

2Dp-5

緑葉細胞における遺伝子発現の暗処理による変化—単離
葉緑体に輸送されるタンパク質の遺伝子について—

○川上直人・渡辺 昭（名大・農・生化学制御）

緑葉がセネッセンスする際の葉緑体の崩壊は、タンパク合成阻害剤を用いた実験などから細胞核の遺伝情報によって支配されていることが示唆されている。しかし、どのような遺伝子の産物がどのようにして葉緑体の崩壊に関与しているのか、その分子レベルのメカニズムについては現在のところ全くわかっていない。演者らは本学会1984年度年会において、切り取って暗所に置いたハツカダイコン子葉のセネッセンスの過程で多くの細胞核由来の遺伝情報の発現がmRNAレベルで変化していることを報告した。セネッセンスの過程でその発現に変動が見られた細胞核遺伝子の中から葉緑体の崩壊に関与するものを選び出すため、暗処理をほどこしたハツカダイコン子葉から調製したpoly(A)⁺RNAの翻訳産物のうち単離した無傷葉緑体に輸送されたものの変動を調べることを考えた。

試験管内において翻訳産物の葉緑体への輸送を行なわせるにはその無傷葉緑体が生理的な活性を持っている必要がある。12時間の明暗周期で育てた播種後9日のハツカダイコン子葉を破碎する際の緩衝液に1 mM DTT、遊離脂肪酸の吸着剤として0.5% (w/v) BSA、およびポリフェノールの吸着剤として子葉の生重量の5%のポリビニルピロリドンを加えることによってハウレンソウ緑葉から単離した無傷葉緑体と同等の酸素発生能を持つ無傷葉緑体を得ることができた。また、このようにして得られたハツカダイコン子葉の無傷葉緑体を用いて、K⁺、Mg²⁺、EDTA、Pi、およびアミノ酸の各至適濃度を検討し、光照射下でハウレンソウの単離無傷葉緑体と同等のタンパク合成能を示す条件を設定した。

明所で育てた播種後14日のハツカダイコン子葉に、0、12、24、48、72時間の暗処理をほどこしてセネッセンスを進行させ、そこから調製した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によって翻訳した。その翻訳産物に上記の条件で調製した無傷葉緑体を加えて光照射下でインキュベートした後、再度無傷葉緑体を単離してチラコイド画分とストロマ画分に分けた。それぞれの画分に取り込まれた標識ポリペプチドをSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動およびO'Farrellらの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。0時間のpoly(A)⁺RNAを用いた場合、チラコイド画分では約30本のバンドが、ストロマ画分では150種以上のスポットが検出された。葉緑体に輸送された多くの翻訳産物はセネッセンスの進行に伴い減少を示したが、逆に増加を示すものがチラコイド画分で少なくとも3種、ストロマ画分では少なくとも28種検出された。ここで増加を示したものの中に葉緑体の崩壊に関与する遺伝子の産物が含まれていると考えられる。また、RNAを抽出した子葉と同じ条件で育てた播種後14日のハツカダイコン子葉から無傷葉緑体を単離し同様の実験を行なったところ、多くの翻訳産物の輸送の効率は上記の葉緑体を用いた場合に比べて低下していたが、逆に輸送の効率が高くなっている翻訳産物が認められた。このことは、葉緑体のエイジによって葉緑体へのタンパク質の局在化機構になんらかの変化が起こっており、輸送されるタンパク質の選択性が変化することを示唆している。