大麦の発芽に伴うデンプン分解酵素活性および 炭水化物含量の変動*

桐 淵 滋 雄, 中 村 道 徳

(東京大学農学部農芸化学科)

昭和 47 年 12 月 25 日 受 理

An Analytical Study on Starch-degrading Enzymes and Composition of Carbohydrates in the Endosperm during Germination of Barley Seeds (Studies on Germination of Barley Seeds Part I)

By Shigeo KIRIBUCHI and Michinori NAKAMURA

*Department of Agricultural Chemistry, Faculty of Agriculture,
The University of Tokyo*

In order to clarify the mechanism of breakdown of reserve starch in the endosperm of germinating barley seeds, analyses of carbohydrates and activities of starch-degrading enzymes were carried out during the course of germination.

1) α -Amylase activity was found after about 2 days of seed imbibition, and the starch in the endosperm was degraded rapidly in a close parallel to the developmental pattern of α -amylase activity and disappeared from the endosperm starting from areas in contact with the scutellum.

2) β -Amylase activity, already present in the endosperm of ungerminated seeds, increased immediately after seed imbibition. The starch in the endosperm was little degraded by β -amylase during the first 2 days of germination until the α -amylase activity appeared in the seed endosperm.

3) Phosphorylase activity could not be detected in the extracts of seed endosperm during the germination, but there existed a starch-degrading enzyme activity that required inorganic phosphate.

4) There was a transient decline in the content of soluble sugars during the first 2 days of seed germination, followed by the gradual increase which coincided with the degradation of starch. Among the soluble sugars, sucrose content was the highest in seed endosperm during germination, while free fructose content was very small. The content of glucose, although not present in ungerminated seed endosperm, was gradually increased after about 2 days of seed imbibition and did not decline appreciably even at very later stages.

5) The significance of these analytical results was discussed in terms of the physiology of germinating barley seeds.

(Received December 25, 1972)

穀類や豆などデンプン質種子が発芽する際、胚乳部の貯蔵デンプンは分解されて、生長部にエネルギーおよび生合成の基質を提供する。大麦種子はデンプン分解酵素として、もともと β -アミラーゼを含み、発芽とともにその活性は増加するが、最も著しい変化は、未発芽種子にはほとんど存在しなかった α -アミラーゼが、(発芽が

始まると)急速に活性を発現することである。 α -アミラーゼが、糊化デンプンをよく分解することは周知のことなので、種子の発芽の際、胚乳中のデンプンが分解されるのは、主としてこの α -アミラーゼの作用によるものであらうと考えられてきた。 α -アミラーゼが生デンプン粒をも分解し得ることは、種々の α -アミラーゼを用いて研究されており⁽¹⁻³⁾、 α -アミラーゼやデンプンの起源に

* 大麦の発芽に関する研究 (第 1 報)。

より消化性に差のあることや、部分消化したデンプン粒のX線回折図の比較⁽⁴⁾、電顕による形態変化の観察⁽⁵⁻⁷⁾がなされている。また、デンプンの利用の一環として、微生物による生デンプンの分解も研究されており、*Asp. awamori* var. *Kawachi*⁽⁸⁾ や、*Asp. cinnamomeus* の変異株⁽⁹⁾の生産するグルコアミラーゼによる生デンプン分解が報告されている。これらの研究は、いずれもアミラーゼがデンプン粒を分解し得ることを示すものであるが、発芽種子以外の酵素によるデンプン粒の分解であって、発芽種子の酵素が、自身のデンプン粒を分解するのとは趣きを異にする。発芽種子から分離した酵素によるデンプン粒の分解に関する研究は、著者らの知る限りでは、ほとんど行なわれていない。また、糊化デンプンの分解には、多数の酵素が関与し得ることが知られているが⁽¹⁰⁾、これらの酵素が発芽種子中にも存在するかどうか、また存在するとしても、それらの活性がどのように有機的に関連し、調節されているのか、さらにその結果デンプン粒がどのような変化を受けて分解されていくのかなどの問題を、系統的に研究した例もほとんどない。

本研究は、大麦種子を一定条件下で発芽させ、その過程でのデンプンおよび、その分解生産物の変動を調べるとともに、デンプンの分解に関与する可能性のあるいくつかの主な酵素の活性を測定した。さらに、得られた結果について、若干の考察を加えた。

実 験 方 法

1. 試 薬

(1) α -アミラーゼ：Schwimmer & Balls の方法⁽¹¹⁾に準じて精製した。粉碎したビール醸造用麦芽に、5倍量の2%酢酸カルシウム溶液を加え、30°Cで攪拌しながら2時間抽出して、その上澄液を70°C、15分間熱処理後、40%アルコール存在下で、生モチ米デンプンに α -アミラーゼを吸着させた。デンプンを集め、ほぼ同量の0.1Mトリス-塩酸緩衝液(pH 7.5, 0.5%酢酸カルシウム含有)を加え、45°Cで1時間攪拌して、 α -アミラーゼを溶出させた。溶出した α -アミラーゼは、硫酸0.6飽和で沈でんさせ、氷室に保存した。後述1-(4)の方法で活性を測定すると、比活性は2240単位/mgタンパク質であった。

(2) β -アミラーゼ：粉碎した未発芽のビール醸造用大麦に、5倍量の5%NaCl溶液(0.2%チオグリコール含有)を加え、30°Cで攪拌しながら2時間抽出

して、その上澄液をpH 3.6~3.7にして、1週間氷室に放置した⁽¹²⁾。多くの大麦抽出液では、この酸処理でも α -アミラーゼを完全には失活できなかったため、さらにアンモニア水でpH 6.3とし、EDTA溶液(pH 6.3)を終濃度0.02Mになるように加え、30°Cで30分間保温した。これを硫酸分画(0.3~0.5飽和)してから、少量の0.005Mリン酸緩衝液(pH 7.0)に溶解し、同緩衝液に対して透析後、同緩衝液で緩衝化したDEAE-セルロースに吸着させ、同緩衝液中0~0.5MまでのNaCl濃度で直線的濃度勾配で溶出させ、 β -アミラーゼ活性画分を集めた。さらに、この画分を0.005Mリン酸緩衝液で平衡化したSephadex G-200でゲル濾過をし、最後に硫酸0.6飽和で沈でんさせ、氷室に保存した。得られた β -アミラーゼは、 β -限界デキストリン溶液に作用させても、ヨウ素呈色を減少させなかった。また、マルターゼおよび α , β -限界デキストリナーゼ活性も認められなかった。後述4-(2)の方法で活性を測定すると、比活性は186単位/mgタンパク質であった。

(3) β -限界デキストリン：2%可溶性デンプン溶液(0.05M酢酸緩衝液, pH 4.8含有)100mlに大麦 β -アミラーゼ(600単位)を加え、トルエン存在下で30°C、24時間反応させた。これを1分間沸とうさせて、凝固物を除いてから減圧濃縮し、エタノールを加えてデキストリンを沈でんさせた。得られたデキストリンの溶液に、 β -アミラーゼをさらに作用させても、還元糖の増加は認められなかった。

(4) α , β -限界デキストリン：10%可溶性デンプン溶液(0.05M酢酸緩衝液, pH 4.8含有)500mlに α -アミラーゼ(2.5×10^4 単位)および β -アミラーゼ(1440単位)を加え、トルエン存在下で30°C、48時間反応させた。老化して沈でんしたデンプンは、1N NaOH溶液で溶解後、pH 4.8に調整し、再び α -および β -アミラーゼを加え、30°Cで24時間反応させた。反応液を合せ、1分間沸とうさせて、凝固物を除いてから減圧濃縮し、エタノールでデキストリンを沈でんさせた。これを99%エタノールで2回、各30分間加熱還流し、可溶性の糖を除去した。得られた α , β -限界デキストリンを、グルコースを基準にしてアントロン-硫酸法⁽¹³⁾で全糖を、またSomogyi-Nelson法^(14,15)で還元糖を定量し、その比から平均重合度を算出すると約9であった。

2. 大麦の発芽 大麦(ビール醸造用二条大麦, ニューゴールドン種, 茨城県産)を50% H_2SO_4 に2時間

浸してから、流水中でもみ洗いをして外殻を除き、洗液が中性になるまで水洗し、これを水に 45 分間浸して吸水させた。吸水後の水分含量は約 34% であった。吸水させたものを、0.1% 逆性石けん液（オスバン液、武田薬品工業製）に 10 分間浸してから滅菌水で十分洗い、滅菌した吸水パーミキュライトを敷いた深いペトリ皿にまき、20°C、暗所で発芽させた。発芽率は、90% 以上であった。微生物の汚染をさけるため、1つの実験には1つのペトリ皿を使用した。発芽0日目の試料は、吸水させる前のものを用いた。

3. 糖質の分析 生育している幼根および幼芽を、胚盤とともにピンセットで除き、胚乳部のみをとり、生重量と粒数を測定後、分析に供した。糖含量は、大麦 10 粒当りの値に換算して表示した。

(1) 全糖およびデンプン：採取した胚乳部を直ちに 90°C、30 分間加熱して酵素活性を止め、さらに 60°C で1夜乾燥した。これを粉碎し、その一部を 1N H₂SO₄ とともに 100°C で1時間加水分解し、1N NaOH 溶液中で中和し、Somogyi-Nelson 法で全糖をグルコースとして定量した。

デンプンは Greenwood 法⁽¹⁶⁾により、40% HClO₄ で抽出し、抽出液についてアントロン-硫酸法でグルコースとして定量し、その値を 0.9 倍してデンプン量とした。

(2) 可溶性糖：胚乳部を 80% エタノール中で、10 分間加熱還流して酵素活性を止め、エタノールとともに磨砕し、それを1時間加熱還流して可溶性糖を抽出した。残渣は抽出を4回繰り返す、最後に残渣を 80% エタノールで、洗液がアントロン試薬で呈色しなくなるまで洗い、抽出液と洗液を合せて可溶性糖定量試料とした。

(i) 全可溶性糖：アントロン-硫酸法でグルコースとして定量した。

(ii) グルコース：グルコース-オキシダーゼ系からなる臨床検査用セット“Glucomesser”（東京臓器化学製）を用いて定量した。なお、発色のため加える 50% H₂SO₄ は、感度を上げるため 1ml に減量した。

(iii) フルクトースおよびショ糖：試料溶液に NaOH 溶液を終濃度 0.2M になるように加え、沸とう水浴中で 10 分間加熱して還元糖を分解した後、システイン-カルバゾール-硫酸法⁽¹⁷⁾でケトースをフルクトースとして定量し、その値を 1.9 倍してショ糖量とした。また、試料溶液そのまま全ケトースをフルクトースとして定量

し、これからショ糖量に相当するフルクトース量を差引いた値を、遊離のフルクトース量とした。

4. 酵素活性の測定 胚乳部約 5g を冷 0.01M リン酸緩衝液 (pH 6.8) 10 ml とともに磨砕し、遠心分離 (10,000×g, 15 分間) して、その上澄を酵素液とした。活性は、大麦 1 粒当りの値に換算して表示した。

(1) α-アミラーゼ：β-アミラーゼの共存下で活性測定ができる International Association for Cereal Chemistry 法⁽¹⁸⁾を一部変更して、次のように行なった。2% β-限界デキストリン溶液 (2M 酢酸緩衝液, pH 4.7 含有) 1ml に、0.2% 酢酸カルシウム溶液で適当に希釈した酵素液 3ml を加え、30°C で反応させた。5~10 分間隔で反応液 0.5ml を 0.0088% ヨウ素-0.4% ヨウ化カリウム溶液 2.5ml 中に吹き込み、水 5ml で希釈して 575 mμ での吸光度 (E) を測定した。反応時間 t に対する log E のプロットが直線関係にある範囲で、アミラーゼ活性を次式で算出した。

$$\alpha\text{-アミラーゼ活性} = 300 \times (\log E_1 - \log E_2) / t_2 - t_1$$

係数 300 は、実用的スケールの数値にするための値である。

(2) β-アミラーゼ：Bernfeld 法⁽¹⁹⁾によったが、反応温度を 30°C に変更し、生成する還元糖をマルトースとして測定し、1分間に 1 μmole 生成する酵素量を 1 単位とした。なお、基質に用いた可溶性デンプン（アミラーゼ活性測定用、和光純薬製）自体が還元力を示すので、NaBH₄ 処理⁽²⁰⁾をして使用した。また共存する α-アミラーゼ作用により生じる還元力を補正するため、あらかじめ α-アミラーゼの糊精化力に相当する糖化力を求めておき（使用した大麦 α-アミラーゼの糊精化力 1 単位は糖化力 1.58 × 10⁻³ 単位に相当した）、さらに測定した α-アミラーゼ活性に相当する還元力を差引いた。マルターゼにより生じる還元力は、上記測定条件では非常に小さく、無視できるので補正しなかった。

(3) マルターゼ：1% マルトース溶液 (0.1M 酢酸緩衝液, pH 4.8 含有) 1.0ml に酵素液 1.0ml を加え、30°C で 30 分間反応させ、生成したグルコースをグルコース-オキシダーゼ法で定量した。酵素活性は、1分間に 1 μmole のグルコースを生成する酵素量を 1 単位と定めた。

(4) α, β-限界デキストリナーゼ：1% α, β-限界デキストリン溶液 5.0ml, 0.1M トリス-マレート緩衝液 (pH 6.8) 4.0ml, 酵素液 1.0ml をトルエン存在下

で, 30°C, 24 時間反応させ, 増加する還元力をグルコースとして Somogyi-Nelson 法で定量し, 1 分間にグルコース 1 μ mole を生成する酵素量を 1 単位と定めた.

(5) 無機リン酸要求デンプン分解活性: 胚乳部を 0.01 M トリス-マレート緩衝液 (pH 6.8) とともに磨砕し, 遠心分離して得た上澄を, 上記緩衝液に対して 24 時間透析した. その間, 3 回外液を交換した. 反応液組成は, 無機リン酸添加系は, 1% 可溶性デンプン溶液 2.5 ml, 0.5 M トリス-マレート緩衝液 (pH 6.8) 1.5 ml, 50 mM リン酸緩衝液 (pH 6.8) 0.5 ml. 無機リン酸無添加系は, 上記組成で, リン酸緩衝液の代りにトリス-マレート緩衝液を加えた. 反応は, 透析酵素液を両反応系にそれぞれ 0.5 ml を加え, 30°C で反応させ, α -アミラーゼ活性の測定法に準じて, ヨウ素呈色の減少を測定した. これより α -アミラーゼ活性計算式を用いて, 無機リン酸添加系と無添加系でのそれぞれの値を求め (ただし, 係数 300 は用いない), 両者の差を 1000 倍して無機リン酸要求デンプン分解活性とした.

5. 糖のペーパークロマトグラフィー 東洋濾紙 No. 50 を用い, *n*-ブタノール: ピリジン: 水 (6:4:3) の溶媒系で, 20°C において下降法で 24 時間展開した. 呈色は AgNO₃ 試薬⁽²¹⁾によった.

実験結果および考察

1. 発芽過程における種子の外見上の変化

Fig. 1 および Fig. 2 は, 吸水後の発芽種子の発育状

Fig. 1. General Appearance of the Germinating Barley Seed.

Dehusked barley seeds were germinated in the dark at 20°C for days as indicated in the figure.

Fig. 2. Schematic Representation of the Utilization of what in the Endosperm during Germination of Barley Seeds.

The shadowed area looked transported and devoid of starch granules.

Fig. 3. Changes of Dry Weight, Total Sugar and Starch in Germinating Barley Seed Endosperm.

況および胚乳中のデンプンが消失していく様子を示した. 吸水後, 3~4 日目から胚乳部のデンプンは, 胚盤に接した部分から消失し始め, 6~7 日で約 50%, 12 日目には 90% 以上が消失し, それ以後生長はほとんど止まった.

2. 発芽過程での糖質の変動

種子の乾燥重量は, 吸水後 2 日間はほとんど変化がないが, 2 日目以降急激に減少し, 発芽中期 (7~10 日) からその減少は再びゆるくなる (Fig. 3). デンプンは全糖質の大部分を占め, 乾燥重量とはほぼ平行して減少し (Fig. 3), 一方, 可溶性糖は 2 日目から急増する (Fig. 4). これから, 貯蔵デンプンは吸水 2 日目から分解を始め, 可溶性糖に変化すると見られる. 発芽過程での胚乳部の可溶性糖の変化の特徴あるパターンは, 未発芽種子にもともと含まれていた可溶性糖が吸

Fig. 4. Changes of Total Soluble Sugar and Individual Sugars in Germinating Barley Seed Endosperm.

The shadowed area is the difference between the content of total soluble sugars and the sum of the individual sugar components.

水後直ちに減少し、貯蔵デンプンが分解し始める2日目までにはほとんど消費され、デンプン分解の開始に伴って再び増加し始め、吸水後6日目に最高になり、以後減少し始めることである (Fig. 4)。可溶性糖のうち、グルコースのみは未発芽種子および吸水後2日目まではほとんど含まれず、2日目から徐々に増加していく。フルクトースは、未発芽種子にも微量含まれ、吸水後2日目までにはほとんど完全に消費され、以後再び増加はするが、未発芽種子のレベルまでには達しない。

発芽の際、種子中のショ糖がいったん減少するのは、米などで観察されているが⁽²²⁾、発芽初期の生理的变化として、増加する呼吸の基質として、遊離の単糖や少糖類が優先的に利用され、吸水2日目以降はデンプン分解が進み、種々の反応の基質は、これより供給されるものと考えられる。すなわち、種子中に貯蔵されているデンプン以外の単糖や少糖類の存在は、種子の登熟期の単なる名残りではなく、発芽初期の代謝に利用される重要な役割を果たす合目的な存在であろう。

発芽中期 (6日目以降) から胚乳部のショ糖は減少し始め、グルコースは漸増し続け、可溶性糖の主要構成糖となる。発芽に伴って生成する胚乳部の可溶性糖は、胚乳部に蓄積されず、生長部へ移行するが、その移行する形はショ糖であるといわれている。しかし、発芽の全期間を通じて、グルコースは漸増し、発芽後期には、可溶

Fig. 5. Paper Chromatogram of Soluble Sugars in Germinating Barley Seed Endosperm.

G: glucose, F: fructose, M: maltose.

Chromatography was carried out on a Toyo Roshi No. 50 paper by the descending technique using *n*-butanol-pyridine-water (6:4:3 v/v) as the solvent.

The sugars were detected by the alkaline AgNO_3 reagent.

性糖の主要構成糖になるのに対し、フルクトースは、全発芽過程で胚乳部にわずかししか含まれていない。ショ糖の合成は、胚乳部で行なわれているのではなく、胚盤で行なわれるといわれている^(23,24)。そうすると、胚乳部は原料のグルコースを供給する場所であると推察され、ただ供給が需要を上回るため、胚乳部に一部逆行し、蓄積されるものと考えられる。しかし、デンプンから遊離の糖を経由しないで、ショ糖を生成する系が関与していないか、さらに検討の必要がある。

全可溶性糖と、グルコース、フルクトースおよびショ糖の和との差 (Fig. 4 の斜線部分) を一応デキストリンと見なすと、 α -アミラーゼ活性が発現し始める吸水後2日目からデキストリンが生成され、最大活性を示す6~7日目が最も多くなる。可溶性糖画分のペーパークロマトグラムを見ると、あまり重合度の大きいデキストリンは見当たらない。これらの結果と Fig. 2 に示したように、発芽の進行に伴い、胚乳部が液化*されていく現象と併せて考えると、発芽過程におけるデンプンの分解には、

* デンプン粒が消失して、そのあとが溶液状態になることを一応液化と呼ぶことにする。液化酵素によるデンプンの液化とは、直接の関係はない。

Fig. 6. Enzyme Activities in the Extracts of Germinating Barley Endosperm.

α -アミラーゼが主役を演じているものと推察される。

3. 発芽過程での酵素活性の変化

Fig. 6に、発芽中のデンプン分解に関する酵素活性の変化を示した。未発芽種子には α -アミラーゼ活性はなく、また吸水後2日間は活性は非常に弱い。しかし、このlag期を過ぎると急激に活性は増加し、吸水後6~7日目に最高になり、それ以後、活性は低下し始めるが、発芽後期でも最高活性の50%以上の活性を保っている。 β -アミラーゼは未発芽種子にすでに活性があり、吸水後直ちに活性は増加し、 α -アミラーゼと同じく、6~7日目に活性は最高になり、発芽前の2倍以上の活性になる。それ以後、活性は低下するが、発芽後期でも発芽前の活性より低くなることはない。無機リン酸要求デンプン分解活性と、 α , β -限界デキストリナーゼ活性は、全発芽過程を通して同じような経過を示し、未発芽種子には活性がなく、2~3日のlag期間を経てから急速に活性は上昇し、 α -および β -アミラーゼ活性より、1~2日遅れて最高活性に達する。マルターゼ活性は未発芽種子にもわずかに活性があるが、吸水後4日くらいは活性に変化がなく、4日目以降徐々に活性が上昇し、10日目くらいに最高活性を示す。しかし、他の酵素活性と異なり、発芽過程での活性の上昇はゆるやかで、しかも発芽後期でも活性の低下は顕著ではない。

*in vitro*での酵素活性の測定結果が、*in vivo*での糖代謝の姿を直接表わしているとはいえないかもしれないが、各酵素活性の発現時期、活性の増加速度から判断すると、 α -アミラーゼ活性はデンプン分解の動きと全く平

行しており、 β -アミラーゼは未発芽種子に活性があるにもかかわらず、胚乳部の可溶性糖の動きから見ると、発芽初期(1~2日)のintactなデンプン粒には作用していないようである。これらから判断して発芽時のデンプン分解は、 α -アミラーゼが主で、 β -アミラーゼが従の関係にあると考えられる。

大麦中には、zymogen型の β -アミラーゼが存在し⁽²⁵⁾、発芽に際して活性化され、発芽中に増加する β -アミラーゼは、このzymogen型 β -アミラーゼの活性化のみで、*de novo*合成はほとんどないと考えられている⁽²⁶⁾。前述のように、未発芽種子に既に存在する活性 β -アミラーゼは、intactな生デンプンに作用していないから、発芽過程でのデンプン分解には、zymogen型 β -アミラーゼが活性化されることで、時間的に十分間に合うと考えられる。そうすると、この相当量の既存 β -アミラーゼの役割を、あらためて考えてみる必要がある。

ホスホリラーゼが生デンプンに作用し得るか、また発芽時のデンプン分解にどの程度関与するのかは、非常に興味ある問題である。Turvey⁽²⁷⁾は馬鈴薯のホスホリラーゼが、デンプン粒を徐々に分解することを観察しており、Walker⁽²⁾は羊のルーメン細菌の酵素による生デンプン分解に、 α -アミラーゼのみではなく、ホスホリラーゼが関与する可能性を示唆している。Swain⁽²⁸⁾はエンドウの発芽実験で、加水分解的な分解系と加リン酸分解的な分解系の2つの系で、デンプンが分解されていると述べている。一方、Murataら⁽²²⁾は米の発芽実験で、 α -アミラーゼとホスホリラーゼ活性の量的関係から、デンプン分解は加水分解的な分解が主流で、加リン酸分解的な分解は、むしろ副次的な経路にすぎないと推論している。しかし、ホスホリラーゼ作用により生成するグルコース-1-リン酸は、種々の代謝の鍵物質であり、遊離のグルコースを生産するより、生体にとっては合理的な経路のはずである。

大麦の胚乳抽出液は β -アミラーゼおよびグルコース-1-リン酸に対するホスファターゼ活性が強く、それらに対する阻害剤を併用するホスホリラーゼ活性測定法を検討したが、現在までのところ満足すべき結果が得られず、胚乳抽出液でホスホリラーゼ活性を直接測定することは非常に困難であった(Fig. 7)。従って本実験では、胚乳抽出液を透析して無機リン酸を除いたものを酵素液として、無機リン酸添加系と無添加系でのデンプンのヨウ素呈色度の減少速度の差で、デンプン分解力を測定し

Fig. 7. Effects of Phosphatase and β -Amylase and their Inhibitors on Phosphorylase Activity.

—●— complete system (C.S.), containing 1.0 ml of 0.5 M acetate buffer (pH 6.0), 0.25 ml of 0.2 M G-1-P, 0.25 ml of 5% starch (primer) and 0.25 ml of barley endosperm extract in a total volume of 3.0 ml, —□— C.S. + primer, —△— C.S. + Hg^{2+} (5×10^{-6} M), —×— C.S. + Hg^{2+} + F^- (100 mM), —○— C.S. + F^- , —■— C.S. + F^- + primer.

た。この差（無機リン酸要求デンプン分解活性）が、直ちにホスホリラーゼ活性であると速断はできないが、発芽時に無機リン酸を要求するデンプン分解活性が存在することは興味ある結果である。なお、この実験で無機リン酸添加系と無添加系のデンプン分解に及ぼす効果を還元力の生成で測定すると、2つの系の間にほとんど差は認められなかった。デンプンの分解がグルコース-1-リン酸の段階で止まっているとすると、2つの系の還元力の間に差を生じないことは理解できるが、実際には反応液中にグルコース-1-リン酸は検出されず、また前述のように酵素液にはホスファターゼ活性が強いので、グルコース-1-リン酸が生じたとしても分解され、遊離のグルコースとなり、当然還元力が増加するはずであるが、実験では測定されなかった。この理由については、今のところ説明し得ない。

α -1,6-グルコシド結合を切断する、いわゆる debranching 酵素の発芽時の挙動は、発芽時のデンプン分解機構を知るうえで重要である。 α 、 β -限界デキストリナーゼ活性は、デンプンのアミロース画分が顕著に増加する時期⁽²⁰⁾とはば時を同じくして、活性が上昇している (Fig. 6)。これは Manners⁽²⁰⁾ が、同じく大麦を発芽させて観察した α -限界デキストリナーゼ活性の動きと類似している。MacWilliam ら⁽²¹⁾は、ソラ豆や馬鈴薯の debranching 酵素をアミロペクチンに作用する活性と、

α -限界デキストリンのみに作用する活性とに分離し、前者をR酵素、後者を限界デキストリナーゼと呼ぶことを提唱し、Manners⁽²²⁾ も大麦麦芽に両酵素が存在することを報告している。一方、Drummond ら⁽²³⁾はR酵素と限界デキストリナーゼは、同一酵素であろうと述べている。本実験で、 α 、 β -限界デキストリナーゼとして測定した活性が、限界デキストリンのみに作用するのか、あるいは高分子基質にも作用するのかは、今後さらに精製した酵素で検討する必要がある。

マルターゼは α -および β -アミラーゼによる生産物、マルトースを分解するのが主作用と考えられており、Schwimmer⁽²⁴⁾は生デンプンの分解に、分解産物のマルトースが反応系に蓄積すると、 α -アミラーゼが阻害されるので、デンプンの完全分解には α -アミラーゼとともに β -アミラーゼよりも、むしろマルターゼの共存が必要であると述べている。発芽中の活性から見ると、 α -アミラーゼがデンプンを分解し始めている発芽4日目くらいから、活性が上昇している。しかし、発芽過程での α -および β -アミラーゼ活性の増加に比較すると、マルターゼ活性の増加は少なく、両活性間の釣合いはとれない。Jørgensen⁽²⁵⁾は大麦麦芽の α -グルコシダーゼはマルトースのみではなく、デンプンの非還元末端からグルコースを切断していく、いわゆるグルコアミラーゼに似た作用のあることを報告している。また、Marshall⁽²⁶⁾はスイートコーンと麦芽抽出液に、酸性 α -グルコシダーゼの存在を発見している。動物では、酸性 α -グルコシダーゼは *in vivo* でのグリコーゲン分解に重要な役割を演じており⁽²⁷⁾、植物でのデンプン分解における α -グルコシダーゼの役割を、さらに検討する必要がある。

要 約

大麦発芽時の貯蔵デンプンの分解機構を明らかにする目的で、発芽過程の大麦胚乳部のデンプン分解に関与し得る主な酵素活性、ならびに糖質含量の変動を測定した。

(1) α -アミラーゼ活性は吸水後2日目から発現し、デンプンの分解はそれと平行しており、胚盤に接する胚乳部分から消失していった。

(2) β -アミラーゼは未発芽種子にも含まれ、吸水後直ちに活性は上昇するが、 α -アミラーゼ活性が発現するまでは、デンプン分解に関与していないようである。

(3) ホスホリラーゼ活性は測定できなかったが、発

芽過程で無機リン酸を要求するデンプン分解酵素活性が存在した。

(4) 未発芽種子に含まれる可溶性糖は、吸水後直ちに一時的に減少し、デンプン分解が始まると再び増加する。

(5) 全発芽過程で、可溶性糖としてフルクトースが最も少なく、ショ糖が最も多い。ショ糖についてデキストリンが多く、その含量の動きは α -アミラーゼ活性の動きとよく合っている。グルコースは未発芽種子に存在せず、吸水後2日目から漸増し、発芽後期には可溶性糖中最も多くなる。

(6) 測定結果と、発芽過程のデンプン分解機構との関係について考察した。

本実験に使用した大麦および麦芽の寄贈をうけたアサヒビール株式会社、ならびにサッポロビール株式会社に深謝します。

- (1) G. J. Walker and P. M. Hope : *Biochem. J.*, **86**, 452 (1963).
- (2) *idem* : *ibid.*, **90**, 398 (1964).
- (3) P. Nordin and Y. S. Kim : *J. Am. Chem. Soc.*, **82**, 4602 (1960).
- (4) 福井俊郎, 藤井ミチ子, 二国二郎 : 農化, **38**, 262 (1964).
- (5) Z. Nikuni and R. L. Whisler : *J. Biochem. (Tokyo)*, **44**, 227 (1957).
- (6) A. D. Evers und E. E. McDermott : *Die Stärke*, **22**, 23 (1970).
- (7) D. Gallant, Christian Mercier and A. Guilbot : *Cereal Chem.*, **49**, 354 (1972).
- (8) 山崎何恵, 上田誠之助 : 農化, **24**, 181 (1951).
- (9) 北原覚雄 : 昭和 46 年度アミラーゼシンポジウム講演要旨, p. 2 (1971).
- (10) C. T. Greenwood and E. A. Milne : "Adv. in Carbohydrate Chem.," Vol. 23, ed. by M. L. Wolfson and R. S. Tipson, Academic Press, New York, 1968, p. 282.
- (11) S. Schwimmer and A. K. Balls : *J. Biol. Chem.*, **179**, 1063 (1949).
- (12) J. Bloom, A. Bak und B. Braae : *Z. Physiol. Chem.*, **241**, 273 (1936).
- (13) W. E. Trevelyan and J. S. Harrison : *Biochem. J.*, **50**, 298 (1952).
- (14) N. Nelson : *J. Biol. Chem.*, **153**, 375 (1944).
- (15) M. Somogyi : *ibid.*, **195**, 19 (1952).
- (16) C. T. Greenwood : *Carbohydrate Res.*, **1**, 17 (1965).
- (17) M. Nakamura : *Agr. Biol. Chem.*, **32**, 701 (1968).
- (18) H. Perten : *Cereal Chem.*, **43**, 336 (1966).
- (19) P. Bernfeld : "Methods in Enzymology," Vol. I, ed. by S. P. Colowick and N. O. Kaplan, Academic Press, New York, 1955, p. 149.
- (20) D. H. Strumeyer : *Anal. Biochem.*, **19**, 61 (1967).
- (21) W. E. Trevelyan, D. P. Protector and J. H. Harrison : *Nature*, **166**, 444 (1950).
- (22) T. Murata, T. Akazawa and S. Fukuchi : *Plant Physiol.*, **43**, 1899 (1968).
- (23) J. Edelman, S. Shibko and A. T. Keys : *J. Exp. Bot.*, **10**, 178 (1959).
- (24) Y. Nomura, Y. Kono and T. Akazawa : *Plant Physiol.*, **44**, 765 (1969).
- (25) J. S. Ford and J. M. Guthrie : *J. Inst. Brew.*, **14**, 61, 472 (1908).
- (26) R. Shinke and N. Mugibayashi : *Agr. Biol. Chem.*, **35**, 1391 (1971).
- (27) J. R. Turvey and R. C. Hughes : *Biochem. J.*, **69**, 4 p (1958).
- (28) R. R. Swain and E. E. Dekker : *Biochim. Biophys. Acta*, **122**, 75 (1966).
- (29) 桐淵滋雄, 中村道徳 : 農化, **47**, 341 (1973).
- (30) D. J. Manners and J. J. Marshall : *J. Inst. Brew.*, **75**, 550 (1969).
- (31) I. C. MacWilliam and G. Harris : *Arch. Biochem. Biophys.*, **84**, 442 (1959).
- (32) D. J. Manners and K. L. Spara : *J. Inst. Brew.*, **72**, 11 (1966).
- (33) G. S. Drummond, E. E. Smith and W. J. Whelan : *FEBS Letters*, **9**, 136 (1970).
- (34) S. Schwimmer : *J. Biol. Chem.*, **161**, 219 (1964).
- (35) O. B. Jørgensen : *Acta Chem. Scand.*, **18**, 1975 (1964).
- (36) J. J. Marshall and P. M. Taylor : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **42**, 173 (1971).
- (37) H. G. Hers : *Biochem. J.*, **86**, 11 (1963).