1Ap13

硝酸及びグルタミン培地におけるホウレンソウ 培養細胞の同化型硝酸還元酵素について 〇白石斉聖 竹葉剛¹⁾ 佐藤隆英 小倉長雄 中川弘毅 (千葉大:園芸:農化 ¹⁾京府大:生科:応生)

目的)高等植物における同化型硝酸還元酵素(NR、EC: 1.6.6.1.)は、硝酸同化の第一段階で働く酵素であり、硝酸塩によって誘導される基質誘導酵素と考えられている。今回、ホウレンソウ培養細胞を用いて、その培地における窒素源の違いによるNR活性、及びNRタンパク質等の変化について解析を行った。

方法)ホウレンソウ液体培養細胞をMurashige-Skoog培地(MS培地)を基本培地とした硝酸培地(KNO_3 、 NH_4NO_3)とグルタミン培地(1.5g/1グルタミン)の2つの条件下で培養した。各条件下で8日毎に継代し、半年間培養した細胞から粗酵素液を調製し、NADH依存NR活性及び還元型MV依存亜硝酸還元酵素(NiR)活性を調べた。また抗ホウレンソウNR抗体を用いTNRタンパク質量について調べた。

結果)NR活性は、硝酸培地では、維代後2日目に活性のピークを示しその後減少する活性変動を示したが、グルタミン培地では培養期間を通じて硝酸培地の最大活性時の80%程度の活性を維持し続け、硝酸培地とは異なる活性変動を示した。一方NiR活性は硝酸培地と比較してグルタミン培地では20~30%程度の活性しか得られなかった。また、抗NRポリクローナル抗体を用いたイムノブロットの結果、硝酸培地及びグルタミン培地共にNRタンパク質量は、NR活性の変動にほぼ平行して変動することが観察された。また当研究室で得られた2種類の抗NRモノクローナル抗体を用いてその反応性を比較したが、硝酸培地およびグルタミン培地で培養した細胞中のNRタンパク質間に差は認められなかった。

1Ap14

クロレラ細胞の熱応答における細胞の重水素化の影響

海野けい子、山田直美、安藤一郎、岡田昌二 (静岡県大・薬・放射薬品)

[目的〕演者らは水素の安定同位体である重水素(D)の生物学的同位体効果について、クロレラ細胞(Chlorella ellipsoidea C-27)を用い検討を行っている。Dによる同位体効果の一つとして演者らは、D2Oを含む培地中で培養することにより得られた、高度にD化されたクロレラ細胞(D-クロレラ)が、通常のH2O培地のクロレラ(H-クロレラ)に比べ熱ショックに対する応答能が変化し、D化により細胞が熱に弱くなっていることを見いだし報告してきた(1988、1989年度年会)。この熱ショック応答の変化の機構を解明するため、今回、Dによる細胞の熱耐性誘導機構の変化と、D化による細胞膜の変化について検討を加えた。

〔方法〕D − クロレラは、60% D $_2$ O を含む培地中25% で独立栄養的に培養を行って得た。細胞は30.0-45.0% の各温度で処理を行った。また細胞膜については、細胞を界面活性剤のSDSで穏やかに処理し熱応答の変化を比較するとともに、SDSで可溶化された成分についてTLCやゲル電気泳動で調べた。

[結果] ① 熱耐性誘導に対するDの影響 予備加熱処理により細胞に熱耐性が誘導されることが一般に知られている。D-クロレラにおいては、最も熱耐性となる温度条件がH-クロレラより 3-4 \mathbb{C} 低かった。そのような変化の一因として、熱ショック蛋白質 (HSP)の量的質的変化が示され、熱耐性誘導にとってHSPが重要であることは確かめられたが、熱耐性の強さと、その時に誘導合成されるHSPとの量的関係については、未だ結論には至っていない。

②細胞膜の変化 細胞の熱傷害のターゲットの一つとして細胞膜の重要性が挙げられている。そこで、D-クロレラをSDS共存下37 \mathbb{C} で1h 処理したところ、H-クロレラと異なり熱感受性となった。SDS処理および37 \mathbb{C} の熱処理は、A々単独ではH-およびD-クロレラの両細胞にとって、その後の細胞の増殖に影響を与えない穏やかな条件である。また SDSで可溶化された成分について検討したところ、D-クロレラでは脂質画分および蛋白質画分両者にH-クロレラとの相違が認められた。これらのことから、D-クロレラでは細胞膜成分に変化が生じていることが示唆された。

1Ap15

真正粘菌Physarum polycephalumのスライム層に存在するN型糖 タンパク質について

守田雅志、西荒介 (富山医薬大・薬・微生物)

動物細胞では、細胞表層に存在する糖タンパク質やプロテオグリカンなどが、細胞相互の認識や接着に重要な役割を担っていることが知られている。微生物においては、植物細胞と同様に、一般にその壁構造が障害となってあまり研究されていない。本実験で使用した真正粘菌Physarum polycephalumの栄養増殖体である変形体には、多くの微生物に見られる様な壁構造はなく、細胞膜はスライムと呼ばれる粘液質に覆われている。この変形体の産生する糖タンパク質には、各種グリコシダーゼ消化やレクチンとの親和性から、マンノースを多く含むハイマンノース型からガラクトース、N-アセチルガラクトサミンを含むコンプレックス型まで様々なN型糖鎖が存在し、また硫酸基をもつ糖鎖も認められた。今回は、この変形体の膜周辺に存在するスライムの構造やスライム中に存在するN型糖タンパク質について検討を行った。

スライムは、硫酸化されたガラクトースのポリマーから成り、変形体の増殖が定常状態に達したのち多量に分秘されることが知られている。この時期の変形体からスライム層をあつめ、エタノール沈澱によりスライム画分を回収し、ゲル濾過や電気泳動で分析した。その結果、スライムは、比較的大きい分子量をもつ糖鎖が、コアタンパク質に0型結合した巨大なプロテオグリカン様の構造をしていることが推察された。一方、このスライム画分をSDS-PAGEで分析したところ、分子量約80kdと96kdの位置に2つのバンドが認められた。これらは、非還元下で約120kdの位置に一本のバンドとして現れることから、ジスルフィド結合をもつタンパク質と考えられた。また、このタンパク質は、コンカナバリンAレクチンに対して高い親和性があることや、ツニカマイシン処理によりその合成が抑えられることなどから、ハイマンノース型の糖鎖を多くもつN型糖タンパク質であると推察され、2価のカチオン存在下で、スライムと結合して存在していると考えられる。このN型糖タンパク質が存在するスライム層は、増殖期の変形体より調整した膜画分を、EDTAを含むバッファーで抽出することにより遊離することから、膜表面に弱く結合した状態で存在していることが推察された。

.1Ap16

真正粘菌Physarum polycephalumの子実体形成に伴う膜タンパク 質の変化

村田芳美、守田雅志、西 荒介、(富山医科薬科大学・薬)

真正粘菌 (physarum polycephalum)は、環境条件の変化に伴い、様々な形態変化を起こすことが知られている。又、その栄養増殖体である変形体は、壁構造を持たないことから、細胞膜を調べる実験材料に適していると考えられる。本実験では、この変形体が胞子になる子実体形成過程での膜タンパク質について検討した。

子実体は、変形体をオートミール寒天培地上で3日間十分に成長させた後、ニコチン酸等を含む子実体形成培地で2日間暗黒下で飢餓状態とし、その後12時間蛍光灯を照射することで誘導した。この子実体形成過程での各時期の細胞膜を遠心分画と水性二相分配法により精製して用いた。膜の構成成分について調べたところ、変形体の膜画分には多量のヘキソースとウロン酸の存在が認められた。しかし、これらの糖質は、成長期・飢餓期から子実体形成期に入ると激減した。

各時期の膜をSDS-PAGE後ウエスタンブロットし、各種レクチン(RCA, WGA, Con A)を用いて糖染色を行った。粘菌変形体には、多くの糖タンパク質の存在が確認されたが、特に、ガラクトースに高い親和性のあるRCA レクチンで染色したところ、子実体形成時に特異的に現れる66kdの膜糖タンパク質が認められた。

上述の条件では、子実体形成率は、95%と非常に高い値を示したが、蛍光灯照射の 2 時間前にツニカマイシン・モネンジン・デオキシマンノジリマイシン等で処理すると、それぞれ形成率は、6%、20%、0%とかなり低下し、明かな阻害が認められた。このことは、子実体形成には、光照射中に新たに合成される糖タンパク質が必要であると考えられる。又、この薬物処理で子実体形成を阻害すると、66kdのバンドはRCA で染色されないことが確認された。

以上のことより、粘菌の子実体形成には、de novo の糖タンパク質合成が必要で、特に、その時期に現れる66kdの分子量の膜タンパク質は、形態形成の過程で、何らかの役割を担っている可能性が考えられた。なお、現在この66kdの糖タンパク質の単離を試みているが、このタンパク質は、膜に強く結合し、GlycopeptidaseF抵抗性であることが確認されている。

報告する。

イネの原形質膜H*-ATPaseの活性化に及ぼすホスファチジルコリンの分子種の影響 笠毛 邦弘 (農水省 農業生物資源研究所)

原形質膜に存在するH*-ATPaseは、典型的な膜内在性タンパク質であり、その活性化は、膜の構成成分であるホスファチジルコリン(PC)やホスファチジルセリン(PS)などのりん脂質に強く依存することが演者らによって明らかにされた。また、低温処理によりイネの原形質膜H*-ATPase活性は著しく低下すること、またりん脂質を構成する不飽和脂肪酸の含量が低温処理により増加することなどからも、自然界において膜内のりん脂質がH*-ATPaseの活性発現に重要な役割を演じていることが示唆されている。そこで一つのモデル系として、単一のりん脂質で最もH*-ATPaseの活性化に影響を及ぼすものの一つであるPCの、どのような分子種がその活性化に関与するかをin vitroの系で明らかにしたので

原形質膜はイネ (Oryza sativa L. var. Nipponbare)の根由来の培養細胞から得られた。H*-ATPaseは、原形質膜をデオキシコール酸とZwittergentで可溶化した後、グリセロールで純化精製した。ATPaseの活性化に及ぼす影響は、りん脂質およびPCの分子種などを、直接酵素反応液に加え、ATPase活性を測定することによって調べられた。

りん脂質は頭部極性基、グリセロール、それに脂肪酸から成る。まずこれらのATPase 活性に及ぼす影響を見てみると、脂肪酸のアルキル鎖が16から18と長くなるにしたがって H^* -ATPase活性は阻害され、 $18:0 \rightarrow 18:1 \rightarrow 18:2 \rightarrow 18:3$ と不飽和度が増すにしたがっても活 性は阻害された。またグリセリドやイノシトールやセリンなどの頭部極性基による活性化 は、わずかしか見られなかった。りん脂質は、Asolectin>PS>PC>LPC>PGの順で活性化した。

次に、PCの分子種のATPaseの活性化に及ぼす影響を見てみると、sn-1,sn-2のいずれも飽和脂肪酸を持つものでは、 $14:0\rightarrow 20:0$ になるにしたがって活性が低下し、また不飽和脂肪酸を持つものにおいては、不飽和度が増すにしたがって活性は低下した。もっとも強く活性化させる分子種はsn-1 18:1,sn-2 14:0 or 16:0、またはsn-2 18:1,sn-1 14:0 or 16:0で、約4倍の活性化が見られた。このように、もっとも強くATPaseの活性化を起こさせるPCの分子種は、sn-1およびsn-2のいずれかが飽和脂肪酸、他方が不飽和脂肪酸の組み合わせで、アルキル基の長さは $14\sim18$ が最も適当であると思われる。

ヤエナリ液胞膜のH[†]-ATPase 活性への種々のアミノ酸化学修飾 試薬の影響

○ 山西弘恭 笠毛邦弘 (農水省・生物資源研)

液胞膜に存在する \mathbb{H}^+ -ATPase は、ATP の加水分解によって生じるエネルギーを用いて \mathbb{H}^+ の輸送を行い、液胞膜内外に \mathbb{H}^+ の勾配を形成して、それによりイオン、糖、アミノ酸等の輸送に関与すると考えられている。

我々はヤエナリ肧軸からデキストラン2段階濃度勾配法によって得られた液胞膜に富む 分画を、0.1%デオキシコール酸と、40mMオクチルグルコシドを用いて可溶化し、グリセロ - ル密度勾配遠心法によって液胞膜のII[±]ATPaseを部分精製した。この酵素標品は阻害剤の 影響から、ミトコンドリア、及び原形質膜ATPaseの混入のほとんどないものと推定された。 今回はこの酵素標品を用いて、液胞膜Ⅱ[±]ATPaseの活性中心に関わるアミノ酸残基を検討す るために種々のアミノ酸化学修飾試薬を用いて、その活性への影響を調べたので報告する。 化学修飾試薬の効果はSH基やOH基の環元作用のあるDTT の存在によって大きく異なるため、 精製過程からDTT を除いたBuffer系で精製を行うと、1/2 阻害濃度は、チロシン残基の化 学修飾試薬であるNBD-C1で0.5uM.. SH基の化学修飾試薬であるNEM で2uM と著しく高い感 受性を示し、カルボキシル基の化学修飾試薬であるDCCDと、リジン残基の化学修飾試薬で あるTNBSでは30µMであったが、アルギニン残基の化学修飾試薬であるPGO では1mM まで阻 害は認められなかった。精製の過程にDTT が含まれると感受性は約1/10に減少する。DTT を除いた系で精製した酵素標品を、1μMNBD-C1 , 2μMNEM,50μMTNBS で20分間処理して化 学修飾した後、2mMDTTを加えて活性の回復を見たところ、NBD-C1による化学修飾は約90 %が回復したのに対し、NEM. TNBSでは、60%前後の回復しか見られなかった。 C1, NEW, TNBS による活性阻害はアルカリ領域で大きく、pH9 ではpH6 の5~10倍の阻害 が認められた。

また液胞膜I^{*}-ATPase の基質であるATP 及び、活性部位結合性の阻害剤に拮抗作用を持つADP の共存下で、これらの化学修飾試薬を作用させたところ、NBD-C1, NEM , では約60%の活性が保持されるのに対して、TNBSでは活性の保護が認められなかった。

これらのことから液胞膜 \mathbb{H}^{\star} -ATPase の活性部位にはチロシン残基、及びシステイン残基の関与が示唆された。速度論的解析も合わせて発表する。

トウモロコシおよびホウレンソウのCF₁-ATPaseのNBD-C1による 活性阻害とその結合部位

鍵田 文子¹・篠原 健司²・笠毛 邦弘¹ (¹農水省 農業生 物資源研究所、²森林総合研究所)

 CF_1 -ATPaseは、葉緑体内膜の内外のプロトン濃度勾配の駆動力を利用して、ATPの合成や加水分解反応を触媒する酵素で、生体のエネルギー変換に深く関与し、またプロトン濃度 (pH) の調節によって細胞の恒常性を維持する上でも重要な役割を持つ。昨年の本学会で演者らが報告した通り、 α β γ 複合体が活性発現のための最小単位であること、 CF_1 α β γ -ATPase活性はNBD-C1によって阻害されるが、その阻害はDTTによって回復されること、およびそれらのカイネティックスなど、この酵素の活性中心は β サブユニットに存在する 1 分子のチロシン残基であることを示す証拠がある。その後、このチロシン残基の同定を試み、いくつかの興味深い知見を得たので報告する。

トウモロコシおよびホウレン草の葉緑体由来のCF」から得たαβγ複合体を、ポリア クリルアミドゲル電気泳動し、ゲルからβサブユニットのみを電気溶出したものを二つに 分け(①,②)、一方は¹⁴C-NBD-C1のみで(①)、もう一方はそれにDTTを加えて(②) 処理した後、両者をリシルエンドペプチダーゼ (以下LEP) で分解した。分解生成物のペ プチド断片を、高濃度の尿素を含むゲルで泳動してから、PVDF(ポリビニリデンジフロリ ド)膜にブロッティングし、オートラジオグラフィーによって14C-NBD-C1の結合している ペプチド断片を同定することを試みた。また、同時に、NBD-C1で処理しないβサブユニッ トのLEP分解によるペプチド断片を、PVDF膜にブロッティングし、それぞれの断片のN末の アミノ酸配列を気相シーケンサーで決定した。その結果、①、②および③で、ほぼ同じ分 解パターンが得られたが、14C-NBD-C1が①では強く、②では弱く結合する、15kDのペプチ ド断片があることが確かめられた。そのペプチド断片は、N末端が359番目のグリシンで、 おそらく498番目の最後のアミノ酸残基まで続き、5つのチロシンを含むと思われる。こ のうちのどれかが活性中心であろうと考えられるが、今、それを確認するため、別の種類 のプロテイン分解酵素やCNBrなどを用いた実験を進めている最中である。また、DTTの存 在下で14C-NBD-C1が強く結合する、12kDの断片も存在し、これはN末端が51番目のグリシ ンではじまるペプチドであることがわかったが、ここに含まれると思われる唯一のチロシ ン残基(162番目)とATPase活性の相互関係ははっきりしない。

ヤエナリ培養細胞の低温による液胞膜H+-ATPaseの失活と回復

吉田 静夫 (北大低温研)

植物の低温傷害の生理機構について黄化ヤエナリ実生を実験材料として研究している。 黄化ヤエナリの低温傷害は、可逆的な初期段階($0 \, \mathbb{C} \cdot 24$ 時間)を経て不可逆的な後期段 階($0 \, \mathbb{C} \cdot 72$ 時間以降)へと進むことが知られている。すでに報告したように、低温傷害 の初期段階では液胞膜 H^+ -ATPaseが他の生体膜結合酵素に先行して失活し、低温傷害に於て 重要な役割を演じていると考えられる。細胞の低温傷害の機構を解明するには、低温によ る液胞膜 H^+ -ATPaseの失活と回復過程を詳しく調べることが必要である。

液胞膜H+-ATPaseの低温失活の原因を生理理学的に詳しく研究する上で培養細胞は非常に 優れた材料と言える。ヤエナリ実生の根から誘導された液体培養細胞(農業生物資源研究 所の笠毛氏から恵与された)を用いて、低温による液胞膜H+-ATPaseの失か津と回復過程を 検討した。培養細胞は元の組織細胞と同じく高い低温感受性を示し、培養後8日目の細胞 は2℃24時間以内では全く傷害を受けないが、72時間以降婦可逆的な傷害を受ける。 粗ミクロゾ~ム画分(10.000 - 156、000g沈澱)を2℃暗黒で所定時間冷やされた細胞と冷却 後26℃明所に移された細胞からそれぞれ調製し、NO3感受性H→ATPaseの基質分解ならび にプロトン輸送の低温による失活と回復を経時的に調べた。H+-ATPaseの基質分解活性は低 温処理によって速やかに失活し、2℃10時間後には最低値(対照の20-30%)となる。プ ロトン輸送活性は基質分解活性にやや先行して低下し、低温処理開始10時間後には活性 はゼロとなる。2℃14時間前処理された培養細胞を26℃明所に移すと、基質分解活性 は約30分後に対照の値まで回復したが、プロトン輸送活性は緩やかに進行し約2時間後 に対照値まで回復した。このことは低温失活後の酵素機能の回復が二つの段階で進められ る事を示唆している。酵素の活性回復はシクロヘキシミドによって阻害されずアザイド(NaNa)によって強く阻害される。したがって、活性回復にはタンパク質合成を必要としな いがエネルギーを必要とするものと思われる。

以上の結果から、低温による液胞膜H*-ATPaseの失活は蛋白分解酵素の作用でなく酵素の高次構造の可逆的な変化によるものと推定される。黄化ヤエナリ実生の下胚軸組織の液胞膜H*-ATPaseは合計9個のサブウニットで構成され、低温処理によって一部のサブユニット(32kDa)が欠落することが明らかにされている(遠藤らが今大会で発表予定)。活性回復過程では遊離したサブユニットの再結合、あるいは高次構造の正常化がエネルギーに依存して進むものと考えられ、基質分解活性の速やかな修復とそれに続いてプロトン輸送活性の修復が緩やかに進行すると推察される。

植物の耐冷性と液胞膜H+-ATPaseの硝酸イオン感受性

吉田 静夫 (北大低温研)

低温に敏感なヤエナリ黄化実生に低温(0 $\mathbb C$)を与えると液胞膜H*-ATPase(以下To-ATPaseと略す)は比較的短時間で失活する。これとは対照的に耐寒性植物では長期に亘る低温処理後も高い活性を維持する。一方、ヤエナリ黄化実生の下胚軸から分離された液胞膜小胞は低温に安定で、 $250\,\mathrm{mM}$ sorbitol、 $25\,\mathrm{mM}$ Hepes-BTP(pH7.2)、 $1\,\mathrm{mM}$ DTTを含む緩衝液中で0 $\mathbb C$ に冷やしても長時間安定で、-80 $\mathbb C$ で長期間高い活性を維持できる。したがって、in vivoでのTo-ATPaseの低温失活にはある種の細胞内因子が関与しているものと思われる。一方、To-ATPaseの構造的特性や膜との結合様式がこれらの植物で異なっているかも知れない。動物のchromaffin granulesのいわゆる液胞型H*-ATPaseは低温感受性で、MgATPとKNO3やKCIを含む溶液中で低温を与えるとサブユニットへ解離し短時間で失活することが知られている(Moriyama & Nelson 1989)。また、彼らは植物の液胞膜酵素についても検討し同様に低温失活すると述べている。

本報告では、低温感受性のヤエナリと耐寒性のエンドウの黄化実生からそれぞれ液胞 膜小胞を高純度で分離し、To-ATPaseの低温失活に与えるKNO3、KNO2、KC1の影響を比較検 討した。液胞膜小胞は250mM sorbitol、25mM Hepes-BTP (pH7.2)、1mM DTTを含む basal bufferに懸濁し、MgATPと上記の塩をそれぞれ加えて0℃でincubate後、basal bufferで薄めてから遠心した。 得られた膜沈澱をbasal bufferに懸濁し酵素の基質分解活 性とプロトン輸送活性を測定した。ヤエナリ液胞膜小胞をMgATP存在下でそれぞれ50mMの KNO3、KNO2および200mMのKCIを加えてO℃でincubateすると、To-ATPaseのプロトン輸送活 性は短時間で完全に失活した。一方、エンドウの液胞膜小胞ではKNO3によって輸送活性は 僅かに低下したがこれ以外の塩は影響がなかった。酵素の基質分解活性に対する影響は活 性測定条件で異なり、ヤエナリではTritonを加えて測定すると失活は認められないが、 Tritonを加えないで測定するといずれの塩も約50%の活性低下が見られた。このTriton の効果は現在明らかでないが、おそらく酵素の活性部位の部分的な構造修復に関係してい るものと推定される。またこのことは、ヤエナリのTo-ATPaseのin vitro下での低温失活 の機構がchromaffin granule由来の酵素の場合とは異なっていることを示唆している。 エンドウの液胞膜酵素では界面活性剤の有無に関係なく基質分解活性は全く低下しなかっ た。このように両植物間でTo-ATPaseのin vitro下の於ける低温感受性に大きな違いのあ ることが確認された。また、KNO2はKNO3と同様に10mM以内の濃度でATP依存性とビロリン酸 依存性のプロトン輸送を共に著しく阻害するが酵素の基質分解活性は全く阻害しないこと が分かった。KNO2はこれらの酵素のプロトンチャンネル部位に特異的に作用し輸送を可逆 的にuncouplingさせるものと推定される。

食塩ストレスによるキウリ根膜画分のカルシウム、リン脂質、H+-ATPase活性の変動 Chung.G.C・松本英明 (Chonnam Natl Univ・岡山大資生研)

植物は塩類に対して耐性を示す植物(halophyte)と耐性を示さない植物(glycophyte)の他にそれらの中間の性質を示すものがある。演者らはこれまで塩類に対して比較的耐性を示すオオムギが、Naclストレスを加えられると液胞膜のH*ポンプの活性を増加することを明らかにした。一方、キウリは極めてNaclストレスに弱く200 mM NaCl で一日間処理するだけで、根が著しく軟弱化することを認めた。植物のNaClに対する耐性の機構はよく解明されていないが、膜の機能が関与していることは間違いなく、ここではキウリ根の原形質膜を主体とする膜画分のNaClによる障害について検討した結果を報告する。

NaCl処理を加えないコントロール根と、200 mM NaCl で一日間処理をしたキウリ根の ミクロソーム膜画分をショ糖密度勾配遠心で分画すると、活性の約70%がバナジン酸で阻 害を受けるK+-Mg²⁺-ATPase活性がショ糖濃度40~45%付近に認められた。このATPase活性 はNaClストレスによってコントロール根の約40%に低下し、原形質膜由来のATPaseである と考えられた。一方、密度勾配遠心で得られた膜画分のリン脂質と膜に結合しているCa²⁺ 量はストレス根で顕著に減少していた。そこで原形質膜ATPaseのNaClストレスによる変動 をさらに検討するため簡便法として、二段階のショ糖濃度を用いて原形質膜に富む膜画分 を調製した。得られた膜画分のK*-Mg²⁺-ATPase活性の50℃熱処理に対する安定性を検討し た。コントロール根では4分の過熱で約50%の活性が失活したが、NaClストレス根では2 分の過熱処理で同程度の失活を受けた。またショ糖密度勾配遠心による実験から膜のリン 脂質含量の低下がストレスによって認められたので、簡便法で得た膜画分に、リン脂質と してダイズレシチンであるアゾレクチン添加の効果を調べた。コントロールでは0.02%の アゾレクチンの添加でK+-Mg²⁺-ATPase活性は約2倍増加したが、NaClストレス根では約5 倍増加した。一方SDS-PAGEの結果から膜タンパクには大きな差が認められないことから、 キウリ根におけるNaClストレスによる一義的な障害の発生部位は原形質膜に結合している Ca²⁺がNa⁺ によって除去され、その結果、リン脂質の減少をともなった膜構造の変化が引 き起こされると同時に、K+-Mg2+-ATPase活性の著しい低下が起こっているものと考えられ た。

植物培養細胞におけるリン酸輸送と細胞質pHの調節機構

I. 蛍光試薬による細胞質 p Hの測定。

三村 徹郎 (東大・理・植物)・坂野 勝啓 (農水省・生物研)

昨年度の植物生理学会において、坂野はニチニチソウ培養細胞に無機リン酸を与えると、培地のアルカリ化とそれに引き続く酸性化を引き起こすことを報告した。このアルカリ化はリン酸飢餓状態にある細胞が、ブロトンとの共輸送でリン酸を吸収することに起因するものと考えられる。また、アルカリ化に続く培地の酸性化は、リン酸とともに細胞内に入ったブロトンが細胞質の酸性化を引き起こして原形質膜のブロトンボンブを活性化することによると考えることができる。すでに、ウキクサを用いた電気生理学的実験から、リン酸吸収にともなう原形質膜プロトンボンブの活性化が報告されているが、リン酸吸収に際し実際に細胞質pHがどの様に変化しているかを報告した例は無い。また、微小pH電極を用いた測定から、アミノ酸や糖ではプロトンとの共輸送に際し、細胞質が一過的にアルカリ化するという報告もある(Johannes and Felle 1987)。

ここでは、リン酸吸収にともなう細胞質pHの変化をpH感受性の蛍光物質を用いて測定した。細胞質pHの測定には³¹P-NMRや微小pH電極を用いる方法が知られているが、時間分解能や培養細胞への応用という点で困難が大きい。そこで膜透過性のpH感受性蛍光物質2'.7'-bis-(2-carboxyethy1)-5(and-6)carboxyfluorescein acetoxymethylester (BCECF-AM)を用いて細胞質pHの測定を行った。BCECFはpH6-8の領域において溶液のアルカリ化に応じて蛍光強度が大きくなることが知られている。

ニチニチソウ培養細胞を 1μ MのBCECF-AMとともに一時間振とうし、洗浄後、蛍光分光計でリン酸添加にともなう蛍光強度の変化を測定した。この際pH電極を用いて測定培地のpH変化も併せ測定した。リン酸添加後、培地は急速にアルカリ化し、一定時間後に酸性化に向かった。アルカリ化の開始とともに蛍光強度も減少しはじめその後減少は停止した。外液の酸性化開始とともに今度は蛍光強度の増大が測定された。これは、リン酸添加後細胞質が酸性化し、その後プロトンボンプの活性化にともなって元の値に復帰する細胞質pH調節機構を示しているものと考えられる。BCECFは液胞にも一部分布するためpHの絶対値の決定は難かしいが、pH変化量について簡単な推定を行ったのでそれについても報告する。

植物培養細胞におけるリン酸輸送と細胞質 p H の調節機構 Ⅱ. 有機酸代謝による調節

坂野勝啓·矢崎芳明·清田誠一郎(農水省·生物研)

ニチニチソウ培養細胞に無機リン酸を与えると、培地のpHは急速なアルカリ化とそれに引き続く酸性化を起こす。これは細胞による無機リン酸の吸収がプロトンとの共輸送によるために、リン酸吸収時にはアルカリ化が、吸収終了時にはプロトンボンプによる細胞内の過剰のプロトンの排出による酸性化が起きるためである。われわれは先にこの共輸送におけるH゚/Pi比が投与するリン酸量によって0.5-4となり、投与量が多いほど小さい値を取ることを見いだした。この理由はリン酸輸送の開始と共に細胞質pHが低下し、やがて細胞質pHがある閾値を越えると、プロトンボンプが活性化してプロトンを細胞外に排出するので、リン酸輸送が長引くほど、すなわちリン酸投与量が多いほど共輸送に用いられるプロトンの量が見かけ上少なくなるためである。かくて真の化学量論比は4であると考えた。これらについては昨年の本大会で報告した。プロトン共輸送機構は必然的に細胞質の酸性化を招き(前講演参照)、それをシグナルとして各種の細胞質pH調節反応が起きると考えられる。その一つはプロトンボンプの活性化であり、他の一つはD.D.D.D. Davis (1973)によって提唱されたBiochemical pH stat と呼ばれる有機酸代謝調節機構である。今回はリン酸輸送に伴う有機酸代謝の変動を調べた。

(方法) MS培地で培養したニチニチソウ細胞5gを50m1の培地(10mM CaCl2, 1mM KCl, 2% glucose) に懸濁して振盪し、リン酸投与後の培地pH、酸素吸収速度、炭酸ガス発生速度を各種の電極を用いてモニターし、リン酸による有機酸の脱炭酸反応の促進を検討した。また経時的にサンプリングを行い、細胞内有機酸の変化を調べた。

(結果) リン酸投与により酸素吸収速度、炭酸ガス発生速度共に増加するが、RQ値は 1. 14からリン酸投与後に2. 11となり、リン酸による脱炭酸反応の促進が見られた。細胞内の有機酸は主としてリンゴ酸、クエン酸であるが、いずれもリン酸投与後培地pHがピークに達するまで急速に減少し、引き続く酸性化の開始と共にリンゴ酸は増加した。クエン酸はこの後、あまり大きな変化はみられなかった。

洋ナシ果実からのトノプラストの調製と糖の透過

坂野満、山木昭平 (名古屋大・農・園芸)

洋ナシ果実は、糖を積極的に細胞内に取込むことによって膨圧を高め、糖を蓄積しながら肥大生長する。それ故トノプラストにおける糖の吸収段階は生長に最も重要な役割をするものと思われる。本研究では洋ナシ果実よりトノプラストを調製し、その H+-ATPase の性質及び糖の透過性の特徴を検討したので報告する。

トノプラストATPaseの阻害の特徴: 成熟した果実(ラ・フランス)を磨砕し、8000 -105,000xg沈殿をKIで洗浄後、6%デキストランに上層し遠心し、境界面の亜細胞をトノプラスト画分(TP)とした。TPのATPaseは硝酸により20%,バナジウムにより70%も阻害され、アザイドでは阻害されなかった。しかしながら glucansynthase II 活性の混入はわずかであり、バナジウムの阻害は原形質膜の混入に由来しないと思われた。そこで 沈殿を 0-10%デキストラン密度勾配遠心分離により分画し、それぞれについてマーカー酵素を検討したところ、ATPase活性は高密度(F1)と低密度(F2)にピークを示した。硝酸阻害はF2のみ、バナジウム阻害は両方に、glucansynthase II活性はF1のみに認められた。またF2に混入した Antimycin-insensitive NADH-cyt c reductase活性はマグネシウム添加により消えたにも拘らず、バナジウムによる阻害は変わらなかった。以上より、F1には主に原形質膜、F2には主にトノプラストが含まれ、F2におけるATPase活性のバナジウムによる阻害は原形質膜、ERなどの混入ではなくトノプラスト自身に因るものと思われた。

糖の透過性の特徴: キナクリンの蛍光消失よりトノプラストは完全にシールし、小胞を形成したので、この小胞内への糖の透過を検討した。14C-糖と反応した小胞をメンプランフィルターで集め、取込まれた14Cを測定することによって小胞に吸収された糖を求めた。その結果、洋ナシの主要な転流糖であるソルビトールの吸収はATPによって促進されなかった。しかしながらPCMBSによって約40%阻害され、CCCP,DNP,硝酸、バナジウムによっては全く阻害されなかった。さらにPCMBSに感受性な吸収はソルビトール濃度に対して飽和した。このことより、ソルビトールのトノプラスト小胞内への吸収はH+-ATPaseに共役しないが、PCMBSに感受性なキャリヤーに依存していることが明かになった。グルコース、シュクロースの吸収もソルビトールと同様な傾向を示した。

塩ストレス状態のモヤシマメ幼根におけるH・放出に及ぼす 外液Ca²・の影響

中村 善行、下里 規子、太田 英二、坂田 亮 (慶大理工計測)

試料には発芽2日後のモヤシマメ (Vigna mungo) 無傷幼植物を用いた。 幼根細胞のH か出量は、予めpH7.0に調整した外液のpH変化をガラスpH電極で測定し、0.1NKOHで逆滴定して算出した。原形質膜は、根組織磨砕液からDextran T-70 の二段階濃度勾配遠心法で単離した。その結果以下のことがわかった。

- 1)塩ストレス状態では、幼根のH⁺放出率が増加し、原形質膜H⁺-ATPase活性も上昇した (Fig.1, Table 1)。
- 2)育成液に0, 2 Mマンニトールを加え幼根を水ストレス状態にしても、 H^{+} 放出量、 H^{+} -ATPase活性はいずれも変化しなかった。
- 3)外液 Ca^{2+} 濃度を10倍(5mM)に上げると、塩ストレス状態での H^{+} 放出の活性化と H^{+} —ATPase活性の上昇はいずれも抑制された(Fig.1, Table 1)。
- 4)外液 Ca^2 +濃度が5mMの場合には、水ストレス状態では根のH+放出は、抑制された。以上の結果から、塩ストレス状態では、Na+により原形質膜H+-ATPaseの活性が上昇し、根細胞のH+放出量が増加することが示唆された。 また、 Ca^2 +の塩ストレス緩和効果は、H+放出の活性化に伴う溶質吸収の促進とは関連しないと考えられる。

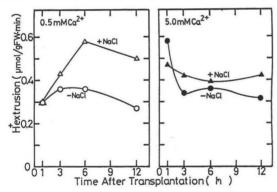


Fig.1 幼根のH⁺放出量の経時変化

	H ⁺ ATPase Activity(+NaCl) H ⁺ ATPase Activity(-NaCl)	
	0.5 mMCa ²⁺	5.0 mM Ca ²⁺
Plasmalemma	2 • 1	1.5
Tonoplast	0.90	0.95

Table 1 塩ストレスによるH・- ATP as e活性 の上昇に及ぼす外液 C a²*濃度の影響

光照射によってチラコイド膜につくられる電位差と pH 差に対するアニオン輸送阻害剤の効果

柴田正敏・荒田博行・山崎秀雄・西村光雄(九州大・理・生物)

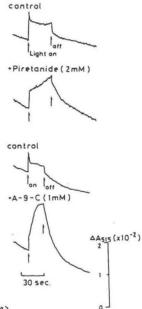
葉緑体チラコイド膜や光合成細菌の細胞膜は、光エネルギーを化学エネルギーに変換する。これらは光、が当たると、酸化還元系上の電子伝達に共役して H^+ を膜を横切って輸送し、 H^+ の電気化学ボテンシャル差($\Delta \mu H^+$)をつくり、それを ATP 合成の駆動力とする。 $\Delta \mu H^+$ には pH 差(ΔpH) と膜電位($\Delta \psi$)とが寄与するが、光合成細菌の細胞膜では ΔpH 及び $\Delta \psi$ が明確に維持されるのに対し、チラコイド膜では連続光照射下で $\Delta \psi$ のみが著しく減少する。この差異はチラコイド膜が膜電位を打消す方向に陰イオンを受動的に輸送するためにおこると考えられている。これに関連して Hind 等 [1] は光照射によるチラコイド膜の CI^- とり込みを電極を用いて観察しているが、陰イオン輸送についての研究はその後あまり進んでいない。そこで我々は CI^- 輸送阻害剤として知られているピレタニド [2,3]、A-9-C (Anthracene-9-carboxylic Acid)を加えることによってチラコイド膜に生じる電位差と PH 差に対する影響の観察を試みた。

我々はまず、定常光の照射によって生じる膜電位の指標として ΔA515 (515nm における吸光度変化)を用いることにした。葉緑体懸濁液にピレタニド、A-9-C を加えると光をつけた直後の比較的速やかな吸光度変化の後、数十秒間のおそい吸光度増加が大幅に促進されるのが観察された(図)。同様の変化は酸化還元のコファクターであるメチルビオロゲンを加えたときにも見られた。この吸光度の増加は広い波長範囲でみられ、バリノマイシンよりもナイジェリシンによって顕著に阻害された。これらのことからこの吸光度の増加は膜電位を反映しているいわゆる ΔA515 ではなく、ΔpH、あるいは膜の局所的な pH 差によっておこることが想像される。ピレタニドや A-9-C は電子伝達系を促進する事はないので、両者はチラコイド膜周辺の H+ の分布に影響を及ぼしている可能性がある。

一方、 H^{\dagger} のとりこみによる外液の pH 変化を pH 電極を用いて観察したところ、ピレタニドや A-9-C の添加、あるいは CI^{\dagger} の $iminodiacetate への置き換えによって光励起終了後の <math>H^{\dagger}$ 放出の 1/2 変化時間 $(t^{1}/2)$ が短くなった。このことは、陰イオン輸送を抑制する操作によって膜電位が増加したことを示唆している。

現在、観察されている吸光度変化の遅い相が何を表しているのかを確かめるとともに、 ΔpH と Δψの形成・維持・消失に対する陰イオンの役割について他の研究手段も加えてさらに解析を進めている.

- (1) Hind, G., Nakatani, H. Y. and Izawa, S. (1974) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 71, 1484-1488
- (2) Vambutas, V. and Schechter, S. (1983) Arch. Biochem. Biophys. 224, 442-448
- (3) Vambutas, V., Beattie, D. S. and Bittman, R. (1984) Arch. Biochem. Biophys. 232, 538-548



低温及び熱ショックを与えたモヤシマメ(Vigna)芽生えにおける
¹ H - NMR緩和挙動とストレス誘導蛋白質
。
井上這理 、 賀来章輔(九大・教養・生物)

ヤエナリは0 \mathbb{C} (1 h) 処理で、 T_1 、含水量ともにやや減少したがこれは対照区(20 \mathbb{C})の変化と大差がなかった。 7 h 処理区は含水量は殆ど変化しなかったが、 T_1 は明らかに増大した。 2 4 h 処理区では含水量の減少の程度は小さいが、 T_1 の増大は7 h より更に顕著であった。一方、高温 4 5 \mathbb{C} (1 h) 処理区では T_1 、含水量共に減少したが、7 h 処理区では 1 h 処理区に比べ含水量は更に減少したが T_1 の減少は同程度であった。 このように低温や高温ストレス下で水プロトンの N M R 緩和挙動は明らかに異なり、これは演者らが従来、温度ヒステリシス法で得た結果ともよく一致した (Plant water relations and growth under stress 1989)。

二次元電気泳動法による植物膜タンパク質複合体の分析 ^o久堀徹・赤羽康宏・・井上和仁・・・岩上淳・真鍋勝司 (横浜市立大・文理・生物、・ライオン、・・神奈川大・理・ 応用生物)

生体膜で機能を持った膜タンパク質は多くの場合複合体を形成している。しかし、生体膜から膜タンパク質を単離精製したとき、どのサブユニットが失われているのかは適切に調べる手立てがないため、機能性膜タンパク質の生体膜中での実体については、正確なことはあまり明らかにされていない。最近、一般的に電気泳動に用いられている界面活性剤SDSよりも温和な界面活性剤ポリオキシエチレンラウリルエーテル硫酸ナトリウム(AES)とジメチルドデシルアミンオキサイド(DDAO)の混合系を用いて低温で電気泳動を行なうと、動物細胞膜のNa・K・-ATPase¹)や高度好熱菌のATPase²)をサブユニットに解離させずに泳動できることが報告されている。そこで、我々はこの界面活性剤が植物の膜タンパク質複合体の分析に応用出来るのではないかと考え、その可能性を検討した。

1) 葉緑体チラコイド膜の分析

葉緑体のチラコイド膜は、光合成の光化学反応中心複合体や、シトクロム複合体等の電子伝達成分を多く含んでいる。また、膜表面には、RuBPカルボキシラーゼ (Rubisco)やATP 合成酵素 (CF₁)を多く結合している。チラコイド膜は、ストロマチラコイドとグラナチラコイドに分画遠心によって容易に分けられる。前者は光化学系 I 複合体を多く含み、後者は光化学系 II 複合体を多く含んでいることが知られている。そこで、この2種類のチラコイド膜標品をそれぞれAES/DDA0存在下で電気泳動するとクロロフィルを含む数種の複合体に分離できた。このゲルを二次元目にSDS-PAGEで分析すると、光化学系 I 複合体と光化学系 II 複合体が一次泳動において異なるバンドとして泳動されていたことが分り、複合体を形成する多くのサブユニットが保存されていた 5)。また、ストロマチラコイド標品では、Rubiscoの大サブユニットと小サブユニットも複合体のまま泳動されていた。これらの複合体が一次泳動後も生理活性を保っているかどうかは、現在検討中である。

2) 黄化芽生えの緑化にともなうタンパク成分の変化

暗所で育てたオート麦 (Avena sativa L.)の黄化芽生えに光照射をして緑化をさせたとき、粗膜画分(1-40 Kppt)に含まれるペプチドの組成がどのように変化するかを1)と同様の方法により分析した。その結果、緑化の進行にともなって消長する複数のペプチドが検出できた。さらに、これらのうちの幾つかは、一次のAES/DDAO泳動において挙動を共にしていたらしく、二次のSDS-PAGEでは上下に並んだペプチドが同時期に消滅したり、出現したりすることが観察された。このことは、この方法が複合体の消滅や形成の解析に応用し得ることを示唆している 5)。

- 1) Koide, M., et al. (1987) Anal. Biochem., 164, 150-155.
- ² 赤羽ら (1988) 生体エネルギー研究会第14回討論会講演要旨集 p.144-145.
- ³ Hisabori, T., et al. Anal. Biochem. submitted.

大腸菌acrA遺伝子の細胞膜タンパク質の合成支配

長谷 篤(大阪市環科研)、船附賢三、中村 運(甲南大・理)

【はじめに】 大腸菌K-12株のアクリフラビン(AF)感受性は大腸菌染色体上10.6分に座位する遺伝子acrAに支配されている。AF感受性突然変異株(acrA, N43株)は野生株 $(acrA^+, N90$ 株)に比べて、分子量約60Kの細胞内膜タンパク質 $(acrA^+$ タンパク質と考えられる。)を欠失しており、この60Kの細胞膜タンパク質が大腸菌のAF感受性と密接に関係しているものと我々は考えている。これまでに、ClarkeとCarbonの作製した大腸菌のgene bankからプラスミドpBR322の制限酵素EcoRI部位に5.4kbのDNA断片としてクローニングした $acrA^+$ 遺伝子(プラスミドpAF1)を用いて、60Kタンパク質とAF感受性について報告してきた。本大会では、我々の分離した野生株から $acrA^+$ 遺伝子を新しくクローニングし、制限酵素地図と遺伝子産物について調べたので報告する。

【材料と方法】(1)AF耐性野生株N90株から常法にしたがって、染色体DNAを分離精製し、制限酵素EcoRIで切断後、ベクターpBR322のEcoRI部位に、各DNA断片を結合した。AF感受性突然変異株N43株にHanahanの方法により形質転換し、AF加(30 μ g/m1)L寒天平板上で生育するものを選択した。(2)AF感受性試験は次のように行った。各種濃度のAFを加えたL液体培地に菌を接種し、37°Cで3時間培養した後、その生菌数を調べた。(3)プラスミドの分離精製はアルカリ法で行い、また遺伝子産物はミニセル法によって調べた。

【結果及び考察】(1)AF耐性遺伝子を持つプラスミドPAF3を得た。PAF3の制限酵素地図を作製し、PAF1と比較すると全く同一であることがわかった。(2)PAF1とPAF3をそれぞれ形質転換したN43株のAF耐性度を比較すると、PAF1の方が若干耐性度が強いことがわかった。(3)PAF1とPAF3を用いてacra 遺伝子の遺伝子産物を調べた結果、いずれも分子量125K,56K,22Kのタンパク質をコードしていることがわかった。以上の結果から、PAF1とPAF3にクローニングされたacra+遺伝子は同一のものと思われるが、AF耐性度に若干の違いがあり、塩基配列の解析などのが必要と思われる。また、遺伝子産物については、結合している断片が5.4kbと大きいため3種類のタンパク質が検出されたが、これらのいずれかがacra+タンパク質であろうと思われる。

イネ waxy 座遺伝子の構造と発現 平野博之、山田初音、佐野芳雄(国立遺伝学研究所)

米にウルチ性とモチ性があることは、日本人の食文化を豊かにしているの要因の一つであろう。このウルチ米とモチ米という性質は生物学的にはどのようにして説明されるのであろうか。米(胚乳)の大部分を占めるデンプンがすべてアミロペクチンから構成されている場合にはモチ米となり、十数から二十数パーセントアミロースを含む場合にウルチ米となる。この性質は、 waxy locus (モチ座)と呼ばれる遺伝子座に存在する複対立遺伝子によって支配されている。この遺伝子座が野生型(正常)の場合にはウルチ米となり、機能を失うとモチ米になる。したがって、waxy 座遺伝子はアミロースの合成を支配していると考えられる。同様の表現型を示すトウモロコシの waxy 座遺伝子は UDP-glucose starch glycosyl transferase をコードしていることが示されている。我々は、イネ胚乳(米)の質を決定するとともに、アミロースの合成という生物学的にも応用的にも重要な機能を担っている waxy 座遺伝子の発現制御機構に興味を持ち、分子遺伝学的研究を開始した。

トウモロコシの waxy 座遺伝子をプローブとしてサザーンハイブリダイゼーションにより解析したところ、イネにおいてはこの遺伝子は1コピーであることが明らかになった。これは、以前より示されていた遺伝学的解析の結果とも一致する。日本型(0ryza sativa Japonica)より二系統、インド型(0. sativa Indica)より一系統のイネより、それぞれ mini-genomic library を作製し、各系統の waxy 座遺伝子をクローン化した。このうち、日本型の一系統(165株)の waxy 座遺伝子の全塩基配列を決定した。この遺伝子は約4Kb の領域からなり、トウモロコシの waxy 座遺伝子の塩基配列との比較から、14個のエクソンと 13個のイントロンから構成されていることが明らかになった。遺伝子の構成が類似していることやコード領域の塩基配列の相同性が非常に高いことなどから、イネの waxy 座遺伝子はトウモロコシと同様、アミロースの合成に関わる UDP-glucose starch glycosyl transferase をコードしていることが強く示唆される。

また、 waxy 座遺伝子の産物であるWxタンパク質を精製し、このタンパク質に対する抗体を作製した。この抗体を用いて、種々の系統のイネをウェスタンプロティングにより解析した。モチ(wx)系統のイネのタンパク質抽出液中には抗体と反応するバンドは検出されなかったので、この抗体は非常に特異性が高いと考えられる。また、インド型のイネには日本型に比べて10倍以上のWxタンパク質が発現していることが示された。これは、以前我々が示した細胞内顆粒分画後のSDS-PAGEの解析結果と一致する。同じ機能をになう一つの遺伝子の発現量が同一種内の系統間で10倍以上異なっていることは注目に値し、この遺伝子発現の量的制御が如何にしてなされているかは極めて興味深い問題である。

ダイズ・メタロチオネイン様cDNAの単離

1Cp02

川嶋一郎、井口義夫¹、茅野充男、木村正巳²、清水信義¹ (東大・農・農化、¹慶応大・医・分子生物、²産医研)

メタロチオネイン(以下MTと略記)はCd、Zn、Cu等の重金属と結合する低分子量タンパク質であり、システインがそのアミノ酸組成の約30%を占めるという特徴を有している。MTは哺乳類、鳥類、魚類、無脊椎動物、菌類などの広範囲にわたる生物種に存在しており、有害重金属の解毒、必須微量金属の代謝調節に関与している。植物では、フィトケラチン〔 $poly(\gamma-Glu\cdot Cys)$ Gly〕がMTと同様な働きをしていることが報告されているが、我々はダイズ根中に抗ラットMT-1抗体と反応するタンパク質を見出しており、植物にも哺乳類型のMTが存在する可能性が示唆された。そこで今回はこのタンパク質のcDNA遺伝子の単離を試みた。

哺乳類のMTに見出されるN末側(アミノ酸1~7番目)および中央部(アミノ酸24~38番目)の保存配列に対応する21mer、44merのオリゴヌクレオチドを合成してプローブとした。これらのプローブを用いて、ダイズ全DNAとサザンハイブリダイゼーションを行った結果、21merプローブで4本、44merプローブで5本のバンドが認められ、ダイズDNA中にMTと相同性のある配列が存在することが示唆された。次に播種後6日目のダイズ全植物体から調製した λ gt11cDNAライブラリーをこれらのプローブを用いて λ gt11cDNAライブラリーをこれらのプローブを用いて λ gt11cDNAライブラリーをこれらのプローブを用いて λ gt1元をクローン21-1-A(0.7kb)の塩基配列を解析したところ、237塩基から成るオープンリーディングフレームが見られ、システイン14個(18%)を含む79アミノ酸残基をコードしていた。このシステインはN末側とC末側に集中しており、その両方で[一CーCーーーCーCー]という哺乳類のMTに特徴的な配列をしていた。さらに、N末側の14アミノ酸残基がアカバンカビのMTと相同性(64%)を示すことからこのタンパク質は重金属結合能を有することが推定された。一方、このcDNAをプローブとし、ダイズ根RNAとノーザンハイブリダイゼーションを行なった結果、約0.8kbのmRNAが検出された。従ってダイズにもメタロチオネイン様タンパク質が存在することが示唆された。

カボチャ、グリオキシゾーム リンゴ酸脱水素酵素のcDNAクローニングとその構造解析

o武田陽子、槻木竜二、西村いくこ、森仁志¹、西村幹夫 (神戸大・理・生物、¹基生研・情報制御)

リンゴ酸脱水素酵素(MDH)は、細胞内でミトコンドリア、細胞礎質、そしてマイクロボディに互いに異なったアイソザイムとして存在している。相同性解析の結果、ミトコンドリアMDHは、細胞礎質MDHより原核生物である大腸菌のMDHと高い相同性を示すことが知られており、このこと自体がミトコンドリアの内部共生説を支持する証拠としてあげられている。今回私たちはカボチャの子葉組織を材料にしてマイクロボディの一種、グリオキシゾームに特異的なMDHのcDNAクローンを単離し、これから推定されるアミノ酸配列と他のMDHのそれとの相同性を解析することにより、グリオキシゾームの起源について考察を行ったのでその結果を報告する。

カボチャ 黄化 子葉から調製 したpoly(A)+RNAと発現ベクターpTTQ18を用いてcDNAライブ ラリーを作製し、グリオキシゾームMDHに対する特異抗体を用いてスクリーニングを行った ところ、不完全長であると思われる陽性クローンが得られた。そこで次にこのcDNAをプロ ーブとして、ライブラリーを新たにスクリーニングした結果、いくつかのクローンを得る ことができた。このうちpgMDH8は最もインサートが大きく(1.4kb)、またこのクローンを 用いて行った in vitro transcription - translation の産物はpoly(A)+RNA を用いて in vitro で合成したMDHと同じ分子量(約38kDa)であった。この結果から私たちは pgMDH8 をグリオキシゾーム MDHの 全長をコードしたクローンであると断定し、その全塩基 配列の決定を行った。このクローンは全長1414bpでそのうち1068bpからなるコーディング 領域を含んでおり、また成熟MDHのN末端アミノ酸シークエンスより、N末端側36アミノ酸は プレ配列であることが明らかとなった。このプレ配列は非常に親水性であり、またC末端に あると言われているマイクロボディ局在化シグナルをこの中に持つことから、MDHの場合、 このプレ配列がマイクロボディへの局在化の鍵となっていることが推察される。次に、グ リオキシゾームMDHと他のMDHとを アミノ酸レベルの相同性解析を行った結果、 グリオキシ ゾームMDHは細胞礎質MDHではなく、ミトコンドリア、大腸菌のMDHと高い相同性を示すこと が判明した。このことからミトコンドリアのようにグリオキシゾームも内部共生していた 原核生物から進化したものであるという可能性が示唆される。

カボチャ・グリコール酸酸化酵素のマイクロボディへの 局在化

○槻木竜二、武田陽子、西村いくこ、西村幹夫 (神戸大・理・生物)

脂肪性種子の子葉組織に存在するマイクロボディは、光照射に伴う子葉緑化過程で、 貯蔵脂肪の分解から糖新生に関与するグリオキシゾームから、光合成(光呼吸)に関与す る緑葉パーオキシゾームへと機能的に変換する事が知られている。既に私達はこの変換が 同一マイクロボディ内で生じる現象であること、 光照射によりマイクロボディ内にグリオ キシゾーム特異的酵素 malate synthase の分解系が誘導されることを明らかにしている。 マイクロボディ機能変換におけるもう一つの大きな側面は光照射を引き金としてマイクロ ボディ内に蓄積されていく緑葉パーオキシゾーム特異的酵素の生合成、細胞内輸送、活性 発現などを含むその遺伝情報発現機構の解析にある。私達は既に緑葉パーオキシゾーム酵 素グリコール酸酸化酵素(glycolate oxidase)の全翻訳領域を含む2種の cDNA クローン (pPGO1、pPGO2) を調製すると共に、このクローンを用いて glycolate oxidase 特異 mRNA が光照射により増加する事を明らかにしている。今回は glycolate oxidase のマイ クロボディへの細胞内輸送に着目し、glycolate oxidase cDNA in vitro 転写、翻訳産物 のマイクロボディへの in vitro 膜透過輸送系を確立して解析を加えたので、その結果を 報告する。pPGO1 の in vitro 転写、翻訳産物の分子量は glycolate oxidase の全 RNA in vitro 翻訳産物の分子量に一致し、しかも原酵素と同じ 40kD であった。pPG01 の in vitro 転写、翻訳産物と単離したマイクロボディを共存させることによって in vitro 膜透過輸送系を確立した。その結果、pPGO1 の in vitro 転写、翻訳産物は時間の経過と 共に緑葉パーオキシゾームに取り込まれていった。グリオキシゾーム、及びグリオキシゾ ーム特異的酵素 malate synthase の分解系が誘導されている変換時のマイクロボディを膜 透過実験に用いた場合にもこれと同様の結果が得られた。以上の結果は、緑葉パーオキシ ゾーム特異的酵素 glycolate oxidase が緑葉パーオキシゾームのみならずグリオキシゾー ムにも取り込まれうること、光照射に伴ってマイクロボディ内に誘導されるグリオキシゾ ーム特異的酵素に働く分解系が緑葉パーオキシゾーム特異的酵素 glycolate oxidase には 働かない事を示唆している。

[°] 久保明弘、佐治 光、田中 浄、田中國介¹ 、近藤矩朗 (国立公害研・生物環境、¹ 京府大)

葉緑体には、光合成に伴って生じる有害な活性酸素を消去する代謝系がある。アスコルビン酸ペルオキシダーゼはこの代謝系の酵素で、活性酸素毒性防御に必須と考えられる。ところで、オゾン(03)にさらされた植物に可視害が出る際に、活性酸素の関与が示唆されている。また、活性酸素消去系の酵素のうち、アスコルビン酸ペルオキシダーゼとグルタチオン還元酵素は、傷害が出ない濃度のオゾンで、活性とタンパク質量が増大する。我々は、オゾンによるこれらの酵素の誘導機構を解明するため、また、オゾン耐性、感受性植物を遺伝子工学的に作出することを目指して、これらの酵素のcDNAクローニングを試みている。今回はアスコルビン酸ペルオキシダーゼについて報告する。これまでの研究では主としてホウレンソウを用いているが、cDNAクローニングには、遺伝子の研究に適したシロイヌナズナを用いた。

ホウレンソウのアスコルビン酸ペルオキシダーゼに対する8種類の単クローン性抗体がすでに得られており、このうち5種類がシロイヌナズナのタンパク質とも反応した。そこで、このうち2種を混合したものをプローブにして、 λ gt11をベクターとするシロイヌナズナcDNAライブラリーをスクリーニングした。 その結果、5個の陽性クローンが得られたが、サブクローニングして調べたところ、3種類であった。これらのクローンに含まれるcDNAがアスコルビン酸ペルオキシダーゼのものであることを確認するため、それぞれのクローンの溶原菌から調製したタンパク質に対する、単クローン性抗体の反応を調べた。その結果、認識部位の異なる4種の抗体が、3種のクローンのいずれにも反応した。この結果より、得られた3種の陽性クローンはすべてアスコルビン酸ペルオキシダーゼのcDNAクローンであると結論した。

これらのクローンに含まれるcDNAの最長のものは 1.1kbであった。他のふたつは、制限地図により、最長のcDNAの左右をそれぞれ欠くものと判明したが、制限地図の一部に不一致が見られるので、少なくとも 2 種のアイソザイムに対応すると考えられる。 1.1kbの cDNAをプローブにしてシロイヌナズナの転写産物を調べたところ、約 1.1kbの転写産物が検出されたので、ほぼ全長のcDNAがクローニングできたと思われる。

ハツカダイコン子葉のセネッセンス時に特異的に発現する グルタミン合成酵素遺伝子の構造 數岡 徹、横井 宏行、渡辺 昭 名大・農・生化学制御

多くの高等植物において、グルタミンは窒素の転流形態の主要な部分を占める化合物である。それゆえグルタミン合成酵素(GS)は体外から取り込まれた窒素や光呼吸によって生成するアンモニアを同化する主な酵素であるだけでなく、植物体内の窒素転流に用いられるグルタミンの生成という役割を担っている。高等植物のGSには、細胞質に局在するイソフォーム(GS1)と葉緑体に局在するそれ(GS2)があり、それぞれのイソフォームは等電点を異にする数種のサブユニットから構成されている。我々は、セネッセンスが進行したハツカダイコン子葉ではGS1を構成している一部のサブユニットとそのmRNAが増加し、GS2を構成しているサブユニットおよびそのmRNAはすべて減少することを明かにしてきた。さらに、セネッセンスとGS遺伝子発現との関係を分子レベルで解明することを目的として、GSサブユニットmRNAのcDNAクローニングを行い、複数の陽性組換え体(λ GS1-43、 λ GS13-93、 λ GS18-1b)を得た。その塩基配列の解析から、これらはすべて同一のGS1遺伝子由来のmRNAに対応したcDNAクローンであることがわかった。また、ノーザンブロットハイブリダイゼーションの結果から、セネッセンスの進行とともにこのcDNAに相補的なmRNAが増加することを明かしてきた。

GS遺伝子の転写レベルでの調節の分子機構をさらに詳しく調べるために、GS遺伝子のクローニングをおこなった。 λ GS1-43をプローブとして遺伝子ライブラリーのスクリーニングを行い、多数の陽性組換え体を得た。さらに λ GS18-1bに特異的な3 '非翻訳領域のDNA断片をプローブとして第2次スクリーニングを行い、 λ GS18-1bに対応した陽性組換え体gGS35-2を単離した。cDNAとして単離された λ GS18-1bは翻訳開始コドンATGを含む5 '末端領域が欠けていたが、遺伝子クローンとの比較からその翻訳領域は1062bpであり、メチオニンから始まる354残基であることが明かとなった。GS1の構造遺伝子は2.1kbであり、7 個のイントロンが存在した。それらの挿入されている位置は、すでに報告されているアルファルファのGS1遺伝子と同じであったが、アルファルファのGS1遺伝子の第6.7.10、11 イントロンに相当する配列は存在しなかった。3 'フランキング領域のポリA付加部位には複数のポリアデニレーションシグナルが存在する。その中の2 つは実際に機能しており、3 '非翻訳領域の長さの異なるcDNAが検出されていることから、ポリA付加部位はかなり多様化していると考えられる。5 'フランキング領域には、TATAボックスおよびCAATボックスと類似する配列が認められたほか、真核生物の一群の熱ショックエレメントとよく似た配列が見つかった。また、複数の繰り返し配列がプロモーター領域やイントロンに存在した。以上、セネッセンスを起こした子葉で特異的に発現するGS1遺伝子の詳細な構造解析の結果を報告する。

トウモロコシ、フェレドキシン依存性グルタミン酸合成酵素の 遺伝子とその発現

榊原均、長谷俊治、杉山達夫 (名古屋大・農化)

高等植物の緑葉細胞ではアンモニアは、主に葉緑体内に存在するグルタミン合成酵素 (GS)およびフェレドキシン依存性グルタミン酸合成酵素 (Fd-GOGAT)から成る GS/GOGAT サイクルによってアミノ酸へ同化される。我々はこれまでに、トウモロコシ cDNA ライブラリーから Fd-GOGATの cDNAのクローニングを行ない、その構造決定をした (第62回日本生化学会)。そこで Fd-GOGATの発現調節機構への理解をより深める事を目的として以下の実験を行なった。

(i) Fd-GOGATは光誘導を受けることが知られている。この現象を解析するために、トウモロコシ黄化薬の緑化過程における mRNAでの量的変動を調べた。黄化薬に光照射した後、経時的に葉組織をサンプリングし、poly(A)+RNAの抽出を行なった。ノーザンブロットを行なったところ、約5.2kbのバンドのみが検出され、Fd-GOGATの分子量 (160,000)から予想されるサイズとほぼ一致した。 RNAドットプロット法で Fd-GOGAT mRNA量の変化をみたところ、mRNAの増加は黄化薬にくらべ光照射下で著しく、蛋白質の増加パターンとよく対応していた。したがって、光による Fd-GOGATの発現誘導は転写レベルでその調節が行なわれているものと推定された。また、RubisCO mRNAの挙動と比較したところ、Fd-GOGAT mRNAは RubisCOよりもやや遅れて蓄積がおこっており、炭酸固定系酵素との発現開始のずれに興味が持たれた。

(ii)ゲノミックサザンプロットからは、Fd-GOGAT遺伝子は single copyであることを示唆する結果が得られ、AEMBL3ベクターを用いて作製したトウモロコシのゲノムライブラリーから、Fd-GOGAT cDNAの5'末端側約1.2kb部分に相当する領域を含むFd-GOGAT遺伝子のクローンを得た。構造解析の結果、数箇所に小領域のイントロンが存在した。現在この遺伝子断片のさらに詳しい構造解析および残りの領域を含むクローンのスクリーニングを行なっている。

キュウリ・アスコルビン酸オキシダーゼのゲノム遺伝子 のクローニング

○大川淳・大屋智資・岡田尚輔・新名惇彦・高野光男 (阪大・エ・醱酵)

[目的] アスコルビン酸オキシダーゼ(ASO) はアスコルビン酸を分子状酸素を用いてデヒドロアスコルビン酸に酸化する分子量約68kDの同一サブユニットより成る二量体の糖タンパク質である。ASO はサブユニット当たり銅を 4原子有する酵素群に属し、一般に"multi-copper oxidase"と呼ばれている。多くの高等植物はこの ASOを含んでおり、特にウリ科植物の果皮に多量に存在することが知られているが、その生理的意義は明らかではない。当研究室では、既にキュウリ(Cucumis sativus) 果実cDNAライブラリーから、ASO cDNAを単離した1)。今回は、ASO ゲノム遺伝子の構造と発現制御機構の解明のためにcDNAをプローブに用いて ASOゲノム遺伝子のクローニングを行った。

[方法および結果] キュウリ果実より抽出したゲノムDNA を EcoRIまたは XbaI で 完全分解した後、ASO cDNAをプローブとしてサザンブロッティング分析を行った。その結 果、 EcoRI分解によって約18, 5.0, 3.2kbp の 3本のバンドがハイブリダイズし、中でも 3.2kbpのバンドが最も強度が強かった。また、 XbaI 分解では約8.0, 5.5, 4.8, 2.3kbp の 4本のバンドがハイブリダイズした。そこで、キュウリゲノムDNA を EcoRIで分解した 後、ショ糖密度勾配遠心分離によりサイズ分画し、各画分についてサザンブロッティング 分析を行い、3.2kbpのバンドのみ含んでいた画分のDNA を 2 ZAP Ⅱベクターに接続してジ -ンバンクを作製した。 ASOcDNAを用いてスクリーニングを行いポジティブクローン(pG-ASOE3.2)を得て解析したところ、pGASOE3.2 はASO ゲノムDNA の3'側領域の一部を含む部 分クローンであることが判った。そこで、5'側領域を含むクローンを得るためにジーンウ オーキングを行った。4.8kbpの XbaI DNA 断片を含むクローン(pGASOX4.8) が5'側領域を 含み、pGASOE3.2 と重複していた。pGASOE3.2 とpGASOX4.8 の塩基配列を決定した結果、 ASOゲノムDNA は396, 213, 195, 960bpの 4つのexonと 3つのintronより成っていた。さ らに5'側領域中にはプロモーターのコンセンサス配列(TATA box,CAT box)が見出された。 また、開始コドンの上流 500bpを GUS遺伝子に連結しタバコプロトプラストでのトラン ジェント発現を調べた結果、高いプロモーター活性が見出された。

1) J. Ohkawa et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 1239-1243

イネ・グルタミン合成酵素アイソザイム遺伝子プロモーターの タバコでの発現調節

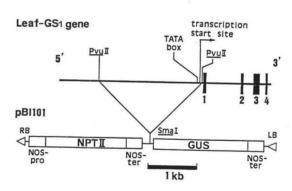
木崎暁子¹、坂本 敦²、田中國介²、竹葉 剛³(¹京大・応植、 ²京府大・農化、³京府大・応生)

イネのような好アンモニア性植物の窒素同化では、グルタミン合成酵素(GS)が主要な役割をはたしている。我々はすでにイネから3種の cDNA (RGS 8, RGS 28, RGS 31)を単離・解析した(Plant Mol. Biol.,13,611-614,(1989))。RGS 8 は主に根で発現する GS_1 (cytosol)型 であり、RGS 28 は主に葉で発現する GS_1 型である。RGS 31 は葉緑体に局在する GS_2 型である。これらの3つの cDNA に対応する核遺伝子も単離・構造解析しており、それらの遺伝子の器官特異的発現を調節するシス配列を解析中である。これらの遺伝子の発現調節機構を調べるために、それぞれの遺伝子の 5'上流域を β -glucuronidase (GUS)遺伝子に連結し、Ti plasmid を介してタバコに導入した。主に葉の cytosol で発現するRGS 28に対応する遺伝子の場合には、葉でより強い GUS 活性が検出され、イネにおける本来の発現パターンを反映していた。

ところで、GS ではどのような物質がその誘導に直接関与するかはまだ明らかにはなっていない。それは GS が酵素分子の turn over の他に、いろいろな条件下で活性化や失活を受けるので、GS 活性を測定することによってはその誘導因子を正確に決定できなかったからである。ところが上に述べたような GS 遺伝子の 5'上流域を GUS 遺伝子と連結したキメラ遺伝子を導入したタバコにおいては、遺伝子の発現を GUS 活性を測定することによって調べることができる。そこで我々は GS 遺伝子の発現を誘導する因子を検討するために、RGS 28 に対応する遺伝子の 5'上流域 (2kb) と GUS 構造遺伝子とのキメラ遺伝子(下図

NH₄⁺、NO₃⁻、カザミノ酸、そしてGS 活性阻害剤である methionine sulfoximine (MSO) を与え、誘導される GUS 活性を測定したところ、NH₄⁺、MSO により GUS 活性が誘導されることが明らかになった。従って GS 遺伝子の直接の誘導物質はNH₄⁺ であろうと推定された。

参照)を導入したタバコの葉に、



矮化遺伝子(rolc)5'側非転写領域の特異的構造と結合タンパク 質- AT-1 boxおよび octamer配列の存在について ・ 金谷 潔、早川克志、内宮博文(筑波大生物)

我々は、土壌細菌 Agrobacterium rhizogenes の持つRiプラスミドより、矮化等の形態変化を誘導する遺伝子 rolC (RiプラスミドTL-DNA のORF12)を同定した。 タバコ毛 状根に存在する rolC 5'上流域に結合するタンパク質の存在については昨年の本大会で報告した。 今回は同様な結合タンパク質が単子葉植物であるコムギの胚芽組織にも存在すること、またその結合部位の特徴について報告する。

コムギ胚芽を0.25 M ショ糖を含む buffer(pH 7.9) を用いホモジナイズし、遠心 (700 xg) 後粗核画分を得た。その後、percoll gradient により精製し、0.35 M NaClを含む buffer で核タンパク質を溶出した。得られたタンパク質と rolC 5'上流域(144塩基対) DNA断片を probe とし、gel shift assay を行ったところ、結合タンパク蛋白の存在が確かめられた。この核タンパク質を bacterial alkaline phosphatase (BAP)、 calf

intestine alkaline phoshatase (CIP) で処理すると、DNA結合能が抑えられた。同様な処理をタバコ毛状根の核タンパクで行っても、結合活性に変化はみられなかった。このことから、コムギ胚芽核タンパクとDNAとの結合反応にタンパク質のリン酸化が関与していることが示唆された。

核タンパク質の硫安塩析を行ったところ、 30-60 % 飽和画分にDNAとの結合活性が検出された。この画分を用い、DNaseI footprinting を行い、コムギ胚芽核タンパク因子の結合部位を同定した。 $poly[dI-dC]poly[dI-dC]を1\mu$ g合む buffer で 3μ gから 100μ g までのタンパク質を probeと反応させ、DNaseI処理を行った。その結果<math>rolC上流の-158塩基から +23塩基までの間の領域には、3r所の結合部位があることが明らかになった。Box Π と名づけた結合領域内には、植物の光感受性遺伝子に見られる保存配列のひとつであるAT-1 box (AATATTTTTATT)、動物の発生に関わるホメオティック遺伝子の保存配列のひとつである octamer 配列 (ATTTGCAT)が見られた。以上のことから rolC プロモーター領域に認められる DNA 結合タンパク質の認識する配列は、植物が本来持っている種種の遺伝子の転写制御に関与している可能性が強く示唆される。

レポー・ター 遺伝子による 分化始原細胞の分析 ウ内宮博文、藤井伸治、菅谷純子 (筑波大学・生物科学)

植物個体は生殖細胞や体細胞を始原として分化した種々の器官より構成されている。成長しつつある種子植物においては、成長点部位における分裂細胞を起原として、葉や花器が分化する。一方、不定根は、皮層の内部に存在する師部組織の細胞より分化することが知られている。

我はRiプラスにGUS細るをGUS細るをGUS細るをGUS細るをGUS細るをGUS細るをGUS細るをGUS細るをGUCuronidase(GUS)細るのであるは、 β の β の

一の活性化が認められた。 そこで、 同様のキメラ遺伝子を持つニンジンの培養細胞を作成し、 胚発生に伴う遺伝子発現を解析した。 その結果 ニンジンカルスを 2,4-Dを含まない培地に移し分析したところ 不定胚形成に伴って GUS活性の上昇が観察された。 また、 組織化学的観察の結果 不定胚発生の初期においてレポーター遺伝子の発現が認められた。 従って、 rol C プロモーターは、 胚発生における細胞の起原を探る上で有効であるものと考えられる。

次に、細胞特異的発現に関与するシス配列の決定を行った。その為、エキソヌクレアーゼⅢを用いた5′上流からのプロモーター領域の欠損変異体を作成し解析を行った。その結果、特定の領域に細胞特異性に関するDNA配列が存在する事が明らかになった。

トランスジェニック植物におけるRiプラスミド rolC遺伝子産物の解析

'大野 豊、里見 透、内宮 博文 (筑波大•生物科学)

土壌細菌Agrobacterium rhizogenesのRiプラスミドTL-DNA領域の遺伝子発現は、植物に様々な形態変化を引き起こすことが知られている。我々は、これまで、TL-DNA領域に存在するORFのひとつであるrolCをタバコに導入し、rolCが矮化や頂芽優勢の減少、花の形態変化、開花期の促進、培養根の生長等を引き起こすことを明らかにしてきた。本研究では、形質転換体内におけるRolCタンパク質の存在とその細胞内での状態を調べるため抗RolC抗体の作成を試みた。

<u>rolC</u>遺伝子を含むDNA断片を発現ベクターpEX3に挿入し、pEX3-<u>rolC</u>を構築し、 β -ガラクトシダーゼ(Lac)との融合タンパク質の形での発現を試みた。その結果、大腸菌の不溶性 画分に多量に融合蛋白質が認められた。このタンパク質はTritonX-EDTAに不溶であることから、大腸菌内で封入体を形成していると考えられた。そこで、このタンパク質をSDS-PAGEで分離し、ウサギを用いて抗血清を作製した。

得られた抗血清を、大腸菌pEX3およびpEX3-<u>rolC</u>より抽出したTritonX-EDTA不溶画分のタンパク質を用いアフィニティー精製し、Lacタンパク質には親和性がなく、Lac-RolC融合タンパク質に吸着するような抗体を得た。

植物(Nicotiana tabacum SR1)からのタンパク質の抽出は、水耕栽培した植物の根及び培養根を用いた。タンパク質を200,000xgの遠心にかけ分画し、それぞれをSDS-PAGEにかけた後ウエスタンブロッティングをおこなった。その結果、抗体はrolc 形質転換体の根、培養根のみに存在する分子量22,000の可溶性タンパク質と反応した。

以上のことから、rolC(0RF12)遺伝子の産物が、rolC形質転換体において分子量22,000の可溶性タンパク質として実在することが示唆された。

T-DNA転移の分子機構: VirD4タンパク質のAgrobacterium細胞膜局在性 岡本繁久、伊藤賢治、山本章子、町田泰則(名大*理*生物)

Agrobacterium tumefaciensは双子葉植物に感染し、クラウンゴール腫瘍を形成する。 腫瘍形成の初期過程であるT-DNA転移には、Tiプラスミド上のVirulence領域の遺伝子が重 要な働きをする。その内の一つvirDオペロンには四つの遺伝子が存在し、virD1, virD2は、 Agrobacterium細胞の中で起こるT-DNAの再編成反応に関与することが知られている。 しか し、残りの二つ遺伝子(D3、D4)については不明な点が多い。本研究では、腫瘍形成に必須 であるvirD4遺伝子がT-DNA転移に果たす機能を解明するために、VirD4タンパク質のAgrobacterium細胞内の存在部位を調べた。まず、VirD4/アルカリ性フォスファターゼ(AP)融合 タンパク質を作製し、それが酵素活性を有することを明らかにした。この融合タンパク質 が酵素活性を持つためには融合タンパク質のN末端がシグナルペプチドとして機能し、AP部 分が内膜を通過してペリプラズムへ移行することが前提となる。したがって、上記の結果 は、VirD4タンパク質のN末端が分泌のためのシグナルペプチド配列であることを示す。次 に、Agrobacterium細胞を細胞分画し、ウエスタン法でVirD4タンパク質の細胞内分布を調 べたところ、そのほとんどが膜画分から検出された。さらに、Agrobacteriumの内膜(細胞 質膜)と外膜を分離し、VirD4タンパク質とVirD4/AP融合タンパク質の膜分布を調べたとこ ろ、VirD4タンパク質は内膜及び外膜画分の両方から検出された。一方、融合タンパク質は 内膜画分から検出された。これらの結果は、VirD4タンパク質がそのN末端側領域で内膜と 結合し、C末端側領域のどこかで外膜系と結合していることを示す。以上のように、VirD4 タンパク質は内膜と外膜の隣接している場所に存在している可能性が考えられる。 大腸菌 でもこの様な膜領域(Bayer's junction)の存在が知られており、また、その領域はT2及び Φ X174ファージが吸着し、DNAを送り込む場所として知られている。したがって、Vir D4は T-DNA転移中間体の通過する構造体を形成していると類推される。

トウモロコシのトランスポッシAcとDsのイネへの事人と転移。トランスポッツの脱離により生ずる塩基配列、飯田養は井沢毅で、山本幹傳で寺田理枝で宮崎から原本中で、「東理大・基礎工」、「植工画で)

トウモロコシのトランスポッシュ Ac 及び Ds は現在知られているトランスポッシ中最初に発見され、また高望植物中最も詳細に研究されているトランスポッショる。 Ac はれらいさ、その内部に転移に必要な転移酵素遺合子をコードしてむり自ら転移できるので自律性転移因子と呼ばれる。一方、Ds は多くの場合 Ac の内部欠失変異務事体であって、 本性を転移酵素を生於できず、 Ac が失存した時のみ Ac の取を酵素の作用により転移できるようになるので非自律性因子と呼ばれる。 Ac Qu Ds の転移機構はトウモロコシに於ける遺伝学的研究により、トランスポッシが教育体上の挿入されていた部位から脱離して新た存部位に再挿入する保存的転移を行うものと考えられている。 Ac マ Ds は新た存部位に挿入されるとをこにも中の標的重複を起す。またこれら因子の脱離の際には、脱離された部位にいたなりが再編成が起ることが知られており、これをFotprintsと呼ぶ。挿入によって起る標的重複はほとんど全ての生物種のトランスポッシを開発されているが、脱離によって起る標的重複はほとんど全ての生物種のトランスポッシではけにみられる特徴的を現象である。

我もはこのAceDs をイネをどの異種植的に事入、トランスポゾレタッギレグにより た知慮できの分離同定法を確立する為の第一歩として、CaMV 35な プロモーターとハイ グロマイシン耐性(Hum)遺合子の間にAceDsを入れたプラスミドを構築し、イネプロト プラストに直接法により事入した。この際自律性転移回子Acをもつアラスミドは単独で導 入し、Dsの場合にはAcをもつプラスミドかAcの転移酵素遺伝子をCaMVの355プロモ ーターで活性化できるようにしたプラスミドかAcの転移酵素遺伝子をCaMVの355プロモ ーターで活性化できるようにしたプラスミドと同時に事入した。この結果、AcをDsの転移につけるはできるようにしたプラスミドと同時に事入した。この結果、AcをDsの転移によってHux と後、たイネ形質転換体中でAc B 以 Ds が転移していることを確認し、第12回日本分子生物を含む含で発表した。今回はさらに奪入イ 本細胞中でAc B 以 Ds の転移により生ずるFootprints について検討し、既に知られているトウモロコシをどで観察された Footprints と比較して、事入されたトウモロコシのト ランスポゾレAc B 以 Ds の異種植的であるイネにがける転移について方案したい。

パーティクルガンによる植物細胞への遺伝子導入と発現 (第4報)

森川弘道、〇鎌田光宜、飯田朝子、関原明、山田康之 (京大農、細胞実験センター)

演者らはガス圧(チッソボンベ圧¹⁾および圧縮空気圧)を駆動力とするパーティクルガンによる植物細胞への遺伝子導入について研究を進めている。 今回は圧縮空気圧式装置によるタバコ葉などの組織の細胞への遺伝子導入についての実験結果を報告する。

演者らの開発した圧縮空気圧式装置(本装置の開発は東京ライフル(株)との共同による)はプロジェクタイルの加速圧力を220kg/cm²以上(プロジェクタイルの初速度 = 440m/s以上)まで連続可変である。

実験材料としてタバコ (Nicotiana tabacum cv. Samsunおよび N. tabacum cv. Petit Havana SR1)の無菌培養植物の葉切片を用いた。 寒天培地を入れた内径5.2cmのシャーレー面に葉切片を並べ、一定期間 (0-4日間)前培養した後導入実験に用いた。 プラスミド DNAとしては pB I 2 2 1 または pCa H V N E 0 を用いた。 プラスミド DNAをエタノール 沈澱によりコーティングした金粒子 (径1-3ミクロン、 Alpha Chem Co.)をエタノールに懸濁し、 その懸濁液の一定量をプロジェクタイルの上表面に展開 (4 μg DNA/mg金粒子、 0.2 mg金粒子/プロジェクタイル)、 乾燥させた。 ストッパーー試料間の距離を 5 cmまたは 10 cmに固定、 減圧下 (60 mm Hg)、一試料あたり 1-3 回金粒子を撃ち込んだ。遺伝子導入処理後、 26°C、 明所で一定期間培養した。 遺伝子導入処理後 24時間に x-Gl c Aを含むアッセイバッファーを添加した。 さらに 24時間インキュベートした後、青色スポット (トランジェントに GU S遺伝子を発現している細胞からなる)を観察した。また、 70 % エタノール処理により脱色してコントラストをつけた。

加速圧力の効果を検討したところ、GUS遺伝子を発現した細胞からなる青色スポット数は115-150kg/cm²で最大となった(5.2cmシャーレ当り、100-250個)。 葉の横断切片を作製、観察した結果、多くの場合、表皮細胞は淡青色、表皮下の2-3層の細胞が濃青色を呈した。したがって、調べた撃ち込み条件下では金粒子は表皮細胞を貫通するものと考えられる。また、表皮細胞が濃青色を呈する場合も観察された。前培養の効果を調べると培養2日が最もよい結果を与えた。現在、カナマイシン抵抗性遺伝子によるトランスジェニック植物の育成を目指して、カナマイシン抵抗性カルスの選抜を進めている。

1) H. Morikawa, A. Iida and Y. Yamada. Appl. Microbiol. Biotechnol. 31:320-322(1989).

ラン藻への遺伝子導入

細谷義孝、北廣恒司、芦田直美、澤 嘉弘、柴田 均、 落合英夫

(島根大、農、生物機能学)

(目的) 光合成能を持つ原核性生物としてのラン藻は、その多機能性のゆえに基礎生化学、応用生化学的に強い関心を集めている。 私達はこれまでに糸状性好温性ラン藻 Phormidium lapideumが光発酵能¹⁾を有し、また高度に耐熱性の諸酵素を有することなどを報告してきた²⁾。 この様な興味ある性質の解明、有用な機能の開発を更に進めるためには、本ラン藻への遺伝子導入技術を開発する必要がある。この目的のために、今回はその基本的条件の検討を行ったのでその成果について報告する。

(方法) 一般に糸状性ラン藻類はその制限酵素系が強く作動している場合が多い。従って糸状性ラン藻類への遺伝子導入技術として、 1. 直接導入法 2. 接合伝達法などがあるが、いずれの場合もその制限系に対する防護対策を講ずる必要がある。 P.lapideumの制限酵素について調べ導入すべきプラスミド遺伝子には、それらの制限酵素によって犯されなくするためメチル化修飾を施した。プラスミドとしてはPhormidium foveolarumより抽出単離した pPF1プラスミド(1.5 Kb)と pBR322とのキメラプラスミド、及びメチル化 pBR322、メチル化 pUC104などを用いた。 後二者についてはすでに、単細胞性ラン藻 Anacystis nidulans R2への遺伝子導入とその形質発現に成功している。遺伝子導入に際しては Electroporation法も併用した。

(結果) 1. Phormidium lapideumは二種類の制限酵素Pla I, Pla II を有していた。Pla II はHae IIIの、Pla II はNsp(7524) VのIsoschizomerであった。 2. P.lapideum自身はプラスミドを有しておらないので、P.lapideumと同系列のP.foveolarumより2種類のプラスミドを抽出単離し、それぞれをpPF1、pPF2と名付けた。このうち約1.5 K b を有するpPF1の制限酵素に対する挙動を調べた。 3. pPF1をCla I で切断し、pBR322とのキメラプラスミドpPF1-pBR322を作製した。更にそのsubclone、pHSG298sub(約4.5 K b)も調製した。 4. これらのプラスミドをM.Hae IIIで処理してPla I による切断より保護した。5. 断片化処理を施したP.lapideumに対するメチル化プラスミドの導入条件を検討した。1).Agric.Biol.Chem., 50 1361 (1986). 2).J.Biochem., 104, 917 (1988).

植物種子のTi-プラスミド-アグロバクテリア系による形質転換条件

山際洋子、西川正信、鈴木克周、吉田和夫 (広島大学・理・生・植物)

近年、Agrobacterium tumefaciensのTiプラスミドによって、外来遺伝子を植物細胞に導入し、形質転換植物を作出する方法がタバコ等の植物において確立されている。このための従来のプロトプラスト感染法や、リーフディスク法は有効な方法であるが、宿主植物の培養系が確立していない植物種では、個体への分化が困難であったり、また培養系が確立されていたとしても、Agrobacterium の感染、その他形質転換細胞選抜のための薬剤の培地添加によって植物細胞の増殖や脱分化/再分化は、抑制されがちである。植物種子に直接Agrobacterium を感染させることによって形質転換植物を作出することが可能となれば、完全な植物成長個体となるまでの期間もプロトプラストやカルスからスタートするのに比べ、格段に短縮され、有効な方法となり得るであろう。シロイヌナズナ(Arabidops is thaliana)の発芽中の種子に Agrobacteriumを感染させることによって外来遺伝子を導入する事が報告されている。(1) しかし、再現性、作出頻度・条件、他の植物種子への応用など不明の点が多い。

我々は、Agrobacterium 感染による種子への外来遺伝子導入条件を検討し、形質転換植物作成のための方法を改善しようと試みている。本実験では、Tiプラスミドベクター系を用いる方法でタバコ (Nicotiana tabacum) およびレンゲ (Astragalus sinicus) の種子に、遺伝子導入を行なった。YEB液体培地中で一晩培養した Ag. tumefaciens LBA4404 (pLA4404,pBI121)を MS 液体培地中で、12~24時間、28℃、明所下で共存培養することによってタバコとレンゲの種子へ感染させ、種子へのGUS、NPT-Ⅱ遺伝子の導入を試みた。カナマイシンを含んだMS 0.8%寒天培地または 0.8%寒天培地上で発芽後、選抜を行なった。感染処理によりカナマイシン耐性を持つ植物個体が得られた。得られた植物個体の細胞抽出液には、弱いながらもGUS活性が検出されたが、維管束でのGUS活性はみられなかった。種子への感染は、種子の表層部分のみである可能性もあり、現在その結果を検討中である。なお、検出されたGUS活性が植物個体表面に付着した Agrobacteriumのものでないことを検証するための細菌を選抜しているので合わせて報告したい。この種子感染系におけるシグナル物質であるアセトシリンゴンの効果についても報告する。

文献(1) Kenneth A. Feldmann and M. David Marks (1987) Mol Gen Genet 208;1-9

1Dp01

テンサイ懸濁培養細胞に対するウサギ血清の影響について

●増田宏志、菅原四郎 (帯広畜大・農化)

テンサイ懸濁培養細胞は培地にウサギ血清蛋白質(IgG)を添加して培養すると、その一部が破壊される現象が観察され、さらにこのIgGと結合する蛋白質が細胞壁および培養培地中に存在することを見いだしたので報告する。

ウサギ血清および血清から塩析、DEAE-Celluloseで精製したIgGを添加したMurashige-Skoog液体培地で細胞を培養すると、一部の細胞 と細胞壁が破壊される(Fig.1)。この細胞破壊は 細胞添加後2~3日目で最大となり、培地中のIgG 濃度が0.1mg/ml培地以上で起る。FITC標識IgGを 調製し、それを添加した培地で培養した細胞を観 察したところ破壊した細胞の細胞壁にIgGが結合 していることがわかった(Fig.2)。これはIgGが細 胞壁と結合することにより細胞が破壊される可能 性を示唆している。そこでIgGと結合する細胞壁 蛋白質の存在を調べた。細胞壁を調製し、細胞壁 蛋白質を食塩、次いでEDTAで抽出し、SDS-DAGE、 ウェスタンプロッテイングを行ない、IgG結合蛋 白質をパーオキシダーゼ標識第2抗体で検出した。 その結果、主にIgG結合蛋白質はEDTA抽出画分に 見いだされた。また、この蛋白質とIgGは Ouchterony法では沈降反応は確認されなっかた。 この種の蛋白質は細胞外分泌型蛋白質中にも存在 した。IgG結合蛋白質の精製はEDAE-Cellulose、 Buthyl-Toyopearl、Sephadex G-200、電気泳動等 で行なった。市販の牛血清γーグロブリンと牛血 清アルブミン、ヒト血清アルブミンも同様に細胞 破壊を引き起した。

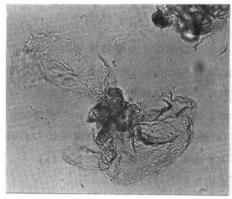


Fig. 1

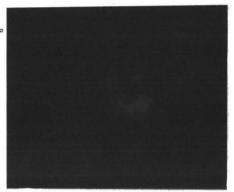


Fig. 2

ニチニチソウ培養細胞における2,4-D飢餓、再添加によって誘導される同調培養系の確立

西田敏昭・○大西直人・児玉浩明・駒嶺穆(東北大・理・生)

高等植物における細胞増殖の制御機構の解明は、高等植物の生理現象を明らかにする上で、非常に重要な問題の一つである。高等植物の細胞増殖の制御にはオーキシンが大きく関わっている。この高等植物のオーキシンによる増殖の制御機構を解明していく上で、外生オーキシンによって増殖が制御されるような培養細胞系の確立は、非常に有効な手段になると考えられる。

ニチニチソウ(Catharanthus roseus (L.) cv. Little-Pinky)の葯からカルスを誘導しさらに液体培地中で懸濁培養したところ、培地中の2,4-Dに依存した細胞増殖を示す細胞株を得た。この細胞株をTN21 strainと名付けた。植継ぎ後8日目のstationary phaseにあるTN21 strainを、2,4-Dを含まないMS培地で4~5回洗浄し $6x10^5$ cell/mlになるように希釈した後、2,4-Dを含まない培地でさらに二日間培養して2,4-D飢餓処理を行なった。この間細胞数の変動は見られなった。ここで最終濃度が $4.4x10^{-6}$ Mになるように2,4-Dを培地中に直接添加することにより、同調的な細胞分裂が誘導された。2,4-D添加後12中間目の3時間の間に $70\sim80$ %の細胞分裂が観察された。分裂指数は2,4-D添加後12時間目までは1%以下であったのに対し、14時間目でピーク(約1%%)に達し、18時間目では1%以下に低下した。18+17-TdRのDNA画分への取り込みは、18-D添加後19時間目にピークに達した。このように細胞分裂に先立ってDNA合成が起こることから、18-D飢餓処理により18-TN21 strainは19-Qに停止していることが考えられる。また19-Qの一般処理により11-TN21 strainは数日間にわたって見られなかった。

次に2,4-D以外のオーキシンによる増殖への影響を検討した。2,4-D飢餓処理後、NAAを投与した場合では2,4-Dの時と同様に細胞分裂が観察されたが、IAAを投与した場合では、細胞分裂はほとんど観察されなかった。IAAによる増殖の誘導が見られないのは、細胞に取り込まれたIAAが細胞内ではすみやかに分解されてしまうためと考えられる。またオーキシンアナログとして2,3-D、2,4,6-Tを単独で2,4-D飢餓処理したTN21 strainに投与したところ、細胞数の増加はまったく観察されなかった。

以上のことから、TN21 strainにおいて、オーキシン飢餓、再添加による同調的な細胞分裂を誘導する系が確立された。今後はこの系を用いて2,4-Dによる増殖の制御機構の解明に取り組む予定である。

ニンジン不定胚分化初期過程における分裂活性の推移と組織構築の三次元画像解析

○藤原 有仁・川原良一・福田裕穂・駒嶺 穆 (東北大・理・生物)

演者らの研究室ではニンジン培養細胞において、細胞数が少なく、細胞質に富む小さな細胞塊(これをState 1と呼ぶ)を分画し、これを分化誘導の出発材料とすることで、高頻度、同調的に不定胚が誘導される実験系を確立した。この系を用いて不定胚形成過程の連続観察を行ない、以下のような結果を得ている。不定胚分化誘導後、State 1でははじめ細胞塊全体にわたってゆっくりとした細胞分裂が数回起こり(この時期をPhase I と呼ぶ)3~4日目にかけて細胞塊の一部分の細胞が急速な細胞分裂を開始して(この時期の細胞塊をState 2と呼び、State 2から球状胚までの期間をPhase I と呼ぶ)、不定胚を形成してゆく。演者らはこの不定胚分化初期過程における分裂活性の推移を解析するために $[^3$ I] チミジンの取り込みによるIDNA合成活性の組織内での動向をIPhase I で追跡した。

[3H]チミジンによる核の標識はPhase Iの後期(分化誘導後48時間目)、Phase II初期(分化誘導後72時間目)、同中期(分化誘導後96時間目)よりそれぞれ24時間行い、また取り込まれた[3H] チミジンの動向を追うため各々24時間または、48時間チェイスをした。[3H]チミジンの取り込みは連続切片を作製しそのオートラジオグラフィーで検出し、DNA合成を行った核の立体分布パターンはコンピューターでオートラジオグラムを3次元再構築し解析した。不定胚分化誘導後48時間目から24時間標識した場合の分布パターンはランダムであり、この時期に細胞分裂に局在がないことが示唆された。また同様に標識を行ったものをチェイスすると球状胚に分化した時点で胚柄様細胞群付近に標識が残存し、胚柄様細胞群はPhase Ⅱの初期には分裂活性が低下することが明らかとなった。分化誘導後72時間目から96時間目にかけて標識された細胞塊のDNA合成を行なっている細胞の分布は細胞塊内で局在していた。またチェイスしたものでは、標識は不定胚の中心部分(前形成層)、及び最外部(前表皮)で疎であり、胚柄様細胞群では全く認められなかった。96時間目から24時間標識された不定胚は、不定胚本体全域の細胞に取り込みがみられたが、胚柄様細胞群には全く見られなかった。同様に標識を行ないチェイスしたものでは前形成層、前表皮に標識が疎で、皮層には比較的多く認められた。

以上の結果をまとめると次のようになる。State 1をオーキシンを含まない培地に移して培養を開始し不定胚分化を誘導すると、State 1でははじめの3日間程細胞分裂は細胞塊全域にわたってランダムに起こる。ところが4日目になると細胞塊の一部分に分裂が局在し、その部分の急速な分裂により球状胚が形成され、残りの部分は胚柄様細胞群となる。 また、球状胚の本体では、はじめのうちこそ分裂活性に差が現れないが、 前組織の分化に伴い前組織間で分裂活性に差が見られるようになり、その高い順に、 前表皮≃前形成層>皮層>胚柄様細胞群、となる。

cAMPによるトレニア茎切片からの不定芽誘導

石岡奈穂子、[●]谷本静史(佐賀大・農・生物工学)

高等植物の不定芽分化の制御機構を明らかにするために、演者らは材料としてトレニア(Torenia fournieri)の茎切片を用いて検討を加えてきた。トレニア茎切片では、誘導刺激によって不定芽原基である分裂域(meristematic zone; MZ)が表皮組織に形成され、MZが発達して不定芽となることがわかっている。MZ形成が傷害や嫌気処理、サイトカイニンやCa²⁺-イオノフォア・A23187の培地への添加等によって促進されることはすでに報告してきたが、今回はMZ形成に対するサイクリックAMP(cAMP)の関与について検討したので、その結果を報告する。

トレニアの長さ5 mmの茎切片を庶糖 3%を含むMS培地上で培養し、1週間後に表皮をはぎ取って表皮上に形成されたMZ数を測定することにより不定芽分化に対する各種の物質の影響を調べた。培地中にdibutyryl cAMPを添加するとMZ形成数は9倍に増加した。また c A M P 合成酵素のadenylate cyclaseに対する活性化剤であるforskolinやprostaglandin E_1 , c A M P 分解酵素であるphosphodiesteraseの阻害剤のtheophyllineやisobutyl methyl xanthineを添加することによってもMZ形成の促進がみられた。これらの物質と同時に、サイトカイニンによるMZ形成を阻害する坑サイトカイニンを添加したところMZ形成は抑制されなかった。さらに c A M P の内生量は上記の物質およびサイトカイニンやA 2 3 1 8 7 の添加によって 3 ないし 4 倍に増加していた。従って、不定芽分化には c A M P が重要な役割を果しているものと考えられた。動物細胞や微生物では、 c A M P は c A M P 依存性protein kinaseを介して生理現象を制御していることが知られているので、protein kinaseの阻害剤を添加したところMZ形成は阻害された。

以上の結果から、サイトカイニンやA23187などが内生cAMP濃度を上昇させ、そのcAMPがcAMP依存性protein kinaseを活性化させることによって不定芽分化を制御しているという機構が考えられた。このprotein kinaseがどのような蛋白質を燐酸化して不定芽分化を誘導するのかという点については現在検討中である。

コーヒー(Coffea canephora)の体細胞胚形成と植物生長調節物質との関係

畠中知子 安田武司¹ 内田直次 山口禎¹ (神戸大・自然科学 ¹神戸大・農学部)

コーヒーは熱帯原産の木本植物であり、その種子は飲料として世界に広く普及している。経済的に有用な種はアラビカ、カネフォラ、リベリカの3種である。主に実生によって繁殖されているが、本研究で扱うカネフォラ種は自家不和合性であり、優良樹のクローン繁殖のためには組織培養法は有効な手段である。カネフォラ種はアラビカ種にはない葉錆病抵抗性を持ち、コーヒー属の中では最も早く組織培養による再分化に成功した種である(Staritsky, 1970)。しかもアラビカ種よりはるかに短期間で体細胞胚を形成するため、木本植物の再分化機構を研究する上でも有用な材料である。本研究ではこのカネフォラ種の葉切片を無菌培養して、体細胞胚形成に及ぼす種々の植物生長調節物質の影響を調査した。

カネフォラコーヒー葉の培養では植物生長調節物質として2-イソペンテニルアデニン (2-i P) とインドール酪酸(IBA)を用いた報告がある(Piersonら 1983)が、2-i Pの濃度を一定にしてIBAの濃度を変えて培養したところ、IBAによる胚形成促進効果はほとんどみられなかった。オーキシンをナフタレン酢酸(NAA)に代えて調べたところ、NAAは濃度の上昇とともに苦しく胚形成を阻害した。サイトカイニンの種類ではベンジルアデニンより2-i Pが効果が高く、2-i Pの濃度では5 Mが胚形成に最も有効であった。このように植物ホルモンとしてサイトカイニンのみを用いることにより、カルス増殖することなしに体細胞胚が形成される。最適条件下では培養5 週間以内に葉切片当り150個以上の胚様体が得られた。培養期間中、3 週間以内にホルモンフリーの培地に移植すると、胚形成はほとんどみられず、胚形成誘導までに最低3 週間のサイトカイニン処理を要した。体細胞胚は葉切片の切り口にのみ、特に培地との接触部に多く形成された。

また、培養途中にエチレンの前駆物質であるACCを滴下処理すると胚形成が抑制されたが、ACCの前駆物質であるSAMの処理では促進された。ACC合成酵素の阻害物質であるAVGを処理すると、体細胞胚の発達は促進されたが形成された体細胞胚数は減少した。SAMの他の働きとしてメチル基供与とアミノプロピル基供与(ポリアミン合成)があり、メチル化反応とポリアミンの役割が重要であると思われる。

。神山俊治³・畠中知子²・仲西孝弘¹・安田武司¹・内田直次²・山口禎¹ (¹神戸大・農,²神戸大・自然科学,³長瀬産業)

コーヒーは、世界的に重要な嗜好飲料のひとつであり、熱帯の重要な経済作物である、永年作物であるコーヒーは、通常は種子繁殖が行われているが、栽培適地も限られているため、組織培養法を用いた栄養繁殖、品種改良法の開発は有意義である。アラビカコーヒーの葉切片を植物ホルモンとしてサイトカイニンのみを含む培地で培養し、体細胞胚形成しながら増殖するカルスが得られた。このembryogenicカルスを、10μM 2,4-D を含む培地に移植したところ、黄色と白色の2種のカルスが得られた。これら2種のカルスを肉眼的に分離し継代培養した。これらのカルスを5μM 2iPを含む改変MS培地に移すと黄色のカルスは体細胞胚を形成したが、白色のカルス(W)は形成しなかった。

黄色のembryogenicカルス(Y~E)を4週ごとに継代しているが現在でも体細胞胚を形成することが認められる.一方、継代培養中、外観はほとんど同じであるが、少し色調の異なった黄色カルス(Y~NE)が得られたので分離して培養したところ 2iP培地に移植しても全く体細胞胚を形成しなかった.これらの2種の黄色カルスは体細胞胚形成機構を調べるのに非常に有効な材料と考えられる.

体細胞胚形成の機構解析の一つとして、これら2種(Y-E,Y-NE)のカルスを用いてタンパク質の差異について検討した。2種のカルスは $10\,\mu$ M 2,4-D,0.3%Gelriteを含むM S 培地に、2週ごとに継代培養した。植え替え後2週目のカルスを、種々のタンパク保護剤を含む0.25M sucrose-MOPS/KOH緩衝液で破砕後、遠心で分画した。水性二層分配法による細胞膜の分画も試みた。

2種のカルスの可溶性画分のSDS-PAGEのパターンをみると、 $22k \ge 18k$ のタンパク量の比率が異なったが、ほとんど同じであった。embryogenic カルスの特徴は不溶性画分にあると考え、 10^3 g、 10^4 g、 10^5 g 画分及び水性二層分配法の膜画分などのタンパクパターンを比較したところ、種々の差異が認められた。外観の異なる白色の non-embryogenicカルスは、黄色のカルスとは、かなりの差がみられるので、これら黄色 2 種 (Y - E, Y - NE) は体細胞胚形成能を持つカルスの特徴を調べるのに非常に有効な材料であることが認められた。

再分化能をもつインド型イネ培養細胞の 特異的タンパク質について °仲西孝弘・神山俊治¹・安田武司・内田直次²・山口 禎

(神戸大・農、1長瀬産業、2同・自然科学)

インド型イネ(Oryza sativa L.) 培養細胞からの再分化の機構解明を目指し、形成カルスの再分化能の異なる品種、また、植物ホルモンのカルス誘導時の濃度を変えることにより、分化能に違いを持つ種々のカルスを得、それらのカルスの特にタンパク質について調べることにより、再分化能を持つ培養細胞の特徴について検討した。

材料品種として,カルス形成量がほぼ同じで,特に,カルスの外観が非常に似ている3品種,比較的再分化しやすいTriani(T), $Nona\ Bokra(N)$ と再分化しないBaisbish(B)を用いた.成熟種子胚を,2,4-Dを含んだMS培地上でカルスを誘導した。これらのカルスからタンパク質を抽出し,SDS-PAGE,2-D 電気泳動で分析した.

3 品種のインド型イネから,2,4-Dの濃度を $1\sim125\,\mu$ Mまで変えて誘導したカルスは,その誘導濃度によって生成されるカルスの再分化能が異なった.そこでこれらのカルスから抽出したタンパクをSDS-PAGEで調べたところ再分化能をもったカルスに共通して出現する約40kDのポリペプチドが認められた.このポリペプチドは,0.25M sucrose-MOPS/KOH(PH 7.6)では可溶化されず,1%-SDSの存在下で可溶化した.また1% NP40や0.5% TritonX100ではほとんど可溶化できなかった.

そこでこのボリペプチドの細胞中での存在をより明らかにするために,遠心分離法,水性二層分配法により細胞を分画しSDS-PAGEで分析した.上記のボリペプチドは,遠心100gx5minで沈降する画分(核を多量に含む)に存在することが認められた.また,約40kDと同様に出現,消失する約22kDのボリペプチドも認められた.また, $10^4gx15min$ で沈降する画分 $10^5gx30min$ での上澄の画分,また 10^5g で沈降する画分のうち細胞膜以外の画分には大きな差が認められなかった.細胞膜画分には再分化能力が高いと消失するボリペプチドが認められた.

1000gで沈降する画分を2-D電気泳動でさらに詳しく調べたところ約40kDのポリペプチドは3つのスポットに分離されそれぞれplは,6.3,6.0,5.7であると推定され、約22kDのポリペプチドは約8.5の塩基性タンパクであることが認められた。

光誘等アントシアン合成系の酵素活性、MRNAレベルに対する 柱皮酸の効果

竹田淳子,阿郊俊之助. 篠崎眞輝 (京大. 殿· 耀化, "鱼缬大. 舰· 舰· **京大. 觀. 粮生)

ニンジン培養細胞のアントシアン合成が 光(UV-B)により誘導されること、他の弓くの二次代謝生成物がそうであるように合成に関すする諸酵素が 活性、m-RNAレベルともに時間差を持ちながら協調的に発現することを示して来た。このような量伝子の登廻には代謝の中間生成物が関すしているものと考えられているが今のとこる明確乃証拠は得られていない。 牧をロニンジン培養網胞を用いて二次代謝の入口に位置するフェニールアラニンアンモニアケアー ゼ(PAL) について、反応生成物 挂皮藤(CA) の効果について調べた

配果について報告する。

秋軒は、里田立す人参の下胚軸自来のサスペンジョンで、アントション誘導には、 2.4-Dを除去した後、治に希釈した改変 Lin-State 塔地に 10⁷M Zeatani Bu 4% Snunse E混加したもので5月 向賭培養した後光興射により行った。 CAの浮かりは光照射 30分前に行った。

CA 短加トよりアントシマン生成は低濃度(ハISMM)では促進すれるが、高濃度(ハ200 MM以上)では阻害でれる。 PAL活性は光虹射トより、約3たのlagの後増大し 約12たご最大ト連する。 鳥濃度 CA 延加トより的/5んのdelayを生するが 最大値トは影響しない。 M-RNAは 光虹射後、1.5んのlagの後増大、約45んで最大ト連するが、 CA 芝加トより (15MM. 200,MM), /5んのdelayを生じ 約60 R後 最大に運する。 200,MM CA 老加の場合、最大値は無深200 約2倍ト連する。このことは、CA が光により誘手でいる PALの tamocrintion ト delayをみえるのみで 凹塞しない、むし3 高濃度では促進していることを示して がり、Wunding、 Flicton トより誘手でよる PALとは要なることを示している。一方 tamo-latin は 活性の 酵素量と考えると あしる高濃度 CA では 効率が下がっているようト 見らいる 活性の 酵素量と考えると なしる高濃度 CA では 効率が下がっているようト 見らいる 添り ロトより フェー・ルプロバノイト代謝を物の動向を 割へたところ、 CA 添加トより大きく促進される YUN Pack を 授出して おり 理を同定中である。 さらに CA 添加トより 光トより 誘手を 1 のる YUN Pack を 授出して おり 理を同定中である。 さらに CA 添加トより 光トより 誘手を 1 のる YUN Pack を 授出して おり 理を同定中である。 さらに CA 添加トより 光トより 誘手を 1 のる YUN Pack を 授出して おり 理を同定中である。 さらに CA 添加トより 光トより 誘手を 1 のる YUN Pack を 授出して おり 現を同定中である。 さらに CA 添加トより 光 1 のまで 報告する。

ヨウシュヤマゴボウ培養細胞におけるチロシン供給レベルで のベタシアニン生成の制御

°作田正明,清水 碩 (お茶の水大・理・生物)

ベタシアニンは、ナデシコ科を除く中心子類に特異的に分布する赤色色素で、チロシンよりDOPAを経て生合成されるインドールアルカロイドの一種である。一般に、二次代謝産物の生成・蓄積と細胞増殖とは背反的であるのに対し、ヨウシュヤマゴボウ培養細胞におけるベタシアニン蓄積は対数増殖期においてピークとなる。さらに、培地中のホルモン濃度や栄養源の飢餓処理により細胞増殖を抑制するとベタシアニン蓄積も抑制されることより、細胞増殖とベタシアニン生成とは正の相関を持つことが示唆されている(日本植物生理学会1988年度年会)。また、種々の条件下でベタシアニン蓄積量と細胞内での遊離チロシンのプールサイズとの間に相関が見られることから、前駆体であるチロシン供給レベルがベタシアニン生成の制御要因の一つである可能性が示されている(日本植物生理学会1986,1987年度年会)。このことより、今回はベタシアニン蓄積とチロシン合成系であるシキミ酸経路の代謝変動について検討を加えた。

シキミ酸経路のEPSP synthase (5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate syntase)阻害剤であるglyphosate(1mM)を添加し6日間培養すると増殖が抑制されると共に生重量当りのベタシアニン蓄積量も約50%阻害された。Glyphosateと同時にTyr(1mM)を添加することにより阻害の一部に回復がみられた。培地中のN源の飢餓処理を行うと細胞内の遊離チロシンのプールサイズはアミノ酸アナライザーの検出限界以下となり、ベタシアニン蓄積も減少した。シキミ酸経路のキーエンザイムであるDAHP(3-deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate) synthase(DS-Co,DS-Mn)とchorismate mutase(CM)の活性を測定したところ、N源飢餓処理によりDS-Co,DS-Mnはいずれも活性の著しい低下がみられた。また、N源飢餓処理と同時にtyr(1mM)を投与するとベタシアニン蓄積は回復することより、N源飢餓処理によるベタシアニン蓄積の低下はチロシン供給レベルの低下がその要因と考えられる。リン酸飢餓処理においてもDS-Co,DS-Mnの低下がみられ、ベタシアニン蓄積も抑制された。しかしながら、細胞内の遊離チロシンのプールサイズは上昇することより、リン酸飢餓処理によるベタシアニン蓄積の抑制はチロシン以後の代謝阻害が要因と考えられる。

時任康弘、黒崎文也、守田雅志、西 荒介 (富山医科薬科大学・薬)

高等植物の β -1,3-glucanase の役割については、各種の生理機能への関与が推定されている外、最近では、植物が微生物の感染を受けた際に示す防御反応の一部と考えられている。本実験では、ニンジン培養細胞から β -1,3-glucanase を精製し、その性質を明らかにすることを目的とした。

ニンジン培養細胞のホモジネートの遠心分画によって、本酵素は壁結合画分と可溶性画分に局在が認められたが、培地中への分泌は認められなかった。又、数種の糖質及びエチレンによる誘導は起こらず、タバコなどとは異なって constitutive な酵素だと考えられる。壁結合性の β -1,3-glucanase をNaClで抽出し、硫安分画、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過を順次行って精製したところ約40倍の精製物が得られ、SDS-PAGEにより約63kDaの分子量であることが推定された。又、トリフルオロメタンスルホン酸での糖鎖切断処理によって約3kDa分子量が減少したことにより、この酵素は糖タンパク質であることが示唆された。

ニンジン培養細胞をモネンシン処理することによって、細胞内酵素活性が上昇し、代わって壁結合画分の活性が減少したことから、本酵素の分泌機構にはゴルジ体を介す輸送システムが含まれると推定される。又、ツニカマイシン存在下において、本酵素はN型糖鎖の修飾を受けないままで細胞壁へと輸送され、培地中へも放出されていないことが確認されたことから、糖鎖部分は本酵素の分泌や細胞壁での保持において、特に重要な役割を果たしてはいないと考えられる。壁結合画分と可溶性画分の酵素の糖鎖を比較した結果、壁結合画分が mature なものであって complex 型のN型糖鎖を持ち、可溶性画分中の酵素の糖鎖は mannose-rich であって壁結合型の前駆体ではないかと考えられた。本酵素は、pH6.0で最も安定性を持ち、pH5.5で最も高い活性を示した。本酵素を用いてラミナリンを加水分解したところ、その生成物のほとんどがモノマーのヘキソースであったことから、Exo型の酵素であることが示唆された。又、本酵素による菌糸壁の水解物をニンジン培養細胞に対して elicitor として用いてみたが、リグニン化を促進するフェノール酸類の合成や、ファイトアレキシンの産生誘導は認められなかった。

茎頂培養アサクラサンショウ育成株の生葉香気成分 今泉和光・戸塚良宣・小田 茂・山田康之¹ (PL学園女子短大・植物研、¹)京大・農・細胞実験センター)

【目的】 ミカン科に属するサンショウは、葉および果実に特有の芳香と辛味を有し香辛料野菜として利用する他、成熟果実は芳香性健胃整腸剤、苦味チンキなどの生薬原料として用いられている。演者らは芳香が強く生薬では良品とされるアサクラサンショウ(\overline{Z} . piperitum DC. f. inerme Makino)の増殖と優良株育成を目的として、これの茎頂培養をおこなうと共に、得られた育成個体の生葉中に含まれる香気成分をヘッドスペースガスクロマトグラフィ(HSS-GC)法を用いて分析した。

【方法】 茎頂培養;ポット内で3~4年育成した成木(=親株)から、定法により茎頂(0.2~0.3mm大)を採芽しMS改変培地で培養後、茎葉分化、発根、馴化、土壌定植を経てファイトトロン内で6~9カ月間育成し、樹高40~60cm程度の幼苗を得た。

HSS-GC分析;採取した生葉の0.15gを直ちに20m1容のバイアル瓶中に封入し、40℃で30分間加温後、容器内のヘッドスペースガス (0.8 ml)をガスクロマトグラフ (島津GC14A)に全量注入し香気成分を分析した。分析は0V-1相当のワイドボアキャピラリーカラム (島津 CBP1-W25-300 25m×0.53mm 薄膜3 μ m)を用い、50℃-5分間の定温分析後、毎分5℃で200℃まで昇温しておこなった。検出はFIDを用いた。香気の評価としてはGC-MSで確認できたαーピネン、ミルセン、リモネンの各成分の絶対量および相対量を指標とした。また、比較対照区として培養に用いた親株および培養株と同程度の種子繁殖株をもちいた。

【結果】 得られた茎頂培養株を親植物および種子繁殖株と比較したところ、株の形態、生葉大きさは親株よりも種子繁殖株に類似していたことから香気成分においても同様の傾向がみられることが予想されたが、香気成分量は親植物のパターンに類似していた。種子繁殖個体ではαーピネンのみが高くなる傾向を示すのに対し、茎頂培養株および親株はリモネン、ミルセン共増加した。リモネン量に対する各成分の相対量比のパターンは、茎頂培養株では系統間で異なるものの大体において親植物に類似するものが多かった。

また、培養系統株中には親植物に比べて香気成分含量のかなり高い個体も得られており、今後選抜をおこなっていくことによってさらに高生産株が得られるものと思われる。

ニチニチソウ茎葉器官培養における二量体インドールアルカロ イド生合成について

常 片山博史、瀬川恭子、平田収正、宮本和久、三浦喜温 (阪大・薬)

ニチニチソウ (Catharanthus roseus)は、生理活性を有する多くのインドールアルカロイドを含有している。我々は、これらのアルカロイドのうち抗腫瘍活性を有するvinblastine (VLB)などの二量体アルカロイド及びその生合成系の重要な中間体であるvindoline (VDL) とcatharanthine(CRT)が主として葉部に蓄積されることに着目し、ニチニチソウ幼芽から、多数の分節茎葉を有する器官培養株 multiple shoot culture(MSC)を誘導し、この株がこれらのアルカロイドを安定に生合成すること、さらに、この生合成系が照射光により多大な影響を受けることを確認した。そこで、これらの現象をより詳細に考察するため VDLと CRTの coupling 反応に対する光照射条件の影響について検討を行なった。

本検討においては cell-free系を用いた。まず、VDL 及びCRT を 0.1M Tris-HCl緩衝液 (pH 7.0)中に溶解し、この溶液に西洋ワサビ由来のペルオキシダーゼ (HRP)、フラビンモノヌクレオチド (FMN) ならびに $MnCl_2$ を添加し、光照射後、 $NaBH_4$ を添加して還元反応を行った。この反応液を抽出し、反応生成物である3',4'-Anhydrovinblastine (AVLB)をHPLC により定量した。 Coupling 反応に対する光照射の影響は、生成したAVLBの、VDL に対する収率を指標として、光強度・照射光の波長の影響に関する検討を行なった。

MSC における検討の結果、強光下、ならびに短波長側の光照射下で二量体アルカロイド含量が上昇した。特に370nm に極大波長を有する近紫外光の照射下ではVDL・CRT の含量が低下するという現象も観察された。酵素的 coupling 反応に関する検討の結果、強光下・短波長側の光照射下でAVLBの収率は高くなった。したがって、MSC における現象は、coupling反応が促進された結果であると考えられる。さらに、HRP 無添加の場合にも AVLB の生成が認められたことから、coupling反応は酵素的にも非酵素的にも起こり得ることが示唆された。そこで、この非酵素的反応についても検討を行なった。また、coupling以後の反応についても、MSC より調製した粗酵素抽出液を用いて若干の検討を加えた。

茶カルスのテアニン蓄積に及ぼす前駆体及び温度の効果

1Dp13

松浦孝寬、角田隆巳 (㈱伊藤園 中央研究所)

[目的] テアニン(L-γ-glutamylethylamide)は茶(Camellia sinensis)特有のアミドであり、緑茶の旨味成分として知られている。茶葉中にテアニンは1~2%含まれているが、組織培養により得られたカルス中には殆ど含まれない。この原因として、テアニンの前駆体の生合成能が低下しているものと考えられる。そこで、この様なカルスを用いてテアニン生合成量を高める為の最適培養条件を検討した。

[方法] <u>C. sinensis</u> cv. Yabukita の茎から誘導したカルスをBA 4mg/1,IBA 2mg/1を含む塩酸チアミンが1.3mg/1に修正されたMS培地(BI培地)にて、25℃,30001ux·16時間照明下で継代培養し本実験に供試した。

テアニンの種々の前駆体(硫酸アンモニウム,アラニン,塩酸エチルアミン)が添加されたBI培地を用いて上述の温度及び照明下でカルスを培養し、テアニン生合成における前駆体の効果をみた。また、有効な前駆体についてその至適添加濃度を検討した。

次に前駆体が添加されたBI培地を用いて暗黒下にて回転振とう培養(70rpm)し、カルスの増殖及びテアニン蓄積に及ぼす温度の影響をみた。また、カルス内成分の培地への放出 状況について調べた。

[結果] 塩酸エチルアミン添加区のみテアニン生合成量を高めることができた。また、 塩酸エチルアミン添加の至適濃度は25mMであった。

温度の試験では塩酸エチルアミン(25 mM)が添加されたBI培地を用いた。カルスの増殖は25 Cで最も良く、カルスのテアニン蓄積量についても25 C区で最も多かった。テアニン蓄積量は25 Cより低温及び高温になるにつれて減少した。テアニンの前躯体の一つであるグルタミン酸は、カルスの褐変がみられた32及び35 C区を除いてほぼ一定量カルス中に存在した。カルス内成分の培地への放出状況は、テアニン蓄積量の多かった25 C区について調べた。カフェインは全体量の30%以上、グルタミン酸,グルタミン及びアラニンは約4%が培地中に放出されていた。一方、テアニンは1%以下しか放出されておらず、生合成されたテアニンの殆どがカルス内に蓄積されていることがわかった。また、振とう条件を100 rpmとし25 Cで30 H間培養したところ、テアニン蓄積量は約20%に達した。

カボチャ培養細胞から分泌されるキチナーゼおよびアスコルビン酸酸化酵素について

江坂宗春、榎 恵子、藤澤浩一、豊田安基江

(広島大・生物生産)

これまでに、カボチャ培養細胞におけるアスコルビン酸酸化酵素の誘導1)・分泌2)に 関する研究を行ってきいる。アスコルビン酸酸化酵素の分泌条件を調べるために、液体培 養後の培養液を分析したところ、アスコルビン酸酸化酵素以外に培養液の全タンパク質量 の60~80%をしめるタンパク質が認められた。本研究では、この主要分泌タンパク質を精 製し、その諸性質および機能について調べた。また、アスコルビン酸酸化酵素の分泌条件 を調べた結果から、本酵素がストレスタンパク質である可能性が示唆されたので報告する。 [方法と結果] カボチャ果肉組織をMS培地(1.0mg/1 2.4-D, 0.1mg/1 kinetinを含む) を基本培地としてカルス化誘導した。20代以上継代した安定なカルスを液体培地に植え つぎ振とう培養した。培養液を硫安分画し、セファロース6Bカラムクロマトグラフィーに より分画した。タンパク質のビーク画分をSDS-PAGEにアプライしたところ、一本のペプチ ドバンドのみ認められたことから、本画分を精製主要分泌タンパク質とした。分子量32000 の本分泌タンパク質はPAS染色の結果から糖タンパク質であることがわかった。精製標品を 兎に免疫して得た抗体はイムノブロッティングの結果から、主要分泌タンパク質に対する 特異抗体であることが判明した。本抗体を用いた一元平板免疫拡散法により主要分泌タン パク質の定量が可能となった。主要分泌タンパク質のアミノ酸分析、さらに、N末端側から のアミノ酸配列を14残基決定し、ホモロジー検索を行った結果、タバコやインゲンマメに 認められるキチナーゼの一つと有意なホモロジーが認められた。また、実際に本タンパク 質がキチナーゼ活性を有することもわかり、本主要分泌タンパク質がキチナーゼであるこ とが判明した。一方、アスコルビン酸酸化酵素はカルシウムにより3)、また、PRプロテ インの誘導剤であるエオシンイエローやサリチル酸により、その分泌が促進した。このこ とより、アスコルビン酸酸化酵素がストレスタンパク質の一つである可能性が示唆された。

- 1) M. Esaka et al. (1988) Plant Physiol. 88, 656
- 2) M. Esaka et al. (1989) Phytochemistry 28, 117
- 3) M. Esaka et al. (1989) Phytochemistry 28, 2655

コンピュータ制御電気信号発生器によるプロトプラストの性 状-2

前田桝夫・中村三千代(福井大学・教育・生物)

植物プロトプラストを融合する主な方法は化学的融合法と電気的融合法に区分される。 特に後者の方法は細胞毒性の皆無による細胞種を選ばないことから融合法として発展の可 能性を秘めている。しかし融合率、生存率などについてまだ多くの問題点が存在するため 各種の電気信号に対するプロトプラストの性状についての基礎的研究が必要とされる。

通常、電気融合にはプロトプラストの接着配列のための正弦波、融合のための方形波(パルス波)が用いられる。これらの基本的波形のみならず色々な信号の周波数・振幅値(開始値、最終値、減衰率、回数、発生時間、波形間時間、波形合成)を高い精度で制御発生し、これらのパラメータを任意に組合せることができ、また設定のパラメータデータを保存するためのコンピュータプログラム制御の電気信号発生装置を構成した。用いる機器間の制御にはHP-IBインタフェースバスを用いた。また、同じバスをもつオシロスコープによりモニターし、その信号の電極にかかる実際の波形をフロッピーデスクにファイル出来るようにもした。

次に、このように発生した信号に対するプロトプラストの性状を比較するために電極間のパラメータとして電気電導度、抵抗値、容量値、インピーダンスについて検討した。また、再現性の高いデータを得るためには電極の均一性と微量処理を可能とするための電極を試作した。電極間のけん渦液容量は200 μ 1とした。

プロトプラスト産生材料としてBY-2およびキンタロウニンジンの培養細胞系、ソラマメ葉肉組織、モエジマシダ(Pteris vittata)およびカニクサ(Lygodium japonicum)の前葉体および胞子体、アネミア(Anemia phyllitidis)の前葉体および胞子体由来カルスを用いた。

電気信号に対するプロトプラストの性状を敏感に表すパラメータをコンピュータ制御電気信号発生器からの信号を用いて計測した値をプログラム上で計算し表すことにより非常に鋭敏に性状反応を捉えることが出来た。

花粉プロトプラストの寒天培地及び柱頭上での発芽について

西原昌宏、伊藤道夫 ¹ (名古屋大・理・生物、¹静岡大・理・生物)

テッポウユリの花粉では、酵素的方法によってプロトプラストが高率に得られる。 そこで、開花一日前のつぼみから得た花粉からプロトプラストを分離し、培養して細胞壁 を再生させたいわゆる再生花粉が、正常花粉と同じ花粉としての機能を有するか否かを調 査した。また、正常の受精過程を再生花粉で行なう可能性についても検討した。

花粉プロトプラストは、培養開始後1-2日で細胞壁を再生した。その再生花粉は培養被に懸濁した状態で、しょ糖濃度 0.3Mの寒天発芽培地にまくと、花粉管を伸長した。発芽率、花粉管の長さともに正常花粉とほぼ同程度であった。また再生花粉の発芽率は、プロトプラスト分離に使用したもとの花粉の発芽能(個体、季節により大幅に異なる)に、大きく依存していた。発芽した再生花粉では、花粉管の中に栄養核と生殖核が移動し、生殖核が分裂中のものや、既に分裂し終えて二核になっているものが観察され、その率は長く培養するにつれ高くなった。再生花粉の発芽は、しょ糖濃度 0.3Mの液体培養液中でも高率で起こった。

再生花粉は液体中で培養され、細胞壁が薄いので乾燥に弱く、柱頭につけるのは困難であったが、発芽に最適の状態を保ったまま柱頭にのせるために、様々な方法を考案した。その結果、柱頭につける方法が適当であれば、再生花粉は柱頭上で発芽し、花粉管が花柱内にまで伸長することが確認された。以上の結果から、再生花粉は、柱頭上で発芽して花柱内に花粉管を伸長させ受精に至る機能を保持していることがわかった。

この他、テッポウユリ以外の被子植物の花粉からのプロトプラスト分離を試みた結果 についても報告する。

トウモロコシ子葉鞘のL-およびD-トリプトファンそれぞれに特異的なアミノ基転移酵素

小柴 共一 (都立大·理·生物)

植物ホルモン、インドール-3-酢酸(IAA)は、植物体内においてトリプトファンを前駆体として合成されると考えられているが、その合成経路や関係する酵素についての詳細は未だに明らかにされていない。演者は、IAA生合成に関連すると考えられる酵素についてトウモロコシ子葉鞘とエンドウ幼葉を用いて研究を進めているが、トリプトファンを基質とした酵素反応についてはデカルボキシラーゼの活性は検出できず、また、L-とD-の光学異性体の変換を触媒するラセマーゼの活性も極めて低いものであった。一方、アミノ基転移酵素についてはL-とD-トリプトファンのそれぞれに特異的な酵素の存在を確認した。今回は、このアミノ基転移酵素の部分精製を進め性質を比較したので報告する。

【材料と方法】トウモロコシ種子を、25°C、赤色光下2日間、暗所1日間で発芽させた。子葉鞘先端1cm、およそ5gから抽出した粗酵素液から30-60%硫安分画を得、Phenyl-5PWカラムによりそれぞれの酵素を分離した。酵素活性は0DSカラムを用いインドールピルビン酸を定量することで測定した。分子量の推定は、SynChropack GPC-100カラムにより行った。

【結果】Phenyl-5PWカラムクロマトグラフィーにより2種のL-トリプトファンアミノ基転移酵素(L-TAT-I,II)と1種のD-トリプトファンアミノ基転移酵素(D-TAT)が分離された。L-TAT-I,IIには大きな相違はみられず、至適温度50~60°C、アミノ基の受容体としては α -ケトグルタル酸、オキザロ酢酸、ピルビン酸が働く。分子量はそれぞれ70と50Kd程度である。これに対してD-TATは、至適温度30°C前後、アミノ基受容体としてはピルビン酸のみが有効である。分子量は60Kd程度である。

【考察】最近、 DートリプトファンがIAAの前駆体である可能性も報告されているが (Hamilton, 1989)、 結果に示したようにD-TATがアミノ基の受容体としてピルビン酸だけを選択していることからこれまでに植物において知られているD-アラニンアミノ基転移酵素と同一の可能性が強く、 IAA生合成に特異的に働くものであるのかどうかは検討を要する。 また、 2種のL-TATについては至適温度が高く植物体内で実際に働いているかどうかの検討が必要である。こうした点を明確にして行くため、 現在 in vivoでの H-トリプトファンを用いたトレーサー実験を平行して進めている。

D-トリプトファンを経由するインドール酢酸生合成経路の検討

鶴崎健一、桜井直樹、倉石晉 (広島大·総科)

〈目的〉インドール酢酸(IAA)の高等植物における生合成経路について Low (1987) は、L-トリプトファン (L-trp) がD-trpを経て、IAAが合成されるという経路を提唱した。一方、オオムギ (Hordeum vulgare) の矮性系統渦赤神力 (uzu) の子葉鞘の矮性化は、IAAの量が少ないことが原因であるとInouheら (1982) が明らかにした。そこで、uzuと正常系統並赤神力 (Normal) を用い、IAA合成におけるD-trpの役割とIAA合成の制御について検討を行った。

〈方法〉伸長実験は、Normal、uzuの種子を 25.5 ± 0.5 ℃の暗所で3日間成育させ、生長した子葉鞘から5mmの切片を切り取った。K-クエン酸バッファー (pH 6.5、10mM) の培地に切片を浮かべ、 25.5 ± 0.5 ℃の暗所で培養し、切片の伸長を測定した。また、同じ切片を用いてトリプトファン量をD-、L-trpに分離し定量を行った。試料は、80%EtOHで抽出し、遠心分離後、上清を減圧濃縮した。次に、Dowex50W-X4カラムクロマトグラフィーにより、アミノ酸画分を精製した。精製後、強酸性陽イオン交換HPLCカラムでD-trpとD-trp

〈結果と考察〉D-、L-trpはともに、Normal 、uzuの子葉鞘切片の伸長を促進し、しかもD-trpはL-trpよりも伸長促進効果が大きかった。また、uzuではtrpによる伸長促進が、Normalよりも早く生じた。しかし、Normal、uzuともにL-trpの内在量に差は見られなかった。内在のD-trpは、蛍光検出器でも検出されず、D-trpに対する検出器の感度がIAAに比べ10倍悪いため、IAAと同程度以下と考えられた。[¹¹C] L-trpを与えると、uzuではD-trpの放射能がL-trpに比べNormalよりも高いことが示された。またD-trpから、uzuでもNormalでもIAAが合成され、これはアミノ基転移酵素阻害剤D-シクロセリンで完全に阻害された。以上の結果、L-trpと同様、D-trpもオオムギではIAAの前駆物質である可能性が示された。またトリプトファンラセマーゼによってL-trpがD-trpに変換される経路がオオムギ子葉鞘に存在する可能性も示された。更に、uzuの矮性化はL-trpの内在量が少ないことが原因ではなく、D-trpからIAAへの中間代謝経路に異常のある可能性が示された。

トマトのつぼみから果実までの成長段階でのIAAとABA の変動

倉石 晉, 児島清秀、桜井直樹、房尾一宏¹(広大・総科、 ¹広島農試)

つばみの形成からはじまり、受精、着果、果実の成長は植物にとってダイナミックな 形態形成の過程であり、植物ホルモンが関与している重要な反応として古くから調べられ てきた。しかし従前の方法では正確なホルモン量の測定ができず、また花の各器官別の測 定なども行われなかった。我々は先にABAが物質集積性という新しい機能を持つ可能性 を示し、果実の肥大に重要な働きを示すことを報告した。今回はトマト(品種名瑞秀)果 実の成育のさいのIAAおよびABAを定量し、植物ホルモンの意義について検討した。

IAAとABAはナイロン66を用いて精製後、IAAは高速液体クロマトグラフで 分画し、螢光で定量した。またABAは高速液体クロマトグラフで分画後ECD検出器付 ガスクロマトグラフィーで定量した。

開花前10日のつぼみのIAAはがくと花弁に多く、雄ずいでは総量・濃度とも最低であった。一方ABAはこれに反し、雄ずいで総量・濃度ともにずばぬけて多かった。開花期になると雄ずいのIAA量は総量でつぼみの8倍、濃度でも4倍に急増した。開花期のIAAはがくで高い値を維持した。しかしABA量は1/3に急減した。一方雌ずいのABAは約2倍に急増し、受精後では特に子房での増加が著しく、物質集積性にABAが関与している可能性を強く示した。つぼみから開花期にかけての雄ずいでのIAAの急増は花粉の成熟にIAAが関与している可能性を示すとともに、IAAは着果に重要な働きをしていると考えられる。

次に除雄処理を行い、その後の各器官のホルモン分布に対する効果を調べた。除雄処理をしていない花の子房の中、肥大した子房に含まれるIAA総量は開花期の雌ずいに比較して1.6pmolから65pmolへと、またABA総量は62pmolから140pmolへと著しく増加していた。一方除雄処理をしなかったのにもかかわらず、肥大しなかった子房のIAAとABAの総量はそれぞれ7および41pmol、また除雄処理をした子房はそれぞれ6および42pmolで開花期のIAAとABA総量(1.6pmolおよび62pmol)と同程度であった。がくのIAAとABA総量は除雄処理後やや減少したが、濃度では差がなく、がくでの植物ホルモンはそれ程大きな働きをしていないと考えられる。

Pichia spartinae におけるインドール酢酸の存在と作用

°中村輝子、村上智子、早乙女真紀、村山肇子¹、橘和丘陽²、S.P. Meyers³(日女大、1関東学院大、2島津、3Louisiana State Univ.)

Saccharomyces ellipsoideus (1963), S. cerevisia (1967), Neurospora crassa (1978), Phycomyces blakesleeanus (1980), Fusarium culmorum (1984), Gibberella fujikuroi (1985), Penicillium notatum (1985)等の菌類において、オーキシンがこれらの生長、分化に促進的効果を示すことが報告されてきた。更に菌類におけるオーキシンの作用を検討するために Pichia spartinae を用いて次の実験を行った。

Pichia spartinae はルイジアナ州海岸湿地帯のOyster grass, Spartina alterniflora の根圏および地上部の植物組織内に棲息する野生酵母である。培養は Difco社のBacto Yeast Nitrogen Base と 2%のグルコースの液体培地 300mlを含む坂口フラスコを用い、30℃、暗所、振とう培養で行った。この培養条件で24時間の前培養をしたculture から得られた菌を用いて2×105 cell/mlの細胞濃度にして本培養を行った。

- 1)IAAの作用:10⁻⁷~10⁻⁵MのIAA、NAA、2,4-Dを培養開始時に培地中に加えて、培養開始24時間後に定常期の細胞数(約5×10⁸ cell/ml)及び乾重量(フラスコ当り約1.2g)に及ぼす効果を調べたところ、促進効果は認められず、弱い抑制効果が認められた。培養開始3時間後に調べた場合には、IAAによる弱い促進効果が認められるか、効果が全く認められないかであった。約10⁻⁵Mの2,4,6-Tおよび約10⁻⁵MのIAAを培養開始時に培地に加えて、3時間後に測定した場合は2,4,6-Tによる抑制効果のIAAによる回復が認められた。
- 2)内生IAAの同定:培地からのIAAの抽出・精製は Akiyamaらの方法(1983)により行い、同定は SHIMADZU GCMS-QP1000Aにより行った。
- 3)内生IAAの生産:内生IAAの生産は細胞数の増加とともに増加し、対数期後期にピークに達し、フラスコ当り約60μg、培地中の濃度約10-6M、菌体乾重量約 150mg 当り 240ngに達した。この後培地中のIAA量は減少した。

1Ep05 アカパンカビ albino株の分生子発芽過程

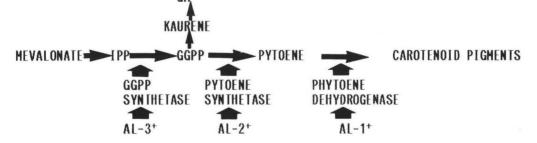
• 沖津由紀子、中村輝子(日女大・生理研)

野生株74Aを用いて、アカパンカビの分生子発芽過程におけるGAの生理作用について報告してきた。内生GA(GA₃)は発芽開始前の成熟分生子中にかなりの含量(190ng/g.d.w.)蓄積されているが、それに加えて、発芽開始後に新たなGA合成が見られた。さらにGA合成を阻害することにより発芽のphase は遅れ、外からGA₃を添加すると 逆に発芽のphase は早まることから、分生子発芽過程は分生子中のGAレベルにより調節されている可能性が示唆された。

今回、分生子発芽過程におけるGAの調節的役割を明らかにするために albino株(al-3)*を用いてGAとABA の相互作用についての検討をおこなった。albino株は、野生株に比べて発芽の開始も早く、発芽の終了に要する時間も4時間と短い傾向にあった。albino株の発芽は、野生株のそれと異なり、ABA(10^{-4} H)により阻害された。ABA の阻害効果はGA3(10^{-3} H)によってのみ解除された。また、ABA 様物質は野生株により多く存在し、albino株には、ほとんど認められなかった。albino株においては、単独で与えたGA3 は分生子発芽になんら効果を示さなかったばかりか、GA合成阻害剤の効果もみられなかった。

これらの結果から、野生株において分生子発芽過程はABA 様物質により抑制されており、GAはその抑制効果を解除することにより分生子発芽の進行を早めたものと考えられる。 野生株分生子中のABA 以外の発芽阻害物質の検索も引き続き行っている。

Fig 1 CAROTENOID BIOSYNTHESIS IN NEUROSPORA CRASSA



プラズマエッチング処理によるレタス種子発芽におけるジベレリン感受性の上昇

井上康則、江頭徹太郎¹、本多卓也¹、神沢淳¹ (東大・理・ 植物、¹東工大・工・化工)

植物種子の表層は一般的に物質の透過が悪く、この低い透過性がcoat-imposed dormancyの原因の1つに上げられている。低い物質透過性は、トレーサー等を用いて発芽生理を研究して行く際の障害にもなっている。レタスを含む光発芽性種子の多くは、ジベレリンにより暗所で発芽が誘導されるが、 10^{-4} M以上の濃度が一般的に必要と報告されている。しかし、レタスの場合は種子に針で穴を1つ開けるだけで1/1000程低い濃度のジベレリンが発芽を誘導できることが報告されている(8urdett 1972)。しかし、小型種子では針による穴開けは不可能である。そこで演者等は針の代わりにプラズマによるエッチングで種子表層に穴を開けることを試みた。

材料にはGrand Rapids種レタス種子を用い、発芽におけるジベレリン感受性の上昇を指標にエッチングの効果を測定した。プラズマエッチングには、ガラスの真空容器を用い、容器内に直径 $50\,\mathrm{mm}$ の電極を $15\,\mathrm{mm}$ 離して 1 対設け、下部の電極は水道水により冷却可能とした。この下部の電極部分に種子を約200粒のせ、約 $1.5\mathrm{Torr}$ の真空中で $2\,\mathrm{ml}/\mathrm{min}$ の流量でArを流し、電極間に高電圧を加えガスをプラズマ化し、 Ar^* を種子の置いてある-電極に衝突させることによりエッチングを行った。種子表面の温度は熱電対で常時測定した。

極間電圧300v・電流7mAで7分間処理を行っても、ジベレリンに対する感受性は変化しなかったが、60分処理で $5x10^{-6}$ MGA $_3$ により80%程度の発芽が誘導された。放電時種子をアルミ箔で覆うと顕著な発芽誘導は観察されなかった。電極の極性を変えて+極に種子を置いて放電を行った場合、一極に置いた場合の半分以下の発芽率しか示さず、 e^- より Ar^+ によるエッチングがより効果的なことがわかる。前記60分間処理で表面温度は42 $^{\circ}$ に達した。真空中異なる温度条件下に60分間保った種子のジベレリン感受性を調べたところ、50 $^{\circ}$ ではまったく変化が見られず、75 $^{\circ}$ で初めて極わずかの上昇が見られたことから、温度が放電による感度上昇の原因ではないことが明らかになった。

上記の結果から、プラズマエッチングによるレタス種子発芽におけるジベレリンに対する感度上昇は、Ar⁺の衝突による穴開け効果によるものと考えられる。

イネ茎葉部内生ジベレリン含量に及ぼす矮化剤 B X - 1 1 2 の影響

○中山 礎・阿部 洋・小林正智¹・神谷勇治¹・桜井 成¹(クミアイ化学・生科研、¹理研・植物生活環制御)

広範な高等植物種に対し活性を示す矮化剤 BX-112 (一般名 prohexadione calcium、化学名 Calcium 3,5-dioxo-4-propionylcyclohexanecarboxylate) 及びその遊離酸化合物であるprohexadioneで処理したイネ幼植物の伸長抑制は、外から与えたGA1、GA3、GA4で回復するが、GA19やGA210では回復しないことを報告した(1、2)。また、cell-free系での検討から、prohexadioneはGA生合成経路の中で、GA12-aldehyde以降の2-oxoglutarate要求性dioxygenaseが触媒する酸化過程を阻害することを明かにした(3)。今回は、BX-112を処理したイネ茎葉部のGA含量の変化を経時的に調べたので報告する。

【材料と方法】 人工光ファイトトロン内で4葉期まで育てたイネ(品種晴々)に、BX-112を茎葉散布した。 BX-112は1mg/m²及び30mg/m²を処理し、0、5、12日後に茎葉部を採取した。 茎葉部はメタノールで抽出し、重水素標識 G A を内標として加えた後、常法により溶媒分画を行い、酸性酢酸エチル画分(AE区)を得た。AE区はHPLC(GPC)とカートリッジカラムで精製し、HPLC(ODS)でGA1、GA18、GA20、GA44、GA53を分離した。同定・定量はMe-TMS化の後、GC-SIMで行なった。

【結果と考察】 BX-112を処理したイネの草丈は、 $1mg/m^2$ 及び $30mg/m^2$ 処理区で、それぞれ無処理区の80、53%に低下した。 $1mg/m^2$ 処理区のイネでは、 GA_1 含量 $(ng/g \ f.w.)$ が処理後5、12日目に無処理区の<math>69、36%にまで減少した。また $30mg/m^2$ 処理区でも GA_1 含量が無処理区の29、18%にまで減少した。一方、 GA_1 の生合成前駆体である GA_2 8含量は5、 $12日目に無処理区よりも増加し、<math>30mg/m^2$ 処理の方が $1mg/m^2$ 処理よりも多く蓄積し、もっとも多かった $30mg/m^2$ 処理5日目では無処理区の230%に達した。 GA_1 9は $30mg/m^2$ 処理後5日目に無処理区の150%に増加したが、他の処理濃度や時期では無処理区と大差なかった。 GA_4 4は処理5、 $12日目に両処理区とも著しく低下した。<math>GA_5$ 3量はほとんど変化がなかった。

これらの結果は、これまでの検討結果から示唆されているように、BX-112がイネ植物体内で GA_{20} から GA_{1} への 3β 水酸化過程を強く阻害し、活性型である GA_{1} の内生量を低下させて茎伸長を抑制していることを示した。

(1)日本植物生理学会1989年度年会、(2)PCP 31:印刷中、(3)日本農芸化学会1989年度大会

小林正智¹, ○神谷勇治¹, 中山礎², 阿部洋², 桜井成¹ (¹理研、²クミアイ化学)

3.5-Dioxo-4-ethylcarbonylcyclohexanecarboxylic acid, prohexadione (旧省略名 DOCHC、コード番号BX-112)は茎葉処理によって広範囲な植物に対して矮化作 用を示す。カボチャ、エンドウ、インゲンの未熟種子から調製したセルフリー系を用いた 実験から、BX-112はGA12からGA1に至る生合成経路上の2-オキソグルタル酸要 求型の酸素添加酵素を阻害することを明らかにした。 B X - 1 1 2 はジベレリンの活性化 と不活性化に関与する酵素を阻害するが、ジベレリンのレセプター部分には影響を与えな いと思われる。そこでイネに対して伸長活性を示す各種ジベレリンとジベレリン以外でイ ネに対して伸長活性を示すヘルミントスポロールを用いて BX-112の作用をしらべた。 [方法および結果] 短銀坊主、矮稲Cの発芽後2日目の子葉鞘に点滴法でジベレリンとB X-112を投与し、処理後3日目に第二葉鞘長を測定した。その結果GA5を単独で短銀 坊主と矮稲Cに与えた場合(10 ng/plant)、短銀坊主に対して伸長活性を示したが、矮稲 Cには殆ど活性を示さなかった。 BX-112 (10 ng/plant) とGAsを同時に短銀坊主 に与えた場合、GA5の伸長活性は著しく阻害された。これらの結果はGA5がそれ自身で イネに対して活性を示すのではなく、2-オキソグルタル酸要求型の酸素添加酵素によっ て活性型に変換されて伸長活性を示すことが示唆された。そこでイネの葯から關製したセ ルフリー系を用いてGA5の代謝を調べたところ、GA5はGA3に変換された。

ヘルミントスポロールを短銀坊主と矮稲Cにそれぞれ単独で与えた場合、ほぼ同程度の伸長活性を示し、この活性はBX-112を同時に与えても阻害されなかった。この結果はヘルミントスポロールがジベレリンのレセプターに直接作用して伸長活性を示しており、BX-112はレセプターに対して阻害しないことを示している。

正常品種のイネをパクロブトラゾールにより矮化して短銀坊主 の代わりに用いる点滴法

村 上 浩 (農業生物資源研究所)

矮性イネ、短銀坊主を用いる点滴法のイネ苗テストは、内生GAの検出に広く使用されている。しかし、種子の入手に困難性がある。短銀坊主の芽ばえが多くのGAで伸長が促進されるのはGA生合成経路の初めの方でブロックされているためである。最近GA生合成系を阻害する優れたトリアゾール系矮化剤が発売されるようになった。これらは、初期の矮化剤 CCCや Amo-1618 などと違って、根や幼葉鞘の伸長をほとんど阻害しないに関わらずシュートの伸長を強く抑制する。正常種の水稲種子をパクロブトラゾール溶液中で発芽させ、短銀坊主の芽ばえ以上にGAに対する感受性を高めて、内生GAのバイオアッセイに使用する方法を開発した。この方法を種々な植物の抽出物について適用した結果についても報告する。

材 料 水稲: 正常品種の銀坊主を用いた.短銀坊主は銀坊主の矮性突然変異体である.矮化剤: パクロブトラゾール 0.6%含量の PP333粒剤を用いた.この粒剤は商品名スマレクト (イネの倒伏軽減剤) として発売されている.

I. イネ芽ばえの内生GA含量に及ぼすPP333 の作用

PP333 はent-カウレンからent-カウレン酸への酸化を阻害することが明らかにされている. しかし、矮化されたイネ芽ばえについて内生 G A の有無を調べた報告が見当たらない. そこで銀坊主の種子を 0.1% PP333粒剤の水溶液(パクロブトラゾール 6 ppm)で発芽させ、3 葉期まで生育させた芽ばえ 50 g を材料とし、70% アセトンで抽出、酸性酢酸エチル分画を TLCに付した後、短銀坊主による点滴法によって G A 活性の検出を行なった. その結果、無処理の芽ばえでは、G A $_{19}$ および G A $_{4}$ 様活性が検出されたが、処理芽ばえでは G A 活性が全く検出されなかった.

Ⅱ. PP333 処理銀坊主芽ばえのGAおよび植物抽出物への反応

PP333 の 0.1%水溶液で発芽させた銀坊主の第2葉鞘長は無処理の40%の長さに過ぎない. GA。(0.2 ng/plant)を投与された銀坊主では伸長促進が認められないが、矮化銀坊主の第2葉鞘長は対照の 138%と短銀坊主よりも感度が高かった. 水稲シュートの抽出物中の銀坊主アッセイで検出されないGA19による活性も矮化銀坊主アッセイで短銀坊主アッセイに劣らない活性が検出された.

Nishijima & Katsura (P.C.P. 1989) はウニコナゾールで短銀坊主を処理すればGAに対する感受性が高められることを報告している。正常品種の水稲種子もトリアゾール系矮化剤で処理することによって短銀坊主の代わりにGAアッセイに使用することができる。

わい性エンドウの光生長抑制の定常状態と回復期における生長抑制物質A-2とxanthoxinの挙動

野口 尚、鶴見 誠二、橋本 徹(神戸大学 自然科学)

わい性エンドウ (Pisum sativum L. cv. Progress No.9)のわい性は赤色光照射によって初めて発現するので、赤色光による生長抑制の機構の解析は、わい性発現の機構の解明につながる。我々は、生長抑制物質の観点からこの研究を進めており、赤色光照射によってエンドウの茎で著しく増量する中性の生長抑制物質(新規の生長抑制物質であると考えられるA-2 α、βとxanthoxin)が存在していること、これらは何れも強い生長抑制活性を持つことを明らかにした。また、A-2 は矮性エンドウの芽生えの伸長部位において、光による茎の生長変化(生長抑制と回復)の時間的推移に先行して含量が変動することや、A-2 はわい性エンドウに高性エンドウより遙かに多く存在していることを明らかにした。今回は、光量の異なる赤色光を連続照射した場合と赤色光下で育てたわい性エンドウ芽生を暗所に移した場合において芽生えの生長と生長抑制物質の含量変動が相関しているかどうを調べたので報告する。

まず、黄化芽生えに光量の異なる赤色光を連続照射すると、6時間頃まで急速に生長速度が減少し、18時間頃より光量に依存してほぼ一定の生長速度になった。 A-2 α と A-2 β は光量に依存して、照射後直ちに増加を初め3時間頃まで急速に増加し、12時間頃より一定含量になった。 xanthoxinは6時間後にようやく増加を開始し、この増加は24時間まで続いた。

次に、赤色光下で育てた芽生えを暗所に移すと、8時間頃より生長が回復してくるが、 $A-2\alpha$, $A-2\beta$ はこの生長の回復に先だって4時間頃より減少を初め、24時間後には最初の20-25%に減っていた。他方、x an tho x in の含量は殆ど減少しなかった。以上の様に、連続赤色光下で生長速度が一定である場合においてもまた赤色光から暗所への移行により生長が回復する場合においても、 $A-2\alpha$ と $A-2\beta$ の含量は生長速度と比例関係にあり高い相関を示した。一方、x an tho x in はこの様な相関は認められなかった。この事は、赤色光による矮性エンドウのわい性発現に、x an tho x in が関与している可能性は少ないが、新規の生長抑制物質 $A-2\alpha$ と β が関与していることを示唆している。

コムギ種子の休眠と、アブシジン酸によって変化する胚のmRNA

川上直人、川端ちさと、野田和彦 (横浜市大・木原生研)

コムギの系統、北系-1354(Triticum aestivum L. line Hokkei-1354)の種子は収穫時に休眠を持ち、発芽には約1ヶ月の後熟期間を必要とする。休眠中の北系-1354 種子を半分に切り、吸水させると速やかに発芽が誘導されるが、同時にアブシジン酸(ABA)を加えておくとその発芽は完全に抑制される。ABA の種子胚に対する発芽抑制効果は、種子の後熟に伴って失われる。この発芽レベルで見た ABA に対する種子胚の感受性の変化を分子レベルの変化として捉えるため、休眠中および後熟後の種子胚を $10\,\mu$ M ABA で処理し、種子胚中の翻訳可能な mRNA の変化を調べた。一定時間蒸留水あるいは $10\,\mu$ M ABA 溶液を吸水させた半切種子から種子胚のみを単離し、SDS-フェノール法によって全 RNA を抽出した。全 RNA からの poly(A)+RNA の精製はオリゴ (dT) ラテックスを用いて行い、35S-メチオニンを含むコムギ胚無細胞タンパク質合成系を用いてタンパク質に翻訳させた。翻訳産物は 0'Farrell の二次元電気泳動法によって分離し、オートラジオグラフィーによって検出した。

休眠中の種子を半切にして蒸留水を吸水させると、種子胚の mRNA は後熟後の種子が発芽する時とほぼ同様の変化を示した。ここで量的変化を示した mRNA 種の多くは、 $10\,\mu$ M ABA によってその変化が抑制された。また、蒸留水の吸水時には変化が見られず、ABA を与えることによって増加する mRNA 種が認められた。

後熟後の休眠が切れた種子を半切にして用いた場合、蒸留水の吸水に伴う胚の mRNA 種の量的変化は休眠中の種子と同様であったが、ABA に対する反応は休眠中の種子胚の場合と以下の差異が見られた。休眠種子の胚では ABA によってその量的変化が抑制されていた mRNA 種の多くが、後熟後の種子の胚では抑制されず、発芽時と同様の変化を示すことがわかった。また、休眠種子の胚でも、後熟後の種子胚でも、ABA によって同様に増加する mRNA 種が見出された。これらの結果から、mRNA レベルにおいても ABA に対する種子胚の反応性が後熟に伴って変化していることが示された。

トマトにおけるペクチナーゼのエチレン生合成系に及ぼす影響 について

沢村正義、宮崎智子、伊藤耕三 (高知大・農・農化)

(目 的) クリマクテリック果実であるトマト (Lycopersicon esculentum Mill.) が成熟するにつれて、エチレン生成の増大、クロロフィルの分解やリコピン生成の結果として起こる色の変化、そしてペクチン分解酵素などの作用による高分子物質の分解に基づく組織の軟化などの現象が観察される。これらの現象には一般に植物ホルモンであるエチレンの関与が考えられるが、エチレンは、成熟に関する様々な代謝過程に先行するものなのか、それとも一連の成熟現象の結果として得られた生成物¹¹なのかという疑問は現在なお残されている。本研究では、トマトの成熟過程におけるエチレンの役割を明らかにするために、トマト果実におけるペクチナーゼのエチレン生合成系への影響を検討した。

(方 法) 試料は本学附属農場より入手したmature green (MG) とripe (R) ステージのトマトを使用した。ペクチナーゼの調製は Baldwinら¹⁾の方法、活性測定は井上ら²⁾の方法に従った。すなわち、トマトの果皮部より冷水抽出、pH調整によりcell wall 画分を得て、その粗酵素活性をWillstatter 法によって測定した。

(結果) まず、in vitro実験で1-アミノシクロプロパン-1-カルボン酸 (ACC)シンターゼおよびエチレン生成酵素 (EFE) 活性に及ぼすペクチナーゼの影響を調べた結果、ペクチナーゼ処理により、いずれの活性も増加傾向を示した。次に、in vivo 実験でMGトマトにペクチナーゼを処理したところ、EFE 活性は増加したのに対し、ACC シンターゼ活性は増加しなかった。また、アミノエトキシビニルグリシン (AVG) によってペクチナーゼ活性が阻害されないことを確認した上で、MGトマトにAVG 処理を行なった。その結果、ACC シンターゼ活性がAVG によって阻害されたことにより、エチレン生成が抑制され、同時にペクチナーゼ活性も抑制された。これらの結果は、エチレンが成熟開始の引き金であることを支持するものである。また、ペクチナーゼによるEFE 活性の増加は、ペクチナーゼによって細胞間ペクチンが分解され、膜結合性酵素であるEFE が遊離したことに由来するのではないかと考えられる。

- 1) E.A. Baldwin and R. Pressy: J. Amer. Soc. Hort. Sci., 113, 92 (1988).
- 2) 井上雅資、岡田茂考:科学と工業, 43, 642 (1969).

(名大・農・生化制御、・基生研・情報制御) 中嶋信美、・森仁志、山崎健一、今関英雅

ACC合成酵素はエチレン生合成の調節酵素で植物にオーキシンを投与したり傷を与えると強く誘導されることが知られている。我々はエチレン生成の調節機構を解明する目的で、すでに傷害誘導 ACC合成酵素を精製しその抗体(AsIII)を得ており、この抗体を用いてカボチャ果肉の傷害誘導 ACC合成酵素に対する cDNA のクローニングに成功し、その塩基配列の決定を行なった。

傷害を与えたカボチャ果肉から調製したPoly(A)*RNAを用いて、pTTQ18をベクターとして Vector-Primer 法で cDNA ライブラリーを作成した。AsIIIを用いて約20万個のコロニーをスクリーニングしたところ、1個のボジティブクローン (pCMW33)を得た。pCMW33 の形質転換菌は、1mM IPTG によって誘導され AsIIIと強く反応する分子量約58kDaのタンパク質を生産した。また、IPTG で誘導した形質転換菌の抽出液には強いACC合成酵素の活性が検出できることから、pCMW33 は ACC合成酵素に対する cDNA を持つクローンであると判断した。pCMW33のインサート部分をプローブとした Northern Hybridization の結果、ACC合成酵素の mRNA の大きさは約1.9kbで傷害によって強く誘導され、その誘導はエチレンによって抑制されることから、傷害による ACC合成酵素の誘導及びエチレンによる誘導の抑制は転写段階で調節されていることが実証された。

この cDNA の塩基配列を決定した結果、その大きさは 1748bpで、そのうち 1479bpが 493アミノ酸からなるタンパク質 (55.9kDa) をコードしていた。また、推定されるアミノ酸配列の一部は、精製した ACC合成酵素を CNBr分解して得られたペプチドのアミノ酸配列と完全に一致していた。この結果、in vivo ラベルの実験から推定したように ACC 合成酵素のサイズは 58kDaであることが明らかとなった。

エチレンによりアズキ第一葉に誘導される蛋白質の性質とその 遺伝子の cDNAクローニング 石毛郁治、森仁志¹、山崎健一、今関英雅 名古屋大・農・生化学制御、¹基生研・情報制御

植物ホルモンの一つであるエチレンの作用機構を分子レベルで解析するために、我々はアズキ第一葉をもちい、少なくとも 3種の蛋白質 (AZ-1,AZ-2,AZ-3)がエチレンによって誘導されることを見つけ、それらの精製について、既に 1988年度の本年会で報告した。

今回は、AZ-1とAZ-2の性質、エチレンによる誘導様式の相違、更に、これらのcDNAクローニングについて報告する。

AZ-1は 27kdの酸性キチナーゼで、エチレン処理によって少なくとも 24hr 以内に誘導合成され細胞間隙に分泌されること、AZ-2は 42kdの糖蛋白質(糖含量約 8%) で、エチレン処理後 8 hr以内に誘導され細胞内に存在することが、酵素活性 及び 特異抗体を用いたWestern Blotting により明かとなった。

エチレン処理後 48hrのアズキ第一葉から調製した poly(A)*RNA を鋳型とし、pTTQ18 をベクターとしたベクタープライマー法で作成した cDNAライブラリーを、AZ-1と AZ-2 そ れぞれの特異抗体を用いて cDNA の選別を行った。 AZ-2に対して 3つの positiveクロー ンが得られたが、挿入 DNA は全て予想される長さより短かったので positiveクローンの 插入DNA をプローブにして更に cDNA の選別を行い、2種類のクローン(共に約1.5kb)を 得た。一方、AZ-1に対しては免疫選別で positiveクローンが得られなかった。 そこで、 AZ-1の N末端のアミノ酸配列から予想される正逆二方向の合成ヌクレオチドを合成し、こ れをプラライマー、新たに Gubler & Hoffman 法で作成したcDNAライブラリーを鋳型とし て PCRを行い AZ-1の cDNA断片 (72bp) を増幅合成した。これをプローブとし pTTQ18を用 いて作成した cDNAライブラリーを選別し 2種類の positiveクローン(1.1kb,1.3kb)を得 た。それぞれの cDNAをプローブとした Northern blot hybridization の結果、 AZ-1の mRNA は,約1.3kbでエチレン処理後 8-16hr の間で急激に誘導合成されるのに対し、AZ-2の mRNA は,約1.5kbでエチレン処理後 1hr以内に誘導されていることが明かとなった。また、 この結果は無細胞翻訳系による mRNA の翻訳活性の変化の結果と一致した。これはAZ-1 と AZ-2のエチレンによる誘導の制御様式が異なることを意味しており、エチレン作用の制御 機構を解析する上で非常に興味あるところである。

担体を用いない光化学系Ⅱ膜乾燥標品の調製

1Fp01

。川本邦男、浅田浩二 (京都大·食研)

【目的】 光化学系 II 膜標品を担体にしみ込ませ、12~13時間凍結乾燥すると、無処理標品に比べ70~80%の酸素発生活性を持つ光化学系 II 膜乾燥標品が得られる (川本、高橋、浅田 1989年度年会講演要旨 p.286)。しかし、担体またはその不純物が標品になんらかの影響を及ぼしている可能性があり、また、乾燥標品への光照射の妨害も考えられるので、本研究では担体を用いない光化学系 II 膜乾燥標品を調製し、その酸素発生活性と酸化還元状態を調べた。

【方法】 Kuwabara、Murataの方法によりホウレンソウから調製した光化学系 I 膜標品を H_2 0で約10倍に希釈し、35,000 × gで10分間遠心して得られた沈澱を H_2 0で懸濁した。これに27 mM 2,6-dimethylbenzoquinone(DMBQ)を添加した、または添加しないサンプルを200 μ 2 ずつ試験管に入れ、4.5時間暗所で凍結乾燥して得られた標品を光化学系 I 膜乾燥標品とした。

乾燥標品の酸素発生活性は、K-4溶液(0.4 M sucrose, 15 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 20 mM Mes-NaOH (pH 6.5)), 0.3% digitoninの溶液に乾燥標品を懸濁し、DMBQを電子受容体として測定した。

閃光照射による酸素発生は薄膜透過-質量分析計を用い測定した。質量分析管の試料導入口にシリコーンゴム膜を隔ててつけた反応セルに、50 mM Hepes-NaOH (pH 6.8)、2 mM DMBQを入れてArガスで5分間バブリングし、0.3% digitoninを含む K-4溶液に懸濁した乾燥標品を気体透過膜に重層して暗所に置いた後、閃光照射し酸素発生を測定した。

【結果と考察】 乾燥標品の連続光下での酸素発生活性は、凍結乾燥前の標品に比べ、DMBQを添加しない乾燥標品では約45%、DMBQを添加した乾燥標品では約25%であった。乾燥標品に反応液中で閃光照射した場合、4または5閃光目で最大の酸素発生を示し、水-酸化酵素はこの凍結乾燥によって見かけ上1または2電子還元された。

光化学系Ⅱコアー複合体の構造の沈降法および電子顕微鏡による解明

寺下紀子、小林睦、藤吉好則¹、高橋正昭(甲南大・理・生物、 「蛋白工学研)

光化学系 II (PSII) コアー複合体は、酸素発生能を持つ最小のユニットで、構成しているサブユニットタンパク質の分子量を合計すると最小分子量は約250 kDa となる。放射線標的サイズで求めた機能サイズもこの分子量に一致している。本研究では、沈降法でPSIIコアー複合体の分子量を調べ、構造を電子顕微鏡によって観察した。

【方法】 PSI膜を 60 mM オクチル-β-D-グルコシド (0GP)、40 mM Mes-NaOH (pH 6.0)、10 mM NaC1 に溶かし、同じメジウムを含む 5 - 20% ショ糖密度勾配 (4.5 m1)に重層、RPS-50 ロータ中で、103,000 x g、4 および 8 時間、5℃で遠心した。遠心管底部から分画した試料のクロロフィル濃度と酸素発生活性の測定、SDS-PAGEによりPSIIコアーの沈降距離を求めた。PSIIコアー複合体をカーボン膜に吸着させ、酢酸ウラニルで染色するか、あるいは、親水化されたマイクログリッドに載せ、液化エタン中に投下して非晶質の氷中に包埋し、電子顕微鏡観察を行った。

【結果】 5-20% ショ糖直線密度勾配遠心において、分子量 MW1、 MW2 をもつ分子 1、 および、 2 の沈降距離には、 $(MW_1/MW_2)^{1.5}=S_1/S_2$ の関係 $[S_1,S_2]$ は各分子のメニスカスからの沈降距離]が、 0 GP 存在下でも成り立つことを、カタラーゼとアルコール脱水素酵素を標準に用いて確認した。 0 GP で可溶化された PSII 膜のショ糖密度勾配遠心には集光性クロロフィルタンパク質複合体 II (LHC2)、 PSI、 PSII コアーのバンドがあり、各々の分子量を沈降の距離から判断すると、 LHC2 140 kDa、 PSI 260 kDa、 PSII 470 kDa となった。 0 GP のタンパク質に対する結合数は、カタラーゼ、 PSII ともに約 65 μ mol/mg タンパク質と等しく、上記関係式を応用できる。 0 GP 中では、 LHC は 6 量体で存在し、一方、 PSI はサブユニット組成から計算される複合体の分子量に一致していた。しかし、 PSII コアーの 0 GP 中でのサイズは、 サブユニットの合計分子量の約 2 倍で、ダイマーであることが示唆された。 LHC、 PSII は 8 時間の遠心でも同じ分子量を示したが、 PSII はダイマーより大きな複合体が密度勾配中で生成した。 電子顕微鏡像にも、モノマーと思われる直径 100 A の粒子のへテロにつながった構造が見られた。ジギトニンを用いると、結合したジギトニン層を含めた直径 200 \sim 250 A の粒子が見られた。

系IIコア複合体の解体

小池裕幸·藤井良子·井上賴直(理研·太陽光科学)

光化学系IIコア複合体は、反応中心を構成するD1・D2タンパク質とアンテナクロロフィルタンパク質であるCP47・CP43及びシトクロムb559で構成されていると考えられていた。しかしSDSゲル電気泳動法の改良によりコア複合体は10kDa以下に多数の低分子量タンパク質が存在していることが明らかになった。最近我々は好熱性ラン色細菌シネココッカスのコア複合体においてこれら低分子量タンパク質のN-末端アミノ酸配列を解析することにより、全ての低分子量成分を同定した。それによるとシトクロムb559を含め8kDa以下に10種のタンパク質が存在していることが判った。従ってシネココッカス系IIコア複合体は高分子量タンパク質成分を含めて計14種のタンパク質から構築されていることになる。本研究ではこのコア複合体を更に解体・分離することを試みた。

好熱性ラン色細菌シネココッカスの系IIコア複合体を種々の界面活性剤、変性剤存在下で解体し、DEAEカラムクロマトグラフィーにより分離した。分離した画分はSDS-ゲル電気泳動によってそのタンパク質組成を調べた。

尿素存在下でトリトン8-100 (Tx-100) を用いて解体すると、高等植物の反応中心標品に近いものが得られた。この標品にはD1、D2の他にCP47がまだコア標品の1/5程度残っていた。低分子量成分としては高等植物の反応中心成分であるシトクロムb559 (E,Fタンパク質)とエタンパク質の他に、ほとんど同量のLタンパク質 (ORF38) と少量のMタンパク質 (ORF34) が結合していた。尿素存在下でTx-100処理をしないと反応中心標品が得られないことを考え合わせると、好熱性ラン色細菌ではタンパク質間の相互作用が強く、またLタンパク質は高等植物よりもより強固に反応中心に結合していることを示している。一方オクチルグルコシド処理した時は少量のCP43が遊離したのみで複合体はほとんど解体されなかった。しかしNaSCNを共存させるとコア複合体が解体され、CP43、CP47、シトクロムb559がそれぞれ分離された。ほとんどの低分子量タンパク質はモノマーとして可溶化されたが、H-タンパク質はCP47とともに単離されてきた。しかしD1・D2複合体はこの方法では回収されてこなかった。D1、D2は凝集し易いので、脱塩あるいはDEAE-クロマトグラフィーの間に凝集して溶出不能となった可能性がある。

シネココッカス系Ⅱ反応中心複合体の Zwittergent 3-14 による部分的解体

菓子野康浩、佐藤和彦、加藤栄、(東大、理、植)

好熱性ラン色細菌シネココッカス系Ⅱ反応中心複合体は、集光性クロロフィルを結合している47kDaと40kDa蛋白質、光化学反応の部位である約30kDaのD1およびD2蛋白質、チトクロームb559の9kDaと5kDaサブユニットから構成されている。さらにこれらに約50分子のクロロフィルaの他にカロチノイド、鉄、プラストキノンなどが結合している。系Ⅱの光化学反応やそれに続く電子伝達反応の機構を理解するためには、各サブユニットの役割や結合している成分さらに相互的な位置関係を明らかにすることが不可欠である。本研究では、この目的のために界面活性剤を用いた複合体の部分的解体を行なった。

両親媒性の界面活性剤 Zwittergent 3-14 を使ってラン色細菌シネココッカスの系Ⅱ反 応中心複合体を処理し、同じ界面活性剤の存在でゲル電気泳動を行なって分離するクロロ フィル蛋白質複合体のサブユニット成分を、それぞれのサブユニット蛋白質に特異的な抗 体を用いて調べた。この界面活性剤は、従来用いられていた各種界面活性剤とは全く異な る様式で系Ⅱ複合体を解体することが見出された。Zwittergent 3-14 はまず47kDa蛋白質 を複合体から遊離させた。同時にチトクロームbsssも複合体から分離した。ついで40kDa 蛋白質を部分的に溶出させ、またD1-D2 蛋白質複合体の一部を解体した。このため、ゲル 電気泳動でいままでに報告されていない型のクロロフィル蛋白質複合体、D1-D2蛋白質と 40kDa蛋白質の複合体が分離された。これにより、40kDa蛋白質がD1-D2複合体と結合して いることを示し、この蛋白質に結合しているクロロフィルが励起エネルギーを直接系Ⅱ反 応中心に伝達し得る可能性を強く示唆する。また、チトクロームbssgを含まないD1とD2蛋 白質のみの複合体が分離された。これはこのチトクロームの系Ⅱ反応中心での機能的ある いは構造的な役割を調べる上で興味ある複合体と考えられる。Zwittergent 3-14の大きな 特徴はサブユニット蛋白質を分離する際に結合しているクロロフィルをほとんど遊離しな いことである。そこで各分画のクロロフィルとフェオフィチンの含量を測定し、各サブユ ニット蛋白質に結合しているクロロフィル分子数を求めた。その結果、47kDa、40kDaおよ びD1-D2 蛋白質にそれぞれ、約23、22、および 6分子のクロロフィルが結合していること が見いだされた。

シネココッカスD1-D2-チトクロ-ムbssg複合体の単離とその性質

元木章裕, 佐藤和彦, 加藤栄, (東大 理 植物)

系 II の初期光化学反応は、D1-D2-チトクロームbsso複合体で行なわれるとされている。本研究は、熱や界面活性剤に対して安定な蛋白質を持つことが示されている好熱性ラン色細菌 Synechococcus elongatusを用いて、D1-D2-チトクロームbsso複合体を単離、精製し、その光学的活性や色素成分や鉄含量を調べた。

好熱性ラン色細菌 Synechococcus elongatus のチラコイドをトリトンX-100で処理してゲル電気泳動することにより、47kDa, 40kDa, D1, D2, $51/9u-4b_{559}$ よりなる系 II 反応中心複合体を精製した。この系 II 反応中心複合体をヘプチルチオグルコシドにより解体し、ゲル電気泳動することにより、D1, D2, $51/9u-4b_{559}$ よりなる複合体を単離,精製した。この複合体のポリペプチド組成を 5DS-ゲル電気泳動で調べたところ 47kDa, 40kDa, D1, D2, $51/9u-4b_{559}$ 0 2 つのアボ蛋白質から構成されていた。これ以外にいくつかの薄いバンドが認められたが、D13よび D2の抗体を使ってウエスタン ブロッティグを試みたところ、これらのバンドはD13よび D2蛋白質の会合体または分解産物であることが分かった。これにより、この複合体は混在のない $D1-D2-51/9u-4b_{559}$ 複合体であることが示された。

この複合体にジチオナイトの存在下で連続光を照射すると685nmで還元型フェオフィチンの蓄積が観察され、初期光化学反応の活性を保持していることが確かめられた。電子受容体ジフェニルカルバジドの存在でシリコモリブデン酸の光還元反応が認められた。この還元反応は、4℃に保存したとき4日後にも90%の活性が保持されていた。Q₆の光還元反応は検出できなかった。

この複合体には、フェオフィチン2分子当り6~7分子のクロロフィルaと3分子近い β -カロチンが含まれていた。しかし、プラストキノンは、ほとんど結合していなかった。また、鉄含量の測定を行ない、チトクローム b_{559} の含量を分光学的に求めた。系II 反応中心複合体には約3.3原子の鉄が結合しており、チトクローム b_{559} が約0.9分子含まれていた。D1-D2-51-70- Ab_{559} 複合体には約1.9原子の鉄が含まれており、またチトクローム b_{559} の含量は約0.3分子であった。これは、 Q_a と Q_b の近くに存在する1原子の非へム鉄がよく保存されている他に、もう1原子の役割不明の鉄が結合していることを示唆する。

非イオン性界面活性剤によるD1-D2-Cyt b559複合体の部分解体

° 唐 晓松、伏見 和郎、佐藤 公行 四川大学 生物系、 岡山大学 理 生物

最近の研究により、酸素発生型光合成生物の光化学系II 反応中心を担う色素蛋白複合体 (D1-D2-Cyt b559)が単離され、その構成ポリペプチドをコードする遺伝子の構造も解明された。その結果、化学構造の解明された紅色細菌反応中心のLとMサプユニットと光化学系II 反応中心のD1とD2ポリペプチドとの間に意味のある相同性が認められることが明らかになった。この相同性の認識は、光化学系II 反応中心における物理化学的解析や蛋白化学的解析の結果と相まって、D1-D2蛋白質が紅色光合成細菌類似の反応中心を形成していることを強く示唆するものである。しかし、光化学系II 反応中心の結晶化が成功していない今日では、その分子構築に関して、まだ多くの問題点が残されている。例えば、D1,D2蛋白質が反応中心の本体であることのより直接的な証拠や、チトクロムb559の役割、更にはP-680の強力な酸化力の形成の仕組みなどについては、より進んだ解析が待たれている。そこで、本研究においては、ホウレンソウ葉緑体からNanba&Satohの方法により純化された光化学系II 反応中心複合体について、非イオン性界面活性剤による部分解体を試みることにより、その構造と機能の解析を行った。

Triton X-100で調整したD1-D2-Cyt b559複合体は、まず界面活性剤をジキトニンに置き換えられた後、アルカリ性 (pH8.5)条件下で0ctyl-p-glucopyranoside処理され、高速ゲル濾過 (東ソー、G3000SW) にかけられた。その結果、四つのクロロフィル含有画分が出現し、それぞれP-I, P-II, P-III とP-IV と名づけられた。そのうち、P-I とP-II の主成分はD1-D2であり、チトクロム b559の含有量が少なくなっているのに対して、P-III には主にチトクロム b559が含まれ、P-IV が遊離された色素であった。P-I とP-II をそれぞれ集め、上の操作をもう一回繰り返し、それによってほとんどチトクロム b559を含まずD1, D2だけで構成されている二つの画分が得られた。この二つの画分について生化学的及び生物物理的な解析が行われた。その結果は、光化学系 II 反応中心がD1, D2蛋白質から形成されているとの考えを支持し、また、チトクロム b559が、光化学系 II 反応中心の初期反応に基本的に必須なものではないが、複合体の安定化や構造の維持などにおいて重要な機能を持つことも強く示唆している。

D 1 / D 2 / cytochrome b-559 反応中心複合体中のChl a と β-カロテンの分子数

小林正美、前田広幸、渡辺 正、中根弘之¹ 、佐藤公行¹ (東 大・生産研、¹ 岡山大・理・生物)

目的)1987年に単離された光化学系 II の D 1 / D 2 / cytochrome b-559複合体の色素組成と内部構造は、系 II のメカニズムを解明する上で基本的な情報となるが、現在までに報告された測定結果間には著しい差異が認められる。 そこで本研究では順相HPLCを用いて色素組成を詳細に検討した。

方法)ホウレンソウより得た反応中心複合体標品懸濁液20μ1にアセトン20mlを加え超音 波抽出を行った後ろ過し、HPLCと可視吸収測定(アセトン ,ベンゼン溶液)を併用して色 素構成を分析した。

結果と考察)アセトン抽出液のHPLC分析結果(図1)より、反応中心複合体中にはChla、 β -カロテン、Pheo aの3種類の色素のみ存在することがわかる。分光光度法とHPLC法の結果を総合するとPheo a 2分子あたりの色素数は、Chl a が 6.01 ± 0.37 (n=24), β -カロテンが 1.84 ± 0.11 (n=4)となり、これは反応中心複合体の色素構成が Chla/ β -カロテン / Pheo a = 6 / 2 / 2 であることを示唆する。

紅色非イオウ細菌の反応中心にはBPheo aが 2分子、BChlaが4分子、カロチノイドが1分子存在し、タンパク質の相同性より一般に充系 II 反応中心も同一の色素構成を持つと推測される。しかしこれら2つの反応中心は機能(ととしているが、今回の結果はこれとは著しくととしいるが、今回の結果はこれとは関なるに駆動される酸化反応)の点で完全に異なるにといるというのがD1、D2タンパク質には保存されない。たずなりになると、両者の色素構成に基本的なだの表を考えると、両者の色素構成に基本的なだを要が存在することは自然かいてはなお検討を要がある。

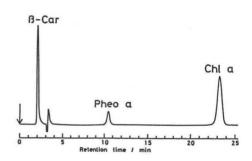


図1 アセトン抽出液のHPLCチャート

光化学系II (D1-D2-Cyt b559)複合体へのキノン再構成

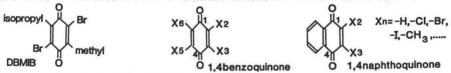
- ハロゲン化キノンはQA機能をリゲインできるか?!-

中根 弘之 · 佐藤 公行 (岡山大学 理学部 生物) 〇岩城 雅代 · 伊藤 繁 (基礎生物学研究所)

光化学系 II 反応中心 (PS II RC) では、光照射により励起された反応中心クロロフィル a (P680*)と第一次電子受容体、フェオフィチン(I)との間で初期電荷分離が起こり、光還元された I の電子はプラストキノン(QA) に移動する。 QAのない PS II RC 蛋白質複合体(D1-D2-Cyt b559)標品では P680と I 間で分離した電荷は半減期 40 ns で再結合し³ P680を生成する。 この標品に 2,5-dibrono-3-methyl-6-isopropyl-1,4-benzoquinone(DBMIB)あるいはシリコモリブデン酸等を添加すると再結合が抑えられる事からこれらの化合物がPS II RC内でQAの機能を代替すると考えられている(③④)。本研究では、ベンゾキノン(BQ)やナフトキノン(NQ)の各種誘導体を再構成したPS II RC標品についてその効果を分光学的に解析し、キノンの化学構造とQA機能との関係を明らかにしようと試みた。

[方法] 難波と佐藤の方法(①)により得られたホウレンソウ PSIIRC 複合体を等電点電気泳動法により高度に精製すると同時に蛋白質複合体を可溶化する界面活性剤をTriton-X100 から digitoninに置き換えて、安定性の高い(室温で 24 時間以上 0.K.) PSIIRC 複合体を得た(②)。 これをdigitonin(0.2 %)及び グリセロール(30 or 60 % (v/v))を含む 50 mM Tris (pH 7.2) 緩衝液に希釈し、dimethylsulfoxide に溶かしたアルキルあるいはハロゲン化 BQ (7種)、NQ (5種)を加えた。この試料に Nd-YAG レーザ閃光(532 nm)を照射しμ~m秒時間域での吸光度変化を測定した。

[結果と考察] キノン添加により、 $P680^+$ がm秒域で安定化され、 3P680 の生成が減少した事から、 $P680 \rightarrow I \rightarrow + I \rightarrow$



[文献]① Nanba, O. & Satoh, Ki. ('87) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 109-112.

- 2) Satoh, Ki. & Nakane, H. ('89) in Proc. VIIIth Int. Congr. Photosynthesis, in press.
- 3 Mathis, P., Satoh, Ki. & Hansson, O. ('89) FEBS Lett. 251, 241-244.
- 4 Takahashi, Y., Satoh, Ki. & Itoh, S. ('89) FEBS Lett. 255, 133-138.

ハロゲン置換ベンゾキノンとQB 部位との相互作用

佐藤和彦、加藤栄、A. Donner¹, W. Oettmeier¹ (東大·理·植物、¹Rhur-Univ.)

我々は先の植物学会において、種々のベンゾキノン誘導体が光化学系IIのQB 部位に 親和性があり、QB 部位において、プラストキノンに置き代わって電子を受け取ること、 3, - (3、4-ジクロロフェニル)-1.1-ジメチルウレア (DCMU) とも拮抗作用を 示すことを報告した。本学会では4つの水素原子をすべてヨー素や塩素などのハロゲン原 子に置換したベンゾキノンの誘導体について見いだされたQB 部位との強い相互作用につ いて報告する。

材料としては好熱性ラン色細菌 Synechococcus elongatus より調製した酸素発生系 I 標品を用い、QA-の酸化反応は閃光照射後の青色領域での吸光度変化により、又酸素発生反応はクラーク型の酸素電極を用いて測定した。

ここで用いたテトラヨードベンゾキノン(TIBQ)、テトラブロモベンゾキノン(TBBQ)、テトラクロロベンゾキノン(TCBQ)及びテトラフルオロベンゾキノン(TFBQ)はすべて電子受容体としての作用があり、TCBQ> TIBQ, TBBQ> TFBQ の順に高い酸素発生活性を示した。酸素発生速度と添加したキノンの濃度の逆数プロットより計算した Km は K

これらのキノンは電子受容体として作用するにもかかわらず、2, 6 ージクロロベン ゾキノン (DCBQ) を電子受容体とした酸素発生反応に対しては阻害作用を示した。半分阻害する濃度は TIBQ, TBBQ, TCBQ, TFBQ で各々、0.037、0.33、8.5及び620 μ Mであった。

関光照射後に起きる青色領域での吸収変化から測定された QA^- の酸化速度は、非常に低濃度の TIBQ, TBBQ, TCBQ の添加で大きく促進された。しかし TFBQ ではむしろ QA^- 酸化の阻害が観察された。これらのキノンは QA^- からQB への電子伝達反応に対する DCMU の阻害作用に対し、拮抗的に作用して、その50%阻害に必要な DCMU 濃度を高濃度側にシフトさせた。

これら全ての結果は、ハロゲン置換ベンゾキノンは系IIのQB 部位に強い親和性を持っていることを示している。特に TIBQ や TBBQ は DCMU に匹敵するか又はより強い親和性を示した。TCBQ がそれらに続き、TFBQ の親和性は一番弱いと考えられる。

光化学系Ⅱ膜におけるD1タンパク質とアトラジンの親和性に 影響を与える要因

高野正好、高橋正昭 (甲南大・理・生物)

アトラジンは光化学系 Π (PS Π) 反応中心 D 1 タンパク質に結合し、電子伝達を阻害することが分子レベルで明らかにされている。アトラジンの結合は強く、極微量で PS Π を阻害出来る。時には100%阻害に要する結合型アトラジンの分子数が、推定される反応中心の分子数よりも少ないことが報告されている。その原因として、酸素発生能、アトラジン結合能を共に持たない PS Π のグループがあるか、あるいは、PS Π 反応中心と1:1のストイキオメトリーで結合しなくても酸素発生を阻害することが考えられる。本研究ではアトラジンの PS Π に対する結合を調べ、この不一致の理由を明らかにした。

【方法】 PSII 膜 $(80~\mu g~Ch1/m1)$ を ^{14}C -アトラジン $(0\sim1.0~\mu M)$ 、 40~mM Mes-NaOH (pH~6.5) 、 10~mM NaCl、 0.4~Mショ糖を含む反応液 (0.5~m1) 中で、 5^{\mathbb{C}}、 15 \mathcal{H} インキュベートした後 10.500~x g、 20 分遠心し、上清の一定量を採ってフリーのアトラジン濃度を決定した。 全量からフリーを除いたアトラジンのモル数を Ch1~o モル数で割って結合数とした。 膜表在性タンパク質は、 PSII 膜の 1~M $CaCl_2$ 抽出液より DEAE-トーヨーパールを用いたイオン交換クロマト (pH~8.0) により単離した。

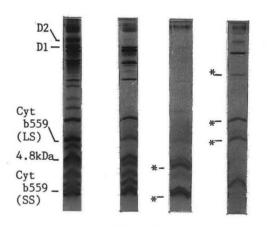
【結果】アトラジンのPSI膜に対する最大結合数(=結合部位の数)はPSI膜標品によって異なり1.18 ~ 2.82 mol/1000 mol Ch1 で、この結合数は個々のPSI標品の示す酸素発生活性(176 ~ 375 μ mol/mg Ch1/hr)と直線的な比例関係があった。解離定数は1.28 (±0.33) x 10^{7} /M と一定で、酸素発生能の失われたPSIにはアトラジンが結合しにくいことを示した。事実、CaCl2処理PSIは0.1~ $1.0~\mu$ M の濃度範囲でわずかしか結合を示さない。酸素発生に対するアトラジンの阻害カーブと結合カーブは、PSI反応中心に1分子結合すると阻害すると仮定するとよく一致しているので、酸素発生の阻害に要するアトラジン量は活性の低い標品ほど微量で済むと言える。しかし、酸素発生能自体はアトラジンの結合には必須ではなく、例えば、NH2OH 処理PSIではアトラジンの結合量は低下しない。D1タンパク質分子内のアトラジン結合部位の構造を安定化する、或は、結合に影響するファクターの存在が示唆される。CaCl2 処理で失われる膜表在性タンパク質の中でアトラジンとD1タンパク質に対する親和性を与える成分の検索を行っている。

PSII Qa機能の再構成。そのII.

°福原聡・荒賀千笑・赤堀興造・豊島喜則 (広島大・総合科学)

前年度の講演では、Qa光還元活性の異なる5種のPSII複合体を調製し、 その蛋白質および補欠分子組成とQa活性の関係を調べた。さらに、PQaを保持しているにもかかわらず、Qa活性の失活した複合体に対してQa機能の再構成を行い、Qa機能の発現にはD1/D2/Cyt b559/4.8kDa蛋白質以外にも 2種以上の蛋白質成分が必要であることを指摘した。本講演では、これらの成分の検索結果について報告する。

<結果>ほうれん草より得た○2発生PSII反応中心複合体 (RC)をオクチルチオグルコシド(OTG)で可溶化後、イオン交換クロマトグラフィ (DEAE-Toyopearl 650s)により新しい複合体を調製した。この複合体は1反応中心当りPQ。0.63分子を保持するが、パルス光照射に伴う325nm近傍での吸光度変化を指標にして求めたQ。活性はRCの16%まで減少していた。この複合体にOTG処理により反応中心から遊離した全抽出成分を加えて再構成すると、Q。活性はRCの50%まで回復した。そこで全抽出成分をさらに可溶化剤存在下でイオン交換カラム(DEAE-Sephacel)によりいくつかの面分に分面した。これ



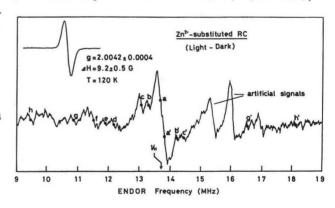
RC

OTG- fraction fraction extracts 1 2

光合成光化学系エプラストキノンアニオンラジカル(Qai)の EPR/ENDOR 小林次部,赤城興造,豊島喜則¹,河盛阿佐子²(¹ 広島大・総合科,²関学大・理)

紅色非イオウ細菌(Rps. Vividis)の光化学反応中心との比較から PSエ K おける第1電子定受容体 QA の存在状態はある程度推測されている。しかし、PSエ では細菌以比べ QA の安定性は低く、また QA、QB と相互作用している非人仏鉄(下が) への配位状態も Rps. vividisの場合と大きく異っていることが報告されている。ここでは EPR法、持以 ENDOR 法以より光化学反応で生成する プラストキ)ンアニオンラジカル(QA)とその近傍の分子との相互作用を調べ、 Rps. Vividis の それらと比較検討することを目的とする。 〈実験〉 PS 正粒子は桑原、村田の方法以従って得た。 EPR/ENDOR 試料濃度を高くする目的で、 ganotakisらの方法以より、 PSエから寒光性蛋白質をほとんど除去した反応中心複合体(RC)を作った。 QAでと高スセン下がとの成気的相互作用を取り除くため、 下でを Zatに変えた Zatー置換R C を調製し EPR/ENDOR試料とした。 1mm-アスコルビン酸塩の5 mm・デアミンデュンン存在下、 PH 8.0(4°C)、 70K方はび 120Kで、 EPR キャビティー中の試料以光照射することにより QAでを生成させた。 国には光照射試料から暗順応させた試料のシグナルを差し引いた状態の EPR かよび 1HENDOR スペクトルを示す。プラストキノンラジカル(PQAH、PQA)の報告例と比べると、この EPRスペクトルは、その形、 3値、吸收線中より、エタ) -1ル中生成した PQAで(第三2.0046±0.0002、4H=95±0.3分)

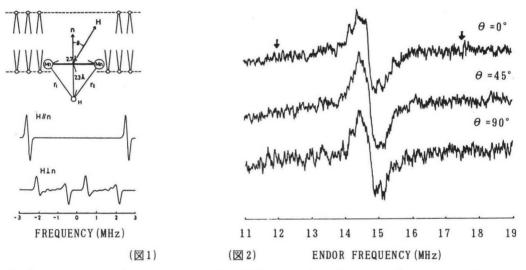
と非常以類似している。またこのシフナルの総加特性よりENDORスペクトルを得るための条件を検討した(Microf:0.8 mm, x.f.p.: 250m, mod. width: ±70kHz)。スペクトル中に電子スピンと「H 校スピン相互作用以より分離した NMR対を a-al, b-bl,---, a-紀で示す。



三野広幸、河盛阿佐子、小寺義男、永谷明美 (関西学院大・理)

図 2 に観測したスペクトルを示す。 H//n ($\theta=0^\circ$)の方向にシュミレーションと一致するスペクトルが認められた。他の方向については信号強度が弱いのでなお積算を要する。しかしEPRよりも大きな異方性が認められた。

これらの解析およびSig・IIsのENDORシュミレーションを報告する。



[1] A. W. Rutherford. BBA 807 (1985) 189-201

1Fp14 光化学系IIのD1タンパク質のヨウ素化部位

池内昌彦¹・篠原健司²・井上頼直¹(¹理研・太陽光科学、 ²森林総研・遺伝子発現)

高等植物の光化学系IIの水分解反応には塩素イオンが必須因子である。これと類似のヨウ素イオン(I^-)も同様の促進効果があるが、塩素イオンと違って系IIに電子を供与することができる。この電子の授受の結果として、D1 タンパク質が特異的にヨウ素化される (Ikeuchi et al. 1988)。これは、水分解酵素によって酸化されて生じた活性ヨウ素がその近傍のD1 タンパク質に共有結合したためと解釈される。したがって、D1 タンパク質分子内のヨウ素化部位の同定は、水分解酵素の構造解析の手がかりとなる。また、Mn 複合体を欠き水分解活性を失った系II 粒子でもD1 タンパク質の特異的ヨウ素化が起こる。このヨウ素化はD1 上の二次電子供与体(Z^+)によると推論されている。 Z^+ は別の証拠からD1 の1 6 1 番目(高等植物の場合)のチロシン残基であることが知られているので、水分解酵素によって引き起こされたD1 のヨウ素化がこのチロシン残基の近傍でおこっているかどうかは興味深い。

[実験] コムギの系Ⅱ膜断片からオクチルグルコシドを用いて水分解活性を保持した系Ⅱコア複合体を調製した。このコア複合体を塩素イオンのない溶液に懸濁し、ヨウ素イオン(125 I つ)存在下で光照射して D 1 タンパク質を特異的にヨウ素化した。処理後のコア複合体から電気泳動的に D 1 タンパク質を単離し、種々のプロテアーゼで断片化した。 得られたペプチド断片からヨウ素化を受けているものを分離し、プロテインシーケンサーでヨウ素化部位を決定した。

[結果] D1 タンパク質は疎水性が強くSDS の存在下でもプロテアーゼの作用を受けにくい。種々のプロテアーゼで得られた 125 I を含むペプチドの最小のものはトリプシン処理で生じた7 k D a ペプチド画分であった。この画分は<math>1 3 7 番目のロイシンから始まるペプチドと2 3 9 番目のフェニルアラニンから始まるペプチドを含んでいた。このペプチド画分をプロテインシーケンサーで分析 DN 末端から個々の残基に分離した。各画分の 125 I 含量を調べると2 5 -2 6 番目にピークが得られ、1 6 1 番目のチロシン残基の分離パターンと一致していた。 Z^* がこのチロシン残基のラジカルとすると、ヨウ素イオンや塩素イオンの結合部位もしくは水分解系の S_2 状態での正電荷の局在部位は Z^* の近傍にあることになり従来の知見を支持している。

葉緑体熱発光の発光スペクトル

園池 公毅、小池 裕幸、井上 賴直(理研・太陽光科学)

葉緑体の示す熱発光は、通常発光温度の異なる 6 種のバンドからなっている。 これらのバンドのうち -80 $^{\circ}$ -80 $^{\circ}$ $^{\circ}$ -40 $^{\circ}$ $^$

熱発光スペクトル測定は、発光をポリクロメーターで分光したのち Imaging Photon Detector System によって2次元的に記録し、これをスリットの高さ方向に積分することに よってスペクトルを得た。B-バンドの発光スペクトルは690nmに極大を示し、その形は 室温での蛍光スペクトルに一致した。 光化学系IIの遅延蛍光のスペクトルも690nm付近 に極大を持つと報告されており、B−バンドは系Ⅱから発光しているとの考えを支持する。 葉緑体(チラコイド膜)の Z -バンドの発光スペクトルは 7 4 0 nmに極大を示し、これは液体 窒素温度での系Iの蛍光スペクトルの極大波長に相当する。チラコイド膜を光化学系Iと 系 II に 分離 して 測定 したところ、系 I 標品 は Z -バンドを強く発光し、葉緑体の場合と同じく 7 4 0 nmに極大が観察されたが、系 II 標品では Z - バンドの発光強度が非常に弱く、発光極大 も69 Onmで葉緑体の場合とは異なっていた。この結果はZ-バンドがクロロフィルからの 非特異的発光であるとする従来からの考え方を支持しない。そこで有機溶媒抽出で得たフ リーのクロロフィルの熱発光を再検討したところ、100% MetOH中では発光せず、水を含む系 のみで発光することがわかった。このことは Z-バンドがクロロフィルのモノマーからは発 光せず、アグリゲートからのみ発光することを示唆する。光化学系Iは系Iに比べてタンパ ク質あたり高濃度(2倍近く)でクロロフィルを結合している。系Iのみが Z-バンドを発光 することは、この系Iに特有なクロロフィルの存在状態を反映しているためと考えられる。

イネ クロロフィル b 突然変異株におけるケイ光クエンチング の段階的暗回復過程

^o小林善親、山本晃市、与志平 尚、奥 達雄 (九大・農・林学)

植物葉に光を照射すると、クロロフィルのケイ光強度は光照射直後に最大となり、その後振動しながら徐々に減少し定常値に達する。このようなケイ光の消光(クエンチング)は、QAの酸化、光化学系Iの集光性クロロフィル蛋白質(LHC-II)のリン酸化によるLHC-IIから光化学系Iへの励起エネルギー移動の増加、チラコイド膜を介して形成された ΔH+による無幅射遷移の増大、光による消光物質(ゼアキサンチン)の生成などによって起こると考えられている。

このようにいくつかの原因に由来するケイ光の消光が、光化学系Iを構成しているどの クロロフィル蛋白質複合体で起こっているかを明らかにするため、全クロロフィル当たり の Chl b含量が 0~25%の間で少しづつ異なるイネ突然変異株およびそれらのハイ ブリットを用いて、クロロフィル蛋白質組成、ケイ光の暗回復の時間変化などを解析し、 次のような結果を得た。

- (1) クロロフィル当たりのLHC-II量(28、27、26kDaポリペプチド)はChlb含量に比例して増加した。CP43、CP47などのChlaのみを含むアンテナ・クロロフィル蛋白質は、すべての突然変異株に存在していた。
- (2) 12 時間暗所に置いたイネ(暗適応葉)に光を照射したときのケイ光消光の大きさ (消光率) は、Ch1 b含量が $0\sim15\%$ の間ではb含量の増加とともに減少、 $15\sim25\%$ の間ではb含量の増加とともに大きくなった。
- (3) 暗適応葉に $8\sim1$ 0 分間光を照射し、その後、 $0\sim1$ 8 0 分間暗所に置いたのち再び光を照射したときたときの消光率の増加の時間変化(ケイ光強度の暗回復)は、野生型イネでは少なくとも 3つの過程($t_{1/2}=1\sim2$ 分、 $5\sim6$ 分、約 6 0 分)で段階的に起こり、Ch 1 b 欠失型イネでは、主に 1つの過程($t_{1/2}=5\sim6$ 分)で進行した。

以上の結果は、ケイ光の消光はLHC-IIと反応中心を構成するOロロフィル a 蛋白質の両方で起こること、Chl b 欠失型イネにおいて $t_{1/2}=5\sim6$ 分で進行するケイ光強度の暗回復は、反応中心コアでのケイ光消光の暗回復であることを示唆している。

一般講演第2日3月29日(木)

一般講演

第2日 3月29日(木) 午前の部

A会場 酵素

B会場 オルガネラ

C会場 分子生物学Ⅲ

D会場 炭酸固定

E 会場 成長制御・障害

F 会場 光化学系 I

D-1蛋白質プロセッシング酵素の精製と性質(続報)

。藤田 修嗣 佐藤公行 (岡山大 ·理・生物)

D-1 蛋白質は D-2 蛋白質、チトクローム b_{559} と共に光化学系 II 反応中心を構成する成分である。この蛋白質はチラコイド膜蛋白質としては最も大きい速度で代謝回転する蛋白質としても知られている。33.5~kDa の前駆体として合成された D-1 蛋白質は合成後数分以内に C 末端のアミノ酸 9 残基分のペプチドが切除されて、32~kDa の成熟型へと変化する。この C 末端切除による成熟化の生理的意義は未だ明らかにされていない。

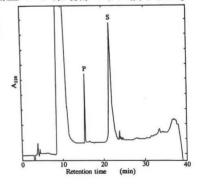
すでに我々はホウレンソウのチラコイド膜より D-1 蛋白質の成熟化にかかわる酵素を可溶化し、 QAE-Toyopearl 550C 及び Hydroxylapatite を用いたクロマトグラフィーでその精製を試みたが、カラム上で挙動をともにする酸素発生系 33kDa 蛋白質を除去することは困難であった(1989 日本植物生理学会)。今回我々は、Cu-chelate affinity gel を使用することにより両蛋白質を分離し高度な精製標品を得た。なお、酵素活性の検出は $in\ vitro\$ 系で得た D-1 蛋白質前駆体を基質として用い、フルオログラム上で成熟型の産生を検出する方法で行なった。

SDS-PAGE 及び Sephadex G-75 によるゲル濾過から本酵素の分子サイズは 35 kDa と推定できた。また、活性の至適 pH は約 7.5 であった。酵素活性はイオン強度に対し非常に敏感であり、 $100\,$ mM の NaCl 存在下では可逆的に失活した。更に、各種のプロテアーゼ阻害剤の効果を調べたが、有効と認められる阻害剤は見いだせなかった。

一方、D-1 蛋白質前駆体の C 末端 29 残基の合成ペプチドが、本酵素により成熟型の C 末端に相当する部位と他の一ヶ所で切断されることも分かった(FEBS Lett. 1989)。しかし、今回高度に精製した酵素を用いたときには成熟型の C 末端部のみに限られた。

また C 末端11 残基のペプチドでは切断は認められず、 酵素の認識部位が切断点より N 末側にあることが示唆

された。このような解析を進めることにより認識部位の同定、新たな活性検出方法の確立などが可能となり、D-1 蛋白質の成熟化の意義に関する情報を与えてくれるものと期待される。



O 河野 昭子、南森 隆司¹ (大手前栄養文化学院、栄養学科、 ¹神戸大学、農、農化、)

一般に植物種子発芽時には、 α -アミラーゼが合成されて、デンプン分解の主役を演じることが報告されている。 β -アミラーゼに関しては、大麦、小麦では種子中に結合型で存在していたものが、発芽過程で遊離型に変換されるとされており、ダイズ、レンズ豆においては種子中に存在するが、発芽過程では増加しない。我々は、マメ科牧草であるアルファルファ (Medicago sativa L.) 種子中に、 β -アミラーゼが存在し、発芽過程で著しく活性が増加することを見い出した。そこでアルファルファ発芽種子デンプン分解系の特徴を明らかとしたい。

アルファルファ種子(5g)を暗発芽させ、8日目までサンプリングし、100m1の酢酸バッファー中でホモゲナイズし、遠心上清を粗酵素液とした。粗酵素液の凍結乾燥標品を、電気泳動の試料とした。 $β-アミラーゼ活性は、3,5,DNS法、Pantrak E.K.テスト法で測定し、<math>\alpha-Pミラーゼ活性は、カルシウム保護法、Blue value減少法、及びPhade-basテスト法で測定した。また<math>\alpha-グルコシダーゼ$ (マルターゼ)活性は、グルコース Cテスト法で測定した。等電点電気泳動は、Multiphor Π y x f λ (Pharmacia-LKB)を用い、イモビラインゲル及びアンホラインゲル中で行い、活性染色法でアミラーゼパターンを分析した。

発芽過程でβーアミラーゼ活性は、4 - 6 日の期間に種子の約2倍に増加した。イモビラインゲル中で5個のβーアミラーゼアイソフォームが検出され、それぞれこの期間に量的増加が認められた。一方、αーアミラーゼは、未発芽種子中に存在しているが、発芽3日後急速に減少した。興味あることに本αーアミラーゼは、アンホラインゲル中では活性を保持していたが、イモビラインゲル中では失活し検出されなかった。そして、アンホラインゲル中では、発芽3日以降の量的減少が確認された。マルターゼ活性は、種子中には少ないが、発芽初期に急増し2日目でピークとなり以後発芽七日目まで暫時減少をたどった。故に、アルファルファ発芽種子中のデンプン分解系には、αーアミラーゼ、βーアミラーゼ、マルターゼが、以上のような様式で関与する。このような特殊性は他の植物種子では報告されていない。

1) J. Biochem. 105.231(1989) 2) 生化学 Vol. 61 No. 9 p. 1108(1989)

武市哲郎 · 中村保典 (農業生物資源研)

Q-Enzyme (以下QE)は、デンプン生合成過程において、 $\alpha-1$ 、4結合を $\alpha-1$ 、6結合に転位することによりデンプン分子に分岐構造を導入する酵素である。イネ種子の登熟期におけるデンプン含量の増加に相関してこのQE活性が急激に増大することから、QEはデンプン蓄積過程におけるキー酵素の一つであると考えられる。今回このQEの精製を試みたので報告する。

QE活性の測定は、ウサギ筋肉の phosphoryrase a 共存下でグルコース1リン酸より生成するアミロペクチンをヨウ素呈色反応で定量することにより行った。登勲中のイネ(早生品種フジヒカリ)種子を氷冷しながら乳鉢でホモゲナイズし、20%~55%硫安沈澱分画より精製を開始した。 Sephacryl S300 HR, Butyl Toyopearl 650S, (以下HPLCを使用) G3000SW, QAE2SW, Ether-5PW の各種カラムクロマトグラフィを用いて精製を行った。Butyl-Toyopearl 650S による疎水クロマトグラフィにおいて、疎水性の低いメジャーピーク (QE1とする) と疎水性の高いマイナーピーク (QE2とする)が認められたので、この2種類について精製を試みた。QAE2SW, Ether-5PW によるクロマトグラフィにおいても、QE1とQE2の溶出のピークの位置が明確に異なることが確認できた。QE1については、SDSーPAGEにおいて分子量約80Kの明瞭な単一バンドとなるまで精製することができた。含量のはるかに少ない(1/10以下)QE2については今のところ部分精製の段階にとどまっているが、ゲルろ過の結果よりQE1とほぼ等しい分子量を持つことが分かっている。

また精製したQE1を抗原としてウサギを免疫し、粗抽出タンパクのウェスタンブロッティングにおいてQE1と特異的に結合する抗血清を得た。この抗血清より単離したIgGはQE1の活性を阻害したが、QE2の活性はほとんど阻害しなかった。

以上の結果より、登熟中のイネ種子に少なくとも2種類のQEが存在し、この 2種(QE1とQE2)はかなり異なった構造を持つ酵素であることが分かった。

ホウレンソウ緑葉中に存在する同化型硝酸還元酵素不活性化 因子の精製と性質。

> 〇吉村倫彰,佐藤隆英,小倉長雄,中川弘毅 (千葉大, 園芸,農化)

我々は既にホウレンソウ緑葉から硝酸還元酵素(NR)活性を阻害するタンパク質性因子(NRI)を見いだしている。このNRIは糖タンパク質であり分子量約110KDaで2個のサブユニットから構成されている。NRにNRIを反応させるとNRの見かけの分子量が大きくなるが、サブユニットサイズには変化が認められなかった。これらの結果から、本NRIはNRのFADドメインに結合するタンパク質であろうと予想していた。しかしその可能性を直接支持する結果は得られていないので、今回NRIの同定を試みると共にNRIの阳客様式を再検討したので報告する。

(方法ならびに結果)

前回の本大会で報告した部分精製標品は分子量110KDa前後の2種の成分が混在するものであり、いずれの成分がNRI活性を有するのかを特定できなかった。そこでNRI標品を非変性条件下でのポリアクリルアミドゲル電気泳動(PAGE)にかけた後、ゲルを1mm間隔で切り出し、各々の切片からタンパク質を抽出した。各画分のNRI活性とSDS-PAGEの結果を比較することにより2成分のうち分子量の小さい成分がNRIであると推定した。このNRIは分子量51KDaのサブユニット2個から成るホモダイマー構造をとっている。

NRとNRIを反応させ経時的に反応物を非変性条件下でのPAGEにかけると、新たに移動度の小さい2本のタンパクバンドが出現した。これらをゲルから切り出し、SDS-PAGEにかけたところ、NRIのサブユニットに相当する染色バンドは認められたがNRIのサブユニットに相当する染色バンドは検出できなかった。従ってこれら新たに生成した2つの分子種はNRとNRIの結合産物とは考え難いことを示している。以上の結果は、NRIはNRに結合することによりNR活性を阻害するとの我々の予想と矛盾しており本NRIの阻害様式は再検討する必要があることを示している。

Yamagishi et al. (1988) Plant Cell Physiol 29:371-376

NAD-ME型C4植物からのアスパラギン酸アミノ基転移酵素アイソザイムの精製とその性質 谷口光降・杉山達夫(名古屋大・農・農化)

NAD-ME型C4植物のC4ジカルボン酸回路において、アスパラギン酸アミノ基転移酵素(AspAT)は、葉肉細胞(MC)の細胞礎質および維管束鞘細胞(BSC)のミトコンドリアに局在し、中心的な役割を演じていると考えられている。本研究ではこの両細胞でのAspATアイソザイムの機能発現を解明するために、両アイソザイムを精製し、その性質を比較検討するとともに抗体を調製した。

シコクビエ(Eleusine Coracana)緑葉には、ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離される少なくとも三種のアイソザイムがあり、AspAT-1はMCに、AspAT-3はBSCに多量に存在した。また、AspAT-2は他に比べ量的には少なく、みかけ上両細胞に分布している。さらに両アイソザイムの細胞内局在性および光による誘導から、AspAT-1とAspAT-3がC4光合成に関与していると判断して両アイソザイムを精製した。最終的にAspAT-1は120倍、AspAT-3は60倍にまで精製され、両アイソザイムともにSDS-PAGEで分子量40,000のバンド1本と僅かな混在タンパク質が認められた。未変性状態での分子量はゲルろ過により共に80,000と測定されたので、両アイソザイムはホモダイマーであると思われる。一方、両アイソザイムの基質に対するKm値には有為な差異は認められなかった。しかし、オキザロ酢酸生成方向の反応においてAspAT-3はAspAT-1よりも至適pH範囲が狭く、AspAT-3の活性は酸性側で急激に低下した。また、両者の荷電状態にも著しい差がみられ、タンパク質の表面構造上の違いを反映していると思われる。

次にAspAT-3に対するウサギの抗体を作出し、両アイソザイムとの反応性を検討したところ、AspAT-3に優先的に反応した。一方、当研究室で以前に調製されたPanicum maxim um Jacq. var. trichoglume Eyles (PEP-CK型C4植物)のMC細胞礎質由来のAspATに対する抗体は、シコクビエAspAT-1と特異的に反応した。したがって、シコクビエAspATアイソザイムは,動物のAspATアイソザイムと同じく,免疫学的に区別される異なる構造をとっていることも判明した。

現在我々は、光照射にともなうAspATアイソザイムの発現についても検討中であり、この点についても報告する予定である。

〇中村勝人、 田村五郎 (千葉大·園芸·農化)

植物におけるシステイン合成酵素系はセリンアセチルトランスフェラーゼ(SATase)およびシステイン合成酵素(CSase)により構成されており、前者はL-セリンのアセチル化による0-アセチル-L-セリン(OAS)合成反応を、後者はOASと硫化物イオンとの縮合によるL-システイン合成反応を触媒する。我々は従来より、高等植物であるコマツナおよびニラ緑葉からSATaseおよびCSaseを分離精製し、その諸性質について検討を加えてきた。その結果、CSaseには一次構造の異なる多様性成分が存在すること、SATaseはCSaseとの複合体を形成し、特に、ニラ緑葉では3種のCSase多様性成分のうち特定のCSase成分が複合体形成に関与しているという知見を得た1)。本研究では、CSase多様性成分の存在と生理的役割との相関をさらに明確にするために、触媒活性に着目した検討をおこなった。

既報 $^{1)}$ に準じた精製法により得られた二ラ緑葉 CSase 3 成分 (CSase 1-A, 1-B,2)それぞれのシステイン合成活性に対する阻害実験をおこなったところ、インドール、ヒドロキシルアミンおよび 2 -オキソーグルタル酸による CSase 2 活性の特異的阻害が観察された。また、CSase 2 のシステイン合成における 2 基質に対する K m 値が他成分に比べて高いことは、本酵素成分が他の酵素反応を触媒する可能性を示唆した。実際、システイン合成以外の酵素活性の検出をおこなったところ、トリプトファン合成酵素の β -サブユニットに相当する活性は検出されなかったが、CSase 2 からは高い β -シアノアラニン、S-メチルシステインおよび S-ヒドロキシエチルシステイン合成酵素 活性が検出された。このうち、 β -シアノアラニン合成酵素 (CNASase) の比活性 (26.0 units/mg protein)は、ルーピンより CNASase として精製した標品 2)のそれ (43.5 units/mg protein)と同等であった。さらに、CNASase のイオン交換および疎水クロマトグラフィーにおける挙動と CSase 3 成分の含量は、ニラ緑葉に存在する CNASase 活性の84% が CSase 2 に由来することを示した。本研究と既報 1)の結果はニラ緑葉 CSase 3 成分のうち、1-B は複合体形成、2 はシアン解毒に関与することと同時に、1-A が正味の CSase であることを示唆している。

- 1) 中村、政田、福島、田村 日本植物生理学会1989年度年会要旨集 p. 90
- 2) Akopyan, T. N. et. al. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 72, 1617 (1975)

フェレドキシン - NADP還元酵素の精製途上における限定分解に ついて

辻田麻紀、亀井加恵子、 ○先浜直子、押野礼子、新 勝光 (神戸大・理・生物、 ¹神戸山手女子短大・生化)

先年ホウレンソウのフェレドキシン-NADP還元酵素(FNR)の分子量が精製途上において35 kDaから33 kDaに減少していくことを報告した(1)が、この分子量変化は成熟FNR分子が限定分解による2次的変化を受けることに起因すると考えられる。そこで本研究では2つの異なる方法で分子量の異なる2種類のFNR(33 kDa FNR 及び35 kDa FNR)を単離してその構造を比較することにより限定分解がどのように起こっているかを調べた。

[精製法] 33 kDa FNRの精製は既報(2)によった。35 kDa FNRはホウレンソウ葉のアセトン粉末から35%飽和硫安中で超音波処理により抽出し、2段階の疎水性クロマトと固定化フェレドキシンカラムによるアフィニティクロマトで精製した。精製途上の限定分解を阻止するため全ての操作を4℃以下、pH 9.3(1)で行った。

[結果] 33 kDa FNRはイオン交換HPLC分析で3成分に分離し、各成分はKarplus ら(3)の報告と比較すると $11\sim17$ 個のN 末端アミノ酸を欠落していたが、C 末端構造はKarplus の報告と同一であった。一方、限定分解を抑えて単離した35 kDa FNRにはイオン交換HPLC 分析で検出される2成分が混在したが、手動エドマン分解によるN 末端分析ではI1e-2 から始まる構造のみが同定された。このことは、残る1 成分がエドマン分解では遊離しない τ -ピログルタミン酸残基をN 末端にもつKarplus のFNR と同一のものであることを示している。以上の結果から、Karplus のFNR が葉緑体で機能している成熟FNR 分子であり、これが精製途上でN 末端側のみに限定分解を受けて分子量や電気的性質の異なるFNR に変化したと判断される。

- (1) 冨沢ら(1987)日本植物生理学会1987年度年会講演要旨集 p.291.
- (2) Sakihama, N. et al. (1983) J. Biochem. 83, 129-134.
- (3) Karplus, P. A. et al. (1984) Biochemistry 23, 6576-6583.

ソラマメ葉肉細胞液胞のペルオキシダーゼの精製とその性質

高浜有明夫 (九州歯大・生物)

最近、ペルオキシダーゼ(POX)の生理的役割についていくつか明らかになってきている。それらは、細胞壁の木化、オーキシン代謝、感染からの防御、酸化的障害からの保護等である。細胞壁の木化に関与するPOXは細胞壁に、酸化的障害からの保護に関与するPOXは葉緑体に存在している。この他、液胞内にもPOXが存在することが示されている。我々は、ソラマメ葉肉細胞液胞を用いて液胞内に塩基性POXが存在することと、その酵素が液胞内で液胞に含まれているフェノール性化合物の過酸化水素による代謝に関与していることを示してきた($Plant\ Cell\ Physiol.in\ press$)。ここでは、ソラマメ液胞に含まれている塩基性POXを単離精製したのでその性質を示すと共にその生理的役割について議論する。

ソラマメ葉 (190g)を12.5 mM Tris-HCl(pH 7.5)中で壊してガーゼで濾過した後、遠心 分離で得られた上清に対して硫酸アンモニウム分画(50-90%)をおこなった。透析後、10 m M リン酸緩衝液(pH 7.0)で平衡化したCM-セルロースを用いてPOXを分離した。ここで 分離されたPOXは0.1 N NaClを含む25 mMリン酸緩衝液(pH 7.0)で平衡化したトヨパー ル HW 55Fを用いてゲル濾過を行なった。この分画には二種類のPOXイソ酵素が含まれ ていた。これらは更にCM-セルロースを用いて分離した。ここで得られたPOXを用いて 以下の実験を行なった。この酵素は404,510,635 nmに吸収極大を持っていた。この吸収極 大は過酸化水素 (0.1 mM)によって418,522,556 nmに変化した。分子量はショ糖密度勾配 遠心によって約49,000と推定された。至適pHは約5であった。シアンイオン、アジドでこ の酵素活性は抑制されたが、pCMBは殆ど影響を与えなかった。この酵素はソラマメ葉肉細 胞液胞に含まれているフラボノールとDOPAを酸化できた。フラボノールに対するKm値は0. 1 mM以下であった。DOPAに対するそれは約 7 mMであった。1.78 mMグアイアコール存在下 での過酸化水素に対するKm値は0.83 mMであった。フラボノール類に対するVmaxはケンフ ェロール=クエルセチン>ルチン≫ロビニンであった。DOPAに対するVmaxはルチンに対す るそれと同程度であった。液胞内のフラボノールとDOPAの濃度は1-10と20-100 mMと推定 された。以上の結果に基づき液胞内POXの生理的機能について議論する。

アスコルビン酸ペルオキシダーゼの組織及び細胞内での分布 - 分別測定法-

陳 功祥 浅田浩二 (京都大 食研)

アスコルビン酸ペルオキシダーゼ (APX)は葉緑体内で過酸化水素を消去する。我々はチャの葉からこの葉緑体型のAPXとは性質の異なるAPX isozymeを精製した (Chen, G-X. and Asada, K. (1989) Plant Cell Physiol. 30:987-989.)が、そのisozymeの細胞内での局在性、そしてAPXの植物組織間での分布は明らかにされていない。ここで我々はAPXのisozyme間、そしてAPXとグアヤコールペルオキシダーゼ (GPX)との性質の相違を利用し、これらのperoxidaseを分別測定する方法を開発し、その組織及び細胞内での分布をいくつかの植物について明らかにした。

方法) 1. Hydroxylamine (HA)はAPXを失活させるが、GPXには影響を及さないので、HA存在下でのアスコルビン酸 (AsA)酸化活性をGPX活性とした。また、p-Aminophenol (AP)は APXによって1電子酸化され生ずるAPラジカルがAPXを失活させる。しかし、このラジカルはGPX失活させず、ascorbate (AsA)を酸化する。この性質を利用してAP存在下でAPXとGPXの相対活性を測定した。2. APX Iは80 mM Hydroxyurea (HU)存在下でAsAの酸化初速度がHUの存在しない時の265%に増加するが、一方、APX IIの初速度は56%となる。この性質を利用して、APX IIとAPX Iの相対的な活性を求めた。また、APX IIはAsAを除くと1分以内に失活するが、APX Iの半減期は40分であるので、AsAを含まない条件下での失活曲線からAPX IIとIの相対含有量を求めた。

結果)我々は前述した方法を各生育段階のチャの葉、ホウレンソウの葉と根、単離葉緑体に応用し、次の結果が得られた。 APXはこれらの植物の緑色組織に存在し、かつAsAのperoxidaseによる酸化活性の95%以上を占める。また、APX活性はダイコン、ホウレンソウの根など非緑色組織にも検出されたが、緑色組織にはAPX IとIIの両方を含むのに対し、根はAPX Iのみを含む。ホウレンソウの葉の粗抽出液にはAPX isozyme IとIIが存在するが、単離無傷葉緑体にはisozymeIIのみが存在することを証明した。葉緑体の分化が進んでいないチャの幼芽ではほとんどisozyme Iの活性しか検出できないが、葉の成熟と葉緑体の発達とともにisozyme IIの活性が増加し、成熟葉では全活性の70%以上となった。以上の結果はAPXIIが葉緑体に、APX Iが葉緑体以外の細胞画分にそれぞれ局在していることを示している。

アスコルビン酸ペルオキシダーゼの自殺基質 - その構造との関係 -

陳 功祥 尼子 克己 浅田 浩二 (京都大 食研)

【目的】 アスコルビン酸ペルオキシダーゼ(APX)は葉緑体などに局在し、植物でのH₂O₂ の消去に機能している。APXはHydroxylamine(HA), Hydroxyurea(HU), p-Aminophenol(AP), p-Cresol(CR)を1電子酸化し、これらのradicalが酵素を失活させる、すなわちこれらが自殺基質となることを見いだした(J. Biol. Chem. <u>265</u> in press(1990))。今回は、これらの化合物およびその誘導体によるAPXの失活のkineticsについて解析し、そのradicalの構造との関係を検討した。

【方法】 APXの2種のアイソザイム(I, II)は、チャの葉から精製、或いは部分精製した。またradicalはEPRシグナルで、peroxidase活性はアスコルビン酸(AsA)の酸化速度をA₂₉₀の減少から検出した。

【結果】 HA, HU, AP, CRと同様、HA の誘導体であるN-methylhydroxylamine(MH), Acetohydroxamatic acid(AH), Glycinehydroxamic acid(GH)とHydrazine の誘導体である Semicarbazide(SC), Hydrazinium(HN), Phenylhydrazine(PH)は、自殺基質としてAPX を阻害した。これらの化合物の存在下でAPXによるAsAの酸化速度を時間に対してプロットしたところ、APXの阻害は一次的であった。これからみかけの阻害定数 K₁と失活の反応速度定数 K_{1nact}を求めた(Table.1)。この結果からAP, HA, PHが高い阻害効果を示した。

Table 1. Comparison of the kinetic parameters of various suicide inhibitors of AsA peroxidases I and II

Suicio			K _I (mM)		k _{inact} (s ⁻¹)	
IIIII I	APX I	APX II	APX I	APX II	APX I	APX II
APb)	0.50	0.25	-	-	-	-
CRb)	-	10	_	-	-	-
HU	54	15	660	500	0.16	0.50
HA	0.12	0.08	0.57	0.84	0.13	0.25
MH	>100	-	377	-	0.03	-
AH	60	-	280	-	0.33	-
GH	33	-	166	-	0.16	-
SC	50	-	110	-	0.08	-
HZ	>50	-	-	-	-	-
PH	0.015	-	0.2	-	0.21	_

a) Determined as the concentration causing 50% inhibition of ascorbate oxidation by the isozyme at interval of 50-60 s after the start of reaction.
 b) Determined as concentration of 50% inhibition of hydrogen

b) Determined as concentration of 50% inhibition of hydrogen peroxide reduction rate in first 60 s after start of reaction.

モノデヒドロアスコルビン酸還元酵素のアミノ酸配列

2Aa11

"佐野 智、浅田浩二 (京大・食研)

光合成生物では、光合成の最終的な電子受容体である CO_2 の量に比べて照射光が過剰であると光化学電子伝達反応にともない、 O_2 が還元されてスーパーオキシドアニオンラジカル (O_2^-) が生成する。 O_2^- の不均化反応で生じる H_2O_2 はストロマの CO_2 固定能を阻害する。この阻害を防御するために植物の葉緑体やラン藻にはアスコルビン酸(AsA)を電子供与体とするアスコルビン酸ペルオキシダーゼを中心としたNAD(P) H依存の H_2O_2 消去系が存在する。この系に存在するモノデヒドロアスコルビン酸(MDA)還元酵素はAsAの1電子酸化生成物であるMDAラジカルをNAD(P) Hを電子供与体として還元する。

われわれは、昨年度本大会において、キュウリ果実から単離したMDA還元酵素に哺乳類のミトコンドリア由来のリンゴ酸脱水素酵素と相同性の高いアミノ酸配列を持つ部分が一部あること、またこの二つの酵素はNADHによって互いの基質(MDAラジカルおよびオキザロ酢酸(OAA))両方ともを還元し得ることを報告した。さらにアミノ酸配列と活性の関係について比較するため、MDA還元酵素を新たに精製しアミノ酸配列をさらに決定することにした。

キュウリ果実からの粗抽出液の硫安40~75%画分を、まずDEAE-SephacelおよびSephadex G-100カラムクロマトグラフィーにかけ精製した。この段階においてMDA還元活性画分に0AA還元活性が混在しており、この後のBlue Sepharose CL-6Bカラムクロマトグラフィー(0~10 mM NADH直線濃度勾配)によっても2つの活性を分離できなかった。このことはキュウリのMDA還元酵素とリンゴ酸脱水素酵素の物理化学的性質が似ていることを示唆する。その後、5'-AMP Sepharose 4Bカラムクロマトグラフィーによりさらに精製を行い、SDS-PAGE電気泳動で単一バンドになる標品を得た。しかし、この標品にも0AA還元活性が残存していた。両活性の熱失活の挙動が異なっていることから、この0AA還元活性の大部分はMDA還元酵素由来ではなく、混在しているリンゴ酸脱水素酵素由来であると思われるが、5'-AMP Sepharose 4Bによって得られた0AA還元活性画分の比活性から考えると、リンゴ酸脱水素酵素は最高でも3%しか混入していないと思われる。

この標品を、リジルエンドペプチダーゼで消化後、逆相HPLCによって約40のペプチドを得た。これらのペプチドのアミノ酸配列を現在決定中である。

田中 养、久保明弘、榊 剛、「河村幸雄 (国立公害研 生物、「食総研 蛋白研)

グルタチオン還元酵素 (GR) (NADPH + H+ + GSSG → 2GSH + NADP+)は生体内のGSH/GSSG 比を高く保つことでチオール酵素の安定化、植物の過酸化水素の解毒に働くアスコルビン 酸ペルオキシダーゼの基質アスコルビン酸の再生系に関与すると言われている。GRは種々 の環境ストレスで誘導生合成されることが知られているので植物の環境ストレス耐性機構 を調べる上で興味ある酵素であると思われる。私たちはホウレンソウ葉緑体からGRを単離 し、酵素化学的性質について検討した。植物には葉緑体型、細胞質型の2種のGRが存在し、 細胞質型GRは他の種からのGRと比較的類似した性質であるのに反し、葉緑体型GRは今まで 知られているGRと種々の点で性質が異なっていることが明らかになったので報告する。

ホウレンソウGRのアイソザイムの分離はホウレンソウ葉粗抽出液をFPLCのMonoQカラムで20 mM K-phosphate (pH 7.8)の0-400 mM KC1濃度勾配で行った。ホウレンソウと大腸菌のGRの単離はADP-Sepharoseを含む数種のカラムクロマトグラフィーで行った。

ホウレンソウのageとGRのアイソザイムパターンの関係をFPLCで調べた。播種後14日目の明条件下で育成したホウレンソウ芽生えは葉緑体型のGRのみ検出され、播種後42日目まで同じく葉緑体型GRのみ検出された。一方、暗黒下で14日間育てられたホウレンソウ芽生えては細胞質型が大部分で若干の葉緑体型も検出された。葉緑体型のGRから調製した抗体は葉緑体型GRと反応したが細胞質型とは反応しなかった。葉緑体型GRのnativeな分子量はゲルロ過で12.8万、native gradient-PAGEで12.3万、SDS-PAGEで6.0万と算出された。それゆえに分子量6万の同一のサブユニットからなるdimerであると想像される。一方、植物葉緑体以外から単離されたGRは例外なく分子量約10万のhomodimerであり葉緑体GRはこの点でも異なったタンパク質構造をもっているといえる。アミノ酸組成を他の起源の GRと比較した時、かなり類似しているが葉緑体GRはPhe残基、Met残基が少ないことが特徴として挙げられる。葉緑体GRのN-末端付近のアミノ酸の一次配列はNH2-Gly-Ala-Lys-Tyr-Asp-Phe-Asp-Leu-Phe-Thr-Ile-で今まで報告されているGRと共通配列が見出されなかった。

葛西身延、武藤尚志、宮地重遠 (東大・応微研)

Ca²+が細胞内情報伝達物質として機能する様々な細胞生理過程が数多く明らかにされてきた。通常、細胞内サイトゾルのCa²+濃度は10-7-10-6M程度に保持されていることが一般に受け入れられている。細胞内遊離Ca²+を低濃度に保持する機構は、原形質膜を通しての細胞外へのくみ出しと細胞内オルガネラ内への隔離濃縮であり、それらは各々の膜上に存在するCa²+輸送体によって行なわれている。高等植物において、この中で最も寄与度の大きい輸送体は、サイトゾルの遊離Ca²+濃度付近にKm値をもつ原形質膜のCa²+ポンプであると考えられる。従って、Ca²+ポンプはCa²+による細胞内情報伝達システムを考える上で一つの要になると考えられる為、その詳細なメカニズムと調節機構を明らかにすることは重要である。前回までの学会では、トウモロコシ葉原形質膜のCa²+輸送系の基本的なkinetics、及び輸送系がCa²+ポンプとCa²+/H*交換輸送系の二つから成ることを報告した。

最近高等植物では、原形質膜上の $Ca^2+ATPase$ が $Ca^2+ATPase$ の単離とその人工リポソームへの再構成を試みた。種々の界面活性剤によって可溶化された原形質膜成分を人工リポソームへ再構成し、そのリポソームのATP依存性の Ca^2+ の取り込みを測定した。 Ca^2+ 輸送タンパク質の可溶化と再構成には $C_{1,2}E_{\epsilon}$ が最も適していた。次にイオン交換カラム(DEAE-5PW)を用いて、HPLCにより可溶化膜タンパク質を分画し、各フラクションのATPase活性と再構成後のリポソームの Ca^2+ 輸送活性を測定した。クロマトグラフィー条件を検討した結果、 VO_4 3-によって活性が抑制されるATPaseと Ca^2+ によって促進されるATPaseを分離することに成功した。再構成リポソームのATP依存性の Ca^2+ の取り込みは、 VO_4 3-によって抑制されるATPaseの分画には認められず、 Ca^2+ ATPaseの分画に認められた。また、このリポソーム小胞内外にnigericinを用いて外向きのH・の勾配を形成させても、 Ca^2+ の取り込みはわずかしか起こらなかった。これらの結果は、再構成リポソームへの Ca^2+ /H・交換輸送系の混入がないこと、観察された Ca^2+ の取り込みは組み込まれた Ca^2+ ATPaseによって行なわれたことを示している。

°川崎信二、宮本 勝¹、児玉 治¹、赤塚尹巳¹ (農水省・生物研、¹茨城大・農化)

細胞の分化や環境の変動に伴い、オルガネラを構成する生体膜の構成タンパク質も変動することが考えられる。2次元電気泳動(2D-EP)法は、こうした差の解析で可溶性成分については大きな成功を収めたが、膜の構成タンパク質ではスポットの分離が悪く、バックグラウンドも高い等の問題があり、特に植物細胞についてはこの傾向が著しい。

イネの緑葉の細胞膜はいもち病等に対する抵抗性遺伝子の発現や過敏感反応誘導のためのシグナル伝達の場とも考えられるが、これまで分離の報告がない。演者らは緑葉から細胞膜を単離すると共に、膜の前処理により高分解能の2D-EPに成功した。この手法を用いて、緑葉、根、培養細胞(MS培地、アミノ酸培地)から夫々得た細胞膜間での構成タンパク質を比較した結果を報告する。

方法:播種後25日前後のイネ(日本晴)から緑葉と根を得た。培養細胞は同品種の胚芽から誘導したものをMS培地及びアミノ酸培地(Muller '78)で培養した。アミノ酸培地ではより大きな細胞集塊を形成する傾向を示した。組織と細胞をそれぞれ、ミキサーとホモじナイザーで破砕して得たミクロゾーム膜画分から2相分配とショ糖密度勾配遠心との組合せにより細胞膜を分離した。これを各種の溶媒で脱脂処理した後2D-EPにかけた。

結果:得られた細胞膜のショ糖密度勾配遠心による密度は緑葉で38%、培養細胞で40~41%と有意の差を示し、組成の差を示唆した。細胞膜分画で各種のオルガネラの標識酵素を測定したところ、vanadate感受性ATPase以外の酵素活性は無視できるレベルであった。PTA-加ム酸染色により細胞膜を特異的に染色したところ、緑葉で72%,培養細胞で87%の膜が染色され、緑葉ではミクロゾーム膜に比較し30倍以上の精製が示された。膜の脱脂を7セトン、フェ/-ル、クロロワネルムム/メタ/-ル混液等で比較したところ最後の処理で最も良い結果を得、緑葉、培養細胞の膜分画で数百のスポットが分解されたが、培地の違いによる差はわずか2-3スポットであった。これらはアミノ酸や硝酸イオン等の取込みに関与していることが考えられる。これに対し、培養細胞と緑葉の差は大きく相当数のスポットで差が見られた。緑葉では約27kDと22kDの大きなスポットが特徴的であった。これに比較すると緑葉と根の間の差は小さいが22kDのスポットは根では小さく、緑葉に特異的と考えられる。

タバコ培養細胞のゴルジ体分画の細分画とゴルジ体特異的タンパク質の検出

川崎信二、宮本 勝1 (農水省・生物研、1茨城大・農化)

細胞内のオルガネラの構成タンパク質の研究はミトコンドリア、葉緑体を中心に分子生物学のレベルで進んでいるが小胞体、ゴルジ体等での研究は遅れている。そこでこれらのオルガネラの研究のネックとなっている多数の標識酵素群の測定をマイクロプレートで行ない、膜分画のアッセイの効率を大巾に向上させる事を試みた。これによりゴルジ体の分画や細分画の条件検討が容易に行なえるようになり、こうして得られた各オルガネラ分画及び細分画を膜成分のために改良した2次元電気泳動(2D-EP)で展開して比較し、ゴルジ体特異的タンパク質を検出した結果を報告する。

方法: MS培地で液体培養したタバコの培養細胞(BY-2, XD-6S)をグラステフロン又はグラスグラスホモジナイザーで破砕し、ミクロゾーム画分をショ糖密度勾配(20~45%, w/w)遠心にかけた。得られた分画の各種のオルガネラ標識酵素を主にマイクロプレートを用いて測定した。ゴルジ体分画を回収後、より緩い傾斜のショ糖密度勾配遠心(35~27%前後)により、細分画を行ない同様の標識酵素アッセイを行なった。

得られた代表的な膜分画について脱脂の後2D-EPを行ない、画像解析装置を利用して 特異的タンパク質をスクリーニングした。

結果:マイクロプレートリーダーを用いた場合22分画のATPase活性の VO_4 ³⁻(細胞膜), RNO_3 (ト/プラスト), N_3 ⁻(ミトコント゚リア膜)による阻害、IDPase(ゴルジ体)の測定がOtimeの測定を含めてOtimeの測定を含めてOtimeの可能で完了した。ただOtimeの測定には精度が足りず分光器による測定が必要であった。Otimeの細胞では典型的には比重の高い方から細胞膜、ミトコンドリア、ゴルジ体、Otime Otime Otime

なお比較のため行なったイネの培養細胞(日本晴)での分画でも、ショ糖密度勾配により、タバコの場合と同様のゴルジ体を始めとするオルガネラの分離パターンが得られた。

ホウレンソウ培養細胞からの液胞の単離及び精製 〇本間督二、佐藤隆英、小倉長雄、中川弘毅 千葉大学 閲芸 農化

液胞は、植物においてリソソーム様の働きをしていることが示唆されて以来、その解析が急がれるオルガネラである。これまでに、さまざまな植物種、組織からの液胞の単離及び精製が報告されているが、ホウレンソウの液体培養細胞を用いた研究は報告されていない。すでに演者らは安定したホウレンソウの液体培養細胞(継代周期8日)を得ており、これを材料として液胞機能の解析を行うため、まずその単離及び精製法について検討したのでここに報告する。

(方法及び結果)

材料のホウレンソウの液体培養細胞は、バッチ法でMS培地で培養を行い、本研究には細胞活性が比較的高い継代3日目から7日目の細胞を用いた。細胞のプロトプラスト化にはセルラーゼオノズカRS及びマセロザイムR-10を用い、0.4Mマンニトール及び0.45Mショ糖による密度勾配遠心法によって二層間に精製プロトプラスト標品を得た。プロトプラストからの液胞の遊離はDEAE-デキストランを用いた西村らの方法に改変を加えた。遊離液胞の精製は下層から3%フィコール、液胞遊離画分、0.4Mマンニトールの三層からなる密度勾配で遠心を行い(10,000r.p.m.×90min)、0.4Mマンニトールの三層からなる密度勾配で遠心を行い(10,000r.p.m.×90min)、0.4Mマンニトール層に液胞画分を得、これを精製液胞とした(収率は12~18%程度)。精製液胞の検定にはニュートラルレッド染色、及び液胞内、外局在性酵素の活性測定によって行った。(Table1)。この結果から、他のオルガネラの混入が極めて少ない液胞標品を得ることができた。

Table I Vacuolar and extravacuolar markers in protoplasts and purified vacuoles

	Per 10 ⁶ protoplasts	Per 10 ⁶ vacuoles	% In vaculoes
α-Mannosidase	0.019	0.26	106.2
Acid phosphatase	0.090	0.081	90.0
β-N-acetyl- glucosaminidase	0.0046	0.0041	89.4
Nitrate reductase	0.054	N.D.	0
Catalase	901.81	N.D.	0
Fumarase	0.13	N.D.	0
Protein (µg)	690.6	29.8	4.3

(µmol/min)

前島正義 (北大・低温研)

【はじめに】 種子芽生えの胚軸は短時日に急速に成長する。これは盛んな細胞分裂と細胞体積の増大に支えられた現象である。そして、細胞の増大に伴って急速な液胞体積の増大が観察される。したがって、伸長中の胚軸は液胞の形成発達を研究する好材料と考えられる。これまでに、植物細胞の液胞膜からH*-ATPaseとH* 輸送性ピロホスファターゼが単離された。H*-ATPaseが分子量の異なる多数のサブユニットで構成されているのに対して、ピロホスファターゼは1種のポリペプチド(73 kDa)で構成されている(J.Biol.Chem.,1989,264,20068)。ピロホスファターゼは膜内在性であることも確認されているので(生化学、1989,61,961)、液胞膜の良い指標といえる。そこで、胚軸を分裂、伸長、成熟の3つの部位に分け、酵素の量的、質的な差異、液胞膜の組成・密度等を解析した。

【結果および考察】 ヤエナリの種子は暗所、25℃で発芽させた。成長率の最も高い3日めの芽生えの胚軸 (約5 cm)を材料とし、上から分裂、伸長、成熟部位の3つに分けた。各部位のプロトプラストの直径は約40,86,126μmで、細胞が分裂後20~30倍に増大していることを示した。このことは新鮮重あたりのDNA量の比較からも確認された。つぎに液胞膜ピロホスファターゼの活性を測定し、特異抗体を用いてタンパク質量も定量した。新鮮重あたりの酵素活性および酵素タンパク質量を比較したところ、ともに分裂部位は成熟部位の3倍の値を示した。細胞あたりの酵素量を比較する目的で、細胞DNA当たりの量を算出したところ、分裂部位の値は成熟部位の約4分の1であった。また、各部位の液胞膜の密度をショ糖密度勾配遠心法で比較したところ、同じ沈降距離のところに酵素活性のピークが観察された。さらに、液胞膜のSDS/PAGEによる分析結果は、いくつかのタンパク質を除いて大きな差異のないことを示した。以上の結果より、1)分裂直後の細胞には成熟細胞とほぼ同じ組成の液胞膜が存在し、2)細胞伸長の過程で、膜リン脂質とタンパク質が合成・供給され、既存の膜に付加されて液胞膜は発達するものと結論した。細胞伸長の後期に急速に形成されたり、分裂部位の小さな液胞が単に融合するだけでもないことを示し、同時に、液胞膜の発達と細胞伸長の密接な関係を示す結果と判断した。

イタドリ胚軸細胞液胞中のアントシアニン蓄積能のある 小胞について 久保浩義,野末稚之,安田齊 (信州大・理・生物)

アントシアニンを合成している細胞の液胞中には、しばしばアントシアニンを多量に蓄積し赤く染まった小胞(アントシアノプラスト)が光学顕微鏡の下で観察される。このアントシアノプラストは、比較的多くの植物に見られ、古くよりその存在は知られていたが、それがどの様な構造をもち、どこで形成され、どの様にして液胞内に入ってくるのかまた、どの様な機構でアントシアニンを蓄積するのかなどについては、まだ不明の点が多い。本講演では、イタドリ芽生えの胚軸部に見られるアントシアノプラスト様の小胞についての観察結果を報告する。

多くの場合、アントシアノプラストはアントシアニンを含んだ細胞内にのみ観察されるが、イタドリ芽生えの胚軸においては暗所で育てアントシアニンを全く含んでいない細胞にもアントシアノプラストとよく似た小胞が観察された。この暗所で育てたイタドリの細胞内の小胞はほとんど無色であるが、 蛍光顕微鏡(B励起)でみると液胞とは異なったあずやかな黄緑色の蛍光が観察された。液肥と小胞とでは含まれている物質の組成が異なると予想されたので、胚軸の表層から1~2層の細胞をtのリ取り顕微分光光度計により液胞と小胞の吸収スペクトルを調べた。液胞は320~330nmにピーク、280nmに肩のある吸収スペクトルになるのに対し、小胞では360~400nmにピークをもつ吸収スペクトルが得られた。

芽生えを暗所から白色光の下にうつすと胚軸部にアントシアニンが合成されしだいに赤くなってくるが、それとともに小胞はまずうすい黄色になり、その後徐々に赤味を増していった。この時の小胞の吸収スペクトルは、光照射開始後まず400 nm付近の吸収が少し増加し、次に450 nm付近の吸収の増大が見られた。さらに時間がたつと、小胞が赤味をおびてくるにつれアントシアニンに特有の530 nm付近の吸収の増加が見られた。

以上より、イタドリに見られるこのアントシアノプラスト様の小胞には、液胞中の物質を選択的に取り込む何られの機構もしくは小胞に特有の生合成経路が存在すると思われる。

サツマイモ培養細胞のアントシアノプラストの単離とその諸性 質の検討

野末雅之¹、西村幹夫²、今関英雅²、久保浩義¹、服部千穂¹、加藤朗¹、臼田信光³、永田哲士³、安田斉¹(¹信州大・理・生物、²基生研・情報制御、³信州大・医・第一解剖)

目的: アントシアニン色素を生成、蓄積しているサツマイモ培養細胞に赤色の小胞(直径5-10μm)が観察される(Nozue & Yasuda, 1985)。この小胞は、アントシアノプラストと呼ばれアントシアニンを生成する細胞内にしばしば観察されることから、色素の生成に関与する可能性が示唆されている(Pecket & Small, 1980)。しかし、アントシアノプラストの単離の成功例はなく、その機能についても明確ではない。今回、サツマイモ培養細胞からアントシアノプラストの単離を試み、その諸性質を検討することによりアントシアノプラストのアントシアニン生成、蓄積における機能を明らかにしようとした。

材料と方法: 2,4-D(0.3mg/1), 3%ショ糖を含むPRL-4C(Gamborg,1966)寒天培地で継代培養したアントシアニン高生産性サツマイモ培養カルスを2,4-D 無添加の液体培地に移植し、光照射下でアントシアニン生成およびアントシアノプラストの形成を誘導した。 その懸濁細胞からプロトプラストを単離、パーコール浮上法で精製し、30%(w/w)ショ糖(2 mM EDTA含)中でナイロンメッシュ(20 μ m) を通過させることによりプロトプラストを破壊した。 それを40%、50%、60%(w/w)ショ糖に上層し、21、000rpm、30分間遠心し、60%ショ糖の沈殿分画からアントシアノプラストを回収した。 また、 リン酸処理法(K_2 HPO $_4$ -HCl、 $_1$ HB.0)、フィコール密度勾配遠心法によりプロトプラストから液胞を調製した。

結果と考察: ①アントシアノプラストは、60%(w/w)ショ糖で沈殿することから高密度の構造物であると思われる。②単離液胞中にアントシアノプラストが観察された。③アントシアノプラストと液胞との両分画のSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動パターンの比較からアントシアノプラスト分画で顕著に濃縮されているタンパク質の存在が確認された。④電顕観察からアントシアノプラストの膜構造は認められなかった。⑤培養細胞、プロトプラスト、液胞にそれぞれ中性赤を処理するとアントシアノプラスト様の構造物が速やかに誘導された。以上の結果から、サツマイモ培養細胞のアントシアノプラストは、高濃度のアントシアニンとタンパク質を含む高密度の液胞内構造物で、アントシアニン色素の液胞内集積に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

高分泌突然変異 (ssl1) は液胞のプロテアーゼを sxl1

鈴木克周°(1、2)、地神芳文(1)

((1)工業技術院化学技術研究所、(2) 広島大学·理学部)

タンパク質を分泌しなくなる突然変異体(<u>sec</u>)の解析により、タンパク質分泌機構の分子遺伝学的な理解が急速に深められつつある。一方、タンパク質を多量に分泌する変異体は有用タンパク質の生産に役立つだけでなく、タンパク質の分泌量を抑えている因子を調べるのに有用となる。私達は化学合成ヒトリゾチーム遺伝子を酵母染色体に導入した<u>Saccharomyces cerevisiae</u>菌株からヒトリゾチームを高分泌する突然変異株を分離した(Suzuki et al. MGG 219:58-64)。これらの変異体のうち、主要なタンパク質分解酵素ProteinaseA および Bの活性は正常であるがCarboxypeptidaseY(CPY)の活性が低下する<u>ssl1</u>変異体に注目し、現在解析している。<u>ssl1</u>変異体の細胞抽出液には成熟型CPYより高い分子量のタンパク質(ProCPY)が検出される。<u>SSL1</u>遺伝子は、CPYの構造遺伝子<u>PRC1</u>およびCPYの成熟化を直接行う遺伝子<u>PEP4</u>と異なるので、CPYの成熟化(即ちリゾチーム分泌量を抑える)要因としてタンパク質ソーティングあるいは新規なCPY成熟化因子の遺伝子と想定されていた。今回、<u>ssl1</u>変異体でCPYが細胞表層へ移行しソーティングの変化が起こっていることを確認できたので報告する。

<u>s s l 1</u>変異体を富栄養培地で一夜培養後、培養液上清と菌体とに分け、さらに菌体を細胞壁分解酵素ザイモリエースで処理して細胞表層画分とプロトプラストに分画した。各画分を抗CPY抗体を用いたウェスタンプロット法で調べた。その結果、ProCPYは培養液上清及びプロトプラスト画分には無く、細胞表層画分にのみ検出された。従って、<u>S S L 1</u>遺伝子はCPYの液胞へのソーティングに必要な遺伝子であるといえる。CPYのソーティングシグナルはPro配列のN末端側に存在することが報告されている。ソーティングシグナルに注目してProCPYとヒトリゾチームのアミノ酸配列を比較したところ、リゾチームのN末端側に類似の配列を見出すことができた。従って、野性型細胞ではリゾチームは液胞に輸送されるが、<u>s s l 1</u>変異体では細胞表層・培養液へと放出されるために分泌量が高まるのであろうと考えられた。

単離チラコイドへのタンパク質の輸送

小西智一. 丸田嘉幸, 渡辺 昭 名大·農·生化学制御

細胞核支配の葉緑体タンパク質は、細胞質で N 末端にトランジットペプチドを持つ前駆体として合成された後に葉緑体へと輸送される。葉緑体への輸送にともなって前駆体タンパク質はトランジットペプチドを切り外され(プロセシング)、成熟型タンパク質となる。チラコイド内腔へ輸送されるタンパク質は、ストロマで最初のプロセシングを受け、さらにチラコイドへ輸送されて最終的なプロセシングを受けることが知られている。本大会ではこのチラコイド膜への輸送の機構について行った実験の結果を報告する。

輸送実験のモデルとしては、アラスカエンドウの酸素発生系に関与する 23kd タンバク質を使用した。このタンパク質については、'88 年の大会で次のことを報告している。1)このタンパク質のトランジットペプチドは 73 アミノ酸残基長であり、これは性質の違う二つの領域から構成されることが cDNA の塩基配列から予想されること、2)この cDNA を試験管内の系で転写・翻訳した産物は単離葉緑体への輸送前駆体として働くこと、3)この前駆体タンパク質を単離ストロマ画分と保温すると、トランジットペプチドの二つの領域を分ける -20 Ala と -19 Leu の間で最初のプロセシングを受けて中間体タンパク質になること。我々はその後、この単離ストロマ画分によるプロセシングが葉緑体の中で起こっていることを正確に反映しているのかどうか、またストロマからチラコイドへの輸送機構はいかなるものなのかを調べるために、単離したチラコイドへのタンパク質の輸送を試みた。輸送の基質として前駆体タンパク質と中間体タンパク質を用いた。使用した中間体タンパク質は、23kd の前駆体の最初のプロセシングが起こる部位の cDNA 上に翻訳開始コドンを挿入し、試験管内の転写・翻訳系で合成した。

中間体タンパク質は 10mM の ATP の存在下で単離チラコイドへ輸送され、成熟型タンパク質へとプロセシングされた。前駆体タンパク質の輸送には単離ストロマ画分を必要とし、輸送の効率は中間体タンパク質よりも低かった。この結果は、中間体タンパク質がチラコイド内腔への輸送中間体であることを強く示唆している。このタンパク質輸送に必要な条件を詳細に検討した結果を報告する。

イネ温度感受性クロロフィル突然変異株における葉緑体の発達

射場 厚,高宮建一郎,藤 義博,西村光雄,佐藤 光¹ (九大・理・生物,¹九大・農・遺伝子)

イネには virescent と称せられる低温で白くなり、高温になると緑となる特性を持った 温度感受性クロロフィル欠失突然変異が多数見つかっている。これまで、この感受性に関与す る遺伝子で染色体地図上での位置が決定されているものもあるが、その形質発現の機構につい ては殆ど解明されていない。本研究では、感受性温度の異なるいくつかの virescent 株を用 いて、緑化過程における葉緑体の形成や機能発現と、クロロフィル生合成過程や、光合成装置 の構築および葉緑体内でのタンパク生合成との関わりについて解析した。

(材料と方法)九大遺伝子資源センターに保存されているイネ 0ryza sativa の virescent変異株 $KL514(y_1)$, $515(y_2)$, および $604(y_3)$ を温度 20, 25, 30 $^{\circ}$ 、湿度 60% RHで それぞれ黄化芽生えさせ,第3葉葉身が十分に展開した後に,光強度 $80\,\mu$ mol m^{-2} s $^{-1}$ の連続光で緑化させた。対照には水稲品種「金南風」を用いた。クロロフィル生合成経路の中間体は,採取した第3葉葉身から有機溶媒を用いて抽出し,そのスペクトルから定量した。葉緑体を構成するタンパクはウエスタンプロティング法により,また細胞内リボソームの局在の変動は全RNAを抽出しアガロースゲル電気泳動により分離することによって調べた。オルガネラ微細構造は電顕により観察した。

(結果と考察) 連続光照射下で生育させた場合,30℃に比べ,25℃の低温条件下では virescent 変異株はどれも対照の「金南風」に比べて第3葉葉身あたりのクロロフィル含量は低下し,20℃では殆ど検出されなかった。各温度で黄化芽生えした第3葉葉身を用いてクロロフィル生合成過程を調べた結果,変異株では共通して特にδ-アミノレブリン酸までの初期の経路が低温で阻害されることがわかった。次に,黄化芽生えした第3葉に連続光を照射してその前後の葉緑体構成タンパクの蓄積を調べた。集光性クロロフィル・タンパク複合体LHCP2や光化学系ⅡのD2アボタンパク等のクロロフィル結合膜タンパクの蓄積は、20℃で生育した変異株においては照射後も著しく阻害された。一方,光化学系Ⅱの表在性33-kDaタンパクやリブロースニリン酸カルボキシラーゼ大サブユニットタンパク等の可溶性タンパクは、20℃で生育した変異株においても少量ながら検出された。また、細胞質リボソームRNA(25S,18S)に対して、葉緑体リボソームRNA(23S,16S)の比は、20℃で生育した変異株では大きく減少し、葉緑体内でのタンパク生合成能の低下が示唆された。さらに、プラスチドの構造を観察した結果、20℃で黄化芽生えした変異株においては前葉緑体の状態であり、プロラメラボディがいくつかの細菅の集合として観察されたが規則的な格子構造は形成されていなかった。一方、20℃、連続光で生育した変異株では、チラコイド膜の発達は殆ど見られなかった。

以上のことから、virescent 株は、単にクロロフィル生合成経路が温度感受性であるばかりでなく、チラコイド膜の発達や、光合成装置の構築、さらに、葉緑体における調和のとれたbiogenesis に関わる突然変異株であることが明かにされた。

同調培養ユーグレナ細胞におけるLHCPIの細胞内分布に関する 免疫電子顕微鏡法による観察

°長舩哲齊、角田修次、江原友子、Jerome A. Schiff¹、長谷榮二² (東京医大・微生物、¹ブランダイス大・光生物、²帝京大・医)

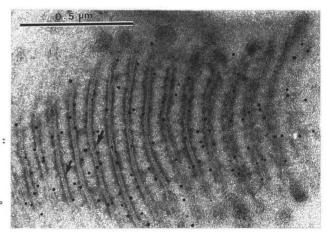
先に、免疫電子顕微鏡法をもちて、ユーグレナの葉緑体形成過程におけるLHCPIの細胞内局在性を観察した。 暗培養細胞に光を照射すると、LHCPIがゴルジ体上にみられた。 その後、ゴルジ体と同時にプロプラスチド(プロチラコイド膜)にも観察された。 光照射 7 2 時間前後で葉緑体構造が完成する、この時期のLHCPIはチラコイド膜に局在し、葉緑体の形成途中に観察されたゴルジ体上には全く見られなかった。 今回は同調培養したユーグレナ細胞をもちいて、cell cycle におけるLHCPI¹)の細胞内配置を免疫電子顕微鏡法 2)により経時的に追跡した。 Brandt 3)らはユーグレナのLHCPIの合成はcell cycleの初期、中期に起こることを報告している。

LHCPIはcell cycle中すべてのステージでチラコイド膜上に局在した。一方、ゴルジ体上のLHCPIは光照射初期~中期に限って観察された。すなわち、免疫電子顕微鏡写真に示すように、LHCPIはゴルジ体のシスターネ内部、シスターネ膜の繊維様構造、シスターネ間のdenseな部位に特異的に局在する。 光照射直後の細胞を"0時間細胞"とすると、大部分のゴルジ体は葉緑体に接近して見られたが、LHCPIのゴルジ体への局在性は全くない。"3時間細胞"をみると、60%のゴルジ体上にLHCPIが局在し、"8~9時間細胞"では95%に達した。その後、ゴルジ体への局在性は急激に減少し"10時間細胞"での局在50%、"14時間細胞"5%、暗期、10時間は0%であった。

以上の結果から、合成されたLHCPⅡはゴルジ体を通じて葉縁体に運ばれていくことが示唆される。 今後、他の細胞のオルガネラについても検討したい。

- 1) Cunningham and Schiff(1986)
 Plant Physiol.,80:223-230.
- 2) Osafune et al.(1989)
 J.Electron Microscopy, 38:399-402.
- Brandt and Kessel(1983)
 Plant Physiol.,72:616-619.

急速凍結置換固定・免疫電子顕微鏡写真: 9時間細胞"のゴルジ体上に LHCPII(15nmのゴールド粒子)が 特異的に局在している。 矢印はシスターネ膜の繊維様構造を示す。 スケール:0.5μm。



黒岩常祥、内田英伸、矢部尚登、頼藤徹也、太田敏郎(東京大・理・植物)

基粒体(basal body)がDNAを含むか否かは、基粒体が半自立的細胞器官であるか否かを決定する重要な事柄である。また基粒体におけるDNAの存在は、Margulis(1967)の真核細胞の起源説における鞭毛の起源を説明するのに極めて都合良い。基粒体においてDNAが存在するという幾つかの報告があるが、何れも追試の結果は否定されている。最近、Luckらのグループ(1989)は、新しい分子生物学的方法と細胞生物学的方法を用いて、クラミドモナスの染色体の一部が基粒体に存在すると報告した。著者はこれまで、クラミドモナスを用いて研究を行って来て、細胞核、葉緑体核、ミトコンドリア核以外に、DNAの存在を見ることはなかった。そこで、Luckらの報告を検討するとともに、基粒体にDNAが存在するか否かに焦点を合わせて解析した。Luchらの報告には、幾つかの疑問点が存在する。a)蛍光抗体法で示された蛍光のスポットは、従来DNAあるいはRNAの繊維が観察される基粒体coreでなく、基粒体と鞭毛の接点のtranditional regionであること、b)基粒体に存在するDNA量は60-90Megabaseと極めて多く大腸菌の染色体に相当すること、c)メンデル遺伝する等である。

クラミドモナスの栄養細胞、配偶子、接合子を抗チュープリン抗体とDAPIで二重染色し、10kbpまで観察可能な高分解能蛍光顕微鏡ーVIMシステムを用いて、基粒体におけるDNAの局在を調べた。また、細胞質や細胞核からのハレーションによる影響を避けるために、鞭毛、基粒体と細胞核の複合体、及び鞭毛と基粒体の複合体を、ライシンとトライトンx100処理によって単離したものも解析した。更に基粒体からの蛍光強度を比較するために大腸菌の核(90Megabase)をマーカーとして使用した。

その結果、クラモドモナスの栄養細胞、配偶子、接合子の何れの基粒体においても1kb以上のDNAは存在しないことが明かとなった。最後に、なぜLuckのグループが基粒体にDNAが存在すると言ったのか、彼らの方法の問題点を指摘する。

細胞周期特異的cDNAのニチニチソウ培養細胞の増殖過程における発現パターンの解析

○伊藤正樹・児玉浩明・駒嶺穆 (東北大・理・生物)

演者らは高等植物の細胞周期の制御機構の解明をめざし、ニチニチソウ同調培養系の細胞周期における周期特異的cDNAの単離およびその解析を行ってきた。既に、演者らは細胞周期のG1/S期に特異的に発現する2種類の遺伝子をcDNAとして単離している(日本植物学会 第53回大会)。これらのcDNA(cyc02, cyc07)については、塩基配列の決定を行い、構造解析の結果を得ている(日本植物生理学会 1989年度年会)。今回演者らは、この2つのcDNAについて様々な増殖過程にある培養細胞、及び植物体における発現様式を詳細に検討した。

cyc02は、ニチニチソウ同調培養系の細胞周期において、リン酸飢餓処理による増殖停止状態の細胞とG1/S期の細胞に特異的に発現する。しかし、バッチ培養過程においては細胞が活発に増殖するlog-phaseではなく、むしろlate log-phaseからearly stationary-phaseにかけて発現する。またニチニチソウ幼植物体においては根および下胚軸の基部において強く発現することなどから、cyc02は増殖を停止しつつある過程において、むしろ強く発現するようである。

cyc07は、hybrid selectionにより単離したmRNAを用いてin vitro translationを行い、翻訳産物を1次元目 acid-urea-Triton、2次元目 SDS/PAGEの2次元電気泳動により解析した結果、ヒストンと同程度かそれ以上に塩基性の強いタンパクをコードしていることが示された。cyc07は2度のリン酸飢餓処理によるニチニチソウ同調培養系の細胞周期においてG1/S期にのみー時的に発現する。バッチ培養過程においては増殖の最も盛んなlog-phaseに特徴的に発現し、ニチニチソウ幼植物体においては根端で最も強く発現する。また cyc07は、ニチニチソウ培養細胞のオーキシン飢餓、再添加により誘導される同調的な細胞分裂の過程においても、DNA複製の開始と共に発現が誘導され、S期にそのmRNAの蓄積量が増大した。以上の結果は、cyc07の発現が細胞増殖と密接に関係していることを示している。また、2度のリン酸飢餓処理による同調培養系におけるG1/S期でのcyc07の特異的な発現は、DNA合成を阻害することにより見られなくなった。この結果はcyc07のG1/S期における発現は、DNA複製と共役していることを示唆している。このcyc07のcDNA断片をプローブとして、複数の植物種の増殖中の細胞から得たpoly(A)*RNAに対してノーザンハイブリダイゼーションを行ったところ、調べた全ての植物種において、発現が検出され、cyc07が広い植物種にわたって共通に存在する増殖に関与する遺伝子である可能性が示唆された。

今回は、cyc02、cyc07に関する以上の結果と、得られた結果から予想される2つの遺伝子の細胞周期に関わる機能の考察を含め報告する。

ニチニチソウ同調培養系の細胞周期における proliferating-cell nuclear antigen (PCNA) 遺伝子の発現の解析 °児玉浩明、伊藤正樹、大西直人、鈴鹿巌¹、駒嶺穆 (東北大・理・生物、¹農水省・生物研)

細胞周期は、増殖、発生、分化の基礎をなすもので、その進行機構の解明は真核生物の理解にとって最も基本的な問題の一つである。しかし植物細胞の細胞周期の進行とその制御機構に関する分子生物学的な研究は、未だほとんどなされていないのが現状である。我々の研究室では、Amino et al. (1983)によって確立された二度のリン酸飢餓処理によるニチニチソウ同調培養細胞系を用いて、高等植物の細胞周期について生化学的、および分子生物学的に解析を進めている。既に筆者らは、細胞周期、特にS期に特異的に発現するcDNAをdifferential screeningによりクローニングしている。さらに細胞周期中での遺伝子発現について知見を得るために、動物細胞においてDNAポリメラーゼ δ の補助因子として同定された proliferating-cell nuclear antigen (PCNA)に対するcDNAをニチニチソウcDNAライブラリーからクローニングし、このニチニチソウPCNA遺伝子の細胞周期中での発現について調べた。

高等植物のPCNA遺伝子はSuzuka et al. (1989)によってイネのゲノム中に動物細胞由 来のPCNA遺伝子とホモロジーの高い塩基配列が存在することが示され、イネゲノムPCNA遺 伝子がクローニングされている。このイネゲノムPCNA遺伝子をプローブとして、ニチニチ ソウPCNA cDNAを単離した。得られた cDNAの塩基配列を決定した結果、ニチニチソウPCNA は268個のアミノ酸からなり、分子量は29,765 daltonと推定された。ニチニチソウPCNAの アミノ酸配列をヒトPCNAのアミノ酸配列と比較すると、保存的置換を含めた場合、85%の ホモロジーを有していた。二度のリン酸飢餓処理による同調培養系、およびオーキシン飢 餓、再添加による同調培養系において、ニチニチソウPCNA mRNAはS期特異的に発現するこ とが示された。バッチ培養過程においては、植継ぎ後 3-4日目のmid-logarithmic phase で最も多くPCNA mRNAが検出された。G.期にアフィジコリンを添加してDNA合成を阻害して も、PCNA mRNAの発現は誘導された。しかしS期にアフィジコリンを添加してDNA合成を阻 害すると、PCNA mRNAのS期での急速な量的増加は抑制された。このことはPCNA mRNAの発 現の誘導はDNA合成と独立に生じるが、S期でのPCNA mRNA量の増加には正常なDNA合成が必 要であることを示している。以上のようにニチニチソウ PCNA遺伝子は、ヒト PCNA遺伝子 と高いホモロジーを有しており、S期特異的に発現することから、高等植物のPCNAも動物 細胞を用いた研究から示唆されているように、恐らくはDNAポリメラーゼδの活性を調節 することによりDNA複製に関与していることが示唆された。

タバコ培養細胞への高頻度形質転換系を用いた 液胞タンパク質の液胞輸送シグナルの検討 松岡 健,中園幹生,中村研三 (名大・鼻・生化)

人工改変cDNAを作成し、細胞内でこれを発現させ、その産物の挙動を解析することは、タンパク質の細胞内輸送シグナルを検討するための有効な手段である。しかし、現在植物で用いられている形質転換系では形質転換体の作製に長期間を要する為、解析速度が自ずと制限され、また、個々の形質転換体により遺伝子の組込位置が異なり、発現量が大幅に異なるという問題点がある。

我々は、プレプロ型構造をもつサツマイモ塊根液胞蛋白質スポラミンの前駆体上の液胞輸送シグナルの検索を、タバコ培養細胞BY-2への形質転換系を用いて行なっており、16 アミノ酸残基からなるプロ領域の欠失変異ではスポラミンが細胞外へ分泌される事を既に報告している。 今回、Tー領域欠失変異強病原性Tiプラスミドを持つ Agrobacterium tumefaciens EHA101株を用い、形質転換体使用時における上記問題点の解決を図った。

EHA101へCaNV35SプロモーターとスポラミンcDNAの融合遺伝子(CaNV35S-SPO)を持つバイナリープラスミドを導入し、BY-2への形質転換に用いたところ、LBA4404株を用いた際より約2桁高い形質転換効率を示し、1回の形質転換で約104個の独立形質転換カルスの作成が可能であった。この多くの形質転換体の混合懸濁培養系作成し解析することにより形質転換体毎の発現量のばらつきを考慮する必要が無くなった。またBY-2への形質転換の初期段階である Agrobacterium との2日間の共存培養の後、クロラムフェニコール存在下で直ちに35Sアミノ酸で標識することによりBY-2で発現したスポラミンを検出し得ることを見出した。この際のスポラミンの標識効率は、CaNV35S-SPO を持つプラスミドをエレクトロポレーションによりBY-2へ導入した際の約30倍であった。また、プロ領域欠失変異の発現の検討により、選択して得た形質転換細胞と同様の細胞外分泌が観察され、この実験系の有効性が示された。

スポラミン前駆体のプレ・プロ領域とCATとの融合タンパク質遺伝子の産物の挙動を上記実験系で検討し、CATのタンパクと活性は細胞内に存在すること、またプロ領域のうち保存性の高い領域の4アミノ酸毎の部分欠失変異ではスポラミンが細胞外へ分泌されることを見出した。現在他の変異体についても解析を進めている。

サツマイモ葉柄における塊根主要タンパク質とデンプンのショ 糖処理による蓄積誘導

大藤雅章、武田真、中村研三 (名大・農・生化)

サツマイモ塊根の2つの主要タンパク質、全可溶性タンパク質の約80%を占めるスポラミンと約5%を占める β -アミラーゼ、は栽培植物体では塊根以外の組織には殆ど存在しない。我々は先に、ショ糖培地で生育したサツマイモ幼植物体の茎には多量のスポラミンが存在し、葉や葉柄においても人為的にショ糖を与えるとスポラミンの蓄積が誘導され、このとき β -アミラーゼも同時に誘導されること、などを報告した。これらの結果は、塊根肥大過程におけるスポラミンや β -アミラーゼ各遺伝子の活性化には、地上部より転流してくる高濃度のショ糖が重要な役割を果たしていることを示唆している。本研究では、まずショ糖処理した葉柄では多量のデンプンの蓄積も誘導されることを明らかにし、次いでデンプン、スポラミン、 β -アミラーゼ三者の蓄積誘導のショ糖濃度依存性と各ショ糖濃度での誘導のキネティクスを同一葉柄試料を用いて比較した。また、デンプン蓄積の細胞特異性についても検討した。

葉柄組織中のデンプン含量は、未処理の葉柄では約1 mg/gFWであるが、0と1%のショ糖液で処理すると、いずれも5日目以降に若干の増加を始め、14日後に約7倍になった。一方、3%以上の濃度のショ糖では、3日後には5~8倍の増加がみられ、その後も直線的に増加を続け、14日後には3%ショ糖で17~26倍、6%及び9%ショ糖では30~36倍に増加した。一方、スポラミンは6%ショ糖においても3日後までは誘導量は僅かであったが、5日目以降14日目までほぼ直線的に増加した。デンプンと同様に1%ショ糖では0%のものと顕著な差はみられなかった。βーアミラーゼもほぼ同様の挙動を示したが、スポラミンに比べると3日後には明らかな増加が始まるなどの違いも認められた。組織学的には、未処理の葉柄では維管束系とその周辺の細胞と表皮のすぐ内側の細胞にデンプン粒が観察されるが、3%以上のショ糖で処理すると、維管束系の外側の柔組織細胞に顕緒に発達した多数のデンプン粒の蓄積が認められた。塊根ではスポラミンとβーアミラーゼはデンプンを蓄積している柔組織細胞に存在しいることから、ショ糖で処理した葉柄でも塊根と同様に同一の細胞にデンプン、スポラミン、βーアミラーゼの三者が蓄積していると推定される。

サツマイモ塊根主要タンパク質スポラミン遺伝子プロモーター:GUS融合遺伝子のトランスジェニック・タバコでの発現 太田象三、服部東穂、中村研三(名大・農・生化)

スポラミンはA・B二つのサブファミリーに分けられる多重遺伝子族によって支配されているが、それぞれのサブファミリーに属する核遺伝子gSPO-A1、gSPO-B1の5'上流域には、TATAボックス周辺の相同性の高い領域(ボックス1)の他、ボックス2,3(3')と名付けた短い保存配列が見出されている。これに類似の配列は、塊根で強く発現し、またスポラミンと同じようなショ糖処理による発現誘導がみられる β -アミラーゼ遺伝子の5'上流域にも見出されている。これらのボックス配列を含むgSPO-A1 5'上流域、転写開始点より-305塩基までと、大腸菌chloramphenicol acetyltransferase(CAT)の融合遺伝子をタバコに導入し、ショ糖寒天培地上で生育した形質転換タバコ in vitro幼植物体は、茎に強いCAT活性を発現し、葉・根におけるCAT活性は弱いか検出されなかった。このような発現パターンは、サツマイモin vitro幼植物体におけるスポラミンの発現パターンと類似している。

そこで今回我々は、gSPO-A1およびgSPO-B1 5'上流域と、組織化学的解析が可能なGUS (大腸菌 β-glucuronidase)との融合遺伝子をタバコに導入し、形質転換タバコ in vitro 幼植物体の茎におけるGUS発現の特異性を細胞レベルで解析した。その結果、いずれの融合遺伝子を導入した形質転換タバコにおいても、茎の篩部、とりわけ内部篩部細胞で強い発現がみられた。また葉が分枝する部分の縦断切片の活性染色を行うと、多くの場合腋芽の基部において強い染色がみられた。このような染色パターンは、サツマイモ in vitro幼植物体の茎を薄いヨウ素ヨウ化カリウム溶液で処理した場合にみられる、多量のデンプン粒子による深紫色の染色パターンと類似していた。サツマイモ葉柄におけるショ糖処理によるスポラミンの蓄積誘導の研究から、スポラミン遺伝子の発現はショ糖の流入によって変動する代謝的因子によって制御されていると考えられるが、形質転換タバコにおけるスポラミン:GUS融合遺伝子の発現の特異性からは、それに類似の機構が異種植物であるタバコにも存在してスポラミン:GUS融合遺伝子の発現が起こったという可能性が示唆される。

またgSPO-A1プロモーターについて、ボックス配列を5'側から順次欠失したプロモーターを作製し、形質転換タバコでの発現に関わるcis領域についての検討を行ったところ、ボックス3が発現の量的側面に関わる要素であることを示唆する結果が得られた。

サツマイモ塊根主要タンパク質遺伝子の5[°] 上流域に結合する 核内因子

石黒澄衞、加藤麻理子、中村研三(名大・農・生化)

サツマイモ塊根の主要タンパク質であるスポラミンや β -アミラーゼの遺伝子は、栽培条件下の植物体での塊根特異的な発現の他にも、例えば植物体より切り取った葉-葉柄部のショ糖溶液による処理といった人為的誘導系においても、類似の発現誘導を受ける。したがって、スポラミンおよび β -アミラーゼ遺伝子の発現には、共通の転写制御機構が存在していると推定される。すなわち、両遺伝子の5'上流域には共通のシス配列が存在し、そこを認識して結合する転写制御因子によってこれらの遺伝子の発現が制御されていると推定される。本講演では、スポラミンA遺伝子 gSPO-A1 と β -アミラーゼ遺伝子の両者の δ 7'上流域に、同一の核内因子が結合する8塩基対の配列が共通に存在することを見出したので報告する。

栽培サツマイモ植物体より切り取った葉-葉柄部を 3%ショ糖溶液で 4日間処理し、スポラミンおよび β -アミラーゼ遺伝子の発現を誘導した。この葉柄部分より核抽出液を調製し、gSP0-A1 の 5'上流域をプローブに用いて DNaseI フットプリントを行ったところ、転写開始点より約 150bp 上流に明瞭なフットプリントが認められた。また、 β -アミラーゼ遺伝子の 5'上流域をプローブに用いて行った同様の実験の結果、この遺伝子の 5'上流域にも同様にフットプリントされる領域が認められた。両遺伝子について、フットプリントされる領域の塩基配列を比較したところ、これらの領域は 5'-ACTGTGTA-3'の8塩基よりなる共通の配列(SP8)を互いに逆向きに含んでいた。さらにゲルシフトアッセイの競合実験の結果より、両遺伝子の 5'上流域に結合する因子が共通であることが示された。この SP8 結合因子はショ糖による処理を行わない葉柄や塊根の核抽出液中にも存在しているが、スポラミンA遺伝子および β -アミラーゼ遺伝子の 5'上流域に共通に結合しうることから、この因子が両遺伝子の転写制御に何らかの役割を果たしている可能性があると考えられる。現在、SP8 結合因子の認識配列の特異性や、スポラミンB遺伝子 gSP0-B1 の 5'上流域に対する結合の可能性について解析を進めている。

タバコ葉肉プロトプラストより単離されたオーキシンで誘導される遺伝子 par のシスエレメントの決定 高橋陽介 丹羽康夫 町田泰則 を長田敏行! (名大 理 生、 '基生研 細胞生物)

我々は、既に報告したようにタバコ葉肉プロトプラストよりオーキシンで発現誘導される遺伝子 par の cDNA を単離したが、この par 遺伝子は、オーキシンで速やかに誘導され、葉肉プロトプラストの細胞周期の Go-S 期においてのみ発現し、葉肉プロトプラストの細胞分裂開始に重要な役割を果すと推定された (1)。本研究では、par 遺伝子のゲノム遺伝子を単離し、遺伝子の 5'側の非翻訳領域のオーキシンによる転写を制御しているシスエレメントを同定することができたのでその結果を報告する。

par 遺伝子の 5'側の非翻訳領域は、タバコの遺伝子ライブラリーより par 遺伝子の cDNA をプローブとして用いて単離し、レポーター遺伝子としては GUS 遺伝子を用いてキメラプラスミドを作製した。プロモーターと予想される領域の 5'側の欠損突然変異株は Exo III を用いて作製した。調製したキメラプラスミドのプロトプラストへの導入は、改良したエレクトロポレーションにより行ない、プロトプラストにおける遺伝子発現は、24-40 時間培養した後に、 GUSアッセイで検出した。

まず最初に 0.8 kb の Mae II 断片をプロトプラストへ導入し、オーキシンの有無の下でプロモーター活性を調べたところ、この領域にオーキシンによる十分な GUS 活性の発現が認められたが、オーキシンの投与のない場合には活性が認められなかったので、オーキシンに反応するシスエレメントはこの領域にあると推定された。一方この領域の塩基配列を決定したところ、特徴的な 111 bp の直列の反復配列が見られた。従って、どの配列がシスエレメントであるか同定するために、5'側を削ったプロモーターを導入したところプロモーター活性は、111 bp を欠如させることにより著しく低下することが見出されたので、この 111 bp こそオーキシンに反応してシスエレメントとして働くと結論した。なお、この 111 bp の 5'側には、AGTTTTT という配列が見られたが、これは、他のオーキシンで誘導されるダイズから単離された遺伝子 Gmbsp 26-A やシロイヌナズナの dbp遺伝子にも見られるので共通したオーキシンに対するシスエレメントである可能性がある。

本報告は、オーキシンに関するシスエレメントの同定の最初の報告であるが、最も早く発見されながらその作用機構が最も明確でなかったオーキシンによる遺伝子発現機構解明の端緒は本研究により付けられた。

(1) Takahashi, Y. et al.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 9297-9283 (1989)

タバコ感染特異的(PR)タンパク質遺伝子のタバコ葉肉 プロトプラスト中における発現制御

大橋 祐子、大島 正弘、松岡 信(農水省、生物研)

タバコ感染特異的(pathogenesis-related:PR) 1 タンパク質はウイルス等の感染により生ずる壊死斑形成に伴う過敏感反応、サリチル酸 (SA)等の薬剤処理、および傷害などのストレスによって誘導される一種の酸性ストレスタンパク質であり、PR1a, 1bおよび1cと名付けられた 3 種から構成されている。我々は、これらPR 1 タンパク質遺伝子をタバコから単離し、その構造を解析した結果、活性な遺伝子は、タバコハプロイドゲノムあたりそれぞれ 1 コピーずつであることを明らかにした。また、PR1遺伝子の発現制御機構を明らかにするため、形質転換植物を用いた実験によって、タンパクコード領域の上流、約300bp内に誘導に必要な情報が存在していることをすでに確認している。今回は、さらに詳細にその発現制御領域を解析するため、PR1a遺伝子の5、上流側を段階的に欠失させたDNA断片とGUSレポーター遺伝子との融合遺伝子を作り、これをタバコ葉肉プロトプラストに導入してその発現をGUS活性を指標に調べたので報告する。

PR1a遺伝子の5'上流域2.4Kbを含む融合遺伝子は、エレクトロポレーションによりプロトプラストに導入するとinducerであるSAを加えないでも発現し、培養時間が長くなるに従って35S-GUSに比べその発現量が顕著に増加した。これはプロトプラスト調製中のストレスがこの遺伝子発現の誘導原因になっていることを示唆するもの思われる。また、その発現量は、SA濃度に比例して増加した。下流側に欠失を進めると全体として発現レベルは少しずつ減少していくが、SAによる誘導や培養時間に伴う増加はは180bpまでに削り込んでも認められた。この領域は、上記の活性な3種のPR1遺伝子に共通に保存されている5'領域とよく一致している。さらに5'上流の欠失を進めるとSAによる誘導は認められなくなるとともに活性は最低になった。また、思いがけずそれ以上の削り込みで一時的に活性がふたたび増加する領域が発見されたが、TATAボックスまで消失させると活性は0になった。以上の結果は、PR1a遺伝子が基本的にはnegativeな制御を受けていること、またSA処理やストレスに応答するシス領域がPR1a遺伝子の5'上流域約180bp以内にあることを示唆するものと考えられる。また、これらの5'欠失DNA断片を導入した形質転換タバコを用いて得られた情報は、プロトプラストを材料にして得られた上記の結果を支持した。

タバコ感染特異的タンパク質遺伝子の 5、上流域に結合する核内因子 萩原央子、松岡信、大島正弘、渡辺実¹、細川大二郎¹、 大橋祐子、 (農水省・生物研、¹東農工大)

タバコPRタンパク質遺伝子の発現は、ウイルス感染、傷害等のストレスによって誘導される。この発現メカニズムを明らかにすることは、転写の調節機構のみならず植物抵抗性遺伝子の発現をコントロールしている機構解明の端緒となると考えられる。我々は高等植物におけるストレス誘導性遺伝子発現調節機構の解析を目的としてPR1a遺伝子をそのモデル系として研究を行っている。

PR1タンパク質は、PRタンパク質の中ではもっとも小さいグループで、PR 1a、1b、1c の 3 つに分けられるが、この 3 つは免疫学的に類似性質を示し、TMV感染の他、サリチル酸等の薬剤処理によっても誘導を受けることが知られている。これまで我々は、PR1a遺伝子 5

上流域のDNA断片とGUS遺伝子の融合遺伝子を作成し、トランスフォーメーション実験を 行って来た。その結果転写開始より上流300bpまでの配列が、PR1タンパク質の発現及び誘 導に必要であり、この中にPR1a遺伝子の転写を抑制するcis-element、及び転写を促進する cis-elementが存在することが示唆された。 そこでこの調節領域に作用する因子の解析のた め、PRタンパク質を恒常的に発現している植物をN.debneyiとN.glutinosaとの交配により 作出し、このF1植物と、PRタンパク質を発現していないSumsun NNから核タンパクを抽出し、 ゲルシフトアッセイによりPR1a遺伝子上流域に特異的に結合する因子の検出を試みた。 そ の結果、Sumsun NNの核の中にのみPR1a遺伝子の-300bp断片をシフトさせる因子を検出した。 この因子についてデリーション実験により結合部位の同定を行ったところ断片の2カ所に 結合部位を同定することができた。この2つの結合部につく因子の同定を、コンペティシ ョンにより行ったが、この2つは同じ因子かもしくは類似した結合活性をもつものであり、 コンペティションでは区別できなかった。これらの事からSumsun NNにのみ見られるこの因 子はF1には存在しないことからも、PR1a遺伝子の発現にnegativeに働いていると考えられ る。次にこのファクターがその他のPRタンパクの転写調節にも関与している可能性を考え、 PRグループの他の遺伝子、PR-S、GRP の5′側上流を用いてゲルシフトアッセイを行った 所、それぞれの遺伝子上流域断片でPR1aとほぼ同じ移動度を示すシフトが観察されコンペ ティション実験によりこれらに結合する因子は、同一のものと考えられた。

タバコPR1タンパク質遺伝子の発現は植物の生育段階において異なる制御を受けている

*村上 髙,横山富美子,大島正弘,松岡 信,大橋祐子 (農水省・生物研)

PR1タンパク質は一種のストレス誘導性タンパク質であり、人工改変した PR1遺伝子を用いた発現制御解析系は、ストレス誘導による遺伝子発現調節解析のモデル系となるものと思われる。本講演では、形質転換タバコを用い、傷害ストレス、或はサリチル酸処理によって誘導されるPR1a遺伝子発現の様相を、異なった生育段階において、或はまた異なった器官において組織化学的に解析した結果を報告する。

[結果] 35S-GUS植物の葉身では、棚状組織と維管束に強く、海綿状組織および毛茸にも GUS活性が検出されたが、SA処理によるその誘導は、全く、あるいはほとんど起こらなかった、一方、PR(2.4Kb)-GUS 植物でも同じ傾向の組織特異性で GUS活性が検出されたが、SA処理によって GUS活性は顕著に上昇し、それは特に棚状組織および海綿状組織において著しかった、Control-GUS植物では、SA処理によっても全く GUS活性は検出されなかった、また、SA誘導による GUS活性の上昇は、生育段階により大きく異なり、同じ上位位でも、幼ない植物のものよりも、旺盛に生育中の青年期の植物の上位葉の方が GUS活性の上昇が著しかった、特に処理前に弱かった海綿状組織および表皮系の活性の上昇は頭著であった。また、同じ植物でも葉位が異なるとSAに対する応答が異なり、老化しかかった下位葉では、もともと GUS活性は低かったが、SAによる GUS活性の誘導もかかりにくく、生育段階において異なる制御を受けていることが示唆された。

35S-GUS 植物の若い葉柄では、弱い GUS活性が篩部、木部柔組織、葉基部等に検出されたが、SA誘導による活性化は見られなかった.一方、PR(2.4Kb)-GUS 植物の若い葉柄では、維管束部、葉基部をはじめ髄柔組織にも、SAによる活性の誘導がみられた.しかし、老化した葉柄ではSAによる誘導は起こりにくかった.

吸水 3 日目の幼植物体(種皮から幼根のみが出た時期)では、35S-GUS、PR(2.4Kb)-GUS、PR(0.3Kb)-GUSでは、ともに茎根遷移部から根端までにかなり強い GUS活性を示すとともに、SA誘導によって、後2者では強い活性が誘導された。 GUS活性の局在性は PR-GUS、35S-GUS植物ともに、植物の生長に伴い異なった器官の異なった部位に遷移していくが、PR-GUS植物では、SAによって誘導される GUS活性は、この組織特異性を維持したまま増巾されるようであった。ただ、培地置床35日目、第2本葉期には、PR(2.4Kb)-GUS の幼植物の表皮系由来である根毛に、SAによる強い GUS活性の誘導が特異的にみられた。

これらの結果は、PR1a遺伝子の発現が生育段階で異なった制御を受けていること、またSAによる発現誘導には、あまり組織特異性がないことを示唆しているものと思われる.

°伊藤博孝、榎本末男、石毛光雄、大島正弘、村上高、大橋祐子 (農水省・生物研)

タバコPR1タンパク質遺伝子の発現制御機構を異種植物において解析する目的で、PR1a遺伝子の5'上流領域2.4kbにレポーター遺伝子であるGUS遺伝子をつなげた融合遺伝子(PR-GUS)を同じナス科のバレイショやキク科のレタスに導入し形質転換植物を作製した。本演題ではこれらの形質転換植物を用い、GUS活性を指標にストレスによるPR1a遺伝子の発現を調べ、形質転換タバコで得られた結果との比較を行った。また対照実験として35S-GUS導入植物についても同時に解析を行った。切断ストレスやサリチル酸(SA)処理によるGUS発現の誘導を調べるために、leaf discを蒸留水あるいは5mM SAに浮かべ2日間保温したところ、PR-GUS導入植物では切断傷害およびSAによって明らかにGUS活性が上昇したが、35S-GUS植物ではその上昇は見られなかった。これらの結果は科の異なる植物においても形質転換タバコで得られた結果と同様に、切断やSAによる刺激にタバコPR1a遺伝子のプロモーターが応答し、その発現が誘導されることを示したものと思われる。しかし形質転換レタスにおける発現はタンパク質量あたり形質転換タバコの約10の1であった。

次に組織化学的にGUSの局在性を明らかにする目的で、切断およびSA処理を施した形質転換レタス葉をX-glucuronide(X-gluc)染色した。その結果、PR-GUSレタスではleaf discの切断面に沿って強いGUS活性が、またSA処理したleaf discではさらに全体に一層強い染色が認められた。一方、35S-GUSレタスでは傷害やSAによるGUS活性の誘導は認められなかった。レタス斑点病細菌(X.campestris pv. vitians)感染により壊死斑を生じたPR-GUSレタス葉についてX-gluc染色を行ったところ壊死斑の周辺部に強い活性が認められた。次に器官特異的なGUSの発現を組織切片を用いて調べたところ、PR-GUS、35S-GUSレタスの子葉、葉身、茎、茎頂、根、特に維管束にかなり強いGUS活性が認められた。しかしPR-GUSレタスをSA処理しても、器官および組織特異的なGUS活性の誘導は観察されなかった。

以上の結果はこれらPR-GUS導入植物においても、PR-GUS導入タバコにおけるinducerに対する誘導および器管、組織特異的な発現と基本的に類似した応答をすることを示している。即ち、異種生物においても効率は落ちるものの科を越えて普遍的な発現制御機構がタバコPR1a遺伝子に働くことを示唆している。

ホウレンソウ葉緑体におけるPGA依存の酸素発生

2Da01

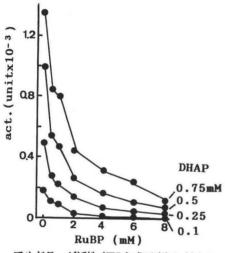
都筑幹夫(東大応微研)·M.N.Sivak·D.A.Walker(シェフィールド 大光合成研究所)

ホウレンソウ葉から単離した葉緑体は、CO2や3-フォスフォグリセリン酸(PGA)を基質と して、酸素発生を行う。しかし、CO2依存の活性が100-200 μ mol/mg chl.hと、高い光合成 活性を示す無傷葉緑体では、PGA依存の酸素発生は持続せず、時間とともにその速度が低下 し、まだ基質が存在するにもかかわらず、ついには停止する。そして、その停止後にさら にPGAを添加しても、わずかしか酸素発生を示さない。一方、葉緑体包膜を持たない破砕、 または再構成の葉緑体では、PGA依存の酸素発生速度は時間と共に直線的に進み、無傷葉緑 体の場合に比べて、約2倍の酸素を発生する。この違いの原因を明らかにするために、PG A依存の酸素発生の性質を検討した。無傷葉緑体においては、光強度が高いほど、PGA依存 の酸素発生速度も量も多いこと、PGA依存の酸素発生は少量のCO2が混在していてもその性 質は基本的には変わらないこと、破砕葉緑体では、ATP/ADP比がPGAの還元速度に関係して いることが明かとなった。次に、PGA依存とCO₂依存の酸素発生時に、クロロフィルの室温 蛍光を測定し、そのクエンチングにより、Qaの酸化還元(光化学系IIが開いている程度;qQ)と、チラコイドにおけるエネルギー状態(qE)を求めた。まず、破砕葉緑体では、Fmが低か った。破砕葉緑体におけるPGA環元では、qQは酸素発生の停止に伴って低下した。一方、無 傷葉緑体においては、PGA依存の酸素発生が低下しても、qQは減少せず、CO2依存の酸素発 生が停止する場合(CO2の枯渇)、qQの低下が見られた。qEの値は、同じ酸素発生速度で比 較した場合、PGA依存の場合の方が、CO₂依存の場合より高かった。近赤外光を照射して、 光化学系Iの酸化を促した場合のqQの増加は、CO2の場合に比べて、PGA依存の場合少なかっ た。さらに、810 nmの光吸収を用いて、P700の酸化還元の変動を調べたところ、PGAの場合、 P700の還元が、C02の場合に比べて抑えられていた。以上の結果から、無傷葉緑体における PGA依存の酸素発生では、CO₂依存の酸素発生の場合に比べて、チラコイド膜におけるエネ ルギー状態が高く、光化学系Iへの電子伝達が抑えられていること、破砕葉緑体ではその抑 制が見られないことが示唆された。

定常状態におけるカルビンサイクルの調節機構: Phosphoribulokinaseとaldolaseの役割

〇岩城俊雄·和田野晃·横田明穂·姫野道夫 (大阪府大·農・農化)

葉緑体内のカルビン回路はトリオースリン酸(TP)を介して細胞質とつながったリプロースビスリン酸(RuBP)再生系である。 光飽和条件下で緑葉周辺の CO_2 濃度を変化させると、カルビン回路中のRuBPと3-ホスホグリセリン酸の定常濃度は大きく変化するが他の代謝中間物濃度は一定に保たれる。その時、RuBPの合成速度は CO_2 固定速度に等しい $O\sim350\,\mu\,mol/mg$ Chl/hrで変化する。この現象は、現在提唱されている不可逆過程を触媒する種々の調節酵素の性質によっては全く説明できない。 我々はフラクトースビスリン酸(FBP)→トリオースリン酸(TP)を触媒するアルドラーゼおよび、ホスホリブロキナーゼ(PRK)の両酵素がRuBPによって強く阻害されることに注目し、上記の現象を説明しようと以下の実験を行った。



アルドラーゼ活性 (FBP合成反応) に対する RuBPの影響

DHAP; dihydroxyaceton phosphate

ホウレンソウ葉よりKrügerとSchnarrenberger らの方法にしたがってアルドラーゼを精製した。報告されている葉緑体内定常濃度のTPを基質として種々の濃度のRuBPを反応系に加えてアルドラーゼ(TP→FBP合成反応)活性を測定した(図)。図に示すようにアルドラーゼはRuBPによって顕著に阻害された。実験に用いられたRuBP濃度は通常大気の CO₂濃度で光合成を行っているときに生じるRuBP濃度である。 葉緑体中のアルドラーゼのVmaxは~300μmol/mg Chl/hrなので、この強い阻害はカルビン回路の調節を考える上で重要である。本報告ではさらにアルドラーゼのTP→FBP 合成反応の性質とPRK の性質も併せて報告し、カルビン回路のダイナミズムについて考察を加える。

Krüger, I. and Schanarrenberger, C., Eur. J. Biochem. 136, 101(1983) ○榛葉繁紀、 山内伸子、 海野けい子、岡田昌二 (静岡県大・薬・放射薬品)

〔目的〕演者らは重水素(D)の生物学的同位体効果をクロレラを用いて検討しており、 1988年会においてクロレラのsucrose合成が D_2 0環境下において強く抑制されることを報告した¹⁾。そこで今回、sucrose合成に関係した種々の酵素活性ならびに調節物質の D_2 0中における変動について検討を行った。

「方法」 H_2 0培地中で培養したクロレラ($Chlorella\ ellipsoidea\ C-27$)を D_2 0中において光合成を行わせ、 無機リン酸量をTausskyらの方法で、ATPおよびAMP量をルシフェラーゼ法で、 <math>glucose-6-phosphate (G6P)量をG6Pデヒドロゲナーゼを用いたNADP+の還元量よりそれぞれ測定した。また、 酵素活性は $Cell\ homogenate$ (Brawn型ホモジナイザー処理)を用いて測定した。

- 〔結果〕① C_3 回路への影響 D_2 0中において葉緑体fructose-1,6-bisphosphatase(葉緑体FBPase)および3-phosphoglycerate kinaseの活性は H_2 0中の約50%に低下した。また D_2 0はATP+ADP+AMP量に変化をあたえることなしにATP量を有意に低下させた。
- ②細胞質FBPase活性への影響 細胞質FBPaseの inhibiterであるAMP量 idD_2 0中において有意に増加した。また細胞質FBPase活性 idD_2 0中において約25%の低下を示した。
- ③ Sucrose-phosphate synthase(SPS)活性への影響 D_2 0中ではSPSのactivatorであるG6P量が低下する一方で inhibiterである無機リン酸量は有意に増加した。また D_2 0中ではG6P存在下でも酵素活性の増加はみとめられなかった。

〔考察〕 D_20 は C_3 回路ならびにsucrose合成の調節をつかさどる酵素の活性を低下させるとともに 各調節物質を合成に対して負の方向に変動させることによってsucrose合成を抑制することが明らかになった。

1) Shimba et al. (1990) $\underline{31}$: Plant Cell Physiol. "In press".

今泉 信之・鮫島 宗明¹・石原 邦 東京農工大・農、¹農水省生物研

イネの収量形成における穂の光合成の果たす役割を解明する研究の過程で、穎花の光合成特性が葉の特性と異なることが見いだされた。特に前報で報告したように穎花の表面には気孔がなく、気孔を通してのガス拡散を行っていないにもかかわらず、その炭酸固定速度はクロロフィル当りで比較して止葉の70-100%の値を示し、またC4光合成関連酵素の活性は止葉よりも高く、その値は穎花のRuPBCase活性とほぼ等しかった。

そこで、開花前後のイネの穂より経日的に類花を採取し、 14 CO2 を用いた炭酸固定速度の消長、炭素代謝関連酵素の発現量を調べた。ウエスタンプロッティングによる酵素タンパク質の定量の結果、RuBPCaseは出穂直後に発現した後一定の値を示したが、PEPCase は開花前後で一定となり、PPDKは開花後6日前後に発現量が顕著に増大することが明かとなった。また、開花前後の炭酸固定活性の変動は主としてRuBPCase量に追随した。さらに、PPDKの発現量が顕著に増大する開花6日後の顆花を用いて光合成的 14 CO2 固定を行わせ炭素代謝を調べた結果、短時間でC4 化合物中に取り込まれる 14 Cの割合は止葉より多いが、典型的なC4 光合成の代謝型とは異なっていることが示され、この時期に特異的に発現するPPDKの役割については明かにできなかった。

C。植物であるイネの穎花で多量に発現しているC4光合成関連酵素遺伝子の発現機構をさぐるため、PPDKのゲノムクローンを単離し、そのクローン化されたDNAの制限酵素地図を作成した。

まず、イネ(日本晴)の暗所育成苗より核DNAを単離し、Mbolにより部分分解した約2.0 kbp の画分を用いてEMBL3 入ファージベクターにクローニングすることにより核DNAライブラリーを作成した。トウモロコシPPDK遺伝子の3 1側cDNAクローンをプロープとしてイネ核DNAライブラリーのスクリーニングをおこなった結果、3個のボジティブクローンを得た。これらのクローンについて制限酵素地図を作成し検討したところ、これらのクローンはすべて同一で、PPDKの全領域を含むことが予想された。

。 朽津和幸、都筑幹夫、宮地重遠 (東京大学応用微生物研究所)

ピレノイドは、多くの真核藻類の葉緑体ストロマに存在するタンパク質複合体である。 従来はタンパク質の貯蔵庫と考えられていたが、その周囲に蓄積されるデンプンの合成と分解は、ストロマに散在するデンプン粒と独立に制御されており、ピレノイド周辺で局所的に 代謝調節が行われていると考えられた¹。 そこで環境条件によるピレノイドの変化を調べた ところ、5%CO2で培養したChlorella vulgaris 11h 細胞のピレノイドは痕跡程度であるが、 CO2濃度を大気レベルに低下させると数時間のうちにピレノイドが形成されることが明かと なった。ピレノイドの発達は、CO2濃度の低下に伴う一連の適応現象(CO2 Syndrome)2の一環 と考えられる。この過程には光が必要で、DCMU、CHIで阻害されたが窒素同化を抑制しても阻 害されず、ピレノイドの解離、構築には積極的な調節機構が存在すると考えられた。

そこでピレノイドの構成成分や機能を明らかにするため、細胞分画の容易なChlamydomonas 細胞を用いてピレノイドを単離したところ、構成タンパク質の大部分は、ほぼ1:1のモル比で存在する炭酸固定酵素RuBisCOの大、小両サブユニットと同定された³。 またChlamydomonasのRuBisCOに対する抗体を用いた間接蛍光抗体法、免疫電子顕微鏡法によっても、RuBisCOのピレノイドへの集中が示された。 さらにピレノイドのRuBisCOの存在割合や活性を明らかにするため、細胞壁欠損変異株から葉緑体を単離し、70%パーコールに重層し、界面活性剤で葉緑体を破砕した直後に強く遠心して、その沈澱、上澄を分画した。 膜成分は可溶化されて上澄に回収され、沈澱画分のタンパク質組成は、単離ピレノイドと同様に大部分がRuBisCOであった。 この時、低 CO_2 細胞では葉緑体全体の約7割のRuBPCase活性が沈澱画分に検出され、抗体を用いてRuBisCOを定量した結果とほぼ一致した。 光合成活性と比較した結果ピレノイドのRuBisCOが定量した結果とほぼ一致した。 光合成活性と比較した結果とレノイドのRuBisCOは炭酸固定に寄与していると考えられ、高 CO_2 条件における主たる炭酸固定の場はストロマであるが、低 CO_2 条件ではRuBisCOがピレノイドに集中し、炭酸固定の場となっている可能性が示唆される。 RuBisCOが他のタンパク質と複合体を形成し局所的な反応の場を形成することが、炭酸固定の効率化に寄与している可能性が考えられる。

【引用文献】1)Plant Cell Physiol 29:1269-1278 (1988) 2)Inorganic Nitrogen Metabolism p.16-21 Springer-Verlag (1987) 3)Protoplasma 144:17-24 (1988)

コムギ葉より機械的または、酵素的手法により単離した RuBisCO分解活性

宮台健司・前忠彦・鈴木正人・牧野周・小島邦彦 (東北大・農・農化)

光合成のkey enzymeであるRibulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (RuBisCO: EC; 4.1.1.39) は、葉緑体のストロマ画分中に存在し、量的にはC3 植物の可溶性タンパク質の約5割を占め、生長部への転流窒素源としても重要である。

RuBisCO の生合成に関しては、多くの知見が得られているが、植物葉の老化過程における分解のメカニズムに関しては全く不明で、その分解の場さえ確定していないのが現状である。但し、葉の老化過程の初期段階おいて、RuBisCO 量の減少は葉緑体数の減少に先立って起こるという結果が得られており、RuBisCO の分解は葉緑体内で生じていることが予想されている。

そこで、本研究ではまず、現在までに報告されている葉緑体におけるRuBisCO 分解活性が、液胞プロテアーゼのそれに似ていることに留意し、精製抗LSU抗体を用いて、機械的に単離精製した葉緑体と、液胞の破砕液によるLSU分解パターンの比較を行ったところ、両者は、ほぼ一致した。また、葉緑体と液胞破砕液の分解パターンは、V8プロテアーゼ、トリプシン及び活性酸素による分解パターンとは異なることから、LSUが非特異的に切断されたのではなく、同一プロテアーゼによる切断と判断され、これらの結果から、次の二つの可能性が考えられた。

- 1. 液胞、葉緑体中に同種のプロテアーゼが存在する。
- 2. 被胞由来のプロテアーゼが包膜へ付着し、精製業縁体に混入してくる。

そこで、サーモリシン(EC; 3.4.24.4)で精製業緑体をそのインタクトネスを保持したまま処理し、サーモリシンの活性を抑えた後、葉緑体を破壊、インキュベートすることで、内在LSUの分解を見たところ、分解物を検出できなくなった。次に、もう一つの葉緑体の単離方法であるプロトプラスト法により、精製葉緑体を調製後、その破砕液についてLSUの分解を見たところ、液胞プロテアーゼによる分解パターンと一致した。

以上のことから、今まで知られていたin vitroにおける精製業緑体破砕液のRuBisCO分解活性は、おもに葉緑体画分への液胞プロテアーゼの付着に起因していたことが示された。

構田 明穂 (大阪府大・農)

光合成CO。固定酵素、リブロースビスリン酸カルボキシラーゼ/オキシゲナーゼ (RuBisCO, E) は、その活性発現に^ACO₂(C)とMg²⁺(M)による活性化を必要とする。 活性化されたRuBisCO (ECM) に基質であるSCO2とリブロースビスリン酸(RuBP)を加えると、そのカルボキシラーゼ反応は最初 の数分間のinitial burstとその後のlinear phaseから成る二相性を示して進行する。 我々はこれ までの動力学的解析から、この反応の二相性の生じる原因を次のように考えている。1,2) ECMに SCO,とRuBPを加えた直後RuBisCOはECMR(Rsは基質結合部位に結合したRuBP)として機能し、高い活 性を示す。 ECMRsは数分を要して徐々にRrECMRs(RrはRs部位とは異なる部位、恐らく調節部位、に 結合したRuBP)およびRrⁿECMRs(nは複数を示す)の形態を採り、それぞれの活性を示す。 RrECMRsと RrⁿECMRsは反応系のRuBP濃度がそれぞれ 0.1~1.0、1.0~5.0 mMで出現する。 今回、このように 推測してきたRuBisCOの機能形態変化がカルボキシラーゼ反応中に実際に生じていることを見いだ したので、報告する。 なお、ケイ光プローブとしてはタンパク質の脂溶性部位と会合しケイ光を 発する2-p-トルイジニルナフタリン-6-スルホン酸カリウム(TNS)を用い、Exass、Em427にて測定し

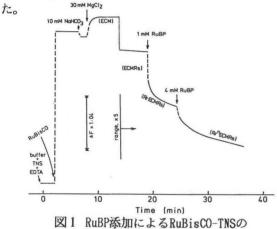


図1 RuBP添加によるRuBisCO-TNSの ケイ光強度変化

図1に結果の一つを示した。 SCO。の存 在下でECMに1 mM RuBPを加えると瞬時の ケイ光減少とその後のゆっくりとした減 少が見られた。 さらにRuBPを5 mMに増 加させると、ゆっくりとさらにケイ光強 度は減少した。 ケイ光減少の二つの成 分の内、ゆっくりしたケイ光の減少の経 時変化はRuBisCOのカルボキシラーゼ反 応の二相性の経時変化に一致していた。 今回発表するその他の多くの結果から、 この瞬時のケイ光減少はECM→ECMRsによ るものであり、ゆっくりとした減少は ECMRs→RrECMRsあるいはRrⁿECMRsによ るものであると考えている。

- (1) Yokota, A. and Kitaoka, S (1989) Plant Cell Physiol. 30: 183-191.
- (2) 横田ら(1989) 日本植物生理学会1989年度年会講演要旨集 p.298

辻本 憲孝、 横田 明穂 (大阪府大・農)

不活性型のRuBisCO(E)は $^{\Lambda}$ CO $_{2}$ (C)と $^{\Lambda}$ Mg $^{2+}$ (M)を結合し活性型(ECM)となって触媒機能を発現する。活性化されたRuBisCOを S CO $_{2}$ とRuBPに反応させると、最初の数分は高い活性(initial burst)を示すが、その後活性は徐々に低下し反応は低い活性で直線的に進行(linear phase)してゆく。 これは、RuBisCOがinitial burstでECMRs、linear phaseでは $0.1\sim1.0$ mM RuBP存在下でRrECMRs, $2\sim5$ mM RuBP存在下でRr $^{\Pi}$ ECMRs構造を取るためである(横田、本年会にて発表)。 通常空気中では葉緑体内の遊離RuBP濃度は > 2 mMとなるので、Rr $^{\Pi}$ ECMRsの酵素化学的性質を知ることは重要である。 また、RuBisCO activaseが機能する為には高濃度のRuBPが必要であるが、その理由と機構は不明である。そこで、4 mM RuBP存在下でのRuBisCOの酵素化学的性質を調べてみた。

RuBisCOのcarboxylase反応は30℃ではlinear phaseはinitial burstの70~80%の活性を示すが、反応温度の上昇に伴いこの差は縮まり、50℃では反応の経時変化は直線となった。 SCO₂飽和、4 mM RuBPという条件下で1~50℃での活性のアレニウスプロットをとると、initial burst、linear phaseとも15℃付近で大きな折れ曲がりを示した。 15℃以上での活性化エネルギーはどちらにおいても12~14 kcal/mol、15℃以下では23~24kcal/molであった。 至適pHはinitial burstが8.0、linear phaseが8.1であった。 SCO₂に対するKm値は30℃ではinitial burstで30 μM、linear phaseで40 μMであった。 次に4 mM RuBP存在下での光合成代謝中間物によるECMの安定化の影響をみた。ECMをCO₂-freeにすると最初の約1分は高い活性を持っているが、その後活性は低下し不活性化が起こる。 ここへNADPH、FBP、6-PGなどの中間体を加えたが、不活性化の抑制は見られなかった。このことより、従来考えられていたこれら中間体によるECMの安定化は、4 mM RuBP存在下では起こりえないと考えられる。

水陸両生植物エレオカリスの組織構造と光合成酵素の分布

上野 修、鮫島 宗明 (農水省·生物研)

これまでの研究から、ハリイ属の水陸両生植物、Eleocharis viviparaは、陸上と水中とで各々C』型とC』型の光合成代謝特性を発現することが見出されている。この光合成機能の変換では光合成組織の形態変化も伴い、陸生型ではクランツ構造を示すが、水生型ではこの構造は不明瞭となる。このため、本植物はC』、C』光合成と関連した構造と機能の分化・発現機構を究明して行く上で、きわめて興味深い実験系になるものと考えられている。本研究では、陸生型と水生型にみられる形態上の相異がどのような細胞・オルガネラの量的変化により生じているのかを明確にし、合わせて、Ca、Ca光合成のキーエンザイムであるRubisco、PEP-カルボキシラーゼ(PEP-C)、ピルビン酸Piジキナーゼ(PPDK)の局在分布を金コロイド免疫電顕法により解析し、光合成型の変換機構を検討した。

陸生型と水生型の光合成組織は、葉肉細胞、柔組織鞘細胞(PSC)、クランツ細胞という3種の細胞から構成されている。水生型では陸生型に比較して、クランツ細胞の数とサイズの減少および葉肉細胞のサイズの増大を示し、この結果、クランツ細胞と他の2種光合成細胞の量的比率は両型で著しい相異を示す。葉緑体は水生型のクランツ細胞で小形となり、その頻度も減少する。また脱炭酸の場と考えられるクランツ細胞のミトコンドリアも(陸生型のCaサブタイプはNAD-malic enzyme型)、水生型で著しい頻度の減少を示す。ウエスタン・ブロット法による解析では、PEP-CとPPDKともに陸生型に比較して、水生型で顕著に減少し、活性測定から得られた結果と一致した。免疫電顕法による観察では、PEP-CとPPDKの存在を示す金粒子の標識は陸生型の葉肉細胞とPSCの、各々、細胞質と葉緑体に見出された。水生型では両酵素の明確な標識は確認されなかった。一方、Rubiscoは陸生型、水生型ともに3種の光合成細胞のすべての葉緑体に標識された。

以上の結果から、陸生型ではRubiscoは葉肉細胞とPSCにも存在はしているものの、C 4 光合成酵素については局在分布の傾向を示し、C 4 型の光合成代謝を働かせているものと考えられる。一方、水生型では葉肉細胞とPSCにおけるC 4 光合成酵素の減少とクランツ細胞の退化が起こり、その結果、葉肉細胞とPSCでRubisco依存のC \S 型の光合成代謝を稼働させるようになるものと推定される。

窒素欠乏トウモロコシの回復過程における代謝中間体と PEP カルボキシラーゼ mRNA レベルの変動

Bambang Sugiharto、杉山 達夫(名古屋大学・農学部)

トウモロコシ葉 PEPCase の蓄積は硝酸塩濃度に応答し mRNA レベルの変動を伴い選択的に制御され、この変動は成熟中の細胞で最も大きく増幅される¹⁾。さらに、この制御は転写の段階又はmRNAの安定性によることが単離核の run-on 実験の結果からも強く示唆される²⁾。本実験では PEPC 遺伝子発現の窒素シグナルについて知見をうるため、i) 窒素源としてアンモニアが硝酸塩の替りをするか否かを検討するとともに、ii) 窒素回復の過程で窒素同化に炭素骨格を提供する 2-oxoglutarate (2-0G) と窒素同化の初期産物 glutamate (GLU)と glutamine (GLN) の変動を PEPC mRNA 蓄積との関連で解析した。

[材料と方法] 低窒素 (0.8 mM NO₃-) で2週間生育した植物体またはその切除した完全 展開葉 (第3葉) に高窒素 (16 mM NO₃-または 6 mM NH₄+) を加え、第3葉の基部を分析 に用いた。中間体の葉肉細胞での分布は differential filtration 法を適用した。

[結果と考察] i) 窒素ストレス植物に高 NH_4^+ を加えると、 PEPC 蓄積は硝酸塩の場合と同様に数日間増加し続けた。一方、 PEPC mRNA の蓄積は NO_3^- では添加後直ちに増加するのに対し、 NH_4^+ では数時間の遅延の後、 NO_3^- と同様な速度で増加した。従って、 PEPC の硝酸による発現制御はタンパク質と mRNA の蓄積で判断する限り、アンモニアで代替できる。このことは PEPC 遺伝子発現をもたらすシグナルが NO_3^- または NH_4^+ ではなく、後者の同化産物であることを示唆する。

- ii) 窒素ストレス植物に NH_4^+ を加え、回復の遷移過程での 2-0G、GLU と GLN の葉肉 細胞での変動を解析した。その結果、2-0Gレベルは添加後徐々に低下するのに対し、GLU と GLN のレベルは、数時間の遅延の後 PEPC mRNA の蓄積と平行して増加し、48 時間後 には低下した。興味あることに、GLU と GLN の変動のパターンは PEPC 遺伝子の run-on 活性のそれと一致していた。これらの中間体レベルが PEPC 遺伝子のスイッチの on/off を引起こすか否かは検討中である。
- 1) Sugiharto, B. et al.(1990) Plant Physiol. in press 2) 鈴木石根ら。"トウモロコシ PEP カルボキシラーゼ遺伝子の窒素による発現制御、本講演要旨集。

。 白岩善博・大川英子¹・猪熊正則 (新潟大・理・生物、¹日本化薬・高崎研究所)

低および高CO2条件下で培養されたクロレラなどの微細藻類は各々の条件に適応し、前者は後者に比較して、高いカルボニックアンヒドラーゼ(CA)活性、細胞内無機炭素(DIC)濃縮機構活性をもち、それらの作用によって光合成におけるDICに対する高い親和性を獲得している事が明らかとなっている。また、外界のCO2条件は膜結合性タンパクの合成や細胞の構造変化をも引き起こしている反面、カルビン回路や光呼吸系の酵素活性には影響を与えないとされている。この中で、演者らは、グリコール酸の取り込み活性が生育時のCO2条件により変化していることを見いだし、その機構やその誘導条件等について調べた。

- (1) Chlorella vulgaris 11 h によるグリコール酸取り込み活性は低CO2条件に適応した細胞 (Low-CO2 cells) においてのみみられ、高CO2盾ノ適応した細胞 (High-CO2 cells)ではみられなかった。また、Chlorella regularis では High-および Low-CO2 cells の双方においてグリコール酸取り込み活性は認められず、種特異性の存在が示唆された。したがって、以後の実験では全て C. vulgaris 11 h を用いた。
- (2) High-CO2 cells を低 C O 2 条件に移した場合グリコール酸取り込みは時間と共に増大し、2 3 時間で、定常状態に達した。この経時変化は、C A 誘導のそれとほぼ一致した。また、これはタンパク合成阻害剤シクロヘキシミドと転写阻害剤 6 -メチルブリンにより阻害され、クロラムフェニュールやリファンピシンによっては阻害されなかった。
- (3) グリコール酸取り込み活性の増大には低CO2条件と強光条件が必須であった。また、それはDCMUやCCCP存在下ではみられなかった。

以上の結果から、グリコール酸取り込み活性が光および低COュ条件下におけるタンパクの de novo 合成のレベルで調節されていることが明らかとなった。

(4) グリコール酸取り込み活性は膜不透性の種々のタンパク合成阻害剤(メリサリル酸など)により阻害された。更に、HCO₃-, HCOO-, C1-によって拮抗的に阻害された。また、EGTAは影響なくEDTAによって大きく阻害された。この活性は光照射下においてのみみられ、暗所および明中でもDCMUや CCCP 存在下ではみられず光エネルギーが必須であった。

以上の結果は、細胞膜上にグリコール酸取り込みをコントロールするエネルギー依存性のキャリアタンパクが存在することを示唆する。

R. rubrumのプラスミドとG-1-P adenylyltransferase遺伝子のホモロジー

o金福煥、井手口隆司、西瀬弘¹、胡澄、角野冨三郎、山下仁平² (阪大・蛋白研、¹甲子園大、²阪大・R I 総合センター)

私達は光合成細菌Rhodospirillum rubrum S-1のプラスミドpKY1(55kb)の塩基配列を決定しつつある。今回決定した塩基配列中のオープンリーディングフレームをアミノ酸配列に読み換えて、蛋白質データベースSWiss-Plotに対してホモロジー検索を行った結果、有意と思われるものが見つかったのでこれについて報告する。以下、このオープンリーディングフレームを便宜上、ORF1と呼ぶ。

ORF1の開始コドンATGの上流にSD配列と思われるAGAGAGという配列が存在する。Fickettの方法によるとテストコードの値は1.27となり、タンパク質がコードされている可能性が高いことが示唆される。Swiss-Plotに対するホモロジー検索の結果、Streptomyces griseusのstrD、Pseudomonas aeruginosaのフォスフォマンノースイソメラーゼ、Escherichia coli 及び、Salmonella typhimurium のグルコース-1-リン酸アデニリルトランスフェラーゼが高いホモロジーを示した。

<u>s t r D</u> は、アミノグリコシド抗生物質であるストレプトマイシンの合成に関する遺伝子クラスター中に存在するオープンリーディングフレームで、その遺伝子産物は同定されでいないけれども、<u>s t r D</u> は<u>B. coli</u> のグルコース-1 - リン酸アデニリルトランスフェラーゼのアミノ酸配列と高いホモロジーをもつことと、いくつかの傍証から、グルコース-6 - リン酸のヌクレオチジレーションを行う酵素であると考えられている。グルコース-1 - リン酸アデニリルトランスフェラーゼは、糖代謝経路上のキーエンザイムであり、グリコーゲンの合成に関係している。

R. rubrum は、光照射下でポリーβーヒドロキシブチレートとグリコーゲンを合成する事が知られている。R. rubrum のグルコース-1-リン酸アデニリルトランスフェラーゼについては、Furlong等によって報告されているが、アミノ酸配列は知られていない。Ο R F 1 がグリコーゲンの合成に関係している可能性が考えられる。