[農化 第 48 卷, 第 12 号, p.707~710, 1974]

グラジオラス球根酸性フォスファターゼに 対する陰イオンの影響*

祐田泰延, 高橋亮司, 岡谷栄三, 山本丈夫
(静岡薬科大学)

昭和 49 年 7 月 3 日 受 理

Effect of Anions on Acid Phosphatase in Gladiolus Bulbs (Acid Phosphatase in Plant Part II) [Note]

By Yasunobu SUKETA, Ryoji TAKAHASHI, Eizo OKAYA and Takeo YAMAMOTO
Shizuoka College of Pharmacy

Effects of various anions on the acid phosphatase in Gladiolus bulbs were studied.
The following results were obtained:

- 1) The activity of the enzyme was markedly inhibited with fluoride, molybdate or arsenate, respectively.
- 2) The activity of the enzyme was not influenced with various concentrations of EDTA or EGTA.
- 3) The inhibition of the enzyme by fluoride was not influenced with addition of phosphate.

(Received July 3, 1974)

前報⁽¹⁾において, グラジオラス球根より β -グリセリン酸に対して特異性の高い酸性フォスファターゼを約 1300 倍に精製し, 諸性質について調べ報告した。

本報では, 先に精製した酵素標品を用いて, 主として陰イオンによる酵素活性に与える影響について検討した。一方, Christianら⁽²⁾, Malmström⁽³⁾, Millerら⁽⁴⁾などによって, エノラーゼのフッ素イオン阻害に関する研究, さらに Yangら⁽⁵⁾によるシュクロース合成酵素系でのフッ素イオン阻害に関する研究などが報告されている。

そこで, 著者らは先に精製した酵素標品⁽¹⁾を用いて, フッ素イオンによる阻害についても検討し, 2, 3 の知見を得た。

実験材料, 酵素調製法: 前報⁽¹⁾に同じである。

試薬: EDTA および EGTA (=glycol ether diamine tetraacetic acid) は, 和光純薬 KK (ドータイト試薬)

* 植物酸性フォスファターゼ (第 2 報)。

を用いた以外はすべて前報⁽¹⁾に同じである。

酵素活性測定法: (i) リン酸イオン添加実験以外の酵素活性測定は, すべて前報⁽¹⁾と同じ測定法によった。
(ii) クロモトローブ酸法による酵素活性測定法 (リン酸イオン添加実験の場合): 酸性フォスファターゼ活性は β -グリセリン酸を基質とし, 酵素反応により遊離するリン酸の代りに, 同時に遊離するグリセリンをクロモトローブ酸法⁽⁶⁾により定量した。

(I) 陰イオンによる影響

本酵素活性に対するハロゲンイオンの影響について, 種々イオン濃度について検討し, Fig. 1 のような結果を得た。またハロゲン以外の数種の陰イオンの影響についても同様, イオン濃度を種々変えて検討し, Fig. 2 のような結果を得た。本酵素は, ハロゲンイオンではフッ素イオンのみで強く阻害された。また, ひ酸, 酒石酸およびモリブデン酸イオンによっても強く阻害され, 特にモリブデン酸イオンでは, 10 μ M の低濃度でほぼ完全に阻

Fig. 1. Effect of Halogen Ions on Acid Phosphatase.

○—○ F^- , ×—× Cl^- ,
△—△ Br^- , □—□ I^- .

The reaction mixture (2.0 ml) containing 0.1 M acetate buffer (pH 5.6), 0.61 μg of the enzyme protein, 10^{-6} – 10^{-2} M various anions and 20 $\mu moles$ of substrate was incubated at 37°C for 30 min. Activity was expressed as per cent of that without added anions.

害された。このようなモリブデン酸イオンによる強い阻害は、酸性フォスファターゼに一般的であり、Weigedalら⁽⁷⁾の骨の酸性フォスファターゼは、100 μM で97%の阻害を示したとしている。またリン酸イオンは、10 mMで68%の阻害を示したが、これは本酵素がリン酸を遊離することから、product inhibitionであろうと推察される。

なおハロゲンイオンはすべてカリウム塩を、リン酸、ひ酸、酒石酸および硫酸イオンは、すべてナトリウム塩

Fig. 3. Relation between Halogen Ionic Radius and Inhibitory Activity.

Concentration of halogen ions: 10^{-2} M.

Fig. 2. Effect of Anions on Acid Phosphatase.

○—○ molybdate, △—△ arsenate,
□—□ tatarate, ×—× sulfate,
●—● phosphate.

を使用した。

以上の本酵素に対する陰イオンの阻害効果をそれぞれのイオン半径に従ってプロットしてみると、Fig. 3およびFig. 4のごとくなる。ハロゲンではフッ素イオン以外、イオン半径は約2.0 Å付近で、フッ素イオンのみが1.3 Å付近と小さい。また多価陰イオンは、それぞれ核となるイオンでもって示したが、Fig. 4のごと

Fig. 4. Relation between Ionic Radius and Inhibitory Activity of Anions.

Concentration of various anions: 10^{-4} M.

く、イオン半径と阻害効果が相関しているという結果を得た。

一方、酒石酸は 10^{-2} M で 25% 程度の阻害を示すが、これは本酵素の活性因子として、金属イオンが関与している可能性を推測させた。

(II) 金属キレート剤による影響

本酵素がフッ素イオンおよび酒石酸などによって阻害されることから、金属イオンが本酵素の活性因子として関与している可能性が示唆された。そこで、EDTA およびカルシウムイオンに特異的な EGTA を用いて、本酵素に与える影響について検討した。その結果、本酵素活性は EDTA および EGTA (10^{-6} ~ 10^{-2} M) 添加によって、ほとんど影響はみられなかった。

(III) フッ素イオンによる阻害

Reiner ら⁽⁸⁾は、300 倍に精製したヒト前立腺酸性フォスファターゼを用いて、フッ素イオンによる阻害について検討し、フッ素イオン濃度により阻害様式が異なると報告している。また Tamiya ら⁽⁹⁾は、不全菌（擬似酵母菌）の一種の *Fusarium moniliforme* から 1360 倍に精製した酸性フォスファターゼ II についてフッ素イオンによる影響をみているが、フッ素イオンによる阻害機構については言及していない。

1) EDTA 存在下でのフッ素イオン阻害の検討：

本酵素溶液を、種々濃度の EDTA 存在下でブレインキュベートした後、フッ素イオンを添加することにより、本酵素のフッ素イオン阻害と金属イオンとの関係について検討した。その結果、Table I に示すように、本酵素のフッ素イオン阻害は、EDTA 処理によってほとんど

Table I. Reaction of Acid Phosphatase with Fluoride

Conditions		Acid phosphatase	
EDTA (mM)*	F ⁻ (mM)	Activity (μmoles/ml/min)	% of control activity
0	0	37.2	100
0	0.25	27.9	76
0	1.25	18.2	50
1.25	0	44.4	119 (100)**
1.25	0.25	30.5	82 (69)**
1.25	1.25	26.2	71 (60)**
12.5	0	43.4	117 (100)**
12.5	0.25	30.3	81 (69)**
12.5	1.25	26.6	72 (62)**

* The enzyme solution was preincubated with EDTA at 37°C for 30 min. ** The number in parentheses shows % of activity without F⁻.

Table II. Effect of Phosphate on the Degree of Inhibition of Acid Phosphatase by Fluoride

Phosphate (mM)	Enzyme activity (%)		Inhibition by NaF (%)
	Without NaF	With NaF	
0	100 ^{a, b)}	35.3 ^{a)}	64.7
5	54.2 ^{b)}	19.4 ^{b)}	64.2
10	31.7 ^{b)}	11.7 ^{b)}	63.1
15	21.0 ^{b)}	8.2 ^{b)}	61.0

The reaction mixture (2.0 ml) containing 0.1 M acetate buffer (pH 5.6), 0.61 μg of the enzyme protein, 20 μmoles of substrate, 4 μmoles of fluoride and the amounts indicated phosphate (as Na₂HPO₄) was incubated at 37°C for 30 min.

^{a)} Pi determination was carried out by the method of Nakamura.⁽¹¹⁾ ^{b)} Glycerine determination was carried out by the method of Korn.⁽⁶⁾

影響を受けないことがわかった。

2) フッ素イオン添加時による影響およびフッ素イオン阻害の可逆性：本酵素のフッ素イオン阻害の Lineweaver-Burk プロットは、前報⁽¹⁾のごとく直線性を示さなかった。そこで、フッ素イオンの添加時の影響について、基質濃度の高い場合 (10 mM) と低い場合 (1 mM) についてそれぞれ検討したが、フッ素イオン添加時による影響は、いずれの場合にもほとんどみられなかった。

また本酵素のフッ素イオン阻害の可逆性については、本酵素溶液をフッ素イオン存在下で 37°C、20 分間インキュベートした後、4°C で 0.1 M 酢酸緩衝液に対して透析し、経時的に活性の回復を追ってみたところ、24 時間透析で酵素活性はほぼ完全に回復した。この結果、フッ素イオンによる本酵素の阻害は可逆的であることがわかった。

3) フッ素イオン阻害に与えるリン酸イオンの影響：Slater ら⁽¹⁰⁾は、コハク酸酸化酵素がフッ素イオンで阻害されるが、さらにリン酸イオンを共存させることにより、フッ素イオンによる阻害が増強されることを報告している。

そこで、この点についても検討した。その結果は Table II のごとくで、本酵素のフッ素イオン阻害度は、リン酸イオン濃度を増すことにより増強されるとはいいいがたい。

(1) 祐田泰延, 岡谷栄三, 高橋亮司, 山本丈夫：農化, 48, 537 (1974).

(2) C. Warburg and W. Christian: *Biochem. Z.*, 310, 385 (1942).

(3) B. G. Malmström: *Arch. Biochem. Biophys.*,

- 46, 345 (1953).
- (4) G. W. Miller : *Plant Physiol.*, **32**, 199 (1957).
- (5) S. F. Yang and G. W. Miller : *Biochem. J.*, **88**, 509 (1963).
- (6) E. D. Korn : *Methods Biochem. Anal.*, **7**, 145 (1959).
- (7) J. E. Wergedal : *Proc. Soc. Exp. Med. Med.*, **134**, 244 (1970).
- (8) J. M. Reiner, K. K. Tsuboi and P. B. Hudson : *Arch. Biochem. Biophys.*, **56**, 165 (1955).
- (9) H. Yoshida and N. Tamiya : *J. Biochem.*, **69**, 525 (1971).
- (10) E. C. Slater and W. D. Bonner : *Biochem. J.*, **52**, 185 (1952).
- (11) 中村道德 : 農化, **24**, 1 (1950).
-