

琉球大学学術リポジトリ

甘蔗幹茎酸性インベルターゼに関する研究(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: 知念, 功, 江川, 義和, 外間, 宏一, 四方, 治五郎, Chinen, Isao, Egawa, Yoshikazu, Hokama, Koichi, Yomo, Harugoro メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12000/4239

甘蔗幹茎酸性インベルターゼに関する研究

知念 功*・江川 義和*・外間 宏一*
四方 治五郎*

Isao CHINEN, Yoshikazu EGAWA, Koichi HOKAMA and
Harugoro YOMO. : Studies on acid invertase of sugar
cane stalk

I 結 論

甘蔗幹茎中に存在する酸性インベルターゼは、成長期においては、葉等で合成されてきた蔗糖を分解し、グルコース、フラクトース等のヘキソースにし、そのヘキソースを利用して幹茎等は、急速な増大伸長をする。一方成熟期になると、この幹茎のインベルターゼは、消失し、その蔗糖は幹茎に蓄積されることになる。その蔗糖の蓄積にともない、幹茎では、中性インベルターゼが生成され、それによりその蔗糖濃度は、統制されていると報告されている。³⁾

またこれらの幹茎インベルターゼは、降雨、気温等の気象状況により影響を受け、降雨量が多くなり、気温が上昇した場合には、成長期の甘蔗では、この酸性インベルターゼ活性値が高くなり、それにより幹茎等も急速な増大伸長をおこす。^{1), 2)} 一方、成熟期の甘蔗では、このような場合には、幹茎での蔗糖蓄積量が減少するといわれている。

本研究では、甘蔗幹茎の増大伸長および幹茎での蔗糖蓄積におよぼすこれらインベルターゼの役割を研究することとしている。今回は、その研究の一環として甘蔗幹茎搾汁からこの酸性インベルターゼを抽出し、その抽出酵素について、その酵素活性測定法を検討した。またその酵素をセファデックスゲルカラムクロマトグラフィーにより部分的に精製した。その精製インベルターゼについては、種々の金属塩等の影響を明らかにした。そのためこれらの結果を以下に詳細に記述する。

II 実験方法

1. 甘蔗幹茎酸性インベルターゼの抽出法

株出し後、約3ヶ月生育した甘蔗(NCO310)を刈り取り、よく洗浄したのち、二つ割りにし、それを電動式圧搾機で圧搾し、蔗汁を得た。その蔗汁は、ただちに氷冷したのち、8,000rpmで、30分間冷却遠心分離を行い、上清を得た。その上清部は、硫酸を加えて硫酸飽和とし、冷所(4℃)に、24時間放置したのち、再び8,000rpmで30分間、冷却遠心を行い、硫酸飽和沈澱部を得た。その沈澱部は、蒸留水に溶解したのち、再び12,000rpmで、30分間冷却遠心を行ったのち、その上清は、脱塩等を行う目的で、セファデックスG-25ゲルを用いてゲルろ過を行なった。その活性部分を限界ろ過(分画分子量100,000)により濃縮したのち、凍結乾燥を行ない、得られた粉末を粗酵素として用いた。

* 琉球大学農学部農芸化学科

2. インベルターゼ活性の測定法

市販の蔗糖を用い、0.2M蔗糖溶液を作成し、その溶液1mlを基質として用い、それに先に得られた粗酵素を用いて作成した酵素溶液1ml(酵素量500~1,000 μ g)を加えて、45 $^{\circ}$ Cで、30分間インキュベートし、その間に生成した還元力をSomogi Nelson法⁴⁾で測定した。その得られた値を反応時間30分間当り、酵素量500 μ g当りに生成するグルコース μ g還元力に換算し、インベルターゼ酵素活性値としてあらわした。

3. セファデックスカラムクロマトグラフィー

用いたセファデックスゲルG-25, 150, および200は、それぞれ一定量取り、それに水を加え撹拌したのち、煮沸浴槽に入れて加熱し、十分ゲル化したものについて、G-25ゲルの場合は、3 \times 30cmカラムにつめて、甘蔗幹茎搾汁硫酸飽和沈澱物の脱塩³⁾として用いた。G-150およびG-200ゲルの場合は、0.1M食塩水を加えた0.001Mリン酸緩衝液(pH7)で平衡化したのち、1.6 \times 85cmカラムにつめ、同緩衝液に溶解した試料3ml(タンパク量100 μ g)のをせ、同緩衝液で溶出した。得られる各分画(5ml)については、波長280nmの紫外部吸収を分光光度計で測定し、タンパク量を求めると共に、インベルターゼ活性を測定し、甘蔗幹茎インベルターゼの精製に用いた。

4. ディスクポリアクリルアミド電気泳動法⁵⁾

7.5%アクリルアミド溶液(pH9.4)を5 \times 70mmチューブにつめ、試料用ゲル(タンパク質含量50~200 μ g)をつめたのち、室温で、1チューブ当り2mAの電流を約2時間程流し、泳動を行なった。なおマーカーとしては、0.005%ブロムチモブルーを用いた。染色には、0.044% Coomassie Brilliant Blue 溶液に、泳動を行なったゲルを40分ないし1時間浸漬した。脱色は、酢酸:メタノール:水(8:7:85, v/v/v)溶液に、同ゲルを浸して、約40 $^{\circ}$ Cに加温した。

III 実験結果

1. 甘蔗幹茎中の酸性インベルターゼ活性測定条件の設定

1) 基質として用いる0.2M蔗糖溶液のpHの影響

基質として用いる蔗糖溶液は、塩酸等の酸により加水分解を受けるため、本研究では、pH3から9までのMcIlvaine氏緩衝液を作成し、それらの緩衝液を用いて0.2M蔗糖溶液を作りその溶液を、45 $^{\circ}$ Cで、30分間インキュベートしたのち、その溶液中の還元力を測定し、基質蔗糖溶液のpHの影響を調べた。その結果を、Fig. 1に示した。その結果、pH5.5から9までの緩衝液で作成した蔗糖溶液では、その還元力はほとんど一定であり、その還元力は、もともと蔗糖中に混在する単糖類等によるものと思われる。pH5以下で作成した蔗糖溶液では、pHが低くなるにつれ、その溶液中の還元力も増大し、用いる緩衝液のpHにより影響を受けた。そのため、pH5以下の緩衝液で作成した基質蔗糖溶液を用いる場合は、その緩衝液のpHにより生成する還元力を測定し、その値を差引くことにした。またpH5.5以上の緩衝液で基質蔗糖溶液を作成する場合も、その蔗糖自身に混在すると思われる還元力を測定し、その値を差引くことにした。

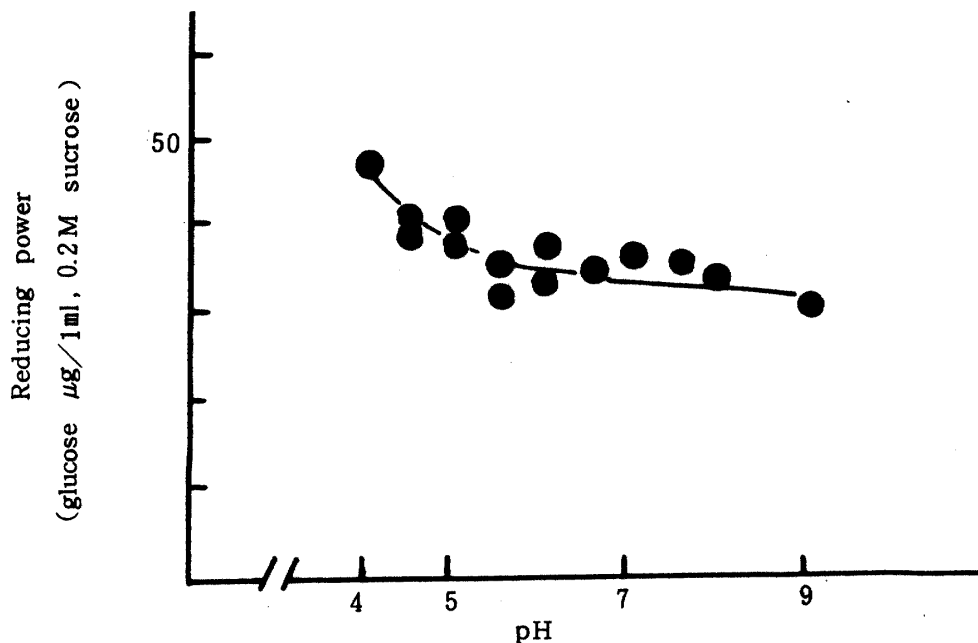


Fig. 1. Hydrolysis of sucrose by pH

2) 酵素濃度の影響

先に調製したこの酸性インベルターゼ粗酵素を、100 μ gから1,000 μ gまで用いて、それぞれ濃度のことなる酵素液を調製し、その液1mlに、0.2M蔗糖基質溶液(pH5.5)1mlを加え、45 $^{\circ}$ Cで、30分間反応を行い、その間に生成してくる還元力を測定し、インベルターゼ活性を求めて、その酵素反応におよぼす酵素濃度の影響を調べた。その結果をFig. 2に示した。その結果、本酵素反応では、酵素量1,000

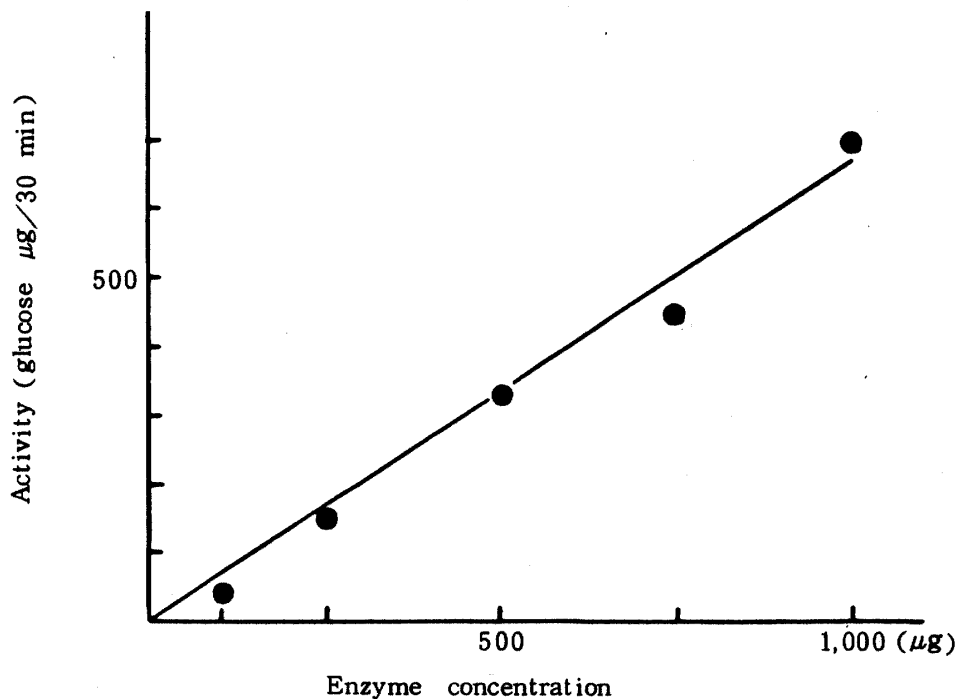


Fig. 2. Relationship of sugar cane invertase activity to enzyme concentration

μg を含む酵素溶液でも、その活性は、酵素量に比例した。そのため本研究では、そのインベルターゼ活性を測定するにあたっては、酵素量は、その酵素の節約上、酵素量 $500\mu\text{g}$ を含む酵素溶液を用いることにした。

3) 反応時間の影響

前述の項と同様に、酵素量 $500\mu\text{g}$ を含む酵素溶液 1ml に、 0.2M 蔗糖基質溶液 1ml を加えた反応物を準備し、その反応物を、それぞれ10分から180分間までそれぞれ反応時間を変えて 45°C で反応を行い、その間に生成する還元力を測定し、その酵素活性を求めて、その酵素反応におよぼす反応時間の影響を調べた。その結果、本酵素反応による本酵素活性は、反応時間180分間まで、比例的に増大し、直線関係が得られた。そのため本研究では、本酵素反応の反応時間は、便宜上、30分間行なうことにした。その結果を、Fig. 3に示した。

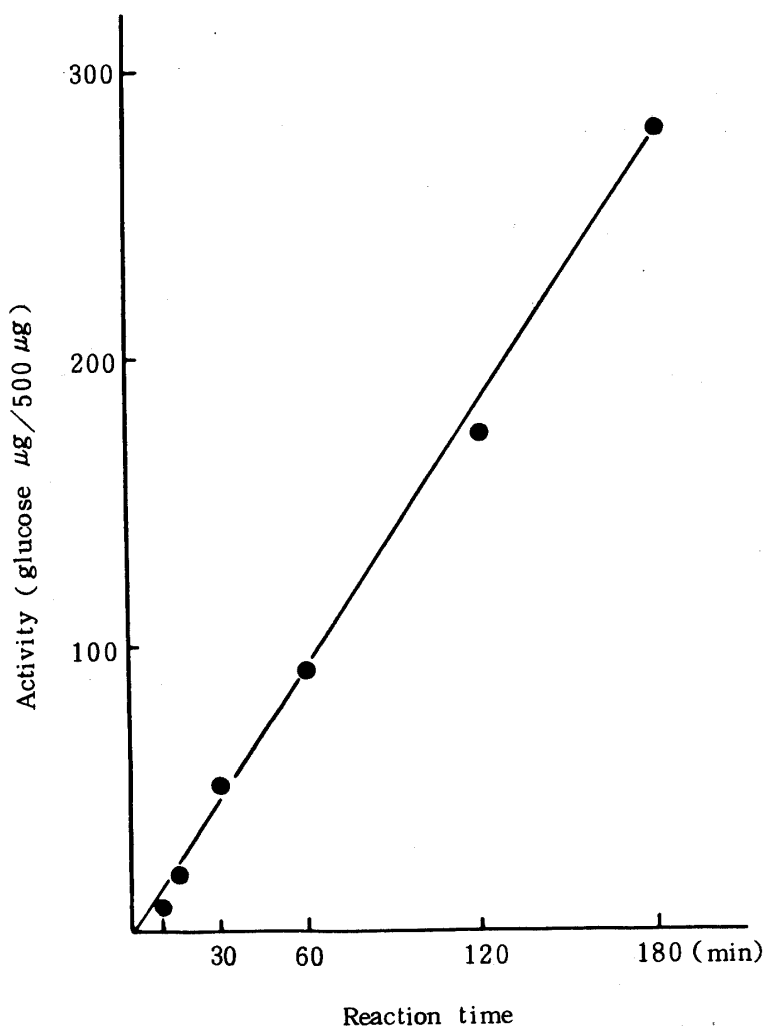


Fig. 3. Acid invertase activity as a function of incubation time

4) 反応温度の影響

前項と同様に、同酵素溶液 1 ml, 同基質溶液を加えたものを用意し、それを 30℃ から 60℃ まで種々温度を変えて各々 30 分間反応し、その間に生成する還元力を各々測定して、本酵素反応の反応温度と酵素活性の関係を調べた。その結果、本酵素活性は、反応温度 45℃ で、ピークに達した。その結果は、Fig. 4 に示した。そのため本研究では、本酵素反応の反応温度は、45℃ で行なうことにした。

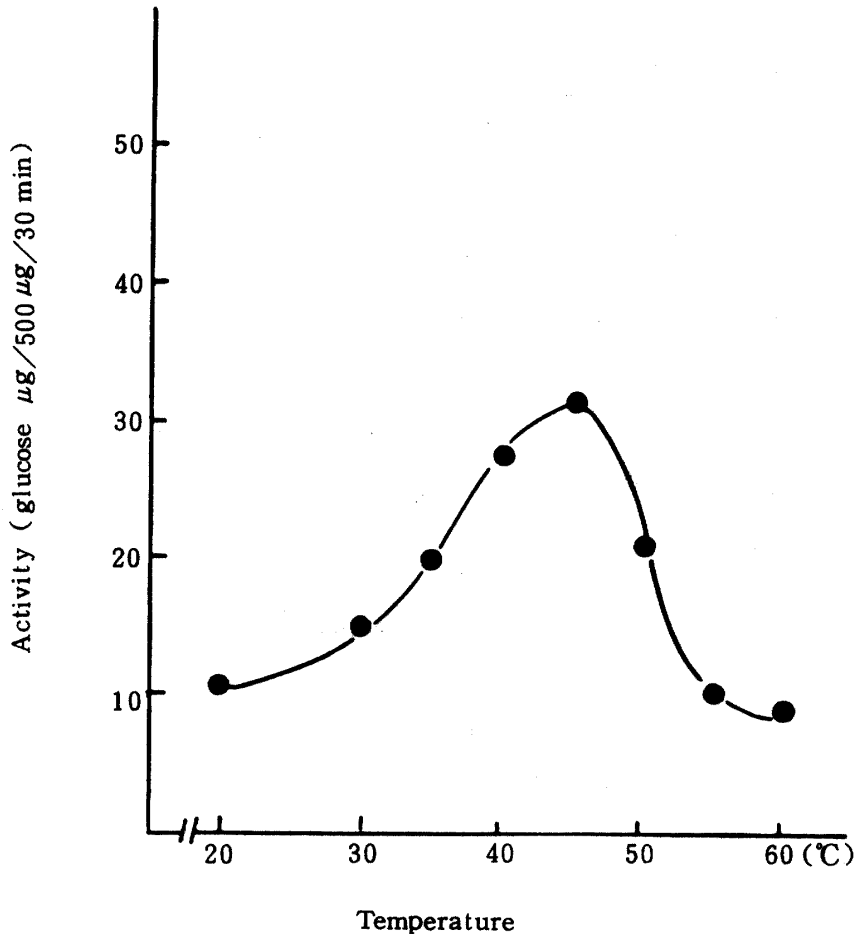


Fig. 4. Relationship of acid invertase activity to Reaction Temperature

5) 反応pHの影響

pH 4 から 9 まで、種々 pH のことなる McIlvaine 氏緩衝液を調製し、その緩衝液を用いて、例の様に、酵素および基質溶液を作成し、その溶液を各々 1 ml ずつ取り、45℃ で、30 分間インキュベートを行い、その間に生成する還元力を各々の pH で調製した反応系について測定し、本酵素反応の酵素活性値と反応 pH の関係を調べた。その結果、本酵素活性値は、pH 5.5 で、ピークに達した。pH 7.5 以上では、本酵素活性は、見られなかった。また pH 4 以下でも、その活性は、見られなかった。そのため本研究では、本酵素反応の反応 pH は、pH 5.5 で行なった。(Fig. 5)

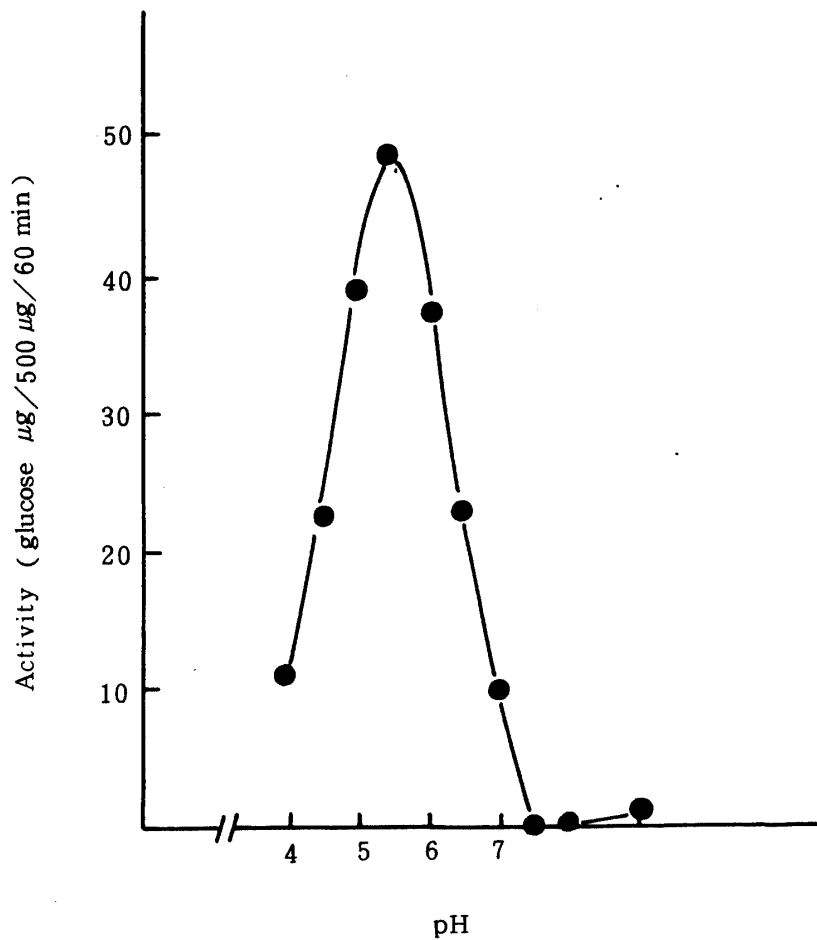


Fig. 5. pH dependence of sugar cane invertase activity

6) 基質溶液の濃度の影響

0.1 Mから1 Mまでの種々の濃度のことなる蔗糖基質溶液を調製し、その溶液1 mlに、例のように酵素溶液1 mlを加えて、45°Cで、30分間インキュベートし、その間に生成した還元力を測定し、本酵素活性値と基質溶液の濃度との関係を調べた。その結果、本酵素活性値は、0.4 Mまでの基質濃度では、基質濃度の増加と共に、増加したが、0.4 M以上の基質濃度では、本酵素活性値は、たえず一定値を保った。本研究で用いている蔗糖には、0.3%のグルコースを含むため、0.4 M濃度の蔗糖基質溶液を調製すると、その溶液自身に含まれる還元力の影響が大であるため、本研究では、用いる基質溶液の濃度は、0.2 M濃度で調製した。その結果をFig. 6に示した。

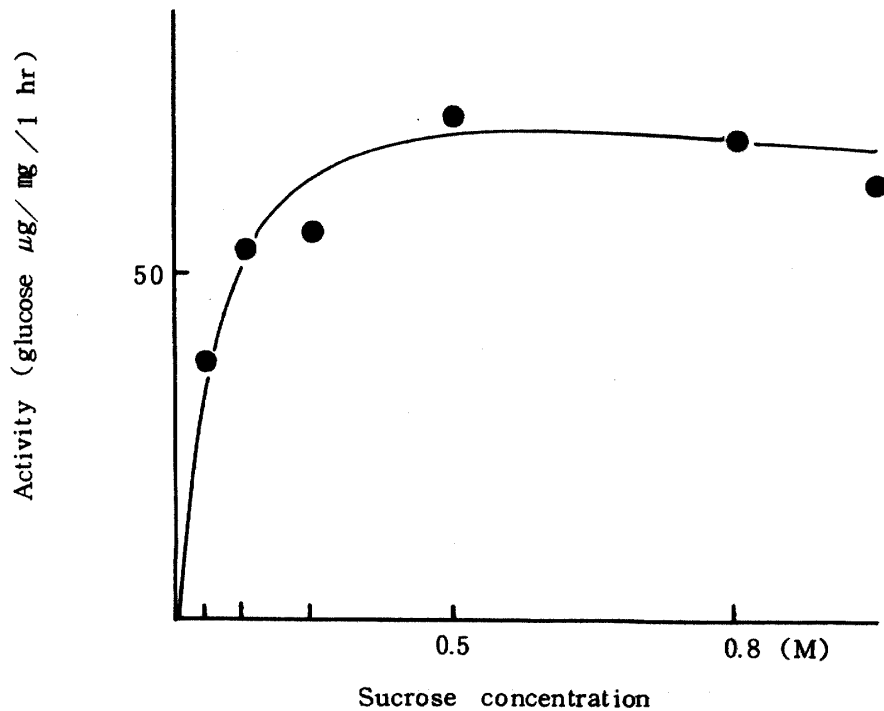


Fig. 6. Effect of sucrose concentration on invertase activity

2. 酸性インベルターゼの分布

成長期の甘蔗幹基全体および成熟期の甘蔗幹基上部と下部について、糖度と酸性インベルターゼ活性を測定し、本酵素の分布と糖濃度との関係を調べた。その結果、成長期の甘蔗幹基では、糖濃度は、Brix 7で、低い値であったが、その酵素の比活性値は、高い値を示し、その酵素 500 μg 当り、30分間で、35 μg のグルコース還元力を示した。ところが成熟期の甘蔗幹基では、その上部は、糖濃度は Brix 13 であり、成長期のそれより約 2 倍も高い値であったが、その酵素活性は、低く、15.7 μg グルコース還元力を示し、成長期のその活性値のほぼ半分であった。また下部は、糖濃度が最も高く、Brix 18 であったが、その酵素活性値は、見られなかった。そのため本研究では、この酸性インベルターゼを調製する際には、用いる甘蔗幹基は、糖濃度の低い、成長期の甘蔗幹基を選択することにした。その結果は、Table 1. に示した。

Table 1. Distribution of acid invertase in sugar cane stalk

	Sugar conc. (Brix)	Activity (Glucose $\mu\text{g} / 500 \mu\text{g} / 30 \text{ min}$)
Immature	7	35
Mature		
Upper part	13	15.7
Lower part	18	0

3. セファデックスカラムクロマトグラフィーによる酸性インベルターゼの精製

成長期の甘蔗幹茎より、調製し、得られた粗酸性インベルターゼをさらに精製するためその粗酵素液を、セファデックスG-150ゲルをつめたカラムを用いて、ゲルろ過を行なった。その結果、フラクション13とフラクション30付近で、主要タンパクピークが、2つ溶出したが、そのインベルターゼ活性は、その両タンパクピークの中間のフラクション17付近でピークが見られた。(Fig. 7), その活

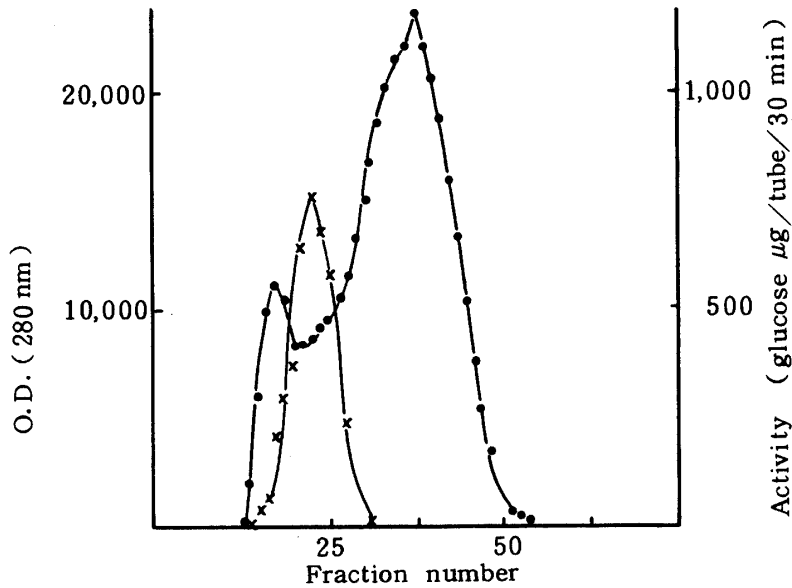


Fig. 7. Elution profile of immature sugar cane acid invertase on a Sephadex G-150 column

●—● Protein concentration
×—× Activity

性の存在する分画を、さらに精製するため、今度は、この分画を、セファデックスG-200ゲルをつめたカラムを用いて、ゲルろ過を行なった。その結果は、Fig. 8に示した。その結果、フラクション25附

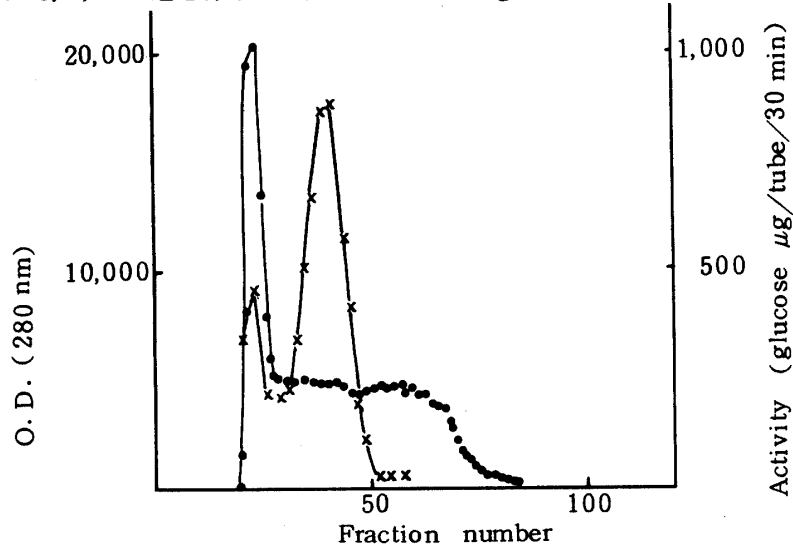


Fig. 8. Sephadex G-200 column chromatography of fraction II obtained by the Sephadex G-150 column chromatography

●—● Protein concentration.
×—× Activity

近で、主要タンパクピークが、溶出してきたが、インベルターゼ活性は、その主要タンパクピーク部には、わずかに見られ、大部分の活性は、そのタンパクピークの直後のフラクション40附近で大きいピークとなってあらわれた。これらのセファデックスカラムクロマトグラフィーによって得られた精製過程

Table 2. Purification of sugar cane acid invertase by Sephadex column chromatography

	Activity (Glucose $\mu\text{g}/500\mu\text{g}/30\text{ min}$)	Purification
Crude	35	1
G - 150	120	3.43
G - 200	167.2	4.78

は、Table 2にまとめた。その結果、この粗インベルターゼ酵素は、このセファデックスG-150で、ゲルろ過を行なうことにより、比活性が、120になり、その純化倍率は、3.43倍になった。またセファデックスG-200でカラムクロマトグラフィーにかけると、その比活性値は、主要活性分画で、167であった。またその純化率は、4.78倍になった。これらの精製活性分画をポリアクリルアミドゲルディスク電気活動により、その純度を調べた結果、この精製酵素は、8つのタンパクバンドが見られた。(Fig. 9)

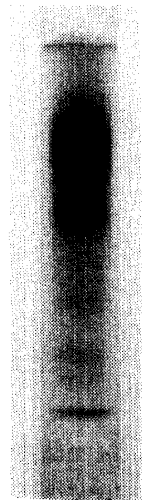


Fig. 9. Polyacrylamide gel electrophoresis of acid invertase purified by Sephadex G-200 gel column chromatography

4. 精製酸性インベルターゼの活性におよぼす塩類等の影響

上述の方法により、精製したこの酸性インベルターゼの諸性質を知るひとつとして、本酵素活性におよぼす塩類等の影響を調べた。その結果、本酵素活性は、塩化水銀、PCMB、塩化マンガンにより著しく阻害を受け、完全に活性を失なった。また塩化亜鉛、硝酸銀、酢酸鉛によっても本酵素活性は、50%以上阻害を受けた。塩化カルシューム、塩化カリ、塩化コバルトによつては、本酵素活性は、ほとんど影響を受けなかった。これらの結果については、Table 3 に示した。また本酵素活性と塩化水銀、塩化

Table 3. Effect of various salts on sugar cane acid invertase activity

		Activity	
		Glucose $\mu\text{g}/500\mu\text{g}/30\text{ min}$	%
None		167.2	100
EDTA	($2.5 \times 10^{-4}\text{M}$)	187.2	112.0
KCl	(" ")	178.4	106.7
CaCl ₂	(" ")	166.6	99.3
CoCl ₂	(" ")	161.2	96.4
CdCl ₂	(" ")	106.5	63.4
ZnCl ₂	(" ")	72.8	43.5
HgCl ₂	(" ")	0	0
PCMB	(1.4×10^{-4} ")	0	0
MnCl ₂	(2.5×10^{-4} ")	0	0
CuSO ₄	(" ")	8.7	5.7
AgNO ₃	(" ")	41.7	26.4
C ₂ H ₃ O ₂ Pb	(" ")	85.84	54.3
FeCl ₂	(" ")	121.0	76.6

亜鉛、塩化カドミニウム等の濃度との関係を調べ、その結果を Table 4 に示した。塩化水銀の場合は、反応系内のその濃度が、250 μM で、本酵素は、完全に失活した。塩化亜鉛の場合は、10 mM で、その酵素は、90%失活した。

Table 4. Effect of concentration in various salts on sugar cane acid invertase activity

	Activity	
	Glucose / 500 μ g / 30 min	%
None	167.2	0
HgCl ₂ (250 μ M)	0	0
(50 ")	28.0	16.6
(1 ")	32.0	19.1
(0.1 ")	22.0	13.2
ZnCl ₂ (10 mM)	17.2	10.3
(5 ")	39.8	23.2
(1 ")	43.5	72.8
(0.5 ")	159.2	95.2
CdCl ₂ (10 ")	0	0
(5 ")	22.8	14.6
(1 ")	106.0	63.4
(0.5 ")	138.8	83.2

IV 考 察

基質として用いている蔗糖溶液のpHによる影響を調べた結果、pH 3.5以下では、この基質溶液中のほとんどの蔗糖が、このpHにより、加水分解を受けるため、pH 3.5以下で本酵素活性を測定する際には、そのpHの影響を受けるため、その活性測定は、困難となる。またpH 3.5～5.5の場合も、その酵素活性を測定するには、そのpHにより生成する還元力を差引く必要がある。またpH 5.5以上の場合には、用いる蔗糖自身に含まれる還元力を差引く必要がある。

本研究で調べた³⁾甘蔗幹基酸性インベルターゼの至適pHは、5.5であることがわかったが、この値は、M. D. Hatchらの報告している未熟甘蔗インベルターゼの至適pH値とよく一致している。また種々植物体中のインベルターゼ活性の至適pHについては、これまでに数多くの報告がなされており、ソテツ⁶⁾では、4.0、チュリップおよびヤマユリの花粉⁷⁾では、4.0、ザクロの花⁷⁾では、5.2、ホウセンカ、ツバキ、サザンカ、チャ、シュロ、クロマツの花⁷⁾では、5.5～6.1、甜菜の結合型サッカラーゼでは、4.6、ナツメヤシでは、4.6となっている。一般的に、植物体中のインベルターゼ活性の至適pHは、これらの報告から判断すると、その値は4.0～6.1間に存在し、酸性側にその値が存在する傾向があるといえよう。

また本研究で行なった本酵素活性の至適反応温度は、45℃であった。その至適反応温度については、チュリップやヤマユリの花粉⁷⁾で調べられており、その値は、35～45℃と報告されている。また甜菜の結合型サッカラーゼでは、その値は、50℃と報告されている。本研究で得られたこの至適反応温度の値は、この両報告で得られた値のほぼ中間の値になっている。

甘蔗幹基搾汁の硫酸飽和沈澱分画中のタンパク質は、この分画をセファデックスカラムクロマトグラ

フィにかけて得られる溶出液中のタンパク質量を比較した場合、成長期の甘蔗の方が、成熟期の甘蔗よりも、高い値を示していた。また、酸性インベルターゼの活性値も、成長期の甘蔗で高い値が得られていることから、成長期の甘蔗幹茎では、タンパク合成能等が盛であり、それに共い甘蔗幹茎の急速伸長増大に関与していると思われる酸性インベルターゼ活性等も高くなるものと思われる。その幹茎の伸長増大が完了する成熟期では、タンパク合成能が減少し、この酸性インベルターゼ活性も減少し、それにともない幹茎での蔗糖蓄積がおこるものと推定される。

この甘蔗幹茎インベルターゼを、セファデックスゲルG-150 および G-200 を用いて、ゲルろ過を行い、得られる精製酵素をディスクゲル電気泳動法により純度を調べた結果、8つのバンドが見られたが、このバンド数は、セファデックスG-200で、この酵素をゲルろ過を行なった場合、2個の活性ピークが見られること、そのゲルろ過で得られる第2番目の活性ピークの幅が広いことなどから、恐らくは、このバンド数は、この甘蔗幹茎中に存在する酸性インベルターゼは、アイソザイムとして存在し、そのアイソザイムによるものとも考えられる。

本酵素活性におよぼす種々の金属塩等の影響を調べた結果、本酵素は、 Mn^{2+} , Hg^{2+} , Fe^{2+} , Cu^{2+} , PCMB 等で阻害をうけることがわかったが、チューリップ、ヤマユリの花粉のインベルターゼも、 Mn^{2+} で阻害をうけ、また甜菜の結合型サッカラーゼは、 Fe^{2+} , Hg^{2+} , PCMB で阻害を受けると報告されている。この甘蔗の酸性インベルターゼは、 Mn^{2+} で阻害をうける点は、チューリップ、ヤマユリの花粉のインベルターゼと共通し、 Fe^{2+} , Hg^{2+} , PCMB で阻害をうける点は、甜菜の結合型サッカラーゼと共通している。

V 要 約

成長期の甘蔗幹茎搾汁より、硫酸飽和沈澱法により、酸性インベルターゼを調製した。その調製粗酸性インベルターゼを用いて、その酵素活性測定条件を検討した。本酵素反応のpHは、5.5であり、温度は、45℃であった。次にこの調製粗インベルターゼを、ゲルろ過法により精製した結果、セファデックスゲルG-150を用いて精製した場合、その活性分画の純化倍率は、3.43倍になった。またこの活性分画をセファデックスゲルG-200を用いて精製すると、2つの活性ピークがみられた。その両ピークのうち、主要活性ピークの純化倍率は、4.78倍であった。この精製酵素を、ディスクゲル電気泳動法で、純度を調べた結果この製精酵素では、8つのバンドが見られた。この精製酸性インベルターゼは、塩化水銀、塩化マンガン、硫酸銅、PCMB等で著しく阻害を受けることがわかった。

謝 辞

本研究を終えるにあたり、甘蔗を提供したり、それを圧搾するにあたり、種々ご協力下さいました、琉球農業試験場化学室の与古田幹也氏に、深くお礼申し上げます。

参 考 文 献

1. Hatch M. D and K. T. Glasziou 1963 Sugar Accumulation Cycle in Sugar cane. II. Relationship of Invertase Activity to Sugar Content and Growth Rate in Storage Tissue of Plants Grown in Controlled Environments. *Plant physiol.* **38** 344-348 (1963)
2. Hatch M. D, J. A. Sacher, and K. T. Glasziou 1963 Sugar Accumulation Cycle in Sugar Cane. I. Studies on Enzymes of the Cycle.

- Plant physiol. **38** 338-342
3. Gayler K. R. and K. T. Glasziou 1972 Physiologica Functions of Acid and Neutral Invertases in Growth and Sugar Storage in Sugar Cane. *Physiol Plant.* **27** 25 ~ 31
 4. 安藤鋭郎他編集 1969 生化学研究法 I P255 朝倉書店
 5. 菊谷元資 1969 DISC 電気泳動法 化学と生物 **7** 545
 6. Hara A. M. Yamamoto Y. Horita and T. Watanabe 1972 Invertase of Cell Walls from Cycard Pollen *Mem. Faculty Agr. Kagoshima Univ.* **8**(2) 27.
 7. 中村紀雄, 新井勇治, 岩波洋造 1975 花粉のショ糖合成酵素とインベルターゼの性質 *農化* **49**(9)469~474
 8. 増田宏志, 菅原四郎 1973 甜菜主根スライス中に発現する結合型サッカラーゼの塩類による可溶化, *農化* **47**(3)147~152
 9. Hasegawa S and Dara C. Smolensky 1970 Date Invertase : Properties and Activity Associated with Maturation and Quality. *J. Agr. Food Chem* **18**(15) 902

Summary

Crude acid invertase was prepared from juice of sugar cane stalk by saturated ammonium sulfate precipitation. Assay condition for the enzyme was investigated; reaction pH was 5.5 and temperature 45°C.

Two peaks of acid invertase activity were obtained by partial purification from the crude enzyme by Sephadex G-150 and G-200 gel column chromatography and specific activity of the main active peak was 4.78 fold increase.

The acid invertase purified revealed eight bands by poly acrylamide disc gel electrophoresis and were significantly inactivated by HgCl₂, MnCl₂, CuSO₄ and PCMB.