

緑葉におけるセネッセンスに伴う遺伝子発現の変化に関する研究

誌名	生研時報 : seiken zihou : report of the Kihara Institute for Biological Research
ISSN	00808539
著者名	川上,直人
発行元	木原生物學研究所
巻/号	36号
巻号補足	
掲載ページ	p. 1-90
発行年月	1991年3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



第1章 緒 論

高等植物における緑葉のセネッセンスの生理学的意義

高等植物におけるセネッセンスとは、その役割を果たした緑葉や花などの器官、もしくは植物体全体（個体）が死に至る過程を言う。一年生草本においては、開花、結実により有性生殖が済むと緑葉を含むすべての栄養組織が枯死してしまうが、緑葉のセネッセンスは必ずしも植物個体の死と同時に起こるものではなく、植物の生活環の様々な局面で観察される。たとえば、落葉樹の緑葉は秋になると次第に緑色を失い、紅葉して枯れ落ちてゆく。また、個体としては盛んに光合成を行ない、成長を続けている植物体においても、下位の緑葉から順にその光合成能が減退して黄色化し、枯れ落ちてゆく。

一見非建設的な過程のようにも見える緑葉のセネッセンスには、以下に述べるような生理学的な意義があると考えられている。

- 1) 落葉樹や一年生草本などは、季節の変化によって光、水、温度などの環境条件が自分自身の生育に不適当になると、セネッセンスによって葉を落とし、休眠芽や種子などの形でその期間を過ごす。この現象は不利な環境に適応し、植物個体もしくは種を保存してゆく手段として重要であると考えられる（Leopold 1961）。
- 2) 植物個体の成長に伴い、上位に新たな葉が形成されて光合成に十分な光を得られなくなってしまった下位の葉や、加齢（aging）によってその生理的機能が減退した葉は、光合成器官としての機能が低下し、エネルギーを供給するのではなく、逆にエネルギーを消費する器官になってしまう。もし、本来の機能を失ってしまった緑葉がセネッセンスによって枯れ落ちることがないとしたら、その植物個体にとって大きな負担となるであろう。
- 3) 緑葉がセネッセンスを起こす際、その細胞中のタンパク質、核酸、クロロフィルなどは分解される。その分解産物に含まれる窒素、リン、カリウム、マグネシウムなど、植物にとって重要な栄養素は植物体に回収され、種子や塊茎などの貯蔵器官、もしくは成長を続ける部位などに転流されることが明らかにされている（Thomas & Stoddart 1980）。炭素は大気中に二酸化炭素の形で豊富に存在し、光合成によって固定して利用することができるが、その他の栄養素はその植物体が生育している限られた土壤中から摂り入れなければならず、決して無駄にはできない。したがって、個体から脱落してゆく運命にある緑葉から栄養素を回収し、新たな生長に再利用することは、緑葉のセネッセンスが持つ非常に重要な役割であると考えられる。

緑葉のセネッセンスの進行に関与する要因

1) 光

緑葉を植物体に付けたまま、もしくは切り取って暗所に置くとセネッセンスが誘導、促進されることが知られており、古くから緑葉のセネッセンスを誘導する実験系として用いられ、様々な細胞学的、生理学的、生化学的な研究がなされている。植物の生長に伴って上位に形成された緑葉は、その下位の葉が利用できる光の量を減少させ、またその質を変化させることにより下位の葉のセネッセンスを誘導していると考えられる（Stoddart & Thomas 1982）。このように、光にはセネッセ

ンスの進行を抑制する働きがある。光によるセネッセンスの抑制効果については光合成およびフィトクロームの作用の両面から説明されている。

光照射下においてドクムギ (*Lolium temulentum* L.) の植物体を炭酸固定の基質である二酸化炭素を除いた空气中に置くと、暗所に置いた場合と同じようにその下位の葉からクロロフィルおよびタンパク質が失われてゆき、セネッセンスが進行することが観察された (Lloyd 1980)。また、マカラスムギ (*Avena sativa* L.) の葉切片にショ糖を与えて暗所に置くと、明所に置いた緑葉と同じ程度にセネッセンスの進行が抑制されることが観察された (Udvardy et al. 1967)。これらの観察から、光は光合成による糖の生産を維持することによってセネッセンスの進行を抑制していることが示唆された。

光合成の電子伝達阻害剤である DCMU は、光化学系 II から光化学系 I への電子伝達を阻害するが、光化学系 I におけるサイクリックな電子伝達は阻害しない。マカラスムギの葉切片を DCMU 存在下で明所に置くと、糖の蓄積は完全に阻害されるが、葉切片は緑色を保ち、セネッセンスの進行が阻害されていることが観察された (Thimann et al. 1977)。この結果から Thimann らは、光によるセネッセンスの進行の抑制は、炭酸固定による糖の生産が維持されたためではなく、むしろ光リン酸化による ATP の生産が維持されたためであると主張した。

タバコ (*Nicotiana tabacum* L.) やオオムギ (*Hordeum vulgare* L.) の葉切片の暗所におけるセネッセンスの進行は、短時間の赤色光照射で抑制され、さらにこの抑制効果は遠赤光によって打ち消されることから、セネッセンスの進行にフィトクロームが関与していることが示唆された (Sugiura 1963, Biswal & Sharma 1976)。高等植物において、光合成に関与するタンパク質をコードする遺伝子を初めとした多くの遺伝子の発現が、フィトクロームを経由した、もしくは他の光受容体を経由した光の作用によって調節されていることが明らかにされつつある (Tobin & Silverthorne 1985)。したがって、光はある特定の遺伝子の発現を抑制または誘導することによってセネッセンスの進行に関与していると考えられる。

2) 栄養素

植物の生長の過程で、植物体にとって重要な栄養素はセネッセンスを起こした葉から若い組織へと転流される。新たに組織を構築するには、他の組織、器官から様々な栄養素の供給を受けねばならない。発達段階にある若い組織は、古い葉から栄養素を奪うことによってそのセネッセンスを誘発しているとも考えることもできる。実際、注目する葉よりも上部に形成された生長点を取り除いたり、マメ科植物の発達中の種子を取り除いたりすると、その下位の葉のセネッセンスの進行が遅れることが観察されている (Thomas & Stoddart 1980)。これは、生長点や種子などを取り除くことによって、その植物体における窒素その他の栄養素の需要が減少したためであると考えられる (Thomas & Stoddart 1980)。

3) 植物ホルモンおよびポリアミン

葉切片を用いた実験から、サイトカイニン は緑葉のセネッセンスの進行を抑制する強い作用があることが多くの植物について知られている (Stoddart & Thomas 1982)。また、数種の植物においてジベレリンにも緑葉のセネッセンスの進行を抑制する働きがあることが知られている。逆に緑葉のセネッセンスを誘導、促進する作用を持つ植物ホルモンとしてアブシジン酸とエチレンが知られている。

実際、セネッセンスの進行に伴い緑葉中のサイトカイニン含量が減少し、アブシジン酸は増加することが観察されている (Elkinawy 1984)。また、タバコの葉切片を用いた実験では、クロロフィルが急激に減少する時期にエチレン生成が増加し、その後減少することが観察されている (Aharoni

et al. 1979, Aharoni & Lieberman 1979)。

エチレンの前駆体であるS-アデノシルメチオニンはポリアミンの前駆体でもある。ポリアミンには、緑葉のセネッセンスを抑制する効果があることが多くの植物で知られており (Kaur-Sawhney & Galston 1979, Cohen et al. 1979, Kaur-Sawhney et al. 1982, Altman 1982), エチレン生合成との競合関係を考えると大変興味深い。

これらの観察から、各種植物ホルモンやポリアミンのバランスが緑葉のセネッセンスの進行の調節に関与していると考えられる。また、各種の植物ホルモンが様々な遺伝子の発現を調節していることが示唆されており、植物ホルモンのバランスがセネッセンスの際に発現する遺伝子の調節に役かっている可能性が考えられる。

細胞核遺伝子によるセネッセンスの調節

植物は様々なに変化する環境に適応し、個体もしくは種を保存してゆく機構をその長い進化の過程で獲得してきた。細胞が死に至る老化の過程は、分化の最終段階として遺伝的にプログラムされているという考え方が以前から提出されている (Woolhouse 1967)。細胞は様々な遺伝子の on, off によって分化し、ある段階に達すると老化を司る遺伝子にスイッチが入り死に向かうと考えられる。高等植物は環境条件の変化によって緑葉などの古い栄養組織から栄養素を回収し若い組織や貯蔵器官などに転流させるとともに、古い組織を個体から脱落させるといったセネッセンスに関与する遺伝子を進化の過程で持つようになったと考えられる。

間接的ではあるが、次のような証拠からセネッセンスを直接支配しているのは細胞核遺伝子であることが示唆されている。

- 1) カナダモ (*Elodea densa* Casp.) の若い葉を 0.2 M CaCl_2 水溶液で処理することにより原形質分離を起こさせると、一つの細胞内で細胞核を含む部分と含まない部分との、細胞膜によって囲まれた二つに分けることができる。この原形質分離を起こさせた葉を培養したところ、細胞核を持った部分に存在する葉緑体は 8 日間の培養期間中にセネッセンスを起こして黄色化し、完全に崩壊してしまうが、細胞核を持たない部分に存在する葉緑体は 8 日目においても緑色を保ち、デンプンを蓄えていることが観察された (Yoshida 1961)。
- 2) Thomas & Stoddart (1975) は、牧草の一種である *Festuca pratensis* Huds. の冬期にも黄色化しない突然変異株を用いて、緑葉のセネッセンスにおいて最も顕著な症徴であるクロロフィルの分解に関与する酵素が細胞核遺伝子にコードされていることを遺伝学的に証明した。野生型の *Festuca pratensis* Huds. における緑葉のセネッセンスの過程では、クロロフィル量、タンパク量、RNA 含量、葉緑体 rRNA 含量の減少、RuBPCase 活性、glutamate pyruvate transaminase 活性の低下、および peroxidase 活性の上昇が観察される。冬期にも黄色化しない突然変異株では、このうちクロロフィル含量の減少のみが起らないことから、クロロフィル代謝に関与する酵素をコードする遺伝子に変異が起こったと考えられた。さらに、この突然変異の遺伝様式は厳密にメンデルの法則に従うことから、セネッセンスの際のクロロフィルの分解に関与する遺伝子は細胞核 DNA 上に存在することが示された。
- 3) 細胞質の 80 S リボソームにおけるタンパク合成阻害剤であるシクロヘキシミドは、多くの高等植物緑葉のセネッセンスを強く阻害する (Martin & Thimann 1972, von Abrams 1974, Peterson & Huffaker 1975, Thomas 1975, Thomas 1976)。ところが、葉緑体やミトコンドリアの 70 S リボソームにおけるタンパク合成阻害剤であるクロラムフェニコールは緑葉のセネッセンスの進

行をほとんど阻害しない。Cuello ら (1984) は、このようなタンパク合成阻害剤を用いた実験から、オオムギ葉切片の暗所におけるクロロフィルの減少を指標としたセネッセンスの進行には細胞核の遺伝情報が必要であることを示した。しかしながら、葉緑体におけるタンパク合成が量的、質的に変動していること、およびクロラムフェニコールによってセネッセンスの進行がわずかながら抑制されることから、葉緑体の遺伝子産物もセネッセンスの進行になんらかの役割を果たしていることを示唆した。

緑葉のセネッセンスに関与する遺伝子の発現調節

放射性同位元素で標識したアミノ酸を用いて緑葉の発達段階におけるタンパク合成の変動を調べたところ、葉緑体の形成期、光合成が最も盛んに行なわれる時期、およびセネッセンスの開始時期にタンパク合成が盛んに行なわれていることが観察された (Stoddart & Thomas 1982)。

セネッセンスの過程で、緑葉組織の protease, RNase などの加水分解酵素の活性が上昇し、それに伴ってタンパク質、核酸、クロロフィルなどが減少することが知られている (Spencer & Titus 1972)。さらに、ムラサキオモト (*Rhoeo discolor* Hance) の葉切片を D_2O で標識した実験から、セネッセンスの過程で RNase タンパク質が *de novo* に合成されることが示された (Sacher & Davies 1974)。また、シクロヘキシミドがセネッセンスに伴うタンパク質、核酸、クロロフィルの減少を抑え、かつ protease, RNase, peroxidase などの活性の上昇を抑制することが多くの実験から知られている。これらの観察から、各種の加水分解酵素を含む、緑葉のセネッセンスに関与するタンパク質はセネッセンスの際に *de novo* に合成されることが明らかになった。

RNA 合成の阻害剤である actinomycin-D は、クロロフィルおよびタンパク含量を指標としたセネッセンスの進行を阻害しないことから、緑葉のセネッセンスに関与する遺伝子の転写はセネッセンスの開始以前にすでに完了しており、転写以降の段階で発現が調節されているという考えが提唱されている (Thomas & Stoddart 1977, von Abrams 1974, Thomas 1975)。

RNA 合成および mRNA の 3' 末端のポリアデニル化を強く阻害する cordycepin (3'-deoxyadenosine) はタバコの葉切片のクロロフィルおよびタンパク質の減少を抑え、緑葉のセネッセンスの進行を抑制する効果があることが見出された (Takegami & Yoshida 1975)。 ^3H で標識したアデニンをを用いて *Festuca pratensis* Huds. の緑葉を標識したところ、基部の若い組織 (緑葉の形成期) および中央部の成熟した組織 (セネッセンスの開始時期にあたる) に最も多く放射能の取り込みが見られた (Stoddart & Thomas 1982)。これらの観察から、緑葉のセネッセンスに関与する遺伝子の発現は、その転写産物をポリアデニル化する段階で制御され、mRNA の細胞内における翻訳活性を変化させることによって調節されている可能性が示唆された。ただし、これらの観察はポリアデニル化だけでなく、mRNA の転写効率をも含めてみている可能性があり、必ずしも転写レベルにおける調節を否定できない。一般に、阻害剤を用いた実験においてはその細胞内への透過性、作用の特異性などに問題があり、正しい結論を得るにはより直接的な証明が必要である。

ダイズ (*Glycine max* L.) の子葉中の 6 種類の leucyl-tRNA はその相対的な存在比がセネッセンスの進行に伴って変化することが報告されている (Bick et al. 1970)。さらに、ダイズ子葉の leucyl-tRNA 合成酵素活性がセネッセンスの進行に伴って変化することが報告された (Bick & Strehler 1971)。特定の tRNA または aminoacyl-tRNA 合成酵素活性の変化により、コドン使用頻度が偏った mRNA の翻訳速度が変化することも考えられる。したがって、緑葉のセネッセンスに関与するタンパク質のコドン使用頻度がもし偏っているならば、tRNA もしくは aminoacyl-

によってインゲン (*Phaseolus vulgaris* L.) 葉緑体のチラコイド膜の相転移温度を調べたところ、セネッセンスに伴って緑葉のタンパク量が減少し始める時期になると、突然 -30°C から $+30^{\circ}\text{C}$ に上昇し、通常の生育温度で相分離状態をとる可能性が示唆された (McKersie & Thompson 1978)。これらの観察から、セネッセンスの進行に伴って生体膜の物理的性質が変化することによりその透過性が変化し、隣接した液胞に存在する endopeptidase が葉緑体に侵入し、RuBPCase の分解が起こる可能性も考えられる。

Dalling ら (1983) は、オオムギから単離した葉緑体に RuBPCase を分解できる endopeptidase 活性があることを示した。また、単離したエンドウ (*Pisum sativum* L.) の葉緑体において、新たに合成されたタンパク質が ATP に依存して分解されることが観察されている (Liu & Jagendorf 1984, Malek et al. 1984)。これらの葉緑体内に存在するタンパク質分解酵素がセネッセンス初期の RuBPCase タンパク質の分解に働いている可能性も充分考えられる。

以上述べてきたように、高等植物は様々な環境の変化に適応して生育を続けるために緑葉から重要な栄養素を回収し、最終的には植物体から脱落させるための遺伝子を獲得し、外的もしくは内的な刺激に対応してそれらの遺伝子の発現を調節する機構を備えてきたと考えられる。ただし、緑葉のセネッセンスが遺伝的にプログラムされていることを直接的に証明するような報告は未だなされていない。このような観点から、ここで解決すべき問題点を以下のように整理してみた。

- 1) セネッセンスに伴う緑葉細胞の様々な生物活性の低下、および、加水分解酵素などのセネッセンスの進行に関与すると思われる酵素活性の上昇が観察されているが、これらの現象は直接的に遺伝子の発現が変化することによるものなのか。
- 2) 阻害剤を用いた研究などから、緑葉のセネッセンスに関与する遺伝子の発現は転写以降の段階で調節されていることが示唆されているがこれを直接的に証明することはできないか。
- 3) セネッセンスに伴う葉緑体の崩壊は細胞核の遺伝子によって支配されていることが示唆されている。そうだとすると、そのような遺伝子の産物は葉緑体に輸送されなければならない。これを実験的に証明することはできないか。
- 4) 葉緑体におけるタンパク合成はセネッセンスの比較的初期の段階で停止することが示唆されているが、この葉緑体遺伝子の発現を停止させるのはどのような機構によっているのであろうか。
- 5) セネッセンスを起こした葉からその内容物の転流が起こるが、その転流を支配するのはどのような遺伝子で、その発現は緑葉細胞の中でどのように変化するのであろうか。

本論文においては、緑葉のセネッセンスが遺伝的にプログラムされていることをより直接的に証明し、その機構を明らかにすることを目的として上記のような問題点を中心にして行なった研究についてまとめた。まず第2章において暗所における緑葉のセネッセンスに伴う細胞核由来の翻訳可能な mRNA 種の変化について述べる。次いで、第3章においてはセネッセンスと光条件の関係を葉の細胞中に発現している mRNA のレベルで検討し直し、緑葉のセネッセンスにより深く関与して変化する mRNA 種を選び出す試みについて述べる。さらに、第4章においては葉緑体の崩壊に関与する細胞核遺伝子産物を見出す第一歩として、葉緑体に輸送される細胞核由来の遺伝子産物のセネッセンスに伴う変化について述べる。第5章では、セネッセンスを起こした葉における葉緑体自身の遺伝子発現の変化について検討する。最後に第6章において、窒素の転流に重要な働きを持つと考えられるグルタミン合成酵素について、セネッセンスの進行に伴うサブユニットタンパク質の構成と mRNA の変化について検討し、その遺伝子の発現とセネッセンスの関連について考察する。

tRNA 合成酵素活性を変化させることによってその合成が翻訳段階で調節される可能性も考えられる (Pillay & Cherry 1974)。

葉緑体のセネッセンス

緑葉において光合成を司るオルガネラである葉緑体は、窒素代謝系、アミノ酸、イソプレノイド、ポルフィリンや脂質の合成に関与する酵素類をも含んでおり、緑葉細胞の物質代謝の中心的な役割を果たしている。緑葉の可溶性タンパク質の 50 % 以上を占める RuBPCase は葉緑体における炭酸固定に関与する酵素であり、セネッセンスの際に転流される窒素の最大の供給源となっている。光合成能その他の葉緑体における物質代謝機能の低下は緑葉のセネッセンスに最も特徴的な現象であり、緑葉のセネッセンスは葉緑体のセネッセンスといっても過言ではない。

Wittenbach ら (1982) は、コムギ (*Triticum aestivum* L.) の葉肉細胞あたりの葉緑体数がセネッセンスの進行とともに減少することを観察し、葉緑体の減少と可溶性タンパク質の減少との間に相関関係のあることを示した。また、電子顕微鏡による観察から、葉緑体はセネッセンスの進行に伴って細胞の中央に移動し、あたかも液胞内に取り込まれて行くように見えることを同時に報告している。彼らはこれらの観察から、緑葉がセネッセンスを起こす際に液胞は葉緑体を受動的もしくは能動的に取り込み、液胞中でその崩壊が進行し、RuBPCase の分解が起こることを示唆した。

一方、Mae ら (1984) は、コムギの緑葉あたりの RuBPCase のタンパク質はセネッセンスの初期に急激に減少するが、その同じ時期に緑葉あたりの葉緑体数はほとんど減少しないことを報告している。また、Wardley ら (1984) は、コムギ葉肉細胞あたりの葉緑体数はセネッセンスの過程でほとんど減少せず、葉肉細胞あたりのタンパク質量が 80 % 以上減少するまでセネッセンスが進行して、はじめて葉緑体数に 22 % の減少が見られることを報告した。この二つの報告は、少なくともセネッセンスの初期における RuBPCase の分解は限界膜である包膜を保持したままの葉緑体中で起こっていることを示唆している。

セネッセンスを起こした葉における RuBPCase の分解に関与するプロテアーゼについては多くの研究がなされ、RuBPCase 分解活性を持つ複数の endopeptidase がセネッセンスを起こした緑葉から見出されている。緑葉のセネッセンスに伴う endopeptidase 活性の上昇はシクロヘキシミドによって抑制され、同時に RuBPCase 活性の低下およびタンパク量の減少が抑制されることから、RuBPCase を分解する endopeptidase は細胞核にコードされ、細胞質で合成されと考えられる (Martin & Thimann 1972, Peterson & Huffaker 1975)。セネッセンスを起こしたオオムギの緑葉から endopeptidase を精製したところ、RuBPCase を分解する二種類の endopeptidase が見出された (Miller & Huffaker 1981)。オオムギ緑葉組織の全 endopeptidase 活性の 95 % を占めるこの二種の endopeptidase は、Ficoll を用いた密度勾配遠心による細胞分画から、液胞内に局在することが示された (Thayer & Huffaker 1984)。

液胞は緑葉の発達とともにその体積を増し、成熟した緑葉の葉肉細胞においては葉緑体を含む細胞質は細胞膜周辺に押し付けられて細い帯状になり、RuBPCase の分解が開始される時期には、葉緑体包膜と液胞膜が非常に薄い原形質をはさんで近接していることが観察されている (Peoples et al. 1980)。細胞膜や葉緑体の膜などの脂質二重層は通常液晶状態にあり、膜を構成する脂質やタンパク質分子は回転や並進などの運動を行なっている。熱帯起源の植物の生体膜は、低温下に置くと同一膜上に液晶状態の脂質と、分子の運動が極端に制限されるゲル状態の脂質が共存する相分離状態となり、イオンや低分子物質に対する障壁としての機能を失うことが知られている。X 線回折

第2章 暗処理によって起こるセネッセンスの進行に伴う翻訳可能な mRNA の変動

序 論

前章で述べたように、細胞質におけるタンパク質合成の阻害剤であるシクロヘキシミドによって葉の黄色化が抑制されること (Makovetzki & Goldschmidt 1976, Pjon 1981)、カナダモの葉を高浸透圧処理することにより細胞質を細胞核を持つ部分と持たない部分に分けると、核が存在する部分の葉緑体のみが黄色化し、退化崩壊してゆくこと (Yoshida 1961) などの観察から、緑葉のセネッセンスおよびそれに伴う葉緑体の崩壊は細胞核遺伝子の働きによって調節されていることが示唆されてきた。

Watanabe & Imaseki (1982) は、コムギ緑葉の poly (A)⁺RNA の翻訳産物を分析することにより、セネッセンスに伴って細胞核の遺伝情報発現に変化が起きることをはじめて明らかにした。また、同様の観察がダイズの子葉を用いた研究から報告されている (Skadsen & Cherry 1983)。これらの観察は、緑葉がセネッセンスを起こす際には、細胞核遺伝子の発現が単に停止してゆくだけでなく、その進行に伴って様々な遺伝子の発現が活性化されていることを示唆するものである。

Watanabe & Imaseki (1982) は、poly (A)⁺RNA 翻訳産物を SDS-PAGE で分離、解析することによって遺伝子発現の変化を調べた。ただし、一次元の SDS-PAGE はその分解能に限界があり、一本のバンドが種類のポリペプチドによるものなのか、もしくは SDS-PAGE で挙動を同じくする複数のポリペプチドによるものなのかを見極めることができない。また、第5章で述べるように、試験管内の実験によって葉緑体の崩壊に関与する細胞核遺伝子産物を見出そうとする場合、無傷葉緑体を単離することが必要になるが、単子葉植物であるコムギの緑葉は葉緑体の単離に難点があり、適当な材料のようには見えない。

以上のような観点から、本章においてはハツカダイコン子葉を実験材料に選び、暗所に置くことによって起こるセネッセンスの進行に伴って細胞内に発現している細胞核由来の mRNA 種がどのように変化しているかについて述べる。そのため、セネッセンスを進行させた子葉から poly (A)⁺RNA を調製し、そのコムギ胚無細胞タンパク合成系における翻訳産物を O'Farrell ら (1977) の二次元電気泳動法によって分離して、その個々の翻訳産物の量的変化から対応する mRNA の蓄積量の変動を求めた。

材料および方法

植物材料およびセネッセンスの誘導

植物材料としては、常時均一な緑葉が得られること、切り取って暗所に置くことにより同調的にセネッセンスを誘導できること、RNA の抽出が容易であること、無傷葉緑体の単離が容易であることから、ハツカダイコン幼植物の子葉を用いることにした。

ハツカダイコン (*Raphanus sativus* L. cv. Comet) の種子を、バーミキュライトを敷き詰めたプラスチック製バットに播き、24時間アルミホイルで覆って 25℃に置くことにより暗所で発芽さ

せた後、約 5,500 lux の白色蛍光灯による連続光下、25 °C で生育させた。肥料は Hoagland の完全培養液 (Arnon & Hoagland 1940) を用いた。セネッセンスの開始時期にあたると考えられる、ほぼ完全に展開した播種後 14 日の子葉を材料とした。

湿度を保つために水を含んだペーパータオルを底に敷き、ステンレスの網を置いたポリスチロールの箱に切り取った子葉を並べて密閉し、25 °C 暗黒下に一定時間置いてセネッセンスを進行させた。

RNA の抽出および poly (A) ⁺RNA の調製

約 400 対 (生重量約 30 g) の子葉を流水で約 20 分間洗った後、ペーパータオルで水気を除き、60 ml の 7 M グアニジン塩酸溶液 [7 M guanidine-hydrochloride, 0.1 M β-mercaptoethanol, 2 % (w/v) sodium-N-lauroylsarcosinate, 25 mM sodium citrate (pH 7.5)] および適量のシリコン系の消泡剤 (Shin-Etsu Silicone KM-72, 信越化学) を加え、ブレンダーで破碎した。破碎液に同容積のフェノール:クロロホルム 1:1 の混液を加えて 10 分間攪拌し、1,500 xg で 10 分間遠心して水層を回収した。この水層をさらに同容積のフェノール:クロロホルム混液、クロロホルムで処理した後、水層に酢酸を滴下して pH を 5.0 に下げ、0.6 容積のイソプロパノールを加えて -20 °C に最低 6 時間置くことにより核酸を沈澱させた (Schmidt et al. 1981)。遠心によって集めた核酸の沈澱を 70 % (v/v) エタノールで 2 回洗った後、少量の Tris-SDS 溶液 [1 % (w/v) SDS, 50 mM Tris-HCl (pH 9.0)] (Watanabe & Price 1982) に溶解し、再度フェノール抽出とエタノール沈澱による核酸の精製操作を行なった。得られたエタノール沈澱を少量の水に溶解し、濃度が 2 M になるように 10 M LiCl を加え、0 °C に 2 時間以上置くことにより高分子 RNA を沈澱させた。沈澱を 70 % エタノールで洗った後、少量の水に溶解し、oligo (dT) cellulose column chromatography (Aviv & Leder 1972) によって poly (A) ⁺RNA を調製した。

無細胞タンパク合成系

Marcu & Dudock (1974) の方法にしたがって調製したコムギ胚無細胞抽出液を用い、標識アミノ酸としては ³⁵S-メチオニン (1,300 Ci/mmol, Amersham, U. K.) を 1 μCi/μl の濃度で加え、Watanabe & Price (1982) の条件で翻訳反応を行なった。³⁵S-メチオニンのタンパク質への取り込みは、Sato ら (1980) の方法で測定した。ハッカダイコン子葉の poly (A) ⁺RNA の翻訳活性はセネッセンスの進行には影響されず、その濃度が 80 μl/ml で最大を示し、加えた ³⁵S-メチオニンの約 40 % が熱酸不溶性画分に取り込まれた。これは、コムギ胚抽出液自身に含まれる mRNA による翻訳活性の約 20 倍以上であり、ハッカダイコン子葉から上記の方法で調製した poly (A) ⁺RNA は十分な翻訳活性を持っていることがわかった。また、この翻訳活性は RNase の阻害剤 (Human placental ribonuclease inhibitor, Amersham, U. K.) を加えても改善されないことから、コムギ胚抽出物に含まれる RNase 活性は無視できることがわかった。

翻訳産物の二次元電気泳動およびその検出

二次元電気泳動は、O'Farrell (1975) および O'Farrell ら (1977) の方法にしたがって行なった。ただし、両性担体としては Biolyte (Bio-Rad) を使用した。また、lysis buffer は 9.5 M urea, 1 % (w/v) NP-40, 2 % (w/v) Biolyte (pH 3-10) とし、sample overlay solution は 8 M urea, 1 % (w/v) NP-40, 2 % (w/v) Biolyte (pH 3-10) とした。中酸性のポリペプチドは 1 % (w/v) Biolyte (pH 4-6), 1 % (w/v) Biolyte (pH 6-8) を含む、長さ 11 cm の 4.5 % ポリアクリルアミドゲルを用いた等電点電気泳動 (IEF, 400 V × 12 h + 800 V × 1 h) によって分離し、塩基性の

ポリペプチドは1% (w/v) Biolyte (pH 6-8), 1% (w/v) Biolyte (pH 8-10) を含む, 長さ12 cm の4.5% ポリアクリルアミドゲルを用いた非平衡 pH 勾配電気泳動 (NEPHGE, 400 V × 5 h) によって分離した。二次元目の SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) は, 12-17% のアクリルアミド濃度勾配を持つゲルを作成し, Laemmli の緩衝液系 (Laemmli 1970) を用いて行なった。電気泳動用試料は, 無細胞タンパク合成系における翻訳産物に, 9 倍容の lysis buffer を加えて作製し, 全試料の放射活性を一定にそろえて (1×10^6 cpm) 分析した。分子量マーカーとしては, Pharmacia 社のマーカータンパク質混合物 (phosphorylase b, 94 kd; bovine serum albumin, 67 kd; ovalbumin, 43 kd; carbonic anhydrase, 30 kd; soybean trypsin inhibitor, 20.1 kd; α -lactalbumin, 14.4 kd) を用いた。これを4%アクリルアミド溶液に溶かして, 内径2.5 mm のガラス管に流し込んで重合させ, 4 mm の長さに切ったものを IEF または NEPHGE の試料ゲルと共に SDS-sample buffer (Laemmli 1970) で平衡化し, 二次元目のゲルに乗せて泳動した。電気泳動終了後, 二次元目のゲルを Coomassie Brilliant Blue R 250 を用いて染色, 脱染して分子量マーカーの位置を同定した後, 電子レンジを利用したゲル乾燥機 (Gersten et al. 1983) で乾燥させ, オートラジオグラフィーによって翻訳産物を検出した。

特異抗体による翻訳産物に同定

15 μ Ci の ^{35} S-メチオニンを含む 50 μ l の無細胞タンパク合成反応液に, 翻訳反応後 10 μ l の 10% (w/v) SDS を加え 3 分間煮沸し, さらに 10 μ l の 20% (w/v) Triton X-100 を加えた後, 3 ml の Triton-saline [20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.14 M NaCl, 0.1% (w/v) Triton X-100, 1 mM EDTA] で希釈した。ここから 10 μ l 取って熱酸不溶性画分への放射能の取り組みを測定し, その結果から各試料の放射活性を一定にそろえた後, 抗体処理を行なった。抗体としては, ホウレンソウから精製した ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase の小サブユニット (RuBPCase SSu), 酸素発生に関与する 33-kDa タンパク質 (33-kDa), phosphoribulokinase (PRKase) をウサギに感作して作製した特異抗体を用いた。抗 RuBPCase SSu 抗体は当研究室の渡辺昭助教授, 抗 33-kDa タンパク質抗体は東邦大学の桑原朋彦博士, 抗 PRKase 抗体は名古屋大学農学部植物栄養および肥料学の杉山達夫教授の御好意により分与いただいた。希釈した無細胞タンパク合成系の反応液を 3 等分し, 適量の抗体をそれぞれ加え, Watanabe & Price (1982) の方法に従って抗原抗体複合体を得た。Protein A-Sepharose に結合した抗原抗体複合体は 40 μ l の 2 倍濃度の SDS-sample buffer で溶出し, さらに 20 μ l の水で残存した抗原を回収した。溶出した試料は, その全量を SDS-PAGE によって分離し, 酢酸に溶解した 20% (w/v) Diphenyloxazol を用いたフルオログラフィー (Skinner & Griswold 1983) によって抗原性を持った翻訳産物を検出した。X線フィルムとしては, 37°C で 24 時間水素ガス処理を行なった Fuji RX film (富士フィルム) を pre-flash して使用した (Minami & Watanabe 1984)。

放射性アミノ酸による子葉の短時間標識

ハッカダイコンの子葉を蒸留水で洗い, ペーパータオルで水気を除いた後, その中心を直径 1 cm のコルクボーラーで打ち抜いた。10 枚の子葉のディスクを向軸側を上にして蒸留水を含んだろ紙を敷いたシャーレに並べ, 1 枚のディスクに 4 μ l の labeling solution [50 mM MES-KOH (pH 7.0), 0.2% (w/v) Tween 20, 4 mCi/ml ^{35} S-methionine] を表面に塗布し, 25°C で 1 時間標識した。暗処理を行っていない子葉は 5,500 lux の光照射下で, 暗処理をほどこした子葉についてはシャーレをアルミホイルで包むことにより光を遮断して新たに合成されるタンパク質を標識した。

また、暗処理をほどこした子葉を用いる場合には、すべての操作を弱い緑色の安全光の下で行なった。標識したディスクは蒸留水で2度洗い、ペーパータオルで水気を除いた後、0.6 mlの50 mM Tris-HCl (pH 7.5)を加え、ガラスホモゲナイザーを用いて氷中で破碎した。破碎液を12,000 xgで5分間遠心し、その上清にRNase Aを50 µg/mlの濃度で加えた後、100,000 xgで1時間遠心し、膜成分を取り除いた。この上清に0.7 gのセルロースパウダー (Cellex 410, Bio-Rad)を加えて懸濁し、遠心によってセルロースパウダーを除いた。この操作により、二次元電気泳動後のフルオログラムのbackgroundが下がり、解像度を上げることができた。標識された可溶性タンパク質を5%のTCAで沈澱させ、80% (v/v) アセトンで3回洗うことによりTCAを除き、遠心エバポレーターを用いて乾燥させた。乾燥したタンパク質を200 µlの9.0 M urea, 2% (w/v) NP-40, 2% (w/v) Biolyte (pH 3-10), 5% (v/v) β-mercaptoethanolに懸濁し、超音波処理によって溶解させた。子葉組織内への³⁵S-メチオニンの取り込み、および、可溶性タンパク質中への³⁵S-メチオニンの取り込みは2 µlの100,000 xgの上清をガラスフィルターにスポットし、そのまま乾燥させて、もしくはSatoら (1980)の方法にしたがって測定した。

二次元電気泳動は標識されたタンパク質の放射活性をそろえて、一次元目にIEFを、二次元目に14%のアクリルアミドゲルを用いたSDS-PAGEを行なった。新たに合成されたタンパク質はフルオログラフィーによって検出した。

クロロフィルの定量

Arnon (1949)の方法にしたがって行なった。10枚の子葉を無作為抽出し、生重量を測定した後、2 mlの80%アセトンを加えて乳鉢ですりつぶした。破碎液を氷中の遠心管に移し、乳鉢と乳棒を2 mlの80%アセトンで3回洗い、残ったクロロフィルを回収した。破碎液の量を10 mlに合わせ、10分ごとに攪拌しながら0℃に1時間置いた後、沈澱を遠心で除き、上清に抽出されたクロロフィルの吸光度を分光光度計で測定した。

結 果

暗所におけるセネッセンスの進行

セネッセンスの進行の指標として、単位生重量あたりのクロロフィル量の変動を調べた。子葉を幼植物から切り離して暗所に置くと、24時間後まではクロロフィル量に変動が見られないが、その後急激に減少して72時間後には始めの約15%まで減少した (Fig. 1)。幼植物をそのまま暗所に置いた場合の子葉中のクロロフィル量の減少は、切り離して暗所に置いた場合よりも若干遅くなるが、ほとんど同様な変化を示した。ただし、この場合には個々の子葉におけるセネッセンスの進行に個体差が見られた。このことから、mRNA種の変化にたいする子葉の切り離しの影響を見る実験 (Fig. 3) 以外では、切り離して暗所に置き、セネッセンスを同調的に進行させた子葉を用いた。

RNA 抽出法の検討

細胞中に発現している細胞核由来のmRNAを*in vitro*でタンパク質に翻訳して検出しようとする場合、生物活性の高いpoly (A)⁺RNAを組織から調製することが必須である。ハツカダイコンの子葉は種子の中では貯蔵組織としての役割を果たしているため、生物活性を持つmRNAの抽出を妨げる脂肪、多糖類やポリフェノールなどの代謝産物に富んでいる。また、セネッセンスの進行に伴ってRNaseタンパク質が*de novo*に合成され、RNase活性が上昇すること (Sacher & Davies

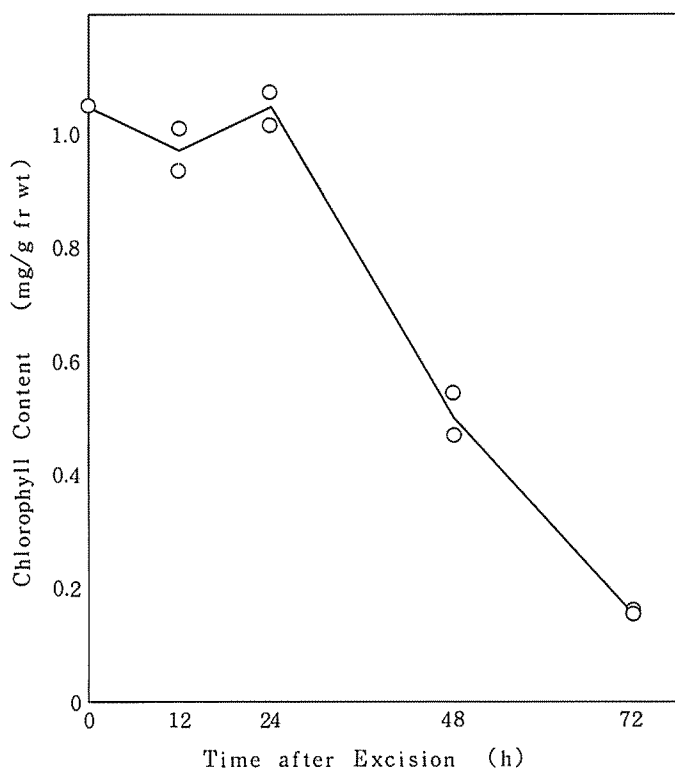


Fig. 1. ハツカダイコン子葉のセネッセンスに伴うクロロフィル量の減少

播種後 14 日の幼植物から子葉を切り取って一定時間暗所に置いた後、クロロフィル量を測定した。

1974) が知られているため、播種後 14 日のハツカダイコン子葉を用いて RNA の抽出法を検討した。

RNA の抽出法として広く用いられている SDS/フェノール法 (Watanabe & Price 1982) で抽出した場合、一定の収率で poly (A) ⁺RNA を得ることができたが、コムギ胚無細胞タンパク合成系における 60 kDa 以上の高分子ポリペプチドの翻訳活性が低いことがわかった。また、グアニジンイソチオシアネート/CsCl 超遠心法、および、グアニジン塩酸/CsCl 超遠心法 (Chirgwin et al. 1979, Maniatis et al. 1982) で調製した poly (A) ⁺RNA は、100 kDa 以上の高分子ポリペプチドまで効率よく合成したが、RNA の収率にばらつきが大きく、また、多糖類が十分に除けないこともあった。本章の材料および方法の項で述べたグアニジン塩酸/フェノール法を用いた場合、一定の収率で poly (A) ⁺RNA を得ることができ、また、コムギ胚無細胞タンパク合成系において高分子量のポリペプチドを効率良く合成した。これらの結果から、ハツカダイコン子葉からの RNA の抽出は、すべてグアニジン塩酸/フェノール法で行なうことにした。

暗所におけるセネッセンスに伴う mRNA の変動

セネッセンスの進行に伴う細胞核遺伝子発現の変動を調べるため、暗所においてセネッセンスを誘導したハツカダイコン子葉から poly (A)⁺RNA を調製し、³⁵S-メチオニンを含むコムギ胚無細胞タンパク合成系によってポリペプチドに翻訳した上で二次元電気泳動法によって分析した。

単位生重量あたりの抽出可能な poly (A)⁺RNA の量はセネッセンスの進行に伴って減少し、72 時間の暗処理によって初めの約 30 % まで減少した。ただし、無細胞タンパク合成系における翻訳効率、セネッセンスを進行させた子葉から調製した poly (A)⁺RNA を用いた場合にも変動は見られず、高い翻訳活性を示した。

中酸性の翻訳産物は IEF で、塩基性の翻訳産物は NEPHGE で分離して二次元電気泳動を行ない、オートラジオグラフィーによって検出したところ、中酸性の産物としては約 700 種、塩基性の産物としては約 300 種のポリペプチドが認められた。このうちの大部分は暗処理時間に関係なく、どの子葉から調製した poly (A)⁺RNA の翻訳産物中にも同様に検出された (Fig. 2 A, 2 B)。しかしながらオートラジオグラムを詳しく比較したところ、Fig. 2 A および 2 B に示すように、0 時間に比べて増加を示した翻訳産物 (○印)、減少を示した翻訳産物 (□印) が認められた。なお、ここでは最低 2 回の独立した実験で同様に、かつ、はっきりと変動が認められたもののみ印を付けた。

まだクロロフィル量に変動が見られない 12 時間の暗処理ですでに 14 種、24 時間では 29 種の翻訳産物に変動が認められた (Fig. 2 A)。暗処理時間の経過に伴って増加を示した翻訳産物の数は 12 時間で 7 種、24 時間で 15 種 (Fig. 2 A)、48 時間で 18 種、72 時間で 29 種 (Fig. 2 B) 認められた。減少を示した翻訳産物の数は 12 時間で 7 種、24 時間で 14 種 (Fig. 2 A)、48 時間で 14 種、72 時間で 15 種 (Fig. 2 B) であった。また、一旦増加した後、72 時間の暗処理中に減少を示す翻訳産物も検出された。

mRNA レベルで見た遺伝子発現の変化に対する葉柄切断の影響

本章の実験においては、植物体に付いたままの子葉よりも、より同調的にセネッセンスを誘導させるために植物体から切り離した子葉を用いている。ところが、切断傷害による刺激は植物組織の細胞中に発現する mRNA 種を変化させることが知られている (Ishizuka et al. 1981)。本章で用いた子葉細胞中においても、切断傷害によって mRNA 種が変化している可能性が考えられた。そこで、72 時間暗所に置いたハツカダイコン幼植物の子葉から調整した poly (A)⁺RNA の翻訳産物と、切り取って 72 時間暗処理をほどこした子葉から調製した poly (A)⁺RNA の翻訳産物を比較した (Fig. 3)。Fig. 2 と同様に 0 時間に比べて増加もしくは減少を示した翻訳産物に ○印もしくは □印を付けた。切り取って暗処理した子葉において量的変動を示した 44 種の産物のうち、矢印を付けた 7 種の産物は、植物体に付けたまま暗所に置いた子葉においては変動が認められなかった (Fig. 3)。以上の結果、この 7 種のポリペプチドをコードする mRNA 量の変動は、切断傷害に対応した変化であると考えられた。

Fig. 4 は Fig. 2 と Fig. 3 の結果をまとめて模式的に表わしたもので、切断傷害によって変化したと考えられる 7 種のポリペプチドは除いてある。暗処理時間の経過に伴い、72 時間後まで単純に増加もしくは減少を示した翻訳産物を ○もしくは □ で表わした。中の数字は量的変動が最初に認められた時間を表わしている。また、72 時間の暗処理中、一時的に増加を示した産物は ◇ で表わし、中の数字は最高レベルを示した時間である。以上の結果から、切り取って暗所に置いたハツカダイコン子葉中における mRNA の変動は、切断傷害によって引き起こされた変化をもいくつか含んでいるが、これらふたつの実験系で共通して量的変動を示した多くの mRNA 種は、セネッセンスの

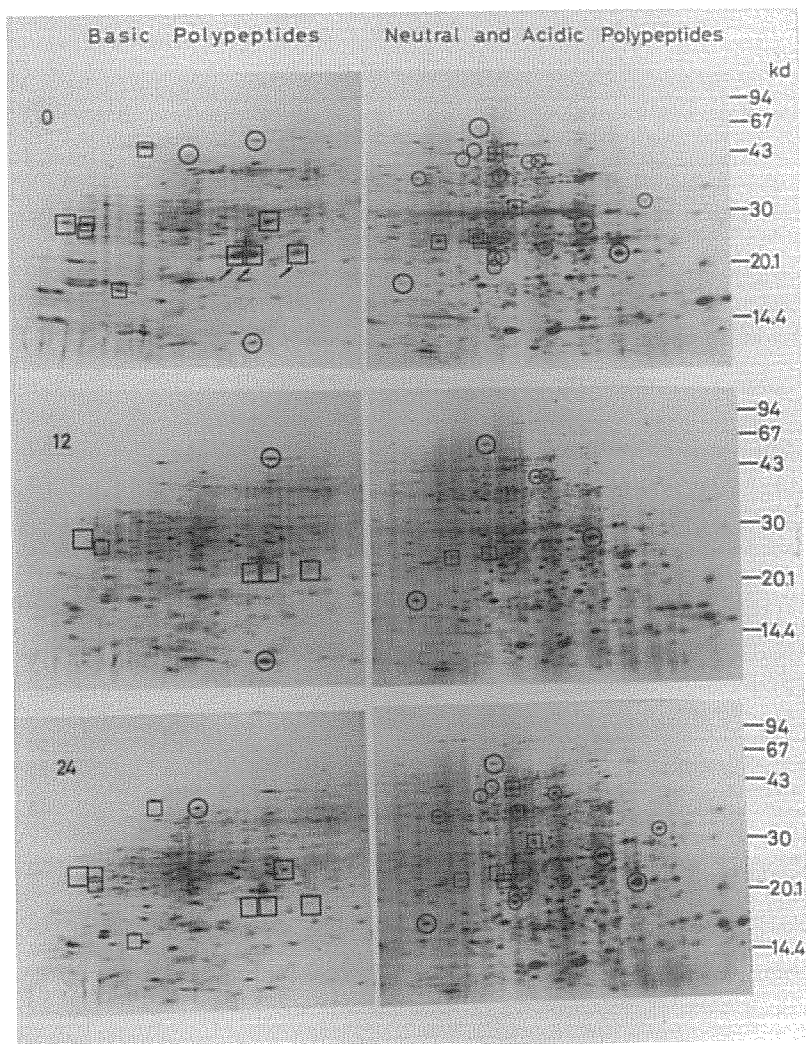


Fig. 2 A. 12 時間もしくは 24 時間暗処理をほどこした子葉から調製した poly (A) ⁺RNA の翻訳産物

幼植物から切り取って 0, 12, もしくは 24 時間暗所に置いた子葉から調製した poly (A) ⁺RNA を, ³⁵S-メチオニンを含むコムギ胚無細胞タンパク合成系で翻訳させた。翻訳産物はその放射活性を一定にそろえて二次元電気泳動で分離し、オートラジオグラフィーによって検出した。○または□で示したスポットは、2 回の実験で共通に、かつ、はっきりと、0 時間に比べて増加または減少を示した産物である。比較のため、0 時間のパネルの対応する部位にも印を付けた。0 時間の 3 本の矢印は RuBPCase SSu の前駆体を示している。

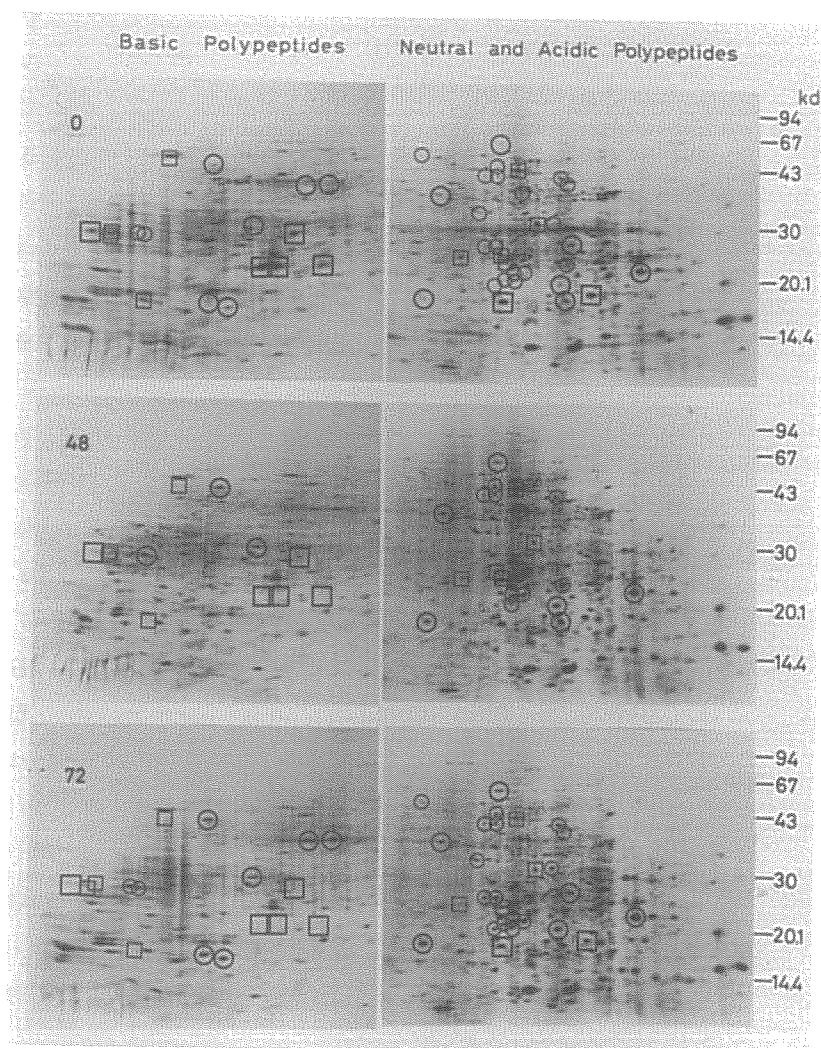


Fig. 2 B. 48 時間もしくは 72 時間暗処理をほどこした子葉から調製した poly (A) ⁺RNA の翻訳産物

幼植物から切り取って暗所に 48, もしくは 72 時間置いた子葉から poly (A) ⁺ RNA を調製した。他の条件および記号は Fig. 2 A と同じである。

進行に関与している可能性が示唆された。

光合成に関与するタンパク質をコードするいくつかの翻訳可能な mRNA の量的変動

緑葉の光合成能はセネッセンスの進行に伴って低下してゆくことが知られており、緑葉のセネッセンスの一つの大きな特徴となっている。そこで、細胞核支配であることが知られており、光合成

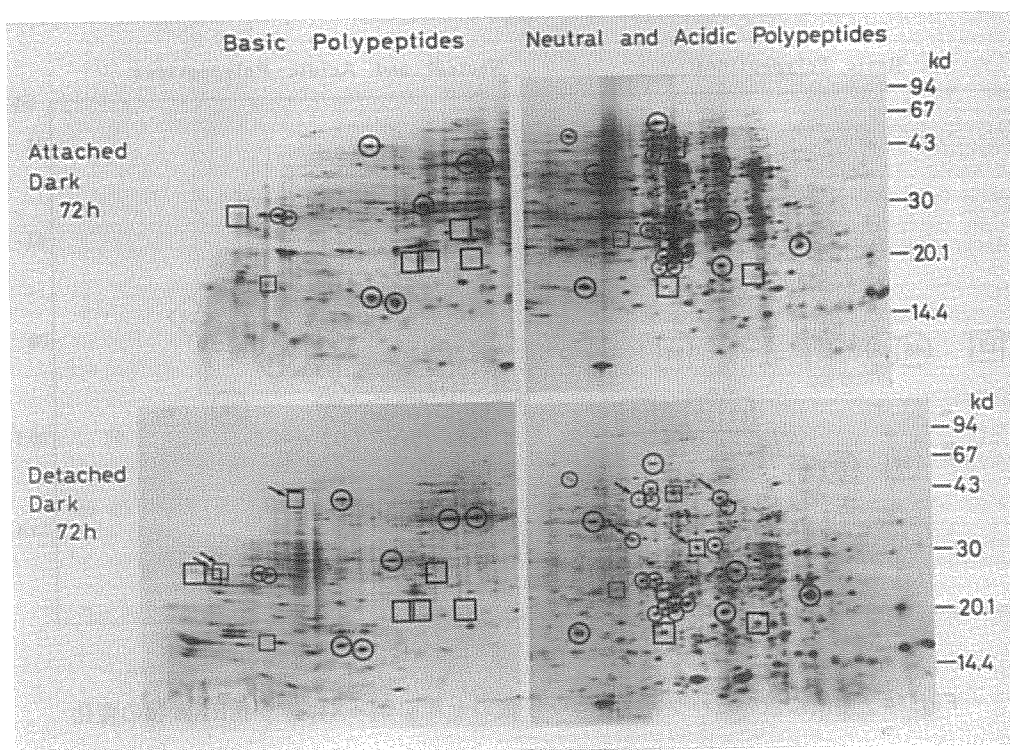


Fig. 3. 植物体に付けたまま暗所に置いた子葉, および, 切り取って暗所に置いた子葉から調製した poly (A)⁺RNA の翻訳産物の比較

植物体に付けたまま (Attached Dark 72 h), あるいは, 切り取って暗所に 72 時間置いた子葉 (Detached Dark 72 h) から poly (A)⁺RNA を調製した。その翻訳産物の分離および検出は Fig. 2 に示した方法で行なった。○もしくは□で示したスポットは 0 時間に比べて増加もしくは減少を示した産物である。矢印で示したスポットは切り取って暗所に置いた子葉でのみ変化を示した産物である。

に關与するものとして炭酸固定系の酵素である RuBPCase の小サブユニット, PRKase, 酵素發生に關与する 33-kDa タンパク質について, poly (A)⁺RNA の翻訳産物中からそれぞれの特異抗体と反應するものを捕えてその量的變動を追うことにより, それぞれのタンパク質をコードする mRNA 量の變動を調べた。

ホウレンソウの RuBPCase SSu, PRKase, 33-kDa タンパク質にたいする特異抗体によって得られた抗原抗体複合体に捕えられた翻訳産物を SDS-PAGE で分離したところ, それぞれ 22 kDa, 44 kDa, 38 kDa の単一バンドがフルオログラム上に検出された (Fig. 5)。ハッカダイコン子葉から抽出した可溶性タンパク質を SDS-PAGE で分離し, イムノブロッティング法によって調べたところ, これら 3 種のタンパク質は, RuBPCase SSu が 15 kDa, PRKase が 39 kDa, 33-kDa タンパク質が 32 kDa で, すべて poly (A)⁺RNA からの翻訳産物より小さい値を示した。この結果

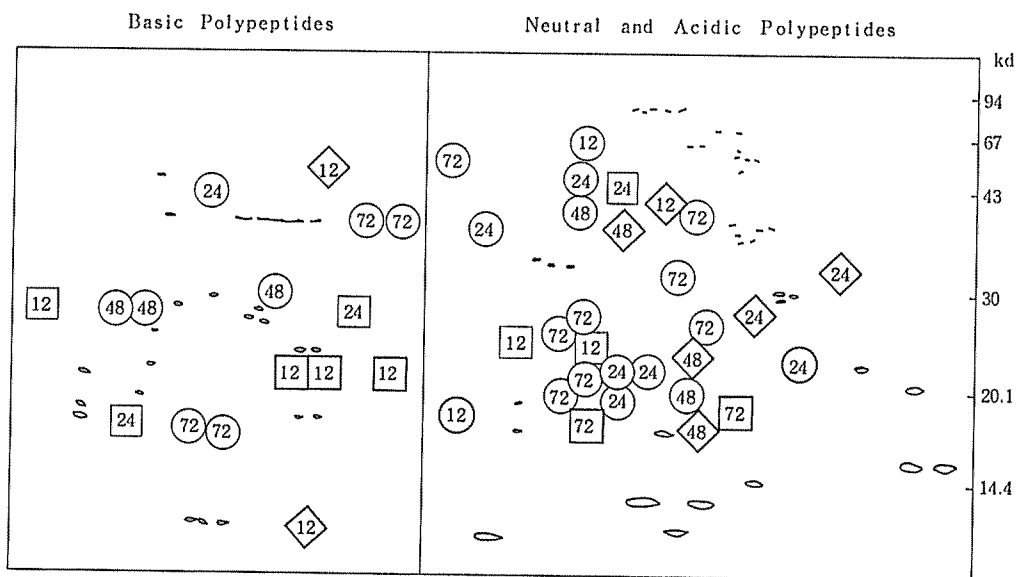


Fig. 4. 暗所に置いたハツカダイコン子葉のセネッセンスに伴う mRNA 種の変化

○もしくは□はセネッセンスの進行に伴って増加もしくは減少を示した産物を表わしている。中の数字は変化が最初に認められた時間を表わしている。また、一時的に増加を示した産物は◇で表わし、中の数字は最高レベルを示した時間を示している。

から、翻訳産物中に検出されたポリペプチドは葉緑体への移行に必要な情報を担っていると考えられている transit peptide をそのアミノ末端に持った前駆体であると判断した。翻訳産物中のこれら 3 種のポリペプチドはセネッセンスの進行に伴って減少しているので (Fig. 5), これらのポリペプチドをコードする mRNA はすべてセネッセンスの進行に伴い減少すると考えられた。また, RuBPCase SSu および PRKase の mRNA は 12 時間の暗処理によって急激に減少し, 24 時間後ではほとんど検出されなくなるが, 33-kDa タンパク質の mRNA は比較的ゆっくりと減少し, 72 時間の暗処理によってもその存在が検出された (Fig. 5)。

子葉におけるタンパク質合成の暗処理による変化

Fig. 4 で見られた翻訳可能な mRNA レベルの変化が実際にセネッセンスを起こした子葉細胞中で合成されているタンパク質の種類の変化に反映していることを確認するため, 切り取って暗所に置き, セネッセンスを進行させた子葉を ^{35}S -メチオニンをを用いて標識し, 新たに細胞中で合成された可溶性タンパク質を二次元電気泳動で分離し, フルオログラフィーによって検出した。

Fig. 6 に暗処理をほどこした子葉細胞におけるタンパク質の合成速度の変化を示した。 ^{35}S -メチオニンのタンパク質への取り込みは子葉組織中に取り込まれた ^{35}S -メチオニンにたいするパーセ

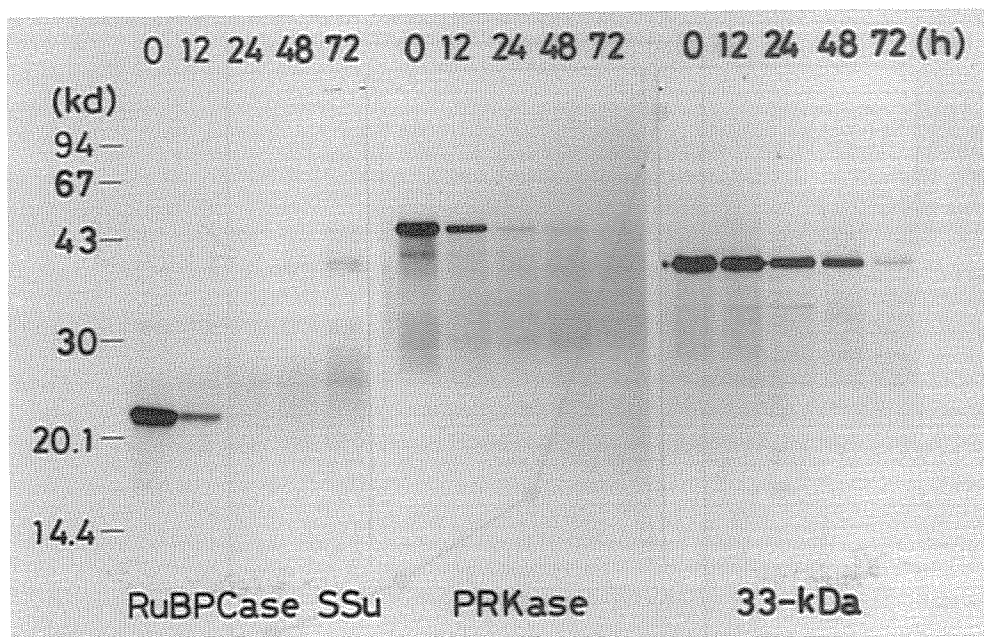


Fig. 5. 細胞核に支配される3種の葉緑体タンパク質 mRNA のセネッセンスの進行に伴う量的変動

切り取って 0, 12, 24, 48, 72 時間暗所に置いた子葉から poly (A)⁺RNA を調製し、コムギ胚無細胞タンパク合成系で翻訳反応を行なわせた。翻訳産物の放射活性をそろえた反応液を、ハウレンソウの RuBPCase SSu, PRKase, 33-kDa タンパク質にたいする特異抗体で処理し、得られた抗原抗体複合体を 13 % ポリアクリルアミドゲルを用いた SDS-PAGE で分離し、抗原をフルオログラフィーによって検出した。

ンテージで表わした。暗処理をほどこした子葉細胞におけるタンパク質の合成速度は 0 時間の子葉を用いた場合よりも低くなっており、また時間の経過に伴って低下している。

poly (A)⁺RNA の翻訳産物で見られたように、多くのポリペプチドの合成が暗処理時間の経過に伴って低下してゆく中で、○で示したいくつかのポリペプチドの合成が明らかに増加していることが認められた (Fig. 7)。ただし、これらのポリペプチドのサイズおよび等電点は、セネッセンスの進行に伴って増加を示した poly (A)⁺RNA の翻訳産物のそれと一致していない (Fig. 2 A, 2 B)。

0 時間の子葉細胞中で最も多く合成されているのは Fig. 7 で矢印を付けた分子量約 55 kDa の RuBPCase LSu タンパク質である。RuBPCase SSu も矢印で示した。このふたつのタンパク質の合成は、24 時間暗処理をほどこした子葉中ではもはや認められなかった。

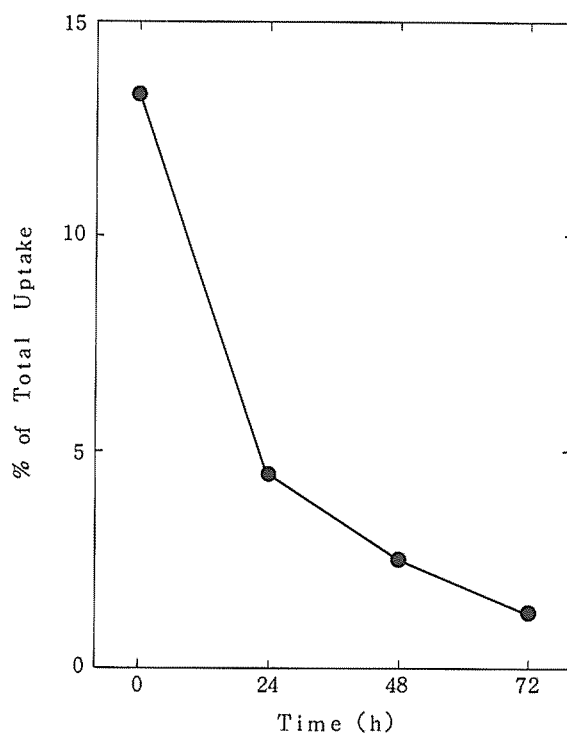


Fig. 6. セネッセンスを起こした子葉細胞中におけるタンパク質合成速度の変化

切り取ってから 0, 24, 48, 72 時間暗所に置いた子葉から直径 1 cm のディスクを打ち抜き、 ^{35}S -メチオニンを塗布して新たに合成されるタンパク質を標識した。子葉組織内への ^{35}S -メチオニンの取り込み (total up take) およびタンパク質への取り込みは、子葉の破碎液を 100,000 xg で遠心した上清から 2 μl 取って測定した。タンパク質への ^{35}S -メチオニンの取り込みは、組織内への取り込みにたいするパーセンテージで表わした。

考 察

Watanabe & Imaseki (1982) は、コムギの緑葉から調製した poly (A) $^+$ RNA の *in vitro* における翻訳産物を一次元の SDS-PAGE で分離し、7 種のポリペプチドのバンドが暗所におけるセネッセンスの進行に伴って変動することを報告した。ただし、一次元の SDS-PAGE はその分離がポリペプチドの分子量によるものだけであるため、かなり限られており、1 本のバンドが 1 種類の mRNA の翻訳産物を示しているとは限らないし、比較的微量な mRNA の翻訳産物は見逃している可能性

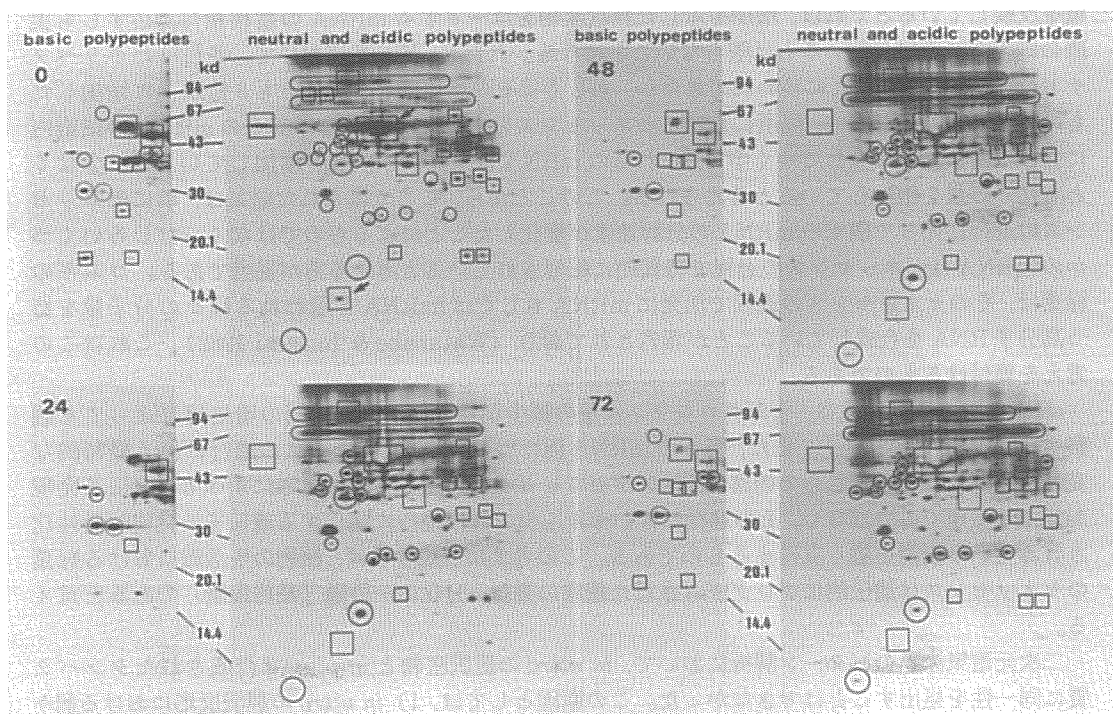


Fig. 7. セネッセンスを進行させた子葉細胞中で新たに合成されたタンパク質

切り取ってから0, 24, 48, 72時間暗所に置いた子葉から直径1cmのディスクを打ち抜き、 ^{35}S -メチオニンを塗布して新たに合成されるタンパク質を標識した。0時間の子葉は明所で、その他の子葉は暗所で1時間標識した後、可溶性タンパク質を抽出し、二次元電気泳動で分離した。新たに合成されたタンパク質はフルオログラフィーによって検出した。○もしくは□で示したスポットは、0時間に比べて増加もしくは減少を示したポリペプチドである。ただし、2回の独立した実験で同様に変動したものにのみ印を付けた。0時間のパネルの矢印はRuBPCaseのLSuおよびSSuを示している。

が高い。本章においては、分子量に加えて等電点という1種類のポリペプチドの二つの異なる性質を利用して分離することにより、約1,000種の翻訳産物を分離することができた。また、暗所におけるセネッセンスの誘導後、少なくとも44種の異なるmRNAの増加もしくは減少を検出できた。ここで検出できたポリペプチドの数は、実際に子葉細胞に発現している細胞核由来の遺伝子産物の数よりもかなり少ないと考えられるが、本章の実験の結果は、緑葉のセネッセンスにはかなり多くの遺伝子が関与していることを示唆している。

細胞中のmRNAレベルの変動は、必ずしも転写レベルの変化を意味する訳ではなく、mRNAの分解速度が変化することによっても起こりうる。抽出可能なpoly(A)⁺RNA量が細胞中の全mRNA

量を反映しているとすれば、増加を示した翻訳産物をコードする mRNA の蓄積量は、必ずしも実際の細胞中で増加しているとは限らないことになる。ただし、Fig. 2 において○を付けたポリペプチドのスポットは、新たに現われてきたか、もしくはその黒化度が少なくとも 3 倍以上に増加したものである。したがって、暗所におけるセネッセンスの進行に伴って他の多くの mRNA の細胞内における蓄積量が減少してゆく中で、これらの mRNA は実際にその量が増加しているか、少なくとも初めの量を維持していると考えられる。このことから、ここで得られた結果は、単にセネッセンスの進行に伴って個々の mRNA の分解速度が変化したことによるものではなく、むしろいくつかの mRNA はセネッセンスの過程で特異的に転写されていると考える方が妥当である。コムギの緑葉は、そのセネッセンスの過程で活発に mRNA もしくは hnRNA と思われる種々の分子量を持つ高分子 RNA を合成していることが報告されており (Watanabe & Imaseki 1982)、これはこの考えを裏付けるものである。

mRNA レベルの変化は、まだクロロフィル量の減少が見られない短時間の暗処理によっても観察された (Fig. 1, 2 A)。また、多くの mRNA 種について、セネッセンスの進行に伴う経時的な変動が観察された。これらの観察は、緑葉がセネッセンスを起こす際には単にすべての遺伝子発現が低下してゆくのではなく、その進行に伴いセネッセンスの進行に関与する遺伝子の発現が活性化されるという仮説を強く支持するものである。この考えに立脚すれば、植物の生活環における緑葉のセネッセンスは遺伝的にプログラムされた器官の発生、分化の一段階 (最終段階) であると言える。

二次元電気泳動のパターン解析において、*in vitro* の翻訳産物と *in vivo* で合成されたタンパク質に同一性を見出すことはできなかった。この原因としては、1) *in vitro* の翻訳反応における個々の mRNA の翻訳効率が子葉細胞中の反応とは異なること、2) 子葉細胞中で個々のタンパク質の分解速度が異なること、3) 子葉細胞中で標識されるものは葉緑体で合成されるタンパク質が大きな割合を占めており、細胞核にその遺伝子が存在するタンパク質の検出が困難であること、4) *in vivo* では翻訳後、種々の修飾が行なわれて成熟したタンパク質になるため、*in vitro* の翻訳産物とは異なった分子量と等電点になってしまうことなどが考えられる。いずれにしても、これらの観察はセネッセンスの進行に伴って細胞中で新たに合成されるタンパク質が質的に変化していることを示している。

セネッセンスの進行に伴って緑葉細胞中のタンパク質やクロロフィル、核酸などは分解されて減少してゆくが、この過程においてプロテアーゼおよび RNase の活性が上昇することが知られている (Spencer & Titus 1972)。また、Sacher & Davies (1974) は緑葉のセネッセンスに伴い、RNase が *de novo* に合成されることを報告している。本章の実験において増加を示した mRNAの中には、このような加水分解酵素をコードしているものも含まれていると考えられる。

特異抗体を用いた実験から、光合成に関与する RuBPCase の SSu, PRKase, 33-kDa タンパク質の mRNA はセネッセンスの進行に伴っていずれも減少してゆくことが明らかになった (Fig. 5)。セネッセンスの進行に伴って光合成活性が低下してゆくことから考えると、この他の光合成に関与するタンパク質の mRNA も減少していると考えられる。ただし、多くの葉緑体タンパク質をコードする細胞核遺伝子の発現は、黄化植物を光照射することによって活性化されること (Tobin & Silverthorne 1985) から考えると、子葉に暗処理をほどこすことによってこれらの光合成に関与する遺伝子の発現が可逆的に抑制されてしまった可能性も否定できない。

本章の実験において、子葉を切り取ったことによる mRNA の変化を除いてはいるが (Fig. 3, 4)、暗処理によってセネッセンスを誘導するという実験系を用いているため、Fig. 4 に示したす

すべての mRNA 種がセネッセンスに関連して変化しているとは言えない。しかし、暗所でセネッセンスを誘導した葉における生理学的、生化学的な変化は、光の下でセネッセンスした葉においても観察されていることから、少なくとも本章において変動が観察された mRNA 種の中にセネッセンスに関与しているものが含まれていると考えられる。

要 約

明所で育てたハツカダイコン幼植物の子葉を切り取って暗所に置くことによりセネッセンスを同調的に誘導するモデル系を用いて、細胞核の遺伝情報の発現の変化を翻訳可能な mRNA レベルで調べた。

- 1) ハツカダイコン幼植物の子葉から調製した poly (A) ⁺RNA のコムギ胚無細胞タンパク合成系における翻訳産物を O'Farrell らの二次元電気泳動法によって展開したところ、中酸性のポリペプチドとして約 700 種、塩基性のポリペプチドとして約 300 種の産物が検出された。
- 2) 暗処理によって起こるセネッセンスの進行に伴い、子葉細胞中に発現している mRNA 種の中で相対的な量が一時的に増加するもの、増加し続けるもの、減少してゆくものが認められた。
- 3) 2) で変動を示した mRNA 種の中に、子葉の切断傷害によって変動したと考えられる mRNA が 7 種認められたが、ほとんどの mRNA 種は切断傷害によって変動したものではないことが明らかとなった。
- 4) 光合成に関与する RuBPCase SSu, PRKase, 33-kDa タンパク質をコードする mRNA は、セネッセンスの進行に伴っていずれも減少してゆくことが明らかとなった。
- 5) セネッセンスを進行させた子葉を ³⁵S-メチオニンで短時間標識したところ、セネッセンスの過程にある子葉細胞中で合成されているタンパク質においても、mRNA 種の変化と同様な変化が認められた。

以上の結果から、緑葉のセネッセンスは単に器官が死に至る受動的な過程ではなく、その細胞中では光合成に関与する遺伝子を含む多くの遺伝子の発現が低下してゆく中で、セネッセンスの進行を推し進めるような機能を持った多くの遺伝子の発現が活性化されてゆくといった、遺伝的にプログラムされた分化の最終段階であることが強く示唆された。

第3章 セネッセンスに伴う mRNA 種の変化に たいする光再照射の影響

序 論

前章においては、ハツカダイコン幼植物の子葉を切り取って暗所に置くという、いわば人工的な条件下でセネッセンスを同調的に誘導する系を用いて細胞核由来の mRNA の変化を調べ、減少するものだけでなく増加を示す mRNA 種を見出した。植物体あるいは切り取った緑葉を暗所に置いてセネッセンスを進行させる実験系は植物生理学的な研究でよく用いられており、その生理学的、生化学的な変化は明所でセネッセンスを進行させた場合と共通なものが多いことが知られている。しかし、植物においては多くの細胞核遺伝子の転写が光によって調節されていることが知られている (Tobin & Silverthorne 1985)。したがって前章において変化が観察された mRNA 種の中には、セネッセンスの進行には直接関与せず、その遺伝子の転写が単に光によって可逆的に変動したものが含まれている可能性が考えられる。そこで、次のような二つの実験によって、暗処理によるセネッセンスの進行に伴って量的変動を示した mRNA 種の中から直接セネッセンスの進行に関与していないものを除くことを試みた。

- 1) 暗所に置いた子葉のセネッセンスの進行に伴うクロロフィル量の減少は、光照射によって元に戻る可逆的な過程と、そのまま進行してしまう不可逆的な過程に分けることができる。そこで、明所で育てたハツカダイコン幼植物を一定時間暗所に置き、その後光照射下に戻すことにより、暗処理で起こった mRNA 種の変化に、どのような影響があるかを調べることにした。可逆的な過程においては、セネッセンスに関与する mRNA も元のレベルに戻ると考えられる。しかし、不可逆的な過程においては、単に光で調節されている mRNA は元のレベルに回復するが、セネッセンスに関与する mRNA はもはや回復しないことが予想される。
- 2) ハツカダイコン幼植物を長期間明所で育てると、個体差は大きいですが、その子葉は次第に黄色化し、セネッセンスが進行することが観察された。光照射下でセネッセンスが進行した子葉細胞中の mRNA が、暗処理によってセネッセンスを進行させた場合と同じ様な変化を示すかどうかを調べた。

材料および方法

植物材料および明暗処理

第2章と同様に明所で育てた、播種後14日のハツカダイコン幼植物を24時間もしくは48時間、25℃暗所に置いた後、白色光の照射下に戻した。光の再照射は徐々に光強度を上げ、初めの30分は1,500 lux、次の30分が3,000 lux、残りの時間は5,500 luxの白色光の下に置いた。

その他は第2章で述べた方法に準じて行なったので、以下にその概略のみを記す。

Poly (A)⁺RNA の調製および無細胞タンパク合成

約400対の子葉から、グアニジン塩酸/フェノール法によってRNAを抽出した。暗処理した幼

植物の場合には弱い緑色の安全光の下で子葉を切り取って集めた。Poly (A)⁺RNA は oligo (dT) cellulose column chromatography (Aviv & Leder 1972) によって調製し、³⁵S-メチオニンを含むコムギ胚無細胞タンパク合成系を用いて Watanabe & Price (1982) の条件で翻訳した。

翻訳産物の二次元電気泳動およびその検出

翻訳産物は熱酸不溶性画分の放射活性をそろえて (1.0×10^6 cpm), 中酸性ポリペプチドについては IEF で、塩基性ポリペプチドについては NEPHGE によって分離し、二次元目の SDS-PAGE を行なった。ゲルの乾燥後、オートラジオグラフィーによって翻訳産物を検出した。

クロロフィルの定量

10 枚の子葉を無作為抽出し、第 2 章に述べた方法でクロロフィルの抽出を行い、Arnon (1949) の方法で定量した。

結 果

暗処理をほどこした幼植物子葉中のクロロフィル量にたいする光の再照射の影響

第 2 章に記した実験においては暗所におけるセネッセンスに伴う mRNA の変化を調べる系として、切り取って暗所に置いたハッカダイコン子葉を用いた。これは、子葉を植物体に付けたまま暗処理するよりも、クロロフィルの減少から見たセネッセンスの進行を同調的に誘導することができるためである。本章においても、まず幼植物から切り取った子葉を用いて実験を試みたが、暗処理をほどこした子葉に光を再照射すると急激に蒸散が活性化されるためか、光を当てるとすぐに子葉が萎れてしまい、水ストレスによる影響が心配された。植物体をそのまま暗所に置いた後、光を再照射した場合にも子葉が萎れる傾向にあったが、材料および方法の項で述べた様に、段階的に光の強度を上げてゆくことによって子葉の萎れを完全に防ぐことができた。また、幼植物をそのまま暗所に置いた場合の子葉細胞中に発現している mRNA 種の変化は、切断障害によって変化したと考えられる数種を除き、子葉を切り取って暗処理した場合の mRNA 種の変化と一致している (第 2 章, Fig. 3)。これらの観察から、本章においては幼植物をそのまま暗処理した後、光の再照射を行ない、mRNA 種の変化にたいする影響を調べた。

種々の光条件の下に置いたハッカダイコン幼植物子葉のセネッセンスの進行を、子葉のクロロフィル量の減少を指標にして調べた (Fig. 8)。24 時間の暗処理によって子葉のクロロフィル量に変化は見られず、その後の光照射によってゆるやかな減少が見られた。この変動の様子は、全く暗処理を行なわない連続光下で育てた子葉のクロロフィル量の変動とほとんど変わりがなかった。48 時間の暗処理によって子葉のクロロフィル量は初めの 80 % まで減少した。この幼植物に光を再照射すると、初めの 24 時間は暗処理を続けている幼植物の子葉より若干低い速度でクロロフィルが減少し、その後の 24 時間はさらに減少速度が小さくなることが観察された。このことから、ハッカダイコン子葉のセネッセンスの進行は、24 時間の暗処理後までは可逆的な過程にあり、48 時間の暗処理以降では不可逆的な過程にあると判断した。

24 時間暗処理後の子葉細胞中の mRNA 種にたいする光照射の影響

セネッセンスの進行が可逆的な過程にある 24 時間暗処理の前後、および、光再照射後の幼植物子葉から poly (A)⁺RNA を調製し、コムギ胚無細胞タンパク合成系を用いてタンパク質に翻訳し

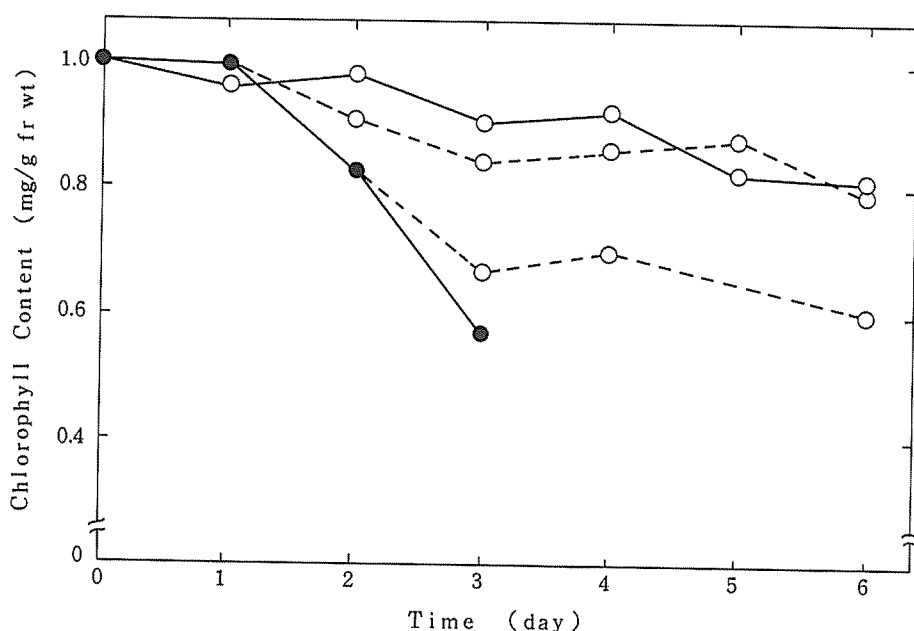


Fig. 8. 暗処理をほどこしたハツカダイコン幼植物子葉のクロロフィル量の変化

播種後 14 日の幼植物を一定時間明所に (○—○), 暗所に (●—●), もしくは一定時間暗所に置いた後, 明所に戻した (●—○) 後, 10 枚の子葉を無作為に取り, クロロフィル量を測定した。

た上で, 暗処理によって変動を示した mRNA 種が光照射によって元のレベルに回復するかどうかを調べた。poly (A)⁺RNA の *in vitro* における翻訳活性は暗処理もしくはその後の光照射によって影響を受けず, 高い活性を示した。

オートラジオグラム上に現われたスポットの黒化度の変化から, 24 時間の暗処理によって中酸性では 16 種 (Fig. 9 A), 塩基性では 4 種 (Fig. 9 B), 合計 20 種のポリペプチドが増加していることがわかった。したがって, これらのポリペプチドをコードする mRNA の相対的な量が 24 時間の暗処理によって増加したと考えられる。この 20 種のポリペプチドのうち 17 種が 6 時間の光照射によって暗処理前のレベルに戻り, 24 時間の光照射後にはすべて暗処理前のレベルに回復した。このことから, これらのポリペプチドをコードする mRNA 量は光によって負に, かつ, 可逆的に調節されていると考えられる。

また, 光によって正に調節されている mRNA 種も認められた。すなわち, 24 時間の暗処理で減少を示した 8 種の mRNA は, その後の 24 時間の光照射によって暗処理前のレベルに回復した。この代表的な例は RuBPCase SSu の前駆体の mRNA である (Fig. 9 B, 矢尻印で示したポリペプチド)。

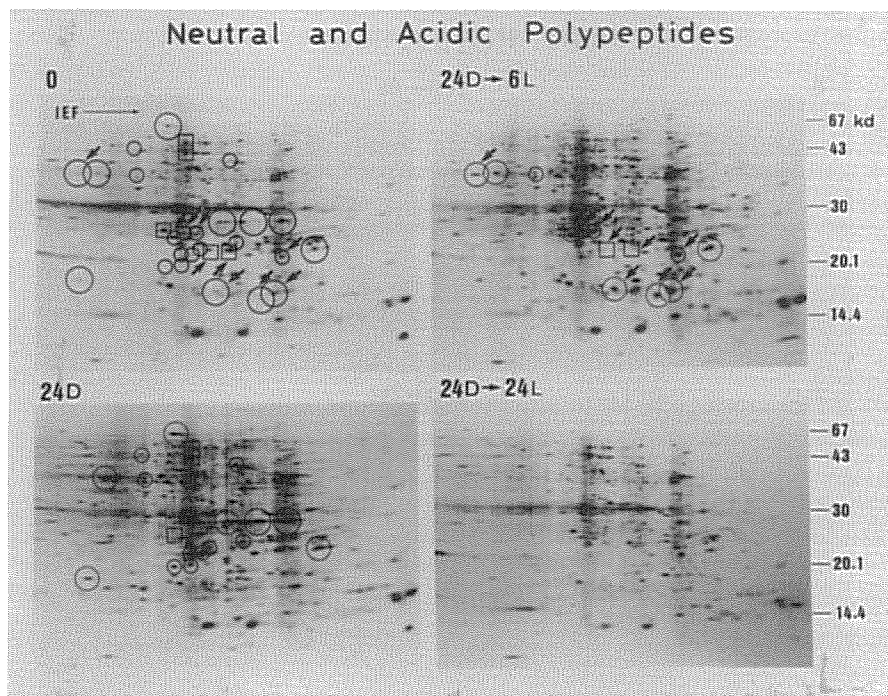


Fig. 9 A. 24 時間暗処理後，光照射下に戻した幼植物子葉中の mRNA 種の変化：中酸性の翻訳産物

播種後 14 日の幼植物子葉 (0)，24 時間暗処理をほどこした幼植物子葉 (24 D)，24 時間暗処理の後，6 時間光照射した子葉 (24 D → 6 L)，24 時間暗処理の後，24 時間光照射した子葉 (24 D → 24 L) から poly (A) ⁺RNA を調製し，³⁵S-メチオニンを含むコムギ胚無細胞タンパク合成系で翻訳させた。各翻訳産物は，その放射活性をそろえて一次元目に IEF で分離し，二次元目は 12 % から 17 % のアクリルアミド濃度勾配をもつゲルを用いた SDS-PAGE で分離し，オートラジオグラフィによって検出した。○印または□印を付けたスポットは，0 時間に比べて増加または減少を示したポリペプチドである。また，矢印を付けたスポットは暗処理後に 6 時間の光照射した場合にのみ変化が検出されたポリペプチドである。0 時間のパネルにも，比較のため対応するポリペプチドに印を付けた。

Fig. 9 において矢印で示したスポットは暗処理した子葉に 6 時間光照射した時にのみ，一時的に増加を示したポリペプチドで，光照射を続けることにより元のレベルにまで戻った。

48 時間暗処理後の子葉細胞中の mRNA 種にたいする光照射の影響

48 時間暗処理をほどこしたことにより子葉のセネッセンスが不可逆的な過程にある幼植物に 12 時間，もしくは 48 時間光を照射し，前項と同様に mRNA 種の変化を調べた。

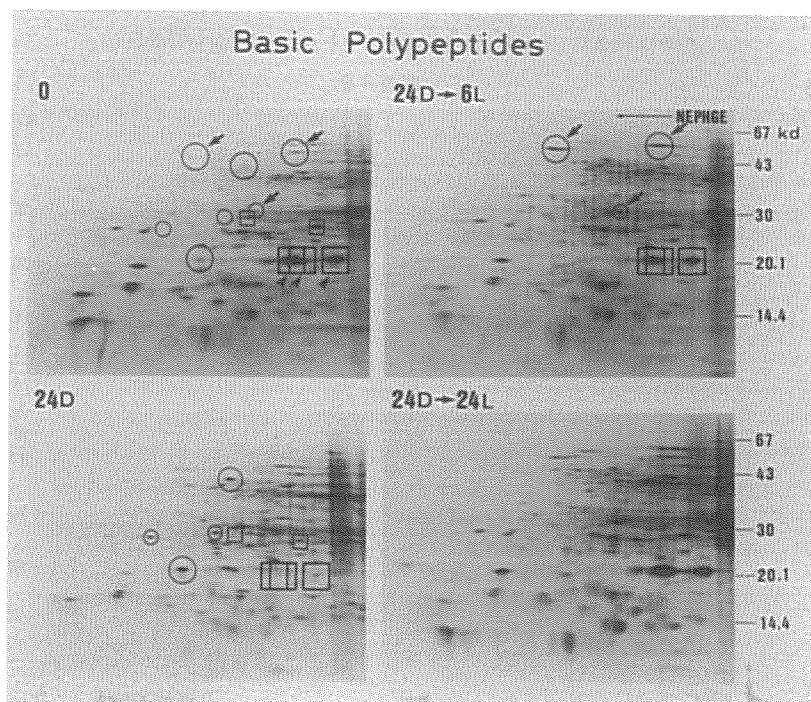


Fig. 9 B. 24 時間暗処理後、光照射下に戻した幼植物子葉中の mRNA 種の変化：塩基性の翻訳産物

Fig. 9 A と同じ試料を、二次元電気泳動の一次元目に NEPHGE で分離した。
矢尻印を付けたスポットは RuBPCcase SSu の前駆体である。

48 時間の暗処理によって中酸性では 17 種 (Fig. 10 A), 塩基性では 4 種 (Fig. 10 B), 合計 21 種の mRNA が増加し, 中酸性で 13 種 (Fig. 10 A), 塩基性では 5 種 (Fig. 10 B), 合計 18 種の mRNA が減少していることがわかった。このような変化を示した mRNA 種の光照射による回復は, 24 時間暗処理を行なった場合よりもかなり遅れており, 12 時間の光照射では, 一部の mRNA 種しか暗処理前のレベルに回復しなかった。48 時間の暗処理によって増加を示した mRNA 種の約半数は, その後の 48 時間の光照射によって暗処理前のレベルに戻っているが, 9 種の mRNA は光再照射後も高いレベルを保っており, 暗処理前の量までは減少しなかった。この 9 種の mRNA のうちの 3 種は, 24 時間暗処理を行なった子葉においてもその増加が認められたが, 光照射によって元のレベルに戻ることが観察された (Fig. 10 A, 白ヌキの矢印)。また, 暗処理によって減少を示した mRNA 種は, 48 時間の光照射によってすべて暗処理前のレベルに回復している。

光の再照射によって一時的に増加を示す mRNA 種が 48 時間暗処理を行なった幼植物の子葉においても認められたが, その数は 24 時間暗処理を行なった場合に比べ, 少なくなっている (Fig. 10 A, 10 B, 矢印で示したポリペプチド)。

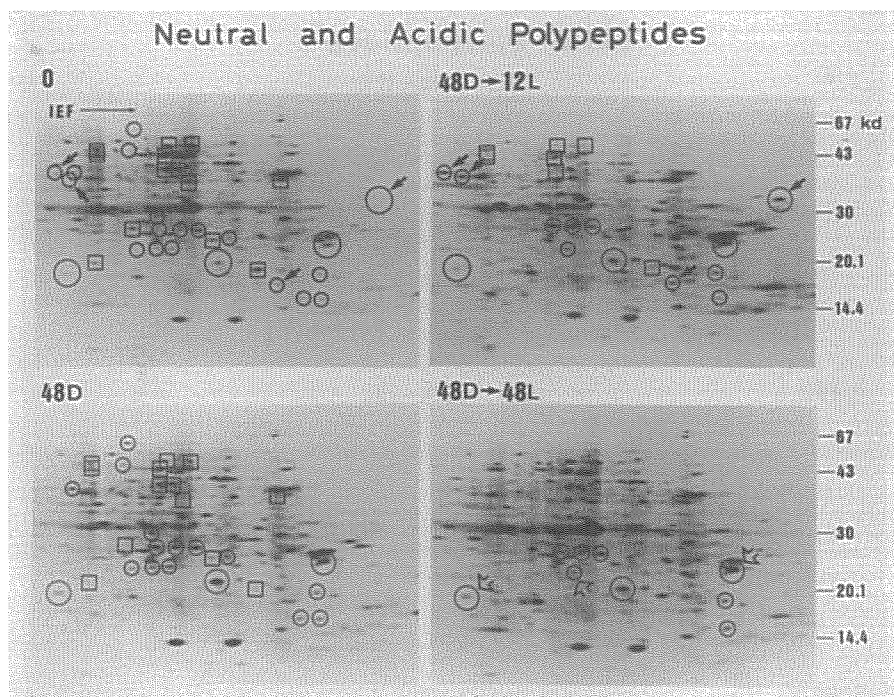


Fig. 10 A. 48 時間暗処理後、光照射下に戻した幼植物子葉中の mRNA 種の変化：中酸性の翻訳産物

播種後 14 日の幼植物子葉 (0)、48 時間暗処理をほどこした幼植物子葉 (48 D)、48 時間暗処理の後、12 時間光照射した子葉 (48 D → 12 L)、48 時間暗処理の後、48 時間光照射した子葉 (48 D → 48 L) から poly (A) ⁺RNA を調製した。翻訳反応および電気泳動は Fig. 9 A と同様である。○印または□印を付けたスポットは、0 時間に比べて増加または減少を示したポリペプチドである。また、矢印を付けたスポットは暗処理後に 12 時間の光照射した場合にのみ変化が検出されたポリペプチドである。0 時間のパネルにも、比較のため対応するポリペプチドに印を付けた。白ヌキの矢印を付けたスポットは、24 時間暗処理の場合には可逆的な変化を示したが、48 時間暗処理の場合には不可逆的な変化を示したポリペプチドである。

連続光下で長期間育てた幼植物子葉中の mRNA 種の変化

連続光下で長期間育てたハツカダイコン幼植物の子葉においてもクロロフィルの減少が見られ、ゆっくりではあるがセネッセンスが進行していることがわかる (Fig. 8)。播種後 21 日の幼植物子葉中のクロロフィル量は、14 日目の約 80 % にまで減少しており、この値は暗所に 48 時間置いた幼植物のクロロフィル量とほぼ同じである。そこで、暗所でセネッセンスを誘導した子葉で変化を示した mRNA 種が連続光下で自然にセネッセンスが進行した子葉中においても同様に変化してい

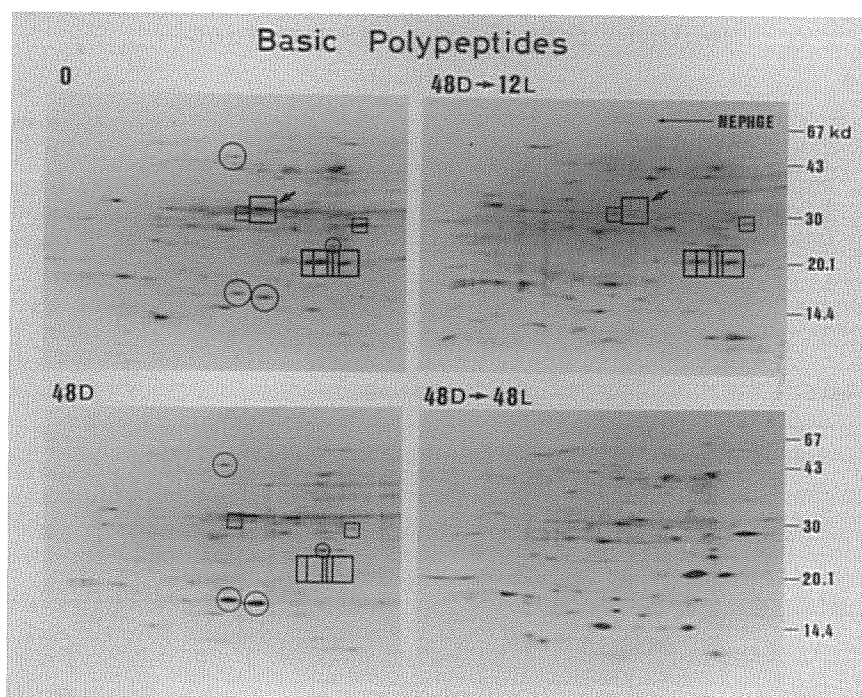


Fig. 10 B. 48時間暗処理後、光照射下に戻した幼植物子葉中の mRNA 種の変化：塩基性の翻訳産物

Fig. 10 A と同じ試料を、二次元電気泳動の一次元目に NEPHGE で分離した。
図中のマークは Fig. 10 A に準じた。

るかどうかを調べた。播種後 14 日の幼植物子葉細胞中に発現している mRNA 種に比べて、播種後 21 日の幼植物子葉では、38 種についてその相対的な蓄積量が増加、11 種について減少が観察され、7 日の生育期間でかなり変化していることが明らかになった (Fig. 11)。48 時間の暗処理によって不可逆的な増加を示した 9 種の mRNA は、すべて播種後 21 日の幼植物子葉においても増加していることがわかった (Fig. 11, ★を付けた矢印)。また、48 時間の暗処理によって増加し、その後の光照射によって元のレベルに戻った 14 種の mRNA についても連続光下でセネッセンスが進行した子葉中で増加していることが認められた (Fig. 11, ★のない矢印)。

考 察

本章の実験結果から、暗処理によって変動を示す mRNA 種は、光の再照射による暗処理前の状態への回復の度合いから 3 つのグループに分類することができた。1) 光の再照射によってその蓄積量が暗処理前のレベルに戻る mRNA 種、2) 同じ処理によって元のレベルに戻らないもの、3) 暗処理によっては変動しないが、その後の光の再照射によって一時的に変動するもの、である。

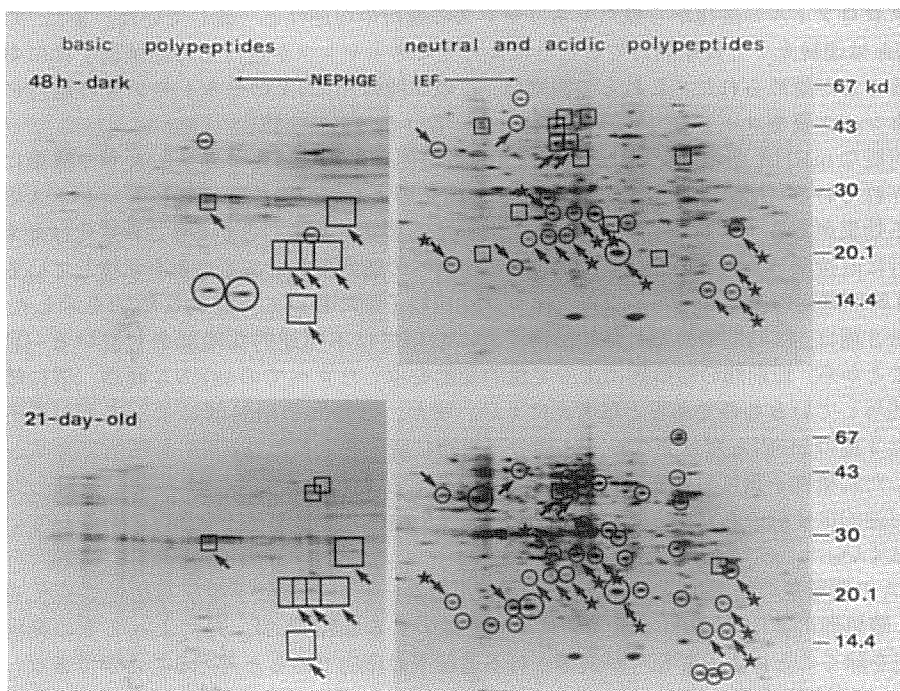


Fig. 11. 明所でセネッセンスを進行させた幼植物子葉中の mRNA 種の変化

播種後 21 日のセネッセンスが進行した幼植物子葉 (21-day-old), および, 播種後 14 日の幼植物を 48 時間暗所に置いてセネッセンスを進行させた子葉 (48 h-dark) から poly (A)⁺RNA を調製した。翻訳反応および電気泳動は Fig. 9 と同様である。○印または□印を付けたスポットは, 播種後 14 日の幼植物子葉 (Fig. 9, 10 の 0 時間) に比べて増加または減少を示したポリペプチドである。★を付けた矢印は, Fig. 10 において不可逆的な変化を示したポリペプチド, ★のない矢印は可逆的な変化を示したポリペプチドである。

ただし, 1) と 2) に属する mRNA 種は, はっきりとは区別できない。というのは, 24 時間暗処理の場合には可逆的な増加を示した 3 種の mRNA が, 48 時間暗処理を行なった子葉中においては不可逆的な増加を示したからである (Fig. 9 A, 10 A)。

24 時間暗処理を行なった幼植物子葉におけるクロロフィルの減少は, 光照射によってほとんど完全に阻害されるが, 48 時間暗処理を行なった場合には前者ほど効果的な抑制は見られなくなった (Fig. 8)。つまり, 暗処理開始後 24 時間の子葉のセネッセンスは, 光によってその進行が抑制されるという半可逆的な過程にあり, 48 時間後においてはもはや抑制されなくなるという不可逆的な過程にあると考えられる。暗処理によって増加する mRNA 種のうち 9 種については, 24 時間の暗処理では光照射によって暗処理前のレベルにまで減少するが, 48 時間後においては, もはや元のレベルに戻らなくなった (Fig. 9 A, 10 A)。このような時間経過に伴う mRNA の量的変動の可

逆性はクロロフィルの変化から見たセネッセンスの進行の可逆性と一致していた。また、この9種の mRNA は連続光下で長期間育てることによってセネッセンスが進行した幼植物子葉においても増加することが認められた。これらの観察は、この9種の mRNA がセネッセンスの進行に深く関与するタンパク質をコードしている可能性を示している。

翻訳可能な mRNA 種の可逆的な変化は、短期間暗処理を行なったマカラスムギの緑葉においても観察されている (Malik 1987)。Malik は、この光による可逆的な変化がセネッセンスの進行を抑制する効果があるサイトカイニン存在下においても観察されることから、この変化はセネッセンスの進行に直接関与したものではなく、むしろ暗所への適応現象であることを示唆している。ところが、24 時間暗処理を行なったハツカダイコン幼植物子葉において可逆的な増加を示した mRNA 種のうち3種は、48 時間暗処理した幼植物子葉においては不可逆的な増加をしている (Fig. 9 A, 10 A) ことから、短期間の暗処理によって量的変動を示したすべての mRNA 種が、単に暗所への適応に関与しているものであるとは考えにくい。また、48 時間の暗処理によって不可逆的な増加を示した9種の mRNA だけでなく、14 種の可逆的な変化を示した mRNA も明所でセネッセンスが進行した幼植物子葉において同様に変化していることから考えても、48 時間暗処理した子葉において可逆的な変動をしたからといってその mRNA 種がセネッセンスの進行に寄与していないとは言いにくい。

mRNA の蓄積量の増減は必ずしもその mRNA をコードする遺伝子の転写活性の変化を意味しないが、暗処理によって増加し、光照射によって減少する mRNA は、光によってその発現が抑制され、光を除くことによって転写が誘導される遺伝子の産物であると考えることができる。黄化植物においては NADPH-プロトクロロフィリドオキシドレダクターゼ (Apel 1981) およびフィトクローム (Colbert et al. 1983) の遺伝子の発現が光によって負に調節されていることが知られている。上記の実験結果は、これらの遺伝子の他にも、緑葉細胞中で夜間に発現し、昼はその発現が抑制される遺伝子が存在することを示唆するものである。

暗所で培養したパセリ (*Petroselinum hortense* Hoffm.) の培養細胞に紫外線を照射することにより、フェニルプロパノイド合成系の酵素をコードする mRNA の蓄積量が一時的に増加することが報告されている (Schröder et al. 1979)。また、エンドウの黄化植物において未同定の 17-kDa の葉緑体タンパク質をコードする mRNA が光を照射した最初の数時間の間にのみ検出されることが報告されている (Meyer & Kloppstech 1983)。ハツカダイコン幼植物の子葉において、暗処理によっては変化せず、その後の光照射によって一時的な増加を示した mRNA 種は、上記のような光にたいする一過性の発現を示す遺伝子の産物であると考えられる。

第2章および本章における実験結果から、ハツカダイコン子葉のセネッセンスに関与する遺伝子は、若い子葉においては光によってその発現が抑制されているが、加齢に伴ってその抑制機構から放たれ、明所においても発現が誘導されるようになるのではないかと考えられる。

要 約

- 1) 24 時間暗処理したハツカダイコン幼植物を光照射下に戻した場合、その後の子葉中のクロロフィル量の変動は明所に置いたままのものとなんら変わりが無い。したがってこの子葉はセネッセンスの可逆的な過程にあると考えられる。また、48 時間暗処理した幼植物子葉中のクロロフィル量は光照射下に戻すとその後の減少速度は遅くなるが、引き続いて減少する。したがって48 時間後にはすでにセネッセンスの不可逆的な過程にはいったと考えられる。

- 2) 24時間の暗処理によって変化が認められた mRNA 種は、その後の光照射によってその蓄積量がすべて暗処理前のレベルに戻った。
- 3) 48時間の暗処理によって変化が認められた mRNA 種は、その後の光照射によってそのほとんどの蓄積量が暗処理前のレベルに戻ったが、暗処理によって増加した 9 種の mRNA は元のレベルに戻らず、増加を示した。このうち 3 種は 24 時間暗処理をほどこした子葉では可逆的な変化を示したものであった。
- 4) 14 日間連続光下で育てたハツカダイコン幼植物子葉中の mRNA 種に比べて、播種後 21 日の幼植物子葉中では、38 種の mRNA の相対的な蓄積量が増加、11 種が減少しており、発現している遺伝子が大きく変化していることが明らかになった。ここで変化を示した mRNA 種の多くは暗所において変化を示した mRNA 種と一致し、また、光照射によって不可逆的な量的変動を示した mRNA 種だけでなく、可逆的な量的変動を示した mRNA 種も含んでいた。

第4章 葉緑体に取り込まれる細胞核遺伝子産物の変動

序 論

葉緑体は緑葉細胞の物質代謝の中心的な役割を果たしており、また、緑葉のセネッセンスの進行に伴い退化、崩壊し、構成するタンパク質は緑葉細胞から転流される窒素の最大の供給源となっている。このセネッセンスに伴う葉緑体の退化と崩壊が細胞核の遺伝情報に支配されている機構を知る一つの方法として、第2章および第3章で見出されたセネッセンスに伴って新たに合成されるタンパク質のうち、葉緑体に輸送される細胞核の遺伝子産物を選び出すことを本章の目的とした。すなわち、ハツカダイコン幼植物の子葉から無傷葉緑体を単離し、そこに取り込まれるタンパク質をコードする細胞核由来の mRNA 種のセネッセンスに伴う変化について述べる。

葉緑体に輸送される細胞核支配のタンパク質を調べるには、二つの方法が考えられる。一つは葉緑体におけるタンパク合成を特異的に抑制する阻害剤を緑葉に与えておいてから放射性アミノ酸で *in vivo* で標識した後、葉緑体を単離する方法である。しかし、タンパク質合成阻害剤は、その特異性や緑葉細胞への透過性などに問題があり、また大量の放射性同位元素を扱わねばならないことから、良い方法であるとは言えない。二つめの方法として、細胞核由来の mRNA である poly (A) + RNA の無細胞タンパク合成系における翻訳産物を単離した葉緑体に試験管内で輸送させる系が確立されており (Grossman et al. 1980, 1982)、この系を利用することを考えた。

試験管内において poly (A) + RNA の翻訳産物を葉緑体に輸送させるためには生物学的な活性を持った無傷葉緑体を単離することが必要である。そこでまず、単離した無傷葉緑体の酵素発生能およびタンパク質合成能を指標として、ハツカダイコンの子葉から生物学的な活性を十分に保っている無傷葉緑体を単離する方法を検討した。

セネッセンスの進行に伴って細胞核遺伝子の発現に変化が起こり、新しいタンパク質が葉緑体へ輸送されるようになるだけでなく、葉緑体自身のタンパク質輸送の選択性に変化が起こっている可能性も考えられる。そこで、セネッセンスが進行したハツカダイコン幼植物の子葉から無傷葉緑体を単離し、翻訳産物の輸送を行なわせることを考えた。

材料および方法

植物材料およびセネッセンスの誘導

第2章と同様に連続光下で育てた播種後14日のハツカダイコン幼植物から子葉を切り取り、暗所に置いてセネッセンスを誘導した。この子葉から RNA の抽出および無傷葉緑体の調製を行なった。また、12時間の明暗周期 (明: 5,500 lux の白色光下, 20℃, 暗: 15℃) で育てた播種後9日の若い子葉からも無傷葉緑体の単離を行なった。

poly (A) + RNA の調製および無細胞タンパク合成

約400対の子葉から、第2章に述べたグアニジン塩酸/フェノール法で RNA を抽出した。poly (A) + RNA は oligo (dT) cellulose column chromatography (Aviv & Leder 1972) によって調製し、³⁵S-メチオニンを含む 100 μl のコムギ胚無細胞タンパク合成系を用いて Watanabe & Price

(1982) の条件で翻訳反応を行なった。反応後、4 μ l の 0.1 M DTT, 10 μ l の 0.2 M L-methionine, 30 μ l の 5 倍濃度の Sorbitol-HEPES (下記参照) を加えて 100,000 xg, 1 時間の遠心を行ないリボソームを除いた。

無傷葉緑体の調製

子葉は 20 分間流水で洗い、ペーパータオルで水気を除いた。無傷葉緑体の調製は Morgenthaler & Mendiola-Morgenthaler (1976) の方法にしたがって行なった。約 80 g の子葉に 240 ml の GRM (0.33 M sorbitol, 50 mM HEPES-NaOH (pH 6.8), 1 mM $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$, 2 mM EDTA, 1 mM MgCl_2 , 1 mM MnCl_2 , 5 mM isoascorbic acid, 1 mM DTT, 1.0 % (w/v) BSA) および生重量の 5 % (w/w) の Polyclar AT を加え、市販のミキサーを用いて短時間破碎した。破碎液を二重のミラクロスでろ過し、そのろ液から 3,000 xg, 5 秒の遠心によって粗葉緑体を集め、少量の GRM に懸濁した。GRM で調製した 20-50-80 % の Percoll (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala) 不連続濃度勾配上に粗葉緑体を重層し、日立 RPS-10 のローターを用いて 10,000 rpm で 5 分間遠心し、50 % と 80 % の界面に沈降した無傷葉緑体の画分を集めた。これを 4 倍量の GRM で希釈し、3,000 xg, 5 秒の遠心によって無傷葉緑体を集め、Sorbitol-HEPES (0.33 M sorbitol, 35 mM HEPES-KOH (pH 8.3), 1.0 % (w/v) BSA) で二度洗った後、少量の Sorbitol-HEPES に懸濁した。

単離葉緑体の酸素発生能の測定

得られた粗葉緑体または無傷葉緑体を Sorbitol-Tricine (0.33 M sorbitol, 50 mM Tricine-KOH (pH 8.4)) で二度洗った後、少量の GRM に懸濁した。酸素発生能の測定はクラーク型の酸素電極 (LD 2 leaf disc electrode unit, Hansatech Ltd.) を用いて行なった。反応は pH を 7.8 にした 1 ml の GRM に 25 から 30 μ g クロロフィルを含む 0.1 ml の葉緑体懸濁液および NaHCO_3 を 5 mM になるように加えることによって開始させた。反応は赤色光の照射下、25 $^{\circ}\text{C}$ で行ない、1 ml の蒸留水中の酸素を 0.254 mole として計算した。

単離無傷葉緑体におけるタンパク合成

単離無傷葉緑体におけるタンパク合成は Nivison & Jagendorf (1984) の方法に基づいて行なった。反応液の組成は、0.33 M sorbitol, 35 mM HEPES-KOH (pH 8.3), 0.2 mM Na_2HPO_4 , 1.2 mM MgCl_2 , 0.6 mM EDTA, 1.0 % (w/v) BSA, メチオニンを除くそれぞれ 50 μ M の 19 種のアミノ酸および 7 μ M の ^{35}S -メチオニンである。なお、 K^+ , Na_2HPO_4 , Mg^{2+} , EDTA およびアミノ酸の濃度を種々検討した上で最適条件を決定した。反応は赤色光下、25 $^{\circ}\text{C}$ で振盪しながら行なった。反応後、葉緑体を 1,500 xg, 30 秒の遠心で集め、Sorbitol-Tricine で二度洗った後、30 μ l の 10 mM NaPPi を加えて葉緑体を壊した。15,000 xg, 10 分の遠心によって得られた上清をストロマ画分とし、沈澱は二度 10 mM NaPPi で洗ってチラコイド画分とした。

翻訳産物の葉緑体への輸送

翻訳産物の無傷葉緑体への輸送は Grossman ら (1982) の方法に基づいて行なった。反応は、熱酸不溶性画分の放射活性をそろえた翻訳産物 (約 5.0×10^7 cpm) および 100 から 200 μ g クロロフィル量の葉緑体懸濁液に Sorbitol-HEPES を加えて 420 μ l とし、赤色光下、25 $^{\circ}\text{C}$ で 1 時間振盪しながら行なった。反応後、1,500 xg, 30 秒の遠心によって葉緑体を集め、Sorbitol-HEPES で洗った

後、180 μ l の Sorbitol-HEPES に懸濁した。これに10 μ l の1.8 mg/ml thermolysin を加えて30 分間4 $^{\circ}$ C に置くことにより、主に葉緑体外包膜表面に非特異的に吸着した翻訳産物を分解した (Soll & Buchanan 1983)。9 μ l の0.1 M EGTA を加えて thermolysin を不活性化した後、Sorbitol-HEPES で調製した40 % Percoll 上に重層し、トミー TMS-1 のローターを用いて9,000 rpm、5 分の遠心によって再度無傷葉緑体のみを沈降させた。得られた無傷葉緑体を、BSA を抜いた Sorbitol-HEPES で二度洗った後、30 μ l の10 mM NaPPi を加えることによって破壊し、ここから5 μ l を取り、クロロフィルの定量を行なった。破壊した葉緑体の懸濁液を15,000 xg で10 分間遠心し、得られた上清をストロマ画分とした。また、沈澱は10 mM NaPPi で二回洗ってチラコイド画分とした。

包膜画分の調製

Douce & Joyard (1982) の方法にしたがって、単離無傷葉緑体から包膜を調製した。翻訳産物の輸送反応後、クロロフィル量300 μ g の葉緑体を Sorbitol-HEPES で洗って葉緑体に取り込まれなかった翻訳産物を除いた後、400 μ l の swelling medium (50 mM Tricine-KOH (pH 7.8), 20 mM $MgCl_2$) に懸濁し、水中に10 分間置くことにより、包膜を遊離させた。この全量を、30 % (w/v) および20 % (w/v) のショ糖を含む swelling medium の不連続密度勾配上に重層し、日立 RPS 55 T-2 ローターを用いた25,000 rpm、1 時間の遠心により、30 % および20 % ショ糖の界面に包膜を沈降させた。この画分を4 倍容の swelling medium で希釈し、100,000 xg、1 時間の遠心によって包膜を集め、30 μ l の2 倍濃度の SDS-sample buffer に懸濁した。

電気泳動およびフルオログラフィー

由来する無傷葉緑体のクロロフィル量で一定にそろえたストロマ画分に15 mg の尿素、1.2 μ l の NP-40、1.5 μ l の40 % Biolyte (pH 3-10)、1.5 μ l の β -mercaptoethanol および適量の水を加えて30 μ l とした。この全量を pH 4-8 の IEF ゲルに乗せ、第2 章に述べた方法で二次元電気泳動を行なった。SDS-sample buffer に溶かしたチラコイド画分は遠心によって不溶物を除いた後、クロロフィル量をそろえて SDS-PAGE によって分離した。葉緑体中に移行した翻訳産物はフルオログラフィーによって検出した。

クロロフィルの定量

クロロフィルの定量は Arnon (1949) の方法にしたがって行なった。

結 果

生物学的な活性を持った無傷葉緑体の単離

葉緑体に取り込まれる細胞核支配の翻訳産物を調べるためには、ハツカダイコン子葉から生物学的な活性を持った無傷葉緑体を単離することが必須である。そこでまず、明所で育てた播種後14 日のハツカダイコン子葉から無傷葉緑体を単離し、生物学的な活性の指標の一つとしてその酸素発生能を調べた (Table 1)。

ハウレンソウを材料として確立されている方法にしたがって、0.33 M sorbitol、50 mM HEPES-NaOH (pH 6.8)、2 mM EDTA、1 mM $MgCl_2$ 、1 mM $MnCl_2$ 、1 mM $Na_4P_2O_7$ 、5 mM ascorbic acid を含む緩衝液で子葉を破碎し、遠心で集めた粗葉緑体を Sorbitol-Tricine で洗った。この粗

Table. 1. 単離葉緑体の酸素発生能におよぼす葉組織破碎液の組成

葉緑体標品		破 碎 液	酸素発生能
ハウレンソウ	無傷葉緑体	GRM	30.0 μ moles/mgChl/h
ハツカダイコン	粗葉緑体	GRM	0.0
	粗葉緑体	GRM + BSA	6.7
	無傷葉緑体	GRM + BSA	8.4
	無傷葉緑体	GRM + BSA + Polyclar AT	42.8

GRM : 0.33 M sorbitol, 50 mM HEPES-KOH (pH 6.8), 2 mM EDTA, 1 mM MgCl_2 ,
1 mM MnCl_2 , 1 mM $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$, 5 mM ascorbic acid

葉緑体は位相差顕微鏡による観察からその約 50 % が無傷葉緑体であったが、酸素発生能は全く失っていた。ハツカダイコンの種子には貯蔵脂肪が多く含まれており、その子葉を材料としているため、発芽過程で生じた遊離脂肪酸が単離葉緑体の酸素発生を阻害している可能性が考えられた。そこで、子葉を破碎する際に遊離脂肪酸の吸着剤としてウシ血清アルブミン (BSA) を 0.5 % (w/v) の濃度で加えたところ、その単離葉緑体からわずかながら酸素発生が認められた。この値は、Ludox の密度勾配遠心によって精製した無傷葉緑体を用いても改善されなかった。また、葉緑体を調製する際に子葉組織に含まれるポリフェノールが酸化され、単離した葉緑体の機能に悪影響を及ぼしている可能性が考えられた。そこでさらにポリフェノールの吸着剤である Polyclar AT を子葉の生重量の 5 % の割合で子葉の破碎液に加えたところ、ハウレンソウ葉緑体と同程度の酸素発生能を持つ無傷葉緑体を得ることができた。

葉緑体の生物学的な活性のもう一つの指標として、光をエネルギー源としたタンパク合成能を調べた。酸素発生能の検討から改善した GRM を用いて単離した、酸素発生能をもつ無傷葉緑体を Sorbitol-Tricine に懸濁し、Morgenthaler & Mendiola-Morgenthaler の方法により光をエネルギー源とした *in organello* translation を行なわせたところ、60 分後の熱酸不溶性画分への放射活性の取り込みは初めの約 3 倍と低いことがわかった。また、電気泳動によって反応後の葉緑体タンパク質を分離し、フルオログラフィーを行なったところ、CBB で染色された葉緑体タンパク質に対応するバンドは検出できなかった。そこで、Fish & Jagendorf (1982 a), Nivison & Jagendorf (1984) の報告をもとに、ハツカダイコン子葉から単離した無傷葉緑体による *in organello* translation の最適条件を検討した。

「材料および方法」に述べた方法で単離した無傷葉緑体を用いてタンパク合成を行なわせる際に標識アミノ酸として使用するメチオニンを除く 19 種のアミノ酸混液を加えることによりそのタンパク合成能が約 2 倍に上昇し、その至適濃度は各アミノ酸について 50 μ M であった。無機リン酸 (Na_2HPO_4) は 0.2 mM から 0.4 mM にかけて比較的広い範囲の至適濃度を持ち、熱酸不溶性画分への放射活性の取り込みを約 1.5 倍に促進した。単離無傷葉緑体を Mg^{2+} を全く含まない緩衝液に懸濁すると葉緑体中から Mg^{2+} が失われ、それに伴ってタンパク合成能が低下すること、単離無傷葉緑体中の Mg^{2+} 濃度を一定に保つためには EDTA でキレートされた Mg^{2+} およびキレートされない遊離の Mg^{2+} が必要であることが報告されている (Deshaies et al. 1984)。そこでハツカダイコンについて EDTA でキレートされた Mg^{2+} の至適濃度を調べたところ、0.6 mM で単離無傷葉緑

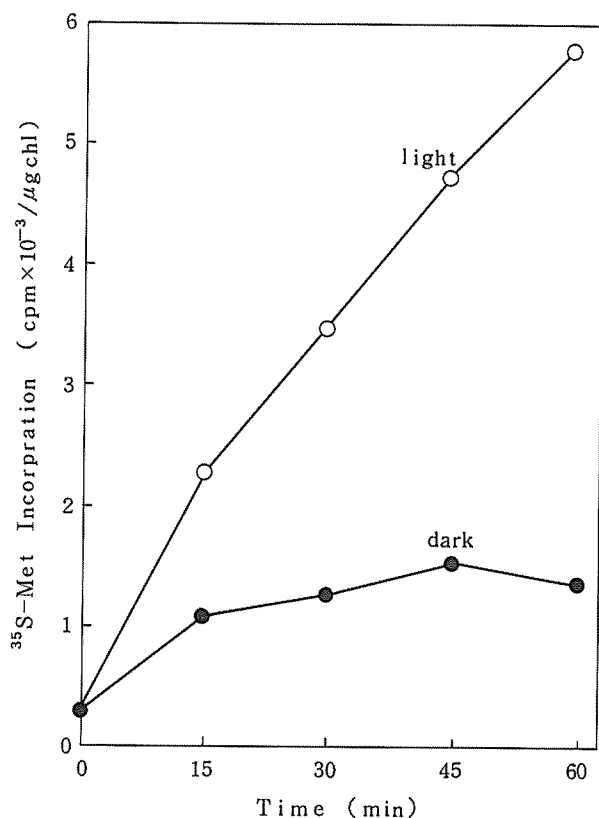


Fig. 12. ハツカダイコン子葉から単離した無傷葉緑体における
光に依存したタンパク合成

子葉から単離したクロフィル量 $50 \mu\text{g}$ の無傷葉緑体を、至適条件の葉緑体タンパク合成用反応液 (0.33 M sorbitol, 35 mM HEPES-KOH (pH 8.3), 0.6 mM EDTA, 1.2 mM MgCl_2 , 0.2 mM Na_2HPO_4 , 0.5 % (w/v) BSA, 50 μM each of 19 amino acids (-Met)) に懸濁し、20 μCi の ^{35}S -メチオニンを加えて 300 μl とした。これを赤色光下 (light) またはアルミホイルで遮蔽した暗黒下 (dark), 25°C で振盪しながら 15 分ごとに 20 μl ずつ取り、酸不溶性画分への放射活性の取り込みを調べた。

体のタンパク合成能が約 2 倍に上昇した。この条件下でさらに遊離の Mg^{2+} を加えてその至適濃度を調べたところ、0.6 mM でさらに約 2 倍にタンパク合成能が上昇した。

以上のようにして決定した条件でハツカダイコン子葉から単離した無傷葉緑体のタンパク合成速度は約 60 分間にわたり一定に保たれ、 ^{35}S -メチオニンの熱酸不溶性画分への取り込みは初めの約 20 倍という、高いタンパク合成活性を示した (Fig. 12)。ここで得られた無傷葉緑体による翻訳産

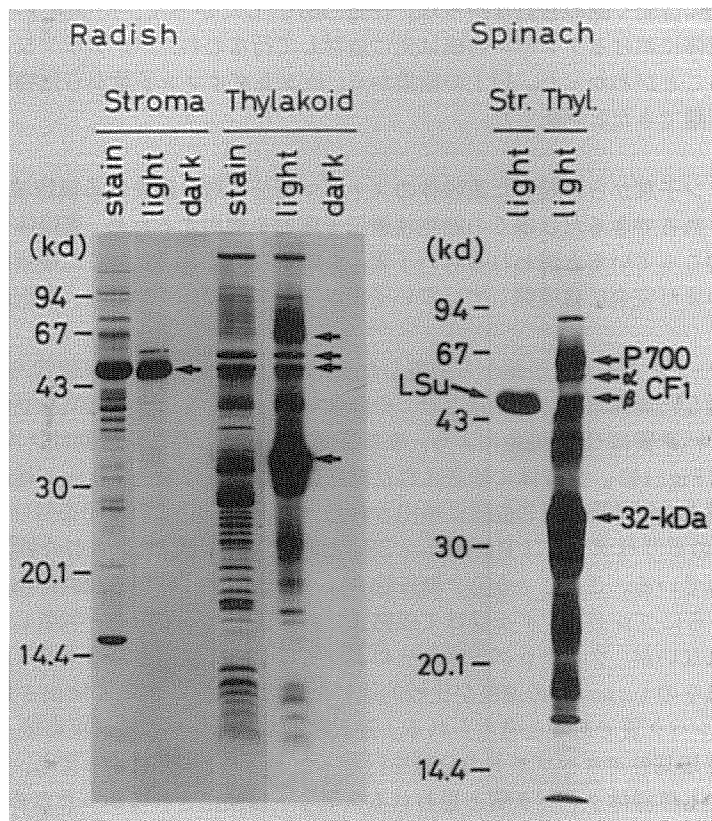


Fig. 13. ハツカダイコン子葉から単離した無傷葉緑体において合成されるポリペプチド

Fig. 12 と同じ条件で 60 分間赤色光下 (light) で、もしくは暗黒下 (dark) で反応させた後、葉緑体をストロマおよびチラコイド画分に分け、SDS-PAGE によってポリペプチドを分離し、フルオログラフィーによって単離無傷葉緑体内で合成されたポリペプチドを検出した。ハツカダイコンについては $3\mu\text{g}$ 、ホウレンソウについては $5\mu\text{g}$ クロロフィル量の葉緑体を電気泳動に供した。ストロマ画分の矢印は RuBPCase LSu, チラコイド画分の矢印は上から、光化学系 I 反応中心の P 700 アポタンパク質, CF1 の α および β サブユニット, 光化学系 II の 32-kDa タンパク質である。lane 1 および 4 は、ハツカダイコン葉緑体のストロマおよびチラコイド画分のポリペプチドの染色像である。

物を SDS-PAGE で分離したところ、染色によって検出された葉緑体タンパク質に対応した位置に放射活性が見られた。また、これはホウレンソウ緑葉から単離した無傷葉緑体の翻訳産物によく一致するものであった (Fig. 13)。エネルギー源としての光を照射せずに 60 分間翻訳反応を行なわせると、初めの約 3 倍の放射活性が熱酸不溶性画分に取り込まれたが (Fig. 12), その産物は

フルオログラム上には全く認められなかった。(Fig. 13)。したがって、ハツカダイコン子葉から単離した無傷葉緑体におけるタンパク合成は光に依存して行なわれ、バクテリアなどの混在による寄与は無視できることがわかった。以上の結果から、ハツカダイコン子葉から生物学的な活性を持つ無傷葉緑体を単離できたと判断した。

若いハツカダイコン子葉から単離した葉緑体のストロマ画分に取り込まれる細胞核の遺伝子産物

葉緑体に輸送されるできるだけ多くの細胞核遺伝子産物を検出するため、葉緑体へのタンパク質の輸送が盛んに起こっていると思われる若い子葉、すなわち明暗周期で育てた播種後9日のハツカダイコン幼植物のまだ完全には展開していない子葉から無傷葉緑体を単離し、翻訳産物の輸送を行なわせた。

播種後14日のハツカダイコン子葉から調製した poly (A)⁺RNA からの試験管内翻訳産物をこの若い子葉から単離した無傷葉緑体に輸送させ、そのストロマ画分を二次元電気泳動によって展開した。ストロマタンパク質はCBB染色により、また葉緑体に移行した翻訳産物はフルオログラフィーにより検出した (Fig. 14)。葉緑体に輸送された翻訳産物の多くは染色によって検出されたポリペプチドとその等電点、分子量が同じ位置に検出された (32種, Fig. 14の矢印を付けたスポット)。約15 kDaの3種のポリペプチドはRuBPCase SSuと考えられるが、輸送された翻訳産物も全く同じ位置に泳動されている。このことから、無細胞タンパク合成系における翻訳産物は葉緑体内に正しく輸送され、さらにプロセッシングを受けて成熟タンパク質になっていると判断した。CBBによる染色では検出されないが、フルオログラフィーによってはじめて検出されるスポットも数多く認められた。これらはそのturnoverの速度が比較的速いために、染色によって検出されるほど葉緑体内に蓄積しないタンパク質であると考えられる。翻訳産物の葉緑体への輸送反応後、NEPHGE/SDS-PAGEによって塩基性ポリペプチドの分離を行なったところ、染色によっても、またフルオログラフィーによっても葉緑体タンパク質と思われるスポットは検出されなかったため、以後の実験においてはIEF/SDS-PAGEによってのみ葉緑体タンパク質の分離を行なった。

子葉から調製した poly (A)⁺RNA の試験管内翻訳産物のうち、若い子葉から単離した無傷葉緑体のストロマ画分に輸送されるもののセネッセンスに伴う変化を調べた (Fig. 15)。葉緑体のストロマ画分に輸送される多くの翻訳産物はセネッセンスの進行に伴って減少した。ところが、12時間暗処理した子葉の poly (A)⁺RNA の翻訳産物を用いた場合には33種、24時間の場合31種、48時間の場合31種、72時間では21種と、逆にセネッセンスの進行に伴って輸送される量が相対的に増加するポリペプチドが認められた (Fig. 15, ○を付けたスポット)。以上の結果から、葉緑体に輸送されるタンパク質をコードする mRNA はその多くがセネッセンスの進行に伴って減少してゆくが、一時的にもしくは72時間後まで増加するものも数多く存在することがわかった。

セネッセンスが進行した葉緑体のストロマ画分に取り込まれる細胞核遺伝子の産物

前項の実験では、できるだけ多くの細胞核遺伝子産物のセネッセンスに伴う変化を調べるため、若い子葉から調製した葉緑体を用いたが、セネッセンスを起こした子葉細胞では葉緑体自身のタンパク質輸送系に変化が起こり、葉緑体に取り込むタンパク質の種類に変化が生じる可能性も考えられる。そこで、連続光下で育てた播種後14日のハツカダイコン子葉を24時間暗処理し、そこから単離した無傷葉緑体を用いて翻訳産物の輸送実験を行なった (Fig. 16)。

24時間暗処理をほどこした子葉から調製した無傷葉緑体への翻訳産物の輸送効率、若い子葉の葉緑体を用いた場合の約25%と低くなっている。ところが、若い子葉の葉緑体よりも相対的な

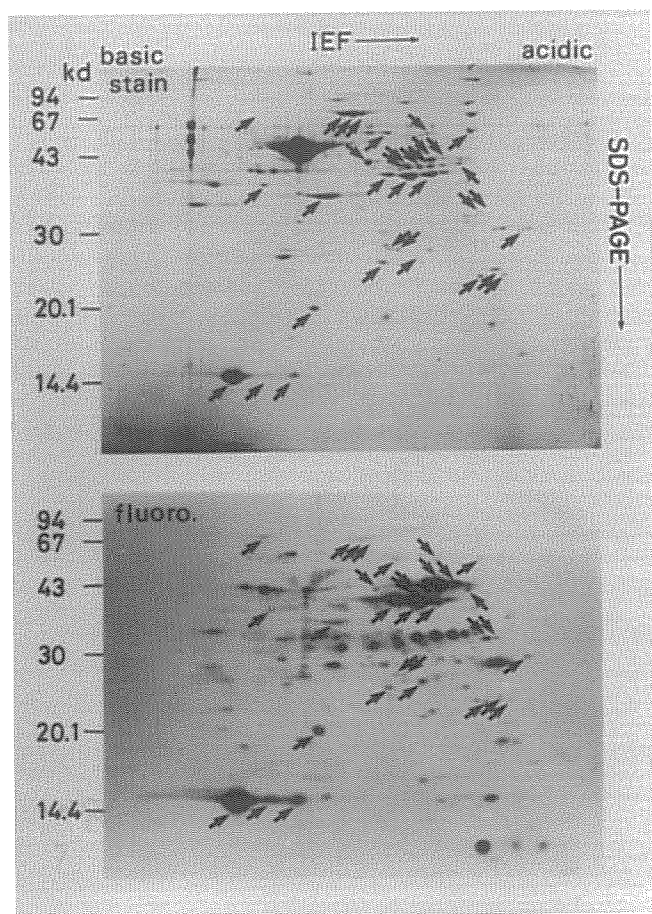


Fig. 14. ハツカダイコン子葉から単離した葉緑体のストロマ画分に
に輸送される poly (A)⁺RNA から翻訳産物

播種後9日の若い子葉から単離した無傷葉緑体に、播種後14日の子葉から調製した poly (A)⁺RNA のコムギ胚無細胞タンパク合成系における翻訳産物を輸送させた後、そのストロマ画分を O'Farrell の二次元電気泳動法で分離した。ストロマ画分のポリペプチド (stain) は染色によって、試験管内でストロマに輸送されたポリペプチド (fluoro.) フルオログラフィーによって検出し、両者に対応するスポットに矢印を付けた。

輸送効率が高くなっているか、もしくは若い子葉の葉緑体では検出されなかったポリペプチドが複数認められた (Fig. 16, 矢印を付けたスポット)。

葉緑体のストロマ画分に輸送される翻訳産物の多くは、若い子葉の葉緑体を用いた場合と同様にセネッセンスの進行に伴って減少している。逆に0時間の子葉の poly (A)⁺RNA から翻訳産物に

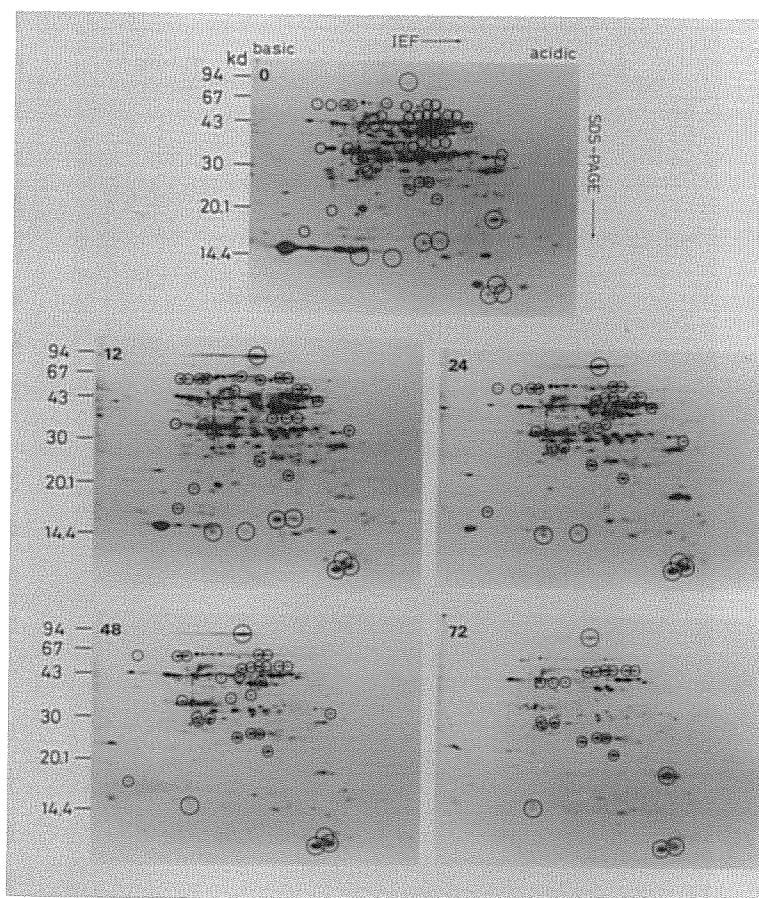


Fig. 15. 若い子葉から単離した葉緑体のストロマ画分に輸送される細胞核支配タンパク質のセネッセンスに伴う変化

播種後9日の子葉から単離した無傷葉緑体に、暗処理によってセネッセンスを進行させた子葉から調製した poly (A)⁺RNA のコムギ胚無細胞タンパク合成系における翻訳産物を輸送させた後、そのストロマ画分を O'Farrell の二次元電気泳動法で分離した。輸送された翻訳産物はフルオログラフィーによって検出した。○を付けたスポットは0時間の poly (A)⁺RNA を用いた場合に比べて増加を示したポリペプチドである。

比べて輸送が相対的に増加するポリペプチドが12時間の暗処理では14種、24時間では27種、48時間では27種、72時間では20種認められた (Fig. 16, ○を付けたスポット)。

葉緑体のチラコイド画分に取り込まれる細胞核遺伝子の産物

播種後9日のハッカダイコン子葉および播種後14日の幼植物から切り取って24時間暗処理をほ

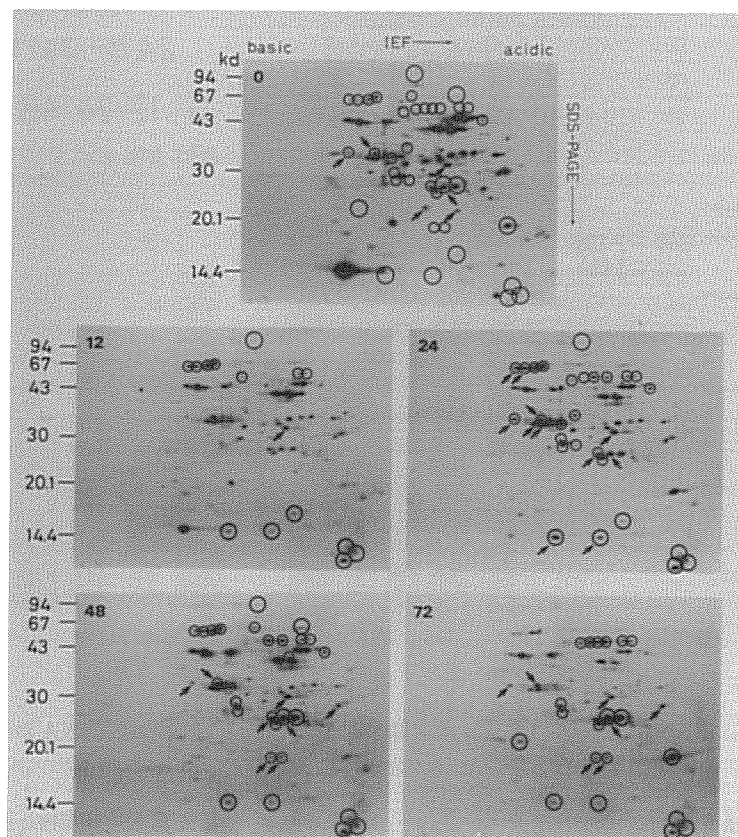


Fig. 16. 24 時間暗所に置いた子葉から単離した無傷葉緑体のストロマ画分に輸送される poly (A)⁺RNA からの翻訳産物

播種後 14 日の幼植物子葉を切り取って 24 時間暗所に置いた。この子葉から単離した無傷葉緑体に、暗処理によってセネッセンスを進行させた子葉から調製した poly (A)⁺RNA のコムギ胚無細胞タンパク合成系における翻訳産物を輸送させた。再単離した無傷葉緑体のストロマ画分を O'Farrell の二次元電気泳動法で分離し、輸送されたポリペプチドをフロオログラフィーによって検出した。○を付けたスポットは 0 時間の poly (A)⁺RNA を用いた場合に比べて増加を示したポリペプチドである。矢印を付けたスポットは、播種後 9 日の若い子葉から単離した葉緑体を用いた場合に比べて輸送され易くなったポリペプチドを示す。

どこした子葉から単離した無傷葉緑体のチラコイド画分に輸送される翻訳産物を比べ、葉緑体自身の持つタンパク質輸送能のセネッセンスに伴う変化を調べた (Fig. 17)。

若い子葉から単離した無傷葉緑体のチラコイド画分に輸送される翻訳産物の多くはストロマ画分

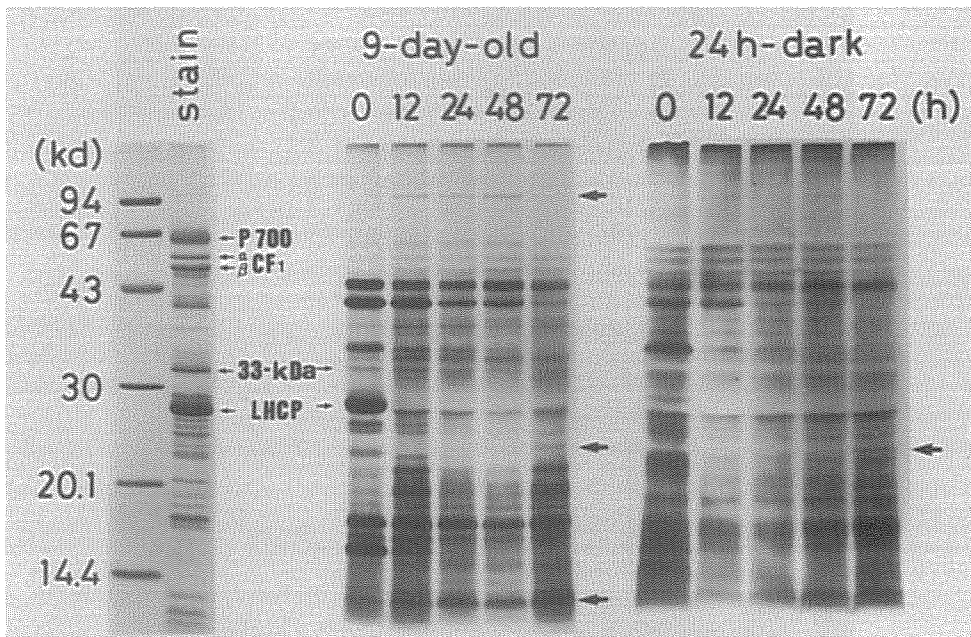


Fig. 17. 無傷葉緑体のチラコイド画分に輸送される poly (A) ⁺RNA からの翻訳産物のセネッセンスの進行に伴う変化

播種後9日の幼植物子葉 (9-day-old), または, 播種後14日の幼植物から切り取って24時間暗処理をほどこした子葉 (24 h-dark) から単離した無傷葉緑体に, 暗処理によってセネッセンスを進行させた子葉から調製した poly (A) ⁺RNA の翻訳産物を輸送させた。反応後, 再単離した無傷葉緑体のチラコイド画分を SDS-PAGE で分離し, フルオログラフィーによって輸送されたポリペプチドを検出した。矢印を付けたバンドは0時間の poly (A) ⁺RNA を用いた場合に比べて増加を示したポリペプチドである。また, 分離されたチラコイド膜タンパク質の染色像に見られる移動度から, 光化学系 I 反応中心の P 700 アポタンパク質, CF_I の α および β サブユニット, 酸素発生に関与する 33-kDa タンパク質, および, 光化学系 II の集光性クロロフィル a/b 結合タンパク質 (LHCP) と推定されるポリペプチドに印を付けた。

に輸送される産物と同様にセネッセンスの進行に伴って減少した。しかし, 12 時間から 48 時間暗処理をほどこした子葉の poly (A) ⁺RNA の翻訳産物中に一時的に増加するポリペプチドが 1 種, 暗処理開始 72 時間後まで増加し続けるものが 2 種認められた (Fig. 17, 矢印を付けたバンド)。

チラコイド画分への翻訳産物の輸送効率, 暗処理をほどこすことによりやはり若い子葉の葉緑体の約 25 % と低下した。また, 暗処理をほどこした葉緑体のチラコイド画分に輸送される翻訳産物の多くは poly (A) ⁺RNA を調製した子葉のセネッセンスの進行に伴って減少したが, セネッセ

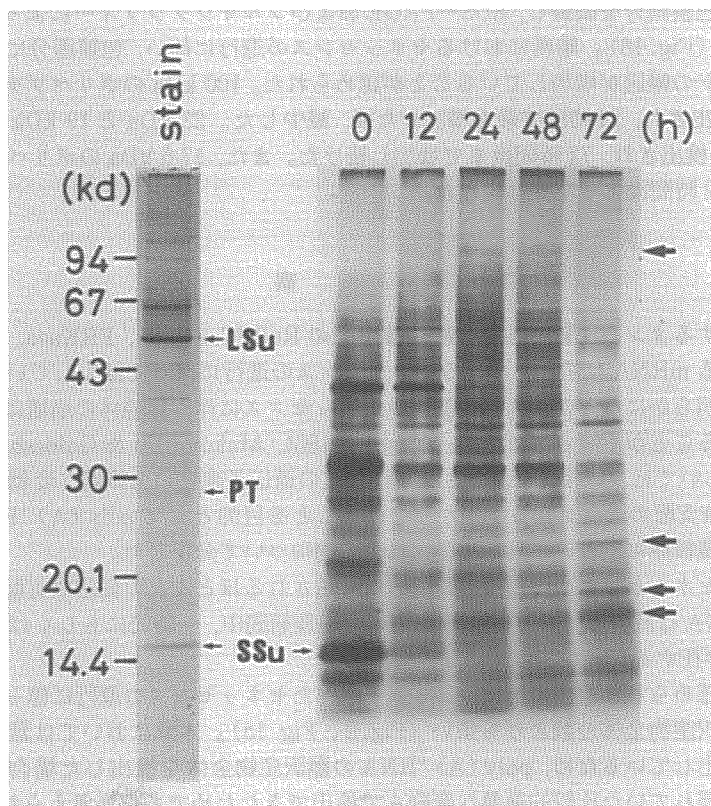


Fig. 18. 播種後9日の幼植物子葉から単離した無傷葉緑体の包膜画分に輸送される poly (A)⁺RNA からの翻訳産物のセネッセンスの進行に伴う変化

播種後9日の子葉から単離した無傷葉緑体に、暗処理によってセネッセンスを進行させた子葉から調製した poly (A)⁺RNA の翻訳産物を輸送させた。反応後、無傷葉緑体の包膜画分を SDS-PAGE で分離し、フルオログラフィーによって輸送されたポリペプチドを検出した。矢印を付けたバンドは0時間の poly (A)⁺RNA を用いた場合に比べて増加を示したポリペプチドである。また、染色像における移動度からリン酸のトランスローケーターと考えられるポリペプチド (PT), および、調製した包膜画分に混入した RuBPCase の LSu および SSu のポリペプチドに印を付けた。

ンスの進行に伴って増加を示す産物が1種のみ認められた (Fig. 17, 矢印を付けたバンド)。

葉緑体包膜に輸送される細胞核遺伝子産物

播種後9日の若い子葉から単離した無傷葉緑体に翻訳産物の輸送を行なわせた後、シロ糖密度勾

配速心によって包膜画分を調製し、SDS-PAGE およびフルオログラフィーによって取り込まれた産物を検出した (Fig. 18)。暗所におけるセネッセンスの進行に伴い、包膜画分に取り込まれた4種のポリペプチドの輸送が増加していることが認められた。100 kDa のポリペプチドは暗処理開始12時間後から検出され、24時間で最も増加した後、減少した。23 kDa と 19 kDa のポリペプチドは24時間後から検出され、72時間後まで増加し続けた。また、17.5 kDa のポリペプチドは0時間でも検出され、72時間後まで増加し続けた。

考 察

光合成に関与するタンパク質であり、細胞核由来の RuBPCase SSu, PRKase, 33-kDa タンパク質をコードする mRNA は明所におけるセネッセンスの進行に伴って減少していることが第2章の実験結果から明らかになった。また、緑葉のセネッセンスに伴う葉緑体の崩壊は細胞核の遺伝子に支配されていることが示唆されている (Yoshida 1961, Makovetzki & Goldschmidt 1976, Pjon 1981)。本章においては、葉緑体に輸送される細胞核の遺伝子産物の全体的な変動を調べることに、その細胞核支配の機構を知る手懸かりを得ることを目的として poly (A) ⁺RNA の翻訳産物を単離した無傷葉緑体に取り込ませ、輸送された産物について分析した。

暗所におけるセネッセンスの過程で、葉緑体に輸送されるほとんどの細胞核支配のタンパク質をコードする mRNA は減少してゆくが、72時間の暗処理期間中、一時的にもしくは連続的に増加する mRNA 種が存在することが明らかになった。

本章で増加が認められた産物の数は、第2章で述べたセネッセンスの進行に伴って増加する poly (A) ⁺RNA の翻訳産物全体の数よりも多い (Fig. 2, Fig. 15)。本章においては葉緑体に輸送された産物のみを検出しているため、poly (A) ⁺RNA の翻訳産物全体を検出した場合には量的に多い他の産物の影に隠れていた比較的微量な産物まで検出できたためであると考えられる。

緑葉のセネッセンスの進行に伴う葉緑体の崩壊は、チラコイドのグラナ構造などの内部構造がまず崩壊してゆき、二重の包膜はセネッセンスの比較的後期までその構造を保っていることが電子顕微鏡による観察から報告されている (Barton 1966, Butler 1967)。また、細胞あたりの葉緑体の数はクロロフィルやタンパク質の減少が見られる段階においても減少していないなどの観察から (Mae et al. 1984, Wardley et al. 1984)、セネッセンスの過程における葉緑体の崩壊は包膜などの外側の構造から壊れたり、液胞に取り込まれて崩壊するのではなく、まず内部から分解が始まると考えられる。したがって葉緑体に取り込まれる細胞核遺伝子の産物のうち、セネッセンスの進行に伴いその mRNA が量的増加を示したものは、プロテアーゼやクロロフィラーゼなどの加水分解酵素自身あるいはその活性化に関与するような、葉緑体を積極的に崩壊に導く機能を担ったタンパク質を含んでいると考えられる。また、次章で述べる葉緑体の中の遺伝子発現を制御するための情報もこのような形で送られてくる可能性が考えられる。

24時間暗処理をほどこした子葉から調製した無傷葉緑体への翻訳産物の輸送効率は、若い子葉の葉緑体を用いた場合よりかなり低くなっており、ほとんどの細胞核遺伝子由来の産物は葉緑体のセネッセンスの進行に伴い輸送されにくくなっていると考えられる。これとは逆に、24時間暗処理をほどこした子葉の葉緑体に取り込まれ易くなっている翻訳産物も存在することが認められた。さらに、これらのポリペプチドをコードする mRNA の多くは暗所におけるセネッセンスの進行に伴いその蓄積量が増加しているものである (Fig. 16)。これらの観察は、セネッセンスの進行に伴い葉緑体自身のタンパク質の輸送系にもなんらかの変化が起こっており、多くの細胞核にコードされ

る葉緑体タンパク質は葉緑体に輸送されにくくなり、葉緑体を崩壊に導くような機能を持った遺伝子産物が選択的に輸送されるようになる可能性を推測させる。この可能性を検討するため、包膜に輸送されるポリペプチドを調べたところ、4種の翻訳産物がセネッセンスの進行に伴い増加していることが認められた。この観察はセネッセンスの進行に伴い、葉緑体包膜のタンパク質組成に変化が起きていることを示唆している。ただし、ここで得られた包膜画分からはストロマに存在するRuBPCaseの大小のサブユニットの混在が認められるため、この新たに輸送されるようになったポリペプチドが包膜に特異的に存在するタンパク質であるかどうかについてはさらに検討する必要がある。ここで輸送の増加が認められた23 kDaのポリペプチドは、チラコイド画分において検出された23 kDaの産物と同じ挙動を示している。この実験におけるチラコイド膜の調製法では包膜を巻き込んでしまう可能性があるため、このポリペプチドは包膜に存在している可能性が高い。ただし、これらの膜タンパク質は二次元電気泳動で分離することができないので、SDS-PAGEを用いているため、チラコイド膜と包膜で分子量は同じであるが等電点の異なるポリペプチドを検出している可能性も否定できない。

要 約

- 1) 単離した葉緑体の酸素発生能およびタンパク質合成能を指標として、ハツカダイコン子葉から生物学的な活性を持つ無傷葉緑体を単離する方法を確立した。
- 2) 葉緑体に輸送されるタンパク質をコードする mRNA は、その多くがセネッセンスの進行に伴って減少してゆくが、一時的にもしくは72時間後まで増加するものも数多く存在しており、これらの産物が葉緑体の退化崩壊に関与している可能性を示唆した。
- 3) 24時間暗処理した子葉から調製した無傷葉緑体の全体的なタンパク質の輸送効率、若い子葉の葉緑体を用いた場合よりも低くなっているが、若い子葉の葉緑体を用いた場合よりも輸送の効率が高くなっているか、もしくは若い子葉の葉緑体では検出できなかった複数のポリペプチドが認められた。特にセネッセンスを起こした葉緑体に取り込まれ易くなったポリペプチドの多くはセネッセンスの進行に伴いその mRNA が増加するものであった。このことはセネッセンスの進行に伴って葉緑体自身のタンパク質輸送の選択性に変化が起これ、細胞質で合成される葉緑体タンパク質の変化と相まって葉緑体を積極的に崩壊に導いている可能性を示唆している。
- 4) 包膜へ輸送される poly (A)⁺ RNA からの翻訳産物を分析したところ、セネッセンスの進行に伴い増加を示す4種のポリペプチドが認められた。このことは、セネッセンスの進行に伴って葉緑体包膜のタンパク質組成にも変化が起きていることを示唆し、3) に述べた可能性を支持するものである。

第5章 セネッセンスを起こした葉の葉緑体におけるリブローズジリン酸カルボキシラーゼ大サブユニットおよび光化学系Ⅱ 32-kDaタンパク質の合成における転写と翻訳の非共役

序 論

緑葉のセネッセンスの過程における葉緑体の退化、崩壊は、タンパク質合成阻害剤を用いた実験などから細胞核遺伝子の働きによって制御されていると示唆されている。実際、前章までの実験から、ハツカダイコン子葉がセネッセンスする際には様々な細胞核遺伝情報の発現が劇的に変動していること、さらに、これらの変動を示した細胞核遺伝子産物の中には葉緑体に輸送されるものがあることが多く存在することを明らかにしてきた。ただし、葉緑体自身が持つ遺伝情報がセネッセンスの進行に関与していないという確証は未だ得られておらず、またタンパク質合成阻害剤を用いた研究から、葉緑体自身の遺伝情報がセネッセンスの進行に関与していることを示唆する報告もなされている (Cuello et al. 1984)。また、セネッセンスの比較的初期の段階で葉緑体におけるタンパク質合成が停止していることを示唆する報告がなされており (Ness & Woolhouse 1980)、第2章における実験結果からも RuBPCase LSu の合成が短時間の暗処理によって停止することが観察された。しかしながら、セネッセンスの過程で葉緑体中のタンパク合成がどのような機構で制御されているのか、その詳細な研究は未だなされていない。

現在タバコ (Shinozaki et al. 1986) およびゼニゴケ (Ohya et al. 1986) においてその葉緑体 DNA の全塩基配列が決定されており、その詳細な解析が進んでいる。葉緑体における遺伝子発現の調節は黄化植物の緑化の際の発現様式の研究などから、転写レベルよりも、むしろ転写以降のレベルで調節されている可能性が示唆されてきている (Minami & Watanabe 1984, Jensen et al. 1986, Monroy et al. 1987, Gruissem et al. 1987)。

そこで、暗処理によるセネッセンスの進行に伴い、葉緑体遺伝情報の発現がどのように変化しているかを調べるため、代表的なものとして RuBPCase LSu (*rbcL*) および光化学系Ⅱの反応中心を形成していると考えられている 32-kDa タンパク質 (*psbA*) についてその mRNA 量の変化およびタンパク質の合成速度について検討した。

一般に葉緑体のストロマに存在する可溶性タンパク質はストロマの遊離リボソームで、チラコイド膜に存在する膜タンパク質はチラコイド膜に結合したリボソーム上で合成されることが示唆されている (Minami & Watanabe 1984)。このことから、*rbcL* および *psbA* の転写産物のストロマとチラコイド画分における分布が光の on/off によって変化することにより、翻訳レベルでタンパク質の合成が調節されている可能性が考えられた。両転写産物がストロマおよびチラコイド膜上にどのような割合で存在するかを調べるため、予備的な実験としてホウレンソウの葉緑体を材料としてストロマおよびチラコイド膜に存在するそれぞれの転写産物の定量を行なった。

材料および方法

植物材料および暗/明処理

第2章と同様に、連続光下で育てた播種後14日のハツカダイコン幼植物の子葉を材料とした。この幼植物を子葉を付けたまま24時間もしくは48時間暗所に置き、その後光照射下に戻した。

放射性アミノ酸による子葉の短時間標識

第2章に述べた方法によって子葉を ^{35}S -メチオニンで標識し、可溶性画分と膜画分を調製した。暗処理した子葉を暗所で標識するにはすべての操作を弱い緑色の安全光の下で行なった。可溶性画分および膜画分は子葉組織中に取り込まれた ^{35}S -メチオニンの放射活性をそろえてSDS-PAGEによって分離し、フルオログラフィーによって新たに合成されたタンパク質を検出した。

RNAの抽出

暗/明処理したハツカダイコン幼植物の子葉から、第2章で述べたグアニジン塩酸/フェノール法によって高分子RNAを抽出した。

ハウレンソウ緑葉からの無傷葉緑体の単離

ハウレンソウ (*Spinacia oleracea* L. cv. Viroflay) は、野外で育て、5 cm から10 cm に育った展開中の緑葉を、実験を行なう日の午前12時頃に採取した。主脈を除いた葉組織から、Morgenthaler & Mendiola-Morgenthaler (1976) の方法を以下のように改変して無傷葉緑体を単離した。葉緑体の単離を行なう間にリボソームがポリソームから解離しないように、0.2 mg/ml のクロラムフェニコールをGRMに加えた。また、無傷葉緑体の分離はPercollを用いた密度勾配遠心によって行なった。

全葉緑体、ストロマおよびチラコイド画分からのRNAの抽出

単離した無傷葉緑体を20 mM Tris-HCl (pH 8.5), 15 mM Mg-acetate, 30 mM KCl, 1 mM DTT, 0.2 mg/ml chloramphenicol に懸濁し、パスツールピペットの先を遠心管の底に押し付けた状態で懸濁液を出し入れすることにより確実に包膜を破壊した後、20,000 xg, 10 分の遠心によって上清と沈殿に分けた。沈殿を上記の緩衝液で2回洗い、チラコイド画分とした。この洗浄液を上清に加え、ストロマ画分とした。

RNAの抽出はSDS/フェノール法によって行なった。SDS/フェノール法によるRNAの回収率は、トレーサーとして ^{32}P -orthophosphateを用いて *in vivo* で標識した大腸菌のrRNA (3.1×10^4 cpm, 10^6 cpm/ μg) を抽出液にあらかじめ加えておき、RNA標品への ^{32}P の回収率を計算することによって求めた。

転写産物の検出および定量

ノーザンハイブリダイゼーションおよびドットブロットハイブリダイゼーションはThomasの方法(1983)に従って行なった。ノーザンブロットティング: RNAを変性させた後、1.4%アガロースゲルを用いて電気泳動を行ない、ナイロンメンブレン (Biodyne A: Pall Ultrafine Filtration Corp.) に転写した。ドットブロットティング: 変性させたRNAを8×SSCおよび蒸留水で種々の濃度に希釈し、試料中のSSCの濃度は4倍とした。ドットブロット装置 (ADVANTEC DP-48,

東洋科学産業)を用いて、あらかじめ $4 \times \text{SSC}$ を浸潤させておいたナイロンメンブレンに RNA をブロットした。タバコ葉緑体の *rbcL* および *psbA* の遺伝子をクローン化したプラスミド DNA (pTBa 17 および pTB 22) を α - ^{32}P -dCTP (3,000 Ci/mmol, Amersham) を用いたニックトランスレーションによって標識してプローブを作製した。タバコ葉緑体の遺伝子クローンは、名古屋大学遺伝子実験施設の杉浦昌弘教授および篠崎一雄助教授の御好意により分与していただいた。ハイブリダイゼーションは $5 \sim 10 \times 10^6$ cpm の放射活性を持つプローブを用い、 42°C で 16 時間から 20 時間行なった。ナイロンメンブレンは $2 \times \text{SSC}$, 0.1 % SDS で 15 分間 4 回室温で洗い、次に、 $0.1 \times \text{SSC}$, 0.1 % SDS を用いて 50°C で 30 分間 2 回洗った。転写産物の検出はオートラジオグラフィによって行なった。

結 果

RuBPCase Lsu および 32-kDa タンパク質の合成速度の明暗処理による変化

Fig. 19 および Fig. 20 に示すように、連続光下で育てた播種後 14 日のハッカダイコンの子葉を光照射下で ^{35}S -メチオニンで短時間標識したところ、もっとも盛んに合成されているのは、可溶性画分においては RuBPCase の大サブユニットタンパク質であり、膜画分においてはその分子量から判断して光化学系 II の 32-kDa タンパク質であった。この子葉を暗所で同様に標識すると、RuBPCase Lsu の合成速度は明所で標識した場合とほとんど変わらないが、32-kDa タンパク質の合成速度はかなり低下していることがわかった。また連続光下で育てた播種後 14 日のハッカダイコン幼植物を暗所に置き、1 時間後に子葉を暗所で標識したところ、RuBPCase Lsu の合成速度はかなり低下し、32-kDa タンパク質の合成はほとんど見られなくなった。さらに暗処理を続けると 6 時間後には RuBPCase Lsu の合成も見られなくなった。

24 時間暗処理したハッカダイコン幼植物の子葉を光照射下で 1 時間標識すると、RuBPCase Lsu の合成は認められないが、32-kDa タンパク質の合成は 1 時間の光照射のうちに開始し、標識されるようになることがわかった。24 時間の暗処理後の幼植物を 1 時間明所に置くと、32-kDa タンパク質の合成速度は暗処理前に明所で標識した場合とほぼ同じレベルまで回復したが、RuBPCase Lsu の合成はまだほとんど見られなかった。RuBPCase Lsu の合成は光照射後約 3 時間ごろから認められ、12 時間後には暗処理前とほぼ同じレベルまで回復した。また、この明暗処理によって RuBPCase Lsu の合成は、RuBPCase SSu の合成と時間的にほぼ同時に変動することがわかった。

rbcL および *psbA* の転写産物の明暗による量的変化

光条件を変えることによって起こる 32-kDa タンパク質の合成速度の急激な変化、および RuBPCase Lsu の合成速度の比較的ゆるやかな変化が mRNA のレベルで調節されているかどうかを調べるため、播種後 14 日の子葉、24 時間もしくは 48 時間暗処理した幼植物の子葉、およびその後光照射した幼植物の子葉から高分子 RNA を調製し、タバコの *rbcL* および *psbA* の遺伝子断片をプローブとしてハイブリダイゼーションを行なって各遺伝子の転写産物の定量を行なった (Fig. 21)。

得られたオートラジオグラムの黒化度をデンストメーターで測定したところ、どちらのプローブを用いた場合にも $1\mu\text{g}$ までは RNA の濃度と黒化度に比例関係が認められた。そこで、RNA $1\mu\text{g}$ のドットの黒化度で比較したところ、*rbcL* の転写産物は 24 時間の暗処理によって約 60 % に、48 時間で約 40 % に減少するが、その後の光照射によって暗処理前のレベルよりも高くなることがわかった (Fig. 22)。また、*psbA* の転写産物の量は暗処理やその後の光照射によっても全く変動を

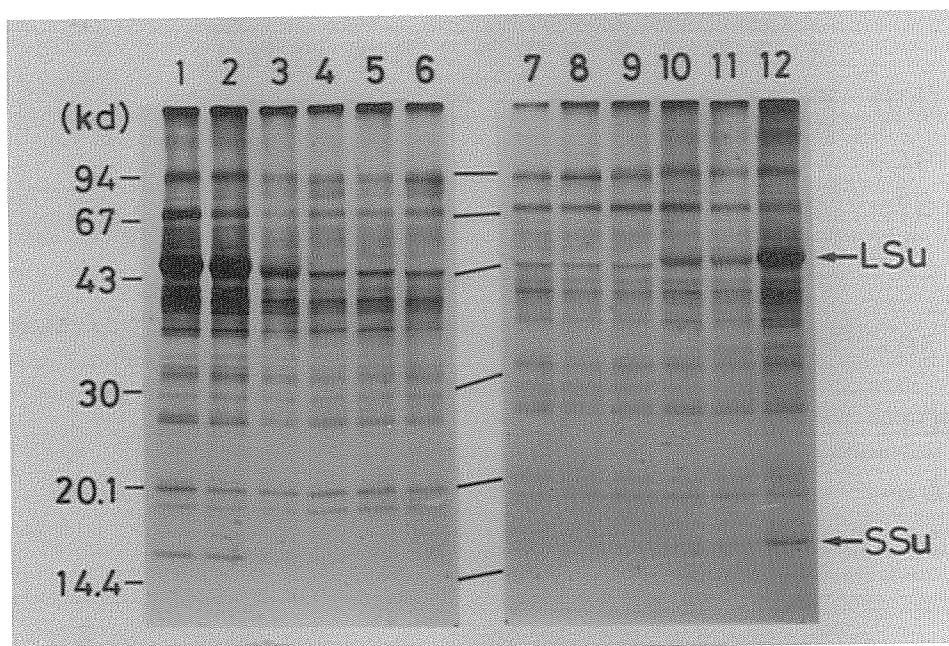


Fig. 19. 暗/明処理による RuBPCase L Su タンパク質合成速度の変動

播種後 14 日の子葉に ^{35}S -メチオニンを与えて光照射下で 1 時間標識したもの (lane 1), または幼植物を暗黒下に置いて 0 時間 (lane 2), 1 時間 (lane 3), 3 時間 (lane 4), 6 時間 (lane 5), 12 時間 (lane 6), 24 時間 (lane 7) 後に子葉を暗黒下で同じように標識した。また, 24 時間暗所に置いた幼植物を光照射下に 0 時間 (lane 8), 1 時間 (lane 9), 3 時間 (lane 10), 6 時間 (lane 11), 12 時間 (lane 12) 戻した後, その子葉を光照射下で 1 時間 ^{35}S -メチオニンで標識した。標識した子葉を破碎して遠心によって可溶性画分と膜画分に分け, その可溶性画分を SDS-PAGE で分離し, フルオログラフィーによって標識されたタンパク質を検出した。

示さなかった (Fig. 22)。

rbcL および *psbA* の転写産物のサイズを調べ, さらにドットブロットハイブリダイゼーションによって検出されたシグナルに, 葉緑体 DNA 由来のものやそれぞれの転写産物の分解物が含まれていないことを確認するため, ノーザンハイブリダイゼーションを行なった (Fig. 23)。 *rbcL* をプローブとして用いた場合には, 暗処理前, 暗処理後の幼植物子葉から調製した RNA から, 1.7 kb の単一のバンドのみが検出された。また, *psbA* をプローブとして用いた場合には, 暗処理前後でやはりその大きさに変化はなく, 1.25 kb の単一のバンドのみが検出され, ドットブロットハイブリダイゼーションの結果は正しく転写産物の量を反映していると考えられた。また, 翻訳反応が停止した状態の葉緑体中の転写産物にもそのサイズの差異は検出されず, サイズ的にはすべて mRNA として機能し得るものであることが明らかになった。

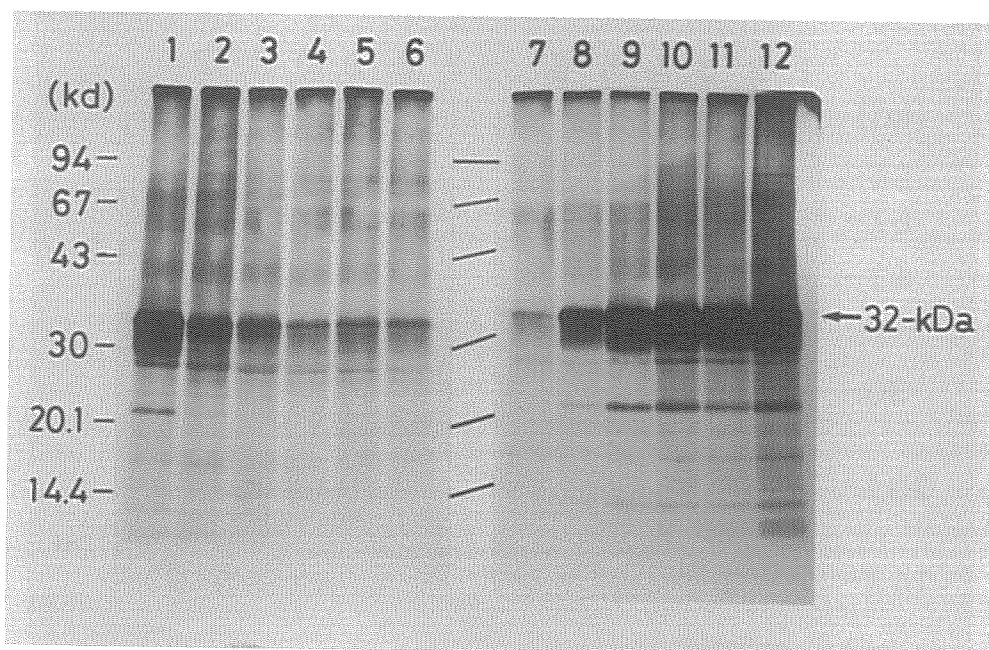


Fig. 20. 暗/明処理による光化学系IIの32-kDaタンパク質合成速度の変動

Fig. 19 に述べた条件で標識した子葉の膜画分を SDS-PAGE で分離し、フルオログラフィーによって標識されたタンパク質を検出した。lane の番号は Fig. 19 と同じ標識試料の膜画分を示す。

以上の結果は、ハツカダイコン子葉の葉緑体における RuBPCase L_{Su} および 32-kDa タンパク質の明暗による合成の調節は、転写以降のレベルで行なわれていることを推測させた。

ホウレンソウ葉緑体のストロマおよびチラコイド膜に結合して存在する *rbcL* および *psbA* の転写産物の定量

ハツカダイコン子葉よりも多量の無傷葉緑体が調製し易いホウレンソウを用いてストロマおよびチラコイド画分に存在する転写産物を定量した。

まず、全葉緑体、ストロマおよびチラコイド画分に存在する高分子 RNA の量をできるだけ正確に求めるため、³²P で標識した大腸菌の rRNA を出発材料に加えておき、最終的な RNA 標品中に回収される放射活性を測定した。そのほとんどが rRNA と考えられる高分子 RNA のストロマ対チラコイドの存在比は、出発材料の葉緑体のクロロフィル量あたりで計算して 5:6 であった (Table 2)。ストロマおよびチラコイド画分から別々に計算した RNA 量の合計は、常に全葉緑体から計算した RNA 量を上回っていた。高分子 RNA の回収率は余り高いものではなかったが、出発材料のクロロフィル量あたりの高分子 RNA の収量はかなり一定で再現性は高かった。

得られた高分子 RNA の *rbcL* および *psbA* の転写産物の量を、それぞれの遺伝子をプローブとしてドットブロットハイブリダイゼーションにより求めた。Fig. 24 に示したように、転写産物にハ

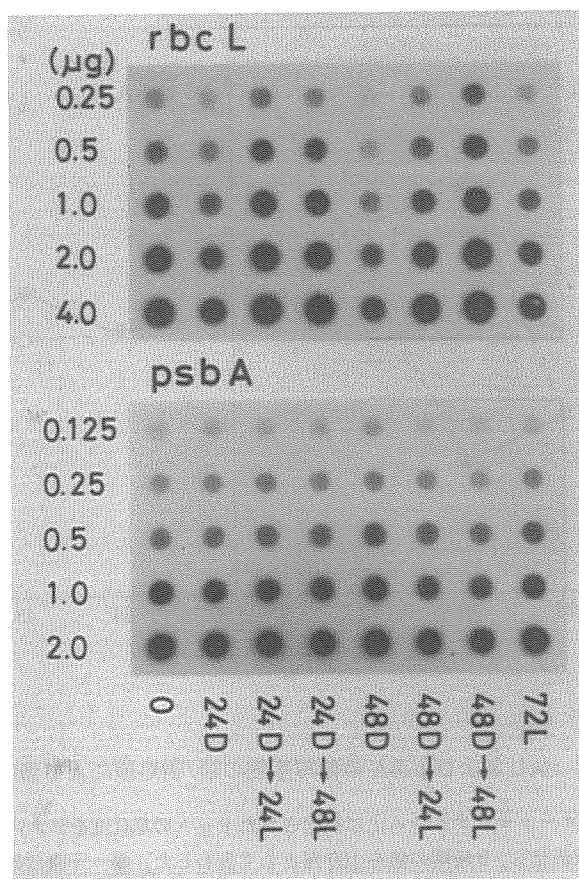


Fig. 21. ドットブロットハイブリダイゼーションによる
rbcL および *psbA* の転写産物の定量

播種後 14 日のハッカダイコン幼植物 (0) を 24 時間 (24 D), もしくは 48 時間 (48 D) 暗所に置いた後, 24 時間 (24 D → 24 L, 48 D → 24 L), または 48 時間 (24 D → 48 L, 48 D → 48 L) 光を照射した。これらの子葉および播種後 17 日の幼植物子葉 (72 L) から高分子 RNA を調製した。0.125 μ g から 4.0 μ g の RNA をナイロン膜上にドットし, ^{32} P で標識した *rbcL* もしくは *psbA* 遺伝子断片をプローブとしてハイブリダイゼーションを行なった。

イブリダイズした放射活性はドットした RNA 量が 0.5 μ g まで比例的に増加した。このことから, 単位 RNA 量あたりに結合した放射活性は 0 から 0.5 μ g RNA までの傾きから計算し, Table 3 に示した。チラコイド画分に存在する *rbcL* の転写産物およびストロマ画分に存在する *psbA* の転写産物は, 葉緑体内において翻訳されていないことが示されている (Minami & Watanabe 1984, Leu et al. 1984)。この計算から, 葉緑体に存在する *rbcL* の転写産物の 80 % はチラコイド画分に存在

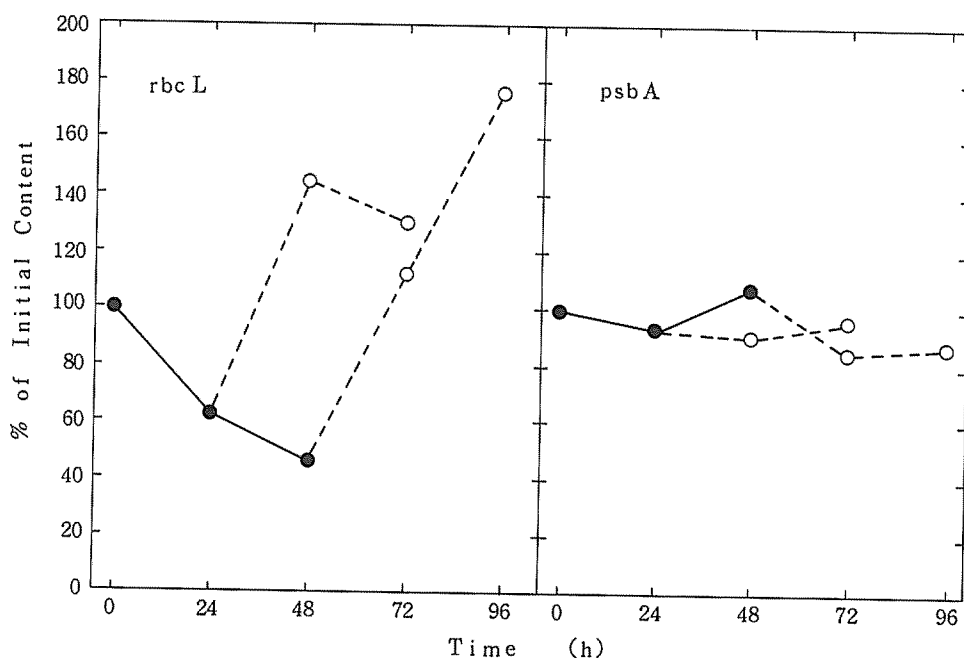


Fig. 22. *rbcL* および *psbA* の転写産物の暗/明処理による量的変動

Fig. 21 のオートラジオグラム上に検出されたドットの黒化度をデンシトメーターで測定して数値化し、0時間の値を100%として表わした。●—●は暗処理中の、○-----○はその後の光照射による変動を表わしている。

Table 2. 葉緑体の各画分からの高分子RNAの回収率

	回収されたRNA量 ¹ ($\mu\text{g}/0.2\text{ mg Chl}$)	回収率 ² (%)	存在量 ³ ($\mu\text{g}/\text{mg Chl}$)
全葉緑体	34.5	50.3	343 (1.0)
ストロマ	8.5	23.8	179 (0.5)
チラコイド	12.9	29.8	216 (0.6)

- 1 得られた高分子RNAの260 nmの吸光度から求めた。
- 2 出発材料に加えた³²Pで標識した大腸菌rRNAの、高分子RNA画分への放射活性の回収率から計算した。
- 3 回収されたRNA量を標識した大腸菌のrRNAの回収率で割ることによって求めた。括弧内の値は全葉緑体RNAにたいする割合を表わしている。

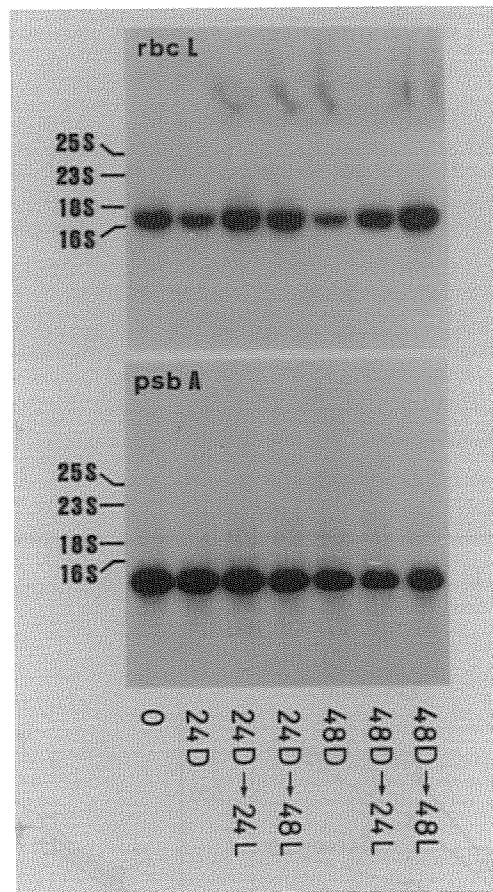


Fig. 23. 暗/明処理をほどこした幼植物子葉中の
rbcL および *psbA* の転写産物のサイズ

播種後 14 日のハツカダイコン幼植物 (0) を 24 時間 (24 D), もしくは 48 時間 (48 D) 暗所に置いた後, 24 時間 (24 D → 24 L, 48 D → 24 L), または 48 時間 (24 D → 48 L, 48 D → 48 L) 光を照射した子葉から高分子 RNA を調製し, 1.4 % アガロースゲルを用いて電気泳動により分離した。泳動後, RNA をナイロン膜に転写し, それぞれの遺伝子 DNA 断片をプローブとしたハイブリダイゼーションによって *rbcL* もしくは *psbA* の転写産物を検出した。RNA のサイズマーカーとしては, 大腸菌の rRNA およびコムギの rRNA の混合物を用いた。

していた。また, *psbA* の転写産物の 40 % はストロマ画分に存在する計算となった。

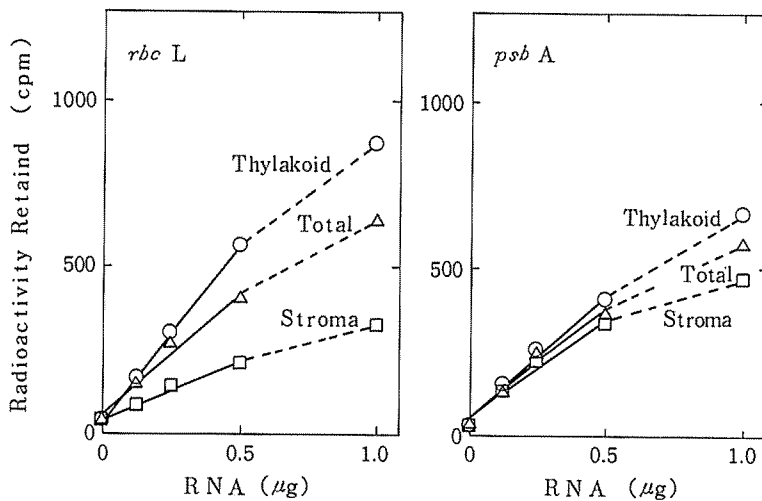
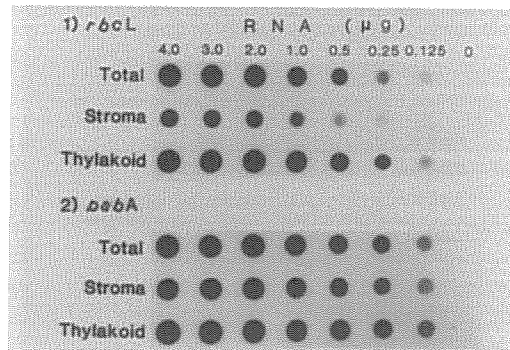


Fig. 24. ドットプロットハイブリダイゼーションによる
rbcL および *psbA* の転写産物の定量的解析

(上) 全葉緑体 (total), ストロマ画分 (Stroma), チラコイド画分 (Thylakoid) から高分子 RNA を抽出し、その一定量をナイロン膜にドットした後、 ^{32}P で標識した *rbcL* および *psbA* の転写産物に特異的な遺伝子プローブを用いてハイブリダイゼーションを行なった。

(下) このナイロン膜をそれぞれのドットに切り分け、液体シンチレーションカウンターを用いて放射活性を測定し、プロットした RNA 量に対してプロットした。

Table 3. *rbcL* および *psbA* の転写産物の葉緑体内における分布

	ドットの放射活性 ¹ (cpm/ μ g RNA)	RNA の存在量 ² (μ g/mg Chl)	相対値 ³ (cpm $\times 10^{-3}$ /mg Chl)
<i>rbcL</i>			
Total	730	343	250 (1.0)
Stroma	349	179	62 (0.3)
Thylakoid	1067	216	230 (0.9)
<i>psbA</i>			
Total	670	343	230 (1.0)
Stroma	598	179	105 (0.5)
Thylakoid	747	216	161 (0.7)

1 Fig. 24 の値から求めた。

2 Table 2 で求めた値。

3 ドットの放射活性と RNA の存在量を積算した値。括弧内の値は全葉緑体 RNA 中の値にたいする割合で表わしている。

考 察

ハツカダイコンの幼植物を暗所に置くと、その子葉における 32-kDa タンパク質の合成は速やかに停止し、光の再照射にも速やかに反応してその合成を再開する。ところが、その転写産物の量には暗処理前後で全く変動が見られなかったことから、葉緑体の中における 32-kDa タンパク質の合成は転写以降のレベルで調節されていると考えられる。*psbA* の転写産物のサイズは暗処理によっても変化しないこと、また、その合成は 24 時間の暗処理の後、再び光を照射すると、ほとんどラグなしに速やかに再開することから、ハイブリダイゼーションで検出された転写産物は mRNA としての機能を持ったものであること、および、この mRNA は暗所においてなんらかの形でその翻訳が抑制されているという翻訳レベルでの遺伝子発現調節機構の存在が示唆された。翻訳反応は多量の ATP のエネルギーを消費するので、光合成により葉緑体で生産される ATP が光を遮断することによって減少し、そのためにこれらの mRNA の翻訳反応が抑制されることも考えられる。ところが、RuBPCase LSu と 32-kDa タンパク質の合成では光条件の変化にたいする応答が時間的に大きくずれており、単に ATP レベルの増減からこの翻訳反応の調節を説明することはできない。

また、データは示さなかったが、明所および暗所に置いたハツカダイコン幼植物の子葉から無傷葉緑体を単離し、そこから葉緑体 RNA を抽出してコムギ胚無細胞タンパク合成系を用いて翻訳反応を行なわせたところ、どちらの RNA を用いた場合にもほぼ同じ効率で RuBPCase LSu および 32-kDa タンパク質の合成が見られた。このことは、それぞれのタンパク質をコードする mRNA は暗所においても翻訳されうる形を保持しており、翻訳レベルにおける調節の存在をさらに強く示唆している。ただし、葉緑体 RNA をコムギ胚無細胞タンパク合成系という異質な系で翻訳させているため、暗所において存在するすべての mRNA が翻訳されうる形であると断定することはできない。この証明には、葉緑体の無細胞タンパク合成系を確立し、homologous な系を用いた実験を

行なう必要がある。

Minami & Watanabe (1984) は、ハウレンソウの葉緑体における RuBPCase LSu および 32-kDa タンパク質の mRNA はストロマおよびチラコイドの両画分に存在するが、RuBPCase LSu はストロマの遊離リボソームで、32-kDa タンパク質はチラコイド膜に結合したリボソームでのみ合成されることを報告し、タンパク質合成の場の違いによる翻訳レベルの遺伝子発現調節機構の存在を示唆した。また、エンドウではチラコイド膜に結合していたリボソームが光を遮断することによってストロマ画分に遊離してくることが報告されている (Fish & Jagendorf 1982 b, Hurewitz & Jagendorf 1987)。ハッカダイコン子葉の葉緑体で観察された暗処理によるタンパク質合成の抑制は、このような合成の場における調節が働いている可能性も考えられた。本章の定量的な実験の結果から、ハウレンソウ葉緑体のチラコイド膜画分に存在する翻訳されない RuBPCase LSu の mRNA は、予想外にも、全体の 80 %、ストロマ画分に存在する 32-kDa タンパク質の mRNA は全体の 40 % をも占めるという値が得られた。また、この翻訳されない mRNA のサイズは両画分でそれぞれ同じであり、また、フェノール処理によって除タンパクするとコムギ胚無細胞タンパク合成系において翻訳活性を持つこと (Minami & Watanabe 1984) から、mRNA は分解などを受けていないと考えられる。翻訳されていない mRNA がこのように大量に存在するのは、翻訳レベルでの調節機構の中で急激な光強度の上昇等に対応する mRNA の貯蔵形態として機能しているためではないかと考えられる。データは示さないが、予備的な実験として明暗処理をほどこしたハッカダイコン幼植物の子葉から葉緑体のストロマおよびチラコイド画分の高分子 RNA を調製し、この 2 種の転写産物の分布を調べたが、明暗の条件の違いによって大きな変化は認められないようである。この点に関してはさらに詳細な実験を行なう必要がある。

ハウレンソウ葉緑体のストロマ画分をショ糖密度勾配遠心によって分画し、転写産物の沈降速度を求めたところ、ストロマに存在する翻訳されない 32-kDa タンパク質の mRNA はリボソームには結合しておらず、なんらかのタンパク質と複合体を形成している可能性が考えられた (Minami 1986)。ハッカダイコン子葉の葉緑体においてもこのようなある種のタンパク質と mRNA が複合体を形成することにより、暗所で翻訳が抑制されている可能性も考えられる。

ハッカダイコン子葉中の *rbcL* の転写産物の量は、24 時間もしくは 48 時間暗処理によって約 60 % から 40 % まで減少はするが、比較的大量に存在しており消失することはない。ところがそのタンパク質の合成は暗所において完全に止まることから、*rbcL* の発現は転写レベルにおいても調節されているが、転写以降、おそらくは翻訳レベルにおいても調節が働いていることが示唆された。RuBPCase LSu の合成の明暗による変動は SSu の合成と時間的に共役して起こっており、32-kDa タンパク質ほどその合成が急激に変動していない (Fig. 19, 20)。第 2 章に述べた実験結果により、RuBPCase SSu をコードする翻訳可能な mRNA の量は明暗によってその子葉における SSu の合成速度とほぼ同じ変動を示した。このことから、RuBPCase SSu の合成は主に転写レベルで調節されていると考えられる。

トマト (*Lycopersicon esculentum* Mill.) の果実が成熟する際、その果肉に存在する葉緑体は、次第に緑色を失うとともにその光合成活性が低下し、かつ、lycopene の蓄積のより赤色の有色体 (chromoplast) に転換する。この際、多くの葉緑体遺伝子の発現が停止してその転写産物は減少し、消失してゆくが、*psbA* の転写産物は赤色の有色体においても比較的多量に存在していることが報告されている (Piechulla et al. 1985)。この有色体への転換は、緑葉がセネッセンスを起こす際の葉緑体の退化過程と類似しており、また、暗所におけるセネッセンスの際の葉緑体 mRNA の変動から考えると、明所においてセネッセンスを起こした緑葉の葉緑体においても、32-kDa タ

ンパク質をコードする mRNA は比較的多量に存在している可能性が考えられる。ただし、暗所におけるセネッセンスの際と同じように、そのタンパク質の合成が抑制されているかどうかについては今後に残された問題である。

要 約

- 1) RuBPCase LSu は 24 時間暗処理した子葉の葉緑体において全く合成されていない。ところが、その mRNA は暗処理前の約 60 % まで減少しているものの、比較的多量に存在していること、および、光の再照射によって mRNA 量が大きく増加し、タンパク質の合成もゆっくりではあるが再開することから、その遺伝子の転写が光によって制御されているのに加えて mRNA の翻訳のレベルにおいても発現が調節されていることを示唆した。
- 2) RuBPCase LSu の合成はその SSu の合成と時間的に共役して変動していることから、翻訳レベルの調節機構において、細胞質における SSu の合成となんらかの相互作用を持っていることが示唆された。
- 3) 光化学系 II の 32-kDa タンパク質の合成は暗処理開始後速やかに停止し、光の再照射にも速やかに反応して再開すること、および、その mRNA 量は明暗処理によってほとんど変動しないことから、成熟したハツカダイコン子葉におけるこのタンパク質の合成は主に翻訳レベルで調節されていることを示唆した。
- 4) ホウレンソウ葉緑体中の翻訳されない RuBPCase LSu のチラコイド画分に存在する mRNA は、全体の 80 %、32-kDa タンパク質の翻訳されないストロマ画分に存在する mRNA は全体の 40 % をも占めることがわかった。

第6章 セネッセンスに伴う細胞質局在性 グルタミン合成酵素の遺伝子発現

序 論

光合成によって大気中から直接固定することによって利用できる炭素と異なり、窒素はその植物体が生育している限られた土壤中からしか取り入れることができない。緑葉がセネッセンスする際、枯れ落ちてゆく緑葉細胞中のタンパク質は分解され、そこに含まれる窒素は転流によって植物体に回収される (Williams 1955)。このように植物にとって重要な栄養素である窒素の経済の面から考えて、緑葉のセネッセンスは重要な生理学的意味を持っている。セネッセンスの際のタンパク質の分解産物であるアミノ酸は、そのほとんどがそのままの形では運ばれず、いったんグルタミンやアスパラギンといったアミドに転換されてから転流されると言われている (Bollard 1960, Zimmermann 1960)。さらに、ドクムギの葉切片を暗所に置いてセネッセンスを起こさせると、その細胞中のタンパク質を分解し、アミドに転換する際に働くと考えられる一群の酵素の活性が上昇することが報告されている (Thomas 1978)。高等植物において、グルタミン合成酵素はグルタミン酸合成酵素とともに窒素代謝の中心的な役割を果たしている酵素であり、植物における窒素同化の主要な経路である GS-GOGAT 系においてオキザロ酢酸とアンモニアからグルタミン酸を生成する。セネッセンスを起こした緑葉の細胞においてグルタミン合成酵素は最終的にグルタミン酸とアンモニアからグルタミンを生成し、窒素を転流可能な形に転換するところで働いていると考えられる。予備的な実験からセネッセンスを起こしたハツカダイコン子葉においてこの酵素のタンパク量に変動が起こることが観察されたので、これを mRNA のレベルで詳細に調べることにした。

高等植物緑葉中のグルタミン合成酵素には、細胞内局在性を異にする少なくとも2種のアイソザイムの存在が知られている。一つは細胞質に局在する GS₁ であり、もう一つは葉緑体に局在する GS₂ である。本章では、ハツカダイコン子葉がセネッセンスを起こした際にグルタミン合成酵素タンパク質の蓄積量、およびその翻訳可能な mRNA の蓄積量がどのように変動しているかについて述べる。

GS₁ および GS₂ はどちらも互いに分子量の異なるサブユニットから構成される8量体である。また、ハウレンソウ (Hirel et al. 1984)、インゲン (Cullimore et al. 1984)、アルファルファ (Tischer et al. 1986)、およびエンドウ (Tingey et al. 1987) においては GS₁ および GS₂ のサブユニットがそれぞれ等電点を異にする数種のイソタンパク質から構成されていることが知られている。そこでハツカダイコンのグルタミン合成酵素についてそのサブユニット構成を調べ、それぞれのサブユニットについてもセネッセンスの際にどのように変動しているかを免疫化学的手法によって調べた。

材料および方法

植物材料およびセネッセンスの誘導

第2章と同様に明所で育てた播種後14日のハツカダイコン幼植物から子葉を切り取り、暗所に置いてセネッセンスを誘導した。

全グルタミン合成酵素活性の測定

50 枚の子葉（生重量約 5 g）に 5 ml の extraction buffer [100 mM Tris-HCl (pH 7.5 at 4 °C), 1 mM EDTA, 25 mM MgSO₄, 10 mM L-glutamate, 2 mM DTT] および 0.6 g の Polyclar AT を加え、乳鉢を用いて破碎した。破碎液を 10,000 xg で 10 分間遠心し、その上清を equilibration buffer [20 mM Tris-HCl (pH 7.4 at 4 °C), 0.2 mM EDTA, 20 mM MgSO₄, 10 mM L-glutamate, 1 mM DTT] であらかじめ平衡化しておいた Sephadex G-25 カラムを用いて脱塩した。グルタミン合成酵素の transferase 活性の測定は、O'Neal & Joy (1975) の方法にしたがって行なった。200 μ l の粗抽出液に 600 μ l の assay mixture [100 mM Tris-acetate (pH 6.4), 1 mM MgCl₂, 100 mM L-glutamine, 60 mM hydroxylamine, 0.5 mM ADP, 20 mM arsenate] を加え、30 °C で 1 時間反応を行なわせた後、800 μ l の発色液 (0.37 M FeCl₃, 0.67 N HCl, 0.2 M TCA) を加え、3,000 xg で 10 分間遠心することにより沈澱物を取り除いた。反応生成物である γ -glutamyl-hydroxamate と鉄が形成した錯体による発色度は、540 nm の吸光度で測定した。

無傷葉緑体の単離とストロマ画分の調製

無傷葉緑体は連続光下で育てた播種後 9 日のハツカダイコン子葉から、第 4 章に述べた方法で単離した。得られた無傷葉緑体に 10 mM NaPPi を加えて浸透圧を下げることににより破壊し、遠心によって得られた上清をストロマ画分とした。

可溶性タンパク質の調製

二等分した 40 枚の子葉（生重量約 2 g）に 4 ml の 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) を加え、ガラスホモジナイザーを用いて氷上で破碎した。破碎液を 20,000 xg で 10 分間遠心し、その上清を可溶性画分とした。タンパク量は Sedmak & Grossberg (1977) の方法で測定した。SDS-PAGE によって分離する場合には可溶性タンパク質に等量の二倍濃度の SDS-sample buffer を加え、電気泳動に供した。また、二次元電気泳動によって分離する場合には可溶性画分に TCA を 5 % の濃度で加え、得られた沈澱を 80 % (v/v) アセトンで 2 回洗い、遠心エバポレーターを用いて乾燥させた後、60 μ l の lysis buffer を加えて超音波処理によって溶解した。電気泳動はタンパク量をそろえて行なった。

Poly (A)⁺RNA の調製および無細胞タンパク質合成系による翻訳産物の抗体処理

第 2 章で述べたグアニジン塩酸/フェノール法によって約 400 対の子葉から RNA を抽出した。Poly (A)⁺RNA は oligo (dT) cellulose column chromatography (Aviv & Leder 1972) によって調製し、10 μ Ci の ³⁵S-メチオニンを含む 20 μ l のコムギ胚無細胞タンパク合成系を用いて Watanabe & Price (1982) の条件で翻訳反応を行なわせた。トウモロコシの細胞質グルタミン合成酵素 (GS₁) もしくはトウモロコシの葉緑体グルタミン合成酵素 (GS₂) をウサギに感作して作製した特異抗体を用い、第 2 章で述べた方法にしたがって放射活性を一定にそろえた翻訳産物を処理し、抗原抗体複合体を得た。トウモロコシのグルタミン合成酵素にたいする特異抗体は名古屋大学農学部植物栄養及び肥料学の杉山達夫教授の御好意により分けていただいた。Protein A-Sepharose に結合した抗原抗体複合体を、SDS-PAGE で分離する場合には 40 μ l の 2 倍濃度の SDS-sample buffer で溶出し、さらに 20 μ l の水で残存した抗原を回収し、その全量を電気泳動に供した。二次元電気泳動を行なう場合には 30 μ l の lysis buffer で溶出し、その全量を一次元目の IEF に供した。

電気泳動法、フルオログラフィーおよびイムノブロッティング

in vitro における翻訳産物および可溶性タンパク質は、Laemmli の方法 (Laemmli 1970) による SDS-PAGE または第 2 章に述べた二次元電気泳動によって分離した。二次元電気泳動は、一次元目に pH 4-8 の等電点電気泳動を行ない、二次元目には 13 % のアクリルアミドゲルを用いて行なった。SDS-PAGE においても 13 % のアクリルアミドゲルを使用した。翻訳産物はフルオログラフィーによって検出し (Skinner & Griswold 1983), 可溶性タンパク質は Towbin (1979) の方法に従って、0.18 A, 12 時間の電気泳動によってニトロセルロース膜にトランスファーした。一次抗体はトウモロコシの葉緑体に局在するグルタミン合成酵素にたいする特異抗体を用い、二次抗体としてはウサギの IgG にたいするヤギ抗体にアルカリホスファターゼを結合させたものを用いた (Blake et al. 1984)。

結 果

全子葉抽出液中のグルタミン合成酵素活性の変動

セネッセンスの進行に伴う全子葉抽出液中のグルタミン合成酵素の transferase 活性の変動を調べたところ、24 時間の暗処理によって若干低下が見られ、その後 72 時間までに始めの約 50 % まで低下していることがわかった (Fig. 25)。

多くの高等植物において、グルタミン合成酵素は細胞質に局在する GS₁ と葉緑体に局在する GS₂ の 2 種のアイソザイムがあることが知られている。そこで、この 2 種のアイソザイムの活性のセネッセンスに伴う変動を分けて測定するため、Davis の方法にしたがって子葉の抽出液を native な電気泳動によって分離し、ザイモグラムを試みたが、1 本のバンドしか得られず、GS₁ と GS₂ を分けることはできなかった。

グルタミン合成酵素タンパク質の免疫化学的検出およびその細胞内局在性

ハツカダイコンの GS₁ と GS₂ の活性は電気泳動的に分離できなかったもので、これらのアイソザイムが存在するかどうかを免疫化学的な方法で調べることにした。

子葉の可溶性画分および子葉から単離した無傷葉緑体のストロマ画分を SDS-PAGE によって分離し、トウモロコシの葉緑体グルタミン合成酵素 (GS₂) にたいする特異抗体を用いたイムノブロッティング法によってハツカダイコン子葉のグルタミン合成酵素を検出し、その細胞内局在性を調べた (Fig. 26)。トウモロコシの GS₂ にたいする特異抗体により、ハツカダイコン子葉の可溶性画分からは 42 kDa と 40 kDa の二本のバンドが検出された (Fig. 26, lane 1)。この抗体はトウモロコシにおいても細胞質グルタミン合成酵素 (GS₁) と交差反応することが知られている (高橋と杉山, 私信) これは葉緑体および細胞質のグルタミン合成酵素の一次構造が類似しているためであると思われる。一次抗体としてトウモロコシの GS₁ にたいする特異抗体を用いた場合には 40 kDa のバンドがやや濃くなったが、Fig. 26 と同様の結果が得られた。また、ストロマ画分からは 40 kDa の単一のバンドのみが検出された (Fig. 26, lane 2)。GS₁ にたいする特異抗体に用いてイムノブロッティングを行なった場合にもストロマ画分からは単一の 42 kDa のバンドのみが検出された。この結果から、ハツカダイコン子葉から検出された 40 kDa のバンドは細胞質に局在するグルタミン合成酵素 (GS₁)、42 kDa のバンドは葉緑体に局在するグルタミン合成酵素 (GS₂) であると判断した。

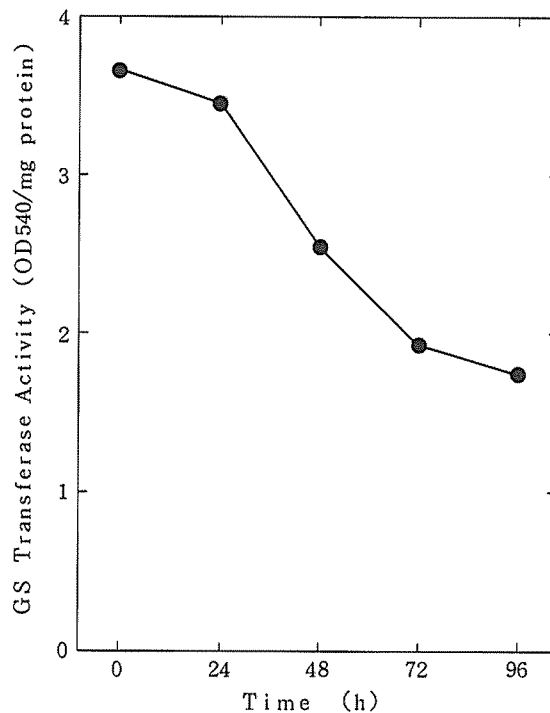


Fig. 25. 子葉のセネッセンスに伴う全グルタミン合成酵素活性の低下

播種後 14 日のハツカダイコン幼植物から切り取って暗所に置いてセネッセンスを進行させた子葉から粗酵素液を調製した。粗酵素液中のグルタミン合成酵素の transferase 活性は、反応生成物である γ -glutamylhydroxamate と鉄の錯体による 540 nm の吸光度で測定した。

GS₁およびGS₂サブユニットタンパク質のセネッセンスに伴う量的変動

セネッセンスに伴う GS₁ と GS₂ タンパク質の量的変動をイムノブロッティング法によって調べた。どのステージにある子葉の可溶性タンパク質からも、40 kDa と 42 kDa の二本のバンドのみが検出された (Fig. 27)。この二本のバンドの発色度をデンシトメーターで測定し、数値化したのが Fig. 28 である。一定タンパク量あたりの GS₂ タンパク質の相対的含量はセネッセンスの進行とともに減少し、72 時間の暗処理後には初めの約 50 % にまで減少したが、逆に GS₁ タンパク質の含量は暗処理開始 24 時間後頃から増加し初め、72 時間後には初めの約 2 倍にまで増加を示した。ただし、子葉細胞中の可溶性タンパク質は 72 時間の暗処理によって約半分に減少している (Fig. 29) ため、生重量あたりの GS₁ タンパク質の含量は暗所におけるセネッセンスの過程でほぼ一定に保たれているか、もしくはやや増加していると考えられる。

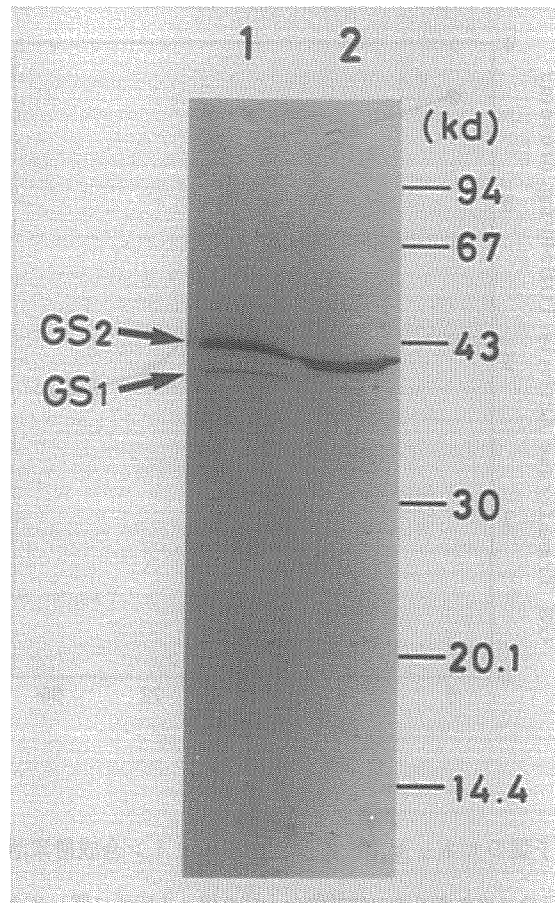


Fig. 26. ハツカダイコン子葉のグルタミン合成酵素タンパク質のイムノブロッティング法による検出およびその細胞内局在性

播種後 14 日のハツカダイコン幼植物子葉から調製した可溶性タンパク質 (lane 1, 3 μ g protein) および単離した無傷葉緑体のストロマ画分 (lane 2, 60 μ g Chl.) を、13 % アクリルアミドゲルを用いた SDS-PAGE で分離した後、ニトロセルロース膜にブロッティングした。一次抗体としてはトウモロコシの GS₂ をウサギに感作して調製した抗血清を用い、二次抗体としてはアルカリホスファターゼを結合したウサギの IgG にたいするヤギの抗体を用いた。

GS₁ および GS₂ サブユニットタンパク質をコードする mRNA のセネッセンスに伴う量的変動

前項で述べた GS₁ と GS₂ タンパク質の量的変動が、細胞内に存在する mRNA 量によって調節されているかどうかを調べるため、暗所でセネッセンスを進行させた子葉から poly (A)⁺RNA を調

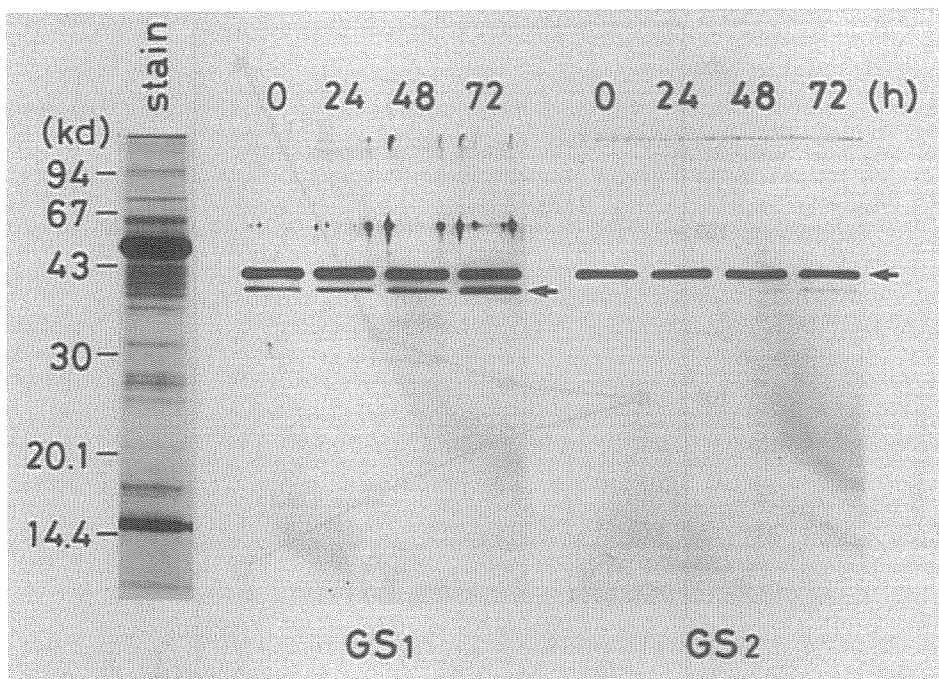


Fig. 27. セネッセンスを起こした子葉中の GS_1 および GS_2 タンパク質の検出

播種後 14 日の幼植物から切り取って暗所に置き、セネッセンスを進行させた子葉から調製した可溶性画分を 13 % アクリルアミドゲルを用いた SDS-PAGE で分離した後、ニトロセルロース膜にブロッティングした。 GS_1 を検出する場合には $4 \mu\text{g}$ 、 GS_2 を検出する場合には $1 \mu\text{g}$ のタンパク質を含む試料を電気泳動に供した。一次抗体としてはトウモロコシの GS_1 (GS_1) もしくは GS_2 (GS_2) をウサギに感作して調製した抗血清を用い、二次抗体としてはアルカリホスファターゼを結合したウサギの IgG にたいするヤギの抗体を用いた。矢印は、それぞれ GS_1 および GS_2 の位置を示している。

製し、コムギ胚無細胞タンパク合成系を用いて翻訳したポリペプチドを、トウモロコシの GS_1 または GS_2 にたいする特異抗体で処理し、反応する翻訳産物の量からおのこの mRNA 量の変動を調べた (Fig. 30, 31)。

トウモロコシの GS_1 および GS_2 にたいする特異抗体と反応する poly (A) ⁺ RNA の翻訳産物からは、いずれの抗体を用いた場合にも 45 kDa と 40 kDa の 2 種類のポリペプチドが検出された。ただし、 GS_1 にたいする特異抗体は 40 kDa のポリペプチドにたいする特異性が高く、逆に GS_2 にたいする特異抗体は 45 kDa のポリペプチドにたいする特異性が高いことがわかった。このことから、40 kDa のポリペプチドは GS_1 をコードする mRNA の翻訳産物であり、45 kDa のポリペプチドはそのアミノ末端に葉緑体への移行に必要な transit peptide を持った GS_2 の前駆体であると判断した。

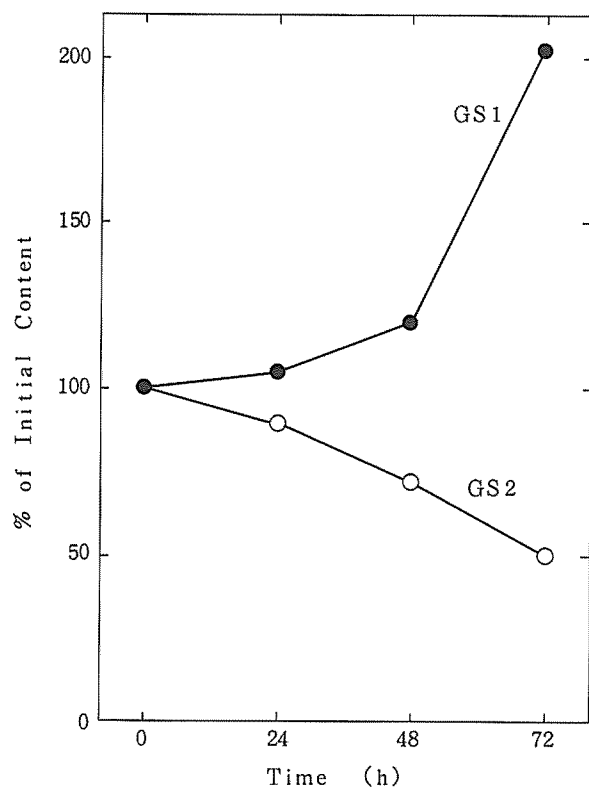


Fig. 28. 子葉のセネッセンスに伴う単位タンパク質量あたりの GS_1 および GS_2 タンパク質の量的変動

Fig. 27 で得られた GS_1 および GS_2 のポリペプチドの抗原抗体反応による 530 nm の反射光をデンストメーターで測定した。0 時間の測定値を 100 % として表わした。

GS_2 をコードする mRNA は暗所におけるセネッセンスの進行に伴い減少していることがわかる (Fig. 30)。ところが、 GS_1 をコードする mRNA は逆に増加を示した (Fig. 30)。このフルオログラムの黒化度をデンストメーターで測定したところ、 GS_2 をコードする mRNA は暗処理開始 24 時間で初めの 15 % まで急激に減少しているが、 GS_1 をコードする mRNA は暗処理開始 12 時間以降から増加が認められ、72 時間後には初めの 6.7 倍にまで増加していることがわかった (Fig. 31)。

細胞質グルタミン合成酵素タンパク質のサブユニット構成とそのセネッセンスに伴う変化

暗所でセネッセンスを進行させたハツカダイコン子葉から可溶性タンパク質を調製して O'Farrell の二次元電気泳動法で分離した。その分離したタンパク質の中から GS_1 にたいする特異抗体を用いたイムノブロッティング法によってグルタミン合成酵素サブユニットのイソタンパク質を検出し、

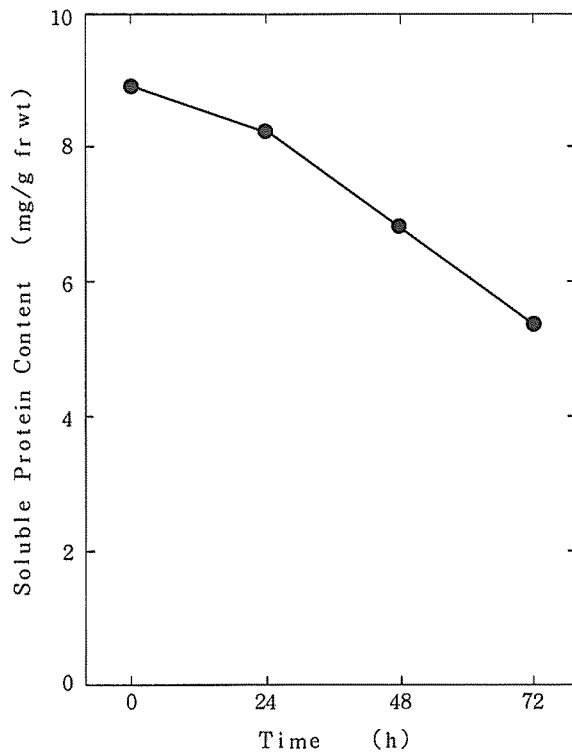


Fig. 29. 子葉の単位生重量あたりの可溶性タンパク質の
セネッセンスに伴う量的変動

播種後14日の幼植物から子葉を切り取って暗所に置き、セネッセンスを進行させた。この子葉から可溶性タンパク質を調製し、タンパク質量を測定した。

セネッセンスに伴うそのサブユニット構成の変化を調べた (Fig. 32)。

分子量からGS₂タンパク質のサブユニットと考えられる42 kDa, 等電点5.4から5.9の5種のポリペプチド (Fig. 32, Oh, 矢印を付けたスポット) および, GS₁タンパク質のサブユニットと考えられる40 kDa, 等電点5.3から6.2の6種のポリペプチド (Fig. 32, Oh, 1から6の数字を付けたスポット) が検出された。5種のGS₂サブユニットタンパク質はすべて暗所におけるセネッセンスの進行に伴い減少した。GS₁サブユニットタンパク質1と2は暗所におけるセネッセンスの進行に伴ってその量が顕著に増加したが, サブユニット3, 4, および5の量にはほとんど変動が見られなかった。また, サブユニット6も暗処理によって若干の増加を示した。

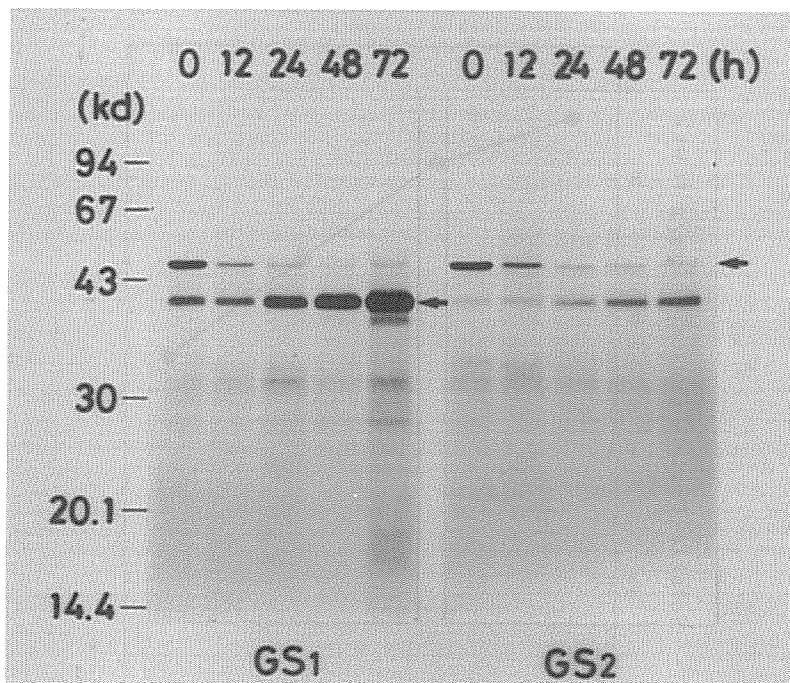


Fig. 30. セネッセンスを起こした子葉中の GS_1 および GS_2 タンパク質をコードする mRNA の翻訳産物の検出

切り取って暗所に置き、セネッセンスを進行させた子葉から poly (A) ⁺RNA を調製し、³⁵S-メチオニンの存在下でコムギ胚無細胞タンパク合成系を用いて翻訳反応を行なわせた。翻訳産物の放射活性をそろえてトウモロコシの GS_1 (GS_1) もしくは GS_2 (GS_2) にたいする特異抗体で処理し、得られた抗原抗体複合体を 13 % ポリアクリルアミドゲルを用いた SDS-PAGE で分離して標識された抗原をフルオログラフィーによって検出した。

GS₁ サブユニットのイソタンパク質をコードする mRNA のセネッセンスの進行に伴う量的変動

イムノブロッティング法によって検出されたグルタミン合成酵素サブユニットのイソタンパク質は、それぞれのサブユニットにたいする個別の mRNA から翻訳されたものではなく、翻訳後の修飾によって生じた可能性も考えられる。そこで、それぞれのサブユニットに対応する mRNA を検出し、さらにサブユニットタンパク質の構成の変化が mRNA 量の変動によるものであるかどうかを調べるため、poly (A) ⁺RNA の翻訳産物のうち、 GS_1 にたいする特異抗体に反応するものを二次元電気泳動によって分離した後、フルオログラフィーによって検出した (Fig. 33)。

Poly (A) ⁺RNA の翻訳産物から、イムノブロッティング法によって検出された GS_1 サブユニットイソタンパク質 (Fig. 32) と同じ分子量および等電点を持つ 6 種のポリペプチドが検出された。暗所におけるセネッセンスの進行に伴い、サブユニット 1 および 2 に対応する mRNA 量に顕著な

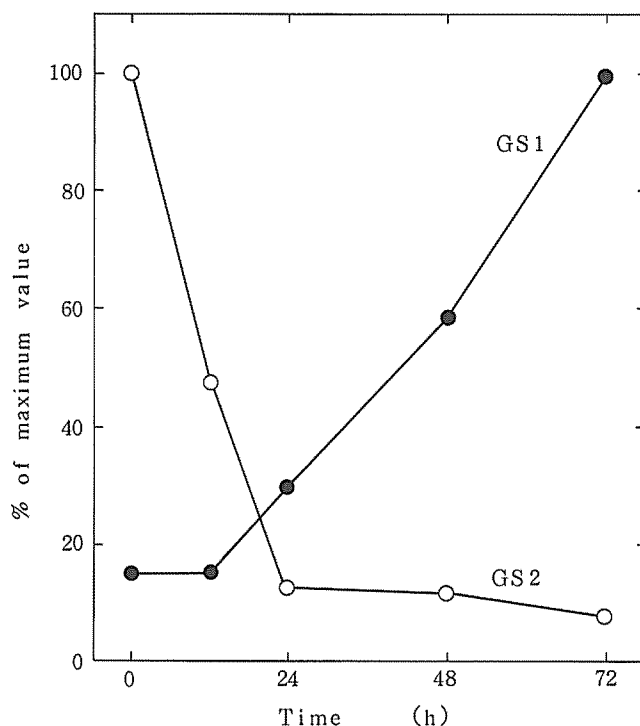


Fig. 31. GS₁およびGS₂をコードする mRNA のセネッセンス進行に伴う量的変動

Fig. 30 で得られたフルオログラム上の GS₁ および GS₂ の黒化度をデンスitomーターで測定して数値化し、それぞれの最大値を 100 % として表わした。

増加が認められた。また、サブユニット 5 および 6 に対応する mRNA にも量的増加が見られたが、サブユニット 3 および 4 に対応する mRNA 量にはほとんど変動が認められなかった。

40 kDa の翻訳産物の他に、45 kDa, 等電点が 6.0 から 6.5 の GS₂ サブユニットイソタンパク質の前駆体と考えられる 5 種のポリペプチドが検出された。いずれのポリペプチドをコードする mRNA も、セネッセンスの進行に伴って減少することが認められた。

Fig. 32 と Fig. 33 の結果をデンスitomーターを用いて数値化してまとめたのが Fig. 34 である。GS₁ タンパク質のサブユニット 1 および 2 の相対的な含量は 72 時間の暗処理で顕著に増加しているが、サブユニット 3, 4, 5 についてはほとんど変動が見られず、GS₁ のサブユニット構成が変化していることがわかる。また、サブユニット 1 および 2 をコードする mRNA もやはり顕著に増加していることから、タンパク質レベルの変動はそれぞれのサブユニットをコードする mRNA の量

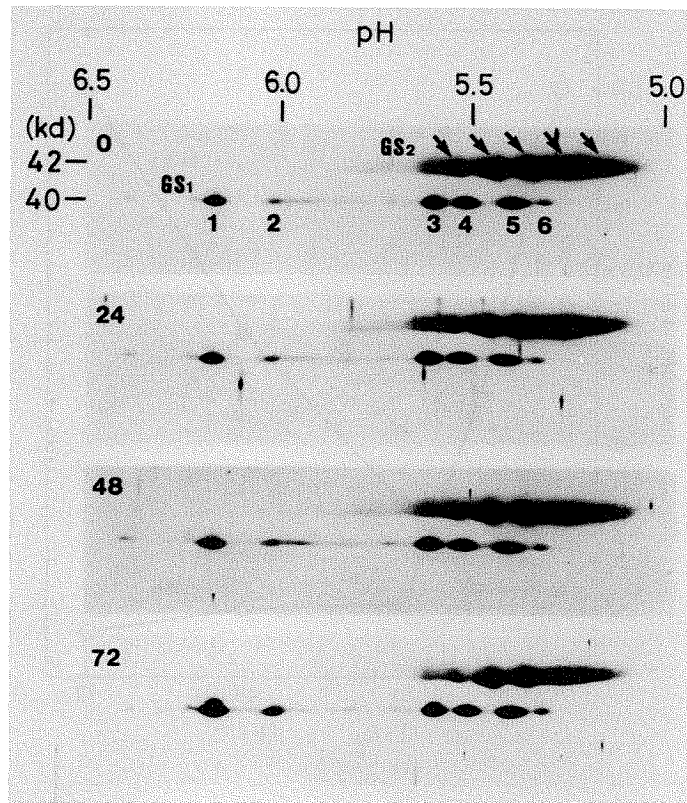


Fig. 32. セネッセンスを起こした子葉中の GS_1 サブユニット
イソタンパク質の検出

切り取って暗所に置き、セネッセンスを進行させた子葉から調製した $30\mu g$ のタンパク質を含む可溶性画分を二次元電気泳動法によって分離した後、ニトロセルロース膜にブロッティングした。一次抗体としてはトウモロコシの GS_1 にたいする特異抗体を用い、二次抗体としてはアルカリホスファターゼを結合したウサギの IgG にたいするヤギの抗体を用いた。 GS_1 サブユニットのイソタンパク質は、1 から 6 の数字を付けて示した。矢印は、 GS_2 サブユニットのイソタンパク質のポリペプチドを示している。

的增加によってもたらされていると考えられる。ただし、サブユニット 5 については、そのタンパク質の含量に変動が認められないが、mRNA レベルで約 3 倍の増加が認められた。これは、mRNA の転写以降においてなんらかの調節が働いているためであると考えられる。

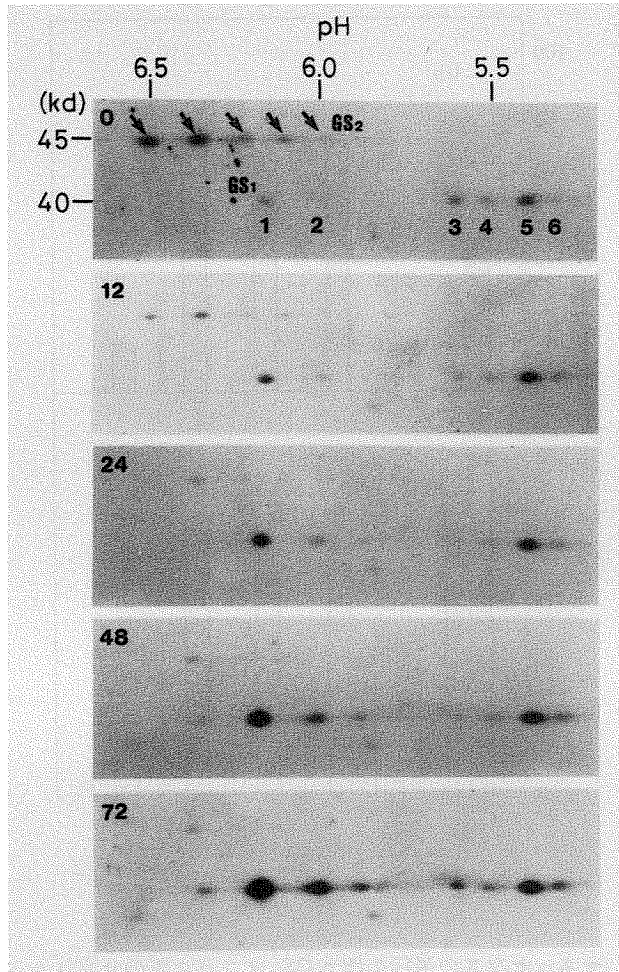


Fig. 33. GS₁サブユニットイソタンパク質の mRNA のセネッセンスの進行に伴う量的変動

切り取って暗所に置き、セネッセンスを進行させた子葉から poly (A)⁺RNA を調製し、³⁵S-メチオニンを含むコムギ胚無細胞タンパク合成系を用いて翻訳反応を行なわせた。翻訳産物の放射活性をそろえてトウモロコシの GS₁ にたいする特異抗体で処理し、得られた抗原抗体複合体を二次元電気泳動法で分離した後、フルオログラフィーによって標識された抗原を検出した。GS₁ サブユニットイソタンパク質の翻訳産物には 1 から 6 の数字を付けて示した。矢印は、GS₂ サブユニットイソタンパク質の翻訳産物を示している。

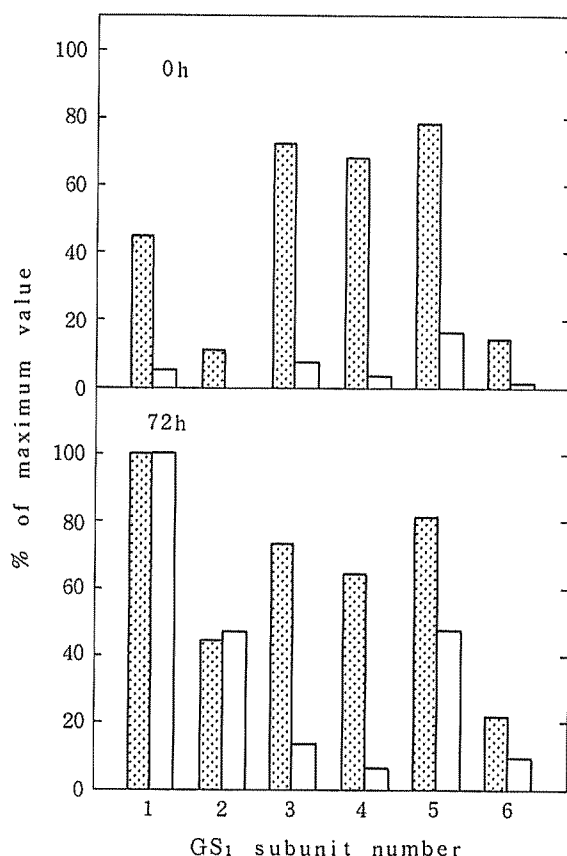


Fig. 34. セネッセンスの進行に伴う GS₁ タンパク質のサブユニット構成およびそれぞれのサブユニットイソタンパク質の mRNA の量的変動

Fig. 32 で検出された GS₁ のサブユニットイソタンパク質の各スポットの 530 nm の反射光, および, Fig. 33 で検出された GS₁ の各サブユニットイソタンパク質の mRNA の翻訳産物の黒化度をデンストメーターで測定して数値化し, それぞれの最大値を 100 % として表わした。斜線はタンパク量, 白ヌキは mRNA 量を示している。

光条件下でのセネッセンスおよび暗処理後の光再照射の影響

本章で記述したこれまでの実験においては, すべて暗処理によってセネッセンスを誘導した子葉から調製した Poly (A) ⁺ RNA を用いている。第 3 章で述べたことから, ここで見られたグルタミン合成酵素をコードする mRNA の量的変動は暗処理による変化であり, セネッセンスに関与した

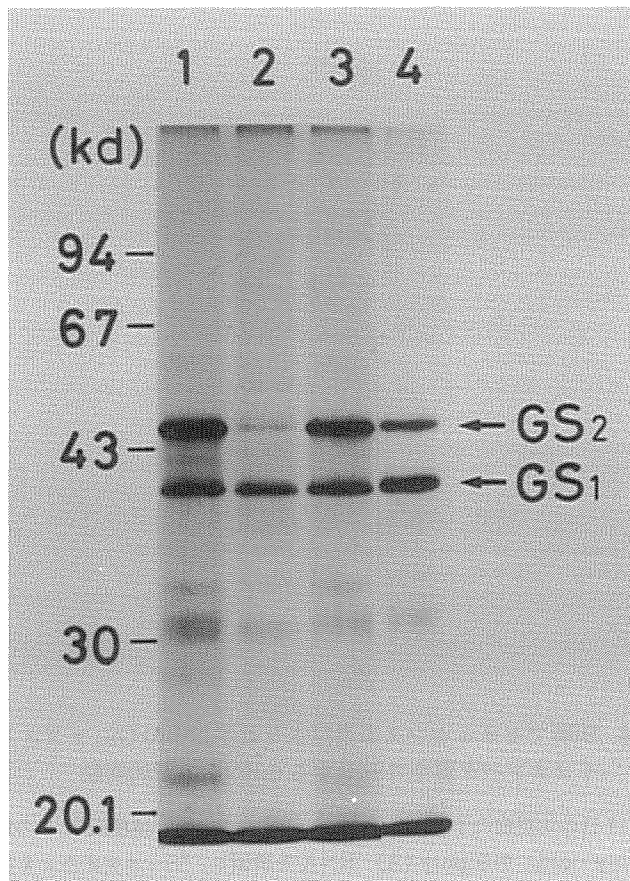


Fig. 35. GS₁およびGS₂サブユニットタンパク質のmRNAにたいする光の影響、および、明所でセネッセンスを進行させた子葉における両mRNAの量的変動

播種後14日の幼植物の子葉 (lane 1)、その幼植物を48時間暗処理した子葉 (lane 2)、48時間の暗処理後、24時間光照射した子葉 (lane 3)、および、播種後21日の幼植物子葉 (lane 4) からそれぞれ poly (A)⁺RNA を調製し、³⁵S-メチオニンを含むコムギ胚無細胞タンパク合成系を用いて翻訳反応を行なわせた。翻訳産物の放射活性をそろてトウモロコシのGS₁にたいする特異抗体で処理し、得られた抗原抗体複合体をSDS-PAGEで分離した後、フルオログラフィーによって標識された抗原を検出した。

変化ではない可能性も考えられる。そこで、暗処理をほどこしたハツカダイコン幼植物に光を再照射した場合、および、連続光下で長期間育てることによりセネッセンスを進行させた場合、子葉中のグルタミン合成酵素をコードするmRNAがどのように変動するかを調べた (Fig. 35, 36)。

連続光下で育てた播種後14日のハツカダイコン幼植物を48時間暗所に置いた後、光を再照射した

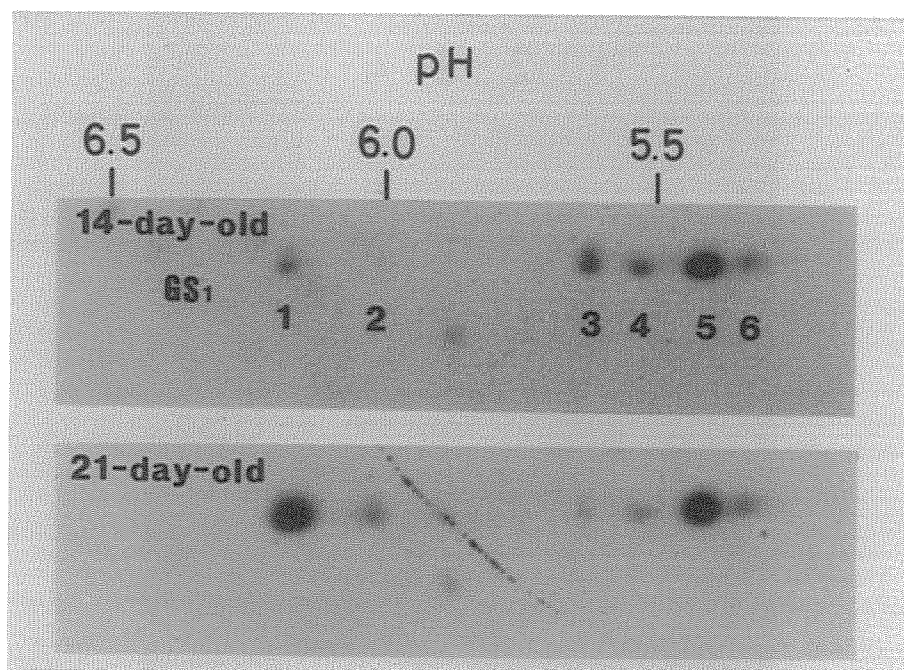


Fig. 36. 明所でセネッセンスを進行させた子葉中の GS_1 サブユニット
イソタンパク質をコードする mRNA の量的変動

播種後 14 日の幼植物の子葉 (14-day-old), および, 播種後 21 日の幼植物子葉 (21-day-old) から poly (A)⁺RNA を調製し, ³⁵S-メチオニンを含むコムギ胚無細胞タンパク合成系を用いて翻訳反応を行なわせた。翻訳産物の放射活性をそろえてトウモロコシの GS_1 にたいする特異抗体で処理し, 得られた抗原抗体複合体を二次元電気泳動法で分離した後, フルオログラフィーによって標識された抗原を検出した。 GS_1 サブユニットイソタンパク質の翻訳産物には 1 から 6 の数字を付けて示した。

子葉, および連続光下で 21 日間育てることによりセネッセンスが進行した子葉から poly (A)⁺RNA 調製した。その翻訳産物のうち GS_1 にたいする特異抗体と反応するものを SDS-PAGE で分離し, フルオログラフィーによって検出した (Fig. 35)。 GS_2 の前駆体である 45 kDa のポリペプチドは, 暗処理によって減少したが, 光の再照射によって増加した。また, 21 日間連続光下で育てた幼植物の子葉においては, 播種後 14 日の子葉に比べて減少が認められた。ところが, GS_1 の mRNA の翻訳産物は, 暗処理およびその後の光照射によっても変化が見られなかった。また, 21 日間連続光下で育てた幼植物子葉においては増加が認められた。この結果から, GS_1 をコードする mRNA の増加は光を消したことにたいする反応ではなく, セネッセンスの進行に強く関連したものであることがわかった。また, GS_2 の mRNA 量は光によって調節を受けるが, セネッセンスの進行に伴って減少してゆくことがわかった。

前項において、暗所におけるセネッセンスの進行に伴い GS_1 タンパク質のサブユニット 1 および 2 をコードする mRNA に顕著な量的増加が認められた。同様の変化が播種後 21 日の連続光下でセネッセンスを進行させた子葉においても起こっているかどうかを前項と同様に調べた (Fig. 36)。

このような子葉においても、サブユニット 1 をコードする mRNA の翻訳産物は播種後 14 日の子葉のそれに比べて顕著な増加が認められた。また、14 日目の子葉から調製した poly (A) ⁺RNA の翻訳産物からは、サブユニット 2 が検出されないが、21 日目の子葉を用いた場合にはその存在が認められた。サブユニット 3, 4, 5 の mRNA には量的変動が見られず、サブユニット 6 の mRNA については若干の増加が認められた。この結果からも、 GS_1 サブユニット 1 および 2 の mRNA の顕著な増加は、光を消したことによる影響ではなく、セネッセンスに強く結び付いたものであることがわかった。

考 察

本章の実験結果から、暗処理によってセネッセンスを進行させたハツカダイコン子葉において葉緑体グルタミン合成酵素タンパク質およびその mRNA 量は減少するが、逆にそのアイソザイムである細胞質グルタミン合成酵素タンパク質およびその mRNA 量は増加していることが明らかになった (Fig. 28, 31)。単位生重量あたりの抽出可能な poly (A) ⁺RNA の量は暗所における子葉のセネッセンスの進行に伴って減少し、72 時間後においては、初めの 30 % まで減少している。抽出可能な poly (A) ⁺RNA の量が実際の細胞中の mRNA 量を反映しているとする、相対的な GS_1 の mRNA 量は 72 時間の暗処理によって 6.7 倍に増加していることから、単位生重量あたりに換算しても 2 倍以上に増加していることになる。したがって、 GS_1 の mRNA の分解速度がセネッセンスの進行に伴って特異的に低下する可能性を考えなければ、 GS_1 遺伝子の転写活性がセネッセンスの過程で上昇していると考えなければならない。この GS_1 に関する知見は、セネッセンスの過程における機能のわかった遺伝子の活性化に関するはじめての例である。

ドクムギの緑葉切片の暗所におけるセネッセンスの過程で、タンパク質を分解し、窒素の転流可能な形態であるアミドに転換する際に働くと考えられるプロテアーゼ、グルタミン酸脱水素酵素、グルタミン酸オキザロ酢酸アミノ転移酵素などの諸酵素の活性が上昇するが、全グルタミン合成酵素の活性は減少することが報告されている (Thomas 1978)。ハツカダイコン子葉においても粗酵素画分の全グルタミン合成酵素の比活性は 72 時間の暗処理で始めの約 50 % に減少した (Fig. 25)。ただし、単位タンパク量あたりの GS_2 のタンパク質量は 72 時間の暗処理によって始めの約 50 % に減少しており、また GS_1 のタンパク質量は増加している。したがってこの比活性の減少は全活性の主要な部分を占める GS_2 の減少によるものであり、 GS_1 の活性は増加しているか少なくとも暗処理前のレベルを保っていると考えられる。以上の結果は、細胞質グルタミン合成酵素の mRNA の量的増加はその酵素タンパク質の *de novo* 合成をもたらし、その活性上昇によってセネッセンスの際の緑葉から植物体への窒素の転流を容易にしている可能性を示している。セネッセンスの際に転流される窒素の最大の供給源は葉緑体に存在するタンパク質である。本章の結果から考えると、セネッセンスの進行に伴う葉緑体タンパク質の分解によって生じたアミノ酸は葉緑体内でグルタミンにまで転換されるのではなく、細胞質に輸送された後、 GS_1 によってグルタミンに転換され、植物体に転流されるものと考えられる。一方、 GS_2 の mRNA は第 2 章で述べた光合成に関与するタンパク質の mRNA と同様に光に依存して増減した。この酵素はもっぱら葉緑体の持つ機能である窒素同化に働いているとすると、このような量的変動は納得できるものである。

Guizら(1979)はイネ(*Oryza sativa* L.)の黄化芽生えの葉が緑化する際、グルタミン合成酵素活性の大部分をしめていたGS₁の活性は低下し、逆にGS₂の活性が上昇して、緑葉においてはGS₂がグルタミン合成酵素活性の大半をしめるようになることを報告している。また、インゲンの緑葉においては、GS₂タンパク質が全グルタミン合成酵素タンパク質の大半をしめているが、黄化葉においてはGS₁とGS₂がほぼ等量存在していることが報告されている(Lara et al. 1984)。これらの観察は、GS₂の発現が光によって誘導され、逆にGS₁の発現は光によって阻害されており、光を除くことによって誘導されることを予想させる。しかしながらハツカダイコンの子葉においてはGS₂のmRNAは暗処理によって減少し、その後の光照射によって増加するが、GS₁のmRNAは暗処理および光の再照射によっても変動が見られないこと(Fig. 35)から、GS₂のmRNAの量は光によって調節を受けるが、GS₁については光による制御を受けていないと考えられる。ところが、連続光下で長期間育てた幼植物の子葉においては、GS₂のmRNAに減少が見られること(Fig. 35)から、GS₂のmRNAの量は、黄化植物が緑化する際や成熟葉においては光によって調節されているが、セネッセンスという分化の最終段階においては光以外の要因によって調節を受けていると考えられる。また、GS₁のmRNAは、連続光下で育てた幼植物の子葉において増加が見られること(Fig. 35)から、光による調節ではなくセネッセンスの進行に強く結び付いて増加すると考えられる。

ハツカダイコン子葉の可溶性画分から、GS₁については6種、GS₂については5種の等電点を異にするサブユニットが検出された(Fig. 32)。GS₂が前駆体タンパク質として合成されることを考慮するとこれらのサブユニット種はすべてpoly(A)⁺RNAの無細胞タンパク合成系における翻訳産物中から検出されたポリペプチドに対応していること(Fig. 33)から、それぞれのサブユニットに対応するmRNAが存在し、さらにその遺伝子が存在すると考えられる。タバコのGS₂(Hirel et al. 1984)、エンドウの根粒に特異的なグルタミン合成酵素GS_n(Tingey et al. 1987)、インゲンのGS₁、GS₂、およびGS_n(Lara et al. 1984)においても等電点の異なる数種のサブユニットの存在が知られている。インゲンの根のグルタミン合成酵素は α および β の2種のサブユニットから構成されているが、根粒菌の感染によって根粒が形成される過程で α サブユニットは消失し、 γ サブユニットが新たに合成されることによって根粒中のグルタミン合成酵素は β および γ の2種のサブユニットから構成されるようになることが報告されている。本章の実験から、細胞質グルタミン合成酵素という同じ機能を持ったタンパク質の遺伝子群はそれぞれ異なる制御を受けており、一部のメンバーの遺伝子のみの発現がセネッセンスの進行に関連して活性化され、セネッセンスを起こした子葉で働くグルタミン合成酵素を*de novo*に合成し、かつその構成を変化させることによって葉からの窒素の転流を容易にしていることが示唆された。ただし、サブユニット構成の変化がグルタミン合成酵素活性にどのような影響を及ぼしているかについては、さらに酵素学的な研究を行なう必要がある。

一般にマメ科植物の根のグルタミン合成酵素活性は根粒菌の感染により上昇することが知られている(Lara et al. 1983)。Hirelら(1987)は、ダイズの根のGS₁の発現は根粒菌の感染によって増大するが、窒素固定能を持たない変異株の感染によってはそれが見られないこと、および、外からNH₄NO₃または(NH₄)₂SO₄を加えることによっても短時間で発現の増大が見られるが、KNO₃を加えた場合にはさほど急速な増大が見られないことを報告した。このことは、マメ科植物の根のGS₁の発現はアンモニアによって誘導されることを示唆している。ドクムギの緑葉のセネッセンスの進行に伴って、グルタミン酸脱水素酵素活性が上昇することが知られており(Thomas 1978)、セネッセンスを起こした緑葉細胞中においては、アンモニアの濃度が高くなる可能性が考えられる。

ハツカダイコン子葉のセネッセンスの際に顕著な増加が見られた GS₁ サブユニットタンパク質 1 および 2 をコードする遺伝子の発現は、セネッセンスの進行に伴うアミノ酸代謝のこう進によって細胞内のアンモニアの濃度が上昇し、その結果として誘導されるのかもしれない。

要 約

- 1) トウモロコシのグルタミン合成酵素に対する特異抗体を用いた免疫化学的な観察により、ハツカダイコンの子葉から細胞質に局在するグルタミン合成酵素および葉緑体に局在するグルタミン合成酵素の 2 種のアイソザイムが検出された。
- 2) 暗所におけるセネッセンスの進行に伴い、子葉の単位生重量あたりの葉緑体に局在するグルタミン合成酵素タンパク質およびその mRNA の蓄積量は減少するが、細胞質に局在するグルタミン合成酵素タンパク質の蓄積量はほぼ一定のレベルを保ち、さらにその mRNA は顕著に増加していることを示した。
- 3) ハツカダイコン子葉の葉緑体グルタミン合成酵素は 5 種、細胞質グルタミン合成酵素は 6 種の等電点を異にするサブユニットから構成されており、それぞれのサブユニットに対応する mRNA 種が存在することを示唆した。
- 4) 暗所におけるセネッセンスの過程で 6 種の細胞質に局在するグルタミン合成酵素サブユニットタンパク質のうち、2 種のみが顕著に増加を示すこと、この増加はそのサブユニットタンパク質に対応する mRNA 種の顕著な増加によるものであり、この変化がセネッセンスを起こした細胞で働くグルタミン合成酵素タンパク質の構成を変化させ、セネッセンスの際の窒素の転流を容易にしている可能性を示唆した。
- 5) 成熟したハツカダイコン子葉においては、葉緑体に局在するグルタミン合成酵素の mRNA 量は光によって正に調節されているが、細胞質に局在するグルタミン合成酵素の mRNA 量は光による調節を受けないことを示した。さらに、連続光下で長期間育てることによってセネッセンスが進行した子葉においても葉緑体グルタミン合成酵素の mRNA は減少し、細胞質グルタミン合成酵素の mRNA は増加していること、かつ暗所で増加が見られた 2 種のサブユニットをコードする mRNA 種が同様に増加していることを明らかにした。この結果により、暗所におけるセネッセンスの進行に伴ってみられた細胞質グルタミン合成酵素タンパク質およびその mRNA の変動は暗処理にたいする応答ではなく、セネッセンスの進行に強く結び付いた遺伝子発現の活性化であることをさらに強く示唆した。

第7章 総合考察および総括

緑葉のセネッセンスに関する研究は細胞学的、生理学的、生化学的に多くの植物で行なわれており、多くの現象が記載されてきた。緑葉のセネッセンスは植物体全体が枯死する時だけではなく、植物の生活環の様々な局面で見られる現象である。この現象は、光、栄養素、水分、温度などの環境因子、加齢、植物ホルモンなどの内的な因子によってその進行が調節され、個体もしくは種を維持するために積極的に緑葉を枯死させる機構として捉えることができる。高等植物は自分が生育している環境から逃れる術がなく、様々に変化する環境の中でそれに適応して生育してゆかねばならない。その様々な環境変化に対応するための遺伝形質を獲得し、刺激に対応した複雑な遺伝子の発現機構を備えるようになったものと考えられる。ある種の遺伝子の発現は複数の環境刺激によって同様に変動し、またある種の遺伝子については異なった環境刺激に対応して発現する複数のコピーを持つようになったと考えられる。このようにして高等植物は、環境の変化に対応して発現する遺伝子の構成を変化させ、その結果新しい環境に適応して生育を可能にしてきたと考えられる。緑葉のセネッセンスに関しても外的な環境因子は直接的に、あるいは、内的な環境因子を変化させることによって緑葉細胞中に発現する遺伝子の構成を変化させ、セネッセンスを引き起こすと考えられる。

遺伝子発現の調節という言葉は、多くの場合、転写レベルの調節を意味する。しかし、遺伝子の発現をタンパク質としての機能が発現するまでと考えると、その調節部位は転写の段階だけでなく、mRNAのプロセッシング、mRNAの安全性、翻訳、タンパク質の修飾および機能する部位への移行、タンパク質の安定性など、多くの段階が考えられる。このような観点から、第2章においては暗処理という環境変化に対応してセネッセンスを起こすハッカダイコン子葉を緑葉のセネッセンスのモデルシステムとして用い、細胞核由来の翻訳可能なmRNAの構成がどのように変動しているかを調べ、セネッセンスの進行に伴って特異的なmRNA種が増減していることを明らかにした。そして、セネッセンスを開始した緑葉においては単に生命活動に必要な遺伝子の発現が停止してゆくのではなく、様々な遺伝子の発現が転写レベルで活性化されていることを示唆した。ただし、セネッセンスに関連して転写以降のレベルでその発現が調節されている遺伝子群が存在する可能性も否定はできない。第3章ではさらに、暗所におけるセネッセンスの進行に伴うmRNAのレベルから見た変動が、明所でセネッセンスが進行した子葉中でもほぼ同様に認められることから、暗処理によってその発現量に変動が見られた多くの遺伝子は、光以外のなんらかの内的因子のよっても同様に調節を受けることを明らかにした。ただし、これは単に光による遺伝子発現の調節機構が加齢に伴って失われたためである可能性も否定できない。

第4章においては、緑葉のセネッセンスに伴う葉緑体の崩壊を導く細胞核の支配機構を知る手懸かりとして、単離した無傷葉緑体に輸送されるタンパク質の変化を調べ、多くの葉緑体タンパク質のmRNA量が減少する中で、葉緑体に輸送される新しいタンパク質のmRNAが出現してくることを明らかにし、これらの新しく輸送されるようになったタンパク質が葉緑体の退化、崩壊に関与している可能性を示唆した。セネッセンスを起こした葉における葉緑体の崩壊の過程においては、その比較的后期までその包膜は健全であり、チラコイド膜などの内部構造から崩壊してゆくことが電子顕微鏡によって観察されている(Barton 1966, Butler 1967)。ここで輸送の増加が認められたタンパク質は、葉緑体に輸送されたのち、RuBPCaseをはじめとする葉緑体タンパク質の分解、

クロロフィルの分解、膜構造の破壊などに関与しているものと推察されるが、現時点においてその機能は全くわかっていない。また、セネッセンスの進行の伴い、葉緑体自身のタンパク質輸送の選択性が変化することが認められ、新しく出現してくるタンパク質を積極的に取り込んでいることが推察された。葉緑体に輸送されるタンパク質は細胞質においてそのアミノ末端に葉緑体への移行のシグナルと考えられる transit peptide を持った前駆体として合成され、葉緑体内でプロセッシングを受けて成熟したタンパク質になることが知られている (Chua & Schmidt 1979, Schmidt & Mishkind 1986)。さらに、まだ確認されていないが、葉緑体包膜上にその transit peptide と相互作用を持つようなレセプターの存在が示唆されている (Pfisterer et al. 1982, Cline et al. 1985)。包膜に輸送されるタンパク質をコードする細胞核由来の mRNA 種にも、セネッセンスに伴った量的変動が見られ、このような変化が、葉緑体のタンパク質輸送系の変化を引き起こしている可能性を示唆した。

セネッセンスを起こした葉の細胞の葉緑体内で分解されたタンパク質やクロロフィルなどの分解産物は、包膜を通過して細胞質へ運ばなければならない。このような葉緑体の中から外への輸送系の活性がセネッセンスの進行に伴って増加あるいは新生されている可能性も考えられる。

第5章においては、セネッセンスの過程における葉緑体遺伝子の発現の様子について、RuBPCase LSu および 32-kDa タンパク質を例にして述べた。RuBPCase LSu および光化学系 II の 32-kDa タンパク質は、若いハッカダイコン子葉においては光照射下で盛んに合成されているが、暗処理によってセネッセンスを開始した子葉においては全く合成されていない。RuBPCase LSu をコードする mRNA は暗所におけるセネッセンスの進行に伴って減少するが、それでも比較的大量に存在しており、LSu が全く合成されないことを説明できない。さらに、32-kDa タンパク質の mRNA にはほとんど量的変動が見られず、翻訳レベルにおける遺伝子発現調節機構の存在を示唆した。

ハッカダイコン子葉における LSu の光に対応した合成は、32-kDa タンパク質ほど急速な変化をせず、SSu の合成の変化にほぼ対応して比較的ゆるやかに変動していることを明らかにした。このことは、RuBPCase LSu と 32-kDa ではタンパク質合成における翻訳レベルの調節機構は多少異なっていることを示唆している。

葉緑体遺伝子の発現は、緑葉のセネッセンスのかなり初期において停止することが示唆されているが、その制御機構については全くわかっていない。ここで得られた結果は、緑葉のセネッセンス時における葉緑体遺伝子発現の調節機構を探る上で重要な手懸かりを提供している。第4章で述べた細胞核から葉緑体へ送られてくる情報の中にこのような制御機構に関与するものが含まれていることも充分考えられる。また、黄化植物の緑化過程の研究から、葉緑体遺伝子の発現は転写以降のレベルで主に調節されている可能性が示唆されているが、ここで得られたような明確な系は今のところ見出されていない。したがって、セネッセンスとは離れて、成熟した緑葉の葉緑体における光による翻訳レベルの遺伝子発現の調節機構を解明するためにも有効な実験系を提供したと言える。

第6章においては、緑葉のセネッセンスの最も重要な生理学的意義である、葉から植物体への窒素の転流機構の一部を担うと考えられるグルタミン合成酵素について検討した。葉緑体に局在するグルタミン合成酵素のタンパク質およびその mRNA 生重量あたりの存在量はセネッセンスの進行に伴って減少するが、そのアイソザイムである細胞質に局在するグルタミン合成酵素タンパク質の存在量は増加し、さらにその mRNA は顕著に増加することを明らかにした。いくつかの加水分解酵素についてはその活性がセネッセンスの進行に伴って増加すること (Spencer & Titus 1972, Peterson & Huffaker 1975)、また、あるものについては *de novo* の合成があること (Sacher & Davies 1974) などが報告されているが、その機能、細胞内局在性、さらにサブユニット構成まで知

られている酵素タンパク質で、セネッセンスに伴ってその遺伝子が活性化されることを直接的に証明したのはこのGS₁がはじめてである。

セネッセンスを起こした葉の細胞中で分解されたタンパク質の産物であるアミノ酸は、その大部分がそのままの形では運ばれず、一旦アスパラギンもしくはグルタミンに転換されてから転流される (Zimmermann 1960)。緑葉がセネッセンスする際に転流される窒素の最大の供給源は葉緑体を構成するタンパク質である。タンパク質の分解によって葉緑体内に生じたアミノ酸のアミノ基は、葉緑体に局在するグルタミン合成酵素によってグルタミンにまで転換されるのではなく、おそらくアミノ酸のまま細胞質に輸送された後、細胞質グルタミン合成酵素によってグルタミンに転換されると考えられる。グルタミン合成酵素は、セネッセンスの進行に伴ってその活性が上昇したグルタミン酸脱水素酵素の働きによって生成されたアンモニアとグルタミン酸からグルタミンを生成することにより窒素の転流機構の一翼を担っていると考えられる。

根粒菌の感染によるダイズの根におけるグルタミン合成酵素活性の上昇は、根粒菌の働きによって生成されたアンモニアによってその遺伝子発現が活性化されたためであることが示唆されている (Hirel et al. 1987)。アミノ酸代謝の過程で生じたアンモニアが、セネッセンスを起こした葉に特異的なグルタミン合成酵素遺伝子の発現を活性化している可能性も考えられる。

原核生物のサルモネラ (*Salmonella typhimurium*) において、活性型のグルタミン合成酵素は、それ自身がヒスチジン代謝に関与する一群の酵素をコードするオペロンの転写を窒素欠乏条件化で誘導することが知られている (Tyler et al. 1974)。高等植物のグルタミン合成酵素はその構成や活性化機構も原核生物とは異なっており、また、細胞核遺伝子の発現調節機構も原核生物とは異なっているが、グルタミン合成酵素などの酵素活性を持ったタンパク質やアンモニアなどの代謝産物が、緑葉のセネッセンスに関与するような遺伝子の発現調節に働いている可能性も考えられる。

高等植物のグルタミン合成酵素は、等電点の異なる数種のサブユニットから構成される 8 量体であることが知られている。ハツカダイコン子葉の細胞質グルタミン合成酵素は、6 種の等電点を異にするサブユニットから構成されており、そのうちの 2 種のためのタンパク質およびその mRNA がセネッセンスの過程で顕著に増加していることを明らかにした。インゲンマメの根においては、根粒菌の感染によって形成される根粒の発達に伴ってグルタミン合成酵素サブユニットの構成が変動することが知られている。ダイズの例から考えると、この質的な変化もグルタミン合成酵素遺伝子群のあるメンバーのみがアンモニアによって活性化された結果である可能性も考えられる。また、トマトの RuBPCase SSu をコードする遺伝子群のメンバーの発現は器官特異的であり、緑化の際には葉で発現するメンバーの構成が変化することが報告されているので (Sugita & Gruissem 1987)、そのサブユニット構成も器官特異的であり、また器官の発達段階により異なっていると考えられる。このような多重遺伝子族の存在は、高等植物において多くのタンパク質について報告されている。器官特異的、もしくは発達段階に特異的なサブユニット構成の変化は、生長、分化によって変化した細胞内の環境下で、そのタンパク質の機能を十分に発揮するための対応策であるとも考えられる。いずれにしても、高等植物は、生長、分化、環境刺激に対応して発現する多重遺伝子族を発達させてきたものと考えられる。

高等植物は、外的な環境からの刺激に対応するため、また、生長、分化に伴ってその本来の機能を失い、自分の生育にとって負担になるような器官、葉を積極的に落とすための遺伝子およびその発現調節機構を備えてきたと考えられる。外的もしくは内的な様々な環境刺激、光、植物ホルモン、加齢、温度、栄養素、水分、などに対応してセネッセンスの進行に関与する、それぞれの刺激に共通な、あるいは特異的な遺伝子群の発現を活性化し、他の多くの細胞核遺伝子および葉緑体の遺伝

子の発現を不活性化しているのであろう。セネッセンスを起こした葉の葉緑体には、その崩壊に
与する細胞核遺伝子の産物が輸送され、また葉緑体自身もそのような産物を積極的に取り込むよう
になり、タンパク質やクロロフィル、核酸などが分解されてゆくと考えられる。これらの分解産物
を植物体に転流させる系も、セネッセンスの進行に伴って形成され、植物にとって重要な栄養素を
枯れ落ちてゆく葉から積極的に回収しているものと考えられる。

謝 辞

本研究を行なうにあたり、終始適切な御指導、御助言をいただきました渡辺昭助教授に深く感謝致します。ホスホリブロキナーゼにたいする抗体ならびにグルタミン合成酵素にたいする抗血清を快く分与して下さった名古屋大学農学部植物栄養および肥料学の杉山達夫教授、33-kDa タンパク質にたいする抗血清を分与して下さった東邦大学の桑原朋彦博士、タバコ葉緑体のクローン化した遺伝子断片を分与して下さった名古屋大学遺伝子実験施設の杉浦昌弘教授および篠崎一雄助教授に感謝致します。また、現在農林水産省におられる南栄一、篠原健司両博士をはじめ、生化学制御研究施設の皆様には大変お世話になりました。ここに合わせて感謝致します。

文 献

- Aharoni, N. and Lieberman, M. (1979) Ethylene as a regulator of senescence in tobacco leaf discs. *Plant Physiol.* 64: 801-804
- Aharoni, N., Lieberman, M. and Sisler, H. D. (1979) Patterns of ethylene production on senescing leaves. *Plant Physiol.* 64: 796-800
- Altman, A. (1982) Retardation of radish leaf senescence by polyamines. *Physiol. Plant.* 54: 189-193
- Apel, K. (1981) The protochlorophyllide holochrome of barley (*Hordeum vulgare* L.): Phytochrome-induced decrease of translatable mRNA coding for the NADPH: protochlorophyllide oxidoreductase. *Eur. J. Biochem.* 120: 89-93
- Arnon, D. I. (1949) Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol.* 24: 1-15
- Arnon, D. I. and Hoagland, D. R. (1940) Crop production in an artificial solutions and soils with special reference to factors influencing yield and absorption of inorganic nutrients. *Soil Sci.* 50: 463-471
- Aviv, H. and Leder, P. (1972) Purification of biologically active globin messenger RNA by chromatography on oligothymidylic acid-cellulose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69: 1408-1418
- Barton, R. (1966) Fine structure of mesophyll cells in senescing leaves of *Phaseolus*. *Planta* 71: 314-325
- Bick, M. D., Liebke, H., Cherry, J. H. and Strehler, B. L. (1970) Change in leucyl- and tyrosyl-tRNA of soybean cotyledons during plant growth. *Biochim. Biophys. Acta.* 204: 175-182
- Bick, M. D. and Strehler, B. L. (1971) Leucyl transfer RNA synthetase changes during soybean cotyledon senescence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 68: 224-228
- Biswal, U. C. and Sharma, R. (1976) Phytochrome regulation of senescence in detached barley leaves. *Z. Pflanzenphysiol.* 80: 71-73
- Blake, M. S., Johnston, K. H., Russell-Jones, G. J. and Gotschlich, E. C. (1984) A rapid, sensitive method of detection of alkaline phosphatase-conjugated anti-antibody on Western blots. *Anal. Biochem.* 136: 175-179
- Bollard, E. G. (1960) Transport in the xylem. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, ed. by Machlis, L. and Briggs, W. R., vol. 11: 141-166, Annual Reviews Inc., Palo Alto, California
- Butler, R. D. (1967) The fine structure of senescing cotyledons of cucumber. *J. Exp. Bot.* 18: 535-543
- Chirgwin, J. M., Przybyla, A. E., MacDonald, R. J. and Rutter, W. J. (1979) Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry* 18: 5294-5299
- Chua, N.-H. and Schmidt, G. W. (1979) Transport of proteins into mitochondria and chloroplasts. *J. Cell Biol.* 81: 461-483
- Cline, K., Werner-Washburne, M., Lubben, T. H. and Keegstra, K. (1985) Precursors to two nuclear-encoded chloroplast proteins bind to the outer envelope membrane before being imported into chloroplasts. *J. Biol. Chem.* 260: 3691-3696

- Cohen, A. S., Popovic, R. B. and Zalik, S. (1979) Effects of polyamines on chlorophyll and protein content, photochemical activity, and chloroplast ultrastructure of barley leaf discs during senescence. *Plant Physiol.* 64: 717-720
- Colbert, J. T., Hershey, H. P. and Quail, P. H. (1983) Autoregulatory control of translatable phytochrome mRNA levels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 2248-2252
- Cuello, J., Quiles, M. J. and Sabater, B. (1984) Role of protein synthesis and light in the regulation of senescence in detached barley leaves. *Physiol. Plant.* 60: 133-138
- Cullimore, J. V., Gebhardt, C., Saarelainen, R., Mifflin, B. J., Ider, K. B. and Barker, R. F. (1984) Glutamine synthetase of *Phaseolus vulgaris* L. : Organ-specific expression of a multigene family. *J. Mol. Appl. Gen.* 2: 589-599
- Dalling, M. G., Tang, A. B. and Huffaker, R. C. (1983) Evidence for the existence of peptide hydrolase activity associated with chloroplasts isolated from barley mesophyll protoplasts. *Z. Pflanzenphysiol.* 111: 311-318
- Deshaies, R. J., Fish, L. E. and Jagendorf, A. T. (1984) Permeability of chloroplast envelopes to Mg^{2+} : Effects on protein synthesis. *Plant Physiol.* 74: 956-961
- Douce, R. and Joyard, J. (1982) Purification of the chloroplast envelope. in *Methods in Chloroplast Molecular Biology*, ed. by Edelman, N., Hallick, R. B. and Chua, N.-H. pp. 239-256, Elsevier Biomedical, Amsterdam
- Elkinawy, M. (1984) Hormonal changes associated with leaf senescence in cotton (*Gossypium harhadense*). *Physiol. Plant.* 62: 593-598
- Fish, L. E. and Jagendorf, A. T. (1982a) High rates of protein synthesis by isolated chloroplasts. *Plant Physiol.* 70: 1107-1114
- Fish, L. E. and Jagendorf, A. T. (1982b) Light-induced increase in the number and activity of ribosomes bound to pea chloroplast thylakoids *in vivo*. *Plant Physiol.* 69: 814-825
- Gersten, D. M., Zapolski, E. J. and Ledley, R. S. (1983) Rapid polyacrylamide slab gel drying using a microwave gel dryer. *Anal. Biochem.* 129: 57-59
- Grossman, A. R., Bartlett, S. G. and Chua, N.-H. (1980) Energy-dependent uptake of cytoplasmically synthesized polypeptides by chloroplasts. *Nature* 285: 625-628
- Grossman, A. R., Bartlett, S. G., Schmidt, G. W., Mullet, J. E. and Chua, N.-H. (1982) Optimal conditions for post-translational uptake of proteins by isolated chloroplasts. *J. Biol. Chem.* 257: 1558-1563
- Gruissem, W., Deng, X.-W., Jones H., Stern, D., Tonkyn, J. & Zurawski, G. (1987) Transcriptional and post-translational regulation of chloroplast gene expression. in *Plant Molecular Biology*
- Guiz, C., Hirel, B., Shedlofsky, G. and Gadal, P. (1979) Occurrence and influence of light on the relative proportions of two glutamine synthetases in rice leaves. *Plant Sci. Lett.* 15: 271-277
- Hirel, B., Bouet, C., King, B., Layzell, D., Jacobs, F. and Verma, D. P. S. (1987) Glutamine synthetase genes and regulated by ammonia provided externally or by symbiotic nitrogen fixation. *EMBO J.* 6: 1167-1171
- Hirel, B., Weatherley, C., Cretin, C., Bergounioux, C. and Gadal, P. (1984) Multiple subunit composition of chloroplastic glutamine synthetase of *Nicotiana tabacum* L. *Plant Physiol.* 74:

- Hurewitz, J. and Jagendorf, A. T. (1987) Further characterization of ribosome binding to thylakoid membranes. *Plant Physiol.* 84: 31-34
- Ishizuka, M., Sato, T., Watanabe, A. and Imaseki, H. (1981) Alteration of coding properties of polysome-associated mRNA in potato tuber slices during aging. *Plant Physiol.* 68: 154-157
- Jensen, K. H., Herrin, D. L., Plumley, F. G. and Schmidts, G. W. (1986) Biogenesis of photosystem II complexes: Transcriptional, translational, and posttranslational regulation. *J. Cell Biol.* 103: 1315-1325
- Kaur-Sawhney, R. and Galston, A. W. (1979) Interaction of polyamines and light on biochemical processes involved in leaf senescence. *Plant, Cell and Environment* 2: 189-196
- Kaur-Sawhney, R., Shih, L.-M., Flores, H. E. and Galston, A. W. (1982) Relation of polyamine synthesis and titer to aging and senescence in oat leaves. *Plant Physiol.* 69: 405-410
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685
- Lara, M., Cullimore, J. V., Lea, P. J., Milflin, B. J., Johnston, A. W. B. and Lamb, J. W. (1983) Appearance of a novel form of plant glutamine synthetase during nodule development in *Phaseolus vulgaris* L. *Planta* 157: 254-258
- Lare, M., porta, H., Padilla, J., Folch, J. and Sanchez, F. (1984) Heterogeneity of glutamine synthetase polypeptides in *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Physiol.* 76: 1019-1023
- Leopold, A. C. (1961) Senescence in plant development. *Science* 134: 1727-1732
- Leu, S., Bolli, R., Mendiola-Morgenthaler, L. and Boschetti, S. M. (1984) In-vitro translation of different mRNA-containing fractions of *Chlamydomonas* chloroplasts. *Planta* 160: 204-211
- Liu, X.-Q. and Jagendorf, A. T. (1984) ATP-dependent proteolysis in pea chloroplasts. *FEBS Lett.* 166: 248-252
- Lloid, E. J. (1980) The effects of leaf age and senescence on the distribution of carbon in *Lolium temulentum*. *J. Exp. Bot.* 31: 1067-1079
- Mae, T., Kai, N., Makino, A. and Ohira, K. (1984) Relation between ribulose biphosphate carboxylase content and chloroplast number in naturally senescing primary leaves of wheat. *Plant Cell Physiol.* 25: 333-336
- Makovetzki, S. and Goldshmidt, E. E. (1976) A requirement for cytosolic protein synthesis during chloroplast senescence in the aquatic plant *Anacharis canadensis*. *Plant Cell Physiol.* 17: 859-862
- Malek, L., Bogorad, L., Ayers, A. R. and Goldberg, A. L. (1984) Newly synthesized proteins are degraded by an ATP-stimulated proteolytic process in isolated pea chloroplasts. *FEBS Lett.* 166: 253-257
- Malik, N. S. A. (1987) Senescence in oat leaves: Changes in translatable mRNAs. *Physiol. Plant.* 70: 438-446
- Maniatis, T., Fritsch, E. F. and Sambrook, J. (1982) in *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, pp. 194-196, Cold Spring Harbor Laboratory, New York
- Marcu, K. D. and Dudok, B. (1974) Characterization of a highly efficient protein synthesizing system derived from commercial wheat germ. *Nucl. Acids Res.* 1: 1385-1397

- Martin, C. and Thimann, K. V. (1972) The role of protein synthesis in the senescence of leaves. I. The formation of protease. *Plant Physiol.* 49: 64-71
- McKersie, B. D. and Tompson, J. E. (1978) Phase behaviour of chloroplast and microsomal membranes during leaf senescence. *Plant Physiol.* 61: 639-643
- Meyer, G. and Kloppstech, K. (1983) A rapidly light-induced chloroplast protein with a high turnover coded for by pea nuclear DNA. *Eur. J. Biochem.* 138: 201-207
- Miller, B. L. and Huffaker, R. C. (1981) Partial purification and characterization of endoproteinases from senescing barley leaves. *Plant Physiol.* 68: 930-936
- Minami, E. (1986) Thesis, Nagoya University, pp. 13-51
- Minami, E. and Watanabe, A. (1984) Thylakoid membranes: The translational site of chloroplast DNA-regulated thylakoid polypeptides. *Arch. Biochem. Biophys.* 235: 562-570
- Monroy, A. F., McCarthy, S. A. and Schwartzbach, S. D. (1987) Evidence for translational regulation of chloroplast and mitochondrial biogenesis in *Euglena*. *Plant Sci.* 51: 61-76
- Morgenthaler, J.-J. and Mendiola-Morgenthaler, L. R. (1976) Synthesis of soluble, thylakoid, and envelope membrane proteins by spinach chloroplasts purified from gradients. *Arch. Biochem. Biophys.* 172: 51-58
- Ness, P. J. and Woolhouse, H. W. (1980) RNA synthesis in *Phaseolus* chloroplasts. II. Ribonucleic acid synthesis in chloroplasts from developing and senescing leaves. *J. Exp. Bot.* 31: 235-245
- Nivison, H. T. and Jagendorf, A. T. (1984) Factors permitting prolonged translation by isolated pea chloroplasts. *Plant Physiol.* 75: 1001-1008
- O'Farrell, P. H. (1975) High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* 250: 4007-4021
- O'Farrell, P. Z., Goodman, H. M. and O'Farrell, P. H. (1977) High resolution two-dimensional electrophoresis of basic as well as acidic proteins. *Cell* 12: 1133-1142
- Ohya, K., Fukazawa, H., Kohchi, T., Shirai, H., Sano, T., Umesono, K., Shiki, Y., Takeuchi, M., Chang, Z., Aota, S., Inokuchi, H. and Ozeki, H. (1986) Chloroplast gene organization deduced from complete sequence of liverwort *Marchantia polymorpha* chloroplast DNA. *Nature* 322: 572-574
- O'Neal, D. and Joy, K. W. (1973) Glutamine synthetase of pea leaves. I. Purification, stabilization, and pH optima. *Arch. Biochem. Biophys.* 159: 113-122
- Peoples, M. B., Belharz, V. C., Waters, S. P., Simpson, R. J. and Dalling M. J. (1980) Nitrogen redistribution during grain growth in wheat (*Triticum aestivum* L.) II Chloroplast senescence and the degradation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase. *Planta* 149: 241-251
- Peterson, L. W. and Huffaker, R. C. (1975) Loss of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase and increase in proteolysis activity during senescence of detached primary barley leaves. *Plant Physiol.* 55: 1009-1015
- Pfisterer, J., Lachmann, P. and Kloppstech, K. (1982) Transport of proteins into chloroplasts. Binding of nuclear-coded chloroplast proteins to the chloroplast envelope. *Eur. J. Biochem.* 126: 143-148
- Piechulla, B., Imlay, K. R. C. and Gruissem, W. (1985) Plastid gene expression during fruit ripening in tomato. *Plant Mol. Biol.* 5: 373-384

- Pillay, D. T. N. and Cherry, J. H. (1974) Changes in leucyl, seryl, and tyrosyl tRNAs in aging soybean cotyledons. *Can. J. Bot.* 52: 2499-2504
- Pjon, C.-J. (1981) Effects of cycloheximide and light on leaf senescence in maize and hydrangea. *Plant Cell Physiol.* 22: 847-854
- Sacher, J. A. and Davies, D. D. (1974) Demonstration of *de novo* synthesis of RNase in *Rhoeo* leaf sections by deuterium oxide labeling. *Plant Cell physiol.* 15: 157-161
- Sato, T., Ishizuka, M., Watanabe A. and Imaseki, H. (1980) The synthesis and properties of polysomal RNA in potato tuber slices during the early stage of aging. *Plant Cell Physiol.* 21: 137-147
- Schmidt, G. W., Bartlett, S. G., Grossman, A. R., Cashmore, A. R. and Chua, N.-H. (1981) Biosynthetic pathways of two polypeptide subunits of the light-harvesting chlorophyll a/b protein complex. *J. Cell Biol.* 91: 468-478
- Schmidt, G. W. and Mishkind, M. L. (1986) The transport of proteins into chloroplasts. *Ann. Rev. Biochem.*, ed. by Richardson, C. C., Boyer, P. D., Dawid, I. B. AND Meister, A. 55: 879-912, Annual Reviews, Inc. Palo Alto, California
- Schröder, J., Kreuzaler, F., Schäfer, E. and Hahlbrock, K. (1979) Concomitant induction of phenylalanine ammonia-lyase and flavanone synthase mRNAs in irradiated plant cells. *J. Biol. Chem.* 254: 57-65
- Sedmak, J. J. and Grossberg, S. E. (1977) A rapid, sensitive, and versatile assay for protein using Coomassie Brilliant Blue G250. *Annal. Biochem.* 79: 544-552
- Shinozaki, K., Ohme, M., Tanaka, M., Wakasugi, T., Hayashida, N., Matsubayashi, T., Zaita, N., Chunwongse, J., Obokata, J., Ymaguchi-Shinozaki, K., Ohto, C., Torazawa, K., Meng, B. Y., Sugita, M., Deno, H., Kamogashira, T., Yamada, K., Kusuda, J., Takaiwa, F., Kato, A., Tohdoh, N., Shimada, H. and Sugiura, M. (1986) The complete nucleotide sequence of the tobacco chloroplast genome: Its gene organization and expression. *EMBO J.* 5: 2043-2049
- Skadsen, R. W. and Cherry, J. H. (1983) Quantitative changes in *in vitro* and *in vivo* protein synthesis in aging and rejuvenated soybean cotyledons. *Plant Physiol.* 71: 861-868
- Skinner, M. K. and Griswold, M. D. (1983) Fluorographic detection of radioactivity in polyacrylamide gels with 2,5-diphenyloxazole in acetic acid and its comparison with existing procedures. *Biochem. J.* 209: 281-284
- Soll, J. and Buchanan, B. B. (1983) Phosphorylation of chloroplast ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase small subunit by an envelope-bound protein kinase *in situ*. *J. Biol. Chem.* 258: 6686-6689
- Spencer, P. W. and Titus, J. S. (1972) Biochemical and enzymatic changes in apple leaf tissue during autumnal senescence. *Plant Physiol.* 49: 746-750
- Stoddart, J. L. and Thomas, H. (1982) Leaf senescence. in *Encyclopedia of Plant Physiology.* vol. 14A, ed. by Boulter, D. and Parthier, B., pp. 592-636, Springer-Verlag Berlin
- Sugita, M. and Gruissem, W. (1987) Developmental, organ-specific, and light-dependent expression of the tomato ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase small subunit gene family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 7104-7108
- Sugiura, M. (1963) Effect of red and far-red light on protein and phosphate metabolism in tobacco

- leaf discs. Bot. Mag. 76: 174-180
- Takegami, T. and Yoshida, K. (1975) Remarkable retardation of the senescence of tobacco leaf disks by cordycepin, an inhibitor of RNA polyadenylation. Plant Cell Physiol. 15: 157-161
- Thayer, S. S. and Huffaker, R. C. (1984) Vacuolar localization of endo-proteinases EP₁ and EP₂ in barley mesophyll cells. Plant Physiol. 75: 70-73
- Thimann, K. V., Tetley, R. M. and Krivak, B. M. (1977) Metabolism of oat leaves during senescence. V. Senescence in light. Plant Physiol. 59: 448-454
- Thomas, H. (1975) Regulation of alanine aminotransferase in leaves of *Lolium temulentum* during senescence. Z. Pflanzenphysiol. 74: 208-218
- Thomas, H. (1976) Delayed senescence in leaves treated with the protein synthesis inhibitor MDMP. Plant Sci. Lett. 6: 369-377
- Thomas, H. (1978) Enzymes of nitrogen mobilization in detached leaves of *Lolium temulentum* during senescence. Planta 142: 161-169
- Thomas, H. and Stoddart, J. L. (1975) Separation of chlorophyll degradation from other senescence process in leaves of a mutant genotype of meadow fescue (*Festuca pratensis*). Plant Physiol. 56: 438-441
- Thomas, H. and Stoddart, J. L. (1977) Biochemistry of leaf senescence in grasses. Ann. Appl. Biol. 85: 461-463
- Thomas, H. and Stoddart, J. L. (1980) Leaf senescence. Ann. Rev. Plant Physiol., ed. by Briggs, W. R., Green, P. B. and Jones, R. L. vol. 31: 83-111, Annual Reviews, Inc. Palo Alto, California
- Thomas, P. S. (1983) Hybridization of denatured RNA transferred or dotted to nitrocellulose paper. in Methods in Enzymol., ed. by Wu, R., Grossman, L. and Moldave, K. vol. 100 pp. 255-267, Academic Press, New York
- Tingey, S. V., Walker, E. L. and Coruzzi, G. M. (1987) Glutamine synthetase genes of pea encode distinct polypeptides which are differentially expressed in leaves, roots and nodules. EMBO J. 6: 1-9
- Tischer, E., DasSarma, S. and Goodman, M. (1986) Nucleotide sequence of an alfalfa glutamine synthetase gene. Mol. Gen. Genet. 203: 221-229
- Tobin, E. M. and Silverthorne, J. (1985) Light regulation of gene expression in higher plants. Ann. Rev. Plant Physiol., ed. by Briggs, W. R., Jones, R. L. and Walbot, V. vol. 36: 569-593, Annual Reviews, Inc. Palo Alto, California
- Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 4350-4354
- Tyler, B., Deleo, A. B. and Magasanik, B. (1974) Activation of transcription of hut DNA by glutamine synthetase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71: 225-229
- Udvardy, J., Farkas, G. L., Marre, E. and Fortis, G. (1967) The effects of sucrose and light on the level of soluble and particle-bound ribonuclease activities in excised *Avena* leaves. Physiol. Plant. 20: 781-788
- von Abrams, G. J. (1974) An effect of ornithin on degradation of chlorophyll and protein in excised leaf tissue. Z. Pflanzenphysiol. 72: 410-421

- Wardley, T. M., Bhalla, P. L. and Dalling, M. J. (1984) 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
- Watanabe, A. and Imaseki, H. (1982) Changes in translatable mRNA in senescing wheat leaves. *Plant Cell Physiol.* 23: 489-497
- Watanabe, A. and Price, C. A. (1982) Translation of mRNAs for subunits of chloroplast coupling factor 1 in spinach. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79: 6304-6308
- Williams, R. F. (1955) Redistribution of mineral elements during development. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, ed. by Arnon, D. L. and Machlis, L. 6: 25-42, Annual Reviews, Inc. Stanford, California
- Wittenbach, V. A., Lin, W. and Hebert, R. R. (1982) Vacuolar localization of proteases and degradation of chloroplasts in mesophyll protoplasts from senescing primary wheat leaves. *Plant Physiol.* 69: 98-102
- Woolhouse, H. W. (1967) The nature of senescence in plants. in *Symp. Soc. Exp. Biol.*, ed. by Woolhouse, H. W. 21: 179-214, Cambridge University Press, London
- Yoshida, Y. (1961) Nuclear control of chloroplast activity in *Elodea* leaf cells. *Protoplasma* 54: 476-492
- Zimmermann, M. H. (1960) Transport in the phloem. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, ed. by Machlis, L. and Briggs, W. R. vol. 11: 167-190, Annual Reviews, Inc. Palo Alto, California

Change in Gene Expression during Leaf Senescence

Summary

Leaf senescence is characterized by the degradation of macromolecules such as proteins, nucleic acids and chlorophylls, and redistribution of nutrients (degradation products) to actively growing part of the plant. It has been suggested that leaf senescence is controlled by nuclear genes. Watanabe and Imaseki (1982) presented the first direct evidence for senescence-related changes in gene expression, obtained by analyzing the cell-free translation products of poly(A)⁺ RNA prepared from senescing wheat leaves. Qualitative changes in translatable mRNA during senescence have also been reported for soybean cotyledons (Skadsen and Cherry 1983). These observations indicate that leaf senescence involves not only the turning-off of vital genes, but also temporary and sequential activation of senescence-related genes.

A prominent event in the senescence of green leaves is the decrease in chlorophyll content, which is generally used as an indicator of the progress of senescence. As the term 'chlorophyll degradation' suggests, chloroplasts in senescing leaves degenerate functionally and structurally (Barton 1966, Batt and Woolhouse 1975, Ben-David et al. 1983). These events have long been thought to be under nucleo-cytoplasmic control, on the basis of the senescence-retarding effect of cycloheximide, a potent inhibitor of cytoplasmic translation (Makovetzki and Goldschmidt 1976, Pjon 1981). This concept is also supported by the observation that the degeneration of chloroplasts in *Elodea* is retarded by enucleation of the cells (Yoshida 1961).

As the first step to identify the nuclear genes necessary for leaf senescence and degeneration of chloroplasts, radish cotyledon was chosen as an experimental system because it permits facile isolation of RNA and chloroplasts.

Cotyledons detached from light-grown radish (*Raphanus sativus* L. cv. Comet) seedlings were used as a model system to study the changes in nuclear gene expression during dark-induced senescence of green leaves. Polyadenylated RNA was prepared from the cotyledons at different times and then translated in a wheat germ system. Approximately 1,000 different polypeptides of the translation products were separated from each other by two-dimensional gel electrophoresis. As judged from the density of autoradiographic spots of the translation products, the induction of senescence by dark treatment involved an increase in 26 species, a decrease in 11 species, and a temporary increase and subsequent decrease in 8 species of translatable mRNA. A similar pattern of change in protein synthesis was also observed in the dark-treated cotyledons when the cotyledons were pulse-labeled with ³⁵S-methionine and the soluble proteins separated by two-dimensional gel electrophoresis, though the polypeptide pattern on the gel did not coincide exactly with those of the cell-free translation products. These findings strongly suggest that the process of leaf senescence is not simply a passive and gradual death of the tissue, but involves a drastic and sequential response of the cells to environmental stimuli with respect to the gene expression of the cells.

In the above experiments, the cotyledons were excised and placed in the dark since they

senesce more rapidly and uniformly under these conditions than those attached to the seedlings and kept in the light. It was not possible, however, to ascribe all of the observed changes in the translatable mRNAs to the progress of senescence, because light is known to regulate the expression of a number of genes in plants (Tobin and Silverthorne 1985).

In an attempt to obviate the effects of dark treatment on the level of translatable mRNAs which are not directly related to the progress of senescence, light-grown seedlings were placed in the dark, returned to the light, and examined changes in the population of translatable mRNA of the cotyledons by analyzing cell-free translation products. A decrease in the chlorophyll content of the cotyledons indicated that dark treatment of seedlings for longer than 48 h led the cotyledons to senesce irreversibly, and subsequent illumination could not stop the progress of senescence.

All of the mRNA species which showed relative increase or decrease during a 24 h dark treatment returned to their initial levels after a subsequent 24 h illumination with white light. When seedlings were kept in the dark for 48 h, 21 mRNA species increased, but the increase in some of them was no longer reversible; 9 out of the 21 mRNA species remained at the same level even after 48 h of re-illumination. All of the 18 mRNA species which decreased during 48 h in the dark returned to their initial levels upon re-illumination. The mRNA species that showed irreversible increase were also found to accumulate in cotyledons senesced after a lengthy growth period under light. This may suggest that these nine mRNA species code for proteins with functions closely related to the progress of senescence. The mRNAs which showed reversible increase after dark treatment can not be excluded from senescence-related mRNAs, since not only those mRNA species which showed irreversible increase, but also other mRNA species showing reversible increase in the dark-treated cotyledons were accumulated in the cotyledons senescing under continuous light. There were also some mRNA species whose content was not affected by dark treatment, but increased transiently after re-illumination of the seedlings.

Intact chloroplasts isolated from 9-day-old light grown radish cotyledons had O_2 evolution and *in organello* translation activities comparable with those of spinach chloroplasts. The translation products of poly(A)⁺RNA prepared from senescing radish cotyledons were transported into the isolated chloroplasts to find nuclear gene products which are related to the degeneration of chloroplasts. A lot of translation products which transported into stroma fraction decreased during senescence. However, 48 translation products increased temporarily and sequentially during senescence. Efficiency of the transport of translation products into chloroplasts isolated from 24 h dark-treated senescing cotyledons was 25% of that of non-senesced chloroplasts. There were 15 polypeptides, however, which were more efficiently transported into senescing chloroplasts than into non-senesced chloroplasts. Translatable mRNAs for 13 out of the 15 polypeptides increased during senescence of the cotyledons. These polypeptides may work on the degeneration of chloroplasts. Similar changes were also observed in thylakoid and envelope fractions. These findings suggest that not only the change in nuclear gene expression, but also the change in selectivity of proteins which transported into chloroplasts by chloroplast itself are related to the degeneration of chloroplast during leaf senescence.

Change in chloroplast gene expression during dark-induced senescence was also observed by *in vivo* labeling experiment and northern blotting. *In vivo* labeling experiment showed that the

large subunit (LSu) of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (RuBPCase) was not synthesized in 24 h dark-treated cotyledons in the dark. However, the LSu transcript existed 60% of the initial in 24h dark-treated cotyledons. Content of LSu transcript increased to 140% of the initial by 24h re-illumination. These results suggest that the expression of RuBPCase LSu gene is regulated at transcriptional and also at post-transcriptional level in mature and senescing radish cotyledons. The LSu synthesis changed synchronously with the synthesis of SSu by dark treatment and re-illumination of the cotyledons. This suggests that the LSu synthesis in chloroplasts is mutually related to the synthesis of the SSu in cytoplasm. Synthesis of D1 protein, the reaction center protein of photosystem II, was ceased immediately after turn off of light and immediately began by re-illumination of the cotyledons. The amount of D1 protein transcript was not changed during 24h dark-treatment and re-illumination for 24h. This suggests that D1 protein synthesis is regulated mainly at post-transcriptional level in mature and senescing radish cotyledons.

Glutamine synthetase (GS) plays a central role in nitrogen metabolism of higher plants. It is responsible for the primary assimilation of ammonia in root cells, and for that of ammonia generated by nitrate reduction in chloroplasts. It also works in the assimilation of ammonia produced by nitrogen fixation in root nodules, and in the reassimilation of ammonia released by photorespiration in the leaf cells (McNally and Hirel 1983). In many plant species leaf cells contain two isoforms of GS, one in the cytosol (GS₁) and the other in the chloroplast (GS₂). Senescing leaves become a source of nitrogen for the plant, as their constituent protein is hydrolyzed, and the nitrogen moiety is redistributed within the plant (Neales et al. 1963, Thomas 1978, Williams 1955). The amides, glutamine and asparagine, are the major organic forms of the translocation in plants (Bollard 1960, Zimmerman 1960). Activities of several enzymes which are likely to engage in the conversion of proteinaceous nitrogen into amides have been shown to increase during the senescence of *Lolium temulentum* leaves. However, GS activity was shown to decrease in the senescing *Lolium* leaves (Thomas 1978).

Changes in the levels of cytosolic and chloroplastic isoforms of glutamine synthetase were examined in senescing radish cotyledons by immunoblotting analysis using antibodies raised separately against maize glutamine synthetase isoforms. Translatable mRNAs for these isoforms were also examined by analyzing translation products from poly(A)⁺RNA in a wheat germ system with the antibodies. The relative content of cytosolic isoform (GS₁) increased twofold in the cotyledons that were placed in the dark for 72 h to accelerate senescence, while that of chloroplastic isoform (GS₂) declined to half of its initial level. The dark-treatment also increased the relative level of translatable mRNA for GS₁ sevenfold after 72 h, and decreased rapidly that for GS₂ and for other nuclear-coded chloroplast proteins as well. Cotyledons also accumulated GS₁ mRNA when they became senescent after a lengthy growth periods under continuous light. These observations suggested that GS₁ genes were activated, while those for GS₂ were repressed, and eventually the population of the enzyme was altered in senescent cotyledonary cells. Increase in the content of GS₁ mRNA and protein suggests that its activity also increase in senescing cotyledons, and enhances the formation of amides from degraded cellular proteins for the efficient translocation of nitrogen to growing parts of the plant.