水稻乳熟期種実における Q-酵素に関する研究 (第 5 報)*

酵素 Q-画分のクロマトグラフィー (その 2)

伊 賀 上 郁 夫 (新潟大学農学部生物化学教室)

昭和 35 年 6 月 29 日 受 理

緒 論

前報⁽¹⁾において水稻乳熟期から得た酵素 Q-画分について hydroxylapatite を吸着剤とするクロマトグラフィーが可能なることを知り、リン酸塩緩衝液の濃度を順次上げて stepwise elution を行うことにより酵素 Q-画分から混在アミラーゼ成分及び大部分の不純蛋白を除去して、Q-酵素成分を分離することが出来た。本報告では分離された Q-酵素成分はアミロースに対する作用形式に加うるに生成物として得た多糖類 (以下 Q-多糖類と呼ぶ) の性質を更に検討することによっていわゆる Q-酵素であることを確認するとともに、うるち種及びもち種について分離された Q-酵素成分の一、二の性質について考察した。

実 験 材 料

1. 酵素試料

a) Q-酵素成分 : 前報⁽¹⁾により hydroxylapatite を吸着剤とするクロマトグラフィーで分別し、リン酸塩緩衝液、pH 6.8 の 0.2 M の濃度で溶出された成分 II を集め使用した (0.012 mg 蛋白/ml)。

b) α -アミラーゼ : Meyer ら⁽²⁾の方法に従って人唾液から精製し、結晶直前の段階で得たアセトン粉末である。電気泳動的にほとんど均一であり、使用時蒸留水に溶解して用いた。

c) β -アミラーゼ : Balls ら⁽³⁾の方法に従って甘藷から調製し、得られた結晶を 3 回再結して使用した。 α -アミラーゼ及びマルターゼの作用はほとんど認められない。

2. 多糖類の調製

a) Q-多糖類 : 水稻農林 1 号でんぶんから調製したアミロース 1 g を 0.2% 溶液としてその 500 ml に Q-酵素成分溶液 100 ml, クエン酸緩衝液 (pH 6.7) 200 ml 及び水 200 ml を加え、27° で反応せしめ、経時的にその一定量を採って青色度の減少及び還元力を測定した。青色度減少率 88% (赤色), 還元力がぶどう糖として 3.9% の所で反応液を煮沸し、遠沈で蛋白を除去後、透析及び減圧濃縮を行い約 150 ml とし、ここでアルコールを加え 70% として白色ちんでんを得た。更にメタノール脱脂を行って乾燥した。収量約 55%。

b) 直鎖 α -デキストリン : 前項に準じて 0.2% アミロース溶液 500 ml に唾液 α -アミラーゼ溶液 (0.05 mg%) 100 ml, 0.2 M リン酸塩緩衝液 (pH 6.7) 200 ml, 0.25 M 食塩溶液 100 ml (クロール濃度を最終 0.05 M とする) 及び水 100 ml を加え 37° で反応せしめた。アミロースの青色度は急速に低下し、1 時間で 97%, 還元力はマルトースとして 28.5%, 2 時間でヨード呈色は消失し、還元力はマルトースとして 42.1% であった。この反応において前項 Q-酵素成分を用いた場合と同じヨード呈色度 (88%, 赤色) を示す所 (還元力はマルトースとして 21.0%) で煮沸して反応を止め、遠沈、透析及び減圧濃縮を行い、70% アルコール濃度として白色ちんでんを得た。収量約 40%。

実 験 結 果

1. Q-酵素成分によって生成された多糖類の性質 Q-酵素成分によって生成された多糖類の性質を再検討する上において、水稻でんぶんから得たアミロース、アミロペクチン及びアミロースから得た直鎖 α -デキストリンについて比較検討した。

a) Q-多糖類に対する β -アミラーゼ作用 : 試料 0.2% 溶液 10 ml に 0.2 M 酢酸緩衝液 4 ml, 水 4 ml 及び甘藷結晶 β -アミラーゼ 2 ml (20.2 単位⁽⁴⁾) を加え pH 4.8, 30° で作用せしめ、経時的に 2 ml 宛採って還元力を Hanes 法⁽⁴⁾でマルトースとして測定し、分解限を求めた。結果を第 1 図に示す。図から Q-多糖類の β -アミラーゼによる分解限は 57% であり、直鎖 α -デキストリン、アミロース及びアミロペクチンはそれぞれ 73

* 米でんぶんの生化学的研究 (第 16 報)

Studies on Q-Enzyme in the Seedrice at the Milky Stage. Part V. Chromatography of the Enzyme Q-Fraction. (2)

By Ikuo IGAUE (Laboratory of Biochemistry, Faculty of Agriculture, Niigata University)

第1図 Q-多糖類に対するβ-アミラーゼ作用
●—● Q-多糖類 ○—○ 直鎖 α-デキストリン
▲—▲ アミロース ×—× アミロペクチン

第1表 Q-多糖類のβ-リミットデキストリン

基質 反応時間 (分)	Q-多糖類		直鎖 α-デキ ストリン		アミロース		アミロペクチン	
	吸光度	ヨード 呈色	吸光度	ヨード 呈色	吸光度	ヨード 呈色	吸光度	ヨード 呈色
0	0.235	赤	0.033	桜赤	1.301	青藍	0.084	赤褐
30	0.020	赤褐	0	無	0.863	青	0.050	〃
60	0.019	〃	0	〃	0.582	青緑	0.049	〃
240	0.018	〃	0	〃	0.262	淡緑	0.047	〃
1440	0.016	〃	0	〃	0.219	淡緑	0.040	〃

0.5% 及び 1.0% 溶液を 0° 及び室温に放置 (1 週間) してその溶液からの老化性を調べたが、アミロース以外は何れもちんでんを生じなかった。又 0.5% 溶液 25 ml に *n*-ブタノール・イソアミルアルコール混液 4 ml を加えて攪拌加温後室温に数日放置するもアミロース以外は何れもちんでんを認めなかった。

d) 粘度: 試料をアルカリ加温分散させ、塩酸中和して 0.2% 溶液とし、30° でオストワルド粘度計によって相対粘度 (η_{rel}) を求めた。これによると Q-多糖類、直鎖デキストリン、アミロース及びアミロペクチンはそれぞれ 1.025, 1.008, 1.092 及び 1.030 で合成多糖類はアミロペクチンに近く、直鎖デキストリンよりはかなり高い値を示した。

e) ヨード比色及び吸収スペクトル: 試料 0.2% 溶液 1 ml, 0.2% ヨード溶液 2 ml をとり 100 ml に充たして、そのヨード呈色度を 20 mm のセルを用い S-66 のフィルターで光電比色し、また 10 mm のセルを用いてスペクトロホトメーターで吸収を測定した。結果は第2表に示した。基質 2 mg%, ヨード 4 mg% 及びヨードカリ 40 mg% であった。

第2表 Q-多糖類のヨード比色及び吸収スペクトル

試料	ヨード比色		吸収スペクトル	
	吸光度	色調	吸光頂点 (m μ)	吸光頂点 の吸光度
Q-多糖類	0.096	赤〜赤紫	540	0.315
直鎖 α-デキストリン	0.024	赤〜赤褐	500〜510	0.215
アミロース	0.928	青	640	0.557
アミロペクチン	0.022	赤褐	520	0.093

表から Q-多糖類は直鎖デキストリンやアミロペクチンより吸光頂点はやや長波長側にずれ、吸光度も高く、やや鎖長の長い部分を多く含むことが考えられる。

f) Q-多糖類のペーパークロマトグラフィー: 滝の方法^(5,6)に準じて、試料 0.5%

溶液 0.02 ml を用い氷室で過塩素酸を展開剤としてペーパークロマトグラフィーを行った。結果を第2図に示す。第2図aは 35% 過塩素酸で展開後ヨードで呈色させたもので、第2図bは 40% 過塩素酸を展開剤としてヨード蒸気中で展開させたものである。図から Q-多糖類はアミロペクチンと全く同じような行動を示すことがわかる。直鎖 α-デキストリンは第2図aに見られるように Q-多糖類と同じくヨードで赤紫色を呈するが、原線に止まる成分はなく全部が移動する。しかして Q-多糖類及びアミロペクチンにも先端に移動する成分が僅かに認められ、前者の量が後者よりやや多い。この成分は直鎖 α-デキストリンと同様大部分は赤紫を呈するもので第2図bと比べ合せておそらく一種のデキストリンが混在しているものであらうと考えられる。

%, 75% 及び 49% であった。

b) Q-多糖類のβ-リミットデキストリン: 前項の反応液から経時的に 1 ml 宛採り、0.2% ヨード溶液 (ヨード 0.2 g, ヨードカリ 2 g/100 ml) 1 ml を加え 25 ml に充たし、20 mm のセルを用いて S-66 のフィルターで比色し、β-アミラーゼによる分解限がほぼ一定になったときのヨード呈色を測定した。結果を第1表に示す。

この結果から Q-多糖類は直鎖デキストリンと異なってβ-アミラーゼによる分解限は低く、ヨードで赤褐色に呈色するβ-リミットデキストリンを残すことがわかる。

c) Q-多糖類の溶解性、老化性及びアミロースちん

でん剤との作用: 乾燥試料について、合成多糖類は直鎖デキストリン及びアミロペクチンと同じく熱水に對してよく溶解するが、アミロースは難溶である。又試料 2.5 N 苛性ソーダで分散させ塩酸中和したものの

類が比較的小さい値を示しているのは、いままでの結果から短鎖長デキストリンの混在或いは還元性末端がやや多いことなどに由来するのではないかと考えられる。しかし Swanson⁽¹⁰⁾、大橋⁽¹¹⁾らはアミロデキストリンのヨード呈色及び吸収スペクトルと平均重合度との関係を調べているが、測定法が異なるので直接比較は出来ないにしても重合度 50 前後の直鎖デキストリンはヨード呈色は青、吸光頂点は 580m μ 以上にあり、吸光度も 0.75 以上と高いので、Q-多糖類はデキストリンとは異なりアミロペクチン型であると考えられる。

g) フォルムアミドテスト: 分枝のあるアミロペクチン型多糖類の検出に Nussenbaum⁽⁷⁾ が利用しているフォルムアミドによるスポットテストを Q-多糖類に試みたのが第 3 図である。Q-多糖類はアミロペクチンと同様なパターンを示す。直鎖デキストリンはほとんど流去され、この成分は前項ペーパークロマトグラム第 2 図 a で先端に移動した成分と考えられる。

h) フェリシアニド還元力: Hanes 法⁽⁴⁾によって Q-多糖類

のフェリシアニド還元力をマルトースとして求めたところ、9% であり、直鎖 α -デキストリン、アミロペクチン及びアミロースはそれぞれ 15.9%、0.70% 及び 1.8% で、Q-多糖類は還元性末端がアミロペクチンよりかなり多いことが推定される。

i) Q-多糖類のジニトロサルチル酸法による分子量: Meyer ら⁽⁸⁾の方法に基いて Q-多糖類の分子量を測定した。Meyer らによればとうもろこし及び馬鈴薯のアミロペクチンは本法によってそれぞれ 45,000 及び 180,000 の値を得ている。又 Bebbington ら⁽⁹⁾は *Polytomella coeca* の Q-酵素で合成させた多糖類について、同様に 21,000 の値を得た。著者の得た結果によれば、Q-多糖類は 9,000、直鎖 α -デキストリン、アミロペクチン及びアミロースはそれぞれ 1,600、44,000 及び 99,000 であった。Q-多糖

2. うるち及びもち種 Q-酵素成分の作用の最適 既報⁽¹²⁾においてうるち種酵素 Q-画分の作用の最適について述べたが、もち種においては種実胚乳でんぷんは乳熟期においてもほとんどがアミロペクチンから成っていることは当然 Q-酵素作用との強い関連を考えなければならない。うるち種の場合と全く同様にして得たもち種酵素 Q-画分について同様な Q-酵素作用を認めるので、酵素 Q-画分をそれぞれクロマト分別した成分について両者の

作用の最適を調べた。第 4 図に示すように両者の間には差はなく、pH 6.7, 25~27° であった。最適温度は 22~30° の付近では作用力の差は少ない。さらに 33~35° と報告したが恐らく混在アミラーゼの影響でであろうと考えられる。ちなみにアミラーゼ画分の最適温度は 40° である。

3. 二、三の品種の Q-酵素作用

a) Q-酵素作用の活性単位：既報⁽¹²⁾でも触れたがアミロースの青色度減少率と作用時間及び酵素量との関係は次のようである。酵素 Q-画分については青色度減少率—作用時間の関係図は既述の反応条件において酵素蛋白量が 0.5mg/ml 以内の範囲で 20 分値まで比例的であり、又青色度減少率—酵素蛋白量の関係図は酵素蛋白量 0.4mg/ml 以内の範囲で 20 分値まで比例的である。このような条件においてアミロースの青色度を 1 分間に 1% 減少させる量を 1 単位 (U) と決めて比較を行った。更に精製された酵素については上記の比例関係を満足させる条件で測定した。

b) 二、三の品種の Q-酵素作用：試料は新潟大学農学部農場において標準栽培法に従って育成された四方光 (水稻うるち)、戦捷 (陸稲うるち) 及び平和もち (水稻もち) で、何れも開花後 13~15 日目の乳熟期種実を一定粒数宛採取して分析し、2 回の平均値をもってした。結果を第 3 表に示す。

ト分離された Q-酵素成分について、蛋白当りの比活性は陸稲がかなり高かったが、粒当りの活性には大きな相違はみられなかった。	品 種	乳熟期種実採取粒数	水分 %	クロマト分離酵素蛋白量 mg	Q-酵素総活性 U	Q-酵素比活性 U·mg ⁻¹	種実粒当り活性 U×10 ⁻²	種実粒乾物当り活性 U×10 ⁻²
	四方光 (水稻うるち)	12,000	56.4	4.2	277	66	2.3	5.3
	戦捷 (陸稲うるち)	"	49.5	2.6	325	125	2.7	5.3
	平和もち (水稻もち)	"	53.7	4.6	336	73	2.8	6.0

考 察

前報及び本報を中心に水稻乳熟期種実における Q-酵素作用について考察すると、酵素 Q-画分を hydroxylapatite を吸着剤とするクロマトグラフィーによって更に分別し Q-酵素作用をもつ成分をいままで分離困難であったアミラーゼ成分から分離することが出来た。従来酵素 Q-画分についてはアミラーゼ成分の混入に妨げられて正しい検討が困難であったが、分離された成分についてその作用形式及び生成物の検討などからアミロースの 1.4 結合に 1.6 結合の枝分れを促進する所謂 Q-酵素であることが確かめられ、Q-多糖類については天然アミロペクチンと比較して線状構造をやや多く有し、分子の大きさも小さいようであるが明らかにアミロペクチン型のものであると考えられる。しかしうるち種及びもち種の種実胚乳でんぷんにおけるアミロペクチンの量的な差異について Q-酵素の関連を考えると、Q-酵素作用の活性或いは作用の場になんかの差があるのではないかと考えられる。著者の in vitro における実験結果からは少なくとも両品種の Q-酵素作用について作用の最適には差がなく、種実の粒当りの活性にも大きな差は認められなかった。

育種遺伝学的な観察^(13,14)によれば、うるち種及びもち種においてヨードででんぷんが赤褐色を呈する部分は花粉 (n) と胚乳 (3n) の部位のみで、他の 2n の個体は両種とも同じく青紫色に呈色するでんぷんを有し差はないといわれている。これらの事実からでんぷんないしはアミロペクチンの合成の場における Q-酵素活性の生理的意義は興味ある問題で更に検討を加えたい。

結 論

水稻乳熟期種実から得られた酵素 Q-画分を hydroxylapatite を吸着剤とするクロマトグラフィーによって混在アミラーゼを除去して Q-酵素成分を得た。得られた成分を用い基質アミロースに作用させて得た Q-多糖類は β-アミラーゼによる分解限、β-リミットデキストリンの性質、老化性、溶解性、粘度、ヨード呈色及び吸収スペクトル、ペーパークロマトグラフィー、フォルムアミドテスト及びジニトロサルチル酸法による分子の大きさなどの測定からアミロペクチン型多糖類であることを知り、本酵素はアミロースの分枝を促進するいわゆる Q-酵素であることを確かめた。

また、うるち種及びもち種における Q-酵素作用については、作用の最適及び粒当りの活性にたいして差のないことが認められた。

実験に当り終始御助言、御鞭撻を戴いた主任倉沢文夫教授、恩師九州大学農学部山藤一雄教授に厚く御礼申し

上げます。また β -アミラーゼ母結晶を恵与戴きました滋賀短大馬場明先生に深謝致します。なお本報告は昭和35年度日本農芸化学会大会において講演した。

(1) 伊賀上郁夫 : 本誌, 34, 1028 (1960).	P. Gürtler, G. Noelting : <i>J. Phys. Colloid Chem.</i> , 53, 319 (1949).
(2) K. H. Meyer, E. H. Fischer, A. Staub, P. Bernfeld : <i>Helv. Chim. Acta</i> , 31, 2158 (1948).	(9) A. Bebbington, E. J. Bourne, I. A. Wilkinson : <i>J. Chem. Soc.</i> , 246 (1952).
(3) A. K. Balls, M. K. Walden, R. R. Thompson : <i>J. Biol. Chem.</i> , 173, 9 (1948).	(10) M. A. Swanson : <i>J. Biol. Chem.</i> , 172, 825 (1948).
(4) C. S. Hanes : <i>Biochem. J.</i> , 23, 99 (1929).	(11) 大橋一二 : 本誌, 33, 576 (1959).
(5) 滝基次 : 本誌, 33, 245 (1959).	(12) 倉沢文夫, 伊賀上郁夫, 早川利郎 : 同上, 33, 541 (1959).
(6) 滝基次 : 同上, 33, 448 (1959).	(12) 渡辺忠世, 梅景修 : 日作紀, 27, 441 (1959).
(7) S. Nussenbaum : <i>Anal. Chem.</i> , 23, 1478 (1951).	(14) 佐藤庚 : 同上, 28, 28 (1959).
(8) K. H. Meyer, P. Bernfeld, R. A. Boissonnas,	

植物体内のチオール基濃度分布*

永井康豊, 舟橋三郎 (東京大学農学部農芸化学科)

昭和35年6月30日受理

ウニの受精卵の有糸分裂に伴って酸溶性チオール基の週期的変化が起ることは1931年にRapkine⁽¹⁾によって観察され、Maziaらによって追試確認されている⁽²⁾。このことから直ちに生長とチオール基との量的関係を論ずることはできないが、植物は同一個体で新旧組織を明確に区別できるので、生長の盛な部位とそれ以外の部位との間にチオール基の量的差量があるか否かを知るのに都合がよい。片井⁽³⁾は桑葉中のグルタチオンを定量して老葉よりも若葉中に含量が高いことを報告している。著者は前報⁽⁴⁾で報告した微量電流滴定法により数種の植物組織のチオール基を定量し、ナタネなどの植物では生長が盛んと思われる部分には、他の部分より高濃度の酸溶性チオール基が存在するが、カボチャでは生長の盛んと思われる部位は見かけ上、他の部位に比して酸溶性チオール基の濃度が低いという結果を得たので報告する。

材料および方法

植物材料は1956年3月より同年9月にかけて、東京大学農学部園場において採取したものをを用い、採取後直ちに分析を行った。検体として植物体2.0~5.0gを上皿天秤により秤取し、これにナタネなどの場合は10倍量(v/w)のスルホサリチル酸水溶液を、またカボチャについては10倍量の(v/w)メタ磷酸水溶液を加え乳鉢中で少量の金剛砂とともによく磨砕し、2,000 r.p.m. で10分間遠心分離してその上液の容量を求め、濁りのあるときは濾紙を用いて濾過し、その濾液の一定量について分析した。全チオール基(チオール基+酸化型チオール基)の定量的場合はスルホサリチル酸抽出液には粉状亜鉛を、メタ磷酸抽出液には粒状亜鉛と3%になるように塩酸を加え、30分間還元してその濾液を試料とした。また植物体を105°で12時間乾燥して水分を求めたものをケルダール法による窒素定量用の試料とした。チオール基の定量は微量電流滴定法により⁽⁴⁾、還元型アスコルビン酸⁽⁵⁾とヨード消費量⁽⁶⁾は藤田の方法によった。葉緑素については試料を20倍量のアセトンと金剛砂で乳鉢中でよく磨砕して抽出し、遠心分離器により残渣を分け、この残渣を更に2回各20倍量のアセトンで抽出、遠心分離した。全上清を合しこれを日立光電比色計EPO-A型(filter 0, 透過光 max 610 mμ)で比色しその吸光度を比較して葉緑素相対量を求めた。

結果および考察

A) ナタネのチオール基濃度分布 1956年の4月上旬に地上部の草丈が約40cm、その新鮮重が約20gでつぼみができ始めた頃のナタネについて、チオール基濃度分布を定量した。すなわち全植物体(地上部)を先

* The Distribution of Thiol Group in Plant Body.

By Yasutoyo NAGAI and Saburo FUNAHASHI (Department of Agricultural Chemistry, University of Tokyo)