

ヒノキ針葉エステラーゼおよび酸性フォスファターゼ・アイソザイムの基質特異性

林業試験場九州支場 白石 進
上中 久子

1. はじめに

多くの生物において、種々の酵素のアイソザイムはその検出に用いる基質(試薬)に対する選択性を持つことが認められている。例えば、イネのパーオキシダーゼ¹⁾、トウモロコシのロイシニアミノペプチターゼ²⁾、オオムギのエステラーゼ³⁾等で報告されている。このことは、当然、林木においても存在するものと思われ、アイソザイムバンドの相対活性を遺伝子支配によるものとして利用する場合には、この基質特異性についても考慮する必要がある。

そこで、林木の遺伝育種の研究にアイソザイム手法を応用する際の基礎的知識のひとつとして、ヒノキ針葉中のエステラーゼと酸性フォスファターゼ・アイソザイムの基質特異性について調べた。

2. 材料と方法

供試材料としては、ヒノキ3個体から、生長休止期に採集、 -20°C で冷凍保存しておいた針葉を用いた。泳動試料は(1)この針葉250mgを0.1Mトリス-塩酸緩衝液、pH7.5(0.5Mスクロース、6mMアスコルビン酸、6mMシステイン、1%Tween80を含む)2mlとポリクラールAT150mgでホモジネートし、得られた粗抽出液を 0°C のもとで2回遠心分離(10,000xg・20分間、35,000xg・60分間)し、その上清液を用いた。(2)針葉250mgを80%冷アセトン(-20°C)中で摩砕した後、さらに2~3回の冷アセ

表-1 実験に用いた基質

エステラーゼ

- 1) α -ナフチルアセテート(α -N.A.)
- 2) β -ナフチルアセテート(β -N.A.)
- 3) α -ナフチルブチレート(α -N.B.)
- 4) β -ナフチルブチレート(β -N.B.)
- 5) α -ナフチルプロピオネート(α -N.P.)
- 6) β -ナフチルプロピオネート(β -N.P.)

酸性フォスファターゼ

- 1) α -ナフチルリン酸ナトリウム(α -Na.N.P.)
- 2) β -ナフチルリン酸ナトリウム(β -Na.N.P.)

ンによる洗浄でアセトン可溶物質を除去し、 0°C で減圧乾燥して得られた粉末(以下、アセトン粉末という)に前記緩衝液を加え、以下(1)同様に調整した。アイソザイム分析は、アクリルアミドゲル垂直平板電気泳動法を用いおおむねDavisの原法に従い、泳動試料液各20 μl を、 4°C 、約10mA/cm²の条件下で約3時間泳動した。泳動後、ゲルをエステラーゼで6種類、酸性フォスファターゼで2種類の基質用試薬(表-1)を各々含む染色液(37°C)に浸漬し、アイソザイムの検出を行なった。なお、染色液中の各基質最終濃度はエステラーゼで2mM、酸性フォスファターゼで0.1%(w/v)とした。

3. 結果と考察

ヒノキ針葉中のエステラーゼおよび酸性フォスファターゼの抽出方法を検討するために、(1)と(2)の方法で調整した試料を用いて実験した。その結果、(1)で得られた試料液を用いて泳動・染色した場合、両酵素ともザイモグラム上のRf20-50のゾーンに、葉中脂質の影響と思われる汚れがひどく、このゾーンのバンドの検出が困難であった。(2)で得られた試料は、冷アセトン処理で針葉中のアセトン可溶物質が除去されているので、この部分の汚れはかなり減少し、バンドがシャープに現れ、判読も容易になったことから、この2酵素には、アセトン粉末法は有効な抽出方法のひとつと思われる。以下、アセトン粉末を用いて得られた結果について述べる。

エステラーゼ、酸性フォスファターゼ・アイソザイムバンドの相対活性(以下、活性という)は、活性の高い順に[+++],[++],[+],[0]の4段階とし、検出されなかったバンドは[-]とした。供試ヒノキ3個体とも、両酵素で、同様な結果を示したので、表-2、表-3に、このうちの2個体について掲げた。なお、バンド名には、Rf値を用いた。

エステラーゼの基質としては、多数のフェノール性エステルが使用されているが、いまのところ良好な結果が得られているナフチルエステルの中から表-1に掲げた3種類の化合物の各々 α -および β -異性体、計6種類について基質特異性を調べた。その結果、基

質間で検出されたバンド数とバンド活性に大きな違いが見られた。最もバンド数が多く検出されたのは、 α -N.A.と α -N.P.で、この2基質を用いた場合は各バンドの活性も高かった。逆に、 β -N.P.で検出されたバンド数は少なく、その活性も弱かった。また、 β -N.B.では、ほとんど検出することができなかった。同一化合物の α -と β -異性体の比較では、 α -異性体の方が、 β -異性体を用いた場合より、検出バンド数が多く、その活性もかなり高かった。バンドは、 α -異性体を使用したときは、茶味を帯びた黒色に、 β -異性体では、赤紫色に呈色され、両基質の混合液を用いた場合は、ザイモグラム上で色分けされる⁴⁾ので、 α -N.A.と β -N.A.の混合液で染色した結果、わずかに赤味を帯びたバンドが1~2本見られた他は全て黒色を呈したことから、ヒノキ針葉中のエステラーゼは、 α -特異性の方が、 β -特異性に比べかなり高いものと思われる。多数のバンド数と高い活性が見られた α -N.A.と α -N.P.に対する各アイソザイムバンドの活性を、2基質間で比較すると、多くのバンドで違いが見られた。とくに、Rf値の小さいゾーン(36~44)のバンドは、 α -N.A.を用いた場合に活性が高く、逆に、Rf60~71のゾーンに出現するバンドは、 α -N.P.の方で高い傾向が認められた。こ

のことから、この2つのゾーン間では、 α -N.A.と α -N.P.に対する選択性に違いのあることがうかがわれた。

酸性フォスファターゼについては、基質としてよく用いられている α -Na·N.P.と β -Na·N.P.について調べた。今回用いた3個体で7本のアイソザイムバンドが観察され、各バンドの2種類の基質に対する選択性に明らかな違いが認められた。Rf 38, 51のバンドは α -特異性が大きく、逆にRf 44~49のバンドでは β -特異性が大きかった。

以上の結果、エステラーゼ、酸性フォスファターゼ・アイソザイムとも基質に対する選択性が認められたことから、ザイモグラム上の活性の程度を用いて、実験結果を検討する場合、この点を十分考慮する必要がある。

- (1) T. Endo: Plant. Cell. Physiol., 9, 333~338, 1968
- (2) J. S. Scandalios: Biochemical Genetics, 3, 37~79, 1969
- (3) A. L. Kahler & R. W. Allard: Corp Science, 10, 444~448, 1970
- (4) 遠藤徹: 最新電気泳動法, 581~632, 広川書店, 東京, 1978

表-2 エステラーゼ・アイソザイムバンドの相対活性 (ヒノキ-A)

基質 \ バンド名	36	39	41	44	46	49	51	54	59	60	65	66	69	71	74	78	81	83
α -N.A.	++	++	+	+++	++	++	+	+	+	t	t	+	+	+	+	+	++	++
β -N.A.	+	+	-	++	+	++	+	t	+	-	-	t	-	-	t	+	++	++
α -N.B.	-	-	-	-	-	-	-	t	+	+	t	t	+	+	-	-	+	+
β -N.B.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
α -N.P.	++	++	+	-	+++	++	t	+	+	+	++	t	+	++	+	t	++	++
β -N.P.	-	-	-	-	+	+	-	-	t	-	-	-	-	-	-	-	+	+

(ヒノキ-B)

基質 \ バンド名	36	39	41	44	46	49	51	54	60	63	64	65	69	71	74	78	81	83
α -N.A.	++	++	++	+++	+++	+++	+	-	++	-	t	-	+	+	+	+	++	++
β -N.A.	+	+	-	++	++	+	t	-	+	-	-	-	-	-	t	-	++	+
α -N.B.	-	-	-	t	t	t	-	-	++	-	+	-	-	+	t	-	+	-
β -N.B.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	t	-	-	-	-
α -N.P.	++	++	+	t	+++	+++	+	t	+++	+	++	+	+	++	t	-	+++	+
β -N.P.	-	-	-	-	t	t	-	-	+	-	-	-	-	t	-	-	+	-

表-3 酸性フォスファターゼ・アイソザイムバンドの相対活性 (ヒノキ-A)

基質 \ バンド名	38	40	43	44	46	49	51
α -Na·N.P.	+	+	t	-	t	t	++
β -Na·N.P.	-	++	t	++	++	+	-

(ヒノキ-B)

基質 \ バンド名	38	40	43	44	46	49	51
α -Na·N.P.	++	+++	+	-	+	+	+++
β -Na·N.P.	t	+++	+	+++	++	++	-