

## クロマツ花粉のADP-グルコースピロフォスフォリラーゼ

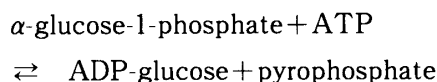
丸井 正樹, 新井 勇治\*

ADP-glucose pyrophosphorylase from Pollen of *Pinus thunbergii*

MASAKI MARUI and YUJI ARAI\*

Properties of ADP-glucose pyrophosphorylase from pollen of *Pinus thunbergii* were determined and the enzyme had an important relation to soluble type starch synthase of the pollen in the point of a pathway of starch synthesis with ADP-glucose as a glucose donor. The two enzymes have the same profile of culture time at the peak of activity (culture for 3~4 hr), optimum pH (7.5~8.0) and inhibition by magnesium ion (more than 4mM). The Michaelis constant for glucose-1-phosphate was 3.85mM but 3-phosphoglyceric acid had no effect on the enzyme activity.

ADP-グルコースは高等植物のデンプン合成における特有の中間体であり、同化組織および貯蔵組織のデンプン合成酵素 (ADP-glucose:  $\alpha$ -1, 4-glucan  $\alpha$ -4-glucosyl transferase) の基質である。これの形成はADP-グルコースピロフォスフォリラーゼ (ATP:  $\alpha$ -D-glucose-1-phosphate adenylyl transferase) によるものと、シュクロース合成酵素の逆反応によるものの二通り考えられている。前者の反応は次式で表される。



前報においてクロマツ花粉は、発芽後の花粉管伸長時にデンプンを蓄積すること、デンプンの生合成にはADP-グルコースを基質として利用することを明らかにした<sup>9)</sup>。このことからADP-グルコースを生成する経路の存在が考えられる。ADP-グルコースピロフォスフォリラーゼの存在が、葉などの<sup>3,7,14)</sup>同化組織のほかにも、トウモロコシ種子<sup>2,11,12)</sup>とその胚<sup>13)</sup>と内胚乳<sup>4,5,16)</sup>、小麦<sup>6,15)</sup>、イネの種子<sup>10)</sup>などで確

認されていることから、クロマツ花粉にも同酵素の存在が推測される。また、同化組織においてはADP-グルコースピロフォスフォリラーゼはデンプン合成の調節酵素としての役割を持つことが指摘されている<sup>5,14)</sup>。ここでは、クロマツ花粉のADP-グルコースピロフォスフォリラーゼの存在の確認とその性質を調べた。

## 実験方法

## 1. 植物材料

前報<sup>9)</sup>と同様のクロマツ (*Pinus thunbergii*) の花粉を用いた。

## 2. 試薬

<sup>14</sup>C-グルコース-1-リン酸はRadio-chemical Center (England) 製を、アルカリフォスファターゼはBoehringer and Soehle Co. (Germany) 製をそれぞれ用いた。その他の試薬は国産の試薬一級品を用いた。

## 3. 蛋白質の定量

280nmの吸光度およびLowryらの方法<sup>8)</sup>によ

\*Institute of Applied Biochemistry, University of Tsukuba.

Key words: pollen, ADP-glucose, pyrophosphorylase.

り測定した。

#### 4. 花粉の培養

5% シュクロースを含む2.5% 寒天培地に花粉を1.5mg/cm<sup>2</sup>の割合で均一に一層にまいて、27℃で培養した。

#### 5. ADP-グルコースピロフォスホラーゼの調製

3時間培養した花粉に50mM トリス-塩酸緩衝液 (pH7.5) 10mlを加え、ポッター型ホモジナイザーで氷しながら磨砕した。磨砕液を15,000×gで20分間遠心分離し、上澄液を脱油綿カラム (1×1.5cm) で濾過した。この濾液に飽和硫酸溶液 (639g/l, pH7.5) を加えて60%飽和にし、45分間攪拌放置したのち、15,000×gで30分間遠心分離した。沈殿を50mM トリス-塩酸緩衝液 2mlで溶解し、セファデックスG-25カラム (1×25cm) により脱塩した。280nmの吸光度を測定し、蛋白質画分を集めて酵素標品とした。なお、本酵素の調製は0~6℃で行なった。

#### 6. 酵素活性の測定

反応液は50mM トリス-塩酸緩衝液 (pH7.5), 2mM MgCl<sub>2</sub>, 2mM ATP, 0.2μmol <sup>14</sup>C-グルコース-1-リン酸 (15.1μCi/mmol), および酵素液50μlを含み、総液量を140μlとした。反応は37℃で30分間行ない、沸騰水中で1分間煮沸して停止した。反応液中の未反応の<sup>14</sup>C-グルコース-1-リン酸はアルカリフォスファターゼと37℃で60分間反応させ、<sup>14</sup>C-グルコースに分解した。この反応液をDEAE-セルロース円形濾紙 (直径2cm, 東洋濾紙) 4枚に吸着させて、脱イオン蒸留水100mlで洗浄し、遊離の<sup>14</sup>C-グルコースを取り除いた。<sup>14</sup>C-グルコース-1-リン酸より生成したADP-<sup>14</sup>C-グルコースが吸着しているこの濾紙を乾燥後、トルエンシンチレーター

(POPOP 0.1mg, PPO 4g/トルエン1l) とともにシンチレーションカウンター (日本無線アロカ-LSC-601型) で測定した。

酵素活性は、反応30分間に生成したADP-<sup>14</sup>C-グルコース 1nmolを 1 unitとし、unit/mg of proteinで表示した。

## 実験結果および考察

### 1. 培養に伴う酵素活性の変動

培養の時間的経過と酵素活性との関係をFig. 1に示した。酵素活性は培養開始から4時間まで高い値を示したが、4~6時間で急激に低下し、6時間以降は顕著なピークは現われなかった。この酵素活性曲線は、前報<sup>9)</sup>で報告した可溶性デンプン合成酵素のそれと類似している。このことは、可溶性デンプン合成酵素とADP-グルコースピロフォスホラーゼとが関係している可能性があることを示唆している。

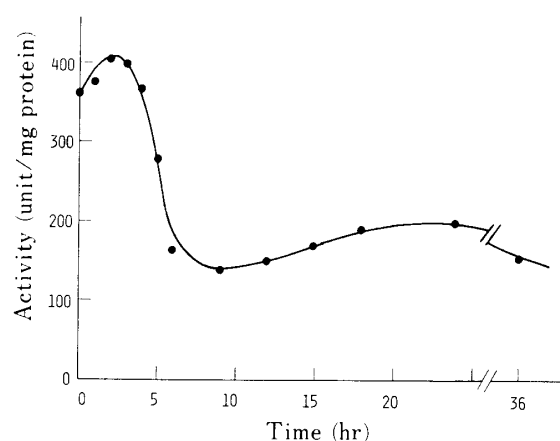


Fig. 1 Time Course of ADP-glucose pyrophosphorylase Activity during Incubation. The reaction mixture containing 7μmol of Tris-HCl buffer (pH7.5), 0.28μmol of MgCl<sub>2</sub>, 0.28μmol of ATP, 0.2μmol of <sup>14</sup>C-glucose-1-phosphate (15.1μCi/mmol) and 50μl of enzyme in a final volume of 140μl.

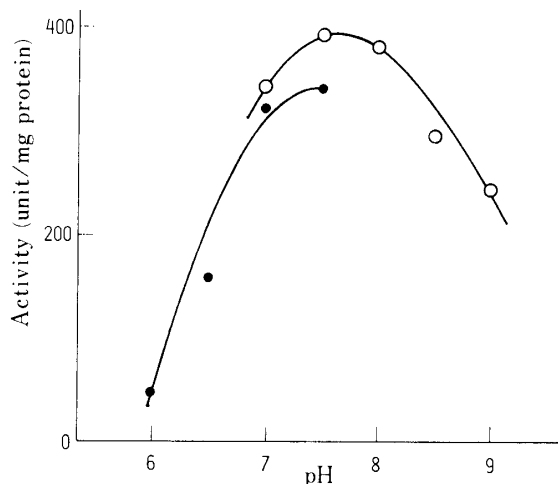
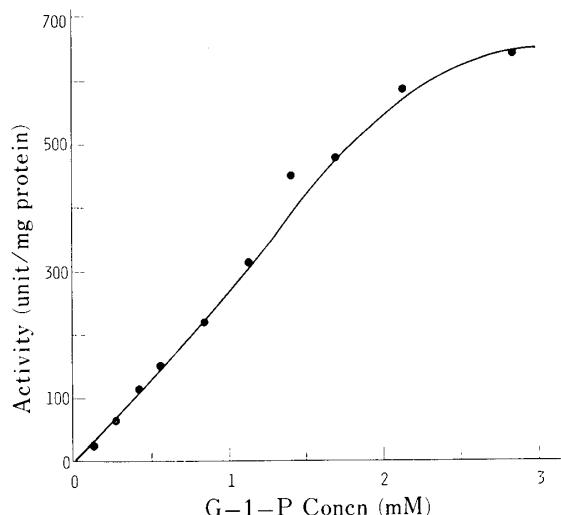


Fig. 2 Effect of pH on Activity of ADP-glucose pyrophosphorylase. Experimental condition was the same as that of Fig. 1 except buffer. ○: Tris-HCl buffer, ●: Tris-malate buffer.



**Fig 3** Effect of G-1-P Concentration on ADP-glucose pyrophosphorylase.  
Experimental condition was the same as that of Fig.1 except G-1-P concentration.

## 2. pHの影響

使用した緩衝液には、pH6.0~7.5ではトリスマレイト緩衝液を、pH7.0~9.0ではトリス塩酸緩衝液を用いた。Fig. 2に示すように、トリス塩酸緩衝液のほうがやや活性が高く、至適pHは7.5~8.0であった。トウモロコシの種子<sup>2,11,12</sup>、またその一部である内胚乳<sup>4,5,16</sup>、胚<sup>13</sup>のADP-グルコースピロフォスホリラーゼの至適pHはそれぞれ8.0, 7.9, 8.0であり、本酵素の値はこれらの値とほぼ一致していた。

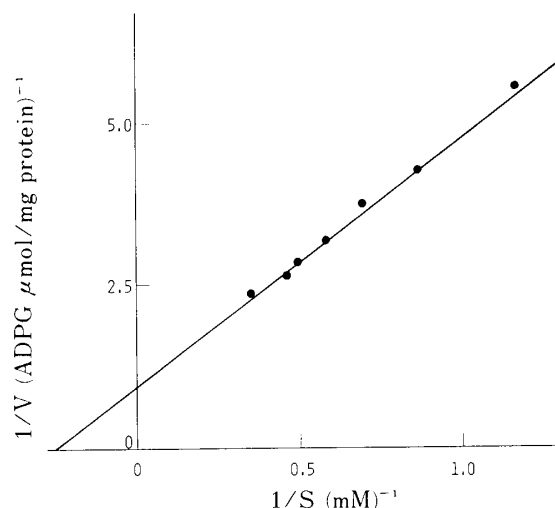
## 3. 基質濃度の影響

グルコース-1-リン酸濃度と反応生成物量との関係はFig. 3のようになった。2 mM以下において一次関係になっており、基質濃度は1.5mM付近が適していることが分かった。

Lineweaver-Burk プロットにより求めたKm値は3.85mMであった (Fig. 4)。一般に植物のADP-グルコースピロフォスホリラーゼのKm値は $10^{-3}$ ~ $10^{-4}$ Mであり、この値はその範囲内にあった。

## 4. ATP濃度との関係

ATP濃度と反応生成物量との関係を調べた (Fig. 5)。2.5mM以下では一次関係にあり、ATPは2.0mMで適していることが分かった。ADP-グルコースピロフォスホリラーゼのATP濃度は、トウモロコシの内胚乳では1.0mMが適している<sup>4,5</sup>)のに対して、本酵素ではそれ



**Fig 4** Plots of Determine the Michaelis Constant for G-1-P.  
Experimental condition was the same as that of Fig.1 except G-1-P concentration.

の2倍の濃度を必要とした。

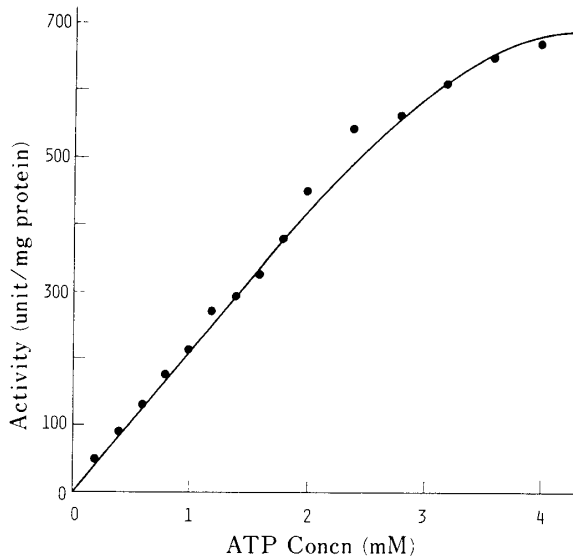
## 5. Mg<sup>2+</sup>との関係

Mg<sup>2+</sup>と酵素活性との関係を調べるに当たり、Mg<sup>2+</sup>はMgClで与えた (Fig. 6)。0 mMから高い活性を示し、2~4 mMの間でピークがあった。4 mMから減少が始まり、Mg<sup>2+</sup>が高濃度において阻害に働くことが分かった。トウモロコシ種子では、Mg<sup>2+</sup>の至適濃度は5~10 mMであり、それより高濃度でも阻害効果は示さないことが報告されている<sup>2,5,13</sup>。本酵素はこれと比べて値が低く、ATPの至適濃度である2 mMとほぼ一致した値であった。

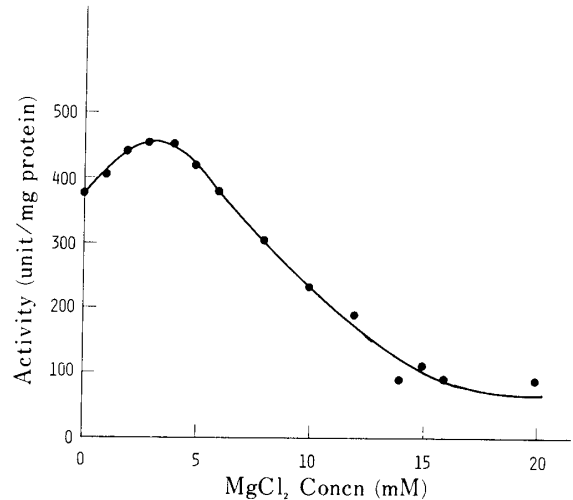
## 6. グリセリン酸-3-リン酸 (3-PGA) の影響

一般に光合成を行なう組織に存在するADP-グルコースピロフォスホリラーゼは3-PGAにより活性化されるが<sup>5,14</sup>、トウモロコシ種子のADP-グルコースピロフォスホリラーゼにも3-PGAが10~15mMで活性剤として働くことが報告されている<sup>2,4,5,13</sup>。しかし、本酵素に対する3-PGAの影響を濃度0~20mMの範囲で調べた結果、3-PGAは活性剤でも阻害剤でもないことが分かった。

前報<sup>9</sup>)の顆粒型および可溶型デンプン合成酵素がADP-グルコースの基質特異性を示したことから、ADP-グルコースピロフォスホリラーゼの存在を推定してその有無を調べ



**Fig 5** Effect of ATP Concentration on ADP-glucose pyrophosphorylase. Experimental condition was the same as that of Fig.1 except ATP concentration.



**Fig 6** Effect of  $Mg^{2+}$  Concentration on ADP-glucose pyrophosphorylase. Experimental condition was the same as that of Fig.1 except  $Mg^{2+}$  concentration.

た。本酵素は、活性ピークが現われる時期、 $Mg^{2+}$ 高濃度時における阻害影響、至適pHにおいて可溶性デンプン合成酵素と一致しており、この二つの酵素は細胞内の非常に近い部分に存在していると考えられる。よって、本酵素は可溶性デンプン合成酵素とともに培養初期のデンプン合成に関与し、その合成経路は、グルコースから変換したグルコース-1-リン酸をADP-グルコースピロフォスフォリラーゼがADP-グルコースに変え、それを可溶性デンプン合成酵素がデンプンに転移するものであることが推定される。この経路は赤沢ら<sup>1)</sup>が提唱したものと同一である。一方、顆粒型デンプン合成酵素は、その活性ピークが現われる時期にADP-グルコースピロフォスフォリラーゼ活性が低いことから、グルコース供与体として用いるADP-グルコースはシュクロースからシュクロース合成酵素の逆反応により生成したものと考えられる。同化組織のADP-グルコースピロフォスフォリラーゼが、光合成初期産物である3-PGAによって活性化され、デンプン合成が調節されるのは合目的的であると考えられる<sup>5,14)</sup>。これに対して、花粉は光合成と直接的な関係はなく、また光合成産物であるシュクロースの転流にも関係がない。その発芽は独立した現象である。したがって、花粉の酵素が光合成初期産物である3-PGAによる活性の調節を受け

ないことも合目的的といえる。

## 要 約

クロマツ花粉の発芽時におけるデンプン合成について検討するためにADP-グルコースピロフォスフォリラーゼの性質を調べた。

1. 本酵素は活性ピークが3~4時間にあり、可溶性デンプン合成酵素と一致したが、顆粒型デンプン合成酵素とは一致しなかった。
2.  $K_m$ 値は3.85mMであった。また、至適pHは7.5~8.0であり、 $Mg^{2+}$ は2~4mMでピークを持ち、4mM以上では阻害効果を示し、これらは可溶性デンプン合成酵素の諸性質と一致した。
3. 本酵素は可溶性デンプン合成酵素の基質であるADP-グルコースを生成する経路に関与していると推定された。

## 参考文献

- 1) AKAZAWA, T., MINAMIKAWA, T. and MURATA, T.: *Plant Physiol.*, **39**, 371(1964).
- 2) AMIR, J. and CHERRY, J.S.: *Plant Physiol.*, **49**, 893(1972).
- 3) ARAI, Y. and FUJISAKI, M.: *Bot. Mag. Tokyo*, **84**, 76(1971).
- 4) DICKINSON, D.B. and PREISS, J.: *Plant Physiol.*, **44**, 1058(1969).

- 5) DICKINSON,D.B. and PREISS,J.:Arch. Biochem. Biophys., **130**, 119(1969).
- 6) ESPADA,J.:J. Biol. Chem., **237**, 3577 (1962).
- 7) GHOSH,H.P. and PREISS,J.:J. Biol. Chem., **240**, 960(1965).
- 8) LOWRY,O.H., ROSENBROUGH,N.J., FARR,A.L. Randall,R.J.:J. Biol. Chem., **193**, 265(1951).
- 9) 丸井正樹：聖徳栄養短期大学紀要，**20**，24 (1989)。
- 10) MURATA,T., SUGIYAMA,T. and AKAZAWA,T.:Arch. Biochem. Biophys., **107**, 93(1964).
- 11) OZBUN,J.L., HAWKER,J.S. and PREISS,J.:- Plant Physiol., **48**, 765(1971).
- 12) OZBUN,J.L., HAWKER,J.S. GREENBURG,E., LAMMEL,C. and PREISS,J.:Plant Physiol., **51**, 1(1973).
- 13) PREISS,J., LAMMEL,C. and SABRAW,A.: Plant Physiol., **47**, 104(1971).
- 14) SANWAL,G.G., GREENBURG,E., HARDIE,J., CAMERON,E.C. and PREISS,J.:Plant Physiol., **43**, 417(1968).
- 15) TOVEY,K.C. and ROBERTS,R.M.:Plant Physiol., **46**, 406(1970).
- 16) WEAVER,S.H., GLOVER,D.B. and TSAI,C.-Y.:Crop Science, **12**, 510(1972).