Type を異にするトウモロコシ種子の多糖類 生成に関する酵素学的研究 II

Non-waxy トウモロコシの Q-酵素

田 中 国 治*

Kuniji TANAKA: Enzymatic Studies on the Mechanism of Polysaccharide
Formation in Maize-Seed II

Q-Enzyme of Non-Waxy Seeds

1955 年 8 月 2 日受付

著者は先に¹⁾糯質トウモロコシの胚乳形成にあ
ずかる wx 遺伝子の作用の本質を明らかにしよ
うとする目的から、糯質 (Tokuto) 及び Non-
waxy の種子 (Country Gentleman × Wisconsin
No. 690) よりそれぞれデンプン形成に關与する
Branching 酵素をとり、トウモロコシ・アミロ
ース及びグルコース-1-リン酸に対する行動をしらべ、
その際 Non-waxy の酵素では糯質の酵素と異つ
て、アミロースよりアミロペクチンへの変化がヨ
ウ素呈色法では認められなかつたことを報告し
た。糯質及び Non-waxy の種子の炭水化物の本
質的相違はアミロペクチン部分にあること^{2, 3)}、
P-酵素については両者の間に相違がないと見られ
る結果が得られていること⁴⁾等よりして、これら
両 type の種子の Branching 酵素についての比
較研究は、wx 遺伝子の作用の本質を理解する上
に有力な知見を与えるように思われた。

本研究では Non-waxy 酵素の枝分れ形成作用
の機構を明らかにするために、ジャガイモのアミ
ロースを基質として Branching 酵素を作用させ、
その生成物では β -アミラーゼによる加水分解の程
度が低下するか否かを検し、更に前回の研究にお
いてヨウ素呈色法ではアミロースよりアミロペ
クチン形成の認められなかつた原因を追求した。又
そこに得た結果が、実験条件の相違にもとずくも

のであるか否かを確めるために、既によく研究さ
れているジャガイモの Q-酵素について同様の実
験を行つた。それらの結果について報告する。

実験の部

トウモロコシ Branching 酵素の調製——ト
ウモロコシ種子は Country Gentleman (糯質)
に Wisconsin No. 690 (デンプン質) を交配させ
て得たもので、若干の点を除き、大略前回と同じ
方法で調製した。

2 日間室温で水に浸し、膨潤させた種子 10gm.
を石英砂及び 40 cc の 0.25 M クエン酸塩緩衝液
(pH 6.0) と共に乳鉢中で塵状に粉碎した後遠心
分離して液面に浮遊した物質と共に懸濁液をと
り、これに硫安飽和溶液を加えて 1/2 飽和とし
た。混合後溶液を 26° に加温し、直ちに遠心分離
した (2000 r. p. m. 10 分間)。析出物は液面に浮
遊したのでサイフォンを用いて液のみをとりわ
け、これに更に硫安飽和溶液を加えて 2/3 飽和と
し、混合後遠心分離して沈澱を集めた。これを 20
cc の 0.25 M クエン酸塩緩衝液に溶解し、不溶
物を遠心分離して除いた。この液に再び硫安飽和
溶液を加えて 60% 飽和とした後、これを冷蔵庫中
(0°) に 1 昼夜乃至 2 日間保存後生じた沈澱を遠
心分離 (3000 r. p. m. 5 分間) して集めた。沈澱
を 0.25 M クエン酸塩緩衝液 (pH 6.0) を含む
1/2 飽和の水冷した硫安飽和溶液で 3 乃至 4 回
(毎回 3000 r. p. m. 3 乃至 5 分間) 洗滌後得た沈
澱を 7 cc 乃至 12 cc の水に溶解した。

* 大阪学芸大学池田分校生物学教室. Biologi-
cal Institute, Ikeda Branch, Osaka Liberal
Arts University, Osaka.

かくて得た酵素液は少量のアミラーゼ及びフوسفターゼを含んでいたが、pH 6.7 では大体不活性であつた。又酵素液は少量の P-酵素を含んでいた。

ジャガイモ Q-酵素——ジャガイモ Q-酵素は Barker 等⁵⁾の方法により市販のジャガイモより調製した。100 cc のジャガイモ搾汁より得た酵素を 20 cc の水に溶解した。

β-アミラーゼ——β-アミラーゼは大豆粉末より Bourne 等⁶⁾の方法により調製した。酵素 2.5% 水溶液を水道水に対し 2 日間透析し、生じた沈澱を遠心分離して除いた後冷蔵庫に保存した。この酵素液は α-アミラーゼ及びマルターゼを含んでいない。

ジャガイモアミロースの調製——McCrady & Hassid⁷⁾の温水抽出法に Haworth 等⁸⁾のチモール法を併用して調製し、純度約 93% のものをえた。

枝分れ結合の形成機構に関する実験——先ず磷酸塩が実質的に存在しない条件でアミロースに酵素を作用させた後、β-アミラーゼによる加水分解の程度が低下するか否かを検した。反応条件は、0.3% アミロース (150 mg, アミロースに数滴のエタノールを加えて潤おした後 0.5 N NaOH 10 cc を加えて煮沸水浴上で溶解し、0.5 N 硫酸で中和後 50 ml. とした) 4.0 ml., 0.25 M クエン酸塩緩衝液 (pH 6.7) 2.0 ml., 酵素液 1.0 ml., 反応温度 30°。一定時間酵素を作用させた後試験管を取出し、長さ 70 cm, 直径 5 mm のガラス管を附し、100° に 10 分間加熱して酵素を失活させた。冷却後 β-アミラーゼ溶液 1.0 ml. を加えて 30° で加水分解させ、その反応液 1.0 ml. をとり出して Shaffer-Somogyi 試薬 No. 60¹⁰⁾ (以下麦芽糖の定量にはこの試薬を用いた) で定量し、Branching 酵素添加直後同様の方法で測定した対照の結果と比較した。

この β-アミラーゼ消化液 1 ml. 中には 1.5 mg の基質が含まれているが、その純度 93%, 又澱粉 0.94 gm. より約 1 gm. の麦芽糖を生成するから、消化液 1.0 ml. より生成されるべき麦芽糖量は

$$1.5 \text{ mg} \times \frac{0.93}{0.94} = 1.5 \text{ mg}$$

で、従つて Branching 酵素反応中混在するアミ

ラーゼによる生成麦芽糖量 [x] を補正したときの β-アミラーゼによる生成麦芽糖%は

$$\text{生成麦芽糖\%} = \frac{\text{β-アミラーゼ作用により生じた麦芽糖 mg}}{1.5 \text{ mg} - x} \times 100$$

となる。この場合 x は β-アミラーゼ添加直後の反応液 1.0 ml. の還元力と対照における同様な測定値との差を麦芽糖として求めた。

実験の結果を Fig. 1 に示した。この場合反応中生じた還元力は麦芽糖として 5% であつた程度

Fig. 1. Hydrolysis by β-amyglase of the polysaccharide formed from potato amylose by the action of maize Q-enzyme.

少であつた。この図にみられるように、対照では 89% 麦芽糖生成がみられたのに対し、24 時間酵素を作用させたものでは約 66% にすぎなかつた。従つてこの酵素は磷酸塩の関与なしにアミロースをアミロペクチンに変化させるものであることがわかつた。

次にアミロースよりアミロペクチンへの変化に對してグルコース-1-磷酸及び無機磷酸塩を添加することにより、分枝形成が促進されるか否かを検した。この酵素標品中には P-酵素が含まれているので、新たに P-酵素を加えなかつた。この実験の結果を TABLE I に示した。

表にみられるように、グルコース-1-磷酸及び無機磷酸塩を添加した場合の β-アミラーゼによる分解限はそれぞれ 72% (P-酵素により葡萄糖-1-磷酸より合成された多糖類を補正した) 及び 68% で、添加しなかつたもの (70%) と殆んど同程度であつた。

以上の結果よりこの酵素は Q-酵素であつて、

TABLE I.

EFFECT OF GLUCOSE-1-PHOSPHATE AND INORGANIC PHOSPHATE ON THE ACTION OF MAIZE Q-ENZYME IN THE PRESENCE OF P-ENZYME Reaction temperature, 30°. Q-Enzyme action was stopped by heating after incubation period as indicated and then the reaction product was subjected to the action of β -amylase. With 1.0 ml. aliquot of the digestion mixture maltose was estimated.

Reaction mixture	Reaction time hour	Maltose produced by the action of amylase contained in the enzyme solution during the reaction time mg.	Polysaccharide produced by the action of P-enzyme during the reaction time mg.	Maltose to be formed in the reaction mixture from total polysaccharide (A) mg.	Actual production of maltose by the action of β -amylase (B) mg.	Maltose produced (B) $\times$ 100 (A) %
A	0	0		1.5	1.33	89
	12	0.05		1.45	1.02	70
B	12	0.05	0.12*	1.58	1.14	72
C	12	0.11		1.39	0.94	68

*: calculated from milligrams of inorganic phosphate liberated from glucose-1-phosphate. The determination was made by the method of Fiske-Subbarow¹¹⁾.

A: 0.3% Amylose 4.0 ml., 0.25M Citrate buffer (pH 6.7) 2.0 ml., Enzyme solution 1.0 ml.

B: 0.3% Amylose 4.0 ml. 0.014M Gl-1-P dissolved in 0.25M citrate buffer (pH 6.7) 2.0 ml., Enzyme solution 1.0 ml.

C: 0.3% Amylose 4.0 ml., 0.25M Citrate buffer (pH 6.7) 1.5 ml., 0.2 M Phosphate buffer (pH 6.7) 0.5, Enzyme solution 1.0 ml.

ジャガイモ Q-酵素と同様にアミロースを交叉結合して枝分れを形成するものであると思われる。

枝分れ形成作用の限界に関する実験——前回の研究においてヨウ素呈色法で検した場合、アミロースよりアミロペクチンへの変化が認められなかつたことを報告したが、これを本酵素が Q-酵素であるという事と併せて考察すると、生アミロペクチンの直鎖部分のグルコース鎖長が比較的長く、その分枝程度が低い結果ヨウ素呈色ではアミロースと著しい相違を示さなかつたことによるものであろうかと推測される。そこでこの酵素の枝分れ形成作用の限界を β -アミラーゼによる分解限についてしらべた。この実験では反応中生じた麦芽糖量 [x] は、酵素作用を測定するのと同じ組成をもつた別の反応混合液より、0.875 ml. をとり出して測定した。

実験の結果を同じ実験条件でジャガイモ Q-酵素について得た結果と比較して Fig. 2 に掲げた。この場合 Q-酵素反応中のアミラーゼによる麦芽

糖生成量はトウモロコシの場合は最終（反応時間 24 時間）で 5%，ジャガイモ酵素の場合は全然認められなかつた程度僅少であつた。この図から見られるように、Q-酵素の反応の進行に伴い、 β -アミラーゼによる加水分解限は急速に低下するが、トウモロコシ酵素の場合では曲線は約 62% 附近で限界に達し、その限界はジャガイモ酵素による場合と比較して 10% 以上高かつた。又トウモロコシ Q-酵素による実験の場合には、枝分れ形成作用が限界点附近に達すると、反応生成物が沈澱してくる現象が認められた。

トウモロコシ及びジャガイモ Q-酵素によりそれぞれジャガイモアミロースより調製したアミロペクチンの性質の比較——アミロペクチン調製：0.3 gm. ジャガイモアミロースを 0.5 cc のエタノールで潤おした後、20 cc の 0.5 N NaOH を加えて煮沸水浴上で溶かし、冷却後 0.5 N H₂SO₄ でフェノールフタレインに対し中性とし、水を加えて 100 cc とした。これに 0.25 M クエン酸塩

Fig. 2. Decrease of limit of hydrolysis by β -amylase of potato amylose by each action of maize Q-enzyme and potato Q-enzyme. (•) Maize Q-enzyme. (○) Potato Q-enzyme.

Reaction mixture contained 4.0 ml. of 0.3% amylose, 2.0 ml. of 0.25 M citrate buffer (pH 6.7) and 1.0 ml. of Q-enzyme solution. Reaction temperature, 30°. After heat inactivation the reaction mixture was added with β -amylase and the resulting maltose was determined.

Fig. 3. β -Amylolysis of amylopectins formed from potato amylose. (•) Amylopectin obtained by the action of maize Q-enzyme. (○) Amylopectin obtained by the action of potato Q-enzyme.

緩衝液 (pH 6.7) 25 cc 及び 30 gm. の膨潤させたトウモロコシ種子より得た酵素を 25 cc の水に溶解して加えた。少量のトルエンを添加後 30° で 29 時間反応させた。反応中のアミラーゼによる

基質の分解は麦芽糖として 9% にすぎなかつた。煮沸水浴中に 15 分間加熱して酵素を失活させた後、60° に冷却し、不溶物を遠沈して除いた。溶液を 1 昼夜水道水に対し、更に引き続き 1 昼夜 2 l の蒸溜水に対して透析し、エタノールを加えて 70% とした。沈澱を遠沈して集め、エタノールで 2 回、エーテルで 2 回洗滌後、 P_2O_5 上減圧乾燥した。収量約 85%。このアミロペクチンを先のアミロースと同じ仕方で溶解し、更にトウモロコシ Q-酵素を作用させたが、 β -アミラーゼによる加水分解限が低下することは認められなかつた。

ジャガイモ Q-酵素によるアミロペクチンの調製も略前実験と同じ条件で行った。使用した酵素量は、ジャガイモ搾汁 100 cc より得た酵素を 25 cc の水に溶解して作用させた。72 時間反応後再び新たに調製した酵素液 25 cc を添加し、更に 70 時間反応させた。その後はトウモロコシ酵素におけると同様に操作し、約 77% の収量でアミロペクチンをつつた。

反応時間中還元力の増加は全然認められなかつた。

β -アミラーゼによるアミロペクチンの分解: 0.3% アミロペクチン (溶解は先にアミロースを溶解した操作に準じた) 4.0 ml., 0.25 M クエン酸緩衝液 (pH 6.7) 2.0 ml., β -アミラーゼ溶液 2.0 ml. で 30° で分解させた場合の β -アミラーゼ分解限測定結果を Fig. 3 に示した。試料中のアミロペクチンの正確な量は、アミロペクチン溶液 4.0 ml. と 7% H_2SO_4

10 cc の混合液を 100° に 3 時間加熱し、アミロースの純度を求めた方法に準じてグルコース量を測定して求めた。図にみられるように、結果は先に得たものと略一致し、トウモロコ

Fig. 4. Absorption spectrum of amylopectin-iodine complex of the amylopectins formed from potato amylose. (—) Amylopectin formed by the action of maize Q-enzyme. (—) Amylopectin formed by the action of potato Q-enzyme.

アミロペクチン-ヨード結合物の色調及び吸収スペクトルは、試料及び試薬混合の割合を Mc-Cready 及び Harsic⁵⁾ の方法にならつて発色させ、G. E. 分光光度計で測定した。トウモロコシ酵素によるアミロペクチンの場合はヨウ素呈色は青紫色、ジャガイモ酵素による場合では赤紫色、又それらの吸収スペクトルの頂点は Fig. 4 に示したように、それぞれ 575 mμ 及び 535 mμ で、前者は後者よりも約 40 mμ 長波長のほうに片寄っていた。

両者共温水にとけ易い点是一致的にいたが、水溶液の安定性は異なり、トウモロコシ Q-酵素によつて調製したアミロペクチンは室温数時間で混濁を生じた。

TABLE II.
PROPERTIES OF AMYLOPECTINS FORMED FROM POTATO AMYLOSE BY THE ACTION OF MAIZE Q-ENZYME AND POTATO Q-ENZYME.

Property	Source of Q-enzyme	
	Potato tuber	Maize seed
Solubility in hot water	Easily soluble	Easily soluble
Stability in water	Stable	Unstable
Limit of hydrolysis by β -amylase	49 %	59 %
Colour of iodine complex	Reddish-purple	Bluish-purple
Maximum of absorption spectrum of iodine complex	535 mμ	575 mμ
Colour of β -dextrin-iodine complex	Red	Violet

シ及びジャガイモ Q-酵素で調製したアミロペクチンの β -アミラーゼによる分解限はそれぞれ 59 % 及び 49 % であつた。

アミロペクチンの性質の比較: β -アミラーゼによる分解限が一定した後、それぞれその 1 cc をとり、0.005 N ヨード液 2 滴を加えてヨウ素呈色をしらべると、ジャガイモ酵素によるアミロペクチンの β -デキストリンが赤色を呈したのに対し、トウモロコシ酵素によるものは靑色であつた。

これら両アミロペクチンの性質を総括して TABLE II に示した。即ち、ジャガイモ Q-酵素によつて調製したアミロペクチンの性質は、従来の研究結果とよく一致しているのに対し、トウモロコシ酵素によつて得たアミロペクチンはそれと種々の点で異なつてゐることを示している。

考 察

以上の実験結果より、ここに得られたトウモロコシ Branching 酵素が Q-酵素であることが明ら

かにされると共に、前回の研究においてアミロースよりアミロペクチンへの変化がヨウ素呈色の肉眼的観察では認めることができなかった原因が推測され得る。即ち本酵素によつて形成されたアミロペクチンはそのヨウ素結合物の光吸収の頂点が多少長波長部に片寄っているからであり、 β -アミラーゼによる加水分解限が高いことから、おそらくアミロペクチンの直鎖部分の平均グルコース鎖長が長く、その分枝程度が割合に少いことを意味するものであろう。天然のトウモロコシアミロペクチンとここに得たものとを比較してみないとはつきりしたことを述べることはできないが、 β -アミラーゼによる分解限が高いこと、及びその水溶液が比較的不安定であることは、Meyer 等¹²⁾がトウモロコシアミロペクチンについて得ている結果とよく一致している。また Lerner¹³⁾は筋肉の Branching 酵素の Amylo-(1,4 $\rightarrow$ 1,6)-transglucosidase はその作用の本質においては Q-酵素と異つてゐるものではなく、酵素の特異性の相違にあるものとし、その性質がグリコーゲン形成に重

要な意味をもつてゐることを指摘した。ここに得られた事実及びこれらの知見は、Non-waxy トウモロコシ種子におけるアミロペクチンの構造を規定する上に、本酵素が重要な役割を行つてゐることを示唆する。

一方 Non-waxy トウモロコシの一種である糖質の胚乳には、多量のフィトグリコーゲンが含まれていることが知られてゐる¹⁴⁾。Hassid¹⁵⁾等によるとこのグリコーゲンは動物性グリコーゲンに類似し、 β -アミラーゼによる分解限は 47%と報告されている¹⁵⁾。したがつてここに得た実験結果は、このグリコーゲンはアミロペクチンより本酵素の作用によつて形成されるものではないであろうことを示唆する。

本研究において有益なご示唆を頂き、また論文のご校閲を賜つた東京教育大学三輪知雄教授に対して深謝する。又トウモロコシ材料のご提供を頂いた農林省農業技術研究所山崎義人博士及び吸収スペクトルの測定についてご便宜を頂いた大阪国立工業試験所福田保氏に対し深謝する。

Summary

The branching enzyme of non-waxy maize seeds (Country Gentleman $\times$ Wisconsin No. 690) was found to belong to the Q-enzyme type, and it differed from potato Q-enzyme producing a slightly different amylopectin. The amylopectin produced was saccharified by soybean β -amylase to 59~62% (calculated as maltose), and gave an iodine complex with a maximum at 575 $m\mu$ in absorption spectrum, while potato Q-enzyme yielded an amylopectin with a limit of saccharification by β -amylase of 49% and with an absorption maximum of iodine complex at 535 $m\mu$.

References

1. Tanaka, K., Symposia on Enzyme Chemistry, 10: 189 (1954).
2. Bates, F.L., French, D. & Rundle, R.E., J. Am. Chem. Soc., 65: 142 (1943).
3. Sprague, G.F., Brimhall, B. & Hixon, R.M., J. Am. Soc. Agron., 35: 817 (1943).
4. Tanaka, K., Memoirs of the Osaka University of the Liberal Arts and Education, B. 3: 99 (1954).
5. Barker, S.A., Bourne, E.J., Wilkinson, I.A. & Peat, S., J. Chem. Soc., (1950) 84.
6. Bourne, E.J., Macey, A. & Peat, S., J. Chem. Soc., (1945) 882.
7. McCready, R.M. & Hassid, W.Z., J. Am. Chem. Soc., 65: 1154 (1943).
8. Bourne, E.J., Donnison, G.H., Haworth, W.N. & Peat, S., J. Chem. Soc., (1948) 1687.
9. Shaffer, P.A. & Somogyi, M., J. Biol. Chem., 100: 695 (1933).
10. Somogyi, M., J. Biol. Chem., 119: 741 (1937).
11. Fiske, C.H. & Subbarow, Y.A., J. Biol. Chem., 66: 375 (1925).
12. Meyer, K.H., Bernfeld, P., Rathgeb, P. & Gürtler, P., Helv. Chim. Acta, 31: 1536 (1948).
13. Lerner, J., J. Biol. Chem., 202: 491 (1953).
14. Morris, D.L. & Morris, C.T., J. Biol. Chem., 130, 535 (1939).
15. Hassid, W.Z. & McCready, R.M., J. Am. Chem. Soc., 63: 1632 (1941).
16. Meyer, K.H. & Gibbons, G.C., Advances in Enzymology, Vol. XII, Interscience, New York, p. 371 (1951)