



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	植物の低温生化学的研究 II : ポプラのトランスケターゼ活性の変動とこれにともなう磷酸エステル代謝系の体制変化
Author(s)	匂坂, 勝之助; SAGISAKA, Shonosuke
Citation	低温科学. 生物篇, 27, 73-80
Issue Date	1970-02-20
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/17753
Type	departmental bulletin paper
File Information	27_p73-80.pdf



植物の低温生化学的研究 II*

ポプラのトランスケトラーゼ活性の変動とこれに
ともなう磷酸エステル代謝系の体制変化

匂坂勝之助

(低温科学研究所)

(昭和44年9月受理)

I. 緒 言

この報告は低温環境から春期の生育の適温へ移行する時期における物質代謝体制の転換を、とくにトランスケトラーゼ活性を中心として検討を加えたものである。低温環境下で生活しているポプラの韌皮部では夏期に比べてトランスケトラーゼ活性の高いことが、この時期における物質代謝上の特徴の一つである¹⁾。トランスケトラーゼは五炭糖磷酸回路系の酵素であるから、この回路の役割を中心として考察を加える必要がある。

五炭糖磷酸回路は植物、微生物、動物など生物界に広く存在する。その役割については、1) 光合成系における炭酸固定反応、2) 五炭糖の合成分解とそのヘキソーズへの転化、3) 芳香核を有するアミノ酸とフェノール系化合物合成の基礎反応、および 4) 細胞内で必要とするTPNHの供給などが従来論じられている。ポプラ韌皮部では、五炭糖磷酸回路の活性が冬期間に強くあらわれ、春期に消失するから、この回路の生物細胞内における生理的役割を理解するための好個の実験材料と思われる。そしてその為には、冬期間の高いトランスケトラーゼ活性が糖代謝反応系で果している生化学的意義を詳しく検討する必要があると思われる。

トランスケトラーゼ活性の変動を通じて、ポプラの冬期間の五炭糖磷酸回路の役割を知るため次の作業仮説をたてた。すなわち、1) 冬期間、貯蔵性の炭水化物が糖類として存在するように制御する機構での役割。2) 春期にポプラの生長点で必要とされるトランスケトラーゼとして、蛋白質の分解を伴わずに利用される可能性。3) 低温環境下で活発になる脂質代謝反応のグリセロール磷酸合成系としての働き。および 4) フェノール系化合物の合成は低温下においても活発に行なわれる。

これらのことを念頭において、まずトランスケトラーゼ、トランスアルドラーゼおよびホスホフラクトキナーゼ活性の変動について実験を行なった。これらの活性の測定は韌皮部と同様に材部についても行なった。それは個体として植物を見る場合に、この両者の生物的活性を知ることが必要と思われたからである。

* 北海道大学低温科学研究所業績 第1005号

本文で使用した略号は次の通りである。F6P, フラクトース 6-リン酸; GA3P, グリセルアルデヒド 3-リン酸; G6P, グルコース 6-リン酸; Xu5P, ザイリュロース 5-リン酸; E4P, エリスロース 4-リン酸; G6PDH, グルコース 6-リン酸脱水素酵素; PHI, ホスホヘキソズイソメラーゼ; GDH, α -グリセロリン酸脱水素酵素; TIM, トライオースリン酸イソメラーゼ; CySH, システイン; 6PGLU, 6-ホスホグルコン酸; PFK, ホスホフラクトキナーゼ。

II. 材料と方法

材料: 靱皮部からの酵素液の調製は前報¹⁾と同様であるが、磨砕は5分間とし、透析は30分間0°Cで攪拌しつつ行ない、この間3回緩衝液を取りかえた。材部からの酵素液の調製は材部から靱皮部と髓を完全に除去(暫時放置すると靱皮部と髓部は褐変するからこれを完全に除去した)してからその1.0gをとって細片とし、これに1.0gの海砂と2.0mlの冷緩衝液(トリス塩酸, pH 7.6, 0.05 M)を加えて5分間磨砕したのちガーゼで濾過し、上記のように透析して用いた。

おもな試薬の購入先は前報¹⁾の通りである。G6P-U-¹⁴Cはグルコース-U-¹⁴Cからクレアチンリン酸によるリン酸化により調製した²⁾。比放射能は 6.9×10^6 cpm/ μ moleである。

方法: 1. トランスクエターゼおよびトランスアルドラーゼ活性。F6Pの生成(トランスクエターゼ)およびGA3Pの生成(トランスアルドラーゼ)に基づく方法³⁾に従い測定を行なった。

2. ホスホヘキソイソメラーゼ活性。F6P 5 μ mole, トリス塩酸緩衝液 150 μ mole, pH 7.6, 粗酵素液 0.05~0.10 mlを加えて25°Cで0分, 5分, および10分間反応を行ない, 生成したG6Pの定量は, F6Pの定量系からPHIを除いて行なった。

3. ホスホフラクトキナーゼ活性。反応液組成は次の通りで, 20°Cで1時間30分反応を行なった。反応液: G6P-U-¹⁴C 0.21 μ mole (1.38×10^6 cpm), UTP 0.50 μ mole, MgCl₂ 1.20 μ mole, トリス塩酸緩衝液 5 μ mole, pH 7.4, 靱皮部あるいは材部抽出液 0.07 ml, 全容 0.125 ml。反応停止は冷水に試験管を移したのち, 直ちに0.4 mlの0.1 N過塩素酸を加えて行ない, 遠心後(3,000 rpm, 5分)その上清を固体のKHCO₃で中和した。沈澱部分は0.4 mlの0.1 N過塩素酸で洗浄し, 遠心後上清を合した。中和した上清区分をアンモニアでpH 8付近としたのち, Dowex 1-X4 (Cl⁻型)カラム(3 cm \times 0.31 cm²)に移してリン酸エステル類を吸着させた。溶出分析の方法は前報¹⁾と同じである。ここでFDP区分に出現する放射能の量からFDPの生成量を求めた。放射能の測定は日本無線医理学研究所製のGM自動放射能測定装置JDC-104Bによった。

4. 蛋白質の定量。前報¹⁾と同様に牛血清アルブミンを標品として, アミノ酸として蛋白質を定量した。

III. 結果

1. トランスクエターゼ活性

第1図に靱皮部のトランスクエターゼ活性について得た結果をまとめた。トランスクエターゼ活性の変動は開芽時期に著しい。すなわち, 5月中旬頃になると靱皮部では非常にわずか

第1表 材部トランスケトラーゼによるF6Pの生成

反応時間 (分)	μmole F6P/mg 蛋白質		
	0	5	10
完全系	0	1.27	2.44
- Xu5P	0	0	0

か或いは全く活性が認められないがこの時新梢の生長点および葉中には既に顕著な活性が見られる。第2図に材部におけるトランスケトラーゼ活性の測定結果を示した。材部におけるトランスケトラーゼ活性は靱皮部と同様に採取した枝により、また同じ枝でも上部と下部で活性に差がある。なお、材部の抽出液においても第1表に示すように、トランスケトラーゼ活性の測定系が有効であることがわかる。C₂ 供与体としてのXu5Pを除くとF6P生成の反応は全く進行しない。第2図からわかるように、材部におけるトランスケトラーゼ活性は年間を通じて変化しないと思われ、これが靱皮部と比較して

根本的に異なる点である。第2の差異は材部における方が約15倍も高い活性を示すことである。一般的にいて、五炭糖磷酸回路の代謝活性は若い細胞、発生初期の組織あるいは活発に働いている器官が活発であるから、ポプラにあっては活性強弱の一般的類型から、材部がこのような生体内での役割を果している可能性が強くなった。

第2表 靱皮部のトランスアルドラーゼ活性

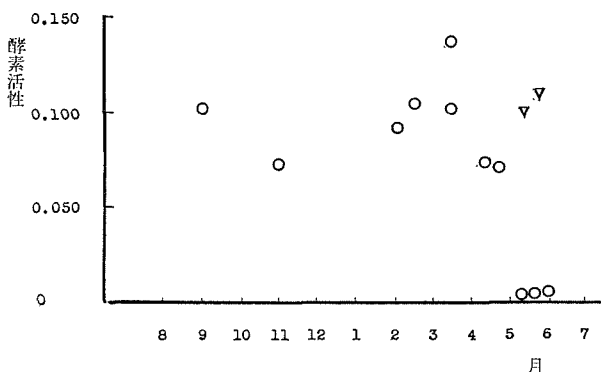
採取月日		活性*
3/11	靱皮部	0
3/12	"	0
5/9	"	0.003
5/12	"	0.012
5/12	新梢	0.048

* μmole DHAP/10分/mg 蛋白質

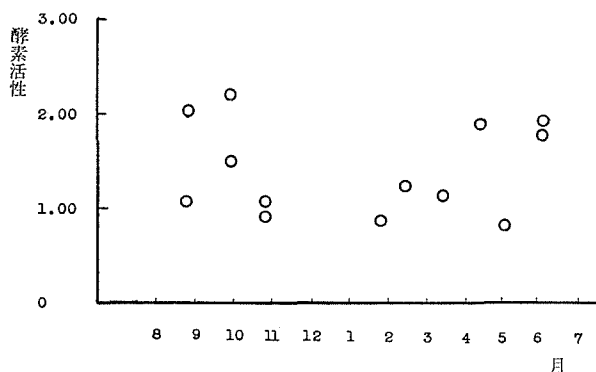
第3表 材部のトランスアルドラーゼ活性

採取月日		活性*
2/10	材部	0.014
4/17	"	0.011
5/12	"	0.053
5/27	"	0.112

* μmole DHAP/10分/mg 蛋白質



第1図 生活相による靱皮部トランスケトラーゼ活性の変動
▽, 新梢の活性; ○, 靱皮部の活性
活性: μmole F6P/10分/mg 蛋白質



第2図 材部のトランスケトラーゼ活性
活性: μmole F6P/10分/mg 蛋白質

2. トランスアルドラーゼ活性

靱皮部のトランスアルドラーゼ活性は非常に弱いので正確な値を得ることはなかなか困難である。例を第2表と第3表に示した。靱皮部のトランスケトラーゼ活性が低下して非常に弱まる頃にトランスアルドラーゼ活性が検出出来るようになる。冬期間の低温下で蛋白質の合成反応は合成反応の時間因子からも進行し難いと思われるので、早春における活性の出現はどのような機構によるのか興味ある問題である。

靱皮部と対象的に、時期によりやや変動があるがトランスアルドラーゼは材部では常に活性が検出される。この点および前記のトランスケトラーゼ活性を考え合せてみると糖代謝系の活性は常に材部の方が高い水準を保持しているものと言えよう。トランスケトラーゼ活性の低下、あるいは消失する時期にトランスアルドラーゼ活性の出現してくることは生長期における五炭糖磷酸回路の酵素活性に適合したものと思われる。

3. ホスホヘキソーズイソメラーゼ活性

糖の合成と分解が解糖系と五炭糖磷酸回路のいずれを通るかは大切な問題であるが、この物質の流量を規定する最大の要因は PHI と G6PDH の活性の差によるものが最も基本的である。G6PDH 活性の測定は阻害物質⁴⁾が存在する為に測定困難なので別の実験⁵⁾で取扱った。一方、第4表に示すように PHI は冬と

春の時期で活性に大きな差が見られない。この酵素活性はかなり強く、しかも細胞内では構成的成分と考えられる。前述の如くこの酵素は解糖系と五炭糖磷酸回路の分岐点の位置で触媒反応をしていて、かつ構成的であるからこの酵素の活性調節は上記の二つの代謝系の相対的流量を決める上にかなりの役を果しているのであろう。

4. ホスホフラクトキナーゼ (PFK) 活性

上記の PHI により触媒される反応の平衡は $\frac{G6P}{F6P} = \frac{65}{35}$ である⁶⁾。従って PHI が完全に作用している場合に磷酸エステル⁷⁾の流量を決めるのは隣接した次の反応段階の PFK である。

第5表 靱皮部と材部の PFK 活性

採取月日	活性* (cpm×10 ⁻³)	
	靱皮部	材部
10/25	0	2,360
1/31	0	—
2/10	239	—
3/11**	—	1,100
4/10	228	—
5/12	124	1,140

* FDP-U-¹⁴C 生成量, cpm×10⁻³/mg 蛋白質/時

** 1967年3月11日採取

第4表 靱皮部の PHI 活性

採取月日	活性
	μmole/mg 蛋白質/10分
2/10	2.0
2/11	1.3
3/11	2.1
3/11	2.1
5/27	1.56
5/27	1.77

この酵素の靱皮部と材部における活性を第5表に示した。靱皮部のトランスアルドラーゼ活性の出現する以前にこの酵素の活性が検出出来るようになる。これはこの時点から解糖系を利用しはじめたことを意味する。この酵素の酵素化学的性質は別に報告する予定であるが、その性質として ATP より UTP との反応の方が FDP の生成が進行しやすい。現在、PFK は糖代謝系上の非常に重要な“Key enzyme”であることから詳しく研究され、ATP、クエン酸で阻害され、AMP、アンモニア、磷酸および G6P で回復⁷⁾することが知られている。ポプラの靱皮部の抽出液にはこの

ような因子とは別の阻害物質がある。この物質の実体はまだ明らかにしていないが、植物ではこの物質により制御をうけている可能性が強いと思われる。PFK は制御関係が複雑であるから、第6表に示した PFK 活性の変化については、細胞内における調節機構の変動として見る方が現時点では妥当のように思われる。すなわち、低温環境下においてもポプラの韌皮部では物質代謝が進行していてトランスアルドラーゼ活性の発現する以前に制御関係に、とくに阻害物質の量的な変化がおこり PFK の活性が検出出来るようになるものと思われる。この阻害物質による調節は材部では行われたいと思われる。

IV. 考 察

ポプラの冬期間の“生活”を理解する目的でトランスケトラーゼ活性を中心として糖代謝系で重要と思われる酵素活性をしらべた。それは、将来、これらの事柄から生理的機能を実体的に理解することが可能と思われるからである。五炭糖および六炭糖磷酸エステルを生体内における流量とその方向はこれらの反応系がすべての代謝反応系への出発点と考えられるので重要な問題である。これまで得た実験事実よりも更に多くの事柄がこの糖代謝系に残っているように思われる。それらのものをすべて理解し、生物の“生活”上の信号を理解することが今後必要である。代謝系を大きく分けると次の様なものがある。1) アミノ酸および蛋白質代謝系。2) グリコーゲンあるいは澱粉の合成と分解系。3) TCA 回路と電子伝達系(膜を含む)。4) 脂質の合成と分解。5) 核酸の構成素材の合成系。および 6) RNA および DNA の合成と再生等。これらの系は生体内では全体として一つの体制にあり、関連して物質が動いているから、糖磷酸エステル系以外で冬期間に特徴的に進行している反応はかなりの数にのぼるものと予想される。代謝系単位の酵素活性の増加あるいは低下から、その時細胞が必要とする物質を通じて生体全体の合成反応の進む方向の理解が容易になると思われる。

これまでに得た知見の中で、最も重要な点はトランスケトラーゼ活性の高い期間にトランスアルドラーゼ活性が検出し難く、PFK 活性も同様の傾向を示すことである。あとで記述するように、トランスケトラーゼ活性の低下の時期に前後して G6PDH の阻害物質が出現して五

第6表 生活相の変化に伴う枝の先端部と基部の蛋白質量の変動(韌皮部)

採取月日	韌皮部	蛋白質*				H ₂ O (%)
		沈澱区分**	a/b	上清区分**	a/b	
3/20	apex	2.32	1.52	0.88	1.0	45.7
	base	1.50		0.88		46.8
4/7	apex	—	—	1.80	2.7	—
	base	—		0.65		—
5/15	apex	1.25	0.86	0.75	2.1	54.3
	base	1.45		0.35		55.0
5/27	apex	1.32	0.86	<0.04		61.1
	base	1.50		<0.02		59.6

* mg 蛋白質/0.10 g 生重量 ** 7×10²×g, 5分 a/b: apex/base

炭糖磷酸回路による糖の代謝を抑え、あるいは制御する機構が働いていることおよび PFK の阻害物質の消長から、冬期間と生育の適温下の期間では磷酸エステルの代謝経路が全く異なるということが言えそうである。

この点は蛋白質量の変化を知るだけでは理解し難いと思われる。靱皮部と材部の蛋白質の消長を見ると蛋白質量の減少から酵素活性の増減は予測出来ないことがわかる(第6表)。蛋白質の消失は春になると徐々に進行し、残存量としては単位重量あたりほとんど一定の値を示すようになる。この変化は組織に結合している蛋白質成分と低速遠心($7 \times 10^2 \times g$, 5分間)で沈澱しない両方の区分で共に起こる。冬期間の靱皮部から得た多量の蛋白質を含む抽出液を超速心($1.05 \times 10^5 \times g$, 60分間)して得られる上清蛋白質は全体の約10%である。第6表に示した上清区分はミトコンドリアやマイクロゾームなどの多くの顆粒を含んでいるからトランスケトラーゼ活性の消失はこれらの顆粒成分の消失と時期を同じくしているということが言えそうである。従ってこれらの成分の“Metabolic fate”が今後の一つの課題となるであろう。ポプラの枝の先端と基部ではその代謝活性の差からも推察出来るように蛋白質含量が異なる。植物体が活動を開始すると先端と基部の蛋白質量の比が異なってくる。この時に顆粒や蛋白質は既に消失していて低速度遠心の上清にはほとんど存在しなくなる。材部における蛋白質の消長は靱皮部と類似しているが、常に生長点の方が高い蛋白質含量を示し、靱皮部のように大きな変動を示すことはないように思われる(第7表)。林部の酵素活性は低温下の環境においてもまた生育の適温下にあってもあまり変らないことは、蛋白質量の変動の程度から納得出来る。

靱皮部では、この時期になると蛋

白質量の減少にもなってトランスケトラーゼ活性の消失が起こるが、トランスアルドラーゼ活性と PFK 活性が検出出来るようになり、酵素活性の消失に選択性のあることがわかる。とくに、生長点では強いトランスケトラーゼ活性が認められ、見掛上酵素活性は生長点に移行したかの如く観察される。

このような物質の移動は既存の構造成分と蛋白質が選択的な形で再編成されるものと考えられる。靱皮部で蛋白質や顆粒が減少する時期に生長点で強いトランスケトラーゼ活性が検出されるからである。高分子物質や構造成分が、個体の再編成の段階でどの程度にまで分解されるか、あるいはそのまの型で輸送されて別の部位で再び活性を示すかについては未だ明確な見解がない。通常は、細胞の壁や膜などの存在とこれらの構造を通過する段階を必要とすることから、高分子物質は一旦低分子物質に分解され再合成されるものと信じられている。最近、微

第7表 生活相の変化に伴う枝の先端と基部の蛋白質量の変動(材部)

採取月日	材部	蛋白質*		
		沈澱区分**	a/b	上清区分**
3/20	apex	2.78	1.7	0.10
	base	1.60		0
4/7	apex	2.88	1.6	0.21
	base	1.78		0
5/15	apex	3.34	2.1	0.05
	base	1.56		0
5/27	apex	3.34	1.2	0
	base	1.93		0

* mg 蛋白質/0.10 g 乾物重量 ** $7 \times 10^2 \times g$, 5分
a/b: apex/base

生物で種々の酵素蛋白質分子をそのまま細胞内にとりこむ現象が見出された⁸⁾。実際、実験に用いた α -アミラーゼは分子量 45,000⁹⁾ であるから、細胞間での物質の移動は相当大きな単位で行なわれる可能性を示している。細菌にみられる形質転換に関して分子量 10^6 程度の DNA が細胞中にとりこまれることは既に古くから知られている^{10,11)}。これらのことを考えるとピノサイトシスのような機構で、蛋白質分子やさらに大きな顆粒物質についても細胞から出入りする可能性があるように思われる。

V. 摘要と結論

- 1) トランスケトラーゼ活性を中心として、ポプラ韌皮部と材部の生活相の変化に伴う酵素活性をしらべた。また、蛋白質含有量についても枝の先端部と基部についてその変化量をしらべ酵素活性と蛋白質量の変動の関係を考察した。
- 2) 韌皮部、材部共に蛋白質の大部分は組織に結合した形で存在し、このうち生活相の変化に伴い顕著に変動する酵素群とほとんど変化を示さない恒常的な活性を示す二つの群に分れる可能性を示した。組織結合型および比較的可溶性な蛋白質のいずれも生活相の変化に伴い量的変化を示すことがわかった。
- 3) 蛋白質の変動に伴って活性の変化する酵素はトランスケトラーゼであって、トランスアルドラーゼ、ホスホフラクトキナーゼ、ホスホヘキソズイソメラーゼなどの活性は蛋白質の変化にあまり影響をうけない。トランスケトラーゼ活性は開芽時にその大部分が消失し、韌皮部では殆んど検出不可能であった。
- 4) 春期、代謝の活発化に先だってトランスアルドラーゼ活性が検出出来るようになり、続いてホスホフラクトキナーゼも作用し始める。
- 5) 材部においては年間を通じて一様な酵素活性を示し、かつ韌皮部よりはるかに高い活性を有していることがわかった。

文 献

- 1) 匂坂勝之助 1968 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. 低温科学, 生物篇, **26**, 33-34.
- 2) Lowenstein, J. M. 1963 Preparation of tritium-labeled substrates. *In Methods in Enzymology* (S. P. Colowick and N. O. Kaplan eds.), Academic Press, London, **6**, 877-878.
- 3) 匂坂勝之助 1969 植物の低温生化学的研究 IV. トランスケトラーゼとトランスアルドラーゼ活性の測定方法について. 低温科学, 生物篇 **27**, 90-96.
- 4) 匂坂勝之助 1969 植物の低温生化学的研究 III. ポプラの生活環境変化と関連した基質流量の調節機構について. 低温科学, 生物篇, **27**, 81-89.
- 5) 匂坂勝之助 1969 植物の低温生化学的研究 V. 冬と春におけるポプラ韌皮組織の五炭糖燐酸回路の活性. 低温科学, 生物篇, **27**, 97-108.
- 6) Topper, Y. J. 1961 Aldose-ketose transformations. *In the Enzymes* (P. D. Boyer, H. Lardy and K. Myrbäck eds.), Academic Press, London, **5**, 429-441.
- 7) Wood, W. A. 1966 Carbohydrate Metabolism. *In Ann. Rev. Biochem.* (P. Boyer ed.), Annual Reviews, Inc., Palo Alto, Calif. **35**, 529-530.
- 8) 福本寿一郎・岡田茂孝・辻阪好夫・那部浩一 1969 細菌細胞による酵素蛋白質の取り込みについて (第1報). 農化, **43**, 379-384.

- 9) 赤堀四郎・池中徳治・萩原文二 昭和31年 Amylase (赤堀編：酵素研究法), 朝倉書店, 東京, 2, 112.
- 10) 阿部美穂子・富沢純一 1957 細菌の型質転換. 蛋白質 核酸 酵素, 2, 263-270.
- 11) Hayes, W. 1963 The Genetics of Bacteria and their Viruses. Wiley, New York, 488-522.

Summary

The present study is concerned with a description of the changes of the transketolase activity in the bark of *P. gelrica*, during the process of the metabolic shift from winter to spring. Activities of several enzymes; transaldolase, phosphofructokinase, aldolase and phosphohexoseisomerase, have also been studied.

With the onset of growth, portions of proteins both in bound and extractable fractions disappear from the bark, concurrent with preferential disappearance of transketolase activity. During this process, phosphohexoseisomerase activity remains unchanged.

Transaldolase and phosphofructokinase activities, undetectable at about the beginning of the winter, appear towards the end of winter and become more active as the conditions become more suitably to growth.

Disappearance of transketolase activity and these events seem to be regulated by the over-all developmental program.

In the xylem, these enzymes including transketolase, are found to retain almost equal levels of activities while abrupt changes in the bark are taking place.

低温科学生物篇 第27輯 訂正

頁	行		誤	正
11	英文タイトル	1	Freeze Drying	Freeze-Drying
15	下から	2	無糖	蔗糖
45	上から	6	<u>4</u>	<u>6</u>
64	下から	10	<u>4</u>	<u>6</u>
78	下から	16	林部	材部
110	下から	16	第3図	第2図
122	上から	2	Escherichia Coli	Escherichia coli
130	第4表		側芽	副芽
131	第6表		側芽	副芽
131	第7表		側芽	副芽
132	第8表		側芽	副芽
159	下から	7	Supercoold	Supercooled
159	下から	9	Supercoold	Supercooled
159	下から	11	低温化学	低温科学