



Title	酵母細胞から抽出したポリリン酸の重合度及び重合形態
Author(s)	僧都, 博; SOUZU, Hiroshi
Citation	低温科学. 生物篇, 25, 119-125
Issue Date	1967-12-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/17726
Type	departmental bulletin paper
File Information	25_p119-125.pdf



酵母細胞から抽出したポリリン酸の 重合度及び重合形態*

僧 都 博
(低温科学研究所 医学部門)
(昭和 42 年 9 月受理)

I. 結 言

酵母細胞に存在するポリリン酸が、その生理的意義においても、また細胞の凍結による障害の機構を知るための手段としても重要な意味をもつものであることがこれまでの一連の実験によって明らかにされてきた。

前報^{1,2)}では正常な細胞内におけるこのリン酸の位置が細胞膜の外側に限定されること、及び細胞の凍結融解の結果生ずる細胞膜の透過性の変化によって、膜をへだてて内側に存在するポリリン酸分解酵素の作用が活潑になり、その結果このリン酸の分解がおこって流出することが確かめられた。また細胞に蓄積されたポリリン酸は核酸合成に使用されること、及び凍結融解処理後の細胞ではこのリンの流出が直接細胞増殖のおくれの原因となっていることも明らかにされている³⁾。このようにポリリン酸の細胞の代謝上における役割や、細胞の障害と関連のある状態変化についてはかなり詳細に知られてきたが、正常な細胞内におけるその性状についてはまだよく知られていない。凍結融解細胞において見られるポリリン酸の分解流出と細胞の障害との間の関係を追求するためには、正常な細胞内におけるこのリン酸の代謝の経路や蓄積された状態での分子形態等を知る必要があると考えられる。細胞内部に存在する状態を抽出後まで保持することが出来るか否かについてはまだ多くの残された問題があるが、このたびは現在までに使用してきた方法で抽出したポリリン酸について、その分子の形状及び重合数を測定してみた。

II. 材料と方法

ポリリン酸の抽出及び分割：蒸留水でよく洗ったパン酵母（日甜イースト）を 4% Glucose 及び 0.2% K_2HPO_4 を含む溶液中に 10~20 mg/ml の濃度に浮遊し 30°C で 4 時間培養した。この材料から Ogur and Rosen⁴⁾の方法をもちいて前報⁵⁾にしたがいがらポリリン酸を抽出した。次いで常法にしたがいエーテルでトリクロル酢酸を除き、更にエーテルをとばしてしまつた抽出液を Dowex-1 カラムに吸着した。使用したカラムの bed volume は径 1.5 cm, 高さ 15 cm で、吸着したリン酸はカラムを軽く水で流したのちに KCl 溶液で溶出した。溶出には 0.02 N

* 北海道大学低温科学研究所業績 第 852 号

HCl 600 ml 中で KCl 濃度を 0.1 から 0.8 M まで連続的に変化させる方法及び、KCl 濃度 0.4 M までに溶出される部分を除いたのちに同じく 600 ml の溶出液の KCl 濃度を 0.4 から 0.68 M まで連続的に変化させる方法の二法をもちいた。溶出液は 6 ml 宛に分取し、その各々の磷酸量は 1 N HCl 中で 100°C 7 分間の加水分解の後に Fiske and SubbaRaw の方法で測定した。

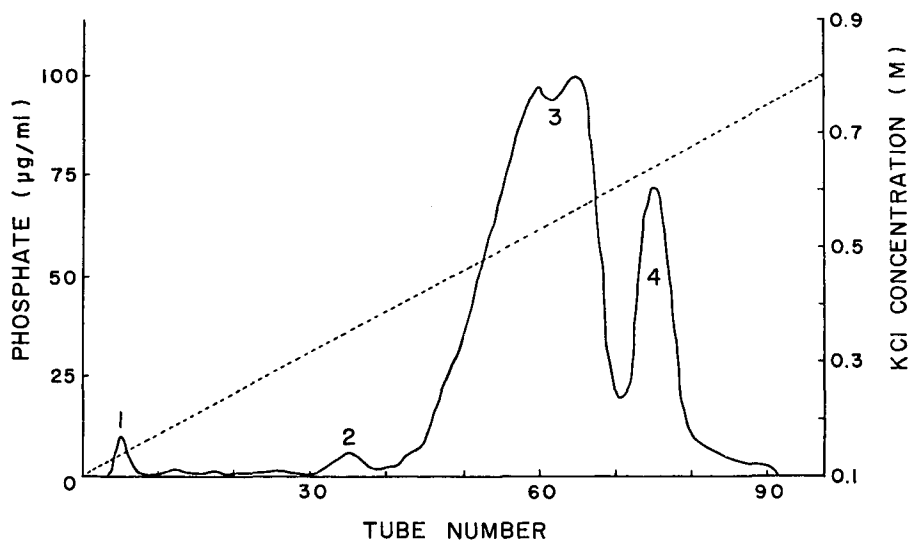
ポリ磷酸の脱イオン及び加水分解： 溶出した試料から適当な部分をえらんで (第 2 図参照) 5 つの劃分を取り、その各々を冷蒸溜水に 92 時間以上透析した。これらの試料について径 1.5 cm, 高さ 15 cm の Dowex-50 カラムを通過する方法でマトリックイオンを除き、磷酸をアルカリで滴定した。ポリ磷酸の加水分解処理としては、透析及び Dowex-50 によるイオン交換処理をほどこした試料の一定量を試験管に測り取り、時々蒸溜水を補給しながら 100°C 湯浴中で 4 時間以上加熱した。

磷酸の滴定： 完全に脱炭酸した 0.005 N NaOH 溶液を滴定液とし、第 1 中和点にはメチルオレンジを、第 2 中和点にはフェノールフタレインをそれぞれ指示薬として用いた。試料溶液は磷酸濃度に応じて 2.5~5.0 ml を用い、1 つの試料について要した滴定液量は 1~4 ml であった。

III. 結 果

1. カラムクロマトグラフィによるポリ磷酸の分離

イオン交換樹脂に吸着したポリ磷酸は、一般にその重合度の高いもの程高濃度の塩で溶出されることが知られている⁶⁾。酵母から抽出したポリ磷酸を Dowex-1 カラムに吸着させ、溶出液の KCl 濃度を 0.1 から 0.8 M まで連続的に上昇させて分離すると、ごく大まかに 4 つのグル

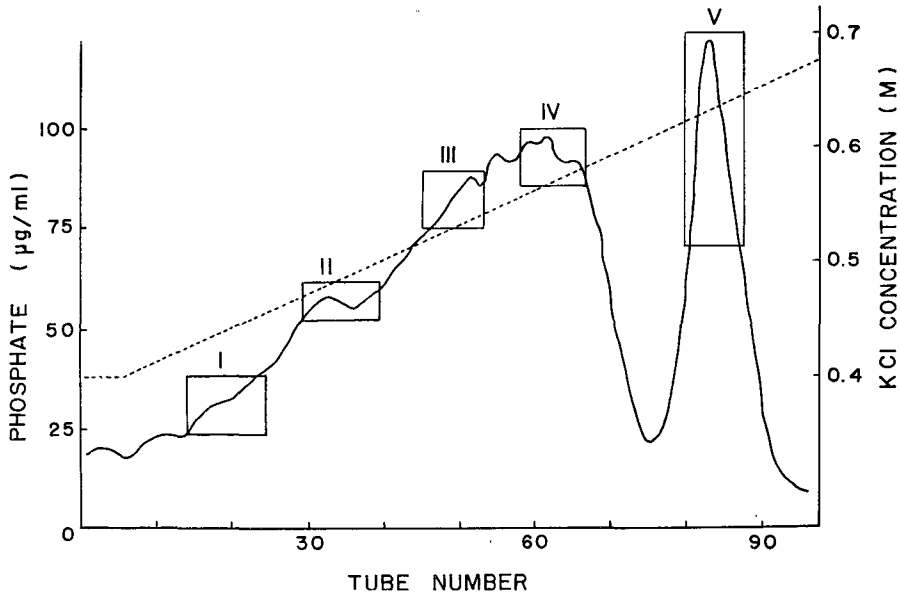


第 1 図 ポリ磷酸の溶出曲線 I

カラム bed volume, 径 1.5 cm × 高さ 15 cm

溶出液: 0.02 N HCl 中で KCl 0.1~0.8 M, 総量 600 ml, 温度 5°C

試験管 1 本の液量: 6 ml. —, 磷酸量; -----, KCl 濃度



第2図 ポリリン酸の溶出曲線 II

カラム bed volume, 径 1.5 cm × 高さ 15 cm
 溶出液: 0.02 N HCl 中で KCl 0.4~0.68 M, 総量 600 ml. 温度 5°C.
 試験管 1 本の液量: 6 ml. —, リン酸量; -----, KCl 濃度

ープが得られた (第1図)。これら 4 グループの溶出される KCl 濃度は、第1グループ 0.1 M, 第2グループ 0.3 M, 第3グループ 0.5 M, そして最後のグループは 0.65 M 近辺となっており、吸着したリンは KCl 濃度 0.7 M 以下で全部溶出された。このうち第3グループでは溶出曲線の先端が二つの小さなピークに分れていて、更に分割される可能性が考えられたので、0.4 M KCl 濃度以上で溶出される二つのグループについて、溶出液の塩濃度勾配をゆるめて、より細かい分割を試みた。結果は第2図に示されるように、KCl 0.65 M 付近で溶出されるグループは単一のピークを示したが、0.5 M 付近で溶出されるグループは不規則な階段状の溶出曲線を示し、いくつかのグループの重なり合ったもののようにみられた。

2. 末端基滴定による構造の決定

前節にのべた溶出曲線の形から、酵母抽出のポリリン酸は異なる重合度のものの混合物と考えられた。そこでたとえば第2図に示すように、それぞれのピークの代表的な値を示すとおもわれる点で試料を集め、透析及びイオン交換処理によってメタリックイオンを除いたものについて、NaOH でその末端基を滴定し重合度を測定した。またリン酸の重合形式が直鎖であるか、あるいは側鎖を持った構造であるかを知る目的で、同じ試料を 100°C で 4 時間加熱して加水分解したのちに同じようにして滴定した。第1表に、第2図に示した試料についての滴定値を、左側に加水分解しないもの値、右側に加水分解後の値として示した。加水分解しないもの試料では、第1中和点迄に要する滴定値はリン酸量に比例するが、第1中和点迄に要する滴定値

第1表 未処理及び加水分解試料の滴定値と平均重合数

試料番号*	溶出液塩濃度 平均値 (M)	滴 定 値 (ml/5 ml 試料)				
		未 処 理			加 水 分 解**	
		第1中和点	第2中和点	重 合 数	第1中和点	第2中和点
I	0.44	0.62	0.76	9	0.60	1.22
II	0.49	1.24	1.45	12	1.24	2.49
III	0.53	2.01	2.34	12	2.01	4.04
IV	0.57	2.61	2.95	15	2.61	5.25
V	0.63	2.50	2.78	18	2.50	5.03

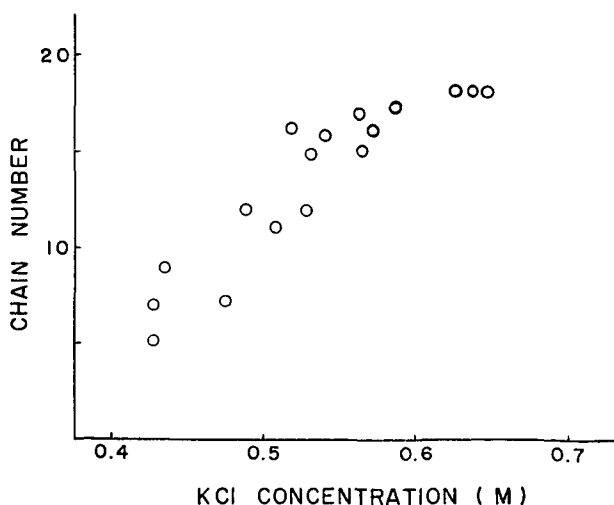
滴定液: 0.005 N NaOH 指示薬: 第1中和点, メチルオレンジ;
第2中和点, フェノールフタレイン

* 第2図参照 ** 蒸留水中, 100°C 4時間

に対する第2中和点迄の滴定値の比率は高濃度の KCl で溶出されるもの程低くなっており、これは重合度の高いもの程高濃度の塩で溶出されることを示している。また第1中和点迄に要する滴定値は、試料の加水分解によっては全く増加が見られないが、このことはここに使用されたポリリン酸が直鎖の重合物のみからなり側鎖を全くもっていないことを示している。加水分解した試料ではどの試料についても第2中和点迄に要する滴定値は常に第1中和点迄に要する値に対して誤差の範囲内で丁度2倍となっている。この値は加水分解の時間を増してもこれ以上増加することはないので、この試料中のリン酸は全部オルトリン酸になっているとおもわれる。またこれらのことは同時に、滴定試料のメタリックイオンも完全に除かれていることを示すものである。

3. 溶出液の KCl 濃度と重合度との関係

第3図にいくつかの材料について得られたリン酸の重合数と溶出液の KCl 濃度との関係を示す。この結果から知られるように 0.5 M KCl 付近で溶出される割合はリン酸重合数が平均7から16位までのものの混合からなっており、KCl 濃度の増加につれて平均重合数も大きくなっている。KCl 濃度 0.65 M 付近で溶出されるグループはリン酸重合数が平均18程度のものからなっており、第1図における第3及び第4グループの間では重合数の大きな開きは見られなかった。溶出液の KCl 濃度とポリ



第3図 溶出塩濃度とポリリン酸平均重合数との関係
滴定条件は第1表参照

リン酸の重合度との間の関係は、吸着したリン酸の量、及び溶出液の KCl 濃度勾配等によって多少の影響を受けるものの、基本的には一定濃度の KCl で溶出されるポリリン酸は一定の重合数をもったものと考えて差しつかえないとおもわれた。

IV. 考 察

酵母細胞から抽出したポリリン酸の分割クロマトグラフィはすでに前報においてもこころみられ⁵⁾、溶出液の KCl 濃度を段階的に高める実験の結果それぞれ 0.1, 0.3, 0.5 及び 0.7 M KCl で溶出される4つのグループからなることが明らかになっている。今回は溶出液の KCl 濃度を連続的に変化させることによって更にこまかいグループに分離することを期待したのであるが、基本的には前報と一致した結果が得られたにとどまった。しかし、KCl 濃度 0.5 M 付近で溶出されるグループが重合度の異なる多数のポリリン酸の混合物と考えられる結果が得られたことは、今後ポリリン酸の細胞内における状態や、これの抽出操作中における状態変化の可能性等を考える上に重要な参考になるとおもわれる。このたびの実験結果では、前報の結果⁵⁾に比較して 0.1 及び 0.3 M KCl で溶出される劃分の比率が非常に低かった。0.1 M KCl で溶出される劃分ではそのほとんどがオルトリン酸なので⁵⁾、このものが多く含まれている理由としては、ポリリン酸抽出の前処理として行なう低分子リン酸の抽出が不完全なために細胞に残留したものがポリリン酸劃分に抽出されてくること、及びポリリン酸抽出操作中及び抽出後酸を除くまでの間における酸分解によることの二つが考えられる。このうち後者はポリリン酸自体の状態変化を含んでいる点特に注意しなければならぬことであろう。Kornberg⁷⁾は酵母からトリポリリン酸及びトリメタリン酸を抽出分離したが、これらが細胞内でもそのままの状態で存在したのかどうかは疑わしいとのべている。著者等の研究室においても、抽出したポリリン酸が強酸との長時間の接触によって低温でも除々にではあるが分解されることが知られているので、このたびの試料においても 0.1 及び 0.3 M KCl で溶出される部分や 0.5 M KCl で溶出されるグループの低分子のものには抽出処理の際に低分子化されたものも含まれるのかもしれない。しかし、これらを含む試料のうち大部分は重合数 20 前後のものであると考えて間違いのないであろう。Langen⁸⁾等の詳細な実験によると、酵母細胞には大きく分けて4つの異なる重合数のポリリン酸グループがあり、そのうち重合数 20 程度のものももっとも多量に存在する。細胞の種類、培養条件や抽出法等が必ずしも同じでないにしても、著者の得たポリリン酸がこのグループに相当するものと考えられることは一応妥当であろう。

ポリリン酸の重合度の測定には、高分子のものでは比粘度の測定、拡散恒数、超遠心法などが適用されるが、比較的重合度の低いものについては末端基滴定法が利用される⁹⁾。この方法では重合数と同時にある程度その構造も判定できるところに利点がある。すなわち、この滴定において第1中和点をもとめる滴定値が、加水分解の前及び後の試料の間で一致していることは、このリン酸が完全な直鎖か又は環状化合物からなり側鎖は持たないことの証拠となる。もし側鎖を持った構造ならば、リン酸分子中の PO_4 グループのうちに3ケの O 原子が共有されているものが必ずあることになるが、そのような結合は他の PO_4 グループに比べてより不安定な

ために最初に加水分解を受ける。その結果、第1中和点の滴定値は加水分解試料においては加水分解前のものより高く出るはずである。次にこの磷酸分子が完全な環状化合物よりなるものでないことは、第1中和点の滴定値に比して第2中和点迄に要する滴定値が高くなることから明らかである。完全な環状化合物では第1中和点だけがもとめられ、第2中和点に相当するものは存在しない。またかりに環状化合物がこの試料中に混在していたとしても、トリメタ磷酸の酵母磷酸中に含まれる比率は極めて小さいこと⁷⁾及びテトラメタ磷酸以上の環状化合物が実在する可能性は非常にひくいこと¹⁰⁾などから考えて、その量は極めて少ないものと考えられる。

V. 摘 要

酵母細胞から抽出したポリ磷酸について、その重合数及び重合形態をしらべた。抽出した試料についてイオン交換クロマトグラフィをおこなうと、低濃度の KCl で溶出される二つの少量のグループと、次いでより高濃度の塩で溶出される二つの大量のグループとが得られた。あとの二つの大量のグループについて、異なる KCl 濃度で溶出されるいくつかの部分で試料をとって末端基滴定をおこなった結果、これらのグループは平均重合数が7乃至18の直鎖磷酸重合物からなっていて、高い塩濃度で溶出されるものほど平均重合数の大きいものであることがわかった。また一定の塩濃度では一定重合数のものが溶出される傾向が見られた。

おわりに、御校閲をいただいた根井教授に感謝する。

文 献

- 1) 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**, 85-96.
- 2) Souzu, H. 1967 Location of polyphosphate and polyphosphatase in yeast cells and damage to the protoplasmic membrane of the cell by freeze-thawing. *Arch. Biochem. Biophys.*, **120**, 344-351.
- 3) 僧都 博・荒木 忠 1962 酵母細胞の核酸合成過程における凍結障害. 低温科学, 生物篇, **20**, 69-79.
- 4) Ogur, M. and Rosen, G. 1950 The nucleic acids of plant tissues. I. The extraction and estimation of desoxypentose nucleic acid and pentose nucleic acid. *Arch. Biochem.*, **25**, 262-276.
- 5) 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.
- 6) Matsuhashi, M. 1956 Über die chromatographische Trennung von kondensierten Phosphaten an Anionenaustauscherharzen. *J. Biochem.*, **44**, 65-67.
- 7) Kornberg, S. R. 1956 Tripolyphosphate and trimetaphosphate in yeast extract. *J. Biol. Chem.*, **218**, 23-31.
- 8) Langen, P., Liss, E. and Lohmann, K. 1962 Art, Bildung und Umsatz der Polyphosphate der Hefe. *Colloq. Intern. Centre Natl. Rech. Sci.*, (Paris) **106**, 603-612.
- 9) Van Wazer, J. R. and Holst, K. A. 1950 Structure and properties of the condensed phosphates. I. Some general considerations about phosphoric acids. *J. Amer. Chem. Soc.*, **72**, 639-644.
- 10) Schmidt, G. 1951 The biochemistry of inorganic pyrophosphates and metaphosphates. In *Phosphorus Metabolism, I* (W. D. McElroy and B. Glass, eds.), Johns Hopkins Press, Baltimore, 443-476 pp.

Summary

Polyphosphates extracted from yeast cells were separated into two fractions of small quantity and two large quantity fractions on ion exchange chromatography, in which the salt concentration of the eluant was increased linearly. These small and large quantity fractions were eluted with lower and higher salt concentrations, respectively. It was demonstrated by titration that the two large quantity components consisted of several straight chain polymers of different molecular weight: One of them, which was eluted with lower salt concentration and showed a broad elution curve, indicated an average chain length ranging from 7 to 16, in accordance with the increase of salt concentration. The other consisted of only about 18 chain polymers and showed a narrow peak of elution curve. Larger polymers were eluted with the increase in salt concentration.