HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	イラガ前蛹と蛹のフォスフォリラーゼ及びアルドラーゼ活性について
Author(s)	竹原, 一郎
Citation	低温科學. 生物篇, 20, 35-43
Issue Date	1962-12-20
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/17660
Type	departmental bulletin paper
File Information	20_p35-43.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

Ichiro TAKEHARA 1962 On the Phosphorylase and Aldolase Activity in a Slug Caterpillar. *Low Temperature Science, Ser.* ***B, 20.*** (With English résumé p. 43)

イラガ前蛹と蛹のフォスフォリラーゼ及びアルドラーゼ活性について*

竹　原　一　郎
(低温科学研究所　生物学部門)

(昭和37年8月受理)

I. はしがき

前報[1)-4)]までに，数種の昆虫の体内にグリセリンが存在することを報告し，特にイラガ *Monema flavescens* の越冬前蛹については，その自然状態におけるグリセリン量の変化と耐凍性及び休眠との関係を調べ，更にそれらが環境温度によって，どのように影響されるかを述べた。そして，それらの結果及び蚕の休眠卵[5)]やシクロピア蚕の休眠蛹[6)]の結果から，グリセリンはグリコーゲンから生成されるであろうと推論した。この報文では，グリセリン生成の機構を知る為の予備実験でその存在が明らかにされたフォスフォリラーゼ活性とアルドラーゼ活性について報告する。

II. 実験の材料と方法

イラガは札幌市内で，幼虫の間に採集，虫舎内で飼育し，マユを作らせた。マユは秋から冬の期間戸外におき，2月中頃 −5°C の低温室に移し保存した。この条件では形態的変化は起らない。前蛹を蛹にしたい時は，これを 20°～25°C の恒温箱に移した。この温度では，20日間に半数以上が，30日間で大部分が蛹になった。

酵素液として，イラガ越冬前蛹或いは蛹を −20°C で凍結後，その生体重の2倍量の脱イオン水と共に Waring blendor でホモジェナイズ，約 14,000 g で5分間遠心分離，その上清を濾過した濾液を用いた。

グルコーズ-1-燐酸 (G-1-P) の K 塩はバレイショのフォスフォリラーゼを用いて調製した。その純度は約90%であった。ヘキソーズ2燐酸 (HDP) は Ba 塩で Nutritional Biochemicals Co, の製品をそのまま用いた。

フォスフォリラーゼ活性を測定する際の反応混液の組成は次の通りである。

酵　素　液	1.0 mℓ
グリコーゲン (5%)	0.5 〃
G-1-P (≒0.1 M)	0.5 〃

* 北海道大学低温科学研究所業績　第619号

NaF (0.5 M)	0.2 〃
Tris-maleate 緩衝液 (0.2 M)	1.3 〃

緩衝液の pH は 6.0 或いは 6.6, 反応温度は 37°C である。反応は 10% トリクロール酢酸 (TCA) 10 ml を加えて停止させ，その除蛋白濾液について無機燐を Fiske-Subbarow 法で定量，反応混液当りに遊離する無機燐の量を以ってフォスフォリラーゼ活性とした。

アルドラーゼ活性の測定は Sibley & Lehninger の方法[7]によった。その反応混液の組成は次の通りである。

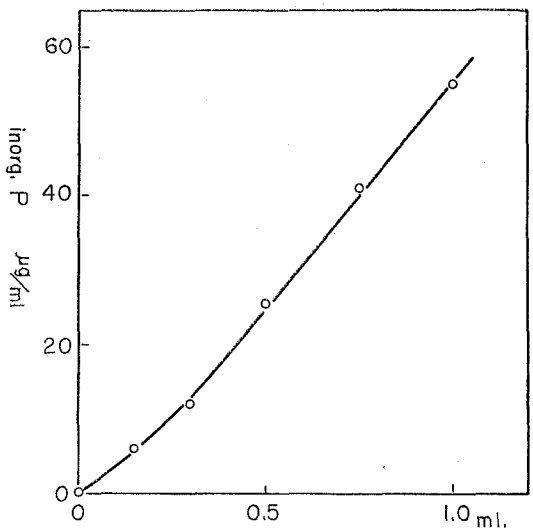
酵 素 液	1.0 mℓ
HDP (≒0.03 M)	0.25 〃
Hydrazine (0.56 M)	0.25 〃
Tris 緩衝液 (0.2 M)	1.0 〃

緩衝液の pH は 7.5 或いは 8.6, 反応温度は 38°C である。反応は 10% TCA 2 ml を加えて停止させた。アルドラーゼ活性は反応混液当りの 540 mμ の吸収で表わした。

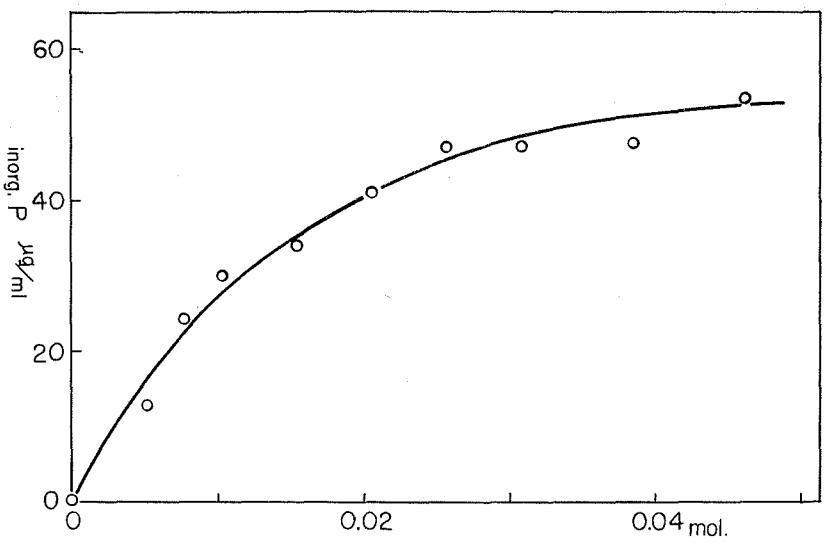
III. 実験の結果と考察

1) フォスフォリラーゼ

先ず反応時間とフォスフォリラーゼ活性との関係を見ると，酵素液が 0.15 ml から 1.0 ml の間，この反応は時間と共に，少なくも 60 分までは直線的に進行する。又酵素濃度とその活性の関係は，第1図に見るように，酵素濃度の高い場合には直線関係を示す，しかし低い酵素濃度ではやや上向きの曲線を示している。これは恐らく，酵素液中に含まれていると思われる解離しやすい activator の影響によるものかも知れない。このような例は幾つかの酵素でも知



第1図 フォスフォリラーゼ活性に対する酵素濃度の影響

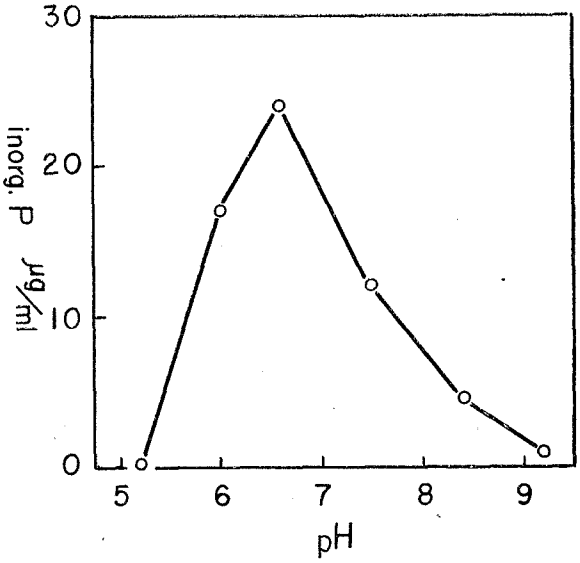


第2図　フォスフォリラーゼ活性に対する基質濃度の影響

られており，これはその酵素濃度が増すに従って，active な型の酵素の割合が増加する為であると説明されている[8]。

第2図には，酵素活性に対する基質濃度の影響を示す。この図から求められた G-1-P に対する K_m の値は約 1.12×10^{-2} M である。ウサギの筋肉フォスフォリラーゼ[9]で報告されている K_m の値は，これに比べてやや小さく 5.7×10^{-3} M であった。

第3図に見るように，この酵素活性に対する至適 pH は 6.6 附近にある。ウサギの筋肉フ



第3図　フォスフォリラーゼ活性に対する pH の影響

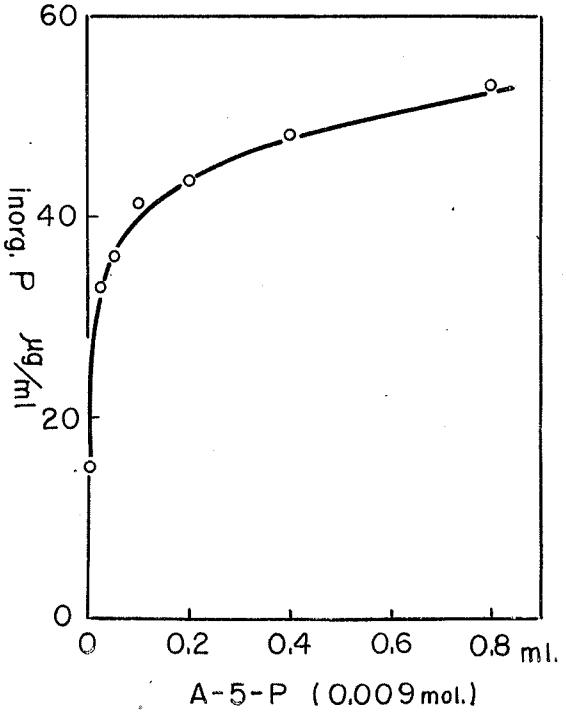
ォスフォリラーゼ[9]の至適 pH は 6.5～6.9 と報告されており，この点に関してはイラガの場合とよく一致している。

次に動物組織のフォスフォリラーゼの activator として知られているアデノシン-5-燐酸 (A-5-P) が，イラガのフォスフォリラーゼ活性の場合にも，その影響を及ぼすかどうかを調べて見た。第1表に示すように実験の項で述べた方法で調製された酵素液 (A) に対しては，A-5-P はその活性を 1.4～1.5 倍増加させるに過ぎない。一方酵素液 (A) から飽和硫安 (pH 6.8) でその酵素蛋白を沈澱させ，それに適当量の脱イオン水を加えて調製した酵素液 (B) を用いた場合には，A-5-P は約4倍もその活性を増大させる。このような A-5-P の影響は，第4図に見るように，その濃度に依存している。ウサギの筋肉フォスフォリラーゼの場合，A-5-P はその活性を 30～35% 増すと言われているが[9),10)]，酵素 (A) の場合がこれに相当するのかも知れない。又フォスフォリラーゼは硫安によって阻害されること及び，その阻害が A-5-P により或る程度除かれるという報告[9)]があるが，ここで示した酵素 (B) の場合のような大きな影響は見られないようである。このような影響を与える原因は今のところ不明である。

第1表 フォスフォリラーゼ活性に対するアデノシン-5-燐酸の影響

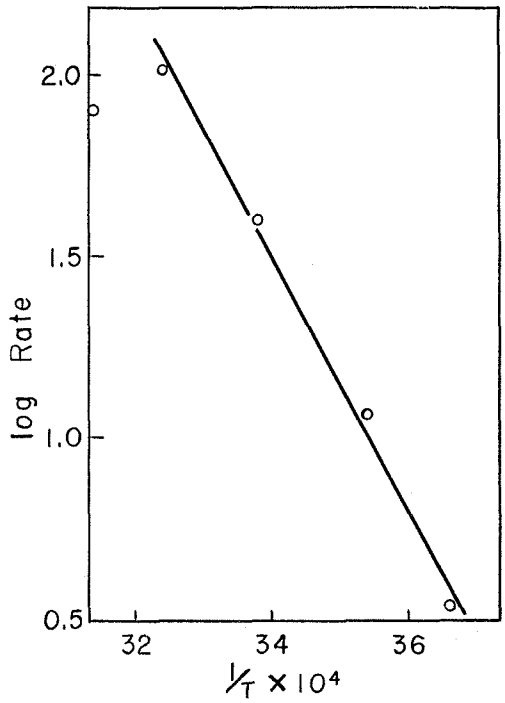
A-5-P	酵素活性 μg/mℓ	
	酵 素 (A)*	酵 素 (B)*
−	9.6	10.4
+	13.5	41.2

* 本文参照



第4図 フォスフォリラーゼ活性に対する A-5-P の影響

第5図は酵素活性に対する温度の影響を示す。0℃から35℃までの温度範囲ではこの関係はArrheniusの式に従い，直線で示される。この図から計算した活性化エネルギーは約16,000 calである。これに対しウサギの筋肉フォスフォリラーゼ[9]のそれは約25,000 calと報告されており，この間にはかなりの差がある。又図で見るように45℃で既に酵素活性の低下が起っているがウサギの筋肉フォスフォリラーゼの場合にも39℃より温度が高くなると酵素活性の急速な低下が観察されている。活性化エネルギーの場合とは違って，このような熱変性と思われる酵素の不活性化の起る温度範囲に関しては両者共大体一致しているようである。

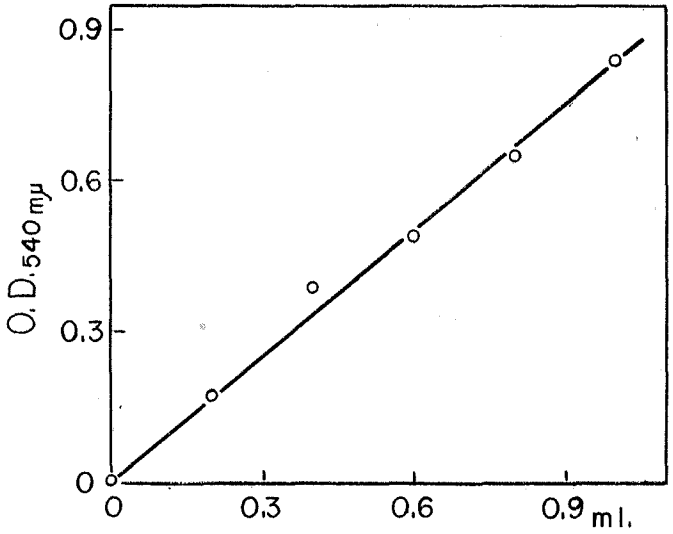


第5図　フォスフォリラーゼ活性に対する温度の影響

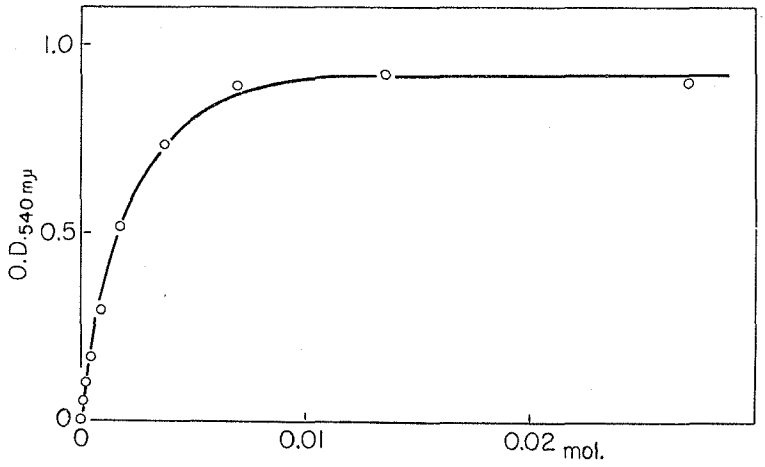
2) アルドラーゼ

この酵素の場合にも反応曲線は，酵素液が0.2 mlから1.0 mlまでの間，少なくも初めの10分間は直線になる。酵素活性と酵素濃度の関係も第6図に示すように，酵素液が1.0 mlまでは直線となる。

酵素活性に対する基質濃度の影響を示した第7図から求めた K_m の値は約 1.5×10^{-3} Mで



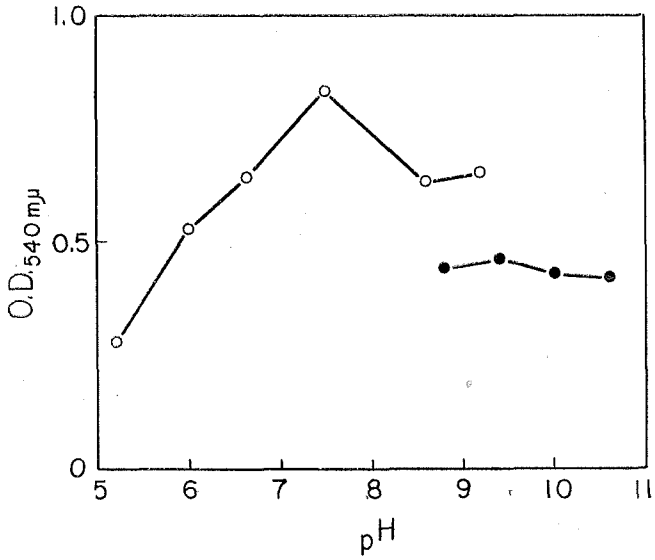
第6図　アルドラーゼ活性に対する酵素濃度の影響



第7図 アルドラーゼに対する基質濃度の影響

ある。これは Dounce 等[11] が筋肉結晶アルドラーゼで求めた K_m の値 (0.001～0.002) とよく一致している。

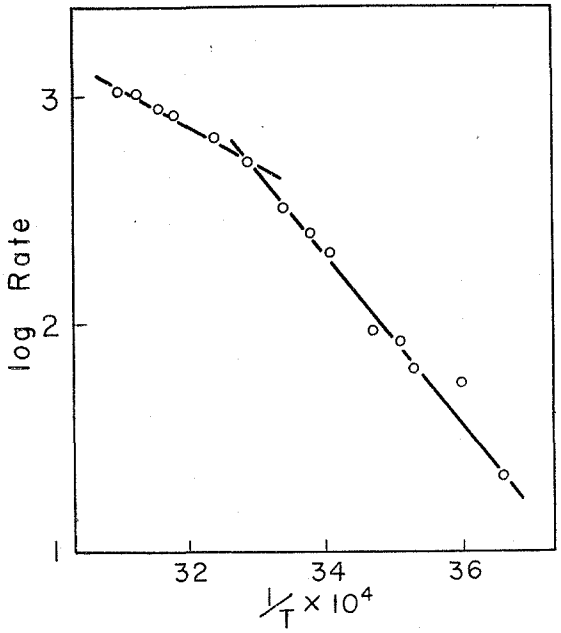
第8図に見るようにこの反応の至適 pH は 7.5 である。Siblay & Lehninger[7] はアルドラーゼの至適 pH は 8.6 であると報告している。しかし Dounce 等[11] は Sibley & Lehninger の用いた測定法の為にその至適 pH がアルカリ側にずれているとして，その測定法を改良，7附近がアルドラーゼの至適 pH であると述べている。イラガの場合に Sibley & Lehninger の方法を用いたにも拘わらず 7.5 という至適が得られたのは何故か，又この値が本当に正しいものか



第8図 アルドラーゼ活性に対する pH の影響
○： Tris 緩衝液、●： Glycine 緩衝液

は，今後詳しく調べてみなければ分らない。

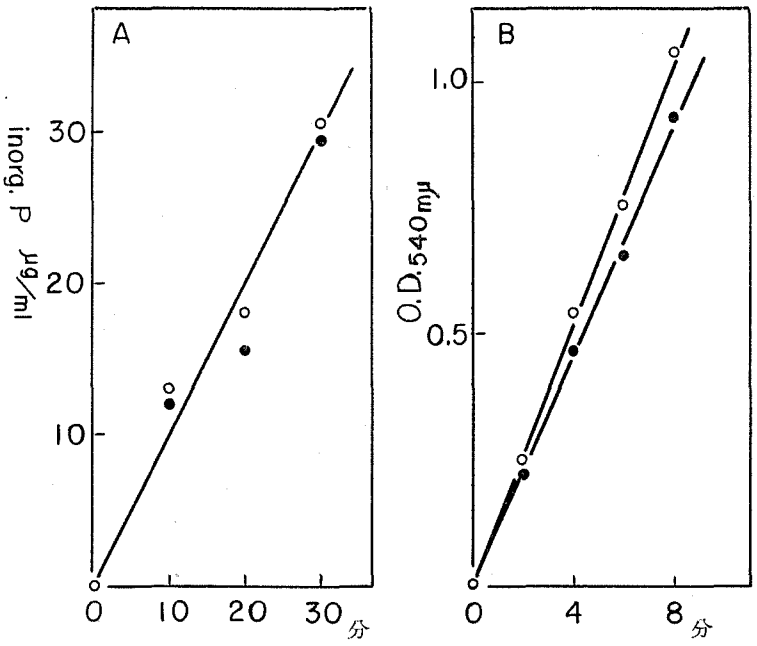
次に酵素活性に対する温度の影響を見ると(第9図)，フォスフォリラーゼの場合と異なって，30°C附近に明らかな折れ曲りが生ずる。これら2つの直線から，それぞれ活性化エネルギーを計算すると，30°Cから50°Cまでの温度範囲では7,800 cal，0°Cから30°Cまでの範囲では16,900 calである。前に求めたウサギの血液のアルドラーゼ活性[12]に対する場合には，37°Cから−5.5°Cの温度範囲で，折れ曲りは出来ず，その活性化エネルギーもイラガの場合よりかなり大きく18,000〜21,000 calであった。又至適温度の問題に関し，筋肉ホモジェネートとその結晶アルドラーゼの場合[11]には30〜35°Cにそれが存在していると報告されているが，イラガ及びウサギの血液の場合にはそのような至適温度の存在は見られない。これは酵素液中に共存する蛋白その他の保護物質の効果によるのかも知れないが，精製した酵素が得られるまでは明らかではない。



第9図　アルドラーゼ活性に対する温度の影響

3) イラガ前蛹と蛹との酵素活性の比較

20°Cの恒温に移されたイラガ前蛹が蛹になった時，こうして得られた蛹とそれまで−5°Cで保存されていた前蛹とから酵素液を調製して，フォスフォリラーゼとアルドラーゼ活性をそれぞれ比較してみた。第10図に示したように，蛹の方に少しその活性の低下が見られるが，殆んど両活性の間に違いがないと言ってよい結果である。このことから，両酵素共，蛹で起る次に述べるような凍結による死と何の関係もないことが明らかである。それは，酵素液調製の際前蛹も蛹も−20°Cで数時間凍結しているにも拘わらず，−5°C，2分間の凍結でも死んでしまう蛹でも−20°Cの凍結で生存し得る前蛹でも[1]，その酵素活性に差が認められないからで



第10図 前蛹と蛹のフォスフォリラーゼ及びアルドラーゼ活性
A： フォスフォリラーゼ活性， B： アルドラーゼ活性
○： 前蛹， ●： 蛹

ある。

IV. 摘 要

イラガ越冬前蛹と蛹にフォスフォリラーゼ及びアルドラーゼ活性の存在を認め，それら酵素の幾つかの性質について調べた。

フォスフォリラーゼ活性の G-1-P に対する K_m の値は約 1.12×10^{-2} M， その至適 pH は 6.6，活性化エネルギーは 0°C から 35°C までの温度範囲で約 16,000 cal であった。又 A-5-P はこの酵素活性，特に一度硫安で沈澱させた酵素液の活性を著しく増大させた。

アルドラーゼ活性の HDP に対する K_m の値は約 1.5×10^{-3} M， 至適 pH は 7.5 であった。この酵素活性の場合， Arrhenius plot は 30°C 附近に折れ曲りを生じ，その活性化エネルギーは 0°C から 30°C までの温度範囲では 16,900 cal，30°C から 50°C の範囲では 7,800 cal であった。

前蛹と蛹のフォスフォリラーゼ及びアルドラーゼ活性の間には殆んど差が認められなかった。

終りに，御校閲くださった朝比奈英三教授に感謝する。

文 献

1) 竹原一郎・朝比奈英三 1950 越冬昆虫の体内にあるグリセリンについて．低温科学，生物篇，***17***，159–163.

2) 竹原一郎・朝比奈英三 1960 イラガ越冬前蛹のグリセリン(予報). 低温科学, 生物篇, **18**, 51-56.
3) 竹原一郎・朝比奈英三 1960 昆虫の耐凍性とグリセリン. 低温科学, 生物篇, **18**, 57-65.
4) 竹原一郎・朝比奈英三 1961 イラガ越冬前蛹のグリセリン I. グリセリン生成, 休眠, 耐凍性に及ぼす環境温度の影響. 低温科学, 生物篇, **19**, 29-36.
5) Chino, H. 1958 Carbohydrate metabolism in the diapause egg of the silworm, *Bombyx mori*. II. Conversion of glycogen into sorbitol and glycerol during diapause. J. Ins. Physiol., **2**, 1-12.
6) Wyatt, G. R. and Meyer, W. L. 1959 The chemistry of insect hemolymph. III. Glycerol. J. Gen. Physiol., **42**, 1005-1011.
7) Sibley, J. A. and Lehninger, A. L. 1949 Determination of aldolase in animal tissue. J. Biol. Chem., **177**, 859-872.
8) Dixon, M. 1958 Enzymes. Longmans, Green and Co., London.
9) Cori, C. F., Cori, G. T. and Green, A. A. 1943 Crystalline muscle phosphorylase. III. Kinetics. J. Biol. Chem., **151**, 39-55.
10) Long, C. (ed.) 1961 Biochemist's Handbook. E & F. N. Spon Ltd., London.
11) Dounce, A. L., Barnett, S. R., and Beyer, B. G. 1950 Further studies on the kinetics and determination of aldolase. J. Biol. Chem. **185**, 769-780.
12) 竹原一郎 1958 血液の解糖作用に及ぼす温度の影響. 低温科学, 生物篇, **16**, 77-82.

Résumé

Phosphorylase and aldolase activity were found in the overwintering prepupa as well as the pupa of a slug caterpiller, *Monema flavescens*. The present paper describes several properties of these enzymes.

With phosphorylase, the K_m value for G-1-P was ca. 1.12×10^{-2} M. Optimum pH was near 6.6. The Arrhenius plot was linear within the temperature range from 0°C to 35°C and activation energy was 16,000 cal. A-5-P remarkably effected enzymatic activity, especially the enzyme solution made from the precipitate of original enzyme solution by $(NH_4)_2SO_4$.

With aldolase, the K_m value for HDP was ca. 1.5×10^{-3} M. Optimum pH was about 7.5. In contrast to phosphorylase, the Arrhenius plot was non-linear and a downward bend was observed at 30°C. Activation energy was ca. 169,000 cal within the temperature range from 0°C to 30°C, while within 30°C to 50°C it was 7,800 cal.

There was found no difference between prepupa and pupa of the slug caterpiller in enzymatic activity of phosphorylase and aldolase.