水稻の登熟機構に関する生理的研究*

相見 靈三・村上 高・藤巻 和子

(農業技術研究所)

水稻の登熟機構を澱粉形成及び蓄積に関する生理を中心として研究した。特に水稻種実のフォスフォリラーゼとアミラーゼの性質及び活性の変化、フォスフォリラーゼの生成する澱粉及び遊離してくる無機磷酸の分布、又反応の場である原形質の物理化学的性質の変化を検べ、これら諸条件の相互関係から澱粉形成並びに蓄積に関する生理機構を考察した。

材料及び方法 供試した品種は農林 29 号で、構内(西ヶ原)の水田枠内で普通栽培したものである。種々の発育段階の種実を採取し、直ちに穎を除き生体重及び乾物重を秤量する。一部は生体のままその 10-80 粒に生体重の 10 倍量の 0.1μ 硫酸アンモニア-アンモニア混合液 (pH を 8.0 に調節したもの) を加えて乳鉢でよく摩擦後遠心分離しその上澄を酵素液 (E) としてフォスフォリラーゼ (FISKE-SUBBAROW 法に従い遊離磷酸を比色定量した。) 及びアミラーゼ (SHAFFER-HARTMANN 法に従い還元力の増加を測定), 全窒素 (micro-KJEHLDAHL 法による) 及び無機磷酸を測定した。他の一部は乾燥し、粉碎してソックスレーでアルコール抽出を行い、その抽出物につき還元糖及び全糖を定量, その抽出残渣を再び過塩素酸で抽出し澱粉の定量 (加水分解してその還元力を測定) を行つた。又組織化学的方法を用いて pH (methyl red 染色), 等電点 (二重染色法による), 無機磷酸 (molybden blue 法による), 澱粉 (沃度反応), フォスフォリラーゼの分布と消長 (グルコース-1-磷酸へ浸漬後沃度反応を行い対照切片と比較) をそれぞれ測定した。

実験結果 1. 生体重及び乾物重: 種実の生体重は受精後 20 日前後まで急激に増加し、それ以後はやや緩慢になり 30 日ごろまで増加する。乾物重は生体重より少しおくれで増加しはじめ、20 日すぎるとかなり増加率は減少し 40 日位までその増加はつづく (第 1 図)。

2. 澱粉, 糖, 無機磷酸: 澱粉は受精後 7 日ごろより急激に増加し、乳熟期から黄熟期まで増加しつづける。これに反して還元糖及び蔗糖は受精後 13-17 日即ち乳熟期を山として急速に消失する。還元糖に比し、蔗糖は常に多く 2-5 倍量を保っている (第 1 図)。無機の磷酸は初期に多く、完熟に向つて次第に減少していく。一方組織化学的検査では澱粉は初期、受精後 3 日ごろ迄は胚乳中には全くみられず、以後急に増加してくる。糊粉層には殆んどなく胚は完熟期に至ると全くなくなる。無機磷酸は澱粉の分布と逆で、受精後 6 日ごろまでは胚乳にかなり多く、以後次第に消失する。糊粉層には完熟期には極めて多量の磷酸が存在する。胚には常に多い (第 1 表)。

3. フォスフォリラーゼ及びアミラーゼ: フォスフォリラーゼとアミラーゼの pH と活性の関係を求めたところ第 2 図の結果を得た。即ちフォスフォリラーゼの至適 pH は 6.5-6.7 のところにあり、その酸性側では急速に失活し pH 6.0 では約 85% も消失する。塩基性側ではこれよりも徐々に失活する。一方アミラーゼは pH 4 が最適で、酸性・塩基性の両側に徐々に失活する。次ぎにフォスフォリラーゼの活性と温度の関係をみると第 3 図の如く、反応 1-3 時間に於ける最適温度は 37°C で、 $10-30^{\circ}$ では温度と共に活性は高まり、 40°C 以上では急激に失活する。水稻種実の発達に伴うこれら酵素の変遷をみると第 4 図に示す如くで、フォスフォリラーゼは乳熟後期を頂として直線的に強くなり、黄熟期に入ると急速に失活する。アミラーゼはこれと異なり、受精後 10 日ごろまでは弱く以後活性を高めるが、フォスフォリラーゼの活性のおちはじめるところ最高に達し、その後は

第 1 図 水稻種実の発達と炭水化物の消長

*昭和 31 年 4 月 8 日 第 111 回講演会に於て発表

日本作物学会紀事 第 25 巻 第 2 号 (昭和 31 年 12 月)

第1表 組織化学的方法による水稻種実細胞の諸性質

		種実発育度	胚乳	糊粉層	胚	果皮
pH	組織形成期 f)		5.6	5.4		5.2
	a) 乳熟期		6.0 $\leq$	5.4		5.2
	黄熟期		6.0 $\leq$	5.4	5.0-5.5	
	完熟期		6.0 $\leq$			
等電点	組織形成期		5.0			5.5
	b) 乳熟期		6.0	4.0	3.0-4.0	6.0
	黄熟期		6.5	4.0	3.0-4.0	6.0?
	完熟期		7.0	4.0	3.0-4.0	6.0?
無機磷酸	組織形成期		++			
	c) 乳熟期		+	+		-
	黄熟期		+, -g)	++	+++	-
	完熟期		-	+++	+++	-
澱粉	組織形成期		-	-	-	-
	d) 乳熟期		+++	-	+	+++
	黄熟期		++++	-	+	±
	完熟期		++++	-	±	-
フォスフォリラーゼ	組織形成期		+++	-		+++
	e) 乳熟期		++?	±		++
	黄熟期		+	±	+++	-
	完熟期		±?	±	+++	-

a: メチルレッド染色, b: 色素二重染色, c: モリブデン青法, d: 沃度反応, e: 葡萄糖-1-リン酸液処理後沃度反応を行い対照切片と比較, f: 乳熟期以前, 受精後5日目まで, 未だ澱粉が胚乳中に形成されない時期を云う. g: 中心部は -, 周辺部は + なる. 胚及び糊粉層は常にひくい (第1表).

考察 水稻の登熟過程に於ける上記種々の因子の盛衰が登熟の生理機構に如何に関連してくるのかについて考察してみたい.

〔フォスフォリラーゼの存在〕 多くの植物においてフォスフォリラーゼは天然に澱粉が形成される場所には必ず存在しており⁽³⁾⁽⁴⁾, 水稻種実内においても澱粉の形成される場所とフォスフォリラーゼの分布は一致している. その上, 胚乳のフォスフォリラーゼはかなり強いことが確認された. 従つて, フォスフォリラーゼが天然における澱粉形成に関与していると考えることが出来よう. しかし, 成熟した種実の胚に於けるように, フォスフォリラーゼの存在する場所でも天然には澱粉の形成がなされないことがある. これはフォスフォリラーゼによる澱粉の生成に必要な諸条件が満たされていないためであろう.

〔酵素反応の場における pH の効果〕 受精後5日目位までの若い種実の胚乳には, フォスフォリラーゼの強い活性がみられるにも拘らず天然には澱粉の形成がなされない. これは pH 値のひくいことに基ずいていると考えられる. 即ち初期の胚乳の pH は約 5.6 で, フォスフォリラーゼによる澱粉形成の至適 pH 域から外れている. しかし澱粉が形成し始めると急に 6 又はそれ以上の pH 値を示す様になりフォスフォリラーゼの澱粉形成の至適 pH 域に入ってきたことがわかる. 又胚及び糊粉層は非常に pH が低いために殆んど澱粉の形成がみられないと考える.

〔アミラーゼとの関係〕 アミラーゼがフォスフォリラーゼと共存すると, フォスフォリラーゼの作用を拮抗的に阻害することは多くの報告で知られている⁽³⁾⁽⁵⁾⁽⁷⁾⁽⁸⁾. それ故これら二酵素が水稻種実の胚乳中でどのような関係にあるかをみた. 登熟過程に於いてこれらの酵素は, その働く pH 値が全く異つている事がわかる. 生体内原形質の pH は, 澱粉形成中の胚乳で 6.0 又はそれ以上で, フォスフォリラーゼの作用に最も適した値であり, アミラーゼには不適當である. いま胚乳の pH を 6.5 と仮定してフォスフォリラーゼ/アミラーゼ比を計算すれば受精後5日目頃より 30 日に至るまでの期間は常にフォスフォリラーゼの方が大きく, 特に8日目前後に於いては最高値 310 倍に達する. 従つて澱粉蓄積期に於けるフォスフォリラーゼの澱粉形成に対するアミラーゼの阻害作用は殆んど無視して差支えないと思われる. 完熟期にかなり強いアミラーゼが検出されたが, これも胚乳の pH 値の高いこと及び水分減少のため, 実際には不活性の状態で休眠期に入るものと予想される. 黄熟期以後, フォスフォリラーゼの作用は急激に弱くなり, 完熟期には殆んど完全に失活する. この原因としては種々考えられるが, pH の変化, アミラーゼの阻害等によるものではなく, 反応の場の水分減少によつてフォスフォリラー

活性を上下することはなく完熟期に至る. この両者の活性は, 澱粉の増加する受精後 30 日までは常にフォスフォリラーゼの方が強く, 受精後 10 日ごろは約 170 倍もの活性を示した.

4. pH 及び等電点: 生体内に於ける種々の化学的性質は, その場に於ける pH によつて大きく支配される. 又等電点をはかることによつて, その蛋白組成乃至その分布を推察することが出来るから, 場に於ける酵素の活性を動的に考察する上に有意義なことである. まず pH をみると, 胚乳では極く幼く未だ澱粉のみられない時期には pH がひくい約 5.6 位である. 乳熟期になり胚乳に澱粉が形成されはじめると pH が 6 又はそれ以上になり完熟期に至る. 胚及び糊粉層は常に pH がひくい (第1表). 次に等電点の分布をみると, 胚乳の等電点は初期にひくい, 次第に上つて完熟期には pH 7 位に

第2図 水稻種実フォスフォリラーゼ及びアミラーゼのpH活性度曲線

フォスフォリラーゼ

○：反応液組成，0.1 M 葡萄糖-1-リン酸 0.2 ml.; 2% 可溶性澱粉 0.1 ml.; Tris-maleate 緩衝液 0.2 ml.; 0.1 M 弗化ソーダ 0.1 ml.; 1:10 酵素液(E.) 一乳熟後期の胚乳—0.2 ml.; 全容 0.8 ml, トルオール添加. 反応温度 30°C.

●：条件は上記○印に同じ. 但し緩衝液は醋酸塩を, 材料は黄熟期の胚乳を用いた.

◎：反応液組成, 0.1 M 葡萄糖-1-リン酸 0.2 ml.; 2% 可溶性澱粉 0.1 ml.; Tris-maleate 緩衝液 0.5 ml.; 1:10 E.-黄熟期—0.2 ml., 全容 1.0 ml. トルオール添加. 反応温度 30°C.

アミラーゼ

○黄熟初期, ●完熟期, 何れも胚乳のみ.

反応液組成：全容 4 ml. 中, 2.5% 可溶性澱粉 2 ml.; クエン酸-第二リン酸ソーダ緩衝液 1.5 ml.; 1:5 酵素液 0.5 ml. を含む. トルオール添加. 反応温度 30°C.

と遊離のリン酸の濃度比に左右され, 澱粉生成の方向へ反応が進行するためには常に $\text{free-P/ester-P} = 3.3$ (pH 7.0) 以下 (奥貫, 醗酵化学 P. 80) でなければならない. 従つて多量の澱粉が蓄積されるためには連続的に遊離されるリン酸が不活性化されるか又は反応の場から排除されるかの何れかが必要である. いま胚乳中のリン酸含量をみると, 若いうちは高く, 発育するに従つて胚乳中心部から減少し始め, 成熟した胚乳の澱粉層には殆んど存在していないことがわかる. 一方, 糊粉層及び胚のリン酸は発育に伴つて増加するので, 澱粉形成のために遊離されたリン酸はその場にはとどまらず外層に移行, 蓄積するものと解してよいと思われる. 従つてフォスフォリラーゼの活性は強く, 場における環境条件が適切であつても, 以上のリン酸の収容機能がよくなければ良好な澱粉蓄積は望めないもので, この点に関して今後研究を進めなければならない.

〔基質の形成と転流〕 稲体内炭水化物の分析結果や穂への転流液の分析結果⁽¹⁾によると殆んど蔗糖, 葡萄糖, 果糖のみが検出され, 他の糖や, 糖のリン酸エステルは検出されていない. これらの事から, 葉又は茎の同化産物の移行は主としてこれら三つの糖の形で穂へ転流しそこでリン酸が結合してヘキソースリン酸エステルが出来るものと思われる. 筆者らの実験からも, 乳熟期中にかなり増加した蔗糖又は還元糖が黄熟期に至ると急激に減少しはじめ, 同時に澱粉は一段と増加する事から, 糖の形で茎葉より供給されて澱粉の合成に使われるものと考えられる事が出来る.

第3図 水稻種実フォスフォリラーゼの活性と温度の関係

反応液組成：0.1 グルコース-1-リン酸 0.2 ml.; Tris-maleate 緩衝液 (pH 6.2) 0.2 ml.; 2% 可溶性澱粉 0.2 ml.; 1:5 酵素液 (黄熟期) 0.2 ml. 全容 0.8 ml. トルオール添加.

ゼ蛋白が変性するためと考えられる.

〔温度条件〕 登熟に関与する種々の体内系列の中で温度の影響を受けるものは極めて数多くあると思われるが, フォスフォリラーゼの澱粉形成のみから論ずれば, 第3図の如く 30-40°C の範囲内において澱粉形成の最高域があり, この領域から外れると, 澱粉の形成に支障を来し, 糖の如き形で残留することが多くなると思われる. 従つてフォスフォリラーゼにとつてはその活性の最も強い受精後 10-20 日頃に至適温度が与えられれば, 澱粉の形成に望ましい結果が得られるものと考えられる.

〔無機酸リンの分布と量の関係〕 フォスフォリラーゼの作用により, 1分子のグルコース-1-リン酸からグルコースが切れて澱粉が生成される際に1分子のリン酸が遊離される. この反応の平衡は, グルコース-1-リン酸

文 献

- 1) FISKE, C. H., SUBBAROW, Y., *J. Biol. Chem.* 66, 375 (1925).

- 2) SHAFFER, P. A. HARTMANN, A. F. J. *Biol. Chem.* **45**, 349, 365, (1921).
- 3) 相見豊三, 村上高, 日作紀 **23**: 277-280 (1955).
- 4) YIN, H. C., SUN, C. N., *Plant Physiol.*, **24**, 103-110 (1949).
- 5) 中村道徳, 丸尾文治, 日農化, **24**: 299-302 (1951).
- 6) 中村道徳, 日農化 **24**: 302-309 (1951).
- 7) 小野林, 植雑 **66**: 103-111 (1953).
- 8) PORTER, H. K. *Biochem J.* **45**: xxxvii (1949); *ibid.* **47**, 476, (1950).
- 9) 高杉直幹, 伊藤英治: 酵素化学シンポジウム **6** 50 (1951).
- 10) 村山登, 他; 農業技術研究所報告 B4: 123-166 (1955).
- 11) 三輪知雄, 他, 未発表.

第4図 水稻種実のフォスフォリラーゼと
アミラーゼの消長

フォスフォリラーゼの測定: 反応液全容 2.0 ml. 中, 0.1 M グルコース-1-リン酸 0.5 ml.; Tris-maleate 緩衝液 (pH 6.2) 0.5 ml.; 2% 可溶性澱粉 0.2 ml.; 蒸溜水 0.3 ml.; 1:10 酵素液 0.5 ml. を含む. トルオール添加. 反応温度 30°C.

アミラーゼの測定: 反応液全容 8 ml. 中, 2.5% 可溶性澱粉 4 ml.; 0.1 M 醋酸緩衝液 (pH 5.2) 3 ml.; 1:10 酵素液 1 ml. を含む. トルオール添加. 反応温度 30°C.

Physiological Studies on the Mechanism of Ripening in Rice plant.

Reizo AIMI, Taka MURAKAMI and Kazuko FUJIMAKI.

(National Institute of Agricultural Sciences)

Summary

Chemical, Physico-chemical, and enzymatic changes that occur in the seed of rice plant as it grows from fertilization to maturity were studied.

1. There is little synthesis of starch up to the 4th day after flowering. A very rapid synthesis of starch takes place between the 7th and the 20th day. Storage of starch reaches to a maximum about at the 30th day.

2. The contents of sugars, including reducing sugars, increase until around the 15th day after flowering, and decrease rapidly thereafter.

3. A lot of inorganic phosphorus is present in the seed in an earlier period of its development. After about the middle milk-ripe stage, its content in endosperm falls continuously. In the fullripe stage it is practically negligible. On the contrary it increases in the aleuron layer and embryo. The fact that inorganic phosphorus is not accumulated in the storage organ of starch is suitable for the accumulation of starch, because the starch synthesis by phosphorylase is inhibited by the presence of inorganic phosphorus.

4. The optimal pH for synthesis of starch by phosphorylase is 6.5-6.7. The optimal temperature is around 37°C. The amount of phosphorylase in endosperm rapidly increases until the 18th day after flowering, hereafter it decreases continuously. After about the 30th day its activity is lost almost completely. The period of the highest activity of phosphorylase closely relates to that of the rapid accumulation of starch.

5. The optimal pH of rice-amylase is 4.1. The amount of amylase is very small in the early period of seed development. It increases from about the 10th day after flowering and reaches the maximum value about the 20th day.

6. The pH value of endosperm at the early stage is around 5 or less. However, it rises to more than 6 after the milk-ripe stage. On the contrary the pH value of aleuron layer and embryo is 5 or less. As the favorable pH value for synthesis of starch by phosphorylase is in the range from 6 to 7, it may be said that the pH condition within the endosperm of the milk-ripe stage later is suitable for synthesis of starch.

As a final conclusion, chemical, physico-chemical, and enzymatic conditions of endosperm are favorable for synthesis or accumulation of starch by the action of phosphorylase as far as the present author has examined.