Shonosuke SAGISAKA 1969 Studies on Cryobiochemistry in Plants. III. Regulatory Steps of Sugarphosphate Flow in Winter Bark of *Poplus gelrica*. *Low Temperature Science, Ser.* ***B, 27.*** (With English Summary p. 88)

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

匂坂勝之助
(低温科学研究所)

(昭和44年9月受理)

I. 緒　　言

この報告では，ポプラの靱皮部の代謝反応系に見出された基質流量の調節機構について述べる。解糖系と五炭糖燐酸回路に属する酵素群は，一般に植物では六炭糖がエネルギーおよび合成素材蓄積の基本的形態であることから，これが低分子していく反応を律している最も基本的な役割をになっていると考えられる。従って，細胞あるいは組織の必要とする物質の種類および量を反映して出発物質としての糖類の異化反応が進行するであろう。細胞は生活環上の体制に基づいて特定の時期に必要とする物質の生合成を行なっていると思われる。

生体内における物質の流れとその方向は一個体単位では質量作用の法則に従うが，これと質的に異なった領域の反応が生物的な特徴と役割を示していると思われる。生体内に存在している一切の反応が常に活動していると，生活のある時点で必要としない物質が合成され，ある濃度で存在することになるが，一般に正常な生物では不要物質の蓄積は見られない。必要な物質を必要な水準の量に保つ機構，大量に必要な物質を供給する機構，および不必要な物質は可能な限り合成しないなどのしくみが存在すると思われる。

このような考え方は基質流量の調節系，換言すると，その流れの量的関係を特定の反応段階において正確に感知し且つ作動する所謂 “stop or go” 信号の存在を必要とする。基本的に酵素蛋白質自身がそのような物質の量的情報を知り得る機能を有する場合と，個体全体としてある体制のもとで不必要なものの生成を抑える機構を作り出す二つの様式が考えられる。

植物体内における物質の流量調節系の概略を以下に述べるが詳細な検討は今後に残されており，本報の内容は序論的なものである。

本文では次の略号を用いた。

F6P, フラクトース 6-燐酸; GA3P, グリセルアルデヒド 3-燐酸; G6P, グルコース 6-燐酸; Xu5P, ザイリュロース 5-燐酸; E4P, エリスロース 4-燐酸; G6PDH, グルコース-6-燐酸脱水素酵素; PHI, ホスホヘキソーズイソメラーゼ; GDH, α-グリセロ燐酸脱水酵素; TIM, トライオース燐酸イソメラーゼ; 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; DHAP, ジヒドロキシアセトン燐酸。

* 北海道大学低温科学研究所業績　第1006号

II. 材料と方法

材料： ポプラの粗抽出液調製は前報[1]の通りで，主な試薬と酵素類は Boehringer u. Soehne GmbH 社製である。E4P は前報[1]に用いたもので，S7P は，ポプラ靱皮部の R5P 代謝活性を測定した実験の過程で得たものを濃縮して用いた。

方法： ホスホフラクトキナーゼ (PFK) とホスホヘキソーズイソメラーゼ (PHI) の活性測定は前報[2]の通りである。アルドラーゼ活性測定は次式に従い，生成した GA3P を TIM にて DHAP として GDH により α-グリセロ燐酸に還元し，その時消費した DPNH の量で活性を求めた。

$$FDP \rightleftharpoons GA3P + DHAP$$

$$GA3P \xrightarrow{TIM} DHAP$$

$$DHAP + DPNH \cdot H^{+} \xrightarrow{GDH} \alpha\text{-グリセロ燐酸} + DPN^{+}$$

反応液組成は次の通りである。FDP 30 μmole，トリス塩酸緩衝液 150 μmole，pH 7.4，EDTA 4 μmole，GDH と TIM の混液の稀釈液 (1/25) 0.05 ml，供試酵素液 0.10 ml，および DPNH 約 0.3 μmole，全容 3.0 ml。G6PDH の活性測定は次の反応液中で行なった。すなわち，トリス塩酸緩衝液 150 μmole pH 7.7，TPN^{+} 約 0.3 μmole，$MgCl_2$ 30 μmole，G6P 0.1～0.2 μmole，G6PDH 0.28 単位，全容 3.0 ml。

蛋白質の定量は加水分解後にアミノ酸を定量して，牛血清アルブミンを標準として蛋白質を求めた[1]。

III. 結　　果

A. ポプラ靱皮部の解糖系での流量調節

1. トランスケトラーゼ活性の変動に伴ってひきおこされる流量の調節

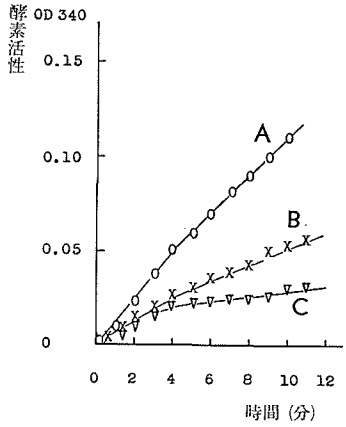
冬期間の高いトランスケトラーゼ活性がポプラ靱皮部の特徴の一つである[2]。この時期にトランスアルドラーゼ活性は測定し得るほどに高くないから，トランスケトラーゼによる生成物は S7P と G3P である。一方，粗酵素液中のアルドラーゼ活性は春，冬共に 0.10～0.25 μmole/10 分/mg 蛋白質であって，生成した S7P から活発に E4P を生成する能力を有する。

0°C で R5P の反応を行なわせると多量の S7P を蓄積するが，比較的高い温度で反応を行なうと FDP, F6P が蓄積してくることはすでに述べた[1]。従って，E4P および S7P の蓄積が六炭糖および五炭糖の代謝系にどのよう

第1表 E4P および S7P による PHI の阻害

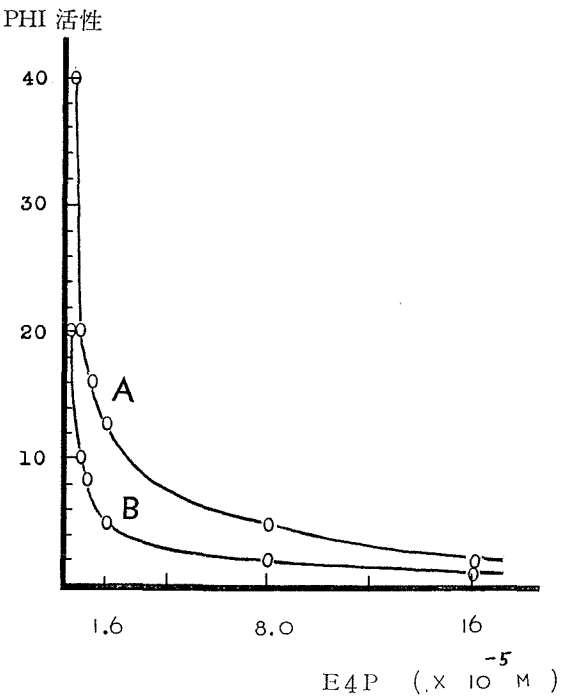
添加物	活性 μmole TPNH/10 分/mg 蛋白質
な し	1.32
E4P, 1.6×10^{-5} M	0.66
E4P, 1.6×10^{-4} M	0.14～0.26
S7P, 1.0×10^{-4} M	0.66
UTP, 1.0×10^{-3} M	1.32

反応条件： F6P 1 μmole，トリス塩酸緩衝液 150 μmole，pH 7.7，$MgCl_2$ 30 μmole，TPN^{+} 0.32 μmole，G6PDH 0.28 単位および冬期のポプラ靱皮部からの粗酵素液 0.05 ml。全容 3.0 ml



第1図　E4P と S7P によるポプラ靱皮部の PHI 活性の阻害

A, 抽出液のみの時の活性; B, S7P を 1.0×10^{-4} M 加えた時の活性; C, E4P を 1.6×10^{-4} M 加えた時の活性



第2図　PHI 活性におよぼす E4P 濃度の影響

反応条件は第1表と同じであるが, PHI は市販標品 0.022 単位を用いた。A, F6P 1×10^{-4} M; B, F6P 4×10^{-5} M
活性は O.D. 340 mμ の1分間の変化としてあらわした

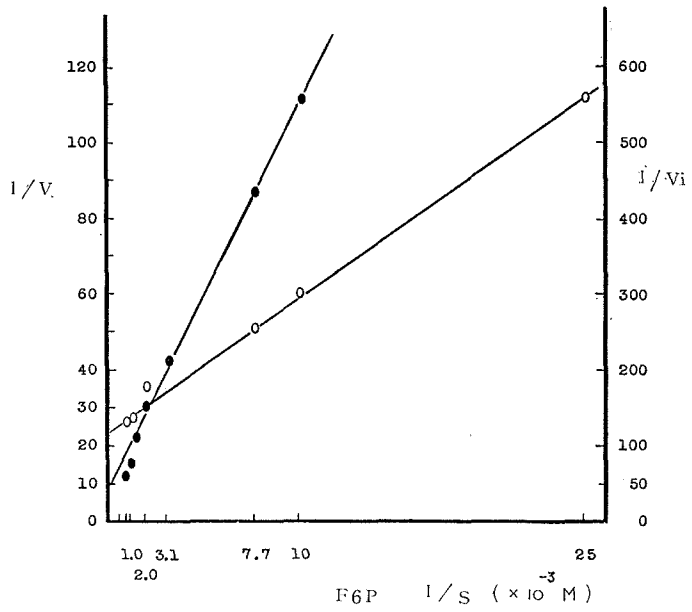
な影響をおよぼすかをしらべた。第1図は E4P と S7P が PHI 活性を強く阻害することを示している。実際, 過剰量の G6PDH の存在下で, ポプラ靱皮部の PHI 活性におよぼす E4P と S7P の効果は顕著であって第1表に示したように E4P は 1.6×10^{-4} M および 1.6×10^{-5} M の濃度で 80～90% および 50% の PHI 活性をそれぞれ阻害する。この阻害度は F6P (G6P) の濃度に依存するわけであるが, 冬期間の後半に靱皮組織中に存在する F6P は非常に少なく, 低濃度の E4P あるいは S7P で PHI 活性が殆んど完全に抑えられていると思われる。春になると F6P (G6P) の濃度が高まり (0.45 μmole/1.0 g 生重量), かつ 2-keto-3-deoxy-D-arabo-heptonic acid 7-燐酸合成も活発となって E4P が積極的に反応系から消失していくので, PHI 活性の抑制が徐々に除かれると思われる。

ポプラの PHI 活性は組織に結合していて (第2表) 年間を通じて意味あるほどの活性の変

第2表　ポプラ靱皮部の PHI 活性と画分

		活性 (μmole/10 分/mg 蛋白質)	蛋白質 (mg)
上清 ($1.2\times10^4\times$g, 10 分)		0	0.37
トリス塩酸緩衝液抽出区分:	超遠心上清	0	0.08
	超遠心沈澱	0.04	0.24
硼酸抽出液		0.32	0.89
抽出後の沈澱		1.77	3.60

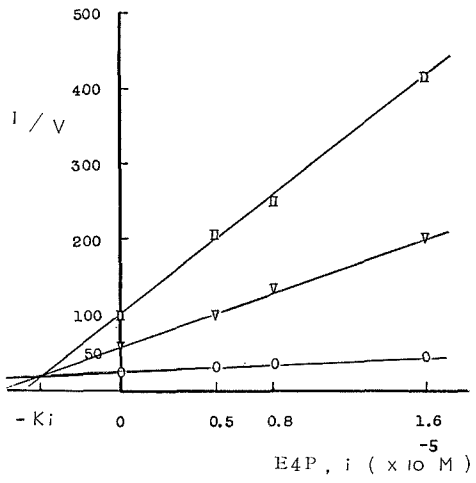
硼酸処理[3] は, 0.2 M 硼酸緩衝液, pH 8.5 で 30 分, 0°C で行なった。トリス塩酸緩衝液は 0.05 M, pH 7.7



第3図 ミカエリス定数と E4P の影響

○: E4P の存在しない場合 ●, ▽: E4P が 8×10^{-5} M 存在する場合

動がおこらないが，この反応段階の活性制御を五炭糖燐酸回路系にあるトランスケトラーゼ活性によって行なっている可能性が強くなった。第2および3図は市販の純粋な PHI を用いて得た成績である。F6P濃度を一定に保ち，E4P 濃度を変えた時の PHI 活性（第2図）から次のように結論出来る。すなわち，植物体の F6P 濃度と思われる 10^{-4} M の準位以下では 10^{-4} M 準位の E4P で殆んど完全に PHI 活性が抑えられて F6P→G6P の反応が停止し，E4P 濃度の低下に伴いこの反応の活性が回復する。第3図から PHI の F6P に対する Km[4] は 1.53×10^{-4} M であり，8×10^{-5} M の E4P が同時に存在すると 1.28×10^{-3} M となる。また，第4図から Ki[4] は 4.1×10^{-6} M であった。



第4図 E4P の拮抗的阻害

□, F6P 4.0×10^{-5} M; ▽, F6P 1.0×10^{-4} M; ○, F6P 1.0×10^{-3} M

これにより E4P[6] や S7P[6] による阻害の生理的意義の考察も可能になったと考えられる。なお，UTP は PHI 活性に影響を与えない。

2. ホスホフラクトキナーゼによる調節

初冬に採取したポプラ靱皮部においては，PFK 活性が認められないが，春が近づくにつれて活性があらわれてくる[2]（第3表）。このことは PHI 活性の E4P による抑制とあわせ考えると非常に重要な内容を示しているように思われる。すなわち，もし E4P と S7P による PHI

の調節が充分に行なわれなかった場合でも PFK の段階で六炭糖の流れが完全に停止し不経済な要因が完全に除かれるからである。

第3表　ポプラ靱皮部の PFK 活性

実験番号	採取月日と酵素処理	基質に使ったニュークレオタイド	活性* (cpm×10⁻³)
1	A　10/25	UTP	0
	B　2/10	〃	740
	A＋B	〃	0
2	B′　3/11	〃	687
	B′＋A の加熱上清** (B′：Aの加熱上清＝1：1 v/v)	〃	272
	〃　〃	ATP	58
	B′＋A の加熱沈澱	UTP	557
3	A＋B′→sephadex G-50	〃	1570
	A→　〃	〃	1504
	B′→　〃	〃	3030

*　cpm/mg 蛋白質/時.
**　90℃, 5分

一方，前報[1]で示したように S7P→E4P+GA3P, 2GA3P→FDP, FDP→F6P+Pi の反応は低温下でも比較的活発に進行するから，このようにして生成した F6P は E4P の存在下で G6P となる反応が抑えられるために PHI による反応の平衡 $\frac{G6P}{F6P}=\frac{65}{35}$ とはおよそかけ離れた量的関係で存在するようになるであろう。ポプラ靱皮部に存在する PFK の阻害物質は低分子物質熱耐性である[7]。多くの生物で ATP やクエン酸などがすでに "Effector" として知られている[8]。ポプラ靱皮部抽出液中の物質については予測し難いが，ATP を用いた場合の方が UTP より影響が大きいので同様の物質かも知れない。

PFK 活性については Sephadex 処理を行なうと著しく活性が増大し，かつ "Effector" の影響が著しいので，活性を定量的な数値で表現するのは粗酵素液による実験では中々困難である。

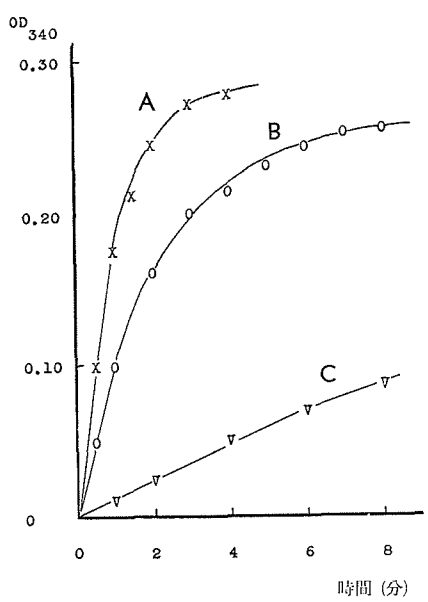
B.　ポプラ靱皮部における五炭糖燐酸回路への流量調節

1.　グルコース-6-燐酸脱水素酵素段階での調節

第5図に市販の G6PDH 活性におよぼすポプラ靱皮部抽出液の効果を示した。5月下旬頃のポプラの代謝系には G6PDH を抑制する物質が存在する。冬期間および早春のものには若干量が認められるが，さほど顕著ではない。阻害物質を含む抽出液を種々の濃度に加えた場合の G6PDH 活性を第6図に示した。抽出液には強い阻害物質が含まれていて，少量の抽出液でも明瞭な阻害効果を示し，加える量に比例して G6PDH 活性の低下がみられる。この活性の低下が徐々におこることに生物学的意義が見出されよう。

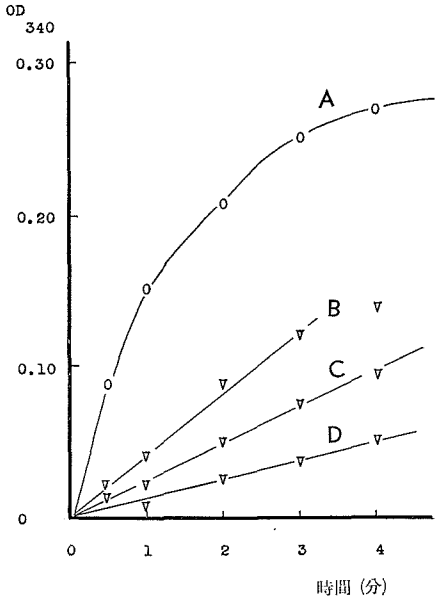
2.　トランスケトラーゼ活性の変動による流量調節

トランスケトラーゼ活性の触媒する反応産物として S7P が，さらに関連して E4P が解糖系の PHI を抑えることによる調節はすでに述べた。トランスケトラーゼ活性が減少すること



第5図 G6PDH の阻害物質の存在と時期による差異

反応液組成は本文参照 A：市販の G6PDH のみの時の活性，B：3月11日に採取した試料の抽出液 0.05 ml (蛋白質 37 μg 含む) を A に加えた場合，C：5月27日に採取した試料の抽出液 0.05 ml (蛋白質 8 μg を含む) を A に加えた場合



第6図 G6PDH 活性と春の靱皮組織の阻害物質の濃度

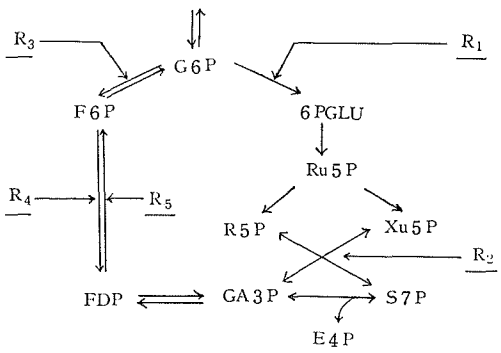
反応液組成は本文参照 A：市販の G6PDH のみの時の活性，B：靱皮組織抽出液 0.020 ml を加えた場合，C：0.035 ml を加えた場合，D：0.050 ml を加えた場合。抽出液は 0.050 ml 中 8 μg の蛋白質を含む

により S7P, E4P の生成量が減少する結果 PHI が活潑になる。従って，トランスケトラーゼ活性の低下は G6PDH の基質である G6P の濃度を低下させ，結果として五炭糖燐酸回路への流入量を減少させる。

IV. 考　　察

ポプラ靱皮部の五炭糖燐酸回路と解糖系にまたがる反応系には，生活の相によって作用の様式が異なる4個所の基質流量の調節信号のあることがわかった。

右図で制御機構の判明した箇所について R_1 から R_4 まで示した。R_5 は，他の実験材料で得られている一般的知見から予想される場所である。



流量調節信号の見出された反応段階

図ではトランスアルドラーゼ活性の出現に関しては特定の反応段階の制御として表現していないが，R_1 と R_2 の制御体制が変わりつつあっていまだ R_3 が抑制されている時に，次の反応によって E4P を除き体制転換を促進することが考えられる。PHI に対する阻害作用

$$F6P+E4P \rightleftharpoons S7P+GA3P$$

は E4P の方が強く，この反応の平衡は1に近いから相当量の E4P が消失し阻害から回復の方向にむかう。E4P は上式を経ないで 2-keto-3-deoxy-D-arabo-heptonic acid 7-燐酸になるが，上式で生成した S7P も一旦 E4P となったのちに同様に芳香系化合物合成の前駆体となる。

今までに得られた結果から，R_1 と R_2 部位の制御が殆んどなくなって R_3 部位で強い抑制が働いている状態が冬型の靱皮部代謝である。

一方，R_1 が何らかの制御を受けてこの部位で基質流量調節を受ける頃になると R_2 の反応を触媒する酵素活性が非常に変化する。この過程で R_3 部位での抑制がとけて G6P→F6P あるいは F6P→G6P の転換が非常にすみやかになる。従って基質流量の調節は R_1 と R_4 に重点が移るであろう。これが生育適温下における靱皮部代謝である。

代謝系を機能的な立場からみると，基質流量の調節によってグリコーゲンあるいは澱粉の段階から FDP 生成までがある水準に保たれるように一つの領域を作りあげているように思われる。そしてさらに多くの制御機構が存在するものと思われる。これまでに得た知見から蔗糖やグリセロールなどの蓄積や脂質合成促進の説明も容易になった。

V. 摘要および結論

1) ポプラ靱皮部における糖燐酸エステルの代謝反応系に見出された代謝反応の調節機構について述べた。

2) 制御機構として基質流量の調節は現在まで4個所の反応段階で見出された。五炭糖燐酸回路の制御機構についてはこれまで知られていなかった知見である。

3) 調節機構は，G6PDH，トランスケトラーゼ，PHI およびホスホフラクトキナーゼの酵素によって行なわれ，冬型代謝と生育適温下の代謝の二型に特徴づけることができた。

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**, 33-43.

2) 匂坂勝之助 1969 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燐酸エステル代謝系の体制変化. 低温科学，生物篇，**27**, 73-80.

3) Arnold, W. W. 1966 β-Fructofuranosidase from grape berries II. Solubilization of a bound fraction. *Biochim. Biophys.* Acta, **128**, 124-129.

4) Dixon, M. 1964 Enzymes, Longmans, London, 54-166.

5) Grazi, E., DeFlora, A. and Pontremoli, S. 1960 The inhibition of phosphoglucoseisomerase by D-erythrose 4-phosphate. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **2**, 121-125.

6) Venkataraman, R. and Racker, E. 1961 Mechanism of action of transaldolase I. Crystallization and properties of yeast enzyme. *J. Biol. Chem.*, **236**, 1876-1882.

7) 匂坂勝之助　未発表.

8) 宇井理生 1968 ホスホフラクトキナーゼについて. 蛋白質核酸酵素，**13**, 261-282.

Summary

This communication is intended to present evidence that pentose phosphate cycle and glycolytic pathway of *P. gelrica* may well be regulated at four key loci in these cycles. The regulatory loci are catalyzed by transketolase, glucose-6-phosphate dehydrogenase, posphohexoseisomerase and phosphofructokinase, respectively. The fructose-1, 6-diphosphatase step remains to be determined.

Combinations of the inhibitory loci have been found to elicit two unique forms of regulation systems. A scheme which incorporates these findings into a regulatory network connecting glycolysis and pentose phosphate cycle was formulated.