</sub>セクターからなる (Sze et al. 2002)。V<sub>1</sub>セクターは A-H の 8 つのサブユニットからなり、V<sub>0</sub>セクターは a, c, c', d, e の 5 つのサブユニットからなる。表 3-2 にシロイヌナズナのゲノムにおいて液胞型 H<sup>+</sup>-ATPase のサブユニットをコードしている 28 遺伝子を並べた (Sze et al. 2002)。V<sub>1</sub>セクターのすべてのサブユニットは同定されたが、V<sub>0</sub>セクターの AtVHA-E2、AtVHA-G2、AtVHA-G3 は見つからなかった。AtVHA-B3 については、AtVHA-B1 と AtVHA-B3 に共通にみられる断片が検出された。あるタンパク質 (At1g16820) は AtVHA-A と相同性を示すものとして検出された (表 3-5)。このタンパク質の理論上の分子量は 10,426 と AtVHA-A に比べて、非常に小さい。プロテオーム解析の結果はこの遺伝子がシロイヌナズナで発現していることを示すが、このタンパク質が AtVHA-A と相互関係をもつか明らかではない。

V<sub>0</sub>セクターの 2 つの a サブユニットと 1 つの d サブユニットが同定された (表 3-2)。c サブユニットは同定されたが、c サブユニットをコードする遺伝子間では相同性が高いため、遺伝子座が同定されなかった。c' と e サブユニットは同定されなかった。これらの分子量は小さすぎて、SDS-PAGE のゲルから抽出できなかった可能性がある。

AVP1、AVP2、AVPL1 はシロイヌナズナのゲノムにおいて、液胞型 H<sup>+</sup>-PPase をコードしていると報告されている (Drozdowicz et al. 2000)。近年、Mitsuda ら (2001) が、AVP2/AVPL1 が液胞膜よりゴルジ体に局在することを示した。この 3 つの遺伝子産物は今回すべて同定されているが、AVPL1 は AVP2 と AVPL1 に共通にみられる配

列から同定されている。また今回の LC-MS/MS 解析では、タンパク質の分子量が同じような場合、含有量の高いタンパク質は高い sequence coverage を示す傾向にある。それゆえ、AVP2/AVPL1 に比べて、AVP1 の高い sequence coverage は、液胞膜のサンプルにおいて AVP1 が AVP2/AVPL1 より含有量が高いことを示唆している。

### トランスポーター

シロイヌナズナにおいて、ABC トランスポーターのスーパーファミリーは 115 の遺伝子からなる (Arabidopsis Genome Initiative 2000)。多くの ABC トランスポーターは液胞膜または細胞膜に局在し、これらの膜を介した 2 次代謝産物の輸送に貢献している。今回、5 つの ABC トランスポーターが同定された (表 3-3)。これらのうち、AtMRP1、AtMRP2、AtMRP4、AtMRP10 の 4 つは multidrug resistance-associated protein (MRP) のサブファミリーに属している。AtMRP2 は液胞膜での発現が報告されており (Liu et al. 2001)、今回の結果は AtMRP1、AtMRP4、AtMRP10 も液胞膜に局在することを示唆している。同定されたもう 1 つの ABC トランスポーターは AtTAP2 である。大麦の AtTAP2 のホモログは GFP (IDI7) 融合タンパク質をタバコの培養細胞において一過的に発現させた場合、液胞膜に局在することが報告されており (Yamaguchi et al. 2002)、今回の結果と一致する。

Ca<sup>2+</sup>/ATPase (ACAs) に属する calmoduline-binding protein である ACA.c も同定された (表 3-3)。EST のデータベースによると、ACA.c は長角果で発現している。ACA4 は液胞膜で発現しているだろうと報告されているので (Geisler et al. 2000)、今回の結果は、ACA.c がおそらく液胞膜で発現していることを示唆している。

亜鉛トランスポーターと推定されるタンパク質も同定された (表 3-3)。亜鉛耐性の植物は亜鉛感受性の植物に比べ、液胞膜を介した亜鉛の輸送活性が 2.5 倍も高いことがすでに報告されている (Verkleij et al. 1998)。シロイヌナズナにおいて、亜鉛トランスポーターをコードする候補遺伝子が同定されたが (Bloss et al. 2002)、その局在は実証されていなかった。今回、亜鉛のトランスポーターが液胞膜に局在し、おそらく亜鉛

の解毒にかかわっていることが示された。その後、Kobae らにより、このタンパク質が AtMTP1 として液胞膜に局在し、過剰な亜鉛の液胞への隔離に関わっていることが報告されている (Kobae et al. 2004)。

亜鉛トランスポーターに加えて、2つの natural resistance-associated macrophage proteins (Nramps) である、AtNRMP3 と AtNRMP4 も同定された (表 3-3)。Nramps は幅広い 2 価の金属イオンの輸送に関わっていることが報告されている (Thomine et al. 2000)。Mn と Fe の取り込みに欠損をもつ酵母に AtNRMP3 と AtNRMP4 を発現させると、その表現型を相補した (Thomine et al. 2000)。酵母における AtNRMP3 と AtNRMP4 の発現は、Cd<sup>2+</sup>の蓄積と Cd<sup>2+</sup>に対する感受性の増加を刺激した (Thomine et al. 2000)。AtNRMP3 を過剰発現させた植物はまた、Cd<sup>2+</sup>処理に対して、より高いレベルの Fe を蓄積した (Thomine et al. 2000)。シロイヌナズナにおいて、AtNRMP3 の欠損は Cd<sup>2+</sup>耐性の増加を導く一方、AtNRMP3 の過剰発現は Cd<sup>2+</sup>感受性を増加させる (Thomine et al. 2000)。これらの結果は、AtNRMP3 と AtNRMP4 が Cd<sup>2+</sup>の輸送において重要な役割を果たしていることを示したが、これらの細胞内の局在は証明されていなかった。その後、AtNRMP3 と AtNRMP4 が液胞膜に局在することが報告されており (Thomine et al. 2003, Lanquar et al. 2005)、今回の結果と一致する。

液胞膜を介したアミノ酸の輸送についてはたくさんの報告があり、少なくとも 3 つの輸送システムが介在しているが (Dietz et al. 1994)、分子レベルでの同定はなされていない。今回の結果では、ヒスチジンのトランスポーターがみつまっている (表 3-3)。

## 2 つ以上の膜貫通領域をもち、機能の推定されているタンパク質

今回の結果では、Cytochrome b<sub>561</sub> family protein が同定されており、Cytochrome b<sub>561</sub> は液胞に存在することがすでにいくつか報告されている (Griesen et al. 2004, Preger et al. 2005)。なお、スイカの Cytochrome b<sub>561</sub> は細胞膜に局在すると報告されている (Nanasato et al. 2005)。

細胞膜では、sucrose と H<sup>+</sup>の共輸送体として、sucrose transporter 1 (AtSUC1) が

発現していることが知られている (Sauer and Stolz 1994)。この AtSUC1 によって細胞に取り込まれた sucrose は sucrose と  $H^+$  の対向輸送によって、液胞へ運ばれているだろうと考えられていた。しかしながら、今回の結果から、液胞膜において AtSUC1 様のトランスポーターが同定された (表 3-3)。後に、大麦のプロテオーム解析では AtSUC4/AtSUT4 のホモログ HvSUT2 が液胞膜に存在し、GFP 融合タンパク質の発現解析から、液胞膜に局在することが報告された。同時にシロイヌナズナとタマネギの葉で、AtSUC1 が細胞膜に局在することも示された (Endler et al. 2006)。また、AtSUC1 は細胞膜のプロテオーム解析でも見つかった (Alexandersson et al. 2004)。そこで、シロイヌナズナ培養細胞における AtSUC1 の細胞内局在を確認した。GFP 融合タンパク質の一過的発現をみると、液胞膜と細胞膜に GFP の蛍光が観察された。今回のサンプルでは、細胞膜型  $H^+$ -ATPase のような他の細胞膜タンパク質が同定されなかったため、細胞膜の混入は考えにくい。シロイヌナズナの培養細胞においては、AtSUC1 は細胞膜と液胞膜の両者に局在するのかもしれない。

2 つ以上の膜貫通領域を持つタンパク質のいくつかは、以前ミトコンドリアや葉緑体に存在することが報告されているものがあつた (表 3-4)。ミトコンドリアや葉緑体の主要なタンパク質が検出されなかったことから、これらの少数のタンパク質の存在は他のオルガネラの単なる混入によるものではないかもしれない。

### 膜貫通領域を持たないまたは 1 つ持つ機能既知タンパク質

膜貫通領域を 1 つまたは持たないタンパク質も同定された。これらのタンパク質は膜表在画分と膜内在画分の両方で検出された。膜表在タンパク質と膜内在タンパク質を分離する方法は、液胞型  $H^+$ -ATPase の  $V_0$  セクターから  $V_1$  セクターを分離するには効果的ではあつたが、他の膜表在性タンパク質を液胞膜から完全に遊離させるには十分ではなかつたと考えられる。

このカテゴリーに属するものとして、12 個のリボソームタンパク質が同定された (表 3-5)。これは、リボソームタンパク質が液胞の表面に結合している可能性を示唆してい

る。タンパク質の分解に関与していると思われるタンパク質は21個同定された(表3-5)。これは、液胞がタンパク質分解の機能を持つことと一致している。

その他のいくつかは液胞の役割に関係しているかもしれない。例えば、FAD-linked oxidoreductase family protein (At4g20830) は berberine-bridge-forming enzyme (BBE) と類似している(表3-5)。BBEは液胞で発現していることが報告されているので(Bock et al. 2002)、同定されたFAD-binding proteinは液胞に局在し、液胞膜の内側に結合しているかもしれない。At5g34850はacid phosphataseをコードしており、至適pHから考えて、液胞内に局在することが推測されている(Veljanovski et al. 2006)。At1g10290またはAt1g59610として同定されたdynamin-like protein 3 (ADL3)とADL6は高いホモロジーを示すため(Jin et al. 2001, Mikami et al. 2000)、LC-MS/MS解析では遺伝子の同定まではできなかった。しかし、ADL6はトランスゴルジネットワークから分解系液胞への積荷タンパク質の輸送に関与していることが報告されている(Jin et al. 2001)。他の多くのタンパク質は液胞との関与が報告されていない(表3-5)。単離した液胞の周囲には小さな小胞が観察され、これらの小胞の中に含まれていたタンパク質かもしれない。

### 液胞膜局在新規タンパク質

機能が知られていないタンパク質として34個が同定された(表3-6)。このうち17個は少なくとも2つ以上の膜貫通領域を持つ。これらの膜貫通領域を2つ以上持つ機能未知のタンパク質の多くは、TargetPによりその細胞内局在が割り当てられていないことから、新規の液胞膜タンパク質である可能性が高い。

### 液胞膜リン酸輸送候補タンパク質

Carterら(2004)もシロイヌナズナ葉肉細胞から単離した液胞のプロテオーム解析を報告しているが、リン酸トランスポーターの候補は見いだされていない。葉肉細胞では液胞へのリン酸取り込み活性が低いため(データ示さず)、リン酸輸送に関わるタンパ

ク質がほとんど発現していない可能性がある。第1章で示した通り、今回のプロテオーム解析に用いたシロイヌナズナ培養細胞では液胞へのリン酸の輸送活性が十分検出されており、その機能を持つタンパク質が発現していると期待される。そこで、解析の結果、液胞膜に存在することが示されたタンパク質の中から、リン酸輸送に関わるタンパク質の探索を試みた。候補タンパク質をしぼり込むため、条件を設定した。まず、一般的にトランスポーターは複数の膜貫通領域を持つと考えられるので、2つ以上の膜貫通領域を持つこと。2つ目として、第2章で示したリン酸と Biotin-Sulfo-OSU の競合実験より、分子量が約 60 kDa または約 100 kDa であること。3つ目として、遺伝子のプロモーター領域に着目した。これまでにリン酸欠乏下で発現が増加する遺伝子のプロモーター領域には特異的な配列が存在することが報告されている。リン酸欠乏に応答する遺伝子を制御する転写因子として知られている PHR1 (phosphate starvation response 1) が認識する配列として、PHR1 binding motif: GNATATNC (Rubio et al. 2001) と、PHR1 binding motif とは異なる PHO-like motif: C (G/T/A) (C/T/A) GTGG (Hammond et al. 2003) がある。PHO-like motif はリン酸欠乏の初期段階で一過的に発現が上昇する遺伝子のプロモーター領域にもみられるが、一般的なストレス応答に関連する遺伝子にもみられる配列である。第1章において、液胞へのリン酸の取り込み活性が低リン酸条件で上昇していたことから、リン酸の輸送に関わる遺伝子の発現も増加していると考えられる。そこで、3つ目の条件として、プロモーター領域にこれらの特異的な配列を持つものとした。液胞膜プロテオームデータの中から、上記で述べた条件を満たすものについて、実際に液胞膜で発現しているか、GFP 融合タンパク質の局在を調べた。図 3-5 に示すように、液胞膜だけでなく、小胞体や核にも蛍光が観察されるものもあったが (At3g01930)、他の遺伝子については液胞膜に GFP の蛍光が観察された (At1g61890, At3g21690, At1g76520)。この結果は、今回の液胞膜プロテオームデータの信頼度を支持するものである。今後、これらの遺伝子の機能について、さらに詳しい解析を行っていく予定である。

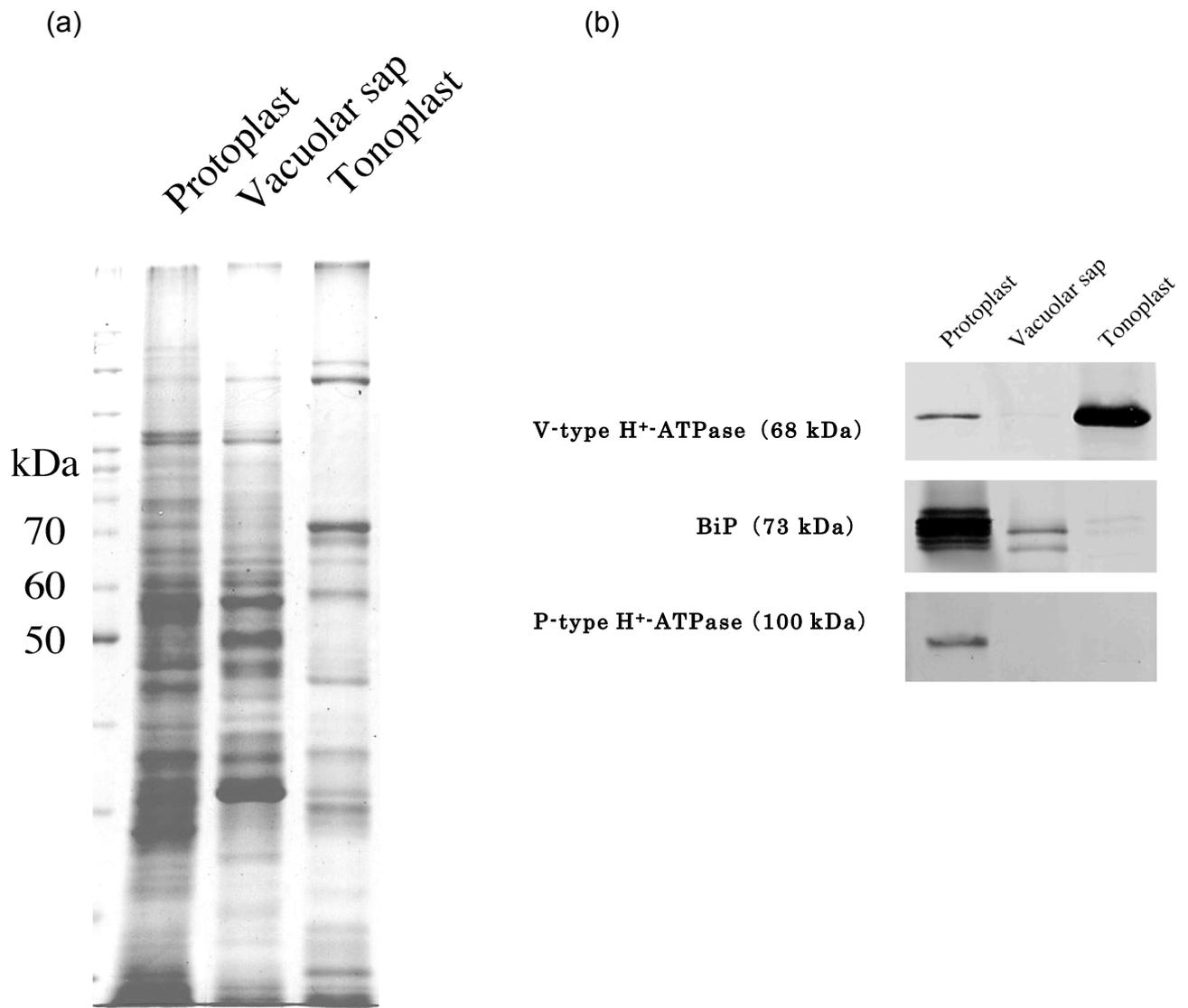


図3-2 液胞膜タンパク質の泳動パターンとWestern blots解析による液胞膜タンパク質の純度の検定

(a) シロイヌナズナの培養細胞から単離したプロトプラスト、液胞sap、液胞膜タンパク質をSDS-PAGEで泳動し、CBB染色した結果。(b) aと同じサンプルをV-type H<sup>+</sup>-ATPase、BiP、P-type H<sup>+</sup>-ATPaseの抗体を用いてWestern blots解析した結果。液胞膜のタンパク質は各レーン50 μg泳動した。

表 3-1 標識酵素活性の測定による液胞膜の純度検定

	Protoplast	Vacuolar sap	Tonoplast
V-type H <sup>+</sup> -ATPase (nmol / min / μg)	0.03 (1)	0 (1)	0.34 (1)
Latent IDPase (nmol / min / μg)	0.04 (1.3)	0.06	0.06 (0.18)
P-type H <sup>+</sup> -ATPase (nmol / min / μg)	0.05 (1.7)	0.02	0.03 (0.09)

値はそれぞれのサンプルのタンパク質量あたりの反応量で、3回の測定の平均を示す。  
 ( ) 内の数字はそれぞれの V-type H<sup>+</sup>-ATPase の活性を 1 とした時の比を表す。

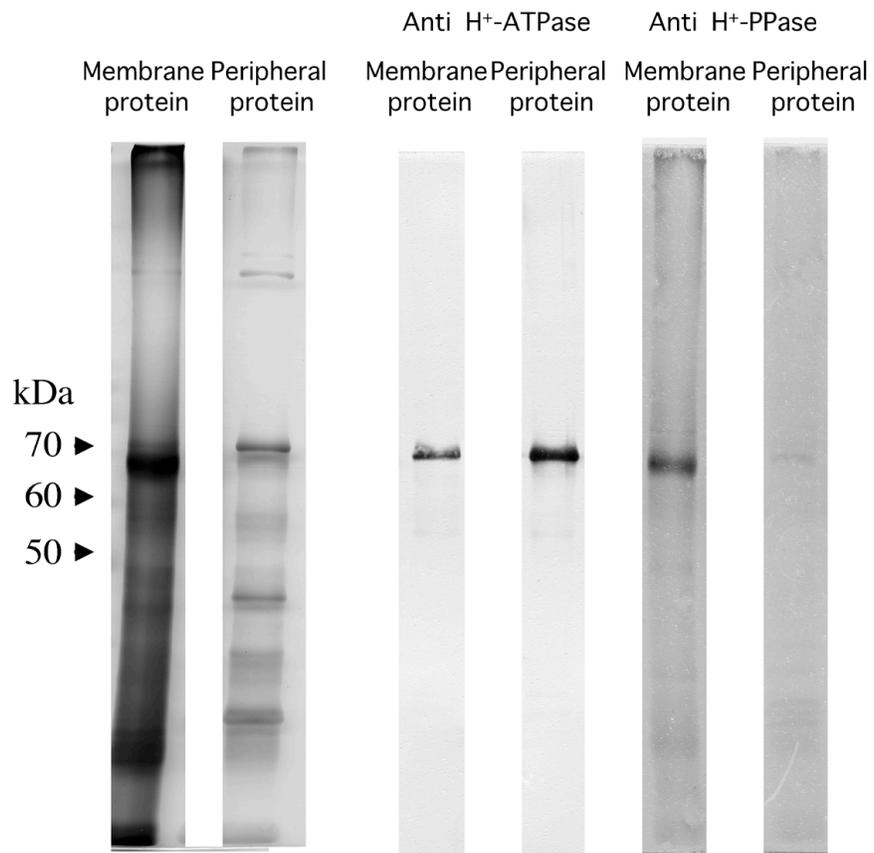


図 3-3 液胞膜タンパク質の膜表在タンパク質と膜内在性タンパク質の分離

Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> と KSCN で液胞膜を処理後、SDS-PAGE を銀染色した結果と western blot 解析を示す。V-type-H<sup>+</sup>-ATPase と H<sup>+</sup>-PPase の抗体を用いた。膜表在タンパク質である H<sup>+</sup>-ATPase V<sub>1</sub> セクターは膜タンパク質の画分から減少し、膜内在性である H<sup>+</sup>-PPase は膜タンパク質の画分にとどまった。

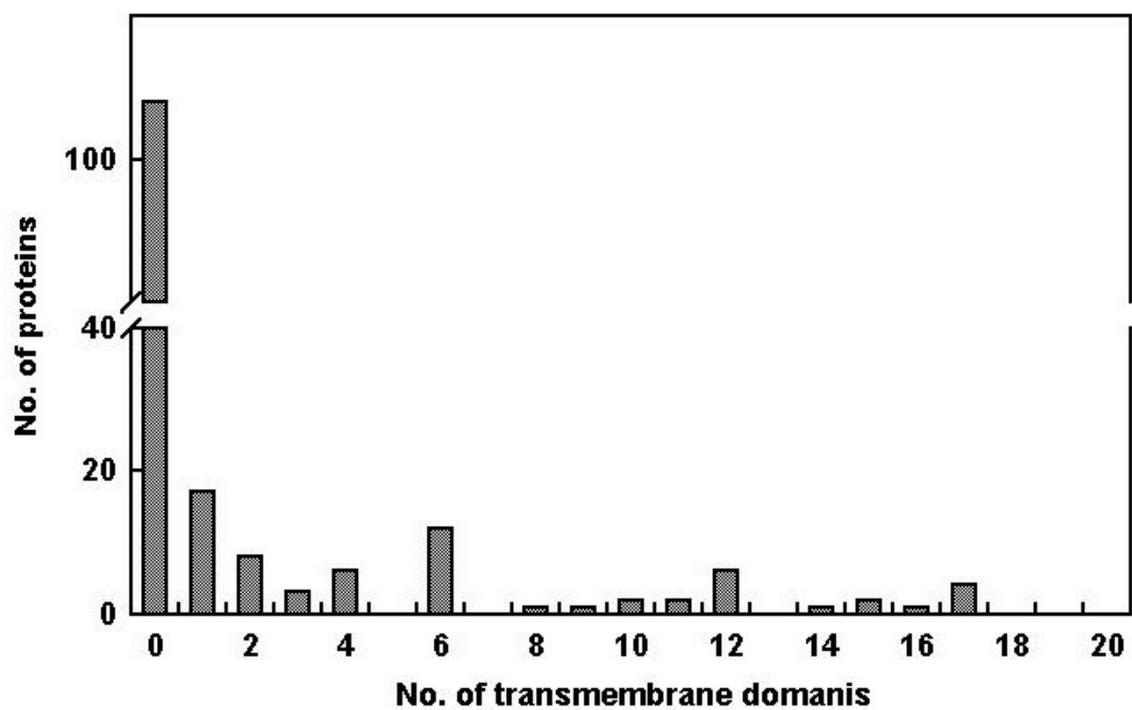


図 3-4 今回同定されたタンパク質の膜貫通領域数の分布図

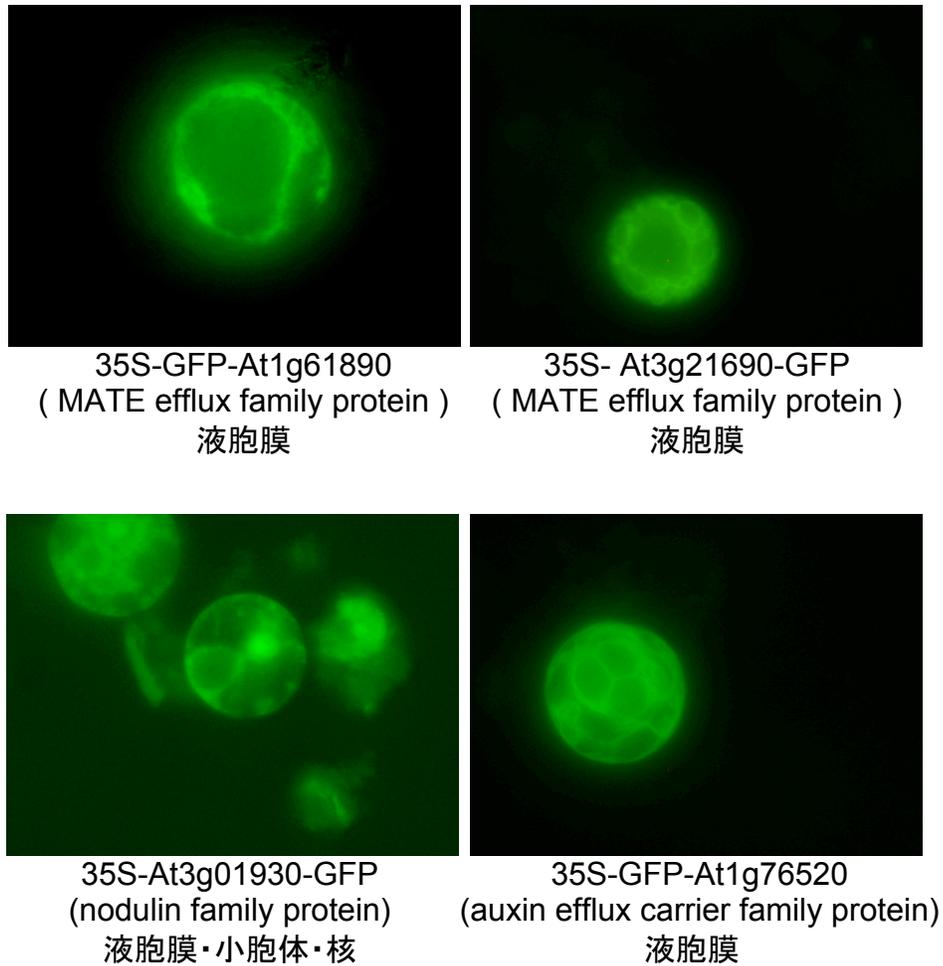


図 3-5 シロイヌナズナ培養細胞における新規液胞膜タンパク質の細胞内局在

GFP 融合タンパク質を PEG 法により一過的に発現させた。At3g01930 は液胞膜だけでなく、小胞体や核にも蛍光が観察されたが、他の遺伝子については、液胞膜に GFP の蛍光が観察された。

表 3-2 プロトンポンプ

Subunit names	Gene Locus	Sequence coverage (%)	TM <sup>a)</sup>	MW (Da) <sup>b)</sup>
<b>V-type H<sup>+</sup>-ATPase</b>				
AtVHA-A	At1g78900	65	0	68795
AtVHA-B1	At1g76030	50	0	54090
AtVHA-B2	At4g38510	44	0	54288
AtVHA-B3 <sup>c)</sup>	At1g20260	19	0	36341
AtVHA-C	At1g12840	44	0	42602
AtVHA-D	At3g58730	29	0	29041
AtVHA-E1	At4g11150	58	0	26042
AtVHA-E2	At3g08560	not detected	0	26835
AtVHA-E3	At1g64200	35	0	27067
AtVHA-F	At4g02620	54	2	14242
AtVHA-G1	At3g01390	32	0	12379
AtVHA-G2	At4g23710	not detected	0	11724
AtVHA-G3	At4g25950	not detected	0	12098
AtVHA-H	At3g42050	19	0	50267
AtVHA-a1	At2g21410	17	6	93089
AtVHA-a2	At4g39080	21	6	92817
AtVHA-a3	At2g28520	not detected	6	93398
AtVHA-c1 <sup>d)</sup>	At4g34720	10	4	16554
AtVHA-c2	At1g19910			16625
AtVHA-c3	At4g38920			16554
AtVHA-c4	At1g75630			16668
AtVHA-c5	At2g16510			16554
AtVHA-c"1	At4g32530	not detected	4	18357
AtVHA-c"2	At2g25610	not detected	4	18201
AtVHA-d1	At3g28710	46	0	40774
AtVHA-d2	At3g28715	47	0	40770
AtVHA-e1	At5g55290	not detected		

AtVHA-e2	At4g26710	not detected		
<b>V-type H<sup>+</sup>-PPase</b>				
AVP1	At1g15690	17	16	80803
AVP2	At1g78920	2	17	85116
AVPL1 <sup>c)</sup>	At1g16780	1	17	85332

- a) ARAMEMNON database による膜貫通領域の数
- b) Bioperl 0.7 から算出されたタンパク質の推定分子量 (MW)
- c) アイソフォーム間で共通にみられる断片のみが検出されたもの
- d) AtVHA-c は同定されたが、遺伝子座は同定されていない。

表 3-3 シロイヌナズナ液胞膜輸送体と推定されるもの

Protein names and AtDatabase annotations	Gene Locus	sequence coverage (%)	TM <sup>a)</sup>	MW (Da) <sup>b)</sup>
<b>ABC proteins</b>				
ABC transporter (AtMRP1)	At1g30400	5	15	181911
ABC transporter (AtMRP2) <sup>c)</sup>	At2g34660	4	15	182114
ABC transporter (AtMRP4)	At2g47800	5	17	169064
ABC transporter-like (AtMRP10)	At3g62700	6	17	172121
ABC transporter-like (AtTAP2) <sup>c)</sup>	At5g39040	9	6	69086
<b>Pumps</b>				
Ca <sup>2+</sup> -transporting ATPase (ACA.c)	At3g57330	2	10	111928
<b>Other transporters and channels</b>				
putative zinc transporter	At2g46800 or At3g58810	3	6	43810 41204
histidine transport protein (PTR2-B)	At2g02040	7	11	64404
putative metal ion transporter (Nramp3) <sup>c)</sup>	At2g23150	4	12	56121
Nramp metal ion transporter 4 (Nramp4) <sup>c)</sup>	At5g67330	4	12	56368
permease 1 - like protein	At5g62890	5	14	50941
translocon-associated protein alpha (TRAP alpha) family	At2g21160	5	2	28150
voltage-dependent anion-selective channel protein hsr2	At5g15090	35	0	29193
putative porin similar to outer mitochondrial membrane porin (voltage-dependent anion-selective channel protein) (VDAC) (POM 34)	At3g01280	29	0	29408
sucrose transport protein SUC1	At1g71880	12	12	54841

a) ARAMEMNON database による膜貫通領域の数

b) Bioperl 0.7 から算出されたタンパク質の推定分子量 (MW)

c) 液胞膜に局在することがすでに報告されているタンパク質: At2g34660, Liu et al. (2001); At5g39040, Yamaguchi et al. (2002); At2g23150, Thomine et al. (2003); At5g67330, Lanquar et al. (2005)

表 3-4 液胞膜にあると推定される膜タンパク質

Protein names and AtDatabase annotations	Gene Locus	sequence coverage (%)	TM <sup>a)</sup>	MW (Da) <sup>b)</sup>
cytochrome b561 family protein (Artb561-1)	At4g25570	4	6	25847
plasma membrane intrinsic protein (SIMIP)	At4g35100	6	6	29725
adenylate translocator	At3g08580	9	3	41458
putative CAAX prenyl protease	At4g01320	6	6	48465
cytochrome c, putative	At3g27240 or At5g40810	12	2	33633 33673
cycloartenol synthase [(S)-2,3-epoxysqualene mutase] (CAS1)	At2g07050	5	2	86016
ATP synthase alpha chain, mitochondrial, putative	At2g07698	5	3	85916
microsomal glutathione-s-transferase, putative	At1g65820	15	3	16568

a) ARAMEMNON database による膜貫通領域の数

b) Bioperl 0.7 から算出されたタンパク質の推定分子量 (MW)

表 3-5 膜貫通領域を持たないまたは一つ持つ機能既知タンパク質

Protein names and AtDatabase annotations	Gene Locus	sequence coverage (%)	TM <sup>a)</sup>	MW (Da) <sup>b)</sup>
<b>Proteinases</b>				
20S proteasome alpha subunit C (PAC1)	At3g22110	4	0	27457
20S proteasome alpha subunit D (PAD1)	At3g51260 or At5g66140	10	0	27319 27306
20S proteasome alpha subunit G (PAG1)	At2g27020	5	0	27360
20S proteasome beta subunit A (PBA1)	At4g31300	4	0	25134
20S proteasome beta subunit D (PBD1)	At3g22630 or At4g14800	6 7	0	22523 21966
acylaminoacyl-peptidase like protein	At4g14570	3	0	47014
aminopeptidase -related	At1g63770	13	0	101698
aspartic proteinase -related	At1g62290	4	0	55731
aspartic proteinase -related	At1g11910	15	0	54596
aspartyl aminopeptidase - like	At5g60160	32	0	52408
cysteine proteinase RD21A	At1g47128	3	0	50949
cysteine proteinase RD21A	At5g43060	7	0	51186
leucine aminopeptidase -related	At2g24200	25	1	54492
leucyl aminopeptidase - like protein PIR2	At4g30920	12	1	61290
S-adenosyl-L-homocysteinase -related	At3g23810 or At4g13940	2	0	53142 53361
serine carboxypeptidase -related	At2g35780	2	0	51504
serine carboxypeptidase III, putative	At3g10410	4	0	57284
expressed protein tripeptidyl-peptidase II	At4g20850	40	0	152351
acid phosphatase -related	At1g04040	31	0	31078
peptidase family similar to prolyl aminopeptidase	At3g61540	10	0	57568
glutamate hydroxy-peptidase ileal peptidase I100	At5g19740	2	0	73446
<b>ribosomal proteins</b>				
putative 60S ribosomal protein L1	At3g09630	8	1	44685
60S ribosomal protein L2	At2g18020 or At4g36130	9	0	27842 27931
60S ribosomal protein L7	At2g44120	13	0	27922

putative ribosomal protein L7	At2g01250	19	0	28153
60S ribosomal protein L9 (RPL90B)	At1g33120 or At1g33140	21	0	22000 22000
60S ribosomal protein L11 (RPL11A)	At2g42740, At3g58700, At4g18730, At5g45775 or At5g45775	21 20 20 21 20	0	19727 20844 20844 19757 20844
60S ribosomal protein L14	At2g20450 or At4g27090	8	0	15489 15488
putative 60S ribosomal protein L17	At1g27400 or At1g67430	5	0	19879 19836
putative 60S ribosomal protein L18	At3g05590 or At5g27850	12	0	20908 20949
60S ribosomal protein - like	At5g02870	8	1	44704
ribosomal protein	At1g43170	13	1	44542
60S ribosomal protein L10 (RPL10A) 60S ribosomal protein L10 (RPL10C)	At1g14320 or At1g66580	5 4	0	24900 24912
ribosomal protein, putative	At3g25520	20	0	34340
<b>others</b>				
FAD-linked oxidoreductase family	At4g20830	8	0	63542
calcineurin-like phosphoesterase family	At5g34850	6	0	54992
cell elongation protein (DWARF1)	At3g19820	8	0	65377
alpha-soluble NSF attachment protein	At3g56190	13	0	32737
glycosyl hydrolase family 17 similar to elicitor inducible chitinase	At4g31140	13	1	52698
glycosyl hydrolase family 19 (basic endochitinase)	At3g12500	4	0	34591
glycosyl hydrolase family 20 similar to beta-hexosaminidase A	At3g55260	12	0	61212
glycosyl hydrolase family 27 (alpha-galactosidase/melibiose)	At3g56310	5	0	48345
glycosyl hydrolase family 31 similar to alpha-glucosidase precursor	At5g11720	4	1	101101
glycosyl hydrolase family 35 (beta-galactosidase) similar to beta-galactosidase	At2g32810	2	0	99181
glycosyl hydrolase family 38 (alpha-mannosidase) similar to alpha-mannosidase	At5g13980	6	0	115885
glycosyl hydrolase family 38 (alpha-mannosidase) similar to	At3g26720	11	0	115203

lysosomal alpha-mannosidas				
myrosinase-associated protein, putative	At1g54010	40	0	43126
myrosinase-associated protein, putative	At1g54020	10	0	32438
myrosinase-associated protein, putative	At1g54000	15	0	43176
N-carbamoylputrescine amidohydrolase	At2g27450	9	0	33515 36439
nitrilase 2	At3g44300	15	0	37135
dynammin-like protein 6 (ADL6) putative dynammin-like protein (ADL3)	At1g10290 or At1g59610	3	0	99149 100211
dynammin-like protein C (DL1C)	At1g14830	1	0	68705
putative expansin	At2g39700	4	0	27830
putative protein strictosidine synthase	At3g57030	9	1	40984
strictosidine synthase family	At1g74010 ?	7	0	34166
strictosidine synthase family	At1g74020	36	0	35275
reversibly glycosylated polypeptide-1 (RGP1)	At3g02230	31	0	40611
reversibly glycosylated polypeptide-2 (RGP2)	At5g15650	30	0	40873
ribonuclease III -related	At1g24450	30	0	20724
kinesin heavy chain-like protein	At5g42490	0	0	123618
aspartate aminotransferase, cytoplasmic isozyme 1 (transaminase A/Asp2)	At5g19550	9	0	44249
aspartate aminotransferase, mitochondrial (transaminase A/Asp1) I	At2g30970	6	0	47740
mitochondrial processing peptidase alpha subunit, putative	At1g51980	11	0	54384
putative mitochondrial processing peptidase	At3g02090	12	0	59143
chaperonin 60alpha subunit	At2g28000	4	0	62055
chaperonin (CPN60/HSP60)	At3g23990	6	0	61263
chaperonin, putative	At2g33210?	3	0	61961
glutamate dehydrogenase 1	At5g18170	14	0	44507
glutamate dehydrogenase 2	At5g07440	13	0	44682
mitochondrial dihydrolipoamide dehydrogenase 2	At3g17240	5	0	53969
dihydrolipoamide S-acetyltransferase -related	At1g54220	7	0	58450
enolase (2-phospho-D-glycerate hydroylase)	At2g36530	10	1	47702

alcohol dehydrogenase (ADH)	At1g77120	26	1	41161
aldehyde dehydrogenase, putative (ALDH)	At1g44170	14	1	53141
monodehydroascorbate reductase, putative	At1g63940	5	1	52484
pectin methylesterase, putative	At1g11580	16	0	61670
membrane import protein, putative	At3g20000	9	0	34232
mitochondrial H <sup>+</sup> -transporting ATP synthase beta chain-related	At5g08670, At5g08680 or At5g08690	36	0	59654 59842 59696
invertase -related	At1g35580	2	0	62817
prohibitin	At5g40770	24	0	30382
prohibitin	At5g44140	8	1	30742
prohibitin, putative	At3g27280?	10	0	30620
prohibitin-like protein	At4g28510	7	1	31689
putative prohibitin 2	At1g03860	8	1	31793
L-allo-threonine aldolase -related	At3g04520	8	0	38235
expressed protein (vacuolar ATP synthase catalytic subunit-related / V-ATPase-related / vacuolar proton pump-related)	At1g16820	16	0	10426

a) ARAMEMNON database による膜貫通領域の数

b) Bioperl 0.7 から算出されたタンパク質の推定分子量 (MW)

表 3-6 機能未知タンパク質

Protein names and AtDatabase annotations	Gene Locus	sequence coverage (%)	TM <sup>a)</sup>	MW (Da) <sup>b)</sup>	Possible subcellular Localization <sup>c)</sup>
<b>two or more TM domains</b>					
unknown protein (nodulin family protein)	At3g01930	2	12	63500	mitochondria
hypothetical protein (MATE efflux family protein)	At1g61890	4	12	55116	other
integral membrane protein, putative (MATE efflux family protein)	At3g21690	6	12	54934	other
putative protein Niemann-Pick C disease protein (patched family protein)	At4g38350	5	11	116033	other
unknown protein (auxin efflux carrier family protein)	At1g76520 or At1g76530	3 2	10 8	42615 45568	secreted
24 kDa vacuolar protein - like	At5g20660	3	9	100077	other
putative protein (glycine-rich protein)	At5g11700	1	6	151531	secreted
unknown protein (Nuf2 family protein)	At1g61000	0	6	111643	other
putative protein (mechanosensitive ion channel domain-containing protein)	At5g12080	14	6	83015	other
senescence-associated protein family	At1g32400	4	4	31538	secreted
glycine-rich protein	At5g47020	1	6	152296	secreted
expressed protein	At4g28770	4	4	30959	secreted
unknown protein	At2g20230	12	4	29704	secreted
unknown protein	At1g29820	8	2	61051	other
hypothetical protein (prenylated rab acceptor (PRA1) family protein)	At1g55190	10	2	21054	other
expressed protein	At5g49900	1	2	106692	other
expressed protein	At5g63910	15	2	55281	secreted
<b>One or no TM domain</b>					
leucine-rich repeat family protein / extensin family protein	At3g24480	4	0	54685	secreted
putative protein embryo-specific protein 3	At5g62200	10	1	21053	secreted

unknown protein (outer membrane OMP85 family protein)	At5g05520	3	0	58502	other
expressed protein (serine carboxypeptidase S28 family protein)	At4g36195	20	0	54756	secreted
disease resistance protein-related (LRR)	At1g33590	4	0	51724	secreted
expressed protein (meprin and TRAF homology domain-containing protein / MATH domain-containing protein)	At3g20370	29	0	43431	secreted
expressed protein (cathepsin B-like cysteine protease, putative)	At1g02305	8	0	40016	secreted
expressed protein (meprin and TRAF homology domain-containing protein / MATH domain-containing protein)	At5g26280	15	0	39428	secreted
unknown protein (Constitutes a peptide sensitive ion channel in chloroplast outer membranes)	At2g43950	22	1	38818	chloroplast outer membrane <sup>d)</sup>
expressed protein (lipid-binding serum glycoprotein family protein)	At1g04970	5	0	53476	secreted
hypothetical protein (nicastrin-related)	At3g52640	20	0	42353	other
expressed protein	At3g57990	12	0	39874	other
putative protein (band 7 family protein)	At5g51570	39	0	32361	other
putative protein hypersensitive-induced response protein HIR3 (band 7 family protein)	At5g62740	29	0	31413	other
unknown protein (band 7 family protein)	At1g69840	14	0	31388	other
unknown protein (band 7 family protein)	At3g01290	12	0	31303	other
unknown protein	At5g42330	6	0	19860	other

a) ARAMEMNON database による膜貫通領域の数

b) Bioperl 0.7 から算出されたタンパク質の推定分子量 (MW)

d) TargetP による細胞内局在

d) 細胞内の局在がすでに報告されているもの: At2g43950; Goetze et al. (2006)

## まとめ

ニチニチソウ培養細胞から単離した intact 液胞を用いて、液胞膜のリン酸輸送機構を検討した。細胞外のリン酸栄養条件に対する液胞の応答を、特に液胞内へのリン酸取り込みの駆動力となるプロトンポンプとの関係を中心に次の知見を得ることができた。低リン酸条件下では、高リン酸条件下に比べて、液胞へのリン酸の取り込みが増加し、プロトンポンプの活性は、リン酸の取り込みを反映して増加がみられたが、タンパク質量には変化がみられなかった。また、シロイヌナズナ培養細胞からも intact 液胞を単離することで、リン酸の取り込みを測定することが可能となり、ニチニチソウと同様、リン酸に対する液胞輸送機構の応答が確認された。液胞へのリン酸の取り込みを担う輸送体の同定を目指し、純度の高いシロイヌナズナ液胞膜を用いてプロテオーム解析を行った結果、液胞膜に存在するタンパク質を 163 個検出することができた。この中には既知の液胞膜タンパク質に加え、新規膜タンパク質も多数含まれていた。さらに、阻害剤の実験などから得たリン酸輸送体の条件を満たすタンパク質について細胞内の局在を調べた結果、液胞膜に局在することが確認された。今後、さらに解析を進め、リン酸輸送に関わる分子が同定できれば、液胞のリン酸輸送機構について、さらなる知見を得ることが期待できる。

## 参考文献

柴田大輔 (1999) 「植物の環境応答」 植物細胞工学シリーズ 11. 200-206. 秀潤社

三村徹郎 (1999) 「植物の環境応答」 植物細胞工学シリーズ 11. 191-199. 秀潤社

三村徹郎, 三橋尚登, 関口陽子, 大西美輪 (2003) 植物の代謝コミュニケーション.  
蛋白質核酸酵素-別冊 48. 2044-2051. 共立出版

三村徹郎, 大西美輪, 深城英弘 (印刷中) 「植物における環境と生物ストレスに対する  
応答」 蛋白質核酸酵素-別冊. 共立出版

Alexandersson E, Saalbach G, Larsson C, Kjellbom P (2004) Arabidopsis plasma  
membrane proteomics identifies components of transport, signal transduction and  
membrane trafficking. *Plant Cell Physiol* 45: 1543-56

Angeli AD, Monachello D, Ephritikhine G, Frachisse JM, Thomine S, Gambal F,  
Barbier-Brygoo H (2006) The nitrate/proton antiporter AtCLCa mediates nitrate  
accumulation in plant vacuoles. *Nature* 442: 939-942

Arabidopsis Genome Initiative (2000) Analysis of the genome sequence of the  
flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408: 796-815

Ashihara H, Ukaji T (1986) Inorganic phosphate absorption and its effect on the  
adenosine 5'-triphosphate level in suspension cultured cells of *Catharanthus roseus*.  
*J Plant Physiol* 124: 77-85

Bencini DA, Wild JR, O'Donovan GA (1983) Linear one-step assay for the determination of orthophosphate. *Annal Biochem* 132: 254–258

Berecki G, Varga Z, Van IF, Van DB (1999) Anion channels in chara corallina tonoplast membrane: calcium dependence and rectification. *J Membr Biol* 172: 159-68

Bloss T, Clemens S, Nies DH (2002) Characterization of the ZAT1p zinc transporter from *Arabidopsis thaliana* in microbial model organisms and reconstituted proteoliposomes. *Planta* 214: 783–791

Bock A, Wanner G, Zenk M (2002) Immunocytological localization of two enzymes involved in berberine biosynthesis. *Planta* 216: 57–63

Boller T, Kende H (1979) Hydrolytic Enzymes in the Central Vacuole of Plant Cells. *Plant Physiol* 63: 1123-1132.

Booth JW, Guidotti G (1997) Phosphate transport in yeast vacuoles. *J Biol Chem* 272: 20408-13

Bun-Ya M, Nishimura M, Harashima S, Oshima Y (1991) The PHO84 gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes an inorganic phosphate transporter. *Mol Cell Biol* 11: 3229-38

Carter C, Pan S, Zouhar J, Avila EL, Girke T, Raikhel NV (2004) The vegetative vacuole proteome of *Arabidopsis thaliana* reveals predicted and unexpected proteins. *Plant Cell* 16: 3285–3303

Costa dos Santos A, Seixas da-Silva W, de Meis L, Galina A (2003) Proton transport in maize tonoplasts supported by fructose-1,6-bisphosphate cleavage. Pyrophosphate-dependent phosphofructokinase as a pyrophosphate-regenerating system. *Plant Physiol* 133: 885–892

Czempinski K, Zimmermann S, Ehrhardt T, Müller-Röber B (1997) New structure and function in plant K<sup>+</sup> channels: KCO1, an outward rectifier with a steep Ca<sup>2+</sup> dependency. *The EMBO Journal* 16: 2565–2575

Czempinski K, Frachisse JM, Maurel C, Barbier-Brygoo H, Mueller-Roeber B (2002) Vacuolar membrane localization of the *Arabidopsis* 'two-pore' K<sup>+</sup> channel KCO1. *Plant J* 29: 809-820

Dietz KJ, Klughammer B, Lang B, Thume M (1994) Soluble transport across the tonoplast of barely mesophyll vacuoles: Mg<sup>2+</sup> determines the specificity, and ATP lipophilic amino acids the activity of the amino acid carrier. *J. Membr. Biol* 137: 151–158

Dietz KJ, Heber U, Mimura T (1998) Modulation of the vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase by adenylates as basis for the transient CO<sub>2</sub>-dependent acidification of the leaf vacuole upon illumination. *Biochim Biophys Acta* 1373: 87–92

Drozdowicz YM, Kissinger JC, Rea PA (2000) AVP2, a sequence-divergent, K(+)-insensitive H(+)-translocating inorganic pyrophosphatase from *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 123: 353–362

Emmerlich V, Linka N, Reinhold T, Hurth MA, Traub M, Martinoia E, Neuhaus HE (2003) The plant homolog to the human sodium/dicarboxylic cotransporter is the vacuolar malate carrier. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 11122-11126

Endler A, Meyer S, Schelbert S, Schneider T, Weschke W, Peters SW, Keller F, Baginsky S, Martinoia E, Schmidt UG (2006) Identification of a vacuolar sucrose transporter in barley and *Arabidopsis* mesophyll cells by a tonoplast proteomic approach. *Plant Physiol* 141: 196-207

Ferro M, Salvi D, Riviere-Rolland H, Vermat T, Seigneurin-Berny D, Grunwald D, Garin J, Joyard J, Rolland N (2002) Integral membrane proteins of the chloroplast envelope: identification and subcellular localization of new transporters. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 99: 11487–11492

Ferro M, Salvi D, Brugiére S, Miras S, Kowalski S, Louwagie M, Garin J, Joyard J, Rolland N (2003) Proteomics of the chloroplast envelope membranes from *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Cell Proteomics* 2: 325–345

Frangne N, Eggmann T, Koblischke C, Weissenböck G, Martinoia E, Klein M (2002) Flavone glucoside uptake into barley mesophyll and *Arabidopsis* cell culture vacuoles. Energization occurs by H(+)-antiport and ATP-binding cassette-type mechanisms. *Plant Physiol* 128: 726-733

Fukao Y, Hayashi M, Nishimura M (2002) Proteomic analysis of leaf peroxisomal proteins in greening cotyledons of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* 43: 689–696

Fukao Y, Hayashi M, Hara-Nishimura I, Nishimura M (2003) Novel glyoxysomal protein kinase, GPK1, identified by proteomic analysis of glyoxysomes in etiolated cotyledons of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* 44: 1002-1012

Gaxiola RA, Fink GR, Hirschi KD (2002) Genetic manipulation of vacuolar proton pumps and transporters. *Plant Physiol* 129: 967-73

Geisler M, Frangne N, Gomes E, Martinoia E, Palmgren M (2000) The ACA4 gene of *Arabidopsis* encodes a vacuolar membrane calcium pump that improves salt tolerance in yeast. *Plant Physiol* 124: 1814–1827

Geisler M, Girin M, Brandt S, Vincenzetti V, Plaza S, Paris N, Kobae Y, Maeshima M, Billion K, Kolukisaoglu UH, Schulz B, Martinoia E (2004) *Arabidopsis* immunophilin-like TWD1 functionally interacts with vacuolar ABC transporters. *Mol Biol Cell* 15: 3393-405

Goetze TA, Philippar K, Ilkavets I, Soll J, Wagner R (2006) OEP37 is a new member of the chloroplast outer membrane ion channels. *J Biol Chem* 281: 17989-17998

Gogarten J, Fichmann J, Braun Y, Morgan L, Styles P, Taiz S, DeLapp K, Taiz L (1992) The use of antisense mRNA to inhibit the tonoplast H<sup>+</sup> ATPase in carrot. *Plant Cell* 4: 851–864

Griesen D, Su D, Berczi A, Asard H. (2004) Localization of an ascorbate-reducible cytochrome b561 in the plant tonoplast. *Plant Physiol* 134: 726-734

Hammond JP, Bennett MJ, Bowen HC, Broadley MR, Eastwood DC, May ST, Rahn C, Swarup R, Woolaway KE, White PJ (2003) Changes in gene expression in *Arabidopsis* shoots during phosphate starvation and the potential for developing smart plants. *Plant Physiol* 132: 578-596

Hatano K, Shimada N, Hiraiwa M, Nishimura M, Hara-Nishimura I (1997) A rapid increase in the level of binding protein (BiP) is accompanied by synthesis and degradation of storage proteins in pumpkin cotyledons. *Plant Cell Physiol* 38: 433–451

Heazlewood J, Howell K, Whelan J, Millar A (2003) Towards an analysis of the rice mitochondrial proteome. *Plant Physiol* 132: 230–242

Heazlewood JL, Tonti-Filippini JS, Gout AM, Day DA, Whelan J, Millar AH (2004) Experimental analysis of the *Arabidopsis* mitochondrial proteome highlights signaling and regulatory components, provides assessment of targeting prediction programs, and indicates plant-specific mitochondrial proteins. *Plant Cell* 16: 241-56

Hirschi KD, Zhen RG, Cunningham KW, Rea PA, Fink GR (1996) CAX1, an H<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>

antiporter from *Arabidopsis*. Proc. Natl Acad. Sci. USA 93: 8782-8786

Jin JB, Kim YA, Kim SJ, Lee SH, Kim DH, Cheong GW, Hwang I (2001) A new dynamin-like protein, ADL6, is involved in trafficking from the trans-Golgi network to the central vacuole in *Arabidopsis*. Plant Cell 13: 1511–1526

Kasai M, Nakamura T, Kudo N, Sato H, Maeshima M, Sawada S (1998) The activity of the root vacuolar H<sup>(+)</sup>-pyrophosphatase in rye plants grown under conditions deficient in mineral nutrients. Plant Cell Physiol 39: 890–894

Kataoka T, Watanabe-Takahashi A, Hayashi N, Ohnishi M, Mimura T, Buchner P, Hawkesford MJ, Yamaya T, Takahashi H (2004) Vacuolar Sulfate Transporters Are Essential Determinants Controlling Internal Distribution of Sulfate in *Arabidopsis*. Plant Cell 16: 2693-2704

Kawasaki-Nishi S, Nishi T, Forgac M (2003) Proton translocation driven by ATP hydrolysis in V-ATPases. FEBS Lett 545: 76–85

Kinoshita T, Shimazaki K (1999) Blue light activates the plasma membrane H<sup>(+)</sup>-ATPase by phosphorylation of the C-terminus in stomatal guard cells. EMBO J 18: 5548–5558

Kobae Y, Uemura T, Sato MH, Ohnishi M, Mimura T, Nakagawa T, Maeshima M (2004) Zinc transporter of *Arabidopsis thaliana* AtMTP1 is localized to vacuolar membranes and implicated in zinc homeostasis. Plant Cell Physiol 45: 1749-1758

Kobae Y, Mizutani M, Segami S, Maeshima M (2006) Immunochemical analysis of aquaporin isoforms in *Arabidopsis* suspension-cultured cells. *Biosci Biotechnol Biochem* 70: 980-987

Kulakovskaya TV, Kulaev IS (1997) Transport of phosphate into vacuoles of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiologia* 13: 71-74

Lanquar V, Lelievre F, Bolte S, Hames C, Alcon C, Neumann D, Vansuyt G, Curie C, Schroder A, Kramer U, Barbier-Brygoo H, Thomine S (2005) Mobilization of vacuolar iron by AtNRAMP3 and AtNRAMP4 is essential for seed germination on low iron. *EMBO J* 24: 4041-4051

Li X-N, Ashihara H (1990) Effects of inorganic phosphate on sugar catabolism by suspension-cultured *Catharanthus roseus*. *Phytochemistry* 29: 497–500

Liu G, Sanchez-Fernandez R, Li Z, Rea P (2001) Enhanced multispecificity of *Arabidopsis* vacuolar multidrug resistance-associated protein-type ATP-binding cassette transporter, AtMRP2. *J. Biol. Chem* 276: 8648–8656

Lu M, Sautin YY, Holliday LS, Gluck SL (2004) The glycolytic enzyme aldolase mediates assembly, expression, and activity of vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase. *J Biol Chem* 279: 8732–8739

Maeshima M (2000) Vacuolar H<sup>+</sup>-pyrophosphatase. *Biochim Biophys Acta* 1465: 37–51

Maeshima M (2001) Tonoplast transporters: Organization and function. *Annu. Rev. Plant Mol. Biol* 52: 469–497

Massonneau A, Martinoia E, Dietz KJ, Mimura T (2000) Phosphate uptake across the tonoplast of intact vacuoles isolated from suspension-cultured cells of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. *Planta* 211: 390–395

Mathur J, Szabados L, Schaefer S, Grunenberg B, Lossow A, Jonas-Straube E, Schell J, Koncz C, Koncz-Kálmán Z (1998) Gene identification with sequenced T-DNA tags generated by transformation of *Arabidopsis* cell suspensions. *Plant J* 13: 707–716

Matsuura-Endo C, Maeshima M, Yoshida S (1992) Mechanism of the decline in vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase activity in mung bean hypocotyls during chilling. *Plant Physiol* 100: 718–722

Mikami K, Iuchi S, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (2000) A novel *Arabidopsis thaliana* dynamin-like protein containing the pleckstrin homology domain. *J. Exp. Bot* 51: 317–318

Mimura T, Dietz K-J, Kaiser W, Schramm MJ, Kaiser G, Heber U (1990) Phosphate transport across biomembranes and cytosolic phosphate homeostasis in barley leaves. *Planta* 180: 139–146

Mimura T (1995a) Homeostasis and transport of inorganic phosphate in plants. *Plant Cell Physiol* 36: 1–7

Mimura T (1995b) Physiological characteristics and regulation mechanisms of the H<sup>+</sup> pumps in the plasma membrane and tonoplast of characean cells. *J Plant Res* 108: 249–256

Mimura T (1999) Regulation of phosphate transport and homeostasis in plant cells. *Int Rev Cytol* 191: 149–200

Mimura T, Sakano K, Shimmen T (1996) Studies on distribution, re-translocation and homeostasis of inorganic phosphate in barley leaves. *Plant Cell Environ* 19: 311–320

Mimura T, Ohnishi M, Shimaoka T, Tomizawa K Proteome analysis of vacuolar membrane. In “ Plant Genetic Engineering vol 9: Plant membrane and vacuolar transporters”, Ed. by Jaiwal PK. In press.

Mitsuda N, Enami K, Nakata M, Takeyasu K, Sato MH (2001) Novel type *Arabidopsis thaliana* H(+)-PPase is localized to the Golgi apparatus. *FEBS Lett* 488: 29–33

Mitsukawa N, Okumura S, Shirano Y, Sato S, Kato T, Harashima S, Shibata D (1997) Overexpression of an *Arabidopsis thaliana* high-affinity phosphate transporter gene in tobacco cultured cells enhances cell growth under phosphate-limited conditions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 7098-7102

Mornet C, Tommasini R, Hörtensteiner S, Martinoia E (1997) Transport of sulphate and reduced sulphur compounds at the tonoplast membrane. In: Cram WJ Kok LJ De, Stuten I (eds) Sulphur metabolism in higher plants. Backhuys, Leiden, The Netherlands, pp 1-11

Muchhal US, Pardo JM, Raghothama KG (1996) Phosphate transporters from the higher plant *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 10519-10523

Nagano M, Ashihara H (1993) Long-term phosphate starvation and respiratory metabolism in suspension-cultured *Catharanthus roseus* cells. *Plant Cell Physiol* 34: 1219–1228

Nagano M, Hachiya A, Ashihara H (1994) Phosphate starvation and glycolytic bypass catalyzed by phosphoenolpyruvate carboxylase in suspension-cultured *Catharanthus roseus* cell. *Z Naturforsch* 49c: 742–750

Nanasato Y, Akashi K, Yokota A (2005) Co-expression of cytochrome b561 and ascorbate oxidase in leaves of wild watermelon under drought and high light conditions. *Plant Cell Physiol* 46: 1515-1524

Nishimura M, Beevers H (1978) Hydrolases in Vacuoles from Castor Bean Endosperm. *Plant Physiol* 62: 44-48

Nishimura M, Beevers H (1979) Hydrolysis of protein in vacuoles isolated from higher plant tissue. *Nature* 277: 412 – 413

Otegui MS, Capp R, Staehelin LA (2002) Developing seeds of *Arabidopsis* store different minerals in two types of vacuoles and in the endoplasmic reticulum. *Plant Cell* 14: 1311-1327

Palma DA, Blumwald E, Plaxton WC (2000) Upregulation of vacuolar H<sup>+</sup>-translocating pyrophosphatase by phosphate starvation of *Brassica napus* (rapeseed) suspension cell cultures. *FEBS Lett* 486: 155–158

Pei ZM, Ward JM, Harper JF, Schroeder JI (1979) A novel chloride channel in *Vicia faba* guard cell vacuoles activated by the serine/threonine kinase, CDPK. *EMBO J* 15: 6564-6574

Peltier J, Emanuelsson O, Kalume D, Ytterberg J, Friso G, Rudella A, Liberles D, Soderberg L, Roepstorff P, von Heijne G, van Wijk K (2002) Central functions of the luminal and peripheral thylakoid proteome of *Arabidopsis* determined by experimentation and genome-wide prediction. *Plant Cell* 14: 211–236

Plaxton WC (1999) Metabolic aspects of phosphate starvation in plants. In: Deikman J, Lynch J (eds) *Phosphorus in plant biology: regulatory roles in molecular, cellular, organismic, and ecosystem processes*. American Society of Plant Physiologists, Rockville, pp 164–176

Poirier Y, Bucher M (2002) Phosphate Transport and Homeostasis in *Arabidopsis*. *The Arabidopsis Book*, eds. C.R. Somerville and E.M. Meyerowitz, American Society of Plant Biologists, Rockville, MD, doi/10.1199/tab.0024, <http://www.aspb.org/publications/arabidopsis/The Arabidopsis Book, eds. C.R.>

Preger V, Scagliarini S, Pupillo P, Trost P (2005) Identification of an ascorbate-dependent cytochrome b of the tonoplast membrane sharing biochemical features with members of the cytochrome b561 family. *Planta* 220: 365-75

Prime T, Sherrier D, Mahon P, Packman L, Dupree P (2000) A proteomic analysis of organelles from *Arabidopsis thaliana*. *Electrophoresis* 21: 3488–3499

Rausch C, Bucher M (2002) Molecular mechanisms of phosphate transport in plants. *Planta* 216: 23–37

Rebeille F, Bligny R, Martin, J-B, Douce R (1983) Relationship between the cytoplasm and the vacuole phosphate pool in *Acer pseudoplatanus* cells. *Arch Biochem Biophys* 225: 143-148

Rebeille F, Bligny R, Martin, J-B, Douce R (1985) Effect of sucrose starvation on sycamore (*Acer pseudoplatanus*) cell carbohydrate and Pi status. *Biochem J* 226: 679-684

Rubio V, Linhares F, Solano R, Martin AC, Iglesias J, Leyva A, Paz-Ares J (2001) A conserved MYB transcription factor involved in phosphate starvation signaling both in vascular plants and in unicellular algae. *Genes Dev* 15: 2122-2133

Sakano K (1990) Proton/phosphate stoichiometry in uptake of inorganic phosphate by cultured cells of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. *Plant Physiol* 93: 479–483

Sakano K, Yazaki Y, Mimura T (1992) Cytoplasmic acidification induced by inorganic phosphate uptake in suspension cultured *Catharanthus roseus* cells. *Plant Physiol* 99: 672–680

Sakano K, Yazaki Y, Okihara K, Mimura T, Kiyota S (1995) Lack of control in inorganic phosphate uptake by *Catharanthus roseus* (L.) G. Don cells. *Plant Physiol* 108: 295–302

Santoni V, Rouquie D, Doumas P, Mansion M, Boutry M, Degand H, Dupree P, Packman L, Sherrier J, Prime T, Bauw G, Posada E, Rouze P, Dehais P, Sahnoun I, Barlier I, Rossignol M (1998) Use of a proteome strategy for tagging proteins present at the plasma membrane. *Plant J* 16: 633–641

Sauer N and Stolz J (1994) SUC1 and SUC2: two sucrose transporters from *Arabidopsis thaliana*; expression and characterization in baker's yeast and identification of the histidine-tagged protein. *Plant J* 6: 67–77

Sazuka T, Keta S, Shiratake K, Yamaki S, Shibata D (2004) A proteomic approach to identification of transmembrane proteins and membrane-anchored proteins of *Arabidopsis thaliana* by peptide sequencing. *DNA Res* 11: 101-113

Schönknecht G, Spormaker P, Steinmeyer R, Brüggeman L, Ache P, Dutta R, Reintanz B, Godde M, Hedrich R, Palme K (2002) KCO1 is a component of the slow-vacuolar (SV) ion channel. *FEBS Letters* 511: 28-32

Schubert M, Petersson U, Haas B, Funk C, Schroder W, Kieselbach T (2002) Proteome map of the chloroplast lumen of *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem* 277: 8354–8365

Schumacher K, Vafeados D, McCarthy M, Sze H, Wilkins T, Chory J (1999) The *Arabidopsis* det3 mutant reveals a central role for the vacuolar H(+)-ATPase in plant growth and development. *Genes Dev* 13: 3259–3270

Shevchenko A, Wilm M, Vorm O, Mann M (1996) Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal. Chem* 68: 850–858

Shin H, Shin HS, Dewbre GR, Harrison MJ (2004) Phosphate transport in *Arabidopsis*: Pht1;1 and Pht1;4 play a major role in phosphate acquisition from both low- and high-phosphate environments. *Plant J* 39: 629-642

Smith FW, Ealing PM, Dong B, Delhaize E (1997) The cloning of two *Arabidopsis* genes belonging to a phosphate transporter family. *Plant J* 11: 83-92

Sun-Wada GH, Wada Y, Futai M (2004) Diverse and essential roles of mammalian vacuolar-type proton pump ATPase: toward the physiological understanding of inside acidic compartments. *Biochim Biophys Acta* 1658: 106–114

Sze H, Schumacher K, Muller M, Padmanaban S, Taiz L (2002) A simple nomenclature for a complex proton pump: VHA genes encode the vacuolar H(+)-ATPase. *Trends Plant Sci* 7: 157–161

Szponarski W, Sommerer N, Boyer J, Rossignol M, Gibrat R (2004) Large-scale characterization of integral proteins from *Arabidopsis* vacuolar membrane by two-dimensional liquid chromatography. *Proteomics* 4: 397–406

Takasu A, Nakanishi Y, Yamauchi T, Maeshima M (1997) Analysis of the substrate binding site and carboxyl terminal region of vacuolar H<sup>+</sup>-pyrophosphatase of mung bean with peptide antibodies. *J Biochem* 122: 883–889

Tavakoli N, Kluge C, Golldack D, Mimura T, Dietz KJ (2001) Reversible redox control of the plant vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase activity is related to disulfide bridge formation not only in subunit A but also in subunit E. *Plant J* 28: 51–59

Thomine S, Wang R, Ward J, Crawford N, Schroeder J (2000) Cadmium and iron transport by members of a plant metal transporter family in *Arabidopsis* with homology to Nramp genes. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 97: 4991–4996

Thomine S, Lelievre F, Debarbieux E, Schroeder JI, Barbier-Brygoo H (2003) AtNRAMP3, a multispecific vacuolar metal transporter involved in plant responses to iron deficiency. *Plant J* 34: 685–95

Ueda T, Yamaguchi M, Uchimiya H, Nakano A (2001) Ara6, a plant-unique novel type Rab GTPase, functions in the endocytic pathway of *Arabidopsis thaliana*. *EMBO J* 20: 4730–4734

Uemura T, Ueda T, Ohniwa RL, Nakano A, Takeyasu K, Sato MH (2004) Systematic analysis of SNARE molecules in *Arabidopsis*: dissection of the

post-Golgi network in plant cells. *Cell Struct Funct* 29: 49-65

Urech K, Durr M, Boller T, Wiemken A, Schwencke J (1978) Localization of polyphosphate in vacuoles of *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch Microbiol* 116: 275-278

Veljanovski V, Vanderbeld B, Knowles VL, Snedden WA, Plaxton WC (2006) Biochemical and Molecular Characterization of AtPAP26, a Vacuolar Purple Acid Phosphatase Up-Regulated in Phosphate-Deprived Arabidopsis Suspension Cells and Seedlings. *Plant Physiol* 142: 1282-1293

Verkleij J, Koevoets P, Blake-Kalff M, Chardonens A (1998) Evidence for an important role of the tonoplast in the mechanism of naturally selected zinc tolerance in *Silene vulgaris*. *J. Plant Physiol* 153: 188–191

Voelker C, Schmidt D, Mueller-Roeber B, Katrin Czempinski K (2006) Members of the Arabidopsis AtTPK/KCO family form homomeric vacuolar channels *in planta*. *Plant J* 48: 296-306

Wagner GJ, Siegelman HW (1975) Large-Scale Isolation of Intact Vacuoles and Isolation of Chloroplasts from Protoplast of Mature Plant Tissue. *Science* 190: 1298-1299

Yamaguchi H, Nishizawa N, Nakanishi H, Mori S (2002) IDI7, a new iron-regulated ABC transporter from barley roots, localizes to the tonoplast. *J. Exp. Bot* 53: 727–735

## 謝 辞

本研究を遂行するにあたり、たくさんの方に御指導とご援助を賜りましたこと深く感謝いたします。北海道東海大学 網野真一博士には、ニチニチソウ培養細胞を分与していただきました。Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung の Dr. Csaba Koncz ならびに東京大学（現 奈良先端大学院大学）梅田正明博士には、シロイヌナズナ培養細胞を分与していただきました。名古屋大学 前島正義博士には液胞膜型  $H^+$ -ATPase ならびに  $H^+$ -PPase に対する抗体を分与していただき、膜タンパク質の分離精製の御指導、御助言もいただきました。九州大学 島崎研一郎博士には細胞膜型  $H^+$ -ATPase に対する抗体を分与していただきました。京都大学 西村いくこ博士には BiP に対する抗体を分与していただきました。島根大学 中川強博士には形質転換用ベクターを分与していただきました。理化学研究所バイオリソースセンターよりシロイヌナズナの完全長 cDNA をご提供いただきました。プロテオーム解析については地球環境産業技術研究機構にて嶋岡泰世博士をはじめ研究室の皆様、富澤健一博士、横田明徳博士にお世話になりました。かずさ DNA 研究所（現 名古屋大学）の佐塚隆志博士には電気泳動用のサンプル調製について御指導いただきました。名古屋大学 西川周一博士には培養細胞の形質転換方法について御指導いただきました。基礎生物学研究所の林誠博士、深澤美津江さんにマイクロアレイ解析について御指導いただきました。神戸大学 小菅桂子博士にはシーケンス解析においてお世話になりました。奈良女子大学 坂口修一博士、酒井敦博士、神戸大学 七條千津子博士、深城英弘博士、鶴見誠二博士には日頃より貴重な御助言と励ましのお言葉をいただきました。奈良女子大学三村研究室では辻村とも子さんより本研究の基礎となる実験の御指導をいただきました。三橋尚登博士には奈良、神戸両三村研究室において、日頃の実験において丁寧な御指導、御助言をいただきました。関口陽子博士には学位申請にあたり御助言と励ましのお言葉をいただきました。科学技術振興機構 CREST には技術員として、また今回の学位申請にあたり、事務局の高橋紀子さんにお世話になりました。Dr. Enrico Martinoia には来日の際に液胞単離方法

について御指導、御助言をいただきました。昨年6月にお亡くなりになった岡山県立大学 池田己喜子博士には膜タンパク質の分離精製について御指導いただきました。ご生前のご厚情に深く感謝するとともにご冥福をお祈りいたします。

この六年間、たくさんの方にお世話になりながら研究に取り組むことができました。さまざまな面で支えていただいた三村研究室の皆様、そして家族に感謝いたします。

そして本論文の審査にあたり貴重な御意見、御助言をいただいた神戸大学 川井浩史博士、坂本博博士、深見泰夫博士に深く感謝いたします。

最後に本研究をまとめる機会を与えてくださり、終始にわたり親身な御指導を賜りました三村徹郎博士に心より感謝いたします。