食品中のフォスファターゼに関する研究 (第 5 報)

Studies on Phosphatases in Foods (Part 5)

小麦粉中の酸性フォスファターゼの分離

Separation of acid phosphatases in wheat flour

(昭和 41 年 3 月 12 日 受 理)

戸 田 準

(Jun Toda)

中 谷 弘 実

(Hiromi Nakatani)

和 田 正 三

(Shyozo Wada)

Succeeding to the preceding paper, studies on the phosphatases in wheat flour were carried out. The phosphatases in wheat flour are separated into three fractions by DEAE-cellulose column-chromatography. All of these are active at the acidic region, and designated as acid phosphatase I, II and III (or simply, I, II and III), according to the order of elution from the DEAE-cellulose column. Acid phosphatase I shows the strongest activity on 5'-nucleotides. It is activated by Mg^{++} , Mn^{++} , Zn^{++} , Co^{++} , Ni^{++} and Cu^{++} , and inhibited by Ca^{++} . On the other hand, Zn^{++} and Cu^{++} inhibit the activities of acid phosphatases II and III. Acid phosphatase I is less thermo-stable than III.

The inhibition of acid phosphatase I by Ca^{++} is affected by the concentration of Ca^{++} and pre-incubation time of the enzyme with Ca^{++} , as described in the preceding paper, in the case of crude extract. It is presumed that the inhibition of acid phosphatase I by Ca^{++} is due to the competition (or replacement) between Ca^{++} and the activating metal ions.

前報¹⁾で小麦粉中の 5'-リボヌクレオチドの安定性および 5'-リボヌクレオチドの分解に関与する酸性フォスファターゼが Ca^{++} により阻害されることを報告した。

小麦の麩の酸性フォスファターゼは、すでに高度に精製されその性質についての報告²⁾がみられる。さらに小麦胚芽³⁾、小麦の葉⁴⁾のフォスファターゼについて報告がある。しかしながら、通常食用とする小麦粉のフォスファターゼについてはあまり研究されていない。そこで小麦粉中のフォスファターゼについてさらに検討を続け、小麦粉中には DEAE-セルロース・カラム・クロマトグラフィーにより分離される 3 種類のフォスファターゼが存在し、主としてこのうち一種の酸性フォスファターゼが 5'-リボヌクレオチドの分解に関与することが認められた。

これら 3 種類の酸性フォスファターゼについて二、三の実験を行なったのでその結果を報告する。

実 験 方 法

1. 小麦粉中のフォスファターゼの抽出および分離：市販小麦粉（強力粉および薄力粉）に倍量の水を加えて氷冷下ホモジナイズし、遠心分離により上清を集める。こ

の上清を、はじめは純水に対して、つぎに 0.01 M トリス緩衝液に対して透析し、透析内液を粗酵素液とする。この粗酵素液を 0.01 M トリス緩衝液 (pH 8) であらかじめ緩衝化した DEAE-セルロース・カラム (2×20 cm) に吸着させる。非吸着部が流出するまで、0.01 M トリス緩衝液 (pH 8) を流し、つぎに塩化ナトリウム 0.06 M を含む同一緩衝液 500 ml、塩化ナトリウム 0.12 M を含む同一緩衝液 500 ml で溶出する。溶出液は 20 ml のフラクションとして集め各フラクションの蛋白質質量およびフォスファターゼ活性を測定した。

2. 蛋白質量の測定：280 m μ の吸光度を蛋白質量とした。

3. フォスファターゼ活性の測定法：5'-IMP あるいは PNPP* (いずれも二・ナトリウム塩を用いた) を基質として既報¹⁾の方法で行なった。酸性フォスファターゼ活性の測定には pH 5 酢酸緩衝液を用いた (反応液中 0.1 M)。また金属イオンは塩化物として、EDTA は二・ナトリウム塩を用いた。

* *p*-Nitrophenyl phosphate

結 果

1. 小麦粉酸性フォスファターゼの分離：実験方法の部で述べたように、小麦粉抽出液を透析した後、粗酵素液 250 ml について直接、DEAE-セルロース・カラムを用いてクロマトグラフィーを行なった結果を第1図に示す。この図からフォスファターゼが大きく3つの区分に分離されることがわかる。すなわち流出部にあらわれる 5'-IMP に対する活性の高い区分、塩化ナトリウム、0.06 M で溶出する区分、および塩化ナトリウム 0.12 M で溶出し PNPP に対する活性の高い区分である。第1図に記したように溶出順序にしたがい、これらを酸性フォスファターゼ I、酸性フォスファターゼ II、酸性フォスファターゼ III、あるいは簡単に I、II、III とする。このクロマトグラムのパターンは強力粉、薄力粉とも同一である。

第1図 小麦粉抽出液の DEAE-セルロース・カラム・クロマトグラム

—○—蛋白質量, —・— 5'-IMPに対する活性 (pH 5)○..... PNPP に対する活性 (pH 5)
溶出液, 0.01M トリス緩衝液 (pH 8)

第1表 小麦粉中の酸性フォスファターゼ(強力粉)

酸性フォ スファ ター ゼ	容 量 (ml)	蛋白質量 (E ₂₈₀)	フォスファターゼ活性*	
			5'-IMP (E ₂₈₀ /hr)	PNPP (E ₄₀₀ /hr)
I	220	270	1,794	3,450
II	60	123	346	3,500
III	100	64	425	11,500

* pH 5, 37°C

第2図 小麦粉酸性フォスファターゼに対するpHの影響

(基質, PNPP 10⁻²M)

第3図 小麦粉酸性フォスファターゼの pH 安定性

(基質, PNPP 10⁻²M 反応, pH 5, 37°C)

これら3種類の酸性フォスファターゼ区分の活性を pH 5 で測定した結果の一例を第1表に示す。酸性フォスファターゼ I は 5'-IMP に対する活性が高く、回収された活性の約70%を占める。これに対して酸性フォスファターゼ III は PNPP に対する活性が高い。これらの2つに比較して、酸性フォスファターゼ II の活性は 5'-IMP, PNPP のいずれに対しても低い。

2. 小麦粉酸性フォスファターゼの性質

a. pH の影響：PNPP を基質とした場合の3種の酸性フォスファターゼの活性に対する pH の影響を第2図に示す。酸性フォスファターゼ I は pH 4, 酸性フォスファターゼ II は pH 5 に至適 pH を持つ。これらはいず

第 4 図 小麦粉酸性フォスファターゼの熱安定性

(基質, PNPP 10^{-3} M 反応, pH 5, 37°C)

第 2 表 小麦粉酸性フォスファターゼの基質特異性

基 質	酸性フォスファターゼ		
	I	II	III
5'-IMP	100	100	100
5'-GMP	75	62	112
5'-AMP	80	74	86
2'(3')-AMP	66	534	210
β GP	7	77	97

pH 5, 37°C, 基質濃度 10^{-3} M第 3 表 β -グリセロリン酸および 5'-IMP による PNPP に対する活性の阻害 (酸性フォスファターゼ I)

添 加 物	PNPP 濃度 添加物濃度(M)	PNPP に対する活性 (E_{400})	
		10^{-3} M	10^{-2} M
—	0	0.182	0.430
β GP	10^{-3}	0.186	0.425
	2×10^{-3}	0.179	0.422
	5×10^{-3}	0.149	0.399
	10^{-2}	0.113	0.345
5'-IMP	10^{-3}	0.042	0.120
	2×10^{-3}	0.032	0.090
	5×10^{-3}	0.023	0.072
	10^{-2}	0.014	0.053

(pH 5, 37°C)

れもアルカリ性では活性を示さないが、酸性フォスファターゼ III は pH 5~6 と pH 8 とにピークを持つ。これはアルカリ性フォスファターゼと分離されていないためと思われる。

b. pH 安定性: 第 3 図に酸性フォスファターゼ I お

よび III の pH 安定性を示す。 10^{-3} M の緩衝液中で酵素液を 37°C において 1 時間 incubation を行なった後、pH 5 (酢酸緩衝液, 0.1 M) とし, PNPP を基質として活性を測定した。

I, III と pH 11 以上のアルカリ性で不安定である。

c. 熱安定性: pH 5 における酸性フォスファターゼ I および III の熱安定性を第 4 図に示す。I はかなり不安定で 40°C においても徐々に失活する。一方, III は 40°C では安定である。

d. 基質特異性: 酸性フォスファターゼ I, II, III について 5'-IMP, 5'-GMP, 5'-AMP, 2'(3')-AMP, β GP (β -Glycerophosphate) に対する活性をしらべた結果を第 2 表に示す。ここで著しい特徴は, I の β GP に対する活性がきわめて低く, II の 2'(3')-AMP に対する活性が高いことである。I の β GP に対する活性が低いことを確認するために, PNPP を基質として, その分解に対する 5'-IMP および β GP の影響をみた。その結果を第 3 表に示す。すなわち 5'-IMP の存在により, PNPP の I による分解が著しく低下するのに対し, β GP の存在下では PNPP の分離はそれほど低下しない。

第 4 表 小麦粉酸性フォスファターゼに対する金属イオンの影響

濃 度 (M)	酸性フォスファターゼ					
	I		II		III	
	10^{-4}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-3}
無 添 加	100					
Mg ⁺⁺	185	235	92	94	99	98
Ca ⁺⁺	92	59	83	91	105	105
Ba ⁺⁺	113	94	85	96	104	83
Zn ⁺⁺	147	143	54	31	77	48
Co ⁺⁺	185	226	84	105	112	105
Ni ⁺⁺	166	166	91	101	96	82
Cu ⁺⁺	142	162	53	14	71	40

(基質, PNPP 10^{-3} M)
(pH 5, 37°C)

e. 金属イオンの影響: 酸性フォスファターゼ I, II, III に対する各種金属イオンの影響を第 4 表に示す。I に対しては Mg⁺⁺, Zn⁺⁺, Co⁺⁺, Ni⁺⁺, Cu⁺⁺ が活性化効果を示し, Ca⁺⁺ が阻害を示す。これに対して II, III を活性化する金属イオンはない。また, I に対する活性化効果を持つ Zn⁺⁺, Cu⁺⁺ が II, III に対して阻害的に作用する。

3. 酸性フォスファターゼ I に対する Ca⁺⁺ の影響: 前報¹⁾で小麦粉中のフォスファターゼが Ca⁺⁺ により阻害

第5図 小麦粉酸性フォスファターゼに対する Ca^{++} の影響

第6図 小麦粉酸性フォスファターゼ I に対する Ca^{++} 接触時間の影響

第7図 酸性フォスファターゼに対する Ca^{++} , Mg^{++} および EDTA の影響

されることを報告した。また上に述べたように、酸性フォスファターゼ I が主として 5'-IMP の分解に関与し、 Ca^{++} によって阻害されることから、前報に報告した現象は I によるものと考えられる。

そこで、DEAE-セルロース・カラム・クロマトグラフィーにより分離した酸性フォスファターゼ I, II, III に対する Ca^{++} の影響を検討し第5図のような結果を得た。I は Ca^{++} により阻害されるが、II および III はその影響を受けない。また、第6図に示すように I の Ca^{++} による阻害は Ca^{++} と酵素液の pre-incubation の時間に関係し、pre-incubation の時間の増加と共に活性の低下が大きくなる。I はかなり不安定なため、 Ca^{++} 無添加で pre-incubation を行なっても活性が低下するが Ca^{++} 添加時の活性と Ca^{++} 無添加時の活性の比をとると、

第5表 酸性フォスファターゼ I の Ca^{++} による阻害に対する金属イオンの影響

Ca^{++} 濃度(M)	活性 (E_{400})		阻害率* (%)
	0	10^{-3}	
—	0.397	0.213	46
Mg^{++}	0.678	0.639	6
Ba^{++}	0.387	0.209	46
Zn^{++}	0.426	0.384	10
Co^{++}	0.590	0.586	1

基質, PNPP, 10^{-2} M, pH 5

金属イオン濃度, 10^{-3} M

Pre-incubation, 37°C , 20分

* 阻害率 = $\frac{(\text{Ca}^{++}\text{無添加時の活性}) - (\text{Ca}^{++}\text{添加時の活性})}{(\text{Ca}^{++}\text{無添加時の活性})}$

第6表 EDTAに対して透析した酸性フォスファターゼ I に対する金属イオンの影響

金属イオン濃度 (M)	活 性	
	10^{-4}	10^{-3}
—	100	
Mg^{++}	374	394
Ca^{++}	131	112
Ba^{++}	115	112
Zn^{++}	121	174
Co^{++}	129	165
Ni^{++}	147	175

(基質, PNPP, 10^{-2} M pH 5)
(Pre-incubation, 37°C , 20分)

この活性比が pre-incubation の時間とともに減少し、ほぼ20分で平衡に達することは粗酵素液について得られた結果と一致する。

I が Mg^{++} によって活性化されることはさきに述べたが、さらに Mg^{++} , Ca^{++} , EDTA の濃度の影響を検討した結果が第7図である。 Mg^{++} は濃度の増加とともに活性を増大させ、 Ca^{++} は濃度の増加とともに活性を減少させる。これらに対して、EDTAを添加した場合には、低濃度でやや活性が増大するが、 10^{-3} M以上では濃度の増加とともに活性が減少する。

ついで他の金属イオンが共存する場合において、 Ca^{++} が酸性フォスファターゼ I に与える影響をみた。その結果を第5表に示す。他の金属イオンが存在しない場合、あるいは活性化効果を持たない Ba^{++} が共存する場合には Ca^{++} は阻害作用を示すが、 Mg^{++} , Zn^{++} , Co^{++} のような活性化効果を持つ金属イオンが共存すると、 Ca^{++} の阻害効果は著明でない。さらに、I を EDTA 水溶液に対して透析した後、純水に対して透析したものを酵素

液として、この活性に対する各種金属イオンの影響をしらべ第 6 表のような結果を得た。すなわち、 Mg^{++} の活性化効果がもっとも大きく、 Zn^{++} 、 Co^{++} 、 Ni^{++} も活性化効果を持つ。しかしこの酵素液に対しては、 Ca^{++} はもはや阻害効果を示さない。

考 察

同一種あるいは同一器官に 2 種以上のフォスファターゼが存在することは、*E. coli* の酸性フォスファターゼ⁹⁾ などについて報告されているが、小麦粉においても基質特異性、金属イオンの影響、クロマトグラム上の位置から相互に区別できる 3 種類の酸性フォスファターゼが認められた。このうち小麦粉中の 5'-リボヌクレオチドの安定性に関与するフォスファターゼは、その基質特異性 Mg^{++} あるいは Ca^{++} の影響からみて酸性フォスファターゼ I であろうと考えられる。前報¹⁾ で、粗酵素液を用いて、5'-IMP を基質とするとき酸性の高いフォスファターゼが存在することを報告したが、PNPP を基質としても同様に酸性で高い活性を示す。

現在、フォスファターゼの分類には、その至適 pH、 Mg^{++} の影響、 F^{-} の影響等が用いられているが、 Zn^{++} の影響によってもフォスファターゼを分類することが可能であろうと思われる。すなわち、小麦粉中のフォスファターゼについては、I が Zn^{++} により活性化されるのに対し、II および III は阻害される。また、*E. coli* のアルカリ性フォスファターゼが Zn 酵素⁷⁾ であることなどを考えあわせると、フォスファターゼ反応における Zn^{++} の役割は、 Mg^{++} の役割と同様に興味ある問題である。

つぎに酸性フォスファターゼ I に対する Ca^{++} の役割を考察する。EDTA に対して透析した酵素が Ca^{++} により阻害されないことから、 Ca^{++} は本来このフォスファターゼに対して影響を与えない金属イオンであると考えられる。DEAE-セルロース・カラム・クロマトグラフィーによって分離した酸性フォスファターゼ I は微量の Mg^{++} のような活性化金属イオンを含み、これに対して過剰の Ca^{++} が存在すると、 Ca^{++} とたとえば Mg^{++} の置換によりみかけ上の阻害を示す。しかし Ca^{++} と Mg^{++} が同程度の濃度で存在するときには、 Ca^{++} の酵素に対する親和性が Mg^{++} のそれより弱いため Ca^{++} による阻害はみられない。このような現象は *bull semen* の 5'-ヌクレオチダーゼについても報告されている⁹⁾。また本来は不活性な金属イオンが活性化金属イオンと置換することによって、みかけ上の阻害を示す現象は、赤血球⁹⁾ あるいは酵母¹⁰⁾ のピロ・フォスファターゼについて認められており、小麦粉酸性フォスファターゼ I の Ca^{++} に

よる阻害もこれらと同じ現象と考えられる。

また、小麦麴の酸性フォスファターゼ²⁾ と比較してみると、これが Zn^{++} および Cu^{++} により阻害されることから、小麦粉酸性フォスファターゼ I とはあきらかにことなり、麴の酸性フォスファターゼは、小麦粉酸性フォスファターゼ II あるいは III に近い性質であると思われる。

要 約

小麦粉中には DEAE-セルロース・カラム・クロマトグラフィーによって相互に分離される酸性フォスファターゼが、すくなくとも 3 種類存在する。これらはいずれも、その基質特異性、金属イオンの影響などのちがいで区別できる。これらのうち、主として 5'-リボヌクレオチドの安定性に関与する酸性フォスファターゼは Mg^{++} 、 Zn^{++} 、 Cu^{++} 、 Co^{++} 、 Ni^{++} により活性化され、 Ca^{++} により阻害される。他の 2 つの酸性フォスファターゼはいずれも Zn^{++} および Cu^{++} により阻害される。

終わりに発表の機会を与えられた研究開発本部立岡末雄本部長、ご指導をいただいた工業技術研究所間中次郎所長、同島菌平雄食品技術部長、ならびに実験に協力された小川浩三氏に深謝いたします。

(本報告は昭和 40 年 11 月 20 日第 4 回日本栄養・食糧学会近畿支部大会において発表した。)

文 献

- 1) 戸田 準, 森高真太郎, 中谷弘実, 和田正三: 栄養と食糧, 19, 171 (1966)
- 2) Y. Nagai & S. Funahashi: *Agr. Biol. Chem.*, 26, 794 (1962)
- 3) B. K. Joyce & S. Grisolia: *J. Biol. Chem.*, 235, 2278 (1960)
- 4) D. W. A. Roberts: *J. Biol. Chem.*, 219, 711 (1956)
- 5) 戸田 準, 中谷弘実, 石井清文, 藤田栄一郎: 栄養と食糧, 18, 60 (1965); 戸田 準, 沢田幸七, 中谷弘実, 和田正三, 藤田栄一郎: 栄養と食糧, 18, 210 (1965)
- 6) B. v. Hofsten & J. Porath: *Acta Chem. Scand.*, 15, 1791 (1961)
- 7) D. J. Plocke, C. Levinthal & B. L. Vallee: *Biochemistry*, 1, 373 (1962)
- 8) L. Heppel & R. J. Hilmo: *J. Biol. Chem.*, 188, 665 (1951)
- 9) B. Nagana & V. K. N. Menon: *J. Biol. Chem.*, 174, 501 (1948)
- 10) K. Bailey & E. C. Webb: *Biochem. J.*, 38, 394 (1944)

(武田薬品工業株式会社)
研究開発本部工業技術研究所