



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	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
Author(s)	匂坂, 勝之助; SAGISAKA, Shonosuke
Citation	低温科学. 生物篇, 27, 89-96
Issue Date	1970-02-20
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/17755
Type	departmental bulletin paper
File Information	27_p89-96.pdf



植物の低温生化学的研究 IV*

トランスケトラ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

匂坂勝之助

(低温科学研究所)

(昭和44年9月受理)

I. 緒言

この報告は植物組織から調製した粗酵素液中に含まれるトランスケトララーゼとトランスアルドラーゼの活性測定方法について考察を加えたものである。以下に述べる方法により上記酵素の活性測定が可能になった。

“生物としての活性”を測定する一方法は酵素群の活性を測定することである。細胞の生活の具体的内容の一面として、その細胞に必要な物質が必要な時に合成される際には、一連の反応系が特定の方向へ効率よく進行していることが指摘出来る。酵素合成の開始と停止および既存酵素の分解、あるいは酵素活性の見掛上の上昇と低下など、これらはすべて細胞あるいは組織の機能と結びついている。

低温環境下の植物の物質代謝系として五炭糖リン酸回路の活性が顕著に高まり、これが解糖系の反応系と拮抗するような傾向を示していることは既に述べた¹⁾。この点を更に詳しく理解する為に、これらの反応系を触媒している酵素群の活性を定量的に測定することを試みたが粗酵素液中に存在する妨害物質のために困難であった。現在、実際的に用いられている活性測定方法は主として DPN⁺ あるいは TPN⁺ の酸化還元による 340 m μ の吸収変化にもとづくものであって^{2,3)}、植物組織抽出液のように褐色を呈する物質が大量に存在したり、あるいは酵素の阻害物質の存在する場合は正確に近似的な値を得ることがほとんど不可能である。

妨害物質の除去に活性炭が有効であることがわかり、市販の酵素標品を用いてトランスケトララーゼおよびトランスアルドラーゼ活性の測定条件を検討した。

本文では次の略号を使用した。

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, システィン; 6PGLU, 6-ホスホグルコン酸; PFK, ホスホフラクトキナーゼ。

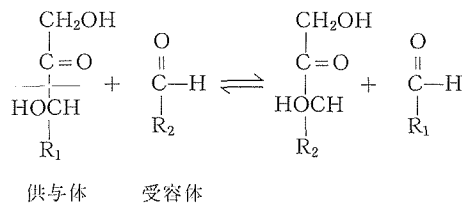
* 北海道大学低温科学研究所業績 第1007号

II. 材料と方法

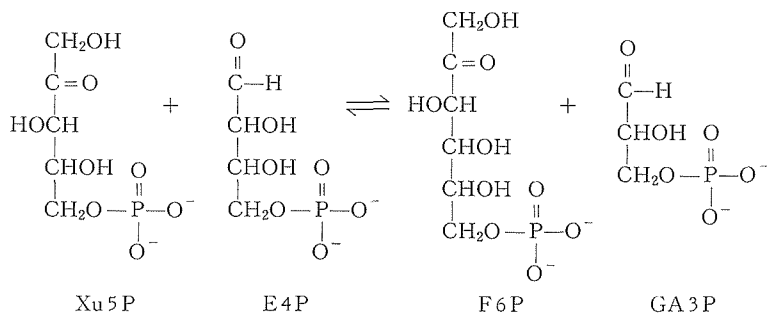
材料：粗酵素液は前報¹⁾と同様に調製した。実験に用いた磷酸エステル類の大部分と酵素標品は Boehringer u. Soehne GmbH から購入した。Xu5P, Ru5P および R5P の混液は次のようにして得た。R5P 10.0 ml (456 mg) に春期に採取した *Populus I-214* から調製した靱皮部抽出液 15.0 ml (7.0 g 生重量相当), トリス塩酸緩衝液 1,500 μmole pH 7.4 を加え, 20°C で 27 時間反応せしめた。50%トリクロル醋酸 2.0 ml を加えて除蛋白後, Norit A を加えて濾過, ついで水酸化バリウムにて pH を 6 付近としたのち 4 ml の 1 M 醋酸バリウムと 4 容のアルコールを加えて磷酸エステルを沈澱せしめた。この沈澱を洗浄乾燥後常法によってバリウムを除去しカリウム塩として実験に供した。

この溶液 1.0 ml は R5P 42.5 μmole とケトペントース磷酸 25 μmole を含む。ホスホケトペントースエピメラーゼにより触媒される反応の平衡は 1 であるから Xu5P が 12.5 μmole 含まれている。

トランスケトラーゼ活性の測定原理：トランスケトラーゼは次の一般式に示した反応を触媒する。



基質としては、反応に対する K_m 値と反応生成物の測定の難易などの点から供与体の磷酸エステルに Xu5P, 受容体として E4P を選んだ。



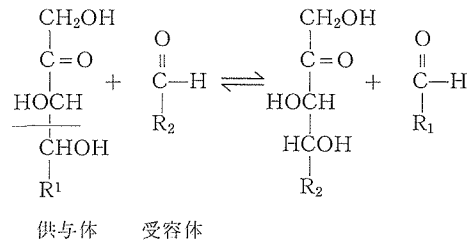
従って生成物の F6P あるいは GA3P を定量すると、その生成量からトランスケトラーゼ活性が求められる。

F6P の定量は次の反応式の通りで G6PDH により生成する TPNH を測定することによった。

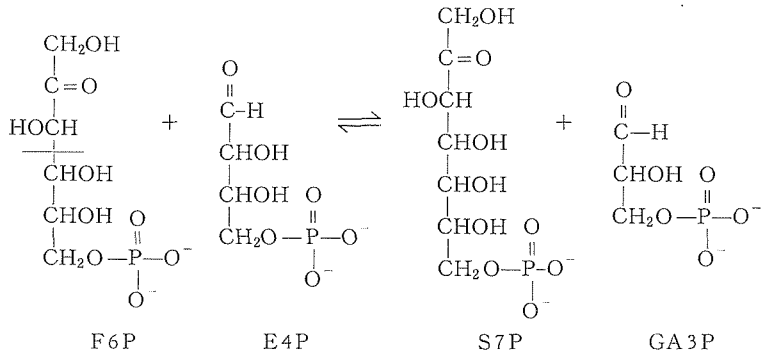


粗酵素液を用いたトランスケトラーゼ活性の測定：反応混液は次に示すものを 0.50 ml 中に含む；Xu5P 約 1.0 μmole (Ru5P 約 1.0 μmole , R5P 3.4 μmole を含む), E4P 約 2.85 μmole , トリス塩酸緩衝液 pH 7.4, 20 μmole および粗抽出液 0.10~0.30 ml。反応は 25°C で行ない、一定時間毎に 0.10~0.20 ml の反応混液をとって 0.20 ml の 0.2 N 過塩素酸溶液に加え、更に 0.20 ml のフラクトース溶液 (1 μmole を含む) と 0.20 ml の水を加えた後、0.20 ml の Darco G-60 の 10% 懸濁液を加えて 3,000 rpm, 5 分間遠心し、定量を妨害する褐色の物質を除去したのち上清に含まれる F6P の量を測定した。F6P の定量系の組成は次の通りである。分析試料 0.50 ml (固体 KHCO_3 で中和) PHI 1.55 単位, G6PDH 0.28 単位, MgCl_2 30 μmole , トリス塩酸緩衝液 pH 7.7, 150 μmole および TPN^+ 0.32 μmole , 全容 3.0 ml。

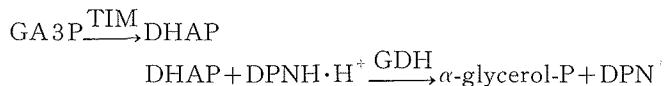
トランスアルドラーゼ活性の測定原理：トランスアルドラーゼは次の一般式に示した反応を触媒する。



基質としての磷酸エステルには次式のものを選んだ。従って一定時間の反応後に生成した GA3P を定量することで目的が達せられる。



GA3P の定量は次式により行なった。



粗酵素液中のトランスアルドラーゼ活性の測定：反応混液の組成は次の通りである。F6P 6 μmole , E4P 2.85 μmole , トリス塩酸緩衝液 pH 7.4 35 μmole , 粗酵素液 0.20~0.30 ml, 全容 0.5 ml。反応は 25°C で行ない、0.10~0.20 ml の混液を 0.20 ml の 0.2 N 過塩素酸溶液に加えて反応を停止した。定量を妨害する着色物質の除去は上記 F6P の定量と同様で、先ず 0.2 ml のグリセリン溶液 (2.2 μmole を含む) と 0.20 ml の水を加えたのち 0.20 ml の 10% Darco G-60

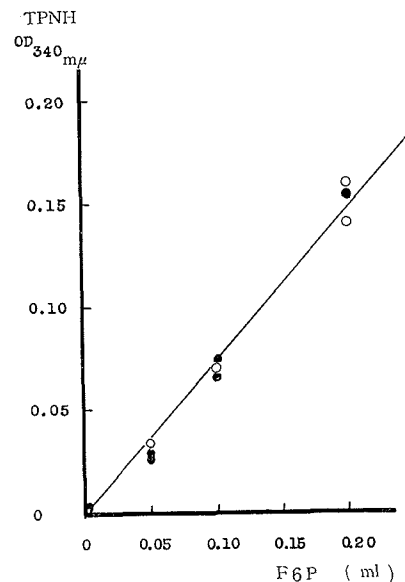
を加えて遠心し (3,000 rpm, 5分), 褐色の定量妨害物質を除去した。遠心上清の 0.50 ml に含まれる GA3P を定量する系は次の通りである。分析試料 0.50 ml (固体 KHCO_3 で中和), トリス塩酸緩衝液 pH 7.2, 150 μmole , EDTA 4 μmole , DPNH 約 0.1 μmole および 0.05 ml の GDH と TIM の混液, 全容 3.0 ml。

III. 方法の検討と考察

これまで述べてきたように, 植物から調製した粗酵素液中のトランスケトラーゼおよびトランスアルドラーゼの活性を測定するには, 酵素反応を行なったのち生成した F6P あるいは GA3P を定量すればその目的を達する。

試料が透明で着色物質が存在しない時はあらかじめ特定の燐酸エステルの定量系酵素を過剰に加えておいて反応生成物を直接定量し, 目的とする酵素活性を直接比色定量し得るのであるが, 植物から調整した酵素は褐色を呈するのでこの方法は適用できない。従って, 一定時間反応を行なわせたのち除蛋白し, 蓄積した反応生成物を定量することによって目的を達し得る。また, 反応の平衡が生成物の側に寄っていること, あるいは換言すると生成物に対する酵素の K_m が大きいことが定量の条件にあげられる。これらの条件を満たすものとして $\text{Xu5P} + \text{E4P} \rightleftharpoons \text{F6P} + \text{GA3P}$ は $K_{eq.} = 10.3$ であることが既に知られている²⁾ のでこれを定量系に応用可能であるが, 従来 E4P の入手が容易でなかった為にこの反応系を定量に応用した例はまだ知らない。従って, この反応系を実際に用い得るようにすることは特に活性の低い試料を取りあつかう上に必要と思われた。上記の反応の生成物は F6P と GA3P であり, いずれを定量しても目的を達するのであるが, TPNH^+ の還元を測定する方が DPNH の酸化を測定するより試薬の安定性など有利な点があるので前者を用いた。この定量系では生成した F6P を G6P に変え, これを G6PDH により酸化してその時生成する TPNH を測定するのであるから 340 $m\mu$ 付近に吸収を有する着色物質があれば非常に不都合である。しかし, 植物抽出液中にあって褐色を呈し妨害する物質の除去には, 種々検討した結果, 活性炭が非常に有効であることがわかった。第1図は F6P の種々の濃度のものを緩衝液あるいは粗酵素抽出液を含む緩衝液に加え, 方法の項に記したように活性炭を加えて処理し, その遠心上清の F6P を定量したものである。実験条件下でほとんどの着色物質が除去され, 通常の測定条件下で定量が可能であった。活性炭添加前にフラクトースを若干加えた方が再現性が幾分よいようである。

トランスアルドラーゼ活性測定の系として $\text{F6P} + \text{E4P} \rightleftharpoons \text{S7P} + \text{GA3P}$ の反応は既に広く用いられて



第1図 PHI と G6PDH による F6P の定量

- 植物抽出液を加えない場合
- 植物抽出液を加えた場合

いる³⁾。植物からの粗酵素液に応用するには、酵素由来の着色物質を反応生成物の量に影響を与えることなしに除去することが必要である。この反応系で生成する GA3P と S7P では前者の定量が容易である。GA3P の定量も活性炭を使用して、F6P と同様に可能なことがわかった (第 1 表)。使用する活性炭は Darco G-60 が最も良い。活性炭の粒子があまり細かいと遠心操作の段階で除去が完全に行なわれ難く、結果として操作に時間を要し、またこれが定量用溶液に混入すると、このものの性質として、 TPN^+ や DPN^+ を強く吸着するので注意を要する。Darco G-60 はこれらの点で適当と思われる。

第 1 表 Darco G-60 処理と GA3P の定量

	TPNH, μmole			
	1	2	3	4
GA3P, Darco G-60 処理後	0	0.043	0.080	0.150
GA3P, 計算値	0	0.046	0.076	0.150

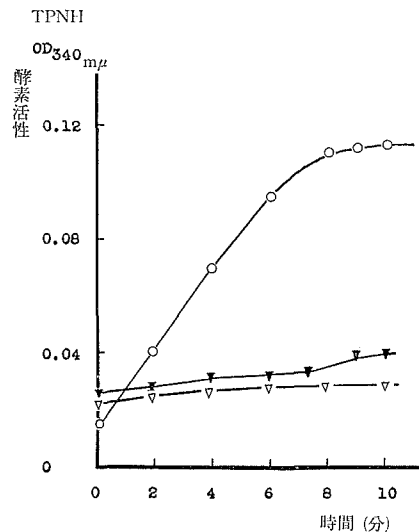
測定条件は本文の方法を参照

酵素活性測定の場合

粗酵素由来の着色物質を除去することにより植物組織のトランスケトラーゼとトランスアルドラーゼの活性測定が可能になったことをこれまで述べてきた。一般に、この方法で F6P, G6P, GA3P などが反応生成物である場合の酵素活性の測定が出来ることを意味し、植物組織中の PHI 活性の測定⁴⁾も行なわれた。

細胞内代謝制御の研究が活発に進みつつある現在では、単一の反応段階の基質として加えた物質、あるいはその生成物が他の系の酵素の作用に大きな影響を与えている例が益々増えつつあり、生物細胞の効率的な物質利用を理解する上に大きな要素となっている。

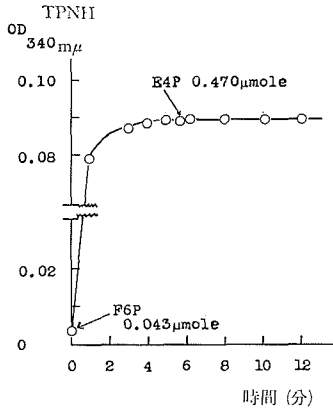
この活性測定の反応のうち、定量系の反応が加えた磷酸エステル、あるいはそれからの生成物により阻害 (あるいは促進) される場合が考えられる。トランスケトラーゼ活性測定の場合として定量系の PHI と G6PDH に対する Xu5P, R5P, Ru5P, E4P, GA3P の効果を、トランスアルドラーゼ活性測定の場合には F6P, E4P, S7P の GDH, TIM に対する効果を検討した。この結果既に知られている如く S7P と E4P の PHI に対する影響^{5,6)}を詳細に検討することが必要になった。第 2 図に示した様に PHI 活性が低いと E4P



第 2 図 E4P と CySH の PHI 活性におよぼす影響

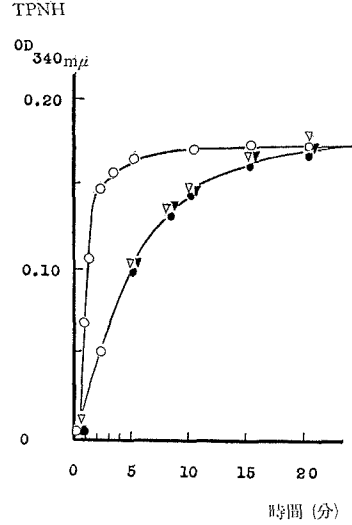
○, 定量系に E4P がいない時の活性; ▽, E4P が $1.6 \times 10^{-4} \text{ M}$ ある時の活性; ▼, E4P が $1.6 \times 10^{-4} \text{ M}$, CySH が $1.6 \times 10^{-4} \text{ M}$ ある時の活性; 反応液は PHI 0.02 単位, G6PDH 0.28 単位, TPN^+ 0.32 μmole , $MgCl_2$ 30 μmole , F6P 0.05 μmole , トリス塩酸緩衝液 pH 7.7, 150 μmole を含む。全容 3.0 ml。本文参照

の阻害効果が非常に顕著にあらわれ、定量条件は成立しない。この現象は定量の反応系内で生成した TPNH が E4P の還元反応に消費されているのではないことは明らかで (第 3 図), また E4P は G6PDH を阻害しないから (第 4 図), PHI に関して F6P 定量の条件を求めればよい



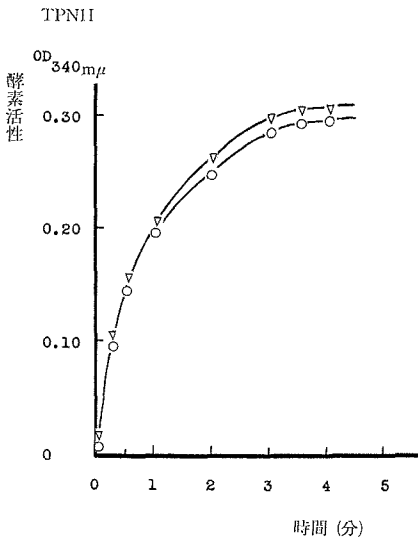
第 3 図 E4P 存在下の TPNH の安定性

反応液は PHI 0.02 単位, G6PDH 0.28 単位, TPN^+ 0.32 μ mole, トリス塩酸緩衝液 pH 7.7, 150 μ mole, $MgCl_2$ 30 μ mole, F6P 0.043 μ mole を含む。F6P を加えて反応を開始し, これが殆んど完全に G6P を経て酸化された時に E4P (1.6×10^{-4} M) を加え TPN^+ の増減をしらべた。全容 3.0 ml



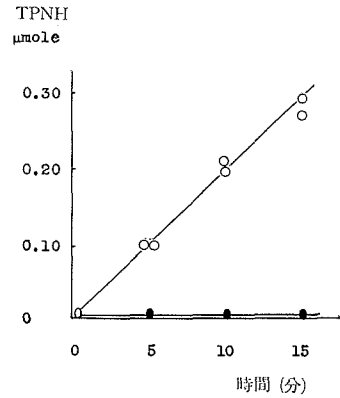
第 5 図 E4P 存在下における F6P の定量条件

○, E4P のない時; ▽, E4P を 1.6×10^{-4} M 加えた時; ▽, E4P 1.6×10^{-4} M, と CySH 1.6×10^{-2} M を加えた時; ●, E4P 1.6×10^{-4} M, Ru5P 0.7×10^{-4} M, Xu5P 0.7×10^{-4} M および R5P 2.3×10^{-4} M が同時に存在する場合; 反応液は PHI 1.55 単位を含む。詳細は本文を参照



第 4 図 G6PDH におよぼす E4P の影響

▽: E4P の存在しない場合
○: E4P を 1.6×10^{-4} M 加えた場合
反応液は第 2 図と同じ, 但し F6P の代わりに G6P 0.15 μ mole を含む



第 6 図 トランスケトラーゼ活性 測定の時間経過

○: 完全系
●: 完全系から Xu5P, Ru5P, R5P の混液を除いたもの

ことになる。トランスケトラーゼ活性の測定条件として加えた E4P が全く変化しない場合が定量系内における E4P の最大値であるので (1.6×10^{-4} M), この濃度の E4P が存在する時に定量が充分出来るまで PHI 活性を高めた。第 5 図に示すごとく過剰の PHI を加えることにより満足する値が得られた。市販の PHI は高単位で且つ、比較的安価なので PHI の使用量については定量方法上問題ないと思われる。尚、CySH は PHI に対する E4P の効果に何ら影響を与えない (第 2 および 5 図)。

以上の結果から得られた条件下で、ポプラ靱皮部のトランスケトラーゼ活性を測定した例を第 6 図に示した。

一方、GA3P の定量に関する反応系は E4P の影響をうけない。GA3P 脱水素酵素は E4P を徐々に酸化することが知られている。この GDH と TIM による反応は市販酵素に DPNH 酸化酵素が含まれていないので考察する必要がない。

V. 摘 要

1. 植物から調整した粗酵素液中のトランスケトラーゼと、トランスアルドラーゼ活性を測定する際の問題点は、酵素由来の着色物質にあるので、これを活性炭を用いて除去する方法を記述した。
2. トランスケトラーゼおよびトランスアルドラーゼの反応産物である F6P と GA3P をそれぞれ定量する条件を確立した。

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) Racker, E. 1961 Transketolase. In *The Enzymes* (P. D. Boyer, H. Lardy and K. Myrbäck eds.), Academic Press, London, **5**, 397-406.
- 3) Racker, E. 1961 Transaldolase. In *The Enzymes* (P. D. Boyer, H. Lardy and K. Myrbäck eds.), Academic Press, London, **5**, 407-412.
- 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に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**, 81-88.
- 5) Grazi, E., DeFlora, A. and Pontremoli, S. 1960 The inhibition of phosphoglucose isomerase 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.

Summary

The present report deals with a method for the quantitative determination of transketolase and transaldolase activities in crude plant extracts.

We frequently encounter difficulties in the determination of fructose 6-phosphate or glyceraldehyde 3-phosphate which are formed in the solution as a result of transketolase or transaldolase activities. The difficulties arise from the presence of yellow and brown colored substances found in the crude extract. A direct analysis of the phosphate after

the reaction may give unreliable results and may disturb the conventional spectrophotometric assay at 340 m μ .

By use of Darco G-60, it becomes possible to remove the disturbing substances without any influence on the amount of the phosphates. Procedures, which permit the quantitative determination of fructose 6-phosphate and glyceraldehyde 3-phosphate are described.