

乾燥強光下の野生スイカにおけるシトルリン蓄積の
制御機構の解明

高原 健太郎

奈良先端科学技術大学院大学

バイオサイエンス研究科 分化・形態形成学講座

(横田 明穂 教授)

2006年（平成18年）3月

目次

第1章	緒論	4
第2章	乾燥強光時のシトルリン蓄積を担う窒素源の解析	12
2-1.	序論	12
2-2.	材料と方法	14
2-3.	結果	16
2-4.	考察	22
第3章	シトルリン生合成第5段階を担う酵素の同定	24
2-1.	序論	24
2-2.	材料と方法	27
2-3.	結果	33
2-4.	考察	45
第4章	シトルリン代謝の鍵酵素とその制御	51
2-1.	序論	51
2-2.	材料と方法	53
2-3.	結果	59
2-4.	考察	72
第5章	結論	78
	謝辞	81
	参考文献	82
	論文目録	99

第1章

緒論

地球の人口は、1900年は16億人であったのに対し、現在は、65億人を超えるまで増加しており、2050年には約90億人に達すると予測されている (FAOSTAT data, 2005)。この人口を賄う安定な食糧供給を行うためには、現在の穀物の収量を1.7倍にする必要がある。その方法としては、農地面積の拡大や単位面積当たりの収量の増加が考えられる。地球の全陸地面積135億 haのうち農地面積は約50億 haであり、そのうち穀物やイモ類を生産する農地面積は15億 haである (FAOSTAT data, 2005)。農地を拡大するに十分な土地はあるが、開墾が期待される土地は半乾燥地が多く、その作業は容易ではない。また近年、自然・人為的環境要因によって土壌が劣化し、地球の全陸地面積の約40%、農耕地の約70%が乾燥地となっている (Edward, 1992)。乾燥は、穀物の生産量を制限する最も主要なストレスであることから (Boyer, 1982)、単位面積当たりの収量を増加させるのに大きな問題である。したがって、植物の乾燥応答機構を解析し、その耐性を高めることができれば、食糧生産の増量に大きく貢献できると期待される。

乾燥により植物は、植物体内の水分含量が低下すると、成長が阻害され、膨圧が低下しやがて枯死に至る (Sinclair, 1983)。そのため、乾燥地で生育するような植物は、生理的、形態的に適応している。例えばサボテンは、蒸散を抑えるために葉を針状に小さくし、水分を貯えるために茎を太くするといった顕著な形態変化により適応している (Mauseth, 2003)。また、サボテンはこのような形態変化により非常に生育速度が遅くなるが、形態ではなく生理的な機構を発達させ、乾燥に適応している植物もある。その例としては、光合成システムを発展させたCAM植物が挙げられる。CAM植物は、昼は気孔を閉じ蒸散を抑え、夜間に気孔を開き、二酸化炭素を取り込んで炭素固定を行う (Hopkins and Hüner, 2004)。このような進化を通じて乾燥に適応した植物だけでなく、すべての植物に共通した生理防御応答もある。すなわち、乾燥状態を感知した植物は、水分の損失を防ぐために気孔を閉じ、蒸散を抑制するという生理的な応答である。さらに乾燥が進行すると、細胞レベルで脱水条件に応答して親水性の低分子化合物である適合溶質を細胞内に蓄積し、細胞を乾燥から保護するという、細胞内代謝を光合成による物質生産からストレス防御物質の生合成に変換する応答である (Hare et al., 1998)。

これまでに適合溶質として、アミノ酸やアミノ酸誘導体であるプロリンやグリシンベタイン、糖や糖誘導体のマンニトール、トレハロースそしてフラクタ

ンなどが知られている (Hare et al., 1998)。これらの機能としては、浸透圧調節、膜の保護、タンパク質の保護、そして活性酸素の一種であるヒドロキシルラジカルの消去が報告されている (Hare et al., 1998)。これらの適合溶質の細胞内濃度は、乾燥前は低く保たれており、乾燥に伴い急激に増加する。このことから、その蓄積は代謝学的な応答としても興味深い。特に乾燥時の植物体は、気孔が閉鎖すると、葉内への二酸化炭素の取り込みが激減する。その結果、炭素固定が抑制され、乾燥時には新たに炭素骨格を得ることはできない。さらに、気孔の閉鎖と土壌含水量の低下により、根から栄養成分を吸収することができず、乾燥時の細胞内代謝は、限られた栄養源を用いて行われている。そのため、細胞内構成成分の分解と再分配が、高度に調節されているのではないかと予測される。また再分配される代謝物が、いかに適合溶質生合成経路へ流れ込み、蓄積に至るのかは非常に興味深い。解析が進んでいる適合溶質であるプロリン、グリシンベタイン、そしてマンニトールでは、生合成の鍵酵素が同定されており、生合成酵素の活性化や異化酵素の抑制により代謝の流れを大きく変動させて蓄積を達成している (Rontein et al., 2002; Nuccio et al., 1999; Hare et al., 1998)。しかしながら、これらの適合溶質の研究において、適合溶質が蓄積するための炭素もしくは窒素化合物がどのように供給されているかについてはほとんど解析されていない。また、多量に適合溶質を蓄積したトランスジェニック植物の生育が妨げられるという報告から (Maggio et al., 2002; Abebe et al., 2003)、適合溶質を多量に生合成すればよいわけではなく、生態活動に適切な生合成量を制御する必要がある。すなわち、乾燥下の炭素や窒素源が限られた植物において、炭素や窒素源を分配する制御機構は、植物の生命活動を支える基盤であり、非常に重要である。

本研究室で解析している野生スイカ (*Citrullus lanatus* sp. No.101117-1)は、非常にユニークな乾燥強光耐性機構を有する実験材料である。この野生スイカは、アフリカ南部のカラハリ砂漠に自生しており、生育期間が3ヶ月の1年生植物で、雨季に生育して乾季に結実する生活環である (Fig. 1-1A-D)。カラハリ砂漠の気候を模倣した人工気象器内で野生スイカと栽培種スイカを生育させ、灌水停止により乾燥ストレスを与えたところ、乾燥5日目で栽培種スイカは葉が萎凋し水分を失っているのに対し、野生スイカは水分を保ち、葉の萎凋は観察されないことが明らかにされている (Fig. 1-2A-C)。またこの野生スイカは、サボテンのような顕著な形態変化による適応は見られず、水分消費量の多いC₃型の光合成機構を営んでいた (Miyake and Yokota, 2000; Yokota et al., 2002)。近年、さまざまな作物において、遺伝子組成がきわめて似ている野生型と栽培型間のわずかな遺伝子配列の違いが、形質に大きく影響していることが報告されている (Fridman et al., 2004, Li et al, 2005)。このことから野生スイカも、進化的にわずか

な遺伝子の制御の違いにより乾燥強光に適応していると考えられる。

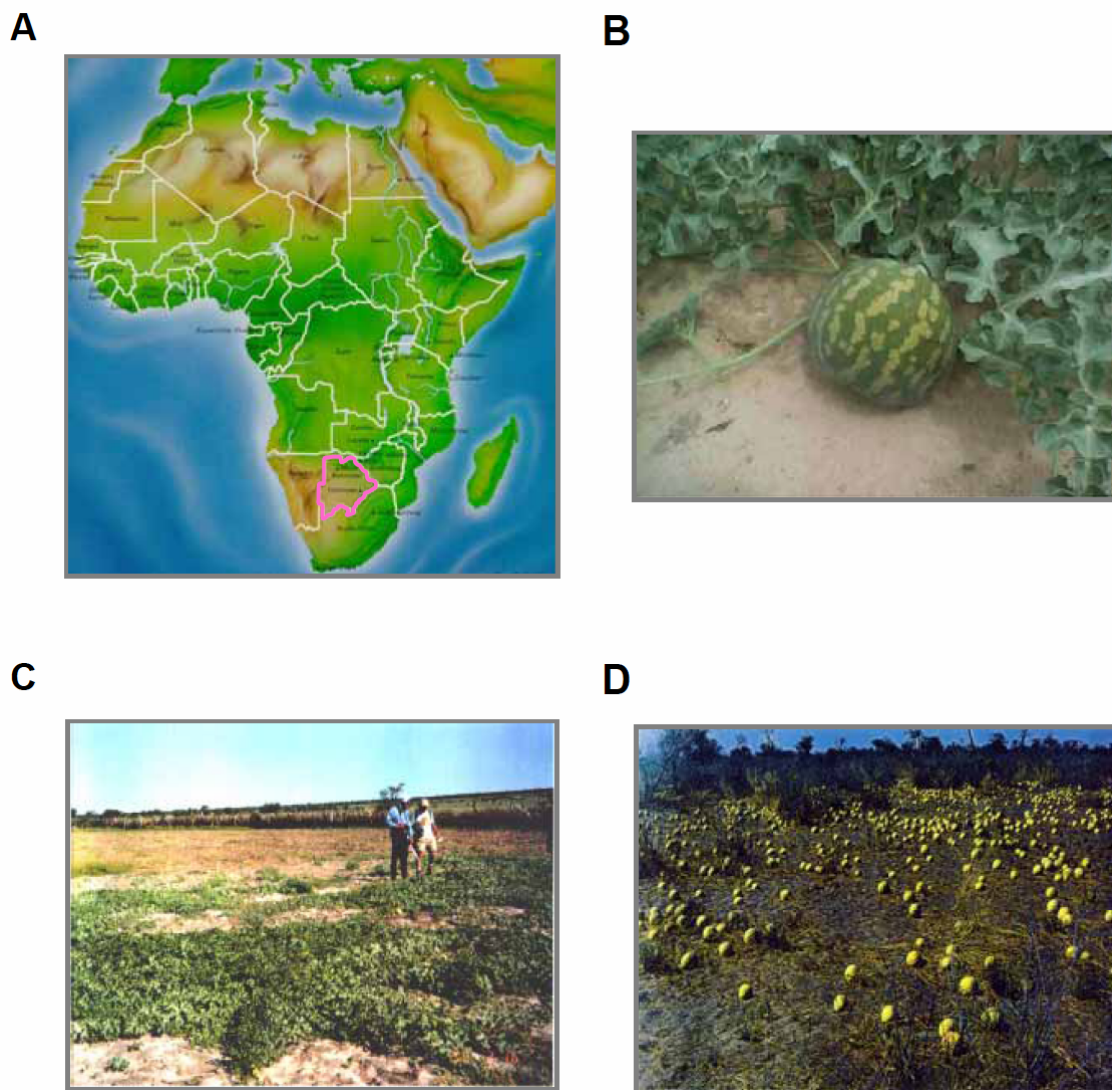
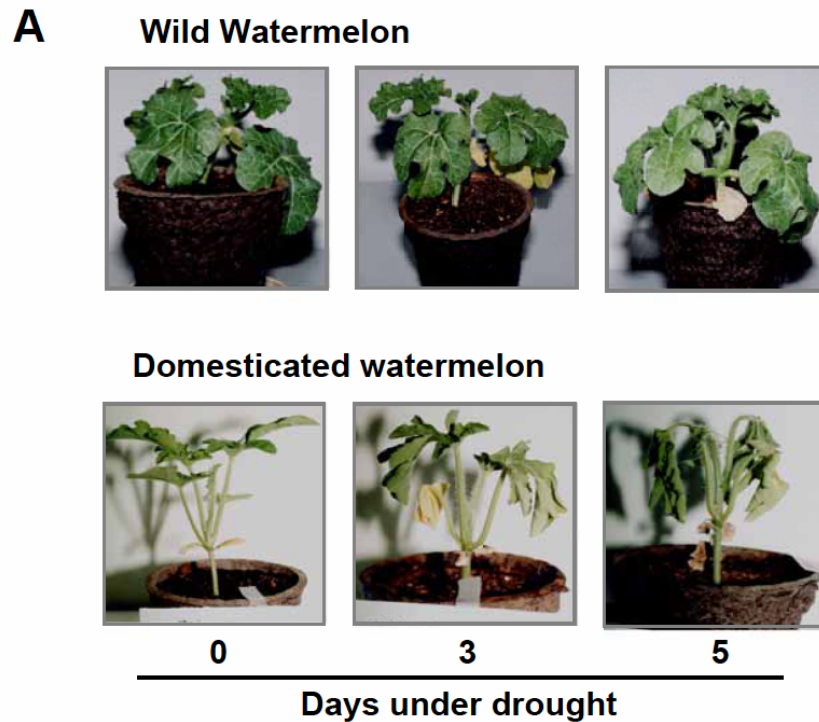
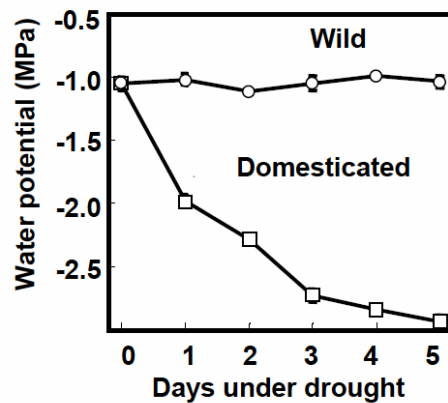


Figure 1-1. アフリカ・ボツワナ共和国・カラハリ砂漠に自生する野生スイカ
A. アフリカ大陸。ピンクでボツワナ共和国を示す。ボツワナ共和国周辺の黄土色で示しているのがカラハリ砂漠 B. 野生スイカ C. カラハリ砂漠の雨季の野生スイカ D. カラハリ砂漠の乾季の野生スイカ



B



C

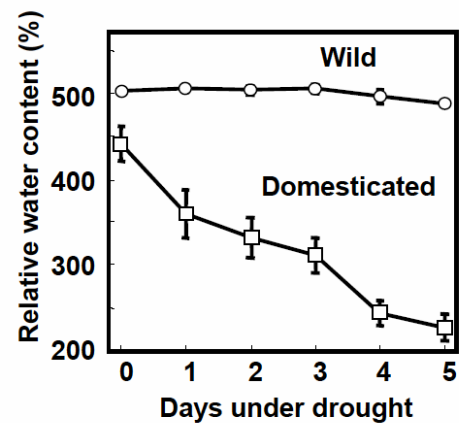


Figure 1-2. 野生スイカと栽培スイカの水分保持能

A. 野生スイカと栽培スイカの乾燥強光ストレスに伴う形態変化。生育条件は、明期16時間/暗期8時間、温度35/25°C、湿度50/60%、光強度1000 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ である。灌水停止により乾燥ストレスを付与した。B. 乾燥強光に伴う野生スイカと栽培スイカの水分ポテンシャルの変化 C.乾燥強光に伴う野生スイカと栽培スイカの相対水分含量の変化。

(○)は野生スイカ、(□)は栽培スイカを示す。

(中村, 2000より改変)

また、野生スイカの注目すべき点は、乾燥と強光との複合ストレス条件下において強い耐性能を示すところである。乾燥下の植物は、気孔を閉鎖により炭素固定が停止するが、それまで炭素固定に使われていた光エネルギーが余剰となる。特に強光条件では、余剰光エネルギーが多量に発生し、植物を枯死させる活性酸素を産出する (Foyer et al., 1994; Apel and Hirt, 2004)。本研究室の解析から野生スイカは、光合成が完全に停止して光エネルギーが余剰になるような条件下でも、一般作物と異なり光傷害を受けず細胞内構造を保持しており (Fig. 1-3A, B; Kawasaki et al., 2000; Yokota et al., 2002)、光傷害を回避または修復する能力に優れている機構を持っていると予測された (Kawasaki et al., 2000)。実際に本研究室のディファレンスディスプレイ法や二次元電気泳動により、さまざまな光障害防御または回避機構に関わる遺伝子やタンパク質が単離された (Akashi et al., 2004; 吉田, 2006)。そしてそれらの因子の解析により、乾燥強光によりヒドロキシルラジカルを消去するメタロチオネインの誘導されること (Akashi et al., 2004)、余剰光エネルギーの細胞外散逸機構 (Nanasato et al., 2005)、や葉緑体ATP合成酵素εサブユニットの解離による余剰エネルギー散逸機構が示唆されている (上妻, 2004)。

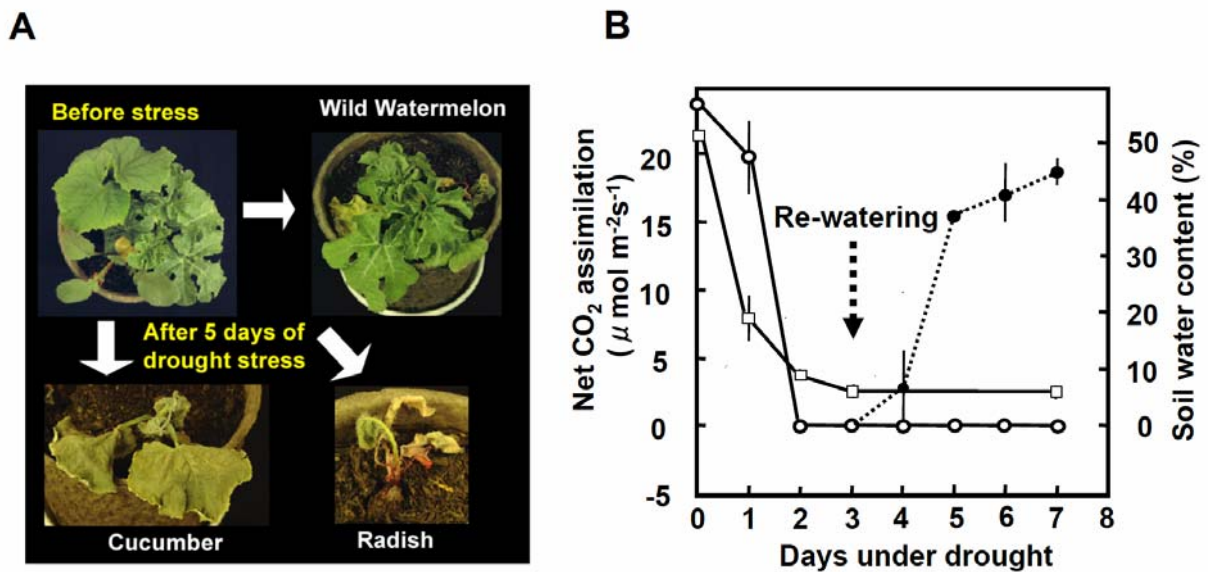


Figure 1-3. 野生スイカの過酸化耐性

A. 野生スイカ、キュウリそしてラディッシュの乾燥強光ストレスに伴う形態変化。生育条件は、明期16時間/暗期8時間、温度35/25℃、湿度50/60%、光強度1000 μmol photons m⁻² s⁻¹である。灌水停止により乾燥ストレスを5日間付与した。野生スイカは、葉に水分を保持健全であるのに対して、キュウリやラディッシュは光傷害を受けている。B. 乾燥強光ストレス時における土壌含水量と野生スイカの光合成活性。(○)は乾燥強光ストレス及び(●)は最灌水時の光合成速度、(□)は土壌含水量を示す。

(Yokota et al., 2002; Kawasaki et al., 2000より改変)

野生スイカの乾燥強光に対する代謝適応を明らかにするために、野生スイカ葉内の乾燥強光に伴う遊離アミノ酸濃度の変化の解析が行われた。その結果、アルギニン生合成の中間体であるシトルリンが、乾燥強光8日目に乾燥前の50倍にあたる25 $\mu\text{mol/gFW}$ も蓄積することが明らかにされた (Fig. 1-4A; Kawasaki et al., 2000)。さらなる解析によりシトルリンは、細胞内の代謝を乱さない新規適合溶質であり、既存の適合溶質の中で最も優れた活性酸素の一種ヒドロキシルラジカル消去能を示すことが明らかにされた (Table 1-1; Akashi et al., 2001)。このことからシトルリンの蓄積は、野生スイカの乾燥強光耐性の一因を担っていること考えられる。また、シトルリンは一分子中に3窒素原子を含む高窒素化合物であり、乾燥強光時の葉においてシトルリンが占める窒素量は、約75 $\mu\text{mol/gFW}$ 、すなわち約1 mg/gFW に達する。一般的に植物の葉における窒素量は、3~8 mg/gFW とされているので、乾燥強光時の野生スイカの葉のシトルリン占める窒素量は、葉の全窒素含量の約10~30%まで蓄積すると見積もられる。乾燥強光時の野生スイカは外来から栄養分を獲得することができないことから、これまでの報告にないような大規模な窒素代謝の変動が起こっていると考えられた。

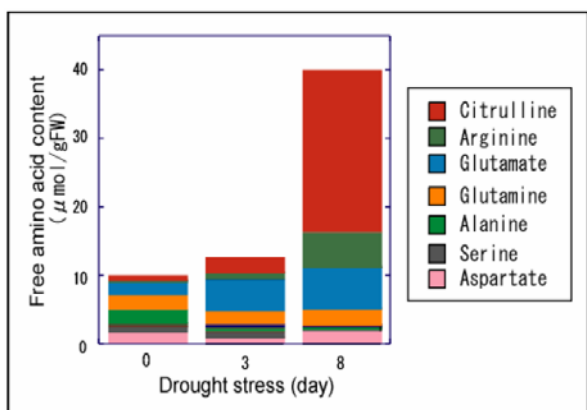


Figure 1-4. 野生スイカ葉組織における乾燥強光に伴う遊離アミノ酸濃度の変化
乾燥前、乾燥3日目は野生スイカ第3葉、乾燥8日目は野生スイカ第4葉を解析した。赤で示すシトルリンが乾燥強光8日目には乾燥前の50倍である約24 $\mu\text{g/FW}$ まで蓄積する。
(Kawasaki et al., 2000より改変)

Table 1-1. 適合溶質とヒドロキシルラジカルの2次反応速度
(Akashi et al., 2001より改変)

Compound	Rate constant ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)
Citrulline	$(3.9 \pm 0.82) \times 10^9$
Mannitol	$(2.1 \pm 0.58) \times 10^9$
Proline	$(5.4 \pm 0.94) \times 10^8$
Glycine betaine	$(8.2 \pm 0.31) \times 10^7$

シトルリンを中間体を含むアルギニン生合成経路は、生物により非常に異なっている (Fig. 1-5)。微生物では、主にタンパク質合成を行うためのアルギニンを生合成する経路であり、その経路はフィードバック阻害や転写制御によって高度に制御されていて、中間代謝産物が蓄積することはない。一方、動物における本経路は、肝臓において体内の窒素を排泄するために尿素を生合成するのに重要であり、この経路においても中間代謝産物が蓄積することはない (Caldovic and Tuchman, 2003)。

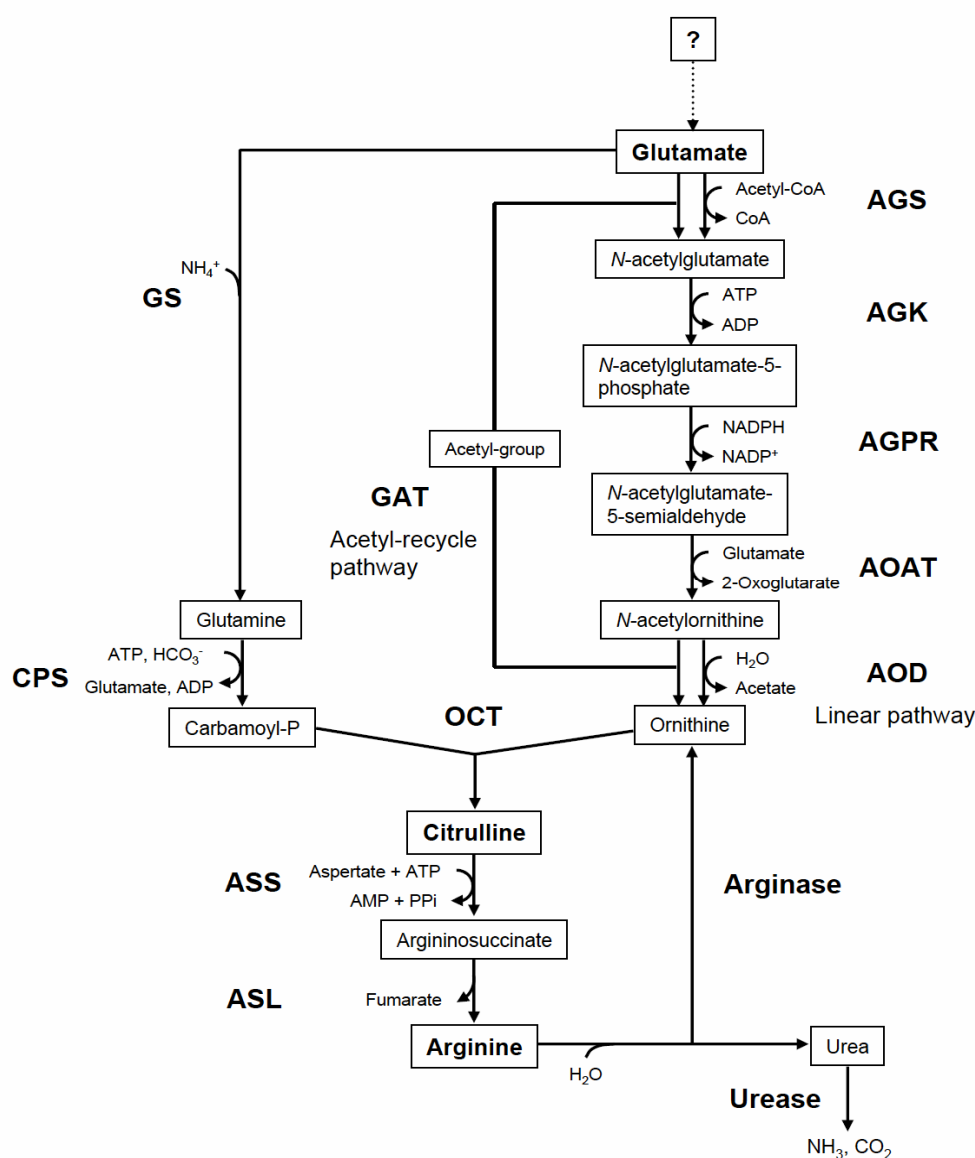


Figure 1-5. 植物におけるシトルリン代謝経路

AGS, *N*-acetylglutamate synthase; AGK, *N*-acetylglutamate kinase; AGPR, *N*-acetylglutamate-5-phosphate reductase; AOAT, *N*-acetylornithine transaminase; AOD, *N*-acetylornithine deacetylase; GAT, glutamate *N*-acetyltransferase; CPS, carbamoylphosphate synthetase; OCT, ornithine carbamoyltransferase; ASS, Argininosuccinate synthetase; ASL, Argininosuccinate lyase

植物におけるアルギニン生合成経路の知見は、非常に断片的である (Thompson, 1960; Slocum, 2005)。経路を担う酵素遺伝子も同定されておらず、その局在もほとんど明らかになっていない (Slocum, 2005)。野生スイカにおいては、乾燥強光に伴い高蓄積するタンパク質 Drought-induced polypeptide-1 (DRIP-1) が、アセチルオルニチンを加水分解することでシトルリン生合成第5段階を担うバクテリアの *N*-acetylornithine deacetylase (AOD) と配列相同性を持つことが報告されていた (Fig. 1-5; Kawasaki et al., 2000)。このことから、DRIP-1 が生合成酵素としてシトルリン蓄積に寄与することが想定される。しかしながら、DRIP-1 の触媒機能は未解明であり、シトルリン蓄積との関連も明らかになっていない。また植物において、AOD と同じくシトルリン生合成第5段階を触媒するアセチルオルニチンのアセチル基をグルタミン酸に転移する glutamate *N*-acetyltransferase (GAT) の活性が検出されることが報告されている (Fig. 1-5; Morris and Thompson, 1977)。野生スイカにおいてシトルリン生合成第5段階を DRIP-1 と GAT のどちらが担うか明らかになっていない。

そこで本研究では、ストレス時の乾燥強光耐性機構をもたらす代謝変動の制御機構のモデルとして、乾燥強光時の野生スイカにおけるシトルリン蓄積機構に注目した。第2章において、乾燥強光時のシトルリンの窒素源が、葉内の可溶性タンパク質の約30%を占める RuBisCO であると仮説を立て、検証した。次に第3章において、シトルリン生合成第5段階を担う酵素を同定し、その酵素学的諸性質から乾燥強光時の制御機構を考察した。第4章では、全11酵素からなるシトルリン代謝経路の迅速・簡便な酵素活性測定法を考案・確立し、乾燥強光における経路の全酵素活性の変動を解析することで、シトルリン蓄積の鍵酵素を明らかにした。そして同定した鍵酵素のうちの一つである *N*-acetylglutamate kinase (AGK) と、細胞内の窒素量を制御するシグナルタンパク質である P_{II} protein との関連について解析した。以上のことから、乾燥強光時の野生スイカにおけるシトルリン蓄積と窒素代謝を解析することで、栄養源の限られた植物体内での窒素の供給と防御物質である適合溶質の生合成の高度な制御機構を考察した。

第2章 乾燥強光時のシトルリン蓄積を担う窒素源の解析

2-1. 序論

一般に、乾燥ストレス状態の植物体は、気孔が閉鎖し根から水分を吸収できないために、炭酸固定ならびに窒素栄養の吸収が妨げられる。さらに乾燥により硝酸イオンをアンモニウムイオンに還元するnitrate reductase活性が低下することから (Kaiser and Foyster, 1989; Foyer et al., 1998; Ferrario-Méry et al., 1998)、硝酸イオンからの窒素供給も抑制されている。このことから、乾燥状態での植物の代謝は限られた窒素源を有効に利用するために、これまでに光合成などの物質生産に使われてきたタンパク質を分解して、防御応答を行うための代謝活動に利用していると考えられる。

植物は、さまざまな環境下において代謝を効果的に変換して適応している。例えば、植物の老化や窒素飢餓状態における再分配は、生体内の物質の有効利用の一例である (Gan and Amasino, 1997; Hörtensteiner and Feller, 2002)。このような再分配では、それまで光合成により物質生産していた老化葉において、さまざまな分解酵素が発現し始め、細胞内の窒素の約75%が存在する葉緑体が分解される (Peoples and Dalling, 1988)。特に、葉緑体内のほとんどがRuBisCOであるため、おもにRuBisCOが分解される。そして、若葉や生殖器官がその分解産物を受け取ることで、活発に代謝活動を行うことができる。これら一連の反応は、植物体内の栄養分を有効に利用するために高度に制御された機構であり、アブシシン酸により促進され、サイトカイニンにより遅延するという植物ホルモンによる制御が報告されている (Buchanan-Vollaston, 1997; Noodèn et al., 1997; Zeevaart and Creelman, 1988; Tadas et al., 1999; He et al., 2005)。

野生スイカは、乾燥強光に伴いシトルリンを葉内に高濃度蓄積することが明らかになっている (Fig. 2-1)。シトルリンは、1分子中に窒素を3原子含む高窒素化合物であり、生合成には多くの窒素源が必要である。特に乾燥強光8日目の第4葉におけるシトルリン中の窒素量は、約1 mg/gFWにも達する。また野生スイカは、葉内にシトルリンの次に分子中に窒素を4分子もつアルギニンも蓄積する。乾燥強光8日目の第4葉におけるアルギニン中の窒素量は、約0.3 mg/gFWである。乾燥強光時のシトルリンとアルギニンの占める窒素量は、葉の窒素量の30%程度と見積もられ、非常に大きい値である。乾燥強光により、野生スイカには栄養の供給が絶たれているために、シトルリンとアルギニンの生合成には、この植物は何らかの生体内の物質を分解して再利用していると考えられる。これまでに、乾燥などのストレスにより老化葉のタンパク質の分解が促進されるという

報告がある (Gan and Amasino, 1997; Pic et al., 2002)。また、多くの乾燥応答性遺伝子を制御するABAは老化を促進するシグナルである (Yang et al., 2002)。これらのことから、乾燥による物質生産から防御応答への代謝活動の変換は、老化や窒素飢餓で見られる栄養源の不足を補うための代謝変換と類似の物質再利用が起こっていると考えられる。そこで、乾燥強光時の野生スイカのシトルリンの窒素源は、主に老化葉の主要タンパク質であるRuBisCOであるという仮説を考えた。

そこで仮説を検証するために、乾燥前ならびに乾燥強光1~8日目の野生スイカの葉の形態を観察し、すべての葉からシトルリン量とRuBisCO量を測定した。この結果から、乾燥時の適合溶質生合成に必要な窒素の供給源を予測した。

2-2. 材料と方法

2-2-1. 植物材料と栽培条件

野生スイカ (*Citrullus lanatus* L. sp. No. 101117-1) をKawasaki et al (2000)の方法を一部改変して栽培した。改変した点は、750 mLの紙ポットを用いたこと、そして灌水時間を明期開始1時間後としたことである。播種後約3週間の第4葉が完全展開した植物体をサンプルとして用いた。サンプリングは、それぞれの葉の葉面温度と蒸散速度を測定した後に、葉を切断して重量を測定した。そして葉一枚から3~5枚の65 mm²のリーフディスクを作成し、即座に液体窒素で凍結し保管した。また葉面積は、葉の総重量とリーフディスクの平均重量から見積もった。

2-2-2. 蒸散速度と葉面温度の測定

蒸散速度は、展開後の第4葉を用い、栽培条件と同じ35度、800 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の光条件下でporometer (type AP4; AT delta-T device, Cambridge, UK)により測定した。葉面温度は、thermometer (model AP-320, 0.25K-J1M1, Anritu meter, Tokyo)を用いて測定した。これらの測定は、明期開始7時間後の午後3時に行った。なおサーモグラフィは、赤外線カメラ (TVS-8500, Nippon Avionics Ltd, Tokyo)により撮影した。

2-2-3. 野生スイカ葉からシトルリンの抽出

凍結したリーフディスクを冷やした1.5 mLチューブに入れ、50 mM HEPES-KOH (pH 7.6)を500 μL 加えてマイクロドリルで破砕し、即座に50%(w/v)のTCAを125 μL 加えた。そして、再度すりつぶした後に、12000 gで3分間遠心分離を行い、その上清からシトルリンを定量した。

2-2-4. シトルリンの定量

シトルリンは、Feron反応により定量した (Boyde and Rahmatullah, 1980)。抽出液100 μL に対して、chromogenic reagent を900 μL 加え、90°Cで10分間インキュベートし、530 nmの吸光度でシトルリン由来のcolor complexを定量した。chromogenic reagentは、チオセミカルバジドを1 mg含む0.5%(w/v)のジアセチルモノキサム溶液と25%(v/v)の濃硫酸、20%(v/v)の濃リン酸、及び250 mg/LのFeCl₃を含む溶液を1:2で混合した溶液である。

2-2-5. 野生スイカ葉からの可溶性タンパク質の抽出

凍結したリーフディスクを冷やした1.5 mLチューブに入れ、マイクロドリルで

破碎した。この1.5 mLチューブに、50 mM potassium phosphate (pH 7.5)、5 mM DTT、1 mM EDTAそして1 tablet/50 mL protein inhibitor cocktail tablets (Roche, Mannheim, Germany)からなる抽出bufferを50 μ L加え、懸濁した。この細胞破碎液を4 $^{\circ}$ C、12000 gで20分間遠心分離を行い、上清をRuBisCO定量のためのSDS-PAGEサンプルとした。タンパク質定量は、Bradford法 (Bradford, 1976)で行い、牛血清アルブミンをスタンダードとして用いた。

2-2-6. RuBisCOの定量法

野生スイカ葉のタンパク質抽出液とホウレンソウの精製RuBisCOを12.5%のpolyacrilamide gelで展開し、Coomassie Brilliant Blue R-250により染色した。そしてホウレンソウの精製RuBisCOをスタンダードとして、CS analyzer (ATTO, Amherst, NY)によりタンパク質量を見積もった。

2-3. 結果

2-3-1. 野生スイカの各葉における乾燥強光に伴うシトルリン含量の変動

野生スイカの各葉におけるシトルリン濃度は、乾燥強光ストレスの進行に伴いすべての葉において増加し、特に乾燥3日目から4日目にかけて最も大きな増加を示していた (Fig. 2-1A)。最もシトルリンが高濃度に達したのは、第3葉であり約25 $\mu\text{mol/gFW}$ と見積もられ、第1葉における最大シトルリン含量は、乾燥強光4日目の7 $\mu\text{mol/gFW}$ 程度であった。一方、第2葉、第4葉そして第5葉における最大シトルリン含量は、15 $\mu\text{mol/gFW}$ 前後の値であった。第1葉や第2葉は乾燥強光に伴い新鮮重量が低下するので、葉内のシトルリン量が同じでも、新鮮重量が低下しただけシトルリン濃度が高く見積もられてしまう。そこで葉1枚あたりの総シトルリン含量を算出した (Table 2-1; Fig. 2-1B)。その結果、総シトルリン含量が最も大きい値を示したのは、第3葉であり、続いて第4葉、第2葉、第5葉そして第1葉の順番であった。第1葉と第2葉そして第5葉の総シトルリン含量は、乾燥強光後期には減少傾向であった。

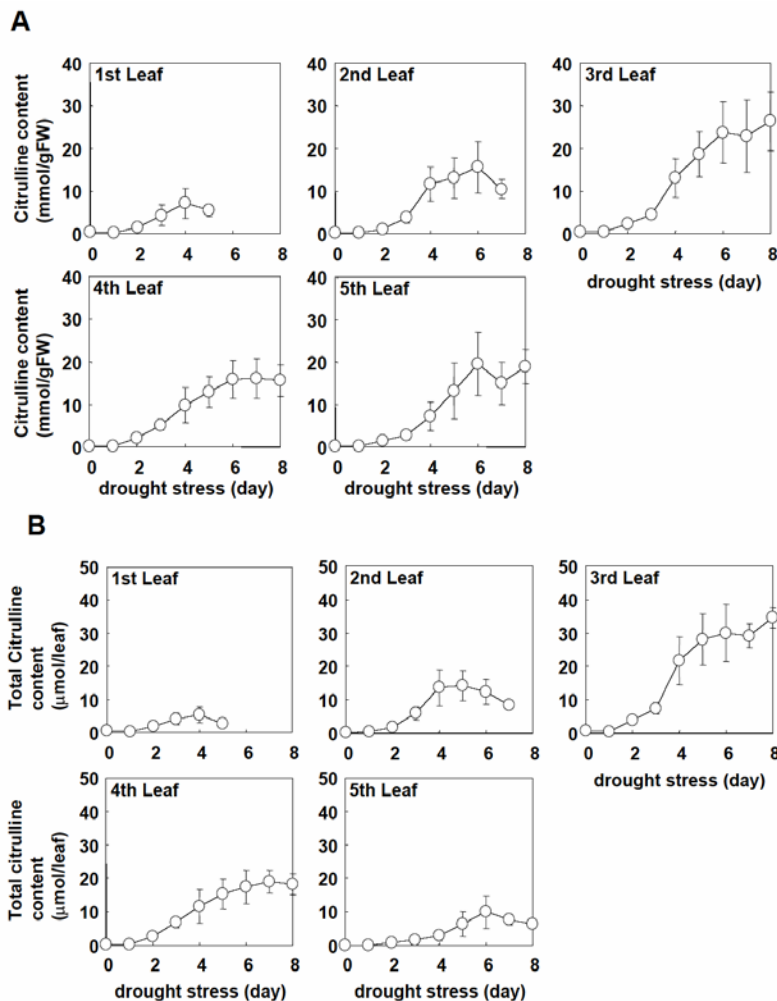


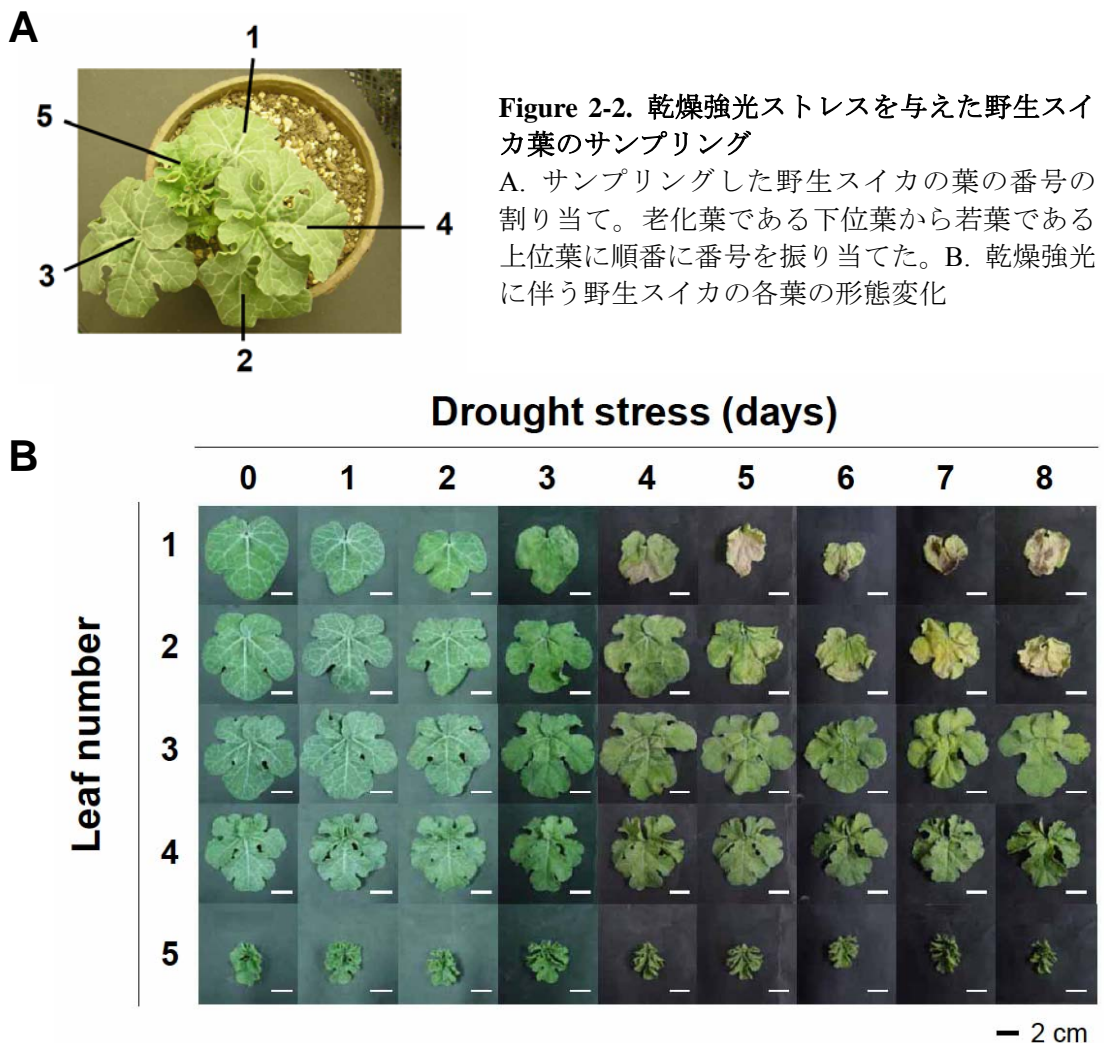
Figure 2-1. 乾燥強光に伴う野生スイカの各葉におけるシトルリン濃度と総シトルリン量の変化

A. 乾燥強光に伴う野生スイカの各葉におけるシトルリン濃度の変化。B. 乾燥強光に伴う野生スイカの各葉における総シトルリン量の変化。データは、3個体の平均±標準誤差を示した。

(芳野, 2006より改変)

2-3-2. 野生スイカの各葉における乾燥強光に伴う形態変化

野生スイカの乾燥強光時のシトルリン蓄積のための窒素源を探索するために、すべての葉組織をサンプリングし、その形態を観察した (Fig. 2-2B)。上位葉と比較し下位葉ほど乾燥強光ストレス時に急速に黄化した。最も老化している第1葉は、乾燥強光2日目には黄化が始まり、乾燥6日目には水分を失い葉が枯死してしまい、リーフディスクをサンプリングできなくなった。それに対して、第4葉は、乾燥強光8日目でも水分を保持しており、若干黄化している程度であった。次に、野生スイカの各葉における乾燥強光に伴う新鮮重量を測定した (Fig.2-3A)。その結果、各葉の形態の観察結果と同じく、乾燥ストレスに伴い下位葉ほど新鮮重量が著しく低下した。特に乾燥8日目の第1葉は、乾燥前と比較して約20%、第2葉は約40%、第3葉は約80%に新鮮重量が低下していたのに対し、第4葉と第5葉は乾燥前ほぼ同程度の新鮮重量を保っていた。同サンプルを用いて、各葉の葉面積を測定した (Fig.2-3B)。各葉の葉面積の変化は、新鮮重量の変化と類似していた。これらの結果から、乾燥強光により下位葉の老化が優先的に促進されていることが示唆された。



A

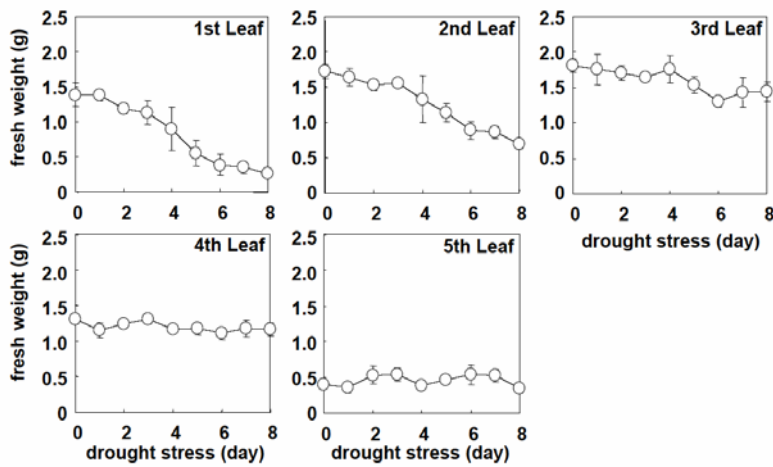
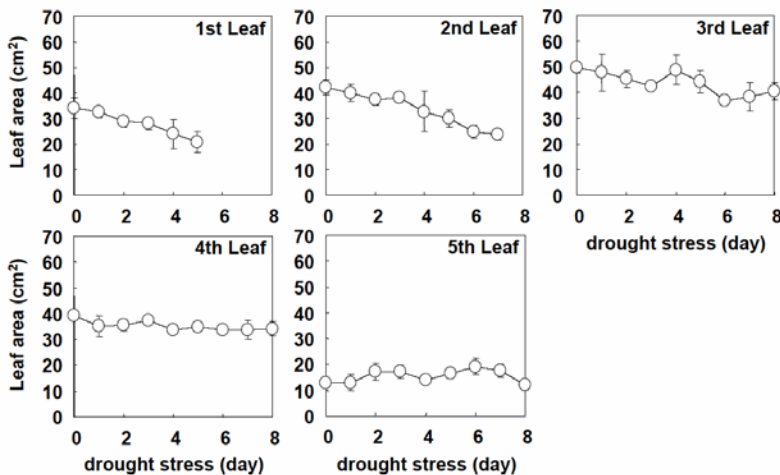


Figure 2-3. 乾燥強光に伴う野生スイカの各葉における新鮮重量と葉面積の変化

A. 乾燥強光に伴う野生スイカの各葉における新鮮重量の変化。B. 乾燥強光に伴う野生スイカの各葉における葉面積の変化。データは、3個体の平均±標準誤差を示した。Fig. 2-1と同じ植物体を用いて解析した。

B



2-3-3. 乾燥強光に対する野生スイカの各葉の応答

植物は、乾燥を感知して気孔を閉鎖し、蒸散を抑える。下位葉の新鮮重量の低下は、上位葉と比べて気孔の閉鎖が不完全であり、蒸散により水分を失うことで起こるという可能性が考えられた。そこで、乾燥ストレスに伴う野生スイカの各葉における蒸散速度の変動を解析した (Fig 2-4A)。乾燥前は、下位葉ほど蒸散速度が遅い傾向が見られた。しかしながら乾燥強光2日には、すべての葉において蒸散速度が低下し、気孔が完全に閉鎖していることが示唆された。気孔が閉鎖すると、蒸散速度が低下し、気化熱が減少することから、葉面温度が上昇する。気孔の開度は、この葉面温度から見積もることもできる (Idso et al., 1981; Cohen et al., 2005)。そこで蒸散速度を測定したすべての葉において、葉面温度を測定した (Fig 2-4B)。その結果、蒸散速度の減少に伴い葉面温度が上昇しており、すべての葉において葉面温度上昇後の定常値は同程度であった (Fig. 2-4, 5)。このことから、下位葉における新鮮重量の低下は、気孔の開度による水

分損失の違いが原因ではないと考えられ、植物が積極的に下位葉の構成成分を分解、転流していることが予測された。

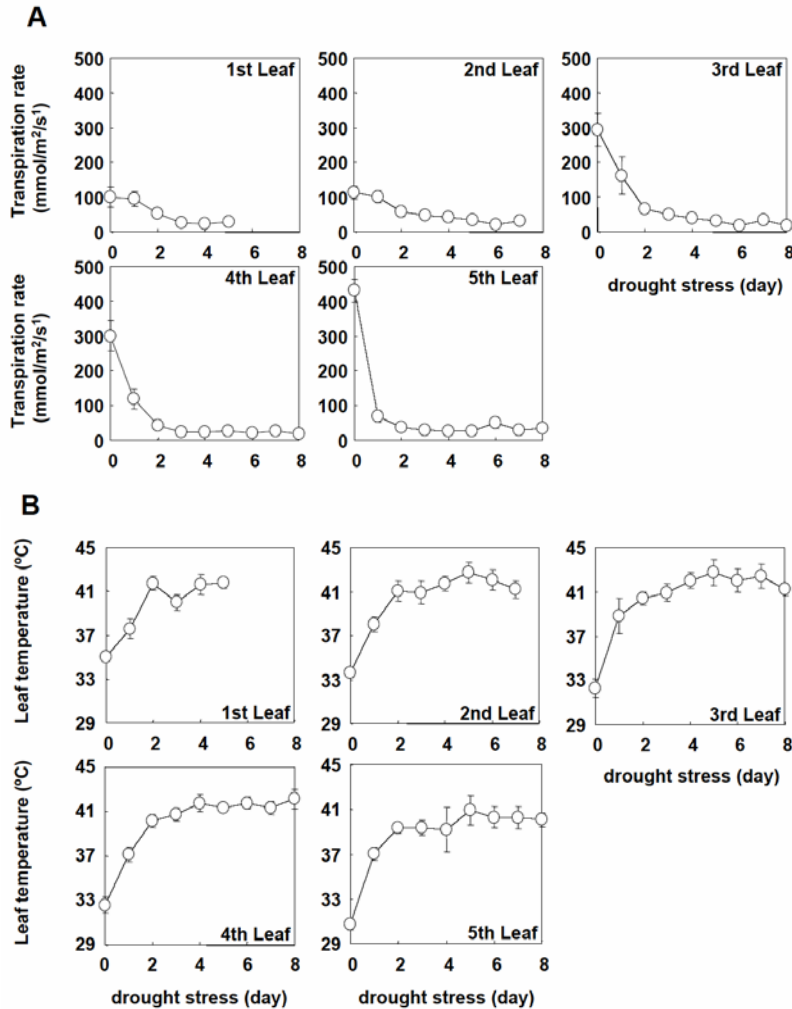


Figure 2-4. 乾燥強光に伴う野生スイカの各葉における蒸散速度と葉面温度の変化

A.乾燥強光に伴う野生スイカの各葉における蒸散速度の変化。B.乾燥強光に伴う野生スイカの各葉における葉面温度の変化。データは、3個体の平均±標準誤差を示した。Fig. 2-1と同じ植物体を用いて解析した。

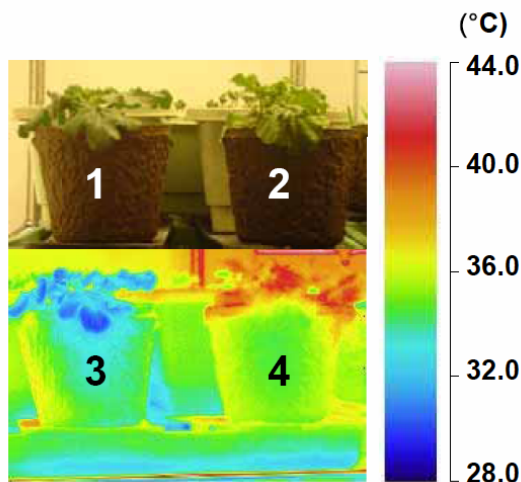


Figure 2-5. 乾燥強光ストレスに伴う野生スイカの葉面温度の上昇
乾燥強光ストレス前後の野生スイカの形態とその植物体のサーモグラフィー。イメージ1と2は、それぞれ乾燥前の野生スイカと、乾燥強光ストレス5日目の野生スイカの写真。イメージ3と4は、イメージ1と2の植物体のサーモグラフィー。

2-3-4. 野生スイカの各葉における乾燥強光に伴うタンパク質量及びRuBisCO含量の変動

乾燥強光時のシトルリン生合成の窒素源を探索するために、野生スイカの各葉における乾燥強光に伴う可溶性タンパク質量の変動を解析した (Fig. 2-6A)。その結果、下位葉である第1葉や第2葉におけるタンパク質量は、乾燥強光ストレスの進行に伴い減少していた。しかしながら、上位葉である第4葉や第5葉におけるタンパク質量は、乾燥8日目までほとんど変化しなかった。このことから乾燥強光時の野生スイカは、下位葉におけるタンパク質分解産物を持ちいて、植物体の生合成反応を行っていることが示唆された。次に乾燥強光時の野生スイカの各葉において、可溶性タンパク質の約30%を占めるRuBisCOを定量した (Fig. 2-6A)。その結果、すべての葉において、乾燥強光ストレスの進行に伴いRuBisCO量は減少していたが、下位葉ほどその減少が顕著であった。減少したRuBisCO窒素量と増加したシトルリンの窒素量を比較した結果、分解されたRuBisCOの窒素量は増加したシトルリンの窒素量とほぼ同程度であった (Fig. 2-7)。このことから、シトルリン生合成の窒素源の大部分は、RuBisCO分解産物であることが示唆された。

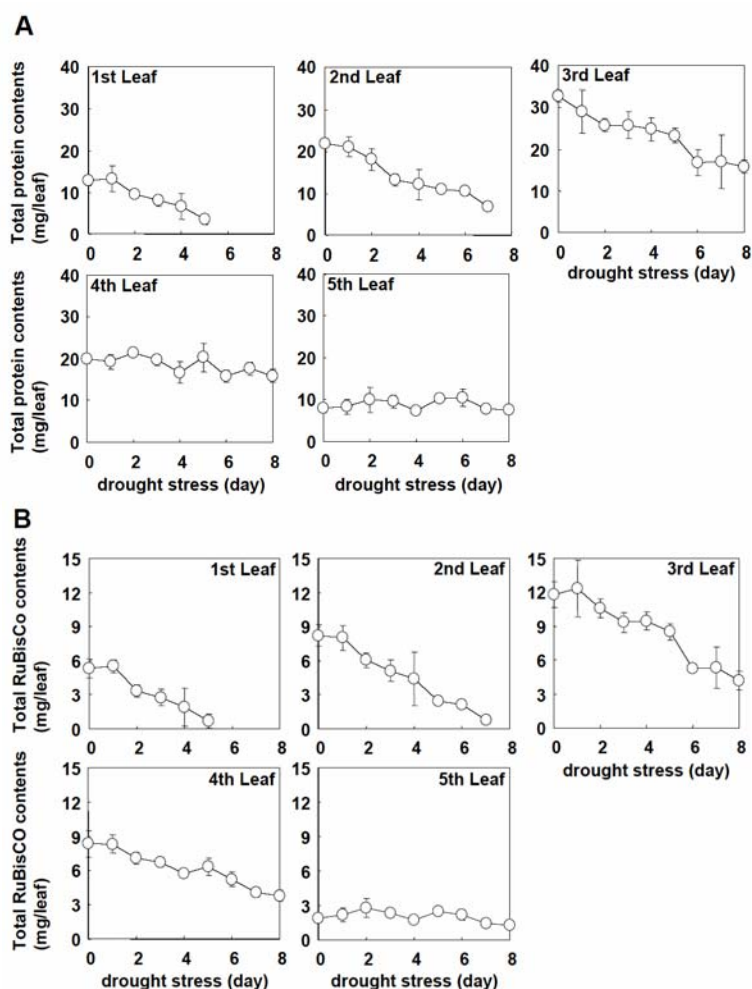


Figure 2-6. 乾燥強光に伴う野生スイカの各葉におけるタンパク質量とRuBisCO量の変化

A. 乾燥強光に伴う野生スイカの各葉におけるタンパク質量の変化。B. 乾燥強光に伴う野生スイカの各葉におけるRuBisCO量の変化。データは、3個体の平均±標準誤差を示した。Fig. 2-1と同じ植物体を用いて解析した。

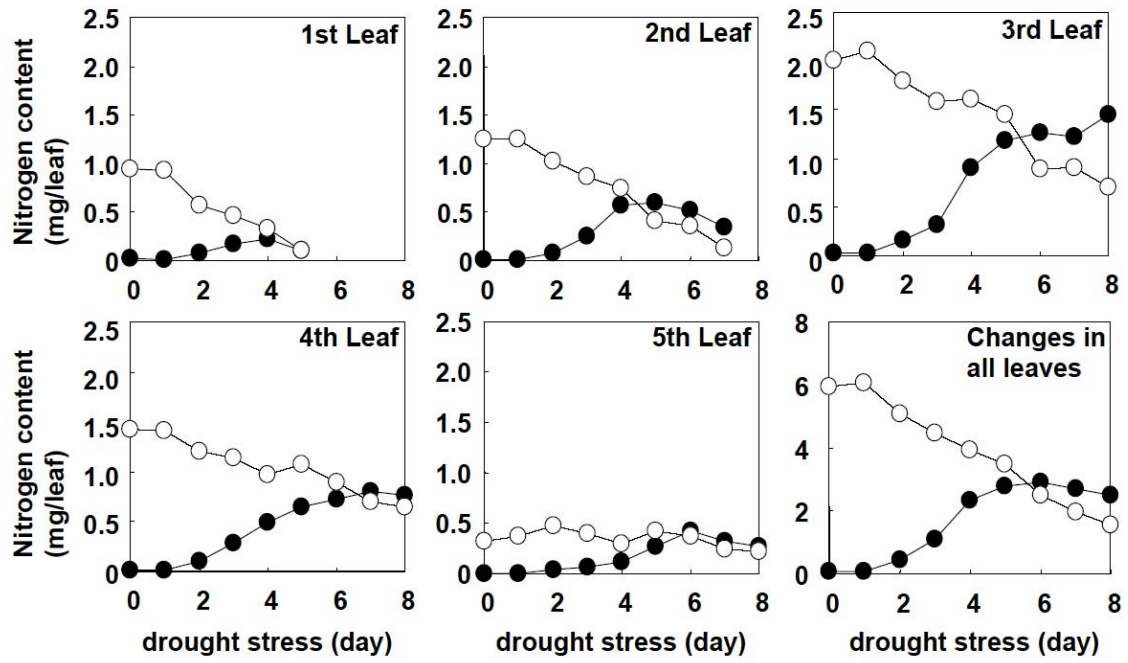


Figure 2-7. 乾燥強光に伴う野生スイカの各葉におけるシトルリンの窒素含量とRuBisCOの窒素含量の変化

(●)がシトルリンに含まれる窒素量、(○)がRuBisCOに含まれる窒素量。

2-4. 考察

本章の実験から、野生スイカは乾燥強光を受けると、すべての葉が同様に気孔を閉鎖し乾燥に応答していたにもかかわらず、上位葉では新鮮重量が一定であるのに対して、下位葉の新鮮重量が低下することが明らかになった。そしてその下位葉ほど、タンパク質含量の低下が激しく、シトルリンの蓄積も小さかった。それに対して上位葉はタンパク質含量の低下が小さいにもかかわらず、高濃度のシトルリンを蓄積していた。このことから乾燥強光時の野生スイカは、下位葉の構成成分を分解して得られた炭素及び窒素を利用し、シトルリンの生合成反応を行っていると考えられる。今回観察された老化葉における分解産物を、若葉へ運ぶという物質移動は、老化などでみられる物質移動と類似していた (Gan and Amasino, 1997; Hörtensteiner and Feller, 2002)。このことから、乾燥強光時の老化葉の枯死は、ストレスによる傷害の結果ではなく、高度に制御されたプログラム細胞死であると考えられる。

葉のタンパク質量におけるRuBisCO量は、第5葉では約20%であったが、その他の葉では、約30%であった。しかしながら、第5葉を除いたすべての葉において乾燥強光ストレスの進行に伴うRuBisCOの減少量は、タンパク質の減少量の約50%を占めていた (Fig. 2-6)。このことからRuBisCOは、乾燥強光下で優先的に分解される主要なタンパク質であると考えられる。RuBisCOに含まれる窒素量は、分子量の約17%と見積もられることから、RuBisCOから供給される窒素量はシトルリンが定常値に達する乾燥強光5日目には植物体あたり約2.5 mgと産出された。このときのタンパク質の分解による窒素量が植物体当たり約4.3 mgと算出され、約60%がRuBisCOにより担われてことが明らかになった。このときの増加したシトルリンが含む窒素量は、植物体あたり約2.7 mgであり、RuBisCOの分解による窒素だけでシトルリン生合成をほぼ賄うことができると考えられる。野生スイカは、乾燥強光時にアルギニンも蓄積すること、そして植物は水ストレスによりアンモニアを蓄積するという報告があることから、その他の窒素源はこれらの化合物に用いられている可能性が考えられる (Lawlor and Cornic, 2002)。また今回の実験では、茎や根のシトルリン量を測定しておらず、葉以外の器官に窒素が用いられている可能性も考えられる。

シトルリン含量が最も高かったのは第3葉であった (Fig. 2-1A)。第3葉は葉面積が一番大きい完全展開葉であり (Fig. 2-3B)、上位葉と重なっていないことから光を最も捕捉する器官である (Fig. 2-2A)。このことから、最も活性酸素が発生しやすい器官であると予測され、シトルリンが高濃度蓄積していることは合理的であると考えられる。しかしながら、第3葉と同じく光を捕捉しやすい第4葉は、第3葉ほどシトルリンを蓄積していなかった。シトルリン生合成の炭素及

び窒素源となるタンパク質の分解が下位葉ほど盛んに起こっていることから、第3葉においてタンパク質分解による基質の供給とシトルリン生合成のバランスが最もシトルリン蓄積に適していたのかもしれない。

乾燥前の植物体において、下位葉ほど蒸散速度が低かった (Fig. 2-3A)。これまでに、葉が影になることにより光合成が抑制され、蒸散速度が低下することが明らかになっている (Rousseaux et al., 1996)。このことから、下位葉が上位葉により光を遮られた結果、蒸散速度が低下していたのかもしれない。このような蒸散速度が低下した葉は、黄化が進行すると報告されている (Gan and Amasino, 1997)。しかしながら、コントロールとして乾燥強光を与えずに8日間生育させた野生スイカは、下位葉の黄化は認められなかった。このことから下位葉の黄化は、乾燥強光ストレスにより促進されたと考えられる。

スイカの果実の生育は、窒素栄養状態に大きく左右されることが知られており (Hegde, 1988)、野生スイカが生育しているカラハリ砂漠の土壌成分は、無機態窒素が乏しい (Doudill et al., 1998)。従って、野生スイカにとって窒素成分は、子孫を残すために非常に大切な栄養源であると考えられる。今回の結果から、乾燥強光下の野生スイカは、光合成が停止することで使用しなくなったRuBisCOをはじめとするタンパク質を、上位葉の影になって生産性が見込めない老化葉において分解する。そして、その分解産物を上位葉に転流して、最も光条件が厳しく活性酸素が産出しやすい上位葉において、ヒドロキシルラジカルとの反応性の高いシトルリンを生合成するということが考えられた。この応答は、乾燥強光の限られた窒素源を、物質生産から防御反応に適切に変換するという非常に優れた耐性機構であると考えられる。

第3章

シトルリン生合成第5段階を担う酵素の同定

3-1. 序論

第2章において、乾燥強光時に野生スイカに蓄積するシトルリンは、RuBisCOの分解産物であることが予測された。タンパク質は分解されると、一般的にグルタミンやグルタミン酸となり転流することが知られている。グルタミン酸は数多くの代謝産物の出発物質であり、その中のひとつであるシトルリンが特異的に蓄積していることから、グルタミン酸からシトルリン代謝経路への流量が極めて増大していると考えられる。これまでに適合溶質の蓄積機構解析には、まずそれらの生合成経路が決定され、そしてその知見に基づいて蓄積機構の解析が行われている (Delauney and Verma, 1993; Hanson AD and Hitz, 1982; Stoop et al., 1996)。それに対して、植物におけるシトルリン生合成経路は明らかになっていないことから (Thompson, 1960; Slocum, 2005)、野生スイカにおけるシトルリン蓄積機構を明らかにするためには、その代謝経路を明らかにする必要があった。

シトルリンを中間代謝産物とするアルギニン生合成経路の解析が盛んに行われている微生物において、シトルリン生合成は6段階の反応から成る (Fig. 1-5)。まず、グルタミン酸をアセチル化し、アセチルグルタミン酸となる。その後アセチルグルタミン酸が、リン酸化、還元、アミノ基転移の3反応によりアセチルオルニチンに変換する。そして生合成第5段階の反応として、アセチルオルニチンが脱アセチル化反応によりオルニチンに変換し、最終段階においてオルニチンがカルバモイル化されシトルリンが生合成される。この生合成経路第5段階は、微生物によって異なる2つの酵素が触媒している。ひとつは、アセチルオルニチンのアセチル基を加水分解することでオルニチンと酢酸を生成する *N*-acetylornithine deacetylase (AOD) であり (Vogel and Bonner, 1956)、大腸菌などに見られる。第5段階をAODが担う経路はリニアー経路と呼ばれ (Fig. 1-5)、この経路は、第一段階を担う *N*-acetylglutamate synthase (AGS) がアルギニンによりフィードバック阻害を受けることで制御されている (Leisinger and Hass, 1975)。もうひとつの酵素は、アセチルオルニチンのアセチル基をグルタミン酸に転移することでアセチルグルタミン酸とオルニチンを生成し、経路の第1、第5両段階を触媒する *glutamate N*-acetyltransferase (GAT) であり、酵母や枯草菌において機能している。第5段階をGATが担う経路は、アセチルオルニチンのアセチル基を再利用しアセチルグルタミン酸を生合成することから、アセチルリサイクル経路

と呼ばれている (Sakanyan et al., 1992; Liu et al., 1995; Fig. 1-5)。アセチルリサイクル経路は、AGSだけでなく経路の第2段階を担う*N*-acetylglutamate kinase (AGK) もアルギニンによりフィードバック阻害を受ける (Pauwels et al., 2003)。さらにGATもアルギニンにより弱いながらもフィードバック阻害を受ける (Baetens et al., 1998)。このように、アセチルリサイクル経路には、経路への流量を決定する初発段階を担う酵素がAGSとGATの2酵素存在するため、その制御機構はリニア一経路と異なっている。

一方、植物におけるシトルリン生合成第5段階を担う酵素に関しては、シロイヌナズナやイネにおけるゲノム解析から、AODとGATの両相同酵素遺伝子が存在することが明らかにされている (Arabidopsis Genome Initiative, 2000; International Rice Genome Sequencing Project, 2005)。またこれまでに野生スイカのシトルリン蓄積機構に関連する知見として、野生スイカは葉内に乾燥強光ストレスに伴い新規タンパク質Drought-induced polypeptide-1 (DRIP-1)が全可溶性タンパク質の約4%まで蓄積することが報告されていた (Kawasaki et al., 2000; Fig. 3-1)。DRIP-1は、大腸菌のAODと20.4%の相同性を示し、AOD活性に必要な金属イオンを結合する残基をすべて保存している (Fig. 3-2)。このことからDRIP-1はAODとして機能し、シトルリン蓄積に寄与することが想定される。しかしながら、DRIP-1の触媒特性は決定されておらず、DRIP-1とシトルリン蓄積との関連は明らかになっていない。

そこで本章では、野生スイカのシトルリン蓄積機構を明らかにする足がかりとして、シトルリン生合成第5段階を担う酵素を同定することで、植物におけるシトルリン代謝経路を明らかにした。次にこの段階を担う酵素が、シトルリン蓄積時にどのように制御されているのか明らかにすることとした。

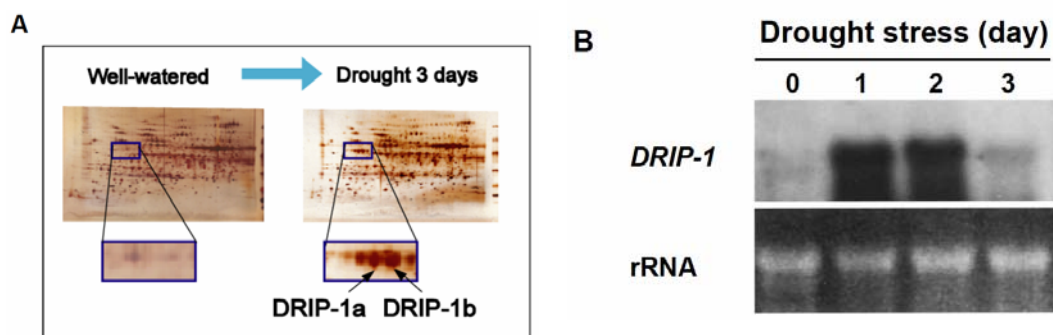


Figure 3-1. 乾燥強光により誘導されるDRIP-1タンパク質

A. 乾燥前後の野生スイカの葉から抽出した可溶性タンパク質の二次元電気泳動。一次元目はpH4から6で等電点電気泳動を行い、2次元目は12.5%のSDS-PAGEで展開した。B. 乾燥強光に伴う野生スイカの第4葉におけるDRIP-1遺伝子の発現解析 (Kawasaki et al., 2000, Yokota et al., 2002より改変)

DRIP-1	1	MGSVPSIKEIIGGLQKESYIPLLSKLIQEAEFVQNNPDLIPEDKILKHVLDVINPFSI
Dic-ArgE	1	----MIRKPVASYELDEKRFLLTLGKLIGETENIQNRPPALIPEDNAGRHVIEALTSYMK
Eco-ArgE	1	-----MKNKLPETIEYRALIATPSIS----ATEEALDQSNADIIITLADTWBK
*		
DRIP-1	61	DNGGSLVIKQVNYVCG---RGNLIIIEYPGTVRC---KVVSVFVGSMDVVPANRDTWTF
Dic-ArgE	57	ANGGVLAEIQVHCDPVNYPKRGNIIEIYPGTSRGTSSPKTISFVGSMLDVPADKTAWR
Eco-ArgE	45	DLGFNVEVQPVPGTRN---RFNMLASIGQGAGC-----LLLAGHTLTVPFIDGRWTR
*		
DRIP-1	113	DPFSLSIDGDKLRGRGTTDCLGHVALLTELLKRIACTKPKLKYSVVVIFFIASEENNSIQG
Dic-ArgE	117	NPFQLIIEGDKLYGRGTTDCLGHVALLTDLFIQLATEKFKALKHSIFAVFIVSENDEREFG
Eco-ArgE	94	DPFTLIEHDGKLYGLGTDMMKGFFAFILLDALRVDVTKLKKP--LYILATADEE-TSMAG
*		
DRIP-1	173	IGVEKLWADGYFDNLKGGPLYWIDTADSQPCIGTGG-SIPWSVETTGLFHSGLPNKALN
Dic-ArgE	177	IGVDALDHSKMNPKNGPVYVWDSADSOPTIGTGGGAQTWNLTAGKNNMHSAMPYRIVN
Eco-ArgE	151	ARYFAETTALREDCAITC-----EPTSLQPVRAHKC-HISNAIRICQSGHSSDPARGVN
*		
DRIP-1	232	ALELAMDAKLPITQLNFYRDEPHPKESDYGFETPSTMKPTQWSYFVGGVNCQIPGKSTIAG
Dic-ArgE	237	SVELVNEALAEIQRRFYINFKPHPKAEYKFDCSSTMKPTLWKPIAGSYNTIPEGESTICG
Eco-ArgE	205	ALELMHDAIGHILLQLRDNLKERYHYEA---FTVVEYPTLNLGHIHGDAENRICAACCELHM
*		
DRIP-1	292	DVRLTPFYEVKDVITKIQSYVEDINAHVEDLESRGFVSKYTLFD---EGIRGRIDVITFG
Dic-ArgE	297	DIRLTPFYDMKEMRAKVEGYIKDINANITELRNRRGPFVSKYDVPASEGVPEVKGSVSIEWL
Eco-ArgE	262	DIRPLPGMTLNEIING-----LINDALAPVSRWE-----GRLTIVDEL
*		
DRIP-1	348	-EPISGLACDLDISIGYKILYNATKEVIGHVKPYSITGSLPLVRELQEEGFDVQIVCYGLT
Dic-ArgE	357	GEASAGVACKLDSGKALGKATSEIILGSITPVATCGILPLVLDLQDSGFDIQITGFCKE
Eco-ArgE	299	HPPIEGVECPPNHQLVEVVEKLLGAKTEVVN---YCTEAPFIQTLCP----TLVIGPESI
*		
DRIP-1	407	DTYHADNEYCLYSDMNNGYKVFASITISQLEEA
Dic-ArgE	417	ETVHADNEYALISDFKNAIKILSRTIDLLEKN
Eco-ArgE	352	NQAHQPDVEYLETRFIKPTRELLIQVITHHFCWH

Figure 3-2. 野生スイカDRIP-1 (accession number AB036420)、細胞性粘菌*Dictyostelium discoideum*のArgE (Dic-ArgE, accession number P54638)、そして大腸菌*Escherichia coli*のArgE (Eco-Arg, EP23906) の推定アミノ酸配列のアライメント
 同一アミノ酸を黒、類似アミノ酸を灰色で表した。金属イオンを結合する残基を * で示した (Javid-Majd et al., 2000)。下線は、メタロペプチダーゼを含むArgE/DapE/CPGファミリーに保存されたアミノ酸配列である (Biagini and Puigserver, 2001)。
 (Kawasaki et al., 2000より改変)

3-2. 材料と方法

3-2-1. 試薬

N-acetylorithineはSigma (St. Louis, MO)で購入し、その他の試薬はNakalai (Kyoto, Japan)より購入した。

3-2-2. 植物材料と栽培条件

2-2-1と同様の条件で野生スイカを栽培、サンプリングした。また、GATタンパク質の精製には、気温25~35°Cの実験温室にて2004年の6月から8月までの2ヶ月間栽培した植物体をサンプルとして用いた。

3-2-3. AOD、及びGAT活性測定

AOD及びGAT活性は、両酵素反応の生成物であるornithineをninhydrinで発色させ測定した (Vogel and Bonner, 1956 and Liu et al, 1995)。AOD活性測定の反応溶液は、100 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0)、10 mM *N*-acetylorithine、そして0.5 mM CoCl₂またはZnCl₂に酵素溶液を加え、終量を200 μLとした。一方、GAT活性測定の反応溶液は、100 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0)、10 mM *N*-acetylorithine、そして10 mM glutamateに酵素溶液を加え、終量を200 μLとした。それぞれの反応開始は、*N*-acetylorithineの添加により行い、反応停止は、0.4 M citrateと2-methoxyethanolに1% ninhydrinを溶解させたninhydrin溶液を1 : 2で混合したninhydrin試薬を600 μL加えることで行った。酵素反応停止後、90度で10分間反応し、溶液が室温になるまで放置した後、4 M NaOHを200 μL加え、470 nmの吸光度を測定した。検量線は、酵素を除いた反応溶液に20、40、60、80、100 nmolのornithineを加えた溶液を用いて作成した。AOD、GATともに、1 unitは1分間に1 μmolのornithineを生成する酵素量と定義した。

3-2-4. 大腸菌AOD欠損株

大腸菌のAOD欠損株 (JW3929)は、大腸菌BW25113 (*lacI*^f *rrnB*_{T14} Δ *lacZ*_{WJ16} *hsdR514* Δ *araBAD*_{AH33} Δ *rhaBAD*_{LD79})由来であり、KO collection (Systematic Knock Out strain of *E. coli* K-12; GenoBase: <http://ecoli.aist-nara.ac.jp/GB5/search.jsp>)から分譲を受けた (Mori, 2004)。

3-2-5. 大腸菌AOD欠損株のDRIP-1遺伝子を用いた相補試験

相補試験には2種類のベクターを用いた。一つは、*DRIP-1* cDNAの全長をpBluescript II SK- (Stratagene, La Jolla, CA)のT3プロモーターの下流の*EcoRI-XhoI*部位に挿入した。もう一方は、*DRIP-1* cDNAの全長をpSE380 (Invitrogen, Carlsbad,

CA)のlacリプレッサーにより制御される強力なプロモーターであるtrcプロモーターの下流の*EcoRI-XhoI*部位に挿入した。そして大腸菌AOD欠損株に2種類のプラスミドベクターもしくは*DRIP-1* cDNAを保持したプラスミドをそれぞれ導入した。作製した4種類の大腸菌を、0.1 mM IPTGの有無ならびに10 mM arginine有無の4種類のM9最小培地で37°C、2日間生育させた。

3-2-6. DRIP-1タンパク質の精製

以下のすべての作業は4°Cで行い、カラムクロマトグラフィーはFPLC system (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden)を用いた。乾燥強光ストレス3日目の野生スイカの生葉100 gに100 mM potassium phosphate buffer (pH 8.0)、1 mM DTT、10 mM β -mercaptoethanol、1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)、そして1% (w/v) polyvinylpyrrolidoneを含む抽出buffer100 mLを加え、ミキサーで破碎し、ガーゼで濾した。得られた細胞破碎液は、12,000 gで30分間遠心分離を行い、上清を得た。以下断りがない限り、遠心分離は同条件で行った。この上清を65°Cで10分間攪拌しながら熱処理を行い、その後氷上で4度まで冷却し、遠心分離を行った。以下3種のカラムクロマトグラフィーにより精製を行い、DRIP-1抗体でDRIP-1タンパク質が検出されるフラクションを次の精製ステップに用いた。先ほど得られた上清を5 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0)、10 mM β -mercaptoethanol、1 mM DTT、そして20% (v/v) glycerolからなるbuffer Aで平衡化したSephadex G-25 column (5 cm i.d. \times 20 cm)で脱塩及びbuffer交換を行った。次に得られたタンパク質溶液をbuffer Aで平衡化したhydroxyapatite column (1.6 cm i.d. \times 10 cm; Bio-Rad, Hercules, CA)に供し、5から50 mMの濃度勾配のpotassium phosphateで分離、溶出した。得られたDRIP-1画分を回収し、終濃度1 Mとなるように硫酸アンモニウムを加え、50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0)、10 mM β -mercaptoethanol、1 mM DTT、20% (v/v) glycerol、そして1 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ で平衡化したButyl-Sepharose Fast Flow column (1.6 cm i.d. \times 10 cm; Amersham Bioscience)に供した。1から0 Mの濃度勾配の硫酸アンモニウムで溶出を行い、DRIP-1タンパク質が検出された画分を集めた。そしてその画分を50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0)、10 mM β -mercaptoethanol、1 mM DTT、そして20% (v/v) glycerolで平衡化したSephadex 200 column (1.6 cm i.d. \times 60 cm; Amersham Bioscience)に供し、展開した。得られたDRIP-1画分を12.5%のpolyacrilamide gelで展開し、Coomassie Brilliant Blue R-250により染色した。

3-2-7. ウェスタンブロッティング

SDS-PAGEで展開したタンパク質をPVDF膜 (Sequi-Blot PVDF membrane; Bio-Rad)にセミドライ式ブロッティング装置 (NA-1512, Nihon-Eido, Tokyo)を用

いて転写した。そして抗体染色には、DRIP-1抗体 (Yokota et al, 2002)を500倍希釈で用い、その後二次抗体としてgoat anti-rabbit IgG peroxidase conjugate (Funakoshi, Tokyo)を1000倍希釈で用いた。検出は、Immunostaining HPR-1000 kit (Konica, Tokyo)で付属のプロトコールに従って行った。

3-2-8. GAT酵素の精製

以下のすべての作業は4°Cで行い、FPLC systemならびに遠心分離の条件は、3-2-6と同様の条件で行った。野生スイカの葉300 gに100 mM potassium phosphate buffer (pH 8.0)、1 mM EDTA、10 mM β -mercaptoethanol、1 mM PMSF、そして1% (w/v) polyvinylpyrrolidoneからなる抽出buffer 300 mL中にて、ミキサーによって破碎した。その抽出液を6層に重ねたガーゼで濾し、遠心分離を行った。得られた上清に終濃度10 mMとなるように*N*-acetyloronithineを加え、70°Cで10分間攪拌しながら熱処理を行った。そして氷上で4度まで冷却した後に、遠心分離を行った。その後、得られた上清に20%飽和濃度となるように硫酸アンモニウムを加えて、氷上で30分間ゆっくりと攪拌し、遠心分離を行った。その上清を20 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0)、1 mM EDTA、10 mM β -mercaptoethanol、1 mM DTT、20% (v/v) glycerol、そして20% saturation of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ で平衡化したButyl-Sepharose Fast Flow column (1.6 cm i.d. \times 10 cm; Amersham Bioscience)に供した。30%から0%の濃度勾配の飽和硫酸アンモニウム濃度で溶出を行い、活性が検出された画分を集めた。そしてその画分を5 mM potassium phosphate buffer (pH 8.0)、1 mM EDTA、10 mM β -mercaptoethanol、1 mM DTT、そして20% (v/v) glycerolからなるbuffer Aで平衡化したSephadex G-25 column (5 cm i.d. \times 20 cm)で脱塩及びbuffer交換を行った。次に得られたタンパク質溶液を、buffer Aで平衡化したMono Q HR column (0.5 cm i.d. \times 5 cm; Amersham Bioscience)に供した。そして0から200 mMの濃度勾配の KClで溶出を行い、活性が検出された画分を集め、Centriplus YM-10 (Amicon, Beverly, MA)で1 mLまで濃縮した。次に20 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0)、1 mM EDTA、10 mM β -mercaptoethanol、1 mM DTT、150 mM KCl、そして20% (v/v) glycerolで平衡化したSephadex 200 column (1.6 cm i.d. \times 60 cm; Amersham Bioscience)に供し、展開した。得られた活性画分をbuffer Aで平衡化したMono Q HR column (0.5 cm i.d. \times 5 cm; Amersham Bioscience)とMono S HR column (0.5 cm i.d. \times 5 cm; Amersham Bioscience)に供したところ、活性画分は素通り画分に検出された。この溶液を5 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0)、10 mM β -mercaptoethanol、1 mM DTT、そして20% (v/v) glycerolからなるbuffer Bで平衡化したSephadex G-25 column (1.6 cm i.d. \times 10 cm)に供し、buffer置換を行った。そしてbuffer Bで平衡化したhydroxyapatite column (0.7 cm i.d. \times 5.2 cm; Bio-Rad)に供し、5~100 mMのpotassium phosphateで分離、溶

出した。得られた活性画分を12.5%のpolyacrylamide gelで展開し、市販の銀染色キット(Daiichikagaku Chemical, Osaka, Japan)を用いて染色した。タンパク質定量は、Bradford法 (Bradford, 1976)で行い、牛血清アルブミンをスタンダードとして用いた。

3-2-9. N末端アミノ酸配列の解読

3-2-7と同様の方法でタンパク質をPVDF膜に転写した。転写したタンパク質をCoomassie Brilliant R-250で染色し、タンパク質が転写されている部分を切り取った。このメンブレンをサンプルとしてautomated protein sequencer (Model 492, Applied Biosystems, Foster City, CA)によりアミノ酸配列を解読した。

3-2-10. GAT遺伝子の単離

乾燥強光ストレス1日目の野生スイカの葉3 gからTRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA)を使用してtotal RNAを調整した。そしてmRNA purification kit (Amersham Bioscience)によりtotal RNAからmRNAを単離した。このmRNAからMarathon cDNA Amplification Kit (Clontech, Palo Alto, CA)を用いてcDNA libraryを作製し、5'-RACE法によるGAT遺伝子の単離に用いた。また3'-RACEは、First-Strand cDNA Synthesis Kit (Amersham bioscience)を使用し、NotI-d(T)₁₈ bifunctional primer (5'-TAACTGGAAGAATTCGCGGCCGCAGGAAT₍₁₈₎-3')により作製した一本鎖cDNAを用いて行った。そのためのprimerは、Genbankに登録されていた酵母GATと相同性を示す栽培種スイカのEST clone (accession number AI563351)から作製した。作製したGAT特異的なprimerは、以下の4本である。

CLGAT5a 5'-GGCATCAACATCACAAGCAACAAGTGCAAG-3'

CLGAT5b 5'-TCCTCCATCAATCTGCTTCCATGGACCATC-3'

CLGAT3a 5'-GCTGTGGCTACGAATGAGGCCGCC-3'

CLGAT3b 5'-AAGGGAGAGAAACCTGACCTTGCACTTG-3'

5'-RACEは、first PCRにCLGAT5aを用い、second PCRにCLGAT5bを用いた。3'-RACEには、first PCRにNot1 primer (5'-AACTGGAAGAATTCGCGGCCGC-3')とCLGAT3aを用い、second PCRにはNot2 primer (5'-GAAGAATTCGCGGCCGCAGG-3')とCLGAT3bを用いて行った。これらRACE法により得られた遺伝子断片は、plasmid vector pBC (Stratagene, La Jolla, CA)にクローニングした。そして目的の遺伝子の塩基配列をBigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems)を用いてDNA sequencer (model 3100, Applied Biosystems)により決定した。

3-2-11. サザンブロットニング

ゲノムDNAは、以前報告されている方法 (Akashi et al, 2004)に従い、野生スイカの葉から調整した。ゲノムDNA10 µgを制限酵素*Bam*HI、*Eco*RI、*Eco*RV、*Hind*III、そして*Xho*Iで切断した。そのDNA溶液を0.8%のアガロースゲルを用いて電気泳動し、展開したDNAをHybond N⁺ membranes (Amersham Bioscience)に転写した。Probeは、CLGAT3b and CLGAT3c (5'-GGTACTCGTATCCCCATCCACCG-3')によるPCRで得られたGAT遺伝子の中央部の615 bpの断片を用いた。増幅したPCR産物は、MinElute Gel Extraction Kit (QIAGEN, Valencia, CA)により精製し、probeの放射ラベルはPrime-It II Random primer Labeling Kit (Stratagene)により行った。ハイブリダイゼーションは定法に従い行った (Sambrook et al, 1989)。

3-2-12. GFP融合タンパク質を用いた細胞内局在解析

GAT遺伝子の葉緑体移行シグナルと予測される配列 (N末端側26アミノ酸) をPCRで増幅し、green fluorescent protein (GFP) vectorであるpTH2XA (Kohchi et al, 2001)にクローニングした。そのコンストラクトは、推定の葉緑体移行シグナルの塩基配列とGFPの5'末端を連結し、カリフラワーモザイクウイルス35Sプロモーター下で融合タンパク質が発現するように設計した。このplasmid (1 µg)をbombardment (PDS-1000/He apparatus, Bio-Rad)によりタバコの葉に導入した。そして暗所、室温で一晩インキュベートした後、そのGFPの蛍光をconfocal microscopy (LSM510, Carl Zeiss, Jena, Germany)にて観察した。

3-2-13. 野生スイカ、シロイヌナズナ、酵母のGAT遺伝子の単離、発現コンストラクトの作製

野生スイカGAT (CLGAT)、シロイヌナズナGAT (AtGAT)遺伝子は、それぞれのcDNA libraryからPCRで増幅した。酵母GAT (ScGAT)遺伝子は、酵母のゲノムDNAから増幅した。CLGATとAtGATは、葉緑体移行シグナルを、またScGATはミトコンドリア移行シグナルをそれぞれ除くようなprimerを設計した。それぞれのprimerは次のとおりである。

CLGAT forward 5'-GGAATTCCATATGGTGGCTACGAATGAGGC-3'

reverse 5'-CCGCTCGAGTGATAATTTATTCTGTTGTAG-3'

AtGAT forward 5'-GGAATTCCATATGGCAACTACCGTCGAGGA-3'

reverse 5'-ACGCGTCGACAGTTCTATGAGGTGTACTCA-3'

ScGAT forward 5'-AATTGGCCCATATGCAACGCTCGAAGCAGCT-3'

reverse 5'-CCGCTCGAGTTCTGTGCGTTTATATAACCA-3'

下線は、PCR産物のクローニングに利用するために新たに導入した制限酵素配列である。forwardにはすべて*Nde*I切断配列、reverseはCLGATとScGATには*Xho*I切

断配列を、AtGATには*Sal*I切断配列を導入した。得られたGAT遺伝子は、N末端側にintein-chitin binding domainが融合するように、open reading frameをpTYB12 vector (New England Biolabs Inc, Beverly, MA)の*Nde*Iと*Xho*Iもしくは*Sal*Iの制限酵素配列を利用して挿入した。配列の確認は、3-2-10で述べたのと同様の方法で行った。

大腸菌におけるリコンビナントCLGAT、AtGAT、ScGATの発現、精製

pTYB12-CLGAT、AtGAT、そしてScGATを大腸菌ER2566 (New England Biolabs Inc)に導入した。そして、これらの形質転換大腸菌を100 µg/mLのAmpicilinを含むLB培地において生育温度37°Cで600 nmの吸光度が0.6になるまで生育させた。その後、生育温度を15度に下げ、続いて0.3 mM IPTGを加えタンパク質発現を開始させ一晩培養した。培養した大腸菌を8,000 g、30分間の遠心分離により集菌し、50 mM Tris-HCl, (pH 8.0)、2 M NaCl、1 mM EDTAからなるbufferAに懸濁し、超音波破碎を行った。細胞懸濁液を8,000 gで30分間の遠心分離を行い、得られた上清を抽出bufferで平衡化したchitin beads (New England Biolabs Inc)に供した。その後、20 bed volumeの10 mM *N*-acetylornithineをbufferAに加えたbufferBで、カラムを洗浄した。そして50 mM DTTをbufferBに加えたbufferCで置換し、室温で16時間放置した。そしてInteinから切断されたGATは、bufferAで溶出した。このタンパク質溶液は、Centriplus YM-10で1 mLまで濃縮した。そして20 mM potassium phosphate (pH 7.5)、1 mM DTT、1 mM EDTA、そして20%(w/v) glycerolからなるbufferで平衡化したゲルろ過カラムクロマトグラフィーSephadex 200に供し、分離・精製を行った。

3-3. 結果

3-3-1 野生スイカのシトルリン生合成第5段階を担う酵素

シトルリン生合成経路において、*N*-acetylornithineはAODもしくはGATによりornithineへと変換されると考えられた (Fig. 1-5)。これら2つの酵素がどのようにシトルリン生合成に関与しているか明らかにするために、野生スイカの葉抽出液において両酵素の活性を測定した。その結果AOD活性は、乾燥前後、及びAODホモログのDRIP-1の発現の有無に関わらず、検出限界以下 ($<0.02 \text{ nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg protein}^{-1}$)であった (Fig. 3-3A, B)。細菌のAODは、活性にコバルトや亜鉛などの二価の金属イオンにより活性化される (Javid-Majd and Blanchard, 2000)。しかしながら、コバルトや亜鉛イオンを反応溶液に添加しても、野生スイカの葉からはAOD活性は検出されなかった。

またポジティブコントロールとして、大腸菌の粗抽出液を用いてAOD活性を測定したところ、 $2.8 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg protein}^{-1}$ の活性が検出され、報告されている $2.5 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg protein}^{-1}$ と同程度であった (Vogel and Bonner, 1956)。このことから、AODの活性測定法は妥当であり、野生スイカの葉からAOD活性が検出されないのは活性測定法が原因ではないと判断した。

それに対して、GAT活性は、野生スイカの葉粗抽出液から検出された (Fig. 3-3A)。その比活性は $3.2 \text{ nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg protein}^{-1}$ であり、乾燥強光ストレスが付与されても変化しなかった (Fig. 3-3A)。またGAT活性は乾燥強光ストレスに伴い活性を変化させないのに対して、DRIP-1タンパク質は乾燥強光により誘導されることから、GAT活性とDRIP-1タンパク質量の挙動は一致しなかった (Fig. 3-3B)。

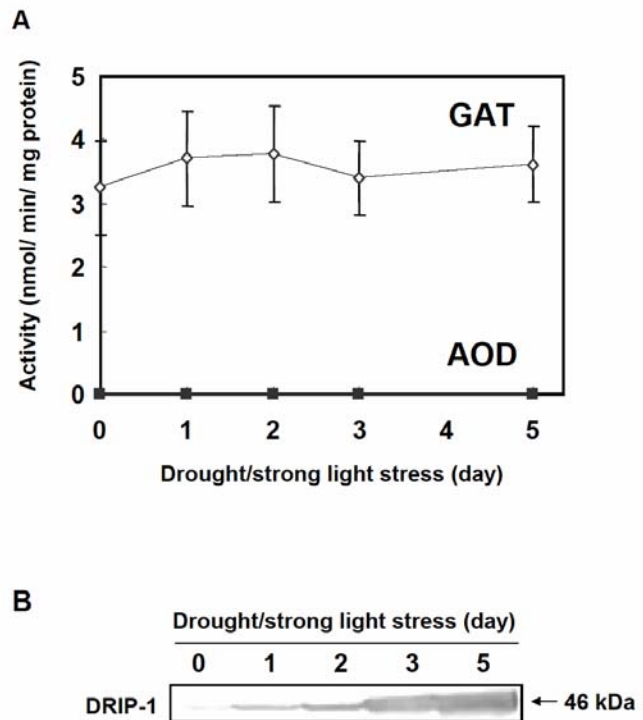


Figure 3-3. 乾燥強光に伴う野生スイカ葉におけるGATおよびAOD活性、ならびにDRIP-1タンパク質蓄積量の変化

A. 乾燥強光に伴うGAT (◇)ならびにAOD活性 (■)。データは、3個体の平均±標準偏差を示した。B. 乾燥強光に伴うDRIP-1タンパク質のWestern blot。乾燥前 (0 day)、乾燥強光ストレス1、2、3、5日目の野生スイカ第4葉から抽出した可溶性タンパク質 (20 μg)をSDS-PAGEで展開し、DRIP-1抗体で検出した。

3-3-2. DRIP-1タンパク質はAOD活性を持つのか？

乾燥強光ストレスを受けた野生スイカの葉はDRIP-1が発現しているにもかかわらず、AOD活性は検出されなかったことから、DRIP-1はAOD活性を持たないことが示唆された。実際にDRIP-1がAOD活性を持つかどうか明らかにするために、リコンビナントDRIP-1を用いた解析を行った。

まず、*DRIP-1* cDNAを用いて大腸菌AOD欠損株の相補試験を行った。*DRIP-1* 遺伝子の発現には、プロモーターの異なる2種類の発現ベクターを用いた。一つは、T3プロモーターにより恒常的に発現させるpBluescript II SK-であり、もう一方は、*trc*プロモーターによりIPTGにより誘導的に高発現させるpSE380である。これらのプラスミドに*DRIP-1* cDNAを挿入し、大腸菌AOD欠損株に導入した。その結果、*DRIP-1* 遺伝子を挿入したプラスミドの有無に関わらず、大腸菌AOD欠損株は生育にアルギニンが必要であった (Fig. 3-4A)。また、*DRIP-1* 遺伝子を保持したプラスミドを導入した大腸菌AOD欠損株において、DRIP-1タンパク質の発現が確認された (Fig. 3-4B)。このことから*DRIP-1* 遺伝子は、大腸菌AOD欠損株を相補せず、リコンビナントDRIP-1タンパク質はAOD活性を持たないことが強く示唆された。

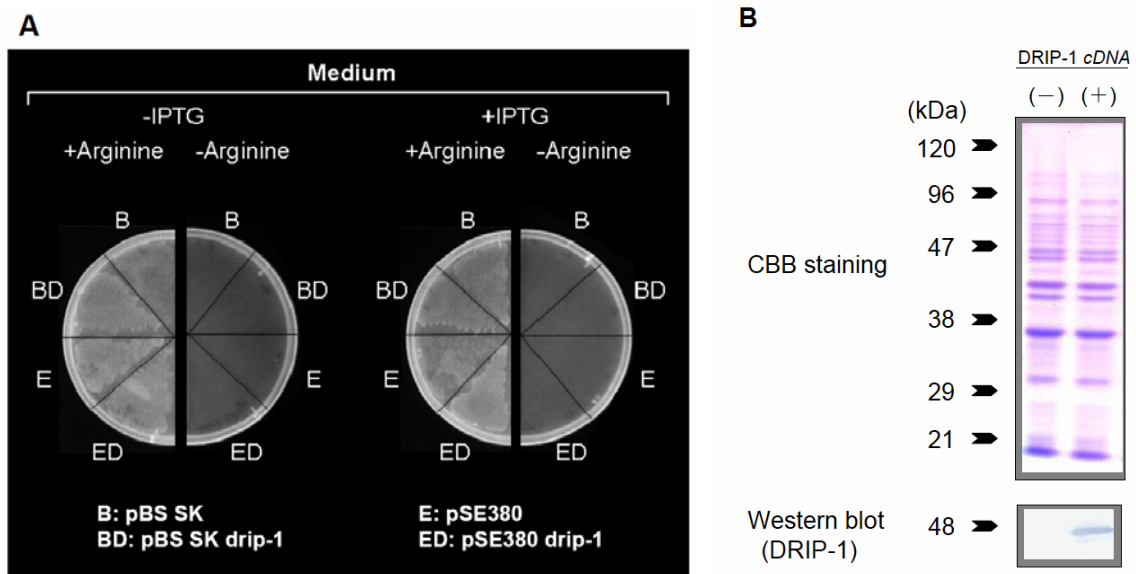


Figure 3-4. *DRIP-1* 遺伝子を用いた大腸菌AOD欠損株の相補試験

A. 大腸菌AOD欠損株の相補試験。大腸菌AOD欠損株にベクターのみ (B: pBluescript, E: pSE380)、またはdrip-1 cDNAを含むベクター (BD: pBluescript-drip-1, ED: pSE380-drip-1) を導入し、M9最小培地、100 μ Mのアルギニンを加えたM9最小培地、100 μ MのIPTGを加えたM9最小培地、100 μ Mのアルギニンと100 μ MのIPTGを加えたM9最小培地の4種類の培地にそれぞれ植菌した。培地は、37°Cで2日間培養した。B. 相補試験で用いた大腸菌株 (B, BD) から抽出したタンパク質に対するDRIP-1抗体を用いたWestern blot。LB培地で生育させたそれぞれの株における可溶性タンパク質を12.5% (w/v)のポリアクリルアミドゲルで展開し、DRIP-1抗体により検出した。

リコンビナントDRIP-1がAOD活性を持たないのは、植物と原核生物とのフォールディング機構、及び翻訳後修飾の違いが原因であるかもしれない。そこで次に乾燥強光ストレスを与えた野生スイカ葉からDRIP-1タンパク質をDRIP-1のWestern blotによるシグナル強度を指標に精製し、AOD活性測定を行った。DRIP-1タンパク質の精製は、熱処理とHydroxylapatite、疎水、ゲルろ過の3種のカラムクロマトグラフィーにより行った。ゲルろ過カラムクロマトグラフィーのタンパク質ピーク画分をSDS-PAGEで展開し、Coomassie Brilliant Blue染色したところ、単一バンドが検出された (Fig. 3-5A)。この単一バンドは、DRIP-1抗体によるウェスタンブロットによりDRIP-1タンパク質であることが明らかになった (Fig. 3-5B)。この精製DRIP-1タンパク質を50 µg用いてAOD活性測定を行った結果、AOD活性は検出されなかった。活性が検出されなかった原因として何らかの補因子や活性化因子が欠乏している可能性が考えられた。そこでTable. 3-1に示す化合物を反応溶液に加えAOD活性を測定した。しかしながら、どの化合物を反応溶液に加えても、DRIP-1タンパク質のAOD活性は検出限界以下であった。以上のことからDRIP-1はAOD活性を持たないと考えられる。

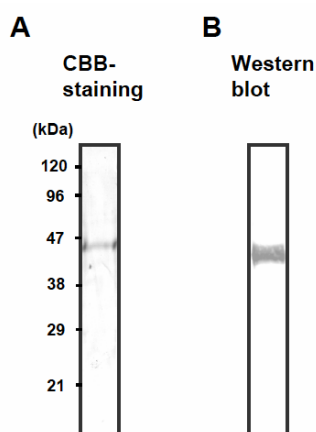


Figure 3-5. DRIP-1タンパク質の精製

A. 乾燥強光ストレスを与えた野生スイカの葉から精製したDRIP-1タンパク質のSDS-PAGE。B. DRIP-1抗体を用いたWestern blot。ゲルろ過カラムクロマトグラフィーのタンパク質ピーク画分を12.5% (w/v)のポリアクリルアミドゲルで展開し、DRIP-1抗体を用いて検出した。

Table 3-1. 精製DRIP-1タンパク質を用いたAOD活性測定に加えた化合物の一覧

反応溶液は、50 mM potassium phosphate (pH 7.0)、10mM *N*-acetylornithine, 0.5 mM ZnCl₂、DRIP-1 100 µg、および下記の化合物をそれぞれ加えた。

Compound	Final concentration	Compound	Final concentration
Yeast extract	10 mg/200 µL	aspartic acid	6 mM
Watermelon leaf extract *1	10 µL/200 µL	asparagine	6 mM
Mg ²⁺	0.2 mM	glutamine	6 mM
Zn ²⁺	0.2 mM	lysine	6 mM
Co ²⁺	0.2 mM	histidine	6 mM
Cu ²⁺	0.2 mM	serine	6 mM
Mn ²⁺	0.2 mM	threonine	6 mM
Mo ²⁺	0.2 mM	tyrosine	6 mM
Ca ²⁺	0.2 mM	alanine	6 mM
Fe ²⁺	0.2 mM	glycine	6 mM
Pyridoxine	10 mM	valine	6 mM
Biotin	10 mM	leusine	6 mM
NAD	20 mM	isoleucine	6 mM
NADH	20 mM	proline	6 mM
NADP	20 mM	phenylalanine	6 mM
NADPH	20 mM	methionine	6 mM
ATP	20 mM	tryptophan	6 mM
		cysteine	6 mM
		arginine	6 mM
		citruiline	6 mM
		arginosuccinate	6 mM
		Thiamine	6 mM
		carbamyf-phosphate	6 mM

*1. 乾燥ストレスを3日与えたスイカの葉20 mgに100 mLのエタノールを加えたすりつぶした抽出液

3-3-3. 野生スイカの葉からのGAT酵素の精製

GATの性質を詳細に解析するために、野生スイカの葉からGAT酵素を精製した (Table 3-2)。精製は、野生スイカGATが高い熱安定性を持つことを利用した。野生スイカ葉の細胞破碎液を遠心分離し、細胞片を除いた後に70°Cで10分間熱処理を行ったところ、24倍と高い精製倍率を示した。その後、疎水、陽イオン及び陰イオン交換、ゲルろ過、そしてHydroxylapatiteの6種のカラムクロマトグラフィーを行い、GAT酵素を7000倍以上に精製した。精製最終段階のタンパク質溶液をSDS-PAGEで展開したところ、約27 kDaの位置に2つのポリペプチドが検出された (Fig. 3-6)。これら2つのポリペプチドのN末端アミノ酸配列を解読したところ、下方のポリペプチド (α ペプチド) のN末端アミノ酸配列はXATNEAANYLPEAPであり、上方のポリペプチド (β ペプチド) のN末端

Table 3-2. 野生スイカの葉からGATの精製

Step	Protein (mg)	Total activity ¹ (U)	Specific activity (U/mg)	Purification (-fold)
Crude extract	5500	37	0.00067	1
Heat treatment	280	46	0.017	24
Butyl Sepharose	15	35	0.23	340
Mono Q (8.0) ²	0.94	11	1.2	1700
Sephadex 200	0.24	4.6	1.9	2800
Mono Q (7.0) ²	0.13	3.4	2.6	3900
Mono S	0.070	3.0	4.3	6400
Hydroxylapatite	<0.020	0.94	>4.7	>7000

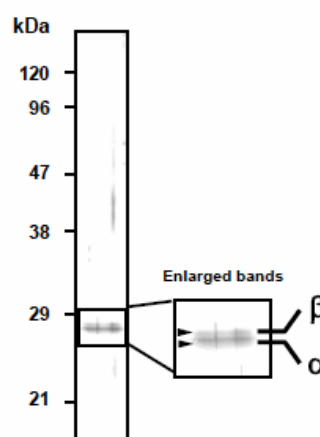


Figure 3-6. 精製GATのSDS-PAGE Hydroxylapatite カラムクロマトグラフィーより得られた活性ピーク画分を12.5% (w/v)のポリアクリルアミドゲルで展開した。

アミノ酸配列はXMLGVVTTDAVVACDVWRKMOVQISVDRSFNQITVDであった (Xは同定できなかったアミノ酸)。 α ペプチドのN末端アミノ酸配列は、スイカのESTクローンAI563351から予測されるアミノ酸配列の一部と一致した。

3-3-4. 野生スイカGATのcDNAの単離

野生スイカGATのcDNAの全長を単離するために、スイカESTクローンAI563351から遺伝子特異的なプライマーを作製し、5'-及び3'-RACEを行った。その結果、得られたcDNAは460アミノ酸からなるタンパク質をコードしており、このタンパク質はシロイヌナズナのAt2g37500、枯草菌のGAT、酵母のGATとそれぞれ71、38、26%の相同性を示した。GATのcDNAから推定されるアミノ酸配列の27~42番目のアミノ酸と239~273番目のアミノ酸は、野生スイカの葉から精製したGATの α ペプチドと β ペプチドのN末端アミノ酸配列と一致していることから (Fig. 3-7)、この酵素をCLGAT (*Citrullus lanatus* glutamate

N-acetyltransferase)と命名した。CLGATの*N*末端側の26アミノ酸は、タンパク質局在予測ソフトCHLOROP (Nielsen et al., 1997)により、葉緑体移行シグナルペプチドと予測された。

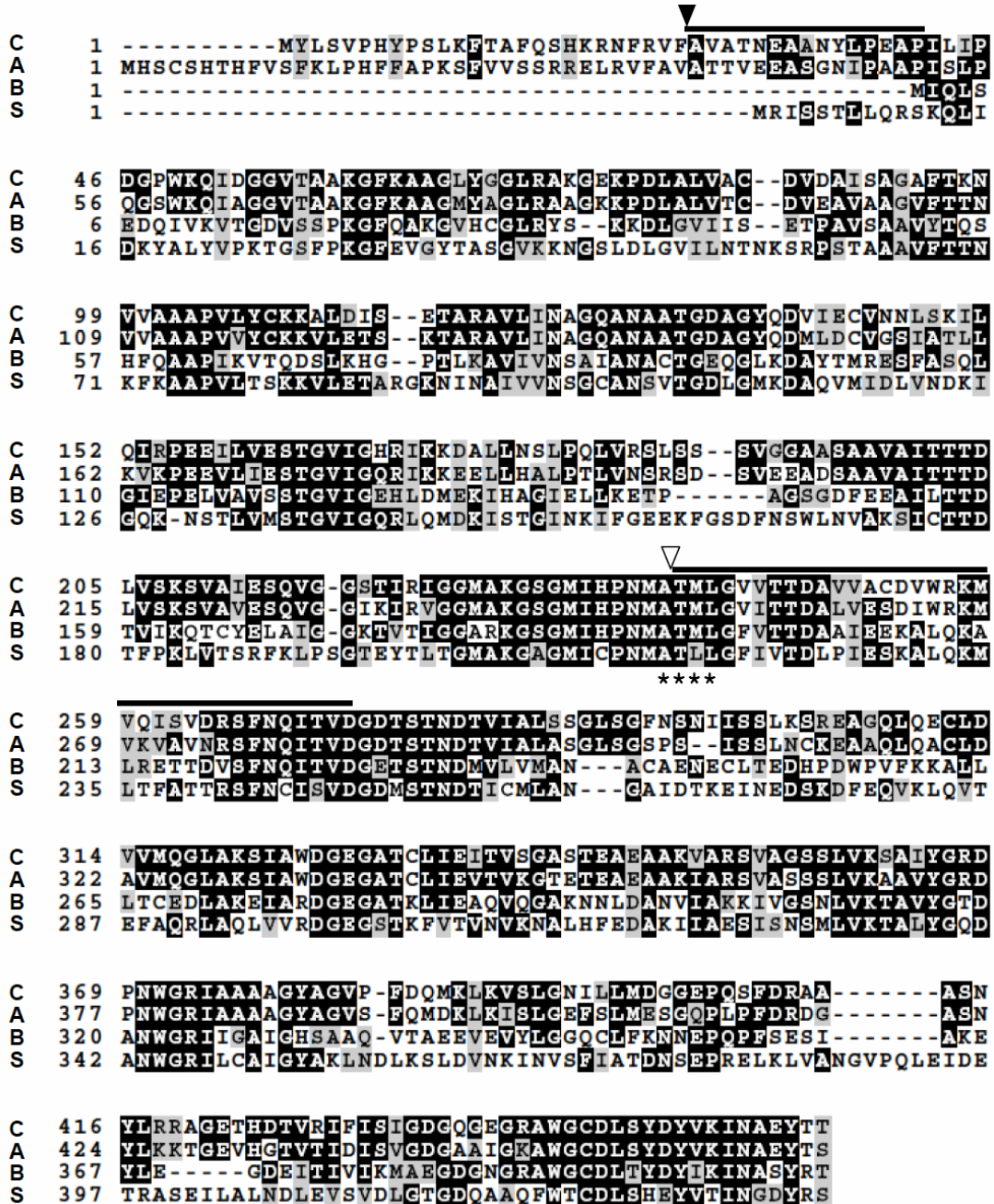


Figure 3-7. CLGAT (C; accession nu. AB212224)、シロイヌナズナのAt2g37500 (A; AAC98066)、枯草菌のGAT (B; NP389002)、そして酵母GAT (S; NP012464)のアミノ酸配列の比較

CLGATと同一のアミノ酸を黒、類似アミノ酸を灰色で示した。精製したCLGATの2つのサブユニットの*N*末端アミノ酸配列はアライメントの上に線で示し、GATファミリーの保存されたモチーフはアスタリスクで示した。また、▼は葉緑体移行シグナルペプチドの推定切断部位を表しており、▽はGATの推定自己触媒切断部位を示している。

CLGAT遺伝子の中央部の615 bpをプローブとして用いてサザンブロットを行ったところ、野生スイカには2コピーのGAT遺伝子があることが示唆された (Fig. 3-8)。そこで、単離したcDNAが本研究において精製したGATをコードする遺伝子であることを確認するため、スイカESTクローンAI563351をプローブとして、乾燥前後の野生スイカの葉を混ぜ合わせたサンプルから作製したcDNA library (5×10^6

プラーク)からスクリーニングを行った。その結果、このlibraryから9個のクローンが単離され、すべてのクローンが上記のRACE法により単離したESTと一致した。このことから、野生スイカの葉において転写されているGATのmRNAは一種類のみであり、RACE法により単離したcDNAは精製したCLGATをコードする遺伝子であることが明らかになった。

CLGATは、GATファミリーに保存されているAT(M/L)Lモチーフを持ち (Fig 3-7, asterisk)、GATの前駆体タンパク質はモチーフのアラニンとスレオニンの間で自己切断される (Abadjieva et al., 2000; Marc et al., 2001)。実際に精製したCLGATの β ペプチドのN末端アミノ酸配列は、保存されたモチーフの切断によって生成するC末端側のサブユニットのN末端アミノ酸配列と一致する。これらの結果から、CLGATも報告されている他生物のGATと同様に、保存配列ATMLで自己切断することが強く示唆された。CLGATのcDNAから予測される α ペプチドと β ペプチドの分子質量は、それぞれ21.5、23.5 kDaであり、SDS-PAGEにより見積もられる分子質量より小さかった (Fig. 3-6)。しかしながら、CLGATをMALDI-TOF-MSにより解析したところ、 m/z が21.3と23.5 kDaの位置に2本の主要なピークが検出され、cDNAから予測される分子質量と一致した (Fig. 3-9A)。CLGATの多量体構造を明らかにするために、ゲルろ過カラムクロマトグラフィーによりnative CLGATの分子量を解析したところ、約90 kDaであると見積もられた (Fig. 3-9B)。このことからCLGATは、 α サブユニットと β サブユニットが2分子ずつからなるヘテロ4量体であると示唆された。

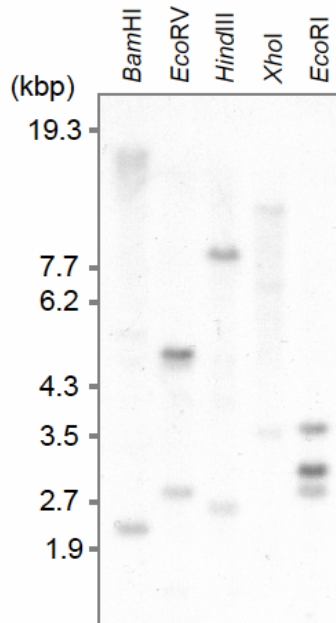


Figure 3-8. CLGATのゲノミックDNAブロット

野生スイカのゲノムDNAを *Bam*HI (lane 1)、*Eco*RI (lane 2)、*Hind*III (lane 3)、*Xho*I (lane 4)、*Eco*RV (lane 5)で制限酵素処理し、アガロースゲルで展開した。そしてHybond-N Plus膜に転写し、 32 PラベルしたCLGATの中央部615 bpに相当するプローブを用い、検出した。

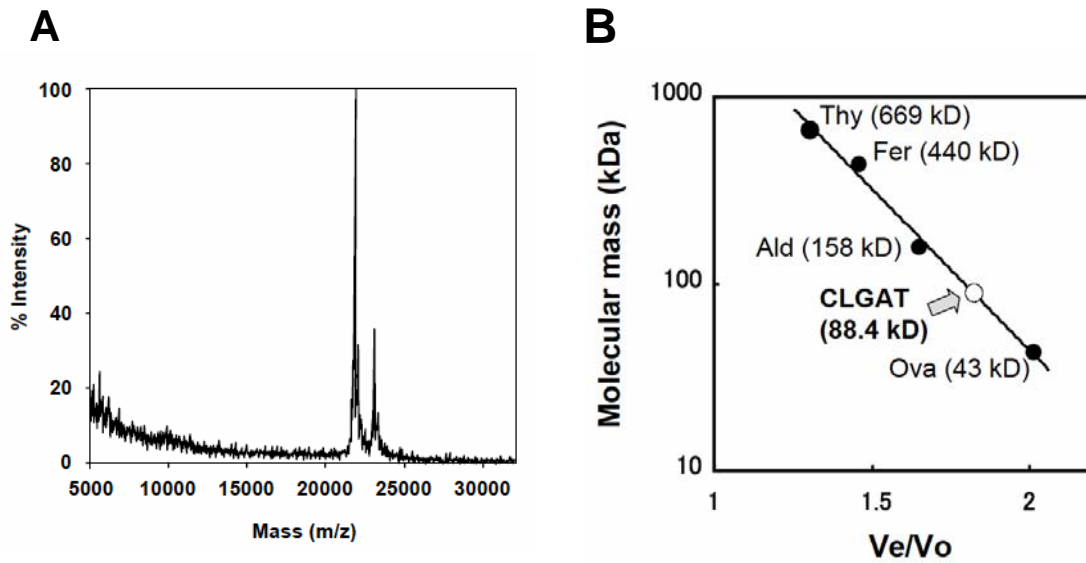


Figure 3-9. CLGATの分子質量と多量体構造

A. MALDI-TOF-MSによるCLGATの分子質量。マススペクトルは、25%アセトニトリルと5 mg/mLの α -cyano-4-hydroxy-cinnamic acidに精製CLGATを加えた溶液で記録した。分子質量の重量スタンダードとして、Inulin、cytochrome *c*、myoglobinそしてubiquitinを用いた。B. native CLGATの分子質量。Superdex 200カラムクロマトグラフィーによりCLGATとマーカータンパク質を溶出し、その溶出体積から分子質量を求めた。マーカータンパク質として、thyroglobulin (Thy)、ferritin (Fer)、aldolase (Ald)そしてovalbumin (Ova)を用いた。

3-3-5. CLGATの局在解析

CLGATのcDNAの解析から、精製したCLGATのN末端の上流に26アミノ酸が存在し、このアミノ酸配列が葉緑体移行シグナルペプチドであることが予測された。CLGATが実際に葉緑体に移行するかどうか調べるために、予測された葉緑体移行シグナルペプチドとGFP (green fluorescent protein)の融合タンパク質をタバコの葉で一過的に発現させ、そのGFPの蛍光を共焦点顕微鏡により観察した。葉緑体の自家蛍光を葉緑体のマーカーとして用いた。予測された葉緑体移行シグナルペプチドと

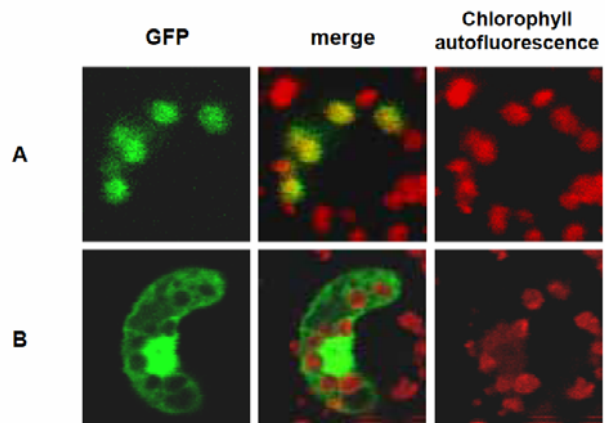


Figure 3-10. CLGATのGFP融合タンパク質による局在解析

CLGATの推定葉緑体移行シグナルペプチドとGFPの融合タンパク質 (A)とコントロールとしてGFPタンパク質のみ (B)をタバコの葉に一過的に発現させ、蛍光顕微鏡で観察した。

GFPの融合タンパク質を発現させたとき、細胞質に蛍光は観察されず、GFPの緑の蛍光は、葉緑体自家蛍光と一致した (Fig. 3-10A)。それに対して、GFPタンパク質のみ発現させたときは、葉緑体を除いた細胞質と核でGFPの蛍光が観察された (Fig. 3-10B)。これらの観察からCLGATは、葉緑体移行シグナルペプチドにより葉緑体に輸送されることが強く示唆された。

3-3-6. 野生スイカから精製したCLGATの酵素学的諸性質

野生スイカの葉から精製したCLGATの至適pHは7.0であり (Fig.3-11A)、基質である*N*-acetylornithineとglutamateに対する K_m 値はそれぞれ3.4、17.8 mMであった (Fig. 3-11B, C)。経路の下流の代謝産物によるCLGATの制御を調べるために、乾燥強光時に蓄積すると予測される濃度のシトルリンとアルギニン存在下でCLGAT活性を測定した。その結果、30 mMのシトルリン、7 mMのアルギニン存在下で、CLGATの活性は初期活性に対してそれぞれ100、98%であった。このことから、CLGATは経路の下流の代謝産物により活性が阻害されないことが明らかになった。

CLGATの至適温度は、70°Cと非常に高い値を示した (Fig. 3-11D)。そこでCLGATの熱安定性を評価するために、酵素を30~90°Cのさまざまな温度で30分間インキュベートし、その残存活性を測定した (Fig. 3-11E)。その結果、CLGATは70°Cでインキュベートすると98%活性を保持しており、80°Cでインキュベートしても初期活性の15%の活性を示した。また、至適温度の結果からアレニウスプロットを作製すると、30~70°Cの間で直線性を示した (Fig. 3-11F)。

CLGATの熱安定性が非常に高いことから、気温35°Cの強光条件下で野生スイカに乾燥強光ストレスを与えたときの葉面温度と蒸散速度を経時的に測定した。その結果、乾燥前の野生スイカ葉は、蒸散速度が約450 mmol H₂O m⁻² s⁻¹で葉面温度が約30°Cであった (Fig. 2-4A)。それに対して、乾燥4日目の野生スイカの葉は、蒸散速度が約15 mmol H₂O m⁻² s⁻¹と低下しており、葉面温度が約44°Cに増加していた (Fig. 2-4B)。この葉面温度の上昇は、サーモグラフィーを用いても観察できた (Fig. 2-5B)。

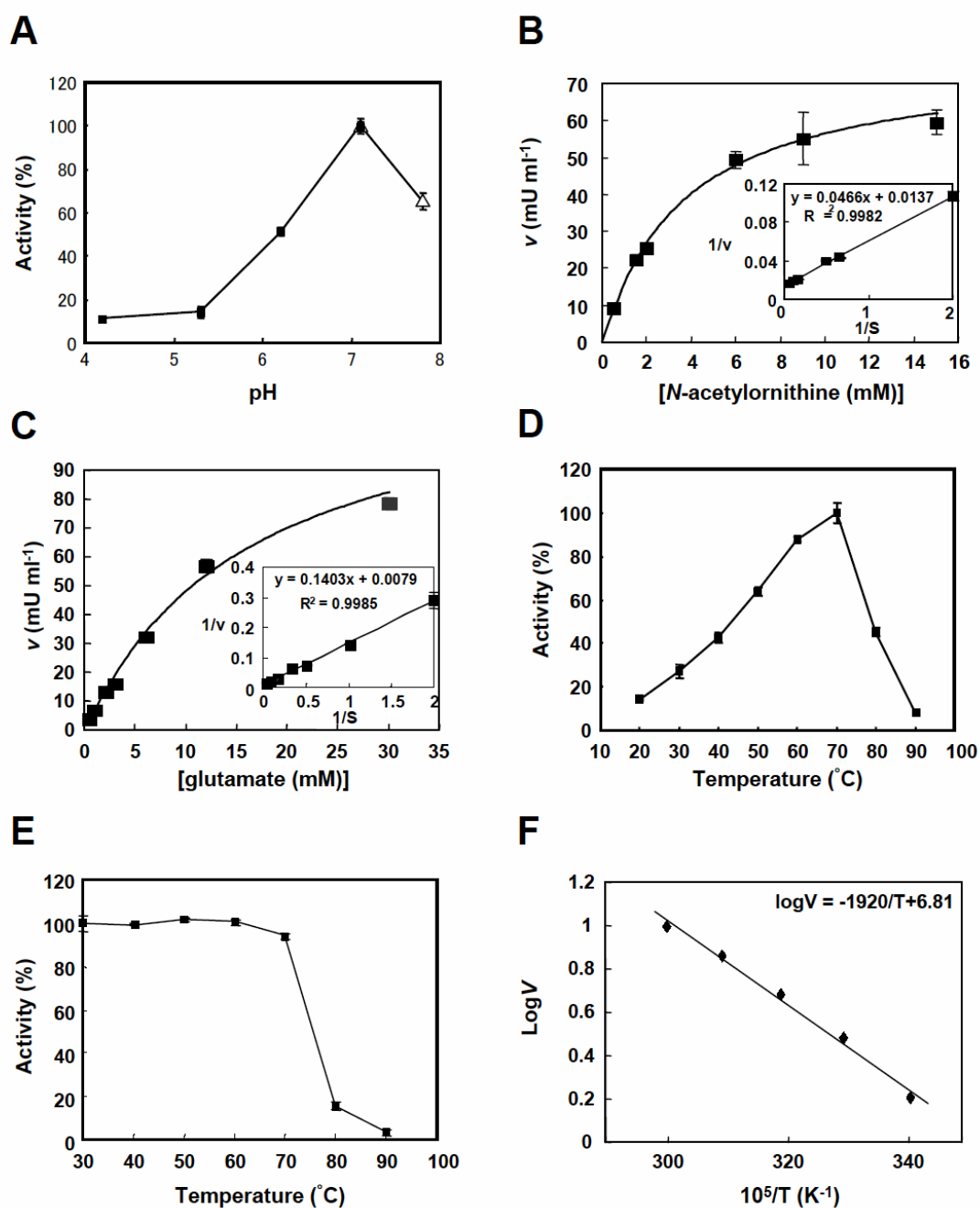


Figure 3-11. 野生スイカGATの酵素学的諸性質

A. CLGATのpH依存性。酵素活性をpH 4.2~7.8の間で測定した。Citrate/ sodium phosphate bufferを■で、Tris-HCl bufferを△で示す。CLGATの*N*-acetylorntithine (B)とグルタミン酸 (C)の濃度依存性。(B)グルタミン酸の濃度を10 mMに固定し、*N*-acetylorntithine濃度を0.5~15 mMの間で変化させ、活性を測定した。(C)*N*-acetylorntithineの濃度を10 mMに固定し、グルタミン酸濃度を0.5~30 mMの間で変化させ、活性を測定した。インセットにラインウェーバー・バークのプロットとその近似直線の一次式を示した。D. CLGATの温度依存性。活性測定を20~90°Cの温度で測定した。E. CLGATの熱安定性。30分間30~90°Cでインキュベーションし、30°Cで活性測定を行い、残存活性を示した。F. CLGATのアレニウスプロット。データは、3回のアッセイの平均±標準誤差を示した。

3-3-7. 大腸菌におけるCLGAT、AtGATそしてScGATの発現、精製

CLGATは植物で初めて同定されたGATであるため、決定した酵素学的諸性質が、植物のGATに一般的な性質であるのか、または野生スイカ特異的な性質であるのかが判断できなかった。そこでCLGATと他植物のGATの性質を比較するために、大腸菌においてCLGAT、比較対象としてシロイヌナズナGAT (*Arabidopsis thaliana* glutamate N-acetyltransferase: AtGAT)、そしてよく研究がなされている酵母GAT (*Saccharomyces cerevisiae* glutamate N-acetyltransferase: ScGAT)を発現、精製した。これまでに大腸菌においてGATを高発現させるのが困難であることが報告されており (Crabeel et al., 1997; Marc et al., 2000)、唯一pTYB12 vectorを用いたChitin binding domain-Intein融合タンパク質として発現させたとき高発現に成功している (Kershaw et al., 2002)。これらの報告から、CLGAT、AtGATそしてScGATをpTYB12 vectorを用いて大腸菌ER2566において発現させたところ、それぞれ可溶性画分に目的の分子量のバンドが強く検出された (Fig. 3-12)。標的のタンパク質は、Chitin beadsを用いてアフィニティー精製を行い、続いて高濃度のDTT存在下のInteinの自己切断を利用して1段階精製を行った。この精製タンパク質に対してゲルろ過カラムクロマトグラフィーを行い、得られた精製GATがSDS-PAGEにより95%以上の精製度であることを確認した (Fig. 3-12)。

3-3-8. リコンビナントCLGAT、AtGAT、ScGATの酵素学的諸性質

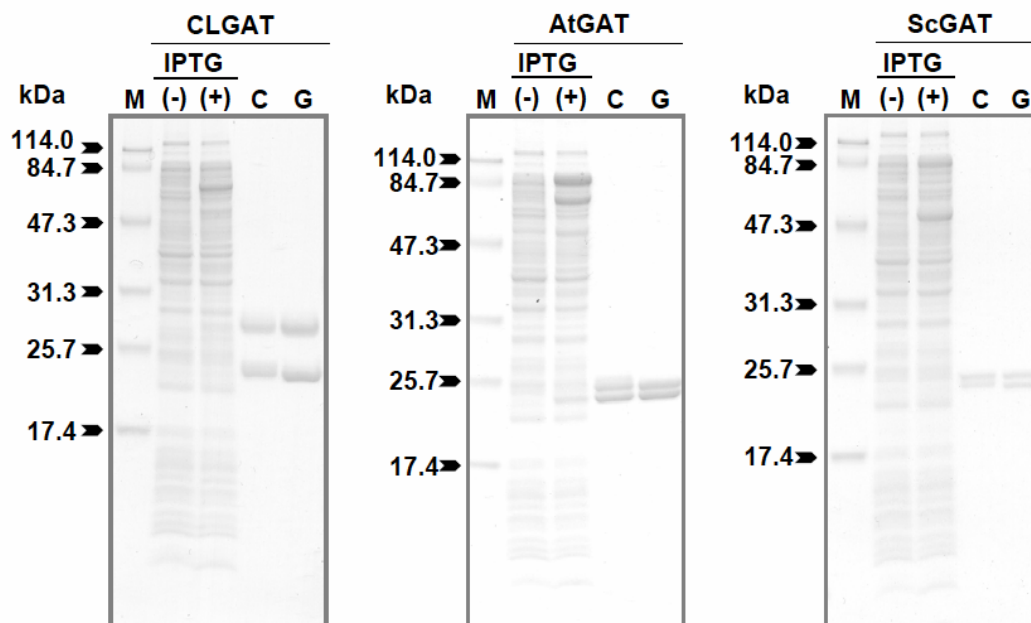


Figure 3-12. リコンビナントCLGAT、AtGATそしてScGATの発現と精製

各ゲルのレーンは左からIPTG (-): IPTG添加前の粗酵素溶液、IPTG (+): IPTG添加後の粗酵素溶液、C: Chitin beadsにより精製したタンパク質、G: Chitin beadsにより精製したタンパク質をさらにゲルろ過カラムクロマトグラフィーSephadex 200で精製したタンパク質を20 μ g泳動した。泳動後、Coomassie Brilliant Blueで染色した。

pTYB12 vectorを用いて発現させたGATは、N末端に3アミノ

酸（アラニン、グリシン、ヒスチジン）が付加されている。この付加された3アミノ酸がGATの酵素学的諸性質に影響を与えるかどうか明らかにするために、野生スイカの葉から精製したCLGATとリコンビナントCLGATの酵素学的諸性質を比較

Table 3-3. 精製したCLGATとリコンビナントCLGAT、AtGAT、ScGATの酵素学的諸性質の比較

	recombinant GAT			
	<i>C. lanatus</i> (CLGAT)	<i>C. lanatus</i> (CLGAT)	<i>A. thaliana</i> (AtGAT)	<i>S. cerevisiae</i> (ScGAT)
K_m glutamate (mM)	17.8	17.4	16.5	8.4
K_m N-acetylornithine (mM)	4.3	3.9	4.2	2.8
optimum temperature (°C)	70	70	50	40
optimum pH	7.0	7.0	8.0	7.5

した。その結果、N-acetylornithineとglutamateのふたつの基質に対する K_m 値、至適温度そして至適pHはほぼ同程度の値を示した (Table. 3-3)。このことから、付加された3アミノ酸は、GATの性質に影響を与えないと判断し、リコンビナントCLGAT、AtGAT、そしてScGATの酵素学的諸性質を解析した。

CLGAT、AtGAT、ScGATの至適pHは、それぞれ7.0、8.0、7.5とほぼ同程度の値だった (Table. 3-3)。CLGAT、AtGAT、ScGATのN-acetylornithineに対する K_m 値は17.4、16.5、8.4 mMであり、glutamate に対する K_m 値は3.9、4.2、2.8 mMであり、大きな違いはなかった (Table. 3-3)。CLGAT、AtGAT、ScGATの至適温度は、それぞれ70、40、40であり、CLGATがAtGATとScGATに対して高い値を示した (Fig. 3-13A)。3種のGATの温度特性を詳細に明らかにするために、GATを30～100°Cのさまざまな温度で30分間インキュベートし、その残存活性を測定した。その結果、CLGATは70°Cまで活性を保っているのに対して、AtGATは50°C、ScGATは40°Cを境に活性が低下した (Fig. 3-13B)。

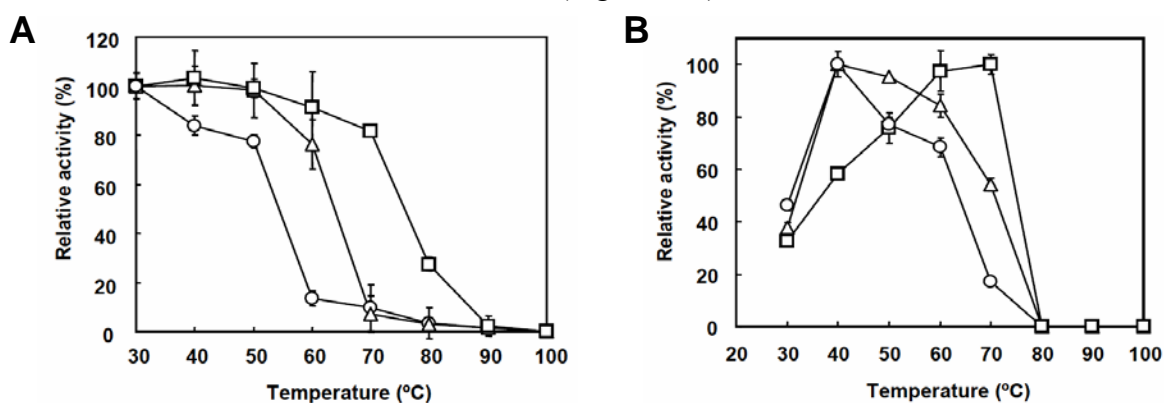


Figure 3-13. リコンビナントCLGAT、AtGATおよびScGATの熱応答性

A. 各GATの温度依存性。活性測定を20～100°Cの温度で測定した。 B. 各GATの熱安定性。30分間30～100°Cでインキュベーションし、30°Cで活性測定を行い、残存活性を示した。データは、3回のアッセイの平均±標準誤差を示した。(□)はCLGAT、(△)はAtGAT、そして(○)はScGATを示す。

3種のGAT活性の経路の下流の代謝産物による影響を調べるために、3種のGATを乾燥強光時に蓄積すると見積もられる30 mMのシトルリン、7 mMのアルギニン存在下で測定した。その結果、30 mMのシトルリン存在下で、CLGAT、AtGAT、そしてScGATの活性はすべて初期活性と変化しなかった (Fig. 3-14)。それに対して、7 mMのアルギニン存在下で、CLGAT、AtGAT、そしてScGATの活性は、初期活性に対してそれぞれ100、92、74%であった (Fig. 3-14)。

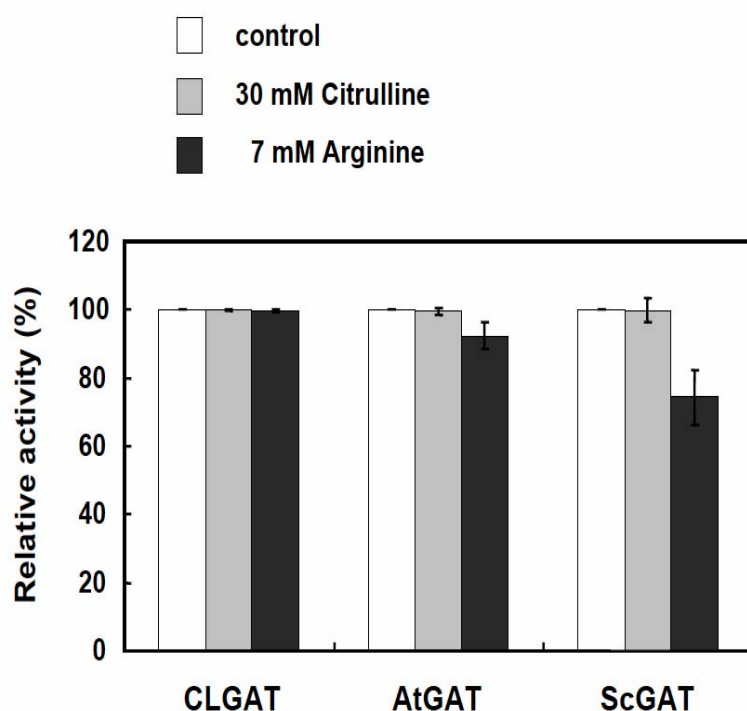


Figure 3-14. 各GATに対するアルギニンとシトルリンの影響
白抜きがコントロール、灰色が30 mMシトルリン存在下でのGAT活性、黒色が7 mMアルギニン存在下でのGAT活性。データは、3回のアッセイの平均±標準誤差を示した。

3-4. 考察

シトルリンは、既存の適合溶質の中で最も優れたヒドロキシルラジカル消去能を示し、野生スイカに酸化ストレス耐性をもたらしていると考えられている (Akashi et al., 2001)。経路の研究が進んでいる微生物では、細胞内のシトルリン濃度は、フィードバック阻害や転写制御などの厳密な制御により低く保たれていることが報告されている (Thompson, 1980; Cunin et al., 1986; Mass, 1994)。それに対して野生スイカは、乾燥強光ストレスに応答してシトルリンを葉内に高濃度蓄積するため、濃度を低く保つような制御を打破し、経路の流量を増大させるような機構を持つと考えられる。しかしながら、シトルリン蓄積機構はほとんど明らかになっていない。これまでの研究により、乾燥により誘導されるAODホモログであるDRIP-1がシトルリン蓄積に関与していることが報告されていたが (Kawasaki et al., 2000)、DRIP-1の機能は明らかになっていなかった。本研究により、DRIP-1が高発現している乾燥強光ストレスを受けた葉において、AOD活性は検出されず、GAT活性が検出された (Fig. 3-3)。このことから野生スイカは、リニア経路ではなく、GATが第5段階を担うアセチルリサイクル経路によりシトルリンを生合成することが明らかになった。次にCLGATを野生スイカの葉から精製、同定した。これは、植物GATを解析した初めての報告である。

3-4-1. 乾燥強光時の葉内環境とCLGATの酵素学的特性

乾燥強光下で植物は、水の損失を避けるために気孔を閉鎖する。そのため、蒸散速度が低下し、気化熱が低下することにより葉面温度が上昇する (Radin et al., 1991)。本研究では、野生スイカの葉面温度は、乾燥強光ストレスにより30から44°Cに上昇していた (Fig. 2-5)。野生スイカが生育する砂漠環境において、乾燥強光ストレスを受けた野生スイカは、葉面温度を60°Cまで上昇させることが報告されている (Larcher, 1995)。本研究において解析したCLGATの至適温度は、AtGATやScGATと比較して20~30°C高い70°Cであり、好熱性細菌*Bacillus stearothermophilus*のGATの至適温度に匹敵する高い値を示した (Marc et al., 2000)。さらに、CLGATの熱安定性もAtGATやScGATと比較して約20°C高く、*B. stearothermophilus*のGATが75°Cで30分間のインキュベーションにより活性を失うのに対し、CLGATは80°Cで30分間インキュベーションしても15%活性を保持していた (Marc et al., 2000)。以上の結果から、CLGATはその他植物のGATと異なり、乾燥強光時の高い葉面温度に適応した性質を獲得していることが考えられる。

乾燥強光ストレスを受けた野生スイカは、葉内にシトルリンとアルギニンをそれぞれ30及び7 mMも高濃度蓄積する (Kawasaki et al., 2000)。そこで、GATが経路の下流の代謝産物であるシトルリンやアルギニンによりどの程度阻害を受け

るのか解析した。その結果シトルリンを蓄積する野生スイカのCLGATは、シトルリンを蓄積しない生物由来であるAtGATやScGATと同様にシトルリンにより阻害を受けなかった (Fig. 3-16)。このことから、GATは生物種に関係なく、シトルリンによりフィードバック阻害を受けないと考えられる。一方、AtGATやScGATは、7 mMのアルギニンにより活性を8及び26%阻害されたのに対して、CLGATはアルギニンによる活性を阻害は認められなかった (Fig. 3-14)。酵母のGATは、5 mMのアルギニン存在下で活性が10%阻害されることが報告されており (Crabeel et al., 1997)、リコンビナントScGATの解析結果を支持している。その他の報告として、これまでに*Thermus aquaticus* ZO5のGATがアルギニンにより強く阻害されること ($K_i = 1.75$ mM; Van de Castele et al., 1990)、そして*Thermus thermophilus* HB27のGATはアルギニンにより弱く阻害されること ($K_i = 26$ mM; Baetens et al., 1998)が報告されている。これらのことから、CLGATはGATファミリーの中でもアルギニンに対して非感受性であり、乾燥強光時のアルギニンが細胞内に高蓄積した条件下でも機能し続ける性質を持っていると考えられる。ところで、微生物のGATは触媒反応生成物であるオルニチンにより阻害されることが報告されている (Liu et al., 1995; Marc et al., 2000)。乾燥強光時の野生スイカは葉内にオルニチンを約0.1 mM蓄積する (Kawasaki et al., 2000)。この濃度は、報告されている微生物のGATのオルニチンに対する K_i 値1~3 mMより1オーダー低いことから (Marc et al., 2000)、乾燥強光時の野生スイカ葉において、CLGATはオルニチンによりほとんど阻害されていないと推察される。

CLGATの酵素学的諸性質から、シトルリン蓄積に対するCLGATの役割を議論することができる。CLGATは乾燥強光に伴い活性を増加させないが (Fig. 3-3)、葉面温度が30から44°Cに増加することにより活性を増加させると考えられる。Fig. 3-11Fに示すCLGATのアレニウスの式 ($\log V = -1920/T + 6.81$; V は反応速度; T は反応温度) から30°C、44°Cにおける活性を算出すると、44°Cにおける活性は、30°Cにおける活性の約2倍であると算出される。さらにCLGATの基質であるグルタミン酸は、乾燥強光に伴い2.5から7.5 mMに増加することから (Kawasaki et al., 2000)、Fig. 3-11Cに示すグルタミン酸に対するラインウェーバー・バークの式 ($1/V = 0.14/S + 0.0079$)からグルタミン酸が2.5、7.5 mMにおけるCLGATの活性を算出した。その結果、グルタミン酸が2.5 mMから7.5 mM増加したとき、CLGAT活性は約2.5倍になると算出される。CLGATはシトルリン生合成第5段階だけでなく、初発段階も触媒することから、CLGATは乾燥強光に伴う基質の増加と反応温度の上昇により、経路へのグルタミン酸骨格の流量を約5倍に増加させることが示唆される。このようにCLGATは、高い熱安定性や下流代謝産物によるフィードバック阻害の欠如というユニークな性質を獲得することで、シトルリン蓄積に貢献していると考えられる。

3-4-2. CLGATの局在

GFP融合タンパク質を用いた局在解析により、CLGATは葉緑体タンパク質であると示唆された (Fig. 3-10)。酵母や*Neurospora crassa*において、GATを含むオルニチン生合成酵素はミトコンドリアタンパク質であり (Liu et al., 1995; Crabeel et al., 1997; Jaumiaux et al., 1978; Davis, 1986)、生合成されたオルニチンは細胞質へ輸送され、シトルリンを介しアルギニンに代謝される (Jaumiaux et al., 1978; Crabeel et al., 1996; Davis, 1986)。動物では、オルニチンは植物や微生物と異なりプロリン生合成の前駆体であるグルタミン酸セミアルデヒドから生合成され、ミトコンドリアにおいてornithine carbamoyltransferase (OCT)によりシトルリンへと代謝された後、細胞質でアルギニンへと変換される (Caldovic and Tuchman, 2003)。一方、植物ではシトルリン代謝酵素の局在の知見はほとんどないが、*Canavalia lineate*においてシトルリン生合成第6段階をになうOCT、ならびにイネにおいて生合成第2段階をになう*N-acetylglutamate kinase* (AGK) が葉緑体に局在することが報告されている (Lee et al., 2001; Sugiyama et al., 2004)。このことから、植物におけるシトルリン生合成は、葉緑体で起こるかもしれない。実際、シロイヌナズナのシトルリン生合成を担う6つの酵素は、さまざまな局在予想プログラムにより葉緑体移行シグナルペプチドを持つことが予測されている (Slocum, 2005)。葉緑体は、余剰光エネルギーによりヒドロキシルラジカルが盛んに産出する器官である。このような器官でシトルリンを生合成することで、ヒドロキシルラジカルと即座に反応し、細胞内に傷害が広がるのを防いでいるのかもしれない。

3-4-3. CLGATタンパク質の生合成

CLGATは、ひとつの前駆体ポリペプチド由来の α 、 β の2つのサブユニットから構成される (Fig. 3-6)。精製したCLGATの β サブユニットの*N*末端アミノ酸配列は、CLGATのcDNAから推定される高度に保存されたモチーフであるATMLの自己触媒的切断サイトのアミノ酸配列と一致した。このことから、CLGATは、他生物のGATにおける報告と同様に、前駆体タンパク質が自己触媒的に切断され2つのサブユニットを生成し、それらが会合して $\alpha 2 \beta 2$ ヘテロ4量体を形成することが示唆された (Marc et al., 2000, 2001; Abadjieva et al., 2000)。GATの自己触媒的切断は、保存モチーフのスレオニンの側鎖のヒドロキシル基の酸素分子が、アラニンの α 位のペプチド結合を形成する炭素に求核攻撃することで形成した反応性の高いエーテル結合が加水分解されることで起こると考えられている (Fig. 3-15; Marc et al., 2001; Paulus, 2000)。植物において、このような機構で自己触媒的切断を起こすタンパク質はいくつか報告されているが (Perler, 1998; Paulus,

2000)、自己触媒的切断を起こす葉緑体タンパク質としては、CLGATが初めての例である。CLGATは、翻訳後の自己触媒的切断、葉緑体への移行、そして多量体の形成と多数の段階を経て生合成されることが明らかになったが、その生合成がどのような順番で成し遂げられるのかは明らかになっていない。

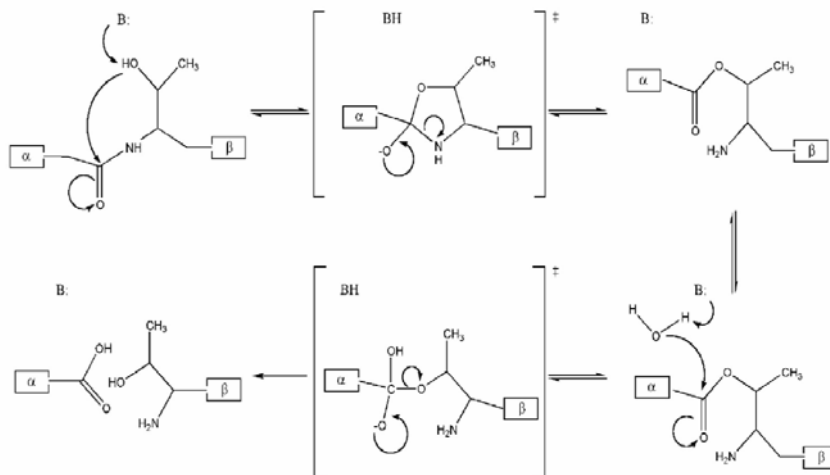


Figure 3-15. GATの自己触媒的切断の分子機構
(Marc et al., 2001より引用)

このCLGATの生合成について2つの可能性が考えられる。ひとつは、CLGATは細胞質で自己触媒的に切断され、 α 、 β サブユニットが個別に葉緑体に輸送されるという可能性である (Fig. 3-16A)。ミトコンドリアに局在する酵母のGATでは、 α サブユニットはミトコンドリア移行シグナルペプチドによりミトコンドリアに輸送される。一方、 β サブユニットは、酵母に単独で発現させたとき、ミトコンドリア移行シグナルペプチドを持たないにもかかわらず、約60%がミトコンドリアに局在することが明らかになっている (Abadjieva et al., 2000)。この報告は、 β サブユニット単独でも細胞小器官に移行しうると考えられ、この可能性を支持している。一方もうひとつは、CLGATは翻訳され葉緑体に移行した後に、葉緑体内で自己触媒的切断が起こるという可能性である (Fig. 3-16B)。本研究でシグナルペプチドを取り除いたGATのN末端側にChitin binding domain-Inteinを融合させ、大腸菌で発現させたとき、自己触媒的切断を起こしていなかった (Fig. 3-12)。*Streptomyces clavuligerus*のGATの結晶構造解析から、GATのN末端は、自己触媒切断が起こる部位に近接している (Elkins et al., 2005)。そのため、GATのN末端側に融合させたドメインが、自己触媒的切断を起こす部位の折り畳みを阻害し、その結果自己触媒的切断が起こらなかったと考えられる。以上のことから、葉緑体移行シグナルペプチドがN末端に存在するときは、Chitin binding domain-Intein融合GATと同様に自己触媒的切断を阻害し、シグナルペプチドが切断され葉緑体へ輸送されたときに初めて自己触媒的切断が起こるのかもしれない。

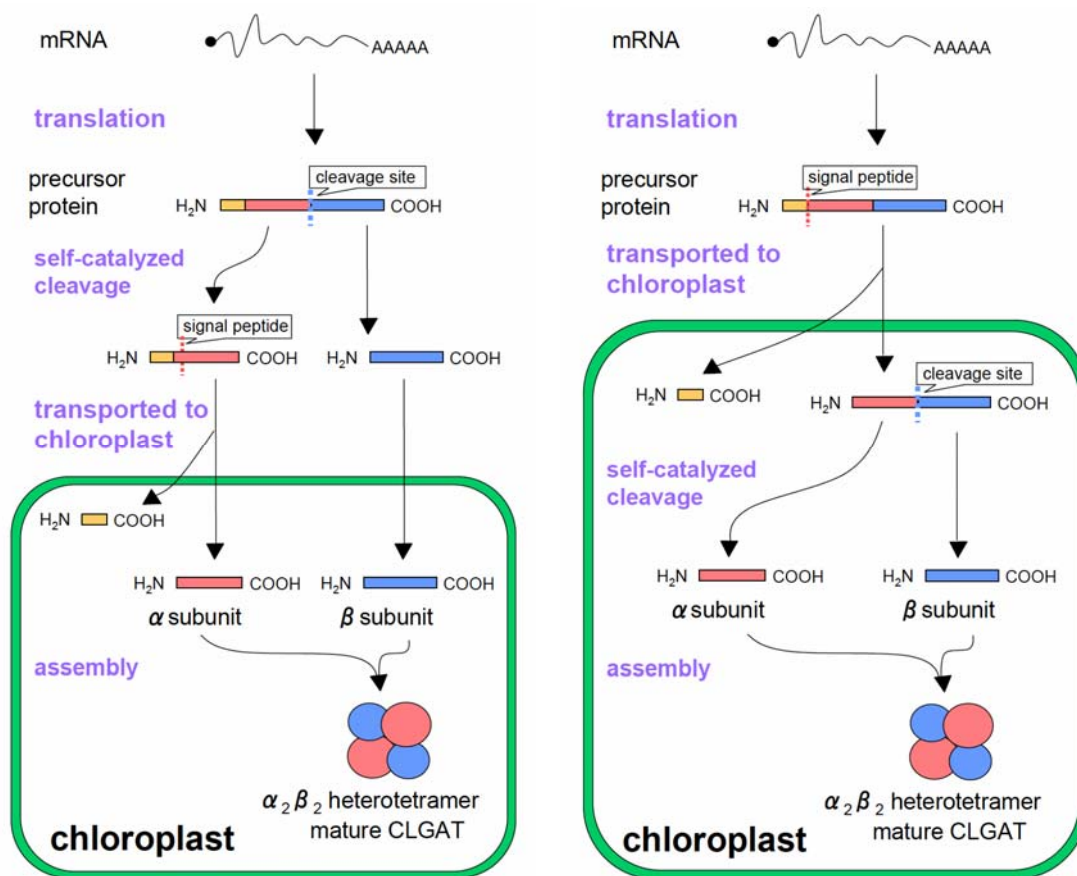


Figure 3-16. CLGATの生合成の2つのモデル

A. CLGATは翻訳後、細胞質で自己触媒的切断を起こし、精製した2つのサブユニットが個別に葉緑体に移行し成熟CLGATを形成するモデル。B. CLGATは翻訳後、葉緑体に輸送され、葉緑体内で自己触媒的切断を起こし、精製したサブユニットが成熟タンパク質を形成するモデル。

3-4-4. DRIP-1タンパク質の機能

乾燥誘導性タンパク質であるDRIP-1は、シトルリン生合成第5段階を触媒するAODのホモログであるが、その機能は未解明である。本研究から、DRIP-1が高発現した乾燥強光ストレスを受けた野生スイカの葉からは、AOD活性が検出されなかった (Fig. 3-3)。さらにDRIP-1遺伝子は、大腸菌のAOD欠損株を相補できなかった (Fig. 3-4)。その上、精製DRIP-1タンパク質にさまざまな活性化因子や補因子を加えAOD活性を測定したが、活性は検出されなかった (Table. 3-1)。以上の結果から、DRIP-1タンパク質はAOD活性を持っていないと考えられる。そのため、DRIP-1とシトルリン蓄積との関連は不明である。

これまでの報告で、カボチャにおいてDRIP-1と87%の相同性を示すSLWI遺伝

子が、傷害や脱水ストレスに応答して発現誘導されることが明らかになっている (Wihelmina et al., 2000)。また、キュウリの師管液の主要タンパク質の同定を行ったところ、多くの酸化ストレス耐性関連タンパク質が同定され、その中にキュウリのDRIP-1ホモログも含まれていた (Walz et al., 2004)。さらに本研究室の解析により、野生スイカにおいてDRIP-1は、花器官においても多量に発現していた (澤江、2006)。花器官は、ストレス関連タンパク質が多く発現しているという報告がある (Defny-Yelin et al., 2005)。以上のことからDRIP-1は、ストレス関連タンパク質であることが強く示唆される。今後、DRIP-1のRNAi発現抑制形質転換体を用いた解析や、精製DRIP-1タンパク質を用いた生化学的解析により、この機能が明らかになることが期待される。

第4章 シトルリン代謝の鍵酵素とその制御

4-1. 序論

第3章において、シトルリン生合成第5段階をGATが担うアセチルリサイクル経路をもつことが明らかになり、野生スイカにおけるシトルリン代謝経路が明らかになった。また、CLGATは、乾燥強光時の葉内環境に対応した性質を持つことでシトルリン蓄積に貢献していると考えられた。しかしながらその他のシトルリン代謝酵素を解析していないことから、シトルリン蓄積に対するGATの貢献度は判断できない。それだけでなく、シトルリン代謝経路の中でGAT以外にも蓄積の鍵酵素が存在する可能性がある。

蓄積機構の解析が進んでいるプロリンは、グルタミン酸を出発物質とし、glutamate semialdehydeと Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate (P5C)を介する3段階反応により生合成されるが、ストレスにより初発の2段階を触媒するP5C synthaseが強く発現誘導されることが明らかになっている(Abraham et al., 2003; Oono et al., 2003; Ginzberg et al., 1998)。またプロリンの分解は、proline dehydrogenase (PDH)とP5C dehydrogenaseにより触媒される2段階からなるが、ストレス時にPDHは強く発現抑制されることが報告されている (Abraham et al., 2003; Miller et al., 2005)。これらの報告からプロリン蓄積は、生合成の初発段階を活性化させ、経路への流量を増大させ、またプロリン分解の初発段階を抑制することにより成し遂げられると考えられている。

また、ホウレンソウやサトウダイコンにおいて蓄積するグリシンベタインは、コリンを出発物質とし、choline monooxygenase (CMO)とbetaine aldehyde dehydrogenase (BADH)により2段階酸化されることで葉緑体において生合成される (Sakamoto and Murata, 2000)。さらにコリンは、細胞質でphosphoethanolamine (PE)の3段階のメチル化、及び脱リン酸化により生合成され、葉緑体に輸送される (Smith et al., 2000)。このグリシンベタインの蓄積の鍵酵素は、S-adenosyl-L-methionine (SAM)のメチル基をPEに転移することでコリン生合成の初発を担うphosphoethanolamine N-methyltransferaseと、CMO、そしてBADHであり、この3酵素遺伝子の発現、及びその活性がストレスにより増加することが明らかになっている (Rathinasabapathi et al., 1997; Weretilnyk et al., 1990; McCue and Hanson, 1992; Nuccio et al., 2000)。さらに脱メチル化したSAMを再合成する経路の酵素であるS-adenosylhomocysteine hydrolaseやadenosine kinaseの活性が、ストレスにより増加することが報告されている (Weretilnyk et al., 2001)。これらの報告からグリシンベタイン蓄積は、生合成を担う酵素群の全体的に活性化され、経

路の流量が高まることで起こると考えられている。

これらの他の適合溶質の蓄積機構の例から、シトルリンの蓄積においても、細胞内環境に適応したGATのような鍵酵素だけでなく、遺伝子発現及び活性がストレスにより大きく変動する鍵酵素が存在すると予測された。ところが、シトルリン代謝は、生合成を担う7酵素と異化を担う4酵素からなる非常に複雑な経路であるため (Thompson, 1980; Slocum, 2005)、鍵酵素を予測して解析することは非常に困難である。シトルリン蓄積機構の解析する研究方向として、これまで解析されてきた適合溶質の蓄積機構の研究のように、生合成経路の酵素遺伝子を同定し、その発現解析により鍵酵素を決定する方法が挙げられる (Chen and Murata, 2002; Nuccio et al., 1999; Rontein et al., 2002)。しかしながら、野生スイカの遺伝情報が乏しいこと、また遺伝子発現の変動が必ずしもタンパク質発現や活性と相関しないことから、生合成経路の酵素群の活性を測定することが最も現象を忠実に捉えられると考えられた。

代謝変動の全体像を明らかにするためには、経路の全酵素を解析するにあたって全酵素活性は同一抽出液で測定することが望ましい。そのためには、全酵素の活性測定法が迅速、かつ簡便であることが重要である。また粗抽出液において活性測定を行うので、その活性測定法は高感度で特異的に生成物を検出できる必要がある。しかしながら、シトルリン代謝酵素に関して既存の活性測定法の中には、反応生成物が検出困難であることから、粗抽出液を用いた測定には不適切な測定法がある (Haas and Leisinger, 1975)。またほとんどの活性測定法が、反応停止後に反応生成物を検出する方法であり、時間がかかり多量のサンプルを扱うのに適していない (Abadjieva et al., 2001; Albrecht and Vogel, 1964; Liu et al., 1995; O'Brien, 1979; Davis et al., 1980)。そのため、活性検出がリアルタイムで行えるような活性測定法が必要であった。

そこで本章では、第一にシトルリン代謝を担う全酵素活性を迅速、簡便に測定するために、酵素カップリング反応を利用して活性を吸光度変化としてリアルタイムに測定できる活性測定法を確立した。次にシトルリン蓄積の鍵酵素を明らかにするために、確立した活性測定法を用いてシトルリン代謝を担う全11種の酵素活性を乾燥強光前後の野生スイカ葉抽出液から測定し、経路の全体的な代謝の流れを考察した。さらに、葉緑体内の窒素量を制御すると報告されているP_{II} proteinがシトルリン生合成第2段階を担うAGKを制御するという報告 (Maheswaran et al., 2004; Chen et al., in press)と、AGKが乾燥強光に伴い活性増加していたことから、P_{II} proteinとAGKの関連を解析した。

4-2. 材料と方法

4-2-1. 試薬

N-acetylornithine、acetyl-CoA、そしてargininosuccinateはSigma (St. Louis, MO) から購入した。ATP、NADP⁺、NADPHはオリエンタル酵母 (Tokyo, Japan)から購入した。その他の試薬はNakalai (Kyoto, Japan)より購入した。またカップリング酵素として用いたureaseは、Calbiochem (San Diego, CA)、Glutamate dehydrogenaseは、Biogenesis (Poole, UK) から購入した。

4-2-2. 菌株と培養条件

大腸菌BW25113 (*lacI^f rrnB_{T14} ΔlacZ_{WJ16} hsdR514 ΔaraBAD_{AH33} ΔrhaBAD_{LD79}*)由来の大腸菌のアルギニン生合成酵素欠損株 (AGS欠損株, JW2786; AGK欠損株, JW5552; AOAT欠損株, JW3322; ArgR欠損株, JW3206)は、KO collection (Systematic Knock Out strain of *E. coli* K-12; GenoBase: <http://ecoli.aist-nara.ac.jp/GB5/search.jsp>) から分譲を受けた (Mori, 2004)。

4-2-3. 野生スイカの生育条件

2-2-1と同様の条件で 野生スイカを栽培し、サンプリングした。

4-2-4. 大腸菌からのタンパク質抽出

大腸菌は5 mLのLB培地に植菌し、37°Cで一晩前培養した。300 mLのフラスコ中に100 mLのLB培地を加え、前培養した大腸菌を1000倍希釈で植菌し、37°CでA₆₀₀が1.0になるまで培養した。8000 g、30分間の遠心分離により集菌した後に、20 mM potassium phosphate buffer (pH 7.5)、1 mM EDTA、1 mM DTT、20% (v/v) glycerol、そして1 tablet/50 mL protein inhibitor cocktail tabletsからなるタンパク質抽出bufferで懸濁し、超音波破碎を行った。細胞破碎液は、8000 gで30分間遠心分離を行い、タンパク質抽出bufferで平衡化したPD-10カラムで脱塩した。

4-2-5. 野生スイカ葉からのタンパク質抽出

野生スイカの葉0.5 gに、100 mM HEPES, pH 7.6, 5(w/v) PVPP, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 1 mM PMSFからなるタンパク質抽出bufferを2.5 mL加え、乳鉢ですりつぶした。得られた植物抽出液は、12,000 g で30分間遠心後、上清を100 mM HEPES, pH 7.6, 1 mM EDTA, 1 mM DTTからなるbufferで平衡化した PD-10カラムで脱塩ならびにbuffer交換し、活性測定に用いた。

4-2-6. 大腸菌リコンビナントタンパク質発現系の構築

大腸菌JM109のゲノムDNAを鋳型として、AGK、AGPR、そしてAOAT酵素遺伝子をPCRで増幅させた。それぞれのprimerは次のとおりである。

AGK forward 5'-GGAATTCCATATGATGAATCCATTAATTAT-3'
reverse 5'-CGCGGATCCGGCCAACAAACTTAAGCTAA-3'
AGPR forward 5'-GGAATTCCATATGTTGAATACGCTGATTGT-3'
reverse 5'-CGCGGATCCAGCAGTACGCCGCCAGTTTG-3'
AOAT forward 5'-AATTGGCCATATGGCAATTGAACAAACAGC-3'
reverse 5'-CGCGGATCCGACATCTTTTGCCTGATGCTT-3'

下線部は、forward primerが*Nde*I、reverse primerが*Bam*HIの制限酵素サイトを示している。得られた酵素遺伝子は、N末端に6個のヒスチジンタグが融合するように、pET-15b vector (Novagen, Madison, WI)の*Nde*Iと*Bam*HIクローニングサイトに挿入した。塩基配列の確認は3-2-8で述べたのと同様の方法で行った。

4-2-7. リコンビナントタンパク質の精製

各酵素遺伝子の発現コンストラクトを*E.coli* BL21 (DE3) pLysS (Invitrogen, Carlsbad, CA)に形質転換した。この大腸菌を50 µg/mLのAmpicillinならびに30µg/mLのchloramphenicolを含む100 mLのLB培地に植菌し、37°Cで振盪培養した。培養液のOD₆₀₀が0.4に達したときにIPTGを終濃度1 mM加え、3時間培養し、タンパク質の発現誘導を行った。8000 gで30分間の遠心分離により菌体を収集した後、50 mM potassium phosphate (pH 7.5)、300 mM KCl、そして10 mM imidazolからなるbinding bufferに懸濁し、超音波破碎を行った。細胞懸濁液を8000 gで30分間遠心分離を行い、得られた上清を生成に用いた。精製は、カップリング酵素のN末端に付加したHis-tagを利用した。タンパク質抽出液を、binding bufferで平衡化したbed volume 1 mLのBD TALON Metal Affinity Resin (BD Biosciences Clontech, Palo Alto, CA)に供し、50 bed volumeのbinding bufferでタンパク質が検出されなくなるまで十分に洗浄した。そして50 mM potassium phosphate (pH 7.5)、300 mM KCl、そして150 mM imidazolからなるelution bufferでタンパク質を溶出し、精製タンパク質を得た。得られた精製タンパク質は、20 mM potassium phosphate (pH 7.0)、20%(v/v) glycerolからなるbufferで平衡化したPD-10カラムに供し、buffer交換を行った。すべての操作は、氷上または4°Cで行った。得られた精製得られたタンパク質を12.5%のpolyacrilamide gelで展開し、Coomassie Brilliant Blue R-250により染色を行い、精製度を確認した。

4-2-8. N-acetylglutamate 5-semialdehydeの合成と精製

N-acetylglutamate 5-semialdehydeの合成は、酵素反応を利用して行った

(Wandinger-Ness et al., 1985)。100 mM potassium phosphate (pH 7.0)、0.14 M α -ketoglutarate、0.12 M *N*-acetylornithine、そして5 μ M pyridoxal phosphateからなる反応溶液に100 μ gのリコンビナントAOATを加え10 mLとし、30°Cで3時間反応させた。反応停止は3分間の熱処理で行い、12000 gで10分間遠心分離を行い析出したタンパク質を取り除いた。得られた上清は、12 NのHClを0.4 ml加え酸性化し、そのうち1 mLを0.1 N HClで平衡化したDowex AG50W-X8 ion exchange columns (H⁺ form, 0.7 cm i.d. \times 12 cm)に供した。そして10 mLのH₂Oで溶出し、*N*-acetylglutamate 5-semialdehydeを得た。得られた溶液は、凍結乾燥し、1 mLのH₂Oで溶解した後に、4 NのNaOHでpHを7.0に調整した。

4-2-9. *N*-acetylglutamate 5-semialdehydeの定量

N-acetylglutamate 5-semialdehydeの定量は、glutamate 5-semialdehydeと*o*-aminobenzaldehydeのカップリング反応により生成する色素を利用して行った(Albrecht and Vogel, 1964)。適量のサンプルをH₂Oで0.25 mLにメスアップし、0.15 mLの6 N HClを加えて90°Cで30分間反応させ、*N*-acetylglutamate 5-semialdehydeのアセチル基を加水分解する。反応液は、室温まで冷ました後に、3.6 mMの酢酸ナトリウムを0.5 mL加え、反応を停止させた。得られたglutamate 5-semialdehyde溶液に0.1 mMの*o*-aminobenzaldehydeを加え室温で15分間反応させ、その溶液の440 nmの吸光度を測定した。得られた溶液の440 nmの吸光度0.1が43 nmolのglutamate 5-semialdehydeに相当する(Albrecht and Vogel, 1964)。

4-2-10. シトルリン代謝酵素の活性測定

以下の活性測定における吸光度は、U-3000 spectrophotometer (Hitachi, Tokyo)を用いて測定した。また、すべての活性測定は、30°Cで行い、buffer、基質、そして補因子からなる反応溶液は、前もって30°Cに平衡化した。これらの反応溶液は、活性測定を行う直前に調整した。断りのない限り、酵素溶液を加えることで反応開始とした。

4-2-10-1. AGSの活性測定

AGS活性は、AGSの反応生成物である*N*-acetylglutamateを基質としてAGKとAGPRのカップリング反応により生成するNADP⁺を、340 nmの吸光度 ($\epsilon=6220 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)の変化から測定した。反応溶液は、100 mM Tris-HCl (pH 9.0)、2 mM acetyl-CoA、10 mM glutamate、10 mM ATP、20 mM MgCl₂、0.2 mM NADPH、そしてargC 50 μ g、argB 20 μ gからなる。以下断りのない限り、glutamateを除いた反応溶液から得られた吸光度をリファレンスとした。AGS活性の1 unitは、30°Cで1分間にNADPHが1 μ molの酸化する速度に相当する。

4-2-10-2. AGKの活性測定

AGK活性は、AGPRとのカップリング反応により生成するNADP⁺を、340 nmの吸光度により定量することで測定した。反応溶液は、100 mM HEPES-KOH (pH 7.6)、10 mM *N*-acetylglutamate、10 mM glutamate、10 mM ATP、20 mM MgCl₂、0.2 mM NADPH , そしてargC 20μgからなる。以下断りのない限り、*N*-acetylglutamateを除いた反応溶液から得られた吸光度をリファレンスとした。AGK活性の1 unitは、30°Cで1分間にNADPHが1 μmolの酸化する速度に相当する。

4-2-10-3. AGPRの活性測定

AGPR活性は、逆反応の反応生成物であるNADPHを340 nmの吸光度により定量することで測定した (Vogel and McLellan, 1970)。反応溶液は、100 mM glycine-NaOH (pH 9.0)、2 mM *N*-acetylglutamate 5-semialdehyde、20 mM potassium phosphate (pH 9.0)、0.4 mM NADP⁺からなる。AGPR活性の1 unitは、30°Cで1分間にNADPHが1 μmolの生成する速度とした。

4-2-10-4. AOATの逆反応の活性測定

AOAT活性は、AOATの逆反応を測定することで見積もった (Vogel and Jones, 1970)。AOATの逆反応により生成する*N*-acetylglutamate 5-semialdehydeを基質としたAGPRのカップリング反応により生成するNADPHを、340 nmの吸光度により定量することで測定した。反応溶液は、100 mM glycine-NaOH (pH 9.0)、10 mM *N*-acetylornithine、10 mM α-ketoglutarate、5 μM pyridoxal phosphate、20 mM potassium phosphate (pH 9.0)、0.4 mM NADP⁺、そして100 μgのArgCからなる。以下断りのない限り、*N*-acetylornithineを除いた反応溶液から得られた吸光度をリファレンスとした。AOAT活性の1 unitは、30°Cで1分間にNADP⁺が1 μmolの還元する速度に相当する。

4-2-10-5. GATの活性測定

GAT活性は、AGS活性測定法と同様にAGKとAGPRのカップリング反応により生成するNADP⁺を、340 nmの吸光度により定量することで測定した。反応溶液は、100 mM HEPES-KOH (pH 7.6)、10 mM *N*-acetylornithine、10 mM glutamate、10 mM ATP、20 mM MgCl₂、0.2 mM NADPH , そしてargC 50μg、argB 20μgからなる。以下断りのない限り、glutamateを除いた反応溶液から得られた吸光度をリファレンスとした。GAT活性の1 unitは、30°Cで1分間にNADPHが1 μmolの酸化する速度に相当する。

4-2-10-6. OCT及びCPSの活性測定

OCT活性は、生成するシトルリンをdiacetyl monoximeと反応させることで生成する色素を定量するFeron反応を利用した (Boyde and Rahmatullah, 1980)。また、CPS活性は、CPSの反応生成物であるcarbamoyl phosphate基質とするOCTのカップリング反応により生成するシトルリンを、Feron反応により定量することで測定した (Rubino et al., 1986)。これらの活性測定法の検討は、芳野の修士論文 (2006)に詳細に記載している。

4-2-10-7. ASSの活性測定

ASS活性の測定は、ASS反応の基質であるシトルリンの減少量をFeron反応で定量する方法である (Ratner, 1973; Hwang et al., 1996)。反応溶液は、100 mM HEPES-KOH (pH7.6)、1 mM citrulline、10 mM aspartate、10 mM ATP、そして10 mM MgCl₂からなる。反応後、反応液100 µlに50%(w/v) trichloroacetic acid溶液を25 µl加え、4°C、13000 gで3 分間遠心分離した。得られた上清を100 µl回収し、chromogenic reagentを900 µlずつ加え、90°Cで10分間反応した。反応液を室温まで冷ました後、530 nmの吸光度を測定した。Chromogenic reagentは、thiosemicarbazide 1 mgを0.5%(w/w) diacetyl monoxime 溶液10 mlに溶解し、acid-ferric solution (25%(v/v) conc.H₂SO₄、20%(v/v) conc.H₃PO₄、FeCl₃ (250 mg/L)) を20 ml加えた試薬である (Boyde and Rahmatullah, 1980)。ASS活性の1 unitは、30°Cで1分間にcitrullineが1 µmol消費する速度に相当する。

4-2-10-8. ASLの活性測定

ASL活性の測定は、ASS反応生成物であるフマル酸を240 nmの吸光度で定量する方法である (Havir et al., 1965; Hwang et al., 1996)。反応溶液は、100 mM HEPES-KOH (pH 7.6)、2 mM argininosuccinateからなる。argininosuccinateを除いた反応溶液から得られた吸光度をコントロールとした。フマル酸量は、モル吸光係数2440 M⁻¹ cm⁻¹で算出した (Alberty et al., 1954)。ASS活性の1 unitは、30°Cで1分間にフマル酸が1 µmolの生成する速度である。

4-2-10-9. Arginaseの活性測定

Arginase活性は、Arginaseの反応生成物であるureaを基質とするureaseとGDHのカップリング反応により生成するNADP⁺を、340 nmの吸光度により定量することで測定した (Ozer, 1985)。反応溶液は、100 mM Tris-HCl (pH 9.0)、250 mM arginine、10 mM α-ketoglutarate、0.2 mM NADPH、そしてurease 10 U、GDH 50 Uからなる。以下断りのない限り、arginineを除いた反応溶液から得られた吸光

度をリファレンスとした。Arginase活性の1 unitは、30°Cで1分間にNADPHが2 μ molの酸化する速度に相当する。

4-2-10-10. Ureaseの活性測定

urease活性は、GDHのカップリング反応により生成するNADP⁺を、340 nmの吸光度により定量することで測定した (Kaltwasser & Schlegel, 1966)。反応溶液は、100 mM Tris-HCl (pH 9.0)、100 mM urea、10 mM α -ketoglutarate、0.2 mM NADPH、そしてGDH 50 Uからなる。以下断りのない限り、ureaを除いた反応溶液から得られた吸光度をリファレンスとした。urease活性の1 unitは、30°Cで1分間にNADPHが2 μ molの酸化する速度に相当する。

4-2-11. 野生スイカからP_{II} 遺伝子の単離

3-2-8で述べたMarathon cDNA Amplification Kitを用いて5'ならびに3'-RACE法によりP_{II} 遺伝子を単離した。primerは、本研究室により作製されたEST databaseに登録されていたイネのP_{II} 遺伝子と相同性を示すEST clone (clone number ROS_072_F05.b)をもとに作製した。作製したP_{II} 遺伝子特異的なprimerは、以下の4本である。

PII5a	5'-GGTGGATCTACAGAGAGGCATGGTGGGT-3'
PII5b	5'-CAGAGAGGATGACCGGAGGGCGATAACG-3'
PII3a	5'-CGCCCTCCGGTCATCCTCTCTGCTC-3'
PII3b	5'-CTCCATGGCCTGAGGATAGCCTCCAC-3'

5'-RACEは、first PCRにPII 5aを用い、second PCRにPII 5bを用いた。3'-RACEには、first PCRにNot1 primerとPII 3aを用い、second PCRにはNot2 primerとPII 3bを用いて行った。以下、クローニングとシーケンスは、3-2-8に従った。

4-2-12. ウェスタンブロッティング

3-2-7に従った。そして抗体染色には、PII抗体 (Sugiyama et al, 2004)を1000倍希釈で用い、その後二次抗体としてgoat anti-rabbit IgG peroxidase conjugate (Funakoshi, Tokyo)を5000倍希釈で用いた。検出は、ECL-Plus kit (Amersham Biosciences Corp, Piscataway, NJ)で付属のプロトコールに従って行った。

4-3. 結果

4-3-1. シトルリン代謝酵素の迅速かつ簡便な活性測定法の考案

全11種のシトルリン代謝酵素の活性を迅速かつ簡便に測定するために、それぞれの酵素に対して、分光学的に簡便に活性が測定できる方法を考案した。特に、反応生成物の検出が困難、または複雑である反応に対しては、その反応生成物を基質とし、検出が容易な生成物を産出するような酵素を利用したカップリング活性測定法を利用した。

まず、AGS、AGK、AOATそしてGATについて、シトルリン生合成第3段階を担うAGPRとカップリングさせる新規活性測定法を考案した。AGPRは、*N*-acetylglutamate 5-phosphate (AGP)とNADPHを基質とし、*N*-acetylglutamate 5-semialdehyde (AGSA)とphosphateとNADP⁺を生成する酵素であり (Fig. 1-5)、この酵素の活性測定は、NADPHの酸化に伴う340 nmの吸光度変化で簡便に測定できる (Fig. 4-1-(3); Vogel and McLellan, 1970)。シトルリン生合成第2段階を担うAGKは、*N*-acetylglutamate (AG)をATPによりリン酸化し、ADPとAGPRの基質であるAGPを生成する (Fig. 1-5)。そのためAGK活性は、反応系にAGPRとNADPHを加えることで、カップリング反応により生成するNADP⁺を340 nmの吸光度で定量することで測定できる (Fig. 4-1-(2))。さらにAGSとGATは、AGK-AGPRのカップリングシステムを利用した活性測定が可能である。AGSはglutamateをacetyl-CoAによりアセチル化し、AGとCoAを生成する酵素である (Fig. 1-5)。またGATは、*N*-acetylornithineのアセチル基をglutamateに転移によりAGSと同様にAGを生成する (Fig. 1-5)。AGSやGATにより生成されるAGはAGKの基質であるため、AGSとGAT反応は、AGK/AGPRとカップリングさせることができる。このカップリング反応を用いた測定系では、AGと等量のNADP⁺が生成し、NADPHの340 nmの吸光度で定量することで活性測定できる (Fig. 4-1-(1), (5))。それに対して、AOATの活性測定は、AGPRの逆反応を利用が可能である。AOATは、AGSAにglutamateのアミノ基を転移して*N*-acetylornithineと α -ketoglutarateを生成する可逆反応を触媒する酵素である (Fig. 1-5)。AGPRは、AOATの逆反応の生成物であるAGSAとphosphateを基質とし、NADP⁺を還元に伴いAGPを生成する。このことから、AOATは、AGPRとカップリングさせることでAGSAと等量生成するNADPHを340 nmの吸光度で定量することで測定できる (Fig. 4-1-(2))。

その他のシトルリン代謝経路の活性測定法は、既存の吸光度により活性が簡便に測定できる方法を用いた (Fig. 4-1)。OCT、CPS及びASS活性はシトルリンを、Feron反応により定量することで測定することとした (Boyde and Rahmatullah, 1980; Rubino et al., 1986; Ratner, 1973; Hwang et al., 1996; Fig. 4-1-(6-8))。その中でもCPSの活性測定法は、活性を高感度に検出できるよう改良した (芳野, 2006)。

ASLの活性測定法は、反応生成物であるフマル酸量を240 nmの吸光度で定量する既存の簡便な方法を用いた (Havir et al., 1965; Hwang et al., 1996; Fig. 4-1-(9))。ureaseとarginaseは、既存のGDHのカップリング反応によりNADPHの減少量を340 nmの吸光度で定量する方法を用いた (Kaltwasser & Schlegel, 1966; Ozer, 1985; Fig. 4-1-(10, 11))。

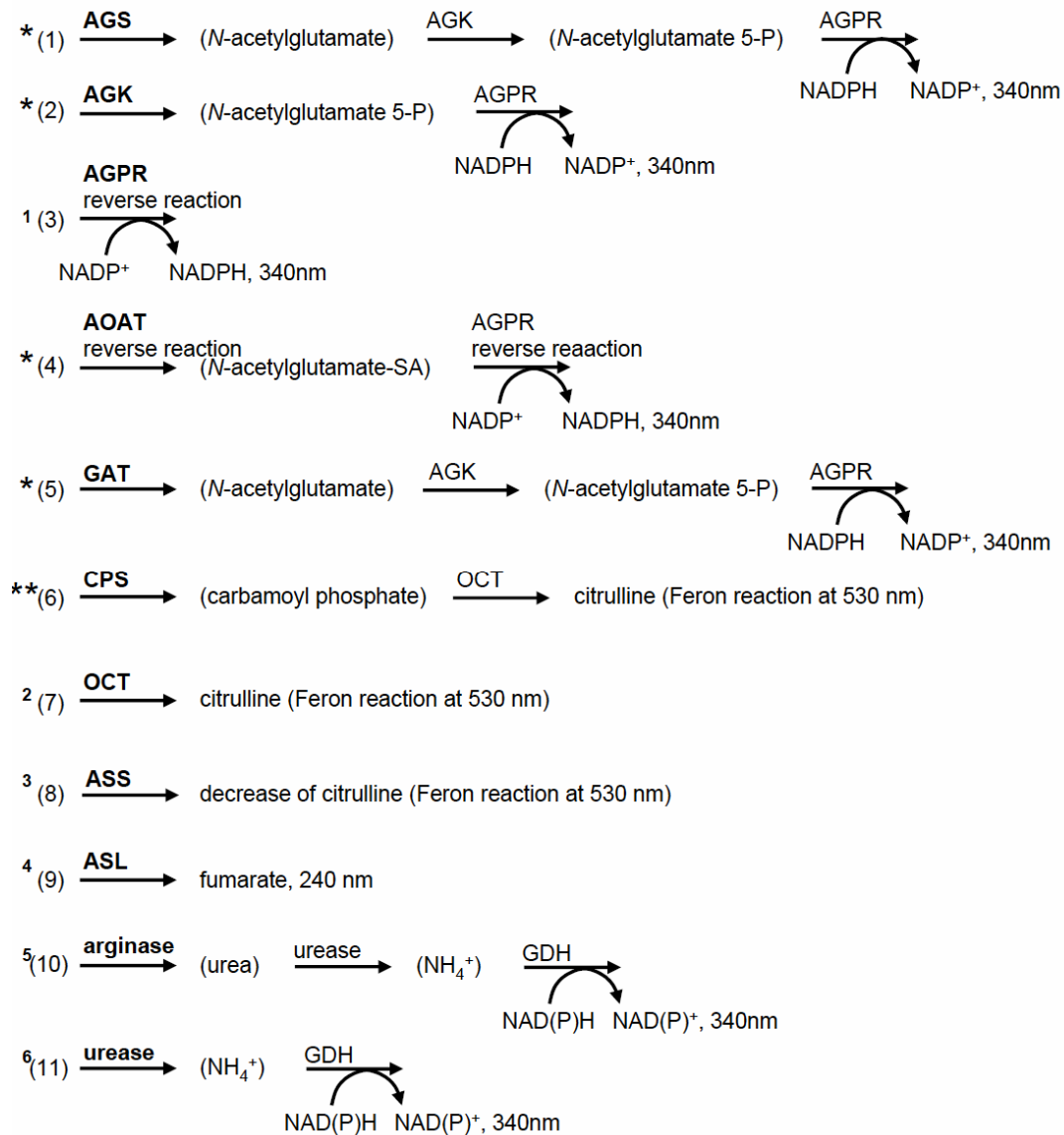


Figure 4-1. 全シトルリン代謝酵素の簡便な活性測定法の考案

標的酵素を太字、共役させる化合物を括弧で示してある。(*)は、新規活性測定法。(**)は、新規活性測定法で芳野の修士論文 (2006)で系を確立した反応。数字は、既存の活性測定法。以下、参考文献を示す。1. Vogel and McLellan, 1970、2. Boyde and Rahmatullah, 1980、3. Ratner, 1973; Hwang et al., 1996、4. Havir et al., 1965; Hwang et al., 1996、5. Ozer, 1985、6. Kaltwasser & Schlegel, 1966

4-3-2. リコンビナントタンパク質発現系の調製

Fig.4-1のアスタリスクで示した新規活性測定法に供するために、大腸菌由来のAGK、AGPR、AOATのリコンビナント酵素を調製した。大腸菌の各酵素遺伝子を持ち、大腸菌においてヒスチジン融合タンパク質として発現させた。各リコンビナントタンパク質に融合させたhistidine-tagを利用して精製し、SDS-PAGEを行ったところ、それぞれの目的の分子量に単一のバンドが観察された (Fig. 4-2)。以下の実験には、これらのリコンビナントタンパク質を用いた。

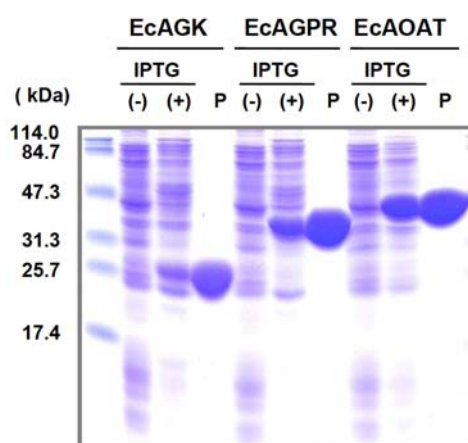


Figure 4-2. 大腸菌のAGK、AGPRそしてAOATの発現と精製

各ゲルのレーンは左からIPTG (-): IPTG添加前の粗酵素溶液、IPTG (+): IPTG添加後の粗酵素溶液、P: BD Taron metal affinity columnにより精製したタンパク質をそれぞれ20 μ g泳動した。泳動後、Coomassie Brilliant Blueで染色した。EcAGK、EcAGPRおよびEcAOATはそれぞれ大腸菌由来のAGK、AGPR、AOAT。

4-3-3. 新規活性測定法の確立

AGS、AGK、AOAT、そしてGAT活性が、上記の新規活性測定法により340 nmの吸光度の変化として検出できるか試験するために、それぞれの反応溶液とその基質、またはカップリング酵素を除いた溶液の340 nmの吸光度の時間変化を観察した。活性測定法の検討に用いた標的酵素表品としては、AGKとAOATは、本章で精製したヒスチジンタグ融合リコンビナントタンパク質を用い、GATは第3章で作製した精製リコンビナントScGATを用いた。AGSの検討には、AGS遺伝子のリプレッサーであるArgRを欠損したためにAGSが多量に発現している大腸菌ArgR欠損株の粗抽出液を用いた (Marvil and Leisinger, 1977; Mass, 1994)。なお、ここでの活性測定では、本章の『材料と方法』のそれぞれの活性測定法で記しているリファレンスは用いていない。

まず、AGKのAGPRによるカップリング活性測定の検討を行った。1mLの反応系に0.4 μ gのAGK と10 μ gのAGPR、そしてAGKの基質を加えたところ、吸光度が大きく減少した (Fig. 4-3A; filled diamonds)。それに対して、基質、もしくはカップリング酵素を反応系から除いたとき、ごくわずかな吸光度が減少しか観察されなかった (Fig. 4-3A)。これは、NADPHの自動酸化による吸光度の変化であると考えられる。この問題は、実際の活性測定では、N-acetylglutamateを除いた

反応液をリファレンスとすることで解決した。以上のことから、AGK活性に起因して吸光度が大きく減少することが明らかになった。次にAGK/AGPRのカップリング反応を用いるGATとAGSについて吸光度の時間変化を測定した。GAT活性測定は、1 mLの反応系に0.1 μg のGAT、カップリング酵素である10 μg のAGKと10 μg のAGPR、そしてGATの基質を加えて反応を開始したところ、吸光度が直線的に減少した(Fig. 4-3B; filled diamonds)。一方、基質、もしくはカップリング酵素を反応系から除いたとき、ほとんど吸光度変化が見られなかった(Fig. 4-3B)。わずかな吸光度の減少の理由は、AGKと同様にNADPHが自己参加したためであると考えられる。そのため、glutamateを除いた反応液をリファレンスとして活性を

測定した。このことから、AGKと同様にGAT活性特異的に吸光度が減少することが示された。AGSの活性測定は、1 mLの反応系に大腸菌ArgR欠損株の粗抽出タンパク質38 μg に20 μg のAGKと50 μg のAGPRそしてAGSの基質を加えて反応を開始させた。その結果、活性検出に必要な化合物がすべて含まれているときは、吸光度が大きく減少した (Fig. 4-3C; filled diamonds)。またAGSの活性測定では、AGKやGATと異なり、基質やカップリング酵素を反応系から除いても小さな吸光度変化が観察された (Fig. 4-3C)。この比較的高いバックグラウンドは、用いたタンパク質粗抽出液に混在するカップリング酵素が原因であると考えられる。そこで、活性測定のリファレンスには、基質であるglutamateを除いた反応液をリファレンスとした。AOATの活性測定は、5 μg のAOATにカッ

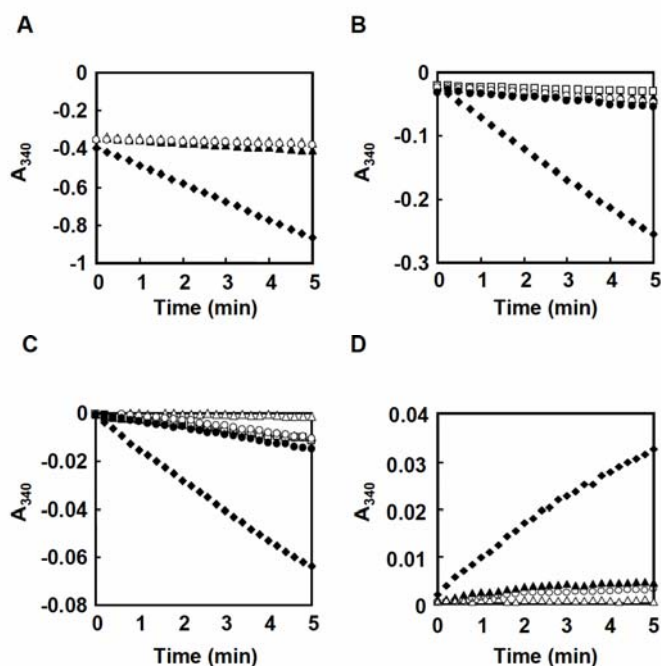


Figure 4-3. AGS、AGK、GATおよびAOATの共役活性測定における340 nmの吸光度変化

A. AGK活性測定。◆が完全な反応溶液、以下、反応構成成分を1つ除いたコントロール。▲がAG、△がATP、○がAGPR。B. GAT活性測定。◆が完全な反応溶液、以下、反応構成成分を1つ除いたコントロール。▲がGlutamate、△がN-acetylmethionine、□がATP、○がAGPR、●がAGK。C. AGS活性測定。◆が完全な反応溶液、以下、反応構成成分を1つ除いたコントロール。▲がGlutamate、△がN-acetylmethionine、□がATP、○がAGPR、●がAGK。D. AGS活性測定。◆が完全な反応溶液、以下、反応構成成分を1つ除いたコントロール。▲がGlutamate、△がN-acetylmethionine、○がAGPR。

プリング酵素である10 μg のAGPR、そしてAOATの基質を加えて反応開始したところ、吸光度が直線的に増加した (Fig. 4-3D; filled diamonds)。AOATの反応系から α -ketoglutarateを除いたとき吸光度変化は観察されなかったが (Fig. 4-3D; open triangles)、*N*-acetylmornithineもしくはAGPRを除いたとき、約2分までのわずかな吸光度の上昇が観察された (Fig. 4-3D; filled triangles, open circles)。この吸光度の上昇は、 α -ketoglutarateを添加する溶液に含まれる何らかの物質の影響によるものであると考えられる。これらの問題に関しては、 α -ketoglutarateを添加し*N*-acetylmornithineを除いた反応溶液をリファレンスとすることで本実験に利用できる。以上の結果から、考案した4種の活性測定において、標的酵素の活性が吸光度変化において経時的に測定できることが証明された。

カップリング反応を用いて活性測定を行った場合、カップリング酵素ではなく標的酵素が反応の律速になっているときのみ、正確な活性値を測定することができる (Segel, 1975)。そこで、この活性測定を用いて正確な値を測定するために、標的酵素の量を変動させ、そのときの活性を測定した。その結果、AGKの測定系では、精製AGK量が0.2~0.6 μg の範囲においてAGK量と NADP^+ 生成量が正比例していた (Fig. 4-4A)。GATでは精製GAT量が0.05~0.15 μg の範囲、そしてAGSでは大腸菌ArgR欠損株のタンパク質粗抽出液が19~57 μg の範囲において、標的タンパク質の量と活性測定値がリニアであった (Fig. 4-4B, C)。またAOATの活性

測定系では、精製AOAT量が5~20 μg の範囲において、AOAT量に比例して活性が増加した (Fig. 4-4D)。また、それぞれの活性測定系について、カップリング酵素の量を2倍にして上記の範囲で活性測定を行っても、標的タンパク質量と活性との直線性に影響はなかった。これらの結果から、上記の酵素量と活性測定値が比例する実験条件では、カップリング酵素が律速因子とならず、吸光度変化が標的酵素の活性に依存して観察されることが明らかになった。

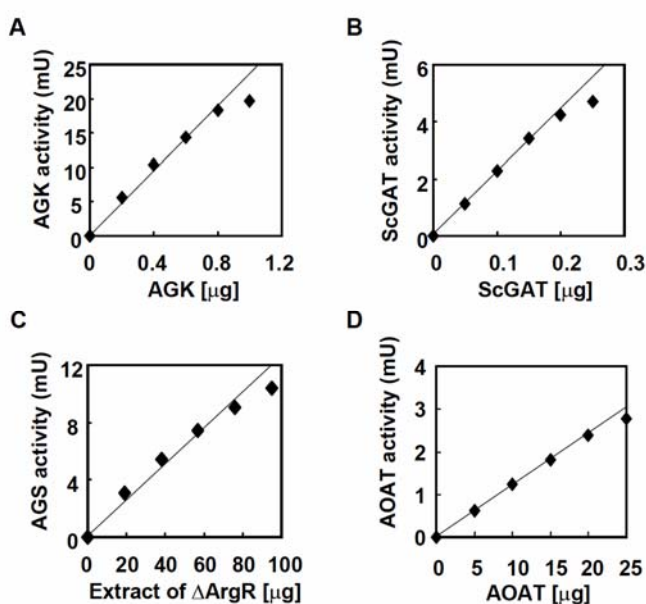


Figure 4-4. AGS、AGK、GATおよびAOATの共役活性測定で測定した初期速度に対する標的酵素の濃度の影響

A. AGKを 0.2~1.0 μg で変化させた。 B. をGAT 0.05~0.25 μg で変化させた。 C. AGS を19~95 μg で変化させた。 D. AOATを 5.0~25 μg で変化させた。データは、3回のアッセイの平均 \pm 標準誤差を示した。

実際にこれらの新規活性測定法による測定値が正確であるか検討するために、標的酵素の基質濃度依存性を決定した。AGS、AGKそしてGATの基質濃度依存性をカップリング活性測定法により解析した (Fig. 4-5A-F)。得られたそれぞれの測定値をミカエリス-メンテンの式にフィッティングし K_m 値を産出した。その結果、AGKのAGに対する K_m 値は 0.46 ± 0.04 mMであり、ATPに対する K_m 値は 0.36 ± 0.02 mMであった (Fig. 4-5A, B)。この解析には精製ヒスチジンタグ融合AGKを用いたが、以前報告されている大腸菌のnative AGKのAG とATPに対する K_m 値 (AG, 0.2 mM; ATP, 0.29 mM)と近い値を示した (Marco-Marin et al., 2003)。AGSのglutamateに対する K_m 値は 2.65 ± 0.16 mMであり、acetyl-CoAに対する K_m 値は 0.47 ± 0.07 mMであった (Fig. 4-5C, D)。これまでに大腸菌のAGSの K_m 値を解析した報告はないが、今回産出された値はヒトや*Neurospora crassa*や*Ruttus norvegicus*のAGSのglutamateとacetyl-CoAに対する K_m 値と同等の値を示した (Caldovic et al., 2005; Hinde et al., 1986; Kamemoto and Atkinson, 1985)。GATのglutamateに対する K_m 値は 8.4 ± 0.8 mMであり、*N*-acetylornithineに対する K_m 値は 2.8 ± 0.1 mMであった (Fig. 4-5E, F)。この値は、報告されている酵母のGATの K_m 値とほぼ一致した (Liu et al., 1995; glutamate, 7.2 mM; *N*-acetylornithine, 1.0 mM)。これらのことから、カップリング活性測定法を用いてAGK、AGSそしてGAT活性が正確に測定できることが明らかになった。

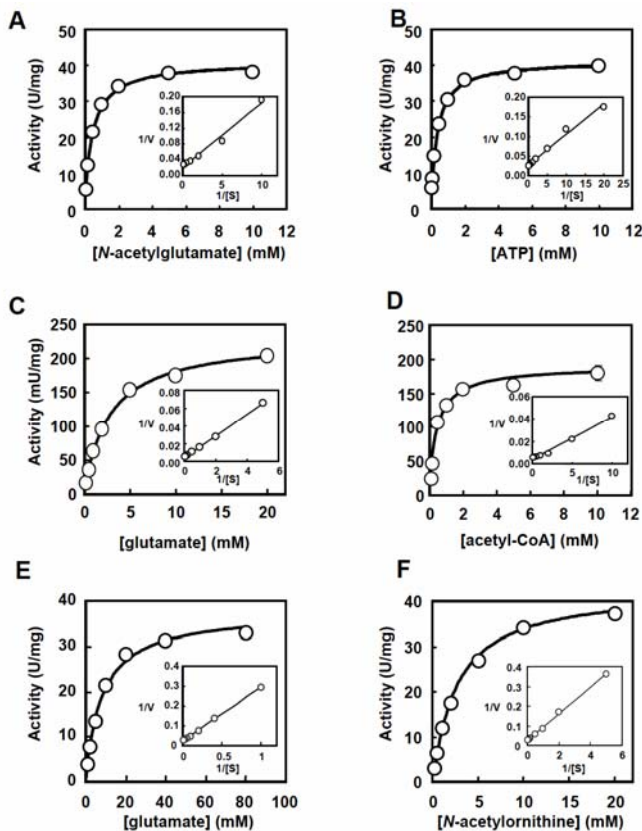


Figure 4-5. AGS、AGKおよびGATの基質濃度依存性。

A. B. AGKの基質濃度依存性。Aは、ATPを10 mMに固定し、AGを0.1-10 mMに変動させた。Bは、AGを10 mMに固定し、ATPを0.05-10 mMに変動させた。C. D. はAGSの基質濃度依存性。Cは、glutamateを10 mMに固定し、Acetyl-CoAを0.1-10 mMに変動させた。Dは、Acetyl-CoAを2 mMに固定し、AGを0.2-20 mMに変動させた。E. FはGATの基質濃度依存性。Eは、*N*-acetylornithineを10 mMに固定し、glutamateを1-80 mMに変動させた。Fは、glutamateを40 mMに固定し、*N*-acetylornithineを0.1-20 mMに変動させた。データは、3回のアッセイの平均±標準誤差を示した。

4-3-4. 新規活性測定法の特異性

考案したカップリング活性測定法の標的酵素活性に対する特異性を解析するために、AGS、AGK、AOATそしてArgRが欠損した大腸菌のタンパク質粗抽出液からそれぞれの酵素活性を測定した。なお、大腸菌はGATを持たないため、GATについての解析は行っていない。大腸菌ArgR欠損株におけるAGS、AGK、そしてAOATの活性は、それぞれ 203 ± 2 、 47.6 ± 3.6 、 471 ± 5 mU/mg proteinであり、大腸菌野生株における活性 (AGS, 0.518 ± 0.008 mU/mg protein; AGK, 1.76 ± 0.06 mU/mg protein; AOAT, 2.16 ± 0.08 mU/mg protein) よりかなり高い値を示した (Table 4-1)。この結果はArgRがアルギニン生合成系酵素遺伝子のリプレッサーとして機能するという報告からも支持される (Mass, 1994)。それに対して、AGS、AGK、そしてAOATの活性は、それぞれの欠損株からは検出されなかった (Table 4-1)。これらの結果から、カップリング活性測定法は標的酵素活性を特異的に検出することが明らかになった。

Table 4-1. さまざまな大腸菌株において共役活性測定法で測定したAGS、AGK、そしてAOAT活性
データは、3回のアッセイの平均±標準誤差を示した。N.D., not determined.

Strain	Relevant genotype	AGS activity	AGK activity	AOAT activity
		(nmol min ⁻¹ mg protein ⁻¹)		
BW25113	wild type	0.518 ± 0.008	1.76 ± 00.6	2.16 ± 0.08
JW2786	<i>argA</i>	<0	N.D.	N.D.
JW5552	<i>argB</i>	N.D.	<0	N.D.
JW3322	<i>argD</i>	N.D.	N.D.	<0
JW3206	<i>argR</i>	203 ± 2	47.6 ± 3.6	471 ± 5

4-3-5. 野生スイカにおける乾燥前後の全シトルリン代謝酵素活性の変化

野生スイカにおけるシトルリン蓄積の鍵酵素を同定するために、考案した活性測定法を用いて、乾燥強光前後の野生スイカの葉における全シトルリン代謝酵素活性を測定した。活性測定に用いた野生スイカ葉は、代謝が盛んであることが望ましいため、完全展開して間もない第4葉を用いた。また、野生スイカ第4葉において、最もシトルリンが蓄積するのが乾燥強光3日目から4日目であるため (Fig. 4-6; 芳野, 2006)、乾燥前と乾燥3日目の活性を比較した。活性測定の結果、乾燥前の野生スイカのシトルリン生合成経路において、シトルリンの基質となるオルニチン生合成の1段階を担うAGS活性が 0.67 ± 0.23 mU/mg protein、第2段階を担うAGK活性が 1.56 ± 0.31 mU/mg protein、そしてシトルリンのもう一つの基質であるcarbamoyl-phosphateを生合成するCPSが 0.17 ± 0.09 mU/mg proteinと

生合成の入り口を担う3酵素の比活性が小さい値を示した (Fig. 4-7A, B and F)。このことは、乾燥前のシトルリン代謝経路は入り口を担う酵素がボトルネックになっていることを示唆している。一方、シトルリンを生合成するOCTは、 65.1 ± 11.0 mU/mg proteinと最も高い値を示した (Fig. 4-6G)。また、シトルリンの異化経路では、シトルリン分解酵素であるASS活性が、 0.044 ± 0.016 mU/mg proteinと非常に低い値を示し、尿素を分解するurease活性も 1.13 ± 0.48 mU/mg proteinと低い値を示した (Fig. 4-6H, K)。

それに対して野生スイカに乾燥ストレスが与えられると、AGS、AGKそしてCPSの活性がそれぞれ約7倍、7倍、5倍増加していた (Fig. 4-7A, B and F)。また、乾燥前に顕著に比活性が低かったASS活性が約5分の1に低下しており、arginineの分解酵素であるarginase活性が約70%に低下していた (Fig. 4-7H, J)。その他の酵素活性は乾燥前後の変化が10%以内であり、有意差はなかった (Fig. 4-7C-E, G, I and K)。以上の結果から、乾燥強光に伴い活性が増加する経路の入り口を担う3酵素と、シトルリン分解を担う酵素がシトルリン蓄積の鍵酵素となっていることが示唆された。

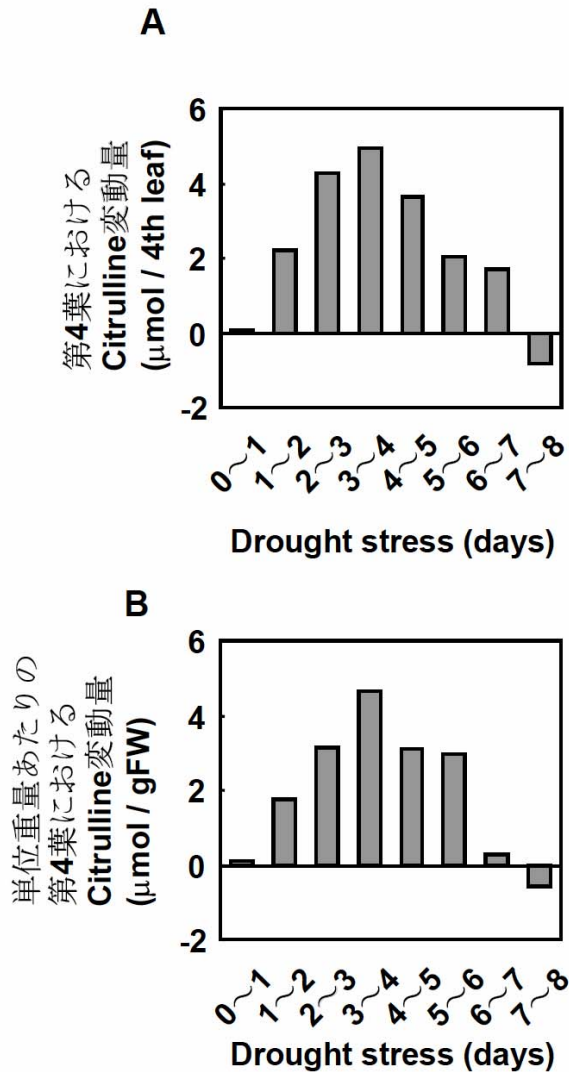


Figure 4-6. 乾燥強光に伴う野生スイカ第4葉のシトルリン含有量の変化

A. 第4葉に含まれるシトルリン量の1日あたりの変動量。B. 第4葉に含まれるシトルリン濃度の1日あたりの変動量

(芳野, 2006より、一部改変)

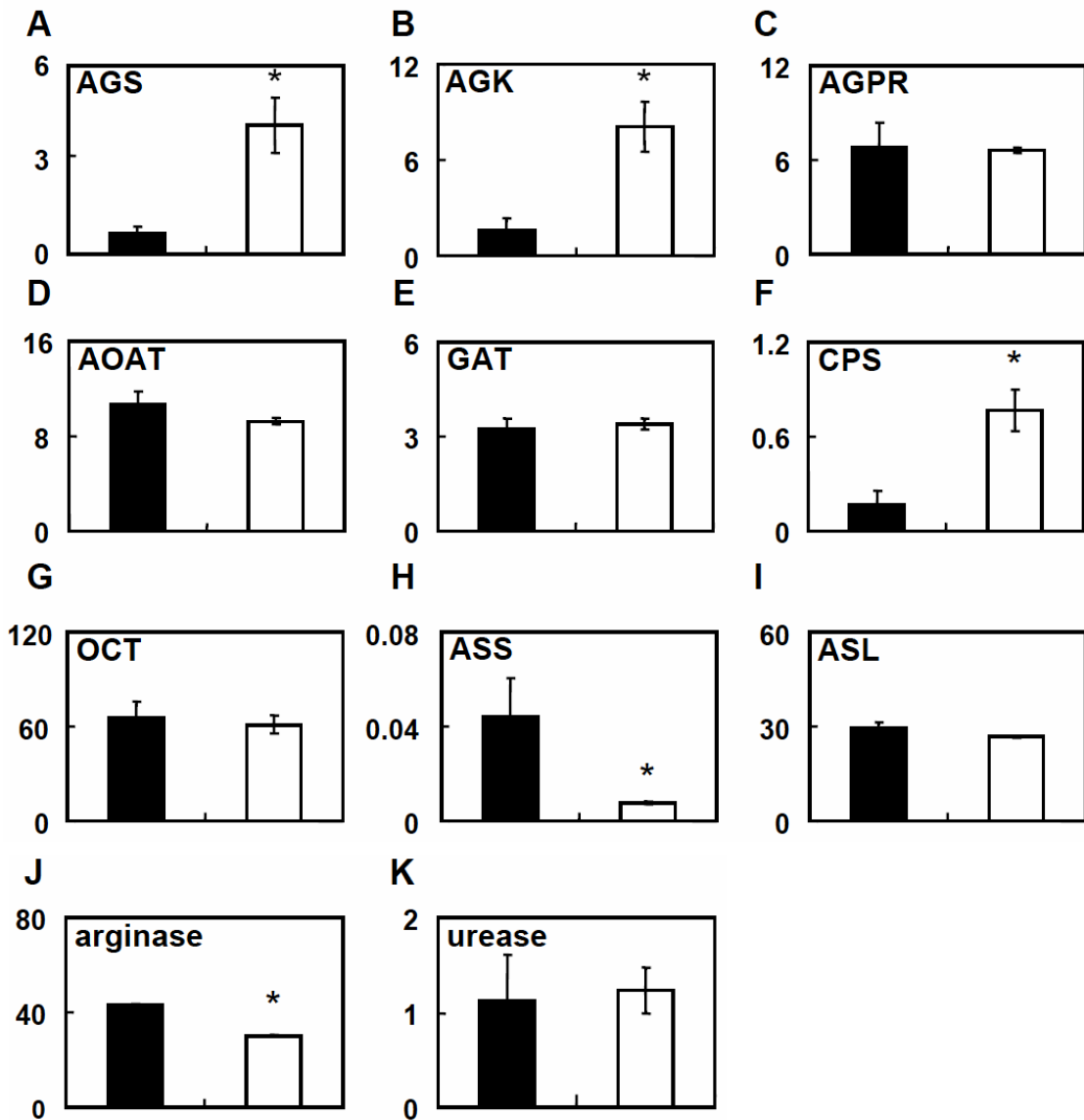


Figure 4-7. 野生スイカの全11種のシトルリン代謝酵素の乾燥強光ストレスに伴う活性変動

A. AGS, B. AGK, C. AGPR, D. AOAT, E. GAT, F. CPS, G. OCT, H. ASS, I. ASL, J. arginase, K. urease。 *は測定値が乾燥前後でt検定により5%以下で有意差がある。データは、3回のアッセイの平均±標準誤差を示した。縦軸は、nmol of product formed/min/mg proteinである。黒色は乾燥前、白色は乾燥3日目の活性を示している。(OCTとCPSのデータは、芳野, 2006より改変)

4-3-6. 乾燥強光に前後のAGKのアルギニンによるフィードバック阻害

これまでに、植物においてAGSとAGKがアルギニンによりフィードバック阻害を受けることが明らかになっている (Morris and Thompson, 1977; McKay and Shargool, 1981)。シトルリン生合成第1段階はAGSとGATが担っており、第3章の結果から植物のGATはアルギニンによるフィードバック阻害をほとんど受けないことが明らかになっている。このことから、アルギニンが高濃度に存在しても、第1段階はGATの寄与により大きく阻害されることはないと考えられた。一方、第2段階を担うのはAGKのみであり、アルギニンにより阻害されるとシトルリン生合成が大きく阻害されるはずである。このことから、乾燥強光前後でのAGKのアルギニンによるフィードバック阻害を解析することとした。活性測定は、第4章で考案したカップリング活性測定法を用いるため、カップリング酵素であるAGPRがアルギニンにより阻害されると、AGKのアルギニンに対する応答を観察できない。大腸菌のAGKは、アルギニンによるフィードバック阻害受けないことが報告されていることから (Ramón-Maiques et al., 2002)、第4章で精製した大腸菌AGK活性をカップリング活測定法によりアルギニン存在下で測定することで、アルギニンのAGPRに対する影響を観察した。その結果、10 mMのアルギニン存在下でも活性が阻害されなかったことから、カップリング酵素として用いる大腸菌のAGPRはアルギニンにより阻害されないことが明らかになった (Fig. 4-8A)。すなわち、野生スイカAGKのアルギニン応答性の解析に、AGPRを用いたカップリング活性測定法が利用可能である。次にこの活性測定法を用いて、乾燥前および乾燥3日目の野生スイカ葉のタンパク粗抽出液において10 mMアルギニン存在下でAGK活性を測定した。乾燥前の野生スイカ葉タンパク粗抽出液ではAGK活性が10 mMのアルギニン存在下で約25%まで活性が抑制された (Fig. 4-8B)。それに対して、乾燥

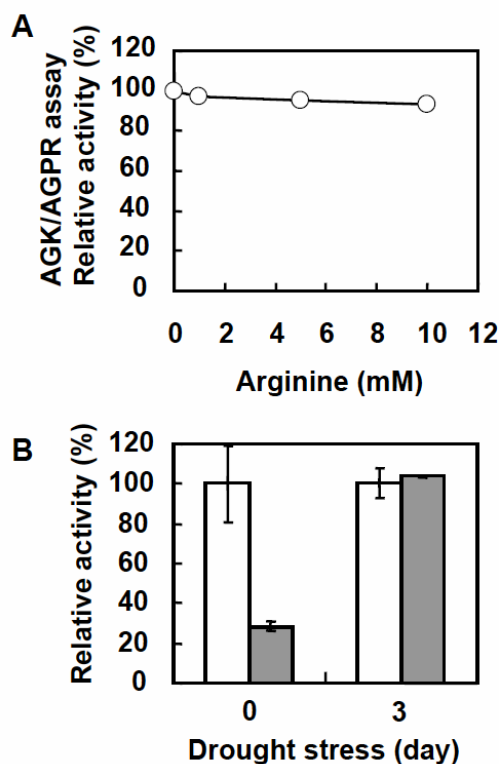


Figure 4-8. 野生スイカAGKのアルギニン応答性

A. AGK/AGPR共役活性測定に対するアルギニンの影響。大腸菌のAGK活性をAGK共役活性測定によりアルギニン存在下で測定した。B. 乾燥前後の野生スイカ葉のタンパク質粗抽出液におけるAGKのアルギニン応答性。白抜きはコントロール、灰色は10 mMアルギニン存在下での活性を示す。データは、3回のアッセイの平均±標準誤差を示した。

3日目の野生スイカ葉タンパク粗抽出液中のAGKは、10 mMのアルギニンにより阻害されなかった (Fig. 4-8B)。

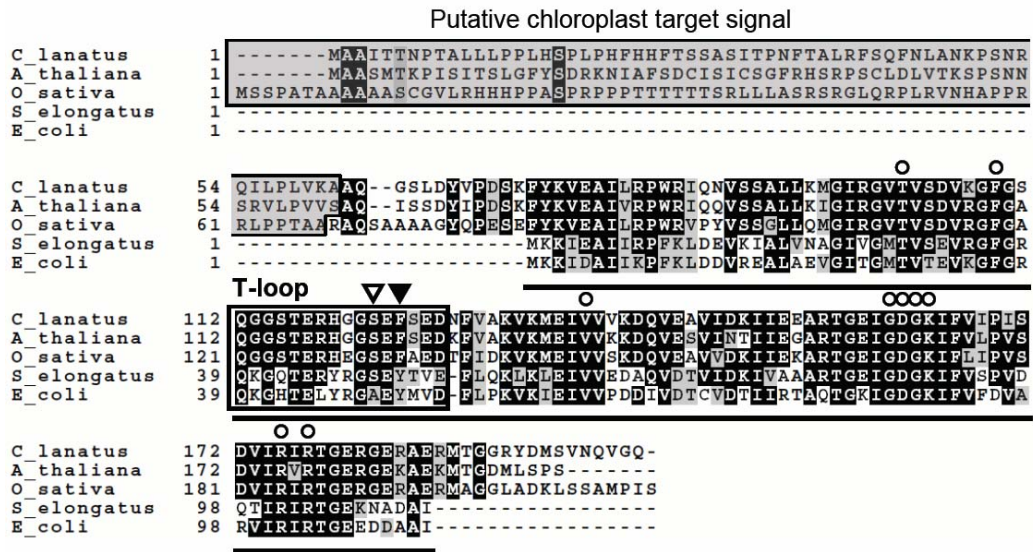
4-3-7. 野生スイカAGKとP_{II} proteinの関連

近年、シアノバクテリアやシロイヌナズナにおいて、AGKが、生体内の炭素・窒素比を感知し、細胞内の窒素量を調節するシグナルタンパク質P_{II} proteinにより活性制御されることが報告されている (Heinrich et al., 2004; Burillo et al., 2004; Ninfu and Jiang, 2005)。これらの報告によると、AGKはP_{II} proteinとが相互作用することで、触媒効率が増加し、アルギニンによるフィードバックが緩和される (Maheswaran et al., 2004; Chen et al., in press)。このP_{II} proteinによる活性制御が野生スイカの乾燥強光時のAGKの活性制御と関連があることが予想されたことから、野生スイカのAGKとP_{II} proteinの関連を明らかにすることとした。

野生スイカP_{II} 遺伝子のcDNAの全長を単離するために、野生スイカESTクローンROS_072_F05.bから遺伝子特異的なプライマーを作製し、5'-及び3'-RACEを行った。その結果、得られたcDNAは960 bpからなり、202アミノ酸からなる推定分子量22.2 kDaのタンパク質をコードしていた。野生スイカのP_{II}の推定アミノ酸配列は、他生物のP_{II}の推定アミノ酸配列と比較し、N末端側74アミノ酸とC末端側16アミノ酸を除いて、高度に保存されており、P_{II} の機能に関わるT-loopや、ATPに結合する残基も高度に保存されていた (Fig. 4-9; Jaggi et al., 1996; Moorhead and Smith, 2003)。また、*Synechococcus* sp. P_{II}の49番目のセリンは、リン酸化部位であるが、野生スイカを含む植物のP_{II}においてもリン酸化部位であるセリンは、高度に保存されていた (Fig. 4-9, white arrow; Forchhammer and Tandeau de Marsac, 1995)。一方、大腸菌P_{II}のウラシル化部位である51番目のチロシンは、植物ではフェニルアラニンに置換されていた (Fig. 4-9, gray box; Arcondéguy et al., 2001)。植物のP_{II}は葉緑体移行シグナルペプチドを持つと予測され、イネのP_{II}は、GFP融合タンパク質を用いた解析により葉緑体へ移行することが示唆されている (Sugiyama et al., 2004)。野生スイカP_{II}をタンパク質局在予測ソフトCHLOROP (Nielsen et al., 1997)により解析したところ、他の植物の場合と同様にN末端側の62アミノ酸が葉緑体移行シグナルペプチドと予測された (Fig. 4-9, underline)。

野生スイカP_{II}の乾燥強光に伴う発現変動を解析するために、ストレス前と乾燥強光1日から8日目までの野生スイカ第4葉から抽出したタンパク質を用いてウェスタンブロットを行った。ウェスタンブロットには、イネP_{II}のFig4-10Aの下線部のリコンビナントタンパク質を抗原として作製した抗体を用いた (Sugiyama et al., 2004)。解析の結果、野生スイカP_{II}の分子量と思われる約15.5 kDaの位置にバンドが検出され、野生スイカP_{II}は乾燥強光により発現誘導され、蓄積することが明らかになった (Fig.4-9B)。

A



B

Drought stress (days)

0 1 2 3 4 5 6 7 8

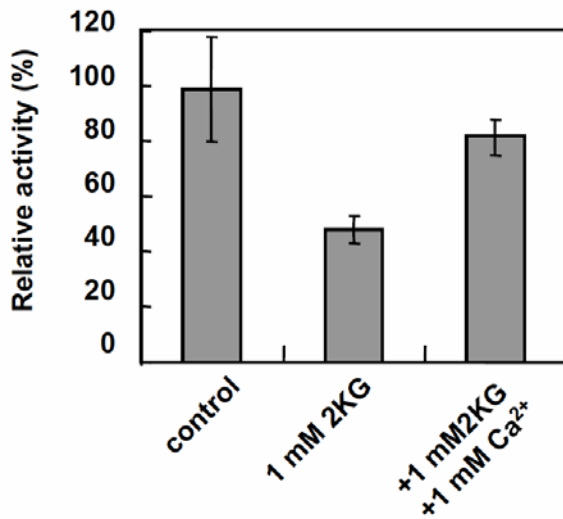


Figure 4-9. 各生物P_{II} proteinのアライメントと野生スイカにおけるP_{II} proteinの乾燥強光に伴う発現変動

A.野生スイカ、シロイヌナズナ、イネ、シアノバクテリアそして大腸菌におけるP_{II} proteinのアライメント。T-loopを四角、リン酸化されるセリンを▽、ウラシル化されるチロシンを▼、ATP結合残基を○で示す。また、下線部は、イネP_{II} protein抗体作製のための抗原としたアミノ酸配列を示す。B.野生スイカの 乾燥強光に伴うP_{II} proteinのウェスタンブロット。ストレス前、および乾燥強光1日～8日目の野生スイカ第4葉の30 μg分のタンパク質をSDS-PAGEで分離し、イネP_{II} protein抗体で検出した。

シアノバクテリアのP_{II} protein-AGK複合体は、α-ketoglutarateがP_{II} proteinと相互作用することで解離し、カルシウムイオンがそのアンタゴニストになっていることが明らかになっている (Maheswaran et al., 2004)。仮に、野生スイカがP_{II} protein-AGK複合体を形成しているとする、α-ketoglutarateにより複合体が解離し、AGK活性が低下し、CaCl₂によりその低下が緩和されると予測される。そこで乾燥強光3日目の野生スイカの葉を用いて、AGK活性に対するα-ketoglutarateとカルシウムイオンの影響を観察した。反応溶液に1 mMのα-ketoglutarateを添加したところ、AGK活性が約4割まで減少した。それに対して、1 mMの

α -ketoglutarate と 1 mM の CaCl_2 を AGK の反応溶液に添加したところ、 α -ketoglutarate 添加時に見られた活性の減少が緩和された (Fig. 4-10)。この結果は、野生スイカ AGK が P_{II} protein と複合体を形成していることを支持している。



以上のことから、野生スイカ AGK は、乾燥強光に伴い、活性増加し、アルギ

Figure 4-10. 野生スイカ AGK に対する α -ketoglutarate とカルシウムの影響

左のバーからコントロール、1 mM α -ketoglutarate 存在下の AGK 活性、1 mM CaCl_2 と 1 mM α -ketoglutarate 存在下の AGK 活性。データは、3回のアッセイの平均±標準誤差を示した。

ニンによるフィードバック阻害が緩和された。この応答は、シロイヌナズナやシアノバクテリアにおける AGK が P_{II} protein と相互作用することによる活性制御機構と類似していた。そして野生スイカにおいて乾燥強光に伴い P_{II} protein が蓄積していた。これらの結果から、乾燥強光に伴う野生スイカ AGK は、 P_{II} protein により制御されている可能性が示唆された。

4-4. 考察

固着生活を営む植物は、細胞内の代謝を変化させ、さまざまな環境に適応している。そのような応答のひとつとして、野生スイカは、乾燥強光時にシトルリンを高蓄積する (Kawasaki et al., 2000)。植物において、シトルリン蓄積は稀有な現象である。野生スイカ以外にシトルリンが蓄積する例として、*Alnus*のような根粒菌と共生する植物が、導管液に高濃度シトルリンを含むことが報告されているが、その蓄積機構の詳細は明らかになっていない (Barnes, 1963; Lundberg and Lundquist, 2004)。植物がストレス時に適合溶質を蓄積するとき、その生合成経路における鍵酵素の活性を大きく変動させる (Yokota et al., 2006; Chen and Murata, 2002)。このことから野生スイカのシトルリン蓄積においても、その生合成の鍵酵素活性が大きく変動すると予測される。しかしながらシトルリン代謝経路は、近年盛んに研究されている形態形成やストレス応答に関わるポリアミンや、シグナル分子である一酸化窒素の生合成経路と直結しているにもかかわらず (Walters, 2003; Delledonne, 2005)、ほとんど解析されていない (Thompson, 1980; Slocum, 2005)。そのため、植物におけるシトルリン代謝酵素活性の知見は非常に乏しく、またその活性測定法も洗練されていない。そこで、本章ではシトルリン代謝経路を担う全11酵素の迅速、簡便な活性測定法を考案し、その活性測定法を用いて野生スイカにおけるシトルリン蓄積の鍵酵素を探索し、同定された鍵酵素の制御機構を考察した。

4-4-1. カップリング反応を用いた新規活性測定法

シトルリン代謝経路を担う前11種の酵素活性を測定するには、迅速、簡便な活性測定法を用いることが望ましい。特に植物のタンパク質粗抽出液は、さまざまなタンパク質を含むため、比特異的な活性を捕らえないような特異性の高い活性測定である必要がある。そこでカップリング活性測定法を応用した測定系を用いることとした。カップリング反応活性測定法は、標的酵素反応の反応生成物を基質とするカップリング酵素を過剰量反応系に加えることで、カップリング酵素の反応生成物を定量して活性測定する方法である (Segel, 1975)。活性測定が困難である反応に対して、カップリング反応を用いて吸光度により簡便に検出できる最終産物を生成するような反応系を構築すれば、反応をリアルタイムに計測できる。また、化学的な活性測定法では、反応生成物の特定の構造を検出するため、類似の構造を持つ化合物も同時に検出してしまう。そのため、タンパク質粗抽出液を用いた解析では、注意が必要である。ところがカップリング活性測定法では、カップリング酵素の基質特異性により標的酵素の反応生成物を特異的に検出することができる。以上のことから、野生スイカの葉粗抽

出液を用いた活性測定に適した方法であると考えられる。

カップリング活性測定法を利用し、シトルリン代謝を担う全11種の酵素の簡便な測定法を考案した (Fig. 4-1)。考案した活性測定法では、7酵素がNAD(P)H由来の340 nmの吸光度、ひとつの酵素fumarate由来の240 nmの吸光度、そして3酵素がFeron反応によるcitrulline誘導体由来の530 nmの吸光度により測定できる。このように反応測定法が類似であるため、迅速に11種の酵素を測定することが可能であると考えられる。全11酵素のうち、5酵素AGS、AGK、AOAT、GATそしてCPSが新規活性測定法である。CPSについては、芳野の修士論文 (2006)にて詳しく記載している。CPSを除く4酵素の活性測定法は、シトルリン生合成第3段階を担うAGPRの活性測定が簡便であることから、AGPRとカップリングさせる方法である。この4酵素の新規活性測定法の検討を行ったところ、それぞれの活性を正確に検出できることが明らかになった (Fig.4-3-4-5)。また、大腸菌欠損株を用いた解析から、特異的に活性を検出できることが明らかになった (Table. 4-6)。以上のことから、新規カップリング活性測定法は、迅速、簡便かつ特異性の高い測定法であることが明らかになった。さまざまな生物の代謝経路を解析する際、活性測定が困難な酵素反応は多く存在する。これらの困難を乗り越えるために、カップリング活性測定法が非常に効果的であると考えられる。特に大腸菌は、古くからの代謝研究により代謝マップが充実しており、そのゲノム解読も完了している (Blattner et al., 1997)。このことから、検出困難なさまざまな酵素に対して、大腸菌の代謝酵素を用いたカップリング活性測定法を考案し、活用できると期待される。

4-4-2. 乾燥強光に伴う野生スイカの全シトルリン代謝酵素の活性変動

シトルリンは、5段階の反応により生合成されたオルニチンと、1段階の反応により生合成されたcarbamoyl phosphateからOCTにより生合成され、4段階の反応によりアンモニアと二酸化炭素とオルニチンに異化される。本研究では、野生スイカのシトルリン代謝を担う全11種の酵素の乾燥強光に伴う活性変動を解析した (Fig. 4-7)。5段階からなるオルニチン生合成経路において、AGS、AGKが乾燥強光により活性をそれぞれ7倍増加していた (Fig. 4-7A-E)。これまでに、微生物では、オルニチン代謝の制御がAGS、AGKそしてGATにより制御されていると報告されている (Caldovic and Tuchman, 2003)。植物では、ビートにおいてAGSがアルギニンにより阻害されること (Morris and Thompson, 1977)、そしてエンドウにおいてAGKがアルギニンにより阻害されることが明らかになっている (McKay and Shargool, 1981)。また、第3章の結果から、植物のGATはほとんどアルギニンにより阻害を受けなかった。このことから、植物におけるオルニチン生合成制御の鍵酵素は、第1段階のAGSと第2段階のAGKであると考えられる。

そのため今回の結果から野生スイカは、アルギニンにより制御されるAGSとAGK活性を増加させ、フィードバックを打破するとともに、経路の流量を増大させ、オルニチン生合成量を増加させていると考えられる。

また、グルタミン酸をアセチル化する第1段階はAGSとGATにより触媒されるが、植物においては、主にGATが第1段階を担っておりAGSは*N*-acetylglutamtaeを補充する役割を担うことが示唆されている (Shargool and Jain, 1985)。今回の活性測定では、乾燥前の野生スイカにおけるAGS活性は、 0.67 ± 0.23 mU/mg proteinであり、GAT活性が 3.24 ± 0.34 mU/mg proteinであり、GATの比活性が約5倍高く (Fig. 4-7A, E)、この仮説を支持していた。第3章の結果から、野生スイカからアセチル基を加水分解するAOD活性は検出されなかった。このことから、オルニチン生合成経路のアセチル中間体は、GATによりリサイクルされるのみであり、その量は変化しないと考えられる。そのため、AGSによりacetyl-CoAを用いて生合成されたAGは、アセチル中間体量を増加させ、その結果オルニチン生合成経路の流れが速まると考えられる。

carbamoyl phosphateを生合成するCPSは、乾燥強光に伴い3倍活性増加していた (Fig. 4-7F)。carbamoyl phosphateは、シトルリン生合成のOCTとピリミジン生合成のAspartate carbamoyltransferase (ACT)の基質である。ACTのcarbamoyl phosphateに対する K_m 値はOCTより低く、通常carbamoyl phosphateはピリミジン生合成に優先的に利用されると考えられている (Garcia-España et al, 1989)。乾燥強光時の野生スイカでは、OCT活性が変化していないが (Fig. 4-7G)、シトルリンが高濃度蓄積する。このことから、シトルリン生合成にcarbamoyl phosphateを優先的に利用する制御機構が存在すると考えられる。その一つの可能性として、ACT活性が抑制され、carbamoyl phosphateがシトルリン代謝経路に流れることが考えられる。また、これまでに植物において、CPSとACTは、ピリミジン生合成の最終産物であるuridine monophosphate (UMP)により活性抑制されること (O'Neal and Naylor, 1976; Ong and Jacson, 1972)、そしてUMPによるCPSの阻害はオルニチンにより緩和されることが報告されている (Kollöffel and Verkerk, 1982; O'Neal and Naylor, 1976)。これらのことから、もうひとつの可能性として、乾燥強光時の野生スイカは、UMPが増加しACTとCPS活性を抑制し、さらにAGSとAGKの活性化により増加したオルニチンがCPSの阻害を緩和することで、carbamoyl phosphateがシトルリン生合成に利用されていることが考えられる。

一方、シトルリン異化経路においては、シトルリン分解酵素であるASSとアルギニンを異化するarginaseがそれぞれ20%、70%に低下していた (Fig. 4-7H, J)。乾燥強光時の野生スイカは、シトルリンとアルギニンが蓄積することから (Kawasaki et al., 2000)、これらの分解酵素の活性低下は、蓄積の一因であると考えられる。野生スイカにおける乾燥前のASS活性は、 0.044 ± 0.016 mU/mg protein

とその他のシトルリン代謝酵素と比較して非常に低い値を示した (Fig. 4-7H)。 *Canavalia lineata* のカルスにおいて ASS は OCT の約 5 分の 1 の活性であった (Hwang et al., 1996)。このことから野生スイカは、他の植物と比較して ASS 活性が低く、シトルリンが蓄積しやすいのかもしれない。アルギニンが細胞内に高濃度蓄積すると細胞内の代謝を乱す可能性がある (Akashi et al., 2001)。そのため、野生スイカがアルギニンを高濃度蓄積するのは、不利であるように思われる。アルギニンは、一酸化窒素合成やポリアミン合成にも利用される。そのため、乾燥強光時の arginase 活性の減少は、アルギニンを蓄積するためではなく、アルギニンから派生する生合成経路の制御に関与している可能性がある。

以上のことから野生スイカは、乾燥強光時に経路の入り口である初発段階を担う AGS、AGK そして CPS の 3 酵素の活性を増加させることで、経路への窒素化合物の流量を増大し、そしてシトルリン分解酵素 ASS の活性を抑制することでシトルリン蓄積を達成していると考えられる。

4-4-3. 野生スイカ AGK の制御

野生スイカにおいてシトルリン蓄積の鍵酵素として同定させた AGS と AGK は、他の植物ではアルギニンによりフィードバック阻害を受けることが報告されている (Morris and Thompson, 1977; McKay and Shargool, 1981)。AGS はアルギニン非感受性の GAT とともにシトルリン第 1 段階を制御していることから、AGK がシトルリン代謝の制御に最も重要であると考えられた。さらに乾燥強光に伴い AGK のアルギニンによるフィードバック阻害が緩和された (Fig. 4-8B)。このことから AGK は、活性増加とフィードバック阻害の脱感作により、アルギニン濃度が高まる乾燥強光時においてもシトルリン蓄積を促進し続けると考えられる。

シアノバクテリアやシロイヌナズナの AGK は、P_{II} protein と相互作用し、触媒効率を増加させ、アルギニンによるフィードバック阻害を緩和することが報告されている (Maheswaran et al., 2004; Chen et al., in press)。この活性制御は、野生スイカ AGK の乾燥に伴う活性制御と関連していると予測される。そこで野生スイカの乾燥強光時の AGK の P_{II} protein による制御を考察するために、野生スイカから P_{II} 遺伝子を単離したところ、野生スイカの P_{II} 遺伝子から推定されるアミノ酸配列は、T-loop とリン酸化に関わるセリンを高度に保存していた (Fig. 4-9A, white box and white arrow)。シアノバクテリアにおいて T-loop とリン酸化に関わるセリンは、AGK との相互作用に重要とされる (Burrilo et al., 2004; Maheswaran et al., 2004)。これらのことから野生スイカ P_{II} は、AGK を活性制御する他生物の P_{II} に必要な構造を兼ね備えており、野生スイカ P_{II} は構造的には AGK と相互作用する構造を有していた。さらに、野生スイカ P_{II} protein 発現量を解析したところ、乾燥強光により葉内に蓄積していた (Fig. 4-9B)。また、P_{II} protein と相互作用してい

ると予測される乾燥3日目の野生スイカAGKが、 α -ketoglutarateにより活性が低下し、カルシウムイオンにより活性低下が緩和された。この応答は、シアノバクテリアのAGKとP_{II} proteinの複合体の応答と類似していた (Maheswaran et al., 2004)。以上のことから、野生スイカAGKの乾燥強光に伴う活性増加は、P_{II} proteinにより制御されていることが示唆された。今後は、乾燥強光に伴うAGKの発現量の変化、ならびに野生スイカP_{II}とAGKとの*in vivo*での結合を明らかにすることで、P_{II}によるAGKの制御機構がより明らかになると考えられる。

シアノバクテリアのAGKは、P_{II} proteinと相互作用し、触媒効率が40倍増加し、アルギニンによるフィードバックが10分の1に緩和する (Maheswaran et al., 2004)。このAGKの活性化は、窒素が多量な条件において、豊富にアルギニンを含む窒素貯蔵物質であるcyanophycinを生合成する基質を供給していると考えられている (Ninfa and Jiang, 2005)。一方、植物では、イネとシロイヌナズナにおいてAGKとP_{II} proteinが相互作用することが報告されており (Sugiyama et al., 2004; Chen et al., in press)、シロイヌナズナにおいて、AGK はP_{II}と相互作用することで、触媒効率が30%増加し、アルギニンによるフィードバックを3分の1に緩和すると報告されている (Chen et al., in press)。しかしながら、植物におけるP_{II} proteinは、窒素代謝に関わることは明らかになっているが、生理学的な機能は明らかになっていない (Hsieh et al., 1998; Smith et al., 2002; Smith et al., 2004; Ferrario-Méry et al 2005)。乾燥強光に伴う野生スイカAGKは、活性を約7倍に増加させ、アルギニンによるフィードバックを約5分の1に緩和させる。現在のところ、AGKのタンパク質発現量を解析していないのでこの活性変動とP_{II} proteinの関係は明らかではない。しかしながら、乾燥強光時の野生スイカAGKがP_{II} proteinにのみに活性制御されると仮定すると、活性が7倍に増加していることから、植物の制御よりむしろシアノバクテリアの制御に近いのかもしれない。AGKが活性化されることでアルギニン生合成経路への流量を増加することから、シトルリンを蓄積する野生スイカは、P_{II} proteinの制御をより強くしているのかもしれない。

シアノバクテリアにおいて、P_{II} proteinは細胞内への硝酸イオンの取り込みも制御しており (Lee et al., 2000)、大腸菌では、P_{II} proteinはアンモニアトランスポーターと相互作用し、不活性化させることが明らかになっている (Javelle A et al., 2004)。このように、微生物のP_{II} proteinは、窒素化合物の取り込みを制御している。一方、植物のP_{II} proteinは葉緑体に局在し (Sugiyama et al., 2004)、微生物のP_{II} proteinと局在が異なるため、微生物と機能が異なるかもしれない。しかしながら、シロイヌナズナのP_{II}変異株は、野生型に比べて亜硝酸イオン耐性を示すようになり、また、高アンモニア培地で生育させると、野生型と比較して、炭水化物量が増加し、窒素化合物量が減少することから、窒素化合物の取り込み

に参与することが示唆されている (Ferrario-Méry et al., 2005)。以上のことから、野生スイカのP_{II} proteinも窒素化合物の取り込みに参与していると予測される。もしそうであれば、乾燥強光に伴うP_{II} proteinの増加は、AGKの活性制御だけでなく、下位葉のタンパク質の分解により生成した窒素源を、上位葉の葉緑体へ取り込みを促進することでシトルリン蓄積に参与しているかもしれない。

結論

シトルリンは、活性酸素ヒドロキシラジカル消去能に優れた新規適合溶質であり、乾燥強光に伴い野生スイカの葉組織に高蓄積する。またシトルリンは一分子中に3窒素原子を含む高窒素化合物であり、乾燥強光時の葉の窒素含量の約2割を占めると見積もられている。乾燥時の植物は、新たな栄養成分を取り込むことができないため、高濃度のシトルリンを蓄積するためには、生体構成成分の大規模な再分配が必要である。また、シトルリンはアルギニン生合成経路の中間体であり、その高蓄積を達成するためには経路を構成する複数の酵素が異なる制御を受ける必要があると想定される。従ってシトルリン蓄積は、ストレス時の代謝変動の制御機構を理解する上で好適なモデルであると考えられた。そこで本研究では、野生スイカにおけるシトルリン蓄積の制御機構を解明することを目的とした。

まずシトルリン生合成の窒素源にあたって、葉緑体の可溶性タンパク質の約5割を占める光合成カルビン回路の鍵酵素であるRuBisCOに注目し、その蓄積量の変動を解析した。その結果RuBisCOは、乾燥強光ストレスの進行に伴い、特に老化葉において顕著に分解されることを見出した。さらにこの分解されたRuBisCOの窒素量は、蓄積したシトルリンの窒素量と同程度であることを見積もられ、シトルリンの窒素供給源は主にRuBisCOであることが考えられた。このことから、光合成の抑制により利用効率が低下したRuBisCOがシトルリン生合成に利用されていることが示唆された。

次にシトルリン蓄積機構を解析するにあたって、野生スイカは葉内に乾燥強光に伴い新規タンパク質Drought-induced polypeptide-1 (DRIP-1)が全可溶性タンパク質の約4%まで蓄積することが報告されていた。DRIP-1は、原核生物などにおいてアセチルオルニチンを加水分解することでシトルリン生合成第5段階を担う*N*-acetylmethionine deacetylase (AOD)と相同性を持つことから、DRIP-1が生合成酵素としてシトルリン蓄積に寄与することが想定されていた。そこで野生スイカのシトルリン生合成第5段階について解析したところ、野生スイカの葉抽出液からAOD活性は検出されず、また精製DRIP-1を用いたAOD活性測定、ならびに大腸菌のAOD相補試験から、DRIP-1はAOD活性を有さないが示された。これに対して、アセチルオルニチンのアセチル基をグルタミン酸に転移することで経路の第5段階とともに初発段階を触媒するGlutamate *N*-acetyltransferase (GAT)の活性が葉抽出液から検出された。さらにGATの性質を詳細に明らかにするために、GATを野生スイカ葉より精製し、酵素学的諸性質を明らかにした。その結果野生スイカGATは、他生物のGATと異なり高い熱安定性を示し、乾燥強光時の葉面温度の上昇に適した性質を有していた。また野生スイカGATは、代謝

経路の下流の産物であるアルギニンやシトルリンによりフィードバック阻害を受けなかった。以上のことから野生スイカGATは、乾燥強光時の葉内環境に適応した特性を持つことで、シトルリン蓄積に関与すると考えられた。

GATは経路の一酵素であり、他にも鍵酵素が存在する可能性がある。そこで次にシトルリン蓄積を促進する鍵酵素を明らかにするために、シトルリン代謝を担う全11種の酵素群の活性測定を行うこととした。しかしながら、経路の酵素反応の中には検出困難な反応が存在し、経路のすべての酵素を迅速に解析することが困難であった。そこでそれぞれの酵素について、カップリング反応を利用し、吸光度変化をモニターすることで活性を見積もることができる迅速・簡便な活性測定系を考案、確立した。この活性測定系を用いて、乾燥ストレス前と乾燥3日目の野生スイカの葉粗抽出液における酵素活性を比較した。その結果、経路の第1段階を担う*N*-acetylglutamate synthase (AGS)、第2段階を担う*N*-acetylglutamate kinase (AGK)、およびシトルリンの基質の1つであるカルバモイルリン酸を生合成するcarbamoyl phosphate synthetase (CPS)の3酵素が、乾燥によりそれぞれ約7倍、7倍、5倍活性が増加していた。これに加えて、シトルリンの異化酵素であるargininosuccinate synthase (ASS)の活性が5分の1に低下していた。その他の代謝酵素活性は、乾燥前後で大きな変化が見られなかった。これらのことからシトルリン蓄積は、グルタミン酸からの合成経路の初発段階を担う3酵素の活性増加により経路への炭素と窒素の流量が増大すると共に、シトルリン異化酵素の活性が低下してシトルリン分解が抑制されることにより達成されることが考えられた。

これまでにシアノバクテリアのAGKは、炭素・窒素代謝の協調的制御に関わるシグナルタンパク質であるP_{II} proteinと複合体を形成することで、最大速度と基質親和性が増加し、アルギニンによるフィードバック阻害が緩和されることが報告されている。一方、植物ではシロイヌナズナのAGKがP_{II} proteinと相互作用し、活性制御機構されることが*in vitro*で解析されていた。そこで野生スイカの乾燥強光ストレスに伴うP_{II} protein量を解析したところ、シトルリンの蓄積と相関して発現量が増加していた。さらに野生スイカAGKは、乾燥強光に伴い活性が増加するだけでなく、アルギニンによるフィードバック阻害が緩和されることを見出した。これらの結果は、野生スイカAGKがP_{II} proteinにより活性制御されることで、適合溶質の生合成代謝と、他の炭素・窒素代謝系が協調して制御される可能性を示唆する。

以上のことから、野生スイカのシトルリンの蓄積には、光合成に関連するタンパク質の窒素分がシトルリン生合成に再利用されること、グルタミン酸からのシトルリン生合成初発段階の3酵素の活性が増加する一方、異化酵素の活性が減少すること、そしてシトルリン生合成に関わる酵素が乾燥強光時の葉内環境

に適応した特性を持つことに起因していると考えられる。さらにシトルリン代謝は、他の炭素・窒素代謝系と協調して、ストレス時の限りある窒素源を効率よく利用できるよう厳密に制御されていることが考えられる。これら総合的な代謝制御は、植物が悪環境に対して適応を図る上で、重要な機構ではないかと考えられる。

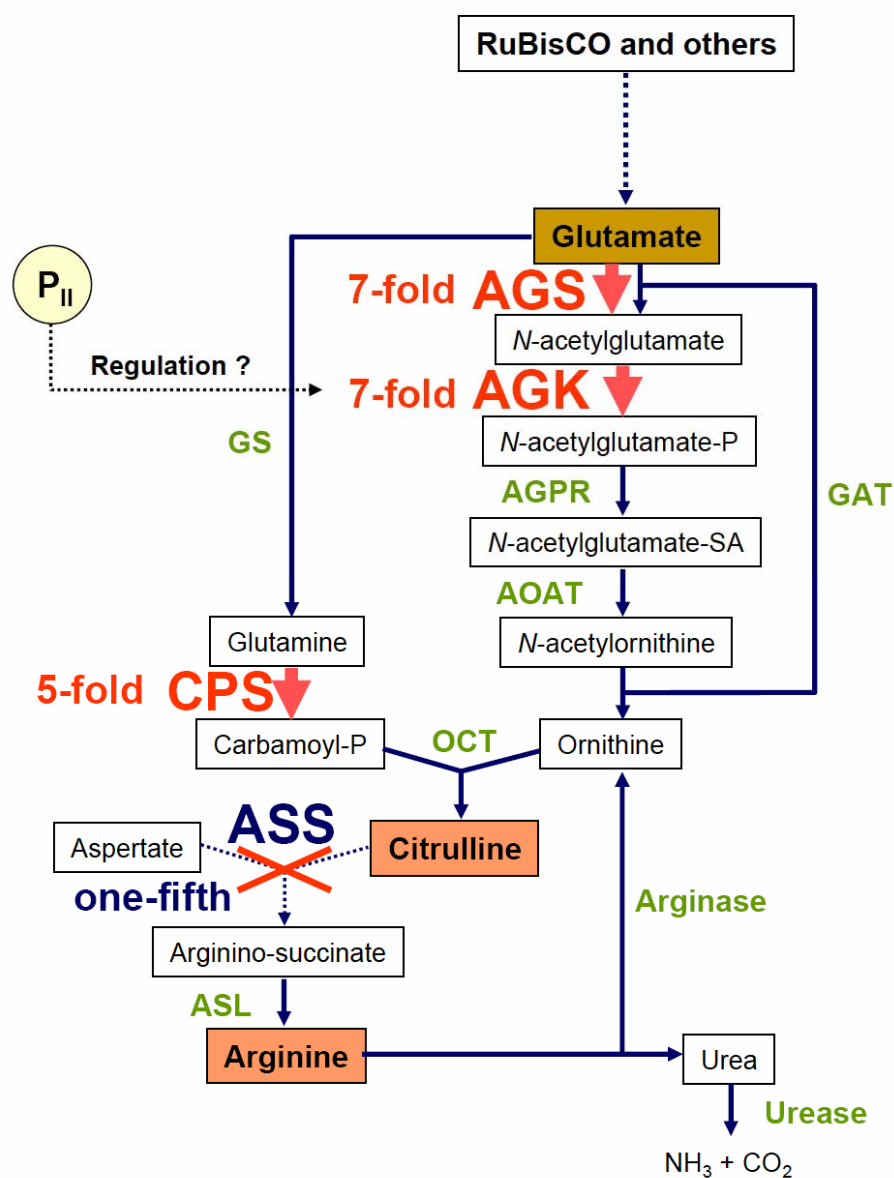


Fig. 5-1 乾燥強光に伴うシトルリン代謝経路の酵素活性制御のモデル

謝辞

奈良先端科学技術大学院大学において、本研究に取り組むにあたり、様々な人々から影響を受け、また指導していただきましたおかげで、本論文を書き上げることができました。

本研究に取り組むチャンスを与えていただき、多くの非常に有益な議論をしてくださった横田明徳教授に深く感謝を申し上げます。今後も研究に真摯に取り組む、結果について議論できたらうれしく思います。そして、私の至らない部分をカバーし、指導してくださった明石欣也助手に厚く御礼申し上げます。文章の添削やプレゼンテーションの助言により、本論文がより質の高いものになったと思います。現在京都大学農学部、ならびに石川県立大学生物資源工学研究所でご活躍なさっている河内孝之教授と竹村美保助教授には、私が取り組んでいる視点と別の切り口から多くの議論をいただき、様々な角度からの議論を楽しく行うことができました。また蘆田弘樹助手の研究から、私の研究に吸収できることが数多くあり、多くの助言をいただいたことで、思い通りに研究を進めることができました。心より感謝いたします。半年間と短い間でしたが、宗景ゆり助手には鋭い指摘をいただき、感謝申し上げます。

P_{II} proteinの抗体を快く分与していただきました東北大学の山谷知行教授、N末端アミノ酸配列の解読ならびにMALDI-MSをしていただいた塚本潤子技官、スイカのお世話を協力していただいた萩原農場の橋詰利治氏、森川かおる技官に深く感謝申し上げます。おかげで実験をスムーズに進めることができ、様々な有用な情報を得ることができました。

ここでは、多すぎて名前を挙げることはできませんが、私と同じく野生スイカの研究をしていた本講座に在籍していた先輩、同輩、後輩の皆様本当に世話になりました。モデル植物ではない野生スイカの苦勞を協力して乗り越え、ときには傷をなめあい、ときには励ましあい、お互い高め合えたことを非常に誇りに思います。また本研究室に在籍していたすべての皆様に、公私にわたり助言していただき感謝申し上げます。最後に、この5年間私の好きにさせていただいた、父、母、姉に対しては、感謝の気持ちを言葉では表すすべもありません。

この5年間多大な人々から受けた影響をすべてプラスの方向で発揮できるよう日々精進し、また私からも少ないながら皆様に影響を与えるよう努力いたしますので、これからも機会があれば叱咤激励していただきたく存じ上げます。

参考文献

Abadjieva A, Hilven P, Pauwels K & Crabeel M (2000) The yeast ARG7 gene product is autoproteolyzed to two subunit peptides, yielding active ornithine acetyltransferase. *J. Biol. Chem.* **275**, 11361-11367.

Abadjieva A, Pauwels K, Hilven P & Crabeel M (2001) A new yeast metabolon involving at least the two first enzymes of arginine biosynthesis: acetylglutamate synthase requires complex formation with acetylglutamate kinase *J. Biol. Chem.* **276**, 42869-42880.

Abebe T, Guenzi AC, Martin B & Chushman JC (2003) Tolerance of mannitol-accumulation transgenic wheat to water stress and aslinity. *Plant Physiol.* **131**, 1748-1755.

Abraham E, Rigo G, Szekely G, Nagy R, Koncz & Szabados L (2003) Light-dependent induction of proline biosynthesis by abscisic acid and salt stress is inhibited by brassinosteroid in Arabidopsis. *Plant Mol. Biol.* **51**, 363-372.

Akashi K, Miyake C & Yokota A (2001) Citrulline, a novel compatible solute in drought-tolerant wild watermelon leaves, is an efficient hydroxyl radical scavenger. *FEBS Lett.* **508**, 438-442.

Akashi K, Nishimura N, Ishida Y & Yokota A (2004) Potent hydroxyl radical-scavenging activity of drought-induced type-2 metallothionein in wild watermelon. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **323**, 72-78.

Alberty RA, Massey V, Friedin C & Fuhlbrigge AR (1954) Studies of the enzyme fumarase. III. The dependence of the kinetic constants at 25° upon the concentration and pH of phosphate buffer. *J. Amer. Chem. Soc.* **76**, 2485-2493.

Albrecht AM & Vogel HJ (1964) Acetylornithine δ -transaminase. Partial purification and repression behavior. *J. Biol. Chem.* **239**, 1872-1876.

Apel K & Hirt H (2004) Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Ann. Rev. Plant. Biol.* **55**, 373-399.

Arabidopsis Genome Initiative (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **408**, 796-815.

Arcondéguy T, Jack R & Merrick M (2001) P_{II} signal transduction proteins, pivotal players in microbial nitrogen control. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **65**, 80-105.

Baetens M, Legrain C, Boyen A & Glansdorff N (1998) Genes and enzymes of the acetyl cycle of arginine biosynthesis in the extreme thermophilic bacterium *Thermus thermophilus* HB27. *Microbiology* **144**, 479-92.

Barnes RL (1963) Organic nitrogen compounds in tree xylem sap. *For. Sci.* **9**, 98-102.

Biagini A & Puigserver A (2001) Sequence analysis of the aminoacylase-1 family. A new proposed signature for metalloexopeptidases. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* **128**, 469-481.

Blattner FR, Plunkett G3rd, Bloch CA, Perna NT, Burland V, Riley M, Collado-Vides J, Glasner JD, Davis NW, Kieckpatrick HA, Goeden MA, Rose DJ, Mau B & Shao Y (1997) The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* **277**, 1453-1474.

Boyde TRC & Rahmatullah M (1980) Optimization of conditions for the colorimetric determination of citrulline, using deacetyl monoxime. *Anal. Biochem.* **107**, 424-431.

Boyer JS (1982) Plant productivity and environment. *Science* **218**, 443-448.

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.

Buchanan-Wollaston V (1997) The molecular biology of leaf senescence. *J. Exp. Bot.* **48**, 181-199.

Burollo S, Luque I, Fuentes I & Contreras (2004) Interaction between the nitrogen signal transduction protein PII and *N*-acetyl glutamate kinase in organisms that perform oxygenic photosynthesis. *J. Bacteriol.* **186**, 3346-3354.

Caldovic L, Lopez GY, Hasskins N, Panglao M, Shi D, Morizono H & Tuchman (2005) Biochemical properties of recombinant human and mouse *N*-acetylglutamate synthase. *Mol. Genet. Metab.*, in press.

Caldovic L & Tuchman M (2003) *N*-acetylglutamate and its changing role through evolution. *Biochem. J.* **372**, 279-290.

Chen TH & Murata N (2002) Enhancement of tolerance of abiotic stress by metabolic engineering of betaines and other compatible solutes. *Curr. Opin. Plant Biol.* **5**, 250-257.

Chen YM, Ferrar TS, Lohmeir-Vogel E, Morrice N, Mizuno Y, Berenger B, Ng KK, Muench DG & Moorhead GB, The PII signal transduction protein of *Arabidopsis thaliana* forms an arginine regulated complex with plastid *N*-acetyl glutamate kinase. *J. Biol. Chem.*, in press.

Cohen Y, Alchanatis V, Meron M, Saranga Y & Tsipris J (2005) Estimation of leaf water potential by thermal imagery and spatial analysis. *J. Exp. Bot.* **56**, 1843-1852.

Crabeel M, Abadjieva A, Hilven P, Desimpelaere J & Soetens O (1997) Characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* ARG7 gene encoding ornithine acetyltransferase, an enzyme also endowed with acetylglutamate synthase activity. *Eur. J. Biochem.* **250**, 232-241.

Crabeel M, Soetens O, De Rijcke M, Pratiwi R & Pankiewicz R (1996) The ARG11 genes of *Saccharomyces cerevisiae* encodes a mitochondrial integral membrane protein

required for arginine biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **271**, 25011-25018.

Cunin R, Glansdorff N, Pierard A & Stalon V (1986) Biosynthesis and metabolism of arginine in bacteria. *Microbiol. Rev.* **50**, 314-352.

Dafny-Yelin M, Guterman I, Menda N, Ovadis M, Shalit M, Pichersky E, Zamir D, Lewinsohn E, Adam Z, Weiss D & Vainstein A (2005) Flower proteome: changes in protein spectrum during the advanced stages of rose petal development. *Planta* **222**, 37-46.

Davis RH (1986) Compartmental and regulatory mechanisms in the arginine pathways of *Neurospora crassa* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Rev.* **50**, 280-313.

Davis RH, Ristow JL & Hanson BA (1980) Carbamyl phosphate synthetase A of *Neurospora crassa*. *J. Bacteriol.* **141**, 144-155.

Delauney AJ & Verma DPS (1993) Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. *Plant J.* **4**, 215-223.

Delledonne M (2005) NO news is good news for plants. *Curr. Opin. Plant. Biol.* **8**, 390-396.

Doudill AJ, Heathwaite AL & Thomas DSG (1998) Soil water movement and nutrient cycling in semi-arid rangeland: vegetation change and system resilience. *Hydrol Process* **12**, 443-459.

Edward A (1992) World atlas of desertification, UNEP

Elkins JM, Kershaw NJ & Schofield CJ (2005) X-ray crystal structure of ornithine acetyltransferase from the clavulanic acid biosynthesis gene cluster. *Biochem. J.* **385**, 565-573.

FAO Statistical databases (2005) Food and Agriculture Organization of the united nation

Ferrario-Méry S, Valadier MH & Foyer CH (1998) Over expression of nitrate reductase in tobacco delays drought-induced decrease in nitrate reductase activity and mRNA. *Plant Physiol.* **117**, 293-302.

Ferrario-Méry S, Bouvet M, Leleu O, Savino G, Hodges M & Meyer C (2005) Physiological characterization of *Arabidopsis* mutants affected in the expression of the putative regulatory protein PII. *Planta* **223**, 28-39.

Forchhammer K & Tandeau de Marsac N (1995) Phosphorylation the P_{II} protein (*glnB* gene product) in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7942: analysis of in vitro kinase activity. *J. Bacteriol.* **177**, 5812-5817.

Foyer CH, Valadier MH, Migge A & Becker TW (1998) Drought-induced effects on nitrate reductase activity and mRNA and coordination of nitrogen and carbon metabolism in maize leaves. *Plant Physiol.* **117**, 283-292.

Foyer CH, Descourvieres P & Kunert KJ (1994) Protection against oxygen radicals: an important defence mechanism studied in transgenic plants. *Plant Cell Environ.* **17**, 507-523.

Fridman E, Carrari F, Liu YS, Fernie AR & Zamir D (2004) Zooming in on a quantitative trait for tomato yield using interspecific introgressions. *Science* **305**, 1786-1789.

Gan S & Amasino RM (1997) Making sense of senescence. *Plant Physiol.* **113**, 313-319.

Garcia-España A, Carbonell J & Rubio V (1989) Arginine biosynthesis, ornithine transcarbamoylase and aspartate transcarbamoylase activities in the pea ovary. *Plant Physiol.* **90**, 1565-1569.

Ginzberg I, Stein H, Kapulnik Y, Szabados L, Strizhov N, Schell J, Koncz C & Zilberstein A (1998) Isolation and characterization of two different cDNAs of

Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthase in alfalfa, transcriptionally induced upon salt stress. *Plant Mol. Biol.* **38**, 755-764.

Haas D & Leisinger Y (1975) *N*-acetylglutamate 5-phosphotransferase of *Pseudomonas aeruginosa*. Purification and ligand-directed association-dissociation. *Eur. J. Biochem.* **52**, 365-375.

Hanson AD & Hitz WD (1982) Metabolic responses of mesophytes to plant water deficits. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **33**, 163-203.

Hare PD, Cress WA & Van Staden J (1998) Dissecting the roles of osmolyte accumulation during stress. *Plant Cell Environ.* **21**, 535-553.

Havir AE, Tamir H, Ratner S & Warner RC (1965) Biosynthesis of urea. XI. Preparation of properties of crystalline argininosuccinase. *J. Biol. Chem.* **210**, 3079-3088.

He P, Osaki M, Takebe M, Shinano T & Wasaki J (2005) Endogenous hormones and expression of senescence-related gene in different senescent types of maize. *J. Exp. Bot.* **56**, 1117-1128.

Hegde DM (1988) Effect of irrigation and nitrogen fertilization on yield, quality, N uptake and water use of watermelon (*Citrullus lanatus*). *Ind. J. Agril. Sci.* **58**, 444-448.

Heinrich A, Maheswaran M, Ruppert U & Forchhammer K (2004) The *Synechococcus elongatus* P_{II} signal transduction protein controls arginine synthesis by complex formation with *N*-acetyl-L-glutamate kinase. *Mol. Microbiol.* **52**, 1303-1314.

Hinde RW, Jacobson JA, Weiss RL & Davis RH (1986) *N*-acetylglutamate synthase of *Neurospora crassa*. Characteristic, localization, regulation, and genetic control. *J. Biol. Chem.* **261**, 5848-5852.

Hopkins WG & Hüner NPA (2004) Energy conversion in photosynthesis: CO₂ assimilation. In *Introduction to Plant Physiology* 3rd Edn, pp. 89-122. Hoboken, New Jersey: John Wiley and Sons, Inc.

Hörtensteiner S & Feller U (2002) Nitrogen metabolism and remobilization during senescence. *J. Exp. Bot.* **53**, 927-937.

Hsieh MH, Lam HM van de Loo FJ & Coruzzi G (1998) A PII-like protein in *Arabidopsis*; putative role in nitrogen sensing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 13965-13970.

Hwang ID, Lee Y, Kim SG, Lee JS & Kwon YM (1996) Enzyme activities of canavanine metabolism in *Canavalia lineate* L. callus. *J. Plant Physiol.* **149**, 494-500.

Idso SB, Jackson RD, Pinter PJ, Reginato RJ & Hatfield JL (1981) Normalizing the stress-degree-day parameter for environmental variability. **24**, 45-55. *Agricultural Meteorology*

International Rice Genome Sequencing Projects (2005) The map-based sequence of the rice genome. *Nature* **436**, 793-800.

Jaggi R, Ybarlucea W, Cheah E, Carr PD, Edward KJ, Ollis DL & Vasudevan SG (1996) The role of the T-loop of the signal transducing protein P_{II} from *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* **391**, 223-228.

Jauniaux JC, Urrestarazu A & Wiame JM (1978) Arginine metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*: subcellular localization of the enzymes. *J. Bacteriol.* **133**, 1096-1107.

Javelle A, Severi E, Thornton J & Merrick M (2004) Ammonium sensing in *Escherichia coli*. Role of an ammonium transporter AmtB and Amt-GlnK complex formation. *J. Biol. Chem.* **279**, 8530-8538.

Javid-Majd F & Blanchard JS (2000) Mechanism analysis of the *argE*-encoded *N*-acetylornithine deacetylase. *Biochemistry* **39**, 1285-1293.

Kaiser WM & Foster J (1989) Low CO₂ prevents nitrate reductase in leaves. *Plant*

Physiol. **91**, 970-974.

Kaltwasser H & Schlegel HG (1966) NADH-dependent coupled enzyme assay for urease and other ammonia-producing systems. *Anal. Biochem.* **16**, 132-138.

Kamemoto ES & Atkinson DE (1985) Modulation of the activity of rat liver acetylglutamate synthase by pH and arginine concentration. *Arch. Biochem. Biophys.* **243**, 100-107.

Kawasaki S, Miyake C, Kohchi T, Fujii S, Uchida M & Yokota A (2000) Response of wild watermelon to drought stress : Accumulation of an ArgE homologue and citrulline in leaves during water deficits. *Plant Cell Physiol.* **41**, 864-873.

Kershaw NJ, McNaughton HJ, Hewitson KS, Hernandez H, Griffin J, Hughes C, Greaves P, Barton B, Robinson CV & Schofield CJ (2002) ORF6 from the clavulanic acid gene cluster of *Streptomyces clavuligerus* has ornithine acetyltransferase activity. *Eur. J. Biochem.* **269**, 2052-2059.

Kohchi T, Mukougawa K, Frankenberg N, Masuda M, Yokota A & Lagarias JC (2001) The Arabidopsis *HY2* gene encodes phytylchromobilin synthase, a ferredoxin-dependent biliverdin reductase. *Plant Cell* **13**, 425-436.

Larcher W (1995) *Plant under stress. Physiological plant ecology*, Third edition. pp. 321-448. Springer-Verlag, New York.

Lawlor DW & Cornic G (2002) Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants. *Plant Cell Environ.* **25**, 275-294.

Lee HM, Flores E, Forchhammer K, Herrero A & Tandeau de Marsac N (2000) Phosphorylation of the signal transducer P_{II} and an additional effector are required for the P_{II}-mediated regulation of nitrate and nitrite uptake in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7942. *Eur. J. Biochem.* **267**, 591-600.

Lee Y, Choi YA, Hwang ID, Kim SG & Kwon YM (2001) cDNA cloning of two isoforms of ornithine carbamoyltransferase from *Canavalia lineata* leaves and the effect of site-directed mutagenesis of the carbamoyl phosphate binding site. *Plant Mol. Biol.* **46**, 651-660.

Leisinger T & Haas D (1975) N-acetylglutamate synthase of *Escherichia coli* regulation of synthesis and activity by arginine. *J. Biol. Chem.* **250**, 1690-1693.

Li ZK, Fu BY, Gao YM, Xu JL, Ali J, Lafitte HR, Jiang YZ, Rey JD, Vijayakumar R, Zheng TQ & Zhu LJ (2005) Genome-wide introgression lines and their use in genetic and molecular dissection of complex phenotypes in rice (*Oryza sativa* L). *Plant Mol. Biol.* **59**, 33-52.

Liu Y, Van Heeswijck R, Hoj P & Hoogenraad N (1995) Purification and characterization of ornithine acetyltransferase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.* **228**, 291-296.

Lundberg P & Lunfquist PO (2004) Primary metabolism in N₂-fixing *Alnus incana*-*Frankia* symbiotic root nodules studied with ¹⁵N and ³¹P nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Plant* **219**, 661-672.

Maggio A, Miyazawa P, Veronese P, Fujita T, Ibeas I, Damsz B, Narasimhan ML, Hasegawa PM, Joly RJ & Bressan RA (2002) Does proline accumulation play an active role in stress-induced growth reduction? *Plant J.* **31**, 699-712.

Maheswaran M, Urbanke C & Forchhammer K (2004) Complex formation and catalytic activation by the P_{II} signaling protein of N-acetyl-L-glutamate kinase from *Synechococcus elongates* Strain PCC 7942. *J. Biol. Chem.* **279**, 55202-55210.

Marc F, Weigel P, Legrain C, Almeras Y, Santrot M, Glansdorff N & Sakanyan V (2000) Characterization and kinetic mechanism of mono- and bifunctional ornithine acetyltransferases from thermophilic microorganisms. *Eur. J. Biochem.* **267**, 5217-5226.

Marc F, Weigel P, Legrain C, Glansdorff N & Sakanyan V (2001) An invariant threonine is involved in self-catalyzed cleavage of the precursor protein for ornithine acetyltransferase. *J. Biol. Chem.* **276**, 25404-25410.

Marco-Marin C, Ramon-Maiques S, Tavares S & Rubio V (2003) Site-directed mutagenesis of *Escherichia coli* acetylglutamate kinase and aspartokinase III probes the catalytic and substrate-binding mechanisms of these amino acid kinase family enzymes and allows three-dimensional modeling of aspartokinase. *J. Mol. Biol.* **334**, 459-476.

Marvil DK & Leisinger (1977) *N*-acetylglutamate synthase of *Escherichia coli*: purification, characterization, and molecular properties. *J. Biol. Chem.* **252**, 3295-3303.

Mass WK (1994) The arginine repressor of *Escherichia coli*. *Microbiol. Rev.* **58**, 631-640.

Mauseth JD (2003) Botany: an introduction to plant biology, third edition, John and Bartlett Publisher, Inc.

McCue KF & Hanson AD (1992) Effects of soil salinity on the expression of betaine aldehyde dehydrogenase in leaves: investigation of hydraulic, ionic and biochemical signals. *Aust. J. Plant. Physiol.* **19**, 555-564.

McKay G & Shargool PD (1981) Purification and characterization of *N*-acetylglutamate-5-phosphotransferase EC 2.7.2.8 from pea (*Pisum sativum*) cotyledons. *Biochem. J.* **195**, 71-81.

Miller G, Stein H, Honig A, Kapulnik Y & Zilberstein A (2005) Responsive modes of *Medicago sativa* proline dehydrogenase genes during salt stress and recover dictate free proline accumulation. *Planta* **222**, 70-79.

Miyake C & Yokota A (2000) Determination of the rate of photoreduction of O₂ in the water-water cycle in watermelon leaves and enhancement of the rate by limitation of photosynthesis. *Plant Cell Physiol.* **41**, 335-343.

Moorhead GBG & Smith CS (2003) Interpreting the plastid carbon, nitrogen, and energy status. A role for PII? *Plant Physiol.* **133**, 492-498.

Mori H (2004) From the sequence to cell modeling: Comprehensive functional genomics in *Escherichia coli*. *J. Biochem. Mol. Biol.* **37**, 83-92.

Morris CJ & Thompson JF (1977) Formation of *N*-acetylglutamate by extracts of higher plants. *Plant Physiol.* **59**, 684-687.

Nanasato Y, Akashi K & Yokota A (2005) Co-expression of cytochrome b561 and ascorbate oxidase in leaves of wild watermelon under drought and high light conditions. *Plant Cell Physiol.* **46**, 1515-1524.

Nielsen H, Engelbrecht J, Brunak S & von Heijne G (1997) Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Eng.* **10**, 1-6.

Ninfa AJ & Jiang P (2005) PII signal transduction proteins: sensors of α -ketoglutarate that regulate nitrogen metabolism. *Curr. Opin. Microbiol.* **8**, 168-173.

Noodèn LD, Guamet JJ & John I (1997) Senescence mechanism. *Physiologia Plantarum* **101**, 746-753.

Nuccio ML, Rhodes D, McNeil SD & Hanson AD (1999) Metabolic engineering of plants for osmotic stress resistance. *Curr. Opin. Plant. Biol.* **2**, 128-134.

Nuccio ML, Ziemak MJ, Henry SA, Weretilnyk EA & Hanson AD (2000) cDNA cloning of phosphoethanolamine *N*-methyltransferase from spinach by complementation in *Schizosaccharomyces pombe* and characterization of the recombinant enzyme. *J. Biol. Chem.* **275**, 14095-14101.

O'Brien (1979) Isolation and characterization of argininosuccinate synthetase from human liver. *Biochemistry* **18**, 5253-5256.

O'Neal TD & Naylor AW (1976) Some regulatory properties of pea leaf carbamoyl phosphate synthetase. *Plant Physiol.* **57**, 23-28.

Ong BL & Jackson JF (1972) Aspartate transcarbamoylase from *Phaseolus aureus*. Partial purification and properties. *Biochem. J.* **129**, 571-582.

Oono Y, Seki M, Nanjo T, Narusaka M, Fujita M, Satoh R, Satou M, Sakurai T, Ishida J, Akiyama K, Iida K, Maruyama K, Satoh S, Yamaguchi-Shinozaki K & Shinozaki K (2003) Monitoring expression profiles of *Arabidopsis* gene expression during rehydration process after dehydration using ca 7000 full-length cDNA microarray. *Plant J.* **34**, 868-887.

Ozer N (1985) A new enzyme-coupled spectrophotometric method for the determination of arginase activity. *Biochem. Med.* **33**, 367-371.

Paulus H (2000) Protein splicing and related forms of protein autoprocessing. *Annu. Rev. Biochem.* **69**, 447-496.

Pauwels K, Abadjieva A, Hilven P, Stankiewicz A & Crabeel M (2003) The N-acetylglutamate synthase/N-acetylglutamate kinase metabolon of *Saccharomyces cerevisiae* allows co-ordinated feedback regulation of the first two steps in arginine biosynthesis. *Eur. J. Biochem.* **270**, 1014-24.

Peoples MB & Dalling MJ (1988) The interplay between proteolysis and amino acid metabolism during senescence and nitrogen reallocation. Mathis P, ed. *Photosynthesis: from light to biosphere*, Vol. III. Amsterdam: Kluwer, 945-948.

Perler FB (1998) Breaking up is easy with esters. *Nat. Struct. Biol.* **5**, 249-252.

Pic E, de la Serve BT, Tardieu F & Turc O (2002) Leaf senescence induced by mild water deficit follows the same sequence of macroscopic, biochemical, and molecular events as monocarpic senescence in pea. *Plant Physiol.* **128**, 236-246.

Radin JW, Lu Z, Percy RG & Zeiger E (1994) Genetic variability for stomatal conductance in Pima cotton and its relation to improvements of heat adaptation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 7217-7221.

Ramón-Maiques S, Marina A, Gil-Ortiz F, Fita I & Rubio V (2002) Structure of acetylglutamate kinase, a key enzyme for arginine biosynthesis and a prototype for the amino acid kinase enzyme family, during catalysis. *Structure* **10**, 329-342.

Rathinasabapathi B, Brnet M, Russell BL, Gage DA, Liao PC, Nye GJ, Scott P, Golbeck JH & Hanson AD (1997) Choline monooxygenase, an unusual iron-sulfur enzyme catalyzing the first step of glycine betaine synthesis in plants: Prosthetic group characterization and cDNA cloning. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 3454-3458.

Ratner S (1973) Enzymes of arginine and urea synthesis. *Adv. Enzymol.* **39**, 11-90.

Rontein D, Basset G & Hanson AD (2002) Metabolic engineering of osmoprotectant accumulation in plants. *Metab. Eng.* **4**, 49-56.

Rubino SD, Nyunoya H & Lusty CJ (1986) Catalytic domains of carbamoyl phosphate synthetase. *J. Biol. Chem.* **261**, 11320-11327.

Sakamoto A & Murata N (2000) Genetic engineering of glycine betaine synthesis in plants: current status and implications for enhancement of stress tolerance. *J. Exp. Bot.* **51**, 81-88.

Sakanyan V, Kochikyan A, Mett I, Legrain C, Charlier D, Pierard A & Glansdorff N (1992) A re-examination of the pathway for ornithine biosynthesis in a thermophilic and two mesophilic *Bacillus* species. *J. Gen. Microbiol.* **138**, 125-130.

Sambrook J, Fritsch EF & Maniatis T (1989) *Molecular cloning: A Laboratory Manual*, Third edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY

Shargool PD & Jain JC (1985) Use of N^2 -bromoacetyl-L-ornithine to study L-ornithine and L-arginine biosynthesis in soybean (*Glycine max* L.) cell cultures. *Plant Physiol.* **78**, 795-798.

Slocum RD (2005) Genes, enzymes and regulation of arginine biosynthesis in plants. *Plant Physiol. Biochem.* **43**, 729-745.

Segel IH (1975) Enzyme Kinetics: Behavior and Analysis of Rapid Equilibrium and Steady-State Enzyme System. Wiley, New York, USA.

Sinclair R (1983) Water relation of tropical epiphytes. II Performance during droughting. *J. Exp. Bot.* **34**, 1664-1675.

Smith CS, Zaplachinski ST, Muench D & Moorhead GBG (2002) Expression and purification of the chloroplast putative nitrogen sensor, PII, of *Arabidopsis thaliana*. *Protein Expr. Purif.* **25**, 2-7.

Smith CS, Morrice NA & Moorhead GBG (2004) Lack of evidence for phosphorylation of *Arabidopsis thaliana* PII: implication for plastid carbon and nitrogen signaling. *Biochim. Biophys. Acta* **1699**, 145-154.

Smith DD, Summers PS & Weretilnyk EA (2000) Phosphocholine synthesis in spinach: characterization of phosphoethanolamine *N*-methyltransferase. *Physiol. Plant* **108**, 286-294.

Stoop JM, Williamson JD & Pharr DM (1996) Mannitol metabolism in plants: a method for coping with stress. *Trends Plant Sci.* **1**, 139-144.

Sugiyama K, Hayakawa T, Kudo T, Ito T & Yamaya T (2004) Interaction of *N*-acetylglutamate kinase with a PII-like protein in rice. *Plant Cell Physiol.* **45**, 1768-1778.

Tadas P, Agata P, Pholop DR, Bernard R & Elsbeth LW (1999) Identification of

senescence-associated genes from daylily petals. *Plant Mol. Biol.* **40**, 237-248.

Thompson JF (1980) Arginine Synthesis, Proline synthesis, and related processes. *The Biochemistry of Plants*, Vol.5. pp. 375-402. Academic Press

Van de Castele M, Demarez M, Legrain C, Glansdorff N & Pierard A (1990) Pathways of arginine biosynthesis in extreme thermophilic archeo- and eubacteria. *J. Gen. Microbiol.* **136**, 1177-1183.

van de Ven WT, LeVesque CS, Perring TM & Walling LL (2000) Local and systemic changes in squash gene expression in response to silverleaf whitefly feeding. *Plant Cell* **12**, 1409-1423.

Vogel HJ & Bonner DM (1956) Acetylornithinase of *Escherichia coli*: partial purification and some properties. *J. Biol. Chem.* **218**, 97-106.

Vogel HJ, & McLellan WL (1970) *N*-acetyl-glutamic- γ -semialdehyde dehydrogenase (*Escherichia coli*). *Methods Enzymol.* **17A**, 255-260.

Vogel HJ, & Jones EE (1970) Acetylornithine δ -aminotransferase (*Escherichia coli*). *Methods Enzymol.* **17A**, 260-264.

Walters DR (2003) Polyamine and plant disease. *Phytochemistry* **64**, 97-107.

Walz C, Giavalisco P, Schad M, Juenger M, Klose J & Kehr J (2004) Proteomics of curcubit phloem exudates reveals a network of defence proteins. *Phytochemistry* **65**, 1795-1804.

Wandinger-Ness AU, Wolf EC, Weiss RL & Davis RH (1985) Acetylglutamate kinase-acetylglutamyl-phosphate reductase complex of *Neurospora crassa*. Evidence for two polypeptide. *J. Biol. Chem.* **260**, 5974-5978.

Weretilnyk EA, Alexander KJ, Drebenstedt M, Snider J, Summers PS & Moffatt BA

(2001) Maintaining methylation Activities during salt stress. The involvement of adenosine kinase. *Plant Physiol.* **125**, 856-865.

Weretilnyk EA & Hanson AD (1990) Molecular cloning of a plant betaine-aldehyde dehydrogenase, an enzyme implicated in adaptation to salinity and drought. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 2745-2749.

Yang J, Zhang J, Wang A, Zhu Q & Liu L (2002) Abscisic acid and cytokinins in the root exudates and leaves and their relationship to senescence and remobilization of carbon reserves in rice subjected to water stress during grain filling. *Planta* **215**, 645-652.

Yokota A, Kawasaki S, Iwano M, Nakamura C, Miyake C & Akashi K (2002) Citrulline and DRIP-1 protein (ArgE homologue) in drought tolerance of wild watermelon. *Ann. Bot. (Lond)* **89**, 825-832.

Yokota A, Takahara K & Akashi K (2006) Chapter 1 Water Stress, in K.V. Madhava Rao, A.S. Raghavendra and K. Janardhan Reddy, Eds. *Physiology and Molecular Biology of Stress Tolerance in Plants*. Springer.

Zeevaart JAD & Creelman RA (1988) Metabolism and physiology of abscisic acid. *Ann Rev Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **39**, 439-473.

上妻馨梨 (2004) 葉緑体ATP合成酵素ε-サブユニットの解離による電子伝達リン酸化脱共役の可能性 奈良先端科学技術大学院大学 修士論文

澤江寿一 (2006) 野生種スイカの乾燥誘導性タンパク質DRIP-1の機能解析 奈良先端科学技術大学院大学 修士論文

中村智恵 (2000) 野生種スイカ (*Citrullus lanatus* sp.)の乾燥ストレス耐性機構の形態学的解明 奈良先端科学技術大学院大学 修士論文

吉田和生 (2006) 野生種スイカの葉における乾燥強光ストレス応答性タンパク

質の網羅的解析 奈良先端科学技術大学院大学 修士論文

芳野杏利 (2006) 野生種スイカの適合溶質シトルリンの生合成に必要なカルバモイルリン酸の代謝制御 奈良先端科学技術大学院大学 修士論文

論文目録

Takahara K, Akashi K & Yokota A (2005) Purification and characterization of glutamate *N*-acetyltransferase involved in citrulline accumulation in wild watermelon. *FEBS J.* **272**, 5353-5364.

Yokota A, Takahara K & Akashi K (2006) Chapter 1 Water Stress, in K.V. Madhava Rao, A.S. Raghavendra and K. Janardhan Reddy, Eds. *Physiology and Molecular Biology of Stress Tolerance in Plants*. Springer