HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	植物の低温生化学的研究　VI ： ポプラ材部のグルコース６－燐酸および６－ホスホグルコン酸脱水素酵素の活性について
Author(s)	匂坂, 勝之助; SAGISAKA, Shonosuke
Citation	低温科學. 生物篇, 28, 37-42
Issue Date	1971-01-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/17767
Type	departmental bulletin paper
File Information	28_p37-42.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

Shonosuke SAGISAKA 1970 Studies on Cryobiochemistry in Plants. VI. Glucose-6-phosphate and 6-Phosphogluconate Dehydrogenase Activities in Xylem of *Populus gelrica*. *Low Temperature Science, Ser.* ***B, 28.*** (With English Summary p. 42)

植物の低温生化学的研究 VI*

ポプラ材部のグルコース-6-燐酸および6-ホスホグルコン酸脱水素酵素の活性について

匂坂勝之助
(低温科学研究所)

(昭和45年9月受理)

I. 緒言

この実験は，ポプラにおける基質流量の調節機構に関する研究の一部として行なったものである。

G6Pはグルコースが低分子化していく反応径路あるいは高分子物質にとりこまれる過程などの分岐点に位置していて，次の4反応を接触する酵素の基質となる。

1. G6P⇄G1P
2. G6P⇄F6P
3. G6P⟶6PG (6PG⟶Ru5P⟶R5P)
4. G6P⟶グルコース+Pi

六炭糖が盛んに合成されて澱粉の形成が活発な状態では式1,2の反応系が主要な径路を形成しているが，式3の反応がこれに組合されると制御材構が働らく[1]ので複雑となる。

従来，植物の生化学的研究は“葉”の機能に関する事柄に集中していて，“幹”のように個体にとってむしろ主要な部分に対してはあまり関心がもたれていないきらいがある。前の報告[2]によって，材部はその酵素活性からみて可成り重要な機能を有することがわかった。本報では一連の実験として，式3を接触する酵素活性の変動をしらべ反応径路の分岐点における制御関係に若干の考察を加えた。

実際，冬のポプラの材部に強いG6Pの脱水素酵素群が存在し，開芽にともない徐々にそれらの活性低下のおこることがわかった。

本文では次の略号を用いた。G6P, グルコース6-燐酸；F6P, フラクトース6-燐酸；G1P, グルコース1-燐酸；6PGLU, 6-ホスホグルコン酸；Ru5P, リブロース5-燐酸；R5P, リボース5-燐酸；PHI, ホスホヘキソーズイソメラーゼ；GA3P, グリセルアルデヒド3-燐酸；G6PDH, グルコース6-燐酸脱水素酵素；6GPDH, 6-ホスホグルコン酸脱水素酵素；Pi, 無機燐酸。

* 北海道大学低温科学研究所業績 第1114号

II. 材料と方法

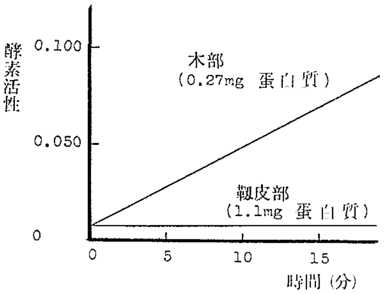
材料： ポプラ (*Populus gelrica*) は鉢植のものと圃場に生育しているものの両者を用いた。前者は，1月中旬に圃場から 4°C の室に移して保存し実験に供した。酵素と主な試薬は Boehringer u. Sohne GmbH 製を用いた。

方法： 酵素液の調製は前報[2] と同様に擂潰機を用いて行なった。磨砕後のガーゼ搾汁をトリス-塩酸緩衝液 (0.05 M, pH 7.6) に対して，30 分毎に外液を取換えて 90 分間透析し，ついで 10,000×g で 10 分間遠心してその上清を酵素液とした。酵素活性の測定は次の反応液を用いて行なった。反応液組成：G6P 0.2 μmole あるいは 6PGLU 0.5 μmole，TPN^+ 0.25 μmole，$MgCl_2$ 30 μmole，トリス-塩酸緩衝液，pH 7.6，150 μmole および酵素液，全容 3.0 ml。蛋白質の定量は 6 N 塩酸で加水分解したのち，牛血清アルブミンを標準として，アミノ酸を定量する方法で行なった。

III. 結　果

材部の G6PDH と 6PGDH の活性

越冬中のポプラ材部は G6PDH と 6PGDH の活性が非常に強い。第1図に示すように靭皮部中のこれら2酵素は TPN^+ の還元を比色する方法では検出不可能で，前報[3] のようにアイソトープを用いて活性の検出が可能な程度である。これに反して材部はこれらの酵素活性が強いので少量の酵素液で酵素活性の測定が可能である。



第1図 ポプラの材部の G6PDH 活性
反応液組成：G6P 0.2 μmole, TPN^+ 0.25 μmole，$MgCl_2$ 30 μmole，トリス-塩酸緩衝液，pH 7.6，150 μmole および酵素液，全容 3.0 ml，酵素活性は O.D. 340 mμ であらわした

第1表 冬* のポプラの G6PDH 活性

区　分	材部 蛋白質 (mg)	材部 G6PDH (μmole/10 分/mg 蛋白質)	靭皮部 蛋白質 (mg)	靭皮部 G6PDH (μmole/10 分/mg 蛋白質)
易溶性	1.3	0.07	2.7	0**
硼酸緩衝液可溶性	—***	0**	12.3	0**
〃 不溶性	0.5	0**	6.7	0**

* 3月11日採取　** 比色法では活性が検出されない　*** 極く微量の蛋白質

第2表 春* のポプラの G6PDH 活性

区　分	材部 蛋白質 (mg)	材部 G6PDH (μmole/10 分/mg 蛋白質)	靭皮部 蛋白質 (mg)	靭皮部 G6PDH (μmole/10 分/mg 蛋白質)
易溶性	0.74	0** (0.01 以下)	0.7	0**
硼酸緩衝液可溶性	—***	0**	0.9	0**
〃 不溶性			3.6	0**

* 5月27日採取　** 比色法では活性が検出されない　*** 極く微量の蛋白質

冬と春の材部の G6PDH 活性をしらべた結果を第1表と第2表に示した。磨砕物を3つの蛋白質区分，即ちトリス-塩酸緩衝液で容易に可溶化する区分，硼酸緩衝液抽出で可溶化する区分および不溶区分に分けた結果，G6PDH は易溶性区分にあることが示された。比較の為に靱皮部の蛋白質区分についてそれぞれ蛋白量を示した。前述のように靱皮部の G6PDH 活性は極めて弱いので，この実験条件では活性の分布は明らかでない。

材部の G6PDH は通常の磨砕・抽出の条件で，その 80～90% が最初の抽出液に含まれる。6PGDH 活性も G6PDH と同様に易溶性で，その殆んどが初回の抽出液中に含まれる。冬期の材の高い脱水素酵素活性は開芽後 2～3 週間内に低下してしまい，極めて弱い活性を示すようになる。このような活性低下の現象がポプラの材部に一般的なことであるか否かを検討する為に第1,2表とは別のポプラで活性の違いをしらべた。第3表にその結果を示した。このように G6PDH の高い活性は冬の材部に特有の性質であることが明らかになった。

第3表 ポプラ材部の G6PDH

採取	可溶区分	不溶区分
月日	(μmole/10 分/mg 蛋白質)	
3/20	0.07	0*
7/16	0.01 以下	0*

* 比色法では活性が検出されない

G6PDH と同時に行なった実験で，材の 6PGDH 活性は，常に G6PDH より高く (3～6 倍あるいはそれ以上)，また，開芽後に G6PDH 活性の検出が容易でない時期においても比色法で検出し得る程度の水準を保っていることがわかった。

G6PDH と 6PGDH 活性低下の時期

鉢植のポプラを用いて開芽前後の G6PDH と 6PGDH 活性をしらべた。1月中旬まで圃場においた鉢植のポプラを室内に入れると約2週間で開芽が始まり，新稍の伸長と緑葉の繁茂が相伴なう。このような"生活相"の変化に応じた G6PDH と 6PGDH の活性を第4表に示した。表からわかるように開芽にともなう活性の低下は顕著である。開芽が始まる頃はまだ高い酵素活性が保たれているが，その後の変動は著しく G6PDH は比色法によっては検出し難くなり，6PGDH 活性も僅かとなる。このように鉢植のポプラを用いても，圃場における冬から春の状態の変化と同じことが観察された。

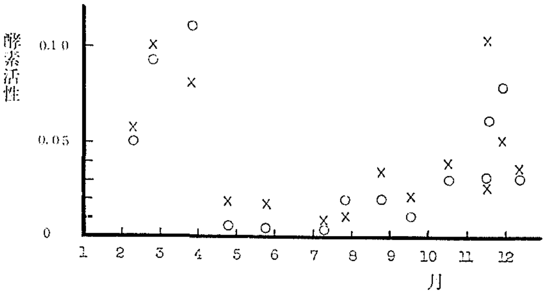
第4表 開芽にともなう材の G6PDH と 6PGDH の活性変化

月 日		G6PDH	6GPDH
		(μmole/10 分/ml 酵素液)	
2/ 7	実験開始*	0.28	1.00
2/23	開芽開始		
3/ 2		0**	0.17
3/ 9		0**	0.07

* 1月中旬から実験開始まで 4°C に保った
** 比色法では活性が検出されない

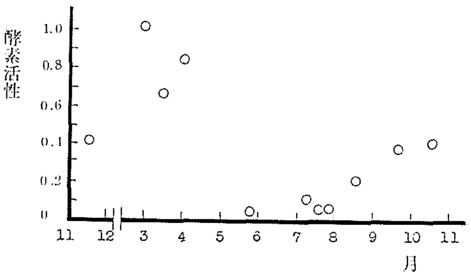
G6PDH と 6PGDH の活性変動

年間を通して活性をしらべた結果を第2図 (G6PDH) と第3図 (6PGDH) に示した。春の開芽時期に低下した材の G6PDH 活性は通常の条件ではその低い



第2図 ポプラ材部における G6PDH 活性の変化
反応条件は第1図参照。酵素活性：○，μmole TPNH/10 分/ml 酵素液；×，μmole/10 分/mg 蛋白質

水準を8月頃まで保つように思われる。秋における活性の高まりは徐々に進み，落葉の時期には可成の高い活性を示すようになる。6PGDH活性も同様な経過をたどることがわかる。このように越冬中の材のG6PDHと6PGDHは，春と夏の低い水準を経て再び高い活性の水準に到達することが判明した。



第3図　ポプラ材部における6PGDH活性の変化

反応条件は本文参照

酵素活性：μmole TPNH/10分/ml 酵素液

G6PDHの阻害物質について

靱皮部には，開芽時期に強力なG6PDH阻害物質が出現するが[1]，この時期の材部には阻害物質はほとんど存在しない。また，他の時期にも存在しないように思われる。冬期は材部に比べて靱皮部のG6PDH活性は非常に弱く，春期および夏期においてもこの低い水準を示すが，開芽・成長時期には材部の活性が著しく低下するので個体として靱皮部のG6PDHに依存する度合が増している。このような時期に阻害物質が出現するのでこの物質は物質代謝に相当な影響を与えているものと考えられる。この物質は特に靱皮部の代謝と密接な関連をもつように限定された効果を示しているように思われる。

市販のG6PDHに春の靱皮部抽出液を加えると強い阻害を示す[1]。この阻害は桔抗的であり，抽出液をあらかじめヒドロキシルアミンで処理すると阻害効果を示さなくなる（第5表）。これらのことから阻害物質は，既に微生物などで知られているAcyl-CoAであると思われる。

第5表　靱皮部抽出液に対するヒドロキシルアミンの効果

	阻害（%）
1. 対　照	0
2. 1＋靱皮部抽出液	50
3. 1＋0.5 M ヒドロキシルアミン処理抽出液	0

G6PDHの活性測定系：トリス–塩酸緩衝液，pH 7.6, 150 μmole, $MgCl_2$ 30 μmole, TPN^+ 0.2 μmole, G6P 0.2 μmole, G6PDH 0.05単位，G6PDHを1/2阻害する量の靱皮部抽出液，全容3.0 ml。靱皮部抽出液のヒドロキシルアミン処理：開芽後の靱皮部抽出液0.05 mlに中和した1 Mヒドロキシルアミン0.05 mlを加えて30分間反応させた

IV. 考　察

冬期のポプラ材部は高いG6PDHと6PGDH活性を有している。落葉後のポプラでは，靱皮部の両酵素活性は比較にならない程度に低いから，個体としてみると両酵素活性のほとんどの部分が材に集中していることがわかった。この点から材部の生化学的役割を検討することが必要になったと思われる。第6表は5年生のポプラの幹

第6表　冬のポプラ材部のPHIと6PGDHの活性

年輪	*P. gelrica*		*P. jacometii*	
(年)	PHI*	6PGDH	PHI*	6PGDH
5	−**	−**	+	+
4	+	+	+	+
3	+	+	+	+
2	+	+	+	+
1	++***	++***	++	++

* 酵素活性測定系は本文のG6PDH測定系からG6Pを除き，F6Pと過剰の市販G6PDHを加えた

** 褐変していた

*** 活性は1年目を基準とした。PHIと6PGDHの活性が等しいことを意味しない

(直径約10 cm)から年輪毎に材を分けてPHIと6PGDHの活性をしらべた結果である。幹の部分は枝と比べて酵素活性は低いが何れも比色法で検出可能である。前述の如くPHIとこれら2酵素はG6P代謝の分岐点に位置しているから，この実験結果はこれらの酵素群が太い幹の内部において機能と結びついた役割を果していることを示しているものと考えられる。

開芽後，緑葉が繁茂する頃までに材部のG6PDHと6PGDH活性が著しく低下する。この時，材部のトランスケトラーゼ活性に変動がおこらない[2)]。靱皮部では開芽にともなってトランスケトラーゼ活性が顕著に低下し，年間を通じて存在する弱いG6PDH活性の調節にはAcyl-CoAのような阻害物質が関係しているように考えられる。このように現在までの成績では，材部ではG6P代謝系の分岐点での代謝調節がみられ，靱皮部ではこの分岐点から離れた点に大きな変化がみられる。酵素量の変化は主として五炭糖燐酸回路系の酵素におこり，反応生成物を通じてPHIの活性を調節しているように考えられる。このような酵素量の変化は選択的な点に特徴がみられ，生活環を通じて変動しない酵素と消失する酵素は極めて対照的で，且顆粒と密接な関係がある[2)]。材部の顆粒構造も靱皮部のものと同様に消失する傾向が強いが，これら顆粒は不均一成分で消滅するものと残るものとに関する検討は今後の課題と考えている。開芽後のポプラの材部に比べて靱皮部には強いG6PDHの阻害物質が存在する[1)]。この物質は緑葉のある期間中存在するが，春の開芽時期に最も多量に存在するように思われる。この物質はすでによく知られている脂肪酸のCoAエステル[4)]と挙動が同じである。ポプラ材部のG6PDH活性が低下したのち，Acyl-CoAが靱皮部G6PDHの作用調節に関与しているのであろう。G6PDHや6PGDHの酵素活性からみても，ポプラは四季を通じてその生活環にもとづいて常に変りつつあると云えよう。

V. 摘要と結論

1. 冬期のポプラ材部は高いG6PDHと6PGDH活性を示し，1個体のG6PDHと6PGDHの大部分は材に集中していることが明らかになった。

2. 材部におけるG6PDHと6PGDHの変動は著しく，開芽伸長にともない2～3週間内にその殆んどが消失していくことがわかった。これが靱皮部の弱い両酵素活性と異なる点である。

3. 材部の両酵素活性は夏期から徐々に高まり，落葉の時期に明瞭に検出出来るようになる。

4. ポプラの材部は重要な生化学的機能を果していると思われ，実際5年生の幹のそれぞれの年輪の部分に酵素活性が認められた。

文　　献

1) 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**, 81-88.

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) 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靱皮組織の五炭糖燐酸回路の活性. 低温科学, 生物篇, **27**, 97-108.

4) Wood, W. A. 1966 Carbohydrate metabolism. *Ann. Rev. Biochem.*, **35**, 529.

Summary

In view of the previous work implicating transketolase as a main controlling step in poplar bark, a test in poplar xylem was made to see if G6PDH and 6PGDH were varied in winter and spring.

It was conspicuous for the difference of the activities of two dehydrogenases. Most of the activities found in winter xylem begin to be lowered during a metabolic shift from winter to spring. In spring and summer, the xylem contained such a low G6PDH activity that it was difficult to detect the activity spectrophotometrically. On the other hand 6PGDH activity, which also became lower on budding, could be detected spectrophotometrically and was several times higher than the former through the year.

The low dehydrogenase activities lasted into late September and then appeared to resume its original activities.

The strong inhibitor for commercial G6PDH occurring in budding bark of poplar was found to be acyl-CoA. There was no indication of such a strong inhibitor for G6PDH in the xylem.