



Title	硝酸還元酵素及び亜硝酸還元酵素の活性測定
Author(s)	前田, 真一; 上坂, 一馬; 小俣, 達男
Description	3章 単離・精製・活性測定 1. 代謝産物量の定量 c
Relation	光合成研究法. 北海道大学低温科学研究所, 日本光合成研究会共編
Citation	低温科学, 67, 175-177
Issue Date	2009-03-31
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/39117
Type	departmental bulletin paper
File Information	67-028.pdf



1. 代謝産物量の定量

C. 硝酸還元酵素及び亜硝酸還元酵素の活性測定

前田 真一¹⁾, 上坂 一馬¹⁾, 小俣 達男¹⁾

光合成生物の多くは、硝酸イオンをアンモニアに還元し有機窒素化合物を合成する硝酸同化機構を持っているため、硝酸イオンを窒素源として利用できる。本章では植物及びラン藻の硝酸還元酵素及び亜硝酸還元酵素の活性測定方法について紹介する。

Assay of the Activities of Nitrate Reductase and Nitrite Reductase in Photosynthetic Organisms

Shin-ichi Maeda, Kazuma Uesaka, Tatsuo Omata

Nitrate, which is a major source of nitrogen for photosynthetic organisms, is reduced to ammonium by the sequential action of nitrate reductase and nitrite reductase. In this chapter, we describe the methods to measure the activities of nitrate reductase and nitrite reductase in photosynthetic organisms.

1.c.1 硝酸還元酵素及び亜硝酸還元酵素の種類

硝酸還元酵素は、硝酸イオンを亜硝酸イオンに還元する反応を触媒する酵素である。光合成生物には、電子供与体としてフェレドキシンを用いる酵素と NAD(P)H を用いる酵素があり、いずれもモリブデン酵素である。

亜硝酸還元酵素は、亜硝酸イオンをアンモニアに還元する反応を触媒する酵素である。光合成生物の亜硝酸還元酵素は、シロヘムを持ち、フェレドキシンを電子供与体として用いる。

pH 7.5, 1 mM DTT, 2 mM KNO₃) 150 μ l を加え、30°C で 1 分間インキュベートする。

- 0.6 mM NADH (または NADPH) 溶液 50 μ l を加えて反応を開始させる。
- 経時的 (5 分おき) に 50 μ l サンプルングし、直ちに 450 μ l の氷冷した水と混合し、激しく攪拌することで反応を停止させる。NADH (または NADPH) を空気中の酸素と反応させることで酸化し、反応を停止させる。
- 反応液中の亜硝酸イオンの濃度を測定し、その増加速度から硝酸還元酵素活性を算出する。

1.c.2 実験方法

1.c.2.1 NAD(P)H 依存型硝酸還元酵素の活性測定 (植物組織)¹⁾

- 植物組織 (約 100 mg) を液体窒素で凍結させ、乳鉢と乳棒を用いて粉碎し、酵素抽出液 (50 mM HEPES-KOH pH 7.5, 5 mM EDTA, 10 mM 2-メルカプトエタノール, 1 mM DTT, 0.5 mM PMSF, 5 mg ポリビニルピロリドン) 300 μ l に懸濁し、遠心 (15,000 $\times$ g, 3 分) 後、その上清を酵素溶液として回収する。
- 酵素溶液 100 μ l に反応溶液 (50 mM HEPES-KOH

高等植物の硝酸還元酵素は、翻訳後修飾により活性調節を受けている。リン酸化された硝酸還元酵素は、14-3-3 タンパク質と結合し不活性化される²⁾⁻⁴⁾。この翻訳後修飾には 2 価のカチオンが必要であるため⁵⁾、酵素抽出液中の EDTA の代わりに MgCl₂ を加えると、活性化状態の硝酸還元酵素の活性のみ測定することができる。

1.c.2.2 フェレドキシン依存型硝酸還元酵素の活性測定 (ラン藻)⁶⁾

フェレドキシンを電子供与体とする硝酸還元酵素 (および亜硝酸還元酵素) の活性測定には、Na₂S₂O₄ により還元したメチルピオローゲンを電子供与体として用いるのが一般的である。

1) 名古屋大学大学院生命農学研究科 生物機構・機能科学専攻 分子細胞機構学講座 (植物分子生理学研究分野)

- ラン藻細胞 (0.2~0.5 mgChl) を遠心 (2,000 $\times$ g, 10 分) により回収し、無窒素培地¹⁾ で洗浄後、無窒

素培地 1 ml に懸濁する。細胞質膜の透過性を高めるために、細胞懸濁液にトルエン 25 μ l を加え、2 分間激しく攪拌する。

2. 6 mM KNO_3 を含む炭酸緩衝液 (120 mM NaHCO_3 / Na_2CO_3 , pH 10.5) 2.43 ml を試験管に入れ、30°C に保温しておく。
3. これに 100 mM メチルビオローゲンを 0.12 ml, トルエン処理した細胞懸濁液を 0.15 ml 加え、30°C で 5 分間インキュベートする。
4. 次に 100 mM $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ (0.3 M NaHCO_3 に溶解する) を 0.3 ml 加え反応を開始する (メチルビオローゲンが $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ により還元されることで反応液が青色に変わる)。
5. 経時的 (3 ~ 5 分ごと) に 0.5 ml サンプルングし、(反応液の色が $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ を加える前の色に戻るまで) 激しく攪拌する。 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ を空気中の酸素と反応させることで酸化し、反応を停止させる。
6. 反応液を遠心 (15,000 $\times$ g, 1 分) し、上清を回収し、反応産物である亜硝酸イオンの濃度を測定する。亜硝酸イオン濃度の増加速度から硝酸還元酵素活性を算出する。

※1 無窒素培地

ラン藻培養用培地 BG11⁷⁾ のクエン酸鉄 (III) アンモニウム、硝酸ナトリウム、硝酸コバルトをそれぞれ同濃度のクエン酸鉄 (III) 水和物、塩化ナトリウム、塩化コバルトで置換して作製する。培地の pH は、20 mM HEPES-KOH で 8.2 に合わせる。

1.c.2.3 フェレドキシン依存型亜硝酸還元酵素の活性測定 (植物組織)¹⁾

1. 2-1 の 1 と同じ
2. 酵素溶液 50 μ l に反応溶液 (50 mM HEPES-KOH pH 7.5, 1 mM DTT, 2 mM メチルビオローゲン, 1.5 mM NaNO_2) 200 μ l を加え、30°C で 1 分間インキュベートする。
3. 60 mM $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ (0.3 M NaHCO_3 に溶解する) を 50 μ l 加え反応を開始する (メチルビオローゲンが $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ により還元されることで反応液が青色に変わる)。
4. 経時的 (5 分おき) に 50 μ l サンプルングし、直ちに 450 μ l の氷冷した水と混合し、(反応液の色が $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ を加える前の色に戻るまで) 激しく攪拌することで反応を停止させる。 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ を空気中の酸素と反応させることで酸化し、反応を停止させる。

反応液中の亜硝酸イオンの濃度を測定し、その減少速度から亜硝酸還元酵素活性を算出する。

1.c.2.4 フェレドキシン依存型亜硝酸還元酵素の活性測定 (ラン藻)⁸⁾

1. 2-2 の 1 と同じ
2. 1.5 mg/ml 臭化セチルトリメチルアンモニウム 0.15 ml と MOPS 緩衝液 (40 mM MOPS-NaOH, pH 7.2) 1.98 ml を試験管に入れ、30°C に保温しておく。
3. これにトルエン処理した細胞懸濁液を 0.3 ml 加え、30°C で 5 分間インキュベートする。
4. 次に 100 mM メチルビオローゲンを 0.12 ml, 10 mM NaNO_2 を 0.15 ml 加え、30°C で 5 分間インキュベートする。
5. さらに 200 mM $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ (0.3 M NaHCO_3 に溶解する) を 0.3 ml 加え反応を開始する (メチルビオローゲンが $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ により還元されることで反応液が青色に変わる)。
6. 経時的 (3 ~ 5 分ごと) に 0.5 ml サンプルングし、(反応液の色が $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ を加える前の色に戻るまで) 激しく攪拌する。 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ を空気中の酸素と反応させることで酸化し、反応を停止させる。
7. 反応液を遠心 (15,000 $\times$ g, 1 分) し、上清を回収し、基質である亜硝酸イオンの濃度を測定する。亜硝酸イオン濃度の減少速度から亜硝酸還元酵素活性を算出する。

1.c.2.5 亜硝酸イオン濃度の測定⁹⁾

1. スルファニルアミド 0.5 g, N-1-ナフチルエチレンジアミン二塩酸塩 0.01 g, 塩酸 6.25 ml, 蒸留水 141.25 ml を混合し、発色試薬を作る。
2. サンプル 0.05 ml を発色試薬 2.95 ml と混合し、15 分反応後、540 nm の吸光度を測定する。検量線作成には、0 ~ 0.5 mM の亜硝酸イオン溶液を用いる。

参考文献

- 1) Wray, J. L., and Fido, R. J. (1990) in *Methods in Plant Biochemistry* (Dey, P. M., and Harborne, J. B., eds) Vol. 3, pp.241-256, Academic Press, London
- 2) Huber, S. C., Bachmann, M., and Huber, J. (1996) *Trends Plant Sci.* **12**, 433-438
- 3) Moorhead, G., Douglas, P., Morrice, N., Scarabel, M., Aitken, A., and MacKintosh, C. (1996) *Curr. Biol.* **6**, 1104-1113

- 4) Su, W., Huber, S. C., and Crawford, N. M. (1996) *Plant Cell* **8**, 519-527
- 5) Athwal, G. S., Huber, J. L., and Huber, S. C. (1998) *Plant Cell Physiol.* **39**, 1065-1072
- 6) Herrero, A., Flores, E., and Guerrero, M. G. (1981) *J. Bacteriol.* **145**, 175-180
- 7) Stanier, R. Y., Kunisawa, R., Mandel, M., and Cohen-Bazire, G. (1971) *Bacteriol. Rev.* **35**, 171-205
- 8) Herrero, A., and Guerrero, M. G. (1986) *J. Gen. Microbiol.* **132**, 2463-2468
- 9) Snell, F. D., and Snell, C. T. (1949) in *Colorimetric Methods of Analysis* Vol.2, pp.802-807, Van Nostrand, New York