

3Ea10

in vitro における ATPに依存した近赤外光吸収型フ
イトクロムの分解
中沢 美紀・佐藤 忍・藤伊 正 (筑波大・生物)

前年度、*in vivo* におけるフイトクロムの分解について各種阻害剤を用いて検討し、フイトクロム Pfr型の分解はセリンプロテアーゼに依存しており、金属、及びATP要求性であることを示唆した。これらの結果をもとに、黄化アラスカエンドウの粗抽出液でのフイトクロム Pfr型の分解を再現し、プロテアーゼ検出、精製の assay系の確立を試みた。

〔方法〕 黄化アラスカエンドウ7日目の上胚軸 hook 1.5cmを切りとり5分間赤色光を照射し、等量の 100mM Tris-HCl, pH7.8, 1mM EDTA とともに磨碎し、200,000 xg 30分の遠心後、上清をSephadex G-50 カラムにかけ、低分子物質を除去した。この G-50の void 画分に赤色光を照射し、最終濃度5mMになるようにATPを添加し、暗所 25℃でインキュベートした。阻害剤実験においては0℃、10分の阻害剤処理の後、赤色光照射及び ATPの添加をおこない、暗所25℃でインキュベートした。その後分光学的、及び免疫化学的に残存するフイトクロム量を測定した。

〔結果〕 分光学的に検出されるフイトクロム量の経時的变化は、赤色光を照射した画分で ATP添加後約30分まで急速に減少し、その後ゆるやかに減少することを示した。ATPを添加しなかった画分においては赤色光照射後30分以後に起こるゆるやかな減少のみが観察された。この時、ATP添加の有無にかかわらず、反応開始から30分の時点で残存するフイトクロムのうち約90%がPfr型のままであった。また、赤色光照射及び ATP添加によって引き起こされるフイトクロムの急速な減少は ATP濃度に依存し、5mMで飽和に達した。これらの現象は免疫化学的測定でもほぼ同じ動向を示した。また、この赤色光及び ATP依存性のフイトクロムの減少は、DFP, leupeptin, antipain等のセリンプロテアーゼインヒビターによって阻害された。しかし、*in vivo* で効果のあった α, α' -dipyridylは阻害せず、また Zn^{2+} の添加による促進効果も認められなかった。

〔考察〕 *in vivo* でのフイトクロム分解への阻害剤の効果をもとに *in vitro* での再現を試みた。今回報告した諸結果も、*in vivo* での観察(昨年度報告)も (i) 分光学的及び免疫化学的に、ほぼ同じ経時的变化を示す、(ii) 赤色光及びATP依存性であること、(iii) DFP, leupeptinによって分解が阻害されること、等の点において合致した。しかし、金属要求性に関しては *in vivo* では観察されるのに対して *in vitro* では観察されなかった。このことに関してはキレーターがプロテアーゼに直接作用しているのか、それとも呼吸等の阻害剤として働き、二次的に分解を阻害したのかを考慮する必要がある。以上の結果はフイトクロム、Pfrの分解に関わるプロテアーゼがATP依存性セリンプロテアーゼである可能性を強く示唆した。

また、*in vitro* において、フイトクロムの急速な分解は赤色光照射及びATP添加から30分間観察され、その後低下する。この分解速度の低下はフイトクロムの変性や、暗反転、ホスファターゼ等によるATPの消費などが原因ではなく、プロテアーゼの失活または、未知のコファクター等の失活によるものと思われる。今後は、この赤色光及びATP依存性のフイトクロム分解活性を指標にプロテアーゼの精製を進めて行きたいと考えている。