



酵素活性測定法

- 光合成 CO₂ 固定およびグリコール酸経路関連酵素 -

鈴木健策

農林水産省東北農業試験場生理生態研究室 〒020-01 岩手県盛岡市下厨川字赤平4

Kensaku Suzuki 1997. Measurement of enzyme activities related to photosynthetic carbon assimilation and glycolate pathway. Jpn. J. Phycol.(Sôri) 45:103 -110.

Assay procedures to measure enzyme activities related to photosynthetic carbon assimilation and glycolate metabolism are described for the use of crude extract from microalgae. The procedures and tips for crude extract are introduced first, followed by the assay methods for the enzymes related to carbon assimilation, such as carbonic anhydrase, ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase, and phosphoenolpyruvate carboxykinase. The enzymes described here that are related to glycolate metabolism include phosphoglycolate phosphatase, glycolate oxidizing enzymes, catalase and hydroxypruvate reductase.

Key index words: carbonic anhydrase - glycolate oxidizing enzymes - phosphoglycolate phosphatase - phosphoenolphosphate carboxykinase - photorespiration - photosynthesis - ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (rubisco)

Kensaku Suzuki: Laboratory of Plant Eco-Physiology, Tohoku National Agricultural Experiment Station, Shimo-Kuriyagawa, Morioka, Iwate 020-01, Japan

1. はじめに

藻類は多様な生物集団であり、酵素一つとってもその性質は種によってかなり異なる場合が多い。同一の反応が全く別の酵素により触媒されていることもある。したがって一般的によく使われている酵素測定法であっても、その藻で初めて測定する場合には、至適pH、基質・コファクター濃度くらいは確認しておく必要があることはいうまでもない。

また、藻類に限らないが光合成に関与する酵素には不安定なものが多いので、細胞破碎から酵素活性測定直前までの一連の作業を4℃以下で行うのが普通である。しかし凍結保存により失活する酵素もあり、時には低温保存により失活する酵素もある。したがって高い活性を得ようと思ったら保存など考えずに、しかるべき保護剤、安定化剤等を添加することで活性低下を最小限に留めながら、できる限り短時間のうちに活性測定までもっていく必要がある。それに活性測定まで

の時間が十分に短くできれば低温にしなくてもすむ場合もある。いずれにしても文献等の方法で試みた後の最適化が重要である。ここでは光合成や光呼吸に関わるいくつかの酵素活性を粗酵素抽出液で測定する方法と注意点について、できる限り微細藻類を用いた例に基づいて紹介したい。

2. 酵素の抽出

2-1. 抽出用緩衝液の組成・添加物

細胞を破碎すると、酵素は著しく希釈され、かつ、それまで細胞内で隔離されていた様々な物質と混在することになり、分解を受けたり、失活したりする可能性がある。安定化因子や活性化因子と解離してしまう可能性も大きい。また、緩衝液の成分がかえって酵素活性低下の要因になってしまうこともある。そこで目的とする酵素にあわせて、細胞破碎後にできるだけ高い活性を維持できるよう抽出用緩衝液を工夫する必要

がある。

安定なpHは酵素により異なり、反応の至適pHと一致するとは限らないが、光合成関連の酵素の場合、葉緑体内に近いとされるpH7.5から8.0で抽出することが多い。また、抽出によりpHが大きくなってしまわないよう、十分な緩衝作用を持たせる必要がある。Tris (シグマ社ではTRIZMA) やGood緩衝剤から目的のpHに適したものを選び (シグマ社のカタログの「BIOLOGICAL BUFFERS」や同仁総合カタログの「グッド緩衝剤」を参照)、藻類の場合最初は100 mM以上の濃度で使用するのが無難である。しかし活性や安定性が緩衝剤の種類によって左右される場合もあるので注意を要する。

蛋白質分解酵素の阻害剤としては1 mMのPMSFを加えることが多い。しかし本当に蛋白質分解酵素による分解が問題となる場合は、これでは不十分と言われている。そこでさらに、5 mM ϵ -amino-n-caproic acid, 1 mM benzamidine, 10 mM EDTA- Na_2 等を添加することもある。牛血清アルブミン (BSA) 等の添加も効果があり、目的酵素の安定化にも役立つ場合がある。

ポリフェノール等を多量に含む藻類では酵素の不溶化、アミノ基の酸化、SH基の酸化やそれらによる酵素の不活性化が起こりやすい。この場合、窒素気流化での抽出、ポリフェノールオキシダーゼ阻害剤としてKCNやジエチルジチオカルバミン酸ナトリウムの添加、還元剤としてアスコルビン酸ナトリウム、2-メルカプトエタノール (2-ME) またはジチオスレイトール (DTT) 等の添加、ポリフェノール吸着剤としてポリビニルピロリドン (PVP) またはポリクラール ATの添加等、あるいはその組合せを試みる (猪川 1979)。

また酵素の安定化に基質やコファクターを添加することもある。特に二価カチオンをEDTA等のキレート剤と共に添加することが多い。酵素がSH酵素の場合は通常DTTや2-MEをSH基の保護剤として加える。安定化のためにグリセロール (たとえば20%) を入れることもある。

2-2. 細胞の破碎

酵素活性を測定する場合、通常は藻類細胞を破碎し酵素を抽出する作業が必要になる。微細藻類でよく使われる方法には、超音波破碎による方法、フレンチプレス等を用いる方法、ガラスビーズを用いる方法、界面活性剤を用いる方法等がある。

超音波破碎法：微細藻類の細胞破碎で最も簡便で効果的なのがこの方法である。いろいろなタイプの

プローブ (液中に超音波エネルギーを放射、集中させる部分) があるが、10ml以下であればマイクロチップ式プローブを使用する。細胞壁のない藻ならほんの数秒で充分である。細胞壁があっても、例えばクラミドモナスの細胞懸濁液5 mlを氷冷しながら島津USP-300でパルス処理 (0.2秒-ON, 1.8秒-OFF) した場合、5~15分で完全に破碎できる。壊れにくい材料の場合は界面活性剤を併用こともあるが泡が出すぎると破碎効率が低下する。その時は消泡シリコンの少しついたガラス棒などを泡にふれさせるとよい。

圧力破碎法：細胞内外に急激な圧力変化を生じさせることで生体膜を破裂させる方法である。物理的に圧力をかけるフレンチプレスと、窒素ガス等で圧力をかけるパル細胞破碎器 (Parr Press, Parr社) 等がある。後者の方が取り扱いが簡単で安価である。また前者は内部の液の攪拌が困難であるが、後者は圧力をかけたまま氷冷・攪拌ができ、細胞の沈降等を気にせず長時間の処理もできる。この方法は、等張液中でマイルドに用いることで、葉緑体などオルガネラの単離によく利用されているが、低張液中で何度か繰り返し行えば粗酵素抽出液を得る方法としても効果的な場合がある。細胞壁のない藻や、クラミドモナスのように比較的こわれやすい藻の破碎に適している。

ガラスビーズ衝撃法：紅藻の *Porphyridium* などは超音波や圧力変化では破碎が困難であるが、ガラスビーズ法を用いることで効果的に破碎することができる。専用の装置も市販されているが、特別な装置がなくても次の要領で行えばよい。等量のガラスビーズ (0.5mm径が一般的) と細胞懸濁液を試験管 (またはマイクロチューブ) に入れ氷冷する。温度があまり上がらないように注意しながら試験管ミキサーで激しく振とうする。時々顕微鏡下で破碎状況を確認しながら振とうと氷冷を繰り返す。十分に破碎したところで混合液を遠心濾過する。または試験管を氷の中に静置し、ガラスビーズが沈殿した後の上清を遠心分離または濾過する。

その他の抽出法として、凍結融解法、トルエン等を用いた自己消化法、アセトン粉末法等があり (猪川 1979)、また細胞壁のない藻類では、界面活性剤や浸透圧差による細胞膜破壊も有効である。

2-3. 粗酵素抽出液の調整

通常は、細胞破碎後ただちに高速冷却遠心分離機 (例えば20,000xg, 20 min) などで上清と沈殿に分画する。特にきちんと沈殿を分離したいときは超遠心分離

機 (例えば 150,000xg, 30 min) を用いる。光合成 CO₂ 固定や光呼吸に関与する酵素はほとんどが上清にくるので、普通はこれを粗酵素抽出液とするが、疑わしい場合や活性が両方の画分にある場合は、遠心分離せずに破碎後の懸濁液を粗酵素液とし、できるだけ速やかに酵素活性を測定する。

3. CO₂ 固定関連酵素

3-1. カーボニックアンヒドラーゼ (CA)

溶存 CO₂ と HCO₃⁻ の平衡反応を促進するはたらきをするこの酵素は、ルビスコへの CO₂ 供給で重要な役割を果たしている。活性測定法としては、pH 変化を測定する方法とマスマスペクトロメーターを用いる方法がある。後者の方が高感度でより正確な結果が得られるが装置が高価で一般的でないので、ここでは pH メーターを用いて pH 変化を測定する方法 (Spalding and Ogren 1982, Suzuki and Spalding 1989) について説明する。なおこの方法は微細藻類全般に幅広く用いられている。

活性測定手順：氷冷したミニバイアルまたは試験管中に 0-100 μl の酵素液と氷冷した 25 mM ベロナール緩衝液を加え 3 ml とする。マグネティックスターラー上の小容器中に立てて氷冷する。液中に微小 pH 電極を注意深く挿入し、攪拌子の回転と記録計の紙送りを開始する。pH が安定していることを確認した後、2 ml の氷冷 CO₂ 飽和水を手早く加え、pH の低下を記録する。

酵素液：クラミドモナス細胞表層の CA 活性の測定では、細胞を遠心分離で集め、ベロナール緩衝液 (25 mM) で一度洗い、再懸濁したものを酵素液とする (細胞は 50 から 100 倍に濃縮)。全 CA 活性の測定では、その懸濁液を超音波等で破碎 (界面活性剤を加えてもよい) した懸濁液をそのまま酵素液とするか、0.25% の NP-40 または Triton X-100 で 10 分間 37°C で処理したものを用いる。

ベロナール緩衝液：市販の調整済のベロナール緩衝液 (pH 8.6, 0.05M) を用いるとよい。ベロナール (バルビタール) は向精神薬であるが、市販の調整済緩衝液は法的規制の対象とはならない。

氷冷 CO₂ 飽和水：三角フラスコに純水を入れ、氷冷しながら CO₂ ガスを通気し 2 時間以上たってから使用する。

活性：1 unit = $t_p/t_c - 1$ (所定の pH 変化に要する時間を半分にする酵素量) として表す。ここで t_p は酵素なし、 t_c は酵素添加時、それぞれ pH が 8.3 から 7.3 まで低下するのにかかる時間である。

なお一般的には酵素活性はタンパク質 1 mg 当たりで表すことが多いが、光合成活性との比較を考えるとクロロフィル 1 mg 当たりで表すほうが便利である (例えば CA なら unit · (mg Chl)⁻¹, ルビスコなら μmol · (mg Chl)⁻¹ · h⁻¹)。また、色素の定量が難しい藻類では充てん細胞体積 (packed cell volume) などを用いることもある。クロロフィルの抽出と定量については三室 (1996) に詳しいが、クラミドモナスなどの場合は Spreitzer により簡便化された方法がよく使われる (Harris 1989)。クリプト藻や珪藻などクロロフィル a と c を持つ藻類についても簡便法がある (Suzuki and Ikawa 1984)。

3-2. リブロース-1,5-二リン酸カルボキシラーゼ / オキシゲナーゼ (ルビスコ)

光合成で最も重要な酵素で、CO₂ とリブロース-1,5-二リン酸 (RuBP) から 2 分子の 3-ホスホグリセリン酸 (3-PGA) を生成する (カルボキシラーゼ反応) が、O₂ とも反応し 3-PGA とホスホグリコール酸を 1 分子ずつ生成する (オキシゲナーゼ反応)。オキシゲナーゼ反応は光呼吸の最初の反応として知られている。この二つの反応では CO₂ と O₂ がそれぞれ互いに拮抗的に働く。

3-2-1. カルボキシラーゼ活性

粗酵素抽出液のカルボキシラーゼ活性の測定には ¹⁴CO₂ 固定の測定が最適である (表 1, 2)。緩衝液等の調整は CO₂-free 水を用いて行う (佐藤ら 1997)。

全活性測定前には MgCl₂ と NaHCO₃ を含む緩衝液で平衡化した Sephadex G-25 (PD-10, ファルマシアバイオテック社) などに粗酵素液を通し十分に活性化することが望ましいが、反応液に十分な濃度の MgCl₂ と NaHCO₃ が含まれるなら 10 分間ブレインキュベートするだけでもよい (Suzuki and Ikawa 1993)。

藻体内での活性化状態を調べるには、藻体を液体窒素で急速冷却、CO₂ を含まない緩衝液中で手早く抽出、

表 1. Rubisco抽出用緩衝液の一例 (クラミドモナスの場合)。

	組成	濃度
2.5 ml	Bicine/KOH, pH 8.0, 200 mM	100 mM
0.5 ml	MgCl ₂ , 200 mM	20 mM
0.5 ml	NaHCO ₃ , 200 mM	10 mM
0.5 ml	DTT, 50 mM	5 mM
1.0 ml	water	
0.125 ml	PMSF, 40 mM in isopropanol	1 mM

表2. RuBPカルボキシラーゼ活性測定時の反応液。反応の直線性を確認するため、異なる反応時間で何点か測定する。

添加量	原液	最終濃度
875 μ l	Bicine/MgCl ₂ /KOH *, CO ₂ -free	
50 μ l	NaH ¹⁴ CO ₃ , 400 mM	20 mM
5 μ l	carbonic anhydrase, 2 μ g / ml, CO ₂ -free	10 ng
50 μ l	enzyme **	
----- (CO ₂ -freeのN ₂ ガスで通気、25°Cで約5分) -----		
20 μ l	RuBP, CO ₂ -free	2 mM
----- (反応、25°Cで1分以内) -----		
50 μ l	acetic acid	

* Bicine/KOH, pH 8.0, 100 mM, containing 10 mM MgCl₂

** 10 mM NaH¹⁴CO₃を含む (表1)。

その一部を基質を含む反応液に加え30秒間反応させるとよい (横田, 1994)。

RuBPは溶液で保存するとキシロース-1,5-二リン酸 (XuBP) 等の阻害物質を生じる可能性があるため、原則として溶液での保存は避けたほうがよい。また、市販のRuBP中にもこれらの阻害物質が含まれているおそれがある。しかし粗酵素抽出液中の活性を測る程度で詳細なキネティクス等を調べるのであれば市販品 (Sigma 0878) で充分である。いったん溶かしてしまったRuBPも、使いきることでできる分量ずつに分けて-30°C以下で保存すれば6週間は安定なので目的によっては使用可能である。

3-2-2. オキシゲナーゼ活性

感度は高くないが、オキシゲナーゼ活性はRuBPに依存した酸素の消費として酸素電極で光合成測定 (和田野 1996, 佐藤ら 1997) と同様に測定できる (表3)。

3-2-3. カルボキシラーゼ, オキシゲナーゼ両活性の

表3. 酸素電極によるRuBPオキシゲナーゼ活性測定時の反応液。

添加量	原液	最終濃度
925 μ l	Bicine/MgCl ₂ /KOH *, CO ₂ -free	
5 μ l	carbonic anhydrase, 2 μ g / ml, CO ₂ -free	10 ng
50 μ l	rubisco preparation	150 μ g相当
-----平衡化 (25°C・約5分) -----		
20 μ l	RuBP, CO ₂ -free	2 mM

* Bicine/KOH, pH 8.0, 100 mM, containing 10 mM MgCl₂, CO₂-freeの純水で調製し、使用前までCO₂-freeの空気を通気しておく。

同時測定

分子ふるい (HiLoad 16/60 Superdex 200pg, フェルマシアバイオテック社) などである程度精製した酵素の場合は放射性同位体を用いなくても、任意のCO₂/O₂濃度の気体と平衡状態で反応させ、陰イオン交換液体クロマトグラフィにより3-PGAとホスホグリコール酸を定量することで両活性の同時測定とCO₂/O₂相対特異性の評価ができる (Uemura *et al.* 1996)。ただし高感度かつ高精度の装置が必要なため、あまり一般的ではない。同様の測定は、酸素電極でのオキシゲナーゼ活性測定の後に3-PGAを酵素的に定量 (次項を参照) することでもできるが、精度や感度には若干問題がある。CO₂/O₂相対特異性は藻類群によりかなり異なり、緑藻やラン藻などでは高等植物より低いのに対し、紅藻、ラフィド藻、珪藻などではかえって高いことが最近わかっている (Read and Tabita 1994, Uemura *et al.* 1996)。

3-3. ホスホグリセロキナーゼ (PGK)

ルビスコの両活性により生成する3-PGAを、ATPを用いて1,3-ビスホスホグリセリン酸 (1,3-bisPGA) にする。活性は、グリセロールアルデヒド三リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH) と共役させることでNADHの酸化 (340 nmの吸光度の減少) として測定できる (Macioszek *et al.* 1990)。酵素液として市販のPGKを用いることにより3-PGAの定量に応用できる (Stitt *et al.* 1989)。

3-4. グリセロールアルデヒド三リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH)

細胞質局在のGAPDHはNADHを要求するが、葉緑体のものはNADPHを要求し、PGK活性により生成する1,3-bisPGAからグリセロールアルデヒド三リン酸 (GAP) を生成する。実際にはPGKに結合した1,3-bisPGAを基質としているらしい。PGK測定用反応液中のGAPDHをPGKに代えることで活性を測定できる (Anderson *et al.* 1995)。

3-5. トリオースリン酸イソメラーゼ (TPI)

GAPとジヒドロキシアセトンリン酸 (DHAP) の変換を行う。活性測定はGAPを基質とし、グリセロール-1-リン酸脱水素酵素と共役させることでNADHの酸化 (340nmの吸光度の減少) として測定できる (Anderson and Advani 1970)。

3-6. アルドラーゼ

DHAPとGAPからフルクトース-1,6-二リン酸(FBP)を生成する反応を可逆的に触媒する酵素で、カルビン回路でも解糖系でも重要な役割を持つ酵素である。

FBPを基質としたとき生成するトリオースリン酸を、ヒドラジンの反応を利用して測る方法と、グリセロール-1-リン酸脱水素酵素と共役させNADHの酸化(340nmの吸光度の減少)を測る方法の二通りの分光光学的方法で比較的簡単に測定できる(猪川 1979)。

3-7. フルクトース-1,6-ジホスファターゼ (FBPase)

カルビン回路に関与するものと解糖系に関与するものの少なくとも2種類が知られている。高等植物では、カルビン回路に関与する酵素は光により著しく活性化されることで有名であるが、藻類ではよく分かっていない。遊離するリン酸を比色定量する方法と、ヘキソスリン酸イソメラーゼ、グルコース-6-リン酸脱水素酵素と共役させ、NADPHの生成を測定する方法がある(猪川 1979)。全活性を求める時は測定前に、100 mM DTT, 2 mM FBP, 10 mM MgCl₂を含む緩衝液(Harbinson *et al.*, 1990)で10分間程度活性化を行う。

3-8. ホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ (PEPCK)

この酵素はホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ (PEPCase)と同様、ホスホエノールピルビン酸 (PEP)とHCO₃⁻からオキサロ酢酸 (OAA)を作るが、同時にATPも作る(動物等ではGTP)。いずれもC₄植物の光合成ではルビスコにCO₂を供給するために重要な酵素である。C₃植物では光合成へのCO₂供給とは関係はないとされ、PEPCaseはTCA回路の補充反応に、PEPCKは逆反応で糖新生に関わるとされている。しかし藻類では必ずしもそうではないらしい。褐藻や珪藻ではPEPCaseではなく、PEPCKがPEPのb-カルボキシル化反応を行っていると考えられる。特に褐藻ではこのPEPCK活性が非常に高く、その活性由来とされる「光合成によらない」CO₂固定活性も著しく高い(Akagawa *et al.*, 1972a, Kremer and Küppers 1977)。この高いCO₂「暗」固定は、光合成の律速条件下、特に弱光下での無機炭素の利用とATP供給に役立っている可能性がある。

測定にはNaH¹⁴CO₃を用いる方法が最適であるが、リンゴ酸脱水素酵素と共役させNADHの酸化を340 nmの吸光度の減少で測る方法もある(Akagawa *et al.*, 1972b, Kremer and Küppers 1977)。ここでは褐藻や珪藻におけるPEPCKの測定法を紹介する(表4)。な

表4. PEP carboxykinase活性測定の実験液組成。

添加量	原液	最終濃度
0.25 ml	Tris/HCl, pH 7.6, 0.5 M	125 mM
0.1 ml	NaHCO ₃ , 200 mM	20 mM
0.1 ml	ADP, 100 mM	10 mM
0.1 ml	MnCl ₂ , 100 mM	10 mM
0.1 ml	NADH, 2 mM	0.2 mM
0.05 ml	malate dehydrogenase	12.5 units/ml
0.2 ml	crude extract	
-----25°Cで5分間-----		
0.1 ml	PEP, 20 mM	2 mM

* NADHの原液は緩衝液(中性)に溶かす。反応は340nmの吸光度の減少速度を測定(2分以内)。

お、PEPCaseの測定は、ADPを除きMnCl₂をMgCl₂に置き換えればよい。基質特異性、コファクター、親和性等は藻類によって異なる可能性があるので藻ごとに調べる必要がある。

¹⁴Cを用いた測定ではCO₂-freeの緩衝液を用い、NaHCO₃をNaH¹⁴CO₃(20μCi/ml)に代え、反応開始5分後に50μlの酢酸で未反応のNaH¹⁴CO₃を除去し、残存する¹⁴C量を測定する。またルビスコ活性測定の場合と同様、汚染防止の注意が必要である。

4. 光呼吸関連酵素

4-1. ホスホグリコール酸ホスファターゼ (PGPase)

この酵素は光呼吸で最初に生成されるホスホグリコール酸を脱リン酸してグリコール酸にする。ホスホグリコール酸はカルビンサイクル中のトリオースリン酸イソメラーゼの強力な阻害だが、通常は十分に高い活性のPGPaseによってただちに分解されると信じられている。活性測定は遊離する無機リン酸の定量により行う(Ames 1966)。酵素液の添加で反応開始し、5分後に反応液0.3 mlを直接Ames混液(後出)0.7 mlに加え、そのまま呈色反応を行う。45°Cで20分間(または37°Cで1時間)反応させた後一旦ただちに氷冷し、820 nm (750 nmでもよい)の吸光度を測定する。ただし、反応は全て1.5 mlマイクロチューブ内で行うとよい。ガラス試験管(13 x 100 mm)を使う場合は反応時に溶出する珪酸量の違いからリン酸測定に誤差を生じるので、異なる種類の試験管を混ぜて使用しない。また洗浄にリン酸系の洗剤を使ってはいけない。

この方法は非常に感度が高く、測定に用いる酵素量が少量ですむので通常は除タンパク操作はいらない。しかし酵素活性が著しく低いと粗酵素液中の不安定なリン酸化合物の分解により正しい測定値が得られない

表5. クラミドモナスのPGPase活性測定用反応液の組成 (高感度検出用)。

添加量	原液	最終濃度
100μl	Mes/BTP*, pH 8.3, 50mM	20mM
25μl	MgCl ₂ , 50mM	5mM
30μl	phosphoglycolate, 40mM	4mM
95μl	water	
-----25°Cで5分間-----		
50μl	enzyme*	
-----25°Cで5分間-----		
200μl	perchloric acid, 12.5%	5%

* 50 mM MesをBTP (BIS-TRIS-PROPANE) でpH 8.3に合わせたもの (抽出用緩衝液に20 mM MES-KOH, pH6.3, 5 mM MgCl₂, 1 mM PMSFを用いた場合)。

ことがある。そのような場合は酵素反応の停止を過塩素酸で行い(表5), ただちに氷冷する。そして遠心分離後の上清400 μlを取り1000 μlのAmes混液とよく混ぜ, 上記の呈色反応を行う (Suzuki *et al.* 1990)。

Ames混液はA液(10%アスコルビン酸)とB液(0.42%モリブデン酸アンモニウムを含む1N硫酸)を1:6の比率で混合したもので, 実験当日に調整し氷冷しておく。A液は約1カ月冷蔵保存可能, B液は室温で安定である (Ames 1966)。

4-2. グリコール酸を酸化する酵素

グリコール酸代謝能力は藻類により著しく異なる。グリコール酸代謝能力の小さい藻ではこの過程がグリコール酸代謝の律速となっていることが多く, 過剰に生成したグリコール酸は細胞外に放出される。藻類で

表6. グリコール酸を酸化する酵素の活性測定用反応液 (Nelson and Tolbert 1970)。

添加量	原液	最終濃度
(in thunberg cuvette)		
2000 μl	DCPIP, 0.15 mM in pyrophosphate/Na, pH 8.5, 0.1 M	(12 mM) (20 mM)
50 μl	FMN, 5 mM	0.1 mM
50 μl	Triton X-100, 5%	0.1%
100 μl	water	
200 μl	enzyme	
-----N ₂ に置換後・25°Cで5分間-----		
(in side arm)		
100μl	glycolate-Na, 0.5 M *	8 mM

* glycolate-Naの代わりにD-lactate-LiとL-lactate-Liについて基質特異性を調べる時は最終濃度が20mMとなるように加える。

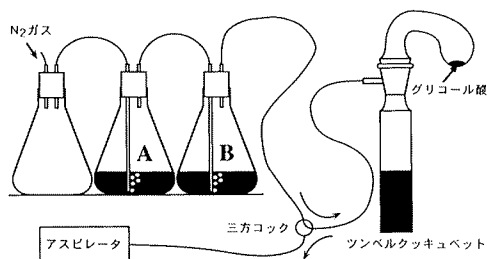


図1. グリコール酸酸化酵素活性測定用反応液の酸素除去

ポンプによる吸引と窒素ガスによるフラッシュを10回繰り返すことで, ツンベルクキュベット内を完全に窒素に置換した後, side armのグリコール酸と反応溶液を混合し, DCPIPの還元由来する600nmの吸光度の減少速度から酵素活性を求める。AはFieser's solutionで, 20gのKOHを100mlの水に溶かし, そこに2gのsodium anthraquinone β-sulfonateと15gのNa₂S₂O₃を加えたもの。Bは酢酸鉛飽和液で, Fieser's solutionから発生するH₂Sを除く。

はこの過程を触媒する酵素としてペロキシソーム局在性のglycolate oxidase (GOX)とミトコンドリア局在性のglycolate dehydrogenase (GDH)が知られており多くの場合そのいずれかをもっているが, 渦鞭毛藻のように活性の検出されていない藻類もある (Suzuki *et al.* 1991)。その分布は系統進化と密接な関係があるのみならず, 関連酵素の有無や細胞内分布の違いと関係があり, 環境適応能力とも関係がありそうである。

GOXとGDHは, ツンベルクキュベットを用いて無酸素条件で2,6-dichlorophenolindophenol (DCPIP, 600 nm)を還元させる(図1, 表6)か, glyoxylate phenylhydrazone (324 nm)を形成させ吸光度変化をすることで測定できる (Nelson and Tolbert 1970)。2 mM KCN添加によりほとんど阻害されなければGOX, ほぼ完全に阻害されるならGDHとしてはほぼ間違いない (Suzuki *et al.* 1991)。また, 基質として20 mMのD型とL型の乳酸リチウムを与えたときD型の方が活性が高ければGDH, 低ければGOXという基準も併せて使われるが, 粗酵素抽出液の場合は必ずしも一致しない。GOXのみの検出は, グリコール酸依存のO₂消費を酸素電極で測定 (Suzuki *et al.* 1991)するか, H₂O₂生成を分光光学的に測定 (Iwamoto *et al.* 1996)するとよい。基質親和性等は藻類によりかなり異なる場合があるので注意を要する (Suzuki *et al.* 1991)。

4-3. カタラーゼ

ペロキシソーム内でグリコール酸オキシダーゼ活性

により生成する H_2O_2 分解し細胞を障害から守るのに必須の酵素であるが、グリコール酸デヒドロゲナーゼを持つ藻類にも高いカタラーゼ活性を持つものがある (Suzuki *et al.* 1991)。活性測定には、 O_2 生成を酸素電極で検出するか H_2O_2 消費を吸光度変化で検出する (Suzuki *et al.* 1991)。 H_2O_2 消費の測定にはシグマ社のカタログの catalase の項を参考にするとよい。

4.4. その他の光呼吸関連酵素

グリコール酸がグリオキシル酸に酸化された後の代謝経路については、藻類ではまだ不明な点が多い。多くの藻類はいわゆるグリコール酸経路を持っていると思われ、グリオキシル酸からアミノ基転移酵素 (serine-glyoxylate aminotransferase と考えられる) でグリシン、グリシン脱炭酸酵素とセリンヒドロキシメチル転移酵素によりセリン、アミノ基転移酵素 (serine-glyoxylate aminotransferase と考えられる) によりヒドロキシビリン酸、ヒドロキシビリン酸還元酵素 (HPR) によりグリセリン酸、グリセリン酸キナーゼにより 3-PGA を生成しカルビン回路で利用されるはずである。しかし珪藻や渦鞭毛藻等では、グリオキシル酸からグリオキシル酸カルボリガーゼでタートロニックセミアルデヒド、タートロニックセミアルデヒド還元酵素でグリセリン酸を生成するという、グリシンを経ない別の 3-PGA 生成経路が知られている。HPR 活性が全く検出されず、この経路のみの機能が示唆される藻もある (Gross *et al.* 1985)。高等植物の HPR には、ペロキシソームに局在し NADH 依存型の HPR-1 (グリコール酸代謝に関与) と、細胞質に局在し NADPH 依存型の HPR-2 (生理的機能不明) が知られているが、黄緑色藻の

Bumilleriopsis ではそのいずれの活性も全く検出されず、上述の別経路の機能を示唆する一連の酵素活性が検出されている (Gross *et al.* 1985)。

謝辞

貴重な助言をいただいた奈良先端科学技術大学院大学の横田明穂博士には、この場を借りてお礼を申し上げます。

参考文献

Akagawa, H., Ikawa, T. and Nisizawa, K. 1972a. $^{14}CO_2$ -fixation in marine algae with special reference to the dark-fixation in brown algae. *Botanica Marina* 15: 126-132.

Akagawa, H., Ikawa, T. and Nisizawa, K. 1972b. The enzyme system for the entrance of $^{14}CO_2$ in the dark CO_2 -fixation of brown algae. *Plant Cell Physiol.* 13: 999-1016.

Ames, B.N. 1966. Assay of inorganic phosphate, total phosphate and phosphatases. *Method Enzymol.* 8: 115-118.

Anderson, L.E. and Advani, V.R. 1970. Chloroplast and cytoplasmic enzymes: Three distinct isoenzymes associated with the reductive pentose phosphate cycle. *Plant Physiol.* 45: 583-585.

Anderson, L.E., Goldhaber-Gordon, I.M., Li, D., Tang, X., Xiang, M. and Prakash, N. 1995. Enzyme-enzyme interaction in the chloroplast: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, triose phosphate isomerase and aldorase. *Planta* 196: 245-255.

Gross, W., Winkler, U. and Stabenau, H. 1985. Characterization of peroxisomes in the alga *Bumilleriopsis filiformis*. *Plant Physiol.* 77: 296-299.

Harbison, J., Genty, B. and Foyer, C.H. 1990. Relationship between photosynthetic electron transport and stromal enzyme activity in pea leaves. *Plant Physiol.* 94: 545-553.

Harris, E.H. 1989. The *Chlamydomonas* source book. Academic Press, Inc., San Diego.

Husic, D.W., Tolbert, N. E.. 1987. NADH:hydroxypyruvate reductase and NADPH:glyoxylate reductase in algae: Partial purification and characterization from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Arch. Biochem. Biophys.* 252:396-408.

猪川倫好 1979. 炭素代謝酵素の抽出と測定 p508-548. 西

表 7. クラミドモナスの NADH 依存性 HPR (HPR-1) 活性測定用反応液 * (Husic and Tolbert 1987)。

添加量	原液	最終濃度
500 μ l	K-phosphate, pH 6.2 or 7.0, 200mM	100 mM
100 μ l	NADH, 2mM **	0.2 mM
100 μ l	water	
100 μ l	hydroxypyruvate-Li, 20mM	2.0 mM
-----25°Cで5分間-----		
200 μ l	enzyme	

* NADPH 依存性 HPR (HPR-2) 活性を測定する場合は、コファクターを NADPH に代えると共に基質濃度 (0.5~2.5 mM) を変えて比較する。またシュウ酸が高等植物では HPR-2 の特異的阻害剤である (Kleczkowski *et al.* 1991) ことが参考になる。

** NAD(P)H は緩衝液 (中性) に溶かす。

- 澤一俊・千原光雄(編)藻類研究法, 共立出版, 東京.
- Iwamoto, K., Suzuki, K., and Ikawa, T. 1996. Purification and characterization of glycolate oxidase from the brown alga *Spatoglossum pacificum* (Phaeophyta). *Journal of Phycology* 32: 790-798.
- Kleczkowski, L.A., Randall, D.D., and Edwards, G.E. 1991. Oxalate as a potent and selective inhibitor of spinach (*Spinacia oleracea*) leaf NADPH-dependent hydroxypyruvate reductase. *Biochem. J.* 276: 125-127.
- Kremer, B.P. and Küppers, U. 1977. Carboxylating enzymes and pathway of photosynthetic carbon assimilation in different marine algae - Evidence for the C₄-pathway? *Planta* 133: 191-196.
- Macioszek, J., Anderson, J.B. and Anderson, L.E. 1990. Isolation of chloroplast phosphoglycerate kinase. *Plant Physiol.* 94: 291-296.
- 三室守・村上明男 1996. 光合成色素と光化学系反応中心の定量法. 藻類 44: 9-18.
- Read, B.A. and Tabita, F.R. 1994. High substrate specificity factor ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase from eukaryotic marine algae and properties of recombinant cyanobacterial rubisco containing "algal" residue modifications. *Arch. Biochem. Biophys.* 312: 210-218.
- 佐藤朗・小林寛・白岩善博 1997. 光合成キネティクス研究法—微細藻類の光合成による "CO₂" の利用および固定特性の解析—. 藻類 45: 21-28.
- Stitt, M., Lilley, R.M., Gerhardt, R. and Heldt, H.W. 1989. Metabolite levels in specific cells and subcellular compartments of plant leaves. *Methods Enzymol.* 174: 518-552.
- Suzuki, K., Ikawa, T. 1984. Effect of oxygen on photosynthetic ¹⁴CO₂ fixation in *Chroomonas* sp. (Cryptophyta) I. Some characteristics of the oxygen effect. *Plant Cell Physiol.* 25: 367-375.
- Suzuki, K., Ikawa, T. 1993. Oxygen enhancement of photosynthetic ¹⁴CO₂ fixation in a freshwater diatom *Nitzschia ruttneri*. *Jpn. J. Phycol.* 41: 19-28.
- Suzuki, K., Iwamoto, K., Yokoyama, S. and Ikawa, T. 1991. Glycolate oxidizing enzymes in algae. *J. Phycol.* 27: 492-498.
- Suzuki, K. and Spalding, M.H. 1989. Adaptation of *Chlamydomonas reinhardtii* high-CO₂-requiring mutants to limiting-CO₂. *Plant Physiol.* 90: 1195-1200.
- Suzuki, K., Marek, L.F. and Spalding, M.H. 1990. A photorespiratory mutant of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol.* 93: 231-237.
- Uemura, K., Suzuki, Y., Shikanai, T., Wadano, A., Jensen, R.G., Chmara, W. and Yokota, A. 1996. A rapid and sensitive method for determination of relative specificity of RuBisCO from various species by anion-exchange chromatography. *Plant Cell Physiol.* 37: 325-331.
- 横田明穂 1994. リブローズビスリン酸カルボキシラーゼ/オキシゲナーゼ (RuBisCO). p125-139. 井上祥平・泉井桂・田中晃二(編) 二酸化炭素-化学・生化学・環境-. (現代化学・増刊 25), 東京化学同人, 東京.
- 和田野晃 1996. 光合成における炭酸ガス固定と酸素発生量の相関および酸素電極測定法. 藻類 44: 109-114.