2Ea01

光合成促進物質の検索

°蔡　晃植、趙　徹、玄　丞培、磯貝　彰、
鈴木昭憲（東大農化）

植物の物質生産能力を向上させる方法の一つは光合成を増大させることである。演者らは、化学的手段による光合成促進を目的として、小麦のプロトプラストと酸素電極を用いた簡単なアッセイ系を確立し、広範な化合物についてスクリーニングを行った。その結果、コリン類縁体とＮ－置換グリシン類縁体のいくつかが光合成促進活性を有することを見いだした。さらに、光合成促進の作用機作解明のため、取り込み実験や代謝実験、光合成電子伝達系や光リン酸化に与える影響、さらにカルビン回路の各酵素に与える影響等も検討したので報告する。

光合成促進物質の検索は、常法により単離した小麦プロトプラストと供試薬を反応液中で２分間インキュベートした後、光を照射することにより光合成を開始させ、光合成由来の酸素放出速度を無処理区と比較し活性を調べる方法で行った。光合成電子伝達系と光リン酸化に与える影響は、単離したホウレン草のチラコイド膜を用いてそれぞれ常法に従い実験を行った。代謝実験を行うため、小麦を［^{14}C］供試薬の入った水耕液で一定期間生育させた後、クロロホルム／メタノール／水の混合溶媒中で磨砕し、水溶性抽出物と脂溶性抽出物に分けた。これら抽出物はアイソトープ検出器を用いた高速液体クロマトグラフィーでさらに分析を行った。カルビン回路系の酵素に与える影響は、Lilleyらが報告した還元的ペントースリン酸回路のタンオーバーシステムを用いた。

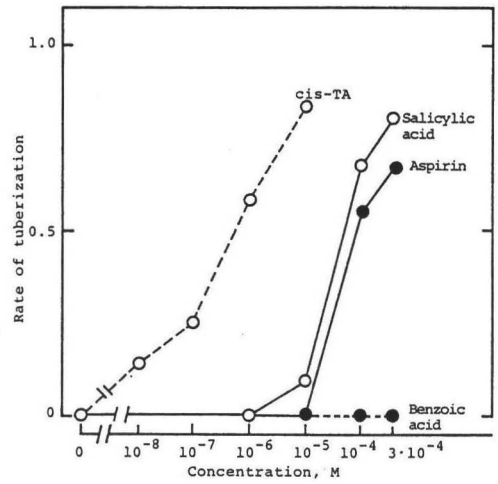
光合成促進物質のスクリーニングの結果、コリン類縁体とＮ－置換グリシン類縁体のいくつかが小麦プロトプラストの光合成を５～１５％促進することが明らかとなった。また、取り込み実験の結果、これら化合物は植物体内に速やかに取り込まれることが明らかになり、さらに代謝実験の結果、いくつかの代謝経路が明らかになるとともに、光合成促進活性はこれら化合物の代謝産物が有するのではなく、その化合物自体が活性を有していることも明らかになった。一方、これら化合物は光合成電子伝達系および循環型、非循環型光リン酸化ともになんら影響を与えていなかった。しかし、カルビン回路系の酵素に与える影響を調べた結果、回路の酵素を促進している可能性が示唆された。現在、詳細な検討を行っている。

2Ea02　バレイショ塊茎形成活性を示す化合物

○幸田泰則・高橋淳・喜久田嘉郎
（北大・農・植物）

バレイショの塊茎は、短日条件下の葉中で形成される塊茎形成物質により誘起される。我々は先にこの物質の一つをバレイショ葉から単離し、そのアグリコンをチュベロン酸(Tuberonic acid, TA)と命名した。ＴＡの化学構造はジャスモン酸(JA)ときわめて類似していることから、ＴＡはＪＡと同様にリノレン酸からリポキシゲナーゼ(LOX) を出発とする一連の酵素群によって生合成されるものと思われる。したがってＬＯＸやその関連酵素の阻害剤は、バレイショの塊茎形成を阻害する可能性がある。そこでバレイショ茎断片培養法を用いて、様々な物質が塊茎形成に及ぼす影響について検討した。

まず動物のシクロオキシゲナーゼの阻害剤であるアセチルサリチル酸（アスピリン）の影響について調べたところ、予想に反してこの物質は 5×10^{-5} M 以上の濃度で塊茎形成活性を示した。インドメタシンやクークミン等の他のシクロオキシゲナーゼ阻害剤は全く活性を示さなかったが、サリチル酸はアスピリンよりやや強い活性を示した（図）。安息香酸、p-, m-ヒドロキシ安息香酸、フタル酸等には全く塊茎形成活性は認められなかった。一方同じく安息香酸の関連化合物であり、オーキシンの極性移動阻害剤であるＴＩＢＡとフルオレセインは弱い塊茎形成活性を示し、またＮＰＡはサリチル酸と同程度の活性を示した。



バレイショ茎の組織片にリノレン酸を与えて放置すると、組織内の塊茎形成活性は大きく増加した。この結果は遊離のリノレン酸レベルがＴＡ生成の律速因子であることを示している。また塊茎形成活性を持つ安息香酸関連化合物は、ＴＡ生成に関与しない主要なＬＯＸｓを阻害することにより内生リノレン酸レベルを高め、それにより増加したＴＡが塊茎形成を引き起こすものと思われる。

2Ea03 紫外線ＵＶ－Ｂ照射のキュウリ芽生えに及ぼす影響

近藤矩朗、川口和彦[1]（国立公害研究所、[1]東邦大・理・生物）

太陽光に含まれる紫外線のうち290nm以下の波長の大部分は成層圏のオゾンに吸収されてほとんど地上に到達しない。近年、クロロフルオロカーボン（CFCs）の大気中への放出の増加に伴い、そのオゾン破壊作用が問題となり、植物に対する影響が懸念されるようになった。オゾン減少により290～320nmの紫外線が増加する。これはいわゆるＵＶ－Ｂ（280～320nm）の範囲にある。オゾン減少に対応する紫外線増加の光環境を野外において人為的に作りだし、ダイズの収穫に対するＵＶ－Ｂ増加の影響が調べられているが、その結果は品種や実験の年により大きくバラついている。ＵＶ－Ｂの影響は種々の環境条件に依存していると思われるが、それを解明するためには実験室における詳細な研究が必要である。室内実験では野外のような光条件を作りにくいという問題があるが、本実験では室内においてキュウリに対するＵＶ－Ｂの影響といくつかの環境要因との関係について検討した。

材料としてキュウリ（品種：北進）の芽生えを用い、20℃あるいは25℃で人工光グロースチャンバー内でＵＶ照射を行った。湿度は70%、日長は12時間（ＵＶ照射は11時間）とした。ＵＶ－Ｂ照射は東芝健康線用蛍光ランプに290nm以下の光をカットするフィルターを装着したものを用いた。ＵＶ－Ａ照射には NIPPO FL20SBLB 蛍光灯を用いた。20℃でＵＶ－Ｂは子葉と第１葉の顕著な成長阻害を引き起こした。また、第１葉の周辺部にクロロシスを引き起こした。しかし、照射時の温度を25℃にすると、クロロシスは生じたものの、成長阻害はほとんど認められなかった。健康線用蛍光ランプにはＵＶ－Ａ（320～400nm）領域の紫外線はわずかしか含まれていないので、ＵＶ－Ａ用蛍光灯によりＵＶ－Ａを補強してＵＶ－Ｂの影響を調べた。表１に示したようにＵＶ－Ａ照射によりＵＶ－Ｂによる成長阻害はほとんど回復した。しかし、ＵＶ－Ｂによる第１葉のクロロシスは回復しなかった。これはＵＶ－Ｂの成長阻害作用とクロロシスとはそのメカニズムが異なることを示唆している。

表１　キュウリの成長に対するＵＶ－ＢとＵＶ－Ａの影響

処理		乾燥重量（mg）	
		子葉	第１葉
－UV-B	－UV-A	66± 8	216±34
	＋UV-A	68± 8	226±49
＋UV-B	－UV-A	57±13	183±34
	＋UV-A	62±13	211±36

2Ea04

ゼニゴケの細胞増殖に関与するプロテインキナーゼ（MK-II）の生理的な役割

金勝一樹、道家建二郎、大槻健蔵[1]（北里大・教養・生物、[1]衛生・生物科学）

ゼニゴケの培養細胞の増殖には、光照射が必須である。暗黒下にある本細胞を、再び光照射すると細胞の増殖が誘導される。この様な実験系は、光照射による細胞増殖の生化学的機構を解析するのに適している。そこで我々は、本機構に関与するプロテインキナーゼ(PKase)とその特異基質となる蛋白質の生理的役割を明らかにする目的で本研究を行った。

【材料および方法】ゼニゴケの細胞は、2%グルコースおよび1ppm 2,4-Dを含むMS改変培地（Katoh ら1980）を用いて、25℃で振とう培養した。(1) 本培養細胞からの PKaseの抽出は、1.0M KClを含む50mM Tris-HCl 緩衝液(pH7.4) で行い、DEAE-celluloseカラムクロマトグラフィー、Sephacryl S-200カラムによるゲル濾過およびMono Q (HPLC)により３つの異なる PKaseを高度に精製した。(2) このようにして得られた PKaseの酵素化学的な性質を解析した。そしてそれぞれの PKaseの持つ特性を基にして粗細胞抽出液中の特異的リン酸化蛋白質を直接検索した。さらに、(3)[^{32}P]KH_2PO_4存在下で細胞を培養し、光照射により誘導される特定蛋白質のリン酸化をSDS PAGEとオートラジオグラフィー法で解析した。

【実験結果】(1)ゼニゴケ細胞から得られた３つの異なる PKaseは、MK-I(23KDa), MK-II (47KDa) および MK-III(28KDa) と命名した。MK-II の蛋白質リン酸化活性は、低濃度(20 ug/ml)のヘパリンによって著しく促進され、また40℃（５分）の前処理でリン酸化活性が完全に消失する点で、他のPKase(MK-IおよびMK-III)と区別された。さらにMK-IIは、①ヒストンH1を最もよくリン酸化すること、② subunitの分子量が 32KDaであること、さらに③ヘパリン affinity カラムに吸着することなどの点で、動物細胞の分裂機構調節に関与するcdc2 kinase (34KDa)とよく似ている。(2)粗細胞抽出液中で特異的にリン酸化される蛋白質の検索から、分子量 60KDaのpolypeptideが検出された。本polypeptideのリン酸化は、40℃の前処理とヘパリンに対する反応性から MK-IIの特異リン酸化蛋白質と考えられた。さらに、(3)in vivoでのリン酸化蛋白質の検索では、光照射後９時間目から徐々に蛋白質のリン酸化が起こり、その中に60KDa polypeptide存在が認められた。

以上の実験結果から、光照射によるゼニゴケの細胞増殖の誘導には MK-IIによって特異的にリン酸化される60KDa polypeptideの関与が示唆された。

2Ea05 イネ培養細胞のメチルシトシンについて

田仲可昌[1]、大野清春[2]（[1] 筑波大学・生物科学系、[2] 農林水産省・生物資源研・細胞育種部）

遺伝子の発現制御機構は多様であるが、演者らはDNA 中のシトシン塩基のメチル化に注目し、イネ培養細胞（プロトクローン）を用いて分化能と^{m}C 含量との関係や植物ホルモンやメチル化阻害剤で処理した場合に、^{m}C含量がどのように変化するかを調べた。

方法：^{m}C含量の測定は微量の試料でも可能なポストラベル法によった。すなわち、DNA標品をMicrococcal nucleaseとspleen phosphodiesteraseでN_pにまで分解し、ついで[α-^{32}P]ATPとT_4 kinaseで$_{32p}N_p$に、最後にPl nucleaseで$_{32p}$Nとした。反応産物をcellulose TLCで２次元展開し、オートラジオグラフィー後、$_pC$と$_pC$ の部分をかき取って放射能を測定し、その^{m}C/^{m}C+Cの％で表示した。この系では、１反応当り0.1-1.0μgまでほぼ一定の^{m}C含量を示した。イネの各種培養細胞などから全DNAを抽出し、試料とした。

結果：

１）１粒の種子カルス由来の培養細胞（プロトクローン）で、個体分化能がある培養細胞とない細胞の間で、^{m}C含量の差はなかった。

２）培養細胞（プロトクローン）から植物体を復原し、培養細胞と復原植物体の葉を比較したが有意の差はなかった。

３）植物体復原能がある株とない株を用いて、植物ホルモンや5-azacytidine 関連物質で処理した培養細胞について比較した。結果は、(1) ホルモン処理によって、顕著な変動は見られなかった。この結果は、植物ホルモンの添加－特に2,4-D－による^{m}C の顕著な増加が観察されたニンジン培養細胞(TAG,77,1989,325-331)と対照的である。(2) 5-azacytidine 関連物質で処理した細胞の植物体復原率と^{m}C含量に関しては、5-azacytidine処理により植物体復原率が有意に減少するとともに、^{m}Cの含量も低下していた。

以上、細胞の全DNAを用いて、^{m}C含量の変動を調べた限りでは、5-azacytidine処理以外は顕著な差は見出せなかった。ニンジン培養細胞の場合と異なる、この結果が単子葉植物全般の特徴であるのか否かは興味深いところである。

2Ea06 褐藻遊走子のcAMP

°大森正之，武藤尚志[1]，宮地重遠[1]（東大・海洋研，[1]東大・応微研）

cAMPやcGMPは細胞における信号伝達系のセカンドメッセンジャーとして良く知られているが、主に動物細胞や細菌、酵母などで研究されており、光合成生物での研究は少ない。我々は、ラン藻に含まれるcAMPが、細胞外環境の変化に応じてすばやい濃度変化を起こすことを見出した。ラン藻においても、cAMPが動物細胞におけるのと同様の役割を果している可能性が考えられる。しかしながら、高等植物におけるcAMPの存在は未だ広く認められてはいない。今回我々は、褐藻におけるサイクリックヌクレオチドの存在について、コンブとワカメの遊走子を実験材料として検討した。

コンブ（*Laminaria angustata*）は室蘭（12月）にて採集したものを、ワカメ（*Undaria pinnatifida*）は、下田湾（4月）、大槌湾（7月）にて採集しためかぶ（胞子葉）を用いた。コンブ、ワカメを半日～1日乾燥した後、再び海水に戻し遊走子を放出させた。遊走子を含む海水をガーゼで沪過し、その沪液を3,000×g、10分間遠心して遊走子を沈澱させた。遊走子を一定量の中性Buffer に懸濁した後、トリクロル酢酸を加えてcAMP、cGMPを抽出した。定量は、^{125}I-ラジオイムノアッセイ法により、ヤマサ（株）の測定キットを用いて行った。また、測定用試料をサイクリックヌクレオチド ホスホジエステラーゼ（PDE）で処理し、cAMPを分解した後、^{125}I-ラジオイムノアッセイを行ったところ、コンブ、ワカメの遊走子とも、PDE未処理のものの数%までcAMP量の低下が見られ、測定法の有効性が確認された。

コンブ、ワカメの遊走子には、cAMP、cGMPがともに5～20 pmol/mg·protein 含まれていた。この濃度はラン藻や大腸菌における濃度とほぼ同じであった。次に、コンブの遊走子について、cAMP依存性のプロテインキナーゼの存在について検討した。まずコンブの遊走子を超音波破砕して得られた粗抽出液を^{32}P-ATPと反応させた後、SDS-PAGEオートラジオグラフィーにより燐酸化されたタンパク質を検出した結果、cAMP依存性のプロテインキナーゼの存在が認められた。cAMP依存性の代謝調節系の存在が考えられる。

本研究では、北海道大学海藻研究所の館脇先生、本村先生、筑波大学下田臨海実験センターの横浜先生に多大のお世話になりました。

2Ea07　ラン藻のcAMP：アデニル酸シクラーゼ活性との相関

坂本敏夫、村田紀夫[1]、°大森正之[2]（東大・理・生化、[1]基生研、[2]東大・海洋研）

我々はこれまでに、糸状性ラン藻 *Anabaena* の細胞内cAMP量が、明・暗、pH変化などの細胞外環境の変化に対応して急激に変化することを観察している。このようなcAMPレベルの変化がラン藻類一般に見られる現象であるか否かを確かめるために、*Anabaena* の他に、糸状性の *Spirulina*、単細胞性の *Synechocystis* について、cAMP含量を測定し、さらにアデニル酸シクラーゼ活性についても検討を試みた。

実験材料には、*Anabaena cylindrica*、*Spirulina platensis*、*Synechocystis* PCC 6803 を連続光照射下で培養した対数増殖期後期の細胞を用いた。細胞を40分間暗所または明所でインキュベートした後、トリクロル酢酸を添加することにより、細胞からcAMPを抽出し、ヤマサ(株)の ^{125}I-ラジオイムノアッセイキットにより定量した。細胞外のcAMP量は、細胞をミリポアフィルターで沪過した沪液について測定を行った。アデニル酸シクラーゼ活性、およびサイクリックヌクレオチドホスホジエステラーゼ活性の測定は、細胞の粗抽出液を 300,000 × g、35分間遠心して得られた上清画分と沈殿画分について行った。

cAMPは、糸状性の *Anabaena* や *Spirulina* には可成りの量含まれ、特に暗所では、含量が多く、明所では少なくなる傾向が認められた。また、cAMPの細胞外への放出に関しては、*Anabaena* では殆ど放出が見られなかったのに対し、*Spirulina* では放出が顕著であり、明所より暗所での放出が活発に見られた。一方、単細胞性の *Synechocystis* ではcAMPは検出されなかった。検出方法に問題がある可能性も否定できない。そこで、アデニル酸シクラーゼ活性について検討した。その結果、*Anabaena* および *Spirulina* では十分な酵素活性が認められたが、*Synechocystis* では酵素活性は検出されなかった。また、*Anabaena* では酵素活性は沈殿画分にのみ局在していたが、*Spirulina* では可溶性画分にも可成りの活性が認められた。ホスホジエステラーゼ活性は、どの種類にも見られたが、*Synechocystis* の活性は他のものより低い値を示した。

これらの実験結果は、ラン様においてcAMPの代謝系は多様であること、また種によって異った信号伝達系を発達させている可能性があることを示唆している。

2Ea08

イネの２種類の老化異常変異体(non-yellowing mutant)の性質について

川崎信二、飯田修一[1]（農水省・生物研、[1]農水省・放射線育種場）

植物の老化は分化過程の一環を成すと考えられ、収穫期のイネや麦の葉が一斉に黄化することから良く制御された素過程から成る事が予想される。こうした素過程の分析には変異体の存在は重要な役割を果すが、果実の成熟過程に比較して葉の黄化過程の変異についての記述はごく少ない。演者らは葉の黄化過程に異常を生じた変異体をイネで初めて、２種類得たので、その性質について報告する。

方法：イネ(コシヒカリ)の種子を0.1MのEMSまたは30kR(7.7×10^{-3}C/kg)のγ線で処理した後、播種した株を自家受粉させ、第II世代(M_2)の中から黄化異常を示すものを選んだ。EMS処理区ではM_3で固定を確認した。種子が完熟し対照の葉が黄化した時期に葉を切取り細胞の電顕観察を行なうと共に、葉を液体窒素下で磨砕し、可溶性分画と膜分画とに分離してSDS-PAGEにより各分画のﾀﾝﾊﾟｸ質の構成を比較した。また各々の葉に含まれるﾌﾟﾛﾃｱｰｾﾞ活性を基質として添加したRubisco LSの分解の模様の観察により調べた。

結果：EMS処理及びγ線処理のイネから１種類づつの黄化異常変異体が見出され、各々NY-1及びNY-2と名付けた。NY-1はむしろ葉の緑がやや深まりつつ対照より少し遅れて枯死に至るので枯葉も緑を帯びている。穎は出穂は遅れるものの対照と同様に退緑し完熟の様子は変らない。NY-2は中程度の黄化が起こるが、穎も退緑が遅れ葉の枯死も遅れる。

黄化した対照の葉の葉緑体は体積の減少とﾃｨﾗｺｲﾄﾞの小胞状の崩壊、油滴化が著しく、膜分画のSDS-PAGEでもﾃｨﾗｺｲﾄﾞﾀﾝﾊﾟｸ質はほとんど分解している。これに対しNY-1ではｸﾞﾗﾅ部分のﾃｨﾗｺｲﾄﾞが良く保存され、油滴はできるが小胞化は起こらず最後はｸﾞﾗﾅ部分が結晶状に凝集する、これに対応して膜分画ではLHCP IIのChlﾀﾝﾊﾟｸ質複合体のみが良く保存されており、Chl含量は対照の4.5倍あり、a/b比は1.5に減少していた。NY-2の葉緑体は油滴はできるものの偏平な形状やﾃｨﾗｺｲﾄﾞの様子等最も正常な状態に近かったがﾃｨﾗｺｲﾄﾞﾀﾝﾊﾟｸ質は対照に近い所まで分解していた。Chl含量は対照の約２倍、a/b比は約３で対照と同じであった。可溶性ﾀﾝﾊﾟｸ質は何れもかなりの分解を受けており、特に黄化した対照で著しい。LSの分解で見たﾌﾟﾛﾃｱｰｾﾞ活性は、対照＞NY-2＞NY-1の順で強く黄化との強い相関が見られ、また何れもSDSとβ-MEにより著しく活性化された。

2Ea09

ヤグルマギク培養細胞におけるアントシアニン生成と紫外光によるピリミジン二量体形成の防御

高橋昭久、武田幸作、大西武雄[1]（東京学芸大・生物、[1] 奈良県立医大・生物）

高等植物に広く分布しているフラボノイド化合物は、紫外域（230-380nm)に大きな吸収帯を示すこと、表皮系細胞の液胞内に局在していることなどから、過剰で有害な紫外光に対するフィルターとして働き細胞の生理機能を保護しているものと考えられている。また興味あることに、太陽光に含まれる紫外光のUV-Bにより、効率良くその生合成が誘導されることも知られている。しかし、細胞中に蓄積したフラボノイドが、実際に紫外光防御の働きをしているのかどうかは調べられていないのが現状である。

そこで本研究では、ヤグルマギク(Centaurea cyanus L.)培養細胞の2つの系、すなわちUV-Bを含む光照射によりフラボノイドの一種のアントシアニンの生合成を誘導するZ系と誘導しないD系を用いて、フラボノイド蓄積と紫外光防御の働きとの関連を調べてみた。まずZ系の細胞で、前照射としてUV-Bを含む光照射時に ① 温度一定(25℃)、照射時間を変えたもの(0, 2, 4 days) ② 照射時間一定(4 days)、温度を変えたもの(5, 15, 25℃)と条件を変えてアントシアニン蓄積量をコントロールした。これらに紫外光として殺菌灯(UV-C)を照射した後、紫外光防御の指標としては紫外光による DNA損傷のピリミジン二量体の形成量と FDA蛍光染色法による生存率の測定により判定した。その結果、①においては前照射せずに暗所で培養を続けたものに比べ 4日間前照射したもの、また②においては前照射時の温度が 5℃のものに比べ25℃のものでは、そのアントシアニン蓄積量はそれぞれ検出限界のレベルから12μmol/g fr.wt.に増えており、紫外光による損傷としてのピリミジン二量体形成は約 1/2に抑制され、さらに紫外光に対する細胞の耐性も明らかに高まっていた。一方、D系の細胞では、前照射の時間や温度条件を変えてもアントシアニンの蓄積は見られず、紫外光によるピリミジン二量体形成の抑制や紫外光に対する耐性に差は見られなかった。

以上の結果から、まさに植物にとって細胞内にフラボノイドを蓄積することは紫外光から身を護る働きがあることを示すものであり、植物が常にsolar-UVにさらされるような過酷な陸上へ生活圏を広げた事とこの物質の合成能の獲得とを合わせて考えると極めて興味深いものがある。

2Ea10

トマトの培養細胞と芽ばえにおけるカドミウム結合性物質の生成

井上雅裕・光宗 円・今井 千春・村山徹郎 （愛媛大・理・生物）

カドミウムイオンは植物の成長を著しく阻害する。しかし、植物を低濃度のカドミウムを含む培地で培養すると、植物はカドミウムに対する耐性を獲得する。この機構には幾つか考えられるが、その中でも重金属結合性蛋白質またはペプチドの誘導的合成は積極的な耐性獲得の機構として重要である。最近、我々は、カドミウムで馴養した酵母（*S. cerevisiae*）が、分子量約9000のカドミウムメタロチオネイン（Cd-MT）を合成することを明かにした（Inouhe et.al. 1989)。本研究では、トマト（*Lycopersicon esculentum* cv. Palace）の芽ばえと根の懸濁培養細胞を用いてカドミウム結合性物質の同定を試み、以下の結果を得た。

（１）トマト培養細胞の成長は、0.2 mM 以上の濃度のカドミウムで強く阻害された。低濃度のカドミウムを含む培地で馴養した細胞は 0.4-0.8 mM カドミウムに対し耐性をしめした。銅に対する耐性は得られなかった。0.1-0.4 mMカドミウムに順応した細胞のカドミウム量は培地に添加したカドミウム濃度と高い正の相関をしめした。細胞内カドミウム結合性物質の同定を行った結果、トマト細胞はCd-MT様タンパク質は合成せず、分子量約 4000 の低分子ペプチドを合成することがわかった。このペプチドは、主として Glu, Cys および Gly から成り、そのモル比は約 3:3:1 であることからフィトケラチン（PCn）であると考えられる。

（２）トマト芽生えは根から与えた0.1 mMカドミウムによって著しい成長阻害を受けた。この条件下で、地上部組織内に蛋白質、アミノ酸および還元糖の増加がみられた。しかし、地上部、根から特定のカドミウム結合性物質は検出されず、ほとんどが遊離の状態で検出された。一方、低濃度（50 μM）のカドミウムで長期間（27日間）培養した植物体では、根からは特定の結合性物質は検出されなかったが、地上部組織から分子量約 7000と約2000の異なるカドミウム結合性物質が検出された。前者は Cd-MTと PCn によく似たアミノ酸組成をもち多量の Cys を含んでいたが、後者はそれをほとんど含んでいなかった。

以上のことから、同じ植物であっても存在状態および培養条件の異なる細胞は多様な重金属ストレス対応機構を有するものと考えられる。

2Ea11　イネ幼苗における凍結融解傷害に関連するタンパク質

肥後健一，肥後ひろみ（農水省・生物研）

細菌から動物，植物までを含める幅広い生物種の細胞，器官あるいは個体を生理的温度よりも数度高い環境に曝すと，分子量約20Kから110Kの特定の数種類のタンパク質（熱ショックタンパク質）の合成が誘導される．熱以外でも金属イオン，アミノ酸誘導体，グルコース飢餓，エタノールなど，あるいは器官の場合は損傷など，のストレスによっても誘導されることからストレスタンパク質とも呼ばれる．我々は凍結・融解というストレスによって植物細胞が受ける損傷の修復過程に関わる遺伝子を同定する目的で，イネ幼苗を材料として凍結・融解によって特異的に誘導されるタンパク質を調べてみた．

［材料と方法］　イネ（IR36）の幼苗（播種後13日）を暗黒下に－２℃で16時間凍結し，その後に同じく暗黒下で28℃に加温（rewarming）した．一定時間経過後の各試料から全RNAを調製し，オリゴテックス-dT30を用いてmRNAを精製した．これを［^{35}S］メチオニン存在下に無細胞蛋白合成系で翻訳させ，合成された蛋白質をSDS-PAGE及びO'Farrellの２次元電気泳動法で分析した．

［結果と考察］　mRNAから翻訳された蛋白質をSDS-PAGEで分析したところ，凍結・融解処理によって特異的に誘導される蛋白質がいくつか見つかった．分子量37,000の蛋白質（P37）は加温開始後30分で誘導され，約２時間ほど同じレベルであった．一方，分子量68,000，70,000，105,000の蛋白質（P68，P70，P105）はP37よりもゆっくりと誘導された．P37の誘導パターンは，トマトを低温（４℃）処理後28度に加温した時に急速に誘導される分子量35,000の蛋白質のそれと類似している（Cooper and Ort，1988）．両蛋白質は低温傷害からの修復に共通の役割を果たしている可能性がある．さらに多くの特異的な蛋白質を同定するために，mRNAから翻訳された蛋白質を２次元電気泳動法で分析した．ゲルの下部に見られる低分子量蛋白質も含めて，少なくとも１０種類の蛋白質の特異的な誘導が見られた（図１右：矢印）．また一方，対照に見られた２つの蛋白質が凍結・融解処理した試料ではかなり減少していた（左図：arrowhead；右図○印）．

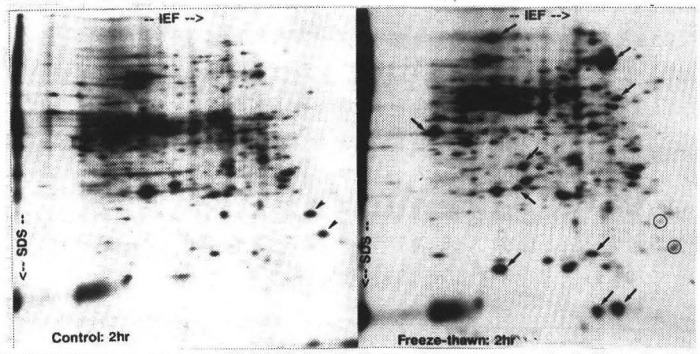


図１．２次元電気泳動によるmRNA翻訳産物の分析（２時間加温試料の比較）

2Fa01

光化学系Ｉ反応中心複合体のサブユニット構成

○岩崎行玄、中島京也、石川　浩、高倍昭洋
（名城大・理工・化学）

光化学系Ｉ反応中心複合体（ＰＳＩ複合体）はＰ７００(psaA,psaB)とＦ$_A$Ｆ$_B$センター(psaC)の２種類の電子伝達キャリヤーを中心に研究が進められているが、実際に調製される標品には、これらの他に分子量30kDa以下のサブユニットが数多く検出される．我々はＰＳＩ複合体の30kDa以下のサブユニットの構造及び機能について解析を進めているが、これらのサブユニットの機能は現在のところほとんど明らかにされていない．さらに、これらのサブユニット構成は、植物種間のみならず同一植物においてさえも調製方法や電気泳動システムにより異なった結果が報告されている．今回は、キュウリ子葉より Mullet らの方法に従って調製したＰＳＩ複合体（ＰＳＩ－１８０ とＰＳＩ－６５）のサブユニット構成を中心に、構造、機能についても言及したい．

Ⅰ．サブユニット構成：　分子量 100kDa-10kDa 領域のポリペプチドは Laemmliのシステムを用い、分子量 10kDa-1kDa 領域のポリペプチドは　Schaggerらのシステムを用いた電気泳動（ＳＤＳ－ＰＡＧＥ）法により解析した．その結果，ＰＳＩ－１８０は Laemmliのシステムを用いた解析により８種類(Sub1-Sub8)，Schaggerらのシステムを用いた解析により５種類(Sub9-Sub13)の合計１３種類の分子量の異なるサブユニットから構成されていた．ＰＳＩ－１８０ をさらに Triton X-100 で処理して得られたＰＳＩ－６５は Sub1,Sub5-Sub9,およびSub11の７種類のサブユニットより構成されていた．

Ⅱ．ＬＨＣＩ複合体：　ＰＳＩ－１８０ をＳＤＳ処理したのち Chuaのシステムにて４℃においてＳＤＳ－ＰＡＧＥを行った結果、３種類のクロロフィルタンパク質複合体（ＣＰ１，ＣＰ２，ＣＰ３）が検出された．このうち２種類（ＣＰ２とＣＰ３）は おのおの728nmと698nmに特異的な蛍光スペクトルを示した．ＣＰ２は Sub4aとSub4b、ＣＰ３は Sub2 のポリペプチドから構成されていた．

Ⅲ．サブユニット構造と機能：　1)カルボジイミドを用いてＰＳＩ－１８０とフェレドキシンおよびプラストシアニンと架橋反応を行ったところ Sub5および Sub7がそれぞれフェレドキシンおよびプラストシアニンと特異的に架橋することが明らかになった．なお、Sub5のｃＤＮＡ塩基配列は昨年度本大会で報告した．

2) Sub7、Sub11のＮ末端アミノ酸配列を気相シークエンサーを用いて決定した．

3) 以上の結果からSub5,Sub7,およびSub11は、それぞれpsaD,psaF,psaCの翻訳産物であることが明らかになった．

2Fa02

高等植物の光化学系Ⅰ複合体の低分子量タンパク質成分の同定

池内昌彦[1]・平野篤[2]・檜山哲夫[3]・井上頼直[1]（[1]理研・太陽光科学、[2]東京電力・技術研、[3]埼玉大・生化学）

我々はさきに好熱性シアノバクテリア(Synechococcus)の系Ⅰ複合体から、６．５kDa，５kDa，４．１kDaのタンパク質を見いだし、そのＮ末端アミノ酸配列を決定した(Koike et al. 1989)。このうち、４．１kDaタンパク質のアミノ酸配列は植物の葉緑体ＤＮＡ中の読み枠（ＯＲＦ４２／４４）と対応することから、このＯＲＦ４２／４４が緑色植物の系Ⅰ成分をコードする遺伝子(psaJ)であろうと推定した。一方、高等植物の系Ⅰの成分としてもいくつか低分子量タンパク質が断片的に報告されているが、低分子量の膜タンパク質の分析は容易でなく、まだＯＲＦ４２／４４に対応するタンパク質は確認されていない。今回、我々はホウレンソウとエンドウからアンテナ色素複合体（ＬＨＣⅠ）を含む系Ⅰ超複合体及び含まないコア複合体を単離し、その低分子量タンパク質を分析した。

［結果］　ホウレンソウの系Ⅰ超複合体には７kDa，４．１kDa，３．９kDaの３種の低分子量タンパク質が見いだされた。このうちコア複合体には３．９ｋＤａタンパク質だけが回収された。一方、エンドウでは６．８kDa，４．４kDa，４．１kDaの３種のタンパク質が見いだされた。これらのタンパク質のＮ末端アミノ酸配列を決定したところ、両植物の４．１kDaタンパク質が葉緑体ＤＮＡのＯＲＦ４２／４４(psaJ)の産物である、つまりこのＯＲＦが系Ⅰの遺伝子として発現していることが確かめられた。シアノバクテリアの４．１kDaタンパク質の配列はこれと相同でしかもＮ末端がブロックされていることや膜貫通性の疎水性ドメインを持つことなども共通しており、ＬＨＣⅠの進化とは無関係にその性質が保存されてきたことがわかる。ホウレンソウ３．９kDa，エンドウ４．４kDaタンパク質は葉緑体ＤＮＡのＯＲＦ３６／４０と相同であった。このＯＲＦはオオムギで系Ⅰの成分をコードしているとして psaI と最近名付けられたものと同じである。このタンパク質は高等植物ではコア複合体に結合しているが、シアノバクテリアの系Ⅰ複合体にはまだ相同なものは見つかっていない。ホウレンソウ７kDaタンパク質は星名らによって報告されている“５kDa”タンパク質と同一で、エンドウ６．８kDaタンパク質もこれと相同であった。またこれらと相同な配列を持つタンパク質が緑藻（Chlamydomonas）でも報告されており、その遺伝子は psaK と最近名付けられている。我々がさきにシアノバクテリアで見いだした６．５kDaタンパク質はこれらと有意の相同性を示し、進化的に保存されてきたと思われる。これら配列の保存されているタンパク質は光化学系Ⅰの構造もしくは機能においてなんらかの役割を果たしていると考えられる。

2Fa03

５ｋＤａポリペプチドを結合した光化学系Ｉ標品の架橋反応について

○星名　哲、須江七丈、和田敬四郎、伊藤　繁[1]、榎並　勲[2]
（金沢大・理・生物、　[1]基生研、　[2]東理大・理・生）

高等植物の光化学系Ｉは反応中心を含む二つの大きなサブユニット（分子量約 83 kDa）と数種の小さなサブユニット（4～18 kDa）から構成されており、Ｐ700 → Ａ0 → Ａ1 → ＦＸ → ＦＡ、ＦＢ の反応が行われている。そのうちＰ700 →→ ＦＸ までの反応は大きなサブユニットに、ＦＡ とＦＢ は 9 kDa のポリペプチドに結合していることが知られている。最近、我々はＰ700 →→ ＦＸ まで活性はあるが、ＦＡ、ＦＢ は完全に失われた光化学系Ｉコア複合体をホウレンソウより調製した(1)。この複合体（60℃/EG コア複合体）は主に大きな反応中心サブユニットと 5 kDa (PSI-K) ポリペプチドより構成されているということを明らかにした(2)。ここでは反応中心サブユニットと小さなサブユニットとの関係を明らかにするため，架橋反応などについて調べ、次のような結果を得た。

【方法】 ホウレンソウの光化学系Ｉ粒子（PS I-200）をエチレングリコール（EG）の存在下で　60℃または 70℃で処理した後、ショ糖密度勾配遠心法により 60℃/EG または 70℃/EG コア複合体を調製した(1)。dithiobis(succinimidylpropionate) (DSP) で PSI-200 またはコア複合体を 架橋した(3)。鉄硫黄クラスター（ＦＡ，ＦＢ，ＦＸ）はレーザー閃光分光法により測定した(4)。

【結果と考察】 PSI-200 を DSP で架橋した後、SDS-PAGE でポリペプチド組成を分析した。DSP により、5 kDa，9 kDa (FA/FB) ポリペプチドのみならず多くの小型サブユニットが架橋され、それぞれの含量が減少した。PSI-200 を EG の存在下で熱処理すると、50-55℃でＦＡとＦＢ が、60-70℃でＦＸ が破壊された(1)。 PSI-200 を DSP で架橋したのち熱処理すると、架橋しなかったものに比べ、ＦＡ／ＦＢ の熱に対する抵抗性が増大した。一方、ＦＸ は架橋により安定化されなかった。また、70℃/EG コア複合体（ＦＸ が完全に破壊され、5 kDa ポリペプチド含量も減少したもの）を嫌気状態で Na_2S と $FeCl_3$ とともにインキュベートすると、Ｐ700とＦＸ の荷電再結合による 1 ミリ秒の成分が観察されるようになり、ＦＸ が再構成されるということが明かとなった。これらの結果は光化学系Ｉ反応中心の P700 →→ ＦＸ までの反応に 5 kDa タンパク質は直接関与していないということを示唆している。

【参考文献】　1) Hoshina, S., Sakurai, R., Kunishima, N., Wada, K. & Itoh, S. (1990) Biochim. Biophys. Acta 1015, 61-68.　2) Hoshina, S., Sue, S., Kunishima, N., Kamide, K., Wada, K. & Itoh, S. (1989) FEBS Lett. 258, 305-308.　3) Enami, I., Satoh, Ka. & Katoh, S. (1987) FEBS Lett. 226, 161-165.　4) Itoh, S. & Iwaki, M. (1989) FEBS Lett. 243, 47-52.

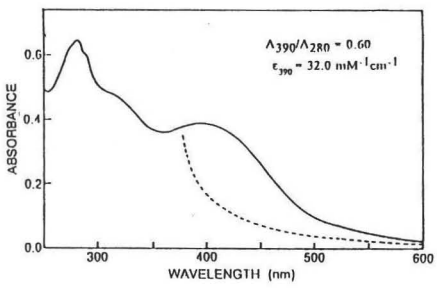
2Fa04

鉄・イオウセンター A, B を配位する 9-kDa ポリペプチドの単離・精製とその性質

大岡宏造、伊藤　繁*、佐伯和彦、高橋康弘、松原　央（大阪大・理・生物、*基生研）

藍色細菌や緑藻をはじめ一般に高等植物の光化学系 I（PS I）複合体には、一連の酸化還元反応を担う電子伝達成分（A_0, A_1, センター X, A, B）が存在している。我々はこれまで PS I 複合体を構成する 9-kDa ポリペプチド（サブユニット VII; psaC 遺伝子産物）がセンター A, B を配位する Fe-S タンパク質であり、一旦複合体より解離させると酸素に対し非常に不安定となることを明らかにしてきた。今回は、今までその単離・精製が困難であった 9-kDa ポリペプチドを完全に native な状態で解離することに成功し、その Fe-S クラスターの特性について調べたので報告する。

9-kDa ポリペプチドは Malkin らの方法を改良し、ホウレンソウ葉緑体より調製した。特に凍結乾燥チラコイド膜をメタノール・アセトンで処理した後はすべて嫌気的条件で行い、タンパク質の抽出やカラムクロマトグラフィは嫌気グローブボックス内（室温）で操作することにした。



単離標品はバクテリア型フェレドキシンとよく似た吸収スペクトルを示し（右図）、390 nm と 280 nm の吸収比は 0.60(=A_{390}/A_{280})であった。この値は本タンパク質の Tyr（3残基）と Trp（2残基）の含量をよく反映したものであると考えられる。クロモフォアの吸収係数は 32.0 $mM^{-1}cm^{-1}$(at 390 nm) であり、[8Fe-8S]型フェレドキシンの値とよく似ていた。事実、一次構造から予測された通り Fe 及び S 含量はそれぞれ 8.5 と 8.0 原子／モルであり、2[4Fe-4S] 型クラスターを持つ Fe-S タンパク質であると判断できる。また本タンパク質に存在する 2 個の Fe-S クラスターが区別できるかどうかを調べるために、酸化還元滴定の実験を行った。その結果、性質の違う 2 種のクラスターが存在し、酸化還元電位はそれぞれ -460 mV と -570 mV 付近にあるとの知見を得ている。しかし、現在さらにこれを確かめる作業を進めつつある。

2Fa05

高等植物及びランソウ光化学系Ⅰ 9kDaサブユニット遺伝子(psaC)の解析

清水徳朗、檜山哲夫、小池裕幸[1]、池内昌彦[1]、井上頼直[1]
(埼玉大・理・生化、[1]理研・太陽光)

光化学系Ⅰ反応中心複合体は色素の他に数種類のたんぱく成分から構成されており、その内のあるものは、遺伝子が葉緑体DNA上に存在することが知られている。その内の一つpsaCは、分子量9kDaのサブユニット(subunit VII)をコードし、２つの4Fe-4Sクラスター、Center-A,Bを含んでいる。光化学系１の電子伝達メカニズムを考える上で、分子量が小さく、二つの電子伝達成分だけを含んでいるこのサブユニットは、構造と機能の関連を調べる上でのよいモデルとなるであろう。また、原核生物でありながら酸素発生型光合成を行うランソウは、葉緑体の進化の過程を考える上からも重要なものと考えられる。今回我々はこのpsaC遺伝子を、熱に対して安定な光化学系１を持つと考えられる好熱性ランソウSynechococcus vulcanusからクローニングし、その塩基配列を決定したので報告する。

タバコ psaC遺伝子を含む葉緑体DNAライブラリは、名古屋大学遺伝子実験施設杉浦昌弘教授より分譲を受けた。好熱性ランソウのDNAライブラリは、DNAをSau3AIで部分的に切断後、ファージベクタλ-DashのBamHI部位に挿入したものを用いた。まずタバコpsaCを含んだDNAを制限酵素で切断・フラグメントを回収し、pTZ19Rベクターに組み込んだ。これを制限酵素で切断してpsa CのDNA断片（328bp）を取り出して^{32}Pでラベルしたものをプローブとし、好熱性ランソウのDNAライブラリを常法に従って、プラークハイブリダイゼーションでスクリーニングし、数個のポジティブクローンを得ることが出来た。次にこのクローンからpsa Cが組み込まれているDNA断片を分離してpTZ19Rベクターにクローニングし、dideoxy法で塩基配列を決定した。

結果: 今回好熱性ランソウからクローニングされたpsa C遺伝子は、タバコ，ゼニゴケ，イネ、エンドウ、コムギとそれぞれ70～73%のホモロジーを示した。以前小池らが決定したＮ－末端側アミノ酸配列との比較から、Ｎ－末端のメチオニンはたんぱく合成後、除去されることが分かった。予想アミノ酸配列は、これまで分かっている他の植物の psa Cのもののどれとも高い相同性を有しており、とくにpsa Cの鉄-イオウクラスターが結合するとされている、バクテリア型フェレドキシンとよく似た２つの特徴的なシステインの配列（Cys-X-X-Cys-X-X-Cys-X-X-X-Cys）を含む９個のシステインは、すべて保存されていた。

2Fa06 ホウレンソウ葉から精製したＰＳＩ反応中心複合体標品に含まれる１９ｋＤａ蛋白。

仲本 準、檜山哲夫 （埼玉大・理・生化）

光合成系Ｉ反応中心複合体（ＰＳＩ Ｃｏｍｐｌｅｘ）を以下のチラコイド膜を出発材料にして精製した。

（１）ホウレンソウ葉を直接、低張液（50 mM Na-Pi buffer, pH 7.0, 10 mM NaCl）中で磨砕し、そのロ液を遠心分離して得られたペレット（以下チラコイド膜Ｂとする）。

（２）ホウレンソウ葉からまず無傷葉緑体を調製し（Percollで高度に精製したもの）、これを上記低張液中で壊し、遠心分離して得られたペレット（以下チラコイド膜Ｉとする）。

チラコイド膜を２％ Triton X-100で可溶化後、硫安分画（12.5 g/100 ml から 25.0 g/100 mlに沈澱する分画）、DEAE-Toyopearl 650 S、DE-52、Hydroxylapatiteの各カラムクロマトグラフィーでＰＳＩ Ｃｏｍｐｌｅｘを単離・精製した。チラコイド膜Ｂ及びＩから精製したＰＳＩ Ｃｏｍｐｌｅｘ 最終標品の Protein / P700比は、各々 427,000 g / mol. 及び 511,000 g / mol.であった。ＳＤＳ－ＰＡＧＥ後、ＣＢＢで各蛋白を染色し比較したところ、両方の標品について６８、６２、２０、１７、１６、１０．５ｋＤａの各蛋白が同様に検出された。ただしチラコイド膜Ｂ由来のものには１９ｋＤａ蛋白が顕著に検出された。

これらの各蛋白質のバンドをＳＤＳ－ＰＡＧＥ後のゲルから切り出し、Ｖ８プロテアーゼ処理をして各蛋白質のペプチドマッピングを行い比較した（Cleveland et al, (1977) J.Biol.Chem. 252, pp1102）ところ、２０ｋＤａと１９ｋＤａ蛋白のマッピングのパターンが類似することがわかった。次に、ＳＤＳ－ＰＡＧＥ後のゲルから２０ｋＤａバンドを切り出し、これを抗原として２０ｋＤａ蛋白に特異的な抗体をウサギを用いて調製した。それを用いてＰＳＩ Ｃｏｍｐｌｅｘ各蛋白質をＳＤＳ－ＰＡＧＥで分離し、イムノブロット法で調べた。その結果、２０ｋＤａと１９ｋＤａが２０ｋＤａ抗体と反応することが明かになった。これらの結果から１９ｋＤａ蛋白は２０ｋＤａ蛋白の分解産物であると考えられた。精製各段階のサンプルを用いてＳＤＳ－ＰＡＧＥを行い、２０ｋＤａ蛋白の抗体を用いてイムノブロット法で調べたところ、チラコイド膜Ｂを調製した段階（Triton x-100 による可溶化前）で既に２０ｋＤａ蛋白の分解がおこっていることが判明した。一方、無傷葉緑体からチラコイド膜を調製した場合には（少なくともTriton X-100 による可溶化前の段階では）１９ｋＤａ蛋白は検出されなかった。さらにこの分解は硫安分画操作の段階でほぼ完了すること、即ちそれ以後の精製段階ではこの分解は進まないことも判明した。

以上の結果は１９ｋＤａ蛋白は、葉緑体外由来のプロテアーゼにより２０ｋＤａ蛋白が分解されて生じた Artifact であることを示唆するものである。

ペプチドマッピングについて御教示下さった名古屋大学の山口淳二氏及び抗体作製時にお世話になった衛生短期大学の関島安隆先生、農水省生物研の松岡信氏そして埼玉大学の大矢武志君に感謝します。

2Fa07

異質倍数性に由来するタバコ属光化学系Ⅰサブユニットの多形性

三上浩輝[1,2]、小保方潤一[1]、林田信明[3]、杉浦昌弘[4]（[1]北大遺伝子、[2]北大・理・植、[3]理研・遺伝子解析、[4]名大・遺伝子）

［目的］　高等植物の光化学系Ⅰ複合体に含まれるサブユニットの数については、これまで研究者によってまちまちの値が報告されてきた。演者らのこれまでの研究によれば、光化学系Ⅰのサブユニットの多くは核ゲノムにコードされている。そこで、植物の核ゲノム構成が系Ⅰサブユニットの数や分子種構成にどの様な影響を与えるのかを検討した。

［方法］　タバコの複二倍体種（Nicotiana tabacum）及び純系祖先種（Nicotiana sylvestris, Nicotiana tomentosiformis）から界面活性剤等を用いて光化学系Ⅰ複合体を調製し、サブユニットの分子種構成をポリアクリルアミドゲル電気泳動法によって比較した。必要に応じてサブユニットの部分アミノ酸配列を決定し、分子種間の比較も行った。

［結果と考察］　N. tabacumの系Ⅰにみられる18.5kDaと17.5kDaの２つの蛋白質は部分アミノ酸配列の比較からトマト等で既に報告されている核ゲノム由来のpsaDサブユニットであると考えられた。この２つの蛋白質の部分アミノ酸配列の間には数個のアミノ酸の欠失／挿入が見られるだけで両者は良く似ていた。しかし、１つの植物種が２つのpsaDサブユニットを持つことは、他の植物種では知られていない。そこで、N. tabacumが複二倍体であることに着目し、電気泳動像と部分アミノ酸配列の両面から、N. tabacumの系Ⅰ蛋白質群を純系祖先種のものと比較検討してみた。その結果 N. tabacumの18.5kDaサブユニットは祖先種であるN. tomentosiformisのゲノムから、同様に17.5kDaサブユニットは N. sylvestrisのゲノムからそれぞれ由来したものであることが明かとなった。このことはN. tabacumはゲノムの倍加によってpsaDサブユニットの多形性を獲得した事を示している。この様な多形性はpsaDサブユニットに特有なものなのかを調べるために、他のサブユニットについても検討を進めた結果、他の数種の核ゲノム由来のサブユニットにおいても同様な多形性が見いだされた。以上の結果より①核ゲノムにコードされている光化学系Ⅰサブユニットは、タバコ属内の進化の過程でアミノ酸の欠失／挿入等の変異を獲得し、次いで②雑種形成によるゲノムの倍加によって植物体内で多型性を獲得した事の二点が導きだされる。

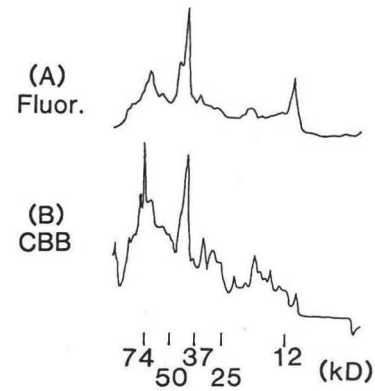
2Fa08

光化学系Ｉ粒子及び緑色光合成細菌光化学系粒子のシステイン含有ペプチド

○白沢 聖一・井上 和仁[1]・槍山 哲夫[2]・高橋 健治[3]・桜井 英博（早大・教・生物，[1]神奈川大・理・応生，[2]埼大・理・生化，[3]東大・理・生化）

PSI粒子においては約８０kDのPsaA,PsaBのダイマーペプチドがFe-Sセンター Ｘを、９kdのPsaCペプチドがFe-Sセンター Ａ及び Ｂを結合していると考えられている。一方、嫌気性である緑色光合成細菌の光化学系にはEPR測定によりPSI電子受容体に対応するシグナルが検出され、PSIとの相同性が推測されている。今回は高等植物及び緑色細菌光化学系Fe-Sセンターについて行った研究を報告する。

①緑色光合成細菌は高硫黄含有の培地で生育しているのでFe-Sの検出に酸不安定性硫化物や^{35}Ｓを用いる方法は適していない。そこで蛍光性ＳＨ試薬 N-(7-Dimethylamino-4-methyl-3-coumarinyl)maleimide (DACM)を用いて、緑色光合成細菌Chlorobium limicolaクロマトフォアから光化学系粒子に富む粒子画分を得、高Cys含有ペプチドの検出を試みた。C.limicola菌体をフレンチプレスで破壊して得られたクロマトフォアをコール酸ナトリウム及びオクチルチオグルコシドにより可溶化し、トヨパールHW65Fでゲルろ過する事により、810nmと740nmの吸収スペクトルの比から見て光化学系に富むと思われる画分が得られた。次にDACMでラベルしたクロマトフォアを同様に可溶化、ゲルろ過し、ほぼ同じ位置に溶出される蛍光に富む粒子画分を得た。この粒子画分のペプチドとラベルしたクロマトフォアをそれぞれSDS電気泳動後、蛍光によるクロマトスキャンを行った(図)。その結果分子量１２及び４２kDに蛍光のピークが認められ、高Cys含有のFe-Sペプチドであると推定された。



DACMラベルクロマトフォアのSDS-PAGE

②PSI９kDペプチドはFe-Sセンター Ａ及び Ｂを結合しているが、それぞれがどのCysに結合しているかは判っていない。我々はTriton抽出したホウレンソウPSIを$HgCl_2$処理することにより、センター Ｂが特異的に破壊されることを見いだした。この事実を利用しCysをＳＨ試薬により選択的に修飾後、アミノ酸配列を調べることを試みている。

2Fa09 光化学系１で機能する集光性クロロフィル蛋白質複合体

小木曽英夫、槍山哲夫（埼玉大・理・生化）

光化学系１の集光性（アンテナ）クロロフィルは光化学系２やバクテリアの場合と異なりかなりの部分は反応中心クロロフィルと同じサブユニットに結合し機能していると考えられている。一方LHCIと呼ばれる別のクロロフィル蛋白（群）が存在し、また系２の集光に働くLHCIIも系１の集光色素として機能している可能性が指摘されている。これら３種の集光性クロロフィルが系１に対して相対的にどの様に機能しているかを、定量的に知るために、種々の量の集光性色素を含む系１反応中心標品（以下psiと略）を調製し、これらについてＰ700の閃光による光酸化の相対的量子収率の測定から機能性アンテナサイズを求め考察した。ホウレンソウ葉緑体チラコイド膜をTriton X-100で可溶化抽出後、イオン交換クロマトにより、LHCIIのみを含むpsi標品を得た。抽出の際、高濃度Triton X-100と塩で処理することで、LHCIもLHCIIもふくまれない標品が得られた。またMulletらの方法によって低濃度Triton X-100処理後ショ糖密度勾配遠心で分離精製して両LHCを含む標品を得た。別にTriton X-100を使用せず、チラコイド膜をParr Bomb で破砕し分別遠心で得たストロマチラコイド膜画分と考えられる標品も調製した。機能性アンテナサイズは、キセノン閃光管と干渉及びＮＤフィルタの組合せで得られる種々の強度の赤色閃光で励起し、430nmにおけるＰ700（＋Ｐ430）の吸収変化を測定し、飽和光でのＰ700酸化量の50%を光酸化する閃光強度（$I_{0.5}$、相対値）を求め、これをクロロフィル／Ｐ700比（chl/P700比）に対してプロットして解析した。$I_{0.5}$をchl/P700比に対してプロットしてみると、Chl／Ｐ700比が50から180までの種々の標品でほぼ直線的に増大した。chl/P700比が200を越えるとほぼ飽和し増大が見られなくなる。$I_{0.5}$がＰ700光酸化のAbsorption cross section及びアンテナサイズと直線関係にあることから、光化学系１の最大アンテナサイズは約190chl/P700であると言える。LHCを含まない標品では120が最大で、またLHCIIのみの標品では170であったことから、系１では集光性クロロフィルの60%以上がLHCと無関係であると結論された。またLHCIのみを含むpsi標品はほとんど得られないことから、このクロロフィル蛋白（群）の機能と役割について再検討の必要があろう。

2Fa10　光化学系１反応中心標品の機能と構造

槍山哲夫、平岩裕美、大日向　光、鈴木浩一
（埼玉大・理・生化）

光化学系１の反応中心は、いくつかのポリペプチドサブユニットと色素、金属錯体クラスタなどの低分子量官能基を含む複合体として、葉緑体チラコイド膜やランソウの膜から調製され、数多くの標品が報告されて来ている。それらは、反応中心色素Ｐ700と２、３の官能基が２種の大型ポリペプチドに結合したものだけで構成されているもの（以下cp1と略）、その他に分子量２万以下の小型サブユニットがいくつか存在するもの（以下ps1と略）に大別できる。昨年度大会で我々は、cp1について、Ｐ700あたりのペプチド鎖（Subunit Ia及びIb）の数、鉄とイオウの原子数、ビタミンＫ1の数を定量した結果を報告した。それによると、Ｐ700：Ia：Ib：Fe：S：ＶＫ1＝１：１：１：４：４：１であった。今回さらに、ps1の小サブユニットについてモル比と役割について知るために行った実験についても報告する予定である。一方、CP1の光化学活性としては、閃光による励起でＰ700の光酸化の他にそれに伴う別の吸収変化が430nm付近に見られる。明暗差スペクトルはＰ700とおなじく430nm付近に極小をもつが、Ｐ700の見られない444nm付近（等吸収点）でも変化が見られる点で異なる。閃光照射後の回復は系１の人工的電子受容体であるメチルビオローゲン等の添加で促進される。差スペクトルのかたち及び電子受容体に対する反応速度定数はPS1で見られるＰ430の場合と類似していた。　このＰ430類似の吸収変化の差スペクトルは以前、Sauerらが報告したＡ2のそれや、また最近Golbeckらがランソウからヨードカリ処理で抽出精製したCP1標品で報告したものともよく似ている。現在この吸収変化は鉄イオウクラスタFeSxの光還元に由来すると考えている。

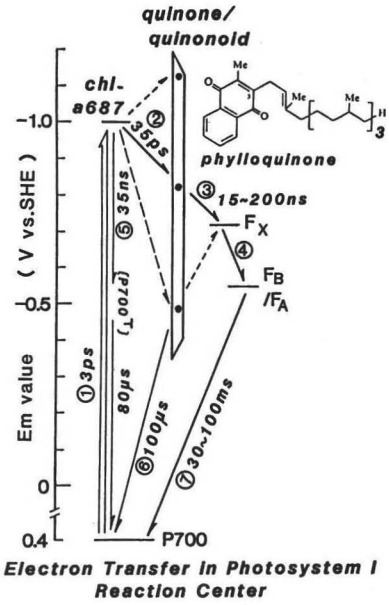
これらの結果をもとに光化学系１反応中心とその周辺の構造について考察する。

2Fa11

キノン及びキノン類似化合物を再構成した改造光化学系Ｉ反応中心
（１）キノン、鉄硫黄センター、Ｐ７００、Ａ0の反応

○伊藤　繁、岩城雅代、※星名　哲　（基生研、※金沢大、理、生物）

光化学系Ｉ反応中心は、酸化還元電位（Em）の非常に低い電子受容体（フィロキノン、鉄硫黄クラスター）を持ち、それらの間の反応も速い。特にキノンの関与する反応については測定の難しさもあり、情報が少なかった。反応中心機能を損なわずにフィロキノンを除去し他のキノンで置き換えた、あるいは一部の鉄硫黄クラスター（FA／FB）を除去した系Ｉ反応中心内での電子移動反応を室温及び低温で測定し、キノンのエネルギーレベルと反応速度、経路の関係を解析した。



Electron Transfer in Photosystem I Reaction Center

「方法」　ホウレンソウ葉緑体より得た光化学系Ｉ粒子を凍結乾燥後、50%水飽和ジエチルエーテルで処理しフィロキノンを抽出した。これに構造及び酸化還元特性の異なる各種キノンあるいはキノノイド（約60種）を添加後、0℃で一晩放置し、キノン再構成標品を得た[1-3]。FA/FBを欠いたPS Ｉ RC標品は60℃/ethyleneglycol処理[4,5]により得た。反応中心クロロフィルａ二量体(P700)及び鉄硫黄クラスター(FX/FA/FB)の酸化還元反応はレーザ閃光分光法により観測した。

「結果・考察」　フィロキノン抽出標品では閃光照射後電子受容体クロロフィルａ-687 とP700 との電荷再結合(反応⑤)が増大しP700^{+}が生成した。これにキノン/キノノイドを再構成すると①が抑えられ、キノンを経由して鉄硫黄クラスターが還元された(反応③)。この還元量はキノンの有機溶媒(DiMethylFormamide)中でのEmに対応して変化した[1]。これより反応中心蛋白質内でのキノンのEmはDMF中より負側に 300mV ずれてしかも並行関係にあると推定された。　また、低温(77K)でもキノンを介する反応が観測された。 これらの事から、再構成したキノンは蛋白質内の特異的な反応環境中（Ｑø部位）にあり、光合成反応中心に特徴的な、活性化エネルギーを示さない電子移動②⑥を行うが、フィロキノンとFXの反応③は活性化エネルギーを必要とすることがわかった。

[参考文献]　1. Iwaki, M. & Itoh, S. ('89) FEBS Lett. 256, 11-16.　2. Itoh, S. & Iwaki, M. ('89) FEBS Lett. 250, 441-447.　3. ('89) FEBSLett. 243, 47-52.　4. Hoshina, S. Sakurai, R. Kunishima, N. Wada, K. & Itoh, S. ('90) Biochim. Biophys. Acta 1015, 61-68.　5. Hoshina, S. Sue, S. Kunishima, N. Kamida, K. Wada, K. and Itoh, S. ('89) FEBS Lett. 258, 305-308.

2Fa12

キノン及びキノン類似化合物を再構成した改造光化学系Ⅰ反応中心 （２） キノン結合部位（Ｑφ部位）の構造

○ 岩城 雅代 ・ 伊藤 繁 （基礎生物学研究所）

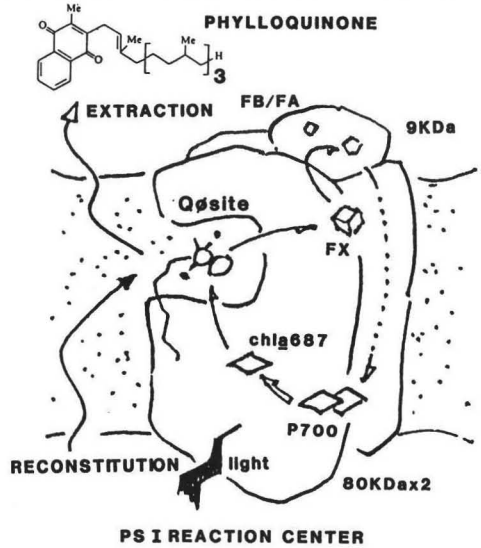
光化学系Ⅰ反応中心(PSIRC)のフィロキノンはNADPを還元するために光化学系II/紅色細菌型のキノンよりも極端に低い酸化還元電位(Em≃-850mV)を示す。これはPSIRC蛋白質が、プラストキノンよりも還元力の強いフィロキノンと選択特異的に結合し、より低い電位を与えるような反応微環境を形成しているためと考えられる。我々は立体構造の解明されていないPSIRCでのキノンの**結合様式**及び**結合部位(Ｑφ部位)の構造**を推定した。

「方法」 ホウレンソウ葉緑体 PSI 標品を凍結乾燥後、50%水飽和ジエチルエーテルでフィロキノンを選択的に抽出した。これに**ベンゾ-、ナフト-、アントラ-、ナフタセンキノン**あるいは**フルオレノン等のキノン類似芳香族化合物(キノノイド)、フェナンスロリン等の阻害剤**(総計約100種)を再構成した。添加濃度を変えて調製した再構成標品に閃光照射し$P700^+$量(光活性のある反応中心量)を測定し各化合物についての濃度依存性を調べ、Ｑφ部位との**結合力(解離定数=Kd)**を算出した。

「結果・考察」 キノン抽出標品では閃光照射後$Chla\text{-}687^-$と$P700^+$との電荷再結合により$P700^T$が生成し(前ページ図、反応⑤)、μ秒では$P700^+$がほとんど観測されなかった。これにキノン/キノノイドを再構成すると⑤が抑えられ、キノンを経由(②)して直接(⑥)あるいは鉄硫黄クラスターを介して(③④⑦)$P700^+$が還元された。このためμ～m秒域での$P700^+$量が、キノン濃度に依存して増大した。また、この量は阻害剤共存下で減少した。

キノンの芳香環が増える、あるいは炭化水素置換基の疎水性が大きくなるほど結合力が増大した。また、一つのカルボニル基しか持たないフルオレノン等の化合物も 強く結合した。それに対し、極性のあるハロゲン(-Cl/-Br/-I)や-NH2/-NO2の置換基の付加は見かけ上、結合力にあまり影響を与えなかった。 以上の事から、フィロキノンの強い結合力(Kd<10 nM)を裏づける、次のような相互作用があると推定した。

▼(i)**キノンのカルボニル基**(>C=O:)と水素供与能のある蛋白質のアミノ酸残基あるいは BACK BONE の-NH基/-OH基との**水素結合。**(ii)キノンの炭化水素鎖 /芳香環と蛋白質の高疎水性領域との**疎水的相互作用。** (iii)キノン環と芳香族アミノ酸残基との近接相互作用(←?)。



一 般 講 演

第 2 日　3 月29日(木)　午後の部

A会場　タンパク質・脂質
B会場　代謝
C会場　分子生物学Ⅳ
D会場　光生物学
E会場　細胞運動・細胞骨格
F会場　光化学系Ⅰ

2Ap01

タバコ不定胚性花粉に特徴的に出現するリン酸化蛋白質の細胞内局在性と部分精製

京　正晴、大川　俊彦、宮武　博昭　（香川大・農・生物資源科学）

一つの花粉から植物体が再生してくるという現象は基礎研究の観点からは植物細胞の分化全能性発現の典型として、また応用的観点からは育種上重要な半数体を作出するための基礎原理として注目を集めてきた。この現象のもっとも初期の過程で細胞内にどのような変化が生じるのかを理解することは細胞生理学的にも、また半数性植物を効率よく作成するという目的のためにもきわめて重要と思われる。この方面の研究を推進するために演者らは近年タバコ未成熟花粉を用いた培養系を開発した。そして、培養過程で花粉に$^{32}P_i$を取り込ませ、全蛋白質の二次元電気泳動パターンのオートラジオグラムを比較することにより、二細胞期中期の花粉が不定胚の起源となりうる花粉に変化する過程（脱分化過程）で特徴的に、リン酸化蛋白質と考えられる一群の spots a-d が出現することを見いだし発表してきた。グルタミンやサイトカイニンを培地に添加して脱分化を阻害したり、二細胞期中期以外の発達段階の花粉を培養して脱分化を誘導できない場合には、spots a-d の出現は部分的に、またはほぼ完全に阻害された。この様に未成熟花粉の脱分化と一群のリン酸化蛋白質の出現との間には相関がみられ、後者は前者において何らかの役割を担っていることが想像された。今回は、これらのリン酸化蛋白質の細胞内局在性の調査結果と簡便な部分精製法について検討したので報告する。

I）細胞内局在性の調査

ショ糖密度勾配超遠心によるオルガネラ分画法により、注目のリン酸化蛋白質 a から d はいずれも同じ画分に多く分布し同一のオルガネラ上に局在していることが示唆された。この画分はリソゾーム及びミトコンドリア指標酵素の活性ピークよりやや軽い画分であって、ＥＲ、ゴルジ体の指標酵素の活性ピークよりも重い画分であった。プラスチドの指標酵素は検出できなかったが葉緑体ＤＮＡ断片をプローブとしたサザンハイブリダイゼーション法により、プラスチドDNA のピークはミトコンドリアよりもさらに重い画分にあることが分かった。以上のことからリン酸化蛋白質 a-d の局在場所としては上に挙げたオルガネラ以外であると考えられた。残る候補としては細胞膜である可能性が考えられたが指標酵素であるカリウムATPase，グルカンシンセターゼ II はこの時期の細胞では活性が低く、それらの活性ピークは検出できていない。

II）リン酸化蛋白質 a-d の部分精製法の開発

多くの予備実験の結果、きわめて簡便な操作によってリン酸化タンパク質 a-d を二次元電気泳動の後、銀染色法によって最もメジャーなタンパク質として検出できることがわかった。すなわち脱分化した花粉を 100 mM Tris-HCl，2mM EDTA，pH 7.3（Lysis buffer）中で破砕後 18,500xg，1hr の遠心後、沈澱に 1%コール酸、40%飽和硫安を含む Lysis buffer をくわえ音波処理を加えるとリン酸化蛋白質a-d はかなり選択的に可溶化されてくることがわかった。このことは、a-d がいずれも可溶化の点で類似した性質を持つ膜タンパク質であること、または同じ膜結合性複合体の構成要素であることを示唆するかも知れない。また、この部分精製法によって得た標品を二次元電気泳動後 PVDF膜にブロッティングし、CBB染色すると a-d のうち c のみを検出することができたので気相ペプチドシーケンサーによるアミノ酸配列の分析を試みている。

2Ap02 クラミドモナスの28kDaユビキチン化タンパク質の精製と同定

°下河原浩介・武藤尚志・宮地重遠（東大・応微研）

ユビキチンは、すべての真核生物に存在すると考えられているアミノ酸76残基よりなる高度に保存された一次構造を持つタンパク質であり、ATP依存的に選択的に異常タンパク質に結合し、その分解のシグナルとなることが知られている。一方、タンパク質のユビキチン化には、明らかにその分解とは無関係に起こるものも知られており、このようなユビキチン化は何らかの調節的機能を持ってるのではないかと推測されている。我々は、植物においてユビキチン系の持つ役割を知る目的で、単細胞性緑藻クラミドモナス（Chlamydomonas reinhardtii 137c）を材料に、そのユビキチン化タンパク質を検索し、それらが様々な生理条件下でどのように変動するかを調べた。その結果、熱や活性酸素によるストレスに応答してきわめて敏感な量的変動を示す分子量28および31kDaのユビキチン化タンパク質を見い出した[1)]。また、これらは細胞周期の進行や配偶体誘導過程においても特徴的変動をすることを報告した[2)]。このうち分子量28kDaのものは細胞核に局在する塩基性タンパク質であることを報告した[3)]。今回、この28kDaの精製および同定に成功したので報告する。

【結果】28kDaはクラミドモナス単離粗核画分より３回の疎水クロマトグラフィー、ゲル濾過ＨＰＬＣ、逆相ＨＰＬＣ、6Mグアニジン塩酸存在下でのゲル濾過ＨＰＬＣ、逆相ＨＰＬＣの過程を経て電気泳動的に純品にまで精製された。次に精製28kDaポリペプチドのアミノ酸配列をペプチドシークエンサーにより決定した。28kDaは、そのままではユビキチンと極めて相同性の高いＮ末端配列のみを与えた。このことから、28kDaのユビキチン以外のポリペプチドのＮ末端はブロックされていることが予想された。そこで、アルギニルエンドプロテアーゼ及びプロテアーゼV8消化ポリペプチド断片のいくつかをシークエンスした。その結果、その中に既報告のコムギヒストンH2Bと高い相同性を示すものを見いだした。このことから、クラミドモナス28kDaは、ユビキチン化ヒストンH2Bであることが強く示唆された。また28kDaの精製過程で同時に得られた分子量20kDaのタンパク質はヒストンH2Bであると推定された。これは他の生物で知られている H2Bの分子量（14-16kDa）より相当大きい。このようなヒストンのユビキチン化の持つ生理的意義について議論する。

（1)PCP 30:9-16(1989) 2)日本植物学会第52回大会(1987) 3)本学会1989年度年会）

2Ap03

カボチャ黄化子葉からの非特異性脂質転移タンパク質の精製

堀　純子、坪井　滋、山田晃弘（東大、教養、生物）

in vitro オルガネラ膜間で、脂質の転移を促進する脂質転移タンパク質（LTP）が、動物、植物、微生物に広く見出されており、基質特異性の高い酸性タンパク質（spLTP）と、基質特異性の低い塩基性タンパク質（nsLTP）がある。今回、カボチャ黄化子葉から後者の nsLTP を単離、精製したので報告する。

カボチャ種子を暗所下25度で発芽生育させ、播種後８日目の子葉を材料とした。脂質転移活性は［^{3}H］ホスファチジルコリンを含むリポソームを供与体膜とし、ジャガイモ塊茎より調製したミトコンドリアを受容体膜としてリポソームからミトコンドリアへの［^{3}H］ホスファチジルコリンの転移量より測定した。

285ｇの子葉の破砕液から酸沈澱によって膜断片を除き、粗抽出液（7200mg タンパク質）を得た。硫酸アンモニウム沈澱を行ない、その画分を DEAE-セファロース CL-6B カラムにのせ、吸着せずに素通りした画分を集めた。次に、CM-セファロース CL-6B カラムへ２度かけ、脂質転移活性のピークが２つ得られた。その一つを集め Mono-S HR 5/5 のカラムクロマトグラフィーにかけたところ、脂質転移タンパク質がＳＤＳを含むポリアクリルアミド電気泳動上で単一のバンドとして精製された。出発材料 285ｇから 0.9 mg の LTP が精製され、比活性は 15.2 nmolPC/mg protein/min であった。分子量はＳＤＳを含むポリアクリルアミド電気泳動上で約7000 と求められ、ゲルろ過クロマトグラフィーによる結果もそれを支持した。精製された LTP はホスファチジルコリンのほかにホスファチジルイノシトール、ホスファチジルエタノールアミン、モノガラクトシルジアシルグリセロール、コレステロール、トリグリセリド、ジグリセリドの転移を促進し、基質特異性の低い nsLTP であった。アミノ酸組成及びＮ－端のアミノ酸配列の分析による、すでにヒマ芽生え、トウモロコシ芽生えの単離された nsLTP との比較もあわせて報告する。

2Ap04 種子の脂質蓄積に及ぼす光の影響

°稲永醇二、柳川辰巳、中庸一、山之口佳与子（鹿大　農学部）

落花生は地上で開花、受精後、地中で結実するが、莢実部に光があたると、莢の肥大のみならず種子の成熟も抑制される。落花生の種子は約５０％の脂質を含むが、種子の脂質含量は環境因子により左右されることが多い。これらは光の照射による落花生の種子の成熟の抑制は脂質の蓄積に関係があるものと推定される。そこで本研究は種子の脂質の蓄積に及ぼす光の影響について、落花生と大豆を用いて検討を行なった。

落花生の子房柄が地中に侵入後、２０日目（莢肥大期）、３０日目（種子成熟期）、５０日目（種子完熟期）に地中から莢実部を取りだし、ガラスビーズと培養液を入れた透明な容器（Ｌ）とアルミホイル（Ｄ）、赤（Ｒ）、青（Ｂ）、緑（Ｇ）及び赤＋青（ＦＲ）のセロファン紙で覆った容器に移して栽培を行なった。また大豆は莢肥大期、種子肥大期、種子成熟期に莢実部を落花生と同様にアルミホイル、各セロファン紙で覆って栽培を行なった。

落花生では、２０、３０日目以降莢実部に光を照射した区では３０日目のＧ区を除き莢、種子重とも小さくなったが、その影響はＬ区についでＦＲ、Ｂ区が大きかった。しかしながら、５０日目以降照射した区と大豆では莢実重に差異は認められなかった。

３０日目以降光を照射した区の落花生の種子の体内成分を調べるとＬ、Ｂ及びＦＲ区はＤ区に比して脂質含量、トリグリセライドの割合が減少し、糖含量、ジグリセライドおよび遊離脂肪酸の割合が高くなった。

一方大豆の体内成分についてみると、いずれの時期からも莢実部をアルミホイルで覆った区では脂質、澱粉含量が増加し、逆に糖および種子成熟期を除いた蛋白含量は減少した。また光の種類についてみると種子肥大期以降セロファン紙で覆った区では、ＦＲ区の脂質、糖含量はＬ区とほとんど変らなかったが、他のセロファン紙で覆った区では脂質含量は増加し、糖含量は減少した。ただ莢肥大期及び種子成熟期以降セロファン紙で覆った区の成分については判然としなかった。

以上の結果は種子の脂質の蓄積が光によって制御されていることを示すものと考えられる。

2Ap05

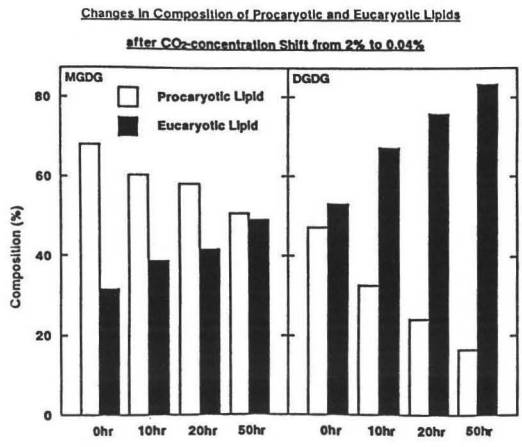
クロレラの脂質代謝に対するCO_2濃度の影響

佐藤典裕、川口昭彦　（東京大学・教養・生物）

クロレラでは培養の際に通気するCO_2濃度が葉緑体の構成脂質であるガラクト糖脂質（ＭＧＤＧおよびＤＧＤＧ）の脂肪酸の不飽和度に大きな影響を及ぼすことが観察されている。例えば低CO_2条件（０.０４％CO_2）では高CO_2条件（２％CO_2）に比べて、主にＭＧＤＧとＤＧＤＧにおいて、１８：２の割合が低く１８：３の割合が高い。また高CO_2条件から低CO_2条件への移行に伴い、主にＭＧＤＧとＤＧＤＧにおいて１８：２から１８：３への不飽和化が進む。

高CO_2条件で育てた細胞（高CO_2細胞）と低CO_2条件で育てた細胞（低CO_2細胞）で、［^{14}C］酢酸を用いて脂肪酸をパルスラベルし、それをチェイスすることによってＭＧＤＧあるいはＤＧＤＧの１８：２から１８：３への不飽和化活性を比較した。その結果、ＭＧＤＧ、ＤＧＤＧともに１８：２から１８：３へのラベルの移行、即ち不飽和化は低CO_2細胞よりも高CO_2細胞で速く進んだ。また全極性脂質へのラベルの取り込みがｐｃｖ（packed cell volume）当りで低CO_2細胞では高CO_2細胞の６７％と低かった。以上の結果は高CO_2条件に比べ低CO_2条件で両糖脂質のC_{18}の不飽和度が高い原因として、１８：２から１８：３への不飽和化活性が高CO_2条件より低CO_2条件で高いという可能性より、むしろ低CO_2条件では高CO_2条件に比べ de novo の脂肪酸合成活性が抑えられ、その結果１８：２の合成も抑えられるため既に存在する１８：２から１８：３への不飽和化が進むことによる可能性が高いことを示唆している。

また高CO_2条件から低CO_2条件への移行に伴い、ＭＧＤＧとＤＧＤＧにおいて葉緑体経路で合成される原核型脂質の割合が減少し細胞質経路で合成される真核型脂質の割合が増加することが観察された（右図）。この現象はCO_2条件が糖脂質の合成に対する両合成経路の貢献の度合に影響を及ぼすことを示唆している。



2Ap06

Changes in membrane constituents by mutation of the gene for fatty acid desaturase in the cyanobacterium, Synechocystis PCC6803

Zoltán Gombos, Hajime Wada, Zsuzsanna Várkonyi, and Norio Murata (National Institute for Basic Biology)

Synechocystis PCC6803 is composed of an endoplasmic membrane system, i.e., the thylakoid membranes and the cell envelope. The latter consists of two distinct membrane layers, the cytoplasmic (or inner) and the outer envelope membranes.

Changes in the membrane constituents following mutation of a fatty acid desaturase (Δ^{12} desaturase) and transformation with a gene (desA) for desaturase were studied in Synechocystis PCC6803. Both the thylakoid and the cytoplasmic membranes have been isolated from the wild type, a mutant (Fad12) defective in the Δ^{12} desaturase, and a transformant (Fad12/desA) of Fad12 with desA. The polypeptide compositions of thylakoid and cytoplasmic membranes present in these strains were compared by gel electrophoresis. The relative amounts of the individual polypeptides were apparently altered by the mutation and transformation with desA. A striking change was observed in the appearance of a polypeptide of 35 kDa. It was present in both membranes originated from wild type, but was absent in those from Fad12, and emerged again in both membranes from Fad12/desA.

Concerning the lipid analysis data it could be stated that neither the mutation of the Δ^{12} desaturase nor the transformation with desA had significant effect on the lipid composition of the thylakoid and cytoplasmic membranes. However, the characteristic alterations of fatty acid pattern due to the mutation and transformation proved to be highly similar in both types of membranes of the wild type, the mutant and the transformant strains. These experimental results may suggest that the fatty acid desaturation takes place in both thylakoid and cytoplasmic membranes in Synechocystis PCC6803.

2Ap07

Vibrio ABE-1 株の温度シフトに伴うリン脂質分子種の変動について

○ 岡島伸浩・森田直樹・奥山英登志・佐々木昭治・[1] 東正一・[1] 村田紀夫（北大・理・植物、[1] 基生研）

Vibrio ABE-1 株は、温度に依存してユニークな脂肪酸である16:1(9t)を合成する（1)。 5℃培養の細胞では痕跡程度のものが成育限界温度であるの20℃では12～15%に達する。トランス型不飽和脂肪酸を含むリン脂質の相転移温度は、炭素鎖長が同じ場合、飽和脂肪酸をもつものとシス型不飽和脂肪酸をもつものとの中間にある。この事から、トランス型不飽和脂肪酸は最高成育温度が低く、C16脂肪酸が90%以上を占める本菌において、微妙な膜流動性の調節に寄与していることが示唆されている。今回は16:1(9t)の役割を探るため、培養温度のシフトアップに伴う経時的な脂肪酸組成およびリン脂質分子種の変動を調べた。

［方法］ 5℃振盪培養中の対数増殖期の細胞を20℃培養液に接種した後、経時的にサンプリングし常法により脂質を抽出した。全脂質の一部はメタノリシスにより脂肪酸メチルエステルとしてキャピラリーGLC で分析した。残りの脂質から TLCでホスファチジルエタノールアミン（PE）を分離した。PEはホスホリパーゼCでジアシルグリセロールとしたのち、ジニトロベンゼン誘導体としてHPLCで分子種を分析した。

［結果と考察］ 5℃から20℃にシフトすることにより脂肪酸組成に顕著な変動が現れた。シフト後 8時間で 16:1(9c) は67%から54%に激減すると同時に、16:0が17%から23%へと増大し、定常期の36時間後には最大15%に達した。

次ぎにPEの分子種についてみると、シフト直後から 16:1(9c)/16:1(9c)が急激に減少し、24時間後まで続いた。それに伴い16:0/16:1(9c) と 16:0/16:1(7c)が増加し12時間後にピークに達した。一方、 16:1(9c)/16:1(9t)は12時間以降も増加を続け36時間後に20%となった。また16:0/16:1(9t) が12時間以降に新たに出現し、最大 7%に達した。

以上の結果から、*Vibrio* ABE-1 株は培養温度を 5℃から20℃にシフトした場合、PEの主要な分子種である16:1(9c)/16:1(9c) が定常期まで減少を続ける一方、16:0/16:1(9c).16:0/16:1(7c) などの16:0を含む分子種が対数増殖期中期までに増加し、それ以降は16:1/16:1(9t) と16:0/16:1(9t) といった 16:1(9t) を含む分子種が定常期まで増加するという二段階の対応をすることがわかった。

(1)H.Okuyama et al.(1989) *In* Biological Role of Plant Lipids (Biacs,L.ed.).Plenum,New York, pp.571-574

2Ap08 Vibrio ABE-1株による長鎖脂肪酸の in vitro 生合成について

°森田直樹・岡島伸浩・奥山英登志・佐々木昭治・[1]東正一・
[1]村田紀夫（北海道大・理・植物、[1]基生研）

Vibrio ABE-1株は生長の至適温度、最高温度をそれぞれ15℃，20℃に持つ好冷菌である。本菌膜脂質の主要脂肪酸は16:1と16:0であり、全脂肪酸の90％を占める。一方、最も炭素鎖長の長い脂肪酸は18:1と18:0であるが、これらの含量が6％をこえることはない。このように本菌の膜脂質が比較的短鎖の脂肪酸に富んでいることは生育温度範囲が低くかつ狭いことと密接に関係しており、また脂質合成において脂肪酸の炭素鎖長は厳密に調節されていると思われる。本研究では Vibrio ABE-1株の脂肪酸合成における鎖長調節機構の解明を目的に部分精製された脂肪酸合成酵素を用い、in vitro 脂肪酸合成による反応産物の分析が行なわれた。

【方法】SilbertとVagelos[2]の方法により脂肪酸合成酵素（FAS）を部分精製した。脂肪酸の合成活性は［2-^{14}C］マロニル-ＣｏＡの脂質画分への取込みにより測定した。反応生成物はケン化後石油エーテルで抽出し、メチル化したものをTLCに供した。TLC上のスポットの位置はラジオスキャナーにより決定した。シリカゲルより回収した脂肪酸メチルエステル（FAME）を $AgNO_3$-TLC により更に飽和脂肪酸と不飽和脂肪酸に分けた。飽和、不飽和FAMEは回収後それぞれラジオGLCにより分析された。脂肪酸の同定は標準物質との保持時間（Rt）の比較により行なった。

【結果及び考察】１）メチル化された反応産物の放射活性の約80％はFAME画分に回収された。２）飽和、不飽和FAMEをそれぞれラジオGLCで分析したところ、本菌が本来持っているC16，C18脂肪酸に加えてこれらの脂肪酸よりRtの長いピークが観察された。これらは標準物質のRtと比較することによって20:0, 22:0, 24:0, 26:0, 28:0, 30:0 とそれらのモノ不飽和脂肪酸であると同定された。

以上の結果は本菌のFASは潜在的には長鎖の脂肪酸を合成する能力を持っているが in vivo ではFAS精製過程で失われる何らかの要因により鎖長が調節されていることを示している。

[2]Silbert & Vagelos, Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., 58: 1579(1967).

2Ap09

登熟期サフラワー種子ホスファチジン酸ホスファターゼの細胞内転移による脂肪合成の調節

市原謙一、室田直紀、藤井昭治
（京都府大・農・農化）

登熟期の油糧植物種子では、貯蔵脂肪の主成分であるトリグリセリドはグリセロリン酸とアシル－ＣｏＡとから合成され、その経路には４種の酵素が関与している。サフラワーでは、この中で３種のアシル基転移酵素がすべて膜結合性であるのに対して、ホスファチジン酸ホスファターゼは膜結合性の活性のみならず、可溶性の活性が存在している。

ホスファチジン酸　⟶　ジグリセリド　＋　Ｐｉ

この可溶性の酵素が、細胞内の脂肪酸レベルに依存して、トリグリセリド合成の場と考えられる小胞体膜に可逆的に転移していると推測できる結果を得た。

【方法】①登熟期サフラワー種子のホモジネート遠心画分（8000g、上清）に脂肪酸カリウム塩を加え、25℃で10分間インキュベートした後、ミクロソームの酵素活性を測定した。②ホスファターゼ活性のない完熟種子からミクロソームを調製し、登熟期種子から調製した100,000g上清と脂肪酸を添加して、ミクロソームに転移した活性を測定した。

【結果と考察】プロプラスチドにおけるデノボ脂肪酸合成の産物であるパルミチン酸、ステアリン酸、オレイン酸は、可溶性酵素をミクロソームに転移させた。これに対して、小胞体でオレイン酸から合成されるリノール酸や脂肪酸合成の最終産物ではないラウリン酸には、転移を誘起する能力はなかった。すなわち、転移は脂肪酸分子種に特異的であった。オレイン酸によってミクロソームに転移した酵素は、オレイン酸濃度を下げることによって可溶性となった。すなわちこの転移は可逆的である。サフラワーの可溶性活性画分を、ダイズ、ナタネ、ヒマワリの完熟種子から調製したミクロソームとオレイン酸存在下にインキュベートすると、サフラワーと同じキク科に属するヒマワリのミクロソームにだけ活性が転移した。このことは、転移には種特異的な機構が働いていることを示唆している。これらの結果から、登熟種子細胞内の脂肪酸レベルが細胞質ゾルに存在するホスファチジン酸ホスファターゼの小胞体膜への転移を誘起して、トリグリセリド合成を調節している可能性が考えられる。

2Ap10 チャ生葉ヒドロペルオキシド開裂酵素の精製と性質

松井健二　梶原忠彦　畑中顕和　（山口大・農・農化）

ヒドロペルオキシド開裂酵素（HPO Lyase)はリノール酸、リノレン酸などの不飽和脂肪酸よりリポキシゲナーゼによって酸素添加されて生成した過酸化脂肪酸の C-C結合を開裂し、3Z-Hexenalなどの短鎖アルデヒドを生成する酵素である。こうした短鎖アルデヒドは緑葉磨砕時の香気として我々に馴染み深いものであるが、HPO Lyase を介した短鎖アルデヒド生成系の植物組織における生理的役割についてはこれまでよく知られていない。本酵素活性はインゲンマメ緑葉、キュウリ子葉、セイヨウナシ果実等種々の植物組織に存在するが、これまで動物細胞には見いだされていない。本酵素はこれまでに精製されたことはなく、その詳細な性質等は明らかでない。我々は短鎖アルデヒド生成系の生理的役割の解明の一環として HPO Lyaseを高度に精製することに成功し、若干の性質を明らかにすることができたので報告する。

酵素源として屋外で栽培したチャ樹（ヤブキタ）より生葉を採取し、これを4%ポリビニルピロリドン(PVP)及び1 mM GSH存在下で磨砕した。従来、チャ葉のHPO Lyase活性は4000 g，10 min程度の遠心で沈澱する膜画分（葉緑体画分）に見いだされていたが、磨砕時に PVPによりポリフェノール類を除くことによってより軽い膜画分に移行することがわかった。また PVP非存在下で磨砕後、集めた膜画分からの可溶化には高濃度の界面活性剤が必要であったが、磨砕時にPVPを添加して集めた膜画分からは 0.15% Triton X-100によってほぼ定量的に可溶化された。このことは HPO Lyaseが磨砕時にチャ葉に多く含まれるポリフェノール類によって膜に吸着されることを示しており、このためにこれまで本酵素の細胞内局在部位を誤っていたものと考えられる。膜画分を0.15% Triton X-100で可溶化し、PEG 6000により分画後、イオン交換、ヒドロキシアパタイト等のクロマトグラフィーによってHPO Lyaseをほぼ均一に精製した。精製酵素は等電点を6.0付近に持つ酸性タンパク質であったが、SDS-PAGEでは57 kD及び55 kD付近にふたつのバンドがみられ、現段階では本酵素がサブユニット構造をとっているのかどうかは明かではない。一方ヘッドスペースガスのGLC分析では pH 7.5で最大活性を示したが、ヒドロペルオキシドの極大吸収(234 nm)の減少で活性測定した場合、至適 pHは6.0であった。

2Ap11

アシルー（アシルーキャリアープロテイン）チオエステラーゼの精製と性質

今井博之、　西田生郎、　村田紀夫　（基生研）

高等植物の葉においては、脂肪酸（オレイン酸、ステアリン酸およびパルミチン酸）は、葉緑体においてアシルー（アシルーキャリアープロテイン）（以下、アシルーＡＣＰ）の形で合成される。葉緑体のストロマには、このアシルーＡＣＰからグリセロ脂質を合成するグリセロールー３ーリン酸アシルトランスフェラーゼと、葉緑体から細胞質への脂肪酸輸送過程の最初の反応を触媒し細胞質のグリセロ脂質合成を支配するアシルー（アシルーキャリアープロテイン）チオエステラーゼ（以下、アシルＡＣＰチオエステラーゼ）が存在する。そこでストロマにおけるこれら両酵素の脂肪酸に対する競争的相互作用を制御できれば、植物生体膜脂質の質的および量的な改変が可能となると考えられる。そのためには、これら両酵素の生化学的・分子生物学的解析が不可欠である。本研究ではカボチャ子葉からアシルＡＣＰチオエステラーゼを部分精製し、本酵素のアイソザイムの存在を明らかにした。

カボチャ（Cucurbita moschata cv. shirakikuza）の種子を連続照明のもとで発芽させ、芽生えを２５℃、７日生育させたのち実験に用いた。アシルＡＣＰチオエステラーゼは、アシルーＡＣＰを脂肪酸とＡＣＰに加水分解する酵素であるが、活性は低いけれどアシルコエンザイムＡ（アシルＣｏＡ）の加水分解も触媒する。そこで、本研究では、［^{14}Ｃ］オレオイルＣｏＡを基質として、アシルＡＣＰチオエステラーゼの活性を測定した。

カボチャ子葉の抽出液に５％（w/v）ポリエチレングリコール６０００を加えて遠心分離し、可溶性タンパク質画分を得た。この画分を等電点電気泳動に供し、等電点4.7、6.4、6.9および7.4の少なくとも４つのアイソホームの存在を明らかにした。発表では、これらアイソホームの物理化学的性質およびＤＥＡＥ－陰イオン交換カラムクロマト法およびＡＣＰアフィニティーカラムクロマト法による精製について報告する。

2Bp01 グラム陽性脱窒細菌Bacillus firmusの異化的亜硝酸還元部位

浦田克郎、佐藤敏生[1]（小山工業高専、[1]広島大学・理・植物）

これまでの脱窒のエネルギー変換機構についての研究はおもにグラム陰性細菌で行われてきた。この脱窒反応はH^+を消費する反応であるため末端還元部位が細胞膜の内側か外側かはエネルギー生成効率から考えると大きな違いと考えられることから、脱窒のエネルギー変換機構を明らかにする上では、まず各還元部位を明らかにしなければならない。脱窒酵素のうち亜硝酸還元酵素は、調べられた全ての脱窒菌においてペリプラスム空間に存在し、その還元部位は細胞膜の外側であった。これに対してペリプラスム空間のないグラム陽性細菌にも脱窒能を持つものが知られているが、その亜硝酸還元酵素の存在部位・還元部位についての報告はない。グラム陽性細菌にはペリプラズム空間がなく、もし細胞質側ならばグラム陰性細菌とは異なる亜硝酸還元系を考えなければならない。本研究では、グラム陽性脱窒細菌Bacillus firmusの亜硝酸還元酵素の反応部位を明らかにすることを目的としoxidant pulse実験を行った。

HOQNO,antimycin A,KCN,NaN_3,valinomycin,CCCPはいずれも内在基質を電子供与体とした亜硝酸還元を阻害した。嫌気条件下でBacillus firmusの細胞懸濁液にKNO_2パルスを加えると、まずアルカリ化が起こり続いて酸性化が起こった。KCN,NaN_3,HOQNOなどの阻害剤存在下では酸性化が阻害されアルカリ化が顕著に観察された。さらに、このKNO_2添加に伴うアルカリ化の原因を明らかにするために、阻害剤存在下でのH^+消費の化学量論、H^+/NO_2^-値を求めた。

KNO_2添加に伴うアルカリ化はHOQNOにより亜硝酸還元を阻害した条件でも起こり（H^+/NO_2^-=1.26)、酵素への直接の電子供与体PMS+Ascorbateを加えてもアルカリ化の大きさ(H^+/NO_2^-=1.61)は変化しなかった。さらにN_2O還元を阻害するNaN_3存在下でのH^+/NO_2^-値は1.36であり、亜硝酸還元が細胞膜の外側で起こるとしたときの値H^+/NO_2^-=3と一致しなかった。以上の実験結果から、グラム陽性脱窒細菌Bacillus firmusの亜硝酸還元酵素の還元部位は細胞膜の内側に存在しており、KNO_2添加に伴うアルカリ化はNO_2^-の細胞内取り込みに関連したものと推定された。

2Bp02

Chlamydomonasにおけるセレン添加及び低CO_2培養による Glutathione peroxidaseの誘導

武田　徹、重岡　成、横田明穂[1],飯塚義富　(近畿大・食栄、[1]大阪府大・農化)

Chlamydomonas reinhardtiiは培養時に低濃度のセレン(Se)を添加すると、既に存在していたAscorbate peroxidase(AsAPOD)が消失し、新たに高い活性を持つSe依存性Glutathione peroxidase(GSHPOD)が出現する。今回、このSe依存性GSHPODを精製し、酵素学的及び免疫学的性質を明らかにし、動物におけるGSHPODと比較検討した。また、Se無添加培地で定常期まで培養したChlamydomonasにおけるSe添加後のGSHPOD活性の変動及び、培養時のCO_2濃度のGSHPOD活性への影響について検討した。

Chlamydomonas reinhardtii Dangeard は亜セレン酸ナトリウム(3mg/ℓ)を含むAllen培地中で空気を通気しながら5日間培養した。Chlamydomonas細胞を10mM GSHを含む100mM Tris-HCl緩衝液(pH8.3)に懸濁し、French pressで破壊後、遠心分離(12000g、30min)を行い、得られた上澄みを粗酵素液とした。GSHPOD及びAsAPOD活性測定は既報[1]に従った。

ChlamydomonasGSHPODは、イオン交換クロマト、硫安分画及びゲル濾過等により電気泳動的に均一に精製した。本酵素は同一のサブユニット(分子量17kDa)からなる４量体であった。本酵素はGSHのみを電子供与体とし、H_2O_2以外にcumene及びt-butylhydroperoxideも分解した。またKCNで活性は全く阻害されなかった。牛赤血球GSHPODより作製した抗体は、Chlamydomonas、ラット、ヒト及び牛赤血球のGSHPOD活性を90%、60%、70%及び80%阻害し、Immunoblotにおいても各々の酵素と反応した。また、SDS-PAGEにおける17kDaのバンドにSeが検出された。これらのことから、ChlamydomonasGSHPODは酵素学的及び免疫学的性質、更にセレンタンパク質であるという点において動物のそれと非常に類似していることが明らかとなった。一方、Se無添加の培地で定常期まで培養したChlamydomonasにSeを添加すると、GSHPOD活性が出現し、Se添加後24時間で最大活性を示した。このSe添加による活性上昇はタンパク質合成阻害剤の影響及び免疫滴定からde novo合成によることが明らかになった。また、Se添加後にCO_2濃度を低濃度(0.03%)から高濃度(5%)に変えると、Se依存性GSHPOD活性の上昇は著しく抑制された。しかし、再びChlamydomonasを低CO_2濃度に戻すとGSHPOD活性は上昇した。

1) Yokota, A., et al, (1988) Plant Physiol., 86, 649

2Bp03

ラン藻 Trichodesmium NIBB1067 の窒素固定：窒素固定活性の制御

大城　香，J.P.Zehr[1]，P.G.Falkowski[2]，藤田　善彦（基生研細胞生物，[1]ニューイングランドバイオラボ，[2]ブルックヘブン国立研）

海洋性浮遊ラン藻 Trichodesmium は ユレモ科のラン藻で，ラン藻の好気的窒素固定の場である異形細胞を分化しないが好気的窒素固定活性をしめす．　しかし本ラン藻の培養が困難なこともあって，その実態には不明な点が多い．　我々は本ラン藻の完全合成培地による人工培養系確立に成功し，本ラン藻の窒素固定系の制御機構を明らかにする目的で異なった窒素源による制御を窒素固定酵素の合成と活性のレベルから検討した．

材料・方法：　Trichodesmium sp. NIBB1067株は人工海水AQUIL培地中で 25℃，10時間明・14時間暗条件で培養した．　窒素固定活性はアセチレン還元法により測定した．窒素固定酵素は細胞より可溶化，SDS-PAGE により分画，ウイスコンシン大学・Ludden博士によりRhodospirillum rubrum の窒素固定酵素の鉄蛋白・鉄モリブデン蛋白に対してそれぞれ作成された抗血清を用いウエスタンブロット法により同定した．

結果・考察：　(1) 窒素固定(アセチレン還元)活性は窒素源を除いた培地で培養した細胞でのみ発現した．　窒素源として $NaNO_3$(2mM)・ NH_4Cl(0.02mM)あるいは尿素(0.2mM)を加えた培地で生育させた細胞はアセチレン還元活性をまったく示さなかった．　(2) 尿素を加えた培地で生育した細胞では窒素固定酵素は合成されていなかった．　(3)しかし硝酸塩・アンモニウム塩を加えた培地で生育し，活性を示さなかった細胞では，窒素固定酵素は鉄蛋白・鉄モリブデン蛋白ともに合成されていた．　(4) 窒素源を除いた培地で生育しアセチレン還元活性を示した細胞の 鉄蛋白は SDS-PAGEにより鉄蛋白抗体と反応する 見かけの分子量が 40kDa・38kDaの2本のバンドとして検出された．　しかし硝酸塩・アンモニウム塩を加えた培地で生育し活性を示さなかった細胞では 鉄蛋白は 40kDaのバンドのみが検出された．　窒素固定細菌では窒素固定活性の失活は鉄蛋白のアデニン化による見かけの分子量の増加を伴うことが知られている．　本ラン藻の 鉄蛋白も 40kDa蛋白は不活性型・38kDa蛋白は活性型である可能性が高い．　Trichodesmium sp. NIBB1067 の窒素固定系は少なくとも酵素の合成(翻訳あるいは転写)および転写後修飾の2段階で調節されていると考えられた．

2Bp04

ラン藻 Trichodesmium NIBB1067の窒素固定：窒素固定酵素の細胞内分布

大城　香，P.G.Falkowski[1]，藤田　善彦（基生研・細胞生物，[1]ブルックヘブン国立研）

窒素固定酵素は，酸素により容易に不活性化される．　酸素発生をともなった光合成を行うラン藻では好気的窒素固定は（a)光合成酸素発生系(PSII)を欠いた細胞(ヘテロシスト)や（b)暗所でのみ行われると考えられてきた．　しかし Trichodesmium は ユレモ科のラン藻で，ヘテロシストを分化しないが，その窒素固定系は高い耐酸素性をもち，光照射下の光合成が起こっている条件で窒素固定が進行する．　本ラン藻の耐酸素機構を明らかにする目的で窒素固定酵素の細胞内分布を免疫電顕法を用いて調べた．

材料・方法：Trichodesmium sp. NIBB1067 細胞は窒素源を含まない培地で培養し，グルタールアルデヒド固定後 Epon樹脂で包埋した．　窒素固定酵素は Rhodospirillum ruburum の窒素固定酵素の鉄蛋白に対して作成された抗血清で超薄切片を処理後 IgG-金コロイドによる免疫染色を行い検出した．　IgG-金コロイドの非特異的吸着の検定は尿素を窒素源として生育させた窒素固定酵素を持たない Trichodesmium 細胞を用いて行った．

結果・考察：　本ラン藻は細胞が連なった糸状体を形成している．　窒素固定酵素(鉄蛋白)は糸状体のすべての細胞から検出された．　この結果は，Trichodesmium ではヘテロシストに相当する特殊な細胞の分化はないことを示している．　各細胞は発達したガス胞を持ち，チラコイドは細胞周辺に存在している．　窒素固定酵素はチラコイド領域には少なく，細胞内部に多い傾向が見られた．　この結果は Trichodesmium の窒素固定系が細胞内で局在することにより，光合成系から発生した酸素から保護されている可能性を示唆している．

2Bp05　硝酸イオンによるマメ科根粒レグヘモグロビンの機能阻害

* 金山喜則、山本幸男[1]（名大・農・園芸、[1]名古屋学院大）

マメ科植物と根粒菌との共生による窒素固定は、NO_3^-により阻害されることが知られているが、その原因は明らかではない。我々はダイズ・カウピー・エンドウの根粒にNO_3^-を与えた後におこる、窒素固定能の低下と根粒内の酸素の運搬に重要な役割を果たすレグヘモグロビン（Lb）の機能低下との関わりについて検討した。

Lbは硫安分画及びセファデックスG-75カラムクロマトにより部分精製した。窒素固定能はアセチレン還元能（ARA）として測定した。Lbの嫌気的抽出は、アルゴンガスにより酸素濃度を0.3%に落としたグローブボックス内で行った。 ニトロシルレグヘモグロビン（LbNO）形成の反応速度論的解析においては、Lbとジチオナイト及びNO_2^-を迅速に混合した後、LbNOの吸収ピークである415nmの吸光度の変化を測定した。

２価のLb（Lb^{2+}）は一酸化窒素と結合しLbNOを形成したが、このLbNOは還元剤の存在下でNO_2^-とLbからも形成された。その吸収スペクトルは、415および545と570nmにピークを示した。ダイズ根粒のARAは、10mMのNO_3^-添加後24時間で49%に低下したのに対して、カウピーやエンドウの根粒のARAは、10mMのNO_3^-添加では低下せず、20mMのNO_3^-添加後48時間目にそれぞれ45%および61%に低下した。ARA低下の際、嫌気的に抽出したLbは、ダイズとカウピーについては上述のLbNOの吸収スペクトルを示したが、エンドウではLb^{2+}の吸収スペクトルを示した。よってダイズ及びカウピーでは、根粒に吸収されたNO_3^-の還元により生成されるNO_2^-とLbからLbNOが形成され、Lbの酸素運搬能が低下することにより窒素固定能が阻害されると考えられるが、エンドウにおいてはLbの機能低下は起こらず、ダイズやカウピーと異なった阻害機構を有すると考えられる。この様な種によるLbNO形成の違いが、Lbの性質に由来するか否か調べるため、LbNO形成の反応速度論的解析を行った。その結果、エンドウのLbNOはダイズのLbNOより約10倍解離しやすく、このことがエンドウ根粒でLbNOが集積しない一因となっていると考えられる。一方、形成の速度定数はむしろエンドウやカウピーのLbの方がダイズのLbより高いため、NO_3^-感受性の弱さやLbNO形成の困難さは、レグヘモグロビンの性質よりはNO_2^-を生成するステップに左右されている可能性も考えられる。

2Bp06　タンパク質合成阻害剤によるシャジクモ細胞内におけるアミノ酸分布の変動

田沢　仁・三村　徹郎（東京大・理・植物）・坂野　勝啓
（農水省・生物研）・森安　裕二（静岡県立大・生物）

車軸藻の節間細胞は非常に大きいので、液胞灌流法により、液胞液を任意に取り出すことができる。さらに液胞灌流液にCaキレート剤を加えると、灌流後、液胞膜が消失し、再度の灌流を行うことで、主に葉緑体からなるゲル層と細胞質基質であるゾル層とを短時間で分離することができる。我々はこのゾル・ゲル層の分離法を用い、アミノ酸代謝において異なる機能を持つ三つの細胞内コンパートメント（液胞、細胞質基質、葉緑体）の明暗によるアミノ酸分布変化を測定し以下の知見を得た。（１）明暗いずれの条件でも、液胞内のアミノ酸組成と細胞質基質のアミノ酸組成はきわめて良く似ているが、葉緑体内のアミノ酸組成は全く異なっている。（２）各アミノ酸の濃度は液胞内ではいずれも1 mM前後であったが、細胞質基質と葉緑体では10 mM から数十mMに達している。（３）12時間の光照射後、液胞と葉緑体内のアミノ酸含量は大きく減少したが細胞質基質の濃度は一定に保たれている。

今回は、この光照射に伴う葉緑体内アミノ酸濃度の減少が葉緑体内タンパク質合成能とどの様に関わり合っているかを検討した。もし光照射が葉緑体内のタンパク質合成を促進するならば、光による葉緑体内アミノ酸プールの減少を予想することが出来る。そこで車軸藻節間細胞をオルガネラタンパク質合成阻害剤であるクロラムフェニコール（0.5　mM）で処理し、その後細胞内の各コンパートメントのアミノ酸濃度を測定した。

暗条件下では１８時間のクロラムフェニコール処理はアミノ酸分布にはまったく影響を与えなかった。明条件下では、全アミノ酸量は変化しないにもかかわらず、細胞内アミノ酸の組成、分布ともに大きく変動した。液胞内のアミノ酸濃度はコントロールの３倍に上昇し、一方、細胞質基質と葉緑体のアミノ酸濃度は半分から三分の一に減少した。いずれのコンパートメントにおいても、アラニンの濃度が顕著に上昇し、イソアスパラギン以外のアミノ酸量は大きく減少していた。アミノ酸分布の時間変化を追うと、阻害剤処理後、徐々に細胞質のアミノ酸含量が減少し、かわりに液胞内のアミノ酸量が増大していた。処理後２時間以内にグルタミン量の顕著な上昇とグルタミン酸およびグリシン濃度の低下が測定された。処理後１０時間目からアラニン濃度が徐々に増大し最終的に全アミノ酸の４割を占める様になった。アミノ酸代謝に関わり合う種々の酵素活性（Glutamic-oxaloacetic transaminase, Glutamic-pyruvic transaminase, Glutamine synthetase）を測定したが、クロラムフェニコール処理にともなう顕著な活性変化は見いだせなかった。

2Bp07

カゼクサ種子の温度処理による二次休眠制御とアミノ酸代謝について

高橋　信・植松直子・°鈴木章方　（山梨大・教育・生物）

カゼクサ（Eragrostis feruginea BEAUV.)の種子は、室内に保存しておいても野外の土中に埋めておいても、採種後数カ月間は休眠しており通常の発芽条件を与えても発芽しない（一次休眠）。ところが、採種後約６カ月たつと、暗所では発芽しないが光を照射すると発芽するようになる（後熟）。この生理状態の種子（光発芽性種子）は、２５°Ｃ暗所で吸水後２－３日目に最大の光感受性に達し、その後は徐々に光不感受性になる（二次休眠）。　二次休眠に陥った種子は通常の発芽条件を与えても発芽しないが、硝酸塩、エチレンなどの化学的処理によってふたたび光感受性を回復して、光によって発芽が誘導されるようになる（二次休眠打破）。二次休眠の打破はその他に、温度処理によっても可能である。すなわち、２５°Ｃ暗所で７日間吸水させ、完全に二次休眠に陥った種子に、約６時間３５－４５° Ｃの高温処理をあたえ中温（２５°Ｃ）に戻すと、二次休眠は打破され、短時間の光照射で発芽を誘導することができるようになる。ところが、高温処理とその後に与える光照射の間隔が３日以上になると、高温処理の残存効果は解消されてしまう。言い換えると種子の休眠制御において「温度メモリー現象」が観察されたことになる。これは、フィトクロムの作用発現における「砂時計説」に相当する現象であり、「砂」に相当する「温度記憶物質」があるとすれば、それは何か、ということが問題になる。なお二次休眠の打破には、上記の処理だけでなく、低温処理（５°Ｃ、＞７日間）もまた有効である。このことは「温度記憶物質」の資格として、高温によっても低温によっても増加し、かつ高温から中温に戻すと減少する物質であることを要求する。

演者らは８９年の本学会で、休眠打破に効果のある硝酸塩などを与えた場合、糖あるいは有機酸の代謝よりもアミノ酸の代謝が強い影響をうけることを報告した。その知見から温度処理によってもアミノ酸プールに変動が起こる、と予測した。今回の研究では、アミノ酸の中から「温度記憶物質」を探索した。ＨＰＬＣによる分析の結果、ロイシン、イソロイシン、バリン、フェニルアラニンが、その資格をもつことがわかった。この事実から、温度処理による二次休眠の制御は、少なくとも代謝レベルにおいては上記アミノ酸の代謝にかかわる酵素系の活性調節を通して行われていることが証明された。

2Bp08

クロレラ白色変異体のアミノ酸取り込み及びアンモニア放出に対する青色光効果

神谷　明男　・　Ｗ．Ｋｏｗａｌｌｉｋ
（帝京大・薬、　西ドイツ・ビーレフェルト大）

青色光は、植物の炭素・窒素代謝をはじめ様々な生理・形態形成に関係している。例えば、藻類の炭素・窒素代謝では、青色光はデンプン分解を促進し呼吸を増し、長時間の照射後に、２０－３０種類の酵素合成を誘導する。　我々は、クロレラの変異体を用いて、青色光はヘキソースの取り込みを顕著に阻害するのに比べ、硝酸の取り込みを促進し、硝酸還元酵素を活性化し（in vitro）、さらにアンモニアの放出を起こすことを報告している。　今回は、アミノ酸類と尿素の取り込みに対する青色光効果を検討し、同時に、グルタミン合成酵素（クロレラ変異体のアンモニア同化経路）の阻害剤であるメチオニンサルフォキシミン（MSX）存在下で起こるアンモニア放出に対する青色光効果を検討した。

クロレラ変異体は、硝酸（Ｎ源）、グルコース（Ｃ源）で暗中、３０Ｃで培養した。アミノ酸はニンヒドリン法、グリオキシル酸は酵素法でそれぞれ定量した。

検討した２０種のアミノ酸のうち、７種のアミノ酸が MSX 存在下で添加するとアンモニア生成が増大した。　まずグリシン取り込みと MSX 存在下でグリシン由来のアンモニア生成に対する光効果を検討した。　グリシンの取り込みは青色光により顕著に促進され、赤色光も幾分効果を示した。　グリシン添加によるアンモニア生成（MSX 存在下）も同様な光効果を示した。　取り込まれたグリシンは、グルコースがない条件では窒素源に利用されずに、酸化反応でグリオキサル酸に変換され蓄積した。　グリシン取り込みに対する青色光効果は、タンパク合成阻害剤のシクロヘキシミド存在下では認められない。

グリシン以外のアミノ酸は、アラニン、セリン、プロリン、アルギニン、アスパラギン　、バリンについて検討した結果、それらの取り込みが青色光で顕著に促進され、アンモニア放出も促進された。　特徴的な点は、Ｎ－スターブした細胞で、この青色光効果が認められることである。　尿素についても同様な結果が得られた。　クロレラのアミノ酸取り込みは、少なくとも７種の輸送体が関与することが知られているので、それらの合成誘導がＮ－スターブ細胞では光により制御されるものと考えられる。

2Bp09

オーキシンを含まない培地で培養したHiprolyオオムギカルスにおけるS－アデノシルメチオニンと1－メチルヒスチジン含量の変化について

加藤　芳伸　（北海道立衛研）

植物の培養細胞（カルス）における二次代謝産物の濃度は起源植物組織に比べて極めて低い。その一般的理由として、二次代謝に関与する特定の酵素が欠如しているためであるとされている。Hiprolyオオムギにおける1－メチルヒスチジン（1-Methis）の生成はカルスで弱く、カルスに期間形成が起こると、その生成が増強される。カルスでの低1-Methisレベルもやはりその合成に関与する特定の酵素の活性と関係があるものと考えられる。そこで、オーキシンを含まない培地で培養したHiprolyオオムギカルスにおける1-Methis合成の変化について調べた。

2,4-D 2mg/lを含むMurashige-Skoog培地にて2年間継代培養したHiprolyオオムギカルスを実験に供した。SAMはGreenbergとCohenの方法にしたがって、試料をSP-Sephadex G-25にて調整した後、逆相系カラムを用いて高速液体クロマトグラフィーにて定量した。ATPはAddankiらの方法で、また1-Methisはアミノ酸分析計（日立835型）にて定量した。

オーキシン無添加培地で培養したカルスは不定根を形成するが、この不定根形成過程で、カルス中のSAM合成は前駆物質であるメチオニン（Met）とATPのレベル増加に伴って急速に上昇した。さらに、Metを添加した培地でカルス培養を行なうと、カルス中のSAMレベル及びMetのSAMへの取り込みが著しく増加することから、SAM合成がMet濃度の影響を強く受けていることが認められた。

一方、カルス中の1-Methis含量はSAMと同様にカルスの不定根形成とその生長に伴って増加した。1-Methisの合成は、Met添加により著しく促進された。メチル基受容体となるヒスチジン(His)にも促進効果が認められたが、Metに比べるとHisによる1-Methis合成の促進は極めて弱いものであった。このことから、1-Methis合成にはMetの合成及び代謝活性に伴って変化するメチル基供与体のSAMが強く関与しており、その濃度が1-Methis合成の調整に重要な役割を果たしていることが示唆された。

1)M.L.Greenberg and S.S.Cohen, Plant Physiol., 78, 568(1985).
2)S.Addanki, J.F.Sotos and P.D.Rearick, Ann. Biochem., 14, 261(1966).

2Bp10 オオムギ・エチオプラストのプロテオリシス

*本多忠紀，田中　歩，辻　英夫（京大・理・植生研）

黄化組織が光照射を受けた後に起こるタンパク質構成の変化を調べる実験から、光照射によるエチオプラストからクロロプラストへの変換過程でNADPH-プロトクロロフィライド-レダクターゼ（NPR）の急速な分解が起こることが示されている。一方、粗エチオプラスト標品に外から与えたヘモグロビンを分解する活性があるとの報告がある。本研究では精製したエチオプラストを用いると粗標品の場合と異なった結果となることが判明したので報告する。

暗所で 5日間発芽させたオオムギの第一葉を材料とし、破砕後、通常の分画遠心法により、1000 g沈澱（粗標品）を得、35%パーコールを用いて精製すると、沈澱として無傷エチオプラストが得られ、上方のバンドに損傷エチオプラストがくる。これらの、無傷、損傷、粗エチオプラストの間で、プロテオリシス活性を比較した。活性測定はいずれの場合も低張液中でエチオプラストを破裂させた状態で行った。

pH 5でのヘモグロビンを基質とするアミノ酸遊離活性は、損傷、粗エチオプラストでは見られたが、無傷エチオプラストでは検出されなかった。液胞の標識酵素である酸性ホスファターゼの混入度を比較すると、損傷、粗標品では高く、無傷標品では低かった。このことは従来報告されてきたヘモグロビン分解活性は液胞の混入によることを示している。損傷をうけることによりこの活性が生じるのではないことは、無傷エチオプラストを低張処理，Triton処理などしてもこの活性が生じないことからも明かである。また、エチオプラストを完全に変性させたものを基質として与えた場合にもアミノ酸遊離は認められなかった。以上のことから、本来エチオプラストにはアミノ酸遊離をもたらすプロテアーゼ活性はないように思われる。

一方、無傷エチオプラストのオートリシスによるタンパク質構成の変化をSDS-PAGE法により調べたところ、プロテアーゼの存在を示唆する結果を得た。

生理的pHと考えられるpH 7では、明暗に関係なくほぼNPRだけが分解されており、これはNEMでよく阻害された。またpH 5でも同じようにNPRの分解は起こったが、このpHではpH 7では安定だったタンパク質までが分解された。この場合にもアミノ酸の遊離は認められなかった。

以上の結果は、エチオプラストが NPRを選択的に分解する活性を持っていることを示し、照射直後に起こる変化を説明する基礎となる。しかし、エチオプラストがプロテアーゼ活性を持つのになぜアミノ酸遊離が認められないかは今後の課題である。

2Bp11 発芽ヤエナリ種子の子葉におけるα－アミラーゼの発現様式

肥塚信也、田中喜之'、諸橋征雄（東京農工大・農、'農水省・農業環境技術研究所）

我々は先にマメ科ヤエナリ（Vigna radiata)種子の子葉におけるα－アミラーゼ活性発現は、胚軸の存在に依存しており、胚軸を除去した子葉では発現は見られないが、しかし、吸水時に子葉がうける処理によっては、胚軸がついていなくとも発現することがあり得ることを報告した。そして、乾燥子葉中にα－アミラーゼ発現に関してinhibitoryに作用する物質が存在し、これが子葉から漏出(leakage）するような条件下で種子を吸水させると、α－アミラーゼ発現が誘導される可能性のあることを示唆した。 そして、その制御は、in vitroの翻訳活性から判断して転写レベルでなされているように思われた。(a)

今回は、この点をより明確にするために、ヤエナリ子葉中のα－アミラーゼmRNA量が、種子が吸水時にうける処理により、どのような変動をするかを、ヤエナリα－アミラーゼcDNAをプローブに用いてノーザン・ハイブリダイゼーションによって調べ、以下のような結果を得た。

(1) 胚軸がついている子葉でのα－アミラーゼmRNA量は急激に増加したが、胚軸を除去した子葉では低いレベルにあった。

(2) 子葉からのleakage が促されると考えられる条件下で吸水させると、子葉中のα－アミラーゼmRNA量は増加した。mRNA量の増加は、leakage がより激しく起っているような条件下で吸水させると、さらに顕著となった。

(3) leakage が抑えられるいると考えられる条件で吸水させた場合、α－アミラーゼmRNA量は低いレベルのままであった。

(4) leakage が顕著におこる条件下で、しかも、3mM スペルメジン存在下で吸水させた場合、α－アミラーゼ活性は低いレベルに抑えられ、mRNA量の顕著な増加もみられなかった。

以上の結果より、ヤエナリ子葉中のα－アミラーゼの発現の制御は、少なくとも転写レベルで調節を受けていることが示唆されたが、この点について考察を加える。

(a) Morohashi Y, Katoh H, Kaneko Y, Mastushima H (1989) Plant Physiol 91:253-258

2Bp12

ステビア葉中のステビオール、ステビオサイド類の配糖体化酵素

柴田　均、園家　暁、落合英夫、西橋秀治[1]、山田正治[1]
（島根大、農、生物機能学、[1] 大日本インキ中研）

南米原産のステビア葉は大量の甘味配糖体、ステビオサイド類を蓄積する。主成分は、ステビオールをアグリコンとして、グルコースが３分子結合したステビオサイド(Stv)と４分子結合したレバウディオサイド-A (Reb-A)であり、これらは砂糖の約300倍の甘味を呈するので、すでにステビア甘味剤として実用化されている。ステビオサイド類の生合成に関する研究は、アグリコンであるステビオールがメバロン酸経路を経て、カウレン酸から合成されるとの報告のみである。われわれはステビオールへの配糖体酵素の検出を試み、併せてステビオサイド類の生合成経路を明らかにする目的で、本研究に着手した。

配糖体化酵素のそれぞれの糖受容体（ステビオール、ステビオールモノシド、ステビオールビオシド、Stv）はいずれも天然のStvから調製し、さらに標準化合物として用いたReb-Aともども、液クロで調製してから用いた。褐変防止剤の共存下で、凍結ステビア葉を緩衝液とともに磨砕し、遠心上清を30-75%硫酸アンモニウムで濃縮後、ゲルロ過して粗酵素液を調製した。ＵＤＰ-^{14}Ｃ-グルコースの共存下で、ステビオール、モノシド、ビオシド、Stvへ糖転移する活性が粗酵素液中に確認できた。粗酵素液をDEAE-Toyopearlで分画すると、ステビオールを基質とする活性は素通り画分に存在した（酵素Ⅰ）。配糖体にさらに糖付加する活性は約 0.15 M KClで溶出された（酵素Ⅱ）。両酵素とも最適ｐＨは７－８であり、反応は９０分まで直線的に進行した。酵素Ⅰによって、ステビオール、19-O-Me-ステビオールは基質となりえたが、立体異性体のiso-ステビオールや13-O-Me-ステビオールは、利用されなかった。また酵素Ⅱは19位と13位の両方にグルコースを有するルブソシドも基質としたが、その速度はステビオールビオシドの45 %程度であった。反応生成物の同定は TLCラジオスキャナーやラジオ-液クロで行った。

以上の結果より、ステビオールはその13位がまずグルコース付加され、次にさらにもう一分子のグルコースが転移されて、ステビオールビオシドとなり、この段階で19位にグルコース転移されてStvが合成され、Stvにさらにもう１分子のグルコースが付加してReb-Aに至る経路が、ステビオサイド類生合成の主経路であると考察された。

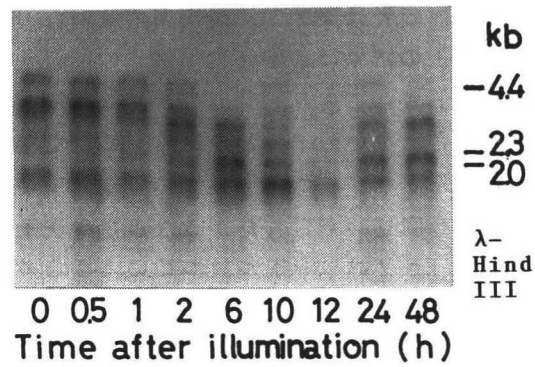
2Cp01　緑化過程における小麦光化学系ⅡｍＲＮＡ群の経時変化

°川口　博・福田　功・椎名　隆・豊島　喜則
（広島大・総合科学）

小麦の光化学系Ⅱ（ＰＳⅡ）蛋白質は緑化過程で発現、蓄積し、機能を有した複合体を形成する。現在、葉緑体ＤＮＡにコードされているＰＳⅡ関連蛋白質の発現調節に関して、転写後の段階での制御が注目されているが、本研究では、葉緑体ＤＮＡコードの大半のＰＳⅡ遺伝子転写産物について、同一試料での１）詳細な経時変化、２）光照射後、短時間での変化を調べることで、ｍＲＮＡレベルでの制御の可能性について再検討した。

＜方法＞緑化中の黄化小麦から一定時間毎に無傷葉緑体を単離し、プラスチドＲＮＡを抽出した。また、光照射後、短時間で起こるｍＲＮＡの変化を調べるためには採取した葉を直接、液体窒素で凍結させた後、ＳＤＳ－フェノール法で細胞全ＲＮＡを抽出した。ｍＲＮＡの蓄積はノーザンハイブリダイゼーションで調べた。

＜結果と考察＞現在までに調べた全てのＰＳⅡ遺伝子（ｐｓｂＡ、Ｂ、Ｃ、Ｄ、Ｅ、Ｆ、（Ｇ）、Ｈ、Ｋ）の転写産物は光照射を受ける前のエチオプラストにも存在しており、ｐｓｂＡ、Ｃ、Ｄ以外は光照射による顕著な変化がみられなかった。ｐｓｂＡのｍＲＮＡの蓄積量は緑化中、増大を続けた。ｐｓｂＣ、Ｄは葉緑体ＤＮＡ上に一部重複してコードされており、Ｃ、Ｄいずれのプローブを用いてもそのｍＲＮＡの電気泳動パターンはよく似た数本のバンドに分かれ、光照射によってそれぞれの量が経時的に複雑な変化を示した。また、約１－２時間後から新たな２種類のｍＲＮＡが現れその蓄積量は経時変化することが明らかになった。図はｐｓｂＤをプローブとしたときのｍＲＮＡの経時変化を示したものである。なお、短時間（光照射開始後１５分）での変化についても詳細に調べたが、顕著な変化はみられなかった。これらの結果は、Ｄ２あるいは４３ｋＤａ蛋白質の発現に関してｍＲＮＡレベルでの制御の可能性を検討す必要性を示している。



2Cp02

重複遺伝子族に由来するタバコ光化学系Ⅰ psaE サブユニットの多形性

小保方潤一[1]、三上浩輝[1,2]、林田信明[3]、山本義治[4]、
杉浦昌弘[5] ([1]北大・遺伝子、[2]北大・理・植、[3]理研・遺伝子解析、[4]京大・理・植生研、[5]名大・遺伝子)

高等植物の光化学系Ⅰ複合体は10種類以上のサブユニットから成り立っている。植物細胞内での系Ⅰの分子構築機構を解明するためには、まず系Ⅰサブユニットの種類と分子種構成とを明らかにしておくことが必要である。このため演者らは、タバコでの系Ⅰサブユニットの分子種構成を、それぞれのサブユニットのN-末端アミノ酸配列を基にして検討してきた。その結果、タバコの系Ⅰの構築には11種ほどのサブユニットの加わっていることが明かとなったが、一方、このような手法では解析の困難な、N-末端のブロックされた15kDaほどの系Ⅰタンパク質群の存在もまた明かとなった。そこで、このブロックされたタンパク質群の分子的性状を明らかにするために、以下のような解析をおこなった。

(1)N-末端のブロックされたタンパク質群の各々をendopeptidaseで切断し、得られたペプチド断片の部分アミノ酸配列を決定したところ、核コードの系ⅠサブユニットであるpsaEサブユニットのアミノ酸配列に高い類似性を示した。しかし、既知のpsaEサブユニットのN-末端はブロックされていない。

(2)前記の結果をうけて、psaEサブユニットをコードしているcDNAをクローニングして検討したところ、2種類の分子種が見いだされた。各々のcDNAのコードするタンパク質は、それぞれ既知のpsaEサブユニットとN-末端のブロックされたサブユニットとに対応していた。両者は、アミノ酸配列では81%、塩基配列では77%のホモロジーを示した。

以上の結果は、①光化学系ⅠのpsaEサブユニットは核ゲノム上の重複遺伝子族によってコードされており、②psaEサブユニットには成熟型タンパク質のN-末端が修飾される分子種とされない分子種とがある、ことを示している。これまでの国内外の研究によって、11種の系Ⅰサブユニットについて部分アミノ酸配列やcDNAの塩基配列などが調べられてきたが、今回見いだされたような重複遺伝子族に由来する多形性は今のところ知られていない。psaEサブユニットが持つこのような多形性が系Ⅰの機能調節に係わっているかどうかは、今後に残された重要な研究課題である。

2Cp03

Ｎｉｃｏｔｉａｎａ属の光化学系ＩｐｓａＨ蛋白をコードするｃＤＮＡの解析

林田信明、井土伸一[1]、小保方潤一[2]、杉浦昌弘[3]　（理研・遺伝子解析、[1]北大・理・植、[2]北大・遺伝子、[3]名大・遺伝子）

光合成明反応を担う光化学系複合体の構成成分のうち、光化学系Ｉには１０種またはそれ以上の種類の成分蛋白質が見いだされている。これらは、核または葉緑体のゲノムにコードされている。葉緑体ゲノムＤＮＡの全構造は、既にＮ．ｔａｂａｃｕｍなどで決定されており、ｐｓａＡ、ｐｓａＢ、ｐｓａＣ、ｐｓａＩおよびｐｓａＪの各遺伝子産物が葉緑体ゲノムにコードされていることが明かとなっている。それ以外の成分蛋白質は核にコードされていると考えられる。

Ｎ．ｔａｂａｃｕｍより単離した光化学系Ｉ複合体からは、ＳＤＳ－ポリアクリルアミドゲル電気泳動法により２０種以上の成分蛋白質が見いだされた。演者らは、これらの構成蛋白質のＮ末端アミノ酸配列を調べ、さらに光化学系Ｉ複合体の泳動像をＮｉｃｏｔｉａｎａ属内の系統間で比較した。その結果、Ｎ．ｔａｂａｃｕｍにおける光化学系Ｉ複合体の構成成分の複雑さは、そのゲノムの異質倍数性によっておおよそ説明できることを明らかにした。

これらの研究をさらに進めるため、また光合成明反応の分子機構を明らかにするため、核にコードされる構成蛋白質のｃＤＮＡの解析を進めており、今回は９ｋＤａの蛋白質のｃＤＮＡの構造について発表する。この蛋白質は鉄・硫黄センターＡ・Ｂ アポ蛋白質より、見かけの分子量が約１ｋＤａ大きく、Ｎ末端アミノ酸配列から、葉緑体にはコードされていないことが明かであった。そこで、アミノ酸配列から予測される遺伝子の塩基配列を化学合成しＮ．ｔａｂａｃｕｍ及びその母系系統と考えられるＮ．ｓｙｌｖｅｓｔｒｉｓ由来のｃＤＮＡライブラリーを検索した。得られたクローンは、ほぼ全長の大きさがあると考えられ、コードされる蛋白質は１４６残基、計算分子量は１５ｋＤａであった。このうち５１残基以降の配列が、蛋白質の解析によって明かとなっていたアミノ酸配列と一致した。５１残基以降の配列の計算分子量は１０．３ｋＤａ であり、その中央にチラコイド膜を貫通すると思われる疎水性領域を持っていた。これらの事から、得られたｃＤＮＡクローンは光化学系Ｉの９ｋＤａ蛋白質をコードしていると考えられ、対応する遺伝子名をｐｓａＨとした。ｐｓａＨの植物種間での比較も議論したい。

2Cp04

エンドウフィトクロムＩ遺伝子－ＧＵＳ遺伝子融合体のペチュニアにおける発現制御

山下博史・米田好文・佐藤直樹[1]・内藤　哲
（東京大学・遺伝子実験施設、[1]東京大学・理・植物）

フィトクロムは、高等植物において光形態形成の制御に関与する光受容色素であり、種々の生理作用の中心分子である。フィトクロムタンパク質の理解は、近年非常に深まったが、生体内作用の分子機構の理解は乏しい。フィトクロム遺伝子の発現調節機構を解明するために、β－グルクロニダーゼ（ＧＵＳ）遺伝子をレポーター遺伝子として用いてエンドウフィトクロム遺伝子５上流域につないでペチュニアに導入し再生植物体における発現解析を行ったのでその結果を報告をする。

エンドウフィトクロム遺伝子５’上流域を プラスミド ｐＢＩ101.1 に結合させ 大腸菌 gusA遺伝子に 正逆の方向に融合させた 導入用プラスミド ｐＫ２ＨＡ８，ｐＫ２ＨＡ９を作成した。プラスミド ｐＫ２ＨＡ９は、gusA遺伝子が フィトクロム遺伝子に対してonの配向になり、ｐＫ２ＨＡ８は　その逆のプラスミドである。 この融合遺伝子を用いれば、酵素β－グルクロニダーゼ活性を追跡することにより 融合した上流部分の転写活性を推定することができる。これらのプラスミドをAgrobacterium を用いて ペチュニア葉断片に導入しカナマイシン抵抗性植物体を多数得た。ベクタープラスミドを プローブとしてサザン解析してＴ－ＤＮＡ部分が低コピー数導入され ＤＮＡ再編成が起こっていない導入体が得られた。 ｐＫ２ＨＡ９導入当代（Ｔ１世代）のβ－グルクロニダーゼ活性は、白色光下では　数pmol 4MU/min/mg protein しかないが、 ４日間暗黒下に置くと約５０％活性は上昇した。 Ｔ２世代の植物を ＭＳ培地、暗黒下で生育させ、酵素活性を調べてみると 明条件下での 50-250倍の活性が得られた。酵素活性のピークは最もよく増殖する１０日目から２０日目に見られた。Ｘ－glucを用いて 組織化学的に活性部位を染色してみると暗黒下で生育した植物のフック領域が 濃い青色に染まった。ＭＳ培地、明条件、８日令の植物を暗黒培養すると、活性は上昇し １０日目で暗黒下での最高活性と同等になった。この植物を染色すると 新たに伸長した部分ではなく、既存の葉の維管束に沿って活性染色された。

レポーター遺伝子を用いて フィトクロム遺伝子の発現調節様式を推定してみると分光学的分析、Northern解析により示されていた事実が、単一の遺伝子を用いて in vivo でも同一であることを示すことができた。

2Cp05

酵母におけるエンドウフィトクロムＩアポ蛋白質の発現とその解析

伊藤直子、°富澤健一、古谷雅樹 （理研フロンティア）

フィトクロムI(PI)は単量体分子量124kDaの光受容蛋白質で、その発色団が蛋白質部分に共有結合している。PI分子の構造を知るうえで発色団を持たないアポ蛋白質の構造の知見を得ることは重要であるが、こうした研究はこれまで発色団合成阻害剤で処理した植物体より得られるアポ蛋白質を対象にしてきた。一方、PIcDNAは５種類以上の異なった植物種より単離されており、このcDNAを適当な微生物に導入し発現させることができればPIアポ蛋白質を多量に得ることが期待でき、さらにアミノ酸の置換や欠損をともなうアポ蛋白質を得ることも容易になる。こうした観点から演者らはこれまで大腸菌を宿主としてエンドウPIアポ蛋白質の発現を試みてきたが、全翻訳領域を含む PIcDNAを導入したにもかかわらず分子量約100kDaのものしか得られなかった。この理由の一つの可能性としてエンドウと大腸菌との間のコドン使用頻度の差が考えられた。そこで宿主を大腸菌から酵母にかえたところ分子量約124kDaの蛋白質の発現が確認できたのでここに報告する。酵母発現ベクターとしてGAL7プロモーターを持つpAA7を用い、このプロモーターの下流にエンドウPIの全翻訳領域を含むcDNAを挿入しpPP3100を得た。このpPP3100を用い酵母菌CG380を形質転換した。形質転換体CG380(pPP3100)のライゼートをウエスタンブロット法により解析したところ、抗エンドウPI単クローン性抗体(mAP5)と反応する分子量約124kDaの蛋白質が検出された。この形質転換体を光学顕微鏡下で観察したところ大腸菌でみられた封入体様の構造は観察されず、また対照として用いたCG380(pAA7)とのあいだに形態的差異は認められなかった。次に、この蛋白質の効率良い発現のための培養条件を検討した。その結果、グリセリンを炭素源としたＹＰ培地において、ガラクトース添加による誘導後４時間でこの蛋白質が最も顕著に蓄積することがわかった。抗原決定基の異なる１２種類の抗エンドウPI単クローン性抗体を用いこの蛋白質に対する反応性を検討したところ１１種が反応した。このことは、この蛋白質がエンドウPIアポ蛋白質に対応していることを示している。さらに、このアポ蛋白質はN-,C-端をそれぞれ認識する抗体とも反応し、しかも分子量が約124kDaのことから全鎖長を含んでいる可能性が高い。以上の結果、このPIアポ蛋白質を利用した、発色団とアポ蛋白質の相互関係の研究の可能性が開けた。

2Cp06 シロイヌナズナ・熱ショックタンパク質遺伝子の発現解析

高橋卓・米田好文（東大・遺伝子実験施設）

真核生物の熱ショックタンパク質(hsp)は、分子量によって、hsp70(70kDa)、hsp90(80-90kDa)、低分子量hsp(15-30kDa)の３つに大きく分けられるが、それぞれのタンパク質の分子種や、その発現様式は、生物種によって異なる。我々は、高等植物におけるhspの機能と遺伝子の発現調節機構を明らかにする目的で、シロイヌナズナ(Arabidopsis thaliana)から、+/-スクリーニングにより、HSP17.4、HSP18.2のcDNA、及び対応する遺伝子クローンを単離した(1)。その後、スクリーニングで得られた他のcDNAクローンについても解析したところ、HSP17.6(2)、HSP70-1(3)、HSP81、及び、既知のものと相同性のないcDNAをもつクローンが含まれていることが明らかとなった。ここでは、HSP81に対応する遺伝子クローンを単離し、構造解析するとともに、各遺伝子の発現を調べた結果について報告する。

HSP81cDNAの部分クローンであったpTT2は、塩基配列の比較から、高等動物や酵母で知られている、hsp90ファミリーの遺伝子と非常に高い相同性を持っていることがわかった。このcDNAをプローブに、シロイヌナズナのゲノムライブラリーより得られた遺伝子クローン、λHS102の塩基配列から、この遺伝子は、翻訳領域に３つのイントロンをもち、700アミノ酸残基から成る、分子量81kDaのタンパク質をコードしていることが推定された。

遺伝子の発現に関して、35°C ２時間の熱ショック、あるいは、hsp合成を誘導する効果を持つとされるカドミウム、亜ヒ酸で植物を処理し、ノーザンブロット解析を行なうと、各遺伝子による反応の違いが認められた。これらの遺伝子の5'上流域には、hsp遺伝子に特徴的なコンセンサス配列である、HSE(Heat-Shock Element)様の配列が見出され、その数や存在位置によって、転写量が厳密に調節されていることが示唆される。

さらに転写調節の分子機構を解析するための系として、HSP::GUS融合遺伝子をもつ、トランスジェニック・アラビドプシスをすでに作成しているが、これを用いた、hsp遺伝子発現に関わる突然変異株単離の試みについても検討したい。

(1)Takahashi,T. and Komeda,Y. (1989) Mol Gen Genet 219:365
(2)Helm,K.W. and Vierling,E. (1989) Nucl Acids Res 17:7995
(3)Wu,C.H. et al. (1988) Plant Physiol 88:731

2Cp07

トランスジェニック・アラビドプシスにおける ダイズ種子貯蔵蛋白質遺伝子発現の変異株を用いた解析

内藤　哲、米田好文　（東京大学・遺伝子実験施設）

ダイズ（Glycine max）は有用植物であることや種子が大きく研究材料として便利なことから、その種子貯蔵タンパク質に関して多くの生理・生化学的研究がなされている。7S種子貯蔵タンパク質（β-conglycinin）はα'、α及びβの3つのサブユニットから成り、いずれも成熟中～後期の種子で特異的に発現するが、各サブユニットの発現パターンを比較すると、種子成熟過程での発現時期、植物ホルモンに対する応答性、硫酸イオン欠乏など環境要因に対する応答性などの点で異なった制御を受けていることが知られており、発現制御を解析する系として興味深い。一方、アラビドプシス（Arabidopsis thaliana）はアブラナ科の一年生植物で、植物体が小さいことや世代時間が短いこと、ゲノムサイズが小さいことなどから、高等植物における遺伝学的実験材料として有利であり、すでに多くの突然変異株の蓄積がある。本研究はダイズの7S種子貯蔵タンパク質遺伝子をアラビドプシスに導入し、導入した遺伝子の発現制御を遺伝学的に解析しようとするものである。

アラビドプシスではアブシジン酸（ABA）欠損変異株（aba）及びABA非感受性変異株（abi1、abi2、abi3）が分離されている。β-サブユニット遺伝子を導入したトランスジェニック・アラビドプシスにこれらの変異を交配により導入し、β-サブユニットの蓄積を調べた。その結果、aba及びabi3変異株ではβ-サブユニットの発現が低下し、abi1及びabi2変異株では反対に上昇した。

α'及びβ-サブユニット遺伝子から5'領域を切り出し、β-グルクロニダーゼ（GUS）の構造遺伝子とつないでアラビドプシスに導入した（Pα'-GUS, Pβ-GUS）。このトランスジェニック・アラビドプシスの未熟果実のGUS活性の経時変化パターンはPα'-GUSとPβ-GUSとで異なり、ダイズにおける差異を反映していると考えられた。Pα'-GUSを持ったトランスジェニック・アラビドプシスの種子は1粒で容易に検出可能なGUS活性を持ち、この種子を発芽させて得た双葉でもなお高い活性を残していた。このことを利用して、α'-プロモーターの発現制御に係わるアラビドプシス変異株のスクリーニングを行なっている。これまでに、およそ16,000株のスクリーニングを終え、GUS活性が低いもの約20株について、野生型株及び親株との検定交雑を行なっている。

2Cp08

トランスジェニック植物におけるダイズ種子貯蔵タンパク質遺伝子発現の栄養条件による制御

横田優美[1]、藤原徹[1]、内藤哲[2]、米田好文[2]、茅野充男[1]
（東大・[1]農学部、[2]遺伝子実験施設）

ダイズ種子貯蔵タンパク質の1つである7Sタンパク質（β-コングリシニン）は、主にα、α'、βの3つのサブユニットから成るが、β-サブユニットの遺伝子はいくつかの点でほかの2つとは異なる発現制御をうけていると考えられている。その1つに、栄養条件による発現制御がある。成熟型β-サブユニットタンパク質はL-メチオニン残基を全く含まないが、その発現量は、ダイズ植物をSO_4^{2-}欠乏条件下で栽培することにより上昇し、逆にL-メチオニンを添加した培地で未熟種子を培養することにより抑制される。これらの現象はα及びα'-サブユニットではみられない。演者らは、βサブユニット遺伝子をペチュニア及びアラビドプシスに導入し、上記の発現制御の機構を解明するための系の開発を行っている。遺伝子導入には、Agrobacterium tumefaciens のTiプラスミド由来のベクターを用いた。得られたトランスジェニック・ペチュニア及びアラビドプシスを用いて、これらの植物においてもダイズ同様にSO_4^{2-}及びL-メチオニンに対する応答がみられるかどうかを調べた。トランスジェニック・ペチュニアにおいてL-メチオニンによりβ-サブユニットの発現が抑制されたことはすでに報告した（89年度土壌肥料学会）。今大会では、SO_4^{2-}欠乏に対するトランスジェニック・アラビドプシス及びペチュニアの応答について報告する。

トランスジェニック・アラビドプシスを用いた養液栽培を行い、通常培地(1.5mM SO_4^{2-})とSO_4^{2-}欠乏培地(20μM SO_4^{2-})とで完熟種子を得た。これらの種子より抽出したタンパク質をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけ、ウエスタンブロッティングの後、抗7Sタンパク質抗体を反応させたところ、SO_4^{2-}欠乏培地の種子では通常培地の種子に比べ十数倍に近い量のβ-サブユニットが発現していることがわかった。また、トランスジェニック・ペチュニアを通常培地とSO_4^{2-}欠乏培地とで水耕栽培し、得られた完熟種子より抽出したタンパク質を同様の方法で調べた結果、SO_4^{2-}欠乏培地の種子では通常培地の数倍程度発現が促進されていた。以上の実験から、異種植物であるアラビドプシスやペチュニアにおいてもダイズと同様にSO_4^{2-}に応答する機構が存在することが示唆された。これらトランスジェニック植物の系を用いて、β－サブユニットの発現制御に関わる因子の変異株を分離・解析することができよう。

2Cp09

トランスジェニック・アラビドプシスにおけるペチュニア カルコン合成酵素遺伝子ＣＨＳ－Ａ::ＧＵＳ融合遺伝子の糖による発現制御

塚谷裕一・大嶋利幸[1]・内藤哲・茅野充男[1]・米田好文
（東京大学・遺伝子実験施設、[1] 東京大学・農・農芸化学）

ペチュニア(Petunia hybrida) から、花弁特異的な遺伝子としてオランダ・フリー大学のMol 博士らによって単離されたカルコン合成酵素のアイソザイム、ＣＨＳ－Ａ遺伝子の器官特異発現の解析を目的として、ＣＨＳ－Ａ遺伝子の上流域約 1kbとβ-glucuronidase（ＧＵＳ）遺伝子との融合遺伝子（ＣＨＳ－Ａ::ＧＵＳ）を作成し、Ｔｉプラスミドを用いてペチュニアとアラビドプシス(Arabidopsis thaliana)に導入した。その結果得られたトランスジェニック植物について融合遺伝子発現の器官特異性を従来法を改良した組織化学染色法などを用いて解析したところ、トランスジェニック・ペチュニアでは本来の発現様式を再現し、花弁において特に強い発現が認められた（塚谷ら、1989年度日本植物学会大会）が、トランスジェニック・アラビドプシスではそのような顕著な花弁特異性は認められなかった。ただし、光誘導性のあること、また、器官特異性についても、茎・根では発現が非常に弱いのに対して葉状器官では強い傾向がある点では両種で一致した。これらの事実は、この遺伝子の発現調節がいくつかの単位に分かれて機能していることを示唆する。

一方、カルコン合成酵素はアントシアニン合成系のキーエンザイムであるが、アントシアニン合成系が糖によって制御を受けていることを示唆する現象が古くから知られていながら、その解析はなされていなかった。本研究では初めてこの点について解析し、ＣＨＳ－Ａ::ＧＵＳ融合遺伝子がトランスジェニック・ペチュニアでもトランスジェニック・アラビドプシスでも糖による発現調節を受けていることを確認した。この発現誘導現象は、glucose および sucroseを投与した場合には体内への糖の取り込み・蓄積と平行して認められたが、 mannitol を与えた場合には認められなかった。また、この誘導は光に依存しなかった。また、トランスジェニック・アラビドプシスで根においては糖による発現誘導は認められなかった。したがって、この糖による発現誘導は器官特異性の支配下にあると考えられる。

他方、通常条件で栽培した植物体での器官毎の糖の蓄積量を測定したところ、ペチュニアでもアラビドプシスでもその蓄積量と、それぞれの器官でのＣＨＳ－Ａ::ＧＵＳ融合遺伝子の発現量との間に強い相関が認められた。

更に、糖で発現が誘導されることが知られているサツマイモのスポラミン遺伝子との共通配列もＣＨＳ－Ａ遺伝子の上流域の中に見付かった。

以上の結果から、ＣＨＳ－Ａ遺伝子の発現調節に細胞内の糖の蓄積量が大きく関与していることが示唆された。

2Cp10

Developmentally regulated expression of a chalcone synthase promoter-GUS chimeric gene in tobacco

D. Wing、 K. Fritze*、 加藤 明、 J. Schell*

・農業生物資源研究所、 *Max-Planck-Institut fur Zuchtingsforschung, Koln, FRG

Chalcone synthase (chs), the branch point enzyme for the flavonoid biosynthetic pathway, is transcriptionally regulated in plants depending on the need for flavonoids. The Antirrhinum majus chs gene promoter and a number of deletion mutants were fused to the beta-glucuronidase (GUS) gene, first, to identify sites of active GUS expression, an indication of probable tissues synthesizing flavonoids, and second, to delimit those sequences of the promoter involved in gene regulation, whether as a regulatory or enhancer sequence.

In situ staining for GUS activity in tissues of transgenics carrying a 1.2 kbp promoter fused to GUS identified the pigmented cells of the petal and the epidermal cells of UV-induced leaves to be GUS positive. Northern blot analysis of the UV irradiated leaves confirmed the co-regulated transcription of the reporter gene and the endogenous chs gene. Further staining tests unexpectedly revealed tissue- and stage-specific expression in roots of 4 week old seedlings and developing seeds 3 days after anthesis.

Deletion analysis of the promoter defined 2 regions of major importance. The first 257 bp of the promoter regulated the gene under all circumstances examined above, but at reduced levels of activity. This quantitative effect could be partially attributed to a 47 bp direct repeat located at position -670 to -564. Deletion of the direct repeat from the 1.2 kbp promoter reduced expression to levels near that of the shortened promoter in all tissues examined, except petals. However, addition of the repeat alone to the sequences up to -257 could not restore full expression. The direct repeat may act in concert with the other flanking sequences in a tissue-specific manner, suggesting a complex chs promoter structure to allow expression in response to a variety of conditions.

2Cp11

形質転換タバコにおける外来遺伝子の発現と遺伝

加藤　明　・農業生物資源研究所

タバコ N. tabacum, SR1 に、プラスミド pBI121 および pGDW83-35SGUS をもちい、アグロバクテリウムによって 35S-GUS 遺伝子を導入し、再生個体T1および後代T2でのGUS活性を調べた。無菌的に培養したタバコ葉から6mmの切片を打ち抜き、アグロバクテリウムの一夜培養に浸してからＭＳ塩類－Ｂ５ビタミン、 1ug/ml BAP, 0.1ug/ml IAA および３％蔗糖を含む寒天培地に２日間培養し、さらに500ug/ml クラフォラン、50ug/ml カナマイシンを含む培地にて培養を続けた。約１カ月で数ｍｍのシュート形成がみられ、数ｃｍに成長したシュートを50ug/mlカナマイシンを含むＭＳ－Ｂ５ビタミン、１％蔗糖、300ug/mlクラフォラン培地にて発根させ、発根したものを温室で育てて種子を採取した。 pBI121 で形質転換した植物の19/28（約７０％）ではカナマイシン耐性形質がＴ２において３： １に分離し、3/28（１０％）は１５： １,6/28はカナマイイシン感受性であった。多くのＴ２芽生えでは、GUS活性の高い個体と、その約1/2 の活性の個体の分離がみられ、gene dosage 効果によるものと考えた。カナマイシン耐性形質とGUS 活性発現の連鎖は完全でなく、Ｔ２の7/19（３５％）では GUS 活性はなかった。Ｔ２芽生えの根および葉の GUS 活性はタンパク質あたりでは同じであった。以上は従来の知見をほぼ追認したものであるが、興味深い現象として次が観察された。１．若干のＴ２芽生えではカナマイシン耐性植物では GUS 活性が低く、感受性の植物が高い活性を示した。２．Ｔ１植物の GUS 活性が低く、Ｔ２芽生えで活性が高くなる例があった。この逆（Ｔ１で高くＴ２で低い）もあった。３．多くのＴ１では花弁の GUS 活性は葉より低かったが、花弁の方が高いものがあった。４．イネ貯蔵タンパク質遺伝子およびキンギョソウカルコン合成酵素遺伝子プロモーターからの組織特異的 GUS 遺伝子発現では程度の差はあるものの大部分のＴ１でGUS 活性を検出したが、３５Ｓ－ＧＵＳ遺伝子では活性の検出されないものが５０％以上あった。

2Cp12

植物における転写因子の構造と機能Ⅰ．　ｃＤＮＡ及び遺伝子の解析から明らかにされた核タンパク因子の構造とその特徴

高瀬尚文、○三上浩司、高山しのぶ、坂本綾子、野沢康平、*中山卓哉、多羽田哲也、岩淵雅樹（京大・理・植物、*北大・理・植物）

コムギヒストンＨ３遺伝子の上流域に存在するヘキサマー配列（ＡＣＧＴＣＡ）は、転写のシス調節配列であり、そこにはコムギ核タンパク質ＨＢＰ－1a（histone DNA binding protein-1a）とＨＢＰ－1bが特異的に結合する。植物ヒストン遺伝子はその5'上流域のヘキサマー配列とオクタマー配列（ＣＧＣＧＧＡＴＣ）の存在様式からこの両者を持つタイプⅠと、オクタマー配列のみを持つタイプⅡとに分けられる。このことは、ヘキサマー配列とＨＢＰ－1aあるいはＨＢＰ－1bの特異的結合が、上記Ｈ３遺伝子を含むタイプⅠヒストン遺伝子の転写調節にかかわっていることを示唆している。ＨＢＰ－1aがＨ３遺伝子のヘキサマー配列にのみ特異的なのに対して、ＨＢＰ－1bは、カリフラワーモザイクウイルスの35Ｓプロモーターや、アグロバクテリウムTiプラスミドのＴ－ＤＮＡ上のオーピン合成酵素遺伝子のプロモーター中に存在するヘキサマー及びヘキサマー類似配列にも特異的に結合することが示されている。このことは、ウイルスやアグロバクテリウムの感染におけるＨＢＰ－1bの重要性を示唆するものであろう。

ＨＢＰ－1aとＨＢＰ－1bをコードするｃＤＮＡの構造解析により、前者はプロリンに富む領域と塩基性領域／ロイシンジッパーを、後者はグルタミンに富む領域と塩基性領域／ロイシンジッパーを持つことが明らかとなった。さらに、ＨＢＰ－1aについては、欠失タンパク質による解析から、塩基性領域／ロイシンジッパーを含む領域のみでＤＮＡへの特異的結合が可能であること、ＧＣＮ４やＣＲＥＢのようにホモダイマーを形成し得ることなどが確かめられた。また、高度精製標品を用いて、ＨＢＰ－1bがリン酸化されていることも確かめられた。以上の特徴は、両因子が、タイプⅠヒストン遺伝子及び他の植物遺伝子の転写調節にかかわる転写因子であることを強く示唆するものと考えられる。現在、両タンパク質のコムギＨ３遺伝子の転写調節における役割分担について解析中である。

2Dp01

エンドウ胚軸におけるフィトクロム発色団の生合成に対するFeケラターゼ阻害剤(N-Methyl Mesoporphyrin IX)の効果について。

許斐康嗣[1],李合生[1・2],古谷雅樹[1]（[1]理研・国際フロンティア,
[2]武漢華中農業大学）

【目的】赤・近赤外光可逆的反応の光受容体フィトクロムは、単量体分子量12万のアポ蛋白に開環テトラピロール（フィトクロモビリン）を結合した色素蛋白である。我々は、アラスカエンドウ種子胚軸に於て、フィトクロモビリンの最初の前駆体は、他のテトラピロールと同様にδ-アミノレブリン酸(δ-ALA)であることを、クロロフィル合成阻害剤Gabaculine(Gardner & Gorton 1985)を用いて示した(Konomi & Furuya 1986)。しかし、フィトクロモビリンの生合成が他のテトラピロール合成経路のどの段階から分岐し、いかなる独自の経路を持つのか依然として不明である。そこで本研究では、テトラピロール合成経路で大きな分岐点となるプロトポルフィリン(Proto)からプロトヘムへの反応を触媒するFeケラターゼの阻害剤NMMP(N-Methyl Mesoporphyrin IX)(DeMatteis et al. 1980)の、フィトクロム生成に対する影響をエンドウ種子胚軸(Konomi et al. 1985)を用いて調べた。

【材料と方法】エンドウ種子胚軸0.1gをNMMPを含む0.2%の寒天培地（暗黒下25℃）で培養した。次に胚軸を、ステンレス製キュベットのガラス板と濾紙の間に詰め、近赤外光と赤色光照射後の差スペクトルを測定した。フィトクロム量は、660nmと730nmの最大吸収変化量ΔΔA＝1を示す時、1 Unitとして表した。

【結果と考察】80μMのNMMP存在下で24時間培養した胚軸の場合、分光光学的に検出されるフィトクロム量は対照の50%以下であった。但しこの場合、生重量は対照と殆ど差がなかった。この結果は、フィトクロモビリンの生合成が、紅藻類に於けるフィコシアノビリンの生合成と同様に(Beale & Chen 1983)、ProtoにFeを結合するFeケラターゼの阻害剤NMMPによって阻害されることを示している。従って、フィトクロモビリンの生合成過程は、8分子のδ-ALAから作られたProtoがMgを結合してMg-Protoとなりクロロフィルを形成する経路と異なり、ProtoがFeを結合してプロトヘムに至る経路を通り、その後Feを解離する段階を経る可能性が強く示唆された。この仮説を検証するために、現在、ヘムの分解産物として知られているビリベルジンやビリルビン等により、NMMPのフィトクロム生成阻害効果が回復されるか否かを検討している。

2Dp02

フィトクロム発色団の分子内配向および光変換にともなう変化
intact と large フィトクロムの比較

°徳富　哲・三室　守　（基生研）

我々はアラスカエンドウ黄化組織より精製したlargeフィトクロム（サブユニット分子量、114,000）の配向試料をゲルスクィーズ法により調製し、その赤色光吸収領域の直線偏光二色性（ＬＤ）を測定し、Ｐrはゲル伸長方向に対して負のＬＤを示すのに対してＰfrは正のＬＤ示す事を報告した(徳富＆三室、植物生理学会1989年度年会)。さらに青色光吸収領域のＬＤを測定し、Ｐrは同領域ではＬＤを示さずＰfrも微小な正のＬＤしか示さない事も報告した（徳富＆三室、植物学会54回大会）。得られた結果に、Ｘ線小角散乱法に基き提出された二量体分子モデル（Tokutomi et al.1989, FEBS Lett.247,139-142）を考慮にいれた解析を行い、二量体分子モデルの二回回転対称軸（C_2軸）に対するＰrの発色団遷移モーメントの平均配向角は59または121°で、Ｐfrではそれが52または128°に変化する（magic angle, 54.7または125.3°を境にして大から小へ変化する）と計算された。同変化は、偏光受容に関与するフィトクロムが生体膜に結合して軸対称回転をしていると考えると、赤・近赤外光に対する最適偏光受容面の方向を定性的に説明する（Tokutomi & Mimuro 1989,FEBS Lett.255,350-353）。Ｐr-Ｐfr光変換に伴う配向角変化量は7°で、無配向オート麦・フィトクロム試料についてphotoselection法を用いて得られた回転角30-32°よりかなり小さく、その理由は発色団遷移モーメントの変換平面がC_2軸とＰr発色団遷移モーメントとが作る平面に対して垂直に近い角度をなしている事によると考えられる。

今回はアラスカエンドウ黄化組織より精製したintactフィトクロム（サブユニット分子量、121,000）について同様な測定を行なったところ、Ｐr、Ｐfrともに赤色光吸収帯でＬＤが検出限界以下という結果が得られた。その理由として、①intactフィトクロム分子がlargeフィトクロム二量体モデルと同様な構造を持ち、ゲル中でlargeフィトクロムと同様な配向をしているとすれば、Ｐr・Ｐfrともに発色団遷移モーメントとC_2軸がなす角度がmagic angleに近い、②largeフィトクロムに欠落するＮ-末端ポリペプチドのせいで、intactフィトクロム分子のゲル中の配向度が低下した、の二つの可能性が考えられる。後者の場合ゲル中のintactとlargeフィトクロムの構造がかなり異なっている可能性もある。現在これらの可能性を配向試料の蛍光偏光解消等の方法を用いて検討中である。

2Dp03

エンドウ・フィトクロムの共鳴ラマンスペクトル、
Ｐr型largeフィトクロムに対する重水置換効果

°徳富　哲・水谷泰久*・北川禎三*（基生研、*分子研）

フィトクロム光変換の分子機構に関しては、開環テトラピロールよりなる発色団のC_{15}-C_{16}間の異性化反応やプロトン移動反応の関与が示唆されているが、Ｐr、Ｐfrおよびその光変換反応中間体の正確な分子構造はまだ解明されていない。共鳴ラマン分光法は、蛋白質発色団の分子構造解析のための有用な手法であるが、フィトクロムに関しては強い蛍光に妨げられてこれまでラマン散乱スペクトルを得ることができなかった。最近Ｐrを750nm励起によって（preresonance）77Kで測定した結果と、surface enhanced法を用いて蛍光を抑えて77Kで測定した結果が発表された。前者はピークのＰr、Ｐfrへの帰属に不確定要素を持込む恐れが有り、後者の場合、銀電極吸着スペクトルと銀コロイド粒子吸着スペクトルに違いがあり吸着によるフィトクロムの変性の問題が持込まれる。そこで我々はよりintactな条件で共鳴ラマン散乱スペクトルを得るべく、フィトクロムを溶液状態でSoret band励起による測定を試みスペクトルを得るのに成功した（1989年生物物理学会予稿）。今回重水置換効果から、ＰrとＰfrの発色団が異なるプロトン化構造を持つ事を示す結果を得たので報告する。

ラマンスペクトルの測定は、アラスカ・エンドウ黄化組織より精製したlargeフィトクロムの水溶液または重水溶液（pH(D) 7.8 と 9.0）を288±3°KでKr⁺（407nm）またはAr⁺（364nm）レーザーで励起し、フォトダイオードアレイ検出器でマルチチャンネル測定を行なった。その際励起光照射によって引き起こされる光定常状態中のＰrあるいはＰfrのモル分率を大きくするために、それぞれTi-doped saphire（740nm）またはHe-Ne（633nm）レーザーの同時照射を行なった。ラマンスペクトルの各ピークのＰr、Ｐfrおよびlargeフィトクロムに特異的な第三成分であるＰblへの帰属は、同条件（二重光照射下）で測定した試料溶液の吸収スペクトルから計算した各成分の相対比に基づいて行なった。

その結果、407nm励起で顕著にみられるＰfr由来の1630および1589cm^{-1}の二つのピークは重水素化によってシフトを示さないのに対して、364nm 励起で見られるＰr由来と考えられる二つのピーク（1625および1587cm^{-1}）のうち前者が7cm^{-1}の低波数側へのシフトを示すことから、Ｐrは発色団にプロトン化構造を持つのに対して、Ｐfrはプロトン化構造を持たないかあるいはＰrと異なるプロトン化構造を持つことが解った。

2Dp04

イネフィトクロム遺伝子導入タバコにおける光による成長制御

長谷あきら[1]、S. A. Kay[2]、M. Deak[2]、N.-H. Chua[2]、古谷雅樹[1]（[1]理研・国際フロンティア、[2]Rockefeller 大）

フィトクロムは緑色植物界に広く存在する単量体分子量約12万の色素蛋白質で、遺伝子の発現をはじめとする様々な赤・近赤外光光可逆的反応の光受容体として重要な役割を果たしている。最近では、単離したフィトクロム遺伝子を植物体に導入し、分光光学的活性を持つフィトクロムを発現させることが可能になり（Keller et al., 1989; Boylan & Quail, 1989; Kay et al., 1989）新しい研究の可能性が開けてきた。しかし、導入したフィトクロムの生理活性についてはまだよくわかっていない。そこで、本研究では、フィトクロムが茎の伸長を抑制することに注目し、外来フィトクロムを過剰に発現している遺伝子導入タバコの下胚軸の成長に対する光の影響について解析を行った。

［方法］ 遺伝子導入タバコ植物体は、単離イネ・フィトクロムI（PI）遺伝子を挿入した植物形質転換用 Ti プラスミドベクター pMON530-E9 を、*Agrobacterium* を用いた方法でタバコ（品種；Xanthi）に導入し（Kay et al., 1989）、得られた遺伝子導入植物体のなかで実際にイネ PI mRNA の発現が確認されたもの3系統を実験に用いた。また、対照としては、野生種のほかに同じ Ti ベクターを用いて他の遺伝子を導入したタバコ2系統を用いた。光による茎の伸長の阻害については、寒天上に種子を蒔き、暗所または白色蛍光灯下で7日間培養後下胚軸の長さをはかった。

［結果と考察］ イネPI遺伝子を導入したタバコ3系統の自花受粉により得た F1 世代の種子を弱光下（白色光、約0.01Wm^{-2}）で培養したところ、下胚軸が対照に比べて短いもの（約5mm）と対照と同程度の長さのもの（約11mm）が3：1に分離した。一方、フィトクロム以外の遺伝子を導入したタバコ2系統の F1 世代では全ての個体の下胚軸が野生種型であった。さらに、イネ PI 遺伝子導入タバコのうち下胚軸が短いものと長いものそれぞれについて、導入した遺伝子のマーカーである Km 耐性について調べたところ、下胚軸が短いものは耐性を示し、長いものは非耐性であった。これらの結果は、弱光下で観察された下胚軸の矮化が導入した PI 遺伝子によることを示唆している。さらに、暗所ではイネ PI 遺伝子導入タバコにおいても下胚軸の矮化はみられず、この現象が光依存であることが示された。しかし、強光下（白色光、約1.5Wm^{-2}）では対照の植物の下胚軸も短いため、遺伝子導入タバコとの間に明確な差は認められなかった。以上の結果は、イネ PI 遺伝子導入タバコでは PI が過剰に存在するため光に対する感受性が高まっている可能性を示唆している。現在、この現象の波長依存性とイネ PI 蛋白質の有無についても実験を進めているので、その結果についても述べる予定である。

2Dp05

シダ原糸体細胞の葉緑体光定位運動にともなうアクチンフィラメント構造の変化

° 門田明雄・和田正三（都立大・理・生物）

ホウライシダ原糸体細胞はフィトクロム依存，青色光吸収色素依存の葉緑体光定位運動を示す(Yatsuhashi et al 1985)．最近，我々はRhodamine-phalloidin によるF-actin 染色により，赤色偏光および青色偏光照射下で弱光定位反応を誘導した葉緑体の周縁部には，暗所には見られないリング状のアクチンフィラメントが形成されることを報告した（Kadota and Wada 1989, Protoplasma 151:171)．今回は微光束による細胞部分照射により弱光および強光の光定位反応を誘導し，リング状アクチンフィラメント形成過程を調べた．

原糸体は1週間赤色光下で培養した後，6時間白色光照射し，その後，暗所に2日間置いたものを用いた．原糸体の部分照射は微光束照射装置により，20 μm幅の微光束を用いて行った．Rhodamine-phalloidin によるF-actin 染色はSonobe and Shibaoka (1989)の方法を改変して行った(Kadota and Wada 1989)．

弱光反応　0.6 Wm^{-2}の赤色光あるいは青色光で反応を誘導した．葉緑体の照射部位への集まりは照射開始後 1h ほどで明らかとなり，以後，時間とともに葉緑体数が増加する．葉緑体周縁部のリング状アクチン構造は 1h で見え始め，2-3h でほとんどの個体で明らかとなる．非照射部の葉緑体にはこの構造は見られない．3h の微光束照射の後，暗所に移すと葉緑体は 約 3h の後，分散し始める．アクチンのリング構造は暗所 1h では顕著であるが 2h で不明瞭となり，3-4h でみとめられなくなる．

強青色光反応　強青色微光束（14 Wm^{-2}）を照射すると，葉緑体は照射部から逃避し，照射部の暗所側に集まる．アクチンのリング構造はこの場合にも出現し，弱光反応と同様な時間経過を示す．

強赤色光反応　強赤色微光束（690 Wm^{-2}）の照射では，葉緑体は照射部から逃避するが，強青色光の場合と異なり，微光束の暗所側には集まらない．この場合には 5h の照射によってもリング状構造はみとめられなかった．

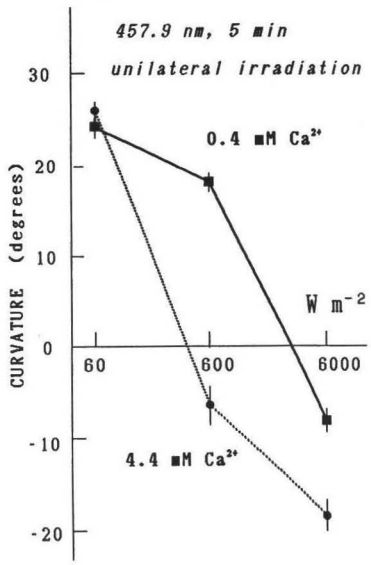
以上の結果，光定位下で見られる葉緑体周縁部のリング状アクチンは，葉緑体が光定位した後に形成され，定位部位から分散し始めるとともに消失することがわかった．このことは，この構造が光定位下での葉緑体のanchoring に働いていることを示唆する．

2Dp06

カルシウムと強い一方向レーザー（458 nm）光照射による
フシナシミドロの負光屈性の誘導.

片岡博尚　（東北大学　遺伝生態研究センター）

黄緑色藻ケノサイト、オカフシナシミドロ（Vaucheria terrstris）は光強度が増すに従って正から負へ光屈性の方向が変わる。これはごく一般的な現象に見えるが、実は、藻類から種子植物を通じてフシナシミドロ以外の植物では見つかっていない。（Pfefferの教科書（1904）の記載中、フシナシミドロについてだけが正しかった）。通常の光源と干渉フィルターで得られる数 W m^{-2}の青色光では負光屈性が起こるまでに長時間かかり、数量的解析はできなかった。そこで、演者は一方向青色光照射と同時に上から背景光として強い青ー緑の光を照射する方法を開発し、１０分程度の照射で屈曲転換を起こすことに成功した。そして、正から負への屈曲方向の逆転は背景光強度と外液のＣａ$^{2+}$に依存していることを発見し、両者に相反則が見られることから先端成長域での青色光に依存したＣａ$^{2+}$流入があり、強い背景光によりＣａ$^{2+}$濃度がある値以上に高まることが屈曲方向逆転の原因となっていると考えた。確かに全てのＣａ$^{2+}$チャンネルブロッカーは屈曲転換を阻害し、Ｃａイオノフォアは背景光無しで負屈曲を引き起こした（1988a,b, 1989a,b,c）。



Ca-dependent negative phototropism caused by strong unilateral blue laser pulse.

背景光を同時照射して起こる負屈曲が、低強度の青色光一方向照射で長時間かかっておこる負屈曲と同じ現象であるか否かを検討するため、基礎生物学研究所の強力なアルゴンレーザー（458nm）を用い、背景光無しで５分程度の一方向光照射が負屈曲を起こすかを調べた。その結果、予測通り、Ｃａ$^{2+}$存在下で、強光の短時間照射が屈曲転換を起こすことがわかった。本実験は1989年度基礎生物学研究所大型スペクトログラフ共同利用実験によるものである。記して関係諸氏に謝す。

Pfeffer, W. 1904 Pflanzenphysiologie. p.573;
Kataoka, H.(1988) Pl. Cell Physiol. 29:1323-30;
--(1989) In Plant Water Relations and Growth under Stress. pp.392-94, Yamada Sci. Found.,Myu K.K., Tokyo; -- 植物生理学会('88,'89) 植物学会('89)

2Dp07　クリノスタット上のアベナ子葉鞘の光屈性（Ⅱ）

三好泰博、森安裕二（静岡県大・教養・生物）

光屈性におよぼす重力の影響を明らかにするため、芽生えの伸長方向に見かけ上０Ｇから１Ｇまで任意の重力加速度をかけることのできるスレショールド形光照射装置付一次元クリノスタットを製作した。この装置の詳細は前年度の日本植物生理学会年会で報告した。今回はこの装置を使用して得た２，３の結果について報告する。

〈材料と方法〉１％寒天培地上に種子まき後、25℃、赤色光連続照射下で66時間発芽生長させたアベナの子葉鞘（約２cm長）を測定材料とした。刺激光照射後の屈曲角の経時変化はクリノスタットに取り付けられたＣＣＤカメラ（Canon　Ci－２０)からの映像をタイムラプス機構付ビデオレコーダー（Victor　ＢＲ－９０００）とビデオコピープロセッサ（Mitsubishi　ＳＣＴ－Ｐ75）とで処理し測定した。

〈結果〉水平から垂直までクリノスタットの回転軸の角度を０°、約15°、30°、約49°、90°と変えることにより、子葉鞘の伸長軸方向のＧをそれぞれ０Ｇ、0.25Ｇ、0.5Ｇ、0.75Ｇ、１Ｇと変えることができる。子葉鞘に刺激光を照射した後、前記角度で回転しているクリノスタット上に置いた場合の屈曲角の経時変化を図１に示す。この図から重力屈性の影響が顕著に見られ始める屈曲角や時間は軸方向のＧの減少にともないより大きい方へと移行することがわかる。図２は静置した場合と垂直にして回転した場合とについて、総照射光量を変えた時の屈曲角の経時変化を示したものである。この図で注目すべき点は照射光量によって屈曲角の大きさに違いはあるが、軸方向のＧが１Ｇであるならばいずれの場合でも重力屈性の影響が顕著に見られ始めるのは、光照射後約90分後ということである。

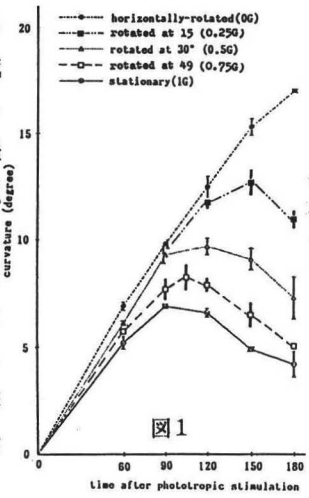


図1

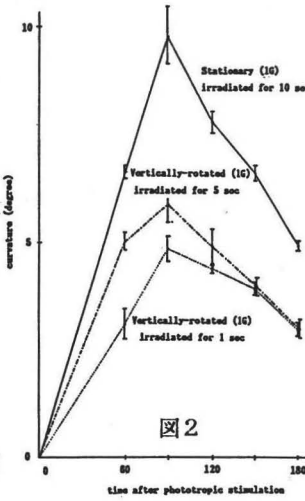


図2

2Dp08

カニクサ胞子発芽に対する光およびジベレリンの作用の相互関係について

加川貴俊、菅井道三（富山大・理・生物）

シダ植物の胞子は一般に暗所では発芽することができないが、カニクサLygodium japonicum の胞子の場合には赤色光照射やＧＡ$_3$ 処理により発芽を誘導することができる。これまで、光あるいはジベレリンといった環境情報の受容から胞子発芽に至るまでに、どのような過程が存在しているかについては、ほとんど明らかにされていない。そこで、赤色光またはＧＡ$_3$ による発芽誘導に対するカルシウムの作用、および赤色光とジベレリンとの相互関係を調べることにより、フィトクロムにより制御されるカニクサ胞子発芽の初期反応の解明を試みた。

ＥＧＴＡを含む培地中では赤色光及びＧＡ$_3$ によるカニクサ胞子の発芽誘導は認められないが、Ｃａ$^{2+}$やＳｒ$^{2+}$を与えると発芽が誘導される。カルシウムチャンネルの阻害剤として知られているＬａ$^{3+}$、Ｃｏ$^{2+}$は同じ濃度で赤色光及びＧＡ$_3$ による発芽誘導を阻害した。また、カルモジュリンのアンタゴニストであるＷ－７も発芽を阻害した。発芽を抑えるＥＧＴＡを含む培地中で光を照射した直後または16時間後にＣａ$^{2+}$を加えてもフィトクロムのエスケープ反応には差が認められなかった。つまり発芽過程のうちＰfrを必要とする過程ではＣａ$^{2+}$は関与しないことがわかった。さらにＣａ$^{2+}$を光照射後24時間までに加えれば発芽を誘導することができた。

ジベレリン合成阻害剤であるＡＭＯ１６１８は赤色光により誘導される発芽を抑制したが、ＧＡ$_3$による発芽誘導は抑制しなかった。さらに培地中のＧＡ$_3$は胞子の発芽に対する赤色光の感度を増加させた。

つぎに赤色光およびＧＡ$_3$ 誘導における温度の効果を調べた。その結果、赤色光による発芽誘導は照射後の温度に大きく依存し２０℃では発芽はほとんどみられなかった。一方、ＧＡ$_3$ による発芽誘導では低温による阻害効果は認められなかった。

赤色光誘導の発芽に阻害効果を示す青色光はＧＡ$_3$ 誘導には効果が認められなかった。

以上の結果はカニクサでは赤色光により胞子内でジベレリン合成が誘導され、合成されたジベレリンにより発芽を引き起こされるものと考えられる。

2Dp09 蘚類ケヘチマゴケ原糸体の生長を誘導する光質について

江口 亨・逸見光明（山口大・理・生物）

蘚類原糸体の光による反応は種によって異なる結果が報告されている。原糸体の光屈性反応はPhyscomitrium turbinatumでは赤色光・近赤外光で共に誘導される（Nebel,1968）が、Ceratodon purpureusでは赤色光ー近赤外光可逆反応がみられる（Hartmann,1983）と報告されている。演者らは蘚類ケヘチマゴケの光反応について次の点を明らかにしてきた。この胞子の光発芽には赤色光ー近赤外光可逆反応がみられるが、胞子からの出芽部位（ORIENTATION）は赤色光・近赤外光で共に誘導される（1988-1989）と報告してきた。今回は蘚類ケヘチマゴケ（Pohlia flexuosa Hook.）の発芽時と48時間光照射後の原糸体（chloronema）生長を誘導する赤色光、近赤外光の影響を調べたので報告する。

750Wプロジェクターランプ、12V-50Wハロゲンランプ、150Wタングステンランプを光源として使用し、フィルターには銀干渉フィルターと減光フィルターとを用い、実験は約21°Cの恒温室で行った。光照射条件は（1）3日間赤色光（663nm,15W／m^2,60sec）、近赤外光（739nm,10W／m^2,60sec）を単独または交互に照射し、その照射を更に間歇（3hr）的に4回／24hr照射した。(2)白色光（30W／m^2,48hr）側方照射後、24hr暗所におき生長を止め、実験光を側方より12hr照射した。生長量の測定は(1)では胞子部分を含め、(2)では負の方向に真っ直ぐに生長した原糸体部分のみを計測した。

(1)の光条件による生長反応には赤色光ー近赤外光可逆反応がみられ、(2)の光条件による生長反応のDOSE-RESPONSE CURVEの極大波長は胞子の光発芽を誘導する波長と一致していた。　この結果はケヘチマゴケにおいては、ORIENTATIONを誘導する光反応は発芽と異なっているが、発芽初期の原糸体の生長を誘導する光反応は発芽を誘導する光反応と同じであると考えられる。

2Dp10　　ＵＶ－Ａによる植物の生長促進

○手塚修文・安藤由香　（名大・農・園芸）

紫外線（UV）は植物の生長に阻害作用を及ぼすと言われている。これは，残念ながら，太陽から地球に到達しているUV（400-290nm波長域）以外の人為的波長域のUV（290nm以下の短波長）を照射した時の阻害作用の結果から憶測し，400-290nm波長域のUVまでもその阻害作用を誘因しているものと鵜呑みにしている観念論者の発想に起因しているようである。我々は1989年の本大会で，地球に到達しているUV［UV-A（400-320nm），UV-B（320-280nm）の290nm以上］は植物の生長にプラス効果をもたらすため，むしろ必要であることを報告している。今大会では，さらに解析を進め，近紫外光（nearUV），特にUV-Aの植物への生長促進および生理・生化学的レベルの代謝活性の変動に及ぼす影響を調べたので報告する。【方法】 1989年の本大会上記報告と同様，400nm以下のUV波長全域を透過しないビニールフィルムで被覆したハウス（内には350nm付近に照射波長ピークをもつUV-Aランプをセットしたもの）を圃場に設置し，その中に，畑土・腐植土の混合物の入ったプラスティック製箱・素焼鉢を置き，それぞれハツカダイコン（Raphanus sativus，cv. Akamaru）・トマト（Lycoperusicon esulenntum，cv. Ōsama-Fukuju）を収穫期まで育て，生長・成分・代謝活性などを測定した。【結果】 UV-A照射下のハツカダイコンの新鮮重および蛋白質・アスコルビン酸含量は葉でも下胚軸部（通称“根”と呼ばれる可食部）でも無照射区に比べて増大した。さらに照射区の葉中のグルタチオンの酸化型（GSSG）は無照射区に比べて増加したが，還元型（GSH）は逆に減少した。一方，下胚軸部のGSSGとGSHは照射区で高い含量を示した。またスーパーオキシドディスムターゼ，グルタチオン還元酵素（GR），カタラーゼは葉でも下胚軸部でも照射区では低い活性を示した。アスコルビン酸ペルオキシダーゼ活性は照射区の葉では他の酵素と同様に低かったが，下胚軸部では逆に高かった。GRのKinetic analysisの結果から，葉・下胚軸部の区別なく，Ｋｍは照射区・無照射区で同じ値を示したが，Ｖmaxは無照射区の方が大きい値であった。またトマトは照射区の方が生長もよく光合成や呼吸活性も高かった。以上の知見より，紫外線，特にnearUV（あるいはUV-A）は植物体内成分や酵素活性を大きく変動させ健康な植物体が発達するように代謝調節を行っており，UV-A無照射下の植物はストレスに遭遇しやすいようである。

2Dp11

紫外光照射によって Rhodotorula minuta 細胞膜画分に生じる吸収スペクトルの変化

°多田 幹郎、中川 一郎、荒見 真一郎、中辻勝也、木村 吉伸、高木 茂明 （岡山大・農）

【目的】演者らは、赤色酵母Rh. minutaにおけるカロチノイド生合成の速度が光によって厳密に制御される現象を見いだし、本菌は細胞内で起きる光化学反応を通して光の質と量を認識し、その認識をカロチノイド生合成に関与する酵素の合成速度に反映させていることを明らかにしてきた。本研究では、UV-A光を照射すると細胞膜の吸収スペクトルが変化することに着目して、このスペクトル変化を精査すると共に、この変化をもたらす光化学反応に拘わる物質を単離・同定することによって、カロチノイド生合成の光制御との関係を明らかにすることを目的とした。

【方法】細胞膜は、菌体を破砕して庶糖密度勾配遠心操作に供し、Mg^{2+}-ATPase 活性を指標として分画し、UV-A光源にはブラックライト蛍光灯（Toshiba, FL20S-BLB）を用いた。細胞膜を滅菌水に懸濁して光学石英セルに入れ、冷却しつつ14W/m²の光強度で照射した。生じる吸収スペクトルの変化は未照射試料との差スペクトルを測定することにより求めた。なお、作用スペクトルの測定には基礎生物学研究所の大型スペクトルグラフを使用した。

【結果及び考察】細胞膜に UV-A光を照射すると、260nmを等吸光度点として、より長波長域で吸収の減少(265、272、283、295nmにピーク)が、低波長域で吸収の増大(235nmにピーク)が照射光量に依存して生じた。これは光化学反応によって、260～300nmに吸収を有する物質が減り、235nm近辺に吸収を有する物質が新たに生成することを示している。そこで、それらの検出を目的として、光照射した細胞膜から得たエタノール抽出物をTLC及びHPLCに供し未照射試料との比較を行った。その結果、エルゴステロール含有量の減少を認めると共に、230nmに強い吸収を示す分子量278の直鎖脂肪族化合物(P-230)と2種のエルゴステロール関連化合物(紫外光域に吸収を示さず、Liebermann-Burchard反応陽性)とを検出した。更に、エルゴステロールの変化とP-230生成の作用スペクトルを求めた結果、両者は殆ど同じであり、しかも既報のカロチノイド生合成の光誘導の作用スペクトルと極めて近似していた。これらの結果から、光照射によってエルゴステロールの変化と未知の物質からのP-230の生成反応が共役して起こり、これらの光化学反応がカロチノイド生合成の光制御に関与している可能性があると推察した。

2Dp12

紫外光照射によって赤色酵母 Rhodotorula minuta 菌体に生じる吸収スペクトルの変化

多田幹郎、滝本浩之、°荒見真一郎、木村吉伸、高木茂明
（岡山大・農）

【目的】Rh. minutaにおけるカロチノイド生合成の速度と量は光によって厳密に制御される。この光制御は、“光化学反応過程”、“酵素合成過程”、“カロチノイド合成過程”の３過程より成っていることが明らかにされ、それぞれの過程について更なる検討が続けられている。しかし未だ不明な点が多く、とりわけ光化学反応に関する物質に付いての知見は皆無に等しい。本研究は、紫外光照射によって菌体の紫外光域の吸収スペクトルに変化が生じる現象に着目し、このスペクトル変化の波長依存性とその変化が生じている細胞内部位について検討し、光化学反応についての分子レベルでの知見を得ることを目的とした。

【方法】被照射試料（暗所生育菌体及びそれより分画調製した細胞壁、細胞膜、可溶性画分）を滅菌水に懸濁し（340nmでの吸光度を0.15にする）、これに光照射して未照射試料との差スペクトルを測定した。UV-A、-B、-Cの光源にはそれぞれ市販蛍光灯ブラックライト(Toshiba FL 20S-BLB)、健康ライト(Toshiba FL20-SE)および殺菌灯(Hitachi GL-15)を用い、それぞれ14、17、0.58W/m²の光強度で照射した。作用スペクトル測定は、基礎生物学研究所の大型スペクトルグラフを使用した。吸収スペクトル及び差スペクトルの測定には自記分光光度計(Shimazu UV-3000 及び Hitachi 356型)を用いた。

【結果と考察】菌体に光を照射すると、光源によって著しく異なるスペクトル変化が生じた。この事実は波長依存性の異なる光化学反応が存在していることを意味している。菌体におけるスペクトルの変化は細胞内の同時に起こる光化学反応の集合であるので、それらを分離またはそれが起きる部位を明らかにする為に、細胞分画画分について同様の実験を行った結果、いずれにもスペクトル変化が認められた。細胞壁画分においては光源の種類によってパターンの異なる変化が生じたが、細胞膜に生じる変化（260～300nmの吸光度の減少と235nmでの増加）及び可溶性画分に生じる変化（265nmでの吸光度の減少）は光源に関係無くほぼ同一のパターンを示した。そこで、細胞膜に生じる吸収スペクトル変化の作用スペクトルを230nm及び280nmでの吸光度を指標として測定した結果、既報のカロチノイド生合成の光誘導の作用スペクトルと極めて高い類似性を示した。このことはカロチノイド生合成の光制御に関与する光化学反応が細胞膜で生じることを予想させる。

2Ep01 トウモロコシ根端におけるCa^{2+}の移動に及ぼす重力と光の影響

鈴木　隆、佐藤宏昭、山田好広（山形大・教育）

根の重力屈性におけるCa^{2+}の役割については、コルメラ細胞における情報変換のセカンドメッセンジャーとして、根冠と伸長域を結ぶ化学シグナルの実体として、あるいは伸長域細胞の成長抑制物質に対する感受性誘導の因子としてなど、種々の仮説が提案されている。仮説の多くは、トウモロコシの重力屈性の解析から導き出されたものである。しかし、トウモロコシの重力屈性が光依存であるにもかかわらず、実験結果が光によるのかあるいは重力によるのか明確にされていないため、Ca^{2+}の動向が光あるいは重力どちらの刺激に依存したのか明らかでなく、重力屈性におけるCa^{2+}の関与が曖昧になっている。そこで、重力刺激のみで誘導される現象を検索するために、トウモロコシ一次根の伸長成長に及ぼすCa^{2+}の影響を暗下で調べたところ、Ca^{2+}による伸長抑制が水平に保持した根においてだけ誘導されることがわかった。この重力依存Ca^{2+}の伸長抑制効果の機作を解析するために、根端におけるCa^{2+}の移動を調べたところ若干の知見が得られたので報告する。

暗下生育約1.5cmのトウモロコシ（Zea mays L.）の一次根の根冠(0-1mm)切片や根端1-2mm切片を材料にした。Ca^{2+}の供与は5mM$CaCl_2$を含む1.5%,1.5mm^3寒天片を用いた。Ca^{2+}の求頂的移動は切片の基部側切断面にCa^{2+}を含む寒天片を付け、根の先端や根冠側切断面に付けたCa^{2+}を含まない寒天片に拡散してくるCa^{2+}量を、一方求基的移動は切片の根の先端や根冠側切断面にCa^{2+}を含む寒天片を付け、基部側切断面に付けたCa^{2+}を含まない寒天片に拡散してくるCa^{2+}量を測定して調べた。Ca^{2+}量はクイン２を含む反応液をキャリヤー液としたＦＩＡ（Flow Injection Analysis）により定量した。

根冠を含む0-1mm切片では、Ca^{2+}の求基的な移動量は切片の保持方向と光の有無に依存し、垂直方向＜水平方向＜光＋水平方向であった。極性のあるCa^{2+}の移動は、切片の保持方向とは関係なく、光を照射した切片でのみ観察され、その極性は求基的であった。根端1-2mm切片では、Ca^{2+}の移動量は根冠を含む切片の約1/4であったが、極性のある移動は観察されなかった。以上の結果は、Ca^{2+}の動向に対し重力と光は異なった反応系を介して作用している可能性を示唆しており、光依存重力屈性における光と重力の役割を解析する糸口になるかも知れない。

2Ep02

遠心加速度場における車軸藻類節間細胞の原形質流動

上坪英治（一橋大学・生物）、菊山宗弘（放送大学・生物）

ストロボスコープ型遠心顕微鏡（ＣＭＳ－Ⅱ）を用い、遠心加速度場における車軸藻(Nitella axilliformis) 節間細胞の原形質流動を観察した。50 ～100 xg 程度の比較的弱い遠心加速度下では、細胞質の流動方向は葉緑体列に付着した動因座繊維の方向と平行、流速は対照と等しかった。約 900 xg の強い遠心加速度場においても、動員因繊維に接して繊維と平行に流動が続いていた。細胞質顆粒が少ないため流速の測定は行なわなかったが、求心方向の減速・遠心方向への加速のいずれも定かでなかった（Protoplasma 1989 印刷中）。今回、 intact の節間細胞（長さ約 2.5 cm ）を用い、動因座繊維近傍における流速におよぼす遠心加速度の影響を再検討した。ＣＭＳ－Ⅱの video-enhanced contrast 光学系(NA 0.55) Ｕ規格ＶＴＲによる記録を、ストリークカメラによって解析した。

図 1

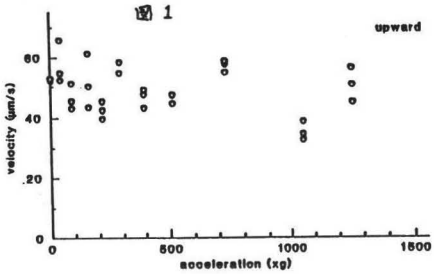
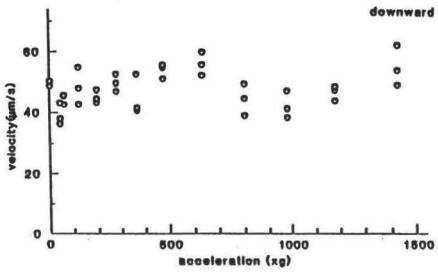


図 2



同一節間細胞について得られた遠心加速度と流速の関係を図１，２に示す。動因座繊維近傍の細胞質の流速は 50 ～1500 xg の範囲でほとんど一定であり、求心方向の減速・遠心方向の加速のいずれも観測されなかった。

250 xg・20～30 分以上の遠心により bulk の細胞質はほとんど遠心端に落ち、動因座に接して流動する細胞質の厚さは遠心加速度にかかわりなくほぼ一定（約 2 μｍ）となる。細胞を電気刺激すると遠心加速度場においても流動は瞬間的に停止し、数秒～１０数秒後徐々に再開する。流動停止の時点で動因座繊維に接する細胞質は "immobilize"（繊維と一過性に架橋構造を形成）する。その厚さは約 2 μｍである。この一致ははなはだ示唆に富むと考えている。

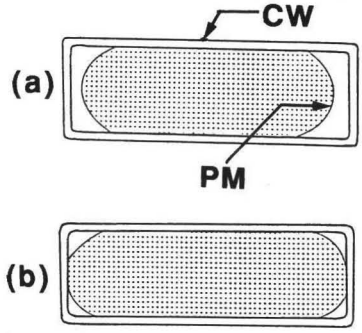
2Ep03

原形質流動の軌道保持のしくみ
1.原形質分離によるマイクロフィラメントの配列変化

増田由美　高木慎吾　永井玲子　（阪大　教養　生物）

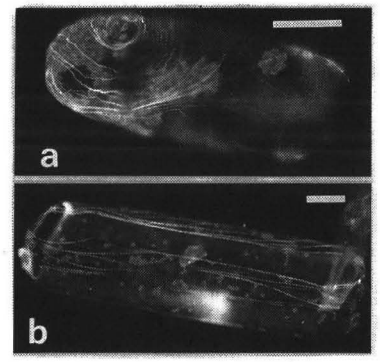
淡水産の単子葉植物オオセキショウモ（Vallisneria gigantea）の葉肉細胞では、光や機械的及び化学的な刺激によって、周回型の原形質流動が誘発される。流動の軌道として細胞外質に固定されているマイクロフィラメント（MF）の束が働いている。我々は、原形質分離によって細胞膜の一部が細胞壁から離れると流動の軌道が大きく変化することを見出し、この現象から流動の軌道を保持している機構について検討した。

実験材料として単離葉肉細胞を調製した。葉の切片をCa^{2+}を含まない酵素液（0.5% Macerozyme R200, 0.1% Cellulase Onozuka RSを含む）で3-4時間処理すると、細胞壁を持った葉肉細胞が単離される。単離細胞を用いることにより、光学顕微鏡での観察においてよい光学条件が得られ、また外液の組成の変化が直接細胞に及ぶようになる。高張処理によって図1（a）のように細胞膜が両端の細胞壁から完全に離れると流動の軌道は乱れてくる。図1（b）のように両端の細胞壁との接着部位が残っていれば流動の軌道は変化しない。軌道の乱れはMFの配列変化によることをFITC-Phalloidin染色によって確認した（図2）。単離細胞を調製する際にプロテアーゼ阻害剤（Leupeptin, APMSF, Chymostatin, Pepstatin）を加えたところ、原形質分離も軌道の乱れも抑えられ、また同様の効果が外液にCa^{2+}を加えることでもみられた。このことから軌道即ちMFの束の固定には、細胞膜と両端の細胞壁との接着が必要であり、プロテアーゼに感受性を持つ因子とCa^{2+}とがこれに関与していると考えられる。



CW:細胞壁　　PM:細胞膜

図1



a:図1(a)のような細胞
b:図1(b)のような細胞
右上の白線:各々100μm

図2

2Ep04

緑藻チョウチンミドロに存在する 90-kDa ＭＡＰ（微小管結合蛋白質）

前川誉実、荻原哲、室伏擴[1]、永井玲子 （阪大・教養・生物、[1]東大・理・生化）

いくつかの植物細胞で、光刺激に反応して細胞質が特異的な運動をすることが知られている。淡水産の管状、多核緑藻であるチョウチンミドロの細胞質の移動運動もその一つである。この藻の細胞質は常時、藻体基部から先端へ、先端から基部へ向かう両方向性の多条型流動をしている。葉緑体、核等の細胞小器官も細胞質基質と共に流動し、その速度はほぼ3μm/秒である。光を照射すると先端向きの流動量が増し、細胞質は先端部に堆積する。暗黒下では基部向きの流動量が増し、先端部に堆積していた細胞質は減少する。流動の原動力発生には微小管が関与している[1]。微小管は藻体長軸に沿って束状構造をなし、細胞質中に埋まっている。束状構造中には微小管同士をつなぐ架橋構造がみられる。明暗に対応した運動に伴い、微小管束の存在状態が著しく変動する[2]。即ち、明期には基部側で微小管束は太く、先端部で細くなり、暗期には先端から基部にかけて一様な太さになる。この変動を担う実体として微小管の架橋構造に注目し、以下の実験を行なった。

牛の副腎から精製された 190-kDa MAP[3]に対する抗体による蛍光染色像は、抗チューブリン抗体による像とよく一致した。MAP1、MAP2に対する抗体による染色は認められなかった。抗 190-kDa MAP抗体を用いた免疫電顕法では、金コロイドは微小管に沿って観察された。同抗体で認識される蛋白質の分子量は約90 kDaであることをウェスタン法によって確かめた。この蛋白質は190-kDa MAPと同様に耐熱性で、190-kDa MAP及びタウ蛋白質のチューブリン結合部位と等しいアミノ酸配列を持つペプチドに対する抗体とも免疫交差した。さらに、加熱処理後、DEAE-Sepharose CL-6Bカラムを用いて藻体から90-kDa蛋白質を部分精製し、別途調製したチョウチンミドロチューブリン分画とタキソール存在下に混合し、微小管束形成能を検討した。 90-kDa蛋白質非存在下では42%の微小管がシングルであったが、存在下では17%に減少し、代わって2-10本からなる微小管束が増加した。

以上の結果は、チョウチンミドロの 90-kDa蛋白質はMAPの一種であり、微小管の束化を担っていることを示唆している。細胞内において、光によってこの蛋白質の機能が部位特異的に修飾を受けるなら、先述の微小管束の変動が説明できると期待される。

1] Maekawa et al. (1986) Plant Cell Physiol. 27:837 2] Maekawa & Nagai (1988) Protoplasma Sup.1:162 3] Kotani et al. (1986) Eur. J. Biochem. 156:23

2Ep05 ヒャクニチソウ葉肉細胞における細胞膜へのアクチン繊維の結合

○小林　仁、福田裕穂[1]、柴岡弘郎（阪大・理・生物、[1]東北大・理・生物）

ヒャクニチソウ単離葉肉細胞はオーキシン（NAA 0.1 mg/l）、サイトカイニン（BA 1 mg/l）を含む培地中で tracheary element（TE：管状要素）に分化する。TEは培養開始後55時間から70時間の間に形成され、その形成率は全細胞の30-40%である。二次壁形成直前に微小管の束が細胞膜直下に縞状に形成され、その上に二次壁が形成されることはよく知られていることである。我々は二次壁形成直前に細胞膜直下に多数形成されるアクチン繊維の集合体がこの時期に起こる微小管の配列変化に関与していることを示唆する結果を得た（Kobayashi et al. (1988) Protoplasma 143: 29-37）。この結果から、細胞膜へのアクチン繊維の結合が、微小管の配列変化に重要であると考えられたので、分化過程にある細胞より細胞膜ゴーストを調製して、細胞膜へのアクチン繊維の結合に関与している因子の存在を調べた。

二次壁形成直前の時期に、培地に0.2% NaN_3 を加えて分化の進行を止めた後に、酵素処理を行うことによりプロトプラストを得、それをポリリジンでコートしたカバーグラスに接着し、0.5% Triton X-100 を含んだPBS で洗うことにより、細胞質側を露出した細胞膜ゴーストを調製した。その膜上に存在するアクチン繊維を蛍光ファロイジンで染色することにより観察したところ、多数のアクチン繊維が存在していることが確認された。細胞膜ゴーストの中にはアクチン繊維の集合体と思われる構造を持つものも存在した。

次に、膜へのアクチン繊維の結合に対するCa^{2+}の影響を調べた。Triton処理時に 100 μM Ca^{2+}、あるいは 1 mM EGTAを加えてアクチン繊維を観察したが、染色像に違いは見られなかった。このことはアクチン繊維の膜への結合がCa^{2+}非依存的であることを示唆している。

膜上のアクチン繊維は0.6 M NaClで洗浄することにより膜から離れた。その後、ウサギ骨格筋より調製したG-アクチンを乗せてアクチンの重合条件にし、10分後にPBS で洗浄してから蛍光ファロイジンで染色したところ、膜上にアクチン繊維が再生しているのが観察された。しかし、膜を0.6 M NaClで洗浄後、0.6 M KIで洗浄すると、アクチン繊維は再生されなかった。

細胞膜ゴースト上へのアクチン繊維の結合に関与していると思われる因子は、0.5% Triton X-100や0.6 M NaClで膜から離れなかったことから、細胞膜にかなり強く結合していると考えられる。

2Ep06 フラグモプラストにおけるvesicleの輸送機構

安原裕紀、園部誠司、柴岡弘郎（阪大・理・生物）

フラグモプラストは植物細胞における細胞質分裂のにない手として知られている。先に報告したように、細胞周期を高度に同調化したタバコ培養細胞BY-2よりフラグモプラストを単離することが出来る。この標品を軽く破砕したものの5000rpm遠心上清を12000rpmの遠心をして得た沈澱分画をネガティブ染色法によって電顕観察すると、微小管に多数のvesicleが結合した微小管・vesicle複合体が観察された。この沈澱分画を通常の方法で固定、包埋し電顕観察したところvesicleと微小管の間にしばしば架橋が観察された。このことから、フラグモプラストにおけるvesicle輸送には微小管が関与していると考えられる。

微小管によってvesicleが運ばれる機構には以下の二通りが考えられる。(1)微小管に沿ってvesicleが移動する。(2)微小管が赤道面側で脱重合することによって赤道面へ移動し、これによって微小管に結合したvesicleが移動する。今回、我々はこれらの機構の可能性を調べるために、フラグモプラストの微小管の脱重合を阻害することを試みた。フラグモプラストを持つBY-2細胞に微小管脱重合阻害剤taxolを与え、培養を続けたところフラグモプラストの遠心的な生長が非常に遅くなり、この際、通常よりも厚い細胞板が形成されていた。これはtaxolによって脱重合を妨害されたために、一定位置にとどまっている微小管に沿ってvesicleが移動し続けたため、通常よりも多くのvesicleが赤道面に集められた結果と考えられた。この結果は、上記(1)の可能性を支持するものである。

微小管をレールとするtranslocatorタンパク質として知られるキネシンや細胞質ダイニンはATP存在下で微小管から解離する性質を持っている。フラグモプラストにおける小胞の輸送がtranslocatorタンパク質による微小管に沿った移動によるならば、微小管に結合している小胞は、ATP処理によって微小管から外れるのではないかと考えた。そこで、フラグモプラストを単離する前のプロトプラストを0.025% NP-40とATPによって処理したのちフラグモプラストを単離し、破砕と遠心分離を用いる上記の方法で微小管とvesicleを含む分画を得た。これをネガティブ染色法によって観察したところ、ATP処理をしたものでは無処理のものに比べ明らかに微小管に結合しているvesicleの数が減少していた。従って、微小管に結合しているvesicleは、ATP処理によって微小管から外れる性質を持つと考えられた。

以上の結果から、フラグモプラストにおけるvesicle輸送はtranslocatorタンパク質による微小管に沿ったものであることが示唆された。

2Ep07　フラグモプラスト微小管構築の制御機構

浅田哲弘，園部誠司，柴岡弘郎（阪大・理・生物）

植物細胞の細胞質分裂はフラグモプラストが細胞の中央から細胞板を形成しつつ，細胞周辺へと広がることによって行われる。細胞板の外周に配列するフラグモプラスト微小管はゴルジ由来の小胞を分裂面に誘導することを通して細胞板の発達に寄与すると考えられているが，この微小管が具体的にどのような機構によって構築されるのかは知られていない。我々は，この構築機構を明らかにするために，グリセリン処理した植物培養細胞に蛍光ラベルしたチューブリンを導入し観察することを試みた。

材料には細胞周期の高度同調化の可能なタバコ培養細胞ＢＹ－２を用いた。グリセリン処理は，分裂後期から終期に同調化した後，部分的に細胞壁を消化した細胞に対して行った。この処理によってフラグモプラストの微小管の配列は損われていないことが間接蛍光抗体法によって確められた。グリセリン処理した細胞をＤＴＡＦ－チューブリン，ＧＴＰと３０％グリセリン，あるいは５μＭタキソール＋１５％グリセリンを含む溶液中でインキュベートしたところ，フラグモプラストの赤道部位に強く蛍光が取り込まれ，また，インキュベーション時間に伴って赤道部位の蛍光のバンドの幅は太くなった。一方，ＤＴＡＦ－チューブリンと短時間インキュベーションを行った後，ラベルしていないチューブリンに置換してインキュベートしたところ，赤道部位で取り込まれた蛍光は分離し，２本のバンドとなった。これらの現象は細胞内に導入したチューブリンが赤道部位に付加する一方で，赤道部位に既に存在していた微小管が両側に押し出されていることを示している。さらにこの結果は，フラグモプラスト微小管は赤道部位において(+)末端でオーバーラップという電顕観察による知見を考え合わせると，ＢＹ－２細胞の持つ本来の微小管の(+)末端に外から導入したチューブリンが重合しつつ，微小管は(−)末端の方向へ押し出されていることを示すものと考えられる。フラグモプラストの赤道部位の微小管重合中心については，その存在が示唆されていたにすぎなかったが，我々は上記の一連の結果から，この重合中心が微小管の(+)末端において，そこでのチューブリンの重合と微小管の押し出しを共に担い得る機能的な構造体であり，フラグモプラスト微小管を積極的に構築し，あるいは，制御し得るものであると結論した。

2Ep08

プロトプラストゴースト微小管の細胞質因子によるATP依存的消失

園部誠司　（大阪大　理　生物）

高等植物細胞において、間期の細胞の細胞膜直下には微小管が多数存在しておりセルロースミクロフィブリルの沈着方向の制御にかかわっていると考えられている。こうした表層微小管は植物ホルモンによってその配向を変えたり、分裂期での消失やその後の再重合などといったダイナミックな変化を示し、その重合状態が厳密に制御されていると考えられる。一方、表層微小管が細胞膜を介して細胞壁成分と相互作用することにより安定化されるという知見がある。こうした表層微小管の安定化機構や重合調節機構に関する分子レベルの知見は殆ど得られていない。そこで我々は、プロトプラストゴーストを表層微小管のモデル系として用い、解析を行った。

タバコ培養細胞ＢＹ－２をプロトプラスト化し、ポリリジン処理したカバーグラスに張り付け低張処理によりプロトプラストを破裂させカバーグラス上にプロトプラストゴーストを得た。蛍光抗体法によりチューブリンを染色したところゴースト上には多数の微小管が観察された。このことは外液にフリーのチューブリンがなくても表層微小管は脱重合しないこと、すなわち細胞膜との結合によって非常に安定化されていることを示している。

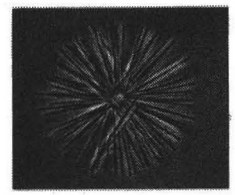
次にゴースト上の微小管を生理的条件下で破壊することを試みた。細胞質中に微小管を破壊する因子が存在するのではないかと考え、ＢＹ－２プロトプラストを超遠心（４００、０００ｘｇ　３０ｍｉｎ）し、上清をとり細胞質extractとした。カバーグラス上のゴーストをATPを加えたextractで処理したところ、ゴーストの微小管がほぼ完全に消失した。ATP非存在下やtaxol共存下ではこうした消失はみられなかった。これらの結果はextract中にATP依存的に微小管を脱重合させる因子が存在していることを示している。また、ＢＹ－２より単離した分裂装置やフラグモプラストをATP存在下でextract処理してもそれらの微小管は消失しなかったことから、表層微小管の消失がチューブリンの分解によるものではないこと、さらにextract中に見いだされた微小管脱重合因子は表層微小管に特異的に働くものと考えられる。

2Ep09

核表面にある微小管重合中心における特徴的な重合様式と必須因子

水野　孝一　　（大阪大学・理・生物）

高等植物細胞の cortical や pre-prophase band 微小管の一部は間接蛍光抗体法による観察から核の表面から発生しているように見えた。この様な観察は核の表面に微小管重合中心が存在するという期待を抱かせるものであった。しかしながら、タバコ培養細胞から単離した核を in vitro 微小管重合系に加えても核表面からの微小管形成はほとんど観察されなかった。ところが、いったん凍結・融解処理したり、ホモゲナイザーで軽く破壊した核標品を用いた場合には図のような重合中心から微小管が放射状に発生した複合体が多数形成されるのが位相差顕微鏡で観察できた。



この様な核標品を遠心分離し可溶性分画と不溶性沈殿分画とに分けると微小管重合中心は沈殿分画にのみ検出されたが、そこから形成された複合体の大きさは分画以前の１／３～１／４にしかならず、さらに沈殿分画を洗うと重合中心活性は完全に消出してしまった。しかしこれに可溶性分画を少量加えるだけで複合体形成能は回復し、その大きさもほぼ分画以前にまで回復した。この様に可溶性分画には重合中心の機能発揮に必須の因子が含まれていることがわかった。さらにこの可溶性分画を通常の分離核標品に加え微小管重合反応を行うと核の表面から多数の微小管が形成された。この事実から核の表面には微小管重合中心が存在し、必須因子は核の内部に存在するため通常の分離核からは微小管形成は起きないが、細胞内においては必須因子の核内から核表面の重合中心への運搬の制御機構が存在するものと考えられる。

一方、必須因子を除くと重合中心からの微小管形成が起きなくなることから動物細胞のＭＴＯＣと呼ばれる重合中心とは重合様式が異なると考えられた。そこでまず動物の脳からの tubulin を用い重合中心から短い微小管を形成させた後、今度はタバコ細胞からの tubulin に切換えさらに微小管を伸長させた後、固定し植物 tubulin に特異的な抗体で蛍光抗体法を行うと染色は複合体微小管の基部にのみ見られることから tubulin の組み込みはやはりＭＴＯＣとは異なることが確認された。この様式は kinetochore や phragmoplast の微小管重合中心でも起きていると考えられているので、核表面に存在する微小管重合中心が分裂期になるとそれらに再配分されるのではないかと考えられる。

2Ep10

タマネギ子葉細胞における分裂準備期微小管帯（Preprophase band of microtubule)と紡錘体との連結構造の発達とその役割

峰雪芳宣[1,2]，B.A. Palevitz[2]（[1]広島大・理・植物，[2]ジョージア大・植物）

分裂準備期微小管帯（ＰＰＢ）は高等植物に特有の細胞内構造で，その局在場所が常に将来の分裂面を予言する位置にあることから，ＰＰＢが植物の形態形成に重要な役割を果たしていると考えられている。我々はＰＰＢの形成過程が，微小管が将来の分裂面の方向に沿って細胞表層に幅広く配向する過程と，幅広ＰＰＢが収束して，最終的な分裂面の位置を決定する過程に分かれることを示した(Mineyuki et al. Planta 1989)が，ＰＰＢ形成後，紡錘体が構築される段階でＰＰＢと紡錘体形成との関係がどのようになっているかほとんどわかっていない。この時期には，微小管によって核が支持されている可能性がが示唆されているが，核とＰＰＢとのあいだの微小管の連結構造がどのようになっているのか，空間的にも，時間的にも不明な点が多い。そこで，最近改良した，細胞を押し潰すことなく微小管を螢光染色できる方法（Mineyuki et al. Protoplasma 1988)を用いて，ＰＰＢと核との間の連結構造の様子とその形成過程を詳細に調べ紡錘体の定位との関連を検討することにした。

吸水開始後３－４日のタマネギの子葉表皮にみられる等分裂及び不等分裂，また表皮のすぐ内側の細胞でみられる等分裂の際の微小管分布について，上記の螢光抗体法を使って調べたところ，前期後半で二つの極を持つ紡錘体が十分に発達した時には，微小管の束がＰＰＢと紡錘体の両極とを連結していることがわかった。この束はＰＰＢと紡錘体の極をまっすぐにつなぎ，常に極側のほうが微小管の束が太かった。核表層と細胞表層との間の微小管による連結はＰＰＢ形成の初期（幅広ＰＰＢの形成期）から見られるが，微小管束は細く，核表層全体から細胞表層の様々なところに走っていた。これが，核の極に制限されるのは紡錘体が十分に発達してからであった。このことから，分裂前期後半の紡錘体－ＰＰＢの連結構造が実際にこの時期の核の機械的な支持に働いている可能性が考えられる。一方紡錘体とＰＰＢは常に互いに垂直であり，分裂面と中期の赤道面の方向の異なる孔辺母細胞の場合も例外でなかった。また，10ug/ml サイトカラシン処理でＰＰＢの収束が阻害された細胞では，紡錘体の形成時期が対照に比べて遅くなっていた。これらのことから考えて，ＰＰＢが紡錘体の形成に関与している可能性が考えられた。

2Ep11 タバコ同調培養細胞におけるβ-チューブリン遺伝子の発現

西村　誠、岡村昭治、西　荒介　（富山医薬大・薬）

高等植物細胞に存在する微小管は、一細胞周期の間に、膜直下微小管、プリプロフェーズバンド、紡錘糸、フラグモプラストとダイナミックにその存在形態が変化することが知られている。本研究は、細胞周期の進行に伴うそのような微小管の変動に、チューブリン遺伝子の選択的発現が関与している可能性について検討する目的で始められた。

微小管の主構成成分であるチューブリンは、α-およびβ-チューブリンとも複数の分子種から成り立っており、それらをコードしている遺伝子も複数のアイソタイプが存在することが知られている。我々はこれまでに、ニンジンの培養細胞を用いて、チューブリンが複数の分子種からなることを示し、β-チューブリンの一つについて、そのcDNAの一部をクローニングした。このcDNAは、β-チューブリンの全長のうち、C末端部のアミノ酸をコードしている部分を含み、現在まで知られているほとんどすべてのβ-チューブリンに共通の部分と、各アイソタイプによって非常に異なるアミノ酸をコードしている部分より成り立っている。今回はこの共通部分をプローブとして、アフィディコリンにより同調化したタバコ培養細胞(BY-2株)を用いてチューブリン遺伝子の発現の様子について調べた。細胞周期各時期の細胞を濾過により集め、瞬時凍結したのち、50mMTris-1%SDS(pH9.0)とフェノールと共に液体窒素中で磨砕したのち融解し、フェノール抽出、LiCl沈澱により総RNA画分を得、このRNAよりオリゴdT-セルロースカラムをもちいてポリ(A)RNAを調製した。ニトロセルロース膜上に、一定量の各時期の総RNAをドットブロットし、上記cDNAをプローブとして、ハイブリダイゼーションをおこなった結果、β-チューブリン遺伝子の転写産物は全期間を通じて存在し、大きな量的変動は認められなかった。また、ポリ(A)RNAのノーザンブロッティングにおいて、転写されているβ-チューブリンmRNAは、細胞周期各時期とも1.6キロベース付近にほぼ単一のバンドとして認められた。

以上の結果から、タバコ培養細胞において、本実験条件で検出できる範囲内では、細胞周期の進行に伴って、β-チューブリンの遺伝子は恒常的に発現されており、その転写産物に顕著な量的、質的変動は認められなかった。

2Ep12

粘菌（*Polysphondylium pallidum*）の接着タンパク質ｇｐ６４の接着部位における局在

落合　廣，伊東一彦，朝見恭裕、綱島康亘、福沢雅志（北大・理・植物）

細胞間接着は細胞性粘菌の形態形成と発生に重要な役割を持つと考えられる．*Polysphondylium pallidum*のＥＤＴＡ抵抗性の接着は、特異的抗体断片（Ｆａｂ）による接着阻害実験から、分子量６４、０００の糖タンパク質（ＧＰ６４）が、関与すると推定される．

細胞－細胞間接着にｇｐ６４が直接に関与するか否かを明らかにする目的で、ｇｐ６４に対する単クローン性抗体を用い、間接蛍光抗体法によつて、このタンパク質の細胞の接着部位における局在が検討された．局在の証明には福井らの寒天重層法（１９８７）を用いて、細胞を押し潰すことにより実施された．この方法によりｇｐ６４は接着部位に局在すること、また細胞内に顆粒状に存在することがしめされた．少なくとも、その一部は小胞体、ゴルジ体などにあつて合成途上のｇｐ６４の前駆体を示すものと考えられる．

ｇｐ６４が細胞膜を貫通して、細胞内骨格タンパク質アクチンと相互作用する可能性を検討する為、二重蛍光抗体法を用いてｇｐ６４とアクチンの分布を調べたところ、両者の分布は全く異なり、アクチンの分布は基質に近く、ｇｐ６４は基質より離れて存在していた．

ｇｐ６４がアクチンと相互作用しない事から、ｇｐ６４がｐｈｏｓｐｈａｔｉｄｙｌｉｎｏｓｉｔｏｌ（ＰＩ）リンカー・タンパク質である可能性を考え、生細胞の懸濁液に［^{3}Ｈ］ｐａｌｍｉｔｉｃ　ａｃｉｄを与え、５時間振盪した後、細胞を壊し、その沈殿物をＳＤＳ－ＰＡＧＥにかけ、フルオログラフィをおこなつた．ｇｐ６４に一致するバンドに取り込みがみられた．現在、さらに検討をおこなつている．

以上の様にｇｐ６４は予想されたように、細胞接着部位に存在し、またＰＩリンカー・タンパク質である可能性が示唆されている．

2Fp01

好熱性ラン藻（Synechococcus elongatus）におけるP700の耐熱性：クロロフィルの抽出、再添加の影響

池上　勇、加藤　栄[1]　（帝京大・薬、[1]東大・理）

好熱性ラン藻のP700は高い耐熱性を示し、100°C、5分の熱処理でもその光化学活性は殆ど失われないことが知られている。ここでは、P700の耐熱性が、エーテル処理によるアンテナクロロフィルの除去により失われ、またアンテナクロロフィルの再構成により再び回復することを見出したので報告する。

1．好熱性ラン藻（Synechococcus elongatus）よりエーテル処理によってアンテナクロロフィルが特異的に抽出され、その結果chl-a/P700比が未処理の150より13に至る様々なアンテナサイズを持ったエーテル処理粒子を得ることができる。chl-a/P700=54のエーテル抽出粒子では50°C、5分の熱処理でP700の光酸化活性は殆ど失活しないが、その比が22の粒子では約50%が、また13の粒子では約75%が失活した。この失活はP700自身が熱処理によって破壊されたためであることが、P700の化学的定量より示された。

2．P700の明暗差スペクトルやその光酸化活性は、P700の耐熱性が変化しても特に大きな変化は認められなかった。

3．エーテル抽出物をエーテル抽出粒子に再添加することにより、P700の耐熱性が部分的に回復した。しかし精製したクロロフィルａのみを加えても耐熱性は回復しなかった。

4．クロロフィルａをPG(phoshatidylglycerol)と共に加えるとP700の耐熱性は著しく回復した。MGDGはPGについで有効であるが、その他の脂質、PI、PC、DGDGは耐熱性の回復には殆ど無効であった。PGのみを単独で加えても効果はなかった。

5．P700の耐熱性が回復する程度は、結合したクロロフィルａがP700へ光エネルギーを伝達するようになった程度と一致した。

以上の結果から、P700の熱安定性はP700が結合しているサブユニット蛋白の熱安定性に由来していることが示された。このサブユニットからクロロフィルが取り除かれるとその熱安定性が失われ、熱処理によってその蛋白構造が歪むと、その結果、P700も破壊されるものと推定される。また、クロロフィルがアンテナとして働き得るようなかたちで膜に再結合すると、サブユニット蛋白の熱安定性が回復し、P700の耐熱性も再び回復するようになる。このアンテナクロロフィルの再構成にはPGが必須であることが明らかになった。

2Fp02

ホウレンソウ系Ｉ標品のＰ700差分子吸光係数に対する Triton X-100 の影響

園池　公毅、加藤　栄[1]（理研・太陽光科学、[1]東大・理・植物）

Ｐ700の酸化還元差スペクトルの形が系Ｉ標品によって大きく異なることは古くから知られていた。その原因が、Ｐ700の差スペクトルには、Ｐ700自身の退色のほかに690nm付近に吸収極大を持つクロロフィルａのレッドシフトが重なっていることにあることをさきに報告した(1)。そしてこのシフトが界面活性剤などの処理によって解消するために全体の差スペクトルが変化し、さらにその結果として見かけのＰ700の差分子吸光係数が大きく変化する。このような変化は界面活性剤を用いて調製された系Ｉ標品においても観察され、系Ｉ反応中心複合体の精製には界面活性剤の使用が不可欠であることを考えると、各種の系Ｉ標品についてその正確なＰ700の差分子吸光係数の再検討が必要であると考えられる。Ｐ700の差分子吸光係数は閃光分光法を用いて求めることができるが、好熱性ラン色細菌の系Ｉにおいては、Ｐ700の差スペクトルの形から簡便にその差分子吸光係数を求められることをさきに示した(2)。今回高等植物の系Ｉについても同様の方法が適用できるかどうか検討した。

Anderson と Boadman の方法でジギトニンを用いて調製した系Ｉ標品のＰ700差分子吸光係数は６３ $mM^{-1}cm^{-1}$ という値を示す。これは Hiyama and Ke によって求められた値とよく一致する。系Ｉ標品をTriton X-100で室温において１時間処理しても0.1%以下の濃度ではほとんど影響を与えない。従って、試料の散乱を減少させるために0.1%以下のTriton X-100を加える場合には差分子吸光係数の変化を無視してよい。しかしTritonの濃度が0.1%を越えると差分子吸光係数は急激に増大し、0.25%以上で８０ $mM^{-1}cm^{-1}$ まで増加する。系Ｉ標品調製の目的には比較的高濃度のTritonを用いるが、そのような場合にはそのＰ700の差分子吸光係数が変化している可能性が大きいと考えられる。また好熱性ラン色細菌の場合と同様に、ホウレンソウでも700nm付近の吸収変化の大きさと680nm付近の吸収変化の大きさの比から差分子吸光係数を推定できることがわかった。どちらの標品でも比が減少するにともない差分子吸光係数は著しく増加したが、その増加の幅は異なっていた。従って高等植物とラン色細菌では、各々について求められた値を使って差分子吸光係数を求める必要がある。

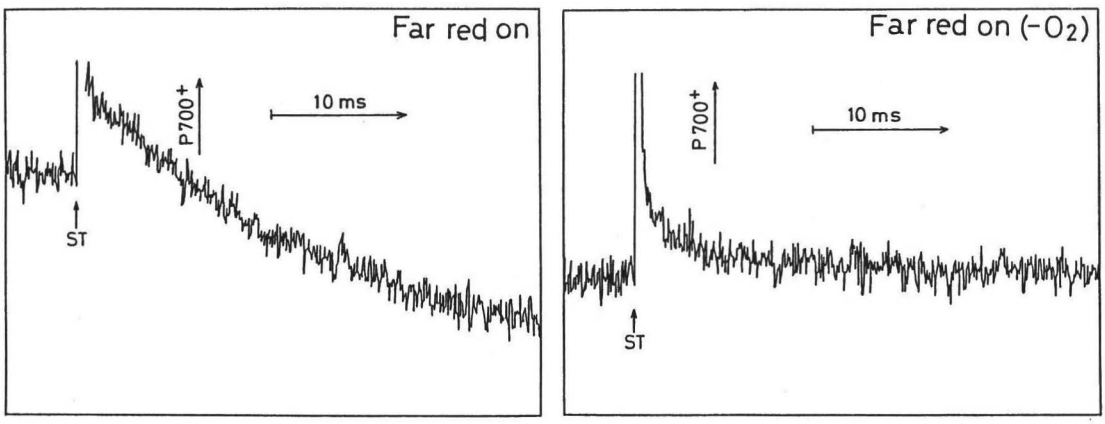
(1) Sonoike, K. and Katoh, S. (1988) Biochim. Biophys. Acta 935, 61-71
(2) Sonoike, K. and Katoh, S. (1989) Biochim. Biophys. Acta 976, 210-213

2Fp03 嫌気条件下での循環的電子伝達とその機構

°遠藤　剛、浅田浩二　（京大・食研）

嫌気条件下での葉緑体の光障害の一因として、浅田ら（前講演）が示した、光化学系Ⅰを中心とした循環的電子伝達によるプラストキノンプールの過還元が考えられる。ここでは、葉緑体の循環的電子伝達の機構を探ることを目的として、メチルバイオロジン等の電子受容体を添加しない場合の無傷葉緑体、チラコイド膜における蛍光、Ｐ７００吸光度変化を解析した結果を報告する。

葉緑体包膜を浸透圧ショックで破壊して得たチラコイド膜では、メチルバイオロジンの有無に関わらず、酸素除去による蛍光の上昇が見られた。また、無傷葉緑体およびチラコイド膜において、無酸素状態では、赤外光照射によるＰ７００の酸化は阻害される。これは、赤外光（ＦＲ）照射下、チラコイド膜に閃光照射した場合、好気的条件では、酸化状態にあるＰ７００は系Ⅱからの電子によって還元される（下図左）のに対し、嫌気条件では、$P700^+$は照射前のレベル以下には還元されない（下図右）ことによって示された。すなわち、嫌気条件下では、ＦＲ照射下でも内在性の電子受容体に依存する循環的電子伝達によってＰ７００が還元されていることが示唆された。このような循環的電子伝達によるプラストキノンプールの過還元が、嫌気条件下で見られる葉緑体光障害の原因の一つと考えられる。嫌気条件下での蛍光のクエンチング抑制は、酸素の光還元がなくなったことよりも、プラストキノンプールの過還元を反映するものと思われる。チラコイド膜においても、嫌気条件下では、蛍光の上昇、Ｐ７００のＦＲによる酸化の阻害等、循環的電子伝達を示唆する現象が見出されるので、循環的電子伝達に、膜結合性の電子担体の関与が考えられる。



2Fp04

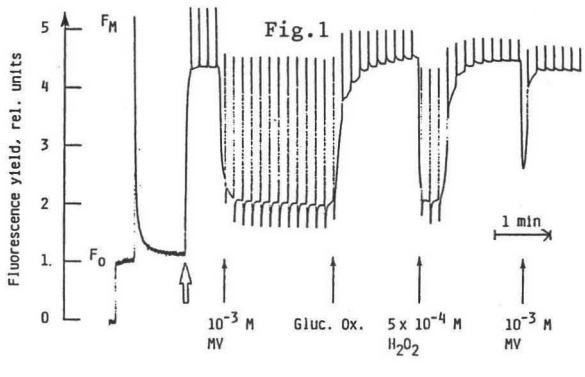
ホウレンソウ葉緑体の嫌気条件下でのメチルバイオロジン依存の循環的電子伝達系

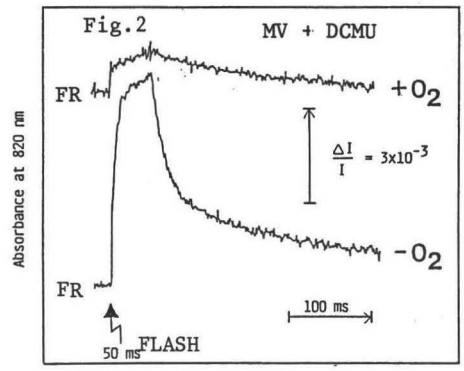
°浅田浩二、C. Neubauer、U. Heber and U. Schreiber
（京大食研、Univ. Würzburg）

〔目的〕葉緑体の光障害は電子受容体に比べ光エネルギーが過剰のとき、光エネルギーが活性分子を生成するように作用し、活性分子による葉緑体成分の酸化分解によって生ずる。葉緑体をCO_2のない嫌気条件下におくと光化学系Ⅰの電子受容体が全くなくなるために葉緑体の光障害は、好気条件下に比べかえって促進される。このように葉緑体を嫌気条件下においたとき系Ⅰ付近の電子伝達系がどのようになるかを明らかにするため、蛍光、P700の酸化還元を測定した。その結果、還元型メチルバイオロジン（MV^-）がプラストキノン（PQ）に電子を供給する循環的電子伝達系があることを見いだしたので報告する。

〔方法〕ホウレンソウから常法により無傷葉緑体を調製し、Percoll遠心で分離した90-95%以上包膜の保持されている葉緑体を用いた。蛍光はパルス振幅変調法(PAM)-蛍光計(Walz)を用い測定し、P700の酸化還元は同じ蛍光計を用い820nmの吸光度変化から測定した。グルコース—カタラーゼにグルコースオキシダーゼを添加して反応液中の酸素を除き嫌気条件とした。

〔結果〕図—1に示すように系Ⅱの蛍光はMV添加で消光されるが、これを嫌気条件にすると消光が抑制される。この嫌気条件下での消光抑制はFerricyanideまたはNADP + Ferredoxinを電子受容体としたときには観測されず、MVに特異的である。一方、MV存在下でFR（λ＞710nm）によるP700の光酸化は酸素があると100%近く進行するが嫌気条件下では進行しない。DCMU存在下でFR照射した葉緑体に白色閃光（50 ms）を照射すると好気条件下では$P700^+$の系Ⅱからの電子による還元はみられないが、嫌気条件下ではMV^-による$P700^+$の還元がみられる（図—2）。$P700^+$の還元はしかしながらDBMIBで阻害され、MV^-はPQプールに電子を供給していることが明らかとなった。このようにMV^-がPQに電子を与える循環的電子伝達系によってPQが“過”還元されるため、系Ⅱからの電子のPQへの移動が抑制され系Ⅱ蛍光が上昇すると考えられる。





2Fp05

光化学系Ｉ反応中心複合体とプラストシアニンの相互作用

[0]安藤孝幸，岩崎行玄，原彰[1]，高倍昭洋
（名城大・理工・化学，[1]名城大・農・生化）

プラストシアニンはチトクロムｂ６／ｆ複合体と光化学系Ｉ反応中心（ＰＳＩ）複合体間の電子伝達を司る分子量１０．５ｋＤａの可溶性の銅蛋白質である．プラストシアニンとＰＳＩ複合体の反応は用いるＰＳＩ標品により著しく変化する（１）．我々は前年度の年会においてプラストシアニンが，エチレンジアミンカルボジイミド（ＥＤＣ）を用いた架橋反応において，ＰＳＩの約２０ｋＤａのサブユニトと特異的に反応することを報告した．今回，プラストシアニンとＰＳＩの相互作用について更に検討したのでその結果について報告する．

キュウリおよびホウレンソウからＰ７００１分子当り約１８０分子のクロロフィルをふくむ標品（ＰＳＩ１８０）を精製した．プラストシアニンとＰＳＩ１８０をＥＤＣを用いて架橋すると，キュウリおよびホウレンソウＰＳＩとも１８．５ｋＤａのサブユニットが消失し，約３０ｋＤａに新たなバンドが出現した．このことはプラストシアニンとＰＳＩ１８０が１：１で架橋した化合物を作ることを示している．キュウリＰＳＩの１８．５ｋＤａ（サブユニット７）は他のサブユニットと分離していたのでゲルから溶出しＮ－末端アミノ酸配列を気相シーケンサーで決定した．その結果，１８．５ｋＤａの蛋白はｐｓａＦ遺伝子の翻訳産物であることが明らかになった．

プラストシアニンとＰＳＩ複合体をＥＤＣにより架橋した化合物の反応性について検討した．プラストシアニンと架橋したＰＳＩ１８０は架橋をしていないものと同じＰ７００の光酸化反応を示した．また，架橋した付加化合物のプラストシアニンからＰ７００への電子移動反応が観測された．このことは付加化合物が電子移動反応の遷移状態のよいモデルになりうることを示している．付加化合物のプラストシアニンからＰ７００への電子移動反応は架橋していない場合と異なりイオン強度の影響をあまり受けなかった．また，付加化合物によるチトクロムｆの光酸化は観測できなかった．以上の結果は架橋することによりバルク層からプラストシアニンのＣｕまでの距離が遠くなることを示唆している．

(1) Takabe, T. and Ishikawa, H. (1989) J. Biochem., 105, 98-102

2Fp06

プレカーサープラストシアニンの大腸菌における発現とそのプロセッシング

[0]日比野隆，山本治世，村川富彦，D. Boer[1]，P. Weisbeek[1]，高倍昭洋（名城大・理工・化学，[1]オランダ・ユトレヒト大）

プラストシアニンはチラコイド膜のルーメン側に局在し，チトクロムｂ６／ｆ複合体と光化学系Ｉ反応中心複合体間の電子伝達を司る分子量１０．５ｋＤａの可溶性の銅蛋白質である．プラストシアニンの遺伝子は核ゲノムに支配され，分子サイズが１６．６ｋＤａのプレカーサーとして合成された後，２段階のプロセスを受けてチラコイド膜のルーメン側に輸送されることが P. Weisbeekのグループにより最初に明らかにされた（1）．そこで我々はプレカーサープラストシアニンがプロセスされ銅が取り込まれる過程を生化学的に明らかにすることを目的とし，大腸菌における発現系を用いて研究を行なった．

プレカーサープラストシアニンは，Silene pratensisから単離したｃＤＮＡを発現ベクター（$pK_{233.2}$）を用いて大腸菌（E.coli K_{12} PC2495）で発現させて作成した後，グアニジン処理，イオン交換カラムクロマトグラフィー等により精製を行なった．大腸菌を用いて作成したプレカーサープラストシアニンはウエスタンブロッティングによりＳＤＳ－ＰＡＧＥで約２３ｋＤａの蛋白質として検出された．２３ｋＤａの蛋白質が確かにプレカーサープラストシアニンであることはＮ－末端のアミノ酸配列を気相シーケンサーで決定することにより確認した．

大腸菌で作成したプレカーサープラストシアニンが２段階のプロセスを受けるかどうかを明らかにするために，硫安分画，Triton X-100処理等によりプロセッシングプロテアーゼを葉緑体から部分精製した（２）．部分精製したプロテアーゼを用いてプレカーサープラストシアニンからmatureプラストシアニンが得られた．次にこのように作成したアポプラストシアニンに対する銅の取り込について検討した．銅がとりこまれたかどうかは５９７ｎｍの吸収，ＥＳＲスペクトルにより行なった．matureのアポプラストシアニンには銅を再構成させることができた．フラッシュ法による測定の結果，再構成したプラストシアニンは光化学系Ｉ反応中心複合体との反応性がnativeなものとほぼ同じであることが明らかになった．これらの結果について報告する．

(1) Smeekens, S. et al. (1986) Cell, 46, 365-375

(2) Kirwin, P.M. et al. (1988) J. Biol. Chem.,263, 18128-18132

2Fp07

オオムギ葉緑体のNADP光還元活性と高分子型フェレドキシンーNADP還元活性について

大橋和子、先浜直子[1]、新　勝光[1]、辻　英夫　（京大・理・植生研、[1]神大・理・生物）

ホウレンソウ葉緑体に存在するFNR（フェレドキシンーNADP還元酵素）には高分子型FNR（FNR-L）と低分子型FNR（FNR-S）とがある。FNR-Lは低塩濃度緩衝液によって短時間で抽出されるのに対し、FNR-Sの抽出には長時間を要することから、FNR-Lはチラコイド膜表面に結合しており、FNR-Sはより内層部に存在していると考えられる。NADP光還元系において2つのFNRの機能に相違があるかどうかという問題は極めて重要であるが、ホウレンソウチラコイド膜による実験では明確な回答は得られていない。そこで今回我々は、オオムギ黄化芽生えの葉緑体を用いて、NADP光還元活性に関与するのはチラコイド膜表面に存在するFNR-Lであるという結果を得たので報告する。

オオムギ黄化芽生えを光照射すると時間に応じて光合成電子伝達系が完成する。DCIPHを電子供与体とするFd還元活性の出現には2時間照射が、NADP還元活性では4時間の照射が必要であった。Fdを介するNADP-Cyt c還元活性でFNRの有無を見ると4時間照射以降に活性がみられたので、Fd-NADP間の完成がFNRの有無に左右されるものと思われたが、チラコイド膜を超音波破壊すると照射前の芽生えですでにCyt c還元活性を示したので、FNRの有無ではなく、FNRがチラコイド膜表面に位置するかどうかによることがわかった。ホウレンソウではチラコイド膜表面に結合するFNRは主としてFNR-Lであると考えられているので、オオムギ芽生えにFNR-Lがあるかどうかを調べた。2時間照射のオオムギ芽生えではFNR-Sしか存在しなかったが、4時間照射ではFNR-LとFNR-Sが検出された。そこでオオムギFNR-Lをイソプロパノールによって抽出し、コネクテイン分画を得、ホウレンソウFNR-Sに加えたところ、FNR-Lが形成された。この事実はオオムギFNR-Lがホウレンソウ FNR-Lと同様の存在であることを示すものである。

以上から、FNR-Lはチラコイド膜表面にあってNADP光還元に関与するのに対して、FNR-Sはチラコイド膜内部にあって、なにかそれ以外の機能に関与するものではないかという可能性が生じてきた。

2Fp08

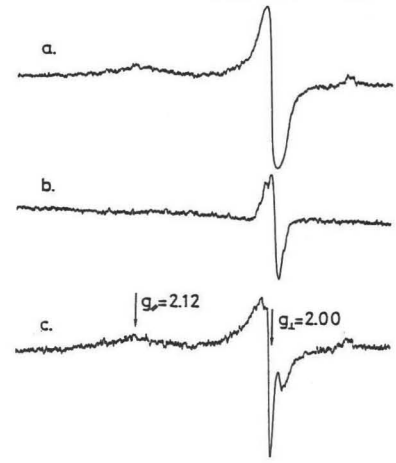
葉緑体電子伝達反応に伴って生成するO_2^-のチラコイド膜中の定常濃度

白石卓夫、高橋正昭[1]、浅田浩二（京大.食研、[1]甲南大.理学部）

葉緑体チラコイド膜の光照射によって、光化学系Iの電子受容体の自動酸化にともなってO_2^-が生成する。生成したO_2^-は膜外に拡散した場合には、不均化反応によってH_2O_2を生じる。ストロマ側に拡散したO_2^-をCyt cの還元反応で検出すると、その速度は高O_2濃度下でも通常の電子伝達反応よりも低い光強度（1 mW cm^{-2}以下）で飽和する。我々はこれまでに、245 nmのO_2^-吸光度変化の追跡から、閃光照射によって光化学系Iの反応中心当り1分子のO_2^-が生成し、このO_2^-は水溶液中の不均化反応よりも速い速度で減衰することから、膜内でO_2^-がサイクリック電子伝達反応に関与している可能性を示した。今回はさらにチラコイド膜中のO_2^-の定常濃度について検討した。

O_2^-濃度をESR装置を用いて藤井、柿沼のAlkali-dripping法によって測定した。チラコイド膜(50 μgChl)を 20 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM DETAPAC, 200 μg ml^{-1} catalaseを含む0.5 mlの50 mM Tris-HCl(pH 7.6)中で光照射、直ちに2倍量の4 N NaOH中に射出した後に凍結し77 Kで測定した。

30秒の光照射によって図(a)のようなシグナルを得た。(a)とアルカリ中でなく水中に射出し得られたシグナル(b)との差スペクトル(c)は、g=2.12, 2.00に水溶液中のO_2^-に特徴的なピークを示した。同程度のシグナル強度が、1 mW cm^{-2}以下の照射光強度でも得られた。また、暗所に5分間置いた後にアルカリ中に射出した場合でも同様なシグナルを得た。これらの結果から、チラコイド膜中のO_2^-の定常濃度は弱光下で飽和値に達することがわかった。暗所に置いたチラコイド膜でもシグナルがみられたことは、膜中に生成したO_2^-の寿命が永いことを示している。O_2^-は負電荷を持つことから、膜表面の負電荷層に阻まれ膜外に溶出しにくいと考えられる。現在、チラコイド膜の定常レベルのO_2^-濃度について検討中である。



2Fp09

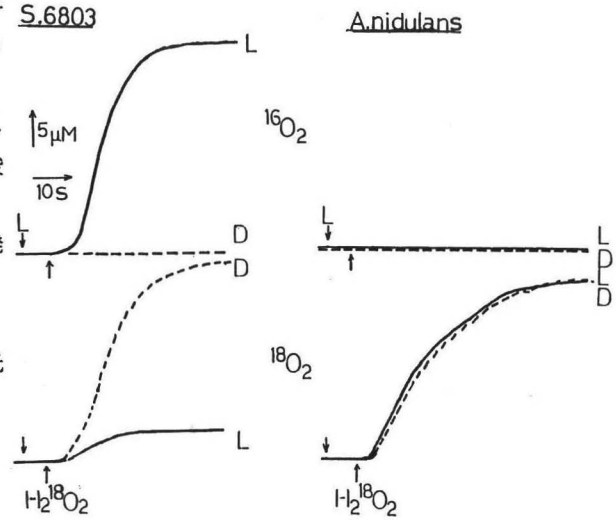
らん色細菌 Synechocystis 6803 と Anacystis nidulans における H_2O_2 消去

°三宅親弘、浅田浩二　（京大食研）

目的）らん色細菌は、H_2O_2 を消去する酵素 Ascorbate (AsA) peroxidase をもつものともたないものに分けられる (Michihata and Asada)。　本研究では、AsA　peroxidase 活性を Synechocystis 6803 がもち、Anacystis nidulans がもたないこと、、さらに H_2O_2 消去機作がこの二つのらん色細菌において互いに異なることを in vivo 及び in vitro で明らかにしたのでその結果を報告する。

方法）1) AsA peroxidase, catalase 活性測定　4,000 lx, 3% CO2 下で対数期後期まで培養した細胞を活性測定に用いた。2) $^{18}O_2$, $^{16}O_2$ 濃度の測定　$H_2{}^{18}O_2$ を、glucose-glucose oxidase により合成した。酸素発生がみられなくなるまで細胞を光照射した後 $H_2{}^{18}O_2$ を添加し、明暗下で発生する $^{18}O_2$, $^{16}O_2$ を薄膜透過型質量分析計により測定した。3) 蛍光測定　細胞に H_2O_2 を添加したときの蛍光収率変化を、パルス振幅変調 (PAM) 蛍光計により測定した。

結果）1) in vitro: AsA peroxidase 活性は S.6803 のみ検出され、Catalase 活性は、A.nidulans, S.6803 共に検出された。2) in vivo: $H_2{}^{18}O_2$ 消去　S.6803 では $H_2{}^{18}O_2$ (60μM) 添加により 明(L)下 $^{16}O_2$ (27.3μM), $^{18}O_2$ (3.3μM) が、暗(D)下 $^{18}O_2$ (25.6μM) のみが発生した。すなわち、明下ではチラコイド膜で生成する還元産物 ($2H_2O \rightarrow O_2+4H^++4e^-$) を電子供与体とするペルオキシダーゼ反応により H_2O_2(2分子)は消去される。このペルオキシダーゼ反応が光化学系とカップリングしていることは、蛍光測定の結果からも示唆される。これに対し A.nidulans に $H_2{}^{18}O_2$ を添加したとき明暗共に $^{16}O_2$ は発生せず $^{18}O_2$(26μM) のみであった。従って、この細胞では H_2O_2 はカタラーゼ反応のみにより消去される。このことは蛍光の H_2O_2によるクエンチングがみられないことからも支持される。



2Fp10

BIOPHOTON EMISSION (ULTRAWEAK DARK PHOTOEMISSION) FROM CHLOROPLASTS IS CONNECTED TO SUPEROXIDE RADICALS

Éva Hideg[+] and Humio Inaba[+,*]
[+]Biophoton Project, Research Development Corporation of Japan (JRDC), [*]Research Institute of Electrical Communication, Tohoku University, Sendai, Japan.

As we reported earlier biophoton emission (ultraweak photoemission) is observable in leaves and also in isolated chloroplasts without any external excitation. High sensitivity photon counting enables us to measure biophoton emission over a time scale from about one hour after the beginning of the dark adaptation (by the time even long lived delayed fluorescence components have become negligible) up to 20-24 hours (chloroplasts) or several days (leaves).

Here we report that in isolated chloroplasts biophoton emission is oxygen dependent, its intensity is in correlation with the production of superoxide in the thylakoid membrane. However, the mechanism of O_2 reduction is probably different from the photoproduction of superoxide radicals since biophoton emission assumes a continuous supply of reducing substrate and oxygen in the dark. Biophoton intensity is decreased by cyanide or salycilhydroxamic acid and enhanced by NADPH.

We suggest that the respiratory chain of chloroplasts (an electron transport from $NADPH_2$ to O_2 in the dark via the reduction of plastoquinone, recently demonstrated to occur in higher plants also) is involved in the (probably complex) series of redox reactions leading to this dark photoemission.

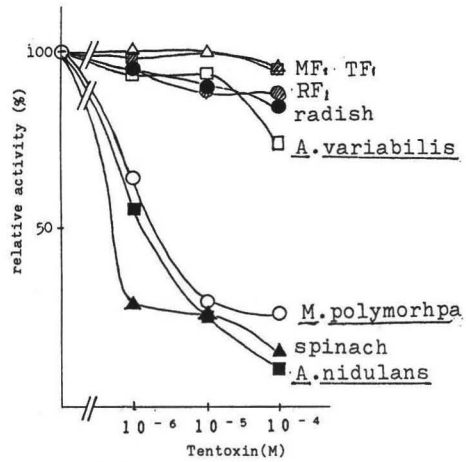
Biophotons are emitted in the red (λ >650 nm) spectral region suggesting that the excitation of chlorophyll molecules to be the terminal step of the process.

2Fp11　各種F_1-ATPaseのtentoxin感受性

太田嘉則、久堀　徹[1]、桜井英博
（早大・教育・生物、[1]横浜市大・文理・生物）

tentoxinは、*Alternaria alternata*の生産する毒素で、感受性植物（ホウレンソウ、レタスなど）にクロロシスをおこすが、それら以外の植物（ハツカダイコン、タバコ、大麦など）には、作用しない。感受性植物にたいする作用部位は、葉緑体ATP合成酵素CF_1-CF_0のCF_1部分であり、阻害の様式はエネルギー伝達阻害剤的である[1,2]。

我々は、ラン色細菌*Anacystis nidulans*から、共役因子F_1-ATPase(AF_1)を単離精製した[3]．AF_1は潜性のATPaseであり、メタノールにより活性化される。種々の阻害剤のATPase活性にたいする影響をしらべたところ、AF_1はtentoxinの阻害を受けることがわかった。そこで、ホウレンソウ、ハツカダイコン、ゼニゴケ(*Marchantia polymorpha*)のCF_1、*Anabaena variabilis*，光合成細菌(*Rhodospirillum rubrum*)クロマトフオアのRF_1、さらに好熱細菌PS3のTF_1、牛心筋ミトコンドリアのMF_1の各ATPase活性に対するtentoxinの影響を調べた。その結果ホウレンソウ、*M.polymorpha* CF_1、*A.nidulans* AF_1は阻害を受けたが、*A.variabilis*を始めとするそれ以外のATPaseは、10^{-4}M tentoxinではほとんど阻害を受けなかった。



F_1型ATPaseのtentoxin感受性

1)B.R.Selman and R.D.Durbin (1978) Biochim. Biophys. Acta 502,29-37
2)S.Reimer and B.R.Selman (1978) J.Biol.Chem. 253,7249-7255
3)H.Nemoto, Y.Ohta, T.Hisabori, K.Shinohara, H.Sakurai (1990) Proc. 8th International Congress on Photosynthesi.in press

一　般　講　演

第３日　３月30日（金）

一 般 講 演

第３日　３月30日(金)　午前の部

A会場　細胞壁
B会場　(講演発表はありません)
C会場　分子生物学Ⅴ
D会場　光合成細菌
E会場　電気生理
F会場　光化学系と色素系

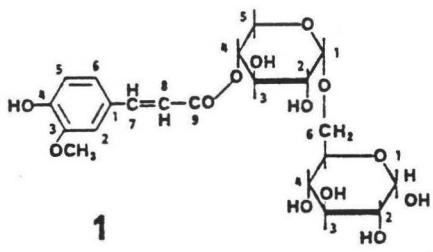
3Aa01　タケノコ細胞壁中でのフェノール酸と糖の結合

石井　忠、広居忠量（農水省・森林総合研究所）

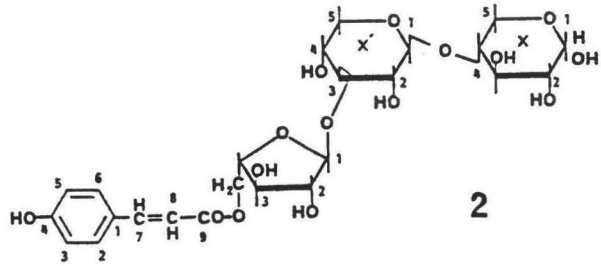
目的　伸長成長中の植物細胞壁には多糖類とエステル結合したフェノール酸が存在することが知られている。このフェノール酸は細胞壁中に存在するperoxidaseの作用により酸化的にカップリングして多糖類と多糖類の架橋を形成し、細胞壁の伸長や細胞の成長を制御していると仮説されている。しかし、多糖類とフェノール酸の結合様式については不明な点が多く、また、フェノール酸の架橋についての直接的証拠は現在まだ得られていない。これらの不明な点を解明することを目的として、タケノコ細胞壁を酵素分解しフェノール酸－オリゴ糖画分を単離・精製してそれらの構造解析を行い、細胞壁中に存在するフェノール酸の役割について考察した。

実験　タケノコ細胞壁を Driselaseで加水分解し、加水分解物を SephadexLH-20を用いて水および 50%ジオキサンで溶出して８分画した。Kav 3.14画分を逆相および順相h.p.l.c.を用いて分析し、化合物１と２を単離した。単離した化合物１と２およびLH-20の50%ジオキサン溶出画分（画分８）をそれぞれ構成糖分析、フェノール酸分析、メチル化分析、^{1}Hおよび^{13}C-NMR、f.a.b.-m.s.により解析した。

結果　構造解析の結果、化合物１は O-(4-O-trans-feruloyl-α-D-xylopyranosyl)-(1→6)-D-glucopyranose(1)、化合物２は O-[5-O-(trans-p-coumaroyl)-α-L-arabinofuranosyl]-(1→3)-O-β-D-xylopyranosyl-(1→4)-D-xylopyranose(2) であると同定した。画分８はケン化するとp－クマール酸、フェルラ酸、ダイフェルラ酸を17:32:50の比で遊離した。構成糖の比は Ara:Xyl:Glc=22:75:3であった。メチル化分析の結果、画分８は主にアラビノキシランと少量のキシログルカンからなることがわかった。これまでの結果と今回の結果をあわせて考えると、タケノコ細胞壁中のアラビノキシランはフェルラ酸を介してアラビノキシランばかりでなくキシログルカンと架橋を形成していると示唆される。また、p－クマール酸を介した多糖類の架橋も存在すると考えられる。



1



2

3Aa02　イネ培養細胞の単細胞化．II．　細胞壁の分析

加藤陽治、大住千栄子[1]、林隆久[1]、山ノ内宏昭[2]、日向康吉[2]
（弘前大・教育、[1]味の素・中研、[2]東北大・農）

我々は先に、イネ培養細胞をB5(Gamborg's B5)培地で生育させると細胞は大集塊で得られるが、AA(amino acid)培地で生育させた場合、細胞の小集塊化が起こることを報告した。また、小集塊化はB5培地にアルギニン添加によっても起こることを明らかにした。この小集塊化現象は培地中に尿素の分泌を伴うことから、分子間の水素結合形成を阻害する尿素により細胞壁構成成分の多糖が必要以上に可溶化するために起こると推測した。今回は、さらに詳細な知見を得るためイネ培養細胞をAA培地及びB5培地でそれぞれ生育させ、生育期間における細胞壁及び細胞外多糖の質的及び量的変化の比較を行った。

細胞壁及び細胞外多糖の構成単糖比はAA培地及びB5培地いずれの場合でも生育期間を通して一定であった。また、AA及びB5の間でも著しい違いは認められなかった。しかし、表１に示すように、フェノール酸含有量に大きな違いが認められた。蛍光顕微鏡による細胞の観察は、AA培地生育の細胞に比べB5培地生育の細胞のほうが多くの蛍光物質（フェルラ酸）を有することを示し、表１の結果を支持した。AA及びB5培地生育細胞間の形態的相違は、フェルラ酸による壁多糖の架橋の頻度の違いによるのかもしれない。

＜表１＞

Culture medium	Culture day	80% Ethanol-insoluble fraction of cells			Extracellular polymer fraction		
		Total cell-wall polysaccharide (mg) [A]	Total phenolic acid (μg) [B]	B/A (μg/mg)	Total polysaccharide (mg) [C]	Total phenolic acid (μg) [D]	D/C (μg/mg)
AA	1	8.99	50.3	5.6	4.88	27.2	5.6
	2	9.67	68.4	7.1	7.11	37.9	5.3
	3	14.44	99.8	6.9	7.94	59.6	7.5
	6	21.45	158.9	7.4	11.66	115.4	9.9
	10	23.08	276.1	12.0	12.85	144.9	11.3
	14	30.61	449.6	14.7	15.16	233.3	15.4
B5	1	16.85	274.6	16.3	3.53	10.7	3.0
	2	22.37	397.5	17.8	3.28	10.5	3.2
	3	21.20	342.3	16.1	4.66	18.6	4.0
	6	16.58	330.2	19.9	4.37	20.1	4.6
	10	30.51	652.1	21.4	5.45	23.8	4.4
	14	28.88	599.3	20.8	4.53	39.7	8.8

*Rice cell suspensions were cultured on 40 ml of liquid medium.

**Phenolic acid content was determined by the UV absorbance at 340 nm and expressed as ferulic acid equiv.

3Aa03 Chlorella ellipsoidea C-27 のプロトプラスト調製

城　斗志夫、長　由美、波多野　昌二（九大・農・食化工）

Chlorella ellipsoidea C-27は、3℃、24時間の低温処理により耐凍性を獲得する。その耐凍性獲得機構の解明や細胞融合による耐凍性付与等に関する研究のためには、プロトプラストの調製が必要である。先に演者らは、グリコシダーゼミックス（GM）とキトサナーゼ（CHI）を組合せた処理により低浸透圧感受性細胞を得たことを報告したが、完全なプロトプラストは得られていなかった。今回は、GMとCHIにクロレラ自身の有する細胞壁溶解活性物質を組合せC-27のプロトプラスト調製に成功したので報告する。

細胞壁溶解活性物質としては、細胞のホモジネート上清の凍結乾燥品を用い、これをGM、CHIと共に0.5Mマンニトール・25mMリン酸緩衝液に溶解し、L_1-細胞に遮光下で作用させた。プロトプラストの生成率は、細胞懸濁液を水で30倍に希釈した後、完全に破裂した細胞の割合で示した。

GMとCHIで2時間処理した場合、4%の細胞しかプロトプラスト化されず、ホモジネートを組合せると90%の細胞がプロトプラスト化した。C-27のプロトプラスト化にはホモジネートの働きが不可欠だと考えられる。しかし、ホモジネート単独では、12%の細胞でしかプロトプラスト化は見られず、CHIを組合せると67%の細胞がプロトプラスト化した。従って、C-27のプロトプラスト化にはCHIの働きも重要だと考えられる。最も有効であったこれら3種類の組合せで酵素処理条件を検討し、pH 7.0、30℃、酵素濃度GM 0.5%、CHI 1.0%、ホモジネート1.5%の条件下で効率良くプロトプラストが得られ、プロトプラストの生成は電顕で確認された。また、プロトプラスト生成率のセルサイクル依存性を調べた結果、細胞の生長に伴うプロトプラスト化率の上昇が見られた。ホモジネートに含まれる細胞壁溶解活性のセルサイクル中の変化を調べると、サイクルを通じて高い活性が維持されていた。さらに、C-27のプロトプラスト化は、プロテアーゼ阻害剤の添加により大きく阻害され、プロテアーゼが細胞壁の溶解に重要な役割を果たすことが示唆された。調製したプロトプラストは、高い呼吸活性及び光合性活性を持ち、細胞壁の再生も観察された。

細胞壁溶解の機作は明らかではないが、まずプロテアーゼが作用し、次いでグリコシダーゼ類が作用するのではないかと推察している。

3Aa04　矮性エンドウ根のジベレリン誘導成長と細胞壁

谷本英一（名古屋市大・教養・生物）

多くの矮性植物の地上器官は顕著にジベレリンに反応する。ジベレリンによる茎や葉の伸長成長の制御機構は主にジベレリン要求性の矮性植物を用いて研究されてきた。しかし、根の伸長成長はこのような矮性植物においてもジベレリンによって殆ど促進されないので、根の伸長成長がどの程度ジベレリンに依存しているのか不明であった。演者のこれまでの研究結果によって次のことが判明した。

1）特異性の高いジベレリン合成阻害剤によって根の成長を抑制すれば、外から与えたジベレリンの効果が根でも顕著に現れる。

2）レタスや正常エンドウにおいては、低濃度のジベレリンが根の伸長成長を制御している。

本研究では、以上の結果をもとにしてまず、矮性のエンドウで同様の現象が認められるか否かを調べた。その結果、矮性エンドウ（cv. Little Marvel）においても低レベルのジベレリンによって根の成長は制御されているらしい事が判明した。

茎の実験系においては、ジベレリンの伸長促進作用はオーキシンとの共同作用であることが示されてきた。根におけるジベレリンの伸長促進作用が、茎と同様オーキシンとの共同作用であるか否かが次の疑問である。そこで、オーキシン作用の特徴である酸成長と細胞壁の変化の２点に着目し、次の２点を調査した。

（１）ジベレリンは根の酸成長能力を促進するか。
　　結果＝【ＹＥＳ】

（２）ジベレリンによって細胞壁糖組成が変化するか否か。
　　結果＝【ＹＥＳ】
　　【変化の大きい分画】
　　［根の先端部伸長帯］：ヘミセルロース画分のアラビノース低下、
　　　　グルコース増加
　　［根の上部成熟帯］　：ヘミセルロース画分のキシロース低下、
　　　　グルコース増加

根の細胞壁については研究情報が少なく、残された課題は多い。しかし、これまで得られた結果によれば、ジベレリンによる根の伸長促進の過程はオーキシンによる茎の伸長促進の過程と矛盾しない。根では内生オーキシンが飽和状態にあることを考えればジベレリンによる根の伸長促進はオーキシンとの共同作用であることが支持される。

3Aa05 細胞壁のin vivoとin vitroクリープ

山本良一・桜井直樹（帝塚山短大・食品、広島大・総合科学）

細胞の伸長生長速度は主として細胞の浸透圧と細胞壁の力学的性質の二つのパラメターの函数であると考えられている。伸長生長はほぼ一定の荷重のもとで起こる細胞壁の伸びであると考えられる。一方、細胞壁試料に荷重をかけて観察される純物理的な伸びはクリープと呼ばれている。すなわちクリープは伸長生長と類似した現象である。細胞壁の力学的性質を測定するためにはクリープ測定が有利であると言える。しかし、クリープ測定のためには細胞壁試料に瞬間的に荷重をかけなければならないが、このときの荷重をかける操作によるショックをのぞくことは容易ではない。

これに対して、われわれの開発した細胞壁の応力緩和測定法では測定の条件を制御することが容易である。粘弾性モデルを用いた理論によれば応力緩和はクリープに変換できる。しかし、得られた細胞壁の応力緩和函数から今までのところこの変換を解析的に解くことができていない。そこでコンピューターを用いたシミュレーション法を利用して数値計算的に応力緩和とクリープの関係を解くことを試みた。また、その結果を用いて伸長生長が細胞壁の伸長のシミュレーションとして計算できるかどうかの可能性を検討した。

エンドウの茎の表皮組織を分離してメタノール固定し、in vitroクリープおよび応力緩和測定をした。この結果、応力緩和パラメターを用いたコンピューターシミュレーションによってクリープがよく表されることがわかった。

次に、in vivoクリープを測定した。in vivoクリープとしてエンドウ茎切片をマニトール処理した後水に戻したときの伸長を用いることにした。マニトール処理によって細胞壁にかかる荷重が取り除かれたと考られる。また、切片を水に戻すと細胞壁に力が再びかかると考えられ、そのときの伸長はクリープと考えることができる。実験の結果、この方法で得られたin vivoクリープはin vitroクリープよりもゆっくりと起こることがわかった。マニトール処理時に切片に入ったマニトールは切片を水に戻しても徐々にしか外に出て行かないことがわかった。マニトールの出ていく速度はin vivoクリープの速度をよく説明しているように思われる。in vivoクリープとして測定した細胞の伸長生長は細胞の浸透ポテンシャルと細胞壁の力学的性質の二つのパラメターの函数としてシミュレーション的に表すことができた。

3Aa06

Chlorella ellipsoidea C-87 における細胞壁溶解酵素の精製とその性質

荒木直子、武田宏[1]（新潟大・理・生物、[1]新潟大・教養・生物）

単細胞緑藻 Chlorella ellipsoidea C-87 において、細胞壁溶解活性が細胞ホモジェネート中及び培地中に検出され、またホモジェネート中の活性は細胞壁に結合していて、それが塩化リチウムによって可溶化できること、そして塩化リチウムによって可溶化された酵素と培地中の活性は互いに似た性質を持つこと等をすでに報告した（日本植物生理学会1989年度年会）。今回、培地中の細胞壁溶解酵素の精製を行ない、細胞壁結合性細胞壁溶解酵素とともにその性質を研究した。

細胞壁溶解に関わる細胞壁結合性の酵素は細胞壁オートリシス分解産物の分析から、細胞壁をエンド型に分解して多糖を遊離するエンド型多糖生成酵素、グルコース二糖を生ずる二糖生成酵素、及びグルコシダーゼであることが示された。また、これらの酵素の中で多糖生成酵素のみが塩化リチウムによって細胞壁から可溶化された。グルコシダーゼは二糖生成酵素によって生じたグルコース二糖をさらにグルコースに分解する働きがあることがオートリシス産物の変化から示された。同様に細胞壁の酵素処理分解産物を分析することにより、培地中には多糖生成酵素と二糖生成酵素が含まれていることが分かった。この培地中の酵素を硫安塩析、ゲル濾過、イオン交換クロマトグラフィによって精製し、多糖生成酵素はゲル濾過における溶出位置から分子量およそ 50 kD と推定した。

細胞壁をヘミセルロースとリジド壁に分画し、それぞれを基質にいろいろな画分の細胞壁溶解酵素の分解活性を調べたところ、ヘミセルロースの分解は多糖生成酵素によることが明かになった。しかし、ヘミセルロースの酵素処理で低分子の分解産物が生じないことから、二糖生成酵素はヘミセルロースには働かないことが分かった。一方、リジド壁は多糖生成酵素によっては分解されず、二糖生成酵素及びグルコシダーゼにより分解され低分子化された

以上の結果から C. ellipsoidea C-87 の細胞壁溶解においては、ヘミセルロースがエンド型分解酵素により分解され、リジド壁には二糖生成酵素とグルコシダーゼがエキソ型に働くことが明かになった。

3Aa07 クロレラにおける細胞壁溶解活性の種特異的変異II.

荒木直子、武田宏[1]（新潟大・理・生物、[1]新潟大・教養・生物）

クロレラにおける細胞壁溶解活性には種特異的な変異があることを先に報告した（日本植物生理学会 1988年度年会)。それを補足するためさらに多くの株について調べたのでその結果を報告する。あわせていくつかのクロレラの細胞壁の他種株からの酵素による分解についても研究した。

クロレラは細胞壁の糖組成をもとにして分類するとリジド壁の成分がグルカンのグループとグルコサミンのグループに大別される（武田 1989)。そして先に報告した結果では細胞壁溶解活性の性質もまたこの両グループのクロレラ間で大きく異なっていた。細胞壁溶解活性の至適 pH についてグルカングループでは C. ellipsoide C-87 及び C. saccharophila 211-1d、グルコサミングループでは C. vulgaris 211-11f, C. kessleri 211-11h/9 について調べた。C-87 の至適 pH は pH 5-6, 211-1a は pH 4-5, 211-11f 及び 211-11h/9 は pH 8 にあり、グルカングループは酸性側、グルコサミングループのクロレラはアルカリ側に活性の至適 pH があるという先の報告を補強する結果を得た。細胞壁オートリシスの分解産物について 211-11f においてはオートリシスをアルカリ側で行なっても酸性側で行なっても分解産物は高分子の多糖のみであり、C-27（Satoh and Takeda 1989）と同じであったが、211-11h/9 においては pH 8 でオートリシスさせた場合に高分子の多糖とともに低分子のオリゴ糖も検出された。グルカングループのクロレラにおいては低分子の分解産物が検出され炭水化物分解酵素が働いていることが示されている。グルコサミングループのクロレラにおいては主に高分子の分解産物が生じ低分子化が見られず炭水化物分解酵素とは異なった性質の酵素が働いている可能性が示唆されているが、今回の結果も同じであった。しかし 211-8l、211-11h/9 では低分子の糖も検出され、グルコサミングループのクロレラに特有の可溶化酵素にあわせて、炭水化物分解酵素も働いていることが示された。

クロレラの細胞壁溶解活性の特異性をいろいろなクロレラの細胞壁と酵素の組み合わせで実験した。グルカングループの細胞壁は同じグループの他のクロレラの酵素により分解されたがグルコサミングループのクロレラの酵素によっては分解されず、逆も大筋では同じような傾向を見せた。しかしグルコサミングループに属する株でも C-27 の細胞壁を分解しない場合がある等、細胞壁溶解活性は種の段階だけでなく株の段階でも変異があることが分かった。

3Aa08　アズキ細胞壁キシログルカンの構造変化を引き起こす酵素

西谷和彦・富永るみ・千田ゆかり　（鹿児島大・教養）

キシログルカンは高等植物の細胞壁マトリックスを構成する主要な多糖類の一つである。アズキ上胚軸では細胞壁中に、重量にして細胞壁高分子全体の１１％のキシログルカンが存在し、その重量平均分子量はおよそ１Ｍｄａｌである。この細胞壁キシログルカンの分子量が変化すると、その変化は細胞壁の力学的性質の変化を引き起こし、その結果、細胞壁の形態変化、すなわち細胞生長が起こることを我々は明らかにした（Nishitani & Masuda 1981）。 その後オートムギ、マツ、エンドウなどでもキシログルカンの分子量変化が細胞生長の制御に関与することが明らかにされてきた。しかしながら、このキシログルカンの分子量変化に関与すると考えられる酵素反応や、酵素は不明である。そこで、我々はアズキ上胚軸アポプラスト液（細胞壁液）中に存在し、キシログルカンの構造変化に関与すると考えられる酵素活性の検出と酵素の精製を進めた。

２５℃の暗所で６日間生育させたアズキ上胚軸より長さ１ｃｍの切片を切取り、１０ｍＭの燐酸緩衝液（ｐＨ６、２）で洗浄した後、５０ｍＭ　$MgCl_2$ 水溶液でアポプラストを平衡化し、アポプラスト液を遠心分離法（２０００ｘｇ）で採取しアポプラスト酵素粗標品とした。この酵素粗標品を硫安塩析、ＴＳＫ－ＳＰ－５ＰＷによるイオンクロマトグラフィー、Ｓｕｐｅｒｏｓｅ　１２ＨＲによるゲルクロマトグラフィーにより精製を進めた。各精製段階にあるアポプラスト酵素標品を、アズキ上胚軸よりアルカリ溶液抽出法等により精製したキシログルカンと反応させ、反応後、キシログルカンの分子量をゲルクロマトグラフィーによって調べることによって酵素活性を解析した。

その結果、アズキ上胚軸アポプラスト中にはキシログルカンの分子量分布を変化させる酵素活性が存在することが明らかになった。反応産物の解析から、この酵素反応によって基質として用いたキシログルカンよりも分子量の大きい水に不溶性のキシログルカン鎖と分子量の小さな水に可溶性のキシログルカンが生じる事が明らかになった。以上の結果は、この酵素がキシログルカン鎖を途中で切断し、切断された断片の一方を他のキシログルカン鎖に転移する酵素、すなわちキシログルカン転移酵素である可能性が高いことを示している。

3Aa09 カボチャ下胚軸切片のＵＤＰ－糖合成に対するＡＢＡの影響

若林和幸[1]、桜井直樹、倉石晉（[1] 香川大・教育、広島大・総科）

黄化カボチャ芽生え下胚軸の切片をＡＢＡで処理すると、切片の伸長が処理後３時間目以降で著しく抑制され、同時に細胞壁構成成分のうちヘミセルロースとセルロース画分での合成が阻害されることを報告した(51 回植物学会、87,88 年植物生理学会）。特に、伸長の抑制がまだ見られない３時間目で既に、ヘミセルロースとセルロースの合成が有意に阻害されていた。また、ジクロベニルやモネンシン等の細胞壁合成阻害剤により切片の伸長が抑制されること、ＡＢＡは切片の浸透圧には影響を与えていないことから、ＡＢＡによる細胞壁合成の阻害が切片の伸長抑制の一因になっていると考えられる。

今回は、ＡＢＡの細胞壁合成の阻害の機構を調べる目的で、切片内のUDP-糖量およびラベルしたグルコースのUDP-糖残基への取り込みに対するＡＢＡの影響を調べた。

黄化カボチャ芽生えの下胚軸から切り取った切片を、^{3}H-ｸﾞﾙｺｰｽ、$\pm 10^{-4}$M ABA を含む10mM K-ｸｴﾝ酸緩衝液(pH 6.8)で処理した。次に、切片を80％EtOH中で磨砕し抽出を行い、この時、内部標準として、UDP-(^{14}C)-ｸﾞﾙｺｰｽを加えた。この後、抽出液を濃縮しジエチルエーテルで洗い、DEAE-Sephadex カラムを通した後再度濃縮し、HPLCにかけUDP-糖画分を分取した。次に、分取した画分にEtOHを加え上清を分取し乾固させ、これに 2NTFAを加え加水分解を行った。この試料の一部をアセチル化しGLC で各糖残基量を定量した。残りの試料は、糖分析用HPLCにかけ各糖残基に相当する画分を取り、それぞれの糖残基への放射能の取り込み量を調べた。

分取したUDP-糖画分の糖残基としてはラムノース、アラビノース、キシロース、マンノース、ガラクトース(Gal)、グルコース(Glc) が確認出来た。UDP-糖の中ではUDP-Glc 量が最も多く全体の60％、次が UDP-Gal 25 ％で、他のUDP-糖類は、5％以下であった。これらの比率は処理時間中を通してほぼ一定であった。また、ＡＢＡの影響はUDP-糖量には見られなかった。次に、取り込みをみると、UDP-糖画分の糖残基に取り込まれた放射能の72％が Glcに、20％が Galに取り込まれており、他はいずれも3%以下であった。ＡＢＡの影響は、3時間処理後で見られ、ＡＢＡはUDP-Glc, UDP-Galへの取り込みを30％, UDP-Xyl への取り込みを20％増加させていた。この時、切片内の遊離 Glcへの放射能の取り込みには、ＡＢＡの影響は見られなかった。以上の結果から、ＡＢＡは前駆物質であるUDP-糖の合成を阻害するのではなく、UDP-糖から細胞壁多糖類が合成される段階を阻害しているものと考えられる。

3Aa10　単離フラグモプラストによるＵＤＰグルコースの取り込み。

柿本辰男　柴岡弘郎　大阪大学、理学部、生物

高等植物の細胞分裂時に細胞隔壁はフラグモプラスト（隔膜形成体）によって形成される。フラグモプラストは２つの娘核の間の赤道面に並ぶ小胞や小胞の融合した細胞板、微小管やアクチンのような細胞骨格系などからなる構造体である。細胞隔壁にはセルロースのほかにカロースやザイログルカンのようなマトリックス多糖が存在する。これらの多糖の合成の起きている細胞内の位置はあまりわかっていない。そこでわれわれは、まずグルカン合成酵素活性の位置を調べた。

ＤＮＡ合成酵素阻害剤のアフィディコリンと微小管合成阻害剤のプロピザマイドを用い細胞分裂後期～終期に同調化したタバコ培養細胞ＢＹ－２のプロトプラストを16μｍのナイロンメッシュを通すと、フラグモプラストと核の複合体が単離される。単離フラグモプラスト・核複合体を［^{14}Ｃ］ＵＤＰ－グルコースとともにインキュベートし、冷エタノール不溶性分画の放射能をグルカン合成酵素の活性として調べたところ、グルカン合成酵素の活性はＥＤＴＡ、ＥＧＴＡによって抑えられた。また、グルカン合成酵素の活性の細胞内局在を調べるため、［^{3}Ｈ］ＵＤＰグルコースと共にインキュベートした単離フラグモプラスト・核複合体をグルタールアルデヒドとOsO_4で固定し、オートラジオグラフィーを行い電子顕微鏡で観察した。放射活性は形成中の細胞板のなかに存在し、小胞体やゴルジ体にはほとんど認められなかった。

以上のことよりフラグモプラストにおいてグルカンは細胞板で合成されると考えられる。今後、本研究において合成されたグルカンがβ-1,3-グルカンであるのかβ-1,4-グルカンであるのかを調べる必要がある。また、基質を変えれば他の多糖の合成酵素活性の位置を調べることも可能である。

3Ca01 分裂酵母の性フェロモンによるシグナル伝達

下田　親、北村憲司[1]　（大阪市大・理・生物、[1]大阪市大・医・第二生理）

分裂酵母 Schizosaccharomyces pombe は通常一倍体で栄養増殖する。培地中の窒素源が欠乏すると、h^+（プラス）型とh^-（マイナス）型の細胞間で接合し二倍体の接合子を形成する。接合反応は、凝集塊の形成、細胞融合、核融合の順に進行する。また、細胞融合前に観察される細胞の突起形成が細胞外に分泌されるフェロモン様物質により引き起こされることが知られている。接合不能突然変異体の遺伝解析から、これまでに１７個の特異的遺伝子が同定されている。演者らは、これらの遺伝子のうちで、h^-接合型細胞でのみ機能するmam2遺伝子について解析を行なってきた。今回はmam2遺伝子の塩基配列から予想される遺伝子産物の機能について報告する。

まず、S. pombe のゲノムライブラリーから単離したmam2遺伝子を含む 1.7 kb のＤＮＡ断片の塩基配列をダイデオキシ法により決定した。その結果、348コドンをからなる、イントロンで分断されていないＯＲＦが認められた。この予想されるmam2産物は、ロイシン、イソロイシン、セリンに富み分子量は39キロドルトンであった。タンパク質データベースのコンピュータ検索から、mam2タンパクはパン酵母 Saccharomyces cerevisiae のαフェロモンレセプターである STE2 タンパクとホモロジーがあることがわかった。また、親水性・疎水性予測から、mam2タンパクも STE2 タンパクと同様７個の膜貫通ドメインとＣ末端側の親水性ドメインを含むロドプシン型膜結合性レセプターであることが示唆された。したがって、mam2 遺伝子産物は、h^+型細胞から分泌されるフェロモン（Ｐ－ファクター）に対するレセプターと推定される。コード領域の約半分を欠失させ、かわりに S. cerevisiae の LEU2 遺伝子を挿入した欠失置換型突然変異遺伝子を作成し、遺伝子破壊実験を行なったところ、生長はするが接合能を欠くという表現型を示した。したがって、mam2 遺伝子は細胞の生存には必要ではないと考えられる。

一方、ノザンハイブリダイゼーションにより mam2 遺伝子の発現を調べたところ、転写レベルで調節されていることがわかった。すなわち、約1.5 kb の mam2 転写産物は、h^-型細胞を窒素源欠乏条件においた場合にのみ出現した。

3Ca02

酵母（S. cerevisiae）の紫外線処理細胞における染色体DNAの変動

久冨泰資、依田彰、壺井基夫（福山大・工・生物工学）

我々は、Saccharomyces cerevisiaeの胞子形成の遺伝子支配を明らかにする目的で、ホモタリックな胞子に紫外線照射を施して、数十のspo突然変異体を分離し、遺伝解析を行ってきた。

最近、それらの胞子形成不能突然変異体の核型解析をパルス・フィールド・ゲル電気泳動を用いて行っているうちに、一つの興味ある現象を見いだした。それは、すべてのspo変異体は単一の親株に由来するにもかかわらず、その第３番染色体DNA付近のDNAバンドの長さに大きな変動が見られたことである。この変動が第３番染色体DNAそのものの変動であることは、第３番染色上のMAT遺伝子及びLEU2遺伝子をプローブに用いたサザン・ハイブリダイゼーションの結果から確認することができ、その変動の幅は上下数100Kbにも及ぶことがわかった。また、第３番染色体以外に存在している数種の遺伝子をプローブに用いて、他の染色体DNAには変動が見られないことも確認した。一方、この変動は胞子形成不能という形質とは無関係であると考えられた。

そこで、次に、我々は、S. cerevisiaeのホモタリックな胞子に紫外線照射をし、任意に数十株を分離して、それらの第３番染色体DNAの長さに関しての変動性を検討した。すると、紫外線照射された胞子より得られた株のうち、約50%のものが第３番染色体DNAの長さに関し、変動していることがわかった。この変動が第３番染色体DNAに特徴的なものであることは、前述したようなサザン・ハイブリダイゼーション実験により確認することができた。現在、この変動を誘起するものが紫外線に特有のものであるかどうかを検定するために、突然変異原にエチルメタンスルフォネート(EMS)等を用いて、同様な核型解析を行っている。

3Ca03

酵母ＧＡＬ４タンパク質ＤＮＡ結合領域による植物内遺伝子発現の調節

横井久美、町田千代子、町田泰則　（名大・理・生物）

酵母の転写活性化因子であるＧＡＬ４タンパク質のＤＮＡ結合領域を持つポリペプチド（GAL４(1-147)）を植物細胞で発現させ、人為的に転写を抑制する系の開発を試みた。そのために、レポーター遺伝子のプロモーターと構造遺伝子の間にGAL４タンパク質が結合するＤＮＡ領域を挿入したキメラ遺伝子を作製し、GAL４(1-147)タンパク質と共存させた時、その発現の抑制が起こるかどうかを検討した。

リプレッサー遺伝子としては、エンハンサー領域を上流につないだカリフラワーモザイクウイルス(CaMV)35ＳＲＮＡプロモーターに、GAL４タンパク質のＤＮＡ結合領域のみを含む1～147アミノ酸残基をコードするＤＮＡ領域を連結したものを用いた。また、レポーター遺伝子としては、ノパリン合成酵素(NOS)遺伝子プロモーターやCaMV 35S RNAプロモーターと、大腸菌のβ-グルクロニダーゼ(ＧＵＳ)遺伝子の間に、GAL４結合部位であるUASG、あるいは結合部位に共通に見られる17塩基対のオリゴヌクレオチドを３つ挿入したものを用いた。レポーター遺伝子とリプレッサー遺伝子を、アグロバクテリウムを用いてタバコの培養細胞(BY-２)に導入し、形質転換細胞を得た。得られたカルスのＧＵＳ活性を測定したところ、いずれのレポーター遺伝子を用いた場合も、リプレッサー遺伝子を含むカルスのGUS活性の平均は、リプレッサー遺伝子を含まないカルスの平均の40～50%程度低くなっていた。このことから我々が用いた系では、不十分ではあるが遺伝子発現の抑制が起こることが分かった。

3Ca04

PCR法を用いたHeterosigma akashiwoの細胞膜 ATPase cDNAのCloning

和田雅人(筑波大・生)　浦山修・原論吉(東医歯大・生化)
佐藤忍・藤伊正(筑波大・生)

前回までの生理学会で我々は、、海産ラフィド藻Heterosigma akashiwo細胞膜上に、Na^+によって活性化されるバナジン酸感受性のATPaseが存在し、そのリン酸化反応中間体の解析により、このNa^+-activated ATPaseがSDS-PAGE上で約140 kDaのポリペプタイドであることを示した。また、構造上の類似性を検討する目的で、抗動物Na^+,K^+-ATPase抗体を用いたところ、動物のNa^+,K^+-ATPaseのαサブユニットと相同な構造を持つことが明らかになった。今回我々は、さらに詳しい構造を検討するためこのNa^+-activated ATPaseのcDNAの単離を試みた。cDNA cloningにPCR(ポリメラーゼ・チェイン・リアクション法)を用いた。現在までに報告されているイオン輸送性ATPase(動物のNa^+ K^+ー, Ca^{2+}ー, H^+ K^+ーATPase, 酵母、アカパンカビ、高等植物のH^+ーATPase)に共通のアミノ酸配列を検索したところ、リン酸化反応中間体のリン酸結合部位とATP結合部位の2ヶ所において、それぞれ7個のアミノ酸が保存されていることを見いだしたので、このアミノ酸を20 merのオリゴヌクレオチドに変換し、これをPCR法のプライマーとした。アカシヲ細胞由来のcDNAを鋳型とし、アニーリング温度を変えて合成を行い約0.75 kbpのバンドを得た。　この0.75 kbpのDNAを用いアカシヲRNAに対しNorthern hybridizationを行い、アカシヲ細胞での発現を確認した。ハイブリダイズしたRNAのサイズは、3.8と1.7 kbであり、これは、アカシヲ細胞膜に140 kDaのNa^+-activated ATPaseと95 kDaのH^+-ATPaseの2種が存在するという結果と一致し、これからNa^+-activated ATPaseのcDNAは、3.8 kbのRNAに対応していると結論した。　この0.75 kbpのDNAをpUC118にcloningし、この3.8 kbのRNAにのみ反応する3cloneを得た。この3 cloneは、全て同一の配列を示した。更に他の生物のATPaseの対応する部分における相同性を検討したところ、原生動物のL. donovaniのH^+-ATPaseとアミノ酸配列で約40%の相同性を示したが、高等植物、真菌、高等動物などのATPaseとは、20-30%程度の相同性しか示さなかった。これは、ATPaseのこの部分の相同性が、近縁種で高く、輸送するイオン種には余り関係がないためと考えられる。現在、この0.75 kbpのPCR fragmentをprobeにし、アカシヲNa^+-activated ATPase分子のfull-length cDNAの再screeningを試みている。

3Ca05

Synechocystis PCC6803の無機炭酸輸送に必須な遺伝子

小川晃男、小俣達男（理研、太陽光科学）、J.G.K. Williams (E.I. Du Pont de Nemours)

ラン藻は無機炭酸(C_i)濃縮機構を持っており、光照射下でCO_2およびHCO_3^-を細胞内に輸送する。我々はSynechocystis PCC6803をもちいて２種類のC_i輸送欠損変異株(RKaおよびRKb*)を単離した。RKaおよびRKb共CO_2輸送活性はほとんど無く，RKbはHCO_3^-輸送活性も無かった。一方、RKaのHCO_3^-輸送活性は野生株の約1/3であった。野生株のDNAライブラリーから、RKbと相補性をもつクローンを単離し、その遺伝子解析を行った。単離したクローンは5.2kbpのDNAが挿入されていた。サブクローニングによって1.2kbpのDNA断片が挿入された、RKbと相補性をもつクローンを作成した。挿入DNAの核酸配列を調べた結果、80個のアミノ酸から成るタンパク質をコードするORFがある事が判った。このタンパク質は極めて疎水性が高い事から膜タンパクであると考えられる。ORF中に２つのSpeⅠサイトがあり、この部分にカナマイシン耐性遺伝子を挿入したものを用いてSynechocystisの野生株をカナマイシン耐性株に形質転換した。カナマイシン耐性株(M9)はRKbと似た性質を示し、CO_2およびHCO_3^-輸送活性をほとんど持たなかった。PCR法によってRKbのDNAを鋳型として上記ORF部分のDNAを合成し、その核酸配列を調べた結果、AAA(Lys)がTAA（終止コドン）に変わる変異である事が判った。一方、RKbと相補性を持つ上記のクローンはRKaと相補性を持たなかった。現在、RKaと相補性を持つクローンの単離を試みている。

*本学会1989年度年会講演要旨集122頁のRKbはRK11と改名し、本講演におけるRKbとは異なる変異株である。

3Ca06 ラン藻Synechocystis PCC6803の脂肪酸不飽和化酵素遺伝子の構造

°和田元、村田紀夫（基生研）

ラン藻は、低温に曝されると膜脂質の脂肪酸を不飽和化して低温による脂質の流動性の低下を補償する。我々は、この脂肪酸の不飽和化に注目し、ラン藻における低温適応の分子機構について研究を行っているが、この機構を解明するためには不飽和化酵素遺伝子を分離し、それらの発現が温度によってどのように制御されているかを調べることが不可欠である。本研究では、ラン藻Synechocystis PCC6803の不飽和化欠損変異株（Fad12）の相補を指標にしてクローニングした、Δ12不飽和化酵素遺伝子（desA）の全塩基配列を決定し、その遺伝子の構造及びそれによって予想される不飽和化酵素の性質について考察した。

Synechocystis PCC6803のgenomic DNA libraryから分離したdesA遺伝子は、Fad12を相補すると共に、この遺伝子によって形質転換して得られるAnacystis nidulans R2-SPcの形質転換体は、この株が本来持たないΔ12不飽和化酵素活性を獲得することから、この遺伝子はΔ12不飽和化酵素をコードしていることが示唆された。次に、desA遺伝子の全塩基配列をdideoxy nucleotideを用いるchain termination法によって決定した。その結果、この遺伝子は1053bpからなる1つのopen reading frameを含み、351個のアミノ酸より構成される40494Daのタンパク質をコードしていることが見いだされた。また、この遺伝子中には5個のATGコドンがin frameで配列しているが、1番目のATGコドンの5'上流域にのみ大腸菌プロモーターのPribnow box、"-35" consensus sequence、ribosome binding siteに類似した配列が見いだされることから1番目のATGコドンから翻訳が開始されることが示唆された。一方、塩基配列から予想されるΔ12不飽和化酵素は、全アミノ酸のうち57％が疎水性アミノ酸によって構成され、またハイドロパシープロットをとると45個及び47個のアミノ酸残基からなる2つの疎水性領域が見られることから、このタンパク質は膜結合性であることが推測された。

3Ca07

遺伝子組換えによるラン藻 Synechocystis PCC6803 の多価不飽和脂肪酸欠損株の作成

坂本敏夫　和田 元　Z.Gombos　村田紀夫　（基生研）

ラン藻 Synechocystis PCC6803 には、脂肪酸の炭素鎖上に二重結合を導入する部位特異性を異にする少なくとも４種の脂肪酸不飽和化酵素が存在し、それらによって脂肪酸の不飽和化が触媒されている．我々は、既に△6および△12の位置での不飽和化が欠損している変異株(Fad6, Fad12)を分離し[1]、Fad12の相補を指標にして△12不飽和化酵素遺伝子(desA)のクローニングを行った．本研究では、光合成の熱的安定性に対する多価不飽和脂肪酸の役割を明らかにするために、遺伝子工学的手法により、多価不飽和脂肪酸欠損株を作成し、その性質を調べた．

＜方法＞

desA 遺伝子の中にカナマイシン耐性遺伝子カートリッジを挿入したＤＮＡ断片を作成した．次に、このＤＮＡ断片を用いて Fad6 の形質転換を行い、カナマイシン耐性となった形質転換体をスクリーニングし、脂肪酸分析を行った．

＜結果＞

表に野生株、変異株(Fad6)、形質転換体(Fad6/desA⁻)を３４℃で培養したときの各脂質の脂肪酸組成を示す．形質転換体には、多価不飽和脂肪酸が無く、パルミチン酸とオレイン酸が多量に含まれていた．このことは、この形質転換体では△6および△12の位置での不飽和化が、ともに欠損していることを示している．

この形質転換体および野生株について光合成活性の熱的安定性を調べ、それらを比較することによって多価不飽和脂肪酸欠損が与える影響を調べたので報告する．

Major fatty acids of lipid classes from the wild type and desaturation mutants of Synechocystis PCC6803 grown at 34°C

Lipid		Fatty acid				
		16:0	18:1 (9)	18:2 (9,12)	18:2 (6,9)	18:3 (6,9,12)
		(mol %)				
MGDG	WT	57	6	10	tr	24
	Fad6	52	11	31	tr	1
	Fad6/desA⁻	52	42	0	tr	0
DGDG	WT	58	3	9	tr	25
	Fad6	53	8	33	tr	1
	Fad6/desA⁻	55	41	0	tr	0
SQDG	WT	76	9	9	tr	1
	Fad6	72	13	6	0	0
	Fad6/desA⁻	76	17	0	0	0
PG	WT	56	9	27	tr	1
	Fad6	53	16	23	0	0
	Fad6/desA⁻	52	43	0	tr	0

1) Wada,H. and Murata,N. Synechocystis PCC6803 mutants defective in desaturation of fatty acids. Plant Cell Physiol. 30: 971-978 (1989)

3Ca08

ラン藻 Synechococcus PCC 7942 の亜硝酸還元酵素遺伝子のクローニング

小俣達男、小川晃男（理研・太陽光科学）

ラン藻は高等植物と同様、硝酸を還元して同化する能力を持っている。硝酸同化反応の基本的な仕組みはラン藻と高等植物で共通であり、(1) 細胞内へのNO_3^-の能動的輸送、(2) 硝酸還元酵素(NR)によるNO_3^-のNO_2^-への還元、(3)亜硝酸還元酵素(NiR)によるNO_2^-のNH_4^+への還元、(4) グルタミン合成酵素(GS)によるNH_4^+のグルタミンへの固定、の四つの段階からなっている。高等植物では既にNR、NiR、GSの一次構造が明らかにされているが、NO_3^-の能動輸送に関与するタンパク質は同定されていない。これに対しラン藻では、GSの一次構造が高等植物のものと相同であることがわかっているほか、演者らによってNO_3^-能動輸送に関与するタンパク質が同定され、その一次構造が明らかにされている。

ラン藻のNRと高等植物のNRは分子量、電子供与体の種類などが異なり、進化的にはかなり隔たりがあるものと考えられる。これに対し、ラン藻と高等植物のNiRは分子量、電子供与体の種類、ヘムの含有などの点で共通の性質を示し、互いに相同のタンパク質である可能性が高い。我々はラン藻Synechococcus PCC 7942のNO_3^-能動輸送に関与する45kDタンパク質の遺伝子(nrtA)をクローニングしてその構造を研究してきたが、最近、この遺伝子のすぐ上流側に別の遺伝子があることを見出した。この遺伝子がコードするタンパク質のC末端部の200アミノ酸残基の配列がホウレンソウNiRのC末端部（アミノ酸 389-594）のアミノ酸配列と53％の相同性を示すので、我々はこの遺伝子がSynechococcusのNiR遺伝子であると推定した。ホウレンソウNiRは補欠分子族としてシロヘムをもっているが、その結合に関与するとされている４個のシステイン残基 Cys(473)、Cys(479)、Cys(514)、Cys(518)とその周辺部の構造は今回Synechococcusで見つかった遺伝子でもよく保存されている。現在、この遺伝子を不活性化することによってその機能の確認作業を行っている。

nrtAと今回見つかったNiRの遺伝子は77塩基対しか離れていない。45kDタンパク質とNiRはともにNH_4^+によって生合成が抑制されるので、これらの遺伝子がオペロンを構成して、共通の転写制御を受けている可能性もある。さらにこれらの遺伝子の近傍にNO_3^-代謝に関与する未知の遺伝子が存在する可能性も高い。これらの点についても現在検討中である。

3Ca09

ラン藻Anabaena variabilisの低温誘導性遺伝子

佐藤　直樹　（東大・理・植物）

高温により誘導されるheat shock proteins (genes)の存在は述べるまでもなく確立されているが，低温による遺伝子発現の誘導についての研究の歴史は浅く，植物においてvernalizationやhardeningとの関連において最近研究が始められている。筆者らは約10年ほど前に，Anabaena variabilisにおける生育温度の変化による膜脂質の組成の変化を調べ，38℃から22℃への温度シフトによって，モノガラクトシルジアシルグリセロール(MGDG)に結合したパルミチン酸(16:0)が速やかにパルミトレイン酸(16:1)に不飽和化されること，およびその後16:0と16:1のレベルがもとに戻るとともに，オレイン酸(18:1)がリノール酸(18:2)を経て，リノレン酸(18:3)に不飽和化されることを示した。これらの不飽和化にはタンパク質とRNAの合成が必要であり，低温シフトによって脂肪酸不飽和化酵素が誘導合成されることが示唆された。本研究では，低温シフトによって発現が誘導される遺伝子(Low temperature-induced genes: Lti genes)をクローン化し，その構造と発現様式を調べることを目的とした。Lti genesの中には，上述の不飽和化酵素の遺伝子および低温刺激に関するシグナル伝達経路の成分に関係した遺伝子も含まれることが期待される。

38℃で生育したAnabaena細胞と22℃に移して2.5時間後の細胞からそれぞれRNA を調製し，ランダムプライマーと逆転写酵素を用いて^{32}Pでラベルされた１本鎖cDNAプローブを合成した。これら２種類のプローブを用いて，λEMBL4 をベクターとして作ったAnabaenaの遺伝子ライブラリーをスクリーニングし，22℃プローブとは反応するが38℃プローブとは反応しないクローンを探した。約60個の候補クローンからDNA を調製し，EcoRI切断後電気泳動し，２枚のメンブレンにブロットした。これらのブロットを上記２種類のプローブとハイブリダイズさせ，22℃プローブと特によく反応するDNA断片を約10個選び出した。これらのDNA断片をpBluescriptにサブクローンしたのち，プローブとして用いてノーザンブロットを行い，少なくとも２つのクローン(Lti2，Lti46)に関しては転写産物の量が22℃への温度シフトにより増加することを確認した。これらの遺伝子について，塩基配列，転写単位を決め，可能なopen reading framesを推定した。現在これらの遺伝子の機能，プロモーター領域の同定などの検討を進めている。

3Ca10 炭酸脱水酵素遺伝子の光による発現制御

福澤秀哉・藤原祥子・Maribel L. Dionisio・宮地重遠
（東京大学応用微生物研究所）

炭酸脱水酵素（カーボニックアンヒドラーゼ: CA）は動植物に広く分布するが、光合成生物においては無機炭素（CO_2, HCO_3^-）の利用に寄与していると考えられており、特に多くの微細藻類において低CO_2条件下でその活性誘導現象が認められている。単細胞緑藻クラミドモナスを、あらかじめ高CO_2濃度（5%）で通気培養した後、CO_2濃度を大気レベル（0.04%）まで低下させるとCA活性が誘導されるが、この活性誘導には光が必須である。

クラミドモナス細胞表層CAは２種類の大小サブユニット２個ずつからなるヘテロ４量体の酵素で、１分子当り２個の亜鉛を含む糖蛋白質である。我々はこれまでに、大小両サブユニットの部分アミノ酸配列に基づいて合成したオリゴヌクレオチドプローブを用いcDNA並びに遺伝子を単離し、それらの構造を明らかにしてきた。ここでは、単離した２個の遺伝子それぞれの発現誘導に対する光の効果を転写レベルで明らかにすることを目的とした。

CA遺伝子については、以下の事が明らかとなっている。 1）２個の遺伝子がゲノム上にタンデムに並んで存在しており、5'上流側の遺伝子をCAH1、下流側をCAH2と命名した。 2）２個の遺伝子はどちらも同じ位置に10個のイントロンを持っている。 3）既に得られたcDNAはCAH1に由来していた。 4）２個の遺伝子は互いにコード領域で高い相同性（アミノ酸レベルで91.8%）を示したが、細胞から単離・精製した酵素の部分アミノ酸配列と一致するのはCAH1産物であった。

酵素が誘導される条件下で２個の遺伝子の転写産物量がどう変動するかを調べるために、両遺伝子それぞれに特異的なオリゴヌクレオチドプローブを作製し、これを用いてノーザンハイブリダイゼーションを行った。全RNA量をそろえて経時的にCA mRNA量の変動を測定したところ、CAH1 mRNAは高CO_2条件では全く検出できず、低CO_2条件に移し光照射を行うと２時間後まで増加し、その後やや減少するものの低CO_2条件では常に存在していた。しかし暗条件ではCO_2濃度を低下させてもmRNAは検出できなかったので、CAH1 mRNAの誘導にはCO_2濃度の低下に加えて光が必須であることが明らかとなった。一方CAH2 mRNAはCAH1と同じ2 kbの位置に検出されたが、CAH1のmRNA量と比較すると極く微量であり、興味深いことに転写のパターンはCAH1とは逆であった。すなわちCAH2 mRNAは高CO_2条件で検出され、低CO_2条件に移すと減少し、暗条件でも検出された。これらの結果からこれまで知られていたCAとは発現調節のパターンが異なるアイソザイムの存在が示唆された。CAH1の発現が光照射を必要とすることから、青色光の影響を転写レベルで調べたところ、CAH1 mRNA誘導に青色光が高い促進効果を示すことが明らかとなった。ただしこの青色光効果は、光合成を細胞に行わせるに足る赤色光照射が必要であった。また光合成阻害剤DCMU存在下では CAH1 mRNAの蓄積は認められなかった。

以上の結果から、低CO_2条件光照射下で誘導される細胞表層CAの遺伝子はCAH1であり、CAH1の転写レベルの調節には、光合成に加えて青色光が寄与していることが強く示唆された。

3Ca11

Rhodobacter capsulatus の２種のフェレドキシンのクローニングと遺伝子解析

佐伯和彦、宮武美枝、Debra A. Young*、Barry L. Marrs*、
松原　央　（阪大・理・生物、*duPont社・中央研）

フェレドキシン（Ｆｄ）は種々の代謝系で重要な機能を果たしている電子伝達蛋白質であり、鉄硫黄クラスターの型や数によっていくつかのグループに分類される。細菌の中には、異なるグループに属する複数のＦｄを持ち、培養条件に応じてそれらの含量の変動するものが知られている。これらのＦｄは生理機能の分担を行っていると考えられ、この蛋白質の機能分化や分子進化を調べる題材として好適である。我々は紅色光合成細菌 R. capsulatus SB1003 株から２種のＦｄ（Ｉ及びⅡ）を精製し、全アミノ酸配列などの性質を調べ、クローニングを行い、それぞれのクロモソーム上の位置と塩基配列を決定した。

まず、２種のＦｄを精製し、蛋白質レベルの解析を行った。ＦｄＩ（６４残基）は、2[4Fe4S]型で、窒素固定条件下で生育した菌体により多く含まれ、他の光合成細菌のＦｄあるいは窒素固定細菌のnif遺伝子近傍で見つかっているＦｄ様遺伝子産物とよく似たアミノ酸配列をもっていた。（しかしながら、２つあるCysクラスターのうちＣ末端側のものの配列が、CxxCxxxxxxxCxxxCMで、通常のＦｄにおいてはProである残基のMetへの置換が認められた）一方、ＦｄⅡ（111残基）は、窒素固定と非固定条件下において培養した菌体のいずれにもほぼ同量含まれ、その分光学的性質とアミノ酸配列はAzotobacter vinelandiiの[3Fe4S][4Fe4S]型Ｆｄとよく似ていた。

次に、アミノ酸配列をもとに合成したオリゴヌクレオチド（２０mer）をプローブとして、 R. capsulatusクロモソームのコスミドライブラリイを検索し、遺伝子のクローニングを行った。その結果、ＦｄＩ遺伝子についてはR. capsulatusクロモソーム上で分散しているnif遺伝子クラスターのうちの一つの近傍に位置していることがわかった。それぞれについてpUC118/119にサブクローニングして、サンガー法により塩基配列を決定したところ、予想される一次構造は開始コドンのMetを除いて、蛋白質を解析した結果と完全に一致していた。ＦｄⅡ遺伝子はモノシストロニックであると推定されたのに対し、ＦｄＩ遺伝子の４４ｂｐ上流には282ｂｐのＯＲＦが認められた。推定産物の一次構造は、植物の[2Fe2S]型Ｆｄに特有なCys配列を持ち、分子全体でも植物Ｆｄと約３０％の相同性を示した[1]。

1) K. Saeki et al　Nucleic Acid Research　Vol. 18　in press

3Ca12

藍色細菌 *Plectonema boryanum* における２つの Fe-蛋白質遺伝子（*nifH*, *frxC*）

°藤田祐一・高橋康弘・松原 央 （阪大・理・生物）

frxC は、ゼニゴケ葉緑体DNAに見出された未同定 open reading frame （URF）の一つで、窒素固定酵素 nitrogenase の component 2（Fe-蛋白質）と有意な相同性を示す。Nitrogenase は、生物界において、原核生物にしか分布していないため、*frxC* 遺伝子が葉緑体DNAに存在している意義及び、その遺伝子産物の機能の解明は、興味深い課題である。我々は、これまでの研究から、*frxC* 蛋白質がゼニゴケ葉緑体の stroma 画分に、二量体として存在し、ATP結合能を有すること、又、ゼニゴケ葉緑体には、nitrogenase 活性は検出されないことを報告した(1)。更に、我々は、藍色細菌 *Plectonema boryanum* から、ゼニゴケ *frxC* と83%に及ぶ高い相同性を示すURFを見出し、これを *P. boryanum* の *frxC* とした(2)。*P. boryanum* は、窒素固定能を有することが知られている。従って、*frxC* 蛋白質が、nitrogenase 系で Fe-蛋白質と類似の機能を担っているのか、或は、従来の Fe-蛋白質遺伝子である *nifH* 遺伝子が存在し、両遺伝子産物が機能的に分化しているのか、という仮説を検証する上で、格好の材料である。今回、我々は、合成 oligonucleotide probe を用いて、*frxC* とは別に *nifH* 遺伝子を同定し、そのcloning 及び塩基配列の決定を行った。

nifH 遺伝子は、既に多くの窒素固定生物から cloning され、非常に保存性の高い遺伝子であることが知られている。これらの *nifH* 間で完全に保存されており、*frxC* とは異なるアミノ酸配列を選び、そこから推定される oligonucleotide（20 mer）を合成した。これを probe として、*P. boryanum* の genomic library を screening し、3.4 kb-*Hind*III 断片を得た。その塩基配列決定の結果、*nifH* 遺伝子の全域（296 A.A.）を見出し、更にその上流には *nifU* 遺伝子の3'-領域、下流には *nifD* 遺伝子の全域（494 A.A.）が、見つかった。この *nifH* は、*Anabaena* 7120 の *nifH* と86%という高い相同性を示したが、同じ *P. boryanum* での *nifH* と *frxC* との相同性は、34%に過ぎなかった。窒素固定生物である *P. boryanum* で、*frxC* とは別に *nifH* が同定されたことから、*frxC* 蛋白質は、nitrogenase 系以外の未知の機能を有しており、両遺伝子は、同一細胞内で、機能的に分化しているという考えを強く支持する。更に、現在、両遺伝子の発現の相異を mRNA レベルで解析しており、この結果も合わせて報告する。

Reference (1) Y. Fujita et al. (1989) *Plant Mol Biol* 13:551 (2) Y. Fujita et al. (1988) 第61回日本生化学会要旨：216120

3Ca13

好冷菌Vibrio ABE-1のイソクエン酸脱水素酵素アイソザイムII遺伝子のクローニング（予報）

石井　睦、福永典之、佐々木昭治　（北大・理・植物）

イソクエン酸脱水素酵素（NADP）は、クエン酸回路の酵素群の一つで生物界に広く分布し、その形状からモノマー型とダイマー型に大別される。細菌類では一部のものを除いて、両者の分子量がほぼ同じであることから、モノマー型はダイマー型のサブユニットの遺伝子重複の産物であろうとの予測があるが、詳細な解析は殆どされていない。

我々は先に、好冷菌 Vibrio ABE-1 に、二種類のイソクエン酸脱水素酵素が存在し、一方はモノマー型、他方はダイマー型であることを報告した。また、これら両者が免疫化学的、およびアミノ末端アミノ酸配列により区別できることから、二つの型のイソクエン酸脱水素酵素の起源が、遺伝子重複によらないことを示唆した。

今回、我々は Vibrio ABE-1 株から上記のイソクエン酸脱水素酵素アイソザイムの遺伝子クローニングを試み、モノマー型（IDH-II）をコードしていると思われる DNA 断片を得、そのシークエンスから一次構造を予測した。Vibrio ABE-1 株の染色体 DNA を制限酵素 Sau3A Iで部分分解し、λDASH ベクターの BamH I の部位に連結、アミノ末端アミノ酸配列に基づいて作成したオリゴ DNA をプローブとしてスクリーニングを行ない、4.2 kbp の XbaI-XhoI 断片を得た。サンガー法により、この断片をシークエンスしたところ、2,226 塩基の読み取り枠と、その上流にリボソーム結合部位様、およびプロモーター様配列を同定した。塩基配列から予測されるタンパク質は、742 個のアミノ酸を含み分子量は 80,624 で、精製酵素の分子量と一致した。既にクローニングされている大腸菌由来のダイマー型イソクエン酸脱水素酵素とは、有意な相同性は見られなかった。データーベースによる検索においても、有意な相同性を示す他のタンパク質は見出せなかった。また、ハープロットの結果、遺伝子重複の際に生ずるような有意な繰り返し配列は発見できず、モノマー型とダイマー型のイクエン酸脱水素酵素は、起源を異にすることが示唆された。

3Da01

脱窒光合成細菌におけるＤＭＳＯ呼吸末端還元酵素のペリプラスミック空間への局在化機構

°吉田嘉宏、高井許子[1]、嶋田敬三、佐藤敏生[1]、高見伸治[1]
（都立大・理・生物、[1]広島大・理・植物）

脱窒光合成細菌Rhodobacter sphaeroides f.s. denitrificansは嫌気呼吸として脱窒のほか、dimethylsulfoxide(ＤＭＳＯ)呼吸系を有する。この呼吸の末端還元酵素であるＤＭＳＯ還元酵素はペリプラスミック空間に存在していること、この酵素はＤＭＳＯで誘導され、全ペリプラスミック蛋白質の１０％以上存在すること、この酵素は分子量82kDaのシングルポリペプチドより成り、補欠分子族としてモリブデンコファクターを１分子含んでいる事などを既に報告した。本実験ではこの蛋白質の局在化の機構について、主にイムノブロッティング法による生細胞の前駆体、成熟体を検出する方法で行った。

ＤＭＳＯ還元酵素が誘導された細胞では、成熟体の82kDaのポリペプチドの他に、前駆体と思われる84kDaのポリペプチドが検出された。この84kDaのポリペプチドは、細胞質または細胞膜に局在し、82kDaのポリペプチドがペリプラスムにのみ局在するのと対照的であった。蛋白質合成を阻害した後の84kDaのポリペプチドは時間と共に減少し、この減少はＣＣＣＰにより抑制された。これらの結果は、これまで知られている多くの分泌蛋白質同様、このＤＭＳＯ還元酵素も、分子量が約2000Da程のシグナル配列を持つより大きな前駆体として細胞質中で合成され、エネルギー依存的に膜透過し、シグナル配列が切断された後、ペリプラスムに分泌される事を示した。通常の生育条件でも前駆体が細胞質、細胞膜に存在する事から、前駆体は一旦細胞膜中にプールされてから分泌されること、および膜透過が成熟体形成の律速段階となっていることが示唆された。細胞膜に結合している前駆体ポリペプチドの大部分は細胞質側からのプロテアーゼにより消化され、細胞質側に残っていることが示唆された。前駆体の細胞質、細胞膜の蓄積は、培地中からモリブデンを除いた時さらに顕著であった。本酵素は補欠分子族としてモリブデンコファクターを持つが、モリブデンコファクターのアポ酵素への挿入と膜透過は密接に共役していることが示唆された。

3Da02

光合成細菌 Rhodopseudomonas viridis における反応中心チトクロムへの電子伝達

°松浦克美，甲斐章彦，畑中究，三木邦夫[1]（都立大・理・生物，[1]阪大・工・応用精密化）

紅色光合成細菌の光化学反応中心には，多くの種で，４つのヘムｃを持つチトクロムサブユニットが強く結合している．そのうち，Rhodopseudomonas viridisでは，結晶解析により立体構造が細部まで明らかになっている．チトクロムサブユニットに含まれる４つのヘムは，バクテリオクロロフィル二量体に近い側から順に，ｃ－５５９，ｃ－５５２，ｃ－５５６，ｃ－５５４と直線的に並んでいる．この反応中心結合型チトクロムへの電子供与体は，可溶性のチトクロムc_2とされているが詳しい解析はまだなく，特に結合型ヘムのうちどのヘムと直接反応しているかは明らかになっていない．そこで我々は，可溶性チトクロムから結合型チトクロムへの電子伝達の性質を特にそのイオン強度依存性を中心に調べ，立体構造における表面電荷の分布の検討と併せて，反応部位を推定した．

R. viridisの細胞から，膜標品や反応中心複合体を単離すると可溶性チトクロムが失われており，アスコルビン酸の存在下でフラッシュ光を照射すると結合性チトクロムｃ－５５６の酸化が観察された．そこへ，ウマミトコンドリアのチトクロムｃや，R. viridisのチトクロムc_2を存在させておくと，光酸化されたチトクロムｃ－５５６への可溶性チトクロムからの電子伝達が速やかに起こった．この結果は，結合型チトクロム中の４つのヘム間の電子伝達速度が可溶性チトクロムとの反応に比べ著しく速いため，両者の直接の反応を必ずしも意味しない．その反応のイオン強度依存性は，イオン強度が増加すると反応速度が大きく低下することを示し，可溶性チトクロムと結合性チトクロムの反応が両成分の電気的な引力に大きく依存していることを示した．ミトコンドリアチトクロムｃや R. viridisのc_2の反応部位周辺にはリジン残基が多く存在しプラスに荷電しているため，それと反応する結合型チトクロムの部位はマイナスに荷電していると推定された．

Deisenhofer らによって解明された立体構造を用いて，結合型チトクロムに含まれる４つのヘム近傍の表面構造を，電荷に注目して検討したところ，反応中心バクテリオクロロフィル二量体から第１番と，第４番のヘムはいずれも周囲の電荷がマイナスに偏っており，塩濃度依存性と矛盾しない．膜の存在の影響の結果および酸化還元電位から，膜に１番近いヘム（ｃ－５５９）のカルボキシル基側の面が反応部位であると示唆された．

3Da03

オーストラリア海域のバクテリオクロロフィルを含む好気性細菌の分布と性質　I　東海岸および西海岸

芝恒男[1],塩井祐三[2],高宮建一郎[3],C.R.Wilkinson[4],D.Sutton[5]
([1]東大・海洋研,[2]宮崎医大・生,[3]九大・理・生,[4]オーストラリア海洋研,[5]シドニー大)

序: 好気性光合成細菌は、その光合成活性や、色素合成に対して酵素が有効であることから、好気的環境に適応進化した細菌と考えられる。これまでに分離された好気性光合成細菌は Erythrobacter sp. OCh 114株を除いては光合成活性の弱い株ばかりであったので、有機物濃度が低く高頻度な分布が予想されるオーストラリア海域で分離を試みた。本報告ではバクテリオクロロフィル(Bchl)を含んだ好気性細菌（Bchl含有細菌: 光合成活性が確認されていないのでこう呼ぶ）の分布と若干の性質、さらにはこれら細菌の生態学的特徴について考察したので報告する。

方法: 西海岸のシャーク湾およびクリフトン湖、東海岸のクリーブランド岬、マグネチック島、オルフェス島、ブリスベーンで採集を行った。シャーク湾は塩類濃度が高く動植物相が貧弱。クリーブランドはシルト砂上の海草群、オルフェス島では良く保護されたサンゴ群落が特徴的であった。海水、海藻、海草、砂、海綿動物、サンゴを滅菌海水で破砕しさらに段階的に希釈したのち、ペプトンを含んだ寒天平板に塗布した。暗下25℃で10日間培養したのち、平板上の色素コロニーを分離し、Bchlの存在を調べた。

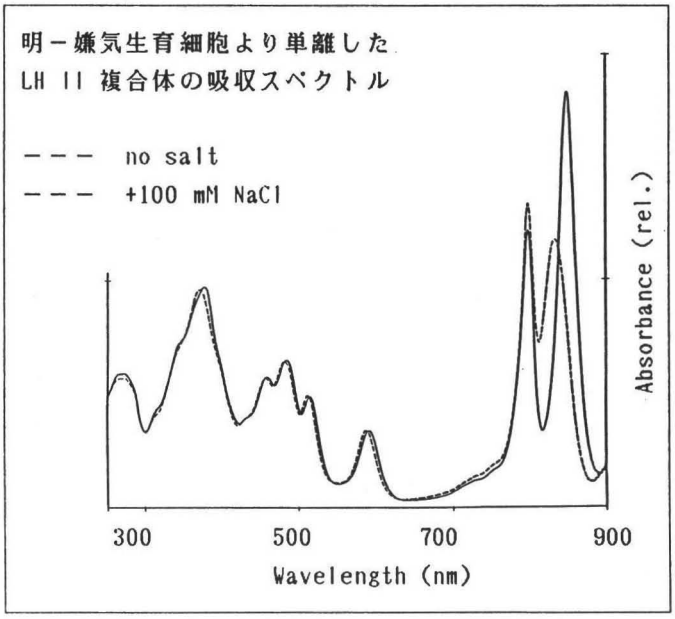
結果: Bchl含有細菌は、一般に海草や海藻から多く分離され、動物からは分離されなかった。Bchl含有細菌の従属栄養細菌中の割合は、30～20 %、時には49 %にもおよび、日本近海では多くて数 %でしかなかったのとは対照的であった。西海岸のシャーク湾とクリフトン湖では、塩分濃度がおよそ４倍ちかく異なるにもかかわらず、ラン藻と石灰石の複合体ストロマトライトからは常にBchl含有細菌が高頻度に分離された。東海岸ではBchl含有細菌が分離される頻度は低かったが、オルフェス島では、波砕帯の岩表面の付着藻からは、全従属栄養細菌の49 %にもおよぶBchl含有細菌の分布が観察された。一般にBchl含有細菌は、強い日照下の環境に多く分布することが推察された。Bchlの含量はOCh114株と同程度か、大多数はその５分の１以下であった。コロニー的には、E. longusタイプのオレンジコロニーと、OCh114タイプのピンクコロニーに類別された。

3Da04

Rhodobacter sulfidophilus から単離された色素蛋白質複合体の性質

° 土井道生・塩井祐三・N. Gad' on[1]・G. Drews[1]
(宮崎医大・生物, [1]Inst. Biol., Albert-Ludwigs-Univ.)

Rhodobacter sulfidophilus は好気性光合成細菌として知られている Erythrobacter sp.OCh 114と同様に，暗－好気的条件下で光合成色素を合成することができる．さらに従来の光合成細菌と同様，明－嫌気条件下で光合成的に生育できる特徴を持っている．本研究では，光合成器官形成に対する酸素の影響を調べる目的で，明－嫌気と暗－好気条件下で培養した菌体から反応中心複合体（RC），光捕集色素複合体（B800-850,LH II）を単離精製し，スペクトル的性質を明らかにした．精製されたLHIIは分子量 4,000～6,000 の２本のポリペプチドからなり，バクテリオクロロフィルとカロテノイドをおよそ3:1の割合で含んでいた．単離されたLH II は800～900nmと450～550nmにバクテリオクロロフィル，カロテノイドによる吸収を示すが，吸収極大の位置，大きさは塩の存在，pHの違い，界面活性剤の種類，濃度に依存して可逆的変化を示した．このような吸収極大の波長位置，大きさの変化は色素蛋白質複合体中での色素－色素，色素－蛋白質，蛋白質－蛋白質間の相互作用の変化を反映していると考えられる．精製標品よりvapour diffusion法により得られた結晶は450～900nm域で強いlinear dichroismを示し，色素分子の結晶内での規則正しい配向を示唆した．精製されたRCは他の光合成細菌で報告されているのと同様の吸収スペクトル，ポリペプチド組成を示した．以上の事から，R. sulfidophilusは酸素存在下で従来の光合成細菌と類似した光合成器官を形成する事単離されたLH IIは外部環境に依存して特徴のある吸収変化（蛋白質の構造変化）を示す事が明らかになった．



3Da05 Rhodobacter sulfidophilus の好気的色素生産と光合成活性

°塩井　祐三・土井　道生　（宮崎医科大・生物）

光合成細菌のバクテリオクロロフィル(Bchl)の生合成と光合成器官の形成は酸素と光によって制御されていると考えられてきた．しかし，好気性光合成細菌の出現によって酸素による調節は細菌によって大きく異なると考えられる．最近我々はRhodobacter sulfidophilus では，暗－好気条件下でも高い色素合成能を有すること，さらに暗－好気培養細胞が光合成活性を持つことを見いだした．この細菌は好気性光合成細菌と異なり，明－嫌気条件下でも生育し，広範囲な環境条件に適応して生育が可能である．本講演では R. sulfidophilus の暗－好気条件下でのBchlの生合成および暗培養細胞の光合成活性について報告する．

［方法］ R. sulfidophilus はグリセロールを含む有機培地で明－嫌気，暗－好気条件下で，28°C，24時間培養した．Bchlはアセトン－メタノール(7:2，v/v)で抽出後，分光的に定量した．生育は650 nmでの濁度またはタンパク量により測定した．

［結果と考察］R. sulfidophilusは明－嫌気，明－好気と暗－好気条件下で生育し，暗－嫌気条件下では明－嫌気条件の10% 以下であった．Bchlの生成は明，暗－好気の両条件下でも起こり，明－嫌気条件のそれぞれ10%，74%であった．明－好気条件下でBchlのレベルが低いのはBchlの膜への取り込みが光によって阻害されるためと考えられる．この光による調節はErythrobacter sp. 114 株よりも感受性が低く強光度下でも色素の蓄積がみられた．明－嫌気と暗－好気培養細胞の吸収スペクトルは 400-550 nm 波長範囲で異なりカロチノイドの変化に伴うものである．暗－好気培養細胞あるいは膜画分ではシトクロムの光酸化反応が見られた．さらに12時間の暗培養細胞を用いて好気的生育に対する光の影響を調べたところ，暗条件に比べて 35%の細胞量の増加がみられた．このことは好気的条件下でも光照射によって呼吸と共に光エネルギー転換が起こり収量が増加したものと考えられる．

R. sulfidophilus は通性光合成細菌の生育条件に加えて好気性光合成細菌の持つ酸素に抵抗性のある光合成能を持っている．このことは酸素や酸化還元のバランスを環境に即応して調節でき，より広範囲な環境条件に応じて生育が可能であることを示している．

3Da06

光合成細菌 Rhodopseudomonas palustris の光捕集系 —— B800 の複数の存在状態

嶋田敬三[1]、山崎 巖[2]、玉井尚登[2]、三室 守[3] ([1]都立大・理・生物、[2]北大・工・合化、[3]基生研)

多くの紅色光合成細菌において光捕集系のバクテリオクロロフィル(Bchl)は近赤外領域の吸収極大から少なくとも３種の存在状態(Bchl フォーム)が認められており、一般に B800, B850, B875(または B880)と呼ばれている。我々はこれらの Bchlフォーム相互および反応中心との間の励起エネルギー転移過程について時間分解蛍光スペクトルにより研究を行い、Rhodobacter sphaeroides においては B875 は単一成分ではなく長波長フォーム B890 が存在すること、同一色素蛋白(LH 2)内にある B800 から B850 への励起エネルギー転移は 時間分解能(6 ps)以下で完了していること, B850 から B875 への励起エネルギー転移も大部分が 6 ps 以下で起ることなどを明かにした(1)。しかしこのような性質は紅色光合成細菌に共通なものとは限らない。Rb. sphaeroides とは多少異なった性質を持つことが知られている Rhodopseudomonas palustris について上記のような性質を検討した。

＜方法＞測定は弱光下で培養した Rp. palustris 生菌を用いて行い 800KHz、パルス幅 6 ps、800 nm の色素レーザー光を励起光とし、時間相関単一光子計数法によって行った。

＜結果＞励起直後にすでに蛍光極大は 890 nm 付近に見られ 865 nm 付近に肩が観察された。前者は B875 後者は B850 からの蛍光と考えられ、Rb. sphaeroides 同様大部分の励起エネルギーが 6 ps以下で B800 から B850 を経て B875 へ転移したことを示している。また 890 nm 付近の極大は 100 ps 以内に 895 nm 付近へシフトし B875 より長波長に成分があることを示している。注目すべきは Rb. sphaeroides では全く認められなかった 830 nm 付近の蛍光が観測されることである。スペクトル解析の結果、各時間の蛍光スペクトルは 833, 865, 892, 914 nm にそれぞれ極大を持つ４つの成分からなることが示された。F914 は上記の長波長フォームと考えられるが、F833 は B800 からの蛍光とは考えられず 820 nm 付近に吸収を持つ Bchl からの蛍光と考えられる。すなわち、Rp. palustris には B875 との相互作用が弱い少量の B800-820複合体が存在することを示唆し、この菌のLH 2 のポリペプチド組成が Rb. sphaeroides 程単純でないこと(2,3)との関連が注目される。

(1)Shimada et al. (1989) BBA 975, 72-79 (2)Hayashi et al.(1982) J. Biochem. 92, 1805-1811 (3) Tadros & Waterkamp (1989) EMBO J. 8, 1303-1308

3Da07

緑色光合成細菌のクロロソームにおける色素間相互作用の可逆的破壊とエネルギー転移

°松浦克美，J. M. Olson[1]（都立大・理・生物，[1]Odense Univ.）

緑色硫黄光合成細菌と緑色糸状性光合成細菌の主要な光捕集性色素であるバクテリオクロロフィルc（BChl c）は，膜の細胞質側に付着した長細い袋状の構造体であるクロロソーム中に存在している．BChl cは，他の多くの光合成色素と違って，蛋白質に結合して存在しているのではなく，色素同士が相互作用して機能的な高次構造をとっているとする考え方が最近有力になってきている．BChl cに吸収された光エネルギーは，クロロソーム中にわずかに存在するBChl aを経由して膜中のBChl aに転移され，反応中心での光化学反応に利用される．我々は，クロロソーム中における色素の高次構造と機能の関係を明らかにしていくために，BChl c間の相互作用を破壊すると示唆されていたヘキサノールの，クロロソームの吸収スペクトルと蛍光スペクトルに対する影響を調べた．

緑色硫黄細菌Chlorobium limicolaおよび緑色糸状性細菌Chloroflexus aurantiacusから単離したクロロソームを１－ヘキサノールで飽和した水溶液（６０mMヘキサノール）に懸濁すると，BChl cの７５０nm(７４０nm)にピークを持つ近赤外吸光帯が６７０nmにピークを持つ吸光帯に完全に変換された．この変換は，BChl cの有機溶媒溶液で明らかにされている集合体から単量体への変換に対応し，隣接するBCHl c分子間の配位結合をヘキサノールの酸素原子がBChl cのMg^{2+}に配位して破壊することによって引き起こされると推定された．このような状態のクロロソームでBChl cを光励起すると放出される蛍光は，BChl a からが主体でBChl cからは少なく，100%ヘキサノールでクロロソームから抽出した色素とは吸収スペクトルが似ているにもかかわらず対照的であった．ヘキサノール処理で単量体型BChl cの吸収スペクトルを示すクロロソームを，２倍以上にゆっくり希釈しヘキサノール濃度を下げると，もとの集合体型の吸収スペクトルにほぼ完全に戻った．また，蛍光スペクトルからも色素間高次構造の完全な回復が確認された．

これらの結果は，クロロソーム中のBChl cの吸収スペクトルが有機溶媒中に比べ７０～８０nm長波長側へシフトしている原因がタンパクとの結合ではなくクロモフォア間の相互作用によること，そのような相互作用なしでも何らかの高次構造を維持しBChl aへのエネルギー転移が可能かつ可逆的に正常なクロロソームに戻れる状態であることを示す．

3Da08

渦鞭毛藻 Protogonyaulax tamarensis 色素蛋白に結合したペリジニンのラマン分光

栗本 宜孝、橋本 秀樹、小山 泰、山野 由美子[1]、伊藤 允好[1]、緒方 武比古[2]、三室 守[3]（関西学院大・理、[1]神戸女子薬大、[2]北里大・水産、[3]基生研）

ペリジニンは、渦鞭毛藻類（dinoflagellate)に特徴的に含まれるカロテノイドで、海中での効率的な光エネルギー捕穫とクロロフィルへのエネルギー伝達を担っていると考えられている。ペリジニンからクロロフィルへのエネルギー伝達は、光捕穫色素蛋白複合体（Peridinin-Chlorophyll a-Protein, 以下ＰＣＰと略す）の蛍光励起スペクトルの観測により高い効率で行われることが示されている[1)2)3)]が、光合成系でペリジニンのエネルギー捕穫・伝達機能の発現に密接に関与すると考えられる分子構造についての報告はほとんどない。今回、ＰＣＰに結合したペリジニンの構造上の特徴を、共鳴ラマン分光法を用いて明らかにすることを試みた。

ＰＣＰは、Haxoらの方法[1)2)]でProtogonyaulax tamarensisより調製し、100mMのリン酸カリウム緩衝液（pH7.0）に懸濁した。このＰＣＰおよび、ペリジニン（メタノール溶液）のラマンスペクトルの測定には、Nd：ＹＡＧレーザーの532nmの光をプローブ光として用いた。図１にフリーなペリジニンとＰＣＰのラマンスペクトル（常温）を示した。図２にペリジニンの異性体である全トランス体（11'Z体）および11'-シス体（11'E体）の1300-1100cm^{-1}領域のラマンスペクトル（液体窒素温度）を示した。この領域では異性体の構造を敏感に反映するC-C伸縮振動に関係したラマン線が現れる。ＰＣＰに結合したペリジニンのスペクトルパターンは、11'-シス体ではなく全トランス体のそれに似ているので、ＰＣＰに結合したペリジニンは全トランス体であると結論できる。これは、「光捕穫色素蛋白複合体に結合したカロテノイドは全トランス体である」という従来の知見に一致している。

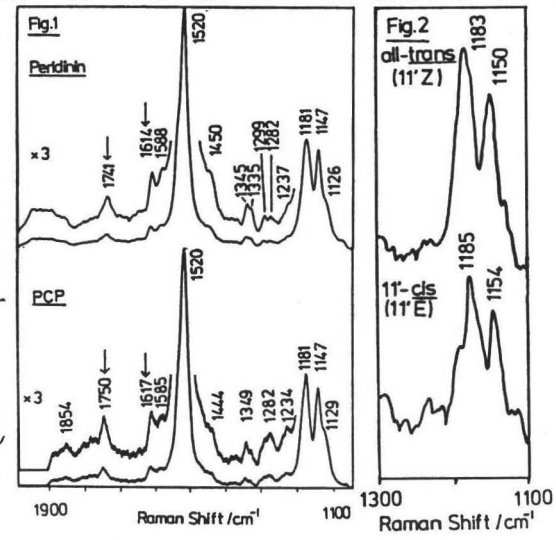


図１においてフリーなペリジニンの1741cm^{-1}とＰＣＰの1750cm^{-1}のラマン線は、ペリジニンの不飽和γ-ラクトン構造のC=O伸縮振動に、一方フリーなペリジニンの1614cm^{-1}とＰＣＰの1617cm^{-1}のラマン線はそのC=C伸縮振動に帰属される。これらのフリーな状態と、蛋白に結合した状態でのラマン線の違いの原因として以下の可能性が考えられる。①ペリジニンをメタノール溶媒中で測定したために、ペリジニンとメタノール間で水素結合が形成されて低波数シフトした。②蛋白に結合した状態で、γ-ラクトン環の酸素原子の不対電子がアミノ酸残基に引っ張られて高波数シフトした。現在、①の原因に関連して溶媒効果を検討中である。

1) F.T. Haxo, J.H. Kycia, G.F. Somers, A. Bennet and H.W. Siegelman, Plant Physiol. 57 (1976) 297-303.
2) B.B. Prezelin and F.T. Haxo, Planta. 128 (1976) 133-141.
3) P.S. Song, P. Koka, B. Prezelin and F.T. Haxo, Biochemistry 15 (1976) 4422-4427.

3Da09

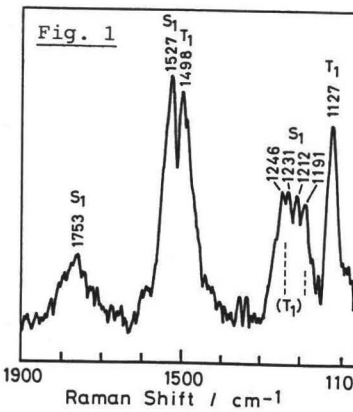
ピコ秒過渡ラマン分光法によるホウレン草クロロプラスト結合カロテノイドのS_1（$2^1A_g^-$）状態の研究

○橋本　秀樹・小山　泰　（関西学院大・理）

集光性色素蛋白複合体に結合したカロテノイドは、光エネルギーの捕穫及び伝達の機能を担っている。カロテノイドからクロロフィルへの効率の良いエネルギー伝達には、カロテノイドの光学的禁制な $2^1A_g^- \rightarrow {}^1A_g^-$ 遷移が関与していることが示唆されている [1]。 溶液中のフリーなカロテノイドの最低励起一重項（S_1）状態が $2^1A_g^-$ 状態であることは、Thrash ら [2] が全トランスβ-カロテンのラマン励起プロフィールを測定することにより最初に示唆した。 著者ら [3] は、全トランス及び 15-シス異性体から生成するS_1状態に由来する、$^1A_g^-$ 状態との振電相互作用により高波数シフトした、'C=C' 伸縮振動のラマン線の検出に初めて成功し、S_1状態が $2^1A_g^-$ 状態であることの２番目の証拠を与えた。 その後、野口ら [4] は全トランス体から生成したS_1状態の 1300 - 1100 cm^{-1} 領域のラマンスペクトルを報告し、つづいて、著者ら [5] は振電相互作用していない、もう一つの 'C=C' 伸縮振動のラマン線が 1530 cm^{-1} に現れることを報告した。 今回我々は、実際に光合成膜（ホウレン草のクロロプラスト）に結合したカロテノイドのS_1状態のラマンスペクトルの測定に成功したので報告する [6]。

図１にホウレン草クロロプラストに結合したカロテノイドのS_1及びT_1状態のラマンスペクトルを示した。 溶液中でのフリーなルテイン、β-カロテン、及び葉部より抽出したカロテノイドの混合物のS_1及びT_1状態のスペクトルとの比較より、以下に示す事柄が結論された。 ① 1498 及び 1127 cm^{-1} のラマン線は、三重項（T_1）励起種に帰属された。 ただし、1200 - 1130 cm^{-1} の領域に現れ、カロテノイドのT_1種を識別するためのキーバンドがS_1種に由来する一連のラマン線によりマスクされているため、得られたラマン線が、どのカロテノイドに由来するか特定することはできなかった。 ② 1753 及び 1527 cm^{-1} のラマン線と 1250 - 1190 cm^{-1} に現れる一連のラマン線は全トランスβ-カロテンから生成する　S_1種に帰属された。

1753 cm^{-1} に現れる 'C=C' 伸縮振動のラマン線の存在は、(i) 観測されたカロテノイドのS_1状態が$2^1A_g^-$ 状態であること、及び (ii) このラマン線がフリーなものより 40 cm^{-1} 低波数シフトしていることから、カロテノイドがアポ蛋白に結合することにより振電相互作用が弱まることが示唆された。



[1] R.J. Thrash et al., Photochem. Photobiol. 29 (1979) 1049.
[2] R.J. Thrash et al., J. Chem. Phys. 67 (1977) 5930.
[3] H. Hashimoto and Y. Koyama, Chem. Phys. Lett. 154 (1989) 321.
[4] T. Noguchi et al., Photochem. Photobiol. 50 (1989) 603.
[5] H. Hashimoto and Y. Koyama, Chem. Phys. Lett. 163 (1989) 251.
[6] H. Hashimoto and Y. Koyama, Biochem. Biophys. Acta (1990) in press.

3Da10

光合成バクテリア Rhb. spheroides 2.4.1のクロマトフォアに結合したカロテノイドの $2^1A_g^-$ 状態のラマン分光

○九鬼導隆，橋本秀樹，小山　泰（関西学院大・理）

【序】カロテノイドは光合成初期過程において光エネルギーの捕獲・伝達および散逸の機能を担っている．前者においてバクテリオクロロフィルへエネルギーを伝達する際にカロテノイドの最低励起一重項（S_1）状態が最も本質的な役割を演じる．有機溶媒中のフリーなカロテノイドに関しては，光学的許容遷移である $1^1B_u^+$ 状態ではなく，光学的に禁制な $2^1A_g^-$ 状態が S_1 状態であることがラマン分光により確証されてきた [1,2]．しかし，光合成膜に結合したカロテノイドについては S_1 状態がどちらの状態であるかは検証されていない．そこで演者らは，橋本・小山のクロロプラストに結合したカロテノイドの $2^1A_g^-$ 状態のラマン分光 [3]に続き，光合成バクテリア Rhb. spheroides 2.4.1のクロマトフォアに結合したカロテノイドについても $2^1A_g^-$ 状態のラマン線を検出したので報告する [4]．

【実験】Rhb. spheroides 2.4.1 のクロマトフォアの過渡ラマン測定．Rhb. spheroides 2.4.1の菌体を超音波破砕し，遠心・超遠心分離により得たクロマトフォア分画(20000-144000 x g)を50mMショ糖，50mMリン酸カリウム緩衝液(pH=7.5)に懸濁して測定に用いた．ピコ秒 YAGレーザーのSHG(532nm，パルス幅 100ps，ML-76MHz，QS-800Hz) を用い，高光子密度(50mW)・低光子密度 (5mW)でのクロマトフォア中のカロテノイドのラマンスペクトルを測定し，差スペクトルを取った．

スフェロイデンおよびスフェロイデノンの過渡ラマン測定．菌体より THFでカロテノイドを抽出し，酸化後，中圧および高圧クロマトグラフィーで各々のカロテノイドを精製した．S_1 状態の測定には 6×10^{-4}Mスフェロイデンのn-ヘキサン溶液を用いた．クロマトフォアと同様にピコ秒パルス YAGレーザーの SHGを用い，高光子密度(50mW)と低光子密度 (2.5mW)で測定したスペクトルの差を取った．T_1 状態の測定には 3×10^{-3}Mアントラセンと 3×10^{-5}Mスフェロイデンを含むn-ヘキサン溶液，または 5×10^{-3}M アントラセンと 3×10^{-5}Mスフェロイデノンを含む THF溶液を用いた．ポンプ光としてN_2レーザーの337nm(5mJ/pulse，パルス幅 9ns)の光，プローブ光としてNd:YAGレーザーのSHG(2mJ/pulse，パルス幅<20ns)光を用い，10Hzで発振させ，遅延時間を1.8μsとして測定した．

【結果】図1にクロマトフォアに結合したおよびフリーなカロテノイドの励起状態のラマンスペクトルを示す．クロマトフォアにおけるカロテノイドの組成（スフェロイデン：スフェロイデノン＝5：1）と，S_1およびT_1状態での共鳴条件により，クロマトフォアに結合したカロテノイドの励起状態のラマン線はスフェロイデンのS_1およびT_1状態に帰属することが出来る．図1の(a)での1507，1262，1151cm^{-1}のラマン線は T_1状態に起因するもので，フリーなとき(c)との波数の違いは T_1状態での構造がアポ蛋白に結合することにより歪を受けていることを示している．(a)の1766cm^{-1}，(b)の1817cm^{-1}のラマン線は，$2^1A_g^-$ 状態の，基底状態($^1A_g^-$)と振電相互作用したC＝C伸縮振動に帰属される．つまり，クロマトフォアに結合したカロテノイドの1766cm^{-1}のラマン線は，①クロマトフォアに結合することにより$1^1B_u^+$状態のエネルギーが低下しても，依然として $2^1A_g^-$ 状態が S_1状態であること，②クロマトフォアに結合すると波数が51cm^{-1} (1817cm^{-1}→1766cm^{-1})も低波数シフトすることから振電相互作用が弱くなっていること，を意味している．

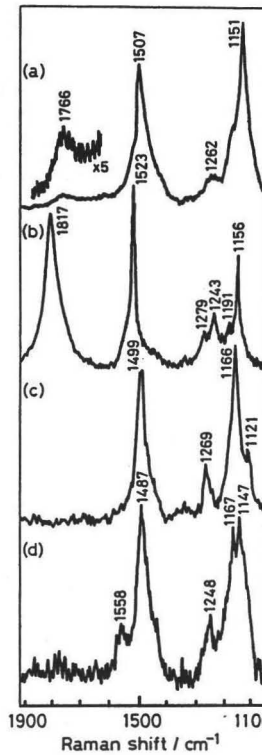


図1　(a)クロマトフォアに結合したカロテノイドのS_1およびT_1状態，(b)スフェロイデンのS_1状態，(c)スフェロイデンのT_1状態，および(d)スフェロイデノンのT_1状態のラマンスペクトル．

[1] H. Hashimoto and Y. Koyama, Chem. Phys. Letters 154 (1989) 321.
[2] T. Noguchi, S. Kolaczkowski, C. Arbour, S. Aramaki and G.H. Atkinson, Photochem. Photobiol. 50 (1989) 603.
[3] H. Hashimoto and Y. Koyama, Biochim. Biophys. Acta in press.
[4] M. Kuki, H. Hashimoto and Y. Koyama, Chem. Phys. Letters in press.