高等植物における ADP-glucose Pyrophosphorylase, UDP-glucose Pyrophosphorylase および Sucrose Synthetase の分布について

新井 勇 治*・藤 崎 三 雄*

Yuji ARAI* and Mitsuo FUJISAKI*: Distribution of ADP-glucose Pyrophosphorylase, UDP-glucose Pyrophosphorylase and Sucrose Synthetase in Higher Plants.

Received October 18, 1970

Abstract

It has been known that four reactions are concerned in the enzymic synthesis of glucosyl donors involved in starch biosynthesis. In this experiment, the presence of enzymes catalyzing these reactions was examined for enzyme preparations from leaves and storage tissues of various higher plants. ADP-glucose pyrophosphorylase activity was detected in all the enzyme preparations from the leaves, whereas the activity was not detected in many preparations from the storage tissues. UDP-glucose pyrophosphorylase activity was detected in all the enzyme preparations. Sucrose synthetase activity was detected in all the enzyme preparations. Synthesis of UDP-glucose from sucrose and UDP by the sucrose synthetase, however, was found in few preparations from the leaves and in all the preparations from the storage tissues.

高等植物におけるデンプン合成の反応基質である ADP-glucose および UDP-glucose の生成については, sugar-nucleotide pyrophosphorylase によって触媒される反応系 (glucose-1-phosphate+ATP (UTP) → ADP-glucose (UDP-glucose) + pyrophosphate) あるいは sucrose synthetase によって触媒される反応系 (sucrose+ADP(UDP) → ADP-glucose (UDP-glucose)+fructose) が考えられている. 高等植物における ADP-glucose pyrophosphorylase の存在は, コムギ種子¹⁾, トウモロコシ種子²⁾, イネ種子³⁾, ホウレンソウの葉⁴⁾, オオムギの葉⁵⁾, トマトの葉⁵⁾, タバコの葉⁵⁾, ソラマメの葉⁵⁾ 等について報告され, UDP-glucose pyrophosphorylase の存在は, エンドウの芽生え⁶⁾,

エンドウ種子⁷⁾, トウモロコシ種子⁸⁾ 等について報告され, また, sucrose synthetase の存在は, コムギの胚⁹⁾, サトウダイコンの葉¹⁰⁾ と根¹¹⁾, サトウキビ¹²⁾, ソラマメ種子¹³⁾, ジャガイモ塊茎¹⁴⁾ 等について報告されている.

しかし, これらの報告は, いずれも単独にいずれかの酵素の活性を調べたものであり, 同一の植物材料について, これら三種の酵素の活性の有無を比較検討したものはないようである. デンプンの生合成過程を考える場合に, その反応基質の生成過程について検討することも, 重要な課題の一つと考えられる.

この報告は, 酵素起源を広く高等植物に求め, それらの葉あるいはデンプン貯蔵組織について, ADP-glucose pyrophosphorylase, UDP-glucose pyrophosphorylase および sucrose synthetase の活性の有無を調査し, 比較検討を行なったものである.

* 東京教育大学 農学部 植物生理 化学 教室 Laboratory of Plant Biochemistry, Faculty of Agriculture, Tokyo University of Education, Komaba, Tokyo, Japan.

材料と実験方法

1) 植物材料

植物材料としては, *Phytolacca americana* (アメリカヤマゴボウ), *Chenopodium album* (アカザ), *Hydrangea macrophylla* (アジサイ), *Humulus japonicus* (カナムグラ), *Cirsium Tanakae* (ノハラアザミ), *Pueraria Thunbergiana* (クズ), *Solanum tuberosum* (ジャガイモ), *Brassica oleracea* (キャベツ), *Fagopyrum esculentum* (ソバ), *Brassica campestris* (カブ), *Brassica perviridis* (コマツナ), *Spinacia oleracea* (ホウレンソウ), *Glycine Max* (ダイズ), *Vigna sinensis* (ササゲ), *Pisum sativum* (エンドウ), *Phaseolus angularis* (アズキ), *Phaseolus vulgaris* (インゲンマメ), *Vicia Faba* (ソラマメ), *Ipomoea edulis* (サツマイモ), *Ginkgo biloba* (イチョウ) を用いた。植物の葉は、すべて午後一時頃に採取したものを使用した。

2) 酵素の調製

植物材料に2~3倍量の0.02M トリス緩衝液(pH 8.0)を加えて、Waring blenderを用いて3分間磨砕した。綿布を用いてろ過した後、12,500 rpmで30分間遠心分離した。得られた上澄液に固形硫酸アンモニウムを0.3飽和になるまで加えて25分間放置した後、12,500 rpmで20分間遠心分離をおこなって上澄液と沈殿部分とを分けた。その上澄液について同様の処置をおこない硫酸アンモニウムの0.5および0.7飽和の沈殿を得た。このようにして得られた沈殿をそれぞれ少量の0.02M トリス緩衝液に溶解し、遠心分離をおこなって不溶物を除いて後、0.005M トリス緩衝液に対して一夜透析した。透析によって生じた沈殿を遠心分離して除いた上澄液を粗酵素液として実験に供した。

3) 酵素活性の測定

(a) ADP-glucose pyrophosphorylase

酵素反応は、全量100 μ l中に1 μ moleのATP, 1.5 μ molesのglucose-1-phosphate, 1 μ moleの3-phosphoglycerate, 5 μ molesのNaF, 1 μ moleのMgCl₂ (一部はMnCl₂), 15 μ molesの緩衝液と20 μ lの粗酵素液を含む反応混合液を用いて、36°でおこなった。反応液に100 μ lの95% ethanol

を加えて反応を停止し、遠心分離をおこなって酵素タンパク質を除去した。その上澄液から100 μ lをマイクロベットでとり、東洋ろ紙 No. 5B上に巾2 cmの大きさに数回に分けて塗布した。展開剤として、ethanol—1M ammonium acetate, pH 7.5, (3:2)を用いて上昇法により約30 cm展開した。ミネラルランプを用いて紫外線を照射し、その吸収から生成物の位置を確めて、その部分を3×4 cm²の大きさに切り抜き、5 mlの0.1N HClを用いて2時間振盪抽出した。ガラスフィルターを用いて吸引ろ過した後、そのろ液について260 m μ の吸光度を測定した。盲試験値としては、粗酵素液を含まない反応混合液をろ紙につけて展開し、試料と同位置のところを3×4 cm²の大きさに切り取ったものについて得た260 m μ の吸光度を用いた。試料のときの吸光度の値と盲試験値の差から酵素活性を判定した。

(b) UDP-glucose pyrophosphorylase

酵素反応は、全量100 μ l中に0.75 μ moleのUTP, 1.5 μ molesのglucose-1-phosphate, 1 μ moleのMgCl₂, 5 μ molesのNaF, 15 μ molesの緩衝液と20 μ lの粗酵素液を含む反応混合液を用いて、36°で行なった。上記(a)と同様の操作によって、生成したUDP-glucoseの量を測定し、酵素活性を判定した。

(c) Sucrose synthetase

酵素反応は、全量100 μ l中に0.5 μ moleのUDP-glucose, 1 μ moleのfructose, 5 μ molesのNaF, 15 μ molesの緩衝液と20 μ lの粗酵素液を含む反応混合液を用いて、36°で行なった。加熱によって酵素反応を停止した後、Rorem等¹⁰⁾の方法に従って、生成したsucroseの量を比色定量した。

また、sucrose合成の逆反応によるUDP-glucose (ADP-glucose)の生成を測定する場合には、全量100 μ l中に3 μ molesのsucrose, 1 μ moleのUDP (ADP), 5 μ molesのNaF, 15 μ molesの緩衝液と20 μ lの粗酵素液を含む反応混合液を用いて、36°で反応を行なった。反応によって生成したfructoseの量をNelson法によって比色定量した。

4) 反応生成物の同定

酵素反応液に当量の95% ethanolを加えて反応

を停止させ、遠心分離を行なって酵素タンパク質を除去した。その上澄液について下記の3種類の paper chromatography をおこない、反応生成物の spot の位置と純品の spot の位置を比較することによって同定した。spots の検出は、ミネラルランプで紫外線を照射し、その紫外線の吸収によっておこなった。

(a) 東洋ろ紙 No. 3 を polyethylenimine で前処理したものを用い¹⁵⁾、0.25 M と 1 M の NaCl 溶液を展開剤として、上昇法により 10 cm 展開した。

(b) 東洋ろ紙 No. 5B を用いて、ethanol-1 M ammonium acetate buffer, pH 7.5, (3:2) を展開剤として、上昇法により約 30 cm 展開した。

(c) 東洋ろ紙 No. 5B を用いて、ethanol-1 M ammonium acetate buffer, pH 3.8, (2:1) を展開剤として、上昇法により約 30 cm 展開した。

実験結果

1) ADP-glucose pyrophosphorylase 活性

(a) ADP-glucose pyrophosphorylase による ADP-glucose の生成

Fig. 1 と Fig. 2 は、glucose-1-phosphate と ATP を含む混合液に、種々の植物から調製した粗酵素液を加えて反応をおこなわせた場合に得られた反応生成物の paper chromatogram である。それぞれ三種類の paper chromatogram において、対照として用いた化学的に合成した ADP-glucose の spot と一致する spot が得られた場合には、その植物材料に ADP-glucose pyrophosphorylase が存在するものと推定した。

葉からの粗酵素液を用いた場合には、いずれの植物においても ADP-glucose の生成が認められた (Fig. 1)。アメリカヤマゴボウとソバの酵素標品では、二価の金属イオンとして Mn^{++} を添加した場合にその生成が認められた。

一方、貯蔵組織からの粗酵素液を用いた場合には (Fig. 2)、イチヨウ、エンドウ、ソラマメ、ソバ等で ADP-glucose の生成が認められたが、その他の7種類の植物では少なくとも反応時間が4時間まではその生成が確認出来なかった。

ADP-glucose pyrophosphorylase の存在は、葉

Fig. 1. Diagrams showing the paper chromatograms of ADP-glucose produced from glucose-1-phosphate and ATP by enzyme preparations from leaves of various higher plants.

The reaction mixture containing glucose-1-phosphate (1.5μ moles), ATP (1μ mole), 3-phosphoglycerate (1μ mole), NaF (5μ moles), $MgCl_2$ (1μ mole) and an enzyme solution (20μ l) in total volume of 100μ l were incubated for 60 min at 36° . The reaction was stopped by adding 0.1 ml of 75% ethanol. The supernatants obtained by centrifugation were concentrated and chromatographed on paper with: I, Ethanol-1 M ammonium acetate, pH 3.8, (2:1); II, ethanol-1 M ammonium acetate, pH 7.5, (3:2); III, 0.25 M NaCl (developed on polyethylenimine-pretreated paper); IV, 1 M NaCl (on polyethylenimine-pretreated paper). A, *Brassica oleracea*; B, *Brassica campestris*; C, *Brassica perviridis*; D, *Spinacia oleracea*; E, *Phytolacca americana*; F, *Chenopodium album*; G, *Solanum tuberosum*; H, *Humulus japonicus*; I, *Hydrangea macrophylla*; J, *Cirsium Tanakae*; K, *Pueraria Thunbergiana*; L, *Fagopyrum esculentum*; S, authentic samples.

Fig. 2. Diagrams showing the paper chromatograms of ADP-glucose produced from glucose-1-phosphate and ATP by enzyme preparations from storage tissues of various higher plants.

Experimental condition was the same as that of Fig. 1. I, Ethanol-1M ammonium acetate, pH 3.8, (2:1); II, ethanol-1M ammonium acetate, pH 7.5, (3:2); III, 0.25 M NaCl (developed on polyethylenimine pretreated paper); IV, 1N NaCl (on polyethylenimine pretreated paper).

A, *Glycine Max*; B, *Glycine Max* (aomame); C, *Phaseolus vulgaris*; D, *Pisum sativum*; E, *Phaseolus angularis*; F, *Vigna sinensis*; G, *Vicia Faba*; H, *Ipomoea edulis*; I, *Solanum tuberosum*; J, *Ginkgo biloba*; K, *Fagopyrum esculentum*; S, authentic samples.

においては普遍的であると考えられるが、デンプン貯蔵組織においてはむしろ普遍的とは考え難いようである。

(b) 硫酸アンモニウム分画と酵素活性

それぞれの植物材料の抽出液について得られた各硫酸アンモニウム分画沈殿部分における ADP-

glucose pyrophosphorylase の活性を Table 1 に示した。ADP-glucose pyrophosphorylase の活性は、硫酸アンモニウムの 0—0.3 飽和沈殿部分あるいは 0.3—0.5 飽和沈殿部分のいずれかにみられ、0.5—0.7 飽和沈殿部分では殆んどその活性はみられなかった。葉からの粗酵素についてみると、アメリカヤマゴボウの活性が最も弱く、アジサイ、ノハラアザミ、クズ等の活性が比較的弱いようである。貯蔵組織からの粗酵素についてみると、イチョウ以外は非常にその活性が弱かった。

(c) 最適 pH

それぞれ酵素活性の強い硫酸アンモニウム分画を用いて、pH の影響を検討した (Fig. 3 と Fig. 4). ADP-glucose pyrophosphorylase の活性に対する最適 pH は、8.0—9.5 の間にあった。この値は、コムギ¹⁾ やトウモロコシ²⁾ について得られている値 (7.5—8.5) に比べてややアルカリ側に寄っている。

Fig. 3. Effect of pH on the activity of ADP-glucose pyrophosphorylase from leaves of various higher plants.

Experimental condition was the same as that of Fig. 1. x, Tris-maleate buffer; ●, glycine buffer. A, *Humulus japonicus*; B, *Chenopodium album*; C, *Phytolacca americana*; D, *Hydrangea macrophylla*; E, *Solanum tuberosum*; F, *Pueraria Thunbergiana*; G, *Cirsium Tanakae*; H, *Fagopyrum esculentum*; I, *Spinacia oleracea*; J, *Brassica campestris*; K, *Brassica perviridis*; L, *Brassica oleracea*.

Table 1. Activity of ADP-glucose pyrophosphorylase in enzyme preparations fractionated with ammonium sulfate.

Enzyme source		Activity (m μ moles/hr/mg protein*)		
		Ammonium sulfate saturation 0—0.3	0.3—0.5	0.5—0.7
Leaves	<i>Phytolacca americana</i>	10	43	12
	<i>Chenopodium album</i>	37	150	44
	<i>Hydrangea macrophylla</i>	0	110	0
	<i>Humulus japonicus</i>	450	0	0
	<i>Cirsium Tanakae</i>	110	30	0
	<i>Pueraria Thnnbergiana</i>	95	0	0
	<i>Solanum tuberosum</i>	28	280	0
	<i>Brassica oleracea</i>	250	20	0
	<i>Brassica campestris</i>	100	380	0
	<i>Spinacia oleracea</i>	110	230	0
	<i>Fagopyrum esculentum</i>	150	0	0
	<i>Brassica perviridis</i>	80	250	0
Storage tissues	<i>Glycine Max</i>	0	0	0
	<i>Glycine Max</i> (aomame)	0	0	0
	<i>Phaseolus vulgairs</i>	0	0	0
	<i>Pisum sativum</i>	0	25	0
	<i>Phaseolus angularis</i>	0	0	0
	<i>Vicia Faba</i>	20	0	0
	<i>Vigna sinensis</i>	0	0	0
	<i>Ipomoea edulis</i>	0	0	0
	<i>Solanum tuberosum</i>	0	0	0
	<i>Ginkgo biloba</i>	910	0	0
	<i>Fagopyrum esculentum</i>	90	48	0

* Protein contents were calculated roughly from the extinctions at 260 and 280 m μ .

2) UDP-glucose pyrophosphorylase 活性

(a) UDP-glucose pyrophosphorylase による UDP-glucose の生成

Fig. 5 と Fig. 6 は, glucose-1-phosphate と UTP を含む混合液に, それぞれの植物から得た粗酵素液を加えて反応を行なわせた場合に得られた反応生成物の paper chromatogram である. それぞれ 3 種類の paper chromatogram において, 対照として用いた UDP-glucose の spot と一致する spot が得られた場合には, その植物材料に UDP-glucose pyrophosphorylase が存在するものと推定した. 葉からの粗酵素についてみると, アジサイを除くすべての植物材料で UDP-glucose pyrophosphorylase の活性が認められた. また, 貯蔵

組織についても, 実験に供したすべての植物でその活性が認められた. このように UDP-glucose pyrophosphorylase は, 葉および貯蔵組織に普遍的に存在していると考えられる.

(b) 硫酸アンモニウム分画と酵素活性

Table 2 は, 各硫酸アンモニウム分画沈殿部分における UDP-glucose pyrophosphorylase の活性を示したものである. UDP-glucose pyrophosphorylase の場合は, 各分画においてその活性がみられるものが多かった. しかし, 一般的傾向としては, 0.5 飽和以下の部分に強い活性がみられた. キャベツの葉からの粗酵素液は例外的であり, 0.5-飽和沈殿部分に強い活性が得られた.

(c) 最適 pH

Fig. 4. Effect of pH on the activity of ADP-glucose pyrophosphorylase from storage tissues of various higher plants.

×, Tris-maleate buffer; ●, glycine buffer. A, *Vicia Faba*; B, *Fagopyrum esculentum*; C, *Ginkgo biloba*; D, *Pisum sativum*.

それぞれ酵素活性の強い硫酸アンモニウム分画を用いて、酵素活性におよぼす pH の影響を検討した (Fig. 7 と Fig. 8). ホウレンソウ、カブ、コマツナ、アメリカヤマゴボウ等の葉の酵素の最適 pH は 7.5-8.0 にあるが、他の植物の葉および貯蔵組織の酵素の最適 pH は 9.0-9.5 にあった。

3) Sucrose synthetase 活性

(a) 硫酸アンモニウム分画と酵素活性

それぞれの植物材料の抽出液から得た各硫酸アンモニウム分画沈殿部分について、sucrose synthetase 活性の有無を検討した結果は、Table 3 でみられるようであった。

植物生葉の場合には、アジサイとノハラアザミの sucrose synthetase の活性は非常に弱くて判定し難いが、他の植物ではいずれも強い活性がみられた。また、その活性は、キャベツの葉の場合を除いて、硫酸アンモニウムの 0.5 飽和以下の沈殿部分に強く

みられた。貯蔵組織の場合にも、硫酸アンモニウムの 0.5 飽和以下の沈殿部分に強い活性がみられた。

(b) 最適 pH

それぞれ酵素活性の強い硫酸アンモニウム分画を用いて、酵素活性におよぼす pH の影響を検討した (Fig. 9 Fig. 10). ホウレンソウの葉の sucrose synthetase の最適 pH だけは、6.5 にあったが、

Fig. 5. Diagrams showing the paper chromatograms of UDP-glucose produced from glucose-1-phosphate and UTP by enzyme preparations from leaves of various higher plants.

The reaction mixtures containing glucose-1-phosphate (1.5 μ moles), UTP (0.75 μ mole), NaF (5 μ mole), $MgCl_2$ (1 μ mole) and an enzyme solution (20 μ l) in total volume of 100 μ l were incubated for 60 min at 36°. The reaction products were subjected to paper chromatography with solvent systems: I, Ethanol-1N ammonium acetate, pH 3.8, (2:1); II, ethanol-1M ammonium acetate, pH 7.5, (3:2); III, 0.25M NaCl (developed on polyethylenimine-pretreated paper). A, *Brassica oleracea*; B, *Brassica campestris*; C, *Brassica perviridis*; D, *Spinacia oleracea*; E, *Phytolacca americana*; F, *Chenopodium album*; G, *Solanum tuberosum*; H, *Humulus japonicus*; I, *Hydrangea macrophylla*; J, *Cirsium Tanakae*; K, *Pueraria Thunbergiana*; L, *Fagopyrum esculentum*; S, authentic samples.

Fig. 6. Diagrams showing the paper chromatograms of UDP-glucose obtained from glucose-1-phosphate and UTP by enzyme preparations from storage tissues of various higher plants.

Experimental condition was the same as that of Fig. 5. I, Ethanol-1 M ammonium acetate, pH 3.8 (2:1); II, ethanol-1 M ammonium acetate, pH 7.5, (3:2); III, 0.25 M NaCl (developed on polyethylenimine-pre-treated paper). A, *Glycine Max*; B, *Glycine Max* (aomame); C, *Phaseolus vulgaris*; D, *Pisum sativum*; E, *Phaseolus angularis*; F, *Vigna sinensis*; G, *Vicia Faba*; H, *Ipomoea edulis*; I, *Solanum tuberosum*; J, *Ginkgo biloba*; K, *Fagopyrum esculentum*; S, authentic samples.

Table 2. Activity of UDP-glucose pyrophosphorylase in enzyme preparations fractionated with ammonium sulfate

Enzyme source		Activity (m μ moles/hr/mg protein*)		
		Ammonium sulfate saturation		
		0—0.3	0.3—0.5	0.5—0.7
Leaves	<i>Phytolacca americana</i>	230	180	60
	<i>Chenopodium album</i>	810	86	40
	<i>Hydrangea macrophylla</i>	0	0	0
	<i>Humulus japonicus</i>	480	90	50
	<i>Cirsium Tanakae</i>	330	30	0
	<i>Pueraria Thunbergiana</i>	95	120	0
	<i>Solanum tuberosum</i>	55	95	0
	<i>Brassica oleracea</i>	0	120	550
	<i>Brassica campestris</i>	170	380	70
	<i>Spinacia oleracea</i>	110	230	60
	<i>Fagopyrum esculentum</i>	140	150	0
	<i>Brassica perviridis</i>	90	380	86
Storage tissues	<i>Glycine Max</i>	160	22	0
	<i>Glycina Max</i> (aomame)	430	110	40
	<i>Phaseolus vulgaris</i>	210	13	0
	<i>Ipomoea edulis</i>	0	210	15
	<i>Pisum sativum</i>	220	20	0
	<i>Solanum tuberosum</i>	130	65	25
	<i>Phaseolus angularis</i>	80	40	0
	<i>Vigna sinensis</i>	180	20	3
	<i>Vicia Faba</i>	15	50	20
	<i>Ginkgo biloba</i>	100	130	30
	<i>Fagopyrum esculentum</i>	45	90	70

* Protein contents were calculated roughly from the extinctions at 260 and 280 m μ .

Fig. 7. Effect of pH on the activity of UDP-glucose pyrophosphorylase from leaves of various higher plants.

Experimental condition was the same as that of Fig. 5. ×, Tris-maleate buffer; ●, glycine buffer. A, *Humulus japonicus*; B, *Chenopodium album*; C, *Phytolacca americana*; D, *Solanum tuberosum*; E, *Pueraria Thuubergiana*; F, *Cirsium Tanakae*; G, *Fagopyrum esculentum*; H, *Spinacia oleracea*; I, *Brassica campestris*; J, *Brassica perviridis*; K, *Brassica oleracea*.

その他の多くの植物の葉および貯蔵組織の酵素の最適 pH はともにアルカリ側 (pH 8.5-9.5) にあった。この後者の値は、ジャガイモ塊茎の sucrose synthetase について得られた値^{14,16)}に近い。

(c) Sucrose 分解反応による UDP-glucose の生成

Sucrose synthetase 活性の強い硫酸アンモニウム分画を用いて、sucrose と UDP から UDP-glucose と fructose が生成する反応系を検討した。この実験条件 (sucrose 終濃度が 30 mM) のもとでは、貯蔵組織ではソラマメを除くすべての植物起源の酵素で UDP-glucose の生成がみられたが、葉の場合には、キャベツ、カブ、コマツナおよびアカザの酵素において UDP-glucose の生成が確認された。Fig. 11 はこれらの酵素の活性におよぼす pH

の影響を調べたものである。キャベツ、カブ、コマツナの葉およびソバ、インゲンマメ、ダイズ、アズキ、イチョウ等の種子の酵素の最適 pH はすべて 8.0-9.0 にあり、sucrose 合成反応の場合の最適 pH とほとんど同じ範囲であったが、アカザの葉およびササゲ、エンドウ、アオマメ、ジャガイモ、サツマイモ等の種子の酵素の最適 pH は 9.5-7.5 にあり、sucrose 合成反応の場合の最適 pH に比べてかなり中性の方へ移動している。このような現象は Pressey¹⁶⁾もジャガイモ塊茎の sucrose synthetase について報告している。

Sucrose synthetase による ADP-glucose の生成についても検討したが、この実験条件下では、キャベツと葉の酵素の場合にその生成が確認されただけで、他の植物については不成功に終わった。Pressey の場合にも、ADP-glucose の生成は非常に弱く、UDP-glucose の場合の約 1/12 程度である

Fig. 8. Effect of pH on the activity of UDP-glucose pyrophosphorylase from storage tissues of various higher plants.

Experimental condition was the same as that of Fig. 5. ×, Tris-maleate buffer; ●, glycine buffer. A, *Glycine Max*; B, *Glycine Max* (aomame); C, *Phaseolus angularis*; D, *Vigna sinensis*; E, *Pisum sativum*; F, *Vicia Faba*; G, *Fagopyrum esculentum*; H, *Ipomoea edulis*; I, *Solanum tuberosum*; J, *Ginkgo biloba*; K, *Phaseolus vulgaris*.

Table 3. Activity of sucrose synthetase (UDP-glucose: D-fructose 2-glucosyltransferase) in enzyme preparations fractionated with ammonium sulfate.

Enzyme source		Activity (μ moles/hr/mg protein*)		
		Ammonium sulfate saturation 0—0.3	0.3—0.5	0.5—0.7
Leaves	<i>Phytolacca americana</i>	220	25	0
	<i>Chenopodium album</i>	180	230	35
	<i>Hydrangea macrophylla</i>	20	35	20
	<i>Humulus japonicus</i>	1,180	15	0
	<i>Cirsium Tanakae</i>	55	50	50
	<i>Pueraria Thunbergiana</i>	520	50	50
	<i>Solanum tuberosum</i>	0	220	0
	<i>Brassica oleracea</i>	0	60	750
	<i>Brassica campestris</i>	30	190	25
	<i>Brassica perviridis</i>	20	125	25
	<i>Spinacia oleracea</i>	150	210	120
	<i>Fagopyrum esculentum</i>	150	85	0
Storage tissues	<i>Glycine Max</i>	580	20	0
	<i>Glycine Max</i> (aomame)	170	430	0
	<i>Phaseolus vulgaris</i>	40	80	0
	<i>Ipomoea edulis</i>	120	1,260	25
	<i>Pisum sativum</i>	60	180	0
	<i>Solanum tuberosum</i>	15	450	0
	<i>Phaseolus angularis</i>	50	120	0
	<i>Vigna sinensis</i>	210	90	9
	<i>Vicia Faba</i>	50	110	20
	<i>Ginkgo biloba</i>	200	130	40
	<i>Fagopyrum esculentum</i>	130	110	80

* Protein contents were calculated roughly from the extinctions at 260 and 280 $m\mu$.

Fig. 9. Effect of pH on the activity of sucrose synthetase from leaves of various higher plants.

The reaction mixtures containing UDP-glucose (0.5μ mole), fructose (1μ mole), NaF (5μ mole) and an enzyme solution (20μ l) in total volume of 100μ l were incubated for 60 min at 36° . x, Tris-maleate buffer; ●, glycine buffer. A, *Brassica oleracea*; B, *Brassica perviridis*; C, *Spinacia oleracea*; D, *Phytolacca americana*; E, *Brassica campestris*; F, *Pueraria Thunbergiana*; G, *Cirsium Tanakae*; H, *Hydrangea macrophylla*; I, *Chenopodium album*; J, *Humulus japonicus*; K, *Fagopyrum esculentum*; L, *Solanum tuberosum*.

Fig. 10. Effect of pH on the activity of sucrose synthetase from storage tissues of various higher plants.

Experimental condition was the same as that of Fig. 9. $\times$, Tris-maleate buffer; $\bullet$, glycine buffer. A, *Glycine Max*; B, *Phaseolus vulgaris*; C, *Phaseolus angularis*; D, *Vigna sinensis*; E, *Vicia Faba*; F, *Glycine Max* (aomame); G, *Ginkgo biloba*; H, *Ipomoea edulis*; I, *Pisum sativum*; J, *Solanum tuberosum*; K, *Fagopyrum esculentum*.

考 察

高等植物の葉における ADP-glucose pyrophosphorylase の存在は、これまでも、ハウレンソウ⁴⁾、サトウダイコン⁵⁾、オオムギ⁵⁾、トマト⁵⁾、タバコ⁵⁾、ソラマメ⁵⁾ 等について報告されている。われわれの実験の結果によると、12種類の植物の葉からの酵素標品は、いずれも ADP-glucose pyrophosphorylase 活性が認められ、従来の結果を支持したばかりではなく、さらに新しい知見も加えられた。この事実は、高等植物の葉には、ADP-glucose pyrophosphorylase が普遍的に存在していることを暗示している。これに対して、デンプン貯蔵組織における ADP-glucose pyrophosphorylase の存在は、われわれの実験の結果によれば、11種類の植物のうちわずかに4種類において酵素活性が確認さ

れただけである。いままでも、トウモロコシ²⁾、イネ³⁾、コムギ¹⁾の種子についてその存在が報告されているが、この実験結果を考え合わせると、その存在が普遍的であるとは考え難い。これらの事実は、葉のデンプン合成酵素¹⁷⁾が ADP-glucose に特異的であるということと関連して考えると、非常に興味深い。

高等植物における UDP-glucose pyrophosphorylase の存在は、エンドウの芽生え⁶⁾、エンドウ種子⁷⁾、トウモロコシ種子⁸⁾等について報告されているが、われわれの実験の結果でも、殆んどすべて

Fig. 11. Effect of pH on the synthesis of UDP-glucose from sucrose and UDP by sucrose synthetases from leaves (A-D) and storage tissues (E-N) of various higher plants.

The reaction mixtures containing sucrose (3 μ moles), UDP (1 μ mole), NaF (5 μ moles), and an enzyme solution (20 μ l) in total volume of 100 μ l were incubated for 60 min at 36°. $\times$, Tris-maleate buffer; $\bullet$, glycine buffer. A, *Brassica oleracea*; B, *Brassica campestris*; C, *Brassica perviridis*; D, *Chenopodium album*; E, *Vigna sinensis*; F, *Pisum sativum*; G, *Fagopyrum esculentum*; H, *Ipomoea edulis*; I, *Ginkgo biloba*; J, *Phaseolus vulgaris*; K, *Glycine Max* (aomame); L, *Glycine Max*; M, *Phaseolus angularis*; N, *Solanum tuberosum*.

の植物材料からの酵素標品でその活性が確かめられた。これらの事実は、UDP-glucose pyrophosphorylase が高等植物では葉にも貯蔵組織にも普遍的に存在していることを示していると考えられる。

高等植物における sucrose synthetase の存在は、多くの植物について報告されている⁸⁻¹⁴⁾。われわれの今回の実験の結果によると、sucrose synthetase は、実験に供したすべての植物についてその活性が確かめられ、従来の結果を支持し、さらに一般化した。しかし、sucrose synthetase による sucrose から UDP-glucose の生成は、貯蔵組織の場合は殆んどすべての植物において確かめられたが、葉の場合は少数の植物において確かめられたにすぎない。この sucrose から UDP-glucose を生成する反応系の場合には、酵素活性の最適 pH が中性に移動するものが半数例あったことは注目に値する。このような現象については、Pressey¹⁶⁾ もジャガイモ塊茎の酵素について報告している。

葉のデンプン合成酵素が ADP-glucose だけを利用し¹⁷⁾、貯蔵組織のデンプン合成酵素が ADP-glucose と UDP-glucose の双方を利用し¹⁸⁻²⁰⁾ いう事実と、ADP-glucose pyrophosphorylase が葉に普遍的に存在し、貯蔵組織では存在しないか、しても活性が弱いという事実や、一方 UDP-glucose pyrophosphorylase と UDP-glucose を利用する sucrose synthetase が葉にも貯蔵組織にも普遍的に存在し、特に貯蔵組織には sucrose から UDP-glucose を生じる反応系 (sucrose 合成の逆反応) も一般的に見られるという事実は、葉および貯蔵組織におけるデンプンの生合成にこれらの酵素が重要な生理的役割を果していることを暗示しているように思われる。

摘 要

酵素起源を広く高等植物に求め、それらの葉あるいは貯蔵組織から調製した酵素標品について、ADP-glucose pyrophosphorylase, UDP-glucose pyrophosphorylase および sucrose pyntetase 活性を調査した。

1) ADP-glucose pyrophosphorylase 活性は、葉からの酵素標品では、実験に供した 12 種類の植物のすべてにおいて確認されたが、貯蔵組織の酵素標

品では、11 種類の植物のうち 4 種類の植物について確認されたにすぎない。

2) UDP-glucose pyrophosphorylase 活性は、アジサイの葉以外のすべての植物材料において確認された。

3) UDP-glucose から sucrose を作る sucrose synthetase 活性は、UDP-glucose pyrophosphorylase と同様にすべての植物で確認された。しかし、sucrose 分解反応系による UDP-glucose の生成は、貯蔵組織の場合にはすべての植物で確認されたが、葉の場合には 4 種類の植物でみられたにすぎなかった。sucrose から ADP-glucose を作る sucrose sythetase は二、三の葉についてしか検出できなかった。

終りに、種々のご意見をいただいた東京教育大学理学部植物学教室西沢一俊教授および中村佐兵衛助教授に深く感謝いたします。

文 献

- 1) Espada, J., J. Biol. Chem. 237: 3577 (1962).
- 2) Dickinson, D. B. and Preiss, J., Arch. Biochem. Biophys. 130: 119 (1969).
- 3) Murata, T., Sugiyama, T. and Akazawa, T., Arch. Biochem. Biophys. 107: 92 (1964).
- 4) Ghosh, H. P. and Preiss, J., J. Biol. Chem. 240: 960 (1965).
- 5) Sanwal, G. G., Greengerg, E., Hardie, J., Cameron, E. C. and Preiss, J., Plant Physiol. 43: 417 (1968).
- 6) Ginsburg, V., J. Biol. Chem. 235: 55 (1958).
- 7) Turner, D. H. and Turner, J. F., Biochem. J. 69: 448 (1958).
- 8) Vidra, J. D. and Loerch, J. D., Biochim. Biophys. Acta 159: 551 (1968).
- 9) Cardini, C. E., Leloir, L. F. and Chiriboga, J., J. Biol. Chem. 214: 149 (1955).
- 10) Rorem, E. S., Walker, H. G., and McCready, R. M., Plant Physiol. 35: 269 (1960).
- 11) Dutton, J. V., Carruthers, A. and Oldfield, J. F. T., Biochem. J. 81: 266 (1961).
- 12) Hatch, M. D., Sacher, J. A. and Glasziou, K. T., Plant Physiol. 38: 338 (1963).
- 13) Nakamura, M., Bull. Agr. Chem. Soc. (Japan). 23: 398 (1959).
- 14) Slabnik, E., Frydman, R. B. and Cardini, C. E., Plant Physiol. 43: 1063 (1968).

- 15) Randerath, K., J. Chromatog. 10: 235 (1963).
- 16) Pressey, R., Plant Physiol. 44: 759 (1969).
- 17) Murata, T. and Akazawa, T., Biochem. Biophys. Res. Comm. 16: 6 (1964).
- 18) Frydman, R. B., Arch. Biochem. Biophys. 102: 242 (1963).
- 19) Murata, T., Minamikawa, T. and Akazawa, T., Biochem. Biophys. Res. Comm. 13: 439 (1963).
- 20) Frydman, R. B. and Cardini, C. E., J. Biol. Chem. 242: 312 (1967).