

## 高等植物のグルタミン酰水素酵素について(4)

誌名	日本土壌肥料學雜誌 = Journal of the science of soil and manure, Japan
ISSN	00290610
著者	三枝, 正彦 大平, 幸次 藤原, 彰夫
巻/号	44巻1号
掲載ページ	p. 18-22
発行年月	1973年1月

# 高等植物のグルタミン酸脱水素酵素について(4)

種々の環境条件下におけるカブラおよび水稻のグルタミン酸脱水素酵素活性\*

三枝正彦\*\*・大平幸次\*\*・藤原彰夫\*\*

## 1. 緒言

前報<sup>1,2)</sup>までの種々の検討の結果、実験に用いたすべての高等植物のグルタミン酸脱水素酵素 (GDH)<sup>\*\*\*</sup> は NADH のみならず NADPH も補酵素としうることが明らかになった。HOLZER ら<sup>3)</sup>の酵母を用いた実験によれば、NADH-GDH はアンモニアの存在で“抑制”されるが、NADPH-GDH は影響を受けないことが見られ、NADPH-GDH がグルタミン酸の生成に、NAD-GDH がグルタミン酸の分解に関与するという補酵素の違いによる本酵素の機能的差異が推察されるようになった。一方、高等植物の GDH については、JOY<sup>4)</sup>がレムナでは NADH-GDH がアンモニアで“誘導”され、アミノ酸で“抑制”されるという酵母の結果とは正反対の結果を報告している。また、INGLE ら<sup>5)</sup>は硝酸還元酵素の研究に関連して二十日大根の GDH 活性を調べたところ、窒素源を変えて生育させても NADPH-GDH と NADH-GDH の比率は変化しないことを報告している。また一方、田中<sup>6)</sup>は水稻のイモチ病について研究し、イモチ病にかかりやすい穂孕期の葉や罹病性の高い品種ではグルタミン酸のような酸性アミノ酸の蓄積と GDH 活性の上昇がみられることを報告している。一般に GDH 反応の生成物であるグルタミン酸や、それからつくられる各種遊離アミノ酸やアミドの含有量は、植物の種類、器官、生育時期、光、栄養状態等の外的、内的要因によって大きく変動することが知られている。<sup>7)</sup> 本報告ではカブラ、水稻を供試材料として種々の環境条件下における GDH 活性を調べたので報告する。

## 2. 実験材料および実験方法

実験材料としては水稻 (農林 16 号)、カブラ (さざなみ)、を用い、水耕あるいは土耕栽培した。発芽時の GDH 活性の変動はそれぞれの種子をビニールネット上に播種し、無肥区と施肥区 (N=20ppm, K<sub>2</sub>O=15ppm, P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>=10ppm) を設け、キセノンランプ照明による幼植物の

栽培装置で 25°C, 12,000 ルクスの連続光下で栽培したものについて経時的に測定した。その他の栽培は自然条件下のガラス室内で行なった。明暗処理は黒および透明なビニールで植物体を覆い、黒のビニールについては温度の上昇を防ぐために表面に白い紙をはりつけて行なった。水稻幼植物におよぼす窒素源の影響は、NaNO<sub>3</sub>, NH<sub>4</sub>Cl を窒素として 50ppm 与え、その他の栄養源は春日井氏的水稻用水耕液組成に準じ、K<sub>2</sub>O…15ppm, P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>…10ppm などの割合で与えた。この栽培では pH の変化が著しいので水耕液は毎日更新し、試料の採取は水耕液更新直前に行なった。

酵素液の調製、可溶性タンパク質 (図表中では Sol. Pro. と略記) の定量、GDH 活性の測定は前報<sup>1,2)</sup>と同じように行なった。

## 3. 実験結果および考察

### 1) 葉位別、部位別グルタミン酸脱水素酵素活性。

第 1, 2 表はカブラおよび水稻の葉位別、部位別 GDH 活性を調べたものである。カブラは土耕にて栽培し、約 11 葉が出葉したとき、1~2 葉を下位葉、4~5 葉を中位葉、7~11 葉を上位葉として酵素活性を測定した。水稻は水耕栽培し、第 7 葉が 1/2 程度抽出した時に採取して GDH 活性を調べた。酵素活性は各葉位によってそれほど大きな変化はなく、可溶性タンパク質の含量とほぼ同

第 1 表 カブラの葉位別、部位別 GDH 活性

	g・新鮮重	mg・Sol. Pro.	(A) NADH-GDH		(B) NADPH-GDH		(B)/(A) (%)*
			unit	unit	unit	unit	
			g・新鮮重	mg・Sol. Pro.	g・新鮮重	mg・Sol. Pro.	
根	5.30	3.59	14.00	3.90	1.44	0.40	10.3
上位葉	1.09	13.11	13.14	1.00	1.55	0.12	12.0
中位葉	3.25	11.23	11.10	0.99	1.44	0.13	13.1
下位葉	2.01	8.50	9.20	1.08	1.18	0.14	13.0

\* mg・Sol. Pro. 当たり活性の比

第 2 表 水稻の葉位別、部位別 GDH 活性

	g・新鮮重	mg・Sol. Pro.	NADH-GDH	
			unit	unit
			g・新鮮重	mg・Sol. Pro.
根	78.8	4.15	29.23	7.04
第 7 葉*	13.9	54.39	30.35	0.56
第 6 葉	14.2	34.20	28.95	0.85
第 5 葉	8.6	45.05	36.60	0.81
第 4 葉	7.9	45.63	36.04	0.79
第 2・3 葉	6.1	37.96	40.86	1.08

\* 最上位葉

\* 本報告の一部は 1970 年の土肥学会東北支部会 (秋田) で発表した。

\*\* 東北大学農学部 (仙台市堤通雨宮町 1-1) 昭和 47 年 7 月 31 日受理

\*\*\* 補酵素によってそれぞれ NADH-GDH, NAD-GDH, NADPH-GDH, NADP-GDH とする  
日本土壤肥料学会雑誌 第 44 巻 第 1 号 p. 18~22 (1973)

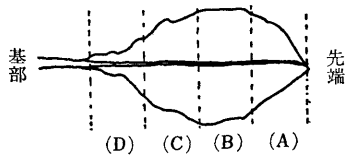
じ傾向を示すことがみられた。また、部位別の GDH 活性は新鮮重当たりでは葉部と根部とで大きな差はないが可溶性タンパク質当たりの活性(比活性)では葉部より根部の方がはるかに高いことが認められた。これに対し、誘導酵素である硝酸還元酵素は代謝の活発な新葉において、とくに活性が高いことが報告されており<sup>8)</sup>、GDH は硝酸還元酵素とは全く異なる分布様式をしている。また、YAMAMOTO<sup>9)</sup> の報告によれば新葉は古葉に比べて、GDH の補酵素である (NADPH+NADP) 量が (NADH+NAD) 量より高く、また NADPH/NADP の比も高いことが知られている。

また、第3表はカブラ第6葉について一枚の葉における GDH の分布を調べたものである。GDH 活性は葉の先端から基部にわたって新鮮重当たりの活性、比活性ともほぼ同じ程度に存在することがみられた。基部で比活性が若干高いが、基部では中肋の占める割合が高く、可溶性タンパク質が少ないことによるものと思われる。これは前報<sup>1)</sup>の、白菜では新鮮重当たりの活性は葉身、中肋ではほぼ同じであるが比活性は中肋部の方がはるかに高いという結果と一致している。このような GDH の一枚の葉の中における均一的分布に対し、硝酸還元酵素は代謝の活発な真中よりやや先端に近い部分が強い酵素活性を示すことが報告されている<sup>8)</sup>。

第3表 カブラ第6葉の部位別 GDH 活性

部 位*	g・新鮮重	mg・Sol. Pro.	NADH-GDH	
			unit	unit
	一葉身	g・新鮮重	g・新鮮重	mg・Sol. Pro.
(A)	0.204	16.15	17.24	1.07
(B)	0.374	15.05	16.23	1.08
(C)	0.411	13.95	14.90	1.07
(D)	0.344	10.30	15.96	1.55

\* 次のように分けた。



第4表 カブラおよび水稲葉の暗処理7日後の GDH 活性

試 料	処 理	g・新鮮重	mg・Sol. Pro.	NADH-GDH	
				unit	unit
	10 個体	g・新鮮重	g・新鮮重	mg・Sol. Pro.	
カ ブ ラ	処理前		17.2	21.1	1.23
	暗処理		7.1	11.6	1.63
	無処理		14.5	18.3	1.26
水 稲	処理前	0.72	48.2	28.2	0.59
	暗処理	1.59	22.3	27.9	1.25
	無処理	1.94	42.1	22.5	0.53

2) カブラおよび水稲のグルタミン酸脱水素活性におよぼす明暗処理の影響

第4表はカブラ、水稲葉の暗処理7日後の GDH 活性を示したものである。7日間の暗処理でカブラ、水稲葉とも著しい可溶性タンパク質の減少がみられるが、それに比べれば GDH 活性の低下は緩慢である。カブラでは新鮮重当たりの GDH 活性が暗処理で 1/2 近くに減少するが、水稲葉ではほとんど減少せず、両試料とも比活性では暗処理でむしろ増加することがみられた。

3) 発芽時のグルタミン酸脱水素酵素活性の変化

第5表はカブラ発芽時の GDH 活性の変化を示したものである。カブラ種子は水稲種子に比べて新鮮重当たりの活性が 49.3unit と7倍も高いが、可溶性タンパク質の含有量も多いので比活性では水稲種子より低い。発芽とともに個体当たりの GDH 活性は急激に増加し、外部から栄養源を与えるとこの傾向は一層強くなる。比活性も発芽とともに増加し、発芽8日目の施肥区では一般の成葉の比活性が 1unit 前後なのに対し、7unit と非常に高い値を示した。新鮮重当たりの活性は栄養源の施肥によってもそれほど変化がなかった。

これに対し、水稲発芽時の GDH 活性の変化を示したのが第6表である。水稲種子の新鮮重当たりの GDH 活性は低い種子の貯蔵タンパク質はオリゼニンでこの緩衝液に抽出されてこないため、可溶性タンパク質量も少ない。個体当たりの GDH 活性、新鮮重当たりの GDH 活性は発芽とともに増加し、施肥区の方が常に高い値を示した。しかし、施肥することにより新鮮重当たりの可溶

第5表 カブラ発芽時の GDH 活性

日 数	処 理	g・新鮮重	mg・Sol. Pro.	NADH-GDH			NADPH-GDH (%)*
				unit	unit	unit	
		1,000 個体	g・新鮮重	1,000 個体	g・新鮮重	mg・Sol. Pro.	
0		1.56	97.6	76.9	49.3	0.51	10.4
1	施肥区	2.75	51.5	133.4	48.5	0.94	6.9
	無施肥区	2.21	61.1	124.6	56.4	0.92	5.4
4	施肥区	15.38	10.6	386.0	25.1	2.37	19.8
	無施肥区	7.69	13.3	192.3	25.0	1.88	12.0
8	施肥区	55.00	6.7	2,557.5	46.5	6.94	15.4
	無施肥区	17.00	9.3	705.5	41.5	4.46	17.1

\* mg・Sol. Pro. 当たりの活性の比

第6表 水稲発芽時の GDH 活性

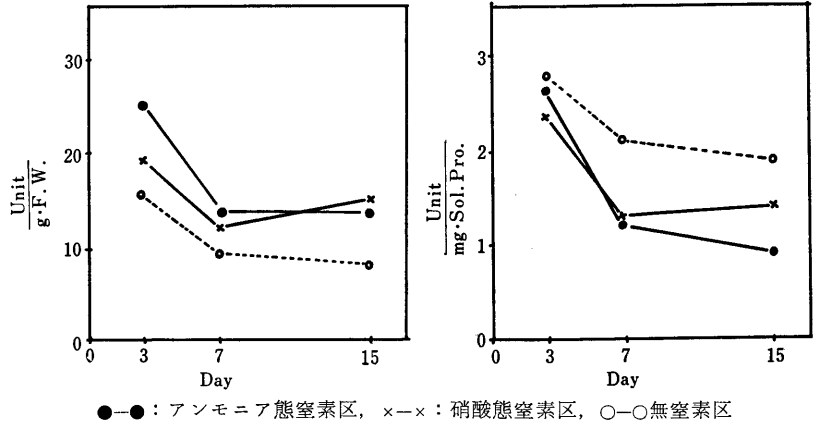
日 数	処 理	g・新鮮重	mg・Sol. Pro.	NADH-GDH		
				unit	unit	unit
	1,000 個体	g・新鮮重	1,000 個体	g・新鮮重	mg・Sol. Pro.	
0		25.6	8.20	179	6.99	0.85
4	施肥区	49.3	5.35	1,055	21.40	4.00
	無施肥区	45.7	3.30	580	12.69	3.85
8	施肥区	79.3	10.56	2,236	28.20	2.67
	無施肥区	62.5	4.57	858	13.73	3.00
12	施肥区	111.0	13.98	2,733	24.62	1.76
	無施肥区	84.2	3.17	1,005	11.94	3.77

性タンパク質が著しく増加するため、比活性は施肥区でむしろ低い値を示している。施肥による比活性の変化がカブラで上昇し、水稻で低下したのは両植物の施肥に対するレスポンスの違いによるものと思われる。すなわち、水稻では施肥で地上部の伸長が著しく、比活性の低い地上部の占める割合が高くなり、全体として比活性が低下したのと思われる。これに対して、カブラでは地上部、地下部の割合は比較的に変化せず、全体として比活性の増大が見られたのと思われる。後述するように、水稻でも地下部は施肥することによって比活性が増大し、地上部ではむしろ減少する傾向にあることがみられた(第 1, 2 図参照)。

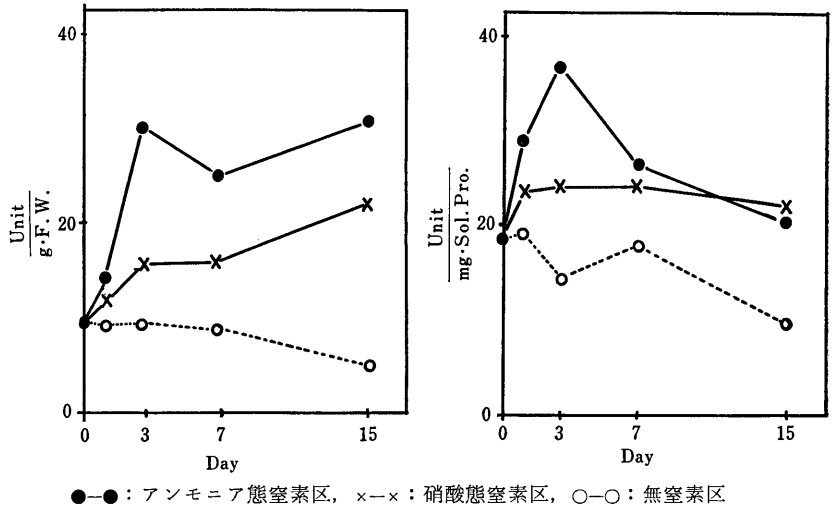
いずれの試料でも発芽とともに個体当たりの GDH 活性と比活性が著しく増加し、GDH は構成酵素として急速に合成が行なわれることが見られた。また、施肥することにより発芽初期から個体当たりの GDH 活性の著しい増加がみられ、発芽初期から貯蔵養分のみならず、外部から与えた養分も積極的に吸収利用されることが考えられる。カブラにおける NADPH-GDH 活性の NADH-GDH 活性に対する比はそれほど大きな変動は認められなかった。

4) 水稻幼植物のグルタミン酸脱水素酵素活性におよぼす窒素源の影響

第 1, 2 図は水道水のみで 2 葉展開時まで育成した水稻幼植物に、窒素源としてアンモニア態窒素区、硝酸態窒素区、無窒素区の 3 処理区を設け経時的に GDH 活性の変化を調べたものである。地上部では新鮮重当たりの活性はアンモニア態窒素区および硝酸態窒素区が無窒素区より高い値を示したが、比活性では可溶性タンパク質含量の少ない無窒素区が他の 2 区より高い値を示した。



●—●：アンモニア態窒素区，×—×：硝酸態窒素区，○—○：無窒素区  
第 1 図 水稻幼植物地上部 GDH 活性におよぼす窒素源の影響



●—●：アンモニア態窒素区，×—×：硝酸態窒素区，○—○：無窒素区  
第 2 図 水稻幼植物地下部 GDH 活性におよぼす窒素源の影響

地下部では窒素源の影響がよくみられ、処理 3 日後には新鮮重当たりの活性でも、比活性でもアンモニア態窒素区が最も高く、明らかに GDH が誘導生成されている。これに続いて硝酸態窒素区が高い活性を示し、逆に無窒

第 7 表 水稻幼植物の GDH 活性におよぼす窒素源の影響\*

	窒素源	(A) NADH-GDH				(B) (A)**
		(B) NADPH-GDH		unit g・新鮮重	unit mg・Sol. Pro.	
		unit g・新鮮重	unit mg・Sol. Pro.			
地上部	アンモニア態	25.1	2.7	3.77	0.40	14.8
	硝酸態	19.3	2.4	3.09	0.39	16.2
	無窒素	16.5	2.9	2.48	0.43	14.8
地下部	アンモニア態	30.3	18.4	4.24	2.57	14.0
	硝酸態	17.5	12.1	2.63	1.82	15.0
	無窒素	9.8	6.7	1.27	0.37	13.0

\* 処理 3 日後の活性

\*\* mg・Sol. Pro. 当たりの活性の比

素区は新鮮重当たりの活性、比活性とも処理以後減少を続けている。処理7日後以降はアンモニア態窒素区と硝酸態窒素区は同じような傾向を示した。新鮮重当たりの活性は常にアンモニア態窒素区、硝酸態窒素区、無窒素区の順に高かった。このように水稻根はアンモニア態窒素に敏感に反応し、根におけるGDHの重要性が推察された。

第7表はGDH活性に最も変化のみられた処理3日後の活性を示したものであるがNADPH-GDHもNADH-GDHと同じような変動をし、両酵素活性の比はいずれの処理区でもほぼ同じであった。HOLZERら<sup>9)</sup>の報告によれば、酵母ではアンモニアが存在するとNADH-GDHが著しく抑制されるというが、本実験に用いた水稻根ではアンモニア態窒素区でむしろ誘導生成される傾向にあった。また、この結果はJOYら<sup>4)</sup>のレムナを用いた実験、INGLEら<sup>5)</sup>の二十日大根での実験、著者ら<sup>2)</sup>の水稻培養細胞での実験と一致するものであった。したがって、高等植物では酵母でみられるようなNAD-GDHがグルタミン酸の分解に、NADPH-GDHがグルタミン酸の生成に関与するという補酵素の違いによる本酵素の機能的差異は存在しないものと思われる。また最近、KANAMORIら<sup>10)</sup>はアンモニア過剰下の水稻幼植物においては新たにNADHとNADPHのいずれをも補酵素としうるGDHが誘導生成されることを報告しているが高等植物においては酵母と異なる代謝調節機構が存在しているものと思われる。

#### 4. 総合考察

本実験結果を総合してみると高等植物のGDHは、誘導酵素である硝酸還元酵素等に比べて、異なる環境条件下でも変動の少ない構成酵素的性格が強いことが明らかとなった。また、NADPH-GDHはNADH-GDHに対して常に10~20%の活性を示し、その比は大きな変動をしなかった。しかしながら、筆者らの水稻培養細胞での結果<sup>2)</sup>ではNADPH-GDHがNADH-GDHに対して50%程度の活性を示すことや、カブラ根GDHではNADPH-GDHとNADH-GDHがDEAEセルロースクロマトグラフィーで異なる溶出パターンを示すこと\*、また、JOYら<sup>4)</sup>によればレムナではNADPH-GDHとNADH-GDHの存在比が栄養状態、生育段階で異なることなどを考えると高等植物においてもNADPH-GDHとNADH-GDHは異なる酵素と思われる。

高等植物におけるNADPH-GDHの存在量はNADH-GDHに対して10~20%とかなり少ないが、NADPH-GDHも植物体内ではグルタミン酸の生成に寄与してい

るであろうと思われる根拠がいくつかある。まず、高等植物は光合成器官においてNADPH（光合成細菌ではNADH）を特異的に生成するという事実である<sup>11)</sup>。クロロプラストでは光化学反応で還元されたフェレドキシンがフェレドキシン-NADP-還元酵素の触媒する暗反応でNADPをNADPHに還元する。したがって、クロロプラストではこの反応に続いてNADPH-GDHによるグルタミン酸の生成が行なわれる可能性がある。事実、前報<sup>1)</sup>においてNADPH-GDHがクロロプラスト画分にも存在することを明らかにした。また、LEECHら<sup>12)</sup>は詳細な研究を行ない、NADPH-GDHがクロロプラストのラメラ構造に存在していることを報告している。次に山本の研究<sup>9)</sup>によれば、高等植物ではNADHよりNADPHの方が10倍以上多く存在するという事実である。同様なことをOGRENら<sup>13)</sup>もホウレン草葉やソラ豆葉で認めている。さらに山本らは、この補酵素の存在量が植物の状態によっても異なることを見だし新葉では古葉よりNADPHレベルが高いことを報告している。したがって、新葉では古葉に比べてよりNADPH-GDHが働いている可能性がある。第三に高等植物のNADPH-GDH活性は $Mg^{2+}$ 、 $Mn^{2+}$ で促進されるという事実である。筆者はカブラ根の部分精製したGDHでNADH-GDH活性は $Mg^{2+}$ 、 $Mn^{2+}$ で促進されないが、NADPH-GDH活性は $10^{-4}$ ~ $10^{-1}M$ の $Mg^{2+}$ 、 $Mn^{2+}$ で促進されることを明らかにした\*。また $Mg^{2+}$ 、 $Mn^{2+}$ の被子植物における存在量はそれぞれ、乾物中の平均で3,200ppm、630ppmであり<sup>14)</sup>乾物%を10%と仮定すればと $Mg^{2+}=1.46 \times 10^{-2}M$ 、 $Mn^{2+}=1.27 \times 10^{-3}M$ なり、NADPH-GDHに対して $Mg^{2+}$ 、 $Mn^{2+}$ が植物体内で促進的に働くことが十分考えられる。したがって、これらの諸事実を総合すると、実際の植物体内ではNADPH-GDHもNADH-GDHと共にグルタミン酸の生成に寄与している可能性もあると推定される。

#### 5. 要約

水稻、カブラを実験材料として、種々の環境条件下におけるGDH活性の変動を調べた。

(1) 葉位別もしくは一枚の葉の各部位におけるGDH活性の強さには大きな差はなく、可溶性タンパク質の増減とGDH活性の増減は同傾向であった。部位別にみると新鮮重当たりの活性は根も葉もほぼ同じであるが、比活性では根の方がはるかに高かった。

(2) 7日間の暗処理で可溶性タンパク質は激減するが、GDH活性それほど減少せず比活性ではむしろ増加した。

(3) 発芽時には著しいGDHの生成がみられ、個体

\* 未発表

当たりの活性および比活性は急激に増加した。また、この際栄養源を与えると水稲、カブラとも積極的に栄養源を利用し GDH 活性も増大した。

(4) 水稲幼植物を窒素源を変えて生育させたところ、地上部では各区で GDH 活性はあまり変化しなかった。これに対し、地下部ではアンモニア態窒素区が処理3日後で比活性、新鮮重当たりの活性も最高となり続いて、硝酸態窒素区、無窒素区の順の活性を示した。

(5) 各種環境条件下でも NADPH-GDH と NADH-GDH の比率はそれほど大きな変化を示さなかった。

(6) これらのことから植物の GDH は組織中の含有量や補酵素特異性の面では変動の少ない構成酵素であると考えられた。

#### 文 献

- 1) 三枝正彦・大平幸次・藤原彰夫：土肥誌，41，461 (1970)
- 2) SAIGUSA, M., OHIRA, K. and FUJIWARA, A.: *Soil Sci. Plant, Nutr.*, (Tokyo) 投稿中.
- 3) HOLZER, H.: *Biochem. J.*, 98, p. 37 (1966)
- 4) JOY, K. W.: *Plant Physiol.*, 44, 849 (1969)
- 5) INGLE, J., JOY, K. W. and HAGEMAN, R. H.: *Biochem. J.*, 100, 577 (1966)
- 6) 田中正三・香月文子：日化，77，1068 (1956)
- 7) HEWITT, E. J.: *Plant physiology*, III, eds. STEWARD, F. C.: Academic Press London and New York (1963)
- 8) 王子善清・伊沢悟郎：土肥誌，39，380 (1968), 40, 385 (1969)
- 9) YAMAMOTO, Y.: *Plant Physiol.*, 38, 45 (1963)
- 10) KANAMORI, T., KONISHI, S. and TAKAHASHI, E.: *Physiol. Plantarum*, 26, 1 (1972)
- 11) 蛋白質・核酸・酵素編集編：光合成の生化学，共立出版 (1965)
- 12) LEECH, R. M. and KIRK, P. R.: *Biochem. Biophys. Res. Com.*, 32, 685 (1968)
- 13) OGREN, W. L. and KROGMANN, D. W.: *J. Biol. Chem.*, 240, 4603 (1965)
- 14) 藤原彰夫：化学生物，9，237 (1971)