

## 第四章

### コリン類縁体およびN-置換 グリシン類縁体が光独立栄養細胞に 与える影響

#### 第四章 光合成促進物質が光独立栄養細胞に与える影響

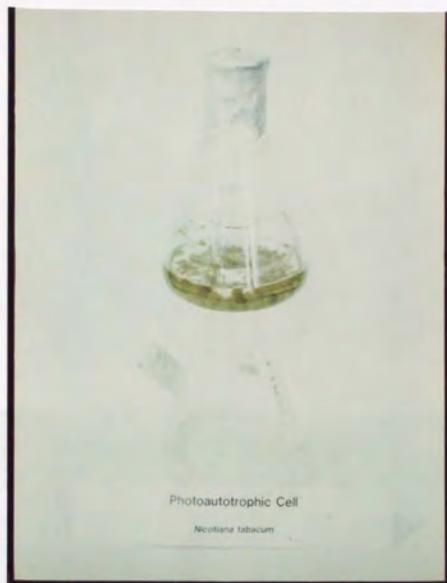
これまで述べたように、著者は小麦プロトプラストと酸素電極を用いた簡単な検定法を用いて、コリンおよびコリン類縁体とN-置換グリシン類縁体のいくつかが光合成促進物質であることを明らかにした。そして、これら化合物の代謝経路を決定することにより、これら化合物の代謝産物が光合成促進活性を示すのではなく、そのままの形で活性を示していることや、コリン類縁体がいくつかの植物ホルモンとの相互作用を有することも同時に明らかにした。しかし、これら化合物の示す光合成促進活性の作用機作はいまだ不明である。一般に、植物生理作用の作用機作を調べるにあたり、いくつかの研究方法が考えられる。たとえば、完全な植物体を用いた研究、葉切片を用いた研究、単離した植物細胞を用いた研究、緑藻類を用いた研究、葉緑体を用いた研究等が上げられる。しかし、完全な植物体を用いた場合、全体の反応を見るにはよいが、余りに複雑すぎて解析が難しかったり、単離した細胞は反応の解析は容易であるにしても、その単離過程で正常な生理作用が失われている可能性があるというように、それぞれ長所と短所を合わせ持つ<sup>9,10)</sup>。さらに、コリンおよびコリン類縁体とN-置換グリシン類縁体の光合成促進活性の作用機作を調べるにあたり最大の難点は、これら化合物による光合成の促進率が少ないことである。そこで、これら化合物の作用機作を調べるためには既存の方法ではなく新しい方法を検討する必要がある。

近年、植物細胞工学の発展により光合成活性を有し光合成のみにより生育する培養細胞である光独立栄養培養細胞や(図4-1)、培地中の糖に

依存しながらも光合成促進活性を有する光mixotrophic培養細胞（図4-2）がいくつかの植物において報告されている<sup>91)92)93)94)</sup>。これらの培養細胞は、光合成活性を有しているので各種光合成阻害の除草剤研究に非常に有効であることが報告されており<sup>95)</sup>、これら細胞は光合成促進活性の研究においても有用であると思われる。さらに、培養細胞を用いることにより長時間の影響を検討でき、小さい光合成促進活性によって引き起こされる種々の影響が、大きい活性となって認められる可能性もある。この章では、タバコやアオビユの培養細胞を用いて、コリンおよびコリン類縁体とN-置換グリシン類縁体の影響を検討することにより、これら化合物の有する光合成促進活性の作用機作について研究を行った結果について述べる。



a



b

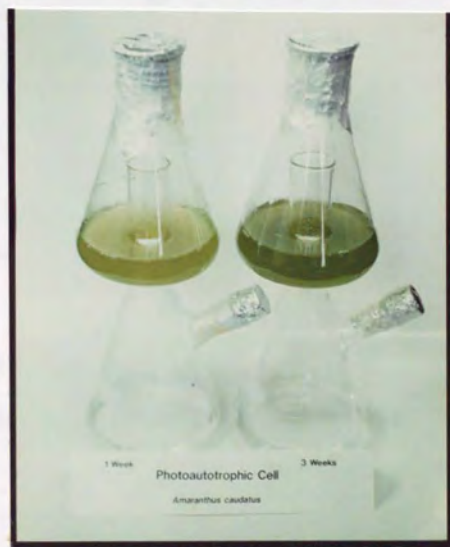


図 4 - 1 光合成に依存した生育を示す光独立栄養培養細胞。  
a: タバコ (*Nicotiana tabacum*, var. samsun) の光独立栄養培養細胞  
b: アオビユ (*Amaranthus retroflexus*) の光独立栄養培養細胞



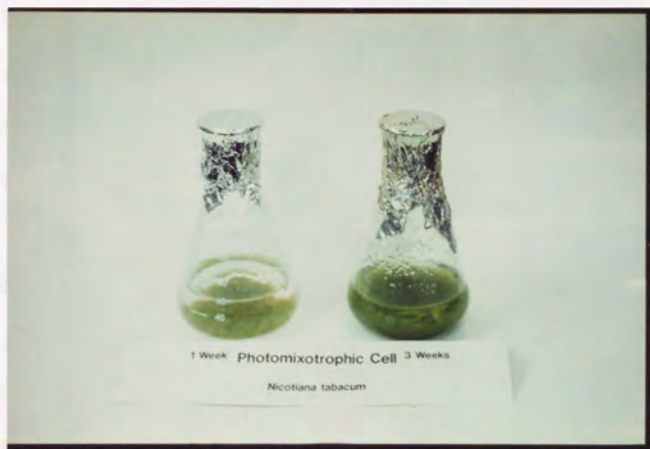


図 4-2 光合成と培地の糖に依存した生育を示す光mixotrophic栄養培養細胞。写真はタバコ (*Nicotiana tabacum*, var. samsun) の光mixotrophic栄養培養細胞である。

#### 4-1 培養細胞の光合成に与える影響

##### 4-1-1 光mixotrophic培養細胞の光合成に与える影響

光mixotrophic培養細胞は、培地中の糖に依存しつつ光合成を行う従属栄養細胞と光独立栄養培養細胞の中間の性質をしめす培養細胞である。培地中の糖に依存しているという点から、完全な光合成システムを有していないことが予想され、植物の光合成研究には問題があるが、生育が速いことと比較的高い光合成活性を有するということから、まずこの培養細胞の光合成に与える影響を調べた。検定はタバコ (*Nicotiana tabacum*, var. *samsun*) の光mixotrophic培養細胞 (図 4-2 参) を用い、光合成の測定は酸素電極を用いた。まず、コリンがタバコ光mixotrophic培養細胞の光合成にどのような影響を与えているか検討した。表 4-1 で示すように、コリンを 1、10、100 ppm の濃度で処理したところ、処理後 1 週間の光合成量がコントロールに比べ約 20-40% 促進されることが明らかになった。さらにそのまま培養し、2 週間後と 3 週間後の光合成活性を調べたところ、2 週間後では 20-30% の同じ様な光合成促進活性を示したが、3 週間後では数% 程度の弱い促進活性しか認められなかった。この光合成促進活性が最大になるコリンの濃度を調べたところ、検定した濃度では 10 ppm の濃度がいちばん高い光合成活性を検定全期間で示し、この濃度付近に最大活性濃度があると推定された。

つぎに、アリルコリンについても同様の検討を行った。その結果、処理後 1 週間の光合成は 1 ppm 処理で 20% 前後の促進を示したものの、5 ppm で 8% の促進を、10 ppm では逆に 6% 程度の阻害を示した。アリルコリン処理 2 週間後の光合成は、10 ppm 処理区ではやはり弱い阻

| compound       | Concentration | Photosynthesis ( $\mu\text{mol O}_2/\text{mg Chl h}$ ) |          |          |
|----------------|---------------|--|----------|----------|
|                |               | 1Week  | 2Weeks   | 3Weeks   |
| Choline        | 1ppm          | 128(127%)  | 78(124%) | 40(111%) |
|                | 10ppm         | 137(137%)  | 85(135%) | 42(117%) |
|                | 100ppm        | 120(119%)  | 72(115%) | 38(106%) |
| Allylcholine   | 1ppm          | 120(119%)  | 85(135%) | 41(115%) |
|                | 5ppm          | 109(108%)  | 81(128%) | 38(106%) |
|                | 10ppm         | 95 (94%)   | 62 (98%) | 36(100%) |
| Benzylcholine  | 1ppm          | 142(141%)  | 88(139%) | 39(109%) |
|                | 5ppm          | 138(137%)  | 77(122%) | 42(117%) |
|                | 10ppm         | 110(109%)  | 72(115%) | 37(103%) |
| N-Allylglycine | 1ppm          | 140(139%)  | 76(121%) | 42(117%) |
|                | 10ppm         | 132(130%)  | 70(111%) | 37(103%) |
|                | 100ppm        | 98 (97%)   | 62 (98%) | 35 (98%) |
| Control        |               | 101(100%)  | 63(100%) | 36(100%) |

表4-1 コリン、アリルコリン、ベンジルコリンとN-アリルグリシンがタバコ光mixotrophic培養細胞の光合成に与える影響。表中の％はコントロールの光合成活性に対する値である。



害活性を示したものの、1、5 ppm処理区で20-30%の高い光合成促進活性を示した。さらに、処理後3週間では1 ppm処理区で10%前後の光合成促進活性を示し、これまで阻害活性が認められていた10 ppm処理区でも阻害活性が認められなくなった。アリルコリンの示す光合成促進活性の最大活性濃度はコリンと比較すると薄い濃度であり、検定の結果から推察すると、アリルコリンの最大活性濃度は1 ppm程度であると思われる。

コリン類縁体の中で唯一サイトカイニン活性を示すベンジルコリン（第三章参照）についても同様の検定を行った。ベンジルコリンの濃度は1-10 ppmとした。表4-1で示すように、ベンジルコリン処理1週間後の光合成は1 ppm処理区で41%と非常に高い活性を示し、ついで5 ppm処理区で37%、10 ppm処理区で9%という光合成促進活性を示した。2週間後の光合成は1 ppm処理区で39%、5 ppm処理区で22%、5 ppm処理区でも15%と引き続き高い促進活性を示すことが明らかになった。さらに、3週間後の光合成は5 ppm処理区で17%、他の区でも弱いながら光合成促進活性を示した。ベンジルコリンの場合は、検定の全期間で、他のコリン類縁体よりも高い光合成促進活性を示していた。また、ベンジルコリンの最大活性濃度はアリルコリンと同程度だと推定されるが、アリルコリンで阻害を示した10 ppmの濃度でもベンジルコリンは光合成促進活性を示しており、アリルコリンに比べ広い光合成促進活性の濃度範囲を有することも同時に明らかになった。

一方、もう一つの光合成促進物質であるN-置換グリシン類縁体についても検定を行った。検定試薬としては、比較的光合成促進活性が強く代謝

の研究にも用いたN-アリルグリシンを選んだ。検定の結果、表4-1で示すようにN-アリルグリシン処理1週間後の1、10ppm処理区の光合成活性がコントロールに比べ約30-40%も促進されることが明らかになった。しかし、100ppm処理区では約3%の阻害活性を示した。このN-アリルグリシンの示す光合成促進活性はコリンや他の類縁体と同じように時間とともに徐々に減少し、2週間後には1ppm処理区で21%、10ppm処理区では11%の促進をそれぞれ示し、100ppm処理区では逆に弱い阻害を示した。3週間後ではN-アリルグリシン1ppm処理区で17%の促進を示した他は、ほとんど光合成に影響を与えないか弱い阻害を示した。N-アリルグリシンは10ppm処理区においても比較的高い光合成促進活性を有していることから、アリルコリンやベンジルコリンに比べ高い濃度で最大活性を示すものと思われる。このように、検定した全ての化合物がその濃度や活性の違いはあれタバコ光mixotrophic培養細胞の光合成を促進することが明らかになった。

#### 4-1-2 光独立栄養培養細胞の光合成に与える影響

上記のように、コリンおよびコリン類縁体とN-置換グリシン類縁体で光mixotrophic培養細胞の光合成が促進されることが明らかになった。しかし、前述の通り光mixotrophic培養細胞は光合成活性を有しているものの、その生育は培地の糖に依存しており、葉緑体の機能もインタクトな植物体の葉緑体に比べると不完全であるため、光mixotrophic培養細胞だけの実験では光合成促進活性を論じることは出来ない。そこでまず、タバコの光独立栄養培養細胞を用いた実験を行った。コリン、アリルコリン、ベンジル



コリンとN-アリルグリシンを用いて光合成に与える影響を調べたが、光mixotrophic培養細胞のような強い光合成促進活性は認められなかった。この理由として、タバコの光独立栄養培養細胞は比較的大きな塊を形成するため(図4-1 a参)、検定試薬が中の細胞にまで行き渡らず促進効果が弱められているのではないかと考えた。さらに、このタバコの光独立栄養培養細胞は酸素電極で光合成を測定するとき、その細胞が大きいため反応槽中の反応液の攪拌にむらが生じ、その結果、測定誤差がでやすくこの検定には適さなかった。そこで、比較的小さな細胞集塊を形成するアオビユ(*Amaranthus retroflexus*)を(図4-1 b参)検定に用いることにした。検定の結果は表4-2に示した。この表が示すように、まずコリン10 ppm処理区で処理1週間後の光合成が42%も促進され、100 ppm処理区でもコントロールに比べ33%の促進活性を示した。処理2週間後ではコリン10、100 ppmともにやはり約30-40%の光合成促進活性を示した。この光合成促進活性は時間経過とともに減少していくものの、処理後3週間目でも光独立栄養培養細胞の光合成はコントロールに比べそれぞれ10 ppm処理区で19%、100 ppm処理区で15%の促進を示した。さらに、光独立栄養培養細胞におけるコリンの最大活性濃度は、光mixotrophic培養細胞で認められた濃度とほぼ同じであると推定された。このような結果は、光mixotrophic培養細胞で認められた結果とほぼ同じであり、コリンはこれら培養細胞に作用し光合成促進活性を示していることが明らかとなった。

つぎに、コリン類縁体であるアリルコリンとベンジルコリンについても *Amaranthus retroflexus*の光独立栄養培養細胞の光合成に与える影響を検



| Compound       | Concentration | Photosynthesis ( $\mu\text{mol O}_2/\text{mg Chl}\cdot\text{h}$ ) |           |          |
|----------------|---------------|---|-----------|----------|
|                |               | 1week   | 2weeks    | 3weeks   |
| Choline        | 10ppm         | 156(142%)   | 128(131%) | 93(119%) |
|                | 100ppm        | 146(133%)   | 134(137%) | 90(115%) |
| Allylcholine   | 1ppm          | 143(130%)   | 125(128%) | 88(113%) |
|                | 5ppm          | 140(127%)   | 113(115%) | 96(123%) |
| Benzylcholine  | 1ppm          | 158(144%)   | 142(145%) | 89(114%) |
|                | 5ppm          | 164(149%)   | 130(133%) | 65( 83%) |
| N-Allylglycine | 1ppm          | 139(126%)   | 119(121%) | 95(122%) |
|                | 10ppm         | 147(134%)   | 128(131%) | 73( 94%) |
| Control        |               | 110(100%)   | 98(100%)  | 78(100%) |

表 4-2 コリン、アリルコリン、ベンジルコリンとN-アリルグリシン  
 がアオビユ光独立栄養培養細胞の光合成に与える影響。表中の  
 %はコントロールの光合成活性に対する値である。

討した。その結果、アリルコリン処理1週間後に1 ppm処理区で30%、5 ppm処理区で27%の光合成促進を示した。この促進活性は、光mixotrophic培養細胞で得られた結果と同様に、その後徐々に減少して行き、処理2週間後に1 ppm処理区で28%、5 ppm処理区で15%の促進率を、処理3週間後に1 ppm処理区で13%、5 ppm処理区で23%の光合成促進活性を示した。また、ベンジルコリンも似たような結果を示した。処理1週間後に1 ppm処理区の光合成活性はコントロールに比べて1 ppm処理区で44%、5 ppm処理区では49%という非常に高い促進率を示した。この促進活性は処理2週間後に若干減少するものの、1 ppm処理区で45%、5 ppm処理区で33%の光合成促進活性を示した。しかし、その後は急速に活性が減少し、3週間後には1 ppm処理区で14%の促進率を示すものの5 ppm処理区では逆に10%程度の阻害を示した。ベンジルコリンが有する活性を他のコリン類縁体と比較すると、最大活性濃度はアリルコリンと同定度であると推定されるが、他のコリン類縁体に比べ光合成促進活性が強いことが特徴である。さらに、この高い光合成促進活性は2週間後も維持されるが、その後急速に減少するという他の化合物では認められない興味深い結果を示した。

もう一つの光合成促進物質であるN-アリルグリシンについてもアオビユの光独立栄養培養細胞をもちいた検定を行った(表4-2)。その結果、N-アリルグリシンも光mixotrophic培養細胞で認められたのと同様な結果を与えることが明らかになった。すなわち、処理1週間後の光合成活性は1 ppm処理区で26%、10 ppm処理区で34%促進された。そして、この光合成促進活性はその後時間経過とともに徐々に減少し、2週間後に

| Compound       | Concentration | Respiration ( $\mu\text{mol O}_2/\text{g FW h}$ ) |          |          |
|----------------|---------------|---|----------|----------|
|                |               | 1week   | 2weeks   | 3weeks   |
| Choline        | 1ppm          | 35(125%)  | 22(120%) | 14(88%)  |
|                | 10ppm         | 37(137%)  | 23(128%) | 15(93%)  |
|                | 100ppm        | 31(111%)  | 19(106%) | 14(88%)  |
| Allylcholine   | 1ppm          | 38(135%)  | 23(128%) | 15(93%)  |
|                | 5ppm          | 36(129%)  | 25(139%) | 14(88%)  |
|                | 10ppm         | 36(129%)  | 21(119%) | 10(63%)  |
| Benzylcholine  | 1ppm          | 36(129%)  | 22(133%) | 15(93%)  |
|                | 5ppm          | 35(125%)  | 24(133%) | 15(93%)  |
|                | 10ppm         | 32(114%)  | 19(110%) | 13(81%)  |
| N-Allylglycine | 1ppm          | 35(125%)  | 24(132%) | 15(93%)  |
|                | 10ppm         | 34(121%)  | 23(128%) | 15(93%)  |
|                | 100ppm        | 30(107%)  | 20(112%) | 11(69%)  |
| Control        |               | 28(100%)  | 18(100%) | 16(100%) |

表4-3 コリン、アリルコリン、ベンジルコリンとN-アリルグリシンがタバコ光mixotrophic培養細胞の呼吸に与える影響。表中の％はコントロールの呼吸活性に対する値である。



1 p p m処理区が21%、10 p p m処理区が31%の光合成促進活性を、3週間後には1 p p m処理区で22%の促進を、10 p p m処理区では逆に弱い阻害活性を示した。また、この検定でのN-アリルグリシンの最大活性濃度は、やはり光mixotrophic培養細胞の時と同様の約10 p p mと推定される。

#### 4-2 培養細胞の呼吸に与える影響

##### 4-2-1 光mixotrophic培養細胞の暗呼吸に与える影響

コリン、アリルコリン、ベンジルコリンとN-アリルグリシンが光mixotrophic培養細胞の呼吸に与える影響を検討した。呼吸の検定は、暗呼吸だけの酸素消費速度を求めるため（即ち光呼吸の無い条件で）光をあてない状態で測定することとし、さらに10 mMのNaHCO<sub>3</sub>を加え炭酸ガス濃度を高めた状態で行った。

まず、コリンについて検定を行った（表4-3）。コリン処理後1週間で呼吸活性はコントロールに比べ1 p p m処理区で25%、10 p p m処理区で37%、100 p p m処理区で11%の促進された。この促進活性は2週間後でも約20%前後促進されたが、3週間後には処理した濃度の全ての区で弱い阻害活性を示した。また、アリルコリンについても同様の検定を行った結果、処理1週間後に1 p p m処理区で35%、5 p p m処理区で29%、10 p p m処理区で29%の呼吸活性促進が認められた。この呼吸活性は、処理2週間後には1、5、10 p p m処理区でコントロールに比べそれぞれ28%、39%、19%の促進を示したが、処理3週間後では逆に、それぞれ7%、12%、37%の呼吸阻害活性を示した。

| Compound       | Concentration | Respiration ( $\mu\text{mol O}_2/\text{g FW h}$ ) |          |          |
|----------------|---------------|---|----------|----------|
|                |               | 1week   | 2weeks   | 3weeks   |
| Choline        | 10ppm         | 37(116%)  | 32(114%) | 20(91%)  |
|                | 100ppm        | 40(125%)  | 33(118%) | 21(95%)  |
| Allylcholine   | 1ppm          | 42(131%)  | 33(118%) | 19(86%)  |
|                | 5ppm          | 38(119%)  | 35(125%) | 18(82%)  |
| Benzylcholine  | 1ppm          | 36(113%)  | 38(136%) | 20(91%)  |
|                | 5ppm          | 44(137%)  | 36(129%) | 20(91%)  |
| N-Allylglycine | 1ppm          | 37(116%)  | 29(104%) | 18(82%)  |
|                | 10ppm         | 41(128%)  | 31(111%) | 17(77%)  |
| Control        |               | 32(100%)  | 28(100%) | 22(100%) |

表 4-4 コリン、アリルコリン、ベンジルコリンとN-アリルグリシンがアオビユ光独立栄養培養細胞の呼吸に与える影響。表中の%はコントロールの呼吸に対する値である。

ベンジルコリンについても同様の実験を行った結果、コリン、アリルコリンが呼吸活性に与えた結果と同様な結果を示した。ベンジルコリン処理1週間後で呼吸活性は1 p p m処理区で29%、5 p p m処理区で25%、10 p p m処理区で14%の促進された。そして、2週間後ではこの呼吸促進活性が認められるものの、処理3週間後では逆に約10%前後の呼吸抑制活性を示した。

さらに、N-アリルグリシンについても同様の検討を行った。その結果、やはりコリンで認められたのと同様に、処理1週間後では1 p p m処理区で25%、10 p p m処理区で21%、100 p p m処理区で7%の促進が認められ、2週間後にはそれぞれ32%、28%、12%、の呼吸活性の促進を示した。しかし、この促進活性は3週間後にはそれぞれ7%、7%、31%の呼吸抑制活性を示した。

#### 4-2-2 光独立栄養培養細胞の呼吸に与える影響

コリンおよびコリン類縁体とN-アリルグリシンがタバコ光mixotrophic培養細胞の呼吸活性に影響を及ぼしていることが明らかになったので、光独立栄養培養細胞についても検討を行うことにした。まず、タバコ光独立栄養培養細胞を用いて呼吸活性に与える影響を検討したが、光合成活性を検討したときと同じ理由でその影響を確認することが出来なかった。そこで、やはり比較的小さな細胞集塊を形成するアオビユを用いて呼吸活性に与える影響を検討することにした。

検定の結果を表4-4に示した。この表で明らかのようにコリン10、100 p p m処理区、アリルコリン1、5 p p m処理区、ベンジルコリン



1、5 p p m処理区ともに処理1、2週間後の呼吸活性はタバコ光mixotrophic培養細胞の場合と同様に、10-30%促進されることが明らかになった。さらに、処理3週間後の呼吸活性もまた、コリン、アリルコリン、ベンジルコリンの全ての処理区で若干抑制された。

一方、N-アリルグリシンもまた表4-4で示すように、処理1、2週間後では呼吸活性の促進が認められるが、3週間後では逆に弱い呼吸活性の抑制が認められるという光mixotrophic培養細胞と同様の結果が得られた。

#### 4-3 培養細胞の生育に与える影響

コリンおよびコリン類縁体とN-アリルグリシンがそれぞれ異なる栄養状態にある3種類の培養細胞（従属栄養培養細胞、光mixotrophic培養細胞、光独立栄養培養細胞）の生育に与える影響を検定した。培養細胞の生育は、培養細胞の生重量と乾物重量をそれぞれ測定することにより評価した。

##### 4-3-1 光mixotrophic培養細胞の生育に与える影響

まず、コリン類縁体がタバコ光mixotrophic培養細胞の生重量に与える影響を検討した。各検定化合物をそれぞれ所定の濃度になるように培地に加え、その培地中で光mixotrophic培養細胞を生育させ1、2、3週間後の細胞の生重量を測定した。なお、各検定サンプルは最初に培地に加え、その後は検定終了時まで加えない1回投与とした。

コリンについて検定を行った結果、表4-5で示すようにコリン1 p p m、10 p p m、100 p p m処理区において処理後1週間、2週間ともに細胞の生重量にはほとんど影響を与えないことが明らかになった。しか

し、コリン処理3週間後にコリン1 ppm処理区で20%、10 ppm処理区で35%、100 ppm処理区で44%の生重量の増加が認められた。このときの最大生重量増加活性を示すコリンの濃度は、10 ppm程度と推定されるが、この濃度はコリンの光合成促進活性の最大活性濃度とほぼ同じであった。アリルコリンも同様の検定を行ったところ、やはりアリルコリン1、5、10 ppmの処理で、処理1、2週間後の生重量にはなんら影響を与えないが、処理3週間後にはコントロールに比べその生重量がアリルコリン1 ppm処理区で32%、5 ppm処理区で27%、10 ppm処理区で24%増加した。また、このときの最大活性濃度はアリルコリンが示した光合成促進の最大活性濃度とほぼ同じであると推定される。コリン類縁体の一つであるベンジルコリンは、コリンやアリルコリンとは少々異なった結果を与えた。ベンジルコリンをそれぞれ1、5、10 ppmの濃度になるように培地に加え細胞の培養を行ったところ、処理1週間後の生重量はコントロールに比べ1 ppm処理区で39%、5 ppm処理区で50%、10 ppm処理区で6%の生重量の増加が認められた。さらに、処理2週間後には、この生重量の増加はそれぞれ49%、28%、22%という値を示し、処理3週間後でもそれぞれ59%、53%、51%という非常に大きい生重量の増加が認められた。

このように、ベンジルコリンで処理された培養細胞は、ベンジルコリンで処理した直後から生重量の増加が認められることが明らかになった。さらに興味深いことに、ベンジルコリン10 ppm処理区で処理1週間後では生重量の増加はほとんど認められないが、そのまま培養していくと3週間後には大きな生重量の増加が認められた。

| Compound       | Concentration | Fresh Weight (g) |            |            |
|----------------|---------------|------------------|------------|------------|
|                |               | 1week            | 2weeks     | 3weeks     |
| Choline        | 1ppm          | 1.9(106%)        | 8.2(100%)  | 10.2(120%) |
|                | 10ppm         | 2.0(111%)        | 8.0( 98%)  | 11.5(135%) |
|                | 100ppm        | 1.7( 94%)        | 7.9( 96%)  | 12.2(144%) |
| Allylcholine   | 1ppm          | 1.8(100%)        | 8.5(104%)  | 11.2(132%) |
|                | 5ppm          | 1.9(106%)        | 7.9( 96%)  | 10.8(127%) |
|                | 10ppm         | 2.0(111%)        | 7.8( 95%)  | 10.5(124%) |
| Benzylcholine  | 1ppm          | 2.5(139%)        | 12.2(149%) | 13.5(159%) |
|                | 5ppm          | 2.7(150%)        | 10.5(128%) | 13.0(153%) |
|                | 10ppm         | 1.9(106%)        | 10.0(122%) | 12.8(151%) |
| N-Allylglycine | 1ppm          | 1.8(100%)        | 8.5(104%)  | 10.0(118%) |
|                | 10ppm         | 1.9(106%)        | 9.2(112%)  | 12.2(144%) |
|                | 100ppm        | 1.5( 83%)        | 7.7( 94%)  | 7.8( 92%)  |
| Control        |               | 1.8(100%)        | 8.2(100%)  | 8.5(100%)  |

表 4-5 コリン、アリルコリン、ベンジルコリンとN-アリルグリシンがタバコ光mixotrophic培養細胞の生重量に与える影響。表中の％はコントロールの生重量に対する値である。



| Compound       | Concentration | Dry Weight (mg) |           |           |
|----------------|---------------|-----------------|-----------|-----------|
|                |               | 1week           | 2weeks    | 3weeks    |
| Choline        | 1ppm          | 120( 99%)       | 325( 98%) | 390(115%) |
|                | 10ppm         | 119( 98%)       | 338(102%) | 426(125%) |
|                | 100ppm        | 115( 95%)       | 318( 96%) | 448(131%) |
| Allylcholine   | 1ppm          | 122(101%)       | 320( 96%) | 412(121%) |
|                | 5ppm          | 125(103%)       | 308( 93%) | 408(120%) |
|                | 10ppm         | 130(107%)       | 310( 93%) | 395(116%) |
| Benzylcholine  | 1ppm          | 162(134%)       | 398(120%) | 478(140%) |
|                | 5ppm          | 143(118%)       | 415(125%) | 453(133%) |
|                | 10ppm         | 118( 98%)       | 365(110%) | 435(128%) |
| N-Allylglycine | 1ppm          | 118( 98%)       | 326( 98%) | 376(111%) |
|                | 10ppm         | 125(103%)       | 330( 99%) | 445(131%) |
|                | 100ppm        | 110( 91%)       | 310( 93%) | 320( 94%) |
| Control        |               | 121(100%)       | 332(100%) | 340(100%) |

表 4-6 コリン、アリルコリン、ベンジルコリンとN-アリルグリシンがタバコ光mixotrophic培養細胞の乾物重量に与える影響。表中の％はコントロールの乾物重量に対する値である。

N-アリルグリシンについても同様な検定を行った。N-アリルグリシンをそれぞれ1、10、100 ppmになるように培地に加え細胞を培養したところ、処理1週間、2週間後では処理した全ての区で生重量の増加は認められず、N-アリルグリシン100 ppm処理区では10-15%程度の生育抑制が認められた。しかし、培養3週間後の1 ppm、10 ppm処理区でそれぞれ18%、44%の生重量の増加が認められた。100 ppm処理区では生重量の増加は認められなかった。

つぎに、生重量に与える影響を検討した化合物について、光mixotrophic培養細胞の乾物重量に与える影響も併せて検討した。生重量は、水分を含んだ細胞の重量なので実際の細胞の同化量をはかっているのではない。そこで、培養細胞の生育について議論する場合、乾物重量の測定が必要になる。まず、コリン、アリルコリン、について生重量を測定したのと同じ濃度で検定を行った。その結果、表4-6で示すように処理1、2週間後では乾物重量の増加は認められなかったが、処理3週間後では約20-30%の乾物重量の増加が認められた。また、ベンジルコリンは処理1週間後に約20-30%乾物重量の増加が認められた。そしてこの増加はその後の培養においても認められ、処理3週間後では約30-40%の増加を示した。

N-アリルグリシンの場合もコリン、アリルコリンで認められたのと同じような結果を与えた。すなわち、処理1週間、2週間後では乾物重量の増加は認められないが、処理後3週間では約20-30%の乾物重量の増加が認められた。以上の結果は、コリンおよびコリン類縁体とN-アリルグリシンで認められた生重量の増加は、水分量の増加ではなく同化量の増

| Compound       | Concentration | Fresh Weight (g) |           |            |
|----------------|---------------|------------------|-----------|------------|
|                |               | 1week            | 2weeks    | 3weeks     |
| Choline        | 10ppm         | 1.7(113%)        | 4.2( 98%) | 12.6(148%) |
|                | 100ppm        | 1.4( 93%)        | 4.7(109%) | 11.8(139%) |
| Allylcholine   | 1ppm          | 1.8(120%)        | 4.2( 98%) | 11.8(139%) |
|                | 5ppm          | 1.2( 80%)        | 4.0( 93%) | 11.5(135%) |
| Benzylcholine  | 1ppm          | 2.6(173%)        | 5.6(130%) | 12.8(151%) |
|                | 5ppm          | 2.2(147%)        | 7.8(181%) | 14.5(171%) |
| N-Allylglycine | 1ppm          | 1.4( 93%)        | 4.9(114%) | 11.2(132%) |
|                | 10ppm         | 1.9(126%)        | 4.2( 98%) | 12.4(146%) |
| Control        |               | 1.5(100%)        | 4.3(100%) | 8.5(100%)  |

表4-7 コリン、アリルコリン、ベンジルコリンとN-アリルグリシンがアオビユ光独立栄養培養細胞の生重量に与える影響。表中の%はコントロールの生重量に対する値である。



| Compound       | Concentration | Dry Weight (mg) |           |           |
|----------------|---------------|-----------------|-----------|-----------|
|                |               | 1week           | 2weeks    | 3weeks    |
| Choline        | 10ppm         | 90( 95%)        | 201(103%) | 394(139%) |
|                | 100ppm        | 97(102%)        | 190( 97%) | 356(126%) |
| Allylcholine   | 1ppm          | 94( 99%)        | 192( 98%) | 380(134%) |
|                | 5ppm          | 84( 88%)        | 198(102%) | 345(122%) |
| Benzylcholine  | 1ppm          | 101(106%)       | 228(117%) | 410(145%) |
|                | 5ppm          | 85( 89%)        | 264(135%) | 422(149%) |
| N-Allylglycine | 1ppm          | 95(100%)        | 192( 98%) | 346(122%) |
|                | 10ppm         | 98(103%)        | 200(103%) | 420(148%) |
| Control        |               | 95(100%)        | 195(100%) | 283(100%) |

表 4-8 コリン、アリルコリン、ベンジルコリンとN-アリルグリシン  
がアオビユ光独立栄養培養細胞の乾物重量に与える影響。表中  
の％はコントロールの乾物重量に対する値である。

加であることを示している。

#### 4-3-2 光独立栄養培養細胞の生育に与える影響

上述のようにコリンおよびコリン類縁体とN-アリルグリシンで光mixotrophic培養細胞の生重量の増加が認められた。しかし、光mixotrophic培養細胞の生育は光合成と培地の糖の両方に依存しているため、この生育促進がこれら化合物が光合成を促進した結果なのか、糖代謝に作用した結果なのかが明らかではない。そこで、光合成のみによって生育する光独立栄養培養細胞を用いて実験を行った（表4-7）。

まず、コリンを用いて検定を行った。検定の結果、コリン処理1週間後の10、100 ppm区で約10%前後の生重量の増加が認められた。この生重量の増加は、その後時間経過とともに徐々に大きくなり、処理後3週間では約30-40%の生重量の増加を示した。アリルコリンもコリンと同様な結果を与えた。アリルコリン1、5 ppm処理区で1週間後には小さな生重量の増加しか示さなかったが、3週間後にはコントロールに比べ約30-40%前後の生重量の促進を示した。一方、光mixotrophic培養細胞を用いた検定で、他のコリン類縁体とは異なった挙動を示したベンジルコリンは、やはり処理1週間後で30%前後の生重量の増加を示し、その後も高い生重量の増加率を維持続けた。N-アリルグリシンも処理1週間後で小さい生重量の増加を示し、その後徐々に増加率が増していくというコリン類縁体と同じ様な結果を与えた。

さらに、これら化合物による光独立栄養培養細胞の乾物重量の変化を調べたところ、上記の生重量の変化と同様な変化を示しており、光独立栄養

培養細胞で認められる生重量の増加が、同化量の増加に由来することが明らかになった（表4-8）。

#### 4-3-3 従属栄養培養細胞の生育に与える影響

コリンおよびコリン類縁体とN-置換グリシン類縁体が示す培養細胞の生重量増加作用が光合成促進による結果であることを確認するため、光合成活性を有さず、培地の糖に完全に依存した生育を示すタバコの従属栄養培養細胞の生重量に与える影響を検討した。タバコカサの生重量に与えるコリンおよびコリン類縁体の影響は第三章ですでに検討している（サイトカイニン検定）。固体培地を用いたこのサイトカイニン検定において、コリンおよびコリン類縁体はタバコカサの生重量にはなんの影響も与えないことが明らかとなっている。そこで、ここでは培地や温度、培養期間等の培養条件を光mixotrophic培養細胞や光独立栄養培養細胞と同様にして、コリンとアリルコリンが生重量にどのような影響を与えるのかについて検討した。

まず、コリンの50 ppm、10 ppm処理区について検討した（表4-9）。従属栄養培養細胞の生重量は両方の処理区ともに、培養の全ての期間（1、2、3週間）でコントロールの生重量を上回ることにはなかった。また、同時に測定した乾物重量もコントロールの乾物重量よりも大きな値を示すことはなく、コリンは従属栄養培養細胞の生重量に関しては増加作用を有さないことが明らかになった。さらに、コリン類縁体の効果も検討するために光mixotrophic培養細胞や光独立栄養培養細胞の生重量に対して比較的大きな促進活性を有するアリルコリンを用いて実験を行った。その



| Compound     | Concentration | Fresh Weight (g) |           |           |
|--------------|---------------|------------------|-----------|-----------|
|              |               | 1week            | 2weeks    | 3weeks    |
| Choline      | 10ppm         | 2.2( 96%)        | 6.3(102%) | 7.9( 98%) |
|              | 50ppm         | 2.4(104%)        | 6.2(100%) | 7.8( 96%) |
| Allylcholine | 1ppm          | 1.9( 83%)        | 6.0( 97%) | 7.9( 98%) |
|              | 5ppm          | 2.1( 91%)        | 5.9( 95%) | 8.0( 99%) |
| Control      |               | 2.3(100%)        | 6.2(100%) | 8.1(100%) |

| Compound     | Concentration | Dry Weight (mg) |           |           |
|--------------|---------------|-----------------|-----------|-----------|
|              |               | 1week           | 2weeks    | 3weeks    |
| Choline      | 10ppm         | 83( 98%)        | 165(102%) | 222( 98%) |
|              | 50ppm         | 86(101%)        | 161( 99%) | 220( 97%) |
| Allylcholine | 1ppm          | 80( 94%)        | 164(101%) | 227(100%) |
|              | 5ppm          | 81( 95%)        | 157( 98%) | 221( 98%) |
| Control      |               | 85(100%)        | 162(100%) | 226(100%) |

表 4-9 コリン、アリルコリン、ベンジルコリンとN-アリルグリシンがタバコ従属栄養培養細胞の生育に与える影響。表中のデータは各コントロールの値を100としてそれとの相対比で表示した。

結果、検定の全期間で生重量と乾物重量の増加は認められず、アリルコリンもコリンと同様、従属栄養培養細胞に対しては生育促進活性を有さないことが明らかになった。光合成活性を有する光mixotrophic培養細胞と光独立栄養培養細胞では生育促進作用が観察されるが、光合成活性を有さない従属栄養培養細胞では生育促進活性が認められないという結果は、コリンおよびコリン類縁体とN-置換グリシン類縁体による生育促進活性は、糖代謝や呼吸の抑制によってもたらされるものではなく、光合成の促進によってもたらされることを示唆する。

#### 4-4 光mixotrophic培養細胞の光合成電子伝達速度に与える影響

これまで述べたように、コリンおよびコリン類縁体とN-置換グリシン類縁体は明所で生育する培養細胞の光合成を促進しその結果生育促進を示すことが明らかになった。これら検定化合物が示す光合成促進活性が、どのような機構によるのかは興味深い問題である。そこで、光合成促進物質で処理した光mixotrophic培養細胞からチラコイド膜を単離し光合成電子伝達速度(Hill反応速度)を測定した。

まず、コリンについて検討した(表4-10)。その結果、コリン処理1週間後の電子伝達速度はコントロールに比べ10ppm処理区で60%、100ppm処理区で35%の促進を示した。この促進活性はその後時間経過とともに徐々に弱くなり、2週間後にはそれぞれ23%、6%の促進率を示し、3週間後には促進活性が確認できなくなった。アリルコリンについても検討を行った結果、処理1週間後に1ppm処理区で5%、5ppm処理区で11%の電子伝達速度の促進を示し、コリンによる促進率よ

| Compound       | Concentration | $\mu\text{mol O}_2/\text{mg Chl h}$ |          |          |
|----------------|---------------|-------------------------------------|----------|----------|
|                |               | 1Week                               | 2Weeks   | 3Weeks   |
| Choline        | 10ppm         | 136(160%)                           | 42(123%) | 22(100%) |
|                | 100ppm        | 115(135%)                           | 36(106%) | 19( 86%) |
| Allylcholine   | 1ppm          | 90(105%)                            | 40(118%) | 21( 95%) |
|                | 5ppm          | 95(111%)                            | 36(106%) | 18( 82%) |
| Benzylcholine  | 1ppm          | 123(145%)                           | 75(220%) | 32(145%) |
|                | 5ppm          | 110(129%)                           | 48(141%) | 25(114%) |
| N-Allylglycine | 1ppm          | 112(132%)                           | 40(118%) | 20( 91%) |
|                | 10ppm         | 120(141%)                           | 38(112%) | 21( 95%) |
| Control        |               | 85(100%)                            | 34(100%) | 22(100%) |

表4-10 コリン、アリルコリン、ベンジルコリンとN-アリルグリシンが光合成電子伝達速度に与える影響。測定は、これら化合物で処理したタバコ光mixotrophic培養細胞から調製したチラコイド膜を用いた。



りも少ない促進率を示した。アリルコリンによるこの促進活性もやはり時間経過とともに減少し、処理3週間後には逆に弱い阻害活性を示した。ベンジルコリンの場合は、処理1週間後で1 ppm処理区で45%、5 ppm処理区で29%と他の化合物と比べても比較的強い活性を示した。さらに、ベンジルコリンの場合は時間が経過してもこの促進活性はそれほど減少せず、処理後3週間の電子伝達速度はコントロールに比べ1 ppm処理区で45%、5 ppm処理区で14%の促進率を示した。

一方、N-アリルグリシンについても同様な検討を行った。その結果、N-アリルグリシン処理1週間後に光mixotrophic培養細胞から単離したチラコイド膜における電子伝達速度はコントロールに比べ10 ppm処理区で32%、100 ppm処理区で41%の促進を示した。この促進活性はコリンの時と同様に時間経過とともに減少し、処理3週間後では弱い阻害活性を示した。電子伝達速度の促進が時間とともに減少するという事実は、これら化合物が示す光合成促進活性が時間とともに減少するという事実と非常に一致を見る。このように、コリンおよびコリン類縁体とN-アリルグリシンが光mixotrophic培養細胞の光合成電子伝達速度を促進することは、これら化合物による光合成促進作用は光合成の電子伝達速度促進に由来する可能性を強く示唆するものである。

#### 4-5 まとめおよび考察

小麦のプロトプラストと酸素電極を用いた検定により光合成促進活性を有することが示されたコリンおよびコリン類縁体とN-置換グリシン類縁体が光mixotrophic培養細胞および光独立栄養培養細胞の光合成、呼吸、生

育にどのような影響を与えるかを検討した。検討の結果、タバコの光mixotrophic培養細胞の光合成に対してコリン、アリルコリン、ベンジルコリンとN-アリルグリシンがその最適濃度の違いはあれ促進活性を有することが明らかになった。また、光合成によって生育する光独立栄養培養細胞の光合成に与える影響も調べた結果、タバコの光独立栄養培養細胞では明瞭な結果が得られなかったが、アオビユの光独立栄養培養細胞ではこれら化合物はやはり光合成速度を促進していることが明らかになった。光合成促進活性と生育促進活性がタバコの光独立栄養培養細胞では認められず、アオビユの光独立栄養培養細胞では認められるという違いは、それぞれの細胞の本質的な違いによるものではなく、それぞれの培養細胞が形成する細胞集塊の大きさに由来すると思われる。実際、アオビユと同じように比較的小さな細胞集塊を形成するゼニゴケの光独立栄養培養細胞を用いて同様な実験を行なったところ、やはりこれら化合物によって培養細胞の光合成と生育が促進された。このことから、コリンおよびコリン類縁体とN-置換グリシン類縁体が示すアオビユの光独立栄養培養細胞の光合成と生育の促進作用は、この培養細胞だけで認められるのではなく、光独立的な生育を示す培養細胞に普遍的なものであると考える。

コリンおよびコリン類縁体とN-置換グリシン類縁体が示す光合成促進活性の機構を解明するため、光合成促進活性を示したタバコの光mixotrophic培養細胞からチラコイド膜を単離しその電子伝達速度を測定したところ、電子伝達速度が促進されており、これが光合成促進の主たる原因であることが示唆された。また、これら化合物の中ではベンジルコリンがいちばん大きな光合成促進活性を示しており、これら化合物間には興味深い構造活



性相関が存在することも同時に明らかになった。光mixotrophic培養細胞と光独立栄養培養細胞の呼吸に関しては、これら化合物は投与後、早い時期では呼吸を促進するが3週間後には逆に呼吸を抑制した。一方、生育に与える影響を検討したところ、これら化合物はその程度の差はあれ緑色培養細胞の生育も促進することが明らかになった。これら化合物が示す生育促進活性の中では、ベンジルコリンがいちばん大きな促進活性を有していることと、ベンジルコリンだけが早い時期から生育促進効果を示すという興味深い事実も明らかになった。これら化合物によるこのような生育促進は、完全に培地の糖に依存した生育を示す従属栄養培養細胞では認められないことから、この生育促進活性は糖代謝や呼吸に作用した結果ではなく光合成の促進によって引き起こされていることが示唆された。

コリンおよびコリン類縁体とN-置換グリシン類縁体はこのように光mixotrophic培養細胞、光独立栄養培養細胞の光合成と生育を促進するが、そのときの最大活性を示す濃度は各化合物間で異なった値を示す。このように、各化合物間で最大活性濃度が違う理由としては以下のようなことが考えられる。(Ⅰ)それぞれの化合物が示す光合成促進活性や生育促進活性の作用機作が異なる。(Ⅱ)このような濃度の違いはそれぞれの化合物が本質的に有する活性の違いに由来する。(Ⅲ)それぞれの化合物間の体内の取り込み速度や代謝速度に由来する細胞内濃度の違いが投与した化合物の最大活性濃度の違いに反映されている。これらの可能性のうち(Ⅲ)の可能性については、第二章で述べたような小麦プロトプラストと小麦幼苗を用いた取り込みと代謝の実験のデータを考え合わせるにより合理的に説明できる。プロトプラストにおいて、コリンとアリルコリンは細胞



内に速やかに取り込まれる。ベンジルコリンも取り込まれはするものの、その取り込み量はコリンとアリルコリンに比べ約30%である。しかし、コリンは速やかに代謝されベタインやホスファチジルコリンに変換されるので細胞内での蓄積量は比較的小さい。アリルコリンもコリンと同等の取り込み量を示すが、ホスファチジルアリルコリンへの代謝を受けるためコリンよりは細胞内の蓄積量が多く、ベンジルコリンはほとんど代謝されないため取り込み量は少なくともコリンよりは蓄積量が多い。この事實は、コリンが比較的高濃度で光合成促進と生育促進活性を示すのに、アリルコリンとベンジルコリンがその約十分の1の量で活性を示すという現象を良く説明する。すなわち、これら化合物の示す最大活性濃度の違いは、それぞれの化合物における細胞内への取り込み量と代謝速度に由来するということである。

光mixotrophic培養細胞をコリン、アリルコリンやN-アリルグリシンで処理すると1~2週間後では生育促進効果が認められないが、3週間後に生育促進効果が認められる。生育促進効果が認められる3週間後というのは培地の糖をほとんど消費している時期であり、このときの細胞の生育は光合成に依存すること大である。このことから、これら化合物が細胞の糖代謝に作用して生育促進作用を示すのではなく、光合成を促進することにより生育促進作用を示しているということが示唆される。さらにこのことは、光独立栄養培養細胞の場合、早い時期から弱いながらも生育促進作用が認められるという事実によっても支持される。このように、コリンおよびコリン類縁体とN-アリルグリシンが緑色培養細胞の光合成を促進することにより生育促進作用を示すことが明らかになったが、ベンジルコリ

ンだけは他の化合物と異なる活性を示した。ベンジルコリンは他のコリン類縁体と同じように光mixotrophic培養細胞の生育促進活性を有しているが、他の化合物のように培養の後半で生育促進効果を示すのではなく、処理直後から高い生育促進活性を示す。この原因については明らかではないが、これまでの実験結果から以下のような可能性が提起される。第三章で述べたように、コリンおよびコリン類縁体はいくつかの植物ホルモンの活性を強めたり、その生成量に影響を及ぼしていることが明らかになっている。これら化合物のサイトカイニンとの相互作用は認められなかったが、ただベンジルコリンだけがキュウリの生重量の増加活性や、ハツカダイコン葉の葉緑体の老化を防止する活性を有し、サイトカイニン様活性のあることが示されている。このことから、ベンジルコリン処理後の初期で認められる生育促進活性は、ベンジルコリンの有するサイトカイニン様活性によるものであり、培養後期で認められる大きな生育促進活性はサイトカイニン様活性と光合成促進活性の両方によるという可能性がある。

これまで述べたように、コリンおよびコリン類縁体とN-置換グリシン類縁体は、光合成活性を有する培養細胞に対し光合成促進活性と生育促進活性を有することが明らかになった。さらに、これら化合物の示す光合成促進活性は光合成の電子伝達系の促進によることも併せて明らかになった。一方、第1章で述べたように、コリンおよびコリン類縁体とN-置換グリシン類縁体のいくつかは小麦プロトプラストの光合成も促進する。プロトプラストにおける光合成促進活性の作用機作を論じるとき、プロトプラストと培養細胞では生理作用が異なっていることと、プロトプラストの結果は短時間の検定結果であるのに対し、培養細胞を用いた実験は長時間の検

定の結果であるという事実により、プロトプラストで認められる光合成促進活性の作用機作が光mixotrophic培養細胞や光独立栄養培養細胞で認められる光合成促進活性の作用機作と同様であるという結論は出せない。しかし、詳しくは第五章で述べるが、光合成の律速段階が電子伝達反応であるという実験結果を考え併せると<sup>123)124</sup>、プロトプラストで認められる光合成促進活性も、やはり、光合成電子伝達速度の促進に由来する可能性が高い。



## 第五章

### コリン類縁体およびN-置換 グリシン類縁体が有する光合成 促進作用の検討

## 第五章 コリン類縁体およびN-置換グリシン類縁体が有する

### 光合成促進作用の検討

ここまで述べたように、コリン類縁体とN-置換グリシン類縁体は植物の光合成を促進する。さらに、これら化合物のいくつかは植物に対して多面的な生物効果を有し、その原因の一つとして各種植物ホルモンとの相互作用であることを明らかにした。コリン類縁体とN-置換グリシン類縁体があるこのような生物活性の中でも、植物の光合成を促進するという事は非常に興味深い現象である。それゆえ、この光合成促進活性の作用機作については興味をもたれる。そこで、本論文第三章と第四章で述べたように、光合成促進活性の作用機作を解明すべく、代謝研究と光独立培養細胞を用いた研究を行なった。その結果、コリン類縁体とN-置換グリシン類縁体はその代謝産物が活性を示すのではなく、これら化合物がそのままの形で促進活性を示すということと、この化合物による光合成促進は、チラコイド膜における光合成電子伝達速度の促進が第一義的な原因である事を明らかにした。しかし、これまでの研究からではコリン類縁体とN-置換グリシン類縁体が光合成電子伝達反応以外にも影響を及ぼしている可能性も否定できない。この章では植物の各オルガネラや光合成関連の酵素レベルでこれら化合物の影響を検討した結果を述べる。さらに、その実験結果からコリン類縁体とN-置換グリシン類縁体がある光合成促進活性の作用機作についていくつかの検討を加える。

## 5-1 光化学系に与える影響

### 5-1-1 単離したチラコイドの電子伝達系に与える影響

まず、小麦クロロプラストから単離したチラコイド膜の光合成電子伝達速度に与える影響を検討した。常法により単離した小麦クロロプラストの包膜を、浸透圧的に破壊してチラコイド膜を得た。このチラコイド膜に10 mMの検定化合物を加え、さらに電子受容体として1.5 mMのフェリシアン化カリウムを加える。そして、2分間インキュベートした後、1400  $\mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ の光を照射し、水の分解による酸素の放出量を酸素電極で測定した。その結果、表5-1で示すように、コリン、エチルコリン、アリルコリンとN-アリルグリシンとともに、単離したチラコイド膜に直接投与する事では光合成電子伝達速度を促進しない事が明らかになった。

### 5-1-1 光リン酸化反応に与える影響

さらに、このことを確認するため、光合成電子伝達系と共役している光リン酸化反応についても、これら化合物が与える影響を検討した。方法は、同様に調製したチラコイド膜に基質として $^{32}\text{P}$ でラベルしたリン酸とコールドのADPを加え、さらに電子受容体として、循環型光リン酸化反応を測定する場合は50  $\mu\text{M}$ のPMS (N-メチルフェナゾニウムメチルスルフェート)を、非循環型光リン酸化反応を測定する場合は1.5 mMのフェリシアン化カリウムをそれぞれ加える。これに、光を照射しATPを合成させ、その生じたATP量を液体シンチレーションカウンターで測定した。検定試薬の濃度は上記実験と同じ10 mMとした。検定の結果、コリ



| Compound       | Electron Transport | Photophosphorylation | CF <sub>1</sub> |
|----------------|--------------------|----------------------|-----------------|
| Choline        | 101                | 102                  | 100             |
| Ethylcholine   | 100                | 98                   | 98              |
| Allylcholine   | 98                 | 97                   | 95              |
| N-Allylglycine | 102                | 98                   | 99              |
| Control        | 100                | 100                  | 100             |

表5-1 コリン、エチルコリン、アリルコリンとN-アリルグリシンが単離したチラコイドの光合成電子伝達、光リン酸化、と単離したCF<sub>1</sub>の活性に及ぼす影響。表中のデーターはすべて、各コントロールの値を100として、その相対比で示した。検定化合物の濃度は10mMとした。

ン、アリルコリンベンジルコリンとN-アリルグリシンは循環型、非循環型ともに生々するATP量にはなんら変化はなく、やはり光合成電子伝達系の場合と同様に直接投与において光リン酸化に何等影響を与えていないことが明らかになった(表5-1)。

### 5-1-3 クロロプラストATPase ( $CF_1$ ) に与える影響

光リン酸化は、電子伝達の結果葉緑体チラコイド内外に生じた $H^+$ の電気化学ポテンシャルを利用してATPを形成する反応である。この反応を触媒するのが葉緑体チラコイド上に存在するクロロプラストATPase ( $CF_1$ ) である。そこで、この酵素を単離して、その活性に対しコリン類縁体とN-置換グリシン類縁体がどのような影響を与えるのかを検討した。チラコイド膜から常法により単離した $CF_1$ に基質としてATPを加え、さらに、10 mMの検定化合物を加えることによって、これら化合物が $CF_1$ のATP分解反応に与える影響を検定した。その結果、表5-1で示すようにこれら化合物は単離した $CF_1$ に対しても何等影響を与えなかった。

### 5-2 炭酸固定系に与える影響

#### 5-2-1 RuBpCaseとPEPCaseの活性に与える影響

コリンおよびコリン類縁体とN-置換グリシン類縁体が有する光合成促進活性を解析するため、炭酸固定系の酵素に与える影響も検討した。植物は、光エネルギーを利用して合成したATPとNADPHを用いて、炭酸ガスを固定する。この一連の炭酸ガス固定反応の中で、Key酵素といわ

れるRuBPCaseの活性とC<sub>4</sub>植物の光合成で重要な酵素であるPEPCaseに与える影響をまず検討した。検定の方法は、常法によって調製したRuBPCaseとPEPCaseに検定化合物を加えその酵素反応を測定する方法とこれら検定化合物を植物に葉面散布しその葉から調製した酵素の活性を測定する方法を用いた。酵素反応の測定は、いくつかの酵素系と共役した反応により消費されるNADPHの量を分光学的に測定した。さらに、酵素活性は全可溶性タンパクあたりの活性として表示した。検定の結果、表5-2で示すようにこれら化合物は直接投与でも葉面散布によってもこの酵素活性に影響を与えなかった。

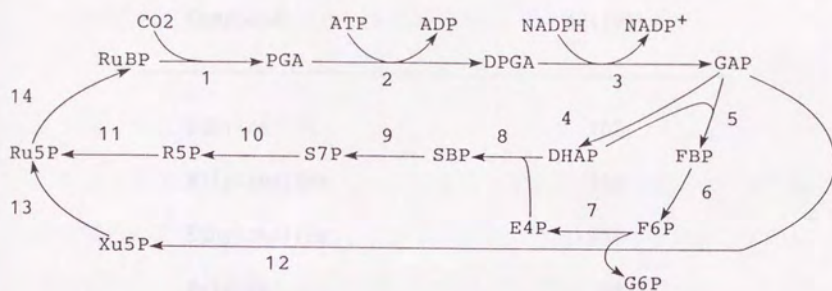
#### 5-2-2 光合成炭酸固定回路に与える影響

つぎに炭酸固定回路（カルビン-ベンソン回路、図5-1）全体に与えるこれら化合物の影響について調べてみた。近年、Lilleyらはエンドウおよびホウレンソウの葉緑体から単離したストロマ抽出物に炭酸固定回路の基質をくわえる事によって、in vitroでカルビン-ベンソン回路の反応を観察できる事を報告しており<sup>117)</sup>、この系を用いてコリンおよびコリン類縁体とN-置換グリシン類縁体がカルビン-ベンソン回路に与える影響を調べることにした。このアッセイ系に、GAP、DHAPおよびFBP等のどれかを基質として用いると、その後の酵素反応がカスケード的に起こり、PGA、DPGAを経て回路が一周することになる。検定はDHAP（ジヒドロキシアセトンリン酸）を基質として用い、反応のモニターはDPGA（グリセルアルデヒドジリン酸）からGAP（グリセルアルデヒド3リン酸）への変換においてNADPHが消費されるので、この消費速



| Compound       | RuBpCase | PEPCase |
|----------------|----------|---------|
| Choline        | 101      | 100     |
| Ethylcholine   | 102      | 101     |
| Allylcholine   | 100      | 99      |
| N-Allylglycine | 101      | 100     |
| Control        | 100      | 100     |

表 5-2 コリン、エチルコリン、アリルコリンとN-アリルグリシンが精製したRuBPCaseとPEPCaseの活性に及ぼす影響。表中のデータはコントロールの値を100として、その相対比で示した。



1:RuBPCase 2:PGA kinase 3:GAPDH 4:TP isomerase 5:FBP aldolase 6:FBPase 7,10,12:Transketolase 8:Aldolase 9:SBPase 11:R5P isomerase 13:Ru5P epimerase 14:PR kinase

図 5 - 1 カルビン-ベンソン回路の模式図。

| Compound       | Activity |
|----------------|----------|
| Choline        | 102      |
| Allylcholine   | 100      |
| Ethylcholine   | 101      |
| Betaine        | 98       |
| N-Allylglycine | 105      |
| Control        | 100      |

Control Activity:  $1-1.5 \mu\text{mol NADP}^+ \text{ mg}^{-1} \text{ protein hr}^{-1}$

表 5-3 コリン、エチルコリン、アリルコリンとN-アリルグリシンが炭酸固定系の酵素反応に与える影響。表中のデーターはすべて、コントロールの値を100として、その相対比で示した。検定化合物の濃度は10 mMとした。



度を分光学的に測定する事によりおこなった。その結果、表5-3で示すようにコリン、アリルコリン、ベンジルコリンとN-アリルグリシンはカルビン-ベンソン回路の酵素に影響を与えておらず、炭酸固定を促進する事はなかった。このことは、コリンおよびコリン類縁体とN-置換グリシン類縁体の示す光合成促進活性は、暗反応系の酵素に影響を及ぼす事によって発現されているのではない事を示唆する。

### 5-3 まとめおよび考察

コリン類縁体とN-置換グリシン類縁体が示す光合成促進活性の作用機作を明らかにするため、単離したチラコイドの光合成電子伝達系、光リン酸化反応、さらに単離したC<sub>4</sub>や炭酸固定系の酵素に与えるこれら化合物の影響を検討した。このような一連の実験で、コリン類縁体とN-置換グリシン類縁体は単離したチラコイド膜の電子伝達反応に対しては促進活性を有しておらず、これと共役した光リン酸化に対しても影響を及ぼさない事が明らかになった。この結果は、これら化合物で処理した光mixotrophic培養細胞と光独立栄養培養細胞で光合成電子伝達速度が促進されているという第四章で得られた結果と一見矛盾する。これは、コリン類縁体とN-置換グリシン類縁体が無傷の植物、または完全な細胞単位でのみ生理活性を示し、単離したオルガネラに対しては影響を与えないと考えると合理的に説明が出来る。実際、培養細胞からチラコイドを単離し、直接検定化合物を投与しても電子伝達反応は促進されなかった。この結果は、前述の考え方を支持するものであり、無傷植物や培養細胞、プロトプラストなどで認められる光合成促進活性はやはり電子伝達速度の促進によるものである

う。

以上のように、コリンおよびコリン類縁体とN-置換グリシン類縁体が示す光合成促進活性は、明反応の促進によるものと思われる。このことを支持するいくつかの実験データについて紹介する。小麦のプロトプラストを用いて光合成促進活性を検定したときは、飽和光下で検定を行った。そこでまず、小麦プロトプラストの弱光化における光合成に与える影響を検討してみた。検定の条件は、光合成促進物質の検定時と同じとして、光強度だけを  $200 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  にして検定を行った。検定の結果、この条件下では低い光合成活性 ( $10 \sim 15 \mu\text{mol O}_2 \cdot \text{mg}^{-1} \text{chl} \cdot \text{h}^{-1}$ ) しか得られなかったが、コリンによる光合成促進活性は14%と高い値を示した(表5-4)。光飽和条件下によるコリンの光合成促進率が数%である事を考えると、弱光化では明らかに高い促進率を示す。光強度に依存するのは電子伝達だけであるので(カルビン-ベンソン回路のいくつかの酵素が光活性化を受ける事が知られているが、この活性化は直接光によって起こるのではなく明反応に付随して起こる)、このことは、コリンが、光合成電子伝達反応を含めた明反応に影響を及ぼしている事を示している。さらに、単離したクロロプラストに光を照射して、発せられる蛍光( $^{99}120$ )を調べたところ、コリンやベンジルコリン処理で発せられる蛍光量が減少する事が認められた。クロロフィルから発生する蛍光は、反応に使用されなかった光エネルギーが再放出されたものであるため<sup>101)</sup>、蛍光量の減少は光エネルギーの有効利用によるものであろう。

小麦プロトプラストに対して光合成促進活性を有するグリシンの第四アンモニウム塩であるベタインが、光合成電子伝達、特に水の分解に深く関

| Compound       | O <sub>2</sub> Evolution |
|----------------|--------------------------|
| Choline        | 114                      |
| N-Allylglycine | 104                      |
| Control        | 100                      |

#### Methods

- 1) Plant Material : Spinach Chloroplasts
- 2) Light : 15,000 lux
- 3) Temperature : 25 °C
- 4) Substrate : NaHCO<sub>3</sub> 10 mM
- 5) Activity : 10-15  $\mu\text{mol O}_2 \text{ mg}^{-1} \text{ chl hr}^{-1}$

表 5-4 コリンとN-アリルグリシンが弱光下における小麦プロトプラストの光合成由来の酸素放出速度に与える影響。表中のデータはコントロールの値を100として、その相対比で示した。



わっている事がMohanty<sup>1,2)</sup>らによって最近明らかになった。光合成による水の分解に深く関わっている3つの表在性タンパク、17KD、23KD、33KDのうち、17KDと23KDタンパクはNaCl処理によりチラコイド膜からはずれ、水の分解能力が失われる。しかし、このときベタインが存在すると表在性タンパクの遊離が抑えられ、結果水の分解能力は保持される。このことから、彼らはベタインにより表在性タンパクの高次構造が保持されるのであろうと結論している。このことが、ベタインが示す光合成促進活性とどのように結びつくのかは明らかではないが、少なくともベタインが有する高塩濃度下における光合成活性の保持作用が、ここに述べた機構による可能性はある。

さて、コリンおよびコリン類縁体とN-置換グリシン類縁体は小麦プロトプラストの酸素放出速度だけではなく炭酸固定も促進していた（第一章参照）。さらに、これら化合物は光独立培養細胞の同化量も増加させることが明らかになった（第四章参照）。このことは、コリン類縁体とN-置換グリシン類縁体が植物の光合成由来の酸素放出だけでなく、炭酸固定をも促進していることを示している。言い換えると、これら化合物は植物の光合成全体を促進する。コリン類縁体とN-置換グリシン類縁体のしめす光合成促進活性は電子伝達系の促進によることが明らかになったが、光合成電子伝達系を促進する事によってはたして光合成全体が促進されるであろうか。この問題を明らかにするためには、光合成を律速しているのはどの段階であるかを知る必要がある。それには光強度、CO<sub>2</sub>濃度、水条件など人為的に制御しうる環境因子は十分量とし、それらが律速因子となっていない場合に、光合成反応系の中でどの反応段階が、どのような原因によ

り全体の反応速度を決定するかを明らかにする必要がある。

Kato<sup>1923, 1941</sup>らは好熱性らん藻 *Synechococcus* sp. を用いて、上記の方向の研究を行い、次の結果を得た。このらん藻は光合成活性が大きく、現在知られている無機物から有機物を合成する反応の中でもっとも早い合成を行うものである事がわかった。そして、このらん藻の生育の最適温度、光合成の最適温度、光合成電子伝達速度の最適温度はいずれも 58℃であり、この光合成速度、光合成電子伝達反応の速度を温度に対して Arrhenius プロットすると、いずれの場合も、29℃と 11℃付近に明瞭な不連続点を示した。このことは、光合成全反応が電子伝達反応の段階で律速されている事を示す。さらに、このらん藻から調整したチラコイド膜について種々の温度での膜脂質の流動性をスピラベル法で測定し、光合成電子伝達反応は膜の流動性によって大きく作用される事を明らかにした。そして、電子伝達系のどの部位が膜流動性によって影響されるかを検討し、プラストキノンに関係する反応だけが 29℃と 11℃付近で不連続点を示す事から、このらん藻の光合成の律速段階は、電子伝達系のプラストキノンの関与する部位である事を明らかにした。このことは、コリンおよびコリン類縁体と N-置換グリシン類縁体が光合成電子伝達系を促進する事により全光合成を促進するという著者の結論を合理的に支持するものであり、これら化合物による電子伝達速度の促進がプラストキノンに影響を与えた結果である可能性をも示唆する。



著者は、本論文第一章で小麦プロトプラストと酸素電極を用いた光合成促進物質の検定法を確立し、広範な化合物について検索を行ったところ、コリンおよびコリン類縁体とN-置換グリシン類縁体のいくつかが光合成促進活性を有することを明らかにした。さらに、第二章では、これら化合物の植物体内への取り込みとその代謝経路を研究することにより、光合成促進活性はこれら化合物の代謝産物が活性を示しているのではなく、コリンおよびコリン類縁体とN-置換グリシン類縁体そのものが活性を示していることも同時に明らかにした。第三章では、コリン類縁体が有する根の伸長促進活性や発芽の促進活性の作用機作を調べるため、各種植物ホルモンとの相互作用について検討した。第四章ではこれら化合物の示す光合成促進活性の作用機作を明らかにするため、光独立栄養培養細胞を用いた研究を行い、この光合成促進作用はチラコイド膜での電子伝達速度の促進であること、さらにコリンおよびコリン類縁体とN-置換グリシン類縁体の示す成長促進活性は光合成促進によるものであることも明らかにした。そして、第五章ではコリン類縁体とN-置換グリシン類縁体が光合成の各部位に与える影響を検討するとともに、その作用機作について検討を行った。

植物の物質生産能力を向上させるため化学的手段によって光合成を促進させようという試みは、新しく開発した簡便な検定法を用い、光合成促進活性を有するコリンおよびコリン類縁体とN-置換グリシン類縁体を得ることによって所期の目的を達成できた。そして、これら化合物は最初の期



待どうり、植物の光合成を促進することにより物質生産能力も向上させた。このことは、作物の収量を増加させるという農業的な見地からだけでなく、植物の光合成能力を高めることによる物質生産能力の向上の可能性からも意義深い。もちろん、植物の物質生産能力が光合成だけに依存しているわけではないが、光合成を促進することが物質生産を向上させるための重要な問題であることは明白である。

これまでに、化学的手段によって植物の物質生産能力を促進しようという試みはいくつかなされてきた。その過程で、現在では植物ホルモンなどを含む広い意味での植物成長調節物質が各種見いだされている。そして、これら化合物のうちいくつかは、インタクトな植物に対して光合成をも促進することが明らかになっている。しかし、これまでに光合成促進物質を直接検索し、その結果見いだされた光合成促進物質が植物の物質生産を促進するということは報告されていない。この最大の理由は、簡便な検定法が存在しなかったことである。これまで植物の光合成に対する影響を検討するための検定法としては、供試化合物を根または葉から吸収させた後、葉の光合成量を測定するという方法や、植物のオルガネラを用いた方法等が知られている。しかし、前者の検定法は実際の植物に与える影響を検定できる点では優れているものの、多くの化合物を検定することがむずかしいという難点があり、後者は簡便で多くの化合物を検定できるという面では優れているものの、その化合物の示す活性が同時にいろいろなオルガネラに関与している場合は検定ができない難点を有する。その点で、著者らが開発した小麦のプロトプラストと酸素電極を用いた検定法は、多くの化合物に対する検定が可能であり、細胞のほとんどの機能を有していると思

われるプロトプラストを用いるため、その活性がいくつかのオルガネラに依存していようと検定できるという利点を有する。さらに、葉切片を用いた場合とは異なり、プロトプラストは細胞膜しか有していないため、非常に早く高感度で化合物の影響を検討できる。実際、プロトプラストで光合成促進活性を示すコリン類縁体とN-置換グリシン類縁体は、葉切片と酸素電極を用いた検定によっては光合成促進活性を示さなかった。このようなことから、プロトプラストと酸素電極を用いた検定法は、光合成促進物質を検索する上で非常に有効であり、今後光合成促進物質の検索だけでなく除草剤を含めた農薬の検定にも応用されるであろう。

コリン類縁体とN-置換グリシン類縁体が示す光合成促進活性の作用機作を解明するため、本文中で述べたような種々の実験を行ない、この光合成促進は光合成電子伝達速度の促進によることを明らかにした。特に第五章では、光合成各部分に対する影響を検討するとともに、コリン類縁体とN-置換グリシン類縁体が光合成電子伝達反応を促進することによって光合成全体の反応速度が促進される可能性について議論した。そして、第四章ではKatohらが、好熱性らん藻を用いて電子伝達反応が光合成の律速反応であることと、電子伝達のプラストキノンが関与する反応が光合成全体の速度を律速すると報告していることを示した。光合成全体を促進するためには律速部位を促進することが必要なので、プラストキノンの関与する反応が光合成の律速であるならばコリン類縁体とN-置換グリシン類縁体がプラストキノンに影響を及ぼしている可能性がある。プラストキノンの機能としては現在以下のことが考えられている<sup>125)</sup>。1) 光化学系Ⅱの安定な第二次電子受容体としてのQ、2) 光化学系ⅡとⅠとの間の電子プール



として働き、上述の律速段階に関係すると考えられるプラストキノン

( $PQ_2$ )、3)  $Q$  から  $PQ_2$  への電子伝達を仲介する電子蓄積体、4) 水素イオンの輸送。このように、多様な機能を有するプラストキノンはその分子環境の多様性を反映したものであろうと考える。事実、上記のらん藻においてはこのプラストキノンがミトコンドリアにおける呼吸系にも関与している事が報告されている。このことから、呼吸系も光合成系と同様に膜の流動性に依存する反応段階を含むことが考えられ、コリンおよびコリン類縁体や  $N$ -置換グリシン類縁体によって呼吸も促進される可能性が示唆される。そして、プロトプラストでは呼吸の顕著な促進活性が認められなかったが、これら化合物で処理された光独立栄養培養細胞と

光mixotrophic培養細胞の呼吸が光合成と同様に促進された事実は、これら化合物がプラストキノンに影響を与えている可能性を支持するものである。

コリンおよびコリン類縁体と  $N$ -置換グリシン類縁体がプラストキノンに影響を及ぼしているのであれば、どのような作用機構によるのであろうか。この問題に対する回答は、現在得られてないが、これら化合物が膜の流動性に影響を及ぼすことによって生理活性を示している可能性がある。

その根拠の一つとして考えられる事実として、コリンが示す植物の低温傷害の回避活性があげられる。植物の低温耐性は、その膜脂質の種類とそれによる膜の流動性に大きく依存することが、最近の研究によって明らかになってきた。コリンが植物の低温傷害を回避し、膜に存在する各種  $ATPase$  の活性を高めるという事実は、コリンが膜の流動性に大きく関与していることを示す。このことから、これら化合物は膜の流動性に対して影響を及ぼし、その結果、光合成を促進している可能性が提起される



わけである。

化学的手段による光合成促進を目的として開始した本研究により、コリンおよびコリン類縁体とN-置換グリシン類縁体という有効な光合成促進物質を見だし、所期の目的どおりこれら化合物により植物の物質生産能力をも向上させることに成功した。そして、コリンについては甘藷に対する植物成長促進剤として、1986年に農薬登録が許可され、現在もその適用作物を広げつつある。このような面での本研究の意義は大きいものと確信する。同時に、光合成促進という興味深い現象を明らかにし、その作用機構が電子伝達反応の促進であることを明らかにしたことは、植物生理学の研究においても興味深い問題を提起したものと考ええる。

## 実験

### 1. 第一章の実験

#### 植物材料

光合成促進物質の検定に用いたプロトプラスト調整用の小麦 (*Triticum aestivum* L.: Nourin No.61) は、1～2日間流水に浸漬し発芽させた後、パーミキュライトに播種し、約一週間栽培したものを用いた。呼吸の検定に用いたミトコンドリア調製用の小麦も1日間流水中で浸漬した後、やはりパーミキュライト上で2週間栽培した。上記の植物はすべて東京大学農学部生物環境制御システムセンターの自然光ガラス室で栽培した。ガラス室内の環境は、昼25℃、夜20℃、湿度70％に制御されている。

#### プロトプラストの単離

プロトプラストは、Edwards<sup>1969</sup>らの方法に従い以下のように単離した。約5gの小麦の葉身を鋭利なカミソリで約5mm幅に切り、 $200\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ の光を照射しながら25℃で酵素処理した。酵素液(100ml、pH 5.5)の組成は2%セルラーゼ(オノズカ R-10、ヤクルト本社)、0.3%マセロザイム(R-10、ヤクルト本社)、0.5M ソルビトール、1mM  $\text{CaCl}_2$ 、0.05% BSAである。3時間後に酵素液を10mlの注射器で捨て、20mlの洗液を加え穏やかに揺すり、プロトプラストを遊離させた。この操作を3回繰り返し、得られた洗液を茶こし、ついで195 $\mu\text{m}$ のナイロンメッシュで濾過した。洗液の組成は

0.5 M ソルビトール、1 mM  $\text{CaCl}_2$ 、である。濾液を  $100 \times g$  で5分間遠心分離しプロトプラストを含む沈澱を得た。沈澱を0.5 M シュークロース、1 mM  $\text{CaCl}_2$  を含む液5 ml に懸濁し、懸濁液を10 ml のメスフラスコにいれその上に0.4 M シュークロース、0.1 mM ソルビトール、1 mM  $\text{CaCl}_2$ 、5 mM MES緩衝液 (pH 6.0) を含む溶液を2 ml のせ、さらに0.5 M ソルビトール、1 mM  $\text{CaCl}_2$ 、5 mM MES緩衝液 (pH 6.0) を含む溶液を1 ml 加え、 $200 \times g$ 、5分間遠心分離した。プロトプラストは0.5 M ソルビトールを含む液と、0.4 M シュークロースと0.1 M ソルビトールを含む液との間に集められるので、これをピペットで集め実験に用いるプロトプラストとした。酵素処理以降はすべて4℃で行なった。

#### ミトコンドリアの単離<sup>107)</sup>

裁断したエンドウの葉約10 g を氷冷した500 ml の磨砕液にいれ4秒間ポリトロン (PT 35 K、強度7) で磨砕した。磨砕液の組成は0.3 M マンニトール、30 mM MOPS (pH 7.2)、4 mM システイン、1 mM EDTA、0.2% BSA、0.6%不溶性ポリビニルピロリドンである。磨砕液を4層のガーゼで濾過し、濾液を1,200 × g、4分間遠心分離し上清を得た。これを更に、10,000 × g、10分間遠心分離し、上清をアスピレーターに接続したガラス管で吸引除去した。この沈澱を0.4 M マンニトール、25 mM TES緩衝液 (pH 7.6)、0.1% BSA を含む懸濁液40 ml に懸濁し、10,000 × g、10分間遠心分離する。この沈澱はミトコ



ンドリアとして集められ、2 ml の懸濁液に再懸濁され氷中に保存される。  
以上、すべての操作は 4℃で行なった。

#### 光合成促進物質に対する検定法

第一章で述べたように、光合成促進物質の検定のため図 1-1 で示したような系をくんだ。酸素電極を内蔵した透明樹脂製の反応槽は外部に恒温槽から送られる所定温度の水を循環させ反応槽内の温度を一定に保つ。反応槽の上部はすり合わせ栓で外部と遮断し、スターラーで攪拌して反応液中の酸素濃度を均一に保ちこれをレコーダーに記録する。光源はスライドプロジェクターを用いた。この測定装置は光合成酸素放出速度の測定だけでなく呼吸の測定にも用いた。使用機器の名称及び会社名は以下の通りである。酸素電極：Hansatech Co. Ltd.、レコーダー：日立 056 型卓上記録計、恒温槽：東洋製作所循環式電子冷熱装置 TE-105、プロジェクター：理化学精機 HILUX-HR。

単離したプロトプラスト (Chlorophyll, 30-50  $\mu\text{g}$ ) と反応液 (0.4 M ソルビトール、50 mM HEPES (N-2-hydroxyethyl piperazine-N'-ethanesulfonic acid)-KOH pH 7.6、1 mM EDTH、10 mM  $\text{NaHCO}_3$ ) 1 ml を検定試薬とともに酸素電極の反応槽に入れ、25℃で 2 分間攪拌したのち光 ( $1400 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) を照射すると光合成による酸素放出が起こる。そして、光合成による酸素放出は、約 4 分後に最大となる。プロトプラストを氷中に保存しておく約 3 時間ぐらいはほとんど光合成由来の酸素放出速度は減少しないので、全ての測定をこの範囲で行った。活性の判定は第一章で述べたので省略する。

#### 炭酸固定に対する効果の検定

小麦プロトプラストの炭酸固定を検定するに当たり、実験条件は酸素電極法の時と同様にした。すなわち、単離したプロトプラスト (Chlorophyll, 30-50  $\mu\text{g}$ ) を反応液 (0.4 M ソルビトール、5.0 mM HEPES-KOH pH 7.6、1 mM EDTA、10 mM  $\text{NaHCO}_3$ ) 1 ml に懸濁し検定試薬を投与する。2 分間暗黒化でインキュベーションした後、 $^{14}\text{C}$  ラベルの 10 mM  $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$  (3.7 KBq/ $\mu\text{mol}$ ) を加え、光照射 ( $800 \mu\text{E m}^{-2} \text{S}^{-1}$ ) する事により光合成を開始させる。8 分後、6 N の蟻酸 (1 ml) を加え光合成を停止させ、ドラフト内で 1000 w の白熱灯下で蒸発乾固する事により未反応のラベル重曹を飛ばす。数分間室温でさました後、1 ml の蒸留水を加え乾固物を溶かし、8 ml の液体シンチレータ (ACS-II、Amasham 社) を加え液体シンチレーションカウンターで放射エネルギーを測定する。

#### 呼吸に対する効果の検定

常法により単離された呼吸活性検定用のミトコンドリアに NADH と ATP を加え、NADH の酸化にともなう酸素の消費速度に与える供試化合物の効果を、前述の酸素電極を用いて調べることによって各種化合物の検定を行なった。検定は、供試化合物添加による酸素吸収速度の変化から行なった。25  $^{\circ}\text{C}$  に保たれた酸素電極の反応槽中で、単離したミトコンドリアは 1 ml の反応液 (0.4 M マンニトール、2.5 mM TES-KOH pH 7.2、2 mM  $\text{MgSO}_4$ 、5 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、0.1% BSA、

1. 5 mM NADH) 中で検定試薬とともに攪拌される。2 分後、1 mM の ADP を加え反応を開始し、酸素の減少速度を酸素電極で測定する。活性の判定は、プロトプラストを用いた光合成促進検定と同じように、検定試薬投与時とそれをはさむ前後のコントロールの平均値によって算出した<sup>189)</sup>。

#### クロロフィルの定量

クロロフィルの定量は Arnon<sup>189) 110)</sup> の方法に準じて行なった。酸素電極を用いた光合成促進活性検定の測定ごとに、反応槽から一定量のプロトプラスト懸濁液をとり、それに全量が 1 ml になるように水を加える。これに蒸留アセトン 4 ml を加え充分振り混ぜた後、冷暗所におき翌日遠心分離により不溶物を取り除き、上清の 652 nm における吸光度を 80% アセトンを対象として測定する。プロトプラスト試料中 (1 ml) のクロロフィル量は経験的に以下の式で求められる。

クロロフィル量 (mg/ml) = 吸光度  $\times 0.029 \times 5 \div$  分取量  
吸光度は島津製作所の UV-160 を用いて測定した。



## 2. 第2章の実験

### 植物材料

取り込み実験に用いたプロトプラスト調整用の小麦 (*Triticum aestivum* L.: Nourin No. 61) は、1～2日間流水に浸漬し発芽させた後、パーミキュライトに播種し、25℃/20℃(昼/夜)に制御されたコイトロン内で、約一週間栽培したものをを用いた。代謝実験用の小麦は同様な条件下でパーミキュライトに播種後、5日間栽培したものを水耕栽培に移した。

取り込み実験と代謝実験に用いた *Chlamydomonas reinhardtii* の培養は、3/10 HSM 培地 (培地 1000 ml 中  $\text{NH}_4\text{Cl}$  0.15 g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.02 g、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.01 g、 $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.94 g、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.47 g、Trace Element 1 ml) を用いた。さらに、ここで用いた Trace Element の組成は 1000 ml 中、 $\text{EDTA} \cdot \text{Na}$  50 g、 $\text{H}_3\text{BO}_3$  11.4 g、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  22 g、 $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  5.06 g、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  4.99 g、 $\text{CoSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  1.61 g、 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  1.57 g、 $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  1.1 g である。*Chlamydomonas reinhardtii* のスラント用の培地は TAP 培地に 2% の寒天を加えた。*Chlamydomonas reinhardtii* は 3 l の偏平フラスコに植え、そこにフィルターろ過した炭酸ガスが富化された空気をバブリングする事によって培養した。さらに、温度は 28℃ に制御し、光は  $100 \mu\text{E m}^{-2} \text{S}^{-1}$  とした。

## $^{14}\text{C}$ ラベル化合物の合成

[ $^{14}\text{C}$ ]ーラベル化合物中、[メチル- $^{14}\text{C}$ ]ーコリンはNew England Nuclear社より購入した。[ $^{14}\text{C}$ ]ーラベルの[ $^{14}\text{C}$ ]ーアリルコリンと[ $^{14}\text{C}$ ]ーベンジルコリンはそれぞれ目的とする置換基をアルキル基として持つアルキルクロライドと、[2, 3- $^{14}\text{C}$ ]ージメチルエタノールアミンをエーテル中、室温、3時間反応させて合成した。反応生成物は、メタノール中で再結晶させることにより精製した<sup>111)</sup>。[ $^{14}\text{C}$ ]ーNーアリルグリシンはKirino<sup>112)</sup>等の方法にしたがって合成した。[ $^{14}\text{C}$ ]ーベタインと[ $^{14}\text{C}$ ]ーホスホリルコリン、[ $^{14}\text{C}$ ]ーホスホリルアリルコリンは酵素的に合成した。[ $^{14}\text{C}$ ]ベタインは、10 mM Tris-HCl (pH 8.0)の反応液中で10 unitのコリンオキシダーゼ (Sigma社)に10 mMの[ $^{14}\text{C}$ ]ーコリンを基質として加えることにより生成させた。[ $^{14}\text{C}$ ]ホスホリルコリンと[ $^{14}\text{C}$ ]ーホスホリルアリルコリンも同様に10 mM Tris-HCl (pH 8.5)、30 mM NaCl、2 mM  $\text{MgCl}_2$ 、中で1 unitのコリンキナーゼ (Sigma社)に5 mM ATPと[ $^{14}\text{C}$ ]ーコリンまたは[ $^{14}\text{C}$ ]ーホスホリルコリンを加え、目的とする化合物を得た<sup>113)</sup>。

## コリン類縁体及びNーアリルグリシンの取り込み

反応液 (0.33 M ソルビトール、1 mM EDTA、50 mM HEPES-KOH pH 7.6)に懸濁したプロトプラストに $^{14}\text{C}$ ラベルのコリン、アリルコリン、ベンジルコリンおよびNーアリルグリシン (1 ml/l、約185 kBq/ $\mu\text{mol}$ )を加え25℃で一定時間攪拌

する。プロトプラストは一定時間ごとにサンプリングされ、 $100 \times g$ 、5分間遠心分離することにより集められる。集められたプロトプラストは50 mlの洗浄液(0.3M ソルビトール、1mM EDTA、50mM HEPES-KOH pH 7.6)に懸濁する。この洗浄液に50mMのコールドのアッセイ化合物を混ぜておくことにより、ラベルサンプルの細胞内取り込み停止と、細胞表面に非特異的に吸着したラベルサンプルを取り除く。このような処理されたプロトプラストは、遠心分離により集められ、さらに同様な洗浄液に懸濁される。この操作を3回繰り返した後、遠心分離によりプロトプラストを集めその放射エネルギーを液体シンチレーションカウンタにより測定した。放射エネルギーを測定するにあたりプロトプラスト由来のクロロフィルによる色クエンチングが起きるため、プロトプラストの量は、有意的な放射能が検出される最小量に止めた<sup>11)</sup>。

Chlamydomonas reinhardtiiを用いた取り込み実験もプロトプラストと基本的には同様な方法に従った。相違点としては、反応液と洗浄液の組成がそれぞれ1mM EDTA、50mM HEPES (pH 7.6)と1mM EDTA、50mM HEPES (pH 7.6)、50mM コールドアッセイ化合物、であることと、遠心分離の条件が $500 \times g$ 、3分であることである。

#### インタクトな小麦への検定化合物の処理方法

パーミキュライト上で生育させた小麦を水耕栽培し、水耕液中にラベルした検定化合物を加え、根から吸収させた。水耕液はHogland水耕液を用い、空気をバブリングする事により根の酸欠を防いだ。培養は全て



16 L / 8 D、に制御されたコイトロン内で行った。コイトロンは、  
光強度  $100 \mu \text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 、温度  $26^\circ \text{C}$ 、湿度  $80\%$  に設定した。

## 代謝産物の単離

### 1) 代謝産物の抽出

精製方法を図2に示した。 $[^{14}\text{C}]$ ーラベルサンプルを取り込んだ小麦  
を  $200 \text{ ml}$  のクロロホルムーメタノール (1:2) 中でホモジナイザー  
(強度7、1分)により磨砕抽出する。さらに  $200 \text{ ml}$  のクロロホルム  
ーメタノール (1:2) と  $80 \text{ ml}$  の水を加え、ホモジナイザーで磨砕抽  
出を繰り返した後、磨砕液を吸引ろ過し、抽出液を得る。この抽出液は、  
一晚冷暗所に放置するか抽出液を遠心分離 ( $1500 \times g$ 、30分)する  
ことにより水ーメタノール層 (水溶性画分) とクロロホルムーメタノール  
層 (脂溶性画分) に分ける<sup>114)</sup>。

### 2) 水溶性画分の解析

水溶性画分は、減圧蒸留により濃縮し、さらに濃縮液を凍結乾燥で乾固  
する。乾固物は少量の  $0.01 \text{ N HCl}$  に溶かし、これまた  $0.01 \text{ N}$

$\text{HCl}$  で平衡化したセファデックス G-10 カラム (ファルマシア社、  
 $3 \text{ cm} \times 30 \text{ cm}$ ) にかける。同じ溶液で溶出を行い、得られた放射活性  
を有するフラクションは凍結乾燥後、SCX-1101-N (センシュー  
科学、 $4.6 \text{ mm} \times 100 \text{ mm}$ ) イオン交換カラムを用いた HPLC で解  
析した。溶出は  $0.01 \text{ M}$  酢酸アンモニウム  $\text{pH} 2.6$  と  $0.5 \text{ M}$  酢酸ア  
ンモニウム  $\text{pH} 5.0$  の50分かけたグラジエント溶出をおこない、流速

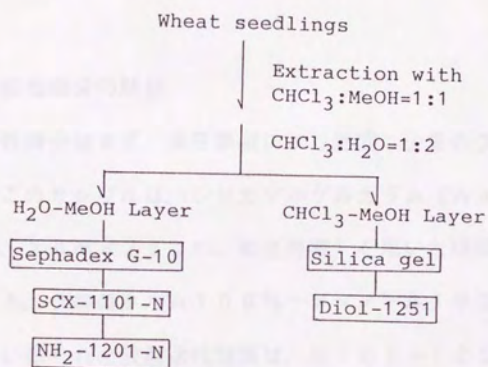


図2 コリンおよびコリン類縁体とN-アシルグリシン代謝産物の精製法

は1 ml/min、温度は室温とした。ここで認められた放射活性を有するフラクションは分取され、凍結乾燥によって濃縮されたあと、さらにNH<sub>2</sub>-1201-N（センシュエ科学、4.6 mm×100 mm）カラムを用いて精製した。このHPLCの溶出条件は、0.1% TFA中でアセトニトリルの濃度80%–20%のグラジエント溶出（50分）である。この段階まででほとんど精製が終了したものと考え、このサンプルを構造解析に供した

### 3) 脂溶性画分の解析

脂溶性画分はまず、減圧蒸留により乾固し少量のクロロホルムで溶かす。そしてこのサンプルは、シリカゲルゲルカラム（Wakogel、C-100、2 cm×25 cm、和光純薬）を用いた順相クロマトグラフィーにかける。クロロホルム100%–メタノール100%のグラジエント溶出を行い得られた放射活性物質は、Diol-1251カラム（センシュエ科学、4.6 mm×250 mm）を用いた順相HPLCによりさらに精製した。HPLC溶出の条件は、2-プロパノール/n-ヘキサン（80:55、v/v）と2-プロパノール/n-ヘキサン/水/メタノール（80:55:15:10、v/v）のグラジエント溶出である<sup>115)</sup>。

### 代謝産物の同定と構造解析

オープンカラムでの放射能活性のモニターは液体シンチレーションカウンター（Packard 2200 CA、Tri-Carb）でおこなった。HPLCにおける放射活性は、(CaF<sub>2</sub> (Eu))を個体シンチレー



ターとして用いた放射能検出器をUV検出器に直列に連結し両方を同時に検出した。代謝産物の構造は、放射能検出器によって得られたリテンションタイムをメルクマールにして精製したコールドサンプルを、NMR等により解析した。

### 3. 第三章実験

#### ジベレリン検定

##### 1) 短銀坊主を用いた第二葉鞘伸長検定（浸漬法）

矮製のイネである短銀坊主 (*Oryzae sativa* L., cv. Tan-ginbozu) の種子を所定濃度のベンレート（デュボン社）中で15分間殺菌した後、水道水に浸して30℃の明所（2,000-5,000 lux）に2日間置き発芽させる（水は毎日取り替える）。発芽したらよく水洗いし、子葉鞘の長さが約2mmの均一な芽生え5~7個を被検液1mlの入った管びんに移し、ポリエチレンフィルムとゴムバンド密封する。これを発芽したときと同じ条件で生育させ、7日後に第二葉鞘の長さを測定する。被検液はあらかじめ検定化合物を溶かした水を用いた。

##### 2) 短銀坊主を用いた第二葉鞘伸長検定（点滴法）

村上らの開発した方法を用いた。50mlのトールビーカーに50mlの0.7%寒天を加えオートクレーブにかけた後、寒天が固まる前に所定濃度の検定試薬を加えすばやく攪拌する。寒天が冷えて固まった後、よく水洗いした浸漬法と同様にして得られた短銀坊主の芽生え（子葉鞘の長さが約2mmの均一なもの）を5個ずつ選び子葉鞘を上にして植える。芽生えを植えたビーカーを下に少量の水を張った透明な容器にいれ、発芽させたときと同じ条件で2日間生育させると第二葉の先端が第一葉から約2mmでた状態となる。この段階で、イネ苗と第一葉の間にマイクロシリンジを用いて1μlの所定濃度のGA<sub>3</sub>を点滴する。点滴するGA<sub>3</sub>は、50%ア

セトン溶液でも95%エタノール溶液でも良いが、エタノール溶液だと表面張力が小さいため点滴した時にながれ易いため、50%アセトン溶液を用いた。処理したイネは同じ条件で生育させ、4日後に第2葉鞘と根の伸長を測定する。

#### サイトカイニン検定

##### 1) タバコカルス生育促進検定

温室で高さ約1 mにまで育てたタバコ (*Nicotiana tabacum*, var. Wisconsin 38) の茎を切りとり、葉の両端をパラフィンで保護した後、10%過塩素酸ナトリウム液に5分付け、殺菌する。殺菌の終わったタバコをクリーンベンチ内に移し、滅菌水でゆすぎ、茎を5 cmから7 cmの長さに切断する。内径6 mmのコルクボーラを用いて打ち抜き、ガラス棒で押し出し、これを厚さ2 mmの円板にきる。この円板を0.08%の寒天を含んだMS培地 (NAA 2 mg/l、ベンジルアデニン 0.2 mg/l) に植え付ける。フラスコを約25℃に保ち、弱い光を当てるか暗黒下で4週間培養すると組織片の表面にカルスの白い塊が誘導される。滅菌したシャーレにこのカルス片をとり一定量に切った後、その小片3個を一組として100 mlのフラスコに植える。このフラスコには上記と同じ培地を50 ml入れておく。以後、一ヶ月毎に同じ培地に植えついで継代培養を繰り返すと、白くて硬いカルスが得られるので、これを、保存用カルスとした。検定には保存用カルスを低濃度のベンジルアデニン (0.03 mg/l) を含む培地に二回前培養し、少し透明で柔らかくなったカルス (検定用カルス) を用いた。



検定に使用する培地は、保存用カ爾スの培地にコリンおよびコリン類縁体とN-置換グリシン類縁体をそれぞれ所定濃度に加え、さらにこれら化合物のサイトカニン活性を調べるときにはベンジルアデニンを除き、サイトカニン活性に与える影響を調べるときには所定濃度のベンジルアデニンを加えた。この培地に検定用のカ爾スの小片（30～50mg）を各フラスコ毎に3個植え込み、保存用カルスと同じ条件で5週間培養し生重量を調べた。

## 2) キュウリ子葉検定

キュウリ (*Cucumis sativus* L.) の種子をベンレート溶液に15分間漬けて殺菌する。この種子を滅菌水でよくゆすいだ後、水で湿した濾紙をしいた大型シャーレに種子をまき、暗黒下24℃に約8日間置き発芽させる。次に、暗い緑色光のもとで、子葉を切りとり、被検液12mlを加えた直径9cmのシャーレに子葉18枚を浮かべる。このシャーレを暗黒下24℃に4日間置いた後、子葉の生重量を測定する。被検液は2mMのリン酸一カリウム溶液（pH6.0）を用い、コリン類縁体やN-置換グリシン類縁体を加えることによるpHの変化をできるだけ少なくした。

## 3) ダイコン葉老化検定

昼25℃夜20℃に制御された自然光ファイトトロン内で、ハツカダイコン (*Raphanus sativa*) を約1カ月間育てる。このハツカダイコンから本葉を切りとり、主葉脈を避けて、コルクボーラーで直径12mmの円盤を作る。直径9cmのシャーレに濾紙を敷き、さらに、キュウリ子葉検定に

用いたのと同じ被検液を3 ml加える。この濾紙の上に、くり抜いたダイコン葉を8枚のせ、暗黒下25℃に保つ。4日後、ダイコン葉を取り出し、80%アセトン6 mlの入った目盛り付き試験管に細かく刻んで入れる。試験管を100℃の湯浴に約5分つけ、クロロフィルを抽出した後、遠心分離し上清を集め、652 nmの吸光度を測定する。クロロフィルの定量は、プロトプラストでのクロロフィルの定量式に当てはめて計算した。

### オーキシン検定

#### アベナ子葉鞘伸長検定法

オーキシンの検定には一般によく知られている、アベナストレートグロース検定を用いた。アベナ(*Avena sativa* L.)のもみ殻を除き、水でよく洗った後、濾紙をしいたシャーレ(径20 cm)に200粒ずつ、胚を上にしてならべる。種子が浮かない程度に水を加え、市販のラップ類で覆って照明下、25℃に置く。このまま一日置くと発芽するので、トレイに海砂を3 cmの厚さに敷き、水をいれ、余分な水を切ってからかき混ぜて、柔らかく敷いた状態にする。ここにアベナの芽生えを約60度の角度で植え込み、25℃で36時間赤色光下、さらに、12時間、暗黒下に置く。これからの操作は赤色光下または緑色光下で行なう。子葉鞘の長さが約2.5 cmになったものを選び、子葉鞘の先端より3~8 mmの部分から5 mmをカッターで切る。カッターは、2枚のカミソリの刃を3枚のプラスチックで組み立てたものである。切りとった切片は蒸留水に浮かべておき、この切片を10個ずつ、1 mlの所定濃度のコリン類縁体とN-置換グリシン類縁体が入った被検液をいれたシャーレ(径2.7 cm)中に

浮かべ、25℃、暗黒下に置く。処理後20時間経過してから切片の長さを測定する。オーキシンとしてはインドール酢酸を用いた。

#### アブシジン酸検定

##### 小麦幼葉鞘切片検定

小麦(*Triticum aestivum* L.)の均一な種子を蒸留水中で一時間吸水させ、ついで胚を上に向けてパーミキュライトに播種する。暗黒下24℃、65時間生育させ、子葉鞘の長さが、25～30mmのものを選別する。その先端部2mmを切除した子葉鞘から、長さ10mmの切片を正確に切り取る。これらの操作は緑色光下で行なう。検定化合物は1%ショ糖を含む10mMリン酸緩衝液pH5.0に溶かし、その1mlをガラスフラスコ(20ml容)にとり、これに幼葉鞘切片10個を浮かべる。フラスコを振とう機にのせ、暗黒下24℃、24時間後、切片の長さを顕微鏡下測定する。

#### エチレン検定

##### オーキシン誘導エチレン生成検定

ヤエナリ(*Vigna radiata*)種子をベンレートで15分間殺菌した後、水道水で洗浄して約15時間26℃の流水に浸漬する。発芽種子を0.4%寒天ゲル(厚さ2～3cm)上に均一にまいて、暗所26℃でさらに48時間生育させると、下胚軸長約4cmの黄化幼植物が得られる。先端から約10mmの下胚軸切片を切り出し、室温の純水中に必要な数を集める。切片を十分に水洗いした後、濾紙で水分を除く。50mMリン酸緩衝液(pH



6. 8) で調製した  $10^{-6} \sim 10^{-3}$  M インドール酢酸 (IAA) とコリン、またはエチルコリンの入った溶液 1 ml を 25 ml の三角フラスコにとり、これに組織切片 10 本をいれ直ちにゴム栓で密栓する。これを、 $30^{\circ}\text{C}$  の振とう恒温槽内で振とう保温し、一時間ごとに気相 1 ml を注射機で採取し、ガスクロマトグラフィーにより生成したエチレン量を測定する。ガスクロマトグラフィーのカラムは活性アルミナカラムを用いた。さらに、カラム温度は  $80^{\circ}\text{C}$ 、試料注入室は  $150^{\circ}\text{C}$  で行なった。

#### 4. 第四章の実験

##### 細胞の培養

タバコ (*Nicotiana tabacum* Var Samsun) の光独立栄養培養細胞、光mixotrophic培養細胞および従属栄養培養細胞とアオビユ (*Amaranthus retroflexus*) の光独立栄養培養細胞を検定に用いた。光独立栄養培養細胞の培養には  $\text{CO}_2$  の富化が必要である。 $\text{CO}_2$  の富化にはコンプレッサーからの圧縮空気と  $\text{CO}_2$  ガスボンベから減圧器を通して発生するガスを除菌した後、培養細胞に吹き込む方法と、2 段フラスコを利用して富化する方法とがある<sup>9,2)</sup>。ここでは、検定サンプルが多いので、より簡便な 2 段フラスコを利用する方法を用いた。300 ml 容の三角フラスコを上下に二段重ね合わせた特性の 2 段フラスコの下段に 2 M 炭酸緩衝液 ( $\text{K}_2\text{CO}_3$  5.3 g / 200 ml と  $\text{KHCO}_3$  16.0 g / 800 ml を別々に殺菌しクリーンベンチ内で混合調製したもの) を 60 ml 入れる。炭酸緩衝液を加えることにより、フラスコ内の  $\text{CO}_2$  濃度は 1-2% に富化される。さらに、上段には MS 基本培地に  $10^{-5}$  M の NAA (1-naphthaleneacetic acid) と  $10^{-6}$  M のカイネチンをいれた培地を 60 ml 入れる。フラスコはパラフィルムでしっかりシールすることにより内部の  $\text{CO}_2$  富化空気が外部に漏れないようにする。光mixotrophic培養細胞と従属栄養培養細胞の培養は 100 ml 容の三角フラスコ中で、60 ml の培地中で行った。培地はやはり、MS 基本培地に  $10^{-5}$  M の NAA と  $10^{-6}$  M のカイネチンを加え、さらに 3% のシュクロースを加えたものを用いた。全ての培養細胞は振とう培養機により振とう培養された。振とう機はタイテック社製の NR-10 を

用い、振とう速度は100Rpmで行った。光独立栄養培養細胞と光mixotrophic培養細胞の培養は全明条件下（蛍光灯下 $120\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}^{-1}$ ）で行い、温度は $26\pm 2^\circ\text{C}$ に制御した。特に、蛍光灯による温度の上昇を防ぐため空気の循環には気をつけた。一方、従属栄養培養細胞の培養は全暗条件で行い温度は $26\pm 2^\circ\text{C}$ で行った。

#### 検定試薬の投与

全ての検定試薬は蒸留水にとかし滅菌済みのシリンジとシリンジフィルター（25mm、20ミクロン、コーニング社）により除菌する。このように除菌した検定液を種々の濃度になるように培地に加えた。そして、タバコの光独立栄養培養細胞と光mixotrophic培養細胞、さらに従属栄養培養細胞を、それぞれの検定試薬を加えた培地に2.5gずつ植えた。アオビユの光独立栄養培養細胞は、上記のように調製された検定培地にそれぞれ0.5gずつ植えた。このようにして培養すると、培養細胞の生重量は3週間後にタバコの光独立栄養培養細胞、光mixotrophic培養細胞、従属栄養培養細胞でそれぞれ20g、18g、5g. になりアオビユの光独立栄養培養細胞は2gになる。細胞は一定期間培養した後、培養液ごと吸引ろ過し（濾紙を用いる。No. 2、アドバンテック社）、20mMトリシン-KOH（pH7.8）の洗浄液で数回洗浄される。生重量を求めるためには、このように処理した細胞の重量をそのままはかり、乾物重量を求めるためには、この細胞を凍結乾燥することにより水分を除き、その粉末の重量を測定した。



## 培養細胞の光合成と呼吸の測定

一定期間培養された光独立栄養培養細胞と光mixotrophic培養細胞は吸引ろ過により集められ、20 mM トリシン-KOH (pH 7.8) で数回洗った後、同じバッファー中に再懸濁する。再懸濁した細胞はできるだけすぐ光合成を測定することとし、速やかに測定できない場合は氷中に保存した。光合成と呼吸は酸素電極によって測定した。酸素電極の反応槽に1 mlの反応液(20 mM トリシン-KOH、pH 7.8、10 mM  $\text{NaHCO}_3$ )を入れさらに測定する培養細胞を一定量入れる。酸素電極の反応槽は恒温槽から送られてくる水によって25℃に保たれる。反応液に懸濁された培養細胞を約3分間そのままインキュベートすると、反応液中の容存酸素量は呼吸によって消費されるため直線的に減少する。この直線から容存酸素の減少量をもとめ、これを呼吸速度と規定した。呼吸速度が求められたら、引き続いて光( $1400 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}^{-1}$ )を照射することにより光合成を開始させる。光を照射すると光合成による酸素放出が起こり、この酸素放出速度は5~10分後に最大に達する。検定は、同じ細胞につき3回から5回行い、その平均値を光合成活性とした。光合成速度はチャートの傾きから算出するものの、真の光合成速度はチャートの傾きから得られる酸素放出速度に暗呼吸の酸素消費速度を加えた値で示した<sup>11)</sup>。なお、各検定時の測定誤差は±5%以内であった。測定終了後、反応槽中の培養細胞を残らず取り出し、これに80%のアセトンを加え、一晚冷暗所に静置することによりクロロフィルを抽出する。クロロフィルの定量は、プロトプラストのクロロフィルを定量した時(第一章、実験の部参照)と同様に行なった。

## 培養細胞の光合成電子伝達速度の測定

タバコの光mixotrophic培養細胞を光合成検定時と同様な方法により集め、それを5 mlの磨砕液に懸濁し、ポリトロンで20秒間磨砕する。磨砕液の組成は0.3 M シュクロース、50 mM ピロリン酸ナトリウム (pH 8.0)、10 mM NaCl、1 mM  $MgCl_2$ 、1 mM EDTA、0.25% 牛血清アルブミン (BSA) である。磨砕液は4層のガーゼでこした後、その濾液を $1500 g \times 15$ 分間遠心分離し、チラコイド膜を含んだ沈澱を集める。この沈澱は、少量の反応液 (0.1 M シュクロース、20 mM トリシン-KOH pH 8.3、10 mM NaCl、1 mM  $MgCl_2$ 、1 mM EDTA、1.5 mM  $K_3[Fe(CN)_6]$ ) に懸濁しその1 mlを酸素電極の反応槽にいれる。反応液に懸濁されたチラコイド膜を2分間インキュベートした後、 $1400 \mu E/m^2/s^{-1}$ の光を照射すると光合成の電子伝達 (ヒル反応) が起こり酸素が放出される。光合成検定時と同じように最大酸素放出速度を求め、それをクロロフィルあたりの活性として表示した。

## 5. 第五章の実験

### チラコイド膜の単離と電子伝達反応速度の測定

電子伝達速度の測定に用いたチラコイド調整用の小麦 (*Triticum aestivum* L. Norin No61) は1～2日間流水中に浸漬し発芽させた後、バーミキュライトに播種し、昼間25℃、夜間20℃に制御された自然光ファイトトロン内で約1週間栽培されたものを実験に用いた。

小麦生葉を、0.33M マンニトール、10mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -pH 7.5、5mM NaCl、1mM  $\text{MgCl}_2$ 、0.1% BSA中で、ポリトロンにより数秒間磨砕する。ホモジネートを4層のガーゼで濾過した後、その濾液を1,800×g、15分間遠心する。得られる沈殿を5mM NaClに再懸濁することにより葉緑体包膜を破壊し、タイプEの葉緑体を得る。なお、すべての操作は4℃で行なった。

電子伝達速度の測定は酸素電極を用いて測定した。反応液(0.1M シュークロース、20mM トリシン-KOH pH8.3、10mM NaCl、1mM  $\text{MgCl}_2$ 、1mM EDTA、1.5mM  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ )1mlを酸素電極の反応槽にいれ、さらに一定量の単離したチラコイド膜を加える。反応液に懸濁されたチラコイド膜を25℃、2分間インキュベートした後、 $1400\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}^{-1}$ の光を照射すると光合成の電子伝達(ヒル反応)が起こり酸素が放出される。光合成検定時と同じように最大酸素放出速度を求め、それをクロロフィルあたりの活性として表示した。



## 光リン酸化の測定

光リン酸化に用いた葉緑体は、光合成電子伝達速度を測定した時と同様にして調製したチラコイド膜を用いた。

目盛り付きの試験管に2 mlの反応液(0.1 Mショ糖、5 mM  $\text{MgCl}_2$ 、10 mM トリシン-NaOH (pH 8.3))、と1 mM ADP、1.5 mM フェリシアン化カリウム、一定濃度の検定試薬を入れる。次に、この試験管に1 mM  $^{32}\text{P}$ -リン酸(約370 Bq)を試験管の壁面を使って注意深く加える。1 mMの $^{32}\text{P}$ -リン酸は以下のような方法で準備した。まず、購入した $^{32}\text{P}$ -リン酸はポリリン酸を含んでいるので加水分解し、オルトリン酸だけにしておかなければならない。購入した $^{32}\text{P}$ -リン酸のバイアルのゴムキャップへ注射針を差し込んで0.5 mlの0.1 N HClを注入する。次に、この注射器でバイアルの中の空気を抜いてから、湯浴中で30~60分煮沸する。室温にもどしてからゴムキャップを取り、5  $\mu\text{l}$ をあらかじめ用意しておいた20 mlの10 mM リン酸緩衝液(pH 8)に加え、これを1 mMの $^{32}\text{P}$ -リン酸とした。

このようにして用意した反応液に一定量のチラコイド膜を加え、その試験管を25°Cに制御されたウォーターバスで光照射した。約5分後、5 mlの10%過塩素酸を加え反応をストップさせ、さらに2 mlのアセトンを加えて試験管ごと水中に移す。この時、対照として光照射せずに同じ時間インキュベートした試料をバックグラウンド用とした。反応を停止した試験管に1 mlの10% モリブデン酸アンモニウムを加え、次に水で飽和したn-ブタノール-ベンゼン混液(1:1、v/v)を4 ml加え、栓をして30秒間ミキサーで激しく振とうした。この操作で未反応の無機

リン酸はほとんどリンモリブデン酸アンモニウムとなって有機層へ分配され、反応によって生成したATPは水層に残る。数分間静置すると2層に分かれるので上層の有機層を吸引除去した。このとき、上下層の間に沈着した暗黄緑色の葉緑体由来のタンパク質なども注意深く取り除く。これだけの操作では未反応の無機リン酸が若干水層に残っており、またアセトンも残っているので以下のようにモリブデン酸アンモニウム量を減らして、無機リン酸の抽出を二度繰り返した。水層にキャリアーとしてコールドの0.1Mリン酸、0.1mlを加え、さらにモリブデン酸アンモニウムを加え再び30秒間激しく振とうし無機リン酸の抽出を繰り返す。3回目の抽出操作で有機層をすべて取り除くと水層に $^{32}\text{P}$ -ATPが残る。次に、この水層5mlを液体シンチレーション用バイアルに移し、5mlの水と2mlの28%アンモニアを加えた。そして、放射能は液体シンチレーションカウンターの低エネルギーレベルのチャンネル( $^3\text{H}$ チャンネル)を使い、チェレンコフ光で測定した<sup>97)</sup>。

#### CF<sub>1</sub>の単離

CF<sub>1</sub>の単離は以下の方法にしたがった。市販のホウレンソウ50gを水洗いし、主脈を除き、約1cmに切る。これを、200mlの磨碎液(20mM トリシン-KOH (pH 7.8)、0.4M ショ糖、10mM NaCl、5mM MgCl<sub>2</sub>)中でホモジナイザーにより10秒間磨碎する。ホモジネートを4層のガーゼで濾過した後、その濾液を200g×90秒で遠心分離する。さらに、この上清を1000g×7分遠心分離した後、沈澱を5mlの懸濁液(10mM NaCl、2mM



トリシン-KOH (pH 8.0) に懸濁し、その懸濁液を氷中で約 20 分間放置する。そして、この懸濁液を 10,000 g × 10 分遠心分離し、沈澱を再懸濁液 (0.25 M ショ糖、10 mM トリス (pH 7.6)、1 mM EDTA、2 mM ATP、5 mM DTT) に再懸濁する。以上までの操作はすべて 4℃ で行い、これ以後の操作は室温で行なう。得られた再懸濁液に 1/2 量のクロロホルムを加え、すばやくスターラーで 15 秒間攪拌した後、この混合液を 300 g × 5 秒遠心分離することにより水層とクロロホルム層にわけける。この操作により CF<sub>1</sub> タンパク質はほとんど水層に抽出されるが、クロロホルム層にもまだ抽出されない CF<sub>1</sub> タンパク質が一部残る。そこで、クロロホルム層に 2 倍量の再懸濁液を加え、300 g × 5 秒遠心分離し、水層とクロロホルム層を分ける操作を行い、得られる水層を前の操作で得られた水層と加えることにより抽出効率を上げる。こうして得られた水層を 120,000 g × 30 分間超遠心すると、上清に CF<sub>1</sub> を含む黄金色の液体が得られるので、これをクルード CF<sub>1</sub> とした。このクルード CF<sub>1</sub> にはまだ他のタンパク質が存在するのと、CF<sub>1</sub> の α、β、γ サブユニットが解離したものが存在しているため、さらに精製を行なった。精製は、mono Q カラムを用いた FPLC により行なった。クルード CF<sub>1</sub> を PD10 で脱塩した後、mono Q カラムを用いたイオン交換 FPLC に供する。溶出は 50 mM LiOH、70 mM ほう酸 (硫酸で pH を 8.5 に調整)、20% (v/v) エチレングリコール、1 mM オクチルグルコース中で NaCl の濃度を 60 分かけて 0-0.5 M に変化させるリニアグラジエント溶出法で行なった。この溶出により α、β、γ サブユニットが会合した状態の (活性が保持された状



態の)  $CF_1$  タンパクが得られる。なお、各ピークの同定は 12.5% の SDS-PAGE によって行い、さらに  $CF_1$  タンパクである確認は ATP の分解活性を測定する事により確認した<sup>98)</sup>。

#### $CF_1$ の活性測定法と Takahashi 法によるリン酸の定量法

活性の測定は笠毛<sup>98)</sup>らの方法にしたがった。目盛り付き試験管に 0.7 ml の反応液 (60 mM トリシン-KOH (pH 8.0)、4 mM  $MgCl_2$ ) と一定量の単離した  $CF_1$  を加え、37℃ の水浴中にいれる。5 分後、8 mM の ATP 200  $\mu$ l をこの反応液に加え反応を開始させる。約 30 分後、30% トリクロロ酢酸 0.2 ml を加えることにより反応を停止させ、その後すばやく氷中に移す。生成したリン酸は以下に述べる Takahashi 法<sup>98)</sup>により定量した。

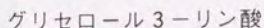
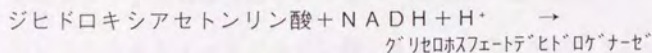
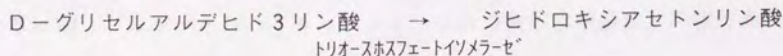
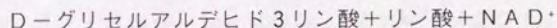
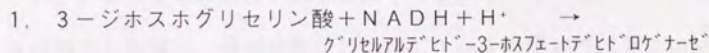
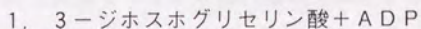
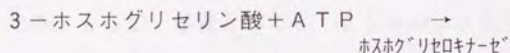
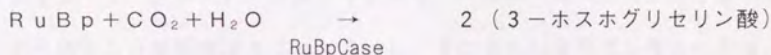
試験管に 0.5 ml の 2% モリブデン酸ナトリウム、0.5 ml の 1.5 N 硫酸、2 ml イソブタノール (2-メチルー1-プロパノール) と 0.5 ml の上記操作で得られたサンプル 0.5 ml を入れる。これを、約 10 秒間ボルテックスミキサーにより攪拌し、静置するとイソブタノール層と水層に分かれる。イソブタノール層 1 ml を他の試験管に移し、さらにエタノール 0.5 ml、0.5% アスコルビン酸 1 ml を加える。これを、37℃ の水浴中で 30 分インキュベーションした後、720 nm の吸光度を測定する。リン酸の検量線は  $NaH_2PO_4$  (数  $\mu$ mol 程度の範囲で作製する) を用いて作製し、この検量線から反応液中のリン酸の絶対量を求めた。

## RuBpCaseとPEPCaseの単離と活性測定

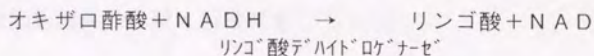
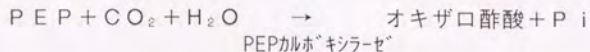
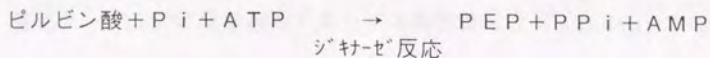
植物材料は昼間25℃、夜間20℃に制御された自然光ファイトトロンで、バーミキュライト上1週間栽培した小麦幼苗を用いた。小麦の葉2gを10mlの抽出液(1mM MgSO<sub>4</sub>、0.5mM CaCl<sub>2</sub>、0.2mM MnCl<sub>2</sub>、50mM トリス-HCl pH7.5、12.5% (w/v) グルコース)に入れ、ポリトロン(強度7、3分)で磨砕する。ホモジネートは4層のガーゼで濾過した後、その濾液を10,000×30分遠心分離しその上清を粗酵素液として以下の活性検討に用いた。

RuBpCaseとPEPCaseの活性の測定は、それぞれいくつかの酵素系を組み合わせた共役反応によって最終的にはNADHの酸加速度を340nmの変化で測定した。それぞれの共役反応系を以下に示す。

### RuBpCase 活性測定のための共役反応



PEPCase 活性測定のための共役反応



RuBpCaseの活性測定は以下のように行なった。分光光度計のセルに反応液1ml (0.33M ソルビトール、50mM HEPES-KOH pH8.2、10mM KCl、1mM EDTA、15mM MgCl<sub>2</sub>、5mM DTT、5mM ATP、10mM NaHCO<sub>3</sub>、5mM ホスホクレアチン、5unit グリセルアルデヒド3リン酸デヒドロゲナーゼ、15unit 3-ホスホグリセリン酸キナーゼ、2unit クレアチンホスホキナーゼ、1mM NADH) と小麦の葉から抽出した粗酵素液50μlをいれ、そのまま約8分インキュベーションする。そして、基質として0.25μmolのリブロース5リン酸

(RuBp)を加えNADHの酸化速度を340nmの吸収で測定する。

PEPCaseの活性の測定は以下のように行なった。RuBpCaseの測定と同様に、分光光度計のセルに1mlの反応液(80mM トリス-HCl pH8.0、10mM NaHCO<sub>3</sub>、2mM MgCl<sub>2</sub>、5mM グルタチオン、14unit リンゴ酸脱水素酵素)に粗酵素液100μlを入れ6分間インキュベーションする。基質として2mM PEP(ホスホエノールピルビン酸)を加え反応を開始させ、上記と同様に340nmの吸収で反応速度を測定する。



両酵素の活性は可溶性タンパクあたりの活性として表示した。なお、可溶性タンパクの定量は市販のタンパク質量キッド (Bio Rad 社) を用いた。

#### 炭酸固定酵素の単離と活性測定

酵素の単離と活性の測定は Lilley<sup>117)</sup> 等の開発した方法を用いた。ホウレンソウの葉 50 g を水洗いし、脱主脈した後、100 ml の磨砕液中でポリトロンによって 3 秒間磨砕する。この時の磨砕液の組成は 0.33 M グルコース、50 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 、50 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、5 mM  $\text{MgCl}_2$ 、11 mM  $\text{NaCl}$ 、7.5 mM イソアスコルビン酸-pH 6.5 である。このホモジネートをすばやく 4 層のガーゼで濾過し、その濾液を 2500 g × 30 秒遠心分離し沈澱物を得る。得られた沈澱 (クロロプラスト) を 50 ml の懸濁液 (0.33 M ソルビトール、2 mM EDTA、1 mM  $\text{MgCl}_2$ 、0.2% BSA、0.5 mM DTT、50 mM HEPES-KOH pH 8.0) に懸濁し、2500 g × 30 秒間さらに遠心分離する。得られた沈澱に 1/13 に薄めた懸濁液 10 ml を加え、クロロプラストを浸透圧的に破壊し、9000 g × 15 分間遠心分離することにより可溶性タンパク質画分を得る。次に、この上清を分子量 10,000 カットフィルターのセントリコンで限外濾過を行ない、得られた残査を 2 ml の再懸濁液 (10 mM HEPES-KOH pH 8.0、10 mM KCl、1 mM EDTA、15 mM  $\text{MgCl}_2$ 、0.5 mM DTT) に懸濁し、酵素試料とした。すべての操作は 4℃ で行なった。

分光光度計のセルに1 mlの反応液(40 mM HEPES-KOH  
pH 8.0, 8 mM KCl, 0.8 mM EDTA, 20 mM  
MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT)に調製した酵素液(約50 μl)、  
0.25 mM NADPH、10 mM NaHCO<sub>3</sub>、4 mM ATPと  
ATP再生系として10 mM ホスホクレアチン、1.1 unit クレ  
アチンキナーゼを加える。3分間、インキュベーションした後、基質とし  
て2 mM DHAP(ジハイドロキシアセトンリン酸)を加えると炭酸固  
定回路が動き出しそれによりNADPHが消費される。活性の測定は、  
NADPHの消費速度を340 nmで分光学的に測定した。分光光度計の  
セルホルダーを恒温槽につなげるにより、セルの温度を25℃に保つ  
た。基質としては、DHAP以外にもすべての炭酸固定回路における反応  
中間製生物を用いることが出来るので、それぞれ適宜用いた。

## 謝辞

本研究を遂行するにあたり、多くの方々の御指導、御協力をいただきました。研究の機会を与えて下さったばかりでなく、終始懇切なるご指導、ご助言を賜りました東京大学農学部生物有機化学研究室、鈴木昭憲教授に心より感謝の意を表します。また、直接研究のご指導を頂きました同研究室、玄 丞培博士には公私ともにたいへんお世話になりました。厚く御礼申し上げます。

同研究室、趙 徹博士（現ジャパンターフグラス株式会社）には研究の初歩からご指導いただいたばかりでなく、共同研究者としても御協力いただきました。心より御礼申し上げます。

光独立栄養細胞を御供与くださり、本研究遂行にあたり御協力をいただいた山田康之教授、佐藤文彦助教授（京都大学農学部）に深く感謝致します。植物のオルガネラの単離や炭酸固定系の酵素の活性測定で多くの御指導、御助言をいただいた東京大学アイソトープ総合センター仲本 準博士（現埼玉大学理学部）、 $CF_1$  や各種ATPaseの単離と活性測定において有益な御助言と御指導をいただきました笠毛邦弘博士（農林水産省食品総合研究所）に心より感謝致します。

各種検定化合物の化学合成に御協力いただいた田中昭宣氏（三菱瓦斯化学株式会社）、エチレンの検定に御協力いただいた丸山岳人氏（同上）、プロトプラストを用いた光合成促進物質の検定に御協力いただいた古島昌和、高橋 巖両氏（同上）に深謝致します。

アイソトープを用いた実験はすべて東京大学アイソトープ総合センター



で行ないました。アイソトープの取扱と実験について多くの御教示を賜りました井尻憲一助教授、遠藤正志文部技官をはじめとする東京大学アイソトープ総合センターの方々に深く感謝致します。

東京大学農学部生物有機化学研究室、磯貝 彰助教授には常日頃からの確な御指導と御鞭撻を頂戴致しました。心より御礼申し上げます。また、長澤寛道博士、片岡宏誌博士を始めとする生物有機化学研究室内の皆様には有益な御助言をいただいたばかりでなく、いつも暖かい励ましのお言葉をいただきました。心より深く感謝致します。

最後に、私事でありますが研究遂行にあたりかげながら支えてくれた妻、英美に感謝の意を表わします。

参考文献

- 1) Wareing, P. F., Khalita, M. M. and Treharne, K. J. (1968) Rate-limiting processes in photosynthesis at saturating light intensities. Nature, 220: 453-457.
- 2) Tanas, I. A., Atkins, B. D., Ware, S. M. and Bidwell, R. G. S. (1972) Indoleacetic acid stimulation of phosphorylation and bicarbonate fixation in light. Can. J. Bot., 50: 1523-1527
- 3) Turner, W. B. and Bidwell, R. G. S. (1965) Rate of photosynthesis in attached bean leaves, and the effect of spraying with indoleacetic acid solution. Plant Physiol., 40: 446-451
- 4) Yakushikina, N. I. and Pushkina, G. P. (1976) Changes in the rate of photophosphorylation in corn seedlings under the influence of gibberellin and kinetin. Soviet Plant Physiol., 22: 994-995
- 5) Pushkina, G. P. and Starikova, V. T. (1976) Effect of growth regulators and inhibitors on the process of photosynthetic phosphorylation in chloroplasts isolated from corn leaves. Soviet Plant Physiol., 23: 171-172
- 6) Harvey, B. M. R., Lu, B. C. and Fletcher, R. A. (1974) Benzyladenine accelerates chloroplast differentiation and stimulates photosynthetic enzyme activity in cucumber cotyledons. Can. J. Bot., 52: 2581-2586
- 7) Feierabend, J. (1969) Der Einfluß von Cytokinen auf die Bildung von Photosyntheseenzymen in Roggenkeimlingen. Planta, 84: 11-29
- 8) Wellburn, F. A. M. and Wellburn, A. R. (1973) Influence of gibberellic and abscisic acids and the growth retardant, CCC, upon plastid development. Planta, 111: 337-346
- 9) 讚井 蕃、(1977)、ニコチン酸アミドの植物に対する生育調節作用について: 植物の化学調節、12、59-69
- 10) Wort, D. J. (1969) Stimulation of vegetative and reproductive growth of bush bean plants by naphthenates. Can. J. Plant Sci., 49: 791-796

- 1 1) Wort, D. J. and Patel, K. M. (1970)  
Agric. J., 62, 644-
- 1 2) Fattah, Q. A. and Wort, D. J. (1970) Metabolic responses of bush  
bean plants to naphthenate application.  
Can. J. Bot., 48: 861-866
- 1 3) Ries, S. K. and Wert, V. (1977) Growth responses of rice  
seedlings to triacontanol in light and dark.  
Planta, 135: 77-82
- 1 4) 石井龍一、村田吉男 (1978)  $C_3$ ,  $C_4$ 植物の光合成.  
日本作物学会紀事、47: 165-188
- 1 5) 山田芳雄、池田元輝 (1979) 光呼吸の制御.  
蛋白質、核酸、酵素(別冊)、共立出版、p. 195-202
- 1 6) 玄 丞培 (1986) 光呼吸の化学的制御.  
植物の化学調節、21: 17-24
- 1 7) 秋田重誠、田中市郎 (1973) 水稻の乾物生産と稔実に対する低  
酸素の影響 日本作物学会紀事、42: 18-23
- 1 8) Quebedeaux, B. and Hardy, R. W. (1973) Oxygen as a new factor  
controlling reproductive growth. Nature, 243: 477-479
- 1 9) 武田友四郎、土屋幹夫、梶 和一 (1978) 酸素濃度が作物の光  
合成及び生育に及ぼす影響.  
日本作物学会紀事、47: 344-349
- 2 0) Quebedeaux, B. and Hardy, R. W. (1976) In  $CO_2$  metabolism and  
plant productivity, (Ed.) Burris, R. H. and Black, C. C., Univ.  
Park Press, Maryland, p.185
- 2 1) Akita, S. and Tanaka, I. (1973) Studies on the mechanism of  
difference in photosynthesis among species.  
Proc. Crop. Sci. Soc. Japan, 42: 288-295
- 2 2) Yoshida, S. (1973) Effect of  $CO_2$  enrichment at different stages  
of panicle development on yield components and yield of rice.  
Soil Sci. Plant Nutr. 19: 311-316
- 2 3) Bjorkman, O., Nobs, N. and Berry, J. (1971) Further studies on  
hybrids between  $C_3$  and  $C_4$  species of Atriplex.  
Carnegie Inst. Y. B., 70: 507-511.



- 2 4) Bjorkman, O., Nobs, N., Percy, R. W., Boyton, J. and Berry, J. (1971) In photosynthesis and photorespiration, (Ed.) Hatch, M. D., Wiley-Interscience, New York, p.105-119
- 2 5) Lloyd, N. D. H. and Calvin, D. T. (1977) Photosynthesis and photorespiration in sunflower selections. Can. J. Bot., 55: 3006-3012
- 2 6) Zelitch, I. (1957) -Hydroxysulfonates as inhibitors of the enzymatic oxidation of glycolic and lactic acids. J. Biol. Chem., 224: 251-260
- 2 7) Kisaki, T. and Tolber, N. E. (1970) Glycine as a substrate for photorespiration. Plant and Cell Physiol., 11: 247-258.
- 2 8) Jewess, P. J. Kerr, M. W. and Whitaker, D. P. (1975) Inhibition of glycolate oxidase from pea leaves. FEBS Lett. 53: 292-296
- 2 9) Zelitch, I. (1974) The effect of glycidate, an inhibitor of glycolate synthesis, on photorespiration and net photosynthesis. Arch. Biochem. Biophys., 163: 367-377.
- 3 0) Zelitch, I. (1978) Effect of glycidate, an inhibitor of glycolate synthesis in leaves, on the activity of some enzymes of the glycolate pathway. Plant Physiol., 61: 236-241
- 3 1) Lawyer, A. L. and Zelitch, I. (1978) Inhibition of glutamate: Glyoxylate aminotransferase activity in tobacco leaves and callus by glycidate, an inhibitor of photorespiration. Plant Physiol. 61: 242-247
- 3 2) Ishibashi, H., Yun, S. J., Hyeon, S. B., Suzuki, A. and Tamura, S. (1978) A simple method for screening photorespiration inhibitors using isolated spinach cells and an oxygen electrode. Agric. Biol. Chem. 42: 1807-1809
- 3 3) Cho, C., Sugimoto, Y., Kim, J. M., Usuda, H., Ishii, R., Hyeon, S. B. and Suzuki, A. (1983) Search for photorespiration inhibitors; glycine and serine derivatives. Agric. Biol. Chem. 47: 2685-2687
- 3 4) Cho, C., Kim, J. M., Ishii, R., Hyeon, S. B. and Suzuki, A. (1985) Effect of aminoacetonitrile on the CO<sub>2</sub> exchange rate in rice leaves. Agric. Biol. Chem., 49: 2847-2850

- 3 5) Cho, C., Kim, J. M. Ishii, R., Hyeon, S. B. and Suzuki, A.  
(1986) Aminomethansulfonic acid as an inhibitor of  
photorespiration. Agric. Biol. Chem. 50: 1315-1316
- 3 6) Cho, C., Ishii, R. Hyeon, S. B. and Suzuki, A. (1987) Inhibition  
of serine:glyoxylate aminotransferase and mitochondrial glycine  
oxidation in the photorespiratory glycolate pathway by  
vinylglycine. Agric. Biol. Chem. 51: 2597-2598
- 3 7) Somerville, C. L. and Ogren, W. L. (1979) A phosphoglycolate  
phosphatase deficient mutant of Arabidopsis. Nature,  
280: 833-836
- 3 8) Somerville, C. L. and Ogren, W. L. (1980) Inhibition of  
photosynthesis in Arabidopsis mutant lacking leaf glutamate  
synthetase activity. Nature, 286: 257-259.
- 3 9) Somerville, C. L. and Ogren, W. L. (1980) Photorespiration  
mutant of Arabidopsis thaliana deficient in serine:glyoxylate  
aminotransferase activity.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 2684-2687
- 4 0) Somerville, C. L. and Ogren, W. L. (1981) Photorespiration  
deficient mutant of Arabidopsis thaliana lacking mitochondrial  
serine transhydroxymethylase activity.  
Plant physiol., 67: 666-671
- 4 1) 村田吉男、山口淳一 (1979) 光合成と物質生産  
蛋白質、核酸、酵素 (別冊) 共立出版、p. 203-213
- 4 2) Black, C. C. Jr (1973) Photosynthetic carbon fixation in  
relation to net CO<sub>2</sub> uptake.  
Ann. Rev. Plant Physiol., 24, 253-286
- 4 3) 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
- 4 4) Monteith, J. L. (1978) Reassessment of maximum growth rates for  
C<sub>3</sub> and C<sub>4</sub> crops. Expl. Agric., 14: 1-5
- 4 5) 山川 理 (1984) 植物生長調製物質による物質の吸収、  
蓄積能力の向上：未来を拓くグリーンハイ・テクノロジー  
(加藤明治、木村 滋 編著) 農林統計協会、p. 49-63



- 4 6) 鮫島宗明 (1984) 光合成メカニズムの解明と改良への  
アプローチ：未来を拓くグリーンハイ・テクノロジー  
(加藤明治、木村 滋 編著) 農林統計協会、p. 78-95
- 4 7) 石井龍一 (1981) 葉の光合成速度の測定：光合成研究法  
(加藤 栄、宮地重遠、村田吉男編集)、共立出版、p. 13-33
- 4 8) 山下 魏 (1981) 農薬実験法3除草剤編  
(深見、上杉、石塚、富沢編)、ソフトサイエンス社、p. 260
- 4 9) 旭 正 (1981) 農薬実験法3除草剤編  
(深見、上杉、石塚、富沢編)、ソフトサイエンス社、p. 237
- 5 0) 松中昭一 (1979) 除草剤の作用機構研究における生理生化学的  
技法 日本農薬学会誌、4: 525-532
- 5 1) 村田紀夫、加藤 栄、山本 泰、桜井栄博 (1979)  
生化学実験講座12巻(上)、(日本生化学会編)、東京化学同人  
p. 357
- 5 2) 西本克侑、尾形悦郎、香川靖雄、萩原文二、寺田 弘、小沢高将  
(1979) 生化学実験講座12巻(上)、(日本生化学会編)、  
東京化学同人、P. 257
- 5 3) Hyeon, S. B., Nishida, M., Ohsaka, A., Kim, J. M. and  
Suzuki, A. (1982) A simple bioassay for chemicals active to the  
photosynthetic or respiratory systems of plants.  
Agric. Biol. Chem., 46: 811-812
- 5 4) 小中伸夫 (1978) 甘藷に対するコリンの効果。  
雑草とその防除 15、54-56
- 5 5) Decker, J. P. (1955) A rapid postillumination deceleration of  
respiration in green leaves. Plant Physiol. 30: 82-84
- 5 6) Hyeon, S. B., Cho, C., Che, F. S., Tsukamoto, C. Tanaka, A.  
Furushima, M. and Suzuki, A (1987) Effects of choline chloride  
and its analogues on photosynthesis in wheat protoplasts.  
Agric. Biol. Chem., 51: 917-919
- 5 7) Hyeon, S. B., Che, F. S., Cho, C., Takahashi, I., Furushima, M.  
and Suzuki, A (1987) Effects of N-substituted glycine analogues  
on photosynthesis in wheat protoplasts.  
Agric. Biol. Chem., 52: 1851-1853



- 5 8) 岡部敬一郎、神谷明夫、都筑幹夫、宮地重遠、(1982)  
炭素代謝：光合成Ⅰ（宮地重遠編）、朝倉書店、p. 114-157
- 5 9) Ohta, Y., Hamazato, H., Kajita, T., Furushima, M. and Suzuki, T.  
(1988,11,18) Synergistic plant growth regulators containing  
choline salt and nicotinamide. Fr. Demande (Patent), 31 pp.
- 6 0) Kajita, T., Suzuki, T. and Maruyama, T. (1987,09,22) Rice seed  
treatment by cholines and ultrasound for growth enhancement.  
Jpn. Kokai Tokkyo Koho, 2 pp.
- 6 1) Che, F. S., Cho, C., Hyeon, S. B., Isogai, A. and Suzuki, A.  
(1990) Metabolism of choline chloride and its analogs in wheat  
seedlings. Plant Cell Physiol., 31: 45-50
- 6 2) Hanson, A. D., May, A. M., Grumet, R., Bode, J., Jamison, G. C.  
and Rhodes, C. (1985) Betaine synthesis in Chenopods:  
localization in chloroplasts.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 3678-3682
- 6 3) Incharoensakdi, A., Takabe, T. and Akazawa, T (1986) Effect of  
betaine on the activity and the dissociation of RuBisCO from  
Aphanothece halophytica. Abstracts of Papers, Annual Meeting of  
the Agricultural Chemical Society of Japan, Kyoto, April, p.726
- 6 4) Weigel, P., Lerma, C. and Hanson, A. D. (1988) Choline Oxidation  
by intact spinach chloroplasts. Plant Physiol. 86: 54-60
- 6 5) Rise, S. K., Wert, V. F., Sweeley, C. C. and Leavitt, R. A.  
(1977) Triacantanol: a new naturally occurring plant growth  
regulator. Science, 195: 1339-1341
- 6 6) Ericksen, A. B., Sellden, G., Skogen, D. and Nilsen, S. (1981)  
Comparative analysis of the effect of triacantanol on  
photosynthesis, photorespiration and growth of tomato  
(C<sub>3</sub>-plant), and maize (C<sub>4</sub>-plant). Planta, 152: 44-49
- 6 7) Houtz, R. L., Ries, S. K. and Tolbet, N. E. (1985) Effect of  
triacantanol on Chlamydomonas. I. Stimulation of growth and  
photosynthetic CO<sub>2</sub> assimilation. Plant Physiol., 79: 357-364
- 6 8) Houtz, R. L., Ries, S. K. and Tolbet, N. E. (1985) Effect of  
triacantanol on Chlamydomonas. II. specific activity of  
ribulose-P<sub>2</sub> carboxylase/oxygenase, ribulose-P<sub>2</sub> concentration,  
and characteristics of photorespiration.

- 6 9 Haugstad, M., Ulsaker, L. K., Ruppel, A. and Nilsen, S. (1983) The effect of triacontanol on growth, photosynthesis and photorespiration in *Chlamydomonas reinhardtii* and *Anacystis nidulans*. Physiol. Plant, 58: 451-456
- 7 0) Kasamo, K. and Nouchi, I. (1987) The role of phospholipids in plasma membrane ATPase activity in *Vigna radiata* L. (Mung Bean) roots and hypocotyls. Plant Physiol., 83: 323-328
- 7 1) Sigenthaler, P. A., Smutny, J. and Rauyler, A. (1987) Involvement of distinct populations phosphatidylglycerol and phosphatidylcholine molecules in photosynthetic electron-flow activities. Biochim. Biophys. Acta., 891: 85-93
- 7 2) Sandermann, H. (1978) Regulation of membrane enzymes by lipids. Biochim. Biophys. Acta., 515: 109-237
- 7 3) Winget, G. D., Kanner, N. and Racker, E. (1977) Formation of ATP by the adenosine triphosphatase complex from spinach chloroplasts reconstituted together with bacteriorhodopsin. Biochim. Biophys. Acta., 460: 491-499
- 7 4) 山根久和、高橋信孝 (1984) 生理活性物質のバイオアッセイ (池上信夫、丸茂晋吾、星 元紀編)、講談社、p. 107
- 7 5) Murakami, Y. (1968) A new rice seedling test for gibberellins, 'Microdrop Method', and its use for testing extracts of rice and morning glory. Bot. Mag. Tokyo, 81: 33-43
- 7 6) Ogawa, Y. (1963) Studies on the conditions for gibberellin assay using rice seedling. Plant Cell Physiol., 4: 227-237
- 7 7) Kimura, Y. and Tamura, S. (1972) Isolation and structure of pestalotin, a gibberellin synergist from *Pestalotia cryptomeriaeicola*. Agric. Biol. Chem., 36: 1925-1930
- 7 8) Murashige, T. and Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant., 15: 473-497
- 7 9) Linsmaier, E. M. and Skoog, F. (1965) Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. Physiol. Plant., 18: 100-127



- 8 0) Skoog, F., Hamzi, H. Q., Szweykowska, A. M., Leonard, N. J., Carraway, F. L., Fujii, T., Helgeson, J. P. and Loeppky, R. N. (1967) Cytokinins: structure-activity relations. Phytochemistry, 6: 1169-1192
- 8 1) Kefford, N. P., Zwar, J. A. and Bruce, M. I. (1968) Biochemistry and Physiology of Plant Growth Substances, p. 61 (ed. Wightman, F. and Setterfield, G.), Runge Press
- 8 2) Narain, A. and Laloraya, M. M. (1974) Cucumber cotyledon expansion as a bioassay for cytokinins. Z. Pflanzenphysiol., 71: 313-322
- 8 3) Green, J. F. and Muir, R. M. (1978) The effect of potassium on cotyledon expansion induced by cytokinins. Physiol. Plant, 43: 213-218
- 8 4) Went, F. W. (1928) The interpretation of the phototropic curvations. Rec. Trav. Bot. Neerl., 25: 483-489
- 8 5) Bonner, J. (1949) Limiting factors and growth inhibitors in the growth of the avena coleoptile. Am. J. Bot., 36: 323-332
- 8 6) Zeevaart, J. A. D. (1971) (+)-Abscic acid content of spinach in relation to photoperiod and water stress. Plant Physiol., 48: 86-90
- 8 7) Sakai, S. and Imaseki, H. (1971) Auxin-induced ethylene production by mungbean hypocotyl segments. Plant Cell Physiol., 12: 349-359
- 8 8) Asen, S., Cathey, H. M. and Stuart, N. W. (1960) Enhancement of gibberellin growth-promoting activity by hydrangenol isolated from leaves of Hydrangea macrophylla. Plant Physiol., 35: 816-819
- 8 9) Kamisaka, S. (1973) Requirement of cotyledons for gibberellic acid induced hypocotyl elongation in lettuce seedlings. Isolation of the cotyledon factor active in enhancing the effect of gibberellic acid. Plant Cell Physiol., 14: 747-755
- 9 0) Paul, J. S., Cornuelli, K. L. and Bassham, J. A. (1978) Effects of ammonia on carbon metabolism in photosynthesizing isolated



- mesophyll cells from Papaver somniferum L. Planta, 142: 49-54
- 9 1) Horn, M. E., Sherrard, J. H. and Widholm, J. M. (1983)  
Photoautotrophic growth of soybean cells in suspension culture.  
Plant Physiol., 72: 426-429
  - 9 2) Husemann, W. and Barz, W. (1977) Photoautotrophic growth and  
photosynthesis cell suspension cultures of Chenopodium rubrum.  
Physiol. Plant, 40: 77-81
  - 9 3) Larosa, P. C., Hasegawa, P. M. and Bressan, R. A. (1984)  
Photoautotrophic potato cells: Transition from heterotrophic to  
autotrophic growth. Physiol. Plant, 61: 279-286
  - 9 4) Yamada, Y. and Sato, F. (1978) The photoautotrophic culture of  
chlorophyllous cells. Plant Cell Physiol., 19: 691-699
  - 9 5) Sato, F., Takeda, S. and Yamada, Y. (1987) A comparison of  
effects of several herbicides on photoautotrophic,  
photomixotrophic and heterotrophic cultured tobacco cells and  
seedlings. Plant Cell Reports, 6: 401-404
  - 9 6) 加藤 栄 (1981) エネルギー変換反応研究法:  
光合成研究法、(加藤 栄、宮地重遠、村田吉男編集)、共立出版  
p. 249
  - 9 7) 向畑恭男 (1981) 光リン酸化反応: 光合成研究法、  
(加藤 栄、宮地重遠、村田吉男編集)、共立出版、p. 422
  - 9 8) Kasamo, K., Kagita, F. and Arai, Y. (1989) Isolation of subunits  
of coupling factor 1 from maize and spinach chloroplasts and  
properties of combinations of subunits with ATPase activity.  
Plant Cell Physiol. 30: 729-738
  - 9 9) Govindjee and Papageorgion, G. (1971), Phytophysiology  
(ed. Giese, A. C.) p.1, Academic Press, New York
  - 100) Papageorgion, G. (1975) Bioenergetics of Photosynthesis  
(ed. Govindjee) p.319, Academic Press, New York
  - 101) Duysens, L. N. M. and Sweers, H. E. (1963) Studies on Microalgae  
and Photosynthetic Bacteria.  
(ed. Japanese Society of Plant Physiologists) p.353,  
University of Tokyo Press, Tokyo

- 1 0 2) Mohanty, P., Papageorgion, G. C. Fujimura, Y. and Murata, N.  
(1990) Betains protection of oxygen-evolving activity of  
photosystem II. Proceedings of the Annual Meeting and 30th  
Symposium Japanese Society of Plant Physiologists, Tokyo, p.118
- 1 0 3) Satoh, K. and Katoh, S. (1980) Light-induced changes in  
chlorophyll a fluorescence and cytochrome f in intact spinach  
chloroplasts: The site of light-dependent regulation of electron  
transport. Plant Cell Physiol., 21: 907-916
- 1 0 4) Hirano, M., Satoh, K. and Katoh, S. (1981) The effect on  
photosynthetic electron transport of temperature-dependent  
changes in the fluidity of the thylakoid membrane in a  
thermophilic blue-green alga.  
Biochim. Biophys. Acta., 635: 476-487
- 1 0 5) 藤茂 宏 (1984) 光エネルギーの吸収と固定:  
生物生産の場における生理的・化学的制御。  
(研究成果報告書編集委員会)、p. 6
- 1 0 6) Edwards, G. E., Robinson, P., Tyler, N. J. C. and Walker, D. A.  
(1978) Photosynthesis by isolated protoplasts, protoplast  
extracts, and chloroplasts of wheat.  
Plant Physiol., 62: 313-319
- 1 0 7) Cho, C., Sugimoto, Y., Kim, J. M., Usuda, H., Ishii, R.,  
Hyeon, S. B. and Suzuki, A. (1983) Search for photorespiration  
inhibitors; Glycine and serine derivatives.  
Agric. Biol. Chem., 47: 2685-2687
- 1 0 8) Hyeon, S. B., Che, F. S., Cho, C., Takahashi, I., Furushima, M.  
and Suzuki, A. (1988) Effects of N-substituted glycine analogues  
on photosynthesis in wheat protoplasts.  
Agric. Biol. Chem., 52: 1851-1853
- 1 0 9) Arnon, D. I. (1949) Copper enzymes in isolated chloroplasts.  
Polyphenoloxidase in Beta vulgaris. Plant Physiol., 24: 1-15
- 1 1 0) 桜井英博、(1967) 生体膜実験技術 (大西 勁編) 南江堂  
p. 250
- 1 1 1) Che, F. S., Cho, C., Hyeon, S. B., Isogai, A. and Suzuki, A.  
(1990) Metabolism of choline chloride and its analogs in wheat  
seedlings. Plant Cell Physiol., 31: 45-50

- 1 1 2 ) Kirino, O., Oshita, H., Oishi, T. and Kato, T. (1980)  
Structure-activity study on N-substituted aminoacetonitriles  
possessing preventive activity against Fusarium diseases.  
Agric. Biol. Chem., 44: 31-34
- 1 1 3 ) Reid, W. D., Haubrich, D. R. and Krishna, G. (1971) Enzymic  
radioassay for acetylcholine and choline in brain.  
Anal. Biochem., 42: 390-397
- 1 1 4 ) Bligh, E. G. and Dyer, W. J. (1959) A rapid method of total  
lipid extraction and purification.  
Can. J. Biochem. Physiol., 37: 911-917
- 1 1 5 ) Heemskerk, J. W. M., Bogemann, G., Scheijen, M. A. M. and  
Wintermans, J. F. G. M. (1986) Separation of chloroplast polar  
lipids and measurement of galactolipid metabolism by  
high-performance liquid chromatography.  
Anal. Biochem., 54: 85-91
- 1 1 6 ) Sato, F., Asada, K. and Yamada, Y. (1979), Photoautotrophy and  
the photosynthetic potential of chlorophyllous cells in  
mixotrophic cultures. Plant Cell Physiol., 20: 193-200
- 1 1 7 ) Furbank Robert T. and Lilley Ross McC. (1981), Reductive  
pentose phosphate cycle and oxidative carbohydrate metabolic  
activities in Per chloroplast stroma extracts.  
Plant Physiol., 67: 1036-1041



