014

シンポジウム

シンポジウムI(I)A-1 What does blue light in plants ?

Horst Senger

Biochemical aspects:

The biophysical and photochemical effects of light reception are followed by a sequence of biochemical reactions controlling the metabolism and expressing themselves finally as developmental events of the plant. The growing awareness of the regulatory effect of blue light on plants increases the knowledge of the variety of metabolic events involved.

This review will dwell principally upon studies of the influence of blue light on those metabolic events from which some rational pattern of results is emerging.

1) Respiration enhancement. The fact that low doses of blue light enhance respiration particularly in algae, seems to be without controversy.

2) Carbohydrate metabolism. The findings that blue light causes a non-photosynthetic carbon fixation and the enhancement of respiration triggered a variety of studies on enzyme activities involved in glycolysis. Most of the stimulating effects of the blue light can be substituted by provision of substrates. This raises the question whether there is one blue light controlled master reaction early in the carbohydrate degradation providing the substrate for subsequent processes and thus aking many of the blue light influences.

3) Transcription and protein biosynthesis . A lot of evidence has accumulated for the blue light control of protein biosynthesis on the transcriptional level. The higher dose of light required and the possible extension of the action spectra into the green and red regions demand the discussion that other photoreceptors

might be involved than in the previous discussed reactions. Protein formation leads often into the synthesis of enzymes. Besides this de novo synthesis enzymes can be activated by blue light via conformational changes or provision of substrates.

4) Pigment formation. Blue light dependent carotenoid formation is a controlled at a early, oxygen requiring step. From inhibitor studies one might conclude that protein formation is involved. Biphasic dose response curves indicate the participation of two photoreceptors. The action spectrum for carotenoid formation can be extended by the addition of artificial dyes. In those cases in which chlorophyll biosynthesis is controlled by blue light one usually finds the formation of the key substance of tetrapyrrol biosynthesis, the δaminolevulinic acid, to be the regulated step.

5) Nitrogen metabolism. The nitrate reductase, containing flavin and cytochrome, seems to be the model system for primary effects of blue light. Light induced absorbance changes (LIAC) can particularly well be studied in this system. Nitrate uptake and subsequent processes are enhanced by the light stimulated action of the nitrate reductase. The recent findings that blue light effects on nitrate reductase can be simulated by the provision of nitrate might stem from a substrate activation.

The variety of blue light effects, their different way of action and their predominance in lower plants suggest that this mode of metabolic and morphogenetic control was developed in an early phylogenetic stage.

シンポジウムⅠ（Ⅰ）A-2　発生生物学的知見

井上康則（東大・理・植物）

植物や微生物の発生現象に対する青色光効果を考える場合，光受容色素の面から幾つかの場合に分けて考えることができる。すなわち，マカラスムギやヒゲカビの光屈性で代表されるような，いわゆる"青色光吸収色素"によるもの，フィトクロムの青色光域の吸収に由来する，いわゆる"高エネルギー反応"と呼ばれていたもの（Mohr, '62），酵母の成長阻害に見られるようなチトクロムによるもの（Epel '73）等である。ここでは，最初の"青色光吸収色素"による現象に限って議論を進めて行きたい。このシンポジウムの後半で論議されるように，"青色光吸収色素"の実体が明らかになっていない現在，青色光効果の現象論は，山積みになっているが，作用の機構論等はほとんどなされていない。そのため本論においても現象論の記述に留まる部分が多いが，予め御了承いただきたい。

1．生物界における分布。　発生現象に対する"青色光吸収色素"の関与は，菌類，藻類から，コケ，維管束植物，さらには，昆虫類まで非常に広い範囲の生物から報告されている。また関与している現象も子実体形成の誘導あるいは，抑制，成長軸方向の変換，胞子発芽の抑制，概日性リズムの調節，細胞分裂時期の調節等多岐にわたつており，直接生理現象とかかわる色素としては最も広い分布範囲を持っている。

2．細胞内での分布。　偏光照射，あるいは微光束照射の実験等から，"青色光吸収色素"は膜系上に存在しているとの報告がなされている。しかしながら，膜系の種類に関しては，細胞膜（ヒゲカビ，ダンゴゴケ，ホウライシダ），核（ホウライシダ），トノプラスト（タマネギ），鞭毛側部のふくらみ（ミドリムシ）等，様々であり，ヒゲカビでは細胞膜だけでなく，細胞質中にも存在するとの報告もあり，現象や材料により異なっている。

3．光刺激から生理反応への変換機構．　青色光効果の研究に関しては，光受容色素の同定に多くのエネルギーがさかれてしまい，光情報から生理反応への変換機構に関してはまだほとんど何も明らかになっていない。2，で述べたように色素が膜上に存在する可能性が高いことから，膜透過を介して生理反応に関与している可能性が考えられ膜電位が測定されたが，現在に至るまで明確な報告はなされていない。一方，物質を介しての変換については高等植物の光屈性においてＩＡＡの側方移動により偏差成長がもたらされることが明らかになっている。さらに，ヒゲカビやフシナシミドロの光屈性並びにウシグソヒトヨタケの子実体形成等において，c－ＡＭＰが光刺激の変換に関与している可能性が報告されている。

以上述べたように青色光効果に関しては，光受容色素から情報変換機構に至るまで断片的な知見しか得られておらず，今後の研究が期待される。

シンポジウムI(II)A-1　青色光効果II. 光受容色素は何か?

A 1. 物理学的知見

鈴木英雄　(早大理工)

青色光受容反応の光受容体の発色団として、フラビンやC_{40}-カロチノイドの可能性が考えられてきたが、筆者らも3-メチル・ルミフラビンやβ-カロチンの電子構造・光吸収を最も厳密なπ電子近似で計算してきたので、その結果を報告する。

まずベンゼン中の3-メチル・ルミフラビンの光吸収スペクトルは、2中心クーロン反撥積分に対する適当なスクリーニングを考慮することによって、Fig.1のように再現されることがわかった。次に、極性溶媒の効果として、3-メチル・

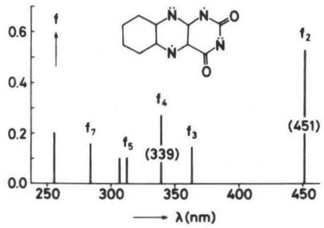


Fig. 1. The optical absorption of 3-methyl lumiflavin, calculated so as to reproduce the absorption spectrum observed in benzene.

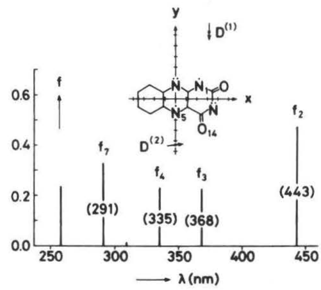


Fig. 2. A theoretical model and its optical absorption, calculated for 3-methyl lumiflavin in ethanol.

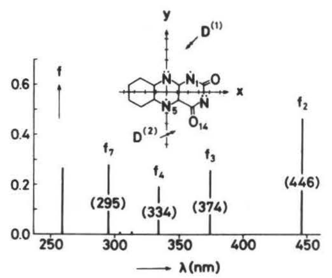


Fig. 3. A theoretical model and its optical absorption, calculated for 3-methyl lumiflavin in water.

ルミフラビンの N_1 および N_5 の近傍にそれぞれ一つの点電気双極子を置くことによって、エタノール中および水中の光吸収スペクトルが、それぞれFig.2およびFig.3のように再現された。これらの計算結果から、3-メチル・ルミフラビンの第1吸収帯の遷移能率と第2吸収帯のそれとのなす角度が、ベンゼン中では44.4°、エタノール中では44.3°、水中でも45.8°以下となることがわかった。

次にβ-カロチンの光吸収に対する共役系の捩れの効果を調べ、主として二つの1重結合 $C_{14}-C_{15}$ と $C_{15}'-C_{14}'$ のまわりの捩れ、および2中心クーロン反撥積分に対するスクリーニングを考慮することによって、全トランス形と15シス形のβ-カロチンの光吸収スペクトルが、Fig.4のように再現されることがわかった。また、このとき、第1吸収帯の遷移能率と第2吸収帯(シス・ピーク)のそれとのなす角度が、90°からあまり大きくずれないこともわかった。

これらの理論的研究の結果から、3-メチル・ルミフラビンと15シス形β-カロチンとの間には、第1吸収帯の遷移能率と第2吸収帯のそれとのなす角度に関して、大きな差があることがわかる。この差を、青色光受容体の発色団の同定に、何んとか役立てれないものであろうか。なお、フラビン蛋白質の光吸収についても言及したい。

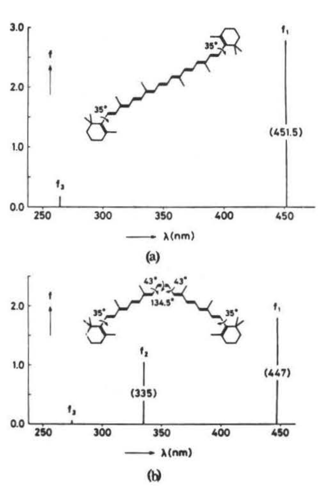


Fig. 4. The optical absorption of (a) all-*trans* or (b) 15-*cis* β-carotene, calculated assuming $\theta_6=\theta_{6'}=35°$.

シンポジウムⅠ (II)A-2

FLAVINS, CAROTENOIDS AND WHAT ELSE? Chemical Aspect

Pill-Soon Song, Department of Chemistry,
Texas Tech University

In contrast to the well characterized photoreceptors such as phytochrome, bacteriorhodopsin, rhodopsin and stentorin, the identity of blue light photoreceptors is neither certain nor unique in terms of the two likely chromophore candidates, flavin and carotenoid. However, in many systems such as Neurospora, Phycomyces and Euglena, flavin now seems to be the logical photoreceptor, based on various types of information including spectroscopic and photochemical considerations. In this report, we review three aspects of the blue light photoreceptors: carotenoproteins as secondary (antenna) photoreceptors, flavoproteins as primary photoreceptors, and blue light effects on phytochrome.

Carotenoproteins

To overcome the most critical kinetic difficulty due to the short lifetime of the excited state of carotenoid, the excited state of carotenoid can be stabilized by dimeric resonance interactions (exciton) with another molecule of carotenoid, as we have recently shown in the case of the dinoflagellate photoreceptor, peridinin-chlorophyll-protein complexes. It was shown by picosecond spectroscopy that an efficient energy transfer occurs from the resonance stabilized dimeric exciton state of peridinin to chlorophyll a, while the energy transfer is halted when the dimeric arrangement is destroyed. The rate constant for the transfer was found to be greater than 10^{11} sec^{-1}. Thus, carotenoproteins can effectively serve as antenna photoreceptors, activating the primary photoreceptor apparatus including the photosynthetic system for sensory transduction.

Flavoproteins

We have studied plasma membrane-bound flavins specifically to ascertain whether or not their excited state dynamics are compatible with the primary photochemical reactivity required for triggering blue light responses in plants in general and corn coleoptile in particular. The 21000 x g membrane fraction of corn coleoptile tips, which are phototropically active, was found to be photoresponsive with respect to the light-induced reduction of a specific *b* type cytochrome. The fluorescence lifetime of the flavoprotein preparation contains a major component of less than 1 nsec lifetime, suggesting that a photochemically reactive flavin is present in the plasma membrane preparation. The fluorescence is readily quenched by exogenous indole acetic acid via a dynamic mechanism, indicating that the singlet excited flavin is photoreactive. In fact, the heavy atom quencher, Xe, did not inhibit the phototropism of corn, even though Xe is an effective quencher of the flavin excited triplet state (unpublished results). Finally, in an attempt to perturb the blue light action spectrum of *Neurospora crassa*, we have incorporated roseoflavin into the mycelium of riboflavin auxotrophs, Rib-2. We were not able to shift the action spectra of blue-light induced carotenogenesis in *Neurospora* (in press).

Blue Light Effects of Phytochrome

Blue light irradiation of large mol wt Pr produces an intermediate ($\lambda \sim 700$ nm) at 77 K which is not detectable by irradiating with red light. The same intermediate was observable by exciting exogenously added FMN with blue light. The blue light irradiation of Pr with or without FMN establishes a photostationary state of Pr and Pfr which differs from that achieved with 660 nm irradiation. A possible implication of the blue light effect on phytochrome in HIR will be discussed.

シンポジウムII－2　　植物脂質リポゾーム

○宮崎龍雄*、William S. Sakai、Harry Y. Yamamoto (Univ. of Hawaii).
(*現・東大海洋研)

動物細胞・細菌の主要膜成分であるリン脂質は水に懸濁すると袋状の膜構造(リポゾーム)をつくることが知られ、この人工膜を用いて多数のモデル実験が行われてきている。これに反して、植物の光合成膜の主要成分であるガラクトリピド・スルフォリピドが袋状構造をつくるか否かについては知られていない。もしこれらの植物脂質が袋状の膜構造をとるならば、チラコイドのモデルとして興味深いものとなるであろう。

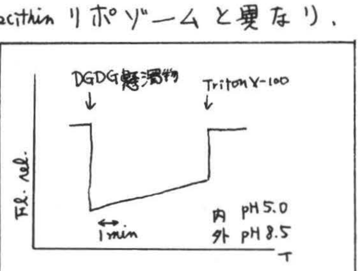
そこで、今回、ホウレンソウの葉緑体からモノガラクトシルジグリセリド(MGDG)・ジガラクトシルジグリセリド(DGDG)・スルフォキノヴォシルジグリセリド(SL)を *Allen et al.* の方法で抽出し、リポゾーム生成の有無を観察した。リポゾーム生成の確認のため、電子顕微鏡写真・膜内外のpH差による 9-aminoacridine 螢光消光・アスコルビン酸のとじこめ・グルコースとじこめを観察した。

リポゾーム作製は次のように行った。脂質のクロロフォルム溶液からクロロフォルムを蒸発させ、緩衝液を加え激しく振盪した。

①電子顕微鏡観察：　リン酸緩衝液中の脂質懸濁物を ammonium molybdate 液と混合し、carbon support film 上に噴霧した後、観察した。MGDGは袋状構造をとらないが、DGDG・SLは袋状構造を示した。

次に、実際に、以上の袋構造が閉じているかを検討した。

②膜内外のpH差による 9-aminoacridine 螢光の消光：　葉緑体などの実験で確められているように、袋状脂質膜の内外にpH差がある時、9-aminoacridine 螢光は消光される。そこで、今回用いた脂質を Sucrose－リン酸緩衝液中に懸濁し、これを 9-aminoacridine 溶液中に加え螢光消光を観察した。DGDG・SLの懸濁物は 9-aminoacridine 螢光を消光した。消光は時間とともに減り、egg lecithin リポゾームと異なり、若干漏れがあることを示している。(右図参照)



9-aminoacridine 螢光 消光

③アスコルビン酸のとじこめ：　袋状構造内にアスコルビン酸がとじこめられるかを観察した。cyt c の還元を目安に測定した。DGDG・SLの場合、やはりアスコルビン酸がとじこめられることが観察された。

④グルコースのとじこめ：　グルコースを膜の内側にいれ、グルコースオキシダーゼを用い酸素電極で観察した。DGDG・SLの懸濁物はグルコースを閉じこめると判断された。このときも若干グルコースの漏れが観察された。

結論　A．MGDGは袋状膜構造をつくらない。

B．DGDG・SLは閉じた袋状構造をつくるが、egg lecithin リポゾームとくらべて、H^+・アスコルビン酸・グルコースが漏れやすい。

シンポジウムII－3　　膜脂質の流動性と光合成・低温感受性

村田紀夫・小野高明・佐藤直樹（東大・教養・生物）

原核生物に属するラン藻はその細胞が葉緑体と類似した膜系を持ち，膜脂質の流動性と光合成の温度依存性との関係を研究するのに適した実験材料である。我々が用いている *Anacystis nidulans* は低温感受性を示すラン藻として知られている。すなわち，0°Cに近い低温に曝すと数分間で光合成の失活，吸収スペクトルの変化がおこり，最終的には細胞の死滅に至る。

一般に生体膜の脂質二重層を形成する脂質（流動脂質）は生理条件下では液晶状態にあり，温度を下げてゆくと相分離状態になる。この相分離状態の開始温度（以下これを相転移温度と呼ぶ）を *A. nidulans* のチラコイド膜について物理的方法（スピンプローブを用いたEPR[1]，クロロフィル蛍光の測定[2]，熱測定，フリーズフラクチャー電子顕微鏡法）によって研究したところ，相転移は38°C培養の細胞では24°C附近，28°C培養の細胞では13°C附近でおこることがわかった。

光合成の温度依存性はこれらの相転移温度で特異点を示し，それ以下の温度で活性は著しく低下した[1]。光合成の部分反応では，光リン酸化反応が最も顕著に相転移の影響を受けた[3]。このことは，膜が相分離状態になるとイオンがリークし，ΔpHや膜電位を保つことができなくなることに原因しているように思われる。事実，ΔpHに依存するクロロフィルの遅延蛍光は相転移温度以下で著しく弱かった[4]。これに対して，電子伝達反応は膜脂質の相転移の影響をあまり受けなかった[3]。

A. nidulans の低温感受性はチラコイド膜の相転移温度よりも低い温度でおこった。光合成，1,4－ベンゾキノンのヒル反応，カロチノイドの吸収スペクトルに対する低温感受性の臨界温度は38°C培養の細胞で12°C，28°C培養の細胞で4°Cであった。また，K^+イオンやアミノ酸がこれらの臨界温度より低い温度で細胞内からリークすることもわかった。フリーズフラクチャー電子顕微鏡法では，これらの臨界温度以下で原形質膜が相分離状態になることがわかった。これらの事実から，低温感受性は，原形質膜が低温で相分離状態になり，細胞内の低分子溶質が細胞外に流出し，その結果，細胞が健全に機能しえなくなることに原因していると結論される。

チラコイド膜と原形質の相転移温度はいずれも生育温度に依存して変化した。これは，膜脂質の脂肪酸組成が生育温度に依存して変化する事実と関連しているらしい。*A. nidulans* に存在する４種の脂質では，低温で培養すると脂肪酸の不飽和度が増加し，同時に脂肪酸の鎖長は減少した[5]。人工膜の研究から，脂肪酸のこのような変化は膜をより流動的にすることが既に明らかにされている。しかし厳密な議論をすれば，相転移温度は，最も高い相転移温度を示す脂質分子種によって支配されているはずである。この点に関する研究の成果も報告する予定である。

高等植物の低温傷害とラン藻の低温傷害との相異点についても言及する。

文献　(1) Murata, Troughton and Fork, Plant Physiol. 56(1975) 508－517.　(2) Murata and Fork, Plant Physiol. 56(1975) 791－797.　(3) Ono and Murata, BBA 545(1979) 69－76.　(4) Ono and Murata, BBA 460(1977) 220－229.　(5) Sato, Murata, Miura and Ueta, BBA 572(1979) 19－28.

シンポジウムII－4　　高等植物のチラコイド膜の脂質と相分離

星名 哲 （金沢大・理・生物）

光合成器官の諸活性のアウレニウス・プロットはある温度で折れ曲ることが知られている。これはラン藻 <u>*Anacystis*</u> <u>*nidulans*</u> などで詳しく調べられ，膜脂質の液晶状態から相分離状態への物理的転移に原因することが明らかにされている。しかし，高等植物の葉緑体では直接的根拠に乏しく，機能的パラメーターと膜脂質の熱的相変化との関連性が充分明らかにされていないので，以下のような研究を行った。

1．脂質の流動性に影響をおよぼす試薬の添加

人工膜脂質の相転移温度を上昇，あるいは下降させる種々の試薬が知られている。ジメチルサルフォオキシド（DMSO）はホスファチジルグリセロールの相転移温度を大巾に上昇させるが，ホスファチジルコリンのそれにはあまり影響しないと報告されている。そこでプチトマト（金沢大学キャンパスで栽培）の葉緑体のアウレニウス・プロットにおよぼすDMSOの添加効果について調べた。フェリシアン化カリ光還元活性のアウレニウス・プロットは17～20°Cに活性化エネルギーの変化する点が見られるが，反応液に2.5％のDMSO（最終濃度）を加えると折れ曲り点はコントロールに比べ，約2°C高くなった。DMSOの濃度を5％にしても同様に上昇が認められたが，10％のDMSOを加えると6～38°Cの間で折れ曲り点は見られなくなった。このことは活性化エネルギーの変曲点がDMSOにより38°C以上に上昇させられたのではないかと示唆される。P-フェニルベンゾキノンを電子受容体として用いた酸素発生活性のアウレニウス・プロットはフェリシアン化カリの光還元活性とほぼ同じ温度で活性化エネルギーの変化する点が見られた。しかしこの温度は10％DMSOでさえも全く影響されなかった。

2．脂質を置換した再構成チラコイド膜

ホウレンソウの葉緑体を表面活性剤の一種であるリゾフォスファチジルコリン（LPC）とインキュベートし，つづいてホスファチジルコリンのリポゾームと更にインキュベートすると，葉緑体脂質の約50％がホスファチジルコリンと置換した活性ある再構成膜を調整することが出来た。トマト（金沢市近郊の農家の温室で栽培）の葉緑体もLPCで可溶化後ホスファチジルコリンを添加すると，失活していたフェリシアン化カリ光還元活性が活性化されるので，脂質の置換が同じように行われているものと考えられる。そこでこのような方法でジパルミトイル・フォスファチジルコリン（相転移温度：41°C）で置換したトマトの再構成チラコイド膜のフェリシアン化カリ光還元活性のアウレニウス・プロットを求めた。その結果，未処理葉緑体では11～12°Cに活性化エネルギーの変曲点が認められたが，再構成膜ではそれよりも5～8°C高温側に上昇していた。

これらの結果はプチトマトおよびトマトの葉緑体の電子伝達活性のうち，少くともフェリシアン化カリ光還元活性は膜脂質の熱的相変化の影響を受けているということを示している。

シンポジウムII－5　　クロレラの耐凍性獲得に伴う脂質変化

°花田聖孝，波多野昌二　（九大・農・食化工）

植物に耐凍性，耐寒性を付与することは，農産物の安定生産，長期保蔵に資するところ大であるが，耐凍性獲得の機作に関しては，なお不明な点が多い。凍結障害のprimary siteは膜系であると考えられるので，膜組成の変化およびこれを惹起する脂質代謝について研究を行った。

Chlorella ellipsoidea Gerneck, IAM C-27は25°Cで培養すると耐凍性は無く，凍結によって死滅するが，3°Cで低温処理(hardening)すると，冷却速度が緩慢な条件で，液体窒素温度の凍結にも生存し得るような耐凍性を獲得する。この株を同調培養して得られる半成熟期(L_2-stage)の細胞が，最も高い耐凍性獲得能を示したので，これを実験材料とした。L_2細胞は，hardeningにより，細胞あたりの乾燥重量，藻体容積が約1.5倍となり，糖脂質は約1.6倍，リン脂質は約3倍に増加した。また，蛋白質あたりの脂質も約1.4倍に増加し，耐凍性増大に伴って，細胞は肥大するとともに，lipid richな状態に移行することが明らかになった。

また，hardeningにより，非極性脂質の著しい増加が認められた。各種代謝阻害剤を用いた実験より，この脂質が合成されない場合は，耐凍性が獲得されないことを明らかにするとともに，その成分として，4種の脂肪酸(パルミチン酸，オレイン酸，リノール酸，リノレニン酸)を同定した。電顕観察の結果，hardeningに伴い，細胞質膜に沿って，lipid body様顆粒が著しく増加した。上記脂肪酸は，この顆粒の消長とも相関が認められた。また，この脂肪酸画分への^{14}C-$NaHCO_3$の取り込みは，粗膜画分(9,000 xg p.p.t.)への取り込みよりも遅く，過剰の脂肪酸がlipid body様顆粒として漸次蓄積されていると推察される。

耐凍性獲得に伴う各膜画分の構成脂肪酸組成の変化を検討するため，細胞内顆粒の分画を行い，各膜画分の脂肪酸組成を分析した結果，hardeningにより，脂肪酸不飽和度の増大が認められた。

光照射下での，^{14}C-$NaHCO_3$によるpulse-chase実験から，全脂質への^{14}Cの取り込み率は，hardening初期にいったん低下した後，再び促進された。この促進される取り込みは，cycloheximideにより阻害されたが，DCMUでは阻害されなかった。また，遮光下での，^{14}C-glucoseの全脂質への取り込み率は，hardeningにより増大した。したがって，低温下では，chloroplast主体の脂肪酸合成系からcytoplasm主体の脂肪酸合成系への移行が示唆された。このことは，hardening中の，acetyl-CoA carboxylase，glucose-6-phosphate dehydrogenase，6-phosphogluconate dehydrogenaseの活性変動の結果からも支持された。

これらの結果から，*Chlorella ellipsoidea*の耐凍性獲得には，chloroplastの機能低下に代わる，cytoplasmでの脂肪酸合成系の活性増大が必要であり，合成された脂肪酸は，膜構成脂肪酸として，一部膜系に組み込まれ，凍結下にも生存し得るような耐凍構造の形成に寄与し，残りは，lipid body様顆粒として細胞内に蓄積されると考えられる。

シンポジウムII－6　植物細胞の凍結融解とホスホリパーゼD

吉田静夫（北大・低温研）

ホスホリパーゼDは植物界に広く存在するリン脂質分解酵素のひとつである。これまでにピーナッツやキャベツから可溶性酵素が分離され分子量はそれぞれ20万および11万前後と報告されている。一方、クロロプラストやミトコンドリアを除く膜画分に不溶性のホスホリパーゼDが存在することも報告されている。植物組織をエーテルやメタノールと共に磨砕するとPCやPEの著しい分解が起きることは古くから知られ、その活性は極めて高く植物細胞から膜画分を調整する場合その活性をいかに抑えるかが重要かつ深刻な問題である。

植物細胞が凍結によって傷害されるときにもホスホリパーゼDの活性が高まり膜リン脂質の著しい分解が起ることが知られている。この反応は凍結中(-5～-25°C)にすでに進行し、融解後著しく加速される。このことは、細胞外凍結による細胞の脱水収縮時にホスホリパーゼDの活性に変化を与えるようなある種の引金がひかれることを示唆している。このことは植物細胞の凍結傷害のしくみを解明する上で重要である。細胞が凍結されたときホスホリパーゼDが働き出すしくみとして、①可溶性酵素の細胞内正画の変化、②細胞内のpHの低下、③活性に影響するCa^{2+}の細胞内分布の変化、④酵素あるいは基質の変化による活性制御の変調などが凍結によって影響されることが考えられる。

材料として用いたニセアカシアの皮層細胞では、ホスホリパーゼDは可溶性および不溶性の画分に分布している。不溶性画分の酵素は凍結融解、超音波処理、KCl処理などで可溶化されず、SDSによってはじめて可溶化された。マイクロゾーム膜画分ではER小胞やK^+で促進されるpH 6.1 ATPaseをもつ膜画分において比活性が高いことがわかった。以後の実験はマイクロゾーム膜画分を用い、内生基質(PC)の分解に対する膜結合ホスホリパーゼDの性質を調べた。その結果、膜結合ホスホリパーゼDはCa^{2+}およびMg^{2+}によってその活性が調節されている可能性が示され、植物材料の耐凍性の大きさや凍結処理によってその活性制御機構が著しく影響されることが明らかにされた。膜結合ホスホリパーゼDの膜リン脂質に対する分解活性にくらべて、ニセアカシアから部分精製された可溶性ホスホリパーゼDのそれへの寄与は小さいことがわかった。このように、植物細胞の凍結によるホスホリパーゼDの活性化は膜における酵素の結合様式が凍結によって変化するためにその活性制御に変調をきたすためと推論される。細胞内のホスホリパーゼDの分布を更にくわしく検討中で、殊に凍結傷害の主要な場としての細胞膜中での存在とその活性について調べている。また、膜脂質の相分離などの物理化学的な性状の変化とホスホリパーゼDの活性との関連について検討を進めている。

シンポジウムⅡ－7　　葉緑体膜脂質の存在状態と機能

平山 修°，森田耕吉 （島根大・農化）

葉緑体チラコイド膜が流動モザイクモデルを基本構造としていることは広く認められているが，個々の脂質成分の分布，存在状態，膜機能との具体的かかわりあいなどについての情報はきわめて乏しい。われわれは葉緑体を外来の脂質アシル水解酵素で処理し，膜脂質の分解性，処理葉緑体の機能を調べることによって葉緑体膜脂質の存在状態ならびに機能を考察した。

1．葉緑体脂質の酵素的分解に関連する諸因子　葉緑体の酵素処理に使用した馬鈴薯ガラクトリパーゼは，葉緑体構成脂質のガラクト脂質，スルホ脂質およびリン脂質のいずれにも作用した。これら脂質の単一基質に働く場合は分解速度に差異がみられるが，混合基質に働く場合はその差異はかなり減少した。葉緑体の酵素処理液に塩を加えると葉緑体のグラナ形成が促進され，酵素の反応性が低下した。牛血清アルブミン（BSA）の添加は同様にグラナ形成を促進して酵素の反応性を低下させるが，生成する遊離脂肪酸を吸着除去するため部分的脱脂質葉緑体の調製を可能にした。また，本酵素は0°C－40°Cの広範囲で働くため，低温における葉緑体の酵素処理が可能であった。

2．葉緑体チラコイド膜の脂質二重層における外層脂質と内層脂質　葉緑体ラメラ膜は複雑であるが，膜を膨潤させグラナ構造をもたない状態にししかも膜骨格がこわれない条件（6°C，0.4Mショ糖；塩，BSAは除く）で酵素処理すると外層脂質が優先的に分解される筈である。実験結果は脂質分解率が37％，分解された脂質の大部分はMGDGであり少量のSQDG，PGが含まれていた。この結果および他の実験結果より，外層脂質の主成分はMGDG，内層脂質の主成分はMGDG，DGDGであることを推測した。また，この脂質分布はinside-out膜，right-side-out膜の酵素処理によっても検討された。

3．葉緑体チラコイド膜における流動脂質と結合脂質　葉緑体ラメラ膜を膨潤させ20°Cあるいは30°Cで酵素処理すると，90％前後の脂質は急速に分解されるが長時間処理でも分解されない脂質の存在が認められる。これは存在状態の異なる流動脂質と結合脂質の存在を示唆している。この結合脂質の存在は系Ⅰ・系Ⅱ粒子を酵素処理することによってより明確に観察された。系Ⅰ粒子に結合する脂質の主成分はMGDG，DGDGであり，系Ⅱ粒子に結合する主脂質成分はPGであった。これら結合脂質の構成脂肪酸は相当する流動脂質のそれとある程度異なり，結合脂質の分子種的特徴が伺われた。

4．チラコイド膜脂質の機能　膜構成脂質の機能はその存在状態によって異なる。流動脂質を酵素的に分解除去すると，電子伝達活性はなおかなり保持されているがプロトン輸送能，光リン酸能は大きく低下した。さらに結合脂質を分解すると電子伝達活性が大きく低下した。また，葉緑体および系Ⅰ粒子の酵素処理ではフェレドキシン-NADP還元酵素が遊離され，機能タンパク質の膜結合が脂質成分と密接に関連していることが示唆された。

シンポジウムⅡ－8　　植物オルガネラ膜間の脂質転移

○田中利典、大西純一、渡辺紳一郎、山田晃弘(東大・教養生物)

植物のミトコンドリア(MT)、および葉緑体は、リン脂質(PL)合成酵素(MTのPG合成酵素を除く)を欠くので、両オルガネラ膜の組成PLは小胞体から供給されるものと思われる。この考えから、オルガネラ膜間のリン脂質交換タンパク質(PLEP)が哺乳動物におけると同様、植物にも存在することが想定された。我々は、PL合成の活発な発芽ヒマ胚乳サイトゾルから、ミクロソーム(MC)とMTとの間におけるPLの交換を促進するPLEPを単離した。すでに、SephadexG-100精製により、PCを特異的に転移するPLEPを分画した[1,2]が、その後、DEAE-Sepharose CL-6B, Sephacryl S-200により精製したところ、PL中のPCのみならず、PIを特異的に交換促進する画分が得られたので、その結果を報告する。

［材料と方法］ PLEPの活性測定には、2種類のリポソーム(donor liposome(dLS), acceptor liposome(aLS))を、ConAを利用して分離する方法を用いた。dLS, aLSの調製：dLSは卵黄PC 50μg, ^{14}C-PL 50μg(6000dpm), cholesterol(ch) 20μg, ^{3}H-ch少量, また、aLSは、卵黄PC 100μg, ch 20μg, dimannosyl diglyceride 約5nmolから、C.Hungの方法に従って調製した。測定及び転移率：dLS, aLS、及び、PLEPを含む反応液(500μl)を30°Cで15分間保温した後、50μlのCon A(500μg)を滴下し、ConAと結合沈澱したaLSをdLSから遠心分離した。転移率は両画分から測定した放射能より次のようにして求めた。転移率(%)=(反応後のaLSの放射能/反応前のdLSの放射能)×100。また、この転移率には、遠心分離によるaLS画分へのdLSの混入、及び、反応後のaLSの損失による補正を加えた。

［結果］ 前報と同様に、PLEPは、ヒマ胚乳サイトゾル(105000g上澄)をpH5.1処理して得られた上澄、さらに、75%硫安飽和塩析画分に分画された(下表)。この硫安画分をDEAE-Sepharose CL-6B(φ40mm×220mm)にかけ、NaClの濃度勾配(0~0.3M)で溶出したところ、PLEP Ⅰ(NaCl 0.08M)、Ⅱ(NaCl 0.12M)に分離した。両画分により転移された脂質の種類をTLCで調べると、PLEP Ⅰ はPIを特異的に転移させ、PLEP Ⅱ は、主にPCの転移を促進するが、さらに、PE or PGをも転移促進している可能性があることがわかった。また、PLEP Ⅱ 画分をSephacryl S-200によってさらに精製すると、PLEP Ⅱa~Ⅱeの5つの活性画分が得られた。各画分を再度Sephacryl S-200によって精製分画して得られたPLEPの比活性を下表に示す。この中で、最も比活性の高いⅡc画分は、PC転移特異性を有し、比活性は734units(μgPL/mg pro, 15min)を示し、pH5.1処理上澄PLEPの約100倍の比活性をもつ。現在、これらのPLEPの精製を進めると共に、各画分のPL転移特異性を検討中である。

なお、植物MT及び葉緑体の膜形成ないしは維持におけるPLEPの役割についても論じたい。

	MCからMTへの転移		LS間の転移		
	比活性	精製度	比活性	精製度	特異性
pH5.1 sup	6.2	—	7.1	—	
$(NH_4)_2SO_4$ ppt	32.1	5.2			
DEAE-Sepharose CL-6B			Ⅰ 73.4	10.3	PI
			Ⅱ 81.7	11.5	PC, (PE or PG)?
Sephacryl S-200 → [Sephacryl S-200]			Ⅱa 144 [	7.2 [ ]	PC
			Ⅱb 122 [400]	17.2 [56.3]	
			Ⅱc 288 [734]	40.6 [103]	
			Ⅱd 252 [316]	35.5 [44.5]	
			Ⅱe 154 [183]	21.7 [25.8]	

(Ref.) 1) P.C.P. 19, 173~176 (1978) 2) P.C.P. 20, 533~542 (1979)

Abbreviation: PC, Phosphatidyl chorine, PI, Phosphatidylinositol, PG, Phosphatidylglycerol, PE, Phosphatidylethanolamine, ConA, Concanavalin A

第１日　４月６日(日)

Ａ 会 場

光合成 Ⅰ

1A-1

フィコエリトリン合成光調節と光可逆的吸収変化を示す色素蛋白の関係

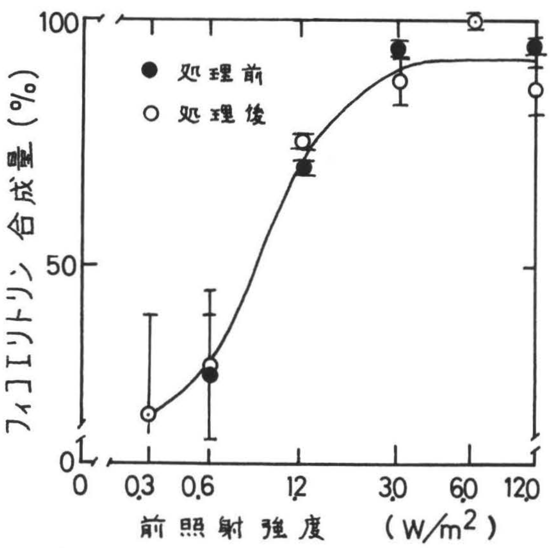
°大城 香・藤田 善彦 （東大・海洋研）

我々は Tolypothrix tenuis のフィコビリン合成系が赤色光と緑色光で相互変換する光受容体により制御される可能性を示してきた。一方 Scheibe は T.tenuis のフィコビリン蛋白分画から，赤色光と緑色光照射により吸収スペクトルが可逆的に変化する色素蛋白を見出し，その吸収変化極大（520, 650 nm）がフィコビリン合成光調節の作用スペクトル極大と似ていることから，この色素が光受容体であろうと報告している。我々は T.tenuis で同様の光可逆的吸収変化を示す色素蛋白の細胞内含量が生育条件で異り，窒素欠乏条件で含量の増加がみられることを明らかにした。今回はこの色素蛋白が生体内で光受容体としての機能を有するかどうかを検討する目的で，色素蛋白含量の異る T.tenuis の細胞を用いてフィコエリトリンの光誘起合成を調べた。吸収変化を示す色素蛋白含量の多い細胞は，正常に生育した細胞を強光低温（15 w/m²・20°C・48hr）処理して得た。表1は，細胞よりScheibeの方法で抽出したフィコビリン蛋白分画で測定した赤色光，緑色光照射による可逆的吸収変化量で，正常に生育した細胞では吸収変化を示す色素蛋白が検出できないが，強光・低温処理した細胞でその含量が著しく増加することを示している。フィコビリン合成の光制御が，光可逆的吸収変化を示す色素蛋白含量に依存するかどうかを調べるため，強光・低温処理を行った細胞と，正常に生育した細胞に強度の異った緑色光の前照射を（5分）行い，照射後暗所で50時間従属栄養的に生育させ合成されたフィコエリトリン量を測定した。図1はフィコエリトリン合成量（相対値）の光強度依存性を示したもので，光可逆的吸収変化を示す色素蛋白の含量が少い細胞（図1, —●—）と多い細胞（図1, —○—）でフィコエリトリン暗合成の示す緑色光々強度依存性に差はみられなかった。この結果は，光可逆的吸収変化を示す色素蛋白がフィコエリトリン合成の光誘起現象の光受容体であるという考えを直接否定するものではないが Scheibe の仮説は更に慎重に吟味する必要のあることを示すものといえよう。なおここで用いた前照射の光強度範囲では，クロロフィル合成は有意な影響をうけなかった。

（表1）

可逆的吸収変化 ($\Delta A_{650-700}/A_{650}$)	
処理前	処理後
<0.0003	0.0017±0.0001

（図1）



1A-2

Porphyra yezoensis 色素変異体における光合成色素系

°John E. Merrill,* 三室 守, 有賀 祐勝*, 藤田 善彦
（東大 海洋研，*東水大）

紅藻スサビノリ（*Porphyra yezoensis*, Ueda）には，野生型の他に，フィコビリン色素の相対含量を異にする三つの色素変異株がある（図1，赤色型，緑色型，黄色型）。我々は，これらの変異株の光合成色素の機能について，(1) 液体窒素温度での蛍光の発光及び励起スペクトル，(2) 単色光照射下での酸素発生の相対量子収率，の二点から比較，検討を行なった。

蛍光スペクトルは，全ての変異藻株とも野生型同様，色素系IIクロロフィルa（PSII Chl a）由来の685, 695 nm蛍光，色素系Iクロロフィルa（PSI Chl a）由来の725nm蛍光が観察され，パターンには，異なりはない。PSI Chl aの励起には，全ての藻株において，Chl a，フィコビリン蛋白の双方に吸収される光が有効で，相対量子収率は，400－600nm の波長領域でほぼ一定であった。一方，PSII Chl aの励起スペクトルは，各々の藻株に特有のフィコビリン蛋白の吸収スペクトルとほぼ一致した。Chl a Soret帯のフィコエリスリン極大に対する蛍光の相対量子収率は，いずれの株でも，約0.15という低い値であった。

単色光照射下での酸素発生の相対量子収率を，563nm光（主として，フィコエリスリン励起），678nm光（主としてChl a励起）を用いて測定した。その結果，全ての藻株について，563nm光照射に対する678nm光照射の相対量子収率は，0.23～0.33と著しく低く，顕著なRed-drop現象が認められた（表1）。

これらの結果は，スサビノリの色素変異株は，単にフィコビリン蛋白含量を異にするのみで，低フィコビリン含量株においても野生型と同様に，全Chl aに対するPSII Chl a量の割合が小さい事を示し，フィコビリン蛋白含量の変化に伴う二つの色素系におけるChl aの機能的分布には，変化のないことを示唆している。

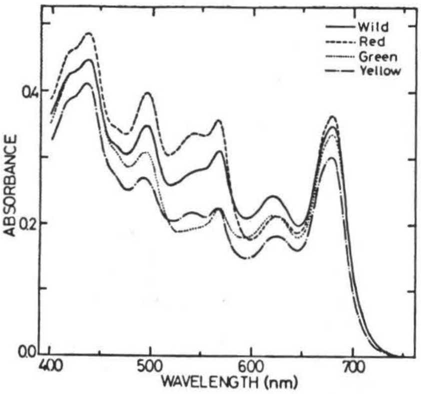


図1，スサビノリ色素変異株の吸収スペクトル

表1，スサビノリ色素変異株における酸素発生の相対量子収率

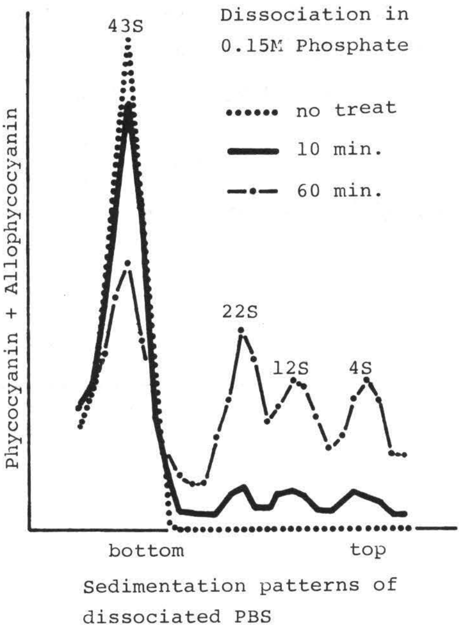
	Wild	Red	Green	Yellow
ϕ_{678}/ϕ_{563}	0.23	0.26	0.26	0.33

1A-3 フィコビリゾーム(PBS)解離過程であらわれる亜粒子について

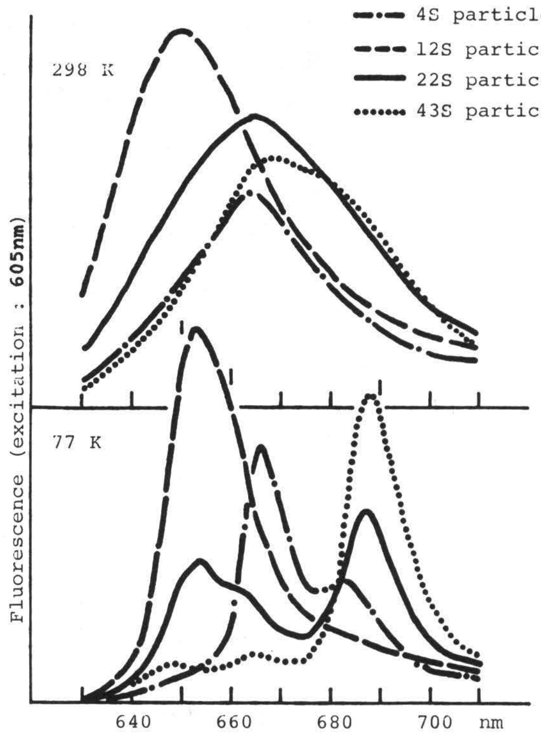
久米直明・磯野高敬・加藤哲也 (京大・理・植物)

ラン藻 *Anabaena variabilis* のフィコビリゾーム(PBS)は長さ約50nmの棒状(43S)で、ドーナツ型サブユニットの会合体である(磯野・加藤 植物学会1979)。PBSにおけるサブユニット集合の様相を明らかにするため、解離の過程であらわれる亜粒子の性質を調べた。

PBSはGanttらの方法で調製したもので、通常フィコシアニン(PC):アロフィコシアニン(APC)の比は1.5~2:1(重量比)である。PCに吸収されるような光を照射するとこのPBSは常温で665nm以外に680nmに、液体窒素温度では685nmにそれぞれ螢光を発するが、この長波長発光型のAPCは、PBSが光合成膜に附着する部位に存在すると考えられる。PBSは高濃度(0.75M)のリン酸塩中では会合状態を保つが、リン酸塩の濃度が低くなると665nm, 680nmの螢光の減少と650nm螢光(PC由来)の増大がはじまる。PCに吸収された光が長波長発光型APCまで転移されなくなり、中間の色素から螢光として失われるためである。このような螢光状態の標品の粒子分布を0.75Mリン酸塩中の密度勾配遠心で調べたのが下図左で、解離の進行とともに22S, 12S, 4Sのバンドがあらわれる。いずれのバンドも幅はせまく、PBSの解離で開裂する位置は特定していることを示す。22Sバンドは液体窒素温度で明瞭な685nm螢光を示し、PBSの膜側端末を含むと思われる。しかしこのバンドのPC/APCの比は2~3で、PBSの膜側に近い色素(APC)がこの粒子に濃縮されているとはいえず、また解離に際してPCとAPCの間で最初の開裂がはじまるのではないことを示している。



Sedimentation patterns of dissociated PBS



Fluorescence spectra of subparticles

1A-4　光捕捉クロロフィルa/bタンパク質でのクロロフィルの分子配列

嶋田誠一、高橋正昭、浅田浩二（京大・食研）

光捕捉クロロフィルa/bタンパク質（LHCP）は葉緑体中で光化学系IIの周辺にポリマーとして存在しその励起エネルギーは最終的に光化学系IIの反応中心へ転移される。Thornberらの方法によってホウレンソウ葉から得られるLHCPは水溶液中ではモノマーとテトラマーとの解離ー会合の平衡状態にありモノマーはテトラマーよりも蛍光収率が高い。クロロフィル分子間の励起エネルギー転移は共鳴機構によってなされその効率は励起エネルギーを供受する分子間距離の6乗に反比例する。モノマーがテトラマーよりも蛍光収率が高い理由はLHCPの解離によってクロロフィル分子間の距離が延長しその結果クロロフィル分子間の励起エネルギー転移効率が低下したためと考えられる。

ところで我々は昨年、テトラマー、モノマーおよび結合したクロロフィル分子数の少ないLHCPのクロロフィルの光酸化効率について検討しテトラマー、モノマー、結合したクロロフィル分子数の少ないモノマーの順に光酸化効率が増加することを明らかにし、これはクロロフィル分子間距離の延長による励起エネルギー転移効率の低下によると推定した。ここではクロロフィル分子間の励起エネルギー転移の主要な役割を占めている共鳴移動機構についてのFÖRSTERの理論に基づき、テトラマー、モノマー、結合したクロロフィル分子数の少ないモノマーについてクロロフィル分子間距離を求めあわせて励起エネルギー転移効率について検討を行なったので報告する。

方法　LHCPはホウレンソウ葉緑体からSDSによって可溶化しヒドロキシアパタイトクロマトグラフィーおよび硫安分画を用いて精製した。結合したクロロフィル分子数の少ないLHCPはECTEORA celluloseにLHCPのクロロフィルを分配させることによって調製した。クロロフィル分子間の距離およびエネルギー転移効率はLHCPの吸収スペクトルと標準蛍光物質として4ージメチルアミノー4'ーニトロスチルベンおよびキニーネを用いて補正した蛍光スペクトルからFÖRSTERの理論を用いて求めた。

結果　光酸化効率の高いモノマー、結合したクロロフィル分子数の少ないモノマーではテトラマーに比べてエネルギー転移効率が低くこの時テトラマーに比べモノマーでは～50％、結合したクロロフィル分子数の少ないモノマーでは～70％クロロフィル分子間の距離は延長している。これらのことはクロロフィル分子間距離が延長しエネルギー転移効率が低下するとクロロフィルが光酸化されやすいことを示している。これらの知見をもとに葉緑体内で効率のよい励起エネルギー転移を行うためのLHCP分子間の関係およびクロロフィル分子のLHCP内での配列について考察を進めたい。

1A-5

光捕捉クロロフィルa/bタンパク質の光酸化機構の光音響による研究

○嶋田誠一、高橋正昭、浅田浩二 (京大・食研)

先に演者らは 光捕捉クロロフィルa/bタンパク質(LHCP)のクロロフィルの光酸化効率と蛍光収率の関係から クロロフィル分子間の励起エネルギー転移効率が高い程、光酸化効率が低くなることを明らかにした。単離したLHCPの場合、クロロフィルによって吸収された光エネルギーは 蛍光として再放出されるか、無輻射的に緩和して熱として放出されると考えられる。

そこで本研究では クロロフィルの光酸化効率と無輻射的な緩和による発生熱量との関係を明らかにし LHCPのクロロフィルの光酸化機構の解明を図った。

材料と方法 材料はホウレンソウ葉緑体をSDSによって可溶化し、ヒドロキシアパタイト クロマトグラフィーおよび硫安分画によって精製したLHCPを用いた。光照射時の熱の発生は 光音響法によって測定した。測定は以下の様に行なった。光源から照射される閃光(3 μsec)をフィルターを通して650 nm以上とし サンプルチェンバー内のLHCP溶液に照射する。サンプルチェンバーは気密な容器であり その内部に装着されたマイクロフォンによって照射後〜50 msecに発生する音波を検出した。測定は50〜200回繰り返し、コンピューターによって平均化および同様の操作によるブランクの差し引きを行なった。

結果 以上の操作によって 光照射時のLHCPからの熱発生が検知された。クロロフィル量として 3〜15 μg/mlの濃度のLHCPからの光音響シグナル(PAS)は光照射直後最大となり 以後一次的に減衰した($t_{1/2}$ = 〜3.5 msec)。サンプルチェンバー内の気相が空気の場合 LHCPのテトラマーからのPASは モノマーのそれよりも小さいが 気相がアルゴンの場合 逆にテトラマーのPASが大きくなった。LHCPのクロロフィルの光酸化には クロロフィルの自己増感によって生じる一重項酸素が関与しており モノマーの光酸化効率はテトラマーの3倍高い。これらの結果から サンプルチェンバー内の気相に酸素が存在する場合 生成した一重項酸素によるクロロフィルの光酸化反応から発生する熱をも検知する可能性があり、気相に酸素がない場合は無輻射的な緩和によって発生する熱のみが検知され得ること、またその様な過程での熱発生は モノマーよりもクロロフィル分子間距離が短かく励起エネルギー転移効率の高いテトラマーの方が大きいことが 明らかになった。

以上の結果から クロロフィル分子間の励起エネルギー転移効率が高い程、光酸化効率が低い理由は 励起エネルギー転移効率が高い場合 無輻射的緩和による熱発生により過剰の励起エネルギーを放出しやすいが 逆の場合には 過剰の励起エネルギーが放出されにくく そのため クロロフィルの自己増感酸化反応が起りやすくなるためと考えられる。

1A-6

好熱性ラン藻のクロロフィルタンパク質

小池裕幸、高橋裕一郎、佐藤和彦、加藤栄　（東大・教養・基礎）

小川らがチラコイド膜をSDS（Sodium dodecyl sulfate）で可溶化し、ポリアクリルアミドゲル電気泳動（PAGE）で分離することにより2種類のクロロフィルタンパク質複合体を得て以来、多くの研究がクロロフィルタンパク質について報告されている。最近では種々の技術の改良が試みられて、より多くの種類のクロロフィルタンパク質が分離されるようになった。しかしラン藻では高等植物の集光性クロロフィルa/bタンパク質（LHCP）が含まれておらず、比較的単純な泳動パターンしか得られていない。現在でもラン藻Phormidiumについて3つのクロロフィルタンパク質を含むバンドが分離されているに過ぎない。本研究で使用したラン藻Synechococcus sp.は高度の好熱性を示し、それから分離したタンパク質もチラコイド膜も、ともに熱に安定であるため、チラコイド膜の構造を機能と関連させて調べる上で特異な有利さを持つ材料である。今回は本ラン藻のチラコイド膜のSDS-PAGEにより、多くのクロロフィルタンパク質の分画を得ることができることを見出したので報告する。

本ラン藻のチラコイド膜はSDS-PAGEにより少なくとも7本の、分子量の異なるクロロフィルタンパク質を含むバンドに分けることができる。これらのクロロフィルタンパク質の泳動パターンはチラコイド膜を可溶化する時間、可溶化する際のSDSとクロロフィルの比、泳動する時間によって変化するが、これらのクロロフィルタンパク質の出現の再現性は高い。分離された7本のクロロフィルタンパク質の見掛けの分子量はそれぞれ300kd（キロダルトン）、240kd、125～95kd、65kd付近に2本及び40～50kd付近に2本であった（分子量は泳動条件で多少異なるため、これらの値はあくまで相対的なものである）。そのうち、分子量125～95kdに分布する幅広いバンドは幾つかの、分子量が非常に接近したクロロフィルタンパク質の集まりであり、その成分の正確な数は不明である。このバンドと300kd，240kdのバンドの間には、より強い処理により高分子量のバンドが減少し低分子のものが増える傾向が見られた。またこれらのクロロフィルタンパク質にはP_{700}が存在しており、液体窒素温度での蛍光の発光スペクトルで720～730nmの発光体が存在する。従ってこれらはP_{700}-クロロフィルaタンパク質複合体（CPI）及びその会合体あるいは他のポリペプチドとの複合体と考えられる。事実その吸収スペクトルも、報告されているCPIとよく一致する。一方分子量65kd付近と50kd付近のクロロフィルタンパク質の吸収スペクトルと蛍光の発光スペクトルはともにより短波長にあり、P_{700}は検出できない。また、より大きなクロロフィルタンパク質に比べて量的にも少ない上にクロロフィルとの結合が弱く、それぞれ1本しか現われないことがある。そのいずれかが系IIクロロフィルタンパク質である可能性が考えられる。

以上のように多くのクロロフィルタンパク質を含むバンドが得られたのは、好熱性ラン藻のチラコイド膜ではそれぞれのクロロフィルタンパク質が安定であり、かつそれらの会合も常温性のものに比べより強固なためであると考えられる。

1A-7 ヨウシュヤマゴボウチラコイド膜からの系II色素蛋白複合体SP-II-2の可溶化とその精製

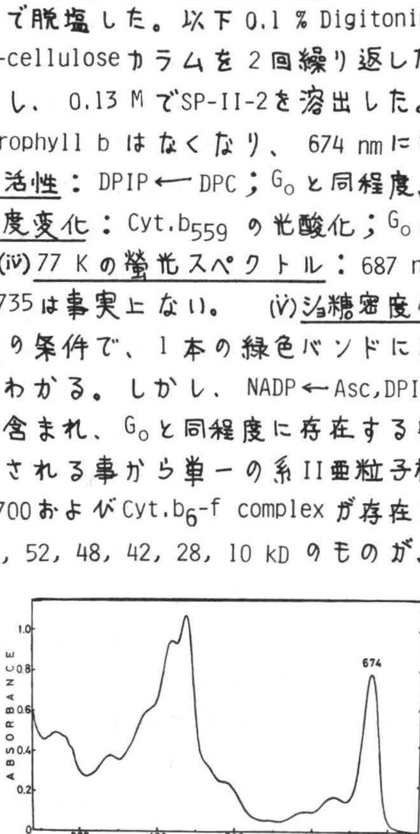
°堀内大介，藤茂 宏（岡山大・理・生物）

我々は、前報で、ホウレンソウ葉緑体のDigitonin抽出物から、DEAEセルロースカラムとBrushiteカラムを用いて、短時間に系II色素蛋白複合体（SP-II-2）を調製し得る事を示した。しかし、この方法は収率面で難点があった。そこでもっと収率よくSP-II-2を得るために、材料をヨウシュヤマゴボウに代え、Digitoninに加えてDeoxycholc と Cholateを併用し、可溶化条件・DEAEセルロースでの分離を検討した結果、chlorophyll b を含まず、NADP光還元活性を示さないSP-II-2が得られた。

（A）調製法の大要 (i) ヨウシュヤマゴボウ葉から25 mM Tris-HCl buffer (pH 7.2), 5 mM $MgCl_2$（以後このbufferをTMと称する）を用いて調製したチラコイド膜をG_oとした。 (ii) 第1回detergent処理：G_oをTMに懸濁し、0.4 % Digitonin, 2 mg Chl/ml, 4°C で4時間処理後、20,000 x g, 1 hrで集めた沈殿をAとする。 (iii) 第2回detergent処理：AをTMに懸濁し、1.2 % Digitonin, 0.24 % bile salts (Deoxycholate:Cholate = 4 : 1), 1.2 M KCl, 4~5 mg Chl/ml, 4°C で10～15時間処理後、100,000 x g, 1 hr上清を100,000 x g, 0.5 hr遠心し、得られた上清をB-SSとする。B-SSにはchlorophyll b はなくなり、NADP← Asc,DPIP 活性も消失する。 (iv) DEAE-celluloseカラム：B-SSを0.08 M Tris-HCl, pH 7.2 で平衡させたSephadex G-25で脱塩した。以下0.1 % Digitonin存在下で、Tris-HCl, pH 7.2の濃度を変化させDEAE-celluloseカラムを2回繰り返した。1回目は0.08 Mで、2回目は0.07 Mで吸着・洗浄し、0.13 MでSP-II-2を溶出した。

（B）SP-II- の性質 (i)吸収スペクトル：chlorophyll b はなくなり、674 nmに赤色部吸光極大、カロチノイドを含む。 (ii)光化学活性：DPIP ← DPC；G_oと同程度、FeCy ← DPC；G_oの6倍。 (iii)77 Kでの光誘起吸光度変化：Cyt.b_{559} の光酸化；G_oの3倍、C 550；G_oの4.5倍、X_{591}；G_oの3倍。 (iv)77 Kの螢光スペクトル：687 nmに発光極大があり、F 695はわずかな肩になり、F 735は事実上ない。 (v)ショ糖密度勾配遠心：0.1 % Digitonin 存在下にWesselsら(1973) の条件で、1本の緑色バンドになる。 —以上の事から系II亜粒子標品である事がわかる。しかし、NADP ← Asc,DPIP 活性はないが、P 700がChl 300分子に1個の割合で含まれ、G_oと同程度に存在する事、Cyt.b_6-f complexがDEAE-celluloseでcochromatographされる事から単一の系II亜粒子標品とは言いきれない。 (vi)ポリペプチド組成：P 700およびCyt.b_6-f complexが存在するために複雑だがintrinsicなpolypeptidesとして54, 52, 48, 42, 28, 10 kDのものが、決められた。54, 52 kDバンドは CF_1 ではない。

すなわちこのSP-II-2標品はPS-II complexが主体であるが、P 700を含むPS-I complexがNADP光還元、F 735を示さない形でaggregateしているのでないかと思われる。但し、Cyt.b_6-f complexは離す事ができるので、DEAE-celluloseでcochromatographされているものと思われる。



ABSORPTION SPECTRUM OF SP-II-2

1A-8　ラン藻Anacystis nidulansの光化学系I粒子のFe-Sセンター

°大塚隆　桜井英博　（早大・教育・生物）

ラン藻Anacystis nidulansからTritonX-100処理によって得られた光化学系I(PS-I)粒子の定量的結果とPS-I粒子中のFe-SセンターのSDS修飾について報告する。

前年度年会で報告したように，TritonX-100処理後，ショ糖密度勾配超遠心によって得られたPS-I亜粒子を，Toyopearl 60を用いたゲル沪過により精製した。酸不安定性硫化物(ALS)はPS-I亜粒子に結合して存在し，P700に対しほぼ一定量が存在する(P700 1分子に10〜13)。これはホウレンソウの場合とほぼ同数である。PS-I粒子のポリペプチド組成をSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動により調べたところ，分子量70,000に非常に濃いバンドが，14,000，11,500，5000にやや濃いバンドがみられ，その他32,000付近に数本，54,000，50,000にうすいバンドがみられた。

Step	CHL/P700	ALS/P700	Protein/CHL
ショ糖密度勾配超遠心	103.7	13.5	13.0
Toyopearl 60 カラムクロマトグラフィー	71.7	12.5	10.1

反応液(50mM Tris-HCl，pH 7.8，0.2M NaCl，5mM $MgCl_2$)中のPS-I粒子にSDSを加えて，0℃で一昼夜インキュベートした後，P700の光酸化活性とALSを定量した(図1)。P700の光酸化活性はアスコルビン酸を電子供与体として，日立557形二波長分光光度計により，408nmに対する430nmの吸収変化を測定した。その結果，インキュベートの際のPS-I粒子のクロロフィル濃度が90μg/mlの場合，SDS濃度0.5%(w/v)で，比活性は50%に低下したが，0.1%ではほとんど変化しなかった。一方，ALSはSDS濃度0.1%で50%に低下した。このようにSDSの低濃度領域では，PS-I粒子のALSはP700の光化学反応よりもSDSに対する感受性が高かった。Golbeckらはホウレンソウ PS-I粒子を尿素-フェリシアン化カリでインキュベートするとP700よりもALSが先に失活すると報告しているが，SDSの場合も同様な結果が得られた。次にSDS濃度を一定(0.3%)にした場合のPS-I粒子のクロロフィル濃度との関係を図2に示す。重量比にしてクロロフィルの約60倍のSDSでP700の光酸化活性は50%に低下し，10倍では全くSDSの影響は受けなかった。これらの結果より，SDSはPS-I粒子のALSの一部を選択的に破壊し，あるいはペプチドを解離させるのに有効であると考えられるので，その可能性を検討中である。

図1．SDSによるP700の不活性化とALSの変化

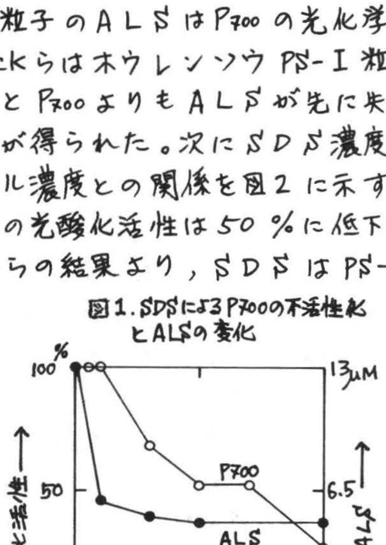
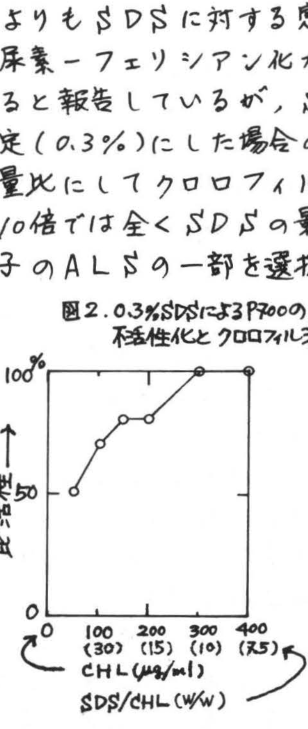


図2．0.3%SDSによるP700の不活性化とクロロフィル濃度



1A-9　光化学系I反応に及ぼすマグネシウムイオンの効果

鈴木浩一　(埼玉大・理・生化)

高等植物の葉緑体から，界面活性剤やフレンチプレス等で光合成の光化学系粒子を分離すると，ストロマラメラが千切れて小胞となった系I粒子は光化学系Iの活性しか持たないが，グラナディスクがバラバラになった状態で取れて来る系II粒子には，強い光化学系IIの活性と共に，常に多少の系I活性が混在する。本来グラナディスクには両系が共存するものなのか，グラナディスクにストロマラメラが千切れ残って付いている為に系I活性を示すのか，今のところいづれとも決め難い。

以前アメリカヤマゴボウから取れる両系粒子の光化学活性を調べていた時，系II粒子中の系I活性は，時としてDCMUが存在するにもかゝわらず，$MgCl_2$によって誤差範囲を超える促進を示す事が見られた。若し此が両系粒子の系I活性の本質的な相違であるならば，上記の論議の解決の手掛りとなる可能性もあるので表題の実験を計画した。

材料はアメリカヤマゴボウの鮮葉を低張燐酸緩衝液中で磨砕し，葉緑体破片を庶糖密度勾配遠心で分別した系I粒子と系II粒子を用いた。此の系II粒子には通常系I粒子の1/10～1/5の系I活性が見られる。

系II粒子中の系I活性は必ずしも常に$MgCl_2$により促進されるものではなかったので，先づ測定条件を検討した処，NADP光還元に用いる粗フェレドキシン(Fd)標品に問題がある事がわかった。標品によってはかなり酸化系を含んでいて，照射光を消すと直ちに早いNADPの再酸化が起るようなものがあって，其のような場合には促進は見られない。粗Fd標品を使わずに系I活性を測定する方法を検討した結果，メチルレッド(MR)光還元系が適当である事が判明した。MRはVernonの報告にもある如く，光照射の直後はゆっくりと，其の後は加速的に還元が進行する。彼はこれをMRがDMPDを中間体として還元される為としているが，反応系を或る程度嫌気性にする事に依り，初期の彎曲を完全に取り除く事が出来た。嫌気化の方法としては，反応液に適量のブドウ糖(1M)とグルコースオキシダーゼ(4mg/ml)を加え(0.2ml each/6.0ml)，良く減圧脱気(3mmHg)し，キュヴェットにはパラフィルムで蓋をする程度で充分である。サフラニンTも試みたが，此の程度の嫌気化では顕著な還元は見られなかった。

此のような系で測定すると，$MgCl_2$(2mM)による系II粒子中の系I活性促進は多少の差はあれ常に観察される。経時変化が関係しているらしく，新鮮な時の10%内外から日時の経過と共に100%近い促進が見られた。系I粒子の系I活性については，新鮮な時には$MgCl_2$によってむしろ僅かな抑制が起る傾向が見られ，1日乃至2日後からは促進が見られるようになり，最大50%近い促進が観察された。$MgCl_2$の濃度を変えて見ると，2mMは促進効果を観察する為にはむしろ低過ぎる事が判った。くわしい解析はまだ出来ていないが，系I粒子に系II粒子と同程度の促進効果を期待する為には，$MgCl_2$濃度が3～4倍高い必要があるようである。

$MgCl_2$による促進は，両系粒子の系I活性にとって本質的な差では無いように見えるが，有効濃度の相違は系の存在状態の差を反映しているのかも知れない。

第１日　４月６日(日)

Ｂ会場

代　謝Ｉ

1B-1 CAM植物メキシコマンネングサの葉におけるアスパラギン酸の脱炭酸について

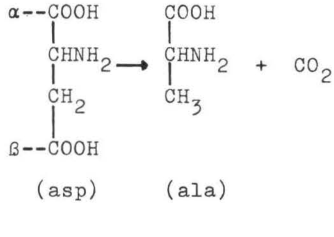
°天笠正，吉田精一　（都立大・理・生物）

CAM植物の暗期における炭酸固定では，主要な固定産物であるリンゴ酸の他に，いくつかの有機酸・アミノ酸が生成される。その中で特に，アスパラギン酸は$^{14}CO_2$を用いた実験から，暗固定の極く初期からラベルが，比較的多量見い出されることが示された。私たちは，このアスパラギン酸の代謝に関する研究を行なってきたが，今回アスパラギン酸の脱炭酸反応について報告する。

CAM植物の一種であるメキシコマンネングサ（Sedum mexicanum）の葉を10mMメルカプトエタノール，5%ポリクラ-ATを含む50mMリン酸buffer，pH6.4を用いて抽出，その遠心上清を粗酵素液として，^{14}C-アスパラギン酸を加えて，30℃，2時間反応させた。その反応液のアミノ酸分画のペーパークロマトグラフィーを行なったところ，^{14}C-アラニンが検出された。生成物がアラニンであることは，3種類の異なった展開剤を用いたペーパークロマトグラフィー，及びLDH－GPTaseを用いた酵素的な方法で確かめられた。この反応を密ぺいした容器で行ない，アルカリトラップを用いて，放出されるラベルのCO_2の検出と定量を行なったところ，その時生成したアラニンの量にほぼ相当する二酸化炭素が放出されることがわかった。以上のことから，この反応は，アスパラギン酸のβ-カルボキシル基の脱炭酸反応であることが予想された。

この反応は透析によって著しく活性が減少したことから，cofactorの存在が考えられた。そこで，透析した酵素液に種々の物質を添加したところ，ピリドキサールリン酸・α-ケトグルタル酸によって活性化されることがわかった。

アスパラギン酸のβ-カルボキシル基の脱炭酸反応では細菌では良く知られ，その反応を触媒する酵素である，アスパラギン酸β-デカルボキシラーゼは，精製・結晶化され，諸性質が詳しく研究されている。それによると，細菌類のアスパラギン酸β-デカルボキシラーゼはピリドキサールリン酸及びα-ケトグルタル酸，オキザロ酢酸のような種々のα-ケト酸によって活性化されることが知られている。メキシコマンネングサの粗抽出液で得られた，アスパラギン酸のβ-デカルボキシレーション反応は，cofactor要求性が，細菌類のアスパラギン酸β-デカルボキシラーゼと比較的類似しており，CAM植物のような高等植物にも，この種の酵素が存在しているものと思われる。

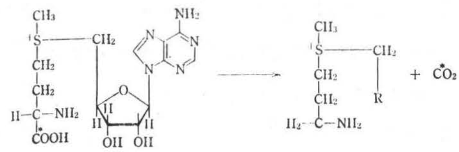


(asp)　(ala)

1B-2　　トウモロコシのS－アデノシルメチオニン脱炭酸酵素

鈴木米三，°平沢栄次　（大阪市大，理，生物）

微生物及び動物のスペルミジン生合成は，プトレシンから合成される。そのためには２つの反応が関与していることが知られている。即ちS－アデノシルメチオニンの脱炭酸によるプロピルアミン供与体生成と，このプロピルアミンのプトレシンへの転移である。この２つの反応はそれぞれ，S－アデノシルメチオニンデカルボキシラーゼと，スペルミジンシンターゼ（アミノプロピルトランスフェラーゼ）によって触媒される。植物の場合，mung bean で前者，ニチニチソウで両方の活性の存在が粗酵素液で報告されている。我々はトウモロコシのスペルミジン生合成系を探る目的で，右図の反応を触媒する前者の酵素を精製し，性質を調べた。活性測定には基質としてS－adenosyl－L－[carboxyl－^{14}C]methionineを用い，発生する$^{14}CO_2$をハイアミンハイドロオキサイドで捕集してカウントした。



S-アデノシル-L-メチオニン　　S-アデノシルメチオニン脱炭酸物

本実験では，トウモロコシの種子を暗所で５日間生育させた芽生えを材料に用い，粗酵素液の２０～５０％硫安分画をＴＥＡＥ－セルロースカラムと本酵素の特異的阻害剤，メチルグリオキサールビス（グアニルヒドラジン）略してＭＧＢＧのアフィニティカラムによって比活性５百倍に精製した。精製酵素は，最適 PH 8.6 でKm＝5×10^{-6}M，反応は３０°Cの場合１５分まで時間に比例し，６０°C，１０分で完全に失活する。また反応時間１５分の時，４０°Cまでは活性が上昇し，活性化エネルギーは3.3 Kcal/moleであった。大腸菌の酵素は，活性発現にMg^{2+}を必要とし，プトレシンで影響をうけないが，ラット前立腺の酵素は反対にプトレシンにより活性化され，Mg^{2+}を必要としないことが知られている。植物の場合，mung bean の酵素はMg^{2+}により促進され，ニチニチソウの酵素はプトレシンで促進されることが報告されている。しかし本酵素においては，どちらの物質によっても活性化されなかった。またラット前立腺の酵素はＭＧＢＧで強く阻害（１μＭで５０％阻害）されるが，大腸菌の酵素では，０.１ｍＭで３０％程度の阻害率であることが報告されている。本酵素の場合，１μＭで約８０％の高い阻害率を示した。またこの酵素にはカルボニル基が存在し，今までの大腸菌，ラット及び酵母では，その本体はピルビン酸であることが証明されている。本酵素はイソニコチン酸ヒドラジドやペニシラミンにより阻害されず，ヒドロキシルアミンやセミカルバジドで阻害をうけることから，ピリドキサールリン酸とは異るカルボニル基の存在が示唆される。また本酵素はSH基の阻害剤であるｐ－ヒドロキシメルクリ安息香酸やN－エチルマレイミドによっても阻害された。

本酵素の発芽過程における活性の変動に関しては，発芽初期に急速に上昇し，５日目で最大となり，その後すみやかに減少する。これらの現象や，微生物及び動物の酵素の性質の比較より生理的役割についても検討した。

1B-3　　水稲葉身におけるD-アラニンの代謝(2)

○真鍋　久*，大平幸次（東北大・農・農化，*福島県立会津短大）

水稲葉身に投与したD-アラニンは，D-アラニルグリシン（D-AG）およびD-アラニンを含むペプチド様物質Comp.(I)さらにはニンヒドリンネガティブな結合型D-アラニン（結合型D-アラニン）にダイレクトに取り込まれること；D-AGおよびComp.(I)へのD-アラニンの移行割合は結合型D-アラニンへの割合に比べてはるかに高いこと；D-アラニンがD-AGおよび結合型D-アラニン（ともに天然D-アラニンとして本組織より見出されている）に取り込まれた場合その後の代謝が極めて緩慢であるのに対し，Comp.(I)へ移行した場合はその後速やかに中性物質等へ代謝されること；D-AGおよびComp.(I)へのD-アラニンの移行系は水稲培養細胞やエンドウ幼植物からは見出されず，本組織に特有の系であるらしいこと；D-アラニンは比較的速やかに一般代謝系にも組み込まれること等を報告してきた。今回は本組織におけるD-アラニンの代謝状況をさらに詳細に把握するために，投与したD-アラニンの初期の代謝状況，AG投与時におけるD-アラニンの代謝状況，本組織内のアラニン，D-AG，結合型D-アラニン部分におけるD-アラニンのプールサイズ，さらには放射性D-アラニン投与後のエタノール不溶区における^{14}Cの分布状況等について2,3の検討を行なったので報告する。

D-アラニン-1-^{14}C投与後30～120分における^{14}Cの分布状況を調べたところ，^{14}Cは極めて速やかにComp.(I)に取り込まれたが，D-AGには経時的に除々に移行する傾向にあった。組織の中性画分の^{14}C量も除々に増加したが，酸性画分ではほぼ一定量を保っていた。また，これら両画分の^{14}C量は，塩基性画分の量に比べてかなり少ないものであった。

AG投与後D-アラニン-1-^{14}Cを取り込ませて，AGを投与しない場合との間で^{14}Cの分布状況を比較した。AGを投与することによってAGへの^{14}Cの移行がおさえられ，アラニンおよびComp.(I)中の^{14}C量が増加したが，これらは経時的に速やかに減少した。組織の中性画分ではAG投与とは無関係にどの物質中の^{14}C量も経時的に除々に増加した。酸性画分では4物質（A, B, C, D）が常にラベルされており，AGを投与した場合にのみ，Aの^{14}C量が経時的に増加しBのそれが減少した。

D-アラニン-1-^{14}Cを濃度別に取り込ませたところ，全吸収量に対するアラニン中の^{14}Cの割合はD-アラニンの投与濃度に対応して高くなったが，D-AG中のそれは減少傾向にあった。また，結合型D-アラニン中の^{14}C量はほぼ一定値を保っており，さらに組織内の結合型D-アラニン含量をD-アミノ酸酸化酵素法で調べてみると，D-アラニンの投与濃度に対応して除々に増加していた。

D-アラニン-1-^{14}C投与後の組織のエタノール可溶区の^{14}C量は経時的に減少したが，それに対応してエタノール不溶区における^{14}C量が増加しており，脱炭酸される割合は少ないようであった。不溶区を酸加水分解して遊離したアミノ酸のラベリングパターンを調べたところ，^{14}Cはアラニンに集中していた。

以上の結果および既報のデータをもとに，水稲葉身に投与したD-アラニンの代謝状況を論議したい。

1B-4　　水分欠乏がプロリン代謝に及ぼす影響

古池直子、岩井純夫、川島伸麿、松山晋　（専売中研）

水分欠乏により proline が集積することは、よく知られているが、ここでは、その機構を検討する目的で、以下の実験を行った。

温室で栽培したタバコ（*Nicotiana tabacum* cv. BY-4）の充分展開した若い葉を用いた。leaf disk に proline-^{14}C(u) を供与し、24時間暗所に放置後、70% MeOH で抽出、イオン交換クロマトグラフィー、ペーパークロマトグラフィー、アミノ酸分析で各成分を分離同定し、^{14}C は液体シンチレーションカウンターで測定した。proline-^{14}C は萎凋葉湿潤葉共に、Asp、Glu、citric acid、fumaric acid、CO_2 等の TCA cycle と関係の深い化合物に代謝された。Pro は Glu に酸化された後、TCA cycle を経て分解されることを示した。また、湿潤葉では多くの radio activity が Pro の代謝産物に検出され、Pro にはわずか 3.8% の ^{14}C が残っているだけであるのに対し、萎凋葉では、代謝産物にはわずかの ^{14}C しか検出されず、多くの radio activity が Pro に残っている。

次に、萎凋（24時間）＿湿潤（6時間）の過程における proline-^{14}C の分解について検討した。24時間萎凋させた後、proline-^{14}C を供与し、下にシリカゲルを敷きつめた口紙および湿潤口紙に6時間放置後の残存 Pro は、萎凋＿湿潤葉では 57.5% であり、萎凋＿萎凋葉では 75.3% であった。この時点でのプロリン含量は、両処理でほぼ同じであった。したがって、プロリン分解は、水分欠乏下で抑制されるものと結論した。

さらに、proline dehydrogenase、Δ^1-pyrroline-5-carboxylic acid (PCA) reductase の活性が水分欠乏によりどのように影響を受けるか調べた。タバコ葉を空気中で萎凋させたものと、湿った口紙上に置いたものとを、0.05M Na-phosphate buffer pH 7.2 と共に摩砕し、遠心、その上清を酵素液として、proline dehydrogenase は 340 nm における NAD の吸収の増加により、また、PCA reductase は同じく 340nm における NADPH の吸収の減少により、それぞれの活性を測定したが、水分欠乏による酵素活性の変化は認められなかった。この実験では萎凋葉を buffer 中で摩砕、抽出し、活性の測定を行っているため水分欠乏下の酵素活性を正確に測定しているとは言えない。そこで、タバコ葉よりプロトプラストを調製し、そのプロトプラストの osmotic stress による酵素活性への影響を調べることにした。プロトプラストは無菌的に調製し、0.4M および 0.7M のマニトールを含む培養液中で24時間培養した。この時、proline の含量は 0.4M マニトール培養プロトプラストに対し、0.7M マニトール培養プロトプラストでは2倍に増加していた。このプロトプラストを酵素液として、proline dehydrogenase、PCA reductase の活性を測定したところ、両者における酵素活性の差異は認められなかった。以上より、proline dehydrogenase と PCA reductase の2つの酵素は、水分欠乏によるプロリン集積の機構に、直接関与していないものと考えられる。

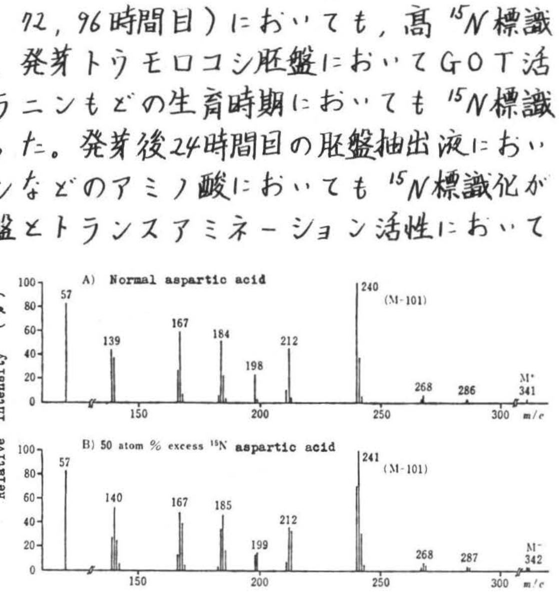
1B-5　発芽トウモロコシ胚盤における ^{15}N アスパラギン酸のトランスアミネーション

○寒川喜三郎，山下通治，山口益郎（大阪府大・農学部）

アミノ酸のトランスアミネーション活性を測定する際には，生成するアミノ酸またはケト酸などを定量することによってその活性とする場合が多く，アミノ基自体の転移について調べた例は少ない．最近著者らはGC－MSの磁場リピートスキャンニング法を用いて，微少量のアミノ酸の ^{15}N 存在比を測定する方法を開発した[1]。その方法を用いてトウモロコシ芽生えの各器官における窒素養分のアミノ酸への同化について検討したが，発芽初期には ^{15}N の取込みがみられず，胚乳貯蔵物質の分解と関連性の深いことを明らかにした[2]。そこで発芽時におけるトランスアミネーション活性を検討するために，発芽過程の胚盤を供試材料として本実験を行なった。

〔実験方法〕トウモロコシ種子を30℃の定温器内（暗所）で発芽させ，24，48，72，96時間ごとに均一に生育した10個体の芽生えをサンプリングし，胚盤をとりだし，5倍量のリン酸緩衝液で磨砕し，遠心分離後の上澄液を粗酵素液とした。^{15}N 標識アスパラギン酸（50 atom % excess ^{15}N）を基質として使用し30℃で反応を行なった。反応開始後，30，60，90分ごとにサンプリングを行ない，エタノールを加え煮沸することによって反応を停止させた。抽出した遊離アミノ酸はイオン交換樹脂分別法によって酸性アミノ酸とその他のアミノ酸類に分けた。それぞれのアミノ酸はN－TFAブチルエステル誘導体にしたのち，GC－MS分析を行なった。GCのカラム液相には0.5％EGA，担体はChromosorb W（AW）のガラスカラム（内径3 mm，長さ1 m）を使用した。GC－MSには日立ガスクロマトグラフィ・質量分析計（RMU－6MG）を用いた。GCで単離されたアミノ酸について磁場リピートスキャンニングを行ない ^{15}N 存在比を測定した。それぞれの遊離アミノ酸量はGC－MSのTIMクロマトグラムからGehrkeの方法によって算出した。

〔結果〕いずれの生育時期（24，48，72，96時間目）においても，高 ^{15}N 標識化されたアミノ酸はグルタミン酸であり，発芽トウモロコシ胚盤においてGOT活性が存在していることを示した。またアラニンもどの生育時期においても ^{15}N 標識化が認められたが，その生成量は少なかった。発芽後24時間目の胚盤抽出液においてはアスパラギン，グルタミン，プロリンなどのアミノ酸においても ^{15}N 標識化が認められ，始動期の胚盤が他の時期の胚盤とトランスアミネーション活性において異なることを示した。発芽後72，96時間における胚盤抽出液のインキュベーション中に増加するグルタミン，プロリンは ^{15}N 標識化が認められず，^{15}N 標識アスパラギン酸由来の窒素を利用しない（α位）ことを示した。



1）寒川喜三郎他，土肥誌，49，383（1978）
2）寒川喜三郎他，ibid.，50，217（1979）

1B-6

ニチニチソウ（*Vinca rosea*）培養細胞のアスパルトキナーゼの変動

坂野勝啓　（東大・理・植物）

アスパラギン酸族アミノ酸の生合成経路における鍵酵素と考えられるアスパルトキナーゼ（AK）は、高等植物でも微生物の場合と同様に種によって調節様式は様々である。ニンジンで、スレオニン（Thr）、リジン（Lys）でそれぞれ独立にフィードバック阻害される二つのアイソザイムが存在すること、およびニンジン根組織を培養することによって、リジン感受性AK（Lys-AK）のみが特異的に増加し、この増加が組織内の可溶性リジンの量の低下に起因する derepression として説明されることについてはすでに本大会で報告している。

高等植物のアミノ酸合成系酵素について最終産物による抑制（repression）調節が報告されたのはこれが最初であるが、その普遍性については他の植物材料による例証が必要である。

ニチニチソウ（*V. rosea*）培養細胞は、Murashige & Skoog の基本培地に 2,4-D（4.5×10^{-6}M）および sucrose（3%, w/v）を加えた培地で、暗黒下、27°C で振盪培養し、通常7日毎に1/10量の細胞懸濁液を新鮮培地に移して継代培養した。

粗酵素液は細胞を液体窒素中で凍結させ乳鉢中で粉砕し、0.1M CH_3COOK, 2mM EDTA, 10mM 2-mercaptoethanol を含む 0.1M phosphate buffer（pH 7.4）で抽出し、10,000×g 10min の遠心上清画分のうち50%硫安飽和で塩析される画分を上記の緩衝液に対して透析して調製した。

AK 活性は ^{3}H-アスパラギン酸とATPを基質とし、生成する β-aspartyl phosphate をヒドロキシアミンで hydroxamate に転換し、ろ紙電気泳動によって分離してから Oxidizer 処理を行い、hydroxamate 中の放射能を測定して計算した。

新鮮重（fresh weight）の急激な増加を伴なう細胞の増殖は植継後3日目以後で、10日目には定常期に入り fresh weight の増加は見られない。他方、fresh weight あたりの全AK活性は3日目が最大でもとの約2倍に増加する。Lys-AK、Thr-AK は3～4日目に peak を示すが、Lys-AK の方がやゝ遅れる傾向がみられる。培養後期では Thr-AK レベルは peak 時の約1/3位に低下して安定するが、Lys-AK レベルは単調に低下し、14日目には peak 時の1/10以下になる。以上のことは、AK が構成的な酵素ではなく、誘導的な酵素であることを示唆している。

AK レベルの変動の要因として、細胞内のアミノ酸プールの変動が予想されるが、fresh weight あたりの遊離アミノ酸含量は植継後3日目まで減少し、4日目から後は増加することが明らかとなった。

1B-7　　高等植物非緑色組織のグルタミン酸合成酵素

井田正二, °間藤　徹*, 高橋英一*（京大食研, *京大農化）

近年, 高等植物における無機態窒素の有機化, 即ちアンモニアのアミノ酸への取込は, 主としてGlutamine synthethase(GS)とGlutamate synthase(Glu·S)が協調的に作用することにより営まれていると考えられてきている。このGlu·sは電子供与体の存在下でglutamineのamide基を2-oxoglutarateに転位して2分子のglutamateを生成する反応を触媒する。微生物由来の酵素ではNAD(P)Hが電子供与体である。高等植物緑色組織由来の酵素は, 葉緑体に局在しferredoxin(Fd)から特異的に電子を受け取ることが広く認められている。我々はトウモロコシ緑葉から抽出精製した酵素標品にて, これを確認した。(54年度本大会にて発表)　高等植物非緑色組織由来のGlu·Sに関してはpreparativeな規模での精製酵素標品の調製が行なわれておらず, 本酵素の酵素化学的性質についてはほとんど不明である。ニンジン培養細胞, エンドウ根(5 days old)など非緑色組織ではNAD(P)H依存の酵素の存在が報告されている。しかしながらイネ根ではNAD(P)H酵素は認められず, Fd依存の酵素のみが存在することが報告されている。我々もエンドウ根(水耕, 3 weeks old)の粗酵素ではNAD(P)H依存酵素よりもFd依存酵素の活性が高いことを認めた。そこで植物における種間, およびageによる本酵素の電子供与体の特異性を調べた結果, Fd依存とNADH依存の活性が共存するが, その量比は, 種およびageにより顕著な相違があることを認めた。また, この相違は, *in vivo* assayによっても確認できた。

これらの事実と酵素の実体との関連を解明する目的で, 種実形成期のエンドウ子葉を材料として酵素の調製を行った。その結果, この組織には, Fd依存酵素（分子量 155,000）とNADH依存酵素（分子量 220,000）の両者が存在し, 両者は, 電子供与体に関して互換性がなく, 実体が異なり, 同時に各種阻害剤に対する挙動も異なることを明らかにした。[1]　さらにNADH酵素の特性を解明するために, エンドウ幼植物を用いて酵素の精製を行った。植物体を磨砕抽出, 硫安分画(30－55%)の後, DEAE cellulose および Sephadex G-200 によるchromatography, さらにBlue-Sepharoseを用いるaffinity chromatographyを行った。また, 酵素の安定化を試み, 2-oxoglutarate, SH-保護剤, glycerolの存在下で比較的安定であることを知った。さらに精製酵素について酵素化学的性質を現在, 検討中である。

1) PCP (1979) 20　1455-1459

1B-8　　ホウレンソウ葉の亜硫酸還元酵素について

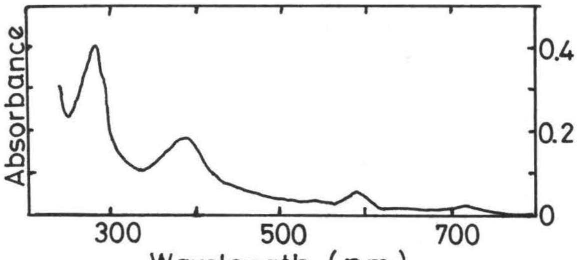
明田川純、石埜路子、田村五郎　（千葉大・農化）

目的）　亜硫酸還元酵素（Hydrogen-sulfide: ferredoxin oxidoreductase EC 1.8.7.1）はシステイン合成系路中において、還元型フェレドキシンを電子供与体とし、亜硫酸を硫化水素まで6電子還元する。しかしながら従来報告されているニラ及びホウレンソウのメチルビオロゲン－亜硫酸還元酵素は、還元型フェレドキシンを電子供与体とする活性（フェレドキシン活性）を有していない。そこで本研究では、フェレドキシン活性を有する酵素を精製・単離し、従来報告されているものと比較検討することを目的とした。

方法）　フェレドキシン活性は、アスコルビン酸－DCIP－グラナ光化学系により生成する還元型フェレドキシンを電子供与体とし、基質、亜硫酸の還元によって生成する硫化水素を比色定量して求めた。1 unitは1分間に1 μmole の硫化水素を生成する量とした。メチルビオローゲン活性は、嫌気的条件下で亜鉛を触媒として還元型としたメチルビオローゲンを用い、反応に伴って減少する604 nm における吸光度を経時的に測定して求めた。1 unitは1分間に1 μmole の還元型メチルビオローゲンを酸化する量とした。

結果）　ホウレンソウ緑葉部の粗抽出液から、アセトン分画、DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィー、ウルトロゲルAcA34によるゲル沪過、フェレドキシンセファロースによるアフィニティークロマトグラフィーなどの手段により、本酵素の精製を試みた。得られた精製標品は44.6 units/mg protein（フェレドキシン活性）及び53.7（メチルビオローゲン活性）の比活性を有し、ゲル沪過の溶出パターン及びディスク電気泳動によりほぼ均一であることが確認された。分子量は、Hedrick & Smith 法、ゲル沪過法及びSDS－ゲル電気泳動法により、それぞれ、270,000，136,000，71,000と推定された。これから、この酵素は71,000のモノマー2個あるいは4個からなるオリゴマー酵素であると考えられるが、生理的条件下でどのようなサブユニット構造をとっているかは現時点では不明である。基質、亜硫酸に対するKm値はメチルビオローゲン活性で6.0×10^{-6} Mであった。また、フェレドキシン活性においては、基質－反応速度について、ミカエリス－メンテン型の飽和曲線は得られず、S字型の曲線が得られた。Hill係数は2.1と計算された。精製標品の吸収スペクトルは、酸化型で279、385、588そして714 nmに吸収極大をもち、A_{385}/A_{279} 及び A_{588}/A_{279} の比はそれぞれ、0.460，0.105であった。（図）この吸収スペクトルからシロヘムの存在が示唆される。従来報告されているホウレンソウのメチルビオローゲン－亜硫酸還元酵素とは、分子量、吸収スペクトル、Km値などの点において若干の差がある。

図．精製酵素の吸収スペクトル



1B-9

ホウレンソウの亜硝酸還元酵素

平沢正一，田村五郎　（千葉大農化）

1　目的．ホウレンソウのフェレドキシン亜硝酸還元酵素（Fd-NiR）についてはすでに前報[1,2]で性質及び精製について報告した。今回は，精製された酵素標品を用いて，さらに性質の検討を試みた。

2．方法．酵素活性は，前報と同じく，ジチオナイトを用いて，フェレドキシンまたはメチルビオローゲンを還元型とし，反応後の基質（亜硝酸）残存量をSnellらの方法により比色定量した。反応生成物のアンモニアはConwayの微量拡散法を用いて比色定量した。　酵素の精製はアセトン分画，DEAE-セルロースクロマトグラフィー，セファデックスG-100または，ウルトロゲルAcA 34を用いたゲル沪過，フェレドキシンセファロースを用いたアフィニティークロマトグラフィーなどの手段によりおこなった。

3．結果．以上の方法により得られた酵素標品はFd-NiRとMV-NiRの両活性を有し，前者で301(units/mg protein)，後者で121(units/mg protein)の比活性を示し，両活性の比（Fd-NiR/MV-NiR）は2.4と前報の報告値より上昇した。吸収スペクトルは，278，390，573，690nmに吸収極大を持つ。また290，530，640nm付近に肩を持ち，A_{390}/A_{278}は0.61，A_{573}/A_{390}は0.23という値を示し，後者の値は前報の報告値より低かった（Fig.1）。　E_{390}は$6.25\times10^{4}\cdot M^{-1}cm^{-1}$という今までの報告値にない高い値を示した。　鉄含量は，7g-atoms iron／8.6×10^{4}g protein という今までの報告にない高い値を示した。　77°Kにおける，ESRスペクトルから，7.0，5.3のg値を示し，high spin heme Fe^{3+}の存在を示した（Fig.2）。これをジチオナイトで還元すると，high spin signalは消失し，このことから，ヘムは完全に還元されたことを示した。　酵素にSO_3^{2-}，NH_2OH，CN^-などを添加すると，吸収スペクトルの変換が見られ，その結果は，VegaとKamin[3)]らの報告したものとは少し異なるものであった。　ヒドロキシルアミン還元活性は，亜硝酸還元活性の1/100の値しか示さず（基質亜硝酸と同濃度において），メチルビオローゲンを電子供与体とする活性とフェレドキシンを電子供与体とする活性の比（Fd/MV活性）は1.9であった。

Fig.1

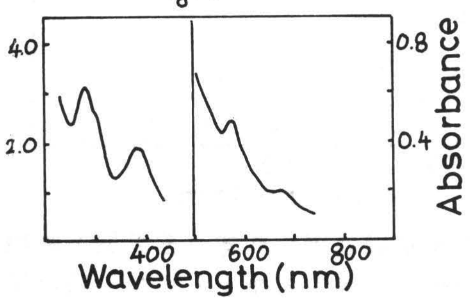
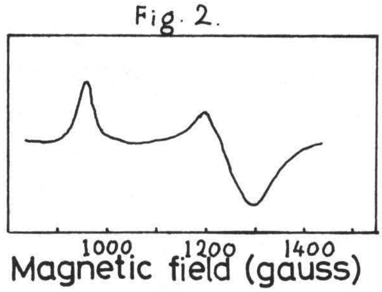


Fig.2.



1)　Hirasawa and Tamura　Agric. Biol. Chem., 43, 659 (1979)
2)　Hirasawa and Tamura　Agric. Biol. Chem., 44, in the press (1980)
3)　Vega and Kamin　J. Biol. Chem., 252, 896 (1977)

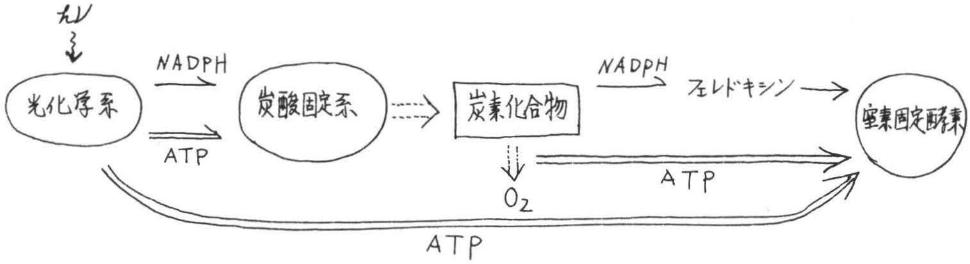
1B-10

暗所におけるラン藻の窒素固定

大森正之（東大・海洋研）

ラン藻の窒素固定活性は、光に依存しており、光の強さと、窒素固定活性との関係は、光合成における、光と酸素発生の関係に類似している。しかしながら、窒素固定反応においては、光は、光燐酸化反応によるATPの生成を通じてのみ、窒素固定反応と直接的にかかわっており、光化学系による電子の伝達そのものは、直接窒素固定反応とは結びついていないと言われている。すなわち、窒素固定酵素への電子の供給は、炭酸固定により生成された炭素化合物の代謝を通じて行なわれていると考えられており、実際には、五炭糖燐酸回路に共役して作られたNADPHが、フェレドキシンを介しての窒素固定酵素への電子供与体であろうと言われている。また、ピルビン酸も、電子供与体になり得るとの説もある。

もし、呼吸により生成されたATPと、適当な電子供与体が存在すれば、暗所においても高い窒素固定活性が期待される。事実、ソテツの根に共生するラン藻は、暗所で窒素固定を行なっている。



そこで、今回、通常明所で独立栄養的に培養している *Anabaena cylindrica* を用いて、暗所における窒素固定活性を測定し、暗所での窒素固定反応の特徴について、検討した。

窒素固定活性の測定は、以下のように行なった。内容量10 mlのペニシリンびんに、培養後3，4日目の細胞の懸濁液3 mlを入れ、気相は空気＋アセチレン(20%)にし、温度は28°Cで行ない、反応開始後15 minおきに0.2 mlずつガスを分取し、ガスクロマトグラフにより発生したエチレンの量を測定した。細胞による酸素吸収は、電極法により、測定した。

暗所におけるアセチレン還元反応は、明条件の場合とは異なり、酸素の存在が必要であり、空気中では可なりの速度で行なわれた。その反応速度は、反応前の前照射の条件により大きく変化する。前照射時間を一定にして、光の強度を増加させると、アセチレン還元活性も増加する。光の強さを15,000 lux以上に上げても、アセチレン還元活性は増加しない。光の強さを一定(15,000 lux)にして、前照射時間を3時間まで増加させると、アセチレン還元活性は、それにつれて増加するが、酸素吸収は、60分以上の前照射では余り変化は見られなかった。これらの事実から、暗所におけるアセチレン還元活性は、前照射時に作られたある物質の濃度に比例して高くなるのではないかと推論した。

第１日　４月６日(日)

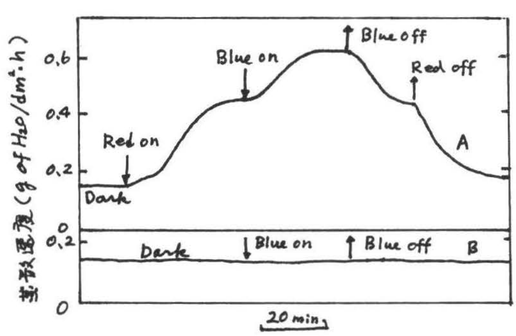
Ｃ 会 場

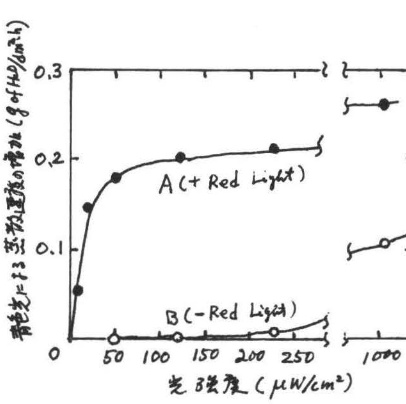
光 生 物 学

1C-1　気孔開孔における青色光効果

○小川晃男，井上頼直　（理研・植物薬理）

気孔開孔は光によって促進される。これまでの研究[1,2]において，そらまめ（*Vicia faba*）の孔辺細胞内リンゴ酸生合成が赤色光照射下では非常に弱い青色光で促進されることを見い出し，その作用スペクトルから青色光の受容体がフラビンであることが示唆された。一方，気孔開孔に伴って孔辺細胞内に取り込まれる K^+ の正電荷は，そらまめの場合は孔辺細胞内で生成するリンゴ酸によって中和されるが，ねぎ類（*Allium*）の場合は外から取り込まれる Cl^- によって中和されることが最近明らかにされている[3]。本研究では気孔開孔におけるこれら異った電荷中和機構をもつそらまめとたまねぎ葉について，蒸散におよぼす赤色光と青色光照射の影響を調べた。そらまめ葉の場合，蒸散速度は赤色光（>600 nm，3.5 mW/cm²）によって増大するが，これに非常に弱い青色光（360～500 nm，50 μW/cm²）を照射すると蒸散速度はさらに増大する（図1，曲線A）。一方，赤色光を照射しない時には青色光による蒸散促進は見られなかった（曲線B）。赤色光照射下における青色光による蒸散促進効果は約 50 μW/cm² で飽和したが，赤色光を照射しない場合，蒸散促進には，はるかに強い青色光を必要とした（図2）。これらの結果は青色光による気孔開孔の促進が光合成存在下でのみ顕著であることを示している。たまねぎ葉についても赤色光照射下で非常に弱い青色光による気孔開孔の促進が観察された。したがって，青色光の作用部位はリンゴ酸代謝とは無関係であると考えられる。そらまめおよびたまねぎの孔辺細胞の液胞は共に強い緑色の蛍光を出し，その蛍光スペクトルはフラビンの蛍光スペクトルと類似している[4]。この事実は緑色蛍光を出す孔辺細胞内色素が気孔開孔における青色光効果の光受容体であることを示唆している。



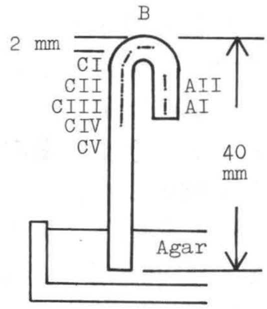


1) Ogawa, T., H. Ishikawa, K. Shimada & K. Shibata: Planta 142, 61 (1978).
2) Ogawa, T.: In The Effect of Blue Light in plants and Microorganisms", Springer-Verlag, in press.
3) Schnabl, H. & H. Ziegler: Planta 136, 37 (1977).
4) Zeiger, E. & P.K. Hepler: J. Cell Sci. 37, 1 (1979).

1C-2

インゲンマメ下胚軸伸長における近赤外光とIAAの相互作用

°後藤伸治，鈴木雅文　（宮教大・生）



明所生育のインゲンマメ（*Phaseolus vulgaris* L.）の下胚軸伸長に対する近赤外光の効果とそのIAAとの相互作用を調べた。明所で6日間生育したhookを持つ幼植物の子葉を切り去り，高さ4 cmの下胚軸切片を作った。これに3mm間隔で点状の印を油性黒インクで付し，hook部をAI,AII，elbow部をB，shank部をCI-CVとした。（図）。これをペトリ皿中の寒天にさし込んで立て，赤色光（180 μW/cm²）または近赤外光（780 μW/cm²）を照射した後，25°C，暗所で一定期間培養し，印を付した間隔の長さを測定した。IAAはラノリンに含ませて上部切断面または各部位に環状に塗布して処理を行なった。

下胚軸の生長パターンは赤色光照射のものは無照射の対照と同じであったが，近赤外光照射のものは若いAI-CI部位の伸長が抑制され，令の進んだCII-CV部位の伸長が促進された。この近赤外光の効果はひき続いて照射された赤色光により打消されたことからフィトクロムの関与が示唆された。最大伸長部位は近赤外光を照射された下胚軸では3日目までCII部位にあり，5日目でCI部位へ移ったが，無照射の対照では1日目で既にCI部位にあった。このことは近赤外光が下胚軸組織の加令を遅らせることを示唆する。

近赤外光による若い部位の伸長抑制と令の進んだ部位の伸長促進は5分間の照射でほぼ飽和した。また，アルミホイルで下胚軸各部位を被い光感受部を調べた結果，若いhook部位も令の進んだshank部位も近赤外光を感受し，その効果は双方へ伝達されることが認められた。

IAAを上部切断面へ処理した場合，若いAI-B部位では効果が認められなかった；CI部位は近赤外光照射のものでは効果がなかったが，無照射のものではIAAの対数濃度に比例して伸長が促進された；CII-CV部位では近赤外光照射の有無にかかわらずIAAは伸長を促進した。この際，生長曲線を調べると，無照射の下胚軸では1日目でCII部位が，2日目でCI部位が，3日目でB部位がIAAにより促進された。一方，近赤外光照射のものでは1～2日目にCII-CIII部位が促進されたが，それより若いB-CI部位では5日目まで促進効果は認められなかった。　IAAをBまたはCI部位へ処理した場合，無照射のものでは処理部位の伸長が著しく促進されたが，近赤外光を照射することによりその促進効果は完全に消失した。IAAをCII-CV部位へ処理した場合，近赤外光の有無にかかわらず処理部位の伸長が促進された。特に，令の進んだCIV-CV部位に処理した場合は，処理部の伸長はIAAと近赤外光により相乗的に促進された。hook（B）部位よりも令の進んだ部位にIAAを処理した場合，IAAは処理部位より下の部位の伸長を促進し，上の部位の伸長を抑制した。この傾向は近赤外光によって拡大された。

1C-4

遠赤色光による花成誘導阻害に対する回復の作用スペクトル

°大谷武，熊谷忠　（東北大・農研）

短日性ウキクサ *Lemna paucicostata* T-101は、赤色光照射に続いて暗期（72 h）を1回与えると花成が誘導されるが、誘導暗期の直前に与えられたある波長の光によって花成誘導が阻害される。この光阻害の作用スペクトルは730 nm 近傍に主ピーク、412 nm に副ピークを示し、その相対効率は約10対1であった。本報告では、誘導期直前に与えた遠赤色光による花成誘導阻害に対する光回復のための作用スペクトルを検討した。

赤色光（1.5 $W \cdot m^{-2}$）を24時間照射した後、72時間の誘導暗期、引き続いて2回の短日処理（6hR + 18hD）を与えると、本植物は通常50～60%の花成率を示した（対照区）。一方、誘導暗期の直前に730 nm の遠赤色光（1.4 $W \cdot m^{-2}$，80 sec）を照射すると、ほぼ0%の花成率を示した。遠赤色光照射直後に、400～715 nm の範囲で単色光を与え、50%の花成率の回復を引き起こすのに必要な光量から作用スペクトルを求めた。その結果、回復のための有効波長域は509～685 nm にあり、612 nm 近傍を中心にして半値巾125 nmの巾広いピークを示した（Fig. 1）。

以上の結果は緑色材料についてであるが、さらに黄化材料についても検討した。つまり、18～21日間、8時間に1回ずつ15分の赤色光を間歇照射をして得た黄化材料は、その後72時間の誘導暗期を与えると、緑色材料の場合と同様に花成が誘導されるが、この花成誘導も暗期直前に与えられた青色光、あるいは遠赤色光で阻害される。この両波長域での黄化材料の光感受性は緑色材料のそれとほぼ同じであった。一方、この黄化材料における誘導暗期直前に与えられた遠赤色光（730 nm，1.4 $W \cdot m^{-2}$，80 sec）による光阻害に対する回復のための光感受性は緑色材料よりも612 nm で12倍、625 nm で17倍、640 nm で24倍、660 nm で45倍それぞれ高かった。また、50%回復に必要な光量は、660＜640＜625＜612となり、660 nm での効率が最も高い。従って、緑色材料における、とくに赤色光域での光反応は光合成色素などによる遮蔽効果によって著しく影響を受けており、また、光感受性も著しく低下することが明らかとなった。

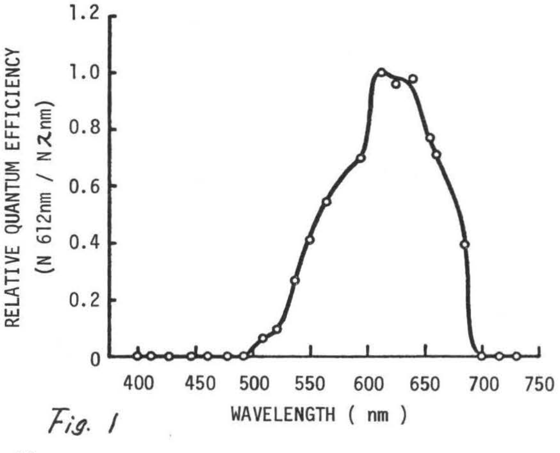


Fig. 1

1C-5

青色光によるフシナシミドロ生長域の膨潤とその光屈性との関連

片岡博尚　（東北大. 農研）

フシナシミドロの光屈性反応は，生長域である先端部の明側に突出がおこることにより起こる。[1,2] 部分的な突出は生長しつつある細胞先端に含まれる小胞と原形質膜の融合，及び膜や壁物質の分泌が青色光により促進されることによると思われる[2]。今回，先端部を均一に青色光で照射すると以後生長する部分が太くなり，刺激除去とともに可逆的に元の太さに戻ることを見い出した[図1]。青色光均一照射は又，縦方向生長も一時的に促進する。これら両反応の解析に着手し，以下の知見が得られたので報告する。又，それらと光屈性反応で得られている知見[3,4,5]とを比較検討し，その関連性について考察したい。

1) 青色光による膨潤には，光屈性の $40 J \cdot m^{-2}$ に対し，$1000 J \cdot m^{-2}$ もの光量を必要とする。しかし，反応は3分以上の照射を必要とし，3〜20分の範囲では照射時間(T_L)に比例し，又，$1 W \cdot m^{-2}$ (450nm) 以上の強度で強度(I)にも比例して増す。従って，光量-反応曲線は log 光量($I \times T_L$)に対し完全な直線にならない。 2) 作用スペクトル[図2]より明らかなように，赤色光も僅かながら（青の 1/300）効果がある。 3) 間歇照射により膨潤反応は増大する。 4) 膨潤と共に縦方向の生長促進もみられるが，両者の間に量的平行関係はない。 5) 青色光連続照射による生長促進は2相性で，5分以内に成就する促進と15分以後におこる促進が見られる。光off と同時に一時的な生長速度の低下がみられ，一種の正光生長反応と考えられる。 6) 450nm, $4 W \cdot m^{-2}$ で (1分明-4分暗)×5 [$(1L\text{-}4D)_5$ と略] の間歇照射で，生長速度は刺激周期の2倍の周期で振動する[図3]。$4 W \cdot m^{-2}$, $(1L\text{-}3D)_5$, $2 W \cdot m^{-2}$ $(2L\text{-}3D)_5$ でも振動するが，$(1L\text{-}1.5D)_{10}$, $(2L\text{-}3D)_5$, $(0.5L\text{-}4.5D)_5$ ―いずれも $4 W \cdot m^{-2}$― では連続照射の時と同様の2相性変化のみを示す。このことは，生長過程が5分より少し長い時定数をもつ反応(群)により律速されていることを示唆する。

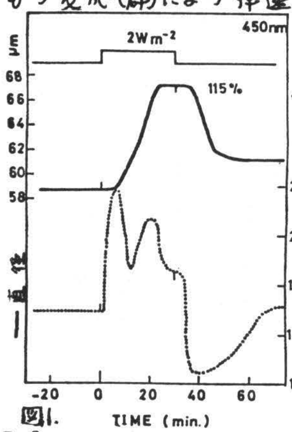


図1.

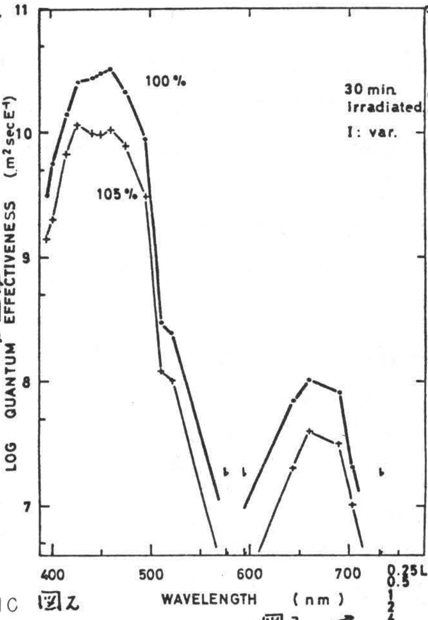


図2

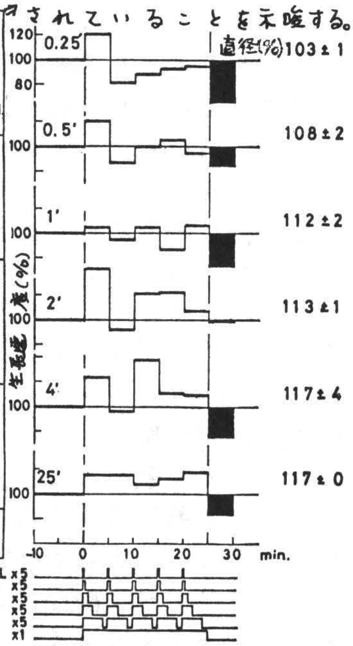


図3 →

References.
1) P.C.P. 16,427-437(1975)
2) ibid. 16,439-448(1975)
3) ibid. 18,431-440(1977)
4) ibid. 18,473-476(1977)
5) Pl. Physiol. 63,1107-1110 (1979)

1C-6

ホウライシダ原糸体先端成長誘導に対する偏光微光束の効果

門田明雄・古谷雅樹　（東大・理・植物）

ホウライシダ原糸体は先端成長を示し、赤色光下では糸状の単細胞として一定の成長率で成長を続けるが、これを暗所に移すと細胞分裂を行い、完全に成長を停止する。しかし、この成長停止した2細胞性原糸体も短時間の光処理により先端成長を再開する(1978年度植物生理学会)。この成長再開の光誘導は、頂端細胞全域に分布するフィトクロム系により制御されている。また、偏光照射実験の結果より、赤色光、近赤外光は共に二色性を示すが、前者は原糸体成長軸に垂直な振動面(電気ベクトル)を持つ偏光が有効であり、後者では、これに対して成長軸と平行な偏光が有効であることは既に報告した(1979年度植物学会)。そこで今回は10μm直径の偏光微光束照射により、細胞の各部分における偏光の効果を調べ、その結果に基きフィトクロム分子の配向について考察した。

本実験では、1977年6月に小石川植物園で採取したホウライシダ胞子を用いた。胞子は10倍希釈したMurashige and Skoogの無機塩溶液の0.3%寒天培地上に無菌的に播き、6日間連続赤色光下で培養後、3日間暗所に置き、成長停止した2細胞性原糸体を得た。この2細胞性原糸体の頂端細胞の各部位に10μm直径の偏光微光束照射を行い、暗所に24時間保った後、成長を誘導された原糸体の百分率を求めた。

微光束照射は図1に示す頂端細胞の3つの部位について行った。Aの部位を赤色偏光微光束(7～8 Wm^{-2})で1秒間照射した場合、成長軸に垂直な偏光の方が平行な偏光よりも有効であった(表1)。次に原糸体先端部Bを同様に部分照射するとAの部位と逆に成長軸と平行な偏光の方が垂直な偏光より効果的であった(表1)。これに対してCの部位では、垂直な偏光と平行な偏光の効果に明確な差は認められなかった。さらに、A,Bの部位について、赤色光照射後、近赤外光(9.6 Wm^{-2}, 20 sec)を照射し、近赤外光の二色性を調べたところ、Aの部位では成長軸と平行な偏光の方が効果的であるが、Bの部位では反対に垂直な偏光が有効であった。

以上の結果は、A.Bの部位共に、赤色光は細胞膜面に対し垂直な偏光が、また近赤外光は平行な偏光が有効であることを示している。このことから、ホウライシダ原糸体先端成長の光誘導に働くフィトクロム系は、そのPr型が細胞膜面に対し垂直に配向し、Pfr型になるとその配向が変化し、膜面に対し平行に配向するようになるのではないかと考えられる。Hauptは1970年にヒザオリ葉緑体運動を制御するフィトクロム系に関し、Prは細胞膜に平行に配向し、Pfrに変換すると配向が90度変化することを示したが、今回の結果は、これと比べPr、Pfrの膜面に対する配向が逆にはなっているがPrとPfrで配向が異なる点でHauptの結果を支持するものである。

図1

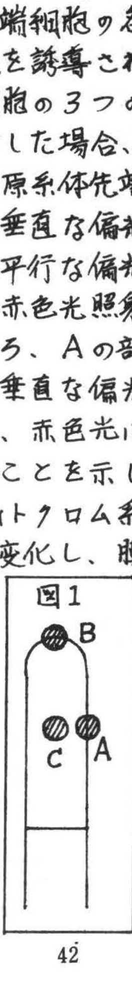


表1

照射部位	光処理(偏光面)	成長を誘導された原糸体(%)
A	赤色光(平行)	9
	〃 (垂直)	26
	暗対照	4
B	赤色光(平行)	32
	〃 (垂直)	15
	暗対照	5

1C-7

高速時間分解分光光度計の開発とその性能

古谷雅樹，井上康則，*前田芳夫　（東大・理，植物
*日立製作所那珂工場）

光を吸収して励起した色素分子が緩和して行く過程は，吸収スペクトルの変化として測定できる．現在，特定の波長については，ピコ秒程度の吸収変化を測れる装置が作られている．（日本化学会編，ナノ，ピコ秒の化学 1979）。しかしこれらの装置では遅延時間が生体色素の機構解析の面から興味深いμ秒近辺の変化を測ることがかえって難しかった。

我々は特定研究「光生理現象の初期過程」の計画に従い単発現象のμ秒領域のスペクトル変化を時間的，波長的に連続して同時に測れる分光光度計を開発し，完成したので，その原理，装置の構成・性能について報告する。

原理：本光度計に用いたＯＭＡ２－ＳＩＴ光検知器は一本で縦×横＝500×500の小検知器を並べたと等価の機能をもっている。またＳＩＴに与える高電圧を制御し10^{-8}～10^{-3}秒までのシャッター作動も行なえる。この機能を利用し，本光度計では白色の測定光が試料を透過した後，分光器で各単色光に分けられＳＩＴの光陰極面に横方向に並んだスペクトルを閃光照射後一定の遅延時間でシャッター作動させ光情報として取込み，一度に２７５nmの波長範囲にわたる光吸収の情報を得ている。

構成：図１に本光度計のブロック図を示す。→は制御信号，➡はデータ，--->は光路，⇢はその他の流れを示す。

性能：励起光はパルス色素レザーにより，閃光時間約0.6μs（ＦＷＨＭ），半値幅約0.2nm，出力約0.4Ｊ（ローダミン640）の性能が得られ，閃光の廻り込みによる測定への影響は1.5μs以降は無視し得た。入射光量と検知器のカウントの間には7～8万カウントまで直線関係が認められた。$KMnO_4$を使用して吸光度の直線性を調べたがA＝1程度の高い濃度で約10％高い値となった。しかし，このズレには規則性があり補正しえる。ノイズレベルはカウント数が減少すると増加する。直線性のある最大カウント時（3μsのシャッター幅相当）のノイズはA＝0.005（peak to peak）であった。

以上の結果，本装置は所期の目的に適う性能を持つことが判った。フィトクロム等の生体色素への適用例は次講演で述べる。

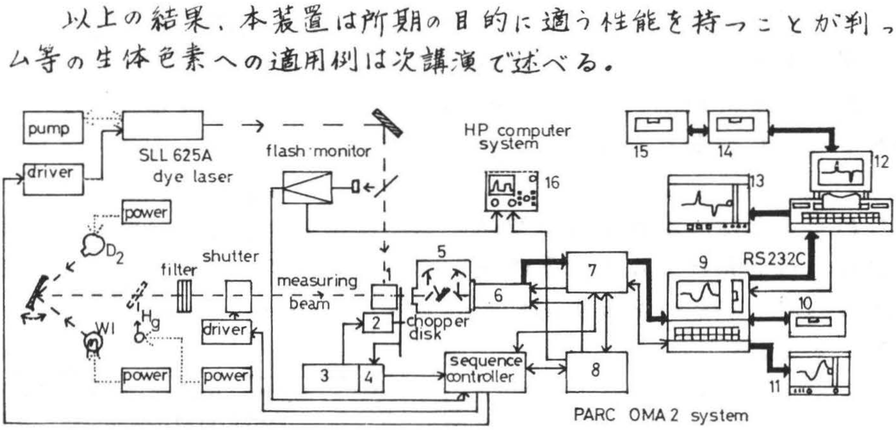


図1. 1;sample. 2; high-speed motor. 3; speed controller. 4; phase detector. 5; polychrometer. 6; SIT detector. 7; detector controller. 8; HV gate puls generator. 9; OMA console. 10; flexible disk drive. 11; X-Y recorder. 12; HP 9845T computer. 13; plotter. 14,15; flexible disk drive. 16; storage oscillo.
OMA system: 2-10.
HP system: 12-16.

1C-8　　高速時間分解分光光度計による二、三の測定例

井上康則，島崎幸雄，古谷雅樹　（東大・理，植物）

パルス幅約600nsのレザー光を生物試料に照射した後，μsオーダーの時間分解能で同試料の光学的変化を270nmの波長範囲にわたり同時測定できる高速時間分解分光光度計を今回新たに開発した（古谷等，今大会報告）ので、その測定例を透明試料および不透明試料について報告する。

実験例(1)：透明試料としてフィトクローム溶液を用いP_RからP_{FR}への変換過程を測定した。この過程においては閃光後0.2ms以降の中間体までしか従来報告されていない（Linschitz 等 '66）。

試料は暗所25°Cで7日間培養した黄化エンドウ芽生えより山本等（Photochem. Photobiol. '80）の方法により抽出精製した純度約35%、サブユニットの分子量約12万のフィトクロム溶液を用いた。溶液は光路長10mm幅3mmの石英セルに入れ温度を2°Cに保ち、励起光として650nmの単色光パルスを与え、種々の遅延時後の吸収を測定した。この結果本試料においては散乱に起因する励起光の廻り込みあるいは測定光の減衰がないため、励起光照射後2μs前後から3μsの光信号取込幅で測定が可能であった。また取込幅を10μsまで広げれば、S/N的に最良の状態で測定できた。図1に種々の遅延時間後の吸収変化をP_Rの状態との差スペクトルとして示す。

実験例(2)：不透明試料としてトウモロコシ黄化葉におけるprotochlorophyllideからchlorophyllideへの光変換を測定した。材料は25°C暗所で9〜11日間培養した芽生えの第一葉を用いた。第一葉は広げて2枚重ね、湿った沪紙一枚とともにガラスではさみ込み、測定光路に対して斜めに挿入し室温で測定した。対照試料には沪紙のみを用いた。励起光は650nmを用いた。本試料においては、散乱により光量が減衰するため、透明試料と同じS/N比を実現するには500μsの信号取込み時間が必要であった。しかし、試料に沪紙を重ねないで黄化葉のみとし疑似の吸収を測定するのであれば100μsの取込み時間で充分なS/N比が得られた。図2に黄化葉ならびに閃光照射後10〜510μs測定した葉の吸収ならびに両者の差スペクトルを示す。

以上の例に示されるように、本装置は透明試料に対しては充分な性能を発揮する上、不透明試料に対してもある程度の制約はあるが適用可能なことが明らかになった。

図1

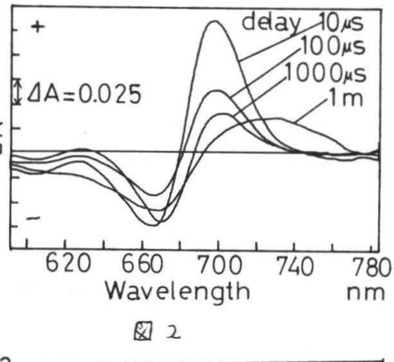
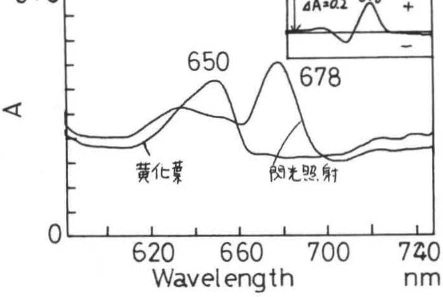


図2



1C-9

アルキル・アガロースをプローブとして用いた、フィトクロムの光変換に伴う化学的性質の変化の検出

山本興太朗、W. O. Smith, Jr. (Smithsonian Radiation Biology Lab.)

PrとPfrの間の光変換に伴うフィトクロムの性質の変化は吸収スペクトル型の変化以外ほとんど知られていない。しかし、黄化エンドウ芽生え粗抽出液中のフィトクロムは赤-近赤外光可逆的に膜付着反応を示し（山本と古谷、1975）、精製したフィトクロムは光可逆的に集合体形成を行う（山本ら、1980）。これらの事実はフィトクロムの化学的性質は吸収型の変化に応じて変化している事を示しているので、この性質の変化を検出する為に、アガロース粒に固定化した、炭素数nが2、4、6、8、10の疎水性が段階的に増加する同族のアルキル基（Agarose-NH-$(CH_2)_n$-H）と、アミノ基の導入の為より非疎水的なω-アミノアルキル基（Agarose-NH-$(CH_2)_n$-NH_2）（共にMiles Lab.製）に対する部分精製したフィトクロムの吸着性を暗所及び1.5 Wm^{-2}の赤色光下で調べた。

フィトクロムは、7日間暗所で育てたエンドウ芽生えからSephadex G-50沪過、ブラシャイト・クロマトグラフィ、硫安分画、DEAEアガロース・クロマトグラフィで精製し、純度は約35％、サブユニットの分子量は約114,000であった。

《結果》1 mlのアルキル・アガロースを詰めた小カラムに1 mlのフィトクロム溶液を加えた後、5 mlの0.1 Mリン酸緩衝液で洗い、吸着しなかったフィトクロム量を分光光度計で定量した。その結果、暗所（Pr）でも赤色光下でもフィトクロムはnが大きくなるにつれてアルキル・アガロースに吸着するようになるが、より疎水的なアルキル・アガロースの方がアミノアルキル・アガロースよりも小さいnでフィトクロムを吸着した。アミノヘキシル・アガロースには赤色光下でより多くのフィトクロムが吸着した。次に、アルキル・アガロースに吸着したフィトクロムを5 mlの塩溶液、エチレングリコール、界面活性剤で洗い、溶出したフィトクロム量を測った。その結果、いずれの場合も赤色光下では暗所よりもフィトクロムは溶出されにくかった。アミノオクチル・アガロースに吸着したフィトクロムはエチレングリコールよりもKClによってより効果的に溶出されたが、ヘキシル・アガロースに吸着したフィトクロムはエチレングリコールによってよりよく溶出された。次に、吸着したフィトクロムのKClの段階的濃度勾配による溶出プロフィルを暗所又は赤色光下で比べた。その結果、nが大きくなるにつれ溶出に要するKCl濃度が増加する事、赤色光下では暗所でよりも溶出するのに高濃度のKClを必要とする事、赤色光下と暗所での溶出に要するKCl濃度の差はnが大きくなるにつれ拡大する事がわかった。

《考察》以上、（アミノ）アルキル基がより疎水性になる程フィトクロムはより強く吸着され、PfrとPrの溶出され方の差も拡大する事、Pfrの方がPrよりより強く吸着される事、吸着されたフィトクロムはイオン強度の増加によっても溶出されるので吸着力は純疎水性とは考えられないが、調べた（アミノ）アルキル・アガロースの中では最も純粋に疎水性であると考えられるヘキシル・アガロースからは非極性溶媒で効果的にフィトクロムは溶出された事から、PrもPfrも疎水性を持ち、Pfrの方がPrよりより疎水性であると考えられる。

第１日　４月６日(日)

Ｄ 会 場

培養細胞とプロトプラスト

1D-1　　ニンジン不定胚からのプロトプラスト調製と、その生物活性

*野村港二、高橋英樹、皆川美由紀、大宅秀央、新田毅
（東京農工大．一般教育、生物）

ニンジン培養細胞から誘導した不定胚でプロトプラストの調製を試みた。現在までのところ、胚細胞のプロトプラストについての報告はないが、多細胞生物で胚の持つ共通の意義、性質、それがどのような機構で生じるかといった点を、細胞レベル、分子レベルで解明して行くためには、胚としての生物活性を持った単細胞としてのプロトプラストの調製は意義があろう。

1）プロトプラスト調製法．

不定胚は、ニンジン栽培品種'黒田五寸'の胚軸から得た細胞を，Lin & Staba (1961) の改良培地に、暗所、25°C の懸濁培養から形成されたものを用いた。実験によっては Fujimura & Komamine (1979) にならい、45μ から 80μ の範囲の体細胞塊を選択し、同調的な不定胚誘導を行った。胚とは沈降速度が異なる体細胞分画を除いた後．種々の条件下でのプロトプラストの生成を比較検討した。観察結果をまとめると、a）1% driselase, 0.6M sorbitol, pH5.2, 25°C で3~4時間処理すると．ほぼ70~90%の細胞がプロトプラストとして得られた。b）2% cellulase onozuka R-20, 1% macerozyme R-20 を用いた場合と，0.05% pectryase, 2% cellulase onozuka R-20 を用いた場合では、プロトプラストは得られたが、driselase処理に較べ．調製されたプロトプラストの生存期間に明らかな短縮がみられた。また．前者では調製時に融合細胞ができやすい。c）pH は．pH4~6 の間であれば．ほとんど差はない。d）浸透圧については、0.4M sorbitol 中の処理では．プロトプラストの生成は．やや遅れる。e）カルス上に誘導されたニンジン不定胚（加藤博之氏より供与）も．多少抵抗性は示すが、プロトプラスト化することができた。

2）不定胚細胞プロトプラストの培養条件についての検討．

生物活性の維持された培養法の確立が必要であるが．そのとき．胚細胞として増殖できるか、体細胞化するかが問題である。酵素処理後のプロトプラストは，0.4M sorbitol を含む培地で洗い．ナイロン篩で沪過してプロトプラスト塊などを除いた。現在までのところ調製された胚細胞プロトプラストは、0.4M sorbitol, 0.1M $CaCl_2$ を加えた培地中で1ヵ月以上生き続け、特に driselase 処理のものは良好で、数回分裂したものがある。2,4-D(10^{-6}M)，カゼイン酸(0.05%)，牛又は馬血清(2%)の培地への添加は効果的であり、yeast extract(0.5%)は阻害的である。また、GA_3(10^{-6}M)は細胞内澱粉顆粒の著しい減少をひきおこした。さらに、sorbitolの 0.2M, 0.4M, 0.6M の各濃度では．0.4M が良好であった。分裂開始が遅く、頻度が低いこと（現状は．6日でほぼ10%）をさらに改良する必要がある。

この系により、胚細胞での核酸合成機構の特色、微細構造の変化、細胞壁の再生などについて検討して行きたい。

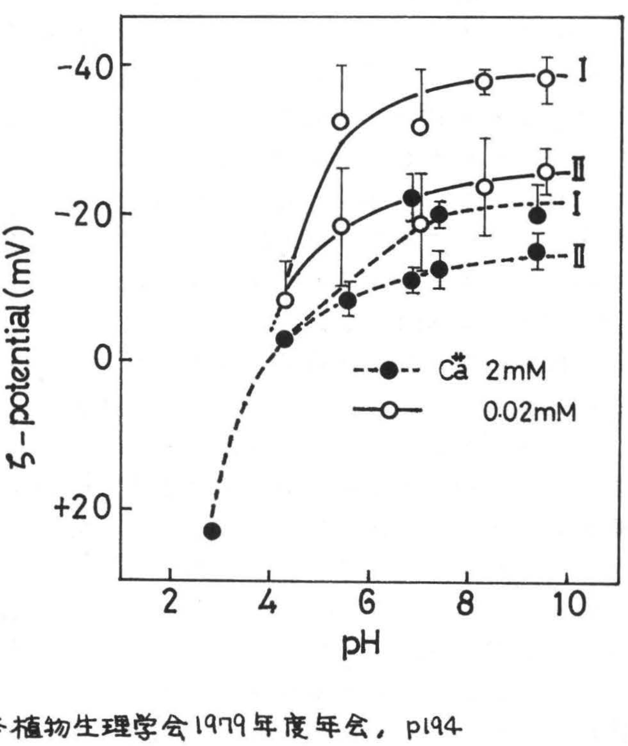
1D-2　　大麦葉肉細胞プロトプラストの電気泳動的挙動

°市川義章，竹田淳子，千田貢（京大・農・農化）

プロトプラストの表面の物理・化学的性質と細胞自体の特性との関連、およびその差異に基づくプロトプラストの分離・分別法の研究・開発は興味深い問題である。ここでは、密度勾配電気泳動法により、プロトプラストの表面電荷の測定および分別を行なった結果について報告する。

プロトプラストは、古沢らの方法により、大麦（*Hordeum vulgare* L., "Gose shikoku"）第一葉から酵素法（1% Cellulase Onozuka R-10，0.6Mソルビトール，20±2℃，2～3時間処理）により調製した。電気泳動はジャケット付きガラス製円筒を用いて行なった。0.6Mソルビトール又は20%ショ糖を含む緩衝液（pH2.9～9.6，Ca^{2+}濃度2mM又は0.02mM，イオン強度0.015）を混合して密度勾配を作った。測定は、一定温度（20±1℃），定電流（10mA，2～5V/cm），定浸透圧（730±20 mOsm/kg H_2O）で行なった。

結果：pH5.5～9.6で、本プロトプラスト標品は電気泳動的に2つの画分に分かれることが見出された（図参照）。一般に泳動距離は、時間とともに直線的に増加した。この泳動距離～時間曲線の勾配から移動度（v）を求め、$v=\zeta D/4\pi\eta$からζ-電位を求めた。図に、移動度の高い画分(I)及び低い画分(II)のζ-電位の泳動メディウムpH依存性（Ca^{2+}濃度2mM又は0.02mM）を示す。前にも報告した様に[1]、弱酸性以上のpHではプロトプラストのζ-電位は負であり、その絶対値はpHの低下とともに減少する。pH<3では電位は逆転して正に荷電することが観察された。このことはプロトプラストが等電点を有することを示す。ただし、Ca^{2+} 0.02mMではプロトプラストは、この pHで不安定であった。また、画分I，IIのζ-電位の差はpHの低下とともに減少し、pH4～5（Ca^{2+}濃度に依存する）以下では、その差は検知できなくなる。



次に、画分I，IIを分取し顕微鏡で観察を行なった。画分IIには大きい細胞がやや多かったが、その他の顕著な差異は認められなかった。

1) 竹田・中村・阿部・千田：日本植物生理学会1979年度年会，p194

1D-3　　電気刺激による植物プロトプラストの融合誘導

竹田淳子　田中美祢子　千田貢　（京大農　農化）

昨年の本学会で電気刺激により任意の２個の植物プロトプラストの融合を誘導できることを示したが、今回はこの電気融合誘導法に於ける電流パルスの効果について報告する。

実験材料は、インド蛇木（Rauwolfia serpentina var Bentham）の培養細胞から酵素法（1% Cellulase onozuka R-10, 0.2% Macerozyme R-10, 0.5% dextran sulfate, 0.6M Sorbitol 中で 33°C, 2.3時間処理）により分離精製したプロトプラストを用いた。測定条件は、0.02〜5mM $CaCl_2$（カチオンによるイオン強度を一定に保つためNaClを加える）、3mM BES-KOH Buffer pH 4.9, 0.6M Sorbitol，室温（22-25°C）で行なった。電気刺激は２本の微小ガラス電極（数MΩ）を用い、融合率は電流パルスを与え５分後プロトプラストを顕微鏡下で観察し、点接，面接，球形融合及び破壊に区別して、通常10対あたりの融合率（%）であらわした。

結果

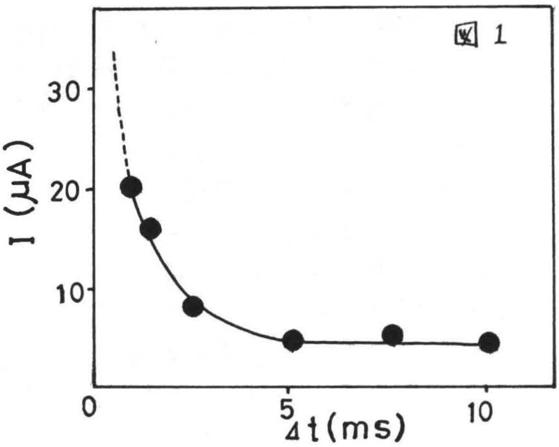
(1) 5mM Ca^{++} 存在下の球形融合60%を示す電流(I)－パルス巾(Δt) 曲線の一例を図1に示す。I·Δt は、I が 5〜20μA の範囲で I·Δt は一定になり、I≦5μA では I·Δt は増大する。即ち融合誘導には Threshold (Rheobase) が存在する。

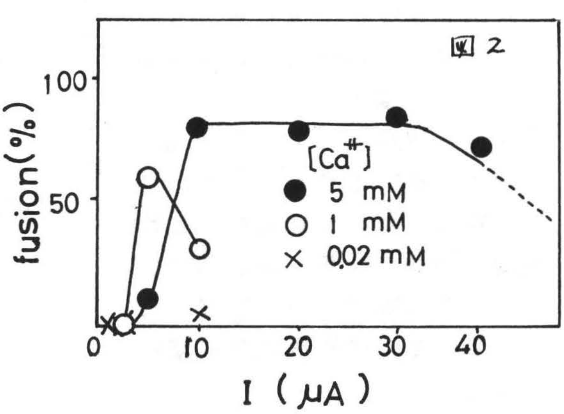
(2) さらに I·Δt が異常に大きくなるとプロトプラストの破壊する割合が増大する。

(3) Δt = 2.5 ms に固定し球形融合率を I に対して目盛ったのが図２である。(i) 融合を誘導するのに必要な I·Δt は$[Ca^{++}]$が低下すれば低下する。(ii) 破壊を生ずる I·Δt も$[Ca^{++}]$が低下すれば低下する。(iii) ただし$[Ca^{++}]$がある程度以下になれば融合自体観察されなくなる。

(4). Δt = 5 ms に固定し、２つの細胞夫々に対するパルス刺激の間隔をかえて融合率を測定すると、この間隔が 7 s 以下では 67 % 以上の融合率を示すが、7〜15 s では その値が30%に低下、20 s 以上では融合はほとんど見られなかった。

以上の点をもとにして電気融合誘導の機構について考察した結果について報告する。





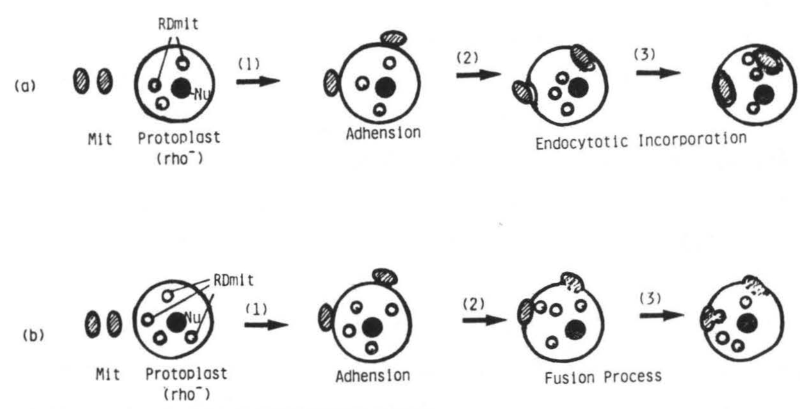
1D-4

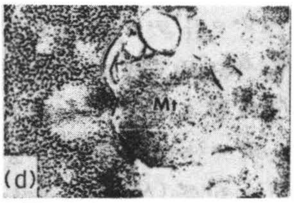
酵母プロトプラストと単離細胞内器官の融合(5)

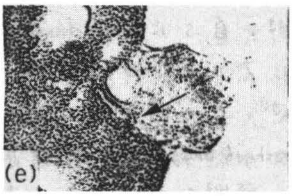
吉田和夫(名大・理・生物), 竹内郁夫(愛知県コロニー研究所)

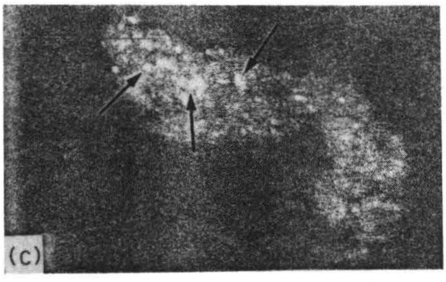
Saccharomyces cerevisiae酵母の細胞質性呼吸欠損突然変異株(ρ^-)を正常な呼吸能を持つ野生株(ρ^+)から調整したミトコンドリアでポリエチレングライコール, $CaCl_2$存在下で処理するとρ^-からρ^+に形質転換することを見出した(1)。この形質転換は種の違う酵母からのミトコンドリアでも惹っ起される。下図に示すようにこの形質転換の機構としてρ^-プロトプラストへミトコンドリアのendocytosisによる取り込み(a)とρ^-プロトプラストとミトコンドリアの融合(b)の二つが考えられよう。顕微鏡下で形質転換溶液中のプロトプラストを見るとミトコンドリアの大きなaggregatesに取り囲まれているのがわかる(c)。この状態ではミトコンドリア自身もaggregatesをつくりお互に一部は融合している。電子顕微鏡で観察するとミトコンドリアがしばしばプロトプラストに接着或は融合しているのが見られた(d-e)。形質転換の程度(10^{-6})から考えてendocytosisの可能性もなお否定できないけれども,融合によってミトコンドリア遺伝子がプロトプラストに取り込まれることが予想される。形質転換体のミトコンドリア及び核DNAをEcoR I制限酵素で分解し,そのアガロース電気泳動マップを野生型のそれと比較検討しつつあるので報告したい。またプロトプラストのプラスミド或はミトコンドリアDNA組換え体プラスミドによる形質転換についても報告したい。

(1) Plant & Cell Physiol. 20(4) 851-856 (1979)









1D-5

植物プロトプラストへのアグロバクテリウム導入による形質転換の試み

°馳澤盛一郎，長田敏行*，庄野邦彦（東大・教養・基礎科学，*名大・理・生物）

植物腫瘍クラウンゴールは、基本培地での無限増殖とオピン合成に代表される特徴を持つ。近年、これらの性質は *Agrobacterium tumefaciens* の持つ10^8ダルトンもの大きなプラスミッド（Tiプラスミッド，pTi）によって決定されること、さらに、クラウンゴール中にpTiの一部が存在し、複製・転写されていることも明らかにされてきた。これらの知見により、クラウンゴールの研究は、単に腫瘍化の分子レベルでの解明に止まらず、pTiを種々の遺伝子を植物細胞に導入するベクターとして、用いる可能性が論議されている。我々は、他の方法に比べ、pTiを直接的かつ安全に植物細胞原形質に導入しうる可能性の高いと考えられる、植物プロトプラストと *A. tumefaciens* スフェロプラストの融合という手法を用いて、高等植物細胞の形質転換系の確立を試みた。

プロトプラストは、一週間毎に培地（Murashige & Skoog，2,4-D 0.5μg/ml，蔗糖3%）を更新して振盪培養されているニチニチソウ（*Vinca rosea*）培養細胞の培養5日目の細胞を、酵素液（2% Cellulase "Onozuka" R-10，0.05% Pectolyase Y23，0.4Mマニトール，pH5.5）で、30℃、1時間処理して得られた。

スフェロプラストは、3週間毎に寒天培地（0.8% Nutrient Broth，1.5%寒天）に継代培養されている *A. tumefaciens* の strain A277 の定常期にあるものをAB培地中で、30℃、24時間の振盪培養を行った後、酵素液（リゾチーム(BMY) 0.4g，Na_2-EDTA 3.72g，100ml 0.025M Tris-buffer pH8.2 / l，0.4Mソルビトール）で、30℃、2時間処理して得られた。

プロトプラストとスフェロプラストを1：100～10000の比率で、ポリエチレングリコール或いはポリビニルアルコール溶液（PEG or PVA 20～40%(w/w) in Murashige & Skoog，0.4Mマニトール）中で10分間接触させ、さらにHigh pH・High Ca溶液を加え、20分間、30℃に保って融合条件とした。プロトプラストは、スフェロプラストをできるだけ洗い落としてから、プロトプラスト培地（Murashige & Skoog，IAA 1μg/ml，蔗糖1%，マニトール0.4M）に懸濁した。これらのプロトプラストは、直ちに *A. tumefaciens* の殺菌の為、4日間、40℃に保たれ、以後26℃で培養された。

プロトプラストは、分裂増殖して、3～4週で各々10～30細胞のコロニーとなるが、その時点で培地からホルモンを除き、しばらく培養を続けた後、基本培地（Murashige & Skoog，寒天0.6%）中に埋め込んで培養された。その結果、早いものでは約2ヵ月後に、肉眼ではっきりと認めうるコロニーの盛り上りが見られた。これらのコロニーの中には、ある程度の大きさに育つと、個別に取り出して基本培地（Murashige & Skoog）上で培養しても盛んに成長を続けるものが数多く存在した。この様なコロニーの出現頻度は、多いものでは元のプロトプラスト数の1/1000以上にもなり、この様なコロニーが全く出現しないか、しても低率であるコントロールの細胞とは、外見上、明確な差が生じた。これらクラウンゴール類似の性質を示すコロニーは、形質転換された細胞由来のものである可能性があり、目下、pTiのマーカー物質であるオクトピンを検索中である。

1D-6　植物葉からの光独立栄養培養細胞の誘導

°安田武司、佐藤文彦、橋本隆、山田康之（京大・農・農化）

高等植物において、クロロフィル含量の高い緑化培養細胞は数多く得られ、光合成活性を持つ細胞も多い。しかし、それら緑化細胞を、糖を含まない条件下で生育させる光独立栄養培養に成功した例は非常に少ない。糖を含む培地に長く培養することにより、糖を含まない条件に適した細胞が減少する可能性を考えて、緑葉を用い、直接、光独立栄養緑化細胞の誘導を試みた。

主にヒヨス（Hyoscyamus niger）を材料とし、他にタバコ（Nicotiana tabacum Wis. 38），ベラドンナ（Atropa belladonna），ダツラ（Datura stramonium）を用いた。殺菌した葉、または無菌的にカルスから再分化させた葉の切片を、糖を含まないLinsmaier & Skoogの基本培地組成にナフタレン酢酸（NAA）とベンジルアデニン（BA）を加えた寒天培地を含むペトリ皿（径9cm）で培養した。葉切片をうえつけたペトリ皿を、ガラス製培養槽（容積20ℓ）中に置き、1%に炭酸ガスを富化した空気（1ℓ/min/槽）を蒸溜水中さらに綿フィルターを通したのち槽中に送りこみ、5～6000ルックス螢光燈連続照明下、28℃で培養した。

ヒヨスは、主にカルスから再分化した葉の切片を用い、糖を含まない培地、1% CO_2気流中でカルス誘導し、継代培養した。培養開始後、葉切片は部分的に緑色をのこして白化するが、この緑色部を分離しさらに継代培養することにより、光独立栄養条件下で増殖していくことが認められた。NAA 10μM と BA 0.05, 0.5, 5μM を用いた場合、BA の濃度が高い程、増殖率がよく、また酸素電極を用いた酸素発生量からみた光合成活性もよかった。NAAを5μM に下げたカルス誘導の場合、0.5μM 以下のBA の条件では、緑色を維持できず枯死した。特にNAA 10μM, BA 5μM が最適であり、6ヶ月以上継代し現在も増殖を続けている。

0.5% sucrose を加えてカルス誘導したのち、緑色部分を糖を含まない培地に移した場合、一部緑色細胞の増殖が認められたが、継代培養を続けるごとに、白化かつ変化しやすく、はじめから糖を含まない培地で誘導する方が有効である。また肉眼的に緑色の濃い部分を分離し培養しているが、クロロフィル含量と増殖率との相関は今のところ認められていない。培地に含まれている有機物、チアミンとイノシトールを除いても生育することが認められ、さらに植物生長調整物質をも除いた、無機栄養素のみで生育する独立栄養細胞の選抜を行っている。

タバコ葉は、殺菌したのち裏表皮をはぎ、糖を含まない培地上に培養することにより、全面から細胞の増殖がみられ、光独立栄養細胞が容易に得られ、NAA 5μM, BA 0.5μM がよかった。またベラドンナ、ダツラも、ヒヨスと同様な方法で光独立栄養細胞の誘導を行なっているが、ヒヨスに比べ生育がおそく、さらに培養を継続中である。

1D-7

ジャーファメンターによるphotoautotrophic, mixotrophic細胞培養

今泉和光, 佐藤文彦, 安田武司, °山田康之 (京大,農,農化)

植物培養細胞による物質生産を考える時大量培養は不可避的問題である。固体静置培養から液体振盪培養に移行する際, 様々な問題が派生したと同様に小規模なフラスコ振盪培養からジャーファメンターによる大量培養への移行においても種々の問題が生じてくる。それぞれの要因はお互いに関連しているが1つはジャーファメンター培養に適した細胞株の問題である。もう1つは培養装置自体, さらに通気, 攪拌, 培地組成などを含んだ培養法の問題である。緑化培養細胞の場合にはさらに照明の問題が加わる。暗条件下ではすでに専売公社が20tタンクでの培養に成功しているが, 明所における緑化培養細胞の大量培養についてはまったく知られていない。我々は明所下でのジャーファメンター培養における基礎的知見を得るべくタバコ緑化培養細胞を用い photomixotrophic 培養の条件を検討するとともにさらにphotoautotrophic培養を試み若干の知見を得たので報告する。

培養に用いた細胞はLinsmaier & Skoog 改変液体培地 (Vitamins 2倍量, NAA 10^{-5}M, Kinetin 10^{-6}M, sucrose 3%を含む) にて明所下 (8000 lux), 26°C, ロータリー方式 (110 rpm), 14日毎の継代振盪培養しているタバコ (*Nicotiana tabacum* var. Samsun) 緑化培養細胞を用いた。ジャーファメンター培養はNBS製MF100型 14lジャーファメンターにpH, 溶存酸素量 (D.O.) 測定装置を取付け, 照明下 (培養槽表面 7000~8000 lux), 26°Cにて行なった。photomixotrophic培養はsucroseを含む培地に空気を通気し, photoautotrophic培養は糖無添加培地にCO_2を1%に富化した空気を通気し行なった。培養中のpH, D.O.の変化は経時的に測定した。

実際の培養に先立ち, 培養方法について考察を加えた。培養細胞は微生物に比べ細胞が大きく攪拌によるshear stressを受け易い。また培養中に培養槽壁に多く付着する問題点がある。一方, 好気的に培養する際生育にもっとも影響を与える要因は培地中の溶存酸素量である。酸素は溶解度が低く, 濃度勾配が小さいため希望する溶存酸素を得るには酸素移動容量係数(K_La)を大にする必要がある。以上の諸問題を解決すべく攪拌羽根の形 (タービン型, マリン型), 攪拌速度, 通気量について検討を加え, 攪拌羽根としてマリン型を採用した。$K_La \gg 10$が細胞増殖に良いという暗所培養での結果を参考に攪拌速度 200rpm, 通気量 1vvmで培養を開始した。この培養条件で14日間 photomixotrophic培養を行ない, 新鮮物重当り5.5倍の生育を得た。培養中のpH変化であるが, 培養初期に減少傾向を示し, 細胞増殖の目につき始める1週間目ごろより上昇に転じ, 特に増殖の目立つ培養後期に大きな増加を示した。D.O.は培養とともに減少し, 特に培養後期の減少度は大であった。培養に伴う培地条件等の変化についてさらに検討を加えている。

一方 photoautotrophicジャーファメンター培養も現在あわせ検討中である。

1D-8

タバコ緑色培養細胞の無機栄養 VIII. 細胞生長に及ぼす培地中のN形態とClとの影響

°清水摂子，河野　均，吉田文武（玉川大・農・農芸）

前報同様，完全植物体でいわれている「植物が最高収量を得るには，体内において一定濃度範囲のカルボン酸イオンが必要である。」というカルボン酸イオン正常濃度説が培養細胞にも成立するかを確かめてみた。この説は，式で示すと，$C-A=(\underline{K^+}+\underline{Mg^{2+}}+\underline{Ca^{2+}}+\underline{NH_4^+})-(\underline{NO_3^-}+\underline{SO_4^{2-}}+\underline{H_2PO_4^-}+R_2PO_4^-+\underline{Cl^-})=RCOO^-$ となる。ただし，＿をつけたものは，代謝されずに残ったイオンであり，$R_2PO_4^-$ は有機態のリン酸イオンである。

前報では，NH_4+NO_3型，NH_4+RCOO型，NH_4+NO_3+RCOO型の培地シリーズで主に収量を中心に検討したが，今回は，以前に得た培地中の過剰NH_4害に対するClの抑制効果にも着目し，NO_3単独と$NO_3 \cdot NH_4$併用との培地中にClの濃度を変化させて加え，この効果をみることにした。すなわち，3つの培地シリーズ，Experiment I（NH_4 0, NO_3 42, Cl 0-20 meq/l），Exp. II（NH_4 10, NO_3 42, Cl 0-25 meq/l），Exp. III（NH_4 30, NO_3 42, Cl 0-25 meq/l）のように，NH_4濃度，NH_4/NO_3比，Cl濃度を変えた各シリーズ培地にタバコ細胞を培養し，細胞中の（C−A）の変動が細胞の生長に及ぼす影響を調査した。

(1)総陽イオン含量（C）――培地へのNH_4の添加により細胞中のK, Ca, Mg含量は，陽イオン間の拮抗作用によりExp. I＞II＞IIIと減少し，また同一実験シリーズ内ではMgとCa含量は，培養細胞で知られる拮抗作用を示した。また，NH_4は吸収後，ほとんど代謝されて有機態N化合物となり，代謝されずに残ったNH_4含量は僅少であった。従って，総陽イオン含量(C)は，Exp. I＞II＞IIIと減少した。

(2)総陰イオン含量(A)――総陰イオン含量(A)は，Exp. I＜II＜IIIと培地の浸透圧に比例的に増加した。各シリーズ内で培地中のCl濃度を0から20または25 meq/lへと増加させたので，Cl濃度が増大するに従って細胞中のCl含量は増加し，総陰イオン含量(A)のかなりの部分をしめた。

(3)有機酸イオン含量（C−A）および含N有機態陽イオン含量（A−C）――以上の結果から，全シリーズの処理区の（C−A）値は，Exp. I＞II＞IIIと減少し，+130〜−110 meq/100 g d.m.のきわめて広い範囲を示した。特にExp. IIIでは，（C−A）がほとんどの処理区で負の値を示し，しかも細胞の生長率は，Murashige-Skoog培地における生長率を100とすると，Exp. IのNo.5（C−A：+120 meq/100g d.m.）と同様，Exp. IIIのNo.7（C−A：−50 meq/100g d.m.）は，300の高い値を示した。（C−A）と有機態N含量との関係をみると，培地中のNH_4濃度が増大し，（C−A）の小さくなるほど，有機態N含量は高くなった。従って，培地のNH_4濃度が高く $C-A<0$ になるときは，$A-C=R\cdot NH_3^+>0$ であり，細胞は含N有機態陽イオンを生成し，これが主として吸収の早いCl^-により中和され，細胞の収量も増大すると考えられた。この含N有機態陽イオンについては定性的に調査した。

従って，タバコ細胞は（C−A）の0以上の値のある範囲に生長に対する正常濃度を持つかもしれないが，C−A＜0の時あるいはカルボン酸イオンがあまりなくても高い生長をとげうる調節能力を持っていると考えられた。

1D-9　ツツソロイゴケ培養細胞の生長における有機酸の効果

○太田喜元，石川桃代，阿部暁津子，加藤研治，広瀬善雄
(サントリー生有研)

ツツソロイゴケ(Jungermannia subulata)の胞子から誘導した緑色の液内培養細胞の生長には，TCA回路の有機酸あるいはピルビン酸が必要であること，および有機酸の消費と生長の関係については既に報告したが，今回は有機酸が有効である理由について検討した結果について報告する。

この細胞系の培養にはゼニゴケ細胞の培養に用いているMSK-1培地を使用している。本培地から有機酸を除くと細胞は数日以内に褐変して死滅するが，TCA回路の有機酸10mMあるいはピルビン酸20mMを添加することにより,生長は正常となる。培養の経過に伴う培地のpHの変動を調べると，有機酸を加えない場合には培養開始後48時間以内にpH3以下に急激に低下すること，および有機酸が存在する場合も同様に低下するが,その速度は遅く11日目にpH3近くまで下り,その後再び上昇することが判明した。このように急激なpH変動の原因としては，培地中の窒素源(硝酸塩40mMおよびアンモニウム塩20mM)の利用のアンバランスによることが考えられる。　硝酸塩濃度を一定とし,アンモニウム塩濃度を0～20mMの間で変化させて培養すると，5mM以上では急激なpH低下の後,細胞は死滅するが，2および1mMの場合にはpHは夫々3.2および3.6と低下するものの細胞は死なず，徐々にではあるが生長を続けることが判明した。硝酸塩のみではpHの低下はないけれども，細胞は殆ど生長しなかった。　MSK-1培地に炭酸カルシウムを10mM相当添加すると，7日目までpHは5.4～5.6に保たれ，有機酸を加えなくても生長は正常であった。培地中の窒素源の減少を測定すると,いずれの場合も，相当量のアンモニアが培養開始直後に急激に取込まれること，およびアンモニアが存在する間は硝酸塩は全く取込まれないことが判明した。また非代謝性のマレイン酸，あるいはTCA回路の阻害剤であるマロン酸を10mMの濃度で与えると，pH低下に関しては同様の緩衝作用が認められるが，細胞の生長は続かず数日後に褐変した。

以上の結果から，ツツソロイゴケ培養細胞の生長における有機酸の効果は,そのpH緩衝作用により,細胞がアンモニアを接状的に取込むことによって生ずる培養初期のpHの極端な低下を抑制すること，および同時に細胞内のアンモニア代謝を促進し，有害量のアンモニアが細胞内に蓄積することを防止することにあると考えられる。

第2日　4月7日(月)

A 会 場

光合成 II、III

2A-1

光合成細菌 *Rhodopseudomonas sphaeroides* の培地組成によるヘム含量の変動

°高市真一，森田茂廣　（東大・理・生化）

光合成細菌の光合成電子伝達系は培養条件により変動することが知られている。先に *Rhodopseudomonas sphaeroides* 菌体中のプロトヘムとヘムCの比（ヘム比）が培地組成（窒素源，ビタミン源，水の種類，金属イオンの添加）により約1と約2の2種類に分類できることを報告した。さらに蛋白及びバクテリオクロロフィル（Bchl）当りのヘム含量に対する培地組成の影響を測定した。

R. sphaeroides を明・嫌気，約48時間培養し，菌体を破砕し，直接ピリジンヘモクロムにし，酸化還元差スペクトルよりプロトヘムとヘムCの含量を算出した。

ヘム/蛋白　　ヘムC含量は培地組成によらず常に約1 n mole/mg蛋白であった。プロトヘム含量は2種類に分けられ、VDP・VDG・YTP・YTG培地では約1 nmole/mg蛋白，その他の培地では約2 n moles/mg蛋白で、これらはそれぞれヘム比約1と約2に対応した。

ヘム/Bchl　　ヘム比が約2のものはどの培地組成でもプロトヘムが約10，ヘムCが約5分子/100分子Bchlであった。ヘム比が約1のものは、VDP・VDG培地では両ヘム共に多く約10分子/100分子Bchl，YTP・YTG培地では両ヘム共に少なく約5分子/100分子Bchlであった。

Bchl/蛋白　　Bchl当りのヘム含量の多いVDP・VDG培地のみBchl含量が少なく、その他の培地ではBchl含量が多い傾向があった。

培地成分の有機酸（乳酸，リンゴ酸）はヘム比及びヘム含量に影響しなかった。またVD(P・G・N)培地では脱イオン水でも水道水でも差がなかった。

ヘム比及びヘム含量は培地組成により変動し，このうち蛋白当りではプロトヘム含量のみ変動したが、Bchl当りでは両ヘムの含量が増減した。ヘム比及び蛋白当りのヘム含量は2種類，Bchl当りのヘム含量は3種類の値を示した。

略号	培地組成（乳酸を含む）			プロトヘム/ヘムC	(1) プロトヘム/蛋白	(1) ヘムC/蛋白	(2) プロトヘム/Bchl	(2) ヘムC/Bchl	(3) Bchl/蛋白
VDP	ビタミン(4)	脱イオン水	ペプトン	1.2	1.3	1.1	12.2	10.1	12
VDG			グルタミン酸	1.2	1.3	1.1	9.0	7.5	14
VDN			リン酸アンモン	2.6	2.4	0.9	14.2	5.5	17
YTP	酵母エキス	水道水	ペプトン	0.9	0.8	0.9	5.0	5.6	17
YTG			グルタミン酸	1.4	1.3	0.9	6.0	4.4	21
YTN			リン酸アンモン	1.7	1.5	0.9	7.1	4.3	22
YDP	酵母エキス	脱イオン水	ペプトン	1.7	2.0	1.2	9.7	5.7	21
YDG			グルタミン酸	2.7	2.0	0.7	13.2	4.9	15
YDN			リン酸アンモン	2.5	2.1	0.9	14.4	5.8	15

(1) n moles ヘム/mg蛋白　(2) moles ヘム/100 moles Bchl　(3) n moles Bchl/mg蛋白
(4) ビタミン：ニコチン酸・チアミン・ビオチン

2A-2

Rhodopseudomonas palustris の色素－蛋白複合体の近赤外部吸収スペクトル

宮尾光恵、林秀則、森田茂廣 （東大．理．生化）

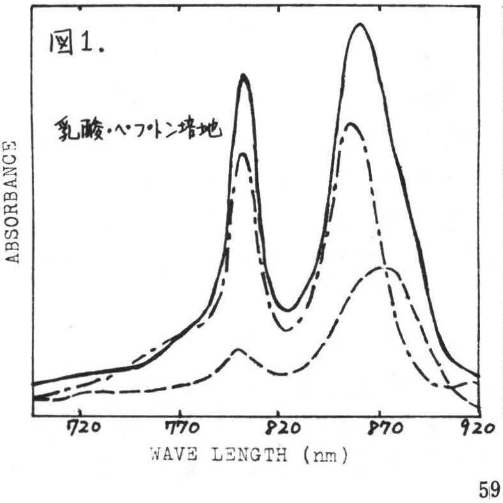
バクテリオクロロフィル（Bchl）は、光合成細菌の菌体内では蛋白質と結合して光合成器官にのみ存在し、培養条件によってBchlの菌体内近赤外部吸収スペクトルが変化する。*Rhodopseudomonas palustris* では、Bchlは２種のBchl a-蛋白質複合体として分離され、それぞれＬＨ１，ＬＨ２と名づけられている。ＬＨ１は主にB870を、ＬＨ２はB800, B850をもっており、培養条件による近赤外部吸収スペクトルの差異は、光合成器官内のLH1とLH2の量比のみによると考えられてきた。

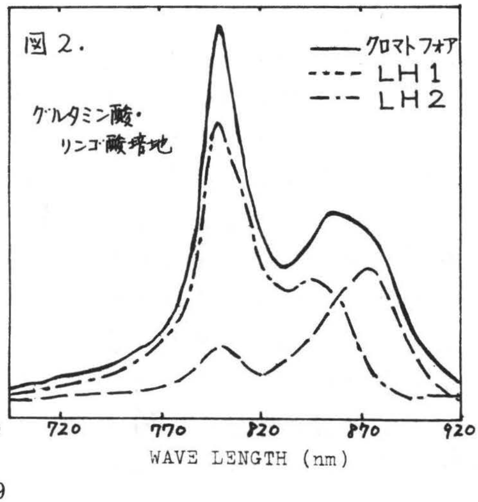
明・嫌気的条件下で、異なる培地組成・光強度で培養した*R. palustris*から、異なる近赤外部吸収スペクトルをもつ２種のクロマトフォアが得られた。800nmの吸収に対して860nmの吸収がほぼ同じ大きさのクロマトフォア（high 850）と、860nmの吸収が800nmの吸収より小さいもの（low 850）の２種類であった。（図1, 2 実線）

両者をそれぞれ、吸収スペクトルの保存される条件の界面活性剤（sodium dodecyl sulfate と sodium deoxy cholateの混合物）で処理し、ポリアクリルアミドゲル電気泳動により、ＬＨ１とＬＨ２を分離した。２種のクロマトフォアとも、ゲル上のほぼ同じ位置にＬＨ１，ＬＨ２のバンドが得られた。ゲルから抽出したＬＨ１の近赤外部吸収スペクトルは両者ともほぼ同一であった。（図1, 2 破線）　これに反してhigh-850からは、800nm, 850nmの吸収がほぼ同じ大きさのＬＨ２（図１鎖線）が、low 850からは、800nmの吸収が大きいＬＨ２（図２ 鎖線）が得られた。

両者のクロマトフォアの近赤外部吸収スペクトルは、ＬＨ１とそれぞれのLH2の吸収に適当な係数を乗じたものの和として近似的に再現できた。このことから、単離されたＬＨ１，ＬＨ２にはクロマトフォアの吸収スペクトルが保存されており、クロマトフォアの吸収スペクトルはＬＨ１とＬＨ２の量比のみならず、ＬＨ２の吸収スペクトルによって決まると考えられる。

*R. palustris*のＬＨ２は、培養条件の差異により少なくとも２種類の異なるBchl の吸収スペクトルを示す。





2A-3

紅色硫黄細菌から得られる色素ー蛋白質複合体の円二色性

林秀則，野沢庸則*，箕野昌弘*，森田茂廣（東大・理・生化，*東北大・非水研）

光合成細菌の菌体内におけるバクテリオクロロフィル a の近赤外部吸収スペクトルは有機溶媒中でのものに比べ 30～120nm 長波長側に移動しており，また複数の吸収極大を示す。紅色硫黄細菌 Chromatium vinosum の場合，菌体における吸収極大波長に応じて B800，B820，B850，B890 などの吸収型が存在すると考えられている。菌体を界面活性剤処理することによって，各々異なった吸収型を持った複数の色素ー蛋白質複合体に分けることができる。これらは例えば主に B890 を持ったものは fraction A，B850 と B800 を持ったものは fraction B，B820 と B800 を持ったものは fraction C などと呼ばれている。

これらの単離した複合体の近赤外部吸収スペクトルが菌体内に存在する時とほぼ同一である可能性については既に報告した（第52回 日本生化学会大会）。今回はさらに同様な処理によって単離した各複合体について円二色性を測定した。

fraction A の円二色スペクトルにおいては 900nm に負のピーク及び 800nm の前後に一対になった負のピークと正のピークが見られた。前者のピークは近赤外部吸収スペクトルのうち B890 に対応し，後者の対になったものは B800 に対応すると考える。他の複合体の円二色スペクトルにおいても fraction B では B850 に，fraction C では B820 に対応する負のピーク，及び各々の B800 に対応して一対となった正負のピークが存在すると判断できる。

単離された各々の色素ー蛋白質複合体の円二色スペクトルをある特定の比率で加算したものは菌体，即ちクロマトフォアの円二色スペクトルと類似していた。これは単離された複合体におけるバクテリオクロロフィルの円二色性が各々菌体内に存在する時のものとほぼ同一であることを示している。

上述の C. vinosum を得た培養条件とは異なった条件下で培養すると，fraction A と fraction B は含むが fraction C は含まず，前述の菌体とは近赤外吸収スペクトルの異なった菌体を得ることができる。この菌体から得た fraction A と前述の菌体から得た fraction A とは近赤外部吸収スペクトルのみならず円二色スペクトルも同様であった。しかし各々の菌体から得た fraction B については吸収スペクトルにおいても差異が見られたが，さらに円二色スペクトルにおいてもより顕著な差異，即ち B850 に対応する二色性の負のピークの位置，あるいは 820nm における正の二色性のピークの有無などにおいて違いが見られた。この結果同一種の菌体から得られる対応する色素ー蛋白質複合体であっても生育条件などの違いによりそれらの性質に差異が生じると思われる。

以上 C. vinosum の色素ー蛋白質複合体の円二色性の測定から B890，B850 などの吸収型に対応して負のみにピークを示す円二色性があると思われる。この結果はこれまで他種の光合成細菌について行なわれた測定から予想される B890，B850 などに対応する一対になった正負のピークを示す円二色性とは異なるものである。

2A-4

クロマトホアに結合したバクテリオクロロフィルに対するクロロフィラーゼの効果

°田中弘一郎，角野冨三郎，山下仁平　（阪大・蛋白研）

ライ麦より精製したクロロフィラーゼは、バクテリオクロロフィル（Bchl）をバクテリオクロロフィリド（Bchlide）とフィトールに水解する反応を触媒する。私達はこの性質を利用して，光合成細菌 Rhodospirillum rubrum のクロマトホアに結合したBchlの存在部位，および，その状態について検討した。

ライ麦のクロロプラストのアセトン粉末より、1％コール酸でクロロフィラーゼを抽出し，つづいてアセトン沈殿，硫安分画，phenyl-Sepharose CL-4B カラムによる疎水的クロマトグラフィーによって精製した。この標品には、プロテアーゼ活性は認められなかった。また、30％アセトン存在下でクロロフィルaに比べて，約40％の速度でBchl a を水解した。

クロロフィラーゼをクロマトホア懸濁液に大過剰に加えても、結合Bchlの水解は起らない。ところが、15％以上のアセトンが存在すると，結合Bchlは水解され、これに由来する吸収極大である870nmの吸光度が減少し、新たに遊離Bchlideによる770nmの吸光度が増加した。この870nmの吸光度の減少量は，Bchlideの生成量に対応していた。

つぎに、クロマトホアとクロロフィラーゼを種々の濃度のアセトン存在下でインキュベートした後，遠心によって上清とクロマトホアに分離し、各分画に残存するクロロフィラーゼの活性を測定した。その結果，10％以上のアセトンが存在すると，クロマトホア膜にクロロフィラーゼが吸着し始め，約20％で飽和すること，また、一部のクロロフィラーゼは15－20％のアセトンが存在すると，クロマトホア膜を貫通して、膜の内側に取込まれることが示唆された。

そこで，クロマトホアとは膜の表裏が逆転していると考えられるスフェロプラストを調製し、これにクロロフィラーゼを作用させたところ，5％のアセトン濃度で結合Bchlは水解されはじめ，明らかにクロマトホア膜の場合とは反応性を異にした。

20％アセトン存在下でクロマトホア膜にクロロフィラーゼを作用させると，約20～35時間ですべての結合Bchlが水解されたが、その時間経過は2層性を示し，初期の段階で約15％の結合Bchlが速く水解された。一方，反応中心Bchlの活性（Liac-860）は、15％の結合Bchlが水解された時には、すでに50％減少した。このことは、反応中心Bchlの約半分が、初期の段階で水解されやすい状態にあることを示していると思われる。

以上の結果より、結合Bchlのうち，集光性Bchlの大部分はクロマトホア膜の裏側に結合しており、反応中心Bchlの少なくとも50％は表側に結合していると思われる。また，クロロフィラーゼと結合Bchlが反応するためには、少なくとも5％のアセトンを必要とし，15％以上のアセトンが存在すると，クロロフィラーゼはクロマトホア膜を貫通して、裏側に結合していると思われる集光性Bchlを水解するものと推測された。

2A-5　クロマトホア膜の再構成における脂質成分の役割

○松田英幸*、西望、角野冨三郎、山下仁平、平山修*、堀尾武一、（阪大・蛋白研，*島根大・農化）

クロマトホア膜は、その乾重量の約30-40%が脂質成分［リン脂質、リポアミノ酸（LA），中性脂質、バクテリオクロロフィル(BChl)などの色素等］から成る。本研究ではクロマトホア膜から電子伝達系成分および光化学系を含む複合体(光反応単位と呼ぶ、F2）を界面活性剤を用いて可溶化し、それらを種々のリン脂質およびLAの存在下で再構成することによって、上記の脂質成分のF2の光合成電子伝達活性におよぼす影響を検討した。

R. rubrumのクロマトホア膜を2%デオキシコール酸と1%コール酸の混液で処理し、ショ糖密度勾配遠心によって得られる光反応単位(F2)は、BChl/UQ-10/Lipid-P=33/1.3/0.25をしめす。F2はチトクロム c_2 (Cyt c_2)を含まず、F2単独で光照射してもCyt c_2の酸化に由来するαバンドおよびγバンド($-\Delta A_{551nm}$または$-\Delta A_{420nm}$)を全く示さない。けれども、F2にCyt c_2を添加するとCyt c_2の光酸化が僅かながら観察される。この系に、さらに菌体から抽出分画した極性脂質（リン脂質とLAよりなる）を加えると、Cyt c_2の光酸化活性は約4倍に増加する。その極性脂質の各成分をそれぞれ単独で添加すると、LAおよびホスファチジルグリセロール（PG）が最も効果がある。再構成の最適条件における各成分の分子数比は、BChl/Cyt c_2/LA=33/7.7/580である。この系のCyt c_2の光酸化$-\Delta A_{551nm}$は、光照射時間が15秒以下である場合には極めて可逆的であり、光を消すと回復する。更に、このCyt c_2の光酸化はアンチマイシンAの添加によって3倍強に増大する。しかし、添加脂質を増加させると、Cyt c_2の光酸加は増大するけれども、アンチマイシンAの添加効果が見られなくなる。酸化還元反応が、過剰の脂質によってF2に結合している反応中心のUQ−10と添加Cyt c_2の間で阻害されるためと推測される。F2に結合しているBChlの吸収極大波長は865nmであるが、F2へ上記脂質を添加して再構成した系のBChlの吸収極大は871nmである。F2のBChlの存在状態は、脂質の添加によってクロマトホアのBChl（吸収極大波長873nm）の存在状態により近くなったと考えられる。また、F2に含まれる反応中心のBChlとUQ−10の光照射による吸収変化は、上記脂質の添加によって、クロマトホアのレベルまで回復する。

EFFECT OF POLAR LIPIDS ON EXTENT OF PHOTO-OXIDATION OF CYTOCHROME c_2 WITH RECONSTITUTED SYSTEM

Added components		$(-\Delta A_{551nm}/A_{865nm})$ $(\times 10^3)$ no addition	+ Antimycin A
(A) F2		0	0
(B) (A) + Cyt c_2		4.1	8.8
(C) (B) + Polar lipids	0.18mg	18.4	47.8
	1.80mg	47.6	50.5
+ LA	0.05mg	17.6	58.7
+ PG	0.06mg	11.0	28.6

これらのことは、F2, Cyt c_2と適当な脂質（特にLA）の添加によって環状の光励起電子伝達系が再構成されている可能性を示す。再構成において、LAおよびPGの両脂質が重要な役割を果していると思われる。

2A-6

光合成細菌 R. rubrum の培養液中に放出されるフェレドキシン

○日裏久英、角野冨三郎、山下仁平、堀尾武一（阪大・蛋白研）

光合成細菌 R. rubrum のフェレドキシンについては、すでに Arnon ら[1-3]によって、4種類のフェレドキシンが存在することが報告されている。彼らによると、2種類の水溶性のもの、および2種類のクロマトホア膜に結合しているものがある。

私たちは[4]、すでに、R. rubrum のヒドロゲナーゼが培養液中に放出されることを報告した。今回は、ヒドロゲナーゼの他に、フェレドキシンも培養液中に放出されることを見い出したので報告する。

R. rubrum を光照射下で4日間培養したのち、菌体を除去した培養液を DEAE—Sepharose カラムに通した後に、1M NaCl を含む 0.1M Tris ＋ 1mM EGTA（pH 8）の緩衝液で吸着成分を溶出させることによって濃縮した。この濃縮液を用いて、Ultrogel AcA 44 カラムによる分子ふるいクロマトグラフィを行なうと、ヒドロゲナーゼが溶出された後に、フェレドキシン分画が溶出されてくる。この分画を DEAE—Sepharose カラムによるイオン交換クロマトグラフィ、Sephadex G—75 カラムによる分子ふるいクロマトグラフィによって、さらに精製した。えられた菌体外フェレドキシン標品は、ポリアクリルアミドゲル電気泳動において、単一バンドをしめした。精製フェレドキシンの吸収スペクトルは、Arnon ら[1]による Type I のフェレドキシンの吸収スペクトルと酷似している（図1）。分子量は、Sephadex G—75 カラムによる分子ふるいクロマトグラフィによって、約 9,000 である。この値も Arnon ら[1]の Type I と一致する。Arnon ら[1-3]の Type II、III、IV のフェレドキシンは培養液中には見い出されなかった。

一方、R. rubrum の菌体外ヒドロゲナーゼの活性に対する、このフェレドキシンの効果はメチルビオロゲンと比較して、約 3% であった。

ABSORPTION SPECTRUM OF EXTRACELLULAR FERREDOXIN FROM R.RUBRUM

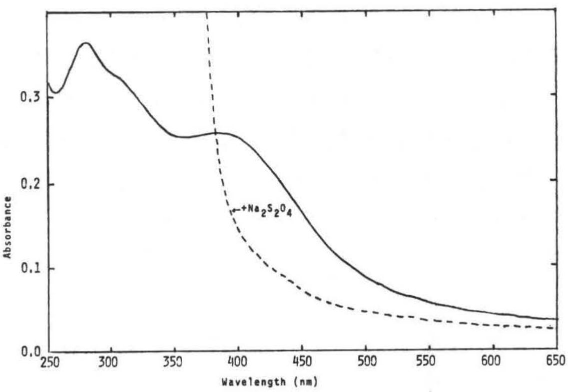


図1

1). Shanmugam,K.T., Buchanan,B.B., and Arnon,D.I., Biochim. Biophys. Acta, 256 477 (1972)

2). Yoch,D.C., Arnon,D.I., and Sweeney,W.V., J. Biol. Chem., 250, 8330 (1975)

3). Yoch,D.C., Carithers,R.P., and Arnon,D.I., J. Biol. Chem., 252, 7453 (1977)

4). Hiura,H., Kakuno,T., Yamashita,J., Bartsch,R.G., and Horio,T., J. Biochem., 86, 1151 (1979)

2A-7

β-ナフチルオリゴリン酸等のホウレンソウCF_1に対する作用 II.

○篠原健司，桜井英博　（早大・教育・生物）

昨年の本学会に於いて，β-ナフチルオリゴリン酸(β-NapPx)のうち，β-ナフチルニリン酸，三リン酸，四リン酸(β-$NapP_2$, β-$NapP_3$, β-$NapP_4$)は光リン酸化反応，単離CF_1のCa^{2+}-ATPアーゼに於いてアデニンヌクレオチドと拮抗的に，一方β-ナフチルーリン酸(β-$NapP_1$)はアデニンヌクレオチドと非拮抗的に阻害することを報告した。その後の研究について報告する。

1)光リン酸化と電子伝達

β-$NapP_2$，β-$NapP_3$，β-$NapP_4$は葉緑体の光リン酸化をADPに関し，拮抗的に，β-$NapP_1$は非拮抗的に阻害した。もう一方の基質P_iに関しては，5mM ADP存在下で，β-$NapP_1$は拮抗的(K_i^{app}=1.45mM)，β-$NapP_2$は非拮抗的(K_i^{app}=8.5mM)であった。この時のP_iに対するK_m^{app}は0.25mMであった。β-$NapP_1$のような有機リン酸がP_iと拮抗することは特筆に値する。

β-$NapP_1$，β-$NapP_2$のHill反応(フェリシアン化カリ還元)に及ぼす影響を調べた。β-$NapP_1$はbasalな電子伝達活性に対してはほとんど影響せず，リン酸化に共役したヒル反応に対しては典型的なエネルギー伝達阻害剤と同様な作用を示したが，逆にβ-$NapP_2$はuncoupler的にbasalな電子伝達活性を促進するように働き，共役した電子伝達活性にはほとんど影響を与えなかった。

2)光-DTT活性化膜ATPアーゼ

β-NapPxは基質にならないが，光リン酸化と同様に葉緑体ATPアーゼ活性を阻害した。阻害程度は，光リン酸化に比べ弱く，基質ATPの50倍濃度でβ-$NapP_1$，β-$NapP_2$はそれぞれ約70%，90%阻害した。β-$NapP_1$はATPに対し非拮抗的(K_i^{app}=3.5mM)に，β-$NapP_2$は拮抗的(K_i^{app}=2.0mM)に阻害した。この時のATPに対するK_m^{app}は0.2mMであった。CarmeliとLifshitz[1]は数μMのADPがDTT存在下前照射により形成した活性化ATPアーゼの暗所下でのdecayを促進すること，P_iは反対にdecayを抑えることを報告しているが，β-$NapP_1$とβ-$NapP_2$はADPのようにdecayを促進することはなかった。

阻害様式についてこれまでの結果をまとめると，β-$NapP_2$，β-$NapP_3$，β-$NapP_4$は光リン酸化，ATPアーゼに於いてアデニンヌクレオチドと拮抗し，光リン酸化においてはP_iに対し非拮抗型の阻害を示し，これに対し，β-$NapP_1$はアデニンヌクレオチドに対し非拮抗型の阻害を，光リン酸化においてはP_iに対し拮抗型の阻害を示した。β-$NapP_1$は活性中心のP_i結合部位に，β-$NapP_2$，β-$NapP_3$，β-$NapP_4$はアデニンヌクレオチド結合部位に作用すると思われる[2]が，これらの点について更に検討中である。

(文献)

1) *Carmeli, C. and Lifshitz, Y. (1972) Biochim. Biophys. Acta,* <u>267</u>, 86

2) *Shinohara, K. and Sakurai, H. (1980) Plant & Cell Physiol. (in press)*

2A-8

インゲンマメ黄化葉緑化過程における光合成膜とクロロフィルaケイ光寿命の変化

田幡憲一・伊藤　繁・西村光雄（九大・理・生）

成熟した葉緑体ではP680，P700，light harvesting chlorophyll a/b 蛋白に結合したクロロフィルなど，異った存在状態及び機能を持つクロロフィルが存在することが知られている．高等植物の黄化葉緑体の緑化過程においては，光照射に伴って膜系の合成が進み，同時に膜中のクロロフィル含量が増加する．この際，クロロフィルは他のクロロフィル分子・タンパク分子等と会合し，様々な機能を持った分子集合へと組み込まれていく．このような過程と平行して，生葉で測定されるクロロフィルaのケイ光寿命が短かくなって行くことは既に報告した（日本植物学会第43回大会）．

本研究では，緑化過程の異った段階で葉緑体を単離し，そのクロロフィルaのケイ光寿命と光合成諸活性との比較検討を行った．

試料と方法：インゲンマメを暗中25°Cで10日から14日間水耕栽培し，その後ケイ光灯（4000lx・葉表面）を100分～300分照射して緑化を行った葉から葉緑体を単離した．

ケイ光寿命は葉緑体懸濁液にハイドロサルファイトを添加した後，Applied Photophysics-OrtecのSP-3システムを用いてTime Correlated Single Photon Counting法で測定した．ケイ光の減衰過程は single exponentialを仮定して解析した．

結果：測定されたケイ光寿命は緑化が進むにつれて短かくなり，100分間の緑化では2～3 nsecであったのが300分間の緑化後は1.5 nsec以下となった．

この緑化過程においては，クロロフィルaの吸収極大が672nmから678nmへの移動をすること，低温（77K）で光化学系IIのクロロフィルaから出ると考えられる695nmのケイ光極大，光化学系Iのクロロフィルaからのケイ光と考えられる730nmのケイ光極大が顕著になってくること，DCIP(2,6-dichloroindophenol)光還元の飽和光強度が低下すること，飽和光強度におけるクロロフィルあたりの還元速度が増加すること，ケイ光の誘導期現象においてF_v/F_oの比が大きくなることなどが観察された．これらの事実は緑化が進むとクロロフィル分子が次第に光化学系に組み込まれ，捕獲された光エネルギーが効率よく光化学反応に使われるようになるためにケイ光寿命が短かくなることを示唆するものである．

しかし，ハイドロサルファイトを添加して光化学反応が起こらない条件下で測定したにもかかわらずケイ光寿命が短かくなることは，単に光エネルギーが光化学反応に使われる効率が上昇したことのみが原因だとは考えられない．クロロフィルが光化学系に組み込まれて行く事に伴って無放射失活の速度が大きくなることも，ケイ光寿命の短縮に寄与していると考えている．

2A-9

光合成細菌 Chromatium vinosum の膜表面pHによる電子伝達速度の制御

橋本 健・西村 光雄　九大・理・生物

Chromatium vinosum のクロマトフォアにおいて、電子伝達速度（光酸化されたチトクローム c-555 の再還元速度）は好気条件下で膜胞内 pH(pH_{in}) により制御されている[1]。この循環的電子伝達の律速段階は、クロマトフォアの膜の内側に，クロマトフォアとは逆の方向性をもつ細胞やスフェロプラストでは、その膜の外側に面して存在すると考えられる。この可能性を確かめるため，膜の一方の表面のpH を懸濁液の pH と塩濃度を変えることにより，変化させる方法を用いた。この解析には以下のような Gouy-Chapman の拡散二重層の理論を適用した。Chromatium vinosum のクロマトフォア膜は、通常の pH で負に帯電している事が Case & Parson[2]，Itoh[3] により報告されている。膜面上にあるこの負の固定電荷により生じる静電的なポテンシャル（表面電位, ψ_0）は、塩濃度 (C_b) と表面の電荷密度（σ）の関数であり次のように表現される。

$\psi_0 = 51.4 \; / \; Z \times \sinh^{-1}(137\sigma/\sqrt{C_b})$ (mV, 25° C) (1)　　Zは塩（Z-Z-型電解質）を構成するイオンの価数である。外液相と膜表面の水素イオンは表面電位に従ってボルツマン分布し、その結果、外液相pH(pH_b)と膜表面pH(pH_s)は次の関係をもつ。

$pH_s = pH_b + \psi_0 / 59.2$　(25° C)　(2)　　我々の使用したpH域では、電荷密度は、ある pK をもつ解離基のみによっているとすると次のように表現される。

$\sigma = \alpha(K / (I + K) - K / ((H^+) + K)$　(3)　　αは、解離基が全部解離している時の表面電荷密度，I は膜の等電点 pH の H^+濃度。これら(1)(2)(3)式より、pH_b と pH_s の関係を pK = 4.6, pI = 4.5, $\sigma = -5\times10^{-4}$ 単位電荷 / $Å^2$ (pH 8) として求めた。

細胞は，0.1 M sucrose に懸濁し pH は，2 mM MES (pH 5-7), HEPES (pH 7-8.5), glycine (pH 8-10) により緩衝した。この低塩濃度および 100 mM KCl を加えた高塩濃度で，チトクローム c-555 の再還元速度の pH_b 依存性を測定すると、塩濃度によって異る pH_b 依存性を示した。この塩の効果は、みられない場合もあり，細胞ではその生育条件に依存して律速段階が変化すると考えられた。塩の効果がみられる場合、上述の pH_b と pH_s の関係より再還元速度を pH_s に対してプロットしなおすと、塩濃度にかかわらず同一の pH_s 依存性を示した。クロマトフォアの場合は、塩の濃度にかかわらず同一の pH_b 依存性を示した。一方クロマトフォアを gramicidin D と共に 0.1 M sucrose, 2 mM HEPES-NaOH pH 7.4 で洗った後、再び gramicidin D を加えて、再還元速度を測定すると NaCl, Na_2SO_4 の有無により、pH_b 依存性は異なった。これを上述の pH_b と pH_s の関係により、pH_s に対してプロットしなおすと、塩の有無にかかわらず，同一の pH_s 依存性を示した。Gramicidin D が，存在しても，塩化コリンの場合は、その有無にかかわらず同一の pH_b 依存性を示した。以上の事より、クロマトフォアでは小胞の内側の pH_s，細胞とスフェロプラストでは膜の外表面の pH_s によって電子伝達が制御されていると結論された。

1. Hashimoto,K. & Nishimura,M. (1979) J.Biochem. 85, 57-64
2. Case,G.D. & Parson,W.W. (1973) Biochim.Biophys.Acta 292, 677-684
3. Itoh,S. (1980) Biochim.Biophys.Acta, in press

2A-10 メロシアニン色素による *Chromatium vinosum* クロマトホアでの膜電位形成過程の解析

伊藤 繁　（九大・理・生物）

光合成細菌クロマトホア膜の環状電子伝達系の解析，特に各電子伝達成分の膜内部での配列状態の研究には，電子伝達成分そのものの反応の測定とともに，電子移動に伴う膜電位形成の解析が大きな役割を果してきた。特に *R. sphaeroides* クロマトホアでは，酸化還元滴定法を併用して，膜内電場変化の内在指標となるカロチノイドの示す，閃光照射時の大きな吸光度変化の測定から，電子伝達系のくわしい解析が行われてきた。このような，カロチノイドの大きな吸光度変化がみられず，研究が遅れていた *Chromatium vinosum* クロマトホア膜での電子伝達系の解析を，膜電位に応じて吸光度変化を示す，メロシアニン色素（日本感光色素，NK2272）を用いて試みた。

Chromatium クロマトホア膜を閃光照射すると，色素の膜への結合量の増加を反映した，570nmでの比較的遅い（$t_{1/2} \approx 5$ms）吸光度増加がみられた。この吸光度変化は，閃光強度を変えて光反応量を変えると，それに比例して変り，バリノマイシン添加により消失する事から，膜電位変化を反映すると考えられる。暗所でのバリノマイシン添加により，K^+濃度差による拡散電位を形成した際の吸光度変化量との比較から，一閃光照射あたり最大約40mV（閃光後10msの時点），定常状態では約120mV のクロマトホア内側が正の電位差が生じると推定された。一方このクロマトホアに存在するカロチノイドの，小さな吸光度変化の測定からも，閃光照射時に同様な，約40～60mVの内側正の電位変化が推定された。クロマトホア懸濁液の酸化還元電位を変えつつ，閃光照射時のメロシアニン色素の吸光度変化量を測定した結果，$BChl_2$（反応中心バクテリオクロロフィル二量体）→X（電子受容体）間，チトクロム $c_{555} \rightarrow BChl_2 \rightarrow X$ 間，チトクロム $c_{552} \rightarrow BChl_2 \rightarrow X$ 間，の各反応での電子移動に伴う膜電位の形成は，各々，9.2mV，40mV，17mV と推定された。この結果は，クロマトホア膜内側からこれらの成分が垂直方向に，$c_{555} \xrightarrow{0.56} c_{552} \xrightarrow{0.21} BChl_2 \xrightarrow{0.23} X$ といった相対距離で配置されている事を示唆している。アンチマイシンA存在下では，閃光照射による色素の吸光度変化量はあまり減小しなかった。この事は，*R. sphaeroides* の電子伝達系とは異なり，上記4成分間での電子移動以外の，チトクロムbの反応に伴う電子移動による膜電位形成は小さい事を示している。これがどのような電子伝達経路を反映しているかについては，現在検討中である。またリン酸化条件下では，閃光照射後の吸光度変化量の低下が見られ，これはエネルギー転移阻害剤DCCD添加により回復した。この事実は，光反応により生じた膜電位が，リン酸化反応により消費される事，おそらくリン酸化に伴う共役因子を通しての，クロマトホア外側への水素イオンの移動に膜電位が利用される事を反映していると考えられる。

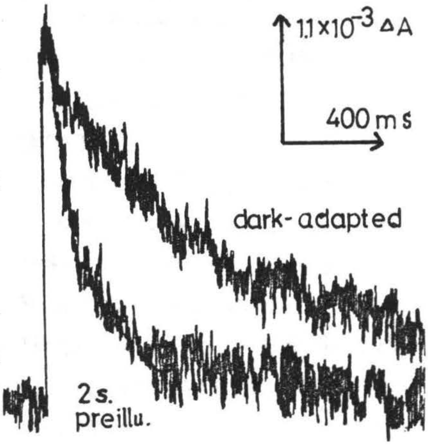
2A-11　生葉中での Flash-Induced 515-nm 吸収変化へのエネルギー状態の影響

°森田眞次，伊藤繁，西村光雄　（九大・理・生）

生葉では，閃光照射時の 515nm 吸光度変化は，前照射を行うことにより，その減衰が著しく促進される。この促進現象の原因，性質を調べるために，種々の条件下で，閃光照射時の 515nm 吸光度変化の測定，あるいは，遅延ケイ光，ケイ光の同時測定を行った。試料は，播種後 3～7 週間のトウモロコシ幼植物の葉を用い，閃光照射時の 515nm 吸光度変化は信号加算器により平均化した。遅延ケイ光，ケイ光は，回転セクターを用いたりン光計を用いて，光照射を続ける際の変化を同時に測定し，次の様な結果が得られた。

〔結果〕

1. 515nm 吸光度変化の減衰の促進の度合は，前照射の長さ，強度の増加に伴い大きくなり，吸光度変化の 1/2 回復時間は最大 1/20 程度まで短縮された。
2. 前照射による促進は，葉を暗所に置くことによって消えた。この暗適応が 1/2 進行するのに要する時間は，10 秒前照射の場合，約 30 分であった。
3. 暗所に適応した葉では，515nm 吸光度変化の減衰には幾つかの成分が見られた。前照射により，ある程度以上に減衰が促進された場合は，単一の指数関数的減衰を示した。
4. 蒸留水中に 30 分～1 時間，暗所で浸しておいた葉では，前照射による吸光度変化の減衰の促進は見られなかった。同じ条件下では，遅延ケイ光の強度は非常に小さくなっていた。同様な前照射による 515nm 吸光度変化の減衰促進の効果の消失，遅延ケイ光の減小は，アルゴン，二酸化炭素ガスによる置換によってもみられた。尚，遅延ケイ光の時間的経過は，二酸化炭素ガスの場合多少異っていたが，これらの影響は可逆的であった。



この様に，515nm 吸光度変化の減衰の促進と遅延ケイ光強度との間に対応が見られた事は生葉中での光合成において，閃光により形成された膜電位の解消速度が葉緑体中のエネルギー状態によって調節されている事を示している。促進された減衰の暗回復に時間を要する（～30分）ことは，高エネルギー状態そのものが減衰を促進しているのではなく，高エネルギー状態により，膜の状態，あるいは，膜構成成分が変化を受け，膜電位の解消が速くなっていることを示すと考えられる。

2A-12

光合成膜系の生理的・化学的制御と515nm吸収変化との関係の解析 (I) 生理的制御の場合

°藤茂 宏・岡村和夫(岡山大・理・生物)

光合成膜系を生理的・化学的に制御した場合の膜系のエネルギー状態の変化を解析する目的で，パルスフラッシュ誘起による515nm吸収変化の消長を追跡した。

(1)実験条件：(i)使用機器：コンピューターコントロール高速パルスフラッシュ分光光度計(ユニオン技研製 RA-602，閃光強度：約100ジュール，持続時間：30 μsec) (ii)励起光：670 nm，730 nm (iii)クロロフィル濃度：10 μg Chl/ml (iv)測定感度：OD 0.03/F.S. (v)サンプリング時間：100 msec/F.S. (vi)加算回数：3~7回。

(2)時間経過：フラッシュ誘起515nm変化(その大きさをFとする)のdecayを時間に対してセミログプロットするとbiphasicallyに反応が進み，次式で表現される。

$$\Delta A_{515} = A' \exp(-k_1 t) + B.\ \exp(-k_2 t)$$

第1項に従う部分をrapid phaseとよび，そのdecayのhalf timeを$t^R_{1/2}$とし，第2項に従う部分をslow phaseとよび，そのdecayのhalf timeを$t^S_{1/2}$とする。

(3) Aging：Fの大きさはagingにより著しく低下し，98時間経つと20%ぐらいに落ちる。$t^R_{1/2}$，$t^S_{1/2}$はagingによりあまり変化しない。

(4)温度処理：515nm変化は温度処理に対して鋭敏であり，40°C-5分の処理によりほとんど認められなくなる。30°C-5分の処理でも，大きさFは20%に減少し，$t^S_{1/2}$は短くなるが，$t^R_{1/2}$はあまり変らない。

(5)温度依存性：515nm変化の温度依存性は反応条件の如何により様相が異なる。条件3(表1)のようにATP生成系と電子受容体を共に与えた場合は，大きさFは温度により変化しないが，$t^S_{1/2}$のArrhenius plotは20°Cで折れまがりを生じ，この温度の上下で見かけの活性化エネルギーを異にする。ATP生成系はあるが電子受容体を与えない条件2の場合もほぼ同様の結果が得られた。なお，条件3の場合はrapid phaseはほとんど認められない。Cl^-のみを与えた条件1の場合は折れまがりを示さず，見かけの活性化エネルギーは5 Kcal/moleで，拡散の活性化エネルギーと同じオーダーとなる。大きさFと$t^R_{1/2}$とは温度依存性を示さない。

以上のことからrapid phaseは膜内で起っている物理的な状態の変化を反映しており，slow phaseはイオンの流れに直接関与する変化で，それに関係した反応のどの段階が律速的になるかによって温度依存性に差異が生ずるものと考えられる。

表1. 515変化の温度依存性

Conditions	Break point (°C)	Activation energy (Kcal/mole) (1)	Activation energy (Kcal/mole) (2)
(1) Tricine buffer, Sucrose (0.4 M), NaCl (0.1 M)	none	4.6 ;	5.5
(2) Tricine buffer, Sucrose (1 mM), KCl (10 mM), $MgCl_2$ (5 mM), K_2HPO_4 (5 mM), ADP (0.3 mM)	17.5	(R) 10.3	0.9
	13.5	(FR) 9.6	1.3
(3) Tricine buffer, Sucrose (0.4 M), KCl (10 mM), $MgCl_2$ (5 mM), K_2HPO_4 (5 mM), ADP (0.3 mM), Methylviologen (0.1 mM)	20	(R) 21.9	2.0
	(*) 18	25	12
	(**) none	15.2	

(R) 670 nm flash ; (FR) 730 nm flash
(*) Graeber & Witt (1974)
(**) Yamamoto & Nishimura (1977)

2A-13

光合成膜系の生理的・化学的制御と515nm吸収変化との関係の解析 (II) 化学的制御の場合

藤茂 宏・ 岡村和夫（岡山大学・理・生物）

(1)パルスフラッシュ誘起の515nm吸収変化の消長に及ぼす種々の薬剤の添加効果をしらべ（効果型とよぶ），その結果を次の符号で表1にまとめた。

F，f：Flash-induced change の吸光度の大きさの増減；controlより増大F，減少f。
R，r：Rapid decayの $t^{R}_{1/2}$ の変化；controlより短縮R，延長r。
S，s：Slow decayの $t^{S}_{1/2}$ の変化；controlより短縮S，延長s。
000：何ら影響のないもの。これら個々の数値の変化の特性はスライドで示す。

表1. 種々の薬剤の効果型

		効果型			効果型
A	o-Phenanthroline	f0S	C	Gramicidine	fRS
A	DCMU	f0S	C	CCCP	f0S
A	Hydroxylamine	f0S	C	NH_4Cl	f0S
A	Salicylaldoxime	f0S	C	FCCP	f0S
A	$HgCl_2$	f0S	C	2,4-Dinitrophenol	f0S
A	PCMB	00S	C	Acrinamine	00S
A	DBMIB	00s	C	Methylamine	00S
A	Na-azide	000	D	Antimycin A	f0S
A	Ethanol	f0S	D	ADP+ P_i	00S
B	Valinomycin	fRS	D	P_i	00S
B	NO_3^-, Cl^-, SO_4^{--}	f0S	D	ADP	00s
B	Nonactin	00S	D	Pyrophosphate	000
B	Divelent pyrrol-ester (A23187)	f00	E	Ascorbate	F00
B	Ouabain	000	E	PMS	F00
B	Nigericin	000	E	DPIP	F00
B	Monensin	000	E	DPIP+ Ascorbate	F00
			E	Ferricyanide	000
			E	Ferrocyanide	000

表1から，一般にC群（脱共役剤）はSlow decayを短くする，これはプロトンの勾配が脱共役により速くもとへもどるためと考えられる。またE群からは電子供与・受容体が Δ_{515} を増大させていることがわかる．これはこれらの試薬がelectron flowを大きくしてcontrolよりプロトン勾配が大きくなるためと推定される。

(2)更にわれわれはDCMUとCCCPの効果を波長を変化させて解析した．その結果 Δ_{515} の消長は670 nm，730 nmの励起光に対して大きさに少量の差はあるが，DCMUとCCCPの効果に大差はない，またDCMUの阻害の程度も高濃度では Δ_{515} の大きさを30%にまで抑える（それ以上は阻害しない）。

この結果はPS-IIをDCMUで抑えて ΔA_{515} が½になりそれ以上阻害の進まないことから，DCMUにより阻害されずに残った Δ_{515} をPS-I-induced Δ_{515} と考えて，Δ_{515} にはPS-IIとPS-Iとがequal contributionしていると結論したSchliephake, Junge, Witt (1968)や，PS-I-induced Δ_{515}，PS-II-induced Δ_{515} に対するDCMU，CCCPの効果を波長を変えて調べ Δ_{515} に関するPS-IとPS-IIの差も議論した山本・西村（1978）らの結果と異なる。

このことについてはさらに検討を進め報告する予定である。

2A-14

葉緑体での光による脂質過酸化反応とO_2吸収に対する陽イオンの効果

高浜有明夫　（九歯大・生物）

単離直後の葉緑体でもマロンジアルデヒドが検出されることから，緑葉中に存在する葉緑体でも脂質過酸化反応がおこっていると推定できる。この脂質過酸化反応は、葉緑体のエイジングと深く関っていると思われるので，葉緑体での脂質過酸化反応のメカニズムが解明されなければならない。我々は先に，単離したホウレンソウ葉緑体での光による脂質過酸化反応に一重項酸素分子が関与していることを示した。単離葉緑体での光による一重項酸素分子形成機構としては、光化学系Iで形成されたO_2^-の光化学系IIに蓄積された酸化力またはその他の酸化剤による酸化反応と，脂質過酸化物をへる反応の二つが考えられるが詳細は不明である。しかしながら，もし一重項酸素分子がO_2^-の光化学系IIによる酸化によって形成されるとするならば，チラコイド膜表面は負の電荷をもっているので，静電的な反撥のため，光化学系Iで作られたO_2^-はチラコイド膜内に入り込みにくいと考えられる。そうすると一重項酸素分子の形成がチラコイド膜表面の電荷の状態に依存すると考えられる。そこで，種々の陽イオンの一重項酸素分子形成に対する効果を調べた。一重項酸素分子形成の指標としてマロンジアルデヒド形成を用いた。

［結果］①5μM CCCP存在下でのマロンジアルデヒド（MDA）形成は，$MgCl_2$, $CaCl_2$, KCl, NaClで促進された。この塩による促進効果は，$MgCl_2$, $CaCl_2$, KCl, NaClの順であった。この$MgCl_2$または$CaCl_2$による促進とKClまたはNaClによる促進は，それぞれ，1mMと10mM付近で極大に達し，20mMと200mM付近で飽和に達した。他に，ヒストンによってもこのMDA形成は促進された。スーパーオキシドデスムターゼは$MgCl_2$とCCCP存在下でのMDA形成を10-20%阻害した。CCCPが存在しない場合のMDA形成は$MgCl_2$（10mM）またはKCl（100mM）では大きな影響を受けなかった。②5μM CCCP存在下でのMDA形成の塩による促進は，塩によるCCCPの光化学系IIの酸化側の阻害の増大によってもたらされると考えられるので，$MgCl_2$について調べた。低い濃度の$MgCl_2$（1mM）では，CCCPはヒル反応の初速度に影響を与えなかったが，高い濃度の$MgCl_2$（10mM）存在下では，CCCPはヒル反応を約50%阻害した。このことは，$MgCl_2$の濃度が低いときには，CCCP（5μM）は電子伝達反応を阻害することなくにMDA形成を促進していることを示している。この場合（CCCP存在下）$MgCl_2$によるMDA形成促進の理由として，$MgCl_2$によるO_2^-形成の促進が考えられる。実際$MgCl_2$によってメーラー反応が促進された。そこで$MgCl_2$がO_2^-形成に大きな影響を与えない条件（10mM NaClまたは2mM NH_4Cl存在下）でMDA形成に対する$MgCl_2$の効果を調べたところ，$MgCl_2$によってMDA形成は促進された。③カタラーゼとCCCP（5μM）存在下（アルコールは含まれていない）での酸素吸収もまた$MgCl_2$, KClによって促進された。④$MgCl_2$（10mM）存在下でのMDA形成は10μM CCCP付近にその最大値が観察された。$MgCl_2$が存在しない場合は、CCCPの濃度（< 100μM）が高くなるにつれてMDA形成は促進された。以上の結果に基づいて，単離葉緑体での光による一重項酸素分子形成機構について推論する。

2A-15

光化学系IでのO_2^-の行方

○高橋 正昭、浅田 浩二（京大・食研）

光合成の電子伝達系はNADPを還元できなくなると代りにO_2を還元しO_2^-を生成する。O_2^-は葉緑体内で不均化反応によってO_2とH_2O_2になると考えられている。葉緑体内にはスーパーオキシドディスムターゼ（SOD）が局在し、O_2^-の消去には、①SODの触媒する不均化反応を第1に考慮しなければならない。しかしO_2^-による②チトクロームfの還元、③プラストシアニンの還元、④Mn^{2+}の酸化、⑤チオール、アスコルビン酸の酸化が明らかになり、その他O_2^-が、⑥CO_2固定系の酵素との反応、⑦光化学系IIにより酸化されることも報告されている。光化学系Iの還元側で生成したO_2^-が消滅する時に非酵素的な不均化反応も加えて上記の反応がそれぞれどれほど寄与できるかを調べた。一般に並発する反応の割合を知るために速度を比較するが、葉緑体の各成分の濃度と、O_2^-との反応速度定数が求められると推定できる。しかし反応する物質の存在部位によって溶液内で得られた速度定数を変更しなければならないし、膜に結合した場合には平均濃度よりも距離が重要で、また、光合成を行っている条件下での有効濃度を知ることが必要である。まずプラストシアニンとO_2^-の反応性を閃光でFMNを励起しO_2^-を生成させて調べた。10μS, 14.4J の閃光によりFMNを還元し最終的に0.7μMのO_2^-を生成させ、600nmの吸収変化を測定してキサンチン酸化酵素系を用いてO_2^-を生成させSODによる拮抗阻害から求めた値（$10^6 M^{-1} s^{-1}$）とほぼ同じ値を得た。同じ方法でチトクロームc還元と非酵素的な不均化反応を同時に行わせチトクロームc還元速度と既知の速度定数からO_2^-の不均化反応の速度定数を求め、その値が蒸留水中で報告されている同pHでの値よりも10〜40倍速いことを見出した。$10^7 M^{-1} s^{-1}$に近い不均化反応の速度定数はO_2^-濃度の高い時には無視できない効果をO_2^-の消去に対して示すと考えられる。またプラストシアニンはO_2^-によるニトロブルーテトラゾリウム還元を阻害しおよそSODの1/1000のSOD活性を示した。塩溶液で洗浄してプラストシアニンを除いた葉緑体の活性にプラストシアニンの添加効果が認められ、プラストシアニン飽和時の最大速度が健全な葉緑体のものに匹適することからプラストシアニンの結合部位はチラコイド膜のストロマ側であると推定した。一方、O_2^-の生成部位は葉緑体によるチトクロームc還元に対してYedaプレス処理でチラコイド膜内に入れたSODの効果が少いことからストロマ側であると思われる。チトクロームcを大豆レシチンより調製した小胞に結合させてO_2^-との反応性を調べてもトライトンX-100を加えた時と同じ速度定数を示した。従ってストロマ側で生成したO_2^-とチラコイド膜の同じ側に結合するプラストシアニンは溶液内と同様に反応するとして良いであろう。光化学系Iで生成したO_2^-がプラストシアニンを還元すると循環的な電子伝達が生じるが、PMSを添加しないサイクリック光リン酸化反応に対してSODは阻害を示さず、O_2^-を経ないか、あるいはストロマのSODが接触できないルートを通るいずれかであろう。以上の結果を参考にして主に①、⑤の反応がO_2^-の除去に寄与する程度について検討した結果を報告する。

2A-16 *Porphyra* Mn-スーパーオキシドジスムターゼとH_2O_2との反応

○金松澄雄、浅田浩二 （京大・食研）

三種のSuperoxide dismutase（Cu,Zn-, Fe-, Mn-SOD）は$O_2^{\cdot -}$の不均化反応についての酵素的な性質に差を見い出すことができないにもかかわらず、生物の種類、細胞内顆粒に特徴のある分布を示す。したがってこのことは三種のSODの間に未知の生理的、生化学的機構の差異があることを示唆する。Mn-SODのタンパク学的性質については植物の場合、藻類の一例を除きまったく知られていない。

今回、我々は紅藻、*Porphyra tenera*よりMn-SODを単離、精製し、その分子的性質を調べ、さらにH_2O_2との反応性をFe-SODと比較することによって二種のSODの性質の差を明らかにしようとした。

Fe-SODは*Azotobacter*より精製した（MW 40,000, subunit MW 20,000, 2g atom Fe / mol of enzyme，未発表）。

［*Porphyra* Mn-SODの精製と物理化学的性質］

Porphyra tenera（20 kg）を5mMリン酸カリウム、pH 7.8、0.1mM EDTAに浸し、自己消化させた後、40-90%の硫安分画、DEAE-Sephadexクロマトグラフィー（段階的溶出）、ゲルロ過、DEAE-Sephadexクロマトグラフィー（直線濃度勾配溶出）を行ない、さらに混在するフィコエリスリンをPhenyl-Sepharoseを用いたハイドロフォービッククロマトグラフィーにより除いた。得られたSODは電気泳動的に均一であり、収率63%で400mgの標品を得た。

Porphyra Mn-SODは分子量45,000（沈降平衡法）で、分子量23,000（SDS-PAGE法）のサブユニットより成る二量体であり、1分子当り1原子のMnを含んでいた。pIは4.10であり、アミノ酸組成は他のMn-SODと類似していた。可視スペクトルはλ_{max}が480nm、λ_{min}が380nmであり600および410nm付近に肩が認められ、CDスペクトルでは445，500nmに負のバンドがあり、445、550nmに正のバンドがみられた。以上の結果より*Porphyra* Mn-SODはこれまで知られている微生物のMn-SODと類似していることが示された。

［*Porphyra* Mn-SODおよび*Azotobacter* Fe-SODとH_2O_2との反応］

Porphyra Mn-SODは10mM H_2O_2，1hrの処理ではまったく影響を受けないが，*Azotobacter* Fe-SODはH_2O_2により二次反応に従い失活する。Mn-SOD，Fe-SODのH_2O_2との反応はH_2O_2によるSODの還元と考えられるが酸素電極で調べるとO_2の発生が認められた。Mn-SODをH_2O_2で滴定すると480nmの吸収が減少し、当モルのH_2O_2で吸収は消失する。この変化の二次速度定数は$3.8 \times 10^2\ M^{-1}sec^{-1}$であった。一方Fe-SODは$H_2O_2$によって350nmの吸収が減少し、SOD 1モル当り2モルのH_2O_2で完全に消失する（$k = 9 \times 10\ M^{-1}\ sec^{-1}$）がそのまま放置するとゆっくりと350nmの吸収が回復する。しかし差スペクトル（H_2O_2+SOD / SOD）で調べると310nmに新しいピークが生じ、この変化は一次反応に従い$t_{\frac{1}{2}}$は32minであった。以上からFe-SODでは310nmに吸収をもつ分子種が失活の途中で生ずると考えられる。

2A-17

ホウレンソウ葉緑体チラコイドに結合した
Mn-スーパーオキシドジスムターゼ

○早川孝彦. 金松澄雄. 浅田浩二 (京大. 食研)

Superoxide radical (O_2^-) の不均化反応を触媒する Superoxide dismutase (SOD) にはその含まれる金属によって Cu,Zn-, Fe-, Mn-SOD の3種がある。我々は. らん藻. ユーグレナのチラコイドに Mn-SOD が結合していることを示し[1,2] ホウレンソウのチラコイドにも Mn-SOD が結合していることを予備的に示した。[3] チラコイド結合 Mn-SOD は. 酸素発生に関与する酵素の1成分である可能性があるので. 今回. ホウレンソウ葉緑体を Percoll(Pharmacia) で分画して Mn-SOD がチラコイドに結合していることを確認し. さらにチラコイドから Mn-SOD の可溶化. 精製を行なった。

ホウレンソウを緩衝液(50mM tricine pH 7.8, 0.33M sorbitol, 1mM EDTA, 1mM $MgCl_2$, 0.5% BSA) 中で3秒間ホモゲナイズし. 8層のガーゼでろ過後 1700g, 1min. で遠沈し. 少量の緩衝液に懸濁した。これを. 10 - 90% の linear Percoll density gradient (50mM tricine pH 7.8, 0.33M sorbitol, 1mM EDTA, 1mM $MgCl_2$, 1% BSA) に重層し 5000g, 15min. で遠心した。各画分について. ミトコンドリアの指標酵素であるチトクロムCオキシダーゼ活性と 1% Triton X-100(TX-100) を含むキサンチン-キサンチンオキシダーゼ系で SOD 活性を調べた結果チトクロムCオキシダーゼ活性を含まない無傷葉緑体分画に KCN で阻害される Cu,Zn-SOD 以外に KCN に非感受性の SOD 活性がみられた。さらに. 葉緑体をチラコイドとストロマに分画すると. KCN に非感受性の SOD は. チラコイドにのみ認められた。他の植物(ダイコン、ナタ豆、ソラ豆. ササゲ)についても同様の結果が得られた。

次に. 20kg のホウレンソウから得られたチラコイドから Mn-SOD の単離を行なった。チラコイドを 10% TX-100 を含む 10mM リン酸緩衝液(K-P buf. pH 7.9) に懸濁し. 40% 硫安を加えて抽出後. 上清を集め透析した。不溶物を遠沈後、1% TX-100 を含む 10mM K-P buf. で平衡化した DEAE-cellulose に吸着させ. 段階的にイオン強度を増加して溶出した。その結果. 50mM K-P buf. で KCN 感受性の SOD が溶出し. 0.2M KCl,100mM K-P buf. で KCN 非感受性の SOD が溶出した。これを再び. DEAE-cellulose に吸着させ. KCl 濃度勾配 (0 - 1.0M; 10mM K-P buf.) により溶出した。KCN 非感受性 SOD 活性は. 0.25M KCl で溶出され. ついで. ゲルろ過 (Sephadex G-100) で精製した。こうして得た標品は. ディスク電気泳動で3本のタンパク質のバンドを示し. うち2本には. KCN 非感受性 SOD 活性があった。そこで. 粗抽出液の KCN 非感受性 SOD 活性のバンドと一致するバンドを切り出し. 溶出した。精製したチラコイド結合 SOD は. 分子量が5.5万～6万. H_2O_2 及び KCN に非感受性であることから Mn-SOD であると推定した。

1) Okada,S.,Kanematsu,S.and Asada,K.(1979) FEBS Lett.103,106

2) Kanematsu,S.and Asada,K.(1979) Arch.Biochem.Biophys. 195,535

3) 金松澄雄, 嶋田誠一, 浅田浩二 (1979)　本学会講演要旨 P182

2A-18

藍藻チラコイドのカタラーゼ活性

○岡田俊也，浅田浩二 （京大・食研）

有核生物でのカタラーゼは主としてペルキシゾームにH_2O_2を生成する酸化酵素と共に局在している。高等植物ではglycolate oxidaseと共にペリキシゾームに存在するが、葉緑体はペロキシゾームに比べると、カタラーゼ活性はほとんど無視できる。チラコイドでのO_2の一電子還元によって生じるO_2^-，その不均化反応で生じるH_2O_2は、葉緑体では光還元生成物を電子供与体としてperoxidase的に消去されるが、これが前核生物であるラランソウではどのようになっているかみるため、カタラーゼの細胞内分布を調べた。

Plectonema boryanumをリゾチーム処理でスフェロプラスト化した後、短時間の超音波処理で藻体をこわし、分画遠心を行なってチラコイドを得た。このチラコイドはフェリシアン化カリを電子受容体として100 μmoles O_2/mg Chl・hrのHill反応活性を示した。カタラーゼ活性は酸素電極を用い、50 mMリン酸緩衝液pH7.4，1mM EDTA，45 mM H_2O_2，25°Cの条件で酸素発生から測定した。

上記の方法で得たチラコイドは120－180 μmoles O_2/mg Chl・hrのカタラーゼ活性を示した。チラコイドをpercoll－密度勾配遠心にかけると、一本のクロロフィルのバンドを示しこのバンドとカタラーゼ活性のピークが一致した。このことはチラコイド結合のカタラーゼがあることを示す。この活性はチラコイドを50 mMのリン酸緩衝液で洗浄してもほとんど低下せず、熱処理で完全に失活した。また各々1 mM EDTA，0.15 M KClを含む50 mMリン酸緩衝液による洗浄でも膜からはずれないが、0.4％のTriton X-100，デオキシコール酸の添加で膜から遊離する。このチラコイドのカタラーゼ活性はサイトゾルの活性の5－8％をしめた。

サイトゾルのカタラーゼのH_2O_2に対するみかけのKm値は23 mMで、チラコイドのカタラーゼのKm値は0.5％Triton X-100存在下で28 mMであった。両者は熱安定性，初速度のpH依存性に差異があり、チラコイドのカタラーゼはサイトゾルのそれに比べて50％阻害の温度が約10°C高く、この値はTriton X-100で可溶化した時も変化がなかった。至適pHは共にpH7－8にあるが、チラコイドのカタラーゼは酸性側での低下が大きく、アルカリ領域で比較的安定なのに対し、サイトゾルのカタラーゼは逆の傾向を示した。KCN，NaN_3に対し両者は1mMで完全に阻害された。以上のようにチラコイド，サイトゾルのカタラーゼはみかけ上性質が異なるが、異なる分子種であるかどうかは明らかでない。

チラコイド，サイトゾルのカタラーゼは高濃度のH_2O_2に対しては高い活性を示す。しかしH_2O_2は～10 μMでもCO_2固定系を阻害するので、H_2O_2消去系はこの濃度のH_2O_2を分解できなければならない。この点から、チラコイド，サイトゾルのカタラーゼが生理的なH_2O_2消去系として機能しているかどうかについて考察する。

2A-19

フェレドキシンの構造と機能：固定化フェレドキシン－NADP還元酵素を用いる複合体形成能の測定法について

先浜直子，押野礼子*，○新　勝光　（神大・理・生物，*神戸山手女短大・生化）

フェレドキシン（Fd）とフェレドキシン－NADP還元酵素（FNR）が1対1のモル比で複合体を形成する性質に着目し、FNRをSepharose 4B上に化学的に固定し、これにFdを結合させる方法によって、Fdの構造と機能の関係を研究する1つの方法を開発したのでここに報告する。

市販のCNBr-Sepharose 4B，1gに新と押野[1]の方法で精製したホウレンソウFNR 10mgを、Fdの固定の場合[1]と同様に反応させてFNR-Sepharose 4Bを作つた。これを一定量分光光度計セル（巾5mm，光路長10mm）にとり、Fd溶液を加えて攪拌後静置して上清部分の420又は275nmの吸光度を測定した。図1はnative Fdを滴加した場合の実験を示す。NaClの不在の場合（直線③）Fdが飽和するまで吸光度の増加は見られない（初期勾配＝0）。そして飽和点からは加えたFd量に応じて吸光度が増加する（飽和後勾配）。一方複合体が存在し得ないような高濃度のNaClの存在下では、初めから加えたFd量に応じた吸光度増加が見られる（直線①）。この中間のNaCl濃度では、Fdの一部分が結合不能となつているので初期勾配はNaCl濃度の増加にしたがつて急となり飽和点以後は一定の飽和後勾配となる（直線②）。この場合飽和点が原点に近づくことが観察されたが、これはFNR側の結合部位の減少を意味している。

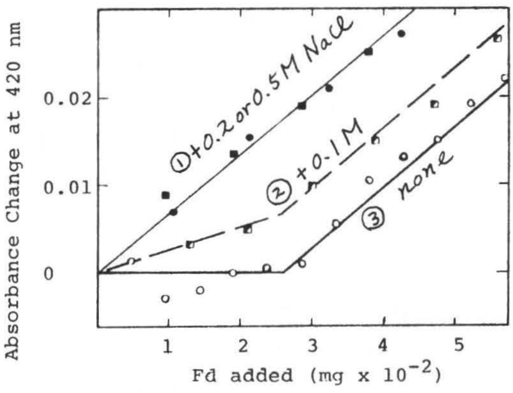


図1　FdとFNR-Sepharose 4Bとの複合体形成の測定

分光光度計セル（巾5，光路長10mm）の底に高さ4mmの量のゲルを入れた。液相は0.02M Tris-HCl, pH 7.5、同液中に作った高濃度Fd液を滴加した。

上の実験でFdの複合体形成能の測定が比較的容易にできるようになつたので、つぎに種々の修飾Fdを用いてそれらの複合体形成能を測定した。

(1) アポフェレドキシン：アポフェレドキシンは全く結合しない。FeとSを加えて再構成フェレドキシンにすると、native Fdと全く同様に複合体形成能を示した。このことは　FeとSをもつクロモホアがこの機能に必要であることを示す。

(2) アセチルフェレドキシン：結合しない。このことはFd上のアミノ基が複合体形成能に関与していることを暗示している。

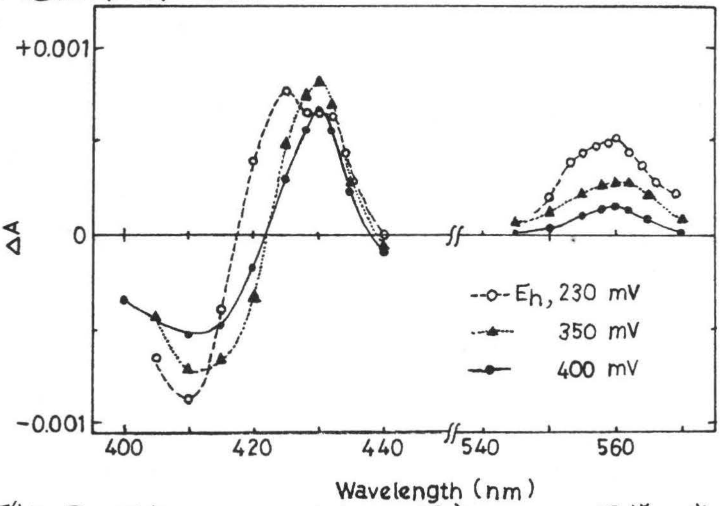
1) M. Shin & R. Oshino, J. Biochem. 83, 537-361 (1978)

2A-20 光合成細菌クロマチウムのチトクロームb_{560}について

高宮建一郎，花田博幸　（九大・理・生物）

紅色非イオウ細菌の大部分の種には，1種以上のB型チトクロームが存在することが知られている。これらのチトクロームは，光合成電子伝達や呼吸に伴う電子伝達に関係しているものと思われているが，詳細なことはまだわかっていない。一方，紅色イオウ細菌においては，B型チトクロームの存在およびその機能については紅色非イオウ細菌以上にわかっていない。最近，Knaff と Buchanan は，*Chromatium vinosum* のクロマトフォアに少量のB型チトクロームが存在し，アンチマイシン存在下で光還元されることを示した。我々は，紅色非イオウ細菌においてB型チトクロームが光合成電子伝達に占める役割の大きさを考え，クロマチウムのクロマトフォアにB型チトクロームが存在するかどうか調べた結果を報告する。

*Chromatium vinosum*は，リンゴ酸を含む有機培地，または無機培地で生育させた。クロマトフォアは，生菌またはスフェロプラストをフレンチプレス処理して調製した。B型チトクロームの存在を知るために，閃光および連続光照射によるチトクロームの光還元，暗所での酸化還元滴定等の測定をおこなった。



クロマトフォアを高い酸化還元電位（約400mV）に保ち，アンチマイシン存在下で充分強く，かつ，閃光時間の短い閃光を照射後約30ミリ秒で吸光度変化をする成分の明暗の差スペクトルには，560および430nmに顕著なピークがあり，410nm附近に谷がみられた（図参照）。この差スペクトルは，閃光照射によるB型チトクロームの還元を示唆する。この光還元は，系の酸化還元電位が200mV附近でも観察された。同様の光還元は，アンチマイシン存在下で連続光照射によっても観察された。クロマトフォアにB型チトクロームが存在することは，暗所での酸化還元滴定からも裏づけられた。異ったpH での滴定の結果，このチトクローム（チトクロームb_{560}）は，pH 7.0 で40mVのEmをもち，pH6からpH9附近までのpH域で−60mV/pHのEm変化を示すことがわかった。さらに，メチルエチルケトン抽出後のピリジンヘモクロモーゲン法による定量から，バクテリオクロロフィル170～200分子あたり1分子のチトクロームb_{560}が存在することが示された。上述の結果は，生育培地の種類によらなかった。

2A-21 *Chromatium vinosum* チトクロムC-552の構造と機能

°福森義宏，山中健生（阪大.理.生物）

紅色イオウ細菌，*Chromatium vinosum*は硫化物やチオ硫酸塩を電子供与体として光合成を行い，その生育に必要なエネルギーや還元力を得ている。われわれはこの細菌から抽出，精製したチトクロムC-552が硫化物－チトクロムC還元酵素活性を持つことを見い出した。また同時に，このチトクロムCは元素イオウを還元して，硫化水素をつくりだす活性も持っていることがわかった。*Chromatium*や*Chlorobium*は嫌気的暗条件下で元素イオウを還元して，硫化水素をつくりだすことが知られており，チトクロムC-552が硫化物の酸化ばかりでなく，元素イオウを還元する酵素活性をも持つことは，このチトクロムCがこれらイオウ化合物の酸化．還元という生理的現象に関与していることを示めすものと考えられる。[1]

一方，チトクロムC-552は1分子中に，その補欠分子族として共有結合したFADを1分子，ヘムCを2分子含んでおり，タンパク質の構造という面からも興味あるものである。われわれはこのチトクロムC分子が2種類のサブユニット，すなわち分子量46,000のフラビン1分子を含んだフラビンタンパク質サブユニットと，分子量21,000のヘムCを2分子含むチトクロムサブユニットのおのおの1分子から成り立っていることを，各サブユニットを6M尿素存在下の等電点分画やゲルクロマトグラフィで精製することによって明らかにした。さらにN末端分析やアミノ酸分析からもチトクロムC-552が2種類のサブユニットから成ることが確認された。[2]

われわれは，さらにこのようなチトクロムC-552の構造と機能の関連性を明らかにするために，チトクロムC-552分子内における電子伝達経路の解明を試みた。

その結果，

①チトクロムC-552はEDTA存在下に光還元される。

②チトクロムC-552の酸化還元電位滴定曲線は$n=1$の理論曲線とよく一致し，2つのヘムの標準酸化還元電位はそれぞれ，16 mV，-33 mVと推定できた。

③チトクロムC-552は他のチトクロムC(例えばウマチトクロムC)に比較して，硫化物により極めてすみやかに還元されることが，ストップドフローによる測定から明らかになった。

今回の発表では，われわれは以上の結果に基づき，チトクロムC-552分子内の電子伝達について考察をする。さらにチトクロムC-552と*Chlorobium limicola f. thiosulfatophilum*の硫化物－チトクロムC還元酵素であるチトクロムC-553[3]とを，その活性やサブユニット構造を比較することによって，*Chromatium*と*Chlorobium*の硫化物酸化に関する類似性についても考察する。

(1) Y. Fukumori and T. Yamanaka (1979) J. Biochem. 85, 1405-1414

(2) T. Yamanaka and Y. Fukumori (1979) Anal. Biochem. 95, 209-213

(3) A. Kusai and T. Yamanaka (1973) Biochim. Biophys. Acta 325, 304-314

2A-22 細菌およびミトコンドリアのチトクロム酸化酵素の比較

○山中健生，紙田祐介，藤井敬子*（阪大・理・生物）

チトクロムa型末端酸化酵素（チトクロムaa₃）は，ほとんどの真核生物の呼吸に関する電子伝達系に存在してO_2の還元に関与している酵素であり，このことはよく知られている事実である。この酵素が多くの好気性細菌にも存在していてチトクロム酸化酵素として作用していることは，1927年D. Keilinが指摘して以来，多くの研究者がそのように信じてきたところである。しかし，細菌の酵素の場合，スペクトル的にその存在を見ただけで，はたしてそれが真核生物の酵素と同じものかどうかは，最近まで不明であった。われわれは，最近，2種類の細菌（*Thiobacillus novellus*，*Nitrobacter agilis*）からチトクロム酸化酵素を電気泳動的に均一な状態にまで精製して，その諸性質を調べた。細菌の酵素の諸性質を真核生物の酵素のものと比較することにより，チトクロム酸化酵素の構造と機能の関係について何か重要な知見が得られるかもしれないと考えて研究を進めている。今回，細菌の酵素の諸性質を真核生物の酵素のものと種々の面から比較してみたい。

表1。細菌および真核生物のチトクロム酸化酵素の諸性質

Properties		Bacteria		Eukaryotes	
		T. novellus	N. agilis	S. oviformis	Cow
Absorption peaks (nm)					
oxidized γ		428	422	423	424
reduced γ		442	442	443	445
α		602	606	603	605
reduced-CO γ		431	436	430	430
Prosthetic groups		haem a, Cu	haem a, Cu	haem a, Cu	haem a, Cu
MW/haem a		55,600	45,900	100,000	93,000
MW of Subunits	I	32,000	40,000	40,000	35,400
	II	23,000	27,000	33,000	24,100
	III			22,000	21,000
	IV			14,500	16,800
	V			12,700	12,400
	VI			12,700	8,200
	VII			4,600	4,400
Activity (%)					
native		100	(~100)		73
S. oviformis		77	57		100
Tuna		93	100		93
Horse		4.7	30		124
Polarity (%)		35.2	36.1	39.1	38.7

引用文献は多数になるので示さなかった。

* 現：塩野義製薬研究所。

第２日　４月７日(月)

Ｂ会場

代　謝 II

2B-1　　ガマ花粉の糖質代謝関連酵素

原　彰，○茶原和也，川本公成，船隈　透（名城大農）

多くの花粉は成熟過程のいずれかの時期にデンプン粒を蓄積する。その含量は植物種によってきわめて多様であるが、一般的にはデンプンは成熟して発芽する過程で糖化され、還元糖とシュクロースに形を変える。

演者らは花粉におけるデンプン－シュクロース転換反応を明らかにする為に、ガマ花粉について糖質代謝関連酵素の検索を行なったところ、下図に示すようにインベルターゼ、無機ピロホスファターゼ、ホスホリラーゼおよびシュクロース合成酵素の存在を確認した。（日本花粉学会誌，No.24，1979）　今回は、ホスホリラーゼ、無機ピロホスファターゼおよびシュクロース合成酵素の分離精製、諸性質について報告する。

デンプンの分解はホスホリラーゼまたはアミラーゼによって行なわれるが、アミラーゼはほとんど検出されなかったので、ガマ花粉では主にホスホリラーゼに依存していると推定した。

$$\mathrm{Starch}_{(Glc_n)} + Pi \rightleftharpoons \mathrm{Starch}_{(Glc_{n-1})} + G\text{-}1\text{-}P \quad \text{―― ①}$$

1mMメルカプトエタノールの存在下でDEAE-セルロースクロマトグラフィーを行なったところ、ホスホリラーゼは大小二つのピークとして溶出された。至適pHはいずれも5.5～6.0付近にあった。

ホスホリラーゼによって遊離したG-1-PはUDP-グルコースピロホスホリラーゼの作用によってUDP-グルコースへ転換されると思われるが、ピロホスホリラーゼについては下記の無機ピロホスファターゼをカップリングさせた測定法を検討中である。

$$G\text{-}1\text{-}P + UTP \rightleftharpoons UDPG + PPi \quad \text{―― ②}$$

$$PPi \xrightarrow{Mg^{2+}} 2Pi \quad \text{―― ③}$$

無機ピロホスファターゼは、アセトン処理、DEAE-Sephadex A-50クロマトグラフィー、等電点(焦点)電気泳動法およびゲルろ過によって精製した。この酵素は、pH8～9において最適の活性を示し、Mg^{2+}-ピロリン酸複合体が真の基質らしく、テストしたその他のリン酸化合物には全く作用せず、Mg^{2+}のみを特異的に要求した。

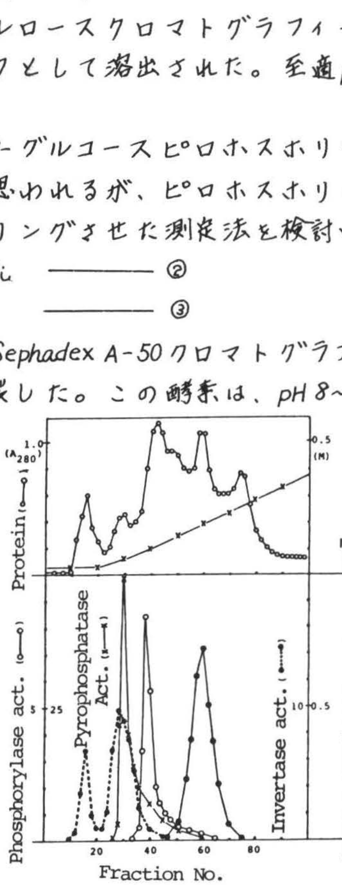
シュクロースの合成酵素としては、④の反応を触媒するシュクロース合成酵素のみがクロマトグラフィーによって確認された。合成反応の至適pHは7～9であった。

$$UDPG + Fru \rightleftharpoons Sucrose + UDP \quad \text{―― ④}$$

以上の結果からガマ花粉においては

$$\mathrm{Starch} \xrightarrow{Pi} G\text{-}1\text{-}P \xrightarrow{UTP \quad PPi \rightarrow 2Pi} UDPG \xrightarrow{Fru(\text{または}6\text{-}P) \quad UDP} \mathrm{Sucrose} \xrightarrow{(\text{インベルターゼ})}$$

（還元糖）の反応経路で、デンプン-シュクロース転換反応が行なわれていると推定される。



ガマ花粉抽出液のDEAE－セルロースカラムクロマトグラフィー

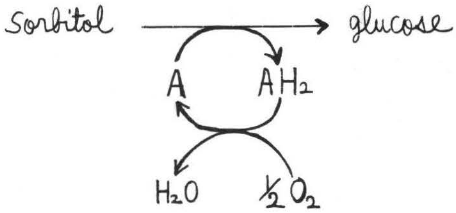
2B-2　　リンゴ葉におけるNAD/NADP非依存性ソルビトール脱水素酵素

山木昭平　（農水省・果樹試）

バラ科植物においては、葉(source)における光合成産物は主にsorbitolの形で果実等の各器官(sink)にtranslocateされ、他の糖類（sucrose、glucose、fructose、starch etc）に変換される。それ故、このsorbitolのsourceでの合成速度、sinkへの移行速度、sinkでの他糖への変換速度が、1)樹体の生長量、2)果実、根、枝、葉への同化産物の分配比、3)果実の品質（糖含量と組成、大きさ）、4)果実の生理障害(みつ症状等)などに大きな影響を及ぼすことが考えられる。最近、sorbitol-6-P dehydrogenase、sorbitol dehydrogenaseが発見されsorbitol代謝のなどが解かれつつある。演者はリンゴ組織において別タイプのsorbitol dehydrogenase（sorbitol→glucoseを触媒）を見い出したので報告する。

リンゴ葉を0.2Mリン酸buffer (PH7.0)、0.1% Triton X-100、1mM DTT、10mM ascorbate、10%新鮮重のpolyclar AT からなる抽出液によりN_2気流中で抽出した。抽出液は100,000xg、30分遠心後、Sephadex G-25で処理し、40～80%飽和硫安画分を集め、DEAE cellulose、Hydroxyapetite、Sephadex G-200処理により約80倍に精製した。測定はsorbitolを基質として生成したglucoseを通常の酵素法に従って定量した。本酵素はsorbitolを基質とした場合、glucoseを生成したがfructoseを殆んど生成しなく、反応は不可逆であった。またCofactorとしてNAD、NADPを必要とせず、嫌気的条件下で反応が阻害されることなどより、最終的電子受容体としてO_2を必要とした（1モルsorbitolの酸化に1/2モルO_2を必要）。しかしながらKCNによる阻害はあまり顕著ではなかった（約30%阻害）。PH範囲は3.5～5.5であり至適PHは4.0であり、かなり酸性側にかたよっていた。Km値はsorbitol基質において約100mMと非常に大きな値を示し、sorbitolが蓄積しやすいことを示唆した。Sephadex G-200 gel ロ過によると分子量は10万以上であった。本酵素はEDTAによって20%程度しか阻害されなく、金属依存性は弱いものと思われた。この阻害はMg^{++}により回復され多少の依存性が見い出された。

演者はすでにsorbitol-6-P dehydrogenaseがsorbitolの合成に関与することを示唆した。一方、本酵素(PH4.0)とsorbitol dehydrogenase (PH9.8)はそれぞれ反応領域を酸性、アルカリ性に持ち、共にsorbitolの利用に役立っているものと思われる。今後これらの酵素の細胞内極在性、sink、source組織での相違を詳細に検討することによってsorbitol代謝を明らかに出来るであろう。

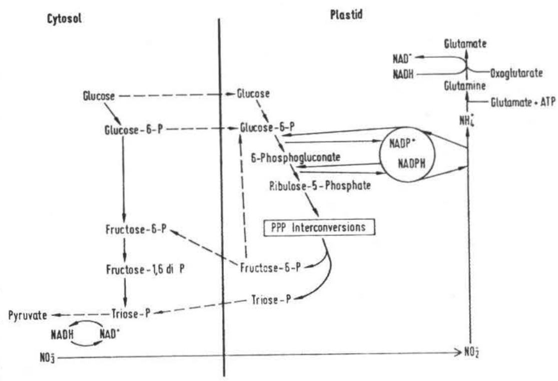


2B-3

高等植物におけるペントースリン酸経路の調節機構
Ⅳ. *Pisum sativum* の根の2種の6-Phosphogluconate dehydrogenaseについて

芦原 坦 (お茶の水大・理・生物) M.J. Emes, M.W. Fowler
(Dept. Biochem., Univ. Sheffield, U.K.)

高等植物の根で吸収されたNO_3^-は、NADH, NADPHを用いて還元されるが、少なくとも亜硝酸の還元過程では、NADPHが使われる。この還元力の供給系としてペントースリン酸(PP)経路が関与していることが推定される。Fowlerらは、*Pisum sativum*の根では右図のように硝酸還元の場がplastidにあることをショ糖密度勾配遠心分離による酵素の細胞内分布の実験から明らかにした。そこでNO_2^-還元の際に利用されると考えられるNADPHを生産するPP経路の活性が、plastidに存在するかどうかを検討した結果、約5%のglucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH)、約20%の6-phosphogluconate dehydrogenase (6PGDH)の活性がplastid分画にみいだされた。そこで今回はcytosolとplastidに存在する6PGDHの性質のちがい、また硝酸還元系活性との間の相互の調節機構が存在するかどうかを検討した。



材料としては暗所で4日間育てた*Pisum sativum* var. Kelvedon Wonderの根を用いた。約100gの材料を2mM EDTA, 0.1% 2-mercaptoethanolを含む40mM glycylglycine buffer (pH 7.6)で抽出し、100,000×gで遠心し、上清に70%飽和になるように硫安を加え、さらにceliteを加えカラムにつめ硫安の逆勾配で溶出したところ、2つのpeaksがあらわれた。最初のpeak(A)はcytosolの6PGDH、あとのもの(B)はplastidの6PGDHに対応することがわかった。これを別々にSephacryl S-200と2',5'-ADP-Sepharoseのクロマトグラフィーで精製した。2つの6PGDHはSephacryl S-200やSephadex G-200では同じ位置で溶出され分子量は、110,000と推定された。最適pHがcytosolの酵素はpH 7.6-8.0、plastidのそれは8.2-8.6であること、最適pHでの6PGに対するKm値がかなり異なる以外2つの6PGDHは、ほぼ同じ性質を示した。どちらの酵素も、$NADPH/NADP^+$比により活性が調節されておりerythrose-4-Pにより阻害がみられたが、他のPP経路や解糖系の中間産物、NO_3^-, NO_2^-, NH_4^+はどちらの酵素に対してもeffectorとしての働きを持たなかった。

一方、*Pisum sativum*の根を10mM KNO_3で8時間処理するとNitrate reductase, Nitrite reductaseなどの活性増加に伴い6PGDHの増加がみられた。この増加は、plastid分画で顕著であり、硫安の逆勾配クロマトグラフィーの結果から、増加したのはplastidの6PGDHであることが確認された。以上の結果は*Pisum sativum*の根ではcytosolとは別にplastidに6PGDHが存在し、この酵素はNO_3^-により誘導されること、そしてplastid内の$NADPH/NADP^+$により活性の調節がおこり得ることを示している。

2B-4

成熟中のヒマ胚乳プラスチドおよびサイトゾルのグルコース-6-リン酸脱水素酵素について.

佐藤八十八, 山田晃弘 (東大, 教養)

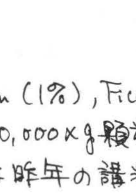
1979年の本大会で我々は次のことを報告した。(1), グルコース-6-リン酸脱水素酵素(G6PDH)はサイトゾル, プラスチド(Pt)両画分に存在する。(2), Pt画分のG6PDHはmatrixと膜成分の両方に存在する。(3), サイトゾルG6PDHはtriton X-100 (0.07%)処理しても失活しないが, Pt-G6PDHは失活する。(4), triton X-100のPt-G6PDHに対する失活効果はPtを洗浄すると著しい。(5), サイトゾルG6PDHはpH 7.5を中心として広い至適pH範囲をもつが, Pt-G6PDHの至適pHは8.5附近に限られる。以上の事実から我々はサイトゾルとPtのG6PDHは互いに性質の異なるisoenzymeであろうと推察した。近年Herbertら (planta, 145 95, 1979) はBryophyllumで2種のG6PDHを発見している。一方Simcoxら (plant physiol. 59 1128, 1977) や西村ら (plant physiol. 64 31 1979) によるとヒマPtにはG6PDHは存在せず, G6PDHのisoenzymeも発見されていない (Simcox et al, plant physiol. 61, 871, 1978)。我々の結果とSimcoxらの結果の相違は酵素活性測定にtriton X-100を用いるか否かに基づくものと考えられるが, Pt-G6PDHの存在およびPtとサイトゾルのG6PDHの相違を更に明確にするため次の実験を行なった.

[材料と方法]

成熟ヒマ種子を30% sucrose, 0.1 M Tris-HCl, pH 7.5を主体とするDextran (1%), Ficoll (1%)等を含む溶液中でカミソリ刃で破砕し, 通常の遠心分画法により10,000×g顆粒画分(P_{10})と100,000×g上清画分(Sup)を調製した。酵素活性の測定法は昨年の講演要旨集に述べた方法によった。電気泳動はpolyacrylamide slab gel (7%)で行ない, 酵素はtetrazoliumで染色した。$(NH_4)_2SO_4$ gradient solubilizationはHerbertらの方法に従った。

[結果と考察]

P_{10}画分(Ptを含む)のG6PDH (P-G6PDH)は40〜50%硫安溶液で可溶化され, Sup画分のG6PDH (S-G6PDH)は50 mM Tris bufferで可溶化された。DEAE-Sepharose CL 6Bを用いたColumn chromatographyではS-G6PDHとP-G6PDHに違いは認められなかった。7% polyacrylamide gelによる電気泳動(40mA, 4h)後, G6PDHを染色すると図のごとく, 3つの主な染色帯が得られた。Sup画分にはこれら3種のうち2と3のG6PDHが見出されるが, P_{10}画分には1および2が存在した。P_{10}に存在する2の染色帯の存在量は実験条件により異なるが, 1は常に見出された。P_{10}をtriton X-100 (0.09%)で処理した後, 電気泳動を行なうと1の染色帯は消失するが, 2は残った。このことはPt-G6PDHがtriton X-100感受性であることとよく一致する。S-G6PDHはtriton X-100処理の影響を受けなかった。以上のことから成熟ヒマ胚乳中には少くとも3種のG6PDHが存在し, プラスチドG6PDHとサイトゾルG6PDHは電気的, 化学的性質が互いに異なるisoenzymeであると推察できる.



2B-5

ヒマ胚乳イソクエン酸脱水素酵素の発芽にともなう安定性の低下.

佐藤八十八 (東大、教養)

ヒマ胚乳中に存在するNADP⁺-イソクエン酸脱水素酵素(NADP⁺-IDH)は種子の発芽と共に活性が増加し，発芽後5日目から急速に減少する。ヒマ種子発芽過程では，このような酵素活性の変動だけでなく，酵素の安定性も変化する。発芽初期の胚乳抽出液を熱処理(57°C)しても，その中に含まれるNADP⁺-IDHは失活しない。またこの標品はtrypsinによる分解に対しても耐性を示し，低塩濃度溶液中にてもその酵素活性は保持される。一方発芽後期の胚乳抽出液中のNADP⁺-IDHは熱処理，trypsin処理，低塩濃度処理に対して極めて不安定である。今回，発芽初期から後期にかけてのNADP⁺-IDHの安定性減少のしくみについて報告する。

発芽初期のヒマ胚乳抽出液に発芽後期の抽出液を加えると，発芽初期胚乳のNADP⁺-IDHの熱安定性は消失した。発芽後期胚乳抽出液を100°C，10分間処理した上清を用いても同じ結果が得られた。従って発芽後期胚乳の抽出液中には発芽初期胚乳のNADP⁺-IDHの熱安定性を失わせる物質が存在することが判明した。発芽後期胚乳抽出液を水溶性成分とエーテル可溶性成分とに分けると，上記の作用をもつ物質はエーテル可溶性成分に見出された。エーテル可溶性成分をTLCおよびGLCで分析した結果，作用物質はリシノール酸と同定された。

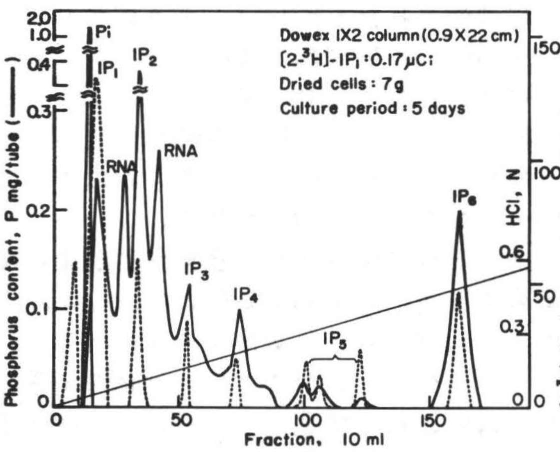
発芽初期胚乳抽出液中のNADP⁺-IDHは耐熱性をもつが，精製酵素自体は熱に対して不安定であった。これは酵素に耐熱性を持たせる物質が抽出液中に存在することを意味している。精製酵素をisocitrate，とmagnesiumで耐熱化し，その耐熱化酵素にリシノール酸を加えると酵素のもっていた熱安定性は消失した。酵素の熱安定性は溶液中に存在するリシノール酸量に依存することが判明した。脱耐熱化物質であるリシノール酸は成熟ヒマの胚乳抽出液中や発芽初期の抽出液中には見出されなかった。Donaldoson (1977)もヒマ胚乳抽出液中にリシノール酸が蓄積することを見出している。山田(1955)はリシノール酸が発芽2日目以後急速に胚乳中に増加すると報告している。このようなリシノール酸の増加と時を同じくして，NADP⁺-IDHの熱安定性は2日目以後急激に減少した。NADP⁺-IDHは発芽進行と共に増加してくるリシノール酸によって耐熱性が奪われるものと考えられる。また発芽初期胚乳から得たNADP⁺-IDHをリシノール酸で処理するとtrypsin耐性が失われ，低塩濃度溶液中で酵素は失活した。すなわち，発芽初期の酵素は発芽後期の酵素の性質をもつようになった。以上のことから，ヒマ胚乳中のリシノール酸はNADP⁺-IDHの安定性を消失させる生理活性物質であると推論できる。

2B-6　　イネ培養細胞におけるミオ・イノシトールリン酸化合物

○宮内　聰，清水正俊，伊賀上郁夫（新潟大・農・農化）

前報（昭和54年度例会）でイネ培養細胞中に、種実の場合と異なって一連のミオ・イノシトールリン酸化合物（IP1～IP6）を見出し、それぞれを同定するとともに、$^{32}P_i$および^3H-ミオ・イノシトールがいずれのIPへもとりこまれることを示した。また細胞可溶画分中にミオ・イノシトールをリン酸化する酵素を見出した。本報では放射性IPの細胞へのとりこみなどからIPの生成機構について2,3の考察を行なった。イネ培養細胞の培養，IPの分析およびミオ・イノシトールリン酸化酵素の測定については前報の方法に従った。

ミオ-[2-^3H]イノシトールを細胞へとりこませて調製した^3H-IP2～IP5のそれぞれを再び新らしい細胞へとりこませ、培養後生成したIPをDowex 1X2 (Cl^-)カラムで分析した結果、いずれの放射活性もそれぞれもとのIPへとりこまれるが、一部水解をうけてより低次のIPへ移行する分を除くと、それより高次のIPへの移行は全くみられなかった。しかし^3H-IP1の場合のみは、もとのIP1からIP6（フィチン酸）にいたるすべてのIPへとりこみがみられることから（図）、少なくともIP1はIP2～IP6生成のプリカーサーであると推定される。またミオ・イノシトールリン酸化酵素をミオ-[U-^{14}C]イノシトールを基質として反応させ、その生成物を同様にクロマトで分離すると、^{14}CはIP1の位置にのみとりこまれ、より高次のIPには見出されなかった。IP1の構造はミオ・イノシトール-2-リン酸と推定された。リン酸供与体としてのATPはGTPおよびUTP（それぞれATPへの活性の76％，48％）で置きかえられた。一方穀粒中でフィチン酸生合成の場と考えられているアリューロン顆粒に相当する構造体はイネ培養細胞中には少なくとも知られていない。IP6を含むIP合成の場に関する知見を得るため、^3H-IP6を細胞へとりこませた後、細胞オルガネラ分画を行ない、それらの酸可溶画分について^3Hの分布をみると、細胞壁≫可溶画分＞ミトコンドリヤ≒ミクロソームであった。また30 mM NaFの存在下に調製したオルガネラ中、細胞壁画分の酸可溶画分についてIP分析を行なった結果は、IP1～IP6のすべてのメンバーが、細胞から直接酸抽出して得られるIPに対応して定量された。一方細胞可溶画分について分析すると、IP1からIP4までは同様に得られるが、IP5，IP6はほとんど見出されなかった。これらの結果はIP6を含むIPの合成の場における細胞壁画分の役割を示唆するとともに、低次のIPよりも高次のIPが細胞壁画分の蛋白成分により強い塩機結合で存在するものと考えられる。



2B-7

ニンジン培養細胞及びプロトプラストのグリコシダーゼについて

°浅水哲也，井上祐司，加藤真弓，西荒介　（富山医薬大・薬）

植物細胞には多くの細胞壁結合酵素の存在が知られている。しかし細胞壁酵素を調製しようとする場合、細胞内酵素の混在が常につきまとう。本実験では、植物の培養細胞及びプロトプラスト化した細胞を用いた場合、培地中に細胞壁物質とともに各種の酵素が放出される現象をみたので、これを利用して酵素の局在性や性質に関する調査を試みた。実験材料として、ニンジン(Daucus carota, L.)の培養細胞(GD-3)、及びそれを材料として酵素処理によって作成したプロトプラストを用い、4種のGlycosidase の局在性を、p-nitrophenyl-α-及びβ-Galactopyranoside, pNp-α-及びβ-Glucopyranosideを基質として検討した。酵素は、細胞壁結合酵素、細胞内酵素、培地に放出される酵素に分けて分離、精製した。各酵素の反応は、それぞれの基質について時間に対して直線性がみられたのでその範囲内で酵素活性の測定を行った。

培養細胞やプロトプラストが培地に放出する酵素については培地をBio Gel P-4で脱塩したものを用い活性の測定を行った。各々の酵素は至適PH4.5~6.0であり、Lineweaver-Burk plot で直線性が認められた。しかし、α-Glucosidase では、高濃度、低濃度において2直線性が表われた。

培養細胞を超音波破砕して、壁成分を除去して得た可溶性画分のα-Galactosidaseは、Sephadex G-200で2つの成分に分離され、それぞれの至適PHが、高分子のものは中性域(PH.7.0)、低分子のものは酸性域(PH.5.0)にあった。しかし培地中に放出される酵素では、培養細胞、プロトプラストの両者とも、中性域に至適PHをもつ酵素は認められなかった。さらに、α-Galactosidaseの局在性を調査するために酵素処理でプロトプラストを作成する過程での酵素活性を調べた。処理液中に壁成分と共に遊離される酵素活性は時間とともに増加し、細胞自体の酵素活性は減少した。光顕的にプロトプラスト化が完全になった時点で、処理液中に遊離された壁成分と、プロトプラストから抽出した酵素をゲル沪過すると、抽出酵素には、2つの成分があらわれ、培地に遊離されたものには1つの成分しかあらわれなかった。このことより、α-Galactosidase の中性域に至適PHをもつものは、細胞内のみに存在する酵素で壁結合型ではないと考えられ、培地中に放出される酵素は主に壁結合型であると思われた。

α-Glucosidase の活性は全般的に低かったが、β-Galactosidase, β-Glucosidase の2種の酵素では、細胞内、培地中に放出されるものとも、Sephadex G-200で、ほぼ1つの成分となることが観察された。

次に、細胞壁の生長と壁結合型酵素の関連について調べるため培養経過における酵素活性の変化を測定した。β-Galactosidaseは、他の3酵素に比較して、壁あたりの活性、細胞内の蛋白あたりの活性が共に対数増殖期に減少し、培養後期に増加した。ところがプロトプラストの細胞内の蛋白あたりの活性は、培養日数とともに増加し、再生された壁量もこれに平行し増加する。このことより、β-Galactosidaseは、他の3種よりも細胞壁の生長に多くの関与をしていると思われた。

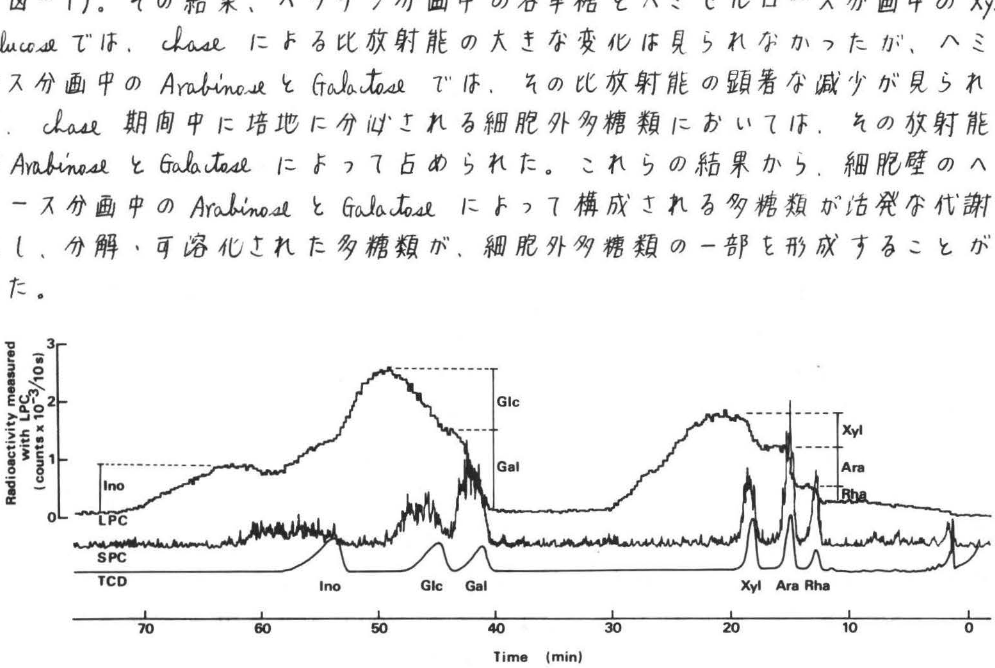
2B-8

ニチニチソウ培養細胞における細胞壁多糖類の代謝回転
—— ラジオガスクロマトグラフィーによる分析

○竹内裕一，駒嶺穆　（東大・理・植物）

植物細胞の生長・分化の機構を解明する上で、細胞壁の代謝、特に細胞壁を構成する多糖類の代謝回転を解析することは重要である。我々は先に、ニチニチソウ（*Vinca rosea*）の懸濁培養細胞を用い、その培養時における細胞壁多糖類の組成の変化に関し報告したが、このような組成の変化は、細胞壁多糖類の合成と分解のバランスの変動の結果であると考えられる。そこで次に、^{14}C－Glucoseを用いて、トレーサー実験を行った。その結果、細胞壁のヘミセルロース分画において、活発な代謝回転が見い出された。しかし、ヘミセルロース分画中のどの多糖類が活発な代謝回転を行っているかが不明であったので、新しく開発したラジオガスクロマトグラフィーの手法を用いて、この点を検討した。

植継ぎ後3日目の、細胞分裂が盛んな時期の細胞と、5日目の体積増加が著しい時期の細胞に、^{14}C－U－Glucose を3時間与えた後、50 mM の ^{12}C－Glucoseを含む培地で chase して、培地及び細胞から細胞外多糖類と細胞壁をそれぞれ分離し、細胞壁はさらに、ペクチン分画・ヘミセルロース分画・セルロース分画に分画した。得られた細胞外多糖類及び細胞壁の各分画を加水分解後、イオン交換樹脂により酸性糖と中性糖に分画し、酸性糖の比放射能は、放射能と含量を、液体シンチレーションカウンターと比色法により、それぞれ測定して求めた。一方、中性糖は、alditol acetate に転換した後、ラジオガスクロマトグラフィーにより、その比放射能を測定した（図－1）。その結果、ペクチン分画中の各単糖とヘミセルロース分画中の Xylose と Glucose では、chase による比放射能の大きな変化は見られなかったが、ヘミセルロース分画中の Arabinose と Galactose では、その比放射能の顕著な減少が見られた。一方、chase 期間中に培地に分泌される細胞外多糖類においては、その放射能の多くが Arabinose と Galactose によって占められた。これらの結果から、細胞壁のヘミセルロース分画中の Arabinose と Galactose によって構成される多糖類が活発な代謝回転を示し、分解・可溶化された多糖類が、細胞外多糖類の一部を形成することが示唆された。



図－1　ヘミセルロース分画中性糖のラジオガスクロマトグラム
LPC: long path counter, SPC: short path counter, TCD: thermal conductivity detector

2B-9　　クロレラにおける細胞壁物質のターンオーバー

武田　宏，広川豊康*（新潟大・教養・生物，*新潟大・理・生物）

クロレラ（*Chlorella ellipsoidea*）の細胞壁物質をアルカリに対する溶解性で分画し，可溶性成分（*hemicellulose*）と不溶性成分（*rigid wall*）のそれぞれについて量的変化をクロレラの*cell cycle*を通してしらべてみたところ，*hemicellulose*は生長期には細胞表面積に比例した増加，分裂期には娘細胞の形成に対応した増加を示したのに対し，*rigid wall*は生長期には全く増加せず，分裂期における娘細胞の形成に対応した増加のみが見られた。このことは生長中のクロレラの細胞壁では*hemicellulose*と*rigid wall*が極めて対照的な変化，すなわち前者は細胞が生長し，表面積が増えるにともなって合成されるのに対し，後者は量的な増え（合成）のないまま細胞の肥大にともなってその表層に薄く引き伸はされていることを示していると考えられた。（PCP 19：591-598（1978））

一方，クロレラの*cell cycle*のいろいろな時期に光合成的にとりこませた^{14}Cが細胞壁物質中に分布する速度を調べ，細胞壁物質の合成能の大きさとその時期との関係を求めてみたところ，分裂期と生長期の二個所に合成能の高まりが現われた。分裂期における高まりは娘細胞形成にともなう新たな細胞壁物質の合成を示すもので当然の高まりと考えられたが，生長期における高まりを，*hemicellulose*および*rigid wall*に分けて調べた結果，そのいずれの成分においても顕著に見出されたことからわれわれは，少なくとも*rigid wall*において，量的増加を全く示さない生長期における^{14}Cのとりこみは，細胞壁物質のターンオーバーの事実を示すものではないかと考えた。（日本植物学会43回大会（1978））

この考えをより直接的に確かめるため，$^{14}CO_2$中で同調的に生育させ，十分に^{14}Cでラベルされたクロレラが次の*cell cycle*を経る過程で細胞壁物質中にとりこまれている^{14}Cのレベルにどのような変動が現われるかをしらべてみた。^{14}Cでラベルされたクロレラは，その後の同調的な*cell cycle*の過程で細胞内の^{14}Cをほとんど失うことなく保持し続ける。しかし，*hemicellulose*と*rigid wall*中の^{14}Cレベルを*cell cycle*を通して追ってみると，細胞の生長の初期の急激な高まりとその後の生長期のゆるやかな低下がどちらの成分にも見られた。このことは細胞の生長の初まる時期に同時に細胞壁物質の合成が初まり，^{14}Cでラベルされた前駆物質が細胞壁成分にとりこまれてくることが生長初期の^{14}Cレベルの急激な高まりであり，その後の^{14}Cレベルのゆるやかな低下は^{14}Cを含む細胞壁物質が組み換えにより分解消失する過程を示していると推定された。

生長期の細胞において*rigid wall*がその量的増加を示さないにもかかわらず，*rigid wall*中への^{14}Cのとりこみ，およびその^{14}Cレベルの減少が見られることは*rigid wall*の成分がターンオーバーしている事実を示していると同時に，*hemicellulose*におけるターンオーバーの事実も^{14}Cでラベルされたクロレラに見られる*hemicellulose*の^{14}Cレベルの低下から実証されたものと考える。

2B-10

イネ幼植物細胞壁の非セルロース性β-グルカンについて.

○加藤陽治、伊藤秀三、井城克廣、松田和雄
（東北大・農・農化）

我々は、高等植物細胞壁多糖の中の非セルロース性β-グルカンに注目し、その構造、普遍性、機能及び生合成機構について総合的に把握する為の研究を進めている。今回は、イネ幼植物細胞壁の非セルロース性β-グルカンの種類及び構造について検討した結果を報告する。

イネ幼植物（子葉鞘と第一葉）から壁を調製、脱脂後、壁多糖を順次抽出分画した（表1）。

表1.

画分	収量 (g)	全糖量 (g)	中性糖組成（モル%） Ara.	Xyl.	Glc.	Gal.
PS-A（0.25% シュウ酸アンモン-シュウ酸抽出中和沈殿）	0.180	0.097	26.3	32.4	26.9	14.5
PS-B（〃 上清）	0.678	0.595	9.7	2.9	68.9	18.3
HC-IA（4% KOH 抽出中和沈殿）	0.199	0.060	21.0	51.9	17.1	10.1
HC-IB（〃 上清）	7.530	5.444	25.9	51.8	14.4	7.8
HC-IIA（24% KOH 抽出中和沈殿）	0.127	0.112	16.5	37.0	27.4	19.2
HC-IIB（〃 上清）	2.940	2.696	27.2	50.8	11.2	10.8
CL（24% KOH 抽出残渣）	7.940					

収量の一番多いHC-IBを硫安分別沈殿法、DEAE-Cellulose及びSepharose CL-6Bカラムクロマトグラフィーで順次分画しグルカンを得た。このものは、$[\alpha]_D$測定、メチル化分析、*Bacillus subtilus* β-グルカナーゼ水解及びそのオリゴ糖の構造解析の結果から、グルコース残基(G)がβ-1,3,及びβ-1,4 結合している直鎖状のβ-グルカンであることが判った。（図1）.

HC-IIBから、DEAE-*Sephadex* A-25及び*Sepharose* CL-6Bカラムクロマトグラフィーなどの分画操作により、水，酸不溶，アルカリ可溶の多糖（グルコース：キシロース：ガラクトース：アラビノース＝46.2：44.5：4.1：5.2）を得た。本多糖は、*T. viride* セルラーゼで加水分解すると92%が可溶化した。Bio-Gel P-2 で可溶化物を分画すると、主要オリゴ糖として3糖と5糖が得られた。それぞれについて、$[\alpha]_D$測定，IR測定，メチル化分析、*Asp. oryzae* β-グルコシダーゼ水解物の検討により構造解析を行い、図2に示すような構造を推定した。また本多糖は、セルラーゼ処理でグルコースも遊離するので、少なくともグルコースと図2の3糖と5糖を繰り返し単位として有するキシログルカンであると考えられる。

PS-Bのグルコース残基は、直鎖状β-1,3:β-1,4-グルカンに由来することも確認された。

図1.

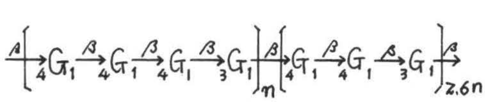
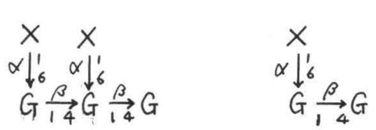


図2.



X: Xylose
G: Glucose

2B-11　　Xyloglucanの生合成に関する研究（第３報）

○林　隆久、加藤陽治、小島邦彦、松田和雄　（東北大・農・農化）

ダイズ培養細胞において、Xyloglucan はヘミセルロースの50%を占め、セルロースに強固に結合している。その化学構造は、骨格がセルロースと同じβ-1,4-Glucanである。そこで、Xyloglucanの生合成機構を解明することは、細胞壁多糖とくにセルロースの生合成機構解明のためにも意義あるものと考えられる。

前報[1]で我々は、UDP-D-XyloseとUDP-D-GlucoseがXyloglucan合成の有効な前駆体であること、さらにそれらによる *in vitro* でのXyloglucan合成に成功したことを報告した。本報では、ダイズ培養細胞より得たXyloglucan合成酵素の諸性質について述べる。

酵素活性の測定は、ダイズ培養細胞の顆粒酵素標品（1000−25000×g ペレット）をUDP-D-[^{14}C]Xylose とともに25℃、20分間インキュベイトし、生じたPolymerを Asp. oryzae酵素標品により分解した後、ペーパークロマトグラフィにより分離されたIsoprimeverose（6-O-α-D-Xylopyranosyl-D-glucopyranose）の放射能より求めた。①この酵素は、高濃度のUDP-D-Glucoseにより著しく活性化されたので、反応には以後2mM UDP-D-Glucoseを添加した。②至適pH は6.5～7.0で、Phosphate buffer. および Tris buffer により阻害を受けた。③２価の金属イオンによる影響では、Mg^{2+}により２倍、Mn^{2+}により15倍に活性化された。④Cell Growth との関係では、酵素活性は対数増殖期に最も高くなり、細胞壁合成と活性は平行していると考えられた。

TDP-D-Glucose はUDP-D-Glucose と同程度に、GDP-D-Glucose はUDP-D-Glucoseの約60%程度活性化を引き起こし、ADP-D-Glucose、CDP-D-GlucoseおよびG-1-P によっては活性化されなかった。またCellobiose、CellotrioseおよびCellotetraoseのAcceptor効果もみられなかった。

次に *in vitro* で合成したXyloglucanを Trichoderma viride のセルラーゼで分解した後、BioGel P-2のゲル濾過を行なったところ、７糖および５糖を主とした高級オリゴ糖のフラグメントが得られた。

これらの結果より、UDP-D-XyloseよりXyloseをAcceptor（GlucoseあるいはGlucan）に転移して、Isoprimeveroseを合成する酵素活性は、現在までに知られている高等植物のβ-Glucan 合成酵素のGlucan を合成する酵素活性と明らかに異なることが示された。また *in vitro* において合成されたXyloglucanが、規則正しいrepeating unitを持つことから、この合成酵素は、マルチエンザイムシステムであることが推察された。

1) 林　隆久ら．昭和55年度日本農芸化学本大会，３C−10

2B-12　　固定化プロテアーゼを用いた藻類の
プロテアーゼインヒビターの精製

渡辺相雄，近藤矩朗　（国立公害研，生理・生化学）

近年プロテアーゼインヒビターの重要性が認識され，動物臓器，血液，微生物，高等植物種子に広く存在していることが明らかにされ，蛋白化学の進展とともにインヒビターの阻害機序がしだいに解明されてきている。

海産の藻類にプロテアーゼインヒビターが存在するか否か不明であったが，紅藻に存在することを見い出したので，精製法及び性質について得られた知見を報告する。

藻体を伊豆半島の下田付近の海岸で採集し，ブレンダーで紛砕し，水抽出後，10,000 g で遠心し上清に 64%飽和硫安を加え，硫安分画し，Sephadex G-100 によるゲル沪過，CM-cellulose，DEAE-Sephadexカラムクロマトで部分精製した標品を固定化トリプシン及び固定化プラスミンを用いて，アフィニティクロマトを行なって精製した。プロテアーゼインヒビターのアフィニティクロマトにおける種々のスペーサーの検討を行ない，アームとして，アミノ化多孔質ガラス（P.G.）に無水コハク酸，m-及びp-フェニレンジアミンを結合したものを作製し，プラスミン，トリプシンのアミノ基やカルボキシル基を結合させた担体を用いてプロテアーゼインヒビターを精製した。

紅藻，*Grateloupia lividia*（ヒラムカデ），*Grateloupia elliptica*（タンバノリ）褐藻，*Myelophycus caespitosus*（イワヒゲ），*Sargassum fulvellum*（ホンダワラ）*Ishige okamurai*（イシゲ）にプラスミン活性及びトリプシン活性を阻害する高分子阻害物質が存在することが見い出されたことから，海藻にもプロテアーゼインヒビターが広く存在している可能性が示唆された。

G. lividia や *G. elliptica* のゲル沪過によって得られた粗画分の阻害活性の強い2画分を Fraction I，II とし，その性質を検討した。F-I，F-II とも 100℃ 10分間の熱処理で阻害活性はほとんど失われなかった。F-II はプロナーゼ及びペプシンで消化され阻害活性が低下した。特にペプシンでよく消化されることから酸性プロテアーゼで分解を受ける蛋白性の阻害物質が，藻類にも存在しているものと推察した。37℃で4%過塩素酸を加え120分間放置後中性にした画分のプラスミン阻害活性は低下しないことから耐酸性のインヒビターであろうと推定した。

固定化トリプシンを用いて精製したトリプシンインヒビターは，100℃ 10分間の加熱処理後のプラスミン及びトリプシン活性の阻害率は処理前とほとんど変らないことから精製されたプロテアーゼインヒビターは耐熱性のインヒビターであることを強く示唆した。

チオールプロテアーゼであるパパインや酸性プロテアーゼであるペプシンの活性を阻害しないことからセリンプロテアーゼの特異的阻害物質が海藻に存在しているものと思われる。

海藻にヒトプラスミン，トリプシン活性を阻害する蛋白性のプロテアーゼインヒビターが存在する生理的意義については不明である。

2B-13

コムギの発芽および低温処理過程におけるα－アミラーゼの変動

石川　鑛，藤岡隆昭*，安芸誠悦，佐々木喜美子　（北大・理・植，*青森県立大間高）

コムギの発芽過程および低温処理過程におけるα－アミラーゼの変動を酵素活性および免疫学的方法により調べた。

発芽7日目のコムギ芽生えから，酢酸緩衝液（pH4.8）により粗抽出，β－アミラーゼの除去，硫安分画，グリコーゲン沈殿，アフィニティクロマトグラフィーの順序で，α－アミラーゼを精製した。この酵素標品はSDS－ポリアクリルアミド電気泳動においては分子量43,000の単一バンドを示すが，免疫電気泳動では抗原決定基の異る2つの成分に分かれ，この酵素標品には同じ分子量をもつアイソザイムが含まれていることが明らかになった。この酵素標品を抗原としてウサギ抗血清を得た。

次に，コムギ種子の24℃の発芽過程と4℃の低温処理過程におけるα－アミラーゼの活性の変化および定量用単一拡散法（マンチーニ法）による免疫学的方法により量的変化を，胚（芽生え）および胚乳に分けて測定した。各時期において酵素活性の90%以上が胚乳にあるが，抗原抗体反応を利用して測定した酵素含量の割合はそれとは異り，胚（芽生え）と胚乳の各部分におけるα－アミラーゼの比活性も違うことも示された。しかし発芽過程と低温処理過程における酵素活性，酵素含量の変化にはあまり違いはみられなかった。

次に，ゲル内二重拡散法（オクタロニー法）により発芽および低温処理の各時期のα－アミラーゼのアイソザイムの変化を調べた。胚（芽生え）と胚乳におけるアイソザイムの消長は，表にみられるように，発芽過程においても低温処理過程においても各部分の間に違いがあり，両過程の間でもその違いがみられた。さらに，コムギ胚を培養した芽生えおよびカルスについて調べた結果について報告する。

Germination	0	1	2	3	4	5	7 (days)	Antigen
Embryos	-	o	oo	o	o	ooo	oooo	oooo
Endosperms	-	o	oo	oo	oooo	oooo	ooo	oooo

Vernalization	0	5	10	15	30	45 (days)	Antigen
Embryos	-	-	oo	ooo	oo	ooo	oooo
Endosperms	-	-	o	o	oo	ooo	oooo

第2日　4月7日(月)

C 会場

生長生理 I、II

2C-1

トウモロコシ子葉鞘における NADH-Cyt.C-reductase と IDPase の活性に及ぼす IAA の影響

°加藤良一，藤伊　正　（筑波大・生物）

最近植物細胞において、auxin と膜との相互作用を示唆する研究が多く報告されている。Batt と Wilkins (1976) は、トウモロコシの子葉鞘から抽出した膜分画に、1-naphthylacetic acid (NAA) および 3-indolylacetic acid (IAA) に対して高親和性結合部位が少なくとも二つ含まれている事を示した。さらに Batt (1976) は、一つの部位は plasma membrane に富む分画に局存し、他の部位は Golgi membrane and/or endoplasmic reticulum (ER) に富む分画に局存することを明らかにした。Golgi および ER 等の膜系は種々の物質の合成・移送に関与し、生理的に重要な役割を持っているにもかかわらず、これら膜系に対する植物ホルモンの生理・生化学的研究はほとんど行なわれていない。そこで本研究ではまず Golgi および ER に対する IAA の影響をそれぞれの marker enzyme である inosin-5'-diphosphatase (IDPase) と NADH-cytochrome C-reductase を指標として調査した。

材料はトウモロコシ (Golden Cross Bantam '70) を用いた。36 時間浸漬後、バーミュキュライトに播種し、26±1°C 暗下で育生させた。約4日後、緑色光下で子葉鞘の先端から 5 mm を除いたその下部 5 mm の切片を取り、実験材料とした。子葉鞘切片に IAA を処理する場合には IAA を含む燐酸緩衝液 (50 mM, pH 5.8) または IAA を含まない同液に子葉鞘を 27°C で一定時間振盪した後、4°C 下で磨砕液 (50 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 0.1 mM $MgCl_2$, 16% (w/w) 蔗糖, pH 8.0) と共に磨砕し、10.000 G で遠心して細胞壁を沈澱させ、その上清を 18% (w/w) と 45% (w/w) の蔗糖 (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 0.1 mM $MgCl_2$, 1 mM KCl, pH 7.0 を含む) 不連続密度勾配にかけ、80.000 G で超遠心の後、膜分画を得た。この膜分画を用い NADH-cyt.C-reductase と IDPase (膜抽出時から 48 時間後に測定) の比活性を求めた。in vitro で膜系に対する IAA の影響を調べる場合には、子葉鞘を切り出した直後に磨砕し、上記と同じ方法で得た膜分画に直接 IAA を加え二つの酵素の活性を IAA 無処理のものと比較した。

子葉鞘切片を IAA で処理した場合、両酵素の活性は低下しその効果は IAA の濃度が高くなるにつれて増大した。分画した膜系に 10^{-6}M の IAA を処理した場合にも同様の効果がみられ、NADH-cyt.C-reductase, IDPase 共にその活性が低下した。しかもその抑制効果は、IAA 処理後比較的短時間のうちに顕われることが示された (NADH-cyt.C-reductase は 5 分以内，IDPase は 30分以内)。IAA 処理による活性の低下が膜系を通して二次的にもたらされるのであろうか、直接酵素に作用するものであるのかを明らかにするために、現在これらの酵素を膜系から外し活性の変動を調べることを試みている。細胞壁中のハイプロ糖タンパクの移送が IAA により減少する (Fujii; Plant & Cell Physiol. 1978) ことなど考えると、IAA が ER あるいは Golgi の膜系にはたらき、その輸送能を低下させていることも十分に考え得るものと思われる。

2C-2

アカパンカビの分生子発芽における細胞壁分解酵素の活性に及ぼすオーキシンの影響 II

川辺由紀子，中村輝子　（日女大・生理研）

昨年の本大会において，分生子の発芽過程に伴う細胞壁分解酵素の活性変動及び2·4-Dの影響について報告したが，今回は粗酵素液の調製方法として超音波処理についての検討及び超音波処理方法からえられた結果について報告する。

分生子の発芽実験は前回同様，10^6conidia/mlの濃度で蔗糖の入ったFriesの最小培地に植え，26℃で振盪培養した。2·4-Dは10^{-6}Mの濃度を用いた。

1 超音波処理の検討

分生子はD.W.で2回洗菌後，10^7conidia/mlの濃度でリン酸緩衝液に懸濁し超音波処理（東陽UD-2N-100型，1kH）をする。超音波処理のさまざまの時間毎に一定量の分生子懸濁液を採り遠心分離後，Fr-1，Fr-2，Fr-3の画分をうる。それぞれの画分のタンパク量及びβ-1·3-glucanaseの活性をLaminarinを基質として測定する。同時に分生子の破砕状態を顕微鏡下で観察する。

分生子は超音波処理時間の経過とともに破砕され，40~60分後には完全な形をとどめるものは数%となった。同時にFr-3（可溶性画分）のタンパク量はβ-1·3-glucanaseの活性の増加をともない増加した。比活性は処理時間を通じ一定の値を示した。Fr-1（細胞壁画分）のタンパク量は逆に処理時間の経過とともに減少したがβ-1·3-glucanaseの全活性は増加した。したがって比活性も増加した。

2 分生子の発芽に伴う生重量・乾重量及びタンパク量の変化

分生子の発芽率，生重量，乾重量及び超音波処理により破砕してえられた各画分のタンパク量の培養時間の経過に伴う変化を調べる。

生重量，乾重量ともに培養開始後3~4時間から急速に増加した。全タンパク量は培養開始直後から徐々に増加し，3~4時間後から急速に増加した。可溶性画分のタンパク量も培養開始後3~4時間から急速に増加した。これらの変化は発芽率の増加及び発芽管の伸長の時期と一致する。細胞壁画分のタンパク量は培養を通じ徐々に増加した。

3 発芽に伴うβ-1·3-glucanaseの活性変動及び2·4-Dの影響

β-1·3-glucanaseの活性はLaminarin，p-Nitrophenyl-β-D-glucosideを基質として測定した。可溶性画分において，LAMaseは発芽初期に一度減少しその後発芽管の伸長とともに全活性，比活性ともに増加したがpNPGaseの活性は増加しなかった。2·4-Dは前者の活性を高めた。分生子1個あたりのLAMaseの活性はaceton powderを用いて測定したが培養とともに活性は増加し，2·4-Dはこの活性を高めた。pNPGaseの活性はintactな分生子を用いて測定したが，2·4-D処理，無処理ともに，培養を通じてほとんど活性は変化しなかった。

これらの結果から，分生子の発芽に関与するglucanaseはexo-typeではないこと，又，2·4-Dはexo-typeのglucanaseの活性には影響を及ぼさないことが示唆される。

2C-3

アズキ上胚軸切片のオーキシンによる細胞伸長と細胞壁多糖類および力学的性質の変化

○西谷和彦・増田芳雄　（大阪市大・理・生）

植物細胞の伸長生長は、細胞の吸水力によって制御されている。また、その吸水力は細胞内外の浸透圧差と細胞をとり囲む細胞壁の力学的性質によって決る。オーキシンが細胞伸長をひき起こすのは、細胞壁の力学的性質を変化させ（すなわち細胞壁をゆるめ）ることにより細胞の吸水力を高めるためであると考えられている。

オーキシンによってひき起こされるこの細胞壁のゆるみの機構を解明するために従来から単子葉植物であるオートムギの幼葉鞘が用いられ、その細胞壁の力学的性質の変化と、その背景となる細胞壁多糖類の構造変化が研究されてきた。その結果、単子葉植物であるオートムギ幼葉鞘では、細胞壁のゆるみがβ-1,3：1,4-グルカンの分解に起因する細胞壁の粘性の低下と関連づけられた（Sakurai et al. 1979）。しかしながら、オートムギ幼葉鞘における細胞壁ゆるみの機構が、細胞壁の構造が全く異なる双子葉植物にあてはめられるかどうかは検討の必要がある。

演者らは従来から双子葉植物であるアズキの上胚軸切片を用いて、その切片がオーキシンに反応して伸長する過程での細胞壁多糖類の構造の変化を調べてきた。その結果、アズキ細胞壁では、オートムギの細胞壁と著しく異なり、長時間（20時間）のオーキシン処理によって、ガラクタンの分解と合成、およびポリウロニドとキシログルカンの合成が高まることが明らかとなった（Nishitani et al. 1980）。しかしながら長時間のオーキシン処理によってひき起こされる上述の多糖類の変化を、オーキシンによる細胞壁のゆるみと直接関連づけることはできなかった。そこで今回は、今まで明らかにされていなかった双子葉植物細胞壁のゆるみの機構を探るために、アズキ切片がオーキシンに反応して伸長する際の短時間内での細胞壁多糖類、および細胞壁の力学的性質の諸変化を調べ、以下の結果を得た。

(1) アズキ上胚軸の細胞壁の力学的性質を、応力緩和法を用いて解析し、得られる緩和曲線から次式の各パラメータを求めた結果、オーキシン処理によって15分以内に、T_0値の減少、b値の上昇、C値の減少が引き起こされることがわかった。

$$S/S_0 = b \cdot \ln\left(\frac{t+T_m}{t+T_0}\right) + C$$

(2) また、上述のT_0, b, Cの変化は、0.15Mマニトール溶液中でオーキシン処理をした時にも認められたことから、これらの変化は、細胞伸長の結果でなく、オーキシンによる細胞壁のゆるみを反映したものであると考えられる。

(3) 短時間（2－6時間）のオーキシン処理をしたアズキ切片の細胞壁をペクチン画分、ヘミセルロース画分、セルロース画分に分け、各画分内の構成糖量、多糖の分子量を測定した結果、オーキシンは、ペクチン画分内のポリウロニド量の増加と高分子化、ヘミセルロース画分内のガラクタン量の減少と低分子化をひき起こすことが明らかとなった。

以上の結果から、双子葉植物における細胞壁のゆるみの機構には、ガラクタンやポリウロニドの代謝が関与していると考えられる。

2C-4

アベナ幼葉鞘切片のオーキシンによる伸長誘導作用におよぼすガラクトースの阻害効果

○山本良一・桜井直樹・増田芳雄 （大阪市大・理・生）

オーキシンが植物細胞の伸長生長を誘導する際、細胞壁がゆるむことが観察される。 また、この細胞壁のゆるみが伸長生長の原因であると考えられている。 演者らは、オーキシンによって引き起こされる細胞壁のゆるみとその背景となっている細胞壁構成多糖類の代謝をオートムギ幼葉鞘を材料として研究してきた。 オートムギ幼葉鞘細胞壁は単糖として，グルコース、ガラクトース、キシロース、アラビノースなどを含んでいる。 ところが、これらの中性糖のうちガラクトースをオートムギ幼葉鞘切片に与えると，オーキシンによる伸長生長がいちじるしく阻害されることが報告されている（Ordin and Bonner, 1957）。このガラクトースの伸長阻害作用を調べることによって，オーキシンによる伸長誘導の機構を解明する手がかりが得られると考えて実験を行なった。その結果，以下のような実験結果が得られたので報告する。

i)オートムギ幼葉鞘切片は，オーキシンによっても低pH によっても伸長が誘導される。 そこで、オーキシンによる伸長と低 pH による伸長に対するガラクトースの働らきにちがいがあるかどうかを調べた。 その結果、ガラクトースはオーキシンによって誘導される伸長生長をいちじるしく阻害したが，低pHによる伸長を阻害しなかった。

ii)酸生長仮説によると，オーキシンは水素イオンの放出を引きおこし，この水素イオンが伸長を引きおこすという。 そこで，オーキシンによる水素イオン放出にガラクトースが影響するかどうかを調べた。 ガラクトースはオーキシンによる水素イオンの放出をやや阻害する傾向が見られた。

iii)ガラクトースは，酸素消費量でみるかぎり呼吸に対しては阻害作用をもたなかった。

iv)細胞壁の構成多糖類の代謝に対するガラクトースの影響を調べた。 オーキシンは細胞壁のヘミセルロース性グルカンの分解を引きおこすが、ガラクトースはこのオーキシンの作用に影響をもたないようである。 また，ガラクトースの存在によって細胞壁のガラクタンの合成が盛んになることは観察されなかった。

以上の実験結果から，ガラクトースはオーキシンによる伸長誘導を特異的に阻害していると考えられる。 ところが，オーキシン作用のうちグルカンの分解に対しては影響せず，何か別の機構を通じて伸長生長を阻害していると考えられる。

2C-5

オーキシンによる11矮性系統オオムギ子葉鞘の生長と、細胞壁の応力緩和

井上雅裕，倉石晋　（広島大学，総合科学部）

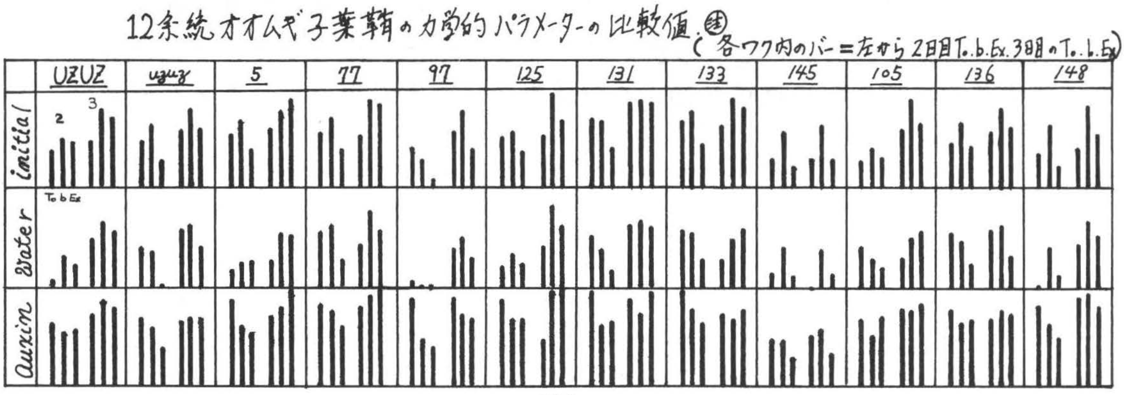
Ethyl methanesulfonate により誘発された単劣性遺伝子支配の矮性突然変異オオムギ同質遺伝子系統を用い、その子葉鞘細胞壁の力学的性質を調べた。

26°C.暗所で1日吸水させた種子を石英砂に植え、伸長の盛んな2日目と伸長率の低下した3日目の両日に長さを測定（無傷の生長）後、1cmの子葉鞘切片を作成し、切りとったばかりの切片（initial）、10^{-5}M・IAA 3時間（オーキシン処理）、あるいは水3時間処理（水処理）の3つのサンプルを熱メタノールで固定した。Instron temsile tester（TM-M）で、各子葉鞘切片の最小応力緩和時間（T_0）、応力緩和速度（b），伸展率（Ex.）を求めた。全処理区を通して、T_0，b は最大値を0、最小値を1，Ex.は最大値を1，最小値を0として、その他の値はこの間に比例配分した。このパラメーターの値が大きい程、良く伸長するといわれている。

使用したオオムギ系統全体を一群として見た場合、T_0，b，Ex. の値は、「オーキシン処理」のものは「initial」と同様、「水処理」よりも大きな値を示した。2日目より3日目の方が全処理区を通じて大きい値を示したが、オーキシンによる増加は2日目の方が著しかった。2日目の各処理区から得られたT_0は2.3日目間の「無傷の生長」とは相関がなく、2日目のオーキシンによるT_0とbの変化量と相関があった。Ex.に関しては相関がなかった。しかしEx.のオーキシンによる変化量を、T_0に加算するとむしろ、T_0，bの変化量よりも「無傷の生長」に対する相関が高くなるのは興味ある点である。さらに2日目におけるオーキシンによるT_0，bの変化量は、3日目のオーキシンによる子葉鞘切片の伸びと相関が高かった。

各系統に注目した場合、77，145，97，125 などが、他の系統と異なったパラメーターの値を示した。77は、高いパラメーターの値を示す割にはオーキシンによる伸びが低く、145は各パラメーターの値と、オーキシンによる伸びも「無傷の生長」とともに低く、97は、2日目の「水処理」で低いパラメーター値を示すが、「オーキシン処理」で著しく回復した。125は、3日目でもオーキシンによりよく伸びるが，T_0は「オーキシン処理」でほとんど変化しなかった。また、2日目のT_0値と、2.3.日目間の「無傷の生長」との関係をみると uzuz，131，133，136 などと他の群に別れる傾向があった。

12系統オオムギ子葉鞘の力学的パラメーターの比較値（図）
（各ワク内のバー＝左から2日目T_0.b.Ex.3日目のT_0.b.Ex）



2C-6

マガタマモプロトプラストにおける初期細胞壁形成及びセルロースミクロフィブリルの配向転換

水田 俊，和田俊司*（高知大・理・生，*東北大・理・生）

巨大単細胞性緑藻マガタマモ（*Boergesenia forbesii*）は物理的あるいは化学的刺激により簡単に不動胞子（プロトプラスト）を形成する。プロトプラストは形成後すみやかに細胞壁合成を開始するので，細胞壁の形成過程を研究する上で有利な材料である。今回はプロトプラストにおける初期細胞壁の形成過程及びミクロフィブリルの配向転換機構の一部を主に電顕的手法により検討したので報告する。

細胞壁形成における初期過程は２つの段階にわけることができる。第１段階では，まずミクロフィブリルを含まないマトリックス相が形成され，引続きランダムに配向を示すミクロフィブリルが現われるようになる。この過程は25℃，3～6時間程度で終了し温度の影響を強くうける。第２段階に入るとミクロフィブリルは一定の配向方向を示す様になり，同時にある方向に回転しながら配向転換をくり返し，いわゆる壁層を形成する。この過程に至るには25°Cで６～12時間を要し，胞子の内部には充分に液胞が発達し，胞子はかなり安定した状態になる。壁層数は時間とともに増加し，細胞壁の構造はThallusにおける構造（水田，和田，1979，日本植物生理学会年会）と類似する。

この様な細胞壁における壁層数を超薄切片として観察すると，ミクロフィブリルの配向転換速度は容易に求めることができる。また胞子は拡張生長をしないので壁厚を測定することにより壁合成速度をも簡単に求められる。下表の如くラメラの90°配向転換する速度は，暗黒条件下では３±0.5回／日で，約４日間は連続的に増加し温度（20°～35°）の影響はほとんどうけない。明条件（約1800 lx）においては，配向転換速度は約２倍に増加し温度の影響をうけるが，光照射による配向転換速度の増加分はＤＣＭＵ（10^{-5}～10^{-6}Ｍ）により阻害される。呼吸阻害剤NaN_3（10^{-3}Ｍ），ＫＣＮ（10^{-4}Ｍ）はいずれも細胞壁合成を阻害するが，ミクロフィブリルの配向転換は阻害しない。ミクロフィブリルの配向転換系は光合成に密接に関係しているものと思われるが，その詳細については検討中である。

マガタマモプロトプラストにおける細胞壁合成及びミクロフィブリルの配向転換におよぼす温度及び光の影響

Condition	Temp(°C)	Thickness(μ)	90°配向転換の回数
Dark	20	0.51 ± 0.1	9 ± 0.5
	25	0.68 ± 0.05	9 ± 1.0
	30	0.83 ± 0.05	10 ± 1.0
	35	0.62 ± 0.05	8.5 ± 1.0
Light (1800lx)	15	0.55 ± 0.1	7.8 ± 1.5
	20	0.83 ± 0.05	10.1 ± 1.0
	25	1.7 ± 0.1	21.5 ± 1.5
	30	2.1 ± 0.15	26 ± 1.5
	35	1.66 ± 0.15	21 ± 1.5

プロトプラストは球形化後 Provasoli のES－enritchment を含む人工海水中で３日間培養.

細胞壁合成阻害剤であるグリセオフルビン（10^{-4}Ｍ）あるいはＳＨ試薬ＮＥＭ（10^{-4}Ｍ），ＰＣＭＢ（10^{-5}Ｍ）等はミクロフィブリルの配向転換に対して阻害的であるが，細胞壁合成をも同時に阻害する。また，コルヒチン（10^{-2}Ｍ～10^{-3}Ｍ）あるいはサイトカラシンＢ（50μg/ml）等はいずれも無効果であった。

2C-7

巨大単細胞緑藻ハネモ(<u>Bryopsis plumosa</u>)における極性的生長と細胞内運動との関係

°水上　誠・和田俊司　東北大・理・生物

ハネモは1つの個体が1個の細胞から成る多核体で、その生長様式は先端生長である。すなわち、その生長域は細胞のごく先端部に限られ、かつ、通常の静置培養条件下では一次元的にのみ生長する結果、細胞の形は1本の繊維状を呈する。この様な極性的生長様式は、細胞の極性的構造と対応している。細胞微細構造を電顕観察すると、生長域は薄い細胞壁とそれを裏打ちする厚い原形質層を持ち、又、原形質中には壁合成に関係していると思われる多数の小胞が観察される。さて、ハネモを代表的な微小管阻害剤であるcolchicineで処理すると、劇的な異常形態形成が観察される。その効果は2つに大別される。1つは、先端生長の阻害及びそれに引き続いて起こる無数の突起＝新しい生長中心の誘導、という効果である。2つめは原形質流動に対する阻害効果である。

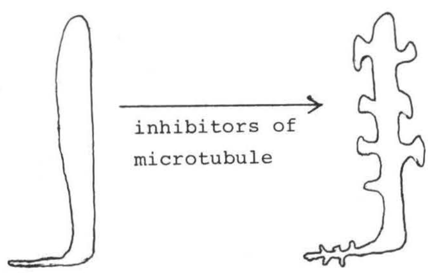
1. colchicineならびに種々の微小管阻害剤による異常形態形成の誘導

colchicine (1mM)海水で細胞を処理すると、処理開始後数時間以内に先端生長が停止、1～2日で細胞全域から突起の発生が認められる。突起誘導に対する処理の必要最小時間は15～30分であり、これより短い場合は効果は見られない。同様な現象はvinblastine, griseofulvin 処理あるいは低温(0°C, 1時間)、高水圧(700気圧, 10分)処理によっても観察される。

2. 原形質流動に及ぼす効果

先端付近(少くとも1mm以内)では主に先端方向に、先端から離れた部分(少くとも5mm以上)では主に基部方向に向かって流れる原形質流動が観察される。この流動はcolchicine及び他の微小管阻害剤によって顕著に阻害を受ける。colchicine処理の場合、25°C、1mMの条件下で、処理開始後15分以内に流動は完全に停止する。微小糸阻害剤であるcytochalasin Bによっては阻害されない。

以上の事実から、細胞内にある一定の様式で配列した微小管が存在し、細胞の形態形成、極性的秩序の維持に重要な役割を果していることが推測される。実際、電顕観察によって、最先端部を除く細胞質中に多数の微小管が、細胞長軸と平行に配列していることが明らかとなった。特に、葉緑体の近傍に多く存在する傾向が見られる。これらの微小管はcolchicine処理によって消失し、vinblastine処理によっていわゆるパラクリスタルを形成する。上記の結果から導かれるもう1つの推論は、微小管は原形質流動を介して、細胞の形態形成に関与しているのではないかということである。すなわち、微小管が破壊されると、細胞内輸送系が停止する結果として、まず先端生長の停止が起こり、次いで細胞の極性的構造が失われ、突起の誘導が起こると考えることが出来る。



2C-8

巨大細胞性緑藻アオモグサ (<u>Boodlea</u> <u>coacta</u>) の形態形成に及ぼす高水圧及びコルヒチンの効果

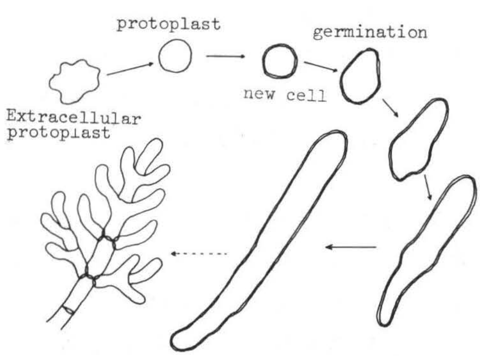
°本尾 真，和田俊司（東北大 理 生物）

巨大細胞性緑藻アオモグサ(Boodlea coacta,Siphonocladales,Chlorophyta)の細胞外原形質は球形化し，細胞壁を再生し，新生細胞となる。Provasoli's ES medium 25°C, 4000 lx. 16L/8D の培養条件下で細胞は下図の様に特有な形態の藻体に生長する。この巨大細胞の生理学的研究は従来全く行なわれていないので，その細胞生長の様式，特性について検討を加えた。

発芽及び生長様式：球形化したプロトプラストは，25°Cでは，2～4時間内にペクチン質，ついでセルロースフィブリルを含む細胞壁を新生する。球形の新生細胞は，Thallusとなる突出につづいてその反対側から Rhizoid 性突出を生じ，それぞれ伸長する。この bipolar な発芽の極性は光照射方向により誘導される。Thallus の生長様式は広域性先端生長で，かつラセン生長である。これに対し Rhizoid では最先端約30 µm内に生長活性が集中している。セルロースフィブリルを含む細胞壁は，Thallus と Rhizoid 共に著しい多層化が起こる。

光生長反応：Thallus と Rhizoid の伸長生長の光依存性は異なり，Thallus は青色光により，Rhizoidは赤色光により，顕著に促進される。Rhizoid は負の光屈性，Thallusは正の光屈性を示すが，Thallus における屈曲様式は屈曲部位が伸長生長活性の低い，先端より離れた所であるという事である。

Antimitotic agent 等による細胞形態形成の異常：生長活性がほぼ両端に集中している棍棒状の細胞を高水圧（500, 750, 1000 kg/cm²），低温処理（2°C, 24 hr），colchicine 処理（10^{-3}, 10^{-4} M, 24 hr），または vinblastine 処理（10^{-5}, 10^{-6} M 24 hr.）すると細胞の極性的秩序が乱され，多数の生長中心が各所に誘導される。処理後通常培養条件下で，側枝として突出生長する。この突出誘導は，Rhizoid先端付近で特に顕著であるが，この際，従来の生長先端は不活性化し，先端付近に局部的な Chloroplast の集積，ついで隔壁形成を伴なう。



2C-9

フリーズ・レプリカ法によるシダ原糸体原形質膜の微細構造

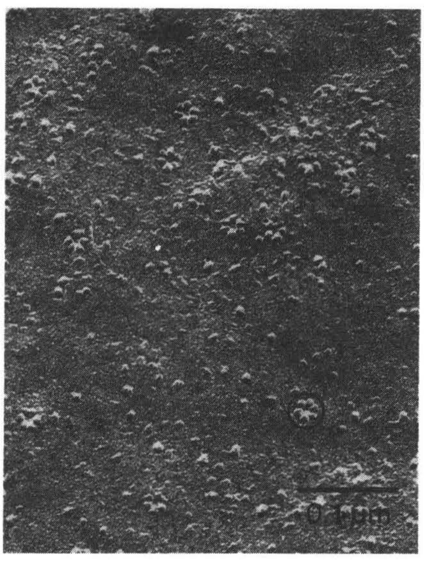
和田正三（東大・理・植物），L.A. Staehelin（コロラド大）

シダの原糸体細胞は先端生長をし，その伸長域は先端から約20μmまでの範囲であり．その他の部域はほとんど伸長しない（高橋1961）。この伸長は主に，原形質膜に存在すると考えられるフィトクロムにより制御されている（Etzold，1965，門田・古谷，1977）。本研究ではこの伸長に対する原形質膜の働きを研究する目的で，ホウライシダ原糸体の原形質膜をフリーズ・フラクチャー法により，主に個々の原糸体における先端から基部への微細構造の変化に着目して観察を行った。

本研究には1978年に，東大理学部付属小石川植物園で採集した胞子を，10倍に希釈したMurashige + Skoog（1962）の無機塩液に0.5%の寒天を加えた培地で4日間約0.5 W m^{-2} の赤色光下で培養して得た単細胞性の原糸体を使用した。原糸体は固定もグリセリン処理もせず，生のまま，ダブルレプリカ法により液化プロパンで凍結・破断後，白金とカーボンの同時蒸着を行った。レプリカは60°Cの70%硫酸で1晩処理した後，漂白剤で試料を剥離・浄化した。

原糸体表面はワックス層で覆われており，ほとんどの原糸体はこのワックス層内で破断され，原形質膜で破断される原糸体数は少ない。一方，仮根細胞の表面にはワックス層がないらしく，常に原形質膜で破断された。

原形質膜Pf面には，6つの粒子から成るロゼット構造（写真）が見られた。ロゼットの外径は約240Åで中心には直径約50Åの空間があり，各粒子の直径の平均は約85Åである。この構造は原糸体先端部から約20μmまでの部域に多く，基部に向って数は減少し，50μm以下ではほぼ見られなくなる。この構造は緑藻のMicrasterias（Giddings et al，1980）や高等植物（Müller & Brown，1980）でごく最近初めて報告された「セルロース繊維を作っていると考えられているロゼット構造」と全く同種のものと考えられる。



ホウライシダ原糸体の先端部から約20μm付近の原形質膜Pf面．ロゼットの外径は約240Å。

その他原形質膜には単独で存在する粒子が多く見られるが，Pf面では原糸体の先端から基部に行くに従い，その数は減少するとともに，大きさの平均値も減少する。Ef面ではPf面に比べ粒子数は少ないが，Pf面同様 数は先端に最も多く，大きさはPf面とは逆に先端部では小さく，基部で増大する。

以上の結果，伸長中のホウライシダ原糸体の原形質膜には、伸長部域にセルロース合成を行っていると考えられるロゼット構造が多数存在していること，また原糸体の先端部から基部にかけ，ロゼットの数，粒子の数や大きさなどに明らかな分化が見られることがわかった。

2C-10　　タマネギ肥大生長と微小管の関係

°三田　高志，柴岡　弘郎（都立大・理・生物）

タマネギは通常初秋に播種し，初夏に収穫しているが，生育期間のうち短日条件である秋，冬の間は基部の肥大は見られず，肥大は3月下旬ごろから4月上旬にかけておこり球根が形成されることが知られている。また，この球根形成には細胞分裂は関与しておらず，葉のたて方向の伸長の停止と，よこ方向への伸長の増大がその原因であることも報告されている。こうしたことは，タマネギが環境と植物の形との関係を細胞伸長の方向性の制御という観点でとらえるためのよい材料であることを示している。

本研究では，まず可能なかぎり早い時期に球根形成を行なわせようという考えから，連続光下（25～28°C）でタマネギを生育させたが，2ヶ月の生育で6枚の葉を持つにいたるまでも球根形成は見られなかった。しかし，このような予備実験の過程で，根を切断すると芽生えの基部に肥大がおこることが観察されたので，根の切断と芽生え基部の肥大との関係を調べることにした。

根を切断した場合の肥大は第2葉の基部より約3mm上の部分で顕著であったので，この部分の細胞について細胞の横断面の面積の比較を行なった。その結果，表皮細胞については，根切断による断面積の変化は認められなかったが，第2層目より内側の細胞では，処理後4日目ぐらいから断面積の増大が認められ，処理後9日目で30％ほどの増大が認められた。

そこで，根を切断処理する前の芽生え，根を切断処理しその後2日間生育させた芽生え，切断処理せず2日間さらに生育させた芽生え，それぞれにつき，第2葉の基部から1～4mmの約3mmの切片を切り取り，常法に従い固定・包埋，超薄切片を切り出し，酢酸ウラン，クエン酸鉛により染色した後，電子顕微鏡により，主として表皮のすぐ内側の細胞の微細構造を調べた。

根を切断処理する以前の芽生えの第2葉の第2層目の細胞では，軸に対して横方向に配列した微小管が多く観察された。たて方向に配列した微小管も観察されたがこれは細胞のすみの部分に局在していた。表皮細胞のOuter tangential wall直下の微小管も観察したが，ここでは横方向の微小管と，たて方向の微小管ともに観察され，その方向は細胞によって異なっていた。

根切断処理せず2日間さらに生育させた芽生えの第2葉の第2層目の細胞では，横方向に配列した微小管が多く観察された。たて方向に配列した微小管は，細胞のすみに見られたが，根切断処理する前の細胞において見られたものよりもすくなかった。表皮細胞では，たて方向の微小管がOuter tangential wallにそって配列していることが，根切断以前のものより多かった。

根を切断処理し2日経過した芽生えの第2葉の第2層目の細胞では，横方向に配列している微小管はほとんど観察されなかった。たて方向の微小管が細胞のすみの部分で観察されたが，あまり多くなかった。表皮細胞では，処理前同様，Outer tangential wallにそって横方向の微小管，たて方向の微小管が共に観察された。

2C-11　植物の微小管タンパク中のATPaseについて

○水野孝一，小山元子，柴岡弘郎（都立大・理・生物）

アズキのエピコチルの微小管タンパクは我々の研究室で開発したエチルフェニルカーバメート（EPC）をリガンドとしたEPC／*Sepharose* 4Bによる*affinity chromatography*と*phosphocellulose column chromatography*を併用する事によりかなりの程度まで精製されるようになった。この方法で精製された微小管タンパクはGTP存在下30℃でインキュベートすると重合し，これを4℃に冷やしたり，Ca^{2+}を加えることにより脱重合する性質を有している。既に報告したように，この微小管はSDS電気泳動により分子量約55,000と推定される主タンパクとその他いくつかの付随タンパクより構成されている。これらのタンパクの中に，微小管の機能を理解する上で重要な意味を持つと考えられるATPase活性が見い出されたのでその性質を調べ，役割りについて考えてみた。

5日間，明所，27℃で育てたアズキのエピコチルを1mM EGTA，1mM $MgCl_2$，1mM GTP，3mM DTTを含む0.1M MES *buffer*，pH 6.5で破砕し，ガーゼで沪過した沪液を100,000×gで40分遠心し上清を得る。この上清をEPC／*Sepharose* 4B *affinity column*にかけ，GTP，DTTを含まない抽出*buffer*（*elution buffer*）でよく洗った後，0.1M NaClを含む*elution buffer*によって吸着したタンパクを流出させる。脱塩後*phosphocellulose column*にかけ吸着分画と非吸着分画とに分けた。吸着分画は，0.8M NaClを含む*elution buffer*で流出させた。各々の分画について笠毛らの方法（*Plant & Cell Physiol.* 20 '79）でATPase活性を測定した。ATPase活性は吸着分画にはほとんど検出されず大部分が非吸着分画に検出され，また微小管重合活性もこの分画に検出されたので以下のATPase活性の測定には，この*phosphocellulose column*非吸着分画を用いた。このATPase活性は微小管を脱重合させるCa^{2+}や，生体内の微小管を消失させるEPCやコルヒチンなどでは全く影響を受けなかった。しかしながらMg^{2+}は必須でありEDTAにより著しく阻害された。またPCMBによっては全く阻害されず，活性発現にSH基は関与していないと思われる。pH 5.5～8.0の範囲でのpH変化の影響を調べると，この範囲ではATPase活性はほとんど影響を受けなかった。このタンパク分画にはATPase活性のほか，より強いGTPase活性が見い出されたが種々の性質は全くATPaseと同様であった。しかしGTPase活性にはpH依存性が有りpH 6.0～6.5に活性ピークを示した。またK_m値はATPを基質とした場合は約3.5×10^{-4}M，GTPを基質とした場合には約2.3×10^{-4}Mと大きな差はないがV_{max}がGTPを基質にした場合は，ATPを基質にした場合のおよそ2倍であった。

このようにATPase活性とGTPase活性はほぼ似たような性質を示すが，これらの活性は単に基質構造の類似性による非特異的反応なのか，それぞれ特異性を有し独立して機能しているのか興味が持たれる。

2C-12　不定根形成に対する微小管蛋白合成阻害剤の影響

加藤美恵子，柴岡弘郎　（東洋大・短，都立大・理・生物）

最近、amyprophos methyl（P.S. Collis and D.P. Weeks, 1978年）が、transcriptionのレベルで微小管蛋白の合成を特異的に阻害するということが報告された。その類似化合物であるO-(3-methyl-6-nitrophenyl)N-sec-butyl-phosphorothioamidate（cremart）が、アズキcuttingの不定根形成を完全に阻害する（色々の時期にcremartを24時間与えて、cuttingを作ってから5日後に外に突出した根の数を数えたところ、いずれも0本であった。）ことがわかったので、アズキcuttingを用いて、発根初期の細胞分裂に対する、cremartのえいきょうを調べた。

明所で育てたアズキの芽生えから、長さ4cmの茎の切枝を作り、cremart（2×10^{-5} M）の溶液に一定時間浸漬して、その基部2mmの部分を切り取り、FAAで固定し、パラプラストで包埋した。厚さ15μの連続切片を作り、ハイデンハインのヘマトキシリンで染色して顕鏡した。cremartは、0，4，6，8，----，22時間から24時間まで与えて、全て24時間目に固定した。コントロールとしては、0，4，6，8，---- 22，24時間の各時間まで、水だけを与えたものを直ちに固定した。

その結果、細胞分裂はいずれもcremartを与える直前の状態で留まっていることが観察された。即ち、分裂開始以前に与えられても、分裂中に与えられてもcremartが存在している間は、分裂は起らないで、cremartを与える直前のコントロールと、分裂の状態は同じであることがわかった。しかし、cremartを与えた方は核が大きくなっているものが観察された。

アズキcuttingの不定根形成の際に見られる細胞分裂は、cuttingを作ってから、10時間目に始まり、24時間までは4時間毎に起っている。この初期の早いcycleの細胞分裂において、分裂装置を作るための微小管蛋白の合成は果して、一回毎に起っているのだろうか。cremartがもし、amyprophos methylと同様にtubulinの合成を阻害するものならば（今後調べなければならないが）、この結果から、アズキcuttingの不定根形成における初期の細胞分裂では、一回毎にtubulinを合成しているものと考えられる。

一方、8時間および10時間（第一回目の分裂が見られる頃）から24時間まで与えた場合に、ほとんど分裂が起っていないことから、tubulinの合成は分裂直前に起るものと思われる。またtubulinの合成阻害ではなくて、colchicineと同じ様に、cremartがtubulinに結合することによる分裂阻害ということも考えられる。cremartがcolchicineと同じように、metaphase arrestを起すという報告（S. Sumida and M. Ueda, 1976年）がある。

アズキcuttingの不定根形成の際の細胞分裂におよぼすcremartの作用機構については今後明らかにしていきたい。

2C-13

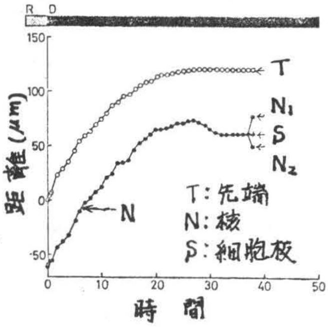
ホウライシダ原糸体の細胞分裂過程に及ぼす遠心処理の影響

峰雪芳宣・古谷雅樹（東大・理・植物）

細胞分裂面の生ずる位置と方向は植物の形態形成における重要な要因の１つになっている。分裂間期には細胞の一端に存在していた核が，分裂の時期に近くなると、分裂をおこす位置まで移動することは、古くから知られている(Sinnott & Bloch, 1941)。本研究は細胞周期を実験的に制御できる糸状単細胞性のホウライシダ原糸体(Miyata et al, 1979)を用いて，その細胞周期の種々の時期に遠心処理を行ない、核の位置を変化させ、それに伴う核の挙動を顕微鏡下で観察し、核分裂の位置がいつ決定されるか，さらに、この決定と時間的に平行しておこる現象を調べた。

〔材料と方法〕小石川植物園で1977年に採集したホウライシダ胞子をプラスチック製キュベット内面に無菌的に播き、その上に10倍希釈のMurashige & Skoog 無機塩溶液を含む0.5%寒天溶液を注ぎ、25°Cの暗所で１日吸水させた後、６日間赤色光下で培養して得た単核単細胞性の原糸体を本研究の材料として使用した。遠心処理は、原糸体の基部の方向に15分間行ない、核及び細胞板の位置を遠心処理の前後及び暗所に移してから３日後に安全光を用いて写真に記録した。連続的観察には、赤外光域用ビデオカメラを光学顕微鏡にセットし、これを微速度撮映用テープレコーダーに接続して用いた。映像記録は20秒に１コマの割合で行なった。

〔結果〕原糸体を赤色光下から暗所へ移すことにより、あるいはG_1期の長さを短縮するため、暗所に移す直前に青色光($1.5 W/m^2$)を10分照射して細胞分裂を誘導した場合について、細胞周期の種々の時期に遠心処理($1300g \times 15$分)を行うと，はじめは処理により核が移動し易く、かつ、処理後３～５時間以内に処理前の位置近くまで戻り細胞分裂をおこす原糸体が多かったが、G_1期の終りに遠心処理を行うと、処理後核は次第に原位置に戻り難くなる。さらにG_2期～M期になると、核は遠心処理で細胞内を移動しにくくなり、細胞周期の時期によって遠心処理の効果に著しい差異があることがわかった。



原糸体を赤色光下から暗所に移すと、先端成長は図(o–o)に示す経過で、核分裂がおきる前に停止する。先端成長が続く間は核は原糸体の先端から一定の距離を保ちながら、先端方向へ移動するが、成長が止まると核の移動も止まり、わずかながら後方に逆戻りした位置で停止し、約5～6時間の後、核は分裂を完了した（図●–●）。

暗所に移す直前に1300×g，15分間遠心処理を行った場合にも、核移動が細胞板の完成する約５～６時間前に停止することが観察された。また原糸体を暗所に移してから20時間後（G_1期の終り頃）に同様の遠心処理を行うと，核は移行させられた場所の近くで分裂するが、この場合もやはり核移動が停止し約５～６時間後に分裂した。

〔まとめ〕以上の結果、遠心処理により核の位置が移り、新生される分裂面の位置が変化しても、位置決定の時期は分裂完了の約５～６時間前であることがわかった。また、この位置決定の時期には、細胞質の粘性が増大することがわかった。

2C-14　種子組織におけるD-アミノ酸によるエチレン生成の促進

○佐藤　茂，江刺洋司　（東北大・教養・生物）

エチレンは、オナモミ種子の発芽過程に必須な役割を果すホルモンである(Katoh & Esashi, 1975)。我々はこの種子のエチレン生成系を検討して来たが、D-アミノ酸(D-AA)が、種子の軸および子葉組織におけるエチレン生成を促進することを見い出した。対応するL-AAには促進効果がみられない。またカボチャ，ヒマワリ，ヤエナリの子葉切片においても，D-AAによるエチレン生成の促進がみられた。今回は，このD-AAによるエチレン生成の促進について報告する。

（方法）　暗黒下，23°Cで24hr水浸前処理したオナモミ子葉切片を、Vial中AA溶液とともに，同じ条件下で6hrインキュベートし、生成エチレン量を測定した。

（結果）　①表に示すように，10mMの濃度で種々のD-AAが子葉切片のエチレン生成を促進した。一方，対応するL-AAには促進効果がみられず，特にL-Metについても促進効果は認められなかった。また非天然のAAであるD-Ethionineにも促進効果がみられた。②これらのD-AAによるエチレン生成の促進は，AVG(Aminoethoxyvinylglycine)およびAIB(α-Aminoisobutyric acid，後出)で阻害された。

高等植物においては，L-Metがエチレン生合成の基質であることが明らかにされている。しかし上述の結果は，D-AAがL-Metにconvertされたり，あるいは，D-AAが他のL-AAの代謝系(たんぱく合成系など)を阻害し，L-Metレベルを高めた結果エチレン生成を促進したとは考えにくい。次に，D-AAの作用機作の解明の手掛りを得る目的で，D-AAの構造と，それらの促進効果の関係について検討した。その結果，①D-AAの活性発現には，α-COOH基，α-NH_2基および側鎖が不可欠で，その配置がD型であること，②酵素反応類似のKineticsにより，D-AAの側鎖の構造の変化は，D-AAの促進作用の見掛けのKmを変えず，Vを変えること，③D-Pheの促進作用を，L-Phe，D-Ser(単独では促進効果がない)が拮抗的に阻害することが示された。以上から，D-AAと細胞内のあるSiteとの立体特異的な相互作用が，D-AAによるエチレン生成促進の引き金になっていることが推察された。

Promotion of ethylene production by various D-amino acids in cotyledonary segments of _Xanthium pennsylvanicum_.

Amino acid (10 mM)	Relative amount of ethylene evolved
H_2O (control)	1.0
D-Leucine	1.69 ± 0.15
L-Leucine	1.05 ± 0.13
D-Threonine	2.21 ± 0.04
L-Threonine	0.95 ± 0.09
D-Methionine	2.66 ± 0.24
L-Methionine	0.84 ± 0.07
D-Ethionine	2.54 ± 0.10
L-Ethionine	1.07 ± 0.04
D-Valine	2.29 ± 0.29
L-Valine	0.84 ± 0.09
D-Phenylalanine	2.11 ± 0.10
L-Phenylalanine	0.96 ± 0.04

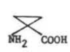
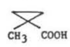
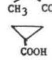
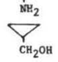
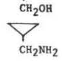
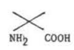
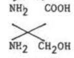
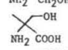
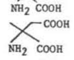
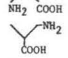
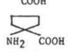
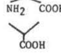
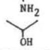
2C-15　α-アミノイソ酪酸によるエチレン生成の阻害

○佐藤 茂，江刺洋司　（東北大・教養・生物）

前報で報告したD-AAによるエチレン生成促進作用は、D-Alaについても僅かではあるが認められる。ところで、α-アミノイソ酪酸（AIB）はD-Alaと共通な部分構造を持つことから、エチレン生成を促進することが予想される。そこでAIBの作用を検討したところ、予想に反しAIBがエチレン生成を阻害することを見い出した。ここでは、AIBのエチレン生成阻害作用についての検討結果を報告する。

前報と同様に処理したオナモミ子葉切片を用い，そのエチレン生成に及ぼすAIBの効果をみると、AIBは4mMで50%エチレン生成を阻害した。更にAIBのエチレン生成阻害作用は、暗所で生育させたヤエナリ，エンドウの胚軸切片でもみられた。次に，AIB，および植物体内におけるエチレン合成の中間体である1-アミノシクロプロパン-1-カルボン酸（ACC）の類似化合物のエチレン生成に与える影響を検討した（表）。ACCはエチレン生成を著しく促進したが、その類似化合物のいずれも、内生エチレンの生成を阻害しなかった。AIB類似化合物のうちでは，DL-α-メチルセリン，シクロロイシンの阻害作用が認められた。これから，エチレン生成の阻害作用の発現には，α-ジアルキル-α-アミノ酸の構造が必要であることが窺われ、中でもAIBの阻害作用が最も大きい。またAIBの阻害作用は，lagなしにあらわれ、且つ20mM AIBはO_2吸収に影響しなかった。従ってAIBはエチレン生成系に特異的に作用することが考えられる。すなわち，AIBとACCの構造の類似から，細胞内におけるACCのエチレンへの分解を、AIBが拮抗的に阻害することが推察される。この可能性を調べるため，Konze & Kende, 1979の方法に従い、暗所で生育させたエンドウ芽生えから調製したHomogenateを用い，in vitroにおけるACCのエチレンへの分解反応に対するAIBの効果を検討した。その結果，AIBは、ACCの分解を拮抗的に阻害することが示された（K_m ACC 20mM，K_i AIB 0.8 M）。

以上の結果から，AIBは植物体内においてもACC→エチレンの反応の拮抗阻害剤として作用し，エチレン生成を阻害するものと考えられる。

Chemicals (10 mM)	Structure	Relative amount of ethylene ±S.E.
1. ACC and its derivatives		
1-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC)		35.10 ± 0.40 [1]
1-Methylcyclopropane-1-carboxylic acid		0.91 ± 0.04
Cyclopropane carboxylic acid		1.02 ± 0.14*
Cyclopropylamine		1.83 ± 0.29*
Cyclopropyl carbinol		1.19 ± 0.05*
Aminomethylcyclopropane		0.91 ± 0.04
2. AIB and its derivatives		
α-Aminoisobutyric acid (AIB)		0.37 ± 0.01
2-Amino-2-methyl-1-propanol		1.05 ± 0.01
DL-α-Methylserine		0.66 ± 0.08 (0.57 ± 0.04) [2]
DL-α-Methyl-aspartic acid		0.95 ± 0.09 (1.10 ± 0.02) [2]
DL-β-Aminoisobutyric acid		1.10 ± 0.09* (1.01 ± 0.05) [2]
Cycloleucine		0.88 ± 0.05
Isobutyric acid		1.17 ± 0.07*
Isopropylamine		0.91 ± 0.03
Isopropanol		0.97 ± 0.01

1, 1mM ; 2, 20mM

2C-16　　カンキツ果実アルベド組織におけるエチレン生成

兵藤 宏，西野 孝　(静大・農・園芸)

カンキツ果実果皮のアルベド組織（白い海綿状組織）を切片にして放置しておくとエチレン生成能が著しく増大する。このエチレン生成誘導に関与する要因は才1に傷害と考えられるが，しかしまだ真の誘導因子については明らかでない。著者らはすでにアルベド切片におけるエチレン生成はメチオニンが基質であることを報告した（Plant Physiol., 1977）。最近1-アミノ-シクロプロパン-1-カルボン酸（ACC）がメチオニンからエチレンに至る中間体であることが明らかにされた（AdamsとYang 1979，Lürssenら 1979）。今回我々はアルベド切片にACCを加えてエチレン生成の促進効果を調べた。ACCの添加はアルベド切片のエチレン生成を著しく増大させた。この系にタンパク質合成阻害剤やエチレン生成阻害剤を加えてその添加効果を調べ，エチレン生成機構の検討を行った。　材料と方法：カンキツ果実として温州ミカン（*Citrus unshiu*），ハッサク（*Citrus hassaku*）を用いた。果皮から9mmのコルクボーラーで切片を打ちぬき，それからフラベド（外側の緑色または黄色の部分）を取り除きアルベド切片を得た。得られたアルベド切片をエルレンマイヤーフラスコに入れ28°Cでインキュベーションした。調製したばかりの新鮮なアルベド切片のエチレン生成は非常にわずかでほとんど検出されない量であるが，数時間のインキュベーションでエチレン生成能は明確にあらわれ，20時間後には著しいエチレン生成能を示すようになる。これらの切片10個ずつを50mlのエルレンマイヤーフラスコに入れ，6mlの水溶液を加えて振とうしながらエチレン生成を調べた。水溶中には調べようとする種々の薬剤を加えた。　結果及び考察：新鮮なアルベド切片はエチレン生成は非常に少いが，ACCを加えると顕著に増加した。インキュベーションした切片（エイジド切片あるいは傷害切片）においてもACCの添加効果は著しかった。しかしその増加の絶対量は新鮮切片のそれに比較してはるかに大きかった。エイジングによりACCの分解活性（ACCよりエチレンへの転換）が顕著に増加していることがわかる。シクロヘキシイミドはACC存在下でのエチレン生成を抑制した。MDMP(2-(4-メチル-2,6-ジニトロアニリノ)-N-メチルプロピオンアミド）もエチレン生成を抑制した。これらの結果はACCを経由するエチレン生成系もタンパク質合成を伴って起きることを示唆している。アミノエトキシヴィニルグリシン（AVG）はACC分解を阻害しなかった。添加したACCによるエチレン生成促進は同時に加えたメチオニン，アラニンなどのアミノ酸により抑制された。これらのアミノ酸は組織内でACCと競合することによりACCの分解反応を抑制しているものと考えられる。L-メチオニンは効果があるがD-メチオニンは作用しなかった。傷害切片での顕著なエチレン生成はACC分解系を含めたエチレン生成系の活性が増大したことによるものと思われるが，ACCの量自身も組織内で増大していることが考えられる。この点については現在検討中である。

2C-17　　黄化ヤエナリ下胚軸のエチレン合成酵素について

高桑進・戸高功・今関英雅（名大・農・生化制御）

黄化ヤエナリ下胚軸におけるメチオニンからエチレンの生成は中間代謝産物として，1－アミノ・シクロプロパン・1－カルボン酸（ACC）が発見された※ことで2つに分けて考えられる。即ちメチオニンからACCの生成とACCからエチレンの合成とである。この内，後者のエチレン合成反応の測定方法を確立しエチレン合成酵素の若干の性質について調べたので報告する。

〈測定法〉ACC，10 mM，Mn^{++}，0.1 mM，下胚軸の酢酸エチル抽出物（Et･Ac）10～20 μl，NADH，5 mM，及び酵素標品，を全量300 μlとして，内容量5.5 mlのバイアル中で保温し生成したエチレン量をガスクロマトグラフィーで検出した。活性は nl C_2H_4 evolved / hr・mg proteinで表わした。酵素標品は，暗所で3日間生育させたヤエナリ下胚軸を，0.3 Mショ糖，1％アスコルビン酸ナトリウム，1 mM DTT，1 mM EDTA及び10％ polyclar ATを含む50 mMリン酸緩衝液（pH 6.8）で磨砕し，膜画分（20,000 g，20分沈澱をミトコンドリア画分とし100,000 g，60分の沈澱を顆粒画分（Mc）とした。）と可溶性画分（100,000 g，60分の上清）とに分けたものを用いた。　可溶性画分にもエチレン合成活性がみられたが膜画分のそれとは性質が違う。ここでは膜画分特にMc画分に局在するエチレン合成活性について述べる。

表に示したようにACCの他にco-factorとしてMn^{++}，下胚軸の酢酸エチル抽出物（Et･Ac），NADH，及びO_2を要求する。基質特異性は高く各種のACC類似化合物からはエチレンは合成されない。この酵素の基質親和性は低く，100 mMのACCでも反応は飽和しなかった。しかし下胚軸切片を用いた場合には1～5 mMのACCで反応は飽和する。Mn^{++}以外の二価陽イオンは有効ではない。下胚軸のアルコール抽出物を更に酢酸エチルで分別すると可溶性画分に未知の不可欠成分が存在する。又各種のフェノールの内で，p－クマール酸，フェルーラ酸，レゾルシノールがこの順序でEt･Ac画分の代用をする。β－NADは無効でNADPHよりもNADHがより有効であった。　更にMc画分でのエチレン合成活性は阻害蛋白質により完全に阻害される他，Catalaseでも強く阻害されたが，superoxide dismutaseはあまり影響がなかった。したがってこの反応にはH_2O_2が関与することが考えられる。又可溶性画分によるエチレン合成活性はパーオキシダーゼ活性によるものと考えている。

表	エチレン合成酵素活性
complete system	22.5
－ Mc	0.0
－ Mn^{++}	3.5
－ Et･Ac	0.2
－ NADH	0.2

※ H. Yoshii et al. (1980) PCP, in press
S. F. Yang et al. (1979) PNAS, 76, 170
Lürrsen et al. (1979) Naturwiss, 66, 214

2C-18　　エチレン生成の阻害タンパク質の作用

○戸高 功、吉井 博、今関英雅（名大、農、生化制御）

我々は、すでに、黄化ヤエナリを用いて、IAAにより誘導されるエチレンの前駆物質が、1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid（以下ACC）である可能性、および、このACCからのエチレン生成を、エチレン生成阻害タンパク質（以下IP）が阻害することを報告している。

今回は、黄化ヤエナリの下胚軸のpeeled segmentsを用いて、ACCからのエチレン生成、および、IPの影響を調べ、non-peeled segmentsのそれとを比較検討した。

〈方法〉 1、Peeled segmentの調製。あらかじめ10mmに切断した下胚軸を、ピンセットで注意深くepidermisを分離し、さらに6mmに切断したpeeled segmentを用いた。

2、IPの精製。すでに報告した方法で、黄化ヤエナリ下胚軸から抽出、精製した。1 unit（50%阻害）が12.9μgのものを用いた。IAA処理した

3、^{14}C-ACCの調製。すでに報告した方法で、黄化ヤエナリ下胚軸切片を用いて、U-^{14}C-メチオニンから調製した。

〈結果〉(1)、non-peeled segmentsによるACCからのエチレン生成を、IPは阻害し、その阻害はIP除去により、完全に回復した。これはIAA誘導エチレン生成におよぼす影響と一致する。

(2)、Peeled segmentsによる^{14}C-ACCのとりこみは、non-peeled segmentsよりも多かった。又、peeled segments, non peeled segments共に、^{14}C-ACCのとりこみでは、IPによる影響は認められなかった。したがって、IPのACCからのエチレン生成の阻害が、ACCのsegmentsへのとりこみを阻害したために生じた可能性は否定される。

(3)、epidermisでは、ACCからのエチレン生成は、ほとんど認められなかったが、Peeled segmentsでは、non-peeled segmentsに相当するACCからのエチレン生成があった。このことから、ACCからのエチレン生成の大部分が、epidermis以外の組織で生じている可能性が示唆される。

(4)、non-peeled segmentsにおけるACCからのエチレン生成が充分阻害される濃度のIPでも、Peeled segmentsによるACCからのエチレン生成には、ほとんど阻害効果が認められなかった。

なお、IAA誘導エチレン生成に関する同様の実験も行なっているので、以上の結果とあわせて報告したい。

2C-19

明暗条件下で生育したエンドウ幼植物のIAA代謝系酵素の活性

°神阪盛一郎・宮田進・増田芳雄・鈴木米三(大阪市大・理)

暗所で生育したエンドウ幼植物の葉条部の内在インドール酢酸(IAA)含量が，明所で生育したそれに比較すると著しく高いことをわれわれは見い出した。また，明所で生育したエンドウ幼植物を暗所に移すと内在IAA含量が高まること，逆に暗所から明所にエンドウ幼植物を移すと内在IAA含量が低下することもわかった。そこで明暗によってIAA含量が変動する原因を知るために，IAAの合成に関与すると考えられる酵素活性を測定したところ，前に報告したようにトリプトファントランスアミナーゼ活性は明暗処理で変化しなかったが，トリプタミン酸化酵素活性は暗所で著しく上昇することが明らかになった。また，IAA酸化酵素によるIAAの分解を抑制する抗酸化物質の含量は，暗所にくらべると明所で著しく高いことがわかった。これらの事実から，暗所でトリプタミン酸化酵素活性が上昇することが暗所における内在IAA含量増加の原因の一つになっている可能性があると考えられた。そこで本報告では，トリプトファントランスアミナーゼとトリプタミン酸化酵素以外のIAA代謝に関係するいくつかの酵素活性が，明暗処理によって変動しないかどうかが調べられた。

明所(3000 lux)および暗所，25°Cで7日間生育させたエンドウ幼植物の葉条部におけるインドールピルビン酸脱炭酸酵素とインドールアセトアルデヒド酸化酵素の活性を測定した。その結果，タンパク質あたりの比活性では，インドールピルビン酸脱炭酸酵素活性およびインドールアセトアルデヒド酸化酵素活性の明暗による顕著な差は認められなかった。また，トリプトファン脱炭酸酵素の活性は，^{14}C-トリプトファンを基質にして測定したが，検出できなかった。他方，エンドウ葉条部のIAA酸化酵素の活性は，明所に比較すると暗所で生育したもので著しく高いことがわかった。また，この酵素活性は葉条部の基部に近い部分ほど活性が高いことがわかった。

明暗処理によってエンドウ幼植物におけるIAAの前駆体の含量が変動する可能性があるので，現在トリプトファンをはじめとするIAA前駆体含量の明暗による差を検討中である。これらの実験結果をもとにして，明・暗によるIAA含量の変動の原因について考察したい。

2C-20

Cell-free系でのサイトカイニンの生合成

°西成典子・庄野邦彦（東大・教養・基礎科学）

遊離型サイトカイニンは、高等植物に広く分布しているが、その生合成経路については、t-RNAのアンチコドンのとなりに組みこまれているサイトカイニンに由来するという考えもあり、ほとんどわかっていない。その原因の一つは、高等植物でサイトカイニンの合成酵素が見出されていないことによると考えられる。我々は、タバコ培養細胞の同調分裂系で、遊離型サイトカイニンのゼアチンとそのリボシドが分裂期に著しく増加することを見出し、この遊離型サイトカイニンの増加は、どこから由来するのかを明らかにする目的で、遊離型サイトカイニンのみならず、t-RNAのサイトカイニン、サイトカイニンリボチド、サイトカイニングルコシドの細胞周期における変動を検討した結果、遊離型サイトカイニンのde novoな合成がおきていると考えられる結論に達した（1979年、植物生理学会）。今回、Cell-free系でのサイトカイニンの生合成について検討したところ、高等植物にサイトカイニンの合成酵素が存在するとの確証を得、さらに合成経路についても一知見を得たので合せて報告する。

材料は、液体培養したタバコXD6S細胞で、対数増殖期のものを用いた。細胞をトリス-塩酸緩衝液、酢酸マグネシウム、KCl、EDTA、メルカプトエタノール、グリセロールの溶液ですりつぶし、遠心して上澄をとり、摩砕液で一昼夜透析し、それを酵素分画とした。酵素反応液には、トリス-塩酸緩衝液pH 7.6、酢酸マグネシウム、イソペンテニルピロリン酸、アデノシンと酵素分画を加え、反応は27°Cで行った。合成されたサイトカイニンの定性、定量は、水飽和ブタノールで抽出後ペーパークロマトグラフィー、TLC、高速液体クロマトグラフィーによった。2.5時間後の反応生成物中には、明らかにサイトカイニンのイソペンテニルアデノシン（i^6Ado）、イソペンテニルアデニン（i^6Ade）、t-ゼアチンを検出した。生合成されたi^6Ado量は、反応1.5時間後が最高で、その後減少したが、i^6Ade量は、反応4時間目まで増加し続けた。t-ゼアチンの合成は、i^6Ado、i^6Adeの合成より遅れてはじまった。基質としては、アデノシン、アデニン、5'-AMPが有効であり、グアニン、ATP、ADPはあまり有効ではなかった。

^{14}C-アデノシンを用いてCell-free系で合成されたサイトカイニンへの放射能のとりこみをみたところ、反応30分後には、i^6Ado, i^6Ade, t-ゼアチンにとりこまれていたが1時間後には、サイトカイニンへとりこまれた放射能のほとんどがゼアチンへとりこまれていた。

以上の結果から、高等植物にt-RNAを経由しないサイトカイニンの生合成系が存在することが明らかになった。また経時的な実験と放射能のとりこみの結果から判断すると、まずアデノシンにイソペンテニル基が結合してi^6Adoとなり、つづいてi^6Ade、さらにゼアチンが合成されると考えられる。タバコ培養細胞から得た粗酵素分画には、これらの各段階を触媒する複数の酵素が含まれ、その酵素は、基質特異性があると考えられる。

2C-21　　矮性イネ"短銀坊主"の葯におけるジベレリンの存在

村上 浩（農技研）

昨年度（1979）の本大会で，筆者は，正常種のイネの葉，茎，根から抽出，検出されるジベレリン（GA）は GA_{19} であるが，開花期の穂には数種のジベレリンが存在し，そのジベレリンは葯に局在していることを報告した。

ジベレリン突然変異体の矮性イネ"短銀坊主"について，正常種のイネと同じように，生育を追って内生ジベレリンを調べると，開花期の穂にのみジベレリン活性が検出され，しかもそのジベレリン活性は，葯に由来していることが判明した。これらの結果について報告する。

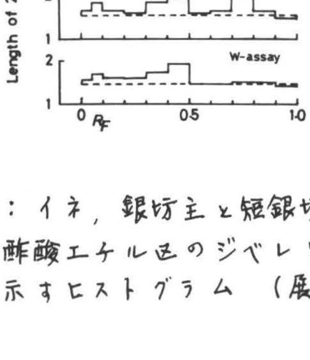
〔方法〕 抽出材料としてのイネは，正常種の銀坊主と矮性種の短銀坊主を用いた。材料を70%アセトンで磨砕し，抽出液を濃縮，リン酸でpH 2.5とし，酸性酢酸エチル区，非酸性酢酸エチル区に分画した。酢酸エチルで抽出したのちの残りの水層をn-ブタノールで抽出し，ブタノール区とした。ジベレリン活性の検出は，シリカゲルHを用いたTLCからの溶出物について，点滴法のイネ苗テストを短銀坊主（T-assay），矮稲C（W-assay）を用いて行った。TLCの展開液としては，Ⅰ：イソプロピルエーテル/氷酢酸（95:5），およびⅡ：イソプロピルアルコール/28%アンモニア/水（10:1:1）を使用した。

［結果］ 正常種のイネ"銀坊主"では，茎葉から GA_{19} が検出されるが，矮性イネの短銀坊主ではジベレリン活性が検出されない。これは，すでに報告したことを確認したものである。

開花している短銀坊主の穂では，ジベレリン活性が検出された。しかし，開花が終り，登熟している短銀坊主の穂では，ジベレリン活性が検出されない。

開花している短銀坊主の穂のジベレリン活性は，葯に由来している。葯のジベレリン活性は酢酸エチル分画のみならず，n-ブタノール区にも検出された。酢酸エチル区には，展開液Ⅰで展開すると，GA_3，GA_4，GA_9 様の活性，さらに原点にもジベレリン活性があり（図参照），極性の高いジベレリンが存在している。この原点のジベレリン活性は結合型ではない。また，酢酸エチルで抽出後の残りの水層をHClで加水分解しても酢酸エチル可溶のジベレリンが生じないから，結合型ジベレリンは葯に存在しないと推定される。

短銀坊主の葯のジベレリン活性が銀坊主の葯のジベレリン活性と異なるのは，R_F 0.1～0.2 の GA_{19} に相当する活性が認められないことである（図参照）。



図：イネ，銀坊主と短銀坊主の葯の酢酸エチル区のジベレリン活性を示すヒストグラム（展開液Ⅰ）

2C-22

4-ピリディル尿素型サイトカイニンの構造・活性相関について

磯谷遥*, 高橋惣四郎, 首藤紘一, 岡本敏彦 (*東大・教養, 東大・薬学)

タバコ（ウィスコンシン No. 38）の髄からつくったカルス（第2代目）の小片（約 30 mg）を種々の濃度の検体を含む Murashige-Skoog 培地に接種し，26°C，散光下に30日間培養して増殖をしらべる Bioassay 法を用いて種々の形式の合成された4-ピリディル尿素型のサイトカイニンの作用をしらべた。その結果化学構造と活性との間に存在する対応関係が明らかになった。即ち，①ピリディン環とフェニール環を結ぶ尿素結合（NHCONH）をチオ尿素（NHCSNH）結合にかえても活性は殆とかわらないが他の形式の結合（NHCO-R または CONH-R）では殆ど作用を失う。②ピリディン環の2位または2，6位を Cl, Br, F, CF_3, CN あるいは OCH_3 で置換した場合には極めて強力なサイトカイニン活性を示す。しかし3位の置換体の活性は極めて弱い。③フェニール環の2，3または4位の置換は活性を低くし，その低下の度合は3位，2位，4位の順に著しい。④ただしフェニール環の3位のFの置換体は例外であって最も強力なサイトカイニン活性をあたえる。

さて個々の化合物の活性は実際にはこれら諸性質の組合せであるから多くの実例を上げて以上の事実を説明し，またこれらの化合物の構造・活性相関にからむ Hanoch の解析についても附言するつもりである。

第２日　４月７日(月)

Ｄ会場

電気生理と運動

2D-1　　*Phaseolus vulgaris* の葉枕内におけるRb^+の動き

細川浩，清沢桂太郎　（阪大・基礎工・生物工）

*Phaseolus vulgaris*の初生葉は，恒常条件でも約28時間の葉の上下運動を示す。最近，K. Kiyosawa (1979) によって，葉の上下運動は，葉柄と葉脈の間にあるlaminar pulvinus (L.P.) の膨圧変化による変形によって起っていることが示された。つまりLD=12：12，温度一定条件で育てたインゲンの初生葉の昼間のL.P.と，夜間のL.P.を，それぞれ上下に分けて，イオン分析を行なったところ，K^+，Cl^-，NO_3^-有機酸に，昼と夜のL.P.の上下切片の間に，分布の逆転が見られた。糖は非常に少なかった。これからL.P.に変化を起こさせる膨圧因子は，K^+，Cl^-，NO_3^-，有機酸であることが結論された。

では，それらのイオンは，時間とともにL.P.内をどのように移動していくのであろうか。K^+，Cl^-については，R. L. Satter ら (1977) によって，*Samanea saman*で，electron microprobe analysis を用いて調べられているが，RIを用いた実験はまだ行なわれていない。

K^+の移動分布をRIで調べるのに半減期の短かい$^{42}K^+$の代りによく$^{86}Rb^+$が用いられている。しかし*Phaseolus vulgaris*にとって，Rb^+が生理学的にK^+と等価であるかどうかということは問題である。本研究では，これを解明するため，根に10mM KCl，10mM RbClあるいは，水だけを与えたときの葉枕内のイオン組成変化を時間を追って調べた。その結果，次のことがわかった。

1. 水だけの場合，葉枕では，K^+の濃度は，ほぼ一定に保たれているが，他のイオン濃度は，だんだん減少していった。
2. KCl溶液の場合，K^+とCl^-は水だけの場合の2倍まで濃度は上昇したが，他のイオンは，減少していった。
3. RbCl溶液の場合，Rb^+とCl^-のみに著しい濃度の増加がみられ，K^+を含めて，他のイオンは減少した。そして，K^+とRb^+との濃度の和は，ほぼ一定であった。

つまり，RbCl溶液に浸した場合，K^+とRb^+のexchangeが起っていると考えられる。しかし，$K^+ + Rb^+$の濃度は，KClだけの場合のK^+の濃度ほどの増加はみられなかった。

次に，K^+とexchange したRb^+が，K^+と同様に葉枕内を日周期的に移動するかどうかを調べた。その結果，K^+，Rb^+，Cl^-，NO_3^-，の分布が昼と夜とで，変化することがわかった。すなわち，exchange したRb^+は，K^+と同じく，葉の上下運動に関与していることが，示唆された。以上のことから*Phaseolus* にとって，Rb^+は全くK^+に等価であるとはいえないが，$^{86}Rb^+$をK^+の tracerとして用いて，オートラジオグラムから，L.P.内のK^+のミクロな分布変化をさぐる方法の可能性が示された。

2D-2　浸透圧変化をともなうK^+-H^+交換反応の可能性

清沢桂太郎（阪大・基礎工・生物工学）

これまで，細菌をはじめ，車軸藻，いくつもの高等植物で，細胞がH^+を外へくみ出す機構を持っていることが報告されてきた。そして，ソラマメ気孔，Avena などでは，H^+を外へ放出するときに外部のK^+をとりこむという，いわゆるK^+－H^+交換反応の存在がいわれている。演者（1979）は細胞がK^+-H^+交換反応を行なうとき，それによって細胞のpHと浸透圧が高くなる可能性のあることを，モデル実験で示唆した。本講演では，細胞のpHを決定しているH^+-donor がHCl, HNO_3などの強酸である場合，citric acid, malic acid などの弱酸である場合，K^+－H^+交換反応で細胞のpH，及び浸透圧がどう変わるかを，もう少しくわしく調べたので，その結果を報告する。実験は，細胞の内外で起こるK^+－H^+交換反応は，上記の酸溶液にKOHを滴定する操作と等価であるという仮定に立って，KOHを滴定しながら，その反応液のpHと，浸透価をそれぞれ，pHメーターと，浸透圧計で測定するというものである。その結果次のことが明らかになった。

（1）H^+－donorが弱酸である場合，K^+－H^+交換反応が進むにつれて，pH及び浸透価とも増加する。例えば，30mM（90meq/l）citric acid は，pH 2.3 で，浸透価は34.7 mOsmol であるから，この溶液はR-$(COOH)_3$ 26mM, R-$(COOH)_2$·COO^- H^+ が 4mM ということになる。これにKOHを滴定して，pH3.8になったときの浸透価は，56.4 mOsmol であった。したがってこの時の溶液は，$R^-(COOH)_3$ 4.8mM, R-$(COOH)_2$·COO^-K^+が22.6 mM, R-$COOH$·$(COO^-)_2$·$2K^+$ 2.5mM（$[H^+]$は無視した）ということになる。さらにKOHを滴定して，pH 8 になると，溶液の浸透価は92.1 mOsmol になる。このときの溶液はR-$COOH$·$(COO^-)_2$·$2K^+$ 0.7mM，R-$(COO^-)_3$·$3K^+$ 29.2 mM となる。

（2）H^+-donor が強酸である場合，例えば，80mN HCl，HNO_3 は，pH1.1で浸透価は151 mOsmol である。K^+－H^+交換反応が進むにつれて，pHは次第に高くなるが，浸透価はH^+-donor がなくなるまでは変らない。

（3）当然かも知れないが，(2)の結果はH^+がCl^-，NO_3^-，K^+，Na^+，R-COO^-等と同じように浸透価に寄与する粒子として存在することを示している。又KOH溶液の浸透価の測定からOHも浸透価に寄与する粒子として存在することが確められた。

Phaseolus vulgaris 葉枕の場合，H^+として測定された量は60～70 meq/l であるので，全部がfreeであるとすると，細胞のpHは約1.2ということになり，これは常識的にありえない。このことは，葉枕内のH^+はほとんど有機酸として存在することを示唆する。したがって，もし，有機酸のカルボキシル基が合成されるとき解離していないなら，K^+－H^+交換反応によって，細胞の浸透圧は増加することが期待される。

2D-3 ムジナモ捕虫葉における活動電位と閉合運動

柴岡孝雄，飯島敏夫　（東北大・理・生物）

ムジナモ捕虫葉は中央脈をはさむ1対のほぼ半円形の裂片からなる．相接する両裂片の中央脈を含む中央域は，表裏の表皮と一層の大形細胞（中層細胞）の3細胞層で構成され，感覚毛が約40本分布している．中央域を囲んで縁辺域がある．ここは中層細胞はなく，表皮のみからなり，感覚毛もない．中央域と縁辺域（その境界線は肉眼でもみえる）の表皮細胞，および中層細胞は，すでに報告したように，すべて興奮性，すなわち活動電位を発生する細胞である．そして一本の感覚毛を刺激すると，活動電位は両裂片の全域に伝達する．同様のことは裂片の一つの細胞を電気刺激してもおこる．各細胞間に多くの原形質連絡があること，また隣接の中層細胞間の電気的結合係数が0.5であることから，伝達は電気的におこると思われる．

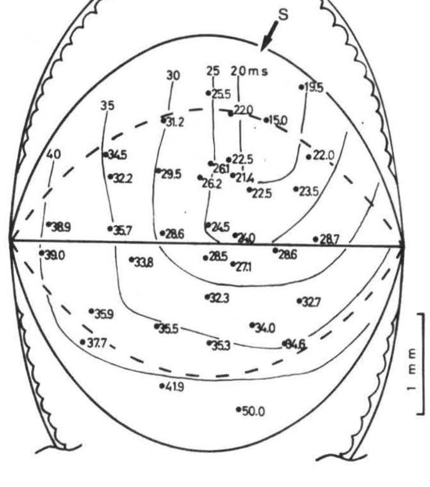


図 1

図1は中央域における活動電位の波及を示す．S位置の細胞に微小電極を刺入し，外向電流で刺激する．黒点で示す種々の位置の細胞に誘導用微小電極を刺入し，刺激後その点の活動電位発生までの時間を測定する．何回かの測定で得られた各点の時間(ms)を数字で示し，細い実線で5ms間隔の等時間曲線を示す．伝達は中央脈に直角方向が平行方向より速く，これは細胞の長軸方向が速いことを示している．

両裂片の急速な内向きの屈曲，すなわち閉合運動は中央脈から両側へ約0.25mmはなれた幅約0.3mmの運動帯でおこる．一方の裂片を固定し，他方の裂片の縁に微小な機械－電気変換器を装着，その運動帯の一つの細胞に電極を刺入し，その活動電位(E)と閉合運動(M)の開始を同時記録した(図2)．EはMに46±4 ms(n＝10)先行し，興奮－運動連関がみられる．運動帯細胞の活動電位が二次的に誘発する機械的応答，それと裂片屈曲との関係については明らかでないが，一応，運動帯細胞の半数が二次的応答をおこすと屈曲が生起すると仮定して，図1の等時間曲線が運動帯を横切る点の時間の平均を計算すると，刺激側裂片では刺激後29ms，他方の裂片では34msで活動電位がおこり，ほぼ同時（約5msの時間差）に両裂片の屈曲がおこり閉合することになる．裂片上の感覚毛の半数以上は中央脈に近く分布しているから，それらの一つが刺激されたときの両裂片の屈曲はもっと時間差がなくおこる筈である．

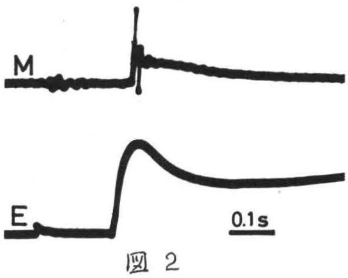


図 2

2D-4　ムジナモ捕虫葉の活動電位におけるカルシウムの関与

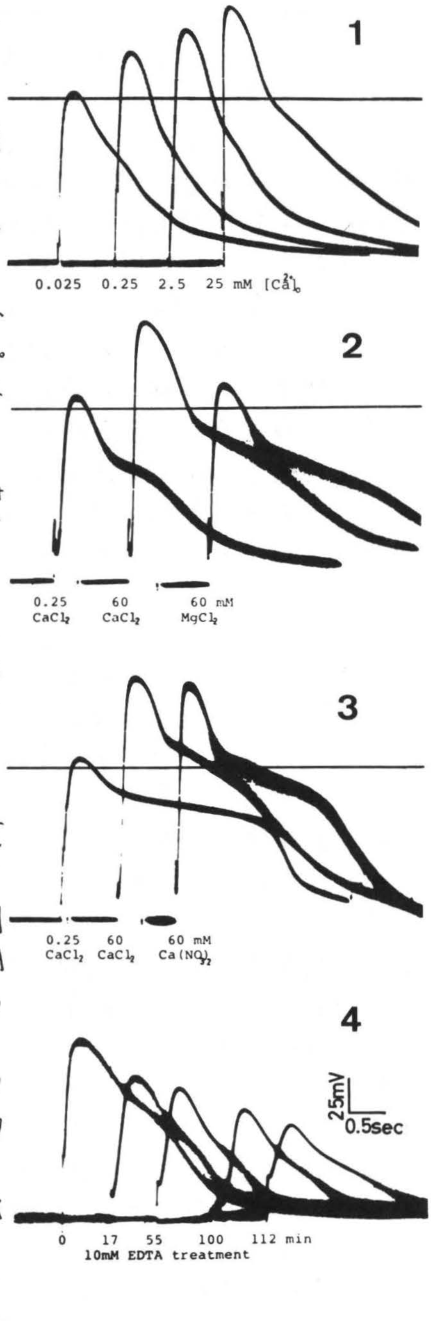
飯島敏夫，柴岡孝雄　（東北大・理・生物）

ムジナモは高等植物の中では，水生植物の利点と構造が簡単なことから電気生理学的研究が比較的容易で，シャジクモ類の細胞に近い実験的な有利さをもつ。捕虫葉を構成するほとんど全ての細胞が興奮性であり，運動帯の細胞では興奮（活動電位）が二次的な機械的応答を導き，捕虫葉の急激な閉合運動を生起すると考えられる。これらのことから，この材料は植物の速い運動の機作の研究に好適であり，その興奮の機構を詳しく理解することが重要である。

前報（1979，植生理年会）で，ムジナモ興奮性細胞の (1) 静止電位のうち約 100 mV は $P_{Na}/P_K = 0.12$ とした Goldman の式で，残り約 40 mV は起電性イオンポンプで説明でき，(2) 活動電位のピーク値は Ca^{2+} 依存らしいことを示した。今回は (2) について，その後の研究を報告する。

外液の Ca^{2+} 濃度（人工池水のそれは 0.125 mM）を10倍ずつ高めると，静止電位の変化はわずかで，活動電位の振幅は段階的に増加する（図1）。Mg^{2+} では同様の効果は得られず（図2），Cl^- を NO_3^- に換えても振幅にはほとんど変化が無い（図3）。又，シャジクモのように活動電位が Cl^- で起るならば，細胞内の Cl^- 濃度は 58 mM（前報）であるから，外液を 60 mM Cl^- にした場合，図2，3のような大きな電位逆転は期待できぬ筈である。また，人工池水に 10 mM の EDTA を加えて，Ca^{2+} 濃度を大きく降下させると次第に活動電位は小さくなり，遂には発生不能となる（図4）。同様のことは 2.5 mM の $LaCl_3$ あるいは $MnCl_2$ を加えた時にも起る。La^{3+}，Mn^{2+} は Ca^{2+} のフラックスを拮抗的に阻害すると考えられている。

これらの結果は，ムジナモ興奮性細胞の活動電位が Ca スパイクである可能性を示すものである。さらに，活動電位に伴なう ^{45}Ca の取り込み実験，Ca イオノフォア A23187 による細胞内 Ca^{2+} 濃度の推定実験からも，これを支持する結果が得られた。



2D-5

オジギソウの葉枕運動におよぼす植物ホルモンと代謝阻害剤の効果

○渡辺 仁，服部眞次 （神大・理・生物）

葉柄を切断したオジギソウの主葉枕に，その切口から水を与えると4日で運動しなくなるのに対しIAAを与えると長期間運動能力を維持すること，また羽片を遮光しても葉柄を切断したのと同様な効果のあることを報告した（日本植物学会第41回大会）。すなわち，運動能力の維持には羽片が光を受けるか，あるいは主葉枕に何らかの形でIAAが供給されればよいわけである。鮫島と柴岡は主葉枕で運動によって細胞間隙へ放出されたCl^-が光が当ると急速に減少することを明らかにし，光合成によって供給されるエネルギーで，放出されたイオンを再吸収することが運動の回復につながっていると報告している。そして小葉の開閉運動におよぼす呼吸阻害剤と脱共役剤の効果をしらべた陣野と藤野は小葉枕の膨圧変化はエネルギーを消費する能動的な過程であることを示唆した。一方Satterらはネムノキの小葉の運動におよぼすIAAの効果をしらべ，IAAはK^+とその counter ions が細胞内外を移動するのを促進するものと推定した。このようにして，植物の運動と回復は光合成から供給されるエネルギーを消費して細胞がイオン輸送をした結果生ずる膨圧変化であるという考え方が有力になって来た。

今回我々はオジギソウの主葉枕の刺激による運動と回復がAuxinおよび各種阻害剤の処理でうける影響をしらべ，その効果から運動機構を考察した。

実験方法は主葉枕の上3cmで葉柄を切断し，ポリエチレンチューブを通じ各種の試薬10^{-3}Mを1日1回，10μlづつ与えた。運動は差動トランスに伝え，記録計で自記記録した。刺激はすべて冷水を静かに主葉枕にのせる方法を用いて行った。

1）阻害剤の効果， DCMUを与えると運動，回復ともに3日でゼロとなった。これは運動能力の維持には光合成によるエネルギーの供給が必要であることを示すものである。DNPは2日でゼロとなった。PCMBやNEMでは3日でゼロとなった。Ouabainはオジギソウに非常に有効で2日でゼロとなった。これらからATPの供給とATP-ase，特にOuabain感受性のATP-aseの活性が運動，回復に密接に関与していることが考えられる。

2）IAAの効果； IAA処理の植物は測定した8日間，無傷の植物と同様に運動し回復した。無傷の植物は羽片から光合成によるエネルギーと同様にIAAが供給されている可能性が考えられる。

3）阻害剤とIAAの組合せ処理による効果， DNP＋IAA処理では3日でゼロになる。PCMB＋IAA，NEM＋IAAあるいはOuabain＋IAAによる処理では5～6日間運動する。これらはいずれも単独よりもIAAが同時に存在することにより阻害効果が緩和されている。Ouabainによる阻害効果のIAAによる緩和がいちじるしい。これらの事実はIAAがイオン輸送に関与するATP-aseに促進効果をもつことを示唆するものかも知れない。いずれにしてもOuabain感受性ATP-aseがオジギソウ主葉枕の運動および回復に関与していることが考えられる。これらのことから運動および回復の機構の検討をこころみる。

2D-6　　オジギソウの運動に伴うイオン移動について

°須田省三，岡本きく子　（神戸大・理・生物）

オジギソウの運動に伴うK⁺の移動はToriyama (1955, 1962), Allen (1969) によりそれぞれ報告されているが，今回昼夜運動及び傾震運動に伴う主葉枕内K⁺の移動とそのcounter ionとしてのCl⁻及びリンゴ酸の量的変化を検討した。

昼夜運動は葉柄の上下運動を差動トランスにより測定したが，イオンなど分析のための材料調製には夜間の就眠運動時でも接触，切り取り等の刺激により運動を起すので，鉢植えの植物を温室内においた冷凍ショウ・ケース（内部温度は温室内と同温度）の中で暫く馴化させ，葉枕採取時の10分前に庫内温度を0°近くに徐々に低下させ，いわゆる冷酔して傾震運動による影響を除き，主葉枕を切り取り，直ちに液体窒素中で凍結させて後，かみそりの刃で上半部と下半部に切り分けた。K⁺の測定は生量，乾量（106°C, 20時間乾燥）の測定の後，再蒸留水を加えて80°C，1時間加熱し，磨砕して，これを10分間，10,000×gで遠心した上清中のK⁺を炎光分析によって測定した。Cl⁻はこの上清中のCl⁻をAg-AgCl電極を用いて測定した。リンゴ酸の定量はGoldberg and Passonneauの方法（1974）に準拠したが，葉枕にはタンニン含有量が多く，測定を阻害するのでPolyclar ATを充分加えて磨砕したhomogenateの上清について定量した。蛋白の定量はLowry et al. (1951) の方法に依った。

葉柄の動きはFig.1に示す如く夕刻から下垂し始め，20時頃最低下し，のち徐々に上昇する。6時，12時，18時，及び24時における各イオンの分布はFig.2に示すように葉柄の上昇時にはK⁺は下半部に多く，下垂時には上半部に多い。Cl⁻はK⁺と同様の動きを示すが，K⁺の電荷に対するcounter ionとしては少ない。リンゴ酸はその不足を補うcounter ionとしての役割を示すかもしれないが，孔辺細胞で知られている変化ほど明らかではなかった。次に傾震性運動時のイオン移動を調べるため，正午頃の開葉している葉を軽くたゝき，下垂した主葉枕を液体窒素処理後，上・下半部のイオン分析を同様に行った。K⁺は上半部に多く，Cl⁻，及びリンゴ酸はこれとほゞ同傾向を示し，昼夜運動における葉柄下垂時と同じ動向を示した。以上の結果はCl⁻の他にリンゴ酸イオンが移動K⁺のcounter ionとしての役割を持つ可能性を示唆する。

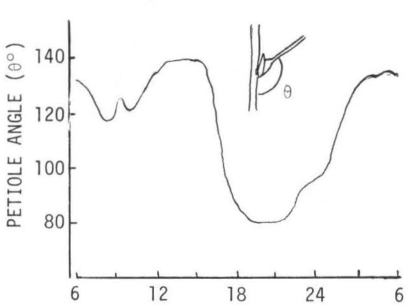


Fig.1

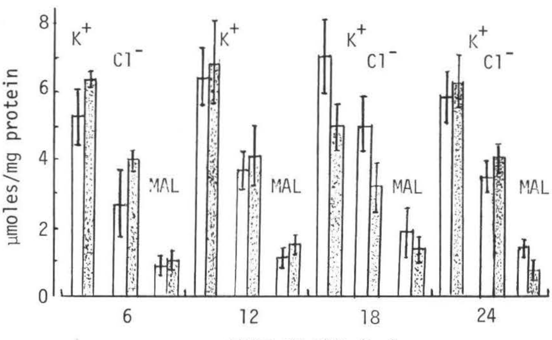


Fig.2
Open column:top, Dotted column:bottom

2D-7　　加齢ジャガイモ塊茎細胞の起電活性

加藤　潔　（名大・理・生物）

ジャガイモ（リシリ種）の塊茎を切片にし、0.1 mM $CaSO_4$ 溶液で十分洗浄して後、20℃加湿条件下で空気に晒して18〜19時間加齢する。この加齢切片をガス交換のできるアクリル樹脂製の容器内に固定し、その表面に斜め上からガラスピペットを通して希薄塩溶液を滴下させ、滴下した溶液は切片に接した濾紙を介してただちに吸引除去するという方法で灌流をして、切片を常に好気条件下に置いた。切片上断面に微小電極を刺入し、切片に接した 3 mM KCl 3% agar との間で最上部細胞の膜電位を誘導した。

ジャガイモ細胞の膜電位（PD）は外部液 1 mM K^+, pH 7.2 の条件下では約 −130 mV であるが、純窒素ガスを通じて無酸素状態にすると急速な脱分極が起り PD は約 40 mV 減少する。ジャガイモ塊茎の切断面の細胞は加齢により高度に好気的な代謝を営むことが知られているので、この PD の減少は代謝に強く依存した起電性のイオンポンプの活動停止に起因するものと考えられる。無酸素下で減少した PD は再通気によりもとの水準にまで回復するが、この回復過程は通気後に起る比較的回復速度の大きな過程とそれに続くゆっくりした回復過程の2つに区別できる。

PD の灌流液中の K^+ 濃度（$[K^+]_o$）に対する依存度をみると、$[K^+]_o$ = 0.1〜10 mM の場合、安定状態にある PD に差はみられないし、$[K^+]_o$ の変化に対する PD 変化は過渡的であり、その経過時間は30分以上にわたる。$[K^+]_o$ = 10〜100 mM の場合、PD は $[K^+]_o$ の増大に伴って減少するが、その変化率は $\Delta PD/\Delta pK^+ \simeq 23$ mV/pK^+ と小さい。しかし無酸素条件下に置くと PD の $[K^+]_o$ に対する感受性は増大して、$[K^+]_o$ = 3〜100 mM の範囲内で $\Delta PD/\Delta pK^+ \simeq 46$ mV / pK^+ となり、膜は K^+ 電極的な反応をする。これらのことは PD の起電性成分が $[K^+]_o$ の増大に反応して増大することを意味する。

以上の事実は無酸素条件下での PD はもっぱらイオンの受動的拡散により決るが、エネルギー供給の十分な好気条件下では、起電性イオンポンプを介した PD の恒常的調節機構が作動していることを示唆する。一般に $[K^+]_o$ の増大に伴って、膜のコンダクタンスは増大することが報告されているので、$[K^+]_o$ の増大に伴う PD の起電性成分の増大は K^+ によるポンプの活性化に起因するポンプ電流の増大を意味するものと思われる。好気条件下で得られた外部イオン濃度に対する PD の関係から各イオンの膜透過性の相対的関係を推定するのは大きな誤差を伴う恐れがある。

この他に PD の外部水素イオン濃度に対する依存性についても述べる。

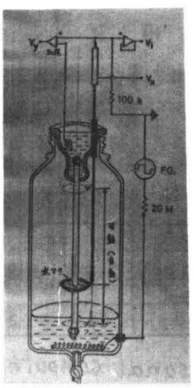
2D-8　　車軸藻節間細胞における膜電位／抵抗の分布と時間的変化

緒方惟昭（関西医療検査大）

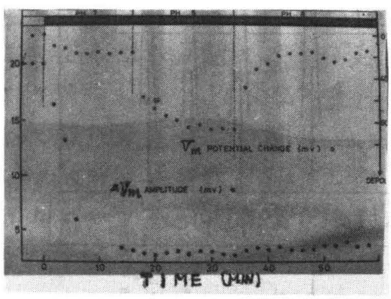
走査型「水膜」電極（図Ｉ＆参１，２，３）を用いて　車軸藻節間細胞の　a) 膜電位と膜抵抗の時間的空間的分布と　b) 光，PH及び薬剤のそれらに対する影響を調べた。　その結果　Ｉ）暗条件では　電位・抵抗とも材料の長軸に沿って比較的均一に分布し　時間的変化も小さかった。　特に抵抗の位値による差異は小さかった．（電位差 $\Delta V_m \fallingdotseq 7mV$　抵抗差 $\Delta R_m \fallingdotseq 0.5 K\Omega cm^2$ ）。　Ⅱ）暗条件→明条件（2000 lux Red）では以下の如き一連の変化が観察された。　① 細胞膜全体が比較的均一に過分極状態になる（-30mV　半値時間 Ca. 0.5 ksec ），この時抵抗も減少する（～20％）。② 光"ON"後　3～5 ksec：部分的な　過分極化（～40mV）と脱分極化（～20mV）がおこり　電位及び抵抗の不均一分布の状態が細胞長軸に沿ってできはじめる（半値時間は 0.1 ksec 前後）。脱分極化がおこる部分は正確に Spear et al. の言うアルカリバンド　と一致する：参４。③ 電位の極大及び極小の空間的位値は実験中（20時間以上）ほとんど移動しない（SD. 1mm）。しかし過分極化・脱分極化の程度（電位の極大極小差 $\Delta V_m = \sim 60mV$ ）には非常にしばしば，数ksecの周期で変化する成分が含まれていて原形質流動の周回周期（計算値）に近い値を示す（参５，６）。　Ⅲ）明条件における外液PH変化に対する応答は図Ⅱによって示した。　；高PHでは $\Delta V_m \uparrow$（pH 8前後が最大），$\Delta R_m \downarrow$。Ⅳ）明条件下薬剤 Triphenyltin-Cl（TPC）（参７）が外液中に存在すると（10μM），ΔV_m，ΔR_m ともに暗条件下と同じ状態になる（$\Delta V_m \downarrow$，$\Delta R_m \uparrow$，$V_m \downarrow$　$R_m \uparrow$）図Ⅲ。

以上の結果から「明条件における電位抵抗の細胞長軸に沿った不均一分布は起電性イオンポンプ（参８）が　本材料では　巨視的に見ても不均一に分布している」と　結論出来る。

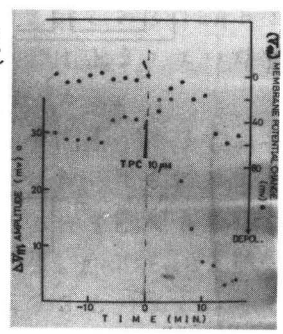
図Ｉ



図Ⅱ



図Ⅲ

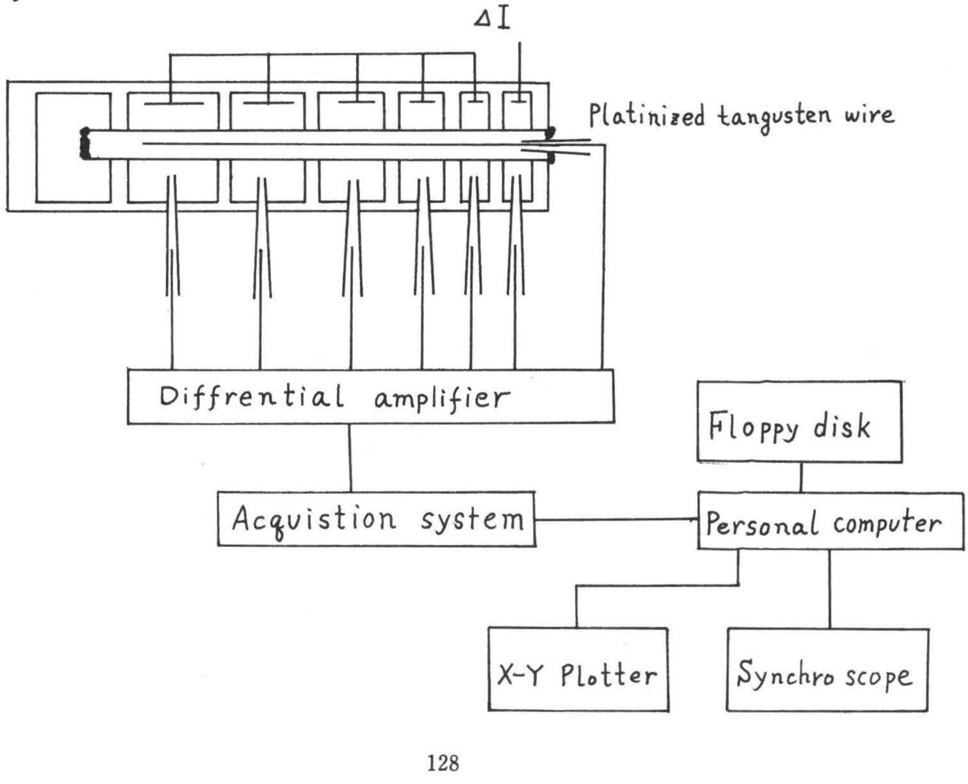


参考　1. 緒方惟昭：第三回基礎生物学研究所コンファレンス要旨 p40～（1979）．　2 ── ：日本植物学会研究発表記録 p218（1979）．　3 ── ：日本生物物理学会予稿集 p91（1979）．　4. Spear, D.G. et al. J.G.P. vol 154（1969）　5. OGATA, K et al: PCP vol 17（1976）etc.　6. Hansen, U.P. J.Memb.Biol. vol 41（1978）　7. 竹内裕子 et al. 日本生物物理学会予稿集（1979）　8. KITASATO, H. JGP Vol 52（1968）。

2D-9　　車軸藻の局所興奮について

吉田秀世，浅井一視，岩崎尚彦　（大阪医大　教養
生物学教室）

Nitella や Chara の節間細胞の細胞膜の興奮時に、各部位がどのように変化するかを調べることを目的とした。Chara の場合、興奮するのに必要な最小面積は、長さで1mm（細胞の直径の2～3倍）であることが報告されている（岸本：オ14回生物物理学会予稿集）。我々はこれをもう少しくわしく調べるために、一本の節間細胞を色々な面積で区切り（4～8つのプール）、これに刺激電流を加えて、面積により活動電位がどのようにかわるか、又活動電位が伝播中の場合にはどうまるかを調べた。そのためには、多チャンネルの電位、電流を同時に記録する必要があり、図Iのような測定システムを製作した。アクイジョンシステムというのは、マルチプレクサ、ディファレシャルアンプ、サンプルホールド、ADコンバータ（12ビット）、トライステートバッファICを一つに組み合わせたものでここから出力された、デジタルのデータが記憶素子（Total 56 Kバイト）に、一時取り込まれ、更に、フロッピーディスク（記憶容量500kバイト）に保存される。一組の電極からとなりの電極の電位を測定する迄の時間は、パーソナルコンピュータのプログラムにより制御されるが、最高60 μ sec 程かかる。フロッピディスクに保存されたデータは、プログラムにより、容易にX－Yプロッタやシンクロスコープに出力することができ、データの解析を容易にしている。現在、この装置を用いて、測定中である。



2D-10 車軸藻類における膜電位依存性の光電位反応

新免輝男・田沢仁　東大・理・植物

光合成植物を光照射すると膜電位が過分極方向に変化する(光電位反応:LPC)。これは起電性イオンポンプが光により活性化されることによっておきる比較的ゆっくりとした反応である(sLPC)。車軸藻類の節間細胞をEGTA液で液胞潅流すると液胞膜が消失するので原形質の組成を任意に変えることができる。液胞膜除去細胞はMg·ATPを含む場合には-200mV程度の静止電位と興奮性を維持し,sLPCを発生する。ATPまたはMg^{2+}を除くと起電性ポンプが止まり静止電位は約-100mVまで脱分極する。このような細胞では当然sLPCは起きないが,アルカリ性の中性赤で染色すると膜電位が数秒で過分極方向に変化する速い光電位反応が起きる(rLPC)。さてrLPCがおきるためにはMg·ATPがなくなって起電性ポンプが止まることが必要なのか,それともポンプ活性には直接関係なく膜電位が脱分極することが必要なのかが問題となる。これに解答を与えるのが本研究の目的である。

*Chara australis*の節間細胞を用いた。Mg·ATPを含んだ液胞膜除去細胞(Mg·ATP細胞)を調製するために節間細胞を1mM Mg·ATPを含むEGTA液で潅流した。細胞内ATP濃度を下げるために潅流液として1mg/ml hexokinaseと5mM glucoseを含むEGTA液を用いた(HK細胞)。外液には10μMの中性赤と1mM Tricine-Tris (pH 8.0)を含む人工池水(0.1mM KCl, NaCl, $CaCl_2$)を用い,膜電位は微小電極法で測定した。

Mg·ATP細胞でも液胞膜消失後一時的に起電性ポンプが止まり脱分極することがある。このような細胞でもrLPCが見られるのでMg·ATPの存在はrLPCの発生と直接関係がないことがわかる。では果して起電性ポンプの停止と脱分極のどちらがrLPC発生に関係しているのであろうか。HK細胞の膜電位を通電によって過分極するとrLPCは小さくなり,逆に脱分極すると大きくなる。Mg·ATP細胞において静止電位は-200mV程度あるが興奮性がなくなる場合がある。このようなMg·ATP細胞を用いて膜電位を通電によって脱分極するとrLPCが起き,K^+チャンネルの阻害剤であるTEAにより抑制される。また脱分極下でもsLPCが起きるので起電性ポンプは止まっていないと思われる。以上の事実より脱分極がrLPC発生の条件であるといえる。

通電時には膜電位(V_m)と膜起電力(E_m)の間に$V_m = E_m + I_m R_m$の関係がある(I_m:膜電流,R_m:膜抵抗)。Mg·ATP細胞で通電脱分極下に起きるrLPCにおいてもV_mは常に負の方向に変化する。上式を用いてE_mの変化を求めた。暗中におけるE_mがある値より正の場合は負の方向に変化し,負の場合は正の方向に変化する。即ちE_mは光照射時にある一定の値に近付くように変化する。その値はE_Kに一致するものとしないものがあった。

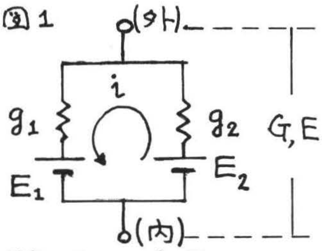
結論:rLPCは膜を介しての電位差が小さいと発生し,膜起電力は一定の値に近付くように反応する。

2D-11

起電性イオンポンプの定量的表現
電気生理の立場から

阪大・教養・基礎工* ○岸本卯一郎・上池伸徳*・竹内裕子

図1



受動性　　起電性
イオン過程

$$g_1 + g_2 = G$$
$$g_1E_1 + g_2E_2 = G \cdot E$$

G：イオンコンダクタンスの実測値
E：膜起電力(emf)の実測値

理想的な阻害剤処理後

$$g_1 = G'$$
$$E_1 = E'$$
$$\therefore \quad g_2 = G - g_1$$
$$E_2 = (GE - g_1E_1)/(G - g_1)$$

ポンプ電流

$$i = g_1(E - E_1)$$

電流clampの条件で，小さい矩形波のテスト電流パルスを重畳し，電圧レスポンスの波形をコンピューターでシミュレートすることにより，Chara細胞膜のイオンコンダクタンス，容量，直列抵抗が極めて正確に決定できる。この細胞の膜のイオン輸送は受動的電気拡散によるものと，起電性イオンポンプによるものとの和であるから，阻害剤処理の定常値から受動的イオン過程のコンダクタンス(g_1)と起電力(E_1)が求まる。これらが決まると，実測のコンダクタンス(G)と起電力(E)の値から，起電性イオン過程のコンダクタンス(g_2)と起電力(E_2)の時々刻々の変化を計算できることになる(左図)。

阻害の過程で起電性イオン過程のコンダクタンスは単調に減少してzeroになるが，その起電力はまず一過性に過分極したのち，受動的イオン過程の起電力に漸近的に近づいてゆくことがわかった(図2)。起電性イオンポンプの存在によって受動性イオンチャンネルに流れこむポンプ電流(i)(通常は内向電流)は阻害の進行につれて減少してzeroになる。

ミトコンドリアのF1粒子の機能の阻害剤の一つであるTriphenyltin chloride (2μM)は，ほぼ理想に近い阻害剤で阻害の過程で活動電位のピークレベルは殆んど影響を受けない(図3)。興奮時のコンダクタンスの著しい増加と起電力の変化は主として受動性イオン過程の変化によるものであり，ポンプ電流は活動電位のピーク付近で大きな最大値に達し，その下降期付近から減少しはじめる。

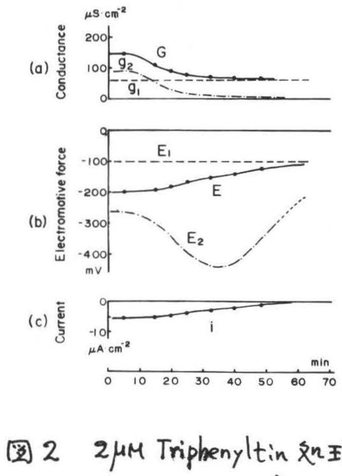


図2　2μM Triphenyltin処理(PH 7.0)に伴なう g, E, i の変化．静止時．25°C

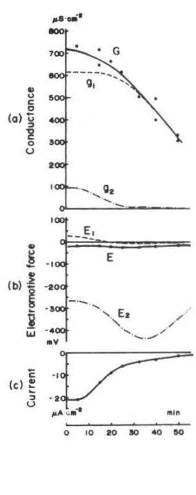


図3　2μM Triphenyltin処理(PH 7.0)に伴なう g, E, i の変化．活動電位のピーク時 25°C

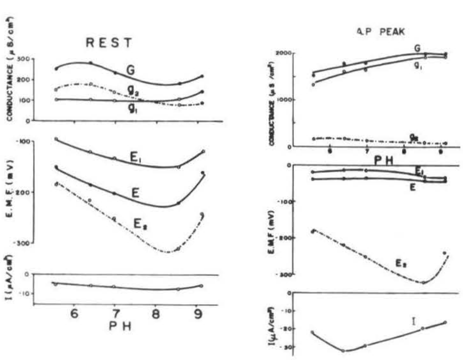
2D-12　Chara節間細胞の起電性ポンプへのPHと温度の効果

°上池伸徳*, 竹内裕子, 岸本卯一郎 (*阪大・基礎工, 阪大・教養)

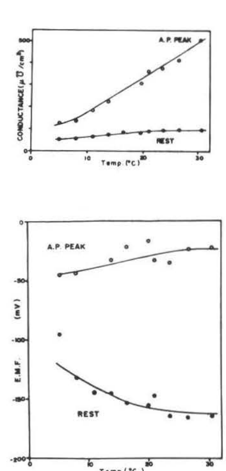
Chara節間細胞の起電性イオン過程と受動的イオン過程のそれぞれがPHと温度を変えることによりどのように変化するかを静止状態と興奮状態について比較した。膜起電力(Emf)とコンダクタンスは、テストパルス重畳法と計算機によるCurve fitting 法により求めた。

i) PH　(図1)の様にPH変化に伴うコンダクタンス(G)の測定値はRESTでもA.P-PEAKでも変化は少ない。阻害剤(TPC: Triphenyltin chloride)を用いてEmf.とGを起電性ポンプの成分(g_2, E_2)と受動的チャンネル(g_1, E_1)に分解してみた。
PHは起電性ポンプのE_2に大きな変化をあたえる。このE_2の変化は低PH側ではH^+の濃度勾配と直接関係があり、高PH側では別の因子でポンプ活性が下がると考えられる。受動的イオン過程はg_H; g_K=g_{Cl} でSimulateできる。

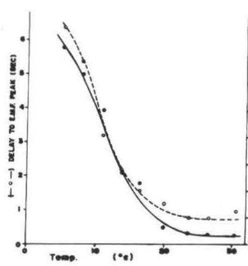
ii) 温度　温度を変えるとRESTのEmf.とA.P-PEAKのGが大きく変化した。(図2)
RESTではGとEmf.は5°C附近では漸近線的に約-100mV, 約50μS/cm²になる。この値は岸本ら(1)によって決められたチャンネル成分に近い。5°C附近では起電性ポンプがほとんどおさえられていると考えられる。A.P-PEAKでは、コンダクタンスの大きな温度変化がほとんどチャンネル(受動的)によるものである。以上のことからRESTでは起電性ポンプが大きく影響をうけA.P-PEAKでは受動的イオンチャンネルが主に影響をうける。A.Pの立上がりやDurationも温度によって大きく変化する。(図3) これは温度の変化で受動的チャンネルのactivation, inactivationの時定数がポンプ電流の変化と関係づけられることを示唆する。ポンプ電流(i)がA.P.の回復過程をはやめていると考えられる。(1) 岸本、上池、竹内 当予稿集



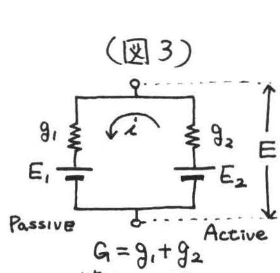
(図1)



(図2)



(図3)



等価回路

2D-13

Chara 節間細胞内ATP濃度に対する阻害剤の影響

○竹内裕子, 上池伸徳*, 岸本卯一郎 （阪大・教養・生物, *阪大・基礎工・生物工学）

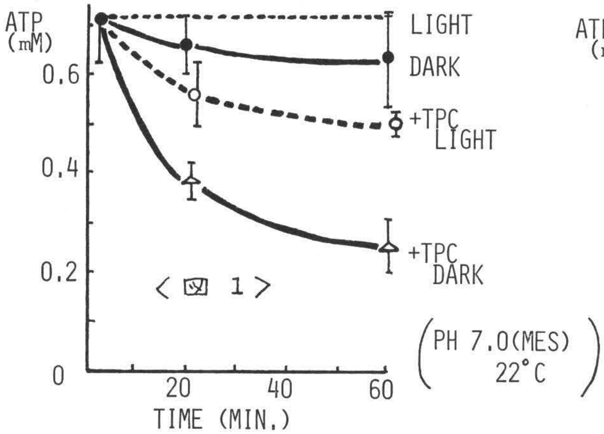
最近、種々の生物において、H^+の濃度勾配を利用した起電性イオンポンプの存在が報告されている。車軸藻においても、電気生理の実験により、起電性イオンポンプが膜電位の大きな部分を占めること、起電性イオンポンプに対するH^+の寄与の大きいことが調べられた[1)2)]。岸本らはミトコンドリアのF_1阻害剤であるTriphenyltin-chloride（TPC）が、ポンプの理想的な阻害剤であると考えられる結果を得た。

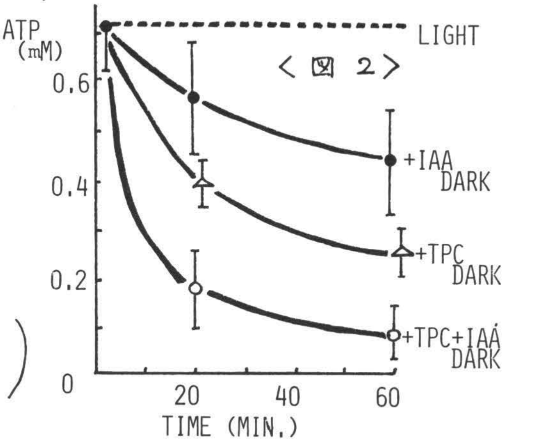
実際にF_1が阻害されることによってATP合成がおさえられるのか、あるいは完全にポンプが阻害された状態では、細胞内ATP濃度はどの程度まで減少するものかを調べる必要がある。今回我々は、電気生理的な実験と同条件にある車軸藻の節間細胞を用いて、種々の阻害剤を与えた時のATP濃度を測定した。

材料は、Cara corallinaを用い、ATP濃度は宮本らの方法[3)]で測った。

図1で示されるように、阻害剤なしで暗条件にしただけでもATP濃度は少し減少する。暗条件でTPC $_{2\mu M}$を与えるとATPは$2.5\times10^{-4}M$になりもとのレベルの35%にまで減少している。電気的な実験から、TPCは明条件では余り阻害効果がないことがわかっているので、$5\times10^{-4}M\sim2.5\times10^{-4}M$の間に起電性イオンポンプが働くために必要な最少ATP濃度が存在するものと考えられる。次にTPC暗条件でも阻害されないで残るATPについて調べるために解糖系阻害剤であるIodo acetic acid（IAA）$_{1mM}$を加えてみた（図2）。IAAを加えるとATP濃度は13%にまで減少した。この濃度では流動は非常に弱くなっている。また脱共役剤であるDinitrophenol $_{0.2mM}$はTPCを与えた時と同程度の阻害効果を示した。

これらの結果は、TPCで起電性イオンポンプが阻害されるという電気生理的な実験を強く支持するものである。また細胞内ATP濃度に対しては、ミトコンドリア，クロロプラスト，解糖系のそれぞれの寄与があることを示している。





1) 岸本他，上池他 当予稿集　2) 田沢・新免 生体の科学 28巻3号（1977）
3) H.Miyamoto,T.Ikehara,T.Sakai,and H.Yamaguchi Acta medica Kinki Univ.1,75-85(1976)

第３日　４月８日㈫

Ａ会場

光合成 Ⅳ、Ⅴ

3A-1　　オオハネモ葉緑体におけるHill反応

岡田光正　（東邦大・理・生物）

オオハネモから抽出される葉緑体は外膜を持つclass Aの葉緑体であり、光合成の全反応を行うと考えられているが、高等植物の葉緑体と異る点も多い。本研究ではこの葉緑体の酸素発生とHill反応に対する試薬や処理の効果について調べた。

1) 浸透圧の影響

藻類の細胞液の浸透圧は陸上植物に較べ高張であることが知られており、オオハネモの酸素発生は0.6～0.9Mソルビトール濃度の時活性の最大値を示す。この低張域での活性低下はDCIP還元、p-BQ Hill反応にも見られたが、高張域での活性低下はp-BQ Hill反応には見られなかった。これ等の低張、高張処理による活性低下は不可逆的であり、反応液中のソルビトール濃度を0.9Mに戻しても活性の回復はなかった。　この葉緑体でのDCIP還元活性の絶対値は低く、酸素発生の数分の1以下であった。この活性の低さはこの葉緑体が外膜を持つ為ではなくシラコイド膜自体の性質によるものと考えられる。

2) Tris処理

Tris処理によってp-BQ Hill反応は80%減少し、常温での蛍光は30～50%減少しDPCで完全に回復した。処理時間は5分で充分だが、Tris濃度は1.5Mが必要であった。

3) DBMIBの効果

酸素発生及びDCIP還元は1μM DBMIBで完全に阻害されたが、照射を続けるとDCIPの二次的還元が起り、この還元は光照射停止後も20秒以上続いた。これはDBMIBを介しての光化学系IIによる還元と考えられる。p-BQ Hill反応は藻体の状態により、阻害されない場合とされる場合があった。

4) uncouplerの効果

1μM以下のCCCP及び10μMのグラミシジンJにより酸素発生は完全に阻害された。これはATP生産が止まる事によるカルビンサイクルの停止に由来すると考えられる。DCIP光還元活性はグラミシジンJにより15%上昇した。

5) KCNの効果

酸素発生は0.1mMのKCNで殆んど完全に阻害され、DCIP還元は1mMで完全に阻害された。一方p-BQ Hill反応は1mM KCNでも20%の阻害に止まった。この低濃度での阻害は、ホウレンソウの無傷葉緑体の場合と同様にカルビンサイクルを阻害する為と考えられる。1mMでの阻害は電子伝達反応（おそらく光合成系IとIIの間）の阻害によるものと考えられる。

これ等の結果はオオハネモ葉緑体が高等植物の場合と共通な点もあるが、異っている点もかなりある事を示しており、特にHill反応試薬とシラコイド膜との反応性が藻体の状態によって変る可能性を示唆している。

3A-2　　オオハネモ葉緑体における蛍光の初期誘導期現象

佐藤和彦，加藤栄　（東大・教養・基礎科）

我々はオオハネモ葉緑体を用いて、クロロフィルaの蛍光の誘導期現象の全過程が、cell-free系でも再現することを見出し、これを用いて光照射後約10秒にわたる蛍光強度変化（DPS$_1$M$_1$）について研究し、報告してきた。今回は、光照射後1秒以内に起きる、いわゆるIDP変化について報告する。

オオハネモ葉緑体を嫌気条件下に置き、前照射後、蛍光の誘導期現象を観察すると、顕著なID-dipが観察される（図1）。ID-dipに関しては、従来なめらかに減少し、ついで増加する単一の変化として報告されてきたが、オオハネモ葉緑体で詳しく調べてみると、図1に示すように複雑な時間経過を示すことが見出された。これは従来のID-dipの他に別の蛍光増加成分が重なっていることによるものである。ID-dip自身は光化学系I及びIIの間を阻害するDCMU（3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea）やDBMIB（2,5-dibromo-3-methyl-6-isopropyl-p-benzoquinone）により電子伝達の阻害と平行して阻害されるが、光化学系Iの還元側の電子伝達阻害剤であるPMA（phenylmercuric acetate）は、ID-dipの大きさを小さくしたにとどまった。従ってID-dipはプラストキノンや光化学系IIの最初の電子受容体であるQがほぼ還元された条件下で光照射すると、Qが光化学系Iによって酸化されることによると考えられる。

一方ID-dipに重なって起きる新しい蛍光変化は、リン酸化反応の脱共役剤であるCCCP（carbonylcyanide m-chlorophenylhydrazone）を添加すると消失し、ID-dipはなめらかな谷となる。同様の効果は膜電位形成を阻害するバリノマイシンを添加した場合にも見られた。しかし、脱共役剤ではあるが、膜電位を解消しないNH_4Clやナイジェライシンはほとんど影響がなかった。従って新しく見出された早い蛍光収率の変動は、チラコイド膜を介して成立する膜電位に依存していると考えられる。事実オオハネモ葉緑体では同じ時間帯に大きな膜電位が成立していることが560nmのカロチノイド変化で示されている。膜電位形成によるクロロフィルaの蛍光収率変化には以下の3つの場合が考えられる。(1).膜電位が、直接的にクロロフィルaの蛍光収率を増大させる場合、(2).光化学系I又はIIにおける光化学反応に影響を与える場合、(3).電子伝達反応の速度に影響を与える場合、である。

ここではチトクロームfや膜電位変化をクロロフィルaの蛍光収率変化と同一条件下で測定し、膜電位形成反応の蛍光収率への影響について考察する。

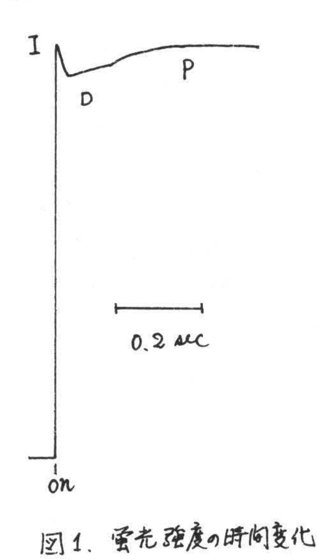


図1．蛍光強度の時間変化

3A-3　　無傷葉緑体のカチオン含量

山岸明彦，佐藤和彦，加藤栄　（東大・教養・基礎科）

葉緑体内で起る光合成の様々な反応は、イオン濃度による影響を大きく受けることがよく知られている。無傷葉緑体のイオンの含量に関していくつかの報告があるが、得られたカリウムの値の間には、0.5～6 μmoles/mg chl. というかなり大きな差がある。しかも光合成反応への影響を考える上で重要なのは、葉緑体中のカチオンの含量よりも活量である。

我々は先に、イオノフォアを用いて葉緑体内外のカリウムイオンと水素イオンを交換させた時に起きる外液のpH変化を測定することから葉緑体内のカリウムイオンの活量を推定する方法を報告した。そして、海産の緑藻オオハネモの葉緑体内には、活量にして 180 mM、濃度にすると 260mM 以上もの高濃度のカリウムイオンが存在していることを報告した。この値は、これまで高等植物において報告された値に比べてはるかに高い値である。今回は、さらに実験方法の精度を高めるとともに、他の方法により、オオハネモ葉緑体が高いイオン含量を持つことを支持する結果を得た。

オオハネモより調整した無傷葉緑体を Tris で pH7.5 に合わせた Sorbitol 1.0M 溶液で２回洗い、葉緑体以外のオルガネラをほとんど含まず、また大半が無傷葉緑体である標品を得た。

この葉緑体標品は、1.0～1.2 M 相当の高い浸透圧を持つソルビトールまたは KCl を含む溶液中で、炭酸固定の最大活性を示した。これは、オオハネモの葉緑体内部が高い浸透価を持っているためと考えられる。海水には合計約 1.1 M ものイオンが存在しているので、それに適応した結果であるとも考えられる。

さらに、この標品について原子吸光光度計を用い、標準添加法によってカリウムの含量を測定し、約 7 μmoles/mg chl. という値を得た。これは、これまで高等植物に対して報告されている値に比べてやはり高い値である。なおナトリウムは、約 1 μmole/mg chl であった。

また、先の活量測定に際しては、Triton X-100 により葉緑体構造を破壊したときのpH変化を測定することから葉緑体内のpHを推定した。この方法の精度を高めるために種々の検討を行い、pHを測定する際の溶液の塩濃度が大きな影響を持つことを見出した。これは、葉緑体内の膜またはたんぱく質の緩衝作用が塩濃度に依存することによると考えられる。この点を検討し、得られた結果を報告する。