

1Da02

小麦第一葉からの液胞の単離・精製とその蛋白分解特性

前忠彦・船木健・牧野周・大平幸次(東北大・農・農化)

コムギ (*Triticum aestivum*) の葉からプロトプラストを調製後、それより液胞を単離・精製し、そのプロテアーゼによる RuBisCO 蛋白の分解特性について調べた。

ファイトロン内で育てたコムギの第一葉を材料に、“Cellulase Chozuka” R-10、および“Macerozyme” R-10を用いて葉肉細胞のプロトプラストを調製した。5%、15%、20%のFicollのstepwise密度勾配遠心によりプロトプラストを精製し、これに液胞のIsolation medium (0.08M sorbitol, 75 mM Na₂HPO₄, 0.5% (w/v) BSA, 1 mM DTT, pH 8.0) を加えて28℃で5分間shakingしたのち、20% Ficollを終濃度7.5%となるように加え、0℃で30分放置して液胞を遊離させた。この上に2 mlの3% Ficoll溶液と0.5 mlの0.2 M Na-phosphate-0.1 M citrate buffer (pH 6.0) を順に重層し、170 g、10分遠心し、3% Ficoll層と0.2 M Na-phosphate-0.1 M citrate bufferの間から精製液胞を得た。トーマ計数板を用いて求めた液胞の収率は約8%であった。この精製液胞に低張液を加えて破壊後、精製RuBisCOを加えて0.1% SDSの存在下、非存在下で37℃、60分incubateし、SDS-PAGEでRuBisCO蛋白の分解を調べた。

pHによる影響をみたところ、0.1% SDS非存在下ではpH 3.5付近に、0.1% SDS存在下ではpH 5.5付近に強い活性がみられた。0.1% SDS非存在下では、RuBisCOのlarge subunit (LSU) ばかりでなく、small subunit (SSU) およびBSAも分解された。0.1% SDS存在下では、LSUがとくに強く分解され、SDS非存在下での分解とは異なっていた。また、各種のInhibitorおよびActivatorの影響を調べたところ、0.1% SDS非存在下のpH 3.5の活性は、PCMB, IAAで強く、NEM, Leupeptinで若干阻害され、DTTにより促進された。0.1% SDS存在下のpH 5.5の活性は、PCMB, IAA, Leupeptinで強く阻害され、DTTにより促進された。液胞のプロテアーゼは、SDSの非存在下、存在下を問わずアルカリ側の活性は極めて弱かったが、プロトプラスト調製液に存在するプロテアーゼは、0.1% SDS存在下、非存在下でともにアルカリ側で強い活性があり、液胞のものとは明らかに異なっていた。これらは0.1% SDS非存在下では、Leupeptinで阻害され、0.1% SDS存在下ではPMSFで阻害された。なおageの異なる葉から単離した液胞間でのRuBisCO分解のパターンには差がみられなかった。