

原 著

ミオ-イノシトールとフィチン酸

原 彰*・船隈 透*

Myo-inositol and phytic acid

Akira HARA and Tooru FUNAGUMA

(受付：1982年10月27日)

著者の一人、原は56年4月から57年3月まで米国ロックフェラー大学へ留学してきました。帰国後、本誌27巻1号でそれを紹介されていた事を知り、報告すべき義務があると思い立ち筆を取りました。しかしながら、留学先での研究は花粉とかけ離れていましたので、直接その研究内容に言及するのは止めて、関係する話題と我々が興味をもっている周囲の話題とを述べる事で、報告に変えさせていただきます。

本文中、第3項は船隈が担当し、残りは原が担当しました。

1) ロックフェラー大学

ニューヨーク市のマンハッタンは、ハーレム川、イースト川およびハドソン川によって囲まれた島である。大学はイースト川に面して64丁目付近に位置し、西へ向えばセントラルパークへ行きつく。ロックフェラー医学研究所がその前身であるが、一般学生はいないので日本流に言えば大学院大学である。小じんまりしているとは言え、これまで10数名のノーベル賞学者が在籍しており、その人々と比べても野口英世は傑出していたらしく、胸像が図書館前に、

また写真はカフェテリア内で見ることが出来る。

私はBiosynthesisの研究室に所属したが、教授はF. Lipmannであった。彼はコエンチームA (CoA)の発見者として、またエネルギー代謝における数々の業績によって1953年にノーベル賞を得ており、82歳の高齢ながらも今なお現役の第一線にいる。助教授のJ. Syはマジックスポット (ppGpp, pppGpp)の代謝および関連酵素の研究で知られており、私は彼のグラントで雇われた。それ故、私に与えられたテーマもマジックスポット水解酵素であったが、その結果をGuanosine 5'-triphosphate, 3'-diphosphate 5'-phosphohydrolase, Purification and substrate specificity⁽¹⁾というタイトルでまとめ投稿したが、掲載可となっている。

留学期間が1年に限られていた為に、帰国3カ月前からはほとんど休みを取らずに仕事に精を出した(給料をもらっているという負い目を感じるのは日本人の習性か)ためか、数キロの体重を失った。帰国してからはその反動で仕事を手につかずブラブラしていた為に、急速に回復するに至った。

6カ月も経過した今、「思い出の壺」の中では、苦しさがほとんど沈んでしまっているのに、なつ

* 名城大学農学部生物化学教室 〒468 名古屋市天白区天白町八事裏山

Faculty of Agriculture, Meijo University, Tenpaku-ku, Nagoya 468, Japan

かしさはいよいよ甘味を増してくる。米国での研究生活は花粉とは全く縁遠いものであった。

2) 米国生化学会で Loewus 夫妻に会う

米国滞在 2 カ月で、セントルイスで行われたアメリカ生化学会へ行かせてもらったが、学会の期間中毎日長い一日を過ごす破目になった。というのも、日本出発前に大した英会話の勉強をしていなかったし、専門の違いもあってシンポジウムを聞いてもそれ程理解できなかつたからである。ポスターを見るにしても忍耐に限度があり、ツアーで遊びに行く知恵も持ち合わせていなかった。もっともハンバーガーのマクドナルドのシンボルに採用されている Gateway Arch (西部へ至る門) には、二度も上まで昇ってみたが。

そのような中でただ一つの収穫は Loewus 夫妻に会えた事であろう。学会へ行く前から彼等に会う積りでいたのではなく、退屈の余りプログラムの人名索引を見ているうちにひらめいたのである。都合よく彼等はミオ-イノシトールホスファターゼの発表を行っていた。この酵素は、後に述べるミオ-イノシトール酸化経路に含まれる酵素の中で、性質がほとんど明らかにされていなかった重要なものだった。彼等が基質として β -グリセロリン酸を用いていた事から分るように、酵素の特異性は余り高くなく、イノシトールホスファターゼであるとした決め手は、多くの有機リン酸エステルの中でイノシトール-1-リン酸に対して最も小さい K_m 値を持っていた事である。イノシトール-1-リン酸を通常の基質として用いなかった理由は、言うまでもなくそれが高価だからである。

その他の性質としては、酵素はアルカリ側に至適 pH を持ち、 Mg^{2+} 依存性である事までは記憶に残っているが、データを書き写したアブストラクトは日本へ持ち帰ったはずなのに幾ら捜しても見あたらない。

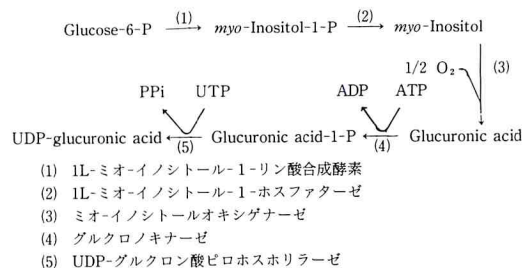
私が何をやっているかを Loewus に聞かれたので Plant and Cell Physiology に投稿していたピロホス

ファターゼの論文⁽²⁾を引き合いに出したところ、彼等は読んでおいてくれており、材料(ガマ花粉)には困らないだろうと笑っていた。

その後彼等から幾つかの別刷⁽³⁻⁶⁾を送ってもらったが、それをもとにしてミオ-イノシトール酸化経路を要約すると次のようになる。

3) ミオ-イノシトール酸化経路

この経路では、図に示すようにグルコース-6-リン酸からミオ-イノシトールを経て UDP-グルクロン酸が生成される。



- (1) 1L-ミオ-イノシトール-1-リン酸合成酵素
- (2) 1L-ミオ-イノシトール-1-ホスファターゼ
- (3) ミオ-イノシトールオキシゲナーゼ
- (4) グルクロノキナーゼ
- (5) UDP-グルクロン酸ピロホスホラーゼ

ミオ-イノシトール酸化経路図

これは Loewus らによって発見されたものであるが、それまでは、植物の細胞壁多糖の前駆体である UDP-グルクロン酸は、微生物や動物におけると同様に糖ヌクレオチド酸化経路(D-グルコース-6-Pから UDP-グルコースを経て UDP-グルクロン酸が生成される経路)で合成されるものと思われていた。しかしながら、Loewus らによるその後の研究から、植物においては、ミオ-イノシトール酸化経路が優勢であることが分った。またミオ-イノシトールは、植物中に遊離の状態あるいは他の物質と結合した形で広く分布しているが、種子の発芽や幼植物の生長の初期においては、遊離のミオ-イノシトールあるいはガラクトキノール [1 L-1-(O- α -D-ガラクトピラノシル)-ミオ-イノシトール] やフィチン酸が加水分解して生じたミオ-イノシトールがそれらの壁多糖の合成に利用されるという。従って Loewus らは、これらがグルコース-6-リン酸とともに、植物の成長に応じた壁多糖の合成において極めて重要な役割を果たしているものと考えている。ユリの花粉では、

発芽の初期において 1 L-ミオ-イノシトール-1-リン酸合成酵素の活性が極めて低く、しかもこの期に合成されたミオ-イノシトールはもともと存在していたもの (*Lilium longiflorum* cv Nellite White の遊離ミオ-イノシトール含量は 3.6 mg/g 花粉) のわずか数%に過ぎなかった。これらの事実から、彼らは花粉管伸長の初期段階における壁多糖の合成には、D-グルコース-6-リン酸からミオ-イノシトールへの転換反応はほとんど意義がないと推察した。しかしながら、後期の段階、すなわち花粉管の伸長が雌しべ中の栄養源に依存している時には、この転換が重要となるかも知れないと述べている。

4) 国際生化学会での花粉に関する報告

前項で述べたミオ-イノシトール酸化経路に関する酵素については、帰国後すぐに実験にとりかかった。しかしながら、次に出かけたオーストラリアでの学会で再び、それに関連する発表に出会うとは思ってもみなかった。

今年の国際生化学会は、オーストラリアのパーズ市で開催された(8月15日~21日)。

私は滞米中に pppGpp-5'-phosphohydrolase and ppGpp-3'-pyrophosphorylase(A.Hara and J.Sy) というタイトルでポスター発表を登録しておいた。勿論それは、Sy 助教授のすすめがあったからだが、肝心の彼は旅費の申請がパスしていないので行けないと言うのだ。私は3月のアトランタでの微生物学会へも1人で行かさず発表させられたので、またも「はめられた」と感じたのであるが、結局旅費を得たらしく参加してくれたので、発表の応答のほとんどは彼にまかせて無事に終えることが出来た。オーストラリアは、米国やヨーロッパからは遠いらしく、国際生化学会としてはやや低調であったらしいが、名簿から計算すると日本人の参加者は約10%で200名を占めていた。

数多くの発表の中で、花粉に関する報告は僅か1件しか目にとまらなかった。それが幸運にもイノシトールのヘキサリン酸エステルであるフィチン酸

(Phytic acid)に関する発表であり、オーストラリア、アデレード大学の J. F. Jackson によって行われた。タイトルは Phytic acid in germinating pollen is hydrolyzed by a phy-tase translated from a long-lived mRNA to give *myo*-inositol for polysaccharide biosynthesis というものである。

彼は、花粉中には花粉管形成や伸長を保証するのに十分な量のミオ-イノシトールは存在せず、またグルコース-6-リン酸からミオ-イノシトール-1-リン酸を合成する酵素も必要量存在しないことから、ミオ-イノシトールの供給源としてフィチン酸を考えた。この文は、第3項で引用した Loewus の考え通りで目新しいものではない。

Petunia hybrida で観察したところによると、花粉管の伸長率は発芽後4時間で最高となるが、それは Phy-tase (フィチン酸分解酵素一片仮名で示すと意味不明となるので英語名をそのまま用いる) 活性が出現し、フィチン酸の減少率が最大になる時間と一致するという。この Phy-tase は発芽前の成熟花粉中に既に存在する mRNA (long-lived mRNA) の翻訳産物である事が阻害利を用いた実験で確かめられていた。Jackson はこの報告以前に Phytic acid in pollen という論文⁽⁷⁾を発表しているが、共著者の1人は Pollen, Biology Biochemistry Management の著者の1人である H. F. Linskens である。余談であるが、我々の関連分野で文献を搜すと、Loewus, Dickinson, Linskens の誰かに到達する。

さて、前記の論文に戻ると、テストされた植物の中で花柱が5mm以上であるものは、花粉重の0.05%~2.1%のフィチン酸を含んでいるが、短い花柱をもつキク科やイネ科植物(トウモロコシを例外として)には、フィチン酸はほとんど含まれていない。すなわち、長い花柱をもつ植物では花粉は長い花粉管を伸ばす必要があり、管形成に要求される糖成分の一部がフィチン酸から供給されるという仮説は容易に導かれる。Jackson が Phy-tase へたどりつくまでにはこのような伏線があったのだ。なお、花粉中の遊離のミオ-イノシトール量については Loewus ら

による報告⁽⁴⁾があるが、測定されたどの植物についてもその量は1%に満たない。

私は Jackson と別れる際に、お互いに別刷を交換しようとして約束したので、帰国後それを実行すると共に Phy-tase の詳しい測定の方法を教えてくださいと手紙を書いた。折り返してきた彼の手紙と別刷の中には Phy-tase の測定法に触れたものではなく、ただ一言、Phy-tase は酸性ホスファターゼの性質を持つことを見つけたとあった。

5) 当研究室における花粉研究の 進行状況

我々は本会誌 24 号に、花粉におけるデンブリン-シュクロース転換反応という雑文を書いた。その中で Mg^{2+} -依存性ピロホスファターゼの役割は、デンブリンやシュクロース、あるいは花粉管壁糖成分の前駆体となる UDP (または ADP)-グルコースが合成される際に生ずるピロリン酸の掃除人であると述べた。さらにその酵素が UDP-グルコースピロホスホラーゼの測定法に利用できる可能性を予言しておいた。実際に実験してみた結果うまくいく事が分り、A simple assay method for determination of NDP-glucose pyrophosphorylase というタイトルでまとめた論文⁽⁸⁾は、現在掲載可となっている。これを投稿してレフェリーに指摘されたのであるが、驚いたことに全く同じ方法を考えた人⁽⁹⁾がいたのである。アプローチの仕方が異なるとは言え、オリジナリティのある仕事をするのはむずかしいものだ。

従来の方法は、アイソトープを使用するか、高価な酵素を加えたカップリング反応を利用していたが、我々の方法は簡便で安価に出来るという利点がある。しかし、盲検値が高くなるので吸光度リニアが高いか、ダブルビームの分光光度計を使った方が望ましい。

測定法が確立したので、ガン花粉から UDP-グルコースのピロホスホラーゼの分離精製に着手した。その結果、リガンドとして UDP-グルコースとグルコース-1-リン酸を結合させた Sepharose 6 B によ

るアフィニティクロマトグラフィーを含めた精製法によって、酵素はポリアクリルアミドゲル電気泳動で均一と判定されるまでに精製された。酵素の分子量は約 55,000 であり UDP-グルコースの加ピロリン酸分解での平衡定数は 2.1 を示し、酵素反応は報告された他の UDP-グルコースピロホスホラーゼと同様、オーダード BiBi 機構に従う事が明らかになった。これらを Purification and some properties of UDP-glucose pyrophosphorylase from pollen of *Typha latifolia* Linne⁽¹⁰⁾ というタイトルでまとめ投稿したが、これも掲載される予定である。

ところで、ガン花粉 1g には約 160 単位の UDP-グルコースピロホスホラーゼが含まれている。この酵素が 1 時間反応し続けると合成される UDP-グルコース量は約 5g に達する。僅か 1% の酵素が働いたとしても、花粉重の 5% も UDP-グルコースが生成されることになる。断っておくが平衡定数から明らかかなように酵素反応は UDP-グルコース合成方向だけでなく、グルコース-1-リン酸合成方向へも容易に進むことができる。問題は反応の場での基質濃度であるが、我々が主張するピロホスファターゼの役割を考慮すると、花粉中では反応は UDP-グルコース生成方向へ一方的に進行しているであろう (かなり我田引水的であると思うが)。しかし UDP-グルコースはそれ自身蓄積することはなく、そのグルコース部分は発芽時にはシュクロース分子として、発芽時には細胞壁グルカンとして取り込まれるであろう。さらに一部は酸化されて UDP-グルクロン酸へ転換されると型通りの図式を描いてみたのだが、第 3 項で述べた Loewus の指摘する通り、UDP-グルコースの脱水素酵素はガン花粉中には検出されなかったのである。そこで次のターゲットになったのがイノシトール酸化経路である。

経路図から明らかのように、UDP-グルクロン酸はイノシトール酸化経路の最終産物でもある。直接反応に関与する酵素は、UDP-グルクロン酸ピロホスホラーゼであるが、活性を測定するには先に述べた NDP-グルコースピロホスホラーゼの測定法⁽⁸⁾

を適用できる。ガマ花粉には確かにこの酵素が存在するが、活性単位で比較するとUDP-グルコースピロホスホリラーゼの1/10以下であった。現在酵素を精製し性質を調べているが不安定なので、純粋な酵素を得るには悲観的な見通しである。

さて、イノシトール酸化経路の最終反応を触媒する酵素を確認できたので、引き続きイノシトールホスファターゼに挑戦した。活性測定はLoewus夫妻らの方法に準じて、 β -グリセロリン酸を基質にして行っているのだが、混在する非特異的ホスファターゼによると思われる活性以外には、イノシトールホスファターゼが存在しているという証拠をつかめないでいる。

イノシトールはどのようにして供給されるのか、困惑している我々に格好のデータを提供してくれたのが、前述したJacksonによるPhy-taseの研究である。我々はその測定法を入手できなかったので、ゼロからスタートしたのだが都合が良い事には、フィチン酸のリン酸エステルは、非特異的ホスファターゼによる攻撃を非常に受けにくいのである。様々の試行錯誤の末、我々はガマ花粉中にPhy-taseの一種らしき酵素を見出した。それはJacksonの言う

Phy-taseと異って、発芽後に急激な活性増加を示すものではなく、また至適pH、 Mg^{2+} 依存性に関しても性質が違うように思われる。Phy-taseが酸性ホスファターゼをもつというJacksonの見解は、米粒のアリューロン層から分離した酸性ホスファターゼがPhy-taseであるとするYamagataらの報告⁽¹¹⁾と一致するので、存在は確かなのだろうか、今はデータの蓄積を急ぐ段階にある。

多くの花粉は短時間で発芽し、花粉管を伸ばすという事実は現在の見解から考えると、そこではイノシトール酸化経路が働いていなければならない。しかし、これまでの話の内容から明らかなように、イノシトール酸化経路に含まれる酵素群の活性はいずれも強いものではない。この食い違いをどのように説明できるだろうか。

花粉を扱えば扱うほど感じさせられることは、「花粉は食欲だ」という事である。彼等は必らずやその使命を全うすべく、準備万端整えているのだけは間違いない。花粉はある時は気難しく、ある時は大盤振舞をしてみせる王様であり、我々はその一挙手一投足によって右往左往する従者に過ぎない。

参 考 文 献

- (1) Hara,A. and J.Sy Guanosine 5'-triphosphate, 3'-diphosphate 5'-phosphohydrolase. Purification and substrate specificity *J. Biol. Chem.* in press.
- (2) Hara,A., K.Kawamoto and T.Funaguma 1980 Inorganic pyrophosphatase form pollen of *Typha latifolia* *Plant and Cell Physiology* **21** : 1475—1482
- (3) Loewus,F.A. and M.W.Loewus 1980 *Myo*-inositol : Biosynthesis and metabolism *The Biochemistry of Plant* Academic Press Inc. Vol. **3** : 43—76
- (4) Baiti,I.B., C.L.Rosenfield and F. A. Loewus 1978 *Myo*-inositol content of lily pollen *Phytochemistry* **17** : 1185—1186
- (5) Loewus,M.W. and F.A.Loewus 1980 The C-5 hydrogen isotope-effect in *myo*-inositol 1 -phosphate synthase as evidence for the *myo*-inositol oxidation-pathway *Carbohydrate Research* **82** : 333—342
- (6) Deshusses,J., S.C.Gumber and F. A. Loewus 1981 Sugar uptake in lily pollen *Plant Physiol.* **67** : 793—796
- (7) Jackson,J.F., G.Jones and H. F. Linskens 1982 Phytic acid in pollen *Phytochemistry* **21** : 1255—1258
- (8) Hara,A., T.Hondo and T. Funaguma A simple assay method for determination of NDP-glucose pyrophosphorylase *Agric. Biol. Chem.* in press.
- (9) Kimata,K. and S.Suzki 1966 Studies on cytidine diphosphate glucose pyrophosphorylase and related enzymes of *Azotobacter vinelandii* *J. Biol. Chem.* **78** : 1099—1113
- (10) Hondo,T.,A.Hara and T.Funaguma Purification and some properties of UDP-glucose pyrophosphorylase from pollen of *Typha latifolia* Linne *Plant and Cell Physiology*, in press.
- (11) Yamagata,H., K.Tanaka and Z.Kasai 1980 Purification and characterization of acid phosphatase in aleurone paricles of rice grains *Plant and Cell Physiology* **21** : 1449—1460