



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	植物の低温生化学的研究 I : ポプラの Ribose 5-phosphate の代謝反応系について
Author(s)	匂坂, 勝之助; SAGISAKA, Shonosuke
Citation	低温科学. 生物篇, 26, 33-43
Issue Date	1968-11-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/17736
Type	departmental bulletin paper
File Information	26_p33-43.pdf



植物の低温生化学的研究 I*

ポプラの Ribose 5-phosphate の代謝反応系について

匂坂勝之助

(低温科学研究所 植物凍害科学部門)

(昭和43年9月受理)

I. 緒言

生活環のある時期に低温度環境を通過する生物では、その時点で低温度に特徴的な生化学反応が進行していると思われる。実際これらの反応は蛋白質^{1,2)}、糖質³⁾および脂質代謝⁴⁾などの全生化学領域にわたっていて、生理学的立場からも解明が待たれているものと思われる。

一般に成育の適温下にある植物では環境条件の変化に対応して速かに物質代謝の型式を調整出来ると考えられる。これは植物界においても比較的未分化の微生物で特に顕著である⁵⁾。しかしながら、物質代謝の活性の変化あるいは代謝型式の変化は、その生物個体の生活環上の物質代謝の経過に従って方向づけられる⁶⁾。この場合、基本的には物質の分解合成を通じて特定の機能の恒常性を保つ反応機構の存在と同時に、反復する生活環のある時点で必要とされる機能を周期的に形成する作用機構の存在を必要とすると考えられる。そして一生活環は非常に多くの物質代謝過程の段階を経て終了するものであるから、細胞はそれらの段階においては、その化学的成分による影響をうけて物理的にも多様性を示すものと思われる。究極的には生活環の主要な段階の物質代謝の基本的型式とその制御機構が解明され、それらを通じて細胞の化学的、物理的性質が理解し得るものと考えられる。

低温下に進行する生化学反応も個体の維持および肥大、または個体数の増加という生活環の一段階の反応として重要なものと思われるがその意義は明らかでない。この時期は現象論的にみて一つの物質代謝の体制が徐々に停止して次の体制に移行する転換期の段階と思われる。

このような観点から、植物細胞を実体的に理解するための一助に資する目的で物質代謝に関する研究を開始した。本報は Ribose 5-phosphate を用いて検討した結果について述べたものである。夏期と冬期のポプラにおける Ribose 5-phosphate 代謝活性は大きな差が見られ、かつ、活性の消失と出現に季節的周期性のあることが判明した。

なお、本文では次の略号を使用した。

R-5-P, リボース5-リン酸; TPN, トリホスホピリジンニュークレオチド; TPP, サイアミンピロリン酸; G-6-P, グルコース6-リン酸; F-6-P, フラクトース6-リン酸; FDP, フラクトース

* 北海道大学低温科学研究所業績 第917号

1, 6-ジリン酸; G-3-P, グリセルアルデヒド 3-リン酸; E-4-P, エリスロース 4-リン酸; G-1, 6-P, グルコース 1, 6-ジリン酸; S-7-P, セドヘプテュロース 7-リン酸; Ru-5-P, リュブロース 5-リン酸; Xu-5-P, ザイリュロース 5-リン酸; PEP, ホスホエノールピルビン酸。

II. 材料と方法

材料: 酵素液としては, *Populus gelrica* の幹の靱皮部を磨碎して得た抽出液を主として用いた。

冬期間に採集したものは -10°C に保存して実験に供し, 夏期の材料は使用の都度これを採集した。粗酵素液は通常, 1g 生重量の靱皮部を細片とし, これに同重量の海砂と 1.4 ml の冷緩衝液 (トリス塩酸, pH 7.6, 0.05 M) を加えて約 10 分間磨碎したのちガーゼで搾り濾過して調整した。抽出液は直ちに上記緩衝液に 5 時間, 0°C で透析して用いた。

また, 超遠心処理を行なったものは, 処理後上清のみを透析して実験に供した。

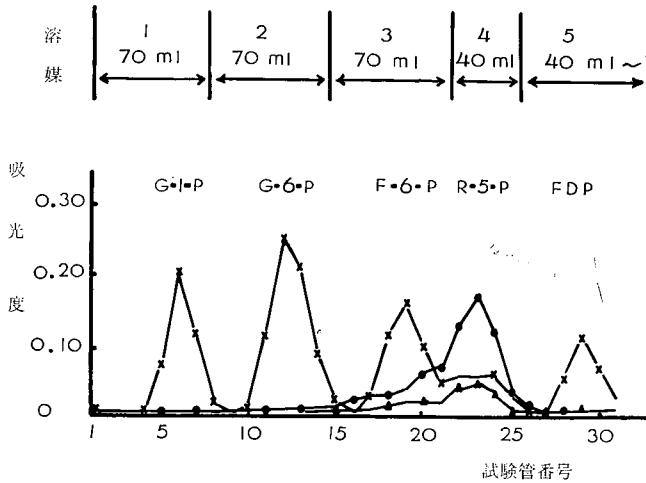
主な試薬の発売元は次の通りである。NBC; R-5-P, TPN, TPP, Sigma Chem. Co.; G-6-P, F-6-P, FDP, Boehringer u. Soehne GmbH; G-6-P 脱水素酵素, ホスホヘキソアイソメレース, ホスホグルコミューテース, アルドレース, G-3-P, 第一化学薬品株式会社; 牛血清蛋白質。E-4-P は四錯酸鉛を用いる方法⁷⁾ によって G-6-P から合成し, G-1, 6-P は酵母を用いて蔗糖より調整した⁸⁾。

方法: 1. 反応条件。反応溶液の組成は次の通りで, 12°C , および 0°C の温度で反応を行なった。反応液: トリス塩酸緩衝液, pH 7.6, $36 \mu\text{mole}$, R-5-P (K 塩) $16.6 \mu\text{mole}$ および酵素液 (2~5 mg 蛋白質), 全量 1.0 ml。所定時間の経過後に等量のアルコールを加えて反応を停止した。

2. 糖リン酸エステルの分析方法。反応液の遠心上清 (3,000 回転, 5 分) に 2N アンモニア溶液を加えて pH 8 付近とした後 Dowex 1-X 4 (Cl 型) カラム ($5 \times 0.7 \text{ cm}$, 1.9 cm^3) に移してリン酸エステル類を吸着させた。

次いでカラムをその約 20 倍量の水で洗滌したのち次のような溶媒で順次流出し試験管に 10 ml ずつ捕集した。この溶媒系は Khym らの方法⁹⁾ を部分的に改変したものである。

① 70 ml: 0.05 M NH_4Cl , 0.01 M $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$, 0.00002 M EDTA ② 70 ml: 0.05 M NH_4Cl , 0.0025 N NH_4OH , 0.001 M $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$, 0.00002 M EDTA ③ 70 ml: 0.05 M NH_4Cl , 0.0025 N NH_4OH , 0.00001 M $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$, 0.00002 M EDTA ④ 40 ml: 0.05 M NH_4Cl ⑤ 40 ml: 0.05 N NH_4Cl , 0.02 N HCl。これらの溶離液は各試験管毎に, オルシノール試薬により R-5-P, Xu-5-P と S-7-P, アンスロン試薬により FDP, F-6-P, G-6-P, G-1-P をそれぞれ定量した。標準試薬によるクロマトグラムを第 1 図に示した。発色の条件は次の通りである。オルシノール反応: 試料 0.5 ml に 0.1% 塩化鉄の濃塩酸溶液 1.0 ml と 6% オルシノールのアルコール溶液 0.07 ml を加え, 100°C , 20 分間加熱後水を加え全量を 5 ml とし O.D. $670 \text{ m}\mu$ (R-5-P, Xu-5-P) と O.D. $580 \text{ m}\mu$ (S-7-P) で測定した^{10,11)}。アンスロン反応: 溶離液 1.0 ml に 0.2% アンスロンの濃硫酸溶液 2 ml を氷冷下に混合し, 90°C , 16 分間加温後 O.D. $625 \text{ m}\mu$ にて比色定量



第 1 図 Dowex 1 クロマトグラフィーによる糖磷酸エステルの分離
 溶離液を 10 ml ずつ捕集し、各試験管毎にこの一定量 (オルシノール反応 0.5 ml, アンスロン反応 1.0 ml) をとって発色した。—x—, アンスロン反応, 625 m μ で測定; —●—, オルシノール反応, 670 m μ で測定; —▲—, オルシノール反応, 580 m μ で測定。詳細は本文の方法を参照

した¹⁰⁾。

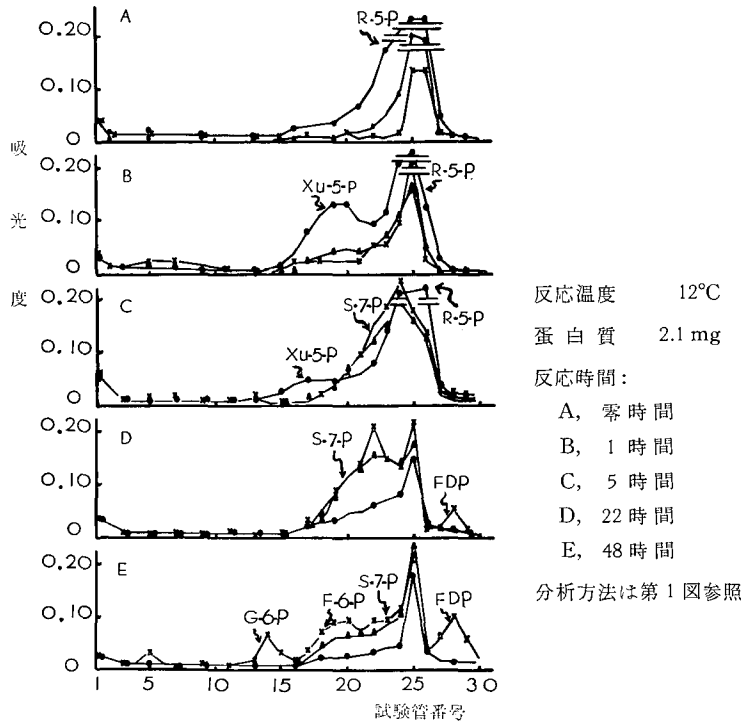
R-5-P から生成した糖磷酸エステル類の同定は上記のクロマトグラフィーにおける挙動と共に、酵素の基質特異性を利用して行った。G-6-P, F-6-P, G-1-P 同定の組成は次の通りである。a) G-6-P の同定: TPN 0.3 μ mole, MgCl₂ 30 μ mole, トリス塩酸緩衝液 pH 7.6, 150 μ mole, G-6-P 脱水素酵素 0.4 μ g および検液 2.5 ml に水を加えて全量 3 ml。b) F-6-P の同定: 上記 a) にホスホヘキソズアイソメラーゼを 1.6 μ g 加えたもの。c) G-1-P の同定: a) にホスホグルコミューターゼ 0.6 μ g, G-1,6-P 0.05 μ mole を加えたもの。

3. 蛋白質の定量。植物蛋白質の定量は動物、および微生物からのものに比べて非常に困難で迅速に行える確実な方法がない。本実験では次の方法により蛋白質を定量した。即ち、酵素液 0.1~0.2 ml に水を加えて全量を 0.95 ml とし、60% 過塩素酸 0.05 ml を加えて氷水中に 30 分間放置して蛋白質を沈澱させた。遠心後、沈澱をエーテル-アルコール (6:4 v/v) で洗浄してから減圧下に溶媒を除去した。次いで、6 N HCl 1.0 ml を加えて 24 時間 105°C で加水分解し、アミノ酸として定量した¹²⁾。標準曲線には牛血清アルブミンを同様な条件で加水分解したものをを用いた。

III. 結 果

1. 冬期間のポプラ靱皮部の有する R-5-P 代謝活性

最初に明らかにしたいことは冬期間における靱皮部の代謝活性の特徴的反応であり、更にそれが生活環に位置づけされる性質のものかどうかということである。低温度で失活する酵素群は別として、反応速度は温度の函数であるから、先ず活性を確めるために比較的高い温度と



第2図 冬のポプラ幹皮部の酵素液による R-5-P 代謝反応の時間的推移

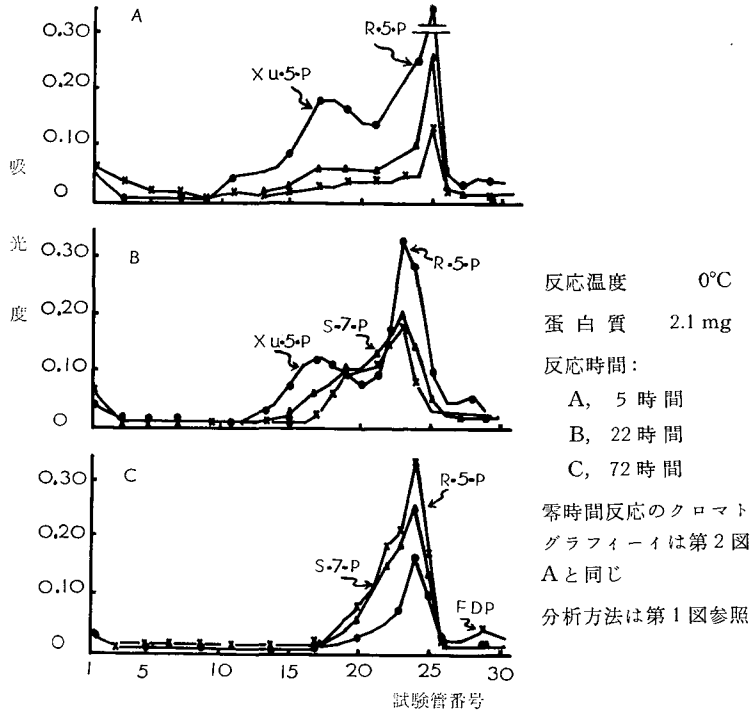
して 12°C における R-5-P の時間的反應経過をしらべた。結果を第2図に示した。ここで R-5-P の消失に伴ない Xu-5-P が出現し反応が進むにつれて S-7-P の蓄積が見られた。反應経過は、五炭糖回路の代謝型式を通ることが明らかである。つまり第2図のクロマトグラムにみられる S-7-P 生成までの経過は次の3反應段階を示している。

- ① $R-5-P \rightleftharpoons Ru-5-P$, ホスホリボースアイソメラーゼ
- ② $Ru-5-P \rightleftharpoons Xu-5-P$, ホスホケトペントースエピメラーゼ
- ③ $R-5-P + Xu-5-P \rightleftharpoons S-7-P + G-3-P$, トランスケトラーゼ

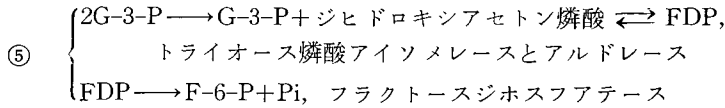
更に、FDP、F-6-P、G-6-P の生成も明瞭であり、R-5-P から出発して主要な糖リン酸エステルの生成の活性が認められた。なお、 $G-6-P \rightleftharpoons G-1-P$ の反應の平衡は G-6-P に片寄っているため G-1-P の生成は G-6-P に比べて非常に少ない。12°C で行なった反應と同様な経過は 0°C においてもみられた。0°C における反應経過のクロマトグラムを第3図に示した。図のように Xu-5-P の生成が明瞭に認められ、トランスケトラーゼ作用としての S-7-P 蓄積も明らかであった。12°C と 0°C における差異は、FDP、F-6-P、G-6-P の生成量にみられ、図から明らかなように FDP の生成量はわずかであり、F-6-P はほとんど見出されなかった。

ところで FDP と F-6-P の生成には次の二通りの生成反應が考えられる。

- ④ $S-7-P + G-3-P \rightleftharpoons F-6-P + E-4-P$, トランスアルドラーゼ



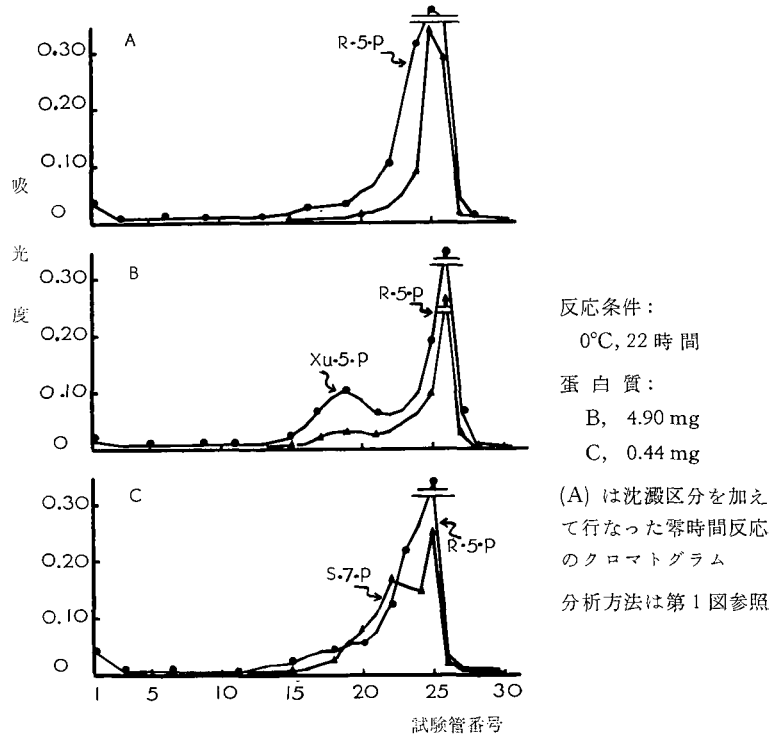
第 3 図 冬のポプラ幹韌皮部の酵素液による R-5-P 代謝反応の時間的推移



④の反応経過の場合は F-6-P と同量の E-4-P 生成が認められるはずであるが、12°C で反応を行なった場合でも、そのような成績は得られなかった。従ってポプラ韌皮部の主要な反応経路は ⑤ と思われる。低温環境下では、このアルドラーゼとこれに次ぐ反応段階であるフラクトースジホスファターゼが大きな活性の変化を示す可能性が予想される。また、特定の組織のトランスアルドラーゼの活性の変動が生活環上で起こるならば、どのような条件下で出現し、消失するかということは重要な問題と思われる。なお、実験条件下で非酵素的な R-5-P の変化は起らなかった。

2. 超遠心分離後の代謝活性について

酵素蛋白質は細胞の構造にたく結合しているものと複合酵素系あるいは単一酵素蛋白質として容易に溶離する状態のものに大別出来る。そこでポプラ韌皮部中の R-5-P 代謝活性は超遠心処理 (105,000 g, 60 分) によりどのような挙動を示すかをしらべた。第 4 図に示したように S-7-P 生成の活性は超遠心上清区分に集まり、沈澱区分には Xu-5-P 生成の活性が認められた。遠心上清区分で S-7-P の生成が認められることは、この区分にトランスケトラーゼ

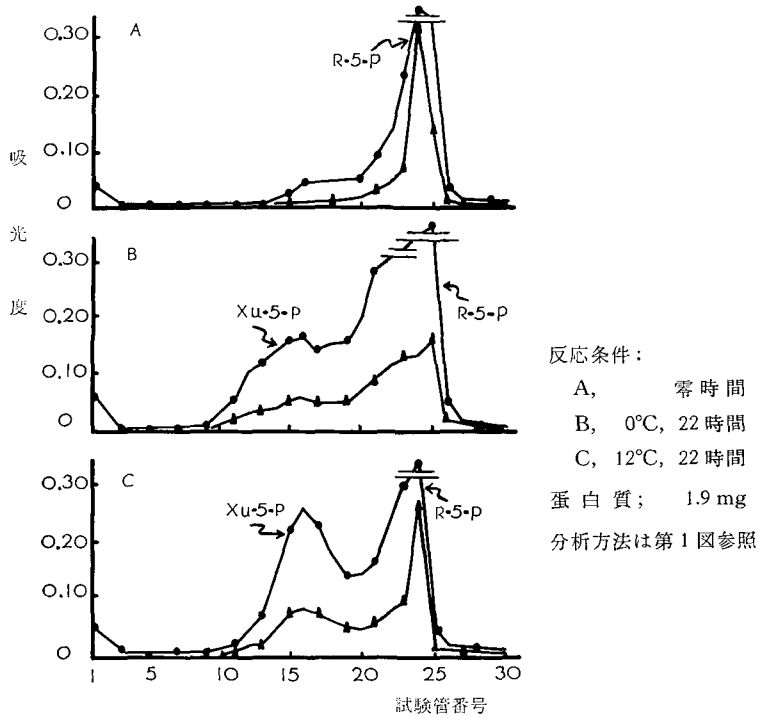


第 4 図 超遠心上清および沈澱区分における R-5-P の代謝活性
冬のポプラの幹皮部から得た酵素液を遠心 (105,000 g, 60 分) した沈澱区分 (B) と上清区分 (C) による反応

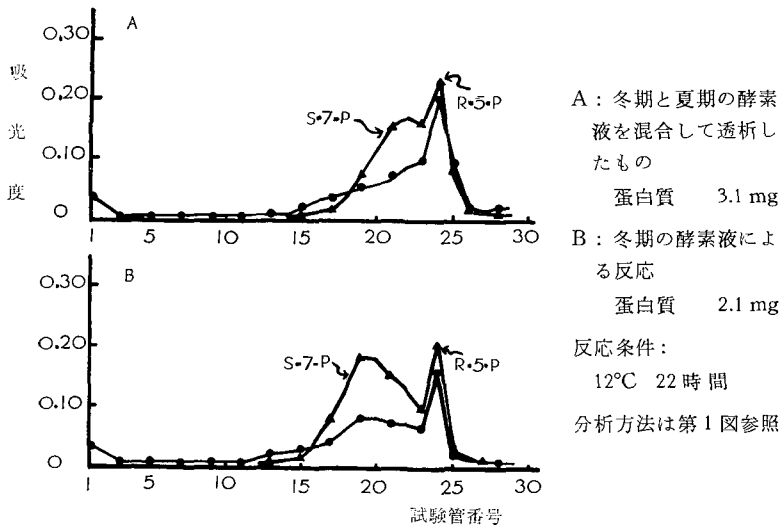
と共にホスホリボースアイソメラーゼとホスホケトペントースエピメラーゼの存在を意味している。また、これら五炭糖異性化酵素などのかかなりの活性部分が構造と結合していることは明らかであって興味深い問題である。このように構造体と結合している酵素 (群) の機能はその部分の細胞のある時期における機能と関係していると思われるので、構造体に結合している酵素 (群) の作用を解明することも大切な問題と思われる。

3. 夏期のポプラ皮部における R-5-P の代謝

冬期と夏期のポプラ皮部における代謝活性を比較することによって、生活環上で一定部位の組織が示す代謝型式の差異を知る可能性に加えて、分化した体制を有する生物における“物質代謝上の体制の分化”を知り得ることが予想された。夏期のポプラ皮部による成績を第 5 図に示した。図から明らかな如く、夏期においては皮部の R-5-P 代謝に関する限り、冬期における超遠心沈澱区分と同様に、ホスホリボースアイソメラーゼとホスホケトペントースエピメラーゼ活性が顕著であった。しかし、種々試みた結果、この時期の試料に S-7-P 生成の活性が認められなかった。このことは茎の生長点についても全く同様であって、この時期における茎の代謝系の特徴の一つと思われる。この際、反応液に、還元型グルタチオン、マグネシウムイオンあるいは TPP を添加しても効果がなく S-7-P の生成は認められなかった。



第 5 図 夏のポプラ韌皮部酵素液による R-5-P 代謝生成物の Dowex 1 クロマトグラム



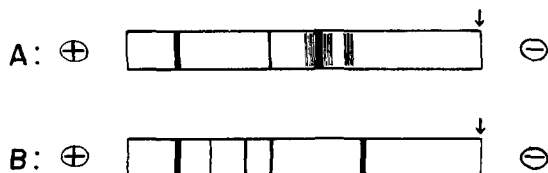
第 6 図 冬期韌皮部酵素液の R-5-P 代謝活性におよぼす夏期韌皮部酵素液の影響

4. 阻害物質の存在について

低分子あるいは高分子の阻害物質により見かけ上酵素活性を示さない場合がある。このような阻害物質の存在の有無を検討する目的で、冬期のポプラの韌皮部と夏期のものからそれぞれ調整した抽出液を直ちに混合し、透析してR-5-Pの代謝活性を調べた。第6図に示した如く、夏期の酵素液添加により、冬期の試料にみられる代謝型式と生成する糖リン酸エステルの量に変化を認め難い。従って、過剰量の阻害物質の存在、あるいは抽出および透析操作中の酵素の変性失活による差異とは考え難い。むしろ生活環上における物質代謝活性の本質的な差をあらわすものと思われる。

5. 蛋白質の電気泳動像について

これまでに述べた実験で、ポプラの韌皮部では冬と夏でR-5-Pの代謝に著しい差のあることが明らかになった。このような差異は特定の代謝系上の極く狭い範囲内でのみ起っている可



第7図 蛋白質の電気泳動像

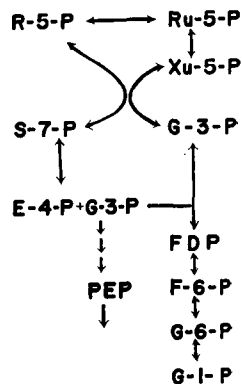
A: 冬期, 蛋白質 0.53 mg, B: 夏期, 蛋白質 0.38 mg。
pH 8.3 ゲルを使用, ゲル 1 本当たり 4 mA 通電。
矢印は分離用ゲルの上端 (試料の原点) を示す

能性と、ほとんどすべての代謝型式が変化する応範囲の変化である二通りが考えられる。この推定を確かめるために蛋白質の電気泳動を行なった。第7図に示した如く、蛋白質泳動像の質的な差は部分的なものではなく、かなり根本的な体制の変化を示すものと思われる。このような知見から冬期と夏期におけるポプラの韌皮部はその機能の上

で少なくとも二つの非常に異なる型式をとっていることが明らかになった。

IV. 考 察

冬期のポプラの韌皮部は、R-5-Pから出発して第8図に示すような反応を接触する活性を有する。反応時間の経過に従って著量のG-6-Pが蓄積してくる。この反応経路上でFDPとF-6-Pの生成に関してトランスアルドラーズの果す役割が明瞭でない。しかし、単一の糖リン酸エステルから出発して主要なほとんどの糖リン酸エステル類を生成し得る能力を有するものと結論されよう。従って共軛する反応系の活性が温度変化によって変り、相対的な反応のレートが異なってきた場合や制御機構との関連で、どのような方向にも反応が進み得るポテンシャルを常に有するものとして特徴づけられる。実際、冬期のポプラ韌皮部のR-5-P代謝のクロマトグラフィーは第2図、あるいは第3図とほとんど同じであった。このことは、夏期の韌皮部にトランスケトラーゼ活性が検出されず、R-5-Pの代謝活性に示されたような夏と冬の違いと



第8図 冬期のポプラ韌皮部におけるR-5-Pの代謝経路

共に重要な点と思われる。

冬期の靱皮部にみられたトランスケトラーゼは夏期に消失し、代ってこの時期には緑葉に活性が顕著であり、冬に至って再び靱皮部に高い酵素活性が出現する極めて明瞭な反復を示す代謝型式である。これは個体全体として機能の分化の状態を示しているように思われる。このような観点から、代謝型式の解明を通じて組織細胞の機能の推移を明らかにし、同時に化学的組成の変化についても理解が深まるものと言えよう。

緑色植物の特徴である光合成反応は葉で行なわれ、糖合成の中心は葉に集中していること、植物細胞の特徴であるキシロース、アラビノースなどの五炭糖が緑葉より茎や根の構成成分に多いこと¹³⁾、夏期靱皮部にはトランスケトラーゼ活性が認められないが、五炭糖異性化系は顕著であること、および蛋白質泳動像に夏と冬でかなりの違いがみられることなどを考慮すると、個体全体としての物質代謝の分化した体制が理解出来る。しかし、冬に至って、靱皮部が、R-5-P 代謝に関する限り、緑葉に似た活性を示すことを理解するのは現状では困難であり、今後の重要な問題の一つと思われる。

更に、体制変化の起りつつある過程では、おそらく非常に多くの物質の出入、あるいは変化があると思われるので細胞の示す多岐にわたる物理的性質との関連が推察される。構成成分の性質と代謝型式の転換期との関連は大きな問題として残っているが、一方、低分子物質の領域では G-3-P, S-7-P, F-6-P, FDP などの蓄積からも推察されるように、glycolipid, phospholipid などの三炭糖の関与する反応系など植物にとって特異的な糖質の代謝について理解が容易になると思われる。

V. 摘要および結論

1. 冬期のポプラ靱皮部から調整した酵素液は R-5-P を活発に代謝して G-6-P を生成する。G-6-P 生成に至る過程には主要な糖リン酸エステルの生成蓄積が明瞭にみられ、この代謝の活性は夏期の緑葉抽出液に匹敵する程であった。
2. 夏期のポプラ靱皮部には、R-5-P を代謝して G-6-P を形成する酵素が欠如していて、その一つはトランスケトラーゼであることが判明した。夏期の靱皮部には冬期と同様に、五炭糖の異性化反応が強く、この酵素活性はかなりの部分が細胞構造に結びついていることが明らかになった。
3. 蛋白質の電気泳動像から見て夏期と冬期の蛋白質にかなり質的な差があり、R-5-P の代謝活性の差も併せて、冬期と夏期のポプラ靱皮部は基本的に異なる体制を有するものと考えられる。

この研究に際し、実験材料を御恵与下さった北海道立林業試験場の森田健次郎氏に感謝する。

文 献

- 1) Graves, D. J., SeaLook, R. W. and Wang, J. H. 1965 Cold inactivation of glycogen phosphorylase. *Biochem.*, **4**, 290-296.

- 2) Numa, S. and Ringelman, E. 1965 Zur Aufhebung der Citrat-Activierung der Acetyl CoA Carboxylase durch Kälte. *Biochem. Z.*, **343**, 258-268.
- 3) 酒井 昭 1957 木本類の耐凍性の増大と糖類および水溶性蛋白質との関係. 低温科学, 生物篇, **15**, 17-30.
- 4) Fulco, A. J. 1967 The effect of temperature on the formation of Δ^5 -unsaturated fatty acid by Bacilli. *Biochim. Biophys. Acta*, **144**, 701-703.
- 5) 菊地吾郎 1965 クロマトホアの代謝調節. 蛋白質核酸酵素, **10**, 702-708.
- 6) Umberger, H. E. 1965 The control of enzyme action in bacteria. *In Genetic Control of Differentiation, Brookhaven Symposia in Biology*, No. 18, 14-26.
- 7) Ballou, C. E. 1962 Preparation and properties of D-erythrose 4-phosphate. *In Methods in Enzymology* (S. P. Colowick and N. O. Kaplan eds.), Academic Press, New York and London, **6**, 479-484.
- 8) LeLoir, L. F. and Paladini, A. C. 1956 Isolation of Glucose 1, 6-diphosphate. *In Methods in Enzymology* (S. P. Colowick and N. O. Kaplan eds.), Academic Press, New York, **3**, 143-147.
- 9) Benson, A. A. 1957 Sugar phosphates, paper and column chromatography. *In Methods in Enzymology* (S. P. Colowick and N. O. Kaplan eds.), Academic Press, New York, **3**, 110-129.
- 10) Ashwell, G. 1957 Colorimetric analysis of sugars. *In Methods in Enzymology* (S. P. Colowick and N. O. Kaplan eds.), Academic Press, New York, **3**, 73-105.
- 11) Horecker, B. L. 1957 The orcinol reaction for mixtures of pentose and heptulose. *In Methods in Enzymology* (S. P. Colowick and N. O. Kaplan eds.), Academic Press, New York, **3**, 105-107.
- 12) Spies, J. R. 1957 Colorimetric procedures for amino acids. *In Methods in Enzymology* (S. P. Colowick and N. O. Kaplan eds.), Academic Press, New York, **3**, 467-471.

Summary

The present paper is concerned with some properties of cell free preparations from barks of *Populus gelrica*, with particular reference to ribose 5-phosphate metabolism in winter and summer. Cell free preparations prepared from materials sampled in winter are capable of metabolizing ribose 5-phosphate to an extent almost comparable with that of green leaves of *Populus gelrica*, and have been shown to contain enzyme systems necessary for the conversion of ribose 5-phosphate to hexose phosphates. Under circumstances of low temperature, the relative rate by which fructose 6-phosphate is formed from fructose 1, 6-diphosphate may cause the accumulation of the latter phosphate, glyceraldehyde 3-phosphate and sedoheptulose 7-phosphate. After ultracentrifugation, activities of pentose isomerization were found both in particulate and soluble fractions but no transketolase activity was found in the former fraction in a comparable incubation.

Cell free preparations prepared from samples growing in summer do not contain transketolase and thus are lacking in the activity of metabolizing ribose 5-phosphate to sedoheptulose 7-phosphate. It has not been possible to demonstrate any action of inhibitor (s) for the reaction. Isomerization reactions of pentose phosphate, however, do occur in enzyme preparations sampled in summer.

Polyacrylamide disc gel electrophoresis of the two enzyme solutions renders it likely

that separate enzyme systems of metabolism or different organizations of tissue are involved. At present no suggestions can be made as to the origin and metabolic fates of transketolase covering a year in the cells of the bark. However, these evidences make it reasonable certain that cellular organizations in winter and summer are different. It may well be possible to conclude that the differences in cellular organization in all stages of growth might be a factor influencing the difference in the intrinsic metabolic activity.