

ポリおよびメタホスファターゼに関する研究 (第3報)

ジャガイモ中のポリおよびメタホスファターゼに及ぼす
 Cu^{2+} および Mn^{2+} の影響

桑 野 安 子

Studies on Poly- and Metaphosphatase (Part 3)

Effect of Cu^{2+} and Mn^{2+} on Poly- and
Metaphosphatase in Potato

Yasuko Kuwano

In the previous paper, it was mentioned that Cu^{2+} and Mn^{2+} inhibited the hydrolysis of pyrophosphate which was the second step of the enzymatic hydrolysis of tripolyphosphate.

This work was undertaken to investigate the inhibition mechanism with Cu^{2+} and Mn^{2+} in the enzymatic hydrolysis of pyrophosphate.

The results are summarized as follows;

1. On a definite condition, substrates are precipitated by Cu^{2+} and Mn^{2+} .
2. On the condition that substrates do not precipitate, Cu^{2+} inhibits the enzymatic action, but Mn^{2+} hardly inhibits the action.
3. These results suggest that the inhibition of the enzymatic hydrolysis of pyrophosphate with Cu^{2+} is due to both the inhibition of the enzymatic action and the precipitation of substrates pyrophosphate, while the inhibition with Mn^{2+} is due to the substrate depletion by precipitation.

(Received May 31, 1969)

緒 言

種々の物質の中で、 Cu^{2+} と Mn^{2+} はピロリン酸の酵素的分解を比較的強く阻害するが、トリポリリン酸については弱く阻害するか、あるいはほとんど阻害しないかである。前報¹⁾において、 Cu^{2+} を用いてピロリン酸の酵素的分解を抑制することにより、トリポリリン酸の分解経路を明らかにした。

しかし、ピロリン酸の酵素的分解の抑止が Cu^{2+} および Mn^{2+} によるピロホスファターゼの阻害によるのか、あるいは Neuberger²⁾ や Naganna³⁾ の報告から推察されるように、ピロリン酸がある種の金属塩として沈澱することによるのか不明であった。

本報ではこの点について検討したので報告する。

実 験 方 法

1. 酵素調製法

前報¹⁾に準じて調製し、ジャガイモ水抽出液の硫酸分画Ⅱ (30~40%飽和) を用いた。

2. 酵素活性の測定法

基質として、ピロリン酸ナトリウム $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ 、トリポリリン酸カリウム $\text{K}_3\text{P}_3\text{O}_{10} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、トリメタリン酸カリウム $\text{K}_3\text{P}_3\text{O}_9$ を用いた。

酵素活性は、反応液中の基質濃度を $5 \times 10^{-3}\text{M}$ とし、適当に希釈した酵素液 0.5ml、添加剤 0.15ml に 1M 酢酸ナトリウム-塩酸緩衝液 (pH3.0~4.6) または 0.2M トリスマレート-水酸化ナトリウム緩衝液 (pH5.2~8.6) 2.2ml を加えて 3ml とし、37°C で 5 時間または 20 時間反

応させ、生成したオルトリン酸を Fiske-Sabbarow⁵⁾の方法で定量した。

実験結果および考察

1. 各種 pH における基質と Mn^{2+} および Cu^{2+} との

関係

酸, アルカリ溶液および緩衝液を用いて所定の pH にした基質溶液に $1 \times 10^{-2}M$ $MnCl_2$ および $CuSO_4$ をそれぞれ添加した結果を表 1 に示す。

表 1 各種 pH における基質と Mn および Cu との関係

pH	pH 調節のため添加	Mn ($1 \times 10^{-2}M$)				Cu ($1 \times 10^{-2}M$)			
		Ortho-P	Pyro-P	Tri-poly-P	Tri-meta-P	Ortho-P	Pyro-P	Tri-poly-P	Tri-meta-P
	無 添 加	—	++	++	—	—	++	—	—
3.0	$CH_3COONa-HCl$ 緩衝液	—	+	—	—	—	+	—	—
"	HCl	—	—	—	—	—	++	—	—
"	CH_3COOH	—	+	—	—	—	+	—	—
4.6	$CH_3COONa-HCl$ 緩衝液	—	++	—	—	—	+	—	—
5.2	トリスマレート-NaOH 緩衝液	—	++	++	—	—	+	—	—
6.0	"	—	++	++	—	+	—	—	—
7.0	"	+	++	++	—	++	—	—	—
7.6	"	++	++	++	+	++	—	—	—
8.6	"	++	++	++	+	++	—	—	—
"	NaOH	++	++	++	+	++	++	+	+
"	NH_4OH	++	++	++	—	++	++	+	+

Mn を添加した場合、オルトリン酸は pH3.0~6.0 の酸性側では沈澱しないが、アルカリ側では白沈を生ずる。ピロリン酸は pH4.6 以上で沈澱する。この沈澱をろ過して除き、そのろ液を塩酸で加水分解してオルトリン酸量を測定した結果、値はほとんど 0 に近く、Mn 処理によってピロリン酸が完全に沈澱することが確かめられた。トリポリリン酸は pH5.2 以上で沈澱するが、トリメタリン酸は pH7.6 以上のアルカリ側で、薄い白濁を生ずるのみである。これらの沈澱はいずれも TCA 溶液や塩酸酸性溶液には溶解する。

Cu^{2+} を添加した場合、オルトリン酸はアルカリ側で沈澱し、ピロリン酸は pH3.0~5.2 の酸性側で沈澱する。水酸化ナトリウムやアンモニアなどのアルカリ溶液中では、 $Cu(OH)_2$ の沈澱を生ずるが緩衝液中では生じない。

トリメタおよびトリポリリン酸は沈澱しない。

2. 基質に及ぼす Mn 濃度の影響

結果は表 2 に示す。

$5 \times 10^{-3}M$ 以上の Mn 濃度においてピロリン酸が、 $1 \times 10^{-2}M$ 以上の濃度で、トリポリおよびトリメタリン酸が沈澱する。

Cu を添加した場合は、pH4.6 で、 $3 \times 10^{-3}M$ 以上に

表 2 基質におよぼす Mn 濃度の影響

Mn 濃度 (M)	基質 ($5 \times 10^{-3}M$)			
	Ortho-P	Pyro-P	Tri-poly-P	Trimeta-P
1×10^{-1}	++	++	++	+
2.5×10^{-2}	++	++	++	+
1.25×10^{-2}	++	++	++	+
1×10^{-2}	++	++	++	+
7.5×10^{-3}	+	+	—	—
5×10^{-3}	+	+	—	—
2.5×10^{-3}	—	+	—	—
1×10^{-3}	—	—	—	—
1×10^{-4}	—	—	—	—

pH 7.6

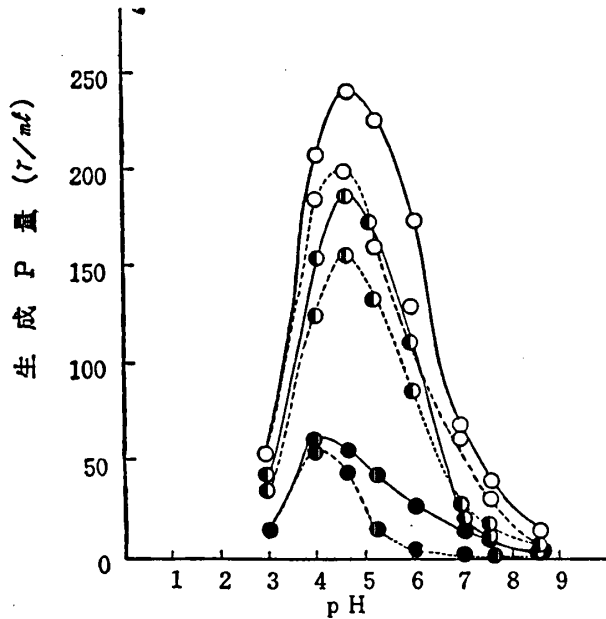
なるとピロリン酸が沈澱する。

以上のように、ある条件下では Cu および Mn によって基質が沈澱することが明らかとなった。

3. 酵素反応に及ぼす Mn^{2+} および Cu^{2+} の影響

Mn^{2+} および Cu^{2+} の酵素反応に及ぼす影響を調べるために、基質が沈澱しない条件下で酵素反応を行なった。

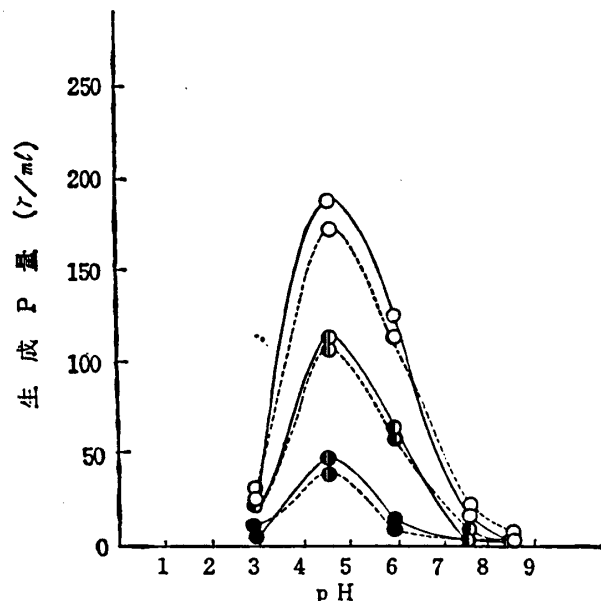
第 1 図に各種 pH における $1 \times 10^{-3}M$ Cu 添加の影響を示した。


 第1図 各種 pH における Cu^{2+} の影響

○—○Pyro-P ●—● Tripoly-P ●—● Trimeta-P
 反応条件：基質 $5 \times 10^{-3}\text{M}$ ，酵素タンパク質量 $100\gamma/\text{ml}$
 CnSO_4 $1 \times 10^{-3}\text{M}$ ， 37°C ，5時間

ピロ，トリポリおよびトリメタリン酸の酵素的分解はいずれも阻害される。

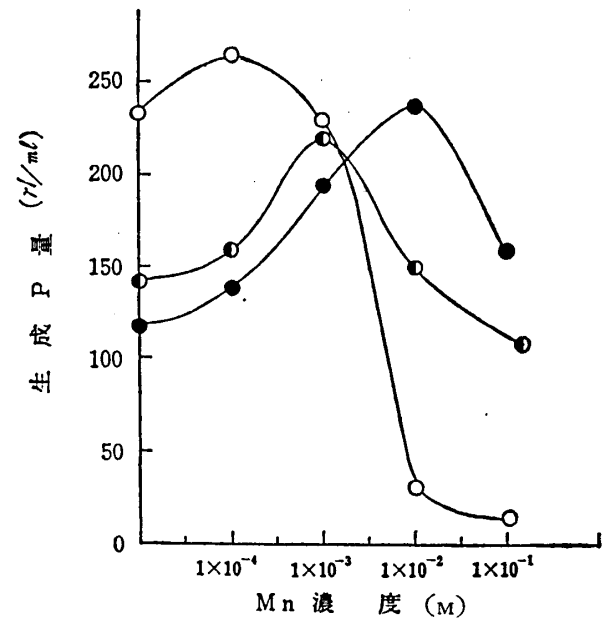
各種 pH における $1 \times 10^{-3}\text{M}$ Mn 添加の結果は第2図に示す。


 第2図 各種 pH における Mn^{2+} の影響

○—○Pyro-P ●—● Tripoly-P ●—● Trimeta-P
 反応条件：基質 $5 \times 10^{-3}\text{M}$ ，酵素タンパク質量 $100\gamma/\text{ml}$
 MnCl_2 $1 \times 10^{-3}\text{M}$ ， 37°C ，5時間

Cu 添加の場合と異なり，酵素反応は Mn によって酸性側でわずかに阻害されるのみで，アルカリ側ではむしろ促進される傾向がみられた。すなわち基質が沈澱しない Mn 濃度においては，酵素作用はほとんど阻害されない。

ついでアルカリ側での酵素反応に及ぼす Mn 濃度の影響を調べた。結果は第3図に示す。



第3図 Mn 濃度の影響

○—○Pyro-P ●—● Tripoly-P ●—● Trimeta-P
 反応条件：基質 $5 \times 10^{-3}\text{M}$ ， $\text{pH} 7.6$ ， 37°C ，20時間

$1 \times 10^{-2}\text{M}$ 以上の濃度においては，ピロリン酸の分解が急激に低下する。これは Mn^{2+} によって基質ピロリン酸が沈澱し，反応系から除かれたためと考えられる。トリポリおよびトリメタリン酸の分解はそれぞれ $1 \times 10^{-3}\text{M}$ ， $1 \times 10^{-2}\text{M}$ の Mn 濃度で促進される。

以上の結果から明らかなように，前報で明らかにされたトリポリリン酸の酵素的分解の経路は，中間生成物であるピロリン酸を Mn^{2+} および Cn^{2+} によって沈澱させることによって確認されたものである。

要 約

1. ある条件下では， Mn^{2+} および Cu^{2+} によって基質が沈澱することが明らかとなった。
2. 基質が沈澱しない条件下での酵素反応に及ぼす Mn^{2+} および Cu^{2+} の影響を調べた結果 Cu^{2+} は酵素を阻害するが， Mn^{2+} はほとんど阻害せず，アルカリ側ではむしろ活性化する傾向が認められた。
3. Cu によるピロリン酸の酵素的分解の抑止は， Cu^{2+}

によるピロホスファターゼの阻害と基質ピロリン酸の沈澱の両作用によるものであり、Mn による抑止作用は、基質ピロリン酸を沈澱させ、反応系から除くことに由来するためと結論される。

本研究をおこなうにあたり、御懇切な御指導を頂いた本学教授北里寅男先生に、心から感謝する。

(昭和44年5月31日受理)

文 献

- 1) 桑野安子：家政学研究 投稿中.
- 2) C. Neuberg, A. Grauer and I. Mandl : *Enzymol.*, **14**, 157 (1950).
- 3) B. Naganna, A. Rraman, B. Venugopal and C. E. Sripathi : *Biochem. J.*, **60**, 215 (1955).
- 4) 桑野安子, 北里寅男：家政学研究, **30** (1969) 印刷中.
- 5) C. H. Fiske and Y. Subbarow : *J. Biol. Chem.*, **66**, 375 (1925).