Summary

1) The absorption of sugars from artificial culture media and enzymes reactions in the pollen were investigated with paper chromatographic method.

2) The pollen of *Lilium* and *Impatiens* absorbed only sucrose from the culture media throughout their growth (Fig. 1).

3) By addition of pollen juice of *Lilium longiflorum* Thunb. to the solution of soluble starch, glucose, maltose and some other unknown sugars were regularly produced, while the color of iodine reaction of this solution turned into yellow brown from blue (Fig. 4).

4) By addition of pollen juice of *Lilium* and *Impatiens* to sucrose solution, glucose and fructose were produced, then sucrose was regularly removed (Fig. 4). It may be said that these pollens have some amylase and invertase.

引用文献

- 1) 岩波洋造, 植雑 69: 91 (1956). 2) 志佐誠, 樋口春三, 育雑 4: 3 (1954). 3) 岩波洋造, 植雑 (印刷中) (1956). 4) Paton, J. B., Amer. Jour. Bot. 8: 471 (1921).

遊離葉緑体における澱粉の形成について II

小野 林*・小長光与壯*

Hayashi ONO and Yoso KONAGAMITSU: The Formation of Starch
in the Isolated Chloroplasts II.

著者等は別報¹⁴⁾で chloroplast, cytoplasm 何れにも phosphorylase が存在し, その作用は温度や光等の外的要因の変化によつて起る細胞内の生理的条件の変化によつてかわる事を明らかにした。即ち高温・明条件におかれた葉の細胞より遊離された chloroplast や cytoplasm は低温・暗所におかれた葉の場合よりも starch の形成作用が著しく大である。しかもそれ等要因の影響は chloroplast や cytoplasm を細胞から遊離させる前に行われると, 遊離させた後に同様に処理したもののよりも phosphorylase の作用に一層効果

的である。他方著者^{11,12)}は細胞内の phosphorylase や amylase の作用は細胞内の水素イオン濃度の変化に支配され, その変化によつて phosphorylase と amylase の作用の相互転換が起る事を明かにした。しかし此等の現象の原因やその機構の説明はまだ不十分である。著者等は此等変化の機構や, 酵素作用と温度や光条件の影響の関係を明かにする為に細胞より遊離された chloroplast や cytoplasm の starch 形成と, phosphorylase の作用に特に影響すると思われる amylase や phosphatase の作用をそれ等酵素阻害剤である HgCl_2 や NaF を使用して追求した。此の実験より細胞内における phosphorylase, amylase, phosphatase の作用関係を知る事が出来たのでその結果をかんたんに報告する。

* 九州大学教養部生物学教室 (Biological Laboratory, General Education Department, Kyushu University).

実験材料と方法

前報¹⁴⁾におけると同様に *Bryophyllum*, *Raphanus* の葉を主として用い、その他 *Trifolium*, *Plantago*, *Solanum* や *Erigeron* の葉を用いた。酵素阻害剤として、 10^{-3} ~ 10^{-5} Mol. の NaF と HgCl_2 を使用した。 HgCl_2 の 10^{-3} Mol. 以上の高濃度は phosphorylase の作用を阻害する。又 0.01% の 2,4-dinitrophenol や rhodamin B 添加の影響も見た。実験に使用した α -amylase は Meyer (1948) の方法により唾液より調製し、 β -amylase は Balls (1948) の方法により甘藷から調製した。その他の方法は前報¹⁴⁾におけると同様である。

実験結果と考察

1. HgCl_2 と NaF 添加の影響: 2-5 日間暗所におかれた大根葉から遊離された chloroplast や cytoplasm では G-I-P を基質として starch が形成される事があるが phosphorylase の作用は極めて弱い。然し此の場合基質に HgCl_2 , NaF を添加すると starch の形成は促進され、特に chloroplast よりも cytoplasm において著しい (Table 1)。前報で明かにした様に光条件におかれた葉より遊離されたものは暗条件におかれたものより starch がよく形成されるが、此の際 HgCl_2 , NaF の添加で starch の形成は尙一層促進される。これは phosphorylase そのものの作用力が光条件において促進された事を示す。

一般に HgCl_2 は amylase (Nakamura, 1952), NaF は phosphatase (Porter, 1953, etc.) の選択的阻害剤として知られている。それで此等の阻害剤の添加は phosphorylase 作用を害する amylase や phosphatase の作用を阻害し、その結果

phosphorylase の作用のみが現れ、chloroplast や cytoplasm 中の starch 形成が促進される。

上述の事実は細胞内に於て温度や光の変化の影響で変化する水素イオン濃度によつて主として作用する酵素系の作用転換が起るという著者^{9,11,12)}の考を証明するものである。即ち葉肉組織細胞内の水素イオン濃度は露光により大となり、その結果 phosphorylase の作用は大となるが amylase の作用は小となる。暗所では逆に細胞内の水素イオン濃度は小となり phosphorylase の作用は小となり amylase の作用は大となる。此の理由から暗処理されたものよりも、光条件におかれた細胞から遊離された chloroplast や cytoplasm に phosphorylase の活性度が大きであり starch 形成も多く、又 HgCl_2 や NaF の添加で phosphorylase に拮抗的に作用する amylase, phosphatase の作用を除く為に phosphorylase の作用がなお強く現れるのである。暗所におかれたものも amylase の作用に阻害されて、そのまゝでは phosphorylase の作用が現れないが、阻害剤の添加で phosphorylase の作用のみが現れる為に starch が形成される。

他方 NaF の添加で starch の形成が促進される理由に関して、これは phosphorylase の phosphatase による直接の阻害作用を除く理由の外に phosphatase 作用の除去により磷酸エステルの蓄積が起り、水素イオン濃度大なる条件において Free P/G-I-P の平衡を大に保つ為に著者が先に報告^{11,12)}した様に starch の形成が起るのである。

HgCl_2 と NaF は *in vitro* において phosphorylase の作用や、starch 形成を促進しないばかりでなく、濃度が高いと反つて阻害作用が現れるが、*in vivo* や、遊離された chloroplast や cytoplasm においてこれ等の添加で starch 形成が促

Table 1. The effect of HgCl_2 and NaF on the formation of starch in the isolated chloroplasts and cytoplasm from the leaves of *Raphanus sativus* L.

	In dark		In light	
	Chloroplasts	Cytoplasm	Chloroplasts	Cytoplasm
Control	±	+	+	+ ~ ++
HgCl_2	+	+ ~ ++	++ ~ +++	+++
NaF	+	+ ~ +++	++	+++

Table 2. The effect of HgCl₂ and NaF on the formation of starch in isolated chloroplasts and cytoplasm from the leaves of various plants kept in the dark three days.

Materials	Parts	Control	HgCl ₂	NaF
<i>Trifolium repens</i> L.	Chloroplasts	— ~ ±	+	±
	Cytoplasm	+	⦿	⦿
<i>Plantago major</i> L.	Chloroplasts	— ~ ±	+	± ~ +
	Cytoplasm	+	⦿	⦿
<i>Solanum tuberosum</i> L.	Chloroplasts	— ~ ±	± ~ +	± ~ +
	Cytoplasm	⦿	⦿	⦿
<i>Erigeron annuus</i> L.	Chloroplasts	— ~ ±	± ~ +	± ~ +
	Cytoplasm	+	⦿	⦿

Table 3. The effects of 2,4-dinitrophenol and rhodamin B on the formation of starch in the chloroplasts and cytoplasm isolated from the leaves of *Raphanus sativus* L. that kept in the dark 2-5 days.

	Chloroplasts	Cytoplasm
Control	±	+
2,4-Dinitrophenol	+	+
Rhodamin B	+ ~ ⦿	⦿ ~ ⦿

Table 4. The effect of amylase on the formation of starch in the chloroplasts and cytoplasm isolated from the leaves.

Materials	<i>Raphanus sativus</i> L.				<i>Bryophyllum calycinum</i> S.	
Treatment	Dark		Light		Dark	
Parts	Chloroplasts	Cytoplasm	Chloroplasts	Cytoplasm	Chloroplasts	Cytoplasm
Control (G-I-P)	±	+ ~ ⦿	+	⦿	⦿	+
G-I-P+α-amylase	±	—	+	±	+ ~ ⦿	±
G-I-P+β-amylase	—	—	+	±	+	—

進されるのは、之等の物質が直接 phosphorylase の作用を促進するものでなく、間接的な作用である。即ち細胞内で phosphorylase の作用に直接、間接に影響する酵素作用系の破壊によるものである。Table 1 及び 2 で明白な様に HgCl₂ や NaF の添加で starch の形成は chloroplast よりも cytoplasm において著しく促進される。これは cytoplasm では此等の物質が直接 amylase や

phosphatase と接触し作用を阻害するが、chloroplast ではそれを構成する膜が此等の阻害剤の透入を阻げる為 amylase や phosphatase に及ぼす阻害作用が cytoplasm の時の様に強くないためと思われる。又前報¹⁴⁾で報告した様に大根葉では chloroplast よりも cytoplasm 中において phosphorylase の活性度が大きなる為である。

2. 2, 4-dinitrophenol と rhodamin B 添加の

影響: Table 3 に示す様に 之等の物質の添加は遊離された chloroplast や cytoplasm の starch 形成を或程度促進し特に rhodamin B 添加の効果が著しい。又 chloroplast よりも cytoplasm においてよく促進される。rhodamin B の細胞内 chloroplast の starch 形成促進作用については、植田¹⁹⁾により報告されているが、細胞から遊離された chloroplast においても同様である。

3. amylase 添加の影響: 孔辺細胞の starch 形成が β -amylase の添加で阻害され、又 *in vitro* では α -又は β -amylase の添加で phosphorylase 作用は完全に阻害される事について著者¹⁰⁾は先に報告した。細胞より遊離された chloroplast や、cytoplasm では Table 4 に示した様に α -, β -amylase の添加で starch 形成は著しく阻害された。即ち光条件の葉より遊離された chloroplast や cytoplasm の phosphorylase 作用は暗処理のものよりも強いが、此の際 amylase の添加で phosphorylase の starch 形成作用は阻害され、特に cytoplasm において著しい。又 β -amylase の添加で著しく阻害された。HgCl₂ や NaF の添加で cytoplasm の starch 形成が chloroplast よりも促進されたと逆に amylase の添加で cytoplasm における phosphorylase の作用が著しく阻害される。此の様に chloroplast と cytoplasm の phosphorylase の作用が amylase の添加で異なるのは前述と同様に chloroplast の膜の存在による透入の困難の爲である。 α -amylase の阻害作用が chloroplast よりも cytoplasm に強い事は α -amylase が β -amylase におけると同様に細胞内において phosphorylase の作用に重要な生理的意味を持つていることを示す。amylase を添加する前に chloroplast 中に形成された starch はその後 amylase を添加しても消失しない。

結 論

細胞内において starch と sugar の相互転換に関係する phosphorylase, amylase や phosphatase の作用関係は一定の条件において生理的に調整され、平衡を得ている。然し外的条件の温度・光やその他内的生理的要因の変化は此の様な酵素作用系の平衡を乱す。ある平衡した条件において細胞を破壊し chloroplast や cytoplasm を細胞から遊離させ、HgCl₂ や NaF の amylase や phosphatase の酵素阻害剤を加える事によつて phosphorylase の作用を比較的強く現す事が出来る。暗処理し細胞内の amylase 作用を強めて phosphorylase の作用が現れない状態のものも HgCl₂ を加え amylase 作用を除く事によつて遊離された chloroplast や cytoplasm に phosphorylase の starch 形成作用を現出させる事が出来る。NaF の添加は細胞より遊離された chloroplast や cytoplasm の phosphatase の作用を阻害し phosphorylase の starch 形成作用は促進されるが、その理由の一つは、phosphorylase の作用を阻害する phosphatase の作用を除く直接的な効果と、他方 phosphatase 作用の阻害によつて磷酸エステルの蓄積を来し一定の水素イオン濃度における free P/G-I-P の平衡を維持する為 starch の形成が促進されるものと考えられる。又反対に α -や β -amylase の添加によつて細胞より遊離された chloroplast や cytoplasm の starch 形成は著しく阻害される。

starch 形成や分解に関与する之等の酵素作用間には拮抗作用的関係があり、主として作用する酵素の種類や作用力が光や温度の外的環境要因の変化、及びそれ等の変化より誘導される内的生理的要因の変化、特に水素イオン濃度の変化で決定されるという事実が、これ等酵素の作用関係を見る事により明かである。

Summary

1. The formation of starch in the isolated chloroplasts and cytoplasm was accelerated by the addition of HgCl₂ that inhibits the action of amylase.
2. The addition of NaF that inhibits the action of phosphatase also accelerates the formation of starch in the isolated chloroplasts and cytoplasm.
3. These reagents are effective in concentrations of 10^{-3} — 10^{-5} Mol. as

inhibitors.

4. The addition of these reagents does not accerelate the starch forming action of phosphorylase *in vitro*, but the elimination of amylase and phosphatase activity by the treatment correlatively and indirectly accerelates the action of phosphorylase.

5. The addition of rhodamin B and 2,4-dinitrophenol accerelates the formation of starch in the isolated chloroplasts and cytoplasm.

6. The addition of amylase inhibits the formation of starch in the isolated chloroplasts and especially in cytoplasm and in this case the inhibitory action is stronger in β -amylase than in α -amylase.

7. There exists the antagonistic relation concerning the action of phosphorylase, amylase and phosphatase, and this relation is controlled by the change of hydrogen ion concentration in the cell.

References

1. Balls, A. K., M. K. Walden, et al., J. Biol. Chem. **173** : 9 (1948).
 2. Cohen, M. and Bowler, E. Protoplasma **42** : 414 (1953).
 3. Dyar, M. T., Amer. Jour. Bot. **37** : 78 (1950).
 4. Gomolyako, S. E., Chem. Abst. **48** : 5881 (1954).
 5. McClendon, H., Plant Physiol. **29** : 448 (1954).
 6. Meyer, K. H. et al., Chem. Abst. **42** : 3450 (1948).
 7. Nagai, S., Bot. Mag. Tokyo **63** : 250 (1950).
 8. Nakamura, M., Jour. Agr. Chem. Soc. Japan **26** : 261, 267 (1952).
 9. Ono, H., Bot. Mag. Tokyo **66** : 103 (1953).
 10. ———, Bot. Mag. Tokyo **66** : 182 (1953).
 11. ———, Jap. Jour. Bot. **15** : 28 (1955).
 12. ———, Sieboldia Acta Biol. **1** : 206 (1955).
 13. ——— and Konagamitsu, Y., Sieboldia Acta Biol. **1** : 223 (1955).
 14. ———, In press.
 15. Porter, H. K., J. Exptl. Bot. **4** : 44-52 (1953).
 16. Sisakyan, N. M. and Kobayakova, A. M., Chem. Abst. **8** : 3050 (1948).
 17. Slater, E. C. and Lewis, S. E., Biochem. Jour. **58** : 327 (1954).
 18. Stocking, C. K., Amer. Jour. Bot. **39** : 283 (1952).
 19. Ueda, R., Bot. Mag. Tokyo **63** : 44 (1950).
 20. Weier, T. E. and Stocking, C. R., Bot. Rev. **18** : 14 (1952).
 21. Yin, H. C., Nature **162** : 928 (1948).
 22. Zirkle, C., Amer. Jour. Bot. **13** : 301 (1926).
-