

## 3Ba-6

## コムギ単離葉緑体による ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase の分解

亀井千鶴子, 前 忠彦, 牧野 周, 大平幸次 (東北大・農・農化)

コムギ第一葉を材料に、機械的方法により単離・精製した葉緑体が、ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase (RuBPCase) の分解能を有するか否かを調べることを目的とした。

植物の老化に伴う RuBPCase の細胞内の分解の場に関して、Dalling らのグループおよび私達のグループは主として葉緑体内でおこる可能性を指摘した。さらに Dalling らのグループは、プロトプラストより得た葉緑体が実際に RuBPCase の分解活性を有することを示した。<sup>3)4)</sup>しかし、私達は、この方法によって調製した葉緑体画分には、プロトプラスト調製時に用いたセルラーゼおよびペクチナーゼ標品由来のプロテアーゼが混入していた可能性があり、直ちに葉緑体自身が分解能を有すると結論するには問題があると考えた。本実験では、葉緑体をプロトプラストからは調製せず、機械的に破碎後、Percoll の自己形成密度勾配遠心法により精製した。この精製葉緑体を用いて RuBPCase の分解について調べた。

〔結果〕(1) まず、得られた精製葉緑体画分の純度を調べた。精製画分にはプロテアーゼ活性の高い液胞や液胞膜、小胞体、細胞質のマーカー酵素の活性は検出されず、ミトコンドリアとパーオキシゾームの混入がわずかずつ認められたにすぎなかった。それらのマーカー酵素の活性は、クロロフィルあたりで比較すると、粗抽出液のそれぞれ 4% 弱、1% 弱であり、精製葉緑体画分の Intactness は 70% 前後であった。(2) この精製葉緑体を用いて pH 7.6 の低張液中で破碎後、0.1% SDS 存在下と非存在下、37°C でインキュベートして RuBPCase の分解活性を検索した。RuBPCase の分解物の検出は、SDS-PAGE 後クマシーによる蛋白染色と ELISA により行った。その結果 SDS 非存在下では 7 時間のインキュベートで分解物が ELISA で認められるようになったが、クマシー染色ではそれに相当する分解物は検出されなかった。また、RuBPCase large subunit (LSU) の減少も確認されなかった。しかしこれに対し SDS 存在下では ELISA で分解物が 1 時間後にはすでに検出され、LSU の減少もクマシー染色により認められた。(3) この SDS 存在下での RuBPCase 分解能におよぼす pH の影響 (pH 5.3~9.1) を ELISA により調べた。すべての pH で分解物が認められたが、酸性域、中性域、アルカリ性域で分解物のパターンに相違がみられた。なお、葉の age に伴う分解パターンの変化は、ごくわずかしか認められなかった。(4) 次に葉緑体の可溶性画分のみを調製し、SDS 存在下で上記と同様の実験を行ったところ、37°C、15 時間のインキュベートでようやく分解物が認められた。

以上のことから機械的方法により単離・精製した葉緑体には生理的 pH において RuBPCase の分解能があることが示され、その分解活性は SDS の存在により促進された。この活性はプロトプラストより調製した葉緑体の分解活性よりずっと弱かった。

1) Martinoia, E., et al. *Biochem. Physiol. Pflanzen* 178, 147-155 (1983) 2) Mae, T., et al. *Plant & Cell Physiol.* 25(2), 333-336 (1983) 3) Dalling, M. J., et al. *Z. Pflanzenphysiol.* Bd. 111, 311-318 (1983) 4) Nettleton, A. M., et al. *J. Plant Physiol.* 119, 35-43 (1985)