

3 B 15

ヒマ成熟期のイソクエン酸脱水素酵素について

佐藤八十八 (農大・教養・生物)

高等植物の NAD 要求性 isocitric dehydrogenase (NAD-IDH) の性質については G. F. Cox (1970), D. T. Davies (1969) らの報告があり NADP-IDH については長町氏ら (1967) の報告がある。NAD-IDH と NADP-IDH との関係については山本氏 (1969) の報告がある。我々はヒマ種子の発芽期及び成熟期の顆粒成分中の IDH と非顆粒成分中の IDH の isoenzyme 性, NADPH, NADH の酸化様式の変動, 非顆粒成分中の IDH の温度依存性に関与する因子等について報告してきた (佐藤, 山田, 1968, 1968, 1970)。今回非顆粒成分中の IDH の温度依存性に関与している因子についての研究及び精製した IDH のいくつかの性質についての報告を行う。

IDH の調製及び精製: 前報 (1970, 植物生理学年報) の如く非顆粒成分を分離しこれを crude enzyme preparation とする。この標品に硫酸を加え (50~65% saturation), 沈澱を溶かし 0.005M Tris-phosphate (pH 7.5) に一夜透析し, DEAE-cellulose chromatography を行い, NaCl で溶出する。溶出液を再度硫酸で塩析し (60~75% saturation) Sephadex G-100 溶出後 DEAE-cellulose にかき Na-phosphate buffer (pH 6.0) で溶出する。

酵素活性は Tris-HCl (pH 8.5) 125 μ moles, DL-Isocitrate 2.5 μ moles, $MgCl_2$ 10 μ moles NADP 0.2 μ moles に酵素を加え全量 1.500 ml 中で反応させ, 生成する NADPH を 340 m μ で測定する。A.O.D. 340 m μ , 0.001/min = 1 unit

結果及び考察: 成熟期にあるヒマの非顆粒成分中には IDH の温度による失活を妨げている factor(s) があり, 透析すると失活を受けるが発芽後期のものにはそのような factor(s) はない。透析した crude enzyme preparation に 2価金属, isocitrate, NADP 等を加えたり, 塩濃度を上げると失活は抑制される。透析してない標品に EDTA を加えると透析したものと同じ結果が得られる。透析によって 2価金属が消失したことが考えられるが図にみられるように IDH 蛋白は活性に必要な金属は持っており発芽期のものにもその傾向はみられる。従って 2価金属の標品中からの消失のみがこのような変化に影響を与えているとは思われない。むしろ何らかの因子との共同の作用の結果であると思われる。硫酸分離や酵素精製を行っても IDH 蛋白はその活性に必要な金属をもっているため金属イオンはかなり強く酵素に結びついておるものと考えられる。

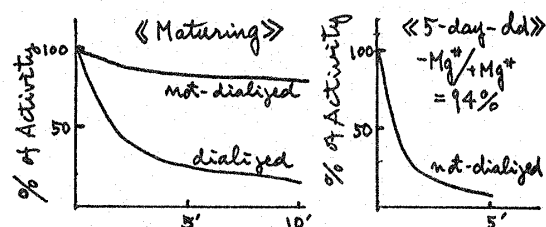


Fig. 1. 粗酵素標品を 50°C で incubate したときの活性の変化。

$-Mg^{2+}/Mg^{2+}$: Fig. 2 参照

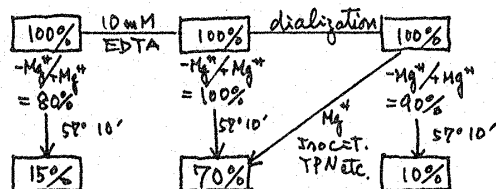


Fig. 2. 各種因子の温度失活におよぼす影響。

$-Mg^{2+}/Mg^{2+}$: Assay medium 中より $MgCl_2$ を除いたものと $MgCl_2$ を入れたもの (Complete system) との活性の比率を示す
□ 内の数字は complete system での活性の比率を示す。