

渡辺恒雄\*・近藤矩朗\*\*： 紅藻及び褐藻からオーキシン誘導黄  
化ヤエナリ下胚軸切片のエチレン生合成を阻害する物質の単離

Tsuneo WATANABE\* and Noriaki KONDO\*\*： Isolation of the inhibitors  
of ethylene biosynthesis in auxin-induced etiolated mungbean  
hypocotyl sections from red and brown algae.

エチレンの作用の多様性やエチレン生合成の生理的意義は、多くの研究<sup>1)~6)</sup> から明らかにされているが、エチレン生合成系が緑、褐、紅藻に存在するか否かは明らかでない。近年植物のエチレン生合成を阻害する物質の存在が明らかにされ、阻害物質として蛋白質<sup>2) 8) 9)</sup>、ペンディルイソチオシアン酸<sup>10)</sup>、Rhizobitoxin<sup>11)</sup> 等が報告されている。海藻におけるエチレン生合成系の存在の検討をしている過程で、阻害物質を分離することに重要な意義があること考え、阻害物質の検索を試みた。緑、褐、紅藻にオーキシン誘導黄化ヤエナリの下胚軸切片のエチレン生合成を阻害する蛋白質が存在することを見出したことは、すでに発表した。今回は、紅藻と褐藻の抽出液を硫酸分画、ゲル濾過、限外濾過、イオン交換、脱塩を行って部分精製して標品を得たので、そのゲル濾過パターンの比較及びイオン交換で得られた分画のリングのエチレン生合成に及ぼす影響について実験した結果を報告する。

材 料 と 方 法

藻体は、伊豆半島白浜、下田鍋田湾で1974年2月、1975年2、3、5、6月に採集した。採集後直ちに大量の海水で洗い、不純物を除去し、水洗し-80°Cのディープフリーザーに保存してから実験に供した。用いた材料は下記の通りである。

褐 藻

ア ラ メ *Eisenia bicyclis* (KJELLMAN) SETCHELL

コモングサ *Spatoglossum pacificum* YENDO

紅 藻

アツパノリ *Sarcodia ceylanica* HARVEY

ヒラキントキ *Prionitis patens* OKAMURA

\* 帝人株式会社生物医学研究所生化学研究室 (191 東京都日野市旭が丘4-3-2)

Laboratory of Biochemistry, Teijin Institute for Biomedical Research, Teijin Limited, Hino, Tokyo, 191 Japan.

\*\* 国立公害研究所 (300 茨城県筑波郡谷田部町船野)

Division of Environmental Biology, The National Institute for Environmental Studies, Yatabe, Ibaraki-ken, 300 Japan.

Bull. Jap. Soc. Phycol., 23: 144-149, Dec. 1975.

タンパノリ *Pachymeniopsis elliptica* (HOLMES) YAMADA

イソマツ *Coeloseira pacifica* DAWSON

紅藻，褐藻からの蛋白分画の抽出，精製法は前報<sup>2)</sup>に従って行った。すなわち40%飽和硫酸分画，ゲル濾過，限外濾過，DEAE—セルロースクロマトグラフィーで行なった。エチレンの定量は，黄化ヤエナリの下胚軸切片 (1.5×6.0 mm) 及びリンゴのディスク (7×3 mm) に 0.5 mM の IAA, (3-indoleacetic acid) を与えて，エチレン生合成系を誘導し，生成されたエチレンの量は酒井，今関<sup>4)</sup>の方法に従って，日立ガスクロマトグラフ 063 型を用いて定量測定した。リンゴのエチレン生合成系はリンゴのディスク 12個を用いて，エチレン量を測定した。IAAを分解するとされているペルオキシダーゼ (E. C. 1, 11, 1, 17) 活性は，基本的には CHANCE と MAEHLI の方法に従い測定した。反応組成は精製したサンプル 5  $\mu$ l と 0.01 M リン酸緩衝液，pH 7.0, 300  $\mu$ l と Donor としての 20 mM グアヤコール 10  $\mu$ l の基質としての 100 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (メルク製) 10  $\mu$ l とであって，これらを 25°C で反応させ，470 nm で測定した。検量線は 1~90 単位/ml のペルオキシダーゼ (Boehringer mannheim 製) を使用して，上記反応組成比で Rapid scan analyzer RA 1300 (Union Giken) を用いて測定し，作成した。蛋白質量は Lowry 法<sup>5)</sup>に従って測定した。

### 結果と考察

Fig. 1. にオーキシン誘導黄化ヤエナリの下胚軸切片 (1.5×6.0 mm) の数とエチレン生成量の関係を示す。培養時間 6 時間，IAA 濃度 0.5 mM の条件下で直線関係が得られたので以下の実験は，20 切片を用いて，二系列で行なった。褐，紅藻の 40% 飽和硫酸沈殿で得られた蛋白分画を 0.1 mg/ml に希釈して，オーキシン誘導黄化ヤエナリのエチレン生合成に対する阻害活性を示したものが Table 1. である。紅藻ヒラキントキ，タンパノリに顕著なヤエナリのエチレン生合成の阻害活性が認められた。アツパノリヤイ

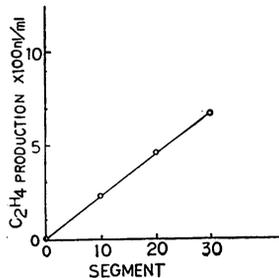


Fig. 1. Calibration curve between etiolated mungbean hypocotyl segments and its ethylene production IAA concentration is 0.5 mM.

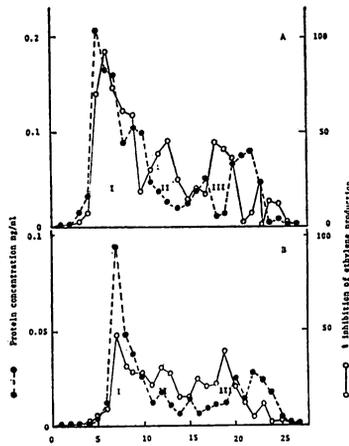


Fig. 2. Gel filtration of crude protein from *Sarcodia ceylanica* (A) and *Spatoglossum pacificum* (B) on Sephadex G-100.

ソマツにも高い阻害活性を示す蛋白分画が得られ、褐藻アラメ、コモングサにも阻害活性は認められるが、紅藻と比較すると低い傾向が見られた。Fig. 2. にはアツパノリ (A) とコモングサ (B) の40%飽和硫酸分画の Sephadex G-100 によるゲル濾過パターンを示す。アツパノリ、コモングサとも Inhibitor I, II, III の存在が認められ、ヒラキ

Table 1. Effects of a crude extract of marine algae on ethylene biosynthesis in etiolated mungbean hypocotyl segments

Algae	C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> produced nl/20 segments/6 hr	% inhibition
Brown algae		
<i>Eisenia bicyclis</i> (Arame)	242.4	47.2
<i>Spatoglossum pacificum</i> (Komongusa)	188.2	59.0
Red algae		
<i>Sarcodia ceylanica</i> (Atsubanori)	94.2	79.5
<i>Prionitis patens</i> (Hirakintoki)	27.6	94.0
<i>Coeloseira pacifica</i> (Isomatsu)	90.1	80.4
<i>Pachymeniopsis elliptica</i> (Tanbanori)	30.8	93.3
Control	459.1	—

Protein concentration is 0.1 mg/ml.

Table 2. Effects of the inhibitor from red algae on ethylene biosynthesis in apple disks

Algae	C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> produced nl/12 disks/19 hr	% inhibition
<i>Sarcodia ceylanica</i>	23.0	65.0
<i>Prionitis patens</i>	13.0	80.0
Control	65.0	—

Protein concentration is 0.1 mg/ml.

Table 3. Effects of the purified inhibitor I from brown and red algae on ethylene biosynthesis in apple disks

Algae	C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> produced nl/12 disks/19 hr	% inhibition
Brown algae		
<i>Eisenia bicyclis</i>	33.2	53.2
<i>Spatoglossum pacificum</i>	30.7	56.7
Red algae		
<i>Sarcodia ceylanica</i>	24.9	64.9
<i>Prionitis patens</i>	18.1	74.5
Control	70.9	—

Protein concentration is 0.025 mg/ml.

ントキ<sup>23)</sup>のパターンと同じ3種類の Inhibitor が存在している。各 Inhibitor ともペルオキシダーゼ活性が認められなかったことから藻類から得られたエチレン生合成阻害蛋白質は IAA を分解するのではなく、エチレン生合成系を阻害しているものと推察される。Table 2. には、リンゴ(国光)のディスク(7×3 mm)12個を30 ml のガラス容器で19時間培養し、アツバノリ、ヒラキントキから得られた Inhibitor I の影響を検討し、0.1 mg 蛋白濃度/ml でアツバノリで65%、ヒラキントキで80%の阻害が認められた。Table 3. には、アラメ、コモングサ、アツバノリ、ヒラキントキの Inhibitor I の DEAE-セルロースの0.25 M NaCl で溶出した分画を、Sephadex G-15 で脱塩し、蛋白濃度0.025 mg/ml に希釈した標品の阻害活性を示す。リンゴのエチレン生合成阻害活性についても紅藻が褐藻の阻害活性よりも強い傾向が見られた。ヤエナリから得られた阻害蛋白質は、リンゴのエチレン生合成阻害活性が非常に弱いと報告されているので、紅藻、褐藻からとりだした Inhibitor I はヤエナリの Inhibitor と性質が異なるようで

ある。紅藻の Inhibitor I は 95°C 20分間加熱に、95%以上の残存活性を示し、黄化ヤエナリの IAA 生長試験で生長を抑制しなかったことから IAA を分解しないものと推定される。Inhibitor I はペプシンで消化され、トリプシン消化は受けにくいことから、ヤエナリの蛋白性阻害物質と性質が異なるものと推察される。アツパノリから得られた Inhibitor I, II, III の分子量は、ポリアクリルアミドゲル電気泳動と Sephadex G-200 のゲル濾過からそれぞれ約 120,000, 78,000, 35,000 と推定された。(未発表)

紅、褐藻のエチレン生合成系の有無及びエチレンの生理的意義については不明であるが、紅藻、褐藻にはマメ料のヤエナリでみられたと同様のエチレン生合成阻害蛋白質が存在すること、褐藻と比べまた紅藻には褐藻よりも強い阻害活性が認められたことから、紅藻を実験対照に選び、エチレン生合成系が存在するか否か現在検討中である。Inhibitor I, II, III の諸性質についても現在検討中である。

稿を終えるにあたり、御指導と御校閲を賜った日本大学農獣医学部西沢一俊教授、研究上の便宜をいただいた東京教育大学理学部横浜康継助教授、帝人株式会社取締役野口照久博士、生物医学研究所長角田哲博士に深謝する。

### Summary

In this study, we have extracted proteinaceous substances, which inhibited ethylene biosynthesis by apple disks and auxin-induced ethylene biosynthesis by mungbean hypocotyl segments, from brown and red algae and partially purified them to homogeneous state. Some preliminary studies on the properties of these substances named inhibitors I, II and III were performed.

Materials used in this study were collected through several times and stored at  $-80^{\circ}$  until a enough material was obtained. These fronds were collected in February 1974, February, March, May and June 1975, at coastal area of Shimoda, Shizuoka Prefecture.

The inhibitory activity of these substances for the auxin-induced ethylene biosynthesis in mungbean was found in all their samples of 0.1 mg protein/ml. The inhibitory effect of inhibitor I from red algae on ethylene biosynthesis in apple disks were very strong; the sample of 0.1 mg protein/ml inhibited by 65 to 85%.

The physiological significances of the inhibitor I, II and III from these marine algae are still obscure, but it was suggested from the above results that there may be ethylene biosynthetic pathway in red and brown algae. Further characterization of the inhibitor is now in progress.

## References

- 1) BURG, S.P. (1962). The physiology of ethylene formation. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **13**: 265-302.
- 2) WATANABE T. and KONDO N. (1975). Isolation of the proteinaceous inhibitor of ethylene biosynthesis from marine algae. *Agr. Biol. Chem.* (in press).
- 3) CHANCE B. and MAEHLY A.C. (1955). Assay of catalases and peroxidases. *Methods in Enzymology.* **II**: 764-775.
- 4) SAKAI S. and IMASEKI H. (1973). A proteinaceous inhibitor of ethylene biosynthesis by etiolated mungbean hypocotyl sections. *Planta.* **113**: 115-128.
- 5) ABELES F.B. (1972). Biosynthesis and mechanism of action of ethylene. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **23**: 259-292.
- 6) PRATT H.K. (1969). Physiological roles of ethylene in plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **20**: 541-584.
- 7) YANG S.F., KU H.S., and PRATT H.K. (1966). Ethylene production from methionine as mediated by flavin mononucleotide and light. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **24**: 739-743.
- 8) SAKAI S. and IMASEKI H. (1973). Properties of the proteinaceous inhibitor of ethylene synthesis; Action on ethylene production and indoleacetylserpate formation. *Plant & Cell Physiol.* **14**: 881-892.
- 9) SAKAI S. (1975). Distribution of the proteinaceous inhibitor of ethylene synthesis in leguminous seeds. *Plant & Cell Physiol.* **16**: 529-532.
- 10) PATIL S.S. and TANG C.S. (1974). Inhibition of ethylene evolution in Papaya pulp tissue by Benzyl isocyanate. *Plant Physiol.* **53**: 585-588.
- 11) OWENS L.D., LIEBERMAN M. and KUNISHI A. (1971). Inhibition of ethylene production by Rhizobitoxin. *Plant Physiol.* **48**: 1-4.
- 12) LOWRY O.H., ROSEBROUGH N.J., FARR A.L. and RANDALL R.J. (1951). Protein measurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.