



イネ葉の光合成活性化におけるRubisco activaseの働きに関する研究

深山, 浩

(Degree)

博士 (学術)

(Date of Degree)

1998-03-31

(Date of Publication)

2007-10-16

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲1831

(JaLCD0I)

<https://doi.org/10.11501/3141174>

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1001831>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



博士論文

イネ葉の光合成活性化における
Rubisco activaseの働きに関する研究

平成10年 3月

神戸大学大学院自然科学研究科

深山 浩

目次

緒論	1
第一章 定常状態の光合成速度とRubisco activase	6
第一節 葉の加齢過程におけるRubisco activase含量の変化と 最大酸素放出速度との関係	7
材料と方法	7
結果	10
考察	15
第二節 生育した光環境と窒素供給量が及ぼすRubisco activase含量と 炭素同化効率への影響	18
材料と方法	18
結果	20
考察	23
摘要	25
第二章 光強度の変化による非定常状態の光合成速度とRubisco activase	27
第一節 光合成活性化における緩和時間とActivase/Rubisco比との関係	28
材料と方法	28
結果	30
考察	38
第二節 Rubisco活性化初速度とRubisco activase含量との関係	42
材料と方法	42
結果	44
考察	47
摘要	49
第三章 加齢に伴うRubiscoの活性とカルバミル化部位数の変化	51
材料と方法	51
結果	55
考察	67
摘要	72

第四章	RubiscoとRubisco activase含量の変化とプロテアーゼ活性との関係	74
	材料と方法	75
	結果	77
	考察	87
	摘要	93
	総合考察	95
	摘要	100
	Summary	108
	謝辞	117
	引用文献	118

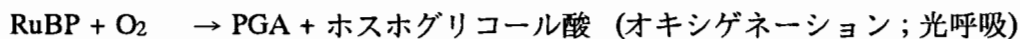
略語

ABA	abscisic acid
ABTS	2,2,-azino-di [3-ethylbenzthiazonlin-sulfonant (6)]
ATP	adenosine-5-triphosphate
ATPase	adenosine-5-triphosphatase
BA	benzyladenine
Bicine	N, N-bis (2-hydroxyethyl) -glycine
BSA	bovine serum albumin
CBB	coomassie brilliant blue
CHX	cycloheximide
Ci	intercellular CO ₂ partial pressure
DDT	dithiothreitol
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
gs	stomatal conductance
IgG	immunoglobulin G
kDa	kilodalton (s)
LSU	large subunits of Rubisco
OPD	<i>o</i> -phenylenediamine
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
PBS	phosphate buffer saline
PFD	photon flux density
PGA	phosphoglyceric acid
PVPP	polyvinylpolypyrrolidon
Rca	Rubisco activase
RLP	rice leaf protease
Rubisco	ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase
RuBP	ribulose-1,5-bisphosphate
SDS	sodium dodecyl sulfate
SM	streptomycin
T-PBS	tween 20-phosphate buffer saline
Tris	tris (hydroxymethyl) aminomethane

緒論

光合成生物は光エネルギーを化学エネルギーに変え、無機物であるCO₂を有機物に変えることができる。つまり、この光合成能を持つことから食物連鎖の中で生産者に位置づけられている。中でも植物が生産する有機物の量は、他の光合成生物に比べて圧倒的に多い。すなわち、我々人間を含めた全ての生命は、植物の光合成から生み出された有機物によって支えられている。

Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (Rubisco) は、光合成を行う全ての生物に存在し、CO₂固定および光呼吸の初期反応を触媒する酵素である(下式参照)。



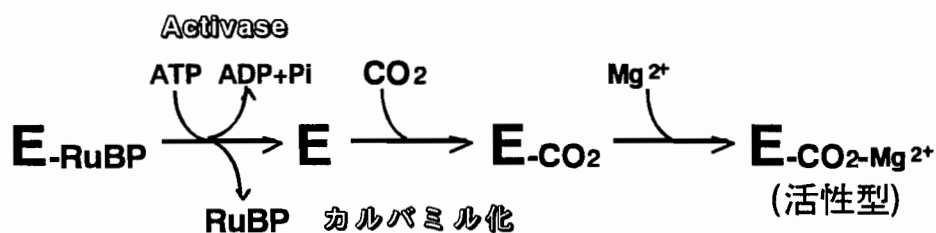
この酵素は、葉内の可溶性タンパクの約50%を占め、地球上で最も多く存在するタンパクである。しかし、酵素学的性質が悪いため、C₃型の光合成を行っている植物において、光合成の律速要因となり得る(Sharkey et al. 1989)。

イネにおいては、Rubiscoの最大比活性が低いため(Makino et al. 1985)、この酵素によって光合成速度が強く制限されていることが予測される。現に、光飽和、大気CO₂濃度下でのCO₂ガス交換速度は、Rubiscoの酵素学的性質と細胞間隙CO₂濃度により説明できることが報告されている(Makino et al. 1984)。しかし、そのような条件下での光合成速度を*in vitro*のRubisco活性により説明できない事実が判明した。すなわち、ガス交換測定における葉緑体内でのCO₂濃度と光合成速度との関係から算出されたRubiscoのミカエリス定数(K_m)は、Makino et al. (1985)が報告している*in vitro*での値より極めて低いことが分かった(内田ら 1988)。このことは、*in vivo*でのRubiscoの触媒機構には、*in vitro*と異なる要素、おそらく何らかのアクティベーターが関与していることを示唆している。さらに、イネ葉における光合成速度とRubisco含量との関係はいくつか報告があり、いずれも高い正の相関を認めているが、それらは全てRubisco含量が多いとき光合成速度が飽和する傾向を示して

いる (Makino et al. 1984, Makino et al. 1994, 内田ら 1982, 和田 1988). その理由として Evans and Terashima (1988) は, CO₂ 輸送抵抗の増加を提案しているが, 一方, 和田 (1988) は, Rubisco のイニシャル活性の低下を指摘している. 後者の説は一般的には受け入れられていないが, もし事実であれば前述のアクティベーターがこの場合の光合成速度に関与している可能性がある.

シロイヌナズナにおいて, 通常の大気 CO₂ 濃度では生育できない変異体が発見され, それは Rubisco が正常に活性化されないことが原因となっていた (Sommerville et al. 1982). また, 2次元電気泳動により, その変異体では 41 と 45 kDa の 2 つのペプチドが欠損していることが分かった (Salvucci et al. 1985). それらのタンパクは Rubisco の活性化に働くタンパクであることから, Rubisco activase と名付けられた. この Rubisco activase は, 光合成細菌から高等植物に至るまで普遍的に存在しており (Salvucci et al. 1987), Rubisco の活性調節に不可欠なタンパクであると考えられる. その後, Rubisco activase の研究は主にオーストラリアとイリノイ大のグループによって進められ, 前者は実際の光合成速度に及ぼす影響 (Hammond et al. 1997, Mate et al. 1996), 後者は機能タンパクとしての生化学的特性 (Lilley et al 1997, Portis 1995, Salvucci and Ogren 1996) という観点からアプローチしている.

現在わかっている Rubisco activase の機能を述べる前に, 基本的な Rubisco の活性化の過程についてふれておく. Rubisco が触媒能を発揮するには, 下図のような活性化を受けなければならない.



Rubisco の活性化には基質である RuBP と CO₂ が関与するため, その機構は複雑である. この図では Rubisco のホロ酵素を E と表す. まず, Rubisco の触媒サイトである リジン残基 (Lys-201) のアミノ基に CO₂ が可逆的に付加する (E-CO₂). これはカルバミル化と呼ばれる反応であり, この時に付加する CO₂ をアクティベーター CO₂ と呼

ぶ (直接基質とはならない)。その後、 Mg^{2+} がカルバミル化された触媒サイトを安定化し ($E-CO_2-Mg^{2+}$)、活性化が達成される。しかし、生理的な CO_2 濃度 (生体内で $10\mu M$ 程度) では自発的にこの活性化は起こり難く、Rubisco activaseの存在により、その活性化が達成される (Portis 1990, Portis et al. 1986)。すなわち、基質であるRuBPは、活性型よりも不活性型のRubiscoに結合しやすく、RubiscoとRuBPの不活性型複合体を形成する (Jordan and Chollet 1983, Cardon and Mott 1989)。Rubisco activaseは、この不活性型複合体からのRuBPの解離を促進する (Wang and Portis 1992)。Rubisco activaseは、その機能から分子シャペロンに属すると考えられる (Sanchez de Jimenez et al. 1995)。つまり、Rubiscoと結合し (Yokota and Tsujimoto 1992)、Rubiscoの立体構造を阻害剤が解離しやすい型に変えると考えられる (Salvucci and Ogren 1996)。最近、Rubiscoの大サブユニット上でRubisco activaseに対する結合部位が同定されている (Larson et al. 1997)。Rubisco activaseは直接Rubiscoのカルバミル化を触媒しないが (Portis 1992)、上記の働きによりRubisco活性化反応の平衡状態を大きく活性型の方向に傾ける (Mate et al. 1996)。

Rubisco activaseはATPase活性を合わせ持ち、RubiscoからのRuBPの解離活性はATPにより促進され、ADPにより阻害される (Robinson and Portis 1989b)。しかし、このATPの加水分解がなぜ必要なのかは、現在も分かっていない。Rubisco activaseは約40 kDaのサブユニットからなり、4-5量体で機能していると考えられていたが (Robinson et al. 1988)、近年、Rubisco activaseはアクチンと類似した特性を持っており、ATPの結合によりRubisco activaseがポリメライズし、14量体程度の巨大分子を形成することが示された (Wang et al. 1993)。また、そのような構造を維持することが触媒能力を発揮するのに必要であることが提案されている (Lilley and Portis 1997, Wang et al. 1993)。つまり、この多量体構造とATPase活性に何らかの関係があるものと考えられるが、今のところ不明である。さらに、Rubisco activaseの活性がPSIを通る電子の流れによって刺激を受けることも報告されており (Campbell et al. 1990)、光による活性調節に関与していると考えられるが、その機構も全く分かって

ていない。以上のように、Rubisco activaseの機能には不明な点も多いが、少なくともATP/ADP比が光によるRubiscoの活性調節に関与していることは確かであると考えられる (Hammond et al. 1997).

Rubisco activaseは一度カルバミル化されたRubiscoに対しても、その状態を維持するために働き続ける必要がある (Mate et al. 1996, Robinson and Portis 1989a). さらに、フォールオーバー (Rubisco活性が時間に伴い低下する現象)の原因とされているRubiscoの触媒反応中に形成される阻害剤 (Edmondson et al. 1990)の解離にも働いていると考えられている (Portis 1995). また、インゲンマメに代表されるいくつかの植物においては、夜間にRuBPの構造アナログである2-carboxyarabinitol 1-phosphate (CA1P)が活性型のRubiscoに結合しRubiscoを不活化する (Seemann et al. 1990). Rubisco activaseはこのCA1Pの解離においても関与していると考えられる (Mate et al. 1993, Robinson and Portis 1988a). つまり、Rubisco活性化反応の中でのRubisco activaseの役割は植物種により異なることが予想できる。さらに、光合成速度に対するRubisco activaseの律速性が異なることも示唆されている (Eckardt et al. 1997). Rubisco activaseはRubiscoの活性調節において中心的な役割を担っていることは間違いないが、その作用機構と光合成速度への貢献度は植物種によって異なるものと考えられる。

以上のことから、光合成速度とRubiscoの関係を明らかにするには、その活性化機構を知る必要があり、活性化機構を理解する上でRubisco activaseについての調査は不可欠である。イネ葉においては、著者ら (1994)が初めてRubisco activaseを精製したが、光合成速度にどの程度関与しているのかは全く不明である。さらに、最近アンチセンスの技術を用いてRubisco activase含量の低い植物を作成し、光合成速度とRubisco activaseとの関係が追求されているが、加齢や窒素供給量によるRubisco activase含量への影響、Rubisco activase含量と光合成速度との関係は調査されていない。そこで本研究ではRubisco activaseに着目し、主に加齢過程におけるRubisco含量とRubisco activase含量および光合成速度の変化から、両タンパクと光

合成速度との関係を検討した。なお、本論文は4つの章より構成されている。第一章では、定常状態の光合成速度を、酸素電極を用いて測定した最大酸素放出速度とガス交換測定によるCO₂同化速度で評価し、Rubisco activase含量との関係を調査した。この章では、Rubiscoの活性化状態を維持するために、どの程度Rubisco activaseが関与するのかを検討した。第二章では、葉に照射する光強度を急速に上昇させた時の非定常状態の光合成速度を緩和法により評価し、Rubisco activaseとの関係を調査した。つまり、弱光下で不活化しているRubiscoがどのように活性化されるのか、その過程にRubisco activaseがどのように関わっているのかを調べた。第三章では、実際のRubiscoの活性化状態を、活性とカルバミル化サイト数で評価し、イネにおけるRubiscoの活性がどの部分で調節されているのか検討した。第四章では、RubiscoとRubisco activaseの葉内含量がどのように調節されているのかを明らかにするために、両タンパクの分解に着目して研究を行った。さらに以上の実験から、イネ葉におけるRubiscoとRubisco activaseの含量のバランスが、どのように光合成速度に影響しているかについて論じた。

第一章

定常状態の光合成速度とRubisco activase

一般的に光合成の定常状態とは、光合成器官をある条件に一定の時間置いた時にみられる、安定した光合成のことを示す。多くの場合、光合成速度はこの定常状態に達した時に測定されたものである。そのような定常状態の光合成速度とRubisco含量との関係は、イネにおいてもいくつか報告されてきた。その結果、光飽和条件においては、飽和CO₂濃度(内田ら1982)、大気CO₂濃度(Makino et al. 1984, Makino et al. 1994, 和田 1988)いずれの条件においても、Rubisco含量と光合成速度の間に高い相関が認められている。そのため、光飽和条件での光合成速度はRubisco含量によって説明できると考えられてきた。しかしこれらは、比較的Rubisco含量が低い場合であり、窒素供給量が十分な若い葉では、Rubisco含量に対して光合成速度が飽和する傾向が認められている。つまり、そのような時にはRubisco含量以外の要因が光合成速度を律速していると考えられる。和田(1988)は、その要因としてRubiscoのイニシャル活性の低下を指摘している。しかし、なぜRubiscoのイニシャル活性が低下するのかは不明である。内田ら(1988)は、CO₂に対する光合成の反応性が、*in vitro*のRubisco活性よりも高いことを報告し、生体内における何らかの活性化機構の存在を示唆している。そこで、本章ではRubiscoの活性化を担うタンパクであるRubisco activaseに着目し、まず第一節では、イネ葉の加齢過程におけるRubisco activaseや他の葉内成分の変化と最大酸素放出速度の変化との関係を、次に第2節では窒素供給量と光条件を変えて生育させ、CO₂ガス交換速度測定によるCO₂同化効率とRubisco activase含量との関係を調査した。さらに、生育環境の違いにより、Rubisco activase、Rubisco含量への窒素の分配がどのように変化するのかについても着目した。

第一節 加齢過程に伴う Rubisco activase 含量の変化と 最大酸素放出速度との関係

最大酸素放出速度は、光合成速度がCO₂と光で飽和する条件で測定される。よって、その葉の持つ最大光合成能力を知ることができる。本節では、光合成速度及び葉内成分の変動の最も大きい葉の加齢過程に着目し、それに伴う Rubisco と Rubisco activase 含量の変化と最大酸素放出速度との関係について検討した。

材料と方法

1. 供試品種と材料の育成

日本型イネ (*Oryza Sativa* L. cv. Nipponbare) を供試した。種子を少量の界面活性剤 Tween20 を含む 1% 次亜塩素酸ナトリウム溶液に 30 分間浸漬して消毒し、良く水洗した後 20–30°C で 24–48 時間催芽した。ハト胸状態になった種子を、プラスチックネットを張った発泡スチロールの上に並べ、水の上に浮かべた。4–5 葉期に水耕液 (Mae and Ohira 1981) の入った 42 L の容器に 6×7cm の間隔で植え替えた。水耕液は 3 日毎に交換し、植物体の生長に合わせて濃度を増加させた。植物体は自然条件下で育成した。9.5 葉期 (主稈上にある葉数) から、第 10 葉のサンプリングを 1 週間毎に行った。

2. 気相型酸素電極による最大酸素放出速度の測定

最大酸素放出速度は気相型酸素電極 (CB1D, LS2, LD-1 ; Hansatech) を用いて測定した。サンプリングした第 10 葉の先端から約 13–18cm の部位から約 5 cm² の葉片を作成し、測定に用いた。予備実験より、サンプリングした直後に測定するよりも、約 12 時間後に測定した方が光合成能力が高く安定しているという結果が得られた。そのため、夜に葉を主稈から切断し、シャーレ中の水に一晩浮かべ、翌日に測定を行った。測定条件は、温度 25°C、5 kPa CO₂、20 kPa O₂、75 kPa N₂ の空気

組成, 光量子束密度は約 $2400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ とした. この光条件で10分間前照射を行った後に酸素放出速度を測定した. 測定を終えた葉切片は液体窒素で凍結させ, 葉内成分の分析を行うまで -80°C で保存した.

3. 葉内成分の抽出

イネ葉切片50 mgに対して4 mLの抽出緩衝液 (50mM リン酸ナトリウム, 5mM DTT, 0.1 mM EDTA, 12.5% グリセリン, pH 7.5)と少量のPVPPと石英砂を加え, 水中で乳鉢と乳棒により磨砕した. クロロフィル分析用に乳鉢上で攪拌しながら1 mLとり, 残りを $30,000 \times g$ で10分間遠心分離した. 得られた上清をRubisco, Rubisco activase, 可溶性タンパクの分析に用いた.

4. Single Radial Imuno Difusion (SRID) 法によるRubiscoの定量

ゲル化温度の低い寒天を1.2%になるように, 0.9% NaCl, 0.1% アジ化ナトリウム溶液に煮沸して溶解し, $50-55^{\circ}\text{C}$ に温度を低下させた後, 抗イネRubiscoウサギ抗血清を0.5%となるよう加えた. その後, 厚さが1.0 mmになるようにガラス板上に流し, 固化したことを確認した後, 2.0 cmの間隔で直径3.0 mmの穴をあけた. Makino et al. (1983) の方法によりイネから精製したRubiscoを用いて4段階の標準を作成し, 上記の試料溶液と共に $4 \mu\text{L}$ ずつアプライした. プラスチック容器に入れ加湿状態にし, 水平に保って 25°C で4日間拡散させた. その後ゲルをガラス板からはずし, 生理的食塩水 (0.9% NaCl) に12時間浸し脱タンパクした. そのゲルを脱イオン水で約2時間洗浄し, 0.2% CBB R-250水溶液で約2時間染色した. 染色したゲルを脱色液 (25% メタノール, 15% エタノール, 17% 酢酸) に1-2日間浸すことにより脱色した. 沈降輪の直径をノギスで測定し, 直径の二乗と標準抗原量が比例することから, Rubisco量を算出した.

5. Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) 法による

Rubisco activaseの定量

試料溶液を緩衝液 (10mM リン酸ナトリウム, pH7.2) で50-100倍に希釈し, 平底96穴ELISA用マイクロプレート (Coming) に50 μ Lずつアプライした. そして, 4°Cで一晩静置し, タンパクをプレートに吸着させた. その後溶液を取り除きT-PBS (20mM リン酸ナトリウム, 150mM NaCl, 0.05% Tween 20) で2回洗浄し, 5% BSAを含むT-PBSをウェル一杯に満たし, 25°Cで2時間あるいは4°Cで一晩静置しブロッキングした. ブロッキングの後, T-PBSでプレートを2回洗浄し, T-PBSで1000倍に希釈したanti-Rubisco activaseウサギ抗血清 (1次抗体) を100 μ Lずつ加えた. 25°Cで1時間インキュベートした後にT-PBSで3回洗浄し, 5% BSAを含むT-PBSで1000倍に希釈したPeroxidase標識抗ウサギIgG (H+L) ヤギ抗体 (和光純薬工業) を2次抗体としてを50 μ Lずつ加えた. 25°Cで1時間インキュベートした後にT-PBSで4回洗浄し, 発色基質溶液 (0.2M クエン酸, 0.1M リン酸ナトリウム, 1 mM ABTS, 8.8 mM H₂O₂, pH5.0) を200 μ Lずつ5秒間隔でアプライし, 発色を開始させた. 25°Cで約30分間発色させた後に, 0.25 M クエン酸溶液を発色基質溶液の添加と同様の手順で100 μ Lずつ加え, 反応を停止させた. 約3分間静置した後にマイクロプレートリーダー (A4; 東ソー) で415 nmの吸光度を測定した. 深山ら (1994) の方法により精製したイネRubisco activaseを同様に操作し, それを標準として試料溶液中のRubisco activase量を算出した.

6. クロロフィルの定量

クロロフィル分析用に取った1 mLの抽出液に100% アセトンを加えて攪拌し, 冷暗所 (4°C) に1時間放置して色素の抽出を行った. その後, 5,000 \times gで10分間遠心分離をし上清を回収した. 得られた上清を, 80% アセトンで5mlに定容し633nm, 645nmの吸光度を分光光度計で測定した. 色素の分解を避けるため, 全ての操作をできる限り暗下で行った. クロロフィル量は, Arnon (1949) の方法により算出した.

7. 可溶性タンパクの定量

可溶性タンパクは、Bradford (1979) の方法により定量した。標準にはBSAを用いた。

結果

主稈第10葉の最大酸素放出速度の加齢に伴う変化を調査した (図1)。最大酸素放出速度は、約9.5葉期の3日目から17日目わずかに上昇し、17日目で最大の約 $34 \mu \text{mol O}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ を示し、その後急速に低下し、38日目でほぼ光合成能力を失った。

Rubisco activase含量は、3日目から17日目にかけて増加傾向を示し、17日目に最大値 93.5 mg m^{-2} となり、それ以後は急速に減少し、38日目にはほぼゼロとなった (図2)。可溶性タンパクに占める割合は、3日目から17日目まで上昇し、17日目に最大値の約1.43%となり、その後急速に低下した。

Rubisco activase含量とRubisco、可溶性タンパク、クロロフィル含量の経時的変化を比較するため、それぞれの最大値を100%とした百分率で含量を示した (図3)。Rubisco含量は3日目に最大となり、その後一定の速度で減少し続けた。可溶性タンパクは3日目が最大で、17日目までは緩やかに減少し、以後は比較的速い速度で減少した。クロロフィル含量では、3日目から17日目まで変化がほとんどなかったが、17日目以後に減少し始め、老化過程の後期になるにつれて減少速度が増す傾向にあった。Rubisco含量は、葉内成分中最も早い時期から減少する傾向にあった。Rubisco activase含量は、その増加過程と減少過程から、これらの葉内成分中、最も変動が大きかった。さらに他の成分は、光合成能力を失っている38日目にも10-30%の含量を残しているのに対して、Rubisco activase含量は、ほぼ0%となった。このような変化過程は最大酸素放出速度と類似していた。

これらの結果をもとに最大酸素放出速度とRubisco activase、Rubisco含量との関

係を調べた。Rubisco含量は約 3 g m^{-2} 以下では最大酸素放出速度と比例関係にあるが、それを越えると光合成速度に対して飽和した(図4)。それに対して、最大酸素放出速度はRubisco activase含量に対して直線的に増加し、飽和しなかった(図5)。1次回帰での相関係数は0.995であり、0.1%水準で高い相関を示した。

さらに、Rubiscoに対するRubisco activaseの量比(Activase/Rubisco比)とRubisco量当たりの最大酸素放出速度の関係を調べた(図6)。Activase/Rubisco比の上昇により、Rubisco量当たりの最大酸素放出速度が指数関数的に上昇する傾向があった。

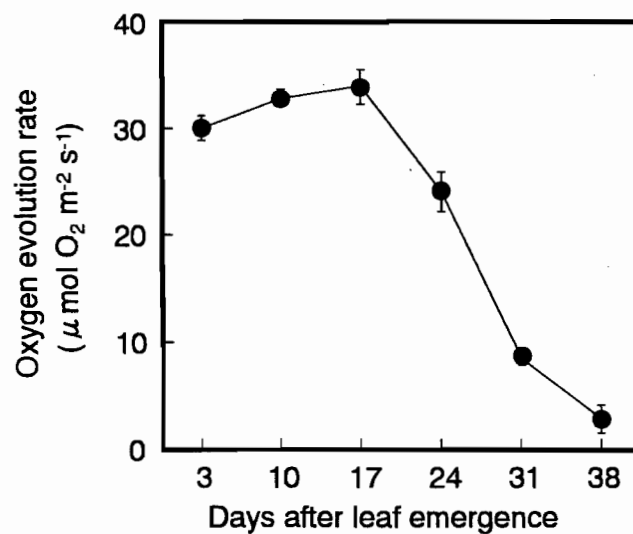


Fig. 1 Changes in the photosynthetic O_2 evolution rate in rice leaves from its emergence through senescence. Photosynthetic activity was measured by an oxygen electrode under the following conditions ; air temperature of 25°C , gas mixture of 5% CO_2 , 20% O_2 and 75% N_2 , saturated water vapor and illuminance of $2,400 \mu\text{mol photon m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Bars in the figure indicate standard errors of the mean ($n=5$).

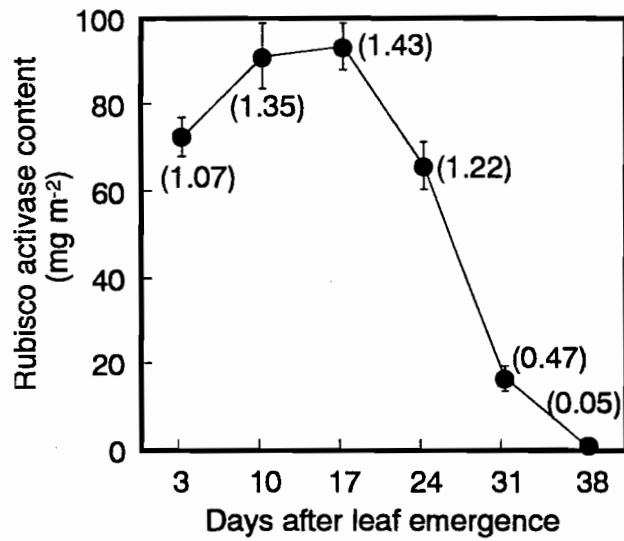


Fig. 2 Changes in the Rubisco activase content in rice leaves from its emergence through senescence. The numbers in parentheses indicate the ratio of Rubisco activase to total soluble protein. Bars in the figure indicate standard errors of the mean (n=5).

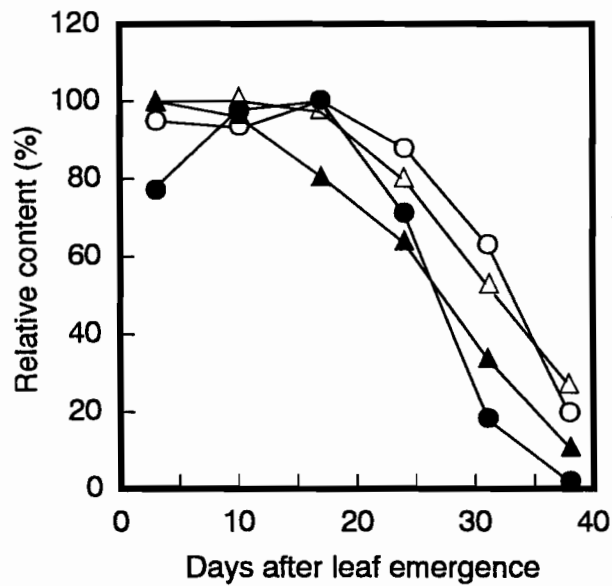


Fig. 3 Changes in the relative contents of Rubisco activase (●), Rubisco (▲), total soluble protein (△) and chlorophyll (○) in rice leaves from its emergence through senescence. The value at each sampling day were represented for percentage of the maximum amounts. The values of Rubisco activase, Rubisco, total soluble protein and chlorophyll were 93.5 mg m⁻², 3.92 g m⁻², 6.76 g m⁻² and 393 mg m⁻², respectively.

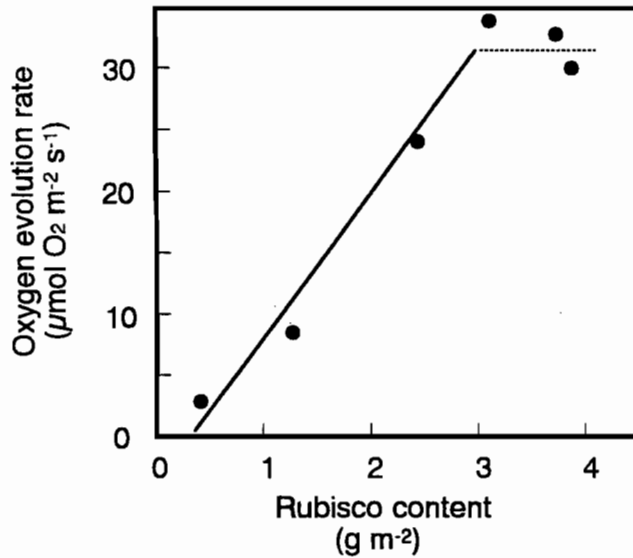


Fig. 4 Relationship between photosynthetic O₂ evolution rate and Rubisco content. ** means significance at 1% level. Data were obtained from Figs. 1 and 3.

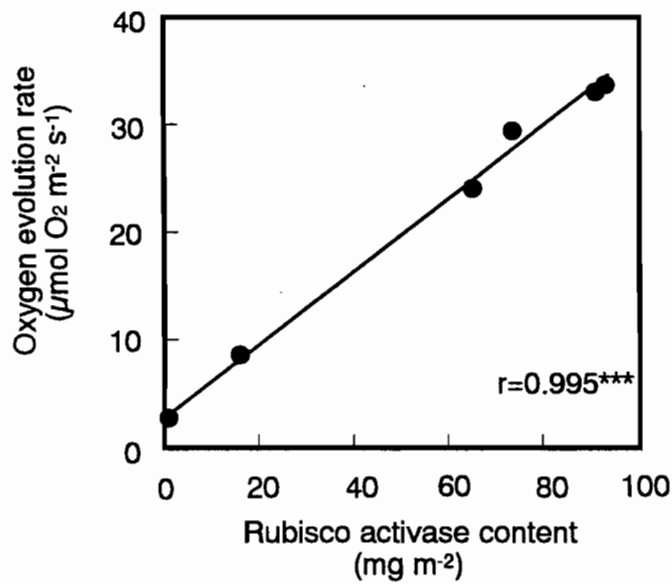


Fig. 5 Relationship between photosynthetic O₂ evolution rate and Rubisco activase content. *** means significance at 0.1% level. Data were obtained from Figs. 1 and 2.

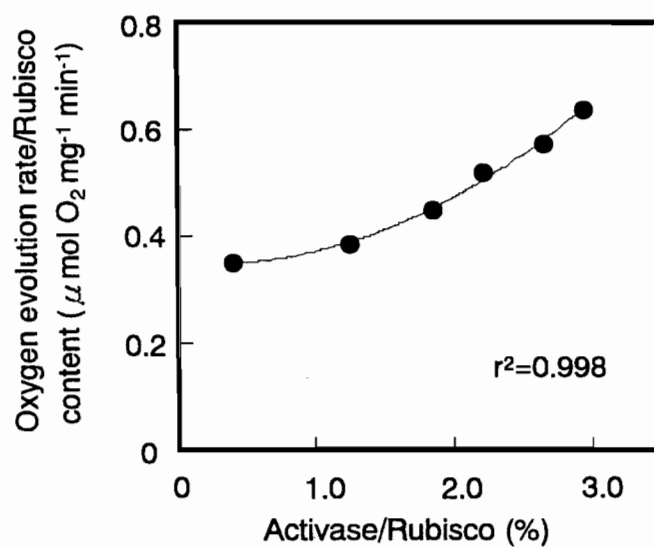


Fig. 6 Relationship between oxygen evolution rate/Rubisco content and the ratio of Rubisco activase to Rubisco content (Activase/Rubisco ratio). The apparent *in vivo* Rubisco activity was defined as the photosynthetic rate per unit Rubisco content. r^2 shows coefficients of determination. Data were obtained from Figs. 1, 2 and 3.

考察

イネ葉においてRubisco activase含量は加齢により変化し、その全可溶性タンパクに占める割合も加齢過程により異なっていた(図2)。Rubisco activase含量、全可溶性タンパクに占める割合はともに出葉後17日目に最大値を示し、それぞれ93.5 mg m⁻²、1.43%であった。全可溶性タンパクに占める割合はハウレンソウでは約2% (Robinson et al. 1989)、含量において、タバコでは約80–100 mg m⁻² (Hammond et al. 1997)、シロイヌナズナでは150–200mg m⁻² (Eckardt et al. 1997) という報告がある。これらの値は、葉の加齢程度が不明であるが、イネにおいても同程度の含量、割合で存在するものと考えられた。Rubisco activase含量は葉内成分中最も変動が大きかった(図3)。それに対してRubiscoは、3日目にすでに最大値に達しており、含量の低下傾向を示す時期が葉内成分中最も早かった(図3)。この結果は、RubiscoとRubisco activaseが両者とも葉緑体内に存在しているにも関わらず、異なった発現または分解の制御をうけていることを示唆している。このことは、Rubiscoがターンオーバーの少ない酵素であること (Mae et al. 1983)、老化過程におけるRubisco小サブユニットのmRNAの蓄積量の低下が、Rubisco activaseよりも若干早いこと (Crafts-Brandner et al. 1996) と関係があるのかも知れないが、このような非常に異なる変化過程を示す背景には、分解機構にも違いがある可能性が推察される。

最大酸素放出速度はRubisco含量が3 g m⁻²以下の時、Rubisco含量に対して直線的に増加するが、その値を超えると飽和した(図4)。イネにおいて、光合成速度がRubisco含量に対して飽和する傾向は、大気CO₂濃度 (Makino et al. 1984, Makino et al. 1994, 和田 1988)、飽和CO₂濃度 (内田ら 1982)、いずれの条件においても報告されている。これらの報告では、飽和傾向を示し始めるRubisco含量が1.5–4.0 g m⁻² とかなり広い範囲で異なっている。この違いは、異なる光合成測定条件によるものとも考えられるが、材料に用いた葉のRubisco活性化能力の違いが関与している可能性も考えられる。イネ葉において、光合成速度は細胞間隙CO₂分圧 (C_i) と完

全に活性化されたRubiscoの*in vitro*での活性によって説明できることが報告されている (Makino et al. 1984). もしこの報告が正しいとするならば、カルボキシレーションサイトでのCO₂分圧はCO₂輸送抵抗によってC_iよりも低くなるため、光合成速度を説明するには、より高いRubisco活性が必要となる。つまり、Rubisco activaseのような何らかのアクティベーターの存在が不可欠となる。他方では、Rubiscoの活性化状態は加齢によって変化し、葉が若い時期はRubiscoが過剰に存在するために低いと考察している (和田 1988). さらにシロイヌナズナでは、アンチセンスDNA技術による緩やかなRubisco activase含量の減少によるCO₂ガス交換速度の低下が報告されている (Eckardt et al. 1997). つまり、光飽和においてRubiscoが必ずしも完全に活性化されていない可能性が示唆される。

一般的に、光とCO₂飽和下での光合成速度は、無機リン酸の再生能力によって律速される。もし、葉緑体内の無機リン酸濃度が低下すると、光リン酸化が阻害され、ATPの合成速度が低下し、それにより、ATPの供給に依存してリブローズ5リン酸からRuBPを合成するホスホリプロキナーゼの活性が抑制され、光合成速度が制限される (Sharkey 1985). しかし、Rubisco activaseもATPase活性を持ち (Robinson and Portis 1989b), Rubiscoの活性化を促進するにもATPの加水分解を必要とする (Streusand and Portis 1987) ことから、無機リン酸が律速する場合にホスホリプロキナーゼとATPを競合し、その結果Rubisco activase含量がRubiscoの活性化状態を決めているということも考えられる。また、無機リン酸濃度の低下自体がRubisco活性を低下させることも指摘されている (Anwaruzzaman et al. 1995, Sawada et al. 1992). つまり、無機リン酸濃度の低下はRubisco活性化におけるRubisco activaseの働きへの負担を増大させると考えられる。本研究結果における最大酸素放出速度は、光とCO₂飽和下で測定されたものであり、RubiscoではなくRubisco activaseと高い相関を示した (図4, 5). このことから、Rubisco activaseがRubiscoの活性化を通じて最大酸素放出速度を決めているのではないかと考えられる。そこで、Rubisco当たりの最大酸素放出速度とRubiscoに対するRubisco activaseの量比

(Activase/Rubisco比)との関係について調べた(図6)。その結果、Activase/Rubisco比の上昇により、Rubisco当たりの最大酸素放出速度が指数関数的に増加する傾向にあった。RubiscoとRubisco activaseの量的な関係の重要さは*in vitro*においても証明されている。つまり、アッセイを行うときのActivase/Rubisco比の上昇により、*in vitro*でのRubiscoの比活性が増加する(Robinson et al. 1988)。本研究結果におけるActivase/Rubisco比は、その報告でRubiscoの比活性が増加する範囲内である。つまり、Rubisco当たりの最大酸素放出速度は*in vivo*における見かけのRubisco活性であり、*in vivo*におけるRubisco活性はActivase/Rubisco比によって決定されていると考えられる。

以上の結果から、Rubisco activaseはRubiscoとの量的なバランスにより、*in vivo*における定常状態でのRubisco活性を決定し、最大酸素放出速度を律速している可能性があると結論づけられる。そして、葉の若い時期はRubisco activaseに先がけてRubiscoが過剰に蓄積されるため、この律速性が増大するものと考えられる。

第二節 生育した光環境と窒素供給量が及ぼす

Rubisco activase含量と炭素同化効率への影響

窒素は光合成器官での主要な構成要素であり，葉内窒素含量の80%以上は光合成と関連がある (Sage and Reid 1994)．よって光合成は窒素供給量により強く影響を受ける．そして，遮光処理では，主に集光系への窒素投資量の増加により，光合成器官内での窒素の分配が変わる．本節では，光強度と窒素供給量を変えてイネを育成し，生育した環境の違いにより，Rubisco activase, Rubisco含量がどのような影響を受けるのか，最大酸素放出速度との関係はどのようなものかについて調査した．さらに，活性化されたRubiscoの量を表す指標である炭素同化効率を，CO₂-光合成曲線の初期勾配から算出し，Rubisco activase含量との関係について調査した．

材料と方法

1. 材料の育成

日本型イネの日本晴を供試材料とし，第一章第一節と同様の方法で水耕栽培により育成した．8.8葉期に3段階の窒素濃度 (0.5, 1.0, 1.5 mM) と2段階の光強度 (0, 58% 遮光) の複合実験区 (計6区) に移した．10.5–11.0葉期の主稈第10葉を材料とし，最大酸素放出速度を測定した．炭素同化効率測定のための材料は，8.8葉期に3段階の窒素濃度 (0, 1.0, 2.0 mM) と3段階の光強度 (0, 50, 80% 遮光) の複合実験区 (計9区) に移した．処理を開始して2週間後，第10葉のCO₂ガス交換速度を測定した．測定後の葉身は，液体窒素で凍結後-80°Cで保存した．

2. CO₂ガス交換速度の測定と炭素同化効率の算出

葉身におけるCO₂とH₂Oの交換速度を開放通気系で測定した．測定に使用するガスは，O₂, CO₂, N₂ポンベのガスを精密ガスコントロールシステム (STEC) で混合

して組成と流量を調節した。さらに、そのガスを恒温器で温度を調節した蒸留水中でバブリングすることにより湿度を調節した。この調整ガスを、アクリル製の同化箱へ流し、その入口と出口のガスの一部を湿度計と赤外線ガス分析器へポンプで交互に導き、湿度とCO₂濃度を測定した。葉温は、葉の背軸面にクロメル-アルメル熱電対を接触させることにより測定した。光源にはメタルハライドランプ(D400, 東芝ライテック)を用いた。

ガス交換速度の測定条件は、光量子束密度 (PFD) $1,500 \mu \text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 、葉温28°C、O₂濃度2%とし、CO₂分圧のみを変化させた。細胞間隙CO₂分圧 (C_i) は von Caemmerer and Farquhar (1981) の方法に従い計算した。炭素同化効率は、C_iが12 Pa 以下の場合でのCO₂同化速度を直線回帰した傾きより算出した。

3. 窒素含量の測定

窒素含量は葉片をケルダール分解後、大山 (1990) の方法に従い比色定量した。

4. その他の分析

最大酸素放出速度、Rubisco含量、Rubisco activase含量、可溶性タンパク含量は、第一章第一節と同様の方法で測定した。

結果

図7に異なる光強度，窒素供給量で生育させたイネ葉における，全窒素含量とRubisco，Rubisco activase含量との関係を示す。Rubisco activase含量は，生育中の光強度に影響されず，全窒素含量と共に直線的に増加した(図7A)。それに対して，Rubisco含量も直線的に増加したが，遮光区において若干低くなった(図7B)。

図8に異なる生育光強度，窒素供給量で生育させたイネ葉における，Rubisco activase含量と最大酸素放出速度との関係を示す。最大酸素放出速度は，自然光区に比べて遮光区で若干低かった(図8A)。それに対して，Rubisco含量と最大酸素放出速度との関係は生育光強度に影響されなかった(図8B)。しかし，Rubisco含量が多くなると，最大酸素放出速度がRubisco含量に対して飽和する傾向があった。

図9に炭素同化効率とRubisco，Rubisco activase含量との関係を示す。Rubisco activase含量と炭素同化効率の間には，ほぼ直線的な関係が認められた(図9A)。一方Rubiscoでは，含量が 3 g m^{-2} 以下の場合にはRubiscoの増加に対して炭素同化効率が直線的に上昇した。しかし，Rubisco含量が 3 g m^{-2} 以上となると，炭素同化効率は飽和する傾向を示した(図9B)。

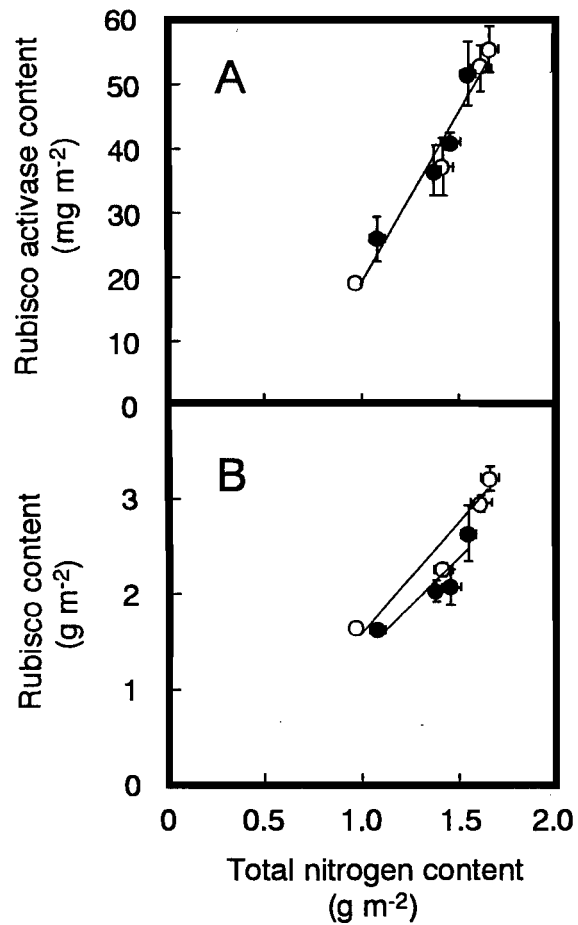


Fig. 7 The amounts of Rubisco activase (A) and Rubisco (B) with varying contents of nitrogen concentrations and light intensities (○; 100%, ●; 42% of full sunlight). Bars in the figure indicate standard errors of the mean (n=6).

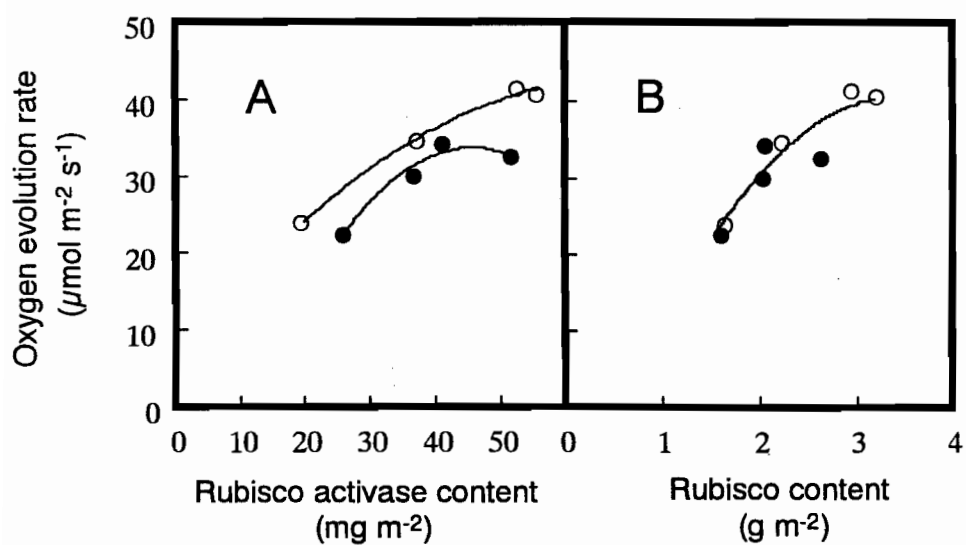


Fig. 8 Relationship between Oxygen evolution rate and the amounts of Rubisco activase (A) and Rubisco (B) in rice leaves grown under different nitrogen concentrations and light intensities (\circ ; 100% and \bullet ; 42% of full sunlight).

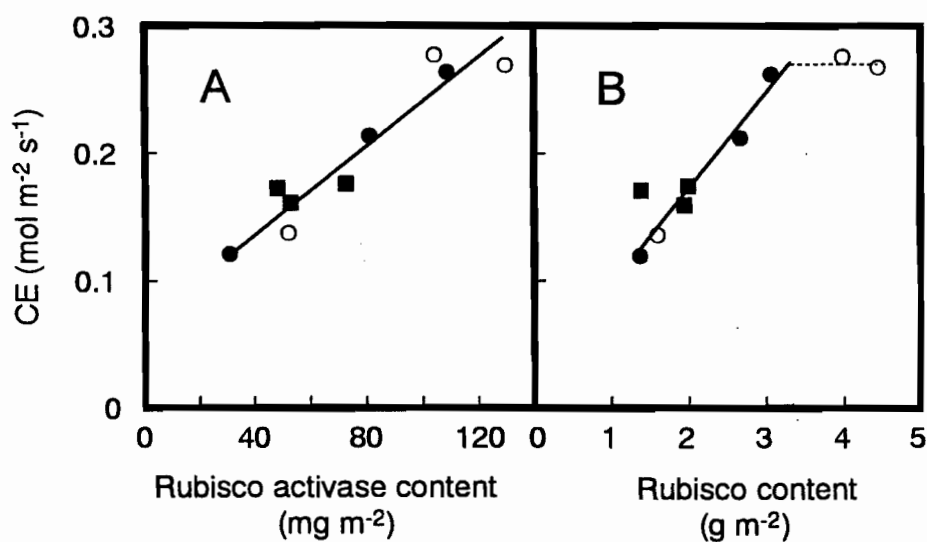


Fig. 9 Relationship between carboxylation efficiency (CE) and the amounts of Rubisco activase (A) and Rubisco (B) in rice leaves grown under different nitrogen concentrations and light intensities (\circ ; 100%, \bullet ; 50% and \blacksquare ; 20% of full sunlight).

考察

Rubisco activase含量は、全窒素含量と共に直線的に増加し、生育光強度に影響されなかった(図7)。このことは、吸収した窒素が一定の割合でRubisco activaseに分配されることを意味する。それに対して、Rubisco含量は遮光区において若干低くなった。このことは、Rubisco含量は吸収窒素量に影響を受けやすい(Sage et al. 1987)が、カルビンサイクルを構成する他の酵素、チラコイド膜構成物質への窒素投入量は、相対的に一定である(Evans 1989, Evans and Terashima 1988)という報告と一致する。遮光区でRubiscoへの吸収窒素の分配が少なくなる理由としては、弱光下で窒素供給量が同じ条件では、吸収窒素のRubiscoへの変換が阻害されることが考えられる(内田ら 1980b)。これらの結果、第一章第一節で述べたような葉の加齢過程だけではなく、葉齢が同じであっても生育環境の違いにより、葉内でのRubisco activaseとRubisco含量のバランスが変わることが明らかとなった。

Rubisco activase含量に対する最大酸素放出速度は、自然光区に比べて遮光区で若干低かった(図8A)。この結果は、遮光区においては葉面積あたりのRubisco含量が 3 g m^{-2} 以下(第一章第一節の結果より、 3 g m^{-2} 以上では最大酸素放出速度がRubisco含量に対して飽和)であること(図8B)、吸収窒素当たりのRubisco含量が自然光区よりも低いこと(図7B)により、Rubiscoが光合成速度を制限しているとも考えられる。しかし、今回の実験では対象にしていないが、ATPとADPの葉緑体内での濃度(Robinson and Portis 1987)、無機リン酸の利用効率(Sharkey 1985)が自然光区と遮光区の葉で異なり、Rubisco activaseの活性に影響した可能性も考えられる。一方、Rubisco含量と最大酸素放出速度との関係は生育光強度に影響されなかった(図8B)。ただし、Rubisco含量が多くなると、最大酸素放出速度がRubisco含量に対して飽和する傾向があった。この結果は、第一節での結果とほぼ一致し、Rubisco含量が多い場合には、Rubisco含量以外の光合成の律速要因、おそらくRubiscoの活性化状態が関与していることを示唆している。

このことを明らかとするために、炭素同化効率とRubisco, Rubisco activase含量との関係を調査した。一般的に低CO₂濃度下では、光合成速度はRubisco活性によって律速されるため、炭素同化効率は葉面積あたりのRubisco活性と高い相関を示す(von Caemmerer and Farquhar 1981)。つまり、炭素同化効率を調べることにより、葉面積あたりの活性化されたRubiscoの量をだまかに知ることができる。本研究結果において、Rubisco activase含量と炭素同化効率の間には、ほぼ直線的な関係が認められた(図9A)。それに対して、Rubisco含量が3 g m⁻²以上の場合には、Rubisco含量に対して炭素同化効率が飽和する傾向が見られた(図9B)。この結果は、イネ葉の光合成におけるRubiscoの活性化率の重要性を示しており、第一章第一節の仮説と一致する。つまり、Rubisco含量が多い場合、相対的にRubisco activaseが不足しRubiscoの活性化率が制限され、結果的に光合成速度が律速されることが示唆される。

摘要

飽和光下における定常状態の光合成速度はRubisco含量によって説明できると考えられてきた。しかし、Rubiscoだけではなく、その活性化状態が関与することを示唆する報告がいくつかある。そのため、本章ではRubiscoの活性化に働くタンパクであるRubisco activaseに着目して、第一節では、最大酸素放出速度との関係を、第二節では、活性化されたRubisco量の指標である炭素同化効率との関係を調査した。また、加齢過程や生育環境によるRubisco activase含量への影響についても検討した。

日本型イネの日本晴を供試し、第一節では、主稈第10葉の加齢に伴う最大酸素放出速度、Rubisco activase含量、Rubisco含量の変化を調べ、それらの間の関係について検討した。Rubisco activase含量は最大値を示す17日目まで徐々に増加し、その後急速に減少した。その変化は葉内成分中最も大きかった。Rubisco含量は出葉後3日目で既に最大値であり、低下しはじめる時期が葉内成分中最も早かった。つまり、この2つのタンパク量の変化過程が非常に異なることが明らかとなった。最大酸素放出速度は 3 g m^{-2} 以下のRubisco含量と比例関係にあるが、その値を超えると飽和する傾向にあった。一方、Rubisco activase含量との間には高い正の相関が認められた。そして、Rubiscoに対するRubisco activaseの含量比が高まると、見かけの*in vivo* Rubisco活性(単位Rubisco量当りの光合成速度)は高くなった。以上の結果から、Rubisco activase含量はイネ葉の加齢に伴う最大酸素放出速度の変化と密接に関わっており、特に葉が若くRubiscoが過剰にある場合、Rubiscoの活性がRubisco activaseによる量的な制限を受けているものと考えられる。

第二節では、窒素供給量と生育光強度を変えてイネを育成し、主稈第10葉の最大酸素放出速度、炭素同化効率とRubisco activase含量との関係を調査した。さらに、生育中の光強度が吸収窒素のRubiscoとRubisco activaseへの分配にどのように影響するのかについても着目した。Rubisco activase含量は、生育中の光強度に影響され

ず、吸収窒素に対して比例的に増加した。それに対して、Rubisco含量は遮光区において、若干低くなった。この結果から、生育光強度の違いにより、葉内でのRubiscoとRubisco activase含量のバランスが変わることが明らかとなった。Rubisco activase含量に対する最大酸素放出速度は、自然光区に比べて遮光区で若干低くなった。一方、Rubisco含量と最大酸素放出速度との関係は生育中の光強度に影響されなかった。しかし、Rubisco含量が多くなると、最大酸素放出速度がRubisco含量に対して飽和する傾向があった。炭素同化効率とRubisco activase含量の間には、ほぼ直線的な関係が認められた。それに対して、Rubiscoでは、含量が 3 g m^{-2} 以下の場合にはRubisco含量の増加に対して炭素同化効率が比例的に上昇するのに対し、Rubisco含量が 3 g m^{-2} 以上になると、炭素同化効率は飽和する傾向を示した。以上の結果から、Rubisco含量が多い場合、光合成速度がRubisco含量に対して飽和傾向を示すのは、Rubisco activase含量が相対的に少なくRubiscoの活性化率が制限されるためであると考えられる。

第二章

非定常状態の光合成速度とRubisco activase

光合成は光強度、温度、湿度などのさまざまな環境要因により影響を受ける。その中でも光は、最も重要な要因の一つであり、多くの研究が行われてきた。自然環境下で、植物は、個体間での相互遮蔽、雲の動きなどにより、光環境の変化にさらされる。そのような時、光合成は非定常状態となり、光合成代謝産物のプールサイズ (Sassenrath and Pearcy 1992)、CO₂固定関連酵素の活性化状態 (Stitt and Grosse 1988)、気孔開度 (Kirschbaum and Pearcy 1988) の変化を経て、新たな定常状態へ移行する。そのような、非定常状態の光合成では、気孔開度の変化を除いた場合、Rubiscoの活性化が最も遅い反応であることが示された (Woodrow and Mott 1989)。その後、Woodrow et al. (1996) は、細胞間隙CO₂分圧で補正した光合成速度を用いて、Rubiscoが律速する非定常状態の光合成をモデル化した。彼らのモデルによると、Rubiscoの活性化速度は、Rubisco触媒サイトのカルバミル化 (Lorimer and Miziorko 1980)、またはRubisco activaseが触媒するRubisco-RuBP不活性型複合体からのRuBPの解離 (Wang and Portis 1992) のいずれかにより制限される。そのため、もし実際にRubisco activaseがRubiscoの活性化速度を律速しているとする、葉内のRubiscoとRubisco activase含量のバランスが、直接的に非定常状態の光合成速度に影響するはずである。第一章では、イネ葉の加齢過程においてRubiscoとRubisco activase含量の変化過程に違いがあることを明らかにした。このことから、光合成の活性化速度が加齢により変化することが推察される。

本章では、イネ葉を弱光から飽和光にさらした時の光合成の活性化速度を、緩和法により評価し、Rubisco activaseとの関係について検討した。さらに、加齢過程における非定常状態の光合成速度の律速要因について論じた。

第一節 加齢に伴う光合成活性化の緩和時間の変化と Activase/Rubisco比との関係

弱光下にさらされていた葉に、強光を照射すると、光合成速度は時間と共に指数関数的に上昇する。そのため、光合成速度の変化を自然対数でプロットすると、その値は時間に対して直線的となる。この直線の傾きは、その反応の見かけの速度定数であり、反応速度を決定する値である。緩和時間 (τ) は見かけの速度定数の逆数であり、反応が完了するまでの時間を表す指標である。Woodrow et al (1996) は、この値を用いて非定常状態の光合成をモデル化した。本節では、イネ葉において、この緩和時間を測定し、この値が加齢過程でどのように変化するかを調査した。さらに、Rubiscoに対するRubisco activaseの量比との関連性について検討した。

材料と方法

1. 供試材料

日本型水稻の日本晴を、自然環境下で土耕栽培により育成した。種子を少量の界面活性剤Tween20を含む1%次亜塩素酸ナトリウム溶液に30分間浸漬して消毒し、良く水洗した後、25–30°Cで約48時間催芽させた。ハト胸状態になった種子を1/5000 are ワグナーポット (1ポットに5種子) に播種した。播種前に、1ポット当たり1g チッ素となるように化成肥料を与えた。緩和時間に対する光量子束密度 (PFD) の影響については、11.0–11.2葉期の主稈第10葉を用いて調査した。細胞間隙CO₂分圧 (C_i) の効果についての調査は、12.5葉期の主稈第11葉を用いて行った。加齢については、主稈第10葉を材料とし、9.5葉期から10日毎に調査した。

2. CO₂ガス交換速度の測定

CO₂ガス交換速度の測定には携帯型光合成測定装置 (LI-6400, LI-COR) を用いた。

測定条件は、葉温 28°C 、 CO_2 分圧 36 Pa 、 O_2 分圧 21 kPa で行った。測定チャンバーに送る気体は、露点発生装置 (LI-610, LI-COR Inc.) を用いて一定の露点発生温度 $17-20^{\circ}\text{C}$ に調節した。光源にはメタルハライドランプ (D400, 東芝ライテック) を用い、水フィルターを通した光を測定チャンバーに供給した。それぞれの測定において、まずチャンバーに固定された葉に、飽和光 ($1800\ \mu\text{mol m}^{-2}\text{ s}^{-1}$) を1時間照射した。その後、弱光 ($0-600\ \mu\text{mol m}^{-2}\text{ s}^{-1}$) 下に1時間置き、光合成速度が安定していることを確認した後、再び飽和光を照射した。そして、光強度を増加させた直後からの CO_2 ガス交換速度を、5秒毎に15分間測定した。 CO_2 ガス交換速度は、 CO_2 ガス交換速度と CO_2 補償点を直線回帰し、 C_i が 25 Pa となる時の CO_2 ガス交換速度として補正した; この計算での CO_2 補償点は 5 Pa で固定した。緩和時間に及ぼす C_i の影響の調査では、大気 CO_2 分圧を $25, 36, 50\text{ Pa}$ に変えて測定し、 C_i を変化させた。この場合の測定における C_i の値は、光強度を増加させてから $0.5-5.0\text{ min}$ の間の C_i の平均値とした。 C_i が高くなると、 C_i と CO_2 ガス交換速度の直線性がなくなるため、この場合の CO_2 ガス交換速度は、 C_i で補正せず、そのまま緩和時間の算出に用いた。加齢過程における CO_2 ガス交換速度の測定では、弱光の条件として2つのPFD (60 と $500\ \mu\text{mol m}^{-2}\text{ s}^{-1}$) を適用し、同じ葉を用いてそれぞれの光からの光合成の活性化を調査した。 CO_2 ガス交換速度測定葉は液体窒素で凍結させ、分析に用いるまで -80°C で保存した。

3. 緩和時間の算出

緩和時間 (τ) は Woodrow and Mott (1989) の方法により算出した。飽和光を照射した後、最終的に到達する CO_2 ガス交換速度とそれぞれの時間における CO_2 ガス交換速度との差の自然対数を、時間に対してプロットした。光強度を切り替えてから $0.5-5.0$ 分後の直線部分の傾きから、見かけの速度定数を算出した。このように光強度を変化させた後、数分間で見られる直線域の傾きはRubisco活性化の見かけの速度定数である (Woodrow et al 1996)。その見かけの速度定数の、負の逆数から

緩和時間を得た。よって、この値はRubiscoの活性化が完了するまでに必要とされる時間の指標となる。

4. RubiscoとRubisco activase含量の測定

第一章と同様の方法で測定した。

結果

弱光下で光合成の定常状態にある葉に、飽和光を照射すると、光合成速度は上昇し、約10分後に新たな定常状態に移行した(図10A)。気孔伝導度もまた、光強度の変化の後に、急速に上昇した(図10B)。この気孔伝導度の上昇は、光合成速度の上昇よりも速く、2-3分後に定常状態に移行した。そのため、 C_i は測定時間中、ほぼ一定に保たれていた(図10C)。しかし、光量子束密度(PFD) $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ で前照射した場合、光強度を増加させてから約2分間、 C_i の上昇が僅かながら確認された。 C_i の変化は光合成速度に影響すると考えられたため、緩和時間の算出に用いる光合成速度は、 C_i で補正した値(C_i が25 Paの時の光合成速度)を用いることとした(図11A)。緩和時間の算出のために、その補正した光合成速度の最大値と、その時間での値との差をプロットした(図11B)。この片対数プロットの直線性は、指数関数的な経時的変化であることを意味する。また、光強度を増加した後、数分間で見られる直線域はRubiscoによって律速されていることが知られている(Woodrow and Mott 1989)。そのため、この直線の傾きの逆数から得られる緩和時間(τ)は、Rubiscoの活性化に要する時間を表す指標として用いることができる。このデータの場合、PFDが60, 500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ で前照射した後の緩和時間は、それぞれ2.09, 1.23分と算出された。

前照射における光強度と緩和時間との間には、負の相関が認められた(図12)。そしてPFDが100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 以下の時、PFDの増加に対して、緩和時間が急激に短縮された。それに対して、PFDが100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 以上になると、緩和時間の

短縮は緩やかとなった。この光強度と緩和時間との関係をもとに、弱光 (PFD $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) と強光 ($500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) を選び、これらの光で前照射した場合の緩和時間の変化を、加齢過程においてを調査した。弱光の場合の緩和時間は、測定の開始時である出葉後3日目に最も大きな値 ($\tau = 2.90 \text{ min}$) を示した (図13)。その後、緩和時間は33日目まで短縮し続けた。それに対して、強光での緩和時間は、葉の加齢過程を通じて、ほぼ一定 ($\tau = 1.5 - 2.0 \text{ min}$) に保たれていた。

葉の加齢における、Rubiscoに対するRubisco activaseの量比 (Activase/Rubisco比) の変化を調査した (図14)。Activase/Rubisco比は、加齢と共に5.19%から7.08%に上昇した。

これらの結果から、緩和時間とActivase/Rubisco比の関係を調査した (図15)。弱光からの緩和時間はActivase/Rubisco比と高い負の相関が認められた。その相関係数は0.994であり、5%水準で有意であった。しかし、強光からの緩和時間はActivase/Rubisco比との関係が認められなかった。

細胞間隙 CO_2 分圧 (C_i) と緩和時間との関係を調査した (図16)。 C_i の上昇に対して、強光からの緩和時間は長くなり、その傾向は30 Pa以下で特に顕著であった。弱光からの緩和時間は、強光の場合と比較して、 C_i にあまり影響されなかった。

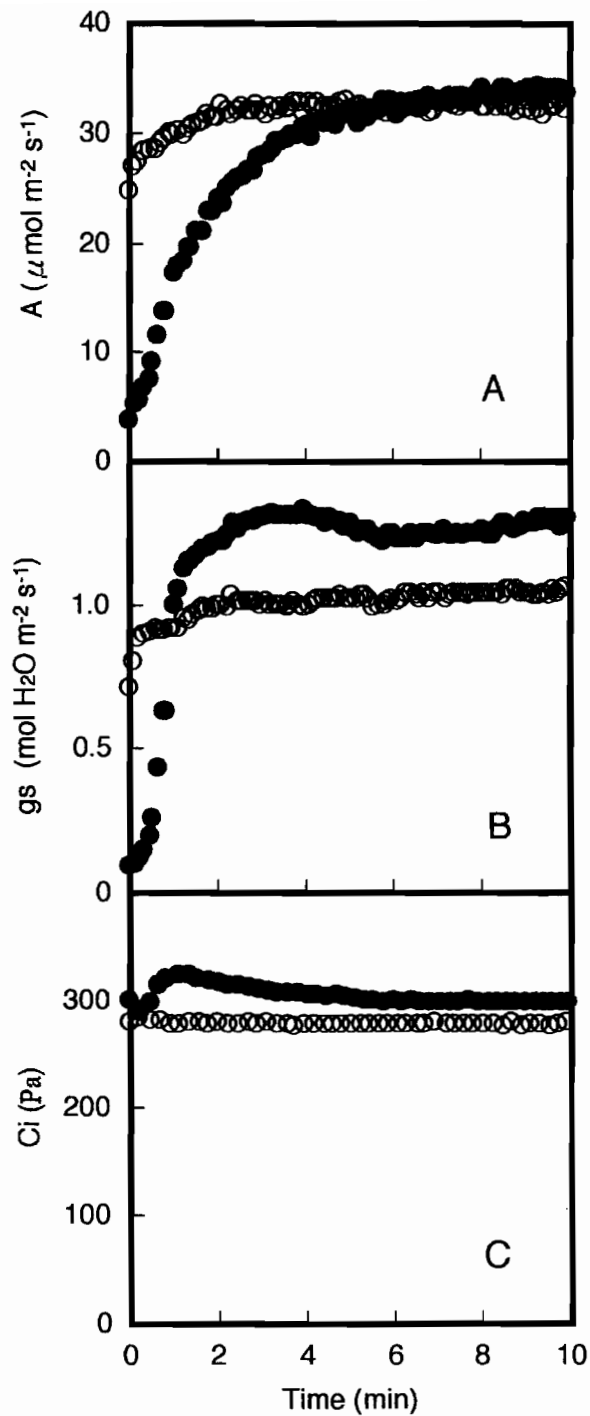


Fig. 10 Time course changes of photosynthesis (A), stomatal conductance (B) and intercellular CO_2 partial pressure (C) following an increase in PFD. Rice leaves were placed for 1 h in low (●; $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) or high (○; $500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) PFD. Then, the leaves were illuminated at saturated PFD ($1800 - 2000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) and gas exchange data were recorded every 5s.

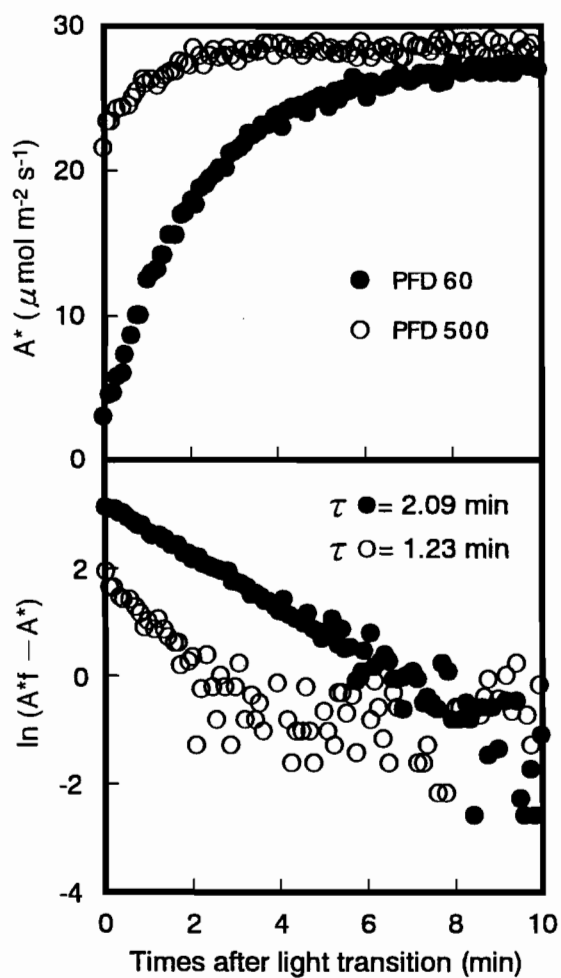


Fig. 11 Time course changes of normalized photosynthesis (A) and the natural logarithm of the difference between maximum and measured normalized photosynthesis rate (B). Data were calculated as described in Materials and Methods. Relaxation times (τ) were determined by the absolute inverse of the slope of the line between 0.5 and 5 min. A^* and A^*f express the normalized photosynthetic rate at each time and the maximal rate by C_i , respectively.

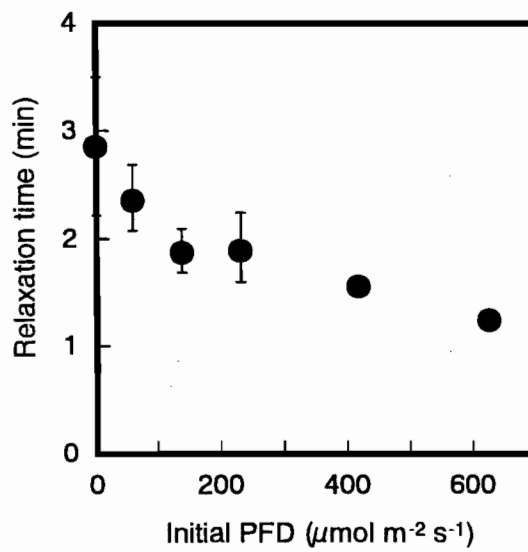


Fig. 12 Effect of initial PFD values on relaxation time for activation of photosynthesis. The 10th leaf blades on the main stems at 11.0 – 11.2 leaf age were used for the study. The rice leaves were equilibrated for 30 min at saturated PFD ($1800 - 2000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), placed for 1 h in various PFD, and then returned to illuminate at saturated level and measured gas exchange every 5s. Bars in the figure indicate standard errors of the mean ($n = 3$).

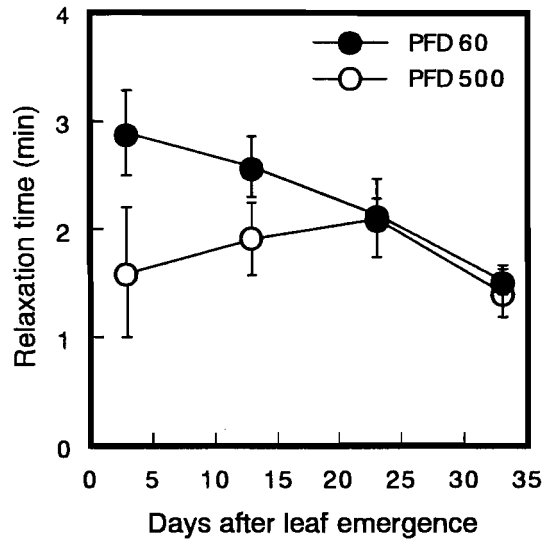


Fig. 13 Change in the Relaxation time for photosynthesis activation in rice leaves from its emergence through senescence. The 9th leaf blades on the main stems of rice were used for the study. The rice leaves were equilibrated for 30 min at saturated PFD ($1800\text{--}2000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), placed for 1 h in low (\bullet ; $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) or high (\circ ; $500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) PFD, and then returned to illuminate at saturated level and measured gas exchange every 5s. Bars in the figure indicate standard errors of the mean ($n = 5$).

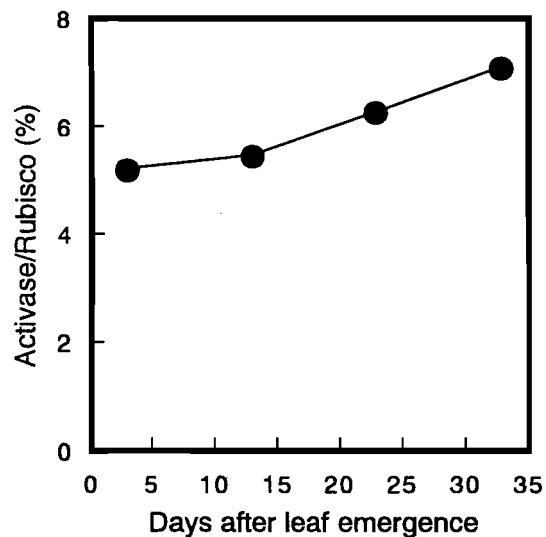


Fig. 14 Change in the ratio of Rubisco activase to Rubisco content from leaf emergence through senescence. Values are the means of five independent estimations.

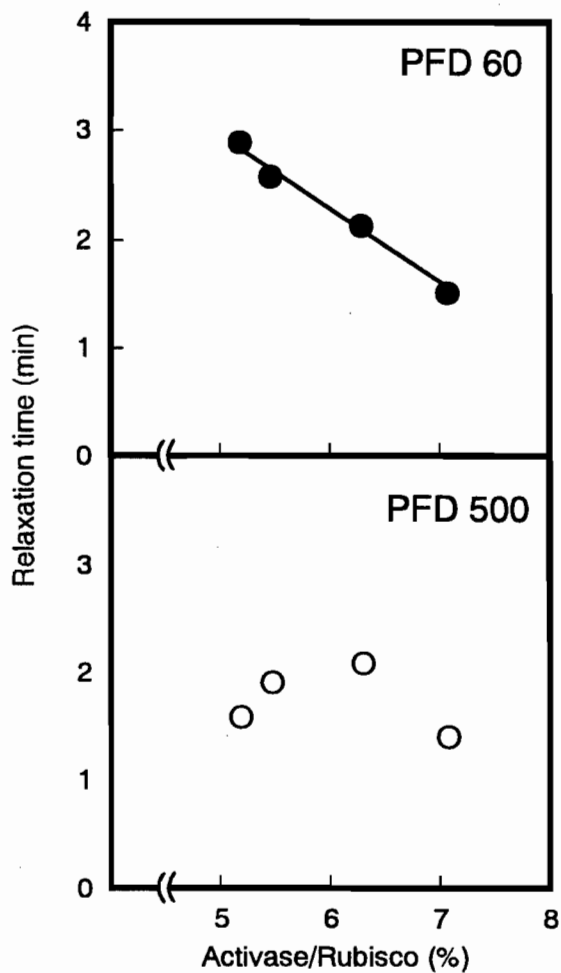


Fig. 15 The relaxation time for photosynthesis activation in relation to the ratio of Rubisco activase to Rubisco content in rice leaves. The relaxation time of low initial PFD ($60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) was negatively correlated to Rubisco activase/Rubisco ratios (upper panel). Its correlation coefficient of linear regression was 0.994 (significant at $p = 0.05$). In case of high initial PFD ($500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), the correlation could not be recognized (lower panel). Data were obtained from Figs. 4 and 5.

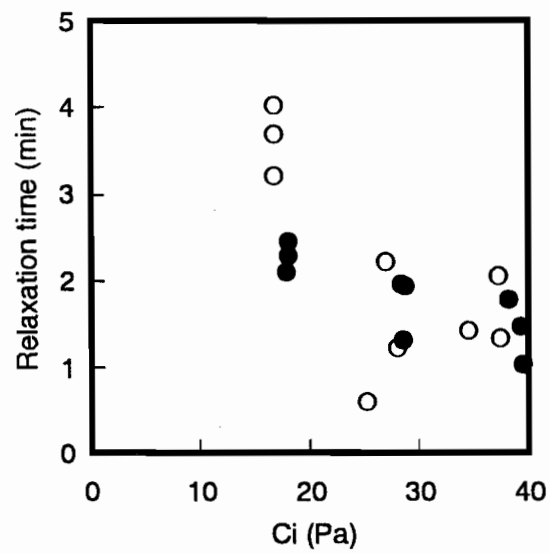


Fig. 16 The relaxation time for photosynthesis activation as a function of C_i . The 11th leaf blades on the main stems at 12.5 leaf age of rice were used in this experiment. Photosynthesis data were directly used to calculate apparent relaxation time of low initial PFD (●; $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) and high initial PFD (○; $500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). The C_i values were determined by averaging the C_i values of time courses between 0.5 – 5.0 min after light intensities were increased.

考察

光強度の増加によって引き起こされる、光合成の活性化の速度はRubiscoによって律速されていると考えられる。その理由としては、そのような光環境を変化させたときの、光合成の活性化の緩和時間とRubisco活性化率の緩和時間が、ほぼ一致すること (Woodrow and Mott 1989)、光合成速度のもう一つの大きな律速要因である、RuBPの再生能力が、Rubiscoの触媒能力を上回っていること (Seemann et al. 1988) が挙げられる。しかしホウレンソウでは、気孔伝導度の上昇速度はRubiscoの活性化速度よりも遅いため、光強度を増加させた直後、 C_i の急激な低下と、その後の緩やかな上昇が認められた (Woodrow and Mott 1989)。このような C_i の変化は、Rubiscoが律速する光合成速度を、 CO_2 ガス交換速度で評価する際に、影響すると考えられた。そのため、彼らは C_i で補正した CO_2 ガス交換速度を用いて緩和時間を算出した。イネにおいては、気孔伝導度は光合成速度よりも速く上昇した (図10A, B)。その結果 C_i は、ほぼ一定に保たれていたことから (図10C)、光合成の活性化は気孔によって律速されないことが示唆される。さらに、このことからイネにおける光合成の活性化は、ホウレンソウに比べて、より強くRubiscoによって律速されているものと考えられる。しかし、強光と弱光での C_i の経時的変化に、若干の差異が認められるため、本研究においても、 C_i で補正した光合成速度を用いて緩和時間を算出した (図11A, B)。

前照射の光強度と緩和時間には負の相関が認められ、その関係は2つの相に分けることができた (図12)。1つは、光強度が $PFD 100 \mu mol m^{-2} s^{-1}$ 以下で見られ、光強度の増加に伴い急激に緩和時間が短縮される相であり、他方は、 $PFD 100 \mu mol m^{-2} s^{-1}$ 以上での緩和時間が緩やかに短縮される相である。また、前照射の光強度に依存した、光合成活性化速度の律速要因の変化 (Jackson et al. 1991, Woodrow et al. 1996) が示唆されていることから、これら2つの相の間で律速要因が異なっていることが考えられた。そのため、2つの相から $PFD 60 \mu mol m^{-2} s^{-1}$ (弱光) と PFD

500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (強光) を選び、これら2つの光強度からの光合成の緩和時間を加齢過程において調査することとした。

弱光の場合の緩和時間は、加齢と共に短くなった(図13)。このことは、弱光からのRubiscoの活性化速度が、加齢の進行により上昇したことを意味する。イネ葉の加齢において、RubiscoとRubisco activase含量の変化過程は異なり、Rubiscoに対するRubisco activaseの量比(Activase/Rubisco比)は加齢と共に上昇し(図14)、Activase/Rubisco比は弱光からの緩和時間と高い負の相関を示した(図15A)。これらの結果は、比較的弱い光からの光合成の活性化速度にActivase/Rubisco比が関与していることを示している。さらに、最も若い葉で緩和時間が最も長く、Activase/Rubisco比が低いという結果(図13, 14)は、第一章での定常状態と同様に、非定常状態の光合成においても、葉の若い時期ではRubiscoが過剰となるためRubisco activaseの律速性が、特に高まることを示唆している。実際のRubisco activaseが制限する緩和時間は、Rubisco含量よりもRubisco activaseの基質である不活性型のRubisco量と、より関係が深いと予測される(Woodrow et al. 1996)。しかしイネ葉においては、第一章で示したように定常状態の光合成においてもRubisco activaseの働きが必要であることから、活性型、不活性型を合わせた量により活性化の速度が決まるのではないかと考えられる。これらの結果から、PFD 60 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 程度の比較的弱い光からの光合成の活性化速度は、Activase/Rubisco比によって決定され、Rubiscoが葉の若い時期に過剰に蓄積されるために、加齢が進むにつれて上昇すると考えられる。

一方、強光(PFD 500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)からの緩和時間は、加齢に影響されずほぼ一定であり(図13)、Activase/Rubisco比との関係は認められなかった(図15)。このことは、弱光での場合と異なりRubisco activaseが関与しないことを意味している。そこで、Rubiscoの活性化における他の律速要因として、もう一つの遅い反応であるカルバミル化(Laing and Christeller 1976)の関与の可能性が考えられる。カルバミル化はRubiscoの触媒サイトのLys-201のアミノ基への可逆的なCO₂の付加反応

(Lorimer and Mizioroko 1980) であり, Rubisco activaseの触媒作用を必要としない (Portis 1992). つまり, この反応速度はRubiscoの触媒サイト周辺のCO₂濃度によって決定されることから, CO₂濃度に対する感受性を調べることにより, その律速性を判断することが可能であると考えられる. 本実験での2種類の光強度からの緩和時間の, 細胞間隙CO₂濃度 (C_i) に対する感受性は, 弱光より強光の場合の方が高かった (図16). よって, 比較的強い光からの光合成の活性化速度はカルバミル化速度によって決定されている可能性が考えられる. さらに, このような自発的な化学反応は加齢に影響されにくい事が予想されることにも裏付けられる. しかし, RubiscoとRuBPの不活性型複合体からのRuBPの解離は, 自発的な可逆反応であるカルバミル化よりも先に起こる反応である. よって, もしこの過程が完全にカルバミル化によって律速されているのならば, その緩和時間はRubisco activaseによって律速されている場合のものより, 短くなるはずである (Woodrow et al. 1996). 今回の結果は, 特にC_iが30 Pa以下において, この条件を満たしていない (図16). その理由として, 今回のC_iの影響の調査においては, 補正していない光合成速度を, 直接に緩和時間の算出に用いたため, 気孔伝導度およびC_iの反応が実験区間で異なっている可能性が考えられる. しかし気孔伝導度はC_iの違いに影響されず, 類似した変化過程を示し, その結果C_iは, ほぼ一定に保たれていた (データは掲載せず). つまり, 気孔は関与していないと考えられる. これ以外に可能性のある原因としては, Rubiscoの活性化状態を左右するCA1Pのような阻害剤の影響が考えられる (Kobza and Seemann 1989, Seemann et al. 1990). この場合のRubiscoの活性化は, Rubisco activaseよりもCA1Paseの活性に依存する (Holbrook et al. 1989, Mate et al. 1993) ため, CA1Pの分解速度がこの場合の活性化を律速すると予測できる. しかし, CA1Pは比較的弱い光で分解されること (Kobza and Seemann 1988), この活性化機構の場合, 直接CO₂濃度に影響されないことから, この機構が中心的に関与しているとは考え難い. Woodrow et al. (1996) によると, カルバミレーションが律速する場合の緩和時間 (τ_c) は下記の式で与えられる.

$$\tau c = (K_r.d [\text{RuBP}] + 1) / K_c.on [\text{CO}_2]$$

ここで、 $K_r.d$ はRuBPの解離定数、 $K_c.on$ はカルバミル化速度定数、 $[\text{CO}_2]$ と $[\text{RuBP}]$ はそれぞれ葉緑体内での CO_2 とRuBPの濃度を表す。RuBP濃度は、弱光下よりも強光下で高いことが知られている (Kobza and Seemann 1988) が、飽和光に切り替えてから短時間で上昇し、その後一定となることが報告されている (Seemann et al. 1988)。よって、この式が正しいとするならば、光によるRubisco activase活性の違い (Lan et al. 1992) が $K_r.d$ に影響すること、何らかの要因で光強度によって $K_c.on$ が変化することが予想できるが、本研究結果では判断できない。よって、現時点ではカルバミル化による律速が働いたものと考えられるが、この現象を解明するには、さらなる研究が必要であろう。

以上の結果から、ある程度強い光からの活性化には、おそらくカルバミル化が関与しているため、加齢に影響されないが、比較的弱い光から誘導した光合成の活性化はRubisco activaseとRubisco含量のバランスによって決定され、加齢が進むにつれて速度が増すものと結論づけられる。

第二節 加齢に伴うRubiscoの活性化における初速度の変化 とRubisco activase含量との関係

Rubiscoの活性化における初速度は、Rubisco活性化における速度定数(緩和時間の逆数)と活性化が起こる直前の不活性型Rubiscoの濃度の積から得られる値である。この値は、緩和時間に比べてより直接的にRubiscoの活性化速度を表すものであり、近年、この値をCO₂ガス交換速度から推定し、Rubisco activaseとの関係を調査しようという試みが行われている(Mott et al. 1997)。その結果、Rubiscoの活性化における初速度とRubisco activase含量との間に密接な関係があることが示唆されている。本節では、加齢過程におけるRubiscoの活性化における初速度の変化とRubisco activase含量との関係について調査した。

材料と方法

1. 供試材料

日本型イネの日本晴を、第二章第一節と同様の方法で育成した。主稈第10葉を材料とし、9.5葉期から10日毎に調査した。

2. Rubiscoの活性化における初速度の推定

CO₂ガス交換速度の測定は、第二章第一節と同様の方法で行った。Rubiscoの活性化における初速度(V_i)はMott et al. (1997)の方法により算出した。飽和光を照射した後、最終的に到達するCO₂ガス交換速度とそれぞれの時間におけるCO₂ガス交換速度との差の自然対数を、時間に対してプロットした(下図参照)。光強度を切り替えてから0.5–5.0分後の直線部分の傾きから、見かけの速度定数(K_{app})を算出した。この直線のY軸切片は $\ln(A^*f - A^*i)$ であり(A^*f は最終的に到達する、 C_i で補正したCO₂ガス交換速度、 A^*i は活性化が始まる直前の、 C_i で補正したCO₂ガス交換速度)、その値から A^*i を算出した。また、その直線は下記の式で表すこと

ができる。

$$\ln (A^*f - A^*) = -K_{app} t + (A^*f - A^*i)$$

この式を、 C_i 補正した CO_2 ガス交換速度 A^* について解くと、

$$A^* = A^*f - (A^*f - A^*i) e^{-k_{app} t}$$

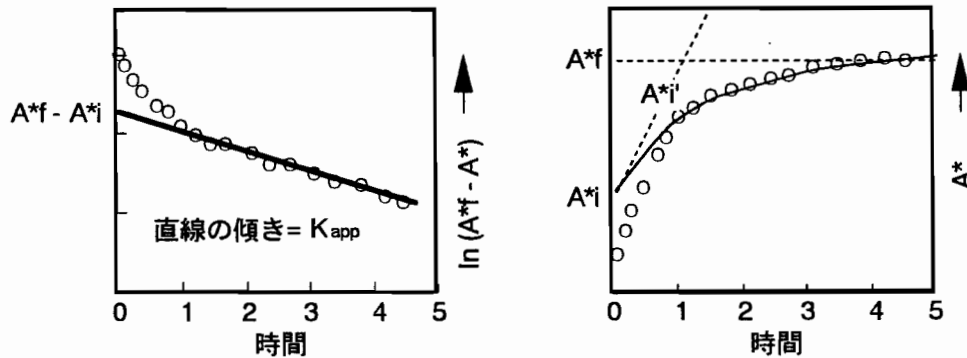
CO_2 ガス交換速度の活性化速度 (A') は、この式を時間 (t) で微分し、

$$A^*i' = K_{app} (A^*f - A^*i) e^{-k_{app} t}$$

CO_2 ガス交換速度の活性化初速度 (A^*i') は、 $t = 0$ を代入し

$$A^*i' = K_{app} (A^*f - A^*i)$$

となる。つまり、この式をRubiscoの活性化部位数に置き換えれば、Rubiscoの活性化における初速度が算出できる。



光合成速度がRuBP濃度で飽和している (Seemann et al. 1988) と仮定すると、 CO_2 ガス交換速度 (V_c) は下記の式で表すことができる (Farquhar et al. 1980)。

$$V_c = V_{max} [CO_2] / [CO_2] + K_c [1 + [O_2] / K_o]$$

ここで V_{max} は最大 CO_2 ガス交換速度、 K_c 、 K_o はそれぞれRubiscoの CO_2 、 O_2 に対するミカエリス定数である。今回の計算における K_c 、 K_o はMakino et al. (1985)のイネ葉から精製したRubiscoを用いた*in vitro*での測定値をBunsen係数で変換した値、 $K_c = 256 \mu mol mol^{-1}$ 、 $K_o = 358 mmol mol^{-1}$ を用いた。また、 $[CO_2]$ は $250 \mu mol$

mol⁻¹, [O₂]は210 mmol mol⁻¹とした。A*fとA*iを式のV_cに代入して、それぞれのV_{max} (A*f), V_{max} (A*i)を求めた。Rubiscoの触媒部位当たりの回転数を3.3 (Woodrow and Berry 1988) とすると、算出される活性部位数 E (A*f), E (A*i) は下記の式で表すことができる。

$$E (A*f) = V_{\max} (A*f) / 3.3$$

$$E (A*i) = V_{\max} (A*i) / 3.3$$

以上より、Rubiscoの活性化における初速度 (V_i) は下記の式で与えられる。

$$V_i = K_{app} (E (A*f) - E (A*i))$$

今後、E (A*f)とE (A*i) の差をΔE (活性化におけるRubisco活性サイトの変動量) で表す。

3. RubiscoとRubisco activase含量の測定

第一章と同様の方法で測定した。

結果

弱光 (60 μmol m⁻² s⁻¹) と強光 (500 μmol m⁻² s⁻¹) から飽和光 (1800 μmol m⁻² s⁻¹) に移したときのRubiscoの活性化における初速度 (V_i) のイネ葉の加齢による経時的変化を調査した (図17A)。弱光におけるRubiscoの活性化初速度は、出葉後23日目までは8-9 μmol site m⁻² min⁻¹の間で一定であったが、23日目から33日目にかけて低下した。一方、強光の場合は加齢によらず約2.5 μmol site m⁻² min⁻¹で一定であった。また、加齢過程を通して、強光よりも弱光におけるRubiscoの活性化初速度の方が高かった。Rubisco activase含量は23日目までは変化が少なく、33日目に低下傾向を示した (図17B)。この変化過程は、弱光におけるRubiscoの活性化初速度と類似していた。

これらの結果から、Rubisco activase含量とRubiscoの活性化初速度の関係を調査した (図18)。Rubisco activase含量の増加により弱光におけるRubiscoの活性化初速

度が増す傾向が認められた。しかし、強光におけるRubiscoの活性化における初速度はRubisco activase含量に影響されなかった。

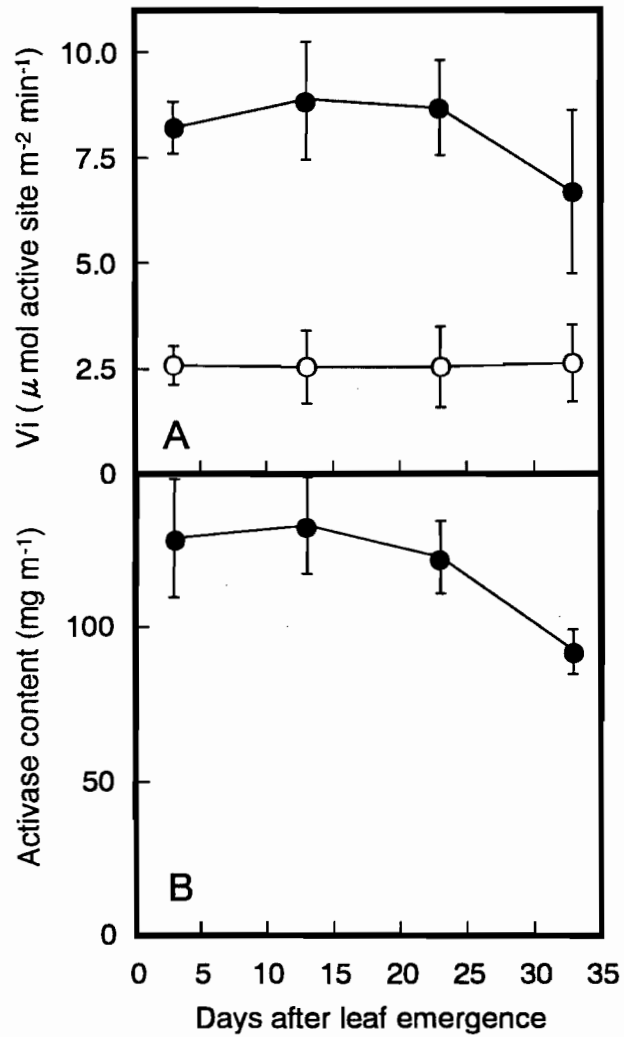


Fig. 17 Changes of Rubisco initial activation rates (A) under low (\bullet ; $60 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), or high (\circ ; $500 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) light intensities and Rubisco activase contents (B) during leaf aging of rice leaves. The bars in the figure indicate standard errors of the means ($n=5$).

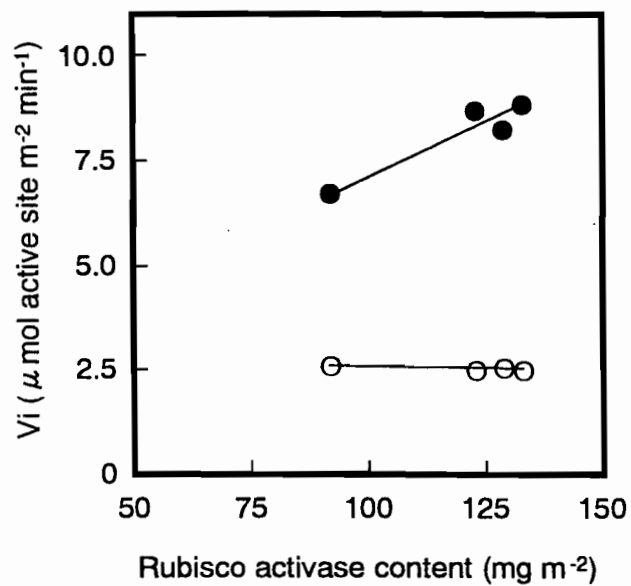


Fig. 18 Relationship between Rubisco activase contents and Rubisco initial activation rates under low (●; 60 μmol quanta m⁻² s⁻¹), or high (○; 500 μmol quanta m⁻² s⁻¹) light intensities. Data were obtained from figure 17.

考察

Rubiscoの活性化における初速度 (V_i) は、比較的弱い光からの活性化の場合、Rubisco activase含量によって律速されることが、Hammond et al. (1996) のモデルから予想できる。イネ葉における、弱光からの V_i は加齢により変化し、その変化過程はRubisco activaseと類似していた (図17)。そして、Rubisco activase含量の増加により弱光からの V_i が上昇した (図18)。このことから、イネ葉においても比較的弱い光からの活性化の初速度はRubisco activase含量によって決まると考えられる。タバコアンチセンスRubisco activase形質転換体を用いた実験では、flux control係数が1.0であり、その場合の V_i が完全にRubisco activaseによって決定されていることを報告している (Hammond et al. 1997)。本研究により、加齢のような生理的な変化においても、その関係が維持されていることが明らかとなった。

それに対して、強光からの活性化の場合、 V_i はRubisco activase含量に影響されず一定であった (図18)。このことから、二章一節での緩和時間と同様に強光からの活性化には異なる律速要因が働いていると考えられる。

第二章一節で弱光からの緩和時間はRubiscoに対するRubisco activaseの量比 (Activase/Rubisco比) と高い相関を示した。その理由としては、緩和時間は反応が完了するまでの時間の指標であることから、存在しているRubisco activaseの基質の量、つまり ΔE (活性化におけるRubisco活性サイトの変動量) にも影響されることが考えられる。そして、第一章の結果から定常状態のRubiscoの活性化状態にもRubisco activaseが関与していることが予想されるため、Activase/Rubisco比が ΔE にも関係していると考えられる。以上の理由から、Activase/Rubisco比が緩和時間を決定していると推測される。それに対して、 V_i もRubisco activaseの基質となる ΔE に影響されるが、弱光から強光に変えた直後ではRubisco activase活性は不活性型Rubiscoに対して飽和していることが予想できる (Woodrow et al. 1996)。つまり、Rubisco activaseの不活性型Rubiscoに対するミカエリス定数 K_m は約 $10 \mu M$ であり

(Lan and Mott 1991), ストロマ内での不活性型Rubiscoの濃度はこの値よりもはるかに高いと考えられる (Woodrow et al. 1996). さらに, 弱光から強光に変えた直後は電子伝達能力がCO₂固定能力を上回るため, Rubisco activase活性に影響するATP/ADP比が高くなる (Robinson and Portis 1988b). 以上のことから, 弱光からのV_iはRubisco activase含量のみによって決定されていると考えられる.

このV_iは*in vivo*におけるRubisco activase活性をガス交換速度から推定できるものである. 測定条件は若干異なるが, 現在までに測定された結果を比較すると, シロイヌナズナで5–6 μmol site m⁻² min⁻¹ (Hammond et al. 1996), タバコで3–5 μmol site m⁻² min⁻¹ (Hammond et al. 1997) であり, イネを用いた本研究結果での値8–9 μmol site m⁻² min⁻¹はかなり高く, 葉面積あたりのRubisco activase活性は高いと推測できる. 今後, この値は植物種におけるRubisco activaseの触媒能力を比較する上で利用できるものと考えられる.

摘要

葉が受けている光強度を短時間で急速に上昇させると、光合成は非定常状態となり、光合成速度は時間と共に上昇する。この場合の光合成速度の主たる律速要因はRubiscoの活性化であることが知られている。本章の目的は、そのような非定常状態における光合成の活性化速度が加齢過程においてどのように変化するのか、Rubisco activaseとの関連性はあるのかを調査することである。

日本型イネの日本晴を土耕栽培により育成し、第一節では主稈第9葉のCO₂ガス交換速度の緩和時間(τ)、Rubisco含量、Rubisco activase含量を経時的に調査した。CO₂ガス交換速度の緩和時間は、光強度を増加させてから新たな光合成の定常状態に移行するまでに要する時間の指標である。緩和時間は、前照射のPFD(光量子束密度)が100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 以下では、PFDの増加に対して急速に短縮され、その値を越えると緩やかとなった。つまり、緩和時間とPFDとの関係は2相に分けることができ、2つの間での律速要因の違いが予想される。そこで、それぞれの相からPFD 60 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (弱光)と500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (強光)を選び、加齢過程における緩和時間の変化を調査した。弱光からの緩和時間は、加齢に伴い短くなった。一方、強光の場合は加齢に影響されなかった。Activase/Rubisco比は加齢に伴って上昇し、弱光からの緩和時間と高い負の相関を示した。それに対して、強光からの緩和時間は、Activase/Rubisco比との関係は認められなかった。強光からの緩和時間は、C_iの上昇により低下したが、弱光の場合は影響が少なかった。以上の結果から、ある程度強い光からの活性化には、おそらくカルバミル化速度が関与しているため、加齢に影響されない、それに対して、比較的弱い光からの光合成の活性化はRubisco activaseとRubisco含量のバランスによって決定され、加齢の進行に伴い速度が増すものと考えられる。

第二節では、加齢過程における主稈第9葉のRubiscoの活性化における初速度(V_i)、Rubisco含量、Rubisco activase含量を調査した。 V_i は光強度を増加させた直後の

Rubiscoの活性化速度を、CO₂ガス交換速度から推定したものである。弱光からのViは加齢により変化し、その変化過程はRubisco activase含量と類似していた。そして、両者の関係を調査したところ、Rubisco activase含量の増加により、Viが上昇した。それに対して、強光の場合は、Rubisco activase含量に影響されなかった。以上の結果から、比較的弱い光にからのViは、加齢過程を通じてRubisco activase含量によって決定されていると考えられる。

弱光から急速に光強度を増加させた直後は、Rubisco activaseは基質となる不活性型のRubiscoで飽和していると予想できる。そのため、Viは、*in vivo*でのRubisco activase活性を表す指標となり得るものであり、Rubisco含量に影響されない。それに対して、緩和時間は新たな定常状態に移行するまでの時間を表す指標であることから、Rubisco activaseのみではなくRubisco含量も関与すると考えられる。これらの値を指標として用いた本研究結果は、弱光から誘導した非定常状態の光合成速度が加齢過程を通じてRubisco activaseの能力に依存していることを示していると結論づけられる。

第三章

加齢に伴うRubiscoの活性とカルバミル化部位数の変化

イネ葉では、定常状態の光合成速度、非定常状態の光合成速度においてRubisco activaseの働きが重要であり、Rubiscoの活性化を通じて光合成速度に影響していることが示唆された。しかし、Rubiscoの不活性型は主に、カルバミル化されていないRubiscoとRuBPの不活性型複合体 (Cardon and Mott 1989)、カルバミル化されたRubiscoと2-carboxyarabinitol 1-phosphate (CA1P) との複合体 (Berry et al. 1987) の2種類が報告されている。ホウレンソウと*Chenopodium album*は前者のみであり (Kobza and Seeman 1988, Sage et al. 1990)、インゲンマメでは後者により中心的にRubiscoを不活化させている (Seemann et al. 1990)。CA1Pは、多くの植物で存在すると予想されているが、その程度はかなり異なり (Seemann et al. 1990)、それらの植物では、この2種類の不活性型が協調してRubiscoの活性を調節していると考えられる。Rubisco activaseは、いずれの不活性型からの活性化にも関与している (Mate et al. 1993, Robinson and Portis 1988a)。ところが、イネにおいてはCA1Pを蓄積するのかさえ解っていないので、イネ葉におけるRubisco activaseの作用点は不明であると言える。さらに近年では、硫酸イオンによって解離が促進される阻害剤 (Parry et al. 1997)、カルバミル化されたRubiscoにおけるフォールオーバーの違い (Miyake and Yokota 1997) が報告されており、Rubiscoの活性化が非常に複雑な反応であることが分かる。そのため、Rubiscoの活性化状態を詳しく調査するためには、現在主流となっているイニシャル活性とトータル活性の測定 (Lorimmer et al. 1977) のみでは不十分である。

本章では、Rubisco活性の測定と同時に、RuBPの構造類似体である2-carboxyarabinitol-1.5-bisphosphate (CABP) を用いてRubiscoのカルバミル化された触媒サイト数を測定し、Rubiscoの活性化状態を評価することを試みた。まず基礎実験として、光強度に対するRubiscoの活性化状態の変化について調査し、Rubisco

の活性調節がどの部分で働いているのかを明らかにし、その後、第一章と第二章で示唆された加齢過程におけるRubiscoの活性化状態の変化が実際に起こっているのか、起こるとしたら、それはどのような機構なのかを明らかにすることを試みた。

材料と方法

1. 供試材料

日本型イネの日本晴を、第二章第一節と同様の方法で育成した。光強度とRubisco活性化状態の関係は、11.0–11.2葉期の主稈第10葉を用いて調査した。加齢過程の調査には、主稈第10葉を9.5葉期から10日毎にサンプリングした。その際、各葉の条件を一定とするために、イネ葉を光合成測定チャンバーに固定し、葉温28°C、大気条件で光を同一時間照射した。測定チャンバーに送る大気は、恒温器で温度を一定にした蒸留水中でバブリングして湿度を調節した。光源にはメタルハライドランプ (D400; 東芝ライテック) を用いた。それぞれのサンプリングにおいて、まずチャンバーに固定された葉に、飽和光 ($1800 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) を1時間照射した。その後、各弱光 ($0-600 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) 下に1時間置き、葉温が安定していることを確認した後、すばやく (1–2 秒) 液体窒素で凍結させた。飽和光におけるサンプリングは、最初の1時間照射の後に行った。酸素電極測定条件におけるサンプリングは第一章第一節と同様の方法で行った。主稈第10葉を9.5葉期から7日毎にサンプリングした。凍結させたサンプルは分析に用いるまで-80°Cで保存した。

2. Rubisco活性の測定

Rubisco活性はLorimmer et al. (1977) の方法に基づいて測定した。イネ葉 (約30mg) に1 mLの抽出緩衝液 (50 mM Bicine-NaOH, 5 mM MgCl_2 , 5 mM DTT, 0.1 mM EDTA, pH 7.8) を加え、室温下で30秒以内に乳鉢と乳棒を用いて粉碎した。ろ過や遠心分離は行わず、この抽出液をそのまま活性の測定に用いた。イニシャル活性

の測定のために、すばやく抽出液を25 μ L取り、210 μ Lの反応緩衝液(100 mM Bicine-NaOH, 25 mM MgCl₂, 5 mM DTT, pH 8.2), 10 μ Lの0.5 M NaH¹⁴CO₂ (0.1 mCi mol⁻¹), 5 μ Lの25 mM RuBPと混合し、25°Cの水浴中で1分間反応させた。1分後、濃ギ酸を125 μ L加えて反応を止めた。トータル活性測定のためには、RuBPを加えない条件において、25°Cで5分間インキュベートした後に、RuBPを加えて反応させた。そして、イニシャル活性の測定と同様の方法で反応を停止させた。その後、これら反応後の液を液体シンチレーション用バイアルに移し、85°Cで一晩乾固させた。翌日、300 μ Lの蒸留水に溶かし、3 mLのシンチレーションカクテル(ACSII; Amasham)と混合して液体シンチレーションにより放射活性を測定した。

今回の実験はできる限りCO₂フリーの条件で行い、使用した緩衝液もpHを合わす前と測定を行う前に窒素ガスでバブリングした。

活性率は下式により算出した。

$$\text{活性率} = \text{イニシャル活性} / \text{トータル活性} \times 100$$

3. Rubiscoカルバミル化サイトの測定

¹⁴CABPはRuBPとK¹⁴CN (55 mCi mmol⁻¹)からPierce et al. (1980), Siegel and Lane (1973)の方法を参考にして合成した。合成における副産物2-carboxyribitol-1,5-bisphosphate (CRBP)とCABPはDowex 1 \times 8 (Cl) 200-400meshを充填したカラムを用いて分離した(Pierce et al. 1980)。得られた¹⁴CABPの濃度は0.802 mM (2.0 MBq μ mol⁻¹)であった。¹²CABPは、CRBPとCABPの分離を行わずに使用した。

Rubiscoカルバミル化サイトはMate et al. (1996)の方法に若干の改良を加えて測定した。イニシャルカルバミル化サイトの測定では、Rubisco活性測定における抽出液25 μ Lを、すばやく135 μ Lのイニシャル緩衝液(50 mM Bicine-NaOH, 5 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, pH 7.8), 5 μ Lの0.802 mM ¹⁴CABP, 10 μ Lの蒸留水と混合し、氷冷下で1時間置いた。その後、10 mM ¹²CABPを10 μ L加えて室温で5分間置いた。

トータルカルバミル化サイトの測定では、10 μL の蒸留水の代わりに7.2 μL の250 mM NaHCO_3 , 2.8 μL の1 M MgCl_2 を加えて混合し、室温で1時間置いた。ブランクには抽出液の代わりに抽出緩衝液を加えた。その後、全ての反応溶液を終濃度で20 mM MgCl_2 , 20% PEG (P-3150, Sigma), 3.3 mg mL^{-1} BSAとし、Rubiscoを含むタンパク質を沈殿させ、氷冷下で30分間置いた。そして、4°Cで15分間遠心分離を行い、沈殿を回収した。その沈殿を、500 μL の緩衝液 (50 mM Bicine-NaOH, 15 mM MgCl_2 , 1 mM EDTA, 20% PEG, pH 7.8) で3回洗浄した。2回目の洗浄のみ、超音波洗浄機を用いて再懸濁し、15分間の遠心分離により沈殿を回収した。懸濁しない場合は5分間の遠心分離とした。得られた沈殿を300 μL の抽出緩衝液で溶かして、液体シンチレーション用バイアルに移し、3 mLのシンチレーションカクテル (ACSII, Amersham) と混合した。そして、液体シンチレーションにより放射活性を測定した。イニシャルカルバミル化サイトの測定は、できる限り CO_2 フリーの条件で行い、使用した緩衝液もpHを合わす前と測定を行う前に窒素ガスでバブリングした。

カルバミル化率と*In situ* Kcatは下式により算出した。

カルバミル化率 =

イニシャルカルバミル化サイト / トータルカルバミル化サイト $\times 100$

In situ Kcat = イニシャル活性 / イニシャルカルバミル化サイト $\times 100$

4. CO_2 ガス交換速度の測定

CO_2 ガス交換速度は第二章第一節の方法で測定した。光の照射方法は上記のサンプリングの条件と同様にし、定常状態の光合成速度を測定した。

5. RubiscoとRubisco activase含量の測定

第一章第一節の方法により測定した。ホロ酵素でのRubiscoの分子量を550 kDaとして、Rubisco含量からのRubiscoのモル数への換算を行った。

結果

図19にCO₂ガス交換速度と光量子束密度との関係を示す。CO₂ガス交換速度は、光量子束密度 (PFD) が約600 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ までは直線的に増加するが、1500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 以上では飽和する傾向が見られた。

図20にRubiscoのイニシャル活性、トータル活性、Rubiscoの活性率とPFDとの関係を示す。イニシャル活性も光合成速度と同様に、PFDが約600 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 付近までは直線的に増加し、1500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 以上では飽和する傾向があった(図20A)。それに対して、トータル活性はPFDの影響を受けなかった(図20B)。Rubiscoの活性率はPFDが100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 以下ではあまり変化がなかったが、その値を超えると600 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ まではPFDが増すにつれて上昇した(図20C)。そして、PFDが600 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の時に、Rubiscoの活性率は100%近くに達しており、それ以上PFDを増しても影響されなかった。

図21にRubisco当たりのイニシャルカルバミル化サイト数(イニシャルサイト)、トータルカルバミル化サイト数(トータルサイト)、カルバミル化率とPFDとの関係を調査した。イニシャルサイトはPFDが0 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の時5.23 mol mol^{-1} と高く、60 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ から600 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ まで徐々に増加し、600 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 以上では飽和する傾向にあった(図21A)。それに対して、トータルサイトはPFDが0 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の時若干高くなったが、その他ではほとんどPFDによる影響は認められなかった(図21B)。カルバミル化率はPFDと共に増加したが、PFDが0 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の時は60.9%と高い値を示した。カルバミル化率はPFDが1500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 以上で最も高く、その時の値は63.3%であった。

図22に*in situ* KcatとPFDとの関係を調査した。*In situ* KcatはPFDが0 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ から200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の間で急激に上昇し、その後、飽和する傾向を示した。*In situ* Kcatの最大値は、PFDが600 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の時の2.28 mol mol^{-1} であった。

図23にイネ葉の加齢に伴うRubiscoのイニシャル活性と活性率の経時的変化を示

す。イニシャル活性はPFDが $1800 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (飽和光) の場合、出葉後3日目から23日目まで徐々に上昇し、33日目で若干低下した。PFDが $500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (強光) では、3日目から13日目までは変化がなく、その後、33日目まで上昇した。PFDが $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (弱光) では、変化が少なかったが、23日目から33日目にかけて上昇した。Rubiscoの活性化率はイニシャル活性と類似した変化過程を示した。

図24にイネ葉の加齢に伴うRubiscoのイニシャルサイト数、*in situ* Kcatの経時的変化を示す。飽和光と強光では加齢が進むにつれ、イニシャルサイト数が徐々に増加した。それに対して、弱光では一定に保たれていた。*In situ* Kcatは、いずれのPFDにおいても加齢過程でほぼ一定に保たれているが、例外として強光では13日目から23日目にかけて上昇した。

図25にRubiscoに対するRubisco activaseの量比とRubiscoのイニシャルサイト数との関係を示す。飽和光における最も量比の高い値以外は、量比の増加により直線的にイニシャルサイト数が増加する傾向があった。

図26に酸素電極による光合成速度測定条件(CO_2 と光飽和)における、Rubiscoのイニシャル活性と活性率の加齢による経時的変化を示す。イニシャル活性は3日目から17日目にかけて上昇し、24日目に少し低下した。活性率は常に高く85-100%の間で推移し、その変化過程はイニシャル活性と類似していた。

図27にイニシャルサイト数と*in situ* Kcatの加齢による経時的変化を示す。イニシャルサイト数は加齢に影響されず、ほぼ一定の値(約 4 mol mol^{-1})を示した。それに対して、*in situ* Kcatは3日目から10日目にかけて上昇し、その後緩やかに低下した。

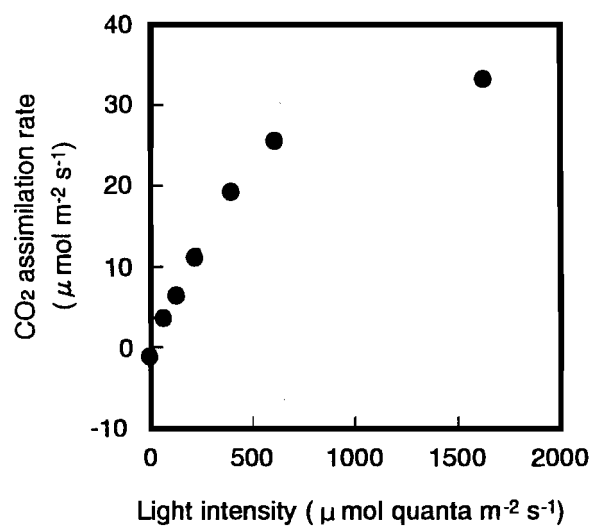


Fig. 19 CO₂ assimilation rates of rice leaves under varying light intensity. Bars in the figure indicates standerd errors of the means (n = 3).

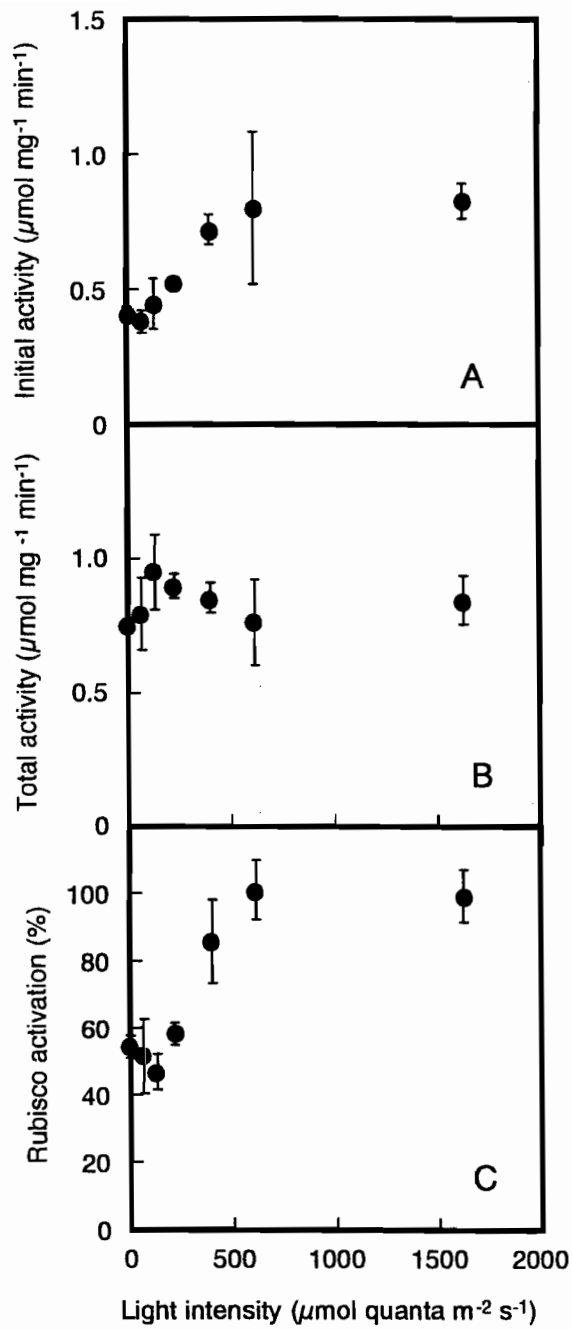


Fig. 20 Initial activity (A), total activity (B) and activation (C) of Rubisco in a rice leaf under varying light intensity. Bars in the figure indicates standard errors of the means (n = 3)

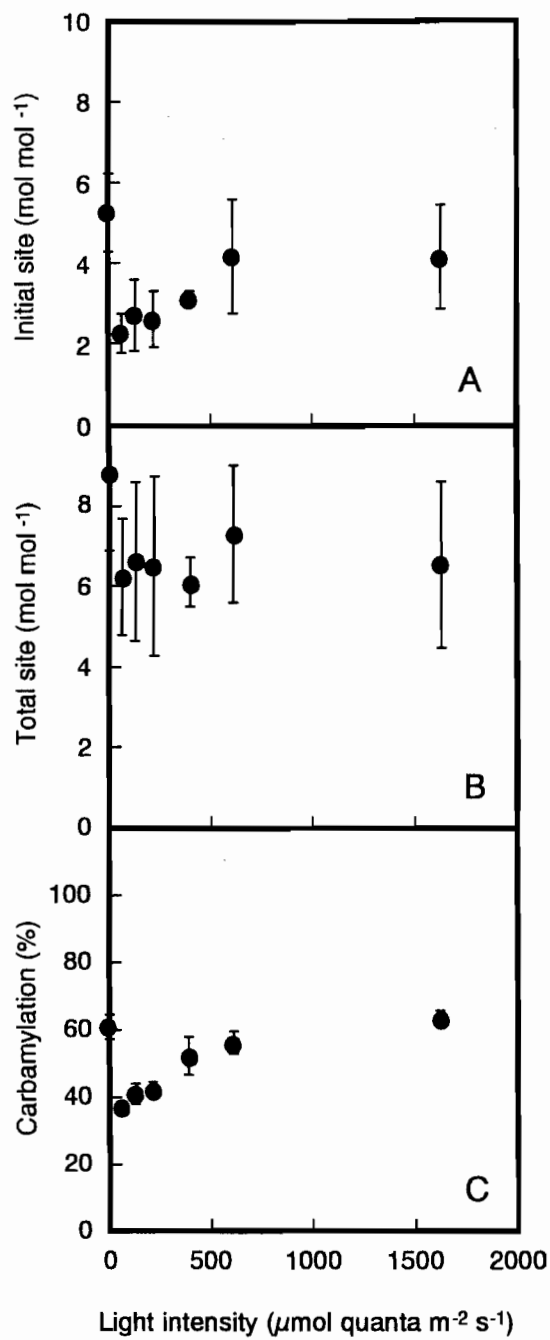


Fig. 21 Initial (A), total (B) carbamylated site and activation related to carbamylation (C) of Rubisco in rice leaves under varying light intensities. Bars in the figure indicates standard errors of the means (n = 3)

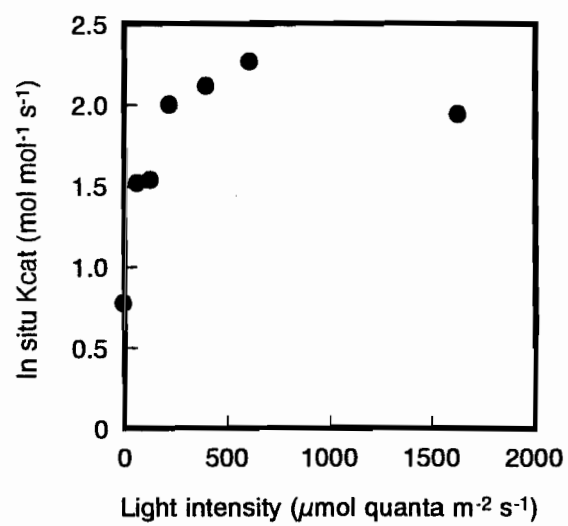


Fig. 22 In situ Kcat in rice leaves under varying light intensity. Values are given as the means of three independent estimations.

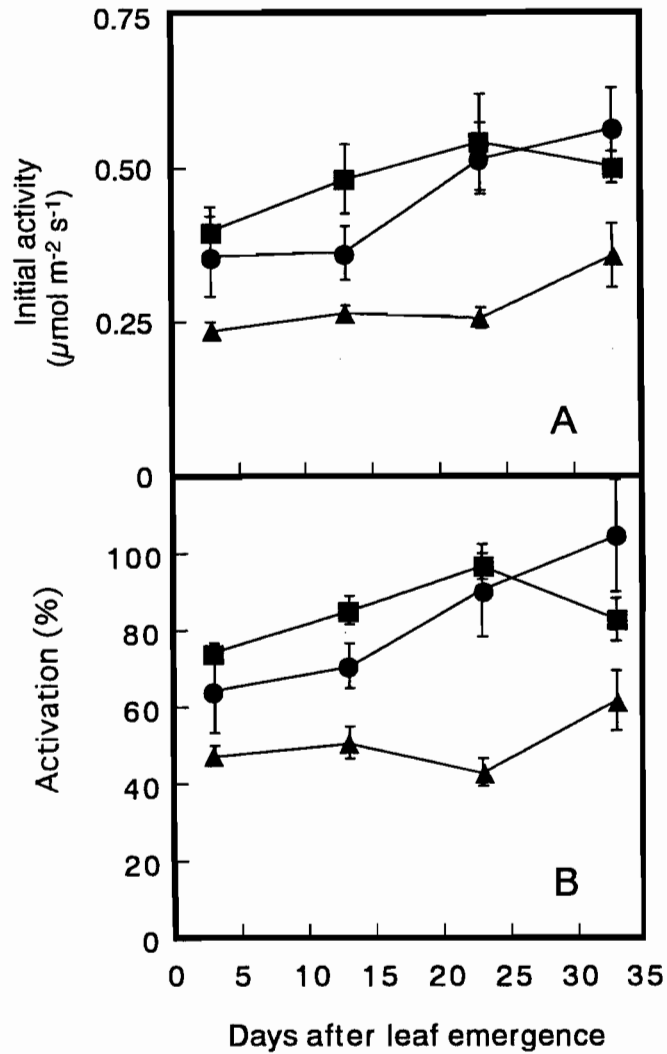


Fig. 23 Changes of initial activity (A) and activation (B) of Rubisco during aging in rice leaves at ambient CO₂ partial pressure under low (▲; 60 μmol m⁻² s⁻¹), high (●; 500 μmol m⁻² s⁻¹) and saturated (■; 1800 μmol m⁻² s⁻¹) light intensities. Bars in the figure represent standard error of three independent estimation.

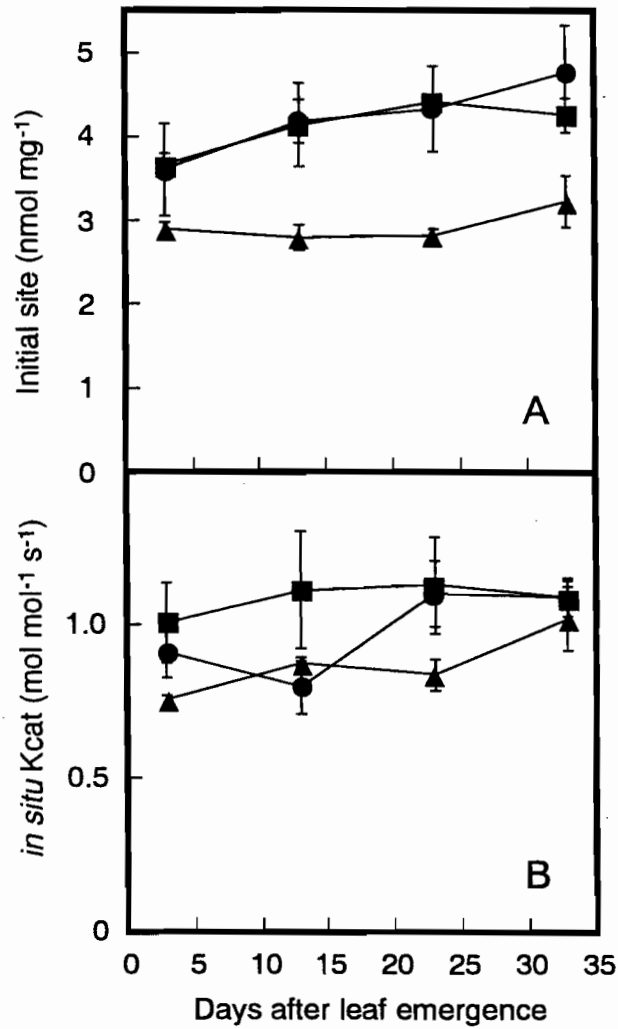


Fig. 24 Changes of initial carbamylated site (A) and *in situ* K_{cat} (B) of Rubisco during aging in rice leaves at ambient CO₂ partial pressure under low (▲; 60 μmol m⁻² s⁻¹), high (●; 500 μmol m⁻² s⁻¹) and saturated (■; 1800 μmol m⁻² s⁻¹) light intensities. Bars in the figure represent standard error of three independent estimation.

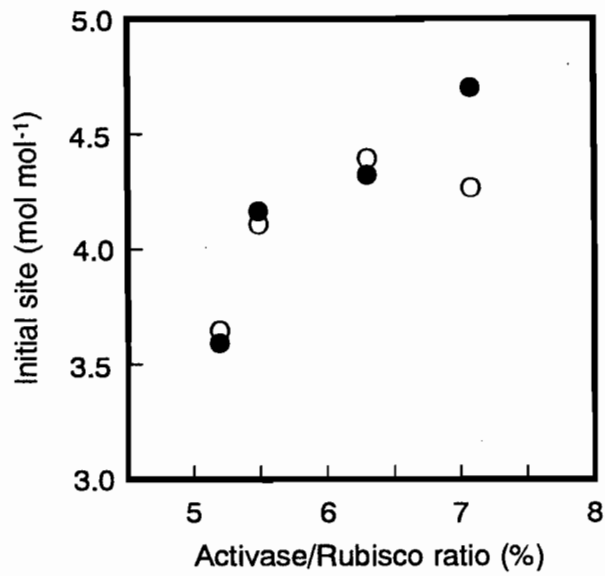


Fig. 25 Relationship between the ratio of Rubisco activase to Rubisco (Activase/Rubisco ratio) and initial carbamylated site of Rubisco (initial site) at ambient CO₂ partial pressure under high (●; 500 μmol m⁻² s⁻¹) and saturated (○; 1800 μmol m⁻² s⁻¹) light intensities.

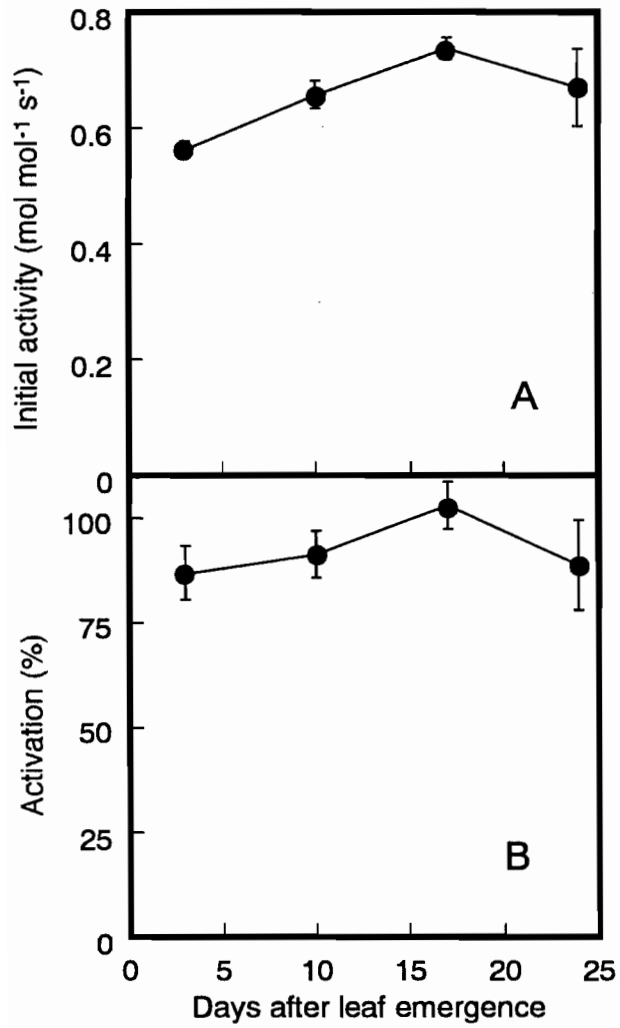


Fig. 26 Changes of Rubisco initial activity (A) and Activation (B) at 5% CO₂ under saturated light intensity during leaf aging of rice. The bars in the figure represent standard error of four independent estimations.

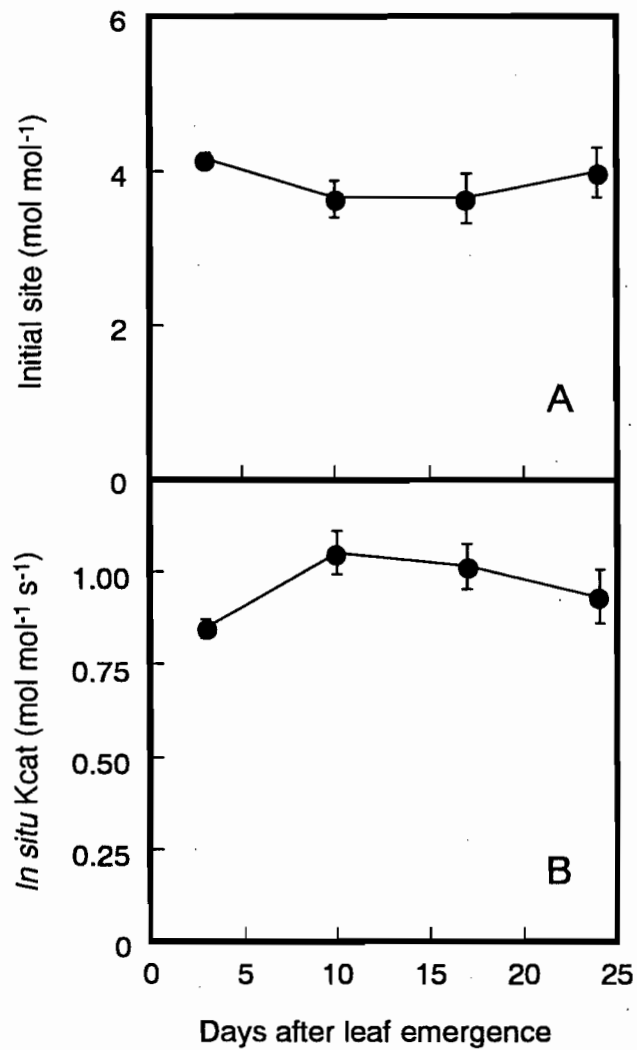


Fig. 27 Changes of Rubisco initial site (A) and *In situ* Kcat (B) at 5% CO₂ under saturated light intensity during leaf aging of rice. The bars in the figure represent standard error of four independent estimations.

考察

Rubiscoの活性化状態を評価するために、本実験では図28に示す値を測定した。Rubiscoのイニシャル活性は、*in vivo*のRubisco活性と考えられるものであり、 $E\text{-CO}_2\text{-Mg}^{2+}$ の量に依存する値である。それに対して、イニシャルカルバミル化サイトは、Rubiscoのカルバミル化されたサイト(活性サイト)にのみ結合する強力な阻害剤CABP ($K_d = 10 \text{ pM}$, Pierce et al. 1980)を用いて測定したものであり、CA1P ($K_d = 32 \text{ nM}$, Berry et al. 1987)のような活性サイトに結合する阻害剤はCABPに置き換わるので、*in vivo*でカルバミル化されているサイト全てを示す値となる。トータル活性は、高濃度の CO_2 , Mg^{2+} で数分間インキュベートした後に測定した活性であり、通常はRubisco量当たりのこの値を最大比活性として扱う。高濃度の CO_2 , Mg^{2+} により活性化の反応平衡状態が大きく活性型に傾けられ、不活性型のRubiscoに結合したRuBPも解離し、Rubiscoのカルボキシラーゼ活性により消滅する。しかし、CA1Pのような解離定数の低い阻害剤をはずすことにはならないため、ECM-CA1Pは考慮されない。それに対して、トータルカルバミル化サイトは、高濃度の CO_2 , Mg^{2+} で十分にカルバミル化させ、なおかつ活性型に結合する阻害剤も置き換わるので、Rubiscoの全活性サイト数を示す値となる。さらに、活性化されたサイトの回転数が変化する可能性を見るために、イニシャル活性/イニシャルカルバミル化サイト (*in situ* Kcat) についても調査した。

最初にこれらの値がPFDにより、どのように変化するかを調べることにより、イネ葉におけるRubiscoの活性化反応機構の解明を試みた。 CO_2 ガス交換速度とRubiscoイニシャル活性の光に対する応答は類似していた(図19, 20A)。そして、トータル活性がPFDに影響されないため、活性率はイニシャル活性と類似した変化過程を示した(図20B, 20C)。この CO_2 ガス交換速度は大気 CO_2 条件で測定したものであり、飽和光下ではRubiscoが律速していると考えられが、PFDに対して直線的に反応している段階では、電子伝達系による律速であると言える(Sage and Reid

1994) つまり見かけ上、PFDに対して類似した軌道を取るのは、Rubiscoのイニシャル活性が電子伝達速度に合わせて調節されるためである。この調節はカルビンベenson回路の代謝産物のプールサイズの関与 (Servaites et al. 1991) は少なく、Rubisco activaseのATPase活性により独自に調節されていると考えられる (Mate et al. 1996)。このようなRubisco活性の調節が、活性化反応の中のどの部分で働いているのかを考えると、まず候補としてイニシャルサイト数が挙げられる。イニシャルサイト数もイニシャル活性と同様にPFDの増加に伴って増加し、その結果、カルバミレーション率を上昇させている (図21)。しかし、1分子のRubiscoは8つの触媒サイトを持つことから、イニシャルサイト数がPFDに対して飽和している時でさえ約4 mol mol⁻¹ という結果は、かなり低いものと考えられる。その結果、Rubisco活性率は飽和光下でほぼ100%に達しているのに対して、カルバミレーション率は約65%と低くなった。つまり、Rubisco活性はカルバミレーションのみでは説明できないと考えられる。そこで、次にサイト数当たりの活性である*in situ* Kcatに着目すると、弱光域において*in situ* KcatはPFDと共に急激に上昇した (図22)。このような現象は現在までのところ報告されておらず、その機構は不明である。しかし、この現象を支持する報告として、Rubisco activase含量を特異的に減少させたタバコ形質転換体で、Rubiscoの活性サイト当たりの光合成速度が低下すること (He et al. 1997)、光強度によりRubiscoのフォールオーバー特性が変わること (Yokota et al. 1997) が知られており、この機構との関与が示唆される。

この機構以外で、このようなRubiscoの活性調節に関与している可能性があるのはCA1Pなどの阻害剤である (Seemann et al. 1990)。しかし、図28の模式の中で、CA1Pのような阻害剤が働いていた場合は、活性率よりもカルバミル化率の方が高くなるはずである。現にButz and Sharkey (1989) はPFDが低い場合、カルバミル化率よりも活性率が低くなることを報告している。しかし本研究結果では逆に、カルバミル化率は活性率よりも低くなった (図20C, 図21C)。さらに、Kobza and Seemann (1988) の報告によると、CA1Pを全く合成しないハウレンソウでは、弱光

域でイニシャル活性とトータル活性がPFDの増加と共に低下する (ホスホリプロキナーゼはRubiscoよりも弱光域で急速に活性化されるため, Rubiscoの阻害剤となるRuBP濃度が上昇する (Servites et al. 1991)). それに対して, CA1Pを合成するインゲンの特徴は活性化率がPFDに影響されない点と考えられる. つまり本研究結果はCA1Pを合成しないホウレンソウに近いと言える (図20). これらのことから, イネ葉においてはCA1Pのような, 活性型のRubiscoに結合して活性調節を行うような機構はあまり機能していないと考えられる.

以上の結果から, イネ葉におけるRubiscoの活性調節はイニシャルカルバミル化サイト数と*in situ* Kcatで行われていると考えらる. よって, 主にこの2つの値に着目して, 加齢過程での弱光 ($60 \mu \text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), 強光 ($500 \mu \text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), 飽和光 ($1700 \mu \text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) 下でのRubisco活性化状態の変化を調査した.

強光と飽和光におけるイニシャル活性は加齢と共に上昇する傾向を示し, それにより, 活性化率もイニシャル活性と類似した変化過程を示した (図23). この結果は, 第一章で提案した葉の若い時期はRubiscoが過剰に存在し, 活性化率が低下するという仮説と一致した. また調査方法にかなりの違いがあるが, イネ葉の加齢過程でイニシャル活性が上昇するという和田 (1988) の報告を支持するものと言える. それに対して, 弱光でのイニシャル活性と活性化率は加齢過程であまり変化がなかった. このことは, 弱光下ではRubisco activaseがRubiscoの活性化の律速要因となりにくい (Eckardt et al. 1997) ためであろう. 次に, このような加齢過程でのイニシャル活性の上昇がRubiscoの活性化反応の中のどの部分で起こっているのかを明らかにするため, イニシャルサイト数と*in situ* Kcatについて調査した (図24). その結果, *in situ* Kcat は加齢にあまり影響されなかったが, 強光と飽和光でのイニシャルサイト数は加齢と共に上昇する傾向が認められた. つまり, 大気条件下での加齢過程におけるイニシャル活性の上昇は, *in situ* Kcat ではなくイニシャルサイト数の上昇によるものと考えられた. さらに, このイニシャルサイト数とActivase/Rubisco比には, ほぼ直線的な関係が認められた (図25). つまり,

Activase/Rubisco比によってイニシャルサイト数が決まるといえる。このことから、大気条件下において加齢過程でRubiscoの活性化率が変化するのは、Activase/Rubisco比によってイニシャルサイト数が変わるためであると結論づけられる。

次に、酸素電極による光合成測定条件である、CO₂と光飽和におけるRubiscoの活性化状態を加齢過程において調査した。イニシャル活性は、この条件においても葉の若い時期に低く、加齢と共に上昇した(図26A)。しかし、大気条件での測定とは異なり、イニシャルサイト数の増加は伴っていなかった(図27A)。つまり、CO₂飽和条件では異なる機構によってRubisco活性が上昇していると考えられる。そこで*in situ* Kcatに着目すると、3日目から10日目にかけて上昇していた(図27B)。しかし10日目以降では*in situ* Kcat が上昇しないことから、この値のみによってイニシャル活性の変化を説明できるとは言えなが、少なくとも葉の若い段階では関与している可能性があると言える。He et al. (1997)は、Rubisco activase含量を特異的に減少させたタバコアンチセンス形質転換体で*in vivo*におけるRubiscoの回転数が低下することを認めている。つまり、葉が若い時*in situ* Kcat が低下するのは、第一章、第二章の結果からRubisco含量に対するRubisco activase含量が低いことに由来すると考えられる。では、Rubisco activaseがどのように*in situ* Kcatに影響し得るのであろうか。その機構を予測してみると、まずCO₂飽和条件であるためカルバミレーションが促進され、自発的に起こることが予想できるので、Rubisco activaseがその部分で働く必要がない。そのためRubisco activaseは主に別の役割を担うこととなる。その役割として、活性型のR-ECM(活性調節部位にRuBPが結合した型で、ECMよりも活性が低い)からのRuBPの解離(横田 1992)、Rubiscoの触媒反応中に生じる阻害剤の解離(Edmondson et al. 1990, Portis 1995)、フォールオーバー特性の向上(Miyake and Yokota 1997)が考えられる。そして、この場合の活性の変化はカルバミル化の程度に依存しない。すなわち、CO₂飽和条件下において*in situ* Kcatの変化にRubisco activaseが関与する可能性は、十分あると考えられる。

活性率の変化は、大気条件での飽和光下におけるものと非常に類似しており、値も同程度であった(図23B, 26B)。Sage et al. (1990)は大気CO₂濃度を越えると、CO₂濃度の上昇によりRubisco活性が低下することを指摘している。それは、CO₂濃度が高くなるとRubisco活性が過剰となり、無機リン酸の再生速度が光合成を律速するという報告(Sharkey et al. 1989)に基づいている。しかし、イネにおいては非常に高いCO₂分圧(5 kPa)においても、高い活性率を維持していた。この結果は、そのような条件においてもRubisco活性が十分でないことを示唆している。イネRubiscoの比活性が他の植物に比べて低いこと(Makino et al. 1985)、Rubiscoへの窒素の投資量が多いこと(Evans 1989)からも、イネ特有の現象である可能性が考えられる。

以上の結果から、CO₂飽和条件下において特に若い葉でRubiscoの活性化率が低下するのは、大気条件のようにイニシャルサイト数ではなく、*in situ* Kcat が変化するためであろうと考えられる。さらに、第一章第一節でのRubisco activase含量と最大酸素放出速度との高い相関から、Rubisco activaseがRubiscoの*in situ* Kcatを通じて光合成速度を律速していることが示唆される。

摘要

イネ葉では定常状態の光合成速度，非定常状態の光合成速度において Rubisco activase の働きが重要であり，それは Rubisco の活性化状態を通じて光合成速度に影響していることが示唆された．特に若い葉では，Activase/Rubisco 比が低いために，*in vivo* での Rubisco の活性が低下していると考えられる．しかし，Rubisco の活性調節は複雑であり，植物種によって機構が異なる．そのため本章では，Rubisco の活性化状態を $^{14}\text{CO}_2$ の取り込みによる Rubisco 活性と $^{14}\text{CABP}$ の結合によるカルバミル化サイト数の2種類の方法で調査し，まず，イネ葉における Rubisco の活性化がどの部分で調節されているのか光強度に対する応答から解明し，次に，Activase/Rubisco 比が低い若い葉で，実際に Rubisco の活性化状態が低下しているのか，また，大気条件と CO_2 飽和条件で違いがあるのかを検討した．

CO_2 ガス交換速度とイニシャル活性の光に対する応答は類似していた．トータル活性は光強度に影響されなかったために，活性率 (イニシャル活性/トータル活性) はイニシャル活性と類似した変化過程を示した．イニシャルサイト数も光強度の増加に伴って上昇し，その結果，カルバミル化率を上昇させた．しかし，活性率は飽和光下ではほぼ100%に達しているのに対して，カルバミル化率は約65%と低かった．つまり，Rubisco 活性はカルバミル化率のみでは説明できないと考えられる．そこで，*in vivo* における活性サイトの反応回転速度と考えられる *in situ* K_{cat} に着目すると，弱光域において光強度の増加に伴い急激に上昇した．これらの結果から，イネ葉における Rubisco の活性調節はイニシャルカルバミル化サイト数と *in situ* K_{cat} によって，行われていると考えられた．よって，特にこの2つの値に着目して加齢過程における弱光 ($60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)，強光 ($500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)，飽和光 ($1800 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) 下での Rubisco の活性化状態の変化を調査した．大気 CO_2 分圧下での，強光と飽和光におけるイニシャル活性と活性率は加齢と共に上昇する傾向を示した．それに対して，弱光でのそれらの値は変化が少なかった．強光と飽和

光におけるイニシャルサイト数は加齢の進行に伴って上昇したが、*in situ* Kcat は加齢にあまり影響されなかった。このイニシャルサイト数とActivase/Rubisco比には、ほぼ直線的な関係が認められた。以上の結果から、大気CO₂分圧で比較的光強度が高い条件では、葉の若い時期にイニシャル活性、活性率が低下し、それはActivase/Rubisco比によってイニシャルカルバミル化サイト数が低いためであると結論づけられる。

次に、酸素電極による最大酸素放出速度測定条件である、CO₂と光飽和におけるRubiscoの活性化状態を加齢過程において調査した。イニシャル活性は、この条件においても葉の若い時期に低く、加齢に伴い上昇した。しかし、大気条件とは異なり、イニシャルカルバミル化サイト数の増加は伴っていなかった。*In situ* Kcat は3日目から10日目にかけて上昇し、その後、緩やかに低下した。これらの結果、飽和CO₂分圧下においてもイニシャル活性と活性率は若い時期に低かったが、それはRubiscoのカルバミル化の程度によるものではなく、カルバミル化されたサイトにおける活性の違いが関与している可能性が考えられる。

第四章

RubiscoとRubisco activase含量の変化と

プロテアーゼ活性との関係

イネにおける上位葉の窒素の50%は下位葉から転流されたものである (Mae et al. 1981). Rubiscoは葉内全窒素の約30%をしめる光合成のキー酵素であり, 葉の老化によりそのほとんどが分解され, 上位葉の窒素源となる (Mae et al. 1983). このことからRubiscoの分解機構を解明することは非常に有意義である. その分解機構は大きく分けて, 2つの説が提唱されている. i) 葉緑体内に依存するチラコイド膜結合型プロテアーゼ (Casano et al. 1994), ATP依存型プロテアーゼ (Yamauchi et al. 1996), Zn^{2+} 依存型プロテアーゼ (Bushnell et al. 1993) などが関与し葉緑体内で分解される. ii) 液胞と葉緑体間の相互作用により, 液胞内プロテアーゼが関与する (Ragster and Chrispeels 1981, Wittenbach et al. 1982). しかし, それらのプロテアーゼは*in vitro*でRubiscoを分解する能力があるが, *in vivo*で実際にRubiscoの分解に関わっているのかは不明である. 最近, コムギ葉緑体においてRubiscoはプロテアーゼによらずとも, 活性酸素により直接分解されることが報告されているが (Ishida et al. 1997), それは, 光が照射された時のみ起こり得ることであり, Rubiscoの分解が光がなくとも進行する (Peterson et al. 1973, Weidhase et al. 1987) ことから, この機構が中心的に生体内で働いているとは考え難い. Rubisco activaseの分解機構についての報告は, 現在までのところ全くない.

本研究ではこれまでに, 定常状態 (第一章) と非定常状態 (第二章) の光合成速度は, Rubiscoの活性化状態 (第三章) を通じてイネ葉の加齢過程で変化することを示した. これらの現象は, すべてRubiscoとRubisco activase含量の変化過程が異なることに起因するものと考えられる. 本章では, この2つのタンパクの異なる変化過程が, どのような機構のによって起こるのかを明らかにするため, 分解機構に着目し調査した. なお, 本章では主にABAにより老化を促進させたイネ葉切片を材

料に用いた。

材料と方法

1. 供試品種と材料の育成

第一章第一節と同様の方法で日本型イネの日本晴を生育させた。材料を自然条件下で9.5葉期まで育成し、その主稈第9葉を用いて葉切片を作成した。

2. 葉切片のホルモンおよびタンパク質合成阻害剤処理

葉切片を25°C、 $60 \mu \text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の光量子束密度下で下記の溶液に浮かべることにより処理をする2つの実験を行った。溶液のpHは全て7.0に調整した。葉切片のサンプリングは4日間毎日行い、液体窒素中で凍結させた後、-80°Cで保存した。

a. ホルモン処理

- ・蒸留水 (CTR)
- ・ $10 \mu \text{M}$ アブシジン酸 (ABA)
- ・ $10 \mu \text{M}$ ベンジルアデニン (BA)

b. タンパク質合成阻害剤処理

- ・蒸留水 (CTR)
- ・ $10 \mu \text{M}$ ABA
- ・ABA + 1 mM ストレプトマイシン (SM)
- ・ABA + 1 mM シクロヘキシミド (CHX)
- ・ABA + SM + CHX

3. イムノブロッティングによるRubiscoとRubisco activaseの検出

電気泳動 (SDS-PAGE) はLaemmli (1978) の方法に従い、ゲル濃度12.5%で行った。泳動はラピダス・二連ミニスラブ電気泳動装置 (アトー) を用いて30 mAの定電流で行った。その後、ゲル中のタンパクをMatudaira (1987) の方法によりニトロセルロース膜 (BA 85 CELLULOSE NITRAT, Schleicher Schuell) に転写した。ブロッ

ティングにはセミドライプロット装置 (AE-6675, ATTO) を用いて, 120 mAの定電流で3時間行った. プロット後のニトロセルロース膜を, 3%のスキムミルクを含むT-PBSで20分間振とうすることによりブロッキングした. そのニトロセルロース膜に, T-PBSで2,000倍に希釈した抗血清を1次抗体として1時間反応させた. その後, T-PBSで1,000倍に希釈したPeroxidase標識抗ウサギIgG (H+L) ヤギ抗体 (和光純薬工業) を2次抗体として加え1時間振とうした. そして, 発色基質溶液 (26mg OPD, 19.5 μ L 過酸化水素水を65mLの緩衝液 (0.2M クエン酸-0.1M リン酸水素二ナトリウム, pH 5.0) に溶かしたもの) を加えて発色させた. バンドが確認できた時点で発色液を除き, 蒸留水で十分に洗った後に乾燥させて保存した.

4. 電気泳動によるプロテアーゼの活性染色

葉内成分の分析と同様の方法によって得た粗酵素液を用いた. その粗酵素液に, グリセリンとSDSを終濃度でそれぞれ20%, 1%になるように加えて混合し, Heussen and Dowdle (1980) の方法により作成した0.25% (w/v) のゼラチンを含む7.5%のSDS-PAGEゲルにアプライした. 泳動はラピダス・二連ミニスラブ電気泳動装置 (ATTO) を用いて20 mAの定電流, 4°Cで行った. 電気泳動後のゲルを2.5% (v/v) Triton X-100 溶液で1時間洗浄し, 0.1%のSDSを含む100 mM クエン酸-リン酸緩衝液 (pH 5.5) 中で30 °C, 12時間のインキュベートを行った. その後ゲルを0.25% (w/v) CBB R-250, 50% (v/v) メタノール, 10% (v/v) 酢酸を含む溶液中で振とうすることにより染色し, 25% (v/v) メタノール, 7% (v/v) 酢酸, 5% (v/v) エタノール溶液を用いて脱色した. プロテアーゼは青色のバックグラウンドにおける染色されない部分により確認した. 脱色後のゲルの像をスキャナー (ScanJet3c, Hewlett Packard) によりパーソナルコンピューター (Power Macintosh 1700/80AV)に取り込み, 画像解析ソフト (NIH-image, National Institutes of Health) によりバンドの濃さを数値化した.

5. 葉内成分の分析

葉内成分の抽出ならびにRubisco, Rubisco activaseと全可溶性タンパクの定量は, 第一章第一節と同様の方法で行った.

結果

図29に植物ホルモン処理したイネ葉切片中の, Rubisco含量, Rubisco activase含量, 全可溶性タンパクとこれら2つのタンパク量の差の経時的变化を示す. Rubisco含量, Rubisco activase含量は共に, 含量の低下がBA処理により抑制され, ABA処理により著しく促進された. しかし, いずれの処理区においてもRubisco含量に比べてRubisco activase含量の低下は速かった. その傾向は0日目から1日目の間で特に顕著であった. それに対して, この2つのタンパク以外の可溶性タンパク量は, すべての処理区で一定に保たれていた.

図30に弱アルカリ性 (pH 7.5) でのプロテアーゼ活性に及ぼす金属イオンとエフェクターの影響を示す. SDSを添加した時のみプロテアーゼ活性が検出されたが, その他のエフェクター, 金属イオンを添加してもプロテアーゼ活性は全く検出されなかった.

図31にプロテアーゼ活性に及ぼすpHの影響を示す. 電気泳動中の基質との相互作用のため, 正確な分子量の推定はできないが, 0.1%SDSを添加した場合, 検出できる顕著なバンドとして約60 kDa (RLP60) と約50 kDa (RLP50) の2つが存在した. RLP60はpH4.5-7.0で活性が確認され, pH5.5において最も活性が高かった. RLP50は, pH4.5-6.0での範囲で確認され, RLP60と同様に, pH5.5において最も高い活性が得られた. これらの結果は, グッドのバッファーにおいても同様であった (データは掲載せず). それに対して, SDSを添加しない場合は, いずれのpHにおいても, ほとんど活性は検出できなかった.

図32に植物ホルモン処理したイネ葉切片中のSDS依存プロテアーゼ活性の経時的变化を示す. 多数のプロテアーゼが存在していたが, その中でも顕著であった

のはRLP60とRLP50の2つであった。最も活性の高かったRLP60は、処理前の0日目においてもかなり強く発現していた。それに対してRLP 50は、処理前には僅かしか確認できないが、ABA処理により発現が強められた。RLP 50は対照区においても4日目には強く発現した。BA処理区では、ほとんど発現しなかった。

さらに、着生葉における老化過程でのプロテアーゼ活性の推移を調査するため、葉位別にサンプリングしたイネ葉中のプロテアーゼ活性を調べた(図33)。最も若く、抽出直後である第11葉では、非常に分子量の高いプロテアーゼが強く発現していたが、老化の進んだ下位の葉では、検出されなかった。RLP60は第10葉よりも下位の葉では最も活性の高いバンドとして検出され、加齢が進むにつれて活性が増した。それに対してRLP50は、加齢過程を通してほとんど活性がなかった。

図34にタンパク質合成阻害剤処理した葉切片中のRubiscoとRubisco activase含量の経時的变化を示す。RubiscoとRubisco activase含量の減少はともに、対照区の蒸留水の場合に比べて、ABA処理により促進された。両タンパク含量の減少は、CHX処理により抑制されたが、SM処理は影響しなかった。また、Rubisco含量の低下はCHX処理により完全に抑制されたが、Rubisco activaseの含量は、緩やかな減少傾向を示した。

図35にタンパク質合成阻害剤処理した葉切片中のSDS依存型プロテアーゼ活性の経時的变化を示す。RLP50の活性は、0日目には全く確認できなかったが、ABA処理により2日目以降に強く発現した。この発現は、CHX処理により完全に抑制されたが、SM処理は全く影響しなかった。約60 kDaのプロテアーゼ活性は0日目には確認できたが、CHX処理における1日目以降では検出できなくなった。SM処理は、RLP50の場合と同様に約60 kDaのプロテアーゼ活性の発現に影響しなかった。

図36にRLP 50活性とRubisco含量、Rubisco activase含量との関係を示す。RLP 50とRubisco含量との間には高い負の相関($r = 0.978$)が認められた。それに対して、RLP 50とRubisco activase含量との間には指数関数的な負の相関が認められた。

図37にイムノブロットングによって検出したイネ葉の粗酵素液中でのRubisco

の分解を示す。0.1% SDSを含む酸性条件 (pH 5.5) での処理前の葉切片の場合では、時間の経過と共に約55kDaのRubisco大サブユニット (LSU) のバンドが徐々に減少した。またLSUが減少するにつれて、LSUの分解産物と思われる分子量の低いバンドが増加した。しかし、5時間後には全てのバンドが検出できなくなった。処理前の葉切片とABA処理した葉切片からの抽出液を混合した場合は、LSUの減少速度は速く、1時間後にはほとんど検出できなくなった。ここでは示さないが、酸性条件でSDSを添加しない場合、LSUはほとんど変化しなかった。

SDSを含まない弱アルカリ性条件 (pH 7.5) での処理前の葉切片の場合、LSUの量は5時間後でもほとんど変化しなかった。しかし、2時間後から変性したLSUと思われる分子量の大きいバンドの増加が確認できた。処理前の葉切片とABA処理した葉切片からの抽出液を混合した場合でも同様にLSUはほとんど変化せず、時間の経過と共に分子量の大きいバンドの増加があった。しかし、SDSを添加すると弱アルカリ性条件においてもLSUのバンドは減少した (データは掲載せず)。

図38にイムノブロットングによって検出したイネ葉の粗酵素液中でのRubisco activaseの分解を示す。Rubisco activaseの約40 kDaのバンド (Rca) は、処理前の葉切片の場合、時間がたつにつれて徐々に減少し、2時間後には検出できなくなった。処理前の葉切片とABA処理した葉切片からの抽出液を混合した場合は、Rcaの減少速度が速く、0.5時間後には全く確認できなくなった。

SDSを含まない弱アルカリ性条件の、処理前の葉切片の場合においてもRcaは徐々に減少し、2時間後には、全く検出できなかった。また、1時間後から変性したRcaと考えられる、分子量の高いバンド (100 kDa以上) が増加した。さらに、0.5から2時間の間で、Rcaの分解産物と思われるRcaよりも僅かに分子量の低いバンドが検出された。処理前の葉切片とABA処理した葉切片からの抽出液を混合した場合は、0.5時間後には全てのバンドが消滅していた。

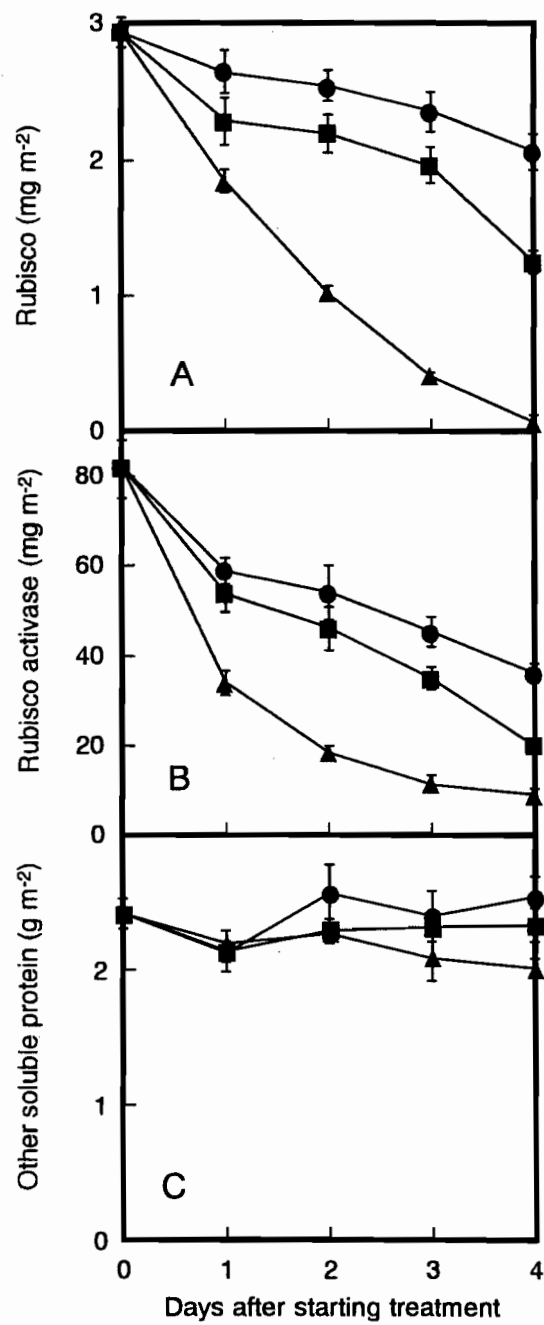


Fig. 29 Time course of Rubisco (A), Rubisco activase (B) and the other soluble protein contents in rice leaf pieces floating on water (■), on 10 μ M solutions of BA (●), or ABA (▲). The bars represent standard error of five independent experiments.

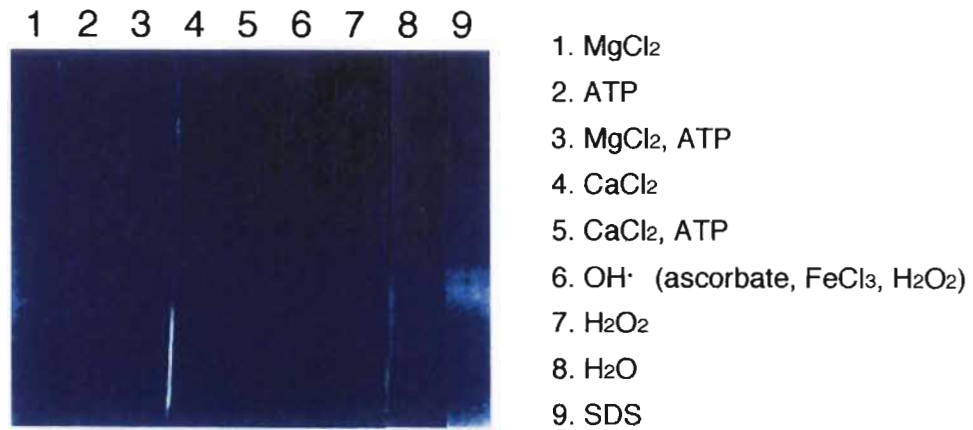


Fig . 30. Effects of cations and effectors on proteolytic activity in rice leaf extracts. Rice leaves floating on ABA solution for 4 days were homogenated with 100 mM Tris, pH 7.5. After these were centrifuged at $15,000\times g$ for 15 min, supernatants (about 1.0 mg FW per lane) were applied to gelatin containing 7.5 % native-PAGE. Then, the gels were incubated at 30°C for 12 h in 100 mM Tris, pH 7.5 with 5 mM MgCl_2 (lane 1), 1 mM ATP (lane 2), 5 mM MgCl_2 , 1 mM ATP (lane 3), 5 mM CaCl_2 (lane 4), 5 mM CaCl_2 , 1 mM ATP (lane 5), 2 mM ascorbic acid, 2 mM FeCl_3 , 2 mM H_2O_2 (lane 6), 2 mM H_2O_2 (lane 7), Control (lane 8), 0.1 % SDS (lane 9). The gels were stained with CBB R-250.

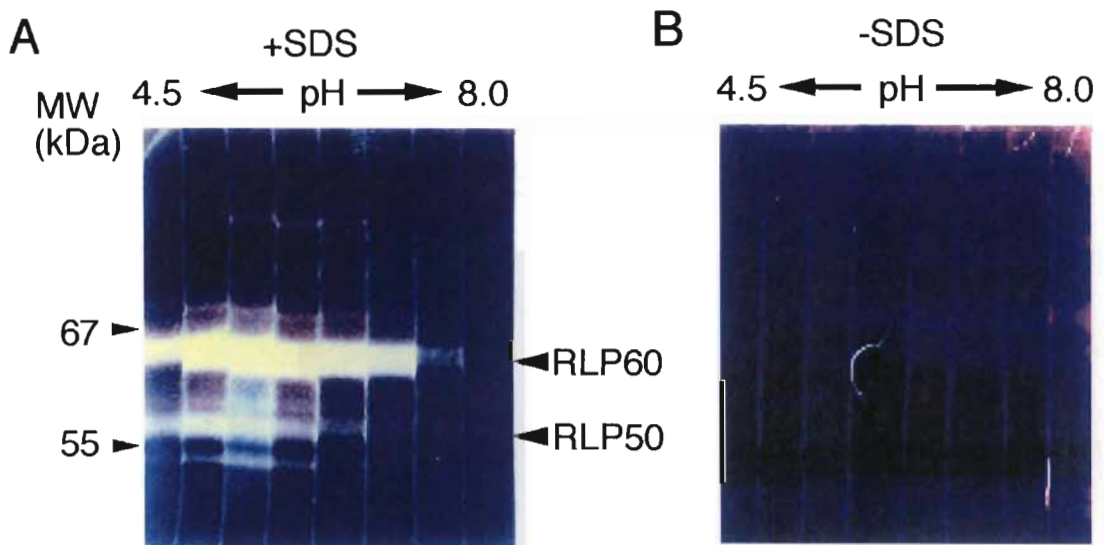


Fig. 31 Proteolytic activity of leaf extracts at varying pH. Rice leaves floated on ABA solution for 4 days were homogenated with 50 mM Na-phosphate, 10 mM β -mercaptoethanol, 1 mM EDTA, pH 7.5. After these were centrifuged at $15,000\times g$ for 15 min, supernatant (about 2.0 mg FW per lane) were applied to gelatin containing 7.5 % SDS-PAGE (A), or 7.5% native-PAGE (B). Then, the gels were incubated at 30°C for 12 h in various pH solution of 100 mM citrate-phosphate which pH was increased at constant width of 0.5 from 4.5 to 8.0 with 0.1% SDS (A), or without SDS (B). The gels were stained with CBB R-250. Molecular weight (MW) is shown on the left.

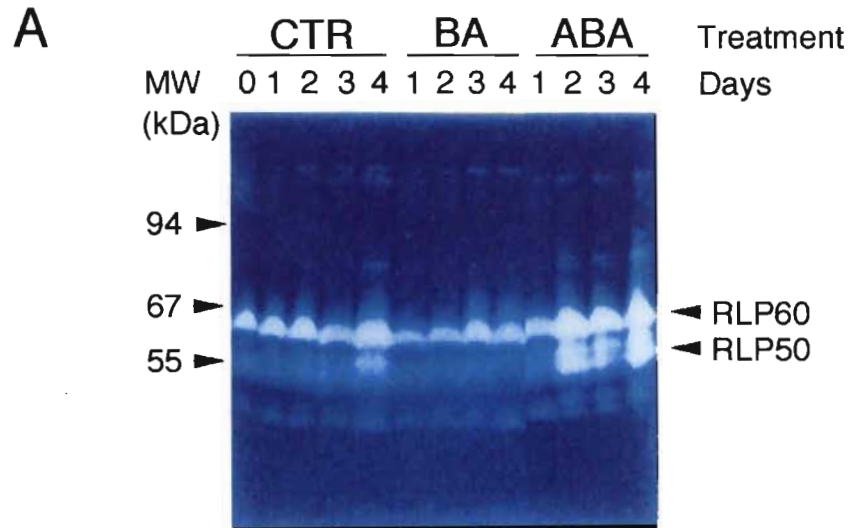


Fig. 32 Activity staining of SDS dependent protease using gelatin containing 7.5% SDS-PAGE in rice leaf pieces treated with plant growth regulators. The rice leaves were homogenated with 50 mM Na-phosphate, 10 mM β -mercaptoethanol, 1 mM EDTA, pH 7.5. These were centrifuged at $15,000\times g$ for 15 min. The leaf extracts containing about 0.20 mg FW per lane were subjected to gelatin containing 7.5% SDS-PAGE. Then, the gels were incubated in the solution of 100 mM citrate - phosphate, 0.1 % SDS, pH 5.5 at 30 °C for 12 h. The gels were stained with CBB G-250. Molecular weight (MW) is shown on the left. RLP50 and RLP60 are indicated on the right.

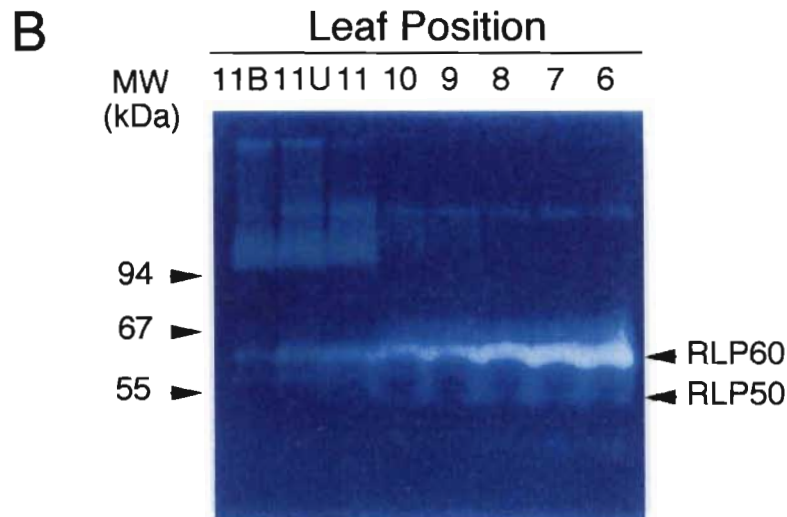


Fig. 33 Activity staining of SDS dependent protease in rice leaves sampled at different positions using gelatin containing 7.5% SDS-PAGE. The experimental procedures were the same as described in Fig, 4-4, except for the leaf extracts containing about 1.0 mg FW per lane were subjected to gelatin containing 7.5% SDS-PAGE. Number of leaf position expresses phyllotaxistical order of leaves on the main stem. 11B and 11U express bottom and upper part of the unemerged 11th leaf. The leaves were sampled at 10.5 leaf stage. Molecular weight (MW) is shown on the left. RLP50 and RLP60 are indicated on the right.

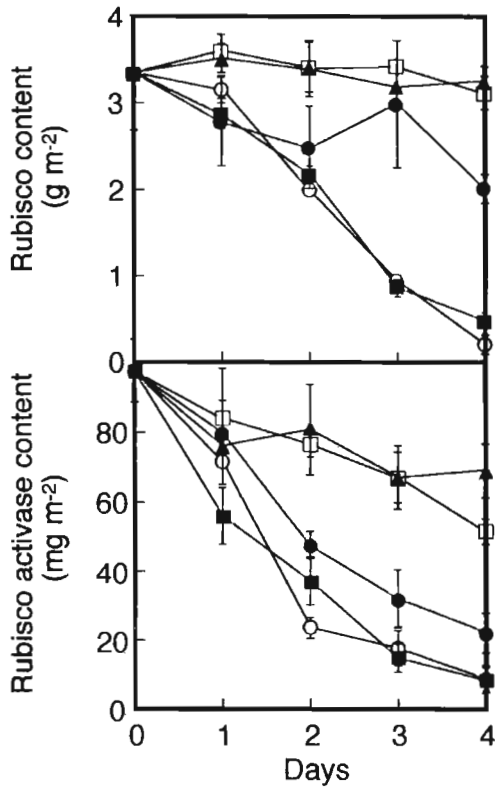


Fig. 34 Effects of protein synthesis inhibitors on the contents of Rubisco (A) and Rubisco activase (B) in rice leaf pieces. The leaf pieces were floated on water (●), on solution of ABA (○), or ABA and SM (■), or ABA and CHX (□), or ABA, SM and CHX (▲). The bars represent standard error of five independent estimations.

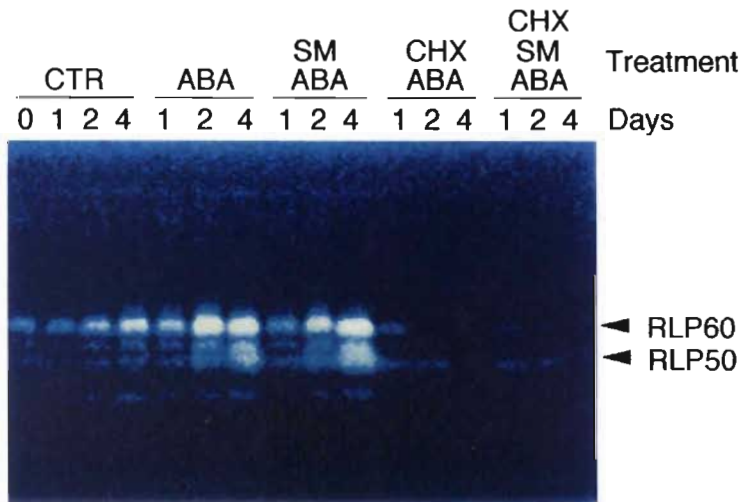


Fig. 35 Effects of protein synthesis inhibitors on SDS-dependent proteolytic activities in rice leaf pieces. The leaf pieces were floated on water (●), on solution of ABA (○), or ABA and SM (■), or ABA and CHX (□), or ABA, SM and CHX (▲) and sampled at indicated time. These were homogenated with 50 mM Na-phosphate, 10 mM β -mercaptoethanol, 1 mM EDTA, pH 7.5. After it was centrifuged at $15,000\times g$ for 15 min, supernatants (about 1.0 mg FW per lane) was applied to gelatin containing 7.5 % native-PAGE. The gels were stained with CBB R-250.

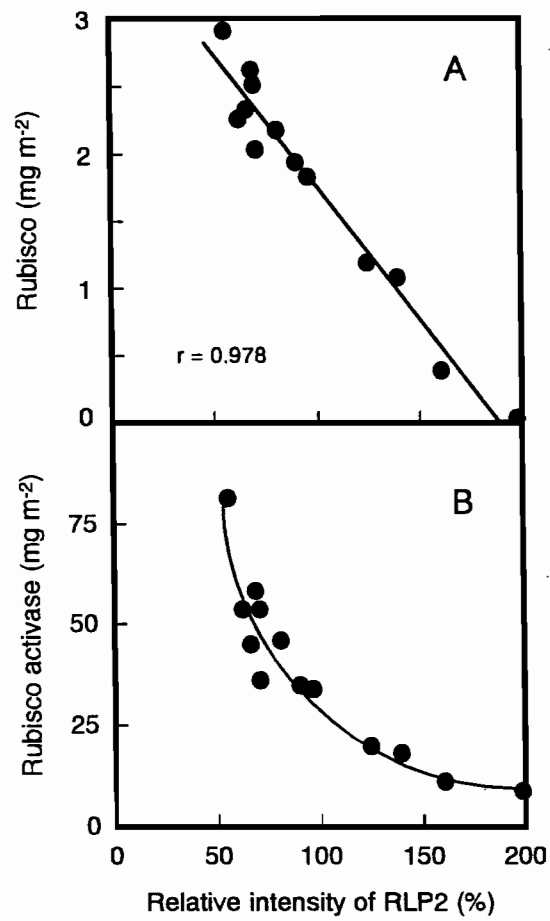


Fig. 36 Relationships between proteolytic activities of RLP50 and Rubisco contents (A), or Rubisco activase contents (B). Data were obtained from Figs 29 and 32.

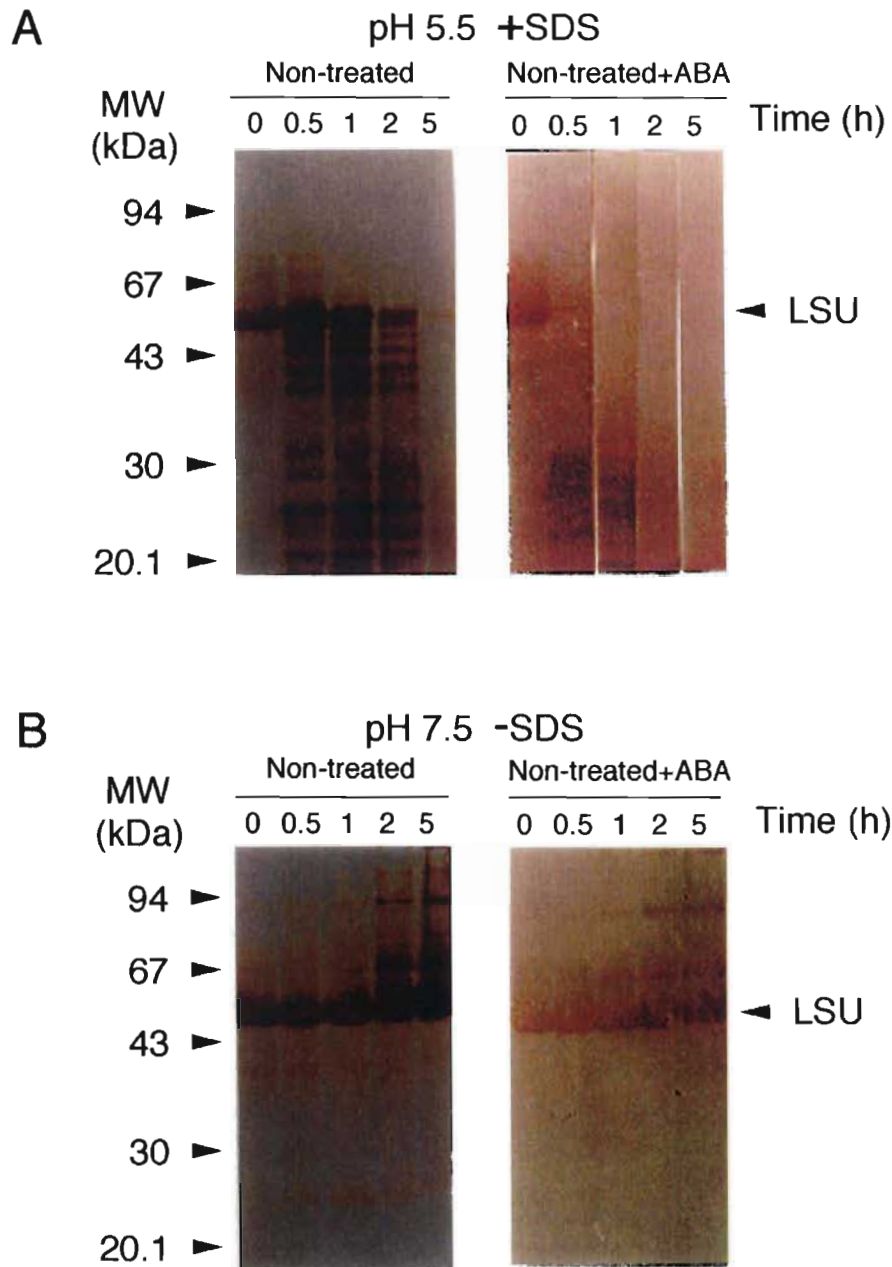


Fig. 37 Proteolytic activity of leaf extracts against Rubisco. Rice leaves were homogenated with 100 mM MES, 0.1% SDS, pH 5.5 (A) or 100 mM Tris, pH 7.5 (B). After these were centrifuged at $15,000\times g$ for 15 min, supernatants from non-treated leaf (Non-treated), or mixture of non-treated and ABA treated (4 days) leaves at the ratio of 1 to 1 (Non-treated + ABA) were incubated at 30°C and frozen in liquid nitrogen at indicated time. About $20\mu\text{g}$ Rubisco (0 time) per lane was applied to 12.5 % SDS-PAGE. Rubisco derivatives were detected with western blotting using anti-Rubisco antibody. Molecular weight (MW) is shown on the left. Position of Rubisco large subunit (LSU) is indicated on the right.

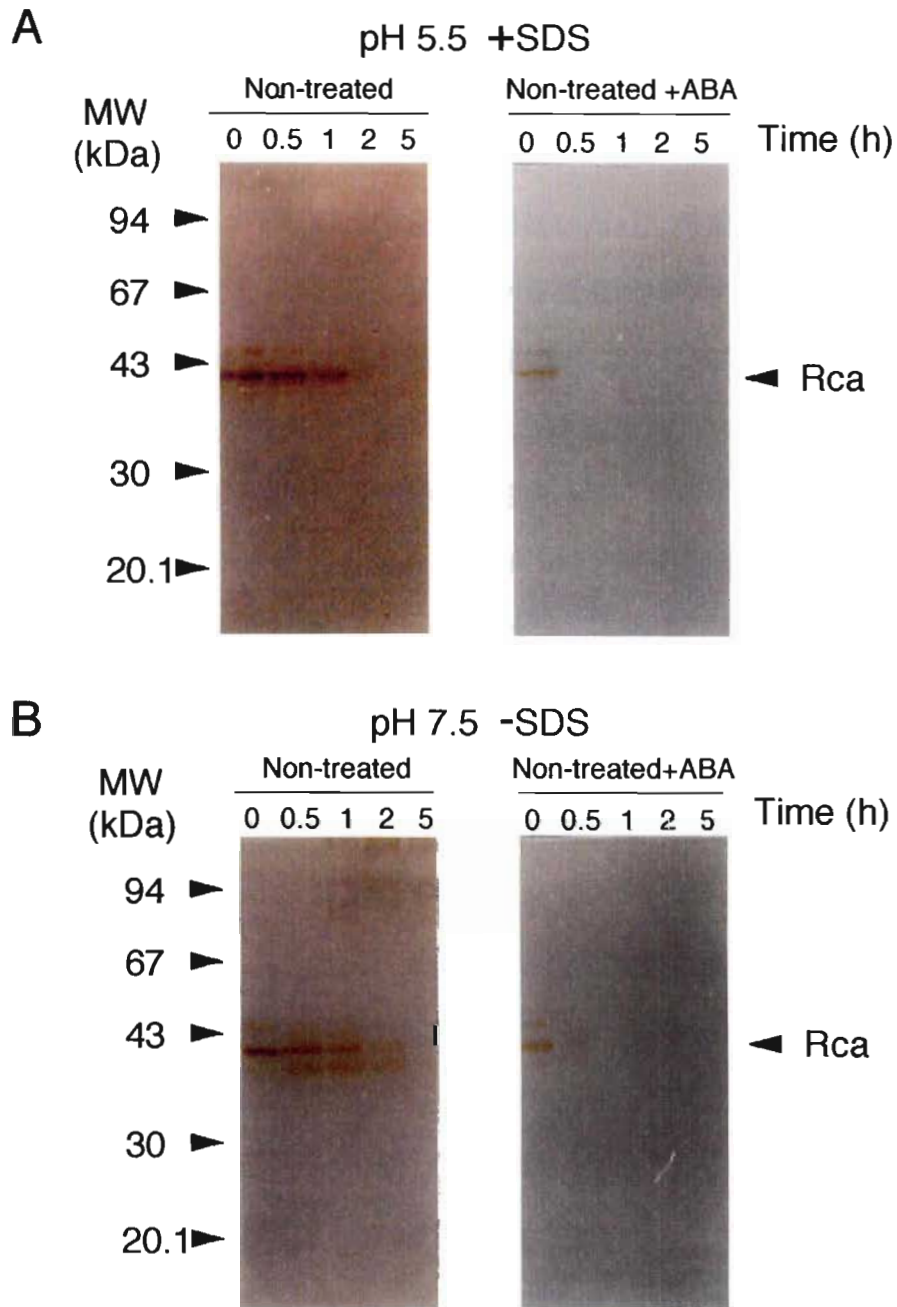


Fig. 38 Proteolytic activity of leaf extracts against Rubisco activase. Rice leaves were homogenated with 100 mM MES, 0.1% SDS, pH 5.5 (A) or 100 mM Tris, pH 7.5 (B). After these were centrifuged at $15,000 \times g$ for 15 min, supernatants from non-treated leaf (Non-treated), or mixture of non-treated and ABA treated (4 days) leaves at the ratio of 1 to 1 (Non-treated + ABA) were incubated at 30°C and frozen in liquid nitrogen at indicated time. About $20 \mu\text{g}$ Rubisco (0 time) per lane was applied to 12.5 % SDS-PAGE. Rubisco activase derivatives were detected with western blotting using anti-Rubisco activase antibody. Molecular weight (MW) is shown on the left. Position of Rubisco activase (Rca) is indicated on the right.

考察

植物組織内でのプロテアーゼ活性は一般に低いため、特定のタンパクの分解機構について調査するには、それらのタンパクが急激に減少するような条件を用いる方が有利である。特にイネの着生葉の加齢過程におけるプロテアーゼ活性は低いことが予想できるため (Mae et al. 1985), 着生葉を用いてRubiscoとRubisco activaseの分解機構を調査するのは困難であると考えられる。ABAは老化を促進するホルモンであり、イネ葉切片におけるRubiscoの分解を促進することが報告されている (内田ら 1980a)。第一章の結果においても、着生葉では、この2つのタンパクが完全になくなるまでに1か月以上必要であったが、葉切片をABA処理することにより僅か4日間で同程度に減少した (図29)。そのため、葉切片のABA処理により老化の進行を促進させた時のRubiscoとRubisco activase含量とプロテアーゼの発現の変化から、それらの分解機構を解明することを試みた。

RubiscoとRubisco activaseはABA処理により含量の減少が促進されるが、この2つ以外の可溶性タンパク含量は一定に保たれていた (図29)。つまり、ABAによりRubiscoとRubisco activaseを特異的に分解するプロテアーゼの発現が促進されたことが示唆される。そこで、この分解に関与するプロテアーゼを特定するために、ゼラチンを基質としたPAGEによる活性染色法を適用した。老化過程を調査する前に、プロテアーゼ活性検出の条件を探るためにいくつかの実験を行った。RubiscoとRubisco activaseは葉緑体内に局在しているため (Anderson et al. 1996), まず非変性条件で電気泳動を行い、葉緑体内に近い弱アルカリ性条件 (pH 7.5) で様々な試薬を添加し、活性の検出を試みた (図30)。Mg²⁺やCa²⁺のような二価の陽イオン (Liu and Jagendorf 1986), ATP (Malek et al. 1984, Crafts-Brandner et al. 1996), 活性酸素 (Casano et al. 1994, Penarrubia and Moreno 1990) によってRubisco分解活性が促進されるプロテアーゼが報告されているが、イネにおいては全く検出できなかった。今回用いた試薬の中では、SDSを添加した時のみ活性が確認できた。SDSは生体内

に存在しない物質であるが、SDSによって活性が促進されるプロテアーゼは植物においていくつか報告されている (Mae et al. 1989, Watanabe and Yamada 1996, Yamada et al. 1995). その中でもハウレンソウから精製された20Sプロテアソームはリノール酸, リノレン酸のような脂肪酸によっても活性が促進される (Watanabe and Yamada 1996). ウシ脳下垂体のプロテアーゼ複合体は, SDSやラウリン酸がアロステリックサイトに結合することにより, 立体構造が変わり, 活性が促進される (Orlowski et al. 1991). つまり, 生体内ではこのような脂肪酸がタンパク分解活性を調節している可能性が推察される. しかし, イネ葉のSDS依存のプロテアーゼ活性では, 脂肪酸や他の界面活性剤による活性の促進は見られなかった (データは掲載せず). この結果は, Yamada et al. (1995) がトウモロコシから精製した39 kDaのプロテアーゼと一致する. イネ葉のSDS依存のプロテアーゼが, 生体内でどのように活性を発現させているのかは不明であるが, SDSの代わりとなる物質が存在し, 基質に結合することによる親和性の変化, またはプロテアーゼ自身の活性化が起こることによると考えられる.

SDSに依存したプロテアーゼ活性は酸性で高く, 弱アルカリ性条件では低かった (図31A). このpH特性から, SDS依存型プロテアーゼは葉緑体ではなく, よりpHの低い液胞に局在していると予想することができる. RubiscoとRubisco activaseは葉緑体ストロマに局在することから (Anderson et al. 1996), SDS依存型プロテアーゼがこれらの分解に関与していないことが示唆される. しかし, Dalling et al. (1983) は, SDSの添加によりプロテアーゼの至適pHが酸性から中性に移ることを報告している. つまり, イネ葉に存在するSDS依存型プロテアーゼも, 何らかの刺激で特性が変化する可能性がある. 一方, Rubiscoは葉緑体内もしくは葉緑体から精製したプロテアーゼにより分解を受けた場合約36 kDaの分解産物を生じるが (Bushnell et al. 1993, Desimone et al. 1996, Ishida et al. 1997), 酸性で活性の高い, おそらく液胞に存在すると考えられるプロテアーゼによる場合も, 同様の分解産物が確認されている (Mae et al. 1989, Miyadai et al. 1990). また, 酸性よりアルカリ性

条件の方が酸化を受けやすいはずであるが、単離された葉緑体の活性酸素による Rubisco 分解の促進効果は pH 5.7 で最も高い (Ishida et al. 1997). さらに, Yoshida and Minamikawa (1996) は Rubisco 分解産物の蓄積過程を調査し, 液胞プロテアーゼが Rubisco の分解に関与することを提案している. これらの報告から, 酸性で働くプロテアーゼが葉緑体内で Rubisco の分解に働いていることも考えられる. 本研究結果では, SDS を添加しない場合, 非変性条件でアッセイしているにも関わらず, いずれの pH においてもプロテアーゼ活性は検出されなかった (図31B). さらに, 単離されたコムギ葉緑体においても SDS を添加しないと Rubisco がほとんど分解されない (Mae et al. 1989, Miyadai et al. 1990) ことから, 葉緑体中の中性から弱アルカリ性に至適 pH を持つプロテアーゼ活性は非常に低く, Rubisco と Rubisco activase の分解に関与していない可能性が考えられる. そのため本研究では, SDS を添加した酸性条件でのプロテアーゼ活性に着目して研究を進めた.

Rubisco や Rubisco activase を特異的に分解するプロテアーゼが存在するならば, それは図29の結果から ABA により活性の発現が促進され, BA により抑制されるはずである. また, 第一章第一節 (図3) の結果から, 着生葉では葉切片の場合に比べて著しく活性が低いと考えられる. RLP50 の活性の発現過程はこれらの条件を全て満たしていた (図32, 33). それに対して, RLP60 は着生葉においても強く発現していた (図33). この結果から, 特に RLP50 の Rubisco と Rubisco activase の特異的分解への関与が推察された. この可能性をさらに確かなものとするために, タンパク質合成阻害剤に対する影響を調べた. Rubisco と Rubisco activase 含量の低下に対して, ストレプトマイシン (SM) はほとんど影響しなかったが, シクロヘキシミド (CHX) は強く抑制した (図34). SM は葉緑体 DNA コード (Leitsch et al. 1994), シクロヘキシミド (CHX) は核 DNA コードのタンパク質合成を阻害することから, 両酵素の含量は核コードのタンパクの *de novo* の合成により制御されていると考えられた. Rubisco の LSU は葉緑体 DNA にコードされており, SM によりその合成が阻害される. また, LSU

が存在しないとき葉緑体内に入ったSSUは、速やかに分解される (Schmidt and Mishkind 1983). このことから、もしRubiscoの合成が、含量に影響していたとすると、SMの添加により、含量の減少が促進されたはずである。つまり、Rubisco量の変化過程は合成ではなく、分解機構によって決定されていることを示唆している。そして、RLP50とRLP60活性の発現は、CHXにより抑制された (図35)。つまり、CHX処理によりRubiscoとRubisco activase含量の低下が阻害されたことは、これらのプロテアーゼ活性の抑制によって説明できると言える。

イネ葉においてはプロテアーゼ活性とチッソ含量の減少との間に相関が認められないことが指摘されている (Mae et al. 1985)。このことは、イネではSDSで活性化されるプロテアソームのような潜在型のプロテアーゼが葉の老化過程で機能している事を示唆している。また、その報告は葉内の全プロテアーゼ活性を調査したものであり、特定のプロテアーゼに着目したものではなかった。Rubisco含量、Rubisco activase含量とRLP50活性との関係について調査したところ、Rubisco含量とRLP50活性との間には高い負の相関が認められた (図36A)。この結果は、Rubiscoの分解にRLP50が関与していることを強く示唆するものである。一方、Rubisco activase含量とRLP50の間には指数関数的な関係が認められた (図36B)。よって、もしRLP50がRubisco activaseの分解に関与しているのであれば、Rubisco activase自身の発現やRLP50に対する基質親和性などによりRubiscoと異なる制御を受けていると考えられる。

実際のRubiscoとRubisco activaseの分解活性をイムノプロットングにより分析したところ、RLP50活性の高かった0.1% SDSを含む酸性条件では、約55kDaのRubisco大サブユニット(LSU)は、非常によく分解されたが、SDSを含まない弱アルカリ条件では、ほとんど分解されなかった (図37)。つまり、Rubiscoは葉緑体内に近い条件では分解されず、RLP50の活性の高い、液胞に近い条件でよく分解されると言える。その分解速度がABA処理により速くなることも今までの結果と一

致する。弱アルカリ性条件では、Rubiscoのアグリゲーション産物と考えられる分子量の高いバンドが、時間の経過と共に増加した(図37)。Mehta et al. (1992)らは、Rubiscoが不溶化し、膜へ移動した後に分解されることを提案した。そのような不溶化は、Rubiscoが酸化を受けることにより起こるものと考えられる(Desimone et al. 1996)。これらの報告と、今回の結果から、葉緑体内ではRubiscoの分解は起こらず変性のみが進行し、分解の場へ移動する可能性が考えられる。それに対してRubisco activaseは、弱アルカリ性条件においても分解された(図38)。つまり、Rubisco activaseはRubiscoと異なる場で、弱アルカリ性条件において働く活性の低いプロテアーゼによっても分解され得ると考えられる。すなわち、このような異なった分解特性が、第一章、第二章で示した加齢過程における含量の変化過程に違いを生じている可能性があるという結論づけられる。

Rubiscoが液胞で分解されるという仮説は以前から存在する。その説とは、老化が進行すると葉緑体が液胞に移動し、葉緑体ごとRubiscoが液胞内で分解されるというものである(Wittenbach et al.1982)。この説が正しいとするならば、Rubisco含量の減少が、葉緑体数の減少と一致しなければならない。しかし残念なことに、Rubiscoは葉緑体数よりも先に減少するという報告が圧倒的に多く(Ford and Shibbles 1988, Mae et al. 1984, Wardley et al. 1984)、この説に対して否定的な意見が多い。しかし、Hashimoto et al. (1989)は、葉肉細胞中の葉緑体数と質が、老化に伴い顕著に低下することを認め、さらに近年、Ono et al. (1995)は、葉緑体数の減少と光合成速度の低下が一致することを指摘した。このことから再び、老化によるタンパク質の減少と、葉緑体数の減少との関係を再確認する必要性が生じたと言える。さらに最近では、酵母における液胞の自食作用が注目されており、窒素や炭素飢餓によりその現象は誘導される(大隅 1994)。植物においても、イネ培養細胞において、そのような自食作用が報告されている(Chen et al. 1994)。これらの報告から予想される機構を、本研究結果に当てはめると、まずABA処理によって液胞の自食作用が促進され、液胞内に葉緑体を取り込まれ、液胞内に存在して

いるRLP50によってRubiscoが分解される，一方，ABA処理は葉緑体内のプロテアーゼ活性も同時に上昇させ，Rubisco activaseは液胞に移動する前から葉緑体内で分解される．この仮説では，RubiscoよりもRubisco activaseの含量の低下が速いという結果 (図29, 34)も説明できる．

しかしながら，この仮説は全く推測の域を脱してはず，今回の研究結果のみでは明らかにデータが不足している．著者自身，Rubiscoの分解がこのような機構に限られて進行しているとは考えていない．おそらく，葉緑体内でも分解されていると考える．しかし，ABA処理によって急激に老化を促進した場合，液胞による分解機構が特に活性化され威力を発揮することは，十分あり得ると思われる．実際，メチルジャスモン酸による老化の促進は，葉片では起こるが，単離した葉緑体では起こらない (Weidhase et al. 1987)．今後，この仮説を実証するためには，老化過程におけるRLP50とRubiscoの細胞内の局在性などを中心に更なる研究が必要であろう．しかし，少なくとも本研究により，RLP50が何らかの形でRubiscoの分解に関与していること，Rubisco activaseとRubiscoの分解機構に違いがあることは示唆できるものと結論づけられる．

摘要

イネ葉の加齢過程における光合成速度の変化には、Rubiscoの活性化状態が密接に関わっていた。その活性化状態の変化は、RubiscoとRubisco activase含量の変化過程が異なることに起因すると考えられた。本章では、この2つのタンパク含量の変化過程の違いがどのようにして生じているのかを解明するために、分解機構に着目して調査した。なお本実験では、短時間で老化を進行させるために、主にABAにより老化を促進させた葉切片を材料とした。

日本型イネの日本晴を、土耕栽培により自然条件下で9.5葉期まで育成し、その主稈第9葉を材料とした。葉切片を作成し25°C、 $60 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の光照射下で、 $10 \mu\text{M}$ アブシジン酸 (ABA)、 $10 \mu\text{M}$ ベンジルアデニン (BA) の溶液に浮かべ、Rubisco含量、Rubisco activase含量、この2つ以外の可溶性タンパク含量の経時的変化を調査した。Rubisco含量、Rubisco activase含量の低下はABAにより促進され、BAにより抑制された。しかし、この2つ以外の可溶性タンパク含量は老化の進行によらず一定であった。この結果から、この2つのタンパクに対する特異的な分解機構の発現が、ABAにより促進されたことが推察される。そのため、RubiscoとRubisco activaseの分解に関与するプロテアーゼを特定するために、ゼラチンを基質としたPAGEによる活性染色法を適用した。まず非変性条件で電気泳動を行い、葉緑体内に近い弱アルカリ性条件 (pH 7.5) で二価の陽イオン、ATP、活性酸素、SDSを添加し、プロテアーゼ活性の検出を試みた。しかし、活性が確認できたのはSDSを添加した時のみであった。このSDSに依存したプロテアーゼ活性は、約50 kDa (RLP50) と約60 kDa (RLP60) の2つが顕著に確認でき、両者共に酸性 (pH 5.5) で高く、弱アルカリ性条件では低かった。SDSを添加しない場合は、いずれのpHにおいても活性は検出できなかった。以上の結果から、SDSを添加した酸性条件でのプロテアーゼ活性に着目して研究を進めた。

RubiscoやRubisco activaseを特異的に分解するプロテアーゼが存在するならば、

それはABAにより活性の発現が促進され、BAにより抑制されるはずである。また、着生葉では葉切片の場合に比べて著しく活性が低いと考えられる。RLP50はABAにより活性の発現が促進され、BAにより抑制された。また、着生葉では葉切片の場合に比べて著しく活性が低かった。それに対して、RLP60は着生葉においても強く発現していた。さらに、シクロヘキシミドによるRubiscoとRubisco activase含量の低下の抑制は、この2つのプロテアーゼの発現阻害により説明できた。また、Rubisco含量とRLP50活性との間には高い負の相関が認められた。一方、Rubisco activase含量とRLP50との間には指数関数的な負の相関が認められた。以上の結果から、特にRLP50がRubiscoの特異的分解へ関与していること、Rubisco activaseの分解には別の要素が関係していることが推察される。そのため次に、実際のRubiscoとRubisco activaseの分解活性をイムノブロッティングにより分析した。RLP50活性の高かったSDSを含む酸性条件では、約55kDaのRubisco大サブユニット(LSU)は、非常によく分解されたが、SDSを含まない弱アルカリ性条件では、ほとんど分解されなかった。それに対してRubisco activaseは、いずれの条件においても分解された。以上の結果は、Rubiscoの分解におけるRLP50の関与を強く示唆するものである。それに対して、Rubisco activaseはRubiscoと異なる場で、弱アルカリ性条件において働く活性の低いプロテアーゼによっても分解され得ると考えられる。つまり、このような異なった分解特性が、加齢過程における含量の変化過程に違いを生じている可能性がある結論づけられる。

総合考察

本論文の主要な目的は、Rubisco activaseがイネ葉の光合成速度にどの程度関与しているのかを明らかにすることであった。近年、生体内における特定の酵素が、その代謝系の中でどの程度の律速性を持っているのかをフラックス調節係数 (Kacse and Burns 1973) を用いて数値化する試みが進められている。この値が1.0であれば、代謝系全体の流速が完全にその過程に依存していることになり、一方、0であればその過程が全く律速要因とならないことを示す。アンチセンス技術を用いた研究報告によると、タバコにおけるRubisco activaseの強光下での定常状態の光合成におけるフラックス調節係数は、強光下で0.28である (Jiang et al. 1994)。この値は強光下におけるRubiscoの0.7 (Stitt et al. 1991) と比較するとかなり低いものであが、Jiang et al. (1994) は、炭素固定におけるフラックス調節はこの2つのタンパクによりシェアされうることを提案している。

Rubisco activase含量を減少させたタバコ形質転換体では、その含量を野生型の数%以下になるまで低下させないと光合成速度は影響を受けない (Jiang et al. 1994, Mate et al 1996)。しかし、Eckardt et al. (1997) はアラビドプシス形質転換体を用いて、比較的穏やかなRubisco activase含量の減少 (野生型の30%程度) により、定常状態の光合成速度と相対生長率が僅かながら低下することを報告している。このことは、植物種により正常な生育に必要なRubisco activase含量が異なることを示唆している。Woodrow et al. (1996) は、タバコで見られたような、定常状態の光合成における見かけの過剰なRubisco activase含量は、光依存の非定常状態での光合成において、CO₂固定量の損失を少なくするために必要であるのではないかという仮説を提唱している。Rubisco activaseの定常状態の光合成におけるフラックス調節係数が0.28である (Jiang et al. 1994) のに対して、光依存でのRubiscoの活性化における初速度では1.0であるという報告 (Hammond et al 1997) から、この仮説は正しいものと思われる。イネにおいては上記のような、アンチセンス技術を用いたフラッ

クス調節係数の算出は行われていないが、本研究結果から、Rubisco activaseの重要性はそれだけではないと考えられる。つまり、定常状態の光合成速度はCO₂飽和下(図4, 5), 大気CO₂分圧下(図9)のいずれにおいてもRubiscoではなく、Rubisco activase含量と高い相関があった。このことは実際のRubiscoのカルバミル化サイト数と酵素の反応回転速度 (*in situ* Kcat) の分析によっても裏付けられた(図23, 26)。しかし、イネでの葉面積あたりの含量は最大で93.5 mg m⁻²であったが(図2), 決して少ないわけではなく、タバコでは約80–100 mg m⁻² (Hammond et al. 1997), シロイヌナズナでは150–200 mg m⁻² (Eckardt et al. 1997) という報告からも同程度と言える。つまり、含量的には他のC₃植物と同程度であるにも関わらず、イネにおいては定常状態の光合成においてもRubisco activaseが十分量存在しないと考えられる。さらに第二章において、弱光からの非定常状態の光合成速度がRubisco activaseの能力に依存していることが明らかとなった(図15, 18)。また、測定条件は若干異なるがRubiscoの活性化における初速度は、シロイヌナズナで5–6 μmol site m⁻² min⁻¹ (Hammond et al. 1996), タバコで3–5 μmol site m⁻² min⁻¹ (Hammond et al. 1997) であり、イネにおける本研究結果での値8–9 μmol site m⁻² min⁻¹は比較的高いと言える(図17)。つまり、イネのRubisco activaseは非定常状態の光合成においては、他のC₃植物と同程度以上の能力を持つが、定常状態の光合成を維持する能力は低いと考えられる。言い換えると、イネのRubisco activaseは、RubiscoとRuBPの不活性型複合体であるERからRuBPを解離させる能力は高いが、活性型のE-CO₂-Mg²⁺を維持する能力は非常に低いことが示唆される。このことから、イネにおいてRubisco activaseは定常状態と非定常状態の光合成、両者において律速要因となり得るのではないかと考えられる。

Rubisco activaseはRubiscoの活性化を通じてイネ葉の光合成速度を決定していると考えられる(図6, 9, 15)ことから、葉内における両タンパクの含量比が重要となる。この含量比の変化は、加齢過程における両タンパクの変化過程の違いによって生じた(図3, 図14)。つまり、RubiscoはRubisco activaseに先駆けて蓄積されるた

め、特に若い葉でActivase/Rubisco比が低くなる。このような変化過程の違いを生じる、1つの原因は、その発現機構にあると考えられる。つまり、エンドウの加齢過程におけるRubisco小サブユニットのmRNAの蓄積量の低下は、Rubisco activaseよりも早いこと (Crafts-Brandner et al. 1996) が報告されている。また両タンパクのmRNAの発現は光によって誘導されるが、Rubisco activaseの発現は翻訳後の制御を受けること、概日リズムを刻むことがシロイヌナズナ (Pilgrim and McClung 1993)、トマト (Martino-Catt and Ort 1992) で確認されている。さらに、このような発現機構が異なるだけでなく、本研究において、分解機構にも違いがあることが提案された。つまり、Rubiscoの分解は約50 kDaのSDS依存型プロテアーゼが関与するが、Rubisco activaseは異なるプロテアーゼによっても分解され得ることが推察された (図36, 37, 38)。このような分解機構の違いは、加齢過程における両タンパクの変化過程の違いを生じる一因となっていると考えられる。

RubiscoとRubisco activase含量は、発現と分解機構が両者とも異なると考えられ、生育環境によっても影響され得ることが予想できる。Rubisco含量は吸収窒素量に影響を受けやすい (Sage et al. 1987) が、カルビンサイクルを構成する他の酵素への窒素投入量は、相対的に一定であること (Evans 1989, Evans and Terashima 1988)、生育光強度は主に集光系への窒素投資量に影響することが知られている (Sage and Reid 1994)。本研究結果では、Rubisco activase含量は窒素供給量に比例して増加するが、生育した光強度には影響されないこと (図7A)、窒素供給量当たりのRubisco含量は遮光区で若干低下することが明らかとなった (図7B)。つまり、生育中の光強度や窒素供給量によっても、葉内でのRubiscoとRubisco activase含量のバランスが変わると言える。このような観点から、これらのタンパクを調査した報告は他にはないが、Jiang et al. (1997) のダイズのクロロフィル欠損変異体を用いた報告によると、クロロフィル欠損変異体では野生型に比べてRubisco含量は低下したが、Rubisco activaseは影響を受けなかった (この論文でJiang et al.はこのことに触れていない)。クロロフィル欠損変異体において、光エネルギーの獲得が制限されると

考えると、本研究における、遮光区でRubiscoへの吸収窒素の分配が少なくなるという結果と一致すると言える。今回は調査していないが、これら以外で、両タンパク含量の割合に影響する可能性のある環境として高CO₂分圧が挙げられる。高CO₂分圧下で生育した植物体では、一般的にRubisco含量が低下することが報告されている (Sage et al.1989, Xu et al. 1994)。イネにおける、生育中の高CO₂分圧は、植物体全体での葉身への窒素分配の低下と、葉面積比の低下を引き起こし (Makino et al. 1997)、葉への窒素吸収を阻害するが、その分配には影響しないことが報告されている (Nakano et al. 1997)。しかし一方、Hu et al. (1997) は、Rubisco activase含量を特異的に減少させたアンチセンス形質転換体では、野生型に比べて生育が遅れ、それはカルバミル化の低下ではなく、*in vivo*でのRubiscoの反応回転速度の低下が原因であることを示し、その違いは高CO₂分圧下で生育した植物体で顕著であることを報告している。つまり、高CO₂分圧下で生育することにより、Rubisco activaseの光合成への律速性が増したと言える。イネを用いた本研究では、葉の若い時期、高CO₂分圧における酸素放出速度は、Rubisco触媒サイトの反応回転速度を通じてRubisco activaseが決定していることを示唆した (図27)。つまり、生育CO₂分圧によってもRubisco activaseとRubiscoは何らかの影響を受け、飽和CO₂濃度下での光合成速度の律速性に变化を生じることが予想できる。以上のことから、植物が経験する様々な環境により、RubiscoとRubisco activaseの含量比は影響を受けることが推察される。

本研究では、イネ葉の加齢過程を中心にRubisco activaseと光合成速度の関係を調査し、特に葉の若い時期にActivase/Rubisco比が低いため、Rubisco activaseが定常状態、非定常状態の光合成速度を制限することを提案した (図6, 14, 15)。加齢過程を通じて光合成能力を高く保つことは、物質生産能力を考える上で非常に重要であると考えられるが、個葉の光合成速度と乾物生産量との間には必ずしも正の相関は認められていない (Cook and Evans 1983, Gifford 1974)。しかし、Eckardt et al. (1997) はアラビドプシス形質転換体を用いて、Rubisco activase含量の特異的な減

少による僅かな Rubisco の活性化率と光合成速度の低下が、最終的な乾物生産量の大きな違いを生むことを示している。つまり、光合成速度あるいは Rubisco の活性化状態のような瞬間値は僅かしか変わらないとしても、積算値である乾物重やバイオマスは大きく影響を受けると考えられる。すなわちイネにおいては、葉の加齢を含めた、生育した光強度、栄養状態、大気のような植物体のおかれた環境の違いは、Rubisco と Rubisco activase 含量のバランスを通じて定常状態と非定常状態の光合成速度に影響し、イネの物質生産能力に直接関わっている可能性があるという結論づけられる。

摘要

Rubiscoは光合成におけるCO₂同化の初発反応を触媒する酵素である。この酵素は、イネ葉内の可溶性タンパクの約50%を占めているにも関わらず、飽和光下での光合成の律速要因となる。Rubiscoは複雑な活性化機構を持ち、その活性化にはRubisco activaseというタンパクの働きが必要である。弱光下でRubiscoはRuBPと不活性型に結合する。Rubisco activaseの基本的な働きは、その不活性型複合体からRuBPを解離させることによりRubiscoを活性型に導くことである。その後、Rubiscoは活性中心にあるリジン残基(触媒サイト)へのCO₂の付加反応(カルバミル化)、Mg²⁺による安定化を経て活性型となる。イネ葉においては、このタンパクが光合成速度にどの程度関与しているのかは全く不明である。そのため本研究ではRubisco activaseに着目し、主に加齢過程における光合成速度ならびにRubisco activaseとRubiscoの含量の変化から、両タンパクと光合成速度との関係を検討した。全ての実験において、自然環境下で育成した日本型イネ (*Oryza sativa* L. cv. Nipponbare) を供試材料とした。

第一章 定常状態の光合成速度とRubisco activase

飽和光下における定常状態の光合成速度はRubisco含量によって説明できると考えられてきた。しかし、*in vivo*でのRubiscoの活性化状態の違いを示唆する報告がいくつかある。そのため、本章ではRubiscoの活性化に働くタンパクであるRubisco activaseに着目して、第一節では、最大酸素放出速度との関係を、第二節では、炭素同化効率との関係を調査した。また、加齢過程や生育環境によるRubisco activase含量への影響についても検討した。

第一節 加齢に伴う Rubisco activase 含量の変化と

最大酸素放出速度との関係

主稈第10葉の加齢に伴う最大酸素放出速度、Rubisco activase含量、Rubisco含量の変化を調べ、それらの間の関係について検討した。Rubisco activase含量は最大値を示す17日目まで徐々に増加し、その後急速に減少した。その変化は葉内成分中最も大きかった。Rubisco含量は出葉後3日目で既に最大値であり、低下しはじめる時期が葉内成分中最も早かった。つまり、この2つのタンパク量の変化過程が非常に異なることが明らかとなった。最大酸素放出速度は、 3 g m^{-2} 以下のRubisco含量と比例関係にあるが、その値を超えると飽和する傾向にあった。一方、Rubisco activase含量との間には高い正の相関が認められた。そして、Rubiscoに対するRubisco activaseの含量比が高まると、見かけの*in vivo* Rubisco活性(単位Rubisco量当りの光合成速度)は高くなった。以上の結果から、Rubisco activase含量はイネ葉の加齢に伴う最大酸素放出速度の変化と密接に関わっており、特に葉が若くRubiscoが過剰にある場合、Rubiscoの活性がRubisco activaseによる制限を受けているものと考えられる。

第二節 生育した光環境と窒素供給量が及ぼすRubisco activase含量と

炭素同化効率への影響

窒素供給量と生育光強度を変えてイネを水耕栽培により育成し、主稈第10葉の最大酸素放出速度、炭素同化効率とRubisco activase含量との関係を調査した。さらに、生育中の光強度が吸収窒素のRubiscoとRubisco activaseへの分配にどのように影響するのかについても着目した。Rubisco activase含量は、生育中の光強度に影響されず、吸収窒素に対して比例的に増加した。それに対して、Rubisco含量は遮光区において、若干低くなった。この結果から、生育光強度の違いにより、葉内で

のRubiscoとRubisco activase含量のバランスが変わることが明らかとなった。Rubisco activase含量に対する最大酸素放出速度は、自然光区に比べて遮光区で若干低くなった。一方、Rubisco含量と最大酸素放出速度との関係は生育中の光強度に影響されなかった。しかし、Rubisco含量が多くなると、最大酸素放出速度がRubisco含量に対して飽和する傾向があった。活性化されたRubisco量を表す指標である炭素同化効率とRubisco activase含量の間には、ほぼ直線的な関係が認められた。それに対してRubiscoでは、含量が 3 g m^{-2} 以上になると、炭素同化効率は飽和する傾向を示した。以上の結果から、Rubisco含量が多い場合、光合成速度がRubisco含量に対して飽和傾向を示すのは、Rubisco activase含量が相対的に少なくRubiscoの活性化率が制限されるためであると考えられる。

第二章 非定常状態の光合成速度とRubisco activase

葉が受けている光強度を短時間で急速に上昇させると、光合成は非定常状態となり、光合成速度は時間と共に上昇する。この場合の光合成速度の主たる律速要因はRubiscoの活性化であることが知られている。本章の目的は、そのような非定常状態における光合成の活性化速度が加齢過程においてどのように変化するのか、Rubisco activaseとの関連性はあるのかを調査することである。

第一節 加齢に伴う光合成活性化の緩和時間の変化と Activase/Rubisco比との関係

日本型水稻の日本晴を供試し、主稈第10葉の CO_2 ガス交換速度の緩和時間(τ)、Rubisco含量、Rubisco activase含量を経時的に調査した。 CO_2 ガス交換速度の緩和時間は、光強度を増加させてから新たな光合成の定常状態に移行するまでに要する時間の指標である。緩和時間は、前照射の光量子束密度(PFD)が $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$

以下では、PFDの増加に対して急速に短縮され、その値を越えると短縮は緩やかとなった。つまり、緩和時間と光強度との関係は2相に分けることができ、2つの間での律速要因の違いが予想される。そこで、それぞれの相からPFD $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (弱光) と $500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (強光) を選び、加齢過程における緩和時間の変化を調査した。弱光での緩和時間は、加齢に伴い短縮された。一方、強光の場合は加齢に影響されなかった。Activase/Rubisco比は加齢に伴って上昇し、弱光での緩和時間と高い負の相関を示した。それに対して、強光での緩和時間は、Activase/Rubisco比との関係は認められなかった。強光からの緩和時間は、 C_i の上昇により短縮されたが、弱光の場合は影響が少なかった。以上の結果から、ある程度強い光からの活性化には、おそらくカルバミル化速度が関与しているため加齢に影響されない、それに対して、比較的弱い光からの光合成の活性化はRubisco activaseとRubisco含量のバランスによって決定され、加齢の進行に伴い速度が増すものと考えられた。

第二節 加齢に伴うRubiscoの活性化における初速度の変化と Rubisco activase含量との関係

日本型水稻の日本晴を供試し、主稈第10葉のRubiscoの活性化における初速度 (V_i)、Rubisco含量、Rubisco activase含量を調査した。 V_i は光強度を増加させた直後のRubiscoの活性化の速度を、 CO_2 ガス交換速度から推定したものである。弱光からの V_i は加齢により変化し、その変化過程はRubisco activase含量と類似していた。そして、両者の関係を調査したところ、Rubisco activase含量の増加により、 V_i が上昇した。それに対して、強光からの V_i の場合は、Rubisco activase含量に影響されなかった。以上の結果から、比較的弱い光における V_i は、加齢過程を通じてRubisco activase含量によって決定されていると考えられる。

弱光から急速に光強度を増加させた直後は、Rubisco activaseは基質となる不活性

型のRubiscoで飽和していると予想できる。そのため、 V_i は、*in vivo*でのRubisco activase活性を表す指標となり得るものであり、Rubisco含量に影響されない。それに対して、緩和時間は新たな定常状態に移行するまでの時間を表す指標であることから、Rubisco activaseのみではなくRubisco含量も関与すると考えられる。

これらの値を指標として用いた本研究結果は、弱光における非定常状態の光合成速度が加齢過程を通じてRubisco activaseの能力に依存していることを示していると結論づけられる。

第三章 加齢に伴うRubiscoの活性とカルバミル化部位数の変化

イネ葉では定常状態の光合成速度、非定常状態の光合成速度においてRubisco activaseの働きが重要であり、それはRubiscoの活性化状態を通じて光合成速度に影響していることが示唆された。特に若い葉では、Activase/Rubisco比が低いために、*in vivo*でのRubiscoの活性が低下していると考えられる。しかし、Rubiscoの活性調節は複雑であり、植物種によって機構が異なる。そのため本章では、Rubiscoの活性化状態を $^{14}\text{CO}_2$ の取り込みによるRubisco活性と $^{14}\text{CABP}$ の結合によるカルバミル化サイト数の2種類の方法で調査し、まず、イネ葉におけるRubiscoの活性化がどの部分で調節されているのかを、光量子束密度 (PFD) に対する応答から明らかにし、次に、Activase/Rubisco比が低い若い葉で、実際にRubiscoの活性化状態が低下しているのか、また、大気条件と CO_2 飽和条件で違いがあるのかを検討した。

PFDとRubisco活性化状態との関係は11.0–11.2葉期の主稈第10葉を用いて調査した。CO₂ガス交換速度とイニシャル活性の光に対する応答は類似しており、PFDの増加に伴って上昇した。トータル活性はPFDに影響されなかったために、活性率(イニシャル活性/トータル活性)はイニシャル活性と類似した変化過程を示した。イニシャルサイト数もPFDの増加に伴って上昇し、その結果、カルバミル化率を

上昇させた。しかし、活性率は飽和PFD下でほぼ100%に達しているのに対して、カルバミル化率はそのPFDでも約65%と低かった。つまり、Rubisco活性はカルバミル化率のみでは説明できないと考えられる。そこで、活性サイトの反応回転速度である *in situ* Kcatに着目すると、弱光域においてPFDの増加に伴い急激に上昇した。これらの結果から、イネ葉におけるRubiscoの活性調節はイニシャルカルバミル化サイト数と *in situ* Kcatによって、行われていると考えられる。

主稈第10葉の加齢に伴う弱光 ($60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)、強光 ($500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)、飽和光 ($1800 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) 下でのRubiscoの活性化状態の変化を調査した。大気CO₂分圧下での、強光と飽和光におけるイニシャル活性と活性率は加齢と共に上昇する傾向を示した。それに対して、弱光でのそれらの値は変化が少なかった。強光と飽和光におけるイニシャルサイト数は加齢の進行に伴って上昇したが、*in situ* Kcatは加齢にあまり影響されなかった。このイニシャルサイト数とActivase/Rubisco比には、ほぼ直線的な関係が認められた。以上の結果から、大気CO₂分圧で比較的PFDが高い条件では、葉の若い時期にイニシャル活性、活性率が低下し、それはActivase/Rubisco比によってイニシャルカルバミル化サイト数が決まるためであると結論づけられる。

次に、酸素電極による最大酸素放出速度測定条件である、CO₂分圧と光飽和におけるRubiscoの活性化状態を、主稈第10葉の加齢過程を通じて調査した。イニシャル活性は、この条件においても葉の若い時期に低く、加齢に伴い上昇した。しかし、大気条件とは異なり、イニシャルカルバミル化サイト数の増加は伴っていなかった。*In situ* Kcatは3日目から10日目にかけて上昇し、その後、緩やかに低下した。これらの結果、飽和CO₂分圧下においてもイニシャル活性と活性率は若い時期に低かったが、それはRubiscoのカルバミル化の程度によるものではなく、カルバミル化されたサイトにおける活性の違いが関与している可能性が考えられる。

第四章 RubiscoとRubisco activase含量の変化と

プロテアーゼ活性との関係

イネ葉の加齢過程における光合成速度の変化には、Rubiscoの活性化状態が密接に関わっていた。その活性化状態の変化は、RubiscoとRubisco activase含量の変化過程が異なることにより起こると考えられた。本章では、この2つのタンパク含量の変化過程の違いがどのようにして生じているのかを解明するために、分解機構に着目して調査した。なお本実験では、短時間で老化を進行させるために、主にABAにより老化を促進させた葉切片を材料とした。

日本型水稻の日本晴を、土耕栽培により自然条件下で9.5葉期まで育成し、その主稈第9葉を材料とした。葉切片を作成し25°C、 $60 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の光照射下で、 $10 \mu\text{M ABA}$ 、 $10 \mu\text{M BA}$ (ベンジルアミノプリン) の溶液に浮かべ、Rubisco含量、Rubisco activase含量、この2つ以外の可溶性タンパク含量の経時的変化を調査した。Rubisco含量、Rubisco activase含量の低下はABAにより促進され、BAにより抑制された。しかし、この2つ以外の可溶性タンパク含量は老化の進行によらず一定であった。この結果から、この2つのタンパクに対する特異的な分解機構の発現が、ABAにより促進されたことが示唆される。そのため、RubiscoとRubisco activaseの分解に関与するプロテアーゼを特定するために、ゼラチンを基質としたPAGEによる活性染色法を適用した。まず非変性条件で電気泳動を行い、葉緑体内に近い弱アルカリ性条件 (pH 7.5) で Mg^{2+} や Ca^{2+} 、ATP、活性酸素、SDSを添加し、プロテアーゼ活性の検出を試みた。しかし、活性が確認できたのはSDSを添加した時のみであった。このSDSに依存したプロテアーゼ活性は、約50 kDa (RLP50) と約60 kDa (RLP60) の2つが顕著に確認され、両者共に酸性で高く、弱アルカリ性条件では低かった。SDSを添加しない場合は、いずれのpHにおいても活性は検出できなかった。以上の結果から、SDSを添加した酸性条件でのプロテアーゼ活性に着目して研究を進めた。

RubiscoやRubisco activaseを特異的に分解するプロテアーゼが存在するならば、

それはABAにより活性の発現が促進され、BAにより抑制されるはずである。また、着生葉では葉切片の場合に比べて著しく活性が低いと考えられる。RLP50はABAにより活性の発現が促進され、BAにより抑制された。また、着生葉では葉切片の場合に比べて著しく活性が低かった。それに対して、RLP60は着生葉においても強く発現していた。さらに、シクロヘキシミドによるRubiscoとRubisco activase含量の低下の抑制は、この2つのプロテアーゼの発現阻害により説明できた。また、Rubisco含量、Rubisco activase含量とRLP50活性との関係について調査したところ、Rubisco含量とRLP50活性との間には高い負の相関が認められた。一方、Rubisco activase含量とRLP50の間には指数関数的な負の相関が認められた。以上の結果から、特にRLP50がRubiscoの特異的分解へ関与していること、Rubisco activaseの分解には別の要素が関係していることが推察される。そのため次に、実際のRubiscoとRubisco activaseの分解活性をイムノブロットィングにより分析した。RLP50活性の高かった0.1% SDSを含む酸性条件では、約55kDaのRubisco大サブユニット(LSU)は、非常によく分解されたが、SDSを含まない弱アルカリ性条件では、ほとんど分解されなかった。それに対してRubisco activaseは、いずれの条件においても分解された。以上の結果から、Rubiscoの分解におけるRLP50の関与が強く示唆される。それに対して、Rubisco activaseはRubiscoと異なる場で、弱アルカリ性条件において働く活性の低いプロテアーゼによっても分解され得ると考えられる。つまり、このような異なった分解特性が、加齢過程における含量の変化過程に違いを生じている可能性がある」と結論づけられる。

Possible Role of Rubisco Activase in the Activation Mechanism of Photosynthesis of Rice Leaves

Rubisco activase is a protein, first discovered from mutant of *Arabidopsis thaliana*, catalyzes activation of Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (Rubisco). Under ambient CO₂ concentration and saturated light intensity, photosynthetic rates are mainly restricted by Rubisco activity. Thus, it is important to study Rubisco activation state in relation to Rubisco activase. In rice leaves, we purified Rubisco activase for the first time and confirmed the existence of this protein. However, it has not been studied how extent Rubisco activase takes part in photosynthetic rate in rice leaves, and the effect of aging, nitrogen supply and growing light intensity on Rubisco activase content. Therefore, the author intended to clarify the relationship between Rubisco activase and photosynthetic activation especially during leaf aging, and discussed the importance of Rubisco activase as a limiting factor of photosynthesis in rice leaves. Japonica rice (*Oryza Sativa* cv. Nipponbare) was used in this study.

Chapter 1 Relation to Steady-state Photosynthesis

Under ambient CO₂ concentration and saturated light intensity, it was considered that photosynthetic rates could be explained by the content of Rubisco and intercellular CO₂ partial pressure (C_i). Whereas, some reports suggested that Rubisco is not always fully activated and some activators need to explain photosynthesis. The aim of this study is to examine the relationships between Rubisco activase content and steady-state photosynthesis. Also, the effects of aging and growing condition on the amount of Rubisco activase were investigated.

1. Relationship between the Maximum O₂ Evolution Rate and the Amount of Rubisco Activase during Leaf Aging

The oxygen evolution rate under saturated CO₂ partial pressure and light intensity (the maximum O₂ evolution rate) and the amounts of Rubisco activase, Rubisco, total soluble protein and chlorophyll were investigated in the 10th leaf of rice in relation to its aging. The content of Rubisco activase increased until the 17th day after leaf emergence, thereafter, it decreased rapidly. This change was most remarkable compared to the other leaf constituents examined. The Rubisco content had already reached its maximum in 3 days after leaf emergence and had begun to decrease at the earliest among the leaf constituents. These findings indicate that the amount of Rubisco activase is not coordinately regulated with that of Rubisco. The maximum O₂ evolution rates depended linearly on the leaf Rubisco content below the value of 3 g m⁻², but tended to saturate above this value. On the contrary, the amount of Rubisco activase and maximum O₂ evolution rates were linearly correlated during the life span of the leaf. The apparent *in vivo* Rubisco activity as the maximum O₂ evolution rate per unit Rubisco content, increased exponentially with the increased Activase/Rubisco ratio. These results show that the amount of Rubisco activase is closely related to the photosynthetic rates in rice leaf from its emergence through senescence, and suggest that *in vivo* Rubisco activity can be restricted by Rubisco activase content, particularly when the leaf is young and accumulates excess Rubisco.

2. Effects of Nitrogen Nutrition and Light Intensity on Rubisco Activase Contents and These Relation to the Carboxylation Efficiency

The carboxylation efficiency estimated from CO₂ gas exchange rate, maximum O₂

evolution rate, the amounts of Rubisco activase, Rubisco and total nitrogen were measured in the 10th leaf of rice, grown under different nitrogen supplies and light intensities. The amount of Rubisco activase increased linearly with increasing nitrogen content regardless of the growing light intensities, whereas, that of Rubisco was slightly lower under the shade condition. This finding indicates that growing light intensity affects the balance between Rubisco and Rubisco activase content in rice leaves. The regression curve between the maximum O₂ evolution rate and the amount of Rubisco activase of shaded leaves was tended to be lower than that of sun-exposed leaves. On the other hand, relationship between Rubisco content and the maximum O₂ evolution rate was not affected by growing light intensity. However, a curvilinear correlation was observed between the maximum O₂ evolution rate and Rubisco content with the tendency to become saturate at higher content. Carboxylation efficiency which is an indicator of the amount of active Rubisco responded almost linearly with the content of Rubisco activase. In contrast, Carboxylation efficiency tended to saturate against Rubisco at values higher than 3 g m⁻². These results suggest that photosynthetic rate can be restricted by Rubisco activation states which is limited by Rubisco activase content, especially at higher Rubisco content in rice leaves.

Chapter 2 Relation to Non Steady-State Photosynthesis

When a leaf maintained under low light intensity is subjected to high light intensity in a step change, photosynthetic rates become non steady-state and increase over a few minutes finally approaching to a new steady state. It is considered that activation of Rubisco mainly limits such a non-steady state photosynthesis. In this chapter, non-steady state photosynthesis was evaluated

by the relaxation method and investigated a relation to the amounts of Rubisco activase and Rubisco during leaf aging of rice plants.

1. Changes of Relaxation Time for Photosynthetic Activation

during leaf aging and these Relation to Activase/Rubisco Ratio

Changes of photosynthetic CO₂ gas exchange rates in relation to step increase of light intensity from two photon flux densities of 60 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (low initial PFD) and 500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (high initial PFD) to saturated PFD of 1800 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ were measured in the 10th leaf of rice during its aging. Rubisco relaxation times (τ) were calculated by the normalized data of intercellular CO₂ partial pressure (C_i) in order to remove stomatal effects. This value means indicator of the time required to complete Rubisco activation. The relaxation time of low initial PFD exhibited largest value ($\tau = 2.90$ min) at 3 days after leaf emergence. This value gradually declined up to 33 days indicating the increase of activation rates of Rubisco with aging under this light intensity. In contrast, the relaxation times under high initial PFD maintained relatively constant ($\tau = 1.5 - 2.0$ min) during leaf aging. The relaxation times under low initial PFD showed high and negative correlation to the ratio of Rubisco activase to Rubisco (Activase/Rubisco ratio). But this correlation could not be recognized in the case of high initial PFD. Moreover, the relaxation times were more sensitive to C_i under high initial PFD than under low initial PFD, especially, when C_i is below 30 Pa. This suggests that with the aging of leaves, the rate of photosynthetic activation tends to increase under relatively low initial PFD through the changes of the Activase/Rubisco ratios, whereas, the rates of photosynthetic activation maintain almost constant under relatively high initial PFD possibly due to the restriction by Rubisco carbamylation rate.

2. Relationship between Initial Rate of Rubisco Activation and the Amounts of Rubisco Activase during leaf aging

Initial rate of Rubisco activation (V_i) was studied in the 10th leaf of rice during its aging. This value means the rate of Rubisco activation just after increasing light intensity, and it was estimated by CO_2 gas exchange rate. V_i under low initial PFD ($60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) varied with leaf aging, and its changing pattern was consistent with that of Rubisco activase content. Further, V_i under low initial PFD was linearly correlated with the amount of Rubisco activase content. On the other hand, V_i under high initial PFD ($500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) was unaffected by the amount of Rubisco activase. These results suggest that V_i under relatively low initial PFD is limited by Rubisco activase content during leaf aging.

Rubisco activation rate just after increasing light intensity can be assumed to be saturated by inactive Rubisco concentration. For this reason, V_i is considered not to be influenced by the content of Rubisco. In contrast, as relaxation time is an indicator of the time needed to achieve new steady-state photosynthesis, substrate (Rubisco) concentration related to the value.

From these results, it is concluded that Rubisco activase plays a central role in non steady-state photosynthesis under relatively low initial PFD.

Chapter 3 Changes in Rubisco Activity and the Number of Carbamylated Site during Leaf Aging

The amount of Rubisco activase was suggested to be a limiting factor of steady-state and non steady-state photosynthesis, particularly in the young leaf, through the activation of Rubisco. Thus, activation states of Rubisco should be measured to verify this hypothesis. Whereas, activation mechanism of Rubisco is a

complicated process and different among plant species. The aim of this chapter is to elucidate the activation mechanism of Rubisco in rice leaves and to investigate whether activation state of Rubisco is actually lower in the young leaf because of low Activase/Rubisco ratio under ambient and saturated CO₂ partial pressure. In this experiment, Rubisco activation states were analyzed by activity using ¹⁴CO₂ and carbamylated site using ¹⁴CABP.

Rubisco initial activity and CO₂ gas exchange rate increased with increasing PFD in the same trajectory. Light response of Rubisco activity ratio (initial activity /total activity) almost accord with that of initial activity because total activity of Rubisco is not influenced by PFD. Initial carbamylated site of Rubisco also increased with PFD, and this made the carbamylation ratio (initial carbamylated site/total carbamylated site) rise. Although the activity ratio reached approximately 100% at saturated light intensity, the carbamylation ratio was only 65% in spite of its maximum value. This finding indicates that regulation of Rubisco activity can not be explained by carbamylation alone. Thus, the rate of catalytic turnover of Rubisco active site (*in situ* K_{cat}) was investigated. This value rapidly increased with light intensity below 100 μmol m⁻² s⁻¹. These results suggest that Rubisco activation states are regulated by initial carbamylated site and *in situ* K_{cat} in rice leaves.

Rubisco activation states under ambient CO₂ partial pressure and low (60 μmol m⁻² s⁻¹), high (500 μmol m⁻² s⁻¹) and saturated (1800 μmol m⁻² s⁻¹) PFDs were studied in the 10th leaf of rice during its aging. Initial activity and the activity ratio under high and saturated PFD were tended to increase with leaf aging. In contrast, these values under low PFD were almost constant during leaf aging. Initial carbamylated site under high and saturated PFD was increased with leaf aging. Whereas, *in situ* K_{cat} was not affected by leaf aging. These initial carbamylated sites almost linearly correlated to the Activase/Rubisco ratios. These results indicate that initial activity

and activity ratio of Rubisco under relatively high PFD and ambient CO₂ partial pressure were lower in the young leaf because of the decrease in initial carbamylated site through the Activase/Rubisco ratio.

Under saturated CO₂ partial pressure and PFD, the initial activities and the activity ratios were also tended to increase with leaf aging. However, initial carbamylated sites were not increased with leaf aging. *In situ* K_{cat} increased from 3 to 10 days after leaf emergence, then decreased gradually. These results indicate that initial carbamylated site is not related to the changes of the activation states of Rubisco during leaf aging under saturated CO₂ partial pressure and PFD, that is *in situ* K_{cat} possibly involved in this phenomena.

Chapter 4 Proteolytic Activity against Rubisco and Rubisco Activase Induced by ABA

Changes in activation states of Rubisco is closely related to photosynthetic rate during leaf aging of rice plants. It is considered to be resulted from different varying patterns between Rubisco and Rubisco activase. In this chapter, degradation mechanism of Rubisco and Rubisco activase were investigated to elucidate why these protein showed different changing pattern during leaf aging. In this experiment, plant growth regulators were adopted to modulate senescence of detached leaf.

The 9th leaf pieces were floated on distilled water, 10 μ M abscisic acid (ABA), or 10 μ M benzyladenine (BA) solution at 25 °C under PFD of 60 μ mol m⁻² s⁻¹. The contents of Rubisco, Rubisco activase and the other soluble protein in the leaf pieces were determined. Decrease of Rubisco and Rubisco activase content was accelerated by ABA and suppressed by BA. Whereas, the other soluble protein was almost constant regardless of leaf senescence. These findings suggest that

specific proteolytic activities against Rubisco and Rubisco activase were stimulated by ABA. Thus, activity staining of protease using gelatin containing PAGE was done to specify the protease related to degradation of Rubisco and Rubisco activase. Effect of divalent cation and effector on proteolytic activity at pH 7.5 was analyzed using gelatin containing native-PAGE. However, there is no proteolytic activity without addition of SDS. SDS-dependent proteolytic activities were conspicuously detected at 60 kDa (RLP60) and 50 kDa (RLP50), and both activities had the same optimum pH of 5.5. Without addition of SDS, proteolytic activity could not be detected over various pH. For these results, further studies were conducted to the SDS-dependent proteolytic activity under acidic pH.

Expressions of specific protease activities related to degradation of Rubisco and Rubisco activase are assumed to be introduced by ABA and suppressed by BA, and lower in natural senescing leaves compared to the leaf pieces treated with ABA. Activity of RLP50 was induced by ABA and suppressed by BA. Further, this activity was extremely lower in natural senescing attached leaves than in ABA treated detached leaves. In contrast, Activities of RLP60 in attached leaves were comparable to detached leaves. Moreover, the suppression of decrease of Rubisco and Rubisco activase content by cycloheximide treatment could be explained by inhibition of the expression of RLP50 activity. The activity of RLP50 showed high and negative correlation to the content of Rubisco, and negatively exponential relation to the content of Rubisco activase. These findings suggest that RLP50 is involved in degradation mechanism of Rubisco, and is not responsible for Rubisco activase cleavage, or need another factors to degrade Rubisco activase. Therefore, proteolytic activities against Rubisco and Rubisco activase were studied by western blotting using specific antibodies against Rubisco and Rubisco activase. Rubisco large subunit (LSU) of 55 kDa was degraded at

acidic pH containing SDS which was optimal condition for RLP50 activity. Whereas, degradation of LSU was not proceeded at alkaline pH without SDS. Contrast to LSU, Rubisco activase (Rca) of 40 kDa was degraded under both conditions. These results support the suggestion that RLP50 is involved in degradation of Rubisco. Further, it is considered Rubisco activase dose not always degrade at the same place in cell to Rubisco. Therefore, it is proposed that these characteristics of degradation could lead to the different changing pattern between Rubisco and Rubisco activase content during leaf aging of rice plants.

謝辞

本研究を行うに当たり、終始御懇篤な御指導と御鞭撻を賜った神戸大学大学院自然科学研究科 安田武司教授に謹んで感謝の意を表します。また、この研究を行う機会を与えて下さり、終始御指導と貴重な御助言を賜りました同研究科 内田直次助教授に謹んで感謝の意を表します。貴重な御助言を賜りました同研究科 南森隆司助教授に感謝の意を表します。本論分の作成に当たり、御指導と御校閲を賜りました同研究科 上島脩志教授ならびに王子善清教授に感謝の意を表します。御指導と御助言を賜りました同研究科 東 哲司助手に謹んで感謝の意を表します。さらに、光合成速度の測定において、御指導と御助言を頂いた同研究科 金地通生助手に心から感謝いたします。CABP の合成において御助言を賜りました奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科 横田明穂教授に感謝いたします。Rubisco の活性化における初速度に関して、貴重な情報を頂いたメルボルン大学植物学研究室 Ian E. Woodrow 教授に感謝いたします。

本研究の共同研究者である荒井里絵氏、基礎実験を共に行った平岡幹朗氏に心から厚くお礼申し上げます。数々の御助言と激励を頂きました、西端豊英先輩、平野達也先輩に心から感謝いたします。公私にわたりお世話になりなした熱帯植物学研究室の諸先輩方、同輩、後輩のみなさん、関係者各位に心から感謝申し上げます。さらに、その他多くの方々の御助言と御助力、激励のうえに本研究は遂行し得たものであります。

最後になりましたが、長期にわたる研究生生活の中で私を激励し、また生活面の支えとなって下さいました、私の両親である、深山宗行氏、深山伸子氏、叔父である深山 温氏、ならびに親類の方々に心から感謝いたします。

引用文献

- Anderson L. E., J. T. Gibbons and X. Wang** 1996. Distribution of ten enzymes of carbon metabolism in pea (*Pisum sativum*) chloroplast. *Int. J. Plant Sci.* 157 (5) : 525-538.
- Anwaruzzaman, S. Sawada, H. Usuda and A. Yokota** 1995. Regulation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activation by inorganic phosphate through stimulating the binding of the activator CO₂ to the activation site. *Plant Cell Physiol.* 36 (3) : 425—433.
- Arnon D.I.** 1949. Copper enzymes in isolated chloroplast ; polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol.* 24 : 1—15.
- Berry J. A., G. H. Lorimer, J. Pierce, J. R. Seemann, J. Meek and S. Freas** 1987. Isolation, identification, and synthesis of 2-carboxyarabinitol 1-phosphate, a diurnal regulator of ribulose-bisphosphate carboxylase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84 : 734—738.
- Bradford M. M.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72 : 248—254.
- Bushnell T. P., B. Bushnell and A. T. Jagendorf** 1993. A purified zinc protease of pea chloroplasts, EP1, degrades the large subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase. *Plant Physiol.* 103 : 585-591.
- Butz N. D. and T. D. Sharkey** 1989. Activity ratios of ribulose bisphosphate carboxylase accurately reflect carbamylation ratios. *Plant Physiol.* 89 : 735—739.
- Campbell W. J. and W. L. Ogren** 1990. Electron transport through photosystem I stimulates light activation of ribulose bisphosphate carboxylase/oxygenase (Rubisco) by Rubisco activase. *Plant Physiol.* 94 : 479-484.
- Cardon Z. G. and K. A. Mott** 1989. Evidence that ribulose 1,5-bisphosphate (RuBP) binds to inactive site of RuBP carboxylase *in vivo* and an estimate of the rate constant for dissociation. *Plant Physiol.* 89 : 1253—1257.
- Casano L. M., H. R. Lascano and V. S. Trippi** 1994. Hydroxyl Radicals and a Thylakoid-Bound Endopeptidase are Involved in Light-and Oxygen-Induced Proteolysis in Oat chloroplasts. *Plant Cell Physiol.* 35 (2) : 145—152

- Chen M-H., L-F. Liu, Y-R. Chen, H-K. Wu and S.-M. Yu** 1994. Expression of α -amylases, carbohydrate metabolism, and autophagy in cultured rice cells is coordinately regulated by sugar nutrient. *Plant J.* 6 : 625—636.
- Cook M. G. and L. T. Evans** 1983. Some physiological aspects of the domestication and improvement of rice (*Oryza* spp.). *Field Crop Res.* 6 : 219-238.
- Crafts-Brandner S. J., R. R. Klein, P. Klein, R. Horzer and U. Feller** 1996. Coordination of protein and mRNA abundance of stromal enzymes and mRNA abundance of the Clp protease subunits during senescence of *Phaseolus vulgaris* (L) leaves. *Planta* 200 (3) : 312—318.
- Daring M. J., A. B. Tang and R. C. Huffaker** 1983. Evidence for the existence of peptide hydrolysis activity associated with chloroplasts isolated from barley mesophyll protoplast. *Z. Pflanzenphysiol.* 111 : 311—318.
- Desimone M., A. Hanke and E. Wagner** 1996. Oxidative stress induced partial degradation of the large subunit of Rubisco in isolated chloroplasts of barley. *Plant Physiol.* 111 : 789—796
- Eckardt N. A., G. W. Snyder, A. R. Portis and W. L. Ogren** 1997. Growth and photosynthesis under high and low irradiance of *Arabidopsis thaliana* antisense mutants with reduced ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activase content. *Plant Physiol.* 113 : 575—586.
- Edmondson D. L., M. R. Badger and T. J. Andrew** 1990. Slow inactivation of ribulosebisphosphate carboxylase during catalysis is caused by accumulation of a slow, tight-binding inhibitor at the catalytic site. *Plant Physiol.* 93 : 1390—1397.
- Evans J. R.** 1989. Photosynthesis and nitrogen relationships in leaves of C₃ plants. *Oecologia* 78 : 9—19.
- Evans J. R. and I. Terashima** 1988. Photosynthetic characteristics of spinach leaves grown with different nitrogen treatment. *Plant Cell Physiol.* 29 : 157-165.
- Farquhar G. D., S. von Caemmerer and J. A. Berry** 1980. A biochemical model of CO₂ fixation in leaves of C₃ plants. *Planta* 149 : 78—90.
- Ford D. M. and R. Shibles** 1988. Photosynthesis and other traits in relation to chloroplast number during soybean leaf senescence. *Plant Physiol.* 86 : 108—111.

- 深山 浩, 内田直次, 東哲司, 安田武司, 山口 禎 1994. イネ葉からの Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activaseの精製. 日作紀, 63 (別号1) : 140—141.
- Gifford R. M.** 1974. A comparison of potential photosynthesis, productivity and yield of plant species with differing photosynthetic metabolism. *Aust. J. Plant Physiol.* 1 : 107-117.
- Hammond E. T., T. J. Andrews, K. A. Mott and I. E. Woodrow** 1997. Regulation of Rubisco activation in antisense mutants of tobacco containing reduced levels of Rubisco activase. *Plant J.* (in press).
- Hammond E. T., G. S. Hudson, T. J. Andrews and I. E. Woodrow** 1995. Analysis of Rubisco activation using tobacco with antisense RNA to Rubisco activase. P. Mathis (ed.), *Photosynthesis : from Light to Biosphere*, Dordrecht, Vol. V, 293—296.
- Hashimoto H., M. Kura-Hotta and S. Katoh** 1989. Changes in protein content and in the structure and number of chloroplasts during leaf senescence in rice seedlings. *Plant Cell Physiol.* 30 : 707—715.
- He Z., S. von Caemmerer, G. S. Hudson, G. D. Price, M. R. Badger and T. J. Andrews** 1997. Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activase deficiency delays senescence of Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase but progressively impairs its catalysis during tobacco leaf development. *Plant Physiol.* 115 : 1569-1580.
- Heussen C. and E. B. Dowdle** 1980. Electrophoretic analysis of plasminogen activators in polyacrylamide gel containing sodium dodecyl sulfate and copolymerized substrate. *Anal. Biochem.* 102 : 196-202.
- Holbrook G. P., G. Bowes and M. E. Salvucci** 1989. Degradation of 2-carboxy - arabinitol 1-phosphate by a specific chloroplast phosphatase. *Plant Physiol.* 90 : 673—678.
- Ishida H., Y. Nishimori, M. Sugisawa, A. Makino and T. Mae** 1997. The large subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase is fragmented into 37-kDa and 16-kDa polypeptides by active oxygen in the lysates of chloroplasts from primary leaves of wheat. *Plant Cell Physiol.* 38 (4) : 471—479.

- Jackson R. B., I. E. Woodrow and K. A. Mott** 1991. Nonsteady-state photosynthesis following an increase in photon flux density (PFD). Effects of magnitude and duration of initial PFD. *Plant Physiol.* 95 : 498—503.
- Jiang C.-Z., W. P. Quick, R. Alred, D. Kliebenstein and S. R. Rodermel** 1994. Antisense RNA inhibition of Rubisco activase expression. *Plant J.* 5 : 787—798.
- Jiang C.-Z., S. R. Rodermel and R. M. Shibles** 1997. Regulation of photosynthesis in developing leaves of soybean chlorophyll-deficient mutants. *Photosynth. Res.* 51 : 185-192.
- Jordan D. B. and R. Chollet** 1983. Inhibition of ribulose biphosphate carboxylase by substrate ribulose-1,5-bisphosphate. *J. Biol. Chem.* 258 : 1390—1397.
- Kacser H. and J. A. Burns** 1973. The control of flux. *Symp. Soc. Exp. Biol.* 27 : 65-104.
- Kirschbaum M. U. F. and R. W. Pearcy** 1988. Gas exchange analysis of the relative importance stomatal and biochemical factors in photosynthetic induction in *Alocasia macrorrhiza*. *Plant Physiol.* 86 : 782—785.
- Kobza J. and J. R. Seemann** 1988. Mechanism of light regulation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase activity and photosynthesis in intact leaves. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85 : 3815—3819.
- Kobza J. and J. R. Seemann** 1989. Light-dependent kinetics of 2-carboxy-arabinitol 1-phosphate metabolism and ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activity. *Plant Physiol.* 89 : 174—179.
- Laemmli U. K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature* 227 : 680—685.
- Laing W. A. and J. T. Christeller** 1976. A model for the kinetics of activation and catalysis of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase. *Biochem. J.* 159 : 563—570.
- Laing W. A. and J. T. Christeller** 1980. A steady-state kinetic study on the catalytic mechanism of ribulose biphosphate carboxylase from soybean. *Arch. Biochem. Biophys.* 202 : 592—600.
- Lan Y., and K. A. Mott** 1991. Determination of apparent Km values for ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (Rubisco) activase using the spectrophoto-

- metric assay of Rubisco activity. *Plant Physiol.* 95 : 604—609.
- Lan Y., Woodrow I. E. and K. A. Mott** 1992. Light-dependent changes in ribulose biphosphate carboxylase activase activity in leaves. *Plant Physiol.* 99 : 304—309.
- Larson E. M., C. M. O'Brien, G. Zhu, R. J. Spreitzer and A. R. Portis Jr.** 1997. Specificity for activase is changed by a Pro-89 to Arg substitution in the large subunit of ribulose-1,5-biphosphate carboxylase/oxygenase. *J. Biol. Chem.* 272 (27) : 17033—17037.
- Leitsch J., B. Schnrttger, C. Critchley and G. H. Krause** 1994. Two mechanisms of recovery from photoinhibition *in vivo* : reactivation of photosystem II related and unrelated to D1-protein turnover. *Planta.* 194 : 15—21.
- Lilley R. McC. and A. R. Portis Jr.** 1997. ATP hydrolysis activity and polymerization state of ribulose-1,5-biphosphate carboxylase oxygenase activase ; Do the effect of Mg²⁺, K⁺, and activase concentrations indicate a functional similarity to actin? *Plant Physiol.* 114 : 605—613.
- Liu X.-Q. and A. T. Jagendorf** (1986). Neutral peptidases in stroma of pea chloroplast. *Plant Physiol.* 81 : 603-608.
- Lorimer G. H., M. R. Badger and T. J. Andrew** 1977. D-ribulose-1,5-biphosphate carboxylase-oxygenase. Improved methods for the activation and assay of catalytic activity. *Anal. Biochem.* 78 : 66—75.
- Lorimer G. H., and H. Mizioroko** 1980. Carbamate formation on the ϵ -amino group of a lysyl residue as the basis for the activation of ribulose biphosphate carboxylase by CO₂ and Mg²⁺. *Biochemistry* 19 : 5321—5328.
- Mae T., T. Hoshino and K. Ohira** 1985. Proteinase activities and loss of nitrogen in the senescing leaves of field-grown. *Soil. Sci. Plant Nutr.* 31 (4) 589—600.
- Mae T., T. Kai, A. Makino and K. Ohira** 1984. Relation between ribulose biphosphate carboxylase content and chloroplast number in the naturally senescing primary leaves of wheat. *Plant Cell Physiol.* 25 : 333—336.
- Mae T., C. Kamei, K. Funaki, K. Miyadai, A. Makino, K. Ohira and K. Ojima** 1989. Degradation of ribulose-1,5-biphosphate carboxylase/oxygenase in the lysates of the chloroplasts isolated mechanically from wheat (*Triticum aestivum*

- L.) leaves. *Plant Cell Physiol.* 30 : 193—200.
- Mae T., A. Makino and K. Ohira** 1983. Change in the amounts of Ribulose biphosphate carboxylase synthesized and degraded during the life span of rice leaf (*Oryza sativa* L.). *Plant Cell Physiol.* 24 (6) : 1079-1086.
- Mae T. and K. Ohira** 1981. The remobilization of nitrogen related to leaf growth and senescence in rice plants. *Plant Cell Physiol.* 22 : 1067—1074.
- Makino A., M. Harada, T. Sato, H. Nakano and T. Mae** 1997. Growth and N allocation in rice plants under CO₂ enrichment. *Plant Physiol.* 115 : 199-203.
- Makino A., T. Mae and K. Ohira** 1983. Purification and Storage of ribulose 1,5-biphosphate carboxylase from rice leaves. *Plant Cell Physiol.* 24 : 1169—1173.
- Makino A., T. Mae and K. Ohira** 1984. Changes in photosynthetic capacity in rice leaves from emergence through senescence. Analysis from ribulose-1,5- biphosphate carboxylase and leaf conductance. *Plant Cell Physiol.* 25 : 511—521.
- Makino A., T. Mae and K. Ohira** 1985. Enzymic properties of ribulose-1,5-biphosphate carboxylase/oxygenase purified from rice leaves. *Plant Physiol.* 79 : 57—61.
- Makino A., H. Nakano and T. Mae** 1994. Responses of ribulose-1,5-biphosphate carboxylase, cytochrome f, and sucrose synthesis enzymes in rice leaves to leaf nitrogen and their relationships to photosynthesis. *Plant Physiol.* 105 : 173—179.
- Malek L., L. Bogorad, A. R. Ayers and A. L. Goldberg** 1984. Newly synthesized proteins are degraded by an ATP-stimulated proteolytic process in isolated pea chloroplasts. *FEBS Lett.* 166 : 253—257
- Martino-Catt S., and D. R. Ort** 1992. Low temperature interrupts circadian regulation of transcriptional activity in chilling-sensitive plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89 : 3731-3735.
- Mate J. C., G. S. Hudson, S. von Caemmerer, J. R. Evans and T. J. Andrews** 1996. Reduction of ribulose biphosphate carboxylase activase levels in tobacco (*Nicotiana tabacum*) by antisense RNA reduces ribulose biphosphate carboxylase carbamylation and impairs photosynthesis. *Plant Physiol.* 102 : 1119-1128.

- Mate J. C., S. von Caemmerer, J. R. Evans, G. S. Hudson and T. J. Andrews** 1996. The relationship between CO₂-assimilation rate, Rubisco carbamylation and Rubisco activase content in Rubisco activase deficient transgenic tobacco suggests a simple model of activase action. *Planta* 198 : 604—613.
- Matsudaira P.** 1987. Sequence from picomole quantities protein electroblotted onto polyvinylidene difluoride membranes. *J. Biol. Chem.* 262 : 10035—10038.
- Mehta R. A., T. W. Fawcett, D. Porath and A. K. Mattoo** 1992. Oxydative stress causes rapid membrane translocation and *in vivo* degradation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase. *J. Biol. Chem.* 267 : 2810—2816.
- Miyadai K., T. Mae, A. Makino and K. Ojima** 1990. Characteristic of ribulose -1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase degradation by lysates of mechanically isolated chloroplast from wheat leaves. *Plant Physiol.* 92 : 1215—1219.
- Miyake C. and A. Yokota** 1997. Δ pH across thylakoid membranes regulates fallover of ribulose-1,5-bisphosphate (RuBP) carboxylase/oxygenase (RuBisCO) in radish leaves. *Plant Cell Physiol.* 38 (supplement) : 33
- Mott K. A., G. W. Snyder and I. E. Woodrow** 1997. Kinetics of Rubisco activation as determined from gus-exchange measurements in antisense plants of *Arabidopsis thaliana* containing reduced levels of Rubisco activase. *Aust. J. Plant Physiol.* (in press).
- Nakano H., A. Makino and T. Mae** 1997. The effect of elevated partial pressures of CO₂ on the relationships between photosynthetic capacity and N content in rice leaves. *Plant Physiol.* 115 : 191-198.
- 大隅良典. 1994. 液胞におけるタンパク質分解. 植物細胞工学, 秀潤社, 東京, 6 : 15—23.
- 大山卓爾 1990. 窒素化合物分析法, 植物栄養実験法, 博友社, 東京, pp 174—179.
- Ono K., H. Hashimoto, and S. Katoh** 1995. Changes in the number and size of chloroplasts during senescence of primary leaves of wheat grown under different conditions. *Plant Cell Physiol.* 36 : 9—17.
- Orlowski M., C. Cardozo, M. C. Hidalgo and C. Michaud** 1991. Regulation of the peptidylglutamyl-peptide hydrolyzing activity of the pituitary multicatalytic

- proteinase complex. *Biochemistry* 30 : 5999—6005.
- Parry M. A. J., P. J. Andralojc, S. Parmar, A. J. Keys, D. Habash, M. J. Paul, R. Alred, W. P. Quick and J. C. Servaites** 1997. Regulation of Rubisco by inhibitors in the light. *Plant Cell Environ.* 20 : 528—534.
- Penarrubia L. and J. Moreno** 1990. Increased susceptibility of Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase to proteolytic degradation caused by oxidative treatment. *Arch. Biochem. Biophys.* 281 (2) : 319—323.
- Peterson L. W., G. E. Kieinkopf and R. C. Huffaker** 1973. Evidence for lack of turnover of ribulose 1,5-diphosphate carboxylase in barley leaves. *Plant Physiol.* 51 : 1042—1045.
- Pierce J., N. E. Tolbert and R. Barker** 1980. Interaction of ribulose bisphosphate carboxylase/oxygenase with transition state analogues. *Biochemistry* 19 : 934—942.
- Pilgrim M. L. and C. R. McClung** 1993. Differential involvement of the circadian clock in the expression of genes required for Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase synthesis, assembly, and activation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 103 : 553-564.
- Portis A. R. Jr.** 1990. Rubisco activase. *Biochim. Biophys. Acta* 1015 : 15—28.
- Portis A. R. Jr.** 1992. Regulation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activity. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 43 : 415—437.
- Portis A. R. Jr.** 1995. The regulation of Rubisco by Rubisco activase. *J. Exp. Bot.* 46 : 1285—1291.
- Portis A. R. Jr, M. E. Salvucci and W. L. Ogren** 1986. Activation of Ribulose bisphosphate carboxylase/oxygenase at physiological CO₂ and ribulose bisphosphate concentrations by Rubisco activase. *Plant Physiol.* 82 : 967—971.
- Ragster L. E. and M. J. Chrispeels** 1981. Autodigestion in crude extracts of soybean leaves and isolated chloroplasts as a measure of proteolytic activity. *Plant Physiol.* 67 : 104—109.
- Robinson S. P. and A. R. Portis Jr.** 1988a. Release of the nocturnal inhibitor, carboxyarabinitol-1-phosphate, from ribulose bisphosphate carboxylase/oxygenase by Rubisco activase. *FEBS. Letts.* 233 : 413—416.

- Robinson S. P. and A. R. Portis Jr.** 1988b. Involvement of stromal ATP in the light activation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase in intact isolated chloroplast. *Plant Physiol.* 86 : 293—298.
- Robinson S. P. and A. R. Portis Jr.** 1989a. Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activase protein prevents the *in vitro* decline in activity of Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase. *Plant Physiol.* 90 : 968—971.
- Robinson S. P. and A. R. Portis Jr.** 1989b. Adenosine triphosphate hydrolysis by purified rubisco activase. *Arch. Biochem. Biophys.* 268 : 93—99.
- Robinson S. P., V. J. Streusand, J. M. Chatfield and A. R. Portis Jr.** 1988. Purification and assay of Rubisco activase from leaves. *Plant Physiol.* 88 : 1008—1014.
- Sage R. F., R. W. Pearcy and J. R. Seemann** 1987. The nitrogen use efficiency of C₃ and C₄ plants III Leaf nitrogen effects on the activity of carboxylating enzymes in *Chenopodium album* (L.) and *Amaranthus retroflexus* (L.). *Plant Physiol.* 85 : 355—359
- Sage R. F. and C. D. Reid** 1994. Photosynthetic response mechanism to environmental change in C₃ plants. In Wilkinson R. E. ed., *Plant Environment Interaction*, Marcel Dekker, New York, pp 413—499.
- Sage R. F., T. D. Sharkey and J. R. Seemann** 1990. Regulation of ribulose -1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activity in response to light intensity and CO₂ in the C₃ annuals *Chenopodium album* L. and *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Physiol.* 94 : 1735—1742.
- Salvucci M. E. and W. L. Ogren** 1996. The mechanism of Rubisco activase : insight from studies of the properties and structure of the enzyme. *Photosynth. Res.* 47 : 1—11.
- Salvucci M. E., A. R. Portis Jr. and W. L. Ogren** 1985. A soluble chloroplast protein catalyzes ribulosebisphosphate carboxylase/oxygenase activation *in vivo*. *Photosynth. Res.* 7 : 193—201.
- Salvucci M. E., J. M. Wernek, W. L. Ogren and A. R. Portis Jr.** 1987. Purification and species distribution of rubisco activase. *Plant Physiol.* 84 : 930—936.

- Sanchez de Jimenez E., L. Medrano and E. Martinez-Barajas** 1995. Rubisco activase, a possible new member of the molecular chaperone family. *Biochemistry* 34 : 2826—2831.
- Sassenrath-Cole, G. F. and R. W. Percy** 1992. The role of ribulose-1,5-bisphosphate regeneration in the induction requirement of photosynthetic CO₂ exchange under transient light conditions. *Plant Physiol.* 99 : 227—234.
- Sawada S., H. Usuda and T. Tsukui** 1992. Participation of inorganic orthophosphate in relation of the ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase activity in response to changes in the photosynthetic source-sink balance. *Plant Cell Physiol.* 33 (7) : 943—949.
- Schmidt G. W. and M. L. Mishkind** 1983. Rapid degradation of unassembled ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase small subunits in chloroplasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80 : 2632—2636.
- Seemann, J. R., M. U. F. Kirschbaum, T. D. Sharkey and R. W. Percy** 1988. Regulation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase activity in *Alocasia macrorrhiza* in response to step changes in irradiance. *Plant Physiol.* 88 : 148—152.
- Seemann J. R., J. Kobza and B. D. Moore** 1990. Metabolism of 2-carboxy-arabinitol 1-phosphate and regulation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase activity. *Photosynth. Res.* 23 : 119—130.
- Servaites J. C., W-J. Shieh and D. R. Geiger** 1991. Regulation of photosynthetic carbon reduction cycle by ribulose bisphosphate and phosphoglyceric acid. *Plant Physiol.* 97 : 1115—1121.
- Sharkey T. D.** 1985. Photosynthesis in intact leaves of C₃ plants : physics, physiology and rate limitation. *Bot. Rev.* 51 : 53—105.
- Siegel M. I. and M. D. Lane** 1973. Chemical and enzymatic evidence for the participation of a 2-carboxy-3-ketoribitol-1,5-diphosphate intermediate in the carboxylation of ribulose 1,5-diphosphate. *J. Biol. Chem.* 248 (15) : 5486—5498.
- Somerville C. R., A. R. Portis Jr. and W. L. Ogren** 1982. A mutant of *Arabidopsis thaliana* which lacks activation of RuBP carboxylase in vivo. *Plant Physiol.* 70 : 381-387.

- Stitt M. and Grosse H.** 1988. Interaction between sucrose synthesis and CO₂ Fixation. I. Secondary kinetics during photosynthetic induction are related to a delayed activation of sucrose synthesis. *J. Plant Physiol.* 133 : 129—137.
- Stitt M., W. P. Quick, U. Schurr, E.-D. Schulze, S. R. Rodamal and L. Bpgorad** 1991. Decreased Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase in transgenic tobacco transformed with 'antisense' rbcS. II Flux-control coefficients for photosynthesis in varying light, CO₂ and air humidity. *Planta* 183 : 555-566.
- Streusand V. J. and A. R. Portis Jr.** 1987. Rubisco activase mediates ATP-dependent activation of ribulose bisphosphate carboxylase. *Plant Physiol.* 85 : 152—154.
- 内田直次, 森下敏和, 安田武司, 山口 禎. 1988. イネ葉CO₂同化の速度論的解析と葉内拡散抵抗の算出. *日作紀.* 57 (別号1) : 143—144.
- 内田直次, 和田義春, 村田吉男. 1980a. 作物の葉における光合成機能の発達と衰退に関する研究. 第四報 イネ切断葉における変化. *日作紀.* 49 (別号1) : 129—130.
- 内田直次, 和田義春, 村田吉男. 1980b. 作物葉における光合成機能の発達と衰退に関する研究. 第一報 イネ葉の発達過程における変化. *日作紀.* 49 (1) : 127—134.
- 内田直次, 和田義春, 村田吉男. 1982. 作物葉における光合成機能の発達と衰退に関する研究. 第二報 イネ葉の老化過程に及ぼす窒素欠乏の影響. *日作紀.* 51 (4) : 577—583.
- von Caemmerer S. and G. D. Farquhar** 1981. Some relationships between the biochemistry of photosynthesis and the gas exchange of leaves. *Planta* 153 : 376—387.
- 和田義春 1988. イネ個葉の光合成特性の老化にともなう変化. 宇都宮大学農学部学術報告特輯. 49 : 1—44.
- Wang Z. Y. and A. R. Portis Jr.** 1992. Dissociation of ribulose 1,5- bis-phosphate bound to ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase and its enhancement by ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activase-mediated hydrolysis of ATP. *Plant Physiol.* 99 : 1348—1353.
- Wang Z. Y. and A. R. Portis Jr.** 1993. Mg²⁺ and ATP or Adenosine 5'-[γ -thio]-

triphosphate (ATP γ S) enhances intrinsic fluorescence and induces aggregation which increases the activity of spinach Rubisco activase. *Biochem. Biophys. Acta* 1202 : 47-55.

Wardley T. M., P. L. Bhalla and M. J. Dalling 1984. Changes in the number and composition of chloroplasts during senescence of mesophyll cells of attached and detached primary leaves of wheat (*Triticum aestivum* L.) *Plant Physiol.* 75 : 421—424.

Watanabe N. and S. Yamada 1996. Activation of 20S proteasomes from spinach leaves by fatty acids. *Plant Cell Physiol.* 37 (2) : 147—151.

Weidhase R. A., J. Lehmann, H. Kramell, G. Sembdner and B. Parthier 1987. Degradation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase and chlorophyll in senescing barley leaf segments triggered by jasmonic acid methylester, and counteraction by cytokinine. *Physiol. Plantarum* 69 : 161—166.

Wittenbach V. A., W. Lin and R. R. Hebert 1982. Vacuolar localization of proteases and degradation of chloroplasts in mesophyll protoplasts from senescing primary wheat leaves. *Plant Physiol.* 69 : 98—102.

Woodrow I. E. and J. A. Berry 1988. Enzymatic regulation of photosynthetic CO₂ fixation in C₃ plant. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 39 : 533—594.

Woodrow I. E. and K. A. Mott 1989. Rate limitation of non-steady-state photosynthesis by ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase in spinach. *Aust. J. Plant Physiol.* 16 : 487—500.

Woodrow I. E., Kelly, M. E. and Mott, K. A. 1996. Limitation of the rate of ribulosebisphosphate carboxylase activation by carbamylation and ribulose-bisphosphate carboxylase activase activity: development and tests of a mechanistic model. *Aust. J. Plant Physiol.* 23 : 141—149.

Yamada T., A. Ozawa, H. Ohta, T. Masuda, Y. Shioi and K. Takamiya 1995. Purification and some properties of an SDS-activated protease in *Zea mize*. In P. Mathis (ed.), *Photosynthesis : from Light to Biosphere*, Vol. V. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. pp 281—284.

Yamauchi Y. 1996. The role and functional responsibility of proteases in nitrogen-recycle system of cucumber plant. Doctoral dissertation, Kobe univ.

横田明穂 1992. RuBisCO活性調節機構 反応の二相性と履歴現象. 化学と生物, 日本農芸化学会, 学会出版センター, 東京, 30 (3) : 140—143.

Yokota A. and N. Tsujimoto 1992. Characterization of ribulose-1,5- bis-phosphate carboxylase/oxygenase carrying ribulose-1,5-bisphosphate at its regulatory sites and the mechanism of interaction of this form of the enzyme with ribulose-1,5-bis-phosphate-carboxylase/oxygenase activase. *Eur. J. Biochem.* 204 : 901—909.

Yoshida T. and T. Minamikawa (1996). Successive amino-terminal proteolysis of the large subunits of Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase by vacuolar enzymes from French bean leaves. *Eur. J. Biochem.* 238 : 317-324.