

氏名	山 口 峰 生		
授与した学位	博 士		
専攻分野の名称	農 学		
学位授与番号	博甲第2280号		
学位授与の日付	平成13年 9月30日		
学位授与の要件	自然科学研究科生物資源科学専攻 (学位規則第4条第1項該当)		
学位論文の題目	The Interaction between Glycolipids and Tonoplast H ⁺ -ATPase of Cultured Rice (<i>Oryza sativa</i> L.) Cells (イネ (<i>Oryza sativa</i> L.) 培養細胞の液胞膜H ⁺ -ATPaseと糖脂質の相互作用)		
論文審査委員	教授 笠毛邦弘	教授 河合富佐子	教授 積木久明

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

糖脂質の液胞膜 H⁺-ATPase への影響を次の2つの手法をもちいて解析した。1)イネ培養細胞の液胞膜から抽出した糖脂質をリン脂質の存在下および非存在下で液胞膜 H⁺-ATPase に添加して活性への影響を調べた。2)液胞膜 H⁺-ATPase をステリルグルコシド(SG)を含むリポソームに再構築した再構成膜小胞を用いることにより液胞膜 H⁺-ATPase への SG の影響を調べた。

精製および脱脂された液胞膜 H⁺-ATPase は液胞膜リン脂質の添加により活性化されたが、液胞膜糖脂質では活性化されなかった。液胞膜リン脂質の存在下で液胞膜糖脂質を添加すると液胞膜リン脂質による液胞膜 H⁺-ATPase の活性化は低下した。液胞膜糖脂質からアシルステリルグルコシド(ASG)それにグルコセレブロシド(GlcCer)を抽出、精製した。液胞膜リン脂質の存在下で液胞膜糖脂質および ASG を添加すると、リン脂質による液胞膜 H⁺-ATPase の活性化は低下した。GlcCer ではわずかに低下がみられ、SG では全く低下がみられず、むしろ増加させる傾向がみられた。

さらに、液胞膜 H⁺-ATPase を SG が含まれるリポソームに再構成することにより液胞膜 H⁺-ATPase への SG の影響を調べた。SG は液胞膜 H⁺-ATPase の H⁺輸送および ATP 加水分解活性の両方を増加させた。また、SG が含まれるリポソームでは、H⁺の膜透過性が減少した。

以上の結果から液胞膜H⁺-ATPaseはリン脂質により活性化されるが、この活性は糖脂質、特にASGにより抑制されていることが明らかにされた。ASGのアシル鎖が液胞膜H⁺-ATPase活性の低下に関与すると考えられる。また、SGは液胞膜のH⁺の透過性を減少させる役割を担っていることが明らかになった。

論文審査結果の要旨

植物の液胞膜に存在する H^+ -ATPaseは、細胞質より液胞内へ H^+ の輸送を司るポンプで、液胞内や細胞質のpHの恒常性を維持する機能を持つ重要な酵素である。特に低温ストレスによるこの酵素の機能低下は、細胞傷害を引き起こす起因となると考えられている。既に、この酵素活性は、リン脂質の添加により著しく活性化される典型的な膜結合タンパク質であることが報告されているが、これらはいずれも市販されているリン脂質を用いて行われたものである。また他の脂質による影響は未だほとんど報告されていない。

そこで学位論文申請者は、液胞膜 H^+ -ATPaseの活性ならびに H^+ 輸送におけるこの酵素の機能に、リン脂質ならびに糖脂質がどのように影響を及ぼすかを、実験に使用したイネの培養細胞から実際に抽出し、それら抽出した脂質を用いて明らかにした。

その結果精製した液胞膜 H^+ -ATPaseは、抽出したリン脂質を添加することによって活性化された。さらにこのリン脂質による活性化は、糖脂質の一つであるアシルステリルグルコシド (ASG) によって著しく活性低下を引き起こした。また反応速度の実験から、ASGは不競合的に液胞膜 H^+ -ATPaseの活性を阻害しており、ASGは液胞膜 H^+ -ATPaseのATP加水分解部位に直接作用しているのではないことが分かった。しかし、ステリルグルコシド (SG) は何ら阻害作用は見られなかった。このことは、SGのアシル化が液胞膜 H^+ -ATPaseのリン脂質の活性化を阻害する要因の一つであることを意味している。またこのような阻害作用は、精製した液胞膜 H^+ -ATPaseをアゾレクチンリポゾームに埋め込んだ再構成膜小胞を用いることによって測定した H^+ の輸送においても同様に観察された。

これらの研究結果は、今までに報告されていない新しい知見を含み、博士（農学）を授与するに相応しい学位論文であると思われる。