

論 説

花粉の生化学的研究 XV

アカマツ花粉のグルコース-6-リン酸,
6-ホスホグルコン酸デヒドロゲナーゼについて

勝又悌三*・鈴木寿直**・故斗ヶ沢宣久***

Biochemical studies on pollen XV

Glucose-6-phosphate and 6-phosphogluconate dehydrogenase in the pollen of
pinus densiflora

Teizo KATSUMATA*, Toshinao SUZUKI** and Yoshihisa TOGASAWA***

緒 言

植物受精の基礎生化学的研究の一部として、また花粉の発芽生理の酵素化学的究明の基礎研究としてまず花粉の糖質^(1,2)、アミノ酸⁽³⁾、塩基性タンパク質⁽⁴⁾、フラボノイド色素^(5,6)、無機成分と各種リン化合物⁽⁷⁾、ビタミン⁽⁸⁾、DNA、RNA⁽⁹⁾、リン脂質⁽¹⁰⁾などを検討した。ついでアカマツ花粉の成熟過程および発芽過程における DNA、RNA、多糖類の変動を細胞化学的に追究し⁽¹¹⁾、とくに多糖類の変動が著しいことを認めたので、多糖類⇌糖類の急激な変化を予想して各種花粉を用い、これら糖質代謝に関与する酵素を検索し、アミラーゼ、インペルターゼ、マルターゼ(アカマツ花粉のみ)、ヘキソキナーゼ、ホ

スホリラーゼなどの発芽時における活性増大を認めた^(12~14)。

花粉発芽時のエネルギーは Embden-Meyerhof-Parnas 経路 (EMP と略記) と TCA サイクル-電子伝達系の共役で供給されていることが常識的に考えられるが、生体内における主要糖質代謝は、EMP とヘキソースモノホスフェートシャント (HMP と略記) によって行なわれていることが明らかになってきた^(15~17)。HMP の本来の役割はエネルギーの生成より、むしろヘキソースの分解によって生ずる糖が種々の物質の合成に用いられることにあると思われ、花粉の場合は発芽に際して花粉粒直径の数百~数千倍の花粉管を伸ばすが、これの合成素材の提供に HMP が関与していると考えられる。

* 〒020 盛岡市上田三丁目 18 番 8 号 岩手大学農学部農芸化学科

Department of Agricultural Chemistry, Faculty of Agriculture, Iwate University, Morioka, Iwate, Japan

** 〒024 北上市黒沢尻町字町分 14 の 51 の 4 岩手県北上保健所衛生課

Division of Food Hygiene, Kitakami Government Office of Public Health, Kurosawajiri-cho, Kitakami, Iwate, Japan

*** 1972 年 9 月 9 日御逝去

著者らはこの論文を謹んで斗ヶ沢宣久博士の御霊前に捧げます。

花粉粒内における EMP の存在はすでに知られているが^(18,19)、HMP に関する研究はみあたらないので、まず HMP における最初の酸化反応に参与するグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ (G-6-P DH と略記) および 6-ホスホグルコン酸デヒドロゲナーゼ (6-PG DH と略記) について検討した。

実験方法

1. 試料

アカマツ (*Pinus densiflora* Sieb. et Zucc.) 花粉は前報⁽⁷⁾に準じ、また発芽花粉は前報⁽¹²⁾に準じてそれぞれ調製し、試料とした。

2. 酵素液の調製

上記花粉を SSA 半融アルミナ製乳鉢で石英砂を少量加えてよく磨砕し、0.5 M KHCO_3 と EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid, 30mg/ml) の同容混液 (pH 8.0)⁽²¹⁾、0.1 M リン酸緩衝液 (pH 6.0、7.0、8.0) などの 5 倍量を加え、0.5~1.5 時間攪拌後、遠心分離 (15,000 rpm、30 分) し、上層液を東洋濾紙 No. 85 で濾過して得た透明液 (酵素原液とする) およびこの透明液を 6 時間 0.02 M トリス緩衝液 (pH 7.5) に対して透析したもの (透析後、酵素原液に対して 1.5 倍になるように希釈した) を酵素液とした。発芽花粉の場合は、前記 0.5 M KHCO_3 -EDTA (pH 8.0) 混液のみを抽出液として用い、同様にして酵素原液を調製した (抽出に際しては発芽花粉の発芽時の水分吸収量を補正した)。

なお以上の実験はすべて 5°C 以下の低温室で行なった。

3. 酵素活性の測定

Kornberg⁽²⁰⁾、Gibbs ら⁽²¹⁾の方法に準じて行なった。すなわち石英セルに 0.25 M トリス緩衝液 0.5 ml、0.3 M MgCl_2 0.1 ml、0.0015 M NADP (Sigma 製) 0.1 ml、0.025 M G-6-P または 6-PG (いずれも Sigma 製) 0.1 ml、蒸留水 (以下水と略記) 2.0 ml (試薬の影響を調べるときはこの量を減らす)、酵素

液 0.2 ml を加えて、直ちに島津 QV-50 型光電分光光度計を用い、340 nm における吸光度の増加を測定して酵素活性を求めた。なお対照として反応液中 NADP および基質の代わりにそれぞれ水を加えたものを同時に試験して吸光度を補正した。

酵素活性と pH、抽出溶媒、抽出時間などの検討は、酵素原液をそのまま用いて行ない、以後の実験は酵素原液および透析酵素液の 2~6 倍希釈液を用いて行なった。

金属イオンの影響を検討する場合は、最終濃度がおのおの 10^{-2} ~ 10^{-4} M (Table 1 参照) になるように調製した塩類を加えて行なった。その他試薬の影響を検討する場合は、モノヨード酢酸、PCMB (p-chloromercuribenzoate)、シスチン、EDTA、フッ化ナトリウムを用い、最終濃度がおのおの 10^{-3} 、 10^{-4} M になるように前記反応混液 (基質を除いておく) に加えて 5 分間室温に放置後、基質を加えて活性を測定した。なお PCMB、シスチンの阻害の可逆性を検討する場合は、予め反応混液に PCMB (10^{-3} M) またはシスチン (10^{-3} M) を加えて 5 分間室温に放置し、システイン (10^{-3} M) またはグルタチオン (10^{-3} M) を新たに加えて 10 分間室温に放置後、基質を加えて活性を測定した。

結果および考察

はじめに酵素原液 (0.5 M KHCO_3 -EDTA 混液による 30 分攪拌抽出液) を用いて、酵素活性と pH の関係を検討した結果 (Fig. 1)、G-6-P DH の最適 pH は 8.5、6-PG DH のそれは 8.0~8.5 で、9.5 でも相当の活性が認められた。酵母⁽²⁰⁾の両酵素の最適 pH は 7.4、エンドウの根⁽²¹⁾では 7.5~7.8 であるが、ラッテ肝臓⁽²²⁾の G-6-P DH は 7.6~8.5、6-PG DH は 9.0~9.8 で、アカマツ花粉の場合むしろラッテ肝臓に類似の最適 pH を示した。

ついで抽出溶媒を検討した結果 (Fig. 2)、G-6-P DH の場合、Dickens ら⁽²³⁾がラッテの肝臓、腎臓などからの抽出に用いているリン酸緩衝液ではよく抽出されず、両酵素とも KHCO_3 -EDTA 混液でよ

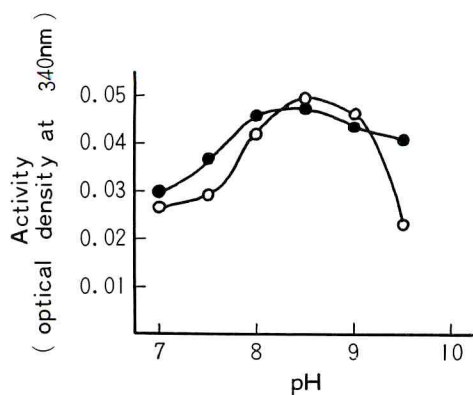


Fig. 1. Relation between pH and the activity of dehydrogenase.

The experiments were carried out at a room temperature for 1 min. See the text for experimental details.

- : Glucose-6-phosphate (G-6-P) dehydrogenase
- : 6-phosphogluconate (6-PG) dehydrogenase

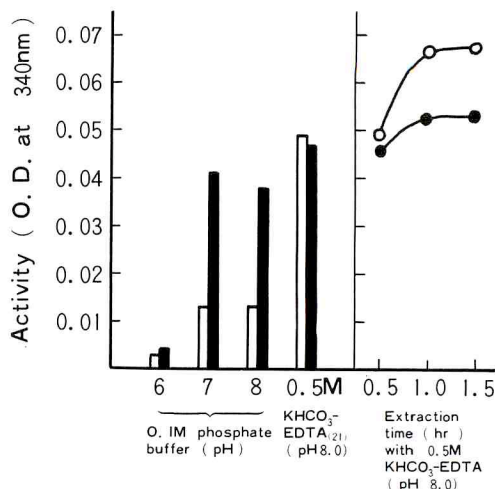


Fig. 2. Effects of extraction solvent and extraction time on the activity of dehydrogenase.

The activities were measured after 1 min reaction at pH 8.5 at a room temperature.

- : } G-6-P dehydrogenase
- : }
- : } 6-PG dehydrogenase
- : }

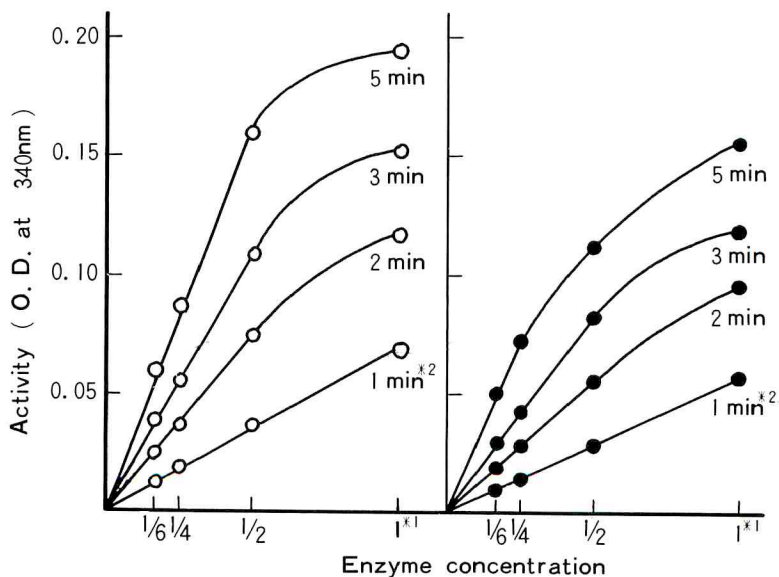


Fig. 3. Effect of enzyme concentration on the activity of dehydrogenase.

*1 The extract with 0.5 M KHCO₃-EDTA at pH 8.0 was used as a original enzyme solution.

*2 The activities were measured after 1~5 min reaction at pH 8.5 at a room temperature.

- : } Same as in Fig. 1
- : }

く抽出されることを認めたが、抽出時間は1時間が最適であった。そこで以後酵素原液としては0.5 M KHCO_3 -EDTA 混液 (pH 8.0) の1時間抽出液を用いた。

酵素原液を1、2、4、6倍に希釈して酵素活性を測定した結果 (Fig. 3)、両酵素とも2、4、6倍希釈液の3分間反応までは、酵素濃度と吸光度の増加量が直線関係にあることを認めた。また透析酵素液を1、2、3、4倍に希釈して活性を測定した結果、両酵素とも2、3、4倍希釈液の5分間反応までは、酵素濃度と吸光度の増加量が直線関係にあることを認めたので、以下これらの直線関係を示す酵素量を用いて実験を行なった。なお酵素濃度としては、透

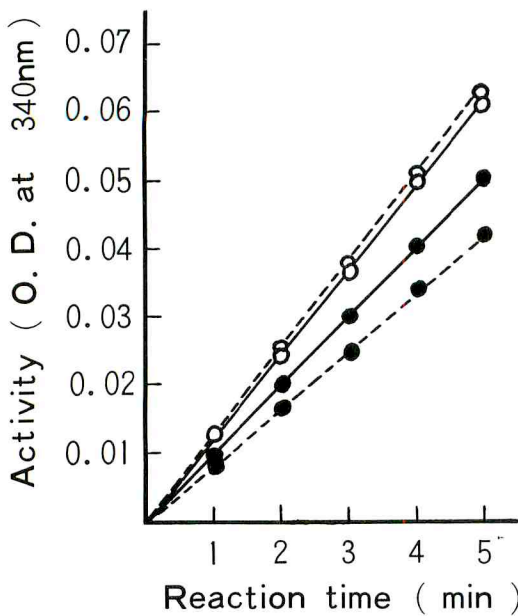


Fig. 4. Effect of dialysis on the activity of dehydrogenase.

The activities were measured same as in Fig. 3. The original enzyme solution shown in Fig. 3 was diluted with 5 vol. of distilled water in \circ — \circ and \bullet — \bullet , and the dialyzed enzyme solution described in the text was diluted with 3 vol. of distilled water in \circ ----- \circ and \bullet ----- \bullet

- \circ — \circ : } G-6-P dehydrogenase
- \circ ----- \circ : } G-6-P dehydrogenase
- \bullet — \bullet : } 6-PG dehydrogenase
- \bullet ----- \bullet : } 6-PG dehydrogenase

析酵素液の4倍希釈液は酵素原液の6倍希釈液に相当するので、両者の活性を比較してみると (Fig. 4)、G-6-P DH では全く活性低下は認められぬが、6-PG DH では約17%活性が低下した。

一般にG-6-P、6-PG DH は補酵素としてNADPを必要とするが、*Azotobacter vinelandii*⁽²⁴⁾のG-6-P DH、*Pseudomonas fluorescens*⁽²⁵⁾の6-PG DH などのように、まれにNADを必要とする場合もある。花粉の場合、NAD、NADP いずれを必要とするかを検討した結果 (Fig. 5)、6-PG DH は

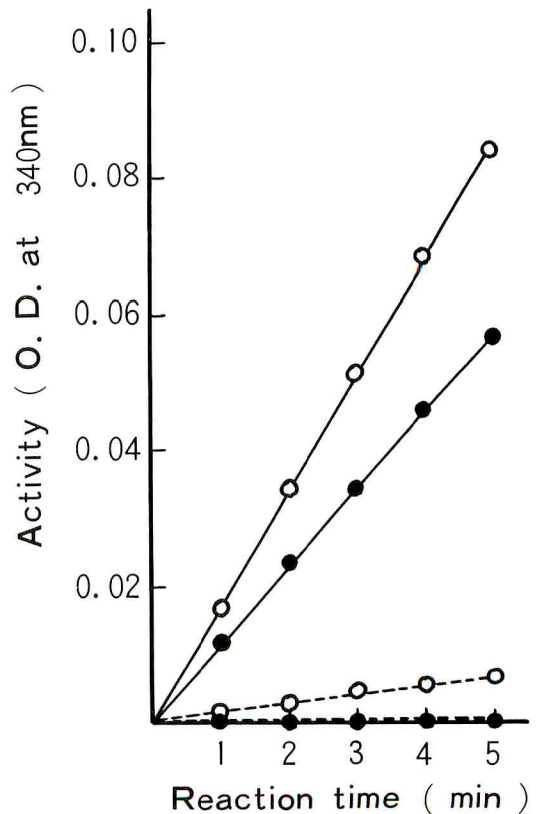


Fig. 5. Effects of NADP and NAD on the activity of dehydrogenase.

The dialyzed enzyme solution diluted with 2 vol. of distilled water was used, and the activities were measured same as in Fig. 3.

- \circ — \circ : NADP added } G-6-P dehydrogenase
- \circ ----- \circ : NAD added } G-6-P dehydrogenase
- \bullet — \bullet : NADP added } 6-PG dehydrogenase
- \bullet ----- \bullet : NAD added } 6-PG dehydrogenase

全く NADP に特異的であるが、G-6-P DH の場合は NAD が NADP 添加のときの約7%の活性を示した。

従来酵母、植物、肝臓などから抽出されたG-6-P DH 活性は、 K^+ 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Mn^{2+} などで、6-PG DH 活性は K^+ 、 Na^+ 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Mn^{2+} などによって賦活されることが報告されているので^(21,22,26)、アカマツ花粉の両酵素に対する各種金属イオンの影響を検討した (Table 1)。G-6-P DH の場合、 K^+ と Na^+ は5分間の反応で対照と活性を

Table 1. Effects of some metal ions and reagents on the activity of dehydrogenase.

Reagents	Activity		Relative activity (%)					
	Reagents (M)		G-6-P dehydrogenase			6-PG dehydrogenase		
	10^{-2}	10^{-3}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}
None	100	100	100	100	100	100	100	100
KCl	113.0	103.3	100.0	104.9	100.0	100.0	100.0	100.0
NaCl	123.3	123.3	108.3	95.0	90.0	100.0		
$MgCl_2$	176.7	141.7	115.0	156.1	134.1	97.5		
$CaCl_2$	168.3	151.7	111.7	93.2	111.4	97.7		
$MnCl_2$	146.7	133.3	110.0	97.5	121.3	97.5		
$CoCl_2$		106.5	115.2		42.5	75.0		
$AlCl_3$	38.2	92.7	103.6	0.0	85.0	90.0		
$FeCl_2$		81.8	100.0		48.8	92.7		
$FeCl_3$		54.5	100.0		58.5	100.0		
$ZnSO_4$		10.9	107.3		0.0	30.0		
$CuSO_4$		45.5	100.0		48.8	85.4		
$HgCl_2$		0.0	60.7		0.0	48.8		
$AgNO_3$		0.0	0.0		0.0	0.0		
$CH_2I\text{COOH}$		72.8	75.3		72.1	78.8		
PCMB		19.8	43.2		4.2	11.7		
Cystine		95.1			74.5			
PCMB+Cysteine*		48.1			20.0			
PCMB+Glutathione*		66.7			18.3			
Cystine+Cysteine*		92.7			83.6			
EDTA		98.7	98.7		84.3	84.3		
NaF		85.2	85.2		74.5	74.5		

The dialyzed enzyme solution diluted with 2 vol. of distilled water was used, and the activities were measured after 5 min reaction at pH 8.5 at a room temperature.

* See the text for experimental details.

比較すると (以下これに準ずる)、 $10^{-2}M$ でそれぞれ13%、28%と若干の活性増大を示し、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Mn^{2+} は $10^{-2}M$ でそれぞれ77%、68%、47%の活性増大を示した。 K^+ 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Mn^{2+} による活性増大は Glock ら⁽²²⁾のラット肝臓の両酵素についての報告と一致するが、アカマツ花粉の場合 Na^+ による

活性増大を認めた。 Co^{2+} は $10^{-4}M$ で若干の活性増大を示した。6-PG DH の場合は、 K^+ 、 Na^+ による影響はほとんどなく Mg^{2+} は $10^{-2}M$ で56%、 Ca^{2+} 、 Mn^{2+} は $10^{-3}M$ でそれぞれ11%、21%の活性増大を示した。これらの金属イオンによる活性増大は Glock ら⁽²²⁾のラット肝臓の両酵素についての報告とよく一致している。両酵素活性とも $10^{-3}M$ では、 Fe^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Hg^{2+} 、 Ag^+ で阻害されたが、6-PG DH はさらに Ca^{2+} で阻害された。

モノヨード酢酸、PCMB を作用させた結果 (Table 1)、 $10^{-3}M$ で前者では両酵素とも活性の約27%が阻害され、後者ではG-6-P DH が約80%、6-PG DH は96%活性が阻害された。ついで予め $10^{-3}M$ PCMB で活性を阻害したものに、それぞれ $10^{-3}M$ システイン、 $10^{-3}M$ グルタチオンを加えて阻害の可逆性を検討したが (Table 1)、G-6-P DH の場合システインで28%、グルタチオンで47%活性が回復されること、6-PG DH の場合システインで16%、グルタチオンで14%活性が回復されることを認めた。一方SH基の酸化剤であるシスチンを用いてPCMBと同様の実験を行なった結果 (Table 1)、 $10^{-3}M$ でG-6-P DH は5%、6-PG DH は25%活性が阻害されたが、両酵素とも $10^{-3}M$ システインの添加で阻害の回復はほとんど認められなかった。 Cu^{2+} 、 Hg^{2+} 、モノヨード酢酸、PCMBによる活性阻害およびPCMBによる活性阻害がシステイン、グルタチオンにより部分的に回復することなどから、アカマツ花粉の両酵素ともその活性にSH基が何らかの役割を果していることは考えられるが、シスチンによる阻害が少なく、しかもその阻害がシステインにより回復されないことや、 $10^{-4}M$ Cu^{2+} によりあまり阻害されないことなどから、Glock ら⁽²²⁾がラット肝臓中の6-PG DH について報告しているようなSH酵素とは推定し難い。

次に金属酵素の阻害剤として利用されるフッ化ナトリウム、EDTA を添加してみた結果 (Table 1)、G-6-P DH の場合 $10^{-3}M$ フッ化ナトリウムで15%阻害されるが、EDTA では全く阻害されず、6

-PG DH の場合 10^{-3} M フッ化ナトリウムで 25%、 10^{-3} M EDTA で 15% 阻害されるのみで、両酵素ともに金属酵素とは考えられない。

両酵素の発芽時の活性を検討した結果 (Fig. 6)、

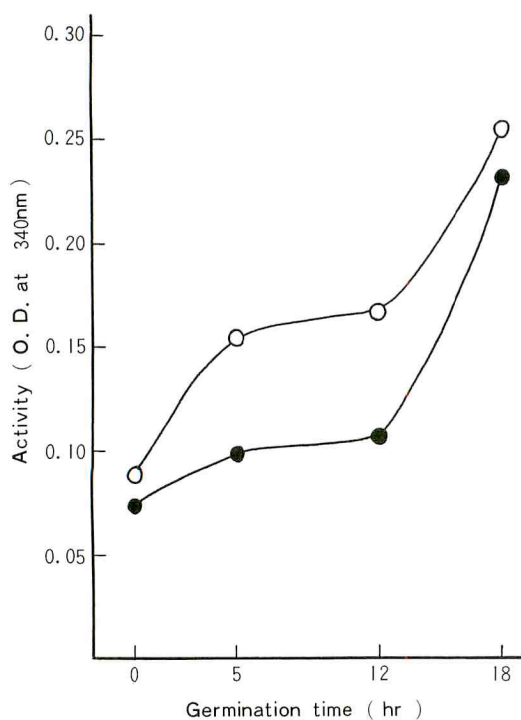


Fig. 6. Activity of dehydrogenase during the germination of the pollen of *Pinus densiflora*.

The extracts from the mature and the germinated-pollen with 0.5 M KHCO_3 -EDTA at pH 8.0 were diluted with 3 vol. of distilled water, then used for enzyme assay. The activities were measured same as in Table 1.

○—○ : } Same as in Fig. 1
●—● : }

発芽初期 (置床 5 時間)⁽¹²⁾に G-6-P DH は 1.75 倍、6-PG DH は 1.32 倍の活性増大を示した。その後発芽時間と共に徐々に活性を増大し、18 時間では G-6-P DH 活性は 2.89 倍、6-PG DH 活性は 3.

14 倍に増大した。とくに発芽初期の G-6-P DH の活性増大は、発芽に際してこの酵素が HMP の代謝を調節する主要な因子であることを示唆するものと考えられる。また両酵素活性が発芽と共に増大することは、HMP が花粉管伸長と密接に関連していることも示唆するもので、葛西ら⁽¹¹⁾のアカマツ花粉の発芽時に、RNA が花粉管先端部に異常に蓄積するという報告を考え合わせると興味深いことである。

要 約

アカマツ花粉を用い、ヘキソースモノホスフェートシャントに関与するグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ (G-6-P DH)、6-ホスホグルコン酸デヒドロゲナーゼ (6-PG DH) を検討し次の結果を得た。

(1) G-6-P、6-PG DH はいずれも 0.5 M KHCO_3 -EDTA 混液 (pH 8.0) でよく抽出され、両酵素作用の最適 pH はいずれも 8.5 であった。

(2) 透析により G-6-P DH 活性は全く変化しないが、6-PG DH 活性は約 17% 失活した。

(3) G-6-P、6-PG DH の補酵素は NADP であるが、G-6-P DH では NAD が NADP の場合の 7% の活性を示した。

(4) G-6-P DH は K^+ 、 Na^+ 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Mn^{2+} で活性が増大 (13~77%) し、6-PG DH は Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Mn^{2+} で活性が増大 (11~56%) した。両酵素とも Fe^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Hg^{2+} 、 Ag^+ で活性が阻害されたが、6-PG DH はさらに Co^{2+} でも阻害された。両酵素ともモノヨード酢酸、PCMB により阻害されたが、PCMB による阻害はシステイン、グルタチオンにより部分的に回復された。両酵素作用に対するフッ化ナトリウム、EDTA の影響は少なかった。

(5) 両酵素とも発芽時に活性を増大したが、とくに G-6-P DH の発芽初期の活性増大が著しかった。

文 献

- (1) 斗ヶ沢宣久・勝又悌三・岩動悠子・高橋睦子：日本農芸化学会誌（農化），35，623（1961）
- (2) 斗ヶ沢宣久・勝又悌三・岩動悠子・高橋睦子：岩手大学農学部報告（岩手大農報），6，6（1962）
- (3) 勝又悌三・斗ヶ沢宣久・小幡弥太郎：農化，37，439（1963）
- (4) 勝又悌三・宮本幸男・伊藤悦次・故斗ヶ沢宣久：岩手大農報，12，265（1975）
- (5) 斗ヶ沢宣久・勝又悌三・川尻秀雄・小野寺紀雅：農化，40，461（1966）
- (6) 勝又悌三・中村修樹・故斗ヶ沢宣久：岩手大農報，12，21（1974）
- (7) 斗ヶ沢宣久・勝又悌三・太田達郎：農化，41，178（1967）
- (8) 斗ヶ沢宣久・勝又悌三・深田 稔・本居孝雄：農化，41，184（1967）
- (9) 斗ヶ沢宣久・山村泰弘・山之内勇夫：岩手大農報，8，155（1966）
- (10) 勝又悌三・石川雄章・内藤千春・故斗ヶ沢宣久：岩手大農報，12，275（1975）
- (11) 葛西千春・宮 慶一郎・勝又悌三・斗ヶ沢宣久：岩手大農報，8，89（1966）
- (12) 勝又悌三・斗ヶ沢宣久：農化，42，1（1968）
- (13) 勝又悌三・斗ヶ沢宣久：農化，42，8（1968）
- (14) 勝又悌三・斗ヶ沢宣久：農化，42，13（1968）
- (15) B. Axelrod and H. Beevers : Ann. Rev. Plant Physiol., 7, 267 (1956)
- (16) M. Gibbs : Ann. Rev. Plant Physiol., 10, 329 (1959)
- (17) 赤沢 堯：蛋白質，核酸，酸素，5 653 (1960)
- (18) K. Okunuki : Acta Phytochim., 11, 28, 65 (1940)
- (19) K. Okunuki : Acta Phytochim., 11, 249 (1940)
- (20) A. Kornberg : J. Biol. Chem., 182, 805 (1950)
- (21) M. Gibbs, J.M. Earl and J.L. Ritchie : Plant Physiol., 30, 463 (1955)
- (22) G.E. Glock and P. Mclean : Biochem. J., 55, 400 (1953)
- (23) F. Dickens and G.E. Glock : Biochem. J., 50, 81 (1951)
- (24) L.E. Mortenson and P.W. Wilson : Arch. Biochem. Biophys., 53, 425 (1954)
- (25) W.A. Wood and R.F. Schwert : J. Cell Comp. Physiol., 41, Suppl. 1, 165 (1953)
- (26) B.L. Horecker and P.Z. Smyrniotis : J. Biol. Chem., 193, 371 (1951)

Summary

Glucose-6-phosphate (G-6-P), 6-phosphogluconate (6-PG) dehydrogenases in the pollen of *Pinus densiflora* were studied. The results obtained are as follows.

1. The optimum pH values of both dehydrogenases were 8.5.
2. By dialysis against for 0.02 M Tris buffer at pH 7.5, the G-6-P dehydrogenase activity was not decreased, but decreased about 17% in the 6-PG dehydrogenase.
3. Both dehydrogenases required NADP for their prosthetic groups, while the G-6-P dehydrogenase activity with NAD was about 7% of that in the presence of NADP.
4. The enzymatic reaction of G-6-P dehydrogenase was promoted by K⁺(13%), Na⁺(28%), Mg²⁺

(77%), Ca^{2+} (68%) and Mn^{2+} (47%) and that of 6-PG dehydrogenase by Mg^{2+} (56%), Ca^{2+} (11%) and Mn^{2+} (21%). Both dehydrogenases were inhibited by Fe^{2+} , Fe^{3+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Hg^{2+} and Ag^+ . Co^{2+} was also inhibitory for the 6-PG dehydrogenase. Both dehydrogenases were inhibited by PCMB and monoiodoacetic acid, but the inhibition by PCMB was partially restored by the addition of cysteine or glutathione.

5. During the germination of the pollen on sucrose-agar medium, both dehydrogenase activities increased with the lapse of time, especially the G-6-P dehydrogenase activity increased at the early stage of growth.

☆ 新 著 紹 介

「市河三次・富田仁編：花粉アレルギーと抗原植物（1975）」（黎明書房・約200頁・定価1300円）

京都・花粉研究会々員等らによる調査にもとづく花粉症抗原性植物の報告である。本邦確認種18、疑われる種35、その他合計160種について解説してある。花粉の形態、ブタクサ・セイタカアワダチソウの生態学、花粉アレルギー、鼻のアレルギーなど7章から成っている。参考文献84。尚、京都・花粉研究会を通じて購入すると1040円（送料別）となる（〒606 京都市左京区岩倉大鷲町83市河方 花粉研究会）（上野実朗）

☆ 昭和51年度から会費3000円となりました。会費はなるべく前金で納付して下さい。