

葉緑体におけるピリミジンヌクレオチドの生合成

柴田 均*・落合 英夫*

Biosynthesis of Pyrimidine Nucleotides in Chloroplasts
Hitoshi SHIBATA and Hideo OCHIAI

The localization of *de novo* and salvage pyrimidine biosynthetic pathways in plastids from radish (*Raphanus sativus*) cotyledons was investigated. The carbamoylphosphate synthetase (EC 6.3.5.5) and aspartate carbamoyltransferase (EC 2.1.3.2), the first two enzymes of the *de novo* pathway were detected in etioplasts. Uracil phosphoribosyl-transferase (EC 2.4.2.9) and uridine kinase (EC 2.7.1.48), the enzymes involved in the salvage pathway of UMP synthesis, were also demonstrated in isolated chloroplasts. We summarized the concentrations of the substrates for these enzymes in chloroplast stroma. From these and previous results (Plant Physiol. 80, 126-129, 1986), we concluded that the *de novo* as well as salvage pathways for pyrimidine biosynthesis operate properly in plastids.

緒 言

核酸や糖ヌクレオチド合成の基材であるピリミジン化合物の合成は、すべての生物に共通した次の2つの経路を経て進行する。*de novo* 合成経路ではグルタミンを窒素供与体、ATP をエネルギー源として、CO₂ から CPSase の作用によって初発の基質 CarP が合成される。続いて CarP とアスパラギン酸との縮合により CarAsp が合成され、この段階には ACTase が関与する。CarAsp からジヒドロオロチン酸、オロチン酸、オロチン酸モノリン酸を経て UMP が合成される(図1)一方 UKase によってウリジンを直接リン酸化して UMP を、PRPP 共存下で UPTase によってウラシルを UMP に変換する経路は、すでに形成されたピリミ

略号

ALAD, 5-アミノレブリン酸脱水酵素; ACTase, アスパラギン酸カルバモイルトランスフェラーゼ; CarAsp, カルバモイルアスパラギン酸; CarP, カルバモイルリン酸; CPSase, カルバモイルリン酸合成酵素; DTT, ジチオスレイトール; PEPCase, ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ; PRPP, ホスホリボシルピロリン酸; UKase, ウリジンキナーゼ; UPTase, ウラシルホスホリボシル転移酵素。

* 生物化学研究室

ジン骨格を再利用することからサルベージ経路と呼ばれている(図3参照)。*de novo* 又はサルベージ経路を経て合成された UMP は UDP を経て UTP にまでリン酸化され、一部は CTP へと変換される。UTP, CTP は RNA や糖ヌクレオチドの合成などに利用される。

葉緑体はタンパク合成に必要なすべての成分を有しており、ある意味では、遺伝的に独立した細胞顆粒であると言えよう。葉緑体 DNA にコードされた情報は葉緑体の RNA ポリメラーゼによって転写され、mRNA は葉緑体リボソーム上で翻訳される。従って葉緑体内で

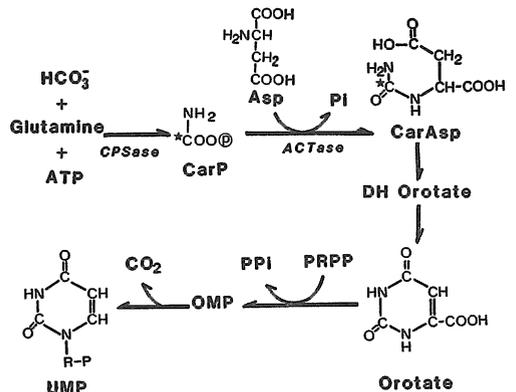


Fig. 1 Pyrimidine *De novo* Biosynthetic Pathway.

m-, t-, r-RNAs の合成に必要なヌクレオチド類の供給が必須となる。¹⁾²⁾ ³⁾ ⁴⁾ ⁵⁾ ⁶⁾ ⁷⁾ ⁸⁾ ⁹⁾ ¹⁰⁾ ¹¹⁾ ¹²⁾ ¹³⁾ ¹⁴⁾ ¹⁵⁾ ¹⁶⁾ ¹⁷⁾ ¹⁸⁾ ¹⁹⁾ ²⁰⁾ ²¹⁾ ²²⁾ ²³⁾ ²⁴⁾ ²⁵⁾ ²⁶⁾ ²⁷⁾ ²⁸⁾ ²⁹⁾ ³⁰⁾ ³¹⁾ ³²⁾ ³³⁾ ³⁴⁾ ³⁵⁾ ³⁶⁾ ³⁷⁾ ³⁸⁾ ³⁹⁾ ⁴⁰⁾ ⁴¹⁾ ⁴²⁾ ⁴³⁾ ⁴⁴⁾ ⁴⁵⁾ ⁴⁶⁾ ⁴⁷⁾ ⁴⁸⁾ ⁴⁹⁾ ⁵⁰⁾ ⁵¹⁾ ⁵²⁾ ⁵³⁾ ⁵⁴⁾ ⁵⁵⁾ ⁵⁶⁾ ⁵⁷⁾ ⁵⁸⁾ ⁵⁹⁾ ⁶⁰⁾ ⁶¹⁾ ⁶²⁾ ⁶³⁾ ⁶⁴⁾ ⁶⁵⁾ ⁶⁶⁾ ⁶⁷⁾ ⁶⁸⁾ ⁶⁹⁾ ⁷⁰⁾ ⁷¹⁾ ⁷²⁾ ⁷³⁾ ⁷⁴⁾ ⁷⁵⁾ ⁷⁶⁾ ⁷⁷⁾ ⁷⁸⁾ ⁷⁹⁾ ⁸⁰⁾ ⁸¹⁾ ⁸²⁾ ⁸³⁾ ⁸⁴⁾ ⁸⁵⁾ ⁸⁶⁾ ⁸⁷⁾ ⁸⁸⁾ ⁸⁹⁾ ⁹⁰⁾ ⁹¹⁾ ⁹²⁾ ⁹³⁾ ⁹⁴⁾ ⁹⁵⁾ ⁹⁶⁾ ⁹⁷⁾ ⁹⁸⁾ ⁹⁹⁾ ¹⁰⁰⁾ ¹⁰¹⁾ ¹⁰²⁾ ¹⁰³⁾ ¹⁰⁴⁾ ¹⁰⁵⁾ ¹⁰⁶⁾ ¹⁰⁷⁾ ¹⁰⁸⁾ ¹⁰⁹⁾ ¹¹⁰⁾ ¹¹¹⁾ ¹¹²⁾ ¹¹³⁾ ¹¹⁴⁾ ¹¹⁵⁾ ¹¹⁶⁾ ¹¹⁷⁾ ¹¹⁸⁾ ¹¹⁹⁾ ¹²⁰⁾ ¹²¹⁾ ¹²²⁾ ¹²³⁾ ¹²⁴⁾ ¹²⁵⁾ ¹²⁶⁾ ¹²⁷⁾ ¹²⁸⁾ ¹²⁹⁾ ¹³⁰⁾ ¹³¹⁾ ¹³²⁾ ¹³³⁾ ¹³⁴⁾ ¹³⁵⁾ ¹³⁶⁾ ¹³⁷⁾ ¹³⁸⁾ ¹³⁹⁾ ¹⁴⁰⁾ ¹⁴¹⁾ ¹⁴²⁾ ¹⁴³⁾ ¹⁴⁴⁾ ¹⁴⁵⁾ ¹⁴⁶⁾ ¹⁴⁷⁾ ¹⁴⁸⁾ ¹⁴⁹⁾ ¹⁵⁰⁾ ¹⁵¹⁾ ¹⁵²⁾ ¹⁵³⁾ ¹⁵⁴⁾ ¹⁵⁵⁾ ¹⁵⁶⁾ ¹⁵⁷⁾ ¹⁵⁸⁾ ¹⁵⁹⁾ ¹⁶⁰⁾ ¹⁶¹⁾ ¹⁶²⁾ ¹⁶³⁾ ¹⁶⁴⁾ ¹⁶⁵⁾ ¹⁶⁶⁾ ¹⁶⁷⁾ ¹⁶⁸⁾ ¹⁶⁹⁾ ¹⁷⁰⁾ ¹⁷¹⁾ ¹⁷²⁾ ¹⁷³⁾ ¹⁷⁴⁾ ¹⁷⁵⁾ ¹⁷⁶⁾ ¹⁷⁷⁾ ¹⁷⁸⁾ ¹⁷⁹⁾ ¹⁸⁰⁾ ¹⁸¹⁾ ¹⁸²⁾ ¹⁸³⁾ ¹⁸⁴⁾ ¹⁸⁵⁾ ¹⁸⁶⁾ ¹⁸⁷⁾ ¹⁸⁸⁾ ¹⁸⁹⁾ ¹⁹⁰⁾ ¹⁹¹⁾ ¹⁹²⁾ ¹⁹³⁾ ¹⁹⁴⁾ ¹⁹⁵⁾ ¹⁹⁶⁾ ¹⁹⁷⁾ ¹⁹⁸⁾ ¹⁹⁹⁾ ²⁰⁰⁾ ²⁰¹⁾ ²⁰²⁾ ²⁰³⁾ ²⁰⁴⁾ ²⁰⁵⁾ ²⁰⁶⁾ ²⁰⁷⁾ ²⁰⁸⁾ ²⁰⁹⁾ ²¹⁰⁾ ²¹¹⁾ ²¹²⁾ ²¹³⁾ ²¹⁴⁾ ²¹⁵⁾ ²¹⁶⁾ ²¹⁷⁾ ²¹⁸⁾ ²¹⁹⁾ ²²⁰⁾ ²²¹⁾ ²²²⁾ ²²³⁾ ²²⁴⁾ ²²⁵⁾ ²²⁶⁾ ²²⁷⁾ ²²⁸⁾ ²²⁹⁾ ²³⁰⁾ ²³¹⁾ ²³²⁾ ²³³⁾ ²³⁴⁾ ²³⁵⁾ ²³⁶⁾ ²³⁷⁾ ²³⁸⁾ ²³⁹⁾ ²⁴⁰⁾ ²⁴¹⁾ ²⁴²⁾ ²⁴³⁾ ²⁴⁴⁾ ²⁴⁵⁾ ²⁴⁶⁾ ²⁴⁷⁾ ²⁴⁸⁾ ²⁴⁹⁾ ²⁵⁰⁾ ²⁵¹⁾ ²⁵²⁾ ²⁵³⁾ ²⁵⁴⁾ ²⁵⁵⁾ ²⁵⁶⁾ ²⁵⁷⁾ ²⁵⁸⁾ ²⁵⁹⁾ ²⁶⁰⁾ ²⁶¹⁾ ²⁶²⁾ ²⁶³⁾ ²⁶⁴⁾ ²⁶⁵⁾ ²⁶⁶⁾ ²⁶⁷⁾ ²⁶⁸⁾ ²⁶⁹⁾ ²⁷⁰⁾ ²⁷¹⁾ ²⁷²⁾ ²⁷³⁾ ²⁷⁴⁾ ²⁷⁵⁾ ²⁷⁶⁾ ²⁷⁷⁾ ²⁷⁸⁾ ²⁷⁹⁾ ²⁸⁰⁾ ²⁸¹⁾ ²⁸²⁾ ²⁸³⁾ ²⁸⁴⁾ ²⁸⁵⁾ ²⁸⁶⁾ ²⁸⁷⁾ ²⁸⁸⁾ ²⁸⁹⁾ ²⁹⁰⁾ ²⁹¹⁾ ²⁹²⁾ ²⁹³⁾ ²⁹⁴⁾ ²⁹⁵⁾ ²⁹⁶⁾ ²⁹⁷⁾ ²⁹⁸⁾ ²⁹⁹⁾ ³⁰⁰⁾ ³⁰¹⁾ ³⁰²⁾ ³⁰³⁾ ³⁰⁴⁾ ³⁰⁵⁾ ³⁰⁶⁾ ³⁰⁷⁾ ³⁰⁸⁾ ³⁰⁹⁾ ³¹⁰⁾ ³¹¹⁾ ³¹²⁾ ³¹³⁾ ³¹⁴⁾ ³¹⁵⁾ ³¹⁶⁾ ³¹⁷⁾ ³¹⁸⁾ ³¹⁹⁾ ³²⁰⁾ ³²¹⁾ ³²²⁾ ³²³⁾ ³²⁴⁾ ³²⁵⁾ ³²⁶⁾ ³²⁷⁾ ³²⁸⁾ ³²⁹⁾ ³³⁰⁾ ³³¹⁾ ³³²⁾ ³³³⁾ ³³⁴⁾ ³³⁵⁾ ³³⁶⁾ ³³⁷⁾ ³³⁸⁾ ³³⁹⁾ ³⁴⁰⁾ ³⁴¹⁾ ³⁴²⁾ ³⁴³⁾ ³⁴⁴⁾ ³⁴⁵⁾ ³⁴⁶⁾ ³⁴⁷⁾ ³⁴⁸⁾ ³⁴⁹⁾ ³⁵⁰⁾ ³⁵¹⁾ ³⁵²⁾ ³⁵³⁾ ³⁵⁴⁾ ³⁵⁵⁾ ³⁵⁶⁾ ³⁵⁷⁾ ³⁵⁸⁾ ³⁵⁹⁾ ³⁶⁰⁾ ³⁶¹⁾ ³⁶²⁾ ³⁶³⁾ ³⁶⁴⁾ ³⁶⁵⁾ ³⁶⁶⁾ ³⁶⁷⁾ ³⁶⁸⁾ ³⁶⁹⁾ ³⁷⁰⁾ ³⁷¹⁾ ³⁷²⁾ ³⁷³⁾ ³⁷⁴⁾ ³⁷⁵⁾ ³⁷⁶⁾ ³⁷⁷⁾ ³⁷⁸⁾ ³⁷⁹⁾ ³⁸⁰⁾ ³⁸¹⁾ ³⁸²⁾ ³⁸³⁾ ³⁸⁴⁾ ³⁸⁵⁾ ³⁸⁶⁾ ³⁸⁷⁾ ³⁸⁸⁾ ³⁸⁹⁾ ³⁹⁰⁾ ³⁹¹⁾ ³⁹²⁾ ³⁹³⁾ ³⁹⁴⁾ ³⁹⁵⁾ ³⁹⁶⁾ ³⁹⁷⁾ ³⁹⁸⁾ ³⁹⁹⁾ ⁴⁰⁰⁾ ⁴⁰¹⁾ ⁴⁰²⁾ ⁴⁰³⁾ ⁴⁰⁴⁾ ⁴⁰⁵⁾ ⁴⁰⁶⁾ ⁴⁰⁷⁾ ⁴⁰⁸⁾ ⁴⁰⁹⁾ ⁴¹⁰⁾ ⁴¹¹⁾ ⁴¹²⁾ ⁴¹³⁾ ⁴¹⁴⁾ ⁴¹⁵⁾ ⁴¹⁶⁾ ⁴¹⁷⁾ ⁴¹⁸⁾ ⁴¹⁹⁾ ⁴²⁰⁾ ⁴²¹⁾ ⁴²²⁾ ⁴²³⁾ ⁴²⁴⁾ ⁴²⁵⁾ ⁴²⁶⁾ ⁴²⁷⁾ ⁴²⁸⁾ ⁴²⁹⁾ ⁴³⁰⁾ ⁴³¹⁾ ⁴³²⁾ ⁴³³⁾ ⁴³⁴⁾ ⁴³⁵⁾ ⁴³⁶⁾ ⁴³⁷⁾ ⁴³⁸⁾ ⁴³⁹⁾ ⁴⁴⁰⁾ ⁴⁴¹⁾ ⁴⁴²⁾ ⁴⁴³⁾ ⁴⁴⁴⁾ ⁴⁴⁵⁾ ⁴⁴⁶⁾ ⁴⁴⁷⁾ ⁴⁴⁸⁾ ⁴⁴⁹⁾ ⁴⁵⁰⁾ ⁴⁵¹⁾ ⁴⁵²⁾ ⁴⁵³⁾ ⁴⁵⁴⁾ ⁴⁵⁵⁾ ⁴⁵⁶⁾ ⁴⁵⁷⁾ ⁴⁵⁸⁾ ⁴⁵⁹⁾ ⁴⁶⁰⁾ ⁴⁶¹⁾ ⁴⁶²⁾ ⁴⁶³⁾ ⁴⁶⁴⁾ ⁴⁶⁵⁾ ⁴⁶⁶⁾ ⁴⁶⁷⁾ ⁴⁶⁸⁾ ⁴⁶⁹⁾ ⁴⁷⁰⁾ ⁴⁷¹⁾ ⁴⁷²⁾ ⁴⁷³⁾ ⁴⁷⁴⁾ ⁴⁷⁵⁾ ⁴⁷⁶⁾ ⁴⁷⁷⁾ ⁴⁷⁸⁾ ⁴⁷⁹⁾ ⁴⁸⁰⁾ ⁴⁸¹⁾ ⁴⁸²⁾ ⁴⁸³⁾ ⁴⁸⁴⁾ ⁴⁸⁵⁾ ⁴⁸⁶⁾ ⁴⁸⁷⁾ ⁴⁸⁸⁾ ⁴⁸⁹⁾ ⁴⁹⁰⁾ ⁴⁹¹⁾ ⁴⁹²⁾ ⁴⁹³⁾ ⁴⁹⁴⁾ ⁴⁹⁵⁾ ⁴⁹⁶⁾ ⁴⁹⁷⁾ ⁴⁹⁸⁾ ⁴⁹⁹⁾ ⁵⁰⁰⁾ ⁵⁰¹⁾ ⁵⁰²⁾ ⁵⁰³⁾ ⁵⁰⁴⁾ ⁵⁰⁵⁾ ⁵⁰⁶⁾ ⁵⁰⁷⁾ ⁵⁰⁸⁾ ⁵⁰⁹⁾ ⁵¹⁰⁾ ⁵¹¹⁾ ⁵¹²⁾ ⁵¹³⁾ ⁵¹⁴⁾ ⁵¹⁵⁾ ⁵¹⁶⁾ ⁵¹⁷⁾ ⁵¹⁸⁾ ⁵¹⁹⁾ ⁵²⁰⁾ ⁵²¹⁾ ⁵²²⁾ ⁵²³⁾ ⁵²⁴⁾ ⁵²⁵⁾ ⁵²⁶⁾ ⁵²⁷⁾ ⁵²⁸⁾ ⁵²⁹⁾ ⁵³⁰⁾ ⁵³¹⁾ ⁵³²⁾ ⁵³³⁾ ⁵³⁴⁾ ⁵³⁵⁾ ⁵³⁶⁾ ⁵³⁷⁾ ⁵³⁸⁾ ⁵³⁹⁾ ⁵⁴⁰⁾ ⁵⁴¹⁾ ⁵⁴²⁾ ⁵⁴³⁾ ⁵⁴⁴⁾ ⁵⁴⁵⁾ ⁵⁴⁶⁾ ⁵⁴⁷⁾ ⁵⁴⁸⁾ ⁵⁴⁹⁾ ⁵⁵⁰⁾ ⁵⁵¹⁾ ⁵⁵²⁾ ⁵⁵³⁾ ⁵⁵⁴⁾ ⁵⁵⁵⁾ ⁵⁵⁶⁾ ⁵⁵⁷⁾ ⁵⁵⁸⁾ ⁵⁵⁹⁾ ⁵⁶⁰⁾ ⁵⁶¹⁾ ⁵⁶²⁾ ⁵⁶³⁾ ⁵⁶⁴⁾ ⁵⁶⁵⁾ ⁵⁶⁶⁾ ⁵⁶⁷⁾ ⁵⁶⁸⁾ ⁵⁶⁹⁾ ⁵⁷⁰⁾ ⁵⁷¹⁾ ⁵⁷²⁾ ⁵⁷³⁾ ⁵⁷⁴⁾ ⁵⁷⁵⁾ ⁵⁷⁶⁾ ⁵⁷⁷⁾ ⁵⁷⁸⁾ ⁵⁷⁹⁾ ⁵⁸⁰⁾ ⁵⁸¹⁾ ⁵⁸²⁾ ⁵⁸³⁾ ⁵⁸⁴⁾ ⁵⁸⁵⁾ ⁵⁸⁶⁾ ⁵⁸⁷⁾ ⁵⁸⁸⁾ ⁵⁸⁹⁾ ⁵⁹⁰⁾ ⁵⁹¹⁾ ⁵⁹²⁾ ⁵⁹³⁾ ⁵⁹⁴⁾ ⁵⁹⁵⁾ ⁵⁹⁶⁾ ⁵⁹⁷⁾ ⁵⁹⁸⁾ ⁵⁹⁹⁾ ⁶⁰⁰⁾ ⁶⁰¹⁾ ⁶⁰²⁾ ⁶⁰³⁾ ⁶⁰⁴⁾ ⁶⁰⁵⁾ ⁶⁰⁶⁾ ⁶⁰⁷⁾ ⁶⁰⁸⁾ ⁶⁰⁹⁾ ⁶¹⁰⁾ ⁶¹¹⁾ ⁶¹²⁾ ⁶¹³⁾ ⁶¹⁴⁾ ⁶¹⁵⁾ ⁶¹⁶⁾ ⁶¹⁷⁾ ⁶¹⁸⁾ ⁶¹⁹⁾ ⁶²⁰⁾ ⁶²¹⁾ ⁶²²⁾ ⁶²³⁾ ⁶²⁴⁾ ⁶²⁵⁾ ⁶²⁶⁾ ⁶²⁷⁾ ⁶²⁸⁾ ⁶²⁹⁾ ⁶³⁰⁾ ⁶³¹⁾ ⁶³²⁾ ⁶³³⁾ ⁶³⁴⁾ ⁶³⁵⁾ ⁶³⁶⁾ ⁶³⁷⁾ ⁶³⁸⁾ ⁶³⁹⁾ ⁶⁴⁰⁾ ⁶⁴¹⁾ ⁶⁴²⁾ ⁶⁴³⁾ ⁶⁴⁴⁾ ⁶⁴⁵⁾ ⁶⁴⁶⁾ ⁶⁴⁷⁾ ⁶⁴⁸⁾ ⁶⁴⁹⁾ ⁶⁵⁰⁾ ⁶⁵¹⁾ ⁶⁵²⁾ ⁶⁵³⁾ ⁶⁵⁴⁾ ⁶⁵⁵⁾ ⁶⁵⁶⁾ ⁶⁵⁷⁾ ⁶⁵⁸⁾ ⁶⁵⁹⁾ ⁶⁶⁰⁾ ⁶⁶¹⁾ ⁶⁶²⁾ ⁶⁶³⁾ ⁶⁶⁴⁾ ⁶⁶⁵⁾ ⁶⁶⁶⁾ ⁶⁶⁷⁾ ⁶⁶⁸⁾ ⁶⁶⁹⁾ ⁶⁷⁰⁾ ⁶⁷¹⁾ ⁶⁷²⁾ ⁶⁷³⁾ ⁶⁷⁴⁾ ⁶⁷⁵⁾ ⁶⁷⁶⁾ ⁶⁷⁷⁾ ⁶⁷⁸⁾ ⁶⁷⁹⁾ ⁶⁸⁰⁾ ⁶⁸¹⁾ ⁶⁸²⁾ ⁶⁸³⁾ ⁶⁸⁴⁾ ⁶⁸⁵⁾ ⁶⁸⁶⁾ ⁶⁸⁷⁾ ⁶⁸⁸⁾ ⁶⁸⁹⁾ ⁶⁹⁰⁾ ⁶⁹¹⁾ ⁶⁹²⁾ ⁶⁹³⁾ ⁶⁹⁴⁾ ⁶⁹⁵⁾ ⁶⁹⁶⁾ ⁶⁹⁷⁾ ⁶⁹⁸⁾ ⁶⁹⁹⁾ ⁷⁰⁰⁾ ⁷⁰¹⁾ ⁷⁰²⁾ ⁷⁰³⁾ ⁷⁰⁴⁾ ⁷⁰⁵⁾ ⁷⁰⁶⁾ ⁷⁰⁷⁾ ⁷⁰⁸⁾ ⁷⁰⁹⁾ ⁷¹⁰⁾ ⁷¹¹⁾ ⁷¹²⁾ ⁷¹³⁾ ⁷¹⁴⁾ ⁷¹⁵⁾ ⁷¹⁶⁾ ⁷¹⁷⁾ ⁷¹⁸⁾ ⁷¹⁹⁾ ⁷²⁰⁾ ⁷²¹⁾ ⁷²²⁾ ⁷²³⁾ ⁷²⁴⁾ ⁷²⁵⁾ ⁷²⁶⁾ ⁷²⁷⁾ ⁷²⁸⁾ ⁷²⁹⁾ ⁷³⁰⁾ ⁷³¹⁾ ⁷³²⁾ ⁷³³⁾ ⁷³⁴⁾ ⁷³⁵⁾ ⁷³⁶⁾ ⁷³⁷⁾ ⁷³⁸⁾ ⁷³⁹⁾ ⁷⁴⁰⁾ ⁷⁴¹⁾ ⁷⁴²⁾ ⁷⁴³⁾ ⁷⁴⁴⁾ ⁷⁴⁵⁾ ⁷⁴⁶⁾ ⁷⁴⁷⁾ ⁷⁴⁸⁾ ⁷⁴⁹⁾ ⁷⁵⁰⁾ ⁷⁵¹⁾ ⁷⁵²⁾ ⁷⁵³⁾ ⁷⁵⁴⁾ ⁷⁵⁵⁾ ⁷⁵⁶⁾ ⁷⁵⁷⁾ ⁷⁵⁸⁾ ⁷⁵⁹⁾ ⁷⁶⁰⁾ ⁷⁶¹⁾ ⁷⁶²⁾ ⁷⁶³⁾ ⁷⁶⁴⁾ ⁷⁶⁵⁾ ⁷⁶⁶⁾ ⁷⁶⁷⁾ ⁷⁶⁸⁾ ⁷⁶⁹⁾ ⁷⁷⁰⁾ ⁷⁷¹⁾ ⁷⁷²⁾ ⁷⁷³⁾ ⁷⁷⁴⁾ ⁷⁷⁵⁾ ⁷⁷⁶⁾ ⁷⁷⁷⁾ ⁷⁷⁸⁾ ⁷⁷⁹⁾ ⁷⁸⁰⁾ ⁷⁸¹⁾ ⁷⁸²⁾ ⁷⁸³⁾ ⁷⁸⁴⁾ ⁷⁸⁵⁾ ⁷⁸⁶⁾ ⁷⁸⁷⁾ ⁷⁸⁸⁾ ⁷⁸⁹⁾ ⁷⁹⁰⁾ ⁷⁹¹⁾ ⁷⁹²⁾ ⁷⁹³⁾ ⁷⁹⁴⁾ ⁷⁹⁵⁾ ⁷⁹⁶⁾ ⁷⁹⁷⁾ ⁷⁹⁸⁾ ⁷⁹⁹⁾ ⁸⁰⁰⁾ ⁸⁰¹⁾ ⁸⁰²⁾ ⁸⁰³⁾ ⁸⁰⁴⁾ ⁸⁰⁵⁾ ⁸⁰⁶⁾ ⁸⁰⁷⁾ ⁸⁰⁸⁾ ⁸⁰⁹⁾ ⁸¹⁰⁾ ⁸¹¹⁾ ⁸¹²⁾ ⁸¹³⁾ ⁸¹⁴⁾ ⁸¹⁵⁾ ⁸¹⁶⁾ ⁸¹⁷⁾ ⁸¹⁸⁾ ⁸¹⁹⁾ ⁸²⁰⁾ ⁸²¹⁾ ⁸²²⁾ ⁸²³⁾ ⁸²⁴⁾ ⁸²⁵⁾ ⁸²⁶⁾ ⁸²⁷⁾ ⁸²⁸⁾ ⁸²⁹⁾ ⁸³⁰⁾ ⁸³¹⁾ ⁸³²⁾ ⁸³³⁾ ⁸³⁴⁾ ⁸³⁵⁾ ⁸³⁶⁾ ⁸³⁷⁾ ⁸³⁸⁾ ⁸³⁹⁾ ⁸⁴⁰⁾ ⁸⁴¹⁾ ⁸⁴²⁾ ⁸⁴³⁾ ⁸⁴⁴⁾ ⁸⁴⁵⁾ ⁸⁴⁶⁾ ⁸⁴⁷⁾ ⁸⁴⁸⁾ ⁸⁴⁹⁾ ⁸⁵⁰⁾ ⁸⁵¹⁾ ⁸⁵²⁾ ⁸⁵³⁾ ⁸⁵⁴⁾ ⁸⁵⁵⁾ ⁸⁵⁶⁾ ⁸⁵⁷⁾ ⁸⁵⁸⁾ ⁸⁵⁹⁾ ⁸⁶⁰⁾ ⁸⁶¹⁾ ⁸⁶²⁾ ⁸⁶³⁾ ⁸⁶⁴⁾ ⁸⁶⁵⁾ ⁸⁶⁶⁾ ⁸⁶⁷⁾ ⁸⁶⁸⁾ ⁸⁶⁹⁾ ⁸⁷⁰⁾ ⁸⁷¹⁾ ⁸⁷²⁾ ⁸⁷³⁾ ⁸⁷⁴⁾ ⁸⁷⁵⁾ ⁸⁷⁶⁾ ⁸⁷⁷⁾ ⁸⁷⁸⁾ ⁸⁷⁹⁾ ⁸⁸⁰⁾ ⁸⁸¹⁾ ⁸⁸²⁾ ⁸⁸³⁾ ⁸⁸⁴⁾ ⁸⁸⁵⁾ ⁸⁸⁶⁾ ⁸⁸⁷⁾ ⁸⁸⁸⁾ ⁸⁸⁹⁾ ⁸⁹⁰⁾ ⁸⁹¹⁾ ⁸⁹²⁾ ⁸⁹³⁾ ⁸⁹⁴⁾ ⁸⁹⁵⁾ ⁸⁹⁶⁾ ⁸⁹⁷⁾ ⁸⁹⁸⁾ ⁸⁹⁹⁾ ⁹⁰⁰⁾ ⁹⁰¹⁾ ⁹⁰²⁾ ⁹⁰³⁾ ⁹⁰⁴⁾ ⁹⁰⁵⁾ ⁹⁰⁶⁾ ⁹⁰⁷⁾ ⁹⁰⁸⁾ ⁹⁰⁹⁾ ⁹¹⁰⁾ ⁹¹¹⁾ ⁹¹²⁾ ⁹¹³⁾ ⁹¹⁴⁾ ⁹¹⁵⁾ ⁹¹⁶⁾ ⁹¹⁷⁾ ⁹¹⁸⁾ ⁹¹⁹⁾ ⁹²⁰⁾ ⁹²¹⁾ ⁹²²⁾ ⁹²³⁾ ⁹²⁴⁾ ⁹²⁵⁾ ⁹²⁶⁾ ⁹²⁷⁾ ⁹²⁸⁾ ⁹²⁹⁾ ⁹³⁰⁾ ⁹³¹⁾ ⁹³²⁾ ⁹³³⁾ ⁹³⁴⁾ ⁹³⁵⁾ ⁹³⁶⁾ ⁹³⁷⁾ ⁹³⁸⁾ ⁹³⁹⁾ ⁹⁴⁰⁾ ⁹⁴¹⁾ ⁹⁴²⁾ ⁹⁴³⁾ ⁹⁴⁴⁾ ⁹⁴⁵⁾ ⁹⁴⁶⁾ ⁹⁴⁷⁾ ⁹⁴⁸⁾ ⁹⁴⁹⁾ ⁹⁵⁰⁾ ⁹⁵¹⁾ ⁹⁵²⁾ ⁹⁵³⁾ ⁹⁵⁴⁾ ⁹⁵⁵⁾ ⁹⁵⁶⁾ ⁹⁵⁷⁾ ⁹⁵⁸⁾ ⁹⁵⁹⁾ ⁹⁶⁰⁾ ⁹⁶¹⁾ ⁹⁶²⁾ ⁹⁶³⁾ ⁹⁶⁴⁾ ⁹⁶⁵⁾ ⁹⁶⁶⁾ ⁹⁶⁷⁾ ⁹⁶⁸⁾ ⁹⁶⁹⁾ ⁹⁷⁰⁾ ⁹⁷¹⁾ ⁹⁷²⁾ ⁹⁷³⁾ ⁹⁷⁴⁾ ⁹⁷⁵⁾ ⁹⁷⁶⁾ ⁹⁷⁷⁾ ⁹⁷⁸⁾ ⁹⁷⁹⁾ ⁹⁸⁰⁾ ⁹⁸¹⁾ ⁹⁸²⁾ ⁹⁸³⁾ ⁹⁸⁴⁾ ⁹⁸⁵⁾ ⁹⁸⁶⁾ ⁹⁸⁷⁾ ⁹⁸⁸⁾ ⁹⁸⁹⁾ ⁹⁹⁰⁾ ⁹⁹¹⁾ ⁹⁹²⁾ ⁹⁹³⁾ ⁹⁹⁴⁾ ⁹⁹⁵⁾ ⁹⁹⁶⁾ ⁹⁹⁷⁾ ⁹⁹⁸⁾ ⁹⁹⁹⁾ ¹⁰⁰⁰⁾

本研究において、黄化幼植物体から調製されたエチオプラスト中にも CPSase と ACTase が存在していること、および単離葉緑体内にサルベージ経路に関与する酵素、UKase と UPTase が存在することを実証し、あわせて葉緑体内での2つの経路によるピリミジン化合物の生合成について考察した。

実験材料と方法

¹⁴C-ウリジンと ¹⁴C-ウラシルは Amersham より購入した。植物材料としてダイコン (*Raphanus sativus*) 幼植物体の子葉を用いた。光照射条件も含めた栽培条件はすでに報告した通りである。葉緑体の単離精製法、CPSase と ACTase の活性測定法も前報に準じた。従って UKase と UPTase の活性測定に用いた葉緑体の純度、活性、インタクトネス等は前報の値と同等である。

UKase と UPTase の活性測定には、放射性の基質を用い、反応停止液を薄層クロマトグラフィーによって基質と反応生成物 (UMP) を分離した後、UMP の放射活性から酵素活性を表現する PLUNKETT らの方法に準じた。UKase 活性測定の反応混液は 50 mM HEPES-KOH, pH 8.0, 10 mM MgCl₂, 5 mM ATP, 1 mM DTT, 5 mM NaF, 0.1 mM ¹⁴C-ウリジン (0.28 μCi) と単離葉緑体画分 300 μl からなり全量 500 μl とした。対照には ATP を除いた混液を用いた。UPTase の活性測定では 50 mM HEPES-KOH, pH 8.0, 10 mM MgCl₂, 0.2 mM PRPP, 1 mM DTT, 0.1 mM ¹⁴C-ウラシル (0.28 μCi) と葉緑体画分 300 μl を含み、全量 500 μl としして反応させた。対照は PRPP を含まないものとした。両混液とも 30℃で30分

間反応させた後、3分間煮沸した。混液を遠心分離して沈殿を除去し、上澄液 200 μl に担体として UMP を添加後、薄層プレート (PEI-セルロース) 上で 1 M 酢酸 pH 3.5 を展開剤として展開し、UV ランプで UMP 部位を確認し、この部分をかき取ってトルエン系シンチレーター中で Aloka LSC-700 液体シンチレーションカウンタで UMP 中の ¹⁴C を測定した。

3日間暗黒下で生育させた黄化子葉からのエチオプラストの調製とシヨ糖密度勾配遠心法による分離は JACOBSON の方法に従って、緑色安全光下 4℃で行った。但しすべてのシヨ糖溶液には 50 mM Tricine-KOH, pH 7.8, 3 mM グルタミン, 2 mM DTT, 1 mM MgCl₂ と 0.2%牛血清アルブミンを添加した。

結果と考察

エチオプラストにおける CPSase, ACTase の存在

ピリミジン *de novo* 合成経路の第1, 第2番目の酵素, CPSase と ACTase が葉緑体に存在することをすでに報告したので、暗所で生育した黄化植物体に存在し光照射に伴って葉緑体へと転換するエチオプラスト内に、これら両酵素が存在する可能性について検討した。黄化ダイコン子葉を等張液中で磨砕し、Miracloth を通過させた濾液を 170 xg 3分間遠心して未破壊細胞や核を除いた後、1000 xg 10分間の遠心分離によって粗エチオプラスト画分を沈殿として回収した。この画分を JACOBSON の方法に従って調製した不連続シヨ糖密度勾配遠心にかけて、分画した。図2に示すように、エチオプラストストロマの標識酵素である ALAD の分布から、インタクトなエチオプラストはシヨ糖密度52-55%の層に集積していた。サイトゾルの標識酵素 PEPCase は15-30%の領域に大部分が存在していた。エチオプラスト画分にも若干この酵素活性が存在していたので、エチオプラスト画分に若干のサイトゾルが混入していたことは否めない。目的とする CPSase と ACTase の活性は ALAD の活性分布とはほぼ一致して存在しており、PEPCase の活性分布とは一致しなかった。これらの結果はエチオプラスト内に CPSase と ACTase が存在することを示している。従って黄化植物体内ではサイトゾルとともにエチオプラスト内でもピリミジン *de novo* 合成経路が作動しているものと考えられる。

葉緑体における UKase と UPTase の存在

40時間光照射した緑化ダイコン子葉から粗葉緑体画分を分画遠心法によって調製し、さらにこの画分を Percoll 密度勾配遠心法によって精製した葉緑体画分を用いて、UKase と PRTase 活性を測定した。¹⁴C-ウリ

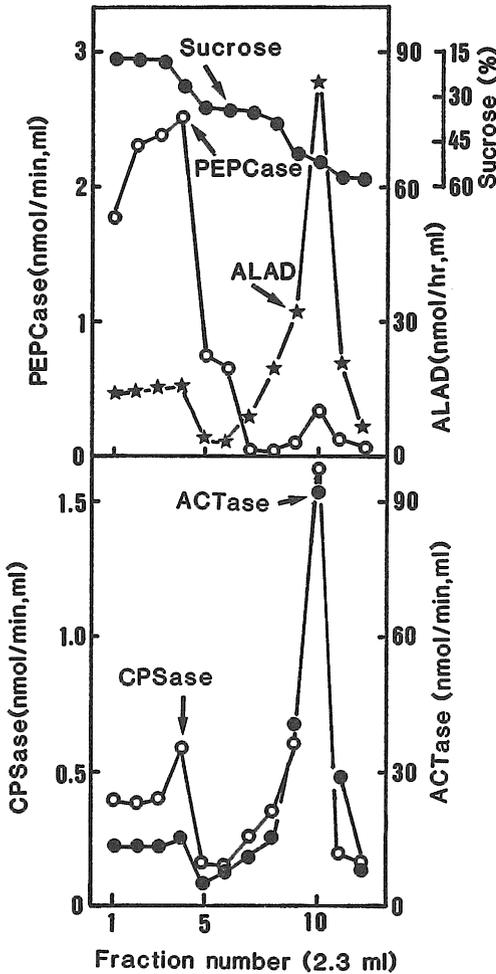


Fig. 2 Distribution of Enzyme Activities in Separated Fractions after Sucrose Density Gradient Centrifugation of Crude Etioplast Fractions.

The 1000 xg fraction prepared from etiolated cotyledons of 3-day-old dark-grown radish seedlings were subjected to sucrose density gradient centrifugation⁷⁾. The activities of ALAD(etoplast stroma), PEPCase (cytosol), CPSase and ACTase were assayed in each fractions, according to the methods described previously⁴⁾.

ジンを ATP 存在下で ¹⁴C-UMP に変換する UKase 活性, PRPP 存在下で ¹⁴C-ウラシルを ¹⁴C-UMP に変換する URTase 活性とともに, 単離した葉緑体画分に存在していた. UKase, UPTase は毎分 1 mg のクロロフィル当り UMP をそれぞれ 33.2, 16.5 nmol 生成した (表1).

Table 1 Enzyme Activities for Pyrimidine Biosynthesis in Chloroplasts

Enzyme ^{a)}	Activity
<i>De novo</i> pathway (nmol/min, mg chlorophyll)	
Carbamoylphosphate synthetase ^{b)}	23.4
Aspartate carbamoyl-transferase ^{b)}	513
Salvage pathway	
Uridine kinase ^{c)}	33.2
Uracil phosphoribosyltransferase ^{c)}	16.5

a) These enzyme activities were assayed in chloroplasts purified by Percoll density gradient centrifugation⁹⁾.

b) assayed by the methods described previously⁴⁾.

c) assayed according to the methods of PLUNKETT et al⁶⁾.

葉緑体におけるこれらのピリミジンサルベージ経路の酵素活性と, *de novo* 経路の初発2段階の酵素活性を比較した. *de novo* 経路の ACTase 活性が CPSase 活性よりも約22倍高い. 図2で得られた精製エチオプラスト中でも, CPSase 活性は 1 nmol のプロトクロロフィライド, 1分間当り 3.2 nmol の CarP を生成し ACTase が 44 nmol の CarAsp を生成したので, 第2の ACTase 活性が約14倍高く検出された. この事実はすでに考察したように, CPSase によって生成する¹⁰⁾ CarP が中性 pH 域でも非常に不安定な化合物であり, 生成した CarP を直ちに安定な CarAsp へと変換させるために約14-22倍高い活性の ACTase が必要とされるのであろう.

CPSase, ACTase とともに各種ヌクレオチドによってフィードバック調節を受け, 植物細胞サイトゾルの両酵素は UMP によって阻害され, 一連の *de novo* 経路において, これら両酵素, 特に CPSase が律速酵素と考えられている.¹¹⁾ われわれは葉緑体 CPSase, ACTase がともに UMP によってフィードバック阻害されること, および成熟葉緑体内ではこれら両酵素を阻害するに足る濃度まで UMP が蓄積されることを明らかにしている.¹²⁾

一方, ウラシルやウリジンのピリミジン骨格を直接再利用するサルベージ経路が葉緑体に存在する可能性については, 単離した葉緑体での ³H-ウリジン¹⁾や ¹⁴C-ウラシル²⁾の RNA へのとり込み実験によって, 間接的には証明されていた. われわれはピリミジン同族体の一種, 4-チオウリジンが発芽中の幼植物体において直接又は4-チオウラシルを経て, 一部が RNA にとり込まれるこ

とを証明し、葉緑体 RNA 中にも 4-チオ UMP 残基が検出されたので、葉緑体内 UKase や UPTase によって 4-チオ UMP が生成され、4-チオ UTP にまでリン酸化されてから、RNA ポリメラーゼによって葉緑体 RNA にとり込まれたものと考察した¹⁴⁾。この事実も葉緑体内に UKase と UPTase が存在することを示唆していた。今回われわれは直接酵素活性を検出することによって、葉緑体に UKase と UPTase が存在していることを初めて証明した。サルベージ経路のこれらの酵素活性が、*de novo* 経路の律速酵素 CPSase の活性とほぼ同等であることを明らかにした(表 1)。

葉緑体における UMP の合成経路

RNA や糖ヌクレオチド合成に用いられるピリミジン化合物、UTP や CTP を合成するキ化合物 UMP を導く *de novo* およびサルベージ経路に關与する酵素がサイトゾルとは独立して葉緑体にも存在することが明らかになった。これら両経路の酵素反応に必要な基質の葉緑体内濃度についても考察したのが図 3 である。葉緑体内ストロマスペースを 26 $\mu\text{l}/\text{mg}$ クロロフィル¹⁵⁾として算出された、グルタミンやアスパラギン酸、光リン酸化能と関連させて求められた ATP のストロマでの濃度は、いずれもミリモル濃度であり、ピリミジンの *de novo*、サルベージ両経路の酵素活性を *in vitro* で活性測定する際に必要とされる濃度に匹敵する。したがってこれら両経路が基質濃度の面からも十分に作動しようと考察される。CO₂ は炭酸固定反応の基質として重要であり、リブコース、1, 5-ジリン酸カルボキシラーゼ/オキシゲナーゼと CPSase に対する CO₂ の親和性が問題となろう。葉緑体内サルベージ経路が葉緑体包膜を通過して葉緑体へ供給されたサイトゾル依存のピリミジン骨格を利用するために備えられた系であるか、または葉緑体内の分解系を経て生じたピリミジン骨格のみを再利用して UMP を再生するための機構であるのかは定かでない。

de novo、サルベージ 両経路に必須の基質 PRPP が葉緑体内で合成されるのか、あるいはサイトゾルで合成

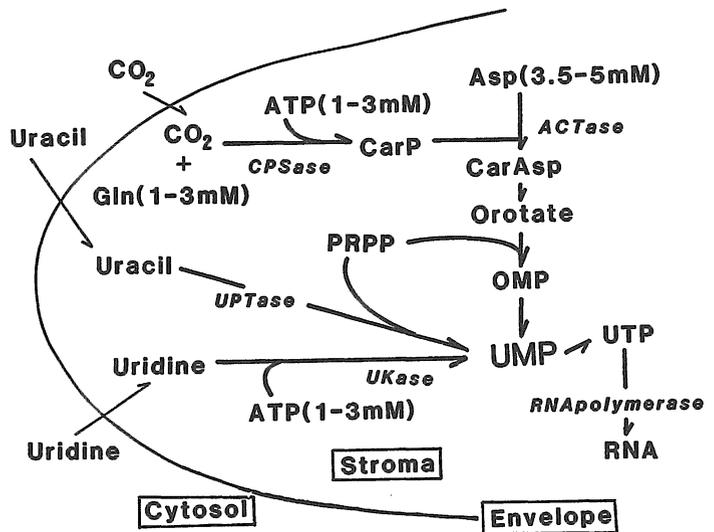


Fig. 3 Possible Pyrimidine Biosynthetic Pathways in Chloroplasts. The numbers in parentheses are the substrate concentrations in chloroplast stroma. The abbreviations used are ; CarAsp, carbamoylaspartate ; CarP, carbamoylphosphate ; PRPP, phosphoribosyl pyrophosphate ; ACTase, aspartate carbamoyltransferase ; CPSase, carbamoylphosphate synthetase ; UKase, uridine kinase ; UPTase, uracil phosphoribosyltransferase.

されて葉緑体内へ供給されているのか、さらに葉緑体内での PRPP の濃度についても現在全く不明である。PRPP はピリミジンの合成のみならず、プリンヌクレオチド、アミノ酸であるヒスチジンやトリプトファン、さらにはピリジンヌクレオチド合成に必須の化合物である¹⁸⁾。すでにトリプトファンやヒスチジン合成に必要な酵素が葉緑体内に存在するとの報告もあり、葉緑体内での PRPP の合成、供給については非常に興味ある課題である。

要 約

ダイコン幼植物体 (*Raphanus sativus*) の子葉を用いて、プラスチックド (エチオプラストや葉緑体) におけるピリミジン生合成経路の植物細胞内分布について検討した。

de novo 合成経路の第 1、第 2 番目の酵素であるカルバミルリン酸合成酵素 (EC 6.3.5.5) とアスパラギン酸カルバミルトランスフェラーゼ (EC 2.1.3.2) が黄化子葉から調製したエチオプラスト中に検出された。これら両酵素が葉緑体に存在することはすでに報告した。UMP 合成のサルベージ経路に關与する酵素、ウリジン

キナーゼ (EC 2.7.1.48) とウラシルホスホリボシルトランスフェラーゼ (EC 2.4.2.9) が単離葉緑体に存在することを実証した。

これら一連の酵素に対する基質の葉緑体ストロマ内の

濃度について要約し、前報 (Plant Physiol. 80, 126-129, 1986) の結果も考慮して、ピリミジン生合成の *de novo*, サルベージ経路が葉緑体内で機能していると結論された。

引用文献

1. HARTLEY, M. R. and ELLIS, R. J. : Biochem. J. **134** : 249-262, 1973.
2. SCHWEIGER, H. G. and BERGERS, S. : Biochim. Biophys. Acta, **87** : 535-537, 1964.
3. LOVATT, C. R., ALBERT, L. S. and TREMBLAY, G. C. : Plant Physiol. **64** : 562-569, 1979.
4. SHIBATA, H., OCHIAI, H., SAWA, Y. and MIYOSHI, S. : Plant Physiol. **80** : 126-129, 1986.
5. DOREMUS, H. and JAGENDORF, A. T. : Plant Physiol. **79** : 856-861, 1985.
6. PLUNKETT, W. and MONER, J. G. : Biochim. Biophys. Acta, **250** : 92-102, 1971.
7. JACOBSON, A. B. : J. Cell Biol. **38** : 238-244, 1968.
8. SHIBATA, H. and OCHIAI, H. : Plant Cell Physiol. **17** : 281-288, 1976.
9. TAKABE T., NISHIMURA, M. and AKAZAWA, T. : Agric. Biol. Chem. **43** : 2137-2142, 1979.
10. ALLEN C. M. JR., JONES, M. E. : Biochemistry, **3** : 1238-1247, 1964.
11. ROSS, C. W. : *In* The Biochemistry of Plants. vol 6. Proteins and Nucleic Acids, ed. by A. Marcus, Academic Press, New York, pp 169-205, 1981.
12. SHIBATA, H., KAWASHIMA, T. and OCHIAI, H. : Plant Sci., submitted.
13. SHIBATA, H., UCHIDA, I. and OCHIAI, H. : FEBS Lett. **119** : 85-89, 1980.
14. SHIBATA, H., FUJIWARA, T., SAWA, Y. and OCHIAI, H. : Plant Cell Physiol. **23** : 365-374.
15. HELDT, H. W., WERDAN, K., MILOVANCEV, M. and GELLER, G. : Biochim. Biophys. Acta, **314** : 224-241, 1973.
16. MILLES, W. R. and JOY, K. W. : Planta, **148** : 75-83, 1980.
17. HALL, D. O. : *In* The Intact Chloroplasts. ed. by Barber, J., Elsevier/North-Holland Biomedical Press, The Netherland, pp 135-170, 1976.
18. SWITZER, R. L. : J. Biol. Chem. **244** : 2854-2863, 1969.