



Title	凍結融解酵母の磷酸分解に作用する酵素について
Author(s)	僧都, 博; SOUZU, Hiroshi
Citation	低温科学. 生物篇, 24, 49-56
Issue Date	1967-02-10
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/17712
Type	departmental bulletin paper
File Information	24_p49-56.pdf



凍結融解酵母のリン酸分解に作用する酵素について*

僧 都 博

(低温科学研究所 医学部門)

(昭和41年11月受理)

I. 緒 言

酵母細胞には、数多くのリン酸分解酵素が含まれているが、それらは、基質特異性の高いピロリン酸分解酵素¹⁾、あるいは、基質特異性の低いアルカリリン酸分解酵素²⁾などで、それぞれ違った性質を持っている。正常な細胞では、これらの酵素または酵素系がたがいに密接な関連のもとに作用し、細胞のリン酸代謝をすすめているものと考えられる。一方、著者は前報において、凍結融解等の作用が細胞にくわえられると、特定の酵素の作用だけが活潑になり、細胞に蓄積されたリン酸化合物の異常な分解流出がおこることを報告した。更に、細胞の凍結融解の結果分解されて流出するリン酸化合物はポリリン酸であることを示し、この分解にはポリリン酸分解酵素が作用しているものと推定した³⁾。しかし、細胞内には多様なリン酸分解酵素が存在するうゑに、これらの実験にもちいられた酵素液も多数の酵素の混合物と考えられるので、ポリリン酸分解酵素以外のリン酸分解酵素が、この反応に関与している可能性を否定することはできなかつた。

酵母細胞に含まれる多くのリン酸分解酵素のうちでも、アルカリリン酸分解酵素は、細胞内におけるその作用についてもよく知られていないうゑに、比較的基質特異性のひくいことがわかっており、更に先報における実験の結果から、著者の使用した酵母細胞ではこの酵素の活性がかなり高いことが推察された⁴⁾。これらのことから、多くの酵素のうちで、特に細胞の凍結融解によるリン酸分解に、アルカリリン酸分解酵素が関与している可能性が強いとおもわれた。そこでこのたびは、ポリリン酸分解酵素とアルカリリン酸分解酵素について、pH 活性曲線、熱変性及び弗素イオンによる活性の障害等の性質をしらべ、それと凍結融解酵母からのリン酸流出反応の性質とを比較することによって、リン酸流出に対するこれら酵素の関与についてしらべたので報告したい。

II. 材料並びに方法

1. 材 料

前回同様市販のパン酵母(日甜イースト)を脱イオン水で3度洗って使用した。

* 北海道大学低温科学研究所業績 第814号

2. 方 法

酵素活性の測定： 酵素液の抽出は上記の酵母浮遊液から前報³⁾にしたがっておこなった。ポリリン酸分解酵素の活性は、前報³⁾にしたがって抽出精製したポリリン酸のうち、0.7 M KCl 溶出劃分を基質として使用し、前報の方法にならって測定した。アルカリリン酸分解酵素の活性は、市販の para-nitrophenyl phosphate (以下 PNPP と略記) を基質として、酵素液との反応ののちにリン酸の分解によって生じた para-nitrophenol の量を測定して決定した⁵⁾。この実験に使用した反応混液の組成は次の通りであった。総量 2 ml 中、0.5 M acetate 又は tris buffer, 0.2 ml; 0.1 M MgCl₂, 0.2 ml; 酵素液, 0.1 ml; 0.01 M PNPP, 0.5 ml。この混液を 30°C 10 分間反応させたのち 0.75 ml の 5% トリクロル酢酸を加えて、生じた沈澱を遠沈で除いてから、1 N NaOH 2 ml を加え para-nitrophenol の黄色を 400 m μ において分光光度計で測定した。ピロリン酸分解酵素の活性は Na-pyrophosphate を基質として、ポリリン酸分解酵素の活性測定と同様にして測定した。

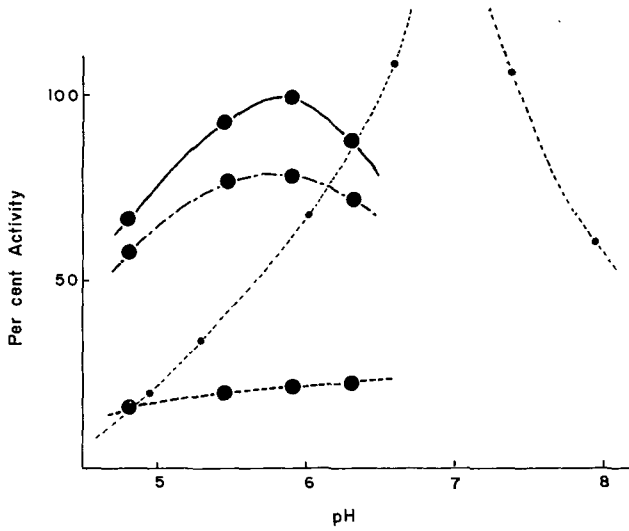
試料の熱処理： 酵母細胞の脱イオン水浮遊液、または酵母から抽出、硫酸劃分の後十分に透析した酵素貯蔵液を、それぞれ 3 ml 宛小試験管にとり、適当な温度にたもった湯浴中で 60 秒間、または 60°C で 20 乃至 60 秒間熱し直ちに氷水中で冷却した。酵素反応を調べるための pH 及び酵素濃度の調整は熱処理後におこなった。

凍結融解酵母中の酵素活性の測定： 細胞濃度の調整、熱処理等必要な前処理ののちに所定の pH に調整した酵母細胞浮遊液一定量を径 1.5 cm の試験管にとり、必要に応じて所定量の NaF を加え、総量 1 ml として、液体窒素中に浸して凍結した。これを約 1 分後に 30°C の恒温槽に移し融解後引き続きその温度で反応させた。試料を恒温槽に移してから正確に 15 分後にこれに 0.5 ml の 5% トリクロル酢酸を加えて反応をとめ、細胞を遠沈で除いてから、上清中に遊離したオルトリン酸を Fiske-Subbarow の方法で測定した。

III. 結 果

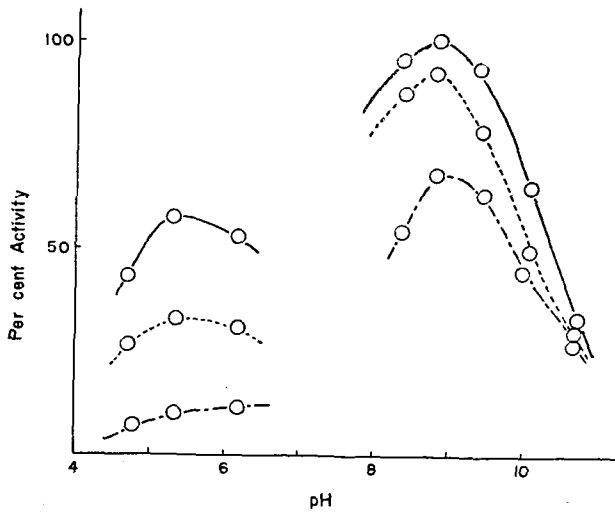
1. 熱変性及び阻害剤による酵素活性の変化

前報でのべたように、機械的に破碎した酵母細胞から抽出し、硫酸劃分で集めた酵素液を、ポリリン酸を基質として反応させると、そのリン酸分解の活性極大は pH 6 附近に存在する^{3,4)}。一方同じ酵素液で PNPP を基質としてその分解反応を見ると、pH 8.8 附近に第 1 の活性極大が見られ、同時に、pH 5.5 附近に第 2 の活性極大の存在することが知られる。これらの活性が同一の酵素作用によるものか否かをたしかめるために、酵素の熱処理に対する安定性及び弗素イオンによる阻害の程度が、これら三つの活性点でどのように異なるかを調べて見た。第 1 図に示すように、ポリリン酸分解に対する酵素の活性は 60°C 40 秒間の熱処理によって約 80% が失われるが、 6.5×10^{-3} M の NaF による阻害は約 20% であった。なおこの酵素の活性は、0°C 保存では 2~3 日以内に失われるが -25°C の凍結状態では 1 カ月以上保存しても安定であることが知られた。一方 PNPP を基質としたときの反応については、同じく 60°C 40 秒間の熱処理によって、pH 8.8 における活性の約 10%、pH 5.5 における活性の約 50% が失われ



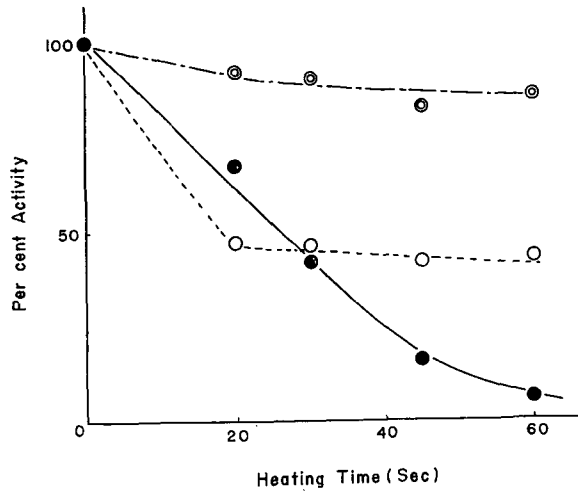
第1図 酵素のピロリン酸分解活性と熱変性及び NaF 阻害によるピロリン酸分解活性の変化。反応条件は本文参照

——, 未処理対照; - - - - , 6.5×10^{-3} M NaF 添加
 ·····, 60°C 40 秒熱処理酵素; ·····●····, 未処理酵素のピロリン酸分解活性と pH の関係。(使用酵素液はピロリン酸分解反応の場合の 1/150 量)



第2図 酵素の熱変性及び NaF 阻害による PNPP 分解活性の変化。反応条件は本文参照

——, 未処理対照; - - - - , 6.5×10^{-3} M NaF 添加
 ·····, 60°C 40 秒熱処理酵素



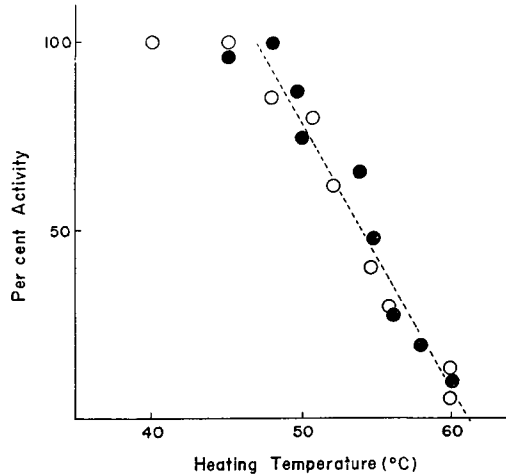
第3図 酵素の熱処理時間と活性との関係。処理温度 60°C。
 処理後の反応条件は本文参照
 ○, 基質 PNPP pH 8.8; ○, 基質 PNPP pH 6.1;
 ●, 基質ポリリン酸 pH 6.1

ることが知られた。また同じ反応の 6.5×10^{-3} M NaF の存在による阻害は、pH 8.8 では約 30 %、pH 5.5 では約 80 % であって、同じ条件のもとでの活性低下の程度は熱変性、NaF による阻害の両方ともに、pH 5.5 における反応の方が pH 8.8 における場合より大であった (第 2 図)。第 1, 2 図の比較からわかるように、ポリリン酸を基質としたとき、60°C 40 秒間の熱処理による酵素活性の低下が 6.5×10^{-3} M NaF の阻害によるものよりはるかに大きいものに対して、PNPP を基質とする反応では、同じ条件のもとで逆の関係になり、NaF の阻害による活性低下が熱変性による場合より大きい。酵素の熱変性の様子を更に詳細に知るために、酵素液の熱処理時間とこれら酵素の失活との関係を調べて見た。あらかじめ 60°C で 20 秒から 60 秒までの間で時間を変えて熱処理をした酵素試料を、ポリリン酸を基質として pH 6.1 で反応させた場合には、処理時間の増加につれて活性の低下は大となり、60 秒間の処理で酵素はほとんど完全に失活している。一方、同様に処理した試料を、PNPP を基質として同じく pH 6.1 で反応させたものでは、活性は最初の 20 秒間で急速に低下しているが、その後 60 秒までの処理時間ではもはや変化していないことが知られる。これを同じく PNPP を基質として pH 8.8 で反応させた場合には、60 秒間の処理によっても活性の低下は極めて僅かである (第 3 図)。第 1, 2 図に示された結果及びこの実験結果から、この抽出液中の、PNPP を分解する酵素は、ポリリン酸分解酵素とはまったく異なる性質を持つものであることがわかった。更に、PNPP を分解する酵素についても、その熱処理及び弗素イオンに対する反応のしかたから考えて、pH 5.5 における活性と pH 8.8 における活性は別の酵素の作用によってもたらされるものと推定される。なおこの抽出酵素液には、ピロリン酸分解酵素も高い活性で含まれていることが知られたが (第 1 図)、これは、この酵素液におけるピロリン酸分解の速度が、ポリリン酸を基質とした場合に比して

200倍程度も高く、その反応の至適pHが7付近であること及び0°C近辺での保存による活性低下の速度が極めて低い等の点で、上記の三つの活性点における酵素の性質とはあきらかに異なっている。

2. 酵素の性質と凍結融解酵母からの燐流出との関係

酵母細胞の凍結融解によっておこるポリリン酸の分解流出が、酵母細胞内に含まれるポリリン酸分解酵素の作用によるものであるならば³⁾、凍結融解細胞におけるポリリン酸分解に関する現象は、抽出されたポリリン酸分解酵素の性質と一致するはずである。このことをたしかめるために、40°Cから60°Cの間でいろいろの温度で60秒間熱処理した酵素のポリリン酸分解活性と、同様に熱処理した酵母細胞を凍結融解したときの細胞内におけるポリリン酸分解活性とを比較してみた。結果は第4図に示されているように、抽出された酵素の活性は、45°Cの熱処理ではまったく影響を受けないが、処理温度の上昇とともに急激な低下を示し、50°Cで25%、60°Cでは完全に失活することが知られる。一方、酵母細胞からのリン酸流出反応についても、50°Cの熱処理では22%、60°Cでは100%の活性低下が見られ、熱変性に対する抽出酵素及び酵母細胞におけるポリリン酸分解の挙動は完全な一致を示している。凍結融解酵母におけるポリリン酸の分解はまた弗素イオンによっても阻害される。この場合、反応の阻害はNaF濃度 1×10^{-3} M程度から始まり 6.5×10^{-3} Mでは30%の阻害が見られる。抽出酵素液中でも、ポリリン酸分解酵素は同じようにNaF濃度 1×10^{-3} M程度から阻害効果が見られるので、弗素イオンによるポリリン酸分解活性の阻害の始まる濃度は凍結融解酵母内部及び抽出酵素の間でよく一致する。



第4図 酵素及び凍結融解酵母によるポリリン酸分解の活性と熱処理温度との関係。反応条件は本文参照

○, 凍結融解酵母; ●, ポリリン酸分解酵素

IV. 考 察

酵母細胞に含まれる多くのリン酸分解酵素のうちで、凍結融解細胞内でのポリリン酸分解に関与する酵素は、ポリリン酸分解酵素のみであることが、この実験で明らかにされた。先に著者は、凍結融解細胞でのポリリン酸分解反応におけるpH活性曲線が、抽出された酵素によるポリリン酸分解反応のpH活性曲線と一致することから、このリン酸の分解は、ポリリン酸分解酵素の作用によるものであろうと推定した。このたびは、この推定を確かめる意味で、凍結融解によっておこる細胞からのポリリン酸分解流出の性状を、抽出された酵素液中でのいろ

いろな酵素の性質と比較してみた。実験は主として、酵素の熱変性による失活、弗素イオンによる活性の阻害、の二つについておこなわれたが、この二つの点について、凍結融解細胞内での反応は抽出された酵素液中でのポリリン酸分解反応の性質とよく一致することを見出したものである。この酵素液の、種々の基質に対して示す活性のうち、ポリリン酸を基質として反応をしたときの pH 6 付近における活性については、それが熱処理に対して極めて不安定であること、逆に弗素イオンの存在による活性阻害に対しては比較的抵抗性が強いこと、などの点で PNPP を基質としたときの酵素活性の性質とは全く異なっており、この活性がポリリン酸分解酵素独自のものであることはほぼ確実であろう。更にこの反応の至適 pH が 6 付近にあり⁶⁾、凍結融解酵母からのリン酸流出反応の至適 pH と一致することとも考え合わせて、前報^{3,4)}における推定の正しかったことが証明されたものと思われる。一方、PNPP を基質としたときの pH 8.8 付近における活性は、他の報告との比較^{2,7,8)} からも、アルカリリン酸分解酵素のものと考えて間違いなであろう。しかし、抽出された酵素試料によっておこるポリリン酸の分解が、アルカリリン酸分解酵素の活性点である pH 8.8 付近では殆んどおこらないこととも考え合わせて、この酵素は、細胞の凍結融解によっておこるポリリン酸の分解には関与しないものと思われる。アルカリリン酸分解酵素の存在と凍結融解細胞でのこの酵素の活性との関係については、Tonino 等²⁾ がすでに報告しており、この酵素が著者の使用した酵母中にも存在することは、先の実験⁴⁾ の結果からも推察されていた。凍結融解酵母及びプロトプラストから pH 8.8 付近において流出するリン酸⁴⁾ は、ポリリン酸以外のリン酸化合物から、アルカリリン酸分解酵素の作用によって分解され流出するものであろう。しかし、通常細胞内においてこの酵素が果している役割についての知見がごく少ないことから、その基質になっているリン酸化合物がどのようなものであるかはわかっていない。つぎに PNPP を基質としたときの pH 5.5 付近における活性は、それが熱処理に対しては、アルカリリン酸分解酵素より不安定であるが、ポリリン酸分解酵素よりは安定であり、弗素イオンによる阻害に対しては、アルカリ、ポリ、両リン酸分解酵素のいずれよりも抵抗性が低い等のことから、これら両者とは別の酵素による作用であろうと思われる。また熱処理に対するその特異的な失活の様子から考えて(第3図)、この点で二つ或いはそれ以上の酵素が作用している可能性もあるが、今の所それらの酵素についての知見は何も得られていない。しかしこの酵素の活性が酵母細胞内部での通常の pH 域に近い所にあることから考えて、この酵素が細胞の凍結融解に際してなんらかの作用をすることは考えられるので、この酵素の性質を調べるのが、今後おこなわれるべき酵母細胞の凍結障害の研究に有用である可能性はかなり高いであろうと思われる。

抽出された酵素液には、ピロリン酸分解酵素が非常に高い活性で含まれており、このことは凍結融解酵母細胞中で、ピロリン酸の分解もおきているであろうことを示している。しかし、ピロリン酸分解酵素の活性の強さにもかかわらず、凍結融解酵母細胞からのリン酸流出反応の至適 pH が 6 付近にあって、ピロリン酸分解酵素の至適 pH である 7 付近において⁹⁾ 必ずしも最高ではないことから、著者の実験に使用した細胞にはピロリン酸の含量は意外に低いものと考えられる。

摘 要

酵母細胞から抽出した酵素液について、ポリリン酸、PNPPを基質として酵素のpH活性曲線、熱変性及び弗素イオンによる阻害に対する抵抗性を調べてつぎの知見を得た。

1. ポリリン酸を基質としたときの酵素の至適pHは6付近にあり、この点における活性は60°Cの熱処理によって急激に低下するが、 10^{-3} M程度の弗素イオンによる阻害の程度は低い。

2. PNPPを基質としたときのリン酸分解反応は、pH 8.8付近及びpH 5.5付近に夫々第1、第2の活性極大を示す。第1の活性は、60°Cの熱変性に対して安定であるが、 10^{-3} M弗素イオンによってかなり強く阻害される。第2の活性は、同じ熱処理によって、ポリリン酸分解作用及びpH 8.8における活性の中間程度に失活し、 10^{-3} M弗素イオンによる阻害はこれら両者のいずれよりもはるかに大である。従ってこの二つの反応はポリリン酸分解酵素の反応とは別のものと考えられる。

3. 凍結融解酵母細胞からのリン酸流出反応は熱に対する安定性、弗素イオンによる阻害、及びpH活性曲線の三点についてポリリン酸分解酵素の性質とよく一致する。

以上の事実から、細胞の凍結融解によって流出するリン酸は、ポリリン酸分解酵素の作用によって生じたものであることが結論された。

おわりに、御校閲下さった根井教授に感謝する。

文 献

- 1) Kunitz, M. 1952 Crystalline inorganic pyrophosphatase isolated from baker's yeast. *J. Gen. Physiol.*, **35**, 423-450.
- 2) Tonino, G. J. M. and Steyn-Parvé, E. P. 1963 Localization of some phosphatases in yeast. *Biochim. Biophys. Acta*, **67**, 453-469.
- 3) 僧都 博 1964 酵母細胞に於ける凍結障害. 凍結融解による磷酸化合物分解の機構. 低温科学, 生物篇, **22**, 109-118.
- 4) 僧都 博 1965 酵母細胞に於ける凍結障害. 凍結融解による酵素活性発現の機構. 低温科学, 生物篇, **23**, 86-96.
- 5) Bessey, O. A. and Love, R. H. 1952 Preparation and measurement of the purity of the phosphatase reagent, disodium p-nitrophenyl phosphate. *J. Biol. Chem.*, **196**, 175-178.
- 6) McGilvery, R. W. 1961 Polyphosphatases. In *Biochemists' Handbook* (C. Long, ed.), E. and F. N. Spon Ltd., London, 252-253 pp.
- 7) Morton, R. K. 1956 The kinetics of hydrolysis of phenyl phosphate by alkaline phosphatases. *Biochem. J.*, **65**, 674-682.
- 8) Ross, M. H., Ely, J. O. and Archer, J. G. 1951 Alkaline phosphatase activity and pH optima. *J. Biol. Chem.*, **192**, 561-568.
- 9) Bailey, K. and Webb, E. C. 1944 Purification and properties of yeast pyrophosphatase. *Biochem. J.*, **38**, 394-398.

Summary

The character of some phosphatases extracted from yeast cells was investigated together with their behaviors with reference to decomposition of phosphate compounds.

The optimal activity of the enzyme on polyphosphate decomposition was at pH 6.1. It was distinctly decreased by heating at 60°C, but only showed slight decrease by an addition of 10^{-3} M NaF. Enzyme activity on the hydrolysis of p-nitrophenyl phosphate (PNPP) showed two optimal points at pH 8.8 and 5.5. There was no change in activity at pH 8.8 by heating at 60°C for 60 seconds, but the activity was diminished by more than 40% by 10^{-3} M NaF. The enzyme activity at pH 5.5 was decreased to 50% by heating and also decreased to less than 10% by NaF. From these data, it was considered that the three types of enzymes, contained in the yeast extract, have different influences on the decomposition of phosphate.

A comparison between the character of these extracts and the behavior in regard to the decomposition of polyphosphate caused by freeze-thawing of yeast cells demonstrated that the behavior of enzyme activity, shown in polyphosphate decomposition was quite similar in both specimens.

These results suggest that the decomposition of polyphosphate in frozen-thawed yeast cells may be attributed to the action of polyphosphatase but not to that of alkaline phosphatase or others.