

# Studies on Ferredoxin-NADP[+] oxidoreductase isozymes from mung bean

著者	金 鉄
journal or publication title	博士学位論文要旨 論文内容の要旨および論文審査結果の要旨 / 金沢大学大学院自然科学研究科
volume	平成8年6月
page range	11-14
year	1996-06-01
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2297/15995">http://hdl.handle.net/2297/15995</a>

氏 名	金 鉄
生 年 月 日	
本 籍	中国
学位の種類	博士(理学)
学位記番号	博甲第152号
学位授与の日付	平成7年9月26日
学位授与の要件	課程博士(学位規則第4条第1項)
学位授与の題目	Studies on Ferredoxin-NADP <sup>+</sup> oxidoreductase isozymes from mung bean (緑豆における Ferredoxin-NADP <sup>+</sup> 酸化還元酵素アイソザイムについての研究)
論文審査委員	(主査) 和田 敬四郎 (副査) 大場 義 樹, 板 垣 英 治 清水 建 美, 桜 井 勝

## 学位論文要旨

The distribution of ferredoxin-NADP<sup>+</sup> oxidoreductase (FNR) isozymes in different tissues of young mung bean plant were determined and their changes under the various light conditions were demonstrated. Two forms of FNR, leaf- and root-type FNRs, were identified in the chloroplasts of the first foliage leaves of mung bean seedlings and their expressions were depended on development stages. Furthermore, the two FNR isozymes were isolated from the first foliage leaves of mung bean and characterized. They differed in N-terminal amino acid sequence but resembled in catalytic properties in in vitro assay. The regulation of FNR isozymes under light and nitrite induction was investigated. The expression of leaf-type FNR is depended on light and that of root-type FNR is depended on nitrite induction. The different functions of FNR isozymes may be caused by the difference in binding ability to thylakoid membranes. An FNR was isolated from mung bean root and it was evident that the root-type FNR in chloroplasts of mung bean leaf is the same as FNR from root. From the results described above, it is suggested that in the chloroplast of mung bean seedlings, the leaf-type FNR functions for NADP<sup>+</sup> photoreduction on thylakoid membranes, however, the root-type FNR mediates the reverse electron transfer from NADPH generated from oxidative pentose phosphate pathway to ferredoxin for the anabolism of nitrate and sulfate as well as amino acid biosynthesis. Furthermore, Fd isoproteins were also purified from leaves and roots of mung bean seedlings. Three distinct forms of Fd isoproteins were identified : Two isoproteins, Fd I and Fd II from leaves and one, from roots. From comparison of N-terminal amino acid sequences, two isoferredoxins, Fd I and Fd II were quite similar to those from other leguminous plants, and root Fd from mung bean showed the characteristics of root Fd prepared from roots of radish, spinach and tomato. The root Fd could not be detected in the first foliage leaves of mung bean seedlings grown in light or

darkness, Fd isoproteins seem to be expressed tissue-specifically, unlike FNR isozymes.

高等植物において、少なくとも二種の Ferredoxin-NADP<sup>+</sup> 酸化還元酵素 (FNR) が存在している。一つは葉のような光合成組織に存在し、光合成電子伝達系で還元された Fd から NADP<sup>+</sup> への電子伝達を触媒している。もう一つは根や果実のような非光合成組織に存在し、ペントースリン酸経路でできた NADPH から Fd に電子を渡し、Fd-依存性の亜硝酸還元酵素、亜硫酸還元酵素を介して窒素、硫黄の同化に、またはグルタミン酸合成酵素を介してアミノ酸代謝に関与している。本研究では、緑豆 (*Vigna radiata*) を用いて、FNR アイソザイムの植物組織内分布、プラスチド内局在性、光調節、窒素源による誘導またはそれらの単離精製、生化学的性質について研究した。

#### FNR アイソザイムの植物組織内分布及び光調節

葉と根の FNR それぞれと特異的に反応する抗体を用いて、Western blot で調べた結果、緑豆幼植物には二種類の FNR アイソザイムが同定された。一つは葉の FNR 抗体と反応するもので、もう一つは根の FNR 抗体と反応するものであった。それぞれを leaf-type FNR または root-type FNR と呼ぶ。緑豆幼植物は明暗いずれの条件 (5日間) 下で育てた場合も、葉には Leaf-type FNR と Root-type FNR がともに存在し、根には Root-type FNR だけ存在していた。茎には、暗所で育てた場合 Root-type FNR のみが存在し、明所で育てた場合両方の FNR アイソザイムが存在した。明所で育てた幼植物の茎は光合成組織に分化するが、暗所で育てた茎は非光合成組織のままであった。これらの結果は leaf-type FNR は植物の光合成組織に特異的発現し、root-type FNR は植物全体に分布していることを示唆している。さらに、葉における FNR アイソザイムの相対量は光照射によって Leaf-type FNR が増加し、Root-type FNR が減少した。しかし、5日間明所で育てた植物を暗所に移すと root-type FNR は再び増加した。植物が成熟した段階では、Root-type FNR はほとんど消失して行くことが分かった。このことは、Leaf-type FNR は光合成電子伝達と深い関わりがあり、Root-type FNR は植物の成長初期には光合成電子伝達と無関係の別の重要な役割を果たしていることを示唆している。

#### FNR アイソザイムの単離、精製及び生化学的性質

緑豆幼植物の第一葉から、二種の FNR アイソザイムを単離、精製した。leaf-type FNR の分子量は33 kDa で、葉の FNR 抗体と特異的に反応した。一方 root-type FNR の分子量は35 kDa で、根の FNR 抗体と特異的に反応した。N-末端アミノ酸配列を調べた結果、leaf-type FNR はダイコンまたはハウレンソウの葉から精製された FNR それぞれと68%、64%の相同性を示し、一方 root-type FNR はダイコンまたはハウレンソウの根から精製された FNR それぞれと46%、56%の相同性を示した。しかし、leaf-type FNR と root-type FNR の間にはわずか18%の相同性しかなかった。Root-type FNR が葉に存在することを証明したのはこれが初めてのことである。Root-type FNR は Leaf-type FNR に比べ、最適 pH、スペクトル、Km 値 (Fd と NADPH それぞれに対する) など諸性質は似ているが、分子量、抗原性、N-末端アミノ酸配列は異なっていた。さらに、Cyt c 還元活性 (NADPH → FNR → Ferredoxin → Cyt C) と NADP<sup>+</sup> 光還元活性 (アスコルビン酸 → PSI → Ferredoxin → FNR → NADP<sup>+</sup>) を用いて、*in vitro* 条件下での反応性を調べたが、著しい差は見つからなかった。これらの結果は、ダイコン、ハウレンソウの葉または根の FNR で得られた結果と一致している。さらに、緑豆の幼植物の第一葉から二種類の Ferredoxin (Fd イソ蛋白質 FdI, FdII) を精製し、N-末端アミノ酸配列の解析からそれらは豆科植物の葉の Fd と似ていることが判明した。しかし、それらの間で Cyt c または NADP<sup>+</sup> 光還元反応に対する有意な触媒能力の差は認められなかった。

緑豆幼植物の根から FNR を精製した。根には一種の FNR が存在しており、分子量は35 kDa で、根の FNR 抗体と特異的に反応する。N-末端アミノ酸配列の解析から、根の FNR は幼植物の第一葉から精製された root-type FNR と同一物だと分かった。また、緑豆の根から一種の Fd を精製した。根

の Fd は葉の Fd イソ蛋白質に比べ電気泳動での移動度、N-末端アミノ酸配列が異なっている。特に根の Fd の N-末端アミノ酸配列は、他の植物の根から得た Fd と高い homology を示した。これらの結果は、根の FNR は緑豆幼植物全体に分布しているが根の Fd は根特異的に発現していることを示した。蛋白質の組織特異的発現機構については明確になっていないが、Fd イソ蛋白質の transit peptide が異なっており、Fd イソ蛋白質の葉緑体内への伝送能力の違いは transit peptide の違いによるものと解釈されている。

#### FNR アイソザイムの硝酸または亜硝酸による調節

植物における硝酸同化は概ね二つの段階に分けられている。硝酸は cytosol で硝酸還元酵素によって亜硝酸に還元され、plastid（葉では chloroplast、根では plastid）中で亜硝酸は Fd 依存性の亜硝酸還元酵素によってアンモニアに還元される。亜硝酸還元に必要な還元力は葉では光合成電子伝達系から Fd を経て提供されるが、根では光合成電子伝達系が存在しないのでペントースリン酸経路でできた NADPH から根の FNR、Fd を経て供給される。根の FNR と Fd は窒素代謝と深く係わり、それらの発現は硝酸によって誘導されるとされている。本研究では窒素源なしで育てた植物の葉における FNR アイソザイムの硝酸または亜硝酸による調節を調べた。leaf-type FNR は硝酸または亜硝酸に対し positive な response を示さないが、root-type FNR は硝酸または亜硝酸によって誘導され、同時に遊離アミノ酸またはアンモニア pool の増大が分かった。硝酸または亜硝酸処理による root-type FNR と遊離アミノ酸またはアンモニアとの間に相関関係が見られた。緑豆幼植物の葉に存在する root-type FNR は根の FNR と同様 chloroplast での亜硝酸還元に関与していることを示唆している。

#### FNR アイソザイムのプラスチド内局在性

5日間育てた植物の葉から、葉緑体を単離し、thylakoid と stroma 画分を得た。それぞれにおける FNR の存在を抗体を用いて調べた結果、leaf-type FNR は thylakoid 膜に結合しており、root-type FNR は stroma に存在していることが分かった。緑豆の thylakoid 膜を用いて *in vivo* に近い条件で NADP<sup>+</sup>光還元活性を調べた結果、leaf-type FNR の添加は NADP<sup>+</sup>の光還元反応を促進するが、root-type FNR の添加はこの反応に効果を示さなかった。その原因は、再構成実験から、leaf-type FNR は thylakoid 膜に結合することはできるが、root-type FNR は結合できないことによると思われる。すなわち、leaf-type FNR は、thylakoid 膜に結合状態で光合成電子伝達を触媒し、root-type FNR は、stroma に遊離状態で存在しペントースリン酸経路による NADPH を利用して亜硝酸、亜硫酸の還元、グルタミン酸合成に重要な役割を果たしている。幼植物の葉緑体における亜硝酸、亜硫酸の還元、グルタミン酸合成に使われる還元力光合成電子伝達系だけではなく、NADPH から root-type FNR を経て提供されていると言える。

FNR アイソザイムの光または窒素源による調節の受け方、葉緑体での局在性の違いはそれぞれにおける機能の違いを示唆している。今後 *in vivo* の反応系を用いた FNR アイソザイムの葉緑体内機能について研究、leaf-FNR をコードする遺伝子上流域における各種エレメントの研究、また root-type FNR 遺伝子をクローンニングし、leaf-type FNR のそれと比較から、光や窒素化合物に対する response と発現誘導の研究等によってここに示されたいくつかの現象論的実験事実が実証されると思われる。

## 学位論文の審査結果の要旨

1986年植物の根から Ferredoxin (Fd) が単離・精製されて以来、非光合成組織のプラスチドにおける窒素やイオウの代謝と関連した電子伝達系の研究が進み、そのコンポーネントとしての Fd や Fd-NADP 還元酵素 (FNR) のイソタンパク質またはイソ酵素の存在が明らかになった。本研究は、森ヶ崎 (平成3年度本研究科博士論文) による根に特異的な FNR イソ酵素の研究の延長線上に位置するもので、

根にのみ特異的に発現するものと考えられて来た FNR イソ酵素 (R-FNR) の葉緑体における存在とその機能を明らかにしようとしたものである。

モヤシ豆 (*Vigna radiata*) の幼植物を材料として、まずダイコンの葉と根の FNR に対する特異抗体を利用した、L-FNR と R-FNR の混合液中のそれぞれの活性を定量する方法を確立した。R-type-FNR の葉緑体における発現を明らかにし、それが光照射によって減少し、暗条件で再び増加することが判った。R-type-FNR は、明暗いずれの条件で育てられた幼植物のすべての器官に存在し、発育と共に光合成器官からは消失することが明らかとなった。一方、L-type-FNR は、いずれの条件で育てられても根の器官に発現することはなかった。また上胚軸を付けて切断したモヤシ豆の幼植物に亜硝酸を 40 mM の濃度で与えると R-type-FNR が誘導され、それに伴って細胞内のアンモニアの量が一時的に増加し、遊離アミノ酸プールが大きくなることを明らかにした。モヤシ豆の幼植物の根から直接 R-FNR を精製して、分光学的、免疫学的、また N-末端アミノ酸配列を比較し、葉緑体に見つかった R-type-FNR が実際に R-FNR であることを証明した。さらに葉緑体内における R-FNR の存在状態を調べ、L-FNR が葉緑体のチラコイド膜に結合して存在するのとは異なり、R-FNR はストロマ中に遊離状態で存在するか、チラコイド膜に結合しているとしても、非常に弱く結合しているものと判断された。

これらのことから R-FNR は非光合成器官のプラスチドまたは葉緑体中でも  $\text{NO}_2^-$  や  $\text{SO}_3^{2-}$  の還元等の非光合成的機能を果たしているものと結論された。本研究は植物イソ酵素の機能と選択的発現の解明に、また種々のプラスチドの形成・進化を明らかにするための道を開くもので非常に意義深く、以上の内容は博士論文に値すると判断された。