

3Ea-11

ノパリン型クラウンゴール及び *in vitro* 形質転換組織におけるノパリンデヒドロゲナーゼ (NDH) の検索

馳澤盛一郎・庄野邦彦 (東大・教養・基礎科学)

土壌細菌 *Agrobacterium tumefaciens* の感染によって生ずる植物腫瘍クラウンゴールのマーカ物質であるノパリン・オクトピンの合成酵素 NDH (ノパリンデヒドロゲナーゼ)・LpDH (リゾピンデヒドロゲナーゼ) の遺伝情報は、この菌の持つ Ti プラスミド上に存在していることが明確になっている。また、これらの酵素により、ノパリンはアルギニンと α -ケトグルタル酸より、オクトピンはアルギニンとピルビン酸より合成されることが知られている。

われわれは、植物プロトプラストへのスフェロプラスト導入や、細胞壁を再生したプロトプラストとノパリン型の菌との co-culture 法により、NDH 活性を示す形質転換したと思われる細胞株を得ている。形質転換の指標として NDH 活性を用いていることから、反応生成物がまちがいにノパリンであることを確認することは必須である。今回、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いた分離方法を開発し、ノパリンの放射性前駆物質が形質転換したと思われる細胞の酵素標品によりノパリンに取り込まれることを確認したので報告する。

NDH 活性の検出のために用いた植物材料としては、ノパリン型のクラウンゴールとテラトーマ、及び、植物プロトプラストへのノパリン型スフェロプラストの導入など *in vitro* 単細胞系における形質転換により得られたノパリン型の形質転換株と思われる細胞株を用いた。各々の試料細胞を破砕し、Offen と Schilperoort の方法で cell-free 系におけるノパリンの生合成を行わせた。基質として ^{14}C -arginine 或いは、 ^{14}C - α -ketoglutaric acid と ^3H -arginine を用いた。反応終了後、得られた酵素反応生成物をイオン交換カラムにより純化した後、薄層クロマトグラフィー (TLC) を行った。展開終了後、薄層板上の放射活性をクロマトスキャナーで検索したところ、クラウンゴール、形質転換株のいずれのサンプルの場合でも、また、シングルラベル (^{14}C -arginine)、ダブルラベル (^{14}C - α -ketoglutaric acid & ^3H -arginine) にかかわらず、標品のノパリンの Rf と同じ Rf 値を示す唯一の放射活性のピークが見られた。また、これらの薄層クロマトグラムを 1cm 刻みに搔き取り、各々をシンチレーション・カウンターで測定した結果もそれを裏付けていた。

さらに、われわれは、ノパリン・オクトピン・アルギニンを始めとするゲアニジン関連物質を分離するための HPLC の系を検討し、これらの物質を分離する系を新規に開発した。この系を用いて分取したサンプルをシンチレーション・カウンターで測定したところ、やはり、標品のノパリンの保持時間と一致して、 ^{14}C と ^3H の取り込みが見られ、その他の位置には全く取り込みが見られなかった。

これらの結果から、えつの前駆体は、確実に、生合成されたノパリンに取り込まれていると考えられる。したがって、*in vitro* 単細胞系で得られた細胞株は、明らかに NDH の活性を有しており、形質転換細胞である可能性をさらに強く支持する。また、ここで用いられた分析系により NDH や LpDH の活性のある程度の定量分析も可能になると考えられ、クラウンゴールの生理機能の解析に役立つことと思われる。