

ジャガイモ酸性ピロホスファターゼの 活性染色法とその組織別分布

種 村 安 子

Application of the Staining Method of Acid Phosphatase Activity to that of Acid Pyrophosphatase and Distribution of Acid Pyrophosphatase in Some Tissues of Potato

Yasuko TANEMURA

Summary

Staining method for detection of acid pyrophosphatase activity was developed. The proteins separated by polyacrylamide gel electrophoresis were transferred electrophoretically on to a nitrocellulose membrane and then stained by the method described by Barkar with some modifications.

Staining patterns showed that acid pyrophosphatase was widely distributed in a variety of potato tissues except for leaves and also that acid pyrophosphatase was not comigrated with acid phosphatase.

Keywords : Acid pyrophosphatase activity 酸性ピロホスファターゼ活性,
Staining method 染色法, Distribution 分布

緒 言

無機ピロホスファターゼ (E C .3.6.1.1) は種々の高等植物の組織中に幅広く分布する加水分解酵素で、酸性側に至適 pH をもつ酸性ピロホスファターゼとアルカリ側に至適 pH をもつアルカリピロホスファターゼの存在が知られている。

著者らはジャガイモ塊茎の休眠期や発芽過程¹⁾およびγ線照射による発芽抑制下でのピロホスファターゼ活性の変動を調べた²⁾。塊茎の酸性ピロホスファターゼ活性は、発芽に伴って増加した。一方、γ線照射した塊茎では貯蔵中に酸性ピロホスファターゼ活性が阻害され、アルカリピロホスファターゼ活性が顕著に増加した。これらの結果はジャガイモ塊茎中での両酵素の生理的役割や活性発現に差異があることを示唆した。

しかし、高等植物に存在する無機ピロホスファターゼは、まだ均一に精製されていないし、その存在意義や植物生理学的役割についても明らかにされていない。

著者はすでにジャガイモの塊茎より酸性ピロホスファターゼを部分精製し、若干の酵素化学的性質

を明らかにしてきた³⁾。今回、酸性ピロホスファターゼを比較的簡便に検出する活性染色法を確立し、本酵素のジャガイモにおける組織分布について検討した。また、酸性ピロホスファターゼ活性は、基質特異性の低い酸性ホスファターゼの活性の一部であるか否か、すなわち、酸性ピロホスファターゼと酸性ホスファターゼとは同一の酵素分子であるか否かについても考察した。

実 験 方 法

1. 材料

ジャガイモの塊茎は男爵 (*Solanum tuberosum* L. *Irish Cobbler*) を購入した。塊茎は表層部 (皮) と食用部に分別した。

市販の春作ジャガイモを無農薬下に栽培し、葉部は塊茎の収穫直前に、芽は発芽後期に平均12cmの長さのものをそれぞれ採取した。採取材料は直ちに使用した。

小麦胚芽由来酸性ホスファターゼは、P-L Biochemicals, Inc.社製を用いた。

他の試薬はすべて市販の特級試薬を購入した。

2. 粗酵素の調製

採取および分別した各組織の細片に、重量あたり2倍容量の1%アスコルビン酸および33%ポリクラル AT を含む0.05M トリス塩酸緩衝液 (pH7.4) を加えたのち、ミキサーでホモジナイズした。三重のガーゼで濾し、抽出液を調製した。ついで、35~70%飽和硫酸で分画した画分を0.01Mイミダゾール塩酸緩衝液 (pH6.4) に溶解後、20倍容積の同緩衝液に対して一夜透析した。透析中に析出する不溶物を遠心除去して粗酵素標品とした。粗酵素標品は使用時まで-20℃で凍結保存した。

3. 部分精製酵素の調製

発芽初期のジャガイモ塊茎より、すでに報告した方法³⁾に準じ部分精製した。部分精製標品は電気泳動的に主バンドとして泳動されるが、数本のマイナーバンドが認められる (図1のf)。

精製時に指標として用いた酸性ピロホスファターゼ活性は、Fiske-Sabbarow らの方法⁴⁾に従って測定した。基質として20 mM ピロリン酸ナトリウムおよび5 mM EDTA を含む0.1M酢酸緩衝液 (pH4.6) に、酵素液0.1mlを加えた反応液を、37℃で15分反応させた後オルトリン酸を定量した。

4. タンパク質の定量法

粗酵素標品および部分精製標品のタンパク質量は、Bradford の方法⁵⁾に従って測定した。

5. ポリアクリルアミドゲル電気泳動

10%ポリアクリルアミドスラブゲル電気泳動 (PAGE) は、Laemmli の方法⁶⁾に準じて実施した。但し、粗酵素標品の還元処理および SDS (Sodium dodecyl sulfate) 包接処理は省き、4℃の低温庫内で、10 mA, 2時間、マリソル社製マイクロスラブ電気泳動装置を用いて泳動した。

5-1 タンパク染色

酵素標品（タンパク質 0.5 μ g 相当）の PAGE 後のゲルプレートは、Morrissey の高感度銀染色法⁷⁾に従って染色した。

5-2 酸性ピロホスファターゼ活性染色

酸性ピロホスファターゼ活性染色をスラブゲル中で行うと、泳動バンドが拡散するために解析度が減弱した。そのため、ニトロセルロース膜上に転写後、活性染色する方法を検討した。

酵素標品（タンパク質 1 μ g 相当）を PAGE 後、Towbin らの方法⁸⁾に準じてスラブゲル中のタンパク質をニトロセルロース膜上に転写した。転写はマリソル社製ゲルメンブラン転写装置の泳動槽を氷水冷却下、40V 定電圧で 2 時間水平泳動した。

ニトロセルロース膜上の酸性ピロホスファターゼ活性は、酵素化学的に染色した。ニトロセルロース膜は数回水洗した後、0.1M 酢酸緩衝液 (pH4.6) で平衡化した。ついで、37°C に保温した染色液に浸し、遮光下 1 時間活性染色したのち、十分に水洗した。

染色液は、 α -ナフチルリン酸ナトリウム 5 mg とファーストガーネット GBC 塩 5 mg を 0.1M 酢酸緩衝液 (pH4.6) 5 ml に溶解後、終濃度 5 mM になるように EDTA を加えて調製した。酸性ホスファターゼおよび酸性ピロホスファターゼは、赤紫色のバンドとして可視化された。

植物起源の酸性ホスファターゼは、その大部分が Cu^{2+} によって著しく阻害を受ける⁹⁾ので、別に、終濃度 5 mM の硫酸銅を溶解した染色液中でも活性染色した。

結果および考察

ジャガイモ酸性ピロホスファターゼ活性は発芽に伴って増加し、 γ 線照射による発芽抑制下では低下した。一方、アルカリピロホスファターゼ活性は、 γ 線照射により顕著に上昇した。このように酸性ピロホスファターゼとアルカリピロホスファターゼは活性発現を異にしている。ピロホスファターゼの活性発現の調節機序やジャガイモ組織での生理的役割を明らかにするには、酵素タンパク質の変動と活性の変動を対応させて分析する手法が必要である。この目的のために、酸性ピロホスファターゼ活性を可視化する活性染色法を確立し、この方法を用いてジャガイモの各組織から調製した粗酵素標品中の酵素分布を検討した。

ジャガイモの塊茎、塊茎の表層部(皮)、発芽後期の芽、収穫直前の葉部より調製した粗酵素標品および塊茎より部分精製した部分精製標品を PAGE により分離した。銀染色したタンパク質泳動像を図 1 に、また、ニトロセルロース膜上に転写後、Barkar の方法¹⁰⁾に準じ、EDTA 共存下で活性染色した染色像を図 2 の A にそれぞれ示した。

ジャガイモの酸性ピロホスファターゼは、すでに既報³⁾で報告したように酸性ホスファターゼ活性を共有する酵素である。このことは、酸性ホスファターゼの活性染色法が、酸性ピロホスファターゼの活性染色に適用可能なことを意味する。ピロリン酸加水分解活性を指標に部分精製した部分精製標品は、図 2 A のレーン e に示すように、赤紫色のバンドとして可視化された。

Barkar は PAGE 後の泳動ゲルを直接活性染色しているので、ゲルの活性染色を試みたが、シャー

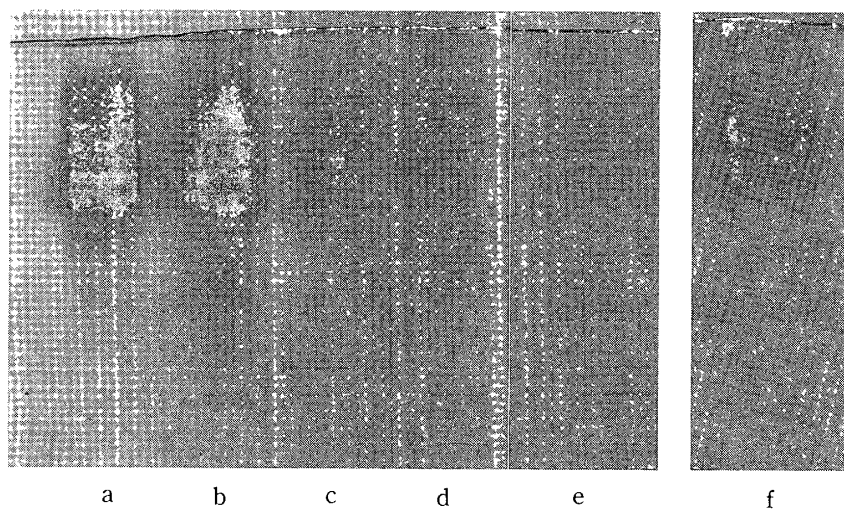


図1. ジャガイモの各組織から調製した酵素タンパク質のPAGE像
 a: 塊茎, b: 塊茎の表層部(皮), c: 芽, d: 葉, e: 小麦胚芽由来の酸性ホスファターゼ, f: 塊茎の部分精製酵素標品

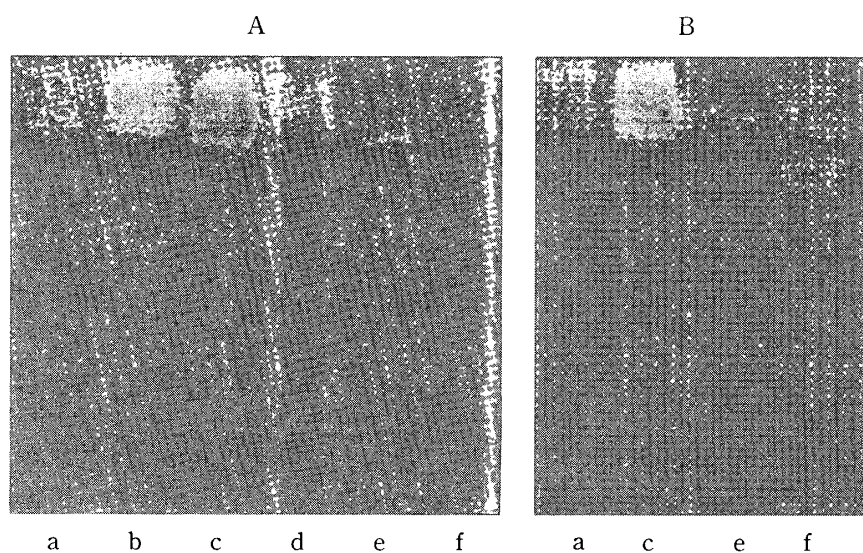


図2. PAGE後ニトロセルロース膜に転写したジャガイモ酵素の活性染色像
 A: EDTA 共存下の活性染色, B: Cu^{2+} 共存下の活性染色
 a: 塊茎, b: 塊茎の表層部(皮), c: 芽, d: 葉, e: 塊茎の部分精製酵素標品, f: 小麦胚芽由来の酸性ホスファターゼ

ブなバンドとして検出できなかった。これは染色中にバンドのゲル内拡散が著しいことを示しており、酸性ピロホスファターゼをシャープなバンドとして活性染色するには、ニトロセルロース膜などのゲルとは異なる支持体に、一度転写する必要のあることを示す。また、染色液に浸したろ紙で泳動ゲル表面を覆い、ろ紙上で検出する方法も検討したが、シャープなバンドとして染色することはできなかった。

ジャガイモの塊茎（図2 A-a）、塊茎の表層部（図2 A-b）および発芽後期の芽（図2 A-c）では、明らかに部分精製酸性ピロホスファターゼと同じ易動度をもつ活性染色バンドがそれぞれ認められたが、収穫直前の葉部（図2 A-d）には相応するバンドを認めなかった。このことから、ジャガイモ酸性ピロホスファターゼは、葉部には存在しないか、仮に存在してもその量は極めてわずかであると考えられる。このことは図1-dのタンパク質の泳動像からも確認された。

検討した各組織には、部分精製酵素標品の染色バンドより易動度の小さい領域に数本のバンドがいずれも観察された。これらはいずれもピロホスファターゼ活性を指標にした精製の過程で除去される活性であることから、酸性ピロホスファターゼとは異なるタンパク質化学的性質をもつ酸性ホスファターゼと考えられる。

Cu^{2+} はすでに報告したように³⁾、ジャガイモ酸性ピロホスファターゼ活性に対しほとんど影響を与えないが、他の植物由来酸性ホスファターゼの強力な阻害剤である⁹⁾。そこで、 Cu^{2+} を含む染色液中で同様に活性染色した。その結果を図2 Bに示した。部分精製標品の活性バンドに対応するバンドの染色度はほとんど変化しなかったが、それ以外の活性バンドの染色性は減退した。また、市販の小麦胚芽由来の酸性ホスファターゼ（図2 B-f）も、 Cu^{2+} 共存下では易動度の小さいバンドの活性が阻害された。

従来、植物の酸性ホスファターゼが酸性ピロホスファターゼ活性を示すことから、酸性ホスファターゼと酸性ピロホスファターゼが同一の酵素分子であるという見解があった¹¹⁾。しかし、本実験の結果から、ジャガイモの酸性ピロホスファターゼについては、精製の過程で酸性ホスファターゼを除去できること、酸性ホスファターゼの阻害剤である Cu^{2+} 共存下での活性染色においても、酸性ピロホスファターゼの活性バンドが消失しないことが明らかになった。このことは、ジャガイモの酸性ピロホスファターゼが、酸性ホスファターゼとは異質の酵素であることを示唆するものである。

葉部には酸性ピロホスファターゼは極めて少なく、酸性ホスファターゼが多く存在することが明らかになった。

今後、さらにアルカリピロホスファターゼの活性染色法を確立し、酸性ピロホスファターゼとアルカリピロホスファターゼの活性発現の調節機序や組織分布について詳細に検討し、酸性およびアルカリピロホスファターゼの生理的役割を明らかにすることが課題である。

要 約

1. 酸性ピロホスファターゼの活性染色法を確立した。すなわち、ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分画したタンパク質をニトロセルロース膜に転写した後、Barkar による酸性ホスファター

ゼの活性染色法を修正して、酸性ピロホスファターゼの活性染色を行った。

2. ジャガイモの各組織から調製した粗酵素標品と塊茎の部分精製標品の活性染色像から、酸性ピロホスファターゼは葉以外の塊茎、塊茎の表層部および芽に広く分布することが明らかとなった。また、酸性ホスファターゼとは分別可能な異質の酵素であることが示唆された。

本研究を進めるにあたり、数々のご教示を頂いた岐阜医療技術短期大学の黒部眞章博士に深謝いたします。

なお、本研究の一部は本学の研究助成を受けて行ったものであることを記し、謝意を表します。

文 献

- 1) 荒井昭代, 種村安子, 高木瞳: 聖徳学園女子短期大学紀要, 第4集, 90 (1978).
- 2) 種村安子, 川岸舜朗: 未発表.
- 3) 種村安子, 和田博, 伊藤尚, 柘植治人, 大橋一二: 日化, 57, 1009 (1983).
- 4) C.H. Fiske, Y. Sabbarow: *J. Biol. Chem.*, **66**, 375 (1925).
- 5) M.M. Bradford: *Anal. Biochem.* **72**, 248 (1976).
- 6) U.K. Laemmli: *Nature*, **227**, 680 (1970).
- 7) J.H. Morrissey: *Anal. Biochem.* **117**, 307 (1981).
- 8) H. Towbin, T. Staehelin, J. Gordon: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 4350 (1979).
- 9) Y. Sugiura, H. Kawabe, H. Tanaka, S. Fujimoto, A. Ohara: *J. Biol. Chem.* **256**, 10664 (1981).
- 10) T. Barkar: *J. Histochem. Cytochem.* **9**, 542 (1961).
- 11) M.Z. Newmark, B.S. Wenger: *Arch. Biochem. Biophys.*, **89**, 110 (1960).