大豆発芽種子子葉のホスホフルクトキナーゼの 部分精製と性質について*

藤井ミチ子, 坂口誠也, 本田幸一郎**

(大阪府立大学農学部農芸化学科)

昭和 51 年 9 月 6 日 受 理

Partial Purification and Properties of Phosphofructokinase from the Germinating Soybean Cotyledon

By Michiko FUJII, Seiya SAKAGUCHI and Koichiro HONDA**

Department of Agricultural Chemistry, College of Agriculture

University of Osaka Prefecture, Sakai, Osaka

Phosphofructokinase was extracted from the 4th day-germinating soybean cotyledons and purified about 300-fold and then its properties were studied.

The optimum pH was about 7.8. The enzyme required Mg^{2+} for its reaction and was inhibited by ADP, AMP, citrate, PEP, 3-PG and high concentrations of ATP.

At a ATP/ Mg^{2+} ratio of about 1:2 the enzyme showed a maximum activity. The change of the ATP/ Mg^{2+} ratio to 2:1 caused an alteration in the shape of the F6P saturation curve from hyperbolic form to sigmoidal one and Hill coefficient increased approximately from 1 to 2 at high concentrations of F6P.

When the enzyme was frozen and thawed, and then passed through a Sepharose 6B column, it was separated into two fractions. In addition, when the enzyme was dialyzed against 2N NaCl or 0.1 M phosphate buffer (pH 6.0), or diluted to a low enzyme concentration, the tailing of peaks was found in the resulting elution profiles on Sepharose 6B column. These phenomena suggest that the enzyme would be dissociated into two forms at least.

Above results suggest that phosphofructokinase plays a key role in the regulation of carbohydrate metabolism in the germinating soybean cotyledon.

(Received August 6, 1976)

緒 言

PFK (ATP : D-fructose-6-P-1-phosphotransferase, EC 2.7.1.11) は解糖系において, F6P の 1 位をリン酸化して, FDP にする酵素である. 本酵素の反応は不可逆的で, 別に存在するフルクトース-1,6-ジホスファターゼが逆方向に関与し, それぞれ代謝調節上重要な律速

段階に位置しているとされている. 動物, 微生物起源の酵素については多数の報告があるが, 植物起源のものについての報告は少ない^(1~7). そこで, 大豆発芽種子子葉の PFK を部分精製し, その性質を検討したので報告する.

実 験 方 法

1. 実験材料および生育条件 実験材料として, 市販の大豆種子 (玉錦) を用いた. 種子は通気しながら, 5 時間水に浸漬した後, 0.1% 硫酸銅溶液で 5 分間殺菌し, 水洗後, 胚が上になるようにパーミキュライトの上に並べ, その上に 0.5cm くらいの厚さにパーミキュラ

* 略語; FDP, フルクトース-1,6-二リン酸; F6P, フルクトース-6-リン酸; PEP, ホスホエノールピルビン酸; PFK, ホスホフルクトキナーゼ; 3-PG, 3-ホスホグリセリン酸.

** 現在, 羽衣学園短期大学.

イトをかぶせる。毎日適当量の水を与え、26°C の恒温器中で通気しながら暗発芽させた。

2. 試薬 F6P, PEP, 3-PG, FDP, アルドラーゼ, トリオースリン酸イソメラーゼ, グリセロール-3-リン酸脱水素酵素 (酵素はいずれもウサギ筋肉) は Boeringer 社, NADH は Sigma 社, ATP, ADP, AMP は (株) 協和醗酵のものを使用した。ATP, F6P および NADH 溶液は調製後冷凍庫に保存し, NADH 溶液は調製後 1 週間以内に使用した。

3. 酵素活性測定法 反応液は 50 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 8.0), 6.6 mM β -メルカプトエタノール, 0.16 mM NADH, coupling enzyme (1.6 unit アルドラーゼ, 20 units トリオースリン酸イソメラーゼ, 1.2 unit グリセロール-3-リン酸脱水素酵素), 0.1 mM ATP, 0.2 mM $MgSO_4$, 0.5 mM F6P を加え, 全量を 2 ml とした。F6P を加えることによって反応を開始し, NADH の減少に伴う 340 nm の吸光度変化を日立 124 型ダブルビーム分光光度計を用いて測定した。測定に用いる coupling enzyme の調製は, アルブミン溶液 (2 mg/ml) で希釈し, 500 倍量の 20 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 8.0, 2 mM EDTA を含む) に対し, 1 夜透析した後, 一定量として用いた。活性測定は, 25°C で行った。

4. 蛋白質の定量 牛血清アルブミンを標準として Lowry の方法⁽⁸⁾で比色定量し, 算出した。カラムクロマトグラフィーの流出液の蛋白量は, 280 nm の吸光度で測定した。

実験結果

1. 発芽に伴う PFK 活性の消長

大豆種子を 26°C で暗発芽させ, 子葉中の PFK の活性変化を調べた。活性測定は, 子葉を 3 倍容の緩衝液 A (100 mM トリス-塩酸緩衝液, 10 mM β -メルカプトエタノール, 5 mM $MgSO_4$, 1 mM EDTA を含む, pH 8.0) とともに磨碎し, 4 重のガーゼで濾過後, 9500 $\times$ g, 30 分間遠心分離し, 得られた上澄液について行った。Fig. 1 に見られるように, PFK の活性は発芽とともに増加し, 4 日目に最高に達し, 以後減少した。

2. 大豆子葉 PFK の精製

粗抽出: 暗発芽 4 日目の大豆種子子葉 40 g を採取し, 3 倍容の緩衝液 A とともに磨碎し, 4 重のガーゼで濾過後, 9500 $\times$ g で 30 分間遠心分離して, 上澄液を粗抽出液とした。精製の操作はすべて, 0~5°C で行った。

Fig. 1. Changes in Activity of PFK during Germination of Soybean Cotyledon.

Enzyme activity was assayed at 25°C in 0.05 M Tris-HCl buffer (pH 8.0), 6.6 mM β -mercaptoethanol, 0.16 mM NADH, coupling enzymes (1.6 units aldolase, 20 units triosephosphate isomerase, 1.2 units glycerol-3-phosphate dehydrogenase, 0.1 mM ATP, 0.2 mM $MgSO_4$, 0.5 mM F6P and enzyme solution. Total volume was adjusted to 2.0 ml. The reaction was started by addition of F6P solution.

硫酸分画: 得られた粗抽出液 117 ml に結晶硫酸 13.3 g (15%飽和) を攪拌しながら, 徐々に加え, 30 分間攪拌, 30 分間放置した後, 遠心分離した。上澄液にさらに硫酸を 17.8 g (35% 飽和) 加え, 攪拌放置後, 遠心分離し, その沈殿を緩衝液 A に溶かし, 同緩衝液に対して, 1 夜透析した。透析液を遠心分離し, 上澄液 (26 ml) を 15~35% 硫酸飽和分画とした。

DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィー: 緩衝液 A で, あらかじめ平衡化した DEAE-セルロースカラム (2.5 $\times$ 50 cm) に硫酸分画した酵素を吸着させ, 緩衝液 A を蛋白質の溶出がなくなるまで流し, ついで, 緩衝液 A 500 ml と 0.8 M KCl を含む緩衝液 A 500 ml で直線的に塩濃度を高めて酵素を溶出した。活性画分を集め, 結晶硫酸 (50%飽和) を加え, 遠心分離し, 沈殿を緩衝液 A に溶かし, DEAE-セルロース画分 (9.5 ml) とした。

セファロース 6B カラムクロマトグラフィー: 緩衝液 A であらかじめ平衡化したセファロース 6B カラム (2.5 $\times$ 50 cm) に, DEAE-セルロース画分を緩衝液 A で流した。活性部分は, void volume 付近に流出した。活性画分を集め, 硫酸で 50% 飽和とし, 生じた沈殿を緩衝液 A に溶かし, 透析後遠心分離した上澄液をセファロース 6B 画分 (12 ml) とした。Table I に, 精製の結

Table I. Partial Purification of PFK from Soybean Cotyledon

Fraction	Volume (ml)	Total protein (mg)	Total activity (unit)	Specific activity (unit/mg)	Fold
Crude extract	117	3276	10.8	0.0032	1
(NH ₄) ₂ SO ₄ (15~35% satn.)	26	1170	10.4	0.0088	2.8
DEAE cellulose	9.5	190	3.3	0.0172	5.4
Sephacrose 6B	1.2	2.4	2.3	0.95	296

果をまとめて示した。以下の実験には、セファロース 6 B 画分を酵素液として使用した。

3. 酵素の性質

pH の影響： 100 mM イミダゾール-塩酸 (pH 6.1~7.3), トリス-塩酸 (pH 7.3~8.9) 緩衝液を用いて, pH による酵素活性の影響を調べた結果, 最適 pH は 7.8 付近であった。

ATP の影響： ATP が酵素活性に及ぼす影響を Fig. 2 に示した。pH 7.8, 8.1 では ATP 濃度が 0.2 mM で活性は最大値を示し, それ以上の濃度では阻害された。しかし, pH 7.2 では, ATP 濃度が 0.5 mM のとき, 酵素は最大活性を示した。

F6P の影響： pH 7.2 において, ATP 濃度 0.1 mM (ATP:Mg²⁺=1:2) で, F6P の飽和曲線を求めると, Fig. 3 のように双曲線になった。この Lineweaver-Burk plot から, $K_m=5.4 \times 10^{-5}$ M, Hill plot から Hill 係数 $n=1$ が得られた。また, 阻害が起っていると考えられる 4 mM ATP の存在下でも, 同様に, F6P の飽

和曲線は双曲線となり, $K_m=22.2 \times 10^{-5}$ M, Hill 係数 $n=1$ が得られた。

Mg²⁺ の影響： 活性測定用の緩衝液として, 100 mM イミダゾール-塩酸緩衝液 (pH 7.0) を用い, 1 mM ATP の存在下で, Mg²⁺ (MgSO₄) の濃度を変えて, 活性の変化を調べてみた。その結果, この酵素活性発現には Mg²⁺ が必要であり, Mg²⁺ 濃度の増加とともに活性は増加し, Mg²⁺ 濃度が 2 mM のとき最高の活性値を示した。このときの ATP と Mg²⁺ の濃度比は, 1:2 である。Mg²⁺ が酵素

Fig. 3. F6P Saturation Curve of PFK.

Inset; (A) Lineweaver-Burk plot, (B) Hill plot.

Assay conditions were the same as described in Fig. 1 except for the use of 100 mM Imidazol-HCl buffer and various concentrations of F6P as indicated.

Fig. 2. Influence of pH upon the ATP Inhibition of PFK.

—○— pH 7.2, —●— pH 7.8, —□— pH 8.1.

Assay conditions were the same as described in Fig. 1 except that the buffer was used at indicated pH and the ATP concentration was varied. ATP/Mg²⁺ ratio was maintained at 1:2.

Fig. 4. Effect of F6P Concentration on PFK Activity.

ATP/Mg²⁺ ratio was 2:1. Inset: Hill plot.

Assay conditions were the same as described in Fig. 1 except that the concentration of F6P was varied as shown and ATP concentration was 0.4 mM.

活性に影響を及ぼす機作の一端を知る目的で, ATP と Mg^{2+} の濃度比を 2:1 (ATP 0.4 mM, Mg^{2+} 0.2 mM) に変え, F6P の飽和曲線を求めた. Fig. 4 に見られるように, 曲線は S 字型になり, F6P が低濃度のときは, Hill 係数は 1 であるが, 高濃度になると, 2 になった. また, Mg^{2+} 濃度が高い場合 (1 mM, ATP : Mg^{2+} = 2:1) には, Mg^{2+} 濃度が低い場合 (0.2 mM) に比べて, 飽和曲線のシグモイド性が増加した.

PEP, クエン酸, 3-PG の影響: エンドウ子葉の PFK は PEP, クエン酸および 3-PG によって阻害されることが報告されている^(9,10). そこで, 大豆 PFK についても, これらの影響を調べてみた. 大豆 PFK は PEP のかなり低濃度 (1 μ M) でも活性が押えられ, 阻害型式は拮抗型であった. エンドウの PFK では PEP が allosteric effector であり, その飽和曲線は S 字型になると報告されている⁽⁹⁾が, 本実験で得られた大豆 PFK については, そのような現象はみられなかった. また, 大豆 PFK はエンドウ子葉 PFK と同様, クエン酸および 3-PG でも阻害され, その型式は拮抗型であった.

AMP および ADP の影響: Fig. 5 に見られるように, 大豆 PFK は AMP および ADP によっても阻害される. ADP は AMP よりも酵素活性を強く阻害し, その阻害型式は拮抗型であった.

セファロース 6B カラムクロマトグラムの 2 つのピークについて: 精製過程におけるセファロース 6B カラ

ムクロマトグラフィーの流出パターンでは, 活性なピークは void volume 付近にただ 1 つだけであるが, 凍結融解した酵素をセファロース 6B カラムに流すと, Fig. 6 のように, 2 つの活性なピークが得られた. 前のピークを PFK-A, 後のピークを PFK-B とし, それぞれの酵素活性におよぼす ATP の影響を調べてみると, Fig. 7 のようになった. これから明らかなように, 分子量の小さい PFK-B は, 分子量の大きい PFK-A に比べて, ATP 阻害に対する感受性が高い. PFK-B について, 2 mM の ATP の存在下で, F6P の飽和曲線を描くと, Fig. 8 のように S 字型になり, その Hill 係数は 1.3 となった. PFK-A では飽和曲線は通常の変曲線となり,

Fig. 6. Elution Pattern of the Frozen and Thawed PFK on Sepharose 6B Column.

Assay condition were the same as described in Fig. 1.

—○— enzyme activity, ---●--- absorbance at 280 nm.

Fig. 5. Effects of ADP and AMP on PFK Activity.

—●— ADP, —○— AMP.

Inset: Lineweaver-Burk plot for the results observed with ADP.

—●— 0.25 mM ADP, —○— no ADP.

Assay conditions were the same as described in Fig. 1 except for the addition of ADP or AMP as indicated.

Fig. 7. Effects of ATP Concentration on the Activities of PFK-A and PFK-B.

—○— PFK-A, —●— PFK-B.

Assay conditions were the same as described in Fig. 1 except that the concentration of ATP was varied as shown.

Fig. 8. Effect of F6P Concentration on PFK-B Activity.

Inset: Hill plot. Assay conditions were the same as described in Fig. 1 except for the use of 2 mM ATP.

Hill 係数も1であった。PFK-Aを取り出して、セファロース 6B カラムにかけても、PFK-B はあらわれてこなかったが、2N NaCl に対して、24 時間透析後、カラムにかけると、PFK-B はあらわれないが、PFK-A のピークは Fig. 6 に比べて tailing していた。また、硫酸分画後の酵素を 100 mM リン酸カリ緩衝液 (pH 6.0) で平衡化した後、セファロース 6B カラムにかけ、同緩衝液で流出させると、あきらかに tailing が認められた。低蛋白質濃度でも、同じように流出パターンに tailing が認められた。以上、凍結融解、pH、蛋白質濃度およびイオン強度等によって、酵素の解離会合を推論できるような結果が得られた。

考 察

PFK は解糖系の key enzyme として重要な役割を演じているので、動物、微生物起源の PFK については数多くの研究がなされている⁽¹⁻⁷⁾。現在までの知見より、植物 PFK が動物 PFK と最も著しく異なる点を考えると、ATP だけでなく、ADP および AMP によっても阻害されることである。すなわち、動物および微生物の PFK については、ADP により活性化または ATP 阻害の軽減が報告され、AMP についても同様のことが報告されている⁽¹¹⁻¹⁷⁾。これに反して、植物の PFK においては、いずれも AMP, ADP により阻害されるか、または ATP, PEP による阻害を強めている^(18,19)。大豆 PFK においても、Fig. 5 に見られるように AMP, ADP により阻害を受ける。

大豆 PFK はエンドウ PFK^(9,10) と同様に、家兎骨格

筋⁽²⁰⁾等の動物 PFK に比べて、はるかに低い濃度の PEP で阻害され、また 3-PG によっても阻害を受ける。PEP, 3-PG がいくつかの植物組織の ADP-グルコースピロホスホリラーゼを活性化すること⁽²¹⁻²⁵⁾、および発芽とともに大豆子葉中にデンプンが合成されること⁽²⁶⁾等を考え合えると、PEP, 3-PG によって阻害を受ける大豆 PFK は大豆の炭水化物代謝において、その分解方向と多糖類合成方向との代謝の流れの調節に非常に重要な役割を演じていると考えられる。

Mansour⁽²⁷⁾ は PFK が pH、酵素濃度、effector により解離会合をおこし、それに伴い酵素の性状が変化することを報告している。大豆 PFK は、Fig. 6 に見られるように、凍結融解によって、もとの PFK より分子量の小さな性状の違った PFK が生成し、これは ATP に対する感受性が強く、飽和曲線も 2 mM ATP の存在で S 字型になり、Hill 係数は 1.3 であった。これに対し、もとの PFK は ATP に対する感受性が弱く、飽和曲線も双曲線であった。しかし、この2つの PFK の間の交換は pH を 6 から 9 に変化させても起らず、2N NaCl 溶液に 24 時間透析したときにセファロース 6B 流出パターンにわずかに tailing がおきるのみであった。精製酵素の ATP による阻害型式も単なる拮抗型であり、allosteric な性質も現われてこなかったため、大豆 PFK に Mansour⁽²⁷⁾ のモデルをそのままあてはめることはできないが、上の現象から、大豆 PFK は、少なくとも一方から他方に変化し得る2つの活性のある型として存在し得ることが示唆される。

一般に、PFK の ATP による阻害が Mg^{2+} の濃度を増加させたとき、解除されることがみられている^(16,27,28)。また、Atkinson⁽¹⁶⁾ は *E. coli* の PFK について、ATP と Mg^{2+} の濃度比によって、その活性曲線が変化することを報告している。大豆 PFK も、ATP と Mg^{2+} の濃度比を変化させると、その活性曲線は変化した。ATP と Mg^{2+} の比を 2 対 1 にしたとき、飽和曲線は S 字型になり、0.4 mM ATP の存在で、その Hill 係数が 2 になった。また、セファロース 6B に Mg^{2+} のない状態で酵素を通すと、その活性が失われた。これらのことから、 Mg^{2+} は pH、酵素濃度とともに大豆 PFK の性状に、なんらかの変化をもたらしていると考えられる。

以上の結果より、大豆子葉中の PFK は基質 (F6P, ATP), ADP, AMP, クエン酸, PEP, 3-PG 等の effector および Mg^{2+} 等の濃度や pH、イオン強度、酵素量によ

り, その性状および活性に変化を生じ, 大豆子葉中の糖代謝を調節していると考えられる。

本論文は大豆子葉中の PFK についての報告であるが, 大豆種子を明発芽させた本葉中の PFK についても同様の実験を行なったが, はほぼ同一の結果が得られた。

要 旨

暗発芽4日目の大豆子葉より PFK を抽出し, 約 300 倍に精製し, その性質を調べた。この酵素は最適 pH が 7.8 で, ADP, AMP, クエン酸, PEP, 3-PG および高濃度の ATP により活性が阻害された。酵素活性におよぼす ATP の影響は, pH によって変化した。この酵素の活性発現には Mg^{2+} が必要であり, ATP と Mg^{2+} の比が 1:2 のとき, 最高活性を示した。ATP と Mg^{2+} の比を 2:1 に変えると, F6P 飽和曲線は S 字型になり, F6P の濃度により Hill 係数が 1 から 2 に変化した。凍結融解した酵素をセファロース 6B カラムにかけると, 活性のある 2 つのピークが得られ, 低分子量のものは高分子量のものに比べて, ATP 阻害に対する感受性が強く, 2 mM ATP 存在下における F-6P 飽和曲線は低分子量 PFK では S 字型を示し, Hill 係数は 1.3 になったが, 高分子量 PFK では通常の双曲線となり, Hill 係数は 1 であった。酵素を pH 6.0 のリン酸緩衝液で平衡化, または 2 N NaCl 溶液中で透析後, あるいは低濃度の酵素を pH 8.0 のトリス-塩酸緩衝液でセファロース 6B カラムに通すと, いずれも活性のあるピークが tailing を起す。これらの現象は, 大豆 PFK が凍結融解, または pH, イオン強度, 酵素濃度の変化により解離を起し, 少なくとも, 2 つの活性のある型として存在できることを示唆する。

以上の結果にもとづき, 大豆子葉中の PFK の生理的意義を考察した。

- (1) T. E. Mansour: "Advances in Enzyme Regulation," Vol. VIII, ed. by G. Weber, Pergamon Press, Oxford, 1970, p. 37.
- (2) D. P. Bloxham and H. A. Lardy: The Enzymes," Vol. VIII, ed. by P. D. Boyer, Academic Press Inc., New York, N. Y., 1973, p. 240.
- (3) M. Y. Tsai and R. G. Kemp: *J. Biol. Chem.*, **248**, 785 (1973).
- (4) C. K. Marschke and R. W. Berlohr: *Arch. Biochem. Biophys.*, **156**, 1 (1973).
- (5) P. M. Lad, D. E. Hill and G. G. Hammes: *Biochemistry*, **12**, 4303 (1973).
- (6) F. Gonzalez, M. Y. Tsai and R. G. Kemp: *Comp. Biochem. Physiol.*, **52 B**, 315 (1975).
- (7) G. Colombo, P. W. Tate, A. W. Girotti and R. G. Kemp: *J. Biol. Chem.*, **250**, 9404 (1975).
- (8) O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall: *ibid.*, **193**, 265 (1951).
- (9) G. J. Kelly and J. F. Turner: *Biochem. J.*, **115**, 481 (1969).
- (10) *idem*: *Biochim. Biophys. Acta*, **208**, 360 (1970).
- (11) J. V. Passoneau and O. H. Lowry: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **7**, 10 (1962).
- (12) T. E. Mansour: *J. Biol. Chem.*, **238**, 2285 (1963).
- (13) K. Uyeda and E. Racker: *ibid.*, **240**, 4682 (1965).
- (14) O. H. Lowry and J. V. Passoneau: *ibid.*, **241**, 2268 (1966).
- (15) A. Parmeggiani, J. H. Luft, D. S. Love and E. G. Krebs: *ibid.*, **241**, 4625 (1966).
- (16) A. Ramaiah, J. A. Hathaway and D. E. Atkinson: *ibid.*, **239**, 3619 (1964).
- (17) D. E. Atkinson and G. M. Walton: *ibid.*, **240**, 757 (1965).
- (18) D. T. Dennis and T. P. Coultate: *Biochim. Biophys. Acta*, **146**, 129 (1967).
- (19) *idem*: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **25**, 187 (1967).
- (20) R. G. Kemp and E. G. Krebs: *Biochemistry*, **7**, 2596 (1968).
- (21) G. G. Sanwal, E. Greenberg, J. Hardie, E. C. Cameron and J. Preiss: *Plant Physiol.*, **43**, 417 (1968).
- (22) D. B. Dickinson and J. Preiss: *Arch. Biochem. Biophys.*, **130**, 119 (1969).
- (23) *idem*: *Plant Physiol.*, **44**, 1058 (1969).
- (24) P. W. MacDonald and G. A. Strobel: *ibid.*, **46**, 126 (1970).
- (25) L. C. Hannah and O. E. Nelson, Jr.: *ibid.*, **55**, 297 (1975).
- (26) 佐々木周郁: 農化, **5**, 491 (1929).
- (27) T. E. Mansour and C. E. Ahlfors: *J. Biol. Chem.*, **243**, 2523 (1968).
- (28) V. Peatau and H. A. Lardy: *ibid.*, **242**, 2035 (1967).