

ダイコン子葉の葉緑体発生に対する4-チオウリジンの生理作用 (2)

その光還元活性と微細構造について

柴田 均・河野 泰久・落合 英夫

Hitoshi SHIBATA, Yasuhisa KONO and Hideo OCHIAI

Effect of 4-Thiouridine on Chloroplast Development in Radish Cotyledons (2)

Photo-reductive Activity and Fine-structure of Chloroplasts

緒 言

前報までに報告してきたように^{1)~4)}、発芽生長期に4-チオウリジン(以下4 SUと記す)で処理されたダイコンめばえにおいては、子葉細胞内でのクロロプラストに固有なリボソーム RNAs の生合成が選択的に阻害される。したがってクロロプラスト内諸酵素および構造タンパク質の生成も抑制され、このことが4 SU処理されたダイコン子葉での光照射に基づく緑化、すなわちクロロフィル色素生成の遅延をもたらしたという事が明らかにされた。このようなクロロプラスト固有のリボソーム RNAs 生成を阻害する例は他にクロラムフェニコール投与の際にも観察されているが⁵⁾、われわれの4 SUの場合には光照射を続けることによってその阻害効果がしだいに消失し、4 SU処理されたダイコン子葉の緑化も光照射4日目には正常体と同じレベルにまで回復するという特異的な性質がある。今回われわれは、4 SU処理された子葉細胞内においてクロロプラストの明反応に関与する光合成系はいかに影響されたかを検討し、またそのクロロプラスト発生過程の形態学的考察を電子顕微鏡により行なったので、それらの結果をここに報告し、前報までに得られた結果と総合してクロロプラストの発生の問題について考察する。

実験材料および方法

実験材料

植物材料としてタキイ種苗株式会社より購入した⁶⁾かいわれ大根、(*Raphanus sativus* LINN.) 種子を用いている。その培養実験条件および4 SUの合成、精製方法も前報²⁾に述べたと同様である。

クロロプラストの単離⁶⁾

子葉 5g を氷冷した乳鉢中にて乳棒でたたくようにして細胞壁を破砕して、0.4M シュークローズ、0.05M トリス塩酸緩衝液 (pH 7.8)、0.01M塩化ナトリウムを含んだ緩衝溶液 20ml に懸濁させ、3層のガーゼを通して濾過した。濾液を 300×g 1分間遠心分離して得られた上澄液を、600×g 7分間遠心分離した。沈殿をクロロフィル 28μg/ml となるように、0.2M トリス塩酸緩衝液 (pH 8.0) に5分間懸濁し、1000×g で遠心分離してトリス処理⁷⁾を行なった。このようにしてトリス処理された沈殿(クロロプラスト画分)を、0.5M シュークローズを含んだ 0.05M トリシン緩衝液 (pH7.6) に懸濁して、クロロフィル量が 100~150μg/ml になるように調整し光還元活性の測定に用いた。クロロフィルの定量は、ARNON の80%アセトン法に従った⁸⁾。

光還元活性の測定⁷⁾

0.25M シュークローズ、0.03M リン酸緩衝液 (pH 6.4)、0.1Mジクロロフェノールインドフェール(以下DCPIPと記す)、0.5mMジフェニールカルバザイド(以下DPCと記す)、クロロプラスト懸濁液(15~10μgクロロフィル)を試料用、対照用セル両方に調整し試料用セルにキャノンスライドスター(スライド用プロジェクター)のタングステンランプを光源として40,000 luxの光を照射し、HITACHI-124型分光光度計によってその590nmでの吸光度減少量を室温で1分間追跡した。DCPIP-DPC系は、純光化学的にも変化するので、クロロプラスト懸濁液を入れない試料について同一条件下で測定した値を、試料測定値より差し引き、クロロプラストによる光還元活性量とした。DPCは酢酸に溶解して、水酸化ナトリウム溶液によってpH 6.4と

※ 生物化学研究室

した後、300nm での分子吸光係数5,400⁷⁾から濃度を決定した。DCPIP は 590nm での分子吸光係数16,000⁷⁾によって濃度および光還元活性量を算出した。

電子顕微鏡観察試料の作製⁹⁾

一定時間生育させた子葉の組織(1~2mm²)を、0.2M リン酸緩衝液 (pH 7.3) で調製した 6 %グルタルアルデヒド溶液で5時間固定し、1%オスミウム酸-リン酸緩衝液にて3時間再固定した。この固定組織を水洗後、エタノール系列にて脱水し、プロピレンオキシドでエポキシ樹脂を誘導しゼラチンカプセルに誘導した。ウルト

ラミクロトーム (JUB-5B. 日本電子株式会社) を用いて超薄切片を作製し、4%酢酸ウラニルで電子染色し、カーボンで補強して HITACHI HS-6型電子顕微鏡で観察した。

実験結果

光還元活性

単離したクロロプラストを pH8.0 のトリス緩衝液で処理すると、酸素発生能を失うけれども、適当な人工的電子供与体の共存下では、電子が光化学反応系IIのレベルを回復させて、non-cyclic な光合成的光リン酸化能が回復されるという事実^{10), 11)}がある。この事実に基づき、最近 VERNON⁷⁾は、光化学反応系IIを特異的、かつ簡単に測定する方法として、トリスで処理されたクロロプラストを用い、DPC を電子供与体として、DCPIP の光還元量を測定する方法を報告した。われわれもこの方法を採用し、4 SU 処理および水培養のダイコン子葉について光化学反応系IIを測定した結果を図1に示した。めばえに対して照射を続けてゆくのにしたが、単位クロロフィルあたりとして求められた DCPIP の光還元量は次第に増加し、水培養、4 SU培養とも2日目にはほぼ定常状態に達することがわかる。しかし図に示されているごとく同じ時期における4 SU培養と水培養のものを比較すると、4 SU処理した方が常に水培養の対照と比べて、20~30%光還元活性量の値が高くなっている。

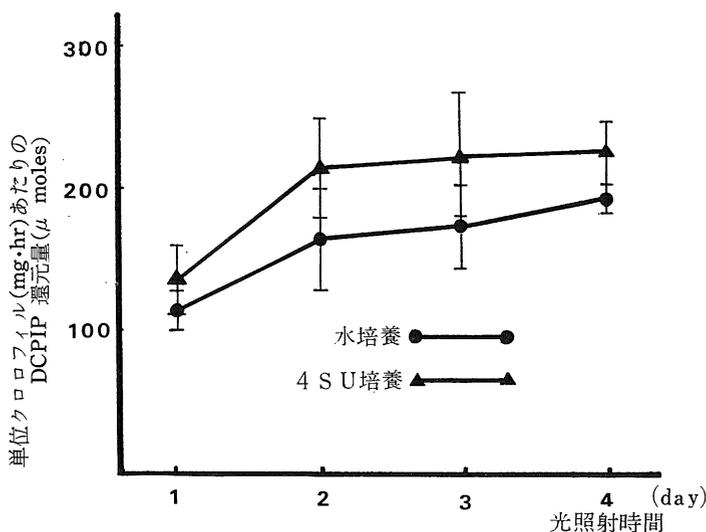


図1 水培養、4 SU培養の子葉における単位クロロフィルあたりの光化学反応系IIの光還元活性量

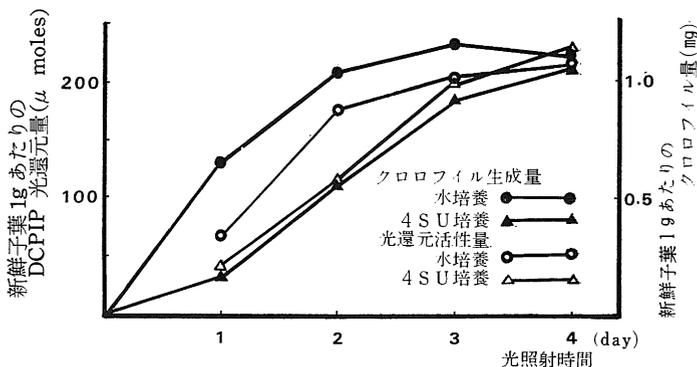


図2 新鮮子葉 1g あたりのクロロフィル生成量と光化学反応系IIの光還元活性量

一方、経時的に生成された新鮮子葉 1g あたりの全クロロフィル量およびこの量から算出した新鮮子葉 1g あたりの光還元活性量の経時変化を図2に示している。水培養、4 SU培養の両者において光還元活性量がクロロフィル生成量と平行していることがよく示されている。なお、照射の初期においてクロロフィル量の少ない4 SU培養子葉では当然のことながら水培養のものに比

