

ヒノキ花粉の酸性ホスファターゼの性質について

中山章文*・井手 武**・田端司郎**

On the Properties of Acid Phosphatases from
Hinoki (*Chamaecyparis obtusa* Endl) Pollen.

Akifumi NAKAYAMA*, Takeshi IDE** and Shiro TABATA**

* *Department of Clinical Laboratory, Prefecture Nara
Hospital, Hiramatsu-cho, Nara, 631, Japan.*** *Chemistry, Nara Medical University, Shijo-cho,
Kashihara, 634, Japan.*

Two different phosphatases (EC 3.1.3.2) derived from inner wall surface of Hinoki (*Chamaecyparis obtusa* Endl) pollen were separately purified through phosphocellulose chromatography and following isoelectrofocusing: the two phosphatases, designated phosphatase A and B for convenience, showed following different properties.

Phosphatase A and B showed pH optima for activity at pH 6.2~6.5 and 5.3~5.5, and had different isoelectric points at 6.2 and 6.9, respectively. Phosphatase A and B activities decreased to half by heating at 80°C for 5 min and 2 min, respectively. Apparent K_m values for *p*-nitrophenyl phosphate (*p*-NPP) of phosphatase A and B were 6.25×10^{-4} M and 6.25×10^{-5} M, respectively. Although both enzymes could hydrolyze ATP, ADP and inorganic pyrophosphate at almost equal rate as *p*-NPP, most striking difference in the substrate specificity of these enzymes were observed in the hydrolysis of AMP, glucose 6-phosphate and glycerol 1-phosphate; these substances could be hydrolyzed at almost the same rate as *p*-NPP by phosphatase B while none of them were effective substrate for phosphatase A. Activities of both enzymes were inhibited by Cu^{2+} , Zn^{2+} and Ag^+ .

緒 言

酸性ホスファターゼは、酸性域に至適 pH を有し、 γ -酸エステル結合を加水分解する酵素である。ホス

* 〒 631 奈良市平松町 127-1 県立奈良病院中央臨床検査部 生化学

** 〒 634 橿原市四条町 840 奈良県立医科大学 化学教室

ァターゼの基質であるリン酸エステル化合物は生体に広く分布し、その生成と分解は核酸、蛋白質、生体膜の生合成やエネルギー産生などの代謝に関連している。今回われわれは、ヒノキ (*Chamaecyparis obtusa* Endl) 花粉に微アルカリで溶出してくる酸性ホスファターゼの活性を認め、このホスファターゼの性質について検討したので報告する。

実験材料および方法

1. 材料

ヒノキ花粉は小枝の雄花を室内で開花させ採集し、使用時まで -20°C に保存した。

2. 試薬

グリセロリン酸、5'-AMP、ピロリン酸、パラニトロフェニールリン酸 (以下 *p*-NPP と略す)、グルコース-6-リン酸 (以下 G-6-P と略す)、5'-ATP は和光純薬、5'-ADP は Oriental Yeast、Bis-パラニトロフェニールリン酸 (以下 Bis *p*-NPP と略す) は Aldrich、リン酸セルロース (3.7 meq/g)

は Serva 製のものを使用した。

3. 蛋白質測定法

蛋白質の測定は、280nm における吸光度による。

4. ホスファターゼ活性測定法

5.0 mM *p*-NPP 1.0 ml と 0.1 M 酢酸緩衝液 (pH 5.4) 0.95 ml に酵素液 50 μl を加え、 30°C で反応させ、20分後に 0.2 N NaOH 1.0 ml を加えて反応を停止させた。遊離した *p*-nitrophenol を 410 nm の吸光度で測定した。

酵素の1単位は、上記条件下で1分間に1 μmol の *p*-nitrophenol を遊離するのに必要な酵素量とした。

実験および結果

1. ホスファターゼの精製

ヒノキ花粉 10 g に 200 ml の 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) を加え 30°C で1時間振盪後 10,000 rpm で20分間遠心分離した。上清を10%のエチレングリコールを含む 50 mM 酢酸緩衝液 (pH 5.4) に対して透析した。

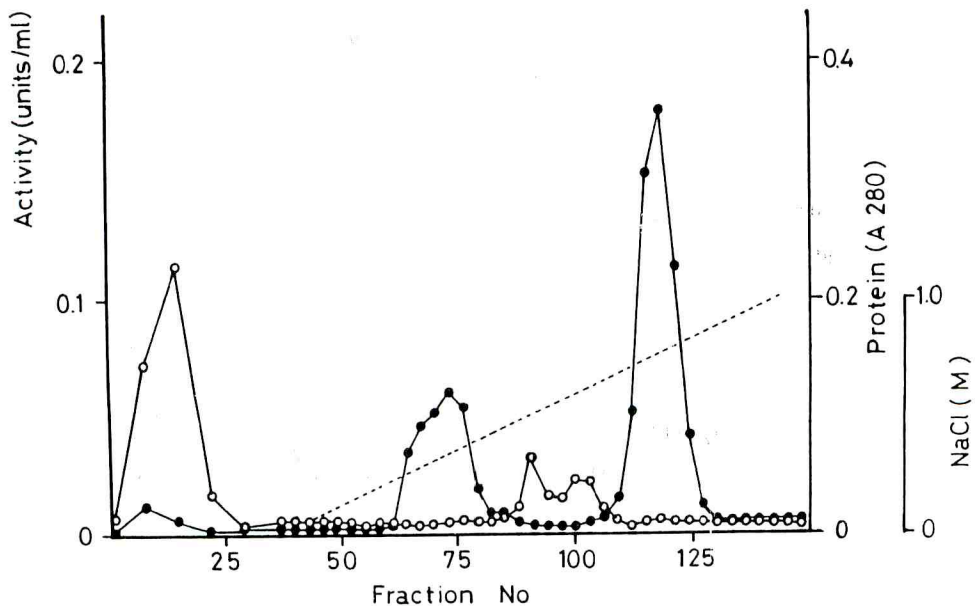


Fig. 1 Chromatography of the acid phosphatase on a P-cellulose column. Each fraction of 8 ml was collected. phosphatase activity (●), protein (○), NaCl concentration (···).

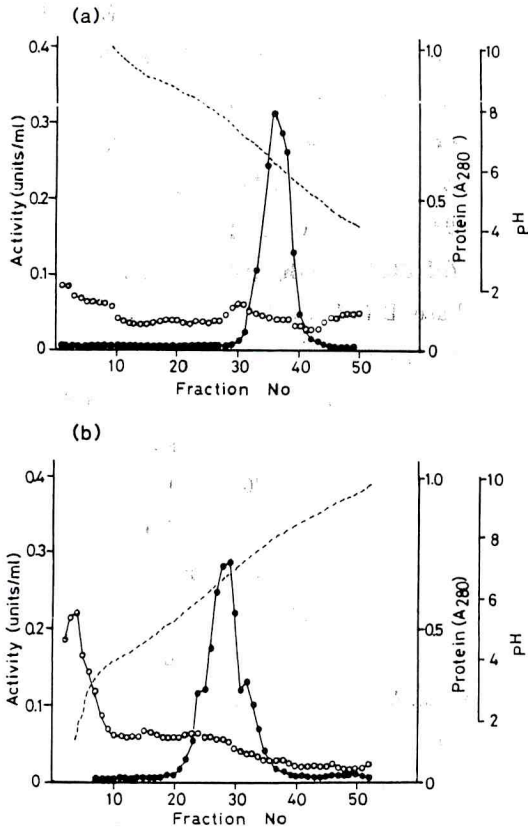


Fig. 2 Isoelectric focusing pattern of the Pasa A (a) and B (b).

One percent Ampholine was used for pH gradient of 3.5-10 and sucrose was used for density gradient of 0-40%. phosphatase activity (●), protein(○), pH(⋯).

これを同緩衝液で平衡化したリン酸セルロースカラム (3.4×20cm) に通し、600ml の同緩衝液で洗浄した後50mM 酢酸緩衝液と1.0M NaCl を含む同緩衝液 (全量1000ml) による直線的濃度勾配法で溶出した (Fig. 1)。ホスファターゼ活性は試験管番号64-79と112-124 の二画分に溶出された。最初に溶出される画分をホスファターゼA (以下 Pasa A), 少し遅れて溶出される画分をホスファターゼB (以下 Pasa B) とした。この二つの活性画分をそれぞれ10%のエチレングリコールを含む蒸留水に対して透析し、各々についてpH 3.5-10.0の等電点電気泳動⁽¹⁾を行な

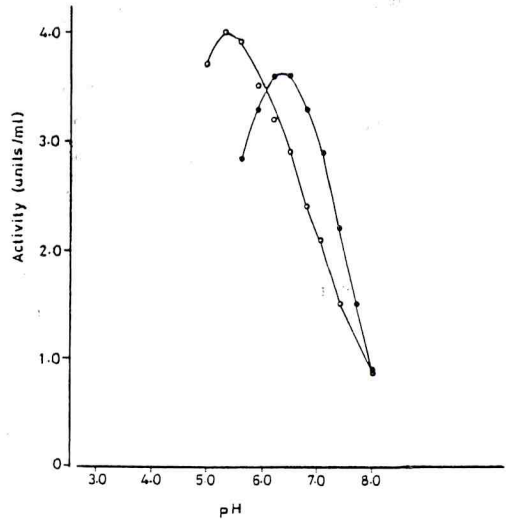


Fig. 3 Effect of pH on the activity of Pasa A and B. Buffers of 0.1M acetate buffer (pH 5.0-5.9) and 0.1M Tris-maleate buffer (pH 6.0-8.0) were used. Pasa A (●), Pasa B (○).

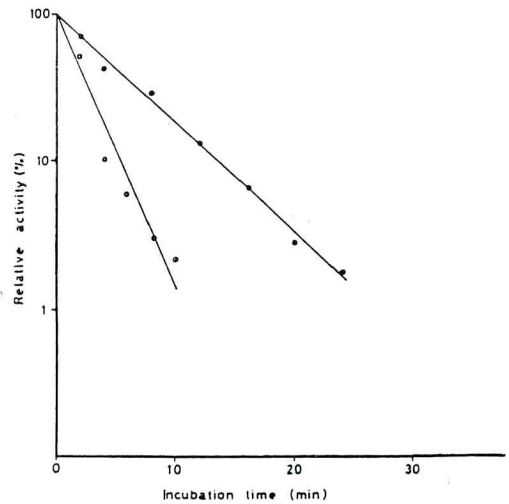


Fig. 4 Heat inactivation curve of the Pasa A and B. The enzyme was incubated at 80°C for various periods. The remaining activity was measured under the standard conditions and was expressed as percent of initial activity. Pasa A (●), Pasa B (○).

った (Fig. 2)。Pasa A の活性ピークは pH6.2付近で Pasa B の活性ピークは pH 6.9 付近であった。

Table 1 Substrate specificity of the Pase A and B. Activity for each substrate (5mM) was assayed by measuring the amount of Pi liberated. Values were expressed as percent of activity for *p*-NPP

Substrate	Relative activity(%)	
	Pase A	Pase B
<i>p</i> -NPP	100	100
ATP	72	102
ADP	81	103
AMP	2	103
Glucose 6-P	3	86
Glycerol 1-P	2	90
PPi	69	110
Bis <i>p</i> -NPP	18	5

2. ホスファターゼの諸性質

(1) 至適pH 0.1M酢酸緩衝液と0.1M Tris—マレート緩衝液を用いてホスファターゼ活性を測定した (Fig. 3)。Pase AはpH 6.2—6.5に最大活性を

示し、Pase BはpH 5.3—5.5に最大活性を示した。

(2) 基質特異性 種々のリン酸化合物を基質として生じたリンをFiske-Subbarow改良法⁽²⁾で測定しPase AとBの相違を調べた (Table 1)。Pase AはATP、ADP、無機ピロリン酸に作用し、AMP、グリセロリン酸、G-6-Pには作用しなかった。また若干ではあるがBis *p*-NPPにも分解能が認められた。Pase BはBis *p*-NPP以外の基質に対して広く活性を示した。

(3) 熱安定性 二種のホスファターゼをそれぞれ70°Cおよび80°Cに加温して耐熱性を調べた。二種のホスファターゼは、70°C、30分に加温においても約80%の活性を保持していた。80°CではPase Aの活性はほぼ5分で半減し、Pase Bの活性は約2分で半減した (Fig. 4)。

(4) 諸試薬の影響 種々の化合物を反応系での濃度が10mMおよび1mMになるように加え、ホスファターゼの活性に及ぼす影響を調べた (Table 2)。Pase AおよびBともにZn²⁺、Cu²⁺、Ag⁺によって阻害され、用いた試薬に限れば両者に大きな相違は認められなかった。しかし10mMのCu²⁺によるPase Bの

Table 2 Effect of various reagents on the activity of Pase A and B. Activity was measured under the standard conditions except that each reagent was added. Relative activity was expressed as percent of the activity without reagent.

Reagent	Concentration (mM)	Relative activity	
		Pase A	Pase B
None	...	100	100
CaCl ₂	10	112	85
MgCl ₂	10	104	95
MnCl ₂	10	114	106
ZnCl ₂	1	75	103
	10	21	58
Cu(NO ₃) ₂	1	81	54
	10	16	8
AgNO ₃	1	58	73
	10	40	42
EDTA	10	97	97

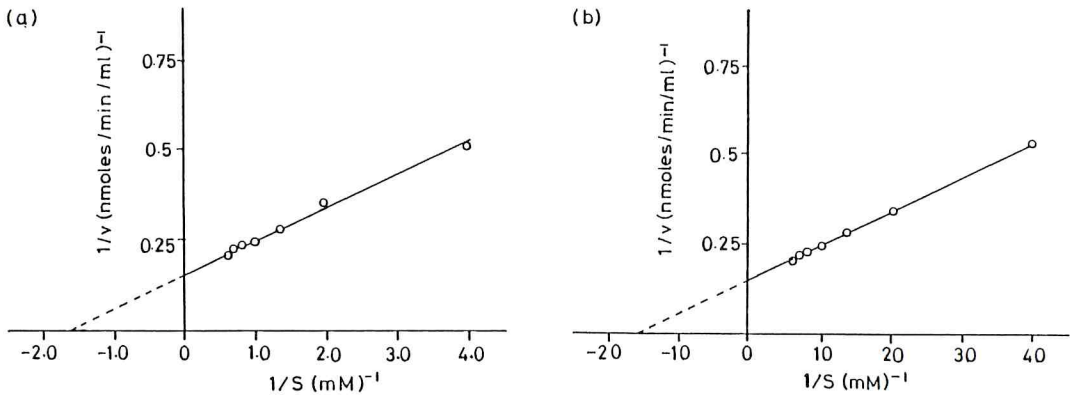


Fig. 5 Lineweaver-Burk plots of the Pase A(a) and B(b) for *p*-nitrophenylphosphate.

阻害は顕著であった。

(5) *p*-NPP に対する K_m 値 種々の *p*-NPP の濃度におけるホスファターゼ活性を測定し、Lineweaver-Burk のプロットより K_m 値を求めた (Fig. 5)。 K_m 値は Pase A が 6.25×10^{-4} M で、Pase B は 6.25×10^{-5} M と 10 倍の差が認められた。

考 察

ヒノキ花粉より微アルカリで溶出する酸性ホスファターゼを、リン酸セルロースカラムクロマトグラフィーにより精製し、Pase A と Pase B の二つの画分を得た。Pase A は ATP、ADP、無機ピロリン酸に活性を示し *p*-NPP 以外のホスホモノエステルやホスフォジエステルである Bis *p*-NPP に対しては活性を示さなかった。この性質は、種村ら⁽³⁾ がジャガイモより精製したホスファターゼのアイソザイム I と類似していた。ただし AMP、グリセロリン酸、G-6-P に活性を示さないことから Pase A は、通常のホスホモノエステラーゼではないと思われる。ただ無機ピロリン酸に対する活性については、Uehara ら⁽⁴⁾ が植物の酸性ホスファターゼの精製物中にピロホスファターゼ活性が残ることを報告していることから、活性画分中に残存したピロホスファターゼによる可能性も否定できない。一方、Pase B はホスフォジエステルである Bis *p*-NPP には活性を示さずホスホモノエステルである他の基質に対しては、全て活性を示したことから非特異的なホスホモノエステラーゼ

と思われる。この性質は *Ustilago esculenta*⁽⁵⁾ の細胞外膜より精製された酸性ホスファターゼと類似していた。スギやヒノキ花粉は微酸性溶液で処理しても外壁の破壊が見られず、ホスファターゼ活性も検出できないが、微アルカリ溶液で処理すると外壁が破れ、顕鏡的には intine の破れていない状態にある。⁽⁶⁾ ここではヒノキ花粉を微アルカリ溶液で処理しているので、Pase A および B は外壁を含む、intine との間に存在するいわゆる表在性の酵素であると考えられる。

次に熱に対する安定性については、Pase A、Pase B ともに 70 °C、30 分の加温においてもその活性の約 80% を保持していた。このことは、アカマツ花粉⁽⁷⁾ のそれよりも熱に対して安定であった。

金属イオンの影響について Pase A は、 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Ag^{+} によって阻害され、Uehara ら⁽⁴⁾ が報告しているサツマイモ由来の酸性ホスファターゼの性質と似た傾向を示し、Pase B は Cu^{2+} によって最も強く阻害された。また、ダンシャクイモ⁽⁸⁾ やホーレン草、大豆の葉⁽⁹⁾ より精製されたホスファターゼにみられるような Mg^{2+} による活性の増大はみられず、Pase A および B は Mg^{2+} による活性の調節機構を有していない。

また、Pase A は K_m 値 6.25×10^{-4} M、等電点 6.2、至適 pH 6.2—6.5 であり、Pase B は K_m 値 6.25×10^{-5} M、等電点 6.9、至適 pH 5.3—5.5 と互いにまったく異なった性質を有していた。このことから

らヒノキ花粉の酸性ホスファターゼには、少なくとも二種のアイソザイムの存在することを認めた。

花粉のホスファターゼについては、勝又ら⁽⁷⁾がアカマツ花粉に酸性ホスファターゼの活性を認め、発芽時に酸性ホスファターゼが細胞内から細胞外へ溶出することを報告している。また、ソテツ花粉⁽¹⁰⁾において酸性ホスファターゼなど種々の加水分解酵素が花粉表面にイオン化していることや、ガマ花粉⁽¹¹⁾において Mg^{2+} 依存性のアルカリ性ピロホスファターゼがデンプン→シュクロース転換反応に関与していることが報告されている。

本報告での二種のホスファターゼが、ヒノキ花粉においてどのような生理的役割を持っているかは今後の検討課題である。

尚、本論文の要旨は第25回日本花粉学会大会（名古屋名城大学 1984年）において報告した。

御校閲いただいた名城大学農学部原助教授に謝意を表します。

要 約

ヒノキ花粉内壁表面に酸性ホスファターゼの活性を認め、その性質について検討した。

(1) ヒノキ花粉から Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) により酸性ホスファターゼを抽出し、リン酸セルロースカラムクロマトグラフィーにより Pase A、Pase B の二種のホスファターゼを得た。等電点は Pase A が 6.2、Pase B が 6.9 であった。

(2) Pase A の至適 pH は 6.2—6.5 で、80°C の加熱により活性は約 5 分で半減した。Pase B の至適 pH は 5.3—5.5 で 80°C の加熱により活性は約 2 分で半減した。

(3) 基質特異性については Pase A が ATP、ADP、無機ピロリン酸に作用し、Pase B がホスフォモノエステルに対して非特異的に活性を示した。

(4) Pase A と B の活性に対する金属イオンによる阻害の様相はほぼ類似していた。

(5) *p*-NPP に対する K_m 値は、Pase A が 6.25×10^{-4} M であり、Pase B は 6.25×10^{-5} M であった。

引 用 文 献

- (1) Vesterberg, O.: Methods in Enzymology (S. P. Colowick and N. O. Kaplan, eds) **22**, 389—412 (1971). Academic Press, New York.
- (2) Hurst, R. O.: Can. J. Biochem. **42**, 278—292 (1964).
- (3) 種村安子、和田 博、伊藤 尚、拓植治人、大橋一二: 農化誌 **57**、1009—1015 (1983).
- (4) Uehara, K., S. Fujimoto, and T. Taniguchi: J. Biochem. **75**, 627—638 (1974).
- (5) Funaguma, T., Y. Kawamura, and A. Hara: Agric. Biol. Chem. **46**, 2117—2125 (1982).
- (6) Hara, A., H. Yamashita, and A. Kobayashi: Plant and Cell Physiol. **18**, 381—386 (1977).
- (7) 勝又梯三、江尻慎一郎、伊藤まき子、小野寺文也: 岩手大学農学部報告 **16**、61—79 (1983).
- (8) Sugawara, S., Y. Inamoto, and M. Usijima: Agric. Biol. Chem. **45**, 1767—1773 (1981).
- (9) Pharr, D. M. and S. C. Huber: Physiol. Plant. **60**, 577—582 (1984).
- (10) 原 彰、船隈 透: 名城大農学報 **17**、64—74 (1981).
- (11) Hara, A., K. Kawamoto and T. Funaguma: Plant and Cell Physiol. **21**, 1475—1482 (1980).

(受理日、1986年4月30日)