植物における澱粉形成の機構

(2) 特に孔辺細胞の澱粉形成について

小 野 林*

Hayashi ONO: On the mechanism of the formation of starch in plants.

1. Especially in guard cells.

1952 年 3 月 13 日受付

1. 緒 言

先⁽¹²⁾に大根における澱粉形成について報告したが、澱粉の合成酵素である Phosphorylase の研究の一部として特に In vivo の実験材料に孔辺細胞内の Phosphorylase の澱粉合成作用を見たので、それに関係した部分についてのみかんたんに報告する。孔辺細胞やその他の植物組織における Phosphorylase の作用や分布については H. C. Yin⁽¹⁹⁻²²⁾, W. T. Williams⁽¹⁷⁾, M. T. Dyar⁽⁶⁾, 丸尾⁽¹⁰⁾, 中村⁽¹¹⁾等により報告されているが著者は違つた立場から孔辺細胞の澱粉形成について研究した。孔辺細胞は他の組織細胞と趣を異にし、植物の種類によつては勿論の事、温度、水素イオン濃度等の環境条件の違による変異が非常に多い。種々の植物の表皮を取り Phosphorylase の作用基質である Glucose-1-phosphate (Cori ester, 爾後 G-1-P と略記する) の溶液中に入れると孔辺細胞の葉緑体や白色体に澱粉が形成されるので種々の条件における孔辺細胞内の Phosphorylase による澱粉合成作用を馬鈴薯より調製した Phosphorylase 作用の In vitro の場合と比較しつつ研究した。この研究にあたり京大、小野寺幸之進氏及び九大、小島教授に対し御厚意と御助言に深甚の謝意を表する。

2. 実 験 方 法

一般に澱粉は Phosphorylase により基質 G-1-P より無機燐が離れて合成される。この反応の進行度は離される燐の量を定量して知る事ができるが、定性的には澱粉の沃度反応による色調の変化で知る事が出来る。特に組織細胞や孔辺細胞の Phosphorylase 作用は、組織切片、表皮を G-1-P 溶液中に一定時間おき形成された澱粉の沃度反応を顕微鏡下に見ればよい。著者は醋酸又は燐酸緩衝液で pH を 6.2-6.4 とした G-1-P の 0.01-0.005 Mol の溶液中に表皮や組織切片を入れ、12 時間後それを取り出して澱粉形成の有無を検した。澱粉は孔辺細胞の葉緑体や白色体中にできるのであるが、Phosphorylase の作用が弱く形成された澱粉の少い時は、点々と黒い澱粉粒が散在するが、多くなると隙間がなくなり孔辺細胞内は眞黒に澱粉で満たされる。普通 3-4 時間で澱粉が形成されるが 12 時間位おいた方がよい。実験に使用した植物の主なる物は *Gladiolus* sp., *Helianthus annuus* L., *Phaseolus coccineus* L., *Zea Mays* L., *Iris laevigata* F., *Tradescantia reflexa* R., *Dahlia pinnata* C., *Canna generalis* B., *Lilium longiflorum* T., *Narcissus Tazetta* L., *Allium cepa* L., *Allium fistulosum* L.,

* 九州大学教養部生物教室

第1図 孔辺細胞内の澱粉の日変化 (模式図).

備考 L 明所 D 暗所.

Species Day : Time	Tradescantia		Lilium		Gladiolus		Dahlia		Canna		Zea Mays	
	L	D	L	D	L	D	L	D	L	D	L	D
1 : 10												
1 : 14												
1 : 19												
2 : 10												
3 : 10												
4 : 10												
5 : 10												
7 : 10												
10 : 10												

Lycoris radiata H., *Zephyranthes candida* H., *Solanum tuberosum* L., *Ipomoea Batatas* L., *Saccharum officinarum* L. である。夏季の植物ではグラジオラス、トウモロコシがよく、冬季の植物ではスイセン、タマスダレがよい。ムラサキツユクサは1年を通じて使用出来るので便利であつた。これらの植物はいずれも孔辺細胞内の澱粉が暗室で消失し易いか（ムラサキツユクサは難かしい）、又は酵素作用が強く現れ G-1-P より容易に澱粉を合成するので便利である。普通夏季の自然状態のものは孔辺細胞に澱粉粒をもっているが予め暗室に入れておいて澱粉の消失した材料を使用した。冬季では自然状態のものも殆ど澱粉の形成は見られないのでそのまま使用して差支えない場合が多い。In vitro における馬鈴薯の Phosphorylase の調製は C. S. Hanes の方法により、甘藷の β -amylase の調製は A. K. Balls の方法によつた。

3. 実験結果及び考察

A. 自然状態の植物の孔辺細胞内の澱粉の消長について。

植物の組織細胞内の澱粉含量は日変化が著しく、一般に日中形成され夜間又は暗室におくと消失するが、孔辺細胞内の澱粉は消失し難く日変化は殆ど見られない。著者は上記の植物について、明所と暗所の両条件下に連続的に孔辺細胞内の澱粉の消長を観察した。その大要を模式的に第1図に示した。この図で明らかなように孔辺細胞は他の組織細胞と異なり、明所のものも晝・夜による澱粉の消長は殆どなくて、むしろ暗所のものの中に大きな変異がみとめられた。即ち一般に暗所におくと4-5日で殆んど完全に澱粉は消失するが、ムラサキツユクサ、テッポウユリ、ハナカンナのように4時間位より次第に増加し2-4日で最高となり後次第に消失するものもある。スイセン、タマスダレ、ヒガンバナ等も冬季に比較して夏季では消失し難い。以上のように孔辺細胞内の澱粉形成は光以外に温度や水素イオン濃度その他の影響を強くうけるようである。

B. 孔辺細胞内の澱粉形成の基質。

基質として glucose, fructose, maltose, mannit, lactose, saccharose, glycogen, pyruvic acid, glucose-1-phosphate の 0.5-0.005 Mol の各種濃度の溶液を使用した。しかし G-1-P を除いてはどの基質からも孔辺細胞に澱粉の形成は見られなかつた。Phosphorylase による澱粉の形成は後述するように温度による影響が多いのでその影響も見たが G-1-P を除いて孔辺細胞には澱粉は形成されなかつた。組織細胞では saccharose や glucose が澱粉形成の基質となり得るのでそれがいかなる原因によるか不明であるが、R. O. Freeland⁽⁸⁾ もいうように、孔辺細胞内の葉緑体が組織細胞内のものと性質を異にしているのではないかと、又は糖より磷酸系に入る爲の ATP の作用等が考察されるが今後の研究にまたねばならない。G-1-P よりは上記のどの植物にも澱粉が合成されるが、後述するように *Allium* 属植物には全くみとめられない。G-1-P の濃度が 0.0005 Mol 以上でない澱粉は形成されないが一般に稀薄な濃度の G-1-P を使用すると孔辺細胞のみ強く澱粉の沃度反応が現れ、組織細胞では弱い。これは Phosphorylase の作用が組織細胞に弱い事を示すものでありその原因については次の機会に報告する。

C. 孔辺細胞の澱粉形成と水素イオン濃度との関係。

水素イオン濃度は醋酸緩衝液 (pH 3.5-6.2) と磷酸緩衝液 (pH 5.5-8.3) を使用しその影響を見た。この結果は第2図に模式的に示したごとくで、pH 4.1-7.3 において澱粉の形成が行われこれ以外の pH においては形成されない。この際面白い事は同じような水素イオン濃度でも醋酸緩衝液を使用した方が磷酸緩衝液よりも Phosphorylase の作用が強く澱粉形成が盛

第2図 孔辺細胞の澱粉形成に及ぼす水素イオン濃度の影響(模写図).

備考 pH. A は醋酸緩衝液 P は磷酸緩衝液 C は基質に G-1-P を缺き蒸溜水使用.

P ^H .	MATERIALS		P ^H .	MATERIALS	
	Gladiolus	Tradescantia		Gladiolus	Tradescantia
A 3.5			P 6.1
A 4.1			P 6.4
A 5.0			P 6.7
A 5.6			P 7.0
A 5.9			P 7.3
A 6.2			P 7.7
			P 8.0
P 5.5			P 8.3
P 5.8			C

であつた。酸性において Phosphorylase の作用が強いのは、著者が行つた大根における実験でも同様で別に報告するように貯藏澱粉含量の多い品種や、同一個体でも澱粉含量の比較的多い部分に pH が低く、又澱粉形成期は消耗期よりも水素イオン濃度が高い事がみとめられた。

D. 孔辺細胞の澱粉形成と温度との関係。

前記のように *Allium* 属の植物を除いて一般に夏季には自然状態のものは孔辺細胞に澱粉が形成されるが、冬季の植物にはあまり形成されない。これら冬季の自然状態のものの表皮を G-1-P で処理すると時により澱粉が形成されるが、形成されない場合が多い。しかしこれらの植物を予め 30°C の定温器で温度処理すると容易に澱粉の形成が起る事を観察したので、著者は次のような実験をした。第1表のように切取つた植物をあらかじめ種々の温度に 24-48 時間処理した。この際光は必要でない。これら植物の表皮を取り G-1-P の溶液に入れて種々の温度

第 1 表 孔辺細胞の澱粉形成に及ぼす温度の影響。

前処 理温 度	基質 実験 温度 材料植物	Dist. water					Glucose-1-phosphate				
		0° C	5° C	10° C	20° C	30° C	0° C	5° C	10° C	20° C	30° C
0° C	A	—	—	—	—	—	—	—	±	+	+
	B	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+
	C	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
5° C	A	—	—	—	—	—	—	—	±	+	+
	B	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+
	C	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
10° C	A	—	—	—	—	—	—	±	+	卅	卅
	B	—	—	—	—	—	—	±	+	+	卅
	C	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+
20° C	A	—	—	—	—	—	+	卅	卅	卅	卅
	B	—	—	—	—	—	+	卅	卅	卅	卅
	C	—	—	—	—	—	±	+	卅	卅	卅
30° C	A	—	—	—	±	±	卅	卅	卅	卅	卅
	B	—	—	—	±	±	卅	卅	卅	卅	卅
	C	—	—	—	—	—	+	卅	卅	卅	卅

- 備考 A *Zephyranthes candida* H.
B *Narcissus Tazetta* L.
C *Tradescantia reflexa* R.
卅 沃度反応で孔辺細胞が隙間なく真黒になる。
卅 沃度反応で孔辺細胞が 1/2 位迄黒くなり隙間が出来る。
+ 沃度反応で孔辺細胞に点々と黒粒が散在する。
± 沃度反応が不明瞭。
— 沃度反応が全く現れない。

の下に澱粉の形成を調べた。この表で明らかなように、 20° – 30°C で反応が強く澱粉が形成された。前処理を低温で行ったものは G-1-P に入れた温度が高くても、Phosphorylase の作用は極めて弱い、逆に前処理を高温でしたものは G-1-P に入れた温度が低温でも澱粉の形成が盛であつた。特にムラサキツユクサは温度に敏感で前処理が 5°C 以下では澱粉は形成されない。冬でもよく繁茂するタマスダレ、スイセンは比較的低温でもよく澱粉が形成される。同じ温度の G-1-P 溶液中でも前処理の温度の差異が澱粉の合成作用に強く現れ 20°C 、 30°C の高温に前処理をし、高温下に合成させると最もよく澱粉ができる。前処理の温度の影響について低温により作用力の減退された Phosphorylase が高温によつて活性化し作用力を起す出発点の活性度の差異が反応に現われてくる事と思われる。なお In vitro における馬鈴薯 Phosphorylase は 0°C でも G-1-P より澱粉を合成するので In vivo における Phosphorylase の活性度には温度の外に他の要因が考えられる。

E. 孔辺細胞の澱粉形成に及ぼす種々の物質の影響。

a) Amylase の作用。植物体内における澱粉の形成を考える場合、同一細胞内でも或時期には合成作用が起り或時期には分解作用が行われる。これらの相反する作用が起る爲には、このような分解・合成に関与すると思われる amylase や Phosphorylase の複雑な関係が予想される。勿論 Phosphorylase 等の磷酸の関与する可逆的な一群の酵素系による分解・合成もあるが、amylase の不可逆的な分解作用も考えなくてはならない。先に発表*したように大根では澱粉合成期に amylase の作用が弱く、澱粉の分解・消耗期に作用が強くなる。また甘藷は諸の肥大、澱粉の形成期は α -amylase が比較的多いが次第に β -amylase の量が増加し完熟期には殆ど β -amylase のみとなる。著者はこれらの見地から Phosphorylase の澱粉形成に及ぼす amylase の種類や量の問題について次のような実験をした。amylase として市販の Diastase や唾液及び甘藷より調製した β -amylase の種々の濃度の溶液を使用し、表皮と共に G-1-P 溶液に入れ G-1-P の濃度が 0.005 Mol 以下とならないようにした。その結果 β -amylase は強い阻害作用がみとめられたが、他のものは余り強くなかつた。これ等の大部分は α -amylase より成つており少量含まれていた β -amylase による作用と考えられるが、馬鈴薯 Phosphorylase に対する In vitro の実験ではどの amylase も強い阻害作用を示した。次に amylase を種々の水素イオン濃度の下に作用させると前述の水素イオンのみの影響に比較して amylase が存在するために澱粉形成の pH 域が非常に狭くなり、pH 5–6 において作用が見られまた作用も全体的に弱い。

b) 種々の植物汁液の影響。H. C. Eyster⁽⁷⁾ は澱粉を形成しない植物の汁液には Phosphorylase の作用を阻害する物質があると報じているが著者は大根、馬鈴薯、甘藷、ネギ属植物、サトウキビの汁液を用いて、グラジオラス、トウモロコシ、ムラサキツユクサの孔辺細胞の澱粉形成に及ぼす影響を見た。これらの汁液を G-1-P の 0.01 Mol 溶液と等量に混じ、この中に表皮細胞又は馬鈴薯 Phosphorylase を入れ、In vivo および In vitro で実験した。この結果によると甘藷、大根、サトウキビの汁液はどの場合にも澱粉形成の阻害作用が現れた。ネギ属では鱗葉、白色部、青色部など部分によつて作用を異にする。即ち In vivo ではどの部分もやや阻害作用が現れたが、In vitro では青色部に強い阻害作用が現れた。これ等の阻害作用を現す植物のエーテル、クロロホルム、ベンゼン、石油エーテルなどの有機溶剤による抽出物や、汁液を 100°C に 10 分間熱処理したものには阻害作用がない。Phosphorylase の作用を阻害す

* 昭和24年東京、昭和25年名古屋における日本植物学会大会に発表

るものは, Eyster のような特別な物質でなくて汁液中に含まれている amylase の量や種類の差によるものであると思われる。特に甘藷汁液では前述のようにその中に含まれている β -amylase の阻害作用と思われる。

c) 各種無機化合物の作用。種々の無機化合物の 0.1-0.01 Mol の溶液を 0.01 Mol の G-1-P と等量に混じ、孔辺細胞の澱粉形成や馬鈴薯の Phosphorylase の作用に及ぼす影響を見た。その結果は次のように三つのグループに分ける事ができる。即ち Phosphorylase に及ぼす作用が、(1) 阻害的に強いもの。硫酸銅、塩化亜鉛、クロム酸、塩化アルミニウム、種々の水銀塩、第二磷酸カリウム、硫酸第一鉄、塩化第二鉄、塩化マグネシウム、磷酸アンモニウム、硝酸カリウム、シアン化カリウム、磷酸カルシウム。(2) やや阻害作用があるが比較的弱いもの。硝酸カルシウム、硝酸ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム、塩化マンガン、チオ硫酸ナトリウム、酒石酸カリナトリウム。(3) 阻害作用が殆どないか又は逆に促進的に働くのではないかと思われるもの。塩化アンモニウム、醋酸カリウム、塩化ナトリウム、ヨウ化カリウム、塩素酸カリウム、モリブデン酸アンモニウム、塩化マグネシウム、フェロシアンカリウム、第一磷酸カリウム、フッ化ナトリウム、硝酸アンモニウムである。阻害作用の強い昇汞、硫酸銅、塩化第二鉄でも 0.005 Mol 以下の濃度では阻害作用はない。これらの物質がどんな機構で作用を現すかは不明である。或場合にはそれ等の物質の直接的な Phosphorylase の破壊が見られたが、間接的な影響即ち水素イオン濃度の変化や、Phosphorylase activator の破壊など色々な場合が考えられる。例えば KH_2PO_4 は阻害作用はないが K_2HPO_4 は阻害する。これは一見水素イオン濃度の違によるアルカリの作用と思われるが、 Na_2HPO_4 は阻害作用がない事などより一概に水素イオン濃度のみに帰する事はできない。これらの化合物の作用は In vivo でも In vitro でも全く同様であつた。

F. *Allium* 属植物の孔辺細胞の澱粉形成について。

既に述べたように大多数の実験植物では G-1-P から澱粉が容易に形成される。特に孔辺細胞においてそうである。また白化ふ入りの部分の孔辺細胞もよく澱粉を作るが *Allium* 属植物では澱粉の形成はみとめられなかつた。*Allium* 属植物の表皮を他の植物と同様種々の温度で種々の濃度の G-1-P または glucose, saccharose などの糖類に入れて澱粉の形成を試みたがどの場合も孔辺細胞には澱粉はみとめられなかつた。Eyster のように、Phosphorylase の作用を阻害する特別な阻害物質があるのではないかと一応考えられるが、前述のように amylase の作用又は Phosphorylase を欠くのではないかと想像されるが結論を下す事は出来ない。

Summary

1. Concerning the formation of starch in guard cells, the author studied the increase or decrease of starch under natural conditions, the effects of concentration of hydrogen ions, amylase, plant juice and inorganic compounds on the formation of starch, and the substratum for the formation of starch.

2. Over ten kinds of plants were used as materials. *Gladiolus* and *Zea Mays* were appropriate to the experiments in the summer season, *Narcissus Tazetta* and *Zephyranthes candida* in the winter season and *Tradescantia reflexa* in all seasons. These plants were very suitable, because they had strong power of synthesizing starch from glucose-1-phosphate.

3. Daily increase or decrease of starch in guard cells under natural conditions is not so remarkable as in tissue cells, though remarkable difference by species was observed. When put in dark room, the starch within tissue cells rapidly disappeared, but that within guard cells, in some plants at least, increased for the first two or four days, thenceforth began to decrease little by little, and finally disappeared.

4. Different from in tissue cells, the starch in guard cells was never formed from carbohydrates, but only from glucose-1-phosphate, its lower limit of concentration for the formation being 0.0005 mol.

5. The starch-forming activity in guard cells was stronger in the existence of weak acids, and the action of phosphorylase was recognized between the pH of 4.1-7.3 coinciding with the pH value at which the reserve starch of radishes was formed.

6. The starch-forming activity in guard cells was very powerful at the temperatures from 20° to 30°C, but not recognized at the comparatively lower temperatures. Therefore starch was found in the guard cells of summer plants, but was not found in those of winter plants in many cases. Winter plants or plants placed at low temperatures formed only small amounts of starch from glucose-1-phosphate in those conditions, but if the temperature was raised to 20°-30°C for one or two days, starch forming power was remarkably enhanced, and at the same time the action of phosphorylase was accelerated. Plants again formed small amounts of starch at the low temperature.

7. *In vitro* amylase hindered starch formation of phosphorylase and *in vivo* β -amylase hindered it stronger and α -amylase weaker. Therefore it may be conjectured that there are complex relation between amylase and phosphorylase in the formation or the dissolution of the starch in living plants.

8. The juice from the plants capable of forming starch and that from the plants incapable of forming starch equally affected phosphorylase and there was no special difference between their effect. The juice of radishes, sweet potatoes, sugar millets and the like prevented the action of phosphorylase *in vivo* and *in vitro* and each part of plant body was different in its effects. None of the juices of these plants treated at 100°C or extracted by organic solvents had inhibiting effect upon the action of phosphorylase. Judging from the above mentioned facts, the inhibiting process was not caused by any special substances, but by difference in species or in the quantity and quality of amylase formed by various plants or in the seasons of development in plants.

9. Equal inhibiting process was observed both *in vivo* and *in vitro* for over 30 kinds of inorganic compounds. And these compounds could be divided into the following three groups: 1. Those which seemed absolutely lacking the action or on the contrary to accelerate it; 2. Those which had powerful actions; 3. Those which had weak actions. But the mechanism of their inhibiting activities was completely obscure.

10. In guard cells of plants belonging to *Allium*, starch was never formed so far as the author's experiments were concerned. But it can not be conjectured at present that they have some substances preventing the action of phosphorylase or they have no phosphorylase in them.

References

1. Alvin, P. T. Amer. J. Bot. 36 : 981-991, 1949.
 2. Balls, A. K., M. K. Walden and R. R. Thompson. Jour. Biol. Chem. 173 (9). 1948.
 3. Bresler, S. E. and E. I. Nidzyan. Chem. Abst. 45 : 2794, 1951.
 4. Cori, G. T., L. P. Colowick and C. F. Cori. Jour. Biol. Chem. 121. 1937, 123. 1938, 124. 1938, 131. 1939.
 5. Desal, M. C. Plant Physiol. 12 : 253, 1937.
 6. Dyar, M. T. Amer. J. Bot. 37 : 786-792, 1950.
 7. Eyster, H. C. Science 109 (2833) : 282, 1949.
 8. Freeland, R. O. Science 114 (2952) : 94, 1951.
 9. Hanes, C. S. Proc. Roy. Soc. 129 : 174, 1940.
 10. 丸尾文治, 中村道徳. 日農化 25 (5) : 245, 1952.
 11. 中村道徳, 外. 日農化 24 (5) : 197, 24 (7) : 229, 24 (7) : 302, 1951, 25 (5) : 248, 25 (3) : 119, 1952.
 12. Ono, H. and H. Kojima. Sieboldia Acta Biologica 1 (2) : 135 1952.
 13. Porter, H. K. Biochem. Jour. 47 : 476-482, 1950. Chem. Abst. 45 (7) : 304, 1951.
 14. Sandstedt, R. M. and O. C. Bechord. Chem. Abst. 41 (5) : 1280, 1947.
 15. Schlamouity, M. et al.. J. Biol. Chem. 171 : 293-295, 1947.
 16. Stanton, W. R. and W. K. Sinclair. Chem. Abst. 45 (15) : 6703, 1951.
 17. Williams, W. T. and G. S. Spermer. Nature 167 : 234-235, 1951. Chem. Abst. 44 (19) : 9014, 1950.
 18. Wilson, C. C. Plant physiol. 23 : 5-32, 1948.
 19. Yin, H. C. and Y. T. Tung. Science 108 : 2795, 1948.
 20. Yin, H. C. and C. N. Sum. Plant physiol. 24 (1) : 103, 1949.
 21. Yin, H. C. Science 105 : 650, 1947.
 22. Yin, H. C. Nature 162 : 920, 1948.
 23. Zinker, E. P. Chem. Abst. 44 (6) : 2692, 1950.
-