

ブルーベリーのグルタミン合成酵素活性と可溶性タンパクの SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動

片倉芳雄・横溝 久

Glutamine Synthetase Activity and SDS-PAGE Pattern of Soluble Protein in Blueberries

Yoshio KATAKURA and Hisashi YOKOMIZO

Summary

Glutamine synthetase activities in leaves and roots of blueberry were determined in relation to ammonium assimilation. SDS-PAGE analysis of soluble protein was also carried out.

There was a little difference between *in vitro* and *in vivo* GS activities in blueberry leaves, while apple leaf GS activity was higher in *in vitro* than in *in vivo*. *In vivo* GS activities in leaves of blueberry and satsuma mandarin were higher in tris-HCl buffer than in phosphate buffer. *In vivo* GS activity was higher at near pH7. *In vivo* and *in vitro* GS activities in leaves and roots of blueberry were lower than those of apple. *In vivo* and *in vitro* GS activities in leaves and roots of apple were increased by addition of ATP, while those of blueberry tended to be decreased. *In vivo* GS activity in blueberry leaves was decreased by addition of glutamic acid from 0 to 25 mM. Leaf and root proteins analyzed by SDS-PAGE were less in blueberry than in apple. These trees had more bands in leaves than in roots. Protein bands of blueberry and apple leaves were influenced by N forms supplied.

低下が認められた⁴⁾。これに関連してブルーベリーの硝酸還元酵素 (NR)、亜硝酸還元酵素活性について検討したところ細根や葉のこれら活性はリンゴ、ミカン、ナシなどに比べ低かった。特にブルーベリーの葉の硝酸還元酵素活性は著しく低かった⁵⁾。また、吸収された窒素の樹体内での化学形態の分別を行ったところ、 $\text{NO}_3\text{-N}$ では葉のタンパク態窒素への取り込み量が低かった⁶⁾。これらのことからブルーベリーでは $\text{NO}_3\text{-N}$ の利用効率がリンゴ、ナシなどの果樹に比べ低いことが考えられた。しかし、ブルーベリーの窒素同化過程の詳細はまだ十分に解明されてはおらず、検討すべき課題を多く残している。ブルーベリーの窒素同化過程について詳細に検討することは、ブルーベリーの好アンモニア性の機構を解明する上で重要なことと考えられる。本報告では、吸収された $\text{NH}_4\text{-N}$ あるいは $\text{NO}_3\text{-N}$ の還元によって生成された $\text{NH}_4\text{-N}$ が取り込まれていく過程に働くと考えられるグルタミン合成酵素 (GS) の活性について検討するとともに、葉及び細根組織内の可溶性タンパクのドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) による解析を試みた。

緒 言

著者らのこれまでの研究では、ブルーベリーの生育はアンモニア態窒素 ($\text{NH}_4\text{-N}$) の供給に伴って増加したが、硝酸態窒素 ($\text{NO}_3\text{-N}$) では

材料及び方法

供試樹としてラビットアイ・ブルーベリー‘ホームベル’、比較のためにリンゴ‘ふじ’、ウンシュウミカン‘宮川早生’を用いた。圃場で栽培されている成木を主に用いたが、供給窒

素形態の影響についてはブルーベリーとリンゴの幼木について水耕法により既報⁴⁾と同様に行った。GS 活性¹⁵⁾については、新鮮な葉あるいは細根を細切した試料を用い Vacuum infiltration による方法 (*in vivo*) と試料にトリス塩酸緩衝液を加え摩砕、抽出した粗酵素液を用いて測定する方法 (*in vitro*) の2通りを行った。GS 活性については *in vitro* と *in vivo* との比較、緩衝液の種類の影響、pH の影響、ATP の影響、グルタミン酸の影響などについて検討した。 *in vitro* GS 活性測定における粗酵素の抽出は新鮮試料に3倍量の0.2M トリス塩酸緩衝液 (pH7.2, 10 mM L-システインを含む) を加え、摩砕し、10000×g、10分遠心分離し、その上澄を粗酵素液とした。以上の抽出操作は4℃で行った。 *in vitro* GS 反応液はL-グルタミン酸ナトリウム50mM、アデノシン三リン酸二ナトリウム3水和物4 mM、ヒドロキシルアミン塩酸40mM、硫酸マグネシウム7水和物20mM、L-システイン10mM、40mM pH7.4 トリス塩酸緩衝液、これらを含む液3 mlに粗酵素液を1 ml加えて30℃で15分反応させたのち、30%トリクロロ酢酸、5.5N HCl, 8 % 塩化第二鉄0.1N HCl溶液の1:1:1混合液2 mlを加え10分以上放置し、540nmで吸光度を測定した。 *in vivo* GS 活性の測定は *in vitro* GS 反応液の5倍希釈液を10ml大試験管にとり4℃に冷却し、これに細切した新鮮試料を入れて vacuum を3回行った後、 *in vitro* の場合と同様に反応させ、反応開始時と終了時に反応液を0.5mlとり、反応停止、発色させ、吸光度の差から活性を算出した。

SDS-PAGE は次のように行った⁹⁾。まず泳動用試料液の調製については、葉あるいは細根の新鮮試料を2 g採取し、50mM pH7.5トリス塩酸緩衝液1 ml、2-メルカプトエタノール0.03 ml、少量の石英砂を加え、冷却しながら摩砕した後、4℃、10000×g、10分遠心分離し、その上澄をタンパク質試料液とした。これをさらに次のように SDS 処理して泳動用試料液とした。0.5M トリス塩酸緩衝液 (pH6.8) 0.125ml、10% (w/v) SDS0.2ml、2-メルカプトエタノール0.05ml、タンパク質試料液0.625ml、総量1.0ml

とし、加熱処理を行った。これを室温まで冷却した後、0.05% (w/v) ブロムフェノールブルーと70% (w/v) グリセリンを含む0.0625M トリス塩酸緩衝液 (pH6.8) の0.1mlを加えて混合し、泳動用のタンパク質試料液とした。これを SDS-ポリアクリルアミドゲルスラブ電気泳動で分離し、銀染色法 (ワコー銀染色キット) により染色した。分子量の標準タンパク質としてオリエンタル酵母及びテフコより市販されているものを用いた。

実験結果

1. *in vitro* GS 活性と *in vivo* GS 活性との比較

GS 活性は *in vitro* と *in vivo* の測定法で活性に違いがみられるかどうか圃場のブルーベリーとリンゴ葉を用い検討を行った(第1図)。ブルーベリーでは *in vitro*、*in vivo* とで活性に大きな影響はみられなかったが、リンゴでは *in vitro* の方が約2倍ほど活性が高かった。ATP の影響は *in vitro* 活性への影響が大きく、ATP 添加でリンゴ葉の *in vitro* 活性が高まり、ブルーベリー葉の *in vitro* 活性の低下が認められた。

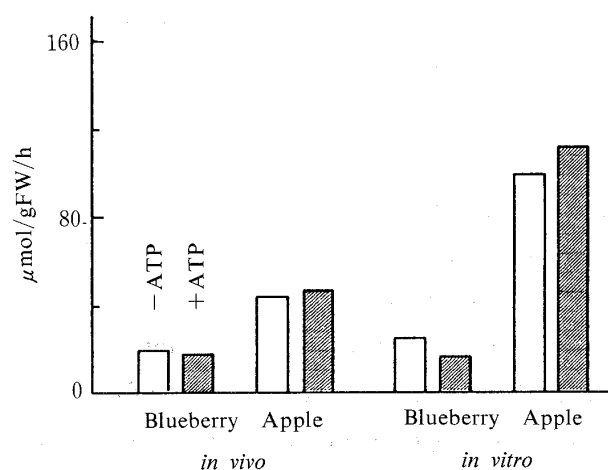


Fig.1. *In vitro* and *in vivo* GS activities of leaves.

2. *in vivo* GS 活性に及ぼす緩衝液の種類の影響

トリス塩酸緩衝液とリン酸緩衝液の2種類の緩衝液が *in vivo* GS 活性に及ぼす影響について圃場ブルーベリーとミカンで検討した (第1表)。ブルーベリー、ミカンとも葉の *in vivo* GS 活性はトリス塩酸緩衝液の方がリン酸緩衝液よりも高かった。ブルーベリー細根ではいずれの緩衝液でも活性が低く、緩衝液による影響は明らかではなかった。

Table 1. Effect of buffer solutions on *in vivo* GS activity of leaves and roots.

	$\mu\text{mol/gFW/h}$	
	pH7.5 Phosphate buffer	pH7.4 Tris-HCl buffer
Blueberry leaf	35.0	91.0
Blueberry root	3.8	1.6
Satsuma mandarin leaf	0.6	20.6

3. *in vivo* GS 活性に及ぼす pH の影響

in vivo GS 活性に及ぼす反応液 pH の影響について検討したところ (第2図)、ブルーベリー葉では pH が4.5付近から高まるにつれ活性も高まり、中性付近での活性が高かった。pH4付近より低下すると活性は高まるようだったが、これに伴い葉の褐変が観察された。

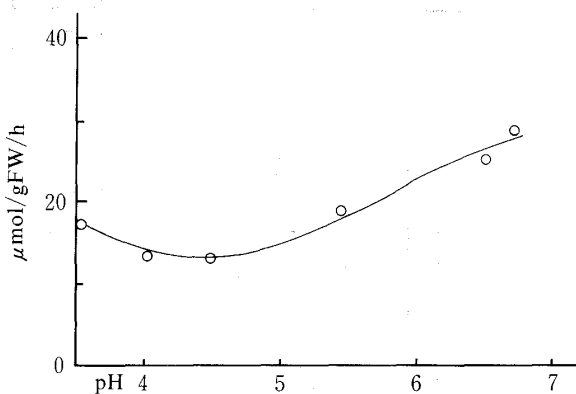


Fig.2. Effect of pH on *in vivo* GS activity of blueberry leaves.

4. *in vivo* GS 活性に及ぼす ATP の影響

in vivo GS 活性に対する ATP の影響についてみると (第3図)、ブルーベリーでは葉への影響はほとんど認められなかったが、細根では ATP の添加により活性の低下が認められた。リンゴでは ATP 添加により葉、細根いずれも活性が高まる傾向が認められた。リンゴの *in vivo* GS 活性は葉、細根ともにブルーベリーよりも高かった。

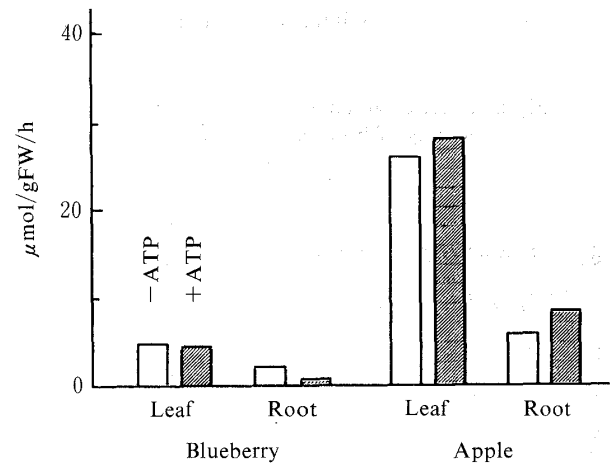


Fig.3. Effects of ATP on *in vivo* GS activities of leaves and roots.

5. *in vivo* GS 活性に及ぼすグルタミン酸の影響

ブルーベリー葉の *in vivo* GS 活性がグルタミン酸の濃度によってどのような変化を示すかについて検討したところ (第4図)、25~100mM では活性はフラットであったが、グルタミン酸濃度の低下に伴って活性は高まった。しかし、これに伴い反応液 pH が低下し、葉の褐変が観察された。

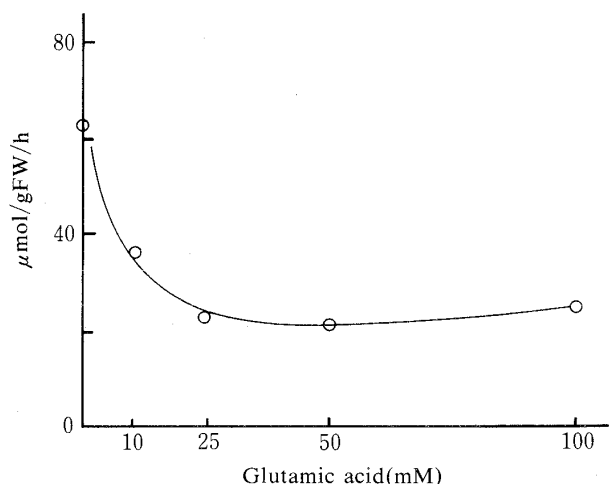


Fig.4. Effect of glutamic acid on *in vivo* GS activity of blueberry leaves.

6. SDS-PAGE パターン

圃場のブルーベリーとリンゴの葉及び細根の SDS-PAGE パターンを第 5 図に示した。ブルーベリー葉では 50kD 程度の特強いバンドが認められ、その他 75、37、20、14kD などに比較的強いバンドが認められ、その他弱いバンドが 5 本ほど認められた。リンゴ葉ではブルーベリー葉と同様に 50kD 付近に特に強いバンドが認められ、その他 20kD 付近の強いバンドとそれより弱いバンドが 10kD~100kD 程度まで 13 本ほど認められた。ブルーベリー細根では 60kD 付近に比較的強いバンドと 50kD に弱いバンドが認められた。リンゴ根ではブルーベリーと同様の個所とその他弱いバンドが 4 本ほど認められた。ブルーベリーもリンゴも細根では葉に比べバンドの数が少なくしかも弱かった。次に供給 N 形態と N 濃度を変えたブルーベリーの葉について 1% SDS を含む抽出液で抽出した場合について第 6 図に示した。いずれも 18、50、60kD の弱いバンドの他、14kD 付近に強いバンドがみられたが、この 14kD 付近のバンドは供給 N 形態により強さが明らかに異なった。供給 N 濃度が高い方が、また $\text{NO}_3\text{-N}$ の方が $\text{NH}_4\text{-N}$ よりも強かった。ブルーベリー細根では (第 7 図) 60kD 付近と 50、90kD 付近の弱いバンドが認められたが、N 形態の影響はみられなかった。リンゴの葉では (第 7 図) $\text{NO}_3\text{-N}$ の場合 55

kD 付近の明らかなバンドと 14、20、30、70 付近の非常に弱いバンドであったが、 $\text{NH}_4\text{-N}$ では 55 と 25kD 付近の明らかなバンドと、12、45kD 付近の弱いバンドのほか非常に弱いバンドが 4 本ほど認められ、特に $\text{NH}_4\text{-N}$ では 25kD 付近に比較的強いバンドがみられたのが $\text{NO}_3\text{-N}$ の場合と異なった。

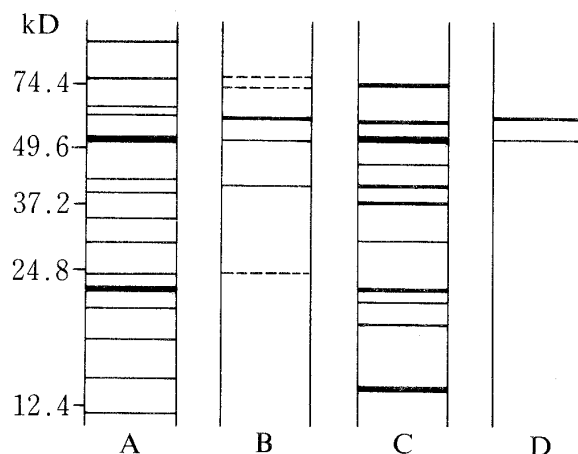


Fig.5. SDS-PAGE patterns of proteins from blueberry and apple trees. A, apple leaf; B, apple root; C, blueberry leaf; D, blueberry root. Leaves were taken on May 18 and roots on June 14.

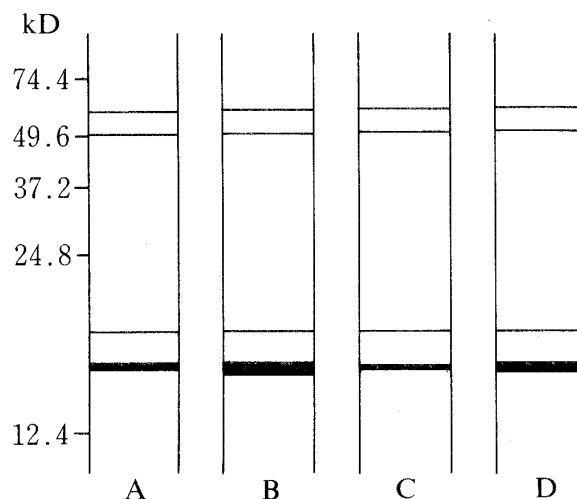


Fig.6. SDS-PAGE patterns of proteins from blueberry leaves supplied with different N forms. A, $\text{NO}_3\text{-N}$ 20ppm; B, $\text{NO}_3\text{-N}$ 40ppm; C, $\text{NH}_4\text{-N}$ 20ppm; D, $\text{NH}_4\text{-N}$ 40ppm.

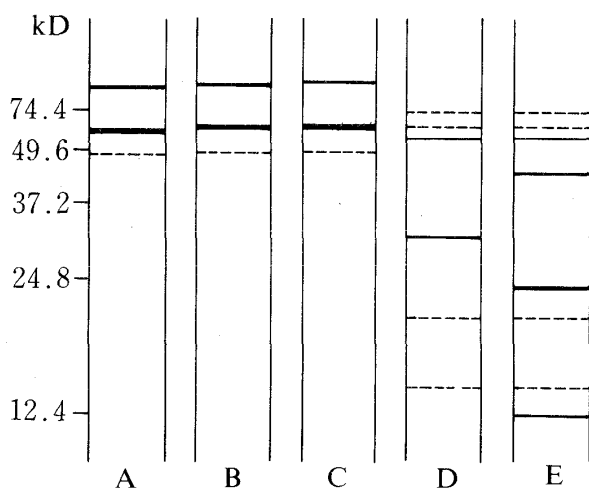


Fig.7. SDS-PAGE patterns of proteins from blueberry roots and apple leaves supplied with different N forms. A, blueberry root ($\text{NO}_3\text{-N}$); B, blueberry root ($\text{NH}_4\text{NO}_3\text{-N}$); C, blueberry root ($\text{NH}_4\text{-N}$); D, apple leaf ($\text{NO}_3\text{-N}$); E, apple leaf ($\text{NH}_4\text{-N}$). Blueberry roots were taken on May 6 and apple leaves on Sept.12.

考 察

ブルーベリーは一般に窒素源として硝酸態窒素よりもアンモニア態窒素供給の方が生育が良いことが認められている。その機作についてはブルーベリー樹の生理機能的特性面から、また菌根菌との関連、土壌酸性との関連などから検討されてきた。著者らはブルーベリーの窒素栄養に関して硝酸同化系酵素活性や樹体内に取り入れられた窒素の化学形態などについて検討してきた。その結果、ブルーベリーでは硝酸還元酵素活性がリンゴなどに比べ、根や葉で低く、特に葉では著しく低かった⁵⁾。また取り入れられた窒素は硝酸態窒素の供給ではアンモニア態窒素の供給に比べタンパク態窒素への取込み量が低く⁶⁾、硝酸態窒素ではアンモニア態窒素に比べ窒素の利用効率が低いと思われた。

本報告では吸収または硝酸の還元により生成されたアンモニアが代謝されていく過程と考えられるアンモニアからグルタミンへの変化に係わるグルタミン合成酵素活性とタンパク質として取り入れられた窒素の分子量による分別を行った。

GS 活性測定では一般に用いられている *in vitro* GS 活性の測定法に加え、細切した試料を使用して測定する *in vivo* GS 活性測定法でも検討を行った。ブルーベリー葉では *in vitro* と *in vivo* とはほぼ同程度の値を示すと考えられるが、リンゴでは *in vitro* の方が高い値を示すようであった。迅速に、しかもできるだけ生体内に近い状態の活性を把握するには *in vivo* GS 活性測定法は有用な方法と考えられた。ブルーベリーの GS 活性は ATP やグルタミン酸の添加により低下傾向がみられたが、これら添加による葉の褐変との関連が考えられる。硝酸還元酵素活性では Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、ATP などの添加により活性の低下がみられるという³⁾。リンゴに比較するとブルーベリーでは葉と根いずれにおいても GS 活性は低く、GS 系によるアンモニアの処理能力はリンゴよりも劣るものと考えられる。福元ら⁷⁾によればリンゴでは窒素供給によって根のグルタミンが $\text{NH}_4\text{-N}$ 供給で 4 倍、 $\text{NO}_3\text{-N}$ 供給で 3 倍ほど増加したが、shoot ではほとんど変化がなかったという。窒素同化系の硝酸還元酵素や GS などの生成に係わる遺伝子発現は窒素をシグナルとして制御されているといわれる¹³⁾。ブルーベリーでは葉中 N 含量は低く⁴⁾、N 要求量は低いものと考えられ、実際栽培上も N の施肥量は低いレベルで行われている。ブルーベリー葉中の N 化学形態分析では $\text{NH}_4\text{-N}$ の供給で葉中アンモニアが増加しやすい⁶⁾ことなどから、ブルーベリーではアンモニア耐性が高いというよりも硝酸耐性あるいは硝酸吸収力が低いことが $\text{NO}_3\text{-N}$ 供給により生育低下をもたらす原因になっていることも考えられる。

小俣¹⁰⁾によれば硝酸態窒素の吸収と吸収された硝酸態窒素の還元とは別の過程である可能性が示唆されており、硝酸還元酵素活性あるいは亜硝酸還元酵素活性が高くても硝酸輸送系が働かないと硝酸の利用効率が低いという。窒素形態による利用効率の違いは窒素吸収過程と両形態窒素が取り入れられていく過程である同化系酵素活性との両面の総合的な結果と考えられる。

窒素同化系酵素についての研究は多くの生物でなされている。ラン藻では 45kD のタンパク

が硝酸トランスロケーターであるかどうか検討されている¹⁰⁾。クロレラの硝酸還元酵素は分子量約100kD という¹²⁾。ハウレンソウ、トウモロコシなどでは亜硝酸還元酵素の分子量は60~70 kD くらいといわれる²⁾。

熊田⁸⁾によれば放線菌 GS では55kD と37.4 kD の2つのサブユニットを持つという。タバコ培養細胞の GS は41kD 程度のサブユニットからなるという¹⁴⁾。GS には細胞質に存在する41kD の GS 1 とクロロプラストに存在する44 kD の GS 2 の2つあるといわれる。細菌由来の GS は分子量52kD のサブユニット12個からなる巨大な分子という⁷⁾。pietilä ら¹¹⁾は空気中の窒素汚染物質が Bilberry の可溶性タンパク質の SDS-PAGE パターンに大きな影響を与えると報告している。

窒素同化系酵素は可溶性のものが多いので、可溶性タンパク質について SDS-PAGE 分析を行い、分子量別の分布パターンについて検討を行った。泳動パターンは樹種、器官、供給窒素形態などにより異なった。ブルーベリーではリンゴに比べ全体にバンドが弱く、タンパク質含量が低く、その種類も少ないことが分かった。しかし、他の生物の窒素同化系酵素で知られている分子量域にバンドがみられ、なかにはリンゴと同じ位置にバンドがみられるものもあり、また、逆にブルーベリーにみられ、リンゴにみられないものもあることから、この違いが何によるものか、どのバンドがどの酵素に対応しているか今後の検討が必要である。

摘 要

ブルーベリーの葉及び細根部のグルタミン合成酵素 (GS) 活性及び可溶性タンパクの SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動による検討を行った。

1. *in vitro* と *in vivo* の GS 活性を比較すると、ブルーベリー葉では両者で大きな違いはみられなかったが、リンゴ葉では *in vitro* の方が活性が高かった。

2. 緩衝液の影響をみると、ブルーベリー葉

の *in vivo* GS 活性はトリス塩酸緩衝液よりも高かった。

3. *in vivo* GS 活性に及ぼす pH の影響について検討したところ、ブルーベリー葉では pH4.5 付近から中性付近にかけ活性が高まった。

4. ブルーベリーの *in vivo* 及び *in vitro* GS 活性は葉、細根いずれもリンゴよりも低かった。ATP 添加によりリンゴでは葉、細根いずれも活性が高まる傾向であったが、ブルーベリーの細根では活性低下が認められた。

5. ブルーベリー葉の *in vivo* GS 活性に及ぼすグルタミン酸の影響について 0~100mM の範囲で検討したところ 0~25mM まで活性は低下し、それ以上では活性はほぼフラットであった。

6. SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動パターンはブルーベリー葉ではリンゴ葉よりもバンドの数が少なく、泳動パターンも異なった。細根でも同様にブルーベリーではリンゴよりもバンド数が少なかった。ブルーベリー葉では15 kD 付近のバンドが供給 N 形態、N 濃度によって影響を受けた。しかしブルーベリー根では供給 N 形態による影響は受けなかった。

文 献

1. 福元将志・長井晃四郎. 1982. リンゴ実生の窒素同化におけるグルタミンとアスパラギンの役割. 果樹試報 C. 9 : 49-59.
2. 井田正二. 1976. 亜硝酸還元酵素・植物酵素・蛋白質研究法. p.349-355. 共立出版.
3. Kaiser, W. M. and D. Spill. 1991. Rapid modulation of spinach leaf nitrate reductase by photosynthesis. Plant Physiol. 96 : 368-375.
4. 片倉芳雄・横溝 久. 1986. ラビットアイ・ブルーベリーの養分吸収、生育および果実に及ぼす供給窒素形態の影響. 恵泉女学園短大研究紀要. 19 : 3-21.
5. 片倉芳雄・横溝 久. 1988. ハイブッシュ及びラビットアイ・ブルーベリー樹の硝酸還元能. 恵泉女学園短大研究紀要. 21 : 91

6. 片倉芳雄・横溝 久, 1989. ブルーベリー一樹体中窒素化合物の分画と、それに及ぼす供給窒素形態、培養液 pH の影響. 恵泉女学園短大研究紀要. 22 : 3-17.
7. 加藤博章・小田順一, 1991. CN 結合酵素系の構造に関する最近の進歩. 日本農芸化学会誌. 65 : 1786-1790.
8. 熊田庸一, 1990. ビアラホス生産菌のグルタミン合成酵素遺伝子. 化学と生物. 28 : 423-424.
9. 宮崎 香・長尾嘉信・斎藤 拓, 1981. SDS ゲルディスク電気泳動法および SDS ゲルスラブ電気泳動法. p.314-333. 堀尾武一・山下仁平編. 蛋白質・酵素の基礎実験法. 南江堂.
10. 小俣達男, 1990. 植物の硝酸トランスロケータの検索. 化学と生物. 28 : 210-211.
11. Pietilä, M., P. Lahdesmaki, T. Pakonen, K. Laine, E. Saari and P. Havas. 1990. Effect of nitrogenous air pollutants on changes in protein spectra with the onset of winter in the leaves and shoots of the bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.). *Environmental Pollution*. 66 : 103-116.
12. Poulle, M., Ann Oaks, P. Bzonek, V. J. Goodfellow, and L. P. Solomonson. 1987. Characterization of nitrate reductases from corn leaves. *Plant Physiol*. 85 : 375-378.
13. 鈴木石根, 1990. 窒素をシグナルとする光合成タンパク質遺伝子の制御. 化学と生物. 28 : 418-419.
14. Yamaya, T., H. Ishida, K. Kamachi, and K. Ojima. 1990. Immunochemical analysis of multiple subunit polypeptides of glutamine synthetase in methionine sulfoximine-sensitive and tolerant tobacco cell cultures. *Plant Cell Physiol*. 31 : 325-331.
15. 山谷知行, 1990. 窒素代謝関連酵素活性の測定法. アンモニア同化系酵素. p.263-266. 植物栄養実験法編集委員会編. 植物栄養実験法. 博友社.