- teriology, 7th ed. (1957).
- (10) R. E. Buchanan : General Systematic Bacteriology, Williams and Wilkins Co. Baltimore, Md. (1925).
- (11) R. H. Mees : "Onderzoekingen over de Biersarcina", Doctoral Thesis, Groningen (1934).
- (12) C. S. Pederson : *Bact. Rev.*, 16, 227 (1952).
- (13) C. S. Pederson, M. N. Albury, R. S. Breed : *Wallerstein Lab. Comm.*, 17, 7 (1954).
- (14) 北原覚雄 : 友田等編, 微生物工学講座, 6 巻, p. 60, 共立出版 (昭 31).
- (15) 北原覚雄 : 私信.
- (16) J. C. Shimmell, W. F. Kirkpatrick : *J. Inst. Brewing*, 45, 137 (1939).
- (17) J. C. Shimwell : *J. Inst. Brewing*, 54, 100 (1948).
- (18) L. Pasteur : "Etudes sur la biere", Paris (1876.6).
- (19) E. C. Hansen : *Compt. rend. trab. Lab. Carlsberg*, 1, 185 (1879); *Z. ges Braw.*, 13, 4 (1890).
- (20) J. Balcke : *Wshr. f. Brauerei*, 1, 181 257 (1884).
- (21) P. Lindner : *Wshr. f. Brauerei*, 4, 23 (1887); *Centr. f. Bakt.*, 4, 427 (1888); *Wshr. f. Brauerei*, 6, 181 (1889).
- (22) N. H. Claussen : *Compt. rend. trab. Lab. Carlsberg*, 6, 64 (1903).
- (23) P. R. Sollied : *Centr. f. Bakt.*, II, 11, 708 (1903).
- (24) W. Henneberg : "Handbuch der Gärungs-bakteriologie", Vols. I and II, Parey, Berlin (1926).
- (25) 北原覚雄 : 本誌, 16, 714 (1940).
- (26) 松下憲次 : 本誌, 13, 635 (1937).
- (27) 石丸義夫 : 本誌, 9, 859, 953, 1143 (1933).
- (28) E. A. Felton, J. B. Evans, H. W. Seeley : *J. Bact.*, 67, 486 (1954).
- (29) R. R. Gutekunst, E. A. Delwiche, H. W. Seeley : *J. Bact.*, 74, 693 (1957).
- (30) 斎藤賢道 : *Centr. f. Bakt.*, II, 17, 20, 152 (1907).
- (31) 香川醬油試験場 : 香川醬試, 48, 6 (1955).

米でんぷんの生化学的研究 (第4報)*

乳熟期の粳中に存在する糖磷酸塩及び単糖, 少糖類について

倉沢文夫, 伊賀上郁夫, 早川利郎, 大上 宏 (新潟大学農学部)

昭和 33 年 8 月 29 日 受理

緒 論

乳熟期の粳中には多量のでんぷんが合成される。このでんぷんの合成にはフォスフォリラーゼの関与が考えられる。

Cori⁽¹⁾ は動物の筋肉組織中にフォスフォリラーゼを発見し, ぶどう糖-1-磷酸からグリコーゲンが酵素的に合成されることを明らかにした。一方 Hanes⁽²⁾ によって植物界にもフォスフォリラーゼが存在していて, この酵素によってでんぷんが合成されることを認めている。よって植物体内におけるでんぷんの合成も恐らくフォスフォリラーゼの作用によってぶどう糖-1-磷酸を経て行われるものであらうと想像されるようになった。

相見, 村上等⁽³⁾ はぶどう糖-1-磷酸 (G-1-P と略記す) 溶液中に水稻種実の徒手切片を入れておいたのに種実切片中にでんぷんが生成されることを認め, フォスフォリラーゼの存在を認めている。フォスフォリラーゼは, G-1-P よりでんぷんを合成する。でんぷんの合成作用の強い乳熟期の粳中には G-1-P の存在が予想される。しかるにこれについての研究は殆んどない。依って私達は乳熟期の粳中で G-1-P の検索と更に糖類の検索を行ったので, その結果を報告する。

実 験 の 部

I. 糖 磷 酸 塩

1. 実験の方法 :

(1) 試料の調製 : 乳熟期の稲穀を使用して G-1-P のカリウム塩の抽出を試みた。この抽出方法は Schnei-

* Biochemical Studies of Rice Starch. Part IV. Sugar-Phosphate, Monosaccharide and Oligosaccharide in the Seedrice at the Milky Stage.

By Humio KURASAWA, Ikuro IGAUE, Toshiro HAYAKAWA and Hiroshi OGAMI (Niigata University, Department of Agriculture)

第 1 図 試料の調製

ル : 水 = 4 : 1 : 1.5, *n*-butyric acid : 0.5N-NH₄OH = 10 : 6, isopropanol : CCl₃COOH : conc. NH₄OH : H₂O = 75 ml : 5 g : 0.3 ml : 25 ml を用い, 呈色剤⁽¹⁰⁾には 1% アニリン塩酸塩のメタノール溶液及び 2% オルシン磷酸メタノール溶液を用いた。展開後呈色剤を噴霧, 直ちに 120~130° の恒温乾燥器中に入れて発色状態をしらべた。

糖磷酸エステル⁽¹¹⁾の検出 : 東洋濾紙 No. 50 を 2N 塩酸で処理したものを用いた。淡黄色の粉末 (S₁) を少量の水に溶かし, H⁺ 型にした Amberlite IR-120 を存在する磷酸 1 mg あたり約 1 ml の割合で添加して攪拌する。上澄液を試料とした。展開剤には *n*-butyric acid : 0.5N-NH₄OH = 10 : 6, isopropanol : CCl₃COOH : conc. NH₄OH : H₂O = 75 ml : 5 g : 0.3 ml : 25 ml を用い, 呈色剤にはモリブデン試薬を用いた。室温で展開後濾紙を風乾し, モリブデン試薬を噴霧し, 風乾後恒温乾燥器中で 85~90° で 2 分間加熱した後紫外線を照射した。約 10 分間照射すると磷酸化合物の存在する部位は青色に発色した。発色した濾紙を放置しておくで紙全面にわたって青色になるが, アンモニアに曝せば再び呈色する。

der⁽⁴⁾ の磷酸化合物分割定量法と中村⁽⁵⁾ の G-1-P 調製の両操作を併用して抽出を行った。

稲籾は新潟県農試阿賀野川試験地にて栽培した越米, 農林 43 号を用いた。試料の調製法は第 1 図の如くである。

(2) 無機磷酸および全磷酸の測定法 : 無機磷酸の定量は中村, 山崎, 丸尾等⁽⁶⁾ の報告に記載してある方法により, 全磷酸の定量は中村⁽⁷⁾ の報告に記載してある方法によって行った。無機磷酸の定量には 10 ml 容のメスフラスコに 15 vol% H₂SO₄, アミドール試薬, モリブデン試薬を夫々 1.0 ml 宛入れ, 更に適量の磷酸 (5~80 γP) を含む被検試料を加え, 蒸留水にて 10 ml とする。良く混合して 20° で 20 分間放置し, 光電比色計にて S 72 の濾光板を用いて燐の量を求めた。又全磷酸の定量には分解コルベンに適量の P を含む試料 (0.5 ml) を採り, 15 vol% H₂SO₄ 1.1 ml を加え, ミクロバーナー上にて燃焼する。内容が黒化し H₂SO₄ の白煙が生じて来たら加熱をやめ, 一たん冷却後 30% H₂O₂ 1~2 滴を加えて加熱を続け, 液が透明になった後, 更に 2 分間許り加熱して過剰の H₂O₂ を除去する。冷却後蒸留水を加え, 更にアミドール試薬, モリブデン試薬を夫々 1.0 ml を加え, 更に蒸留水を加えて 10 ml として, 無機磷酸の場合と同様にして燐を求めた。

(3) 還元糖の定量 : 乳熟期の水稻種実より抽出した淡黄色の粉末 (S₁, G-1-P のカリウム塩に相当する部分) を 1N 硫酸で 100°, 7 分間加水分解によって生じた分解物を Hanes 法^(8,9) によって還元糖を定量した。

(4) ペーパークロマトグラフィーによる検索

還元糖の検出 : 淡黄色の粉末 S₁ は G-1-P の K₂ 塩と考えられるので, カチオン交換樹脂 IR-120 にてカリウムイオンを除いた後アニオン交換樹脂 IRA-400 にて G-1-P 部を吸着, 溶出して共存する無機イオンを除去した。得られた G-1-P 部を未水解及び水解したものについてペーパークロマトグラフィー (PC と略記す) を行った。展開剤にはブタノール : メタノール

2. 実験の結果

(1) 遊離無機磷及び7分磷を定量して G-1-P の量を求める方法 : S_1 44.4 mg を蒸留水 10 ml に溶解させ, これの無機磷 (Pi と略す) を測定し, 更に7分磷 (7 min-P と略す) を測定する. 7 min-P の測定には試料 S_1 44.4 mg を 10 ml にとかし, これより 1 ml を採り, これに蒸留水 2 ml, 15 vol% H_2SO_4 1 ml を加え, 7 分間加水分解する. これにアミドール試薬, モリブデン試薬 1 ml を加えて後 10 ml にする. この溶液について P を測定する. 7 min-P-Pi 即ち Δ_7 -P は G-1-P の P とみなすことができる. 測定の結果 S_1 中には G-1-P $K_2 2H_2O$ として 2.27% を含んでいた.

(2) 還元糖を定量して G-1-P の量を求める方法 : S_1 98.11 mg を蒸留水 25 ml に溶解させ, これより 5 ml をとって Hanes の微量糖定量法によって還元糖を定量した. 試料 100 mg 当り遊離還元糖 18.45 mg, 又試料 100 mg を 7 分 1 N H_2SO_4 にて加水分解した時に生成される還元糖 19.46 mg. よってぶどう糖量は 1.01 mg, G-1-P- K_2 塩は 2.08 mg となる. よって G-1-P- $K_2 2H_2O$ として 2.12% 含まれていることになる.

以上のように粉末 S_1 中には 2% 内外の G-1-P- $K_2 2H_2O$ が含まれることが明らかとなった.

(3) G-1-P 以外の糖磷化合物について : S_1 部分には G-1-P 以外に当然 G-6-P も含まれている部分である. 依って S_1 部分に G-6-P が存在するか否かについて検討した. 前項の実験で S_1 部分は加水分解前に還元性物質が存在していた. この還元性物質は遊離糖又は G-6-P と考えられる. S_1 部分は G-1-P- K_2 塩のエタノールによる精製を反覆行ったので遊離糖は殆んどないものと思われる. 依って G-6-P の存在が考えられる.

加水分解時間	無機磷 Pi	無機磷の増加	各区分の無機磷
0 分 (Pi)	13.5 γ	—	—
7 分 (7min-P)	20.6	7.1	7.1
3 時間	44.2	30.7	23.6
5 時間	54.8	41.3	10.6
8 時間	57.0	43.5	2.2

G-6-P は G-1-P に比して加水分解されにくい. よって次の実験を行った. 試料 S_1 をアブデルハルデン乾燥器にて 80° で乾燥し, 無水物となし, 無水物 29.8 mg を蒸留水 10 ml に溶解する. これより 1 ml をとり, これに水 2 ml, 15 vol% H_2SO_4 1 ml を加える. そして 7 分, 3 時間, 5 時間, 8 時間加水分解後, 7 分磷測定の時と同様にして無機磷を定量した. 結果は第 1 表のようである. 但し 1 ml 中の無機磷の量.

従って 7 分磷 (G-1-P) 以外に 7 分磷より加水分解されがたい糖磷化合物の存在が考えられる.

(4) ペーパークロマトグラフィーによる検出 :

(a) 呈色剤として糖を検出する試薬を用いた場合の糖磷化合物の検出 : 前述のように展開剤として isopro-

写真 1 糖を検出する呈色剤による糖磷化合物の検出

写真 2 糖を検出する呈色剤による糖磷化合物の検出

panol : CCl_3COOH : conc. NH_4OH , *n*-butyric acid : 0.5 N- NH_4OH , ブタノール : メタノール : H_2O 等を用い, 呈色剤はアニリン塩酸塩を用いた. 今展開剤として isopropanol : CCl_3COOH : conc. NH_4OH を用いた結果は写真 1, ブタノール : メタノール : H_2O を用いた結果は写真 2 のようである.

写真 1 によるとぶどう糖の $R_F=0.472$, G-1-P は 0.382 である. 試料には $R_F=0.382$ のスポットがある. よって試料には G-1-P の存在が推定される.

写真 2 によるとぶどう糖の $R_F=0.454$, マルトースの $R_F=0.255$ である. 加水分解前の試料はぶどう糖の位置にスポットがでていないが, 1 N 塩酸にて 7 分間加水分解すると 0.454 の位置にスポットが現われた. よって試料には G-1-P の存在が推定される. なお試料そのものの場合にはぶどう糖の磷酸塩のスポットが現われてもよいと思われるが, 加水分解前の試料にはスポットは見出しにくかった. これはこの展開剤ではぶどう糖磷酸塩は検出されにくいとも考えられる.

(b) 呈色剤として燐を検出する試薬を用いた場合の糖磷酸塩の検出 : 展開剤として前述のように isopropanol : CCl_3COOH : conc. NH_4OH : H_2O , *n*-butyric acid : 0.5 N- NH_4OH を用いた. 展開時間は前者では 22~23 時間, 後者は 17~18 時間かかった. 温度は 23~27° であった. 発色剤はモリブデン試薬を用い, 一次元上昇法を行った. 結果は写真 3, 写真 4 のようである.

写真 3 燐を検出する呈色剤による糖磷酸塩の検出

写真 4 燐を検出する呈色剤による糖磷酸塩の検出

写真 3 であきらかのように展開剤として isopropanol : CCl_3COOH : conc. NH_4OH : H_2O を用いた場合には G-1-P の $R_F=0.382$, 無機磷酸 0.764 であった. よって試料には G-1-P の存在が推定される.

写真 4 であきらかのように展開剤として *n*-butyric acid : 0.5 N- NH_4OH を用いた場合には G-1-P の $R_F=0.245$, 無機磷酸 0.394 であった. よって試料には G-1-P の存在が推定される.

以上のように試料 S₁ には G-1-P の存在が推定される.

II. 単糖, 少糖類の検索 乳熟期の穂部を乳鉢で良く磨砕し, 全体の濃度が 80% になるようにエタノールを加え, これに少量の炭酸石灰を加え, 逆流冷却器をつけて湯煎中で 30 分間加温する. 冷却後抽出液を残渣とわけ, 残渣に更に 80% エタノールを加え, 30 分間加温する. 両抽出液を合せて脱色炭を加えて脱色後減圧にて濃縮してシラップとする. シラップを 80% 熱エタノールにて 3 回精製した. 得られたシラップを用いてペーパークロマトグラフィーによって糖を検索し更に夫々の糖を結晶状に単離した.

(1) 糖のペーパークロマトグラフィー : 展開剤にはブタノール : メタノール : 水 = 4 : 1 : 1.5, 呈色剤にはアニリン塩酸塩のメタノール溶液及び 2% オルシン磷酸のメタノール溶液を用い, 一次元上昇法によった. 濾紙は東洋濾紙 No. 50 を用いた. 結果は写真 5 のようである.

写真からあきらかのようにぶどう糖の $R_F = 0.46 \sim 0.47$, 果糖 $0.53 \sim 0.55$, ショ糖 $0.37 \sim 0.38$ である。呈色剤としてアニリン塩酸塩を用いた場合にはぶどう糖, 果糖, 蔗糖の位置にスポットが生じ, 呈色剤としてオルシン磷酸を用いた場合には果糖, 蔗糖の位置にスポットが生じた。依ってシラップ中にはぶどう糖, 果糖, 蔗糖の存在が推定される。

(2) 糖の単離: 糖のペーパークロマトグラフィーによってシラップ中にぶどう糖, 果糖, ショ糖の存在が推定されたので, この推定をたしかめるために各糖の分離を試みた。すなわち濾紙上にシラップを一直線に引き, 上述の展開剤にて3回展開させ, 各糖の部分を切り取る。得られたおのおのの糖を含む濾紙はそれぞれ別々にエーテルにて脱脂後 50% エタノールにて糖の抽出を行う。抽出液を減圧濃縮後シラップとな

し, 95% 湿アルコールにて数回精製を繰返す。シラップをデシケーター中に放置しておく数日後に夫々結晶が析出した。

ショ糖の決定: $[\alpha]_D^{20} = +65^\circ$ (5% 水溶液) m. p. = 184°

ぶどう糖の決定: $[\alpha]_D^{20} = +52^\circ$ (5% 水溶液) m. p. = 146°

果糖の決定: $[\alpha]_D^{20} = -92^\circ$ (5% 水溶液) m. p. = 95°

よってショ糖, ぶどう糖, 果糖の存在を認めた。

結 論

乳熟期の粃の中に存在する糖磷酸塩, 単糖, 少糖類を検索して次の結果を得た。

- (1) ぶどう糖-1-磷酸塩の存在をペーパークロマトグラムによって認めた。
- (2) ショ糖, ぶどう糖, 果糖の存在を認めた。

本実験に御指導をたまわった恩師三宅捷先生, 二国二郎先生に厚く感謝の意を表します。ぶどう糖-1-磷酸の定量に御教示していただいた東大助教授中村道德氏, 東大大村京生氏に厚く御礼を申し上げます。

(1) C. F. Cori, G. T. Cori : <i>Proc. Soc. Exper. Biol. Med.</i> , 34, 702 (1936).	(6) 中村道德, 山崎鏡次, 丸尾文治 : 本誌, 24, 197 (1951).
(2) C. S. Hanes : <i>Proc. Roy. Soc. B.</i> , 128, 421 (1939~1940).	(7) 中村道德 : 本誌, 24, 1 (1950).
(3) 相見霊三, 村上 高 : 第9回酵素化学シンポジウム講演集, p. 169 (1956).	(8) C. S. Hanes : <i>Biochem. J.</i> , 23, 99 (1929).
(4) 関根隆光 : 標準生化学実験, p. 136 (1953).	(9) 軒原栄三, 角祐一郎 : 本誌, 24, 44 (1950).
(5) 中村道德 : 標準生化学実験, p. 260 (1953).	(10) 倉沢文夫, 斎藤昭三, 本間伸夫 : 新潟大農学術報告, 3, 40, 47, 53 (1947).
	(11) 大村京生, 福士定雄 : 本誌, 27, 516 (1953).