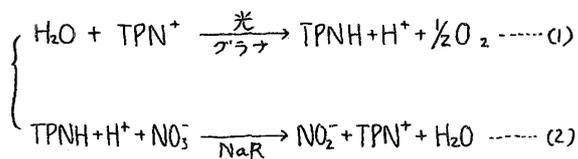


5 緑色植物における亜硝酸の還元と光の作用

藤茂 宏 (岡山大・理・生物)

①序論: 緑色植物における硝酸塩の同化過程が光の照射によって促進されるという事実は古く1884年に Schimper によって発見されて以来, 多くの研究がなされた。初期の頃はこの現象における光の作用は間接的なものであると解釈されていた。すなわち, 光の作用で生成した光合成産物のあるものが硝酸塩又はそれからの生成物で非光化学的に反応するという全く間接的な機作によって促進されるものと考えられていた(例えば Warburg など)。しかしその後の研究によって, 緑色植物においては光エネルギーは単に光合成過程においてのみ利用されるのではなく, 窒素同化の一環としての硝酸塩(又は亜硝酸塩)の還元にも利用されるものであるということがわかった。すなわち, 緑色植物における無機窒素代謝は光合成機作と密接に関連して進行しているものと考えられるに至った。この見解を支持する実験事実の一つとして Evans, Nason (1953) の仕事がある。彼らはダイズ緑葉からグラナと硝酸還元酵素(NaR)とを抽出し, これらを組み合わせた系に TPN と硝酸塩とを与えて照射すると, 顕著な光化学的硝酸還元が起ることも見た。この結果に対して次のような機作を考えて説明した。



すなわち, 照射葉緑体標品で行われる光化学的 TPN 還元(広義の Hill 反応の一種)と共転して, 硝酸塩還元が起ると考えた。

その後の研究により反応の進行にはグラナのほかに或る種の可溶性酵素の添加を必要とすることがわかってきたが, San Pietro ら (1958) はこの酵

素をホウレンソウのホモジネートからアセトン分画及びプロタミンスルファート沈澱などによりある程度純化精製した標品を得た。この酵素は PPNR (Photosynthetic pyridine nucleotide reductase) とよばれている。

所で上記の反応機作において, 反応(2)は酸化還元電位の差から見て, このように簡単な反応で進行するとは考えられない。(TPN⁺/TPNH 系の E₀' は -0.32 V であり, NO₃⁻/NO₂⁻ 系の E₀' は +0.44 V で, その間には 0.7 V の差がある。) これは反応(2)は更にいくつかの段階に分かれて進行するものと考えらるべきであることを示している。この問題を追求し, 又, 無機窒素同化系と光合成系とがどのように関連しているかをしるべし目的で, 光化学的亜硝酸還元系の生化学的研究を行った。

② PPNR の発見: 藤茂・佐藤(1959)は, 鞭毛藻 *Euglena* およびホウレンソウを用いて, 光化学的亜硝酸還元系の存在することを見出し, 更にその酵素的研究を進めた(1960 →)。ホウレンソウからグラナ(G)と酵素(E)とをそれぞれ分離し, 部分的精製後, 再構成実験を行なった。次の知見を得た。すなわち, G 又は E 単独の場合および G, E の共存系でも光を与えない場合には亜硝酸還元は起らないが, G と E との共存系に光を照射すると顕著な亜硝酸還元が起った。

この酵素は光合成系の一部であるグラナ系で光化学的に生成した還元力 [H] を利用して亜硝酸塩を還元する反応を触媒するので, *E. coli* などの非光化学的 Nitrite reductase と区別するために, Photosynthetic nitrite reductase (PPNR) とよんだ。(この酵素はフダンソウ, ダイズ, シロツメクサなどからも抽出することができたが, 大量に処理するにはホウレンソウが最適である。)

③ PNIRの精製: ホウレンソウから抽出した粗酵素(E₀)を更にアセトン分画, DEAE-セルロース吸着・溶離, セフデックスゲル分画などにより精製した。精製操作の概要を図1に示す。(図中に括弧で示した数値は粗酵素の比活性を1とした場合の夫々の標品の比活性を示す。)

(i)粗酵素をアセトン分画し, 50~80%の画分をとり, 少量の緩衝液に溶かしてから軽く遠心した上清では比活性は粗酵素のそれの17倍になった。

(ii)この部分的精製した酵素をDEAE-セルロースカラムにかけると, 図1の左下隅に示すように, カラムの最上部に褐色の層およびそのすぐ下に桃色の層として吸着される。カラムにかかわらず通過してきた液は黄色である。カラムに吸着されたものを洗滌後, 0.05M Tris-HCl+0.4M NaClで分画溶離すると, 赤褐色の酵素液がえられる。これを“E-fraction”とよぶ。このE-fractionの比活性をその前の段階に比べるとそれほど高くなっていない(粗酵素の約27倍)。これに上記の黄色の流下液を加えるとPNIR活性が増大する。このことは, この

黄色の流下液の部分にもPNIR作用に必要な成分が含まれていることを示す。この黄色の流下液を“F-fraction”とよぶ。

(iii)E-fractionおよびF-fractionをそれぞれセフデックスカラムにかけゲル分画をして分画し, 不純成分の除去を試みた。E-fractionについていえば, 最初及び終期に出てくる画分は酵素活性は低いが, 中間に出てくる画分に酵素活性が局在する(図2)。この画分をPNIR-eとよぶ。また, F-fractionについても, 中間に出てくる画分にPNIR-e作用を促進する物質が含まれている。この黄色の画分をPNIR-fとよぶ。(図3)

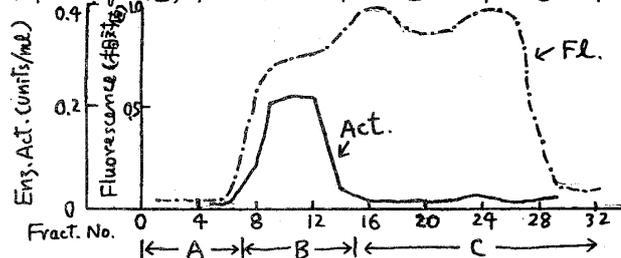
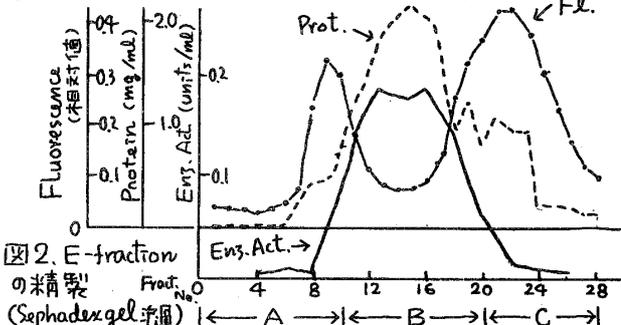
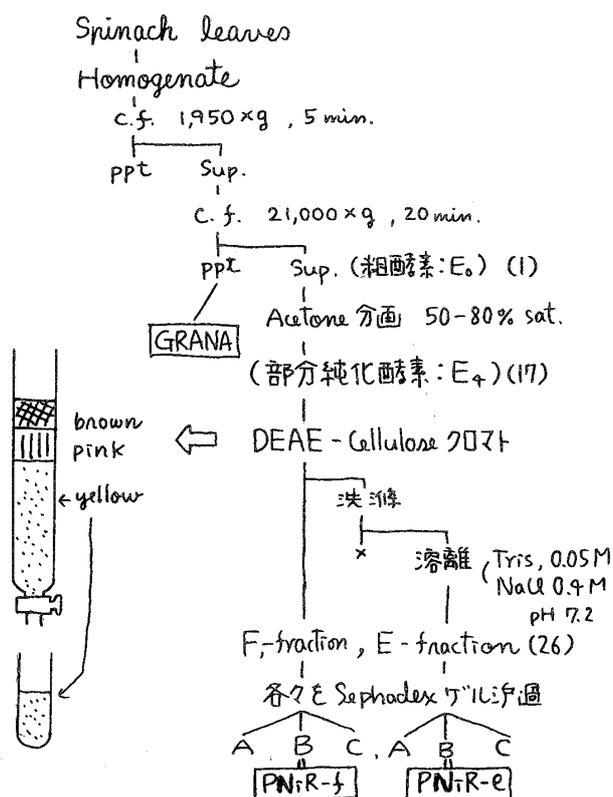
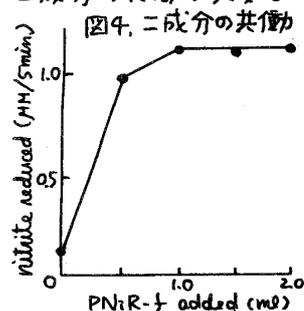


図1. PNIRの精製



④ PNIRの二成分: 純化した赤褐色の酵素(PNIR-e)単独ではほとんどPNIR活性を示さないが, これに純化した黄色酵素(PNIR-f)を添加すると, 図4に示すごとく, 著しいPNIR活性が見られる。このことから光化学的亜硝酸還元反応の進行には, 還元力(H)の光化学的生成に与るグラナ以外に, 可溶性酵素としてPNIR-e, PNIR-fという二成分の共働があることがわかる。

⑤ PNIR-eの酵素的本体: 非蛍光性の赤褐色酵素で, 吸収スペクトル(260, 330, 420, 465nmに極大)は San Pietroらの PPNRの吸収スペクトル



ル(278, 327, 420, 460 μm)とよく似ているのでPNiR-eにも光化学的TPN還元能(すなわちPPNR活性)があるものと考えられるので、これを検討した。PNiR-eとグラナの共存系にTPNを与えて照射し、一定時間後に反応を停止して、生成TPNH量を蛍光法で追跡した所、図5に示す結果を得た。すなわち、PNiR-e, G, TPNのいずれか一つの成分を欠く系又は完全系でも光を与えない場合にはTPNHの生成は認められないが、完全系に光を当てた場合には顕著なTPNH生成が認められた。これらの事実から、我々の得た、PNiRの一つの成分PNiR-eはPPNRと同じ酵素であると考えられる。

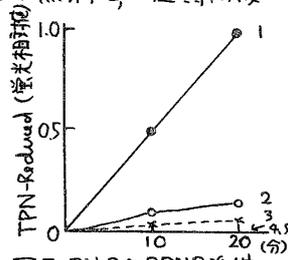


図5. PNiR-eのPPNR活性
1:完全系, 2:-TPN
3:-L, 4:-G, 5:-e

④PNiR-fの酵素的本体:

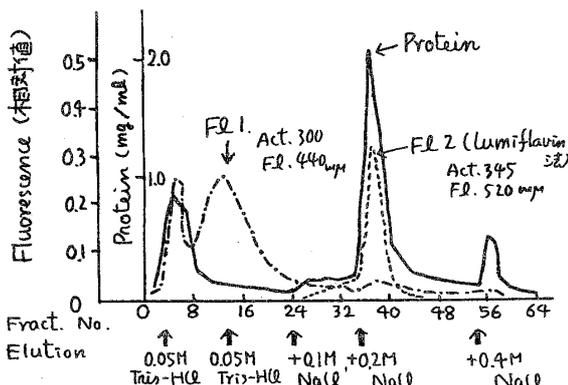


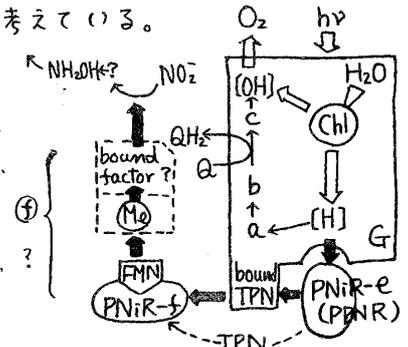
図6. PNiR-fのDEAE-Sephadexカラムクロマトグラフィ—この酵素の酵素的本体を明らかにするため、更に、DEAE-Sephadexカラムクロマトを行い分画精製をした。初期に溶離してくる部分は蛍光性ではあるが酵素活性はなく、0.05M Tris-HCl+0.2M NaClで溶離してくる部分に酵素活性、すなわちPNiR-eと共働して、PNiR作用をもたらす活性がある。この酵素は蛍光性の黄色色素であって、吸収極大は278, 385, 460 μm にあり、既知の多くのフラビン酵素の吸収スペクトルとよく一致している。この酵素に含まれるフラビンを濾紙クロマト法及びルミフラビン法で同定・定量したところ、含まれるフラビンはFMNであり、その含量は最純の段階で0.34%であった。又高感度ホー

ラログラフ、蛍光分析により重金属分析をした結果、この酵素にZn, Feがかなり多量に含まれていることもわかった。これらのことから、PNiR-fはメタロフラボプロテインの一種であると考えられるが、この点目下更に検討中である。

Redox系としてのPNiR-fの性質をしらべると、この酵素はTPNHから電子を受取り、これを更に適当な電子受容体に伝達する働きをもつことが判った。電子受容体としてはCt-C, Plastocyaninなども有効であるが、PNiR-f又はgranaそれ自身の中に含まれている何らかの成分もかなり円滑に電子を授受することが判っている。

⑦各成分間の関係: 以上の実験事実および次に述べる考察に基き、光化学的亜硝酸還元反応の材料を図7の様に考えている。

(i) Hill反応の進行にはgranaとHill oxidantの存在が、PPNR反応にはグラナ、TPNのほかに



可溶性酵素(PPNR= PNiR-e)の添加が必要である。又、PNiR反応には、grana, NO₂の他に更に二つの可溶性酵素(PNiR-eとPNiR-f)が必要である。このことからPNiR系はHill反応系(図7においてGと記した部分)、PPNR系(図7の右半分)を内部材料として含む更に複雑な系であると考えられる。このことはHill oxidant(例えばK-Ferricyanide, p-Benzoquinone, DCPIPなど)を加えると、PNiR反応に対して強い競争的阻害が認められるという事実からも支持される。

(ii)従来単一の酵素と考えられていたPNiRが更に二つの成分に分けることができ、その中の一つの成分PNiR-eはPPNRと同じものと考えられ、他の成分PNiR-fはTPNHから電子を受けるといふことを考えると、

光 \rightarrow [e] \rightarrow PNiR-e \rightarrow TPN \rightarrow PNiR-f \rightarrow X
という電子の流れが考えられる。所が、(a) PNiR反

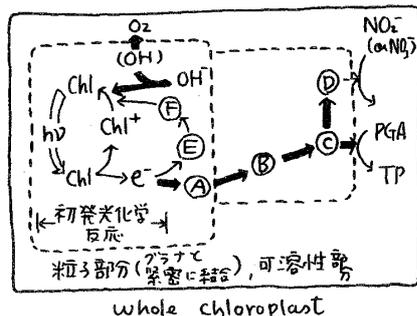
応を測定する場合、G, PNiR-e, PNiR-f だけ与えればよく、外から TPN を与える必要が表1, PNiR反応のPNiR阻害なのということ、および (b) G, PNiR-e, PNiR-f の共存系における PNiR 反応に対する TPN(DPN) 添加の影響をしらべると、表1に示すようにかなり顕著な競争的阻害が認められたことは上述の考えと矛盾するようであるが、このことも PNiR 反応で働いている TPN は grana と結合した形の TPN であると考えれば説明がつく。

TPN (DPN) 添加量 (MM)	PNiR作用の活性比
なし	100
0.8	79
TPN 1.5	61
2.5	45
3.0	92
DPN 4.0	90
6.0	87

⑤無酸素代謝系と光合成系の関連： 上述のような PNiR に関する酵素学的研究は今後更に発展させていくが、ここで序論で述べた植物生理学的問題 — 緑色植物における無酸素代謝系と光合成系とがどのように関連しているか — について述べることにする。

光合成系における電子伝達系については最近著しく解明されたが(詳述は省略)、その大要を概念的に示したのが図8である。初発光化学反応によって遊離された電子(e)は多くの電子伝達系(A, B, C, ...)を経て結局、最終電子受容体にわたされる。光合成反応系において酸化還元の立場から最も問題となるのはPGAの Triose-ph への還元である。光合成反応においては、図8において実線の太字で書いた道を通してPGAの還元が起る。

光化学的硝酸(又は亜硝酸)還元反応においても電子伝達系は光合成の場合と大部分共通であるが、この場合の方がより長い経路を経ている。これを図8. 緑色植物における無酸素代謝系と光合成系との関連：



A: E₀ が非常に低い (-0.95 ~ 0.5V?) 系
 B: PPNR (=PNiR-e = Ferredoxin?)
 C: TPN
 D: PNiR-f (Fl. 酵素)
 E: Flavin enzyme?
 F: ct. 成分 (for CO₂)
 → cyclic electron flow
 → non-cyclic electron flow

別な表現でいいたらうと、無酸素代謝系と光合成系とにおいては、TPNHの奪(あ)けという点で密接に関連しているといえる。これは光合成が盛んなときには光化学的無酸素還元は抑えられ、光合成があととると後者は盛んになると解釈することが出来るが、簡単にそう言ひ切ってしまうにはまだ時期尚早である。しかしこの考えを支持する実験事実はかなりあり、その一つとして我々のタバコを用いて生育段階と光合成能及び体内諸成分の消長との関連を扱った実験事実をあげる事ができる。その結果の概念図を図9に示す。

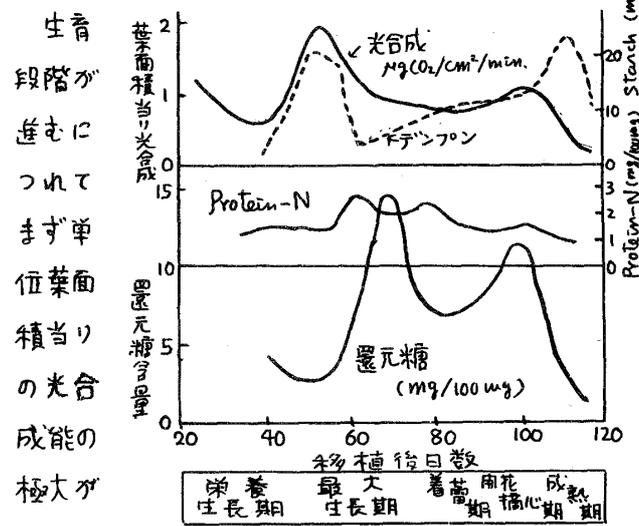


図9. タバコ生育段階と光合成能及び体内諸成分の消長との関係 (Bright Yellow) (移植後50日)

目頃る。この時には澱粉生成量も最大となる。Total-N又はProtein-Nはまだ低い値である。やがて、単位葉面積当りの光合成と澱粉形成能とがあととてくると、次にTotal-N(又はProtein-N)の最大期(移植後60日目)がくる。この全N量も最大期をへると次第に減少し、還元糖の山があらわれてくる。これらの結果、光合成能の高まり → 澱粉増加 → 澱粉分解 ↓ タンパク質の合成 還元糖の増加 という関係も反映したものと見る事ができよう。

* (Hill反応, PPNR反応及びPNiR反応の光失活についての解析, 阻害解析, PNiR反応と光燐酸化反応との関係などの実験結果もあるが、現在の話題にや、極が遠いので、ここでは述べないことにする。)