

DA C.616.2  
48  
1979

( )

「水稻アルドラーゼに関する研究」

筑波大学大学院

農学研究科

応用生物化学専攻

倉沢新一

82600656

## 目 次

	頁
序論	1
第1編 発芽時における Aldolase 活性 の挙動	29
第1章 実験方法	35
第1節 実験材料および試薬	35
第2節 Aldolase の活性測定法	35
その1 NADH 酸化法	36
その2 Dinitrophenyl hydrazine 法	37
第3節 蛋白質の測定法	39
第4節 水稻種子の培養法および 粗酵素液抽出法	41
第5節 ポリアクリルアミドゲル スク電気泳動法	42
第6節 ゲル染色法	44
その1 蛋白質染色法	44
その2 活性染色法	44

第2章	実験結果	47
第1節	発芽時における Aldolase 活性の消長	47
その1	発芽温度の影響	47
その2	種子器官別 Aldolase の 消長	50
第2節	Gibberellin の影響	54
第3節	器官別によるマルチプル フォーム	57
第3章	考察	66
第2編	水稻種子胚・ヌカ層 Aldolase の精製ならびに結晶化	72
第1章	実験方法	74
第1節	実験材料	74
第2節	酵素活性測定法	74
第3節	結晶酵素均一性検定のた めのポリアクリルアミド ディスク電気泳動法	75

第2章	実験結果	76
第1節	水稻種子 Aldolase の精製	76
その1	酵素の抽出	76
その2	硫酸分画	76
その3	DEAE-Cellulose カラムクロマトグラフィー	77
その4	Sephadex G-200 カラム クロマトグラフィー	78
その5	Phosphocellulose カラム クロマトグラフィー	79
第2節	結晶化	84
第3章	考察	89
第3編	結晶水稻種子 Aldolase の性質	94
第1章	実験方法	97
第1節	実験材料	97
第2節	Aldolase 活性の測定	97
第3節	ゲルろ過法	98
第4節	沈降平衡法	99

第5節	S D S ポリアクリルアミ ドディスク電気泳動法	100
第6節	等電点電気泳動法	103
第7節	アミノ酸分析	104
第8節	N末端アミノ酸分析	107
第2章	実験結果	110
第1節	基質特異性ならびに Michaelis 定数	110
第2節	最適pHならびにpH安定性	114
第3節	最適温度ならびに熱安定 性	118
第4節	UVスペクトル	119
第5節	分子量	123
その1	ゲルろ過法	123
その2	沈降平衡法	123
第6節	サブユニット構造	127
第7節	等電点	130
第8節	アミノ酸分析	132
第9節	N末端アミノ酸	135
第3章	考察	138

第4編	水稻種子 Aldolase の反応機構・ 特に活性中心について	144
第1章	実験方法	148
第1節	実験材料	148
第2節	Aldolase 活性の測定	148
第3節	金属イオンならびにキレ ート剤の添加	149
第4節	$\text{NaBH}_4$ 酵素-基質複合体 の還元法	150
第5節	Carboxypeptidase A による C 末端アミノ酸残基消化法 および Carboxypeptidase 活 性測定法	151
第2章	実験結果	153
第1節	金属およびキレート剤の 影響	153
第2節	Schiff 塩基の形成	156
第3節	Aldolase 活性に対する C 末端部アミノ酸の影響	158
第3章	考察	162

本研究の結論および要約 165

謝辞 174

参考文献 175

## 図表目次

第 1 図	発芽時における水稻種子中の Aldolase 活性の変化	49
第 2 図	発芽時における切断種子中の Aldolase 活性の変化	52
第 3 図	発芽種子中の Aldolase 活性に対する Gibberelline の影響	55
第 4 図	水稻種子胚、ヌカ部のポリアクリルアミド電気泳動図	60
第 5 図	水稻種子胚乳部のポリアクリルアミド電気泳動図	61
第 6 図	水稻幼植物体葉部のポリアクリルアミド電気泳動図	62
第 7 図	水稻幼植物体根部のポリアクリルアミド電気泳動図	63
第 8 図	ポリアクリルアミドディスク電気泳動における Aldolase 活性染色法の検討	64
第 9 図	ポリアクリルアミドディスク電気泳動における Aldolase 活性染色法の模式図	65
第 10 図	DEAE-cellulose カラムクロマトグラム	81
第 11 図	Sephadex G-200 カラムクロマトグラム	82
第 12 図	Phospho cellulose カラムクロマトグラム	83
第 13 図	水稻種子 Aldolase 結晶の顕微鏡写真	86
第 14 図	水稻種子 Aldolase 結晶のポリアクリルアミドディスク電気泳動	87
第 15 図	Phospho cellulose カラムクロマトグラフィーによる段階精製法	93
第 16 図	Fru-1.6-P <sub>2</sub> に対する Km 値の測定	112
第 17 図	Fru-1-P に対する Km 値の測定	113
第 18 図	Aldolase の最適 pH	116



第 19 図	Aldolase の pH 安定性.	117
第 20 図	Aldolase の最適温度	120
第 21 図	Aldolase の熱安定性.	121
第 22 図	Aldolase の UV スペクトラム.	122
第 23 図	Sephadex G200 を用いたゲルろ過による分子量測定	125
第 24 図	沈降平衡法による Aldolase の分子量測定.	126
第 25 図	Aldolase の SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動図.	128
第 26 図	SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法による分子量測定.	129
第 27 図	等電点電気泳動法による Aldolase の等電点の測定.	131
第 28 図	DNP 法による N 末端アミノ酸の分析.	137
第 29 図	活性中心における Schiff 塩基の形成.	157
第 30 図	Carboxypeptidase A 処理による活性中心の検索.	161
第 1 表	水稻種子 Aldolase の精製過程.	88
第 2 表	Aldolase の アミノ酸分析.	133
第 3 表	水稻 Aldolase の偏比容の測定.	134
第 4 表	水稻種子およびその他の Aldolase の性質の比較.	142
第 5 表	N 末端アミノ酸残基の比較.	143
第 6 表	Aldolase 活性に対する金属およびキレート剤の影響.	155

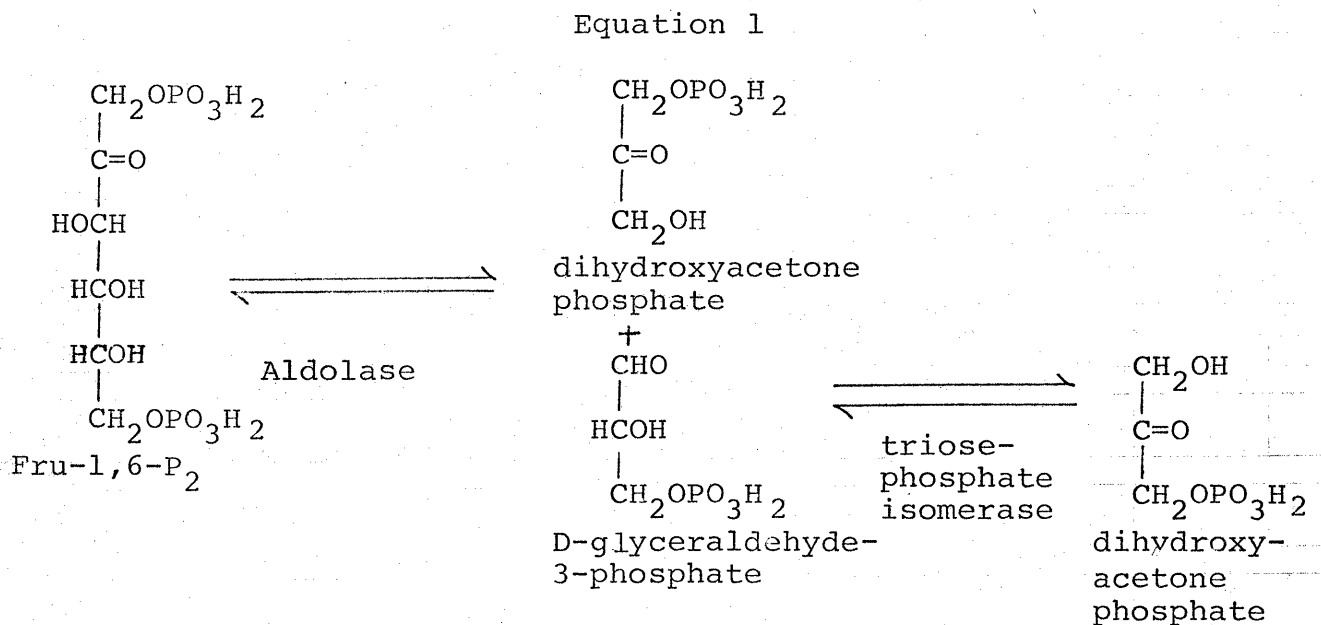
1

化学反応としてのアルドール縮合は、90年以上も前に既に知られていた。この反応を触媒する酵素 Aldolase を発見し命名したのは、Meyerhof と Lohmann<sup>(1)</sup> であった。E. Fischer と Tafel<sup>(2)</sup> は 1887 年に化学反応的に glyceraldehyde から塩基触媒による縮合で、hexose が生成することを報告した。

約 50 年後、H. O. Fischer と Baer<sup>(3)</sup> は、この反応が塩基性条件下で glyceraldehyde から生成される dihydroxyacetone を利用していることを示した。生物体内においてこのような反応が起こっていることを最初に報告したのは、Meyerhof と Lohmann<sup>(4)</sup> であった。彼等は、この Fructose-1,6-bisphosphate (Fru-1,6-P<sub>2</sub>) と dihydroxyacetone phosphate とが相互に変換する反応が、ウサギ筋肉抽出液中で可逆的に進むことを見出した。その後、Meyerhof と Keissling<sup>(5)</sup> は 1935 年に、筋肉抽出液中に dihydroxyacetone phosphate と glyceraldehyde-3-phosphate との平衡に関与する他の酵素が

存在していることを示した。さらに1936年、Meyerhof等<sup>(6)</sup>は酵素の触媒作用により、最終的に dihydroxyacetone phosphate が多くの aldehyde と縮合することが可能であることを示した。

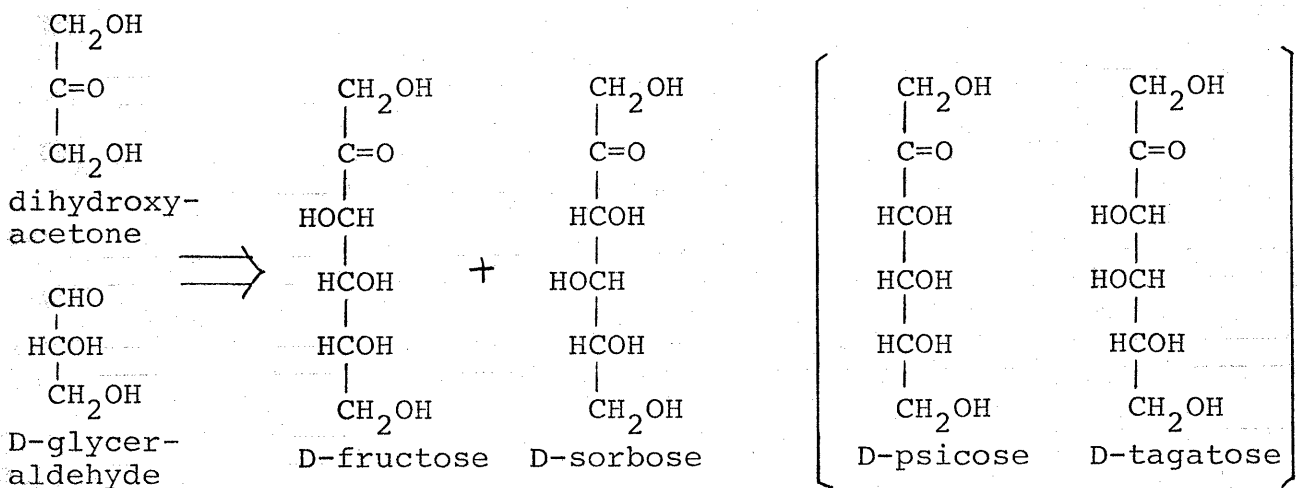
Fru-1,6-P<sub>2</sub> の開裂により形成されるものが、D-glyceraldehyde-3-phosphate であることが知られ<sup>(7)</sup>、全体の反応が Equation 1 に示すものであることが推測された。



この反応の速度論及び熱力学的性質は概ね研究され、その結果は Meyerhof<sup>(8)</sup> により1951年にまとめて発表された。

1936年、Fischer と Baer は、非酵素的アルドール縮合において、温和な塩基性条件下で、dihydroxyacetone と D-glyceraldehyde から生成され得る化合物は、D-fructose、D-sorbose、D-psicose 及び D-tagatose の 4 種類であるにもかかわらず (Equation 2)、C-3 と C-4 の水酸基がトランスの立体配置である 2 種類の生成物、すなわち D-fructose と D-sorbose しか得られないことを見出した。

Equation 2



一方、酵素触媒反応においては、D, L-glycer-

aldehyde と dihydroxyacetone phosphate との縮合で Fru-1,6-P<sub>2</sub> と L-sorbose-1-phosphate のみ生成した<sup>(9)</sup>。これら2種類のトランスアイソマーは、炭素3の位置の水酸基の立体配置がL型である。D-sorbose-1-phosphate と炭素3の位置の水酸基の立体配置がD型である L-fructose-1-phosphate は生成しなかった。このように、酵素触媒によるアルドール縮合反応は、トランス立体配置のうちの1種類のみを生成するという特異性を示した。

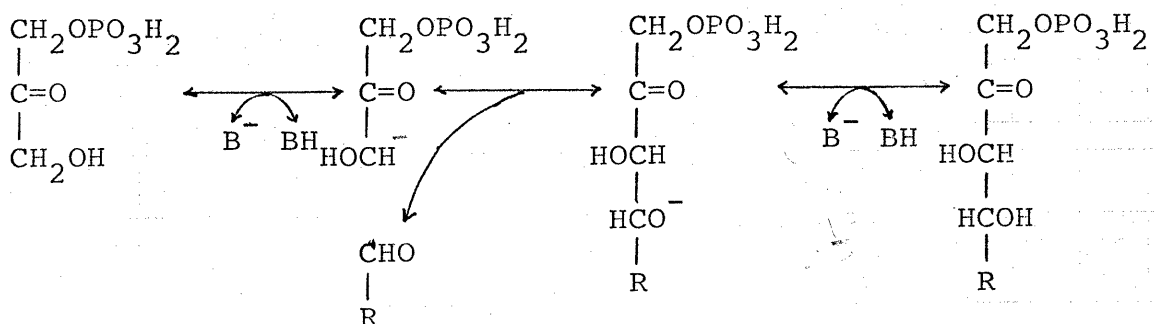
次に、Fructose-1,6-bisphosphate aldolase について述べる。

Aldolase は、糖アルコールのアルドール縮合を触媒する酵素につけられた名称である。そのうち、Fructose-1,6-bisphosphate aldolase (E.C. 4.1.2.13) は広く分布し、大多数の生物試料から容易に調製できることから、Aldolase の原型とも言える。以下本論では、Fructose-1,6-bisphosphate aldolase を単に Aldolase と略す。

Aldolaseは、現在知られている生物のほとんどすべてに存在している。しかし、ある種のヘテロ代謝を行ない、Embden-Meyerhof経路が欠損しているバクテリアには、本酵素が存在しないことが知られている<sup>(9,10)</sup>。

Aldolaseにより触媒されるアルドール縮合反応において、keto triosephosphateであるdihydroxyacetone phosphateは、種々のaldehydeと縮合反応を起こして、炭素数4から8の生成物が得られる。これらの反応は、Horecker<sup>(11)</sup> や Rutter<sup>(12)</sup> により報告されている (Equation 3)。

Equation 3



B<sup>-</sup>, BHは、一般的塩基の酸化型、還元型を示す。aldehyde中のRは、木素の場合(その時のaldehydeはformaldehyde)、メチル基の場合(acetoaldehyde)、糖分子のポリヒドロキシル鎖の場合(glyceraldehyde erithroseなど)がある。これらの糖がリン酸化されている場合は、リン酸化されていない場合に比べ、速く反応が進む。

ウサギ筋肉のAldolaseは、dihydroxyacetone phosphateを必須の反応基質として要求し、反応相手のaldehydeとしてD-glyceraldehydeを主に選択し、炭素3と4における立体配置がトランスであるケトースを特異的に生産する性質を有している<sup>(7,13)</sup>。酵母及び哺乳類のAldolaseにおいては、リン酸化されたaldehydeに対して強い選択性があり、それに対応して、Fru-1,6-P<sub>2</sub>の方が、fructose-1-phosphate (Fru-1-P)より急速に分解される。

この分解速度の比は、ウサギ筋肉で50:1、酵母ではこの値よりはるかに高く、ホウレンソウでは少なくとも25:1である<sup>(12,14~17)</sup>。しかし、

動物の肝臓における Aldolase は、Fru-1,6-P<sub>2</sub> と Fru-1-P とをほぼ同じ速度で分解する<sup>(17~22)</sup>。初め Leuthardt 等<sup>(23)</sup> は、肝臓には Fru-1,6-P<sub>2</sub> を基質とするものと、Fru-1-P を基質とする 2 種類の Aldolase が存在すると考えた。しかし、この酵素が牛の肝臓から結晶化されてもなお両基質に対する比活性が変わらなかったことから、肝臓 Aldolase は両者を基質とすることが判明した。又、大豆の葉における Aldolase も同様な性質があることが、最近示された<sup>(24)</sup>。なお、筋肉由来の Aldolase に Carboxypeptidase を作用させると、Fru-1,6-P<sub>2</sub> に対する活性が低下し、見かけ上、肝臓由来の Aldolase と同様の速度比を示すことが知られている<sup>(25,26)</sup>。

次に Aldolase の分類について述べる。

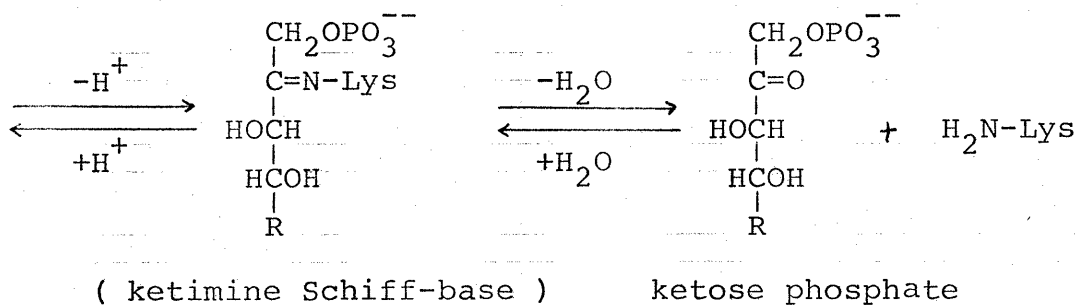
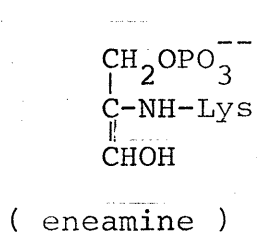
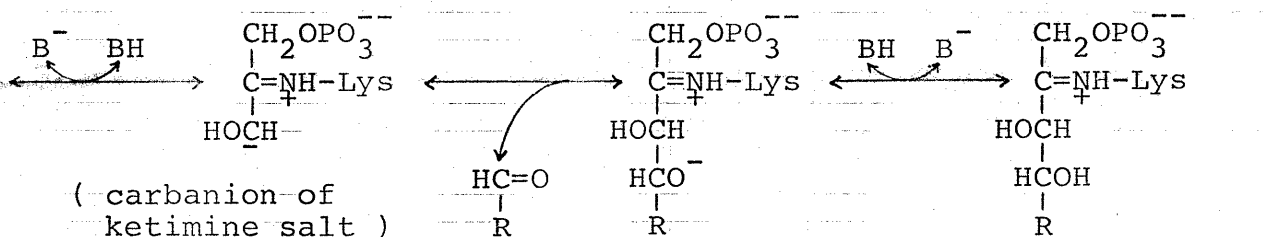
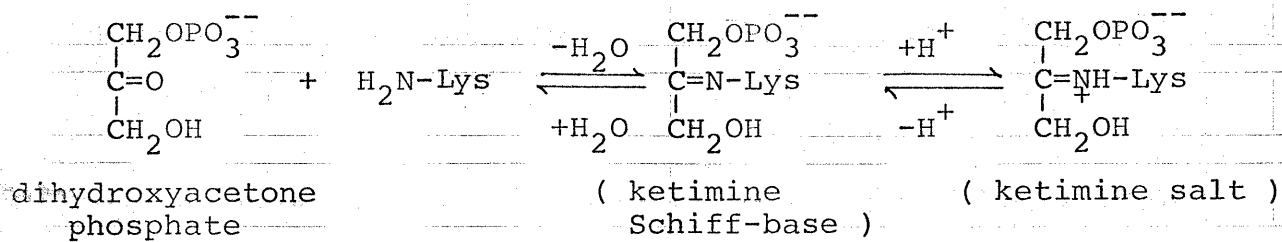
Aldolase は、金属要求性の差により 2 種類に分類できる。この金属要求性は、初め、Warburg と Christian<sup>(27)</sup> により観察された。その後、Rutter<sup>(28)</sup> により詳しく研究され、分



類の指標の1つとされた。Class I Aldolase は、酵素活性が金属キレート剤の影響を受けず、さらにまた基質と Schiff 塩基の中間体を形成する<sup>(29)</sup>。一方、Class II Aldolase は、キレート剤で酵素活性が阻害され、基質と Schiff 塩基中間体を形成することはない。Class I Aldolase の反応機構は、Merse と Horecker<sup>(30)</sup> により確立された。この反応機構は、基本的に Equation 3 に示した反応機構である。

Equation 4 に、最も典型的な Schiff 塩基を形成する Aldolase の反応機構を示した。この反応の第1段階で、Aldolase の lysine 残基の  $\epsilon$ -アミノ基と基質との間に Schiff 塩基が形成される。この反応中間体は、水素化ホウ素で還元した後 Aldolase を酸加水分解することにより、 $N^6$ - $\beta$ -glyceryllysine であることが確認された<sup>(31~33)</sup>。反応の第2段階はカルバニオンの形成である。このカルバニオンの存在は、酵素による触媒反応中にプロトンが置換され

Equation 4



ることから証明された<sup>(34~36)</sup>。後にこの比較的安定なカルバニオン中間体の存在は、tetra-nitromethaneを酵素反応溶液中に加えると発色することにより、直接証明された<sup>(37~39)</sup>。最近ではhexacyanophenorateによるカルバニオンの選択的酸化反応からも確かめられている<sup>(40)</sup>。この置換反応は、炭素3位の水素を利用してゐる。又、この置換反応は、この炭素-3の位置で立体特異的な結合を酵素が触媒するという、以前から知られていた観察結果と一致している。Schiff塩基中間体中に反応性に富んだ二重結合が存在するということは、このSchiff塩基中間体にニアニ化水素を作用させることにより確認された<sup>(41,42)</sup>。

反応の次の段階では、Schiff塩基のカルバニオンにaldehydeが結合し、最終生産物が分離する。これらすべての反応は可逆的であり、基質としてFru-1,6-P<sub>2</sub>あるいはdihydroxyacetone phosphateとglyceraldehyde-3-phosphateを用いても反応はすみやかに進む。

Candida utilis の Transaldolase も基質である fructose-6-phosphate と反応中に Schiff 塩基中間体を形成することから Class I に分類できる<sup>(43)</sup>。この複合体は Fructose-1,6-bisphosphate aldolase の複合体より安定であり、水素化ホウ素により還元しなくても分離精製できる。又、複合体には、dihydroxyacetone phosphate として結合しており、この複合物を水素化ホウ素で還元した後酸加水分解を行なうと、N<sup>6</sup>-β-glycerillysine が得られた<sup>(32)</sup>。しかしながら、Transaldolase は遊離の dihydroxyacetone phosphate と複合体を形成しない。これは、Fructose-1,6-bisphosphate aldolase と大きく異なる性質である。他の様々な Schiff 塩基を形成する Aldolase について、Morse と Horecker<sup>(30)</sup> が総括している。

Schiff 塩基を形成する lysine 残基の他にもいくつかの反応機構に関与しているアミノ酸残基が、ウサギ筋肉 Aldolase において見出されている。中でも最も興味深いのは、Fru-1,6-

$P_2$ を基質とする時、AldolaseのC末端の tyrosine 残基が、基質の開裂に最も効果のある Aldolase の立体構造を保持する時に、おそらく関係があるものと思われる点である<sup>(25,26)</sup>。

このC末端の tyrosine 残基を carboxypeptidase 処理することにより除くと、Aldolase の Fru-1,6- $P_2$  に対する活性のみが低下し、Fru-1-P に対する活性とほぼ等しくなってしまう。C末端以外の tyrosine 残基をアセチル化することによっても、酵素活性は低下する<sup>(44,45)</sup>。これらの結果から、tyrosine 残基は酵素反応機構において特殊な役割を担っていると推測される。

ウサギ筋肉 Aldolase および Candida trans-aldolase において、histidine 残基が触媒機構に関与していると考えられている<sup>(46,47)</sup>。ウサギ筋肉 Aldolase の場合、感光剤として rose bengal を用いて光酸化すると、histidine 残基の消失と共に酵素活性が減少した。carboxypeptidase 処理と異なり、Fru-1,6- $P_2$ , Fru-1-P

に対する Aldolase の活性は、共に同程度の減少が見られた。

Candida utilis から分離した Transaldolase に rose bengal 共存下で光酸化を行なうと、酵素 1 分子当り 1 分子の histidine 残基が失われると同時に、急速にかつ完全に、酵素活性が失われてしまう<sup>(47)</sup>。Schiff 塩基-酵素複合体へのトリチウムの取り込み実験の結果から、あるいは Schiff 塩基複合体が光酸化に対し抵抗性を示すことから、Transaldolase 反応において histidine 残基は、接近した aldehyde 基質からプロトンを受け取る役目を果たしているとされている。このように、ウサギ筋肉 Aldolase と Transaldolase との反応機構における基本的な相違点は、Schiff 塩基でのプロトン置換反応過程にある<sup>(46)</sup>。

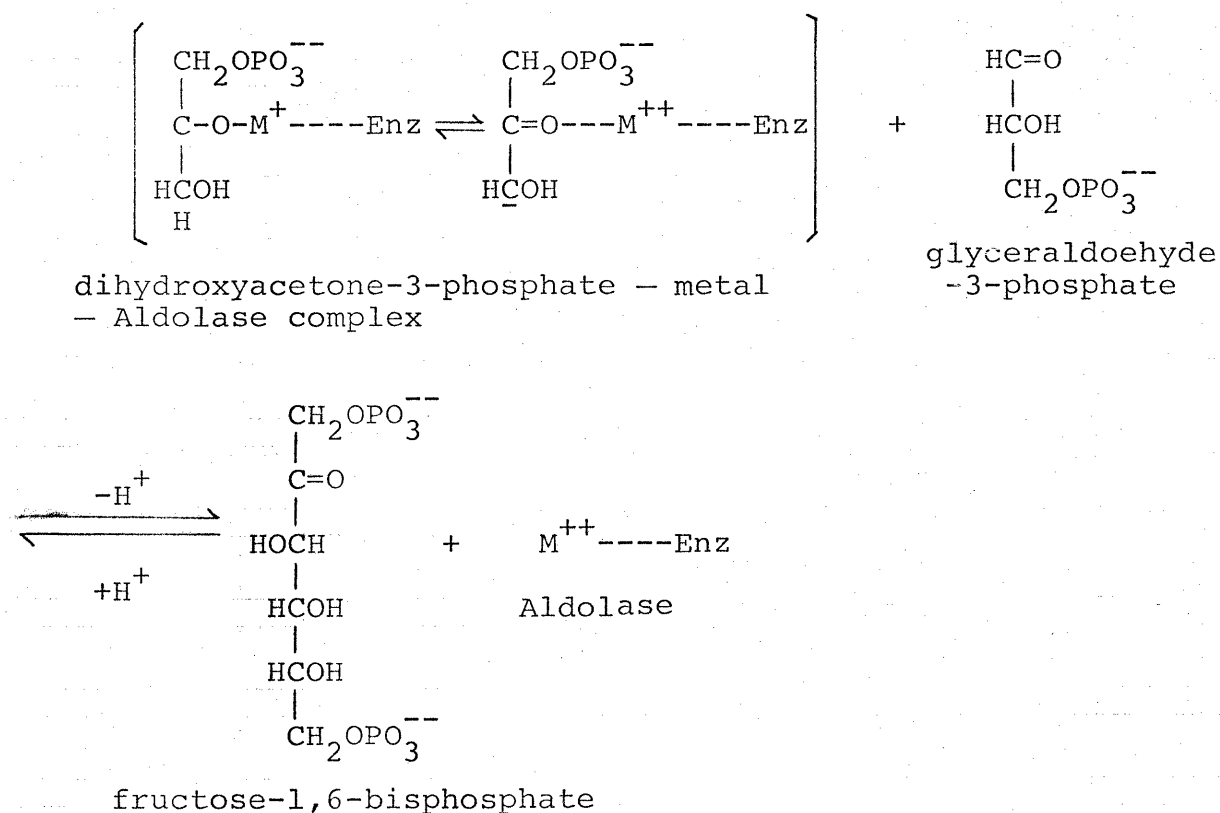
Class II Aldolase は、酵素の不安定性や SH 試薬に感受性があることから、あまり多くは研究されていない<sup>(28,48)</sup>。金属に依存した酵素反応についていくつかの仮定が出されているが、

酵素 - 基質複合体は今のところ得られていない<sup>(49)</sup>。Rutter<sup>(28)</sup>によると、金属は dihydroxyacetone phosphate の炭素 2 位のケトと複合体を形成することにより、3 位の炭素に負電荷を生成させる役割を荷っている。その一方で金属は、接近した aldehyde のカルボニル基の二重結合の分極をも促進させている。さらに Class II Aldolase は Class I Aldolase の約 7 倍の強い活性があることから、金属は酵素の立体配座を活性発現に有利な位置に保つ働きがあると考えられている<sup>(50)</sup>。

Riordan と Christen は、dihydroxyacetone phosphate の存在下で、Class II Aldolase と trinitromethane との反応は、Class I における反応と同様に進むことを明らかにした<sup>39</sup>。これは、Class I と同様にカルバニオンを中間体として形成することを推測させる。しかし大腸菌においては、Fru-1,6-P<sub>2</sub> の炭素 2 位の酸素は開裂反応においても変換していないことがわかった<sup>(51)</sup>。この結果は、大腸菌では

Schiff 塩基が形成されていないことを示す。  
 というのは、Schiff 塩基中間体の形成において、C-2 の酸素が失われることが必須であるからである (52)。Equation 5 に Class II Aldolase の推定反応機構を示した<sup>(53)</sup>。

Equation 5





次に、Aldolaseの種属系統的分布について述べる。

Class I Aldolase は植物界、動物界に分布している。又、金属を含むClass II Aldolase はMonera、原生生物、藻類、菌類に限定されている（この分類はWhittaker<sup>(53)</sup>に依った。）高等植物及び高等動物には、現在まで金属要求性のAldolaseは見られていない。しかし、微生物界ではMicrococcus aerogenes<sup>(55,56)</sup>、Mycobacterium smegmatis<sup>(57,58)</sup>などの生産するAldolaseが、EDTAなどのキレート試薬でも失活せず、逆に基質存在下で水素化ホウ素ナトリウムにより還元するとSchiff塩基中間体の還元物であるN-β-glycero phosphate aldolaseを生じたことから、Class I Aldolaseであると推測されている。

また、ある種の藻類、細菌類ではClass IとClass II両型のAldolaseが生合成されることわかった。Chlamydomonas mundana<sup>(59)</sup>、Ch. reinhard<sup>(60)</sup>、Euglena gracilis<sup>(61)</sup>では、栄養条

件に依存して両型の Aldolase が生合成されている。一般に光合成独立栄養の場合 Class I Aldolase が、酢酸等を炭素源とした従属栄養の場合 Class II Aldolase が、夫々、より多く生合成される。又、Euglena の場合、Class I Aldolase はクロロプラストで、Class II Aldolase は核で生合成されることがわかっている。さらに E. coli (Crooks 株) でも両型の Aldolase の生産が報告されている<sup>(62)</sup>。この場合も栄養条件により生合成される割合が異なっている。

前述のように、Class I Aldolase の反応機構の特徴は、基質の C-2 位のカルボニル基と酵素の活性中心の lysine 残基の  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub> 基とから水がとれて Schiff 塩基が形成され反応が進行することである。これに伴い、基質のカルボニル基の酸素と反応系の水の酸素とが交換される。しかし Class II Aldolase においては、反応中間体として金属が基質のカルボニル基と酵素との橋わたしの形をとるので、酸素の交換は起こらない。これは、基質に 2-[O<sup>18</sup>]

Fru-1,6-P<sub>2</sub>を用いて、O<sup>18</sup>の交換反応から調べることができ(63)。故に、O<sup>18</sup>交換反応は、Class I と Class II の分類や両者の細胞内の存在比率の測定などに有効な手段となり得る。

次に、植物 Aldolase に関する研究について述べる。

前核細胞生物を用いた Aldolase の研究では、そのほとんどに典型的な Class II Aldolase が存在することを報告している(14, 64-66)。Russel と Gibbs<sup>(67)</sup>は、緑藻類の Chlamydomonas mundana には Class I と Class II の両方の Aldolase が存在することを発見し、両 Aldolase を夫々分離精製した。

植物中の Aldolase 活性は、1943年、馬場<sup>(68)</sup>により最初に観察された。馬場は、タバコの葉の抽出液中で Fru-1,6-P<sub>2</sub> が triose phosphate に異化することを報告した。その後、Stumph により大豆種子から得たアセトン粉末中に Aldolase が存在することが報告され、詳しい報告が行われた<sup>(69)</sup>。さらに、他の植物のア

セトン粉末においても研究が行なわれ、相互に比較された<sup>(9)</sup>。

大豆の生長過程を追って Aldolase の活性測定を行なうと、生活環のいずれの段階にも Aldolase は存在するが、最も分裂成長の速い時に最大の活性が認められた。細胞学的研究を行なった結果、細胞質に Aldolase 活性が局在していた。

Stumpf は大豆種子から Aldolase を部分的に精製し、比較的活性の高い標品を得た<sup>(69)</sup>。種子を洗浄し、ワーリングブレンダーで磨砕し、以下硫酸分画、酸分画 (酢酸 pH 5.5) の手順で精製した。最終的にこの精製酵素の比活性は、0.27 unit ( $\mu$  moles substrate cleaved per minute) per mg で、約 100 倍に純化された。この精製酵素の最適 pH と  $K_m$  値は、筋肉 Aldolase と同様な値を示した。しかし、0.1 mM  $\text{CuSO}_4$ 、フェニル酢酸水銀、硝酸銀、酢酸水銀で阻害されず、一般的に重金属に対し安定であった。

Aldolase は、Sanwal と Krishnan<sup>(70-72)</sup> により、

サボテンからも精製された。酵素は細胞内顆粒体に結合しているらしく、高い pH か、0.5M 無機リン酸のような高いイオン強度の緩衝液でしか抽出されなかつた。このような方法で可溶化した酵素は、活性発現に金属を必要とせず、EDTA で阻害されず、cysteine でわずかに阻害された。この結果は、本酵素が典型的な Class I であることを示す。Quinlan-Watson<sup>(73-74)</sup> は、Zn 欠乏大豆で Aldolase 活性が減少することを報告したが、この観察は必ずしも Zn 欠乏が酵素活性に対し直接的に影響を与えることを証明するものではない。なぜならば、Clark 等が明らかにしたように、Zn 及び K の欠乏により低下した植物中の Aldolase 活性は、Zn 及び K を添加しても賦活化されなかつたからである。むしろ、Zn<sup>2+</sup> あるいは Co<sup>2+</sup> を 1 mM 添加しても、明らかに活性が阻害された。EDTA は、例えば 5mM のような高濃度でも酵素活性にほとんど影響を与えない。しかし、1 mM の o-phenanthroline あるいは、

5 mM  $\text{CN}^-$  は強く阻害する。これは、これらの物質のキレート剤としての性質によるものではない。なお、ウサギ筋肉の Aldolase でも同様な結果が得られている<sup>(41,77)</sup>。

以上の結果は部分精製標品について求められたものである。高度に精製した Aldolase は最初にホウレンソウのクロロプラストから得られた<sup>(78)</sup>。しかしながら、磨碎物の全活性の 95% が上澄にあるため、活性収率は低いものであった。Sephadex G-200 によるゲル濾過、硫酸分画、DEAE セルロースクロマトグラフィーを用いて得た酵素画分は、Fru-1,6-P<sub>2</sub> と sedohepturose-1,6-bisphosphate を開裂し、夫々の  $K_m$   $V_{max}$  値、carboxypeptidase 消化に対する酵素活性の変化、広い最適 pH、基質存在下での水素化ホウ素に対する感受性、金属あるいは金属キレート剤に影響されない事等ウサギ筋肉 Aldolase の性質と類似していた。又、沈降速度法による分子量は 140,000 であった。

1967年、Hatz等<sup>(65)</sup>は大豆発芽種子から抽出精製を行なった。硫酸分画、DEAE-Sephadexカラムクロマトグラフィー、Sephadex G-200によるゲル濾過を行ない、均一な酵素を得た。精製Aldolaseの比活性は $7.5 \text{ unit/mg}$ でFru-1, 6-P<sub>2</sub>に対する活性が、Fru-1-Pに対する活性の10倍の値を示した。K<sub>m</sub>値ならびにCarboxypeptidase消化に対する感受性は、ウサギ筋肉Aldolaseと同様であった。分子量は150,000であった。しかしながら得られた最大の比活性の値は哺乳類の約半分で、かつ酵素が甚だ不安定であった。

Willard等<sup>(79)</sup>も同一の試料を用いて酵素の精製を行なった。その結果、 $9 \text{ unit/mg}$ の比活性が得られた。精製の一過程に、哺乳類筋肉Aldolase精製で用いられた、KClで溶出させるphosphocelluloseクロマトグラフィー法が応用され、この操作のみで酵素を約300倍に精製できた。しかし純度試験では、なお不純蛋白質の存在が認められた。本標品には、他

起源の Class I Aldolase の指標とされている p-chloromercuribenzoate に対する耐性があった。その他、規降定数 7.0、これから算出した分子量約 150,000 という値も得られた。また酵素活性の p-chloromercuribenzoate に対する耐性は、大豆の暗所発芽種子から得られた酵素においても観察された。一方発芽種子を光にさらすと、酵素の p-chloromercuribenzoate に対する感受性が増加した<sup>(80)</sup>。

Horecker と彼の共同研究者たち<sup>(4)</sup> は、ホウレンソウの葉からの Aldolase の精製を試みた。精製には酸処理、硫酸分画、DEAE-Sephadex カロマトグラフィーを用い、分子量 120,000 の純品を得た。精製 Aldolase の Fru-1,6-P<sub>2</sub> に対する活性は Fru-1-P に対する活性の 24 倍であり、基質存在下でのホウ素化水素による阻害効果、carboxypeptidase 消化に対する感受性等は、哺乳類 Aldolase のそれと類似していた。さらに、精製した Aldolase に maleic acid による化学修飾を行なうとサブユニットに分離



する<sup>(81)</sup>ことを利用しサブユニットの分子量を28,000~30,000と推定した<sup>(82)</sup>。また酵素に carboxypeptidase を作用させて、C末端を tyrosine と同定した。引き続きホウレンソウ Aldolase を用い、pyridoxal phosphate による阻害実験を行ない、活性中心に関与するアミノ酸残基の検索を行なった<sup>(83)</sup>。Aldolase を pyridoxal 存在下で光酸化すると、histidine 残基が失われるに伴って失活した。この histidine 残基が基質との結合部位でないことは、光酸化をしても Schiff 塩基が形成されることから確かめられた。さらに Horecker 等<sup>(84)</sup>は、放射活性をもつ基質と酵素の間に形成される Schiff 塩基を還元する手法<sup>(85)</sup>を用い、活性中心(基質との結合部)を放射能で標識した Aldolase を得た。この Aldolase を trypsin 消化、elastase 消化を行ない、放射活性ペプチドを分離し、アミノ酸配列を求めた。その結果確定されたアミノ酸配列は、Leu-Leu-Lys-Pro-Ser であり、動物の筋肉および肝臓

Aldolase とセリン残基を除き一致していた。

Anderson 等<sup>(86,87)</sup> は、クロロプラスト Aldolase と細胞質 Aldolase は化学修飾に対する感受性が異なること<sup>(88)</sup>、および哺乳類では生長過程、代謝経路の違いによりアイソザイムが存在すること<sup>(89-101)</sup> から、クロロプラストと細胞質の Aldolase に差があると推測した。しかし、等電点電気泳動で 0.5 pH 単位異なる Aldolase が得られたが、 $K_m$  値等に大きな差はなかった。また、分子量 140,000、サブユニット分子量 87,000、C 末端アミノ酸配列 -Ser-Ala-Tyr-COOH、N 末端アミノ酸配列  $\text{NH}_2$ -Gly-Ser-Tyr-Ala- $\text{z}$  あり、これも差はなかった。

Takeo<sup>(102)</sup> はポリアクリルアミドディスク電気泳動法を用い、数種の植物の活性染色を行ない、Aldolase の多様性を示した。ホウレンソウ、ハッカ大根などの種子中の Aldolase は電気泳動であまり移動せず、葉の Aldolase はそれより比較的よく移動した。

Ishikawa 等<sup>(103)</sup> は冬小麦を用い、発芽種子中

の Aldolase の経時変化を報告している。

Aldolase 活性は発芽後一旦増加し、その後減少した。最大活性は発芽開始の1日後あるいは2日後にあった。

最近 Davies 等<sup>(104-106)</sup> はコウキクサを用いて、窒素欠乏と Aldolase との関係を報告した。窒素欠乏培地でコウキクサを培養すると、Aldolase 及びその他の多くの酵素活性が減少した。Aldolase 活性の低下は、窒素欠乏により pyridoxal phosphate が酵素と結合するためであった。この結合は lysine との非共有結合であり Schiff 塩基の場合のような共有結合ではなく、pyridoxal と非共有結合する lysine 残基と基質と Schiff 塩基を形成する lysine 残基とは別であった。以上が植物 Aldolase に関する現在までの研究の概要である。

植物の発芽時における代謝に関与する酵素として、現在までに、でんぷん性種子における amylase、油脂性種子における lipase、さらには蛋白性種子における protease 等が詳しく

研究されている。また種子の発芽力に関連があるとされている catalase および peroxidase 等の酸化酵素についても研究が進められている。しかし、発芽時に最も盛んな呼吸や、発芽の際に必要な糖新生に関して重要な代謝系である解糖系について、高度に精製した酵素を用いた研究は甚だ少ない。

Aldolase は、六炭糖 (Fru-1,6-P<sub>2</sub>) を 2 種類類の三炭糖 (dihydroxyacetone phosphate, glyceraldehyde-3-phosphate) とに分解する。このように、Aldolase により行なわれる六炭糖と三炭糖との相互変換反応は糖質代謝上大きな意味があり、本酵素の研究は代謝生理を研究する上で不可欠である。さらに、炭素・炭素鎖を切断する反応は解糖系において唯一の反応であり、全代謝系においても脱炭酸反応以外ではこのような反応はまれである。この Aldolase の反応機構は未だ仮説の段階であり、現在でも新たに活性に関与するアミノ酸が報告されており、<sup>(107)</sup> 反応機構の確立が望ま

れている。

著者は農業、特に日本および東南アジアの農業において最も重要な作物である水稲について高度に精製した酵素を用い、その代謝生理を研究することは有意義であると考え。特に、植物生育の出発点でもあり、かつまた比較的研究のた遅れている発芽時の生理作用の研究は重要なことと思われる。

さらに、通常、種子が発芽する際、呼吸がきわめて盛んとなり、酸素は不可欠な条件であるとされている。稲とともに重要な作物である麦を始め、他の多くの作物の種子は冠水した状態では発芽しない。一方、稲の種子は水中でもよく発芽する。このような一般的な作物の種子と異なり、た特徴を有する稲種子の発芽及び幼苗期の代謝生理を研究することは、生物化学的意義のみならず、食糧危機が言われている現在、食糧の増産にも寄与するものであると考えられる。また、前述のごとく、発芽時の代謝において最も盛んな呼吸や、

発芽の際必要な糖新生に関して最も基本的でかつ重要な代謝系である解糖系に関する酵素学的研究は甚だ少なく、解糖系構成酵素を種子中から高度に精製し、その酵素化学的性質を検討することは極めて大切であると言える。

以上の理由から、著者は水稻種子中の Aldolase の発芽時における挙動を調べるとともに、種子ヌカ層より Aldolase を高度に精製し、その酵素化学的諸性質を明らかにする研究を行なった。

第1編 発芽時における Aldolase 活性の挙動<sup>(108)</sup>

発芽種子における代謝は二面性を持つものと考えられる。一つは貯蔵物質の分解を行ない、発芽および生長に必要な物質とエネルギーとを供給する異化作用であり、他の一つは新しい細胞および組織をつくり、あるいは異化作用に必要な種々の器官等をつくるための蛋白質をはじめとする種々の物質の合成を行なう同化作用である。多くの植物において、異化活性は単子葉植物および双子葉植物の胚乳、双子葉植物の子葉などの貯蔵器官に局在し、真の意味での同化活性は一般に胚器官に存在し、機能的に分化されていると考えられる。水稻種子はでんぷん性の種子であり、胚乳中に存在するでんぷんをはじめとする高分子の炭水化物は、主に異化作用である呼吸の基質としての役割を持ち、amylase あるいは phosphorylase 等の酵素の働きにより低分子の糖に分解され、さらに解糖系、TCAサイ

クル等を経て消費される。

一方、発芽種子のこのような代謝経路の反応を触媒する酵素の消長は、様々である。発芽種子中の酵素には、休眠種子中に始めから酵素活性が存在している酵素と、休眠種子中には活性が存在せず発芽後活性が現れる酵素がある。さらに活性が発現する機構として、不活性型の酵素の前駆体が休眠種子中に存在し発芽に伴って活性を有する酵素に変化する場合と、発芽開始後新たにRNAが生合成されさらに酵素が生合成される場合がある。

種子の発芽には温度が大きな影響を及ぼす。しかし種子の発芽が温度の制約を受ける原因は決して一様ではない。種子発芽の温度適応性は、本質的には種子自体の化学組成あるいは構造等の遺伝学的要因によって決定されるものではあるが、種子発芽時の生理的狀態に依存する度合もかなり大きい。後熟の進行に伴い漸次発芽の温度要求性が変化する場合があるが、これはその一例であろう。



イネ種子が発芽可能な温度範囲は、最低10℃から最高40℃とされ、最適温度は32~35℃とされている<sup>(109)</sup>。しかし高温条件下では、一般に不可逆的な障害を起し、場合によっては異常形態を呈することもある。さらに品種により発芽の適温が異なることが知られている。岡等<sup>(110)</sup>によると、大陸群品種は比較的高温(38℃)で発芽しやすく、これに対し島群品種は比較的低温(23℃)で発芽が旺盛であった。

種子中のどの部分に酵素が存在するかという問題は興味深い。通常酵素が主に存在するとされている水稻種子中の部位は胚と糊粉層であり、発芽過程における胚乳中の酵素は、それらの部位から浸透してきたと考えられている。

発芽に対する gibberellin の影響については多くの報告がある<sup>(111-117)</sup>。種子は発芽に伴い貯蔵物質の分解を行ない、それにより新組織形成の材料とエネルギーとを生長部位に供給する。したがって各種酵素類の合成、活性化は、

種子の発芽に対して大きな意味を持つ。でんぷん性種子であるオオムギの種子を水に浸漬すると、種子中の  $\alpha$ -amylase の活性が著しく上昇する。また事前にオオムギの種子を半分に切断し、胚を含まない種子を水に浸漬した場合  $\alpha$ -amylase は合成されなかった。しかし gibberellin を含む水に浸漬した場合、胚を含まない種子の糊粉層において、 $\alpha$ -amylase の生合成が起こった。これは、発芽時に生合成された gibberellin が糊粉層に分泌され、その結果  $\alpha$ -amylase が糊粉層で合成されることによる<sup>(118-122)</sup>。

生物に存在する酵素の中でアイソザイムがあるものは数多く知られている。また、アイソザイムと同定できないうまでも、蛋白質分離操作により同じ酵素触媒能を有する蛋白質が、物理的あるいは化学的性質が異なる蛋白質として相互に分離できることが、しばしば観察されている。

Aldolase においては、動物、主にウサギに

ついて A、B、C の三種のアイソザイムが存在することが知られている<sup>(22, 88)</sup>。これら三種のアイソザイムは一次構造が異なることも確かめられている<sup>(123-125)</sup>。植物においては Takeo<sup>(102)</sup> がポリアクリルアミドディスク電気泳動法で、Lebherz<sup>(88)</sup> がセルロースアセテート膜電気泳動法で、移動度の異なる Aldolase が存在することを報告し、アイソザイムが存在し得ることを示唆している。また、動物の発生において、胚における Aldolase の活性が変化すると共にそのアイソザイムも変化することが知られている。

植物においては、葉緑体の Aldolase と細胞質の Aldolase との比較、種子中の Aldolase に関する研究、葉における Aldolase に関する研究等が行なわれているが、種子発芽における Aldolase の研究は未だに行なわれていない。本編では、水稻種子の発芽時における Aldolase の挙動を調べることを目的とし、発芽時における Aldolase の経時変化を調べ、さらに活性染色法を用いて器官別に酵素の多様性をも調べた。

## 第1章 実験方法

### 第1節 実験材料および試薬

発芽実験に用いた水稻種子は、当年度産の水稻コシヒカリの玄米を用いた。発芽試験に用いるまで、水稻種子は $-20^{\circ}\text{C}$ に保存した。

実験には、和光純薬K.K.製の特級および特級に準ずる試薬を用いた。また、基質、酵素および補酵素類は、Boehringer Mannheim GmbH社製を用いた。なお上記以外で用いた試薬については、その都度、本文中あるいは脚註に示した。

### 第2節 Aldolaseの活性測定法

Aldolaseの活性測定には、主としてNADH酸化法を用い、またdinitrophenyl hydrazine法も用いた。本論文においては、特に記さないかぎり酵素活性の測定はNADH酸化法に

ある。

## その1 NADH酸化法

酵素活性測定は、通常、レコーダーを接続した分光光度計（日立製作所 Model 100-50）を用い、光路長1 cmの石英セル中で行なった。25°Cの水を循環させた恒温セルホルダーに石英セルを装着して、反応を行なわせた。反応は基本的にRackerの方法<sup>(126)</sup>に従った。以下にその反応系を示す。

Tris-HCl 緩衝液 pH 7.4	0.2M	2.00 ml
Fru-1, 6-P <sub>2</sub>	0.02M or Fru-1-P	0.1M 0.25 ml
NADH	4 mg/ml	0.25 ml
glycerophosphate dehydrogenase,		
triosephosphate isomerase	2 mg/ml	0.01 ml
Enzyme		0.05 ml
総反応量		2.56 ml

NADHの減少は340nmの吸光度の減少で測定した。酵素活性は以下の式に従って算出した<sup>109</sup>。

$$\text{酵素活性 } (\mu\text{mole}/\text{min}) = \frac{|A_t - A_0|}{t} \cdot \frac{1}{\epsilon_{340}} \cdot \frac{Q}{l} \times 10^3$$

$A_0$ ; 反応開始前における試料溶液の吸光度

$A_t$ ; 反応開始  $t$  分後の “

$Q$ ; 試料溶液の体積 (ml)

$l$ ; 液層中の光路の長さ (cm)

$\epsilon_{340}$ ; 分子吸光係数 ( $6,220 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ )

## その2 Dinitrophenyl hydrozine 法

酵素溶液が懸濁している時、あるいはカラムクロマトグラフィー溶出曲線作製時には、NADH酸化法は精度的、時間的に不利である。そこで濁った試料でも活性測定を行なうことができ、時間もさほどかからない比色定量法を併用し、活性測定を行なった。

Dinitrophenyl hydrozine 法は、基本的に Sibley 等<sup>(128)</sup>の方法に従った。

反応溶液として試験管に  $0.02M$  Fru-1,6-P<sub>2</sub>  $0.1ml$  と、水酸化ナトリウムで  $pH7.4$  に調整した  $0.5M$  hydrazine sulfate  $0.1ml$  をとり、ここに酵素溶液を  $0.2ml$  加えた。  $25^{\circ}C$  で  $10$  分間酵素反応を行なった後、  $5mM$  の 2,4-dinitrophenyl hydrazine  $0.2N$  塩酸溶液  $0.2ml$  を加え反応を停止した。  $10$  分後、  $0.375N$  NaOH  $1.4ml$  を加え、さらに  $10$  分間放置した後  $525nm$  の吸光度を測定した。検量線は、 Fru-1,6-P<sub>2</sub> のかわりに glyceraldehyde-3-phosphate を用いた。なお glyceraldehyde-3-phosphate の濃度は、あらかじめ Allen 法<sup>(129)</sup> により定量した。

$25^{\circ}C$  で基質  $1\mu mole$  を  $1$  分間に変化させる酵素量を  $1$  単位と定義した<sup>(130)</sup>。また比活性は、蛋白質  $1mg$  当たりの活性単位数とした。

### 第3節 蛋白質の測定法

蛋白質の測定はLowry等<sup>(131)</sup>のフェノール試薬法とUV吸光法を併用した。

Lowry法を行なうに際し、蛋白質溶液に10% (W/V)のトリクロロ酢酸(以下TCAと略す)を加え、生じた沈殿を遠心分離(1000×g, 5分間)して集め、1N NaOH 0.1mlを加え沈殿を溶解したものを試料溶液として用いた。これはLowry法測定の際の妨害物質の影響を除くためである。Lowry法は以下のように行なった。

2%炭酸ナトリウム水溶液50容と、1%酒石酸カリ水溶液に溶かした0.5%硫酸銅溶液1容とを使用前に混合した。この混合液1.0mlを上記の試料溶液0.1mlに加え、さらに使用前に水で2倍に希釈したFoline試薬0.1mlを加えた。Foline試薬添加後すばやく攪拌し、室温で30分以上放置した後、750 nmの吸光度を測定した。標準物質として東京化成K.K.製の標準牛血清albumine溶液を用いて同様に処理し、検



量線を作製した。

カラムクロマトグラフィーにおいては、蛋白質の溶出曲線を、280 nmの吸光度を測定することにより求めた<sup>(132-133)</sup>。また、試料の280 nmと260 nmの吸光度の比が1.5以上の時、蛋白質濃度の近似値を以下の式により算出した。

$$\text{蛋白質濃度 (mg/ml)} = 1.45 \text{ OD}_{280} - 0.74 \text{ OD}_{260}$$

#### 第4節 水稻種子の培養法および粗酵素液抽出法

次のような方法により水稻種子を発芽させた。当年産の水稻玄米種子を4℃に低温貯蔵したものを発芽実験に供した。玄米を10%次亜塩素酸ナトリウム中に20分間浸漬後、滅菌蒸留水で洗淨し種子の殺菌を行なった。シャーレに脱脂綿を敷き、滅菌蒸留水で充分しめらせた後、殺菌した種子を一様に分散させて置床した。播種したシャーレを恒温、暗所に放置し、種子を発芽させた。

また以下に述べる方法により、発芽種子から粗酵素液を得た。

播種後、目的の時間が経過した試料のうち、平均的な発芽生育を示す幼植物体を400個体採取した。試料を1mMEDTA溶液50mlで、乳鉢を用いて充分磨砕し、磨砕液を4層のガーゼでろ過した。次にろ液を9,000×g, 30分間遠心分離し、得られた上澄を粗酵素液とした。

# 第5節 ポリアクリルアミドディスク電気泳動法

本研究においては、酵素の分析手段として、Davis 法の pH組成を変えたアクリルアミド7.5%の pH8.0 用ゲルを用いた。<sup>(134-136)</sup>

ゲル調整法は以下の通りである。

## 保存溶液

A 溶液 (pH7.5)	{	1N HCl	48 ml
		Tris	6.85 g
		TEMED <sup>註1)</sup>	0.46 ml
		水を加えて	100 ml とする

B 溶液 (pH5.5)	{	1N HCl	48 ml
		Tris	4.95 g
		TEMED	0.46 ml
		水を加えて	100 ml とする

C 溶液	{	アクリルアミド	30.0 g
		Bis	0.8 g
		水を加えて	100 ml とする

註 1) TEMED : N, N, N', N'-tetramethyl ethylene diamine

註 2) Bis : N, N'-methylene bisacrylamide

D 溶液 { アクリルアミド 10.0 g  
 Bis 2.5 g  
 水を加えて 100 ml とする

E 溶液 リボフラビン 4.0 mg/100 ml 水

F 溶液 (電極槽用緩衝液)

{ ジエチルバルビツール酸 5.52 g  
 Tris 1.0 g  
 水を加えて 100 ml とする

## 使用液

### 分離用ゲル

A 溶液 : C 溶液 : 水 : 過硫酸アンモニウム溶液  
 (0.14 g / 100 ml 水)  
 = 1 : 2 : 1 : 4

### 濃縮用ゲル

B 溶液 : D 溶液 : E 溶液 : 水 = 1 : 2 : 1 : 4

試料用ゲルは調整せず、試料と 50% ショ糖溶液と同量混和したものを、直接濃縮用ゲル上部に層上した。リーディングイオンの位置を知るため BPB<sup>註1)</sup> を上部緩衝液に加えた。泳動はゲル 1 本あたり 2 mA の電流で行なった。

註 1) BPB : bromo phenol blue

## 第6節 ゲル染色法

### その1 蛋白質染色法

蛋白質染色には amido black 10B を用いた。  
amido black 10B 1g を 7% 酢酸 100 ml に溶解し  
染色液として使用した。泳動後ゲルをカラム  
から抜き出しこの染色液に浸し、湯浴中で1  
時間加熱して染色した。脱染色は、布で包ん  
だ粒状活性炭を浸してある 7% 酢酸溶液中で  
行なった。

### その2 活性染色法

反応に pyridine nucleotide の関与する酵素、  
および酸化還元酵素の活性染色には通常、  
phenazine methosulfate (以下 PMS と略す)  
と nitroblue tetrazolium (以下 NBT と略す)  
を用いる<sup>(137)</sup>。Aldolase の場合、glyceraldehyde  
dehydrogenase (以下 GADH と略す) と連続す

せて活性染色を行なうことができる<sup>(22, 88, 138)</sup>。

本実験は Takeo<sup>(138)</sup>の方法に従って行なった。

染色液は以下の通りである。

保存液		使用液
Arsenate-Tris 緩衝液 pH 7.4		10 ml
50mM Tris 緩衝液中に 10mM $\text{Na}_2\text{HAsO}_4$ , 1mMEDTAを含む		
NAD 溶液	NAD 10 mM (6.7 mg/ml)	1 ml
FDP 溶液 (Fru-1,6-P <sub>2</sub> )	FDP 10 mM (5 mg/ml)	1 ml
PMS 溶液	PMS 2.4 mg/ml	0.1 ml
NBT 溶液	NBT 4 mg/ml	1 ml
GADH 硫酸懸濁液		1.5 mg GADH

泳動後のゲルをカラムから抜き取り、上記の染色液に浸した。遮光して37℃に保温し染色を行なった。酵素反応によりNADが還元されNADHになる。生成されたNADHはPMSを還元し、還元されたPMSはNBTを還元する。還元型NBTは、青に発色すると同時に不溶性となり、Aldolaseの存在する位置でゲルに付着し、明瞭なバンドとなる。

試料が粗酵素の場合、対照として基質を抜いた染色液を用いた実験を行なわなくてはならない。というのは応々にして、NBTを結晶化する時に用いたアルコールが混在するため生ずるアルコール脱水素酵素のバンドが検出されるためである<sup>139</sup>。

染色したゲルは、DENSITOMETER OZUMOR 82 (YAMATO ASUK製) を用いチャートに記録した。蛋白染色ゲル測定には No 57、活性染色ゲル測定には No 50 のフィルターをそれぞれ使用した。

## 第2章 実験結果

### 第1節 発芽時における Aldolase 活性の消長

#### その1 発芽温度の影響

種子の発芽に温度が大きな影響を及ぼす。水稻種子が発芽可能な温度範囲は、最低 $10^{\circ}\text{C}$ から最高 $40^{\circ}\text{C}$ とされている。本実験においては発芽温度を $15^{\circ}\text{C}$ 、 $20^{\circ}\text{C}$ および $27^{\circ}\text{C}$ に設定し、それぞれの場合の Aldolase 活性を測定した。

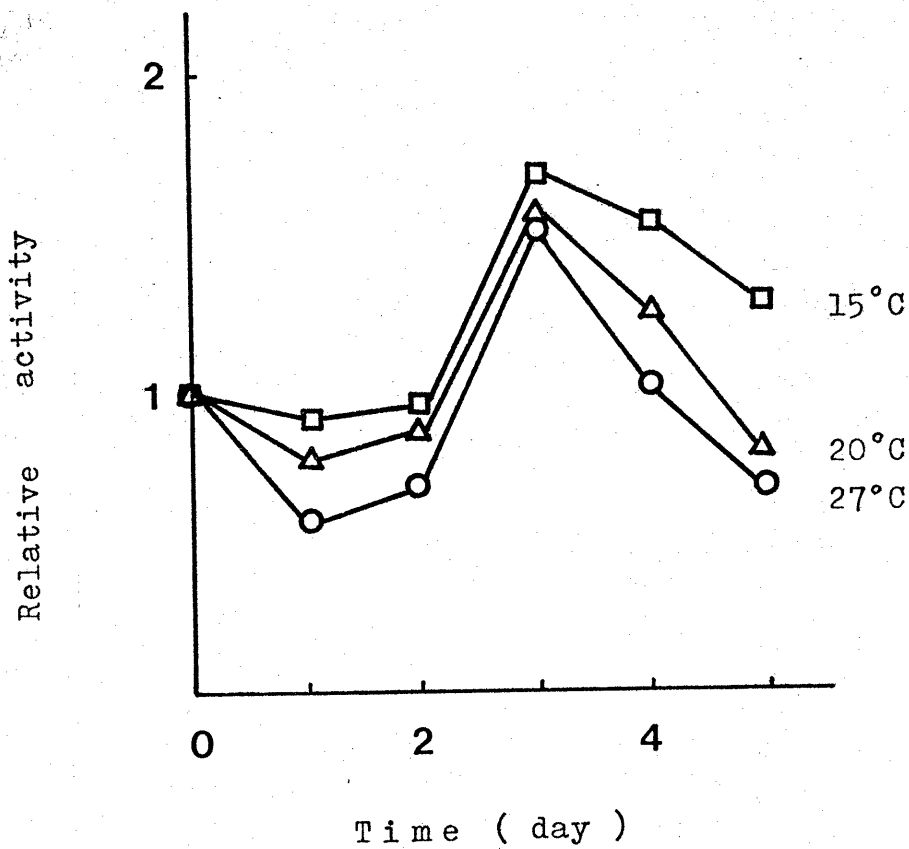
水稻種子400個体から抽出した粗酵素液の活性は約0.3 unitであり、その比活性は $0.003 \text{ unit/mg of protein}$ であった。第1図、第3図Aでは、便宜的にこれらの値を1とした相対的な活性あるいは比活性で、発芽時の Aldolase 活性の消長を示した。

水稻種子はいずれの温度でも発芽した。しかし発芽は、発芽温度が高い方が低い方よりいくぶん速く進行した。その時の Aldolase 活



性的変化を第1図に示した。なお、図に表示した値は3回の実験の平均値である。一般に乾燥種子中に存在していたAldolase活性は、発芽初期（置床後1~2日目）にいったん減少し、3日目に急激に増加し、その後再び徐々に減少した。発芽初期の活性の減少について時間単位で調べると、発芽（置床）後、早い場合で2時間、通常5~6時間後に減少し始めていた。発芽温度の違いによる酵素活性の消長は、あまり大きな差が認められなかった。しかし発芽温度が低い方が、Aldolase活性が高い傾向にあった。この結果は、外気温が高い程、代謝系が活発に働き、呼吸も促進され、解糖系の構成酵素であるAldolaseの活性も高くなるであろうという予想に反していた。

なお同時に行なった35℃での発芽実験においては、微生物の混入のため結果は割愛したが、活性の経時的変化は、3日目に最大値を示し、その値は27℃の値とほぼ同様であった。



第1図. 発芽時における水稻種子中の Aldolase 活性の変化.

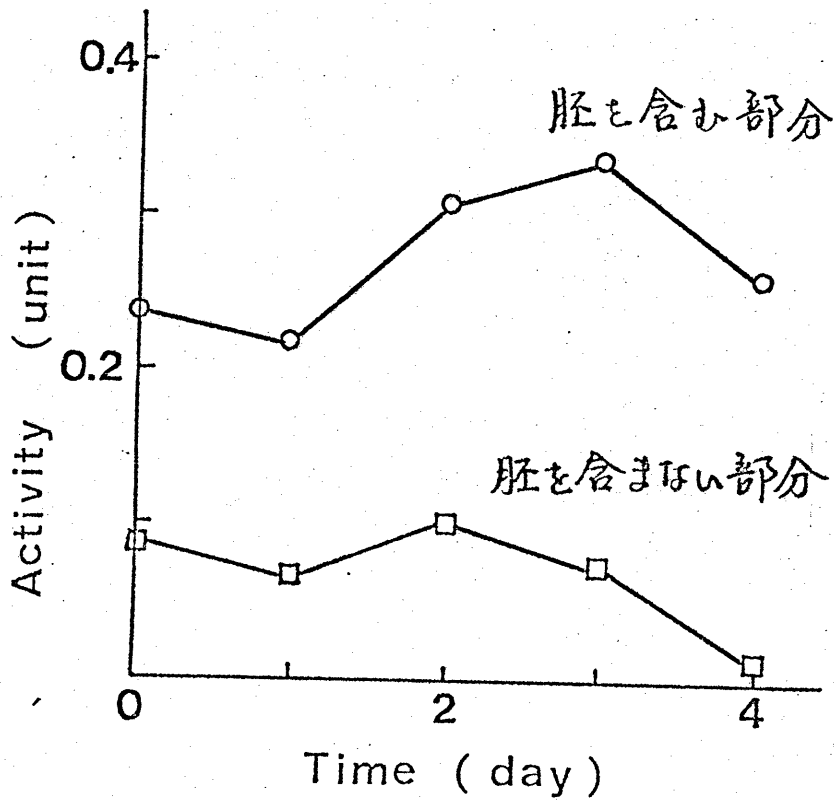
暗所において 15°C, 20°C, 27°C で水稻種子を発芽させた時の Aldolase 活性の相対的变化を求めた。乾燥水稻種子 400 粒中の Aldolase 活性を 1 とした。

## その2 種子器官別 Aldolase の消長

本実験は、水稻種子中の Aldolase が、胚およびヌカ層にどのような割合で存在するかを調べる目的で行なった。まず水稻種子を、胚を含む部分と胚を含まない部分とに分離し、その後通常の発芽試験と同様に置床、採取処理し、粗酵素液を得た。夫々について Aldolase 活性の消長を測定した。結果を第2-A図に示す。一方、Aldolase が発芽種子内を移動する可能性を検するため、全種子を通常通り発芽させた後、胚を含む部分と含まない部分とに分割切断し、夫々の酵素活性を測定した。この結果を第2-B図に示す。2実験ともに切断は、種子が半分になるように横断した。いずれの場合も、胚を含む部分の方が活性が高かった。また、試料の玄米を精白し、胚およびヌカ層を完全に除いた胚乳部の Aldolase 活性を測定したところ、胚乳部にはほとんど活性が無かった。また、切断種子の両方に同じ量

のヌカ層が含まれていると考えられるので、  
両曲線の差が胚における Aldolase 活性のおよ  
その量と推測できることから、胚およびヌカ  
層中の Aldolase 活性は、ほぼ同じ程度存在す  
ると推定した。

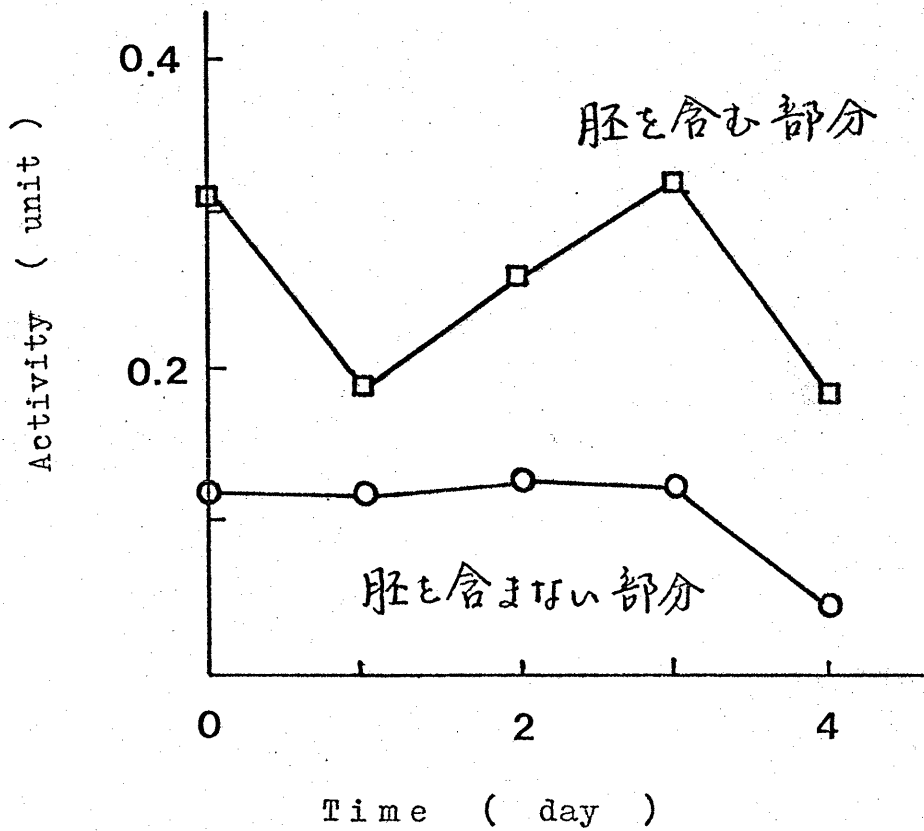
第2図の A と B を比較しても大きな差はな  
いことから、発芽期間中の Aldolase の移動は  
あまりなく、仮に移動があったとしても、わ  
ずかな量にすぎないものと思われる。



第 2 図. 発芽時における切断種子中の Aldolase 活性の変化.

A ; 置床前に切断した水稻種子中の Aldolase 活性の変化.

胚を含む部分と胚を含まない部分とに乾燥水稻種子を切断し、それぞれを置床後、暗所において 25°C に保つた時の Aldolase 活性の変化を求めた。



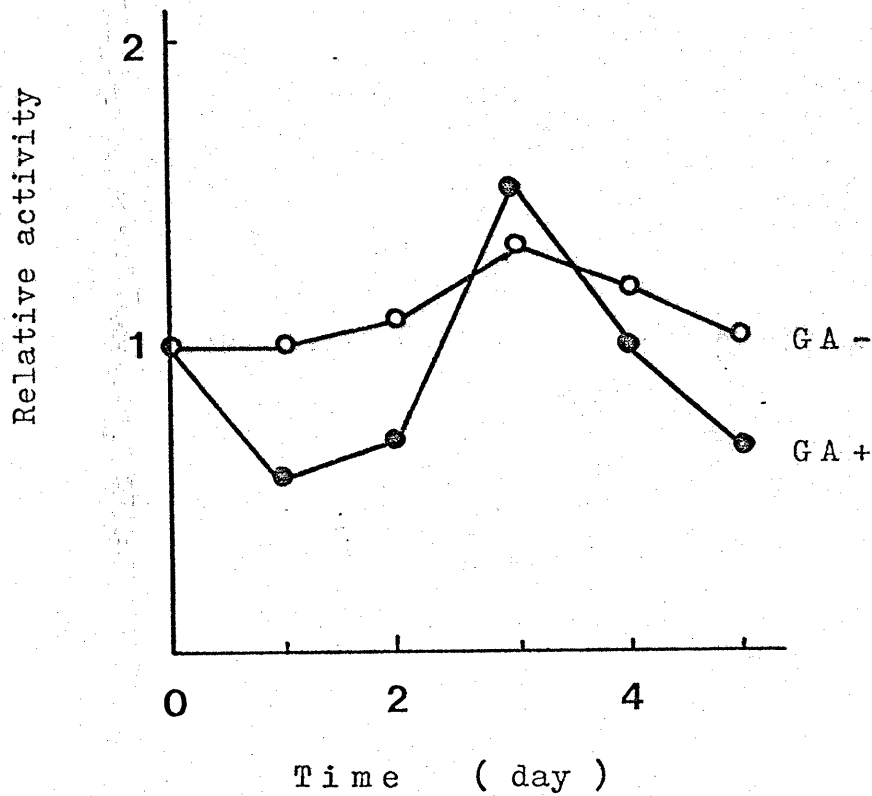
第2図 発芽時における切断種子中の Aldolase 活性の変化。

B ; 発芽後に切断した水稻種子中の Aldolase 活性の変化。

暗所において 25°C で水稻種子を発芽させた後、発芽種子を胚を含む部分と胚を含まない部分に切断し、それぞれの Aldolase 活性の変化を求めた。

## 第2節 Gibberellin の影響

Gibberellin は水稻種子には存在しないが、発芽に際し生合成される<sup>(40)</sup>。前節で明らかになったように、Aldolase は発芽後3日目に活性が増大することから、発芽時にAldolaseが生合成されている可能性がある。そこで、発芽時のAldolaseの増加が、 $\alpha$ -amylase のように gibberellin 作用によるものであるかどうかを調べた。実験は、発芽床に gibberellin を 500 ppm とするように加え、27°C で水稻種子を発芽させ、Aldolase 活性を測定した。結果を第3-A図に示す。発芽初期(1~2日目)の活性が減少したものの、gibberellin 添加による酵素誘導は認められなかった。また玄米を胚を含む部分と含まない部分に分割し、夫々のAldolase活性を測定した。蒸留水又は500 ppm のジベレリン水溶液を発芽床に加えて置床した結果を第3-B図に示す。添加した gibberellin によると思われる酵素誘導および賦活効果は

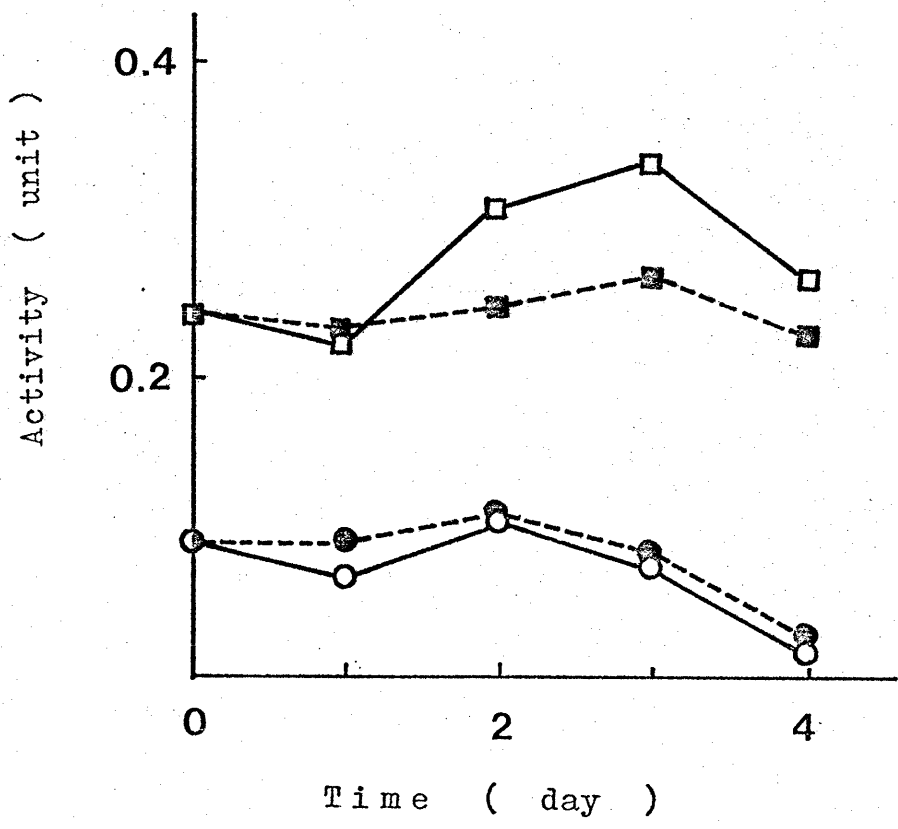


第3図. 発芽種子中の Aldolase 活性に  
 対する Gibberellin の影響.

A ; 種子全体に対する Aldolase 活性に  
 対する Gibberellin の影響.

発芽床に gibberellin を添加した場合 (GA+) としない場合  
 (GA-) との発芽水稻種子中の Aldolase 活性を測定した。





第3図. 発芽種子中の Aldolase 活性に  
対する Gibberellin の影響

B ; 切断種子中の Aldolase 活性に  
対する Gibberellin の影響

胚を含む部分と胚を含まない部分とに乾燥水稻種子を  
切断し. それぞれを gibberellin を含む発芽床と含まない  
発芽床に置き Aldolase の活性の変化を測定した。

- 胚を含む部分, GA-
- 胚を含まない部分, GA-
- 胚を含む部分, GA+
- 胚を含まない部分, GA+

認められなかった。

### 第3節 器官別によるマルチプルフォーム

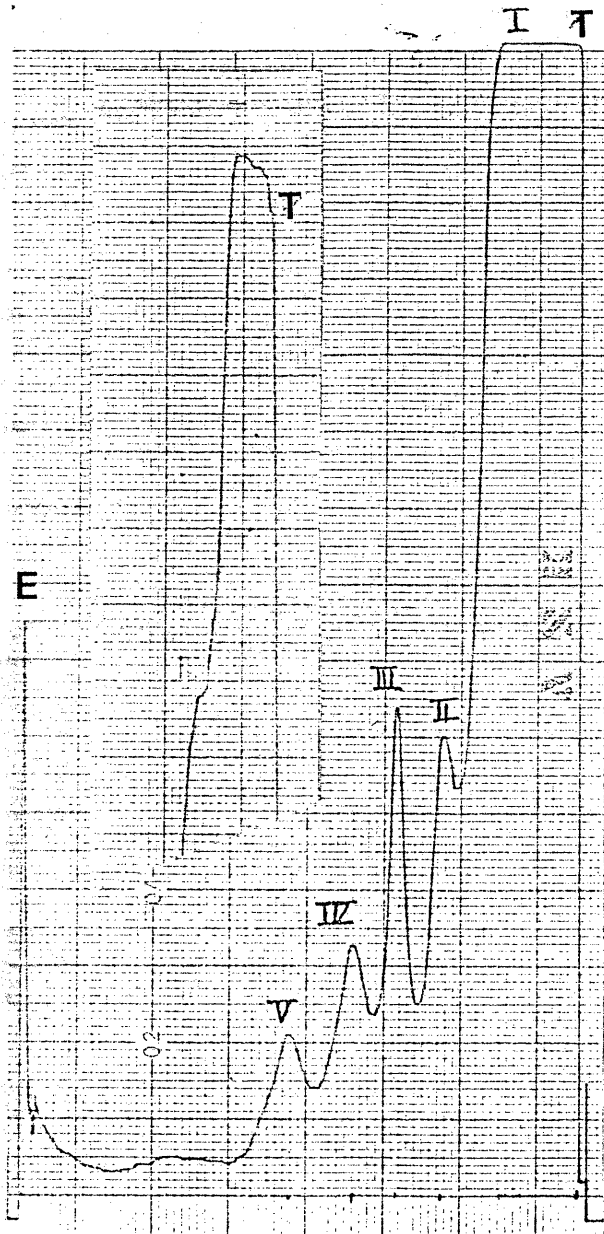
試料として、玄米の胚ヌカ層部、玄米の胚乳部、発芽幼植物の根部、発芽幼植物の葉部の4種を用いた。玄米をSATAKE GRAIN TESTING MILLにより1分間精白し、得られた糠を胚ヌカ層部とした。また、精白を4分間行ない、胚ヌカ層部を玄米から完全に除いた残りを胚乳部とした。幼植物の根部は、玄米を25℃、暗所で5日間発芽させた幼植物の根を集めたもの、また、同じ幼植物の第1葉以上の本葉のみを集めたものを幼植物葉部とした。試料を夫々50mMEDTA溶液で磨砕後、ホモジネートと遠心分離して、得られた上澄をディスク電気泳動にかけた。

胚ヌカ層部、胚乳部、幼植物葉部、幼植物根部の活性染色の結果を、第4-A図、第5-A

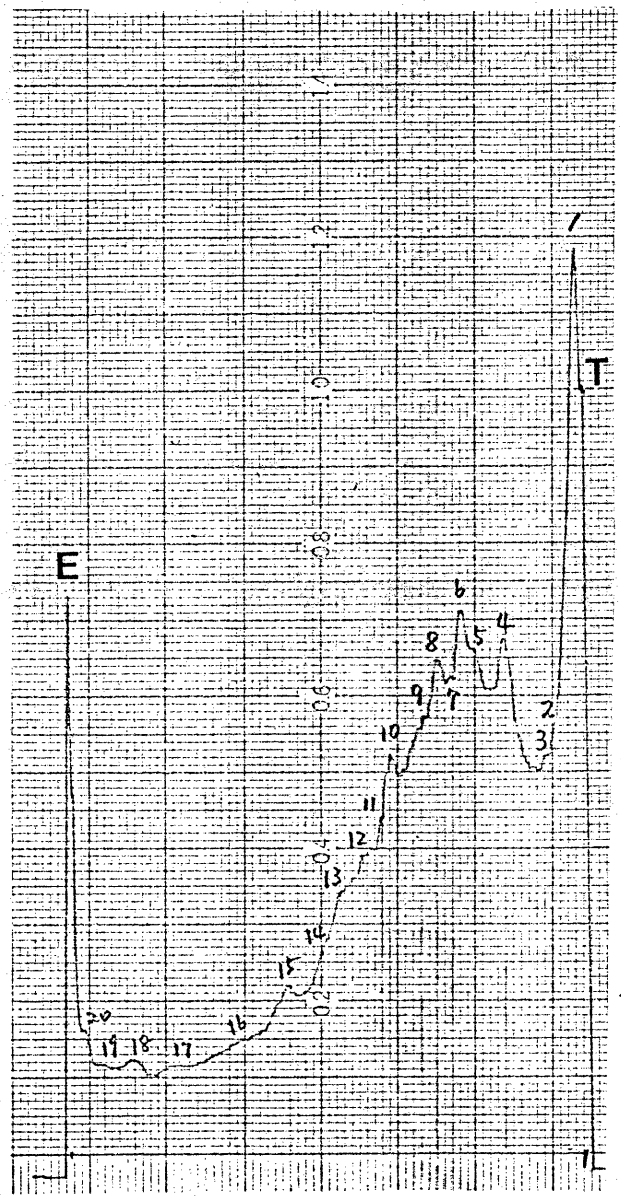
図、第6-A図、第7-A図に、また蛋白染色の結果を第4-B図、第5-B図、第6-B図、第7-B図に夫々示す。また、他の脱水素酵素の影響を検討するために、活性染色液から基質を除いた染色液で胚ヌカ層部を染色した結果を第8図に示す。さらに、それぞれのバンドの位置が比較しやすいように、活性染色の構成図を示す(第9図)。

マルチプルフォームのバンドは胚ヌカ層部に5~6本、胚乳部に1本、葉部に5本、根部に2本、それぞれ認められた。さらにFru-16-P<sub>2</sub>を抜いた染色液を用いた実験においても、バンドが1本検出された。しかし、この脱水素酵素バンドを減じても、胚ヌカ層部、葉部には4本前後のバンドが存在し、Aldolaseがマルチプルフォームの形態をとることがわかった。胚ヌカ層部のバンドIは、試料を少なくしても幅広いバンドを示し、1本であるのが、葉部のように2本あるのか判別できなかったが、吸収のピークの位置は、葉部の2本

目のバンドと等しい位置であった。葉部においても胚ヌカ層と同様に1本目のバンドの活性が最も強かった。また、移動度が等しい胚糊粉層の3本目のバンドと葉部の3本目のバンドとの、それぞれの部位における相対的活性を比べると、葉部の方がはるかに高かった。その他のバンドを比べても、胚ヌカ層部と葉部におけるそれぞれの吸収のピークの相対的な高さには違いがある。さらに吸収ピーク的位置が異なることから、Aldolaseのマルチプルフォームは種子中と葉部とにおいて互いに異なると思われる。



A



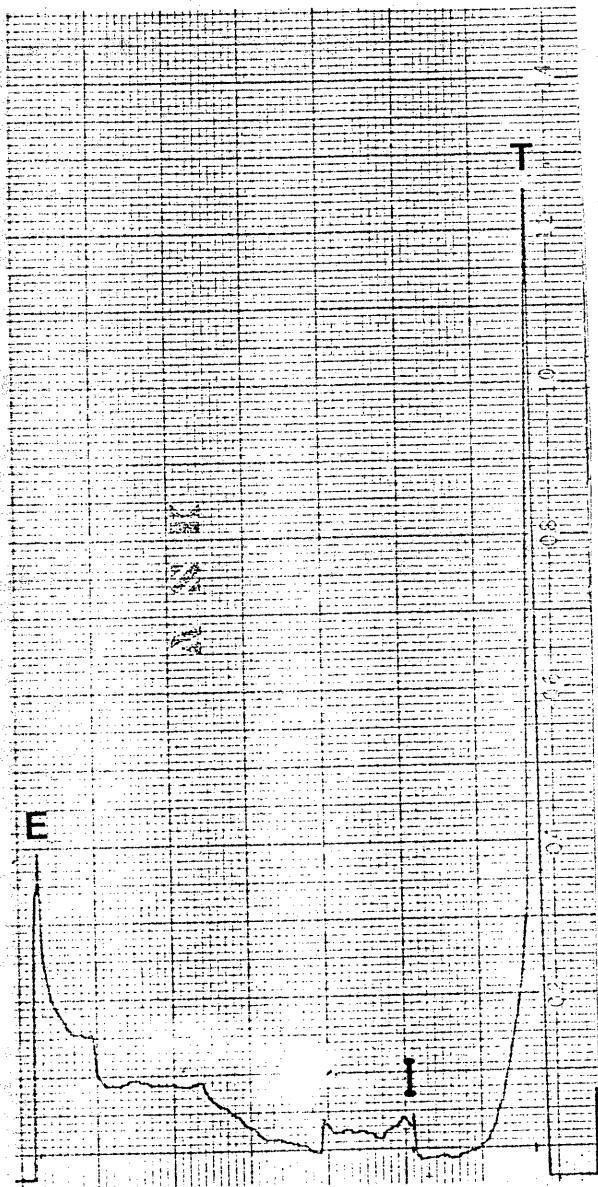
B

第4図. 水稻種子胚・ヌカ層部の  
ポリアクリルアミドゲル電気泳動図.

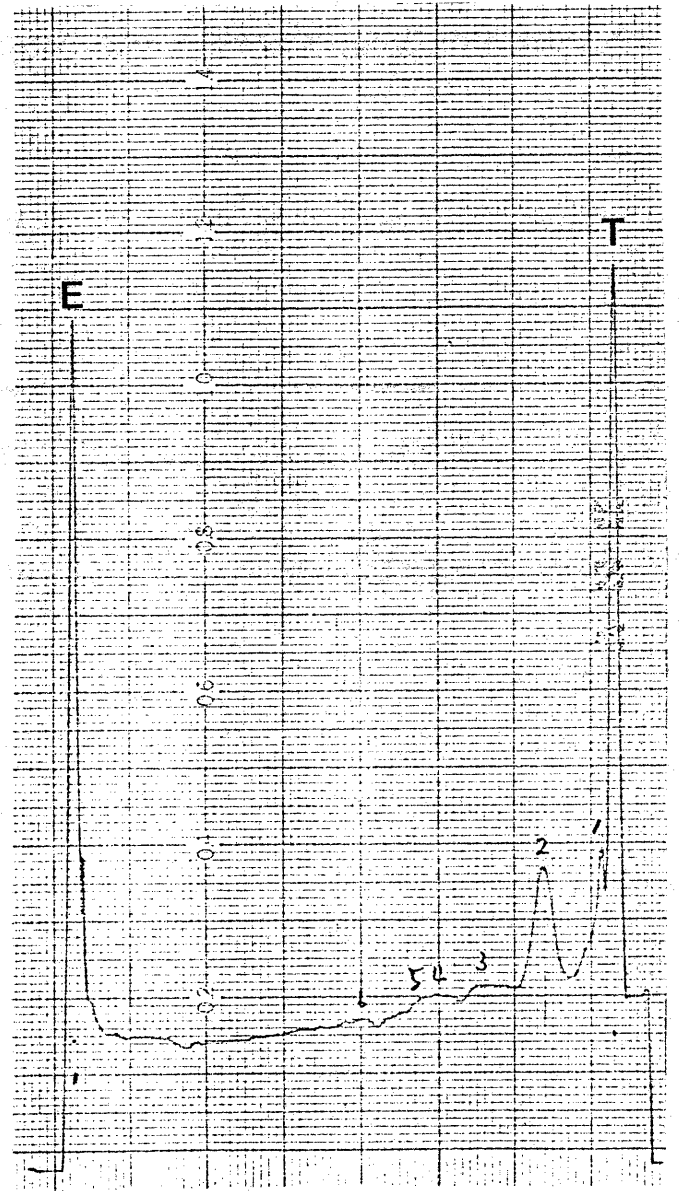
A ; Aldolase 活性染色図.

B ; 蛋白質染色図.

T: ゲルの上端. E: ゲルの下端. I or 1 染色バンド番号



A



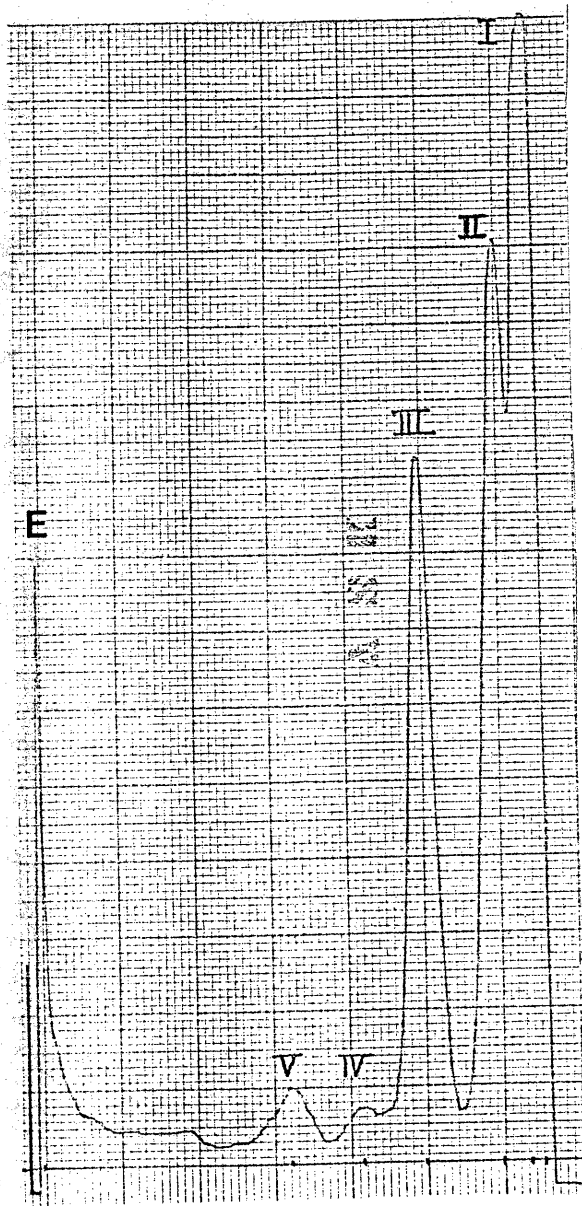
B

第5図. 水稲種子胚乳部の  
 ポリアクリルアミドディスク電気泳動図.

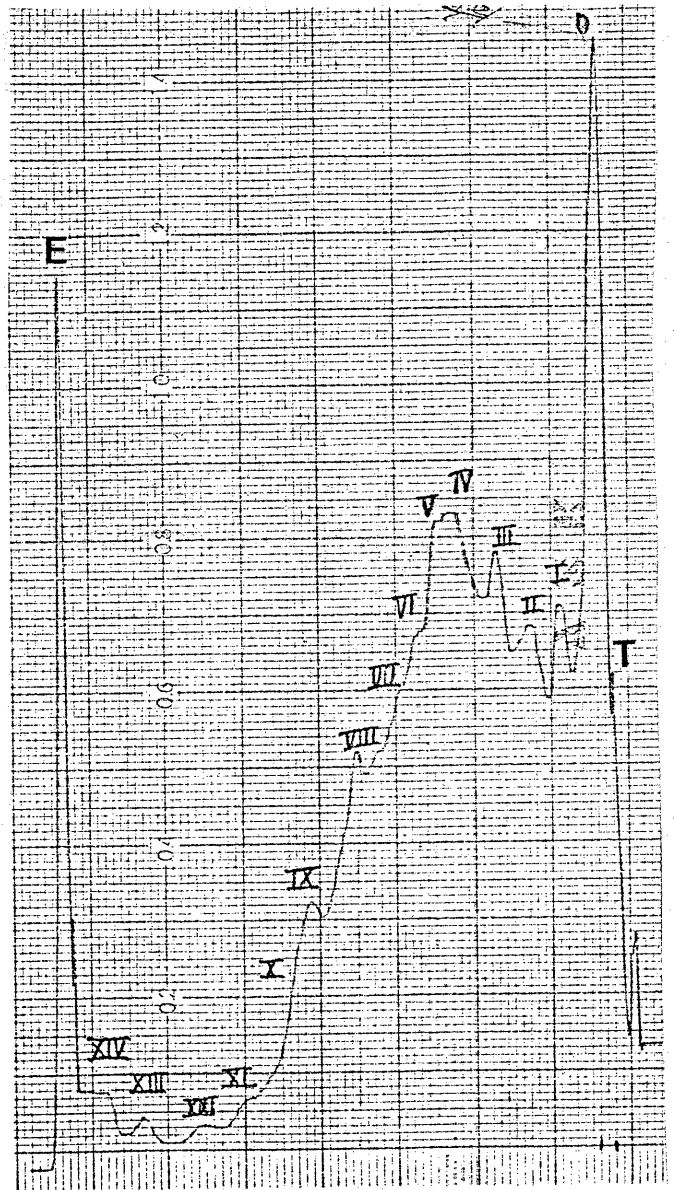
A ; Aldolase活性染色図

B ; 蛋白質染色図.

T : テイルの上端. E : テイルの下端. I ov I 染色バンドの番号



A



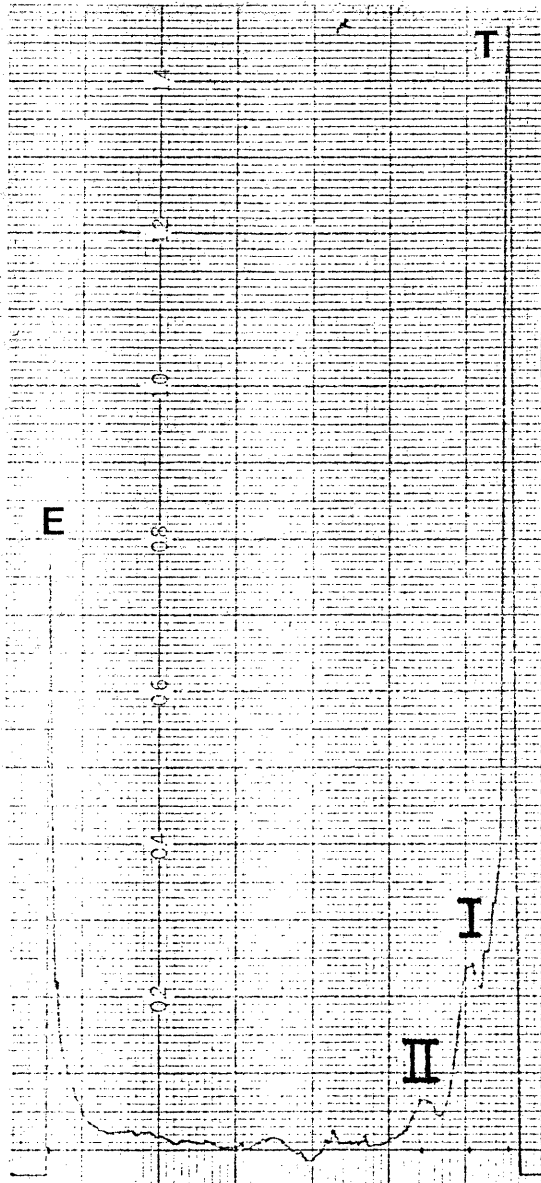
B

第6図. 水稻幼植物体葉部の  
 ホリアクリルアミドディスク電気泳動図.

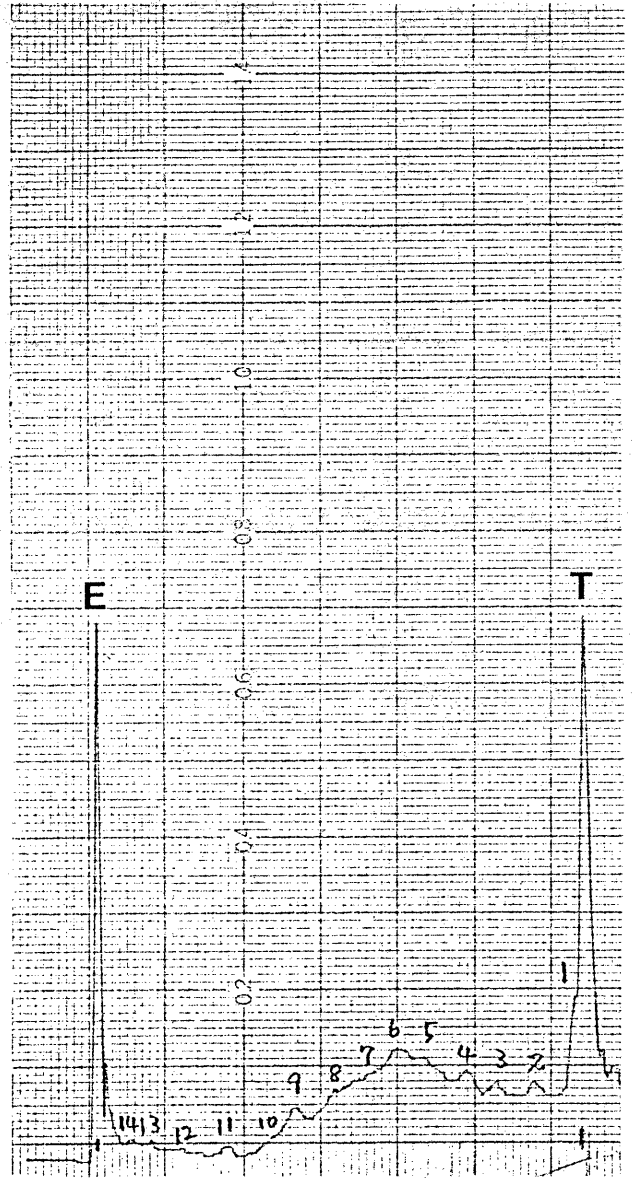
A ; Aldolase活性染色図

B ; 蛋白質染色図.

T ; テルの上端. E : テルの下端. I : 染色バンドの番号.



A



B

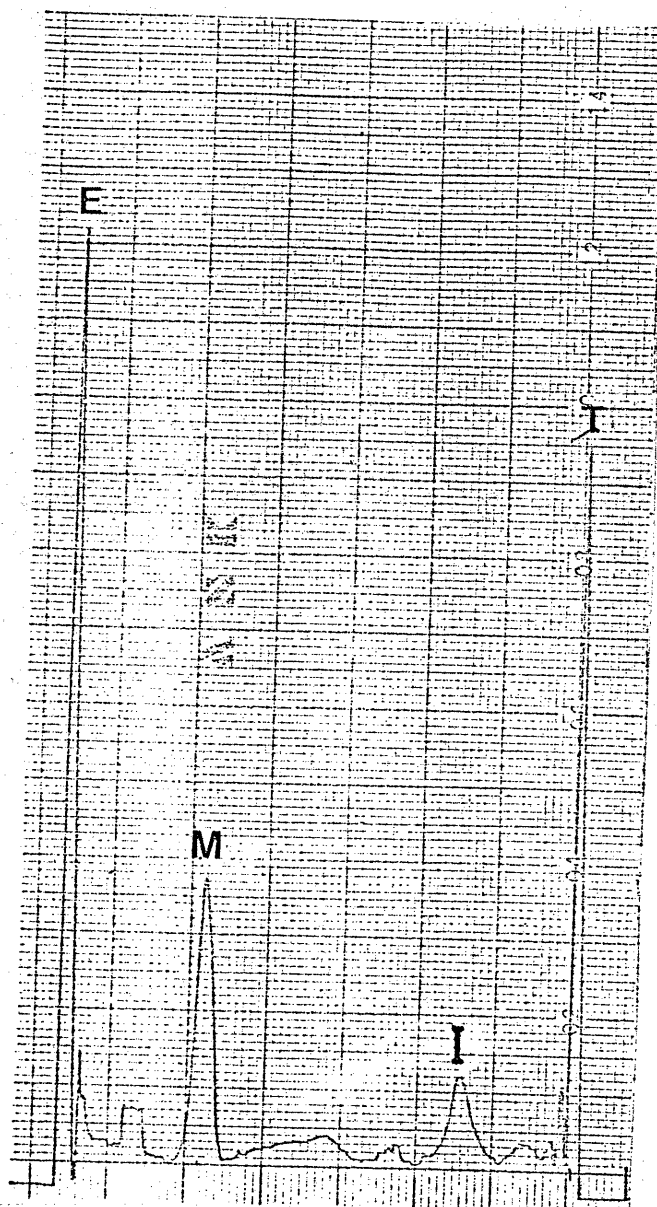
第 7 図. 水稻幼植物体根部の  
ホリアクリルアミドゲル電気泳動図.

A ; Aldolase 活性染色図.

B ; 蛋白質染色図.

T : テルの先端. E : テルの下端. I : 染色バンドの番号.

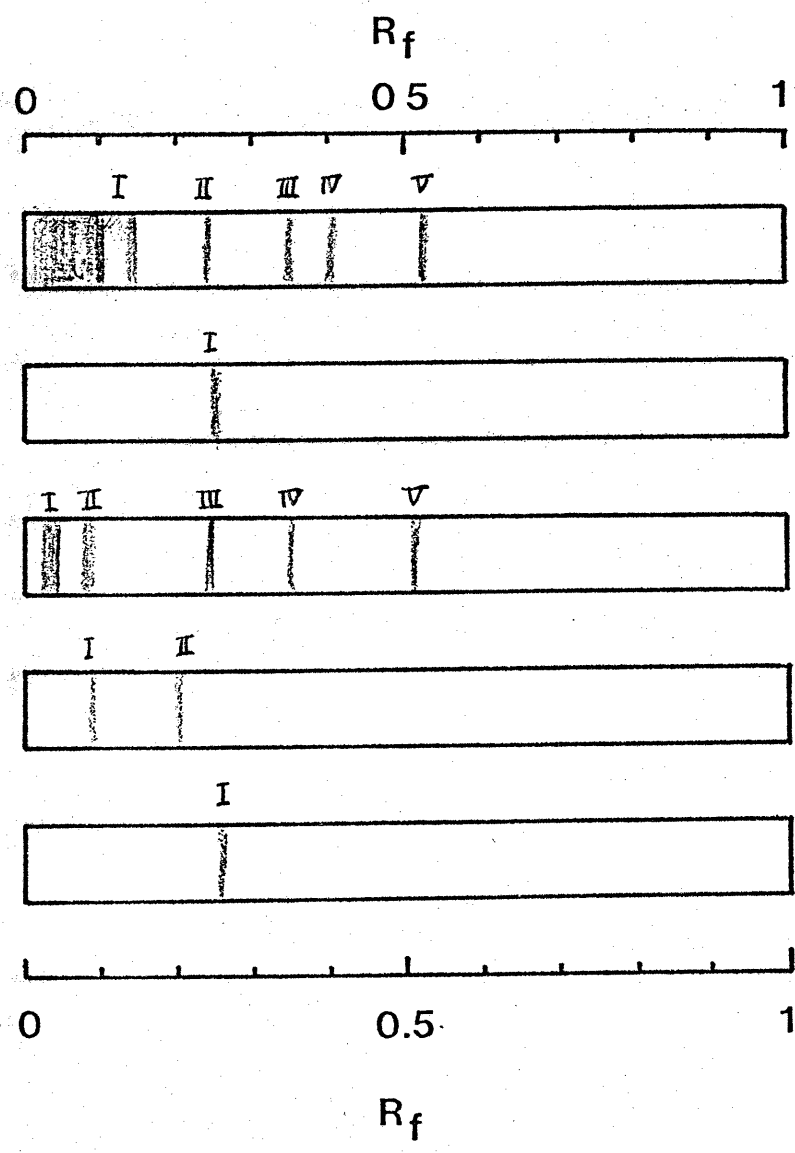




第8図 ポリアクリルアミドディスク電気泳動における Aldolase 活性染色法の検討.

活性染色反応液から基質 (Fru-1,6-P<sub>2</sub>) を除いた時のゲルの染色バンドを調べた。試料は水稻種子胚マカ層部を用いた。

T: ゲルの上端. E: ゲルの下端. M: マーカー (BPB) I: 染色バンド



胚・又カ層部 (第4図)

胚乳部 (第5図)

葉部 (第6図)

根部 (第7図)

Fru-1.6-P<sub>2</sub>(-) (第8図)

第9図. ホリアクリルアミドディスク電気泳動  
における Aldolase 活性染色の模式図.

### 第3章 考察

Aldolaseの活性測定について、種々の方法が報告されている。Meyerhof等<sup>(1)</sup>及びPeanoky等<sup>(141)</sup>はNaCNを反応系に加え、反応終了後アルカリを添加し、生成したtriosephosphateを鹼化した後、過塩素酸処理して遊離無機リン酸を測定し、Aldolase活性とした。またSwenson等<sup>(42)</sup>は、hydrazine sulfate共存下で酵素反応を行ない、反応終了後2,4-dinitrophenylhydrazineによりosazoneを形成し、比色定量を行なった。一方解糖系においてFru-1,6-P<sub>2</sub>がAldolaseによって三炭糖に開裂した後、 $\text{NAD}^+ \rightleftharpoons \text{NADH}$ に関与する反応が連続することから、Fru-1,6-P<sub>2</sub>を基質とし、反応系中にglyceraldehyde phosphate dehydrogenaseを共存させてNADHの増加を、また、glycerophosphate dehydrogenaseとtriosephosphate isomeraseを反応系中に共存させNADHの減少をそれぞれ340 nmで測定し、これを酵素活性

とした<sup>(21, 83, 84, 126, 143, 144)</sup>。本実験においては酵素活性測定法として、NADH酸化法ならびに2,4-dinitrophenyl hydrazine法を用いた。Fru-1,6-P<sub>2</sub>が2種類のtriosephosphateに開裂する反応の標準自由化エネルギー変化は+5.73 kcal mol<sup>-1</sup>である。ゆえに開裂反応自体は反応がなかなか進まないことが予想される。しかしtriosephosphate isomerase及びglycerol phosphate dehydrogenaseとを共役させると、開裂反応はすみやかに進行し、開裂反応におけるAldolase活性は、結果的に逆反応を行なった時のAldolase活性とほぼ同様な値が得られることが知られている。

通常2,4-dinitrophenyl hydrazineはケト酸の定量によく用いられる。しかし、Aldolase反応において、2,4-dinitrophenyl hydrazineと酵素反応生成物との反応は明らかではない。2,4-dinitrophenyl hydrazineはアルドースにもケトースにも反応する。実際2,4-dinitrophenyl hydrazineはdihydroxyacetonephosphate

と glyceraldehyde phosphate とに反応し hydrozone あるいは osazone を形成しているようである<sup>(28)</sup>。また、酵素反応系に加える hydrazine sulfate は、反応生成物の triose と複合体を形成し、triose を固定する働きがある。なぜなら hydrazine sulfate を加えない反応系では、hydrazine sulfate を加えた反応系の約 100 分の 1 程度の発色率しかないからである。このような、hydrazine と酵素反応生成物との反応は、酵素活性測定にも使用されている<sup>(43)</sup>。

発芽の第一段階で、種子は呼吸によりエネルギーを生産しなければならない。呼吸に関与する解糖系の構成酵素である Aldolase の活性が発芽開始前から存在することは合理的である。発芽開始 4~5 日で活性が減少しはじめるのは、暗所で発芽させしかも発芽床に蒸留水を用いていることからある程度推察されるが、1~2 日目の活性の減少と 3 日目に最大の活性があることの推察を行なうのは、本実験

のみでは不十分である。

しかしながら、発芽における Aldolase 活性の消長に関して一つの仮説を推測した。あらかじめ種子中に存在する活性は、発芽初期のみ働き、発芽開始後割合短期間で分解され、一方、 $\alpha$ -amylase 等のごとく、胚乳に存在するでんぷんが最も盛んに分解される発芽後3~4日目以降にあわせて新たに Aldolase が誘導されてくるというものである。これには、分解及び誘導機構を解明しなくてはならないが、少なくとも誘導に関しては、 $\alpha$ -amylase、protease、nuclease 等のように、gibberellin で誘導されるものではない。今後、蛋白質合成経路におけるそれぞれの段階を特異的に阻害する試薬を用いた実験等が必要であろう。また、他の解糖系構成酵素についても同様な実験をする必要もあろう。

動物においては、A、B、Cの3種のアイソザイムが確認されているが、植物においては、電気泳動等により互いに分離されるマルチプ

ルフォームの存在は明らかにされているが、構造遺伝子が異なることにより生合成されるアイソザイムの存在は確かめられていない。本実験においては、水稻種子及び幼植物にマルチプルフォームが存在することが確かめられ、また、マルチプルフォーム間での相対的な活性、及びポリアクリルアミドディスク電気泳動における相対的な移動度が、胚・ヌカ層部と葉部とでは明らかに異なっていた。この結果から、主として種子中に存在し発芽代謝に関与する Aldolase と、主に葉に存在し光合成その他の代謝に関与する Aldolase とが、異なるアイソザイムである可能性が強いと思われる。

Takeo<sup>(102)</sup> は、ハツカダイコンとニンジンの種子についてマルチプルフォームを調べたが、いずれも1種類しか認められなかった。またハツカダイコンの葉においては、種子と同じ位置と、より陽極側との2本のバンドがあり、葉にのみ見出される陽極側のバンドの方が Aldolase 活性が高いという結論を得た。この

結果は水稻種子の場合と同様であり、発芽時の主たる Aldolase と、葉において光合成等に対し主たる Aldolase とが、質的に違う酵素であると推論できる。水稻の場合と比較すると、種子と葉に存在するマルチプルフォームの相対的な活性の強さが変化するという共通点はあったが、マルチプルフォームの数は、特に種子において大きな差があった。

発芽種子では蛋白質代謝が起こっており、protease 活性が存在することは古くから知られている<sup>(145)</sup>。水稻発芽種子におけるマルチプルフォームの形成が、この protease による可能性も存在する。本実験で示されたマルチプルフォームがアイソザイムであるか否かを知るには、それぞれを分離精製しそのアミノ酸配列等の研究が今後の課題となるであろう。



## 第2編 水稲種子胚・ヌカ層 Aldolase の精製 ならびに結晶化<sup>(146)</sup>

水稲種子中および発芽種子中に Aldolase が存在することは前編で明らかにした。また、水稲種子 Aldolase にはマルチプルフォームが存在し、発芽初期とそれ以降では異なるアイソザイムが関与する可能性も指摘した。この問題を解決するためには、酵素の分離精製が不可欠である。

Aldolase の分離精製においては、酸処理、硫酸分画、イオン交換クロマトグラフィー、ゲルろ過等、通常の酵素精製手法が用いられている。そのなかで注目されるのは、ウサギ筋肉 Aldolase に対する硫酸分画を用いた一段階精製法である。<sup>(147)</sup> この方法は、ウサギ筋肉から Aldolase を水抽出し、抽出液に等量の飽和硫酸溶液を加えた後、生じた沈澱を除き、さらに上澄の硫酸飽和度を 0.52 まで高め、静置すると Aldolase の粗結晶が得られるというもの

である。しかしながら、このように簡便な精製法は、ウサギ筋肉 Aldolase の精製以外では報告されておらず、他の生物の Aldolase に対しては通常の蛋白質精製法が用いられている。本編では比較的活性が高く、多量処理が容易である胚、ヌカ層からの Aldolase の分離精製ならびに結晶化について述べる。

## 第1章 実験方法

### 第1節 実験材料

実験に用いた水稲種子・ヌカ層は、山種米穀株式会社より供与された当年度産の水稲コシジワセのヌカである。実験に使用するまでヌカを $-20^{\circ}\text{C}$ で保存した。

### 第2節 酵素活性測定法

粗酵素液を除く各精製段階における Aldolase 活性の測定は、第1編、第1章、第2節、その1に述べた方法に準じて行なった。

粗酵素液およびクロマトグラフィーの各分画における酵素活性測定は、同その2の方法に従った。

### 第3節 結晶酵素均一性検定のためのポリ アクリルアミドゲル電気泳動法

酵素均一性検定のためのポリアクリルアミドゲル電気泳動には、pH 9.4用ゲルを用いた。電気泳動法は第1編、第3章、第1節に述べた方法を部分的に変更して行なった。以下に変更部分のみを記す。

保存溶液 A 溶液  
pH 8.9

{	1 N HCl	48 ml
	Tris	36.6 g
	TEMED	0.23 ml
	水を加えて 100 ml とする	

B 溶液  
pH 6.9

{	1 M $H_3PO_4$	25.6 ml
	Tris	5.7 g
	水を加えて 100 ml とする	

F 溶液 電極槽用緩衝液  
pH 8.3

{	Tris	6.0 g
	glycine	28.8 g
	水を加えて 100 ml とする	

## 第2章 実験結果

### 第1節 水稲種子 Aldolaseの精製

#### その1 酵素の抽出

酵素の抽出には 5 mM EDTA と 5 mM  $\beta$ -mercapto ethanol (以下 E+SH と略す) を含む 50 mM Tris 塩酸緩衝液 (pH 7.4) を用いた。冷凍保存してある胚・ヌカ層 500g <sup>に</sup> 0.8 l の抽出用緩衝液を加えて乳鉢中で 20分 磨砕した。磨砕液を 4層のガーゼでろ過した。次に、ろ液を遠心分離 (10,000 $\times$ g, 30分) し、上に浮いた脂肪層を注意深く取り除き、遠心上澄を抽出液とした。

#### その2 硫酸分析

前節で得た抽出液に固体硫酸を徐々に加え、45%飽和 (抽出液 100 ml につき 27.8g の硫酸)

とした。45%飽和硫酸抽出液に希アンモニア水を加えてpHを7.4に調整した後、3時間以上（通常6時間）放置した。放置後、45%飽和硫酸抽出液に生じた沈澱を遠心（10,000×g, 30分）<sup>に上つて</sup> ~~して沈澱を~~集めた。沈澱を1 mM EDTA, 1 mM EtSHを含む10 mM Tris塩酸緩衝液（pH 7.4）25 mlに溶解し、不溶物を遠心して除いた。上澄を同一の緩衝液で平衡化した Sephadex G-25 カラム（3 × 90 cm）に通して脱塩した。この脱塩酵素溶液を硫酸画分とした。

その3 DEAE-cellulose<sup>註1)</sup> カラムクロマトグラフ、-

前節で得られた硫酸画分をDEAE-cellulose カラムにかけ、分離を行なった。1 mM EDTA, 1 mM EtSHを含む10 mM Tris

註1) DEAE-celluloseはServa社製を用いた。

塩酸緩衝液 (pH 7.4) で平衡させた DEAE-cellulose カラム (4 × 50 cm) に硫酸画分を吸着させ、同一緩衝液で洗浄したのち、0 ~ 0.5 M NaCl 濃度勾配をつけた緩衝液で溶出分離を行った。結果を第 10 図に示した。比較的活性の高い画分 (Fraction No. 42 ~ 45) を集め、これを DEAE-cellulose 画分とした。

その 4 Sephadex G-200<sup>註1)</sup> カラムクロマトグラフィー

前節で得られた DEAE-cellulose 画分を、限外ろ過器<sup>註2)</sup>を用いて約 5 ml に濃縮した。濃縮酵素溶液を 1 mM EDTA, 1 mM E+SH を含む 10 mM Tris 塩酸緩衝液 (pH 7.4) で平衡化

註 1) Sephadex G-200 は Pharmacia Fine Chemicals 社製を用いた。

註 2) 限外ろ過器は MDA / BIOMED 社製のシングルホロファイバーを用いた。

した Sephadex G-200 カラム (3 × 85 cm) を用い、同一緩衝液でゲルろ過した。その溶出パターンを第11図に示した。活性画分は、単一ピークとして溶出された。活性の比較的高かった画分 (Fraction No. 30 ~ 40) を集め、これを Sephadex G-200 画分とした。

その5 phosphocellulose<sup>註1)</sup> カラムクロマトグラフィー

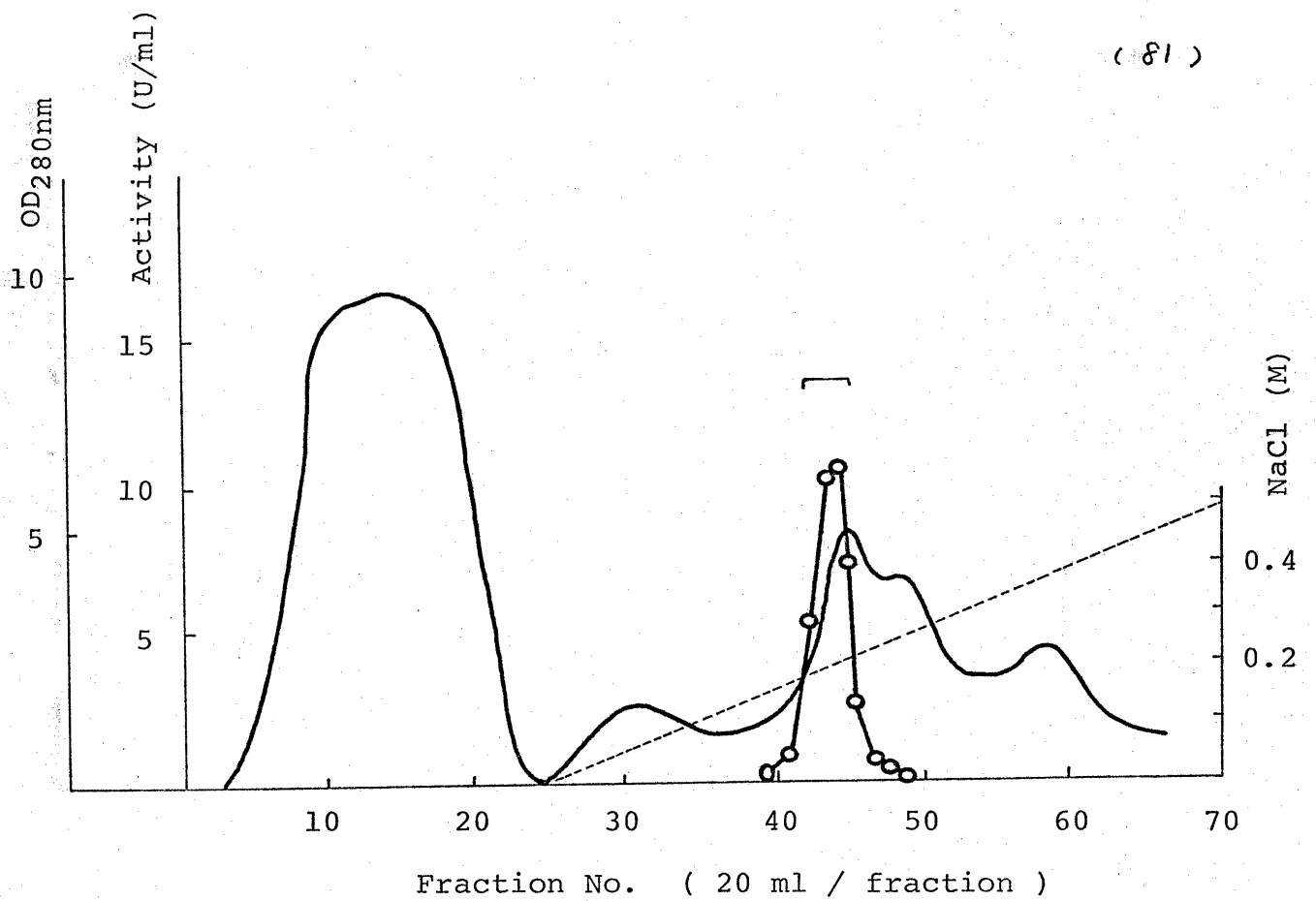
前節で得られた Sephadex G-200 画分を phosphocellulose により分画した。1 mM EDTA, 1 mM EtSH を含む 10 mM Tris 塩酸緩衝液 (pH 7.4) で平衡化した phosphocellulose カラム (2.5 × 70 cm) に Sephadex G-200 画分を吸着させ、同一緩衝液でカラムを十分に洗淨した。溶出液の紫外部 280 nm の吸収が 0.05 以下になるまで洗淨を続けた。十分に洗淨した後、溶出に用い

註1) phosphocellulose は Serva社製を用いた。



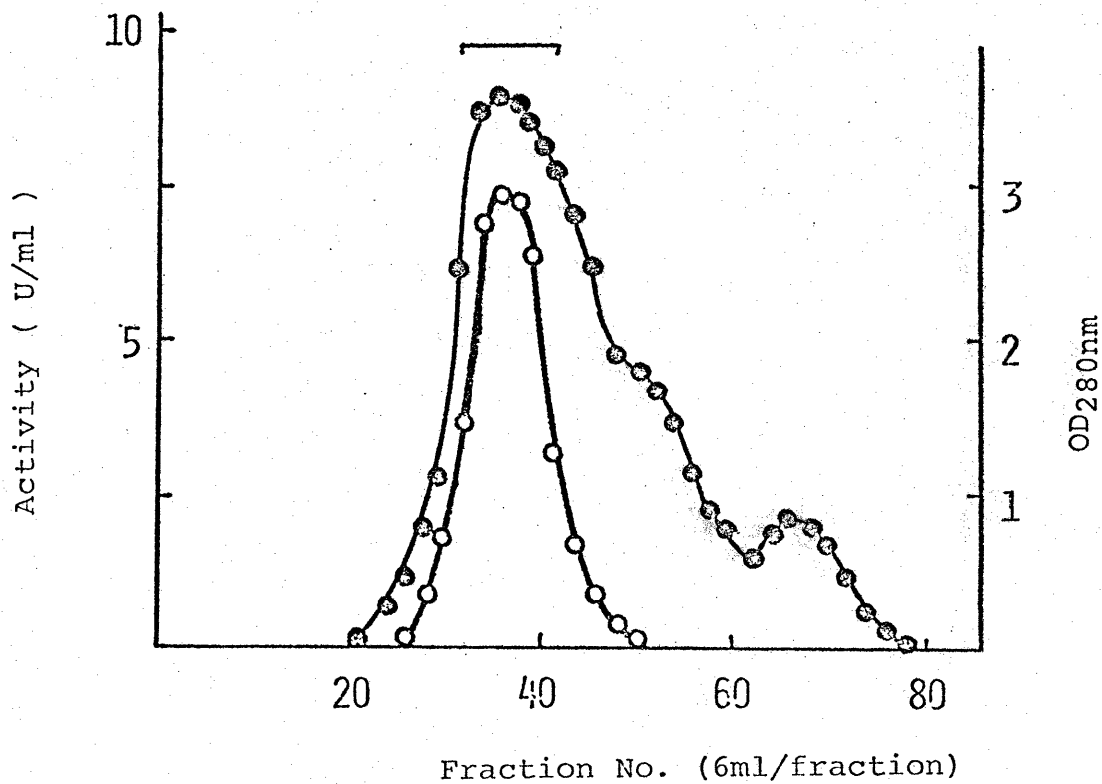
F<sub>1</sub>緩衝液に Fru-1,6-P<sub>2</sub> を 0.0025 M となるよう  
添加し、この緩衝液を用いてさらに溶出を続  
けた。溶出パターンを第12図に示した。

Aldolase 活性は、Fru-1,6-P<sub>2</sub> の添加により特異  
的に溶出された。



第10図. DEAE-cellulose カラムクロマトグラム.

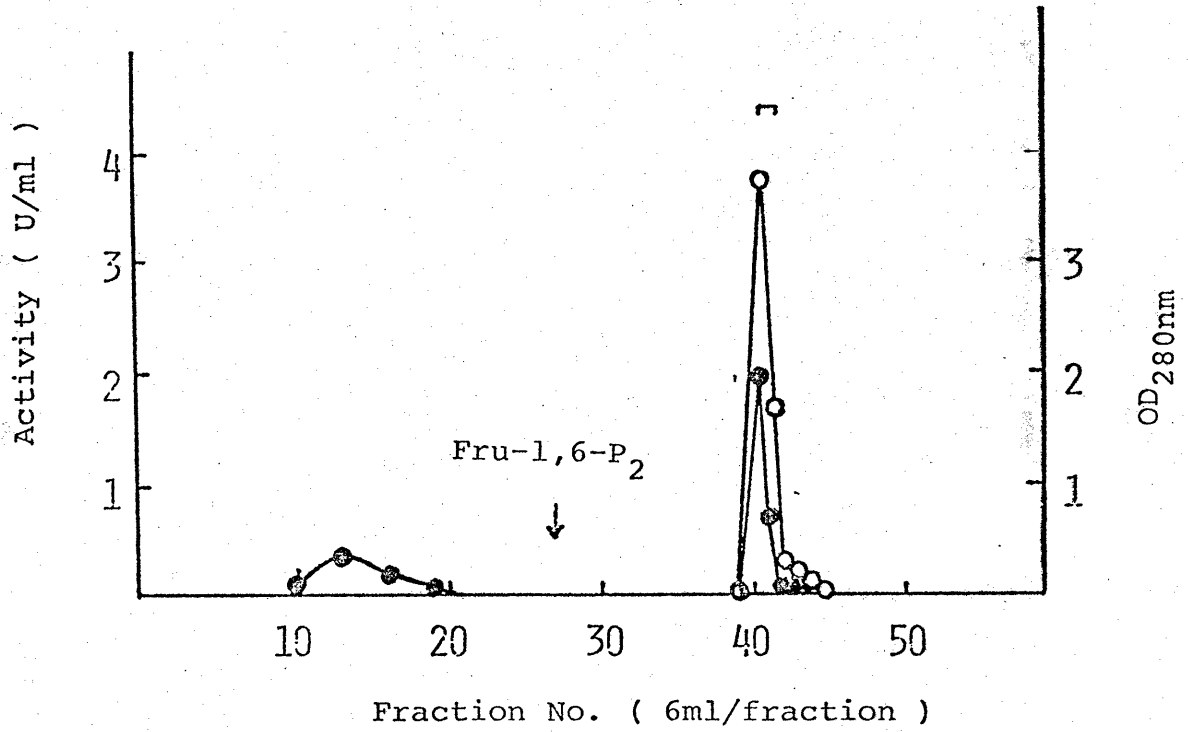
- Aldolase 活性.
- 280 nm の吸光度による蛋白質量.
- 溶出液中の NaCl のモル濃度.



第 11 図. Sephadex G-200 カラムクロマトグラム.

○ Aldolase 活性.

● 280 nm の吸収による蛋白質量.



第 12 図. Phosphocellulose カラム フロマトグラム

○ Aldolase 活性.

● 280 nm の吸収による蛋白質量.

## 第2節 結晶化

前節で得た精製酵素の結晶化を行なった。  
 精製酵素を限外ろ過器を用いて10 mg/ml程度に濃縮した。濃縮した酵素溶液をViskingチューブ<sup>註1)</sup>に入れ、硫酸<sup>註2)</sup>溶液に対して透析を行なった。透析外液の硫酸濃度を0%から徐々に増加させ、約12時間後に最終濃度65%飽和となるようにした。さらに数日間透析を続けた。このようにして得られた結晶を遠心(1,000 rpm, 5分間)して集めた。結晶の写真と第13図に示した。結晶は無色透明な針状結晶であり、平均的な長さは約50  $\mu\text{m}$ であった。

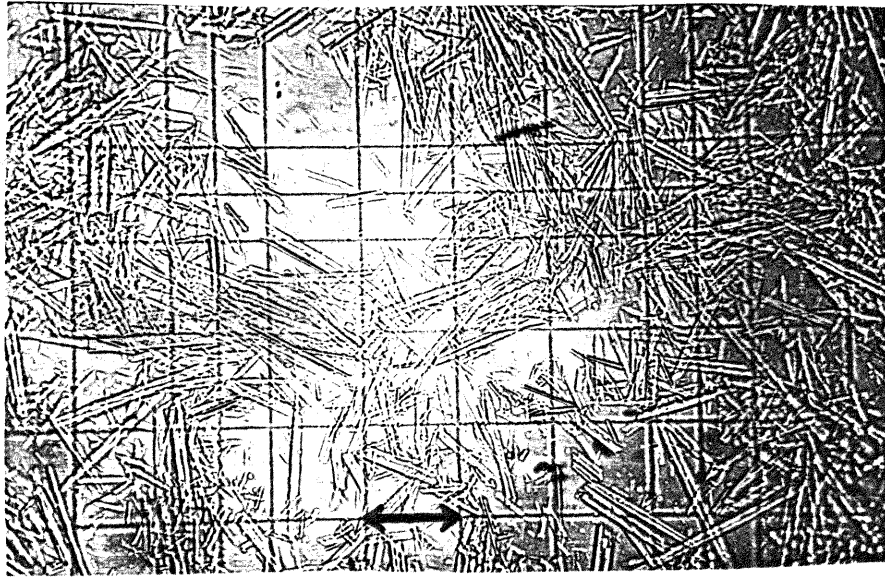
前章の各酵素精製段階と本章の結晶化における活性量、比活性量、収率等を第1表に示した。本結晶酵素の比活性は、約1.23 unit /

註1) Viskingチューブは、Visking社製の透析チューブを用いた。

註2) 硫酸は、和光純薬社製の酵素精製用硫酸を用いた。

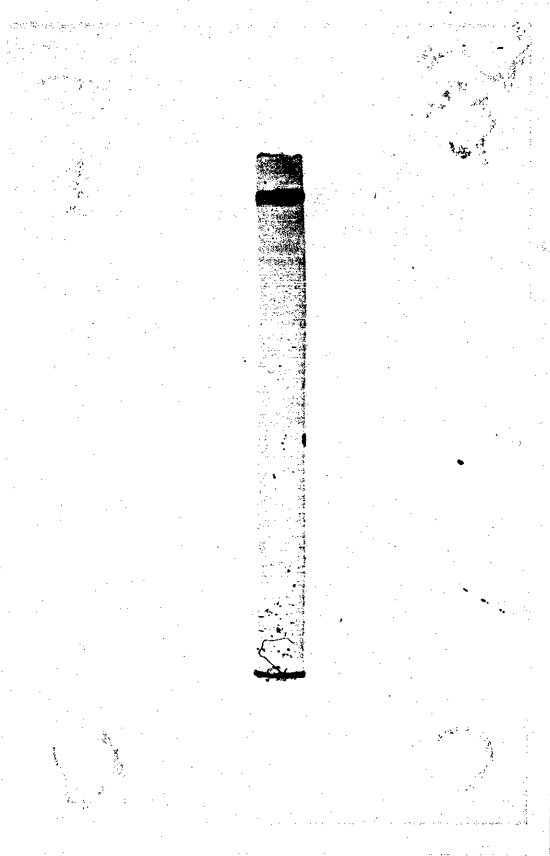
mg of protein であり、粗酵素抽出液の 473 倍に精製された。この結晶は再結晶を行っても比活性の増加は認められず、混晶である可能性はないものと思われる。

結晶酵素を脱塩した後、ポリアクリルアミドディスク電気泳動を用いて分析した。分析後の蛋白染色バンドは1本のみであった(第14図)。



第 13 図. 水稻種子 Aldolase 結晶 の  
顕微鏡写真.

図中の矢印は 50  $\mu\text{m}$  の長さである。



第 14 図. 水稻種子 Aldolase 結晶の  
ポリアクリルアミドディスク電気泳動図.



第 1 表 水稻種子 Aldolase の 精製過程

Step of purification	Protein (mg)	Activity (units)	Specific activity (units/mg)	Yield (%)
Crude extract	43,800	114	0.0026	100
Ammonium sulfate	1,630	75	0.046	65.8
DEAE-cellulose	116	52	0.448	45.6
Sephadex G-200	20.8	18.3	0.880	16.1
Phosphocellulose	13.5	16.6	1.23	14.6

### 第3章 考察

塩析(硫酸)、酵素のイオン化特性(D E A E-cellulose)および分子量(Sephadex G-200)などの性質を利用して酵素の分画を行なった。しかし、Sephadex G-200 カラムクロマトグラフィーの溶出パターンは、単一ピークを示すものの、正規分布を示すに至らず、再クロマトあるいは他の性質を利用した分離を行なう必要があった。Pogell<sup>(148)</sup>は Fructose-1,6-bisphosphatase を分離精製する手法として、基質である Fru-1,6-P<sub>2</sub> を用いて、酵素を吸着させた CM-cellulose カラムから酵素を特異的に溶出させることに成功した。また、Sarngadharan<sup>(149)</sup>等は CM-cellulose に吸着させた Fructose-1,6-bisphosphatase を Fru-1,6-P<sub>2</sub> で、Eley<sup>(150)</sup>は phosphocellulose に吸着させた ribonuclease を RNA で、Carminatti<sup>(151)</sup>等は CM-cellulose に吸着させた pyruvate kinase を アロステリック エフェクターである Fru-1,6-P<sub>2</sub> で、さらに、Rattazi<sup>(152)</sup>は CM

- Sephadex に吸着させた Glucose - 6 - phosphate dehydrogenase を glucose - 6 - phosphate でそれぞれ特異的に溶出させ酵素精製に利用している。

Penhoet 等<sup>(89)</sup> は、動物起源の Aldolase を phospho cellulose に吸着させたのち、Fru - 1,6 - P<sub>2</sub> で特異的に溶出させることに成功した。そこで、本実験においてもこの手法を多少改良して応用し、酵素精製に用いた。Aldolase を phospho cellulose に吸着させたのち、Fru - 1,6 - P<sub>2</sub> を用いて特異的に溶出させることに成功し、水稻種子 Aldolase 精製に対して極めて有効であった。なお、試みに硫酸分画後直ちに phospho cellulose カラムクロマトグラフィ - を行い、良い結果を得ている (第15回)。

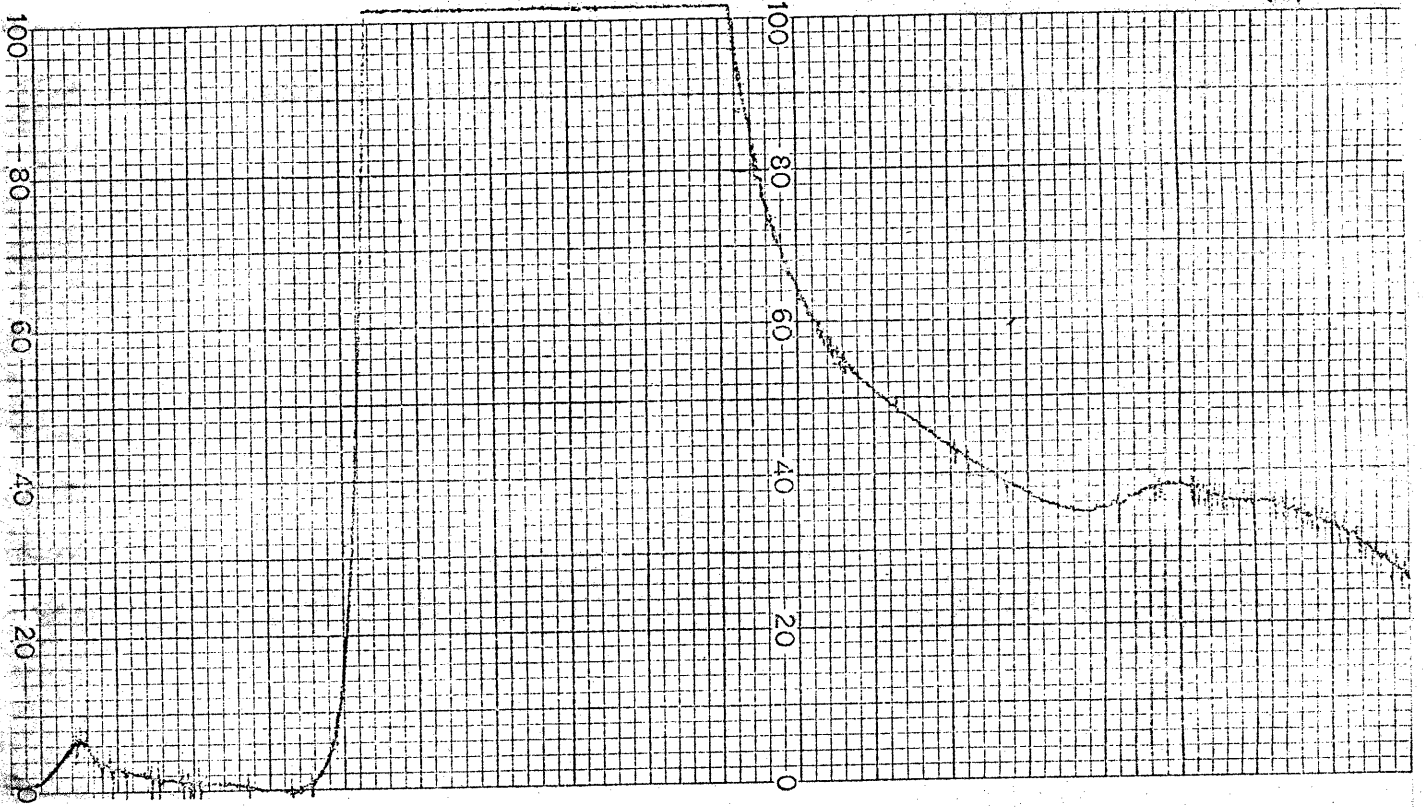
動物、特にウサギ筋肉 Aldolase は結晶化しやすく、Taylor<sup>(147)</sup> 等は硫酸分画のみで結晶を得ている。他にも現在までに動物ではウサギの<sup>(153)</sup> 肝臓、および<sup>(89)</sup> 脳、カタツムリの<sup>(154)</sup> 筋肉、ブタの腎臓、<sup>(155)</sup> タラの<sup>(156)</sup> 筋肉、カエルの<sup>(125)</sup> 筋肉、<sup>(157)</sup> 回虫の<sup>(157)</sup> 筋肉からそれぞれ結晶が得られている。また、微

生物では酵母<sup>(15)</sup>などから結晶が得られている。しかし、植物においてはいまだに結晶化に成功したという報告はなく、水稻種子 Aldolase が最初の例である。

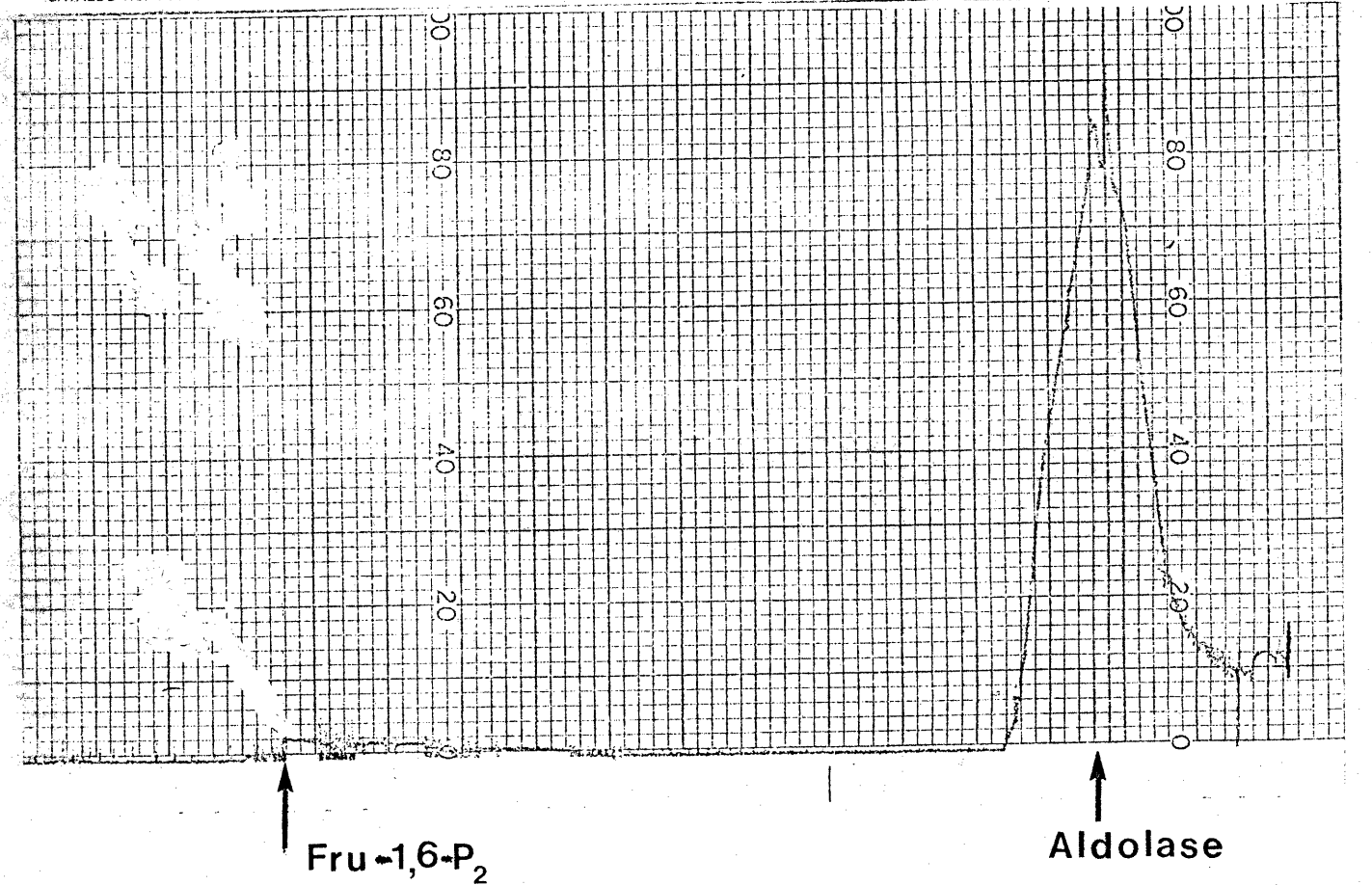
現在蛋白質の純度検定法として最も鋭敏な方法であるポリアクリルアミドゲル電気泳動において、単一の蛋白染色バンドを得たことにより、結晶酵素の均一性を確認した。さらに、超遠心沈降平衡法による Fringi の変位量の対数と同転半径の二乗とが直線性を示し（第24図参照）、等電点電気泳動において、構成蛋白質が単一の等電点を示した（第27図参照）。また、N末端アミノ酸分析において、Glx. の他は DNP-アミノ酸が認められなかった。以上の結果から、本結晶酵素は均一であると断定した。本実験で得た結晶酵素標品は、本論文の酵素研究のための試料として十分な純度を有するものと判断する。

本研究において、初めて植物から Aldolase を結晶として得ることができ、たちおくれて

いた植物 Aldolase の研究に、有効な酵素試料を提供したことは、重要な意義を有するものと考えられる。



CATALOG NO. 0505U MADE IN U.S.A.



第15図. Phospho cellulose カラムクロマトグラフィーによる一段階精製法.

図中の線は 280nm の吸収を示す.

### 第3編 結晶水稻種子 Aldolase の性質<sup>(146)</sup>

Aldolase は、反応機構がま、たく異なる Class I と Class II とに分類される。さらに Class I においては、A、B、C のアイソザイムが動物において知られており、それぞれ特有な酵素化学的性質<sup>をもつ</sup>があり、その分布に器官特異性がある。これは各アイソザイムの役割がその存在箇所によって違うことを示唆する。例えば B 型は、基質に対する  $K_m$  値から、Fru-1-P 経由の糖の合成および fructose の代謝に対して他の A、C 型より有利であると推察される。事実、B 型アイソザイムが存在する肝臓と腎臓皮質では、糖新生がさかんである。したがって、植物体にも代謝系別の特異性、あるいは器官別の特異性が Aldolase に存在することが考えられる。そこで、水稻種子発芽の初期代謝に重要な役割を荷う胚・ヌカ層 Aldolase の諸性質を詳しく検討することは重要なことと考える。

一方、Aldolase の物理的性質で、過去に大きな問題となつたのは分子量とサブユニットの数である。ウサギ筋肉から分離精製した酵素は、当初分子量<sup>(158)</sup> 150,000 で分子量<sup>(159)</sup> 50,000 のサブユニット3個であると考えられていた。その後、分子量とサブユニットの数について数々の報告<sup>(160-162)</sup>が<sup>(160-162)</sup>出され、大きな争点となつた。現在では、分子量160,000で、分子量40,000のサブユニット4個より構成されていると結論づけられている。哺乳類の脳に存在するAldolase以外はすべて、同種のサブユニットで酵素が構成されている。水縮種子Aldolaseもサブユニットから成り立つオリゴマー酵素であることが予想された。そこで、分子量をゲルろ過ならびに平衡沈降法により測定を行うとともに、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動法を用い、サブユニットに関する実験を行つた。また、高等植物の発芽代謝に対するひとつのアプローチとしてAldolaseを研究するために、酵素の最も基本的な性質である



速度論的性質ならびに化学的性質を明らかに  
することは重要なことであると考へ、種々の  
実験を行なつた。

## 第 1 章 実験方法

### 第 1 節 実験材料

第 2 編において精製、結晶化した水稻種子 Aldolase を第 3 編の実験に使用した。使用に先立ち、結晶 Aldolase を、それぞれの実験に用いる緩衝液および再蒸溜水に対して充分透析し、硫酸を除いた。

### 第 2 節 Aldolase 活性の測定

Aldolase 活性の測定は、第 1 編、第 1 章、第 2 節、その 1 に述べた方法に準じて行なった。ただし、酵素活性の最適温度ならびに酵素蛋白の等電点を求める実験においては、第 1 編、第 1 章、第 2 節、その 2 の方法に従った。

### 第3節 ゲルろ過法

ゲルろ過による分子量の測定は基本的に Andrews<sup>(163)</sup>の方法に従った。

Sephadex G-200 カラム (2.5 X 80 cm) を 1 mM EDTA, 1 mM 2-mercaptoethanol (以下 E+SH) を含む 10 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4) で平衡化した。結晶酵素 1 mg をビスキングキューブにより同一緩衝液で脱塩したのち、カラムにかけた。溶出液の流速は 4 ml/hr とした。溶出液を 1 ml ずつ分取し、その酵素活性を測定して溶出体積 ( $V_e$ ) を求めた。標準蛋白質<sup>註1)</sup>として、鶏卵 albumin (HEA, 分子量 45,000), 牛血清 albumin (BSA, 68,000), ウサギ筋肉 Aldolase (RM-ALD, 160,000), 牛肝臓 catalase (CAT, 240,000) を用いた。標準蛋白質各 2 mg を含む 1 ml の緩衝液を

註1) 標準蛋白質は、Boehringer Mannheim GmbH 社製の蛋白質分子量測定キットを用いた。

Sephadex G-200 カラムにかけ、同様な操作を行  
い溶出させた。それぞれの蛋白質の溶出体積  
を 280 nm の吸収で求めた。ボルドボリユーム  
( $V_0$ ) は、blue dextran<sup>註1)</sup>を用いて同様に測定し  
た。

#### 第 4 節 沈降平衡法

沈降平衡法の実験にはスピコンモデル E に  
干涉光学系を着装して用いた。本実験は Yphantis<sup>(164)</sup>  
の double-sector cell を用いる meniscus depletion 法 (high-  
speed 法) に従った。超遠心に先立ち、結晶酵  
素を 0.19 M の NaCl, 2 mM の E+SH を含む 10 mM  
リン酸ナトリウム緩衝液で溶解したのち、  
同一緩衝液で 6 時間透析を行なった。初期蛋  
白質濃度を 0.05% として遠心した。遠心は、  
14,000 r.p.m. ( $\omega^2 = 2.149 \times 10^6$ ), 10.4 °C で行な  
った。

註 1) blue dextran は、Boehringer Mannheim GmbH 社製を用いた。

## 第5節 SDS<sup>註1)</sup>ポリアクリルアミドデキース の電気泳動法

SDSポリアクリルアミドデキース電気泳動は、Weber と Osborn の方法<sup>(165)</sup>を改良した林らの方法<sup>(166)</sup>に従って行った。以下に実験方法を述べる。

保存液	① 22.2% アクリルアミド - 0.6% BIS <sup>註2)</sup>	100 ml
	② 0.5 M リン酸ナトリウム緩衝液	500 ml
	③ 10% SDS	100 ml
	④ 0.05% BPB <sup>註3)</sup>	10 ml
	⑤ 50% グリセロール - 2% SDS - 0.02M リン酸緩衝液 (pH 7.2)	50 ml

結晶酵素 2  $\mu$ g を含む水溶液 0.2 ml と保存液⑤ 0.2 ml とを混合し、E+SH を 20  $\mu$ l 加え、50°C で 2 時間放置した。放置後 0.2 ml の保存液④を加えて

註 1) SDS ; ドデシル硫酸ナトリウム

註 2) BIS ; methylene bis acrylamide

註 3) BPB ; bromophenol blue

よく混合し、これを試料溶液とした。一方、ゲルの調製は、保存液①を13.5 ml, ②を6.0 ml, ③を0.3 ml, 脱イオン水8.5 ml, さらに1.5%過硫酸アンモニウム1.5 ml (用時調製)の混合液をよく攪拌したのち、脱気を行なった。この混合液を氷中に置き、TEMED<sup>註1)</sup>を0.045 ml加えて攪拌混合し、これを常法に従い、カラム中でゲル化させた。カラムを泳動層にセットした後、上下の電極層に0.1% SDS-0.1M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.2) を満たし、さらに試料溶液をゲルの上面に静かに重層した。クーブ1本あたり8 mA 通電し、約5時間泳動した。泳動後の染色法、脱染色法は、第1編、第1章、第6節に準じて行なった。また、分子量推定用の標準蛋白質として牛血清 Alb.<sup>註2)</sup> (BSA, 分子量68,000), ウサギ筋肉 Aldo-

註1) TEMED ; N,N,N',N' tetra methyl ethylene diamine

註2) BSA は、Boehringer Mannheim GmbH社製を用いた。

ase<sup>註1)</sup> (RM-ALD, 40,000), cytochrom C<sup>註1)</sup> (CYT, 12,500) を用いた。この標準蛋白質の混合溶液を試料溶液と同様に処理して泳動、染色、ならびに脱染色を行なった。

註1) RM-ALD, CYTは、Boehringer Mannheim GmbH 社製を用いた。

## 第6節 等電点電気泳動法

等電点電気泳動の実験は、基本的に Svensson の方法に従った。<sup>(167)</sup> Ampholine<sup>註1)</sup> は pH 3.5 ~ 10 を用い、平均 1% の濃度で用いた。分離には 110 ml 用のカラムを用い、カラム中のショ糖および Ampholine の濃度勾配の作成には、段階法 (24 段階) を用いた。試料は 9 ~ 16 段階に加えた。試料および Ampholine をカラムに充填した後、カラム温度を 4 °C に保ち、2 mA, 200 V で通電した。通電は 72 時間行い、終了時の電圧は 1000 V であった。泳動後、Ampholine 溶液を 50 滴ずつ分画し、順次 pH および酵素活性の測定を行なった。酵素活性は、dinitro phenyl hydrazine 法 (第 1 編, 第 1 章, 第 2 節, その 2)、蛋白質量は、280 nm の吸収でそれぞれ測定した。

註 1) Ampholine は、LKB Produkter, AB 社製を用いた。



## 第7節 アミノ酸分析

結晶酵素を用いてアミノ酸分析を行なった。蛋白質の加水分解は、Moore等の方法<sup>(168)</sup>に準じた。酸分解に用いる塩酸は、あらかじめ108.6℃の定沸点分溜を行なった。結晶酵素を脱塩水に対して充分透析した後、凍結乾燥を行なった。凍結乾燥標品約5mgをよく洗浄した試験管に入れ、定沸点塩酸を1ml加え、真空にして封じ、110℃で20時間および72時間ドライブロックバス<sup>註1)</sup>を用いて加熱した。加熱後、試験管の封を切り、内容物をロータリーエバポレーターで蒸発乾固させ、乾固物をアミノ酸アナライザーの第一緩衝液で溶解させた。アミノ酸オートアナライザーは、日本電子K.K.のJLC-6ASを用いた。カラム樹脂は、LCR-2を使い、単一カラム方式で行った。

註1) ドライブロックバスは、M-S機器社製、DB-1H型を用いた。

た。カラム温度は 52℃ に調節した。アミノ酸のニンヒドリンによる発色率の補正は、標準アミノ酸（和光純薬工業 K.K. アミノ酸混合標準液 H 型）の発色率を測定して行なった。チャート上のピーク面積は HW 法<sup>(169)</sup>により計算した。比較的加水分解の影響を受けない Asp., Glu., Ala., Leu. の 20 時間加水分解して得た値と、72 時間の値とそれぞれの平均値が一致するよう比を求め、この比をアミノ酸分析値に乗ずることにより 20 時間、72 時間の値をそろえた。また、Val., Ileu. はその立体障害のため加水分解を受けにくいことから、72 時間値を採用した。Thr., Tyr., Ser. は酸加水分解により破壊される。このため、次の式<sup>(168)</sup>を用いて 0 時間の値に補正した。

$$\log A_0 = \left( \frac{t_2}{t_2 - t_1} \right) \log A_1 - \left( \frac{t_1}{t_2 - t_1} \right) \log A_2$$

$A_0, A_1, A_2$  は加水分解 0,  $t_1, t_2$  時間後のアミノ酸の量

これ以外のアミノ酸の値は、20 時間と 72 時間の値とを平均することにより求めた。Cys と

CysSHは過ギ酸酸化し、cysteic acidとして定量した。<sup>(170)</sup>蛋白質を過ギ酸酸化したのち、過剰の過ギ酸は臭化水素を用いて除いた。蛋白質を加水分解(20時間)した後、前述と同様にアミノ酸の分析を行なった。また、Try.の定量は、蛋白質を6Mグアニジン塩酸塩に溶解し、288 nmの吸光度から次式により算出した。<sup>(171)</sup>

$$N_{\text{Trp}} = \frac{\epsilon_{288} - (385 M_{\text{Tyr}} + 72.5 P_{\text{Cys}})}{4815}$$

$N_{\text{Trp}}$ ,  $M_{\text{Tyr}}$ ,  $P_{\text{Cys}}$  ; 蛋白質1 mol当りの Trp, Tyr, Cysの数

$\epsilon_{288}$  ; 6Mグアニジン塩酸塩溶液中における蛋白質の分子吸光係数

## 第8節 N末端アミノ酸分析

水稻種子 Aldolase の N 末端アミノ酸分析は Sanger の開発した DNP 法<sup>註) (172)</sup>で行なった。結晶 Aldolase (30 mg) と等重量の  $\text{NaHCO}_3$  とを 0.3 ml の水に懸濁し、これに 0.6 ml の 5% 1-fluoro-2,4-dinitrobenzene (FDNB) を加え、振とうしながら室温で 2 時間反応させた。2 時間後、濃塩酸を 3 滴加え反応液を酸性にして DNP-Aldolase を沈澱させた。この DNP-Aldolase を含む反応液をエーテルで 5 回洗浄したのち、さらに DNP-Aldolase と水、acetone、ether でそれぞれ 3 回ずつ遠心して洗い、五酸化リンを入れたデシケータ中で減圧乾燥させた。乾燥した DNP-Aldolase を試験管にとり、定沸点 6 N 塩酸 2 ml に懸濁し、減圧下で封管したのち、 $105^\circ\text{C}$  で 10 時間加水分解した。加水分解物を苺栓付き試験管に移し、

註 1) DNP 法; dinitro fluoro benzene 法

水を加えて塩酸濃度を1規定にした後、加水分解されたDNP-アミノ酸をetherで5回抽出した。さらにこの水溶液をethyl acetateで抽出した。

etherおよびethyl acetate抽出液を減圧乾固し、Levyの方法により二次元ろ紙クロマトグラフィ-を行なった。ろ紙は東洋No. 51を40×50 cmに切断して用いた。一次元目のクロマトグラフィ-には、toluene - pyridine - 2 - chloro ethanol (30 : 9 : 18) に0.8 N アンモニア水(18)を接触させ展開溶媒として用いた。あらかじめろ紙をアンモニア蒸気で平衡させたのち、クロマト槽に上記展開溶媒を加え、ろ紙クロマトグラフィ-を行なった。展開後、ろ紙を30°Cで乾燥し、有機溶媒を完全に除去した。二次元目の展開には1.5 M リン酸ナトリウム緩衝液(pH 6.0)を用い、下降法で一晩行なった。

また、etherならびにethyl acetateで抽出後のDNP - Aldolase加水分解水溶液については、

これを乾固した後、acetone (塩酸弱酸性) 抽出を行なった。ろ紙に 0.05 M フタル酸緩衝液 (pH 6.0) を噴霧した後、同一緩衝液で飽和した tert-amyl alcohol を展開溶媒としてアセトン抽出物のクロマトグラフィーを行なった。DNP 法全般にわたり、DNP 化合物を昼光にさらさないようにした。

## 第2章 実験結果

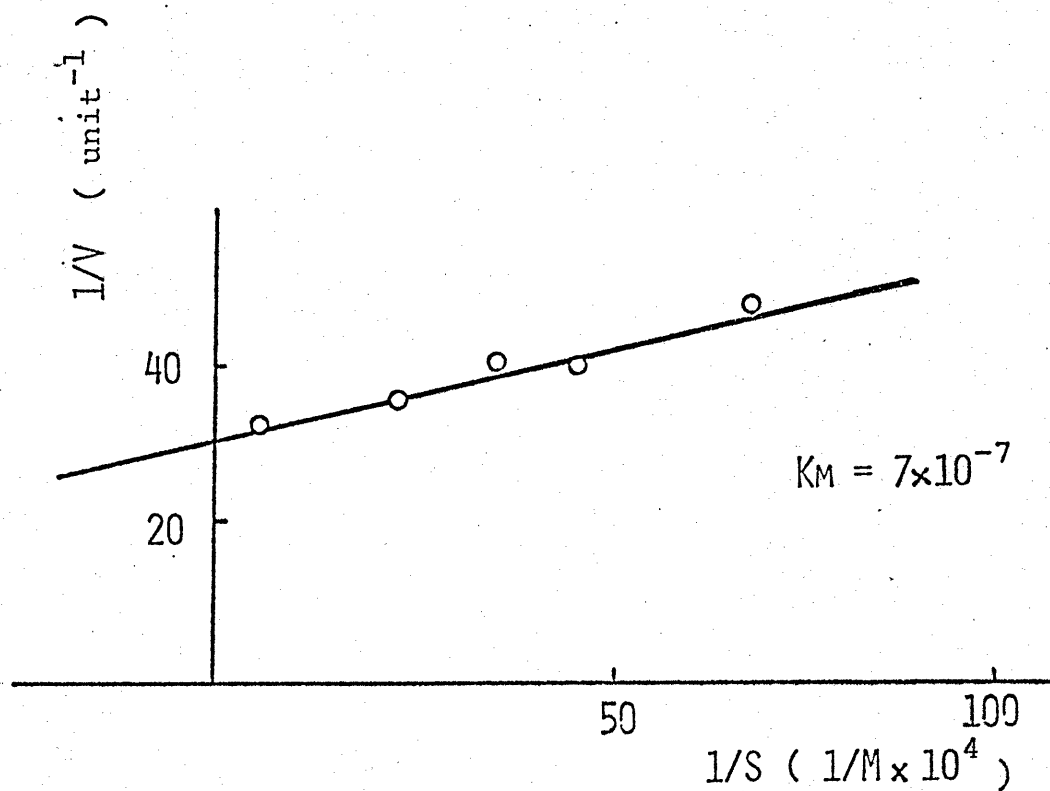
### 第1節 基質特異性ならびに Michaelis 定数

基質特異性を Fructose, Fru-1-P, Fructose-6-P (Fru-6-P) ならびに Fru-1,6-P<sub>2</sub> について調べた。反応系に基質として Fructose およびそのリン酸エステルをそれぞれ 10 mM 加え、Aldolase の活性を測定した。酵素活性の測定には NADH 酸化法ならびに 2,4-dinitro-phenyl hydrazine 法を用いた。Fructose と Fru-6-P を基質とした場合、Aldolase 活性は認められなかった。一方、Fru-1-P と Fru-1,6-P<sub>2</sub> を基質とした場合、Aldolase 活性は認められた。したがって、永稻種子 Aldolase に対し、Fru-1-P と Fru-1,6-P<sub>2</sub> は基質として作用し、Fructose と Fru-6-P は基質として作用しないことが明らかとなった。

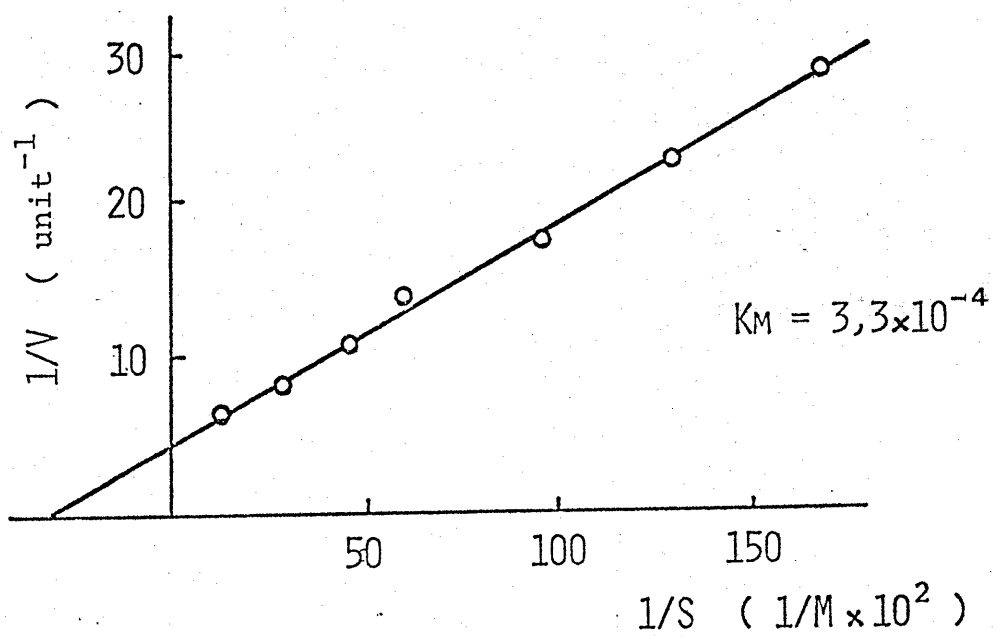
そこで Aldolase の基質となる Fru-1-P と Fru-1,6-P<sub>2</sub> について、それぞれの Michaelis 定数

を測定した。基質濃度の増加に伴い、酵素反応速度が増加し、両基質に対して Aldolase は典型的な Michaelis-Menten 型の酵素と予想された。Fru-1,6-P<sub>2</sub> および Fru-1-P についてそれぞれ Lineweaver-Burk プロットを作成した (第16図, 第17図)。図から求められる K<sub>m</sub> 値は Fru-1,6-P<sub>2</sub> に対して  $7 \times 10^{-7} \text{ M}$ 、Fru-1-P に対して  $3.3 \times 10^{-4} \text{ M}$  であった。また、Fru-1,6-P<sub>2</sub> を 0.02 M 反応系に加えた時の本酵素の活性と Fru-1-P を 0.1 M 反応系に加えた時の活性の比は約1であった。 (ほぼ等しかった)





第 16 図. Fru-1,6-P<sub>2</sub> に対する  $K_M$  値の測定.



第17図. Fru-1-P に対する  $K_M$  値の測定.

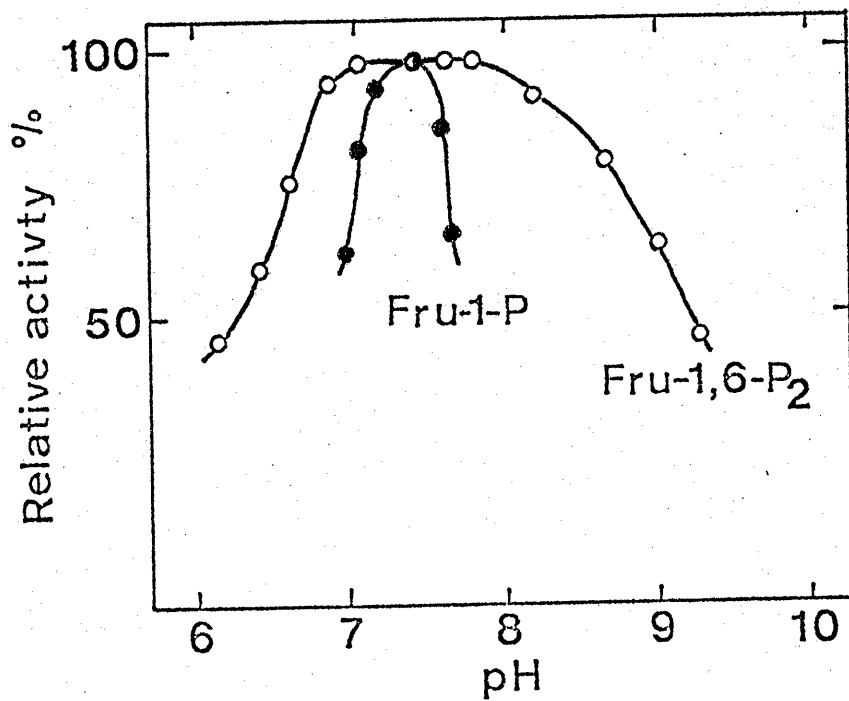
## 第2節 最適pHならびにpH安定性

最適pH値を求める実験においては、酵素反応系中の緩衝液として0.01 M Tris-0.05 M malate 緩衝液を用いた。pH調整は6 N HClおよび6 N NaOHを用い、さらにNaClを加えてイオン強度を一定にした。また、活性を測定したpH値においてそれぞれ非酵素的NADHの分解がないこと、glycerol-3-phosphate dehydrogenase / triose phosphate isomerase 活性が充分であることを確かめた。基質として、Fru-1,6-P<sub>2</sub>とFru-1-Pとを用い、それぞれの最適pHを求めた。結果を第18図に示した。

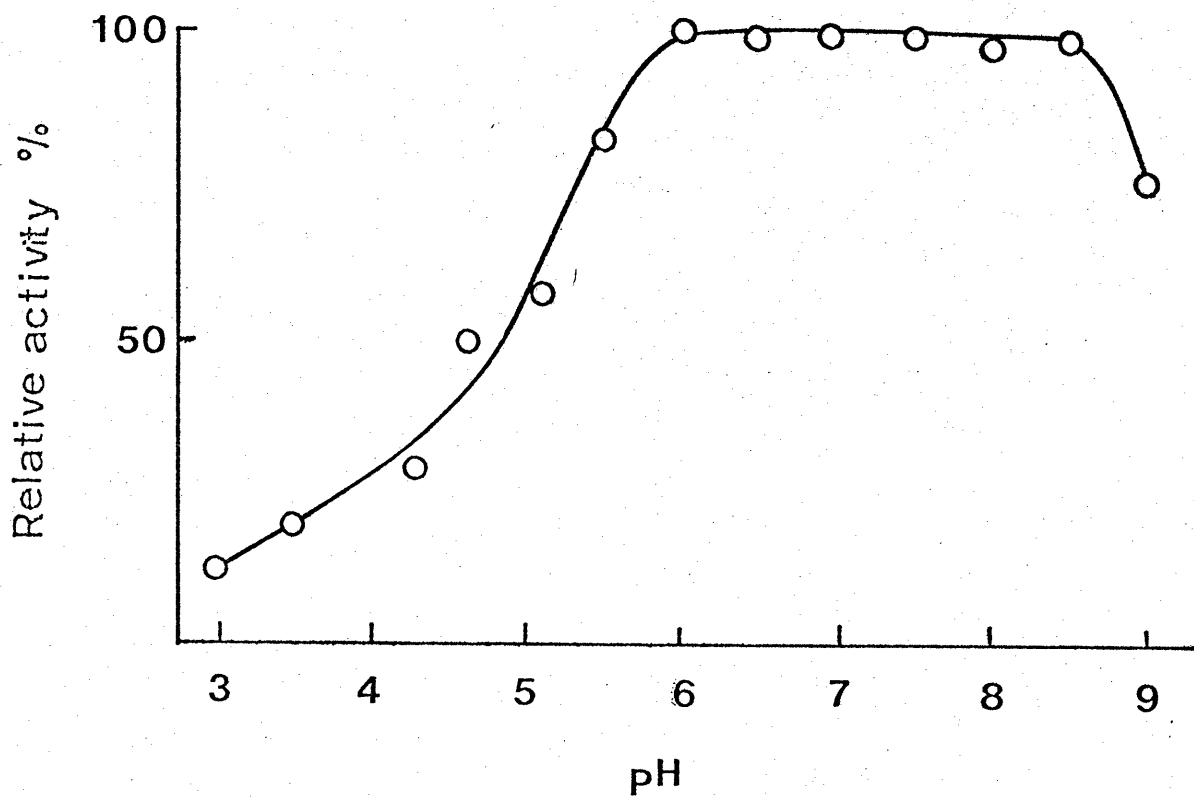
pHに対する酵素活性の様子は、両基質間により、大きな相違が認められた。Fru-1,6-P<sub>2</sub>を基質とした時の最適pH値は広く、7.0~8.0であった。対照的にFru-1-Pを基質とした時の最適pH値は狭く、pH7.4付近であった。

次に本酵素の各種pH下での安定性に関する実験を行なった。10 mMの酢酸-酢酸ナトリ

ウレ ( pH 3.0 ~ 5.5 ) , Tris-malate ( pH 5.5 ~ 8.5 ) ,  
Tris-HCl 緩衝液 ( pH 7.0 ~ 9.0 ) の各 pH の緩衝液と  
共に 30 °C で 6 時間酵素溶液を放置した。残存  
酵素活性の測定は pH 7.4 で行なった。結果を第  
19 図に示した。酵素は pH 6 ~ 8.5 の範囲で比較  
的安定であった。なお、使用した各緩衝液間  
に酵素活性の差はあまり認められなかった。  
また、pH 5 付近では約 50 % の残存活性があり  
、pH 3 においても約 10 % の残存活性が認めら  
れた。



第18図. Aldolase の最適 pH.



第 19 圖. Aldolase の pH 安定性.

### 第3節 最適温度ならびに熱安定性

酵素の活性を  $20^{\circ}\text{C}$ ,  $29^{\circ}\text{C}$ ,  $43^{\circ}\text{C}$ ,  $48^{\circ}\text{C}$ ,  $57^{\circ}\text{C}$ ,  $84^{\circ}\text{C}$  の各温度で測定することによって、この酵素の最適温度を求めた。測定法は温度の影響を比較的受けにくい 2,4-dinitrophenyl hydrazine 法を用いた。各温度での反応の経過を第20-A図に、反応時間を10分間とした時の各温度における酵素活性を第20-B図にそれぞれ示した。反応時間10分では、水稻種子 Aldolase の最適温度は  $50^{\circ}\text{C}$  近辺にあった。また、通常の活性測定に用いている  $25^{\circ}\text{C}$ ; 10分間という反応条件下では反応が直線的に進むことが明らかになった。

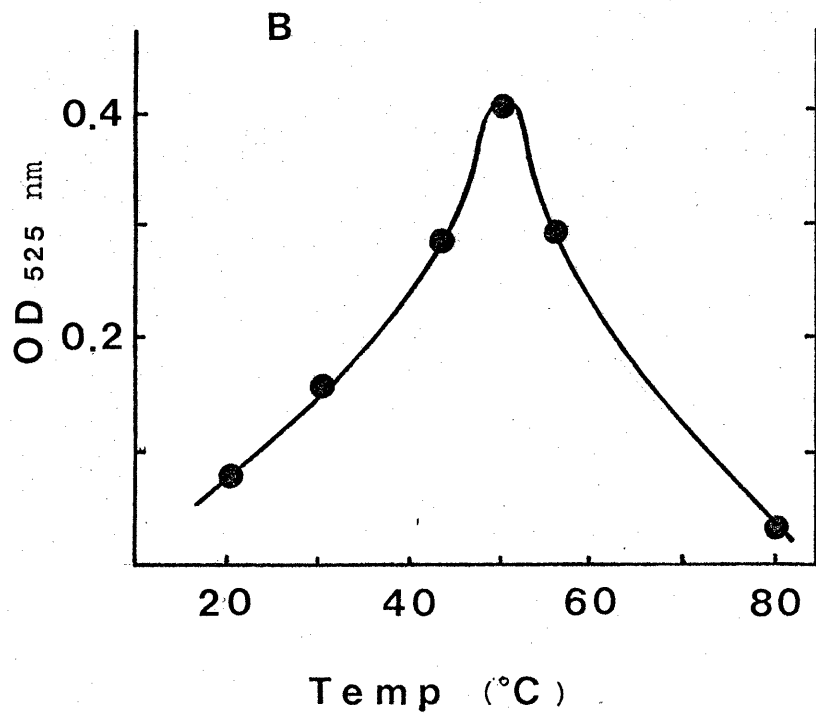
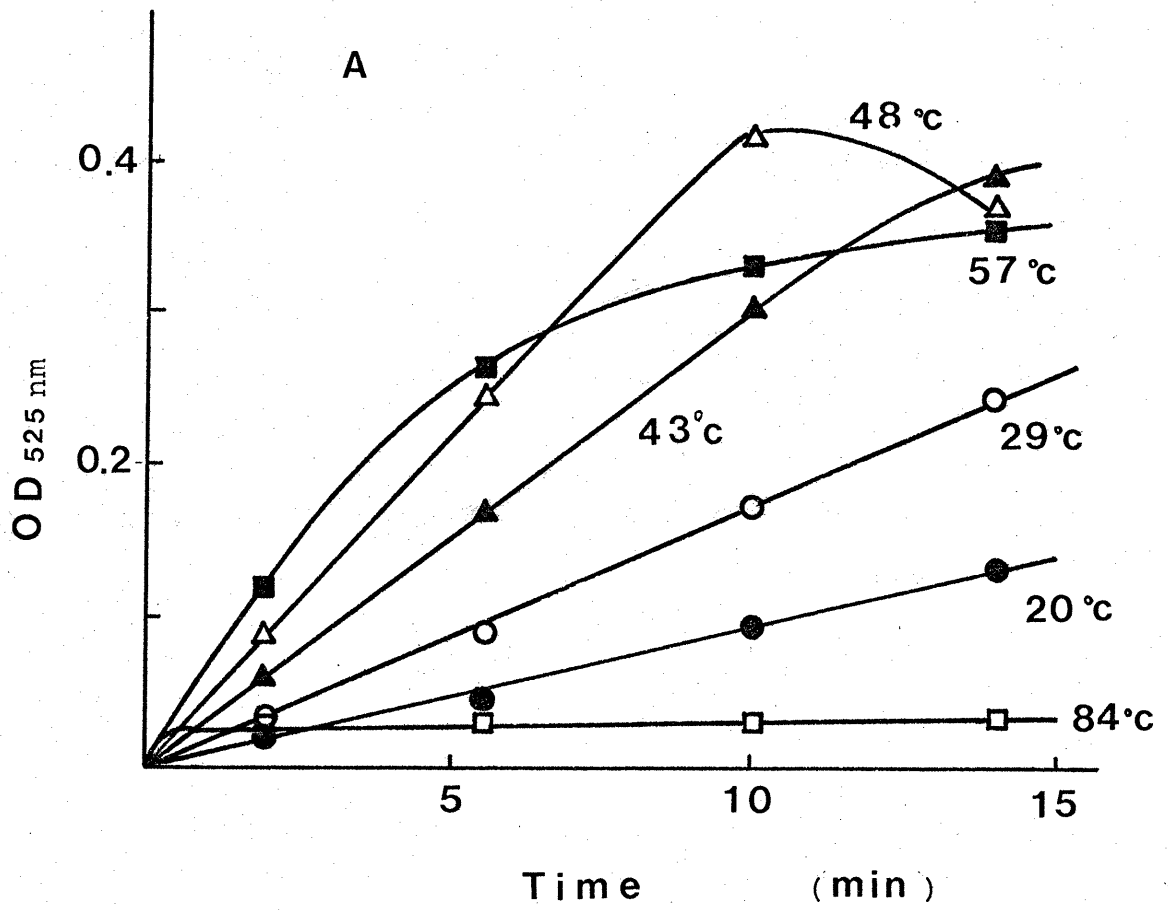
熱安定性を次のようにして求めた。酵素を  $50\text{ mM Tris-HCl}$  緩衝液 ( $\text{pH } 7.4$ ) に溶解し、各温度に10分間保持した。冷水で急冷後、通常の NADH 酸化法により残存酵素活性を測定した。結果を第21図に示した。  $50^{\circ}\text{C}$  以上の温度から失活が起り、  $75^{\circ}\text{C}$  では約30%の残存活性

を有していたが、80℃では活性が全く認められなかった。

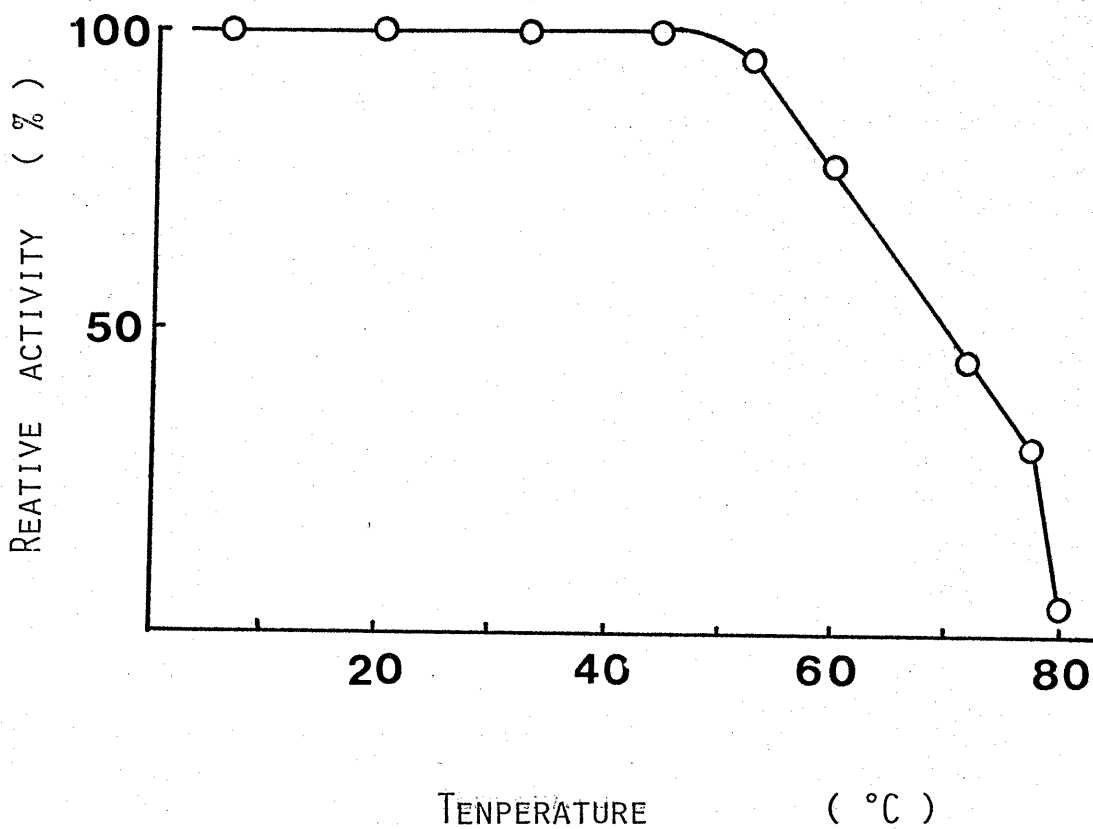
#### 第4節 UVスペクトル

結晶酵素を50 mM Tris-HCl緩衝液で透析した後、酵素溶液の可視およびUVの吸収を測定した。可視部(800 nm ~ 340 nm)には吸収が認められなかった。第22図にUV吸収チャートを示す。極大吸収値は278 nmにあった。

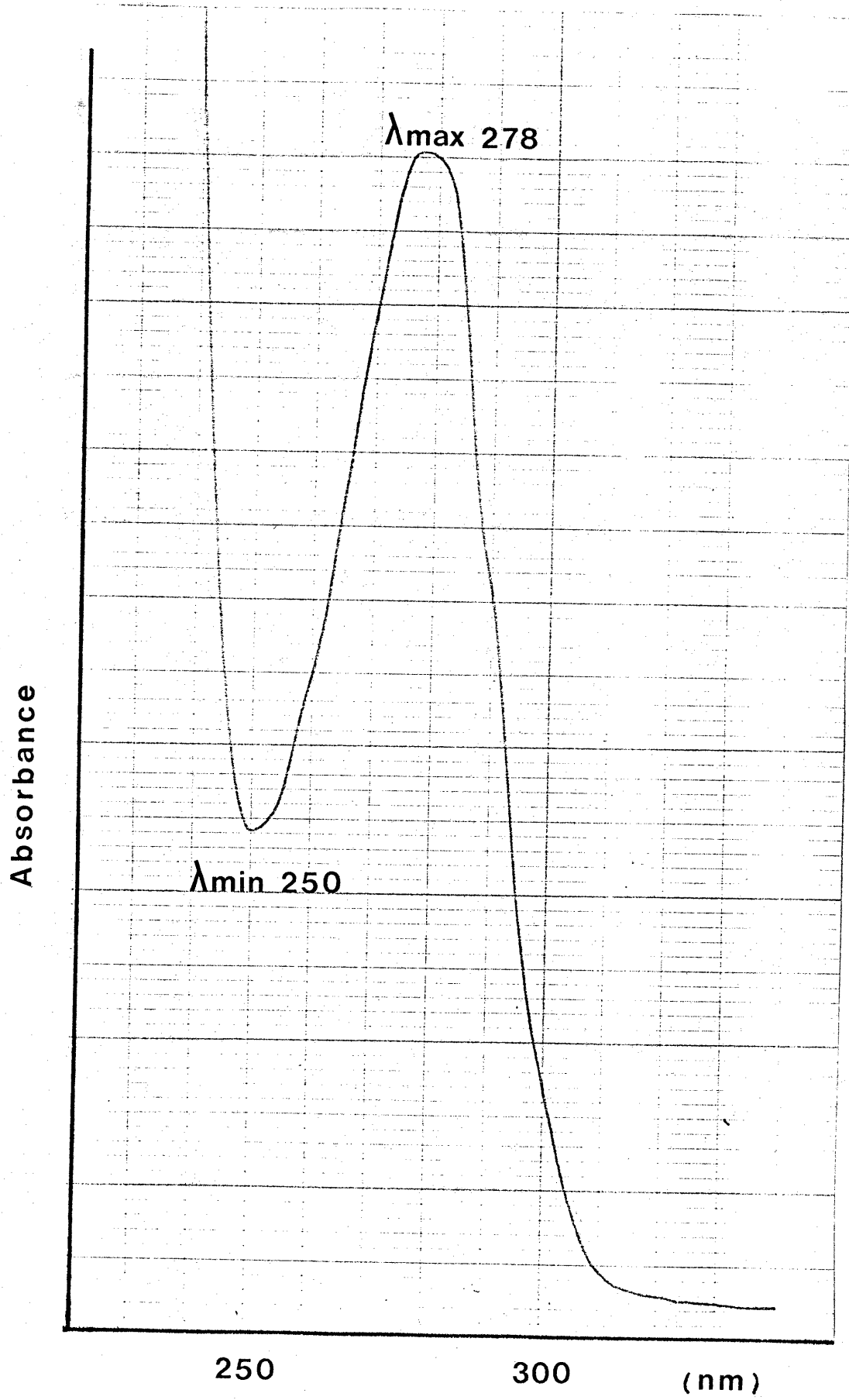




第20図. Aldolaseの最適温度



第21図 Aldolase の熱安定性.



第22図. Aldolase の UV スペクトラム.

## 第5節 分子量

### その1 ゲルろ過法

Sephadex G-200 を用いて水稲種子 Aldolase の分子量を測定した。標準蛋白質として鶏卵 albumin, 牛血清 albumin, ウサギ筋肉 Aldolase ならびに牛肝臓 catalase を用い、それぞれの  $V_e / V_0$  を測定し、検量線を求めた。検量線は直線であり、水稲種子 Aldolase (RB-ALD) の見かけの分子量は 16,200 と推定された(第23回)。

### その2 沈降平衡法

沈降平衡法を用いて水稲種子 Aldolase の分子量を測定した。沈降平衡分析の結果から得られる Fringe 変位量の対数と、回転半径の二乗との関係を第24図に示した。グラフが直線になることから、溶液は多分散系ではなく均一とみなすことができる。また、この直線の傾

よから分子量を次式により導いた。

$$M = 2 \left[ \frac{R \cdot T}{(1 - \nu) \omega^2} \right] \cdot 2.303 \cdot \left[ \frac{d \log(y_r - y_0)}{dr^2} \right]$$

M: 分子量 R: 気体常数 T: 絶対温度  $\nu$ : 偏比容

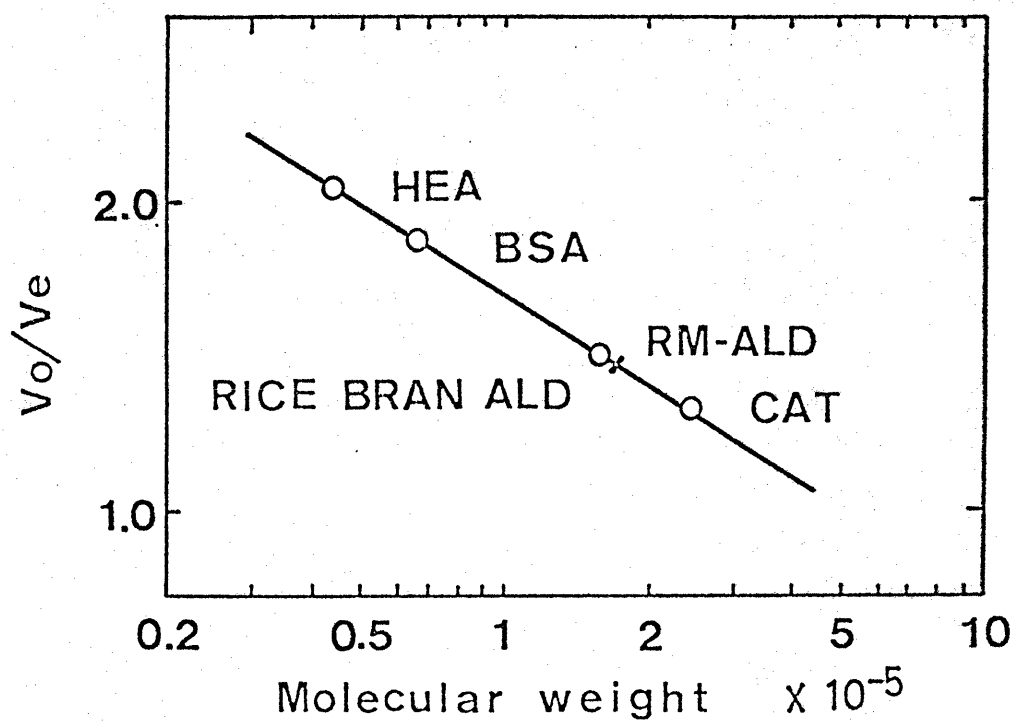
$\omega$ : 角速度  $y_r - y_0$ : フリンジの変位量 r: 回転半径

本実験の結果は

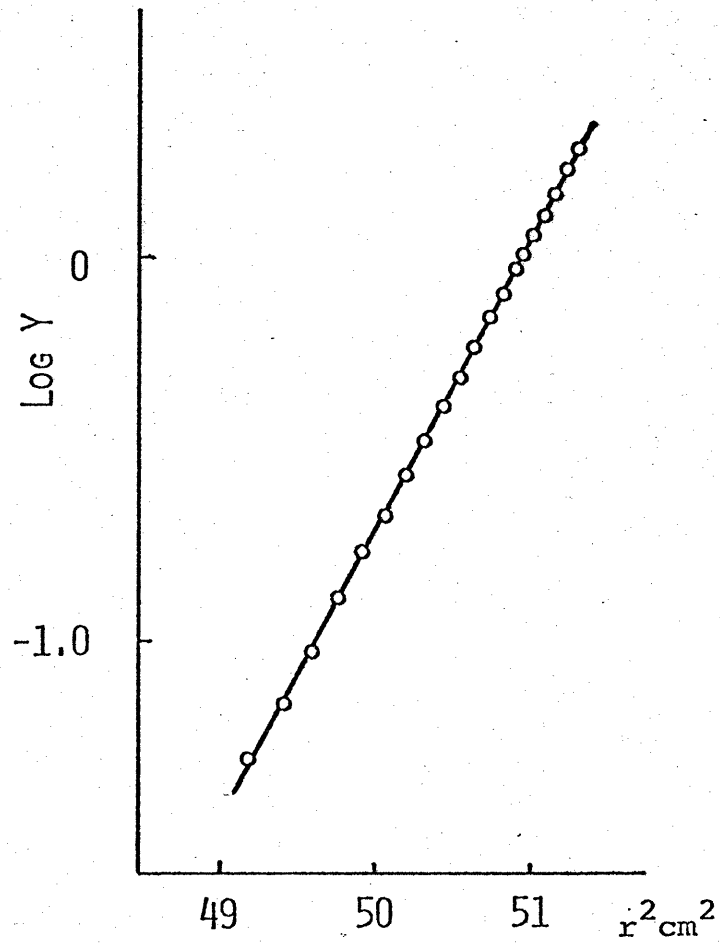
$$\frac{[2][8.313 \times 10^7][283.6][2.303][0.8052]}{[2.149 \times 10^6][1 - 0.74]} = 156488$$

$$\approx 156500$$

なお偏比容の値は、本編第2章、第8節で求めたアミノ酸分析値から、 $0.74 \text{ ml/g}$  である（第3表）。計算の結果から水稲種子 Aldolase の分子量は  $156,500$  である。



第23図. Sephadex G-200を用いたゲルろ過によるAldolaseの分子量測定.

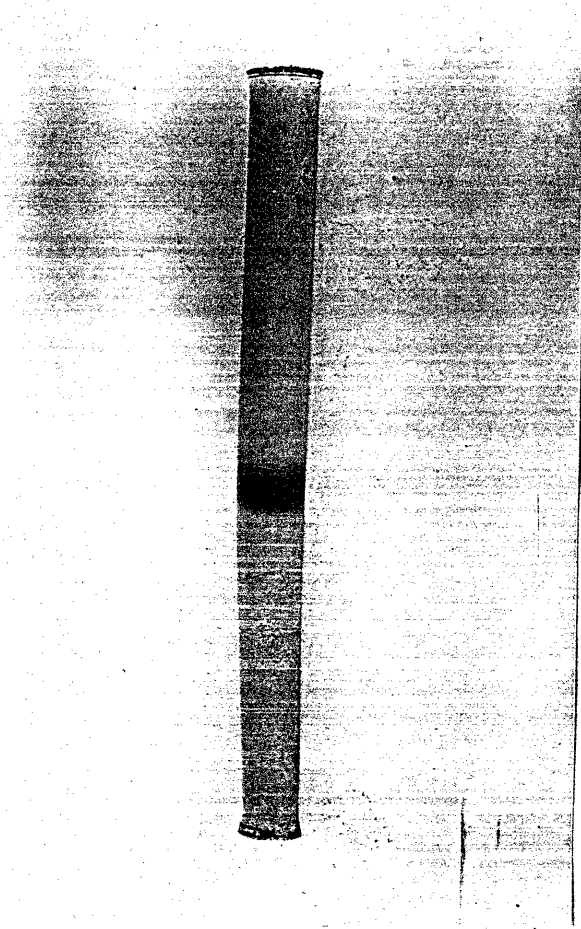


第 24 図. 沈降平衡法による Aldolase の  
分子量測定

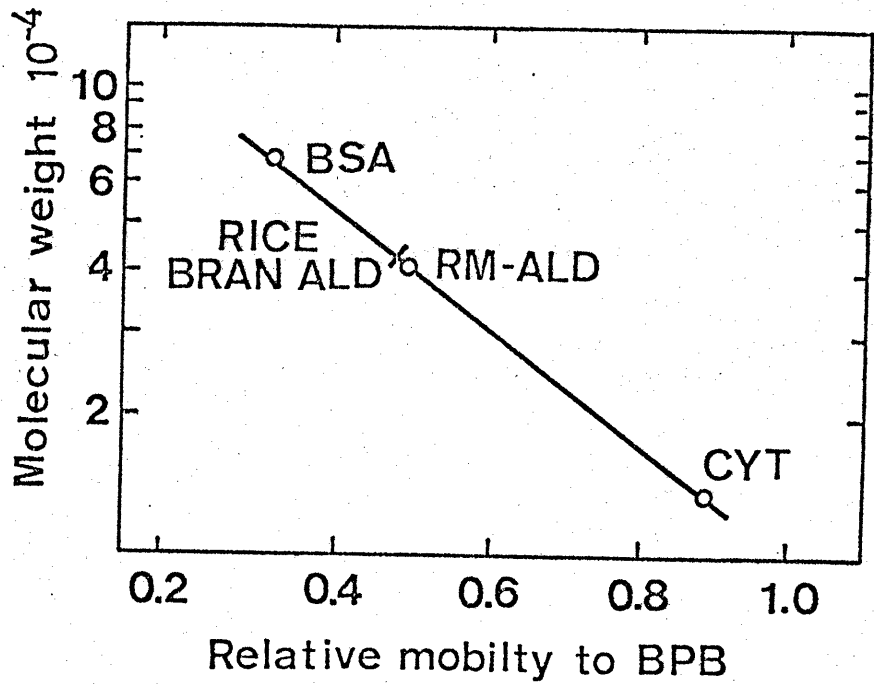
## 第6節 サブユニット構造

水稲種子 Aldolase のサブユニットの構造を SDS - ポリアクリルアミドゲル電気泳動を用いて調べた。SDS - ポリアクリルアミドゲル電気泳動の結果を第25図に示した。染色バンドは一本のみであった。また、標準蛋白質の分子量と移動度を基に作製した検量線を用い、本酵素の分子量を算出した(第26図)。SDS 電気泳動法で得られた分子量は約41,000 であり、この分子量は沈降平衡法から算出した分子量(156,500)あるいはゲル透過法により求めた分子量(161,000)の約4分の1強という値であった。この結果、水稲種子 Aldolase は、分子量が等しい4個のサブユニットから成るオリゴマー酵素であると結論づけられる。





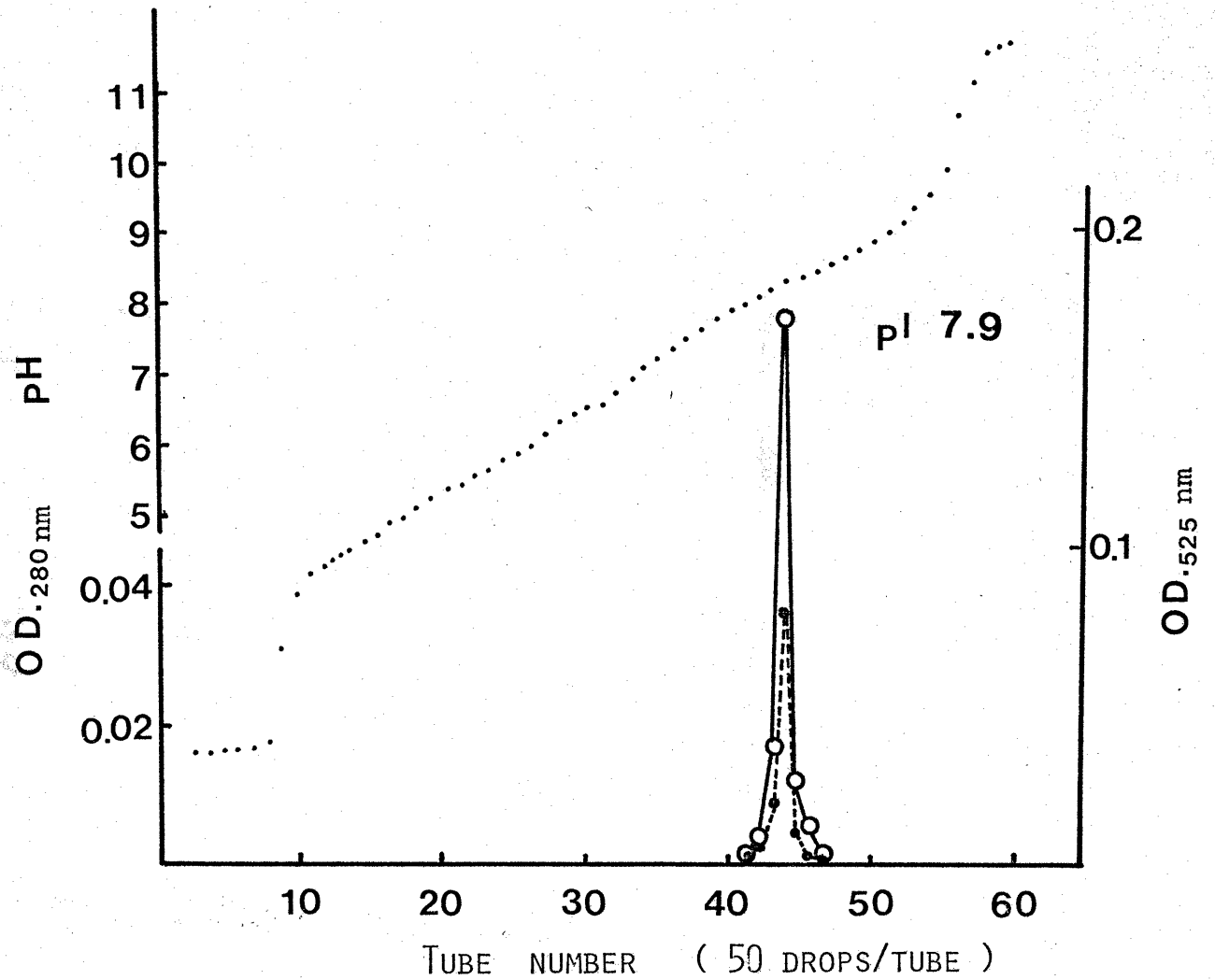
第25図. Aldolase の SDS-ポリアクリルアミド  
ディスク電気泳動図.



第26図. SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法による Aldolase の分子量測定法.

## 第7節 等電点

結晶水縮 Aldolase の等電点を Ampholine を用いて測定した。測定結果を第27図に示す。pH 7.9 前後の画分に活性があり、他の pH 画分には認められなかった。さらに蛋白質の溶出も活性画分であり、他の pH 画分には認められなかった。この結果、本酵素の等電点は pH 7.9 であることが判明した。pI 7.9 という値は、ポリアクリルアミドゲル電気泳動法における本酵素の低い移動度を裏づけるものである。



第27図 等電臭電気泳動法による Aldolaseの等電点の測定

- 525 nm の吸収による Aldolase 活性.
- 280 nm の吸収による蛋白質量.
- ..... pH.

## 第8節 アミノ酸分析

結晶水縮種子 Aldolase のアミノ酸分析を行った。一般のアミノ酸の残基数は、6 N 塩酸で20時間および72時間加水分解することにより分析した。また、Cys. の残基数は酵素を過ギ酸酸化し、Cysteinic acid として求めた。さらに、6 N グアニジン塩酸塩中の結晶酵素の288 nm における分子吸光係数は  $69621 \text{ cm}^2 \text{ M}^{-1}$  であった。この分子吸光係数の値と、Aldolase I 分子中の Cys. と Tyr. の数より Try. の残基数を算出した。アミノ酸分析の結果を第2表に示した。水縮種子 Aldolase には Glx., Gly., Ala., Leu., Thr. および Lys. 等のアミノ酸が比較的多かった。

## 第 2 表

## Aldolase 了 (三) 酸分析

Amino acid	Rabbit muscle	Rabbit liver	Rabbit brain	Human heart	Spinach leaf	Rice seed
Lys	95	105	77	100	66	124
His	39	35	29	32	9	24
Arg	57	60	69	58	48	54
Cys	28	31	22	32	12	35
Asp	106	136	131	140	88	100
Thr	74	91	68	88	56	102
Ser	67	73	80	92	64	94
Glu	148	171	166	192	140	182
Pro	69	56	84	80	58	51
Gly	108	120	127	128	102	140
Ala	154	160	177	148	130	154
Val	68	99	115	80	76	90
Met	11	23	12	12	20	9
Ile	68	77	84	60	47	67
Leu	127	136	135	136	107	150
Tyr	40	41	50	48	33	44
Phe	26	42	32	32	32	37
Try	6	14	14	16	25	10

Reference (182)

(89)

(89)

(191)

(14)

第3表. 水稻 Aldolase の 偏比容の測定

CALCULATION OF APPARENT SPECIFIC VOLUME OF  
RICE BRAN ALDOLASE FROM ITS AMINO ACID COMPOSITION

AMINO ACID RESIDUE	NUMBER OF RESIDUES/ MOLECULE	$W_i$ (% BY WEIGHT OF RESIDUE)	$V_i^*$ (SPECIFIC VOLUME OF RESIDUE)	$V_i W_i$ (% BY VOLUME OF RESIDUE)
ASPARTIC ACID	7.8	9.56	0.59	9.33
ASPARAGINE**	92.1	6.69	0.60	4.01
GLUTAMIC ACID	89.3	7.11	0.66	4.69
GLUTAMINE**	92.2	7.30	0.67	4.89
GLYCINE	140.2	5.70	0.64	3.65
ALANINE	153.6	7.41	0.74	5.48
VALINE	90.7	5.75	0.86	4.95
LEUCINE	149.9	10.64	0.90	9.58
ISOLEUCINE	66.5	4.72	0.90	4.25
SERINE	93.6	5.33	0.63	3.36
THREONINE	102.3	6.60	0.70	4.62
HALF CYSTINE	35.4	2.32	0.63	1.46
METHIONINE	8.9	0.72	0.75	0.54
PROLINE	51.0	3.18	0.76	2.42
PHENYLALANINE	37.2	3.33	0.77	2.56
TYROSINE	44.1	4.33	0.71	3.07
HISTIDINE	23.5	1.97	0.67	1.32
LYSINE	127.3	19.07	0.82	8.26
ARGININE	54.3	5.12	0.70	3.58
		$W_i=98.85$		$W_i V_i=73.02$

$$W_i V_i / W_i = 0.740 \text{ cc./g.}$$

\* Methods in Enzymology Vol.V p.70

\*\*It was assumed that the amide groups were approximately equally distributed between the glutamic and aspartic residues.

## 第9節 N末端アミノ酸

結晶水稲種子 Aldolase を DNP 化したのち酸加水分解して得られた DNP - アミノ酸を、ether, ethyl acetate および acetone を用いて抽出して DNP - アミノ酸の同定を行なった。

ether 抽出物の二次元クロマトグラフィーで3つの黄色スポットが認められた(第28図)。標準 DNP 化合物(和光純薬製、DNP アミノ酸標準品 A セット)を平行させてクロマトグラフィーを行なった結果、DNP - Glu.<sup>註1)</sup>、DNP - OH,<sup>註2)</sup> DNP - NH<sub>2</sub><sup>註3)</sup> であることを確認した。さらに、展開後のろ紙を塩酸蒸気にさらし、2ヶ所の黄色スポットが消えることから DNP - OH, DNP - NH<sub>2</sub> であることを確かめた。

註 1) DNP - Glu. ; 2,4-dinitro phenyl glutamic acid

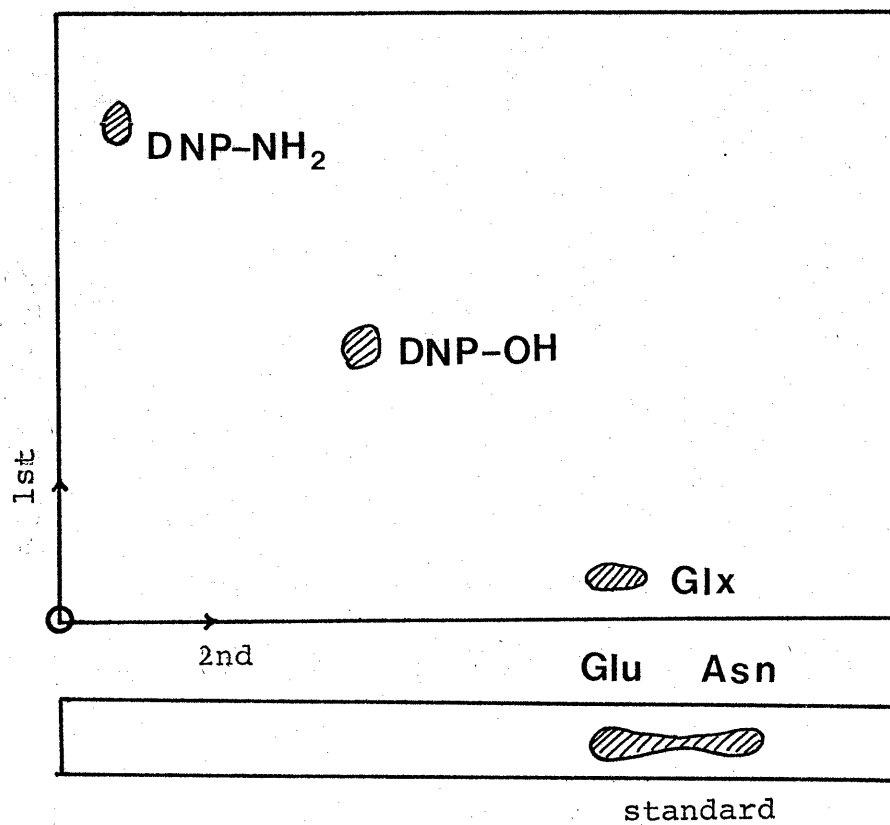
註 2) DNP - OH ; 2,4-dinitro phenol

註 3) DNP - NH<sub>2</sub> ; 2,4-dinitro aniline



一方、ethyl acetate 抽出液中にも acetone 抽出液中にも DNP-アミノ酸の存在は認められなかった。

以上の結果から、水稲種子 Aldolase の N 末端アミノ酸は Glx. であると推定した。



第28図. DNP法によるN末端アミノ酸分析.

1st. solvent ; toluene:pyridine:2-chloroethanol (30:9:8:)

2nd. solvent ; 1.5M phosphate buffer (pH 6.0)

## 第3章 考察

本章においては水稲種子 Aldolase の結晶標品について、種々物理化学的な値を決定した。分子量測定では、ゲルろ過法で 162000、沈降平衡法で 156500 と値に差が出た。ゲルろ過法では、分子の大きさの他に分子の形が問題となり、分子ふるいにおける蛋白質分子の挙動を考へる場合の尺度として、Stokes 半径の概念が妥当であるとされている<sup>(173)</sup>。この Stokes 半径と分子量との間には、通常一義的な対応はあるが、例外も存在する<sup>(163, 173)</sup>。一方、超遠心分析においては、正確な分子量が理論上求められるが、パラメーターの一つである偏比容の測定精度が問題となる。本法では、偏比容を求めろ方法として便宜上よく用いられる蛋白質を構成するアミノ酸組成より算出する方法によつた<sup>(174)</sup>。この計算値は、実測値と比較的よく一致するとされているが、誤差が出る場合もある。Cohn 等<sup>(175)</sup>は、数種の蛋白質について計算

値と実測値とを比較し、計算値が低く出たことを報告している。SDSポリアクリルアミドゲルスク電気泳動法によるサブユニットの分子量は、41,000であった。この結果とも考え合わせ、本酵素の分子量を16,000とした。今後、さらに正確な分子量を求めるために、同位体を用いて溶媒の密度を変えて偏比容を測定したり、固有振動数測定法を用いて偏比容を測定したりすることが必要と思われるが、一般には本研究で採用した方法で酵素の分子量を決めているので、本酵素の分子量は16,000とみなして支障はないものと思われる。

酵素の最適pHを求めたところ、Fru-1,6-P<sub>2</sub>ならびにFru-1-Pに対する最適pH曲線は互いに異なった。通常、単一の酵素が2種類以上の基質に対して活性を有する時、それぞれの最適pHを示す曲線はほぼ同様な曲線となり、最適pH曲線が基質により異なる場合には、別種の酵素が混在している可能性が強いと言

われている。しかし、動植物 Aldolase の多くは、水稻 Aldolase と同様な活性の pH 依存性が認められ、<sup>(89)</sup> また使用した水稻種子 Aldolase は、第 2 編で論じたように均一であり、Fru-1,6-P<sub>2</sub> と Fru-1-P に対する最適 pH 曲線の相違は本酵素特有の性質であると結論づけた。

第 1 節において水稻種子 Aldolase の基質特異性とその K<sub>m</sub> 値を求めた。水稻種子 Aldolase は Fru-1-P と Fru-1,6-P<sub>2</sub> を基質とし、それぞれ K<sub>m</sub> 値は  $3.3 \times 10^{-4} M$ ,  $7 \times 10^{-7} M$  であることを明らかにした。また、Fru-1,6-P<sub>2</sub> / Fru-1-P 活性比は約 1 であった。これらの値を他の動物および植物の Aldolase の値と比較した (第 4 表)。水稻種子 Aldolase は、他の植物 Aldolase とくらべ両基質に対する K<sub>m</sub> 値が低かった。また、Fru-1,6-P<sub>2</sub> / Fru-1-P 活性比は低く、他の植物 Aldolase よりも fructose 代謝に有利であると思われる。

酵素の化学的性質として、アミノ酸分析と N 末端アミノ酸分析を行った。アミノ酸分

析の結果、ある特定のアミノ酸が多いといった特徴はなかった。一方、N末端アミノ酸分析では Glx. であることは判明したが、高分子蛋白質に有利な DNP 法を用いたため、Glu.、Gln. のいずれであるかは判定できなかった。水稲種子 Aldolase と他の生物の Aldolase のアミノ酸分析値を第 2 表において、また N 末端アミノ酸を第 5 表においてそれぞれ比較した。

SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動により本酵素が一本のバンドを示したこと、さらに DNP 法による N 末端アミノ酸分析で N 末端アミノ酸が Glx. のみであったことから、水稲種子 Aldolase は 4 個のサブユニットから成り立ち、その 4 個のサブユニットは、互いに分子量のみならず構造面においても極めて類似しているものと思われる。

第4表 水稻種子およびその他のAldolaseの性質の比較

	Rice seed	Pea seed (66)	Spinach leaf (82)	Pea leaf (86)	Rabbit muscle (192)	liver (193)	brain (194)
Km							
Fru-1,6-P <sub>2</sub> ( uM )	0.7	120	20	20	3	1	3
Fru-1-P ( mM )	0.3	12	10	8	10	0.3	4
V							
Fru-1,6-P/ Fru-1-P	1	ND*	24	2.5	50	1	10
Specific activity	1.23	ND	12	9	30	4	12
Mw. of subunit	41,000	ND	28,000- 30,000	37,000	40,000	40,000	40,000
Partial specific volume	0.74	ND	0.735	ND	ND	ND	ND
Effect of CPase	-	/	+	/	+	-	/

ND ; not detect

## 第5表 N末端アミノ酸残基の比較.

		Ref.
PEA CYTOPLASMIC	H <sub>2</sub> N-gly-ser-tyr-ala-gly.....	(24)
PEA CHLOROPLAST	H <sub>2</sub> N-gly-ser-tyr-ala.....	(24)
EUGLENA	H <sub>2</sub> N-leu.....	(190)
SPINACH	H <sub>2</sub> N-gly.....	(14)
RABBIT C	H <sub>2</sub> N-pro-his-ser-tyr-pro-ala.....	(195)
RABBIT A	H <sub>2</sub> N-pro-his-ser-his-pro-ala.....	(160)
MICROCOCCUS	H <sub>2</sub> N-met.....	(55)
RICE SEED	H <sub>2</sub> N-glx.....	



## 第4編 水稻種子 Aldolase の反応機構・特に活性中心について<sup>(146)</sup>

酵素分子中の特定のアミノ酸残基が酵素反応に関与することは、Balls と Jansen<sup>(176)</sup> の chymotrypsin に対する dinitrofluorophosphate を用いた酵素反応阻害実験により明らかとなった。

以来、現在までに酵素反応機構を解明するひとつの手段として、多くの酵素について様々な化学修飾試薬が用いられている。<sup>(177,178)</sup> Aldolase においても、ウサギ筋肉の Aldolase を中心に研究が行われている。

Aldolase は、微生物界および動・植物界に広く存在する酵素である。しかしその反応機構は一様ではなく、主に動・植物に存在する Class I Aldolase と、主に微生物に存在する Class II Aldolase とでは、反応機構に大きな相違がある。<sup>(28)</sup> Class I Aldolase は、反応機構に金属が関与せず、従ってキレート剤の影響を受けない。活性中心には Lys. 残基が関与している

一方、Class II Aldolaseは金属酵素であり、金属イオンにより賦活化され、キレート剤により強く阻害される。

Class IのAldolaseが基質とSchiff塩基を形成することがGrazi等によつて1962年に報告された。Grazi以前にもAldolaseと基質とが複合体を形成することは知られていたが、複合体形成に關与するアミノ酸は同定できなかった。

(35, 36, 179-181)

Grazi等はSchiff塩基を $\text{NaBH}_4$ で還元すると酵素基質複合体は還元されて安定となり、その結果酵素活性が失われたことを報告した。<sup>(31)</sup> また基質と結合する官能基は、Lys. 残基の $\epsilon$ -アミノ基であると確認された。<sup>(32, 182)</sup> この事実により、Lys. 残基が活性部位のうちの触媒部位のアミノ酸であるという結論が導かれた。Grazi等の $\text{NaBH}_4$ によるSchiff塩基還元法は、その後多くのAldolaseに試みられ、Class Iの特徴とされた。

Aldolaseは、ウサギ筋肉について最も研究が進んでいる。ウサギ筋肉Aldolaseにおける活

性に関与するアミノ酸として、第1の Lys. の他に第2の Lys. がある。この Lys. 残基は pyridoxal phosphate と Schiff 塩基を形成する残基であり、この修飾に伴い Aldolase は失活する。この第2の Lys. の役割は、基質のリン酸基と結合して基質の酵素に対する親和性を高めるものと考えられている<sup>(183)</sup>。また His. は光化学反応で修飾され、これにより Aldolase は失活する。この His. の役割は、反応中のプロトン交換に関与するものと考えられている<sup>(184)</sup>。さらに Cys. 残基も活性に関与すると考えられている。この Cys. 残基は、電子供与体として機能していると思われる<sup>(185)</sup>。

Drechsler 等<sup>(25)</sup>は、Aldolase の C 末端アミノ酸残基を Carboxy peptidase A (CPase A) を用いて調べた。その結果、C 末端アミノ酸残基は Tyr. であることがわかった。さらに、CPase 処理による Aldolase 活性の変化を測定したところ、C 末端の Tyr. 残基の遊離に伴い、活性が減少することから、C 末端 Tyr. 残基が活性に

関与するものと考えた。その後の研究により、Aldolase を CPase A 処理することによる活性の減少は、他の動物の筋肉 Aldolase に共通した現象であることがわかった。

そこで本編では、最初に水稲種子 Aldolase が他の高等植物と同様に Class I Aldolase に分類されるのか否かを確かめるために、水稲種子 Aldolase 活性に対する金属およびキレート剤の影響を調べるとともに、本酵素が基質と Schiff 塩基を形成するか否かを  $\text{NaBH}_4$  を用いて調べた。さらに、他の反応機構に対する知見を得るために、CPase A を用いて C 末端アミノ酸残基の活性に対する役割を調べた。

## 第1章 実験方法

### 第1節 実験材料

第2編において精製、結晶化した水稲種子 Aldolase を本編の実験に使用した。使用に先立ち、結晶 Aldolase をそれぞれの実験に用いる緩衝液で充分透析し、硫酸を除いた。

### 第2節 Aldolase活性の測定

Aldolase活性の測定は、第1編、第1章、第2節 その1に述べた方法に準じて行なった。

### 第3節 金属イオンならびにキレート剤の 添加

Aldolase活性に対する金属イオンならびにキレート剤の影響を次のような方法により測定した。

金属イオンとして  $Zn$ ,  $K$ ,  $Li$ ,  $Na$ ,  $Ca$ ,  $Mn$ ,  $Mg$  の各硫酸塩を用いた。各金属イオンは、反応液中の濃度が  $10\text{ mM}$  となるように調整した。

まず最初に、結晶酵素を  $50\text{ mM Tris-HCl}$  緩衝液 ( $\text{pH } 7.4$ ) に対し3日間透析を行い、精製過程および結晶化操作で用いた緩衝液に含まれていた  $EDTA$  を除去した。この酵素溶液を用いて、各金属イオンを加えた酵素反応系における活性を測定した。コントロールとして、金属イオン溶液のかわりに脱塩水を用いた。また、キレート剤の効果を調べるために、反応系中に  $EDTA$  を  $50\text{ mM}$  となるよう添加し、さらに、上記の各種金属イオンを加え

に酵素反応液に、EDTAを50 mMとなるよう添加した場合の酵素活性を測定した。

#### 第4節 $\text{NaBH}_4$ 酵素-基質複合体の還元法

Aldolase と基質である dihydroxy acetone phosphate との複合体の還元法は、Fluri等<sup>(14)</sup>の方法に準じて行った。結晶酵素 0.04  $\mu\text{mole}$  を 50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4) 0.8 ml に溶解したのち、dihydroxy acetone phosphate 溶液 2.0 ml (3.6  $\mu\text{mole}$ ) を加え、25°C で 15 分間インキュベートした。この溶液を、氷冷しながら 2 N 酢酸で pH を 5.9 に調整した。ここへ 10  $\mu\text{l}$  の  $\text{NaBH}_4$  溶液 (2.6  $\mu\text{mole}$  用時調整) を徐々に添加した。 $\text{NaBH}_4$  の添加の間、2 N 酢酸を用いて pH 5.5 ~ 5.9 に保った。 $\text{NaBH}_4$  を添加し始めた時をスタートとし、時間ごとの酵素活性を測定した。対照として、 $\text{NaBH}_4$  を水に変えて同様な実験を行った。

## 第5節 Carboxypeptidase A による C 末端アミノ酸残基消化法および Carboxypeptidase 活性測定法

Carboxypeptidase A (CPase A) による C 末端アミノ酸残基の消化は次のようにして行なった。消化に用いた CPase A は Worthington 社製で、serine protease を失活させるために、phenyl methyl sulfonyl fluoride 処理してあるものを用いた。使用に先立ち、CPase A 結晶を水で洗淨後、冷却下で攪拌しながら 10% LiCl 水溶液を加え溶解させた。酵素溶液の濃度は、分子量 35,300 と  $A_{278}^{1\% \text{ cm}} = 19.4$  を用いて計算して求めた。

水稻種子 Aldolase 結晶は、0.2 M N-ethyl morpholine - 酢酸緩衝液 (pH 8.5) に溶解し、同一緩衝液に透析して用いた。CPase A 処理の反応系は、50 mM Tris - HCl 緩衝液 (pH 8.0) 2 ml 中、Aldolase 0.05  $\mu\text{mole}$ 、CPase A 1.40  $\mu\text{mole}$  とし 36°C で反応させた。反応液を適当な時間ごと



に採り、Aldolase活性を測定した。対照として、ウサギ筋肉Aldolaseを用いて同様な実験を行った。

CPase 測定法は Folk 等<sup>(186)</sup>の方法に従った。基質として carbobenzoxy-Gly-Phe (Z-Gly-Phe) を用いた。反応系として、3 ml 中に 25 mM / Tris-塩酸緩衝液 (pH 7.6), CoCl 6.6 mM, NaCl 100 mM, Z-Gly-Phe を含むものを用いた。活性測定は酵素反応を 37°C で行い、232 nm の吸光度の変化を求めた。

## 第2章 実験結果

### 第1節 金属およびキレート剤の影響

本実験においては水稲種子 Aldolase が、金属イオンにより賦活化され、キレート剤により強い阻害を受ける Class II Aldolase であるか否かを検討した。結果を第6表に示す。第6表の値は、Aldolase 活性測定の実験系に、金属イオンならびにキレート剤である EDTA を含まない場合の酵素活性を 100 とした時のそれぞれの相対活性である。実験系に金属を添加しても酵素活性は賦活化されず、Mn および Mg を除いてはむしろ金属イオンによる阻害効果が認められた。また、実験系に EDTA のみを添加した場合、酵素活性はあまり阻害されず、5% 程度の低下にとどまった。さらに、実験系に金属イオンとともに EDTA を添加した場合、金属イオンによる酵素活性の阻害効果は、軽減される傾向であった。以上の

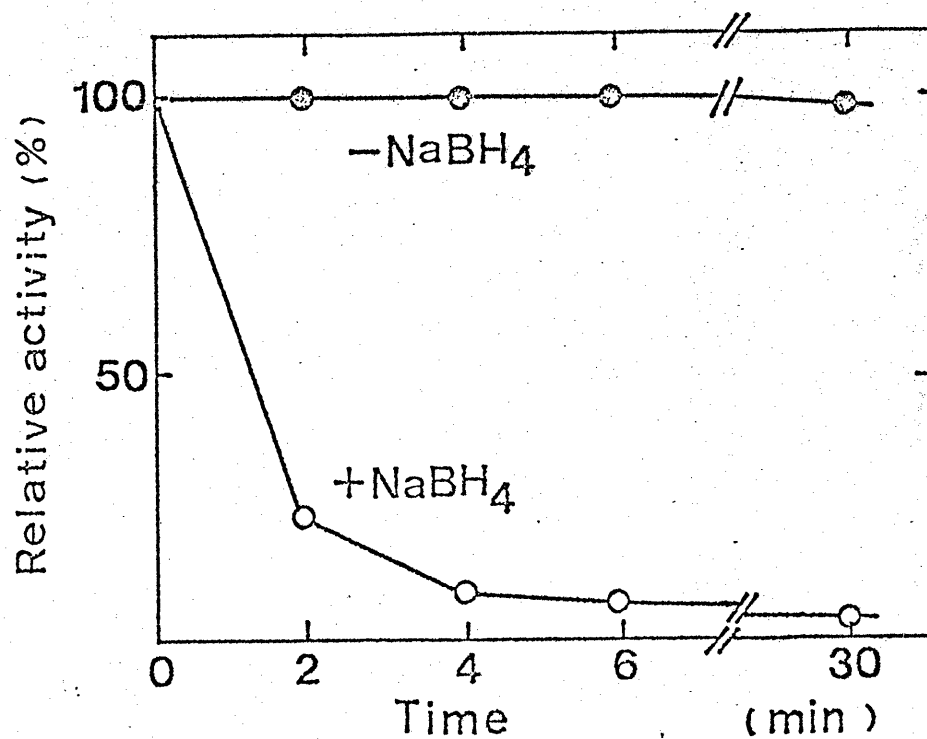
結果から、水稻種子 Aldolase は、Class II Aldolase  
ではないことが明らかとなった。

第 6 表 Aldolase 活性に対する  
金属およびキレート剤の影響.

金属	(-)	Zn	K	Li	Na	Ca	Mn	Mg
EDTA -	100	82	83	85	88	85	100	100
+	95	75	93	102	105	83	86	72

## 第2節 Schiff 塩基の形成

水稻種子 Aldolase は、前節で検討したように、Class II Aldolase の特徴である金属に対する感<sup>レ</sup>感性が認められた。そこで本実験においては、基質である dihydroxy acetone phosphate と、水稻種子 Aldolase とで酵素 - 基質複合体を形成させ、そこへ  $\text{NaBH}_4$  を添加することにより酵素活性がどのように変化するか調べた。結果を第29図に示す。  $\text{NaBH}_4$  添加後2分で活性の80%が失われた。これは、水稻種子 Aldolase の酵素 - 基質複合体が Schiff 塩基を形成し、  $\text{NaBH}_4$  により、この Schiff 塩基が還元されて失活したものと考えられ、水稻種子 Aldolase の活性中心は Lys であり、したがって、本酵素が Class I Aldolase であることを示すものである。



第29 図. 活性中心における Schiff塩基  
の形成

### 第3節 Aldolase 活性に対する C 末端部アミノ酸の影響

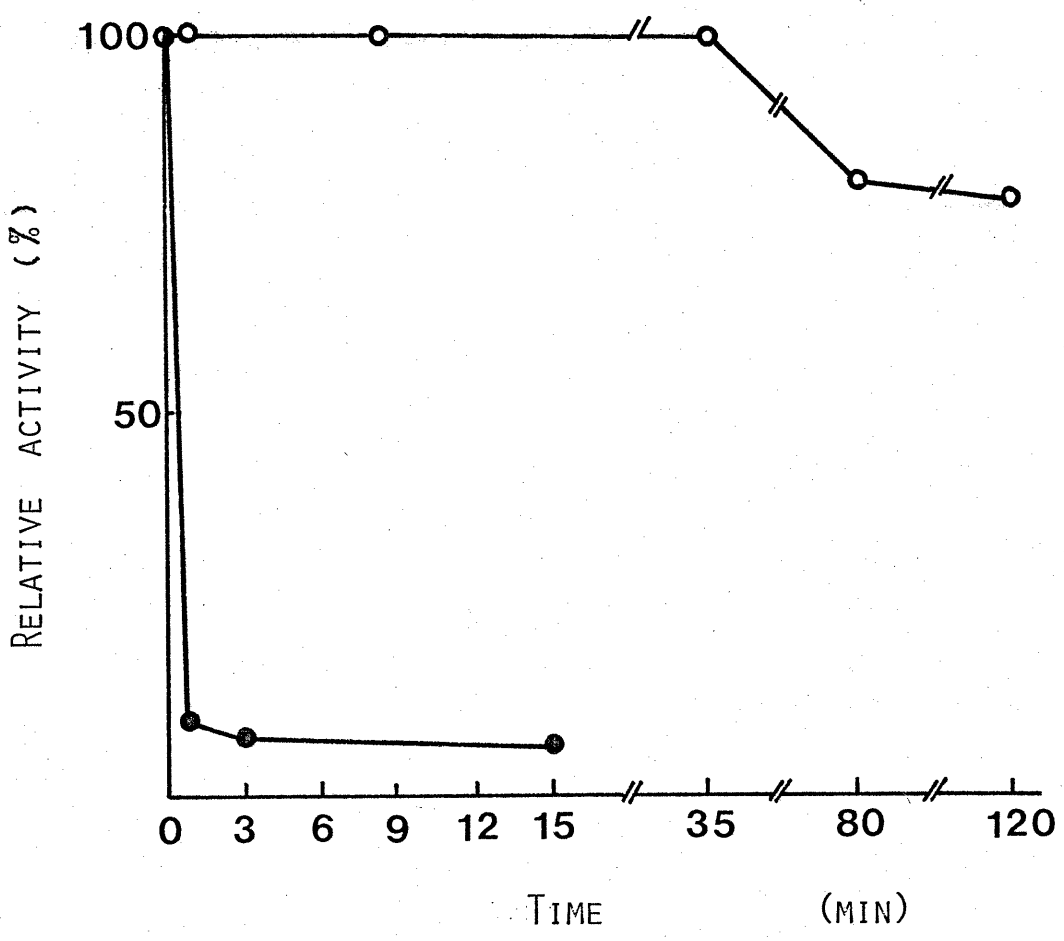
前節において水稲種子 Aldolase が Class I Aldolase であると推定できたので、本実験においては、他の Class I Aldolase において広く観察される現象である CPase 処理による Aldolase 活性の低下が本酵素においても認められるかを調べた。この結果を第30図に示す。水稲種子 Aldolase は、モル比にして約27倍の CPase A 処理を行なっても活性はさほど減少しなかった。一方、同一処理したウサギ筋肉 Aldolase の活性は急速に減少した。この結果は、水稲種子 Aldolase の C 末端部のアミノ酸が、活性に関与しないことを意味する。また、CPase A による分解反応を5分間行なった時点の遊離アミノ酸を分析した。遊離アミノ酸の分析は、反応系を 2 N HCl を用いて pH を 2.2 に下げ、沈殿した蛋白質を遠心分離によって除き、上澄を試料とした。通常の C 末端アミノ酸分析で

は、蛋白質と CPase A のモル比を  $1 : 0.03 \sim 0.005$  として行う。本実験の場合、その比を  $1 : 26.7$  としても Aldolase 活性の減少は認められなかった。アミノ酸分析の結果、Asp., Ser., Arg., Glu. 等のアミノ酸が遊離していることが示されており、CPase A の自己分解による遊離アミノ酸を考慮しても、C末端からのアミノ酸残基の消失は、水稻種子 Aldolase 活性に対して大きな影響を及ぼさないことを示すものと思われる。換言すれば、本酵素の活性部位は、C末端近傍にはないとすることができると。

しかしながら、水稻種子 Aldolase が CPase 処理を行っても活性に影響を受けないということとは、水稻種子中に存在するかもしれない CPase により、抽出精製過程中に Aldolase が限定分解を受けてしまったという可能性も考えられる。そこで、水稻の胚、ヌカ層の酵素抽出液中の CPase 活性を測定した。酵素の抽出は、 $50 \text{ mM Tris-塩酸緩衝液 (pH 7.4)}$  を用い、胚、



又か層を磨碎し、磨碎液をガーゼ4層でろ過した後、遠心分離（ $10,000 \times g$ , 20分）し、上澄を得た。この上澄を試料とし、CPase活性を測定した。実験の結果、CPase活性は認められなかった。



第30図. Carboxypeptidase A処理による  
活性中心の検索

- 水稻種子 Aldolase
- ウサギ筋肉 Aldolase

### 第3章 ~~本編~~の考察

第1節において、本酵素の活性が金属により賦活化されず、EDTAによる阻害を受けないことから Class II の可能性を否定した。ちなみに Bacteria や Fungi 等の Class II Aldolase は、5 mM の EDTA 存在下で活性が 95~100% 失われる。また  $K^+$  による賦活化は、Bacteria で 2~4 倍、Fungi にいたっては 20~30 倍である<sup>(28)</sup>。本酵素においては、 $K^+$  の存在で酵素活性はむしろ減少し、さらに EDTA を添加しても活性の減少はわずかである。また、第2節において、基質との間で Schiff 塩基を形成することから Class I Aldolase であることを確認した。

さらに、本酵素が Class I であることを裏づけるものとして、第3編、第2章、第1節で論じた Fru-1,6-P<sub>2</sub> / Fru-1-P の活性比の値がある。通常 Class II Aldolase は、ほとんど Fru-1-P を基質としない。その結果、Class II の

Fru-1,6-P / Fru-1-P 活性比は非常に大きな値となる。しかし、水稻種子 Aldolase の活性比は 1 であり、この値は、最大50までの Class I Aldolase の範疇に入るものである。

第3節において、動物筋肉、ホウレンソウその他の Aldolase とは異なり、水稻種子の Aldolase の活性部位は C 末端近傍に存在しないことを明らかにした。

動物の Aldolase において、筋肉 Aldolase は CPase A 処理による比活性の減少、ならびに Fru-1,6-P<sub>2</sub> / Fru-1-P 活性比の減少が認められるが、肝臓 Aldolase は CPase A 処理で活性に影響を受けない<sup>(187)</sup>。第4表にウサギ筋肉、肝臓、ホウレンソウの葉および水稻種子のそれぞれの Aldolase の性質をまとめた。水稻種子 Aldolase は、肝臓の Aldolase に、また、ホウレンソウの葉の Aldolase は筋肉 Aldolase に類似していることは、それぞれが存在している器官が生物に対して果たす役割と考え合わせると興味深いことである。

植物の種子発芽においては、proteaseが発芽に重要な役割を果たしている。そのproteaseの一種であるCPaseに関する報告も多数行われている。種子発芽に関して、Wells<sup>(188)</sup>がいんげん豆において、また、藪内等<sup>(189)</sup>が麦芽においてそれぞれCPaseの存在を報告している。ちなみに、ホウレンソウの葉から精製したAldolaseをCPase A処理すると、比活性が処理前の12より低下し、Tir. 遊離の程度により最低0.4となり、また、Fru-1,6-P<sub>2</sub> / Fru-1-P 活性比も減少し、24から最低0.4<sup>(14)</sup>となった。これらCPase A処理したホウレンソウAldolaseの値は、水稻種子Aldolaseの比活性1.24、Fru-1,6-P<sub>2</sub> / Fru-1-P 活性比1と近似した値である。しかしながら、水稻種子胚、又カ層においてはCPase活性は認められず、酵素精製の途中で水稻種子AldolaseのC末端部がCPaseにより切断されることはいないものと思われる。

## 本研究の結論および要約

本論文第1編、第2編、第3編および第4編の研究によつて、著者は次のようなことを明らかになし得た。

### (I) 水稻種子発芽期における Aldolase の挙動 (第1編)

(1) Aldolase は、発芽前の水稻種子中にも存在している。発芽に際し、Aldolase の活性は変化する。発芽後1日目に、酵素活性は最小となるが、その後増加し、3日目に活性は最大となり、4日目以降再び減少する。

(2) 発芽時における Aldolase の活性は、発芽温度によりあまり影響を受けない。

(3) Aldolase は発芽後3日目に活性が最大となるが、この活性増加は、gibberellin による酵素誘導によるものではない。

(4) Aldolase のマルチプルフォームを、ポリアクリルアミドゲル電気泳動を用いて

調べた。水稲種子胚・又カ層部に5~6種、胚乳部に1種、また、5日間発芽させた水稲幼植物の葉部に5種、根部に2種、Aldolaseのマルチプルフォームがそれぞれ存在した。

(5) 種子胚・又カ層部と幼植物葉部とでは、Aldolaseのマルチプルフォーム間の相対的活性の強さが異なっていた。この結果は、発芽時に主に働くAldolaseと、葉において光合成などの代謝に主に働くAldolaseとが、マルチプルフォーム的に異なるものであることを推測させる。

(II) 水稲種子胚・又カ層よりのAldolaseの精製および結晶化(第2編。)

(1) 水稲種子胚・又カ層より、硫酸分画(45~55%)、DEAE-celluloseカラムクロマトグラフィー、SephadexG-200カラムクロマトグラフィーおよびPhosphocelluloseカラムクロマトグラフィーを用いてAldolaseを分離

精製した。

(2) 精製酵素を硫酸溶液（終濃度 65%）に対して透析することにより、植物から初めて Aldolase の結晶化に成功した。

(3) 得られた Aldolase 結晶は、無色透明な針状結晶であった。その長さは平均 50  $\mu\text{m}$  であった。

(4) 水稻種子胚・ヌカ層から Aldolase を分離精製し、最終的に結晶を得た。この精製過程で、Aldolase の比活性は 473 倍となり、比活性は 1.23 unit/mg であった。

#### (Ⅲ) 結晶酵素の均一性（第 2 編、第 3 章）

(1) 本結晶酵素は、ポリアクリルアミドゲル電気泳動で一本のバンドを示し、ポリアクリルアミド電気泳動的に均一であることが明らかとなった。

(2) 本結晶酵素は、沈降平衡法による超遠心分析で、Fringe 変位量の対数と回転半径の二乗とが直線関係を示し、超遠心分析的に均



一であることが明らかとなった。

(3) DNP法により、結晶酵素のN末端アミノ酸残基は、Glxのみであった。この結果から、本結晶酵素は、分子構造的に均一であると推測できた。

(4) 等電点電気泳動法を用い、結晶酵素の等電点を測定した。結晶酵素の等電点はpI 7.9であり、この画分にはのみ蛋白質が検出された。この結果、本結晶酵素は、等電点電気泳動的に均一であることが明らかとなった。

#### (IV) 結晶水稻種子 Aldolase の性質 (第3編)

(1) 結晶酵素を用い、水稻種子 Aldolase の物理学的、速度論的および化学的性質を検討した。

(2) 本酵素の分子量を、Sephadex G-200を用いたゲルろ過法により求めた。標準蛋白質として、鶏卵 albumin, 牛血清 albumin, ウサギ筋肉 Aldolase, 牛肝臓 catalase を用いた

。ゲルろ過法による見かけの分子量は 162,000 と推定された。

(3) 本酵素の分子量を、超遠心分析沈降平衡法を用いて測定した。蛋白質濃度 0.05%、回転数 14,000 rpm、操作温度 10.4°C で分析を行い、 $d \log(r-r_0) / dr^2$  ( $r-r_0$ ; フリンジの変位量、 $r$ ; 回転半径) の値を 0.8054 と求めた。この値とアミノ酸分析値から求めた偏比容 0.74  $\text{mg/ml}$  から、本酵素の分子量を 156,500 と算出した。

(4) 本酵素のサブユニット構造を SDS ポリアクリルアミドディスク電気泳動法を用いて調べた。本酵素は、SDS ポリアクリルアミド電気泳動で、単一のバンドとなった。このバンドの分子量を、標準蛋白質 (牛血清 albumin、ウサギ筋肉 Aldolase、cytochrom c) の移動度と比較して、41,000 と推定した。この結果から、本酵素は、41,000 の等しい分子量のサブユニット 4 個から成り立つことが明らかとなった。

(5) Sephadex G-200 によるゲルろ過法、超遠心分析法および SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動法の結果から、本酵素の分子量を 160000 とした。

(6) 本酵素の最適 pH は、基質 fructose-1,6-bisphosphate に対して pH 7.0 ~ 8.0 と比較的広く、一方、fructose-1-phosphate に対しては、pH 7.4 と狭い最適 pH であった。また、本酵素は pH 6 ~ 8.5 において比較的安定であった。

(7) 本酵素の最適温度は、反応時間を 10 分とした時、約 50°C であった。また、熱安定性については、50°C で失活が始まり、75°C では、約 30% の残存活性があった。

(8) 本酵素の UV スペクトラムは、278 nm に極大ピークがあった。また、可視部には吸収がなかった。

(9) Ampholine を用いて、本酵素の等電点を測定した。4°C に冷却し、2 mA、200 V で 72 時間通電した。Ampholine 溶液 pH 7.9 付近に Aldolase 活性が認められた。また、蛋白質の 280

nmの吸収も同一 pH値にのみ観察された。この結果、本酵素の pI は、7.9 であることが明らかとなった。

(10) fructose および fructose リン酸エステルを用いて本酵素の基質特異性を調べた。本酵素は、fructose - 1 - phosphate および fructose - 1,6 - bisphosphate を基質としたが、fructose - 6 - phosphate および fructose は基質としなかった。

(11) fructose - 1,6 - bisphosphate および fructose - 1 - phosphate を基質とした時の解離定数を、Lineweaver - Burk プロットから求めた。fructose - 1,6 - bisphosphate に対する  $K_m$  値は、 $7 \times 10^{-7}$  M、また fructose - 1 - phosphate に対する  $K_m$  値は、 $3.3 \times 10^{-4}$  M であった。

(12) 本酵素のアミノ酸分析を、JEOL JLC-6AS を用いて行なった。蛋白質加水分解を24時間および72時間行い、それぞれをアミノ酸分析計で分析した。アミノ酸残基としては、Glx.、Gly.、Ala.、Leu.、Thr.、Lys. などが

た。た。

(13) 本酵素の N 末端アミノ酸を DNP 法で分析した。DNP 化されたアミノ酸は一種類しか認められず、それは DNP-Glx. であつた。ゆえに、本酵素の N 末端アミノ酸は、Glx. であることが明らかとなつた。

#### (V) 水稻種子 Aldolase の反応機構

(1) 本酵素は、金属により賦活化されず、また金属キレート剤により阻害されない。この結果から、本酵素は、Class II Aldolase でないことが明らかとなつた。

(2) 基質存在下において形成する酵素基質複合体を、水素化ホウ素ナトリウムを用いて還元したところ、酵素活性が失われた。これは、酵素の活性中心の Lys. 残基と基質の dihydroxy-acetone phosphate とが形成する Schiff 塩基を還元したためである。この結果から、水稻種子 Aldolase は、活性中心に Lys. が存在する、Class I Aldolase であることが明らかとなつた。

○

(3) 通常 Class I Aldolase を carboxypeptidase A (CPase) で分解すると、その C 末端アミノ酸が分解され、酵素の活性が失われるが、水稻種子 Aldolase においては、CPase 処理を行っても活性が失われなかった。この結果から、水稻種子 Aldolase は、他の Aldolase と異なり、その C 末端近傍には活性に関与するアミノ酸が存在しないことが明らかになった。

## 本研究の総括

本研究において、初めて植物から Aldolase を結晶として得ることができ、たち遅れていた植物 Aldolase の研究に、有効な酵素試料を提供し得たことは、重要な意義を有するものと考えられる。また、結晶酵素を用いてその性質及び反応機構の一部を明らかにし、今後の植物種子の発芽代謝、特に解糖系に対する研究の道を開いたことは、本研究の大きな特徴であると考えられる。

## 謝 辞

本稿を終るにあたり、終始懇切なる御指導御鞭撻を賜われ、大伊藤達郎教授、新井勇治助教授に感謝いたします。また実験および貴重な討議の機会を与えられた代謝化学研究室の諸氏に厚く感謝の意を表わします。さらに本研究の遂行にあたり、米糠を提供していただいた山種米穀株式会社、超遠心分析に際して種々の御便宜を与えられた明治製菓株式会社中央研究所山田雄次郎博士に深謝いたします。なお水稻種子 Aldolase の最初の研究者であり、本研究にあたり、終始御懇得なる御助言をいただきました新潟大学名誉教授、郡山女子大学教授倉沢文夫先生に厚く感謝の意を表します。



## References

(175)

- (1) Meyerhof, O. and K. Lohmann  
Biochem. Zeit. 271, 89 (1934)
- (2) Fischer, E. and J. Tafel  
Berichte (Berlin) 20, 1088, 2566, 3384 (1934)
- (3) Fischer, H.O.L. and E. Baer  
Helv. Chim. Acta 19, 519 (1936)
- (4) Meyerhof, O. and K. Lohmann  
Naturwiss. 22, 220 (1934)
- (5) Meyerhof, O. and W. Keissling  
Biochem. Zeit. 279, 40 (1935)
- (6) Meyerhof, O., K. Lohmann and P. Schuster  
Biochem. Zeit. 286, 301, 319 (1936)
- (7) Meyerhof, O.  
Bull. Soc. Chem. Biol. 20, 1033, 1345 (1938)
- (8) Meyerhof, O.  
in "The Enzymes", Vol. II, p.162 (1951)
- (9) Tewfik, S. and P.K. Stumpf  
Amer. J. Botany. 36, 567 (1949)
- (10) Fewson, C.A., M. Al Hafidh and M. Gibbos  
Plant Physiol. 37, 402 (1962)
- (11) Horecker, B.L.  
J. Cell Comp. Physiol. 54, Suppl I, p.89 (1959)
- (12) Rutter, W.J.  
in "The Enzymes", 2nd Ed. Vol.5, p.361 (1961)
- (13) Rose, I.A. and E.L. O'Connell  
J. Biol. Chem. 244, 126 (1969)
- (14) Fluri, R., T. Ramasarma and B.L. Horecker  
Eur. J. Biochem. 1, 117 (1967)
- (15) Rutter W.J. and J.R. Hunsley  
in "Methods in Enzymology" 9 p.480 (1966)
- (16) Harris, C.E., R.D. Kobes, D.C. Teller and W.J. Rutter  
Biochemistry 8, 2442 (1969)
- (17) Kowal, J., T. Cremona and B.L. Horecker  
Arch. Biochem. Biophys., 114, 13 (1966)
- (18) Louthardt, O., E. Testa and H.P. Wolf  
Helv. Chim. Acta 36, 227 (1953)
- (19) Hers, H.G. and T. Kusaka  
Biochem. Biophys. Acta 11, 427 (1953)

- (20) Penansky, R.J. and H.A. Lardy  
J. Biol. Chem. 233, 365, 371 (1958)
- (21) Blostein, R. and W.J. Rutter  
J. Biol. Chem. 238, 3280 (1963)
- (22) Penhoet, E. T. Rajkumar and W.J. Rutter  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 56, 1275 (1966)
- (23) Leuthard, F. and H.P. Wolf  
Helv. Chim. Acta 37, 1734 (1954)
- (24) Anderson, L.E., R.L. Henrikson and C. Noyes  
Arch. Biochem. Biophys. 169, 262 (1975)
- (25) Drechsler, E.R., P.D. Boyer and A.G. Kowalsky  
J. Biol. Chem. 234, 2627 (1959)
- (26) Spolter, P.D., R.C. Adelman and S. Winhouse  
J. Biol. Chem. 240, 1327 (1965)
- (27) Warburg, O. and W. Christian  
Biochem. Zeit. 314, 149 (1943)
- (28) Rutter, W.J.  
Federation Proc. 23, 1248 (1964)
- (29) Grazi, E., P.T. Rowley, T. Cheng, O. Tchola  
and B.L. Horecker  
Biochem. Biophys. Res. Commun. 1, 38 (1962)
- (30) Morse, D.E. and B.L. Horecker  
Advances in Enzymology 31, 125 (1968)
- (31) Grazi, E., T. Cheng and B.L. Horecker  
Biochem. Biophys. Res. Commun. 1, 250 (1962)
- (32) Horecker, B.L., P.T. Rowley, E. Grazi, T. Theng  
and O. Tchola  
Biochem. Zeit. 338, 36 (1963)
- (33) Speck, W.C. Jr., P.T. Rowley and B.L. Horecker  
J. Amer. Chem. Soc. 85, 1012 (1963)
- (34) Rose, I.A. and E.L. O'Connell  
J. Biol. Chem. 244, 126 (1969)
- (35) Rutter, W.J. and K.H. Ling  
Biochim. Biophys. Acta 30, 71 (1958)
- (36) Bloom, B. and Y.J. Tapper  
Science 124, 982 (1956)
- (37) Christen, P. and J.F. Riordan  
Federation Proc. 27, 291 (1968)

- (38) Christen, P. and J.F. Riordan  
Biochemistry 1, 1531 (1968)
- (39) Riordan, J.F. and P. Christen  
Biochemistry 8, 238 (1969)
- (40) Grazi, E.  
Biochem. Biophys. Res. Commun. 56, 106 (1974)
- (41) Cash, D.J. and I.B. Wilson  
J. Biol. Chem. 241, 4290 (1966)
- (42) Brand, K. and B.L. Horecker  
Arch. Biochem. Biophys. 123, 312 (1968)
- (43) Horecker, B.L., S. Pontremoli., C. Ricci and T. Cheng  
Proc. Natl. Acad. Sci. 47, 1949 (1961)
- (44) Pugh, E.L. and B.L. Horecker  
Biochem. Biophys. Res. Commun. 26, 360 (1967)
- (45) Pugh, E.L. and B.L. Horecker  
Arch. Biochem. Biophys. 122, 196 (1967)
- (46) Hoffee, P.A., C.Y. Lai, E.L. Pugh and B.L. Horecker  
Proc. Natl. Acad. Sci. 57, 107 (1967)
- (47) Brand, K., O. Tsolas and B.L. Horecker  
Arch. Biochem. Biophys. 130, 521 (1969)
- (48) Warburg, O. and W. Christian  
Biochem. Zeit. 314, 399 (1943)
- (49) Kobes, R.D., R.T. Simpson, B. Vallee and W.J. Rutter  
Biochemistry 8, 585 (1969)
- (50) Richards, O.C. and W.J. Rutter  
J. Biol. Chem. 236, 3185 (1961)
- (51) Caprioli, R. and D. Rittenberg  
Biochemistry 8, 3375 (1969)
- (52) Model, P., L. Ponticorvo and D. Rittenberg  
Biochemistry 1, 1309 (1968)
- (53) Mildvan, A.S., R.D. Kobes and W.J. Rutter  
Biochemistry 10, 1191 (1971)
- (54) Whittaker, R.H.  
Science 163, 150 (1969)
- (55) Lebherz, H.G., R.A. Bradshaw and W.J. Rutter  
J. Biol. Chem. 248, 1660 (1973)
- (56) Lebherz, H.G. and W.J. Rutter  
J. Biol. Chem. 248, 1650 (1973)

- (57) Bai, N.J., M.R.Pai, P.S.Murthy and T.A.Venkitasubramanian  
Arch. Biochem. Biophys. 168, 230 (1975)
- (58) Bai, N.J., M.R.Pai, P.S.Murthy and T.A.Venkitasubramanian  
Arch. Biochem. Biophys. 168, 235 (1975)
- (59) Kussel, G.K. and M.Gibbs  
Biochem. Biophys. Acta 132, 145 (1967)
- (60) Guerrini, A.M., T.Crmona and E.C.Preddie  
Arch. Biochem. Viophys. 146, 249 (1971)
- (61) Mo, Y., B.G.Harris and R.W.Gracy  
Arch. Biochem. Biophys. 157, 580 (1973)
- (62) Stribling, D. and R.W.Perham  
Biochem. J. 131, 833 (1973)
- (63) Heron, E.J. and R.M.Caprloli  
Biochem. Biophys. Acta 405, 563 (1975)
- (64) Brooks, K. and R.S.Criddle  
Arch. Biochem. Biophys. 117, 650 (1966)
- (65) Hatz, C. and F.Leuthardt  
Hoppe-Seyler Zeit. Physiol. Chem. 348, 354 (1967)
- (66) Hatz, C. and F.Leuthardt  
Biochim. Biophys. Acta 139, 460 (1967)
- (67) Russell, G.K. and M.Gibbs  
Biochim. Biophys. Acta 132, 145 (1967)
- (68) Baba, T.  
Biochem. Zeit. 275, 248 (1943)
- (69) Stumpf, P.K.  
J. Biol. Chem. 176, 233 (1948)
- (70) Sanwal, G.G. and P.S.Krishnan  
Enzymologia 23, 249 (1961)
- (71) Sanwal, G.G. and P.S.Krishnan  
J. Sci. & Ind. Res. 18c, 183 (1959)
- (72) Sanwal, G.G. and P.S.Krishnan  
Enzymologia 21, 177 (1959)
- (73) Quinlan-Watson, T.A.F.  
Nature 67, 1033 (1951)
- (74) Quinlan-Watson, T.A.F.  
Biochem. J. 53, 457 (1953)
- (75) Clark, R.B. and K.I.Pearce  
Plant. Physiol. 40, XXXviii (1965)

- (76) Clark, R.B.  
Crop. Sci. 6, 593 (1966)
- (77) Kobashi, K., C.Y. Lai and B.L. Horecker  
Arch. Biochem. Biophys. 117, 437 (1966)
- (78) Horecker, B.L. and P.Z. Smyniotis  
J. Biol. Chem. 212, 811 (1955)
- (79) Willard, J.M., M.D. Schulman and M. Gibbs  
Nature 206, 195 (1965)
- (80) Willard, J.M. and M. Gibbs  
Plant Physiol. 43, 793 (1968)
- (81) Sia, C.L. and B.L. Horecker  
Biochem. Biophys. Res. Commun. 31, 731 (1968)
- (82) Rapoport, G.L., L. Davis and Horecker  
Arch. Biochem. Biophys. 132, 286 (1969)
- (83) Davis, L.C., L.W. Graci, G. Ribereau-gayon  
and B.L. Horecker  
Arch. Biochem. Biophys. 140, 215 (1970)
- (84) Ribereau-gayon, G., T. Ramasarma and B.L. Horecker  
Arch. Biochem. Biophys. 147, 343 (1971)
- (85) Lai, C.Y., P.A. Hoffee and B.L. Horecker  
Methods in Enzymology 11, 667 (1967)
- (86) Anderson, L.E. and I. Pacold  
Plant Physiol. 49, 393 (1972)
- (87) Anderson, L.E., R.L. Henrikson and C. Noyes  
Arch. Biochem. Biophys. 169, 262 (1975)
- (88) Leberer, H.G. and W.J. Rutter  
Biochemistry 8, 109 (1969)
- (89) Penhoet, E.E., M. Kochman and W.J. Rutter  
Biochemistry 8, 4391 (1969)
- (90) Johnson, L.W. and S.F. Velick  
J. Biol. Chem. 247, 4138 (1972)
- (91) Orevi, M., E. Gorin and E. Shafrir  
Eur. J. Biochem. 30, 418 (1972)
- (92) Gershon, H. and D. Gershon  
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 70, (1973)
- (93) Kawachi, T., N. Tanaka, K. Kogre and T. Sugiura  
Biochim. Biophys. Acta. 320, 59 (1973)
- (94) Zeelon, P., H. Gershon and D. Gershon  
Biochemistry 12, 1743 (1973)

- (95) MacDonnell, P.C. and O. Greengard  
Arch. Biochem. Biophys. 163, 644 (1974)
- (96) Mennecies, F. and J.-C. Dheyfus  
Biochim. Biophys. Acta. 364, 320 (1974)
- (97) Anderson, P.J.  
Biochem. J. 140, 341 (1974)
- (98) Mainwaring, W.I.P., F.R. Mangan, R.A. Irving and D.A. Jones  
Biochem. J. 144, 413 (1974)
- (99) Koster, J.F., R.G. Slee and J. Fernandes  
Biochem. Biophys. Res. Commun. 64, 289 (1975)
- (100) Lebherz, H.G.  
J. Biol. Chem. 250, 5967 (1975)
- (101) Lebherz, H.G.  
J. Biol. Chem. 250, 5976 (1975)
- (102) Takeo, K.  
Phytochemistry, 8, 2127 (1969)
- (103) Ishikawa, H., K. Ishikawa and S. Usami  
Plant & Cell Physiol. 17, 196 (1976)
- (104) Humphrey, T.J., S. Sarawek and D.D. Davies  
Planta, 135, 256 (1977)
- (105) Sarawek, S. and D.D. Davies  
Planta, 135, 265 (1977)
- (106) Sarawek, S. and D.D. Davies  
Planta, 135, 271 (1977)
- (107) Hartman, F.C. and J.P. Brown  
J. Biol. Chem. 251, 3057 (1976)
- (108) 倉沢新一, 新井勇治, 倉沢文天, 伊藤連郎  
日農化誌 (投稿中)
- (109) 井上重陽  
日作紀 7, (1935)
- (110) 岡彦一, 蔡國海  
育雜 5, 90 (1955)
- (111) 藤伊正, 石川茂雄, 中川篤  
植雜 73, 404 (1960)
- (112) Barton, L.V.  
Plant. Physiol. 32, suppl. (1957)
- (113) Ogawara, K. and K. Ono  
Bull. Sch. Educ. Okayama Univ. 1, (1955)

- (114) Ogawara, K. and K. Ono  
Japanese Gibberelline Research Association  
First Symposium on Gibberellin Research in Japan (1957)
- (115) Clagett, C.O.  
Plant physiol. 33, (1958)
- (116) 市原 淳吉  
農及園 33, 1551 (1985)
- (117) Mittal, S.P. and N. Mathur  
Pysiologia Plantarum 18, 798 (1965)
- (118) Filner, P. and J.E. Varner  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 58, 1520 (1967)
- (119) Jacobsen, J.V. and J.E. Varner  
Plant Physiol 42, 1596 (1967)
- (120) Yomo, H. and J.E. Varner  
Curr. Top. Dev. Biol. 6, 111 (1971)
- (121) Bennett, P.A. and M.J. Chrispeels  
Plant Physiol. 49, 445 (1972)
- (122) Ashford, A.E. and J.V. Jacobsen  
Planta 120, 81 (1974)
- (123) Lai, C.Y. and T. Oshima  
Arch. Biochem. Biophys. 144, 363 (1971)
- (124) Ting, S.M., C.Y. Lai and B.L. Horecker  
Arch. Biochem. Biophys. 144, 476 (1971)
- (125) Ting, S.M., C.L. Sia, C.Y. Lai and B.L. Horecker  
Arch. Biochem. Biophys. 144, 485 (1971)
- (126) Racker, E.  
J. Biol. chem. 167, 847 (1974)
- (127) Horecker, B.L. and A. Kornberg  
J. Biol. Chem. 175, 385 (1948)
- (128) Sibley, J.A. and A.L. Lehninger  
J. Biol. Chem. 177, 859 (1949)
- (129) Allen, R.J.L.  
Biochem. J. 34, 858 (1940)
- (130) 田宮 信雄 訳  
"酵素名. 酵素反応記号一覽" 共立出版
- (131) Lowry, O.H., N.J. Rowe brough, A.L. Farr and R.J. Randall  
J. Biol. Chem. 193, 265 (1951)
- (132) Vanes, W.L. and J.H. Wisse  
Anal. Chem. 61, 135 (1963)

- (133) Warburg, O. and W. Christian  
Biochem. Z., 310, 384 (1941)
- (134) Ornstein, L.  
Ann. New York Acad. Sci. 121, 321 (1964)
- (135) Davis, B. J.  
Ann. New York Acad. Sci. 121, 404 (1964)
- (136) Williams, D. E. and R. A. Reisfeld  
Ann. New York Acad. Sci. 121, 373 (1964)
- (137) Gabriel, O.  
"Method in Enzymology" Vol. XXII p. 578
- (138) Takeo, K.  
Comp. Biochem. Physiol. 32, 543 (1970)
- (139) Susor, W. A., E. Penhoet and W. J. Rutter  
"Method in Enzymology" Vol. XLI p. 66
- (140) 高橋 信孝  
化学増刊 "生物の制御機構" p. 3
- (141) Peanasky, R. J. and H. A. Lardy  
J. Biol. Chem. 233, 365 (1958)
- (142) Swanson, A. D. and P. D. Boyer  
J. Am. Chem. Sol. 79, 2174 (1957)
- (143) Jagannathan, Singh and Damodaran  
Biochem. J. 63, 94 (1956)
- (144) Richards, O. C. and W. J. Rutter  
J. Biol. Chem. 236, 3177 (1961)
- (145) Green, J. R.  
Proc. Roy. Soc. 48, (1890)
- (146) Kurasawa, S., Y. Arai, H. Kurasawa and T. Ito  
J. Biochem. (投稿中)
- (147) Taylor, J. F., A. A. Green and G. T. Cori  
J. Biol. Chem. 173, 59 (1948)
- (148) Pogell, B. M.  
Biochem. Biophys. Res. Commun. ±, 225 (1962)
- (149) Sarngadharan, A., B. Watanabe and B. M. Pogell  
J. Biol. Chem. 245, 1926 (1969)
- (150) Eley, J.  
Biochem. 8, 1502 (1969)
- (151) Carminatti, H., E. Rozengurt and L. Jimenez  
Fed. Eur. Biol. Soci. Lett. 4, 307 (1969)



- (152) Rattazzi, M.C.  
Biochem. Biophys. Acta 181, 1 (1969)
- (153) Gracy, R.A., A.G. Lacko and B.L. Horecker  
J. Biol. Chem. 244, 3913 (1969)
- (154) Guha, A., C.Y. Lai and B.L. Horecker  
Arch. Biochem. Biophys. 147, 692 (1971)
- (155) Alarcon, O., F. Gonzalez, H. Flores and F. Marcus  
Biochem. Biophys. Acta 227, 460 (1971)
- (156) Lai, C.Y. and C. Chen  
Arch. Biochem. Biophys. 144, 467 (1971)
- (157) Kochman, M. and D. Kwianoska  
Arch. Biochem. Biophys. 152, 856 (1972)
- (158) Taylor, J.F. and C. Lowry  
Biochem. Biophys. Acta 29, 109 (1956)
- (159) Stellwagen, E., and H.K. Schachman  
Biochemistry 1, 1056 (1962)
- (160) Lai, C.Y., N. Nakai and D. Chang  
Science 183, 1204 (1974)
- (161) Lai, C.Y.  
Arch. Biochem. Biophys. 166, 358 (1975)
- (162) Deal, W.X., W.J. Rutter and K.E. Van Holde  
Biochemistry 2, 246 (1963)
- (163) Andrews, P.  
Biochem. J. 96, 595 (1965)
- (164) Yphantis, D.A.  
Biochemistry 3, 297 (1964)
- (165) Weber, K. and M. Osborn  
J. Biol. Chem. 244, 4406 (1969)
- (166) 林 健志, 大場 義樹  
蛋白質. 核酸. 酵素 17, 304 (1972)
- (167) Svensson, H.  
Acta Chem. Scand. 15, 325 (1961)  
      ibid 16, 456 (1962)  
      20, 820 (1966)
- (168) Moore, S. and W.H. Stein  
"Methods in Enzymology" Vol. 6 p. 819 (1963)
- (169) Eveleigh, J.W. and G.D. Winter  
"Protein Sequence Determination" Berline p. 91 (1970)

- (170) Mppre,S/  
J. Biol. Chem. 238, 235 (1963)
- (171) Edlelhoch  
Biochemistry 1, 1948 (1967)
- (172) Sanger,F.  
Biochem. J. 39, 507 (1945)
- (173) Siegel,L.M. and K.J.Monty  
Biochem. Biophys. Adta 112, 346 (1966)
- (174) Schachman,H.K.  
"Methods in Enzymology" Vol.1 p.70
- (175) Cohn,E.J. and J.T.Edsall  
"Proteins Amino acids and Peptides" Reinhold (1943)
- (176) Jonsen,E.F., M.D.F.Nutting, R.Jang and A.K.Balls  
J. Biol. Chem. 179, 189 (1949)
- (177) 六鹿 宗治, 大西 正健, 広海 啓太郎  
蛋白質.核酸.酵素 10, 1127 (1970)
- (178) 石井 信一, 谷沢 和隆, 笠井 献一, 金岡 祐一, 横沢 英良  
"生化学実験講座1「タンパク質の化学」" 東京化学同人 p.121 (1977)
- (179) Rose,I.A. and S.V.Rieder  
J.Am. Chem. Soc. 77, 5764 (1955)
- (180) Topper,Y.J., A.H.Mehler and B.Bloom  
Science 126, 1287 (1957)
- (181) Rose,I.A. and S.V.Rieder  
J. Biol. Chem. 231, 315 (1958)
- (182) Lai,C.Y., O.Tchola, T.Cheng and B.L.Horecker  
J. Biol. Chem. 240, 1347 (1965)
- (183) Anai,M. C.Y.Lai and B.L.Horecker  
Arch. Biochem. Biophys. 156, 712 (1972)
- (184) Hartman,C. and M.G.Welch  
Biochem. Biophys. Res. Commun. 57, 85 (1974)
- (185) Kobashi,K. and B.L.Horecker  
Arch. Biochem. Biophys. 121, 178 (1967)
- (186) Folk,J.E. and J.A.Gladner  
J. Biol. Chem. 235, 60 (1960)
- (187) Rutter,W.J., O.C.Richards and B.M.Woodfin  
J. Biol. Chem. 236, 3193 (1961)

- (188) Wells, J.R.E.  
Biochem. Biophys. Acta 167, 388 (1968)
- (189) 藪内精三, 土井悦四郎, 秦忠夫  
日農化誌 46, 591 (1972)
- (190) Cremona, T.  
G. Boy. Ital. 102, 253 (1968)
- (191) Allen, B., R. Gracy and H. Harris  
Arch. Biochem. Biophys. 155, 325 (1973)
- (192) Kawahara, K. and C. Taanford  
Biochemistry 5, 1578 (1966)
- (193) Gracy, R.W., A.G. Lacko, L.W. Adelman and B.L. Horecker  
Arch. Biochem. Biophys. 136, 480 (1970)
- (194) Lee, Y. and B.L. Horecker  
Arch. Biochem. Biophys. 162, 401 (1974)
- (195) Penhoet, E.E., M. Kochman and W.J. Rutter  
Biochemistry 8, 4396 (1969)

(12) (19)

Effect of pH on Stability ~~of Aldolase~~  
of Aldolase

(12) (20)

Effect of Temperature <sup>on</sup> Activity of  
Aldolase

(12) (21)

Effect of Temperature on Stability  
of ~~Activity~~  
Aldolase

(12) (27)

Ampholine Electrofocusing of  
Aldolase

表 2