



オオムギの細胞内カリウム濃度制御におけるプロレシンの役割に関する研究

玉井, 鉄宗

(Degree)

博士 (農学)

(Date of Degree)

2000-03-31

(Date of Publication)

2014-11-26

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲2166

(JaLCD0I)

<https://doi.org/10.11501/3173105>

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1002166>

※ 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

オオムギの細胞内カリウム濃度制御における
プトレシンの役割に関する研究

平成12年3月

神戸大学大学院自然科学研究科

玉井 鉄宗

博 士 論 文

オオムギの細胞内カリウム濃度制御における
プトレシンの役割に関する研究

平成12年 3月

神戸大学大学院自然科学研究科

玉井 鉄宗

目次

序論

第一節 高等植物におけるカリウムの役割	1
第二節 細胞内カリウム濃度の制御	2
第三節 ポリアミン	3
第四節 カリウムとプトレシンの相互関係	5
第五節 本研究の意義	5

第一章 プトレシンによるカリウム濃度制御について

第一節 緒言	7
第二節 実験方法	8
第三節 実験結果	10
第四節 考察	21

第二章 カリウム供与によるプトレシン減少機構について

第一節 緒言	23
第二節 実験方法	24

第三節 実験結果	27
----------	----

第四節 考察	38
--------	----

第三章 プトレシンによるカリウム吸収の促進について

第一節 緒言	41
--------	----

第二節 実験方法	42
----------	----

第三節 実験結果	45
----------	----

第四節 考察	54
--------	----

総括	55
----	----

謝辞	59
----	----

参考文献	60
------	----

略号

ACC	: 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid
ADC	: Arginine decarboxylase
ATP	: Adenosine 5'-triphosphate
BCIP	: 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate
DAO	: Diamine oxidase
DMF	: N,N'-dimethyl formamide
DTT	: Dithiothreitol
EDTA	: Disodium ethylenediamine tetraacetate
Hepes	: 2-(4-(2-hydroxyethyl)-piperazinyl)ethanesulfonic acid
HPLC	: High performance liquid chromatography
IgG	: Immunoglobulin G
LSC	: Liquid scintillation counter
MES	: 2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid
NBT	: Nitro-blue tetrazolium chloride
ODC	: Ornithine decarboxylase
SAM	: S-adenosylmethionine
SDS	: Sodium dodecylsulfate
TLC	: Thin layer chromatography
Tris	: Tris (hydroxymethyl) aminomethane
VO ₄ ³⁻ -ATPase	: VO ₄ ³⁻ -sensitive ATPase

序 論

第一節 高等植物におけるカリウムの役割

高等植物において、カリウムは多くの重要な役割を果たす必須元素である。まず、カリウムの細胞内の機能としては、核酸、タンパク質、有機酸といった過剰の負電荷に対するカウンターイオンとして働くことが挙げられる。カリウムは相対的に大きさに対する電荷が小さいため水和殻が小さく、水分子の運動を妨げにくいという性質から、高濃度に存在してもタンパク質の立体構造を維持することが可能である。一般的に、植物の細胞質のカリウム濃度は、動物と同様に80mM-120mMであると考えられている (Maathui and Sanders 1993)。元来、カリウムは細胞内の負電荷に対するカウンターイオンとして働いていたが、進化の過程で補助的でより特殊化された多くの役割をも担うようになり、タンパク質合成やmRNAの翻訳等、広範囲の反応を活性化するようになったと考えられている (Wyn-Jones and Pollard 1983)。さらには、カリウムは細胞質や液胞の浸透圧の調節因子であり、リグニン化されていない細胞を構造的に強固にするための膨圧に著しく貢献している。また、高等植物において観察される気孔の開閉や葉の昼夜運動等の細胞や組織の運動は、カリウムの吸収や放出を介した膨圧の変化と関連している (Satter and Galston 1981)。カリウムは植物の生体有機成分を構成していないにもかかわらず、C、O、H、Nについて含量が多い。カリウムを十分与えて育てた植物においては、カリウムは全乾燥重の10%にまで達する場合すらある。また、カリウムはそれ自身が同化あるいは代謝されないカチオンであるため、植物体内でのカチオンの挙動を示すモデルとして捉えられている。従って、古くから必須元素として、カチオンの代表としてのカリウムは植物栄養学的あるいは植物生理学的見地から盛んに研究がな

されてきた。

第二節 細胞内カリウム濃度の制御

上述のようにカリウムは生命活動において不可欠であるため、植物は様々な組成の外部環境のカリウムに対しても細胞内のカリウム濃度をある程度維持する能力を有している。このことは、細胞膜を横切るカリウムイオン輸送が必要であり、それを担うカリウム輸送担体が重要な役割を果たしていることを暗示している。このカリウム輸送担体は大きく、高親和性トランスポーター、低親和性トランスポーター（内向き整流カリウムチャンネル）、外向き整流カリウムチャンネルの三種類に分類される。高親和性カリウムトランスポーターは細胞内のあるいは培地中のカリウム濃度の減少に伴い発現が誘導され（Wang et al. 1998）、電気化学的勾配に逆らって低濃度（ μM レベル）のカリウムを吸収する。十分なカリウム供給（ mM レベル）がなされる時は、高親和性トランスポーターの発現は抑制され（Fernando et al. 1990）、電気化学的勾配に従い、主に低親和性トランスポーターによりカリウムの取り込みが行われる（Kochian and Lucas 1982）。細胞内に過剰のカリウムが存在し、原形質膜が脱分極すると外向き整流カリウムチャンネルが働き、細胞外にカリウムを放出することによりカリウム濃度と膜電位の維持を行う。

このように、植物はあらゆるカリウム栄養条件下でも、三種のカリウムトランスポーターを駆使し、細胞内のカリウム濃度を制御していると考えられている。

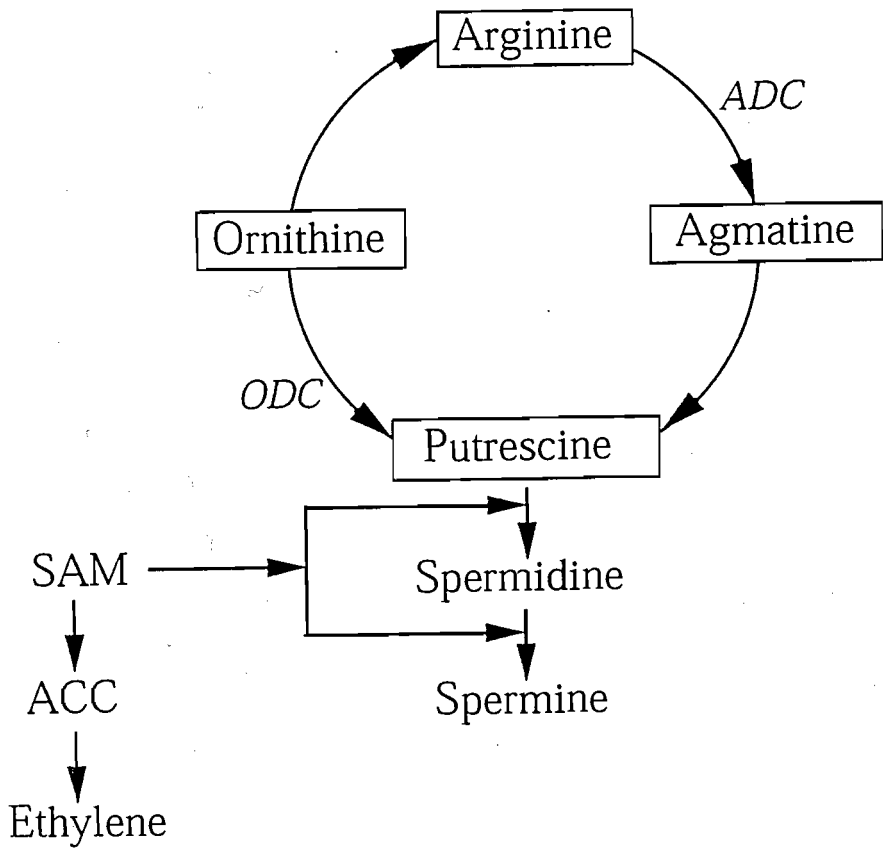
第三節 ポリアミン

ポリアミンは、プトレシン (Put ; $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$)、スペルミジン (Spd ; $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$)、及びスペルミン (Spm ; $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$) より成る。ポリアミンは動物、植物、微生物、ウイルスとすべての生物にほとんど例外なく存在する。生理的pHでは、これらのポリアミンはカチオンとして働き、アニオン性の分子 (DNA、RNA、リン脂質、タンパク質等) と相互作用する (Kumar et al. 1997)。

植物において、ポリアミンは様々な成長、発達段階 (細胞分裂、胚発生、根の形成、花の形成、果実の発達、老化等) での関与が示唆されている (Evans and Malmberg 1989)。従って、ポリアミンを植物ホルモンの一種であるとする考え方もあったが、既知の植物ホルモンに比べ、その有効濃度の高さや、作用の間接性から現在では成長制御因子として位置づけられている。

ポリアミンの生合成経路については現在までに、第1図に示すように明確にされている。プトレシンはODC (オルニチンデカルボキシラーゼ) の働きにより直接オルニチンから、あるいはADC (アルギニンデカルボキシラーゼ) の働きにより間接的にアルギニンから合成される。S-アデニルメチオニンを前駆体とし、スペルミジン、スペルミンはそれぞれ合成される。

ポリアミンの細胞内の存在形態としては、大きく分類して、遊離型、酸可溶結合型、酸不溶結合型ポリアミンがある。酸可溶結合型ポリアミンは主に桂皮酸類と共有結合した形態であり、開花や花の発達に関係していると考えられている (Tarenghi and Martin-Tanguy 1995, Martin-Tanguy 1997)。酸不溶結合型ポリアミンはある種のタンパク質 (クロロフィルa/b複合体、リブローズリン酸カルボキシラーゼ/オキシダーゼ (Rubisco)、グリシニン) と共有結合することが報告されている (Margosiak et al. 1990, Del Duca et al. 1994, Serafini-Fracassini et al. 1995, Kang et al. 1998)。しかし、このタンパク質と共有結合するポリアミンの機能は、そのタンパク質の機能から推察されるにとどまっており、詳細は不明である。



第1図 ポリアミン生合成経路

プトレシンは様々なストレス条件下において蓄積が誘導されることが知られている (Smith 1973, Young and Galston 1983, 1984, Slocum et al. 1984)。対照的に、スベルミジン、スベルミンはそのようなストレス条件には応答しない。ストレス条件に応答し、蓄積するプトレシンの機能は様々な推察はあるものの (Altman 1982, Datta et al. 1987, Drolet et al. 1986, Kaur-Sawhney et al. 1982, Reggiani et al. 1992, Roberts et al. 1986, Srivastava and Rajbabu 1983a,b, Veluthambi and Poovaiah 1984)、未だ不明確のままである。

第四節 カリウムとプトレシンの相互関係

カリウムが欠乏すると細胞内にプトレシンが蓄積することが古くから知られている (Smith 1973, Young and Galston 1984)。また、プトレシンを供与することによりカリウム欠乏症状が緩和されること (Tachimoto et al. 1992)、さらには、カリウム供与によりプトレシン含量が低下することも報告されている (Sarajala et al. 1997, Young and Galston 1984, Reggiani et al. 1993)。これらの現象は、プトレシンは生理的pHでは二価のカチオンとして働くため、細胞内のカリウム濃度の減少を補い、イオンバランスを保持する役割を担っていると解釈されている。ところが、カリウム栄養条件が一定であるストレス条件下 (酸素欠乏、低温、低pH、アンモニア過剰、高塩濃度、高浸透圧等) においても、プトレシンの蓄積は確認されているが (Evans and Malmberg 1989, Smith 1985)、この時、細胞内のカリウム濃度との関係について論じられた報告はない。

第五節 本研究の意義

上述のように、プトレシンはカリウムの電気的アナログとして機能し、細胞内のカリウム濃度の低下を補うと考えられている。常に細胞内において、

プトレシンとカリウムの拮抗関係が成立しているのであれば、カリウム栄養条件に関係なくプトレシンが蓄積する条件下では、当然細胞内のカリウム濃度は制限されるはずである。もし、このようなプトレシンによるカリウム濃度の抑制が起こりうるのであれば、プトレシンを新たな細胞内カリウム濃度制御因子として再認識することが要求される。さらには、このことによりプトレシン蓄積現象を、カリウム濃度減少として新たな側面から考察することが可能となる。

そこで本研究では、プトレシンが細胞内カリウム濃度の制御因子であるとの仮説をたて、それを証明することを試みると同時に、プトレシンとカリウムとの相互関係におけるプトレシンの機能について明らかにしようとした。

第一章 プトレシンによるカリウム濃度制御について

第一節 緒言

プトレシンが細胞内のカリウム濃度制御因子である可能性を検証するためには、カリウムが欠乏していない条件下でプトレシンの蓄積が誘導される条件を見出す必要がある。

エチレンは発芽から様々な器官の老化に至るまでの発達過程や環境ストレスに関係する植物ホルモンである。エチレンとポリアミンはその生合成においてS-アデノシルメチオニン (SAM) を共に基質とするため (第1図)、エチレンとポリアミンの相互作用には大きな関心が払われてきた。エチレンとポリアミンの相互作用はエンドウの幼植物 (Apelbaum et al. 1985)、ダイズ葉 (Pennazio and Roggero 1990, Turano et al. 1997)、ダイズ胚軸 (Suttle 1981)、イネ葉 (Lee and Chu 1992)、イネ子葉鞘 (Lutts et al. 1996) において調べられている。しかし、これらの研究からはエチレンがポリアミンの生合成を阻害する、あるいは促進するといった相矛盾する結果が得られている。従って、エチレンのポリアミン合成に与える影響は調べられた植物種、器官、発達段階により、異なるものと考えられている。

オオムギにおいて、エチレンがポリアミン合成にどのような影響を与えるかについては不明であったが、我々はエチレンによってプトレシンの蓄積が誘導されることを明らかとした。そこで、本章では、人為的にプトレシンを蓄積させる一手段として、ACC (1-アミノシクロプロパン-1-カルボン酸) 供与によりエチレン合成を誘導して、プトレシンがカリウム濃度の制御因子として働きうる可能性について検討した。

第二節 実験方法

植物材料

オオムギ (*Hordeum vulgare* L. cv. Amagi) 種子は1% (v/v) 次亜塩素酸ナトリウム溶液で30分間殺菌した後、脱塩水で数回洗浄した。次に、種子を湿らせた濾紙上に播き、暗所25°Cで24時間発芽させた。その後種子をサランネット上に移し、暗所25°Cで脱塩水で生育させた。24時間後に脱塩水を培養液 (10 mM MES-Tris pH 6.0, 0.5 mM CaSO₄, ±0.1 mM ACC) に交換し、通気しながら暗所25°Cで生育させた。培養液交換後0、2、4、6日後に地上部、根部、種子を採取し、エチレン、カリウム、ポリアミン量の定量を行った。プトレシン、コバルトの影響を調べるためには、培養液の組成を10 mM MES-Tris pH 6.0, 0.5 mM CaSO₄, 1 mM putrescine-HCl または0.1 mM ACC, 50 μM CoSO₄ とした。

エチレンの定量

切断根を15-mLの試験管に入れ、ゴム栓をして室温でインキュベートした。2時間後、その試験管から1 mLの空気を抜き取りガスクロマトグラフィー (model GC-9A; Shimadzu, Kyoto, Japan) に供した。検出器はflame ionization detector、カラムは60°Cで Porapak glass column (2 m, 3/bin, 50/80 mesh; Waters Associates, Inc., Tokyo, Japan) を使用した。

カリウムの定量

新鮮重を測定した後、根部、地上部、種子は500℃、24時間で灰化させた。それぞれの灰化試料は20 mLの脱塩水に溶解させた後、HPLC (model HIC-6A; Shimadzu, Kyoto, Japan) によりカリウム量を測定した。検出器は電気伝導度検出器、カラムはTSKgel IC-Cation column (4.6 mm id × 5 cm; Tosoh, Tokyo, Japan) を使用し、カラム温度は35℃、溶媒は5 mM HNO₃、流速は1.0 mL/minで行った。

ポリアミンの定量

ポリアミン定量のためのダンシル化及びTLCはFlores and Galston (1982) の方法に従った。植物試料を10倍量の5% (v/v) 過塩素酸で抽出し、その抽出液を12000 gで15分間遠心分離し上清を得た。200 μLの上清に400 μLのダンシルクロライド (5 mg mL⁻¹ acetone) と200 μLの飽和炭酸ナトリウムを加え、暗所で一晩静置した。過剰のダンシルクロライドを取り除くために、100 μLのプロリン (0.1 g mL⁻¹) を加え30分間静置した。ダンシル化されたポリアミンはボルテックスすることによりベンゼン (500 μL) に回収した。2層に分離した後ベンゼン層50 μLをTLCプレートのLK6D silica gel 60 (Whatman, Inc., Clifton, NJ, USA) にのせ、展開溶媒 (クロロホルム : トリエチルアミン; 25:2, v/v) 中で約1時間展開させた。展開終了後プレートを乾かし、UV照射によりダンシル化されたポリアミンを可視化して、目的のスポットを切り出した。その粉末を2 mLの酢酸エチルと混和し、ダンシル化されたポリアミンを酢酸エチルに溶出して蛍光光度計 (model FP-770; Japan Spectroscopic Co., Ltd., Tokyo, Japan) により蛍光度を測定した。励起波長は395 nm、発光波長は450 nmとした。

カリウム吸収量の測定

幼植物の根を脱塩水で数回洗浄し、40 mLの吸収溶液（0.5 mM CaSO₄, 50 μM K₂SO₄）に移した。25°Cで60分間インキュベートした後、幼植物を吸収溶液から取り出すことにより吸収を終了させ、根部を切断し新鮮重を測定した。カリウム吸収速度はカリウム吸収前後の吸収溶液中のカリウム量の差から計算した。吸収溶液中のカリウム量は上述したのと同様にHPLCにより求めた。

第三節 実験結果

ACC供与によるエチレン生成量、新鮮重、ポリアミンとカリウム含量の影響

ACCはエチレンの前駆体であり、ACCをエチレンに変換する酵素であるACCオキシダーゼは構成的に発現していると考えられているため、一般的にACCを供与するとエチレン生成量は増加する。そのため、根部において内生的エチレンを増加させるために、培養液にACCを添加する手段を選んだ。

培養液にACCを添加することにより、確かに根部におけるエチレンの生成は誘導された（第2図）。処理2日後にエチレン生成量は最大となり、コントロールの約2.5倍となった。エチレン生成量の測定には切断根を用いたために、傷害によってある程度エチレン合成は誘導されるたことが考えられた。従って、インタクトな根部においては、エチレン生成量の差はさらに大きいものと考えられた。

ACC供与により、根部の新鮮重の増加は著しく阻害されたが、地上部の新鮮重はあまり影響を受けなかった（第3図）。根部は、コントロールでは処理後

4日以降も成長を続けたが、ACC処理により、成長が停止した。

根部において、エチレンがポリアミン合成に与える影響を調べた。ACC供与により、スペルミジン、スペルミンは処理日数と共に徐々に減少したものの、コントロールと比べて変化はなかったが、プトレシンの蓄積は誘導されることが明らかとなった（第4図）。

カリウム濃度はACC処理により、根部では著しく減少したが、逆に地上部では増加した（第5図）。根部の新鮮重の差から考えると、根部の全カリウム含量は劇的に減少することが分かった。

根部におけるプトレシンとカリウム濃度の相関関係

このエチレン処理による根部のカリウム濃度の減少は、エチレンにより蓄積が誘導されたプトレシンの影響であるかどうかを確かめるために、培養液にプトレシンを添加し、プトレシン濃度とカリウム濃度を調べた。プトレシン供与により、根部にプトレシンは蓄積し、同時にカリウム濃度も低下した（第6図）。

根部において、プトレシンとカリウム濃度の相関関係を明らかにするために、ACC、プトレシン、様々な濃度のカリウムを供与した根部を用い、プトレシンとカリウムの定量を行った。根部において、プトレシン濃度とカリウム濃度の間には明らかな相関関係が存在した（第7図）。プトレシン濃度を対数に変換すると、直線的関係が得られた。

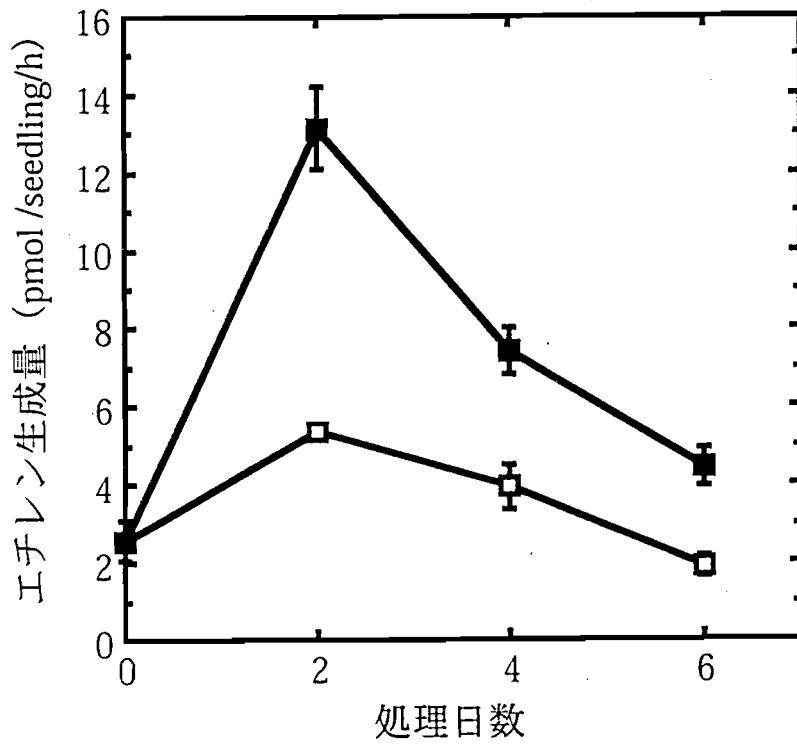
ACC共存下、非共存下におけるコバルトのプトレシン、カリウム濃度への影響

コバルトはエチレン生合成の阻害剤であり、ACCからエチレンの変換を阻害する。ACCと同時にコバルトを供与すると、プトレシンの蓄積とカリウム濃度

の低下は抑制された（第8図）。しかし、コバルト単独ではプトレシンとカリウム濃度に影響は与えなかった。これは、コバルトは外向き整流カリウムチャンネルの活性を阻害しないことを意味する。これらのことは、根部においてACCから生成されたエチレンがプトレシンの蓄積を誘導し、カリウム濃度を制御したことを示している。

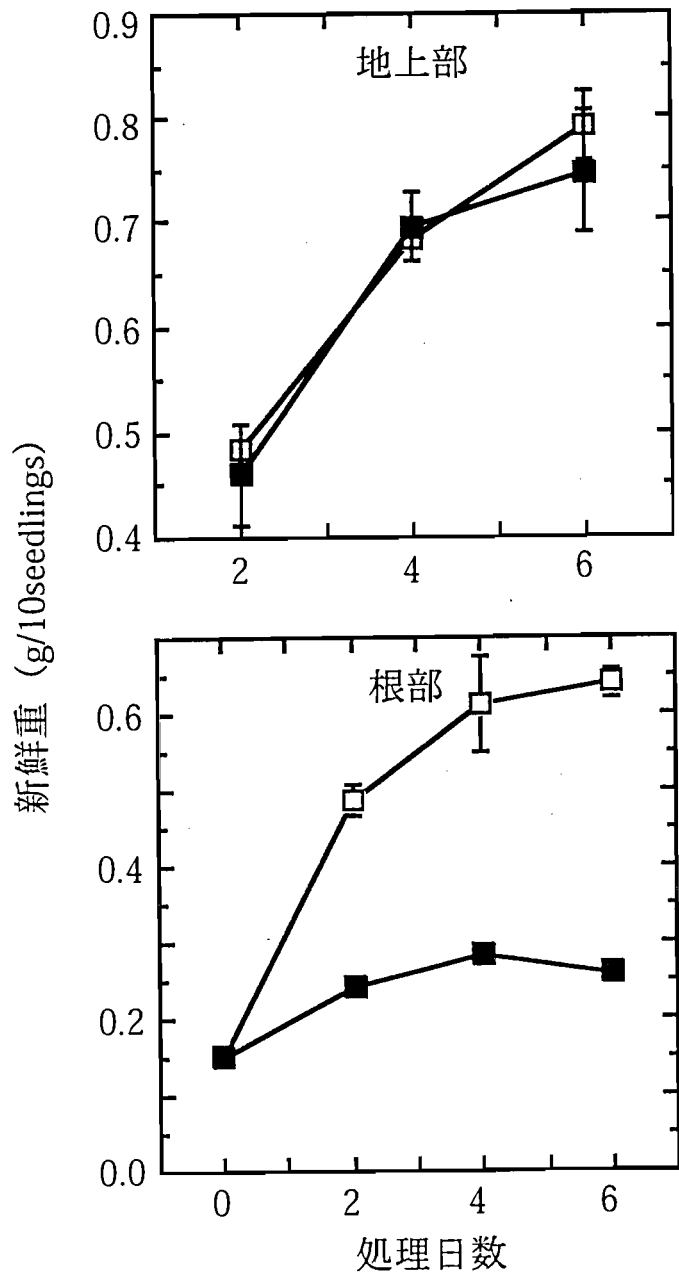
ACC処理根によるカリウム吸収

カリウム吸収速度はACC処理された根とコントロールの根での差はなかった（第9図）。この時、種子中にカリウムは存在しなかったため（データは示していない）、ACC処理により根部のカリウム濃度が低下するのは、種子からのカリウム輸送量が減少するためでもなく、根部からカリウムの放出が生じるためでもなくて、地上部に輸送されるためであることが明らかとなった。



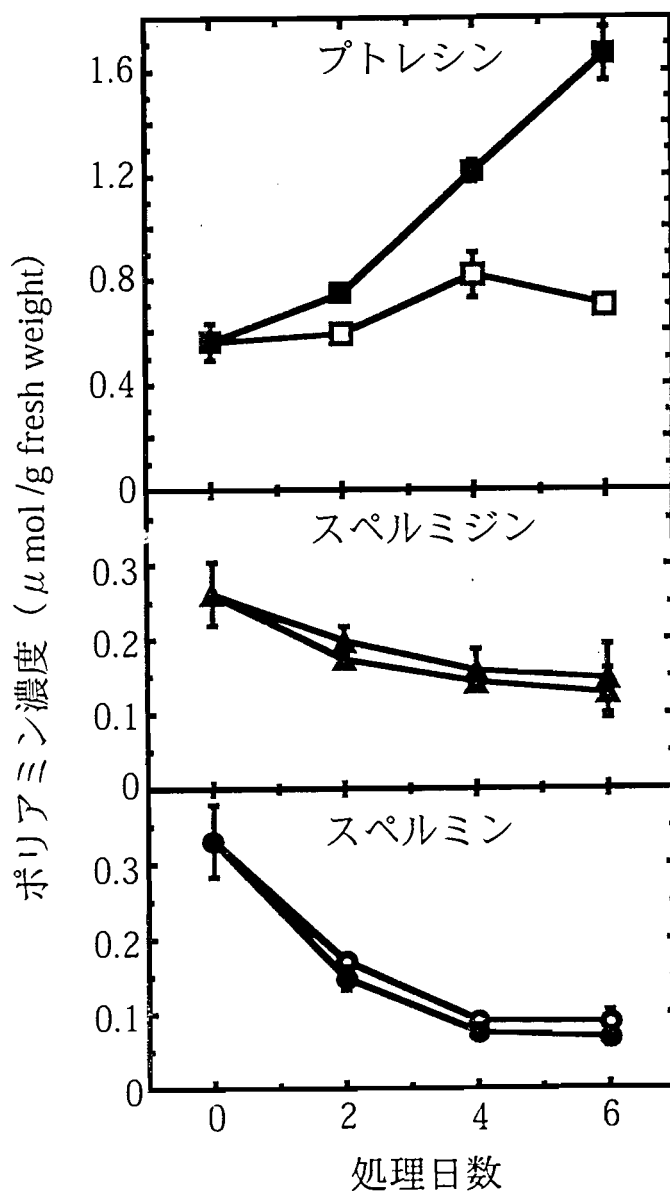
第2図 根部のACC供与によるエチレン生成量の変化

□ コントロール
 ■ +0.1 mM ACC



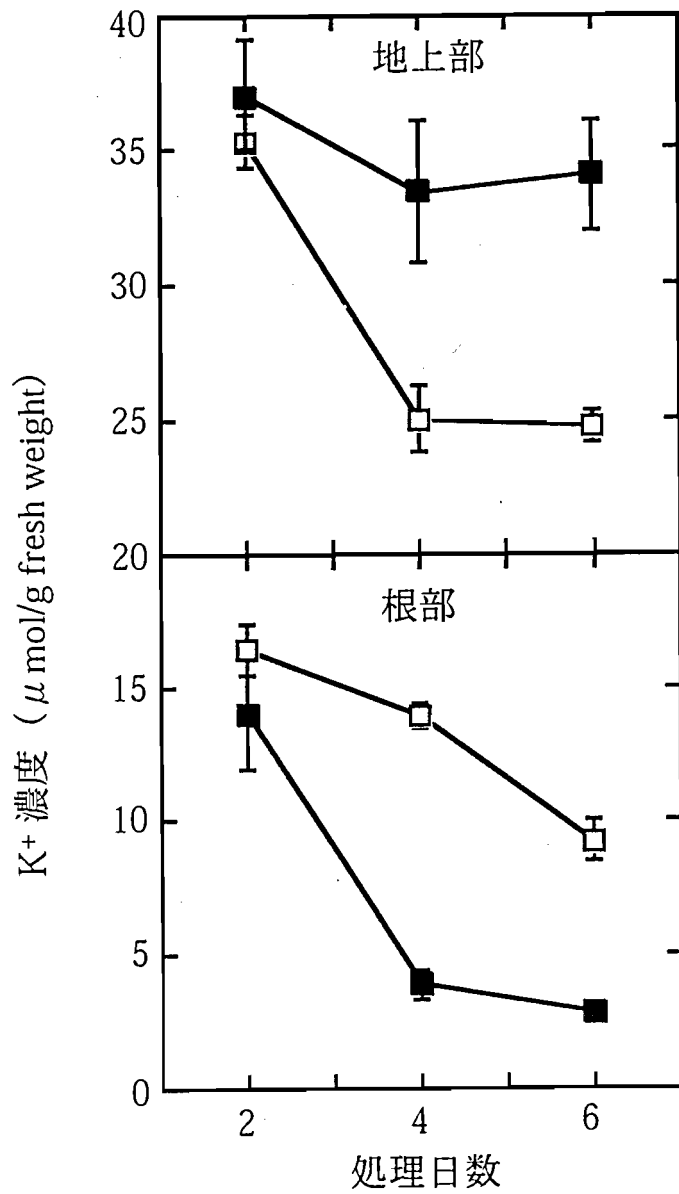
第3図 ACC供与の地上部、根部の新鮮重に与える影響

□ コントロール
 ■ +0.1 mM ACC



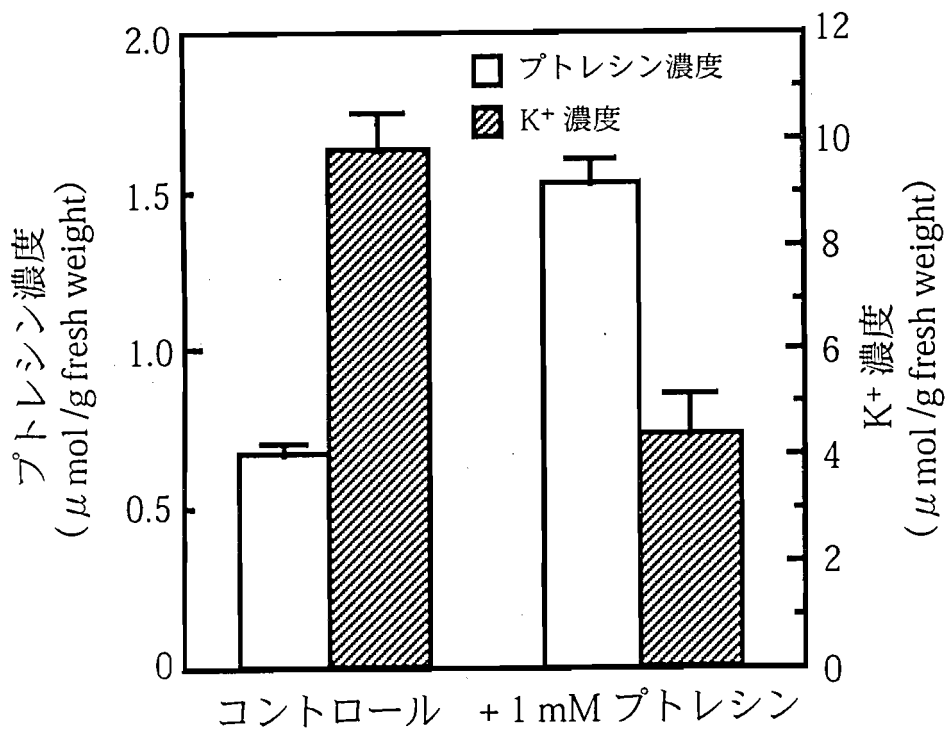
第4図 ACC供与による根部のポリアミン濃度の変化

□—△—○ コントロール
 ■—▲—● +0.1 mM ACC

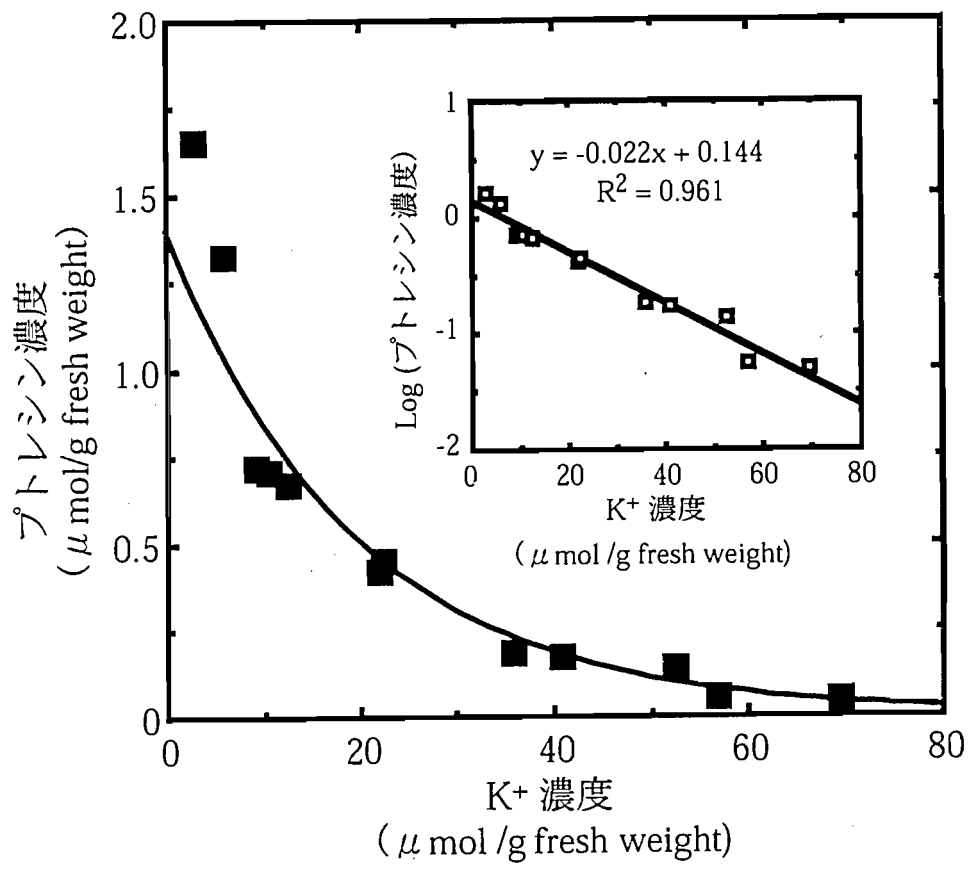


第5図 ACC供与の地上部、根部のカリウム濃度に与える影響

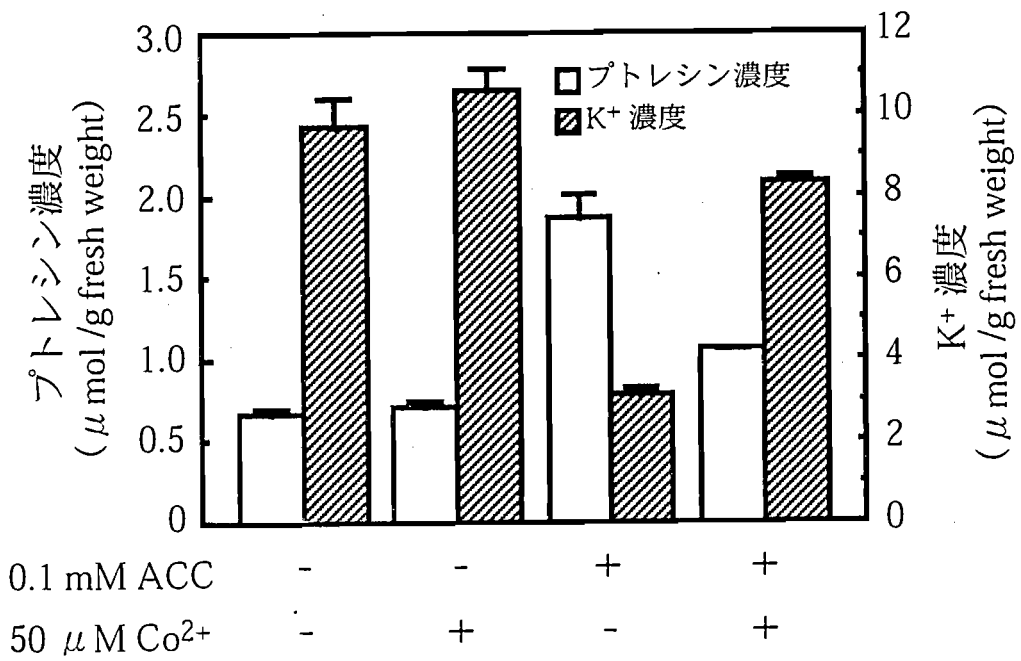
—□— コントロール
 —■— +0.1 mM ACC



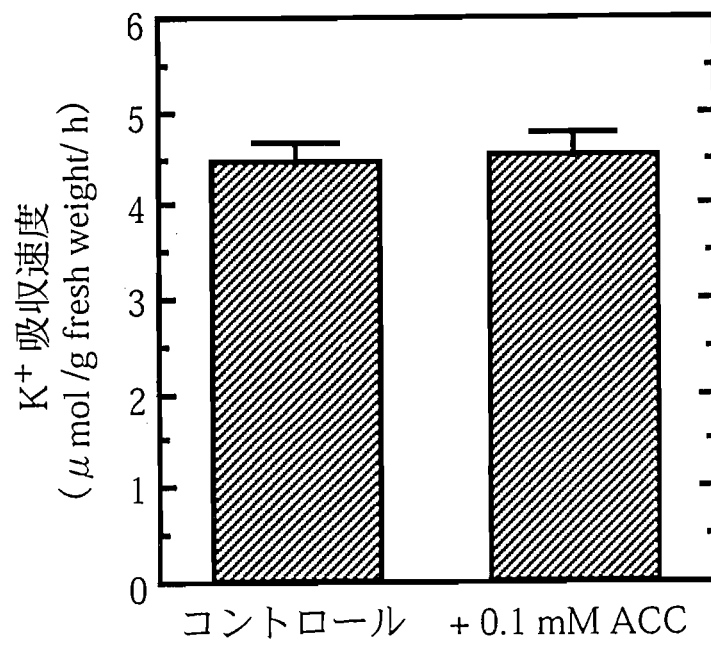
第6図 プロレシン供与による根部のカリウム濃度、プロレシン濃度の変化



第7図 根部におけるプロレシン濃度とカリウム濃度の相関関係



第8図 ACC共存下、非共存下におけるコバルトの
 根部のプロレシン濃度、カリウム濃度を与える影響



第9図 ACC処理根とコントロール根におけるカリウム吸収速度の比較

吸収溶液のカリウム濃度は100μMとした。

第四節 考察

エチレンのポリアミン含量に与える影響は、植物種や器官、発達段階によって大きく異なる。つまり、エンドウの幼植物においては、エチレンがプトレシン合成の律速酵素であるアルギニンデカルボキシラーゼ（ADC）を阻害し（Apelbaum et al. 1985）、ダイズ葉ではポリアミン合成に影響は与えず（Turano et al. 1997）、また、イネの子葉鞘ではプトレシンの蓄積を誘導する（Lee and Chu 1992）。一方、ポリアミン供与によっては、ダイズ葉（Pennazio and Roggero 1990）やイネ葉（Lutts et al. 1996）ではエチレンの生成を促進し、ダイズの胚軸では阻害する（Suttle 1981）。オオムギにおいては、ACC供与はスベルミジンやスベルミンには影響を与えず、プトレシン蓄積を誘導することが明らかとなった（第4図）。また、ACCと同時にコバルトを供与するとプトレシンの蓄積は認められなかったため（第8図）、ACCや他の因子がプトレシンの蓄積を誘導したのではなく、ACCから変換されたエチレン自身がプトレシンの蓄積を誘導することが確かめられた。しかし、エチレンがどのような機構でプトレシンの蓄積を誘導するのかについては明らかではないが、おそらく、イネの子葉鞘と同様にエチレンがADCを活性化することによって行われるのであろう（Lee and Chu 1992）。

以前から、カリウムの栄養状態がプトレシン含量に影響を及ぼすことは知られていた（Young and Galston 1984, Sarjala et al. 1997, Reggiani et al. 1993）。オオムギの根部においても、プトレシン濃度とカリウム濃度との間には負の相関関係が存在していた（第7図）。一般的に、プトレシン含量はカリウム含量によって決定されると考えられてきた。つまり、カリウムは細胞内の主なカチオンであるため、その濃度が増加すると同じカチオンであるプトレシンの濃度が低下し、カリウム欠乏条件下では、細胞内の電荷バランスを維持するためにプトレシンの濃度が高まるとされてきた。しかし、本研究において、ACC供与によりプトレシンの蓄積が誘導され、同時にカリウム濃度が低下すること（第

4, 5 図)、プトレシン供与によりプトレシンが蓄積し、カリウム濃度が減少すること(第6 図)を見いだした。また、ACCとコバルトを同時に供与すると、プトレシンの蓄積誘導と、カリウム濃度の低下が抑制された(第8 図)。これらのことは、プトレシンがカリウムの補助的機能を有しているだけではなく、カリウム濃度の制御因子として機能していることを示すものである。

第7 図に見られるように、プトレシン濃度はカリウム濃度に比べ非常に低く、そのためプトレシンがカリウムの電気的アナログとしてカリウム濃度を抑制できるようには思えない。最近、プトレシンが生理的濃度で液胞へのカリウムの輸送を阻害することが報告された(Bruggerman et al. 1998, Dobrovinskaya et al. 1999)。もし、この現象がオオムギの根部にも当てはまるのであれば、エチレンによって蓄積が誘導されたプトレシンによって、細胞内のカリウム濃度を制御することが十分可能である。

また、本実験の結果は根部でのプトレシンの蓄積を通して、カリウムの分配が制御されることも示している(第5 図)。導管柔細胞の外向き整流カリウムチャンネルは地上部へのカリウムの輸送において重要な役割を担っていると考えられている。その外向き整流カリウムチャンネルは原形質膜の脱分極やカルシウム濃度の上昇によって活性化される(Wegner and De Boer 1997)。プトレシンが容易に導管柔細胞に蓄積することができるなら、プトレシンが原形質膜を脱分極し(DiTommaso et al. 1989)、外向き整流カリウムチャンネルを活性化して、導管へのカリウムの放出を促進し、地上部への輸送を活発にしていることが考えられる。

プトレシンはRNase(Altman 1982)、プロテアーゼ(Kaur-Sawhney et al. 1982)、パーオキシダーゼ(Srivastava and Rajbabu 1983a)の阻害、ATPase(Srivastava and Rajbabu 1983b, Reggiani et al. 1992)やプロテインキナーゼ(Veluthambi and Poovaiah 1984, Datta et al. 1987)の活性化、活性酸素の消去(Drolet et al. 1986)、膜の強化(Roberts et al. 1986)といった機能を有していると考えられている。本研究の結果は、カリウム濃度やカリウム分配の制御というプトレシンの新たな機能の存在を明らかにするものである。

第二章 カリウム供与によるプトレシン減少機構について

第一節 緒言

前章において、プトレシンは細胞内のカリウム濃度の制御因子として機能しうることを明らかとした。このことは、カリウム吸収時においては細胞内のプトレシンがカリウム蓄積にとって阻害因子となりうることを意味している。つまり、速やかなカリウムの取り込みを実現させるためには、同時に速やかなプトレシン濃度の減少が要求される。実際、カリウム供与によるプトレシン濃度の減少は、植物の確立した生理的応答として認識されている (Young and Galsotn 1984, Reggiani et al. 1993)。ところが、このカリウム供与によるプトレシン濃度減少機構について研究された例は少ない。

Reggianiら (1993) は、コムギ幼植物においてカリウム供与により、プトレシンの生合成が阻害され、スペルミジンや他のポリアミンへの変換、あるいは代謝が促進されることを報告した。しかし、これらのことだけにより、カリウム供与による劇的なプトレシン濃度の減少を説明するには不十分であると思われる、より主要なプトレシン減少機構が存在するのではないかと考えた。

そこで、本章では、細胞内でのカリウムの蓄積にとって重要であると考えられる、カリウム吸収時のプトレシン減少機構を解明することを目的として実験を行った。カリウム供与時のプトレシン生合成の阻害という因子を除き、より単純化したモデル実験を行うために、予めプトレシン供与によりプトレシンを蓄積させたオオムギ幼植物を試料として用いた。我々は、次のような減少機構の可能性について検討した。1, 根部において、遊離型プトレシンが遊離型スペルミジン、スペルミンやその他の結合型ポリアミンに変換される。2, 遊離型プトレシンが地上部に輸送される、あるいはそこで他のポリアミンに変換される。3, 根部の細胞内からアポプラスとに放出される。4, ジアミンオキ

シダーゼ (DAO) により代謝される。以上のすべてについて検証し、カリウム
供与による主たるプトレシン減少機構を明らかにしようと試みた。

第二節 実験方法

植物材料

オオムギ (*Hordeum vulgare* L. cv. Amagi) 種子は1% (v/v) 次亜塩素酸ナトリウム溶液で30分間殺菌した後、脱塩水で数回洗浄した。次に、種子を湿らせた濾紙上に播き、暗所25℃で24時間発芽させた。その後種子をサランネット上に移し、暗所25℃で脱塩水で生育させた。24時間後に脱塩水をプトレシンを含む培養液 (10 mM MES-Tris pH 6.0, 0.5 mM CaSO₄, 1 mM putrescine-HCl) に交換し、通気しながら暗所25℃で生育させた。播種後6日目の幼植物を培養液 (10 mM MES-Tris pH 6.0, 0.5 mM CaSO₄, ±5 mM K₂SO₄) に移し、暗所25℃で通気した。0、2、4、8、12、24時間ごとに根部、地上部を採取し、ポリアミン、カリウムの定量、DAO活性の測定を行った。

プトレシン放出実験では、プトレシンを与えずに播種後6日目まで生育させ、¹⁴C-プトレシンを24時間与えてインキュベートし、その後¹⁴C-プトレシンの放出を測定した (下記参照)。

遊離型、酸可溶結合型、酸不溶結合型ポリアミンの抽出及び定量

遊離型、酸可溶結合型、酸不溶結合型ポリアミンのダンシル化及びTLCは

塩素酸で抽出し、その抽出液を12000 gで15分間遠心分離した。その沈殿を抽出液と等量の1 N NaOHに溶解したものと上清のそれぞれ200 μ Lに12 N HClを200 μ L加え、試験管に入れ真空にし封管した。110°Cで12時間加水分解した後、乾燥させ200 μ Lの5% (v/v) 過塩素酸に再溶解させた。加水分解していない上清（遊離型ポリアミンを含む）、加水分解した上清（遊離型ポリアミンと酸可溶遊離型ポリアミンを含む）、加水分解した沈殿（酸不溶結合型ポリアミンを含む）それぞれ200 μ Lに400 μ Lのダンシルクロライド（5 mg mL⁻¹ acetone）と200 μ Lの飽和炭酸ナトリウムを加え、暗所で一晩静置した。過剰のダンシルクロライドを取り除くために、100 μ Lのプロリン（0.1 g mL⁻¹）を加え30分間静置した。ダンシル化されたポリアミンはボルテックスすることによりベンゼン（500 μ L）に回収した。2層に分離した後、ベンゼン層50 μ LをTLCプレートのLK6D silica gel 60（Whatman, Inc., Clifton, NJ, USA）にのせ、展開溶媒（クロロホルム：トリエチルアミン; 25:2, v/v）中で約1時間展開させた。展開終了後プレートを乾かし、UV照射によりダンシル化されたポリアミンを可視化して、目的のスポットを切り出した。その粉末を2 mLの酢酸エチルと混和し、ダンシル化されたポリアミンを酢酸エチルに溶出して蛍光光度計（model FP-770; Japan Spectroscopic Co., Ltd., Tokyo, Japan）により蛍光度を測定した。励起波長は395 nm、発光波長は450 nmとした。

酸可溶結合型ポリアミンは加水分解した上清中のポリアミン含量から加水分解していない上清中のポリアミン含量を差し引くことにより求めた。

プトレシン放出の測定

プトレシンを含まない培養液（10 mM MES-Tris pH 6.0, 0.5 mM CaSO₄）で5日間生育させた幼植物10個体を14 mLのプトレシン吸収溶液（10 mM MES-Tris pH6.0, 0.5 mM CaSO₄, 1 mM putrescine-HCl, 37 kBq [¹⁴C]putrescine-HCl（4.07

GBq/mmol, American radiolabeled chemicals, Inc., MO, USA)) に移し、通気しながら暗所でインキュベートした。24時間後幼植物の根部を脱塩水で手早く洗浄した。アポプラストに存在する¹⁴C-プトレシンを除くために、幼植物の根部を50 mLの氷冷した脱吸着溶液 (10 mM putrescine-HCl, 0.5 mM CaSO₄) 中で40秒間インキュベートし、続いて脱塩水で手早く洗浄した。アポプラストの¹⁴C-プトレシンを除いた幼植物を放射能分配測定とプトレシン放出測定に用いた。

放射能の分配を測定するために根部を5%過塩素酸で抽出した (上記参照)。遠心分離後の沈殿は5%過塩素酸で2回洗浄した後、5%過塩素酸で元の液量に再懸濁した。200 μLの上清と再懸濁した沈殿をそれぞれ10mLのシンチゾールEX-H (Dojindo, Kumamoto, Japan) と混和し、LSC (model LSC-5100; Aloka, Tokyo, Japan) で放射能を測定した。上清は上記のようにダンシル化した。ダンシル化されたポリアミンを含む有機溶媒層とプトレシンの代謝産物を含む水層のそれぞれ200 μLを10mLのシンチゾールEX-Hと混和し、LSCで放射能を測定した。有機溶媒層中のダンシル化されたポリアミンはTLC (上記参照) により分離した。100 μLの有機溶媒層をプレートにのせ、展開させ乾かせた後、バス2000システム (Fujifilm, Tokyo, Japan) によりオートラジオグラフィを行った。

放出実験では10個体の幼植物を5個体ずつに分け、ゴム管を接続したガラス管 (7 mm i.d. × 10 cm) に移した。ゴム管をクリップで止め、4mLの放出溶液 (10 mM MES-Tris pH 6.0, 0.5 mM CaSO₄ ± 5 or 50 mM K₂SO₄) をガラス管に加え、室温で放出を開始させた。目的時間ごとにクリップを開いて放出溶液を回収し、新しい放出溶液を加えた。回収した放出溶液1mLを10mLのシンチゾールEX-Hと混和し、LSCで放射能を測定した。

DAO活性測定

DAO活性は¹⁴C-プトレシンから¹⁴C-ピロリンの生成を測定するTorrighianiら（1989）の方法を改良して行った。植物試料は抽出バッファー（0.1 M K⁺-phosphate pH 8.0, 2 mM DTT）で2倍抽出し、その抽出液250 μLを反応液（0.1 M K⁺-phosphate pH 8.0, 2 mM DTT, 7.4 kBq [¹⁴C]putrescine-HCl, 1 mM putrescine-HCl）250 μLに加え反応を開始させた。反応時間は1時間、温度は37℃とした。インキュベートの後、100 μLの飽和炭酸水素ナトリウムを加えて混和した。速やかに1.4 mLのトルエンを加えヴォルテックスし、¹⁴C-ピロリンをトルエンに溶解させた。12000gで5分間遠心分離した後、1 mLのトルエンを10 mLのシンチゾールEX-Hと混和し、LSCで放射能を測定した。DAO活性は少なくとも2時間までは直線的であった。

第三節 実験結果

カリウム供与による遊離型プトレシンの変化

カリウム供与（10 mM）により、根部にカリウムは速やかに蓄積し、遊離型プトレシン濃度は時間とともに低下した（第10図）。DiTomasoら（1989）は、プトレシン供与により膜電位の脱分極やカリウムの著しい放出といった傷害を生じると報告している。我々は、プトレシンを蓄積させるために培養液に1 mMのプトレシンを添加したが、プトレシン添加後4日目においても正常なカリウム吸収が認められた。このことは、用いたオオムギ幼植物は傷害を受けていないことを示している。カリウムを供与しなくても、若干の遊離型プトレシン

の減少も見られたが、これは、人為的にプトレシンを蓄積させたために、カリウムとの平衡状態を保とうとプトレシンを減少させる機構が働いているものと考えられた。

根部、地上部におけるカリウム供与による遊離型、酸可溶結合型、酸不溶結合型ポリアミンの変化

カリウム供与による遊離型プトレシンの減少が、他のポリアミンに変換されるためである可能性について検証した。根部においてカリウム供与により、遊離型プトレシンは減少したが、遊離型スペルミジン、スペルミンは変化しなかった（第11図、上）。主に桂皮酸類と共有結合している酸可溶結合型ポリアミン、及びある種のタンパク質や細胞壁と共有結合している酸不溶結合型ポリアミンの変化も同様なパターンを示した（第11図、中、下）。しかし、酸可溶結合型スペルミンは検出されなかった。これらの結果は、カリウム供与により、根部において遊離型プトレシンは遊離型スペルミジン、スペルミンに変換されるのではなく、結合型ポリアミンに変換されることもないことが示された。

地上部においても根部と同様に、カリウム供与により遊離型プトレシンの減少が認められたが、遊離型スペルミジン、スペルミンは変化しなかった（第12図、上）。また、遊離型プトレシンが速やかに結合型に変換されることは認められなかった（第12図、中、下）。これらのことより、根部においてカリウム供与により遊離型プトレシンが減少するは、根部から地上部に輸送されるためではなく、また、輸送された後に直ちに他のポリアミンに変換されるためでもないことが明らかとなった。Reggianiら（1993）はカリウム供与によって、根部と地上部において¹⁴C-プトレシンのスペルミジンへの変換が促進されることを報告しているが、我々の結果は、もしあるとしても、この変換はカリウム供与によるプトレシン減少の主な経路ではないことを示唆する。

カリウム供与によるプトレシン減少におけるプトレシン放出とDAO活性の関与

カリウム供与によるプトレシン減少に、根部におけるプトレシン放出が関与しているかどうかについて検証した。タバコの根にはプトレシンを基質とし、ニコチンの前駆体を生成する酵素が存在するが (Hibi et al. 1994)、オオムギ根には、そのシンプラストにプトレシンをスペルミジンに変換するスペルミジンシンターゼ以外、プトレシンを代謝する酵素は存在しない。スペルミジンシンターゼはこのプトレシンの減少に関係していなかった (第11, 12図)。プトレシンを酸化して、ピロリン、過酸化水素、アンモニアを生成するDAOは細胞壁に存在することが知られている (Federico et al. 1985, Angelini et al. 1990)。従って、プトレシンは分解されるためには細胞質からアポプラストに放出される必要がある。

細胞質から¹⁴C-プトレシンの放出を測定するためには、アポプラストの¹⁴C-プトレシンを取り除く必要がある。第13図に示すように、氷冷した脱吸着溶液で40秒間のインキュベートすることにより、アポプラストの¹⁴C-プトレシンを効果的に取り除くことができた。よって、プトレシン放出実験は40秒間脱吸着溶液でインキュベートした後に行うことにした。

24時間¹⁴C-プトレシンを吸収させ、アポプラストの¹⁴C-プトレシンを取り除いた後、放射能は抽出液の上清と沈殿にそれぞれ91.1%、8.9%回収された (第1表)。ダンシル化した後、ダンシル化ポリアミンや疎水性物質を含む有機溶媒層に放射能は放出される放射能のうち71.6%が回収され、プトレシン代謝産物を含む水層には28.4%回収された。さらには、有機溶媒層をTLCに供し、その後オートラジオグラフィーに供した結果、有機溶媒層の放射性物質はプトレシンのみであることが明らかとなった (第14図)。これらのことより、根部において放射性物質はプトレシンが優位であることが確認できた。

第1表 ^{14}C -プトレシン供与後における根部の放射能の分配

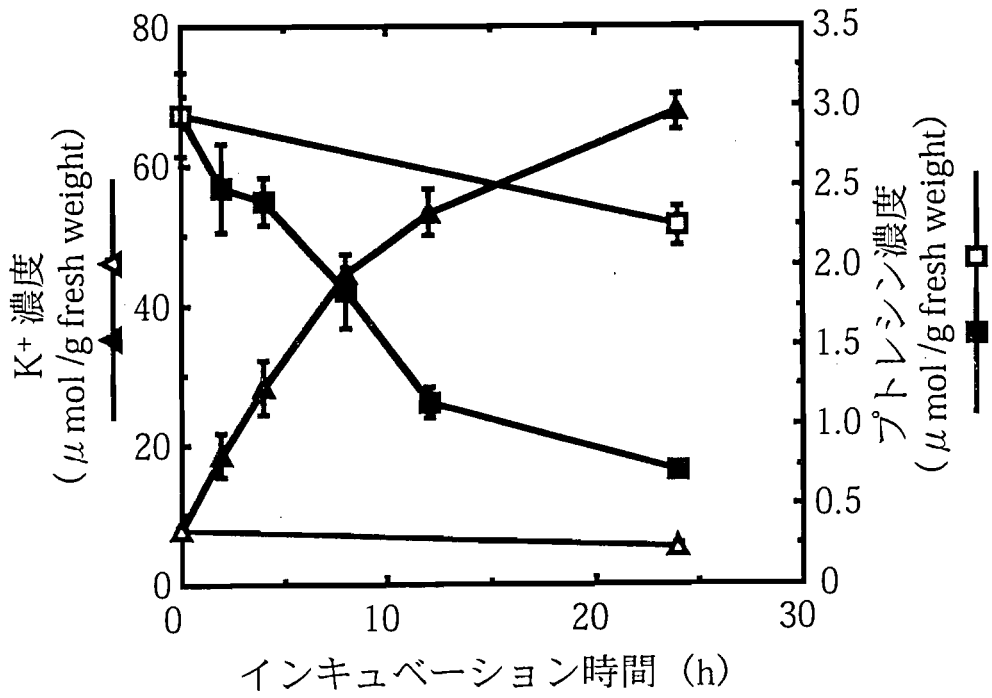
画分	放射能 (%)
上清	91.1 \pm 0.55
有機溶媒層	71.6 \pm 1.55
水層	28.4 \pm 1.55
沈殿	8.9 \pm 0.55

a 上清画分と沈殿画分の全放射能を100とした。

b 上清画分の全放射能を100とした。

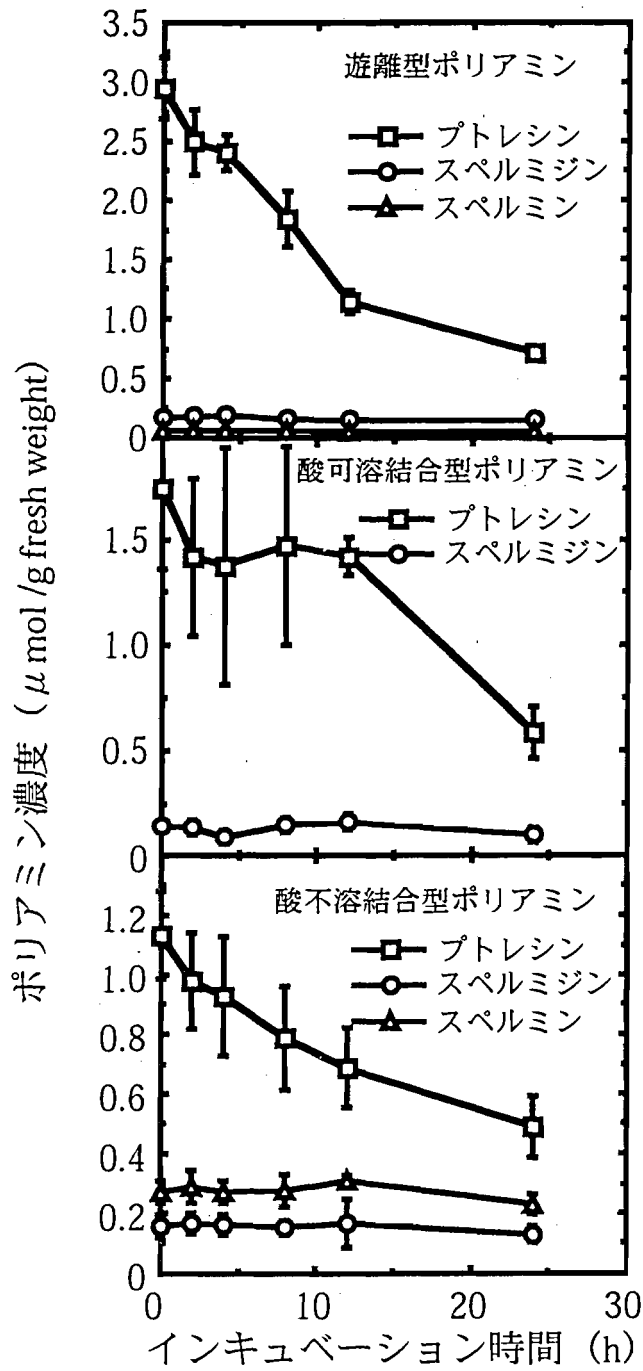
カリウム供与はインタクトな根からのプトレシンの放出を促進した (第15図)。しかしながら、カリウムが存在していなくてもプトレシンの放出が認められた。これは、第10図に見られるように、カリウム非供与下においてもプトレシンが減少したと一致している。

カリウム供与によりDAO活性に顕著な変化は見られなかった (第16図)。現在まで、プトレシンのレベルは合成と分解のみに依存していると考えられてきた。しかし、我々の結果は、オオムギの根においてはプトレシンの放出がカリウム供与によるプトレシンの減少に関係していることを明らかとした。

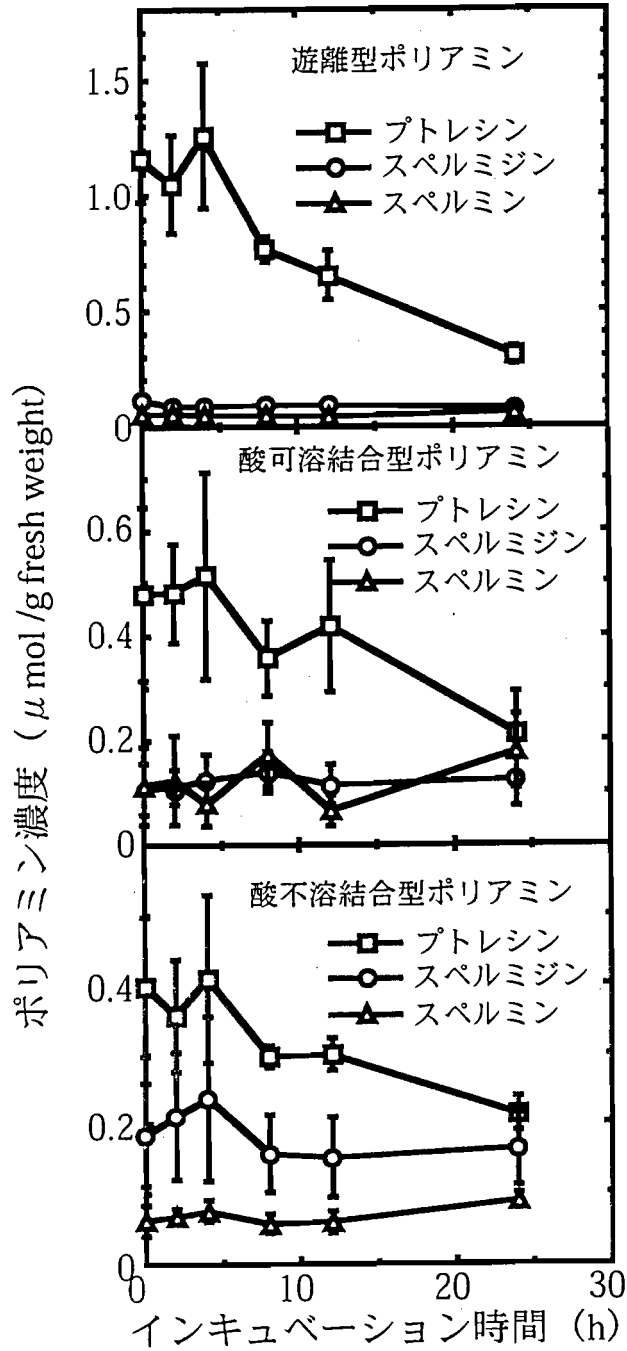


第10図 カリウム供与による根部のカリウム濃度、遊離型フトレシン濃度の変化

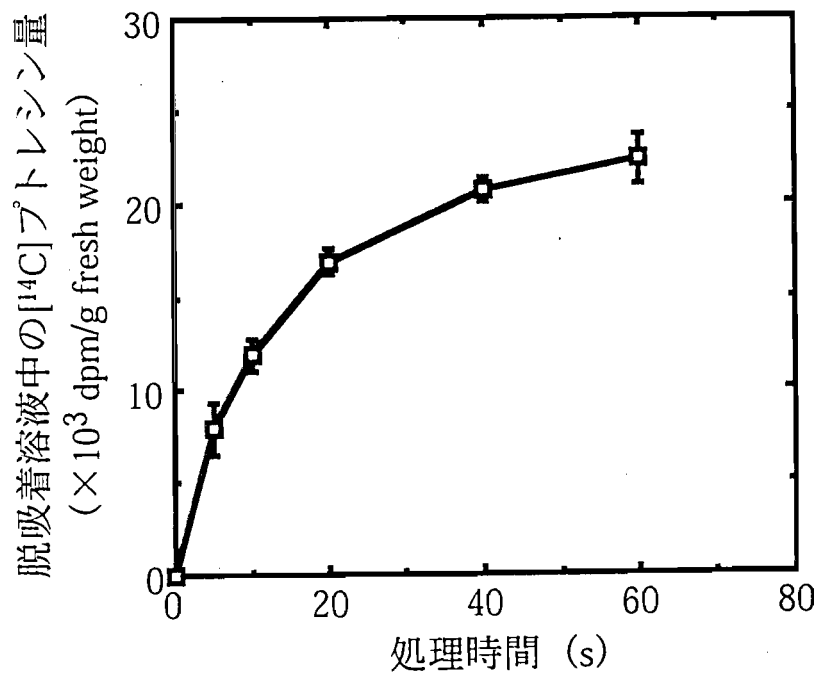
—□—△— コントロール
 —■—▲— +10 mM K⁺



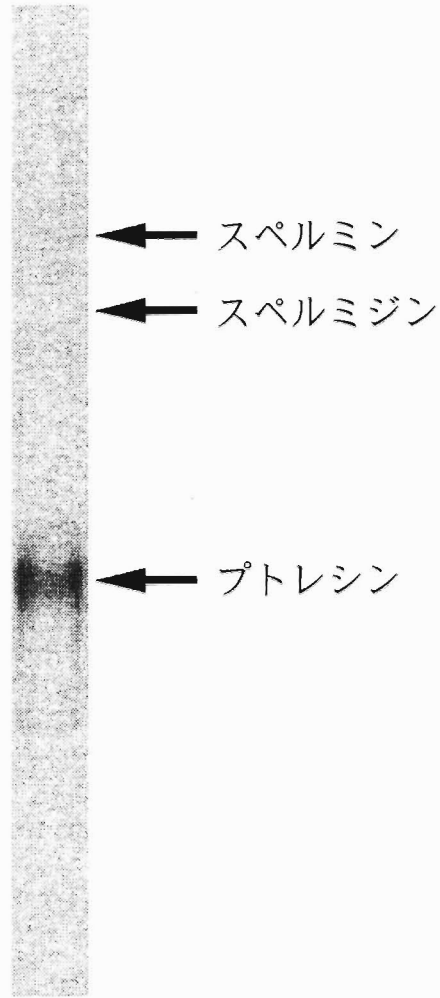
第 1 1 図 カリウム供与による根部の遊離型、酸可溶結合型、酸不溶結合型ポリアミン濃度の変化



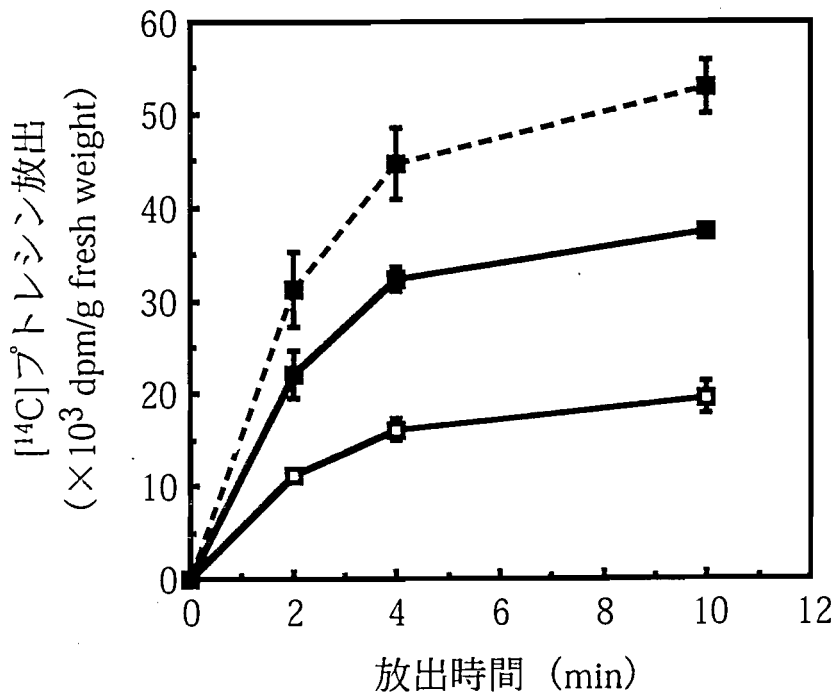
第12図 カリウム供与による地上部の遊離型、酸可溶結合型、酸不溶結合型ポリアミン濃度の変化



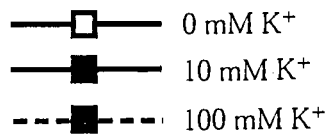
第 1 3 図 氷冷した脱吸着溶液中の $[^{14}\text{C}]$ プロトレシン量の変化

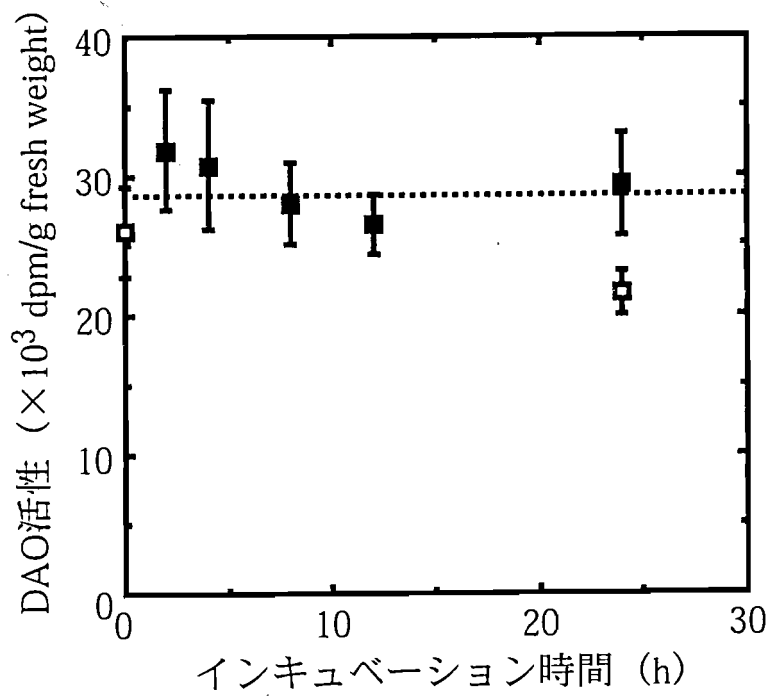


第14図 ^{14}C 後のダンシル化された ^{14}C アミンのオートラジオグラフィー



第 15 図 カリウム存在下、非存在下における [14C]プロトレシン放出





第16図 カリウム供与のDAO活性に与える影響

- コントロール
- +10 mM K⁺

第四節 考察

プトレシン濃度制御において、カリウム濃度に応答した合成による制御は盛んに研究されているが (Young and Golston 1984, Watson and Malmberg 1996)、他のポリアミンや結合同型への変換や、分解による制御については不明のままである。我々の結果は、根部、地上部においてカリウム供与が遊離型、酸可溶結合同型、酸不溶結合同型プトレシンを減少させることを示している (第 11, 12 図)。主に桂皮酸類と結合している酸可溶結合同型ポリアミンは、開花や花の発達に関係していることが示唆されているが (Martin-Tanguy 1997)、成長や環境応答における役割は明らかではない。それらは、遊離型ポリアミンの貯蔵形態である (Flores and Filner 1985)、あるいはそれ自身が特定の機能を持つことが提案されている。カリウム供与によって遊離型プトレシンと平行して酸可溶結合同型プトレシンも減少したことから、前者の提案、さらにはポリアミンと桂皮酸類との結合は遊離型ポリアミンの濃度に依存していること (Langebartels et al 1991) が支持される。一方、いくつかのポリアミン結合タンパク質が植物において同定されているが (Margosiak et al 1990, Del Duca et al. 1994, Serafini-Fracassini et al. 1995, Kang et al. 1998)、その機能は明確にされていない。ポリアミンとある種のタンパク質との共有結合は細胞骨格や細胞壁の形成に関係していることが示唆されている (Serafini-Fracassini et al. 1995)。カリウム供与によって酸不溶結合同型プトレシンが減少するため、カリウムがアクチン、チューブリンといったプトレシン結合タンパク質からプトレシンの分離を促進し、それにより細胞骨格の構造変化を起こして、細胞の膨張を行うことが示唆される。

現在まで、オオムギにおいてDAOは精製されているものの (Cogoni et al. 1990)、その活性は粗酵素抽出液では非常に低いために検出されていない。しかし、我々の放射性プトレシンを用いた方法に従えば、粗酵素抽出液において十分なDAO活性の測定が可能となった。粗酵素抽出液でのDAOの活性の検出が可

能となったことは、オオムギや他のイネ科植物におけるDAOの生理的機能の解明に役立つものと考えられる。

DAOは免疫学的あるいは生化学的手法により、主にアポプラストに存在することが知られている (Federico et al. 1985, Angelini et al. 1990)。このことは、プトレシンが分解されるためには、プトレシンがシンプラストからアポプラストに放出される必要があることを意味する。しかしながら、我々が知る限り、プトレシンの放出は動物細胞 (Tjandrawinata and Byus 1995, Xie et al. 1997) や大腸菌 (Kashiwagi et al. 1992, Tkachenko et al. 1997) においてはよく研究されているものの、植物において生理的に研究されていない。Colomboら (1992) はパッチクランプ法によってアラビドプシスの原形質膜と液胞膜にポリアミンチャンネルを発見した。彼らにより、原形質膜のポリアミンチャンネルは脱分極により活性化され、外向き整流であることが示された。オオムギの根にも同じチャンネルが存在するのであれば、カリウム供与によりプトレシン放出が促進されるのは、カリウム吸収によって誘導される原形質膜の脱分極 (Ullrich and Novacky 1990) によるのかもしれない。

前章でも述べたように、プトレシンとカリウムの相関関係において、プトレシン濃度はカリウム濃度に比べ非常に小さいため単純に互いにアナログ物質として置き変わることはないように思える。オオムギ葉肉細胞において、細胞質のプトレシンは液胞のカチオンチャンネルを阻害して、カリウムの液胞への輸送を抑制することが報告されており (Bruggemann et al. 1998)、さらには動物細胞において報告されているように (Lopatin et al. 1994)、内向き整流カリウムチャンネルを阻害して、カリウムの吸収も阻害することが考えられる。従って、根に蓄積したプトレシンは速やかなカリウム吸収のために取り除かれなければならない。また、ポリアミンを透過できるチャンネルは、電位依存性や活性化に要する時間が特異性の低いカチオンチャンネルと似ていることが示唆されている (Colombo et al. 1992)。このことが、根細胞にも当てはまるなら、プトレシンはカリウムチャンネルを通して放出され、カリウム吸収によって誘導される原形質膜の脱分極により活性化されるカリウムの放出を拮抗的に阻害す

ることも考えられ、このことによって、カリウムの迅速な吸収を可能にしているのかもしれない。この研究によって明らかとなったプトレシンの放出はカリウムの蓄積において重要な役割を果たしていることが示唆される。

植物において、プトレシン減少機構は二種類存在するように思える。一つは、カリウム吸収による原形質膜の脱分極といったある刺激により、プトレシンの放出が促進され、アポプラストでDAOにより代謝される。もう一つは、構成的なプトレシン放出システム（第15図）によりプトレシンが放出され、細胞周期（Torrighiani et al. 1989）、光条件（Angelini et al. 1988）、傷害（Angelini et al. 1990）に応答し活性化されたDAOにより酸化される。いずれにせよ、我々の結果は、植物のプトレシン濃度制御において、プトレシン放出が重要であることを強調するものである。

第三章 プトレシンによるカリウム吸収の促進について

第一節 緒言

第一章、第二章において、プトレシンはカリウム濃度の制御因子として機能し、またそのプトレシンはカリウムによって制御されるという、プトレシンとカリウムの相互制御関係を明らかにした。ところが、プトレシンとカリウムの相互関係において、プトレシンの具体的機能は不明のままである。そこで、本章では特にカリウム吸収におけるプトレシンの機能を明確にすることを試みた。

しかし、内生的プトレシンのカリウム吸収に与える影響を明らかにすることは難しいと思われた。それは、プトレシンの蓄積した根と蓄積していない根とでは、プトレシンとカリウムの相関関係から、カリウム吸収に影響を与える細胞内カリウム濃度も異なるためである。カリウム吸収速度を比較し、プトレシンの機能を推察するには、吸収開始時の細胞内カリウム濃度を統一することが絶対条件となる。よって、我々はカリウム吸収溶液中にプトレシンを共存させ、カリウム吸収速度を比較する手段を選んだ。

植物は、カリウム栄養条件に応じて二種類のトランスポーター（高親和性、低親和性トランスポーター）を使い分け、カリウムを吸収する。二種類のトランスポーターは共に二次的に原形質膜のプロトン輸送性ATPaseの影響を受ける。高親和性トランスポーターは、原形質膜のプロトン輸送性ATPaseによって形成されるプロトン勾配を利用し、プロトンとカリウムを共輸送する。低親和性トランスポーターは、原形質膜のプロトン輸送性ATPaseにより制御される膜電位差を利用し、カリウムの吸収を行う。従って、原形質膜のプロトン輸送性ATPaseはカリウム吸収において、重要な役割を担っていると考えられる（Briskin and Gawienowski 1996）。そこで、プトレシンのカリウム吸収における

機能を、原形質膜のプロトン輸送性ATPaseの活性と結びつけて考察し、プロレシンの機能を明らかにしようとした。

第二節 実験方法

植物材料

オオムギ (*Hordeum vulgare* L. cv. Amagi) 種子は1% (v/v) 次亜塩素酸ナトリウム溶液で30分間殺菌した後、脱塩水で数回洗浄した。次に、種子を湿らせた濾紙上に播き、暗所25°Cで24時間発芽させた。その後種子をサランネット上に移し、暗所25°Cで脱塩水で生育させた。24時間後に脱塩水を培養液 (10 mM MES-Tris pH 6.0, 0.5 mM CaSO₄) に交換し、通気しながら暗所25°Cで生育させた。播種後7日目の幼植物を試料として用いた。

カリウム吸収速度の測定

根部において、カリウムを吸収し始めてから少なくとも4時間後までは直線的にカリウムを蓄積し、地上部への輸送量も無視できたため、カリウム吸収速度は3時間のカリウム吸収の前後におけるカリウム含量の差から計算した。カリウム吸収は幼植物をカリウム吸収溶液 (10 mM MES-Tris pH 6.0, 0.5 mM CaSO₄, ± 10 mM putrescine-HCl, 0, 1, 2, 5, 10, 20あるいは50 mM KCl) に移すことにより開始させた。通気しながら室温で3時間インキュベートした後、根部を脱塩水で手早く3回洗浄し、切断して新鮮重を測定した。カリウム含量の定量は上述と同様に行った。

原形質膜の精製

以下の操作は全て4℃で行った。

採取した根部を二倍量の抽出用緩衝液（50 mM HEPES-Tris pH7.6, 250 mM スクロース, 50 μ M ロイパプチン, 1 mM EDTA, 1 mM DTT）で磨砕し、四層ガーゼで濾過した。濾液を12000gで15分間遠心分離し、再び上清を12000gで15分間遠心分離し、得られた上清を粗酵素画分とした。粗酵素画分を30000gで60分間遠心分離し、沈殿をテフロンホモジナイザーを用いて抽出用緩衝液で懸濁して、それをミクロソーム画分とした。ミクロソーム画分を34/46% (w/w) スクロース不連続密度勾配の上のせ、100000gで2時間遠心分離し、先を曲げたパスツールピペットを用いて34/46%の界面を回収した。それを抽出用緩衝液で希釈した後、100000gで30分間遠心分離して得られた沈殿を抽出用緩衝液で懸濁し、それを原形質膜画分とした。

VO₄³⁻-ATPase活性測定

原形質膜のマーカー酵素でもあり、原形質膜プロトン輸送性-ATPase活性と同義でもあるVO₄³⁻-ATPase活性はVO₄³⁻存在下、非存在下での発色の差から測定した。反応液は全量は500 μ Lにし、基本的な反応液の組成は終濃度で30 mM MES-Tris pH6.5, 3 mM ATP-Tris, 3 mM MgSO₄, 150 mM KCl, 0.1 mM Na₂MoO₄, 1 mM NaN₃, 0.01% TritonX-100, \pm 0.1 mM Na₃VO₄とした。反応は10-20 μ gの膜タンパク質を添加することにより開始し、30℃で15分間行い、ATPを加水分解して放出された無機リン酸を定量した。

無機リン酸定量には、Amesの方法（Ames 1966）を改変したものを用いた（Harada et al. 1990）。酵素反応はAmes試薬（1.05N H₂SO₄, 1.5% (w/v) アスコルビン酸, 0.45% (w/v) モリブデン酸アンモニウム）1 mLを添加するこ

とにより停止させ、10分間インキュベートした後、ATPの減少による発色や低pHにおけるTritonX-100などによる発色の阻害を防ぐために、10% (w/v) SDS, 5%クエン酸ナトリウムを500 μ L加えて十分に混合し、続いて55°Cの湯浴中で20分間インキュベートした後、700nmで比色定量し、リン酸二カリウムを標準として作成した検量線より溶液中の無機リン酸濃度を算出した。

酵素活性は、タンパク質量1mg当たりの基質の加水分解によって1分間に放出された無機リン酸の量で示した。

ウェスタン・ブロッティング

ブロッティング用緩衝液A (0.3 M Tris, 20% メタノール, 0.02% SDS) 、 B (25 mM Tris, 20% メタノール, 0.02% SDS) 、 C (25 mM Tris, 40 mM アミノカプロン酸, 20% メタノール, 0.02% SDS) にゲルと同じ大きさの濾紙を2枚ずつ浸し、ゲルと同じ大きさのPVDF膜をメタノールに20秒間浸した後、ブロッティング用緩衝液Cに1時間浸した。原形質膜画分、ミクロソーム画分を等量のSDSサンプル用緩衝液 (62.5 mM Tris-HCl pH6.8, 2.5% SDS, 5%メルカプトエタノール, 10% グリセロール) と混合して5分間沸騰浴中でSDS化したものをサンプルとし、Laemmliの不連続緩衝液法 (Laemmli 1970) に従いSDS-PAGEを行った。SDS-PAGE後のゲルは、プレートから切り出し15分間ブロッティング用緩衝液C中で振盪した。セミドライブブロッティング装置にブロッティング用緩衝液Cに浸した濾紙、ゲル、PVDF膜、ブロッティング用緩衝液B、Aに浸した濾紙を重ね合わせ、0.8mA/cm²の定電流で1.5時間ブロッティングを行った。ブロッティング用緩衝液D (25 mM Tris-HCl pH7.6, 140 mM NaCl) で2回洗浄したPVDF膜を、1%スキムミルクを含むブロッティング用緩衝液D中で1時間振盪した。そして、10000倍希釈となるようにウサギ抗アシロイヌナズナプロトン-ATPase-IgGを加えて一晩振盪した。このPVDF膜をブロッティング用緩衝液Dで

3回洗浄し、5Uのアルカリフォスファターゼ標識ヒツジ抗ウサギ-IgGを含むブロッキング用緩衝液D30mL中で1時間振盪後、1% TritonX-100 と5 mM 2Na・EDTAを含むブロッキング用緩衝液Dで1回、ブロッキング用緩衝液Dで2回洗浄した。PVDF膜を10mLのアルカリ性緩衝液（100 mM Tris-HCl pH9.5, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂）へ移し、33 μLの50mg BCIP/mL DMFと66 μLの50mg NBT/mL 70%DMFを加えて発色させた。適当な濃さに発色させたところで反応停止用緩衝液（20 mM Tris-HCl pH8.0, 5 mM 2Na・EDTA）にPVDF膜を入れて反応を停止し、風乾した。

第三節 実験結果

プトレシンのカリウム吸収速度に与える影響

カリウム吸収溶液（1mM カリウム）中にプトレシンを共存させると、カリウム吸収速度は著しく増大した（第17図）。このカリウム吸収速度の増大は、吸収溶液中のプトレシン濃度に依存していた。また、この効果は吸収溶液中のカリウム濃度が低下するにしたがい、顕著に見られた（第18図）。プトレシンによるカリウム吸収速度の増大の機構を解析するために、これをLineweaver-Burkの逆数プロットにとり、 K_m 、 V_{max} を算出した（第19図）。その結果、プトレシン非共存下での直線式は $Y = 6.34 \times 10^{-2} + 0.274X$ ($R^2 = 0.962$) で表され、 K_m は4.31 mM、 V_{max} は15.77 μmol/gFW/hであり、10 mM プトレシン共存下での直線式は $Y = 6.15 \times 10^{-2} + 0.142X$ ($R^2 = 0.989$) で表され、 K_m は2.31 mM、 V_{max} は16.23 μmol/gFW/hであった（第2表）。プトレシンにより V_{max} は影響を受けないが、 K_m が半減したことから、プトレシンはカリウムトランスポーター

のカリウムに対する親和性を高めることにより、カリウム吸収を促進することが示唆された。プトレシン共存下において、確かに細部内のプトレシン濃度は、プトレシン非共存下に比べ、蓄積していた（第20図）。

第2表 プトレシンによるカリウム吸収速度の K_m 、 V_{max} に与える影響

プトレシン (mM)	K_m (mM)	V_{max} ($\mu\text{mol/gFW/h}$)	R^2
0	4.31	15.77	0.962
10	2.31	16.23	0.989

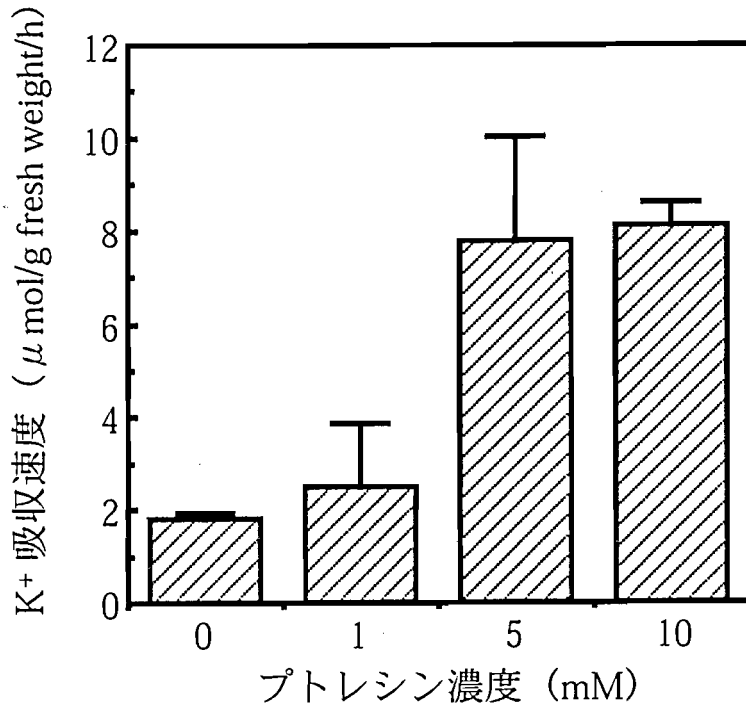
プトレシンの原形質膜プロトン輸送性ATPaseに与える影響

プトレシンがカリウムトランスポーターのカリウムに対する親和性を高める機構を明らかにするために、原形質膜プロトン輸送性ATPaseに与える影響について検証した。そのために、まず原形質膜の精製を行った。原形質膜の精製は膜の密度の差により分離するスクロース不連続密度勾配遠心法を用いて行った。その結果、34/46%スクロース界面から回収した原形質膜画分は、ミクロソーム画分に比べても VO_4^{3-} -ATPase活性が4倍以上増加し（第3表）、さらには、抗アラビドプシスプロトンATPase抗体を用いたウェスタンブロットにより、原形質膜画分において約100kDaのバンドが優位に検出されたことから（第21図）、原形質膜の精製が確認された。

第3表 各画分における VO_4^{3-} -ATPase活性

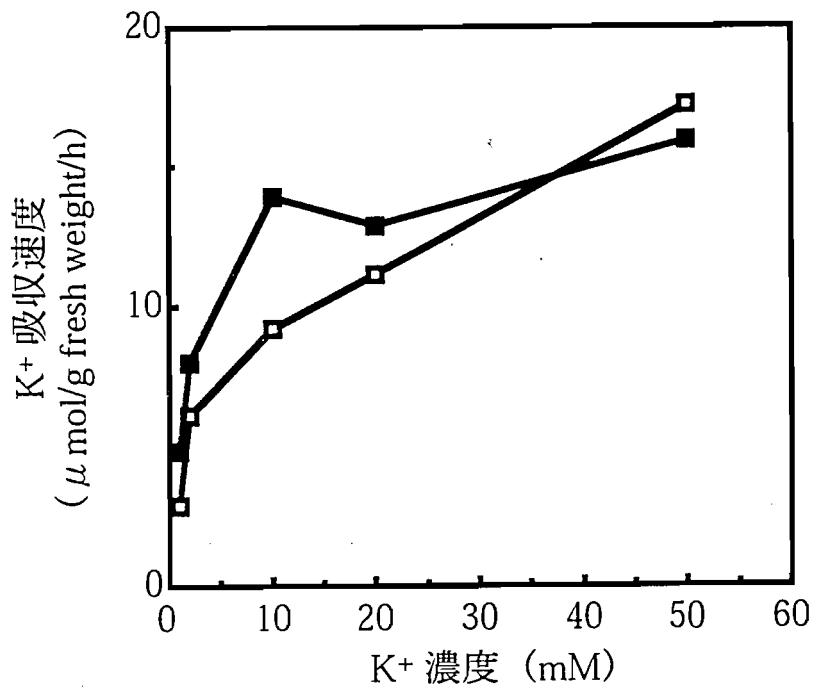
画分	VO_4^{3-} -ATPase活性 ($\mu\text{mol/g fresh weight/min}$)	精製度
粗酵素	0.06	1
ミクロソーム	0.39	6.5
原形質膜	1.73	28.8

この原形質膜を用い、プトレシンの VO_4^{3-} -ATPase活性に与える影響を調べた。プトレシンは、濃度依存的に VO_4^{3-} -ATPaseを活性化した(第22図)。しかし、150 mM カリウム存在下では、その活性化は認められなかった。これらのことから、プトレシンは原形質膜のプロトン輸送性ATPaseを活性化し、その結果カリウム吸収による原形質膜の脱分極を抑制して、カリウム吸収を促進することが考えられた。



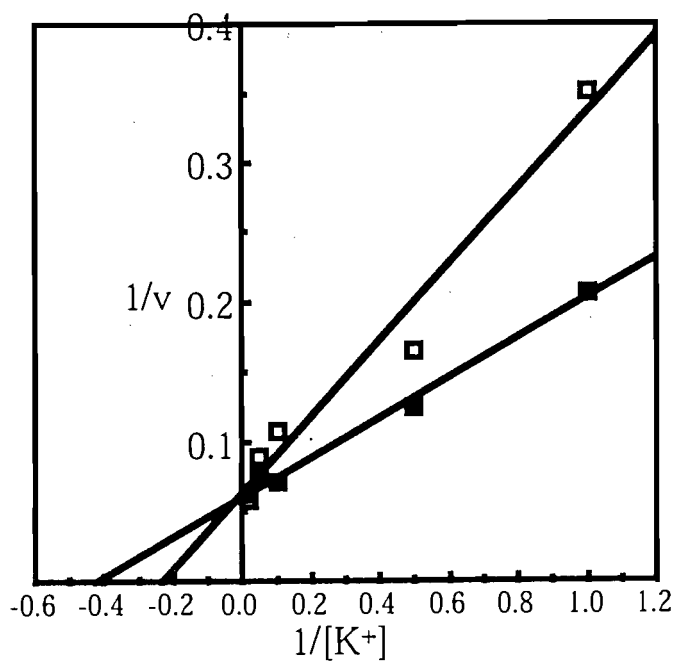
第17図 カリウム吸収速度に及ぼす吸収溶液中
プトレシン濃度の影響

吸収溶液中のカリウム濃度は1 mMとした。



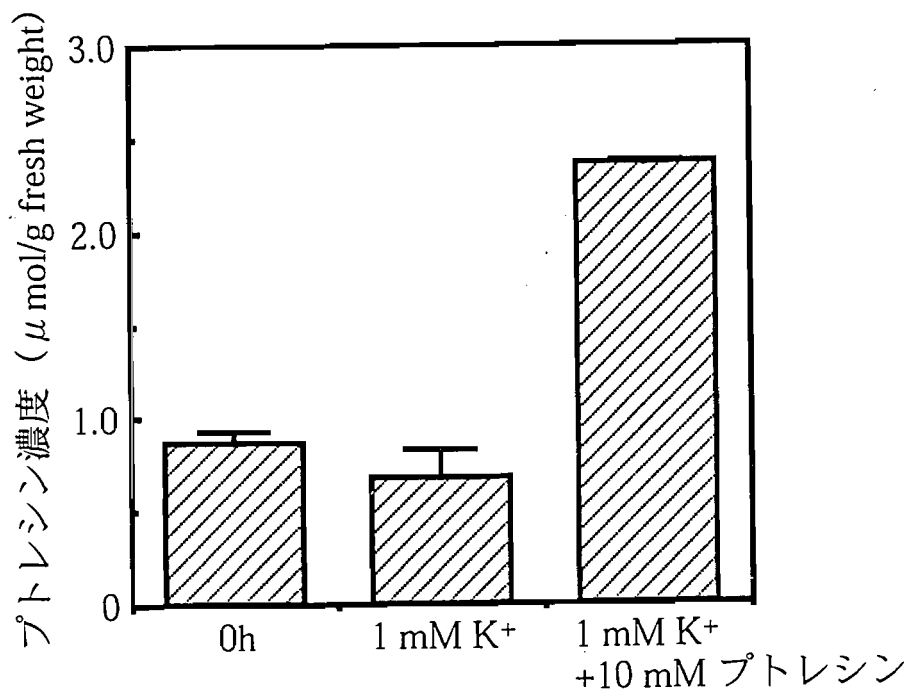
第18図 プトレシン存在下、非存在下における吸収溶液中カリウム濃度のカリウム吸収速度に及ぼす影響

—□— 0 mM プトレシン
 —■— 10 mM プトレシン

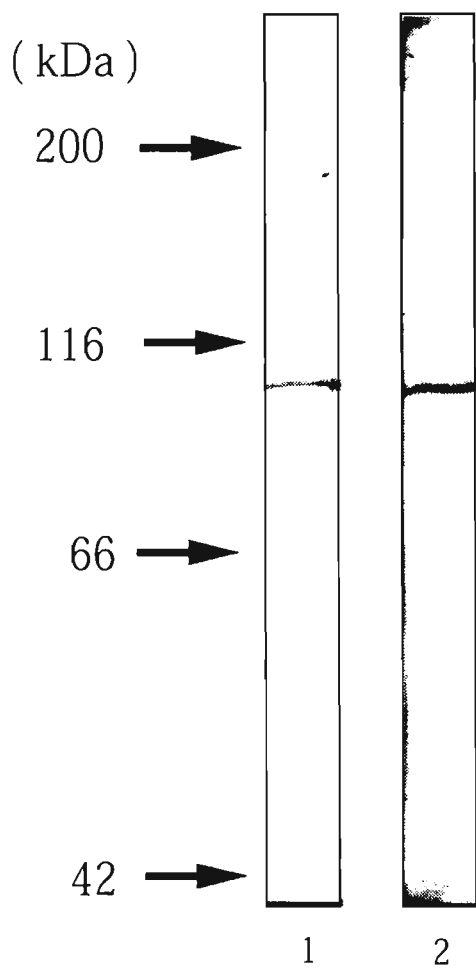


第19図 プトレスシン存在下、非存在下における
カリウム吸収速度のLineweaver-Burkの逆数プロット

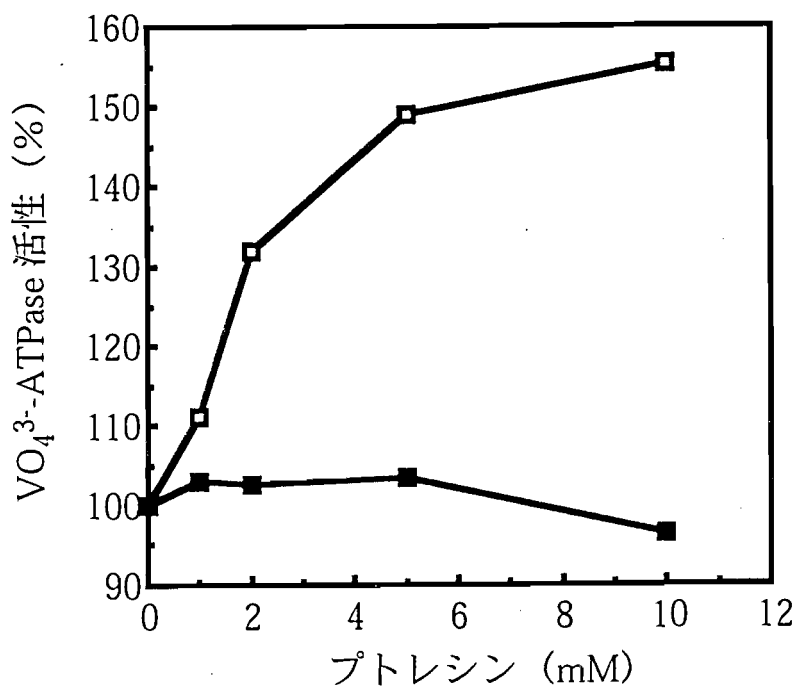
- 0 mM プトレスシン
- 10 mM プトレスシン



第20図 カリウム吸収3時間後の根部プトレシン濃度



第 2 1 図 オオムギ根ミクロソーム画分、原形質膜画分の
 抗シロイヌナズナ H^+ -ATPase抗体による
 ウェスタン・ブロット
 1：ミクロソーム画分
 2：原形質膜画分
 タンパク質量は $30\mu g$ に統一した。



第22図 プロトレシンの VO_4^{3-} -ATPase活性に与える影響

- 0 mM K⁺, 100 = 0.65 (μmol/mg/min)
- 150 mM K⁺, 100 = 1.73 (μmol/mg/min)

第四節 考察

本実験により、プトレシンはカリウム吸収速度を増大させることが明らかとなった。一方、高濃度のカリウム吸収においては外部にポリアミンが存在するとカリウム吸収が阻害され (De Agazio et al. 1988)、また切断根においてはポリアミンが蓄積することによりカリウム吸収を阻害する (De Agazio et al. 1989) という報告もある。しかし、これらの実験はカリウム吸収速度をカリウムのアナログとして $^{86}\text{RbCl}$ の吸収を用いて算出しているが、カリウムトランスポーターのルビジウムに対する特異性は必ずしもカリウムと同じではない (Maathuis et al. 1997)。実際、我々の実験系において、吸収溶液中のバッファーにナトリウムの混入があり、カリウムと同時にナトリウムもある程度吸収されるが、プトレシンによってカリウム吸収が促進されるとき、ナトリウムの吸収が阻害された (データは示していない)。このことは、プトレシンはカリウムトランスポーターのカリウムに対する特異性を高める可能性があることを示唆している。従って、カリウム吸収におけるプトレシンの影響を見ると、 $^{86}\text{RbCl}$ を用いることは不適切であるように思える。カルシウムもカリウム吸収においてカリウムの選択性を高めることが知られており、これは膜の安定化によるものと考えられている (Marschner 1995)。プトレシンも膜の安定化に寄与するため (Roberts et al. 1986)、カルシウムと同様の役割を果たしているのかもしれない。

プロテインキナーゼの阻害剤であるK-252a (Kauss et al. 1992) やセカンドメッセンジャーであるcAMP (Kurosaki 1997) もカリウム吸収を促進することが報告されている。しかし、これらによるカリウム吸収の活性化は一時的なものであり、数分の内に元のレベルに回復する。したがって、この時のカリウムトランスポーターはカリウム栄養の細胞内への取り込みというよりはむしろ、細胞内情報伝達における膜電位の制御に関係しているものと考えられる。カルシウムが膜の安定化に寄与すること、あるいは膜透過性の高い随伴アニオンが

存在することにより、カリウム吸収を促進するという報告はあるものの (Marschner 1995)、我々が知る限りにおいて、必須元素以外の細胞内成分がカリウム吸収を促進するという報告は、本研究が初めてである。

原形質膜プロトン輸送性ATPaseはATPを分解する際発生するエネルギーを利用して、電気化学的勾配に逆らいプロトンを細胞外に放出する。したがって、原形質膜のプロトン勾配と膜電位の形成に大きな役割を担っている (Serrano 1989)。この原形質膜プロトン輸送性ATPaseはカリウム吸収においても、二次的なエネルギー供給を行うことにより、深く関係していると考えられている (Briskin and Gawienowski 1996)。原形質膜プロトン輸送性ATPaseに対するポリアミンの影響については、トウモロコシの胚盤 (Srivastava and Rajbabu 1983) やイネの子葉鞘 (Reggiani et al. 1992) においてポリアミンがATPaseを活性化するという報告がなされている。さらに、イネの子葉鞘において植物ホルモンであるオーキシンや植物毒素であるフシコシンは原形質膜ATPase活性を増大させることにより伸長を促進するが、それはプトレシンの蓄積と関係していることが示唆されている (Lee and Lin 1996)。オオムギの原形質膜プロトン輸送性ATPaseもプトレシンによって活性化され、その活性化レベル、プトレシン濃度依存性もトウモロコシの胚盤、イネの子葉鞘と類似していた。また、カリウムにより最大限に活性化された後では、プトレシンによる活性化は生じなかった (第22図)。このことは、プトレシンはカリウムと同じリン酸化中間体の脱リン酸化のターンオーバー速度を高める (Briskin 1989) という機構によりATPaseを活性化することが考えられた。

カリウム欠乏条件下で、プトレシンが蓄積することが知られている (Young and Galston 1984)。従来、この現象はプトレシンが細胞内のカチオンの減少を補うことによる植物のストレス回避応答であると考えられてきた。しかし、本研究により、プトレシンが原形質膜のプロトン輸送性ATPaseを活性化し、カリウム吸収を促進したことから、プトレシンはカリウム欠乏からの速やかな回復のためにも機能しているのではないかと考えられる。

総括

カリウムは植物の必須元素であり、様々な重要な機能を有している。しかし、その詳細については未だに不明な点が多い。その中で植物栄養学的に明確なことはカリウム欠乏に伴うプトレシンの蓄積現象であり、これについては古くから広く知られている。その理由の一つに、プトレシンが電気的アナログとしてカリウムの欠乏を補う役割を担っていると考えられてきた。一方、細胞内のカリウム濃度は原形質膜に存在する三種類のカリウムトランスポーターによって制御されていると考えられてきた。すなわち、培地中のカリウム濃度が低く、原形質膜の電気化学的勾配に逆らって輸送されなければならないときは、プロトン勾配を利用して高親和性トランスポーターがプロトンとの共輸送を行う。培地中のカリウム濃度が高いときは、電気化学的勾配に従い低親和性トランスポーター（内向き整流カリウムチャンネル）によって細胞内に取り込まれる。細胞内にカリウムが必要以上存在する場合は、原形質膜の脱分極により起動される外向き整流カリウムチャンネルによって細胞外へと放出する。このように、植物はあらゆるカリウム栄養条件に応じて三種類のカリウムトランスポーターを駆使し、細胞内のカリウム濃度を巧妙に制御していると考えられている。プトレシンがカリウムの電気的アナログとして、あるいは別の働きにより細胞内のカリウムの減少を補うるのであれば、逆に、プトレシンは細胞内のカリウム濃度を制御することが可能なのではないかと考えた。もし、この仮説が証明されれば、カリウム濃度は上述の三種のトランスポーター以外に、プトレシンによって制御される新たなシステムの存在が推察される。

そこで本研究ではオオムギ幼植物を試料とし、プトレシンが細胞内カリウムの制御因子である可能性について検討し、その役割について考察した。

第一章では、人為的にオオムギ幼植物の根部にプトレシンを蓄積させるため

の手段として、エチレンの前駆体であるACC (1-アミノシクロプロパン-1-カルボン酸) の供与実験を行い、内生的に蓄積したプトレシンが根部のカリウム濃度あるいは種子中のカリウムの分配に影響をあたえるかについて検討した。ACCの供与により、根部におけるエチレンの生成が誘導され、スペルミジン、スペルミン含量は変化せず、プトレシンのみが蓄積した。対照的に、根部のカリウム濃度は低下し、茎葉部のカリウム濃度は増加した。また、直接培養液にプトレシンを添加することによっても、プトレシンの蓄積とカリウム濃度の減少は同時に認められた。さらに、ACCと共にエチレン合成阻害剤であるコバルトを供与すると、プトレシンは蓄積せず、カリウム濃度の減少も認められなかった。これらのことより、プトレシンは細胞内のカリウム濃度の制御因子として機能し、その結果、種子中のカリウムの分配を制御していることが明らかとなった。

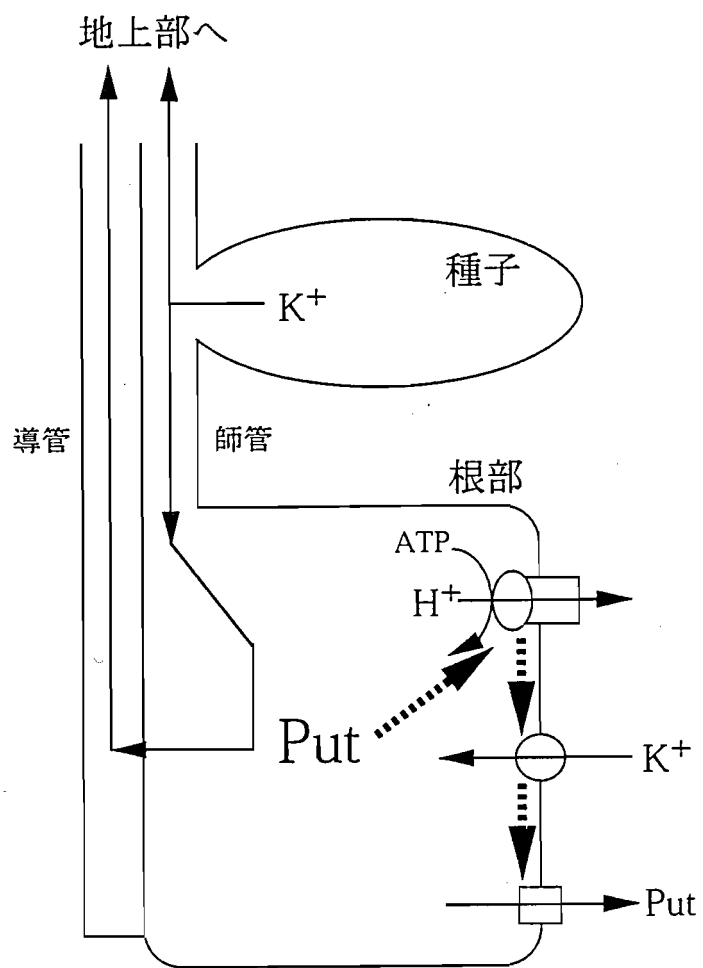
第二章では、カリウム吸収時の根部のプトレシンの挙動を明らかにするために、予めプトレシンを蓄積させたオオムギ幼植物を用いてカリウム吸収実験を行った。その結果、根部において速やかにカリウムは蓄積し、遊離型プトレシンは減少した。細胞内でのポリアミンの存在形態としては、遊離型、酸可溶結合同型、酸不溶結合同型に分けられるが、カリウム吸収による遊離型プトレシンの減少は遊離型スペルミジン、スペルミンや他の結合同型ポリアミンに変換されるためではなかった。また、遊離型プトレシンが地上部に輸送され、そこで他のポリアミンに変換されるということもなかった。¹⁴C-プトレシンを供与した実験によって、カリウム供与は細胞内のプトレシンの放出を促進させることが分かった。従って、カリウム吸収により細胞内のプトレシンが減少するのは、プトレシンが細胞外に放出されるためであることが明らかとなった。このことは、原形質膜におけるプトレシン輸送担体の存在の可能性を示すものである。

第三章では、プトレシン非蓄積植物を供して、カリウム吸収におけるプトレシンの機能を解明するために、カリウム吸収溶液中にプトレシンを共存させて

カリウム吸収実験を行った。その結果、プトレシンはカリウム吸収速度を増大させた。このカリウム吸収速度の増大はプトレシン濃度に依存しており、この効果はカリウム濃度が小さくなるにつれて顕著に現れた。カリウム吸収速度を Lineweaver-Burk の逆数プロットにとり、 K_m 、 V_{max} を算出したところ、 V_{max} はプトレシンによって影響を受けないが、 K_m は減少した。このことは、プトレシンがトランスポーターのカリウムに対する親和性を上昇させていることを示している。また、プトレシンは濃度依存的に原形質膜のプロトン輸送性 ATPase を活性化した。カリウムトランスポーターは原形質膜の膜電位によって制御されていることが明らかとされているため、プトレシンによるカリウム吸収の促進は、プトレシンがプロトン輸送性 ATPase を活性化し、原形質膜の脱分極を抑制したためであると解釈される。

以上の結果をまとめると、1. 人為的にプトレシン蓄積を誘導したオオムギ幼植物の根部を用い、プトレシンの蓄積はカリウム濃度を制限すること、2. プトレシンは根部での蓄積を通して、種子中のカリウムの分配を制御すること、3. プトレシンを蓄積させた根部において、プトレシンはカリウム吸収に伴い減少するが、それはプトレシンが細胞外へ放出されるためであること、4. プトレシンは原形質膜のプロトン輸送性 ATPase を活性化し、カリウム吸収を促進することを明らかにした（第 2 3 図）。

以上のように、プトレシンは単に従来考えられていた細胞内でのカリウム欠乏を補う機能を有しているだけではなく、カリウム濃度の制御因子として働くことが明らかとなった。また、そのプトレシンの濃度はカリウムによって、プトレシンの放出を介して、巧妙に制御されていることも明らかとなった。これらのことは、プトレシンとカリウムが相互にその濃度を制御し合っていること意味している。さらに、プトレシンが原形質膜のプロトン輸送性 ATPase を活性化し、カリウム吸収を促進することから、カリウム欠乏時に蓄積するプトレシンは、カリウム吸収のための電気化学的勾配の形成に寄与し、カリウム欠乏から早期に抜け出すための植物の戦略であると考えられる。



第23図 カリウムとプトレシンの相互関係モデル

—————▶ 物質の移動
▶ 活性化

謝 辞

本論文をまとめるにあたり、御懇篤な御指導および御配慮を賜った、神戸大学大学院自然科学研究科、王子善清教授に、謹んで感謝の意を表します。

また、ご多忙中にもかかわらず、有益な御教示をいただいた、神戸大学大学院自然科学研究科、辻荘一教授、安田武司教授に、厚く感謝の意を表します。

本研究を行うにあたり、懇切な御指導と御教示をいただいた神戸大学農学部植物栄養学研究室の杉本敏男助教授、白石斉聖博士に、深く感謝の意を表します。

さらに、実験技術面において、懇切ていねいな御指導を賜った、神戸大学農学部資源利用科学講座の寺井弘文助教授、および果樹科学講座の野村啓一助教授に、心からの感謝の意を表します。

抗アラビドプシスH⁺-ATPase抗体を分与していただいたバレンシア大学、Seranno博士に心から感謝の意を表します。

最後に、本研究の遂行のために、惜しみない協力と議論をいただいた神戸大学農学部植物栄養学講座の井上美和子氏、島田雄一氏、小池愛氏ならびに卒業生の方々、学生諸氏に、記して厚く御礼申し上げます。

参考文献

- Altman A** (1982) Polyamines and wounded storage tissues. Inhibition of RNase activity and solute leakage. *Physiol Plant* **54**: 194-198
- Ames BN** (1966) Assay of inorganic phosphate, total phosphate and phosphatase. *Methods Enzymol* **8**: 115-118
- Angelini R, Federico R, Mancinelli** (1988) phytochrome-mediated control of diamine oxidase level in the epicotyl of etiolated lentil (*Lens culinaris Medicus*) seedlings. *Plant Physiol* **88**: 1207-1209
- Angelini R, Manes F, Federico R** (1990) Spatial and functional correlation between diamine-oxidase and peroxidase activities and their dependence upon de-etiolation and wounding in chick-pea stems. *Planta* **182**: 89-96
- Apelbaum A, Goldlust A, Icekson I** (1985) Control by ethylene of arginine decarboxylase activity in pea seedlings and its implication for hormonal regulation of plant growth. *Plant Physiol* **79**: 635-640
- Bors W, Langebartels C, Michel C, Sandermann H** (1989) Polyamines as radical scavengers and protectants against ozone damage. *Phytochemistry* **28**: 1589-1595
- Briskin DP** (1989) Phosphorylation and dephosphorylation reactions of the red beet plasma membrane ATPase studied in the transient state. *Plant Physiol* **88**: 84-91

- Brinski DP, Gawienowski MC** (1996) Role of the Plasma membrane H⁺-ATPase in K⁺ transport. *Plant Physiol* **111**: 1199-1207
- Brüggemann LI, Pottosin II, Schönknecht G** (1998) Cytoplasmic polyamines block the fast-activating vacuolar cation channel. *Plant J* **16**: 101-105
- Cogoni A, Piras C, Farci R, Melis A, Floris G** (1990) *Hordeum vulgare* seedlings amine oxidase. *Plant Physiol* **93**: 818-821
- Colombo R, Cerana R, Bagni N** (1992) Evidence for polyamine channels in protoplasts and vacuoles of *Arabidopsis thaliana* cells. *Biochem Biophys Res Commun* **182**: 1187-1192
- Datta N, Schell MB, Roux SJ** (1987) Spermine stimulation of a nuclear NII kinase from pea plumules and its role in the phosphorylation of a nuclear polypeptide. *Plant Physiol* **84**: 1397-1401
- De Agazio M, Giardina MC, Grego S** (1988) Effects of exogenous putrescine, spermidine, and spermine on K⁺ uptake and H⁺ extrusion through plasmamembrane in maize root segments. *Plant Physiol* **87**: 176-178
- De Agazio M, Federico R, Grego S** (1989) Involvement of polyamines in inhibiting effect of injury caused by cutting on K⁺ uptake through the plasma membrane. *Planta* **177**: 388-392
- Del Duca S, Tidu V, Bassi R, Esposito C, Serafini-Fracassini D** (1994) Identification of chlorophyll-*a/b* proteins as substrates of transglutaminase activity in

- isolated chloroplasts of *Helianthus tuberosus* L..
Planta 193: 283-289
- DiTomaso JM, Shaff JE, Kochian LV** (1989) Putrescine-induced wounding and its effects on membrane integrity and ion transport processes in roots of intact corn seedlings. Plant Physiol 90: 988-995
- Dobrovinskaya OR, Muniz J, Pottosin ll** (1999) Inhibition of vacuolar ion channels by polyamines. J Membr Biol 167: 127-140
- Drolet G, Dumbroff EB, Legge RL, Thompson JE** (1986) Radical scavenging properties of polyamines. Phytochemistry 25: 367-371
- Evans PT, Malmberg RL** (1989) Do polyamines have roles in plant development? Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 40: 235-269
- Federico R, Angelini R, Argento-Cerù MP, Manes F** (1985) Immunohistochemical demonstration of lentil diamine oxidase. Cell Mol Biol 31: 171-174
- Fernando M, Kulpa J, Siddiqi MY, Glass ADM** (1990) Potassium-dependent changes in the expression of membrane-associated proteins in barley roots. 1. Correlations with K⁺ (⁸⁶Rb⁺) influx and root K⁺ concentration. Plant Physiol 92: 1128-1132
- Flores HE, Galston AW** (1982) Analysis of polyamines in higher plants by high performance liquid chromatography. Plant Physiol 69: 701-706
- Flores HE, Filner P** (1985) Polyamine catabolism in higher plants: Characterization of pyrroline dehydrogenase.

Plant Growth Regul 3: 277-291

- Harada H, Wakiuchi N, Sueyoshi K, Oji Y** (1990)
Properties of the vanadate-sensitive H⁺-ATPase of plasma membrane vesicles from rice roots. Soil Sci Plant Nutr 36: 545-553
- Hibi N, Higashiguchi S, Hashimoto T, Ymada Y** (1994)
Gene expression in tobacco low-nicotine mutants. The Plant Cell 6: 723-735
- Kang H, Lee SG, Cho YD** (1998) Identification of glycinin *in vivo* as a polyamine-conjugated protein via a γ -glutamyl linkage. Biochem J 332: 467-473
- Kashiwagi K, Miyamoto S, Suzuki F, Kobayashi H, Igarashi K** (1992) Excretion of putrescine by the putrescine-ornithine antiporter encoded by *potE* gene of *Escherichia coli*. Proc Natl Acad Sci USA 89: 4529- 4533
- Kaur-Sawhney R, Shih L-M, Cegielska T, Galston AW** (1982) Inhibition of protease activity by polyamines. Relevance for control of leaf senescence. FEBS Lett 145: 345-349
- Kauss H, Jeblick W, Conrath U** (1992) Protein kinase inhibitor K-252a and fusicoccin induce similar initial changes in ion transport of parsley suspension cells. Physiol Plant 85: 483-488
- Kochian LV, Lucas WJ** (1982) Potassium transport in corn roots. I. Resolution of kinetics into a saturable and linear component. Plant Physiol 70: 1723-1731
- Kumar A, Altabella T, Taylor MA, Tuburico AF** (1997)

- Recent advances in polyamine research. Trends Plant Sci
2: 124-130
- Kurosaki F** (1997) Role of inward K⁺ channel located at
carrot plasma membrane in signal cross-talking of cAMP
with Ca²⁺ cascade. FEBS Lett **408**: 115-119
- Laemmli UK** (1970) Cleavage of structural proteins during
the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature
227: 680-685
- Langebartels C, Kerner KJ, Leonardi S, Schraudner M,
Trost M, Heller W, Sanderman H** (1991) Biochemical plant
response to ozone. I. Differential induction of
polyamine and ethylene biosynthesis in tobacco. Plant
Physiol **95**: 882-889
- Lee T-M, Chu C** (1992) Ethylene-induced polyamine
accumulation in rice (*Oryza sativa* L.) coleoptiles.
Plant Physiol **100**: 238-245
- Lee T-M, Lin Y-H** (1996) Opposite effect of fusaric acid and
IAA on putrescine synthesis of rice coleoptiles.
Physiol Plant **97**: 63-68
- Lee T-M** (1997) Polyamine regulation of growth and chilling
tolerance of rice (*Oryza sativa* L.) roots cultured in
vitro. Plant Sci **122**: 111-117
- Lopatin AN, Makhina EN, Nichols CG** (1994) Potassium
channel block by cytoplasmic polyamines as the
mechanism of intrinsic rectification. Nature **372**: 366-
369
- Lutts S, Kinet J-M, Bouharmont J** (1996) Ethylene
production by leaves of rice (*Oryza sativa* L.) in

- relation to salinity tolerance and exogenous putrescine application. *Plant Sci* **116**: 15-25
- Maathuis FJM and Sanders D** (1993) Energization of potassium uptake in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* **191**: 302-307
- Margosiak SA, Dharma A, Bruce-Carver MR, Gonzales AP, Louie D, Kuehn GD** (1990) Identification of the large subunit of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase as a substrate for transglutaminase in *Medicago sativa* L. (alfalfa). *Plant Physiol* **92**: 88-96
- Marschner H** (1995) Ion uptake mechanisms of individual cells and roots. Academic press, eds, Mineral nutrition of higher plants, Ed2 Vol2 Academic press, San Diego, pp 6-78
- Martin-Tanguy J** (1985) The occurrence and possible function of hydroxycinnamoyl acid amides in plants. *Plant Growth Regul* **3**: 381-399
- Martin-Tanguy J** (1997) Conjugated polyamines and reproductive development: biochemical, molecular and physiological approaches. *Physiol Plant* **100**: 675-688
- Pennazio S, Roggero P** (1990) Exogenous polyamines stimulate ethylene synthesis by soybean leaf tissues. *Ann Bot* **65**: 45-50.
- Reggiani R, Hochkoepler A, Bertani A** (1989) Polyamines in rice seedlings under oxygen-deficit stress. *Plant Physiol* **91**: 1197-1201
- Reggiani R, Zaina S, Bertani A** (1992) Plasmalemma ATPase in rice coleoptiles; stimulation by putrescine and

- polyamines. *Phytochemistry* **31**: 417-419
- Reggiani R, Aurisano N, Mattana M, Bertani A** (1993)
Influence of K⁺ ion on polyamine level in wheat
seedlings. *J Plant Physiol* **141**: 136-140
- Roberts DR, Dumbroff EB, Thompson JE** (1986) Exogenous
polyamines alter membrane fluidity in bean leaves. A
basis for potential misinterpretation of their true
physiological role. *Planta* **167**: 395-401
- Sarjala T, Taulavuori K, Savonen E-M, Edfast A-B**
(1997) Does availability of potassium affect cold hardening
of scots pine through polyamine metabolism? *Physiol
Plant* **99**: 56-62
- Satter RL and Galston AW** (1981) Mechanisms of control of
leaf movements. *Annu Rev Plant Physiol* **32**: 83-110
- Serafini-Fracassini D, Del Duca S, Beninati S** (1995)
Plant transglutaminases. *Phytochemistry* **40**: 355-365
- Serrano R** (1989) Structure and function of plasma membrane
ATPase. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **40**: 61-94
- Slocum RD, Kaur-Sawhney R, Galston AW** (1984) The
physiology and biochemistry of polyamines in plants.
Arch Biochem Biophys **235**: 283-303
- Smith TA** (1973) Amine levels in mineral deficient *Hordeum
vulgare* leaves. *Phytochemistry* **12**: 2093-2100
- Smith TA** (1985) Polyamines. *Ann Rev Plant Physiol* **36**: 117-
143
- Srivastava SK, Rajbabu P** (1983a) Effect of amines and
guanidines on peroxidase from maize scutellum.
Phytochemistry **22**: 2681-2686

- Srivastava SK, Rajbabu P** (-1983b) Effect of amines and guanidines on ATPase from maize scutellum. *Phytochemistry* **22**: 2675-2679
- Suttle JC** (1981) Effect of polyamines on ethylene production. *Phytochemistry* **20**: 1477-1480
- Tachimoto M, Fukutomi M, Matsushiro H, Kobayashi M, Takahashi E** (1992) Role of putrescine in *Lemna* plants under potassium deficiency. *Soil Sci Plant Nutr* **38**: 307-313
- Tamai T, Inoue M, Sugimoto T, Sueyoshi K, Shiraishi N, Oji Y** (1999) Ethylene-induced putrescine accumulation modulates K⁺ partitioning between roots and shoots in barley seedlings. *Physiol Plant* **106**: 296-301
- Tarenghi E, Martin-Tanguy J** (1995) Polyamines, floral induction and floral development of strawberry (*Fragaria ananassa* Duch.). *Plant Growth Regul* **17**: 157-165
- Tjandrawinata RR, Byus CV** (1995) Regulation of the efflux of putrescine and cadaverine from rapidly growing cultured RAW 264 cells by extracellular putrescine. *Biochem J* **305**: 291-299
- Tkachenko AG, Slakhetdinova O, Pshenichnov MR** (1997) Exchange of putrescine and potassium between cells and media as a factor in the adaptation of *Escherichia coli* to hyperosmotic shock. *Mikrobiol* **66**: 329-334
- Torrigiani P, Serafini-Fracassini D, Fara A** (1989) Diamine oxidase activity in different physiological stages of *Helianthus tuberosus* tuber. *Plant Physiol* **89**:

- Turano FJ, Kramer GF, Wang CY** (1997) The effect of methionine, ethylene and polyamine catabolic intermediates on polyamine accumulation in detached soybean leaves. *Physiol Plant* **101**: 510-518
- Ullich CI, Novacky AJ** (1990) Extra- and intracellular pH and membrane potential changes induced by K^+ , Cl^- , $H_2PO_4^-$, and NO_3^- uptake and fusicoccin in root hairs of *Limnobium stoloniferum*. *Plant Physiol* **94**: 1561-1567
- Veluthambi K, Poovaiah BW** (1984) Polyamine-stimulated phosphorylation of proteins from corn (*Zea mays* L.) coleoptiles. *Biochem Biophys Res Commun* **122**: 1374-1380
- Walden R, Cordeiro A, Tiburcio AF** (1997) Polyamines: small molecules triggering pathways in plant growth and development. *Plant Physiol* **113**: 1009-1013
- Wang TB, Gassmann W, Rubio F, Schroeder JI, Glass ADM** (1998) Rapid up-regulation of *HKT1*, a high-affinity potassium transporter gene, in roots of barley and wheat following withdrawal of potassium. *Plant Physiol* **118**: 651-659
- Watson MB, Malmberg RL** (1996) Regulation of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh arginine decarboxylase by potassium deficiency stress. *Plant Physiol* **111**: 1077-1083
- Wegner LH, De Boer AH** (1997) Properties of two outward-rectifying channels in root xylem parenchyma cells suggest a role in K^+ homeostasis and long-distance

- signaling. *Plant Physiol*-**115**: 1707-1719
- Wyn-Jones RG and Pollard A** (1983) Proteins, enzymes and inorganic ions. Springer-Verlag, Berlin **15B**: 528-562
- Xie X, Gillies RJ, Gerner EW** (1997) Characterization of a diamine exporter in chinese hamster ovary cells and identification of specific polyamine substrates. *J Biol Chem* **272**: 20484-20489
- Young ND, Galston AW** (1983) Putrescine and acid stress. *Plant Physiol* **71**: 767-771
- Young ND, Galston AW** (1984) Physiological control of arginine decarboxylase activity in potassium deficient oat shoots. *Plant Physiol* **76**: 331-335