

テンサイの葉柄組織細胞におけるphosphoglucose isomeraseの組織化学的検出

誌名	日本作物學會紀事
ISSN	00111848
巻/号	543
掲載ページ	p. 283-284
発行年月	1985年8月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



テンサイの葉柄組織細胞における Phosphoglucose Isomerase の組織化学的検出

村 上 高
(農業生物資源研究所)

The Histochemical Detection of Phosphoglucose Isomerase in Tissue Cells of Sugar Beet Petiole

Taka MURAKAMI

(Department of Applied Physiology, National Institute of Agrobiological Resources, Tsukuba, Ibaraki 305)

昭和 59 年 12 月 28 日受理

光合成産物の通導と一時貯留の二つの役割りを果しているテンサイの葉柄組織^{4,5,6,8,10)}において、糖の転移経路と転移の場を明らかにしようとして、糖代謝関連酵素の活性と局在性を組織化学的手法で研究を進めている。これまで、UDPG-pyrophosphorylase(UDPG-PPase)²⁾ および Phosphoglucomutase (PGMase)³⁾ について報告したが、今回は Phosphoglucose isomerase (PGIase) の活性を組織化学的に検出したので報告する。

PGIase (EC 5,3,1,9) は、fructose-6-phosphate (F6P) と glucose-6-phosphate (G6P) の相互変換を可逆的に触媒する酵素である。反応生成物の可視化の原理は第 1 図に示したように間接的な Tetrazolium 法で、濃青色の Diformazan が活性の場に沈殿する⁹⁾。すなわち、基質として与えた F6P は、PGIase によって G6P に変換され、G6P 以降の変換については PGMase の組織化学的検出³⁾ の場合と同様である。

材 料 と 方 法

材料は生物研(筑波)の圃場で直播して育成したテンサイ (*Beta vulgaris* var. *saccharifera* ALEF.), 品種: モノホート (HKE-20) を 12 月に掘り上げ、主として若い葉柄の下部に近い部分の生体切片を検鏡材料として光学顕微鏡で観察を行った。切片は、ハンドミクروتームを用いて蒸留水中に切り落とし、直ちに減圧操作を施して組織内の気体を追い出してから水洗し、基質混合液に投入後、その液面をトルエンで覆った。反応終了後水洗してグリセリンで封入し、対照切片と比較観察を行った。

PGIase の活性検出は、MEIJER の PGMase 検出の方法¹⁾ に準拠したもので、基質混合液組成は安田⁹⁾ の記載を多少変えた(第 1 表)。F6P と G6P dehydrogenase は、Boehringer Mannheim 社の製品を使

* 大要は第 175 回講演会 (1983 年 4 月) において発表。

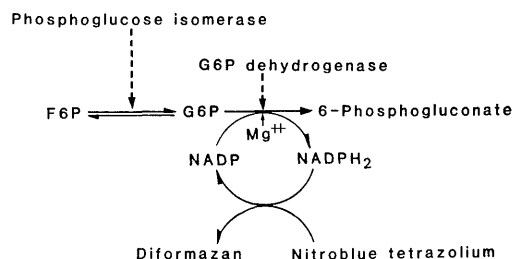


Fig. 1. The principle of the histochemical detection of phosphoglucose isomerase using an indirect tetrazolium method⁷⁾.

Table 1. The substrate mixture for histochemical detection of phosphoglucose isomerase.

Fructose-6-phosphate (2Na)*	10 mg
NADP (5 mg/ml)	0.6 ml
Nitroblue tetrazolium (5 mg/ml)	0.5 ml
Phosphate buffer (0.2 M, pH 7.4)	2.0 ml
Gelatin (3%)	3.0 ml
G6P dehydrogenase (BMY: 1 mg/ml)	20 μl
MgSO ₄ · 7H ₂ O	12 mg

* The control mixture is prepared without F6P.

用した。ゼラチンを加えてあるために、処理時の室温条件下で基質混合液はゲル状を呈している。これは、細胞内の PGIase 活性をできるだけ拡散させないためである。MgSO₄ は賦活剤としての添加である。対照実験はこの基質混合液から F6P を除いた液で行った。呈色反応は室温 (20~25°C) 条件下で 30 分位から現われてくるが、約 3 時間後に観察することによ

て好結果が得られた。

結果と考察

基質混合液に浸漬した切片の髄部柔細胞では、PGIaseの活性は細胞質に認められ、特に核の周囲に強いことが特徴的であった。核そのものには活性は認められなかった。第2図Aは葉柄の横断切片、同Bは縦断切片における髄部柔細胞の写真である。A-1はPGIaseの活性が細胞質に点在していることを示している。A-2はF6Pを除いた対照切片における柔細胞である。これらの細胞のPGIase活性を、葉柄の長軸に平行な側から観察したものが第2図Bである。細胞質に活性があることや、核の周辺に活性が強いことをよく示している。

葉柄の維管束部では、維管束鞘と篩部に特に強い(第2図C-1)。対照切片においては、青色の呈色反応はきわめてわずかであった(C-2)。

表皮系では、孔辺細胞に特に強い活性が観察されたが、一般の表皮細胞にも弱い活性が認められた(第2図D)。

PGIaseの以上のような活性の場と強さは、PGMase活性の検出結果³⁾と光顕的にはほぼ一致している。おそらく、PGIaseはPGMaseなどと共に、glucoseや関連糖質の転流に際して、葉柄の長軸方向に対して水平方向の移行や、気孔の開閉に関係して働いているものと考えられる。

「農水省 GEP 84-II-3-3」

引用文献

1. MEIJER, A. E. F. H. 1967. *Histochemie*, **8**: 248—251.
2. 村上 高 1982. *日作紀* **51**: 248—249.
3. ——— 1983. *日作紀* **52**: 177—182.
4. ———・松崎康範 1977. *日作紀* **46**(別1): 55—56.
5. ——— 1977. *日作紀* **46**(別2): 85—86.
6. ———・吉田俊幸 1979. *日作紀* **48**(別2): 119—120.
7. ORCHARDSON, R. and J. MCGADEY 1970. *Histochemie*, **22**: 136—139.
8. STEIN, M. and J. WILLENBRINK 1976. *Z. Pflanzenphysiol.* **79**: 310—322.
9. 安田健次郎 1980. 武内忠男・小川和朗編, *新酵素組織化学*. 朝倉書店, 東京. 435—438.
10. 吉田俊幸・村上 高 1978. *日作紀* **47**(別2): 83—84.

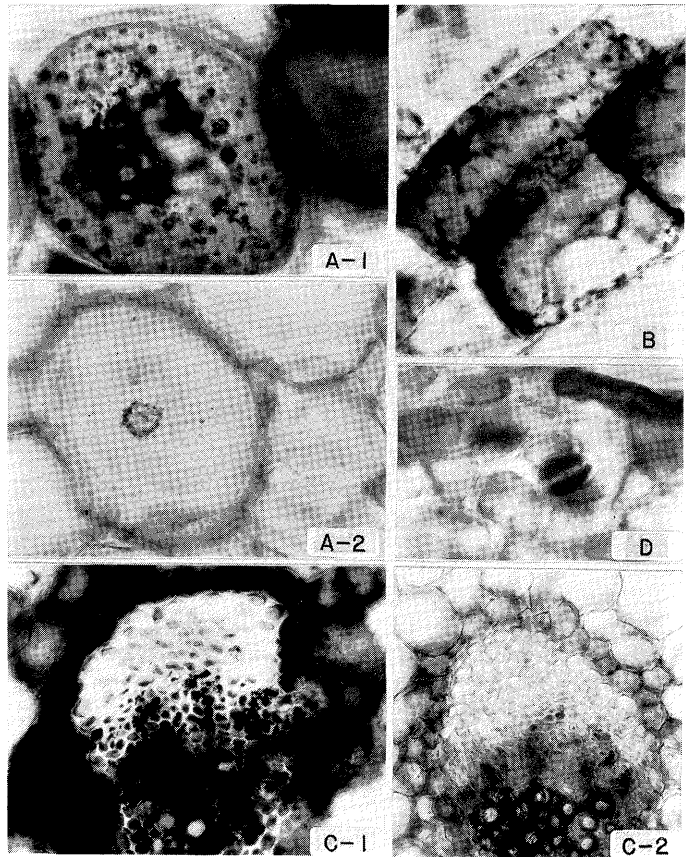


Fig. 2. Enzyme histochemical staining of phosphoglucose isomerase (PGIase) activity in the petiole tissues is shown. Based on the principle as shown in Fig. 1, the activity of PGIase was detected as the formation of diformazan which deposited in the cells in the form of dark blue granules. The composition of substrate mixture is shown in Table 1.

Procedure: Nonfixed hand-sections obtained from the raw-petiole of sugar beet cv. Monofort (HKE-20) were used. After infiltration in distilled water, the sections were put into the test solution covered with toluene, and were then incubated for 3 hours at room temperature (20°C). Prior to observation with a light microscope, the sections were mounted with glycerin after washing with distilled water.

- A: Cross section of basal part of petiole. A-1: The reaction products are detected in cytoplasm of parenchyma cells of pith, particularly around nuclei although nuclei themselves are negative. A-2: In control medium without substrate; F6P ($\times 300$).
- B: Longitudinal sections of same petiole. The reaction products are detected in cytoplasm ($\times 150$).
- C: In vascular bundle, C-1: the reaction products are intensely detected in bundle sheath and phloem ($\times 150$). C-2: In control medium, diformazan appear sparsely ($\times 100$).
- D: The reaction products are intensely detected in guard cells, while there in lateral epidermal cells rather weak ($\times 400$).

The localization of PGIase activity was quite similar to that of phosphoglucosyltransferase reported in the previous paper³⁾.