

1Ba-6

NAD-マリックエンザイムの免疫学的草種間比較

○仲本 達, 村田孝雄, 松岡 信 (生物研)

NAD-malic enzyme (NAD-ME) はミトコンドリアに局在して NAD-ME 型 C₄植物の脱炭酸酵素として働き、光の光合成において重要な役割を果たしている。いくつかの NAD-ME 型 C₄植物について酵素反応速度論的解析が行われ、多型体の存在が示唆された。本研究では、まず Elaeagnus coracana (シコグビエ) の葉身から精製した酵素の抗体を用いて C₃植物及び C₄植物の subgroup を含む C₄植物から抽出した NAD-ME の免疫化学的解析を行ない、多型体の存在の有無、及び NAD-ME の grouping を試みた。次に NAD-ME が他の C₄酵素と之比は PEP carboxylase の様に黄化植物の光照射後の緑化過程で誘導されるのかどうかを明らかにした。

シコグビエからの NAD-ME の精製及びその抗体の調製は村田らの方法による。供試植物とそれぞれの略号は下記の通りである。シコグビエ (COR)、キビ (MIL)、オオクサキビ (DIC)、マカリカリケラス (MAK)、カハラケラス (KAB)、ギニヤケラス (MAX)、トウモロコシ (MAY)、アマランサス (EDU) 及びイネ (SAT) の 9 種である。

まず各植物から調製した NAD-ME 活性を有する抽出液に種々の量の抗体を加え、一定時間後 Protein A Sepharose を加えて抗体を遠心除去し上清に存在する NAD-ME の活性を測定したところ EDU を除く各植物からの NAD-ME は抗体によってその活性の一部またはほぼ全部が阻害された。この活性阻害様式には各植物で差がみられ、NAD-ME 型 C₄植物間でも差が明らか観察された。

次に 0.8% 寒天ゲルを用いて Ouchterlony 法による各植物 NAD-ME の比較を行ったところ EDU を除く他の C₄植物の NAD-ME も抗体と沈降線を形成した。2種の抽出液を隣接する 2つの well に入れ、これらと等距離にある well に入れた抗体との間に生じる沈降線を解析した結果、NAD-ME が (COR)、(MIL、DIC、MAK、KAB、SAT、MAX)、(MAY) 及び (EDU) の 4 群に大別されることが示唆された。

次に各植物抽出液を SDS-PAGE 後、イムノブロット法によって各植物 NAD-ME の解析を行った。その結果、MAY 以外の抽出液で単一のバンドが検出されたが、サブユニットの分子量には差がみられ、COR > MAX > MIL, DIC, MAK, KAB > EDU の順で小さくなった。MAX (PEP-CK 型 C₄植物) は上述の 2つの方法では他の Panicum 属 (MIL、DIC、MAK、KAB) と区別できなかったがイムノブロット法によりサブユニットの分子量は異なることが明らかになった。以上の結果から NAD-ME は C₄植物の NAD-ME 型草種に限らず他の C₄ subgroup 及び C₃型草種にも存在し、多型性を有することが明らかになった。

NAD-ME の発現が光によって調節されているかどうかを明らかにするために、シコグビエ黄化植物に約 3万 lux の光を照射しその緑化過程での NAD-ME と PEP carboxylase の活性変動を明らかにした。光照射後 50 時間後に両酵素の活性は約十倍 (新鮮葉あたり) に増加したので、NAD-ME の光誘導についても報告した。(GEP 61-20)