

総説

植物細胞におけるリン酸輸送と リン酸ホメオスタシス

姫路工業大学理学部 三村徹郎

1 : はじめに

リン酸イオンは無機イオンでありながら、そのままの形で有機化合物と結合し、エネルギー代謝をはじめとする様々な細胞内反応に関与する点で、無機イオン代謝と有機物代謝をつなぐ要に位置するユニークな分子である。また、DNA・RNAの構成要素としての重要性は言うまでもなく、最近ではタンパク質のリン酸化が細胞内反応の主要な制御機構と考えられるようになっている。近年の細胞生物学の発展は、植物細胞においても様々な分子の膜輸送系の詳細を明らかにしつつあるが、無機リン酸についてもいくつかの事実が明らかにされてきた。ここでは、植物細胞におけるリン酸輸送系研究の現状を紹介させていただく。我々は主として葉肉細胞や藻類細胞あるいは培養細胞などを用いて研究を行っているが、ここで述べる機構の多くは根細胞を含めたすべての植物細胞に普遍的なものと考えている。

2 : 植物細胞のリン酸輸送系

植物細胞の細胞膜には、ATPのエネルギーを利用して、 H^+ を細胞質から細胞外に運び出す H^+ ポンプの存在が知られている。この H^+ ポンプが働くことによって、細胞膜の内外に H^+ の濃度勾配（細胞質が弱アルカリ、細胞外が酸性）が形成される。また、 H^+ の輸送は、“+”の電荷を運び出すことになるため、細胞外環境に対して細胞内が負になるような電位勾配ができる。 H^+ ポンプによって作り出された電位差（能動的電位）は、細胞内外に既に存在する他のイオン（主として K^+ ）の濃度勾配にともなって形成されている電位差（拡散電位あるいは受動的電位）とともに、細胞膜電位を形成する。通常植物細胞の細胞膜電位は-200mV程度にもなる。こうして、 H^+ ポンプによって作られた H^+ の濃度勾配と膜電位差（すなわち、 H^+ の電気化学ボテンシャル勾配）は、細胞外が細胞内に対して正の値を示すため、 H^+ はボテンシャル勾配に従って細胞の外から中へ流れ込む。無機リン酸イオンはこの H^+ の細胞外から中への流れを利用して、細胞内に取り込まれるものと信じられている。このような輸送系は共輸送（ H^+ coupled co-transport）と呼ばれ、植物細胞においては、リン酸イオンの他に、糖、アミノ酸、 K^+ 、 C_1^- 等が同様の輸送系によって運ばれているものとされている。ショ糖やアミノ酸輸送系の遺伝子が、既に植物細胞からも見いだされており、また、輸送タンパク質の同定も進められているが、リン酸輸送体についてはまだ報告がない。

H^+ との共輸送という機構は、 H^+ 脱共役剤や H^+ ポンプの阻害剤等を用いた実験から推定されたものであるが、実際に、リン酸輸送と共に役した細胞内外のpH変化を測定した実験からも支

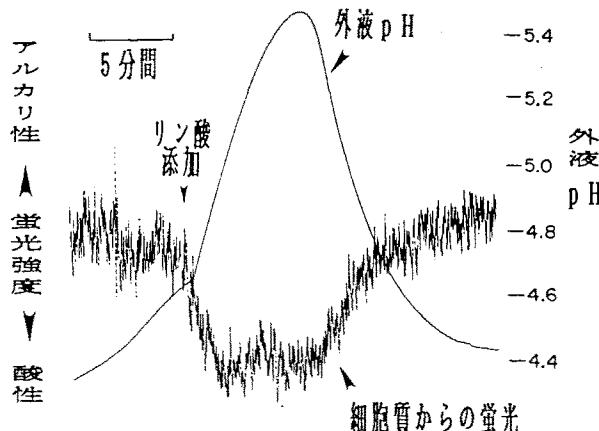


図1：リン酸吸収に伴う細胞内外のpH変化。

持されている。我々は、培養細胞や葉肉細胞を用いて、細胞のリン酸吸収に伴って、細胞外液が急速にアルカリ化すると同時に、細胞質が酸性化する事を見いだした⁽¹⁾。図1はニチニチソウ培養細胞にリン酸を与えた際の、細胞外pH変化をpH電極で、細胞質pH変化を蛍光pH指示薬を用いて同時測定したものである。細胞にリン酸を与えると細胞外液は急速にアルカリ化し、細胞質は酸性化する。細胞質では、pH調節機構が働くため、ある段階で酸性化は停止するが、その後リン酸の吸収が終るとともに細胞膜 H^+ ポンプの働きで細胞質はアルカリ化し、同時に外

液が酸性化し最終的にどちらも初めの pH に戻ることを示している。

リン酸は、pH に応じて価数を変化させるが、実際に輸送される分子種が何価のイオンかは分かっていない。輸送活性の pH 依存性を測定するために緩衝液を使用することはよく行われるが、リン酸輸送系のような H⁺ 共役型の場合、緩衝液の使用は輸送活性に対して阻害的に働き、真の pH 依存性を測定することはできない。実際、坂野(1990)⁵⁾ の測定によれば、緩衝作用のない外液を用いて輸送活性を測定した場合には pH 4 から 7 に到るまで輸送活性は変化せず、この点からも輸送されるリン酸分子の価数を同定することは困難になっている。また、一分子のリン酸を輸送するのにいくつの H⁺ を必要とするのかはっきりしていない。リン酸一分子に対して 2 から 4 ケの H⁺ を必要とするという報告が存在する。リン酸が吸収される際には、輸送されるリン酸分子の価数と、共役して動く H⁺ の数に応じて電荷が移動する。リン酸が動く際の細胞膜電位変化を同時測定すると、多くの場合に膜は脱分極する。これは、リン酸吸収に際して “+” の電荷が細胞内に移動したこと意味するので、少なくともリン酸分子の価数以上の H⁺ が一緒に移動したこと示している。

一般的に土壤中のリン酸濃度は極めて低い（数 μM 以下のこともある）。細胞質の無機リン酸濃度は通常 20 mM 程度と予想されているので、細胞膜を介して 1,000 倍から 10,000 倍の濃縮が行われていることになる。このような高濃度の濃縮を行なうために、細胞膜リン酸輸送系の無機リン酸イオンに対する親和性も大変高い。アイソトープを用いた輸送活性の測定実験からは、K_m (ミハエリス定数) が μM レベルにあることが知られている。ただし、高親和性のリン酸輸送系は、植物細胞に過剰のリン酸が与えられている時には見いだせないため、細胞膜には複数のリン酸輸送系（低親和性と高親和性）が存在するとの議論がなされているが、低親和性リン酸輸送系は本当に実在するのか、また存在するとしていずれの輸送系も H⁺ との共輸送でリン酸を運んでいるのかなど不明の点が多い。

現在、複数の研究室で細胞膜リン酸輸送担体を同定・純化する事が試みられているが、純粋なリン酸輸送体タンパク質の単離に成功し、それを人工膜に埋め込んで輸送活性を測定でき初めて上記の点に答えを得ることができるであろう。

次項で述べるように、細胞内リン酸代謝においては細胞膜のみならず、各オルガネラ膜におけるリン酸輸送も重要な働きをしている。植物細胞においてリン酸輸送機構が最も詳細に明らかにされているのは、葉緑体包膜に存在するリン酸トランスポーターである。このリン酸トランスポーターは、光合成の基質となる細胞質のリン酸イオンと光合成産物であるストロマ内の三炭糖リン酸を濃度勾配に従って交換する働きを持つ。既にタンパク質・遺伝子とともに単離されその詳細が明らかにされているので文献 1 を参考にしていただきたい。

リン酸代謝に最も重要な働きをしているオルガネラ膜は液胞膜であるが、現在液胞膜のリン酸輸送能を測定した仕事は少ない。その大きな理由は、液胞膜のリン酸輸送活性が細胞膜等に比較して極めて低いと言うことが上げられる。実際、我々は大麦葉肉細胞から単離した液胞において、リン酸の放射性同位体を用いて、輸送活性を測定したが、信頼できる測定値を得るのは大変困難であった。わずかな輸送活性を利用して測定された結果では、液胞内へのリン酸の取り込みは液胞外液のリン酸濃度が数十 mM になるまでほぼ直線的に増加した。これは、リン酸が輸送担体を利用して運ばれるというよりチャンネル等を通して移動することを示唆している。また、単離した液胞を

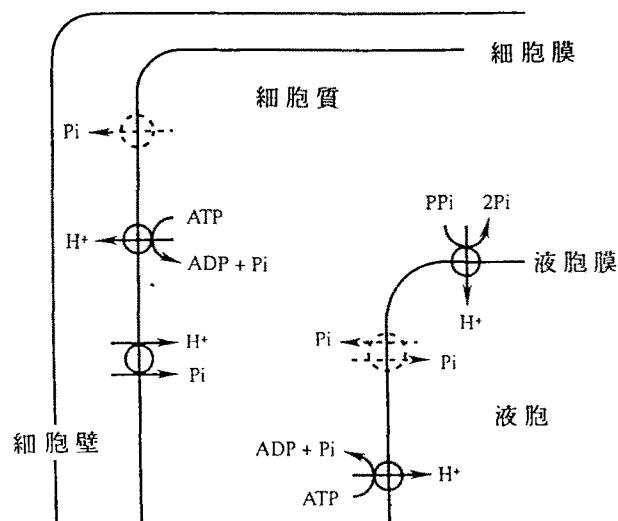


図 2 : 細胞膜と液胞膜のリン酸輸送系

長時間（1時間以上）緩衝液中においても、リン酸は液胞外にはほとんど漏れてこない。リン酸飢餓においていた細胞から単離した液胞では、外液にATPが存在するときには通常よりも高いリン酸取り込み活性を示したが、これもATPがどの様な働きをしているのかははっきりしない。

以上、植物生体膜におけるリン酸輸送機構の現状を通観したが、次にこの輸送系の関わるリン酸イオンの細胞内外における濃度維持機構について考えてみたい。

3：植物細胞内外におけるリン酸ホメオスタシス

植物のリン酸含量は、リン酸の栄養条件に応じて、きわめて広範囲に変動することが知られているが、多くのリン化合物の内、一番変動量が大きいのは無機正リン酸である。最近の測定法の進歩により、細胞内のリン酸分布を生きた状態に近い形で測定することが可能になり、これまで変動量が大きいと考えられていた無機リン酸も、実際にリン酸が代謝される細胞質においては、栄養条件にかかわらず、ほぼ一定の濃度に保たれていることが知られるようになってきた。³¹P-NMR法を用いると、生きたままの植物細胞（根組織を用いた測定がよく行なわれている）の液胞と細胞質のリン酸含量を同時に測定することができる。Douce等の先駆的仕事により、植物細胞はリン酸飢餓条件下では、液胞内のリン酸を細胞質に移すことにより細胞質のリン酸濃度を一定に保つように働き、一方過剰のリン酸が存在する条件下では、細胞質リン酸濃度が高くなりすぎないように、吸収したリン酸の多くを液胞内に蓄積する機構が存在することがわかつてきた⁴⁾。これを植物細胞のリン酸ホメオスタシスと呼んでいる。

リン酸ホメオスタシスが機能するためには、細胞質の有機リン酸化合物の濃度を調節するなど様々な機構を考えられるが、最も大きな要因は細胞質を外界と仕切る細胞膜、および液胞との間に存在する液胞膜のリン酸輸送活性の変動によるものと推定される。NMRによる測定では、絶対量に比べ輸送活性の測定には困難が伴う。そこで我々は、リン酸含量の異なる細胞および液胞を単離して、リン酸ホメオスタシスと各生体膜の輸送活性がどの様に関連するかを調べた²⁾。ここでも、大麦葉組織から単離した葉肉細胞プロトプラストと液胞を用いたが、根細胞でも本質的機構には違いがないと思われる。

実際、細胞膜のリン酸輸送活性は細胞のリン酸含量に応じて変動する。例えば、リン酸飢餓状態におかれた植物から単離した細胞では、細胞質には十分量のリン酸が含まれているが液胞にはほとんどリン酸が存在しない。この時細胞膜のリン酸輸送活性を測定すると、リン酸に対する親和性と最大輸送活性のいずれもが上昇していた。

表1：大麦葉肉細胞のリン酸濃度と細胞膜リン酸輸送活性

培養液のPi濃度 (mM)	細胞質濃度 (mM)	液胞濃度 (mM)	細胞膜輸送活性 (nmol/10 ⁷ Protplasts/hr)
0	26.0	5.2	79
1.5	24.8	40.5	63
40.0	35.1	144.7	31

また、このような細胞にリン酸を与えると、与えたリン酸は急速に液胞内に取り込まれることが見いだされた。リン酸が十分に与えられている植物ではこのような現象は観察できない。これは、細胞膜における急速なリン酸の吸収が細胞質のリン酸濃度を必要以上に高めることを防ぐ機構と考えることができる。実際、これらの細胞から液胞を単離してリン酸吸収能を測定すると、リン酸飢餓植物からの液胞でのみ、ATP依存のリン酸輸送活性を見いだすことができた。一方、リン酸飢餓が進行している状態では、細胞質リン酸濃度を一定に保つために、液胞内に蓄積されたリン酸の細胞質への移動を必要とする。しかし、第一項でも述べたように、液胞からのリン酸放出機構の詳細は、現在ほとんど分かっていない。

また、細胞が過剰のリン酸を吸収するうちに、細胞膜におけるリン酸吸収能が低下していくことが従来から知られている。我々は、細胞膜H⁺ポンプの活性が、細胞質側に存在する無機リン酸イオンによって、ATPに対して非競争的な阻害を見いだした⁷⁾過剰のリン

酸吸収によって一過的に上昇した細胞質リン酸イオンがH⁺ポンプを阻害すれば、その結果として細胞膜を介してのリン酸輸送の原動力であるH⁺の電気化学ポテンシャル勾配が減少してリン酸輸送能が下がるものと推定された。

我々は、さらに細胞が組織の中には存在するときに、細胞外のリン酸環境がどのように成立しているかを知るために、葉組織アボプラストのリン酸濃度を測定することを試みた³⁾。様々な濃度のリン酸を葉組織に吸収させた後、アボプラストのリン酸濃度を測定すると、細胞は細胞膜によるリン酸の吸収のみならず自発的なリン酸放出を行なって、細胞外環境のリン酸濃度を、ほぼ一定の濃度に保つ機構が存在することを見いだした。このような細胞からのリン酸放出によるアボプラストリン酸ホメオスタシスは、葉組織においては植物体全体のリン酸転流に重要な働きをしているものと予想される。最近シロイヌナズナにおいて、根組織での導管部へのリン酸負荷能が特異的に欠損している変異体が発見されている。これは葉肉細胞で我々が見いだしたリン酸放出と同様の機構が、根細胞から導管部に至る組織で働いているものと考えられる。

4 : おわりに

リン酸輸送機構の詳細な研究は、高等植物においてはまだ始まったばかりであり、今後数年間の内に大きな進展が望めるものと思われる。特に、リン酸栄養条件に応じた各生体膜のリン酸輸送活性の変動は、細胞質のリン酸濃度が大きな変動を示さないにも関わらず生じる。従って、輸送活性調節機構（それが、遺伝子の翻訳レベルで生じるのか、タンパク質の活性調節で生じるのかは分からぬが）は、細胞質のリン酸濃度の変化だけでは説明できない。細菌や藍藻では、リン酸代謝関連の遺伝子が一まとまりになっており、細胞膜に存在するリン酸受容体からの情報で発現調節が行われることが知られている。高等植物のいずれの組織においても、同様の調節系が存在するのか、あるいは全く異なる機構が働いているのかも、近い将来に明らかにされるであろう。

参考文献

- 1: Fluegge, U.-I., Heldt, H.W. (1990) Metabolite translocators of the chloroplast envelope. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 42:129-144
- 2: Mimura, T., Dietz, K.-J., Kaiser, W., Schramm, M.J., Kaiser, G., Heber, U. (1990) Phosphate transport across biomembranes and cytosolic phosphate homeostasis in barley leaves. *Planta* 180:139-146
- 3: Mimura, T., Yin, Z.-H., Wirth, E., Dietz, K.-J. (1992) Phosphate transport and apoplastic phosphate homeostasis in barley leaves. *Plant & Cell Physiol.* 33:563-568
- 4: Rebeille, F., Blingny, R., Martin, J.-B., Douce, R. (1983) Relationship between the cytoplasm and the vacuole phosphate pool in Acer pseudoplatanaus cells. *Arc. Biochem. Biophys.* 225:143-148
- 5: Sakano, K. (1990) Proton/phosphate stoichiometry in uptake of inorganic phosphate by cultured cells of Catharanthus roseus (L.)G. Don. *Plant Physiol.* 93:479-483
- 6: Sakano, K., Yazaki, Y., Mimura, T. (1992) Cytoplasmic acidification induced by inorganic phosphate uptake in suspension cultured Catharanthus roseus cell.: Measurement with fluorescent pH indicator and 31P-NMR. *Plant Physiol.* 99:672-680
- 7: Takeshige, K., Mitsumori, F., Tazawa, M., Mimura, T. (1992) Role of cytoplasmic inorganic phosphate in light-induced activation of H⁺-pumps in the plasma membrane and tonoplast of Chara corallina. *Planta* 186:466-472

Inorganic Phosphate Transport and Phosphate Homeostasis in Plant Cells.
Tetsuro MIMURA