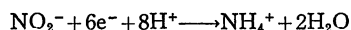


何 智恵*, 荒木 繁**, 猪川倫好***, 西沢一俊****: スサビノリの亜硝酸還元酵素活性におよぼす 2, 3 の培養条件の影響

Chi-Huie HO*, Shigeru ARAKI**, Tomoyoshi IKAWA*** and Kazutosi NISIZAWA****: Effects of some cultural conditions upon the nitrite reductase activity in *Porphyra yezoensis*

亜硝酸還元酵素 (Nitrite reductase, NiR) は一般緑色植物においては, 窒素代謝, 特に硝酸同化に関係した重要な酵素であり, 次の反応を触媒することが知られている。



何は, すでに従来全く行なわれていなかった紅藻について, スサビノリを選んでその酵素を純化精製し, その酵素化学的性質を明らかにした。¹⁾ それはホウレンソウなどの NiR にもよく似た性質を示したが^{2),3)}, 多くの点でクロレラ NiR とは酷似しており⁴⁾, この結果により藻類 NiR に共通した特性も暗示された。

今回は, 人工培養スサビノリにおいて, 通常の NiR 活性および Cytochrome C 553 (cyt c 553) を主とする加熱後 NiR 活性を示す物質の光や培養液組成による影響をみたので, その結果の一部を報告する。

材料および実験方法

1. 実験材料: 山本海苔研究所において培養しているスサビノリ (*Porphyra yezoensis* UEDA) の株を酵素原料とした。
2. 培養条件: 標準培養としては, 須藤 ASP 6 の改変培地⁵⁾ を用い, 4,000 lux 光照射下 (三菱ブラックス白色蛍光灯 30W 8 本) 明暗12時間交代で培養した。強光を用いる時には, 照度 40,000 lux (東芝メタルハライドランプ 350W 1 本) とした。標準培養では, N- 源は NaNO_3 0.2 g/l であるが, 低濃度 N- 源の場合にはその 1/10 濃度を用いた。培養液はいずれも 1 週間毎に全量を交換した。水温は, 3 週間までは 18°C, そ

* 東京教育大学理学部植物学教室 (112 東京都文京区大塚 3-29-1)
Department of Botany, Tokyo Kyoiku University, Otsuka, Tokyo, 112 Japan.

** 山本海苔研究所 (143 東京都大田区大森東 5-2-12)
Yamamoto Nori Research Laboratory, Oomori-higashi, Oota-ku, Tokyo, 143 Japan.

*** 筑波大学生物科学系 (300-31 茨城県新治郡桜村大字妻木字天久保)
Institute of Biological Sciences, The University of Tsukuba, Sakura, Ibaraki, 300-31 Japan.

**** 日本大学農獣医学部水産学科 (154 東京都世田谷区下馬 3-34-1)
Department of Fisheries, College of Agriculture and Veterinary Medicine, Nihon University, Shimouma, Setagaya-ku, Tokyo, 154 Japan.

Bull. Jap. Soc. Phycol., **23**: 87-92, Sept. 1975.

の後は 13°C であった。藻体は、糸状体から放出された殻胞子をクレモナの単糸に付着させ生育させた。

3. 藻体重量：藻体重量測定には、別に対照培養に相当する試料を作り、水分をよく切った後の生重量を測定した。

4. 藻体乾量：葉状体表面に付着している水を吸い取ってから、硫酸デシケーター中で室温で一定重量になるまで減圧乾燥し、それを乾量とした。

5. タンパク質含量：酵素抽出液中のタンパク質は Lowry 法⁶⁾ により、牛血清アルブミンを基準液として定量した。

6. 酵素液の調製：培養藻体のそれぞれの生長段階の葉状体 (3~7g) を取り出し、表面に付着している水を吸い取ってから、液体窒素で速かに凍結し、これを乳鉢中で等量の 0.5 M Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5) と共によく磨潰し、3~4 時間 4°C に静置した後 24,000×g 20 分間遠沈し、その上澄液を酵素液とした。

7. NiR 活性の測定：RAMIREZ ら⁷⁾ の方法を多少改良した。すなわち、75 μ moles の Tris-HCl 緩衝液、pH 7.5, 2 μ moles の亜硝酸ナトリウム (NaNO_2), 0.75 μ mole のメチルビオロゲン (MV), 7.5 mg の亜二チオン酸ナトリウム ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) を 0.29 M NaHCO_3 0.15 ml に溶かしたものを、および酵素液とから成る全体で 1 ml の酵素反応液を 30°C に 10 分間保ってから、反応容器を取り出し還元型 MV が完全に脱色するまで機械的に激しく振盪する。次にこの反応液の 100 倍稀釈液 2 ml にジアゾ化試薬の各 1 ml ずつを加え、水で全体を 5 ml となし 10 分間室温に放置後、日立分光光度計 139 型で 540 nm における吸光度を測定し、基準曲線から亜硝酸量を求め、還元された亜硝酸量を算出した。この条件下で 1 分間に 1 μ mole の亜硝酸を還元する酵素量を 1 単位 (U) とし、U/分を比活性とした。また主として cyt c 553 による加熱後の NiR 活性も同様の定量法により測定した。

実験結果

1. 標準培養液における強弱の光条件下の藻体の生長。

メタルハライドランプ 40,000 lux 下と白色蛍光灯 4,000 lux 下の培養における藻体の生長量を比較した。図 1 に示すように、前者の方が約 30% 生育がよかった。

2. 標準光条件下および低窒素培養条件下における藻体の生長。

光照度その他は標準条件とし、窒素源のみを標準の 1/10 濃度 (NaNO_3 0.02 g/l) として培養し、その生長量を標準条件下のものと比較した。図 2 に示すように、両者は実際にはほとんど同じであったが、低 N-濃度の場合には細胞内容に乏しく、水膨れ状態を呈し、すでに培養 2 週間目頃から葉状体は標準培養のものに比べて色調が薄くなり始めた。別の実験セットで行なった結果であるが、この時期の藻体では、標準条件下の葉状体の乾量/生重量比は 0.146, 全 KJELDAHL N は 7.49% に比し、前者の値は 0.136 で

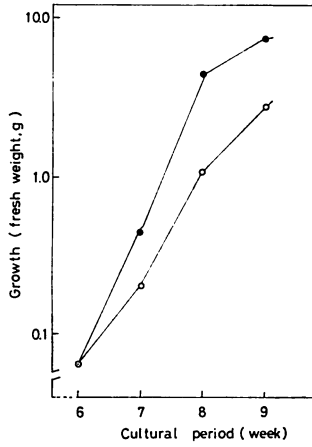


Fig. 1. Growth of thalli of *Porphyra yezoensis* under 40,000 lux from a metal halide lamp and 4,000 lux from fluorescent lamps in the standard culture medium. NaNO_3 0.2 g/l was used as nitrogen source (standard N-concentration). ●—● 40,000 lux, ○—○ 4,000 lux (standard irradiation).

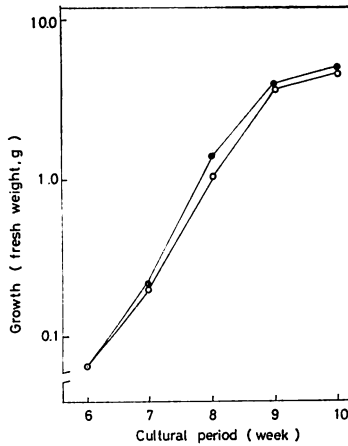


Fig. 2. Growth of thalli of *Porphyra yezoensis* under the standard cultural condition and the cultural condition of a lower N-source. 4,000 lux was irradiated. ●—● NaNO_3 0.02 g/l, ○—○ NaNO_3 0.2 g/l (standard N-concentration).

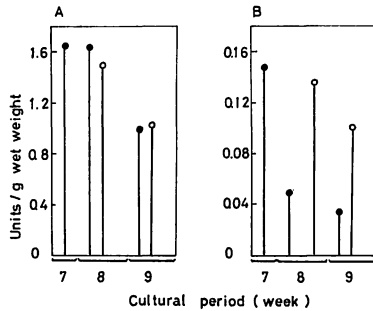


Fig. 3. Effect of light intensity on *Porphyra* NiR activities before (A) and after (B) heating. —● under 4,000 lux, —○ under 40,000 lux.

後者は 2.18% に低下した。

3. 強光および弱光条件下標準培養における藻体抽出液の通常および加熱 NiR 活性の比較。

スサビノリを 4,000lux および 40,000lux の光照射下で標準培養液で培養し、7, 8, 9 週後のそれぞれの試料から酵素を抽出して、NiR 活性および加熱 (70°C, 10 分間) 後の NiR 活性 (主として Cytochrome c 553 含量に当る)¹⁾ を測定した。結果を図3 に示す。4,000 lux 照射下の NiR 活性は、7, 8 週間培養は非常に高く、9 週間培養になると著しく低下した。40,000 lux 照射下でもやや同じような傾向を示した。主として cyt c 553

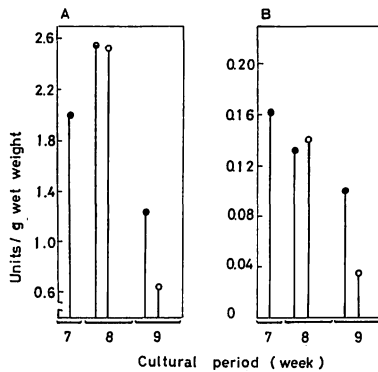


Fig. 4. Effect of N-concentration on *Porphyra* NiR activities before (A) and after (B) heating. —● at normal N-concentration, —○ at 1/100 N-concentration.

含量を示す加熱後の活性は、4,000 lux 照射下では 7, 8, 9 週培養の順に低下している。40,000 lux の場合にも 8, 9 週培養の順に低下はしているが、4,000 lux 照射下の活性に比べると 2 倍以上の活性を示した。この結果から、NiR 活性はここで使用した光の強さに関係なく、9 週培養ではかなり低下したが、cyt c 553 含量は強光の方が遙に高くなっていることが分った。

4. 標準培養条件および低窒素培養条件下における通常および加熱 NiR 活性の比較。

スサビノリを 4,000 lux 光照射下において、標準 N- 濃度とその 1/10 濃度下において培養し 7, 8, 9 週にわたり試料を採取して、抽出酵素液の加熱前後の NiR 活性を測定した。その結果を図 4 に示す。

NiR 活性は標準窒素濃度では 7 週, 8 週と培養が進むにつれて、その強さを増したが 9 週培養になると 7 週よりも低くなった。一方 1/10 N- 源濃度によると、8 週の活性はほぼ普通の N- 濃度の活性と同じであったが、9 週になると、著しく低下した。また、主として cyt c 553 の含量もほぼ前記 NiR 活性と同じ傾向を示し、9 週培養では著しく少なくなった。これらの結果は、活性 NiR および cyt c 553 含量は、藻体が成熟しその生長が遅くなると低下し、特に低 N- 濃度の方がこの傾向が遙かに大きいことを暗示している。

考 察

スサビノリの人工培養には、少なくとも本実験に関する限り標準条件として用いた培養条件が最も適しているように思われた。N- 源として標準条件すなわち NaNO_3 (0.2 g/l) を用いた場合には、4,000 lux でもその 10 倍の 40,000 lux でも、藻体の生重量はあまり違わなかったが、強光照射下の方が cyt c 553 を主とした cytochrome 量はむしろ増えた。それにもかかわらず、NiR 活性は光強度に関係なく、培養が進んで藻体生長が遅くなると低下した。このような結果は藻体の成熟と NiR 活性低下が密接に関係していることを暗示するものである。また主として cyt c 553 の含量は強光の方が高いけれども、成熟に伴って低下する傾向は NiR と同じであった。

一方、N- 源 (NaNO_3) の濃度を標準培養の 1/10 に低下しても、NiR 活性および cyt c 553 含量の培養期間に伴う変化パターンは、量的には多少異なるがほぼ同じ傾向を示した。すなわち、藻体の成熟に伴い両者は低下したが、その際 NiR 活性低下の方が遙かに著しかった。

Summary

Porphyra yezoensis UEDA was cultured in an artificial medium through 9 weeks. The effects of light intensity and the concentration of nitrogen source (sodium nitrate) upon the activity of nitrite reductase and the content of mainly

cytochrome c 553 in the algal frond were investigated. Growth of the alga was apparently similar in the cultures with 4,000 and 40,000 lux irradiations, but its dry weight was remarkably decreased under the lower nitrogen concentration. However, the nitrite reductase activity was changed irrespective of the light intensity, and decreased rather with aging of the algal frond. The content of cytochrome c 553 showed also a similar tendency, except for a higher content under mainly the stronger light intensity. The content of mainly cytochrome c 553 as well as the nitrite reductase activity was also changed similarly independent of the nitrogen concentration, and they decreased with the algal aging.

引用文献

- 1) Ho, C.H. (1975) Faculty of Science, Tokyo Kyoiku University, Ph. D. thesis.
- 2) Ho, C.H. and TAMURA, G. (1973) Purification and properties of nitrite reductase from spinach leaves. *Agr. Biol. Chem.*, **37**: 37-44.
- 3) SHIMIZU, J. and TAMURA, G. (1974) Studies on nitrite reductase from spinach leaves I. Further purification and some properties. *J. Biochem.*, **75**: 999-1005.
- 4) ZUMFT, W.G. (1972) Ferredoxin: nitrite oxidoreductase from *Chlorella*. Purification and properties. *Biochim. Biophys. Acta*, **276**: 363-375.
- 5) SUTO, S. (1960) On a method of laboratory culture of the laver (*Porphyra tenera* KJELLMAN). *Aquiculture*, **7**: 7-11.
- 6) LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L. and RANDALL, R. J. (1951) Protein measurement with FOLIN phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**: 265-275.
- 7) RAMIREZ, J. M., CAMPO DEL. F. F., PANEQUE, A. and LOSADA, M. (1966) Ferredoxin-nitrite reductase from spinach. *Biochim. Biophys. Acta*, **119**: 615-627.