



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	ポプラのホスホフラクトキナーゼについて
Author(s)	匂坂, 勝之助; SAGISAKA, Shonosuke
Citation	低温科学. 生物篇, 29, 39-45
Issue Date	1972-02-10
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/17781
Type	departmental bulletin paper
File Information	29_p39-45.pdf



ポプラのホスホフラクトキナーゼについて*

匂坂勝之助

(低温科学研究所)

(昭和46年9月受理)

I. 緒 言

ポプラ韌皮部および材部の PFK 活性については前報^{1,2)} で簡単に述べた。韌皮部 PFK の活性検出は秋から冬にかけては困難であるが、初春には容易になる。これらの時期の韌皮部粗抽出液は、Sephadex G-50 カラムを通して低分子物質を除くと明瞭な PFK 活性が認められた。一方、材部抽出液では四季を通じて PFK 活性が認められ、その比活性は Sephadex カラム処理後の韌皮部抽出液と同程度であった。秋期に細胞内に蓄積した澱粉が、環境温度の低下にもなって液化して低分子の糖に変わることは越冬植物にとって重要な現象^{3,4)} の一つであって、単糖類・オリゴ糖類などの凍害防御効果については酒井^{5,6)} らによって詳しくしらべられた。越冬中のポプラ韌皮部の可溶性糖濃度はグルコースとして約 0.6 M で、澱粉はほとんど存在しない⁷⁾ 程度にまで糖化が進行する。

ポプラとちがって馬鈴薯は糖化が活発でないので低温処理によって生成する可溶性糖は約 0.3 M 以下⁸⁾ であり、大部分の澱粉がそのまま残っている。可溶性糖類の濃度は凍害防御効果と密接な関係があるので⁹⁾、両者の糖代謝のちがいを知ることは応用的見地からも必要なことと思われた。

越冬中のポプラと馬鈴薯のリボース代謝活性については前報に述べた⁹⁾。PFK は六炭糖が有機酸などに代謝されていく系の重要な制御段階であるので、従来報告されている種々の生物材料の PFK と比較する為にポプラの PFK の性質に若干の検討を加えた。この報告は粗酵素を用いた成績であるが、ポプラの PFK は UTP, CTP との反応性などから新しい型の PFK であると思われる。

本文では次の略号を用いた。

PFK, ホスホフラクトキナーゼ; G6P-U-¹⁴C, グルコース-6-¹⁴C-リン酸-U-¹⁴C; F6P-U-¹⁴C, フラクトース-6-¹⁴C-リン酸-U-¹⁴C; FDP, フラクトース 1, 6-ジリン酸; ATP, アデノージン三リン酸; ADP, アデノージン二リン酸; AMP, アデノージン 5'-モノリン酸; UTP, ウリジン三リン酸; CTP, シチジン三リン酸; GTP, グアノージン三リン酸; UMP, ウリジン 5'-モノリン酸; UDPG, ウリジン二リン酸グリコース; ADPG, アデノージン二リン酸グリコース。

II. 材料と方法

材料: ポプラ *Populus gelrica* は圃場に生育しているものと鉢植のものを用いた。グルコー

* 北海道大学低温科学研究所業績 第 1163 号

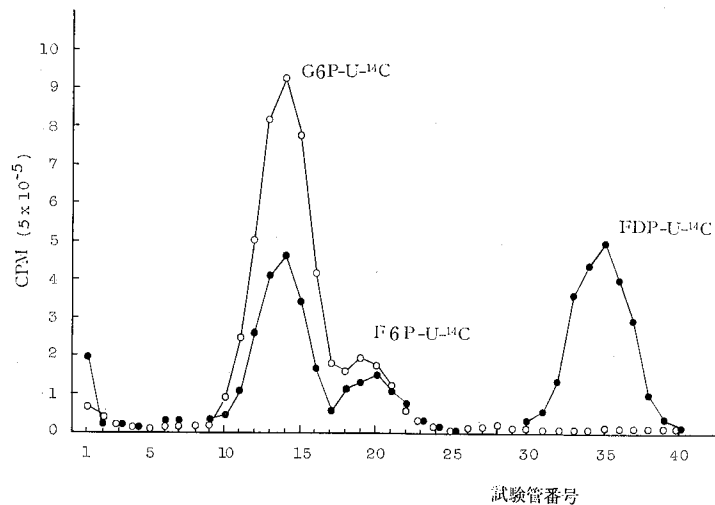
ス-U-¹⁴C は第一化学薬品株式会社から購入したもので、これを用いて G6P-U-¹⁴C を調製した¹⁾。この G6P-U-¹⁴C は少量の F6P-U-¹⁴C を含む。酵素と主な試薬は Boehringer u. Sohne GmbH 製を用いた。

方法： 酵素液の調製は前報¹⁾と同様に攪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 分間透析して粗酵素液とした。このものは必要に応じて 10,000×g, 10 分間遠心し、この上清は更に 105,000×g, 60 分間遠心して実験に用いた。

ホスホフラクトキナーゼ活性は、次の反応により生成する FDP-U-¹⁴C を Dewex 1 カラムを用いて分離し、その放射能を測定して求めた。



反応液組成は次の通りで、20°C で一定時間反応を行なった。反応液： G6P-U-¹⁴C 0.21 μmole (1.38×10⁶ cpm), UTP 0.5 μmole, MgCl₂ 1.2 μmole, トリス-塩酸緩衝液, pH 7.2, 5 μmole, 靱皮部あるいは材部抽出液および水で全容 0.125 ml。反応停止¹⁾ および Dowex 1 カラム (3 cm×0.33 cm²) による糖リン酸エステルの分離は前報¹⁰⁾の通りである。第 1 図にポプラの PFK によって生成した FDP-U-¹⁴C の分離例を示した。



第 1 図 Dowex 1 カラムによる FDP-U-¹⁴C の分離

○, コントロール (零時間反応); ●, 20°C で 5 時間反応
反応液組成は本文参照

G6P, F6P および FDP の混合液から FDP を分離する場合は、Dowex 1 X-4 (Cl⁻ 型, 3 cm×0.33 cm²) カラムに目的試料を吸着させた後に 0.01 N HCl 40 ml で G6P と F6P を溶離せしめ、ついで 0.02 N HCl (0.05 N NH₄Cl を含む) 50 ml で溶離してくる部分を集めて目的が達せられた。この報告の後半の実験は、主としてこの簡単な方法によって FDP-U-¹⁴C を分離した。

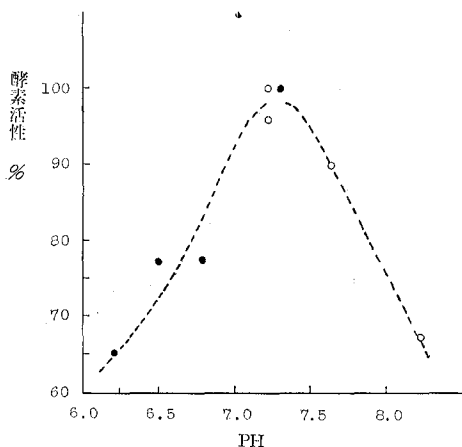
蛋白質定量は、前報のように加水分解後にアミノ酸を測定¹⁰⁾して行なった。

III. 結 果

ポブラ PFK の至適 pH と反応の時間的経過

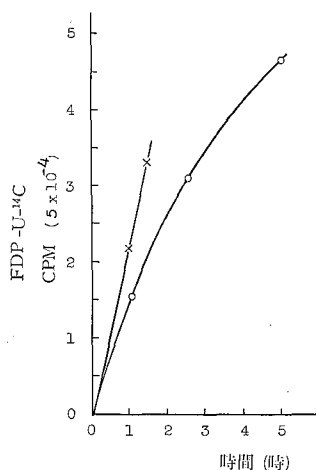
ポブラ PFK の至適 pH は 7.2~7.3 付近にあって鋭い山を示すように思われる (第2図)。一般に PFK の至適 pH は 7~8 にあって¹¹⁾、無機リン酸やクエン酸の添加によって pH 7 付近から酸性側の曲線に著しい変化が生ずるのであるが、ポブラ PFK は至適 pH 曲線の形と後述のようにクエン酸添加の効果が他の生物材料の PFK と異なる。

第3図にポブラ PFK による FDP-U-¹⁴C 生成の時間経過を示した。FDP-U-¹⁴C の生成を検知しうるのに十分な反応時間、たとえば1時間反応の場合には初速度のおよそ 67% 程度の数値が得られている。この時に、最初の 16% (33 m μ mole) の F6P-U-¹⁴C (G6P-U-¹⁴C) が FDP-U-¹⁴C に変わった。第3図のように、実験条件下で反応は 0 次として進行していないが、この報告の成績はすべて同一条件下で得たもので 0 次反応の約 70% の値を示している。



第2図 ポブラ PFK 活性と pH の関係

活性: μ mole FDP/mg 蛋白質/時
●, トリス-マレイン酸緩衝液; ○ トリス-塩酸緩衝液



第3図 PFK 反応による FDP-U-¹⁴C 生成の時間経過

○, FDP-U-¹⁴C の生成量
×, ポブラ PFK 反応を 0 次反応と仮定した時の FDP-U-¹⁴C 生成量

越冬中および開芽後の材部 PFK 活性

第1表に越冬中の材部 PFK 活性と比較の為に開芽後の活性を示した。いずれの時期においてもかなりの個体差があるので、その点を考慮すると材部 PFK 活性は開芽の際にほとんど変化しないと結論しうる。韌皮部 PFK の冬期と春期の活性についてはすでに前報¹⁾で述べた。材部の PFK 活性は、

第1表 越冬中および開芽後の材部 PFK 活性

試料	越冬中の材部	開芽後の材部*
活性	0.15, 0.20, 0.25, 0.27	0.12, 0.16, 0.23

* 5月12日から5月末までの試料。活性: μ mole FDP-U-¹⁴C/時/mg 蛋白質。反応系は本文参照

Sephadex G-50 カラム処理後の韌皮部 PFK 活性と同じ水準の活性を有する。また、韌皮部 PFK と異なって Sephadex 処理に関係なく、常に高い酵素活性を示す。

ポプラの無細胞遠心画分と PFK 活性

ポプラ鞣皮部の PFK 活性は通常ミトコンドリアの沈澱する画分と可溶性蛋白質の画分に見出され、マイクロゾームの沈澱する画分には僅かしか存在しない(第2表)。

第2表 ポプラの無細胞遠心画分と PFK 活性

画 分	鞣 皮 部			材 部		
	活 性*	蛋白質 (mg)	全活性*	活 性*	蛋白質 (mg)	全活性*
1. 粗 抽 出 液	0.049	39	1.91	0.197	1.31	0.27
2. 10,000×g, 10分沈澱	0.087	15.2	1.32	—	—	(0.04)**
3. " , " 上清	—	—	—	0.28	0.82	0.23
4. 105,000×g, 60分沈澱	0.022	5.9	0.12	—	—	—
5. " , " 上清	0.055	13	0.71	—	—	—

* $\mu\text{mole FDP/mg 蛋白質/時}$

** 画分1と3の差

一方、材部 PFK 活性はミトコンドリアの沈澱画分にほとんど見出されない。この点が鞣皮部 PFK と大きく異なる点である。材の PFK を画分4と5に分ける実験は行なわれなかったが、画分3でみられた活性のすべてが可溶性蛋白質の画分に存在するものと思われる。それは材部抽出液にはマイクロゾーム画分が通常極めて少ないからである。

ポプラ PFK のヌクレオサイドトリリン酸に対する特異性

ADPG や UDPG でよく知られているように、ATP や UTP は糖の代謝と密接な関係がある。澱粉の液化とこれともなう蔗糖の増加現象にはこれらの高エネルギーリン酸化化合物が直接関与している。従って、ポプラと馬鈴薯にみられる完全糖化と不完全な部分的糖化の試料の間に ATP などの使い方にちがいがあれば極めて興味深いことと思われた。ポプラ PFK のヌクレオサイドトリリン酸に対する特異性について第3表に示した成績を得た。

ポプラ PFK はピリジンヌクレオサイドトリリン酸に特異的に反応するように思われる。ATP や GTP のようにプ

リン系の化合物は、UTP からの FDP-U-¹⁴C 生成の40%以下で、CTP は ATP より効果がある。ポプラ PFK 反応の基質に ATP を用いた場合は UTP に比較して実験結果に変動が著しい傾向があるが、これは植物の個体全体の制御機構は ATP 量で厳密に調節されていることを示しているのであろう。つまり、成長や肥大などの段階では ATP が大きな影響力を有するのであろう。

第3表 ポプラ PFK のヌクレオサイドトリリン酸に対する特異性

ヌクレオタイド	鞣皮部酵素	材部酵素
	活性, %	活性, %
UTP	100.0	100.0
CTP	59.6	—
ATP	39.8	29.1
GTP	21.0	—
UTP*+ATP*	73.5	97.9

* それぞれ 0.25 μmole 。各々の反応液は同濃度のヌクレオサイドトリリン酸を含む。反応液組成は本文参照

0°Cにおけるポブラ PFK 活性に対する UTP と ATP の効果

巨視的な意味の成長・肥大をとまなわない低温下の反応に対する UTP と ATP の使いわけと関連して制御機構に与える効果が異なるために UTP によって低温下においても物質代謝が進行する（あるいは促進される）可能性を検討した。第4表に結果を示した。0°Cにおける FDP-U-¹⁴C 生成量は 20°C の 1/3 (UTP) と 1/6 (ATP) であって ATP を用いた場合は温度変化による予想生成量より低い値を示した。UTP を基質とした方が低温下で活発に進行する可能性があるので関連した生化学反可系の低温下における生理的意義を詳しく検討することが必要と思われる。

ポブラ PFK 活性に対する UMP, AMP およびクエン酸の効果

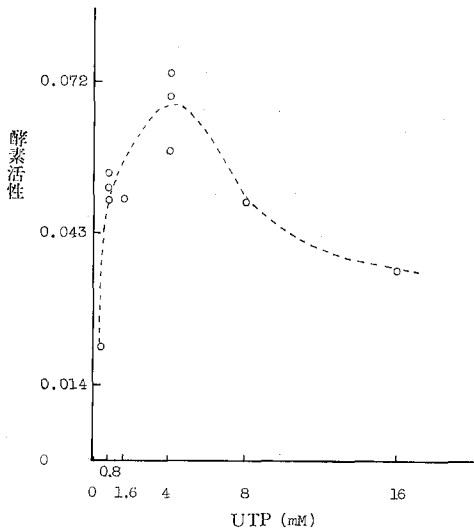
第5表に示すようにポブラ PFK は UMP で若干阻害され、クエン酸で僅かに促進される傾向を示すことがわかる。クエン酸などの影響は、一般に酸性側の pH でより強くあらわれるが、中性付近でも十分に効果は検出可能である。通常は PFK の基質として ATP が最も有効で、クエン酸で阻害され、AMP で促進^{11,12)} されるからポブラ PFK は新しい性質の PFK と思われる。ポブラ PFK は UMP で阻害され、AMP で促進される。

第4表 0°Cにおけるポブラ PFK 反応に対する UTP と ATP の効果

ニュクレオ タイド	濃 度	反応温度	FDP-U- ¹⁴ C 生 量 (%)
UTP	1.6 mM	20°C	100
"	"	0°C	32.3
ATP	1.6 mM	20°C	100
"	"	0°C	16.5

第5表 ポブラ PFK 反応に対する UMP, AMP およびクエン酸の効果

ニュクレオタイド	添 加 物 質	FDP-U- ¹⁴ C 生 成 (%)
1. UTP, 4 mM	—	100
2. " , " UMP, 4 mM		87.8
3. " , " クエン酸, 8 mM		104.9
4. UTP, 1.6 mM	—	100
5. " , " AMP, 4 mM		123.5



第4図 ポブラ PFK 活性と UTP 濃度の関係
活性: $\mu\text{mole FDP/mg 蛋白質/時}$

ポブラ PFK 活性に対する UTP 濃度の影響

第4図に UTP の濃度を変えた場合の PFK 活性を示した。0.4 mM から UTP の濃度が増すにつれて反応が活発となり、4 mM で最大の活性を示すことがわかる。UTP 濃度が 4 mM より高まると活性は再び低下する。

IV. 考 察

ポブラ 靱皮部の PFK 活性は晩秋と初冬に検出し難いが、春が近づくにつれて活性があらわれてくる。みかけ上活性を示さない靱皮部抽液も Sephadex 処理で活性を示すようになる²⁾。この現象は PFK 活性の調節機構に関連しているものと考えられ、FDP を経て低分子化していく六炭糖の量はかなり厳密

に制御されていることを示唆しているものであろう。この実験で使用した春期の靱皮部は、この阻害がある程度軽減されたものである。このことは冬期間に特徴的な代謝反応が低温下で進行し、その結果 PFK を阻害する物質が徐々に除かれていることを示しているように思われる。

ポプラの PFK はクエン酸で阻害されない。これは他の実験材料と異なっていて、ポプラ PFK を強く阻害している物質はこれまで種々の系で一般化された物質^{11,12)} と異なるものと考えられる。

ポプラの PFK 反応では、ATP や GTP よりも UTP や CTP が良好な基質である。これは他の系と異なる第 2 の点である。ATP および UTP との反応性やそれぞれを用いた時の反応の特徴を知るためにより詳細な実験が必要である。ポプラの細胞内で、UTP と ATP の生理的な使いわけがあって、プリンとピリミジンの違いが制御作用に異なった影響を与えているのかも知れない。

一般の生物材料では、PFK 反応の磷酸供与体として ATP¹²⁾ が用いられ、動物や大腸菌では AMP で抑制が除かれる方向へ進む。甘藍、人参¹¹⁾ および馬鈴薯¹³⁾ では ATP が基質で、クエン酸、AMP あれいは ADP で反応が抑えられる。

ポプラはこれらの植物と異なっていて、UTP が最も良好な磷酸供与体で UMP で阻害され、AMP で促進される。クエン酸は 0.5 mM 程度の F6P の存在下で反応阻害しない。

ポプラの PFK の至適 pH は 7.2 付近にあって比較的鋭い山の形を示す。馬鈴薯 PFK の至適 pH は 8.4 付近であり、甘藍では pH が 7 より高い場合は pH の影響を敏感に受けない。

これまで述べたいくつかの性質からポプラの PFK は新しい型の酵素であるように思われる。UTP が有効な磷酸供与体である点で羊の心臓筋肉から得た PFK¹⁴⁾ に似ているが、後者では UTP, ATP, CTP が共に同程度に有効であるのでポプラと異なる。磷酸供与体が異なっても PFK 反応によって生成する FDP は同じであるから、磷酸供与体の特異性の示す生理的な意味は単に FDP 生成活性にあるのではない。ある濃度の ATP でいくつかの反応が抑えられている時に、阻害様式の異なる理由で UTP をよく利用するいくつかの反応が選択的に進むことが考えられる。また、生育条件の相違によって、細胞内の ATP や UTP の相対的濃度が異なることも予想される。環境の変化に対して敏感に作用する反応段階とそうでない段階が、UTP や ATP などに対する特異性の相違やそれらの濃度変化に対応する結果として示し得るならば植物の生活をより一層具体的に理解しようと思われる。第 4 表に示した結果はそのような可能性を示しているように思われる。

V. 摘要および結論

1. ポプラの PFK の性質に予備的な検討を加えた。ポプラの PFK は馬鈴薯や甘藍などと異なった性質を有している。活性の測定は F6P-U-¹⁴C から生成する FDP-U-¹⁴C を定量することによった。
2. ポプラの PFK 活性は越冬中と出芽後のもので相違が認められなかった。靱皮部の PFK は顆粒構造と可溶性蛋白質区分の両者に見出され、材部では可溶性蛋白質区分にその大部分が存在した。

3. ポプラの PFK の至適 pH は 7.2 付近にあって、4 mM の UTP 濃度で最も高い活性を示した。
4. ポプラの PFK は UTP に高い特異性を示し、CTP, ATP, GTP の順に効果が劣る。ピリミジン系のヌクレオサイドリリン酸に高い特異性を示す。また、UMP で阻害されるが AMP で促進される。クエン酸は阻害しない。

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リン酸エステル代謝系の体制変化. 低温科学, 生物篇, **27**, 73-80.
- 2) 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.
- 3) Arreguin-Lozano, B. and Bonner, J. 1949 Experiments on sucrose formation by potato tubers as influenced by temperature. *Plant Physiol.*, **24**, 720-738.
- 4) 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**, 17-29.
- 5) 酒井 昭 1961 植物細胞の凍害の機構 I. 凍害に対する媒液の影響 (1). 低温科学, 生物篇, **19**, 1-16.
- 6) 酒井 昭・吉田静夫 1968 各種化合物の植物細胞に対する凍害防御作用. 低温科学, 生物篇, **26**, 13-21.
- 7) 匂坂勝之助 1970 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係. 低温科学, 生物篇, **28**, 43-48.
- 8) 匂坂勝之助 未発表.
- 9) 匂坂勝之助 1971 0°C におけるポプラと馬鈴薯塊茎のリボース-U-¹⁴C. 低温科学, 生物篇, **29**, 29-38.
- 10) 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.
- 11) Dennis, D. T. and Coultate, T. P. 1967 The regulatory properties of a plant phosphofructokinase during leaf development. *Biochim. Biophys. Acta*, **146**, 129-137.
- 12) Wood, W. A. 1966 Carbohydrate metabolism. *Ann. Rev. Biochem.*, **35**, 529-530.
- 13) 佐々木堯・田所克子・鈴木繁男 1970 馬鈴薯の phosphofructokinase. 生化学, **42**, 533.
- 14) Mansour, T. E., and Ahlfors, C. E. 1968 Studies on heart phosphofructokinase: Some kinetic and physical properties of the crystalline enzyme. *J. Biol. Chem.*, **243**, 2523-2533.

Summary

Phosphofructokinase activity of the wintering poplar bark was very low and hard to be detected even by the tracer study. However, the enzyme activity became active during the period of budding, indicating the regulatory situations of the enzyme in the bark. The bark enzyme was localized both in particulate and soluble fractions. The poplar xylem also contained the enzyme and the activity was detected in a soluble fraction throughout a year. With respect to the nucleoside triphosphate specificity and sensitivities toward citrate and AMP the poplar enzyme was different from the potato, cabbage and animal enzymes. Uridine triphosphate was a good substrate for the enzyme, followed by CTP, ATP, GTP, in this order. UMP inhibited the reaction, while AMP showed no inhibitory effect on the enzyme activity. There was no inhibition of the poplar enzyme by $8 \times 10^{-3}M$ citrate at pH 7.2.