



HOKKAIDO UNIVERSITY

| | |
|------------------|---|
| Title | ニセアカシアのレシチン分解酵素活性 |
| Author(s) | 吉田, 静夫; YOSHIDA, Shizuo |
| Citation | 低温科学. 生物篇, 28, 57-62 |
| Issue Date | 1971-01-25 |
| Doc URL | https://hdl.handle.net/2115/17770 |
| Type | departmental bulletin paper |
| File Information | 28_p57-62.pdf |



ニセアカシアのレシチン分解酵素活性*

吉田 静夫
(低温科学研究所)
(昭和45年9月受理)

I. 緒 言

ニセアカシア¹⁾やポプラ²⁾の磷脂質は秋から冬にかけて蓄積し、春先開葉とともに分解することが知られている。こうした磷脂質代謝の季節的周期性は細胞の構成要素の動的な変化を示すものと考えられ、生理的にきわめて重要な意義を持つものと考えられる。

また、耐凍性と磷脂質の量および質は季節的に平行して変動するので¹⁾、脂質代謝を検討することによって耐凍性変動の機構解明へのひとつの糸口が得られるものと考えられる。

本報では、植物の脂質代謝に関する研究の一端として磷脂質の分解に関与していると思われるレシチナーゼの特性と活性変動についてニセアカシアの皮を使って検討した。さらに、レシチナーゼの細胞内における分布と凍結融解による活性化について2・3の知見が得られたのであわせて報告する。

II. 材料と方法

2月から7月にかけて採取したニセアカシア *Robinia pseudo-Acacia* L. の鞣皮部を用いた。粗酵素液の調製はつぎの通りである。鞣皮部2g(生重量)を同量の石英砂と6mlの抽出液を加えて磨砕し、2枚のガーゼでこしたものを粗酵素液とした。抽出液は0.5Mソルビトールを含む0.05Mトリス-塩酸緩衝液(pH7.6)である。

基質として用いた卵レシチンは、卵黄を10倍量のアセトンで3回洗って濾過し、残渣をクロロホルム-メタノール(2:1v/v)で3回常温で抽出した。抽出液は溶媒を除いて少量のアルコールに溶かした。これに50%塩化カドミウムを加えレシチンを沈澱させ、沈澱をアセトンで洗ってからクロロホルムに溶かした。塩化カドミウムはクロロホルム層を水洗して除いた。こうして得られた粗レシチンを硅胶カラムで処理したものを精製レシチンとした。薄層クロマトグラフで調べるとレシチンのほかにごく少量のホスファチジルエタノールアミンが検出された。

酵素活性は遊離するコリンの量で表わし、反応および定量はつぎのようにして行なった。すなわち、0.1M酢酸-酢酸ナトリウム緩衝液(pH5.0)2.0ml、1.0M塩化カルシウム25 μ l、卵レシチン12.0mg、エーテル1.0mlに粗酵素液(とくにことわらない場合は0.5ml)を加えて25°Cで20分間反応させ、0.5mlの1.0M過塩素酸を加えて反応を停止した。遠沈後エーテル

* 北海道大学低温科学研究所業績 第1117号

を除き 4 ml のエーテルで 2 回洗ったのち 40°C で残っているエーテルを完全に除いて遠沈した。上清に 2 ml のライネッケアンモニウムの 0.5 M 塩酸溶液を加えて 0°C 30 分間放置した。生じた沈澱を遠沈で集め 2 ml の冷水、ついで 2 ml の冷エタノールで沈澱を洗った。この沈澱を 4 ml のアセトンにとかして 562 m μ で吸光度を測定した。蛋白質はつぎのようにして定量した。つまり、蛋白質を 0.1 N 過塩素酸で沈澱させ 6.0 N 塩酸中で 100°C 18 時間加水分解し、ニンヒドリンによりアミノ酸を定量した³⁾。

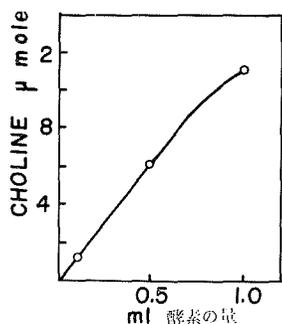
III. 結 果

加えた粗酵素液の量とコリンの遊離からみたレシチナーゼ活性との関係を第 1 図に示した。粗酵素液が 0.1~0.5 ml (蛋白質 1.1~5.5 mg) では活性は直線的に増加したが、0.5 ml 以上ではいくぶん直線からずれた。なお、粗酵素液が 0.1~0.5 ml の範囲では反応時間が 20 分以内のとき活性は時間とともに直線的に増加した。つぎに、反応液の pH と活性との関係を調べ

の結果を第 2 図に示した。至適 pH は 4.5~5.0 の範囲にあり、これよりも酸性側では活性の低下が著しい。

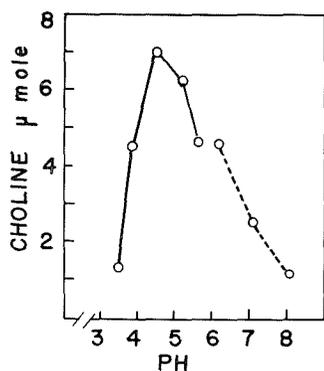
つぎにレシチナーゼ活性におよぼす Ca²⁺, Mg²⁺, エーテルの影響についてしらべた。第 1 表で明らかなように Ca²⁺, あるいはエーテルを単独で加えた場合は活性化されず、Ca²⁺ とエーテルが同時に存在した時はじめて活性化されることがわかった。また、おなじ 2 価の陽イオンでも Mg²⁺ ではエーテルが共存しても活性化されなかった。

レシチナーゼの細胞内分布を知るために、4 月 18 日の材料からの粗酵素液を 600 × g 12 分, 10,000 × g 15 分, 105,000 × g 60 分遠心し



第 1 図 酵素量とレシチナーゼ活性

粗酵素液: 4 月 13 日の材料から調製。反応は 25°C 20 分, 縦軸は遊離するコリンの量, 横軸は粗酵素液の量, 詳細は本文参照



第 2 図 レシチナーゼ活性と pH

用いた粗酵素液の調製は第 1 図とおなじ。実線は酢酸緩衝液を破線はトリス-塩酸緩衝液をそれぞれ反応液に加えた場合を示す。緩衝液の濃度はいずれも 0.1 M, 反応は 25°C 20 分, 詳細は本文参照

第 1 表 Ca²⁺, Mg²⁺ およびエーテルのレシチナーゼ活性におよぼす影響

| 反 応 条 件 | 活 性 (μmole コリン) |
|-----------------------------|--------------------|
| 完全 (Ca ²⁺ +エーテル) | 6.2 |
| Ca ²⁺ のみ | 0.5 |
| エーテルのみ | 0.5 |
| Mg ²⁺ +エーテル | 0.8 |
| Mg ²⁺ のみ | 0.5 |

粗酵素液: 第 1, 2 図のものと同じ, 0.1 ml を用いて 25°C 20 分間インキュベート

Ca²⁺ および Mg²⁺ は最終濃度が 0.01 M となるように加えた。

ておのおの上清について活性をしらべた。結果は第2表の通りであった。600×g 12分では全活性の28%が上清から失われるが、10,000×g 15分ではその90%以上の活性が失われた。600×g 12分ではプラスチックの大部分が沈澱し、10,000×g 15分ではミトコンドリアが沈澱するから、レンチナーゼ活性の大部分はミトコンドリアまたはそれに近い形状をもった細胞顆粒中に存在することが明らかとなった。なお、10,000×g 上清にも多少の活性が存在するが、これは105,000×gで沈澱する細胞顆粒成分に由来するものようで、おそらくミクロゾームによるものと推定される。

ニセアカシアの磷脂質は春から夏に開葉とともに分解され減少してゆくが、この過程でレンチナーゼの活性がどのように変わるだろうか。第3表に示したように単位乾物重量あたりの酵素単位(25°Cで1時間に1 μmoleのコリンを遊離する酵素量を1単位とする)は冬あるいは春先に高く、6月以降開葉につれて約半分まで低下した。そして、この低下は10,000×gで沈澱する細胞顆粒の消長によることが明らかである。なお、粗酵素液と10,000×g沈澱画分の酵素量が同じ比率で低下しないのは開葉後(6月以降)の材料では酵素活性を有する顆粒の一部が上清に移行するためではないかと思われる。第4表に示したように、10,000×g沈澱画分の蛋白量は季節的に変動し、冬から夏にかけて1/2~1/3に減少した。結局、単位乾物重量あたりの酵素量の変動はまさに10,000×g沈澱画分の細胞顆粒成分に帰せられる。

単位蛋白重量あたりの活性は第5表の通りで、粗酵素液にくらべて10,000×g沈澱では高い値を示した。比活性は粗酵素液では時間的にあまり変動がみられないが、10,000×g沈澱では冬から夏にかけて低下した。これは600×gで沈澱する画分が入っているためであろう。

第2表 レンチナーゼの細胞内分布

| 酵 素 液 | 活 性 (μmole コリン) | 活性損失 (%) |
|--------------|--------------------|-------------|
| 粗 酵 素 液 | 6.8 | 0 |
| 600×g 上清 | 4.9 | 28.0 |
| 10,000×g 上清 | 0.6 | 91.2 |
| 105,000×g 上清 | 0.0 | 100.0 |

粗酵素液は4月13日の材料から調製した

第3表 乾物重量(g)あたりの酵素単位の季節的変動

| 材料 | 期 日 | 酵素単位*/乾物重量(g) | |
|----|-------|---------------|-----------------|
| | | 粗酵素液 | 10,000×g 沈 澱 |
| 1 | 2月13日 | 94.8 | 83.4 |
| | 7月23日 | 43.6 | 17.7 |
| 2 | 4月18日 | 111.6 | 85.2 |
| | 6月1日 | 52.5 | 18.6 |
| | 7月23日 | 49.6 | 18.3 |

* 25°Cで60分間に1 μmoleのコリンを遊離する酵素量

第4表 蛋白質の変動

| 材料 | 期 日 | 蛋白質 mg/乾物重量(g) | |
|----|-------|----------------|-----------------|
| | | 粗酵素液 | 10,000×g 沈 澱 |
| 1 | 2月13日 | 81.4 | 8.8 |
| | 7月27日 | 25.4 | 3.5 |
| 2 | 4月18日 | 53.2 | 11.0 |
| | 6月1日 | 30.0 | 3.7 |
| | 7月23日 | 23.4 | 3.0 |

第5表 蛋白あたりの活性

| 材料 | 期 日 | 比 活 性 (μmole コリン/mg 蛋白) | |
|----|-------|----------------------------|-----------------|
| | | 粗抽出液 | 10,000×g 沈 澱 |
| 1 | 2月13日 | 1.3 | 9.6 |
| | 7月23日 | 1.8 | 4.9 |
| 2 | 4月13日 | 2.1 | 7.8 |
| | 6月1日 | 1.8 | 4.9 |
| | 7月23日 | 2.1 | 2.3 |

IV. 考 察

Kate⁴⁻⁶⁾ はサトウダイコン、ハウレンソウ、キャベツの葉およびニンジンの根のレシチナーゼについて報告している。この酵素はクロロプラストおよびプラスチッドにのみ活性が存在し、エーテル添加だけで十分活性化されレシチンの特異的に分解してコリンを遊離する。至適 pH はサトウダイコンとハウレンソウでは 4.8~5.0, キャベツとニンジンでは 5.6~6.0 の範囲にある。至適 pH からみれば、ニセアカシアのレシチナーゼは Kate^{4,5)} のサトウダイコン、ハウレンソウのレシチナーゼに近い性質を持っている。しかし、ニセアカシアの場合はエーテル単独では活性化されず、Ca²⁺ の存在が要求されること、10,000×g 沈澱画分に大半の活性が存在することからこれらの野菜の葉のレシチナーゼとは少し性質を異にしている。また、Davidson, Long⁷⁾ らは savoy キャベツおよび芽キャベツから活性の高い可溶性ホスホリパーゼ D を得ている。これは主としてクロロプラストを含まない非光合成部分から得られ、Ca²⁺ 依存性であることを明らかにした。しかし、上述のごとくニセアカシアのレシチナーゼは 10,000×g 沈澱画分中に存在することから、これらの可溶性ホスホリパーゼ D とは細胞内における存在様式からみてその生理的性質を異にしているものと考えられる。

ニセアカシアのレシチナーゼを卵レシチンに働かせたときの生成物を薄層クロマトグラフでしらべると、すべてホスファチジン酸であり、中性脂質中にはジグリセライドは検出されなかった。したがって、ニセアカシアのレシチナーゼはレシチンの隣とコリンの結合部位に働いてコリンを遊離するもので、Kate⁵⁾ がハウレンソウの葉で明らかにしたホスファチジン酸ホスファターゼは存在しないかあるいは極めて微弱であると考えられる。

別の実験結果によると、糖脂質と磷脂質のかかなりの量が 10,000×g 沈澱画分中にあり⁸⁾、季節的な複合脂質の変動もこの 10,000×g 沈澱画分に負うところが大きいものと予想される。したがって、磷脂質に富む細胞顆粒それ自身が強いレシチナーゼ活性を有しているものと言える。今のところ、秋から冬にかけてこの細胞顆粒の変動とレシチナーゼ活性の変動の関係はしらべていないが、顆粒の生成時にレシチナーゼが平行してつくられるものと仮定するとそれが冬から夏にかけて生理的に活性の高まる機序は興味を持たれる。また、Dawson⁹⁾ によって明らかにされたホスホリパーゼ D のホスファチジル基転位活性がレシチンの生合成にも関与している可能性も考えられる。

僧都¹⁰⁾ はパン酵母に関して興味ある結果を報告している。パン酵母を液体窒素中で急速に凍結して障害を与えると磷脂質の抽出が容易になるとともに磷脂質は急速に分解され消失する。このことはニセアカシアについても認められた。すなわち、真冬のニセアカシアの枝を室温から直接液体窒素中に投入して室温で融解させ、この操作を 2 回くり返したのち無処理の枝を対照として 27°C で 1.5 時間インキュベートした。そのあと生重量で 1 g の靱皮部をとり前報¹⁾ と同様に脂質を抽出し硅胶カラムを使って磷脂質を分析した。その結果を第 6 表に示した。なお前報¹⁾ の Fr III (8% メタノールで溶出される) はホスファチジルエタノールアミンの中に入れて表わした。凍結融解後 27°C でインキュベートすると、ホスファチジルコリンの減少が最も大きく 64% に達した。ホスファチジルエタノールアミンはレシチンよりも少なく 26% が減

第6表 液体窒素-室温で凍結融解後のニセアカシア
 鞣皮部中の磷脂質の変化 ($\mu\text{mole Pi}$)

| | | PA | PG* | PE | PI | PC | メタノール 溶出画分 |
|----------------------------|------|-------|-------|-------|-------|-------|---------------|
| A | NC | 0.61 | 2.56 | 5.70 | 0.94 | 5.12 | 0.52 |
| B | 凍結融解 | 1.80 | 5.66 | 4.19 | 0.43 | 1.80 | 0.38 |
| $\frac{B-A}{A} \times 100$ | | 198.3 | 140.0 | -26.5 | -52.4 | -64.7 | -26.9 |

* PA と PG の分離不良で PA が相当混入している。

PA, ホスファチジン酸; PG, ホスファチジルグリセロール; PE, ホスファチジルエタノールアミン; PI, ホスファチジルイノシトール; PC, ホスファチジルコリン

少した。これとは対称的に、ホスファチジン酸とホスファチジルグリセロールの画分はそれぞれ 198%, 140% と非常に増加した。また、抽出液の水溶性画分には凍結融解後 $4.1 \mu\text{mole/g}$ (生重量) の遊離コリンが認められた。また全磷脂質量は未処理と凍結融解後の材料でそれぞれ 12.8, 12.7 $\mu\text{mole/g}$ (生重量) であって磷脂質総量の変化は認められなかった。したがって、ニセアカシアの細胞中のホスホリパーゼは凍結融解して障害を与えると活性化される。レンチナーゼは $10,000 \times g$ で沈澱する細胞顆粒の中にあるので、凍結融解による顆粒の構造的な破かいのためその本来の調節機構が失われるものと推定される。また、この場合は抽出された酵素と異なって、 Ca^{2+} 、エーテルなどによる活性化を必要としない点において、その活性化の機序は異なっているものと言える。また、無傷組織中におけるいわゆる生理的な活性化とも異なっているかも知れない。

凍結融解した材料について磷脂質以外の脂質について薄層クロマトグラフで定性的にしらべた。その結果、ステロールグルコシド、モノガラクトシルグリセライド、ジガラクトシルジグリセライドは著しく減少したが、エステル型ステロールグルコシド、トリグリセライド、ステロールエステルはほとんど変化しなかった。それに、ステロールは多少増加したが遊離脂肪酸とジグリセライドはほとんど検出されなかった。したがって、ニセアカシアにはホスホリパーゼ C は存在しないものと考えられる。

この報告にあたり御校閲下さった酒井昭教授に感謝します。

V. 摘 要

ニセアカシアについて冬から夏のレンチナーゼの活性を調べた。

ニセアカシアのレンチナーゼは卵レンチンに働いてコリンを遊離させる。その至適 pH は 4.5~5.0 の範囲にあり、 Ca^{2+} とエーテルの共存によって活性化された。酵素の細胞内分布を調べたところ $10,000 \times g$ で沈澱するミトコンドリアの画分に大部分が存在していた。この画分には磷脂質が多く存在するので、春先この顆粒が消失するときレンチナーゼ活性も同様に低下した。

枝を液体窒素中で凍結融解すると、細胞内のレンチナーゼは著しく活性化された。

文 献

- 1) 吉田静夫 1969 植物の耐凍性に関する研究 II. ニセアカシア鞣皮組織の磷脂質の季節的変動. 低温科学, 生物篇, **27**, 119-123.
- 2) 吉田静夫・酒井 昭 (未発表).
- 3) 匂坂勝之助 1968 植物の低温生化学的研究 I. ホブラの Ribose 5-phosphate の代謝反応系について. 低温科学, 生物篇, **26**, 33-43.
- 4) Kates, M. 1954 Lecithinase systems in sugar beet, spinach, cabbage, and carrot. *Can. J. Biochem. Physiol.*, **32**, 570-583.
- 5) Kates, M. 1955 Hydrolysis of lecithin by plant plastid enzymes. *Can. J. Biochem. Physiol.*, **33**, 575-589.
- 6) Kates, M. 1956 Hydrolysis of glycerophosphatides by plastid phospholipase C. *Can. J. Biochem. Physiol.*, **34**, 967-980.
- 7) Davidson, F. M. and Long, C. 1958 The structure of the naturally occurring phosphoglycerides 4. Action of cabbage-leaf phospholipase D on ovolecithin and related substances. *Biochem. J.*, **69**, 458-466.
- 8) 吉田静夫 (未発表).
- 9) Davson, R. M. C. 1967 The formation of phosphatidylglycerol and other phospholipids by the transferase activity of phospholipase D. *Biochem. J.*, **102**, 205-210.
- 10) 僧都 博 1969 酵母細胞脂質におよぼす凍結融解及び凍結乾燥の影響. 低温科学, 生物篇, **27**, 23-30.

Summary

This paper is concerned with the lecithinase activity in the bark cells of black locust trees in winter and spring with reference to its change and localization in the cells.

The lecithinase in the bark cells was found to liberate choline by hydrolysis of egg lecithin in the presence of Ca^{2+} and ether. Using acetate buffer the optimum pH for this reaction was found to be 4.5~5.0. In these respects properties of the lecithinase in the bark cells was similar to that of the soluble phospholipase D which was found in the yellow heart of savoy cabbage by Davidson *et al.* More than 90% of the total activity was found to be associated entirely with particulated fractions sedimented by centrifugation at $10,000\times g$. The lecithinase activity was found to be very high in both winter and early spring, and declined to a half level in early summer as unfolding of the tree proceeded.