

マメ科植物の液胞膜の特性

小 鳴 道 之

生物資源化学科応用生物化学講座

1. 目 的

農産物の多くは、0～12℃の低温により障害を受けやすい。アズキやインゲンマメなどマメ科植物は北海道十勝地方の代表的な作物であるが、6～7月の異常低温によりダメージを受けたり、時には枯死するような著しい冷害に見舞われる事がある。低温障害に関する研究は、生理的な側面からミトコンドリアやクロロプラストが中心に調べられてきたが、最近、植物の低温障害と液胞膜の膜タンパク質（硝酸感受性プロトン ATPase など）や膜脂質に注目が集まりつつある。液胞は多くの加水分解酵素、無機塩類や有機酸などの貯蔵器官と考えられるが、動物の二次ライソゾーム様の機能を持つ事も最近明らかにされている。また、液胞内の pH は常に酸性であり、プロトン ATPase やカルシウム輸送能などの制御が液胞で行われており、液胞の損傷は細胞の恒常性維持に重要な影響を与える事が考えられている。本研究は、三種のマメ科植物：リョクトウおよびアズキ（低温感受性植物）とダイズ（低温耐性植物）の実生の液胞膜を調製して、その特性、特に三者間の膜脂質組成の相違を明らかにしようとした。

2. 実験方法

試料を小片にした後、0℃に冷やした破砕液（0.25 M ソルビトール、50 mM MOPS-KOH (pH 7.6)、5 mM EGTA、5 mM EDTA、10 mM KF、1 mM PMSF、10 μg/ml BHT、2.5 mM K₂S₂O₈、1.5% PVP、1 mM PMSF、10 μg/ml BHT および 0.1% BSA）中でポリトロンを用いて破砕した。組織破砕後、3,600 g で 10 分間遠心し、得られた上清をさらに 156,000 g で 20 分間遠心して粗ミクロソーム画分を得た。粗ミクロソーム画分は、0.32 mM ショ糖含有緩衝液 (pH 7.8) と 0.25 mM ソルビトール緩衝液 (pH 7.8) による二相分配を行い、液胞膜画分を回収した。すべての操作は 0℃で行った。

膜サンプルは、200 μl の阻害剤（150 mM 硝酸カリウムもしくは 100 μM パナジン酸ナトリウム）を加えた反応液および阻害剤を加えていない反応液（最終濃度が 50 mM KCl、3 mM ATP-Na、3 mM MgSO₄、0.03% TX-100、5 mM NaN₃、1 mM Na₂MoO₄、25 mM Hepes-BHT (pH 7.4) の混合液）をそれぞれ加え、30℃で 20 分間反応させ、液胞膜標識酵素の活性測定を行った。反応停止後、2.5 ml の固定液（0.5 g のモリブデン酸アンモニウム、2.6 g の SDS および 2.8 ml の濃硫酸を蒸留水で 200 ml 希釈）および 0.5 ml の還元液（5.7 g の NaHSO₃、0.2 g の NaSO₃、0.1 g の 1-アミノ-2-ナフチルサリチル酸を蒸留水で 100 ml 希釈）を加えて攪拌し、10 分後（30℃）に UV 700 nm で OD を測定して、計算式 $[0.714 \times OD = \text{Pi} \mu\text{mol}]$ により遊離したリン量を求めた。細胞膜の

標識酵素はバナジン酸感受性 ATPase, 液胞膜の標識酵素は硝酸感受性 ATPase であるので, 各々の阻害剤の存在下での ATPase 活性を測定して調製した膜の純度を確認した。UDPase 活性は, 反応液に 3 mM UDP-Na, 3 mM 塩化マグネシウム, 25 mM Hepes-BTP (pH 7.4), 50 mM 塩化カリウムおよび 0.03% TX-100 を用い, ATPase 活性測定法に準じて行った。また, タンパク質の定量は, Bradford 法で行い, UV 595 nm で OD を測定し, 計算式 $[49.1 \times OD = \mu\text{g protein}]$ から求めた。

調製した液胞膜画分は, 直ちに熱イソプロパノールを加えて酵素失活を行い, 常法に従い脂質画分を得た。各脂質クラスの分別は, DEAE イオン交換カラム, Sep-pak シリカカートリッジおよび 2 次元ケイ酸 TLC を組み合わせて行った。TLC の展開溶媒は, クロロホルム-メタノール-水 (65 : 25 : 4, v/v) およびクロロホルム-アセトン-メタノール-酢酸-水 (10 : 4 : 2 : 2 : 1, v/v) などを用いた。グリセロ脂質は, 内部標準として 17 : 0 を用いて, 脂質クラスの定量および構成脂肪酸組成を GLC で求めた。また, ステロール系脂質は, 内部標準にコレステロールを用い, 糖脂質は, 内部標準にマンニトールを用いて GLC で定量した。

3. 結果および考察

暗所で生育させたリョクトウ下胚軸, アズキ上胚軸およびダイズ下胚軸のミクロソーム画分より, 液胞膜を調製した。タンパク質含量 (mg/100 g 新鮮重) は, リョクトウでは 1.99, アズキでは 1.30, ダイズでは 2.45 であった。バナジン酸感受性 ATPase 活性 ($\text{Pi} \mu\text{mol}/\text{mg} \cdot \text{h}$) と硝酸感受性 ATPase 活性 ($\text{Pi} \mu\text{mol}/\text{mg} \cdot \text{h}$) の差を正味の液胞膜 ATPase 活性と考えることができ, それはリョクトウでは 10.13, アズキでは 26.86, ダイズでは 2.88 を示し, UDPase 活性は, リョクトウでは 5.89, ダイズでは 13.33 を示した。調製した液胞膜画分の純度をバナジン酸感受性 ATPase 活性と硝酸感受性 ATPase 活性の比から判断すると, リョクトウ下胚軸の液胞膜の純度は 87%, アズキ上胚軸のそれは 99% およびダイズ下胚軸のそれは 72% であった。

脂質/タンパク質量比は, リョクトウでは 1.57, アズキでは 3.45, ダイズでは 1.33 であった。液胞膜の主要な脂質クラスは, 共通してホスファチジルコリン (PC) ホスファチジルエタノールアミン (PE), セレブロシド (CMH) および遊離ステロール (FS) であり, 各植物ともに四者で全体の 80% 前後を占めていた。しかし, 液胞膜に含まれるリン脂質含量に対する CMH 含量の比は, リョクトウ (0.23) およびアズキ (0.30) では, ダイズのそれ (0.13) よりも高い値を示した。高い相転移温度を持つ化合物である CMH の含量 (組成) が各植物の液胞膜で異なる可能性が示され, 特に低温感受性植物の方が低温耐性植物のそれよりも高かった。CMH 含量が膜全体の相転移温度に与える影響や各植物の低温に対する感受性との関連性の解明は, 今後の課題である。

各植物の液胞膜の主要なグリセロ脂質の構成脂肪酸は, 16 : 0, 18 : 2 および 18 : 3 であり, PC, PE, ホスファチジルイノシトール & ホスファチジルセリン (PI & PS) のそれは, いずれも不飽和脂肪酸の割合が高かった。しかし, ホスファチジルグリセロール (PG) の構成脂肪酸は, 16 : 0 の含量が高く, ダイズのそれよりもリョクトウおよびアズキでその含量が高かった。グリセロ脂質の中で, PG のみが相転移と相関のある事が認められている。特に PG の飽和脂肪酸含有分子種の割合が高い植物は, 低温感受性植物である事が示されており, 液胞膜レベルでも同様の傾向のあることを明らかにすることができた。

また、各植物の液胞膜の遊離型および配糖体型ステロールの構成ステロール組成は、スチグマステロールとシトステロールであり、両者の割合は、リョクトウおよびアズキではほぼ同じであったが、ダイズではシトステロールが全体の70%を占めていた。

液胞膜の標識酵素である硝酸感受性 ATPase は、低温でいち早く不可逆的に失活することが知られている。植物の低温障害と膜タンパク質 (ATPase など) や液胞膜の脂質、特に各脂質クラスの含量やそれらの組成などとの関連性について、今後さらに数種類のマメ科植物で調査する必要があると考えている。