

琉球大学学術リポジトリ

甘蔗茎の NPP- ホスファターゼの性質(農芸化学科)

メタデータ	言語: 出版者: 琉球大学農学部 公開日: 2008-02-14 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 仲宗根, 洋子 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12000/3963

甘蔗茎のNPP—ホスファターゼの性質

仲宗根 洋子*

Yoko NAKASONE : Properties of NPP-phosphatase
from cane stalks

Summary

The existence of an acid phosphatase in the mature cane stalks of NCO 376 variety, cultivated in Okinawa, was confirmed. The acid phosphatase hydrolyzing p-nitrophenyl phosphoric acid (NPP), from the extract of cane stalks, was partially purified by ammonium sulfate fractionation and acid treatment.

This enzyme had an optimum pH of 5.5 and almost no activity at alkaline areas. It had K_m value for NPP of 0.77 mM and an optimum temperature of 50°C and was stable at temperatures lower than 40°C. Magnesium, cupric and manganese ions in 1.16 mM showed no effect on the enzyme activity. However, the inhibition of the activity by calcium and mercuric ions and EDTA in 1.16 mM was remarkable, but that by fluoride ion in 1.16 mM was moderate. EDTA and mercuric ion in 0.11 mM, on the other hand, did not inactivate the enzyme. The modes of the inhibition by EDTA and calcium ion distinguish the enzyme studied in this work from the acid phosphatases obtained from several other plant species.

結 言

オルトリン酸モノエステル加水分解酵素の一つである酸性ホスファターゼは、リン酸エステルやパラニトロフェニルリン酸 (NPP) を加水分解して無機リン酸を遊離するが、ピロリン酸やATPなどに作用するものである。酸性ホスファターゼは動物、植物および微生物に広く分布^{1,3,5)}しているが、植物起源のホスファターゼの生理的意義はまだ明らかではないようである。フィチンを含む米⁸⁾および米糠²⁾においては酵素の精製あるいはその特性が研究されている。これは米の生体成分であるフィチンの代謝とのかかわりで行われてきた。甘蔗では、葉における光合成の初期産物のリン酸エステル (PGA等) 代謝へのホスファターゼの関与について論ぜられたことがある。⁴⁾ これまで、甘蔗茎の酸性ホ

* 琉球大学農学部農芸化学科

スファターゼについての研究はほとんどない。本研究は、甘蔗茎における酸性ホスファターゼと糖代謝との関連を知る手がかりを得ることを目的としている。今回はNPPを基質とする酸性ホスファターゼの二、三の性質について検討した。

実験方法

1. 酵素材料

甘蔗茎の下部をミルで搾汁した。搾汁液を濾布し、濾液を遠心分離(8,000 × g, 20分)して上澄液を得た。これを、酵素の部分精製のための粗酵素液として用いた(Table 1.)

2. 酸性ホスファターゼ活性の測定

基質のNPP 1 mM, 酢酸緩衝液, pH 5.5, 0.2 Mおよび酵素液を含む3 mlの酵素反応液を, 35°Cで30分間反応させたのち, 0.1 N水酸化ナトリウム 1 mlを加えて反応を停止した。基質のNPPより遊離するパラニトロフェノール(NP)を410 nmにおいて測定した。

実験結果および考察

1. 酸性ホスファターゼの活性画分

Table 1. に示したように、粗酵素液の硫酸塩析およびその酸処理を行った。0~35%飽和硫酸画分

Table 1. Preparation of acid phosphatase

Enzyme preparation: Sugar cane crusher juice was obtained from mature stalks. It was passed through four layers of cheesecloth and centrifuged at 8,000 g x 20 min. Solid ammonium sulfate was added to the supernatant (crude extract) and a fraction which precipitated between 35 and 60 % saturation was collected by centrifugation. The was dissolved in 10 mM phosphate buffer pH 6.8. To this solution, solid ammonium sulfate was added up to 35 % saturation and then the pH of the solution was lowered to pH 3.8. The pellet was removed by centrifugation. The supernatant was adjusted to pH 6.0 and solid ammonium sulfate was added up to 80 % saturation. The pellet was collected by centrifugation and suspended in phosphate buffer, pH 6.8.

Enzyme assay: The reaction containing 0.2M of acetate buffer, pH 5.5, 1 mM of NPP and enzyme fraction in a final volume of 3.0 ml was incubated at 35°C for 30 min. The solution was stopped by the addition of 1 ml of 0.1N NaOH. The amounts of released NP were estimated from increases in absorbance at 410 nm. The enzyme unit was defined as an increase in the absorbance of 1.0 per min. under the above conditions. Protein was determined by the Lowry method.

仲宗根：甘蔗茎のNPP-ホスファターゼの性質

Fraction	Total protein (mg)	Total activity (unit)	Specific activity (unit/mg)	Yield (%)
Crude extract	350	297	0.8	100
35 - 60 % Ammonium sulfate	86	142	1.6	48
Acid treatment of ammonium sulfate fraction	14	84	6.0	28

の比活性および収率は、それぞれ0.3%, 4%を示し、硫酸塩析後の大部分の酵素活性は、Table 1の硫酸画分に局在した。この35~60%飽和硫酸沈澱画分は、透析後、沈澱物を生ずるが、この35~60%飽和硫酸沈澱画分は、透析後、沈澱物を生ずるが、この部分には若干の活性が残っていた。ここでは透析後の上澄液を本酵素画分として次の酸処理に用いた。その結果、酸処理画分の比活性は粗酵素液の7倍に上昇した。なお、ここには示さなかったが、本酵素は硫酸のかわりに有機溶剤アセトンによって分画調製が可能であった。以下の実験では、主に、Table 1の酸処理画分を酵素標品として用い、その性質をしらべた。

2. 酵素反応の至適pHと酵素のpH安定性

本酵素の活性は酵素濃度が増すにつれて、10mg/mlの酵素濃度までは直線的に増加した。このことは酵素反応によってNPが生成されていることを示した。また、酵素活性は少なくとも反応時間30分までは比例関係にあった。

Fig. 1-Aに示したように酵素反応の至適pHは5.5にあった。pHが7以上になると活性は急激に低下した。また、緩衝液の種類によって至適pHが変動することはなかった。これらのことから、甘蔗茎には、アルカリホスファターゼではなしに酸性ホスファターゼが存在することが明らかになった。

pHに対する酵素の安定性については、酵素を各pHの緩衝液中に35°Cで20分間保持したのち、残存する酵素活性を測定した。この条件下では、pH 5~6の狭い範囲内で安定であった (Fig. 1-B)

3. 至適反応温度と酵素の温度安定性

20°Cから70°Cまでの各温度において、酢酸緩衝液、pH 5.5, 中30分間酵素反応を

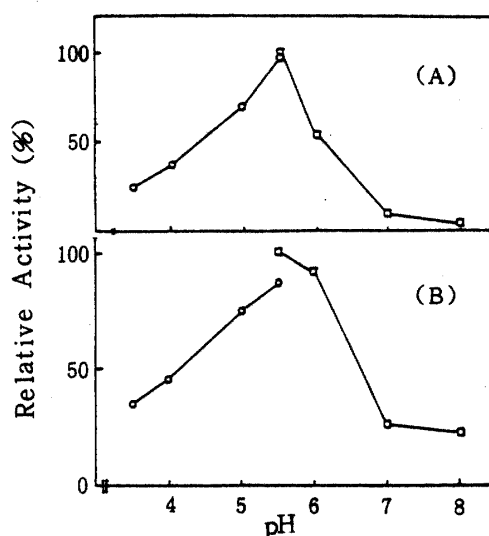


Fig. 1. Effects of pH on acid phosphatase activity (A) and the stability of the enzyme (B)

(A) The reaction mixture (3 ml) containing 1 mM of NPP, 0.2 M of buffer of given pHs and enzyme solution (3.2 μg) was incubated at 35°C for 30 min. (B) The enzyme solutions were preincubated in 0.02 M buffer of given pHs at 35°C for 20 min. and the remaining activities were assayed as described in legend to Table 1. ○; Acetate, □; Tris-maleate.

行った (Fig. 2-A)。本酵素の至適反応温度は50°Cにあった。なお、他の酵素活性は、実験の都合上、35°Cの反応温度で行った。次に酵素そのものの温度に対する安定性をしらべるために、酵素だけを20°Cから70°Cまでの各温度に10分間保持したのち、残存する酵素活性を測定した (Fig. 2-B)。40°Cまでは安定であるが50°Cでは80%の活性となり、それ以後の温度では酵素は急激な熱失活を示した。

4. 酵素活性におよぼす各種化合物の影響

Table 2. の各化合物の存在下において、pH 5.5 で35°C、30分間反応を行い酵素活性を測定した。本酵素の活性は、EDTA、水銀イオンおよびカルシウムイオンによって最も強く、フッ素イオンによって中程度に阻害された。しかしながら、0.1mM濃度のEDTAおよび水銀イオンでは、いずれも100%前後の相対活性を示した。また0.1mM水銀イオンの酵素活性におよぼす影響は、酵素の調製法によって異なった。即ち、有機溶剤により調製した酵素画分(相対活性、43%)がTable 2に示した酸処理酵素標品(92%)よりも、水銀イオンの影響は大きかった。カルシウム、マグネシウムおよびマンガンイオンの2価イオンとEDTAとは植物の酸性ホフファターゼの活性に対して何ら影響をおよぼさない、と報告^{2,6,7)}されている。しかし、本酵素の活性は1mMのカルシウムイオンおよびEDTAによって著しく阻害された。EDTAとマグネシウム、マンガンの2価イオンとに関するこのTable 2の結果は一見

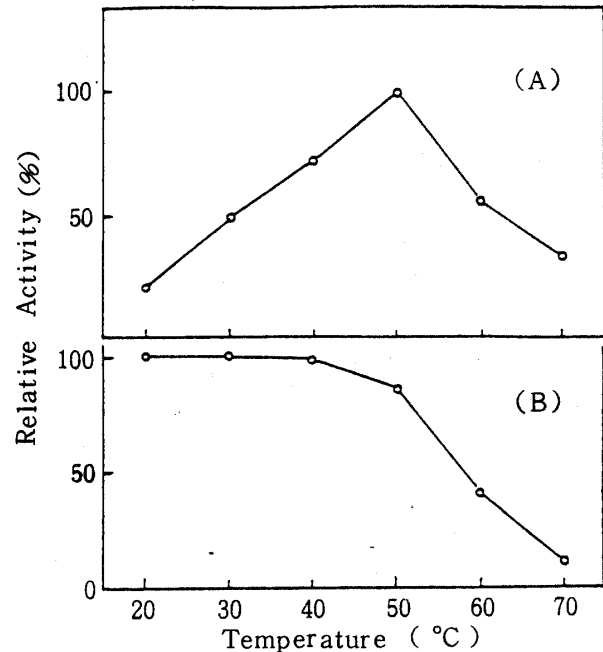


Fig. 2. Effects of temperature on acid phosphatase activity(A) and the stability of the enzyme(B)

(A) The activity was assayed with acetate buffer, pH 5.5, at given temperatures for 30 min. (B) The enzyme solutions in acetate buffer, pH 5.5, were preincubated at given temperatures for 10 min. and the remaining activities were assayed as described in legend to Table 1.

Table 2. Effect of several compounds on acid phosphatase activity

Compound	Relative activity
None	100
MgCl ₂	126
CuSO ₄	110
MnCl ₂	91
NiCl ₂	73
NaF	41
EDTA*	105
EDTA	7
CaCl ₂	4
HgCl ₂ *	92
HgCl ₂	3

Each compound was used at 1.16 mM except EDTA and HgCl₂, shown with asterisk(*), whose concentrations were adjusted to 0.11 mM.

仲宗根：甘蔗茎のNPP-ホスファターゼの性質

矛盾するようであるが、本酵素活性におけるこれらの金属イオンの必要性の有無は今後の研究により明らかにされるであろう。植物の酸性ホスファターゼは、一般に、フッ素イオンによって阻害を受け、阻害の程度は9~55%の範囲にある。本酵素に対してもこの範囲にあった。植物の酸性ホスファターゼには、本酵素のように銅イオンによって阻害を受けない場合と米糠やサツマイモの酵素のように阻害を受ける場合とがある。

5. 基質に対する親和性

Lineweaver - Burkプロットより求めた、本酵素のNPPに対するKmは0.77 mMであった。これはHollander¹⁾およびRossi⁶⁾らの報告と同じレベルにあった。

要 約

登熟甘蔗茎には、パラニトロフェニルリン酸を加水分解する酸性ホスファターゼが存在することを確認した。

蔗汁より、硫酸塩析したのちに酸処理した酵素タンパク画分を、ホスファターゼ酵素標品として用いその性質をしらべた。本酵素は至適pHを5.5にもつ酸性ホスファターゼであった。他の植物起源の酸性ホスファターゼとことなると、本酵素は1 mMのEDTAやカルシウムイオンによりほとんど活性を失なった。本酵素は1 mMの水銀イオンおよびフッ素イオンの阻害を受けたが、銅イオンによっては全く阻害されなかった。また、至適反応温度は50°Cにあって、10分間保持の40°Cまでは安定であった。

本研究に協力された織田有司、田島祐の両氏に謝意を表します。

引 用 文 献

1. Hollander, V. P. 1971 The Enzymes, 4: p449 - 497 New York, Academic Press, Inc.
2. 伊賀上郁夫, 山辺倫, 倉沢文夫, 1975 コメ糠酸性ホスファターゼの多型性と特異性, 農化, 49: 353 - 362
3. Ikawa, T. K. Nishizawa and T. Miwa 1964 Specificities of several acid phosphatases from plant sources, Nature, 203: 939 - 940
4. Kortschak, H. P., C. E. Hartt and G. O. Burr 1965 Carbon dioxide fixation in sugarcane leaves, Plant Physiology, 40: 209 - 213
5. 中村道徳, 山崎鏡次, 丸尾文治- 1951 植物におけるPhosphorylase, phosphatase 及び β -amylaseの分布, 農化, 24: 197 - 201
6. Rossi, A., M. S. Palma, F. A. Leone and M. A. Brigliador 1981 properties of acid phosphatase from scutella of germinating maize seeds, Phytochem., 20: 1823 - 1826
7. Uehara, K., S. Fujimoto, T. Taniguchi and K. Nakai 1974 Studies on violet-colored acid phosphatase of sweet potato, J. Biochem., 75: 639 - 649
8. Yamagata, H., K. Tanaka and Z. Kasai 1980 Purification and characterization of acid phosphatase in aleurone particles of rice grains, Plant & Cell Physiol., 21: 1449 - 1460