

# イネ nucleoside diphosphate kinase の生理的諸性質の解析

共生基盤学専攻 機能性食品変換学  
木原 明彦

(背景と目的) nucleoside diphosphate kinase (NDPK, EC 2.7.4.6)は nucleoside triphosphate (NTP)から nucleoside diphosphate (NDP) へとリン酸基を転移する酵素である。この反応は可逆的であることから、NDPK は細胞内における NTP 量を一定の状態に調節する機能があると推測されている。植物においては、これまで数種の NDPK 遺伝子がクローニングされており、光シグナル系への関与や、細胞分化・成長に関わるGタンパク質の活性制御など多様な生理機能が示唆されている。イネには3種類の NDPK アイソザイム (NDPK1, 2, 3) が存在し、種子の発芽や子葉鞘の伸長、病害ストレス抵抗性への関与等が報告されているが、これらの NDPK アイソザイムの細胞内局在や発現特性、ならびに酵素化学的諸性質といった基礎的知見は明らかにされていない。本研究ではイネ NDPK の生理的諸性質の解明を目的として、登熟種子より遺伝子のクローニングを行い、各 NDPK アイソザイムの細胞内局在および遺伝子発現特性を解析した。また、大腸菌より組換えタンパク質を精製し、各 NDPK の酵素化学的諸性質ならびに、NTP からの ATP 生成反応の速度パラメータを明らかにした。

(方法) NDPK 遺伝子はイネ登熟種子より調製したRNAを用いたRT-PCRにより単離した。細胞内局在性は、各NDPKとGFPの融合タンパク質をタマネギの上皮細胞にて発現させ、蛍光顕微鏡で観察した。葉身、葉鞘および登熟種子から得た mRNA からの逆転写産物を鋳型とし、各 NDPK 遺伝子特異的プライマーにより PCR を行った。組み換えタンパク質は His 融合タンパク質として精製した。酵素活性は HPLC を用いて、各 NTP に ADP を作用させたときの ATP 生成量を測定した。

(結果および考察) クローニングした全長 NDPK1-3 の推定アミノ酸配列の比較から、NDPK2 および 3 はシグナルペプチドを有すると考えられた。これらの局在性を GFP 融合タンパク質として解析したところ、NDPK1 は細胞質、NDPK2 はプラスチド、NDPK3 はミトコンドリアに局在することが明らかとなった。3 種のアイソザイムが細胞質、プラスチド、ミトコンドリアに1つずつ存在することは NDPK が細胞機能において重要な酵素であることを示唆している。NDPK 発現の器官特異性を解析したところ、NDPK1 は葉身と種子においてより強く発現し、NDPK2 は葉身および葉鞘でより強く発現することが明らかになった。NDPK3 では、各器官の発現量に差異は見られなかった。次に、各 NDPK 組換え酵素の酵素化学的諸性質を検討した。至適 pH および pH 安定性では NDPK1 の至適 pH が 8.4, pH 安定域が 7.0-9.0 であるのに対し、NDPK2 および NDPK3 では共に至適 pH が 6.2, pH 安定域が NDPK2 は 6.0-9.0, NDPK3 が 4.0-9.0 と、各アイソザイム間に顕著な差が見られた。速度パラメータを解析したところ、全ての反応において NTP の  $K_m$  が ADP の  $K_m$  よりも高い値を示した。いずれのアイソザイムにおいても CTP を基質とした時の  $K_m$  が高く、CTP は基質になりにくいこと、また GTP を基質とした時の  $K_m$  が低いことから、GTP が基質になりやすいことが推測された。さらに、細胞質局在型の NDPK1 よりも、オルガネラに局在する NDPK2 および NDPK3 の方がほぼ全ての基質に対して低い  $K_m$  値を示した。