



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	カルビン回路の酵素
Author(s)	田茂井, 政宏; 重岡, 成
Description	3章 単離・精製・活性測定 3. 酵素・電子伝達成分の精製・活性測定・定量 a
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, 209-214
Issue Date	2009-03-31
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/39141
Type	departmental bulletin paper
File Information	67-032.pdf



3. 酵素・電子伝達成分の精製・活性測定・定量

a. カルビン回路の酵素

田茂井政宏¹⁾, 重岡 成¹⁾

カルビン回路は光合成炭素固定の初期経路であり, チラコイド膜上で生成された ATP と NADPH を用いて, CO₂ を固定し, 糖に還元する. 高等植物のカルビン回路で機能する酵素群はフェレドキシン/チオレドキシン (Fd/Trx) 系をはじめとする複雑な制御系により厳密な活性調節を受けているが, ラン藻および一部の藻類では植物と異なることも明らかになっている¹⁾. 本章では, カルビン回路の主な酵素活性測定方法について紹介する.

Enzymes for Calvin Cycle

Masahiro Tamoi, Shigeru Shigeoka

3.a.1 カルビン回路

カルビン回路は光合成炭素固定の初期経路であり, 葉緑体に含まれる 11 種類の酵素による 13 の反応で構成されており, 大きく以下の 3 つの段階に分けられる (図 1). 第 1 段階はカルボキシ化過程で, リブローズ-1,5-ビスリン酸カルボキシラーゼ/オキシゲナーゼ (Rubisco) により 3 分子の CO₂ が 3 分子のリブローズ-1,5-ビスリン酸 (RuBP) に固定され, 6 分子の 3-ホスホグリセリン酸 (PGA) が生じる. 第 2 段階は PGA の還元過程で, 生成した PGA は光化学系に由来する ATP と NADPH でリン酸化・還元され, 6 分子のトリオースリン酸 (ジヒドロキシアセトンリン酸: DHAP およびグリセルアルデヒド 3 リン酸: GAP) に変換される. 第 3 段階は RuBP の再生過程で, 一連の反応で RuBP が再生される. この回路において, トリオースリン酸は鍵となる中間体であり, 5 分子のトリオースリン酸から 3 分子のリブローズ-5-リン酸 (Ru5P) が再生され, 1 分子は葉緑体内でのデンプン合成もしくは細胞質でのショ糖合成へと分配される. したがって, カルビン回路での RuBP 再生に利用するためのトリオースリン酸が枯渇しないように, デンプン・ショ糖合成系への転出とのバランスを維持することが葉緑体内での炭素代謝では特に重要である. このバランスを維持するために, カルビン回路のいくつかの酵素群は厳密な制御を受けている. 主な調節機構として, 光還元力を利用したフェレドキシン/チオレドキシン (Fd/Trx) 系がある. フルクトース-1,6-ビスホスファターゼ (FBPase), グリセルアルデヒド-3-

リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH), ホスホリプロキナーゼ (PRK), セドヘプツコース-1,7-ビスホスファターゼ (SBPase) の分子内に存在する 2 つのシステイン残基が, 光照射下では Fd/Trx 系を介した光還元力を利用して還元されて活性型となり, 暗黒下では酸化されてジスルフィド結合を形成し不活性型となる. さらにカルビン回路は, 他の酵素群の特性に基づいて厳密な制御を受けており, それぞれの酵素学的特性からの調節機構については詳細に検討されている^{1,2)}.

3.a.2 リブローズ-1,5-ビスリン酸カルボキシラーゼ/オキシゲナーゼ (Rubisco) 活性測定法

Rubisco (EC 4.1.1.39) は RuBP に CO₂ を固定し 2 分子の 3-ホスホグリセリン酸を生成する反応を触媒する. Rubisco 本来の生理学的な役割は RuBP へのカルボキシ化 (カルボキシラーゼ反応) であるため, リブローズ-1,5-ビスリン酸カルボキシラーゼが正しい呼称であるが, CO₂ の代わりに O₂ を固定する反応 (オキシゲナーゼ反応) も行うことから, リブローズ 1,5-ビスリン酸カルボキシラーゼ/オキシゲナーゼと呼称される. Rubisco の反応において, カルボキシラーゼ反応は O₂ によって, オキシゲナーゼ反応は CO₂ によって拮抗的に阻害される. したがって, 触媒部位近傍の溶存基質濃度をそれぞれ [CO₂], [O₂], カルボキシラーゼ反応とオキシゲナーゼ反応の最大速度をそれぞれ V_{cmax} , V_{omax} , 溶存基質に対するミカエリス定数をそれぞれ K_c , K_o とすると, カルボキシラーゼ反応の速度 (V_c) とオキシゲナーゼ反応の速度 (V_o) は次式で表すことが出来る³⁾.

1) 近畿大学農学部バイオサイエンス学科

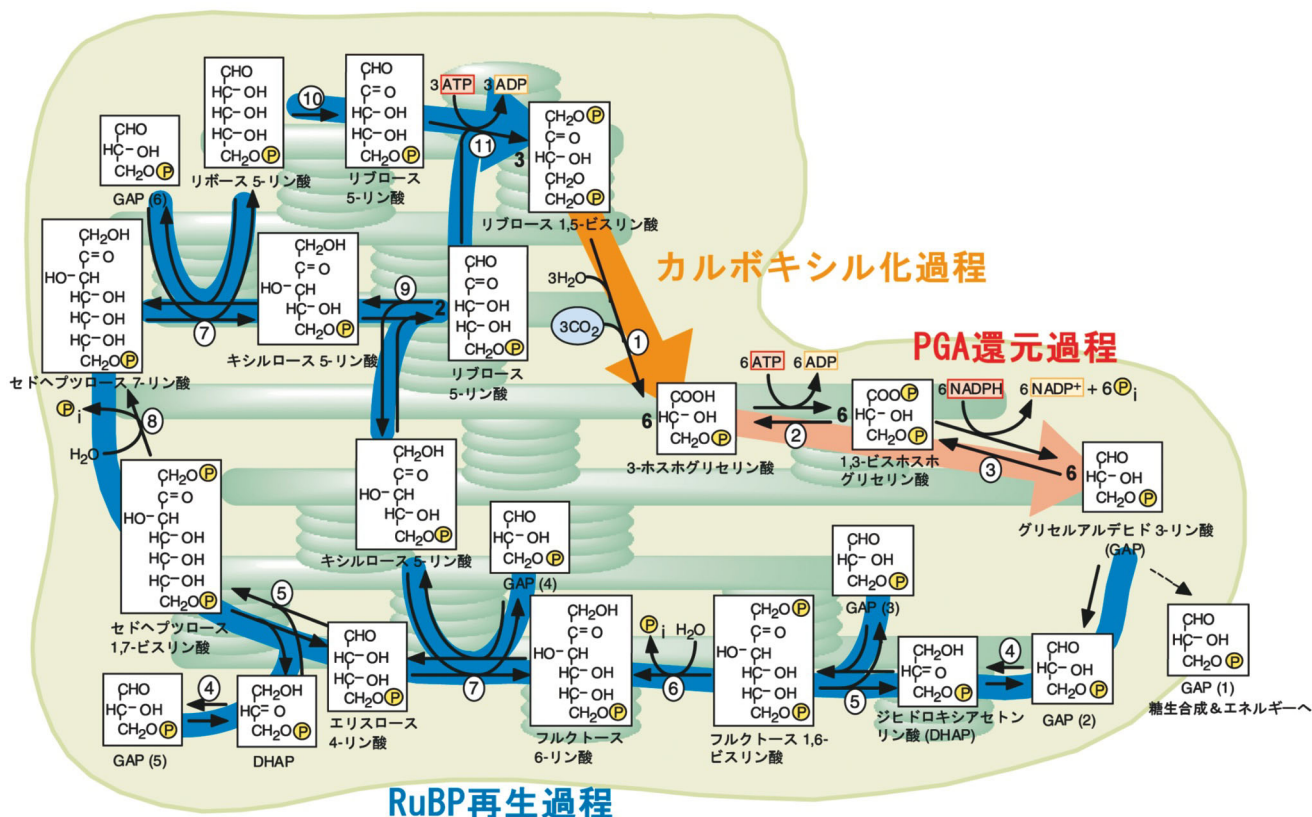


図 1：カルビン回路

(1)リブローズ-1,5-ビスリン酸カルボキシラーゼ/オキシゲナーゼ (Rubisco), (2)ホスホグリセリン酸キナーゼ, (3)グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH), (4)トリオースリン酸イソメラーゼ, (5)アルドラーゼ, (6)フルクトース-1,6-ビスホスファターゼ (FBPase), (7)トランスフェラーゼ, (8)セドヘプツロース-1,7-ビスホスファターゼ (SBPase), (9)リブローズ-5-リン酸エピメラーゼ, (10)リブローズ-5-リン酸イソメラーゼ, (11)ホスホリブリンキナーゼ (PRK)

$$V_c/V_o = (V_{\text{cmax}}/K_c) / (V_{\text{omax}}/K_o) \cdot [\text{CO}_2]/[\text{O}_2]$$

V_{cmax}/K_c はカルボキシラーゼ反応の反応特異性, V_{omax}/K_o はオキシゲナーゼ反応の反応特異性を示す. この式から Rubisco の両反応の特異性の比 $(V_{\text{cmax}}/K_c)/(V_{\text{omax}}/K_o)$, すなわち反応特異性 (relative specificity: $S_{c/o}$ または τ) を示す次式が導かれる.

$$S_{c/o} = V_c \cdot [\text{O}_2] / V_o \cdot [\text{CO}_2] = V_{\text{cmax}} \cdot K_o / V_{\text{omax}} \cdot K_c$$

$S_{c/o}$ が高いほどカルボキシラーゼ反応を好むことを意味する. 高等植物の Rubisco では 60~130, 緑藻の Rubisco では 60~65, ラン藻の Rubisco では 40 前後である³⁾. 空気と平衡にある水中の溶存 CO_2 と O_2 濃度はそれぞれ 11 μM , 256 μM である. この条件では 95 の $S_{c/o}$ をもつ高等植物の Rubisco では, カルボキシラーゼ反応がオキシゲナーゼ反応の 4.1 倍の速度で進行することになる. 一方, 40 の $S_{c/o}$ をもつラン藻の Rubisco では, その値は 1.7 倍となる.

活性測定は, 反応生成物である PGA の増加量を, PGA

キナーゼおよび NAD-GAPDH とのカップリング反応による NADH の減少量として, チャートスピード 15 mm/min, レンジ 0.4 (20 mV), 27°C における 340 nm の吸光度変化により測定する⁴⁾. NADH の 340 nm における分子吸光係数 ϵ は 6220 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ とする.

[実験方法]

1. 植物組織 (1~2 g wt) に 5 ml の 100 mM Tris-HCl (pH 7.8), 1 mM EDTA, 5 mM DTT, 5 mM MgCl_2 , 1% Triton X-100 を加え, 海砂, PVP をスパチュラに 1 杯ずつ加えた後に乳鉢, 乳棒で破碎する.
2. 破碎液を遠沈管に移して 12,000 $\times g$, 4°C で 10 分間遠心分離後, 上清を新しい試験管に移す.
3. 1 ml セル 2 つに反応系 [50 mM HEPES-KOH (pH 8.0), 15 mM MgCl_2 , 1 mM EDTA, 20 mM NaCl, 10 mM DTT, 0.5 mM ATP, 0.2 mM NADH, 5 mM ホスホエノールピルビン酸 (PEP), 5 mM リン酸クレアチン, 10 mM NaHCO_3 , 20 unit

ピルビン酸キナーゼ (PK), 2 unit クレアチンホスホキナーゼ, 18 unit NAD-GAPDH, 18 unit PGA キナーゼ]をそれぞれ 1 ml ずつ加え, 両方に粗酵素液 (10~50 μ l) を加えて攪拌する。

4. W ビームのセルホルダーにそれぞれセットし, 27°C, 吸光度 340 nm の条件で約 2 分間ベースラインを引く。
5. 片方のセルにのみ 1 mM RuBP を加えて素早く攪拌し, 反応開始とする。340 nm の吸光度変化を経時的に測定する (約 10 分間)。
6. 上記実験条件で得られたデータから NADH 減少速度を計算し, Rubisco 活性とする。
7. 活性化状態の活性を測定する場合は, 粗酵素に 20 mM MgCl_2 , 10 mM NaHCO_3 を加えて氷上で 10 分間インキュベートした後に, 上記 3~6 の方法で Rubisco 活性の測定を行う。

3.a.3 グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH) 活性測定法

GAPDH (EC 1.2.1.9) は 1,3-ビスホスホグリセリン酸 (DPGA) $\leftrightarrow$ GAP の反応を可逆的に触媒する酵素であり, 高等植物には葉緑体と細胞質に局在している。葉緑体型 GAPDH は NADP (H) および NAD (H) のいずれも利用し, NADP^+ -GAPDH と表される。一方, 細胞質型 GAPDH は NAD (H) のみを利用することから, NAD^+ -GAPDH と表される。葉緑体型 GAPDH はカルビン回路で機能しており, Fd/Trx 系を介した酸化還元により活性調節を受ける。細胞質型 GAPDH はショ糖合成系 (解糖系) で機能しており, 酸化還元による活性調節を受けない。活性測定の際に NADPH を用いることにより, 葉緑体型 GAPDH のみを測定することが可能である。活性の測定には W ビーム分光光度計を用い, NADPH の減少量を, チャートスピード 15 mm/min, レンジ 0.4 (20 mV), 27°C における 340 nm の吸光度変化により測定する⁵⁾。また, 基質である DPGA が非常に高価である (入手しにくい) ため, PGA を PGA キナーゼによって DPGA に変換する反応をカップルさせて測定する。NADPH の 340 nm における分子吸光係数 ϵ は 6220 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ とする。

[実験方法]

1. 植物組織 (1~2 g wt) に 5 ml の 100 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10 mM MgCl_2 , 1 mM EDTA, 1 mM GSH, 2.5 mM DTT (細胞内活性化率を測定する場

合は GSH, DTT を除く), 1 % Triton X-100 を加え, 海砂, PVP をスパチュラに 1 杯ずつ加えた後に乳鉢, 乳棒で破碎する。

2. 破碎液を遠沈管に移して 12,000 $\times g$, 4°C で 10 分間遠心分離後, 上清を新しい試験管に移す。(細胞内活性化率を測定する場合は, N_2 置換すること)
3. 1 ml セル 2 つに反応系 [100 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10 mM MgCl_2 , 5 mM ATP, 0.2 mM NADPH, 10 mM GSH, 2 unit PGA キナーゼ] をそれぞれ 1 ml ずつ加え, 両方に粗酵素液 (10~50 μ l) を加えて攪拌する。(NAD⁺-GAPDH 活性を測定する場合は, NADPH の代わりに NADH を加える。)
4. W ビームのセルホルダーにそれぞれセットし, 27°C, 吸光度 340 nm の条件で約 2 分間ベースラインを引く。
5. 片方のセルにのみ 3 mM PGA を加えて素早く攪拌し, 反応開始とする。340 nm の吸光度変化を経時的に測定する (約 10 分間)。
6. 上記実験条件で得られたデータから NADPH 減少速度を計算し, GAPDH 活性とする。
7. 活性化状態の活性を測定する場合は, 粗酵素液に 20 mM DTT を加えて氷上で 30 分間インキュベートした後に, 上記 3~6 の方法で GAPDH 活性の測定を行う。

3.a.4 フルクトース-1,6-ビスリン酸アルドラーゼ (FBA) 活性測定法

FBA (EC 4.1.2.13) は $\text{DHAP} + \text{GAP} \leftrightarrow \text{フルクトース-1,6-ビスリン酸 (FBP)}$ FBP の反応を可逆的に触媒する酵素であり, 高等植物には葉緑体と細胞質に局在している。FBA はその酵素学的性質から, 反応に金属イオンを必要としないクラス I-FBA (CI-FBA) と, 反応に金属イオンを必要とするクラス II-FBA (CII-FBA) とに分類される。真核光合成生物の葉緑体には CI-FBA のみが存在するのに対し, 細胞質には CI-FBA と CII-FBA の両方が存在する。ラン藻 (*Synechocystis* PCC6803) には CI-FBA と CII-FBA の両方が存在することが報告されている⁶⁾。FBA 活性の測定は, $\text{FBP} \rightarrow \text{DHAP} + \text{GAP}$ の反応生成物である GAP 生成量を, トリオースリン酸イソメラーゼ (TP イソメラーゼ) およびグリセロール-3-リン酸デヒドロゲナーゼとのカップリング反応による NADH の減少量として, チャートスピード 15 mm/min, レンジ 0.4 (20 mV), 27°C における 340 nm の吸光

度変化により測定する⁷⁾。NADH の 340 nm における分子吸光係数 ϵ は $6220 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ とする。

[実験方法]

1. 植物組織 (1~2 g wt) に 5 ml の 100 mM Tris-HCl (pH 8.0), 5 mM MgCl_2 , 1 mM EDTA, 50 mM KCl, 3 mM DTT, 1 % Triton X-100 を加え、海砂, PVP をスパチュラに 1 杯ずつ加えた後に乳鉢、乳棒で破碎する。
2. 破碎液を遠沈管に移して $12,000 \times g$, 4°C で 10 分間遠心分離後、上清を新しい試験管に移す
3. 1 ml セル 2 つに反応系 [50 mM Tris-HCl (pH 8.5), 5 mM MgCl_2 , 0.15 mM NADH, 5 unit TP イソメラーゼ, 2 unit グリセロール-3-リン酸デヒドロゲナーゼ] をそれぞれ 1 ml ずつ加え、両方に粗酵素液 ($10\sim 50 \mu\text{l}$) を加えて攪拌する。
4. W ビームのセルホルダーにそれぞれセットし、 27°C , 吸光度 340 nm の条件で約 2 分間ベースラインを引く。
5. 片方のセルにのみ 2 mM F6P を加えて素早く攪拌し、反応開始とする。340 nm の吸光度変化を経時的に測定する (約 5 分間)。
6. 上記実験条件で得られたデータから NADH 減少速度を計算し、アルドラーゼ活性とする。
7. CI-FBA は上記方法で測定できるが、CII-FBA を測定する場合は 5 mM MgCl_2 の代わりに 0.2 mM CoCl_2 を加え、反応系の pH を 7.5 にして同様に測定する。

3.a.5 フルクトース 1,6-ビスホスファターゼ (FBPase) 活性測定法

FBPase (EC 3.1.3.11) は、FBP をフルクトース-6-リン酸 (F6P) と無機リン酸に加水分解する反応を触媒する酵素であり、高等植物には葉緑体型と細胞質型の 2 種類のアイソザイムとして存在している。葉緑体型 FBPase はカルビン回路で機能しており、Fd/Trx 系を介した酸化還元により活性調節を受ける。細胞質型 FBPase はショ糖合成系で機能しており、酸化還元による活性調節を受けず、AMP およびフルクトース-2,6-ビスリン酸 (F2,6-P_2) による阻害を受ける。これらの性質を利用することにより、葉緑体型と細胞質型の FBPase を分別測定することも可能である。活性の測定には W ビーム分光光度計を用い、グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ (G6PDH)、ホスホグルコースイソメラーゼ (GP イソメ

ラーゼ) とのカップリング反応による NADPH の増加量を、チャートスピード 15 mm/min, レンジ 0.4 (20 mV), 27°C における 340 nm の吸光度変化により測定する⁸⁾。NADPH の 340 nm における分子吸光係数 ϵ は $6220 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ とする。

[実験方法]

1. 植物組織 (1~2 g wt) に 5 ml の 100 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10 mM MgCl_2 , 1 mM EDTA, 1 mM GSH, 2.5 mM DTT (細胞内活性化率を測定する場合は GSH, DTT を除く), 1 % Triton X-100 を加え、海砂, PVP をスパチュラに 1 杯ずつ加えた後に乳鉢、乳棒で破碎する。
2. 破碎液を遠沈管に移して $12,000 \times g$, 4°C で 10 分間遠心分離後、上清を新しい試験管に移す。(細胞内活性化率を測定する場合は、 N_2 置換すること。)
3. 1 ml セル 2 つに反応系 [100 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10 mM MgCl_2 , 1 mM EDTA, 0.4 mM NADP^+ , 0.5 unit G6PDH, 1.5 unit GP イソメラーゼ] をそれぞれ 1 ml ずつ加え、両方に粗酵素液 ($10\sim 50 \mu\text{l}$) を加えて攪拌する。
4. W ビームのセルホルダーにそれぞれセットし、 27°C , 吸光度 340 nm の条件で約 2 分間ベースラインを引く。
5. 片方のセルにのみ 200 μM FBP を加えて素早く攪拌し、反応開始とする。340 nm の吸光度変化を経時的に測定する (約 10 分間)。
6. 上記実験条件で得られたデータから NADPH 増加速度を計算し、FBPase 活性とする。
7. 活性化状態の活性を測定する場合は、粗酵素に 20 mM になるように DTT を加えて氷上で 30 分間インキュベートした後に、上記 3~6 の方法で FBPase 活性の測定を行う。

3.a.6 トランスケトラーゼ活性測定法

トランスケトラーゼ (EC 2.2.1.1) は $\text{F6P} + \text{GAP} \longleftrightarrow \text{キシルロース-5-リン酸 (X5P)} + \text{エリスロース-4-リン酸 (E4P)}$ (もしくは $\text{セドヘプツロース-7-リン酸 (S7P)} + \text{GAP} \longleftrightarrow \text{X5P} + \text{リボース-5-リン酸 (R5P)}$) の反応を可逆的に触媒する酵素で、活性の測定は $\text{X7P} + \text{E4P} \rightarrow \text{F6P} + \text{GAP}$ の反応生成物である GAP 生成量を、TP イソメラーゼおよびグリセロール-3-リン酸デヒドロゲナーゼとのカップリング反応による NADH の減少量として、チャートスピード 15 mm/min, レンジ 0.4 (20

mV), 27°Cにおける 340 nm の吸光度変化により測定する⁹⁾。NADH の 340 nm における分子吸光係数 ϵ は $6220 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ とする。

[実験方法]

1. 植物組織 (1~2 g wt) に 5 ml の 100 mM Tris-HCl (pH 8.0), 5 mM MgCl_2 , 1 mM EDTA, 50 mM KCl, 3 mM DTT, 1 % Triton X-100 を加え, 海砂, PVP をスパチュラに 1 杯ずつ加えた後に乳鉢, 乳棒で破碎する。
2. 破碎液を遠沈管に移して $12,000 \times g$, 4°C で 10 分間遠心分離後, 上清を新しい試験管に移す。
3. 1 ml セル 2 つに反応系 [100 mM HEPES-KOH (pH 7.5), 12 mM MgCl_2 , 0.15 mM NADH, 0.2 mM チアミンピロリン酸, 0.8 mM X5P, 0.8 mM E4P, 5 unit TP イソメラーゼ, 2 unit グリセロール-3-リン酸デヒドロゲナーゼ] をそれぞれ 1 ml ずつ加え, 両方に粗酵素液 ($10\sim 50 \mu\text{l}$) を加えて攪拌する。
4. W ビームのセルホルダーにそれぞれセットし, 27°C, 吸光度 340 nm の条件で約 2 分間ベースラインを引く。
5. 片方のセルにのみ 0.8 mM X5P を加えて素早く攪拌し, 反応開始とする。340 nm の吸光度変化を経時的に測定する (約 10 分間)。

3.a.7 セドヘブツロース-1,7-ビスホスファターゼ (SBPase) 活性測定法

SBPase (EC 3.1.3.37) はセドヘブツロース-1,7-ビスリン酸 (SBP) を S7P と無機リン酸に加水分解する反応を触媒する酵素であり, Fd/Trx 系を介した酸化還元により活性調節を受ける。活性測定はホスホフルクトキナーゼ (PFK), PK, 乳酸デヒドロゲナーゼ (LDH) とのカップリング反応による NADH の減少量を, チャートスピード 30 cm/hr, レンジ 0.4 (20 mV), 27°C における 340 nm の吸光度変化により測定する方法と¹⁰⁾, SBPase 反応により生じるリン酸を定量する方法¹¹⁾がある。

[実験方法 (カップリング反応による活性測定法)]

1. 植物組織 (1~2 g wt) に 5 ml の 100 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10 mM MgCl_2 , 1 mM EDTA, 1 mM GSH, 2.5 mM DTT (細胞内活性化率を測定する場合は GSH, DTT を除く), 1 % Triton X-100 を加

え, 海砂, PVP をスパチュラに 1 杯ずつ加えた後に乳鉢, 乳棒で破碎する。

2. 破碎液を遠沈管に移して $12,000 \times g$, 4°C で 10 分間遠心分離後, 上清を新しい試験管に移す。(細胞内活性化率を測定する場合は, N_2 置換すること)
3. 1 ml セル 2 つに反応系 [100 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10 mM MgCl_2 , 20 mM KCl, 0.1 mM ATP, 1 mM PEP, 0.15 mM NADH, 20 mM DTT, 2 unit PK, 2 unit LDH, 0.5 unit PFK] をそれぞれ 1 ml ずつ加え, 両方に粗酵素液 ($10\sim 50 \mu\text{l}$) を加えて攪拌する。(initial activity を測定する場合は DTT を除く。)
4. W ビームのセルホルダーにそれぞれセットし, 27°C, 吸光度 340 nm の条件で約 2 分間ベースラインを引く。
5. 片方のセルにのみ $400 \mu\text{M}$ SBP を加えて素早く攪拌し, 反応開始とする。340 nm の吸光度変化を経時的に測定する (約 20 分間)。
6. 上記実験条件で得られたデータから NADH 減少速度を計算し, SBPase 活性とする。
7. 活性化状態の活性を測定する場合は, 粗酵素液に 20 mM DTT を加えて氷上で 30 分間インキュベートした後に, 上記 3~6 の方法で GAPDH 活性の測定を行う。

[実験方法 (リン酸定量による活性測定法)]

1. A 溶液 (50 mM Tris-HCl, pH 8.2, 15 mM MgCl_2 , 1.5 mM MgCl_2) および B 溶液 (50 mM Tris-HCl, pH 8.2, 15 mM MgCl_2 , 1.5 mM MgCl_2 , 10 mM DTT, 1 mM SBP) および粗酵素液を以下のように混合し, 27°C で 5 分間インキュベートする。
コントロール: A 溶液 ($80 \mu\text{l}$ -粗酵素液量), B 溶液 ($66 \mu\text{l}$)
リファレンス: A 溶液 ($80 \mu\text{l}$ -粗酵素液量), B 溶液 ($66 \mu\text{l}$), 粗酵素液 ($10\sim 20 \mu\text{l}$)
2. 反応終了後急冷し, 完全に反応を止めるため, 6 % (v/v) 過塩素酸をすべてのチューブに $50 \mu\text{l}$ 加える。
3. コントロールには粗酵素液をリファレンスと同量加える。
4. 沈殿が多い場合には $12,000 \times g$, 4°C で 10 分間遠心分離後, 上清を新しい試験管に移す。
5. リン酸定量の検量線作製に用いるリン酸標準液として, リン酸二水素ナトリウムを 0.4, 0.25, 0.2, 0.15, 0.1, 0.05, 0.025 mM の濃度になるように 6 % (v/v) 過塩素酸に溶解する。

6. 0.5 N H₂SO₄ に 0.3% モリブデン酸アンモニウムを加えた溶液 (C 溶液) を作製する。
7. リン酸標準液, SBPase 反応液をそれぞれ 40 μ l ずつ試験管に入れ, C 溶液を 850 μ l 加え, 混ぜた後 10 分間室温で静置する。
8. 0.035% マラカイトグリーン, 0.35% ポリビニルアルコール (D 溶液) を 150 μ l 加え混ぜた後, 45 分間室温で静置し, 分光光度計を用いて 620 nm での吸光度を測定する。

3.a.8 ホスホリブロキナーゼ (PRK) 活性測定法

PRK (EC 2.7.1.19) は Ru5P と ATP から Rubisco の基質となる RuBP と ADP を生成する。Fd/Trx 系を介した酸化還元により活性調節を受ける。活性測定は, PRK 反応生成物である ADP の増加量を, LDH, PK とのカップリング反応による NADH の減少量として, チャートスピード 15 mm/min, レンジ 0.4 (20 mV), 27°C における 340 nm の吸光度変化により測定する。また, 基質である Ru5P が非常に高価である (手に入りにくい) ため, R5P をリボース-5-リン酸イソメラーゼ (R5P イソメラーゼ) によって Ru5P に変換する反応をカップルさせて測定する¹²⁾。NADH の 340 nm における分子吸光係数 ϵ は 6220 M⁻¹cm⁻¹ とする。

[実験方法]

1. 植物組織 (1~2 g wt) に 5 ml の 100 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 1 mM GSH, 2.5 mM DTT (細胞内活性化率を測定する場合は GSH, DTT を除く), 1% Triton X-100 を加え, 海砂, PVP をスパチュラに 1 杯ずつ加えた後に乳鉢, 乳棒で破碎する。
2. 破碎液を遠沈管に移して 12,000 × g, 4°C で 10 分間遠心分離後, 上清を新しい試験管に移す。(細胞内活性化率を測定する場合は, N₂ 置換すること)
3. 1 ml セル 2 つに反応系 [100 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10 mM MgCl₂, 5 mM GSH, 1 mM ATP, 0.2 mM NADH, 50 mM KCl, 0.5 mM PEP, 5 unit LDH, 2 unit PK, 2 unit R5P イソメラーゼ] をそれぞれ 1 ml ずつ加え, 両方に粗酵素液 (10~50 μ l) を加えて攪拌する。
4. W ビームのセルホルダーにそれぞれセットし, 27°C, 吸光度 340 nm の条件で約 2 分間ベースラインを引く。
5. 片方のセルにのみ 2 mM R5P を加えて素早く攪拌し, 反応開始とする。340 nm の吸光度変化を経時的に測定する (約 10 分間)。
6. 上記実験条件で得られたデータから NADH 減少速度を計算し, PRK 活性とする。
7. 活性化状態の活性を測定する場合は, 粗酵素液に 20 mM DTT を加えて氷上で 30 分間インキュベートした後に, 上記 3~6 の方法で PRK 活性の測定を行う。

3.a.9 その他の酵素

PGA キナーゼ, TP イソメラーゼ, リブロース-5-リン酸エピメラーゼ⁹⁾, R5P イソメラーゼ⁹⁾ があるが, これらのほとんどが上記酵素活性測定法を改変することにより測定可能である。詳細はそれぞれの報告を参照されたい。

参考文献

- 1) E-M Aro, B. Anderson Eds., Regulation of Photosynthesis, p.297-373, Kluwer Academic Press (2001)
- 2) R. C. Leegood, T. D. Sharkey, S. von Cammerer eds., Photosynthesis: Physiology and Metabolism, pp.9-51, Kluwer Academic Press (2000)
- 3) R. C. Leegood, T. D. Sharkey, S. von Cammerer eds., Photosynthesis: Physiology and Metabolism, pp.85-113, Kluwer Academic Press (2000)
- 4) R. M. Lilley and D. A. Walker, Biochim. Biophys. Acta **358** (1974) p.119
- 5) E. Lazko and R. V. Gibbs, Plant Physiol. **44** (1969) p. 295
- 6) V. Haake, R. Zrenner, U. Sonnewalt, M. Sttit, Plant J. **14** (1998) p.147
- 7) K. Nakahara, H. Yamamoto, C. Miyake, Yokota, A., Plant Cell Physiol. **44** (2003) p.326
- 8) G. Zimmermann, G. J. Kelly, E. Lazko, Eur. J. Biochem. **70** (1976) p.361
- 9) D. J. Murphy and D. A. Walker, Planta **155** (1982) p.316
- 10) I. E. Woodrow and D. A. Walker, Arch. Biochem. Biophys. **216** (1982) p.416
- 11) E. P. Harrison, N. M. Willingham, J. C. Lloyd, C. A. Raines, Planta **149** (1998) p.78
- 12) E. Racker, Arch. Biochem. Biophys. **69** (1957) p.300