

カンショ (*Ipomoea batatas* Lam.) におけるピロリン酸依存ホスホフルクトキナーゼの役割

齋藤, 和幸
九州大学大学院農学研究院

日高, 達也
九州大学農学部生物資源環境学科

縣, 和一
九州大学大学院農学研究院

窪田, 文武
九州大学大学院農学研究院

<https://doi.org/10.15017/4347>

出版情報 : 九州大学大学院農学研究院学芸雑誌. 60 (1), pp.9-12, 2005-02-01. 九州大学大学院農学研究院

バージョン :

権利関係 :

カンショ (*Ipomoea batatas* Lam.) における ピロリン酸依存ホスホフルクトキナーゼの役割

齋藤 和幸*・日高達也¹
縣 和一・窪田 文武

九州大学大学院農学研究科植物資源科学部門植物生産科学講座植物生産生理学研究室
(2004年11月5日受付, 2004年11月11日受理)

Roles of Pyrophosphate-dependent Phosphofructokinase in Sweet Potato (*Ipomoea batatas* Lam.)

Kazuyuki SAITOU*, Tastyuya HIDAKA¹, Waichi AGATA
and Fumitake KUBOTA

Laboratory of Plant Production Physiology, Division of Soil Science and Plant Production,
Department of Plant Resources, Faculty of Agriculture,
Kyushu University, Fukuoka 812-8581, Japan

はじめに

アデノシン-5'-三リン酸 (ATP) 依存ホスホフルクトキナーゼ (ATP:フルクトース-6-リン酸ホスホトランスフェラーゼ, EC 2.7.1.11) によるフルクトース-6-リン酸のリン酸化は, 細菌, 菌類および動物における解糖系を調節する重要な反応である (芦原, 1992). 植物では, ATP 依存ホスホフルクトキナーゼに加えてピロリン酸 (PPi) 依存ホスホフルクトキナーゼ (ピロリン酸:フルクトース-6-リン酸ホスホフルクトキナーゼ, EC 2.7.1.90) が存在し, ピロリン酸に依存したフルクトース-6-リン酸のリン酸化反応を触媒している (Dennis and Greyson, 1987; Stitt, 1990).

PPi 依存ホスホフルクトキナーゼはほとんどすべての植物組織に存在し, その活性は ATP 依存ホスホフルクトキナーゼ活性と同等かそれ以上であることが多い (Stitt, 1990). さらに, 植物の ATP 依存ホスホフルクトキナーゼはフルクトース-2,6-ビスリン酸によって活性が変化しないが, PPi 依存ホスホフルク

トキナーゼは著しく活性化される (Sabularse and Anderson, 1981) ことから, PPi 依存ホスホフルクトキナーゼは植物の代謝において重要な役割を果たしていると考えられている (Spilatro and Anderson, 1989; Theodorou *et al.*, 1992). しかし, カンショにおいては PPi 依存ホスホフルクトキナーゼの研究はほとんどなされていない.

本研究では, カンショにおける PPi 依存ホスホフルクトキナーゼの役割を検討するため, 部位別および根の肥大過程における PPi 依存ホスホフルクトキナーゼおよび ATP 依存ホスホフルクトキナーゼの活性を調査した.

材料と方法

カンショ (*Ipomoea batatas* Lam.) 品種高系14号の苗を1994年6月14日に植え付け, 九州大学農学部貝塚圃場に於いて生育させた. 高系14号は8.5Lのプラスチック製ポットに土耕栽培し, 1ポット当たり化成肥料 (N:P₂O₅:K₂O=16:16:16) 5gを施用した. 苗植え付け後40日目に植物体を部位別に採取した

¹九州大学大学院生物資源環境科学府植物資源科学専攻植物生産科学講座植物生産生理学研究室

¹Laboratory of Plant Production Physiology, Division of Soil Science and Plant Production, Department of Plant Resources, Graduate School of Bioresource and Bioenvironmental Sciences, Kyushu University

*Corresponding author (E-mail: ksaitou@agr.kyushu-u.ac.jp)

後、液体窒素を用いて凍結させ、 -80°C で保存した。

凍結保存した試料に 8 mM MgCl_2 、2 mM エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム、10 mM ジチオスレイトール、12.5%グリセロールおよび10%ポリビニルピロリドンを含む100 mM トリシン [N-[トリス(ヒドロキシメチル)メチル]グリシン]-NaOH (pH 8.0) を生体重の10倍量加え、氷冷した乳鉢と乳棒を用いて素早くすり潰し、4層に重ねたガーゼでろ過した。4 $^{\circ}\text{C}$ 、10,000 $\times g$ で5分間遠心分離した後、上清を酵素活性の測定に用いた。

ATP 依存ホスホフルクトキナーゼ活性の測定のため、酵素を8.2 mM MgCl_2 、6 mM フルクトース-6-リン酸、2 mM ATP を含む50 mM 2-[4-(2-ヒドロキシメチル)-1-ピペラジニル]エタンスルホン酸 (HEPES)-NaOH (pH 7.4) 中で20分間30 $^{\circ}\text{C}$ で反応させた後、100 $^{\circ}\text{C}$ で1分間加熱して反応を停止させた。10,000 $\times g$ で10分間遠心分離後、上清をセルに取り、終濃度が0.25 mM になるように NADH を加えた。酵素活性は、アルドラーゼ (0.09 ユニット)、トリオースホスフェートイソメラーゼ (0.87 ユニット) およびグリセロール-3-リン酸脱水素酵素 (0.3 ユニット) を加えた後、340 nm の吸光度の変化から算出した (Kombrink *et al.*, 1984)。

PPi 依存ホスホフルクトキナーゼ活性の測定は、酵素反応を8.3 mM MgCl_2 、6 mM フルクトース-6-リン酸、1 μM フルクトース-2,6-ビスリン酸、2 mM PPi を含む50 mM HEPES-NaOH (pH 7.4) 中で行った以外は ATP 依存ホスホフルクトキナーゼと同様に行った (Kombrink *et al.*, 1984)。

ウリジン二リン酸 (UDP) グルコースピロホスホリラーゼ (EC 2.7.7.9) の活性は Nakamura *et al.* の方法 (1989)、ホスホグルコムターゼ (EC 2.7.5.1)、グルコースリン酸イソメラーゼ (EC 5.3.1.9) および

アルドラーゼ (EC 2.7.1.40) の活性は MacDonald と ap Rees (1983) の方法、ADP グルコースピロホスホリラーゼ (EC 2.7.7.27) の活性は Nakamura *et al.* の方法 (1989) に従って測定した。

結果と考察

カンショ塊根の糖代謝に関わる主な酵素の活性を Table 1 に示した。ATP 依存ホスホフルクトキナーゼおよび PPi 依存ホスホフルクトキナーゼの活性は、UDP グルコースピロホスホリラーゼ、ホスホグルコムターゼおよびグルコースリン酸イソメラーゼの活性の約 1/600 から 1/200 であり、アルドラーゼ活性と比較しても約 1/6 から 1/4 と著しく活性が低かった。このことから、ホスホフルクトキナーゼによる触媒反応が塊根の糖代謝における律速段階となることが考えられる。

次に、カンショ部位別の ATP 依存ホスホフルクトキナーゼおよび PPi 依存ホスホフルクトキナーゼの活性を測定した。ATP 依存ホスホフルクトキナーゼの活性は葉柄およびほふく茎の地上部で低く、細根および塊根の地下部で高かった (Fig. 1)。PPi 依存ホスホフルクトキナーゼの活性は幼葉と塊根で高く、成熟葉、葉柄、ほふく茎および細根で低かった。また、細根では PPi 依存ホスホフルクトキナーゼの活性に比較して ATP 依存ホスホフルクトキナーゼの活性が著しく高いのに対し、塊根では PPi 依存ホスホフルクトキナーゼと ATP 依存ホスホフルクトキナーゼの間であまり酵素活性に差が認められないのが注目される。

そこで、塊根形成と ATP 依存ホスホフルクトキナーゼ活性および PPi 依存ホスホフルクトキナーゼ活性との関係を検討した (Fig. 2)。ATP 依存ホスホフルクトキナーゼ活性は細根で高く、塊根形成にともなっ

Table 1. Activities of enzymes in tuberous root of sweet potato.

Enzyme	Enzyme activity (unit g^{-1}FW)
UDPglucose pyrophosphorylase	18.8
P-glucomutase	26.2
P-glucose isomelase	15.9
ATP-dependent phosphofructokinase	0.045
Pyrophosphate-dependent phosphofructokinase	0.076
Aldolase	0.227
ADPglucose pyrophosphorylase	0.943

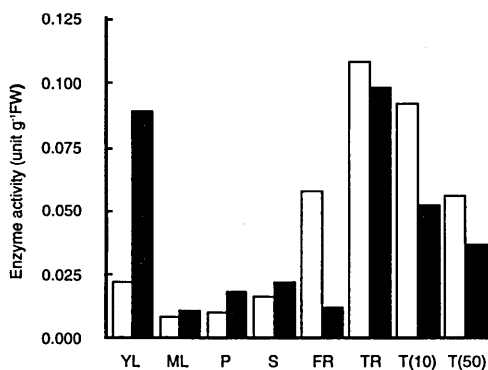


Fig. 1. Activities of ATP-dependent phosphofructokinase and pyrophosphate-dependent phosphofructokinase in different organs.

Numbers between the parentheses represent diameter of tuberous root. YL, young leaf; ML, mature leaf; P, petiole; S, stolon; FR, fibrous root; TR, thick root; T, tuberous root. □, ATP-dependent phosphofructokinase; ■, pyrophosphate-dependent phosphofructokinase.

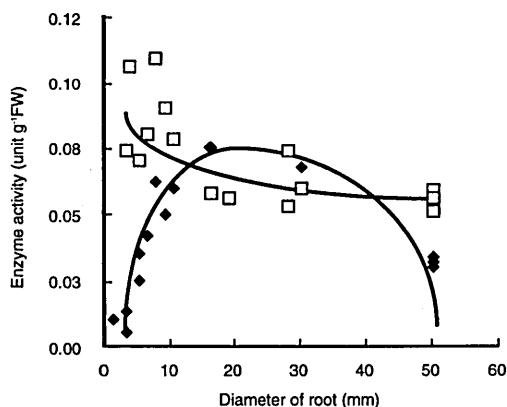


Fig. 2. Activities of pyrophosphate-dependent phosphofructokinase and ATP-dependent phosphofructokinase in root of sweet potato.

◆, pyrophosphate-dependent phosphofructokinase; ○, ATP-dependent phosphofructokinase.

て低下した。一方、PPi 依存ホスホフルクトキナーゼ活性は直径16mm の根において最大値を取る二次曲線型の変化を示した。

バレイショでは塊茎の形成と ATP 依存ホスホフルクトキナーゼ活性あるいは PPi 依存ホスホフルクトキナーゼ活性との間に明確な関連性が認められないことが報告されている (Burrell *et al.*, 1994; Hajirez aei *et al.*, 1994)。カンショにおいても ATP 依存ホスホフルクトキナーゼは塊根の形成にともなって活性が低下し、塊根形成と ATP 依存ホスホフルクトキナーゼとの明確な関係は認められなかった。しかし、PPi 依存ホスホフルクトキナーゼは塊根形成が開始される直前に活性が増加したことから塊根形成の早い段階で重要な役割を果たしていることが考えられる。さらに、幼葉で PPi 依存ホスホフルクトキナーゼの活性が高いことを考え合わせると、カンショにおいては塊根形成過程を含めて細胞の代謝が活発になりエネルギーの要求性が高まると PPi 依存ホスホフルクトキナーゼの活性が高まり、その要求を満たしていることが考えられる。

植物の PPi 依存ホスホフルクトキナーゼはフルクトース-2,6-ビスリン酸によって活性化されることが知られている (Stitt, 1990)。したがって、カンショの根に PPi 依存ホスホフルクトキナーゼの活性を十分高めるのに必要なフルクトース-2,6-ビスリン酸が存在するのか、また、塊根形成にともなうフルクトース-2,6-ビスリン酸の量的変化があるのか、今後検討していく必要がある。

要 約

カンショにおける PPi 依存ホスホフルクトキナーゼの役割を検討するため、部位別および塊根の形成過程における PPi 依存ホスホフルクトキナーゼと ATP 依存ホスホフルクトキナーゼの活性を調査した。塊根では糖の代謝に関わる主な酵素の中で ATP 依存ホスホフルクトキナーゼと PPi 依存ホスホフルクトキナーゼの活性が著しく低かった。部位別に酵素活性を比較すると、ATP 依存ホスホフルクトキナーゼは根で活性が高く、PPi 依存ホスホフルクトキナーゼの活性は幼葉と塊根で高かった。また、塊根形成過程の根において ATP 依存ホスホフルクトキナーゼの活性は低下したが、PPi 依存ホスホフルクトキナーゼの活性は直径16mm の根において最大値を取る 2 次曲線型の変化を示した。

文 献

- 芦原 坦 1992 代謝調節. 宮地編: 現代植物生理学 2 代謝. 朝倉書店, 東京, 30-69頁
- Burrell, M. M., P. J. Mooney, M. Blundy, D. Carter, F. Wilson, J. Green, K. S. Blundy and T. A. Rees 1994 Genetic manipulation of 6-phosphofructokinase in potato tubers. *Planta*, 194: 95-101
- Hajirezaei, M., U. Sonnewald, R. Viola, S. Carlisle, D. Dennis and M. Stitt 1994 Transgenic potato plants with strongly decreased expression of pyrophosphate:fructose-6-phosphate phosphotransferase show no visible phenotype and only minor changes in metabolic fluxes in their tubers. *Planta*, 192: 16-30
- Kombrink, E., N. J. Kruger and H. Beevers 1984 Kinetic properties of pyrophosphate:fructose-6-phosphate phosphotransferase from germinating castor bean endosperm. *Plant Physiol.*, 74: 395-401
- MacDonald, F. D. and T. ap Rees 1983 Enzyme properties of amyloplasts from suspension cultures of soybean. *Biochim. Biophys. Acta*, 755: 81-89
- Nakamura, Y., K. Yuki, S.-Y. Park and T. Ohya 1989 Carbohydrate metabolism in the developing endosperm of rice grains. *Plant Cell Physiol.*, 30: 833-839
- Sabularse, D. C. and R. L. Anderson 1981 D-Fructose-2,6-bisphosphate: a naturally occurring activator for inorganic pyrophosphate: D-fructose-6-phosphate phosphotransferase in plants. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 103: 848-854
- Spilatro, S. R. and J. M. Anderson 1989 Carbohydrate metabolism and activity of pyrophosphate:fructose-6-phosphate phosphotransferase in photosynthetic soybean (*Glycine max*, Merr.) suspension cells. *Plant Physiol.*, 88: 862-888
- Stitt, M. 1990 Fructose-2,6-bisphosphate as a regulatory molecule in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 41: 153-158
- Theodorou, M. E., A. C. Fiona, M. G. D. Stephen and C. P. William 1992 Phosphate starvation-inducible synthesis of the α -subunit of the pyrophosphate-dependent phosphofructokinase in black mustard suspension cells. *J. Biol. Chem.*, 267: 21901-21905

Summary

The activity of PPI-dependent phosphofructokinase and ATP-dependent phosphofructokinase in different parts and change of the enzymatic activities during development of tuberous root were investigated to understand roles of PPI-dependent phosphofructokinase in sweet potato (*Ipomoea batatas* Lam.). The activity of ATP-dependent phosphofructokinase and PPI-dependent phosphofructokinase was very low compared with main enzymes related to carbohydrate metabolism. The activity of ATP-dependent phosphofructokinase* was higher in root than other parts. The activity of PPI-dependent phosphofructokinase was much higher in young leaf and tuberous root. The activity of ATP-dependent phosphofructokinase in root decreased during development of tuberous root, whereas the activity of PPI-dependent phosphofructokinase showed maximum in root with diameter of 16 mm.