

## 葉におけるタンパク質の分解とプロテアーゼ

誌名	日本土壌肥料学雑誌 = Journal of the science of soil and manure, Japan
ISSN	00290610
著者	前, 忠彦
巻/号	57巻2号
掲載ページ	p. 205-214
発行年月	1986年4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



---

 総 説
 

---

## 葉におけるタンパク質の分解とプロテアーゼ

 前 忠 彦\*
 

---

キーワード ターンオーバー, タンパク質, 葉, プロテアーゼ, 老化

## 1. はじめに

植物体を構成する窒素の大部分はタンパク質として存在する<sup>1)</sup>。タンパク質は膜を構成したり、酵素として生体内のさまざまな反応に関与し、植物の生長や、生命現象と深く関わり合っている。

タンパク質はいずれも多数のアミノ酸がペプチド結合で連なった高分子化合物であるが、生体内における機能の多様性を反映して、その種類と存在様式はきわめて多種類・多岐にわたっている。植物体内の個々のタンパク質レベルは、その機能に反映されるゆえに、細胞内でタンパク質レベルがどのように調節されているかは重要な問題といえよう。

植物の体内における個々のタンパク質のレベルは、主としてそれぞれのタンパク質の生成と分解により調節されていると考えられている。近年の著しい生化学の分野での研究の発展により、植物においてもタンパク質の生成に関しては多くのことがわかってきている。しかし細胞内におけるタンパク質の分解については、基本的な問題についてすらすらわからない点が多い<sup>2)</sup>。

窒素はタンパク質の主要構成元素である。したがってタンパク質の生成や分解は必須元素のなかでも窒素栄養と最も密接な関係にある。

ここでは、とくに葉のタンパク質の分解とプロテアーゼに関する最近の報告を中心に解説する。

## 2. タンパク分解酵素 (プロテアーゼ)

タンパク分解酵素は他の酵素に比べてさまざまな呼び方がなされ、複雑である<sup>3,4)</sup>。国際化学連合酵素命名委員会の分類に従えば、ペプチド結合に作用する加水分解酵素 [EC 3. 4. peptide hydrolase] であるが、常用名としてプロテアーゼ (protease) またはタンパク分解酵素 (proteolytic enzyme) と呼ばれる。プロティナーゼ (pro-

teinase) というのは、プロテアーゼ、タンパク分解酵素のような広い総称ではなく、タンパク質を基質としてこれを分解する酵素という場合に限って用いられる。

またタンパク分解酵素は、合成基質に対する作用様式に基づきエンドペプチダーゼ (endopeptidase) とエクソペプチダーゼ (exopeptidase) に大別される。さらに触媒残基 (catalytic residue) による分類 (HARTLEY, 1960)<sup>5)</sup> ではセリンプロテアーゼ (serine protease), チオールプロテアーゼ (thiol protease), 酸性プロテアーゼ (acid protease) および金属プロテアーゼ (metallo protease) の4群に分けられている。どの群のプロテアーゼであるかは、各種のプロテアーゼ阻害剤<sup>4)</sup> を用いて決定される。

プロテアーゼの示す基質特異性は、きわめて限られたペプチド結合のみを限定分解する場合から、不特定多数のペプチド結合を非限定的に分解する場合までと、プロテアーゼによって異なり多様である。

プロティナーゼ活性は、ふつう、カゼイン、ヘモグロビン等のタンパク質を基質にプロテアーゼと一定時間、一定温度で反応させたのち、TCA (trichloroacetic acid) を加えて反応を止め、未分解のタンパク質を沈殿させたのち遠心分離により上澄を分離し、遊離してきた低分子のペプチドとアミノ酸の量を求めて測定される。ペプチドやアミノ酸量の定量にはエンヒドリン法が一般的であるが、精製した酵素等を用いる場合は 280 nm の吸光度や、銅-Folin 法が用いられることもある。またアゾカゼインやアゾコールのように、タンパク質に色素を結合させた基質にプロテアーゼを作用させ、遊離してくる色素の量を測定して活性を測る方法もある。

カルボキシピペプチダーゼやアミノペプチダーゼ活性は、CBZ (carboxylbenzoyl)-phenylalanylalanine や leucine *p*-nitroaniline 等の人工基質とプロテアーゼを反応させ、遊離してくる alanine や *p*-nitroaniline の量を求めて測定される。

\* 東北大学農学部植物栄養・肥料学講座 (980 仙台市堤通雨宮町 1-1)

昭和60年7月22日受理

日本土壤肥料学雑誌 第57巻 第2号 p. 205~214 (1986)

### 3. 葉におけるタンパク質の分解と役割

葉でみられるタンパク質の分解は日常的なタンパク質のターンオーバー（タンパク質量は変らないが、生成と分解が同時に行われ、平衡が保たれている）や葉の老化過程での分解、そして生長過程や環境の変化等により体内で不要となったタンパク質の除去等が主要なものである。その他、プレ・プロタンパク質の成熟タンパク質へのプロセッシングも重要な役割の一つである。

### 4. 葉の一生におけるタンパク質の分解とプロテアーゼ活性

一般に、葉のタンパク質は展開過程で増加し、展開終了頃かその直後に最大値となる。その後しばらくは一定値が保たれるが老化が始まると急激に減少していく。

葉の生長・老化に伴うタンパク質の分解の様子については、<sup>15</sup>N<sup>6-8)</sup> を使用した実験より以下のように考えられる。

生長中の葉でのタンパク質の分解は、量的にみた場合ほとんどないが、葉の窒素量が最大値に近くなる頃には分解もはっきりみられるようになり、しばらくは生成量と分解量が釣り合って進行する。この間はみかけ上、タンパク質量は変らない。葉の老化が始まる頃になると生成量も減少し、逆に分解量が増加するようになる。みかけのタンパク質量も急激に減少していく。

以下、葉の一生におけるタンパク量、あるいは窒素量の変動とプロテアーゼ活性の関係について、主要作物につきみてみよう。

#### 1) コムギ

コムギについては数多くの報告がある。DALLING ら<sup>9)</sup> はコムギ 2 品種を用いて登熟期間中における葉の窒素含量と、ヘモグロビンを基質とした pH 4.2 におけるプロテイナーゼ活性の変動の関係を調べた。止葉の場合、プロテイナーゼ活性は、開花直後の窒素含量の最も高いときに低く、老化初期に窒素量が急激に減少する頃に急上昇し、一度落ち着いたのち老化後期にまた上昇していた。すなわちプロテイナーゼ活性は、窒素量の減少に伴い二つのピークを描いて変動していた。止葉の直下の葉やその下の葉の場合も老化後期には最も活性が高くなっていた。しかし、最初のピークの出現については、はっきりしていなかった。似た傾向は Nair ら<sup>10)</sup> によっても認められている。次いで DALLING ら<sup>11)</sup> は同じ時期のコムギ葉について、種々のプロテアーゼ活性について追跡した。カゼイン (pH 7.5)、あるいはヘモグロビン (pH 4.5) を基質にしたプロテイナーゼやアミノペプチダーゼ活性は

先と同様二つのピークを描いて老化過程で変動したが、カルボキシペプチダーゼや, leucyl tyrosine を基質としたジペプチダーゼ活性は単一のピークを示した。alanyl-glycine を基質としたジペプチダーゼ活性は二つのピークを示したものの、ピークの時期はプロテイナーゼのそれらと異なっていた。このように老化過程でのプロテアーゼ活性の変動はプロテアーゼの種類により異なっていた。

一方、WITTENBACH<sup>12)</sup> も、コムギ葉の登熟期間中におけるタンパク量の変動とプロテイナーゼ活性の関係について調べた。彼は、プロテイナーゼの活性測定に際し、動物タンパクであるカゼインやヘモグロビンに代えて、葉のもともとのタンパクであり、葉中に多量（全Nの約30%）に存在する ribulose bisphosphate (RuBP) カルボキシラーゼタンパクを基質として使用して活性 (pH 4.8~5.0) の変動を追跡した。プロテイナーゼ活性は、止葉、第2葉とも老化が進むにつれて徐々に上昇していき、葉の可溶性タンパクや RuBP カルボキシラーゼタンパクの量的変動と、ちょうど逆の関係がみられた。RuBP カルボキシラーゼを基質とした実験は DALLING らのグループによっても行われたが、その場合は、RuBP カルボキシラーゼの分解活性は先の彼らの結果と同様、老化過程で二つのピークを示した。

コムギについては、幼植物を用いた実験も行われている。WITTENBACH<sup>13)</sup> は、暗所において老化を誘導した第1葉を材料に、可溶性タンパクあるいは RuBP カルボキシラーゼタンパクの量的変動とカゼインを基質としたプロテイナーゼ活性の変動の関係を調べた。RuBP カルボキシラーゼタンパクの量的変動は、RuBP カルボキシラーゼの抗体を用いたロケット電気泳動法により定量した。その結果、プロテイナーゼ活性は RuBP カルボキシラーゼタンパクが半量以下となった2日目まで最初と変わらず、その後の2~4日間の間に急激に上昇した。一方、自然条件下 (12 h, light) における葉の老化とタンパク量の減少、プロテアーゼの関係を追跡した DALLING ら<sup>14)</sup> のグループの結果は、RuBP カルボキシラーゼ活性が急激に減少する老化初期においてプロテイナーゼ活性は上昇しており、異なった結果となっている。

以上述べてきたコムギ葉での結果をまとめてみよう。自然条件下で生育したコムギ葉の場合は、pH 4.5~5.0 の酸性側で、カゼイン、ヘモグロビン、RuBP カルボキシラーゼを基質にプロテイナーゼ活性（新鮮重、器官当たり）を測定すると、展開終了時に低くその後の老化過程では活性が上昇する。しかし上昇の際には、二つのピークとなって現われる場合とそうでない場合があり、と

くに最初のピークについては小さいか、はっきりしない場合がある。あとのピークについては、品種、栽培条件、プロテアーゼの測定法等の違いによらず認められるということができよう。暗所で誘導した老化の場合は、自然条件下のものとは異なる面があると思われる。

## 2) オオムギ

HUFFAKER ら<sup>15,16)</sup>は、ファイトトロン内で育てたオオムギ・第1葉のインタクト葉、切断葉を用いてアゾカゼインを基質にプロティナーゼ活性を調べた。プロティナーゼ活性は老化が進むにつれて徐々に上昇し、WITTENBACH がコムギで得た結果と似かよっていた。

## 3) トウモロコシ

HAGEMAN ら<sup>17)</sup>のグループは、圃場で生育するトウモロコシの止葉を材料にその老化過程を追って、カゼインを基質に pH 5.4 と pH 7.5 のプロティナーゼ活性、アミノペプチダーゼ活性、カルボキシピプチダーゼ活性を追ったところ、タンパク量が減少するのとはほぼ並行してアミノペプチダーゼ、カルボキシピプチダーゼの両エクソペプチダーゼ活性が減少し、逆にプロティナーゼ活性が上昇することを見出した。また齢を追って止葉をインタクト植物より切り取り、その後暗所においてプロテアーゼ活性の変動を調べていったところ、いずれの葉も暗所下ではタンパク量は減少していったが、顕著なクロロフィルやタンパク量の減少が始まる前に切断した葉ではプロティナーゼ活性、アミノペプチダーゼ活性は変わらなかったのに対し、老化が始まったあとの葉では、プロティナーゼ活性が上昇することを見出した。この結果より彼らは、暗所下でのタンパク分解は必ずしもプロティナーゼ活性の上昇を必要としないと結論した<sup>18)</sup>。

## 4) ダイズ

WITTENBACH ら<sup>19)</sup>は、RuBP カルボキシラーゼタンパクを基質にそのプロティナーゼ活性を葉の老化過程を追って調べたところ、老化とともにプロティナーゼ活性は徐々に上昇し、可溶性タンパクあるいは RuBP カルボキシラーゼの量的変化とはほぼ逆の関係となっていた。

## 5) 水稻

MAE ら<sup>20,21)</sup>は、登熟期の水稻の第12葉、第13葉についてその一生を追ってカゼイン、または RuBP カルボキシラーゼタンパクを基質に pH 5.4, 6.9, 8.0 の3段階の pH でプロティナーゼ活性の変動を調べた。第12葉では、老化前半の小さなピークと後半の大きなピークが認められた。一方、第13葉の場合は、前半のピークは認められず、後半の大きなピークのみが認められた。しかしどちらの葉の場合も後半のピークとタンパクの急激な分解が進む時期はずれており、プロティナーゼ活性

は体内の可溶性タンパクがほぼなくなった枯死直前にあって上昇していた。また培地窒素濃度と葉の窒素含量、プロテアーゼ活性の関係について調べたところ、窒素濃度の高い区ほど活性は高かった。そして老化後半のプロティナーゼ活性の上昇は老化の先に進んだ窒素濃度の低い区で先に認められた。

プロティナーゼ活性と pH の関係をみると、カゼインを基質にした場合はほぼ一生を通して pH 5.4 で測定した場合が最も高い傾向にあったが、RuBP カルボキシラーゼを基質にした場合は、後半のピーク時には pH 8.0 で最も高くなった。これらの結果より、水稻ではタンパクの減少とプロティナーゼ活性の上昇は必ずしも対応したものではないと結論した。そして老化後期における活性の急激な上昇は、タンパクの老化に伴う急激な分解に対応したものではなくむしろ死の直前の自己分解に関係したものではないかと推察した。

以上5種類の作物の結果をもとに葉の老化過程におけるタンパクの消長とプロテアーゼの関係について考察してみよう。

葉の老化過程全体を通してプロティナーゼの活性変動をみると、三つのタイプに分けられる。1) 葉の老化前半の比較的小さなピークと後半の大きなピークからなる場合(コムギ、水稻)、2) 活性は、葉の展開終了時から老化前半は変わらず、老化後期にのみ活性が上昇しピークがみられる場合(コムギ(暗所)、水稻)、3) 前半から後半にかけて徐々にプロティナーゼ活性が上昇する場合(コムギ、トウモロコシ、ダイズ)。以上のいずれの場合にも共通な点は、老化後半においてプロティナーゼ活性が最も高くなるという点である。水稻の場合は明らかに、このピークの時期は、葉の窒素量が枯死時のそれにかかなり近づいた時期で、すでに葉の多くの窒素は転流し終わっている。また、他の葉についても葉の枯死が始まる頃かその直後のようである。このことから、老化後半におけるプロティナーゼ活性の上昇は、必ずしも葉におけるタンパクの急激な分解に対応したものではなく、枯死に至る過程で最後に残るタンパクを自己分解するためのものと考えたほうがよさそうである。

一方、タンパクの分解が著しい老化前半では、ピークがみられたり、みられなかったり、あるいは上昇がわずかだったり一定の傾向はみられず、統一的に解釈することはできない。

タバコ<sup>22)</sup>、*Perilla*<sup>23)</sup> およびインゲンマメの葉<sup>24)</sup>では若い葉のほうが老化葉よりプロテアーゼ活性が高いと報告されている。

このような結果は、*in vitro* で測定されるプロティナ

ーゼ活性は、老化の前半においては、必ずしも葉の急激なタンパクの減少と対応してみられるとは限らないとみたほうがよさそうである。

以上プロティナーゼについて述べてきたが、次にエクソペプチダーゼについてみてみよう。研究例としてトウモロコシ<sup>17)</sup>、コムギ<sup>11)</sup>の場合でみると、アミノペプチダーゼ活性は、トウモロコシ葉の場合、プロティナーゼの活性が上昇する時期に低下する傾向を示したのに対し、コムギ葉ではほぼプロティナーゼと一致した傾向で変動し、両植物では異なっていた。一方カルボキシピプチダーゼは両植物とも老化過程で活性が低下していく傾向を示し、プロティナーゼの活性変動には対応していなかった。このようにしてみると、エクソペプチダーゼについてもタンパク減少との関係で、植物に共通の統一的な見方をすることはできない。

### 5. 葉のプロテアーゼの性質

植物葉のプロテアーゼはどのような性質を有するのだろうか。その情報は動物、微生物等に比べると驚くほど少ない<sup>25)</sup>。

DALLING ら<sup>26-30)</sup>はコムギの成熟葉を材料に、ゲルろ過、DEAE-セルロースのカラムクロマト等の手法によりプロテアーゼを部分精製し、六つの画分を得た。いずれの画分も RuBP カルボキシラーゼ、ヘモグロビンを分解したが、その至適 pH は酸性側にみられ、ヘモグロビンを基質にした場合はおよそ pH 4.5 付近であった。そのうちの三つの endo 型の酸性プロティナーゼについて、さらにアフィニティークロマトグラフィを用いて精製し、その性質が比較検討された。そのうちの二つについては、分子量が 89,000 と 135,000 と求められ、一つは酸性プロテアーゼの性質を有しており、他はセリンプロテアーゼを特異的に阻害する PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride) により阻害された。

MILLER ら<sup>31)</sup>はオオムギの老化葉より二つの endo 型のプロティナーゼを精製した。そのうちのおもなほう (EP<sub>1</sub>) は、チオールプロテアーゼで、*in vitro* で測定される全活性の 85% を占めた。この酵素は 5800 倍に精製され、分子量 28,300 でアルカリ側できわめて不安定で 10 μM のロイペプチン (チオールプロテアーゼの阻害剤) により完全に阻害された。もう一つのほう (EP<sub>2</sub>) は、50 倍に精製され、その分子量は 67,000 で、DTT (dithiothreitol) で 20% PMSF で 50% 阻害された。両酵素ともアゾカゼイン、RuBP カルボキシラーゼを基質とした場合は至適 pH が 5.6 付近にあった。

RAGSTER ら<sup>32)</sup>は、人工基質のアゾコールを使用してダ

イズ葉に二つの異なるエンドペプチダーゼを見出した。アゾコラーゼ A は分子量 17,500 で、アゾコラーゼ B は 52,000 であった。いずれも pH 9.0 に至適 pH を有し、前者は金属プロテアーゼの阻害剤の EDTA で、後者はチオールプロテアーゼの阻害剤の PCMB で阻害された。

MAE ら (MAE and HAGEMAN: 未発表) は、トウモロコシの老化葉のプロテアーゼについて調べ、種々の性質の違いから少なくとも 5 種のプロティナーゼの存在と、それぞれ 2 種類のカルボキシピプチダーゼとアミノペプチダーゼの存在を示唆した。そしてプロティナーゼのうち、カゼインを基質に至適 pH をアルカリ側に有するものについて 300 倍に部分精製した。その分子量は 20,500 で、PMSF, TLCK (tosyllysine chloromethylketone) により強く阻害された。またカルボキシピプチダーゼは 516 倍に精製され、その分子量は 123,000 で PMSF, TPCK (tosylamide phenylethyl chloromethyl ketone), Hg<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup> により強い阻害を受けた。その性質は、citrus の果実<sup>33)</sup>や French bean の葉<sup>34)</sup>から精製されたものとよく似ていた。

MAE ら<sup>21)</sup>は、水稻の成熟葉、老化初期、老化後期の葉についてプロテアーゼを DEAE-セルロースを用いて分画し、その溶出パターンを比較した。いずれの時期の葉においても六つ以上のピークがみられたが、そのパターンは齢により異なっていた。成熟葉のプロテアーゼ活性は EDTA で、一方老化後期の葉の場合は PMSF で強く阻害された。これらのことより、葉の老化とともにプロテアーゼの種類と量が変動することを示唆した。

葉のプロテアーゼについては断片的にはデータが集積しつつはある。しかし、いずれの葉の場合も葉のプロテアーゼの一部を調べたに過ぎず、全体像をとらえるには、いまだ不十分である。

以上、得られた結果から、一般的なことを整理してみると以下のようなことがいえるよう。

1) 葉には酸性側に強い活性を示すプロテアーゼが複数存在する。チオールプロテアーゼ、酸性プロテアーゼ、セリンプロテアーゼ、金属プロテアーゼと、すべてのタイプのプロテアーゼが認められている。2) 葉の齢によりプロテアーゼの種類と量は変化しているようである。

### 6. プロテアーゼの細胞内分布

近年の植物細胞顆粒の分画法とプロトプラスト調製技術の発達により、細胞内のプロテアーゼの分布を調べることが可能となってきた。MATILE<sup>35)</sup> は、液胞が動物細胞の lysosome と同様な異化作用に関与しているとの説を提唱している。最近になり、さまざまな植物細胞より

液胞が単離精製され、プロテアーゼをはじめとする種々の分解酵素活性が調べられた。NISHIMURA ら<sup>36)</sup>は、Caster bean の発芽後 4 日目の子葉をセルラーゼ、ペクチナーゼで処理してプロトプラストを調製したのち、シュクロースの密度勾配を用いた遠心分画法により液胞を調製した。この液胞には酸性プロティナーゼ活性、カルボキシペプチダーゼ活性が認められた。

BOLLER ら<sup>37)</sup>はチューリップの花弁、タバコ培養細胞、パイナップルの葉からプロトプラストを調製したのち、Ficoll を用いた浮遊法により液胞を単離した。アゾコルを基質にプロテアーゼ活性を測定したところ、パイナップルの葉の液胞では強い活性が認められた。一方チューリップの花弁やタバコ培養細胞では活性が認められなかった。

LIN ら<sup>38)</sup>は、コムギおよびトウモロコシの葉より葉肉細胞を単離し、シリコンオイルを用いた遠心分離法により葉緑体を単離した。また、同じ細胞について、おだやかに細胞膜を壊して、液胞を遊離後 Ficoll の密度勾配による遠心分離法により液胞を単離した。このようにして調製した葉緑体、液胞を用いて、RuBP カルボキシラーゼタンパクを基質に、pH 4.8 におけるプロティナーゼ活性を測定したところ、液胞にはプロトプラストの全活性に匹敵する分解活性が認められた。一方、葉緑体には 13% の活性が認められたが、これは葉緑体調製の際、他画分から混入したものであろうと推定した。

WATERS ら<sup>39)</sup>は発芽後 8~9 日目のコムギ第 1 葉における peptide hydrolase の細胞内分布について、平衡密度勾配遠心法を用いて、細胞顆粒を分離し調べた。アミノペプチダーゼは葉緑体と細胞質画分に等しい割合で存在し、leucyltyrosine ジペプチダーゼは細胞質に大半が、そして葉緑体には 27% が見出された。液胞にはプロトプラストの全活性に相当する、カルボキシペプチダーゼとヘモグロビンを基質としたプロティナーゼ活性が見出された。

HUFFAKER ら<sup>40)</sup>は、オオムギ第 1 葉のプロテアーゼ活性の 95% を占める EP<sub>1</sub> と EP<sub>2</sub> の細胞内における存在部位について調べた。単離した液胞による RuBP カルボキシラーゼタンパクの分解物のポリペプチドについて、精製した EP<sub>1</sub> および EP<sub>2</sub> によるそれらと電気泳動的な比較を行ったところ両者はきわめてよく似ており、またプロテアーゼ阻害剤や活性化剤に対する影響も同じであった。これらの結果より、彼らは EP<sub>1</sub> および EP<sub>2</sub> は液胞に局在していると結論した。

DALLING ら<sup>41)</sup>および THOMAS ら<sup>42)</sup>は、オオムギ第 1 葉の葉肉細胞のプロトプラストから葉緑体を調製し、内在

する RuBP カルボキシラーゼの分解について調べたところ pH 4.5 に至適 pH を有し、チオールプロテアーゼの阻害剤により活性阻害を受けるプロテアーゼの存在を認めた。また 0.1% の SDS (sodium dodecyl sulfate) の添加により活性は 4 倍となった<sup>41)</sup>。この場合の至適 pH は 6.5 でチオールプロテアーゼおよびセリンプロテアーゼの阻害剤により、阻害がみられた。前ら<sup>43)</sup>はコムギ葉緑体を調製し、RuBP カルボキシラーゼを基質にその分解能を検討したところ、pH 4~5 に強い活性を認めた。また 0.1% の SDC (sodium deoxycholate) を添加したところアルカリ側にも分解活性が認められた。

以上の結果より現在明らかと思われる点を整理すると、液胞には酸前側に至適 pH を有するチオールプロティナーゼ、カルボキシペプチダーゼが存在する。また、セリンプロテアーゼの阻害剤に感受性を示すプロティナーゼも存在するようである。一方葉緑体については、酸性側に至適 pH を有するプロテアーゼ活性が認められたものの、それが液胞由来のもの混入によるのか、それとも本来葉緑体内に存在していたのかはまだ決定的な証明はなされていないといえよう。また、アルカリ側に至適 pH を有する酵素についても、精製されたいずれの葉緑体もプロトプラストから調製していることを考えると、プロトプラスト調製液に含まれるアルカリプロテアーゼの混入も否定できず、これも結論を下すには至っていないと考えたほうがよい。

## 7. 細胞内における RuBP カルボキシラーゼの分解

細胞内における個々のタンパク質の分解については RuBP カルボキシラーゼが最もよく調べられており、他については 2, 3 の例を除いてほとんどわかっていない。

RuBP カルボキシラーゼは、RuBP カルボキシラーゼ/オキシゲナーゼあるいは Fraction I タンパク (粗 RuBP カルボキシラーゼ) と呼ばれ、光合成の CO<sub>2</sub> 固定反応を担うとともに光呼吸の基質生成を同時に触媒する重要な酵素で、葉緑体に局在している<sup>44, 45)</sup>。水稲ではこの酵素のタンパク量が光合成の内的制限要因となっていることが明らかにされている<sup>46~48)</sup>。また、この酵素は緑葉全窒素の 20~30%<sup>49)</sup>を単一タンパクとして占め、自然界では例外的に多く存在している。したがってこのタンパクの葉の生長・老化に伴う消長は、光合成のみならず、植物の窒素経済とも深く関わっている。本酵素は、葉の生長過程で活発に生成され、老化過程での生成量はきわめて少ない<sup>2)</sup>。水稲の葉の一生を追って生成、分解を調べた例では、その 90% は窒素量が最大となる展開

終了後 10 日頃までに生成され、その後の老化過程における生成量はわずかであった<sup>8)</sup>。また RuBP カルボキシラーゼ量が一定に保たれているような条件下でのターンオーバーがオオムギで調べられた結果、ターンオーバーは全くないか、あってもほとんど無視しうるような量であったと報告されている<sup>50)</sup>。

RuBP カルボキシラーゼの分解は、窒素条件にもよるが老化初期から中期にかけて著しい場合が多く、その窒素は生長器官へ転流して枯死時には全くみられなくなる。みかけの全転流窒素中に占める RuBP カルボキシラーゼの割合は、水稻の第 12 葉で計算された例では 31~37% であった<sup>8,49)</sup>。

この RuBP カルボキシラーゼの細胞内における分解については、最近とくに注目を集め多くの報告が発表されている。

THOMAS ら<sup>42)</sup>は、オオムギ幼植物を  $^{14}\text{CO}_2$ 、光条件下において生育させ、その葉から  $^{14}\text{C}$ -RuBP カルボキシラーゼを精製した。精製された RuBP カルボキシラーゼは、pH 5.4 において葉の粗抽出液とインキュベートすると分解され、いくつかのフラグメントになったが、精製酵素のみでも自己分解した。次に彼らはプロトプラストを調製後、葉緑体を精製し、極力他の画分の混入を防いで RuBP カルボキシラーゼを単離した。にもかかわらず、精製酵素は自己分解を示した。これらの結果より彼らは、葉緑体には RuBP カルボキシラーゼを分解するエンドペプチダーゼが存在すると推定した。他方、界面活性剤の SDS あるいは SDC の添加により活性が出現(活性化)するプロテイナーゼが葉緑体に存在することが、DALLING ら<sup>41)</sup>、前ら<sup>43)</sup>によりオオムギおよびコムギでそれぞれ示された。この場合は THOMAS らの場合と異なり、葉緑体内の生理的 pH であるアルカリ側での分解を示したものであった。

一方、WITTENBACH ら<sup>51)</sup>はコムギ第 1 葉の暗所下における RuBP カルボキシラーゼの分解について調べ、1) 葉緑体数の減少と並行してその酵素タンパク量が減少していること、2) 電顕観察で葉緑体が液胞と融合したり、取り込まれることがみられること、3) RuBP カルボキシラーゼの分解能を酸性側でみた場合、分解活性のほとんどが液胞に存在すること等の理由から、RuBP カルボキシラーゼは葉緑体で液胞に取り込まれ、そこで分解されると結論し、液胞分解説を提唱した。

これに対し、MARTINOIA ら<sup>52)</sup>、MAE ら<sup>53)</sup>および DALLING ら<sup>54)</sup>は、オオムギあるいはコムギ葉を材料に、RuBP カルボキシラーゼの分解と葉緑体数の減少は相伴っており、RuBP カルボキシラーゼタンパクの減少は

葉緑体数の減少よりはるかに先んじておきていることを示した。そして RuBP カルボキシラーゼは葉緑体内で分解されるか、あるいは特異的に葉緑体外へ排出されて分解される可能性を提唱した。

以上述べてきたように、RuBP カルボキシラーゼの細胞内の分解場については二つの対立した見解が出されているが、WITTENBACH らのデータを詳細に検討すると、老化初期には RuBP カルボキシラーゼの分解が葉緑体数の減少より先におきていることがわかる。このことから、RuBP カルボキシラーゼは、老化初期においては主として葉緑体内であるいは特異的に葉緑体外へ排出されて分解され、老化中期から後期には葉緑体ごと液胞へ取り込まれ、そこで分解される場合もあると考えたほうがよさそうである。

## 8. RuBP カルボキシラーゼのスマールサブユニットのプロセッシングと限定分解プロテアーゼ

生体内におけるタンパク質の限定分解は、前駆タンパクから成熟タンパクへの変換、生理活性ペプチドへの活性化等今後の研究が期待される分野である。ここではその一例を取り上げる。

RuBP カルボキシラーゼは、分子量約 53,000 と 14,000 の大小それぞれ八つのサブユニットから成っているが、そのスマールサブユニットは、細胞質で分子量 20,000 の前駆体として作られ、葉緑体内に取り込まれたのち、14,000 の成熟サブユニットにプロセッシングされる<sup>55)</sup>。この修飾に関与する特異的なプロテイナーゼが ROBINSON ら<sup>56,57)</sup>によりエンドウマメの葉の葉緑体より部分精製され、その性質が調べられた。このプロテアーゼは細胞質で生成される葉緑体構成タンパクの前駆体から成熟体へのプロセッシングの過程のみに特異的に関与し、その至適 pH は 9 付近で、分子量は約 18 万であった。その活性は、EDTA またはオルソフェナンスロリンにより阻害を受けた。

## 9. 硝酸還元酵素とプロテアーゼ

硝酸還元酵素は誘導酵素としてよく知られている。その生体内における活性の調節は、酵素タンパクの生成と分解に基づく量的調節と既存の酵素の活性化-不活性化による質的な調節に大別される。SOMERS ら<sup>58)</sup>は、オオムギ幼植物を材料に、硝酸還元酵素の活性と酵素タンパク量を免疫化学的手法を用いて追跡し、その活性調節は主として生成と分解によることを明らかにした。硝酸還元酵素タンパクの分解については、この酵素を限定分解

するプロテイナーゼがトウモロコシ根より単離精製され、その性質が詳しく調べられている<sup>59-61)</sup>。この酵素は、PMSF により阻害される endo 型のプロテイナーゼで、分子量 99,000 のクロレラ硝酸還元酵素のサブユニットを大小二つのポリペプチドに分解する。細胞内では cytosol に存在している。基質特異性は比較的高く、調べられた多くの酵素には作用せず、阻害を示した数種の酵素についても硝酸還元酵素の場合に比べ、5~15 倍量の酵素量が必要であった。

また、オオムギ葉より硝酸還元酵素を不活性化するプロテアーゼが単離され、その性質が調べられている<sup>62-64)</sup>。このプロテアーゼはトリプシン様のプロテアーゼで PCMB, iodoacetamide, ロイペプチン等により阻害を受け、分子量 74,000 で、硝酸還元酵素タンパクを限定分解するようである。また、基質特異性については亜硝酸還元酵素、キサンチンオキシダーゼ、グルタミン酸脱水素酵素等には影響はなかったが、グルタミン合成酵素活性は阻害した。

## 10. プロテアーゼインヒビター

プロテアーゼインヒビターの多くは、トリプシンまたはキモトリプシンの阻害剤として植物から単離された<sup>25)</sup>。しかし、細胞内でプロテアーゼインヒビターが植物自身のプロテアーゼに対してどのような働きをしているかという点については、発芽過程における 2, 3 の研究を除いてあまりわかっていない<sup>2)</sup>。植物から単離されたプロテアーゼインヒビターが植物由来のプロテアーゼを阻害することはまれである。

## 11. タンパク質分解の生体内における調節機構

生体内での個々のタンパク質の半減期は、それぞれのタンパクに特有で硝酸還元酵素のように数時間という短いものから、分解されないと思われるものまでさまざまである。このような半減期の違いは何によって決まるのであろうか。分解されるタンパク質自身にあるのか、それとも分解するプロテアーゼ側にあるのか、あるいは両方の要因により支配されているのであろうか。タンパク質分解の生体内における調節に関して四つの要因が考えられる。

1) 個々のタンパク質が生合成された時点ですでに有している物理化学的性質（高次構造を含めた）によりプロテアーゼに対する感受性 (susceptibility) が決まっている。いくつかの動物<sup>65)</sup> や微生物<sup>66)</sup> のタンパク質の *in vivo* における半減期が、*in vitro* におけるプロテアーゼ

(トリプシン、キモトリプシン、パバイン) による分解速度と相関があることが調べられている。また、分子量の大きい peptide ほど短いものより分解されやすく<sup>67-69)</sup>、等電点の低いものほど分解されやすい傾向にあること<sup>70)</sup>も知られている。

2) 生合成された時点ではプロテアーゼによる攻撃に対し、抵抗性を有しているが、その後の生体内における環境の変化（イオン強度、pH 等）や分子修飾（リン酸化、酸化等）、特定物質（カチオン、低分子化合物、高分子化合物、酵素の場合は基質や阻害物質、補酵素）との結合、解離などによりタンパク質のプロテアーゼに対する感受性が変わり、分解されやすくなる。この際の変化のしやすさ、しにくさが、タンパク質によって異なり、それが半減期に関係する。

動物の肝臓のいくつかの酵素の *in vivo* における半減期は、これら酵素を酸性条件下において不活性化したときの変性のしやすさと一致していたという結果<sup>65)</sup> はこの考え方を支持している。

3) それぞれのタンパク質（あるいはタンパク質群）には、それぞれに特異的なプロテアーゼが存在し、その働きが半減期を左右している。トウモロコシの根では硝酸還元酵素を特異的に分解するプロテアーゼが単離されている。

4) タンパク質、あるいはプロテアーゼのどちらかの細胞内での存在場所が変化し、分解されるようになる。

MATILE により提唱された、液胞が lysosome と似た働きをしているとの説は、1), 2), 4) の考え方に合っているように思える。しかし、これらの場合液胞膜が取り込むべきタンパク質（あるいは顆粒）を識別する必要があり、そのような機能が液胞膜にあるかどうかはまだ明らかにされていない。一方 3) の考え方に従えば、すべてのタンパク質（タンパク質群）に対応したプロテアーゼが必要となり、この系だけがタンパク質レベルの調節系として機能しているとは考えにくい。

生体内ではおそらく、これら四つの要因が関係していると考えられるが、個々のタンパク質が実際にどのような機構で分解されていくかを明確に示した例はまだない。

## 12. おわりに

ターンオーバーにだけ関係したり、老化過程にのみ特異的なプロテアーゼ等は実際に存在するのだろうか。プロテアーゼは多くのタンパク質のなかからどうやって特異的にあるタンパクを識別し分解するのか。葉緑体やミトコンドリアの顆粒内のタンパクはどのような機構により分解されるのであろう。細胞には何種類のプロテアー



ゼが存在し、それらはそれぞれ細胞内のどこに分布していてどんな役割を有しているのだろうか。これらはいずれも単純な基本的な点に関する疑問である。残念ながら現時点ではいずれの間に対しても満足に答えられる情報は得られていない。個々のタンパク質の体内での分解について一つ一つ明確にしていく地道な研究が望まれている。

## 文 献

- 1) BEEVERS, L.: Nitrogen Metabolism in Plants, p.175, Edward Arnold Ltd., London (1976)
- 2) HUFFAKER, R. C.: Protein Metabolism ; in Plant Physiology VIII, ed F. C. STEWARD, p.267~333, Academic Press, Inc., London (1983)
- 3) 村地 孝: プロテアーゼの活性と生理的意義, 蛋白分解酵素と生体制御, 村地 孝ら編, p.1~15, 学会出版センター (1977)
- 4) 青柳高明: 酵素阻害物質, p.11~45, 共立出版 (1978)
- 5) HARTLEY, B. S.: Proteolytic Enzymes. *Ann. Rev. Biochem.*, 29, 45~72 (1960)
- 6) YONEYAMA, T.: Nitrogen Nutrition and Growth of the Rice Plant. I. Nitrogen Circulation and Protein Turnover in Rice Seedlings. *Soil Sci. Plant Nutr.*, 23, 237~245 (1977)
- 7) YONEYAMA, T. and SANO, C.: Nitrogen Nutrition and Growth of the Rice Plant. II. Considerations Concerning the Dynamics of Nitrogen in Rice Seedlings. *ibid.*, 24, 191~198 (1978)
- 8) MAE, T., MAKINO, A. and OHIRA, K.: Changes in the Amounts of Ribulose Bisphosphate Carboxylase Synthesized and Degraded during the Life Span of Rice Leaf (*Oryza sativa* L.). *Plant Cell Physiol.*, 24, 1079~1086 (1983)
- 9) DALLING, M. J., BOLAND, G. and WILSON, J. H.: Relation between Acid Proteinase Activity and Redistribution of Nitrogen during Grain Development in Wheat. *Aust. J. Plant Physiol.*, 3, 721~730 (1976)
- 10) NAIK, T. V. R., GROVER, H. L. and ABOL, Y. P.: Nitrogen Metabolism of the Upper Three Leaf Blades of Wheat at Different Soil Nitrogen Levels. II. Protease Activity and Mobilization of Reduced Nitrogen to the Developing Grains. *Plant Physiol.*, 42, 293~300 (1978)
- 11) WATERS, S. P., PEOPLES, M. B., SIMPSON, R. J. and DALLING, M. J.: Nitrogen Redistribution during Grain Growth in Wheat (*Triticum aestivum* L.). I. Peptide Hydrolase Activity and Protein Breakdown in the Flag Leaf, Glumes and Stem. *Planta*, 148, 422~428 (1980)
- 12) WITTENFACH, V. A.: Ribulose Bisphosphate Carboxylase and Proteolytic Activity in Wheat Leaves from Anthesis through Senescence. *Plant Physiol.*, 64, 884~887 (1979)
- 13) WITTENFACH, V. A.: Breakdown of Ribulose Bisphosphate Carboxylase and Change in Proteolytic Activity during Dark-Induced Senescence of Wheat Seedlings. *ibid.*, 62, 604~608 (1978)
- 14) PEOPLES, M. B. and DALLING, M. J.: Degradation of Ribulose-1,5-Bisphosphate Carboxylase by Proteolytic Enzymes from Crude Extracts of Wheat Leaves. *Planta*, 138, 153~160 (1978)
- 15) PETERSON, L. W. and HUFFAKER, R. C.: Loss of Ribulose 1,5-Diphosphate Carboxylase and Increase in Proteolytic Activity during Senescence of Detached Primary Barley Leaves. *Plant Physiol.*, 55, 1009~1015 (1975)
- 16) FRIEDRICH, J. W. and HUFFAKER, R. H.: Photosynthesis, Leaf Resistances, and Ribulose-1,5-Bisphosphate Carboxylase Degradation in Senescing Barley leaves. *ibid.*, 65, 1103~1107 (1980)
- 17) FELLER, U. K., SOONG, T. T. and HAGEMAN, R. H.: Leaf Proteolytic Activities and Senescence during Grain Development of Field-Grown Corn (*Zea mays* L.). *ibid.*, 59, 290~294 (1977)
- 18) SOONG, T. T., FELLER, U. K. and HAGEMAN, R. H.: Changes in Activities of Proteolytic Enzymes during Senescence of Detached Corn (*Zea mays* L.) Leaves as Function of Physiological Age. *ibid.* (Suppl.), 59, 112 (1977)
- 19) WITTENFACH, V. A., ACKERSON, R. C., GIAQUINTA, R. T. and HEBERT, R. R.: Changes in Photosynthesis, Ribulose Bisphosphate Carboxylase, Proteolytic Activity, and Ultrastructure of Soybean Leaves during Senescence. *Crop Sci.*, 20, 225~231 (1980)
- 20) MAE, T. and OHIRA, K.: The Relationship between Proteolytic Activity and Loss of Soluble Protein in Rice Leaves from Anthesis through Senescence. *Soil Sci. Plant Nutr.*, 30, 427~434 (1984)
- 21) MAE, T., HOSHINO, T. and OHIRA, K.: Proteinase Activities and Loss of Nitrogen in the Senescing Leaves of Field-Grown Rice (*Oryza sativa* L.). *ibid.*, 31, 589~600 (1985)
- 22) ANDERSON, J. W. and ROWAN, K. S.: Activity of Peptidase in Tobacco-Leaf Tissue in Relation to Senescence. *Biochem. J.*, 97, 741~746 (1965)
- 23) KANNANGARA, C. G. and WOOLHOUSE, H. W.: Changes in the Enzyme Activity of Soluble Protein Fraction in the Course of Foliar Senescence in *Perilla frutescens* (L.) Britt. *New Phytol.*, 67, 533~542 (1968)
- 24) BEEVERS, L.: Nitrogen Metabolism in Plants, p.280~283, Edward Arnold Ltd., London (1976)
- 25) RYAN, C. A.: Proteolytic Enzymes and Their Inhibitors in Plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 24, 173~196 (1973)
- 26) FYTH, G. J. T., BRUCE, D. G. and DALLING, M. J.: Distribution of Acid Proteinase Activity in Wheat Seedlings. *Plant Cell Physiol.*, 16, 1085~1091 (1975)
- 27) FRITH, G. J. T., GORDON, H. J. and DALLING, M. J.: Proteolytic Enzymes in Green Wheat Leaves. I. Isolation on DEAE-Cellulose of Several Proteinases with Acid pH Optima. *ibid.*, 19, 491~500 (1978)
- 28) FRITH, G. J. T., SWINDEN, L. B. and DALLING, M. J.: Proteolytic Enzymes in Green Wheat Leaves. II. Purification by Affinity Chromatography, and Some Properties of Proteinases with Acid pH Optima. *ibid.*, 19, 1029~1041 (1978)
- 29) FRITH, G. J. T., PEOPLES, M. B. and DALLING, M. J.: Proteolytic Enzymes in Green Wheat Leaves. III. Inactivation of Acid Proteinase II by Diazoacetyl-DL-

- Norleucine Methyl Ester and 1,2-Epoxy-3-(*p*-Nitrophenoxy)-Propane. *ibid.*, 19, 819~824 (1978)
- 30) PEOPLES, M. B., FRITH, G. J. T. and DALLING, M. J.: Proteolytic Enzymes in Green Wheat Leaves. IV. Degradation of Ribulose 1,5-Bisphosphate Carboxylase by Acid Proteinases Isolated on DEAE-Cellulose. *ibid.*, 20, 253~258 (1979)
- 31) MILLER, B. L. and HUFFAKER, R. C.: Partial Purification and Characterization of Endoproteinases from Senescing Barley Leaves. *Plant Physiol.*, 68, 930~936 (1981)
- 32) RAGSTER, L. V. and CHRISPES, M. J.: Azocoll-Digesting Proteinases in Soybean Leaves. Characteristics and Changes during Leaf Maturation and Senescence. *ibid.*, 64, 857~862 (1979)
- 33) ZUBER, V. H.: Reinigung und Eigenschaften der Carboxypeptidase aus Citrusfrüchten. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 349, 1337~1352 (1968)
- 34) CAREY, W. F. and WELLS, J. R. E.: Phaseolain A Plant Carboxypeptidase of Unique Specificity. *J. Biol. Chem.*, 247, 5573~5579 (1972)
- 35) MATILE, P. H.: Vacuoles ; in Plant Biochemistry, ed. J. BONNER and J. E. VARNER, p.189~224, Academic Press, New York (1976)
- 36) NISHIMURA, M. and BEEVERS, H.: Hydrolases in Vacuoles from Caster Bean Endosperm. *Plant Physiol.*, 62, 44~48 (1978)
- 37) BOLLER, T. and KENDE, H.: Hydrolytic Enzymes in the Central Vacuole of Plant Cells. *ibid.*, 63, 1123~1132 (1979)
- 38) LIN, W. and WITTENEACH, V. A.: Subcellular Localization of Proteases in Wheat and Corn Mesophyll Protoplasts. *ibid.*, 67, 969~972 (1981)
- 39) WATERS, S. P., NOBLE, E. R. and DALLING, M. J.: Intracellular Localization of Peptide Hydrolases in Wheat (*Triticum aestivum* L.) Leaves. *ibid.*, 69, 575~579 (1982)
- 40) THAYER, S. S. and HUFFAKER, R. C.: Vacuolar Localization of Endoproteinases EP<sub>1</sub> and EP<sub>2</sub> in Barley Mesophyll Cells. *ibid.*, 75, 70~73 (1984)
- 41) DALLING, M. J., TANG, A. B. and HUFFAKER, R. C.: Evidence for the Existence of Peptide Hydrolase Activity Associated with Chloroplasts Isolated from Barley Mesophyll Protoplasts. *Z. Pflanzenphysiol.*, 111, 311~318 (1983)
- 42) THOMAS, H. and HUFFAKER, R. C.: Hydrolysis of Radioactively-Labelled Ribulose-1,5-Bisphosphate Carboxylase by an Endopeptidase from the Primary Leaf of Barley Seedlings. *Plant Sci. Lett.*, 20, 251~262 (1981)
- 43) 前 忠彦・甲斐典男・牧野 周・大平幸次：小麦葉における Ribulose Bisphosphate Carboxylase の分解，土肥要旨集，30, 85 (1984)
- 44) KAWASHIMA, N. and WILDMAN, S. G.: Fraction I Protein. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 21, 325~358 (1970)
- 45) LORIMER, G. H.: The Carboxylation and Oxygenation of Ribulose 1,5-Bisphosphate. The Primary Events in Photosynthesis and Photorespiration. *ibid.*, 32, 349~383 (1981)
- 46) MAKINO, A., MAE, T. and OHIRA, K.: Photosynthesis and Ribulose 1,5-Bisphosphate Carboxylase in Rice Leaves. Changes in Photosynthesis and Enzymes Involved in Carbon Assimilation from Leaf Development through Senescence. *Plant Physiol.*, 73, 1002~1007 (1983)
- 47) MAKINO, A., MAE, T. and OHIRA, K.: Changes in Photosynthetic Capacity in Rice Leaves from Emergence through Senescence. Analysis from Ribulose-1,5-Bisphosphate Carboxylase and Leaf Conductance. *Plant Cell Physiol.*, 25, 511~521 (1984)
- 48) MAKINO, A., MAE, T. and OHIRA, K.: Photosynthesis and Ribulose-1,5-Bisphosphate Carboxylase in Rice Leaves from Emergence through Senescence. Quantitative Analysis by Carboxylation/Oxygenation and Regeneration of Ribulose 1,5-Bisphosphate. *Planta*, 166, 414~420 (1985)
- 49) MAKINO, A., MAE, T. and OHIRA, K.: Relation between Nitrogen and Ribulose-1,5-Bisphosphate Carboxylase in Rice Leaves from Emergence through Senescence. *Plant Cell Physiol.*, 25, 429~437 (1984)
- 50) PETERSON, L. W., KLEINKOPF, G. E. and HUFFAKER, R. C.: Evidence for Lack of Turnover of Ribulose 1,5-Diphosphate Carboxylase in Barley Leaves. *Plant Physiol.*, 51, 1042~1045 (1973)
- 51) WITTENEACH, V. A., LIN, W. and HEBERT, R. R.: Vacuolar Localization of Proteases and Degradation of Chloroplasts in Mesophyll Protoplasts from Senescing Primary Wheat Leaves. *ibid.*, 69, 98~102 (1982)
- 52) MARTINOIA, E., HECK, U., DALLING, M. J. and MATILE, Ph.: Changes in Chloroplast Number and Chloroplast Constituents in Senescing Barley Leaves. *Biochem. Physiol. Pflanz.*, 178, 147~155 (1983)
- 53) MAE, T., KAI, N., MAKINO, A. and OHIRA, K.: Relation between Ribulose Bisphosphate Carboxylase Content and Chloroplast Number in the Naturally Senescing Primary Leaves of Wheat. *Plant Cell Physiol.*, 25, 333~336 (1984)
- 54) WARDLEY, T. M., BHALLA, P. L. and DALLING, M. J.: Changes in the Number and Composition of Chloroplasts during Senescence of Mesophyll Cells of Attached and Detached Primary Leaves of Wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Physiol.*, 75, 421~424 (1984)
- 55) MIZIORKO, H. M. and LORIMER, G. H.: Ribulose-1,5-Bisphosphate Carboxylase/Oxygenase. *Ann. Rev. Biochem.*, 52, 507~535 (1983)
- 56) ROBINSON, C. and ELLIS, R. J.: Transport of Proteins into Chloroplasts. Partial Purification of a Chloroplast Protease Involved in the Processing of Imported Precursor Polypeptides. *Eur. J. Biochem.*, 142, 337~342 (1984)
- 57) ROBINSON, C. and ELLIS, R. J.: Transport of Proteins into Chloroplasts. The Precursor of Small Subunit of Ribulose Bisphosphate Carboxylase Is Processed to the Mature Size in Two Steps. *ibid.*, 142, 343~346 (1984)
- 58) SOMERS, D. A., KUC, T.-M., KLEINHOF, A., WARNER, R. L. and OAKS, A.: Synthesis and Degradation of Barley Nitrate Reductase. *Plant Physiol.*, 72, 949~952 (1983)

- 59) WALLANCE, W.: A Nitrate Reductase Inactivating Enzyme from the Maize Root. *ibid.*, 52, 197~201 (1973)
- 60) YAMAYA, T., SOLOMONSON, L.P. and OAKS, A.: Action of Corn and Rice-Inactivating Proteins on a Purified Nitrate Reductase from *Chlorella vulgaris*. *ibid.*, 65, 146~150 (1980)
- 61) SOLOMONSON, L.P., HOWARD, W.D., YAMAYA, T. and OAKS, A.: Mode of Action of Natural Inactivating Proteins from Corn and Rice on a Purified Assimilatory Nitrate Reductase. *Arch. Biochem. Biophys.*, 233, 469~474 (1984)
- 62) HAMANO, T., OJI, Y., MITSUHASHI, Y., MATSUKI, Y. and OKAMOTO, S.: A Nitrate Reductase-Inactivating Factor from Barley (*Hordeum distichum* L.) Leaves. *Plant Cell Physiol.*, 24, 1337~1341 (1983)
- 63) HAMANO, T., OJI, Y., OKAMOTO, S., MITSUHASHI, Y. and MATSUKI, Y.: Purification and Characterization of Thiol Proteinase as a Nitrate Reductase-Inactivating Factor from Leaves of *Hordeum distichum* L. *ibid.*, 25, 419~427 (1984)
- 64) HAMANO, T., OJI, Y., MITSUHASHI, Y., MATSUKI, Y. and OKAMOTO, S.: Action of Thiol Proteinase on Nitrate Reductase in Leaves of *Hordeum distichum* L. *ibid.*, 25, 1469~1475 (1984)
- 65) BOND, J.S.: Relationship between Inactivation of an Enzyme by Acid or Lysosomal Extracts and Its *in vivo* Degradation Rates. *Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.*, 34, 651 (1975)
- 66) GOLDBERG, A.L.: Correlation between Rates of Degradation of Bacterial Proteins *in vivo* and Their Sensitivity to Proteases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 69, 2640~2644 (1972)
- 67) DICE, J.F., DEHLINGER, P.J. and SCHIMKE, R.T.: Studies on the Correlation between Size and Relative Degradation Rate of Soluble Proteins. *J. Biol. Chem.*, 248, 4220~4228 (1973)
- 68) DICE, J.F. and GOLDBERG, A.L.: A Statistical Analysis of the Relationship between Degradative Rates and Molecular Weights of Proteins. *Arch. Biochem. Biophys.*, 170, 213~219 (1975)
- 69) GOLDBERG, A.L. and St. JOHN, A.C.: Intracellular Protein Degradation in Mammalian and Bacterial Cells. Part II. *Ann. Rev. Biochem.*, 45, 747~803 (1976)
- 70) DICE, J.F. and GOLDBERG, A.L.: Relationship between *in vivo* Degradative Rates and Isoelectric Points. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 72, 3893~3897 (1975)