

## ポリおよびメタホスファターゼに関する研究

### IV ジャガイモの発芽過程におけるポリおよび メタホスファターゼ活性の変化

荒井昭代・種村安子・高木 瞳

## Studies on Poly- and Meta-phosphatase

### IV Changes in the Activities of Poly- and Meta-phosphatase from Potato during the Course of Germination

Akiyo ARAI, Yasuko TANEMURA, Hitomi TAKAGI

Activities of poly- and meta-phosphatase from potato during the course of germination and properties of the enzymes from the bud were investigated.

(1) All three activities from the bud had almost same temperature optima between 45° and 50°C.

The optimal pH of these enzymes differed with substrates; the activities on pyrophosphate, tripoly- and trimeta-phosphate as substrate were optimal at pH 4.6, 6.0 and 6.0 respectively.

(2) During the course of germination, there were no detectable differences on the enzyme activities between in the light and in the dark.

The pyrophosphatase activity increased rapidly for the middle periods, when the bud grew up markedly, and was maintained constant until the late period of germination.

The activities, when used tripoly- and trimeta-phosphate as substrate, increased gradually from the middle to the late period of the germination.

(3) These three activities in the germinating potato were concentrated in the bud. Especially, specific activity in the bud were found to be approximately 10 for pyrophosphate, 30 for tripoly-phosphate and 20 times for trimetaphosphate as great as in the tuber.

#### ま え が き

微生物中に存在する metachromatic granules とよばれる顆粒の実体が、ポリリン酸であることが証明<sup>1)</sup>されて以来、微生物のポリリン酸について多くの研究<sup>2,3)</sup>がなされるようになり、その構造、代謝、生理的機能がだいに明らかになってきた。

微生物より検出された無機縮合リン酸には、鎖長が

300~500の高縮合度のもの<sup>4)</sup>から、鎖長10以下の低分子のもの<sup>5,6)</sup>までである。高等動植物からは、長鎖のポリリン酸がハウレンソウ<sup>7)</sup>中に、短鎖のポリリン酸が動物の細胞核<sup>8)</sup>中に検出されている。

微生物における高分子のポリリン酸の代謝に関しては、生長に不利な栄養条件下で蓄積が起こり<sup>9)</sup>、生長期にはポリリン酸の分解が行なわれることが明らかにされた。ポリリン酸の生合成に関与する酵素については、poly-

phosphate kinaseが酵母中にみだされている<sup>10)</sup>が、高等動植物ではわかっていない。また、高分子のポリリン酸を分解する酵素については、ポリリン酸を末端基からattackするpolyphosphataseと、ポリリン酸をより小さなfragmentに開裂するpolyphosphate depolymeraseの存在が明らかにされている<sup>11)</sup>。Nishi<sup>12,13)</sup>はAspergillus nigerの発芽胞子によるポリリン酸の利用について調べた結果、ポリリン酸が核酸とリン脂質のprecursorとして供給されていることを示した。また、発芽期にpolyphosphate depolymeraseとpolyphosphataseの比活性が著しく増加することを認め、これらの酵素がポリリン酸の運用に関与していることを明らかにした。

低分子の縮合リン酸については、高分子のポリリン酸のdegradationによって生じる<sup>4)</sup>とされているが、その代謝や代謝に関与する酵素については、ほとんどわかっていない。

われわれは、低縮合度のポリおよびメタリン酸分解酵素の生理的機能を明らかにする目的で、一連の研究を行っているが、本報では、ジャガイモの発芽過程におけるこれらの酵素活性の変化を調べたので報告する。

## 実験材料および方法

### 1. 酵 素 材 料

ジャガイモは6月中旬収穫の北海道産の男爵を用いた。発芽を促進するため、実験開始前に約2週間冷蔵庫に入れ低温処理した。ジャガイモは重ならないようにムシロの上に並べ、日当りのよい室内(明所)と暗室(暗所)にそれぞれ貯蔵し、4週間毎に酵素を調製した。

### 2. 酵素液の調製

ジャガイモは細切し、 $\frac{1}{2}$ 量の冷水を加え、ミキサーでホモジナイズした後ガーゼでこし、口液を10,000r.p.m., 15分間遠心分離した。上清から20~80%硫酸飽和によって得られた沈殿を0.1M酢酸緩衝液(pH4.6)に溶解し、0.001M酢酸緩衝液(pH4.6)に対して透析した。生じた不溶物を遠心分離して除去したものを酵素液として使用した。

ジャガイモの各部位における酵素活性の測定にあたっては、芽と塊茎に分け、それぞれから酵素液を調製した。芽の場合は、2倍量の冷水を加えてホモジナイズしたが、その他の操作は同じである。

### 3. 酵素活性の測定

基質には、ピロリン酸ナトリウム(Pyro-P)、トリポ

リン酸カリウム(Tripoly-P)、およびトリメタリン酸カリウム(Trimeta-P)を用いた。基質の精製および合成は既報<sup>14)</sup>に準じて行なった。

反応液中の基質濃度は、Pyro-P 50mM, Tripoly-P 10mM, Trimeta-P 50mMとした。反応液には、EDTA(終濃度50mM)、0.1M酢酸緩衝液(pH4.6)および酵素を加え全容を2.5mlとし、50°Cで30分間反応させた。

塊茎の酵素活性測定は、いずれの基質に対してもpH4.6で行なったが、芽の酵素の場合は、Pyro-Pに対してはpH4.6で、Tripoly-PおよびTrimeta-Pに対してはpH6.0で行なった。

反応は10%TCA1.25mlを加えて止め、不溶物を口紙(東洋口紙No.5C)で口過して除いたのち、生成したオルトリン酸をFiske-Sabbarow法<sup>15)</sup>に準じて測定した。

酵素活性は、1時間当たり、 $1\mu\text{mole}$ のオルトリン酸を生成する酵素量を1単位として表わした。

酵素タンパク量は、マイクロケルダール法<sup>16)</sup>により測定した。

## 結 果

### 1. 発 芽 の 状 態

ジャガイモの発芽過程を図1に示した。全発芽過程を、芽の外見上の変化から、発芽前期(9月~12月)、発芽中期(1~2月)、発芽後期(3月以降)の3期に分けた。

芽の外見は明所と暗所で著しく異なるが、芽の生長過程はほぼ等しく、10月から発芽をはじめ、11月中旬には、明所で約0.6cm、暗所で2cm近くになる。1~2月になると、芽の生長が盛んになり、急激に伸びる。発芽後期にも芽の生長はつづくが芽の節々からふく枝が伸びはじめ、6月にはその先端に芽イモを形成した。

### 2. 芽の酵素の性質

ジャガイモの芽の部位から調製した酵素の性質を調べた。その結果を図2と3に示した。この酵素の至適温度は、いずれの基質の場合も45~50°Cであった。

至適pHは、基質によって異なった。すなわち、Pyro-Pを基質としたときの至適pHは4.6であり、Tripoly-PおよびTrimeta-Pを基質とした場合は6.0であった。

芽の酵素活性の測定は、それぞれの至適pHで行なった。

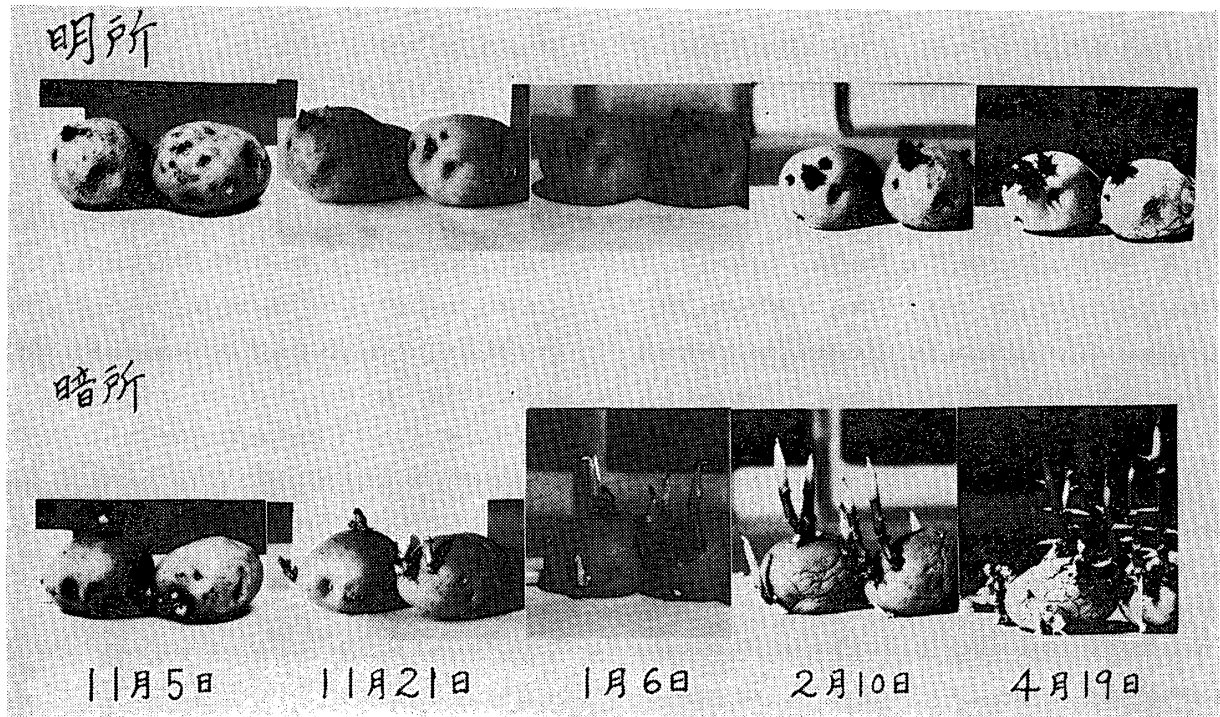


図 1 ジャガイモの発芽過程

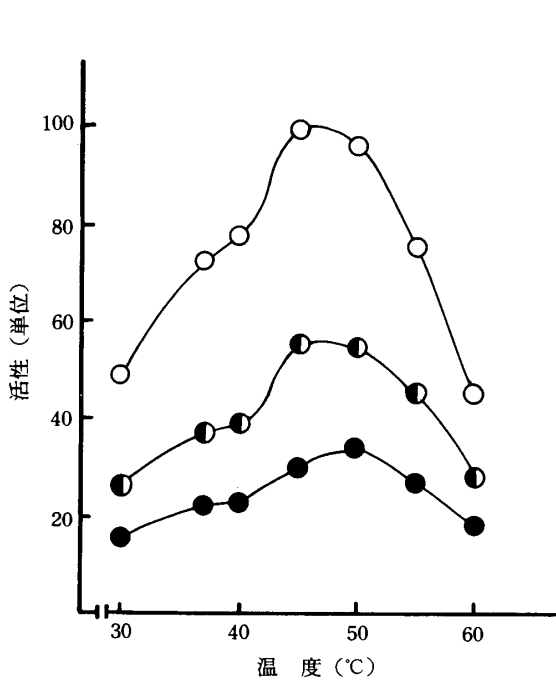


図 2 温度の影響

—○—Pyro-P, —◐—Tripoly-P, —●—Trimeta-P  
緩衝液: 0.1M酢酸ナトリウム-塩酸 (pH4.6)

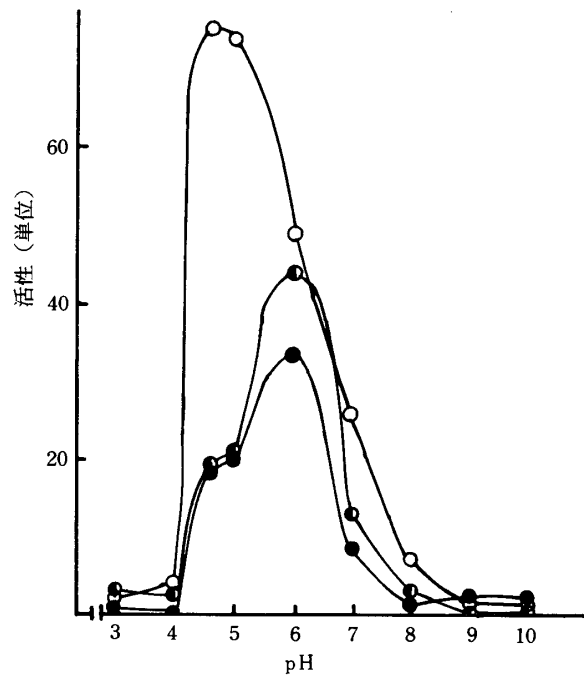


図 3 pHの影響

—○—Pyro-P, —◐—Tripoly-P, —●—Trimeta-P  
緩衝液 { pH 3~5 0.1M酢酸ナトリウム-塩酸  
pH 6~8 0.1Mトリスマレート-水酸化ナトリウム  
pH 9~10 0.1Mグリシン-水酸化ナトリウム  
反応条件: 37°C, 30分

3. 酵素のタンパク量

酵素のタンパク量を表1と2に示した。

全発芽過程を通じ3月がもっとも多かった。

芽の部位における酵素タンパク量は、暗所に比べ、明所の方が多かった。

表 1 酵素のタンパク量 (mg/100 g ジャガイモ)

月	日	明 所	暗 所
9	12	365.9	365.9
9	28	282.7	384.3
10	24	313.9	263.4
11	22	365.2	365.6
12	25	254.4	306.4
1	24	399.8	368.7
2	21	364.3	269.0
3	5	663.2	522.7
3	21	398.3	495.5
4	18	292.3	240.1
5	4	282.9	247.4

表 2 各部位より調製した酵素のタンパク量 (mg/100 g 生重量)

月	日	塊 茎		芽	
		明 所	暗 所	明 所	暗 所
3	5	661.2	525.2	931.8	322.5
3	21	399.0	510.1	299.9	112.4
4	18	269.1	259.8	—	105.4
5	4	303.5	246.4	333.7	134.9

4. 発芽過程における酵素活性の変化

図4および図5に発芽過程における酵素活性の変化を示した。活性はジャガイモ100g当りの総活性に換算して表わした。

明所においては、Pyro-Pに対する活性が最も高く、発芽前期には大きな変化はみられないが、中期になると急激に高まり、発芽前の約2倍以上の活性になる。発芽後期にもこの高い活性は維持された。

Tripoly-PおよびTrimeta-Pに対する活性の発芽過程での上昇はゆるやかで、発芽中期から後期にかけて徐々に高まり、4月下旬では発芽前の約2.4倍と2.9倍にそれぞれ増加した。

暗所においてもPyro-Pに対する活性が最も高いが、明所におけるほど活性の上昇は著しくない。

Tripoly-PおよびTrimeta-Pに対する活性は、1月下旬より上昇し、後期には発芽前の約2倍になった。

タンパク1mg当りの比活性を表3に示した。比活性は

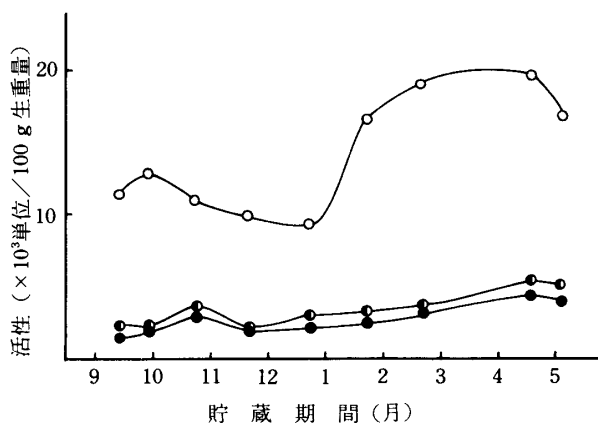


図 4 発芽過程における酵素活性の変化 (明所)

—○—Pyro-P, —●—Tripoly-P, —●—Trimeta-P

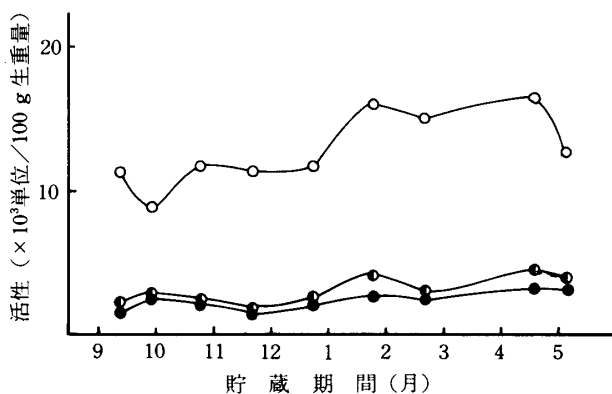


図 5 発芽過程における酵素活性の変化 (暗所)

—○—Pyro-P, —●—Tripoly-P, —●—Trimeta-P

明所と暗所とではほとんど差がみられなかった。

全発芽過程を通してみると、いずれの基質に対しても発芽後期に最高の値を示した。発芽前に比べると、Pyro-Pについては約2倍、Tripoly-Pについては約3倍、Trimeta-Pについては約3.5倍に活性が高まっている。

表 3 発芽過程における比活性の変化

月	日	比 活 性 (単位/mgタンパク)					
		明 所			暗 所		
		Pyro-P	Tripoly-P	Trimeta-P	Pyro-P	Tripoly-P	Trimeta-P
9	12	31.0	6.1	4.0	31.0	6.1	4.0
9	28	44.8	7.9	6.9	23.1	7.6	6.5
10	24	34.5	11.4	9.1	44.3	9.3	8.3
11	22	27.3	5.8	5.7	31.0	5.3	4.3
12	25	36.3	11.2	8.3	38.7	8.7	6.8
1	24	42.0	8.0	6.1	43.4	11.3	7.2
2	21	52.1	10.0	9.0	56.0	11.2	9.1
4	18	67.1	18.4	14.7	68.4	18.7	13.6
5	4	59.5	17.8	14.0	51.2	16.1	12.6

## 5. 発芽ジャガイモの各部位における酵素活性

発芽後期のジャガイモについては、芽と塊茎に分けてそれぞれから酵素を調製し、活性の比較検討を行なった。

酵素活性は、芽および塊茎ともそれぞれ生重量 100 g 当りの総活性に換算して表わした。結果を表 4 に示した。

芽の部位における酵素活性は塊茎の部位に比べ著しく高い。とくに 3 月上旬が高く、それ以後は減少した。また、芽においては、Tripoly-P および Trimeta-P に対

する活性が高いことが注目される。

表 5 に、各部位の酵素の比活性を示した。芽の酵素の比活性は、塊茎に比べて著しく高い。とくに暗所において顕著であり、活性のもっとも高い 3 月上旬においては、Pyro-P に対する活性は塊茎の約 10 倍、Tripoly-P に対しては約 30 倍、Trimeta-P に対しては約 20 倍にも達している。

表 4 発芽ジャガイモの各部位における酵素活性

基 質	総 活 性 ( $\times 10^3$ 単位/100 g 生重量)						
	塊 茎			芽			
	3 / 5	3 / 21	5 / 4	3 / 5	3 / 21	5 / 4	
明 所	Pyro-P	19.6 (100)	14.0 (100)	10.4 (100)	161.7(100)	49.3 (100)	33.3 (100)
	Tripoly-P	4.1 (21.0)	3.8 (27.1)	4.0 (39.0)	55.5 (34.3)	26.3 (53.3)	16.9 (50.9)
	Trimeta-P	3.5 (18.0)	3.0 (21.4)	4.6 (44.6)	45.1 (27.9)	21.0 (42.7)	11.3 (34.1)
暗 所	Pyro-P	14.8 (100)	14.0 (100)	9.6 (100)	100.0(100)	29.9 (100)	32.8 (100)
	Tripoly-P	2.7 (18.3)	3.5 (25.2)	3.2 (33.0)	52.0 (52.0)	15.7 (52.5)	17.0 (51.9)
	Trimeta-P	2.8 (19.3)	2.9 (20.9)	2.4 (24.5)	38.1 (38.0)	12.2 (40.7)	11.3 (34.4)

( ) はピロホスファターゼ活性に対する百分率を示す。

表 5 発芽ジャガイモの各部位における比活性

基 質	比 活 性 (単位/mgタンパク)						
	塊 茎			芽			
	3 / 5	3 / 21	5 / 4	3 / 5	3 / 21	5 / 4	
明 所	Pyro-P	29.6	35.0	34.1	173.5	164.2	99.6
	Tripoly-P	6.2	9.5	13.3	59.5	87.6	50.7
	Trimeta-P	5.3	7.5	15.2	48.4	70.1	34.0
暗 所	Pyro-P	28.1	27.3	39.1	310.1	266.0	243.4
	Tripoly-P	5.1	6.9	12.9	161.2	139.6	126.3
	Trimeta-P	5.4	5.7	9.6	118.0	108.3	83.8

## 考 察

ジャガイモの発芽過程においては、全期間を通じて、ピロリン酸に対する酵素活性がもっとも高かった。発芽前期では、Pyro-P に対する活性はほとんど変化しなかったが、芽の生長が盛んになる発芽中期に急速に増加し、発芽後期も高い活性がつづいた。

一方、Tripoly-P および Trimeta-P に対する酵素活性の変化は緩慢で、中期から後期にかけて徐々に上昇した。

このように、発芽過程で、それぞれの基質に対する活性の変化の仕方が異り、また、Pyro-P に対する活性と Tripoly-P および Trimeta-P に対する活性の比も、ジャガイモの部位や発芽過程において異なった。

また、種々のリン酸エステルに幅広く作用する酸性ホスファターゼと、ピロホスファターゼの関係については、以前より論議されており、Newmark<sup>17)</sup>や Mayer<sup>18)</sup>は同一性の可能性を主張しているが、Kunitz<sup>19)</sup>は別の酵素であると主張している。

種村ら<sup>20)</sup>は、ジャガイモから部分精製した無機リン酸分解酵素の、基質特異性やその他の性質を調べているが、それによると、この酵素は無機縮合リン酸だけでなく、種々のリン酸エステルにも作用し、その他の性質も酸性ホスファターゼと非常に似かよっている。

酸性ホスファターゼの生理過程における活性の変化については、山辺ら<sup>21)</sup>が水稻種実を用いて行なった実験の報告があるが、それによると、酸性ホスファターゼ活性は、

開花後約10日目の乳熟期種実においてもっとも高く、完熟期、発芽期の順に減少しており、ジャガイモの無機リン酸分解酵素の活性の変化とは全く異なっている。この酸性ホスファターゼは、ピロリン酸に対しても高い活性を示しているが、その活性の変化は、 $\beta$ -glycerophosphate に対する活性の変化と同じく、発芽期においてもっとも低い。

このように、酸性ホスファターゼとジャガイモの無機リン酸分解酵素は、基質特異性やその他の性質の面ではかなり類似しているが、生体内における生理的な機能の面では異なっているように思われる。

発芽後期のジャガイモについて、部位の相違による酵素活性の比較を行なったところ、いずれの基質に対する酵素活性も、芽の部位に著しく濃縮されていることが明らかとなった。芽の部位においては、芽の生長の最も盛んな時期に、これらの酵素が急速に増え、芽がある程度伸びきったあとは急に減少している。これに対し、塊茎の部分では、芽におけるような急激な変化はみられず、ピロホスファターゼ活性がやゝ減少の傾向を示す以外はほとんど変わらなかった。

また、タンパク当りの比活性を比べてみると、ピロホスファターゼ活性は塊茎の約10倍、Tripoly-PおよびTrimeta-Pに対する活性は、約30倍と約20倍にそれぞれ上昇している。とくに、Tripoly-PおよびTrimeta-Pに対する活性の上昇が芽において著しいことは興味ある結果である。このように、塊茎と芽では酵素の活性パターンが異なっているばかりでなく、Tripoly-PおよびTrimeta-Pに対する活性の至適pHにも違いがみられた。両酵素の異同については、更に詳細な実験を行なって明らかにしたい。

ジャガイモを明所と暗所とで発芽させた場合、明所においては芽の徒長が抑制され、暗所のジャガイモと外見が著しく異なっているが、発芽過程における酵素活性にはほとんど差がなく、光の影響はみられなかった。光合成とこれらの酵素活性との関連を調べるには、生長期のジャガイモについて実験を行なう必要がある。

現在のところ、ジャガイモ中に無機縮合リン酸が存在するのかどうか何もわかっていないが、低分子のポリおよびメタリン酸を分解する酵素が存在していることは明らかである。ポリリン酸分解酵素をもつ生物の中には、明らかにポリリン酸を含まないものもあることが知られているので、これらの酵素がジャガイモ中で、どのよう

な生理的機能を果しているかを明らかにするには、リン酸代謝について調べる必要がある。

湯村ら<sup>22)</sup>の報告によると、発芽前期から中期にかけては、ジャガイモの貯蔵デンプンが分解されて減少すると同時に糖含有量が増加する時期に相当しており、生長部へのエネルギーの提供が行なわれていることがうかがえる。

このようなエネルギーの消耗のはげしい時期に低分子の無機リン酸分解酵素の活性が著しく増加するということは、これらの酵素がエネルギー代謝と密接な関連をもっていることを示唆するものである。

## 要 約

ジャガイモの発芽過程におけるポリおよびメタホスファターゼ活性の変化と芽の部位より調製した酵素の性質を調べた。

(1) 芽より調製した酵素の Pyro-P, Tripoly-P および Trimeta-P に対する活性の至適温度は、45~50°Cであった。至適 pH は基質により異なり、Pyro-P の場合は 4.6, Tripoly-P および Trimeta-P の場合は 6.0 であった。

(2) 発芽過程における酵素活性は、明所と暗所とではほとんど差がなく、いずれの場合も Pyro-P に対する活性がもっとも高かった。

Pyro-P に対する活性は、発芽中期に急激に高まり、タンパク当りの比活性は、発芽前の約 2 倍になった。発芽後期にも高い活性が維持された。

Tripoly-P および Trimeta-P に対する活性は、発芽中期から後期にかけて徐々に増加し、比活性は発芽前に比べ前者で約 3 倍、後者では約 3.5 倍に高まった。

(3) 発芽後期のジャガイモの芽の酵素活性は、塊茎に比べて著しく高い。とくに Tripoly-P および Trimeta-P に対する活性が高かった。

(1976.9.20受理)

## 文 献

- 1) J. M. Wiame: Biochim. Biophys. Acta., **1**, 234 (1947)
- 2) 吉田 昭: 蛋白質核酸酵素, **4**, 39(1959)
- 3) Franklin M. Harold: Bacteriol. Rev., **30**, 772 (1966)
- 4) E. Liss, P. Langen: Biochem. Z., **333**, 193(1960)
- 5) H. Mattenheimer: Hoppe-Seyl. Z. physiol. Chem.,

- 303, 107(1956)
- 6) S. R. Kornberg : J. Biol. Chem., **218**, 23(1956)
- 7) S. Miyachi : J. Biochem., **50**, 367(1961)
- 8) D. Grossan, K. Lang : Biochem. Z., **336**, 351 (1962)
- 9) I. W. Smith, J. F. Wilkinson, J. P. Duguid : J. Bacteriol., **68**, 450(1954)
- 10) A. Yoshida, A. Yamataka : J. Biochem., **40**, 85 (1953)
- 11) H. Mattenheimer : Hoppe-Seyl. Z. physiol. chem., **303**, 125(1956)
- 12) A. Nishi : J. Bacteriol., **81**, 10(1961)
- 13) A. Nishi : J. Biochem., **48**, 758(1960)
- 14) 桑野安子, 北里寅男 : 家政学研究, **15**, 105(1968)
- 15) C. H. Fiske, Y. Sabbarow : J. Biol. Chem., **66**, 375(1925)
- 16) Official method of analysis of the A. O. A. C. p805 8th Ed. (1955)
- 17) M. Z. Newmark, B. S. Wenger : Arch. Biochem. Biophys., **89**, 110(1960)
- 18) F. C. Mayer, R. E. Campbell, A. K. Smith, L. L. Mckinney : Arch. Biochem. Biophys., **94**, 301(1961)
- 19) M. Kunitz : J. Gen. Physiol., **35**, 423(1952)
- 20) 種村安子, 伊藤 尚, 柘植治人, 大橋一二 : 未発表
- 21) 山辺 倫, 伊賀上郁夫, 倉沢文夫 : 農化, **50**, 77 (1976)
- 22) 湯村 寛, 佐藤正人, 北海道農業試験場彙報, **70**, 88, (1956)
- (筆者 種村・本学助教授, 荒井・本学助手, 高木・本学助手)