



Title	開葉期のポプラのグリセリン代謝
Author(s)	吉田, 静夫; YOSHIDA, Shizuo
Citation	低温科学. 生物篇, 28, 63-71
Issue Date	1971-01-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/17771
Type	departmental bulletin paper
File Information	28_p63-71.pdf



開葉期のポプラのグリセリン代謝*

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^{1,2)} やポプラ³⁾ では、グリセリンを骨格とする脂質が秋から冬にかけて活発に合成され、春先はそれが分解され減少することが定量的な実験から明らかとなった。このような脂質代謝の季節的な変化とともに、植物のグリセロール代謝が大きく変化することが予想される。

本報では開葉期のポプラにおけるグリセリンの代謝を明らかにするため、¹⁴C でラベルしたグリセロールを枝に与えていろいろな物質への¹⁴C のとりこみをしらべた⁴⁾。開葉期にはグリセリンは解糖系を経て活発に代謝されるが、一部は脂質合成に再動員されることが判明した。また、¹⁴C のとりこまれた脂質を分析した結果開葉期に進行する脂質合成の特徴が明らかとなった。

II. 材料と方法

材料：鉢植えにした一年生のポプラ *Populus gelrica* L. の枝を使った。ポプラは冬から4°Cの部屋におかれ冬芽は実験開始時(6月25日)にわずかに動き始めていた。6月20日に一部を屋外に出して開葉させた。所定時期に枝を採取しただちに実験に供した。使った枝の大きさはおよそ直径8 mm、長さ35 mmであった。

方法：グリセロール-1-¹⁴C は第一化学 KK から入手した。比放射能は10 mCi/mM で、2.5×10⁵ cpm/ μ l となるように水を加えた。その10 μ l を上記のポプラの枝の下端から材部を通じて吸わせた⁴⁾。枝の両端をパラフィルムで封じさらに全体をアルミホイルにつつんで20°Cの恒温箱に入れて3.5時間インキュベートした。

(1) インキュベート後枝を材と皮の部分に分け、それぞれ細く刻んで1%グリセリンを含む0.1N 過塩素酸5 ml を加えて4°Cにおいてただちに磨砕した。3,000×g で10分間遠沈し、沈澱を重炭酸カリで中和し10 ml の水で2回洗った。えられた水溶性画分は重炭酸カリで中和してpH 7.5 とし、1×2 cm のDowex-50 H 型カラムを通して糖、糖リン酸エステル画分およびアミノ酸画分を分離した。アミノ酸は2N アンモニアで溶出した。

(2) 糖および糖リン酸エステル画分は水酸化カリで中和してpH 7.2 とし、酢酸バリウム、ついで4倍量のエタノールを加え糖リン酸エステルを沈澱させた⁵⁾。沈澱はエタノール、ついでエー

* 北海道大学低温科学研究所業績 第1118号

テルで洗って乾燥させ酢酸に溶かした。酢酸バリウムとエタノールで沈澱しないものを糖画分とした。糖リン酸エステルは酸性ホスファターゼにより分解⁵⁾して糖の放射能分布を検討した。遊離の糖および糖リン酸エステルの酸性ホスファターゼ分解後の糖は Whatman No. 1 濾紙を用いてブタノール-酢酸-水 (120:30:50 v/v) で下降法で 16 時間展開し放射能の分布をしらべた。

(3) 脂質の抽出と分析はつぎのように行なった。0.1N 過塩素酸抽出残渣をメタノールで抽出し、ついで 10 ml のクロロホルム-メタノール (2:1 v/v) で 3 回常温で抽出し粗脂質画分を得た。粗脂質画分は Folch の方法で非脂質成分を除いた。こうして得られた脂質は硅胶カラムを用いて分画した。硅胶は Merck 製の 70~321 メッシュで使用前に 100°C で 1 時間活性化した。カラムは 1×6 cm で第 2 図に示したように順次溶出した。溶出液は 5 ml ずつ集めその一定量について放射能を測定した。

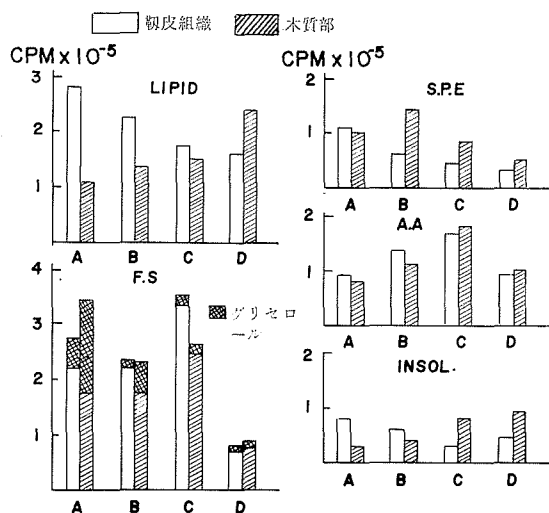
(4) ポプラのグリセロキナーゼ活性はつぎの方法¹⁰⁾により測定した。生重量で 1 g の材と皮をそれぞれ 2 ml の 0.5M 蔗糖, 0.001M EDTA, 0.05M トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.6) とともに 4°C で磨砕しガーゼで濾過し粗抽出液を得た。粗抽出液は 0.5M 蔗糖, 0.05M トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.2) に対して透折した。反応液の組成は, 5.5 μmole グリセロール-1-¹⁴C (比放射能 1.8×10⁴ cpm/μmole), 10 μmole ATP, 1 μmole MgCl₂, 2.5 μmole KF, 25 μmole トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.2), 10 μmole システイン, 酵素液 0.1 ml と水を加えて全容 1.0 ml とした。30°C で 40 分間インキュベートしてから過塩素酸を加えて反応を停止し, 遠沈後上清を苛性カリで中和して pH 7.2 とし酢酸バリウム-エタノールでリン酸エステルを分離し放射能を測定した。

(4) 放射能の測定は窓なしのガスフローカウンターで行なった。なお, 糖のペーパークロマトグラムの一部はラジオペーパークロマトグラフ (JPC-102 型, 日本無線 KK 製) によって測定した。

III. 結 果

グリセロール-1-¹⁴C を与えてインキュベートしたのち, 皮と材における総脂質, 糖, 糖リン酸エステル, アミノ酸および不溶性残渣について放射能分布をしらべ第 1 図に総括して示した。

1. 脂質への ¹⁴C のとりこみ。総脂質へのとりこみは, 皮の部分では開葉後だけに減少したが材ではこれとは対称的に増加した。このことは春先におけるポプラの脂質代謝の特徴と考えられ, 開葉と



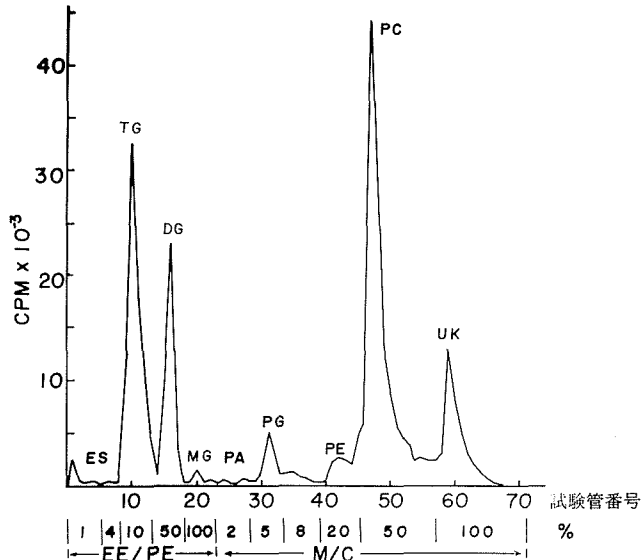
第 1 図 グリセロール-1-¹⁴C のいろいろな画分へのとりこみ

A~D は時期を表わし, A: 開葉直前 (6月 25 日 4°C の部屋のもの), B: 開葉後新梢が 3 cm 伸長 (6月 25 日屋外), C: B とおなじく新梢 10 cm (7月 3 日屋外), D: B と C におなじく新梢 15 cm (7月 14 日屋外)

LIPID, 脂質; F.S., 糖; S.P.E., 糖リン酸エステル; A.A., アミノ酸; INSOL., 不溶性残渣の各画分

ともに材部においてあたらしい細胞の形成が活発になることと関連しているものと思われる。

つぎに、脂質を硅胶カラムで分画しどの画分に ^{14}C がとりこまれたのかしらべた。第2図に開葉直前の皮の部分からえられた脂質についての分析結果を代表例として示した。図の下に示したように石油エーテル中のエーテルの量およびクロロホルム中のメタノールの濃度を段階的に変えながら溶出すると、トリグリセライド、ジグリセライド、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルコリン、そしてメタノール溶出画分の順に現われた。各ピークは前報²⁾のクロマトグラムを参考にして、アルカリ水解物中のグリセロール



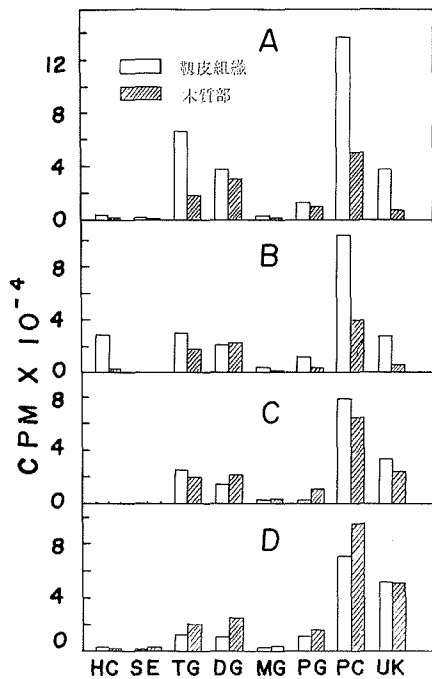
第2図 脂質の硅胶カラムクロマトグラム

材料：グリセロール- ^{14}C を与えた開葉直前のポプラの皮
図中の略号はつぎの通り、ES, エステル型ステロール; TG,
トリグリセライド; DG, ジグリセライド; MG, モノグリセ
ライド; 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; PC, ホ
スファチジルコリン; UK, メタノール溶出 (未同定) の各画
分; EE/PE は石油エーテル中のエーテルの量, M/C はクロ
ロホルム中のメタノールの量を意味する

の分布, Lieberman-Burchard 反応¹⁾ によるステロールの溶出位置および標準物質との薄層クロマトグラフィーにより同定した。なお、ホスファチジン酸とホスファチジルエタノールアミンへのとりこみは全実験期間中非常に少なかったため、以下の実験は中性脂質を溶出したあと、クロロホルム中のメタノールの濃度を5, 50および100%の順に増して溶出し、それぞれホスファチジルグリセロール、ホスファチジルコリンおよびメタノール溶出画分とした。なお、メタノール溶出画分はまだ同定していない。

第3図からも明らかなように、全脂質中で燐脂質にとりこまれる量が極めて多く中性脂質へのとりこみは少なかった。これは開葉期のポプラにおける脂質代謝の特徴と云える。皮では開葉直前にはトリグリセライドへのとりこみが相当大きいが開葉後はしだいに減少した。この傾向はジグリセライドでも同様であった。しかし、材ではトリグリセライド、ジグリセライドへのとりこみは全実験期間を通じて変化なく常に一定値を示した。そして、材ではジグリセライドへのとりこみがトリグリセライドへのとりこみよりも多いのが特徴的であった。このように、開葉期の中性脂質代謝は皮と材ではかなり異なっていることが明らかとなった。

一方、燐脂質についてみると、ホスファチジルエタノールアミンへのとりこみは全実験期間を通じてきわめて少なく、ホスファチジルコリンへのとりこみにくらべて無視しうるほどであった。しかし、第4図に示したように、ホスファチジルエタノールアミンは開葉前には多量

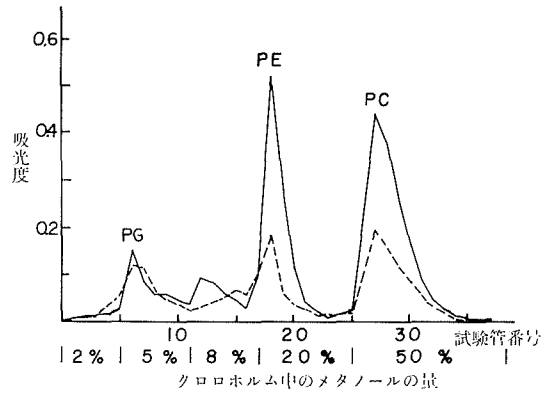


第3図 脂質各画分への¹⁴Cのとりこみ
 図中 A~D は時期を表わし第1
 図とおなじ, そのほかの記号は第
 2図とおなじ

推察される。また、皮ではホスファチジルコリンへのとりこみが開葉につれてしだいに減少したが材では逆に増加した。したがって、磷脂質の生合成の場は開葉につれて皮から材の方に移行するものと考えられる。

メタノール溶出画分へのとりこみはホスファチジルコリンについて大きく、開葉とともに皮、材ともに増加した(第3図)。この画分の磷脂質量は通常非常に少ないので、これが磷脂質であるとすればその比放射能はきわめて高いことが考えられる。

あとでのべるように、¹⁴Cは解糖系の基質にもとりこまれていたのでアセチル CoA を経て脂肪酸、あるいはセリンからコリンへとりこまれる可能性が考えられる。そこで、おもな脂質画分を0.5N 苛性カリメタノール中で30°C 30分加水分解し脂質中の¹⁴Cの分布について検討した。第1表から明らかなように、各脂質画分とも大部分の放射能はアルカリ水解物の水層に分布して脂肪酸(酸性・エーテル層)へのとりこみは非常に少ない。トリグリセライド、ジグリセライド画分にはステロールが混在するが、アルカリーエーテル層(不ケン化物)への¹⁴Cの分布は極めて少ない。また、ホスファチジルコリンのアルカリ水解物の水層をさらに1.0N 塩酸で100°C 20分間封管中で加水分解し、コリンをキャリアーとして加えてライネッケアンモニウムによりコリンを分離⁶⁾した。そして、コリン画分と非コリン画分について放射能分布をしらべるとコリンにはまったくとりこまれていないことがわかった。以上のように、開葉期のポプラではグリセロール-1-¹⁴Cから脂肪酸およびコリンへのとりこみが不活発であることが明



第4図 開葉前(冬の枝)と開葉後のポプラの
 磷脂質(珪酸カラムクロマトグラム)

材料: 乾重量で500mgの皮
 溶出液は5mlずつ集め, その1mlについて分
 解後無機燐を定量, 縦軸は燐の量を700mμに
 おける吸光度で表わす。実線は開葉前, 点線は
 開葉後を表わす。図中の略号は第2図とおなじ。
 詳細は本文参照

含まれていて開葉後ホスファチジルコリンとともに減少する。したがって、開葉期にはこうした磷脂質の分解の進行とともに、一方ではホスファチジルコリンの特異的な生合成が活発に進行しているものと

第1表 脂質中の ^{14}C 分布

脂質画分	アルカリ・エーテル層 酸性・エーテル		水層		
	(cpm $\times 10^{-3}$)		水層	水層	
			コリン	非コリン	
トリグリセライド	0.4	0.9	22.1		
ジグリセライド	0.7	1.4	11.2		
ホスファチジルコリン	1.5	1.0	44.5	0.1	37.3
メタノール溶出画分	0.6	2.1	18.2		

材料：開葉後新梢が 10 cm 伸長したものの皮から得られた脂質

らかである。

2. 解糖系へのとりこみ。 糖へのとりこみは皮と材で大差なく、開葉後新梢の生長が旺盛となるにつれて急激に減少した(第1図)。これは、開葉後も比較的高い糖濃度を保持していることによって ^{14}C がとりこまれた糖がうすめられる結果と考えられる。しかし、糖のペーパークロマトグラム上の放射能分布をしらべたところ、開葉直前ではフラクトースとグルコースにとりこまれたが、開葉後(7月3日屋外)は、蔗糖へのとりこみが著しく増した。したがって、この頃を契機として細胞内の糖の組成が大きく変わることがわかった。

なお、糖画分に含まれる未反応のグリセロールは開葉直前にはかなり残っていたが(糖画分全体の 20~40%) 開葉につれて未反応として回収されるグリセリンの量は著しく減少した。これはあとでのべるようにグリセロキナーゼの活性変化によるものと推定される。

糖燐酸エステルへのとりこみは、皮では開葉とともに直線的に減少し、材では皮よりもいくぶん遅れて減少した。これは、皮および材において開葉につれて解糖系の代謝が活発となるが、皮と材でその時期に差のあることを示している。糖燐酸エステルの酸性ホスファターゼによる分解物をペーパークロマトグラフでしらべたところ、開葉直前にはフラクトースおよびグルコースの燐酸エステルへのとりこみがみられたが開葉後(7月3日)にはこれらの糖燐酸エステルへのとりこみは殆んどなかった。なお、開葉の前後ともグリセロ燐酸へのとりこみは顕著であった。

3. 不溶性残渣へのとりこみ。 皮の部分では開葉とともに減少したが材では逆に増加がみられた(第1図)。これは脂質へのとりこみと傾向的に一致し、あたらしい細胞形成にもなってグリセリンから細胞の構成成分(蛋白質、細胞壁成分)への流れが活発となることを示している。

4. アミノ酸へのとりこみ。 アミノ酸へのとりこみは他の画分へのとりこみとはちがったパターンがみられた。すなわち、皮および材ともに開葉につれてとりこみの量が増した。しかし、新梢がかなり伸長した段階(7月14日)では逆に減少した。このことは蛋白質の合成が開葉の後期の状態になると非常に活発となるためと考えられる。グリセリンを出発点としてどのような径路でアミノ酸へとりこまれるのかについては、アミノ酸の分析を行っていないのでわからない。

5. ^{14}C のとりこみの時間的経過。 第2表に示したように、脂質へのとりこみは 20°C 3.5 時間でおおよそ平衡に達することがわかる。そして、16.5 時間インキュベートしても脂質へのとりこみは減少しない。したがって、いったんとりこまれた脂質の代謝回転は少なくとも 16.5 時間以内

第2表 各画分への¹⁴Cのとりこみの時間経過

インキュベーションの長さ (時間)	脂質	糖	磷酸エステル (cpm×10 ⁻⁴)	アミノ酸	不溶性残渣	全体	皮と材の 比 (%)	
3.5	皮	28.8	27.3	10.9	9.1	7.7	83.8	56.1
	材	10.7	34.5	9.7	7.8	2.8	65.5	43.9
16.5	皮	31.4	21.4	6.1	5.0	20.4	84.3	62.8
	材	17.4	14.5	4.8	3.4	9.8	49.9	37.2

材料：開葉直前の枝

では起らないものと云える。一方、糖、磷酸エステルおよびアミノ酸へのとりこみは、時間経過とともにいずれも約半分まで減少し不溶性残渣へのとりこみが逆に3倍近くまで増加した。したがって、これらの画分は細胞の構成成分にとりこまれていくものと考えられる。

全放射能の皮と材についての分布をみると、3.5時間でも皮の方が材よりも10%多く、16.5時間の場合はこの差はさらに大きく25%に達した。このことは、開葉期のポプラではグリセロールの材から皮への動きが極めて早いことを示している。

IV. 考 察

春先のポプラは開葉とともにあたらしい細胞の形成が活発化する。また、細胞顆粒の消失もこの時期に極めて顕著となる⁷⁾。第4図に示したように開葉期には磷脂質の著しい減少がみられる。しかし、これまでの実験では磷脂質の生合成と分解の差引いた結果しかとらえられなかった。グリセロール-¹⁴Cの脂質へのとりこみをしらべることにより今まで明らかにされていなかった開葉期の脂質合成の特徴をとらえることができた。その特徴としてつぎの1~3の3点があげられる。

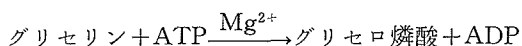
1. 開葉期の脂質代謝の第1の特徴として、中性脂質の合成が不活発である反面磷脂質の合成が特に材において活発なことがあげられる。しかも、合成される磷脂質はホスファチジルコリンとメタノール溶出画分が主で、ホスファチジルグリセロールやホスファチジルエタノールアミンの合成は不活発である点が特に注目される。これは、秋から冬にかけての磷脂質の増加の様式^{2,3)}と著しく異なることが予想される。磷脂質は原形質膜あるいは細胞内顆粒の膜成分として存在するであろうから、開葉期のこうした磷脂質代謝の特徴はこの時期の生体膜合成の特徴の反映とみられ注目される。皮においては脂質への¹⁴Cのとりこみが開葉とともに減少していくので脂質合成の場は実質的に皮から材の方に移行するものと思われる。

2. 第2の特徴として、この時期にはメタノール溶出画分への¹⁴Cのとりこみが皮、材ともに増すことがあげられる。この画分には通常磷脂質の量が少ないのでその比放射能は極めて高いと考えられる。したがって、その代謝回転の速いことが予想され磷脂質代謝上重要な位置を占めている可能性が考えられる。

3. 第3の特徴としてグリセリンから脂肪酸およびコリンへのとりこみのないことがあげられる。したがって、この時期には解糖系から脂肪酸およびコリンへの代謝がほとんど進行してい

ないものと推察される。この時期に合成されるグリセリドや磷脂質の合成素材としての脂肪酸やコリンは冬の間蓄積していた脂質の分解産物を利用しているものと思われる。そのような意味から、細胞あるいは組織間の脂質の分解と合成の調節機構（脂肪酸の細胞間の運搬の機構も含む）は興味もたれる。また、グリセリンの脂質へのとりこみも含めて細胞の構成要素の解体と再構成は極めて効率よく働いていることが推察される。

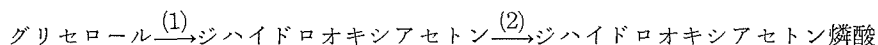
磷酸エステル中グリセロ磷酸へのとりこみが顕著であることから、グリセリンから脂質あるいは解糖系への代謝の初期的段階はグリセロキナーゼで触媒されるつぎの反応であると考えられる。



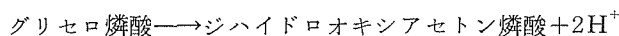
第3表に示したように、ポプラの組織ホモジネートに Mg^{2+} の存在のもとで ATP とグリセロール- $1\text{-}^{14}\text{C}$ を加えて反応させると

グリセロ磷酸画分に放射能が検出され、グリセロキナーゼ活性が証明された。グリセロキナーゼは材部では開葉後ますます活性の高まることが考えられ、開葉とともに未反応のグリセロール- $1\text{-}^{14}\text{C}$ が減少することもこれで説明できるかも知れない。

植物のグリセロールから解糖系への代謝は Stumpf⁸⁾ Beevers⁹⁾ および Yamada¹⁰⁾ らによってしらべられ、いずれもグリセロキナーゼがその初期的段階で働いていることを示した。さらに、Yamada¹⁰⁾ はヒマ種子の発芽の初期に



を径由するいわゆる“Alternative pathway”の存在を確認し、(1)はグリセロール脱水素酵素、(2)の段階はグリセロキナーゼで触媒されることを明らかにした。そして彼は



の反応が DPN 依存のいわゆる Baranowski グリセロ磷酸脱水素酵素によることを明らかにしたが、一方、Stumpf⁸⁾ はピーナッツの芽生えでミトコンドリアのチトクローム C に依存する脱水素酵素によることを明らかにしている。チトクローム C 依存のグリセロ磷酸脱水素酵素の作用は不可逆的であるが、DPN 依存のそれは可逆的であり、細胞内では平衡がグリセロ磷酸の方に片寄っているので脂質合成が活発となるとき活性変化が予想される。しかし、以上のような代謝経路についてポプラではまだ明らかにされていない。

以上のような開葉期におけるポプラのグリセリン代謝は、秋から冬にかけて脂質合成が特に活発となる時期と比較検討することによってその特徴が一層明らかになるものと思われる。

この報告にあたり、御指導いただいた酒井昭教授と匂坂勝之助助教授に感謝の意を表します。

V. 摘 要

開葉期のポプラのグリセリン代謝をグリセロール-1-¹⁴C を使ってしらべた。

1. ¹⁴C の脂質へのとりこみは回収された全放射能の 15~40% におよび皮では開葉につれて減少したが材では逆に増加した。この時期の特徴として、中性脂質へのとりこみが少なく大部分が磷脂質画分にとりこまれた。しかし、ホスファチジルグリセロールとホスファチジルエタノールアミンへのとりこみは少なく大部分はホスファチジルコリンとメタノール溶出画分にとりこまれた。このことは秋から冬にかけての磷脂質増加の様式と著しく異なることが予想され、脂質中の ¹⁴C の分布がグリセリン部分に局限されていることとあわせ開葉期の脂質代謝の特徴をなしているものと考えられる。
2. グリセリンから解糖系への代謝は開葉とともに活発となり、その一部は細胞の構成部分にとりこまれた。その傾向は開葉が進むにつれてますます活発となることがわかった。

文 献

- 1) 吉田静夫 1969 植物の耐凍性に関する研究 I. ニセアカシアの靱皮組織の糖脂質の季節的変動. 低温科学, 生物篇, **27**, 109-117.
- 2) 吉田静夫 1969 植物の耐凍性に関する研究 II. ニセアカシアの靱皮組織の磷脂質の季節的変動. 低温科学, 生物篇, **27**, 119-123.
- 3) 吉田静夫・酒井 昭 (未発表).
- 4) 匂坂勝之助 1970 植物の低温生化学的研究 VIII. 冬型代謝の転換と分解およびとりこみの反応について. 低温科学, 生物篇, **28**, 49-56.
- 5) 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磷酸回路の活性. 低温科学, 生物篇, **27**, 97-108.
- 6) Artom, C. 1957 Nitrogenous constituents of phospholipids. In *Methods in Enzymology* (S. P. Colwick and N. C. Kaplan eds.), Academic Press, London, **3**, 358-367.
- 7) 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ラーゼ活性の変動とこれに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.
- 8) Stumpf, P. K. 1955 Fat metabolism in higher plants. III. Enzymatic oxidation of glycerol. *Plant. Physiol.*, **30**, 55-58.
- 9) Beevers, H. 1956 Utilization of glycerol in the tissue of the castor bean seedling. *Plant Physiol.*, **31**, 440-445.
- 10) Yamada, M. 1960 Studies on fat metabolism in germinating castor beans. IV. Glycerol metabolism. *Sci. Rep. Coll. Gen. Educ., Univ. Tokyo*, **10**, 283-323.

Summary

The metabolism of glycerol in unfolding poplar trees was studied using glycerol-1-¹⁴C. Glycerol-1-¹⁴C was actively metabolized by intact twigs and the radioactivity was found in the following fractions; lipid, sugar, sugarphosphate, amino-acid, and insoluble fraction of cell debris. In the xylem, the incorporation of radioactivity into the lipid fractions increased as the unfolding of the tree proceeded, while the opposite was true in bark. By means of silicic acid column, the majority of the radioactivity found in the lipid fraction was found in the phospholipid fraction especially in phosphatidylcholine

and an unknown fraction. The incorporation into phosphatidylglycerol and phosphatidylethanolamine was very small, regardless of the twigs used. The incorporation into tri- and diglycerides was also small in the twigs, except for the bark immediately before unfolding. After mild hydrolysis of the lipid, the radioactivity was found in the glycerol moiety and little was found in fatty acid and the choline moiety. The incorporation into sugar, sugarphosphate and amino acid fractions also varied as the unfolding of the tree proceeded. From these results it seems likely that the metabolism of glycerol by way of the glycolytic pathway via triosephosphate becomes active at the time of unfolding of the tree.