

ダイコン子葉の葉緑体発生に関する研究 (4)

リンゴ酸脱水素酵素について

落合 英夫[※]・河野 泰久^{※※}・柴田 均[※]

Hideo OCHIAI, Yasuhisa KONO and Hitoshi SHIBATA

Studies on the Chloroplast Development
in Radish Cotyledons (4)

on Malate Dehydrogenases

緒 言

高等植物のリンゴ酸脱水素酵素 (MDH) は、リンゴ酸 \rightleftharpoons ピルビン酸の可逆反応を Mg^{++} の存在下で触媒するいわゆる “malic enzyme” をのぞいて、すべて助酵素として NAD^+ のみを用いるとされて来た。これに対して1969年に Hatch と Slack は C_4 -植物および C_3 -植物の光合成的炭酸固定に関連して $NADP^+$ を特異的に要求する MDH の存在を報告した¹⁾。その後 JOHNSON ら²⁾³⁾ は C_4 -植物の CO_2 固定反応に関係して葉肉細胞葉緑体 (mesophyll chloroplast) と維管束鞘葉緑体 (Bundle sheath chloroplast) という2種の葉緑体が存在するが、前者に $NADP^+$ -MDH が局在し、後者には malic enzyme が存在するとした。すなわち C_4 -植物では CO_2 は葉肉細胞葉緑体の PEP カルボキシラーゼにより PEP と結合してオキサロ酢酸を生じるが、これに $NADP^+$ -MDH が働いてリンゴ酸が生じる。このリンゴ酸は維管束鞘葉緑体に転移して、そこ

で “malic enzyme” によって脱炭酸されピルビン酸を生じる。ここに生成した CO_2 が改めて C_3 -植物のカルビンサイクリックに RuDP カルボキシラーゼにより再固定されるというものである。さらに1971年に JOHNSON は⁴⁾、 C_3 -植物であるホウレン草、大麦の葉における $NADP^+$ -MDH も C_4 -植物の光合成系のそれと共通の役割を演じているものと考察した。同年 TING ら⁵⁾ はこのホウレン草の緑葉における $NADP^+$ -MDH の局在性について調べ、この酵素は intact な葉緑体のストロマ部分に存在するとした。

われわれは以前より光誘起による葉緑体発生を研究してきているが、今回はダイコン子葉での葉緑体発生過程における MDH の局在性、性質、経時的変動、4-チオウリジン (4SU) による阻害効果などについて調べ、新たな知見をえたのでここに報告する。

実験材料と方法

実験植物としては、⁶⁾かいわれダイコン、(*Raphanus sativus* Linn.) 種子をタキイ種苗株式会社より購入して用いた。脱脂綿を敷いたバット上の種子にリン酸緩衝液 (pH 7.0, 10mM) を与え、暗所 $22^\circ C$ にて4日間発芽生育させた。4日後約 8~10cm に成長した黄化めばえを三菱昼光色蛍光灯 (FL-20S PG) 4000lux で一定時間 $22^\circ C$ で光照射した。

子葉より細胞内顆粒の調製

つみとった子葉に、特に記述しない限り 1mM DT T, 1mM EDTA, 1mM KCl, 5mM $MgCl_2$ を含む STN 溶液を加え、日本精機 HA-2 型ホモジナイザーの最高速度にて磨砕処理する。この磨砕汁を 600×g, 10分間遠心分離し沈殿部を粗葉緑体画分とし、上澄を非葉

略号

MDH: Malate dehydrogenase [EC. 1. 1. 1. 37]

GDH: Glutamate dehydrogenase [EC. 1. 4. 1. 3]

PEP: Phosphoenol pyruvic acid

RuDP: Ribulose 1, 5-diphosphate

4SU: 4-thiouridine

DTT: Dithiothreitol

PMS: Phenazine methosulphate

DPIP: 2, 6-dichlorophenol indophenol

STN 溶液: 0.4M Sucrose, 0.01M NaCl を含む
0.05M Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.8)

※ 生物化学研究室

※ 現在京都大学食糧科学研究所

緑体画分とする。葉緑体画分は上記の STN 溶液に懸濁し 300×g, 5分および 1500×g, 10分 (2回) の遠心操作にて洗浄し, その沈殿物を 5mM DTT を含む 0.05M トリス塩酸緩衝液 (pH 7.6) に懸濁し葉緑体標品とした。この標品について NAD⁺-GDH の活性を調べた結果からミトコンドリアの混在は無視しうるものであることが確かめられている。なおすべての操作は 0~4°C にて行なった。

酵素標品の調製

上記のようにして分離した各画分は凍結融解を3回くり返した後, 18,000×g 20分の遠心によりきれいな抽出物を上澄みに得, 0.05M トリス塩酸緩衝液 (pH 7.6) で調整した Sephadex G-25 カラム (1.5×15cm) から溶出した蛋白を酵素標品とした。

MDH 酵素活性の測定

JOHNSON の方法²⁾ に従いオキザロ酢酸形成方向で測定した。反応混合液は 25m moles トリシン緩衝液 (pH 8.9), 1m mole EDTA, 1m mole NADP⁺ または NAD⁺, 50m moles L-malate および適量の酵素標品を加えて, 全量 3.0ml とし 30°C にて反応させた。対照には基質 L-malate の代わりに同量の蒸留水を入れ, Hitachi 124型分光光度計で 340nm の吸光度変化を測定した。なお実験結果1. (後述) の結果に基づき実験 3.4. においては NADP⁺-MDH は酵素標品を 5mM DTT と 2時間 0°C で前培養したのち, その活性測定を行なった。NAD⁺-MDH の場合には DTT の全く存在しない条件下で各画分の抽出調製および酵素活性の測定を行なった。

malic enzyme の活性の測定

JOHNSON の方法²⁾ に従いピルビン酸形成方向で測定した。反応混合液は 25m moles トリス塩酸緩衝液 (pH 7.6), 0.5m mole EDTA, 2.5m mole L-malate, 0.1m mole NADP⁺, 3.3m mole MgCl₂ に適当量の酵素蛋白標品を加え, 全量 3.0ml とした。リンゴ酸脱水素酵素活性を除くため MgCl₂ 添加時を反応開始とし, 対照には MgCl₂ の代わりに等量の蒸留水を入れた。測定方法は MDH の場合と同じである。

精製した蛋白標品の MDH 酵素活性および malic enzyme 活性に対する 4SU の効果を検討するさいの活性測定には 4SU の吸収極大が 330nm にあるため 340nm での吸光度変化による測定が不可能である。このためそれぞれ上記の反応混合液に 0.5m mole PMS, 7.17μ mole DPIP, および 4SU を加えて全量 3.0ml とし, 生成する NADH (または NADPH) を DPIP とカップルさせてその 610nm での吸光度変化を測定し

た。

蛋白質量は LOWRY-Folin 法⁶⁾ にしたがって 500nm での比色にて測定した。標準線は卵アルブミンを用いて作成した。

実験結果

1. ダイコン子葉中の MDH の細胞内顆粒における局在性と性質

Fig. 1 は96時間光照射された緑化ダイコン子葉の葉緑体画分における MDH の比活性である。ゲル濾過で得られた酵素標品を DTT と 2時間培養した後, 助酵素として NADP⁺ を与えた場合の活性はない。

一方 DTT なしで20時間 0°C で培養後に NADP⁺ を与えたものの方が若干活性は高いが, この酵素反応が飽和状態になった時 NAD⁺ を与えると比活性は極めて急激な上昇を示す。このさい DTT を加えて20時間, 0°C

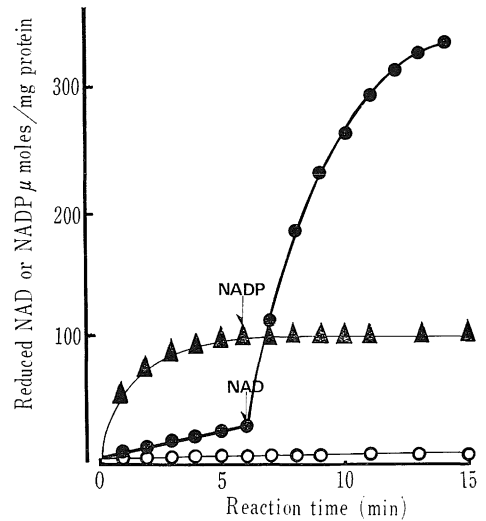


Fig. 1. Specificity of L-malate dehydrogenase(s) localized in chloroplast fraction which was isolated, in the presence of DTT, from radish cotyledons illuminated for 96 hr.

- : Enzyme preparation was pre-incubated with DTT for 2 hr at 0°C before reaction started with NADP⁺ as a cofactor.
- ▲—▲ : pre-incubated with DTT for 20 hr at 0°C, before with NAD⁺ as a cofactor.
- : pre-incubated without DTT for 20 hr at 0°C, before with NADP⁺ as a cofactor.

0.5 mmole NAD⁺ or NADP⁺ was added at the point of arrow.

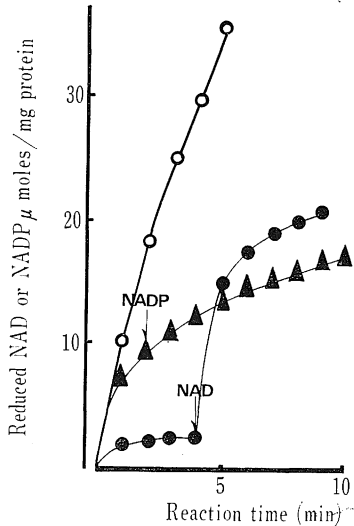


Fig. 2. Specificity of L-malate dehydrogenase(s) localized in non-chloroplast fraction which was isolated, in the presence of DTT, from radish cotyledons illuminated for 96 hr. Marks and reaction conditions are the same as Fig. 1.

に培養したものに NAD^+ を加えると NADP^+ を与えた場合よりはたしかに活性は高いが、DTT と培養しないものよりは低くなる。ここに NADP^+ を添加しても活性に変化はない。これらの事からダイコン葉緑体中の MDH は助酵素として NAD^+ を要求し、かつ DTT はむしろその活性発現を阻害することがわかる。

Fig. 2 は葉緑体を含まない画分の MDH 活性を示すものである。2 時間 5mM DTT と培養した酵素標品に NADP^+ を与えると Fig. 1 の場合と異なり、著しい活性がみられる。また DTT と 20 時間培養した酵素標品に最初から NAD^+ を与えたものでは、 NADP^+ を与えたものに比べて少し初速度が低下するが、やはり高い活性がみられる。ここにあとから NADP^+ を加えても比活性のさらなる上昇はない。一方、逆に DTT なしで 20 時間培養した酵素に NADP^+ を加えたものでは活性は近く、ここに NAD^+ を添加してやると、葉緑体標品でみられたと同じように急激な活性の上昇がみられる。これは、しかしながら非葉緑体画分に葉緑体の破砕断片が混在したための結果と考えられる。したがって非葉緑体画分には NADP^+ -MDH の活性が高く、これは活性は少し低下するが助酵素として NAD^+ でも代用でき、しかも活性の発現には DTT との培養が必要である事がわかる。

以上 Fig. 1, Fig. 2 の結果はさきに示された Jo-

HNSON や TING らの報告の結果とは全く異なるものである。

2. Malic enzyme の局在性および助酵素に対する特異性

4 日間 22°C で 暗所培養したのち 72 時間光照射した緑化子葉を、DTT の存在しない条件下で細胞内顆粒を調製し、洗浄葉緑体も DTT を含まない緩衝液に懸濁してえた。また Sephadex G-25 によりゲル濾過した酵素標品に対しても DTT 処理をせずにゲル濾過後直ちに酵素活性を測定した。すなわち各画分の MDH 酵素反応が飽和状態に達した時点で MgCl_2 を添加し、 MgCl_2 によって初めて発現する malic enzyme の活性を測定した。

Fig. 3 より malic enzyme は完全に非葉緑体画分に局在しており、助酵素としては NADP^+ を特異的に要求するものであることが明らかである。これは KRI-SHNAMURTHY らのマンゴ果肉細胞に含まれる malic enzyme と一致する。いわゆる L-malate : NADP oxidoreductase (decarboxylating) [EC. 1. 1. 1. 40] である。

3. MDH と malic enzyme 活性の経時的変化

24 時間以上光照射したダイコン子葉を二つに分け、一方は DTT なしで酵素標品を調製して NAD^+ -MDH 活性の測定に供した。一方は DTT の共存下で酵素標品を調製しゲル濾過後も 5mM DTT と 2 時間 0°C で培

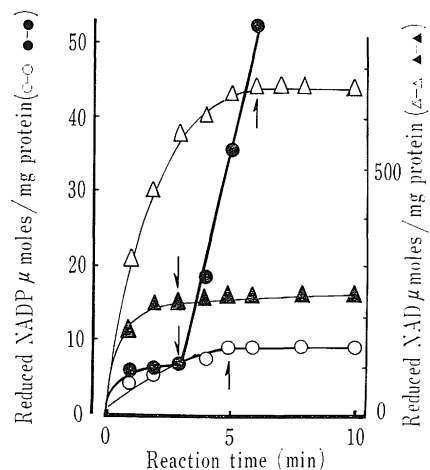


Fig. 3. Localization and Specificity of Malic Enzyme isolated from Radish Cotyledons illuminated for 72 hr.

○—○; △—△: Chloroplast Fraction
●—●; ▲—▲: Non-chloroplast Fraction
3 mmoles of MgCl_2 were added at the point of arrow.

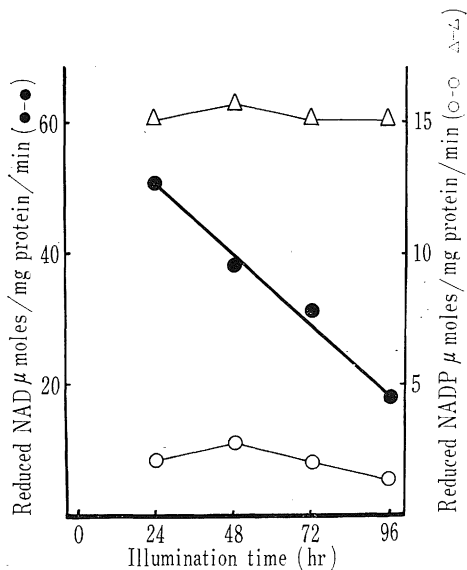


Fig. 4. Time Courses of NAD⁺-MDH of Chloroplast (●-●), NAD⁺-MDH (○-○) and Malic Enzyme (△-△) of Non-chloroplast Fraction.

養してから NADP⁺-MDH の測定に用いた。Fig. 4 に示されているように葉緑体画分の NAD⁺-MDH は照射時間、すなわち葉緑体の発達とともに急速にその比活性は低下していく。一方非葉緑体画分の NAD⁺-MDH および malic enzyme の比活性はほとんど変わらない。この照射による各酵素の経時的変化に関する実験結果は、事実葉緑体画分で NAD⁺-MDH が作用しており非葉緑体画分で NADP⁺-MDH および malic enzyme が作用していることを裏づけするものであろう。さらにまたダイコン子葉においてはその葉緑体発生の初期において NAD⁺-MDH が重要な作用をになっている事を示すものであるし、あるいは C₄-型の CO₂ 固定が行なわれている可能性を示すものとして興味深い。

4. MDH および malic enzyme 活性に対する 4SU の効果

4SU は光誘起による葉緑体 r-RNA の生合成を選択的に抑制し、したがって同一細胞内の葉緑体発生に関与する酵素蛋白、構造蛋白の生合成も選択的に抑制を受けることが知られている⁹⁾⁻¹⁰⁾。ここでは Sephadex G-200 により精製した NAD⁺-MDH、および malic enzyme に対する *in vitro* の 4SU の阻害効果を調べた。なお DTT は酵素活性の測定に用いる DPIP を化学的に還元してしまうので DTT の共存を必要とする NAD⁺-MDH への阻害効果実験は行なっていない。Fig. 5 に示されるように葉緑体局在の NAD⁺-MDH

活性は 4SU 濃度の増加にしたがい初速度が減少し、5.4mM の 4SU の存在下では酵素活性は正常の 1/3 に低下している。これに対し細胞質局在の malic enzyme はその実験結果に多少ばらつきがあるけれども 4SU の阻害作用はうけないとみなされる。

in vitro での酵素反応に対して 4SU が阻害効果をもつ事が観察されたのは NAD⁺-MDH が初めてである。4SU が発生初期の葉緑体に局在する NAD⁺-MDH 反応に阻害効果をもつこと、したがって特に酸化還元反応に対して影響するとの事実は 4SU が葉緑体内の代謝に変動をもたらすことを示すものであり、葉緑体発生の抑制機構の解明という観点から大変興味深いものである。

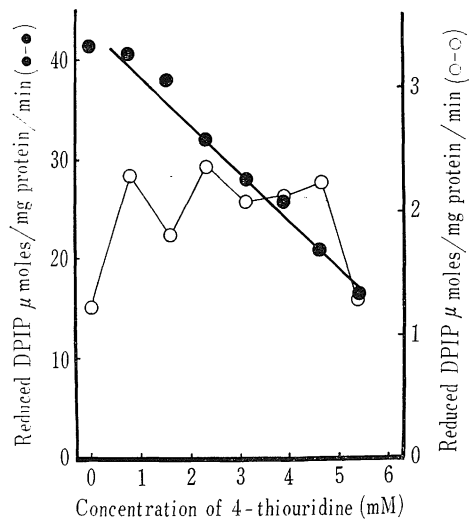


Fig. 5. Effect of 4-Thiouridine on NAD⁺-MDH (●-●) and Malic Enzyme (○-○).

Enzymes used were purified by fractionation through Sephadex G-200 Column Chromatography.

考 察

われわれの実験結果よりダイコン子葉中においては発生初期の葉緑体に NAD⁺ を要求する MDH の存在する事が明らかとなった。この事は JOHNSON や⁴⁾ TING ら⁵⁾ のホウレン草、大麦など C₃-植物を用いた実験結果と相異なるものである。JOHNSON は C₄-植物であるトウモロコシの葉より非水浴媒法を用いて顆粒を分離することにより葉緑体に NADP⁺-MDH が局在することを示した先の実験に基づき成熟したホウレン草、大麦の葉より葉緑体を分離せずに NADP⁺-MDH 酵素蛋白を調製し、C₄-植物の NADP⁺-MDH と同じ性質を有しているという事を見出して、このことからホウレン

草、大麦の葉の葉緑体に NADP⁺-MDH が局在していると結論づけたのである。一方 TING らはシヨ糖密度勾配法により intact な葉緑体、破壊した葉緑体、ミトコンドリア、ミクロソーム画分をホウレン草より分離し、100×g (葉緑体を多く含む画分) と 3000×g (ミトコンドリアを多く含む画分) の両画分においてクロロフィルあたりの NADP⁺-MDH 活性が同じ値を示すことから、そして破壊葉緑体にその活性が見られないことから NADP⁺-MDH は intact な葉緑体のストロマに局在していると結論づけた。

われわれが今回用いた葉緑体標品はその NAD⁺-GDH 活性を調べた結果から不純物の少ない intact な葉緑体標品であると考えられる。この点では JOHNSON の報告よりは正しい結論づけであると思う。もっとも C₃-植物間でも植物種によって酵素の性質が異なることは十分にありうるし、また発生過程の葉緑体と成熟葉緑体とは活性分布が異なるのも当然かもしれない。

ところで MDH はリンゴ酸形成方向、オキサロ酢酸還元方向に平衡が傾いており、このことは少なくとも発生初期のダイコン子葉葉緑体において C₄-ジカルボン酸経路による CO₂ 固定でオキサロ酢酸が生成し、NADH を酸化してリンゴ酸を生ずる経路の存在を示唆するものである。

さて、光化学系 I により生成する還元型フェレドキシンは単に NADP⁺ の還元に供されるだけでなく、葉緑体の Fructose-1, 6-diphosphatase の活性化因子でもある¹¹⁾、また亜硝酸還元酵素の共役因子でもあり、広く光合成炭素還元回路での律速因子として働いていると考えられている。最近 THAUER ら¹²⁾ は *Clostridium Kluyveri* の NADPH-フェレドキシン還元酵素の制御機構について詳細な研究を行ない、NADP⁺ の還元には還元型フェレドキシンとともに NADPH から NAD⁺ への transhydrogenation の反応が必要であることを示唆し、そしてこの反応を酸化型フェレドキシンが促進すること、また逆に NADPH によるフェレドキシン還元は NAD⁺-NADH の酸化還元平衡状態によって左右され、NAD⁺ が必須の活性化剤として働くことを示している。このように還元型フェレドキシンの多様な生理作用とその制御に直接関与する NAD⁺ の MDH による供給関係は、発生初期の葉緑体での光調節機構を研究する上に重要な問題である。

摘 要

光照射をうけて緑化過程にあるダイコン子葉中のリンゴ酸脱水素酵素 (MDH), malic enzyme の局在性、性質、経時的変動および 4-チオウリジンによる阻害効果などについて調べた。その結果

1. ダイコン子葉葉緑体中には NAD⁺ を助酵素として要求する MDH が存在し、その比活性は光照射時間すなわち葉緑体の発達とともに減少していくことが明らかとなった。

2. 非葉緑体画分の MDH は NADP⁺ 型であるが NAD⁺ でも活性の少しの低下を伴うが代用できる。malic enzyme は典型的な NADP⁺ 型であり、これら非葉緑体画分の二つの酵素の比活性には経時的変動はない。

3. 葉緑体画分の NAD⁺-MDH は 1~5mM 濃度の 4-チオウリジンによって阻害をうけるが malic enzyme は影響されない。

これらの実験結果に基づき、葉緑体中の NAD⁺-MDH の生理的意義について考察した。

参 考 文 献

- HATCH, M. D. and SLACK, C. R. : Biochem. Biophys. Res. Commun., **34** : 589-593, 1969.
- JOHNSON, H. S. and HATCH, M. D. : Biochem. J., **119** : 273-280, 1970.
- ANDREWS, T. J. and JOHNSON, H. S. : Phytochemistry **10** : 2005-2013, 1971.
- JOHNSON, H. S. : Biochem. Biophys. Res. Commun., **43** : 703-709, 1971.
- TING, I. P. and ROCHA, V. : Arch. Biochem. Biophys., **147** : 156-164, 1971.
- LOWRY, O. H. et al., J. Biol. Chem., **193** : 265-275, 1951.
- KRISHNAMURTHY, S. and PATWARDHAN, M. V. : Phytochemistry **10** : 1811-1815, 1971.
- OCHIAI, H. and SHIBATA, H. : Agr. Biol. Chem., **34** : 1751-1753, 1970.
- OCHIAI, H., SHIBATA, H. and SUEKANE, T. : ibid., **35** : 1259-1266, 1971.
- SHIBATA, H. and OCHIAI, H. : ibid., **37** : 471-476, 1973.
- BUCHANAN, B. B. et al., : J. Biol. Chem., **246** : 5952-5959, 1971.
- THAUER, R. K. et al., ibid., **246** : 954-959, 1971.

Summary

Localization, properties and time courses of malate dehydrogenases in greening radish cotyledons were studied as well as an inhibitory effect of 4-thiouridine upon the enzymes. Results obtained are as follow.

1) Chloroplast fraction isolated from the radish cotyledon cells contained NAD^+ -specific malate dehydrogenase, the specific activity of which decreased as the development of the chloroplast proceeded on illumination.

2) Non-chloroplast fraction contained NADP^+ -malate dehydrogenase and malic enzyme. Cofactor of the NADP^+ -malate dehydrogenase could be replaced by NAD^+ with a slight decrease of the specific activity. Malic enzyme required NADP^+ as a specific cofactor. Specific activities of both the enzymes remained unchanged with illumination time.

3) NAD^+ -malate dehydrogenase of the chloroplast was inhibited by the presence of 4-thiouridine (1–5mM), but malic enzyme in the cytoplasm was not.

Based upon these observations, biological significance of NAD^+ -malate dehydrogenase in the developing chloroplast was discussed.