

論 説

ソテツ花粉のMg²⁺ 依存性無機ピロホス ファターゼについて

原 彰*・船 隈 透*

 Mg^{2+} dependent inorganic pyrophosphatase of Japanese cycad pollen

Akira HARA* and Tooru FUNAGUMA*

緒 言

無機ピロホスファターゼ (pyrophosphate phosphohydrolase, EC 3.6.1.1) は、無機ピロリン酸を 2 個の正リン酸に分解する酵素である。無機ピロリン酸は、多くの生合成反応、例えば DNA、RNA の合成やアミノ酸、脂肪酸活性化の反応の副産物として生産されるが、ピロホスファターゼはこれを分解することによって、合成反応を促進させる役割を果していると考えられている⁽¹⁾。

著者らは、ソテツ花粉の表在性酵素（花粉の細胞表面に存在する酵素）を証明するための細胞内指標酵素として、この酵素を利用した^(2,3)。R. G. Stanley および H. F. Linskens は、花粉中に存在する酵素として論文中に記載されたものおよび明らかに存在すると考えられるものを、合わせて 90 数種リストアップしている⁽⁴⁾が、ピロホスファターゼに関しては著者らの報告⁽²⁾を引用している。

本酵素は Mg²⁺ 依存性であり、アルカリ側で作用

するという特徴を示すが、ソテツ花粉のみならず、マツ、ライ麦、トウモロコシおよびガマの花粉中にも著量含まれていることが分かった。

本報告は、ソテツ花粉中のピロホスファターゼの精製と諸性質について記述する。

実験材料

ソテツ (*Cycas revoluta* Thunb.) 花粉は、1975 年 7 月鹿児島県西之表市馬毛島において採取し、使用前まで約 -20°C で保存した。

実験方法および結果

1. 活性測定法

ピロホスファターゼ活性は、次のような方法で反応させ、生じた正リン酸量を測定することにより求めた。適当に希釀した 0.2 ml の酵素液に、0.2 ml の 50 mM MgCl₂ および 0.6 ml の 50 mM Tris-HCl 緩衝液、pH 9.0 を加え、37°C で 5 分間保温し、別に保温した 1 ml の 2 mM ピロリン酸ナトリウムを加

* 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

えて 15 分間反応させた後、1 ml の 0.3 N 過塩素酸を添加して反応を止めた。通常の Fiske-Subbarow 法による正リン酸の測定では、未反応のピロリン酸が酸分解されて真の値が求めにくいので、改良法⁽⁵⁾に従った。

37°Cで 1 分間に 1 μmole の無機リン酸を遊離する酵素の量を 1 単位 (unit) とした。比活性は蛋白質 1 mg あたりの活性とし、蛋白質量は 280 nm の吸光度を測定し、O. D. が 1.0 であるときの蛋白質溶液を 1 mg/ml の濃度と規定してあらわした。

2. 酵素精製法

ソテツ花粉 20 g に 400 ml の 5 mM MgCl₂ を含む 10 mM Tris-HCl 緩衝液、pH 7.0 (以下これを M-T buffer と略す) を加え、氷冷下 10 ml ずつ、5 分間テフロン-ガラスホモジナイザーによって磨碎した。ホモジネートを 10,000 rpm で 10 分間遠心分離し、上清 381 ml を得た。上清を氷冷し、冷アセトンを 30% 濃度となるように徐々に加え 30 分間放置後、10,000 rpm で 5 分間遠心分離して沈殿を除去した。上清にはさらにアセトンを加え 60% 濃度とし、前回と同様に放置、遠心分離を行なった。得られた沈殿に 30 ml の 50 mM 食塩を含む M-T buffer を加えかくはんした後、10,000 rpm で 5 分間遠心分離して少量の不溶物を除去し、上清 32 ml を得た。

上清を 50 mM 食塩を含む M-T buffer で平衡化した DEAE-Sephadex A-50 カラム (2 × 28 cm) に通し、少量の同 buffer によって洗浄したのち、160 ml の 50 mM の食塩を含む M-T buffer と 160 ml の 0.6 M 食塩を含む M-T buffer によって構成される食塩の直線的濃度勾配法で溶出した (Fig. 1)。酵素活性のあるフラクション (No 39~49), 50.6 ml を集め、1/5 濃度の M-T buffer に対して透析した。

透析内液について焦点電気泳動を行なった。電気泳動用カラム (LKB 8100-1, 110 ml column, LKB Producter AB Sweden) に 3.5~10.0 の pH 勾配を与える Ampholine carrier ampholyte (終濃度 1%) および 5~50% のシュクロース密度勾配を適用し

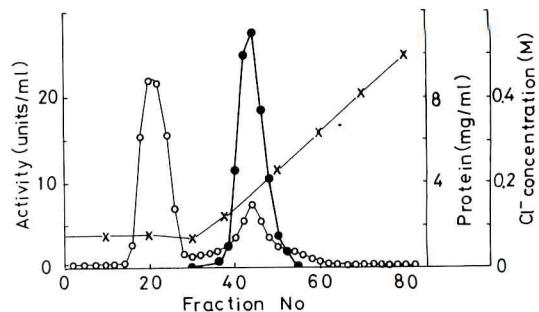


Fig. 1. Chromatography of pyrophosphatase on DEAE-Sephadex A-50.

Pyrophosphatase fraction obtained from acetone fractionation was applied to a column (2 × 28cm) of DEAE-Sephadex A-50 and washed with 10 mM Tris-HCl buffer, pH 7.0, containing 5 mM MgCl₂ and 50 mM NaCl. The column was then eluted with a linear NaCl-gradient. Fractions of 4.6 ml per tube were collected. ○—○, protein; ●—●, pyrophosphatase activity; ×—×, Cl⁻ concentration.

た。Fig. 2 に示すように、酵素活性のピークは pH 5.35 のフラクション (No 20) で得られ、このステップにおける活性の収率は約 50% であった。

活性フラクション (No 20) を M-T buffer に対して透析し、コロジオンバッグによって約 0.3 ml にまで濃縮した後、Sephadex G-100 カラム (2 × 96 cm) によるゲルろ過を行なった。Fig. 3 に示すように、酵素は 1 つの活性ピークとして溶出されたが、その活性フラクションは、280 nm における明確な吸収を示さなかった。

以上の精製過程を Table 1 に要約した。酵素は約 520 倍に精製され、収率は 10.7% であった。最終フラクションについて、ディスク電気泳動 (pH 9.4 ポリアクリルアミドゲル) を試みたが、蛋白質染色と活性染色とを比較した結果、酵素蛋白質以外にももう 1 つのバンドが認められ、精製が不十分であることが分かった。

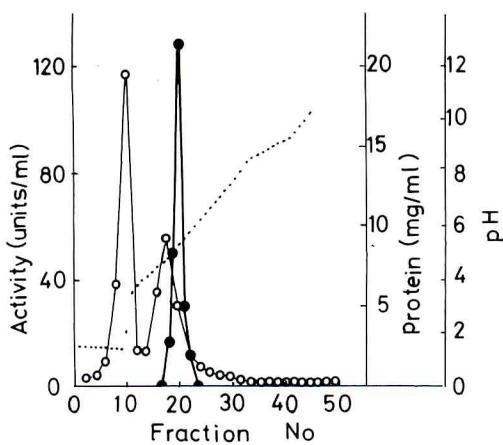


Fig. 2. Isoelectric focusing of pyrophosphatase.

Pyrophosphatase fraction obtained from chromatography on DEAE-Sephadex A-50 column was applied to a column for isoelectric focusing. Electrophoresis was carried out at a constant voltage of 1000V for 26hrs at 5°C. Fractions of 2.7g per tube were collected. ○—○, protein; ●—●, pyrophosphatase activity; -----, pH at 5°C.

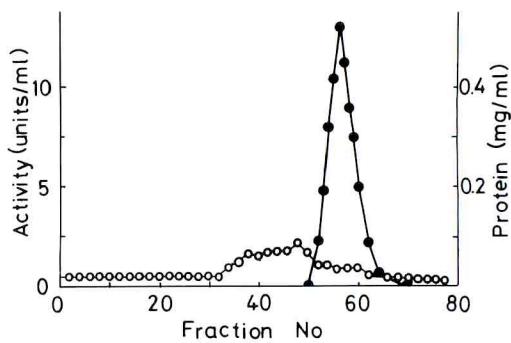


Fig. 3. Gel filtration of pyrophosphatase through a Sephadex G-100.

Pyrophosphatase fraction obtained from isoelectric focusing was applied for gel-filtration through a column (2.0×96cm) of Sephadex G-100. Fractions of 3.2ml per tube were collected. ○—○, protein; ●—●, pyrophosphatase activity.

Table 1. Summary of purification procedure of pyrophosphatase

Step	Volume (ml)	Protein (mg)	Activity (units)	Specific activity (units/mg)	Yield (%)
Crude extract	381	2484.1	1310.6	0.53	100
Acetone precipitation	32.0	633.6	989.7	1.56	75.5
DEAE-Sephadex A-50	50.6	156.3	644.3	4.12	49.2
Electric focusing, dialysis	10.0	6.77	313.3	46.3	23.9
Sephadex G-100	12.8	0.515	141.0	274	10.7

3. 酵素の諸性質

(1) 至適 pH Fig. 4 に示すように、酵素の至適 pH は 9.0~9.3 にあった。また、pH 10.3においても、最大活性の 70%以上の活性を示した。

(2) 酵素反応に及ぼす Mg²⁺濃度の影響 ピロリン酸濃度を一定 (1 mM) に保ち、Mg²⁺ 濃度を変

化させ酵素反応速度を測定した。Fig. 5 に示すように、Mg²⁺ 濃度がゼロの時は全く酵素活性を示さず、10mM の時に最高の活性を示した。また、ピロリン酸と Mg²⁺ の濃度化が 1 : 1 (mM/mM) の場合は、1 : 10 の濃度比のときの活性の約 50%を示した。

(3) 酵素反応に及ぼすピロリン酸濃度の影響

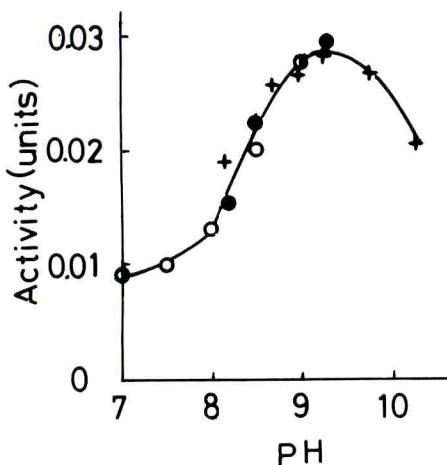


Fig. 4. Effect of pH and buffer on pyrophosphatase activity.

Activity was measured in the routine method except that the buffers indicated replaced the usual buffer. +, 60 mM H₃BO₃·KCl-NaOH; ○, 15 mM Tris-HCl; ●, 30 mM Sodium veronal-HCl.

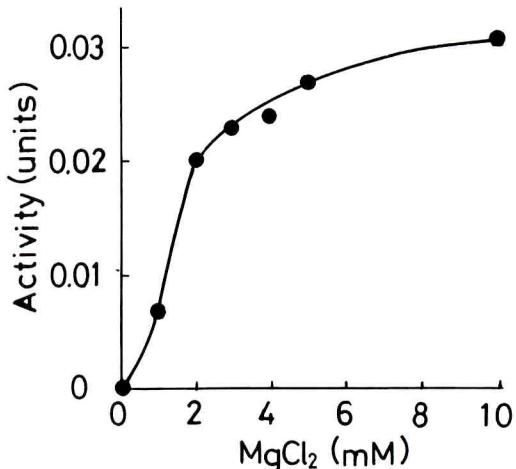


Fig. 5. Effect of Mg²⁺ concentration on pyrophosphatase activity.

Activity was measured in the routine method except that Mg²⁺ concentration was varied.

Mg²⁺濃度を一定(5 mM)にして、ピロリン酸濃度を変化させ、酵素活性を測定した。Fig. 6に示すように、ピロリン酸とMg²⁺の濃度比が0.5:5(mM/mM)あるいは1:5のとき最大の活性が得られるが、ピロリン酸濃度が増加するに従って活性は減少し、濃度比が10:5では、活性はほとんど認められなかった。この結果から、この酵素は遊離のピロリン酸を基質とするのではなく、[Mg-ピロリン酸複合体]を真の基質すると推察した。

(4) 酵素反応に及ぼす2価金属イオンの影響

Mg²⁺以外の2価金属イオンが、酵素の活性化因子となりうるかどうかを検討した。Table 2に示すように、Mg²⁺の非存在下ではCa²⁺, Zn²⁺およびMn²⁺のいずれも、ピロホスファターゼの活性化剤とはなり得ず、Mg²⁺との共存下ではMg²⁺の作用を抑制することが分かった。Mg²⁺の作用の抑制は、Mg²⁺(5 mM)に対し、1/100の濃度で共存してもZn²⁺,

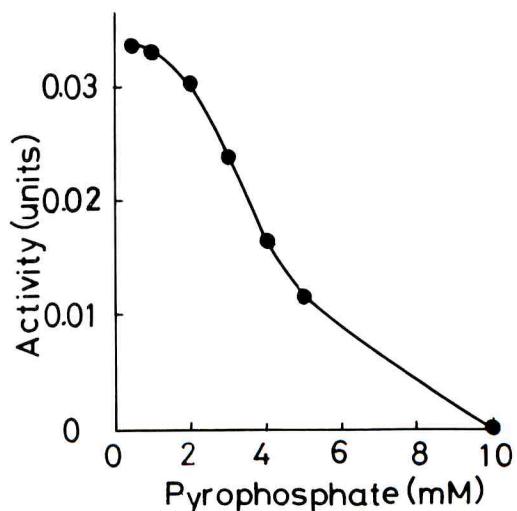


Fig. 6. Effect of pyrophosphate concentration on pyrophosphatase activity.

Activity was measured in the routine method except that pyrophosphate concentration was varied.

Table 2. Effect of divalent cations on pyrophosphatase activity in the absence or presence of Mg^{2+}

Cation added	Mg^{2+} (minus)	Mg^{2+} (5mM)		
	5mM	5mM	0.5mM	0.05mM
Ca^{2+}	4	3	27	78
Zn^{2+}	3	4	12	53
Mn^{2+}	2	3	54	92
None	0		100	

Table 3. Relative rate of hydrolysis of various phosphate compounds by pyrophosphatase

Substrate	Activity
Pyrophosphate	100
Thiamine pyrophosphate	0
Bis- ρ -nitrophenylphosphate calcium salt	0
ATP	0
2'(3')-AMP	1
5'-AMP	0
β -Glycerophosphate	0
ρ -Nitrophenylphosphate	0

$>Ca^{2+}>Mn^{2+}$ の順で明らかに認められた。

(5) ピロホスファターゼによる種々のリン酸化合物の分解 ピロリン酸の代わりに種々のリン酸化合物(反応液中の濃度1 mM)を加え、活性測定法に準じ(Bis- ρ -nitrophenyl phosphateの場合には、生じた ρ -Nitophenol を測定)ピロホスファターゼによる分解性を検討した。Table 3 に示すように、この酵素は無機ピロリン酸のみに作用すると思われ、ATP やチアミンピロリン酸などのホスホジエステル結合あるいは、AMP や β -グリセロリン酸などのホスホモノエステル結合には全く作用しないことが分かった。

考 察

Mg^{2+} 依存性ピロホスファターゼについては、微生物起源のものがよく研究されている。Kunitz がパン酵母から得た結晶標品⁽⁶⁾および *Thiobacillus thiooxidans* の酵素⁽⁷⁾は、 Mg^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} を活性化剤として要求する。大腸菌のそれは、 Mg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} および Co^{2+} によって活性化される⁽⁸⁾。それに対して、ソテツ花粉のピロホスファターゼは Mg^{2+} によってのみ活性化されるが、 Mn^{2+} , Zn^{2+} および Ca^{2+} は活性化剤とはなり得ず、 Mg^{2+} に対し拮抗的な阻害を示すことが分かった。

このように、いずれの起源のピロホスファターゼ

も活性発現に Mg^{2+} を必要とする理由は、真の基質が〔Mg-ピロリン酸複合体〕であるためであると思われるが、有効な複合体型については、酵母と細菌によって異なる報告がなされている。J. Josse は大腸菌の酵素では Mg^{2+} -ピロリン酸 (Mg^{2+} ppi) が真の基質であり、 $(Mg^{2+})_2$ ppi は拮抗的阻害剤である⁽⁹⁾としているのに対し、O. A. Moe と L. G. Butler は、酵母の酵素ではそのどちらも基質になり得るとしている⁽¹⁰⁾。

Fig. 6 に示すように、ソテツ花粉のピロホスファターゼも〔Mg-ピロリン酸複合体〕が真の基質になると思われ、ピロリン酸濃度が増加すると活性を示さなくなるのは、基質である複合体に対しピロリン酸が拮抗的に作用するためであると考えられる。

また、ソテツ花粉のピロホスファターゼは

DEAE-Sephadex A-50 クロマトグラフィーにおいて特異な挙動を示した。すなわち、酵素の溶出には十分量の Mg^{2+} (1 mM 以上) が不可欠であり、 Mg^{2+} の非存在下では活性のある酵素が得られなかった。これは酵素蛋白質自体も Mg^{2+} と結合して活性型となっていることを予想させるが、J. W. Riddington らは、酵母のピロホスファターゼについてその事実を証明している⁽¹¹⁾。

現在、他の花粉のピロホスファターゼについても検討中であるが、マツおよびガマの花粉の酵素は、至適 pH が 8.5~9.0 にあり、等電点も pH 5.2 前後の値を示し、ソテツ花粉の酵素と非常に類似した性質を示すことが分かっている⁽¹²⁾。それらの詳細については、今後明らかにする予定である。

Summary

1. An inorganic pyrophosphatase from Japanese cycad pollen was purified about 520-fold by the procedures of acetone fractionation, chromatography on a column of DEAE-Sephadex A-50, isoelectric focusing and finally gel-filtration through a Sephadex G-100.
2. The enzyme showed optimal activity at pH 9.0 to 9.3 and was activated by Mg^{2+} , but not several other divalent cations (Ca^{2+} , Zn^{2+} , and Mn^{2+}).
3. On the basis of relationship between the enzyme activity and pyrophosphate concentration, it was deduced that magnesium-pyrophosphate complex was the active substrate, while free pyrophosphate was a competitive inhibitor. No activity was found with a variety of other phosphate esters tested.

文 献

1. A. Kornberg. *Horizons in Biochemistry*, Academic Press, Inc., New York, p. 251 (1962)
2. A. Hara, M. Yamamoto, Y. Horita and T. Watanabe. *Mem. Fac. Agr. Kagoshima Univ.*, 8 No 2, 27 (1972)
3. 原 彰・松ヶ野一郷・小林 昭:花粉誌、第 15 号 41 (1975)
4. R. G. Stanley and H. F. Linskens. *Pollen, Biology Biochemistry Management*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, p. 196 (1974)
5. R. F. Furchtgott and T. de Gudareff. *J. Biol. Chem.*, 223, 377 (1956)

6. M. Kunitz. *J. Gen. physiol.*, **35**, 423 (1952)
7. N. Tominaga and T. Mori. *J. Biochem.*, **81**, 477 (1977)
8. J. Josse. *J. Biol. Chem.*, **241**, 1938 (1966)
9. J. Josse. *ibid.*, **241**, 1948 (1966)
10. O. A. Moe and L. G. Butler. *ibid.*, **247**, 7308 (1972)
11. J. W. Ridlington, Y. Yang and L. G. Butler. *Arch. Biochem. Biophys.*, **153**, 714 (1972)
12. 原 彰・船隈 透：未報告

☆第5回国際花粉学会議の第1回予告（1980年）

本会議は4年に1度行われる。第4回はインド・ラクノウ市サニー研究所にて1976年12月29日から1977年1月5日に行われた。今回はイギリスのロンドン郊外ケンブリッジ市にて1980年6月29日から7月6日に行われる。会長はケンブリッジの地質学者 N. F. Hughes 博士。事務局は Department of Geology, Sedewick Museum, Downing street, Cambridge, CB2 3EQ U. K. この国際花粉学会議に引き続き、7月7日から7月17日までパリで国際地質学会議が行われる。パリで7月14日（日本で言うパリ祭）を過せる訳である。国際花粉学会議 5 International Palynological Conference の第2回予告は1979年3月の予定。参加希望者は事務局に連絡されたい
(1978・VI・2 上野)

ICPについて

徳永重元（日本肥糧株式会社）

ICP (International Commission for Palynology) とは汎世界的に活動する、花粉学界における連絡機関である。しかし必ずしも今日まで、世界の花粉学者間にその内容や主旨が徹底されているとは云えず、現在でもその努力が行なわれている。

我国でもこの機関の存在すら知らない人も多いように思うし、偶々私がこの機関に関連するようになったので、これを機会にその内容を解説し理解を深める一助にしたい。

ICPは、国際花粉学会 (International Palynological Conference) の母体とも云えるものであり、常設的に活動している。そしてその運営方針の批准および役員の交代は、4～5年ごとに行なわれるその大会の折に決定される。従ってその下部役員も変るために、必ずしも連絡は滑らかと云えない面もある。

現在は President として米国ペンシルヴェニア大学の Dr. Alfred Traverse (化石専門)、Secretary-Treasurer にカナダのトロント大学の Dr. Geoffrey Norris が任命され、彼等を中心として運営されている。

目的とするところは世界の地域別・国別・専門家別の研究集団間における花粉学についての知識の向上や交流、また会合などの後援等を行なうことにある。ICPの会合は、生物学・地質学の International Union の後援をうけることもある。

会員になるには2通りの方法があり、個人としての場合と地域別・国別・専門別の学会を通じて参加の場合があり後者では年1 US ドルと内規にある。(全く個人で送る場合については調査中)

1976—1977 年の間におけるこの機関の活動は次のようである。

◎ "The evolutionary Significance of the exine" の出版を後援した。

◎ ICP の機構と内規が Lucknow での第4回国際花粉学会の際批准承認された。

◎ 10月19日 AASP (アメリカ花粉層序学会) の会合の際開かれた執行委員会 (Executive Committee) の席で、日本花粉学会を協力団体として含ませることが紹介された。また世界各地における地域的連絡員 (representative) の1人として、徳永が推せんされたがこの件については後日、日本花粉学会長と相談し、President に一任し決定された。

◎ 1978年2月4日アメリカの Pennsylvania state Univ. で開かれた執行委員会で News letter の発行と World list of Palinologist の発行が決められた。

◎ 次回の国際花粉学会の開催が local organizer の Dr. Hughes より発表され、1980年6月29日～7月6日まで、イギリスの Cambridge の Sedwick Museum を中心として行なわれ、野外見学旅行等も紹介された。

(その後上記大会の第1回案内が到着している)

以上 ICP の最近の活動についてのべたが、今後この内容が、花粉研究者の方々に有益になるよう連絡に努力してゆくつもりである。

これに関するお問合せは下記にお願いいたします (〒160) 東京都新宿区百人町2-17-18

Tel.03-371-4009 徳永重元