

1Ba-5

C₄ 植物葉からの NAD-malic enzyme の精製と性質.

村田孝雄, 松岡信, 仲本準 (生物研)

C₄ 光合成は, NADP-malic enzyme (ME), NAD-ME 及び PEP-carboxykinase (CK) 型の三つのサブタイプに分けられ, それぞれ特徴ある C₄ 経路と葉身構造をもつ. NAD-ME 型は Kranz 細胞の葉緑体が多い草種では中心的に位置しているが, Panicum 属の dichotomiflora グループ草種の中には遠心的に位置するものがあり, その脱炭酸酵素である NAD-ME の性質, とくに fructose 1,6-P (FBP) による活性化程度には大きな差がみられた. NAD-ME は他の C₄ サブタイプや C₃ 植物にも広く存在することが知られており, その遺伝的変異が注目される. 本研究では Kranz 細胞の葉緑体が中心的に位置するシコクビエ (Eleusine coracana) と遠心的に位置するオオクサキビ (Panicum dichotomiflorum) から NAD-ME を精製し, その性質を比較検討した.

〈方法〉 C₄ 植物の NAD-ME は通常の条件では失活し易く精製が困難であった. 予備実験の結果, Cl⁻ を酢酸に代え, 50 mM 2-メルカプトエタノール及び 12.5% グリセリンを添加することによりかなりの程度失活を防止でき, また凍結貯蔵が可能であることが判ったので, 精製過程と酵素の保存には基本溶液として (25 mM Tris-acetate pH 7.0-25 mM MnCl₂-50 mM 2-メルカプトエタノール-12.5% グリセリン) を用いた. また, イオン交換等の溶出液には酢酸ナトリウムを使用した. 屋外で生育させた 7-8 葉期の植物の緑葉約 500g を抽出緩衝液 (50 mM HEPES-KOH, pH 7.4-2.5 mM MnCl₂-50 mM 2-メルカプトエタノール-12.5% グリセリン-25g polyclarAT) とともに磨砕して抽出液を得, PEG 6000 による分画 (5.5-11%) を上記基本溶液に溶解して, DEAE トヨハール, トヨハール HW 60S 及び 5'-AMP セフアロ-ズカラムクロマトグラフィーを行った. 酵素活性の測定は標準反応液 (25 mM HEPES-KOH, pH 7.2, 5 mM malate, 2.5 mM MnCl₂, 5 mM DTT, 0.25 mM EDTA, 500 μM FBP, 2 mM NAD, 適当量の酵素液, 全容 1 ml) を用いて 31°C で行った.

〈結果〉 C₄ 植物からの NAD-ME の精製は強光下 (盛夏) で生育した緑葉を供試した場合に極めて効率的であった. シコクビエとオオクサキビとでは精製過程に若干の差があったが, 最終的には約 400 倍に精製した. SDS-PAGE でシコクビエでは分子量 63,000 のバンド 1 本, オオクサキビでは 61,000 のバンドと僅かに混在タンパクを認めた. 活性酵素の分子量は FPLC スーパー-ローズ 6 ゲル濾過で両草種とも約 50 万と測定されたので, 活性酵素はともに同一サブユニットの 8 量体である. 基質等 (NAD, malate, Mn²⁺, FBP) に対する kinetic parameter は Mn²⁺ と FBP に対する S_{0.5} や V_{max} に差がみられたが, FBP による活性化程度は精製酵素においても顕著に異なった. 酵素活性の適温はシコクビエが 37°C 付近なのに対してオオクサキビでは 45-47°C と 10° の開きがあった. なお, 精製酵素の V_{max} は 120-130 μmoles NAD reduced/min/mg protein であった.

シコクビエ精製酵素に対する兔の抗体を作製し Ouchterlony 法で両草種酵素の反応性を検討したところ, 典型的なスバーを形成しオオクサキビの反応性が高かった.

以上の実験結果から NAD-ME は種により遺伝的背景が異なることが明らかになったので, これを指標として C₄ 光合成サブタイプの細分化が可能かを検討したい.

本研究は農林省グリーン・エネルギー計画に基づき実施した (GEP 61-II-1-19).