

1Ca07

赤潮鞭毛藻 *Heterosigma akashiwo* 葉緑体タンパク質のリン酸化の周期的変動

佐藤恵美・佐藤忍・藤伊正（筑波大・生物）

赤潮鞭毛藻 *Heterosigma akashiwo* は、細胞分裂と葉緑体分裂の時期にずれがあり、また、それぞれの分裂は、極めて高い同調性があり、しかも light-on, light-off により制御されていることをみいだした (Sato et al 1987)。この特性は細胞の機能を解析するのに優れた研究材料と思われる。本研究では、12L:12D の光周期下で、暗期の特異的な時期にのみリン酸化される蛋白質を見いだしたので、その局在、出現のリズム等につき検討した。

【材料及び方法】

H. akashiwo 細胞のクローン株 (NIES-6) を、人工海水 ASP-7 で 12L:12D の光周条件下、20℃ にて同調培養を行なった。細胞密度が、 $1.0-1.5 \times 10^5$ cells/ml に達したところで、限外濾過により培地中のリンを除去した。1hr の前培養の後、 $[^{32}\text{P}]\text{-H}_2\text{PO}_4$ を添加し、さらに一定時間の培養の後、遠心処理 (600xg) により細胞を集め、SDS にて細胞を破壊し、SDS-PAGE 及びオートラジオグラフィーによりリン酸化蛋白質の検出を行なった。また、ラベルを取り込ませた細胞を 0.5mM EDTA, 0.4mM PMSF, 0.5M sucrose を含む 20mM Tris-HCl (pH7.6) で破碎し、遠心分画法により細胞画分を得、それぞれの画分における蛋白質の検出を行なった。

【結果及び考察】

12L:12D 光周条件下において、4 時間毎にラベルを取り込ませたところ、D4-8、D8-12 に特異的にリン酸化されるタンパク質 (31 kD) が検出された。この蛋白質の局在を確かめたところ、4,300 xg の画分に存在した。この画分を詳細に調べたところ、chlorophyll a が 80%, cyt c oxidase の活性は 10% 以下であった。この画分において O_2 発生能を測定したところ高い活性が認められた ($150 \text{ O}_2 \mu\text{mol/mg chl/hr}$)。フェリシアナイド法により、この画分の葉緑体は 85% 以上の intactness を持つことが示された。この葉緑体画分を再度 Yeda-Press により破碎し、Sucrose gradient にかけて分析を行ったところ、31 kD は sup 画分に存在したので、われわれは、この蛋白質が stroma に局在していると推測した。しかし、この画分には小胞体のマーカーである NADPH-cyt c reductase 活性が存在し、さらに電顕により、小胞体様の膜構造が葉緑体のまわりに観察されたことから、この蛋白質が chloroplast-associated ER に局在する可能性も残されている。

12L/12D を 24L (細胞分裂は正常) に変えたところ、31 kD は L20-24 においてもリン酸化を受けた。このことはこの蛋白質のリン酸化が暗期の特定な時期に起こる現象ではなく、むしろ細胞の周期に依存している現象と思われる。

【参考文献】 Sato, et al (1987) Plant Cell Physiol 28 1093-1099