

1B-14

緑化ダイコン子葉中の δ -アミノレブリン酸脱水酵素の精製と特性

柴田 均, 落合英夫 (島根大・農・農化)

δ -アミノレブリン酸脱水酵素(以下 ALAD)はポルフィリン生合成系路の2番目に位置し, 2分子の δ -アミノレブリン酸を脱水的に縮合して1分子のポルフィobilinogenを生成する酵素である。本酵素は動物, 植物, 微生物を材料として広く研究されているが, 植物の系では黄化植物体に光照射して引き起される緑化の過程すなわち葉緑体の発達過程と関連したALADの活性変動について研究されている。われわれは黄化ダイコン子葉を用いた実験から 1) 光照射にともなうクロロフィルの急激な生合成と平行してALAD活性が増大する, 2) 葉緑体のストロマにALADが存在する, 3) ALADは細胞質リボソーム上でのみ合成されることを確認するまでに報告した。動物や微生物由来のALADではすでに精製標品について多くの報告があるが, 植物由来のALADについての情報はそのほとんどが部分精製した標品を用いたものであり, 精製酵素を用いた実験結果は数例しかない。ここでは緑化ダイコン子葉からALADを精製し, その精製標品を用いて得られたALADの性質について報告する。

黄化ダイコン芽生えに光照射した場合ALAD活性は48時間目に最大に達し以後減少するので光照射48時間後の子葉を材料とした。粗抽出液をゲルろ過し, アセトン分画すると全活性が約2倍に上昇し, ゲルろ過で分離された低分子画分を再添加するとALAD活性が阻害されることから, ダイコン子葉の粗抽出液中に低分子の阻害物質が存在するものと結論した。粗抽出液をアセトン, 硫酸分画後DEAEセルロース, ヒドロキシルアパタイトのクロマトの後セファデックスG-200によるゲルろ過によって精製した。精製標品はディスクゲル上で活性と一致した単一のタンパクバンドを呈した。比活性は粗抽出液に対して約1400倍に, さらに粗抽出液をセファデックスG-25でゲルろ過後の標品に対して約290倍に上昇している。

pHの影響を調べた結果, 本酵素は酸性領域では非常に不安定でありアルカリ領域で比較的安定である。至適pHは8.0であった。チオール修飾剤で阻害され, 最大活性の発現に Mg^{2+} を必要とした。 Fe^{2+} や低濃度の Zn^{2+} によって阻害された。低濃度のEDTAによって阻害を受け, さらに Mg^{2+} を添加すると部分的な回復が観察されたが完全に回復しなかった。メルカプトエタノール, Mg^{2+} の共存下での δ -アミノレブリン酸に対する K_m 値は $3.85 \times 10^{-4} M$ であった。基質のアナログであるレブリン酸は競争阻害剤であり, その K_i 値は $2.14 \times 10^{-4} M$ である。

葉緑体に光照射すると, チオール濃度および Mg^{2+} 濃度が上昇し, ストロマ部分のpHが7.2から8.0程度に上昇することが知られている。これらの事実はいずれも葉緑体のストロマに存在するALADが光照射によって活性化されることを示唆するものである。黄化植物体に光照射した場合の急激な活性増大に対しては *de novo* な合成が考えられているが, 緑化植物体の葉緑体では光照射にともなう活性化の機構が存在しているものと思われる。