

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

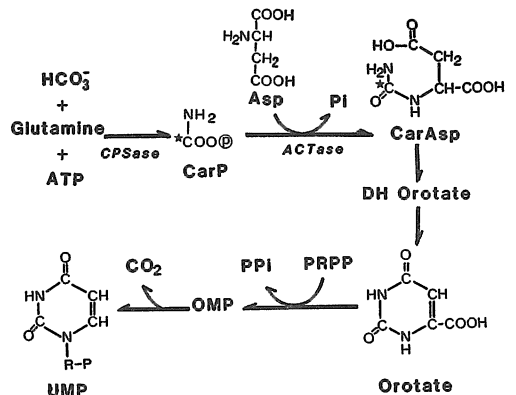


Fig. 1 Pyrimidine *De novo* Biosynthetic Pathway.

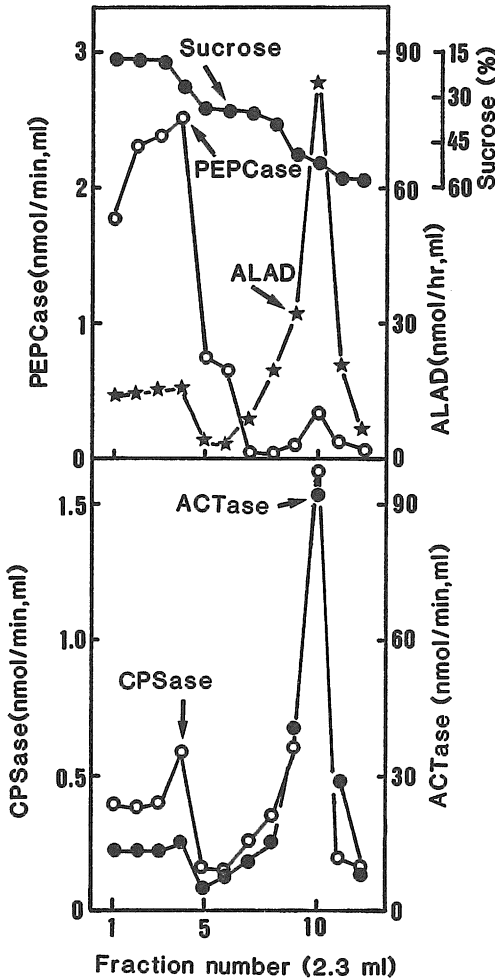


Fig. 2 Distribution of Enzyme Activities in Separated Fractions after Sucrose Density Gradient Centrifugation of Crude Etioplast Fractions.

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 μl/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

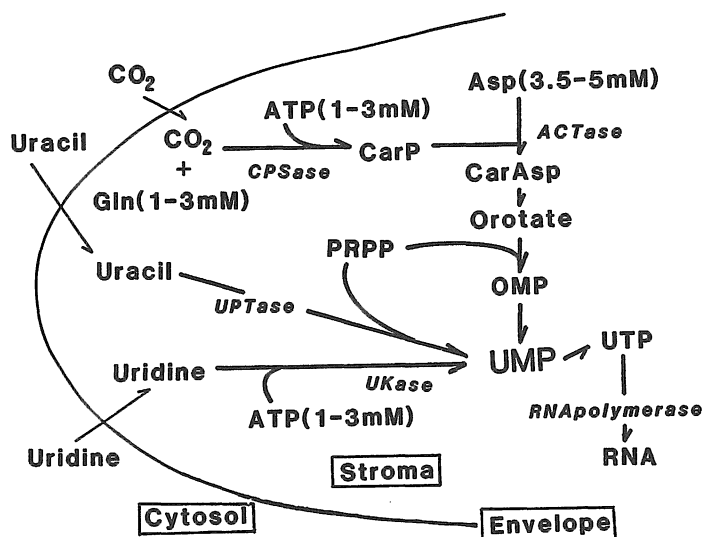


Fig. 3 Possible Pyrimidine Biosynthetic Pathways in Chloroplasts.

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.