第 2 表 結晶のハツカダイコンの芽生えにおよぼす影響

稀釈倍数(万)		0.1	0.2	0.4	0.6	0.8	1	2	4	6	8	10	20	対照
伸長度(cm)														
草	丈(平均値)	0	0	0.42	0.50	0.52	0.69	0.62	0.59	0.74	0.70	0.83	0.80	1.21
根	長(平均値)	0	0	0.61	0.86	0.88	0.85	1.18	1.47	2.04	1.95	1.95	2.21	3.02

第 1 図 結晶のハツカダイコンの芽生えにおよぼす影響

番号 1 2 3 4 5 6 7
稀釈倍数(万) 0.2 0.4 0.8 2 4 20 対照

III. 生育阻害物質の理化学的性質 本物質は m. p. 158° の無色針状結晶で昇華性を有する。アルコール, アセトン, エーテルおよび熱水に易溶, ベンゼン, 水に難溶である。アルコール溶液に塩化鉄を加えると赤紫色を呈する。

本物質の元素分析, 分子量, 紫外線および赤外線吸収スペクトル測定の結果はサリチル酸に一致する。なおサリチル酸と混融して融点降下しない。

要 約

(1) スイカの根部の水浸出液から m. p. 158° の無色針状結晶を単離した。

(2) 本物質はハツカダイコンの種子の発芽およびその後の生長を著しく阻害することを認めた。

(3) 本物質は理化学的性質を検討した結果サリチル酸であることを確認した。

本研究において元素分析は藤沢薬品株式会社東京研究所酒井平一氏に, 吸収スペクトルの測定は名古屋大学農学部寺島典二氏に依頼した, 深く感謝する。

(1) 西村正暘: 日植病報, 24, 139 (1959).

〔農化 第 35 卷, 第 11 号, p.1108~1111, 1961〕

水稻 Q-酵素に関する研究 (第 6 報)*

成熟中の Q-酵素活性

伊 賀 上 郁 夫 (新潟大学農学部農芸化学科)

昭和 36 年 5 月 4 日 受 理

緒 論

さきに著者はデンプン合成のさかんな水稻乳熟期種実中に Q-酵素作用を見出し, その性質について結果の一部を報告した^(1,2)。以来乳熟期種実の Q-酵素作用についてその特性を追求し酵素の精製を行なった。また前報⁽³⁾において酢酸鉛処理, 硫安分画及びリン酸カルシウムクロマトグラフィーによって精製した酵素試料についてウルチ種とモチ種の間の活性に有意の差が認められないことを述べた。

水稻についてはその後相見ら⁽⁴⁾も Q-酵素作用の存在を推定し, 成熟期種実の Q-酵素作用について報告している。また不破⁽⁵⁾はトウモロコシ胚乳における熟期別の Q-酵素活性について報告した。

しかしして種実から抽出した粗酵素試料を扱う場合に問題になるのは Q-酵素作用をヨード反応で追跡するとき基質のアミロースあるいはデンプンに対して全く同じようにその青色度を低下させるアミラーゼまたはアミラーゼとイソアミラーゼの混在, ホスホリラーゼの存在, などである。

既報⁽⁶⁻⁸⁾でも報告したように出穂開花後 10 日前後の乳熟期においてかなり強いアミラーゼ, イソアミラーゼ,

* Studies on Q-Enzyme of Rice Plant. Part VI. The Activity of Q-Enzyme During the Ripening.
By Ikuro IGAUE (Department of Agricultural Chemistry, Faculty of Agriculture, Niigata University)
コメデンプンの生化学的研究 (第 17 報)

ホスホリラーゼなどの作用が認められ、Q-酵素作用を妨害することが知られている。しかしリン酸カルシウム (hydroxylapatite) によるクロマトグラフィーは少なくともアミラーゼ、イソアミラーゼ、ホスホリラーゼなどをほとんど無視できる程度に Q-酵素試料から分別することができたので、この精製度の酵素をもって開花後の種々の熟期について種実、稈、葉鞘、葉身の Q-酵素活性を調べ、活性の消長を知るとともに酵素の抽出精製についての時期的適性に関する知見を得ようとした。

一方抽出酵素試料の活性を保持するため試料の凍結乾燥について検討した。既にバレイショ⁽⁹⁾、マメ類⁽¹⁰⁾、*Polytomella coeca*⁽¹¹⁾などの Q-酵素について中性クエン酸緩衝液の存在下に凍結乾燥することによって活性の損失はほとんどないことが報告されているが、水稻の場合も粗酵素、精製酵素ともに凍結乾燥によって活性がほとんど完全に保持されることが認められた。

実験方法及び結果

1. Q-酵素活性と凍結乾燥

a) 酵素 Q-画分の凍結乾燥： 酵素試料は既報⁽¹²⁾に従って乳熟期種実から酢酸鉛処理及び硫酸分画を行なって得たもので硫酸分画 (18g/dl, pH7.0) を 2 回繰返した酵素ちんでんほぼ同量宛を、蒸留水または種々の緩衝液の 4ml に溶解して使用した。この Q-画分の比活性は $8 \sim 9 \text{Umg}^{-1}$ 、供試溶液中のタンパク量は約 $10 \sim 20 \text{mg}$ であった。4ml の溶液を 2ml 宛 2 部に分け、1 部を凍結乾燥し、1 部はそのまま対照とした。凍結乾燥はアセトン-ドライアイスで凍結させ、 $0.01 \sim 0.02 \text{mmHg}$ で乾燥させた。凍結乾燥酵素は水 2ml を加えて溶解させ対照と比較した。作用の測定は上記試料溶液をそれぞれ 20 倍に希釈し、既報⁽¹²⁾の反応系及び方法に従って行なった。使用した緩衝液及び凍結乾燥前後における活性及び pH の変化は第 1 表のようであった。

第 1 表 酵素 Q-画分の凍結乾燥

供試緩衝液	凍結乾燥前		凍結乾燥後		凍結乾燥前後の活性比 (b/a)
	酵素活性 (a) U	pH	酵素活性 (b) U	pH	
蒸 留 水	1.75	6.4	0	5.2	0
0.2M クエン酸緩衝液	1.88	7.18	1.90	7.08	1.01
0.2M " "	1.72	6.9	1.70	6.80	0.99
0.2M " "	1.79	6.68	1.74	6.64	0.97
0.2M " "	1.41	6.25	1.29	6.19	0.91
0.05M " "	1.90	7.14	1.78	6.78	0.94
0.02M " "	1.91	7.09	1.78	6.40	0.93
0.2M 酢酸緩衝液	1.18	6.89	1.18	6.71	1.00
0.2M リン酸緩衝液	1.83	6.92	1.66	6.91	0.91

バレイショなどにおいては Barker ら⁽⁹⁾によると酢酸緩衝液では活性の損失の著しいことを認めているが、第 1 表の実験範囲では pH6.25 $\sim$ 7.2 の pH を保つ緩衝液中で活性にたいした変動はない。ただし蒸留水のときは全く失活する。Q-酵素活性は pH5.5 以下になると著しく失活すること⁽¹³⁾から考えて凍結乾燥後の pH 低下が原因と考えられる。また緩衝液量に対して酵素タンパク量がとくに多い場合も活性の低下がみられた。

b) 精製酵素の凍結乾燥： 酵素 Q-画分をリン酸カルシウムによるクロマトグラフィーによって精製した試料 (比活性 60Umg^{-1}) を 0.2M クエン酸緩衝液 (pH7.0) に溶解させ凍結乾燥を行ない、さらに 10 日、60 日間乾燥試料を冷凍室 ($0 \sim -2^\circ$) に保存後凍結乾燥を行なわない対照と比較した。結果を第 2 表に示す。

第 2 表 精製酵素の凍結乾燥

乾燥酵素貯蔵日数	0	10	60
非 乾 燥 対 照	1.42U	—	—
0.2M クエン酸緩衝液中、乾燥	1.44	1.44	1.41

第 2 表から精製酵素の場合も同様に失活は認められなかった。

2. 種実における熟期別の Q-酵素活性 新潟大学農学部農場で標準栽培法に従って栽培したものを試料とした。品種は青森農試で育苗して戴いた「とわだ」(ウルチ種)と新潟大学で育苗した「こがねもち」(モチ種)の二品種で、両種とも早生である。

「とわだ」は出穂開花が 7 月 30 日頃、「こがねもち」は 8 月 10 日前後であった。種実は 50g ずつ、稈、葉鞘、葉はそれぞれ 100g ずつ採取し、水分、1,000 粒重を測定するとともに前報⁽⁸⁾に準じて水 50ml とともに磨砕圧搾し、酢酸鉛ちんでん処理後の溶出液約 200ml を 18g/dl 硫酸飽和 (pH7.0) とする。得られた塩析ちんでんを定量的に 5ml の 0.2M クエン酸緩衝液に溶解させて凍結乾燥を行ない、順次リン酸緩衝液に溶解させてクロマトグラフィーを行なった。Q-酵素活性は 0.2M リン酸緩衝液溶出区分について測定した。開花以後の種実における水分、1,000 粒重及び粒当り、粒乾物当りの Q-酵素活性の消長を第 1 図及び第 2 図に示した。

以上の方法で実験した範囲では「とわだ」(ウルチ種)及び「こがねもち」(モチ種)とともに稈、葉鞘、葉につい

第 1 図 成熟中における水稻種実の水分及び 1,000 粒重の変化

●—● とわだ 1,000 粒重 ○—○ とわだ 水分
 ▲—▲ こがねもち " " △—△ こがねもち "

第 2 図 成熟中における水稻種実の Q-酵素活性の変化

●—● とわだ 粒当り活性 ○—○ とわだ 粒乾物当り活性
 ▲—▲ こがねもち " " △—△ こがねもち "

いでの予備実験も種実における Q-酵素活性の変化について、この場合の両種と類似した結果が得られている。

一方相見らは糊熟期以後も完熟期に至るまで Q-酵素作用は高い活性を維持したと報告しており著者の結果と相違がみられる。またトウモロコシにおいては不破によればうるち及びもち種ともに開花後 12~16 日で Q-酵素活性は最高を示し、25 日以後になると漸減すると報告されている。

要 約

(1) 水稻乳熟期種実から抽出精製した Q-酵素試料について凍結乾燥による影響を検討した。pH6~7 のクエン酸、リン酸あるいは酢酸緩衝液の存在下で凍結乾燥するときは活性はほとんど完全に保たれる。この場合 pH の低下が失活の大きな原因と考えられる。

(2) 水稻種実における Q-酵素活性を種々の熟期について測定した。使用した二品種「とわだ」(ウルチ種)及び「こがねもち」(モチ種)ともに Q-酵素活性は開花後増加し始め、乳熟期から糊熟期にかけて最高の活性を維持し、黄熟期以後は急速に活性の低下がみられた。また実験の範囲内では稈、葉鞘、葉などには Q-酵素活性をほとんど検出することができなかった。

実験に際して終始御鞭撻を賜っております主任倉沢文夫教授、恩師九州大学農学部山藤一雄教授に御礼申し上げます。

また水稻苗を御恵与下さいました青森県農試作物科の方々、凍結乾燥に御援助受けました本学農産製造教室、実験に御援助受けました阿部貞夫君に深謝致します。

- (1) 倉沢文夫, 山本幸正, 伊賀上郁夫: 総合研究報告集録(農学篇), No. 9, p. 107 (1957).
- (2) 倉沢文夫, 伊賀上郁夫, 真島 進: 日農化大会シンポジウム講演集, p. 75 (1958).
- (3) 伊賀上郁夫: 本誌, 34, 1032 (1960).
- (4) 相見 霊三, 村上 高: 日作紀, 26, 245

(1958).

- (5) H. Fuwa: Arch. Biochem. Biophys., 70, 157 (1957).
- (6) 伊賀上郁夫, 真島 進, 倉沢文夫: 本誌, 34, 253 (1960).
- (7) 倉沢文夫, 早川利郎, 伊賀上郁夫: 本誌,

ては Q-酵素活性はほとんど検出できず、検出できても極めて弱かった。

第 2 図から「とわだ」及び「こがねもち」ともに種実においては開花後から次第に活性は増加し、10 日目前後の乳熟期でほぼ最高となる。18~23 日目位の糊熟期に至るまではその強さを維持するが、糊熟期以後 25 日目前後の黄熟期に入ると急に活性は低下し、40 日目前後の完熟期になるとさらに活性は低下した。

栽培した両品種は同じ早生でも熟期が少しずれるので「とわだ」が「こがねもち」より開花後少しおそくまで高い活性が維持されているのはこの場合両種における Q-酵素活性の相違とは考え難い。前報⁽³⁾において使用した「四方ひかり」(ウルチ種)及び「平和もち」(モチ種)につ

- 34, 183 (1960).
 (8) 倉沢文夫, 伊賀上郁夫, 早川利郎, 大上
 宏: 本誌, 33, 393 (1959).
 (9) S. A. Barker, E. J. Bourne, I. A. Wilkinson,
 S. Peat: *J. Chem. Soc.*, 1950, 84.
 (10) P. N. Hobson, W. J. Whelan, S. Peat: *ibid.*, 1950, 3566.
 (11) A. Bebbington, E. J. Bourne, M. Stacey,
 I. A. Wilkinson: *ibid.*, 1952, 240.
 (12) 倉沢文夫, 伊賀上郁夫, 早川利郎: 本誌,
 33, 541 (1959).
 (13) 伊賀上郁夫: 本誌, 34, 1028 (1960).

[農化 第 35 卷, 第 11 号, p. 1111~1116, 1961]

水稻 Q-酵素に関する研究 (第 7 報)*

Q-酵素作用の阻害及び活性化

伊 賀 上 郁 夫 (新潟大学農学部農芸化学科)

昭和 36 年 5 月 4 日 受 理

緒 論

酵素の作用形式あるいは特性を明らかにするために酵素作用に対する阻害及び活性化に関する知見は重要な要素となる。

水稻 Q-酵素の作用力に対するこのような検討はまったくなく、水稻とくにその種実におけるデンプン合成上から他のデンプン合成分解酵素の関連において必要なことと考えられる。Q-酵素など種々の branching enzyme については次のような報告がみられる。阻害剤の影響については、Barker ら^(1,2)はバレイショ Q-酵素について鉛及びフロリジンの影響を、Bebington ら⁽³⁾は *Polytomella coeca* の Q-酵素の塩化第二水銀による阻害を述べ、Gunja ら⁽⁴⁾は酵母の branching enzyme について塩化第二水銀及びモリブデン酸アンモニウムの阻害を報告している。活性化に関しては、Gilbert ら^(5,6)、Barker ら⁽⁷⁻⁹⁾はバレイショ Q-酵素について種々の塩類の効果について報告している。さらに Barker らは *Polytomella coeca* の Q-酵素の作用速度がマルトース、マルト少糖類、アミロペクチンなどの添加によって著しく増大することを認め、Larner ら⁽¹⁰⁾は肝ぞう、バレイショ、ソラマメ及びシワエンドウの 4 種の branching enzyme についてマルトース、イソマルトースなどは作用促進効果がなかったことを報告した。一方 Gunja ら⁽⁴⁾は酵母の branching enzyme もマルト少糖類の効果のないことを述べている。

さきに乳熟期種実から抽出精製した水稻 Q-酵素は成分的にまったく単一ではないが、アミラーゼ、マルターゼ、イソアミラーゼ、ホスホリラーゼなどの活性はほとんどみられず、しかも凍結乾燥することによって活性を安全に保ちうるので⁽¹¹⁾この精製酵素を用いて阻害及び活性化について実験を行ない知見を得たので報告する。

実 験 の 部

1. 酵素試料 既報⁽¹²⁾で報告した精製 Q-酵素をさらに再クロマトグラフィーを行なって使用した。比活性は 65 Umg^{-1} 。実験に際しては $1 \sim 2 \text{ U/ml}$ とした。使用時アミラーゼ、マルターゼ、イソアミラーゼ、ホスホリラーゼ及びホスファターゼの作用はほとんど認められない。

2. 基質 アミロース、アミロペクチンは Schoch 法⁽¹³⁾に準じて精製脱脂デンプンから調製し、アミロースは熱飽和 *n*-ブタノールから 5 回再結した。使用に際しては 2.5 N 水酸化ナトリウム溶液に加熱分散せしめ、塩酸もしくは硫酸で中和して所要の濃度とした。

3. 酵素作用の測定 既報⁽¹⁴⁾に準じた。すなわち 0.2% アミロース溶液 5 ml 、 0.2 M クエン酸あるいは酢酸緩衝液 ($\text{pH} 6.7$) 3 ml 、Q-酵素溶液 1 ml 、阻害剤あるいは添加物 1 ml で全容 10 ml とし、 27° で反応させた。基質を除く他の添加物をすべて加え 27° に 15 分放置平衡させた後、同温度に保った基質溶液を加え経時的に 1 ml 宛とりヨード呈色させその変化量で活性を表示した⁽¹²⁾。また阻害剤などを加えない反応を同時に行なわせて対

* Studies on Q-Enzyme of Rice Plant. Part VII. Inhibition and Activation of Q-Enzyme Action.
 By Ikuo IGAUE (Department of Agricultural Chemistry, Faculty of Agriculture, Niigata University)
 コメデンプンの生化学的研究 (第 18 報)