



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。



【 3 2 1 】

氏 名・(本 籍)	大西 美輪	(兵庫県)
博士の専攻分野の名称	博士 (理学)	
学 位 記 番 号	博ろ第73号	
学位授与の 要 件	学位規則第5条第1項該当	
学位授与の 日 付	平成19年3月9日	

【 学位論文題目 】

植物細胞液胞膜におけるリン酸輸送機構の解析と液胞膜
プロテオームによる膜輸送体の探索

審 査 委 員

主 査	教 授	三村 徹郎
	教 授	川井 浩史
	教 授	坂本 博
	教 授	深見 泰夫

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 (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 H^+ -ATPase と 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す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。

氏名	大西 美輪		
論文 題目	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		
審査委員	区分	職名	氏名
	主査	教授	三村 徹郎
	副査	教授	川井 浩史
	副査	教授	坂本 博
	副査	教授	深見 泰夫
要 旨			
<p>植物は光合成によって生育に必要な有機物を作り出す。しかし、実際の生育には、土壌からの水や無機イオン吸収が不可欠である。土壌から吸収される無機イオンの内、必須栄養素の一つがリンである。リンは、植物体の遺伝子、細胞膜などの構造を作るのみならず、エネルギー代謝、情報伝達系においても重要な働きをしている。植物は土壌中のリンを無機正リン酸として吸収し、体内に分配していく。各細胞に分配された無機リン酸は、代謝過程に組み込まれていくが、実際の代謝の場である細胞質では、外部栄養条件、あるいは植物体の状態に関わらずリン酸濃度が一定に保たれることが知られている。これをリン酸ホメオスタシスと呼ぶ。リン酸ホメオスタシスの維持には、植物細胞内で最大のオルガネラである液胞のリン酸緩衝能が重要な働きをしていることが判っているが、実際にどのような制御機構が働いているかはほとんど理解されていない。さらに、リン酸イオンに限らず生命反応の素過程としての細胞内イオン濃度の維持には、液胞機能の重要性が指摘されてきたが、液胞機能を支える分子レベルの研究はこれまで十分になされて来なかった。</p> <p>本研究で学位申請者は、植物細胞から液胞をインタクトの形で取り出す技術を利用し、リン酸栄養条件が変動した時に、液胞のリン酸取込能がどのように変動するかを測定し、その機構の一端を明らかにした。さらに、モデル植物として知られるシロイヌナズナ培養細胞からインタクト液胞を単離する技術を開発し、リン酸輸送能を分子レベルで解析するための実験条件を整えることに成功し、液胞膜においてリン酸輸送に働くタンパク質分子の同定を目指して、分子標識、遺伝子発現解析を進めた。最終的に、シロイヌナズナ培養細胞から単離した液胞膜のプロテオーム解析を実現し、リン酸輸送体自体の同定には至っていないが、これまで知られていなかった複数の膜タンパク質が液胞膜に存在することを初めて証明し、液胞研究の分子レベルの研究を広げることに成功している。</p> <p>本論文は、序論、本論となる3章、まとめの全5章からなる。序章では、研究の背景となる植物におけるリン代謝と液胞の役割の全体像をまとめ、本論文の位置付けを行っている。</p> <p>第1章「液胞におけるリン酸輸送機構」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インタクト液胞を用いた解析について述べている。異なるリン酸条件で培養した細胞から単離したインタクト液胞の液胞膜を介した無機リン酸の取り込みを測定し、高濃度のリン酸存在下で培養した細胞に比べて、低濃度で培養した細胞では、単離したインタクト液胞へのリン酸の取り込みが活性化され、それが、液胞膜をエネルギー化する液胞膜型 H^+-ATPase と H^+-PPase の活性化によること、しかしプロトン輸送活性が増加するにもかかわらず、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いことを明らかにし、リン酸栄養条件の変動により、液胞のリン酸輸送能が変化することと細胞質リン酸ホメオスタシスの維持についての考察を行っている。また、リン酸輸送体の分子レベルの解析を行うために、シロイヌナズナ培養細胞からの液胞の単離方法を確立している。</p> <p>第2章「液胞膜リン酸輸送体の探索」では、第1章で可能となったシロイヌナズナ培養細胞からのインタクト液胞単離法と、申請者が新に見出したリン酸輸送阻害剤 Biotin-Sulfo-OSu によるタンパク</p>			

氏名	大西 美輪		
<p>質標識を組み合わせることで、液胞膜タンパク質中にリン酸輸送体の候補タンパク質を見出すことに成功している。さらに、リン酸の取り込みに関わるタンパク質遺伝子の発現が、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、二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し、二つ以上の膜貫通領域を持つ膜タンパク質が 62 個見いだした。</p> <p>第3章「液胞膜プロテオーム」では、第1章で確立したシロイヌナズナ培養細胞からの高純度インタクト液胞の単離と、第2章で見出したリン酸輸送体候補タンパク質の同定を目指してプロテオーム解析を進めた結果について考察している。単離液胞のプロテオーム解析は SDS-PAGE によるタンパク質の分画と LC-MS/MS を用いた単離液胞膜の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に成功した。液胞型 H^+-ATPase や H^+-PPase といったこれまで知られている液胞膜タンパク質の多くのサブユニットとともに、幅広い他のトランスポーターや、機能未知タンパク質も複数同定することに成功している。</p> <p>本研究では、リン酸輸送体自身の同定には至っていないが、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制御について新たな知見を得ることで、リン酸ホメオスタシス機構を理解する上での新しい考察を可能にし、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ている。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、これまで知られていなかっ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で、植物細胞の液胞研究に新しい可能性を作り出した価値ある集積であると認める。よって、学位申請者の大西美輪は、博士(理学)の学位を得る資格があると認める。</p> <p>・特記事項 ・特許登録数 1 件(出願中) ・発表論文数 9 編(学位論文用論文 2 編(欧文)、その他 7 編(欧文5編、和文2編))</p>			

4f6