
太陽エネルギーの有効利用 (光合成) のための光呼吸に関する理論的研究

Analytical studies on photorespiration in relation to the efficient utilization of solar energy in plants

- 代表研究者 名古屋大学農学部教授 赤 沢 堯
Professor, Res. Inst. for Biochem. Regulation, School of Agriculture,
Nagoya Univ. Takashi AKAZAWA
- 協同研究者 名古屋大学農学部助手 西 村 幹 夫
Instructor, Res. Inst. for Biochem. Regulation, School of Agriculture,
Nagoya Univ. Mikio NISHIMURA
- 名古屋大学農学部助手 高 倍 鉄 子
Instructor, Res. Inst. for Biochem. Regulation, School of Agriculture,
Nagoya Univ. Tetsuko TAKABE
- 日本学術振興会奨励研究員 浅 見 純 生
Postdoctoral Fellow, The Japan Society for the Promotion of Science
(JSPS) Sumio ASAMI

(1) Photorespiratory glycolate formation in the photosynthetic bacteria, *Chromatium*:

A primitive photosynthetic bacterium, *Chromatium vinosum*, can produce glycolate under the photorespiratory environments and excretes it extracellularly. The metabolic pathway of glycolate in the bacterial cells has been investigated, and it is concluded that the bacterial glycolate pathway is a prototype of photorespiratory C-pathway operating in green plants. The evolutionary significance of the bacterial glycolate pathway is discussed.

(2) Biosynthetic mechanism of glycolate formation catalyzed by transketolase:

It is found that transketolase isolated from spinach leaf catalyzes the formation of glycolate utilizing O_2^- as an oxidant. It is thus postulated that transketolase-dependent glycolate formation has a means of detoxifying the harmful effect of O_2^- (active oxygen) produced in the chloroplast under the photorespiratory environments.

(3) Analytical studies on the mechanism of the glycolate transport using the intact spinach leaf chloroplasts:

The intact chloroplasts, free from contamination of other organelles such as mitochondria and peroxisomes and sustaining a potent metabolic activity, are isolated from spinach leaf tissues by means of the gradient centrifugation on a modified silica sol "Percoll". The mechanism of the transport (inward uptake and outward excretion) of glycolate in chloroplasts is studied as a function of the incubation temperature and concentration of glycolate. It is demonstrated that glycolate is excreted from the intact chloroplasts by the "simple diffusion" process. It is likely that the further elucidation of this mechanism may help our understanding on the dynamic role of glycolate in the photorespiratory processes occurring in green leaf tissues.

(4) Isolation of intact mitochondria from spinach leaf:

Spinach leaf protoplasts are gently disrupted and subsequently applied to the discontinuous gradient centrifugation on "Percoll" to isolate the intact and metabolically active mitochondria. It is found that the isolated pure mitochondria are metabolically competent; P/O ratio and RC ratio being 2.5 and 3.1 respectively, and showing the activity of 231 O_2 taken up/mg protein min^{-1} (glycine oxidation).

(5) Studies on the photosynthetic/photorespiratory reactions using subprotoplasts:

Spinach leaf protoplasts are subjected to the stepwise gradient centrifugation on "Ficoll/Percoll" medium to isolate the "subprotoplasts" which are devoid of vacuoles. The patterns of the photosynthetic $^{14}\text{CO}_2$ fixation in the subprotoplasts are compared with those using the intact protoplast preparations, and results obtained indicate that vacuoles may take part in transport and accumulation of some metabolites such as malate produced in the photosynthetic C-pathway.

研究目的

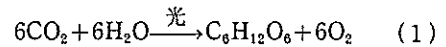
光合成に対して相殺効果をもつ光呼吸の機構には未解決の問題が多く、これは現代植物生物学(基礎および応用)領域におけるもっとも魅力的な研究テーマの一つである。とくに光呼吸機構の解明は高等植物(作物)の生産機能の向上に寄与する可能性があり、農業面からもはなはだ重要な意義をもっている。したがってこの命題に関して、数多くの研究者が様々な手段を用いて多くの角度から研究に従事しているが、我々の研究グループが手がけたのは光合成に対する酸素(O_2)の可逆的阻害、ならびに不可逆的阻害の機構の解明であった。このような研究をとおして、光呼吸の生理的意義ならびにその進化発達の過程を明らかにし、終局的には自然界における光合成生物、とくに高等緑色植物(作物)の光合成反応、すなわち、太陽エネルギーの利用の本質をよりよく理解できるであろうと期待したのである。我々は1962年以降継続して、光合成 CO_2 -固定反応の酵素化学的研究(比較生化学的研究)に携ってきたのであるが、日産科学振興財団からの援助を受けてからは、光合成反応に対する O_2 効果(光呼吸)を研究の中心課題としてとりあげ今日に至ったのである。

研究経過

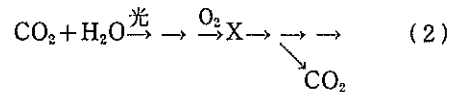
本研究課題にとっては、高等緑色植物の光合成(光呼吸)反応の解析が枢要のものであるところから、 C_3 -、 C_4 -植物の個体、遊離細胞(プロトプラスト)、葉緑体(クロロプラスト)および分離した精製酵素標品(RuBPカルボキシラーゼ/オキシゲナーゼ(RuBisCO))を用いて研究してきた。しかし原始的な光合成生物(いわゆる prokaryote とよばれるラン藻、光合成細菌)をも材料として用

い² 有用な知見をえた。後者、すなわち、嫌氣的光合成細菌の光合成反応に対する O_2 -効果の実体を解明することは、光呼吸の起源および進化の過程、またその生理的機能を究明する上から極めて有力な実験系であり、その利点も最大限に活用して研究を進めた。

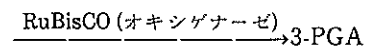
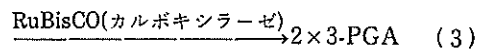
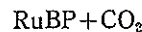
光合成 CO_2 -固定反応は一般に Eq. (1) で表わされる。しかし、光呼吸



によってかなりの固定産物が脱離することが知られている。



Eq. (2) の実体には不明な点が多いが、光に依存するというその特質から、呼吸と区別して光呼吸とよばれる。ところで光合成に対する O_2 の阻害的効果はおおむね可逆的であり、発見者の名に因んで Warburg 効果とよばれることが多い。しかも、近年の生化学的研究によって、Warburg 効果に実質的に関与する酵素が RuBisCO (Eq. (3) および (4)) であると考えられるような多くの研究成果が得られてきた。



すなわち、Eq. (2) における X の本体はグリコール酸であり、光呼吸はグリコール酸の代謝(グ

リコール酸経路)と密接不可分の関係をもつことも明らかにされてきた。事実、我々の研究からもこのことを支持するいくつかの成果が得られた。つまり O_2 存在下においては、光合成生物の Calvin-Benson サイクル中の RuBP が P-グリコール酸を経てグリコール酸となって離脱し (Eq. (4)), Calvin-サイクル中間代謝物の濃度が低下するために、光合成活性が低下するものと理解されるのである。

したがって、 O_2 と CO_2 の相対的濃度が RuBisCO の反応速度を規制するとすれば、① CO_2 enrichment によって光呼吸を抑制する可能性はないか? ② RuBisCO の特異的阻害剤の探索によって光呼吸を抑制する道はひらけないか? ③ RuBisCO のオキシゲナーゼ/カルボキシラーゼ活性比を異にする植物変異株 (mutant) の探索によって、光呼吸抑制の道は求められないか? という基礎生物学的な研究、あるいは作物生理学的立場からの研究が興味をよぶことになったのである。しかしながら、いまだにそのいずれの試みも希望的観測をもち得るような成果を与えてはいない。

我々はすでに、RuBisCO 分子中においては、 CO_2 および O_2 が結合する部位が同一であることを明らかにしてきたのであるが、このことからすれば、Eq. (3), (4) で示される全く相反する二つの type の酵素反応を differential に抑制することは理論的にはなほ難しいことが容易に推測されよう。逆説的にいえば、 O_2 存在下において RuBisCO がオキシゲナーゼ作用を触媒する機構によって P-グリコール酸→グリコール酸が不可避的につくられるということこそ光呼吸現象の本質がかくされているとも考えられるのである。

光呼吸研究に関するこのような一般的状況を背景として、我々が3年間にわたって行なってきた研究成果を以下に簡条書にする。それらは決して満足すべきものではないけれども、いくつかの新しい知見が得られたことは事実であり、また将来の研究に対する指針というべきものが得られたことをも記しておきたい。

研究成果

1. 光合成細菌 *Chromatium* の光呼吸的グリコール酸生成

光合成細菌 *Chromatium vinosum* は本来絶対嫌気性光合成生物であるが、酸素を含む気相下においたとき、その光合成活性が著しい阻害をうける。同時にまた、顕著なグリコール酸生成がみられる。これは好氣的な光合成生物、すなわち緑色高等植物が光呼吸的にグリコール酸を生成するのと極めて類似した現象である。したがって、光合成細菌にみられる一連の代謝過程を解析することによって、光呼吸の原型 (prototype) を知り、あるいはまたその進化的発達の過程を類推することも可能であることがわかった。これまで低酸素気相下においては *Chromatium* はグリコール酸を全く生成しないと考えられていた。しかしながら、我々は *Chromatium* のグリコール酸代謝の capacity (触媒能) が著しく小さいということを発見したのである。たとえば、外から非放射性グリコール酸を与えるときは、内生的に合成されたグリコール酸、およびそれからさらに派生的につくられるグリシンはいずれも菌体外に排出されることが明らかになった。つまり「*Chromatium* は原始的な形 (prototype) でグリコール酸経路ともよぶべきものを持っている」という進化論的に極めて重要な事実を発見した。

2. 光呼吸的につくられるグリコール酸の生合成機作

Chlorella, *Chromatium* および *Rhodospirillum rubrum* が酸素 ($^{18}O_2$) 気相下で生成するグリコール酸のカルボキシル基に ^{18}O が特異的に取り込まれることを明らかにした。これは RuBisCO がグリコール酸生成において主役を担うことを示す最も強力な実験的証拠であり、その酵素化学的意味は甚だ大きい。

3. 光呼吸の機作と O_2^- (ラジカル) のもつ役割

しかし一方では、光呼吸に好都合な環境条件 (強光、高酸素分圧) 下におかれた *Chromatium* 細胞は、 O_2 の還元によって O_2^- (ラジカル) を生成し、それが不可逆的に光合成活性を抑制するばかりか、またグリコール酸の生成に与かるとい

実験事実を発見した。嫌気的光合成生物においては、構造的に、また機能的に O_2^- の除去の機構が十分発達していないために、強光/高酸素濃度という特異的環境下においては、 O_2^- などの阻害効果が顕在化するわけである。しかし、高等緑色植物においては、いくつもの保護作用の組合せによって、細菌におけるような O_2 の強い破壊 (阻害) 効果を認めることができないものと考えられる。

このような観点からすれば、高等植物葉から得た transketolase が O_2^- を利用する酸化反応によってグリコール酸を生成することの発見、ならびにその機作の解析、さらにその発展として活性 O_2 (O_2^- または $\cdot OH$) の光合成器官に対する傷害作用に関する実験的知見を得たことは重要な意味をもつものと考えられる。これまで transketolase 反応によるグリコール酸生成の光呼吸生理学的意義については、おおむね否定的見解をもつ研究者が多かった。したがって本研究において O_2^- が fructose-6-P を酸化的に解裂してグリコール酸を生成するという我々が得た実験結果が、上述の ^{18}O によるグリコール酸の標識実験の結果とどのように対応するかを究明することは将来に残された重要な命題であり、光呼吸の機作について新しい視点を開くことが期待されるのである。

4. 無傷 (intact) 葉緑体を用いたグリコール酸の放出機構の研究

ホウレン草葉を Waring blender 中で破壊し、その後シリカゾル "Percoll" の密度勾配遠心法により、無傷の葉緑体を単離、精製することに成功した。精製した葉緑体に [^{14}C]-グリコール酸を取り込ませ、その後グリコール酸を含まない溶液中において希釈してから、シリコンオイル遠心法によって反応を停止させ、グリコール酸の放出のプロセスを定量的に測定した。種々の温度における放出速度の測定、ならびに、濃度変化の実験結果などから、グリコール酸は葉緑体から単純拡散 (simple diffusion) の機構によって放出されることが明らかになった。またこのようなグリコール酸の放出とひきかえに、葉緑体がグリセリン酸や重炭酸イオン (HCO_3^-) を取り込むという現象

(C の回収機構) についても理論的解析をすすめた。これらの実験結果は、初めに述べた、植物体の光呼吸現象において中心的役割をもつグリコール酸の動的な姿を明らかにする点で重要な意義をもつものと考えられる。

5. ホウレン草葉から無傷ミトコンドリアの単離と光呼吸における役割

ホウレン草プロトプラストを温和な条件で破壊した後、分画遠心で得た $1000\sim 10,000\times g$ の沈殿画分を "Percoll" 不連続密度勾配遠心にかけて、無傷 (intact) で、しかも他のオルガネラの混在しない純度の高いミトコンドリアを単離することに初めて成功した。精製したミトコンドリアは、グリコール酸経路の代謝産物であるグリシンを基質として酸化し、 $230\text{ n mol } O_2/\text{mg protein}/\text{min}$ の極めて高い活性を示した。また P/O ratio および respiratory control (RC) ratio はそれぞれ 2.5, 3.1 という値を示した。この結果はグリシンの脱炭酸反応によって生成した NADH が、ミトコンドリア内の電子伝達系で酸化されることを示唆するものである。グリシンからセリンへの変換の過程で遊離するアンモニアを再固定するためのグルタミン合成酵素の活性はミトコンドリアには存在しないことが明らかになった。これらの新しい知見にてらすとき、光照射条件下において植物緑葉起源のミトコンドリアのもつ生理、生化学的機能をさらに詳しく説明することは、光呼吸のメカニズムを解明する上からきわめて重要な課題である。

6. サブプロトプラストを用いた光合成-光呼吸の研究

ホウレン草葉肉細胞から調製したプロトプラストを Ficoll/Percoll のステップグラジェント遠心分離法 ($40,000\times g$, 2 時間) に供して、液胞を含まないサブプロトプラストを分離した。サブプロトプラスト標品の示す光合成-光呼吸 C-代謝反応における活性をプロトプラストのそれと比較することによって、植物緑葉細胞中において、液胞が光合成-光呼吸経路の代謝産物の貯蔵の役割を果たしていることを示す実験結果を得た。

この他、とくに説明を加えなかったいくつかの

研究報告もあるが、これらも、我々の研究室における光合成研究の一環として行なわれているものであり、それらが直接、または間接的に光呼吸と関係をもつということを付言しておきたい。

今後の課題

前述したように光呼吸の本質には未知の要因が多く、その実態の解明にはまだ時間を要するものと考えられる。そのような点からすれば、以上に要約したいいくつかの新知見を含む我々の研究成果がそれらのギャップをうめる上で重要な意義もっていることは確かである。とくに高等植物にとって光、高 O₂ 傷害作用 (O₂⁻ を介する) が光呼吸と密接不可分の関係をもつことを示す実験結果を得たことは重要であり、今後これをさらに発展させたいと考えている。このことは新しい実験系を組むことによって、高等植物の齢と光呼吸との関係を解明するための手がかりを与えるかもしれない、生物の“老化”といった一般的命題に関してもなんらかのヒントを与えるものと期待されるのである。

過去3年の間にあげた研究成果は、別記学会誌などに発表されたもののほか、第4回国際光合成会議 (Reading, England) (1977年)、第5回国際光合成会議 (Haldikiti Greece) (1980年)や、米国 Brookhaven 国立研究所第30回生物学シンポジウム (1978年) などにおいて発表したことも付記したい。それは、我々の研究がそれなりの評価を得ていることの反映であると考えているが、日産科学振興財団よりの財政的援助なくしては達せられなかったことであり、ここに衷心より謝意を述べるものである。

研究報告

[A] 原著、論文等

- 1) Asami, S., T. Takabe, and T. Akazawa: Biosynthetic mechanism of glycolate in *Chromatium* IV. Glycolate-glycine transformation. *Plant Cell Physiol.*, 18, 149-159 (1977).
- 2) Asami, S., and T. Akazawa: Enzymic formation of glycolate in *Chromatium*. Role of superoxide radical in a transketolase-type mechanism. *Biochemistry*, 16, 2202-2207 (1977).
- 3) Takabe, T., and T. Akazawa: A comparative study on the effect of O₂ on photosynthetic carbon metabolism by *Chlorobium thio-*

sulfatophilum and *Chromatium vinosum*. *Plant Cell Physiol.*, 18, 753-765 (1977).

- 4) Matsumoto, K., M. Nishimura, and T. Akazawa: Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase in the bundle sheath cells of maize leaf. *Plant Cell Physiol.*, 18, 1281-1290 (1977).
- 5) Inoue, K., M. Nishimura, and T. Akazawa: Effect of α -hydroxy-2-pyridinemethanesulfonate on glycolate metabolism in spinach leaf protoplasts. *Plant Cell Physiol.*, 19, 317-325 (1978).
- 6) Lorimer, G. H., C. B. Osmond, T. Akazawa, and S. Asami: On the mechanism of glycolate synthesis by *Chromatium* and *Chlorella*. *Arch. Biochem. Biophys.*, 185, 49-56 (1978).
- 7) Akazawa, T., E. H. Newcomb, and C. B. Osmond: Pathway and products of CO₂-fixation by green prokaryotic alga in the cloacal cavity of *Diplosoma virens*. *Marine Biol.*, 47, 325-330 (1978).
- 8) Nishimura, M., and T. Akazawa: Biosynthesis of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase in spinach leaf protoplasts. *Plant Physiol.*, 62, 97-100 (1978).
- 9) Asami, S., and T. Akazawa: Biosynthetic mechanism of glycolate in *Chromatium*. 6. Glycolate formation and metabolism under low O₂. *Plant Cell Physiol.*, 19, 1353-1362 (1978).
- 10) Asami, S., and T. Akazawa: Photooxidative damage in photosynthetic activities of *Chromatium vinosum*. *Plant Physiol.*, 62, 981-986 (1978).
- 11) Takabe, T., C. B. Osmond, R. E. Summons, and T. Akazawa: Effect of oxygen on photosynthesis and biosynthesis of glycolate in photoheterotrophically grown cells of *Rhodospirillum rubrum*. *Plant Cell Physiol.*, 20, 233-241 (1979).
- 12) Kobayashi, H., T. Takabe, M. Nishimura, and T. Akazawa: Roles of the large and small subunits of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase in the activation by CO₂ and Mg²⁺. *J. Biochem.*, 85, 923-930 (1979).
- 13) Asami, S., K. Inoue, K. Matsumoto, A. Murachi, and T. Akazawa: NADP-malic enzyme from maize leaf. I. Purification and properties. *Arch. Biochem. Biophys.*, 194, 503-510 (1979).
- 14) Asami, S., K. Inoue, and T. Akazawa: NADP-malic enzyme from maize leaf. II. Regulatory properties. *Arch. Biochem. Biophys.*, 196, 581-587 (1979).
- 15) Takabe, T., M. Nishimura, and T. Akazawa: Isolation of intact chloroplasts from spinach

- leaf by centrifugation in gradient of modified silica "Percoll". *Agr. Biol. Chem.*, **43**, 2137-2142 (1979).
- 16) Kobayashi, H., S. Asami, and T. Akazawa: Developmental formation of enzymes involved in photosynthetic carbon assimilation in greening seedlings of maize (*Zea mays*). *Plant Physiol.*, **65**, 198-203 (1980).
- 17) Takabe, T., S. Asami, and T. Akazawa: Glycolate formation catalyzed by spinach leaf transketolase utilizing superoxide radical. *Biochemistry*, **19**, 3985-3989 (1980).
- [B] 総説等
- 18) Akazawa, T.: Structure and function of ribulose bisphosphate carboxylase. In "*Photosynthesis, 1977*". Edited by T. W. Goodwin, J. Coombs and D. O. Hall: *Biochem. Soc., London*, pp. 447-456 (1978).
- 19) Akazawa, T., T. Takabe, S. Asami, and H. Kobayashi: Ribulose bisphosphate carboxylase from *Chromatium vinosum* and *Rhodospirillum rubrum* and their role in photosynthetic carbon assimilation. In "*Photosynthetic Carbon Assimilation*". Edited by H. W. Siegelman and G. Hind. Plenum Press, New York (1978) pp. 209-226.
- 20) Akazawa, T.: Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase. In "*Encyclopedia of Plant Physiology. Photosynthesis II*". Edited by M. Gibbs and E. Latzko, Springer Verlag, Berlin, (1979) pp. 209-229.
- 21) Akazawa, T., and K. Okamoto: Biosynthesis and metabolism of sucrose. In "*The Biochemistry of Plants. A Comprehensive Treatise Vol. 3.*" Edited by P. K. Stumpf and E. E. Conn. Academic Press, New York, N.Y., (1979) pp. 199-220.
- 22) Akazawa, T., T. Takabe, and S. Asami: Photorespiration in photosynthetic bacteria. In "*CRC Handbook of Biosolar Resources. Vol. I. Basic Principles*". Palm Beach, Florida, (1981) in press.
- 23) 浅見純生: 光合成生物に対する酸素の影響, 蛋白質・核酸・酵素 **22**, 33-42 (1977).
- 24) 西村幹夫: リブローズジリン酸カルボキシラーゼをめぐって (3) 生合成, 化学と生物, **16**, 376-380 (1978).
- 25) 浅見純生: リブローズジリン酸カルボキシラーゼをめぐって (4) オキシゲナーゼ活性, 化学と生物, **17**, 42-47 (1978).
- 26) 赤沢 堯: ショ糖とテンサイ糖—C₃-植物と C₄-植物の比較生化学一, 化学と生物, **16**, 120-123 (1978)
- 27) 浅見純生, 赤沢堯: 植物にとって光呼吸とは何か科学, **51**, 308-316 (1981).