

### 3A-4

光合成における, 系1, 系2 の光化学系と, 水の状態との関係について.

小幡 寛, 渡部 教子 (東北大. 教養)

*E. coli* の培養に当って, 培地を3日以上凍結し, 融解直後に inoculate すると, 成長曲線に抑制 (条件によっては促進) が見られる。この現象は, 溶液の水素結合の状態の相異によるものと考えられ, 半減期, 対数時間の寿命の中間状態の水の存在の関与により説明される。更に検討の結果, 培地の凍結融解により, 呼吸系の切替が起こっていることがわかった。すなわち, Cytochromeの形成が若干抑制され, 電子伝達系が不十分なために, 乳酸の酸化による flavin 呼吸の増強により, 解決している事がわかった。このような効果は *E. coli* のみではなく, うちり一般性のある可能性がある。そこで, 光合成における初期光化学過程の電子伝達系に上記の方法を応用して知見を得る事を試みた。

100W 映写用電球を光源とし, R 62 filter を用いた赤色光による次の反応について, 凍結融解効果を示した所。

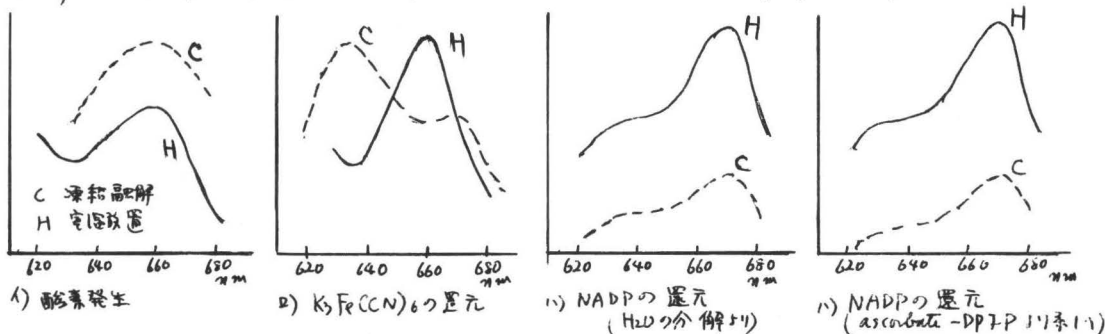
① ホーレン草 Chloroplast にて

イ. 酸素発生	酸素電極にて	促進
ロ. $K_3Fe(CN)_6$ の還元	pH 変化, o-Phenanthroline に 53 比色	効果なし
ハ. NADP の還元	340nm の吸光度増加	抑制
ニ. nm cyclic phosphorylation	pH 変化にて (pH 変化小さく困難あり)	殆ど効果なし
ホ. Cyclic phosphorylation	pH 変化にて	抑制

② *R. rubrum* の chromatophore にて

ア. Phosphorylation	pH 変化にて	抑制
--------------------	---------	----

以上の data は系1, 系2の途中に, 2つ以上の律連段階の存在を暗示しており, 凍結の凍結融解により, 律連段階における反応中間物の蓄積, 或は *E. coli* におけるような *ly path* の存在の可能性を考えうる。これらの事を明確にするために, イ, ロ, ハについてそれぞれ *action spectra* を求めた。光源には 300 W Xium lamp を用い, 島津強力モノクロマトグラフで分光し, 測定した結果を示す。



$K_3Fe(CN)_6$  還元の data は大変興味持たれる所である。以上の結果, 系2, 系1への過程に2つと二つの律連段階がある事がわかる。又ロハ, ホの過程にて, 暗期における逆反応が, 溶液の凍結融解により促進されたり, この事以上記の過程に *ly path* の存在を考えた可能性を示していると思ふ。

平野富彦, 佐藤和彦, 加藤栄 (東大・教養・基礎科)

別府温泉より採取した単細胞のラン藻 (*Synechococcus* sp.) は、 $60^{\circ}\text{C}$  近い高温ではよく生長するが室温では全く増殖しない。この好熱的な生育は、このラン藻の光合成が、やはり高温依存性であることによる。今回は光合成およびその電子伝達反応の温度依存性を詳細に検討した結果を報告する。

本ラン藻の光合成による  $\text{O}_2$  発生速度を酸素電極を用いて測定し、Arrhenius plot すると約  $28^{\circ}\text{C}$  および  $10^{\circ}\text{C}$  に顕著な不連続点を示す3つの直線部分に分かれ、 $55-30^{\circ}\text{C}$ ,  $28-12^{\circ}\text{C}$  および  $10^{\circ}\text{C}$  以下での活性化エネルギーはそれぞれ 17, 24 および 46 kcal/mol であった。また藻細胞の行う光合成電子伝達活性 ( $\text{H}_2\text{O} \rightarrow$  メチルビオローゲン) の Arrhenius plot でも、約  $29^{\circ}\text{C}$  および  $11^{\circ}\text{C}$  に不連続点がみられ、活性化エネルギーは高温側から 11, 23, 34 kcal/mol であった。さらに山岡らはチラコイド膜の流動性の温度依存曲線は、 $30^{\circ}\text{C}$  付近と  $10^{\circ}\text{C}$  で明瞭な不連続点を示すことを報告しているので、上記の結果は光合成電子伝達系がチラコイド膜の流動性に依存しており、さらにそれが光合成自体にも影響を与えていることを示すものである。

光合成電子伝達系の律速段階は、プラストキノンから C 型チトクロームへの電子伝達反応であるとされている。そこで閃光照射により酸化されたチトクローム C-553 (cyt. 553) の還元反応の温度依存性を調べた。 $70^{\circ}\text{C}$  から  $16^{\circ}\text{C}$  の広い温度範囲で 80-90% の cyt. 553 の還元反応は一次反応であり、その Arrhenius plot は約  $57^{\circ}\text{C}$  および  $30^{\circ}\text{C}$  に屈曲点を示す。 $57-30^{\circ}\text{C}$  および  $30-16^{\circ}\text{C}$  における活性化エネルギーは、メチルビオローゲン光還元反応のそれとよく一致しており、この反応が全電子伝達反応の律速段階であるとの考えを支持する。また cyt. 553 の還元反応は顕著な lag を示す。これは cyt. 553 より先に閃光により酸化される電子伝達体があるためである。この lag も温度低下とともに長くなった。そこで閃光照射から cyt. 553 が半量還元されるまでの時間の逆数を、絶対温度の逆数に対してプロットすると、やはり  $57-58^{\circ}\text{C}$  および  $30^{\circ}\text{C}$  に屈曲点がみられ、計算される活性化エネルギーも cyt. 553 の還元反応とほぼ一致した。これは  $16^{\circ}\text{C}$  から  $60^{\circ}\text{C}$  を越える広い温度範囲で、cyt. 553 およびそれより先に系 I により酸化される電子伝達体の量は一定であり、さらにその間の電子伝達反応では cyt. 553 の還元反応が律速段階であることを示すものである。

一方  $16^{\circ}\text{C}$  より低温域では、cyt. 553 の還元反応は複雑になり、異なる半減期をもつ成分と分かれる。また閃光間隔を長くしても、酸化される cyt. 553 の量は次第に減少し、 $10^{\circ}\text{C}$  以下では P700 の酸化およびカロチノイドフラッシュは認められるにもかかわらず、cyt. 553 の酸化は検出できなくなった。

### 3A-6

光合成光化学系I反応中心粒子のピコ秒レーザーフォトリシス。初期電子伝達反応。

加茂川恵司, 中島信昭, 吉原経太郎, 池上勇\* (分子研, 基礎電子, \*帝京大, 薬)

光化学反応中心がすでに単離されている光合成細菌の場合に比べ、高等植物では反応中心が充分精製されていないため、ピコ秒時間領域での吸収変化測定による光化学初期過程の解析はまだ殆んどなされていない。最近、著者らは池上の得た光化学系I反応中心粒子(Chl/P700 ≒ 8~10, 反応中心当りのタンパク量 ≒ 160KD)を用い、ピコ秒領域で、アンテナクロロフィルが励起状態になることによる吸収変化(α帯ピークの吸収減少, β帯近辺での吸収増大など)を観察し、その回復およびその光寿命との関係からアンテナクロロフィルからP700への光エネルギー伝達は約25ピコ秒でおこると推定した。しかし、P700自身の光酸化をピコ秒領域で観察することは成功しなかった。今回、励起光強度を反応中心当り1光子以下にすることにより励起クロロフィルによる吸収変化量を小さくし、P700の光酸化による吸収変化をピコ秒領域で初めてとらえることができたのでその結果を報告する。

〔方法〕光化学系I反応中心粒子の分画法およびピコ秒時間分割測定法の概要は以前に報告した通りである(昭和54年度植物学会年会)。今回励起光は二倍高調波、530nmの光を用い、測定は600~800nmの間で行った。また、シグナルは10回積算してそのS/N比を高めた。

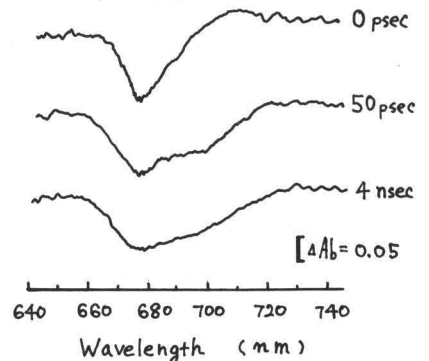
〔結果〕(A) P700(還元)→Z(酸化)状態における吸収変化: ①励起光照射直後(t=0), 反応中心(P700)当り1個以下のアンテナクロロフィルが励起されることによるα帯ピークの吸収減少が観察された(Chl + hν → Chl\*) (図1)。②α帯ピークでの吸収減少の一部分は20~30ピコ秒程度で速く回復する。この速い回復とはほぼ同程度の速度で700nm付近の吸収の減少(P700の酸化によると思われる)がおこる(Chl\* + P700 → Chl + P700\*, P700\* → P700 + e<sup>-</sup>)。③P700酸化による吸収変化は8ナノ秒後に到るまで安定に存在する。④Chlのα帯ピーク付近の吸収減少も8ナノ秒後も回復せず、安定に存在する成分が認められる(図1)。これは長寿命のChl\*が存在するためとは考え難く、還元型の初期電子受容体によるものと推定される(Z + e<sup>-</sup> → Z<sup>-</sup>)。

(B) P700<sup>+</sup>(酸化)→Z(酸化)状態における吸収変化

①(A)①と同様に光照射直後、Chl\*生成による吸収変化が観察される。②Chl\*の大部分は70~80ピコ秒でChlに戻る。一部分は1ナノ秒程度の遅い回復を示す。③P700による吸収変化は全く観察されない。また(A)④に相当する吸収変化も認められないので数ナノ秒後に存在する吸収変化はない。

以上の(A),(B)よりクロロフィルの励起エネルギーは約20~30ピコ秒でP700に伝達され、P700を励起すると同時にP700が酸化されると推定される。

図1. (P-Z)状態での励起光照射により引き起こされる吸収変化(ΔAb(Exc)-ΔExc) (Chl conc. OD peak = 1.00)



### 3A-7

#### 光系IIの初発反応電子受容体の酸化側成分による再酸化

小林久美子<sup>\*</sup>, 若松国光<sup>\*</sup>, 岡山繁樹<sup>\*\*</sup> (福女大・生物, 九大・教養 生物)

光系IIの初発反応電子受容体Qは、水からの電子により還元され、光系IとII間の電子プールAにより酸化される。しかし、DCMUのような阻害剤の存在でQのA<sup>+</sup>による酸化が阻害されている時には、Q<sup>-</sup>は光系IIの酸化側の成分で再酸化される。ここでは、DCMU存在下でのQ<sup>-</sup>の再酸化の測定結果と、それによって知ることが出来たZの性質のいくつかについて報告する。

1. 正常なクロロプラストで、DCMU存在下でのQ<sup>-</sup>の再酸化は外から加えた酸化剤や還元剤の影響はうけない。しかし、NH<sub>2</sub>OHやCCCPのような光系II酸化側の阻害剤で阻害される。この阻害の程度も酸化剤や還元剤によって影響をうけない。

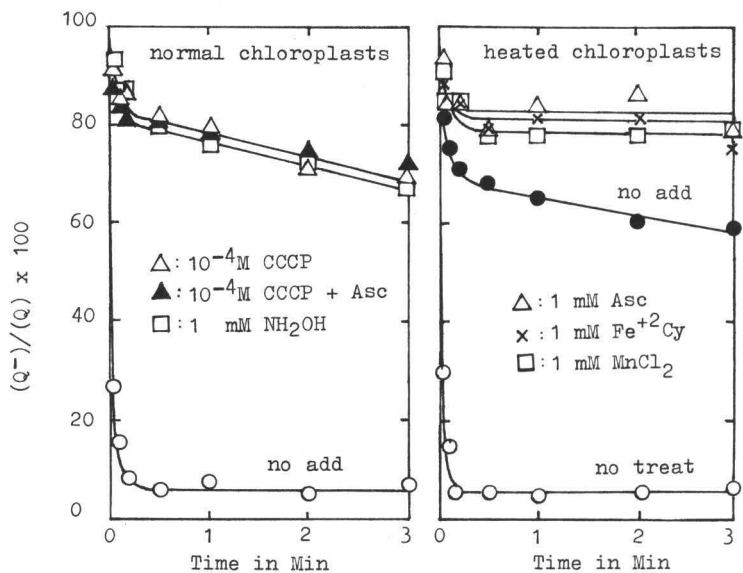
2. 熱(50°C, 2分)あるいはトリス処理をして光系IIの酸化側を失活させたクロロプラストでは、DCMU存在下でのQ<sup>-</sup>の再酸化は阻害されている。この阻害の程度はフェリシアナイドのような酸化剤で減少し、アスコルビン酸のような還元剤で増加する。阻害を高める還元剤としては、他にH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, I<sup>-</sup>, Mn<sup>2+</sup>, フェロシアナイド等のようないわゆる光系IIの酸化側へ水の代りに電子を供与出来る物質が有効である。

3. DCMU存在下でQ<sup>-</sup>を再酸化する成分Zは、NH<sub>2</sub>OH, CCCPの存在下や熱処理あるいはトリス処理クロロプラストでは光により酸化されないが、または酸化されても直ちにQ<sup>-</sup>以外の物質で還元されていると考えられる。

4. Zは正常なクロロプラスト中では、親水性の酸化剤や還元剤が到達出来ないような疎水性環境に存在していると考えられる。そしてこの疎

水性環境は熱またはトリス処理によってこわされ、Zは親水性の酸化剤あるいは還元剤と反応するようになると考えられる。

5. ZのE<sub>m7</sub>は500 mV程度である。



高野誠, 高橋正昭, 浅田浩二. (京大・食研)

トリス処理は、葉緑体チラコイドの電子伝達系における系2の酸化側を特異的に阻害する手段として広く用いられており、その際チラコイドからマンガンが溶出する。我々の前回、トリス処理によるチラコイド膜の蛋白質の一部がスルフィド結合でクロスリンクすることを示し、これが銅-トリス錯体によるチオール残基の酸化によるものと推論した。トリスは銅や鉄と錯体を形成し、特に銅とはかなり安定な錯体を形成する。この銅-トリス錯体がニスチンの酸化を触媒することは前回報告した。チラコイドのトリス処理においては、トリスと錯体を形成する銅は、チラコイド膜に由来することを確認される。そこでトリス処理によるチラコイドからの金属の遊離を、マンガンと銅と鉄について検討した。

**方法と結果** チラコイドを、0.5M, pH 9.0 のトリス緩衝液中で30分インキュベートした後、40,000×g 15分の遠心でチラコイドを分離し、その上澄に存在する金属の含量を測定する。マンガン以外に銅も遊離することから明らかになった。鉄については、トリス処理による若干の遊離のみが見られる。対照では、同程度の遊離が認められ、これは物理的相互作用によるものとと思われる。

トリス処理による遊離する銅はトリスの濃度に従って増加し、0.8M pH 9.0 のトリス処理では400プロモウ分子あたり、約0.8原子の銅が遊離する。これは、360 μg chl/ml のチラコイド懸濁液では約0.8 μM の濃度になる。銅-トリス錯体によるニスチンの酸化を調べると、この銅の濃度での十分に酸化を促進し、チラコイドのトリス懸濁液中で、銅-トリス錯体が膜蛋白質のチオール残基どうしをクロスリンクさせる可能性を裏付けている。

電位差測定法で銅-トリス錯体の安定定数を求めると、約  $10^{10} \text{M}^{-1}$  と高く、蛋白質中の金属リカンドと拮抗して、トリスが銅をキレートし遊離させることを考えられる。また、チラコイドを Neutral Red (NR; 膜透過性のpH指示薬) を含む牛血清アルブミン溶液(膜不透過性の緩衝液)に懸濁して、閃光照射後の膜の内側のpH変化をNRの吸光度変化で測定できるようにした。トリスを添加し吸光度変化を経時的に測定すると、添加後2,3分以内に、閃光照射による膜の内側のpH変化を消失させた。一オトイミンの場合は、5~8分を要した。従ってトリスは比較的自由に膜を透過し、銅をキレートしてチオール残基をクロスリンクさせることが考えられる。

最後に、このようにトリス処理でクロスリンクさせたチラコイドを前回報告した方法で二次元SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動にかき、そのパターンから膜蛋白質の近隣性を調べた。また別に、Cu-o-Phenanthroline と Dimethyl-3,3'-dithiobispropionimide でクロスリンクさせたチラコイドについても同様の解析を行った。下から、このようにクロスリンクした膜蛋白質は特異的であり、これは膜透過性や脂質に対する親和性の違いによるものと考えられる。さらにこれらの結果を合わせて、膜蛋白質のトポグラフィについて検討を加えた。

### 3A-9

## 葉緑体酸毒発生系の光再活性化反応の促進因子と共役因子の比較検討

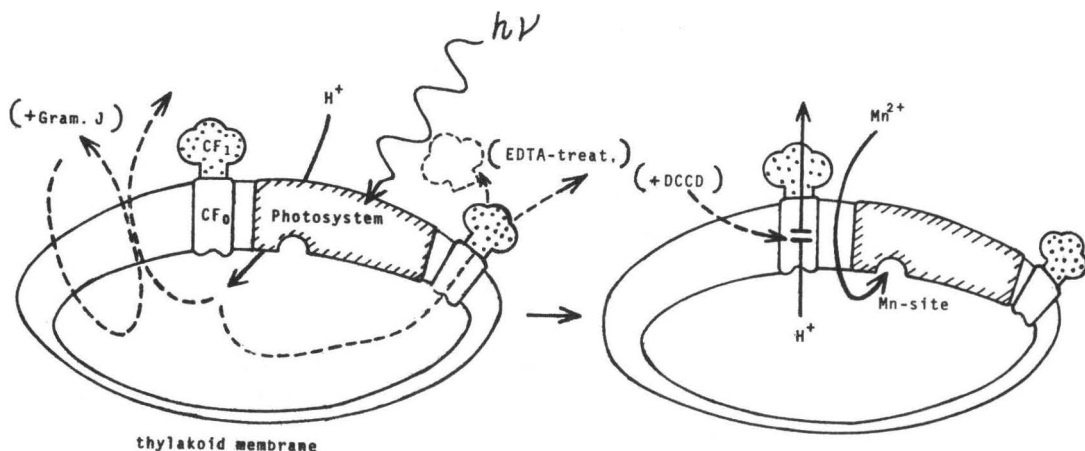
増田 誠, 山下 魏 (筑波大・生物)

一般に、葉緑体の酸毒発生系は光活性化される事により機能を持つようになるが、我々は、この現象をトリス処理葉緑体の光再活性化反応で調べた結果、EDTA処理葉緑体抽出液中にこの活性化を促進する成分を認めため、その成分の性質を葉緑体の共役因子(CF<sub>I</sub>)のものと比較検討して来た。

0.8Mトリス(pH8.8, 2時間)処理して失活させた葉緑体は、還元型DPIP処理とMn<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, DTT, BSAを加えて行なう光再活性化反応で酸毒発生能を回復するが、脱共役剤の20μg/mlグラミシジンJやエネルギー転移反応阻害剤の50μM DCCDを加えると酸毒発生能回復が阻害された。また、EDTA処理で葉緑体を脱共役しても光再活性化が抑制されたので、下図のような共役因子(CF<sub>I</sub>)とH<sup>+</sup>イオンの関与する光再活性化・阻害の反応様式をモデルとして示し、この仮定の正否を調べて来た。

トリス処理・還元型DPIP処理の終わった葉緑体にさらに一般のEDTA処理や(10mMEDTA処理・1mMトリス(pH8)処理)で脱共役したものに共役因子を含むEDTA抽出液を加えると酸毒発生能の光再活性化による回復は増加したが、2M NaBrで強かに脱共役したものではその増加がほとんどなく、(10mMピロリン酸塩処理・0.3Mショ糖処理)葉緑体でもその増加がわずかであり、今後さらに別の要因についても検討する必要があるであろう。

一方、この光再活性化時に加えるEDTA抽出液は3~4日間低温で透析してEDTAを除いたものを使っているが、この間に抽出液中のATP分解酵素活性は約半分に低下した。このEDTA抽出液中にある促進因子はセファデックスA-25での吸着分離、硫酸分割で濃縮精製できるが、その最も純度の高い0-33%飽和硫酸沈澱部分は次の33-50%飽和硫酸沈澱部分よりも1.3倍強いATP分解酵素活性を示した。これらの促進因子に併って見られるATP分解酵素活性は低温失活しているためかかなり低いか、このような低温失活が促進因子では起らないようにも見えるのでさらにくわしくいろいろと比較検討して来るつもりである。



奥達雄 (九大・農)

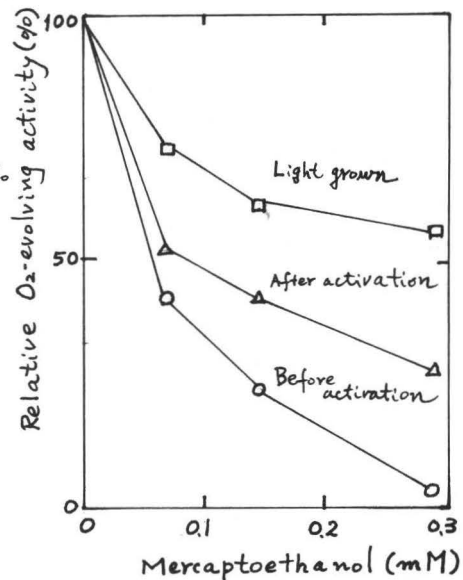
針葉樹の子葉は暗所でクロロプラスト(正しくは etio-chloroplast)を形成する。このクロロプラストは構造的には数層のグラナ以外にプロラメラボディを含み光化学系 1, 2 を完成しているが、 $O_2$  発生能を欠いている。この子葉に短時間弱光を照射すると、 $O_2$  発生中心は光活性化され、 $O_2$  発生が観察できる。被子植物の子葉藻類でも生育条件をうまく設定することによって、同様に光活性化現象がみられる(井上氏・理研)。これらの知見はクロロプラストの形態形成と共に、形成されたチラコイド膜上の  $O_2$  発生中心の活性化にも光が必要とすることを示唆している。

一方、正常な葉緑体が Tris 処理後、Mn 存在下で光活性化されることが発見され(山下氏・筑波大)、Mn-蛋白質(浅田氏ら・京大)と共に、光活性化現象の解析は  $O_2$  発生機構への有力なアプローチと言えよう。

便宜的に光活性化を3つの過程に分けて考えると、遊離 Mn のチラコイドへの吸収(1)、 $O_2$  発生中心への Mn 結合(inactive Mn 結合蛋白の生成)(2)、Mn 蛋白の光活性化(3)となり、トウモロコシのクロロプラストの場合活性化に Mn 添加を必要としないので、活性化は(3)の過程について主に考えればよい。

現在、 $O_2$  発生機構が不明の為、これと光活性化との関係を論じることは難かしいが、Tris 処理クロロプラストでは、S 状態レベルで議論できるようになった。私達は、旭氏(1966)の photoreducible disulfide bond を持つ蛋白にみられるように、Mn 蛋白それ自体の光による構造変化=光活性化を念頭に置いている。反応中の機能的クロロフィル蛋白(P700, P680)が、蛋白の特性によるものとすれば、Mn 蛋白の蛋白の性質に光活性化のナズが含まれているように思える。

トウモロコシのチラコイド膜が光活性化のさい、構造変化を伴っていることは右図より推定できる。即ち、単離クロロプラストの光活性化前後で、 $\beta$ -mercaptoethanol による、 $O_2$  発生阻害が明らかに異なっている。チオール試薬 NEM では全くその効果がみられず、むしろ低濃度で活性化を促進した。これに就いて現在検討中であり、これ迄の成果を報告する予定である。



酸素発生能発現にともなう葉緑体とニトロチオフェノールの反応性の変動

小林善親, 井上頼直\* (鹿大・理・生物, \*理研)

ホウレン草葉緑体をニトロチオフェノール存在下で光照射すると、ニトロチオフェノールは光化学系II蛋白と結合し、同時に結合量に比例した低温ケイ光スペクトル(F695/F685比)の変化が観察される。F695/F685比の変化を指標として測定したこの反応は、(1)光化学系II水側が酸化状態になった時おこる。(2)閃光照射下で反応を行なわせた場合、反応量は与える閃光の間隔に依存している。反応量は、連続して2, 6, 10発の閃光を与えた時極大を示し、4回の閃光を周期として変動する。(3)トリス処理により酸素発生を阻害した葉緑体では、2, 4, 6発の閃光に極大をもつ周期の変動をする。これらの事実から、我々はニトロチオフェノールによる蛋白修飾反応は、水分解系内の電荷蓄積に依存して起こること、蓄積された電荷の致に対応して、光化学系II色素蛋白の存在状態が変化することを示唆した。水分解反応系と系II蛋白の状態変化との関係をさらに明確にするため以下の実験を行った。

裸子植物種子を暗黒中で発芽・生育させると、ほぼ完全な葉緑体や活性(DPIP光還元)をもつが、酸素発生能のみを特異的に欠如した植物体が得られる。このような暗生育葉に連続光を照射すると、短時間で葉緑体は酸素発生能を獲得することが知られている。2週間暗黒中で発芽・生育させたトウモロコシ葉から単離した酸素発生活性の高い葉緑体と、あらかじめ12時間光照射した葉から単離した酸素発生活性を低い葉緑体を用いて、ニトロチオフェノール存在下で閃光照射を行った後、低温ケイ光スペクトルを測定し、閃光数に対するF695/F685比の変動を比較した。酸素発生能をもつ葉緑体は、連続して2, 6発の閃光を与えた時極大を示す4周期の変動をするのに対し、酸素発生能の低い葉緑体では、明確な周期性は観察されなかった。

同様の実験を暗黒中で生育させた酸素発生能をもたないセネテスムス細胞と、光照射下で生育させた酸素発生能をもつセネテスムス細胞から単離した葉緑体を用いて行った。この場合も、酸素発生活性を低い葉緑体でのみ2, 6発の閃光に極大を示す4周期変動が観察された。

以上の結果から、4回の閃光を周期とする光化学系II蛋白とニトロチオフェノールの反応性の周期的変動は、ホウレン草葉緑体だけでなく、酸素発生活性を低い葉緑体では一般的にみられる現象であることが明らかになった。また、ニトロチオフェノールと光化学系II蛋白との結合によりおこる低温ケイ光スペクトル変化(700nm付近のケイ光強度の増大と、685nmのケイ光強度の減少)も、調心たかざり、全ての植物の葉緑体で観察された。これらのことから、多くの植物の色素蛋白は、似通った存在状態にあるものと思われる。しかしながら、トリス処理葉緑体で観察されたような2周期変動は、酸素発生能の低いトウモロコシやセネテスムスの葉緑体では観察されなかった。このことは、これらの葉緑体で閃光照射後の系II水側の酸化状態は、必ずしも同一では無いことを示している。



我々は昨年の年会で、暗中で継代培養したタバコ培養細胞 (*Nicotiana glutinosa*) は白色のまま保たれるが、この細胞は青色光下で緑化し、赤色光下では暗中と同じく緑化しないことを報告した。青色光下でのクロロフィル合成は、 $500 \text{ erg/cm}^2 \text{ sec}$  程度の光強度で飽和する弱光反応である。

今回我々は、青色光前照射により緑化したタバコ培養細胞を、暗中あるいは種々の光強度の赤色光下へと光条件を変えたときのクロロフィル量の変化を検討した。暗中及び強光の赤色光 ( $4,300 \text{ erg/cm}^2 \text{ sec}$ ) 下では、クロロフィル量の著しい低下が認められた。これに対し、弱光の赤色光 ( $1,000 \text{ erg/cm}^2 \text{ sec}$  以下) 下では顕著な低下は認められなかった。この結果は、青色光前照射後では、タバコ培養細胞のクロロフィル合成には、青色光とともに弱光の赤色光も有効であることを示す。

次に、これら青色光及び赤色光の作用部位を検討した。一般に高等植物の緑化過程は、クロロフィルの前駆体 Protochlorophyllide (Pchlde; 青色光・赤色光吸収色素) の光変換 (還元) による始まり、この過程の光受容体は Pchlde 自身であることが知られている。タバコ培養細胞中には Pchlde-630 ( $F_{633}$ ; ケイ光スペクトルのピーク  $633 \text{ nm}$ ) が存在し、青色光照射により Chllide-676 ( $F_{683}$ ) への光変換が認められた。また、この Pchlde の青色光変換は  $500 \text{ erg/cm}^2 \text{ sec}$  程度の弱光で飽和した。これに対し赤色光の場合、強光の赤色光 ( $4,000 \text{ erg/cm}^2 \text{ sec}$ ) 下では光変換は起らず、しかも Pchlde が消失した。しかし、 $100 \text{ erg/cm}^2 \text{ sec}$  近辺の弱光の赤色光下では光変換が認められた。これらの結果は、Pchlde の光変換に対し強光の赤色光は阻害効果を持つことを示す。従って、タバコ培養細胞の緑化が赤色光下で進行しない理由の一つに Pchlde の光変換に対する赤色光による阻害効果が考えられる。しかし、Pchlde の光変換が十分起る弱光の赤色光 ( $200-800 \text{ erg/cm}^2 \text{ sec}$ ) 下でもクロロフィルの蓄積、即ち緑化は起らなかった。以上のことから、タバコ培養細胞の緑化過程は少くとも、Pchlde と青色光受容色素の2つの色素系の制御を受けるものと考えられる。

次に、強光の赤色光照射により、完全に Pchlde を消失させた細胞を用いて、その再生過程を検討することにより、青色光受容色素系の働きを調べた。Pchlde の完全な回復は、青色光照射 (1日) により起った。これに対し、暗中での Pchlde の再生は、青色光下で生成した量の  $\frac{1}{3}$  程度であった。また、弱光の赤色光照射での再生は、暗中の場合と同程度であった。このことから、青色光下 (1日) での Pchlde-630 の供給能は、暗中及び赤色光下の場合の3倍も高く、青色光は Pchlde-630 の供給に効果的であり、赤色光はこの系には無効であることが確認された。

### 3A-13

#### 緑藻 *Scenedesmus* の $\delta$ -アミノレブリン酸生成の光依存性

大次多美子・長谷栄二 (東大・応微研)

一般に緑藻では暗中で生育中にも可成りのクロロフィルが生成される。一方 *Scenedesmus obliquus* 変異体 C-2A' の 30°C での暗生育ではクロロフィル合成が抑えられ、黄色藻体を得られ、光照射によってクロロフィル合成系が誘導される。クロロフィル合成の前駆体  $\delta$ -アミノレブリン酸(ALA)生成活性は 10 mM のレブリン酸存在下で蓄積する ALA を測定することによって求めた。

1) 野生株と変異体 C-2A' の ALA 合成の光依存性 — 生育の停止した暗培養野生株藻体に光を当てることによって生じた ALA 合成活性は、再び暗移行後も可成りの時間持続するが、C-2A' では暗移行後直ちに ALA の蓄積は止つてしまう。その間に図 1 に示したようにプロトクロロフィルの蓄積がおこる。3.3 W・m<sup>2</sup> の青色光で ALA 合成は継続し、その有効波長は 640, 652 >> 612, 679 nm である。また暗培養した C-2A' にはプロトクロロフィルが存在し、暗中で 1 mM ALA 添加でその蓄積は著しく増大した。一方野生株では暗移行によってプロトクロロフィルの蓄積はおこらなかった。これらの結果から C-2A' では暗中でプロトクロロフィルをクロロフィルに還元する系が欠損しているため暗移行によって蓄積してくるプロトクロロフィルが ALA 合成を抑制していることが推定される。

2) ALA 合成活性の誘導 — 暗培養した野生株に 0.5 W・m<sup>2</sup> の青色光を照射すると約 30 分の誘導期をおいて ALA 合成活性が発現する。この過程はピスタマイシン A、6-メチルプリン、クロラムフェニコール、シクロヘキシミド添加で阻害され、核酸、たん白質生成を伴う過程であることを示す。従属栄養的な生育から自立栄養的な生育への変換の初期過程が青色光で制御されているという現象は緑藻にひろく見られるものである。

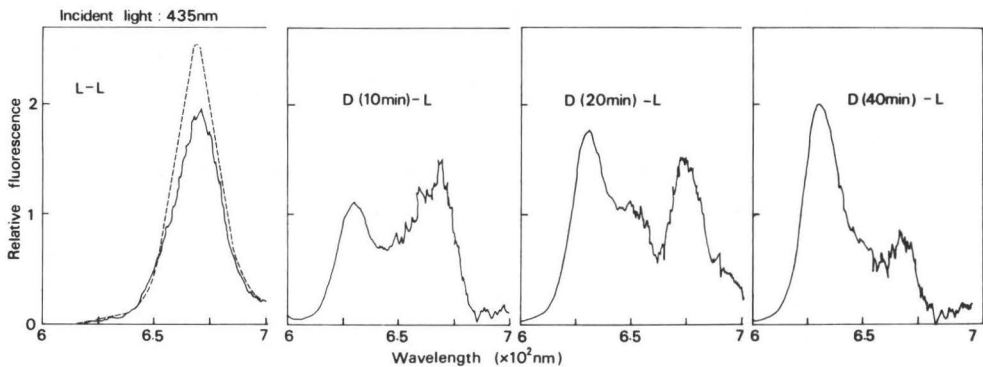


図 1. 暗移行によるプロトクロロフィルの蓄積。L-L 起光 435 nm のプロトクロロフィルの蛍光スペクトルを、10 mM のレブリン酸存在下で 30 分照射した *Scenedesmus obliquus* C-2A' (L) と暗 10, 20, 40 分後の藻体の差スペクトルとして記録。

葉肉細胞プロトプラストの光合成活性に及ぼす亜硫酸イオンの影響

榊 剛, 近藤矩朗 (国立公害研, 生物環境)

二酸化イオウ ( $\text{SO}_2$ ) に植物葉を暴露すると、次第に  $\text{CO}_2$  の吸収速度が減少しはじめ、 $\text{SO}_2$  を除くと部分的あるいは完全に回復する。 $\text{SO}_2$  は気孔を閉じさせることが知られているが、気孔閉鎖だけで  $\text{CO}_2$  の吸収速度の減少 (回復) を説明することは困難であった。この  $\text{SO}_2$  による  $\text{CO}_2$  吸収速度の可逆的阻害は、*in vitro* の実験から RuBP carboxylase に対する拮抗阻害が実体であると考えられた。一方、植物葉に吸収された  $\text{SO}_2$  は、亜硫酸あるいは亜硫酸イオン ( $\text{HSO}_3^-$ ,  $\text{SO}_3^{2-}$ ) になるが、 $\text{SO}_2$  暴露葉中にはこれらのイオンはほとんど検出されず、主に硫酸イオンの形で蓄積している。これは亜硫酸イオンが酸化されやすく測定が困難なためでもあるが、 $\text{SO}_2$  が亜硫酸イオンの形で葉緑体内まで到達しているかどうか疑問をいだかせる。したがって、 $\text{SO}_2$  暴露葉中で亜硫酸イオンが RuBP carboxylase を拮抗的に阻害しているかどうか疑問である。

我々は、上記の  $\text{CO}_2$  吸収及び固定に対する  $\text{SO}_2$  の影響を調べる目的で、気孔の問題や、細胞壁での亜硫酸イオンの酸化等の問題を除くことができるプロトプラストを材料に選んだ。本研究では、まず亜硫酸イオンが種々の条件下でプロトプラストの光合成に及ぼす影響を調べたところ、低 pH 下で亜硫酸イオンによる光合成阻害が顕著に起こることがわかったので報告する。

(材料と方法) 自然光温室でソラマメ (*Vicia faba* L. cv. Otafuku) を 5-8 週間栽培し、完全に展開した葉からプロトプラストを単離した。また一部の実験では、レタス (*Lactuca sativa* L. var. Romaine) から得たプロトプラストも使用した。単離は常法に従い、酵素的に行った。収率は環境条件によりかなり変動する。得られた材料のうち、光合成活性が  $70-120 \mu\text{mole O}_2 \text{ evolved/mg chl-Ru}$  のものを用いた。酸素発生、 $^{14}\text{CO}_2$  固定は、通常  $0.6 \text{M}$  マニトール、 $50 \text{mM}$  トリシン、 $1 \text{mM}$  EDTA、 $10 \text{mM}$   $\text{NaHCO}_3$  (pH 8.0) 溶液で行った。攪拌は、プロトプラストがつぶれないよう低速で行った。

(結果) プロトプラストを  $2 \text{mM}$  亜硫酸イオンの入った種々の pH 溶液中で  $0^\circ\text{C}$  にて 1 分間インキュベートし、pH 8.0 になるようトリシン溶液を加えて酸素発生を測定したところ、pH 6.5 以下で酸素発生速度の急激な低下がみられた。そこで pH 5.0 と 8.0 を選び、亜硫酸イオンが酸素発生に及ぼす影響について調べた。pH 5.0 では  $1 \text{mM}$  で 70%、 $10 \text{mM}$  で 30-40% まで酸素発生速度は低下するが、pH 8.0 では  $10 \text{mM}$  で 95% とほとんど阻害されなかった。 $^{14}\text{CO}_2$  固定についても同様の阻害がみられた。この pH 5.0 でみられる酸素発生の阻害は、亜硫酸イオン処理後洗浄しても回復せず、また亜硫酸イオンをインキュベートする時間を 2 秒まで縮めても、阻害率は変わらなかった。 $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_3$  を用いて pH に依存したプロトプラストへの亜硫酸イオンのとりこみと調べたところ、pH 低下に伴い亜硫酸イオンのとり込みが増加した。

以上の結果にもとづいて、亜硫酸イオンによる光合成活性の阻害について考察する。

グリコール酸酸化酵素による緑葉プロトプラストの  
Intactnessの測定

Roland Douce\*, 西村幹夫, 赤沢 堯 (名大・農・生化制御)

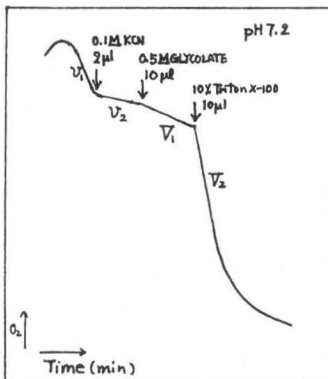
プロトプラストは均一系として取り扱うための、植物の様々な研究に用いられている。演者らは先に緑葉プロトプラストが光合成研究、並びに構成オルガネラの分画に有用な系であることを明らかにした。これらの研究においては、調製したプロトプラストの intactness が重要な因子となる。従来、プロトプラストの呼吸活性、光合成活性が、その intactness の指標としてとりあげられていた。しかしながら、この場合にえられる知見は全体としての intactness の目安という定性的なものであり、調製したプロトプラストの何%が損傷をうけているかという定量的な intactness の測定は不可能である。本大会ではプロトプラストの intactness を定量的に測定する指標としてグリコール酸酸化酵素が有効であるとの結果をえたので、それを報告する。

プロトプラストはポウレンソウ緑葉から二段階法で調製した。最終プロトプラスト標品は  $50 \sim 100 \mu\text{moles CO}_2 / \text{mg chl} / \text{hr}$  の光合成  $\text{CO}_2$  固定活性、 $10 \sim 30 \mu\text{moles O}_2 / \text{mg chl} / \text{hr}$  の呼吸活性を保持している。

シリコンオイル遠心法により、グリコール酸のプロトプラストへの透過を解析した結果、 $\text{pH} 7.2$  では少なくとも 20 分間、プロトプラストへのグリコール酸の取り込みは観察されなかった。図に示すように、プロトプラスト溶液にグリコール酸を添加した場合、酸素吸収の増加が認められる。この条件下ではグリコール酸のプロトプラストへの取り込みは観察されないので、この酸素吸収の増加は損傷をうけたプロトプラストに由来するグリコール酸酸化酵素の作用によると理解される。反応液中の全グリコール酸酸化酵素活性はトリトン X-100 (0.1%) の添加により測定することができるので、損傷をうけたプロトプラストの割合 (A%) は次式に示される。

$$A = \frac{V_1 - V_2}{V_2 - V_2} \times 100 (\%)$$

グリコール酸酸化酵素は安定な酵素であり、プロトプラスト磨砕液を  $4^\circ\text{C}$  で保存した場合、3



日間は同酵素活性の失活はみられない。本法を用いて調製したポウレンソウプロトプラストの intactness を測定すると、7% のプロトプラストが損傷をうけていることを示す結果がえられた。調製したプロトプラストを  $4^\circ\text{C}$  で1日、暗中で保存した場合、損傷をうけたプロトプラストの割合は 20% に達する。この場合、光学顕微鏡による観察からは、プロトプラストの破壊は認められないので、プロトプラストの原形質膜が損傷をうけているものと理解される。

\* Present address:

Univ. of Grenoble, Grenoble, France

ホウレンソウ葉プロトプラストからミトコンドリアの  
単離とその性質

西村 幹夫, Roland Douce\*, 赤沢 堯 (名大・農・生化制御)

光呼吸現象はグリコール酸の代謝と密接に関連しており、グリコール酸の代謝には緑葉中の3種のオルガネラ—クロロプラスト、パーオキシソーム、ミトコンドリア—の関与が報告されている。光呼吸現象を理解していくためには、上記オルガネラがグリコール酸代謝に果たしている役割の解明が不可欠である。特にグリコール酸経路に属する代謝産物のオルガネラ膜透過に関する知見は、光呼吸現象の解析に新たな視点を提供するものと期待される。しかしながら、ミトコンドリア、パーオキシソームに関しては、これらの知見がほとんどえられていない。緑葉からミトコンドリアやパーオキシソームの単離調製法が確立していないことにその原因がもためられる。今回演者らはホウレンソウ葉プロトプラストから代謝活性の高いミトコンドリアを単離調製し、ミトコンドリアにおけるグリシン脱炭酸反応の解析を試みたのでその結果を報告する。

ホウレンソウ葉プロトプラストは二段階法で調製した。最終プロトプラスト標品(約4 mg chl / 4 ml)に抽出液(0.3 M マンニトール, 1 mM EDTA, 0.1% BSA, 10 mM MOPS-KOH (pH7.2), 0.6% PVP) 20 ml を加え、テフロンホモジナイザーを用いてプロトプラストを破壊した。分画遠心によりえられた1000 g - 10000 g 沈殿画分を Percoll 不連続密度勾配遠心(5, 28, 45, 60% v/v Percoll, 0.25 M ショ糖, 0.2% BSA, 10 mM MOPS-KOH (pH7.2)) に供した。遠心は Beckman SW 25-3 ローターを用い、15,000 rpm 30 分間行なつた。

指標酵素活性の測定から、ミトコンドリアの70%は28%-45% Percoll 境界面に回収された。この画分にはパーオキシソーム、ER、チラコイド膜の混入はほとんど観察されない。この遠心条件において、ERとチラコイド膜はサンプル層-5% Percoll 境界面並びに5%-28% Percoll 境界面に分画されており、パーオキシソームは5%-28% Percoll 境界面に検出された。28%-45% Percoll 境界面に分画されたミトコンドリアの比活性は、リンゴ酸を基質として用いた場合、 $321 \text{ nmoles } O_2 / \text{mg protein} / \text{min}$  であり、ジャガイモ塊茎から単離調製されたミトコンドリアと同程度の値を示した。またその P/O 比, RC 比は各々 2.6, 2.9 という値がえられ、代謝的にも損傷をうけていないことが示された。このミトコンドリアはグリコール酸経路の代謝産物であるグリシンを基質として用いることができる。その場合の比活性は  $231 \text{ nmoles } O_2 / \text{mg protein} / \text{min}$  であり、P/O 比, RC 比は各々 2.5, 3.1 という値を示した。この結果はグリシンの脱炭酸反応により生成した NADH がミトコンドリアの電子伝達系で酸化されることを示唆している。

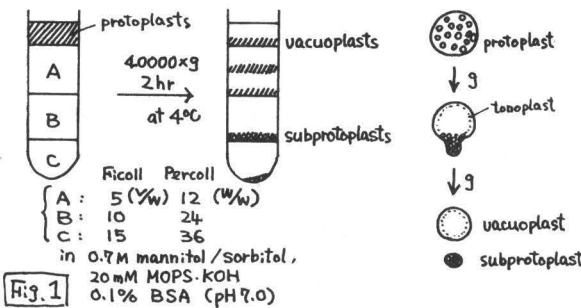
\* Present address:

Univ. of Grenoble, Grenoble, France

浅見純生, 赤沢 堯 (名大・農・生化学制御)

成熟した植物葉の葉肉細胞の大部分は液胞で占められている。液胞が光合成炭素代謝において何等かの役割をもつことは想像されるけれども、どのように関与しているかという実態は不明である。近年、種々の植物組織からの液胞単離法が開発されており、液胞が糖、有機酸などの蓄積に果たす役割に関して有用な知見が累積されつつある。しかしこれらの研究は、いづれ液胞のもつ静的な役割についての知見を提供するものであり、細胞内の炭素代謝を総合的に理解しようとする観点からすれば、単離した液胞を用いる実験系を構成する上からも、新たな作業仮説を導入することが必要であると考えられる。このような作業仮説をえる目的のもとに、ゆれゆれは液胞を含まない葉肉細胞プロトプラスト—サブプロトプラスト(subprotoplasts)—を調製し、それを通常のプロトプラストの示す光合成活性と比較検討することにした。

サブプロトプラストは、ホウレンソウ葉肉細胞から調製したプロトプラストを Fig. 1 に示すような Ficoll / Percoll step gradient によって  $40,000 \times g$ , 2時間遠心することによりえることができる。この調製法の原理は、図示したように、細胞内顆粒のなかで比重の小さい液胞と他の顆粒(クロロプラスト, ミトコンドリアなど)とが遠心力によって細胞内において相互分離し、強い遠心力のもとでは原形質膜がくびれる結果、サブプロトプラストとバキューオプラスト(vacuoplasts)にわかれるというものである<sup>①</sup>。



酸素電極法を用いて、見かけの光合成活性および暗呼吸活性を測定したところ、プロトプラストとサブプロトプラストにおいてとくに著しい差は認められなかった。しかし、放射性同位元素追跡法によって光合成同化産物を解析したところ、両者間におけるアミノ酸、有機酸などの

代謝上の挙動には明らかに質的な差異が認められた。これらの知見をもとにして、高等植物緑葉細胞の光合成炭素代謝において液胞が果たす役割について考察したいと思う。

① Lörz, Harms, Potrykus (1976) Biochem. Physiol. Pflanzen 169, 617-620.

### 3A-18

光合成細菌 *Chromatium* におけるアミノ酸透過機構について

佐渡 守, 浅見純生, 赤沢 堯 (名大・農・生化制御)

光合成細菌 *Chromatium* の glycine 透過を調べ、それが能動輸送によって行なわれていることを明らかにした実験結果について報告する。

(1) *Chromatium* の  $^{14}\text{C}$ -glycine 透過は光によって促進されて、この明条件下におけるアミノ酸透過は、膜結合性 ATPase の阻害剤 DCCD によって阻害されないけれども、cyclic electron transport の阻害剤 HOQNO によって阻害された。また  $\text{Na}_2\text{S}$  の添加は光依存の glycine 透過を促進した。一方、暗条件下における  $^{14}\text{C}$ -glycine の透過は DCCD によって阻害されたが、 $\text{Na}_2\text{S}$  は効果を示さなかった。proton ionophore FCCP は、明暗両条件における glycine の透過を阻害した。したがって、glycine の透過は電子伝達系や ATP 加水分解から形成されるプロトン濃度勾配 ( $\Delta\mu\text{H}^+$ ) により駆動される能動輸送であることが示唆された。

(2) *Chromatium* の glycine 透過について、その基質親和性 ( $K_m$  値) と最大輸送速度 ( $V_{\text{max}}$  値) を測定し、また他のアミノ酸との関連について調べた。glycine の透過の  $K_m$  値は光により変化しなかったが、光条件下での  $V_{\text{max}}$  は暗条件のそれに比しおよそ4倍大きい値を示した。したがって、glycine の透過を促進するのは、carrier の親和性が光エネルギーによって大きくなったのではなく、carrier を駆動するエネルギー量が暗条件よりも明条件の方が大きくなるためであると示唆された。alanine と serine は glycine の透過に対して拮抗的阻害効果を示したので、これら3種のアミノ酸が同一の carrier によって輸送されているものと考えられた。

(3) *Chromatium* における glycine 透過は、明暗両条件において pH 6.5~8.0 に至適 pH がみとめられた。また、温度依存性を調べ、明暗両条件における glycine の透過の活性化エネルギーはそれぞれ 8,200 cal/mol, 5,100 cal/mol であった。

鈴木健策, 清水孝子, 猪川倫好 (筑波大・生物)

淡水産ケイ藻 *Nitzschia ruttneri* では、光合成 $^{14}\text{C}$ 固定実験において、初期産物としてPGAが検出され、短時間のうちに主に糖リン酸からオリゴ糖( $\beta$ -1,3グルカン)へと $^{14}\text{C}$ が取り込まれていく。これに対して、アスパラギン酸やリノゴ酸への取り込みは比較的少なく、初期産物的な挙動は示さない。これらのことから我々は、*N. ruttneri* が基本的には $\text{C}_3$ 型の光合成炭素代謝を行なっているものと考えている。

一般に $\text{C}_3$ 植物では、酸素による光合成炭酸固定の阻害(ワールブルグ効果)がみられる。しかし、*N. ruttneri* では、ワールブルグ効果はみられず、かえって酸素によって炭酸固定は促進された。このとき炭酸固定のパターンは基本的には変化がみられず、グリコール酸、セリン、グリシンへの $^{14}\text{C}$ の取り込みもほとんどみられなかったことは、いままでに報告した。

Miyachi & Okabe (1976)は、ラン藻の *Anacystis nidulans* などにおいて、酸素による光合成炭酸固定の促進がみられることも報告している。*A. nidulans* の場合も、*N. ruttneri* の場合と非常によく似た様相を示しており、酸素による促進が同様な原因による可能性が大きい。しかし、*A. nidulans* においても、この促進に対する十分な説明はなされていない。

今回は、*N. ruttneri* における、酸素の光合成炭酸固定促進効果の解明のすべりがかりを得るために行なう、いくつかのサーベイ実験の結果について報告する。

まず、この効果の再現性について検討を行なったが、 $^{14}\text{C}$ 固定実験に用いた細胞の培養日数(6~21日)、固定実験時の水中炭酸濃度(0.33mM~3.0mM  $\text{HCO}_3^-$ )、実験時の水温(20~26 $^{\circ}\text{C}$ )などのちがいかかわらず、酸素による炭酸固定の促進がみられた。そして促進の大きいときには、窒素気相下の3倍近い値を示した。

RuBPカルボキシラーゼ活性の酸素による阻害を調べるために、窒素及び酸素気相下で、pH7.8、4.3mM又は20mM  $\text{HCO}_3^-$ という条件で活性を測定した。その結果、20mM  $\text{HCO}_3^-$ では酸素気相下で窒素気相下に対して約10%の阻害を示したのに対し、4.3mM  $\text{HCO}_3^-$ では約70%もの大きな阻害がみられた。このことは、RuBPオキシゲナーゼ活性の存在を示唆している。

つぎに、グリコール酸経路に対する酸素の影響を調べるために、グリコール酸オキシダーゼの阻害剤であるヒドロキシピリジンメタンスルホン酸(HPMS)10mM存在下で光合成 $^{14}\text{C}$ 固定を行なわせた結果、酸素濃度に依存したような全固定量に対するHPMSの阻害はみられず、0%、21%、100%の各酸素濃度下で、それぞれ約40%の阻害がみられた。また、HPMS処理に伴ったグリコール酸の蓄積は、みられなかった。

この他、イソニコチルヒドラジド(INH)など、いくつかの阻害剤についてもその効果を調べたが、顕著な影響はみられなかった。

以上のように、これらの実験からは酸素の光合成炭酸固定に対する促進効果を説明するだけの結果は得られなかった。目下、さらに詳細な検討を行なっている。



### 3A-20

光独立栄養培養細胞の光合成特性について  
佐藤文彦, 西田晃二郎, 山田康之  
(京大, 農, 農化, \*金沢大, 理, 生物)

培養細胞は糖添加条件下で培養されている。緑化培養細胞も通常は培地に糖源を要求する(以下この細胞を photomixotrophic 緑化培養細胞, 略して mixotrophic 細胞と呼ぶ)。一方,  $\text{CO}_2$  を富化し適当な光強度下で培養することにより mixotrophic 細胞のあるものは光独立栄養的に生育することができる。mixotrophic 細胞も光合成活性を示すが、そのエネルギー源、炭素源は主に添加した糖によっていると思われる。一方、光独立栄養培養細胞は光合成によってエネルギー、炭素を得ている。mixotrophic, 光独立栄養培養細胞はこのような栄養性の違いをもっている。一方、培養細胞は細胞分裂が常時起っているかどうかという点で緑葉葉肉細胞とは異なった生理状態にあると考えられる。そこでこれら mixotrophic, 光独立栄養緑化培養細胞における代謝特性を明らかにする目的でその光合成特性、特に光合成の初期炭酸固定系の検討を行なった。

Sucrose 3% を含む L.S 培地で明所下培養したタバコ (*Nicotiana tabacum* var. Samsun) 及エニツダ (*Cytisus scoparius* Link) mixotrophic 細胞と sucrose を含まない L.S 培地上  $\text{CO}_2$  1% に富化した空気を通気し明所下培養した光独立栄養培養細胞、各々約 100 mg をリン酸 buffer (pH 7.8) に懸濁し 28°C, 30000 lux 照明下  $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$  (最終濃度 1.7 mM) 添加後の炭酸固定のパターンを追跡した。反応を EtOH で停止した後 80%, 20% EtOH で抽出し、この EtOH 可溶性画分のそれぞれを固定産物の取込を 2次元ペーパークロマトグラフィで分離定量した。

mixotrophic, 光独立栄養細胞とも明所下で暗所下より極めて高い  $^{14}\text{CO}_2$  固定を示した。この時の初期炭酸固定産物をみると 10 秒間の固定で PGA, sugar phosphates とともに高いリンゴ酸の取込みが認められた。PGA, sugar phosphates の取込は時明とともに飽和し、一方 sucrose の蓄積が認められた。これらの結果から緑化培養細胞においてもカルビン回路が作動していると判断された。一方リンゴ酸の取込みは測定時間内直線的に増加した。5 分後の EtOH 可溶性画分中に占めるリンゴ酸の取込みは mixotrophic 細胞 29%, 光独立栄養細胞 15% であり通常の  $\text{C}_3$  植物緑葉中における固定よりはるかに高い値を示した。暗所下における炭酸固定の初期産物の大部分はリンゴ酸であったが明所下のリンゴ酸の固定量の 25% (mixotrophic 細胞), 11% (光独立栄養細胞) であり、明所下での高いリンゴ酸の  $^{14}\text{C}$  の取込みを説明することはできなかった。このことはタバコ細胞のみならずエニツダ細胞においても認められた。

以上の結果明所下緑化培養細胞においては 2 つの炭酸固定系が働いていることが示唆された。炭酸固定に関する酵素の活性測定を行ったところ RuBP carboxylase に比し数倍高い PEP carboxylase の活性を認めた。2 つの炭酸固定系の 1 つは RuBP carboxylase とカルビン回路による固定系、他の 1 つは PEP carboxylase による  $\text{C}_1$ - $\text{C}_3$  carboxylation 系が作動しているものと判断された。

武藤尚志, 臼田秀明\*, G. E. Edwards\* (東大・応微研  
ウィスコンシン大)

暗処理した *Chlorella* 細胞に光を照射するとNADがNADPに変換することが知られている。最近、我々はこの変換反応がCMUやCCCPなどによって阻害されることや、照射光としては、赤色および青色光が効果的であることを明らかにし、光合成と密接に関連した反応であることを示唆した。光合成との関連が深いことから、この変換反応が起る細胞内の場が、葉緑体内であるのか、それ以外の場所であるのかは興味深い点である。

この問題を研究するには、*Chlorella* 細胞は細胞壁が強固で *intact* 葉緑体を調製するには不適切な材料であるので、高等植物葉を実験材料に選んだ。主として播種後10~13日の小麦芽ばえを用いた。まず *intact* 葉における、光によるニコチンアミドヌクレオチドレベルの変動を調べた。暗中に1夜保った小麦芽ばえに光照射し、終時的に葉を切り取って、凍結液中に投入して殺し、凍結乾燥して飼料を調製した。これから0.1N HClあるいは0.1N NaOHでニコチンアミドヌクレオチドの酸化型および還元型をそれぞれ抽出し、MTTテトラゾリウムを用いる酵素的サイクリング法によって定量した。*Chlorella* と同様、光によりNADがNADPに変換することが見出された。トウモロコシ幼植物の葉でも、同様にNAD → NADPの変換が観察された。

次に、暗中でEdwardsらの方法によって、小麦芽ばえから葉肉細胞プロトプラストを調製し、光照射によるNAD → NADPの変換を確認した。また、明所で調製したプロトプラストを、暗所に保った後照射してもNAD → NADPの変換は観察された。更に、暗中で調製したプロトプラストを、暗中で20 $\mu$ m ナイロン網を通過させることにより破壊し、*intact* 葉緑体を得、これに光照射するとNAD → NADPの変換が起ることを見出した。

一方、NAD → NADPの変換は、*Chlorella* およびエンドウを用いた研究から、光リン酸化で生成されたATPを利用する、NADキナーゼに触媒される反応であると推定されているので、この酵素の細胞内分布を調べた。小麦プロトプラストを20 $\mu$ m ナイロン網で破壊し、蔗糖密度勾配遠心法により、葉緑体、ミトコンドリア、ペルオキシゾームおよび可溶性成分に分離し、それぞれの成分の指標酵素の含量を測定した。NADキナーゼは大部分、葉緑体成分に分布することを示した。プロトプラストを葉緑体とそれ以外の部分に分離する手法で、セマワリやメレシバの葉肉細胞でも、NADキナーゼは葉緑体に分布することが見出された。

### 3A-22

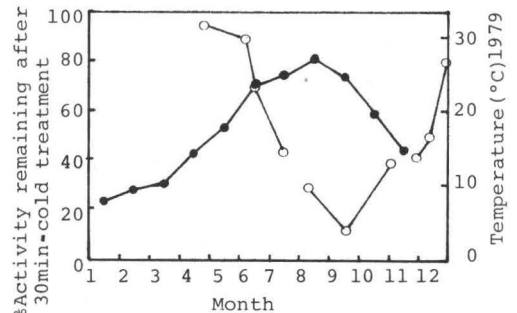
Pyruvate, Pi dikinase の精製にともなう低温不安定性の変動

山崎健一, 杉山達夫 (静岡大・農・農化)

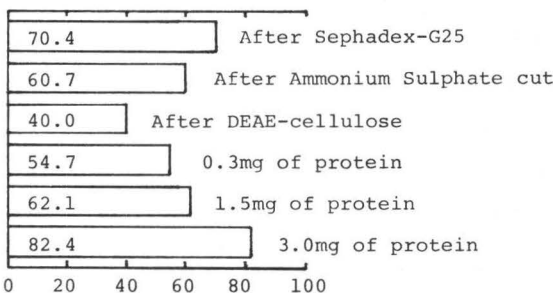
Pyruvate, Pi dikinase (以下略して dikinase) は、 $C_4$  ジカルボン酸サイクルの key enzyme であり、cold labile enzyme である事が知られている。Dikinase が触媒する反応の Arrhenius plot は  $10^{\circ}\text{C}$  前後に屈曲点を持ち、この温度は冷温感受性の  $C_4$  植物葉について測定された光合成速度の Arrhenius plot の屈曲点の温度とほぼ同じである。また、 $C_4$  植物の冷温耐性とそれら dikinase の見かけの cold lability の間に相関の有る事が、トウモロコシ及びその他の  $C_4$  植物を用いた実験から示唆されている。そこで本研究は、この品種・種間における dikinase の低温不安定性の見かけ上の違いが何に起因するのかを明らかにする為に行った。

各種の  $C_4$  植物の種子を  $30^{\circ}\text{C}$  で発芽させ、ガラス室で 7 週間以上成育させ出穂前の植物葉を実験に供した。酵素抽出には、 $\text{MgCl}_2$ , EDTA, DTE, pyruvate, ascorbate, を含む Tris-HCl (pH 7.5 at  $0^{\circ}\text{C}$ ) を用い、Polyclar AT を添加し組織を摩砕した。ホモジネートはモスリン布でろ過した後遠心 ( $40000\text{g } 1\text{sec}$ ) し、その上澄みを Sephadex-G25 によりゲルろ過し、そのタンパク分画を粗酵素とした。酵素活性の測定は既報の標準法に従い PEP carboxylase と Malate dehydrogenase を共役酵素とし NADH の減少を  $340\text{nm}$  で分光測定した。低温不安定性の測定には粗酵素液を氷中で予冷した試験管に移し 1 分後を 0-time とし、以後経時的にその一部を取り活性を測定した。

右の図は、Panicum maximum から得た粗酵素液を氷冷し、30分後の dikinase の残存相対活性 (○) とその月の平均気温 (●) をプロットしたものである。次に、この低温不安定性の見かけ上の違いが何に起因するのかを明らかにする為、低温耐性の高い時期にある植物から粗酵素液を得て、硫酸塩析および DEAE-cellulose クロマトグラフィーによって dikinase の部分精製を試みた。その



結果、左図に示すように、精製が進むにつれて dikinase の低温耐性は著しく低下した。しかし、dikinase 活性を含まない分画を酵素標品に添加することによってその低温耐性は再び回復した。このことは dikinase の低温感受性を支配する物質が粗酵素液に存在することを強く示唆するものである。この物質は熱に不安定であることが明らかとなった。これらの実験結果を述べ、dikinase の低温感受性における生理的意義について考察したい。



%Activity remaining 30min after cold treatment

トウモロコシ葉不活型ピルビン酸、リン酸ジキナーゼ活性化反応の解析

仲本 準, 杉山達夫 (静岡大・農・農化)

C<sub>4</sub>ジカルボン酸サイクルにおけるホスホエノールピルビン酸の供与酵素であるピルビン酸、リン酸ジキナーゼは細胞内で光によるすみやかな活性調節をうける。暗処理葉から単離された不活型ジキナーゼは *in vitro* においても活性化される。この活性化反応は光に無関係であるが、P<sub>i</sub>に依存し、かつ未知の高分子物質が活性化に介在する。この高分子物質(以後、活性化因子と記す)は暗処理葉から抽出された不活型ジキナーゼをP<sub>i</sub>の共存下で触媒的に活性化するタンパクであることが明らかになっている。筆者らはこの活性化因子の部分精製とこれが触媒する反応の阻害を主体とする解析を試みた。

不活型ジキナーゼは既報に従い、暗処理トウモロコシ葉から単離精製したものをを用いた。活性化因子の抽出方法は次のようである。暗処理したトウモロコシ葉組織を乳鉢にて磨砕した。ホモジネートをモスリン布で口過したのち、Sephadex G-25によりケル口過し、遠心(9200g, 5分)後、上清を硫酸分画(30-40%飽和)した。これをBlue Dextran Sepharose 4Bカラムによりアフィニティークロマトにふした。活性化因子はKCl濃度を0.5Mにすると溶出された。この操作で活性化因子はほぼ100%回収される。一方大部分のphosphataseおよびadenylate kinaseは除去された。またこのようにして調整された活性化因子は4℃で保存することにより、1時間後も約90%の活性が保持されていた。

不活型ジキナーゼと活性化因子にP<sub>i</sub>を加えるとジキナーゼ活性は経時的に増加し、その最大比活性は照光下で抽出した活性型の値に到達する。この反応系を用いた動力学的解析から不活型ジキナーゼおよびP<sub>i</sub>が活性化反応の基質であり、活性化因子が不活型ジキナーゼの修飾酵素であることが示唆された。Blue Dextranと活性化因子の結合の様式を知るために、この反応系にBlue Dextranのblue dyeの部分であるCibacron Blueを添加し、その効果を調べた。その結果、これは活性化反応を強く阻害し、その阻害型式は不活型ジキナーゼに対してcompetitiveであり、P<sub>i</sub>に対してはuncompetitiveであった。さらに種々のnucleotide、およびPP<sub>i</sub>についても活性化反応におよぼす添加効果を調べてみたところADP、AMPおよびPP<sub>i</sub>についても顕著な阻害がみられた。(下表) としてADP、PP<sub>i</sub>の阻害型式は不活型ジキナーゼに対してcompetitiveであった。これらの結果から不活型ジキナーゼにはnucleotideまたはその類似物質が結合し、この物質が活性化因子の攻撃部位となっている可能性が示唆される。これらの詳細を述べるとともに、活性化反応のしくみについても考察したい。

活性化反応の初速度に及ぼす各化合物の影響

(無添加の反応の初速度を100とした。また各nucleotideの反応液中における濃度は1mM, PP<sub>i</sub>は1.5mMである。)

無添加	Adenosine	ATP	AMP	ADP	PP <sub>i</sub>	GDP	CDP	UDP	NAD	NADH	NADP	NADPH
100	89	64	27	5	12	46	69	103	86	115	100	100

### 3A-24

高酸素濃度、高光強度下における *Euglena gracilis* z の glycolate の代謝と排泄の相関について

横田明穂, 芳賀敏実, 北岡正三郎 (大阪府大, 農化)

*Euglena*<sup>(~3)</sup> や緑藻、珪藻の glycolate 代謝は、種々の点において C<sub>3</sub>-植物のそれと異なっている。前者における高酸素濃度、高光強度下での glycolate の細胞外への排泄もその一つである。このような条件下では、排泄される glycolate の炭素骨格は光合成によって固定された炭素ではないはずである。そこで、*Euglena* をこの条件下に処した場合の排泄される glycolate の炭素骨格供給源について検討した。また、この条件下での、glycolate の排泄と *Euglena* が mitochondria に持っている glycolate 代謝系との相互関係についても検討した。

*Euglena gracilis* z は 5% CO<sub>2</sub> を含む空気を通気 (1 l/min) しながら、2,000 ルクスの光照射下で 7 日間培養した。細胞を遠心によって集め、10 mM リン酸緩衝液 (pH 6.8) に懸濁した。この細胞懸濁液を 100% O<sub>2</sub> (20 ml の反応液当たり 50 ml/min)、20,000 ルクスの光照射下に各時間保った後、細胞を除いた反応液中の glycolate を Calkins の方法に従って定量した。

5% CO<sub>2</sub> で生育した *Euglena* は、反応開始後 8~10 時間目まで時間に対し直線的に glycolate を排泄した。その量は 115 μg/10<sup>6</sup> cells に達した。これは *Euglena* 細胞の乾重量の 20~30% に相当した。glycolate 排泄中に、*Euglena* の貯蔵多糖である paramylon、127 μg/10<sup>6</sup> cells が減少した。glycolate 排泄は paramylon が溷濁すると直ちに止った。また、5% CO<sub>2</sub> で生育した *Euglena* を NaH<sup>14</sup>C<sub>3</sub>O<sub>3</sub> 存在下に 3 時間光合成させ、細胞内構成成分を標識した後 100% O<sub>2</sub>、20,000 ルクスに保つと、<sup>14</sup>C-glycolate の排泄に伴ない paramylon 画分の <sup>14</sup>C が減少した。これらの事実から、上記条件下では、排泄される glycolate の炭素骨格は paramylon に由来しており、分解された paramylon の炭素の約 70% が排泄された glycolate の炭素となっていると算出された。残り 30% は glycolate として代謝されたものと思われる。ところが glycolate 排泄時には細胞内の glycine, serine, glutamate のプールの変動は全く認められず、この条件下での glycolate の代謝は疑問視された。そこで、排泄のほぼ停止した *Euglena* 細胞に 1-<sup>14</sup>C-glycolate を投与し、100% O<sub>2</sub>、20,000 ルクス光照射下での <sup>14</sup>C の代謝パターンをみると、代謝された <sup>14</sup>C のうち 86% は <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> となって放出され、アミノ酸画分へはほとんど取り込まれなかった。

以上の事実から、100% O<sub>2</sub>、20,000 ルクスでの光照射下では、*Euglena* は paramylon を glycolate に転換し、その 2/3 を排泄し、1/3 を mitochondria で酸化した後脱炭酸しているものと思われる。なお、この仮定された mitochondria での glycolate 酸化速度は、別に測定したこの細胞の glycolate 代謝能力に見合うものであった。以上の事実に基づいて、*Euglena* の glycolate 代謝と光呼吸の関連についても考察する。

1) Yokota, Nakano & Kitaoka, Agric. Biol. Chem., 42, 115 (1978).

2) Yokota, Nakano & Kitaoka, *ibid.* 42, 121 (1978).

3) Yokota & Kitaoka, Biochem. J., 184, 189 (1979).

李舜熙, 趙映東(延世大), 權寧命(ソウル大), 山田芳雄(九州大)

There are conflicting arguments on the site and mechanism of  $\text{CO}_2$  evolution in photorespiration. According to the results of Zelitch (1972 a,b) and Grodzinski (1976, 1979),  $\text{H}_2\text{O}_2$  produced during oxidation of glycolate by glycolate oxidase oxidizes glycolate into formate and  $\text{CO}_2$  which is responsible for photorespiration, and even formate could produce  $\text{CO}_2$  by action of catalase in peroxisomes. But Kisaki, et al (1969, 1971, 1972) and Moore (1977) didn't agree with such results, arguing that catalase activity is so high that remanant  $\text{H}_2\text{O}_2$  is not enough for such oxidation and 2 molecules of glycine formed by transaminase could produce serine and  $\text{CO}_2$  responsible for photorespiration in mitochondria. There is no agreement except the conversion of glycolate to glyoxylate in peroxisomes. First of all, mature leaf was usually used for photorespiration studies by them. To clarify the biochemical and physiological change of metabolism depending on leaf age we observed photorespiration, ability of  $\text{CO}_2$  fixation, enzymatic activities in peroxisomes, amount of chlorophyll and protein, and ultrastructural changes of cell organelles chronologically in spinach leaf. The following results were obtained.

Photorespiration and the ability of  $\text{CO}_2$  fixation tended to increase steadily with growth and decrease with senescence of leaf. While changes in amount of P-glycolate + glycolate associated with photorespiration were similar to changes in photorespiration, there was no relationship between changes in amount of serine + glycine and photorespiration. Changes in glycolate oxidase and catalase activity in both cell free extract and peroxisomal fraction paralleled with that in photorespiration. Such a result in catalase in intact leaf was confirmed by using electron microscope. Changes in ultrastructure of chloroplast and peroxisome tended to associate with  $\text{CO}_2$  fixation, enzymatic activities, and photorespiration. However,  $\text{H}_2\text{O}_2$  production by glycolate oxidase and  $\text{H}_2\text{O}_2$  decomposition by catalase seems to be responsible for  $\text{CO}_2$  evolution in peroxisomes. Sodium azide known for catalase inhibitor was added to the peroxisomal fraction to see the possible role of catalase, in which  $\text{CO}_2$  evolution was 3 times as much as control. Such results lead us to suggest that  $\text{CO}_2$  evolution in peroxisome depends on both activities of glycolate oxidase and catalase.

3A-26

トマト葉におけるリンゴ酸生成反応のグリコール酸による活性化

山内 稔・山田 芳雄 (九大・農・農化)

C<sub>3</sub>植物に光合成をおこなわせた場合、低CO<sub>2</sub>濃度下では<sup>14</sup>CO<sub>2</sub>よりMalate-<sup>14</sup>Cの生成割合および量が増加する。本研究は、低CO<sub>2</sub>濃度下で生成が増加すると考えられる中間代謝物、特にグリコール酸回路中間体が、Malate生成反応を活性化するのではないかという予測のもとにおこなわれた。

同一の同化箱中で、数個のトマト切断葉に各種の代謝化合物(各50mM)を蒸散流により供与しつつ、<sup>14</sup>CO<sub>2</sub>を供与した後、Malate-<sup>14</sup>Cの生成量を測定した。このとき対照として、脱イオン水を供与した。Malate生成量に及ぼす化合物の効果は、Glycolateが最も大きく、対照の6~7倍、次にGlyoxylate、Glycerateが3~4倍、Glycine、Serine、Phosphoglycolate、3-Phosphoglycerate、Pyruvate、Aspartate、Glutamate、Fructose-1,6-diphosphateおよびGlucoseは3~1倍、Ribose-5-phosphate、Alanine、Fructose-6-phosphate、Malate、α-KetoglutarateおよびCitrateは阻害作用を示した。

供与Glycolate濃度の増加とともにMalate-<sup>14</sup>C生成量は増加し、100mM溶液を供与しても平衡化しなかった。ところがGlycolate-1-<sup>14</sup>CからのMalate-<sup>14</sup>C生成量は、Glycolate-1-<sup>14</sup>C濃度が50mMの時すでに平衡化しており、葉内にGlycolate-<sup>14</sup>Cの集積が認められた。ゆえに、供与したGlycolateが基質となり、<sup>14</sup>CO<sub>2</sub>よりMalate-<sup>14</sup>Cの生成量が増加したとは考えられず、GlycolateがMalateの生成反応を活性化していると推察された。

そこで①脱イオン水、②Glycolate、③Glycolate + Malonate、④Malonate(各50mM、pH 5.0)をトマト切断葉にそれぞれ供与しつつ、光条件下で10分間<sup>14</sup>CO<sub>2</sub>を供与した。その結果、Glycolate供与の有無にかかわらず、Malonate処理によりMalateの生成は阻害され、逆にSerineへの<sup>14</sup>Cとり込み割合が増加した。Glycolate供与により、別のMalate生成経路が作動するのではなく、暗条件下でも作動しているMalate生成経路(Fig. 1)が活性化されると推察された。

<sup>14</sup>CO<sub>2</sub>暗固定を30分間おこなった結果、Glycolate供与によりMalateへの<sup>14</sup>Cとり込み割合は増加し、それはAspartateとGlutamateへの<sup>14</sup>Cとり込み割合の減少によって補われた。Glycolate供与によるMalate生成量の増加は、Malate dehydrogenaseが活性化されるためと推定された。

低CO<sub>2</sub>濃度下では、光呼吸基質Glycolateの生成量は増加するといわれている。Glycolateが低CO<sub>2</sub>濃度下でMalate生成量を増加させ、同時に還元力を消費していると推察された。

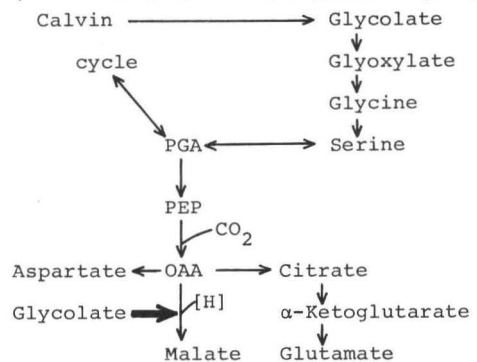


Fig.1. Activation of malate synthesis by exogeneous glycolate in leaves.





第 3 日 4 月 8 日(火)

B 会 場

代 謝 III、IV



山崎良樹, 鈴木幸雄 (岡山大学農業生物研究所)

目的: さきに行者は *Mucor*, *Penicillium*, *Basidiomycetes* に属する糸状菌から  $\alpha$ -グルコシダーゼおよびグルコアミラーゼを純化あるいは結晶化して諸性質を比較検討し, (i)大部分の $\alpha$ -グルコシダーゼは溶性澱粉によく作用すること, (ii)溶性澱粉をマルトースとほぼ同速度で分解する $\alpha$ -グルコシダーゼとグルコアミラーゼの中間的な新しいタイプの酵素が *M. javanicus* および *M. racemosus* から得られたこと, および (iii)  $\alpha$ -グルコシダーゼとグルコアミラーゼは基質特異性および糖転移作用の相違に加えてアミロースからの分解生成物のアノマー型が例外なく $\alpha$ -グルコシダーゼは $\alpha$ 型であり, グルコアミラーゼでは $\beta$ 型であり, この点から区別できることなどを明らかにした。ついでコメ乳熟期種子から2つ, 緑豆もやしから3つ, またネギから3つの $\alpha$ -グルコシダーゼを純化し, いずれの酵素も高い溶性澱粉分解活性を有することを認めた。植物の $\alpha$ -グルコシダーゼは澱粉からの $\alpha$ -および $\beta$ -アミラーゼによる生成物, マルトースを分解するのが主作用と考えられているが, 上記の結果および1978年の千葉らによる甜菜からの $\alpha$ -グルコシダーゼが溶性澱粉をマルトースよりも速やかに水解するとの報告から, 植物での澱粉分解における $\alpha$ -グルコシダーゼの役割をさらに検討する必要があると考え, 本実験を行なった。

方法および結果: 甜菜種子 (*Beta vulgaris* L. cv. *Tsukisappu*) を10%食塩を含む酢酸緩衝液(pH5.3)で懸濁, 磨砕後, 抽出された本酵素を硫酸およびエタノールによる分別沈殿, CMセルロースカラムクロマトグラフィーおよび調製用ディスク電気泳動により精製し, ディスク電気泳動的に単一な2つの本酵素(I, II)を得た。両酵素の分子量はそれぞれ98,000 (I) および60,000 (II)であった。酵素(I)は溶性澱粉をマルトースより速やかに水解し, 他方酵素(II)の溶性澱粉に対する水解作用はマルトースに比して微弱であった。両酵素は5%マルトースからの糖転移生成物でも非常に異なり, 酵素(I)は $\alpha$ -1,6-グルコシル転移を行なってパノース, イソマルトースを生成したが酵素(II)は $\alpha$ -1,4転移を行ないマルトトリオースを生成した。酵素(I)はアミロースから $\alpha$ -グルコースを遊離した。また両酵素の構成糖も異なり, 酵素(I)は糖含量2.7%で主構成糖がマンノースであったが, 酵素(II)は糖含量8.8%で, 主構成糖がグルコースであった。アミノ酸組成では, 酵素(I)は酵素(II)に比較してセリン, メチオニン, チロシンが多く, リジン, プロリンが少なかった。成熟種子および発芽種子における両酵素の活性は, 前者では酵素(I)が酵素(II)より低く, 後者では酵素(I)が酵素(II)より高かった。以上のよりに溶性澱粉分解活性および糖転移生成物などが非常に異なる2つの $\alpha$ -グルコシダーゼが同一植物体中に存在していることは, 本酵素の植物生理的役割を考える上で興味深いことである。

*Bacillus megaterium roseus* における生長と色素産生について

岡本 剛, 福田重夫 (日本医大・生物)

本菌が脂溶性色素(カロチノイド)を産生することは既に寺内らによって報告されている<sup>1)</sup>。本研究は色素産生の意義を明らかにすることを目的とした。

37°Cで振とう培養し菌体を得た。粉末牛肉エキス(0.3%)とイプトン(1%)を含む培地を基本培地とした(B-P培地)。本菌は凝集性が高く非常に沈降しやすいので集菌後の湿重量を生長(菌数)の指標とした。菌体をメタノール脱水後、ベンゼン-メタノール混液(1:1, v/v)で色素を抽出した。抽出液の可視部の吸収極大波長における吸光度を湿重量で除して得られる値を色素産生の指標とした。

培地のpH値の変動は細菌細胞の代謝活動を反映する。そこで生長、色素産生との関係を短時的に調べた。pH変化はいくつかの相が認められた。培養開始から約1時間はわずかにpH低下し(1)、ついでpH再上昇することがあつた。まず若干上昇し(2)、2時間から5時間後にかけてはpH値はほぼ一定であつた(3)。ついで著しいpH上昇があつた(4)。このpH上昇は20数時間後には緩やかになり、以後再び同様な上昇をみた(5)。(1)から(2)においては正味の生長はなく、(3)に入ると若干の生長が認められた。培養初期におけるpH低下は生長開始のための代謝切替を示すと思われる。(4)になると生長が盛んになり、(4)終期に生長は最大に達した。(1)から(4)初期の色素産生量はわずかで、この期間中はほぼ一定であつた。(4)になって2,3時間経過してから色素産生は著しく高まった。B-P培地に酢酸ナトリウムを添加すると(A培地)生長は増大し色素産生は逆に低下した。塩化ナトリウムの場合(N培地)には生長は減じ色素産生は高まった。またB-P培地、A培地およびN培地でpH-生長関係をみるとpH6.5からpH9.0の範囲で、pH8.0からpH8.4付近で生長は最大となり色素産生は最小になった。従つて、色素産生に先行して増殖生長があつたり、その結果pH再上昇がみられるのであろう。A培地において生長増大はみられるけれども、十分な時間経過の後にもB-P培地の場合に比べ色素産生量は少ない。そこで色素産生は必ずしも増殖生長過程の一環として生起する過程ではないと思われる。

本菌に対する熱処理(65°C, 3分)の影響を培養各相について調べた。(1)から(3)で得られた菌体には熱処理後に生育可能なものはなかつた。(4)になり色素産生が著しくなる時点から更に4,5時間経過し色素が一定量以上形成されるとはじめて熱処理後に生育可能なものが得られた。熱抵抗性は色素量の増加に従つて高まった。本菌により産生されるこれらの色素は脂溶性であるから、細胞内の膜構造に局在すると考えられる。恐らく色素含量の増加とともに、膜構造の再構成が継続して誘起され、ある特定の構造が出現すると熱抵抗性を獲得することになるのであろう。

上に述べた本菌の生長過程はこれまでに知られている*Bacillus*属細菌の胞子形成過程とは著しく異なり、本菌の熱抵抗性かどのような構造に由来するのか現在のところ不明である。また色素産生の増大とともに、形成される色素の種類も変化していることがあつた。これらの点については現在検討中である。

1) 寺内, 福田ら 生化学, 32, 130(1966), 32, 744(1967), 31, 506(1969), 32, 548(1975)

蒲生賢次, 川島伸磨 (専売・宇試)

タバコの葉には小さな毛(毛茸)が密生しており, 葉が生長・成熟するにつれてこの毛茸の先端に樹脂が分泌してくる。日本で栽培しているタバコ(*Nicotiana tabacum*)はいづれもこの分泌物の主成分が Duvatrienediol という Macrocyclic diterpene であり, これはタバコに特異的に含まれる成分であるとされている。タバコ属植物 (genus *Nicotiana*) は 65 種あって, いずれもその地上部器官には毛茸が生えており, 量的な差はあるが, いずれも樹脂を分泌することが知られている。そこでこれらの樹脂成分を検索し, *N. tabacum* がどのようにして Duvatrienediol を生成する能力をもつに至ったかを知るため, 以下の実験を行なった。

#### 実験方法

タバコ属植物 50 種と世界各地で局部的に栽培されている在来品種 15 種を温室で栽培し, 各植物の開花期に葉を収穫した。収穫葉 (fr. wt. 50-100g) をその約 10 倍量のクロロホルムに 30 秒間浸漬して葉面に存在する脂質を抽出した。抽出液は Whatman IPS 濾紙で不溶物および水分を除去したのち, 45°C 以下で減圧濃縮し, 分析に供するまで -20°C で保存した。分析は主に GLC (OV101, 3m, 150-280°C, 6°C/min, N<sub>2</sub> 70 ml/min) でおこない, 試料は無処理および Butyl boronate 処理したものをを用いた。ピークは GC-MS で確認した。必要に応じシリカゲルカラム (hexane → 30% ether hexane → ether) で粗分離した画分を GLC で分析した。精製した物質は NMR で確認した。

#### 結果と考察

日本で栽培されている *N. tabacum* の品種 (黄色種: BY, Corker, MC, Virginia; 日本在来種: 水府, 松川, だるま, 白遠州; バレ種) はいづれも diterpene としては  $\alpha$ - と  $\beta$ - Duvatrienediol のみを含むものであった。しかし外国在来種の中には, ブラジルの Galpao, トルコ種の Samsun, ヨーロッパの NFT, Bergerac などのように Duvatrienediol とともにラブダン系 diterpene, cis-Abienol を含んでいる品種もあった。*N. tabacum* 以外のタバコ属植物で Duvatrienediol を含む種は *N. sylvestris* のみであった。ラブダン系化合物は *Paniculata* 節に属する 7 種のうち *N. benavidesii* と *N. raimondii* および *Tomentosae* 節に含まれる 5 種のみ含まれ, 他の節に属する種には含まれていなかった。*N. tabacum* は *N. sylvestris* と *Tomentosae* 節のいずれかの種がかけあわさって発生したとされているので, この節の種をより詳細に調べてみると, *N. glutinosa* は sclareol と manool を含み, *N. otophora* はほとんど分泌物を生成せず, *N. tomentosiformis* は cis-Abienol を含んでいた。

*N. setchelli* と *N. kawakamii* の diterpene は未同定であるが, 少なくとも主成分は cis-Abienol ではないラブダン系化合物であった。この結果から *N. tabacum* は *N. sylvestris* と *N. tomentosiformis* がかけあわさって発生したであろうことを推測させる。

*N. benavidesii* と *N. raimondii* のラブダノイドはそれぞれ分取用 GLC で精製し, oil と結晶を得たので現在構造決定中である。その他ヨーロッパの古い品種の中には  $\alpha$ - Duvatrienediol のみしか含まないもの,  $\alpha$ - よりも  $\beta$ - を多く含むものなどが存在したので, これら品種を用いて Duvatrienediol の生成系を調査する予定である。

イワガネゼンマイ (*Coniogramme intermedia*) から単離された

新しいアミノ酸

畑中信一\*, 室岡葉子, 斉藤晃司, 石田由美子 (東大・  
教養・生物)

日本産シダ植物に含まれる特異アミノ酸を2次元ペーパークロマトグラフィーで検索中, イワガネゼンマイ (*Coniogramme intermedia*) に遊離型で存在しニヒドリンで黄色に紫色する未知アミノ酸を見出したので, その単離と構造研究をおこなった.

[材料] 1979年9月3日埼玉県名栗村で本植物の葉約8.5 kgを採集し, 直ちに抽出に供した.

[抽出と新アミノ酸の単離] 葉を細断し, 繰り返して80%エタノールと共にミキサーにかけて過し抽出液約130 lをえた. これを陽イオン交換樹脂ダイヤイオンSK1B(H+)型) につけ, 吸着したアミノ酸を2Nアンモニア水で溶出し, 減圧濃縮しアミノ酸画分をえた. これを少しづつアビセルカラムにつけメチルセルロース-水で展開すると目的のアミノ酸とバリンの混合物がえられた. これを陰イオン交換樹脂ダウエックス1(酢酸型)のカラム, 次いでアビセルカラムとヒロジゲン-メチルセルロース-水で精製し純品をえた. 収量約300 mg, 水-アセトンから再結晶3回.

[性質] 分解点 > 182°  $[\alpha]_D^{25} = +251^\circ (c=0.68, H_2O), +257^\circ (c=0.34, 3N HCl)$

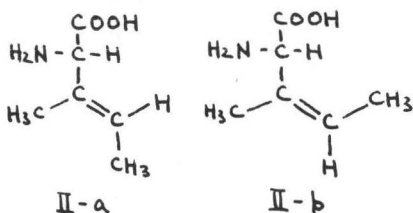
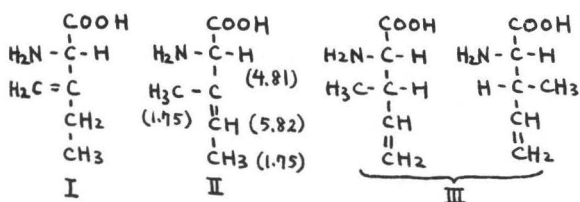
元素分析値

		C	H	N
C <sub>6</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub>	実測値	55.65	8.97	10.86
	計算値	55.80	8.57	10.84

核(H)磁気共鳴スペクトル(δ) 1.75(6H), 4.81(H. s), 5.82(H)

ニヒドリンと反応して黄色になることから不飽和結合が予想されたのでアダマス白金を触媒として接触還元をおこなった. 反応生成物は薄層クロマトグラフィーとアミノ酸自動分析計により, イソロイシンとアロイソロイシンの7:5の混合物であることが明らかになった.

[構造] 旋光度のシフトからL系のアミノ酸と考えれば, 接触還元でイソロイシンとアロイソロイシンの混合物になり, 二重結合を1つもつ構造はI, II, IIIの



いづれかと考えられる. 以前菌類から単離したI, 合成品のIIIと比較した結果, いづれとも一致せず, 可能性はIIに限られる. また核磁気共鳴スペクトルの結果もよくIIの構造を支持する. IIにはa, b 2種の異性体がありうるが, 天然物がいづれかと一致するか現在スペクトルの検討と合成をおこなっている.

本植物の同定と採集に際して御教示いただいた伊藤洋先生に感謝致

## III. Orotate phosphoribosyl transferase と OMP decarboxylase の諸性質

芦原 坦 (お茶の水大・理・生物)

ピリミジンヌクレオチドの合成系には、 $\text{CO}_2$ 、アミノ酸を基質として用いるいわゆる *de novo* 経路と、ピリミジン塩基ヌクレオチドを用いる salvage 経路があることが知られている。今回は、*de novo* 経路の orotate  $\rightarrow$  UMP を触媒する酵素である orotate phosphoribosyl transferase (OPRTase, EC 2.4.2.10) と OMP decarboxylase (ODCase, EC 4.1.1.23) について細胞内分布、酵素複合体の有無、基質特異性、一般的及び調節的性質を検討した。植物では、orotate  $\rightarrow$  UMP の変換はこの酵素系以外でも行われることが報告されているのでそれについても調べた。

材料と方法：無菌的に 0.55% 寒天上で 2-3 日間暗発芽させたモヤシマメ (*Phaseolus mungo*) の胚軸を材料として用いた。約 20g の材料を 50 ml の 2mM EDTA, 0.1% 2-mercaptoethanol, 5% Polyclar AT を含む 50mM Imidazole buffer (pH 7.6) で抽出し、硫酸分画、種々のクロマトグラフィーで精製した。酵素活性は [ $^3\text{-}^{14}\text{C}$ ] orotate または [ $^3\text{-}^{14}\text{C}$ ] OMP を基質として用い生成される  $^{14}\text{C}$   $\text{CO}_2$  を LSC で測定した。

結果と考察：モヤシマメの抽出液での orotate  $\rightarrow$  UMP の変換には PRPP が必須であり、Buchowicz と Leśniewska によりコムギ抽出液で見いだされた PRPP を用いない orotate  $\rightarrow$  UMP の経路 (Phytochem. 9, 1083, 1970) は存在せず OPRTase と ODCase のみによりこの反応が触媒されることが強く示唆された。OPRTase と ODCase の活性の 90% 以上は、細胞質分画に存在し、この分画の比活性は、他の分画の 3-8 倍であった。これは他の生物でみられると同様、活性の大部分が細胞質にあることを示している。この二つの酵素は酵母では精製の過程で分離されるが、哺乳類のものには酵素複合体として存在することが推定されている。モヤシマメのこれらの酵素は、硫酸分画、Sephacryl S-200, DEAE-cellulose, Hydroxylapatite によるクロマトグラフィーで同じ分画にくることから酵素複合体として存在していることが示唆された。モヤシマメの OPRTase は、orotate のみを基質として用い、哺乳類の酵素のように uracil や 5-fluorouracil を基質とすることはせず酵母の OPRTase に似ている。このことは、植物や酵母では、哺乳類とは異なり *de novo* 経路と uracil の salvage 経路が同一の酵素を用いることを示している。orotate  $\rightarrow$  UMP の変換には PRPP の他  $\text{Mg}^{2+}$  が絶対的に必要である。OPRTase の PRPP, orotate に対する  $K_m$  値は、生理的 pH (7.2) でそれぞれ  $1.6\mu\text{M}$ ,  $4.5\mu\text{M}$  であった。OPRTase の最適 pH は 8.0 であったが ODCase のそれは、6.2-9.2 と広範囲にわたっていた。モヤシマメの OPRTase, ODCase による orotate  $\rightarrow$  UMP の変換は xantosine-5-P (XMP), UMP, UDP により阻害されたが、その他のプリン、ピリミジンヌクレオチドの効果は小さかった。XMP による阻害はプリン-ピリミジン相互の調節、UMP, UDP による阻害はフィードバック阻害を考慮することができるが、これは構造的にこれらの物質が 6 員環部分に 2 つのカルボニル基をもつ OMP に類似しているという共通性によるものと思われる。生理的意義については、これらのエフェクターの生体濃度や変化など詳細な研究が必要とされる。

3B-6

ゼラニウムおよびブドウにおけるL-アスコルビン酸の酸化分解反応について

斉藤和実, \*Michael Williams, \*Frank A. Loewus, (京大RIセンター, \*ワシントン州立大)

L-アスコルビン酸(L-AA)からL(+)-酒石酸(TA)を生成する反応は、現在ゼラニウムとブドウにおいて知られている。但しその反応機作は、両植物で全く異っている。すなわち、L-AAのC<sub>1</sub>はゼラニウムでは蔞酸(OA)に取込まれるがブドウではTAに、一オL-AAのC<sub>6</sub>は前者ではTAに取込まれるが後者では糖に取込まれる。今回はこれら両反応をさらに検討するために、各種標識L-AA (特に今回初めて使用したものは L-[4-<sup>3</sup>H]AA と D-[6-<sup>14</sup>C]AA) を上記植物に投与し、その代謝を調べたので報告する。

ゼラニウム (*Pelargonium crispum*) は展葉二枚を含む新梢先端部を、またブドウ (*Vitis labrusca*) 葉は果房に向い合うものを切除し、ベルギー内で切口から標識L-AA溶液を与え、それぞれ72および24時間後の代謝産物を分析した。ここに用いた標識L(D)-AAは、相当する標識D(L)-glucopyranoseから化学合成法で調製した。

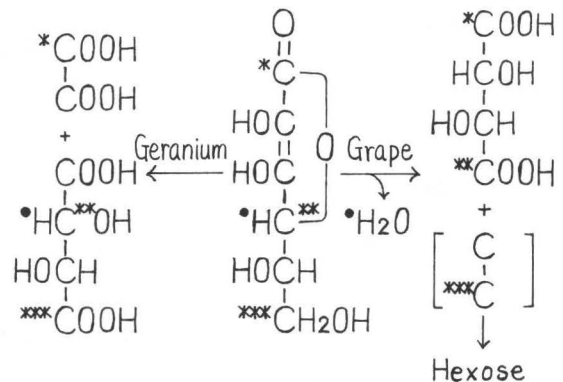
まずゼラニウムにL-[U-<sup>14</sup>C]AAを与え、72時間目までの代謝を経時的に追跡した結果、生成するTAとOAとの比は48時間目までほぼ2:1であることが認められた。

ただし、以後TAはさらに生成し続けたがOAは48時間でほぼプラトーに達した。これは基質である標識L-AA量の低下によるためと思われる。次いでL-[4-<sup>3</sup>H]AA, L-[6-<sup>14</sup>C]AAおよびD-[6-<sup>14</sup>C]AAの代謝を調べた。このうち、L型の標識化合物を与えた場合、<sup>3</sup>H,<sup>14</sup>C共に約40%がTAに取込まれた。また<sup>3</sup>HがH<sub>2</sub>Oに約20%、一オ<sup>14</sup>Cが不溶性画分(<sup>3</sup>Hはほとんど取込まれず)に13%取込まれた以外は、両標識L-AAはほぼ同様の挙動を示した。一オD-[6-<sup>14</sup>C]AAを与えた場合、<sup>14</sup>CはTAに2%しか取込まれず、AAからのTA生成は非酵素的分解反応によるものではないことが強く示唆された。

一オ、ブドウ葉にL-[4-<sup>3</sup>H]AAとL-[U-<sup>14</sup>C]AAを与えた場合、<sup>3</sup>HはH<sub>2</sub>Oに69%、また<sup>14</sup>CはTAに45%取込まれた。この後者の値は、L-AAの68%がTAにまで代謝された場合に相当し、<sup>3</sup>H,<sup>14</sup>Cでの両実験値はこの点で良く一致した。

ゼラニウムとブドウにおけるL-AAからTA生成反応に關し、以上の結果を含めて現在までに確認された事実をまとめたのが下図である。すなわちゼラニウムでは、

L-AAのC<sub>3</sub>-C<sub>4</sub>結合が酸化的に開裂しC<sub>1</sub>~C<sub>2</sub>からOAが、またC<sub>3</sub>~C<sub>6</sub>からTAが生成する。一オブドウでは、L-AAのC<sub>4</sub>-C<sub>5</sub>結合が酸化的に開裂することにより、C<sub>1</sub>~C<sub>4</sub>はTAになり、C<sub>5</sub>~C<sub>6</sub>は糖へと代謝されるが、これに伴いH<sub>4</sub>は酸化されてH<sub>2</sub>Oを生じる。尚現在、これら諸反応に關する酵素レベルでの知見は全く得られていない。

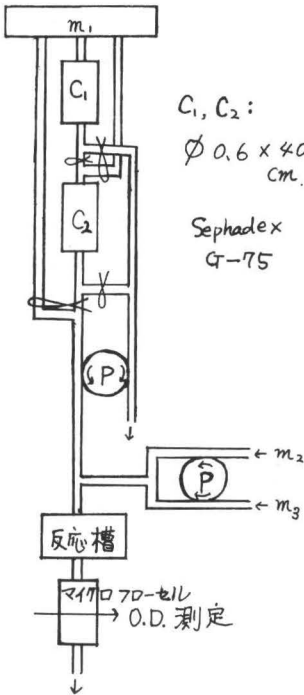


平衡ゲルろ過法による膜粒子への低分子量基質の結合量の測定

小松みづほ (市京大・薬)

リン酸化反応の機作を知る上で、その活性部位と基質との相互作用を知ることが必要不可欠である。ところで葉緑体あるいはミトコンドリアの場合単離した Coupling factor はそれのみでは ATP 合成能を持たない。ATP 合成能を持つためにはある程度の膜系を必要とする。チラコイド膜、サブミトコンドリア粒子、再構成粒子などである。ATP 合成能と基質の結合との直接の関連を知るためには是非このような粒子系を用いて基質の結合を調べたい。ところで ATP 合成の基質の膜系への結合は必ずしも強固なものとは限らない。かなりゆるやかな結合をしている可能性も高い。従って平衡状態のもとで、ATP 合成能を持つ粒子について基質の結合を調べる必要が生ずる。

ここで基質濃度  $2N_0$  の溶液と、同体積の基質濃度ゼロ膜粒子を含む(あるいは含まない)溶液を混合すると膜粒子が含まれていない場合溶液中の基質濃度は  $N_0$  となる。膜粒子が含まれている場合溶液中の基質濃度を  $N_1$  粒子に結合している基質の量を、膜粒子の溶液中に占める体積を  $V_0$  とすると  $\alpha V_0 = N_0 - N_1(1 - V_0/V_0)$  となる。ここで  $V_0$  は溶液全体の体積である。 $V_0/V_0 \approx 0$  とみなし得る場合  $N_1$  を測定することによって  $\alpha$  を知ることができる。しかしチラコイド膜などのかなり大きな大きさをもつ大粒子系では結合部位の数に比しその体積が大きいため  $V_0/V_0$  は無視できなくなる。特に結合量  $\alpha$  があまり大きくない場合著しい誤差の原因となる。ここでは  $V_0$  と  $\alpha$  を平衡ゲルろ過法を用いて求める方法を試みた。



$C_1, C_2$ :  
 $\phi 0.6 \times 40$   
 cm.  
 Sephadex  
 G-75

方法としては左図に示すような装置を用い平衡ゲルろ過を行う。試料として①基質濃度  $2N_0$  の溶液と膜粒子を含む溶液とを正確に等体積混合した反応液  $V_0$  ml、②①の反応液を高速で短時間(〜3分)遠心し膜粒子を除去し  $V_0$  ml の各々を  $C_1$  カラムの上部に添加する。カラム系はすべて  $N_0$  の濃度の基質で平衡しておく。①②各々の場合について検出される基質の変化量を各々  $\Delta n_1, \Delta n_2$  とすると、 $V_0 = V_0(1 - \Delta n_1/\Delta n_2)$ 、 $\alpha = N_0 V_0(1 - \Delta n_1/\Delta n_2) - \Delta n_1$  となり二つの測定値  $\Delta n_1, \Delta n_2$  から基質の膜粒子への結合量  $\alpha$  と膜粒子の体積  $V_0$  とを知ることができる。

ここでは膜粒子としてホウレンソウから単離したチラコイド膜、基質として ADP と Sorbitol とに上記方法を試みたのでその方法の詳細と結果とを報告する。なお、ADP, Sorbitol の濃度は酵素的方法により NADH の  $340 \text{ nm}$  における吸光度変化から測定した。図中  $m_1$  は基質濃度  $N_0$  の溶液、 $m_2$  は NADH (or NAD) 溶液、 $m_3$  は酵素溶液である。



## ヒマワリにおける有機物の転流—葉の Age と転流との関係

代谷康 (都立大・理)

高等植物の有機物質の転流について *active transport* 説の他に *mass flow* 説, *P-protein* 説など提出されている現状である。葉の Age の差異による転流量の変化から *Active transport* について考察する。

ヒマワリの葉に  $^{14}\text{C}$  を投与した場合、その  $^{14}\text{C}$  の代謝産物の葉からの転流量は、成育した葉からの方が若い葉からより多いことを報告した。今回はヒマワリを一定条件下で 6 週間育て、その若い葉と成育した葉に、 $^{14}\text{C}$ -glucose を浸潤法により 1 分間投与し、若い葉と成育した葉での glucose の代謝パターンと転流について調べた。

一枚の葉に  $^{14}\text{C}$ -glucose を投与し、20 分後に投与部分、茎の各部分を切断し、直ちに、メタノール：クロロフォルム：ギ酸：水 (12:5:1:2) の溶液で数回抽出し、次に 80% エタノールで 2 回抽出し、両抽出液を合せて、低温で減圧濃縮を行った。抽出液は  $^{14}\text{C}$ -放射能を測定後、Dowex 1 により、有機酸、アミノ酸、糖のフラクションに分け、さらに  $^{14}\text{C}$ -化合物はペーパークロマトグラムにより同定し、 $^{14}\text{C}$  放射能を測定した。アルコール溶液で抽出した葉は粉末にし、アルコール不溶性物質の抽出を次の様に行った。Labavitch (Plant Physiol. 53 669 1974) の方法により、 $\alpha$ -amylase の作用によりデンプンを分解し、その分解産物は遠心分離を行って分けた。この葉の残渣をさらに pronase、次に pectinase の作用により、前と同様の処理を行い、それぞれの酵素分解産物を抽出し、残りを cellulose + hemicellulose のフラクションとした。各フラクションは  $^{14}\text{C}$  放射能測定後ペーパークロマトグラムにより  $^{14}\text{C}$  化合物を同定した。

$^{14}\text{C}$ -glucose を葉に投与した場合でも、 $^{14}\text{C}$  を投与した時の結果と同じ様に  $^{14}\text{C}$  の葉からの転流量は成育した葉の方が若い葉より多かった。また成育した葉における  $^{14}\text{C}$ -sucrose の生成量も多い。 $^{14}\text{C}$ -sucrose の生成量と転流との関係を再確認した。

アルコール不溶性物質への  $^{14}\text{C}$  のとりこみを比較すると、若い葉の方に多く見出された。アルコール不溶性物質中で比較するとデンプンへの  $^{14}\text{C}$  のとりこみは若い葉も成育した葉も差がなかった。若い葉に多く  $^{14}\text{C}$  がとりこまれていたのはペクチン質とセルロース質であった。このように若い葉ではアルコール不溶性物質への代謝が sucrose への代謝より多く、同時に葉からの export が低いことを示している。

ヒマワリの成育した葉において sucrose-phosphate synthetase の酵素活性が若い葉に比べて高く、sucrose の生成量も高いことなどから成育した葉からの export の促進にこの様な要因が必要であることを示している。

export を促進させるか、低下させるかが転流機構の主要な点であり、それは葉自身の中に存在しているのである。sink なるがゆえに source から転流が起るのではなく、葉それぞれの持つ active な転流機構が存在するのではなからうか。

森脇見義、日野精一（広島大・理・植物）

糸状体を作る点、またすべり運動をする点で藍藻と類似しているが、光合成色素を持たない点で藍藻と異なっている細菌は、無色藍藻と呼ばれることがある。

Beggiatoa はこの群に属する細菌である。この菌は混合栄養で、生長は呼吸代謝に依存しているとの報告がある。しかし分布が広いにもかかわらず、この菌の呼吸代謝についての報告は余り多くない。われわれは Beggiatoa の呼吸に関する酵素系についての調査を行ったので、その結果を報告する。

Beggiatoa の生長には酢酸塩が効果的であるという報告があるが、われわれはエタノールがより効果的であることを見出し、以下の調査を行うに十分な菌量を得ることができた。

培養中では生菌による酸素の吸収が認められたが、集菌、洗浄後では、エタノール、コハク酸、リンゴ酸等の諸基質および培養液について、生菌による酸素吸収は認められなかった。

細胞抽出液中には、イソクエン酸脱水素酵素、コハク酸脱水素酵素、リンゴ酸脱水素酵素の活性は認められるが、その他の TCA 回路の酵素の中には活性がほとんど認められないものがあり、TCA 回路全体としては回転していないようである。一方、イソクエン酸リアーゼ、リンゴ酸合成酵素の活性は認められ、グリオキシル酸回路は回転しているものと考えられる。また、エタノールによる NAD 還元活性は認められるが、Thunberg 管中でメチレンブルーをすみやかに還元する場合があった。

Beggiatoa が A 型キトクロムを持たず、B 型、C 型キトクロムを持つことはすでに報告したが、CO-還元と還元との差スペクトルの測定から、キトクロム<sub>o</sub>を持つことがわかった。また、いくつかの基質を加えた時のキトクロム系の変化を酸化還元差スペクトルにより測定したところ、NADH、NADPH、コハク酸、リンゴ酸はキトクロム系を還元するが、エタノールは還元しなかった。

α-ケトグルタル酸脱水素酵素活性がなく、キトクロム<sub>o</sub>を持つことから、Beggiatoa は、その代謝系が藍藻に近いものと考えられる。生長および呼吸におけるエタノールの役割については検討中である。

ラン藻 *Anabaena variabilis* (IAM M3) におけるニトロゲナーゼと水素代謝の関係

富岡 登, 日野 精一 (広島大・理・植物)

*Anabaena variabilis* を無窒素培地を用い1% CO<sub>2</sub> を含むN<sub>2</sub>を通気して培養すると、フィコシアニン量が低下しそれに伴って酸素発生能も低下した細胞が得られる。その細胞ではヒドロゲナーゼ活性が増大しており、ヘテロシストに似た細胞が出現すると共にニトロゲナーゼ活性も現れたことを、1979年年会で報告した。ここで使用した株と同一のものと思われる *A. variabilis* (PCC 7118) にニトロゲナーゼ活性が存在し得ることは、既に Rippka ら (1978) により報告されたが、我々の得たN-欠乏細胞ではH<sub>2</sub>に依存するC<sub>2</sub>H<sub>2</sub>還元活性がみられたので、ニトロゲナーゼとヒドロゲナーゼの関係について調べるために以下の実験を行った。

好氣的にN<sub>2</sub>固定により生育できる *A. cylindrica* では、intactな糸状体において特に還元力が不足しない限りは外部より与えたH<sub>2</sub>を還元力としては利用しないと考えられている。実際 *A. cylindrica* では気相をArからH<sub>2</sub>に変えてもC<sub>2</sub>H<sub>2</sub>還元活性は増大しない(表)。ところが *A. variabilis* ではAr下でC<sub>2</sub>H<sub>2</sub>還元活性はほとんど認められないのに対し、H<sub>2</sub>下では活性が出現した。しかし、H<sub>2</sub>を与える代わりにAr下でDCMUを添加することによってもC<sub>2</sub>H<sub>2</sub>還元活性が現れたので、このH<sub>2</sub>依存C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>還元反応では、H<sub>2</sub>が還元力として利用されたのではなくH<sub>2</sub>とヒドロゲナーゼにより細胞内に弱いが残存しているO<sub>2</sub>発生系からニトロゲナーゼ系を保護する、すなわち *A. cylindrica* 等で考えられているのと同様にO<sub>2</sub>のscavengerとして働いたと考えられる。このことはH<sub>2</sub>存在下で5%のO<sub>2</sub>を添加することにより活性が消失することからも支持される(表)。

このラン藻のニトロゲナーゼ活性は低いO<sub>2</sub>分圧で阻害されるが(2% O<sub>2</sub>で約50%阻害される)、これは単細胞のラン藻、あるいはヘテロシストを欠くラン藻におけるニトロゲナーゼのO<sub>2</sub>感受性の報告例に近く、ヘテロシストを有するラン藻で報告されているO<sub>2</sub>感受性(20% O<sub>2</sub>で約50%阻害される)とは比較できない。従ってこのラン藻でみられたヘテロシストに似た細胞は、ニトロゲナーゼのO<sub>2</sub>感受性からみてもまた形態的にも成熟したヘテロシストではなく、いわゆる proheterocyst (Kulasooriya et al. 1972) と結論できる。また暗黒下でもH<sub>2</sub>依存C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>還元活性が認められたが、O<sub>2</sub>濃度を変えて測定するとその活性は2% O<sub>2</sub>の存在下で最大の値をとった。

Algae	C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> reduction ( nmoles·mg dry wt <sup>-1</sup> ·hr <sup>-1</sup> )				
	Ar	Ar + 10 <sup>-5</sup> M DCMU	H <sub>2</sub>	H <sub>2</sub> + 10 <sup>-5</sup> M DCMU	H <sub>2</sub> + 5%O <sub>2</sub>
<i>A. cylindrica</i> ( IAM M1 )	70.6	48.0	73.3	54.9	N.D.
<i>A. variabilis</i> ( IAM M3 )	0.2	9.2	11.9	12.8	0.0

Light intensity 30,000 lux, C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> 10%, Temp. 30°C

横山裕彰, 木村元彦, 宮本和久, 三浦喜温(阪大・薬)

窒素固定能を有する藍藻の窒素固定系を利用し、より安定な水素生産システムを確立することを目的とし、好熱性藍藻 *Mastigocladus laminosus* を別府温泉より分離し、その水素発生について検討してきた。その結果、(1) *M. laminosus* の水素発生系は主にニトロゲナーゼの作用であること。(2) 光照射下アルゴン中でインキュベートするとヘテロシストの形成が盛んになり、水素発生活性も上昇すること。(3) しかし、さらに長期間アルゴン中におくと水素発生活性は低下してしまうことなどを報告した。さらに、前年度の本年会において、アルゴン中に *M. laminosus* をおくとヒドロゲナーゼ活性も上昇し、水素発生活性が低下した時点においても高いヒドロゲナーゼ活性が存在することを報告した。これより、長期間のアルゴン中のインキュベートによりみかけの水素発生活性が低下する原因の一つとして、ヒドロゲナーゼによる水素の取り込みが考えられる。そこで今回、*M. laminosus* の水素取り込み活性について検討したので報告する。

*M. laminosus* は、Fitzgerald 改変培地(加硝酸塩あるいは硝酸塩欠乏)中で3%の二酸化炭素を含む空気を通気して生育させた。水素および酸素の発生は、3%の二酸化炭素を含むアルゴン中で、水素取り込みは、水素ガスを加えた窒素ガス中で、光照射下45℃で測定した。活性は、L字管中の各気体の変化速度あるいは通気ガスの出口濃度より求めた。水素および酸素はガスフロマトグラフィにより定量した。

硝酸塩で生育した *M. laminosus* はヘテロシストを形成しておらず、水素発生活性も示さなかったが、水素取り込み活性は若干存在した。この藻体を洗滌後、窒素固定条件下でインキュベートしたところ、ヘテロシストの形成(最大5%位まで)、水素発生活性の出現および水素取り込み活性の増大がみられた。また、窒素固定により生育した藻は、窒素欠乏状態におくとヘテロシストの活発な形成(15~20%)がみられ、水素発生活性も増加した。水素発生活性は約1日のインキュベーションで最大(2~3.5  $\mu\text{l}/\text{mg dry wt}/\text{hr}$ )になり、インキュベーションを続けると活性は低下し、2日目には1/3以下に、3日目以降はほとんど水素発生を行なわなくなった。これらの藻の水素取り込み活性は、少なくとも60時間目までは増加を続けた。この時の活性は、窒素固定により生育した藻の約7倍にも高くなっていた。

一般に、一酸化炭素はヒドロゲナーゼの阻害物質として知られているが、アセチレンも水素取り込みを阻害するという報告もある(Botheら<sup>1)</sup>)。そこで、1時間、0.5日、1日、1.5日窒素欠乏状態においた藻について、アセチレン(10%)、一酸化炭素(0.5%)あるいは両方のガスを気相部に加え水素発生を行なわせたところ、各単独のガスではあまり影響はみられなかったが、両方のガスを加えたものでは、用いた4種の窒素欠乏状態の藻すべてにおいて水素発生活性が増加した。この水素発生活性の増大に関して、水素取り込み活性との関係などについて考察したい。

<sup>1)</sup> H.Bothe et al.: *Planta* 133 237 (1977)

### 3B-13

エネオプラストのアドラメラボディーに結合している

36 kD タンパク質の性質：KCl による抽出。

池内昌彦, 村上悟 (東大, 教養, 生物)

エネオプラスト内の擬結晶状を呈する膜構造体・アドラメラボディ (以下 PLB と略す) には分子量約 36000 ダルトルのタンパク質 (以下 36 kD タンパク質と略す) が多量に存在する (日本植物生理学会 1979 年大会)。SDS ホリアクリルアミドゲル電気泳動法で調べたところ, この 36 kD タンパク質は全 PLB 膜タンパク質の 40% 以上を占めており, 等電点電気泳動と SDS 電気泳動を組み合わせた 2 次元電気泳動法によって少くとも 3 つの等電点の異なる成分に分かれた。また PLB を KCl 処理すると, このタンパク質が膜から遊離されることもわかった。(日本植物学会 44 回大会)

今回は, 36 kD タンパク質の PLB 膜からの遊離化を詳細に検討し, PLB の構造との関連を調べた。暗所で 11 日間生育させたカボチャ黄化子葉からエネオプラストを単離し, 低張処理 (40 mM トリス, 1 mM  $MgCl_2$ , 1 mM EDTA, pH 7.6) によって得られた PLB を濃度の異なる KCl 溶液で処理して遊離されてくるタンパク質を調べた。0 ~ 0.1 M ではほとんど遊離されず, 0.2 M 以上では KCl 濃度の増加とともに遊離が促進された。1 M KCl では全膜タンパク質の 25 ~ 30% が遊離した。このタンパク質を SDS ゲル電気泳動で調べたところ, 共役因子のサブユニットと思われるバンド (分子量 55 kD) も認められたが, 36 kD タンパク質が主成分であった。また膜残渣の電気泳動パターンと比較することによって 36 kD タンパク質の半分以上が遊離したことがわかった。2 次元電気泳動法の解像度を高めるために pH の勾配を小さくしたところ, これまで分かれていた 3 つのスポットはさらにそれぞれ 2 つずつに分離した。PLB に結合している 36 kD タンパク質も同様の成分に分かれた。以上の結果は, 36 kD タンパク質は水溶性で PLB 膜の表面に結合しており, 6 つの成分は同じように KCl 処理で遊離することを示している。

黄化子葉を照射すると 36 kD タンパク質は 1 時間後には目立って減少し, 葉緑体ではまったく認められなくなる。これとほぼ同じ時間経過で PLB の規則的な格子構造が解体して不規則な細管構造となり, そのまわりにチラコイドが形成される。そこで照射していない PLB から 36 kD タンパク質を暗所で KCl 処理によって遊離させたときの PLB の構造変化を電子顕微鏡で調べた。単離した PLB は *in vivo* での PLB と同じように規則的な構造をしている。これを 1 M KCl 処理すると PLB の格子構造の間隔が狭くなったり, 不規則な細管構造となる。また一部には直線的な細管も多数認められる。処理時間が長くなると膜胞が多くなる。このような構造変化は 1 時間前後の照射したときにみられる *in vivo* での PLB の構造変化に対応しており, このことから 36 kD タンパク質が PLB の規則的な格子構造の形成になんらかの役割を果たしているものと考えられる。

現在このことを確かめるために, KCl 処理で遊離させた 36 kD タンパク質と KCl 処理をした PLB から元の PLB の構造を再構成することを試みている。

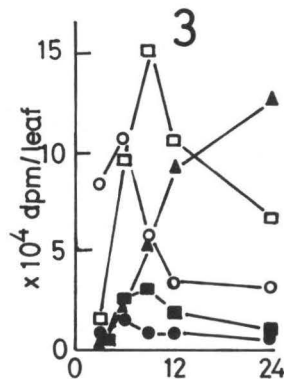
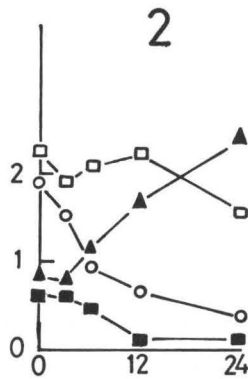
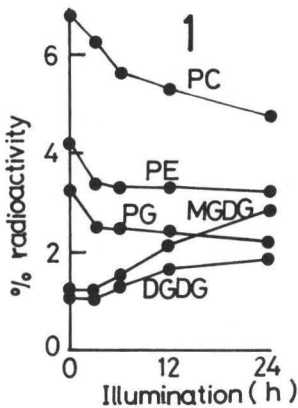
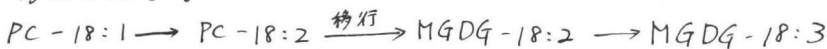
大西 純一・山田 晃弘 (東大・教養・生物)

Avena 黄化葉の緑化に伴う、葉緑体の発達過程での、アラスチド組成脂質の変動及び各脂質の脂肪酸組成の変化については、既に報告した(1979年度 植物生理学 会、植物学会)。その結果から、糖脂質MGDGのC-1 および2位において、18:2 → 18:3の不飽和化反応が進行し、リン脂質PGのC-2位において、16:0 → (3-t)16:1の反応が進行することが示唆された。今回は、Avena 黄化葉を $[1-^{14}C]$ 酢酸により、パルスラベルし、取り込まれた放射能が、脂質および脂肪酸間どのように移行するか調べ、上の考えを更に支持する結果を得たので報告する。

(1). Dark labelling: 光照射開始時に既に存在している脂質の挙動を調べるため、暗下で、葉に $[1-^{14}C]$ 酢酸を取り込ませ、光照射24時間における、脂質中の放射能の変化を調べた。図1に示すように、PCの放射能が著しく減少し、MGDG・DGDGにおいて増大した。また、PCの脂肪酸の間では、光照射6時間まで、18:1が減少し、18:2が増加した。MGDGでは、18:2の減少、18:3の増加が見られた(図2)。以上から、PCからMGDG・DGDGへの脂肪酸の移動、および、18:1の18:2への不飽和化がPCで、18:2の18:3への不飽和化がMGDGで起こることが示される。また、前者の不飽和化に光に依存せず、後者は光により促進された。

(2). Light labelling: 次に、緑化時、de novoに合成される脂肪酸の挙動を調べるため、Avena 黄化葉の緑化(光照射)の最初3時間において、 $[1-^{14}C]$ 酢酸で黄化葉をパルスラベルし、以後の脂質中の放射能の変化を調べた(図3)。PCの18:1が最も早くラベルされ、速やかに減少し、次いでPCの18:2がピークを迎える。これに対し、MGDGの18:3は持続的に増加した。従って、緑化中のde novo合成の場合も、(1)と同様な不飽和化が進行すると考えられる。

以上の結果をまとめると、Avena 葉緑体の発達時、糖脂質合成の系路として、次の経路が考えられる。



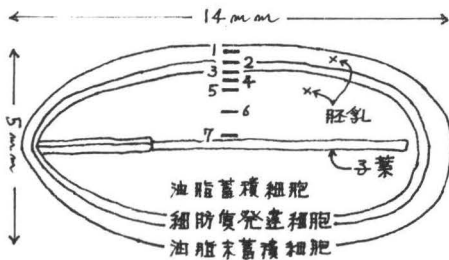
MGDG; 18:1, (●), 18:2, (■), 18:3, (▲)  
PC; 18:1, (○), 18:2, (□), 18:3, (△)

成熟ヒマ種子におけるトリグリセリドの生成Ⅱ、関連オルガネラの発達

山田晃弘、村田憲理子、宇佐美宛、村上悟 (東大教養生物)

受精後、ヒマ種子が発達し、種子内にどのようなしくみで油脂が生産され、蓄積されるかに関して、われわれは細胞分画と生化学的手法により次の点を明らかにした(1979年度植物生理学年会)。プラスチドで18:1(オレイン酸)が *de novo* 合成され、小胞体へ移行し、18:1からOH-18:1(リシノール酸)に水酸化された後DG(ジグリセリド)にエステル化される(または18:1がDGにエステル化された後、水酸化されてOH-18:1-DGが生成する)。そして、最後に脂肪体(oleosome)に移行し、DGからTGになり脂肪体の包膜内に蓄積される。この結果からヒマ種子の油脂蓄積時においてプラスチド、小胞体、脂肪体の三つのオルガネラの発達が期待される。今回は、ヒマ胚乳組織の電子顕微鏡観察により得られた結果とすでに得られた生化学的知見とをまとめて報告する。

〔材料および方法〕 ヒマ胚乳における油脂の生成過程をみると、油脂は子葉に



接する内面から種皮に接する外面に向かって蓄積して行く。適当な時期の種子を選ぶと、図に示すように、油脂蓄積の途中のものがえられる。図中の1,2,3の順に組織を観察することにより、油脂蓄積時の細胞内変化、すなわちオルガネラの発達を観察することが出来る。この方法により、1,2,3の組織から得た細胞をグルタル酸アルデヒド-オスミウム酸固定、酢酸ウラン-クエン酸鉛染色により電子顕微鏡観察した。

〔結果〕 油脂の生産以前の胚乳細胞は大型の液胞が中央にあり、細胞壁は細胞壁にとった部分にわずかしかない。油脂生産の直前になると、細胞壁が発達し、液胞が多数の小穴にわかれ、小穴は包膜をもつ、この包膜が脂肪体 oleosome になり、大型の液胞が糊粉粒に発達する。Schoperらは(1978)油滴が最初に蓄積し、後で包膜でおおわれることをマスタートの子葉で観察しているが、ヒマでは逆に包膜が最初につくられ、後で油滴が蓄積される。細胞壁の発達と共に、プラスチド、ミトコンドリア、粗面小胞体が発達し、数を増す。プラスチドの内部にはプロチラコイド、フロラメラ体が認められる。粗面小胞体が脂肪体のまわりに入り込み、遊離のリボゾームはポリゾームをつくる。プラスチドが大型化し、細管の束(アストチューブル)が認められる。この時期ではまだ脂肪酸および脂質の合成能は低い。プラスチド内にプロチラコイドとフロラメラ体が発達し、デンフン粒様の好オスミウム性果粒が認められるようになる。脂肪酸および脂質合成能が高くなり、脂肪体内に油脂が蓄積しはじめる。プラスチドの分裂像もみられ、分裂のくびれた部分にプラストチュービュールが認められる。プラスチド内部の密度が高くなり、プロチラコイドプラストチュービュールが減少し、やがて脂肪体をかかえるようになる。

佐藤直樹, 村田紀夫 (東大・教養・生物)

〈序〉 ラン藻 Anabaena variabilis は 38°C で生育すると主要脂肪酸として 16:0, 16:1, 18:1, 18:2 を含むが, 22°C で生育するとこの他に少量の 16:2 と大量の 18:3 を含む<sup>(1)</sup>。我々はこの生育温度による脂肪酸組成の変化がチラコイド膜の脂質の流動性の調節に役立つものと考えてきている<sup>(2,2)</sup>。今回の発表では生育温度を 38°C から, 22°C にシフトした後におこる脂肪酸組成の変化について報告する<sup>(3-5)</sup>。

〈材料及び方法〉 A. variabilis は東大応微研保存の M-3 株を用い, Kratz and Myers の C 培地中 1% CO<sub>2</sub>/air を通気し, 38°C では 6000 lux, 22°C では 3000 lux の白色光連続照射下培養した。実験には Packed cell volume 1.5 ml/l の対数期中～後期の細胞を用いた。脂質, 脂肪酸の分析は既発表の方法に拠った。<sup>(1, 3, 4)</sup>

〈結果〉 生育温度を 38°C から 22°C にシフトすると Packed cell volume の増加ははじめの 2 時間停止し, その後回復した。脂肪酸の総量の増加は 10 時間にわたって著しく遅くなりその後回復した。この 10 時間に 16:0 の著しい減少とこれに相補的な 16:1 の増加がみられたが, その後これらの含量は元のレベルに戻った。一方, C<sub>18</sub> 酸のうちでは 18:1 は減少, 18:3 は増加し, 18:2 は僅かに増加した後減少した。

次にこれらの変化を脂質ごとにしらべた。16:0 の減少と 16:1 の増加はモノガラクト脂質 (MGDG) の 2 位でのみおこった。C<sub>18</sub> 酸の不飽和化は各脂質の 1 位でおこったがその速さは脂質ごとに異なり, 22°C の定常値に達する時間は, MGDG では 24 時間, ジガラクト脂質では 100 時間, フォスファチジルグリセロールと硫脂質ではその中間であった。

このように最も速い変化を示す MGDG について分子種組成を調べた。38°C の主要分子種は, 18:1-16:0 (左が 1 位, 右が 2 位) (25%), 18:2-16:0 (23%), 18:1-16:1 (11%), 18:2-16:1 (34%) の 4 つであった。22°C への温度シフト後 10 時間では 18:1-16:0 が 6% まで減少した他, 18:2-16:0 (12%), 18:1-16:1 (8%) となり, また逆に 18:3-16:1 が 19%, 18:2-16:1 が 44% と増加した。

一方, クロロフィルの遅延蛍光の強度の温度依存性から, チラコイド膜の相分離開始温度が 18:1-16:0 の減少に伴なって低下することが明らかにされた<sup>(6)</sup>。

〈結論〉 A. variabilis の低温への適応において, 脂質のうちでは MGDG が中心的役割を果す。特にその 2 位での 16:0 から 16:1 への一時的かつ著しい不飽和化が 18:1-16:0 分子種を減少させ, それによりチラコイド膜の脂質の相転移温度の低下及び膜脂質の流動性の増加をひきおこす。このようにして, 藻細胞が低温にさらされた際にも, 短時間のうちにチラコイド膜が正常な機能を回復することが可能になっている。

- 〈文献〉 1. Sato, Murata, Miura & Ueta (1979) *BBA* 572, 19-28 及び本会 1977 年 p26  
 2. Ono & Murata (1977) *BBA* 460, 220-229 3. 佐藤, 村田 (1978) 脂質生化学研究 20, 57-60  
 4. 佐藤, 村田 (1979) 脂質生化学研究 21, 320-323 5. Sato & Murata 投稿中  
 6. 村田, 小野, 佐藤 (1979) 脂質生化学研究 21, 90-93



3B-17

分布域を異にする日本産ヤマノイモ属植物数種の種子発芽の温度依存性

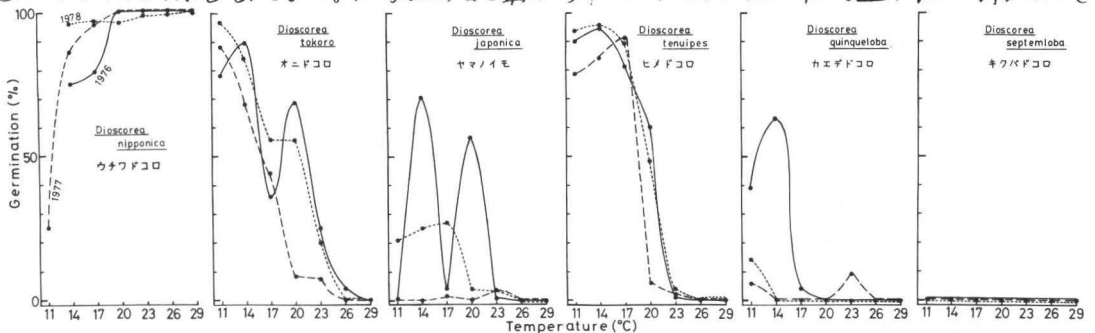
河井聖司(私大・理生), 岡上伸雄(東北大・理生)

ヤマノイモ属(Dioscorea)の植物は、東アジアでは赤道直下の熱帯から北海道のような冷温帯に至るまで多くの種が、それぞれの分布域をもって生育している。それ故、これらの植物の種子は、種によって異なる、多様な休眠性をもっていることが推測される。またこの属には無性繁殖器官である“むかご”をつける種が多い。そこで、繁殖様式におけるこのような多様性の意義を理解することをも意図し、数種の種子の休眠性を調査した。

〔材料〕 トカラ列島以北に分布している11種のうち、おおよその分布域が北のものから順に、ウチワトコロ、オニドコロ、ヤマノイモ、ヒメドコロ、カエデドコロ、キクバドコロの6種の種子について調査した。種子は成熟し、乾燥し、発散直前の時期のものを秋に採集し、すべての種について同じ条件で培養した。

〔結果〕 ヤマノイモ属種子の共通な性質として、①休眠状態があり、②休眠打破には低温処理が必要であり、③高温は休眠を誘導し、④嫌光性であることが判った。そしてこれらの性質の強さは種によって異なり、種特有の休眠性を示した。

下図は低温処理をしない種子の、いろいろな温度下における発芽能である。もっとも北に分布しているウチワトコロの休眠は弱く、容易に発芽するが、南の種ほど発芽し難く、最も南に分布しているキクバドコロは全く発芽しない。このような種間の休眠性の違いは、調査した3年間(1976~1978)同様に観察された。また休眠打破における低温処理の最適温度はオニドコロ、ヒメドコロ、カエデドコロで5°Cであり、ヤマノイモとキクバドコロは0°Cである。また南の種の種子ほど長期間の低温処理の要求性を示した。この傾向は、分布域を異にする同一種内でも観察された。このように、ここで調査したヤマノイモ属6種の種子の、発芽における温度要求性は、それらの分布域の温度条件とは逆の地理的勾配をもつことが解った。しかしこの逆勾配はヨーロッパや北米の草本樹木の種子における順勾配という報告(②③)とは反対の結果である。また以上の結果から、この属の植物は北進に強い休眠性を



突った如くに見えるが、しかし、未熟種子の発芽能の観察結果からは、南の種は種子が成熟したとき最も深い休眠状態にあり、他方北の種子は、最も深い休眠段階と未熟時に観望し、成熟した時点で休眠が浅い段階になっていることが推測される。

〔文献〕 ① Ecology, 12, 728, '31. ② Amer. J. Bot., 45, 53, '58. ③ Nature, 22, 827, '70.

ポプラの枝の耐凍性と休眠の関係—ジベレリン、アブシジン酸及び温浴処理の影響

田川不二夫, 吉田静夫, 酒井昭 (北大, 低温研)

温帯に生育する樹木の多くは、秋になって日長が短くなるにつれて冬芽を形成し、形成層の活動を停止してやがていわゆる自覚休眠期に入る。この過程で、細胞分裂、伸長、肥大及び木化などに必要な物質代謝系は減速させてやがて停止する。その後、気温が低下するにつれて休眠が徐々に破られ、同時に低温下に特有な代謝系の活性化がおこり耐凍性が増大する。このように、自覚休眠を契機として細胞内の物質代謝は質的に変るものと考えられ、耐凍性増大と関連する一連の代謝は低温による休眠打破がひとつの引き金となっているように見える。植物細胞の耐凍性増大に与える低温の影響を理解するためには、植物が自覚休眠から覚醒する初期過程を詳しく解析する必要がある。しかしながら自然条件下では、低温による休眠からの覚醒と耐凍性の増大は平行して進むので解析が難しい。

この報告は、自覚休眠の状態にあるポプラの切枝を用いて長期にあたる低温処理に代って短時間の温浴処理や凍結処理などの物理的的刺激によって休眠を打破した場合やジベレリンを与えて休眠を破ったときにその後の低温処理が耐凍性に対してどう影響するかについて述べると共に、自覚休眠を誘導していると考えられるアブシジン酸を与えて人為的に低温下で休眠を持続させたときの影響についても述べる。

(1) 温浴及びジベレリン処理による影響：自覚休眠中のポプラの切枝をポリエチレン袋に入れて40℃3hr温浴すると休眠はほとんど完全に破れた。また $2 \times 10^{-4} M$ のジベレリン(GA<sub>3</sub>)溶液を材から吸収させても休眠は打破された。このようにして休眠を打破してから0℃で30日低温処理すると耐凍度は低温処理のみの場合よりも高まらなかった。温浴やジベレリン処理による休眠打破は秋から冬にかけての長期の低温による休眠打破とは質的に異なっているようである。

(2) 凍結処理による影響：-3℃で4日間凍結後0℃で26日間低温処理したものは凍結処理せずに低温処理したものより耐凍度の高まりが著しく大きかった。また、-3℃4日間の凍結により0℃30日間処理と同程度の休眠打破効果がみられた。このことから冬期には休眠から覚めた状態の方が休眠中よりも耐凍性増大効果が大きいことがわかった。

(3) アブシジン酸処理による影響： $2 \times 10^{-4} M$ のアブシジン酸溶液を材から吸収させて与えると、0℃30日間の低温処理後も休眠状態が持続し、低温処理のみの場合に比べて耐凍度の高まりが小さかった。このことから、休眠状態を保ったままでは低温による耐凍性増大効果が小さいことがわかる。

低温による休眠打破はアブシジン酸レベルの低下を伴うことが知られているが、以上の結果からアブシジン酸があるレベル以下に存在することが耐凍性増大のために必要であるように思われる。それはおそらくアブシジン酸が耐凍性増大のための新たな物質代謝系の低温による活動を阻害するためであると考えられる。今回は、耐凍性増大過程で起こるいくつかの物質変動に対するアブシジン酸の影響についての予備的な結果も合わせて報告する予定である。

菅原康剛・森 克彦・松島 久・竹内正幸(埼玉大理生体制御)

植物のプロトプラストは、育種学をはじめ生物学の各分野でますます重要な研究材料となりつつあり、その凍結保存の確立の必要性は高まりつつある。一方、細胞の凍結障害における膜(系)の役割の重要性が示唆されており、プロトプラストはこれらの障害の機構解明のための恰好の研究対象としても期待できる。

われわれは、いくつかの種類の植物プロトプラストの液体窒素中(-196°C)で生存し得ることを示した。ここでは、再分化能を保持したセコケ(*Marchantia polymorpha* L.)のカルスから得たプロトプラストの凍結保存とその再分化能について調べた。

プロトプラストは、2,4-D (1ppm) と yeast extract (0.1%) を含む Murashige-Skoog の寒天培地上で継代培養されているカルスから分離した。プロトプラストの分離は植之継ぎ後 7~12日目のカルスと、2% Driselase を含む 0.7M マンニトール (pH 5.5) の酵素液に 30°C, 2時間処理することにより行った。分離したプロトプラストとナイロニクソニユおひ但速選心により精製し、直ちに実験に使用した。プロトプラストの懸濁液は、凍害防御物質を徐々に加えた後、小型バイアル又は、アルミ箔製の小袋に入れ、プロテグラムフリーザー中で予備凍結(1°C/minの冷却速度)後、液体窒素中(-196°C)へ移し、そこで保存した。長期保存はDalicのLN<sub>2</sub>貯蔵槽で行って行った。融解は、40°Cの水槽中で急速に行った。至適の予備凍結温度は5% DMSO 及び10% カルコースを含む液中で凍結した場合、-30~-40°C 付近にあり、通常-35°Cまで予備凍結した。

今回用いたセコケのプロトプラストは、2,4-D (0~1ppm), yeast extract (0.1%) 及び 0.3M~0.5M マンニトールを含む Murashige-Skoog の寒天培地(0.7%)上での平面培養により、およそ1週間目までに細胞壁、再生、分裂が認められ、約2週間後にマンニトールを含む上記の Murashige-Skoog の培地へ移行することによりカルスと形成した。形成したカルスは、その後 Vöth の培地(1943)へ移し明中で培養することにより葉状体(Thallus)と分化した。凍結保存したプロトプラストからのコロニー形成からカルス形成も確かめており、今後葉状体への再分化能について調べていく。

吉田静夫 (北大・低温研)

温帯に生育する植物の耐凍性は季節的に大きく変化することは周知の通りである。このような植物の耐凍性の季節周期性的の原因はこれまでも多くの報告がみられるが十分明らかではない。最近の研究成果によれば、その原因は細胞膜の性質が変化することによると考えられる。細胞膜の性質、殊に凍結による脱水ストレスあるいは凍結温度それ自体に対する安定性の変化は、膜を構築している蛋白、脂質などの量的、質的变化に裏付けられるものと考えられる。このことを明らかにするためには不純物の少ない細胞膜を分離することが不可欠である。この報告では栽培されたクワ(ゴロウジ品種)の枝の韌皮組織から比較的純度の高い細胞膜を得ることができたのでその方法とその性質についてのべる。

夏の韌皮組織は0.75 M sorbitol, 0.2 M Tris-HCl (pH 7.8), 15 mM EGTA, 25 mM mercaptoethanol, 5% PVPを含む溶液中で海砂および Polyclar AT と共に磨砕し、通常の方法でマイクロゾーム画分を得た。この画分を不連続ショ糖密度勾配にかけると K-Mg ATPase (pH 6.5) を持った淡黄色の膜画分は 20/31% (w/w) の界面に回収される。この画分は 3% Ficoll を含む 16% Percoll にのせて 76,000g 60分遠心することによって更に精製された。K-Mg ATPase を持つ膜画分を分取して、15~50% (w/w) のショ糖平衡密度勾配 (9600g 15時間) にかき、単一のバンドとして分離された。この膜画分は ER 小胞、ゴルジ小胞、ミトコンドリアやクロロプラストの fragment の混入は少なく、電子顕微鏡レベルでも可成り純度の高いものであることがわかった。ATPase の至適 pH は 6.5 で 50 mM の  $K^+$  によって 20~30% の促進がみられた。この  $K^+ - Mg^{2+}$  ATPase はオリゴマイシン、アザイド EDAC によって阻害されないが、DCCD によって約 40% の阻害がみられた。

一方、冬の枝の韌皮組織ではショ糖密度勾配ならびに Ficoll-Percoll 密度勾配における細胞膜のふるまいは夏の組織のものと大きく異なり、分離法を大巾に改良する必要があった。磨砕液中に更にグリセロールを 0.75~1.0 M 追加し、不連続ソルビトール密度勾配にかき、1.5/2.2 M 界面に集る膜画分を 5 mM EDTA-10 mM Tris-MES (pH 7.2) で低張処理し、得られるペレットを 2% Dextran T40 を含む 16% Percoll 液と均一に混合し 189,000g 25分遠心して単一のバンドとして回収された。この膜画分は更に液相分離法を用いて精製された。

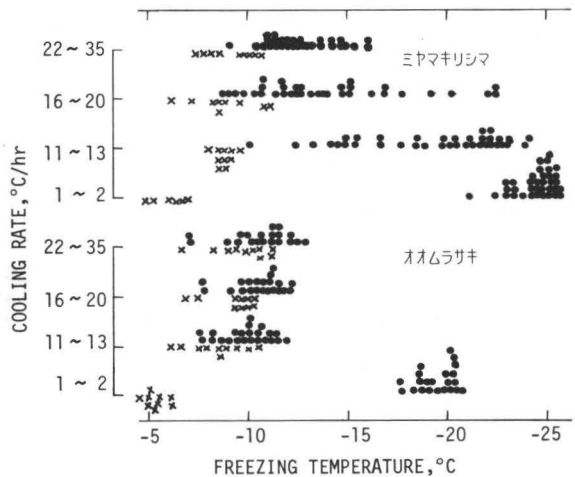
耐凍性の異なる枝より分離された膜画分についてリン脂質、ステロール組織のちがいや、ATPase の温度依存性ならびに膜流動性の相違などについて検討中であるのでこれらの結果を合せて報告する予定である。

賀来章輔・岩屋真理 (九大・教養・生物)

近年、越冬中の植物体において、材の放射組織や花芽が局所的に $-20\sim-40^{\circ}\text{C}$ にも及ぶ低温にまで過冷却し、これによって凍結を回避していることが明らかとなり、耐寒性機構の一つとして注目されるようになった。材におけるこのような過冷却能力は、多くの広葉樹においてその北方分布の潜在能力や耐凍度とよく関係する。一方、越冬花芽におけるこの種の研究はまだわぶかであり、その過冷却能力と耐寒性との関係は明確でない。そしてその一つの理由として、実験室での冷却速度が、自然界や耐凍度の測定の際の冷却速度に比して、はるかに大きいことも一因と考えられる。今回は、ミヤマキリシマとオオムラサキを主な材料として、花芽の過冷却度に及ぼす冷却速度の影響について調べた結果について報告する。

花芽の凍結過程は示差熱分析で行い、芽鱗に包まれた intact な花芽を供試した。花芽の一般的な凍結過程は、 $-5\sim-10^{\circ}\text{C}$  でまず、芽鱗が凍結し、ついで内在する小花が凍る。その際冷却速度が大きければ、各小花の凍結は連続的に起るが、緩冷した場合には凍結は独立的となり、個々の小花の凍結開始には時間的に遅延が生ずる。冷却速度の差による各小花の凍結温度の分布の変化は下図に示した。ミヤマキリシマでは、急冷すると小花の凍結温度は比較的高く、 $-10\sim-15^{\circ}\text{C}$  であるが、冷却速度が小さくなるにつれて、深く過冷却する小花が増加する。最も緩冷した場合 ( $1\sim2^{\circ}\text{C/hr}$ ) には、殆どの小花の凍結が $-23\sim-25^{\circ}\text{C}$  という狭い温度域に集中し、最大の過冷却度を示す。一方、オオムラサキでは冷却速度が、 $11\sim35^{\circ}\text{C/hr}$  の場合には各小花の凍結温度は $-7\sim-12^{\circ}\text{C}$  の範囲であり、冷却速度の影響はほとんど認められない。しかし  $1\sim2^{\circ}\text{C/hr}$  で最緩冷すると $-17\sim-21^{\circ}\text{C}$  まで深く過冷却するようになる。供試した両ツツジのこの時期における耐凍度はミヤマキリシマで $-20\sim-25^{\circ}\text{C}$ 、オオムラサキで $-15\sim-20^{\circ}\text{C}$  であったことから、 $1\sim2^{\circ}\text{C/hr}$  程度に緩冷した場合の花芽の過冷却度は耐凍度ともよく一致するものと考えられる。緩冷のもとでの実験には多くの時間を必要とするが、花芽の最大の過冷却能力をしるためには極めて有効な方法である。現在、多くの生態地理的分布を異にする樹種について過冷却度と耐凍性との関係を、この方法で調査中である。これについても述べたい。

右図において●は各小花、×は芽鱗の凍結開始温度を示す。



### 3B-22

#### レタス種子発芽時の浸透圧調節物質としてのグルタミン およびグルタミン酸

竹葉 剛, 松原 聰 (京府大・応用生物)

レタスは代表的な光発芽種子であり, また, 温度・植物ホルモン類の影響も顕著であるが, これらの要因はいずれも, 胚軸の伸長する力を増大することにより, その作用を表わしている (PCP 20:51, 199). 胚軸の伸長する力の物質的基礎は, 以下の実験事実により, 胚軸の先端約 0.5 mm に蓄積する遊離アミノ酸, とくに Gln, Glu であろうと考えられる。

(1) 発芽の前後から, 胚軸における遊離アミノ酸が急激に蓄積するが, この蓄積は主に胚軸の先端約 0.5 mm に集中している (下図参照)。

(2) 18°C で吸水させた種子が 50% 発芽する時点で, 胚軸中に蓄積する遊離アミノ酸量は, 全く発芽しない 11.35°C と比較して, 約  $20 \mu\text{mole} / 39 \text{ seeds}$  (Gln  $12 \mu\text{mole}$ , Glu  $7 \mu\text{mole}$ ) だけ多い。

(3) 胚軸の先端 0.5 mm 中に蓄積したアミノ酸  $20 \mu\text{mole}$  は, 計算上約 0.22 M の浸透圧増加となる。35°C では胚軸の伸長力は, 50% 発芽レベルに達するのに約 0.15 M 相当分だけ不足しているので, 18°C で胚軸の先端に蓄積するアミノ酸量は, 胚軸の伸長力増加を十分説明しうる量である。

(4) 胚軸の先端における遊離アミノ酸の蓄積が, 発芽 (胚軸の伸長) の結果ではなく原因であることは, 種子を 0.3 M マニトール上で吸水させ胚軸の伸長をとめて発芽させない場合にも, 18°C では胚軸中に遊離アミノ酸が蓄積していることから明らかである。

(5) 0.3 M マニトール上で種子を吸水させた場合, 胚軸中の遊離アミノ酸量は R 光照射で増加し, FR 光照射で増加せず, R/FR の可逆性も成立する。

(6) また, 同じ系で植物ホルモンの効果をみると, GA, KIN により増加し, ABA により遊離アミノ酸の増加は抑制される。

ところで, 吸水開始時より胚軸を子葉から切り離して吸水させた場合にも, 胚軸の伸長とともに遊離アミノ酸とくに Gln, Glu が増加するので, 少なくとも発芽初期においては, 胚軸における Gln, Glu 生成が, 子葉からの N-化合物の供給に依存したものでないことは明らかである。胚軸における<sup>初期</sup>Gln, Glu の増加が, その場所におけるタンパク質の分解によるのか, それとも, Arg 等の転換によるのかは現在検討中である。

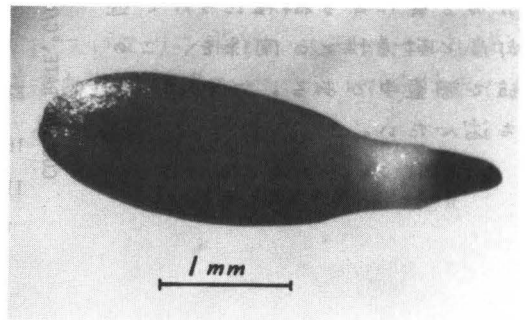


図. レタス胚全体のニヒドリン反応  
吸水開始後 16 hr (18°C) に, まだ  
発芽していない種子から, 種皮  
(+胚乳) を取除き, ニヒドリン溶  
液につけたもの。

第3日 4月8日(火)

C会場

生長生理 III,

花芽形成とリズム

### 3C-1

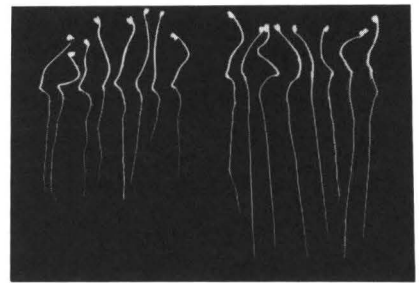
## ホリアクリルアミド誘導体によるコカブ根伸長阻害と検定法の開発

久保井 徹, 藤井國博 (国立公害研)

合成高分子凝集剤は近年下水処理等に多用されつつあり、ホリアクリルアミド誘導体(以下PAMと略す)が主として用いられている。従来PAMは土耕試験、発芽試験において、高等植物にはほとんど害をおよぼさないとされていたが、未だその検討が不十分であることより新たに幼植物試験を行った。演者らはPAMの植物影響も簡易かつ正確に評価するための検定法を開発し、これを用いてPAMのうちカチオン基をもつ製品が、コカブ芽生えの根の伸長を低濃度で阻害することを認めたとのでここに報告する。

方法は以下の通りである。コカブ種子約50粒を20mlの蒸留水とともに100ml 容三角フラスコに入れ、暗所下30°Cで1昼夜振とうする。生育の揃った10個体を選抜し、pH6に調整したPAM溶液20ml中で振とうを継続する。2昼夜経過後根長、莖長および新鮮物重量を測定する。対照は蒸留水とした。この方法により、カチオン性PAMの一種(C-2)について検討したところ、C-2が根の伸長を阻害することが判明した(右写真)。以後は処理後の根の伸長率からPAMの植物影響を判断した。この条件下で根長の変動係数は個体間で11%、フラスコ間で3.5%程度であり、従来のシャーレへの紙発芽試験法によって得られた個体の根長変動が30~70%であるのに比べ、精度が向上した。

PAM製造メーカー各社の製品24種をこの方法で検定したところ、カチオン基(2級あるいは3級アミン)をもつPAMは例外なくコカブ根の伸長を阻害したが、ノニオン性およびアニオン性PAMは害をおよぼさなかった。カチオン性PAMの50%伸長阻害濃度は4~80ppmであり、カチオン基導入率の高いものほど低濃度で阻害した。なおアクリルアミドモノマーの50%阻害濃度は220ppmであった。またメタノールで沈殿させ、洗浄



50 ppm C-2      distilled water

したPAMを試した場合は毒性が高まること、および透析チューブを通じて毒性がおよぼさないことから、PAMの毒性は製品中の不純物の影響ではなく、高分子中のカチオン基によるものと推定した。

カチオン性PAMは、コマツナとハクサイの根の伸長も阻害し、さらにクラミドモナス(緑藻類)の生育も低濃度で阻害すること、通常の水耕培養法でコカブ葉にクロロシスを起こさせたことなどから、植物全般に毒性をもっている可能性がある。下水処理等に用いられるPAMの濃度は数ppmから数十ppmであることから、今後植物や藻類におよぼすPAMの影響とさらに検討していく必要があると思われる。



ジマスモン酸メチルエステルおよびその関連化合物の  
アベナ葉片に対する老化促進効果。

上田統一，加藤次郎（大阪府大・総合科学）

演者らはアベナ (*Avena sativa* L. cv "Victory") 葉片の老化に関与する生理活性物質を検索中、ニガヨモギ (*Artemisia absinthium* L.) の茎葉中に老化促進物質の存在を認めた。この物質は種々のクロマトグラフィーにおける挙動から生理学的に新規な物質の様に思われ、単離した結果、(-)-ジマスモン酸メチルエステルと同定された。本報告は(+)-ジマスモン酸メチルエステルから数種の関連化合物を誘導し、アプサイシン酸を含めて、それらのアベナ葉片に対する老化促進効果を比較したものである。

(+)-ジマスモン酸メチルエステルからの各種誘導体への調製は常法により行なった。すなわち、加水分解は常温におけるアルカリ性メタノール溶液にて、還元は水素化ホウ素ナトリウム ( $\text{NaBH}_4$ ) で、またメチル化はジアゾメタンにより行なった。さらに調製後の試料は精製され、機器分析により確認された。老化促進活性の検定にはアベナ (*Avena sativa* L. cv "Victory") 葉片のクロロフィル分解試験を用い、活性強度はイニシマル、あるいはカイネチン処理区における残存クロロフィル含量に対するパーセントで表示した。

本実験で使用した生物検定系では、アベナ葉片の老化は切除直後より急速に進行し、48時間後そのクロロフィル含量は切除直後の約50%に減少し、さらに96時間後には約10%となり、アベナ葉片は完全に黄変する。ジマスモン酸メチルエステルおよびその関連化合物の老化促進活性はカイネチン非存在下においても認められるが、その活性をより明確にするために、それら関連化合物とカイネチンとの相互作用について検討した。その結果、ジマスモン酸メチルエステルでは(+)-体よりも(-)-体の活性が高く、活性を有するのは(-)-体である事が示唆された。またジマスモン酸メチルエステルのフリーアシッドであるジマスモン酸の活性は著しく低かった。さらにシクロペンタン環の3位のカルボニル基の還元、2位の側鎖の飽和、あるいは1位のアセテートの還元はいずれも老化促進活性と著しく低下させた。比較のために用いたアプサイシン酸についてもメチルエステル体の方がフリーアシッドに比べわすかながら強い活性を示した。以上の結果から、ジマスモン酸メチルエステルおよびその関連化合物の老化促進活性の発現には、メチルエステル体、側鎖の二重結合およびカルボニル基の存在が必要であると思われる。

### 3C-3

ジベレリン酸で促進されるオオムギ糊粉層のフィチン酸分解に対するアブサイシン酸の影響

片山舒康, 鈴木 恕\* (東学大・生物, \*筑波大・生物)

オオムギ種子では、全リン量の約60%が糊粉層中にフィチン酸(IP<sub>6</sub>)として貯蔵されている。このIP<sub>6</sub>は半切無胚種子を水で培養してもあまり減少しないが、10 ppmのジベレリン酸(GA<sub>3</sub>)を加えて培養すると発芽の際と同じように著しく減少する。

我々はすでに、GA<sub>3</sub>によるこのIP<sub>6</sub>分解促進は、RNA合成阻害剤の6-メチルプリン(6MP) 0.1~1 mMで45~85%、タンパク質合成阻害剤のシクロヘキシイミド(CHI) 1~10 ppmで35~90%、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.1 Mで50%の阻害を受けることを明らかにした<sup>(1)</sup>。KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>は糊粉層のP<sub>i</sub>含量を増加させたが、6MPやCHIはほとんど影響を与えなかった。

このGA<sub>3</sub>の促進作用機構を解明するために、オオムギ糊粉層でGA<sub>3</sub>によるα-アミラーゼ誘導を抑制する<sup>(2)</sup>アブサイシン酸(ABA)を半切無胚種子培養系に与えてその影響を調べた。3日間の培養でABAは0.05 ppmで35%、0.5 ppmで65%、5 ppmで100%、10 ppm GA<sub>3</sub>の促進作用を抑えた。しかし、6MPやCHIの場合と同様に糊粉層中のP<sub>i</sub>量を増加させなかったため、この抑制がP<sub>i</sub>によるIP<sub>6</sub>分解酵素の阻害によるとは考えにくい。

3日間の+GA<sub>3</sub>培養の途中で5 ppm ABAを添加した場合、1日目での添加はIP<sub>6</sub>の分解を約90%阻害するのに対し、2日目での添加では約60%の阻害効果にとどまった。3日間の培養の途中でABAを取り除く実験では、1日目と2日目での除去が、ほぼ同じ効果を示した。

これらの結果から、ABAは核酸合成ないしはタンパク質合成のレベルを介して、GA<sub>3</sub>によって促進されるIP<sub>6</sub>分解を抑制している可能性が示唆されるので、目下6MPやCHIによる抑制効果と比較検討中である。

(1) Katayama, N. & H. Suzuki, *Plant & Cell Physiol.*, in press.

(2) Ho, D.T.H. & J.E. Varner, (1976) *Plant Physiol.*, 57, 175-178.

コムギ種子における GA<sub>3</sub>誘導酸性ホスファターゼ活性増大におよぼす ABA の影響

秋山 高、鈴木 恕 (筑波大・生物)

糊粉層において、ジベレリン(GA<sub>3</sub>)により誘導されるα-アミラーゼの合成及び分泌が、アブサイジン酸(ABA)により阻害されることは、よく知られている。また、GA<sub>3</sub>処理により、コムギ糊粉層の酸性ホスファターゼ活性が増大し、同時に細胞外への分泌が誘導されることは、すでに報告した。その後の実験で、この活性増大及び分泌が ABA により阻害抑制されること明らかとなった。そこで、酸性ホスファターゼに対する GA<sub>3</sub> の効果を明らかにすることを目的に、ABA の阻害パターンと、RNA 合成の阻害剤であるコルジセピン、タンパク合成の阻害剤であるシクロヘキシミドのそれらとを比較した。

コムギ無胚半種子を 24 時間 25°C で蒸留水中で前培養し、その後、種々の処理を行なった。半種子からのホスファターゼの分泌は、GA<sub>3</sub>(10<sup>-5</sup>M) 処理後およそ 12 時間で始まり、少なくとも 48 時間まで継続する。

この GA<sub>3</sub> 処理の途中で、ABA (10<sup>-5</sup>M)、コルジセピン (100 ppm)、シクロヘキシミド (10 ppm) を培養開始後、0・6・12・18 及び 24 時間に投与し、培養開始後 24 時間での半種子中及び培地に分泌されたホスファターゼ活性を比較した。その結果、ABA、阻害剤ともに、GA<sub>3</sub> 処理後 0・6 時間というような比較的早い時期に投与した場合に、より強い阻害が観察された。

次に ABA、阻害剤処理の時間を一定 (12 時間) にし、GA<sub>3</sub> の効果に対する阻害度を比較した。24 時間での比較では、12~24 時間処理に対し、0~12 時間処理の方が、GA<sub>3</sub> 誘導ホスファターゼ活性の増大及び分泌をより強く阻害した。これは GA<sub>3</sub> 処理により糊粉層細胞で誘導される一連の変化の中で、分泌のために必要な細胞内の変化、おそらくは構造の形成が、GA<sub>3</sub> 処理後 12 時間以内に進行し、これが、ABA、阻害剤等により阻害される結果、24 時間までで比較した場合に、ホスファターゼの活性の増大と分泌が抑制されるものと考えられる。

次に、種々の濃度の ABA (10<sup>-8</sup>~10<sup>-4</sup>M) を GA<sub>3</sub> (10<sup>-5</sup>M) と同時に半種子に与え、24 時間処理を行なった。その結果、GA<sub>3</sub> により誘導されるホスファターゼの分泌は、ABA の濃度が高くなるに従って、より強く阻害されたが、半種子中のホスファターゼのレベルは、GA<sub>3</sub> のみの対照に対し、むしろ 10~20% 高くなった。これは、ABA が、GA<sub>3</sub> により誘導されるホスファターゼの分泌は阻害するが、活性の増大は、ほとんど阻害しないことを意味する。

この他、GA<sub>3</sub> により誘導されるα-アミラーゼの合成分泌に対する、ABA、阻害剤の影響についても、合わせて報告する。

### 3C-5

キュウリ子葉のプラスチドタンパク質成分に及ぼすBA  
の影響  
大屋俊英, 春邦磨, 内藤邦彦, 鈴木恕 (筑波大・生物)

黄化キュウリ子葉をベンジルアデニン(BA)を含ませた濾紙に伏せて、暗所に18時間、その後明所に5時間の処理をすると、対照の水(DW)処理のものに較べて、クロロフィルで2~4倍、蛋白で1~2割の増加がみられる。トウモロコシでは、エチオプラストがクロロプラストに発達する時、プラスチド膜蛋白に質的、量的変動のみられることが知られている(Grebanier et al. 1979)。黄化キュウリ子葉を用いて、BAの緑化促進に伴うプラスチド蛋白の質的、量的変動の有無について検討を行なった。

暗所培養したキュウリ子葉を暗所でBAまたはDW処理をして、暗所18時間、明所5時間の処理を行なった。この子葉を冷やした磨碎液と混合し、ワーリングブレンダーと、続いてウルトラターラックスで磨碎し、その濾液を1800×g、30秒遠心分離した。沈殿物を磨碎液に懸濁し、ソルビットの濃度勾配遠心分離を行ない、インタクトなクロロプラストの多い画分を取った。この標品を低張緩衝液で破壊して、20,000×g、30分の遠心分離での沈殿物を膜画分、上澄を可溶性画分とした。蛋白成分の分析にはSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を用いた。

切除してないキュウリ子葉について、エチオプラストとクロロプラストの膜蛋白パターンを比較した結果、どちらも13本のバンドが認められ、低分子蛋白がクロロプラストで量的に増加していた。また、切除処理のものを光照射で緑化した子葉から分離したプラスチドの膜蛋白パターンにおいても、エチオプラストのそれに較べて、低分子蛋白の増加がみられた。Grebanierらはトウモロコシのエチオプラストが光によってクロロプラストになる過程で膜蛋白の変化を調べ、31本の蛋白バンドの存在と、比較的low molecular weightの蛋白数本がエチオプラストにはなく、緑化に伴って出現してくることを示したが、この現象はキュウリにおいても観察された。

BAがプラスチド膜蛋白に与える影響については、BA処理とDW処理とで主バンドの数に相違はなかったものの、蛋白の量比に相違が認められた。

これらの類似点と相違点について、また時間経過に伴うパターンの変動について、さらに可溶性蛋白についても合わせて報告する。

3C-6

黄化キウリ子葉の緑化過程に対するベンズルアデニンとカリウムイオンの影響について (IV)

春 彦 彦 内 藤 彦 彦 鈴木 智、(筑波大・生物科学)

切除した黄化キウリ子葉は、ベンズルアデニン (BA), 又は、カリウムイオン (K<sup>+</sup>) で緑化促進、DNA, RNA, 蛋白質量の増加をみたす。前々回、前回大会取組。BAとK<sup>+</sup>による作用様式の違い、DNA量の増加が細胞分裂の促進を反映しているから調べて調査をすめた。6月9日黄化子葉を切除し、水又は、KCl, BA, BA+KCl の水溶液で浸した口紙上に並べ、明所18, 48時間, 暗所18, 48時間, 暗所18時間の前処理とそれに続く明所30時間 (計48時間) と処理開始時の、2日以下、細胞数, DNA, 7日以下、CEL量等を調べた結果を得た。

(i) 明所で、BA, K<sup>+</sup>はDNA量の増加をきたし、其後すると更に効果が高まる。48時間の連続明所では、K<sup>+</sup>の促進効果がBAよりも大であるが、18時間の暗所前処理が加わると、逆に、BAの促進効果がK<sup>+</sup>よりも大きくなる。BA処理葉のCEL量は、暗所前処理があるなしにかかわらず、同じであった。

(ii) 細胞数の増加は、光で必ずおこる促進され、BAも促進される場合もある。

(iii) 子葉あたりのDNA量の増加は、BAによる促進効果が、K<sup>+</sup>よりも大である。BAは、明所、暗所共に促進効果があるが、K<sup>+</sup>は明所のみの促進効果がある。

(iv) 細胞あたりのDNA量を求めると、水, K<sup>+</sup>, BA, BA+K<sup>+</sup>処理葉の順に大くなる傾向が見られた。

(v) K<sup>+</sup>は、暗所で、生量、核酸、蛋白質、カロチノイド量を増加させない。

(vi) 細胞あたりのCEL量もBAとK<sup>+</sup>で増加する。

(vii) 明所48時間で、BA処理葉は、核酸、K<sup>+</sup>は蛋白質量の増加が顕著であった。

(i), (v) より、BAは暗所でも緑化能を促進させるが、K<sup>+</sup>の緑化促進効果は、光が必らず、暗所での効果は少ないと考えられる。(vii) より、BAは核酸、K<sup>+</sup>は蛋白質量の増加に関与していると考えられる。この様に、BAとK<sup>+</sup>は緑化を促進する点では、同じであるが、作用様式に異なる点が多いと考えられる。

DNA合成阻害剤である5-FluorodeoxyuridineでDNA合成を阻害すると、CEL量の低下が見られ、特に、BAによる増加が強く阻害される。Thymidineにより、これらの阻害は回復する。今回、(i), (iv) よりDNA量の増加は主として細胞数の変化ではなく、細胞内のDNA量の変動によるものであると考える。従って、細胞内のDNA量の変動は、CEL量と何らかの関係があると推論できる。細胞内のDNA量の変動は、細胞あたりのプラスク→ト数の変化と対応するのかが検討中である。

### 3C-7

黄化子葉のベンジルアデニン、IAA、GA<sub>3</sub>処理で誘導されるエチレンが緑化促進作用に果たす役割について  
出井 満 (京大・理・植物生態研)

黄化キウリ子葉を連続照明下においた際みられるクロロフィル(Chl)合成は、切り離した子葉を予め暗所でベンジルアデニン(BA)、GA<sub>3</sub>、IAA、エチレンなどのホルモン処理を行なうことにより促進されることが知られている。一方、サイトカイニンやオーキシンが多くの植物組織や培養細胞のエチレン生成を促進し、またジベレリンもエチレン生成に影響するという報告がある。そこで黄化キウリ子葉をこれら各種ホルモン処理した場合にもエチレン生成が影響されるかを調べ、またそのことがこれらのホルモンのChl合成促進効果の発現のうえで何らかの役割を果たしている可能性についても検討した。

暗所3日間発芽させた芽生えより切除した子葉50枚を試験液にインキュベートし、暗所中でのその後の特定の時間帯に3時間容器(内容積15ml)を密封してその間に蓄積したエチレンをガスクロマトグラフィーで定量した。なお試験液の溶媒としては10mM MES buffer (pH 6.0)を用いた。ホルモン処理開始後21-24時間の3時間のエチレン生成量でみると、BAは $10^{-7}$ M以上、IAAは $10^{-4}$ M以上、GA<sub>3</sub>は $10^{-5}$ M以上の濃度でそれぞれ促進効果を示し、 $10^{-4}$ M BAでは水対照の約10倍、 $10^{-3}$ M IAAでは約5倍、 $10^{-3}$ M GA<sub>3</sub>では2~3倍の生成速度を示した。これらのホルモンによる生成促進は $10^{-5}$ M AVG (aminoethoxyvinylglycine)を共存させることによりほぼ完全に抑えられた。なお、BAとIAAはこの場合相乗的に働き、BAとGA<sub>3</sub>、IAAとGA<sub>3</sub>は相加的に働いた。またBA及びIAAの効果は処理開始後少なくとも3時間のlagの後あらわれたが、GA<sub>3</sub>の効果は9時間以上の長いlagの後あらわれた。このことはGA<sub>3</sub>のエチレン生成促進における作用機作がBAやIAAのそれとは異なることを示唆するものであろう。

次にBA、GA<sub>3</sub>、IAAのChl合成促進作用にエチレンが関与しているかをこれらホルモン単独、及びホルモンとAVGを同時に、それぞれ暗所24時間前処理した発芽4日目の子葉の連続照明下でのChl合成量(6時間連続照明後のChl蓄積量)を比較することにより調べた。これまでに得られたデータから判断すると、ホルモンをMES bufferに溶かすと、機作は不明であるがMES自体にChl合成促進効果があってIAAによる促進効果がみられなくなり、またBAやGA<sub>3</sub>によるChl合成促進効果もAVG共存下でも余り減少しない。これに対しホルモンを水に溶かした条件ではGA<sub>3</sub>による促進効果はAVG共存により減少するが、BAの促進効果はAVG共存によらず減少しなかった。エチレンによるChl合成促進効果はageの進んだ子葉程増加するのでそのような子葉について検討中である。又、IAAについてはIAA自体の促進効果がIAAを水に溶かした条件下でも余り大きなものがないので未だ明確な結果を得ていない。以上のことからGA<sub>3</sub>のChl合成促進効果には部分的にエチレンの作用が関与していることが考えられる。

キュウリ黄化子葉のδ-アミノレフリン酸形成能に及ぼす  
ベンジルアデニンと赤色光の影響：アッセー系の検討  
辻 英夫（京大・理・植物生態研）

黄化組織を暗所でサイトカニン前処理するかまたは赤色光で短時間前照射すると、連続照明下へ移してからのクロロフィル形成が促進されるが、この2種の前処理はいずれも暗所中でδ-アミノレフリン酸(ALA)の合成能を増大させる。しかし、両要因によるALA合成能促進機構の異同についてはほとんど知られていない。著者は、両要因の組合せ実験から両要因の作用機構の異同に関する知見を得ようと考えた。そのためには、あらかじめそれぞれの要因が最大効果を發揮するような条件を求めることが必要である。そこで、実験条件を種々検討した結果、組合せ実験に適切な条件を求めることができた。それとともに、この検討の過程で両要因の効果の現れかたについていくつかの興味ある知見を得たので報告する。

エイジ5日のキュウリ黄化めばえから切り取った子葉を用い、ALAのアナログであるレフリン酸(LV)を間欠真空浸潤させ蓄積するALAを定量した。ALA蓄積をみる実験のタイプとしては、最初にLVを与えて長時間の蓄積経過を追跡する方法(累積法)と種々の時点でLVを与えその後の短時間内の蓄積をみる方法(区間法)を用いた。この2つの方法は、それぞれ一長一短があるので、これらを併用し比較検討した。

1) ベンジルアデニン(BA)の場合。LVとともにBAをも最初から真空浸潤させると、暗所中でのBAによるALA合成能促進効果はBAを与えてから数時間(3~4時間)後に現われる。暗所での長時間インキュベーション中に水対照区のALA合成能は徐々に低下するのに対し、 $8 \times 10^{-5} M$  BAはこれを20~60%高いレベルに保たせる。

2) 赤色光の場合。赤色光がALA合成促進に対して2種類の効果(①暗所における終末産物によるALA合成系に対するフィードバック阻害を解除すること、②ALA合成系の増大)をもつことが示唆されているが(Klein et al., 1977)、②の効果の出現時期については調べられていない。ホルモンの作用機構との比較では、②の効果が重要と考えられるので、①の効果との分離を試みた。 $124 \mu W/cm^2$ の赤色光をパルス照射(5分間)したのち再び暗所へ戻した。パルス照射後たんにALA蓄積速度は急速に上昇するが、照射後3時間たつと照射前の暗所でのレベルに戻ってしまう。これは、照射が与えられたのちにALA合成能は高められるが、再びフィードバック阻害がかかってしまうため、高められた合成能は潜在化した結果であると考えた。そこで、オ1パルス照射後の種々の時点で、オ2パルスを与えることによりその時点でのALA合成能を検出しようと試みた。結果は、区間法では、オ2パルスによって検出されるALA合成能はオ1パルス照射後5時間のところでピークを示し、10時間後にはオ1パルス直後と同じレベルに落ちつく。累積法では、オ2パルスを与えると、オ1パルス後のALA蓄積カーブからそれと、急速な蓄積増大がみられるが、その蓄積速度のオ2パルスを与える時点による違いは、区間法の結果とよく一致する。オ2パルスによるALA合成能のピークは、おそらくオ1パルスによるALA合成のpotentiationが最大に達した時点を表しているものと考えられる。

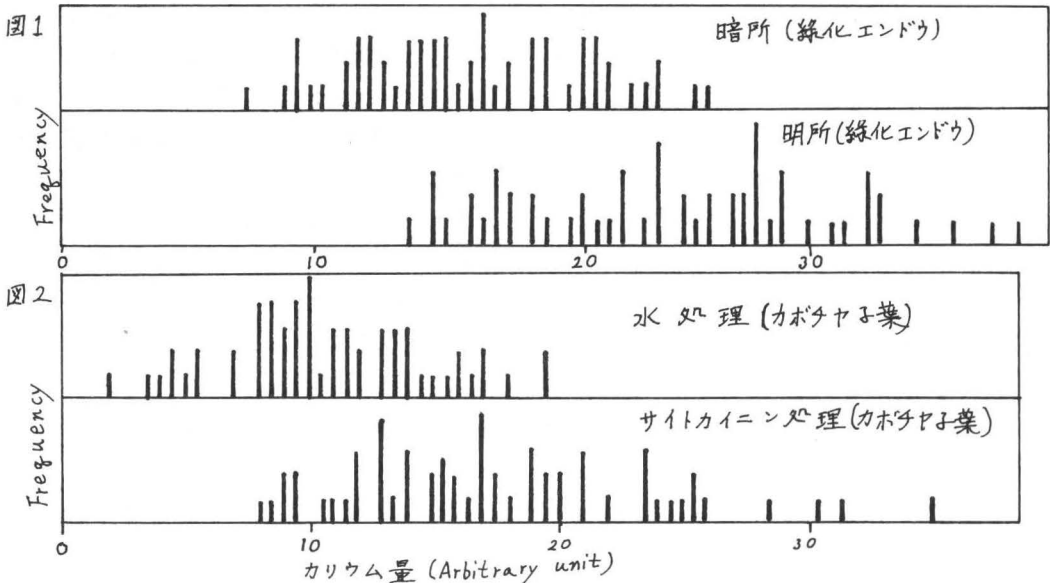
顕微測光法で測定されたサイトカイニンによる気孔内カリウム含量の変化

佐野哲男, 倉石晋 (広大・総合科学)

サイトカイニン処理により気孔の開度が増すが、気孔の開度の測定方法にはあまりの問題が残されている。葉内の気孔はすべて一様に開いているものではなく、同じ葉の中でもかなりのバラツキがあるため、多数の気孔の開度を同時に測定しなければならぬ。そこで亜硝酸コバルトナトリウムとカリウムの反応の結果生じたフイツンヤー塩(亜硝酸コバルトカリウム)の濃度を定量することにより、孔辺細胞内のカリウム含量の定量を試みた。

サンプルの表皮をはぎとり、軽く水洗した後、10N 亜硝酸コバルトナトリウムの7%酢酸水溶液で室温下30分間表皮も処理した。色素を除くため、30, 60, 80%アセトンで軽く攪拌しながら各10分間ずつ洗い、その後100%グリセリンの中に表皮をつけ、約1時間後、サンプルの孔辺細胞に生じたフイツンヤー塩を定量した。測定はオリンパス光学製マルチ測光顕微鏡を用い、水銀光源ランプの直後にグリーンフィルターを、さらに測定には570nmのフィルターを用いる。

図1で示されるようにエンドウ(安芸みどり)を26°C 6500連続光下で生育させたものと、同温で暗所に36時間おいた葉の気孔を調べると、明所におかれたエンドウの方が暗所のものよりも孔辺細胞中にカリウム含量が高かった。さらに暗所で26°C、95時間培養したカボチャ(東京かぼちゃ)の子葉を水あるいは $10^{-5}M$ カイネタン水溶液に浮かべたものでは20時間後に図2のように、カイネタン処理した子葉の気孔孔辺細胞にはカリウム含量が高いものが多かった。カイネタン処理後7.5時間目に急にカリウム含量の増加がみられるが、これはカイネタンによる蒸散促進と緑化促進をひきおこす時間と一致する。なおフジコツキン処理した気孔では開度の増加はみられるが、カリウム量の増加はみられるなかった。





### 3C-10

ツユクサ剥離表皮におけるイオンで誘導される気孔の開孔について

井上 弘, 米林文子 (富山大・理・生物)

我々は先に孔辺細胞内に存在する葉緑体のエネルギー状態を検討するために、クロロフィルの蛍光誘導現象を観察することを試みてきた。その際の都合上、暗中で気孔を開閉させる条件が必要になったので、今回暗中での気孔反応について検討した。

方法: solution-flow方式のポロメータ(露出気孔数は約800)に、一晚暗中に置いたツユクサ葉から剥いだ表皮をはさみ、種々の実験液を流した(図1)。気孔の開度に対応した流出液量はドロップカウンターで測定した。すべての実験液には10mM Tris-HCl (pH 7.2)が含まれているが、以下の記述では省略してある。

結果: 剥離表皮の外液のKCl(あるいはNaCl)濃度が増大すると暗中にもかかわらず気孔は開いてくる。以後の実験には長時間安定して開孔している150mMを採用した(図2)。このようなイオンで誘導される気孔の開孔は単純な物理的效果によるものではなく生理的要因の強いものである。例えば先ず20mM KCl中で60分間 incubateする時に与えられる光照射時間の影響を見ると、前照射時間に依存して開孔速度も開度も大きくなり、暗中での150mM KClによる開孔誘導には前照射によるエネルギーの蓄積が必要であることを示している(図3)。

明中での気孔開孔を強く阻害することが知られているアブサイシン酸( $10^{-5}M$ )はこのイオンで誘導された暗開孔を可逆的に阻害する(図4)。

$CaCl_2$  (5mM)も開孔を阻害することが知られているが、同様にこの暗中におけるイオン誘導開孔を阻害した。

直接のエネルギー源であると思われるATP(0.5mM)を暗中で添加した時には、KCl中では初期のわずかの開孔を得るには促進的であったが、その後は阻害的に作用する。NaCl中では促進的な効果は認められず、阻害的である。このことはThomas(1970, タバコ剥離表皮)の報告と異なるが、Fujino(1967, ツユクサ剥離表皮)の報告に近い。

イオン輸送に関係していると思われる $Na^+-K^+ATPase$ の阻害剤として知られるウワバイン( $5 \times 10^{-5}M$ )はKCl中ではほとんど効果を示さなかったが、NaCl中では開孔の誘導時には効果は見られないが、開孔した時に添加すると開孔をもたらしした。

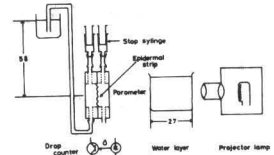


図1

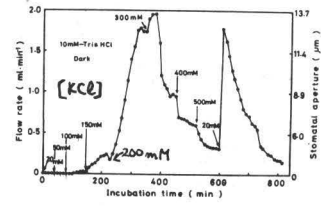


図2

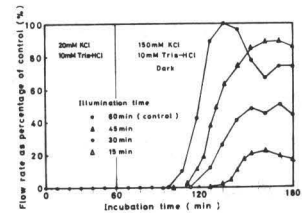


図3

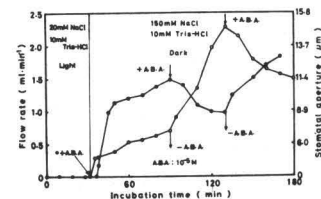


図4

大気汚染物質による植物の被害は気孔を通しての汚染物質の吸収速度に依存する。二酸化硫黄 ( $\text{SO}_2$ ) に接触すると、アブサイシン酸 (ABA) を多量に含む植物は気孔をす早く閉ざして  $\text{SO}_2$  に対して強い抵抗性を示すことは既に報告したが、他の大気汚染物質である二酸化窒素 ( $\text{NO}_2$ )、オゾン ( $\text{O}_3$ ) 等についても同様の関係が存在するか否かについては報告されていない。本実験では、最初に、 $\text{SO}_2$  に対する気孔反応に関して更に数種の植物について検討すると共に、 $\text{NO}_2$ 、 $\text{O}_3$  に対する気孔の反応を調べて、気孔反応と ABA 含有量とを比較した。次いで、 $\text{SO}_2$  に対する気孔反応の機構を解明する手がかりとして、蒸散に対する亜硫酸と塩酸の影響を調べた。

落花生、トマト、ダイコン、ソラマメ、イネ、ハトムギ、コムギ、トウモロコシ、ソルガムは  $25^\circ\text{C}$ 、湿度 70% に制御したガウス室中で栽培した。タバコは植物ウイルス研究所の温室にて栽培したものを使用した。汚染ガス接触実験は植物をガス暴露用グロースキャビネット ( $170 \times 230 \times 190 \text{ cm}$ ) へ移し、 $25^\circ\text{C}$ 、湿度 75%、光強度約 30,000 lx の条件で 2 時間前処理した後に行なった。 $\text{SO}_2$  は 2.0 ppm、 $\text{NO}_2$  は 4 または 8 ppm、 $\text{O}_3$  は 0.5 ppm の濃度で与えた。気孔運動の指標として蒸散速度変化を測定した。蒸散速度は土壌面をおおった鉢植えの植物を上皿天秤に載せ、重量の変化をレコーダーで記録し、重量の減少速度より求めた。ABA は数グラムの葉をメタノール、酢酸エチル、酢酸 (50:50:1) 中でポリトロンを用いて磨砕して抽出し、有機溶媒、薄層クロマトグラフィーにより部分精製し、ジアゾメタンでメチル化した後は、ECD 付きガスクロマトグラフで定量した。

$\text{SO}_2$  暴露による三種のタバコの蒸散変化を調べると、ABA 量の多いものほど顕著な蒸散減少を示した。また、イネ科植物についてはイネ、ハトムギ、コムギの間では、同様に ABA 含有量に応じた蒸散変化を示したが、トウモロコシとソルガムは ABA 含有量が極めて少ないにもかかわらず、 $\text{SO}_2$  により顕著な蒸散低下が認められた。 $\text{NO}_2$  に対しては、8 ppm 濃度で落花生、トマトのような ABA 含有量の多い植物は  $\text{SO}_2$  の場合と同様に蒸散速度の低下が見られた。0.5 ppm  $\text{O}_3$  の場合にも落花生、トマトは同様の蒸散変化を示したが、 $\text{SO}_2$  の場合とは異なりトウモロコシは顕著な蒸散変化を示さず、ダイコンは暴露開始直後から蒸散低下が見られた。 $\text{SO}_2$  は植物葉中に侵入して水に溶解すると亜硫酸あるいは重亜硫酸イオンとなり水素イオンを生じるはずである。そこで、0.04 M 亜硫酸ナトリウムまたは 0.04 N 塩酸を落花生、ダイコンの葉面に塗り蒸散変化を調べると、亜硫酸はどちらも影響を与えず、塩酸は落花生の蒸散を低下させ、ダイコンには全く影響を示さなかった。しかし、ダイコンに ABA を処理した後に塩酸を与えると蒸散減少が認められた。これらの結果は、 $\text{SO}_2$  による蒸散変化は亜硫酸イオンの影響よりも pH 低下としての影響によることを示唆している。

亜硫酸イオンおよび pH のソラマメの気孔開度に及ぼす影響とアブサイシン酸の関与

丸田一成, 近藤矩朗\* (筑波大・環境, \*国立公害研・生物)

アブサイシン酸 (ABA) を葉に多く含有する植物は,  $\text{SO}_2$  に接触するとすばやく気孔を閉じることをすでに報告した。そこで, ソラマメの表皮切片を用いて,  $\text{SO}_2$  接触時の閉孔運動における ABA 関与の生理機構の解明を試みた。気孔を通して植物に侵入した  $\text{SO}_2$  は気孔内湿面に溶け,  $\text{HSO}_3^-$ ,  $\text{SO}_3^{2-}$ ,  $\text{H}^+$  を生じるので, ソラマメの表皮切片の気孔開度に及ぼす亜硫酸イオンと pH および ABA の影響を調べたところ, 低 pH 域で ABA による顕著な開孔阻害が観察された。そこで, pH 低下にともなう ABA の孔辺細胞への取り込みの変化を調べ, さらに, 孔辺細胞内の浸透圧の調節を行なう  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$  およびリンゴ酸の含有量に及ぼす pH と ABA の影響について調べた。

ソラマメは, 昼  $25^\circ\text{C}$ , 夜  $20^\circ\text{C}$ , 湿度 70% に制御した温室で播種後 6-8 週間育てた。  $25^\circ\text{C}$ , 湿度 75%, 30 klux の人工光室で 2-4 時間前処理した後, 葉の裏側の表皮をはぎ, 2 分間の音波処理を施して孔辺細胞以外の表皮細胞を破壊し 10 mM KCl, 100  $\mu\text{M}$   $\text{CaCl}_2$  を含む各種条件の培養液に浮かべた。 pH は主に  $1/10$  強度の McIlvaine の緩衝液を用い調整した。培養液に浮かべた表皮切片は,  $25^\circ\text{C}$ , 30 klux で 1.5-2.0 時間培養した後, 200 倍の顕微鏡写真を撮影し, 30-50 個の気孔開度の平均値を求めた。 ABA の孔辺細胞への取り込みは, 30-40 分間各種 pH で光照射下にて培養した後,  $^{14}\text{C}$  で標識した ABA を加え, さらに 1 時間の培養後, 試料中の放射能を測定した。  $\text{K}^+$  および  $\text{Na}^+$  は光照射した表皮切片を 5% 硝酸を用いて  $100^\circ\text{C}$  で 1 時間抽出し, 原子吸光分析を行い定量した。リンゴ酸は 90% エタノールを用いて  $60^\circ\text{C}$  で 30 分間 3 回抽出し, Møllering の方法で定量した。

気孔開度に及ぼす亜硫酸イオンの影響は, 培養液に ABA を加えていない場合, 亜硫酸濃度  $10^{-5}$  から  $10^{-3}$  M の範囲で開度に若干の増加が見られたが  $10^{-7}$  M ABA 存在下では亜硫酸の促進効果は認められなかった。一方, 気孔開度に及ぼす pH の影響は, pH 3.0 から 7.0 の範囲で有意な差は認められず, ABA 存在下では酸性領域で気孔開度が減少し, pH 4.0 で最小値を示した。これらの結果は,  $\text{SO}_2$  接触時の ABA 関与の気孔閉孔は, 亜硫酸イオンによるのではなく, pH 低下が ABA の作用を増幅したことを示しているように思われる。また, ABA の孔辺細胞への取り込みは pH 低下とともに増大し, pH 4.0 では pH 7.0 の場合の約 5 倍の ABA が取り込まれることがわかった。  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$  の孔辺細胞内含有量およびリンゴ酸量は, いずれも pH 低下とともに減少するという結果を得た。すなわち, pH 低下にともない孔辺細胞への  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$  の移入, リンゴ酸の蓄積が減少し, 低 pH 域において孔辺細胞は浸透圧が低いレベルにあるものと推察される。また,  $10^{-6}$  M の ABA 存在の場合, ABA を加えない場合に比較して pH 5.0, 6.0 で  $\text{K}^+$  含有量が減少する傾向も見い出された。しかしながら, ABA を加えない場合には低 pH 域で気孔開度が減少しないことから, 浸透圧以外の要因の関与も考えられ, ABA が pH 低下にともない孔辺細胞の細胞壁に何らかの影響を与えている可能性が考えられる。

アサガオ子葉の緑化能に於し、近赤外光の連続照射が及ぼす影響。

吉田和子、小西達夫、(京大・農・応種)

近赤外光はChlの形成光としてほとんど効果を持たないが、Chl形成(緑化)を適当な光条件下で進行させるに先立って照射しておくこと、フィトクローム系の活性化を促してChl形成に影響を及ぼす。H. Mohrら(1973)はカラシ菜の芽生えを用いて、近赤外光による前照射がChl合成開始時のLag-phaseを消去し、Chl蓄積量の直線増加期の増加率を引き上げることを報告している。他方、アサガオ(紫)においては近赤外光連続照射下で出芽・生育した芽生えで、暗条件下に生育のものに比べ子葉の緑化能が著しく劣化することが報告されている(小西1975)。

今回の実験で、近赤外光の照射時間と正確に比べるために暗黒下で出芽させた芽生えが地表上に出さるる時(地表約3cm)を0日として近赤外光の(Cut-off 700nm, 2500 erg·sec<sup>-1</sup>·cm<sup>-2</sup>)前照射を開始し、子葉のChl量の変化、Lag-phaseの測定等を行った。Chl形成は白色蛍光灯(500Lx)下で行なわれ、温度条件はすべて25°Cとした。

白色光下24時間までのChl蓄積はほぼ直線増加に近似するのでこれを緑化能の指標として比較してみると、近赤外光前照射0.5日と1日の子葉では緑化能の促進が見られ、更に前照射を続けると1.5日を境として暗条件下に生育した子葉よりも緑化能は次第に低下した。白色光下でのChl量変化を随時的に進んでいくと、近赤外光前処理の子葉では同日の前暗処理のものよりもChl蓄積量が低くなる傾向を示す。また4日間の近赤外光前処理の子葉では白色光下に6日間おいても緑色を呈さない。

Lag-phaseは二波長分光測光、オパールガラス法により子葉の41670-41750の差を直接計測し、その随時的変化より測定した。近赤外光前照射1日及び2日の子葉では白色光照射の開始よりLag-phase無しに670nmの吸収が直ちに増加するが、3日及び4日間の近赤外光前処理した子葉ではLag-phaseが再び出現する。

緑化能の近赤外光前照射による低下が顕著となるのは前照射開始後3日及び4日目であるが、前照射期間を短縮しその後暗条件下において計る日数4日目の子葉の緑化能を調べたところ、短時間であっても近赤外光の前処理があれば緑化能の低下がみられ、1.5日程度の前照射で低下は下限に達すること取わかった。また同じ2日間の暗条件と2日間の近赤外光照射で前処理しても、近赤外光照射後暗黒下におく場合にだけ緑化能力の充分な低下が見られ、どの生育日から近赤外光照射を開始しても同じ促進→低下のパターンが再現される。

これらのことから、アサガオにおいても近赤外光の前照射によるChl合成系の活性化がみられるが、これはごく短時間しか持続しえないこと、緑化能の低下は光に直接に依存する反応ではなく、近赤外光照射によるChl合成系の活性化が、短時間に集中的におこされた結果、二次的にみられるものであることが示唆される。

## トレンニア茎切片からの花芽形成(4)

種々の生理的狀態にある外植片に対するホルモンの影響

°谷本静史・原田 宏(筑波大・生物)

植物の組織培養における成長や分化にとって、外植片の生理的狀態が重要な要因の一つであることは明らかである。我々はこれまでに、シソの不定芽および花芽形成(1977.植物学会)と、トレンニアの花芽形成(1978.植物組織培養シンポジウム, 1979.植物生理学会)に対して、外植片の生理的狀態のおよぼす影響について報告してきた。

トレンニア(*Torenia fournieri* Lind.)の節間切片からの花芽形成は、外植片を切り出す際の植物体上の位置や、材料とする植物体の齢に強く影響される。すなわち、植物体の各節間から外植片を切り出して培養を行うと、花芽形成能力の勾配が見られ、花芽形成率は上部節間由来の外植片で高く、下部節間由来の外植片ほど低い。又、発芽後種々の齢にある植物体を材料とし、その上部節間から外植片を切り出すと、花芽形成率は12週前後の植物体を材料とした場合に最も高い。これらの結果はホルモン類を全く含まない培地を使用して得られた。そこで今回は、それら種々の生理的狀態にある外植片に対して、培地中に添加したホルモン類のおよぼす影響について報告する。

Murashige & Skoogの無機塩類組成から $\text{NH}_4\text{NO}_3$ を全量取り除き、さらに全体を5倍に稀釈し、これに2% sucrose, 0.8% agarを添加したものを基本培地とした。検討したホルモン類は、IAA, Zeatin,  $\text{GA}_3$ , ABAであり、これらを0.01, 0.1, 1.0%の濃度で、ミリポアフィルター(0.45 $\mu\text{m}$ )で滅菌して基本培地に添加した。

発芽後12~15週の花芽を形成している植物体の上部オーおよびオニ節間と、下部オ五節間から外植片を切り出した。低濃度のIAAと $\text{GA}_3$ は、上部および下部節間由来の外植片で、花芽形成率を共に上昇させた。特にIAAは上部節間由来の外植片で形成された花芽のその後の発達を著しく促進した。高濃度のZeatinは花芽形成を阻害した。

発芽後3~6週の花芽を全く形成していない植物体の上部節間から外植片を切り出した場合には、基本培地での花芽形成率は10%前後であるのに対して、ABAは低濃度で花芽形成率を50%以上に上昇させた。IAAと $\text{GA}_3$ による促進効果は顕著ではなかった。Zeatinは阻害的であった。

発芽後20週の植物体から外植片を切り出すと、IAAは花芽形成と形成された花芽の発達を共に著しく促進した。 $\text{GA}_3$ がこれに次ぎ、低濃度のZeatinも若干促進的であった。しかしABAは効果を示さなかった。

以上の結果から、十分な花芽形成能力を持つ外植片では、IAAはその花芽形成過程をさらに促進し、ZeatinとABAはこれを抑制するものと思われる。一方、栄養相にある植物体から切り出された、花芽形成能力の弱い外植片の場合には、ABAは、何らかの形でこの能力を強めることで、花芽形成率を上昇させるのであろう。

安息香酸およびその誘導体による *Lemna paucicostata* 151 の花成誘導一構造活性相関

渡部一夫, 滝本敦, 藤田稔夫\* (京大・農・応植,\* 農薬)

昨年の本学会で発表したように アオウキクサ *Lemna paucicostata* 151 は連続光条件下では花芽を形成しないが、培地に Benzoic acid またはその誘導体を加えると花芽を形成する。今回はこれら花成誘導効果のある Benzoic acid 誘導体における構造活性相関について報告する。

*L. paucicostata* 151 は *Hutner* 培地に培養保存し、実験には 1% M 培地を使用し 25°C, 6000 lux の連続光下 7 日間培養した後観察した。構造活性相関の解析には Hansch 法を用いた。これは生理活性の大きさの変化と化学的・物理・化学的性質の変化とを関係づける方法で、C を一定の効果を示すのに必要な活性物質の濃度とし、これが置換基の疎水性因子  $\pi$ , 電子的因子  $\sigma$ , 立体的因子  $E_s$  などの関数として表わされることを利用したものであり、一般的には

$$\log \frac{1}{C} = a\pi + b\sigma + cE_s + \dots + \text{constant} \quad \dots (1)$$

の関係式が成立する。本実験では *L. paucicostata* 151 が 10% の花成率を示す場合の化合物の濃度を C とし、最小二乗法による回帰分析で各項の係数を求めた。この解析には Benzoic acid を母核化合物とし、種々の置換基によって置換された化合物を培地に加え、その生理活性を調べた。最初の解析では、置換ベンゼン類の ortho 置換基には ortho 効果のあることが知られているのでこれを除いて計算した。その結果、疎水性に対するパラメーターである  $\pi$  は生理活性の大きさの変化には関与せず、電子効果に対するパラメーターである  $\sigma$  だけの単独変数でも

$$\log \frac{1}{C} = 2.6548\sigma - 0.1742 \quad \begin{matrix} n & r & \sigma \\ 15 & 0.9251 & 0.3758 \end{matrix} \quad \dots (2)$$

という関係式が得られ相関係数もかなり大きかった。また立体的効果に対するパラメーターである  $E_s$  のかわりに MR (Molar Refraction) の項を上式の右辺に加えると

$$\log \frac{1}{C} = 2.8685\sigma - 0.7683MR + 0.2444 \quad \begin{matrix} n & r & \sigma \\ 15 & 0.9763 & 0.2228 \end{matrix} \dots (3)$$

となり相関係数が増大し、標準偏差が減少する。したがって Benzoic acid 誘導体のアオウキクサにおける花成誘導効果の大きさ  $\sigma$  と MR によってかなり良好に説明できることができ、 $\sigma$  の関与度が高く、MR はそれに比較して低く、また置換基の電子吸引性が大きく、分子屈折の小さいほうが生理活性を高めることがわかった。さらに、ortho 置換体については  $\sigma$  値を para 置換体と同じ値とし、計算すると

$$\log \frac{1}{C} = 2.8416\sigma - 0.7238MR_{m,p} - 1.2001MR_o + 0.2103 \quad \begin{matrix} n & r & \sigma \\ 19 & 0.9759 & 0.2064 \end{matrix} \dots (4)$$

となり ortho 置換体についても  $\sigma$  と MR が関与してあり、meta, para 置換体よりも分子屈折が生理活性を低下させていることがわかる。

しかし OH 基と NO<sub>2</sub> 基については ortho OH 置換体を除いていすれの置換部位においても上式(4)の計算値よりも活性がかなり低く、その原因は現在のところ未解決である。

以上の Benzoic acid 誘導体以外には、Picolinic acid, Nicotinic acid, Isonicotinic acid などのピリジン環をもつカルボン酸、あるいは Benzylalcohol, Salicylalcohol にもかなり高い花成誘導効果が見られた。

別府敏夫, 滝本敦 (京大・応用植物)

日本産アオウキクサは生理的性質から4タイプに分類できる。しかも4タイプは地理的にもはっきりとした分布域を持っている。N-1タイプは北海道から九州まで広く分布している。N-2タイプは山形, 新潟, 岐阜など裏日本に分布。Kタイプは京都大学構内にもみ分布していると考えられる。Sタイプは九州南部から沖縄地方に分布している。他の3タイプは人工光(蛍光灯), 合成培地で日長処理などに反応しよく開花するが、Sタイプは日長処理, 種々の温度処理, 系統674.6で花成誘導が認められる化学物質などの処理を行なったが、全く開花は認められなかった。その後サルチル酸, 安息香酸を2~20 $\mu$ M与えると、Sタイプの花成誘導が起ることになった。しかし日長処理のみでは依然開花しない。

野生状態でSタイプが開花するかどうかを観察したところ、水俣では8月に、沖縄では5月に開花しているのが認められた。そこで京大構内でSタイプの自然条件下での開花を観察した。磁製のホットに少し烟土を入れ水を滴らし、Sタイプの系統331, 261を入れ自然状態に放置し1週間ごと開花率を測定した。両系統とも6月末から開花が始まり、7月末の実験終了時には50~60%の開花率が得られた。次に温度を制御(22~28 $^{\circ}$ C)したガラス室で日長の効果を調べてみた。日長は連続光と8時間日長。連続光は夜間白熱電球で補光した。系統は331, 241の両系統を用いた。連続光下では10日目から開花が認められ、その後直線的に増加し、4週間後には両系統とも60%以上の開花率が得られた。短日条件(8時間日長)では331のみが4週間で8%開花しただけであった。

蛍光灯下では開花せず、太陽光を用いると開花することから、光の強度および質がSタイプの開花に影響していることが考えられる。そこで陽光ランパ(東芝陽光ランパD400)を用いて実験してみた。まず予備的に次のような条件を設定した。培地は sucrose-free  $\frac{1}{2}$  Hutner, 照度12000 Lux, 連続光。温度約23 $^{\circ}$ C。このような条件下で331は10日後に約10%の開花率を示した。次にPH, sucrose,  $NH_4^+$ , 照度の効果を調べた。

PHの効果 PHを4.8, 5.5, 6.0, 7.0とし開花率をみてみると、PH5.5で最もよく(30%)開花することがわかった。またN-1タイプの353(量的短日植物)でもPH6.5で約50%開花する。

Sucroseの効果 331は培地に1% sucrose を与えるとほとんど開花しない。353では sucrose の効果はほとんど認められない。

$NH_4^+$ の効果  $KNO_3$ を等モルの  $NH_4NO_3$ で置き代ると、331はほとんど開花しない。353は sucrose を含まない培地では全く開花しないが、sucrose を含む培地では12%ほど開花する。

照度の効果 6000 Luxに照度を低下させると331はほとんど開花しない。一方353は29%ほど花をつけた。なお、この条件下で日長に対してSタイプかとのように反応するかは現在調査中である。

*Lemna paucicostata* 6746 の花・フロンド生産に及ぼす  
ジベレリンの効果

森 博行 (名大・理・生物)

短日性ウキクサ、*Lemna paucicostata* 6746 の花成過程は、従来用いられた花成率 (TL%)、花芽数などの指標ではなく、新しく導入された栄養生長率 ( $\alpha$ )、花成率 ( $\Phi$ )、前誘導期 ( $P_1$ )、誘導期 ( $P_2$ )、花生産期 ( $P_3$ ) を用いてのみ、はじめて正確で精細な記載が可能であることが明らかにされた (H. Mori: *Plant & Cell Physiol.*, 20, 615-647, 1979)。これらの諸変数に及ぼす植物ホルモン (オーキシン、ジベレリン、カイネチン) の効果を調査したところ、ジベレリンが顕著な効果をもつことが判ったので報告する。

ジベレリンは、26℃、完全暗黒におかれたウキクサの花・フロンド生産を促進 ( $P_3$  を短縮、 $\alpha$  を増大) する。 $P_3$ 、 $\alpha$  は、ジベレリン濃度の上昇とともに同程度ずつ促進されるので、共通なしくみとして、ジベレリンによる花・フロンド原基細胞の分裂、伸長の促進が考えられる。

栄養生長からの生殖生長への分配の割合 ( $\Phi$ ) は、 $10^{-5}$  M 程度のジベレリンが与えられたとき、最も生殖生長の方へ傾く ( $\Phi$  が大きくなる) が、現在のところ、このしくみは全く不明である。

何らかの計時機構の存在が考えられる前誘導期 ( $P_1$ )、誘導期 ( $P_2$ ) のうち、 $P_1$  はジベレリンに対して何の変化も示さないが、 $P_2$  は与えられたジベレリン濃度に応じて延長される。温度に対する感受性から、 $P_2$  には膜過程が関与することが示唆されているので、 $P_2$  に関してのみ、16、21、26、31℃ の各温度で、ジベレリン効果が詳細に調べられた。

ジベレリンによる  $P_2$  変化は、二つの成分にわけられる。一方は、低濃度ジベレリンに反応する成分で、脂質で構成された人工膜からのケルコースのそれに及ぼすジベレリン効果を示す曲線 (A. Wood and L. G. Paleg; *Aust. J. Plant Physiol.*, 1, 31-40, 1974) に酷似するため、ジベレリンによる膜脂質の流動性変化に起因する膜透過性変化が考えられる。他方は、高濃度のジベレリンによるもので、ジベレリン濃度上昇に伴う  $P_2$  変化が、殊に 26℃ において、顕著な S 字状曲線を示すため、ジベレリン結合型アロスタリックタンパク質の存在と、このタンパク質による物質の膜透過の調節が考えられる。このことから、 $P_2$  の計時機構には、膜にある脂質、タンパク質の存在状態によって規定される膜透過性が関与することが示唆される。



*Lemna gibba* G3 における酵素 G3P 脱水素酵素の、  
概日性振動子による制御機構  
佐藤 健 (名大・理・生物)

長日性ウキクワ *Lemna gibba* G3 において、Cyt (細胞質) - NAD - GPD (グリセルアルデヒド 3-リン酸脱水素酵素) と、Chl (葉緑体) - NADP - GPD の活性は、相互に逆位相の概日性周期的変化を示す。この変化は、夫々の酵素の、基質・補酵素に対する親和性 ( $1/K_m$ ) の変化を反映している。Chl - NADP - GPD の親和性を増加させるエフェクターには、ATP、dithiothreitol (DTT) と NADP(H) がある [Goto, K. PCP 20, 523 ('79)]。本年会に於ては、これらのエフェクターの Cyt - NAD - GPD に対する作用を報告する。併せて、両酵素の  $K_m$  値の相互に鏡像的な変化のメカニズムについてとも報告する。

(1) ATP と NADP(H) は、Cyt - NAD - GPD の  $K_m$  値を増加 (活性の減少) させた。DTT は効果無し。NADH は  $K_m$  値を増加させた。NADH の生体内濃度は、正常な  $O_2$  分圧下では、極めて低いと考えられているし、ATP は概日性変化を示さない [Kondo, T and H. Nakashima Physiol. Plant. 45, 357 ('79)] ので、概日性振動子の制御を媒介し、GPDs の鏡像的日周変化を促すエフェクターは、NADP(H) であることが示唆された。即ち、細胞質と葉緑体の細胞内両区画における NADP(H) 濃度は、同位相で概日性変化を示す筈である。

(2) NAD 生合成の速度が一定に保たれていると仮定すれば、NADP(H) 濃度は、NADP phosphatase と NAD kinase の速度に依存して変化する。そこで両酵素の活性の連続測定条件下における経時変化を追跡した。0.05M Tris-HCl, pH 7.5 (0.25M sucrose を含む) バッファーで磨砕し、40K rpm, 30 min の上清を crude extracts とした。これを Sephadex G25 カラムを用いて、0.05M Tris-HCl, pH 7.5 バッファーにより脱塩し、desalted extracts とする。両酵素は、逆位相に概日性変化を示す。その位相は、NADP phosphatase 活性の場合、CT 18:00 (light-on 後 18hr 目) 前後、NAD kinase 活性の場合、CT 6:00 前後 <sup>(= peak)</sup> であった。予想される NADP(H) 濃度のピークは、CT 12:00 であるので、両酵素活性の位相は、NADP(H) 濃度の変化を説明することが出来る。この結果は、crude extracts と desalted extracts のどちらの標品を用いても得られる。又、NADP phosphatase 活性の変化は、NADP に対する  $K_m$  値変化を反映していた。NAD kinase 活性の kinetics は、現在、調査中である。NADP(H) の代謝における重要性から推して、NADP(H), NAD-kinase と NADP phosphatase が、概日性振動子の構成要素であることが予想される。これらの要素を含む概日性振動子の機構についても議論する予定である。

近藤孝男 (基生研・計時機構)

長日性ウキワサ (*Lemna gibba* G3) に無糖培地を連続的に与えて培養しつつ (*Flow-medium culture, FMC*),  $K^+$  の吸収能を追跡すると, ウキワサは光量依存性の振中をもった顕著な内因性概日リズムを示す。しかし, このリズムは暗黒下では, 速やかに減衰してしまふ。これは, このリズムを支配する振動子の停止を意味するのではなく,  $K^+$  吸収自体に必要なエネルギーの枯渇による振中の消失である可能性が強い。暗期中での位相の動き, パルス光による振動子の駆動等, 光による振動子本体への制御様式を明らかにするためには, 外部栄養を補給して, 暗黒下でも, リズムが観察できるようにする必要がある。

FMC を無菌化し, 1% のショ糖を加えた培地を与えたところ, 暗黒下でもリズムの観察ができるようになった。この条件下でのリズムはエネルギー枯渇によって消失する可能性は少なく,  $K^+$  吸収能を支配する振動子の動きを, より忠実に反映しているものと思われる。今回はこの方法で明らかになった  $K^+$  吸収リズムの光要求性について報告したい。これまで以下に以下の性質が明らかになった。

- 〈自由進行に必要な光量〉 連続暗黒下でリズムは2~3サイクル現われた後, 減衰してしまふ。薄明 (80 lux) と与えると振中は低下するがリズムは4~5サイクル観察できる。減衰の少ない常定的な振動が継続するためには500 lux以上の光量が必要であるが, 1500 lux以上の光量では吸収が飽和気味となる。
- 〈明暗周期への同調〉 明期開始を12時間遅らせた明 (3000 lux) 暗周期下におくとピークは3~4サイクル目に Light-ON に一致し定常状態に達する。500 lux, 80 lux の明暗周期も同様の効果を示す。また明期を短かくするとピークは Light-ON の数時間前に移動する。更に3サイクルの明暗周期後の連続暗黒中では, 明暗周期の, Light-ON の位置に支配される位相を示す。
- 〈パルス光によるリズムの維持〉 1500 lux 以上の15分パルスを24時間毎に与えれば目立った減衰のないリズムが持続する。500 lux のパルスの場合は2~3サイクルの不安定な移行期の後リズムが生じる。又ピークの位置は2~3時間前進する。80 lux のパルスは効果がない。又赤色光のパルスもリズムを維持することができず。
- 〈パルス光によるリズムの再開〉 連続暗黒でリズムが減衰しているウキワサに, 15分, 3000 lux のパルスを与えるとリズムは再開し2~3サイクル続く。500 lux で十分な効果を生じるためには120分以上のパルスが必要であり, この場合再開したリズムの位相は2~3時間前進する。
- 〈DCMU の効果〉 DCMU ( $10^{-6}$  M) 存在下でも, 上記の光処理の効果は消失しないが, 実質的な効果は低下し, 3000 lux の光で500 lux 相当の効果が現われる。

### 3C-20

短日性ウキワサ *Lemna paucicostata* 6746 の Potassium Uptake Rhythm.

○ 續 伯彦 (愛知学院大)・福本 順子 (楊山女学園大)

Potassium Uptake Rhythm (PUR) に関する研究は、主に長日性ウキワサ *L. gibba* G3 を用いて行われ、連続明期中に進行する PUR の諸性格が調査されて来たが、(Kondo & Tsudzuki '78, Tsudzuki & Kondo '79). 我々は比較生理学的関心から、短日性ウキワサ *L. paucicostata* の PUR について調査を開始した。

方法: Sucrose 添加によるバクテリア汚染の防止のために滅菌処置を徹底した以外は、*L. gibba* について開発された flow-medium-culture の手法を基本とした。連続明 (~2,000 lux) 条件で、 $\frac{1}{2}$  Hutner's medium (1% Sucrose) 上で栄養生長している *L. paucicostata* (medium 50 ml に 1 colony を植継いだ後 10 日を経たもの) を実験に供した。83 倍に希釈した Hutner's medium ( $[K^+] \cong 60 \mu M$ ) に 0.1% の Sucrose を添加して flow-medium として使用した。flow cell 内に約 300 mg (initial) のウキワサを植継ぎ、medium は ~7 ml/hr で流した。植継ぎによる、一過性に  $K^+$  の放出がおこり、後吸収に転ずるが、これは PUR を誘起せず、36 時間以上連続明条件に保てば、ウキワサの生長に伴うゆるやかな  $K^+$  取込みの速度で安定する。明条件の際は照度的 3,000 lux の白色蛍光灯による照射を基本とした。特に言及せぬ限り温度は 26°C に保った。

結果: flow-medium-culture に移して 36 時間連続明条件に保ち、その後暗条件に移すと、暗期開始 (= 0 hr) を契機として PUR の振動が始まり、8 hr, ~32 hr に取込みの極大が出現したが、減衰が著しく、~56 hr に期行される 3 番目の極大は medium 中の Sucrose 濃度を増加させても確認出来なかった。むしろ Sucrose 濃度の上昇は PUR の振動を抑制する傾向がある。この暗期中に 5 分間の光パルスを与えると、一般に 2 番目の極大値が上昇した。その出現時刻に変動が生じた。暗期中の PUR の進行には Zeitgeber (本例では光パルス) が与えられることが必要と思われる。様々な長さの暗期の後に再び明条件に移すと、この明期中に現れる (連続暗期の 2 番目の極大値に相当する) 極大値の出現時刻は、明期開始時刻に光パルスを与えた場合とほぼ同様の変動を示した。明らかに light-on の信号は、この PUR に位相変動を与えるのである。我々が用いた光の照度が比較的高い。そのため、明期中のウキワサの生長が促進され、明期中に比し程度まで PUR が維持されているかを直接観察することは困難である。したが、適当な明条件下では PUR は少くとも数サイクルは進行するものと思われる。6 時間暗 + 18 時間明 ([6]18) から [(2)13] にいたる種々の日周期を与えた場合には、これに同調 (しつ、ある) 振動の大き丁 (PUR) が観察された。このウキワサの PUR の温度依存性を検討したところ、40°C に達する温度でも進行が認められた一方、20°C 付近では急激な振動の低下がおこり観察不能とした。リズムの進行が認められる温度域では、その周期はほぼ一定である。

これらの結果を、*L. gibba* G3 の成績や、同種について報告された  $CO_2$  放出のリズム (Hillman '72) と比較検討して論じている。

太田行人 (基生研)

M-1% 蔗糖培地, 26°C の培養条件 (特に断わらない限り本実験ではすべてこの条件を使用) 下で [9(15)], 即ち 9 時間明 + 15 時間暗の光周期スケジュールに馴化させた長日性ウキクサ, *Lemna gibba* G3 を, [12(12)] スケジュール下に移し, その 12 時間暗期を 2 時間ずつの光パルスで走査すると, 光パルスによる花成促進には明瞭な双峰性が認められる. オ一峰は, 先行の主明期開始 (真正あかつき, true dawn, CT 0:00) から約 15 時間後に位置し, オ二峰は, 後続の主明期終了 (真正たそがれ, true dusk) より約 15 時間前に位置する. [12(12)] の代りに [9(15)], [6(18)] あるいは [3(21)] 等の短日性スケジュールを用いても双峰性花成応答は認められるが, オ一峰と先行の真正あかつき, そしてオ二峰と後続の真正たそがれとの時間間隔は, 主暗期の延長に伴って規則的に短縮される. この短縮傾向を外挿すると, [0(24)] スケジュールの下では, 両峰は CT 12:00 時点にはほぼ収斂することになる. 但し, このような光パルス挿入が短日と長日化するのは, 光パルスとこれに隣接する主明期とによって形成される骨格明期の長さが限界日長 (12 時間) を越える場合に限られる.

他方, 長日性スケジュール, [15(9)] あるいは [18(6)] の主暗期に挿入された 2 時間の光パルスは, 挿入時刻に関係なくそれぞれ均一の花成促進をもたらすにすぎない.

さて, このウキクサでは, 24 時間制の長日性スケジュールならばその構造の如何と向わず, 26°C 下では最低 2 サイクルが, 23.5°C 下では最低 3 サイクルが与えられさえすれば花芽誘導は達成される, 一方, これらの温度条件下では同調 (entrainment) 成就のためにはどんなスケジュールにしろ最低 2 サイクルが与えられることが必要である. これらの事実に基づいて工夫された "min-LD 法" (太田, 1975) を使って調査した結果によると, 長日性, 短日性いずれのスケジュールに含まれる主暗期でも, その前半部に挿入された光パルスは擬似たそがれ (false dusk) の信号を, 後半部に挿入された光パルスは擬似あかつき (false dawn) の信号を発する. このような擬似信号を発し得るのは約 30 分を越える長さの白色光, あるいは赤色光パルス (R/FR 可逆性あり) であり, しかもこれらの光パルスが連続して少くとも 2 サイクル投与された後のものである.

以上の事実から, *L. gibba* G3 における花芽誘導は, 根本的には "外的一致 (external coincidence) モデル" に従って行なわれ, 真正あるいは擬似あかつき信号の発信から 12 時間後に, 光感受性の誘導相が訪れること, しかし, 真正あかつきと擬似たそがれ, または擬似あかつきと真正たそがれ, の組合せが, これらに対応する長さの完全明期と生理的に等価の機能を営むという副次的効果が働いたため誘導相到来が見かけ上遅れるのであり, しかもその遅れは主暗期の短縮とともに増大する結果を招くこと, が推察される. これらの推察, 特にその前半部分, が正しければ, *L. gibba* G3 の限界明期の終点 (L2 相) は誘導相に外ならず, 限界日長とは真正あかつき信号 (L1 相) から誘導相到来までの時間間隔 (12 時間) に外ならないことになる; 限界明期の構造 (L1, L2 相) についても太田 (1975) を参照せよ. Oota, Y. PCP 16; 885-894, 1975.

佐藤良 近藤孝男\* 三好泰博\* (東大・理・植物, 養生研)

演者らは、昨年度の本大会で、アカパンカビ (*Neurospora crassa*: al-2, bd 株) の分生子形成の概日リズムに關して

1. このリズムは菌糸体先端部から約3cm程度の若い領域に見られること。
2. リズムが見られる領域内では、各節ほぼ同位相であること。
3. 菌糸体基部の古い領域では、リズムは消失している可能性があること。

等を報告した。さらにつきつづき、演者らは菌糸体先端部の $K^+$ 、 $Na^+$ イオンの含量の時間変化およびその光照射による影響を調べたので、報告する。

アカパンカビ (al-2, bd 株) を15cm 径のペトリ皿の寒天培地に接種し、明所で12~24 時間培養後暗所に移した。寒天培地上には透柙膜を張り、菌糸の収集を容易にすると共に、試料への寒天の混入を防いだ。この条件で、al-2, bd は分生子形成に典型的な概日リズムを示す。試料の $K^+$ 、 $Na^+$ イオン含量の測定は、分生子がまだ形成されていらない菌糸体先端部数mmの菌糸を集め、この生重量を測定後、0.1 規定塩酸で10分間煮沸してイオンを抽出し、Perkin-Elmer社製603型原子吸光光度計を用いて定量した。この測定方法で得られる $K^+$ 、 $Na^+$ イオン含量は、細胞内外の総イオン量を表わすと考えられる。

$K^+$ 量、 $K^+/Na^+$ は、暗所に移してから10, 30時間目にはピークとなるリズムを示した。 $Na^+$ 量は、 $K^+$ 量と鏡像的に変動した。 $K^+/Na^+$ には、生重量測定操作は關与しないので、これらのリズムは有意なものと考えられる。Slayman (1968) は、アカパンカビ (野生株) を、培地中の $K^+$ 濃度を0.2mMに下げた液体培地で培養後、 $K^+$  freeのbufferに移して30mMのKClを加えた場合、pH4~6の条件では、netの $K^+$ のとりこみは、細胞内の $Na^+$ 、 $H^+$ との交換により行われようことを報告している。従って上記のリズムは、 $K^+$ と $Na^+$ が、鏡像的に変化を示すことから、細胞内のイオン濃度の変化を反映している可能性が大きい。このイオン含量のリズムは、分生子形成のリズムと位相が一致し、明所での培養時間にかかわらず、明所から暗所への移行を起点として発進し、連続明下では認められなかった。これらは、イオン含量のリズムにも何らかの形で光の効果があることを示している。

そこで分生子形成リズムの光による位相応答曲線で、位相前進、無変化、後退がおこる時間を選り、20.7w/m<sup>2</sup>、50minの白色光パルスを与え、光照射直後のイオン含量の変化を見た。しかしながら、いずれの場合も、イオン含量に有意な変化は認められなかった。分生子形成のリズムは、形態的変化であるため、位相移動がおこる条件でも光照射直後には、まだ変化は認められない。従ってイオン含量のリズムが、形態的変化に先行して位相移動を完了する可能性もまだ残っており、イオン含量のリズムが、光照射後新しい位相へ移行していく過程を調べる必要がある。この点については現在検討中である。

アカパンカビの分生子形成リズムの位相に及ぼすシクロハキシミドの効果

中島秀明\* (基生研. 計時機構), J. PERLMAN, J. F. FELDMAN (UC Santa Cruz, CA)

アカパンカビ (*Neurospora crassa*) の分生子形成はサーカディアンリズムを示す。このリズムは *bd* 遺伝子の存在で鮮明になる。これまでこのリズムを使用し、主に周期についての遺伝的解析が行われてきた。異相の周期を示す数多くの変異株が分離され、周期の決定に関与している数種の遺伝子座の決定がなされた。もしこのリズムの生化学的解析が同時に行われるならば、この遺伝学的成果と合わせて、サーカディアンリズムの研究にとってこの生物は有用な材料となるであろう。しかし、これまでこのリズムは固体培地でしか観察できず、この条件ではたとえは、薬物のパルス実験や均一な材料を大量に得ることは不可能に近かった。従って、液体培地でこのリズムが動く条件を求め、その決定に成功した。

*bd pan* 2株をバントニ酸をない液体培地で培養し、種々の時刻にバントニ酸を含む固体培地に移してその後のリズムの位相を決定する。このようにして液体培地中でのリズムの進行を推定すると、少なくとも最初の2日間、分生子形成は全く起らないが、時計だけ動いている条件を見つけることができた。同じ条件下で発芽中絶に対する明確なPRCを得ることもできた。この系を使用すれば、先に述べた薬物のパルス実験や生化学的解析のために必要な材料等の獲得が容易であり、しかも、分生子形成は生じないので、分生子形成によって生じる時計とは無関係な副次的な物質的変化も起らない。

従ってこの系を使用して、再びシクロハキシミド (CHX) のパルス実験を行いたい。リズムの位相の変化を調べた。その結果 CHX のパルスで位相の変化する時刻 (CT 05) と変化しない時刻 (CT 19) があることが分かった。CT 12 は明暗転換点である。CHX が蛋白質合成を阻害することによって位相の変化を妨げていることを調べるために、シクロハキシミド耐性株を用い、同じようにPRCを調べた。シクロハキシミド耐性はリボソーム自身の変化によって妨げられていることが分かっている。しかし、CHX はこの株に対して全く無効であった。これ等の事実は一冊の中の特定の時刻 (CT 05 附近) に特異的な蛋白質が合成されることが時計の進行に必要であることを示している。これは *Acetabularia*, *Gonyaulax* で最近得られた結果とよく一致する。現在 CHX 感受性と不感受性の各時刻での発芽パターン及び蛋白質合成パターンを可溶性蛋白質と膜蛋白質について比較し、予想される特異蛋白質の分離を目指している。

第3日 4月8日(火)  
D会場  
細胞・分化,  
分子生物学



### 3D-1

## Saccharomyces cerevisiae における性的凝集能の誘導と接合子形成の分別阻害

柳島直彦, 長谷川聡 (名大・理・生物)

酵母 Saccharomyces cerevisiae のヘテロタリックな株の  $a$ ,  $\alpha$  細胞を混合すると、性的凝集がおこり、つづいて凝集体の中で  $a$ ,  $\alpha$  の細胞対が形成され、この対が接合子になる。接合過程の調節機構を知るためには性的凝集と接合子形成の二つの過程の、それぞれの機構、および両者の関係を知る必要がある。このような研究の第一歩として、性的凝集と接合子（または  $a$ - $\alpha$  細胞対）形成の両過程を生理学的方法により分けることを試みた。実験には、性的凝集に関して構成性株である T55( $a$ ), T56( $\alpha$ ) とそれぞれの誘導性突然変異体である T55S-41, T562S-161 (*saa1* 遺伝子をもつ) を用いた。

#### I. 性的凝集能の誘導の阻害

性的凝集そのものは、 $a$ ,  $\alpha$  の細胞表層に存在する性特異的糖蛋白質、凝集物質の相補的結合による。性的凝集能（活性ある凝集物質の生産）は、それぞれの相手型細胞に由来する性ホルモンによって促進（T55, T56 の場合）又は誘導（T55S-41, T562S-161 の場合）される。Triton X100 は、接合初期の性的凝集の促進又は誘導やさらに出芽抑制を阻害したが、すでにもっている凝集能を阻害することはなかった。これらの事実 は Triton X100 が性ホルモンの作用を阻害することを示している。事実 Triton X100 は  $\alpha$  性ホルモンによる T55S-41 の性的凝集能の誘導を阻害することがわかった。一オ Triton X100 存在下で T55, T56 を培養すると、その構成性の凝集能が著しく低下した。この低下した凝集能は Triton X100 のないところでそれぞれの相手型性ホルモンによって回復することがわかった。なお Triton X100 の接合子形成阻害作用は、接合の初期反応の阻害による結果であると考えられる。

以上の結果は、性ホルモン作用を中心とした接合初期反応には細胞表層、特に細胞膜が重要な働きをしていることを示唆している。

#### II. 接合子形成の阻害

ethyl N-phenylcarbamate 存在下で T55 と T56 又は T55S-41 と T562S-161 を混合すると性的凝集、出芽抑制は正常に起こるが、接合子形成は阻害される。注目すべきことには、ethyl N-phenylcarbamate を与えないと約 2 時間で性的凝集の進行はとまり、それ以後は接合子形成が進みさらに凝集がゆるむが、与えると、凝集が 4 時間以上も進行しつづけ、凝集のゆるみも認められなかった。そしてその結果として大きな凝集体が現れてきた。このことは ethyl N-phenylcarbamate が性的凝集能の促進あるいは誘導、出芽抑制などの初期接合反応には殆ど影響を与えないが、凝集から接合子形成へと進む段階を特異的に阻害することを示唆している。

ethyl N-phenylcarbamate は microtubules の形成を阻害することが知られているので、性的凝集から  $a$ - $\alpha$  細胞対の形成への進行に、microtubules が重要な働きをしている可能性が考えられる。



*Saccharomyces cerevisiae* の孢子発芽過程における性的凝集能の変化

遠山 鴻, 柳島 直彦\* (受援大・理・生, \*名大・理・生)

*Saccharomyces cerevisiae* のハプロイドの $\alpha$ 型,  $a$ 型の栄養細胞は, それぞれの相手型細胞と特異的に反応して性的凝集を行う能力をもっている。この性的凝集反応は接合子形成に必須の接合初期過程の1つと考えられている。この性的凝集反応における $\alpha$ 型と $a$ 型細胞間の特異的結合は, それぞれの細胞表層に存在する凝集物質の相補的な結合によってもたらされることが知られている。デプロイド細胞はこのように性的凝集能を示さないし, その細胞表層に凝集物質も存在していない。我々は性的凝集能を示さないデプロイド細胞が減数分裂を通して形成したハプロイド孢子が性的凝集能をもっているか, また, その孢子が発芽, 出芽してハプロイドの栄養細胞が出来る過程で性的凝集能がどのように変化するかと凝集物質との関連において調べた。

まず, デプロイドの栄養細胞を1%酢酸カリウムを含む孢子形成培地に移して形成させた子のうをサイモリエースで処理して孢子を遊離させ,  $\alpha$ 型と $a$ 型が混在している孢子集団を得た。この孢子の懸濁液はそれ自身で凝集する。しかし, pH9.5で性的凝集は阻害されるが, 孢子の凝集は阻害されなかった。また, Tween 80, Triton X-100, Brij-35の存在下でも性的凝集は起きるが, 孢子は凝集を示さなかった。以後, これらの現象を性的凝集と非性的凝集を区別するのに利用した。さらに孢子のオートクレーブ抽出物中には凝集物質活性は認められなかった。以上の事實は孢子は非性的な凝集を行うが, 性的凝集能力をもっていないことを示している。

次に孢子とTween 80(0.5%)を含む栄養培地(この培地では非性的な凝集は起こらない)に移し, 発芽過程における性的凝集能の出現を調べた。その結果, 6時間目から細胞の性的凝集が始まり, 8時間目にこの凝集が最大に達した。また, 8時間目の細胞から得たオートクレーブ抽出物をDEAEセルロースカラムで分離すると $\alpha$ 型と $a$ 型の両方の凝集物質活性が認められた。すなわち, 8時間目の細胞はすでに $\alpha$ 型と $a$ 型の性的凝集物質をもっていることがわかった。

以上の実験系では, 2時間目までにgermination, outgrowthが終り, つづいて最初の出芽が始まり4時間目頃最初の娘細胞が出現し, 以後栄養的な増殖が続くことがわかった。すなわち, 細胞数は6時間目で約4倍に, 8時間目で約8倍になった。以上の結果から, 孢子そのものは性的凝集能はもたず, 孢子より出芽した娘細胞が凝集能をもつことが示唆された。

井口昌一郎, 林真一, 鹿野英美子 (茨城大, 理, 生)

酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) の細胞にカタツムリの消化酵素を作用させて原形体 (スフェロプラスト) を作る時に使う溶液 (protoplasting medium) はいろいろ報告されているが再生活性の高い原形体を作るには,  $\text{CaCl}_2$  (0.33 g/l),  $\text{MgSO}_4$  (0.5 g/l),  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (2 g/l) を含む 0.7 M mannitol 液がよいとされていること, 又こうして作られた原形体と適当に稀しやくし Melting agar に混ぜて寒天培地に流すと再生して Colony を形成するが, そのまじり稀しやく液と Melting agar の両方にそれぞれ 0.5 M  $\text{CaCl}_2$  を含ませておく必要があることなどを昨年名古屋大会で報告した。

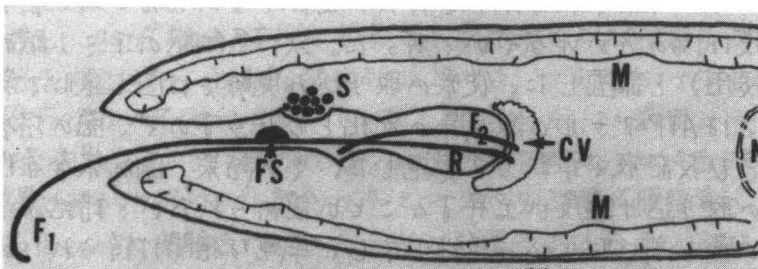
Protoplasting medium 中の 0.7 M mannitol, 及び稀しやく液と Melting agar 中の 0.5 M  $\text{CaCl}_2$  にはそれぞれある種の阻害作用があることを指摘し検討することによって、その二通りの検討結果について報告した上で細胞壁の再生機構について考察する。

# 3D-4

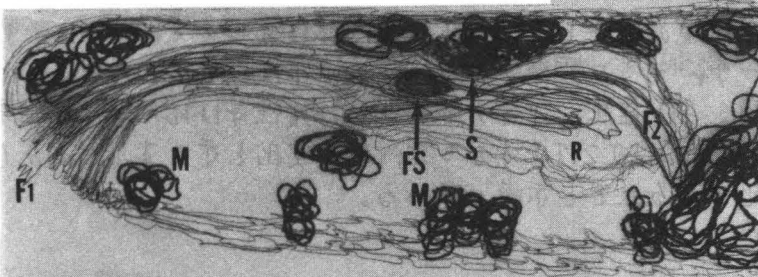
## STIGMA AND FLAGELLAR SWELLING IN RELATION TO LIGHT AND CAROTENOIDS IN EUGLENA GRACILIS VAR. BACILLARIS

Osafune, Tetsuaki and Jerome A. Schiff. Institute for Photobiology,  
Brandeis University, Waltham, Mass. 02154 U.S.A.

Wild type Euglena,  $W_3$ BUL (a mutant having lower amounts and a different mix of carotenoids), and  $W_{10}$ -BSMl (in which colored carotenoids are undetectable) were grown in light and darkness and were serial-sectioned to ascertain the form and relations of stigma and flagellar swelling by electron microscopy. The length and width of the flagellar swelling in all organisms in light and darkness was the same within experimental error, and this structure showed the characteristic fine reticulate substructure in all cases. The stigma is absent or is reduced to a few tiny vesicles in  $W_{10}$  and shows less staining in  $W_3$  compared with wild type. In dark grown resting wild type and  $W_3$  the stigma is rather amorphous and only becomes a group of spheres after prolonged exposure to light. Three dimensional reconstructions of the reservoir region showing the relations of organelles including the stigma and flagellar swelling have been made. Comparing wild type B and its mutants, the presence of a normal flagellar swelling is not correlated with the ability to form colored carotenoids. This conclusion is supported by experiments with (4-chloro-5-(methylamino)-2-(alpha, alpha, alpha trifluoro-m-tolyl)-3-(2H) pyridazinone (SAN 9789) a specific inhibitor of carotenoid biosynthesis in Euglena at the phytoene stage. Growing cells of dark grown wild type or  $W_3$  treated with SAN show a very great reduction in the stigma, but the flagellar swelling is unaffected. Other bodies in the cells which may be associated with hematochrome also show changes on illumination and on treatment with SAN, but more work is necessary to be sure of their identity and their relation to the stigma granules. We conclude that ability to form stigma material does correlate with the ability to make colored carotenoids but light is required to organize this material into the individual spheres characteristic of the normal stigma. NIH GM 14595 Support



THREE DIMENSIONAL MODEL RECONSTRUCTION BY COMPUTER



Euglena  $W_3$ BUL  
CV, contractile vacuole;  
FS, flagellar swelling;  
F<sub>1</sub>, locomotory flagellum;  
F<sub>2</sub>, nonemergent flagellum;  
M, mitochondrion;  
N, nucleus;  
R, reservoir;  
S; stigma;

守家成紀, 西荒介, 柳田友道\* (富山医薬大・薬, \*富山大学)

天然水域には多数の微生物が存在し、その環境は実験室内での培地中よりはるかに貧栄養条件であるが、現在の微生物の培養研究はほとんど富栄養条件が実施されている。一方、実験に繁用される *Escherichia coli* についても、栄養源を質的に変化させた場合の生理的性質は調査されているが、量的変化による貧栄養環境での性質についてはほとんど研究されていない。本実験では、*E. coli* K12 を用いて、希釈された培地中での性質の変化を調査した。

水1ℓにポリペプトン10gと酵母エキス5gを溶解したもの(pH 7.2)を富栄養培地(100%)とし、貧栄養培地はこの培地を水で希釈して調整した。この場合、栄養量的には0.1%培地がほぼ天然環境に近い。なお、培養は自然環境に近づける為、全々20℃で行った。各培地で好氣的に増殖している *E. coli* の比増殖速度( $\mu$ )と最大生長量の対数値は共に培地の希釈濃度(百分率)の対数値と比例関係にあった。光学顕微鏡と電子顕微鏡で細胞の大きさを測定すると、細胞容積は100%培地から1%培地までは徐々に減少するが、さらに貧栄養環境に行るとさらに増加してゆく傾向にあった。対数期後期の細胞の乾燥重量に対する各種高分子物質の量比はDNA, 蛋白質については100%~1%培地の濃度範囲ではほぼ一定であったが、RNAは栄養の低下と共に徐々に減少した。次に各細胞のエネルギー蓄積状態を調べる為に、ルシフェラーゼ法によりATP量を測定した。細胞当りのATP量は0.5%培地まではほぼ一定値( $1.0 \sim 2.4 \times 10^{-18}$  エル)を示し、乾燥重量当りのATP量も1%培地まではほぼ一定( $5.0 \sim 6.5$  mmoles/g)であった。アデニレートエネルギーチャージの値は実験に用いた培地濃度範囲内で0.87~0.98とほぼ一定値を示した。CN<sup>-</sup>による呼吸阻害のもとで、100%培地と1%培地におけるATPの分解過程を追跡したところ、分解されるATP量は共に全ATP量の90%と同じ割合であったが、その分解速度は1%の方がゆるやかであった。次に各細胞のアミノ酸取り込み能(<sup>3</sup>H-アロリンを使用)を調査した。従来の取り込み実験では菌を遠心で集菌しているが、この方法ではATPプールの激減等の変化をとらさず、菌の培養を直接一定のアロリンを含む反応液で希釈して実施した。その結果、菌の栄養条件の低下に伴ってアロリンの取り込み速度が上昇することが認められたが、培地濃度3%~1%付近で生育した菌が最も高い取り込み活性を示し、単純な相関は得られなかった。

以上のことから、栄養環境の低下と共に、生長速度等は著しく変化することが認められたが、エネルギーチャージ等で観察される細胞の恒常性は維持されていると思われる。一方、細胞容積、ATP産生、アミノ酸取り込み活性等は培地濃度の低下と共に変化するが、3%から0.3%付近では必ずしも連続的な変化を示さず、このあたりに複雑な調節機構の変化が起ることを示唆している。

中村 運 (甲南大・理・生)

原核生物である細菌において、細胞膜は、細胞代謝の場として重要な役割を果たしていることは、従来から推察されているところである。しかし、多くの研究にもかかわらず、それが具体的に例証された事実は乏しい。

細胞内酵素は、その代謝特異性と効率(速度)を保つために、細胞内では立体的に配置されている。その様式の一つとして、膜代謝系がある。この代謝系では、関係する酵素群は、一定の順序で脂質2分子層の中に埋め込まれていることが、いくつかの酵素系においてすでに証明され、また他の酵素系について示唆されている。

このような学界の流れから、必然的に、膜代謝系の活性を決定する条件として、膜酵素自身の存在様式が強調され、それらの酵素を支える脂質膜構造の意義については、あまり注意が注がれていない。この研究の目的は、このような学界の現状をふまえて、膜脂質構造が細胞分裂機構にどのような影響を及ぼしうるかを、細菌について調べることである。

この実験に用いた細菌は、大腸菌 K12 の野生型 ( $acrA^+$ ) と変異型 ( $acrA$ ) 両株であった。 $acrA$  変異は、細胞膜タンパク質 ( $acrA^+$  タンパク質) の欠損をきたし、フリーズ・フラクチャーした細胞膜を電子顕微鏡で観察すると、膜タンパク質粒子の存在様式に大きな変化をもたらす。すなわち、細胞膜の脂質2分子層に埋め込まれた大型粒子は消失し、脂質層領域の面積が拡大している。一方、 $acrA^+$  および  $acrA$  株の培養に各種の脂肪酸を加えると、 $acrA$  株では生長障害がおこる。特に、ラウリン酸 ( $C_{12}$ ) を作用させた時に著しい。したがって、以下、ラウリン酸を用いて実験を進めることにした。

$acrA^+$  および  $acrA$  の両株を同調培養し、これにラウリン酸を  $1\text{mg/ml}$  の濃度で加えると、 $acrA^+$  株は、ほとんど影響を受けずに同調分裂するが、 $acrA$  株は1回の細胞分裂をおこすが、以後分裂は阻止される。このような現象は、DNA およびタンパク質合成においてみられた。しかし、脂質合成は、あまりラウリン酸阻害を受けなかった。したがって、ラウリン酸の細胞分裂阻害は、DNA合成阻害に起因することは明らかである。次に、外部から与えたラウリン酸が膜脂質(リン脂質)に取り込まれるかどうかの実験を行なった。その結果、ある分画にかなりの割合で  $C_{12}$  脂肪酸が取り込まれることがわかった。このことは、低級脂肪酸の取り込みによって、DNA合成に関する膜酵素の活性が強い影響を受けることを示唆している。

本大会では、これらの実験データを中心に、細胞膜代謝(DNA合成系)における膜脂質構造の意義について論議する。

西村隆雄, R. R. Pachpande, 岩村達一 (名大, 農)

単細胞緑藻クロレラは核, 葉緑体, ミトコンドリアを各, 一つづつ有する真核細胞で, 独立栄養的にも従属栄養的にもよく増殖する。独立栄養条件下での同調培養系は明暗交代法により同一の Cell cycle の程度も反復し得るが, 従属栄養条件下では他生物同様, 二回止りであった。一方, 光合成産物としてのクロレラの葉緑体は光合成について多くの研究が行われているが, ミトコンドリアについては十分であり, その DNA, その細胞機能は果不没測と明らかではない。事実, 光合成条件下でのクロレラの呼吸能は, 光合成能の 1/10 以下であり (ガス交換), エネルギー論的には重要でないと考えられるが, Cell cycle 後期の成熟細胞 (暗でと娘細胞への分裂, その放母が本来る) では,  $N_2$  中で, 娘細胞の放母が阻害されること判つてゐる。我々はクロレラにおけるミトコンドリアの機能, 又, ミトコンドリア DNA の機能について研究を進めよとして, 反復可能な従属栄養同調培養系を確立すよとこれが重要と考え, これを試みた。

先ず, steady-state の増殖条件を求め, 21°C で, 2% glucose + 魚肝油培養液中で 3%  $CO_2$ -air を通気下よとしたり, 8 ml/l 迄, 最大速度 (暗中) ( $K_f = 0.45$ ) で増殖させよとが出来た。次に通気中の酸素分圧の影響を調べた結果, 0.5%  $O_2$ - $N_2$  氣中で成熟細胞は極く僅かの細胞質量増大と共に, 娘細胞への分裂放母を行ふことを見出した。この結果, 3%  $CO_2$ -air で 22 ± 1 hr, 0.5%  $O_2$ - $N_2$  で 16 ± 1 hr の酸素分圧交代法により, 可成り満足すべき反復同調培養系を確立した。この系についての Cell cycle での呼吸能の変動, DNA, RNA, Protein の合成過程は独立栄養におけるものと近似してゐた。

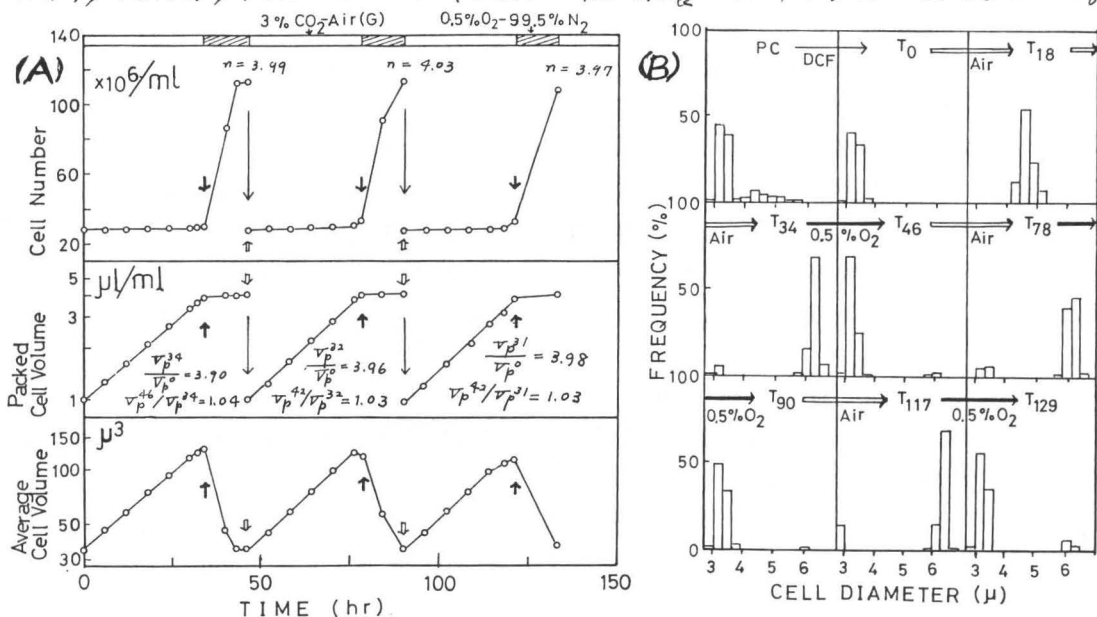


図. (A) 従属同調培養に於ける増殖過程。 (B) 同 Cell cycle 中の Cell size 分布変化。

葉肉単細胞系におけるTracheary element分化と細胞周期との関連 — 阻害剤による解析 —

福田裕穂, 駒嶺穉 (東大・理・植物)

多細胞生物における細胞分化と細胞周期の密接な関連性について、主に動物の培養系を用いて研究が進められてきた。分化全能性にみられるような、明らかに動物細胞と異なる分化能をもつ植物細胞では、こうした研究はほとんどなされていない。そこで私たちは、ヒャクニチソウ (*Zinnia elegans* cv. Canary bird) の葉肉単細胞系を用いて、Tracheary element (以下略してTE) 分化と細胞周期の関連性について研究を続けてきた。その一部については、先の植物学会第44回大会で報告したが、今回は顕微測光で得られた知見と阻害剤を用いた実験結果について報告する。

すでに報告した結果は以下のように要約できる。

- 1) TE分化には、オーキシンとサイトカイニンが共に必要であり、両植物ホルモンの刺激によりTE分化が誘導される。
- 2) TE分化には、TE分化に先行するDNA複製もMitosisも必須ではない。
- 3) TE分化と細胞周期の過程は、同一細胞において同時に平行して進行し得る。

今回はまず、TE分化の誘導が細胞周期の特定の時期におこる可能性を検討するために、顕微測光により出発細胞及び分化途中のTEの核のDNA含量を測定した。その結果、出発細胞はすべて2Cであり、ホルモンによる分化の誘導はG<sub>1</sub>期の細胞でおこっていることが示唆された。TEの核のDNA含量測定の結果は、すでにオートラジオグラフィにより得られた2)、3)の結果を支持するものであった。

エンドウの根の切片やコレウスの茎を用いた実験系において、DNA合成阻害剤によってTE分化が阻害されるという事実がある。そして、これをもって従来はDNA複製がTE分化に必須であるとしていた。私たちは、葉肉単細胞系においてDNA複製がTEの誘導に必須でないことをすでに明らかにした。そこで、DNA複製ではなく、分化の開始に直接必要なDNA合成が存在する可能性についてDNA合成阻害剤を用いて検討した。DNA合成阻害剤のside effectが問題となるので、阻害部位を異にする何種類かの阻害剤 — DNAの基質レベルでの合成阻害剤として5FU、DNAポリメラーゼαの阻害剤としてara C, Aphidicolin、2重鎖DNA間に架橋を形成してしまうMitomycin C — を用いた。これらのいずれの阻害剤を用いても、DNA合成を阻害する濃度でTE形成が阻害された。阻害剤のside effectの可能性が皆無とは言えないが、これらの実験結果はTE分化の開始にDNA合成が関与していることを示唆している。

更に、DNA合成に続くRNA合成、タンパク合成とTE分化の関連について阻害剤を用いて実験をおこなった。RNA合成阻害剤としては、アクチノマイシンDを、タンパク合成阻害剤としては、ピュロマイシンとシクロヘキシミドを用いた。これらのいずれもTE形成を阻害し、TE分化にはRNA合成、タンパク合成が共に必要であることが示された。

## Acetabularia の傘形成の制御

石川依ス子 (阪大・教養・生物)

本邦産カサノリ *Acetabularia calyculus* (ホソエカサ) を能登半島沿岸より採集し、これを実験室内で純粋に継代培養し、生活環の2,3の段階で実験材料としてある程度の量産が可能になった。

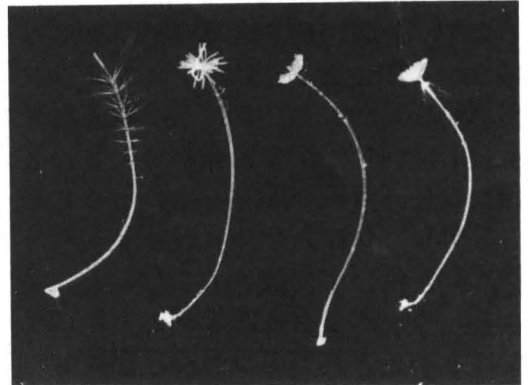
ホソエカサは、光によって成長がうながされるとともに生活環の進行が促進される。長時間の遮光によって、次第に形態的退化がおこり、終局的には核を含む小さな休眠細胞に還元される。

この遮光効果を利用して、輪生枝輪の脱落した藻体を作り、光照射によって、かさ及び輪生枝の分化を同調的におこなわせた。5000 lux 照射下では、かさ形成は培地の窒素栄養添加 ( $\text{NaNO}_3$ ) で誘導され、貧窒素栄養条件で輪生枝の分化が誘導される。カサノリのかさは生殖枝輪で、輪生枝とならち栄養枝輪と同様、藻体の成長点である基部頂端で形成され、その発生初期には両者は区別しがたい。基部先端が、生殖枝に分化するか、栄養枝に分化するかを環境条件で制御することは可能とみられ、現在、詳細な条件について検討している。

同様の方法で遮光処理した藻体で 200 lux 照射下で培養すると豊富な窒素栄養存在下でもかさの分化はおこなない。しかしこれを強光に移すとただちに同調してかさ形成をおこなう。前培養の遮光下で失われた形態形成物質 (long lived m-RNA) が弱光下で形成されるか、または、遮光で活性を失った形態形成物質が弱光下で活性化されるかのいづれかである。

22°C, 2000 lux 照射下で同調的にかさ形成をおこなわせると、すべての藻体が正常形態のかさを生じる。一方、32°C, 5000 lux ではすべてが異常形態のかさを生じる。異常傘を生じた細胞をかさの基部で切断し、有核片を 22°C, 2000 lux 照射下で再びかさ形成をおこなわせると正常傘を生じる。輪生枝輪の場合にも、貧窒素栄養下で異常分枝した細胞を切断し、その有核片を窒素栄養下で再び培養すると輪生枝の少ない藻体を生じ、環境条件が、形態形成を制御している場合細胞質であることが示唆される。

弱光下で培養した藻体の仮根部を切断除去し、無核片を 22°C, 2000 lux に移すと有核藻体と同様に、数日以内に同調的にかさ形成をおこなうが生じたかさは60%以上が異常形態のかさになる。かさの分化の開始は、基部に移行した long lived m-RNA によって規制されるが、かさの正常な形成には核の作用が必要である。32°C, 5000 lux の条件では、この核の作用がまたげられるのであろう。





徳永薫, 山元皓二 (東大・農・農生)

蘚類の原系体上に数個の茎葉体が形成する場合、茎葉体は胞子を中心にして環状に形成される。“Hexenring”と呼ばれるこの現象を解析するために、茎葉体となる芽形成の位置、芽形成の能力(ポテンシアル)について検討を行なう必要があると考えた。

本実験では、蘚類のアゼゴケ *Physcomitrium sphaericum* を実験材料とし、芽を形成した原系体について、芽形成時(芽が1~2細胞の時)の胞子から先端までの細胞数、胞子から芽までの細胞数などを調査した。他に、芽形成のポテンシアルをもつ細胞全てを顕在化するために、芽形成を誘導するサイトカイニン(benzyl adenine 以下 BA と略す)で原系体を処理した。処理は、 $10^{-6} M$ の濃度の BA 溶液 0.20 ml を、原系体を培養したシャーレに添加することで行なった。原系体は添加した培地でそのまま生育させ、芽形成時に無処理と同様な調査を行なった。その際、芽の数についても調査した。

原系体は、主系が生長し長く伸びた後、分枝が生長を開始した。芽形成の位置について解析を行なったところ、主系と分枝(今回は1次分枝に限った)には違いがみられることが明らかになった。主系では、芽形成時の胞子から先端までの細胞数を  $x$ 、胞子から芽までの細胞数を  $y$  とすると、 $y = 0.96x - 5.84$  という回帰直線が得られた。一方、分枝では、芽形成時の分枝の基部から先端までの細胞数を  $x'$ 、分枝の基部から芽までの細胞数を  $y'$  とすると、 $y' = 0.71x' - 3.60$  という回帰直線が得られた。このように、主系と分枝では回帰直線が異なったが、これらの回帰直線は共に、芽形成のポテンシアルをもつ細胞の位置が、フィラメントの生長とともに移動することを示唆するものであった。これらの回帰直線は、BA 処理の有無によつては変化しなかった。従つて、BA は単なる刺激として働くだけで、芽形成の位置を決定するのは、原系体の側であることが示唆された。

また、個体の age (発芽後の日数)を変えて BA 処理を行なったところ、個体の age が進むにつれて、BA に反応して形成する芽の個体当たりの数が増加した。これは、芽を形成するフィラメントの数が増加したことだけによるのではなく、フィラメント当たりの芽の数の増加にも起因することが明らかになった。すなわち、個体の age が進むにつれて、フィラメント上で芽形成のポテンシアルをもつ細胞の数が増加すると考えられた。しかも、1本のフィラメント上に形成する芽は、離れた位置ではなく、ほぼ同じ位置に集まっていた。

本報では、以上の結果に基づき、主系と分枝の芽形成の位置について、芽形成のポテンシアルが原系体の生長とともにどう変化するか、という観点から検討する。

### 3D-11

花粉からの不定胚形成に対する *water stress* とアブサイシン酸の影響

今村順 原田宏 ( 筑波大生物 )

花粉体細胞分裂期とそれにつづく2核期の状態 ( *stage III* ) の花粉を含むタバコ蒴を無菌的に *Nitach H* 培地上で培養すると、蒴内の花粉は植物体上とは異なるタイプの分裂を開始し不定胚を形成する。初回目の分裂が起こるまでは *stage III* の花粉ではおよそ8日間の不定胚誘導期が必要である。この期間に花粉は *gametophyte* の発達過程から *sporophyte* 発生へとスイッチを切り変え不定胚を形成する。このスイッチ切り変え機構を含む不定胚の誘導期の解析に関する報告は、ほとんどなされていない。

→ オ、花粉からの不定胚形成は誘導期の初期に *stress* ( 低温処理・遠心力等 ) を与えることで促進されることが知られている。

そこで我々は誘導期初期に蒴に *water stress* を与え不定胚形成率におよぼす影響について調べた。また同時に *water stress* を与えた蒴内の ABA 量を測定した。その結果から培地に ABA を短期間加え不定胚形成率におよぼす影響も調べた。

方法 > *water stress* は 0.5M マニトールを加えた培地に蒴を一定期間浮かべることで行った。蒴の培養は良く水洗した後通常の寒天培地上で行った。同時に *water stress* を与えた蒴を経時的にサンプリングし内生 ABA 量の変動を測定した。ABA は 80% メタノールで抽出後酸性水溶液からのツクロルメタン分画を TLC ( *Silica gel 60 F254* トルエン: 酢酸エチル: 酢酸 40:5:2 ) で展開した。定量はガスクロマトグラフィを使用した。

結果 > 不定胚形成率は *water stress* を 24 時間から 48 時間蒴に与えることで増加した。しかし 3 日間以上の処理は明瞭な阻害効果を示した。また内生 ABA 量については、0.5M マニトールを含む培地に浮かべた蒴ではマニトールを含まない培地に浮かべた蒴と比較して 24 時間で 170% の増加がみられた。つづく 24 時間では両実験区の ABA 量は急激に減少した。

$10^{-5}M$  と  $10^{-7}M$  の ABA で誘導期の初期にそれぞれ 48 時間、72 時間の処理を行なった蒴においては不定胚形成の促進がみられた。また同時に幼植物体の出現に要する時間が ABA 処理 ( 72 時間 ) によって短縮された。そこで初分裂までに要する時間を測定したところ ABA 処理区において誘導期が短縮されることが確認された。以上の結果にもとづき不定胚誘導期における ABA の作用について考察する。

### 3D-12

体細胞雑種 (*Nicotiana tabacum* + *N. rustica*) の 莖培養より得た  
花粉植物における葉緑体遺伝子の発現  
若井純夫、中田和男、長尾照義、川島伸彦、松山晋  
(専売中研)

細胞融合により、こできた体細胞雑種では、要種細胞の核とともに細胞質の遺  
伝情報(葉緑体、ミトコンドリアなど)も同時に取り込まれたはずである。ところが、  
Smithらの *Nicotiana glauca* + *N. langsdorffii*、Melchersらのトマト+ポテト、  
それに和文のゲルマニアの長尾の *Nicotiana tabacum* + *N. rustica* の3種の体細胞雑種で  
は、Fraction 1 protein (F-1-P)の大サブユニットをマーカーとして調べてみると  
一種の葉緑体遺伝子しか発現していない。いづれが一方の葉緑体は、融合細胞を植  
物体へ再生する過程に排除されたのか? あるいは遺伝子の発現が抑制されたの  
か?。演者は、体細胞雑種の莖培養より得た花粉植物のF-1-P分析により、この  
現象を説明する手がかりの一端を得た。

*Nicotiana tabacum* cv. Bright Yellow mutant Aurea と *Nicotiana rustica* var.  
*Rustica* の体細胞雑種 No.1 の莖から中田らの方法に従って花粉植物9個体を得  
た。花色、花型、葉型は、*N. tabacum*、*N. rustica* の中間型を示し、親である体細  
胞雑種 No.1 およびその自家受粉で得た F<sub>2</sub> と比較すると、花色、花型に余り差異  
は見出せないが、No.1, F<sub>2</sub> では斑入が認められるのに対し、花粉植物では斑入  
は認められず。

花粉植物より、直接結晶法によりF-1-Pを精製、カルボキシメチル化後、等電  
点電気泳動をこなうと、小サブユニット(核遺伝子支配)は9個体、いづれも  
が、*N. rustica*、*N. tabacum* 由来のポリペプチドが混在していた。これは親の体  
細胞雑種が、ある細胞は *N. tabacum*、他の細胞は *N. rustica* というキメラではなく、  
核融合していたことを示している。

また、大サブユニット(葉緑体遺伝子支配)を分析してみると、7個体は *N.*  
*tabacum* 型のみ、2個体は *N. rustica* 型のみであった。ところが、既に報告した様  
に、親の体細胞雑種 No.1 では *N. tabacum* 型のサブユニットのみが検出されてい  
る。この結果から次の様に考えることが出来る。体細胞雑種でいづれが一方の  
親の葉緑体遺伝子しか発現しなかったのは、片方の親の葉緑体が植物体再生過程で  
完全に排除されたからではなかった。少くとも、花粉中には2種の葉緑体が存在  
していた。ところが、成熟葉では同一細胞中に2種類の葉緑体が同時に発現する  
ことは困難であるために、一種の葉緑体遺伝子が発現することになった。

古田 求, 大羽 和子, 瓜谷 郁三 (名大・農・生化)

サツマイモ塊根組織が切断傷害を受けると、ミトコンドリアの新生、ポリフェノールの生合成に関与する酵素の生合成及びポリフェノールの生成等の現象がおこる。そしてこの現象は切断と同時にアクチノマイシンDで処理することにより抑制されることから転写レベルの調節を受けていることがわかる。またこれまで切断傷害に伴いRNA量は切断後12時間まで増加し、以後一足であり、poly(U) unbound RNAの合成速度は切断後12時間まで増加し以後減少し、poly(U) bound RNAの合成速度は切断後6時間まで増加し以後減少するが、poly(U) bound RNAの合成速度はpoly(U) unbound RNAの合成速度の約程であることがin vivoの実験で示された。そこで、本研究ではクロマチン及びRNAポリメラーゼの面からこの切断傷害に伴う転写活性の変動の調節機構を検討したので、ここに報告する。

新鮮組織と切断組織から調製した部分精製クロマチン画分及びそれよりの可溶性RNAポリメラーゼ画分を用い、 $^{32}$ P-UMPがTとA不溶性画分に取り込まれる程度を求め、転写活性を調べた。その結果、クロマチン画分では切断後12時間まで全転写活性は増加し以後減少した。そしてその大部分はRNAポリメラーゼI及びIIによるものであった。また切断傷害に伴う転写活性の変動に対するCHI処理の影響を検討した結果、その変動はCHI処理により完全に抑制された。さらにクロマチン画分と可溶性RNAポリメラーゼ画分の切断傷害に伴う転写活性の変動を比較検討した結果、同一変動を示した。以上の結果より、切断傷害に伴うRNAポリメラーゼI及びIIによる転写活性の初期増加は、鋳型活性の増加よりはむしろRNAポリメラーゼなどのRNA合成に関与するタンパク質のde novo合成によるものと考えられる。また、RNAポリメラーゼIIによる転写活性は弱く、切断に伴う変動をクロマチン画分では明確にできなかったため、DEAE-celluloseを用いて他の酵素と分離することによりその切断傷害に伴う変動を明確にし、さらにRNAポリメラーゼの酵素学的性質についても検討する。

杉田 護, 佐々木喜美子 (北大・理・植)

高等植物における遺伝情報発現機構を解明する一環として、フロマチンレベルでの調節に焦点をあて研究することは重要である。

既に、吉田らによつてコムギ胚フロマチンのRNA合成錐型活性が発芽開始18時間までは低く抑制されているが、18時間以後、著しく増加すること(1)、及び、この錐型活性が主にフロマチン結合の非ヒストン蛋白質によつて調節されていること(2)が報告されている。今回、我々は、フロマチンの抽出にSimon & Becker (1976)の方法を用いた。まず、この方法で得られたフロマチンの発芽過程におけるRNA合成錐型活性の変化を吉田らの結果(1)と比較検討し、さらにフロマチン結合RNAポリメラーゼによるRNA合成活性とフロマチンの構造の変化を調べた。また、フロマチンのRNA転写活性を調節していると思われるフロマチン蛋白質について調査したので以下に報告する。

上記の方法で得られたフロマチンのDNA:ヒストン:非ヒストン蛋白質の重量比は、1:11~13:45~47で発芽過程における変化は小さい。コムギ胚芽から調製したRNAポリメラーゼによる胚フロマチンのRNA合成錐型活性は、発芽に伴い著しく増加する。これは吉田らの報告と一致するところである。フロマチンに結合するRNAポリメラーゼによるRNA合成活性は、未発芽胚と発芽12時間胚で低く、24時間以後急速に増加する。活性は72時間で最大となり、乾燥種子胚の86倍に相当する。ところが、発芽3~4日にかけて錐型活性が増加しているにもかかわらずフロマチン結合RNAポリメラーゼ活性は半減していた。このことは、フロマチン結合RNAポリメラーゼ活性の変化とフロマチンの錐型活性の変化とは必ずしも対応関係にないことを示唆している。錐型活性及び、フロマチン結合RNAポリメラーゼ活性が著しく異なる未発芽胚と発芽3日芽生えのフロマチンの熱変性ポリ-レ-リジンとの結合性、DNA分解酵素に対する感受性、電顕観察から両者の構造的特性を比較した。その結果、フロマチンの構造が発芽ステータズで異なり、RNA転写活性に大きく影響しているものと考えられる。

フロマチン蛋白質が、発芽過程で著しく変動するフロマチンのRNA転写活性の調節に重要な役割を演じていると考えられる。そこで、フロマチンから24N硫酸に可溶性の蛋白質と不溶性の蛋白質を分画し、それぞれをSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけ分析し、発芽過程における変動を調べた(3)。その結果、分子量39,000, 41,000, 50,000のポリペプチドが未発芽胚と発芽24時間までの胚に特異的に存在するのに対して、分子量27,000のポリペプチドは存在せず、発芽48時間以後に出現する。また、ヒストンH1と塩基性非ヒストン蛋白質が発芽2日以後減少しているのが観察された。このように特定の蛋白質成分が発芽に伴って著しく変動するが、これら変動する成分の機能とくにフロマチンのRNA転写活性との関連は現在のところ不明であり、今後の課題である。

(1) Plant Physiol. 69: 497-501 (1977)

(2) *ibid.* 63: 1016-1021 (1979)

(3) *ibid.* 64: 780-785 (1979)

黒岩常祥・鈴木孝仁・河野重行（基生研、細胞生物）

葉緑体の発生、分裂増殖の機構を解明することは、植物生理学、特に光合成生理学の基礎的且つ重要な研究課題であろう。本研究では、これらの問題の解明に「オルガネラの核とゲノム」の概念を導入し、統一的に説明することを試みた。方法：約150種（10門、28綱）の植物の全体あるいは小断片にした葉などを、グルタルアルデヒドを含んだ Buffer-S (Suzuki et al 1980) 内で、おしつぶし固定し、改良 DAPI 法 (Kuroiwa et al 1979) で染色し、観察した。更に、必要に応じて、葉緑体核 (ct-核) の DNA 量を定量した (Kuroiwa et al 1979)。結果：検索した全ての植物のプロプラステドと葉緑体は ct-核を含んでいた。卵細胞、胚乳細胞のプロプラステドは1個の最小の ct-核 (ミニ ct-核) を含んでおり、その螢光量は T<sub>4</sub> フェージに等しいか僅かに多い程度である。この ct-核は種子形成、暗黒発芽の過程で、DNA 量の endoduplication による 7~8 倍の増加をともないながら体積を増大させる。次に光が照射されると、光合成ラメラの発達とともに、大きな1個の ct-核は分散しはじめる。完全に成熟した *Brassica* の葉緑体では約 14~28 個の ct-核をもつようになる。それらの ct-核はそれぞれ均一で、直径 0.4 μm の小球形であり、ミニ ct-核に酷似している。種子形成、暗黒発芽、緑化のそれぞれこの過程で、プロプラステドの分裂が観察された。以上の結果より、ミニ ct-核は最小量の ct-ゲノムを含んでいると考えられる。分裂周期：成熟した *Chlamydomonas* の葉緑体は約 10 個の ct-核を持っているが、細胞の生長とともに、それぞれの体積が増し、chloroplastkinesis 直前にそれぞれ核分裂をし約 40 個になる。次に 10 個ずつ 4 つの娘葉緑体に分配される。分裂に際して ct-核は亜鈴形となる。類似の ct-核変化は、葉緑体が 2 分裂を行う多くの陸生植物、*Cryptomonas* など の藻類でもみられた。葉緑体の発生と分裂周期過程を ct-ゲノムの考えをもとにまとめたものが図 1 である。分類：植物は ct-核のサイズ、数、分布から、次の 5 つに大別される (図 1)。① 葉緑体内に均一に分散した ct-核をもつ植物 (SA-type)。多くの陸生植物と緑藻。② 環状の ct-核をもつ植物 (CL-type)。Cyanidium、ほとんどの珪藻、褐藻。③ 葉緑体の周辺に分散された ct-核をもつ植物 (PS-type)。ほとんどの紅藻。④ ヒレノイドの周辺に局在した ct-核をもつ植物 (SP-type)。Bryopsis、Chlorrella など。⑤ 葉緑体の一部に凝縮塊を形成している ct-核をもつ植物 (CN-type)。Acetabularia が含まれる。種々の type の存在にかかわらず基本的に重要なことは「葉緑体のゲノムは光合成能の増加に先立つか、もしくはともなうって数 10~数 100 倍に増幅される」ということである。

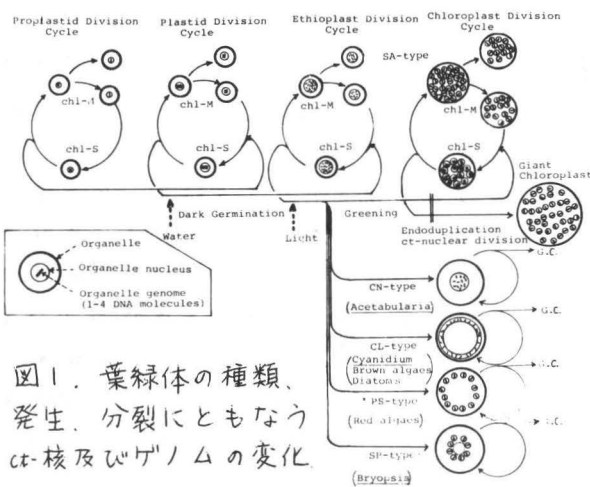


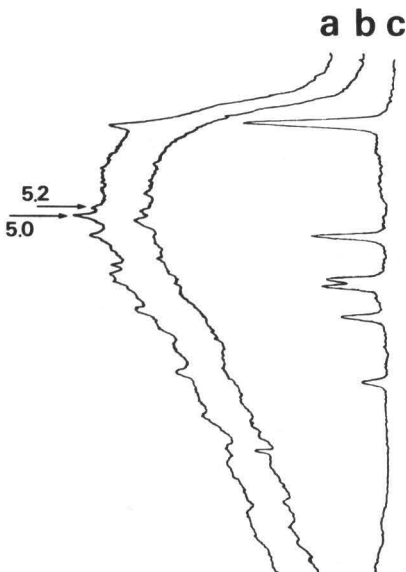
図 1. 葉緑体の種類、発生、分裂ともなう ct-核及びゲノムの変化

環状の ct-核をもつ植物 (CL-type)。Cyanidium、ほとんどの珪藻、褐藻。③ 葉緑体の周辺に分散された ct-核をもつ植物 (PS-type)。ほとんどの紅藻。④ ヒレノイドの周辺に局在した ct-核をもつ植物 (SP-type)。Bryopsis、Chlorrella など。⑤ 葉緑体の一部に凝縮塊を形成している ct-核をもつ植物 (CN-type)。Acetabularia が含まれる。種々の type の存在にかかわらず基本的に重要なことは「葉緑体のゲノムは光合成能の増加に先立つか、もしくはともなうって数 10~数 100 倍に増幅される」ということである。

杉浦昌弘, 犬野清春\* (国立遺伝研, \*農技研)

組換えDNA技術の育種への応用をめざし、立ち遅れている植物の分子遺伝学的研究を開始した。まず、植物の遺伝子重複とその構成を調べるため、重複の明らかなrRNA遺伝子の検出と分離を試みた。イネの核より抽出精製したDNAを、制限酵素EcoRIで完全分解し、0.7~1%アガロースゲル電気泳動で分画した。エチジウムブロマイドで濃く染まるバンド、6.6、5.9、5.2、5.0、1.6メガダルトン等が検出された。特に5.2と5.0メガダルトンのバンドが顕著であった。サザンハイブリッド法で調べると、イネの細胞質(5<sup>32</sup>P)25Sおよび17S rRNAとハイブリッド形成するバンドは、5.2と5.0メガダルトンのバンドであった。この両バンドの濃度比をマイクロデジタメーターで求めると(下図参照)、5.2メガダルトンバンドはイネ全DNA量の約0.08%、5.0メガダルトンバンドは約0.15%であった。イネのゲノム量(1.86 × 10<sup>12</sup>ダルトン/二倍体)より、イネのrRNA遺伝子の数は二倍体当り850コピーと算出された<sup>1)</sup>。この値は、ハイブリダイゼーション飽和曲線より得られた他の植物のrRNA遺伝子のコピー数と比べるとかなり低い。

一方、イネの全DNAを同様にEcoRI分解して分析すると、2.5メガダルトンの濃いバンドが余分に検出された。これは細胞質由来の反復配列DNAと考えられる。イネのような硬い葉から葉緑体を分離するのは極めて困難であることから、イネ全DNA標品から、イネ葉緑体のrRNA遺伝子を、タバコ葉緑体の(5<sup>32</sup>P)23S、16Sおよび5S rRNAをプローブとして、サザンハイブリッド法で検出を試みた。結果は、2.5メガダルトンのEcoRI断片に3種のrRNA遺伝子が存在していることが明らかになった<sup>2)</sup>。小麦から抽出精製した全DNAについても、イネの場合と同様の分析をしたところ、細胞質rRNA遺伝子は5.2メガダルトンのEcoRI断片に、また葉緑体rRNA遺伝子は7.0メガダルトンのEcoRI断片に乗っていることが明らかになった。



- 1) K. Oono & M. Sugiura, Chromosoma (Berl.) in press.
- 2) M. Sugiura & K. Oono, Plant Science Letters, in press.

左図は、イネ核DNAのEcoRI分解物のアガロースゲル電気泳動のマイクロデジタメーターによるトレース図 a: EcoRI-イネDNA + EcoRI-λDNA、b: EcoRI-イネDNA、c: EcoRI-λDNA。上より下へ泳動。

タバコ葉緑体 4.5S および 5S リボソーム RNA 遺伝子の全塩基配列の決定

高岩文雄、杉浦昌弘 (国立遺伝研、分子遺伝部)

葉緑体は細胞質と大きさの異なる 70S リボソームを有している。このリボソームには 16S、23S、5S RNA の他に高等植物に特異的な 4.5S RNA 種が存在し、16S は小亜粒子に 23S、5S および 4.5S RNA 種は大亜粒子に由来する。

我々はすでにこれら葉緑体リボソーム RNA 遺伝子の構造を解析する目的で、タバコ葉緑体リボソーム RNA 遺伝子を大腸菌プラスミド pMB9 をベクターとしてショットガン法でクローニングし、これらリボソーム RNA 遺伝子が 1 コピーづつ 16S → 23S → 4.5S → 5S の順に配列している事、16S と 23S の間には約  $1.2 \times 10^6$  ダルトンのスペーサーが存在し、23S と 4.5S の間には  $0.9 \times 10^6$  ダルトンのスペーサーが存在する事などを明らかにしてきた。

そこで今回さらに 4.5S および 5S RNA 遺伝子の詳細な構造および発現機構、さらに葉緑体の進化的起源を探る目的で、これら両遺伝子のみを含む組換えプラスミド (pTC7) を作成し、このプラスミド DNA を使い、マキサム・ギルバート法で 4.5S、5S RNA 遺伝子およびその近傍の塩基配列 (約 700 塩基対) の決定を行なった。一方 4.5S および 5S RNA 遺伝子 (コード部位) の正確な位置を決めるため、それぞれの RNA について 5' 端を T4 ポリヌクレオチドキナーゼと  $\gamma$ - $^{32}$ P-ATP でラベルし酵素法で、3' 端を T4 RNA リガーゼと  $5'$ - $^{32}$ P-pCp でラベルし、*direct chemical digestion* 法で末端構造を決定した。

<結果> ① 4.5S RNA は 103 塩基より、5S RNA は 121 塩基よりできており、これらの両 RNA 遺伝子の間には 260 塩基対のスペーサーが存在する。5S RNA 分子内にはかなりの相補的塩基対をつくる構造が見られ、折りたたまれた構造をとると思われるのに対し、4.5S RNA 中には相補的塩基対はほとんどない。

② 4.5S RNA のコード部位の下流域には原核生物や真核生物のターミネーター部位に特徴的な構造が見られ (2 回回転対称構造)、その下流域には A-T に富んだ長い繰返し構造、さらに 2 回回転対称構造が続いていた。

③ 5S RNA コード部位上流域にはバクテリアのプロモーター部位に見られる特徴的な塩基配列 (*Pribnow box*) に類似した構造が見られた。

④ 5S RNA コード部位下流域にはコード部位にそって *direct repeat* 構造、ターミネーター部位に特徴的な 2 回回転対称構造、そして非常に A-T に富んだ構造が続いていた。従ってこれらの塩基配列の決定から、5S RNA 遺伝子は固有のプロモーターを有し、4.5S 遺伝子 (おそらく 23S、16S 遺伝子を含め) とは独立して転写されていることが予想された。

さらに今回塩基配列を決定した 5S RNA を使い、葉緑体の進化的位置や起源を推定する目的ですでに報告されている 5S RNA 種との比較を行った。その結果葉緑体 5S RNA は非常にラン藻の塩基配列と類似している事を知る事ができた。これは葉緑体がラン藻起源だとする共生説を支持できる。



# 人名索引

<p><b>あ</b></p> <p>赤沢 堯 148, 149, 150, 151</p> <p>安芸 誠悦 94</p> <p>明田川 純 33</p> <p>秋山 高 187</p> <p>浅井 一視 128</p> <p>浅田 浩二 19, 20, 72, 73, 74, 75, 141</p> <p>浅見 純生 150, 151</p> <p>浅水 哲也 88</p> <p>芦原 坦 84, 166</p> <p>阿部 摂津子 56</p> <p>天笠 正 26</p> <p>有賀 祐勝 17</p> <p><b>い</b></p> <p>飯島 敏夫 122, 123</p> <p>伊賀上 郁夫 87</p> <p>井城 克廣 91</p> <p>井口 昌一郎 210</p> <p>池内 昌彦 173</p> <p>池上 勇 139, 145</p> <p>石川 依久子 216</p> <p>石川 鉦 94</p> <p>石川 桃代 56</p> <p>石田 由美子 165</p> <p>石埜 路子 33</p> <p>磯谷 遙 117</p> <p>磯野 高敬 18</p> <p>井田 正二 32</p> <p>市川 義章 49</p> <p>出井 満 190</p> <p>伊藤 繁 65, 67, 68</p> <p>伊藤 秀三 91</p> <p>井上 弘 193</p> <p>井上 雅裕 100</p> <p>井上 康則 4, 43, 44</p> <p>井上 祐司 88</p> <p>井上 頼直 38, 144</p> <p>猪川 倫好 152</p> <p>今泉 和光 54</p>	<p>今関 英雅 112, 113</p> <p>今村 順 218</p> <p>岩井 純夫 29, 219</p> <p>岩崎 尚彦 128</p> <p>岩村 達一 214</p> <p>岩屋 真理 181</p> <p><b>う</b></p> <p>上田 純一 185</p> <p>宇佐美 究 175</p> <p>白田 秀明 154</p> <p>瓜谷 郁三 220</p> <p><b>え</b></p> <p>江刺 洋司 109, 110</p> <p><b>お</b></p> <p>大城 香 16</p> <p>太田 行人 204</p> <p>太田 喜元 56</p> <p>大谷 武 40</p> <p>大塚 隆 23</p> <p>大野 清春 223</p> <p>大西 純一 14, 174</p> <p>大羽 和子 220</p> <p>大浜 多美子 146</p> <p>大平 幸次 28</p> <p>大森 正之 35</p> <p>大宅 秀史 48</p> <p>大屋 俊英 188</p> <p>岡上 伸雄 177</p> <p>緒方 惟昭 127</p> <p>岡田 俊也 75</p> <p>岡村 和夫 69, 70</p> <p>岡本 きく子 125</p> <p>岡本 剛 163</p> <p>岡本 敏彦 117</p> <p>岡山 繁樹 140</p> <p>小川 晃男 38</p> <p>奥 達雄 143</p> <p>長船 哲齊 211</p> <p>押野 礼子 76</p>	<p>小野 高明 9</p> <p>小幡 寛 137</p> <p><b>か</b></p> <p>栲田 聖孝 11</p> <p>賀来 章輔 181</p> <p>片岡 博尚 41</p> <p>片山 舒康 186</p> <p>加藤 潔 126</p> <p>加藤 研治 56</p> <p>加藤 栄 21, 135, 136, 138</p> <p>加藤 次郎 185</p> <p>加藤 哲也 18</p> <p>加藤 真弓 88</p> <p>加藤 美恵子 107</p> <p>加藤 陽治 91, 92</p> <p>加藤 良一 96</p> <p>門田 明雄 42</p> <p>角野 富三郎 61, 62, 63</p> <p>金松 澄雄 73, 74</p> <p>上池 伸徳 130, 131, 132</p> <p>神阪 盛一郎 114</p> <p>紙田 祐介 79</p> <p>神谷 明男 145</p> <p>蒲生 賢次 164</p> <p>加茂川 恵司 139</p> <p>河井 聖司 177</p> <p>川島 伸麿 29, 164, 219</p> <p>川辺 由紀子 97</p> <p>川本 公成 82</p> <p><b>き</b></p> <p>岸本 卯一郎 130, 131, 132</p> <p>北岡 正三郎 157</p> <p>木村 元彦 172</p> <p>清沢 桂太郎 120, 121</p> <p><b>く</b></p> <p>久保井 徹 184</p> <p>熊谷 忠 40</p> <p>久米 直明 18</p> <p>倉石 晋 100, 192</p>
---	--	--

黒岩常祥	222	嶋田誠一	19, 20	竹田淳子	49, 50
こ		清水摂子	55	武田宏	90
古池直子	29	清水孝子	152	竹葉剛	182
小池裕幸	21	清水正俊	87	田沢仁	129
河野重行	222	代谷康	169	田中弘一郎	61
河野均	55	首藤紘一	117	田中利典	14
小島邦彦	92	庄野邦彦	52, 115	田中美称子	50
後藤健	201	新勝光	76	谷本静史	197
後藤伸治	39	新免輝男	129	田幡憲一	65
小西通夫	196	す		田村五郎	33, 34
小林久美子	140	菅原康剛	179	ち	
小林善親	144	杉浦昌弘	223, 224	馳澤盛一郎	52
小松みづほ	168	杉田護	221	茶原和也	82
駒嶺穆	89, 215	杉山達夫	155, 156	つ	
小山元子	106	鈴木健策	152	辻英夫	191
近藤孝男	202, 205	鈴木浩一	24	続伯彦	203
近藤矩朗	93, 147, 194, 195	鈴木孝仁	222	と	
さ		鈴木恕	186, 187, 188, 189	遠山鴻	209
斉藤和実	167	鈴木英雄	5	徳永薫	217
斉藤晃司	165	鈴木雅文	39	戸高功	112, 113
酒井昭	178	鈴木幸雄	162	富岡登	171
榊剛	147	鈴木米三	27, 114	な	
坂野勝啓	31	須田省三	125	内藤邦彦	188, 189
先浜直子	76	せ		長尾照義	219
桜井直樹	99	千田貢	49, 50	中島信昭	139
桜井英博	23, 64	た		中島秀明	206
佐々木喜美子	94, 221	高市真一	58	中田和男	219
佐渡守	151	高岩文雄	224	長田敏行	52
佐藤和彦	21, 135, 136, 138	高桑進	112	中村輝子	97
佐藤茂	109, 110	高野誠	141	中村運	213
佐藤直樹	9, 176	高橋英一	32	仲本準	156
佐藤文彦	53, 54, 153	高橋惣四郎	117	に	
佐藤八十八	85, 86	高橋英樹	48	西荒介	88, 212
佐藤良	205	高橋正昭	19, 20, 72, 141	西田晃二郎	153
佐野哲男	192	高橋裕一郎	21	西谷和彦	98
寒川喜三郎	30	高浜有明夫	71	西成典子	115
し		高宮建一郎	77	西野孝	111
鹿野英美子	210	田川不二夫	178	西村隆雄	214
篠原健司	64	滝本敦	198, 199	西村幹夫	148, 149
柴岡孝雄	122, 123	竹内裕子	130, 131, 132	西村光雄	65, 66, 68
柴岡弘郎	105, 106, 107	竹内正幸	179	新田毅	48
島崎幸雄	44	竹内裕一	89		

の		藤田善彦	16, 17	村田恵理子	175
野沢庸則	60	船隈透	82	村田紀夫	9, 176
野村港二	48	古田求	220	室岡葉子	165
は		古谷雅樹	42, 43, 44, 108	も	
芳賀敏実	157	へ		本尾真	103
橋本健	66	別府敏夫	199	森克彦	179
橋本隆	53	ほ		森博行	200
長谷栄二	146	星名哲	10	森田耕吉	13
長谷川聡	208	細川浩	120	森田茂廣	58, 59, 60
畑中信一	165	堀内大介	22	森田真次	68
波多野昌二	11	堀尾武一	62, 63	守家成紀	212
簇野昌弘	60	ま		森脇晃義	170
服部真二	124	前田芳夫	43	や	
花田博幸	77	増田誠	142	安田武司	53, 54
早川孝彦	74	増田芳雄	98, 99, 114	柳島直彦	208, 209
林真一	210	松島久	179	柳田友道	212
林隆久	92	松田和雄	91, 92	山内稔	159
林秀則	59, 60	松田英幸	62	山木昭平	83
原彰	82	松原聡	182	山岸明彦	136
原田宏	197, 218	松山晋	29, 219	山口益郎	30
春邦磨	188, 189	真鍋久徹	28	山崎健一	155
ひ		間藤徹	32	山崎良樹	162
日裏久英	63	丸田一成	194, 195	山下仁平	61, 62, 63
日野精一	170, 171	み		山下魏	142
兵藤宏次	111	三浦喜温	172	山下通治	30
平沢栄次	27	水田俊	101	山田晃弘	14, 85, 174, 175
平沢正一	34	水野孝一	106	山田康之	53, 54, 153
平野昌彦	138	三田高志	105	山田芳雄	158, 159
平山修	13, 62	水上誠	102	山中健生	78, 79
広川豊康	90	皆川美由紀	48	山元皓二	217
広瀬善雄	56	峰雪芳宣	108	山本興太朗	45
ふ		三室守	17	山本良一	99
福田重夫	163	宮内聡	87	よ	
福田裕穂	215	宮尾光恵	59	横田明穂	157
福本順子	203	宮崎龍雄	8	横山裕彰	172
福森義宏	78	宮田進	114	吉井博	113
藤井國博	184	宮本和久	172	吉田和夫	51
藤井敬子	79	三好泰博	205	吉田和市	196
藤伊正	96	む		吉田静夫	12, 178, 180
藤岡隆昭	94	武藤尚志	154	吉田精一	26
藤茂宏	22, 69, 70	村上悟	173, 175	吉田秀世	128
藤田稔夫	198	村上浩	116	吉田文武	55

吉原 経太郎	139	渡辺 仁	124	R. R. Pachpande	214
米林 文子	193	権 寧命	158	J. Perlman	206
<b>わ</b>		趙 暎東	158	W. S. Sakai	8
若松 国光	140	李 舜熙	158	J. A. Schiff	211
和田 俊司	101, 102, 103	R. Douce	148, 149	H. Senger	2
和田 正三	104	G. E. Edwards	154	W. O. Smith, Jr.	45
渡部 一夫	198	J. Feldman	206	P. S. Song	6
渡辺 紳一郎	14	M. W. Fowler	84	L. A. Staehelin	104
渡辺 恒雄	93	F. A. Loewus	167	M. Williams	167
渡部 教子	137	J. E. Merrill	17	H. Y. Yamamoto	8

## 1980年度年会および第20回シンポジウム

### 準備委員会委員

(50音順)

加藤 栄*	熊沢 喜久夫
柴岡 弘郎*	田沢 仁
古谷 雅樹	宮地 重遠 <sup>o*</sup>
村上 浩	村田 吉男
山田 晃弘	大浜 多美子
武藤 尚志*	

<sup>o</sup> 印は準備委員長

\* 印は、プログラム編集委員