日 本 農 芸 化 学 会 誌
(NIPPON NÔGEIKAGAKU KAISHI)

昭和 47 年

第 46 卷

報 文

[農化 第 46 卷, 第 1 号, p. 1~7, 1972]

コンニャクマンナン¹⁾の生合成に関する研究 (第 1 報)
生育にともなう炭水化物含有量の変化

村 田 孝 雄

(農業技術研究所生理遺伝部生理第 2 科)

昭和 46 年 5 月 10 日 受 理

Studies on Konjak Mannan Biosynthesis
Part I. An Analytical Study on Carbohydrates during
the Growth on Konjak Plants

By Takao MURATA

*Department of Physiology and Genetics, National Institute of
Agricultural Sciences, Kitamoto, Saitama*

In order to clarify the problems in biosynthesis of konjak mannan, an analysis of carbohydrates was carried out during the growth of konjak plants.

(1) Among the soluble sugars, sucrose content was highest in the organs such as seed bulbs, growing bulbs and leaf blades, while mannose was detected only in sprouting seed bulbs and was not detectable in other organs by paper and Dowex anion exchange column chromatographies.

(2) Mannan content in growing bulbs was gradually increased with the maturation of bulbs and found to be more than 10% on a fresh weight basis at the harvesting stage. On the other hand, starch content was rather constant of about 0.5% throughout the growing stage.

(3) In leaf blades, it was found the existence of mannan which seemed to be different in chemical composition and properties from that of bulbs and its content was about 0.5% on a fresh weight basis.

(4) The relationship of these analytical results to the mechanism of konjak mannan biosynthesis is discussed.

(Received May 10, 1971)

緒 言

コンニャクは貯蔵多糖類として、多量のマンナンを蓄積する特異な植物として知られている。コンニャクマンナンの性質および化学構造は、Nishida and Hashima¹⁾

によりくわしく研究され、グルコースとマンノースを 1:2 の割合に含むグルコマンナンであることが明らかにされた。その後、Smith and Srivastava²⁾ によっても検討され、グルコースとマンノースの比は 2:3 と報告されている。しかし、コンニャクマンナンの化学構造

については、なお不明な点が少なくない。

微生物および高等植物には、種々の構造のマンナンが存在する⁽⁸⁾。しかし、その生合成に関する研究は、まだいとぐちについたばかりである。Cabib and Leloir⁽⁴⁾は、パン酵母のアルコール抽出液から GDPM (guanosine diphosphate-mannose) を単離し、酵母細胞膜のマンナン合成に関与していることを示唆した。Algranati⁽⁵⁾は酵母の細胞壁成分が、GDPM のマンノース分子をマンナンにとりこむ反応を触媒することを初めて明らかにした。その後、いくつかの酵母および植物について、同様に GDPM がマンナン合成のマンノース供与体として作用することが明らかにされている⁽⁶⁻¹⁰⁾。しかしながら、高等植物の光合成器官では一般的に光合成作用の結果、ショ糖または類縁のオリゴ糖を生成し、マンノースまたはそれを含むオリゴ糖の生成は知られていない。したがって、高等植物の場合にはマンナン生合成に関連して、つぎのような興味深い問題がある。(1) 光合成作用の1次産物としてマンノースが合成されないとすれば、ショ糖などからマンノースへの変換が行なわれなければならない。その変換機構は、いかなるものであろうか。(2) コンニャク球茎のように多量のマンナンを蓄積する植物においては、他の植物と異なって光合成の1次産物としてマンノースを生成し、貯蔵器官(球茎)へ転流されるのであろうか。これらの疑問に対して、コンニャク球茎の場合には有用な実験結果がない。

本報では、コンニャクマンナン生合成の問題点を明らかにする目的で、発育中のコンニャクについて炭水化物の分析を行なったので、その結果を報告する。

実 験 方 法

1. 供試材料 コンニャク在来種の2年生球茎(生重70~80g)を種いもとして、5月16日に当研究所の試験圃場に植えつけ、標準耕種法によって栽培した。材料の採取は、外観的に平均的な生育を示すもの4~5株をぬきとり、草丈を測定して洗浄後各器官に分け、生重を測定した。その一部は炭水化物の分析に供し、他の一部は細断して70°Cに乾燥して乾物重を測定した。

2. 可溶性糖の分析 30~50g(生重)の試料を細断したのち、3倍容の80%エタノールを添加し、2分間沸とう水中に加熱した。冷却後、ホモジナイザーで磨砕し、遠心分離して上澄液を得た。残渣は熱80%エタノールでさらに3回洗浄して、70°Cで乾燥、秤量した。洗

Fig. 1. Elution Pattern of Dowex-1 Anion Exchange Column Chromatography of Authentic Sugar Compounds.

One ml aliquot of effluent was used for sugar determination which was carried out by phenol- H_2SO_4 ,⁽¹²⁾ by measuring the optical density at 460 mμ. Solvent systems used for elution were as follows: I 0.004M borate, II 0.004M borate-0.035M boric acid, III 0.02M borate and IV 0.03M borate. Other experimental conditions used were described in the text.

● expt. 1, three mg each of sucrose, mannose and glucose were added, × expt. 2, three mg each of fructose and glucose were added, S: sucrose, M: mannose, F: fructose, G: glucose.

淨液は、上澄液とあわせて糖抽出液とした。糖抽出液は真空濃縮してエタノールを完全に除去したのち、 ZnSO_4 と $\text{Ba}(\text{OH})_2$ を加えて除蛋白⁽¹¹⁾、イオン交換樹脂アンバーライト IR-45 および IR-120 で低温(水槽)で処理して脱塩した。それぞれの糖への分別は、Fig. 1 に示す Dowex 陰イオン交換樹脂カラムクロマトグラフィー(borate 型, 9×60mm)によって行ない⁽¹²⁾、各フラクションを集めてフェノール- H_2SO_4 法⁽¹³⁾によって定量した。なお Fig. 1 における標準糖化合物の回収率は、つぎのとおりであった。ショ糖 105%, マンノース 98%, フラクトース 104%, グルコース 97%。

3. デンプンの分析 可溶性糖抽出残渣 50mg(球茎), 200mg(茎, 葉)について過塩素酸抽出を行ない、抽出液について I_2 -KI 法によってデンプンを定量した⁽¹⁴⁾。この場合、 I_2 -KI 法の検量曲線はジャガイモ精製デンプンを用いた。

4. マンナンの分析 Algranati ら⁽⁵⁾の方法を一部変更して行なった。可溶性糖抽出残渣 30~40mg を 4.5 ml の H_2O にけん濁し、オートクレーブで 120°C, 60 分間加熱したのち、3ml の 2.5N KOH を加え、再びオートクレーブで 40 分間加熱して、マンナンを完全に溶解

した。冷却後, 1N KOH を加えて全容を 10ml としてから遠心分離して, 上澄液 5ml を静かに吸いとった。この溶液にフェーリング液 B および A を各 1.5ml ずつ順次加えて, 15 分間低温に保持したのち, 遠心分離して青色の銅-マンナン複合体を得た。0.5ml の 4N H_2SO_4 に溶解したのち 1.5ml の H_2O を加え, 2 倍容の 95% エタノールを加えて遠心分離した。沈殿を再び 0.5ml の 4N H_2SO_4 に溶解し, 2ml の H_2O を加え冷却しながら, 2.5N KOH を終濃度 1N になるまで添加し, フェーリング溶液を加えて銅-マンナン複合体とした。この沈殿を 0.5N NaOH で 2 回洗浄し, 酸溶解, エタノール沈殿の操作を 2 回くりかえして, やや青味がかった白色のマンナンを得た。この物を 5ml の 4N H_2SO_4 にけん濁し, 沸とう水中で 60 分間加熱して溶解し, その一部をとってフェーノール- H_2SO_4 法によってマンナンを定量した。また, マンナンの糖組成を調べるために, 上述の方法によって得られたマンナンの 4N H_2SO_4 液を 6 時間沸とう水中に加熱したのち, $Ba(OH)_2$ の飽和溶液で中和し, 生じた $BaSO_4$ の沈殿を遠心分離および吸引濾過によって除去し, さらにアンパーライト IR-45 と IR-120 で処理して脱塩し, 可溶性糖の場合と同様に Dowex 陰イオン交換樹脂カラムクロマトグラフィーを行なった。

実 験 結 果

Fig. 2 に, 草丈および乾物重の推移を示す。種いもは発芽前にはかなりの発根が認められた割合には, 乾物重の減少が小さいが, 発芽後は著しく減少して, 地上部で葉の完全展開が認められる 50 日頃 (植えつけ後日数) には, ほぼ完全に消耗する。草丈は発芽から葉の完全展開期まで急激に伸長するが, それ以後ゆるやかになり, 80 日頃からほとんど伸長しない。すなわち, 草丈の伸長は種いも重の減少と一致し, コンニャク地上部の形態的な形成は, ほぼ種いもに依存することが示唆される。茎葉の乾物重増加は初め急であるが, その後も増加し, 110 日頃から低下する傾向を示す。60 日頃からの重量増加は主として葉身部の増加であって, 茎重はほとんど変わらない。新しい重は 50 日頃から顕著に増大するが, とくに 80~140 日で著しい。

可溶性全糖の生育にともなう消長は, Fig. 3 に示される。種いもにおいては植えつけ後しだいに増加して, 40 日頃最大に達し, それ以後急減する。茎, 葉および新しい

Fig. 2. Changes in Plant Height and Dry Weight of Konjak Plants during the Growth.

The arrow shows the date when leaves were completely unfolded.

× plant height, O dry weight of seed bulbs, ● dry weight of growing bulbs, Δ dry weight of stems and leaf blades, ▲ dry weight of leaf blades.

Fig. 3. Changes in Total Sugar Content of Konjak Plants during the Growth.

O seed bulbs, ● growing bulbs, Δ stems, ▲ leaf blades.

もの糖含有率は, 葉の完全展開期に一時的に小さくなるのが特徴的である。葉の展開期以前には, 種いもから養分供給を受けるので, 種いもの消耗が著しくない時期には, 葉, 茎および新しいものの糖含有量は大きい, 種いもの消耗が著しくなり光合成器官の発達も十分でない時期には, 含有量が低下する。しかし, 葉が展開して光合成作用が正常に営まれるようになると, 葉, 茎の糖含有量は増大し, 110 日頃まではほぼ一定に保たれ, それ以後減少する。

Fig. 4 に, 各器官から抽出した糖の陰イオン交換樹脂カラムクロマトグラフィーの溶出パターンの一例を示す。種いもではショ糖, マンノース, フラクトースおよびグルコースが明らかに確認されるほか, 構造未知の

Fig. 4. Elution Pattern of Dowex-1 Anion Exchange Column Chromatography of Soluble Sugars from Growing Konjak Plants.

Soluble sugars were obtained from following plant organs as described in the text (fresh weight and days after planting).

(A) seed bulbs (2g, 40 days), (B) growing bulbs (2g, 78 days), (C) stems (3g, 78 days), (D) leaf blades (1g, 78 days).

糖 (図中の? のフラクション) が検出される。これに対して新しいも、茎、葉ではマンノースの存在が確認できず、ショ糖、フラクトースとグルコースが認められる。Table I に、これら各糖の含有量を示した。全体的に各器官の各糖は、全糖とほぼ同様の傾向で生育に対応する。種いもではショ糖含有量が大きく、ついでフラクトース、グルコース、マンノースの順である。新しいもでは、ショ糖含有量が大きいとはいえ、フラクトース、グルコースの含有量とそれほど大きな差はない。茎ではショ糖含有量はむしろフラクトース、グルコース含有量よりも小さい。葉においてはショ糖含有量が著しく大きく、他

Table I. Changes in Soluble Sugar Contents of Konjak Plants during the Growth (mg/g fresh wt.)

Days after planting	Sucrose	Mannose	Fructose	Glucose	Total sugar
seed bulbs					
0	3.61	0.44	0.28	0.24	4.57
20	3.92	0.53	0.33	0.31	5.19
33	5.35	0.87	0.66	0.58	7.46
40	6.64	1.07	2.80	2.40	12.91
47	2.28	0.56	2.25	2.02	7.11
60	0.35	trace	0.44	0.23	1.07
growing bulbs					
40	6.40	—	6.35	3.67	16.42
47	3.88	—	3.49	1.62	8.99
60	9.00	—	5.00	4.40	18.40
78	4.70	—	3.95	3.93	17.58
109	2.85	—	3.44	2.06	8.35
139	2.53	—	1.84	0.75	5.16
stems					
40	1.44	—	4.32	2.80	8.56
47	1.06	—	1.80	1.35	4.21
60	1.97	—	3.32	2.17	7.47
78	1.65	—	3.03	2.12	6.80
109	2.50	—	2.42	1.65	6.57
139	0.80	—	0.10	—	0.90
leaf blades					
47	3.72	—	1.18	1.34	6.24
60	7.40	—	2.68	1.06	11.14
78	7.80	—	1.14	0.50	9.44
109	12.60	—	1.69	0.34	14.63
139	3.60	—	2.28	0.58	6.46

の植物で得られた結果と、ほぼ一致した結果が得られた。なお、マンノースは新しいも、茎、葉のいずれにおいても、Dowex 陰イオン交換樹脂カラムクロマトグラフィーおよびペーパークロマトグラフィーによって検出することができなかった。

Fig. 5 は、デンプン含有量の変化を示したものである。種いもにおいては、ほぼ乾物重と同様に推移し、新しいもでは葉の展開後急激に増大し、収穫期まではほぼ同程度の含有量を示している。茎では伸長著しい時期には、かなりの含有量が認められるが、その後はほとんど検出されない。葉においては、全生育期間を通じて著しい増減は認められない。

マンナン含有率の変化は、Fig. 6 に示される。種いもでは、デンプン含有量の推移とよく似たパターンを示すが、含有率は約 10 倍程度大きい。新しいもでは、発育の初期からマンナンの存在が認められるが、その含有量は

Fig. 5. Changes in Starch Content of Konjak Plants during the Growth.

○ seed bulbs, ● growing bulbs,
△ stems, ▲ leaf blades.

Fig. 6. Changes in Mannan Content of Konjak Plants during the Growth.

○ seed bulbs, ● growing bulbs,
△ stems, ▲ leaf blades.

Fig. 7. Elution Pattern of Dowex-1 Anion Exchange Column Chromatography of Hydrolyzates of Mannan from Bulbs and Leaf Blades.

(A): mannan hydrolyzate from seed bulbs before planting, (B): mannan hydrolyzate from growing bulbs at the stage of harvest, (C): mannan hydrolyzate from leaf blades sampled at 78 days after planting, (M)n: mannooligosaccharide.

小さく、葉の展開後収穫期までしだいに増大しつづけ、最終的には約 10%、乾物重当りに換算すると 60% 程度になる。なお、種いもも発芽前は約 10% の含有量を示しているが、これは乾物重当りに換算すると 50% に満たない。茎には生育全期を通じて、ほとんどマンナンは含まれない。葉にはかなりの量のマンナンが含まれ（デンプンの約 10 倍）、収穫期を除いてほとんど変化しない。

単離したマンナンの構成糖とその比率を検討するため、マンナンを加水分解してカラムクロマトグラフィーを行なった。Fig. 7 にみられるように、種いもと新しいもの溶出パターンは、きわめてよく類似している。構成糖として、グルコースとマンノースのみが検出され、その比はほぼ 1:1.2 である。これに対して葉のマンナン加水分解物中には、明らかにマンノースが検出されるが、グルコースは確認できない。そして、おそらくマンノオリゴ糖と考えられるいくつかのピークが観察されることから、葉のマンナンは 4N H_2SO_4 , 6 時間加熱では完全に分解されない性質のマンナンではないかと推察される。球茎に含まれるマンナンと葉に含まれるマンナンは化学構造、化学的性質あるいはその機能に違いがあるのではないかと考えられる。葉のマンナンについては、さらに完全加水分解物について検討が必要であろう。

考 察

ここに得られた実験結果をマンナン生合成の観点から考察してみると、第 1 にマンナン合成の場である新しいものには、マンノースが含まれないでショ糖含有量が大いことから、葉または種いもから送られてくる糖は、他の植物と同様にショ糖と考えられる。実際に種いもおよび

葉では、ショ糖の含有量が他の糖に比べて著しく大きく、ショ糖合成の活発なことが推察される。したがって、新しいものでマンナンが合成されるためには、ショ糖からマンノースへの変換が行なわれなければならない。

Bretthauer ら⁽¹⁵⁾ はグルコース培地で培養した *Hansenula holstii* の場合に、グルコース $\rightleftharpoons$ マンノースの変換が phosphomannomutase の作用によって、ヘキソース燐酸のレベルで行なわれることを示唆した。一方、生物界には式 (1) に示されるようなスクレオチド糖レベルでのエピメル化反応を触媒する酵素 (C_4 -エピメラーゼ)

が Leloir⁽¹⁶⁾ によって発見されて以来、数多く認められている⁽¹⁷⁾。Hassid⁽¹⁷⁾ は紅藻のスクレオチド分析の結果から、マンノースの場合にもこの種の反応〔式 (2)〕が

存在するのではないかと暗示している。しかし、式 (2) を触媒する酵素の存在は確認されていない。

第 2 に、新しいもののマンナン含有量は、球茎の発育にもなってしだいに増大するのに対して、デンプンは発育全期を通じてそれほど変化しない。またコンニャク球茎は、栽培年数の増加につれてマンナン含有量が増し、逆にデンプンは低下することが知られている⁽¹⁸⁾ (いわゆるコンニャクだまとして出荷されるまでには、品種によって異なるが、本研究に用いられた在来種などでは 3 年間栽培される)。これらのことから、同じくグルコース供与体といっても、グルコマンナンにとりこまれるグルコースとデンプンにとりこまれるグルコースの供与体は、異なる化合物と考えられる。また、両多糖類の生合成を調節する機構の存在も考えられる。

第 3 に、種いもにおいてはショ糖含有量が大きいが、マンノースも存在することから考えて、種いものマンナンは、デンプンに対するアミラーゼと同様の性質をもった酵素によって、分解されることが示唆される。もし、そうならばマンノースからどのようなメカニズムによって、ショ糖が合成されるのであろうか。しかもこの反応は、ショ糖とマンノースの存在比から判断して、かなり早いことが推察される。

第 4 に、本実験の結果ではコンニャクマンナンの構成糖として、グルコースとマンノースが 1:1.2 の比率で検出された。この値は、市販のコンニャク球茎を材料として研究された Nishida and Hashima⁽¹⁾ (1:2), Smith and Srivastava⁽²⁾ (2:3) のいずれよりもマンノ

ース含量が小さい。この相違は、おそらく用いた材料の品種や栽培年数、あるいは実験法の相違によるのではないかと推察されるが、明確な判断はできない。今後、いろいろな品種や栽培年数の異なる材料について、検討することが必要であろう。

第 5 に、葉には球茎のマンナンとは異なると考えられるマンナンが存在する。その生合成経路と機能についても、興味深いものがある。葉のマンナンは、あるいはその粘質物と関係があるのかもしれない。

また最近、マンナンをほとんど含まないコンニャクの変異株が発見された⁽¹⁸⁾。この変異株は、マンナンのかわりにデンプンを含み、交配実験の結果では劣性遺伝子によって支配されているらしい。このような変異株の利用によって、コンニャクマンナンの生合成経路や、その調節機構を明らかにすることが可能ではないかと考える。

要 約

コンニャクマンナンの生合成の問題点を明らかにする目的で、生育中のコンニャクの各器官の炭水化物について分析を行なった。

(1) 種いも、新しいもおよび葉身などの器官では、可溶性の糖としてショ糖の含有量をもっとも大きく、マンノースは種いもの消耗期においてのみ認められ、他の器官では確認できなかった。

(2) 新しいもののデンプン含有量は生育全期をつうじて、ほぼ 0.5% (生重当り) で一定していた。これに対して、マンナン含有量は生育初期には低く、生育にしたがって増加し、最終的には 10% 以上になった。

(3) 葉身には、コンニャク球茎のマンナンとは化学的性質が異なると考えられるマンナンが存在した。その含有量は、生重当り 0.5% 程度であった。

(4) 分析結果と、コンニャクマンナンの生合成機構との関係について考察した。

本研究の遂行に当たり、群馬県農試渋川こんにゃく試験地から種いもの寄贈をうけ、栽培法その他について有益な御助言をいただいた。ここに記して、感謝の意を表する。

- (1) K. Nishida and H. Hashima: *J. Dept. Agr. Kyushu Imp. Univ.*, **2**, 277 (1930).
- (2) F. Smith and H. C. Srivastava: *J. Amer. Chem. Soc.*, **81**, 1715 (1959).
- (3) T. Akazawa: "Plant Biochemistry," ed. by

- J. Bonner and J.E. Varner, Academic Press Inc., New York, N. Y., 1965, p. 258.
- (4) E. Cabib and L. F. Leloir : *J. Biol. Chem.*, **206**, 779 (1954).
- (5) I. D. Algranati, H. Carminatti and E. Cabib : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **12**, 504 (1963).
- (6) N. H. Behrens and E. Cabib : *J. Biol. Chem.*, **243**, 502 (1968).
- (7) W. J. Lennarz and B. Talamo : *ibid.*, **241**, 2707 (1966).
- (8) M. Scher and W. J. Lennarz : *ibid.*, **244**, 2777 (1969).
- (9) A. D. Elbein and W. Z. Hassid : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **23**, 311 (1966).
- (10) A. D. Elbein : *J. Biol. Chem.*, **244**, 1608 (1969).
- (11) M. Somogyi : *ibid.*, **195**, 19 (1952).
- (12) T. X. Khym and L. P. Zill : *J. Amer. Chem. Soc.*, **74**, 2090 (1952).
- (13) M. Dubois, K. A. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Rebers and F. Smith : *Anal. Chem.*, **28**, 350 (1956).
- (14) R. M. McCready, J. Guggolz, V. Silviera and H. S. Owens : *ibid.*, **22**, 1156 (1950).
- (15) R. K. Bretthauer, D. R. Wilken and R. G. Hansen : *Biochim. Biophys. Acta*, **78**, 420 (1963).
- (16) L. F. Leloir : *Arch. Biochem.*, **33**, 186 (1951).
- (17) W. Z. Hassid : "Metabolic Pathway," Vol. I, ed. by D. M. Greenberg, Academic Press Inc., New York, N. Y., 1967, p. 381.
- (18) 昭和 42 年度群馬県農試金島 こんにゃく試験地試験成績書 (とう写印刷).
-