

原 著

ライ麦花粉のホスホリラーゼ

船隈 透*・小島伸介*・佐野 徹*・原 彰*

Phosphorylase from rye pollen

Tooru FUNAGUMA*・Shinsuke KOZIMA*・Tooru SANO* and Akira HARA*

(受付：1981年5月20日)

緒 言

植物における糖代謝は、光合成による炭素の固定、糖類間の転換、各組織への移動および貯蔵あるいは細胞壁多糖の合成と分解にみる事ができるが、その中心は、カルビンサイクル経路を主体とする炭素の固定とデンプン-シュクロース転換反応にある。しかし、花粉においては、光合成の機能が備わっていないので、デンプン-シュクロース転換反応が極めて重要であると考えられる。渡辺¹⁾によると、ライ麦花粉は成熟するにつれて糖が、デンプン型から糖化型へと移行するが、デンプン型花粉は発芽しないか、発芽しても花粉管は初期に生長を停止するという。それに対して糖化型花粉は発芽がよいとのことである。このことは、ライ麦花粉の発芽においてはデンプンの糖化が必要であることを示唆している。

デンプンは、ホスホリラーゼあるいはアミラーゼによって分解されるが、ライ麦花粉では前者の活性が強く、後者の活性が極めて弱い²⁾ことから、その分解は前者に依存しているものと思われる。

本報告は、ホスホリラーゼの精製と諸性質につい

て記述する。

実験材料および方法

1. 材料

花粉は、名城大学農学部で栽培したライ麦(*Secale cereale cv. petkus*) から採取し、デシケーター中で乾燥させた後、使用するまで -20°C で保存した。

2. 試薬

グルコース-1-リン酸(以下G-1-Pと略す)および可溶性デンプンは半井化学薬品社製、DEAE-セルロースはBrown社製、Ampholine carrier ampholyte (pH 3.5-10.0)はLKB社製、Sephadex G-200はPharmacia社製そしてフェリチン、カタラーゼ、アルドラーゼおよび牛血清アルブミンはBoehringer Mannheim社製を使用した。

3. 蛋白質測定

溶液(液層1cm)の280nmにおける吸光度が1.0のとき、蛋白質量は1mg/mlと仮定して表示した。なお、Sephadex G-200によるゲル濾過においては、蛋白質はLowry変法³⁾によって測定した。

4. ホスホリラーゼ活性測定

* 〒468 名古屋市天白区天白町八事裏山69 名城大学農学部生物化学研究室

Faculty of Agriculture, Laboratory of Biological Chemistry, Meijo University, Tenpaku-ku, Nagoya 468 Japan.

活性測定は、本酵素による合成反応を利用して行った。酵素液0.1mlに、0.2M酢酸ナトリウム緩衝液(pH 6.0)0.4 ml、0.1 M フッ化ナトリウム 0.1 ml およびプライマーとして5%可溶性デンプン(pH 6.0、あらかじめ加熱溶解したもの) 0.2 ml を加え、37°Cで5分間保温し、別に同様に保温していた50mMG-1-P 0.2 ml を加え、37°Cで15分間反応させた。0.15 M 過塩素酸 2 ml を加えて反応を停止させた後、生じた無機リン酸を Fiske-Subbarow の変法⁴⁾によって測定した。

酵素の1単位は、上記条件下で1分間に1 μ molの無機リン酸を生ずるのに必要な酵素量と定義し、比活性は、蛋白質1 mg あたりの酵素活性とした。

実験結果

1. ホスホリラーゼの精製

ライ麦花粉 3 g を 60 ml の 1 mM 2-メルカプトエタノールを含む 10 mM トリス-マレイト緩衝液

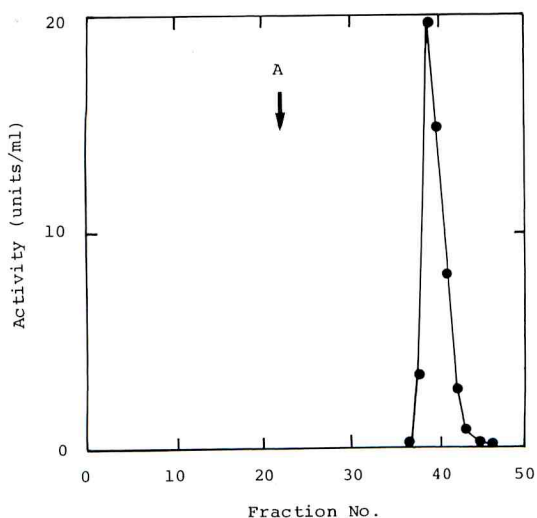


Fig. 1

(pH 7.0、以下 T 緩衝液とする)にけん濁後、10 ml ずつ10分間テフロンガラスホモゲナイザーで処理して遠心分離(8,000xg、10min)を行い、上清を 1 mM 2-メルカプトエタノールを含む 1 mM トリス-マレイト緩衝液 (pH7.0、以下1/10T緩衝液とする)

に対して透析した。透析内液64.5mlを1/10 T緩衝液で平衡化した DEAE-セルロースカラム(3.5×30 cm)に通し、200 ml の 1/10 T 緩衝液で洗浄した後、400mlの 1 mM 2-メルカプトエタノールを含む 50 mM トリス-マレイト緩衝液 (pH 7.0) で溶出した。Fig. 1 に示すように、酵素は1つのシャープなピークとして溶出された。図中に蛋白質量が記してないのは、用いた緩衝液が280nmにおいて高い吸光度を示したためである。活性画分(No.38-42)を集め(51.0 ml)、1/10 T 緩衝液に対して透析した後、等電点電気泳動に供した。泳動用カラムは、LKB社製8100-1 (110mlカラム)を用い、pH3.5-10.0のpH 勾配作製には 1% Ampholine を、また 0-60%の密度勾

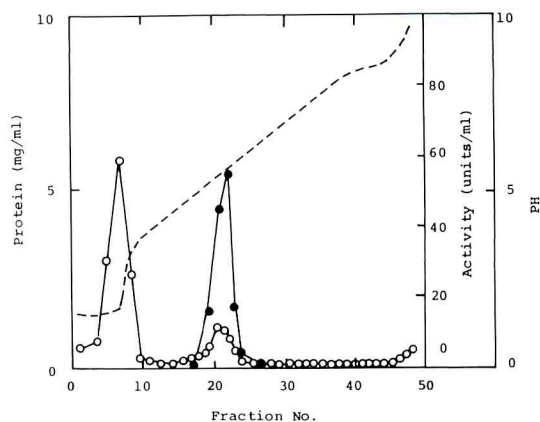


Fig. 2

配作製にはグリセロールを使用した。電気泳動は900 v の定電圧で 44 時間行った。Fig. 2 に示すように、酵素活性のピークは pH 5.5 の画分 (No.22) で得られた。活性画分 (No.20-23) を集め (8.0 ml)、T 緩衝液に対して透析を行い、コロジオンバッグで約 1 ml に濃縮した後、T 緩衝液で平衡化した Sephadex G-200 カラム (2×95 cm) によるゲル濾過を行った。Fig. 3 に示すように、蛋白質および活性のピークはいずれも 1 つであり、それらの位置はほぼ一致した。

以上の精製過程を Table 1 に要約した。酵素は約 170 倍に精製され、収率は約 27.4%であった。

Table 1. Summary of purification procedures of phosphorylase.

Step	Vol. (ml)	Protein (mg)	Activity (units)	Specific activity (units/mg)	Yield (%)
Crude extract	64.5	1,526	700	0.46	100
DEAE-cellulose	51.0	245	434	1.77	62.0
Isoelectric focusing	8.0	203	345	1.70	49.3
Sephadex G-200	24.0	2.45	192	78.4	27.4

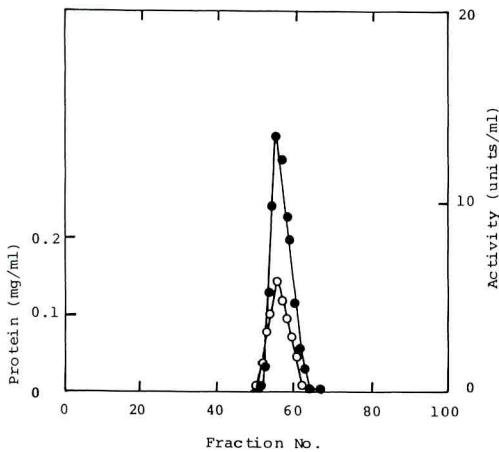


Fig. 3

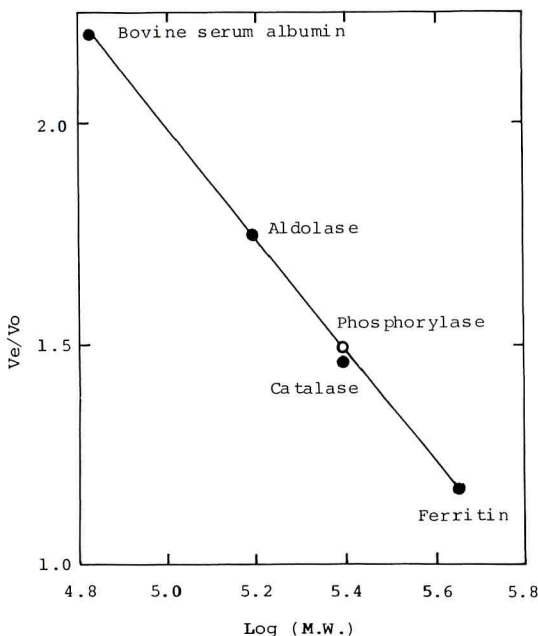


Fig. 4

2. ホスホリラーゼの諸性質

(1) 分子量…分子量は1mM 2-メルカプトエタノールを含む50mM トリス-酢酸緩衝液 (pH7.0) で平衡化したSephadex G-200カラム (2 × 100cm) によるゲル濾過法で求めた。標準蛋白質としては、フェリチン (分子量 450,000)、カタラーゼ (分子量 240,000)、アルドラーゼ (分子量 158,000) および牛血清アルブミン (分子量 67,000) を用い、Whitaker の方法⁵⁾に従ってプロットした。Fig. 4 に示すように、本酵素の分子量は約 240,000 と推定された。

(2) 至適 pH…pH 5.0-7.5 の 50 mM トリス-マレイト緩衝液を用いて、至適 pH を調べた。Fig. 5 に示すように、本酵素の至適 pH は 6.0 付近にあった。pH 7.5 においても活性は最大活性の約 60% を示した。

(3) pH 安定性…酵素標品を 1 mM 2-メルカプトエタノールを含む 1 mM トリス-酢酸緩衝液 (pH 7.5) に対して透析した後、種々の pH の緩衝液を加え、4°C に 24 時間放置して活性を測定した。Fig. 6 に示すように、本酵素は pH 7-8 の狭い範囲でのみ安定であり、pH 6 と 9 では最大活性の約 80% を示した。しかし、pH 10 では約 10% しかなく、pH 5 では失活した。

(4) 熱安定性…酵素標品を種々の温度に 10 分間保持した後、急冷し、活性を測定した。Fig. 7 に示すように、本酵素は 40°C までは極めて安定であったが、50°C では約 10% 失活し、60°C では完全に活性を失った。

(5) 諸試薬の影響…活性測定系に種々の化合物を加え、活性を測定した。Table 2 に示すように、本酵素は Zn²⁺ および Cu²⁺ によって強く阻害されたが、

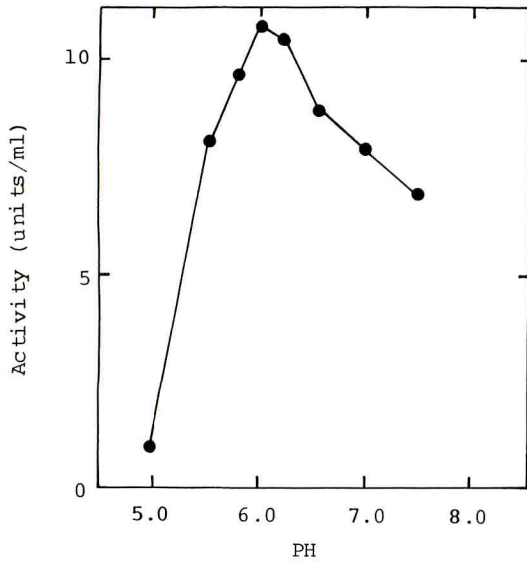


Fig. 5

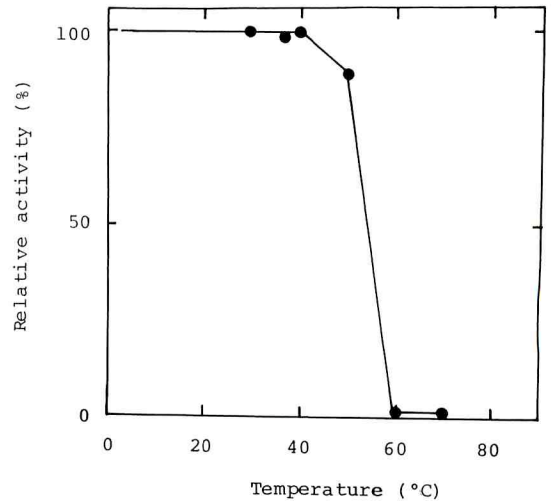


Fig. 7

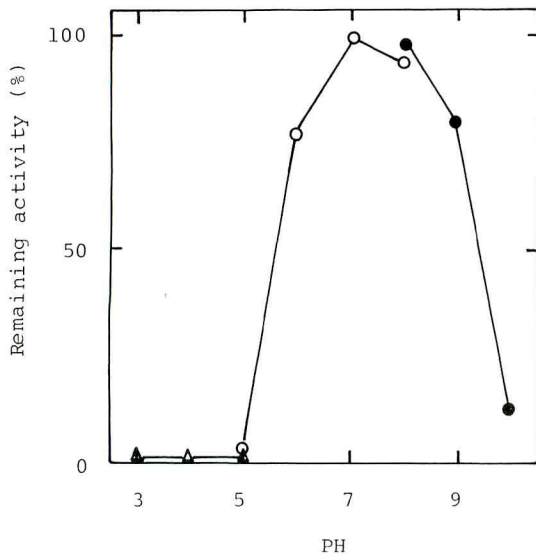


Fig. 6

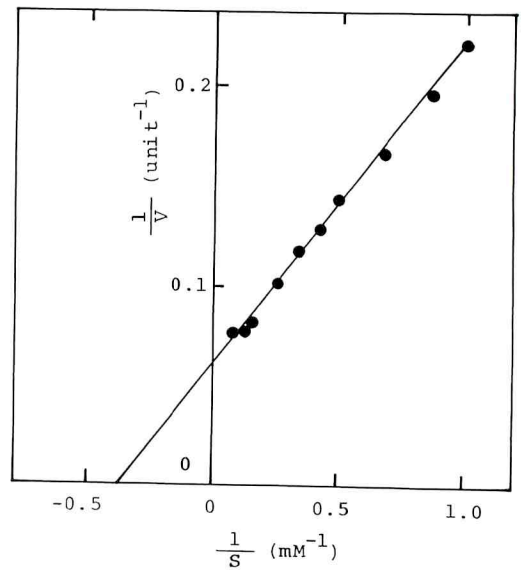


Fig. 8

他の金属イオン、モノヌクレオチド、*p*-クロロマーキユリー安息香酸あるいは α -トリプトファンによって影響を受けなかった。

(6) G-1-P に対する K_m 値…1% デンプンの存在下、G-1-P の濃度を変えて、活性を測定し、Lineweaver-Burk のプロットから K_m 値を求めた。

Fig. 8 から、G-1-P に対する本酵素の K_m 値は約 2.7 mM であった。

(7) プライマー要求性…これまで活性測定系にはプライマーとしてデンプンを加えていたが、本酵素が真にプライマー要求性であるか否かについて検討した。Fig. 9 に示すように、本酵素の反応は、プライ

Table 2. Effect of various reagents on activity of phosphorylase.

Additive	Conc. (mM)	Relative activity (%)	Additive	Conc. (mM)	Relative activity (%)
None	—	100	ATP	1	100.0
MgCl ₂	1	105.1	AMP	10	109.0
	10	93.6		1	108.7
CaCl ₂	1	99.4	UTP	1	105.0
	10	104.5		10	103.5
CoCl ₂	1	98.1	UDP	1	102.0
	10	89.1		10	106.0
FeSO ₄	1	130.6	UMP	1	97.0
	10	100.9		10	98.2
MnSO ₄	1	93.1	GMP	1	102.3
	10	82.8		CMP	1
ZnSO ₄	1	45.7	<i>p</i> -CMB*	10 ⁻⁴	102.1
	10	3.8		5 × 10 ⁻⁴	102.2
CuSO ₄	1	6.6	L-Tryptophan	5	98.5
	10	3.6			
EDTA	1	100.6			
	10	97.1			

Activity was measured by the routine method except for addition of various reagents.

* *p*-Chloromercuribenzoic acid

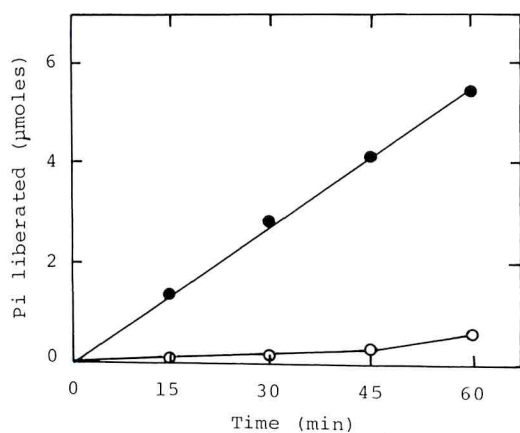


Fig. 9

マーの存在下においては速やかに、かつ直線的に進行したが非存在下では極めて遅く、しかもシグモイド的に進んだ。

(8) プライマー特異性…活性測定系にプライマーとして種々の糖を加え、活性を測定した。Table 3

Table 3. Priming specificity of phosphorylase.

Compound	Conc.(%)	Relative activity (%)
Soluble starch	1	100
Glucose	1	1.3
Maltose	1	0
Cellobiose	1	4.0
Maltotriose	1	6.3
No addition	—	4.6

Activity was measured by the routine method except for addition of each sugar as a primer.

に示すように、活性は、デンプンを加えたときに最も強く、三糖類以下の糖を加えたときには極めて弱かった。しかも後者の場合、活性は、プライマーの無添加時とほぼ等しいか、あるいはそれよりも弱かった。

考 察

植物起源のホスホリラーゼ (EC 2.4.1.1) については、種々の植物から精製され、諸性質について報告されているが、均一な状態まで精製された例は、ジャガイモ塊茎⁶⁾、サツマイモ塊根⁷⁾およびトウモロコシ種実⁸⁾のものだけである。Iwataら⁹⁾は、ホスホリラーゼがプロテアーゼによる限定水解を受けやすく、均一な標品として得にくいことを報告している。またトウモロコシ種実¹⁰⁾、ホウレンソウ葉¹¹⁾、ソラマメ子葉¹²⁾、エンドウ子葉¹³⁾およびガマ花粉²⁾のホスホリラーゼは多型性を示すことがわかっている。著者は、ライ麦花粉からホスホリラーゼを約170倍に精製したが、標品はディスク電気泳動的に均一ではなかった。またライ麦花粉のホスホリラーゼはクロマトグラフィあるいは電気泳動的に多型性を示さなかった。本酵素の分子量は240,000であり、至適pHは6.0であった。そしてpH 7-8の極めて狭い範囲でのみ安定であり、60°C、10分間の熱処理によって完全に失活した。G-1-Pに対する*K_m*値は2.7 mMであった。これらの性質は他の植物のホスホリラーゼのそれ¹⁴⁾と似ていた。一般に植物のホスホリラーゼは動物起源のもののような活性調節機構を有していないが、トウモロコシ種実のホスホリラーゼは¹⁰⁾プリンヌクレオチドによって阻害を受け、Mg²⁺あるいはEDTAによって著しく活性化されること、またバナナのホスホリラーゼ¹⁵⁾は、ATPや芳香族のアミノ酸によって

阻害されることが知られている。それに対してライ麦花粉のホスホリラーゼはテストしたすべてのモノヌクレオチド、L-トリプトファンおよびCu²⁺とZn²⁺を除く金属イオンによって活性化も阻害も受けなかった。従ってライ麦花粉のホスホリラーゼは、これらの物質による調節の機能も有していないものと思われる。

ホスホリラーゼにはプライマーを要求するものとならないものがある。ライ麦花粉のホスホリラーゼは、プライマー(デンプン)の非存在下でも活性を示したが極めて弱く、存在下での活性のわずか3%程にすぎなかった。このことは、本酵素がプライマー要求性であることを示している。しかし、プライマーの非存在下でもデンプン合成能が認められたという事実は、本酵素が糖蛋白質であって、その糖をプライマーとして利用しうる可能性を示唆している。ホスホリラーゼの要求するプライマーは、一般に多糖であるが、ソラマメ子葉のホスホリラーゼI¹²⁾およびエンドウ子葉のホスホリラーゼII¹³⁾は、三糖類を利用できることが報告されている。ライ麦花粉のホスホリラーゼは、デンプンを速やかに利用したが、三糖類以下の糖は利用しなかったことから、プライマーとしてかなり大きな糖を必要とするものと思われる。

以上のように、ライ麦花粉のホスホリラーゼについて、その合成反応を通して得られた結果を述べてきたが、現在、その分解反応についても検討中である。

引 用 文 献

- (1) 渡辺光太郎 (1974) 京教家政(文教)短大紀要 13, 26.
- (2) 原 彰, 船隈 透 (1981) 名城大学農学部学術報告 17, 64.
- (3) E. F. Hartee (1972) Anal. Biochem. 48, 422.
- (4) R. F. Furchgott and T. de Gudareff (1956) J. Biol. Chem. 223, 377.
- (5) J. R. Whitaker (1963) Anal. Chem. 35, 1950.
- (6) S. Iwata and T. Fukui (1973) FEBS Letters 36, 222.
- (7) M.-Ariki and T. Fukui (1975) Biochim. Biophys. Acta 386, 301.
- (8) B. Burr and O. E. Nelson (1975) Eur. J. Biochem. 56, 589.

- (9) S. Iwata and T. Fukui (1975) Arch. Biochem. Biophys. **169**, 58.
- (10) C. Y. Tsai and O. E. Nelson (1969) Plant Physiol. **43**, 103.
- (11) M. Steup and E. Lutzko (1979) Planta **145**, 69.
- (12) M. A. R. de Fekete (1968) Planta **79**, 208.
- (13) N. K. Matheson and R. H. Richardson (1976) Phytochemistry **15**, 887.
- (14) 福井俊郎 (1977) 蛋白質核酸酵素 **22**, 1493.
- (15) S. Singh and G. G. Sanwal (1973) Biochim. Biophys. Acta **309**, 280.

Summary

A phosphorylase from rye pollen was purified about 170-fold by chromatography on DEAE-cellulose, isoelectric focusing and gel filtration through Sephadex G-200. The approximate molecular weight estimated by gel filtration was 240,000 and isoelectric point was about 5.5. The enzyme had an optimum pH about 6.0, was stable in the pH range of pH 7-8 and lost its activity completely by heating at 60°C for 10 min. The activity was strongly inhibited by Cu^{2+} and Zn^{2+} but not by the other metal ions tested. No effect of *p*-chloromercuribenzoic acid and L -tryptophan on the activity was observed. The enzyme had a *K_m* value of about 2.7 mM for glucose-1-phosphate and was able to utilize starch readily as a primer but also slightly catalyze the synthesis of higher saccharide from glucose-1-phosphate in the absence of primer. Glucose, maltose and maltotriose were not utilized as a primer.

Legend

Fig. 1. Chromatography of phosphorylase on DEAE-cellulose.

Phosphorylase extract from rye pollen was applied to a column (3.5×30 cm) of DEAE-cellulose equilibrated with 1 mM Tris-maleate (pH 7.0) containing 1 mM 2-mercaptoethanol, washed with 200 ml of the same buffer and then eluted with 50 mM Tris-maleate (pH 7.0) containing 1 mM 2-mercaptoethanol.

Arrow A indicates the applied position of elution buffer.

Fractions of 10 ml were collected.

●—●, activity.

Fig. 2. Isoelectric focusing of phosphorylase.

Phosphorylase fraction obtained from a DEAE-cellulose column in Fig. 1 was dialyzed against 1 mM Tris-maleate (pH 7.0) containing 1 mM 2-mercaptoethanol and applied to a LKB column (110ml) for isoelectric focusing. Electrophoresis was carried out with 1% Ampholine carrier ampholyte giving a pH gradient of 3.5-10.0 at 900 V for 44 hr at 4°C. Stabilization against convection was achieved with a glycerol density gradient of 0-60%.

Fractions of 2.0g were collected.

●—●, activity; ○—○, protein; ---, pH.

Fig. 3. Gel filtration of phosphorylase on Sephadex G-200.

Phosphorylase fraction obtained from isoelectric focusing in Fig. 2 was concentrated to about 1 ml in a collodion bag and loaded on a column (2×95 cm) of Sephadex G-200 equilibrated with 10 mM Tris-maleate (pH 7.0) containing 1 mM 2-mercaptoethanol. Elution was then carried out with the same buffer.

Fractions of 3 ml were collected.

●—●, activity; ○—○, protein.

Fig. 4. Estimation of molecular weight of phosphorylase by an analytical column of Sephadex G-200.

The following marker proteins were used to make the calibration curve, molecular weight vs. slope : Bovine serum albumin, 67,000, Aldolase, 158,000, Catalase, 240,000 and Ferritin, 450,000.

Fig. 5. Effect of pH on activity of phosphorylase.

Activity was measured by the routine method except that 50 mM Tris-maleate buffer replaced the usual buffer.

Fig. 6. Effect of pH on stability of phosphorylase.

The pH buffer systems employed were; △—△, 20 mM Sodium acetate-HCl containing 1 mM 2-mercaptoethanol for pH 3.5; ○—○, 20 mM Tris-maleate containing 1 mM 2-mercaptoethanol for pH 5-8; ●—●, 20 mM Sodium carbonate-boric acid containing 1 mM 2-mercaptoethanol for pH 8-10.

pH 5-8; ●—●, 20 mM Sodium carbonate-boric acid containing 1 mM 2-mercaptoethanol for pH 8-10.

Fig. 7. Effect of heat treatment on stability of phosphorylase.

The enzyme in 10 mM Tris-maleate (pH 7.0) containing 1 mM 2-mercaptoethanol was left at various temperatures for 10 min and the remaining activity was measured by the routine method.

Fig. 8. Lineweaver-Burk plots of phosphorylase for glucose-1-phosphate.

Fig. 9. Primer requirement for activity of phosphorylase.

The activity was measured in the presence or absence of primer (starch).

●—●, activity in the presence of primer; ○—○, activity in the absence of primer.

新著紹介

Elise Van Campo : Flore pollinique et climat Pliocenes au lac Ichkeul (Tunisie). Mém. Trav. E. P. H. E., Inst. Montpellier, 42 p., 7 fig., 19 pl. 20.8×26.8 cm.1979

北アフリカのチュニジア北部、地中海に近い Ichkeul 湖の花粉分析報告である。Pteridophytes シダ類 135 種、Conifères 針葉樹 194 種、Feuillus 470 種、Herbacées 23 科などがある。ほぼ同じ北緯度付近を日本・東南アジア・中国・台湾などと比較している。図版は光学顕微鏡 L. M. と走査電子顕微鏡 S. E. M とを用いて現生花粉と化石花粉との写真をのせている (上野)。