

イネにおけるNADH依存性グルタミン  
酸合成酵素に関する研究

— 単離・精製と免疫学的手法による  
その役割の解析

早川俊彦

## Abbreviations

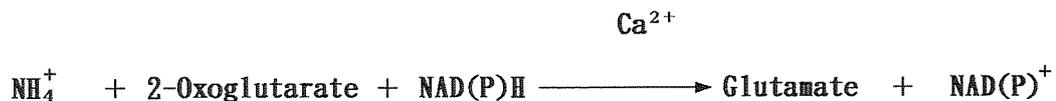
|                   |  |
|-------------------|--|
| BCIP              | 5-bromo-4-chloro-3-indoxyl phosphate                           |
| BPB               | bromophenol blue   |
| BSA               | bovine serum albumin   |
| CBBR-250          | coomassie brilliant blue R-250                                 |
| Fd                | ferredoxin   |
| Fig.              | Figure   |
| GDH               | glutamate dehydrogenase  |
| GOGAT             | glutamate synthase   |
| GS1               | cytosolic glutamine synthetase                                 |
| GS2               | chloroplastic glutamine synthetase                             |
| IDH               | isocitrate dehydrogenase                                       |
| IgG               | immunoglobulin G   |
| NAD <sup>+</sup>  | nicotineamide adenine dinucleotide, oxidized form              |
| NADH              | nicotineamide adenine dinucleotide, reduced form               |
| NADP <sup>+</sup> | nicotineamide adenine dinucleotide phosphate,<br>oxidized form |
| NADPH             | nicotineamide adenine dinucleotide phosphate,<br>reduced form  |
| NBT               | nitroblue tetrazolium  |
| NiR               | nitrite reductase  |
| NR                | nitrate reductase  |
| PAGE              | polyacrylamide gel electrophoresis                             |
| PBS               | phosphate-buffered saline                                      |
| SDS               | sodium dodecyl sulphate  |
| TBS               | Tris-buffered saline   |
| v/v               | volume per volume  |
| w/v               | weight per volume  |

## 目次

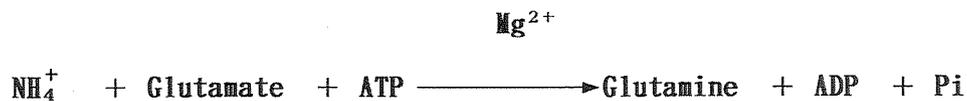
|   |       |
|---|-------|
| 序論  | (1)   |
| 第一章 イネ培養細胞からのNADH-GOGATの精製とその酵素学的、<br>免疫化学的特性 |       |
| 第一節 緒言  | (9)   |
| 第二節 材料及び方法                                    | (10)  |
| 第三節 結果  | (23)  |
| 第四節 考察  | (50)  |
| 第二章 イネ着生葉におけるNADH-GOGAT活性と蛋白質の葉位別分布           |       |
| 第一節 緒言  | (56)  |
| 第二節 材料及び方法                                    | (59)  |
| 第三節 結果  | (66)  |
| 第四節 考察  | (78)  |
| 第三章 イネの登熟過程におけるNADH-GOGAT活性と蛋白質の挙動            |       |
| 第一節 緒言  | (82)  |
| 第二節 材料及び方法                                    | (84)  |
| 第三節 結果  | (91)  |
| 第四節 考察  | (105) |
| 総合考察  | (109) |
| 要約  | (114) |
| 謝辞  | (115) |
| 引用文献  | (116) |

## 序論

窒素は植物にとって最も不足しやすい必須元素であり、植物の生長を直接支配する因子の一つである。高等植物は、そのライフ サイクルにおいて、光合成を行うとともに窒素を効率良く利用して、独立栄養を営む。この窒素代謝においては、アミノ基またはアミド基の炭素骨格への授受とNを含む炭素骨格の他形への変換が基本反応となる。グルタミン酸はこの窒素代謝の中心となるアミノ酸の一つであり、グルタミン、プロリン、アルギニンなどのアミノ酸やクロロフィルなどの合成に直接利用されるのみならず、アミノ基転移反応において他のアミノ酸合成に関与する(Sechley et al, 1992)。グルタミン酸の合成には、高等植物においても、微生物と同様に主にグルタミン酸脱水素酵素(GDH ; EC 1.4.1.4)が関与すると長い間考えられていた。その反応は、以下に示すようにアンモニアと2-オキソグルタル酸からアミネーション反応によってグルタミン酸を生成する。

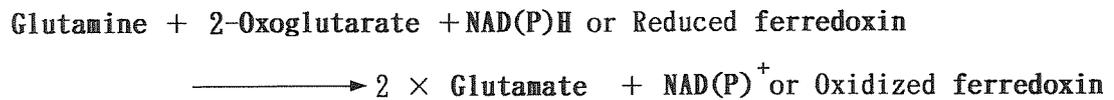


しかし、グルタミン合成酵素(GS ; EC 6.3.1.2) は以下の反応によって、アンモニアとグルタミン酸からグルタミンを合成し、しかもアンモニアに対する親和力がGDH よりも高いことから、アンモニア同化の面でGSが植物体内では主に機能し得ることが明かとなった(Kanamori and Matsumoto, 1972 ; O'Neal and Joy, 1973 ; Mifflin and Lea, 1977)。



更に、1974年にグルタミン酸合成酵素(GOGAT ; glutamine : 2-oxoglutarate aminotransferase) の活性が植物体内に存在することが確認され、しかもGSと共役して、各1分子のグルタミンと2-オキソグルタル酸から、電子供与体の存在下、

2分子のグルタミン酸を合成することが明かにされた(Daugall, 1974 ;Fowler et al., 1974 ; Lea and Mifflin, 1974) 。 その反応を以下に示す。



この共役酵素系はGS / GOGAT cycleと一般に呼ばれる(Fig.1) 。 重窒素標識アンモニアが最初にグルタミンのアミドにとりこまれる結果や、GSとGDHのNH<sub>4</sub>に対する親和力の差、及び突然変異体を用いた結果等を総合して、現在では、植物においては、GOGATがグルタミン酸の合成に直接関与すると考えられている(Srivastava and Singh, 1987 ; Magalhaes et al., 1990 ; Sechley et al., 1992) 。

高等植物には、電子供与体を異にするGOGATが少なくとも2種類存在する。一つは還元型のフェレドキシン(Fd)を電子供与体とするFd依存性GOGAT(Fd-GOGAT ; EC 1.4.7.1)であり、もう一つはNADHから電子伝達を受けるNADH依存性GOGAT(NADH-GOGAT ; EC 1.4.1.14)である(Sechley et al., 1992) 。 なお、微生物と同様にNADPH依存性GOGAT(NADPH-GOGAT ; EC 2.6.1.53)活性の存在も報告されている(Sechley et al., 1992) 。 しかし、NADPH-GOGAT活性は無菌植物や培養細胞においても検出されることから少なくとも微生物由来の活性ではないことが証明されているものの、その反応のみを触媒する酵素は単離されていない(Suzuki et al., 1984b ; Suzuki et al., 1987)。

Fd-GOGATは、緑葉の可溶性蛋白質の0.2 ~0.5 %を占め比較的多量に存在することから、イネ、エンドウ、ホウレンソウ等、多くの植物葉から高度に精製されており、その酵素蛋白質の特性が明かにされてきた(Suzuki and Gadal, 1982 ; Match et al., 1980 ; Hirasawa and Tamura, 1984 ; Marquez et al., 1988) 。 未変性のFd-GOGATの分子量は140 ~244kDである。ホウレンソウ(Hirasawa and Tamura, 1984)とオオムギ(Marquez et al., 1988)のFd-GOGATは単量体と報告されているが、イネでは分子量115kDのホモ二量体と報告されていた(Suzuki

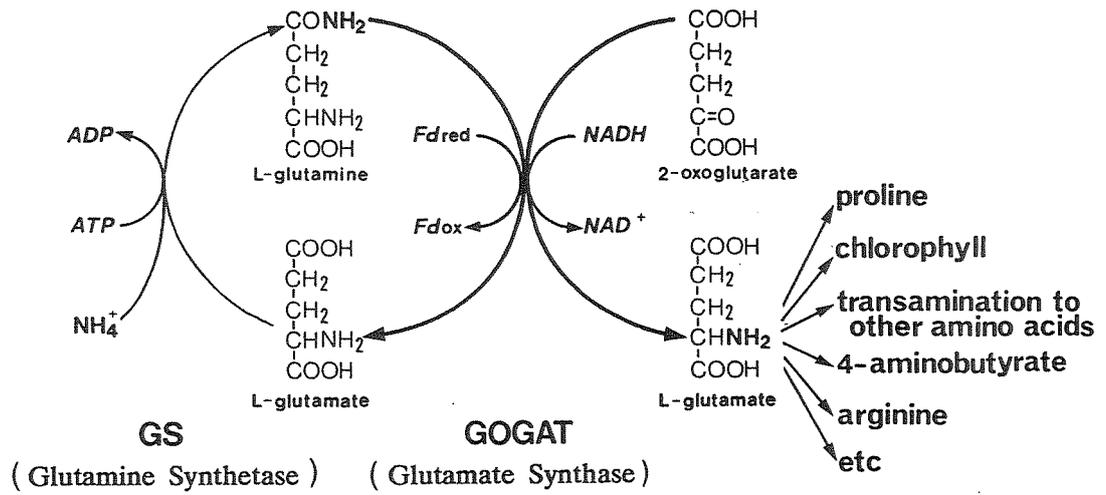


Figure 1. The GS/GOGAT cycle.

and Gadai, 1982)。しかし、当研究室の知見では、イネのFd-GOGATは分子量160kDのポリペプチド単量体から構成されている結果が得られており(Hayakawa et al., 1990)、他の植物の結果と一致している。Fd-GOGATは鉄・硫黄クラスターを含むフラボ蛋白質であることが明かにされている。また、多くの植物葉由来のFd-GOGATに対する特異抗体も作成されており、活性レベルの研究に加え、免疫化学的手法による以下のような解析も行われてきた。Suzuki et al. (1982; 1984a; 1984b; 1987)は抗イネ葉Fd-GOGAT抗体を用い、イネの緑葉、黄化葉、及び根に存在するFd-GOGATは各々抗体の認識性が異なることや、同抗体がタバコ、ダイズ、トウモロコシ等の他の植物種のFd-GOGATを認識することを報告した。また、Fd-GOGATは細胞内オルガネラ分画法により緑葉においては葉緑体に局在し(Matoh and Takahashi, 1981; Wallsgrobe et al., 1982)、根や根粒ではプラスチドに局在することが示されている(Suzuki et al., 1985)。特にBotella et al. (1988)は抗トマト葉Fd-GOGAT抗体を用い、トマト緑葉において、Fd-GOGATが葉肉細胞の葉緑体のストロマに存在することを免疫電子顕微鏡法により確認した。また、当研究室のKamachi et al. (1992b)は同じくC3植物のイネの緑葉において、Fd-GOGATが葉肉細胞に主に存在することをTissue printイムノプロット法により示した。Fd-GOGATの分子サイズが巨大なことから、高度精製標品や特異抗体が得られているにも関わらず、Fd-GOGATをコードする遺伝子の単離は長い間報告例がなかった。しかし、1991年にSakakibara et al.によりトウモロコシ葉のFd-GOGATの全一次構造をコードするcDNAが初めて単離され、またZehnacker et al. (1992)は、タバコ葉のFd-GOGATの一次構造の約7割を含むcDNAの単離に成功した。トウモロコシ葉Fd-GOGATのcDNAの構造解析の結果、同酵素は葉緑体へのトランジット配列と推定される97アミノ酸残基の延長ペプチドと1519アミノ酸残基の成熟体領域から構成されていることが明かとなった。またゲノミックサザンプロット分析から、トウモロコシ葉ゲノムではFd-GOGAT遺伝子はシングルコピーであることも確認された。タバコFd-GOGAT cDNAの部分配列とトウモロコシFd-GOGATのcDNAの塩基配列から推定されるアミノ酸配列の相同性は、約85%と高いものであった。また、トウモロコシFd-GOGATと *E. coli* K-12 NADPH-

GOGAT (Olivier et al., 1987)のLarge subunit は、アミノ酸配列として約42%の相同性を有していた。 これら3種のGOGAT cDNAの共通構造中には、酵母の乳酸：チトクロムC還元酵素のFMN結合領域と極めて類似した配列も見出だされている。 また、以前から活性と蛋白質レベルでFd-GOGATが光により誘導的に発現してくることが報告されていたが(Suzuki et al., 1982 ; Matoh and Takahashi, 1981 ; Wallsgrove et al., 1982 ; Suzuki et al., 1987) 、この誘導が転写レベルで調節されていることもノーザン解析から示唆された(Sakakibara et al., 1992)。

非緑色組織におけるFd-GOGATの生理的役割は不明である。 しかし、Fd-GOGATが多量に存在する緑葉では、Fd-GOGATを欠損したシロイナズナ及びオオムギの変異体を用いた研究により、その役割が明らかにされてきた。 これらの変異体は、光呼吸の生ずる通常の大気条件下では光呼吸系の代謝中間体を蓄積して枯死に至る結果から、光呼吸系代謝の際にミトコンドリア内でグリシンからセリンへの変換過程で多量に生ずるアンモニアの再同化を、葉緑体型GS<sub>2</sub>と共に行うことであるものと結論されている(Somerville and Ogren, 1980 ; Kendall et al., 1986 ; Wallsgrove et al., 1987)。 多くの研究結果に基づき、現在考えられている光呼吸系のモデルをFig. 2 に示した。

NADH-GOGATはマメ科植物の根粒を除き、Fd-GOGATに比較して植物体内における活性は極めて低く、しかも失活しやすいことなどから、1974年にDaugall や Fowler et al. が発見してから現在にいたるまで部分精製標品しか得られていなかった(Matoh et al., 1980 ; Chiu and Shagool, 1979 ; Avila et al., 1987) 。 マメ科植物の根粒のNADH-GOGATについては、蛋白質レベルでの研究が比較的進んでいる。 ChenとCullimore (1988)は、インゲンの根粒から2種類のNADH-GOGAT (NADH-GOGAT I , NADH-GOGAT II) を高度に精製し、NADH-GOGAT II が根粒の発達に伴い活性が増加することを示した。 また、Anderson et al. (1989) はアルファルファの根粒からNADH-GOGATを部分精製した後、調製用SDS-PAGEに供して高度に精製したNADH-GOGATポリペプチドをウサギに免疫して、抗体の作製に成功した。 しかし、この抗体はマメ科植物の根粒のNADH-GOGATを認識するものの、根や葉に存在するNADH-GOGATを認識しなかった。 従って、根粒以外の組織に存在する

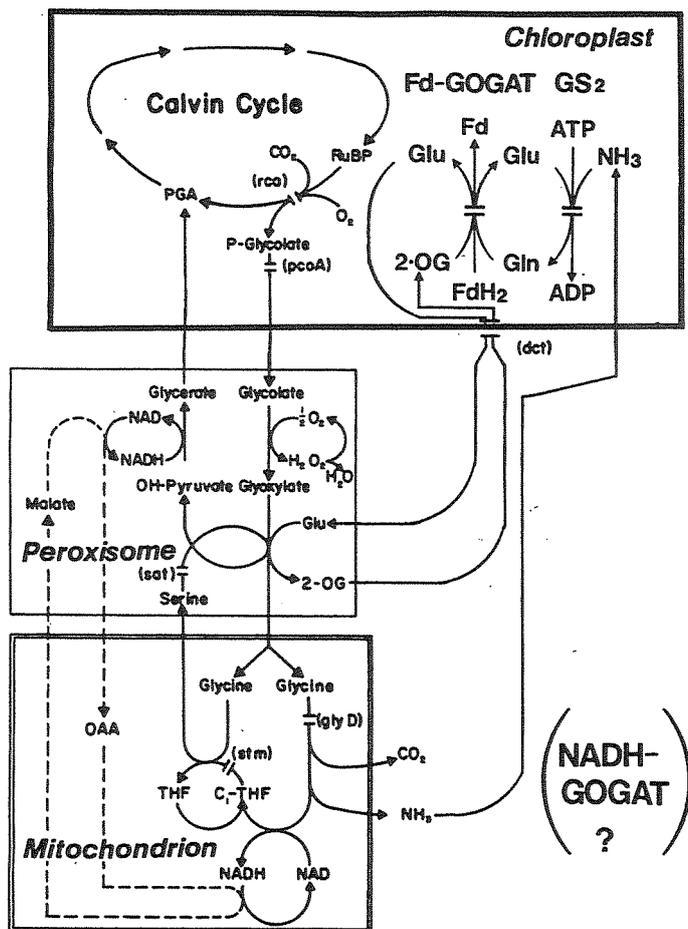


Figure 2. Photorespiration. Enzyme lesions in the mutants of Barley and Arabidopsis are indicated by † .

NADH-GOGATの免疫学的な解析は不可能であった。このように、NADH-GOGATについては、同酵素をコードする遺伝子はおろか、根粒以外の組織のNADH-GOGATを認識し得る特異抗体すら得られていない。また、NADH-GOGATの細胞内の存在場所も明確にされていない。細胞内分布に関しては、細胞内オルガネラ分画法により葉では葉緑体に(Matoh and Takahashi, 1981)及び根ではプラスチドに(Suzuki et al., 1981)存在することが一方では示唆されていた。しかし、Hecht et al. (1988)は、葉緑体を含めたプラスチドを破壊する薬剤であるノルフラーゾン(Nhf)で処理したカラシ幼植物において、Fd-GOGAT活性は失われるがNADH-GOGAT活性に影響がない結果を示し、NADH-GOGATは細胞質に存在するものと報告した。

NADH-GOGATの植物生体内での生理的役割はいまだ不明なままである。しかし、Fd-GOGATを欠損した変異体は光呼吸の生じない低 $O_2$ あるいは高 $CO_2$ の環境下では正常な生育を示し、かつNADH-GOGAT活性を有することから、NADH-GOGATが光呼吸以外の窒素代謝の主要な部分を担っているものと推定されていた(Morris et al., 1989)。また、緑藻の *Chlamydomonas* においては、NADH-GOGATは暗所でのアンモニア同化に重要であるとの報告例がある(Cullimore and Sims, 1981)。また、Matoh とTakahashi(1981)は、エンドウ幼植物葉のGOGATの活性比が、その緑化過程において、NADH-GOGATが減少し、Fd-GOGATが増加することから、従属栄養から葉緑体が成熟し植物体が完全な独立栄養を営むまでの遷移期間において、NADH-GOGATが窒素代謝において重要な役割をもつという仮説を提唱した。

ところで、イネ(*Oryza sativa* L.)は世界人口の5割以上が主食とし、世界の全耕地面積の約20%で栽培され、その穀物生産高は全体の約25%にも及ぶ主要な穀物である。当研究室では、直接イネの生産性に関与する窒素代謝に関して、様々な局面からこれまでに研究成果を得て来たが、光呼吸系以外でのグルタミン酸合成に関わる知見は世界の研究例と同様に得られていなかった。

そこで、本研究ではイネを研究材料に用いてNADH-GOGATを高度に精製し、世界に先がけてその特異抗体を得て、NADH-GOGAT蛋白質の特性を免疫学的に明らかにするとともに、いまだ不明なNADH-GOGATの生理的機能を探求することを目的とし

た。そのため、以下の3点から研究を行った。なお下記の1において増殖初期のイネ培養細胞がイネ個体に比較して高いNADH-GOGAT活性を有することを確認したため(Hayakawa et al., 1990)、NADH-GOGATの精製はイネ培養細胞から行った。また、2, 3ではイネの窒素転流過程に焦点をあてNADH-GOGATの生理的役割を考察した。

1. イネ培養細胞からのNADH-GOGATの精製とその酵素学的、免疫化学的特性
2. イネ着生葉におけるNADH-GOGAT活性と蛋白質の葉位別分布
3. イネの登熟過程におけるNADH-GOGAT活性と蛋白質の挙動

本研究において、イネ培養細胞からのNADH-GOGATの純化と、その特異抗体の作製に成功した。この抗体はイネの各器官のNADH-GOGATを認識した。また、NADH-GOGATはFd-GOGATと免疫化学的に異なる蛋白質分子であることが判明した。更に、イネの若い組織において、老化組織から転流して来た窒素をアミノ酸代謝の中心に位置するグルタミン酸へ、NADH-GOGATが変換している可能性を強く示唆する結果を得た。

第一節 緒言

GOGAT は、1970年にTempest et al.により、アンモニアを制限基質として培養した *Aerobacter aerogenus* でNADPH 依存性のGOGAT が初めて発見された。1974年には高等植物においても、NADH-GOGAT活性がニンジン培養細胞(Dougall)とエンドウ根(Fowler et al.)で確認され、また、Fd-GOGAT活性もエンドウ葉の葉緑体中に見い出された(Lea and Mifflin)。高等植物のFd-GOGATは、イネ、トマト、トウモロコシ等の種々の植物葉から高度に精製されており、その特異抗体も作製されている(Sechley et al., 1992)。当研究室でも、既にイネ緑葉からFd-GOGATを高度に精製し、その特異抗体を作製済みである(Hayakawa et al., 1990)。1991年にはSakakibara et al.により、トウモロコシ(*Zea mays* L.)葉のFd-GOGATの全一次構造を含むcDNAが得られ、蛋白質レベルでの解析に加え、遺伝子レベルでの解析も進行しつつある。しかし、植物のグルタミン酸合成に直接関与しているにもかかわらず、NADH-GOGATの研究は極めて遅れており、高度精製標品の調製や植物葉や根のNADH-GOGATを認識する特異抗体の獲得例はこれまでに皆無であった。そこで本章では、イネ(*Oryza sativa* L. cv Sasanishiki)のNADH-GOGATの酵素的性質を詳細に調べるとともに、その蛋白質的特性を免疫化学的手法を用いて明らかにするため、イネNADH-GOGATの高度精製標品の調製及びその特異抗体の作製を行った。一般に、NADH-GOGAT活性は根(Suzuki et al., 1982)、黄化幼植物(Matoh et al., 1980)、培養細胞(Hayakawa et al. 1990)等の非緑色組織で検出される報告例が多い。しかし、エンドウ幼植物の黄化地上部(Matoh et al., 1980)、トマト葉(Avila et al., 1984)、トウモロコシ子実の胚乳(Muhitch, 1991)からのNADH-GOGATの精製は試みられて来たものの、いずれも部分精製標品しか得られなかった。1974年から現在にいたるまでNADH-GOGATの部分精製標品しか得られなかった理由として、マメ科植物の根粒を除き、植物体

内におけるNADH-GOGAT活性はFd-GOGAT活性に比較して極めて低く、しかも失活し易いことなどが挙げられる。アルファルファの根粒においてはNADH-GOGATが可溶性蛋白質の約0.5%を占め(Anderson et al., 1989)、緑葉のFd-GOGAT含量に匹敵する。しかし、アルファルファの根粒を精製材料とした場合でさえ、抽出後のNADH-GOGAT活性は急激に失活し、その精製は2日間以内に成される必要があると報告されている(Anderson et al., 1989)。本研究においては、精製に先立ち、ササニシキ種子の胚から誘導したカルスをR2液体培地で懸濁培養し、その培養過程のGOGAT活性の変化をまず解析した(Hayakawa et al., 1990)。その結果、イネ培養細胞ではイネ個体植物の各組織とは異なり、全生育期間を通じてNADH-GOGAT活性がFd-GOGAT活性よりも高く、しかも、培養初期のイネ細胞ではNADH-GOGATの可溶性蛋白質当たりの活性がイネの各組織よりも極めて高いことが判明した。そこで、NADH-GOGATの精製には培養初期のイネ細胞を供した。高等植物体のNADH-GOGATの高度精製とその特異抗体の作製に成功したことは、世界で初めてのことである。また本章では、抗イネ培養細胞NADH-GOGAT抗体と抗イネ葉Fd-GOGAT抗体を用いて、NADH-GOGATとFd-GOGATの蛋白質構造の比較を免疫化学的に解析するとともに、イネ培養細胞NADH-GOGATのアミノ酸配列の情報を得る目的で、NADH-GOGAT精製標品のN末端アミノ酸配列の決定を行った。更にイネ生体内の窒素代謝におけるNADH-GOGATの重要性を評価解析する次章からの研究に先立ち、解析対象とするイネの器官を特定し、また本章で得られた抗NADH-GOGAT抗体の汎用性についても検討した。

## 第二節 材料及び方法

### 植物材料

イネ培養細胞は、1987年にイネ(*Oryza sativa* L. cv Sasanishiki)種子の胚からカルス誘導し、ついで懸濁培養した細胞を実験に供した。イネ細胞は、200mLのR2液体培地の入った500mL容の三角コルペン中にて、25℃で2,000lux.

の連続光下、120rpmの回転振とう培養を行った。細胞の継代は、21日ごとに新鮮重として約1gの細胞を新しい培地へ移植して行った(Hayakawa et al., 1990)。精製材料には、上記培養条件下で、定常期となった新鮮重として約12gの細胞を新鮮な培地へ移植して、更に3日間培養した増殖初期の細胞を用いた。また、精製以外の解析には、同様に定常期となった細胞約1g新鮮重を50mLの培地の入った200mL容の三角コルベ中へ移植後、同条件で回転振とう培養した細胞を供した。収穫した細胞は、新鮮重を測定した後、直ちに解析に用いるか、または液体窒素にて瞬即時凍結し、使用するまで-80℃に保存した。

イネ個体は、Makino et al. (1983)の方法に従って、ガラス室内で自然光下、水耕栽培した。収穫した第9葉身が第8葉鞘から抽出中の個体は、完全展開葉身、葉鞘から未抽出の若い葉身、葉鞘、及び根に分け、新鮮重を測定後、液体窒素にて即時凍結し、-80℃に保存した。収穫した開花後5日目の穎果も同様に-80℃で保存した。

ホウレンソウ (*Spinacia oleracea* L.) 緑葉は、収穫直後の新鮮な市販品の葉柄部を除いたものを-25℃に保存して用いた。

#### 粗酵素液の調製

粗酵素液の調製はMatoh et al. (1980)とSuzuki and Gadai (1992)の方法を改変して行った。抽出液にはSH-基保護剤として0.2%(v/v)2-mercaptoethanol, GOGATの安定化剤として2mM 2-オキソグルタル酸、1mM EDTA, Protease 阻害剤として1mM PMSF, 10 $\mu$ M Leupeptin 及び可溶化剤として100mM KCl, 0.05%(v/v) Triton X-100 を添加したpH7.5の50mMリン酸緩衝液を用いた。4℃にて、イネ培養細胞に新鮮重に対して2倍量の抽出緩衝液と0.3倍量の石英砂を加え、乳鉢磨砕した。この磨砕液を4℃にて27,000xg, 30分間遠心した後、その上清を得た。遠心後の上清の一部は蛋白質分析に供した。また残りの上清は0.1%(v/v)の2-mercaptoethanolを含むpH7.5の50mMリン酸緩衝液にて平衡化したSephadex G-25カラムに添加し、同緩衝液にて溶出して脱塩を行った。この脱塩操作後の蛋白質画分を集めて、GOGATの酵素活性測定に供した。イネの葉及

び顕果についても同様に粗酵素液を調製した。

#### GOGAT 酵素活性の測定及び可溶性蛋白質の定量

GOGAT の酵素活性測定は、Matoh et al. (1980) と Suzuki and Gadal (1992) の方法を部分的に改変して用いた。また、市販のL-グルタミンには約0.5%のグルタミン酸が混入しているため、あらかじめグルタミン溶液は、陰イオン交換樹脂 AG1X8(酢酸型, 200 ~400 メッシュ, Bio Rad 社) カラム(Bed volume 2mL)を通して、グルタミン酸を除く前処理を行った。NADH-GOGATの反応液は 1mLとし、その終濃度組成は、100mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  -KOH (pH7.5), 10mM L-グルタミン, 10mM 2-オキソグルタル酸, 0.16mM NADH 及び0.4mL の酵素液とした。反応はNADHを添加して開始し、30°Cで20分間反応させた。その後、反応液を沸騰水中に30秒間つけて、反応を停止させた。Fd-GOGATの反応液は 1mLとし、その終濃度組成は、100mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  -KOH (pH7.3), 10mM L-グルタミン, 10mM 2-オキソグルタル酸, 5mM methylviologen, 又は 0.2mg Fd, 12mM  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ , 13.5mM  $\text{NaHCO}_3$ , 及び 0.3mLの酵素液とした。反応は  $\text{NaHCO}_3$  液に溶かした $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$  を添加して開始し、30°Cで20分間反応させた。同様に反応液を沸騰水中に30秒間つけ反応を停止させた。盲検には、反応液からグルタミン又は電子供与体を除いた2試料を用いた。両反応液は以下同様な操作を行った。すなわち、反応液はvortexにて混合後、3,000rpm, 20分間遠心して変性蛋白質を沈殿させた。遠心後の上清の0.8mLを、AG1X8(酢酸型、200 ~400メッシュ, Bio Rad社) 0.5mLを含む2.5mL容の注射筒カラムに添加した。樹脂を10mLの脱塩蒸留水で洗浄してグルタミンを溶出した後、1,500rpm, 2分間遠心して水を除去した。次に5mLの0.5Nの酢酸液にて、樹脂に吸着しているグルタミン酸を溶出した。カラムは再度遠心し、酢酸液の全量を回収した。生成したグルタミン酸の定量は、Garrel et al. (1972) の方法に従いニンヒドリン法で行った。0.4gのニンヒドリンと1gの $\text{CdCl}_2$ を80mLのethanol(95%), 10mLの酢酸, 及び20mlの脱塩蒸留水に溶かしたニンヒドリン液(使用時調製) 2mLを、樹脂から回収した酢酸液 1mLに加え、10mLの共栓付きガラス試験管内で、80°Cで8分間振とうしてニンヒドリン

反応を行った。反応は即時氷冷して停止させた。グルタミン酸は 506nm で比色定量した。盲検は 1mL の 0.5N 酢酸液を同様に反応させたものとした。また、1mL の 0.5mM グルタミン酸液を常に標準として用い、値を補正した。GOGAT 活性の 1 unit は、1 分間に 1  $\mu$ mol のグルタミン酸を生成するのに必要な酵素量とした。

また、特に精製 NADH-GOGAT の酵素反応動力学的特性の解析時に限り、NADH の 340nm における吸光度減少による NADH-GOGAT 活性測定法を用いた。

可溶性蛋白質の定量は、Bradford (1976) の方法に従い、BSA を標準蛋白質として行った。

#### イネ培養細胞からの NADH-GOGAT の精製

精製操作はすべて 4°C にて行った。新鮮重として約 200g の凍結イネ培養細胞に 400mL の上記抽出液と石英砂を加え、乳鉢磨砕した。磨砕液は 2重の綿布で濾過し残渣を除いた。その濾液を 27,000xg で 30 分間遠心して、上清に粗酵素液を回収した。この粗酵素液に 25%(w/v) 飽和となるように固形硫酸を少量ずつ加えて、穏やかに攪拌した。次にこの粗酵素液に、あらかじめ 2mM 2-オキシグルタル酸、1mM EDTA、0.2%(v/v) 2-mercaptoethanol、及び 25%(w/v) 硫酸を含む pH7.5 の 50mM リン酸緩衝液で平衡化した 400mL の Butyl Toyopearl 650 M (Tosoh 社) ゲルを加え、1 時間穏やかに連続攪拌することにより、NADH-GOGAT をゲルに吸着させた。吸着後のゲルはプフナー漏斗上へ移し、アスピレーターで穏やかに吸引しつつ、平衡化緩衝液にて、濾液に蛋白質が検出されなくなるまでゲルを洗浄した。洗浄後のゲルをカラム (4.4  $\times$  29cm) につめ、緩衝液中の硫酸濃度を 25% から 0% まで連続的直線濃度勾配で下げた疎水クロマトグラフィーを行い、ゲルに吸着した蛋白質を溶出した。溶出には合計 800mL の緩衝液を用いた。溶出後、約 70mL の NADH-GOGAT 活性画分に 70% 飽和となるように硫酸を加えて、蛋白質を硫酸沈殿させた。遠心後の沈殿画分に約 4mL の 2mM 2-オキシグルタル酸、0.5mM EDTA、及び 0.1%(v/v) 2-mercaptoethanol を含む pH7.5 の 50mM のリン酸緩衝液を加えて溶かし、蛋白質を濃縮した。次にこの濃縮した Butyl Toyopearl

650 M 画分を、あらかじめ上記緩衝液にて平衡化したSephacryl S-300 カラム (3.6×95cm) に添着後、同緩衝液で溶出し、ゲルろ過クロマトグラフィーを行った。溶出後、得られた約15mLの活性画分を Immersible CX-30 限外ろ過器 (Millipore社) を用いて、約 5mLまで濃縮した。次にこの濃縮液を、10%(v/v) グリセリンを含む上記緩衝液であらかじめ平衡化したBlue Sepharose CL-6Bカラム(1.0×45cm) に添着した。このカラムを平衡化に用いた緩衝液 350mLで洗浄後、更に30mLの50mM KClを含む緩衝液で洗浄した。洗浄後、50mMから250mM の KCl を含む緩衝液による直線濃度勾配法によりアフィニティークロマトグラフィーを行い、Blue Sepharose CL-6Bに吸着していたNADH-GOGATを溶出した。溶出には合計120mL の緩衝液を用いた。特に、KCl を含まない緩衝液での洗浄時を除き、アフィニティークロマトグラフィーの全操作における溶出流速は0.04mL/min と極めて低速に調節した。溶出されたNADH-GOGATの活性画分を集め、この画分に25%(w/v)飽和となるように硫酸を加えた。この酵素液を、あらかじめ25%(w/v)硫酸飽和とした緩衝液で平衡化したButyl Toyopearl 650 S カラム(1.0×15cm) に添着した後、緩衝液の硫酸濃度を25% から0%まで連続的に下げてNADH-GOGAT を溶出した。溶出には合計40mLの緩衝液を用いた。最後の疎水クロマトグラフィーで得られた精製標品は、硫酸を含まない上記緩衝液に対し透析した後、Immersible CX-30にて濃縮し、終濃度が50%(v/v)となるようにグリセリンを添加して、-20℃に保存した。

#### 抗NADH-GOGAT抗体の調製

イネ培養細胞NADH-GOGATに対するポリクローナル抗体は、精製NADH-GOGAT標品をウサギに免疫して作成した。ウサギの耳部から標準血清を採血した後、精製標品200 μg (500 μL)を等容量のアジュバンド(Freund's complet Adjuvant, Difco)と混濁して不溶化した後、ウサギの横腹部に皮下注射して初回免疫を行った。続いて、3週間置きに150 μg の精製標品を 2回免疫した。最終免疫から1週間後、ウサギの心臓より全採血を行い、約90mLの血液を得た。この血液を遠心後、その上清に約45mLの抗血清を得た。標準血清と抗血清は小分けして、

-80 °Cに凍結保存した。 IgG 画分の調製は以下のように行った(Hayakawa et al., 1990)。 5mL の抗血清を45% 硫酸飽和とし、免疫グロブリン画分を沈殿させた。 硫酸沈殿は、5mL のpH6.8 の17.5mMリン酸ナトリウム緩衝液に溶かした後、再び同様に45% 飽和硫酸分画を行った。 得られた免疫グロブリン画分は、上記緩衝液200mL に対し2 回透析して脱塩した。 この画分を、あらかじめ上記緩衝液で平衡化したDEAE-celluloseカラム(Bed volume 20mL) に添加し、同緩衝液でIgG を溶出させた。 最初に溶出した蛋白質ピークをIgG 画分として集めた。 この精製IgG 画分は濃縮後、PBS ( 0.9%(w/v) のNaClを含むpH7.2 の10mMリン酸ナトリウム緩衝液 )に対し透析し、終濃度が0.05%(w/v)となるように  $\text{NaN}_3$  を加え、4 °Cに保存した。 なお、IgG は280nm の吸光度から定量した(IgGの280nm における吸光度係数  $E^{1\%}=14.6$ )。

#### ホウレンソウFdとイネFd-GOGATの精製及び抗Fd-GOGAT抗体の調製

Fd-GOGAT活性の測定及びFd-GOGATの精製のためのアフィニティー担体の作成に必要なFdはホウレンソウ葉から精製した(Hayakawa et al., 1990)。 すなわち、ホウレンソウ葉からの抽出液をDEAE-celluloseによる陰イオン交換クロマトグラフィー、Toyopearl HW 650 FとButyl Toyopearl 650 S による 2段階の疎水クロマトグラフィー、に順次供し、最後に再びDEAE-celluloseによる陰イオン交換クロマトグラフィーを行い精製Fd標品を得た。 なお、Shin(1976)の報告に従い、各カラムクロマト時に溶出されたFdは420nm の可視部吸収にて追跡し、またFdは、420nm におけるホウレンソウFdの分子吸光度係数  $\epsilon=9,680$ より換算して定量した。 純度検定は $A_{420\text{nm}}/A_{275\text{nm}}=5.0$ を100% Fd として行った。

イネ葉Fd-GOGATの精製及びその抗体の作成は、当研究室のOikawa及びKamachiと共同して行った(Hayakawa et al., 1990)。 Fd-CNBr-activated Sepharose 4Bゲルの作成は、Pharmacia社のアフィニティーゲル調製法を一部改変して行った。 CNBr-activated Sepharose 4B 乾燥担体6gを50mLの1mM HCl 中で15分間膨潤させ、約21mLのゲルを得た。 このゲルをガラスフィルターG3上へ移し、200mLの1mM HCl で洗浄後、水分をアスピレーターで吸引して除いた。 この洗浄操作は合計

6回行った。最後に30mLのカップリング緩衝液(0.5MのNaClを含むpH8.3の0.1M NaHCO<sub>3</sub>)で同様にゲルを洗浄し、水分を除去した。特に、カップリング緩衝液によるゲルの活性基の加水分解を避けるため、この操作は迅速に行った。カップリング緩衝液に対して一晚透析した精製Fd(約4.8mg/mL)に、等容の同緩衝液を加えたものをリガンド溶液とした。先の洗浄後のゲル1容を、直ちにリガンド溶液の2容に加え、4°Cで24時間穏やかに攪拌して、Fdをゲルに固定した。調製後のFd-Sepharose 4Bゲルは、カラム(Bed volume 約10mL)につめ、0.05%(v/v)の2-mercaptoethanolを含むpH7.5の10mMリン酸緩衝液にて平衡化した後、4°Cに保存した。

イネ葉Fd-GOGATの精製は、Suzuki and Gadai (1982)の方法を部分的に改変して行った(Hayakawa et al., 1990)。精製は全て4°Cで行った。新鮮重として100gのイネ葉を、液体窒素を用いて乳鉢磨砕し、粉末状にした。これに、イネ葉の新鮮重に対して10倍容の0.1%(v/v)2-mercaptoethanol, 1mM EDTA, 1mM PMSF, 10 μM Leupeptin, 1%(w/v) PVPPを含むpH7.5の25mMリン酸緩衝液を徐々に加えながら、磨砕抽出した。更に、この磨砕液をミキサーへ移し、20分間磨砕した抽出液を、4重のガーゼで濾過して残渣を除いた。濾液を27,000xg、30分間遠心し、上清に粗酵素液を得た。この粗酵素液に、あらかじめ0.1%(v/v)2-mercaptoethanolを含むpH7.5の25mMリン酸緩衝液にて平衡化したDEAE-cellulose 170mLを加え、1時間穏やかに攪拌してFd-GOGATをゲルに吸着させた。ゲルをカラム(3.6×20cm)につめ、平衡化に用いた緩衝液で洗浄後、0mMから600mM NaClを含む同緩衝液による直線濃度勾配法により陰イオン交換クロマトグラフィーを行い、ゲルに吸着した蛋白質を溶出した。溶出には合計400mLの緩衝液を用いた。容出後、約86mLのFd-GOGAT活性画分に30%飽和となるように硫酸を加えた。この酵素液に、あらかじめ30%飽和硫酸を含む上記緩衝液で平衡化したButyl Toyopearl 650 M 120mLを加え、1時間穏やかに攪拌して、ゲルにFd-GOGATを吸着させた。吸着後のゲルは、プフナー漏斗上へ移し、同緩衝液で洗浄した。洗浄後のゲルをカラム(2.4×30cm)につめた後、緩衝液中の硫酸濃度を30%から0%まで下げた連続的直線濃度勾配法による疎水クロマトグラフィー

を行い、蛋白質をゲルから溶出した。 溶出には、合計300mL の緩衝液を用いた。 得られた約52mLの活性画分は、Immersible CX-30にて約 5mLまで濃縮した。 この酵素液は、等容のグリセリンを加えた後、あらかじめ0.05% (v/v) 2-mercaptoethanol を含むpH7.5 の10mMリン酸緩衝液にて平衡化したSephacryl S-300 カラム(3.6×95cm) に添着し、同緩衝液で溶出してゲルろ過クロマトグラフィーを行った。 溶出後、得られた約28mLの活性画分を、上記のFd-Sepharose 4B カラムに添着し、溶出液に蛋白質が検出されなくなるまで、同緩衝液にて洗浄した。 次に、0mM から300mM NaClを含む緩衝液による直線濃度勾配法によりアフィニティークロマトグラフィーを行い、ゲルからFd-GOGATを溶出した。 溶出には、合計100mL の緩衝液を用いた。 特に、洗浄時を除き、アフィニティークロマトグラフィーの全操作における溶出流速は0.09mL/min と低速に調節した。 得られた精製Fd-GOGAT標品約20mLは、Immersible CX-30にて濃縮し、終濃度が50%(v/v) となるようにグリセリンを加えた後、 -20℃に保存した。

抗Fd-GOGAT抗体の作成は、抗NADH-GOGAT抗体の作成の項で示した方法に準じて、精製Fd-GOGAT標品をウサギに免疫して行った(Hayakawa et al., 1990)。

#### ポリアクリルアミド電気泳動(Native-PAGE), とSDS-ポリアクリルアミド電気泳動(SDS-PAGE), 及びNADH-GOGAT活性染色法

SDS-PAGEは、Laemmli (1970)の方法に従い、スラブゲル(10×12×0.1 cm)を用いた。 GOGAT の分離には、4.5%の濃縮用ゲルと7%または7.5%の分離用ゲルを用いた。 分子量測定には、Bio Rad 社の標準分子量マーカー蛋白質(Myosin, 200kD ;  $\beta$ -galactosidase, 116.3kD ; Phosphorylase B, 97.4kD ; BSA, 66.2kD ; Ovalbumin, 45.0kD)を用いた。

Native-PAGE にはスラブゲルとディスクゲルを用いた。 スラブ型 Native-PAGEは、Laemmli (1970)の方法を一部改変して行った。 すなわち、SDS を除いて4.5%濃縮用ゲルと7%分離用ゲルを作成し、SDS を含まない泳動用緩衝液を用いて、4℃にて、ゲル一枚当たり3mA の定電流で泳動を行った。 ディスク型 Native-PAGE は、Gabriel (1971)の方法に従って行った。 3%濃縮用ゲル(内径

5mm×10mm)と7%分離用ゲル(内径 5mm×70mm)を作成し、4℃にて、ゲル一本当たり 1.5mAの定電流で泳動した。

泳動後分離されたゲル中のポリペプチドあるいは蛋白質は、CBB R-250 染色法または銀染色法により検出した。NADH-GOGAT蛋白質の活性染色法は、Matoh et al.(1980)の方法に従った。Native-PAGE 後のゲルを、冷却した pH7.5の 200 mMリン酸緩衝液中で30分間平衡化した後、15mM L-グルタミン、15mM 2-オキソグルタル酸、1.3mM NADHを含むpH7.5の 100mMリン酸緩衝液中にゲルを入れ、30℃で45分間 NADH-GOGAT 反応を行った。反応液をアスピレーターで吸引して除いた後、10mLのpH8.5の50mMトリス塩酸緩衝液に100mgのNitroblue tetrazolium (NBT)と6mgのPhenazine methosulfate (PMS)を溶かした染色液中にゲルを入れ、30℃で5分間染色した。染色後のゲルは、NBTとPMSを含まない同緩衝液に移した。この方法では、NADHからPMSを介してNBTに電子伝達が生じ、還元されたNBTはゲル中で青紫色の不溶性沈殿となる。従って、NADH-GOGAT活性の局在するゲル部分は、NADHが消費されているためNBTの沈殿が生じずに透明な部分として検出される。盲検には、グルタミンを除いた反応液で同様に操作したゲルを用いた。特に染色液は脱気してから用いた。

#### NADH-GOGAT精製標品の吸収スペクトル分析と分子量の測定

NADH-GOGAT精製標品の紫外部と可視部における吸収スペクトル分析は、Beckman Du-65 spectrophotometer を用いて行った。

精製NADH-GOGATの subunitポリペプチドの分子量は前項で示したSDS-PAGEにより測定した。未変性なNADH-GOGAT精製蛋白質の分子量は、Sephacryl S-300 カラム(3.6×95cm)を用いたゲルろ過クロマトグラフィーにより測定した。標準分子量マーカー蛋白質は、Sigma社のMW-GF-1000キット (Thyroglobulin, 669.0 kD; Aproferritin, 443.0kD;  $\beta$ -amylase, 200.0kD; Alcohol dehydrogenase, 150.0kD; BSA, 66.0kD; Carbonic anhydrase, 29.0kD)を用い、分子量測定のための標準線を作成した。

## 免疫二重拡散法とイムノプロット法

免疫二重拡散法は、Ouchterlony (1949)の方法に従った。PBS に1.0%(w/v)のアガロースを溶かして作成したプレート上の各ウェルに、抗血清16 $\mu$ L と抗原蛋白質(1-3 $\mu$ g)を添加した後、室温で24時間抗体と抗原を拡散させた。プレートは乾燥を防ぐため、水を敷いた密閉容器中に静置した。24時間後、プレートを0.05%(v/v)のTween-20と0.05%(w/v)のNaN<sub>3</sub>を含むPBS 中に72時間浸漬して洗浄した。洗浄後のプレートは、CBB R-250 液に1時間漬けて蛋白質染色し、更に一晩脱色して抗体と抗原の結合により生じた免疫沈降線を検出した。脱色後のプレートは、室温で風乾した。

GOGAT のイムノプロット分析は、Towbin et al. (1979)の方法を改変して行った。Towbin et al. はSDS-PAGE後のゲルから変性蛋白質ポリペプチドをニトロセルロース膜へ電氣的に転写するのに、20%(v/v)のmethanolを含む pH8.3の25mM トリス-192mMグリシン緩衝液を用いている。ここで、SDS 変性したポリペプチドをニトロセルロース膜に効率良く結合させるには、転写緩衝液中のmethanol が不可欠である。しかし通常、methanolにより、100kD 以上のポリペプチドはゲルのマトリクスに固定されてしまい、その転写効率は著しく低下する。また、一般にはこのように不溶化したポリペプチドは、転写緩衝液中に0.05% ~0.1% (w/v) のSDS を添加して可溶化させながら膜へ転写する方法がとられる。しかし、SDS のような強い可溶化剤は、人工的な蛋白質の修飾を生じやすい(Moose et al., 1988)。そこで、methanolの非存在下、SDS 変性ポリペプチドを効率良く結合できるナイロン膜(Zeta-probe membrane, Bio Rad 社)をニトロセルロース膜の代わりに用いた。しかし、Zeta-probe膜は、蛋白質の結合容量が大きいため、結合siteの完全なマスキングが難しく、また陰イオン性の色素と不可逆的に結合するため抗原の検出時のバックグラウンドが高くなりがちであることから、一般にはあまり使用されていなかった。本研究では以下に示す至適条件下でZeta-probe膜を用いたGOGAT のイムノプロット分析を行った。

SDS-PAGEは前項に示した方法で行った。しかし、BPB は最端のゲルコームのみに添加して泳動先端の確認を行った。泳動終了後、BPB の濃縮した部分のゲ

ルは除去した。泳動後のゲルは、冷却した転写緩衝液 (pH8.3 の25mM トリス-192mM グリシン緩衝液) で30分間平衡化して、泳動用緩衝液とBPBを除いた。このゲルとあらかじめ転写緩衝液で20分間平衡化しておいたZeta-probe膜、Whatmann 3MM 濾紙、スポンジを重ね、Trans-Blot (Bio Rad 社) を用いて、4°Cで20Vの定電圧下16時間転写した。転写後の膜は、TBS溶液(500mM NaCl を含むpH7.5 の20mM トリス塩酸緩衝液) で5分間洗浄した。以下の全ての操作は37°Cで行った。洗浄後の膜は、5% (w/v)のskim milk を含むTBS 溶液(TBS-milk)で、4時間処理して、蛋白質結合siteのマスキングを行った。処理後の膜は、0.2% (v/v)のTween-20を含むTBS-milk溶液(TTBS-milk)で20分間、合計2回洗浄した。次にこの膜を、TTBS-milk 溶液で500倍に希釈した抗NADH-GOGAT IgGまたは抗Fd-GOGAT IgG溶液に一時間浸漬することにより、抗原抗体反応を行わせた。反応後の膜は、TTBS-milk 溶液で20分間、合計3回洗浄した。次に洗浄後の膜を、TTBS-milk 溶液で7,500倍に希釈したアルカリフォスファターゼ標識ヤギ抗ウサギIgG(Fc) 二次抗体(Promega社) 溶液に一時間浸漬した。この後、膜を同様にTTBS-milk 溶液で10分間、合計3回洗浄した。更にTBS 溶液で5分間洗浄して、膜からTween-20を除いた。この膜を、20mLの100mM NaClと5mM MgCl<sub>2</sub> を含むpH 9.5 の100mM トリス塩酸緩衝液に132 μL のNBT (Promega社) と66 μL のBCIP (Promega 社) を加えた発色液に浸し、各GOGAT ポリペプチドを検出した。反応は脱塩蒸留水で繰り返し洗浄することにより停止させた。

#### 抗NADH-GOGAT IgGと抗Fd-GOGAT IgGのアフィニティー精製

抗イネ培養細胞NADH-GOGATポリクローナル IgGのアフィニティー精製は、Kelly et al. (1986) の方法を部分的に改変して行った。Kelly et al. は、酵母のミトコンドリア型 RNA polymerase 遺伝子を発現ベクターλgt11にクローニングし、誘導発現させたRNA polymerase蛋白質をニトロセルロース膜に移して、この膜に結合した蛋白質をリガンドとして用いて抗体をアフィニティー精製し、特異抗体を得た。本研究では、精製NADH-GOGAT標品が微量にしか得られないことから、この方法を適用した。また、ニトロセルロース膜よりも物理的強度が高く、化

学的にも安定であり、繰り返し抗原抗体反応が行えるZeta-probe膜を用いた。約10 $\mu$ gのイネ培養細胞NADH-GOGAT精製標品を7% SDS-PAGEにより分離した後、前項の方法に従って、電氣的にZeta-probe膜にNADH-GOGATポリペプチドを転写した。ゲルの両端のレーンに対応する部分を膜から切り取り、この2枚の膜切片をイムノプロット分析の方法と同様に抗NADH-GOGAT IgGと反応させ、アルカリフォスファターゼ標識ヤギ抗ウサギIgGを用いて、NADH-GOGATポリペプチドを検出した。両端の膜切片上に検出されたNADH-GOGATポリペプチドの位置をもとにして、残りの膜上のNADH-GOGATポリペプチドの結合している部分を切り出した。この膜切片(0.5 $\times$ 2.5 cm)を50mLの5%(w/v)のskim milkを含むTBS溶液(TBS-milk)で、37 $^{\circ}$ Cで2時間浸漬して膜上の蛋白質結合siteをマスキングした。次にこの膜切片を、50mLのTTBS-milkで、37 $^{\circ}$ Cで20分間、合計2回洗浄した。洗浄後の膜切片は、TTBS-milk溶液で20倍希釈した抗NADH-GOGAT IgG溶液6mLに入れ、37 $^{\circ}$ Cで12時間抗原抗体反応を行った。次にこの膜切片を、50mLのTTBS-milk溶液で、37 $^{\circ}$ Cで20分間、合計3回洗浄した後、更に50mLのTBS溶液で、37 $^{\circ}$ Cで5分間洗浄した。洗浄後の膜切片は、1.5mL容のエッペンドルフチューブへ移し、1mLのpH2.5の0.2Mグリシン-塩酸緩衝液を加え、室温で2分間穏やかに上下させて膜上に結合したNADH-GOGAT抗原から抗体を遊離させた。2分後、膜をチューブからTBS溶液へ移し、直ちに6.9%(w/v)脱脂BSA(Sigma社)を含むpH8.8の1.0Mトリス塩酸緩衝液0.17mLをチューブに加え、精製抗NADH-GOGAT IgG溶液を中和した。精製抗NADH-GOGAT IgG溶液は終濃度が0.05%(w/v)となるようにNa<sub>3</sub>を加え4 $^{\circ}$ Cに保存した。また、膜切片はTBS溶液で数回洗浄して平衡化した後、同様に0.05%(w/v)のNa<sub>3</sub>を含むTBSに浸漬して、再び抗体の精製に用いるまで4 $^{\circ}$ Cに保存した。

抗Fd-GOGATポリクローナルIgGも同様に精製イネ葉Fd-GOGAT標品を用いてアフィニティ-精製した。

### イネ培養細胞NADH-GOGAT精製標品のN末端アミノ酸配列分析

N末端アミノ酸配列分析に用いたイネ培養細胞NADH-GOGAT精製標品は、精製の最終段階のButyl Toyopearl 650 s カラムによる疎水クロマト後の標品を脱塩及びImmersible CX-30にて濃縮せずに小分けして、液体窒素を用いて瞬時凍結した後、 $-80^{\circ}\text{C}$ に保存した。精製標品 $40\ \mu\text{g}$ ( $200\ \text{pmol}$ )を解凍後、スピードバック濃縮器(Savant SVC-100H)を用いて濃縮し、polyvinylidene difluoride 膜 (PVDF membrane, Immobilon Millipore 社) に添着させてから、気相型プロテインシーケンサー (Shimadzu PSQ-1) にてN末端アミノ酸配列分析を行った。分析は合計 3回行い、アミノ酸を同定した。

### 第三節 結果

#### イネ培養細胞の培養過程におけるGOGAT 活性の変化とイネ各器官におけるGOGAT 活性量との比較

精製に先立ち、ササニシキの種子の胚から誘導したカルスをR2液体培地で懸濁培養し、その培養過程のGOGAT 活性の変化を解析するとともに、培養細胞とイネ個体の各器官におけるGOGAT 活性を比較した。 Fig. 3 にフラスコ当たりの新鮮重を指標とした時の生育曲線、と新鮮重当たりの可溶性蛋白質含量の変化及び可溶性蛋白質当たりのNADH-GOGATとFd-GOGAT活性の変化を示した。 供試イネ培養細胞は、移植後 1日目以降増殖し始め、10日目以降は定常期へと推移した。 最大生育量は、フラスコ当たりの新鮮重として、約5gとなった。 可溶性蛋白質含量は移植後 2日目から急激に増加し、4日目から6日目の間で新鮮重当たり約13 mgと最大となった後、以降減少した。 可溶性蛋白質当たりのNADH-GOGAT活性は移植後急激に上昇し、可溶性蛋白質含量が増加し始める2日目には最大となり、以降急激に低下した。 可溶性蛋白質の減少途中での8日目から12日目にかけては活性はほぼ一定であった。 一方、可溶性蛋白質当たりのFd-GOGAT活性は可溶性蛋白質含量が増加し始める移植後2日目にはすでに最大となり、可溶性蛋白質含量が最大となる4日目まではほぼ一定であったが、以降12日目までゆるやかに減少した。 12日目以降は、Fd-GOGAT活性は検出できなかった。

Table 1. にイネ各器官における新鮮重当たりのNADH-GOGATとFd-GOGAT活性を測定したSuzuki et al. (1982) 及び本研究での結果を示した。 Suzuki et al. の結果ではイネの緑葉中にNADH-GOGAT活性は検出されず、根においてもFd-GOGAT活性がNADH-GOGAT活性よりも高かった。 本研究の結果では、緑葉でもNADH-GOGAT活性は検出されたが、Fd-GOGAT活性よりも極めて低かった。 これらのイネ各器官の新鮮重当たりのNADH-GOGAT活性と、移植後2日目の増殖初期のイネ細胞の新鮮重当たりのNADH-GOGAT活性を比較すると、緑葉では培養細胞の約1/6 であり、根では約1/12と低かった。 この傾向は可溶性蛋白質当たりでもほぼ同様であっ

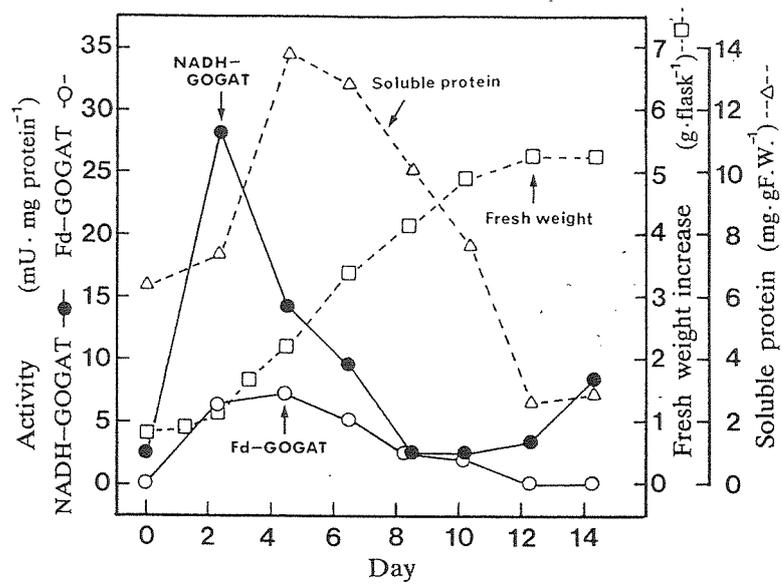


Figure 3. Changes in the activities of NADH-GOGAT (●) and Fd-GOGAT (○) during the growth of rice cells in suspension culture. Cell growth (□) and soluble protein content (△) were also indicated.

Table1. Comparison of Glutamate Synthase Activity in Rice Green Leaves, Roots, and Cultured Cells.

| Reductant   | Green Leaf                                   |      | Root | Cultured Cell |
|-------------|--|------|------|---------------|
|             | <i>nmol glutamate formed / min . g f. w.</i> |      |      |               |
|             | a  | b    | a    | b             |
| <b>Fd</b>   | 2308.7                                       | 8350 | 88.0 | 48.5          |
| <b>NADH</b> | 0  | 31.6 | 16.7 | 208.2         |

a; Suzuki et al. (1982) , b; This study.

た。また、イネ培養細胞では、イネ個体植物の各組織と異なり、全生育器官を通じてNADH-GOGAT活性がFd-GOGAT活性よりも高かった。

#### イネ培養細胞からのNADH-GOGATの抽出と精製

前項の結果に基づき、NADH-GOGATの精製には培養初期のイネ細胞を供した。ここで、NADH-GOGATの活性測定は、通常、NADHの340nmにおける吸光度減少が用いられるが、正確に反応を測定するため、最終精製標品を用いた解析時以外のNADH-GOGAT活性測定には、生成するグルタミン酸をイオン交換樹脂にて反応液から分離後、ニンヒドリン法で定量する測定法を用いた。Yamaya and Matsumoto (1988)の方法に従い、反応測定系の各段階の溶液中のアミノ酸をPTC-アミノ酸誘導体とした後、逆相カラムを用いたHPLCにて分析を行い、GOGAT活性測定系を確立した。また、反応液からグルタミンと電子供与体を除いた2つの盲検を行うことで、グルタミナーゼ、GDH、及び粗酵素液由来の物質の影響は無視できることが判明した。

NADH-GOGATの抽出条件を検討した結果、SH-基保護剤として0.2%(V/V) 2-mercaptoethanol, GOGAT活性の安定剤として2mM 2-オキシグルタル酸, 1mM EDTA, Protease阻害剤として1mM PMSF, 10 $\mu$ M Leupeptin, 及び可溶化剤として100mM KCl, 0.05%(v/v) Triton X-100を添加したpH7.5の50mMリン酸緩衝液を抽出液に用いて、石英砂とともに試料を乳鉢磨砕することにより、効率良くNADH-GOGAT活性を抽出できることが判明した。また、収穫後のイネ細胞を液体窒素にて瞬即時凍結した場合、NADH-GOGATは失活しないことが判明した。また、同試料を液体窒素にて凍結後-80 $^{\circ}$ Cに保存した場合、保存後2日目で約70%まで活性は減少するが、以降70日目まではほぼ一定であり、更に約1年間にわたり比較的安定にNADH-GOGAT活性を保存することが可能であった。

イネ培養細胞からのNADH-GOGATの精製結果をTable 2. に示した。 また、各精製段階で得られた蛋白質試料を7.5% SDS-PAGE に供し、クマシー染色した結果をFig. 8A. に示した。 新鮮重として200gの凍結培養細胞から、最終的に6.1%の回収率で、815 倍に精製された 195  $\mu$ g の標品を得た。 精製酵素の比活性は 9.8 酵素単位/mg蛋白質であった。

精製に先立ち、粗抽出液中のNADH-GOGAT活性の濃縮が必要と考え、予備実験においてDEAE-celluloseを用いたバッチ吸着後の陰イオン交換クロマトグラフィーを検討したが、NADH-GOGAT活性の回収率は約2.0%と極めて低く、精製度も上がらなかった。 そこで、Butyl Toyopearl 650 M を用いてバッチ吸着後、疎水クロマトグラフィーを行った結果、活性の回収率は26% と低いものの精製度が約4.5 倍に上がり、活性画分は約70mLに濃縮できた。 Butyl Toyopearl 650 M カラムのクロマトグラムをFig. 4. に示した。 NADH-GOGATは、溶出緩衝液中の硫酸濃度が約10% (w/v) で溶出された。 この試料を70% 飽和硫酸で濃縮後、Sephacryl S-300 カラムによるゲルろ過クロマトグラフィーを行った時のクロマトグラムをFig. 5 に示した。 この精製段階では、NADH-GOGAT活性の回収率は高く、精製度も約10倍に上がった。 次にBlue Sepharose CL-6Bカラムによるアフィニティークロマトグラフィーを行った。 この精製段階のクロマトグラムをFig. 6. に示した。 NADH-GOGAT活性は溶出緩衝液中のKCl 濃度が約100mM で溶出された。 得られた活性画分をSDS-PAGEにより分析した結果、分子量約200kD のポリペプチドがほぼ単一な主バンドとして確認された(Fig. 8A)。 また、この段階の試料を7% Native-PAGE 後、クマシー染色とNADH-GOGAT活性染色した結果、クマシー染色されたほぼ単一な主バンドと活性染色されたバンドの移動度は一致した。 これより、NADH-GOGATの精製にはBlue Sepharoseカラムによるアフィニティークロマトが極めて有効であることが判明した。 精製の最終段階のButyl Toyopearl 650 S カラムでのクロマトグラムをFig. 7. に示した。 NADH-GOGATは約10%(w/v)の硫酸濃度で溶出され、活性と蛋白質の両ピークは重なって現れた。 Butyl Toyopearl 650 S によるクロマト後の最終精製標品を7.5%SDS-PAGEに供し、クマシー染色して純度検定した結果、分子量約200kD の単一のバンドとして確認され

Table 2. Purification of NADH-GOGAT from cultured rice cells.

| Purification Step     | Protein<br>(mg) | Total<br>Activity <sup>a</sup><br>(Units) | Specific<br>Activity <sup>a</sup><br>(Units/mg protein) | Purifica-<br>tion<br>(fold) | Yield<br>(%) |
|-----------------------|-----------------|---|---|-----------------------------|--------------|
| Crude extract         | 2,594           | 31.2                                      | 0.012   | 1.0                         | 100          |
| Butyl Toyopearl 650 M | 148             | 7.95                                      | 0.054   | 4.5                         | 25.5         |
| Sephacryl S-300       | 13.0            | 7.55                                      | 0.581   | 48.3                        | 24.2         |
| Blue Sepharose CL-6B  | 0.304           | 3.24                                      | 10.7  | 886                         | 10.4         |
| Butyl Toyopearl 650 S | 0.195           | 1.91                                      | 9.8   | 815                         | 6.1          |

<sup>a</sup> One unit (U) = 1  $\mu$ mole glutamate formed  $\cdot$  min<sup>-1</sup> at 30°C.

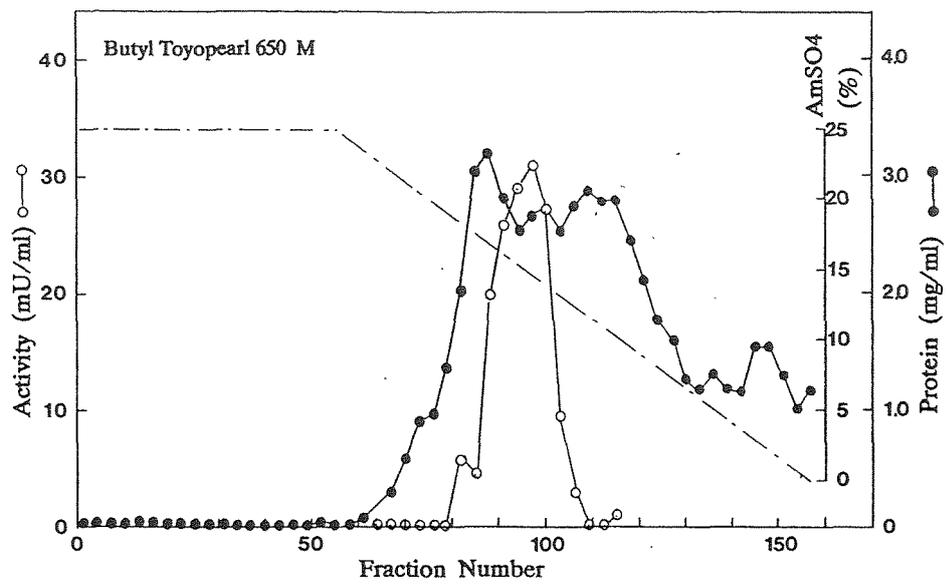


Figure 4. Elution profiles of NADH-GOGAT on Butyl Toyopearl 650M column chromatography.

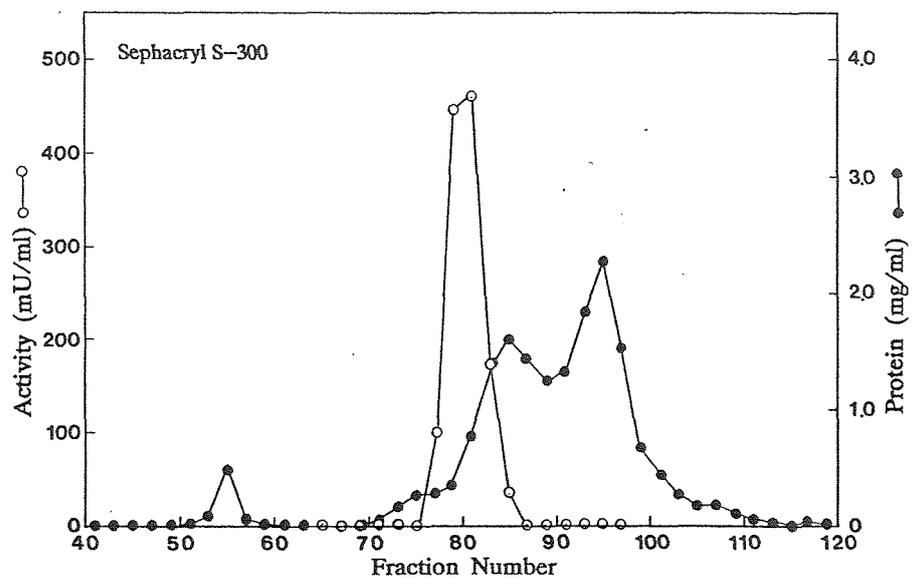


Figure 5. Elution profiles of NADH-GOGAT on Sephacryl S-300 gel chromatography.

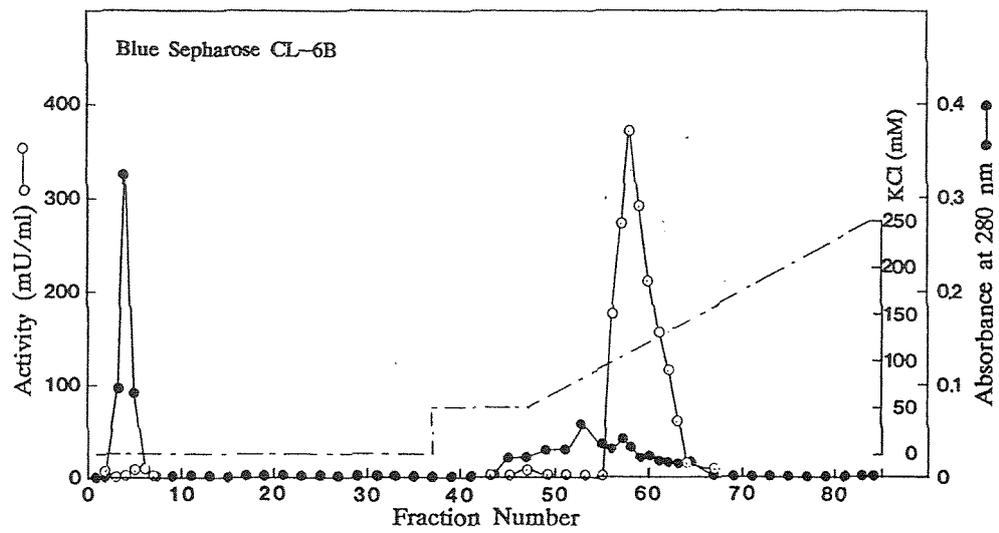


Figure 6. Elution profiles of NADH-GOGAT on Blue Sepharose CL-6B column chromatography.

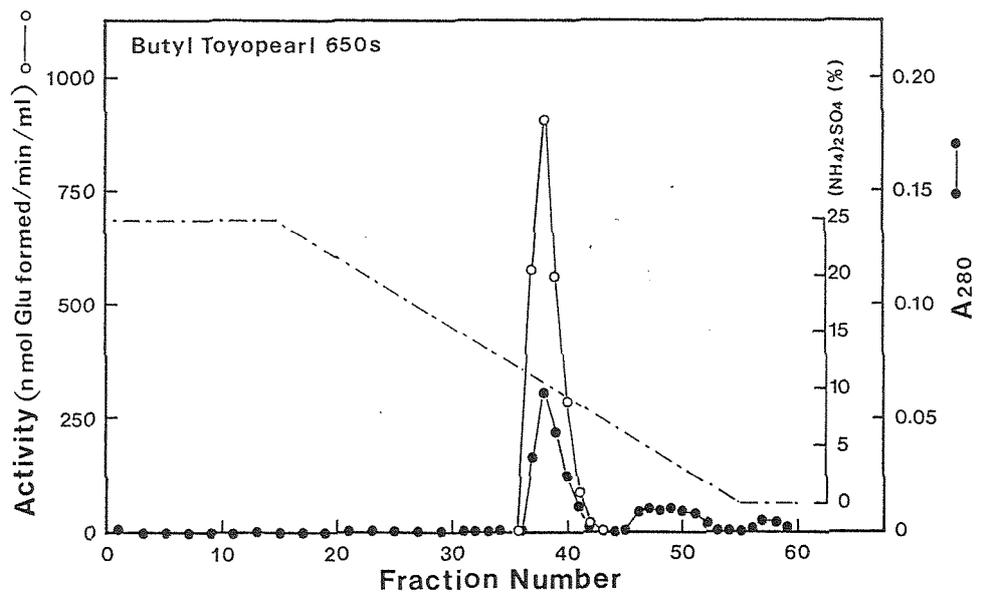
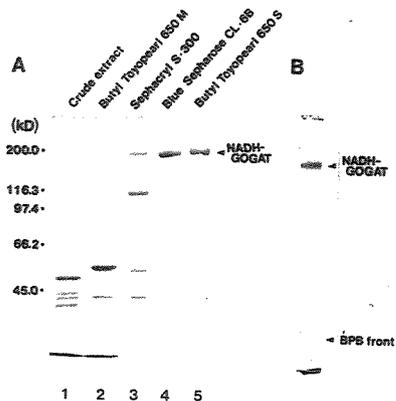


Figure 7. Elution profiles of NADH-GOGAT on Butyl Toyopearl 650S column chromatography.



**Figure 8.** A, SDS-PAGE of NADH-GOGAT at various stages of purification. Crude extract, 20  $\mu$ g protein; Butyl Toyopearl 650 M, 15  $\mu$ g protein; Sephacryl S-300, 10  $\mu$ g protein; Blue Sepharose CL-6B 3  $\mu$ g protein; Butyl Toyopearl 650 S, 2  $\mu$ g protein. B, Native-PAGE of NADH-GOGAT purified from cultured rice cells. The purified enzyme (10  $\mu$ g) was placed on the gel. The gels were stained with Coomassie blue. BPB = bromphenol blue.

た(Fig. 8A)。また、銀染色した結果もほぼ同様であった。最終精製標品を 7% Native-PAGE に供し、クマシー染色した結果も、単一のバンドを示した(Fig. 8B)。これらの結果から、イネ培養細胞のNADH-GOGATは高度に精製されたものと判断した。

#### イネ葉からのFd-GOGATの精製

イネ緑葉からのFd-GOGATの精製結果をTable 3. に示した。新鮮重として約100gのイネ葉から最終的に42%の回収率で126倍に精製された4.6mgの標品を得た。精製酵素の比活性は26.7酵素単位/mg蛋白質であった。精製の最終段階のFd-Sepharose 4B カラムでのクロマトグラムをFig. 9A. に示した。Fd-GOGAT活性と蛋白質は、重なったひとつのピークとして溶出された。この精製 Fd-GOGAT 標品を7.5% SDS-PAGE で分離後クマシー染色して純度検定した結果をFig. 9B. に示した。精製Fd-GOGAT標品は分子量約160kDの単一のバンドとして確認された。また、このことは、Fd-SepharoseカラムによるアフィニティークロマトグラフィーがFd-GOGATの精製に極めて有効であることを示した。精製 Fd-GOGAT 標品を7% Native-PAGEに供しクマシー染色した結果も、同様に単一のバンドを与えた(Fig. 9C.)。

#### NADH-GOGAT精製標品の分子量測定と吸収スペクトル分析

精製NADH-GOGAT標品を SDSにより変性させた後、7.5% SDS-PAGE に供しsubunitポリペプチドの分子量を測定した結果、196kDであった(Fig. 10A.)。イネ葉から精製されたFd-GOGATのsubunit ポリペプチドの分子量は160kDである(Hayakawa et al., 1990) ことから、イネ培養細胞NADH-GOGATsubunit ポリペプチドは、イネ葉Fd-GOGATsubunit ポリペプチドよりも約40kD大きいことが判明した。また、未変性な精製NADH-GOGAT標品をSephacryl S-300 カラムによるゲルろ過法から求めた分子量は、 $194 \pm 13$ kDであった(Fig. 10B.)。よって、イネ培養細胞NADH-GOGATは分子量約200kDの巨大単量体であることが判明した。

Table 3. Purification of Fd-GOGAT from rice leaves<sup>a</sup>.

| Purification step | Activity <sup>b</sup> (units) | Protein (mg) | Specific activity (unit/mg) | Yield (%) | Purification (-fold) |
|-------------------|-------------------------------|--------------|-----------------------------|-----------|----------------------|
| Crude extract     | 292                           | 1,382        | 0.22                        | 100       | 1                    |
| DEAE-cellulose    | 201                           | 863          | 0.23                        | 69        | 1.1                  |
| Butyl Toyopearl   | 130                           | 123          | 1.05                        | 44        | 5.0                  |
| Sephacryl S-300   | 73                            | 32           | 2.27                        | 25        | 10.8                 |
| Fd-Sepharose      | 123                           | 4.6          | 26.7                        | 42        | 126.0                |

<sup>a</sup> Starting from 100 g fresh weight.

<sup>b</sup> MV dependent GOGAT activity.

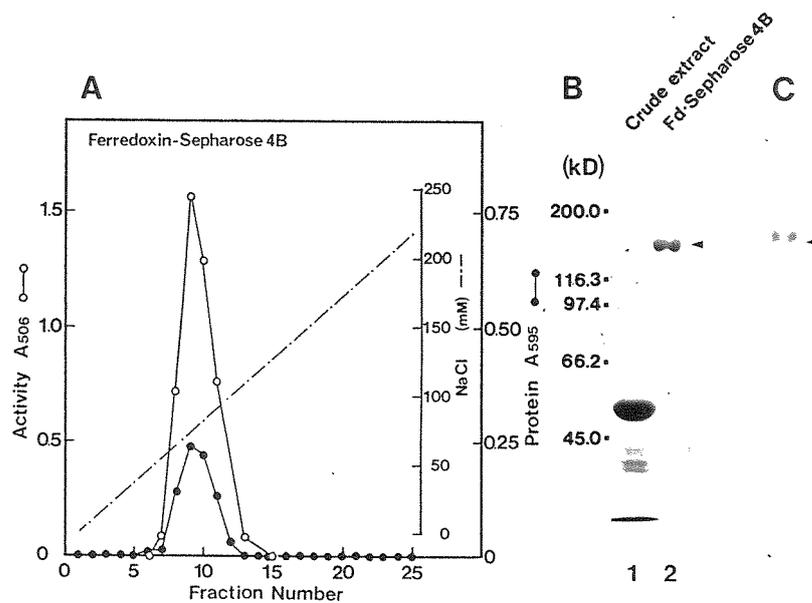


Figure 9. A, Elution profiles of Fd-GOGAT on Fd-Sepharose 4B column chromatography. B, SDS-PAGE of Fd-GOGAT at various stages of purification. Crude extract, 10  $\mu$ g protein ; Fd-Sepharose, 2  $\mu$ g protein. C, Native-PAGE of Fd-GOGAT purified from rice leaves. The purified enzyme(2  $\mu$ g) was placed on the gel. The gels were stained with Coomassie blue. BPB = bromphenol blue.

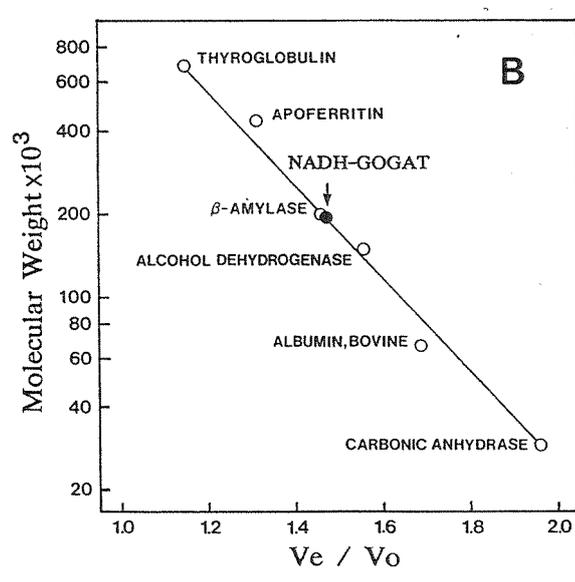
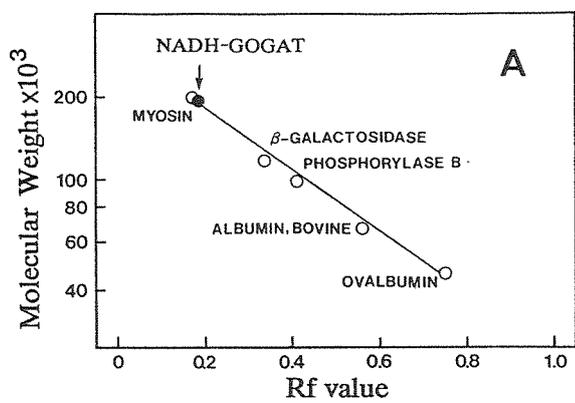


Figure 10. Subunit and native mol wt of NADH-GOGAT purified from rice cultured cells. A, SDS-PAGE. B, Sephacryl S-300 gel chromatography.

精製NADH-GOGAT標品の吸収スペクトルを分析した結果、紫外部の273nm、可視部の373nm及び440nmに吸収極大を有し、475nmに吸収の肩を有する、典型的なフラボ蛋白質様の吸収スペクトルが得られた(Fig. 11)。なお本研究では、得られた精製NADH-GOGAT標品量が少なかつたため、補欠分子団の同定は行わなかつた。

#### NADH-GOGAT精製標品の酵素反応的特性

精製NADH-GOGATの電子供与体と基質に対する特異性を調べた結果をTable 4. に示した。精製NADH-GOGATは、アスパラギンやNH<sub>4</sub> Clは反応基質とはせず、また、ピルビン酸やオキザロ酢酸もアミノ基受容体にはしなかつた。NADHの代わりにNADPHを用いた場合もほとんど活性は検出できなかつた。よって、イネ培養細胞のNADH-GOGATの酵素反応は、電子供与体としてはNADHに、アミノ基供与体としてはグルタミンに、アミノ受容体としては2-オキソグルタル酸に対して各々特異的であることが判明した。また、NADH-GOGAT反応は、GOGATの反応阻害剤であるアザセリン(Matoh et al., 1980)を4.0mM添加することにより完全に阻害された。

精製NADH-GOGATの酵素反応動力学的特性をTable 5. に示した。精製NADH-GOGATの反応における各基質に対する飽和曲線をLineweaver-Burkプロットにより解析した結果、精製標品のグルタミン、2-オキソグルタル酸及びNADHに対する $K_m$ 値は、各々811, 76, 3.0 $\mu$ Mであつた。また、NADH-GOGATのイネ培養細胞における可溶性蛋白質当たり存在量と新鮮重当たりの触媒量は、各々0.12%と0.156 $\mu$ mol glu formed / min / gF. W.であつた。精製NADH-GOGATの反応の $V_{max}$ 値は1 $\mu$ mol glu formed / min / 102 $\mu$ g enzyme proteinであつた。この $V_{max}$ 値と精製NADH-GOGATの分子量196kDから算出したイネ培養細胞NADH-GOGATのTurnover numberは、1920 mol glu formed / min / mol enzyme proteinであつた。これらの値を、部分精製標品ではあるが、比較的精製度の高いエンドウ(*Pisum sativum* L.)幼植物の黄化地上部のNADH-GOGATの値(Matoh et al., 1980)とともに、イネ緑葉のFd-GOGAT高度精製標品の値(Suzuki and Gadal, 1982)と比較してみると、2-オキソグルタル酸に対する親和力はNADH-GOGATの方が高いが、他の反応基質に対する親和力はFd-GOGATの方が高いことが

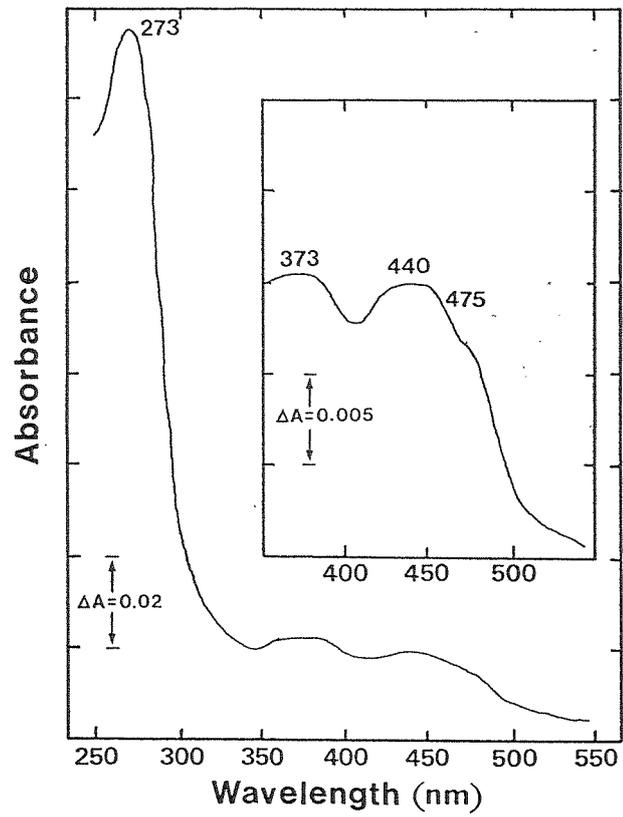


Figure 11. Absorption spectrum of the purified NADH-GOGAT.

Table 4. Specificity for electron donor and substrate of NADH-GOGAT purified from cultured rice cells.

| Treatment                             | Relative Activity |
|---------------------------------------|-------------------|
|                                       | %                 |
| Complete assay <sup>a</sup>           | 100               |
| Inhibitor                             |                   |
| + 4mM azaserine                       | 0                 |
| Electron donor                        |                   |
| - NADH + 160 $\mu$ M NADPH            | 1                 |
| - NADH + 174 $\mu$ M Fd (0.2mg/ml)    | 0                 |
| Nitrogen donor                        |                   |
| - Glutamine                           | 0                 |
| - Glutamine + 10mM asparagine         | 2                 |
| - Glutamine + 10mM NH <sub>4</sub> Cl | 3                 |
| Nitrogen acceptor                     |                   |
| - 2-oxoglutarate                      | 0                 |
| - 2-oxoglutarate + 10mM pyruvate      | 0                 |
| - 2-oxoglutarate + 5mM oxaloacetate   | 5                 |

<sup>a</sup>Complete assay includes 100mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-KOH (pH7.5), 10mM glutamine, 10mM 2-oxoglutarate, 0.16mM NADH.

Table 5. Kinetic properties of NADH-GOGAT purified from cultured rice cells.

| Properties  | Pea                                | Rice                            |                                      |
|---|------------------------------------|---------------------------------|--------------------------------------|
|   | ( <i>Pisum sativum</i> L.)         | ( <i>Oryza sativa</i> L.)       |                                      |
|   | (1) Etiolated shoots<br>NADH-GOGAT | (2) Cell cultures<br>NADH-GOGAT | (3) Green leaves<br>Ferredoxin-GOGAT |
| Specific activity <sup>a</sup> (Units/mg protein)                     | 15.6                               | 9.8                             | 35.88                                |
| % of GOGAT in soluble proteins<br>of crude extract                    | 0.07                               | 0.12                            | 0.50                                 |
| Catalytic activity (Units/g fresh weight)                             |                                    | 0.156                           | 2.54                                 |
| Turnover number (mole glutamate formed<br>/min. /mole enzyme protein) |                                    | 1920                            | 8214                                 |
| Substrate affinity; <i>K<sub>m</sub></i> values ( $\mu$ M)            |                                    |                                 |                                      |
| L-glutamine   | 400                                | 811                             | 270.570                              |
| 2-oxoglutarate  | 37                                 | 76                              | 330                                  |
| NADH  | 4.0                                | 3.0                             |                                      |
| Ferredoxin  |                                    |                                 | 5.5                                  |

(1) Match et al. (1980), (2) this study, (3) Suzuki and Gadal (1982). <sup>a</sup>One unit (U) = 1  $\mu$ mole glutamate formed/min. at 30°C.

明かとなった。特にイネ培養細胞の NADH-GOGAT の Turnover number は、イネ緑葉の Fd-GOGAT の値の約 1/4 であった。なお、イネ培養細胞の NADH-GOGAT の各基質に対する  $K_m$  値はエンドウの NADH-GOGAT の値に匹敵するものであった。

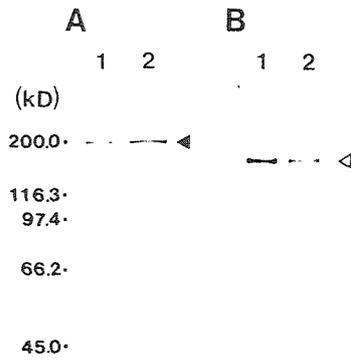
#### イネ培養細胞 NADH-GOGAT とイネ緑葉 Fd-GOGAT の免疫化学的特性の比較

イネ培養細胞 NADH-GOGAT 精製標品を常法に従って、ウサギに免疫し、得られた抗血清から、IgG 画分を調製した。作製した抗体の特異性をイムノプロット法により検定した結果を Fig. 12A. に示した。イネ培養細胞の粗抽出液中には、精製 NADH-GOGAT 標品と移動度の一致する約 200kD のバンドのみが検出された。これより、本抗体は NADH-GOGAT のみを特異的に認識すると判断した。また、イネ緑葉 Fd-GOGAT 精製標品を同様にウサギに免疫して作製した抗体も、イネ緑葉の Fd-GOGAT に特異的であった (Fig. 12B)。

次に両抗体を用いて、イネ培養細胞 NADH-GOGAT とイネ緑葉 Fd-GOGAT の蛋白質構造の比較を免疫化学的に行った。未変性状態の各 GOGAT 抗原に対する各抗血清の認識性について、オクテロニー法により検定した結果を Fig. 13 に示した。抗 NADH-GOGAT 抗血清は、NADH-GOGAT 精製標品とは沈降線を形成したが、Fd-GOGAT 精製標品とは沈降線を形成しなかった (Fig. 13A)。また、同様に抗 Fd-GOGAT 抗血清は、Fd-GOGAT 精製標品とのみ沈降線を形成した (Fig. 13B)。次に、各精製 GOGAT 標品を SDS-PAGE 後、イムノプロット法により解析した結果を Fig. 14 に示した。抗 NADH-GOGAT IgG は、最大 200ng の精製 Fd-GOGAT を用いた場合でも反応するバンドは検出されず、Fd-GOGAT を認識しないことがわかった (Fig. 14A)。また同様に抗 Fd-GOGAT IgG は、NADH-GOGAT 精製標品最大 300ng を認識しなかった (Fig. 14B)。これらの結果から、NADH-GOGAT と Fd-GOGAT は、免疫化学的に異なる蛋白質であることが判明した。

#### イネ培養細胞 NADH-GOGAT 精製標品の N 末端アミノ酸配列分析

イネ培養細胞 NADH-GOGAT のアミノ酸配列の情報を得る目的で、NADH-GOGAT 精製標品の N 末端のアミノ酸 12 残基の配列の内、その 9 残基を決定した (Fig. 15A)。



A , Anti-rice cell NADH-GOGAT IgG  
 Lane1 ; Purified NADH-GOGAT from rice cells  
 Lane2 ; Crude extract from rice cells

B , Anti-rice leaf Fd-GOGAT IgG  
 Lane1 ; Purified Fd-GOGAT from rice leaves  
 Lane2 ; Crude extract from rice leaves

Figure12. Monospecificity of anti-rice cell NADH-GOGAT IgG and anti-rice leaf Fd-GOGAT IgG.

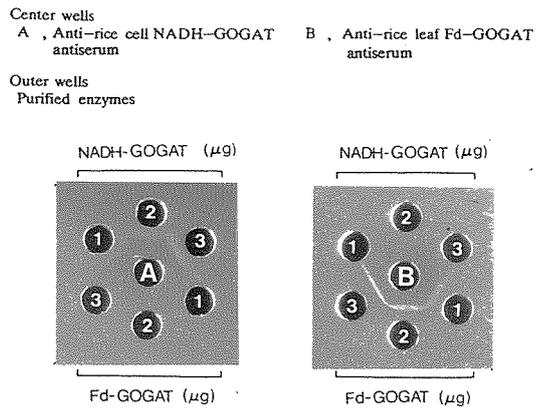
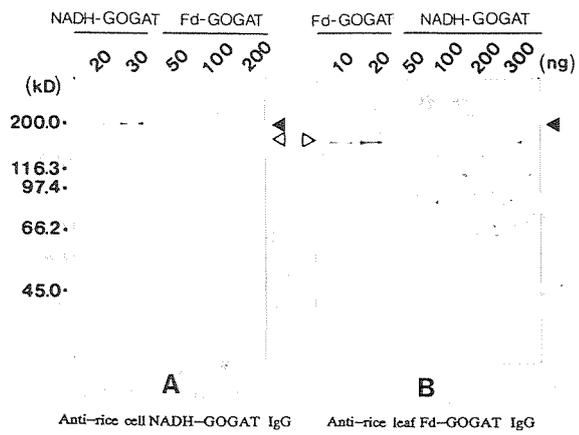


Figure13. Immunodiffusion of GOGAT isoforms with either anti-rice cell NADH-GOGAT antiserum (A) or anti-rice leaf Fd-GOGAT antiserum (B).



**Figure14.** A, Immunoblotting of the rice cell NADH-GOGAT and the rice leaf Fd-GOGAT with anti-rice cell NADH-GOGAT IgG. B, Immunoblotting of the NADH-GOGAT and the Fd-GOGAT with anti-rice leaf Fd-GOGAT IgG.

|            |  | 1   | 2   | 3   | 4   | 5   | 6   | 7   | 8   | 9   | 10  | 11  | 12  |
|------------|--|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| (Plant)    |  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| A          | Rice cultured cell <i>NADH-GOGAT</i>   | Trp | Gly | Val | Gly | Phe | Val | Ala | X   | Leu | X   | X   | Glu |
| B          | Maize leaf <i>Fd-GOGAT</i>             | Cys | Gly | Val | Gly | Phe | Val | Ala | Asn | Leu | Lys | Asn | Met |
| (Bacteria) |  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| C          | <i>E. coli</i> K-12 <i>NADPH-GOGAT</i> |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|            | Large subunit                          | Cys | Gly | Phe | Gly | Leu | Ile | Ala | His | Ile | Glu | Gly | Glu |
|            | Small subunit                          | Ser | Gln | Asn | Val | Tyr | Gln | Phe | Ile | Asp | Leu | Gln | Arg |

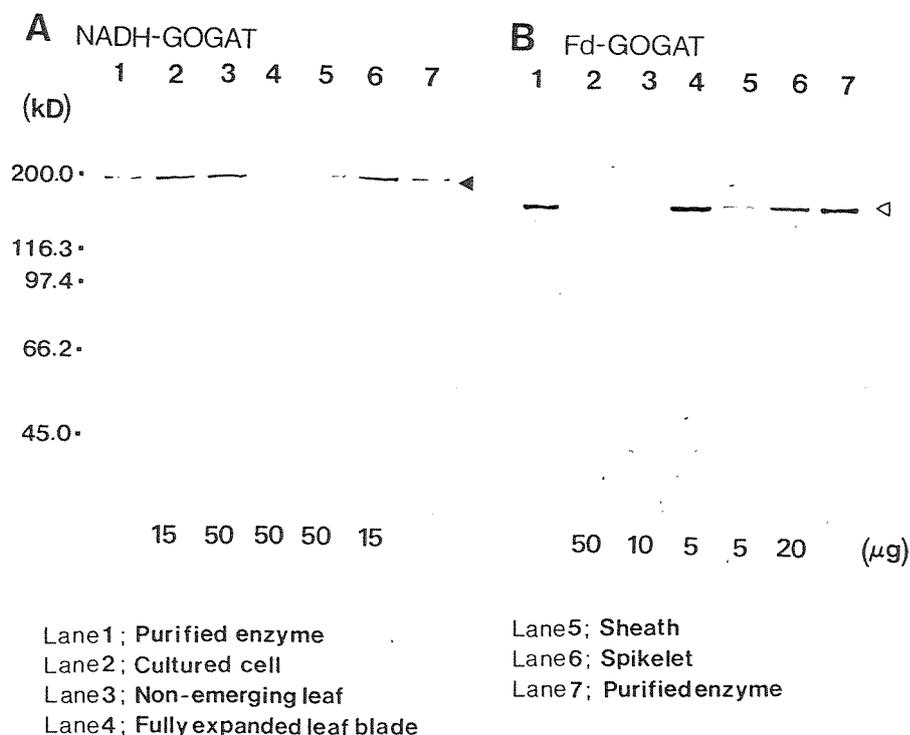
**Figure 15.** The mature N-terminal amino acid sequence of NADH-GOGAT. A; This study, B; Sakakibara et al. (1991), C; Oliver et al. (1987). Homologous amino acids are boxed. Letter X indicates unidentified residue.

この配列を、植物の GOGAT分子種としては唯一成熟蛋白質の N 末端アミノ酸配列が決定されているトウモロコシ (*Zea mays* L.) の Fd-GOGAT の配列 (Sakakibara et al., 1991) (Fig. 15B) と、微生物の GOGAT分子種である *E. coli* K-12 の NADPH-GOGAT Large subunit の配列 (Oliver et al., 1987) と比較した (Fig. 15C)。その結果、イネ培養細胞 NADH-GOGAT の Gly<sup>2</sup> から Ala<sup>7</sup> までの配列と Leu<sup>9</sup> は、トウモロコシ葉の Fd-GOGAT の配列と同様であった。また、*E. coli* K-12 NADPH-GOGAT Large subunit のアミノ酸配列とも部分的に一致していた。これより、NADH-GOGAT と Fd-GOGAT は、その一次構造上の N 末端 12 残基のアミノ酸配列中の決定された 9 残基中に相同な部分があることが判明した。

#### イネの各器官における NADH-GOGAT と Fd-GOGAT 蛋白質のイムノプロット分析

イネの生体内の窒素代謝における NADH-GOGAT の重要性を評価解析する次章からの研究に先立ち、解析対象とするイネの器官を特定すること及び本章で得られた抗 NADH-GOGAT 抗体の汎用性について検討することを目的とし、イネの各器官における NADH-GOGAT 蛋白質の可溶性蛋白質当たりの存在量をイムノプロット法により調べた。また比較として Fd-GOGAT についても同様に解析した。ここで、本研究で得られた抗 NADH-GOGAT 抗体は、イネ個体ではなく、イネ培養細胞から精製された NADH-GOGAT をウサギに免疫して作製した。また、予備実験でのイネ個体の各器官における NADH-GOGAT 活性の測定結果 (Table 1) から、緑葉などのイネ個体の器官においては NADH-GOGAT 蛋白質が極めて微量にしか存在していないことが推定された。そこで、以降の解析においては、抗体の非特異的な結合を極力排除し、極めて微量な GOGAT 抗原をも検出できるように、免疫抗原の GOGAT に対してアフィニティー精製を行った抗体を用いた。供試材料は、イネの培養細胞、葉鞘から未抽出の若い黄色葉身、緑色の完全展開葉身、葉鞘及び開花後 5 日目の登熟初期の穎果とした。精製抗 NADH-GOGAT IgG を用いたイムノプロットでは、完全展開葉身の粗抽出液中では極めて薄いバンドではあったが、解析した全ての器官、組織の粗抽出液中にイネ培養細胞の NADH-GOGAT 精製標品と移動度の一致する分子量約 200kD の単一なバンドのみが検出された (Fig. 16A)。これより、本抗

体はイネ培養細胞だけでなく、イネ個体におけるNADH-GOGAT蛋白質の解析に利用できることが明かとなった。また、NADH-GOGAT蛋白質は未抽出葉身や登熟初期の穎果等の若い生長中の器官に比較的多量に存在していることが判明した。一方、精製抗Fd-GOGAT IgGについても同様に、イネ緑葉のFd-GOGAT精製標品と移動度が一致する分子量約160kDの単一のバンドのみが、解析した全ての器官で検出された(Fig. 16B)。しかし、Fd-GOGAT蛋白質は光合成の盛んな緑色の器官に多く存在し、NADH-GOGAT蛋白質とは明確に異なる器官分布を示すことが判明した。



**Figure 16.** Monospecificity of anti-NADH-GOGAT IgG and of anti-Fd-GOGAT IgG to GOGAT isoproteins in various tissue extracts of rice plant. A, Immunoblotting of the purified rice cell NADH-GOGAT (lane 1, 7, 60 ng protein), the NADH-GOGAT in crude extract from the rice cells (lane 2, 15 μg protein), that from the non-green rice leaves (lane 3, 50 μg protein), that from the green blade of rice leaves (lane 4, 50 μg protein), that from the green sheaths of rice plant (lane 5, 50 μg protein), and that from the rice spikelets (lane 6, 15 μg protein) with anti-rice cell NADH-GOGAT IgG after SDS-PAGE. B, Immunoblotting of the purified rice leaf Fd-GOGAT (lane 1, 7, 30 ng protein), the Fd-GOGAT in the crude rice cell extract (lane 2, 50 μg protein), that in the non-green leaf extract (lane 3, 10 μg protein), that in the green leaf blade extract (lane 4, 5 μg protein), that in the green leaf sheath extract (lane 5, 5 μg protein), and that in the rice spikelet extract (lane 6, 20 μg protein) with anti-rice leaf Fd-GOGAT IgG.

#### 第4節 考察

本章では、イネ培養細胞からNADH-GOGATを高度に精製し、イネの各器官に存在するNADH-GOGAT蛋白質を認識しえる抗NADH-GOGAT特異抗体の作製に成功した。高等植物のNADH-GOGATの高度精製標品の調製と、植物個体における各器官のNADH-GOGATを認識する特異抗体の作製に成功したことは、世界で初めてのことである。

Anderson et al. (1989) は、アルファルファの根粒からNADH-GOGATを部分精製した。アルファルファの根粒のNADH-GOGAT含量は、可溶性蛋白質の約0.5%を占め、緑葉のFd-GOGAT含量に匹敵する。しかし、同研究者等は、抽出後のNADH-GOGAT活性は急激に失活するため、その精製は2日以内に終える必要があると報告した。また、抽出液として3mM DTTを含むpH7.6の20mMリン酸緩衝液を用いたが、3mM DTT, 1%(v/v) 2-mercaptoethanol等の還元剤、2-オキシグルタル酸等の基質、PMSF, Antipain等のProtease阻害剤及び安定化剤としての20%(v/v)エチレングリコール、10%(w/v)ショ糖等を添加したが、NADH-GOGAT活性の安定化に効果がなかったと報告した。本研究では、可溶性蛋白質に占めるNADH-GOGAT含量が約0.1%とイネ個体の各器官に比較して高い含量を有す増殖初期のイネ培養細胞を精製材料として選んだ。抽出液として、SH-基保護剤として0.2%(v/v) 2-mercaptoethanol, GOGATの安定化剤として2mM 2-オキシグルタル酸、1mM EDTA, Protease阻害剤として1mM PMSF, 10 $\mu$ M Leupeptin及び可溶化剤として100mM KCl, 0.05%(v/v) Triton X-100を添加したpH7.5の50mMリン酸緩衝液を用いることにより、粗酵素液中のNADH-GOGAT活性を比較的安定に保つことができた。よって、少なくともイネ培養細胞のNADH-GOGATに関しては、2-mercaptoethanol, 2-オキシグルタル酸、EDTA、Protease阻害剤及びリン酸緩衝液が、その活性の安定化に効果があり、また、イネ培養細胞はNADH-GOGATの精製に関して有効な植物材料であると考えられた。イネ培養細胞からのNADH-GOGATの精製には、Blue Sepharose CL-6Bによるアフィニティークロマトグラフィーが極めて効果的であ

った。 Match et al. (1980)もエンドウ幼植物の黄化地上部からのNADH-GOGATの精製において、同担体を用いたアフィニティークロマトグラフィーが極めて有効であることを報告した。しかし、同研究者等は緩衝液中に塩またはNADHを添加してクロマト条件を検討したが、SDS-PAGE分析で検出される分子量約 200kDのNADH-GOGATポリペプチドの主バンドの下の近接した 2本のバンドを部分精製の画分から分離することができなかった。本研究でも、このようなバンドがアフィニティークロマトグラフィー後の標品中に、微量ではあるが検出された。また、これ等のバンドは、塩またはNADHを溶出緩衝液に添加して条件検討を行ったが、アフィニティークロマトグラフィーのみでは除去できなかった。そこで、本研究においては、精製の最終段階でButyl Toyopearl 650 をクロマト担体とした疎水クロマトグラフィーを用いた。なおNakagawa et al. (1985) は、植物体の窒素同化系酵素としてNADH-GOGATと同様に精製が困難とされているNADH依存性硝酸還元酵素(NADH-nitrate reductase, EC 1.6.6.1)のホウレンソウ葉からの精製に、Butyl Toyopearl 650 を用いた疎水クロマトグラフィーが有効であることを指摘した。植物のNADH-GOGATの精製に疎水クロマトグラフィーを適用した結果、アフィニティークロマトグラフィー後の標品で検出された不純ポリペプチドの除去に成功し、最終精製標品は SDS-PAGE, Native-PAGE分析において単一なバンドを示した。Match et al. (1980)は、これ等の不純ポリペプチドがNADH-GOGATの分解物である可能性を指摘した。しかし、本研究においては、精製抗 NADH-GOGAT 抗体がアフィニティークロマトグラフィー後の標品中のこれ等のポリペプチドを認識しなかった。よって、少なくとも本研究で見られたこれ等の微量ポリペプチドは、NADH-GOGATの分解物ではなく、ピリジンヌクレオチド依存性の異種蛋白質由来のポリペプチドと考えられた。また、本研究においては、精製の初段階でもButyl Toyopearl 650 を用いた疎水クロマトグラフィーを適用したが、アルファルファ根粒のNADH-GOGATの精製過程で生じた活性の急激な消失は本研究では見受けられなかった。よって、NADH-GOGATの精製にはBlue Sepharoseを用いたアフィニティークロマトグラフィーとともにButyl Toyopearl 650 を用いた疎水クロマトグラフィーが極めて有効であることを指摘する。しかし、本研究

ではNADH-GOGATの精製に約10日間を費やし、活性の最終的な回収率は6.1%であった。今後、更に最終精製標品の高回収率化をはかるためには、上記クロマト担体を用いた、中速液体クロマトグラフィー(FPLC)や高速液体クロマトグラフィー(HPLC)の適用が必要と思われる。

Avila et al. (1984)は、トマト葉からのNADH-GOGAT部分精製標品がNADPHも電子供与体となりうる結果を報告していた。同様にSuzuki et al. (1982)は粗抽出液を用いた場合、イネにおいてもNADPH-GOGAT活性が検出できることを報告している。しかし、本研究で得られたNADH-GOGAT高度精製標品の酵素反応は、NADH、グルタミン、2-オキソグルタル酸に対して特異的であった。この電子供与体と基質に対する反応特異性は、エンドウ地上部の部分精製標品(Matoh et al., 1980)とインゲン根粒の精製標品(Chen and Cullimore, 1988)の結果と一致する。よって、イネにおけるNADPH-GOGAT活性は、粗酵素液中のPhosphatase反応に起因するものと考えられる。しかし、現時点では微生物と同様にNADPH-GOGATが粗抽出液中に存在している可能性を完全には否定できないものと思われる。

イネ培養細胞のNADH-GOGAT精製標品の電子供与体と各基質に対する $K_m$ 値は、エンドウ地上部の部分精製標品(Matoh et al., 1980)とインゲン根粒の精製標品(Chen and Cullimore, 1988)の各値に匹敵した。イネ緑葉のFd-GOGAT精製標品の値(Suzuki et al., 1982)と比較すると、グルタミンに対する親和性はFd-GOGATの方が高いが、2-オキソグルタル酸に対してはNADH-GOGATの方が親和性が高かった。また、NADH-GOGATとFd-GOGAT精製標品の共通の反応特性として、グルタミンに対する親和力よりも2-オキソグルタル酸に対する親和力の方が高いということが判明した。このことは、GOGATの酵素反応がグルタミン濃度によつて影響を受けやすいということを示唆すると思われる。また、特にNADH-GOGATの反応は、Fd-GOGATの反応よりも、グルタミン濃度で制限されやすく、炭素骨格供給量の少ない場所では、Fd-GOGATよりも有効に機能しうることが示唆された。イネ培養細胞のNADH-GOGATのturnover numberは、イネ緑葉のFd-GOGATの値の約1/4であった。緑葉のFd-GOGATの主な生理的役割は、Fd-GOGATを欠損したシロイナ

ズナ及びオオムギの変異体を用いた研究等から、葉緑体型GS<sub>2</sub>と共に、光呼吸系で生ずるアンモニアを再同化することであることがほぼ明らかにされている (Somerville and Ogren, 1980 ; Kendall et al., 1986 ; Wallsgrove et al., 1987)。また、Fd-GOGATを欠損した変異体は光呼吸の生じない環境下では正常な生育を示し、かつNADH-GOGAT活性を有することから、NADH-GOGATが光呼吸系以外の窒素代謝の主要な部分を担っているものと推定されている (Morris et al., 1989)。ここで、光呼吸系からのアンモニアの放出速度は、硝酸の同化や蛋白質の分解に由来するアンモニアの生成速度よりも約10倍速いと考えている (Yamaya, 1988)。よって、Fd-GOGATのturnover number が光呼吸系から放出されるアンモニアを同化するのに機能的に十分な触媒力を示すならば、turnover numberがFd-GOGATの値の約1/4であるNADH-GOGATは、生成するアンモニアが光呼吸系の約1/10である光呼吸系以外での窒素利用を十分に担える機能を有していると言える。NADH-GOGATとFd-GOGATのturnover numberの違いから、これら2種類のGOGATが、それぞれ植物体内において根本的な生理的役割が異なっている可能性も推定できる。

本研究において、イネ培養細胞NADH-GOGATが分子量約200kDの巨大単量体であることが判明した。この結果は、インゲン (Chen and Cullimore, 1988) とアルファルファの根粒のNADH-GOGATの結果 (Anderson et al., 1989) と一致した。また、イネ葉Fd-GOGATは分子量約160kDのポリペプチドから構成されていた (Hayakawa et al., 1990) ことから、NADH-GOGATはFd-GOGATよりも約40kD大きいポリペプチドであることが判明した。

吸収スペクトル分析から、イネ培養細胞NADH-GOGATはフラボ蛋白質であることが示唆された。Miller and Stadtman (1972) は、*E. coli* NADPH-GOGATが単量体1分子当たり2分子のフラビン (FAD/FMN=1.30)、9.6分子のFe、及び7.6分子の酸不安定S<sup>2-</sup>を含むことを報告した。また、Trotta et al. (1974) は *A. aerogenes* NADPH-GOGATが1分子当たり1.7分子のフラビン (FAD/FMN=0.8)、6.7分子のFe、及び13分子の酸不安定S<sup>2-</sup>を含むことを示した。一方Hirasawa and Tamura (1984) は、ホウレンソウ葉Fd-GOGATが単量体1分子当たり2分子の

フラビン(FAD/FMN=1)、約4分子のFe、及び4分子の酸不安定 $S^{2-}$ を含むことを報告した。また、近年 Knaff et al. (1991) は電子常磁性共鳴(EPR)分析、磁気円二色性分析及び共鳴ラマン分光分析により、ホウレンソウ葉Fd-GOGAT蛋白質分子には[3Fe-4S]クラスターが唯一のFe-S補欠分子団として存在することを示した。しかし、これらの報告とは異なりSuzuki and Gadal (1982) はイネ葉Fd-GOGATはフラボ蛋白質様の吸収スペクトルを示さないことを示していた。本研究でも精製イネ葉Fd-GOGATの吸収スペクトル分析結果は、ほぼ Suzuki and Gadal (1982)等の結果と同様であった。よって、少なくともイネにおいては、NADH-GOGATとFd-GOGATの蛋白質構造に、分光学的な違いも見出された。またピリジンヌクレオチド依存性GOGATの共通の蛋白質構造的特徴として、フラボ蛋白質であることが挙げられると思われる。

抗NADH-GOGAT抗体と抗Fd-GOGAT抗体を用いた、NADH-GOGATとFd-GOGATの蛋白質構造の免疫化学的な比較解析の結果から、高次構造を保った状態及びポリペプチド鎖をほどいた状態の各GOGAT抗原を相互の抗体が認識しないことが明らかとなった。よって、NADH-GOGATとFd-GOGATが免疫化学的に異なる蛋白質分子であることが考えられ、各抗体は未変性状態の各GOGAT抗原をウサギに免疫して得られたもので、ポリペプチド鎖上の抗原決定基は不明である。また、各抗原決定基を認識する抗体の存在量も、免疫したウサギ個体の抗体生産性に依存するため、一様では無いと思われる。そこで、精製イネ培養細胞NADH-GOGATのN末端アミノ酸配列分析を行った結果、イネ培養細胞NADH-GOGATの決定した9残基の内のGly<sup>2</sup>からAla<sup>7</sup>までの配列とLeu<sup>9</sup>は、トウモロコシ葉Fd-GOGATの配列(Sakakibara et al., 1991)と同様であった。これ等の結果は、NADH-GOGATとFd-GOGATが、その一次構造上の少なくとも決定されたN末端の9残基のアミノ酸配列中に相同な部分を有するが、未変性状態での蛋白質構造が異なっていることを示している。今後更に、NADH-GOGATの全ての一次構造をコードするcDNAを単離して、その構造解析を行うことが必要と思われる。

イネの各器官からの粗抽出液を、精製抗NADH-GOGAT抗体と精製抗Fd-GOGAT抗体を用いてイムノブロット分析した結果、解析した全ての器官で各精製標品と移動

度の一致する単一のバンドのみが検出された。この結果から、イネの各器官に存在するNADH-GOGAT蛋白質とFd-GOGAT蛋白質が各々同一の分子量のポリペプチドから構成されていることが明らかとなった。しかし、現時点ではこれ等の各器官に存在するNADH-GOGATとFd-GOGATの分子種の多様性については不明である。Chen and Cullimore (1988) 等は、インゲン根粒からNADH-GOGAT I とNADH-GOGAT II の 2種のアイソザイムを精製した。NADH-GOGAT I は分子量210kD の単量体であり、NADH-GOGAT II は分子量200kD の単量体であった。また、両アイソザイムには、分子量の違いに加え、反応基質に対する  $K_m$  値及び反応の至適pHに違いが認められた。しかし、Anderson et al. (1989) は、インゲン以外のマメ科植物の根粒のNADH-GOGATに関して、その分子種に多様性は見られなかったことを報告している。よって、イネにおいてもNADH-GOGAT分子種の多様性についての慎重な検討が必要と思われる。このためには、更にイネの各器官からNADH-GOGATを精製し、その酵素学的、蛋白質的特性を調べる生化学的解析に加え、イネの各器官からNADH-GOGATをコードするcDNAを単離してその構造解析を行うことが今後必要と思われる。

また、イネの各器官の NADH-GOGAT と Fd-GOGAT のイムノブロット分析から、NADH-GOGAT蛋白質が未抽出葉身や登熟初期の穎果等の若い生長中の器官に比較的多量に存在していることが明らかとなった。また、Fd-GOGAT蛋白質が光合成の盛んな緑色の器官に多く存在していることが明かとなり、NADH-GOGAT 蛋白質と Fd-GOGAT蛋白質が明確に異なる器官分布を示すことが判明した。この器官分布の違いは、イネにおいて、両GOGAT が異なる発現調節を受けていることを示唆するのみならず、両GOGAT の根本的な生理的役割の違いを示しているものと思われる。Fd-GOGATの器官分布の結果は、上記のように、緑葉において光呼吸系から多量に放出されるアンモニアをGS<sub>2</sub> とともにFd-GOGATが再同化しているという結果を更に支持している。一方、役割が不明のまま残されているNADH-GOGATに関して、本章の研究において、NADH-GOGAT蛋白質が多く発現している器官が特定できた。そこで次章以降、生長中の若い未抽出葉身と登熟過程の穎果を研究材料とし、これ等の器官の窒素代謝におけるNADH-GOGATの重要性を評価解析した。

## 第二章 イネ着生葉におけるNADH-GOGAT活性と蛋白質の葉位別分布

### 第一節 緒言

世界三大作物の一つであるイネでは、通常生長中の若い葉や穂を構成する窒素の半分以上が老化葉からの転流に由来する。Mae et al. (1982)は、 $^{15}\text{N}$ を用いたトレーサー実験から、イネの穂に蓄積する窒素の40-70%が老化葉からの転流窒素に由来すると見積もった。ゆえに、イネにおける窒素転流は、コメの生産性、品質、栄養等を直接支配しうる重要な機構といえる。イネにおける窒素転流の過程は、以下に示す4段階から成る(Fig. 17)。

- ①ソースとなる老化組織での蛋白質等の分解
- ②ソース組織でのグルタミンやアスパラギン等のアミドを主とする転流形態への変換
- ③シンクとなる生長中の葉や穂等の若い組織への篩管を介した転流
- ④シンク組織での転流窒素の再利用

①から③に関しては、古くから物質レベルでの研究が多くなされ、最近では分子レベルでの解析も行われており、比較的研究が進んでいる。①に関して、葉を構成する全窒素の約70%が蛋白質態窒素であることから、蛋白質は重要な転流窒素源と考えられている。特に、葉緑体のストロマに存在し炭酸固定の初期反応を触媒する Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase / oxygenase (Rubisco; EC 4.1.1.39)は、可溶性蛋白質の約50%を占めることから、重要な転流窒素源と考えられている(Huffaker et al., 1974 ; Thomas, 1978 ; Mae et al., 1985)。②に関しては、Kamachi et al. (1991 ; 1992a)は、イネ葉身の老化過程を通じて細胞質型GS<sub>1</sub>のmRNAと蛋白質が一定に保たれており、葉緑体のRubisco, GS<sub>2</sub>, Fd-GOGATとは異なる挙動を示すことを明かにした。更に、GS<sub>1</sub>特異抗体を用いたTissue printイムノプロット法により、GS<sub>1</sub>抗原が葉身の維管束組織に主に存在することを明らかにした(Kamachi et al., 1992b)。同研究者等は、主な転流形

***N-remobilization***

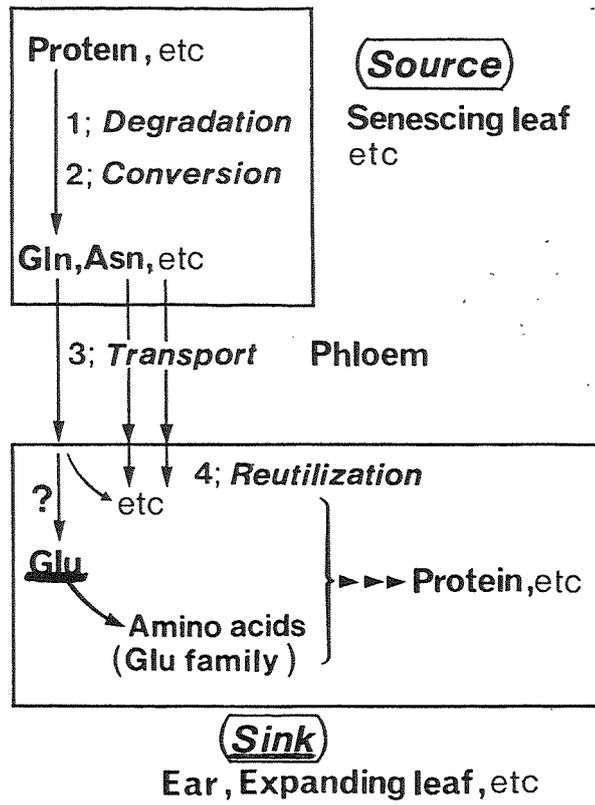


Figure17. Process of nitrogen remobilization in rice plants.

態がGSにより合成されるグルタミンと、グルタミンから合成されるアスパラギンである結果(Sechley et al., 1992) を合わせて、老化葉において維管束組織に存在する細胞質型GS<sub>1</sub> が転流グルタミンの合成を行っていることを示唆した。③に関して、Hayashi et al. (1990)は、インセクトレーザー法を用いて、イネの篩管液中には約0.1Mという高濃度の遊離アミノ酸が存在し、その全アミノ酸の42%をグルタミンが、また12.4%をアスパラギンが占めるという事例を報告した。しかし、④のシンク組織での転流窒素の再利用に関する機構は、その重要性にも関わらず研究例はほとんどない。イネ葉身の主要な遊離アミノ酸は、葉齢に関わらずグルタミン酸であり、登熟過程のイネの穂においてもグルタミン酸は、全遊離アミノ酸の20-34%を占める(Mae and Higurashi unpublished data)。また、グルタミン酸は窒素代謝の中心となるアミノ酸の一つであり、グルタミン、プロリン、アルギニンなどのGlutamate familyと一般に呼ばれるアミノ酸群やクロロフィルなどの合成に直接利用されるのみならず、アミノ基転移反応において他のアミノ酸合成に関与する(Sechley et al., 1992)。従って、生長中の若い葉及び穂における転流窒素の再利用機構の初期反応の一つとして、転流して来たグルタミンのグルタミン酸への変換反応が必要であり、この反応はシンク組織における窒素の再利用機構を考えた場合極めて重要な位置を占める。この変換を触媒する可能性のある酵素としてGOGATが挙げられる。第一章で述べたように、Fd-GOGATは、GS<sub>2</sub>と共に光呼吸に由来するアンモニアの再同化の局面で主要な役割を担っていることが多くの研究で明らかにされている(Somerville and Ogren, 1980; Kendal et al., 1986; Wallsgrove et al., 1987)。一方、第一章の研究から、NADH-GOGAT蛋白質がイネの生長中の若い葉身や登熟過程の穎果に主に存在することが判明した。これより、シンク組織において、転流して来たグルタミンをグルタミン酸へNADH-GOGATが変換し得る可能性があるかと推定した。

そこで本章では、この可能性を更に詳細に検討するため、イネ着生葉を葉位別に葉身と葉鞘に分け、NADH-GOGAT活性と蛋白質の存在量を定量的に解析した。また、Rubisco、Fd-GOGAT、GS<sub>2</sub>、及び細胞質局在型のGS<sub>1</sub>についても、同様に葉位別の各ポリペプチド含量を調べNADH-GOGATと比較解析した。

## 第二節 材料及び方法

### 植物材料

植物材料のイネ (*Oryza sativa* L. cv. Sasanishiki) は、Makino et al. (1983)の方法に従って、1991年に、自然光下ガラス室内で播種後75日間水耕栽培した。1990年に収穫したイネ種子を水洗した後、37℃の恒温器中で水に浸漬して3日間発芽させた。鳩胸状態となった発芽種子を、pH5.2に調整した水道水に浮かべたナイロンネット上に播種した。この状態で30日間生育させた幼植物の12個体を一組として、水耕液で満たした3.6L容のプラスチックポット(1/5000 a)に3本植えて移植した。水耕液は、Makino et al. (1983)の方法に従って調製した。その基本組成を以下に示す。

| Major elements                   | Minor elements                               |
|----------------------------------|--|
| 1 mM $\text{NH}_4 \text{NO}_3$   | 45 $\mu\text{M}$ Fe-EDTA                     |
| 0.6mM $\text{Na}_2 \text{HPO}_4$ | 50 $\mu\text{M}$ $\text{H}_3 \text{BO}_3$    |
| 0.3mM $\text{K}_2 \text{SO}_4$   | 39 $\mu\text{M}$ $\text{MnSO}_4$             |
| 0.2mM $\text{CaCl}_2$            | 0.3 $\mu\text{M}$ $\text{CuSO}_4$            |
| 0.4mM $\text{MgCl}_2$            | 0.7 $\mu\text{M}$ $\text{ZnSO}_4$            |
|                                  | 0.1 $\mu\text{M}$ $\text{Na}_2 \text{MoO}_4$ |

水耕液はpH5.2に調整した。また、水耕液は一週間ごとに更新し、水耕液の濃度はイネの生長に従い以下のように上昇させた。

| 播種後の日数 (Day) | 水耕液濃度 |
|--------------|-------|
| 30-45        | 1/4   |
| 45-59        | 1/2   |
| 59-75        | 3/4   |

第 9葉身が第 8葉鞘から抽出中の主稈の12個体について、下位の第 5葉から上位に向かって、葉身と葉鞘に分けて収穫した(Fig. 18)。 収穫した試料の葉齢は、約 8.6-8.7葉位期であり、第 8葉以下の葉は完全展開葉であった。 また、第 9葉については、第 8葉鞘の外に抽出した葉身部分(9o)と未抽出の葉身部分(9i)及び黄化葉鞘の三つの部分に分けて収穫した。 第 9葉鞘内の光合成器官の未発達な第10葉も実験に供した。 第10葉は、葉鞘がまだ未発達であつたことから全ての組織を第10葉身とした。 収穫した各試料は、新鮮重を測定後、液体窒素にて瞬時凍結し、使用するまで -80℃に保存した。

#### 粗酵素液の調製

粗酵素液の調製は第一章の材料及び方法に従って行った。 4℃にて、新鮮重として0.45-1.3gの凍結試料に新鮮重に対して1-3倍量のGOGAT用抽出緩衝液と0.3倍量の石英砂を加え、乳鉢磨砕した。 この磨砕液を4℃にて39,100xg,30分間遠心した後、その上清を得た。 遠心後の上清の一部は、可溶性蛋白質の定量及びNADH-GOGAT, Fd-GOGAT, GS<sub>1</sub>, GS<sub>2</sub>, Rubiscoのイムノプロット分析に供した。 また、残りの上清を第一章の材料と方法に従って、Sephadex G-25カラムを用いて脱塩した後、その蛋白質画分を集めて、GOGATの酵素活性測定に供した。

Plant Materials  
Rice (*Oryza sativa* L. cv Sasanishiki)  
Plant Culture  
Water culture in a greenhouse

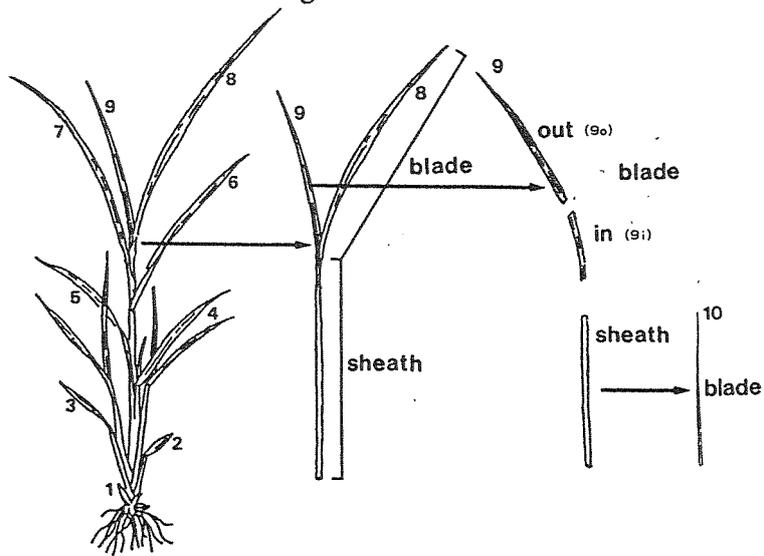


Figure 18. Leaf position (adapted from Hoshikawa 1975) and harvest. The outer green portion and non-green portion of the ninth leaf blade were indicated as 9o and 9i, respectively.

## GOGAT 酵素活性の測定及び可溶性蛋白質の定量

NADH-GOGATとFd-GOGATの酵素活性の測定は、第一章の材料及び方法に従って行った。GOGAT 活性の 1unitは、30°Cで 1分間に 1 $\mu$ mol のグルタミン酸を生成するのに必要な酵素量とした。GOGAT 酵素活性の測定は、別個の 2試料からの粗酵素液を用いて、各粗酵素液について 3連で行った。

可溶性蛋白質の定量は、第一章と同様に BSAを標準蛋白質としてBradford (1976)の方法に従って行った。

## 精製抗イネ培養細胞NADH-GOGAT IgG、精製抗イネ葉Fd-GOGAT IgG、抗イネ葉GS<sub>2</sub> IgG、抗イネ葉GS<sub>1</sub> 合成ペプチド IgG及び抗イネ葉Rubisco IgG の調製

精製抗イネ培養細胞NADH-GOGAT IgGと精製抗イネ葉Fd-GOGAT IgGは、第一章の研究で調製した精製抗体を用いた。

抗イネ葉GS<sub>1</sub> 合成ペプチド IgGは当研究室のKamachi et al. (1992)によって調製されたものを用いた。Sakamoto et al. (1989) が報告したイネGS<sub>1</sub> cDNAの塩基配列から推定されるアミノ酸配列の内、イネGS<sub>2</sub> のアミノ酸配列と相同性の無い+1 - +17のアミノ酸配列部分に相当する17残基の合成ペプチドをovalbumin と結合させた後、ウサギに免疫して抗血清を得た。IgG 画分の調製は、第一章と同様な方法で行われた。以下に合成ペプチドのアミノ酸配列を示す。



抗イネ葉GS<sub>2</sub> IgG は当研究室のKamachi が調製したものを用いた(Hayakawa et al., 1990)。イネGS<sub>2</sub> は、イネ緑葉から、DEAE-Sephacel 陰イオン交換クロマトグラフィー、Hydroxyapatiteクロマトグラフィー、Sephacryl S-300 ゲルろ過により精製された。更にこのGS<sub>2</sub> 精製標品を6.5% Native-PAGEに供して異種蛋白質を除いた後、この精製標品をウサギに免疫して抗血清を作製した。IgG 画分の調製は第一章に従って行った。

抗イネ葉Rubisco IgG は、当研究室のMakino et al. (1983) によって作製された抗血清から、第一章に従ってIgG 画分を調製して用いた。

## イムノプロット分析による NADH-GOGAT , Fd-GOGAT , GS<sub>1</sub> , GS<sub>2</sub> , Rubiscoポリペプチドの定量

各イネ組織から上記の方法に従って抽出した可溶性蛋白質を、第一章の材料と方法と同様にSDS-PAGEに供して各ポリペプチドを分離した。 NADH-GOGATとFd-GOGAT ポリペプチドにおいては、7%(w/v) の分離ゲルを用い、また、GS<sub>1</sub> , GS<sub>2</sub> , Rubisco の各subunit ポリペプチドについては、12.5%(w/v)の分離ゲルを用いた。

NADH-GOGATポリペプチドについては、第一章と同様に、SDS-PAGE後Zeta-probe膜に電氣的に転写して、TTBS-milk 溶液で50倍希釈したアフィニティー精製抗イネ培養細胞NADH-GOGAT IgGと37°Cで12時間反応させ、アルカリフォスファターゼ標識ヤギ抗ウサギ IgG (Fc)(Promega 社) を二次抗体に用いて検出した。

Fd-GOGAT, GS<sub>1</sub> , GS<sub>2</sub> , Rubiscoの各ポリペプチドについては、Towbin et al. (1979)の方法に従ってイムノプロット分析を行った。 SDS-PAGE後のゲルは、冷却した転写緩衝液(20% (v/v)のmethanolを含むpH8.3 の25mMトリス-192mMグリシン緩衝液) 中でニトロセルロース膜(Pore size 0.45  $\mu$ m , Advantec Toyo 社 )、Whatmann 3MM濾紙、スポンジと重ね、Trans-Blot (Bio Rad 社) を用いて、4°Cで30V の定電圧下転写した。 転写時間は、Fd-GOGATについては16時間、GS<sub>1</sub> , GS<sub>2</sub> , Rubiscoについては12時間とした。 転写後の膜は、PBS 溶液(0.9% (w/v)のNaClを含むpH7.2 の10mMリン酸ナトリウム緩衝液) で 5分間洗浄した。 以下の全ての操作は37°Cで行った。 洗浄後の膜は、5% (w/v)のskim milk と0.05% (v/v) のTween-20を含むPBS 溶液(PBST-milk) で一時間処理して、蛋白質結合siteのマスキングを行った。 処理後の膜は、0.3%(w/v) の脱脂BSA(Sigma 社) を含むPBS 溶液 (PBS-BSA)で下記のように希釈した各一次抗体溶液に一時間浸積して、抗原抗体反応を行わせた。 Fd-GOGATについてはアフィニティー精製抗イネ葉Fd-GOGAT IgGを50倍希釈して用い、GS<sub>1</sub> については、抗イネ葉GS<sub>1</sub> 合成ペプチドIgG を1000倍希釈して用いた。 また、GS<sub>2</sub> とRubisco については、抗イネ葉GS<sub>2</sub> IgG と抗イネ葉Rubisco IgG をそれぞれ500 倍希釈して用いた。 反応後の膜は、PBST-milk 溶液で20分間、合計 3回洗浄した。 次に洗浄後の膜を、PBS-BSA 溶液で希釈した二次抗体溶液に一時間浸積した。 Fd-GOGAT、GS<sub>1</sub> ,

GS<sub>2</sub> については、アルカリフォスファターゼ標識ヤギ抗ウサギ IgG(Fc) (Promega社) を7500倍希釈して用いた。 Rubisco については、西洋ワサビパーオキシダーゼ標識ヤギ抗ウサギ IgG (H+L) (Bio Rad社) を2000倍希釈して用いた。 この後、膜を同様にPBST-milk 溶液で10分間、合計 3回洗浄した。 更にPBS 溶液で5分間洗浄して、膜からTween-20を除いた。 Fd-GOGAT, GS<sub>1</sub>, GS<sub>2</sub> の各ポリペプチドについては、第一章の材料と方法に従って、Promega 社のNBT とBCIPをアルカリフォスファターゼ反応の発色基質に用いて検出した。 Rubisco のsub-unitポリペプチドについては、Bio Rad 社の推奨方法に従って以下のように検出した。 4-chloro-1-naphtol (HRP 発色剤, BioRad 社) 18mgを冷却した6mL のmethanolに溶かし、30mLのPBS 溶液に18 $\mu$ L の H<sub>2</sub> O<sub>2</sub> (30%(v/v))を加えた溶液と混合して発色液を調製した。 洗浄後の膜を発色液に浸してRubisco subunitポリペプチドを検出した後、脱塩蒸留水で繰り返し洗浄して反応を停止させた。

各ポリペプチド量は、デンストメーター (Shimadzu CS-930) を用いて膜上の発色したバンド強度を測定することにより定量した。 アルカリフォスファターゼ反応により発色したバンドは、530nm の反射光で測定し、また、パーオキシダーゼ反応により発色したバンドは、560nm の反射光で測定した。

供試した組織の可溶性蛋白質に占めるNADH-GOGATポリペプチド量は極めて微量であったので、約60 $\mu$ L の大容量のウェルから成るゲルを作製し各粗抽出液を載せてSDS-PAGEを行った。 NADH-GOGATの分析には可溶性蛋白質量にして、葉身の粗抽出液は30 $\mu$ g を、葉鞘の粗抽出液は10 $\mu$ g を供した。 まお、NADH-GOGATポリペプチドの分解を避けるためTCA 沈殿等の濃縮操作は行わなかった。 分析にあたり、上記蛋白質量の各粗抽出液と50ngの精製NADH-GOGAT標品を供したプロット及び第 9葉身の未抽出部分(9i)からの粗抽出液20 $\mu$ g と20-100ngの精製NADH-GOGAT 標品を供した検量線用のプロットの 2枚のプロットを実験毎に作成し、これ等を用いてNADH-GOGATポリペプチド量を定量した。 また、同様にFd-GOGAT, とGS<sub>2</sub> の各ポリペプチドについては、標準蛋白質として精製標品の各々30ngと20ngを分析に供して定量した。 また、定量は精製標品の蛋白質量とデンストメーター解析で求めたピーク面積が正比例関係にある範囲で行った。 一方、GS<sub>1</sub> ポ

リペプチドについては、精製標品を得ていないため、粗抽出液の可溶性蛋白質量とデンストメーター解析で求めたピーク面積が正比例関係にある範囲を確認し、この範囲内で最大のピーク面積値を示す試料の値に対する相対値として定量した。

Rubiscoのsubunit ポリペプチド量もGS<sub>1</sub> ポリペプチドと同様に定量した。各酵素ポリペプチドのイムノプロット分析は2回以上行い、ほぼ同様な結果が得られた。

### 第三節 結果

#### イネの各葉位の葉身と葉鞘における新鮮重と可溶性蛋白質含量

イネは、下位葉から上位葉に向かって若い組織となっている。本研究では、イネ主稈12個体の下位の第5葉から最上位の第10葉までの葉身と葉鞘を各々収穫した。収穫時のイネでは、第10葉は第9葉鞘中に在り黄化組織であった。第9葉身は第8葉鞘から全葉身のおよそ半分が抽出していた。第8葉鞘外部の第9葉身部分(9o)は完全な緑色組織であり、第8葉鞘内部の未抽出部分(9i)は外部に近い部分は黄緑色だった。第9葉鞘は黄化組織であった。第5葉から第8葉までは完全展開葉であったが、第5葉身の先端部分はすでに緑色が薄れ肉眼的にも老化が進行していることが観察された。

イネの各葉位における葉身と葉鞘の組織当たりの新鮮重をFig. 19A に示した。葉身においては、第10葉身と未抽出の第9葉身部分(9i)の新鮮重は葉鞘外に抽出した葉身部分(9o)よりも低い値を示した。また、完全展開葉身では、葉齢の進んだ下位葉身に向かって低くなった。葉鞘でもほぼ同様であった。

Fig. 19B には、各試料における新鮮重当たりの可溶性蛋白質含量を示した。完全展開葉身の可溶性蛋白質含量は新鮮重当たり約20mg程度であり、組織当たりの新鮮重の変化と同様に、葉齢の進んだ下位葉身に向かって可溶性蛋白質含量は減少した。一方、非緑色組織の第10葉身と未抽出の第9葉身部分の新鮮重当たりの可溶性蛋白質含量は、各々約9mgと約5mgであり完全展開葉身の含量の半分以下であった。葉鞘の新鮮重当たりの可溶性蛋白質含量は5mg以下であり、葉齢が進むにつれて葉身と同様に減少した。

#### イネ着生葉におけるRubisco蛋白質の葉位別分布

イネの各葉位における葉身と葉鞘のRubisco Large subunit (LSU) ポリペプチド相対含量をイムノプロット法により分析した(Fig. 20A)。可溶性蛋白質当たりのRubisco LSU ポリペプチド相対含量は、完全展開葉身で多く、また、葉鞘で

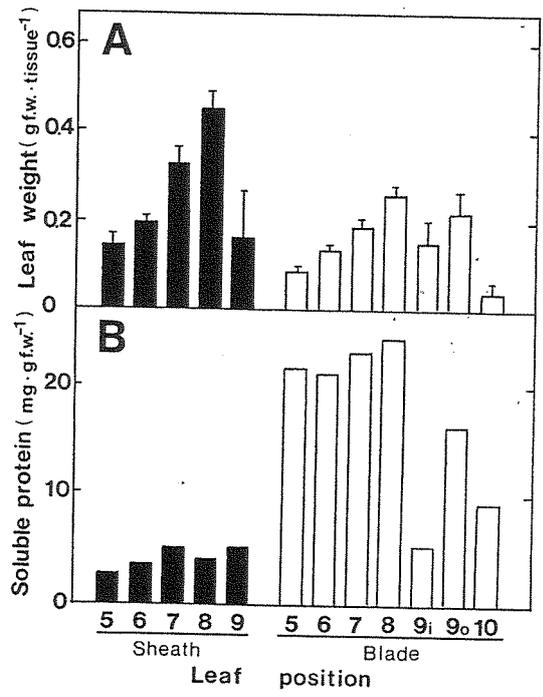


Figure 19. Determination of the tissue weight (A) and soluble protein content (B) in various positions of leaf blade (white bars) and leaf sheath (black bars) of rice plants.

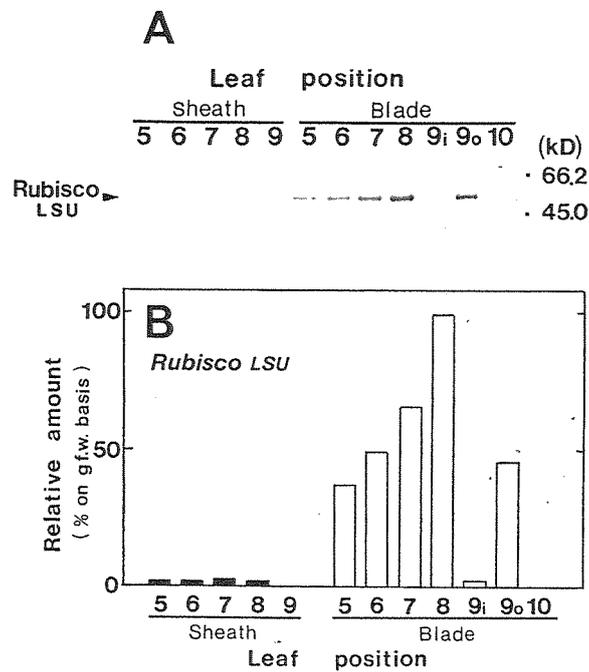


Figure 20. Determination of relative abundance of Rubisco LSU (B) in various positions of leaf blade (white bars) and leaf sheath (black bars) of rice plants. For immunoblotting of Rubisco LSU (A) with antirice leaf Rubisco IgG, 50ng of soluble protein was first separated by SDS-PAGE. The intensity of developed color on the membrane was measured by a densitometer and the peak areas were expressed as the percent of maximum on a fresh weight basis. Numerals indicated the leaf positions. The expanding green portion and non-green portion of the ninth leaf blade was indicated as 9<sub>o</sub> and 9<sub>i</sub>, respectively.

は下位に向かいやや増加した。

新鮮重当たりに換算した各試料のRubisco LSU ポリペプチドの相対含量をFig. 20B に示した。新鮮重当たりのRubisco LSU ポリペプチドの相対含量は、完全展開葉身である第 8葉身で最も高かった。また、完全展開葉身では葉齢が進むにつれて、可溶性蛋白質の減少に先立ち(Fig.19B)、Rubisco LSU の相対含量は減少した。非緑色の第10葉身、未抽出の第 9葉身部分(9i)及び解析した全ての葉鞘における新鮮重当たりのRubisco LSU ポリペプチドの相対含量は、第 8葉身の含量の 2% 以下だった。

#### イネ着生葉におけるNADH-GOGAT活性及びFd-GOGAT活性の葉位別の変動

各試料における新鮮重当たりの各GOGAT 活性をTable6に示した。新鮮重当たりのNADH-GOGAT活性は、未抽出の第 9葉身部分(9th inside)と第10葉身で高く、抽出後の葉身及び下位の葉身ほど低かった。たとえば、完全展開し光合成を活性に営むと思われる第 7葉身及び老化期と思われる第 5葉身の新鮮重当たりのNADH-GOGAT 活性は、第10葉身のNADH-GOGAT活性に比較して、各々20% と16% と低い値であった。葉鞘では、ほぼ一定の傾向を示した。一方、新鮮重当たりのFd-GOGAT活性は光合成の盛んな完全展開葉身で高く、NADH-GOGAT活性の葉位別分布とは異なっていた。未抽出の第10葉身のFd-GOGAT活性を、完全展開葉身である第 7葉身のFd-GOGAT活性と比較すると、第10葉身ではわずかに3.6%にすぎない低い活性であった。葉鞘のFd-GOGAT活性は、未抽出の第 9葉鞘では抽出後の葉鞘よりも低く、また抽出後の第 7葉鞘から下位の葉鞘ではほぼ一定であった。各試料におけるNADH-GOGAT活性に対するFd-GOGAT活性の比を比較すると、緑色の抽出後の第 9葉身部分(9th outside) と完全展開葉身ではNADH-GOGAT活性よりもFd-GOGAT活性が約 $10^2$  倍、抽出後の葉鞘では約10倍各々高いことが明かとなった。従って、イネの緑色の組織においてはFd-GOGAT活性が全GOGAT 活性のほとんどを占めた。一方、非緑色葉身においては、NADH-GOGAT活性とFd-GOGAT活性はほぼ同水準であることが判明した。

Table 6. Activities of NADH-GOGAT and Fd-GOGAT in various positions of leaf blade and sheath of rice plants.

| Leaf Position from Base                             | NADH-GOGAT | Fd-GOGAT | Ratio of Fd-GOGAT/<br>NADH-GOGAT |
|---|------------|----------|----------------------------------|
| <sup>a</sup> munit · (g fresh weight) <sup>-1</sup> |            |          |                                  |
| Leaf blade  |            |          |                                  |
| 5th   | 25.2       | 7250     | 288                              |
| 6th   | 37.0       | 7350     | 199                              |
| 7th   | 31.6       | 8350     | 264                              |
| 8th   | 45.6       | 5660     | 124                              |
| 9th inside<br>(nongreen)                            | 89.2       | 349      | 3.9                              |
| 9th outside<br>(green)                              | 31.7       | 5190     | 164                              |
| 10th  | 155        | 297      | 1.9                              |
| Leaf sheath   |            |          |                                  |
| 5th   | 282        | 658      | 233                              |
| 6th   | 195        | 705      | 362                              |
| 7th   | 290        | 570      | 197                              |
| 8th   | 21.7       | 278      | 128                              |
| 9th   | 21.8       | 127      | 5.8                              |

<sup>a</sup>One unit (U) = 1  $\mu$  mole glutamate formed · min.<sup>-1</sup> at 30 ° C. Values of activity are the means of triplicate assays with independent duplicate samples.

## イネ着生葉におけるNADH-GOGAT蛋白質及びFd-GOGAT蛋白質の葉位別分布

各試料におけるNADH-GOGATポリペプチド含量は、イムノブロット法を用いて分析した(Fig. 21, top panel)。葉身においては、未抽出の第9葉身(9i)及び第10葉身で可溶性蛋白質当たりのNADH-GOGATポリペプチド含量が他の葉位に比較して極めて高く、下位葉身ほど減少した。抽出後の緑色の第9葉身(9o)部分と未抽出の非緑色の第9葉身部分(9i)のNADH-GOGATポリペプチド含量は、第10葉身の含量の各々24%と89%であった。葉鞘の可溶性蛋白質当たりのNADH-GOGATポリペプチド含量は、第10葉身の含量よりも極めて少なく、また、上位から下位に向かい減少した。

各試料のFd-GOGATポリペプチド含量も、イムノブロット法により分析した(Fig. 21, bottom panel)。可溶性蛋白質当たりのFd-GOGATポリペプチド含量は完全展開葉身で高く、また葉鞘では葉身に比較してその含量は低いものの下位に向かいやや増加した。

Fig. 22には、各試料の新鮮重あたりに換算した各GOGATポリペプチドの絶対量を示した。葉身での新鮮重当たりのNADH-GOGATポリペプチド含量は、抽出前の未成熟な非緑色葉身で極めて高く、葉身の成熟に従い減少した。特に解析した試料の内、最も若い第10葉身における新鮮重当たりのNADH-GOGATポリペプチド含量は $33.1 \mu\text{g/g f. w.}$ であり、最も葉齢の進んだ第5葉身の含量の約25倍に相当した。また、未抽出の非緑色の第9葉身部分(9i)のNADH-GOGATポリペプチド含量は $17.7 \mu\text{g/g f. w.}$ であり、この含量は完全展開葉身の含量よりも2-13倍高い値であった。第9葉身においては、第8葉鞘外に抽出した部分(9o)の新鮮重当たりのNADH-GOGATポリペプチド含量は、未抽出部分(9i)よりもやや低かった。葉鞘での新鮮重当たりのNADH-GOGATポリペプチド含量も葉の成熟に従い減少した。

一方、新鮮重当たりのFd-GOGATポリペプチド含量は上位の完全展開葉身で高く、NADH-GOGATポリペプチド量の葉位別分布とは明確に異なっていた(Fig. 22)。特に、完全展開葉身である第7葉身の新鮮重当たりのFd-GOGATポリペプチド含量は $111 \mu\text{g}$ と極めて高かった。しかし、未抽出葉身のFd-GOGATポリペプチド含量は第7葉身の約7%にすぎなかった。葉鞘の新鮮重当たりのFd-GOGATポリペプチド

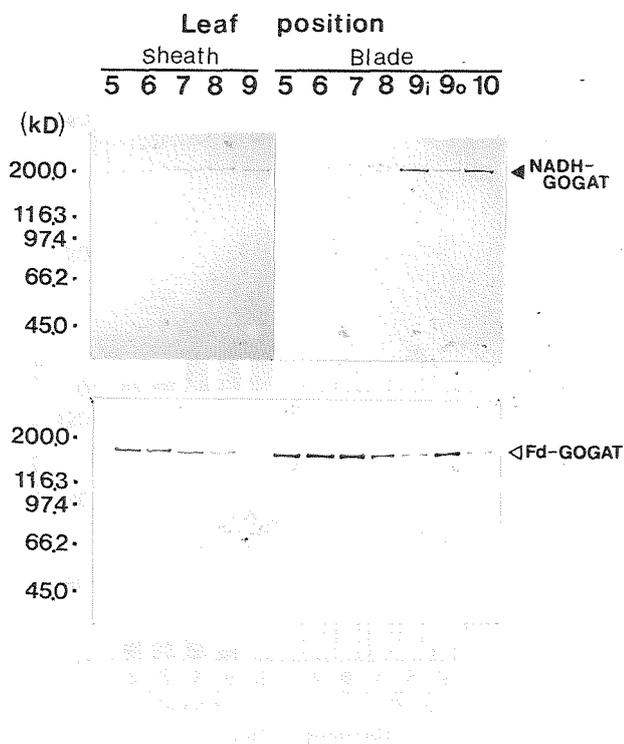


Figure 21. Immunoblotting analysis of NADH-GOGAT (top panel) with anti-rice cell-NADH-GOGAT IgG and Fd-GOGAT (bottom panel) with anti-rice leaf Fd-GOGAT IgG in extracts prepared from leaf blades and sheaths at various positions of rice leaves. Thirty micrograms of soluble protein from leaf blades and 10  $\mu$ g protein from leaf sheaths for NADH-GOGAT and 5  $\mu$ g protein from either the blades or sheaths for Fd-GOGAT were separated by SDS-PAGE at 7.0% (w/v) gel concentration.

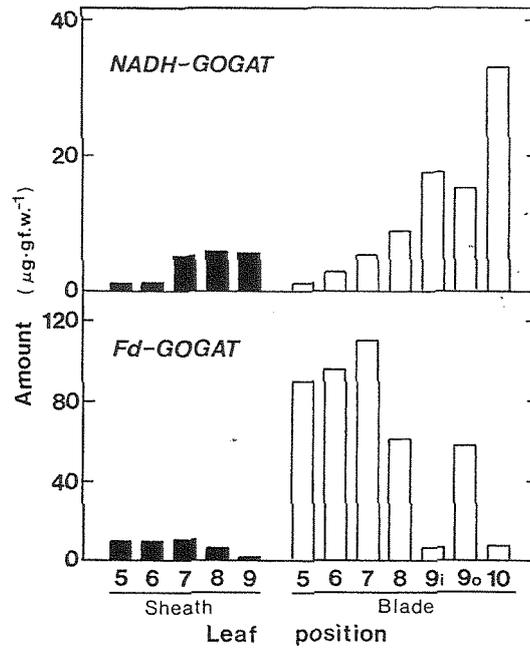


Figure 22. Changes in polypeptide contents of NADH-GOGAT and Fd-GOGAT in leaf blades (white bars) and sheaths (black bars) at various positions of rice leaves. The intensity of developed color on the membrane in Figure 21 was measured by a densitometer, and the peak areas were expressed as micrograms of GOGAT protein per gram fresh weight (f.w.) using purified NADH-GOGAT or Fd-GOGAT as the standard. Numerals indicated the leaf positions. The expanding green portion and non-green portion of the ninth leaf blade was indicated as 9o and 9i, respectively.

ド含量は、第 7葉身の10% 以下であった。非緑色組織である第10葉身と第 9葉身の未抽出部分(9i)のNADH-GOGATポリペプチド含量は、Fd-GOGATポリペプチド含量よりも、新鮮重当たりで各々4.1 倍と2.6 倍高いことが判明した。他方、緑色の葉身と葉鞘に存在するGOGAT 蛋白質は主にFd-GOGAT蛋白質であった。

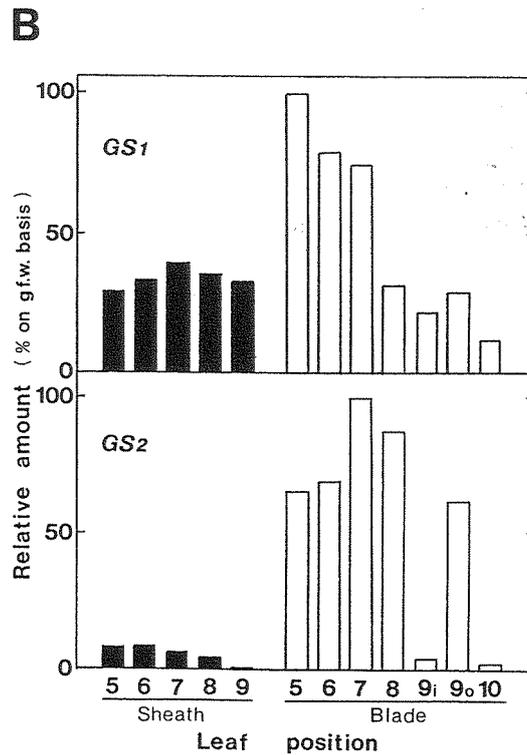
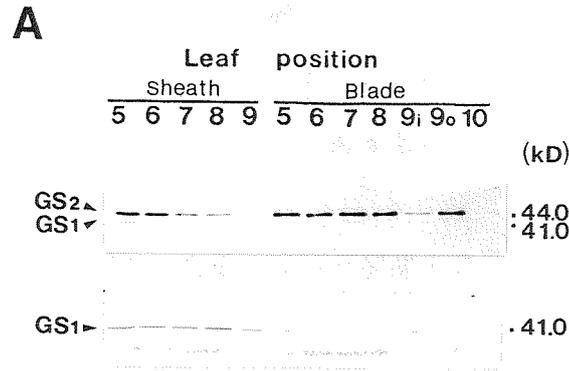
#### イネ着生葉におけるGS<sub>1</sub> 蛋白質及びGS<sub>2</sub> 蛋白質の葉位別分布

各試料におけるGS<sub>2</sub> ポリペプチド相対含量を、イムノプロット法により分析した(Fig. 23A , top panel)。可溶性蛋白質当たりのGS<sub>2</sub> ポリペプチド相対含量は、完全展開葉身で多い結果が得られた。また、葉鞘では下位に向かいやや増加した。

細胞質局在型GS<sub>1</sub> ポリペプチド相対含量のイムノプロット分析の結果をFig. 23 A(bottom panel) に示した。可溶性蛋白質当たりのGS<sub>1</sub> ポリペプチド相対含量は、下位の葉身ほど高く、葉鞘ではほぼ一定であった。

Fig. 23B には、各試料の新鮮重当たりに換算した各GSアイソザイムポリペプチドの相対含量を示した。新鮮重当たりのGS<sub>2</sub> ポリペプチド相対含量は上位の完全展開葉身で高かった。GS<sub>2</sub> ポリペプチド相対含量が最も高かった第 7葉身の絶対含量は、429  $\mu$ g/g f. w. であった。しかし、未抽出の非緑色葉身と葉鞘の新鮮重当たりのGS<sub>2</sub> ポリペプチド相対含量は、完全展開葉身の相対含量に比較して、極めて微量であった。

一方、新鮮重当たりのGS<sub>1</sub> ポリペプチドの相対含量は、葉齢の進んだ下位の葉身ほど高かった(Fig. 23B)。葉鞘の新鮮重当たりのGS<sub>1</sub> ポリペプチドの相対含量は、第 8葉身と第 9葉身の抽出した部分(9o)の相対含量とほぼ同程度であった。



**Figure 23.** Changes in polypeptide contents of GS<sub>1</sub> and GS<sub>2</sub> in leaf blades (white bars) and sheaths (black bars) at various positions of rice leaves. **A**, Immunoblotting of GS isoforms with antirice leaf GS<sub>2</sub> IgG (top panel) and that with anti-GS<sub>1</sub> IgG (bottom panel). Two  $\mu$ g protein from both blade and sheath tissues for GS<sub>2</sub> and 5  $\mu$ g protein for GS<sub>1</sub> were separated by SDS-PAGE at 12.5% (w/v) gel concentration. **B**, Relative content of GS isoforms on a fresh weight basis was calculated as described in Figure 20. Numerals indicated the leaf positions. The expanding green portion and non-green portion of the ninth leaf blade was indicated as 9<sub>o</sub> and 9<sub>i</sub>, respectively.

## イネ着生葉におけるNADH-GOGAT蛋白質と関連酵素蛋白質 ( Fd-GOGAT , GS<sub>2</sub> , Rubisco , GS<sub>1</sub> )の葉位別分布の比較

Fig. 24にイネ着生葉の葉身と葉鞘における新鮮重当たりのNADH-GOGATポリペプチド含量(A)及び新鮮重当たりの各関連酵素蛋白質ポリペプチドの含量( Fd-GOGAT, GS<sub>2</sub> , Rubisco (C) ; GS<sub>1</sub> (B) )を示した。イネ葉における新鮮重当たりのNADH-GOGATポリペプチド含量はシンク組織と考えられる抽出前の未成熟な非緑色葉身で極めて高く、葉の成熟・老化に従い減少する傾向が明らかとなった(Fig. 24A)。また、新鮮重当たりのNADH-GOGAT活性も同様な挙動を示した(Table6)。一方、Fd-GOGATポリペプチド含量は、Rubisco LSU やGS<sub>2</sub> ポリペプチド含量と同様に光合成の盛んな緑色葉身で高く(Fig. 24C)、NADH-GOGATの葉位別分布とは明確に異なっていた。Fd-GOGAT活性も同様な挙動を示した(Table6)。他方、GS<sub>1</sub> ポリペプチド含量は葉齢の進んだ下位の葉身ほど高く、NADH-GOGATポリペプチド含量の変動とは逆の傾向を示した(Fig. 24B)。

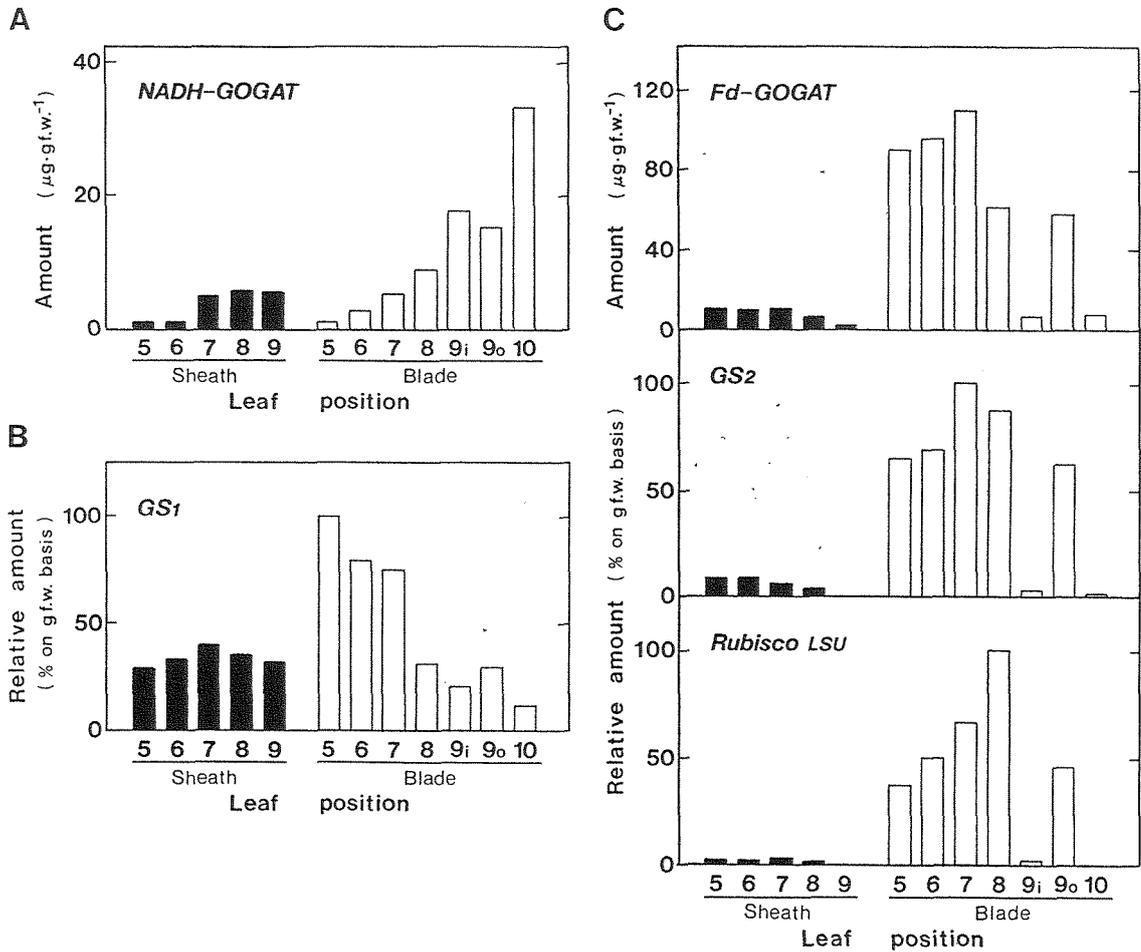


Figure 24. Changes in polypeptide contents of NADH-GOGAT(A), GS<sub>1</sub> (B), Fd-GOGAT (C; top), GS<sub>2</sub> (C; middle), Rubisco LSU (C; bottom) in leaf blades (white bars) and sheaths (black bars) at various positions of rice leaves. Numerals indicated the leaf positions. The expanding green portion and non-green portion of the ninth leaf blade was indicated as 9o and 9i, respectively.

#### 第四節 考察

本章では、イネの異なる葉位の葉身と葉鞘におけるNADH-GOGAT活性と蛋白質含量を定量的に解析した。高等植物葉におけるNADH-GOGAT蛋白質の存在量を示したことは本研究が初めてのことである。Fd-GOGATを欠損したオオムギ(Kendall et al., 1986) やシロイナズナ(Somerville and Ogren, 1980 ; Morris et al., 1988) の変異体は、1) 光呼吸の生じない環境下では正常に生育すること 2) シロイナズナではNADH-GOGAT活性を野生型と同様に有することから、NADH-GOGATが光呼吸以外のグルタミン酸代謝の主要な部分を担っていることが推定されていた(Morris et al., 1988)。しかし、本研究の以前ではNADH-GOGATが主に発現機能している具体的な器官や組織に関する知見さえ無く、NADH-GOGATの生理的役割は全く不明なままであった。

本章の研究結果から、イネ着生葉におけるNADH-GOGAT活性と蛋白質含量は、シンク組織と考えられる未成熟な非緑色葉身において成熟葉身に比較して極めて高いことが判明した。一方、Fd-GOGATは、緑色葉身の主なGOGAT分子種であった。イネ着生葉において、各GOGAT分子種が明確に異なる葉位別分布を示した結果は、これらの2種のGOGAT分子種がイネ生体内で各々異なる生理的役割を担っている可能性を示唆する。シンクである未成熟な葉身にNADH-GOGATが主に存在していた結果は、シンク組織においてNADH-GOGATが、老化組織から篩管を介して転流して来たグルタミン(Hayashi and Chino, 1990)を葉身の主要な遊離アミノ酸であるグルタミン酸(Mae and Higurashi unpublished data)へ変換していることを示唆している。イネ葉の伸長過程では、葉鞘内で形成される若い葉で維管束細胞が最初に分化する。下位の葉鞘から抽出を始めた葉身の細胞分裂は既に終了しており、葉身の抽出後光合成器官の発達にともない葉肉細胞は成熟することが明かにされている(Yamazaki, 1963)。未抽出の非緑色葉身でNADH-GOGAT活性と蛋白質含量が高く、葉の成熟につれて減少した結果は、成熟葉ではNADH-GOGAT蛋白質の合成能が低下していること、または分解速度が速まっているものと考えられ、今

後検討すべき課題である。 緑葉で主に光呼吸系から放出されるアンモニアを再同化しているGS<sub>2</sub> とFd-GOGAT(Somerville and Ogren, 1980 ; Kendall et al., 1986 ; Wallsgrove et al., 1987 ; Morris et al., 1988) は、葉緑体のストロマに局在し(Hirel et al., 1982 ; Botella et al., 1988a, b ; Dotta et al., 1991)、またイネ葉身の葉肉細胞に主に存在していることが示されている(Kamachi et al., 1992b)。 また、本研究からFd-GOGATとGS<sub>2</sub> 及びRubisco はイネ着生葉において同様な葉位別分布を示す結果が明かとなった。 NADH-GOGATの組織内及び細胞内分布に関する正確な結果はまだ得られていないが、NADH-GOGATは、葉肉細胞の葉緑体のストロマに局在するFd-GOGATやGS<sub>2</sub> 及びRubisco と挙動が明確に異なることから、NADH-GOGATはこれ等の酵素とは組織内及び細胞内の存在場所が異なる可能性も示唆される。 予備的な免疫組織化学的実験では、NADH-GOGATは若い葉身の維管束組織に局在している結果を得ている。 従って、NADH-GOGATが未成熟葉の最初に分化する維管束組織に存在するために、葉身展開後の葉肉細胞の発達にともない、成熟葉では見かけ上その含量が下がる可能性も考慮する必要があると思われる。 未抽出の非緑色葉身においては、Fd-GOGAT蛋白質含量はNADH-GOGAT 蛋白質含量の約1/4-1/3 倍と低かったが、Fd-GOGAT活性はNADH-GOGAT活性よりも2-4 倍高かった。 従って、未抽出の非緑色葉身でのグルタミン酸合成にFd-GOGATが全く関与していないとは、現段階では結論できない。 しかし、緑色葉身でのFd-GOGAT活性は、未抽出葉身のFd-GOGAT活性よりも10<sup>2</sup> 倍高いことを考慮すると、過去の知見と同様にFd-GOGATは主に緑葉で機能しているものと考えられた。

近年、Sakakibara et al. (1991) はトウモロコシ葉Fd-GOGATをコードする完全鎖長のcDNAクローンを単離した。 同研究者等は、トウモロコシ幼植物の黄化葉に光照射することにより、定常状態のFd-GOGAT mRNA 含量が増加することを報告した。 Suzuki et al. (1987) は、緑化過程のトウモロコシ葉においてFd-GOGAT蛋白質含量が増加することを示した。 また、光照射に伴ってGS<sub>2</sub> 遺伝子の発現量が増すことも報告されている(Tingey et al., 1988 ; Edwards and Coruzzi, 1989; Cock et al., 1991)。 更に、Sakakibara et al. (1992)はトウモロコシ幼植

物の黄化葉に光照射すると、GS<sub>2</sub> と Fd-GOGAT の各蛋白質と各 mRNA の蓄積量の増加が同様に生ずることを示した。本研究の結果では、イネ着生葉の抽出中の第 9 葉身において、数日間自然光下にあった外部に抽出後の部分 (9o) の Fd-GOGAT と GS<sub>2</sub> の各ポリペプチド含量は、未抽出の部分 (9i) の各含量の各々約 10 倍と 15 倍であった。この結果は、上記の知見を強く支持するものと思われる。一方、第 9 葉身の抽出後の部分 (9o) の NADH-GOGAT ポリペプチド含量は、未抽出の部分 (9i) の含量よりもわずかに低い値を示すのみであったことから、イネ着生葉における NADH-GOGAT 蛋白質の蓄積量は見かけ上光の影響を受けていないように思われた。

本研究の結果では、緑色の完全展開葉身の可溶性蛋白質に占める Fd-GOGAT 蛋白質含量は、4.5 μg- 4.7 μg / mg 蛋白質であり、Fd-GOGAT と GS<sub>2</sub> 及び Rubisco の各ポリペプチドの含量比は 1 : 3.1-3.9 : 120-133 (Fd-GOGAT : GS<sub>2</sub> : Rubisco) であった。同様に C<sub>3</sub> 植物であるタバコの葉においては、Fd-GOGAT 蛋白質含量よりも GS<sub>2</sub> 蛋白質含量が約 5 倍高いという結果が報告されている (Zehacker et al., 1992)。緑葉において、Fd-GOGAT 蛋白質含量よりも GS<sub>2</sub> 蛋白質含量の方が高い傾向は、光呼吸系の窒素代謝速度が極めて速い C<sub>3</sub> 植物 (Keys et al., 1978) の共通の特性ではないかと思われた。

また、本研究の結果から、新鮮重当たりの細胞質型 GS<sub>1</sub> ポリペプチド含量は下位の老化葉身ほど高いことが判明した。老化葉身での転流グルタミンの合成に関与することが示唆されている細胞質型 GS<sub>1</sub> は、イネの成熟葉身及び老化葉身においては維管束組織に主に存在することがすでに示されている (Kamachi et al., 1992b)。よって、この結果はイネ着生葉身における新鮮重当たりの維管束組織量が、若い葉身よりも葉齢の進んだ葉身で高いことを示唆すると思われる。

本章の結果から、NADH-GOGAT が、老化組織から篩管を介してシンク組織である未成熟な葉身に転流して来たグルタミンを、葉身の主要な遊離アミノ酸であるグルタミン酸へ変換している可能性が強く示唆された。この知見を更に検証するため、NADH-GOGAT の組織や細胞内の存在場所を免疫組織化学的手法を用いて明らかにすることや、in vivo での NADH-GOGAT と関連酵素の活性を測定すること及びシンク組織としての未抽出葉身における NADH-GOGAT を中心とした遺伝子発現の調

節機構の解析が今後必要と思われる。また、本研究では、イネの各葉位の着生葉を材料として解析したが、更に個葉の生長過程におけるNADH-GOGATの挙動についても詳細に調べる必要があると思われる。

### 第三章 イネの登熟過程の穎果におけるNADH-GOGAT活性と蛋白質の挙動

#### 第一節 緒言

穂はイネの一生における最終的なシンクとしての物質集積部位であり、生殖生長期にはデンプンや蛋白質をはじめ、種々の物質を蓄積する。Mae et al. (1982)は、 $^{15}\text{N}$ を用いたトレーサー実験から、イネの穂に蓄積する窒素の40-70%が老化葉からの転流窒素に由来すると見積もった。ゆえに、イネにおける窒素転流は、コメの生産性、品質、栄養等を直接支配する重要な機構といえる。

イネの成熟穎果の玄米内部の胚乳中には乾燥重の約10%に相当する蛋白質が含まれ、これ等は主にグルテリン、プロラミン、グロブリン、アルブミン等の貯蔵蛋白質として存在する(Juliano, 1972 ; Iwasaki et al., 1992)。特にイネ胚乳貯蔵蛋白質の60-70%を占めるグルテリンと数%を占めるプロラミン(Juliano, 1972 ; Iwasaki unpublished data)については、イネ貯蔵蛋白質の低リジン含量の改善という応用的な側面からも分子レベルでの研究が進んでおり、その遺伝子発現や蓄積機構が明らかにされている。グルテリン遺伝子の転写産物は、約1.8kbであり(Higuchi and Fukazawa, 1987)、このmRNAを鋳型として膜結合型ポリゾームで約57kDの前駆体として翻訳された後、翻訳後調節としての限定分解を受けて酸性subunit( $\alpha$ -subunit, 分子量37-39kD)と塩基性subunit( $\beta$ -subunit, 分子量22-23kD)に成る(Yamagata et al., 1982 ; Yamagata and Tanaka, 1986)。また、グルテリン前駆体は、N末端にシグナルペプチドを有しゴルジ体を経て液胞に輸送された後、液胞由来のプロテインボディーIIに集積する(Yamagata and Tanaka, 1986)。プロテインボディーII中のグルテリン分子は、 $\alpha$ ,  $\beta$ -subunitがS-S結合を介して1:1に結合した2量体が、更にS-S結合と疎水的相互作用により巨大分子を形成した構造と成っている(Yamagata and Tanaka, 1986)。プロラミンはグルテリンと同様に粗面小胞体でN末端にシグナルペプチドを有した前駆体として生合成され、粗面小胞体由来のプロテインボディーIに移行し、分

子量13kDのポリペプチドを主成分として蓄積する(Yamagata et al., 1982 ; Yamagata and Tanaka, 1986)。

このような登熟過程における穎果の玄米内部の胚乳への貯蔵蛋白質の蓄積は、シンク組織での転流窒素の再利用機構の一つである。この際、ソースとしての老化組織から主にグルタミンとして転流して来た窒素(Hayashi and Chino, 1990)を、シンクとしての穎果において、まずグルタミン酸へ変換する反応が必要となる。しかし、第二章第一節の緒言で述べたように、この変換反応に関する研究は皆無である。GOGATはこの変換反応を触媒しえる。また、第一章の研究から開花後5日目の登熟初期の穎果にNADH-GOGAT蛋白質が多く存在していることが判明した。本章では、未抽出葉とともに重要なシンク組織の一つである登熟過程のイネの穎果において、上記のグルタミン酸の合成をNADH-GOGATが触媒しえる可能性を検証することを目的とした。穂に蓄積する炭素の大部分は、出穂期以降の葉身での光合成産物に由来する(Cock and Yoshida, 1972)が、登熟過程のイネの穎果はクロロフィル当たりで止葉と同程度の光合成を行っていることが報告されている(Imaizumi et al., 1990)。そこで、貯蔵蛋白質とRubiscoの挙動を指標として、NADH-GOGATとFd-GOGATの活性と蛋白質の挙動を定量的に解析し、合わせてもみ殻と未熟玄米における両GOGAT蛋白質の存在割合を求めた結果をもとに、登熟過程のイネ穎果におけるNADH-GOGATの役割を論議した。また、2-オキソグルタル酸をGOGATに供給するものと推定されているNADP<sup>+</sup>依存性イソクエン酸脱水素酵素(NADP-IDH ; EC 1.1.1.42)(Chen and Gadal 1990)の活性の変動及びGOGATとカップルして反応するGS(Sechley et al., 1992)の活性と各アイソザイムポリペプチド量の変動についても解析した。

## 第二節 材料及び方法

### 植物材料

植物材料のイネ (*Oryza sativa* L. cv. Sasanishiki) は、第二章第二節の材料と方法に従って、1991年に自然光下ガラス室内で水耕栽培した。栽培は、イネ植物の12個体を一組とし、ポット(1/5000a) 当たり 3本植えて、合計144 個体/12ポットで行った。水耕液は一週間ごとに更新し、水耕液の濃度はイネの生長に従い以下のように上昇させた。また、主稈の第14葉(止葉)が完全展開した播種後 106日目からは水道水のみで栽培した。

| 播種後の日数(Day) | 水耕液濃度 |
|-------------|-------|
| 21- 36      | 1/4   |
| 36- 50      | 1/2   |
| 50- 57      | 3/4   |
| 57-106      | 1/1   |

主稈の92個体が開花した播種後115 日目を開花日とし、これ等のイネ個体に印しをつけた。穂の上部の一次枝梗に着生する穎果は稔りが良く、下部の二次枝梗に着生する穎果は稔りが悪い。また、特に稔り易い穎果は最上部一次枝梗の先端粒(強勢穎果)であり、稔りにくい穎果は最下部二次枝梗の第二粒(弱勢穎果)である。大部分の穎果の稔りはこれ等の中間であり、その分布は正規分布に従う(Iwasaki et al., 1992)。そこで、本研究では主稈の穂の上部第 1位から第 5位までの一次枝梗の穎果を開花日から開花後35日目まで経時的に収穫した。収穫した穎果の穂上の位置はFig. 25に示した。なお、第 6位以下の穎果は不稔の可能性を考慮し、実験には用いなかった。4個体からの穎果(約100 粒)を1試料として、合計 3試料及び 3個体からの穎果(約150 粒)を収穫混合後、新

Plant Materials

Rice(*Oryza sativa* L. cv Sasanishiki)

Plant Culture

Water culture in a greenhouse

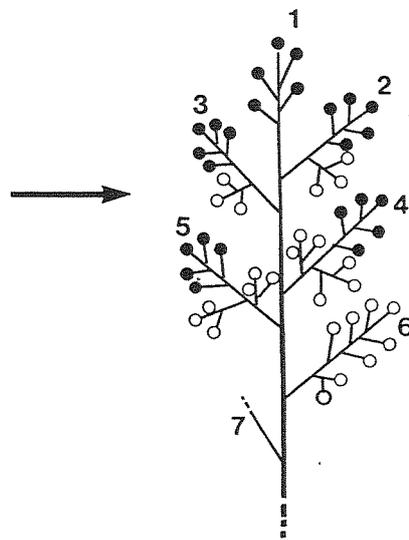


Figure25. Diagram of rice ear. The apical spikelets on the primary branches at the positions from the top to the fifth (●) were harvested from the main stem from 0 to 35 d after the flowering.

鮮重を測定し、液体窒素にて瞬時凍結した後、使用するまで  $-80^{\circ}\text{C}$  に保存した。また、乳熟期では穎果内部の若い玄米組織は極めて破損しやすく、もみ殻との分離が困難なため、GOGAT 蛋白質の組織分布の解析以外の実験には玄米の回りにもみ殻のついた状態の穎果を供した。

NADH-GOGAT蛋白質とFd-GOGAT蛋白質の組織分布の解析においては、上記の状態  
で保存した開花後10日目の穎果40粒を、液体窒素中下で凍結させたままピンセットを用いて未熟玄米ともみ殻に分離し、分離後の各試料を再び  $-80^{\circ}\text{C}$  に保存した。

乾燥重は、約20粒の穎果を 1試料として、これ等の穎果を  $70^{\circ}\text{C}$  の通風乾燥機で一週間乾燥させた後測定した。

また穎果の水分含量は、穎果当たりの新鮮重から乾燥重を差し引いた値を、穎果当たりの新鮮重に対する相対値として求めた。

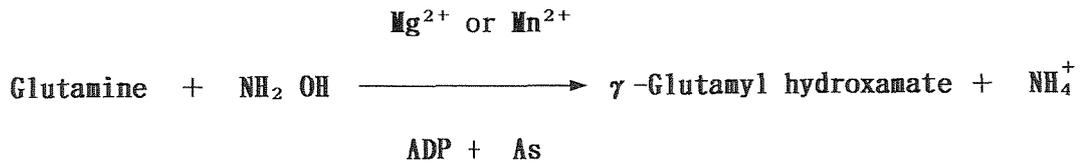
#### 粗酵素液の調製

粗酵素液の調製は第一章の材料と方法に従って行った。全操作は  $4^{\circ}\text{C}$  にて行った。新鮮重として0.58-2.61gの凍結試料を液体窒素中で乳鉢磨碎してパウダー化した後、1.0gの石英砂と2.5-4.5mL のGOGAT 用抽出緩衝液を加えて更に磨碎した。この磨碎液を39,100xg、30分間遠心した後、その上清を得た。遠心後の上清の一部は、可溶性蛋白質の定量とGSの酵素活性の測定及びNADH-GOGAT, Fd-GOGAT, GS<sub>1</sub>, GS<sub>2</sub>, Rubiscoのイムノプロット分析に供した。また、残りの上清を第一章の材料と方法に従って、Sephadex G-25 カラムを用いて脱塩した。この際、平衡化及び溶出用の緩衝液には、1mM PMSFと10  $\mu\text{M}$  Leupeptin をProtease 阻害剤として更に添加した。脱塩後の蛋白質画分を集めて、NADH-GOGAT、Fd-GOGAT 及びNADP-IDHの酵素活性測定に供した。

#### GOGAT, GS 及びNADP-IDHの酵素活性測定と可溶性蛋白質の定量

NADH-GOGATとFd-GOGATの酵素活性の測定は、第一章の材料及び方法に従って行った。GOGAT 活性の 1unitは、 $30^{\circ}\text{C}$  で 1分間に  $1\mu\text{mol}$  のグルタミン酸を生成するのに必要な酵素量とした。

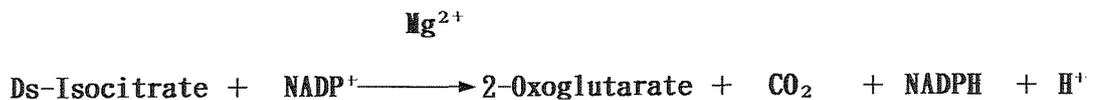
GSのトランスフェラーゼ活性の測定は、Rhodes et al.(1975)の方法を一部改変して行った。酵素反応は下式に示した。



反応液は 1mLとし、その終濃度組成は100mM Imidazole-HCl(pH6.4) , 65mM L-グルタミン, 17mM NH<sub>2</sub> OH, 0.17mM ADP, 2.5mM MgCl<sub>2</sub> , 33mM NaAsO<sub>4</sub> 及び0.25mLの酵素液とした。反応はNH<sub>2</sub> OHを添加して開始し、30°Cで15分間反応させた。

その後、1mL の塩化第二鉄試薬( 0.37M FeCl<sub>3</sub> , 0.67M HCl , 0.2M TCA )を加えて反応の停止と生成したγ-グルタミルヒドロキサム酸の発色を行った。この発色液の540nm の吸光度を測定して、GSトランスフェラーゼ活性を測定した。盲検には、NH<sub>2</sub> OHを添加する前に塩化第二鉄試薬を加えた反応系を用いた。GSトランスフェラーゼ活性の 1unitは、30°Cで 1分間に 1μmol のγ-グルタミルヒドロキサム酸を生成するのに必要な酵素量とした。

NADP-IDHの酵素活性の測定は、Chen et al.(1988)の方法に従って行った。酵素反応は下式に示した。



反応液は 2mLとし、その終濃度組成は100mM KH<sub>2</sub> PO<sub>4</sub> -KOH(pH7.5) , 2mM イソクエン酸 , 5mM MgCl<sub>2</sub> , 0.1mM NADP<sup>+</sup> 及び1.2mL の酵素液とした。反応は酵素液を加えて開始し、30°CでNADPH の生成量を340nm の吸光度の上昇を追跡することにより測定した。この際、分光分析機の対照光側にイソクエン酸を添加しない試料を置いて盲検とした。NADP-IDH活性の 1unitは、30°Cで 1分間に 1μmol のNADPH を生成するのに必要な酵素量とした。

可溶性蛋白質の定量は、第一章と同様に BSAを標準蛋白質としてBradford (1976)の方法に従って行った。

## 可溶性蛋白質のSDS-PAGE分析

各イネ穎果から上記の方法に従って抽出した可溶性蛋白質は、第一章の材料及び方法に従って、12.5%(w/v)の分離ゲルを用いたSDS-PAGEを用いて各ポリペプチドを分離後、CBB R-250 染色法を用いて構成する各ポリペプチドを検出した。

## イムノプロット分析によるNADH-GOGAT , Fd-GOGAT , GS<sub>1</sub> , GS<sub>2</sub> , Rubisco LSU ポリペプチドの定量

各試料から上記の方法に従って抽出した可溶性蛋白質を、第一章と第二章の材料及び方法に従って、SDS-PAGEにより各ポリペプチドを分離した。なお、NADH-GOGATとFd-GOGATの分離には7%(w/v)の分離ゲルを、またGS<sub>1</sub> , GS<sub>2</sub> , Rubisco LSU の分析には12.5%(w/v)の分離ゲルを用いた。

NADH-GOGATとFd-GOGATの各ポリペプチドは、第一章と同様にSDS-PAGE後Zeta-probe 膜に電氣的に転写して、TTBS-milk 溶液で50倍希釈したアフィニティー精製抗イネ培養細胞NADH-GOGAT IgG及び同様に希釈したアフィニティー精製抗イネ葉Fd-GOGAT IgGと各々37℃で12時間反応させ、アルカリフォスファターゼ標識ヤギ抗ウサギ IgG (Fc)(Promega 社)を用いて検出した。

GS<sub>1</sub> , GS<sub>2</sub> , Rubisco LSU の各ポリペプチドは、第二章と同様にSDS-PAGE後ニトロセルロース膜に電氣的に転写し、PBS-BSA 溶液で希釈した各一次抗体溶液と37℃で一時間反応させた。GS<sub>1</sub> については、抗イネ葉GS<sub>1</sub> 合成ペプチド IgG を1000倍希釈して用い、GS<sub>2</sub> については、抗イネ葉GS<sub>2</sub> IgG を500 倍希釈して用いた。また、Rubisco LSU においては、第一章の材料及び方法に従ってニトロセルロース膜に結合させた精製Rubisco LSU 40 μg に対して、精製したアフィニティー精製抗イネ葉Rubisco LSU IgG を100 倍希釈して用いた。一次抗体と結合後、GSの各ポリペプチドはアルカリフォスファターゼ標識ヤギ抗ウサギ IgG (Fc)(Promega社)を用いて検出し、Rubisco LSU ポリペプチドは西洋ワサビパーオキシダーゼ標識ヤギ抗ウサギ IgG (H+L)(Bio Rad社)を用いて検出した。

各ポリペプチド量は第二章の材料と方法に従ってデンシトメーター(Shimadzu CS-930)を用いて定量した。アルカリフォスファターゼ反応により発色したバ

ンドは530nmの反射光で測定し、また、パーオキシダーゼ反応により発色したバンドは560nmの反射光で測定した。また、NADH-GOGATポリペプチド量の定量の際は、20-100ngの精製NADH-GOGAT標品を粗酵素蛋白質と同一のゲルでイムノブロット分析し、標準蛋白質とした。同様に、Fd-GOGATとGS<sub>2</sub>及びRubisco LSUの各ポリペプチド量の定量には、各々10-80ngと10-40ng及び10-80ngの精製標品を標準蛋白質として供した。検量は、精製標品の蛋白質量に対するデンシトメーターで求めたピーク面積値が原点を通る直線となる範囲で行った。なおGS<sub>1</sub>ポリペプチドについては、部分精製標品を用いて相対定量した。また、分析は3回以上繰り返して行った。

### 胚乳貯蔵蛋白質のSDS-PAGE分析

登熟過程における胚乳貯蔵蛋白質の各ポリペプチドの変動の分析は、Yamagata et al. (1982)の方法を部分的に改変して行った。なお開花日の穎果については、胚乳が未発達なため解析は行わなかった。開花後5日目から35日目までの凍結穎果の各15粒について、液体窒素下で凍結させたままピンセットを用いて、玄米からもみ殻を除去した。凍結玄米は液体窒素下で乳鉢磨砕し、粉末状にした。この粉末を25℃に加温した乳鉢に移し、5% (v/v) 2-mercaptoethanol, 2% (w/v) SDS, 10% (v/v)グリセリンを含むpH6.8の125mM トリス塩酸緩衝液 500  $\mu$ Lを加えて更に10分間磨砕した。この磨砕液をエッペンドルフチューブ(1.5mL容)に移し、室温で18,500xg, 15分間遠心した後、その上清を得た。上清は更に3分間煮沸した後、再び同様に5分間遠心した。各試料の遠心後の上清の2.5  $\mu$ Lを14%(w/v)の分離ゲルを用いたSDS-PAGEに供し、各ポリペプチドを分離した。ゲル中の分離された各ポリペプチドは、CBB R-250染色法により検出した。各胚乳貯蔵蛋白質ポリペプチドは、Yamagata et al. (1982)の報告を参考とし、それ等の分子量から同定した。すなわち、プロテインボディーIIに蓄積するグルテリンは分子量37, 38, 39kD ( $\alpha$ -subunit)と22, 23kD ( $\beta$ -subunit)であり、グロブリンは分子量26kDである。プロテインボディーIに蓄積するプロラミンは分子量13kDであり、デンプン顆粒に蓄積するアルブミンは分子量76kDである。本

研究では、胚乳貯蔵蛋白質の多くを占めるグルテリンのsubunit ポリペプチドの内、明確に分離された37kDのポリペプチドについて、595nm の透過光条件でデンストメーター(Shimadzu CS-930) によりバンドの面積を求め、穎果当たりの相対含量を算出した。

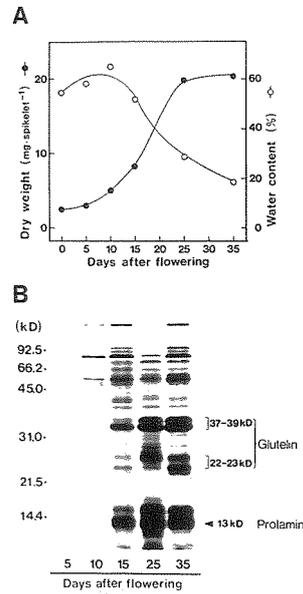
### 第三節 結果

#### 登熟過程のイネ主稈の穎果における乾燥重と水分含量の変化

供試したイネ主稈の穎果の、登熟過程における穎果当たりの乾燥重の変化と水分含量の変化をFig. 26A に示した。穎果当たりの乾燥重は、開花後10日目まではゆるやかに増加するが、10日目以降25日目にかけて急激に増加し、その後はほぼ一定になった。穎果当たりの水分含量は、乾燥重が急増し始める開花後10日目から低下し始め、以降35日目まで低下し続けた。開花日の穎果は新鮮重の約60%が水分であったが、開花後35日目の穎果では約20%にすぎなかった。登熟過程を通じて穎果当たりの乾燥重と水分含量はほぼ逆の変化を示し、この結果はYoshida and Hara (1977) の報告と同様であった。また、これ等の結果は供試した主稈の穎果が開花後35日目には完熟したことを示した。

#### 登熟過程のイネ主稈の穎果における胚乳貯蔵蛋白質の蓄積

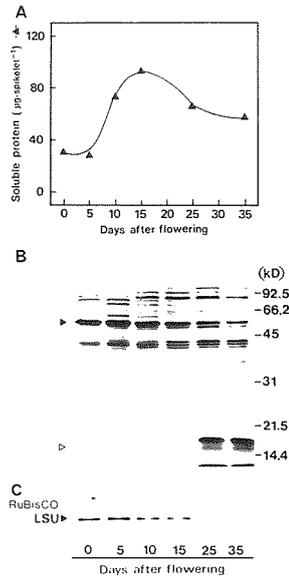
穎果当たりの胚乳貯蔵蛋白質の各ポリペプチド含量の変化を、SDS-PAGEにより分析した結果をFig. 26B に示した。なお開花日の穎果については、胚乳が未発達なため収穫が困難であり、解析は断念した。胚乳のプロテインボディーIIに蓄積するグルテリンは37-39kDの $\alpha$ -subunitと22-23kDの $\beta$ -subunitから構成されている(Yamagata et al., 1982 ; Yamagata and Tanaka, 1986)が、この各グルテリンsubunit ポリペプチドは開花後10日目以降蓄積が見られ、登熟期間を通じて胚乳貯蔵蛋白質の多くを占めていた。また、胚乳のプロテインボディーIIに蓄積するプロラミンは約13kDのポリペプチドから構成される(Yamagata et al., 1982 ; Yamagata and Tanaka, 1986)が、このポリペプチドも開花後15日目にはその含量が増加していた。しかし、グルテリンの蓄積と比較して、プロラミンはやや遅れて蓄積した。これ等の結果は、Yamagata et al. (1982)の報告とほぼ一致した。また、登熟過程における穎果当たりの胚乳貯蔵蛋白質の各ポリペプチド含量の変化と穎果の乾燥重の変化は、ほぼ同様な挙動を示した。



**Figure 26.** Changes in the dry weight and water content (A) and storage proteins (B) in the spikelets of rice plants during ripening process. The apical spikelets on the primary branches at the positions from the top to the fifth were harvested from the main stem from 0 to 35 d after the flowering. Storage proteins were prepared from the endosperm, separated by SDS-PAGE (14% [w/v] gel), and stained with Coomassie brilliant blue R-250.

## 登熟過程のイネ主稈の穎果における可溶性蛋白質の変動とRubisco 蛋白質の挙動

登熟過程における穎果当たりの可溶性蛋白質含量の変動をFig. 27A に示した。穎果当たりの可溶性蛋白質含量は、開花後 5日目以降増加した。その後登熟中期の15日目にピークを示した後、減少した。また、可溶性蛋白質含量の増加は、胚乳貯蔵蛋白質の蓄積(Fig. 26B) に先立って生じた。穎果の可溶性蛋白質を構成するポリペプチドの変化をSDS-PAGEにより分析した(Fig. 27B)。開花日から、Rubisco のLSU とsmall subunit (SSU) と思われるバンドが検出された。Rubisco LSU ポリペプチド含量をイムノプロット分析した結果をFig. 27C に示した。可溶性蛋白質当たりのRubisco LSU ポリペプチド含量は、開花日から高い含量を示し、5日目にやや増加した後、登熟にともなって減少した。開花後 5日目のRubisco LSU ポリペプチド含量は $80 \mu\text{g}/\text{mg}$ 可溶性蛋白質であり、ホロRubisco 蛋白質含量に換算すると  $100 \mu\text{g}/\text{mg}$ 蛋白質であった。よって、穎果の可溶性蛋白質含量に占めるRubisco 蛋白質含量は最大でも10% 程度であることが判明した。更に穎果当たりに換算したRubisco LSU ポリペプチド含量の、登熟過程での挙動をFig. 30A に示した。穎果当たりのRubisco LSU ポリペプチド含量は、開花後 5日目から増加した。その後、開花後15日目にピークを示した後、急激に減少した。登熟の初期から中期にかけては、穎果当たりのRubisco LSU ポリペプチド含量の挙動は可溶性蛋白質含量の変動と酷似していたが、しかし、中期以降完熟期までにRubisco LSU ポリペプチドの大部分は消失した。



**Figure 27.** Changes in the contents of soluble protein (A) and Rubisco (B,C) in the spikelets of rice plants during ripening process. One microgram of soluble protein was separated by SDS-PAGE (12.5% [w/v] gel) and immunoblotting of Rubisco LSU was carried out with affinity-purified antirice leaf Rubisco LSU IgG (C).

## 登熟過程のイネ主稈の穎果におけるNADH-GOGATとFd-GOGAT及びGSとNADP-IDHの各酵素活性の挙動

登熟過程における穎果当たりのNADH-GOGAT活性とFd-GOGAT活性の変化をFig. 28 A に示した。穎果当たりのNADH-GOGAT活性は、開花後ただちに増加したが、Fd-GOGAT活性は開花後 5日目以降増加した。また、両GOGAT 活性は登熟中期の開花後 5日目から15日目付近にピークを示した後、登熟にともなって減少した。登熟初期以降の過程では、穎果当たりのNADH-GOGAT活性とFd-GOGAT活性はほぼ等しいことが判明した。穎果当たりのFd-GOGAT活性の挙動は、Rubisco LSU ポリペプチド含量の挙動(Fig. 30A) と酷似した。また、この結果は可溶性蛋白質当たりでも同様であった。

Chen and Gadai(1990)は、NADP-IDHは2-オキソグルタル酸をGOGAT に供給すると推定している。そこで、穎果においてアミノ基受容体となる2-オキソグルタル酸が、GOGAT 反応に十分量供給され得る能力があるかどうかを推定するため、NADP-IDH活性を測定した。穎果当たりのNADP-IDH活性の挙動をFig. 28B に示した。登熟過程における穎果当たりのNADP-IDH活性の挙動は、穎果当たりのFd-GOGAT 活性(Fig. 28A) とRubisco LSU ポリペプチド含量(Fig. 30A) の挙動と同様な変化を示した。特に登熟期間を通じ穎果当たりのNADP-IDH活性は、NADH-GOGAT活性とFd-GOGAT活性の総和よりも常に高い結果が得られた。よって、穎果では GOGAT反応への炭素骨格の供給能力は十分であるものと推定された。

更にGOGAT とカップルして反応するGS(Sechley et al., 1992) についても、そのトランスフェラーゼ活性を測定した。登熟過程の穎果における穎果当たりのGSトランスフェラーゼ活性の変化をFig. 28B に示した。穎果当たりのGSトランスフェラーゼ活性も各GOGAT 活性の総和よりも常に高かった。穎果におけるGSトランスフェラーゼ活性は、GSのシンテターゼ活性よりも約10倍高かった(unpublished data)。このことを考慮して、GSシンテターゼ活性に換算しても、同様にGSシンテターゼ活性はGOGAT 活性の総和よりも高かった。従って、登熟過程の穎果においては、酵素活性で判断する限り、GOGAT への反応基質の供給能力は十分あると推定された。

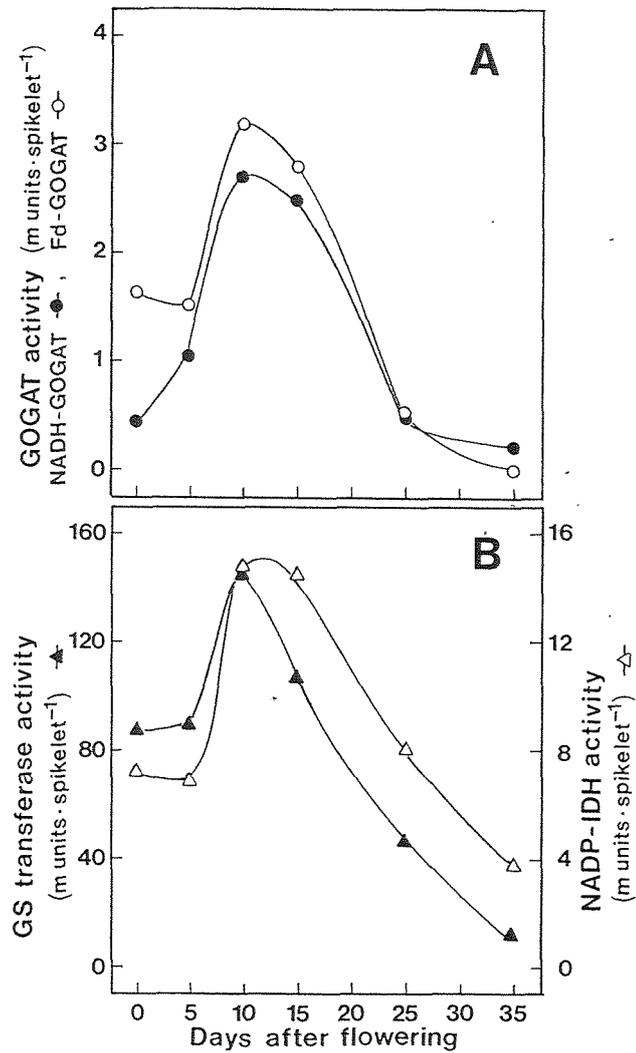
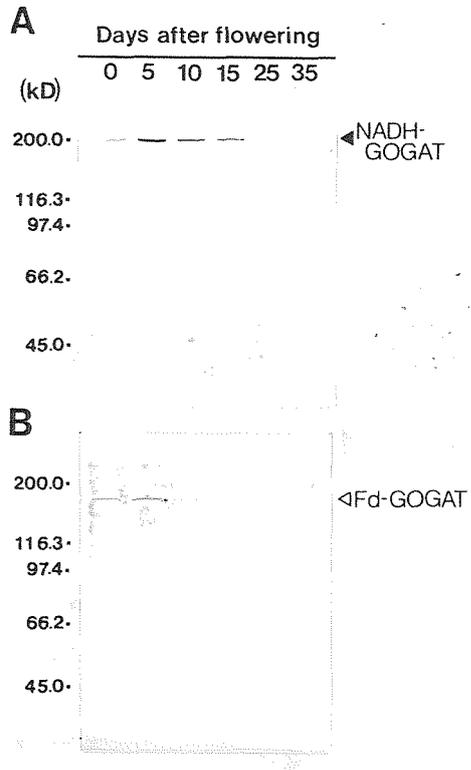


Figure 28. A, Changes in the activities of NADH-GOGAT (●) and Fd-GOGAT (○) in the spikelets of rice plants during ripening process. B, Changes in the activities of NADP-IDH (△) and GS transferase (▲) in rice spikelets during the ripening process.

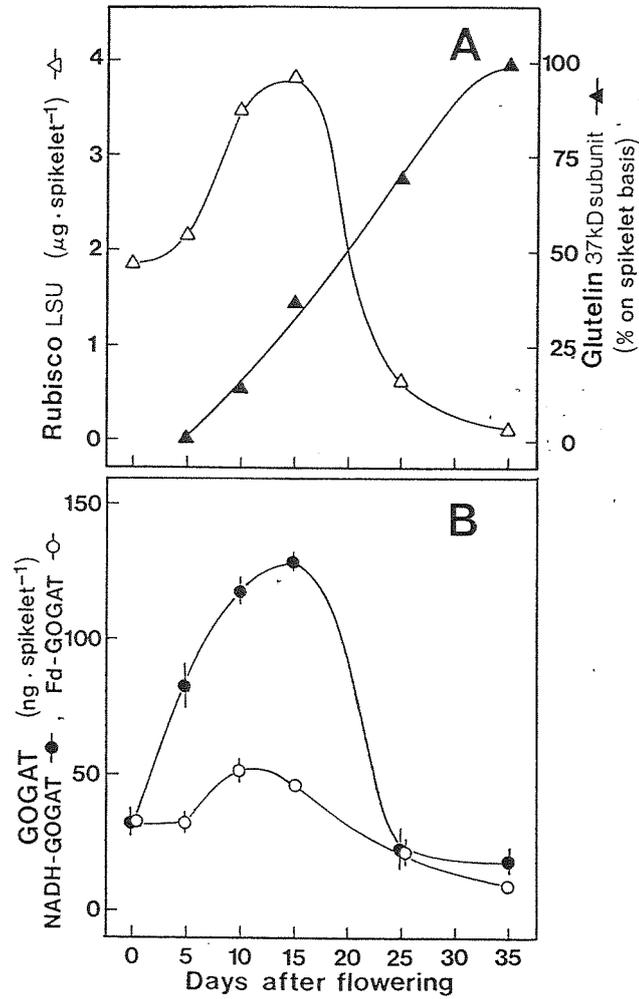
## 登熟過程のイネ主稈の穎果におけるNADH-GOGAT蛋白質とFd-GOGAT蛋白質の挙動

穎果の登熟過程におけるNADH-GOGATとFd-GOGATのポリペプチド含量の変化を、イムノプロット法により分析した結果をFig. 29に示した。可溶性蛋白質当たりのNADH-GOGATポリペプチド含量は、開花後5日目の穎果で最も高く可溶性蛋白質1mg当たりで3.1 $\mu$ gを占めた。この5日目のNADH-GOGAT含量は開花日の穎果の約3倍に相当し、また、5日目以降穎果の登熟に従ってその含量は低下した(Fig. 29A)。可溶性蛋白質当たりのFd-GOGATポリペプチド含量は、開花日の穎果に比較して開花後5日目にやや増えるものの、以降減少した(Fig. 29B)。開花後5日目の穎果のFd-GOGATポリペプチド含量は1.2 $\mu$ g/mg蛋白質であり、NADH-GOGATポリペプチド含量の約40%にすぎなかった。また、Fd-GOGATポリペプチド含量とRubisco LSUポリペプチド含量の登熟過程における挙動は酷似していた。

穎果当たりに換算した各GOGATポリペプチド含量の変化をFig. 30Bに示した。また、比較として、穎果当たりのRubisco LSUポリペプチド含量の変化とグルテリン37kDポリペプチドの相対含量の変化をFig. 30Aに示した。穎果当たりのNADH-GOGATポリペプチド含量は、グルテリンの増加に先立ち、開花日から増加し始め、活性が最大であった(Fig. 28A)開花後15日目では、開花日の約4倍に達した。これ以降、穎果当たりのNADH-GOGATポリペプチド含量は急激に減少し、開花後25日目以降の登熟後期では開花日に比較してやや低い含量を示した。この登熟過程におけるNADH-GOGATポリペプチド含量の変化は、活性の変化(Fig. 28A)と酷似していた。一方、穎果当たりのFd-GOGATポリペプチド含量は、開花後5日目以降増加し、登熟中期の開花後10日目から15日目付近で最大となり、以降減少した(Fig. 30B)。このFd-GOGATポリペプチド含量の変化は、登熟過程における穎果当たりの活性の変化(Fig. 28A)及びRubisco LSUポリペプチドの変化(Fig. 30A)と酷似していた。穎果に含まれる両GOGATを比較すると、NADH-GOGATポリペプチド含量は登熟期間を通じ、常にFd-GOGATポリペプチド含量を上回っており、特に登熟中期の開花後15日目ではNADH-GOGATポリペプチド含量はFd-GOGATポリペプチド含量の約3倍に達した。従って、登熟過程の穎果におい



**Figure 29.** Immunoblotting analysis of NADH-GOGAT (A) and Fd-GOGAT (B) in the extracts prepared from the spikelets of rice plants during ripening process. Immunoblotting of NADH-GOGAT with affinity-purified antirice cell NADH-GOGAT IgG and of Fd-GOGAT with affinity-purified antirice leaf Fd-GOGAT IgG were carried out after the separation of 20  $\mu$ g soluble protein from spikelets by SDS-PAGE (7% [w/v] gel).



**Figure 30.** (A) Changes in the contents of Rubisco LSU ( $\Delta$ ) and Glutelin 37kD subunit ( $\blacktriangle$ ) and (B) NADH-GOGAT protein ( $\bullet$ ) and Fd-GOGAT protein ( $\circ$ ) in the spikelets of rice plants during ripening process.

ては、NADH-GOGAT蛋白質が主たるGOGAT分子種であることが判明した。

#### 開花後10日目のイネ主稈の穎果のもみ殻と未熟玄米におけるNADH-GOGAT蛋白質とFd-GOGAT蛋白質の組織分布

上記のごとくGOGATの活性(Fig. 28A)と蛋白質含量(Fig. 30B)が最も高かった開花後10日目のイネ主稈の穎果を、機械的にもみ殻と未熟玄米部分(Fig. 31C)に分け、これ等の各組織におけるGOGATポリペプチドの分布をイムノプロット法により分析した(Fig. 31A, B)。NADH-GOGATポリペプチドは、もみ殻と未熟玄米の可溶性蛋白質当たりで算出した場合、ほぼ等しい値を示した(Fig. 30A)。一方、Fd-GOGATポリペプチドはもみ殻に多く存在しており、もみ殻の可溶性蛋白質当たりのFd-GOGATポリペプチド含量は未熟玄米中の含量の約5倍に相当した(Fig. 31A)。

組織当たりに換算した場合、穎果全体のNADH-GOGATポリペプチド含量の約84%が未熟玄米中に存在しており、もみ殻中には残りの約16%が存在しているにすぎなかった(Fig. 31B)。一方、組織当たりのFd-GOGATポリペプチド含量は未熟玄米ともみ殻でほぼ1:1であり、NADH-GOGATの組織分布とは大きく異なっていた(Fig. 31B)。特に未熟玄米中のNADH-GOGATポリペプチド含量はFd-GOGATポリペプチド含量の約5倍に相当することが判明した。従って、開花後10日目の、貯蔵蛋白質が蓄積する胚乳を含む未熟玄米においては、NADH-GOGAT蛋白質が主たるGOGAT分子種であった。

#### 登熟過程のイネ主稈の穎果におけるGSアイソザイム蛋白質の挙動

イネ穎果の登熟過程におけるGS<sub>1</sub>とGS<sub>2</sub>のポリペプチド含量の変化を、イムノプロット法により分析した結果をFig. 32に示した。可溶性蛋白質当たりのGS<sub>1</sub>ポリペプチドの相対含量は、開花日から完熟期まで減少し続けた。また、GS<sub>2</sub>ポリペプチド含量は開花後5日目にやや増加するが、以降減少した。登熟過程における可溶性蛋白質当たりで算出したGS<sub>2</sub>ポリペプチド含量の変化は、Fd-GOGATポリペプチド含量とRubisco LSUポリペプチド含量の変化と酷似していた。

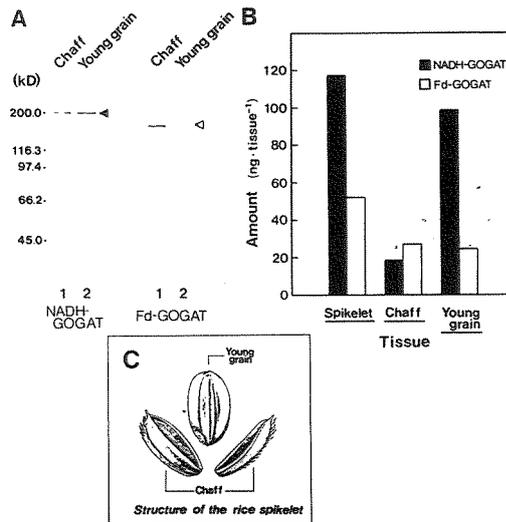


Figure 31. Distribution of NADH-GOGAT protein and Fd-GOGAT protein in the chaff and young grain of the 10-days old rice spikelet. A, Immunoblotting of GOGAT proteins. B, Distribution of GOGAT proteins expressed on the tissue basis. C, The structure of the rice spikelet (adapted from Hoshikawa 1975).

穎果当りに換算した各GSアイソザイムポリペプチド含量の変化をFig. 33に示した。 穎果当たりのGS<sub>1</sub> ポリペプチドの相対含量は、開花後10日目にピークを示した。 穎果当たりのGS<sub>2</sub> ポリペプチド含量は、開花後 5日目から増加し、登熟中期の10日目から15日目付近にピークを示した後、以降減少した。 穎果当たりで求めたGS<sub>2</sub> ポリペプチド含量の登熟過程における変化も、 Fd-GOGATポリペプチド含量とRubisco LSU ポリペプチド含量の変化と酷似していた。 開花後 5日目から15日目までの穎果におけるFd-GOGATとGS<sub>2</sub> 及びRubisco の各ポリペプチドの可溶性蛋白質当たりの相対含量比は、約1 : 1.7-2.0 : 102-134 (Fd-GOGAT (0.5-1.2 μg/mg蛋白質) : GS<sub>2</sub> :Rubisco) であり、第二章で示した緑色の完全展開葉身における可溶性蛋白質当たりの相対含量比 1: 3.1-3.9 : 120-133 (Fd-GOGAT (4.5-4.7 μg/mg蛋白質) : GS<sub>2</sub> :Rubisco )と極めて似ていた。

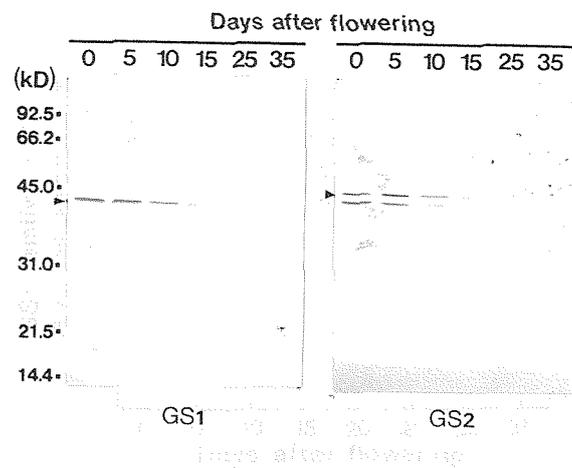


Figure 32. Immunoblotting analysis of GS isoforms with antirice leaf GS<sub>2</sub> IgG (right panel) and that with anti-GS<sub>1</sub> IgG (left panel) in the extracts prepared from the spikelets of rice plants during ripening process. Five  $\mu$ g of soluble protein for GS<sub>1</sub> and 10  $\mu$ g for GS<sub>2</sub> were first separated by SDS-PAGE (12.5% [w/v] gel). Anti-GS<sub>1</sub> IgG raised against synthetic peptide or anti-GS<sub>2</sub> IgG raised against rice leaf GS<sub>2</sub> was used for the immunoblotting.

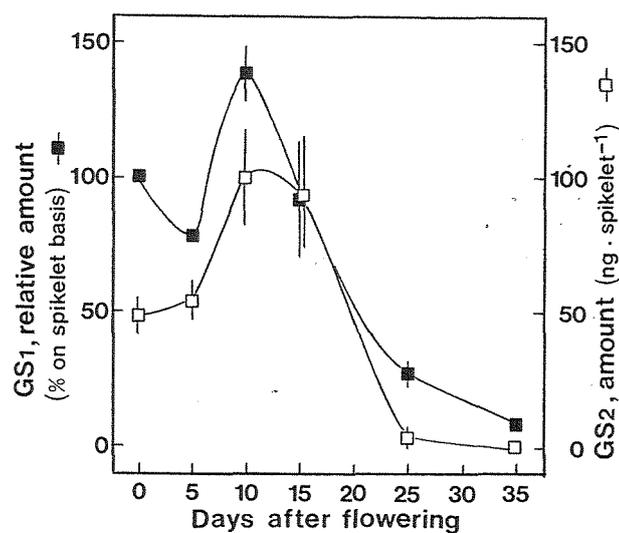


Figure33. Changes in the contents of GS<sub>1</sub> (■) and GS<sub>2</sub> (□) polypeptides in rice spikelets during the ripening process. Relative changes in GS<sub>1</sub> polypeptide was expressed as the percent of 0 d sample on a spikelet basis, because purified GS<sub>1</sub> from rice leaves was not available. Actual contents of GS<sub>2</sub> polypeptide were calculated with purified GS<sub>2</sub> as the standard.

#### 第四節 考察

登熟のごく初期のイネ主稈の穂では、一時的にグルタミンが遊離アミノ酸の主成分となり、以降ただちにグルタミン酸が登熟過程の全期間において主成分となることが知られている(Mae and Higurashi unpublished data)。従って、老化組織から篩管を介して穎果に転流して来たグルタミンは、グルタミン酸へ変換されることが必要となる。本章では、登熟過程におけるイネの穎果において、この変換反応をNADH-GOGATが触媒しうる可能性を検証する目的で、研究を行った。

本章での研究から、1) イネ穎果当たりのNADH-GOGAT活性とポリペプチド含量は、胚乳貯蔵蛋白質の蓄積や可溶性蛋白質の増加に先立ち、開花日から増加したこと、2) 登熟過程を通じて、穎果におけるNADH-GOGATポリペプチド含量はFd-GOGATポリペプチド含量を上回っていたこと、3) 穎果からもみ殻を除いた未熟玄米中に、穎果全体に含まれるNADH-GOGATポリペプチドの約84%が分布しており、Fd-GOGATの約5倍のNADH-GOGATが存在していたこと、等が明かとなった。一般に、玄米内部への転流物質の輸送は中果皮内部の維管束を介して行われ(Thorne, 1985)、特に窒素は、最終的にプロテインボディーIIに蓄積されるグルテリンとプロテインボディーIに蓄積されるプロラミンの蛋白質の形で、胚乳に貯蔵される(Yamagata et al., 1982; Yamagata and Tanaka, 1986)。この穎果における転流と貯蔵の機構を考慮すると、本章で得られた結果は、登熟過程のイネ穎果において、転流して来たグルタミンを再利用する最初の段階でNADH-GOGATがグルタミン酸へ変換している可能性を強く示唆している。NADH-GOGATにより合成されるグルタミン酸は、以降のアミノ酸代謝の中心になるものと考えられる(Sechley et al., 1992)。穎果全体を用いたin vitroの実験ではあるが、NADP-IDHやGS活性と両GOGAT活性の比較から、GOGAT反応への基質の供給能力は転流グルタミンを合わせ、十分であるものと推定され、基質の面からの限定は無いと考えられる。まだ予備的な段階ではあるが、パラフィン包埋した未熟玄米の横断切片を調製して免疫組織化学的にNADH-GOGAT蛋白質の検出を試みたところ、NADH-GOGATは果皮

の維管束の篩部組織に局在している像が得られており、上述の可能性を更に支持している。

登熟過程の穎果においても、第二章の葉身の結果と同様に、**NADH-GOGAT**活性とポリペプチド含量の大幅な増減が観察された。この結果は、**NADH-GOGAT**蛋白質の発現や制御を研究する上で最適の材料を特定できたことになり、今後、同遺伝子の発現や調節機構並びに同酵素蛋白質のturn over等の研究に応用しうる。

もみ殻に多く分布していた**Fd-GOGAT**の活性とポリペプチド含量の登熟過程における変化は、**GS<sub>2</sub>** ポリペプチドと**Rubisco LSU** ポリペプチド含量の変化と同様に推移した。登熟過程のイネの穎果は、クロロフィル当たりで止葉と同程度の光合成を行っていることが知られている(Imaizumi et al., 1990)。また、貯蔵蛋白質が蓄積する胚乳を覆う果皮の横細胞には、登熟の中期に葉緑素が形成され玄米は緑色を呈する(Hoshikawa, 1975)。よって、穎果においても**Fd-GOGAT**は、緑葉と同様に**GS<sub>2</sub>**とともに光呼吸系から放出されるアンモニアの再同化を行っているものと考えられる。このことは、開花後5日目から15日目までの穎果における**Fd-GOGAT**と**GS<sub>2</sub>**及び**Rubisco**の各ポリペプチドの可溶性蛋白質当たりの相対含量比が、約1 : 1.7-2.0 : 102-134 (**Fd-GOGAT** (0.5-1.2  $\mu$ g/mg蛋白質) : **GS<sub>2</sub>** : **Rubisco**)であり、第二章で示した緑色の完全展開葉身における可溶性蛋白質当たりの相対含量比 1 : 3.1-3.9 : 120-133 (**Fd-GOGAT** (4.5-4.7  $\mu$ g/mg蛋白質) : **GS<sub>2</sub>** : **Rubisco**)と極めて似ていた結果からも強く支持される。ここで、穎果の可溶性蛋白質当たりの**Fd-GOGAT**, **GS<sub>2</sub>**, **Rubisco**の含量が緑葉に比べて低かったのは、イネ穎果における光合成はC4型またはC3-C4遷移型であり、イネ葉本来のC3型とは異なる(Imaizumi et al. 1990)ことによるのかもしれない。また、**Fd-GOGAT**, **GS<sub>2</sub>**, **Rubisco**が葉緑体のストロマに局在する(Hirel et al., 1982 ; Botella et al., 1988a, b ; Dotta et al., 1991)事実を考慮すると、穎果におけるこれ等の酵素含量の登熟過程での推移は穎果における葉緑体の生成と崩壊を反映しているものと思われる。

本章の結果では、登熟過程を通じて、穎果の**NADH-GOGAT**ポリペプチド含量は**Fd-GOGAT**ポリペプチド含量を上回っていた。しかし登熟過程の穎果の両**GOGAT**

活性は、ほぼ等しかった。第一章の結果では、NADH-GOGATのturnover numberはFd-GOGATの値の約1/4であった。よって、登熟過程の穎果での両GOGAT間の活性とポリペプチド含量の差は、両酵素のturnover numberの違いに起因する可能性が考えられる。登熟過程を通じて、両GOGATの活性の変化とポリペプチド含量の変化は同様に推移したことから、供試した穎果のGOGAT蛋白質は全て活性を有した状態で存在すると考えられる。開花後10日目の未熟玄米中には穎果全体の約84%のNADH-GOGATポリペプチドが存在し、一方Fd-GOGATポリペプチドはもみ殻と未熟玄米にほぼ1:1で存在した。これ等の各組織における各GOGATポリペプチドの分布比率を各GOGATの活性に置き換えると、開花後10日目の未熟玄米中のNADH-GOGAT活性はFd-GOGAT活性よりも約1.7倍高いことになる。よって、酵素活性から判断しても、開花後10日目の未熟玄米中のグルタミン酸合成は、NADH-GOGATに大きく依存しているものと考えられる。しかし、本研究で測定したGOGAT活性は、in vitroでの最大活性であるので、今後更にin vivoでの両GOGAT活性の測定が必要と思われる。

また本章の研究では、登熟過程の穎果におけるGS<sub>1</sub>蛋白質の挙動についても解析した。本研究で用いた抗イネ葉GS<sub>2</sub>抗体は、GS<sub>1</sub>に対する認識性がGS<sub>2</sub>に対する認識性に劣る(Kamachi et al., 1991)にもかかわらず、抗イネ葉GS<sub>2</sub>抗体を用いた穎果のイムノプロット分析では、GS<sub>2</sub>ポリペプチドよりもGS<sub>1</sub>ポリペプチドの方が発色強度が高かった。よって、登熟過程の穎果においては、GS<sub>1</sub>がGS<sub>2</sub>よりも多く存在していることが判明した。イネ葉身においては、細胞質型GS<sub>1</sub>蛋白質は維管束組織に局在して、老化葉身における転流グルタミンの合成に関与することが推定されている(Kamachi et al., 1991 ; 1992a ; 1992b)。しかし、老化期と思われる登熟後期の穎果においては、葉身とは異なり、可溶性蛋白質当たり及び穎果当たりのGS<sub>1</sub>ポリペプチド含量は減少し続けた。このことは、成熟穎果においては、蓄積した窒素の再転流が生じていないことを示唆すると思われる。

本章の研究から、シンク組織である登熟過程の穎果においてNADH-GOGATが、老化組織から篩管を介して転流して来たグルタミンを、アミノ酸代謝の中心に位置

するグルタミン酸へ変換している可能性が強く示唆された。この知見を更に検証するため、第二章の未成熟葉身と同様に、**NADH-GOGAT**の組織や細胞内の存在場所を免疫組織化学的手法を用いて明らかにすることや、in vivo での**NADH-GOGAT**と関連酵素の活性を測定すること及びシンク組織としての登熟過程の穎果における**NADH-GOGAT**を中心とした遺伝子発現の調節機構の解析が今後必要と思われる。

## 総合考察

本研究では、酵素学的性質や生理学的機能がほとんど研究されていなかった高等植物のNADH-GOGATに関して、イネを研究材料に用いてNADH-GOGATを高度に精製し、世界に先がけてその特異抗体を得て、NADH-GOGAT蛋白質の特性を免疫学的に明らかにするとともに、いまだ不明なNADH-GOGATの生理的機能を探求することを目的とした。

第一章の研究では、イネ個体に比較して高いNADH-GOGAT活性を含有する増殖初期のイネ培養細胞からNADH-GOGATを純化し、その酵素学的性質を調べた。また、NADH-GOGATに対する特異抗体を作製して、Fd-GOGATと比較しつつNADH-GOGATの免疫学的特性を解析した。その結果以下のことが判明した。

- ① イネ培養細胞NADH-GOGATは分子量約200kDの単量体flavo蛋白質であった。
- ② NADH-GOGATのTurnover numberはイネ葉Fd-GOGATの約1/4であった。
- ③ NADH-GOGATはFd-GOGATと免疫化学的に異なる蛋白質分子であった。
- ④ 精製NADH-GOGATのN末端9残基のアミノ酸配列を決定したところ、Gly<sup>2</sup> ~ Ala<sup>7</sup>とLeu<sup>9</sup>は、トウモロコシ葉Fd-GOGATの配列と同様であった。
- ⑤ NADH-GOGAT蛋白質はイネ植物体の全ての器官で検出されたが、特に未成熟な組織に多く存在していた。

高等植物のNADH-GOGATの高度精製標品の獲得と、その特異抗体の作製は世界で初めてのことである。特に⑤の知見をもとにして、続く第二章と第三章の研究では、イネの窒素転流過程に焦点を当ててNADH-GOGATの機能を解析した。

第二章の研究では、イネ着生葉の葉位別の葉身と葉鞘におけるNADH-GOGATの活性と蛋白質含量を定量的に解析した。また、比較としてFd-GOGATの活性と蛋白質含量及びGS<sub>1</sub>、GS<sub>2</sub>、Rubiscoの各ポリペプチド含量についても同様に解析した。その結果以下のことが判明した。

- ① イネ葉における新鮮重当たりのNADH-GOGAT活性及び蛋白質含量は抽出前の未成熟な非緑色葉身で極めて高く、葉の成熟に従い低下した。

② Fd-GOGAT活性及び蛋白質含量はRubisco, GS<sub>2</sub>と同様に、光合成の盛んな展開した緑色葉身で高かった。

第三章の研究では登熟過程のイネの穎果において、胚乳貯蔵蛋白質とRubiscoの挙動を指標として、NADH-GOGATとFd-GOGATの活性と蛋白質の挙動を定量的に解析し、合わせてもみ殻と未熟玄米における両GOGAT蛋白質の存在割合を分析した。その結果以下のことが判明した。

- ① 登熟過程のイネ穎果当たりのNADH-GOGATとFd-GOGAT活性は、ほぼ等しいものの蛋白質含量としてはNADH-GOGATがFd-GOGATを数倍上回った。
- ② イネ穎果当たりのNADH-GOGAT活性と蛋白質含量は、胚乳貯蔵蛋白質の蓄積に先立ち開花日から増加した。
- ③ 開花後10日目では、NADH-GOGAT蛋白質は約84%が穎果の未熟玄米中に存在し、Fd-GOGAT蛋白質の分布とは異なっていた。
- ④ 登熟過程のイネ穎果におけるFd-GOGAT活性と蛋白質の挙動はRubisco, GS<sub>2</sub>蛋白質の挙動と同様に推移した。

イネの篩管液中には約0.1Mという高濃度の遊離アミノ酸が存在しており、その全アミノ酸の42%をグルタミンが、またグルタミンから合成されるアスパラギンは12.4%を占めるという事例が報告されている(Hayashi and Chino, 1990)。一方、イネ葉身の主要な遊離アミノ酸は、葉齢に関わらずグルタミン酸であり、登熟過程のイネの穂においてもグルタミン酸は、全遊離アミノ酸の20-34%を占める(Mae and Higurashi unpublished data)。また、Glutamate familyと一般に呼ばれるアミノ酸群はグルタミン酸から合成されることが明らかにされており、グルタミン酸はアミノ酸代謝の中心に位置づけられる(Sechley et al. 1992)。これ等の事実を考慮すると、生長中の若い葉及び穂に転流して来たグルタミンの再利用機構の初期反応の一つとして、グルタミン酸への変換反応が必要であり、この反応はシンク組織における窒素の再利用機構上の極めて重要な位置を占めると考えられる。第二章及び第三章の結果は、イネの若い組織において、老化組織から転流して来た窒素を、NADH-GOGATがグルタミン酸へ変換している可能性を強く示唆した。特に、イネ着生葉では未抽出葉鞘内の最も若い葉において

NADH-GOGAT活性と蛋白質含量が最大であった事実や、胚乳貯蔵蛋白質の蓄積を開始する開花後10日目の未熟玄米中にNADH-GOGAT蛋白質が主な GOGAT分子種として存在していた事実は、この考えの正当性を強く支持している。なお、in vitroでの解析結果ではあるが、NADP-IDH活性とGOGAT 活性を比較した限りでは、GOGAT 反応のもう一つの基質となる2-オキソグルタル酸の供給能力は、穎果においては十分であるものと予想される。

さて、窒素転流におけるNADH-GOGATの役割の可能性を評価する上で、NADH-GOGAT の組織内分布が重要な点となる。篩管液ではグルタミンが高濃度であるにもかかわらず、葉身や登熟過程の穂の主要な遊離アミノ酸はグルタミン酸であるという事実は、これ等のシンク組織において、グルタミンからグルタミン酸へのすみやかな変換が成されていることを示すものであり、NADH-GOGATが触媒しているのであれば、同酵素はシンク組織の篩管近傍に存在している必要がある。本研究の結果では、NADH-GOGATはイネ着生葉では、葉肉細胞の葉緑体のストロマに局在するFd-GOGATやGS<sub>2</sub> 及びRubisco と器官分布が明確に異なっており、また穎果では、Fd-GOGATとは異なり未熟玄米中に穎果で検出されたほとんどのNADH-GOGAT が分布していた。よって、NADH-GOGATはFd-GOGAT等の葉緑体酵素蛋白質とは組織内及び細胞内の存在場所が異なる可能性が示唆された。予備的な免疫組織化学的実験では、NADH-GOGAT抗原は若い葉身の維管束組織に局在している結果を得ている(unpublished data)。また、同様に胚乳貯蔵蛋白質が蓄積を開始する開花後 7日目の穎果においても、未熟玄米背部の維管束組織の篩部柔細胞にNADH-GOGAT抗原が存在している像が得られている(unpublished data)。また、葉身や登熟過程の穎果の主要な遊離アミノ酸がグルタミン酸であることと、篩管からの原形質連絡が伴細胞までは続いていること(Giaquinta, 1983)を考慮すると、グルタミン酸が、伴細胞以降の細胞間を膜上のジカルボン酸輸送系(Woo et al., 1987) 等を介して移動しやすいことを示すものと思われる。よって、維管束の篩管周縁の組織にNADH-GOGATが局在することを示唆する結果は、提案したNADH-GOGAT の役割の正当性をさらに高めるものと考えられる。今後更に、免疫組織化学的なNADH-GOGATの解析を深めてNADH-GOGATの組織・細胞内分布を正確に把握す

る研究とともに、NADP-IDH等の関連酵素蛋白質についても解析し比較検証することが必要と思われる。本研究においては、イネ植物体の典型的なシンク組織として、未成熟の非緑色葉と登熟過程の穎果を供試したが、生長中の根も重要なシンク器官の一つと考えられる。イネの根には、ある葉の抽出時にそれより3葉下位の葉の基部の節部から若い根が生ずるという生長の規則性がある(Hoshikawa, 1975)。しかし、イネの地下部は根が密生しており、しかも分枝根も発生することから、シンク組織部分の特定が困難であるため、本研究では解析対象としなかった。今後、根のシンク組織部分についても解析を行う必要があると思われる。以上、本研究では、NADH-GOGATが生体内の窒素代謝の主要な部分を担うという推定に対し、世界で初めて、具体的な可能性の一つを提示することができた。

本研究で、NADH-GOGAT蛋白質が比較的濃縮されている器官として、未抽出葉身と登熟初期の玄米の2つを特定できた。また、NADH-GOGAT遺伝子のクローン化に際して特異抗体やN末端アミノ酸配列の利用が可能となった。NADH-GOGATの成熟蛋白質の分子量から求められるmRNAの長さは、翻訳領域だけでも約5.5kbと推定される。今後、未成熟のシンク組織からcDNAライブラリーを作製し、サイズフラクショネーション等を応用してNADH-GOGAT cDNAをクローン化する予定である。光によるFd-GOGAT遺伝子発現の制御などに関して、ごく最近研究が進められている(Sugiyama, Caboch)が、NADH-GOGAT遺伝子に関する研究例は勿論皆無である。イネの葉身や穎果の結果を考慮すると、細胞の分裂・増殖・分化といった局面でNADH-GOGAT遺伝子の発現が動的に制御されている可能性も高く、これ等特定できた器官を利用して早急に分子生物学的研究に発展させたい。

緑葉のFd-GOGATの主な生理的役割は、Fd-GOGATを欠損したシロイナズナ及びオムギの変異体を用いた研究から、GS<sub>2</sub>と共に、光呼吸で生ずるアンモニアを再同化することであることが明らかにされている(Somerville and Ogren, 1980; Kendall et al., 1986; Wallsgrove et al., 1987)。本研究では、登熟過程の穎果においてもFd-GOGAT活性と蛋白質が検出された。Imaizumi et al. (1990)

は登熟過程のイネの穎果は、クロロフィル当たりで止葉と同程度の光合成を行っていることを示した。また、貯蔵蛋白質が蓄積する胚乳を覆う果皮の横細胞には、登熟の中期に葉緑素が形成され玄米は緑色を呈することも報告されている(Hoshikawa, 1975)。更に本研究から、開花後 5日目から15日目までの穎果におけるFd-GOGATとGS<sub>2</sub> 及びRubisco の各ポリペプチドの可溶性蛋白質当たりの相対含量比が、緑色の完全展開葉身における可溶性蛋白質当たりの相対含量比と極めて似ていたことが判明した。よって、穎果においてもFd-GOGATは、緑葉と同様にGS<sub>2</sub> とともに光合成とリンクする光呼吸系から放出されるアンモニアの再同化を行っているものと思われた。一方、シンク組織である未成熟な非緑色葉身においても緑色葉身よりは低いもののFd-GOGAT活性と蛋白質が検出された。非緑色組織におけるFd-GOGATの生理的役割に関しては、硝酸還元系と関係づけた研究がなされている(Sechley et al., 1992)。根などの非緑色組織においては、Fd-GOGATとGS<sub>2</sub> は亜硝酸還元酵素(NiR ; EC 1.7.7.1)と同様にプラスチドに局在する(Sechley et al., 1992 ; Vezina et al., 1987 ; Vezina and Langlois, 1989)。また、Fd様蛋白質(Oji et al., 1985 ; 1989 ; Emes and Bowsher, 1991) やペントースリン酸回路(Emes and Bowsher, 1991) も同様にプラスチドに存在することが示されている。Suzuki et al. (1985) は、トウモロコシ根にFd-NADP 還元酵素(Fd-NADP reductase ; EC 1.6.7.1)が存在することを免疫化学的に証明し、更にトウモロコシ根の抽出液を用いて、in vitroで NADPH及びNADHからFd-NADP 還元酵素とFd様蛋白質を介してFd-GOGATへ電子伝達が可能なことを示した。また、Oji et al. (1985)はオオムギ根のプラスチドにおいてペントースリン酸回路で生成されるNADPH が亜硝酸還元機能していることを示した。更に硝酸を単独の窒素源として与えたイネ培養細胞においても、Fd-GOGATとGS<sub>2</sub> の蛋白質含量が増加することが著者等の以前の研究において示された(Hayakawa et al., 1990)。イネにおいては、根で吸収された硝酸は地上部へも長距離輸送されて同化される(Oji, 1989)。以上の点を考慮すると、非緑色の未抽出葉身でも、根や培養細胞と同様にFd-GOGATは硝酸還元に関与しているのかもしれない。

## 要約

本研究では、まずイネ培養細胞からNADH依存性グルタミン酸合成酵素(NADH-GOGAT; 1.4.1.14)を純化し、その特異抗体を作製して、NADH-GOGATの酵素蛋白質的性質を解析した。次のことが明らかになった。なお、高等植物のNADH-GOGATの高度精製標品の獲得とその特異抗体の作製は世界で初めての事である。

① イネ培養細胞NADH-GOGATは分子量約200kDの単量体flavo蛋白質であり、そのturnover numberはイネ葉Ferredoxin依存性GOGAT(Fd-GOGAT; EC1.4.7.1)の約1/4であった。

② NADH-GOGATはFd-GOGATと免疫化学的に異なる蛋白質分子であった。

(Hayakawa et al., 1992)

③ 精製NADH-GOGATのN末端9残基のアミノ酸配列を決定したところ、Gly<sup>2</sup> ~ Ala<sup>7</sup>とLeu<sup>9</sup>は、トウモロコシ葉Fd-GOGATの配列と同様であった。

(unpublished data)

次にNADH-GOGATの生理学的機能を解析した結果、次の事が判明した。

④ NADH-GOGAT蛋白質はイネ植物体の全ての器官で検出されたが、特に未抽出葉身や登熟初期の穎果などの未成熟なシンク組織に多く存在していた。

(Yamaya et al., 1992; Hayakawa et al., 投稿中)

⑤ イネ穎果当たりのNADH-GOGAT活性と蛋白質含量は、貯蔵蛋白質の蓄積に先立ち開花日から増加した。また、開花後10日目では、NADH-GOGAT蛋白質は約84%が穎果の未熟玄米中に存在した。

(Hayakawa et al., 投稿中)

以上の結果は、イネの若い組織において、老化組織から転流して来た窒素をアミノ酸代謝の中心に位置するグルタミン酸へ、NADH-GOGATが変換している可能性を強く示唆した。また、その重要性にもかかわらず手つかずの状態に残されていたNADH-GOGATの役割について世界で初めて具体的な可能性の一つを提示することができた。

## 謝辞

本研究を進めるにあたり、終始有益な御助言と御指導を戴いた東北大学農学部教授 小島邦彦博士に謹んで感謝の意を表します。また、終始適切な御指導と御助言を戴いた東北大学農学部教授 山谷知行博士、同助教授 前 忠彦博士に謹んで御礼申し上げます。特に、山谷知行博士には、小生の大学院生活を通じて、日常の実験その他の直接の御指導と終始変わらぬ激励を親身になって戴き重ねて御礼申し上げます。

また、本研究を進めるにあたり、組織化学解析において適切な御助言を戴いた東北大学助手 中村貞二博士、ウサギの採血の御指導を戴いた同 大友 泰技官に心から感謝致します。そして、論文投稿にあたり、適切な御助言を戴きました Gelpy大学 Ann Oaks 博士に謹んで御礼申し上げます。

さらに、牧野 周博士、横田 聡助手、佐々木瑞雄技官、蒲地一成博士、日出 間 純氏をはじめとする植物栄養学講座の技官、学生の皆様には、数々の御助言、御協力を戴き深く感謝するとともに、皆様の御発展を心からお祈り致します。

## References

- Anderson MP, Vance CP, Heichel GH, Miller SS (1989) Plant Physiol 90 : 351-358
- Avila C, Cánovas I, Núñez de Castro, Valpuesta V (1984) Biochem Biophys Res Commun 122 : 1125-1130
- Avila C, Botella JR, Cánovas de Castro IN, Valpuesta V (1987) Plant Physiol 85 : 1036-1039
- Bradford M (1976) Anal Biochem 72 : 248-254
- Botella JR, Verbelen JP, Valpuesta V (1988a) Plant Physiol 87 : 255-257
- Botella JR, Vervelen JP, Valpuesta V (1988b) Plant Physiol 88 : 943-946
- Chen FL, Cullimore JV (1988) Plant Physiol 88 : 1411-1417
- Chen R-D, Le Marechal P, Vidal J, Jacquot JP, Gadal P (1988) Eur J Biochem 175 : 565-572
- Chen R-D, Gadal P (1990) Plant Physiol Biochem 28 : 141-145
- Chiu JY, Shargool PD (1979) Plant Physiol 63 : 409-415
- Cock JH, Yoshida S (1972) Proc Crop Sci Soc Jpn 41 : 226-234

Cock JM, Brock IW, Watson AT, Swarup R, Morby AP, Cullimore JV (1991)  
Plant Mol Biol 17 : 761-771

Cullimore JV, Sims AP (1981) Phytochemistry 20 : 597-600

Dougall DK (1974) Biochem Biophys Res Commun 58 : 639-646

Edwards JW, Coruzzi GM (1989) Plant Cell 1 : 241-248

Edward JW, Walker EL, Coruzzi GM (1990) Proc Natl Acad Sci USA 87 :  
3459-3463

Emes MJ, Bowsher CG (1991) In Mj Emes, ed, Compartmentation of Plant  
Metabolism in Non-Photosynthetic Tissues. Cambridge Univ Press,  
Cambridge, England, pp 147-169

Fowler MW, Jessup W, Sarkissian GS (1974) FEBS Lett 46 : 340-342

Gabriol O (1971) In Methods in enzymology 22. Edited by WB Jacoby.  
pp 565-578. Academic Press , New York.

Giaquinta RT (1983) Ann Rev Plant Physiol 34 : 347-387

Hayakawa T, Kamachi K, Oikawa M, Ojima K, Yamaya T (1990) Plant Cell  
Physiol 31 : 1071-1077

- Hayakawa T, Yamaya T, Kamachi K, Ojima K (1992) Plant Physiol 98 :  
1317-1322
- Hayashi H, Chino N (1990) Plant Cell Physiol 31 : 247-251
- Hecht U, Oelmuller R, Schmidt S, Mohr H (1988) Planta 175 : 130-138
- Higuchi W, Fukazawa C (1987) Gene 55 : 245-253
- Hirasawa M, Tamura G (1984) J Biochem 95 : 983-994
- Hirel B, Perrot-Rechemann C, Suzuki A, Vidal J, Gadal P (1982) Plant  
Physiol 69 : 983-987
- Huffaker RC, Peterson LW (1974) Annu Rev Plant Physiol 25 : 363-392
- Hoshikawa K (1975) Growth of the Rice Plant Nosan-gyoson-Bunka-Kyokai,  
Tokyo. PP.15-303
- Imaizumi N, Usuda H, Nakamoto H, Ishihara K (1990) Plant Cell Physiol  
31 : 835-843
- Iwasaki Y, Mae T, Makino A, Ohira K, Ojima K (1992) Soil Sci Plant  
Nutr 38 : 517-525
- Juliano BO (1972) In Rice Chemistry and Technology. Edited by DF  
Houston. Chap.2. pp.16-74 American Association of Cereal chemists  
Inc., St. Paul, Minn.

Kamachi K, Yamaya T, Mae T, Ojima K (1991) Plant Physiol 96 : 411-417

Kamachi K, Yamaya T, Hayakawa T, Mae T, Ojima K (1992a) Plant Physiol  
98 : 1323-1329

Kamachi K, Yamaya T, Hayakawa T, Mae T, Ojima K (1992b) Plant Physiol  
99 : 1481-1486

Kanamori T, Matsumoto H (1972) Arch Biochem Biophys 159 : 113-122

Kelly JL, Greenleaf AL, Lehman IR (1986) J Biol Chem 261 : 10348-10351

Kendall AC, Wallsgrave RM, Hall NP, Turner JC, Lea PJ (1986) Planta  
168 : 316-323

Keys AJ, Bird IF, Cornelius MJ, Lea PJ, Wallsgrave RM, Mifflin BJ (1978)  
Nature 275 : 741-743

Knaff DB, Hirasawa M, Ameyibor E, Fu W, Johnson WK (1991) J Biol Chem  
266 : 15080-15084

Laemmli UK (1970) Nature 227 : 680-685

Lea PJ, Mifflin BJ (1974) Nature 251 : 614-616

Mae T, Makino A, Ohira K (1983) Plant Cell Physiol 24 : 1079-1084

- Mae T, Hoshino T, Ohira K (1985) Soil Sci Plant Nutr 31 : 589-600
- Magalhaes JR, Ju GC, Rich PJ, Rhodes D (1990) Plant Physiol 94 : 647-656
- Makino A, Mae T, Ohira K (1983) Plant Physiol 73 : 1002-1007
- Makino A, Mae T, Ohira K (1983) Plant Cell Physiol 24 : 1079-1084
- Marquez AJ, Avila C, Forde BG, Wallsgrove RM (1988) Plant Physiol Biochem 26 : 645-651
- Matoh T, Ida S, Takahashi E (1980) Plant Cell Physiol 21 : 1461-1474
- Matoh T, Takahashi E (1981) Plant Cell Physiol 22 : 727-731
- Matoh T, Takahashi E (1982) Planta 154 : 289-292
- Mifflin BJ, Lea PJ (1977) Annu Rev Plant Physiol 28 : 299-329
- Miller RE, Stadtman ER (1972) J Biol Chem 247 : 7407-7419
- Moose M, Nguyen NY, Teh-YungLiu (1988) J Biol Chem 263 : 6005-6008
- Morris PF, Layzell DB, Calvin DT (1988) Plant Physiol 87 : 148-154

- Nakagawa H, Yonemura Y, Yamamoto H, Satoo T, Ogura N, Sato R (1985)  
Plant Physiol 77 : 124-128
- Oji Y, Watanabe M, Wakiuchi N, Okamoto S (1985) Planta 165 : 85-90
- Oji Y, Kamatsu Y, Taguchi S, Wakiuchi N, Shiga H (1989) Soil Sci  
Plant Nutr 35 : 427-434
- Oliver G, Gosset G, Sanchez-Pescador R, Lozoya E, Ku LM, Flores N,  
Becerril B, Valle F, Bolivar F (1987) Gene 60 : 1-11
- O'Neal D, Joy KW (1973) Nature 246 : 61-62
- Ouchterlony O (1949) Acta Pathol Microbiol Scand 26 : 507-515
- Rhodes D, Rendon GA, Stewart GR (1975) Planta 125 : 201-211
- Sakakibara H, Watanabe M, Hase T, Sugiyama T (1991) J Biol Chem 266 :  
2028-2035
- Sakakibara H, Kawabata S, Takahashi H, Hase T, Sugiyama T (1992)  
Plant Cell Physiol 33 : 49-58
- Sakamoto A, Ogawa M, Masumura T, Shibata D, Takeba G, Tanaka K,  
Fuji S (1989) Plant Mol Biol 13 : 611-614
- Sechley KA, Yamaya T, Oaks A (1992) Compartmentation of nitrogen  
assimilation in higher plants. Int Rev Cyt 134 : 85-163

- Shin K (1976) *Tampakushitsu Kakusan Koso* pp.226-232
- Somerville CR, Ogren WL (1980) *Nature* 286 : 257-259
- Srivastava HS, Singh RP (1987) *Phytochemistry* 26 : 597-610
- Suzuki A, Gadal P, Oaks A (1981) *Planta* 151 : 457-461
- Suzuki A, Gadal P (1982) *Plant Physiol* 69 : 848-852
- Suzuki A, Vidal J, Gadal P (1982) *Plant Physiol* 70 : 827-832
- Suzuki A, Gadal P (1984) *Physiol Veg* 22 : 471-486
- Suzuki A, Nato A, Gadal P (1984a) *Plant Sci Lett* 33 : 93-101
- Suzuki A, Vidal J, Nguyen J, Gadal P (1984b) *FEBS Lett* 173 : 204-208
- Suzuki A, Oaks A, Jacquot J-P, Vidal J, Gadal P (1985) *Plant Physiol* 78 : 374-378
- Suzuki A, Audet C, Oaks A (1987) *Plant Physiol* 84 : 578-581
- Thorne JH (1985) *Ann Rev Plant Physiol* 36 : 317-343
- Tingey SV, Tsai F-Y, Edwards JW, Walker EL, Coruzzi GM (1988)  
*J Biol Chem* 263 : 9651-9657

- Tempest DW, Meers JL, Brown CM (1970) Biochem J 117 : 405-407
- Thomas H (1978) Planta 142 : 161-169
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979) Proc Natl Acad Sci USA 76 :  
4350-4353
- Trotta PP, Platzer KEB, Haschemeyer RH, Meister A (1974) Proc Natl  
Acad Sci USA 71 : 4607-4611
- Vezina LP, Hope HJ, Joy KW (1987) Plant Physiol 83 : 58-62
- Vezina LP, Langlois JR (1989) Plant Physiol 90 : 1129-1133
- Wallsgrave RM, Lea PJ, Mifflin BJ (1982) Planta 154 : 473-476
- wallsgrave RM, Keys AJ, Lea PJ, Mifflin BJ (1983) Plant Cell Environ  
6 : 301-309
- Woo KC, Flugge UI, Heldt HW (1987) Plant Physiol 84 : 624-633
- Yamagata H, Sugimoto T, Tanaka K, Kasai Z (1982) Plant Physiol 70 :  
1094-1100
- Yamagata H, Tanaka K (1986) Plant Cell Physiol 27 : 135-145
- Yanaya T (1988) Kagaku To Seibutsu 26 : 813-821

Yamaya T, Hayakawa T, Tanasawa K, Kamachi K, Mae T, Ojima K (1992)  
Plant Physiol 100 : 1427-1432

Yamazaki K (1963) Proc Crop Sci Soc Jpn 32 : 237

Yoshida S, Hara T (1977) Soil Sci Plant Nutr 23 : 93-107

Zehnacker C, Becker TW, Suzuki A, Carrayol E, Caboche M, Hirel B  
(1992) Planta 187 : 266-274