



Title	植物の低温生化学的研究 VII : ポプラの糖リン酸エステル含有量と生活相の関連
Author(s)	匂坂, 勝之助; SAGISAKA, Shonosuke
Citation	低温科学. 生物篇, 28, 43-48
Issue Date	1971-01-25
Doc URL	<a href="https://hdl.handle.net/2115/17768">https://hdl.handle.net/2115/17768</a>
Type	departmental bulletin paper
File Information	28_p43-48.pdf



## 植物の低温生化学的研究 VII\*

ポプラの糖磷酸エステル含有量と生活相の関係

匂坂勝之助

(低温科学研究所)

(昭和45年9月受理)

### I. 緒言

これまでの実験で、生物の生活相と酵素活性の関係を検討してきた。この報告は酵素活性の変動にもなって関連した基質の量がどのように変化するかを検討した結果である。これまでの酵素活性の検討は、“冬型の代謝体制”と春の開芽および成長の体制にある二つを選んで“相”の移行にもなる変化に重点をおいた。一連の実験として、基質の量をしらべて冬期間の植物の生活を理解することを試みた。この二つの“相”の間には糖磷酸エステルの質的な相違のあることが明らかになった。

本文で使用した略号は次の通りである。G6P, グルコース6-磷酸; F6P, フラクトース6-磷酸; G1P, グルコース1-磷酸; 6PGLU, 6-ホスホグルコン酸; GA3P, グルセルアルデヒド3-磷酸; G6PDH, グルコース-6-磷酸脱水素酵素; 6PGDH, 6-ホスホグルコン酸脱水素酵素; PHI, ホスホヘキソズイソメラーゼ; TIM, 三炭糖磷酸イソメラーゼ; GDH,  $\alpha$ -グリセロ磷酸脱水素酵素; E4P, エリスロース4-磷酸; PGM, ホスホグルコムターゼ。

### II. 材料と方法

材料: *Populus gelrica* は1年および2年生の鉢植のものを用いた。出芽にもなる磷酸エステルの含有量変化をみる場合は、冬の圃場から鉢を実験室内にとりこんで実験に供した。*Populus nigra* (3年生の枝) は圃場に生育しているものを分析の都度採取した。おもな試薬と酵素類は Boehringer u. Soehne GmbH 製を用いた。大根と梨は市場から購入したもので、馬鈴薯は北海道大学付属農場で収穫したものである。

方法: 1. 磷酸エステルの抽出。細かくきざんだ鞣皮部あるいは材部5gに海砂5g, 5%トリクロル酢酸20mlを加え、擂潰機で約10分間磨砕した。一分析試料につき30~40gを処理してから遠心し(12,000×g, 10分), 沈澱を40mlの水で抽出して遠心上清を合わせて粗磷酸エステル液とした。この溶液に固体Ba(OH)<sub>2</sub>を加えてpH6~6.5としてからアルコールを4容加えて2時間室温に静置した。上澄を傾斜して除き、遠心して磷酸エステルのバリウム塩を集めた。遠沈管内のバリウム塩に2N酢酸25mlを加えてよく混和して磷酸エステルを抽出した。

\* 北海道大学低温科学研究所業績 第1115号

抽出は4回反復し、よく混和してから30分間室温に放置した。酢酸抽出液を酢酸エチルエステルで2回、次いでクロロホルムで2回抽出洗滌したのち、減圧下(湯浴温度40°C以下)で残っている溶媒を除いた。Darco G-60で脱色後4容のアルコールを加えて磷酸バリウム塩の沈殿を得た。2時間静置したあと遠心してバリウム塩を集め、アルコール、アルコール・エーテル(3:1, v/v)およびエーテルで洗って減圧下に溶媒を除去した。磷酸エステルのバリウム塩は乾燥状態で冷所に保存し、分析に際して溶液とした。この抽出操作で得られた糖磷酸エステルのバリウム塩は最初の60%であった。大根、梨および馬鈴薯は下し金でおろしてトリクロル酢酸溶液に加えて除蛋白した。以下の操作はポプラと同様である。

2. 定量法 (1) G6P, F6P および G1P。反応液は3 ml中に次のものを含む: トリス-塩酸緩衝液, pH 7.6, 150  $\mu$ mole,  $MgCl_2$  30  $\mu$ mole,  $TPN^+$  0.25  $\mu$ mole および検液。定量は、最初にG6PDHを加えてG6Pを測定し、次いでPHIを加えてF6Pを、最後にPGMを加えてG1Pの順序に行なった。

(2) 6PGLU。(1)と同様の反応液を別に調整し、6PGDHを用いて定量した。

(3) GA3P。TIMとGDHを用いて定量した。反応液組成は次の通りである: トリス-塩酸緩衝液 pH 7.2, 150  $\mu$ mole,  $MgCl_2$  30  $\mu$ mole, DPNH 約0.1  $\mu$ mole, 全容3.0 ml。

### III. 結 果

#### 越冬中の糖磷酸エステルの濃度

冬期のポプラには春期や夏期とは異なった物質代謝の体制がある。これは、G6PDHや6PGDHのようにG6Pの脱水素に関与する酵素とトランスケトラーゼの変動で特徴づけられる<sup>1,3)</sup>。このような体制変化の時期に応じて基質の濃度をしらべたものを第1表に示した。

第1表 ポプラ韌皮部の磷酸エステル濃度 (mM)

採取月日	11/17 ('69)	11/27	12/23	4/14 ('70)	4/16	4/30	5/8*	6/8	6/11
材 料**	P.n.	P.g.	P.n.	P.g.	P.n.	P.g.	P.n.	P.n.	P.g.
G6P	0.29	0.28	0.26	0.26	0.39	0.27	0.20	0.16	0.15
F6P	0.06	0.08	0.07	0.03	0.05	0.04	0.03	0.04	0.04
G1P	0.03	0.04	0.02	0.01	0.03	0.02	0.01	0.03	0.01
6PGLU	0.05	0.07	0.05	0.02	0.04	0.02	0***	0***	0***
GA3P	0.03	0.03	0.03	0	0	0	0	0.01	0.01

\* 開芽時期

\*\* P.g., *Populus gelrica*; P.n., *Populus nigra*

\*\*\* 0.01 mM 以下

実験に用いた *P. gelrica* は鉢植で、*P. nigra* は圃場からのものであるが糖磷酸エステルの含有量に基本的な違いはないと思われる。表で最も顕著な変動を示しているのは6PGLUとGA3Pである。分析試料の11月17日のものは落葉後約1週間を経たものであるが、この時すでに6PGLUとGA3Pが著量蓄積している。GA3Pはその後消失して春期の開芽以前には検出出来ない。一方、6PGLUは開芽の時期まで蓄積していて材のG6PDHと6PGDH活性

の変動する頃に消失していく傾向が明らかである。これに対して、G6P、F6P および G1P は対照的である。これらのエステルは 6PGLU と異なり成育時期によって消失することはないが若干の量的変動がみられる。

**開芽と糖磷酸エステル濃度の変化**

第 1 表は自然条件下にあって開芽・生長する際の糖磷酸エステルの濃度変化をしらべた結果であるが、6PGLU の消失が開芽時における一般的現象であることをしらべた結果を第 2 表に示した。すなわち、鉢植のポプラ (*P. gelrica*) を冬の圃場から室内にとりこんで開芽せしめ、開芽前後の 6PGLU を靱皮部と材部について測定した結果である。第 1 表と異なるのは、冬に開芽させたことと、ポプラの根が幾分損傷をうけた為に自然条件下のものより根部が少ない 2 点である。第 1 表の成績と同様に開芽にもなって 6PGLU が消失するから、6PGLU の挙動は季節に関係なく、生活環の 1 つの特徴として理解されよう。

材部の糖磷酸エステルは定量可能な程度に高濃度で (第 2 表)、G6P は靱皮部の約 1/4 であった。材部の 6PGLU 濃度は低く、春期に活動を開始した靱皮部の水準である。材部の G6P に対する 6PGLU の比は靱皮部より低い。

**F6P と G6P の平衡**

第 1 表の G6P と F6P から F6P の占める割合を示したのが第 3 表である。第 3 表から、秋期から春期までの間に F6P と G6P の中で F6P の占める割合は可成変動することがわかる。秋期には F6P 濃度が比較的高いその後減少し、春期の開芽の頃まで低い値を示し続ける。

第 3 表 G6P と F6P の平衡状態

採取月日	11/17 ('69)	11/27	12/23	4/14 ('70)	4/16	4/30	5/8	6/8	6/11
材 料*	P.n.	P.g.	P.n.	P.g.	P.n.	P.g.	P.n.	P.n.	P.g.
$\frac{F6P}{G6P+F6P} \times 100$	17.1	22.2	21.6	10.3	11.4	12.9	13.0	20.0	21.0
$\frac{F6P}{G6P} \times 100$	20.7	28.5	26.9	11.6	12.8	14.7	15.0	25.0	26.6

\* P.g., *Populus gelrica*; P.n., *Populus nigra*

**開芽にもなう靱皮部と材部の糖濃度の変化**

第 1 表と第 3 表は秋の遅くから冬にかけて、糖代謝の進行していることを示している。F6P と G6P の比に変動がおこる頃には、第 4 表と第 5 表に示すように糖類の消費が始まるようにみうけられる。このことは靱皮部と材部で同様にみられる。可溶性糖類の含有量に関して靱皮部と材部の間の相違点は枝の上部と基部の濃度であって、靱皮部ではほとんど同じである

第4表 枝の靱皮部の糖濃度

採取 月日	供試部分	糖含有量 (グルコース当量, $\mu\text{mole}$ )*	
		可溶性区分	澱粉区分
3/20	上部	30.0	7.2
	基部	30.0	6.6
4/7	上部	30.0	8.5
	基部	27.5	6.8
5/15	上部	22.5	12.9
	基部	20.0	13.2
5/27	上部	20.0	7.3
	基部	17.3	8.0

\* 100 mg 生重量当り

第5表 枝の材部の糖濃度

採取 月日	供試部分	糖含有量 (グルコース当量, $\mu\text{mole}$ )*	
		可溶性区分	澱粉区分
3/20	上部	37.7	3.6
	基部	20.6	3.5
4/7	上部	30.9	6.0
	基部	16.8	4.2
5/15	上部	32.3	6.1
	基部	14.5	5.4
5/27	上部	18.2	8.1
	基部	2.9	6.9

\* 100 mg 乾物当り

が材部では 1/2 かそれ以下である。材部における枝の上部と基部の糖含有量の差は開芽・伸長にともない益々顕著となる。

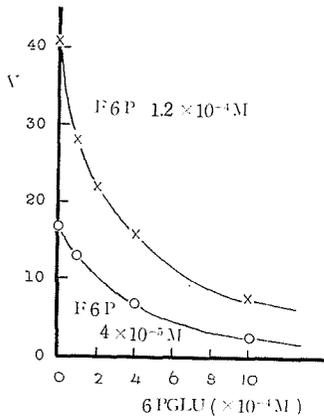
#### IV. 考 察

酵素化学的に得られた知見は実際生体内で進行している反応の様相とは可成異なるらしい。従来、PHI の反応の平衡は約 30/70 のように G6P の方に片寄っている<sup>2)</sup>とされているが、実際に G6P と F6P を定量した結果では、もっと G6P よりになっていて 20/80 から 10/100 の間にある。生体内では他の反応系との相互作用の結果、PHI 活性が可成抑えられていることがわかった。冬期および春期における第3表の数値は、その時期における PHI 反応の進行程度を直接あらわしているかどうかはわからない。秋期の平衡状態から F6P の利用された程度に従って濃度の減少したままの強い抑制の場合と或程度抑制を受けながら F6P の消費も行なわれている場合などが考えられる。

PHI は E4P<sup>3)</sup> や 6PGLU で (第1, 2 図) 強く阻害を受ける。第1表に示したように 6PGLU の蓄積している期間は、ポプラの PHI 活性は著しく抑制を受けていると思われる。表に示した数値は回収率の補正をしていないが、これを考慮すると 6PGLU の濃度は  $10^{-4}$  M の水準で、F6P とほぼ同じ濃度である。材部における濃度は、靱皮部の約 1/5 であった (第2表)。実際に、PHI の作用している環境の水分含有量、換言すると基質濃度は実験で得た組織の平均値としての数値と同じでなく、第1表の数値は最少の数値と思われる。これは特に材部について考えられる。

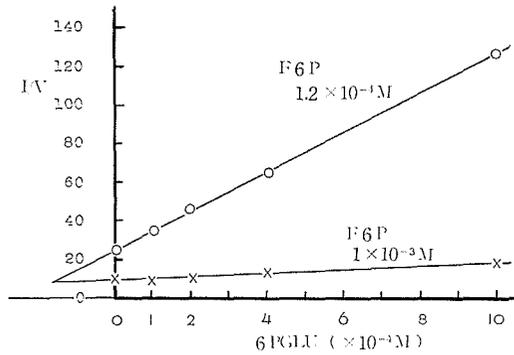
ポプラ材部の粗 PHI に対して 6PGLU は市販 PHI に対すると同様に阻害し、阻害は拮抗的で  $K_i$  は  $1.9 \times 10^{-4}$  M であった (第1 図, 第2 図)。靱皮部 PHI に対する 6PGLU の効果は比色法で直接測定出来ないので磨砕物の懸濁液を用いて検討した。 $4 \times 10^{-4}$  M の 6PGLU が存在すると靱皮部 PHI 活性は約 20% に低下する。

定性的な検討では、靱皮部に四炭糖磷酸エステルが存在する。このものは E4P と思われる。E4P はポプラ材部 PHI に対して拮抗的に作用し、その  $K_i$  は  $8 \times 10^{-6}$  M であった。



第1図 材の PHI 活性と 6PGLU

反応液組成：トリス-塩酸緩衝液, pH 7.6, 150  $\mu$ mole,  $MgCl_2$  30  $\mu$ mole,  $TPN^+$  0.26  $\mu$ mole, G6PDH 0.28 単位および冬期の材抽出液 (0.13 mg 蛋白質), F6P と 6PGLU は図示, 全容 2.5 ml. V: O.D. 340 m $\mu$



第2図 6PGLU の材 PHI 阻害

反応液組成は第1図参照

低温処理で糖濃度の増加することは古くから知られている<sup>4,5)</sup>。この機構はまだ解明されていないが、6PGLU と E4P の蓄積によって PHI 活性が抑えられることによる澱粉の合成反応の停止と続いて起るであろう澱粉の液化と低分子化がその主なものとして考えられる。別の要因は第6表に示したように、蔗糖などの増加する条件で不安定磷酸結合の蓄積がみられることである。馬鈴薯では 4°C に保存すると糖と不安定磷酸が 20°C のものより約 4 倍に増加し、糖磷酸エステルも 2 倍となる。しかし、糖の大部分は澱粉として存在していて、全体からみると磷酸エステルと糖の量は僅かの部分を占めるにすぎない。一方、大根と梨は大部分が可溶性の糖であって馬鈴薯と対照的である。ポプラとこれらの分析結果を併せ考えると、澱粉が殆んど消失するものでは 6PGLU が  $10^{-4}$  から  $10^{-5}$  M の濃度を示していて馬鈴薯の場合は  $10^{-6}$  から  $10^{-7}$  M の水準を保つことがわかった。PHI に対する阻害は E4P が大きいから E4P の実際の濃度を検討することが必要である。

第6表で、低温度で G1P の濃度が高まるから澱粉の液化に関する反応も糖濃度増加の要因となっているのであろうと思われる。低温度では成長肥大が停止しているが、高エネルギー

第6表 低温度における糖と磷酸化合物の蓄積 ( $\mu$ mole/100 g 生重量)

貯 蔵 条 件	馬 鈴 薯		大 根	梨
	4°C	20°C	4°C	4°C
	3 カ 月	3 カ 月	3 週 間	3 週 間
不安定磷酸	41	11	—	—
6PGLU	0.07 以下	0.07 以下	0.8	0.9
G6P	17.1	9.9	5.3	1.6
F6P	3.4	1.8	1.4	0.4
G1P	3.4	1.3	0.3	0.2
可溶性糖類 (グルコース当量)	4,610	1,150	17,970	30,250

化合物の蓄積は進行するからこれが蔗糖などの合成反応に使われると考えられる。このような時期では前述のように PHI 活性が極めて低くなっているもの（ポプラなど）があり、結果として糖が生成するようになると思われる。ポプラでは春の開芽時期に五炭糖磷酸回路系の酵素活性に変動が生じ、6PGLU などの蓄積する機構が消失するが、この時期には再び若干量の澱粉が形成される。

## V. 摘要および結論

- 1 落葉後から開芽時期までの糖磷酸エステルを定量して、ポプラの“生活相”の変化に考察を加えた。
- 2 五炭糖磷酸回路系の酵素活性変動にともなって、6PGLU の濃度に大きな変化がみられる。
- 3 越冬性植物の糖生成機構に考察を加えた。

## 文 献

- 1) 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磷酸エステル代謝系の体制変化. 低温科学, 生物篇, **27**, 73-80.
- 2) Kahana, S. E., Lowry, O. H., Schlz, D. W., Passonneau, J. V. and Crawford, E. J. 1960 The Kinetics of phosphoglucose isomerase. *J. Biol. Chem.*, **235**, 2178-2184.
- 3) 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.
- 4) Arreguin-Lozano, B. and Bonner, J. 1949 Experiments on sucrose formation by potato tubers as influenced by temperature. *Plant Physiol.*, **24**, 720-738.
- 5) 酒井 昭 1957 木本類の耐凍性増大と糖類及び水溶性蛋白質との関係. 低温科学, 生物篇, **15**, 17-19.

## Summary

A concentration of sugar phosphates in poplar bark and xylem has been determined to see an insight into a metabolic situation of the stem and a comparative activity of the pentose-phosphate cycle in the sugar-phosphate metabolism in winter and spring.

The physiological concentration of G6P, F6P and G1P in winter bark was approximately  $3-4 \times 10^{-4}$  M,  $0.8-1.0 \times 10^{-4}$  M, and  $0.4 \times 10^{-4}$  M, respectively. At the onset of growth the concentration of these esters was gradually lowered to levels of half or less than half of that of the winter. An appreciable amount of GA3P was seen only in late autumn and early winter. 6PGLU, an inhibitor of PHI, accumulated both in bark and xylem in autumn at levels almost equal to that of F6P and in spring disappeared at the onset of growth.

In autumn, the pentose-phosphate cycle become active and G6P could rapidly be metabolized by way of the cycle, yielding 6PGLU, which inhibits PHI and splits the glycolytic pathway at this step to some extent. In support of this conclusion, an equilibrium of F6P/G6P shifted from about 0.3 in autumn to 0.1 early in spring, indicating an inhibitory situation of PHI *in vivo*.