

フィチン酸とCa²⁺受容タンパク質・カルモジュリン

原 彰・船隈 透

Phytic Acid and Ca²⁺-Binding Protein, Calmodulin

Akira HARA and Tooru FUNAGUMA

Laboratory of Biological Chemistry, Faculty of Agriculture,
Meijo University, Tenpaku ku, Nagoya,

468

1. はじめに

花粉に関する我々の研究テーマの1つに、糖代謝がある。ミオ-イノシトールとフィチン酸という表題で本誌に掲載された雑文⁽¹⁾の中で、我々はフィチン酸分解酵素(フィターゼ)の存在を明らかにした。その後の研究の進展によって、ガンマ花粉中のフィターゼがこれまで報告されていないタイプの酵素であることが分かったのだが、最近取り組みはじめたカルシウムとその結合タンパク質(カルモジュリン)について興味ある「絡み」を経験したので、この間の過程を含め情報伝達物質について多少の解説をつけ加えたい。

2. 新型フィターゼは金の成る木か

吸水した花粉は短時間で花粉管伸長をはじめが、この過程で花粉管の細胞壁成分であるセルロース性多糖と非セルロース性多糖の前駆体が供給されねばならない。ガンマ花粉中には非セルロース性多糖の前駆体であるUDP-グルクロン酸の合成を触媒するUDP-グルクロン酸ピロホスホラーゼ(Fig.1-A)が検出される⁽²⁾ので、イノシトール酸化経路がはたらいっていることが予想される。我々はこの経路におけるイノシトールの供給を検討する中で、フィチン酸特異的フィターゼ(Fig.1-B)を発見した⁽³⁾。

フィチン酸は、ミオ-イノシトールのヘキサリン酸エステル(Fig.2-A)であり、穀類や幼植物に多い。

このカルシウム・マグネシウム塩はフィチンと呼ばれ、植物では普遍的なリン酸貯蔵体である。これまで報告されたフィターゼは、フィチン酸のリン酸エステルの加水分解順序の差異から、3-フィターゼと6-フィターゼに分類されているが、フィチン酸の最終分解産物はイノシトール-モノリン酸か、イノシトールである⁽⁴⁾。

我々が発見したフィターゼが新型であるという最大の理由は、フィチン酸に作用してそのリン酸エステルの50%だけを分解し、最終産物はイノシトール-三リン酸であることによる。この結果をまとめていた時に眼にとまったのが「受容体活性化とイノシトールリン脂質」⁽⁵⁾という総説であった。論文にはジアシルグリセロールやイノシトール1, 4, 5-三リン酸(Fig.2-C)がセカンドメッセンジャーとしてはたらくと述べていた。詳細は省略するが、Fig.3に示すようにホルモンの刺激を受けた細胞の受容体がまずホスホリパーゼを活性化して、ホスファチジルイノシトール4, 5-二リン酸(Fig.2-B)の分解を導く。分解産物であるジアシルグリセロールはタンパク質リン酸化酵素(プロテインキナーゼ)を活性化することによって、またもう1つの産物であるイノシトール1, 4, 5-三リン酸は小胞体からのCa²⁺の遊離をひき起こし、細胞内のCa²⁺カルモジュリン依存性プロテインキナーゼや各種酵素を活性化することによってホルモン情

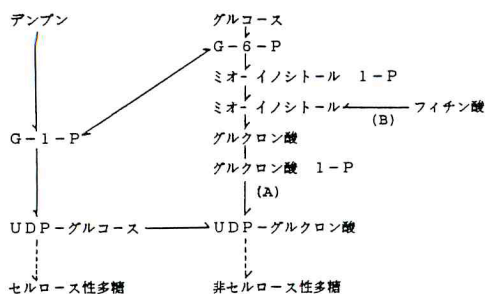


Fig. 1 細胞壁多糖の合成経路

報が発現するというものである。ホスファチジルイノシトールの2つの分解産物と Ca^{2+} が情報伝達物質として位置づけられる。

さて、「絡み」というのは、フィターゼによるフィチン酸の最終分解産物がイノシトール-三リン酸であり、情報伝達物質であるイノシトール1, 4, 5-三リン酸と関わりが有りや無しやという意味である。情報伝達の過程の解明は現在の生化学の分野では最先端の研究の1つであり、最終のゴールを目指して厳しい先陣争いが繰り広げられている。我々の日本農芸化学会大会の講演要旨を見て、東京大学応微研の研究者から試料譲渡の話があった。フィターゼによるフィチン酸分解産物を情報伝達の研究に利用したいというのであるが、イノシトール-三リン酸がどのような異性体か不明であったから、喜んで試料提供を行った。その結果、 Ca^{2+} の遊離活性は1/10程度あるものの、イノシトール1, 4, 5-三リン酸とは異なるとの報告がなされた。それから暫くして今度はスウェーデンの Perstorp Carbotec 社から、論文⁽³⁾を読んで興味をもったから、試料を提供して欲しいという手紙がきた。分析結果は我々が利用してもよいという条件で30mgの分解産物を送ったものの、2ヶ月経過しても報告はきていない。ちなみに、シグマ社のイノシトール1, 4, 5-三リン酸(2, 4, 5-異性体を含む)は1mgが210ドルであった。

3. 花粉にもフィチン酸が含まれる

ガマ花粉にはフィチン酸特異的フィターゼが存在することが分かったので、当然のことながらフィチン酸

が存在するはずである。フィチン酸およびその中間代謝産物はダウエックスカラムによって容易に分離することが可能である。Fig.4にオートクレーブ処理によるフィチン酸の部分分解産物と、フィターゼによるフィチン酸の分解物のクロマトグラフィの結果を示す。ガマ花粉の抽出物について同じクロマトグラフィを行うと、確かにフィチン酸 (IP_6)に相当する位置に明瞭なピークを示すが、四リン酸以上の他の中間代謝産物はほとんど観察されなかった。フィチン酸の抽出方法およびこのフィチン酸が発芽においてどのように利用されるかは、現在検討中であるが、発芽過程でフィターゼの作用によってイノシトール-三リン酸が蓄積

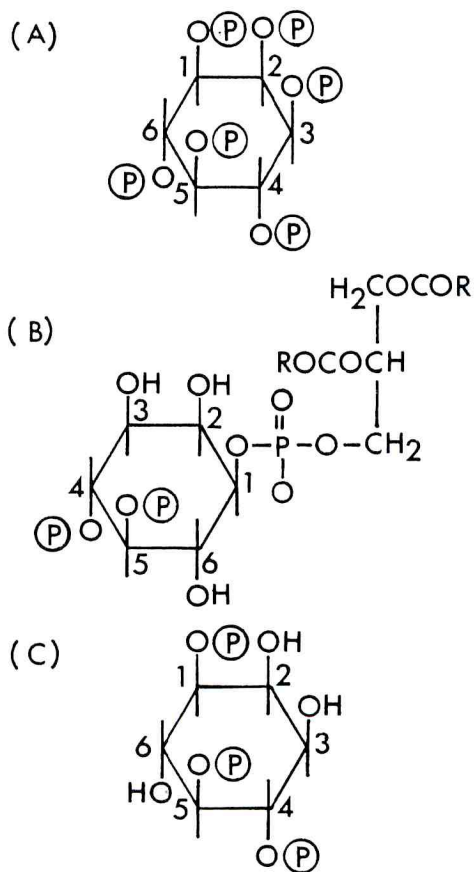


Fig. 2 イノシトールリン酸誘導体

(A) フィチン酸、(B) ホスファチジルイノシトール 4,5-二リン酸、(C) イノシトール1,4,5-三リン酸 (P)=リン酸基

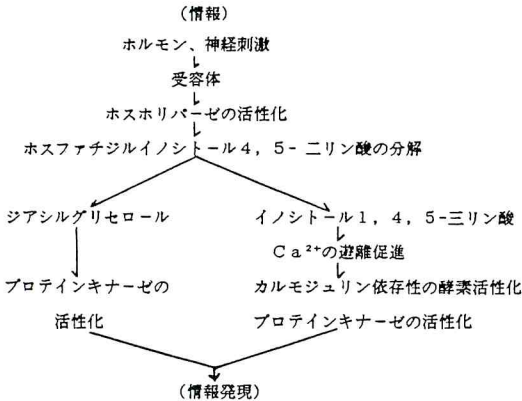


Fig. 3 情報伝達の経路

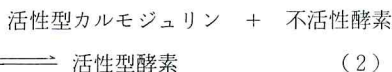
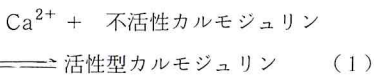
するという図式は描けそうにないことだけをつけ加えておきたい。

4. 情報伝達物質としてのカルシウム

カルシウムは今や重要な情報伝達物質の1つとして、揺るぎない地位を確保しているように見えるが、これは極く最近のことである。発見の同時性はよく指摘されることであるが、Ca²⁺-結合タンパク質（カルモジュリン）もその例の1つである。

Ca²⁺感受性の耐熱性タンパク質の存在は、1970年、アメリカの Cheung と日本の垣内によってそれぞれ独立に発見されたが、両者が同一のタンパク質（カルモジュリン）であることが確認されたのは、1973年である。それから10年足らずで、カルモジュリンを含むCa²⁺-受容タンパク質に関する知識は飛躍的に増大した。以下に述べることも含めて、詳細は垣内らによって編集された2冊の著書を参照していただきたい(6,7)。

Ca²⁺は次のように2段階の反応で酵素を活性化することによって、情報伝達を達成する。



これらの(1), (2)の反応は可逆的であり、Ca²⁺の濃度によってスイッチのオン、オフが行われる。素早

いCa²⁺の濃度変化を保証するものとして、細胞には4つのCa²⁺の濃度調節の反応経路が存在する(8)。

第1は膜電位に依存するカルシウムチャンネルである。第2はナトリウム・カルシウム変換体で、カルシウムイオンを排出する代わりにナトリウムイオンを細胞質に取り込む。第3はカルシウムポンプATPアーゼでATPを分解することによって生じたエネルギーを用いてカルシウムイオンを外に出す。第4はミトコンドリア内膜にあり、カルシウムイオンだけを能動的に除去する。細胞内のカルシウム貯蔵体は小胞体であり、前述のイノシトール1, 4, 5-三リン酸はカルシウムポンプの活性化にはたらいっていると考えられている(7)。数多くのイオンの中でカルシウムだけが情報伝達体として選ばれた理由として、カルシウムイオンはタンパク質との結合力が強く、またタンパク質の不規則な結合部位に適応するための適度な大きさをもってい

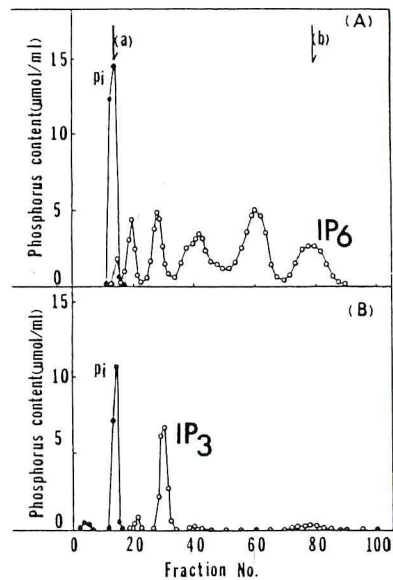


Fig. 4 フィチン酸分解物のダウエックスカラムクロマトグラフィによる溶出パターン(3)

(A) pH 4.0, 45分間のオートクレーブ処理によるフィチン酸の部分水解物

(B) ガマ花粉フィターゼ処理によるフィチン酸分解物 IP₆ = フィチン酸、IP₃ = イノシトール-三リン酸、Pi = 無機リン酸

ることがあげられている⁽⁷⁾。

細胞内では Ca^{2+} の濃度は $10^{-7}\text{M} \sim 10^{-8}\text{M}$ という低いレベルに保たれており、 Ca^{2+} 受容タンパク質が活性化される (Ca^{2+} と結合する) 濃度は $10^{-7}\text{M} \sim 10^{-5}\text{M}$ であることを考えると、細胞内では如何に厳密に Ca^{2+} の濃度が保たれねばならないか驚異的である。

5. 進化できなかったカルモジュリン

カルモジュリンは原生動物から哺乳動物、高等植物に至るまで広く分布している。原生動物 (テトラヒメナ) と牛腦のカルモジュリンとはアミノ酸残基数において1個の違いがあるものの、11箇所でのアミノ酸の置換が観察されるだけである。しかも、テトラヒメナ由来のカルモジュリンは牛や豚腦のホスホジエステラーゼを活性化することが可能である。植物では小麦胚芽のカルモジュリンは牛腦のそれと比較してやはり11箇所のアミノ酸置換があることが報告されている⁽⁹⁾。それに対して、成長ホルモンを例にとると、哺乳動物の牛と人の成長ホルモンのアミノ酸残基数は191個と同じであるものの、35%もの置換がある。霊長類には霊長類の成長ホルモンしか有効ではないことを考えると、カルモジュリンは極端に進化にみまわれなかったと言えるだろう。このことはカルモジュリンが多機能であることに深い関わりがあり、多数の酵素やタンパク質と結合が可能であることは、アミノ酸の置換によって生ずる僅かの構造変化にも結合に影響を及ぼしかねないことになる⁽⁶⁾。

垣内らはカルモジュリンの定義の基準として (1) 牛腦カルモジュリンとよく似た4ドメイン (4箇所) で Ca^{2+} と結合する構造領域をもつ Ca^{2+} 結合タンパク質であって、(2) Davis の緩衝液を用いて15%ポリアクリルアミドゲル上で電気泳動を行うと、 Ca^{2+} 存在下で易動度が小さく、EGTA存在下で大きくなる (3) 脱カルモジュリンホスホジエステラーゼの活性を Ca^{2+} に依存して活性化することをあげている。このような基準が一般的に設定できるのも、原

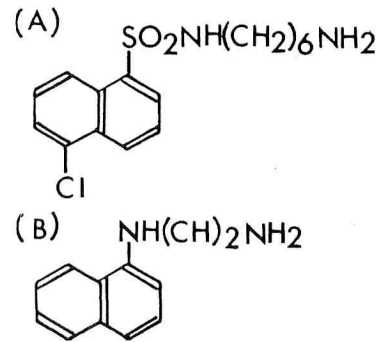


Fig. 5 カルモジュリンと結合する薬物

(A) N-(6-アミノヘキシル)-5-クロロ-1-ナフタレンスルホンアミド (W-7)

(B) N-(1-ナフチル)-エチレンジアミン

核細胞を除くすべての生物から得られるカルモジュリンが極めて類似した構造や性質をもつことが前提にあるのは言うまでもない⁽⁶⁾。

6. カルモジュリンは多機能タンパク質である

カルモジュリンは、やはり情報伝達として知られている3'、5'-環状AMPを加水分解するホスホジエステラーゼの活性化タンパク質として発見された。その後、アデニル酸シクラーゼ、グアニル酸シクラーゼ、ATPase、プロテインホスファターゼ、グリコーゲン合成酵素、トリプトファン水酸化酵素、ホスホリパーゼ、各種のプロテインキナーゼ等の酵素の活性化をひきおこすことが明らかになったが、植物で特有用なものとしてはNADキナーゼの活性化がある⁽¹⁰⁾。

酵素の活性化にカルモジュリンが関与していることは、試験管内で直接測定できるが、最近様々な細胞機能に大きく関わっていることが明らかにされつつある。祖父江は上記酵素群に必要なカルモジュリン量は全カルモジュリン量の数%にすぎないことから、酵素以外の受容タンパク質の存在を予想した。そして細胞骨格に10個のカルモジュリン結合タンパク質 (サイトケルビン) を発見した⁽¹¹⁾。その他にも、カルモジュリンは血管平滑筋収縮機能、心筋の収縮・弛緩、血小板機能、膵島細胞膜での Ca^{2+} 輸送、核分裂装置におけ

る微小管形成、脱重合調節、癌化組織の増殖、植物においては藻類細胞の浸透圧調節機能、フィトクロームによる Ca^{2+} 輸送調節、有糸分裂の制御などに関係していると考えられている。エンドウ芽生えにはクロマチンに結合したカルモジュリン活性をもつタンパク質の存在が報告されており⁽¹²⁾、カルモジュリンの機能解明はますます複雑になりつつある。

カルモジュリンの生理機能を明らかにする上で、重要な働きをしているのが、カルモジュリン阻害剤であろう。カルモジュリンはフェノチアジン誘導体をはじめとする抗精神薬やナフタレンスルホンアミド誘導体、ピナルカロイド類などの多数の薬物と Ca^{2+} の存在下で結合する。これらの薬物の構造で重要なのはナフタレン骨格であり (Fig.5)、これらと結合したカルモジュリンがもはやカルモジュリン結合タンパクと結合しないことから、薬物の結合部位とタンパク質のカルモジュリン結合部位とが同一であると考えられる。いずれこれらの薬物を用いて花粉の発芽への影響を調べるつもりである。

7. 花粉にもカルモジュリンは多量に存在する

トリカルボン酸回路において イソクエン酸 \rightleftharpoons α -ケトグルタル酸 の反応を触媒するイソクエン酸脱水素酵素は補酵素として NAD または NADP を要求する。

一般に NAD を要求する酵素はミトコンドリアに存在し、NADP を要求する酵素は細胞質由来と考えられている。我々は花粉の酵素を測定したところ、圧倒的に NADP 依存性の活性が高かった。NADP は NAD のリン酸化によって合成される。そこでこの NAD キナーゼがカルモジュリン依存性ではないかと想定し実験を進めた。しかし、NAD キナーゼは粗酵素として活性測定できるのだが精製を進めることができないうちに、カルモジュリンの精製が先行してしまった。カルモジュリンは牛脳から調製したホスホジエステラーゼに対する活性化を見ることにより容易に測定できる。カルモジュリンの精製は、そのタンパク質としての特異な性質により比較的容易である。すなわち、トリクロル酢酸によっても変性せず、また先に述べたカルモジュリン阻害剤を結合させたアフィニティ担体に吸着するという性質を利用出来るからである。我々はガマ花粉からカルモジュリンを精製したが、最終産物からはカルモジュリンの定義で述べた電気泳動によって 2 つのバンドが検出された。いずれも、 Ca^{2+} および EGTA の存在下でカルモジュリン特有の挙動を示すのである。さて、いずれが真のカルモジュリンであるか同定できても、花粉に存在するカルモジュリンがどのような機能をもつかを調べることには大変な困難が付きまといそうである。

引用文献

- (1) 原 彰、船隈 透:花粉誌 28, (2)、39-44 (1982)
- (2) Hondo, T., A. Hara and T. Funaguma : Plant and Cell Physiol. 24, 1535—1543(1983)
- (3) Hara, A., S. Ebina, A. Kondo and T. Funaguma : Agric. Biol. Chem. 49, 3539 - 3544 (1985)
- (4) Cosgrove, D. J. : Inositol Phosphate—Their Chemistry, Biochemistry and Physiology. Elsevier Scientific Publishing Co., Amsterdam pp99-117 (1980)
- (5) 竹縄忠臣:生化学 57, 1-19 (1985)
- (6) 垣内史朗、日高弘義編:カルモジュリン- Ca^{2+} 受容蛋白質、講談社 東京 (1983)
- (7) 垣内史朗: Ca^{2+} 受容蛋白質-カモジュリンとトロポニンの分子生物学、蛋白質核酵素 27, 2118 - 2414 (1982)

-
- (8) E. カラフォリ、J. T. ペユストン : サイエンス **16**, (1), 72—82 (1986)
- (9) Toda, H., M. Yazawa, F. Sakiyama and K. Yagi : J.Biochem. **98**, 833—842 (1985)
- (10) Muto, S. and S. Miyachi : Plant Physiol. **59**, 55—60 (1977)
- (11) 祖父江憲治 : 生化学 **57**, 560—577 (1985)
- (12) Matsumoto, H., M. Tanigawa and T. Yamaya : Plant and Cell Physiol. **24**, 593—602 (1983)

(受理日 1986年10月6日)