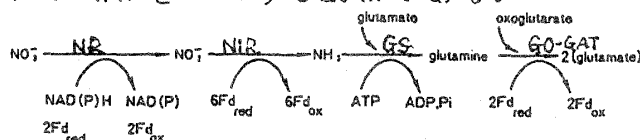


1Ap07

イネ亜硝酸レダクターゼの特性とcDNAクローニング

松井純¹ 竹葉剛² 小川雅広¹ 井田正二¹ (¹京大 食糧科学研究所, ²京府大 生活科学 応用生物)

亜硝酸レダクターゼ(NiR)は、同化的硝酸塩還元において生成するNO₂⁻を6電子還元によってNH₄⁺を生成する酵素である。



NR: Nitrate Reductase, NiR: Nitrite Reductase, GS: Glutamine Synthetase, GO-GAT: Glutamate Synthase

フェレドキシン(Fd)-依存の酵素[Fd-NiR(EC1.7.7.1)]は、光合成独立栄養生物(高等植物, 藻類, 藍藻)に広く分布し、光合成植物のFd-NiRは葉緑体に局在する。そして細胞質に局在する硝酸レダクターゼ(NR)とともにNO₃⁻と光によって誘導合成されることが知られている。ホウレンソウなど双子葉植物起源のFd-NiRの特性は、詳しく研究されているが、単子葉植物の酵素の特質は解明されていない。またイネは窒素源としてNH₄⁺のみならずNO₃⁻を吸収同化する能力がある。そこで我々は、イネFd-NiRの酵素的特性を明らかにするとともに、本酵素の遺伝子レベルでの発現、制御機構を解明することを目的として、まずイネNiRのcDNAクローニングを行った。

イネは10日間暗所において無窒素培養液で栽培後、培養液に15mM KNO₃を与え、光照射下で生育し、NiRを誘導した。KNO₃投与約10時間後の緑化葉を液体窒素中で粉碎し、ク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、超速心分離法でRNAを分離し、オリゴ(dT)-セルロースカラムを用いてpoly(A)⁺ RNAを調製した。このmRNAを鋳型としてcDNAを合成し、フェージ発現ベクターであるλgt11を用いてcDNAライブラリーを作製した。まず既報¹⁾のホウレンソウNiR cDNAの塩基配列をもとにして合成した32P-オリゴヌクレオチドをプローブとして、ホウレンソウ培養細胞より作製されたcDNAライブラリー(千葉大園芸, 白石, 中川氏より提供)からスクリーンハイブリダイゼーションにより約1.0kbのクローンを得た。このクローンの塩基配列を調べた結果、NiR cDNAであることが確認された。

1071' TTCAGGGGAGAGGTTGAGAAGAGAATGCCTGAGCAAGTTCTAGAAAGAGCATCCTCA (A)

 GGGAGAGGTTGAGAAGAGAATGCCTGAGCAAGTTCTAGAAAGAGCATCCTCA (B)

(A) ホウレンソウNiR cDNA¹⁾ (B) ホウレンソウ培養細胞より得たcDNAクローン

次にこのホウレンソウNiR cDNAをプローブとして、イネcDNAライブラリーのスクリーニングを行ったところ、約0.5~1.1kbの4クローンが得られた。これらの塩基配列は現在解析中であり、他植物(ホウレンソウ, トウモロコシ²⁾)のNiRと比較しその構造について検討する。

¹⁾ Back et al. (1988) Mol. Gen. Genet. 212: 20-26

²⁾ Lahners et al. (1988) Plant Physiol. 88: 741-746