

大豆・エンドウ発芽種子子葉のフォスフォエノール ピルビン酸カルボキシラーゼの部分精製と性質について*

竹内章夫**, 藤井ミチ子, 下尾賢次, 木田幸一郎

(大阪府立大学農学部農芸化学科)

昭和 48 年 5 月 23 日 受 理

Partial Purification and Properties of Phosphoenolpyruvate- carboxylases from Soybean and Pea Cotyledon (Studies on Enzymes Catalyzing Reaction between Phosphoenolpyruvate and Oxalacetate on Germinating Seeds Containing Different Reserved Substances Part II)

By Akio TAKEUCHI, ** Michiko FUJII, Kenji SHIMOO
and Koichiro HONDA

*Department of Agricultural Chemistry, College of Agriculture
University of Osaka Prefecture*

The activity of phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC) of soybean cotyledon rapidly reduced with germination and that of pea cotyledon showed the maximum on the 5th day after germination. The enzymes were extracted from the 3rd day soybean cotyledon after germination and from the 5th day pea cotyledon and purified partially, and some properties of both enzymes were studied.

Optimum pH values of both enzymes were about 8.7 and they required Mg ion but not reductant for the activity. K_m values for PEP and $MgCl_2$ were 0.11 mM and 0.095 mM on PEPC from soybean, and 0.084 mM and 0.071 mM on PEPC from pea, respectively. Both enzymes were inhibited by citrate, isocitrate and nucleotides and pea enzyme was also inhibited by succinate. Consequently, both PEPC's were thought to have similar enzymatic properties. The physiological significance of PEPC of soybean might be difficult to consider, since the activity rapidly decreases after germination and the K_m values for ligands are comparatively large. On the contrary, the PEPC of pea might have anaplerotic functions in metabolic regulation. (Received May 23, 1973)

** Present address: Aichi Medical University

緒 言

貯蔵物質の異なる発芽種子における PEP と OAA 反応を触媒する酵素の調節機作を明らかにすることを目的とし、前報に引き続き大豆とエンドウについて実験を行なった。各子葉からフォスフォエノールピルビン酸カル

ボキシラーゼ (PEPC) [E. C. 4. 1. 1. 31] を分離精製し、その諸性質を検討して、代謝調節の面から考察を行なったのでその概要を報告する。

実 験 方 法

1. 実験材料, 生育条件, 試薬, 酵素液の調製および蛋白質の定量 すべて前報⁽¹⁾と同じである。
2. 酵素活性測定法 1) 粗酵素液の活性測定法: 大豆, エンドウとも前報⁽¹⁾の Table I の方法と同じである。2) 精製酵素の活性測定法: 精製した大豆, エン

* 貯蔵物質を異にする発芽種子のフォスフォエノールピルビン酸とオキサロ酢酸の間の反応を触媒する酵素についての研究 (第 2 報)。

** 現在, 愛知医科大学大学生化学研究室。

ドウの PEPC の活性は 30°C で, 次のごとく測定した。160 μ mole トリス塩酸緩衝液 (pH 8.7), 20 μ mole NaHCO₃, 8 μ mole PEP, 4 μ mole MgCl₂, 2 μ mole グルタチオン, 0.5 μ mole NADH, 5.5 unit リンゴ酸脱水素酵素の混合液を 3 分間インキュベートし, 酵素液を加え全量を 2 ml とし反応を開始し, 活性は日立 124 型分光光度計を用いて測定し, NADH の 340nm における吸光度の減少速度から求めた。対照としては, 上の反応液組成から PEP を除いたものを使用した。

実験結果

1. 発芽に伴う PEPC 活性の消長

前報で報告したように, 大豆・エンドウとも PEPC の存在が認められ, 発芽に伴って Fig. 1 のように変化する。大豆は発芽後活性減少を続け, 8 日目からはば一定となった。エンドウでは発芽 2 日目まで活性減少がみられるが, 以後徐々に増加して 5 日目にピークを示した。両者とも PEP 生成反応は, 10 日目までほとんど認められなかった。

2. 大豆子葉 PEPC の精製

暗発芽 3 日目の大豆子葉を 125g 採取し, 50mM リン酸緩衝液 (pH 7.5) 250ml とともに磨砕した。ガーゼで濾過後, 9500×g, 30 分間遠心分離して, 上澄液 275ml を得た。操作は 0~5°C で行なった。緩衝液は記載のな

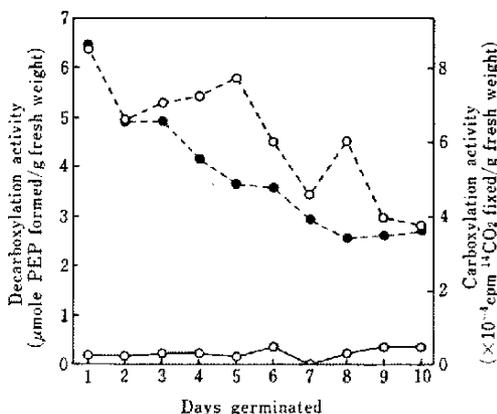


Fig. 1. Changes in the Activities of PEPC during Germination of Soybean and Pea Cotyledon.

—●— carboxylation activity of soybean,
 --○-- carboxylation activity of pea,
 -○- decarboxylation activity of pea.

Assay conditions were the same as described in former paper.

い限り, すべて 1mM EDTA, 10mM メルカプトエタノールを含む。

1 回目硫酸分画: 上で得られた上澄液 275ml に結晶硫酸を加え 50% 飽和にした後, 9500×g, 30 分間遠心分離して沈殿を集め, これを 100ml の 5mM リン酸緩衝液に溶かし, 同緩衝液 2l に対して 3 時間透析した後, 9500×g, 30 分間遠心分離して上澄液 138ml を得た。

2 回目硫酸分画: 上で得られた上澄液に硫酸を加え, 25~45% 飽和の間の沈殿を集めた。沈殿は 5mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) の少量に溶かし, 同緩衝液 2l に対して, 一度透析液を取り換えて 10 時間透析した後, 遠心分離し酵素液 36.5ml を得た。

DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィー: あらかじめ 5mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) で平衡化した DEAE-セルロースカラム (2.9×50cm) に, 上で得られた酵素液の 25ml を吸着させた。5mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) 300ml を流し, ついで 5mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) 800ml と 0.45M NaCl を含む 5mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) 800ml で直線的に塩濃度を高めて酵素を溶出した。活性ピークは, NaCl 濃度 0.2M 付近で溶出された。活性画分 230ml に結晶硫酸を加えて 45% 飽和とし, 遠心分離し, 沈殿を 20mM トリス塩酸緩衝液 (1mM MgCl₂, 10mM メルカプトエタノール含有, pH 8.0) に溶かし, 同緩衝液に透析後, 遠心分離して酵素液 7.7ml を得た。

セファデックス G-100 カラムクロマトグラフィー: 20mM トリス塩酸緩衝液 (1mM MgCl₂, 10mM メルカプトエタノール含有, pH 8.0) で平衡化したセファデックス G-100 カラム (2.5×40cm) に上で得られた酵素液 4ml を流した。酵素は void volume 付近に溶出した (Fig. 2)。活性画分を集め 45% 硫酸飽和とし, 生じた沈殿を上で使用した MgCl₂ を含む緩衝液に溶かし, 透析後遠心分離して 1.53ml の酵素液を得た。

Table I に全量を処理したときの結果を示した。大豆 PEPC の実験には, 比活性の最も高い DEAE-セルロース画分の酵素液を使用した。

3. 大豆 PEPC の性質

精製標品は 4°C 保存で 1 週間に 30% 失活したが, 3 週間目からは失活速度が遅くなった。トリス塩酸緩衝液を使用したとき, Fig. 3 に示したように最適 pH は約 8.7 であった。PEP および MgCl₂ の飽和曲線は Michaelis-Menten 型となり, その Lineweaver-Burk プロットが

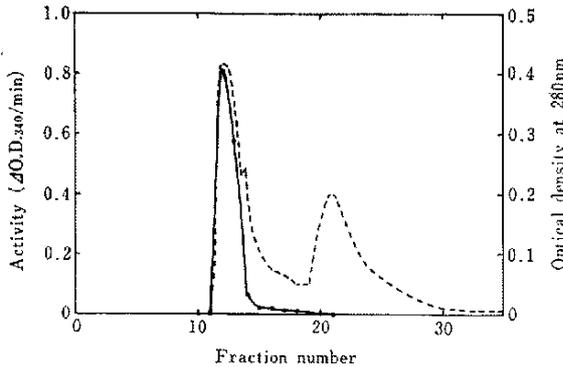


Fig. 2. Elution Pattern of PEP-Carboxylase of Soybean Cotyledon from Sephadex G-100 Column. ●—enzyme activity, ---- optical density at 280 nm.

Table I. Purification of PEPC from Soybean Cotyledon

Fraction	Total protein (mg)	Volume (ml)	Total activity (unit)*	Specific activity (unit/mg)	Recovery (%)	Fold
Homogenate	25520	275	130	0.0051	100	1
(NH ₄) ₂ SO ₄ , 0~50%	4747	138	114	0.0239	87	4.7
(NH ₄) ₂ SO ₄ , 25~45%	4125	36.5	120	0.0292	93	5.7
DEAE-Cellulose column	225	11.2	45.7	0.203	35	40
Sephadex G-100 column	17.2	4.3	2.9	0.169	2	33

* μmole of NADH reduced/min. Assay conditions were described in the text.

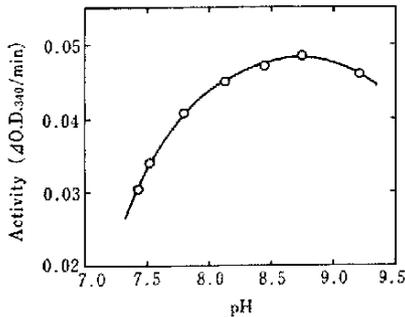


Fig. 3. Effect on pH on the Activity of PEPC from Soybean Cotyledon.

Assay conditions were the same as described in the text except for the use of pH values.

ら, *K_m* 値は PEP が 0.11 mM, MgCl₂ で 0.95 mM であった。基質である NaHCO₃ を加えなくても 69% の活性を示し, 溶存している HCO₃⁻ だけでも反応が進むと考えられる。Mg イオンは必須であり, Mn イオンで 32% の活性しか示さなかった。グルタチオンは活性に影響しなかった。

4. エンドウ PEPC の精製

暗発芽 3 日目のエンドウ子葉 192 g を採取し, 以下, 大豆 PEPC と同様の操作を行なった。

硫安分画: 磨砕液に結晶硫安を添加して, 25~40% 飽和画分を集めた。

DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィー: 大豆の場合と異なり 20 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) を使用し, カラムより溶出するときには 0.6 M KCl を含むものを用いた。活性は KCl 濃度 0.3 M をピークに, 多少広い範囲に溶出した。

セファテックス G-200 カラムクロマトグラフィー: 20 mM リン酸緩衝液で平衡化したものを用い溶出した。活性画分に硫安を加えて 40% 飽和とし,

遠心分離して沈殿を集めた。沈殿は 40% 飽和硫安溶液に懸濁して保存し, 使用時に, 20 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) で透析して用いた。各段階での精製度を Table II にまとめた。

5. エンドウ PEPC の性質

酵素は 40% 飽和硫安溶液として保存すると, 大豆の酵素にくらべてかなり安定であるが,

8 mM 以上の硫安の存在下では 30% の阻害が認められた。トリス塩酸緩衝液を使用したときの pH の影響は Fig. 4 のとおりで, 最適 pH は 8.7 であった。PEP, MgCl₂ の飽和曲線は Michaelis-Menten 型で, *K_m* 値は

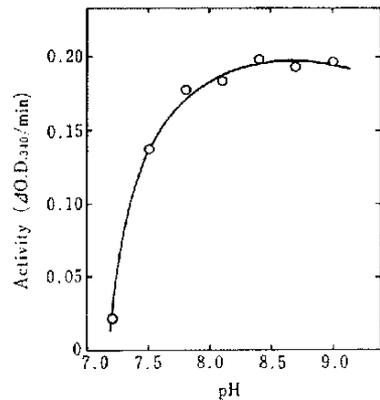


Fig. 4. Effect of pH on the Activity of PEPC from Pea Cotyledon.

Assay conditions were the same as described in the text except for pH values.

Table II. Purification of PEPC from Pea Cotyledon

Fraction	Total protein (mg)	Volume (ml)	Total activity (unit)*	Specific activity (unit/mg)	Recovery (%)	Fold
Homogenate	8819.2	416	183.9	0.021	100	1
(NH ₄) ₂ SO ₄ , 25~40%	990.0	50	110.6	0.112	60.1	5.3
DEAE-Cellulose column	48.0	3.3	21.2	0.442	11.5	21.1
Sephadex G-200 Column	3.8	1.1	6.6	1.718	3.6	81.8

* μ mole of NADH reduced/min. Assay conditions were described in the text.

PEP が 0.084mM, MgCl₂ が 0.071mM であり, 大豆に比して小さい. NaHCO₃ がなくても活性は変わらず, HCO₃⁻ の親和性が非常に高いと考えられる. Mg イオンは必須であるが, Mn イオンでも 80% の活性を示した. グルタチオンは活性には影響しなかった.

6. 大豆およびエンドウ PEPC の代謝中間体による影響

大豆およびエンドウの酵素に対するアミノ酸, TCA サイクル中間体, グリコリシス中間体の影響を Table III に示した. 大豆・エンドウ酵素はともに, クエン酸, イソクエン酸により阻害され, その型式は拮抗阻害であった. エンドウ酵素はコハク酸によっても阻害された. Fig. 5 に, MgCl₂ の濃度によるクエン酸の酵素活性に及

Table III. Effect of Various Intermediates on the Activity of PEPC from Soybean and Pea Cotyledons

Compound	Inhibition (%)	
	Soybean	Pea
Aspartic acid	3.2	2.5
Homoserine	2.2	2.4
Threonine	3.7	3.7
Serine	0	0.5
Lysine	0	0.2
Glutamic acid	0	2.1
Alanine	0	1.6
Proline	0	0
Glutamine	0	1.8
Asparagine	0	3.1
α -Ketoglutaric acid	0	2.0
Succinic acid	4.9	13.8
Isocitric acid	7.7	19.2
Citric acid	14.7	22.2
Glucose-1-phosphate	4.5	2.7
Glucose-6-phosphate	3.6	4.0
Fructose-6-phosphate	0	2.2
Pyruvic acid	1.5	4.1

Assay conditions were the same as described in the text except for the addition of 5mM indicated intermediates.

ぼす影響を示した. 図から, クエン酸と Mg イオンとは見かけ上, 酵素に対して拮抗していると考えられる.

種々のヌクレオチドの影響を Table IV に示した. 両酵素とも塩基による特異的な阻害はないけれども, リン酸基の増加と

ともに阻害が大きくなる傾向を示した. そこでリン酸の

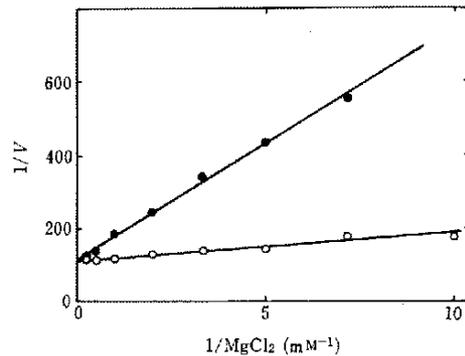


Fig. 5. Effect of Citrate on PEPC from Pea Cotyledon.

—○— no citrate, —●— 5 mM citrate.

Assay conditions were the same as described in Table III.

Table IV. Effect of Various Nucleotides on the Activity of PEPC from Soybean and Pea Cotyledons

Nucleotide	Concentration	Inhibition (%)	
		Soybean	Pea
CTP	3 mM	32.4	21.8
CDP	3	9.4	10.7
CMP	3	0.8	9.2
GTP	1.5	11.7	—
GDP	1.5	5.9	—
GMP	3	3.9	—
ATP	3	29.7	35.6
ADP	3	18.4	15.7
AMP	3	0.4	0.7
UTP	3	32.3	35.3
UDP	3	8.6	15.7
UMP	3	3.1	6.2
ITP	3	52.7	41.0
IDP	3	14.5	17.3
IMP	3	0	12.2

Assay conditions were the same as described in the text except for the use of indicated nucleotides.

重合部分が阻害を示すと考え、大豆 PEPC を用いて、リン酸の重合度が異なる無機リン酸、ピロリン酸、トリポリリン酸の影響を調べたのが Table V である。ピロリン酸、トリポリリン酸に強い阻害が認められた。PEP, $MgCl_2$ 量を 2 倍にすると、PEP では阻害は小さくならないが、 $MgCl_2$ では阻害が著しく小さくなった。この理由を明らかにするため、大豆 PEPC を用い、ヌクレオチドのうち最も阻害の強い ITP の添加と、これに対する $MgCl_2$ の影響を調べたのが Fig. 6 である。ITP の阻害は 4 mM $MgCl_2$ ではほぼなくなった。Mg イオンが多量に存在するときには、ヌクレオチドの阻害はヌクレオチドのリン酸部分が Mg イオンと複合体をつくることによって除かれると考えられる。

Table V. Effect of Poly-phosphate on the Activity of PEPC from Soybean Cotyledon

Addition	Inhibition (%)
Control	0
3 mM Pi^*	6.0
3 mM PPi^{**}	81.3
3 mM $PPPi^{***}$	86.9
3 mM $PPi + 4$ mM $MgCl_2$	19.5
3 mM $PPi + 8$ mM PEP	68.1
3 mM $PPPi + 4$ mM $MgCl_2$	20.7
3 mM $PPPi + 8$ mM PEP	82.1

* orthophosphate, ** pyrophosphate, *** tripolyphosphate.

Assay conditions were the same as described in the text except for the use of indicated additions.

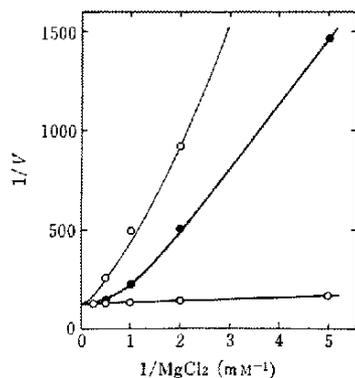


Fig. 6. Effect of ITP on the Activity of PEPC from Soybean Cotyledon.

—○— no ITP, —●— 1.5 mM ITP,
—○— 3 mM ITP.

Assay conditions were the same as described in Table IV.

考 察

植物種子の発芽初期には、光合成による CO_2 の取り込みはなく、結実時に貯蔵した物質を分解して成長しなければならぬ。貯蔵物質である澱粉、脂肪、蛋白質などは分解され、別の物質に合成されたり、そのまま他の部位に転移される。このように考えると、貯蔵物質を異にする種子においては、当然異なった代謝の合理的な経路が存在し、異なった代謝調節が行なわれているはずである。大豆種子はその約 40% が蛋白質、約 20% が脂質であり、エンドウでは約 60% が澱粉である。本報告は、この両種子の $PEP \rightarrow OAA$ 反応を触媒する酵素が、どのように調節されているかを調べたものである。

大豆・エンドウとも子葉中に PEPC が存在し、大豆では発芽後活性は減少するが、エンドウでは 5 日目にピークを示した。両酵素とも活性に Mg イオンを必要とし、最適 pH が約 8.7 で、活性に SH 基は関与していない。リガンドに対する親和性は、エンドウ酵素の方が少し高かった。両酵素ともクエン酸、イソクエン酸、ヌクレオチドで阻害され、アスパラギン酸による阻害やフラクトース-1,6-ジリン酸による活性化を受けないことは、腸内細菌の PEPC⁽³⁾ などとかなり異なっており、どちらかといえばトウモロコシ⁽⁵⁾、酢酸菌⁽⁴⁾ などに見出されるものと類似していた。

大豆の発芽時においては、蛋白質分解により TCA サイクル中間体が豊富に供給され、さらに脂質の β -酸化や TCA サイクルにより多量の ATP が生産されるため、酵素はクエン酸や ATP により強く阻害される状態にあると考えられる。さらに発芽に伴い活性が急激に減少することを考え合わせると、大豆の発芽時における PEPC の生理的意義はきわめて小さく、かえって結実時に活躍したものが残っていたものと考えられる。

エンドウの貯蔵物質は主として澱粉であり、発芽時には TCA サイクル中間体は蛋白質などの炭素骨格として利用されることが多く、そのため中間体の濃度が低下すると考えられる。このとき PEPC により OAA が供給され、TCA サイクルを円滑に回転させる。しかしクエン酸、イソクエン酸、コハク酸等の中間体のレベルが高いときは同時にエネルギーレベルも高くなり、これら中間体、ATP とも PEPC を阻害し、OAA の生成は少なくなる。発芽 5 日目に活性ピークを有し、 K_m 値も小さいことから、エンドウの酵素は anaplerotic な生理的意義⁽⁶⁾

を有するものと考えられる。

大豆・エンドウの両酵素とも、前報⁽¹⁾のヒマと同じく、ヌクレオチドで特異的な影響は受けないが、リン酸基が増加するにつれて阻害が大きくなる傾向を示し、Mg イオンによって回復される。この阻害の機作については、今後の研究が必要であると考えられる。

要 旨

大豆 PEPC は暗発芽後急激に活性が減少したが、エンドウ PEPC は 5 日目に活性のピークを示した。大豆では暗発芽 3 日目、エンドウでは 5 日目の子葉から酵素を精製し、その諸性質を検討した。

両酵素とも最適 pH は約 8.7 であり、活性に Mg イオンを必要とし、還元剤は活性に影響を与えなかった。PEP, MgCl₂ の *K_m* 値は他の PEPC とあまり変わらなかったが、エンドウの方が小さく、リガンドに対する親和性が高かった。エンドウ酵素がコハク酸により阻害され

る以外は、クエン酸、イソクエン酸ヌクレオチドにより全く同じように阻害された。以上のことから両酵素はよく似ていると考えられるが、大豆 PEPC は発芽時に急激に活性が減じ、またリガンドに対する親和性は低い。これに反し、エンドウ PEPC は発芽とともに増加し、リガンドに対する親和性が高い。発芽時においては、前者は生理的に存在の意義は少なく、後者は代謝調節に anaplerotic な機能をもつものと考えられる。

- (1) 竹内章夫, 藤井ミチ子, 本田幸一郎 農化, **47**, 779 (1973).
- (2) E. Ohmann and F. Plhak : *Eur. J. Biochem.*, **10**, 43 (1969).
- (3) I. P. Ting : *Plant Physiol.*, **43**, 1919 (1968).
- (4) B. D. Sanwal and P. Maeba : *J. Biol. Chem.*, **241**, 4557 (1966).
- (5) J. L. Canovas and H. L. Kornberg : *Proc. Roy. Soc.*, **B**, 165, 189 (1966).