

クロマツ花粉の NAD^+ 依存性リンゴ酸脱水素酵素

船隈 透*・久野正人*・熊谷昭宏*・原 彰*

 NAD^+ -dependent Malate Dehydrogenase from Pollen of *Pinus thunbergii*Tooru FUNAGUMA*, Masato KUNO*, Akihiro KUMAGAI*
and Akira HARA** Laboratory of Biological Chemistry, Faculty of Agriculture, Meijo University,
Tenpaku-ku, Nagoya 468, Japan

An NAD^+ -dependent malate dehydrogenase (MDH) from the pollen of *Pinus thunbergii* was investigated. MDH activity changed significantly during cultivation of the pollen on an agar medium with sucrose, while no definite change was observed on the medium without it. The MDH from the ungerminated pollen was purified to almost homogeneity as judged by polyacrylamide gel electrophoresis. In an affinity chromatography on a Blue-Sepharose CL-6B column, MDH was specifically eluted with NADH. The enzyme had optimum pHs of 7.5 for oxaloacetate reduction and 9.0-9.2 for malate oxidation. It was stable up to 40°C on heating for 10 min and lost about 80 % of the original activity at 50°C. The K_m values were 192.3 μM for NADH and 75.8 μM for oxaloacetate. Its possible physiological role was discussed.

緒 言

成熟花粉における貯蔵糖は、一般的にシュクロースとデンプンであるが、クロマツ (*Pinus thunbergii*) 花粉は、シュクロースを含む寒天培地で培養することによって花粉管の中にデンプン粒を合成し、蓄積する⁽¹⁾。しかし、培地上でのこの花粉の発芽および花粉管の伸長には、シュクロースの添加は必要としない。即ち、花粉内の既存の物質を利用して壁多糖などの合成を行うものと思われる。それにはUDP-グルコースなどの前駆体(ヌクレオシドジリン酸-糖)が必要となるが、その合成は、シュクロース-デンプンの転換反応やミオ-イノシトール酸化経路により行われ、ATP などの高エネルギー化合物の存在によって可能となる。従って、クロマツ花粉の発芽および花粉管伸長の機構を

解明するには、そのATP生産系を明らかにすることも重要であると考えられる。著者は、この花粉の NAD^+ 依存性リンゴ酸脱水素酵素(MDH, EC 1.1.1.37)の活性がかなり高いことを見出した。本報では、クロマツ花粉の培養に伴うMDHの活性の変動および本酵素の精製と性質について述べる。

実験材料および方法

(1) 花粉 クロマツ (*Pinus thunbergii*) 花粉は、1986年に名古屋市緑区の大高緑地公園で採取し、一夜風乾した後、-20°C保存したものをを用いた。

(2) 試薬 DEAE-セファデックスA-50およびブルーセファロースCL-6Bは、ファルマシア社から購入した。またハイドロキシルアパタイト(バイオ

・ゲル HT) とバイオ・ゲル A-0.5 m はバイオ・ラッド社、オキサロ酢酸、リンゴ酸ナトリウムおよびフィコールは半井化学薬品社、そして NADH と NAD^+ は興人社から得た。

(3) 花粉の培養および酵素液の調製 直径 20 cm のシャーレに 3% 寒天、3% シュクロース、50 ppm ナイスタチンおよび 50 ppm クロラムフェニコールを含む培地とシュクロースを含まない培地を各 200 ml 調製した後、それぞれに花粉 500 mg をまき、30℃ に静置して培養を行った。経日的に花粉を 20 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) 5 ml に集め、それぞれをテフロンガラスホモゲナイザーで 10 分間ホモゲナイズし後、遠心分離 (20,000 × g, 10 min) を行い、それぞれの上清を酵素液として用いた。

(4) MDH 活性の測定 特に断らない限り、リンゴ酸生成方向で活性を測定した。50 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.5) 0.78 ml に 2.5 mM オキサロ酢酸 0.1 ml と 1.5 mM NADH 0.1 ml を加え、37℃ で 3 分間保温した。それに酵素液 20 μ l を加えて反応を開始させ、

同温度下、340 nm における吸光度の減少を測定した。酵素の 1 単位は、上記条件下で 1 分間に 1 μ mol の NADH が酸化されるのに必要な酵素量とした。なお、培養に伴う MDH の活性変動を調べる際には、反応液中にオキサロ酢酸の代わりに H_2O を含む系でのブランクテストを行った。

またオキサロ酢酸生成方向での活性は、25 mM リンゴ酸ナトリウム、2.5 mM NAD^+ 、緩衝液および酵素を含む反応液 1 ml を 37℃ で保温し、340 nm での吸光度の増加をモニターすることにより測定した。

酵素の希釈は、0.1% 牛血清アルブミンを含む 10 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.5) を用いて行った。

(5) タンパク質の定量 タンパク質は、牛血清アルブミンを標準として Lowry 変法⁽²⁾によって測定した。またカラムクロマトグラムにおいては、280 nm における吸光度で表示した。

(6) ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE)

Davis の方法⁽³⁾に従がい、7.5% ポリアクリルアミドディスクゲル (0.5 × 6 cm) を用いて 50 mM トリス-

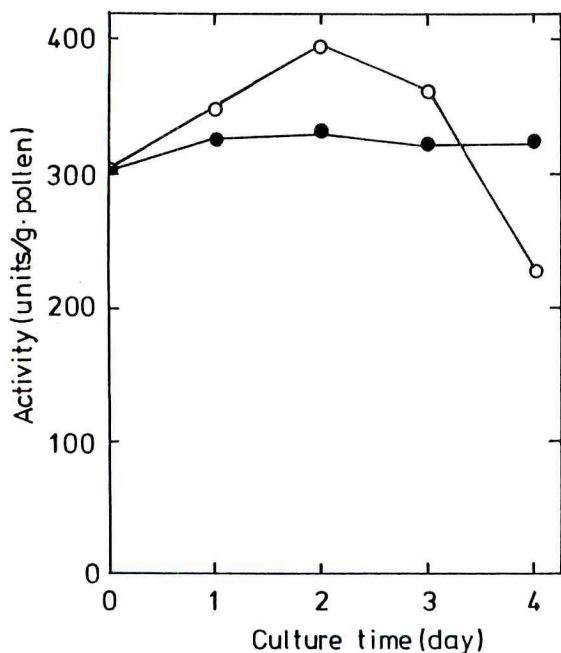


Fig. 1. Changes in MDH activity during cultivation of pollen on an agar medium with or without sucrose.

○, with sucrose; ●, without sucrose

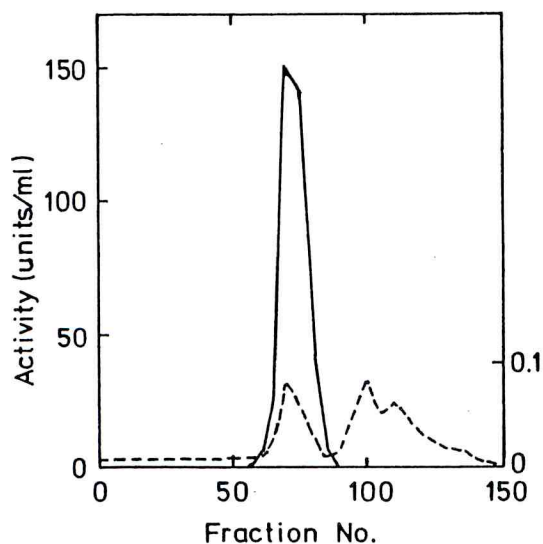
塩酸緩衝液 (pH 8.3) 中で電気泳動を行った。泳動後、ゲル中のタンパク質はクーマシーブリリアントブルー R で染色した。

実験結果

(1) 花粉の培養に伴う MDH 活性の変動 クロマツ花粉はシュクロースの有無にかかわらず、培養後 1 日で発芽を始め、花粉管を伸長させていく。それに対して MDH の活性は、Fig.1 に示すように、培養する前に既に高い値 (305 単位/ g · pollen) を示すが、シュクロースを含む培地で培養するとさらに上昇し、培養後 2 日目に最大値に達した。そしてその後は、減少した。この活性低下の機構およびデンプン粒蓄積との関連等については、検討中である。またシュクロースを加えずに培養した場合には、活性の変動は小さく、ほぼ一定であった。

(2) MDH の精製 クロマツ花粉 40 g を 10 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0、A 液) 400 ml に懸濁させた後、10 ml ずつテフロンガラスホモゲナイザーで 10 分間ホモゲナイズし、遠心分離 (20,000 × g、10 min) を行った。その上清を A 液に対して透析した後、再び遠心分離 (20,000 × g、10 min) を行い、上清 (291 ml) を A 液で平衡化した DEAE-セファデックス A-

50 のカラム (3 × 40 cm) にかけた。120 ml の A 液でカラムを洗浄した後、600 ml の A 液と 600 ml の 0.8 M NaCl を含む A 液とで構成される食塩の直線的濃度勾配法によって酵素の溶出を行った。その結果、MDH は食塩濃度 0.10 M で溶出された。活性画分を集めた後、1 mM EDTA および 1 mM β-メルカプトエタノールを含む 20 mM トリシュー塩酸緩衝液 (pH 7.0、B 液) に対して透析を行った。その内液 (329 ml) は B 液で平衡化したブルーセファロース CL-6B のカラム (2 × 10 cm) に通した。20 ml の B 液でカラムを洗浄した後、10 mM NADH を含む B 液を 100 ml 流して酵素の溶出を試みた。その結果、MDH はかなり効率的に溶出された。活性画分を集め (31.8 ml)、B 液に対して透析した後、その内液を 10 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 6.8、C 液) で平衡化したハイドロキシルアパタイトのカラム (2 × 6 cm) に通した。20 ml の C 液でカラムを洗浄した後、200 ml の C 液と 200 ml の 0.3 M リン酸カリウム緩衝液 (pH 6.8) とで構成されるイオン強度の直線的濃度勾配法によって酵素を溶出させた。活性画分を集め (64.7 ml)、フィコールで 7.1 ml まで濃縮した後、0.1 M NaCl を含む 50 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) で平衡化したバイオ・ゲル A-0.5 m のカラム (2 × 110 cm) にかかけ、ゲル濾



Absorbance at 280 nm

Fig. 2. Gel filtration of MDH through a Bio-Gel A-0.5m column. Fractions of 3 ml were collected at a flow rate of 13 ml/hr. —, MDH activity; ----, absorbance at 280 nm.

Table 1. Summary of purification of MDH.

Step	Vol (ml)	Total protein (mg)	Total activity (units)	Specific activity (units/mg)	Yield (%)
Crude extract	291	893	11,200	12.5	100
DEAE - Sephadex A - 50	329	110	9,910	90.1	88.5
Blue - Sepharose CL-6B	31.8	13.4	4,900	366	43.8
Hydroxylapatite	64.7	7.38	10,400	1,410	92.9
Bio-Gel A-0.5 m	23.0	1.60	3,840	2,400	34.3

過を行った。その結果、Fig. 2 に示すように活性とタンパク質のピークとは、よく一致した。以上の操作により、本酵素は Table 1 に示すように、約190 倍に精製され、収率は約 34 %であった。

(3) 精製酵素の PAGE Fig. 3 に示すように、タンパク質のバンドは、やや幅広いが一本であった。またこのバンドに相当する位置に MDH の活性が認められた。

(4) 一般的性質 至適 pH は、Fig. 4 に示すようにリンゴ酸生成方向については、7.5 付近であった。またオキサロ酢酸生成方向については、pH 9.0 - 9.2 で最大活性を示した。熱に対する安定性は、Fig. 5 に示すように、40℃までしか認められず、50℃では、80%も失活した。また K_m 値は、NADH に対して $192.3 \mu\text{M}$ 、オキサロ酢酸に対して $75.8 \mu\text{M}$ であった。さらに本酵素に対する種々の試薬 (ATP、ADP、AMP、GDP、GMP、UDP、UMP、CMP、クエン酸ナトリウム、DL-イソクエン酸ナトリウム、コハク酸ナトリウム、フタル酸、各 1 mM およびフルクトース 2, 6-ジリン酸、 $10 \mu\text{M}$) の影響を調べたが、特に効果は、認められなかった。

考 察

クロマツ花粉の NAD^+ 依存性 MDH の活性は、シュ

(-)

(+)

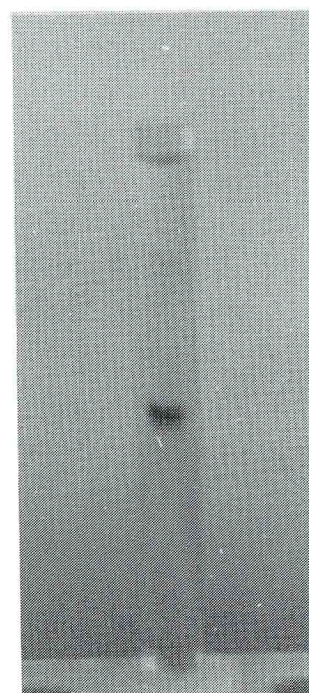


Fig. 3. Polyacrylamide disc gel electrophoresis of the purified MDH. Ten micrograms of MDH were used for electrophoresis.

クロースを添加した培地で培養を行うと 2 日後には約 30% 上昇した。この時期はデンプン粒を盛んに合成する時でもあり、それに連動してエネルギー生産系の動きも活発化するとと思われるが、MDH の上昇が合成によるものか、活性化によるものかは明らかでない。

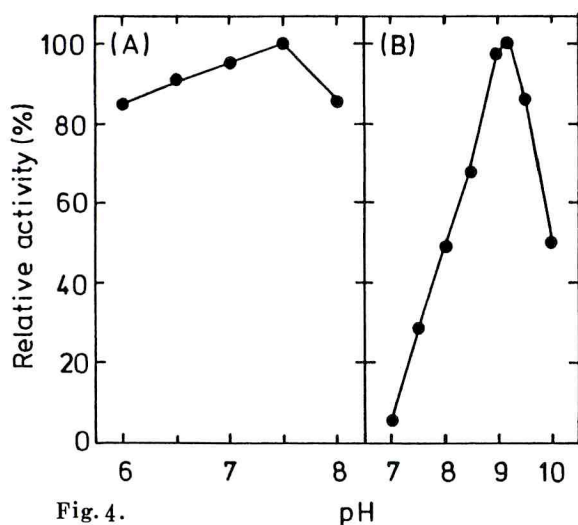


Fig. 4.

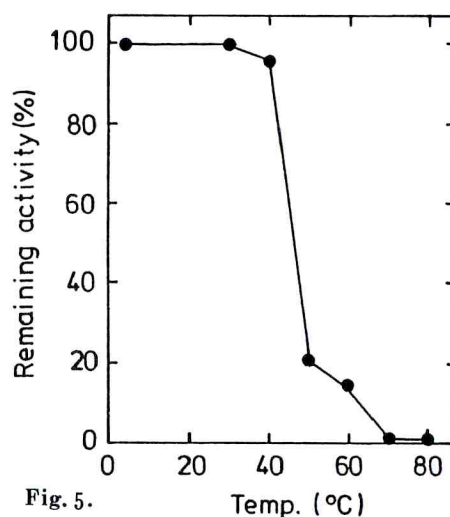


Fig. 5.

Fig. 4. Effect of pH on oxaloacetate reduction (A) and malate oxidation(B). Forty mM potassium phosphate (pH 6-8) for (A), and 40 mM Tris-HCl (pH 7-9) or 40 mM sodium carbonate (pH 9.2-10) for (B) were used as buffers.

Fig. 5. Effect of temperature on stability of MDH.

Enzyme was incubated at various temperatures at pH 7.0 for 10 min and rapidly cooled in an ice-bath. Then the remaining activity was measured under the standard conditions.

それに対してシュクロースを添加せずに培養を行うと、花粉管の発芽および伸長の期間を通じてほぼ一定のレベルに保たれた。このようなシュクロースの有無によるMDH活性の変動パターンの差は、両条件での花粉の代謝の違いを反映していると思われるが、MDHは、いずれでもかなり存在していることから、代謝の過程において何らかの役割を果たしていると解釈してよいであろう。一般にこの種の酵素は、ミトコンドリア、細胞質およびグリオキシゾームに存在していると言われており、^(4, 5) それぞれTCAサイクル、NADHに相当する還元当量の運搬に関わるリンゴ酸-アスパラギン酸往復輸送系、⁽⁶⁾ およびグリオキシル酸サイクルでの関与が考えられている。しかしクロマツ花粉では、MDHの活性がかなり高いにもかかわらず、リンゴ酸-アスパラギン酸往復輸送系に関わるもう一つの酵素であるアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼは、今までのところ検出されていない。

クロマツ花粉のMDHは、PAGEにおいてはほぼ均一と判断される程度に精製された。酵素の濃縮にはフィ

コールが有効であり、限外濾過およびコロジオンバッグの使用は、かなりの失活を招いた。また精製過程の1つ、ブルーセファロース CL-6Bによるアフィニティークロマトグラフィーにおいて、MDHの収量が悪かったのは、次のステップまでにNADHが除かれ、しかも活性が完全に回復したことから、高濃度のNADHが酵素を可逆的に阻害したことによる見掛け上のものと思われる。至適pHは、7.5 (リンゴ酸生成方向) と9.2 (オキサロ酢酸生成方向) であったが、これらの値は、酵母、動物および他の植物の至適pH (それぞれ6.6 - 8.0, 8.8 - 9.5)⁽⁷⁻⁹⁾ と大差はなかった。また熱安定性は、40℃までしか認められなかったことから、本酵素は熱に対して比較的不安定であると思われる。他の植物起源のMDHのアイソザイムの熱安定性は、それぞれ異なっているが、特にグリオキシル酸サイクルのMDHは低いことが報告されている。⁽⁹⁾ 一方、クロマツ花粉のMDHの精製においては、ブルーセファロース CL-6Bのカラムによるアフィニティークロマトグラフィーを行い、10 mM NADHで特異的に溶

出される画分を用いた。しかし、このカラムからは、別に 1 M NaCl で溶出されてくる画分もあることがわかった。Preliminary な実験では、両画分の活性の比は約 20 : 1 であり、前者が圧倒的に多い。また両者は、至適 pH と Km 値はよく似ているが、熱安定性において差異が観察されている。Tortora 等によれば、酵母の細胞質の MDH は、このカラムクロマトグラフィーにおいて 10 mM NADH で溶出されるのに対して

ミトコンドリアの酵素は、1 M KCl で得られることを報告している⁽⁹⁾。このことをそのままクロマツ花粉の酵素に適用できるかどうかは不明であるが、今後、ATP 生産系への関連も含め、2 つの MDH のアイソザイムの生理的役割を明らかにしていくためには、それらの細胞内局在性や花粉発芽と花粉管伸長に伴う変動等を詳細に検討する必要があると思われる。

引用文献

- (1) 岩田 岳、船隈 透、原 彰：花粉誌 **32** (2), 129-130 (1986).
- (2) Hartree, E. F. : Anal. Biochem. **48**, 422-429 (1972).
- (3) Davis, B. J. : Ann. N. Y. Acad. Sci. **12**, 404-427 (1964).
- (4) Breidenbach, R. W. : Ann. N. Y. Acad. Sci. **168**, 324-347 (1969).
- (5) Yamazaki, R. K. Tolbert : Biochim. Biophys. Acta **178**, 11-20 (1969).
- (6) Walk, R.-A, S. Michaeli and B. Hock : Planta **136**, 211-220 (1977).
- (7) Yang, N.-S, and J. G. Scandalios : Arch. Biochem. Biophys. **161**, 335-353 (1974).
- (8) Rarval, D. N. and R. G. Wolfe : Biochemistry **1**, 1118-1123 (1962).
- (9) Tortora, P., N. Burlini, F. Leoni and A. Gueritore : FEBS Letters **155**, 39-42 (1983).

(受理日 1987 年 3 月 19 日)