

氏名(本籍)	和田雅人(福島県)		
学位の種類	理学博士		
学位記番号	博甲第793号		
学位授与年月日	平成2年7月31日		
学位授与の要件	学位規則第5条第1項該当		
審査研究科	生物科学研究科		
学位論文題目	Na ⁺ -activated ATPase in plasma membrane of marine alga <i>Heterosigma akashiwo</i> (海産藻 <i>Heterosigma akashiwo</i> の細胞膜 Na ⁺ 活性化ATPase)		
主査	筑波大学教授	理学博士	藤伊正
副査	筑波大学教授	理学博士	猪川倫好
副査	筑波大学教授	理学博士	内藤豊
副査	筑波大学教授	理学博士	堀輝三

論文の要旨

植物の生存を支える一つの特性である環境適応能力を解明するうえで無機イオン輸送の分子機構の研究は不可欠である。特に海産植物が高塩濃度下で生存し得るメカニズムを明らかにすることは細胞生理学の面だけではなく耐塩性植物の作出という農学的・応用的観点からも重視されている。

本研究は海産ラフィド藻 *Heterosigma akashiwo* を用いて細胞膜上に存在する Na⁺-activated ATPase を植物細胞で初めて検出し、その分子的特徴を解析したものであり、3章から成る。

1) 第1章では、*H. akashiwo* 細胞から細胞膜を単離する方法を開発し、細胞膜上に存在する2種類のイオン輸送性 ATPase の生化学特性の検討を活性を中心に行っている。従来、植物細胞からの細胞膜の単離は極めて困難であったが、著者は本実験材料が植物細胞でありながら細胞壁を持たないという特性を利用し、シリカマイクロビーズを電気的に膜に結合させ、膜を単離する方法を開発し、回収率66%、高純度(95%以上)の細胞膜を得ることに成功している。

この細胞膜画分を用いてATPase活性の特性を調べ、Mg²⁺存在下で1価カチオンの効果がNa⁺で最も高いことから、高等動物のNa⁺-K⁺-ATPaseと類似のATPaseが存在することを示唆している。また、このATPase活性がバナジン酸で阻害されることから酸素反応中にリン酸化反応中間体を形成することを推定し、酸性SDS-PAGEとオートラジオグラフィーによって動物のNa⁺-K⁺-ATPaseと類似のイオン要求性を持つ、140KDaのATPase中間体と植物のH⁺-K⁺-ATPaseと類似のイオン要求性を持つ95KDaのATPaseの中間体の存在を示している。

2) 第2章では、第1章で得られた細胞膜結合イオン輸送性ATPaseと動物のNa⁺-K⁺-ATPaseと

の分子の比較を行っている。

動物 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ は、ATP の分解、イオン輸送性を担う分子量約100KDa の α サブユニットと機能の曖昧な50KDa の β サブユニットから成る。*H. akashiwo* の $\text{Na}^+\text{-activated ATPase}$ が分子量140KDa で、動物の α サブユニットと相同性があると考え、ブタの腎臓の $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ に対する抗体と反応させたところ、*H. akashiwo* 140KDa のタンパク質と反応した。この抗体は動物の $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ の α 、 β 両サブユニットを認識するため、この抗体の affinity purify を行い、 α 、 β に対する mono-specific 抗体を作成し、それを用いて *H. akashiwo* 細胞膜画分についてイムノブロットを行っている。その結果、*H. akashiwo* の140KDa タンパク質は α を認識する mono-specific 抗体のみと反応し、 β のものとは反応しなかった。以上のことから、著者は *H. akashiwo* の $\text{Na}^+\text{-activated ATPase}$ は動物 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ の α サブユニットと分子的相同性を持つ ATPase であることを明らかにしている。

3) 第3章ではさらに遺伝子レベルでの相同性を調べるために *H. akashiwo* 140KDa のタンパク質の cDNA のクローニングを試みている。

動物 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ をプローブにし、*H. akashiwo* poly(A)⁺RNA に対しノーザンハイブリダイゼーションを行ったが、このプローブとは反応せず、両者はタンパク質レベルでの相同性はあるものの、核酸レベルでの相同性は低いものと考えられた。そこで真核生物のイオン輸送性 ATPase に共通である2ヶ所のアミノ酸配列を利用し、これからそれぞれ20mer の DNA プライマーを作成し、ポリメラーゼチェーンリアクション (PCR) 法により、0.75Kbp の DNA フラグメントを合成し、これをプローブにして、*H. akashiwo* poly(A)⁺RNA に対しノーザンハイブリダイゼーションを行い、3.8Kbp のバンドを得た。この3.8Kbp バンドは分子量140KDa のタンパク質と対応し、 $\text{Na}^+\text{-Activated ATPase}$ のものと考えられた。現在3.8Kbp の full length cDNA のスクリーニングを行っている。

審 査 の 要 旨

植物細胞における膜結合性タンパク質の研究が遅れている理由には、純度の高い膜画分を収率よく得ることが出来なかったことにある。本研究で、細胞壁を持たない海産藻 *H. akashiwo* を用い、新たにシリカマイクロビーズ法を開拓し、純度の高い細胞膜を得たことはこれからの植物細胞膜の研究に大きく寄与するものと考えられる。

また、植物細胞で初めて $\text{Na}^+\text{-activated ATPase}$ の存在を明らかにし、その性格付けを行ったことは、植物の環境適応能力を研究するうえで極めて重要な発見であり、高く評価される。

本研究では140KDa タンパク質の cDNA の full length クローニングは行われていないが、現在の技術を持ってすれば近く完成するものと期待される。

よって、著者は理学博士の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認める。