The Japanese Society of Plant Physiologists

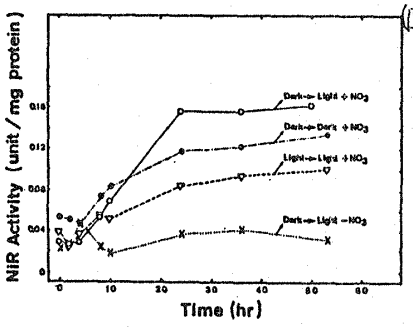
3Ap-3

イネ亜硝酸レダクターゼの誘導とmRNAの単離

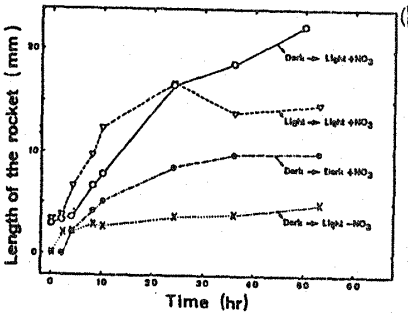
○小川雅広・井田正二（京大・食糧科学研究所）

亜硝酸レダクターゼ（NiR）は緑葉では葉緑体に局在し，硝酸態窒素や光の供給により誘導合成されると考えられている。さらに緑葉とは異なる組織（根，種実－胚，胚乳，アルビノにも広く存在する。それらのNiRの生理的機能を考える上で，NiRの遺伝子及びその発現機構を解析することが重要である。本大会ではイネ黄化葉でのNiRの誘導とin vivoとin vitro生合成について報告する。

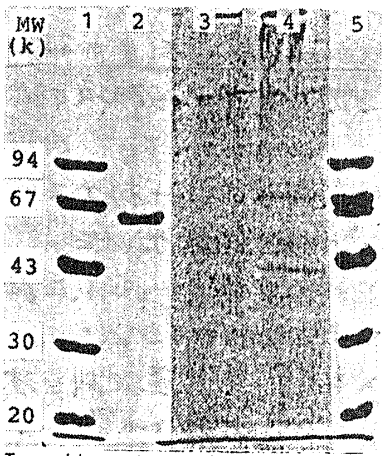
（方法）①植物材料：イネを1週間暗所で水耕栽培した後，培養液にKNO_3を与え，光照射下で生育させた。緑化に伴うNiR活性とNiR酵素蛋白質含量の経時変化を免疫ロケット法により測定した。② Poly(A^+) RNAの単離とin vitroでの翻訳：KNO_3投与10時間後の黄化葉を液体窒素中で粉砕し，グアニジウムイソチオシアネートを含む溶液でホモゲナイズ後，超遠心分離法でRNAを分離した。Oligo(dT)－セルロースカラムを用いてpoly(A^+) RNAを調製した。^{35}S－メチオニンとウサギ網状赤血球抽出液を用いてin vitro蛋白質合成を行った。翻訳産物にホウレンソウ精製NiRに対する抗体を加え，抗原－抗体複合物をProtein A－Sepharoseで分離した。SDS－PAGE後フルオログラフィーにより翻訳産物を同定した。



(図1)



(図2)



(図3)

In vitro translation product
1. Molecular marker
2. Purified spinach NiR
3. Non immune serum-ppt
4. NiR antibody-ppt
5. Molecular marker + purified spinach NiR

（結果と考察）イネ黄化葉のNiRの比活性はKNO_3投与4時間目以降増加し始め，14時間以後一定となった（図1）。NiR酵素蛋白質含量と比活性の変動パターンはほぼ一致した（図2）。一方，KNO_3を投与しない場合，NiRの比活性の増加は見られなかった。また，暗所下でKNO_3を投与した場合やKNO_3を投与しない条件ですでに緑化させたイネにKNO_3を供給した場合，NiRの比活性は増加するが，光とKNO_3を同時に投与した場合のレベルには到らなかった。このことからNiRの誘導には光ではなく，硝酸塩の供給が必須であることが確認された。またイネのNiR誘導は誘導以前の生育歴によって明確な相違があることが認められた。イネ黄化葉から単離したpoly(A^+) RNAのin vitro翻訳産物中にはNiR抗体と結合する2つのポリペプチド（分子量70,000と98,000）が同定された。従ってイネ緑葉のNiRの分子量は64000であったことからイネ黄化葉のNiRは分子量約6000大きい前駆体として合成されると結論した。しかし低分子のポリペプチドについてはその実体は明らかでない。

NII-Electronic Library Service