

# 植物の澱粉粒分解酵素に関する研究

## 1. 小豆種子の酵素の無機リン酸による活性化

檜 作 進・中 村 信 之

(昭和52年8月25日 受理)

### Studies on Plant Starch Granule-degrading Enzyme

#### I. Activation of Azuki Seed (*Phaseolus angularis* W.F. Wight) Enzyme by Inorganic Phosphate

Susumu HIZUKURI and Nobuyuki NAKAMURA

(Laboratory of Chemistry and Technology of Agricultural Products)

### 緒 言

植物種子が環境の変化を認識して、発芽の始動にふみ出す際に、先づ利用されるエネルギーは ATP であり、ついで可溶性の形で存在する蔗糖、グルコース、フラクトース、および各種の糖リン酸エステル類であると理解されるが、澱粉を利用する可能性もある。

植物組織に存在し、澱粉を分解する酵素として、 $\alpha$ -アミラーゼ、 $\beta$ -アミラーゼ、ホスホリラーゼ、R-酵素などが知られているが、生体内で澱粉粒に直接作用して、エネルギー源として利用し易い可溶性の糖を生成するのは  $\alpha$ -アミラーゼであると考えられている。 $\alpha$ -アミラーゼのみが試験管内で澱粉粒の分解作用を示すこと、発芽の際に急速に生合成されることなどが有力な根拠である。

代謝制御の観点からみると、一連の代謝系に働く酵素の中で代謝調節に貢献している酵素 (key enzyme) は、アロステリックな性格をもつものが多い。種子が澱粉を利用する際の律速段階は、澱粉粒を分解して可溶性の糖を生成する反応であると推察される。従って未発芽の種子が発芽へ動き始めるとき、何らかのアロステリック因子によって活性化される澱粉粒の分解機構を有している可能性が考えられる。このアロステリック因子としては、先づエネルギー指標である無機リン酸を有力な候補にあげることができる。

このような観点にたつて、本研究では、未発芽の種子に存在し、発芽の開始期に澱粉粒を分解可溶化する酵素の検索を目的とした。予備テストの結果、澱粉粒分解作用の強い小豆種子を材料とした。その結果、未

発芽種子中に無機リン酸で活性化される澱粉粒分解酵素の存在を見出した。本酵素はホスホリラーゼとは異なり、一種のアミラーゼと考えられる。

### 材料および方法

#### 試薬と材料

ホスホグルコムターゼ、ペルオキシダーゼ、グルコース 6-リン酸脱水素酵素、グルコースリン酸イソメラーゼ、NADP<sup>+</sup> (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate) は C. F. Boehringer Mannheim 社、EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) は同仁化学研究所、トリス [Tris (hydroxymethyl) amimomethane] は Sigma Chemical Co., ストレプトマイシンは武田薬品工業、その他の試薬は和光純薬工業の、それぞれ最高純度のものを使用した。グルコースオキシダーゼ (Deoxin), *B. Subtilis* の結晶  $\alpha$ -アミラーゼは長瀬産業より 恵与されたものである。グルコース 1-リン酸カリ (G-1-P, K<sub>2</sub>) は J. H. Ashby らの方法<sup>1)</sup>、馬鈴薯アミロペクチンは E. J. Wilson らの方法<sup>2)</sup>、小豆澱粉はアルカリを用いて、米澱粉の製法<sup>3)</sup> に準じて調製した。

### 実験方法

$\alpha$ -アミラーゼの活性の測定 不破の方法<sup>4)</sup> を若干変更して行った。すなわち、0.2% 馬鈴薯アミロース溶液 250  $\mu$ l と 0.5 M maleate-NaOH の緩衝液 (pH 6.5) 100  $\mu$ l の混合液に、適当に希釈した酵素液 150  $\mu$ l を加えて、37°C で 30 分反応させた。これに 1 N 酢酸 0.5 ml を加えて反応を停止し、蒸留水 4 ml を加えて希釈し、1,800 $\times$ g で 10 分間遠心分離して濁りを除いた後、上清液 2 ml に 2% KI-0.2% I<sub>2</sub> 溶液

本論文のデータは中村信之の修士論文 (鹿児島大学農学部研究科 昭和46年) から引用した。

0.2 ml を加え、水を加えて 10 ml とし、分光光度計を用いて、光路長 1 cm のセル中で 700 nm の吸光度を測定した。ここで 1 単位の酵素量は、ヨード呈色度を 10% 減少させる量である。

**ホスホリラーゼ活性の測定** 2% の可溶性澱粉と 50 mM の G-1-P を含む 0.05 M クエン酸緩衝液 (pH 6.0) 0.2 ml に 0.05 ml の酵素液を加えて 30°C で反応させた。10 分後に 3% のトリクロール酢酸 (TCA) 1 ml を加えて反応を停止し、生成した沈澱物を遠心分離して除き、その上清液について、C. H. Fiske ら<sup>9)</sup> の方法により無機リン酸を定量した。1 単位の酵素量は本条件下で 1 分間に 1  $\mu$  mole の無機リン酸を遊離する力価とした。

**可溶性全糖の定量** アンスロン—硫酸法で定量した。すなわち、検液 0.5 ml に 1.6% のアンスロンを含む 95% 硫酸溶液 3 ml を加えて、沸騰水溶液中で 10 分間加熱後、生成した緑色を Klett-Summerson 光電比色計を用いて、No. 56 のフィルターで呈色度を測定し、グルコースを標準として全糖量を算出した。

**デキストリンの定量** 検液に塩酸を加えて 0.7 N とし、100°C で 3 時間加水分解し、苛性ソーダで中和後、生成したグルコース量をグルコースオキシダーゼを用いて定量し<sup>7)</sup>、加水分解前の G-1-P とグルコースの量を減じてデキストリン量とした。

**全ケトースの定量** J. H. Roe ら<sup>14)</sup> のレゾルシン—塩酸法を採用し、フラクトースを標準として全ケトース量を求めた。

**蛋白質の定量** O. H. Lowry ら<sup>9)</sup> の方法を若干変更して測定した。すなわち、検液 0.5 ml に 1% の Somogyi 試薬<sup>15)</sup> と 2% の炭酸ソーダを含む 0.1 規定の苛性ソーダ溶液 5 ml を加えて 30 分間室温においた後、0.25 ml のフェノール試薬 (2 N) を加えて 30 分後に牛血清アルブミンを標準として、Klett-Summerson 光電比色計を用い、No. 66 のフィルターで呈色度を測定し、蛋白質量とした。

**グルコース 6-リン酸 (G-6-P) の定量** 既報<sup>7)</sup> の方法を若干変更して測定した。検液 200  $\mu$ l に 7.5 mM EDTA, 25 mM MgCl<sub>2</sub>; 500  $\mu$ g/ml NADP<sup>+</sup> を含む 0.225 M トリス—塩酸緩衝液 (pH 7.5) 150  $\mu$ l と G-6-P 脱水素酵素 10  $\mu$ l (0.5  $\mu$ g) を加え、日立—Perkin Elmer 分光光度計 139 を用い、NADP<sup>+</sup> の還元を 340 nm で測定することにより、G-6-P を定量した。

**G-1-P の定量** 上記の方法で G-6-P を定量後、ホスホグルコムターゼ 10  $\mu$ l (4  $\mu$ g) を反応液に添加

して、NADPH の増加を測定し、G-1-P を定量した。

**フラクトース 6-リン酸 (F-6-P) の定量** 上記の方法で G-6-P を定量後、反応混液にホスホグルコムターゼ 10  $\mu$ l (0.8  $\mu$ g) を加えて、NADPH の増加を測定し、F-6-P を定量した。

#### 小豆抽出液の調製法

荒く粉碎した市販の小豆 (*Phaseolus angularis* W. F. Wight) に 4 倍量の水 (0°C) を加えて、家庭用ミキサー中で 1.5 分間処理し、1 分間水冷後再度 1.5 分間処理した。この処理液を 12,000  $\times$  g で 10 分間 2°C で遠心分離し、抽出液を得た。抽出液を 300 倍量の 0.025 M maleate-NaOH 緩衝液 (pH 6.5) に対して 24 時間、この間 4 回緩衝液を取かえて透析した。以下、単に抽出液と言うのは、この透析した抽出液を意味する。なお、この抽出液の無機リン酸の濃度は 0.08 mM 以下であった。

**抽出液のホスホリラーゼの失活処理** 抽出液に 1 N 酢酸を加えて pH を 4.8 に調整し、45°C で 10 分間熱処理した後、12,000  $\times$  g で 10 分間、0°C で遠心分離して沈澱を除き、上清液の pH を 1 N 苛性ソーダで 6.5 に中和した。この処理でホスホリラーゼはほぼ完全に (97% 以上) 失活したが、 $\alpha$ -アミラーゼ活性も 30~40% 程度失活した。

## 結 果

### 澱粉粒の分解に対する無機リン酸の効果

小豆澱粉粒を小豆抽出液に懸濁し、37°C に保温すると、Fig. 1 に示すように、澱粉粒の分解は初期に遅く、可溶化—時間の関係は直線的にならなかった。数回の反復実験の結果、初期の 2 時間以内の分解速度が特に遅いことが確かめられた。しかしながら、反応混液中に 50 mM の無機リン酸を添加すると、初期の分解の遅延現象はみられなくなり、分解速度が 2 倍近くも促進されることが見出された (Fig. 1)。

リン酸の添加による澱粉粒の分解作用の実体を明らかにするために、リン酸の添加、無添加の場合の澱粉粒の分解可溶物の分析を行なった。リン酸無添加の場合は、Fig. 2 に示したように、可溶化生成物はデキストリンが 80% で大部分を占め、次いでグルコースが 19% であった。ケトース、G-6-P、G-1-P を定量したが、何れも痕跡程度が検出されたにすぎなかった (図中省略)。一方、無機リン酸を添加した場合は、デキストリンが 40%、グルコースが 16%、G-6-P が 28%、G-1-P が 4%、ケトースが 8% 検出され、ケ

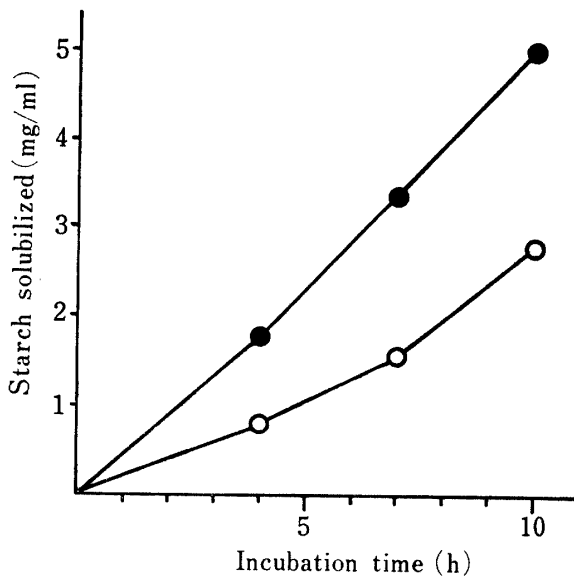


Fig. 1. Effect of inorganic phosphate on the digestion of starch granule by azuki seed extract.

Reaction mixture (*pH* 6.5) contained 150 mg of native azuki starch, 100  $\mu$ g streptomycin, 2.7 ml of dialyzed azuki seed extract and 0.3 ml of 0.5 M phosphate (●) or glass distilled water (○). The mixture was incubated at 37°C.

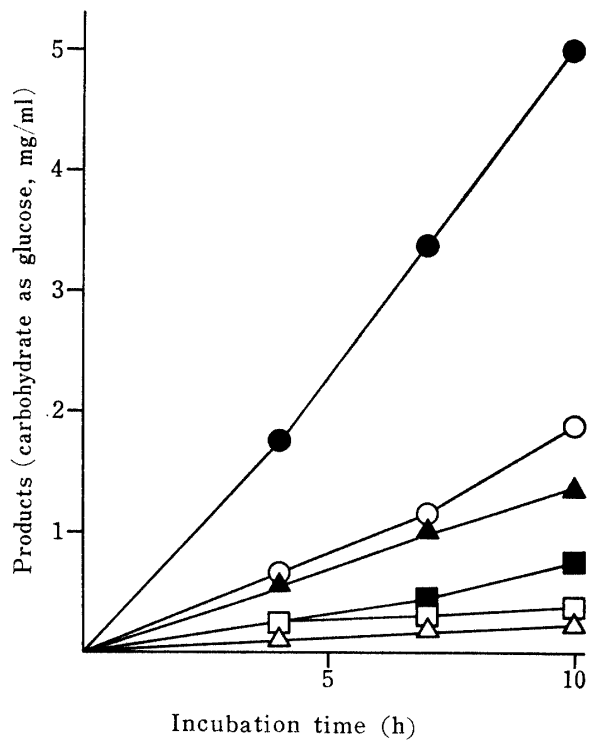


Fig. 3. Time-courses of the formations of solubilized products in the presence of phosphate.

The experimental conditions were the same as in Fig. 1.

- : Total carbohydrates
- : Dextrin
- ▲—▲: Glucose 6-phosphate
- : Glucose
- : Total ketoses
- △—△: Glucose 1-phosphate

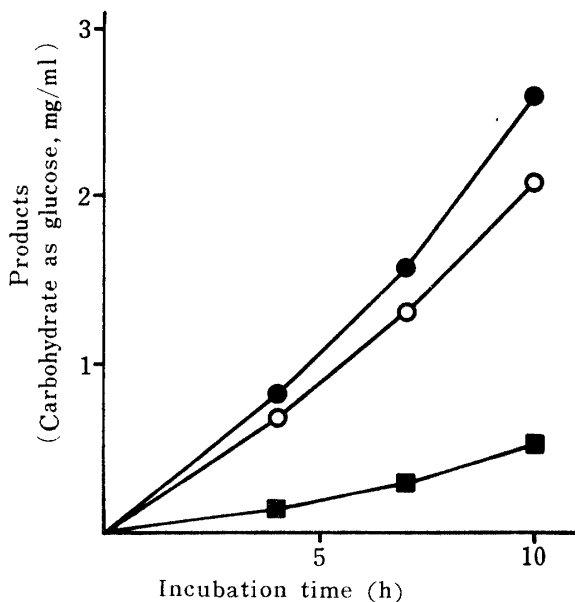


Fig. 2. Time-course of the formation of solubilized products in the absence of phosphate.

The experimental conditions were the same as in Fig. 1.

- : Total carbohydrate
- : Dextrin
- : Glucose

トースの約半量は F-6-P として定量された (Fig. 3). リン酸の添加により、全可溶化物の 36% の糖リン酸が生成することは、リン酸の添加による澱粉分解の促進はホスホリラーゼの作用によることを示唆するようにみられる。無機リン酸の代わりに砒酸を添加すると、リン酸添加時に生成する糖リン酸エステルの約 71% がグルコースとして定量され、糖リン酸エステルは微量検出されたにすぎなかった (Fig. 4). 従って、無機リン酸の添加により糖リン酸エステルが生成するのはホスホリラーゼの関与する反応系に由来することは明らかであるが、ホスホリラーゼは後述のようにリン酸添加による分解促進の効果には無関係である。

小豆種子のホスホリラーゼ活性は、Table 1 のように、乾燥重量当りでは馬鈴薯に匹敵し、乾物量当りでは植物中で含量の高い馬鈴薯よりもはるかに高い値であった。ちなみに、市販の他品種の小豆では、ここに

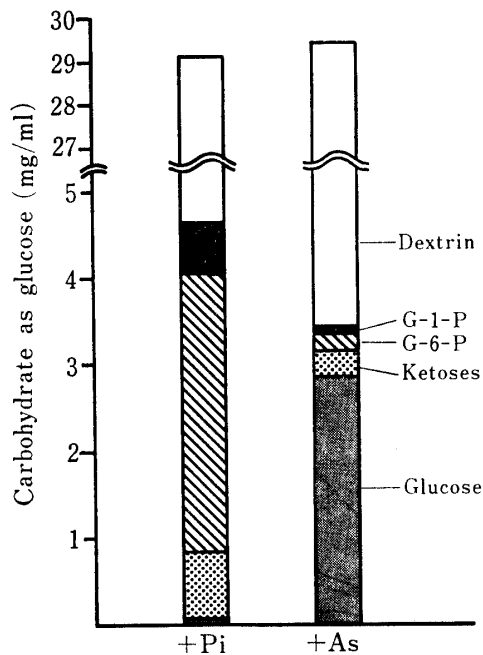


Fig. 4. Solubilized products in the presence of phosphate (+Pi) or arsenate (+As).

Reaction mixture ( $pH$  6.5) was composed of 1g native potato starch, 600  $\mu g$  streptomycin, 18ml azuki seed extract and 2ml 1M sodium phosphate ( $pH$  6.5) or 1M sodium arsenate ( $pH$  6.5). The mixture was incubated at  $37^{\circ}C$  for 5h.

Table 1. Phosphorylase activities of azuki seed and white potato tuber

Materials	U/g Wet tissue	U/g Dry tissue
Azuki	16.7	18.3
White potato	3.0	18.8

用いたものよりも2倍も高い活性を有するものがあった。

**ホスホリラーゼの関与** 無機リン酸の添加による澱粉粒の分解促進効果から、ホスホリラーゼの関与が示唆されたので、抽出液から精製、結晶化したホスホリラーゼ<sup>12)</sup>を抽出液に抽出液中の活性と同程度添加して、澱粉の分解作用を調べたが、添加による分解の促進効果は全く認められなかった。また、 $pH$  4.8で $45^{\circ}C$ ; 10分間処理してホスホリラーゼを失活させた抽出液に結晶ホスホリラーゼを添加した場合も、ホスホリラーゼの添加効果は全く認められなかった (Fig. 5)。さらに、結晶ホスホリラーゼ単独 (リン酸存在下) で澱粉粒に作用させた場合も、澱粉粒の分解は痕跡程度にすぎず、ホスホリラーゼが澱粉粒に直接作用しない

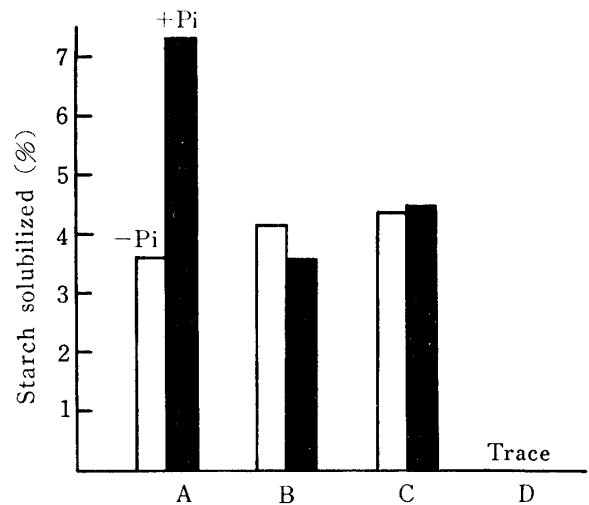


Fig. 5. participation of phosphorylase in the digestion of starch granule by azuki seed extract.

A: Extract; B: Phosphorylase inactivated extract; C: Phosphorylase inactivated enzyme + Phosphorylase; D: Phosphorylase

Reaction mixture contained 150mg native azuki starch, 100  $\mu g$  streptomycin, 50mM phosphate when added (Pi) and 3ml appropriately diluted enzyme solution,  $pH$  6.5 (218 units  $\alpha$ -amylase and 8.4 units phosphorylase). The mixture was incubated at  $37^{\circ}C$  for 15h.

ことが確められた。

これらの事実は、明らかにホスホリラーゼは澱粉粒の分解可溶化に関与しないことを意味している。

**各種澱粉粒に対する作用** 小豆抽出液の各種澱粉粒の分解に対する作用特異性を調べた結果が Fig. 6 である。米澱粉粒には非常によく働き、馬鈴薯澱粉には最も作用し難いが、馬鈴薯、甘藷、小豆の澱粉の間では作用に大差がなかった。米澱粉が最も容易に分解され、馬鈴薯澱粉が最も分解され難いのは、種々のアミラーゼが澱粉粒を分解する場合と同じ傾向であるが、小豆、甘藷、馬鈴薯の各澱粉粒の分解性に大差のないのは特徴的である。比較のために、澱粉粒の分解力の強い細菌  $\alpha$ -アミラーゼについての同様な実験を行なった結果を Fig. 7 に示す。細菌  $\alpha$ -アミラーゼによる各種澱粉粒の分解性の順序は、小豆抽出液の場合と同じであるが、小豆、甘藷、馬鈴薯では明らかに分解性の相違があった。Fig. 6 と 7 の結果を比較すると、馬鈴薯澱粉を除く、他の澱粉では小豆抽出液の方が細菌  $\alpha$ -アミラーゼより、分解能が低い、抽出液ではリン酸を添加すると、分解力が2倍近く上昇すること

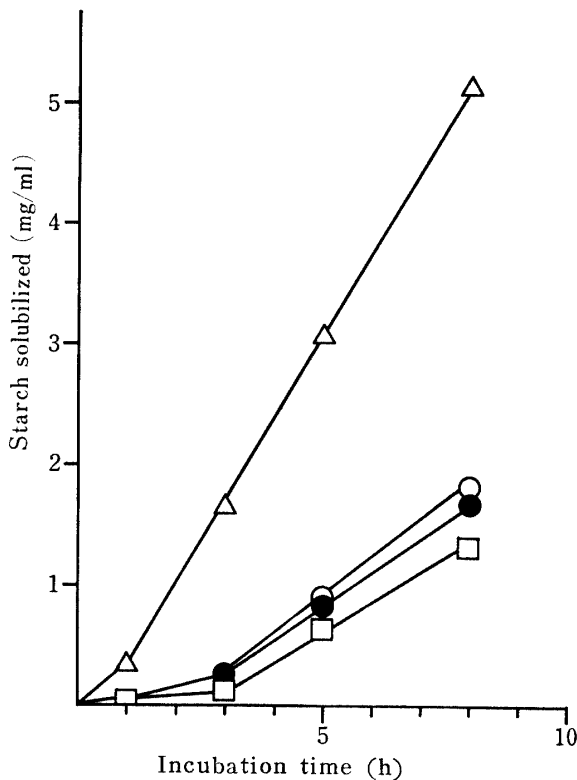


Fig. 6. Digestions of various native starches by azuki seed extract.

△: Rice                      ○: Azuki  
●: Sweet potato              □: White potato

Reaction mixture contained 200 mg native starch, 200 μg streptomycin and 4.0 ml azuki seed extract (235 units α-amylase). The mixture was incubated at 37°C.

を考慮すれば、両者の間の優劣はつけ難い。

考 察

植物組織中存在し、直接澱粉を分解し得る酵素としては、現在 α-アミラーゼのみが知られている。α-アミラーゼは高等植物種子の発芽に際して生合成されジベレリンによって著るしく増加することが、明らかにされている<sup>19)</sup>。最近、前田ら<sup>10)</sup> はアミロペクチンの α-1, 6-結合を分解する R-酵素が、この α-アミラーゼと共存すると、澱粉粒の分解作用を著るしく増強することを報告している。これは、上田ら<sup>18)</sup> が、麴菌のグルコアミラーゼによる澱粉粒の分解作用が *Pseudomonas* のイソアミラーゼとの協同作用により、顕著に高められることを見出したこととともに、α-1, 6-結合を加水分解する酵素自身は単独に澱粉粒には働き難いが、α-アミラーゼとの協同作用で澱粉粒の分解に関与する可能性を示唆する事実である。ホスホリラーゼ、β-アミラーゼについては現在、直接、間接に澱

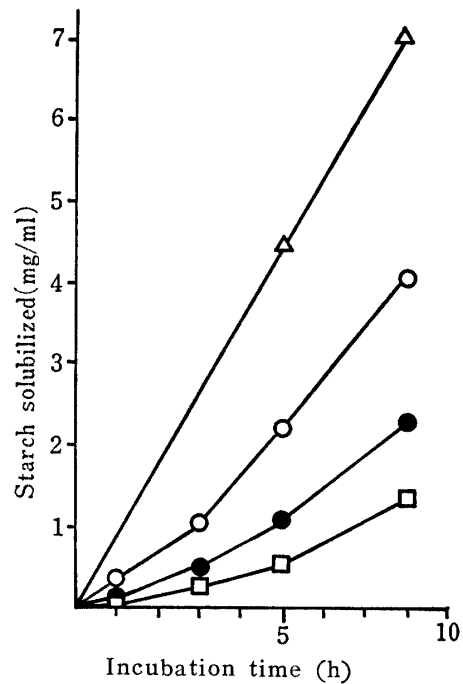


Fig. 7. Digestions of various native starches by *Bacillus subtilis* α-amylase.

Symbols: see Fig. 6.

Experimental conditions were the same as in Fig. 7 but *Bacillus subtilis* α-amylase (249 units) was used with 5mM CaCl<sub>2</sub> instead of azuki extract

粉粒の分解に関与することの積極的な事実は提出されていない。

小豆抽出液中に存在する澱粉粒分解活性は、無機リン酸の添加により活性化されることが見出されたが、既述のようにホスホリラーゼはこのリン酸の効果に関与しないことが明らかである。α-アミラーゼあるいは R-酵素がこのリン酸の効果の原因である可能性があるが、これらの酵素がリン酸により活性化されることは知られていない。興味深いことには、pH 4.8, 45°C の条件下で 10 分間処理したホスホリラーゼ失活処理抽出液では、未だ 60~70% の α-アミラーゼ活性を保持しているにも拘らず、無機リン酸による澱粉粒分解促進効果は全く認められなかった。この事実は、小豆抽出液には酸性下で熱に不安定な、リン酸で活性化される特殊な α-アミラーゼの存在を推測させるが、現在確実な根拠は得られていない。大麦<sup>2,4,8,11,13,16)</sup> や米<sup>17)</sup> などにおいて、発芽時に多数の α-アミラーゼのアイソザイムが出現することはよく知られているが、このアイソザイム中にはリン酸で活性化されるものは見出されていない。リン酸による澱粉粒の分解促進の機構については、幾つかの可能性が考えられる。現在、その本質についての研究を進めている。

本研究で見出されたリン酸による澱粉粒の分解促進効果は、種子が環境の変化を認識して、発芽に動き始めるとき ATP を消費して細胞内の無機リン酸のレベルの上昇を招き、澱粉の利用を促進し、発芽に必要なエネルギーの円滑な供給に役立っているものと考えられる。

### 要 約

未発芽の小豆種子の水抽出液中に、無機リン酸によって活性化される新しい生澱粉の分解活性の存在を見出した。この抽出液の作用で澱粉から可溶化されて生成する主産物はリン酸の存否にかかわらず、オリゴ糖或いはデキストリンであった。抽出液による生澱粉の分解には lag time が認められ、この lag time はリン酸の添加により解消した。ここに、見出された生澱粉分解活性の本質は、明らかでないが、ホスホリラーゼの関与ではなく、新しいタイプのアミラーゼではないかと推測した。

### 謝 辞

グルコースオキシダーゼと細菌  $\alpha$ -アミラーゼを恵与された長瀬生化学工業株式会社の草井清博士、長瀬産業株式会社の小巻利章博士に感謝する。

### 文 献

- 1) Ashby, J. H., Clark, E. M., Crook, E. M. and Datta, S. P.: Thermodynamic quantities for the dissociation equilibria of biologically important compounds. IV. The second acid dissociation of glucose-1-phosphoric acid *Biochem. J.*, **59**, 203-208 (1955)
- 2) Bilderback, D. E.: Amylases from aleuron layers and starchy endosperm of barley seeds. *Plant Physiol.*, **53**: 480-484 (1974)
- 3) Fiske, C. H. and Subbarow, Y.: The colorimetric determination of phosphorus. *J. Biol. Chem.*, **66**, 375-400 (1925)
- 4) Frydenberg, O. and Nielsen, G.: Amylase isozymes in germinating barley seed. *Hereditas*, **54**, 123-139 (1966)
- 5) Fuwa, H.: A new method for microdetermination of amylase activity by the use of amylose as substrate. *J. Biochem. (Tokyo)*, **41**, 583-599 (1954)
- 6) 檜作 進・二国二郎: でんぷん. 大野泰雄編集, 高分子物質の精製と化学反応. p. 46-59, 共立出版 (1958)
- 7) Hizukuri, S., Tabata, S. and Nikuni, Z.: Studies on starch phosphate. Part 1. Estimation of glucose-6-phosphate residues in starch and presence of other bound phosphate(s). *Stärke*, **22**, 338-343 (1970)
- 8) Jacobsen, J. V., Scandalios, J. G. and Varner, J. E.: Multiple forms of amylase induced by gibberellic acid in isolated barley aleurone layers. *Plant Physiol.*, **45**, 367-371 (1970)
- 9) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275 (1951)
- 10) 前田 巖・自見信子・谷口 肇・中村道徳: 植物種子発芽のさいのデンプン分解, 枝分れ分解酵素の役割. 昭和52年度日本農芸化学大会講演要旨集, p. 62.
- 11) Momotani, Y. and Kato, J.: Isozymes of  $\alpha$ -amylase induced by gibberellic acid in embryo-less grain of barley. *Plant Physiol.*, **41**, 1395-1396 (1966)
- 12) Nakamura, N.: 小豆 (*Phaseolus angularis* Wight) ホスホリラーゼの精製と反応速度論的な性質について. 鹿児島大学農学部 修士論文 (昭46)
- 13) von Onckelen, H. A. and Verbeek, R.: Formation of  $\alpha$ -amylase isozymes during germination of berley. *Planta*, **88**, 255-260 (1969)
- 14) Roe, J. H., Epstein, J. H. and Goldstein, N. P.: Photometric method for the determination of inulin in plasma and urine. *J. Biol. Chem.*, **178**, 839-845 (1949)
- 15) Somogyi, M.: A new reagent for the determination of sugars. *J. Biol. Chem.*, **160**, 61-68 (1945)
- 16) Tanaka, Y. and Akazawa, T.:  $\alpha$ -Amylase isozymes in gibberellic acid-treated barley half-seeds. *Plant Physiol.*, **46**, 586-591 (1970)
- 17) Tanaka, Y., Ito, T. and Akazawa, T.: Enzymic mechanism of starch breakdown in germinating rice seeds. *Plant Physiol.*, **46**, 650-654 (1970)
- 18) Ueda, S., Ohba, R. and Kano, S.: Fractionation of the glucoamylase system from black-koji mold and the effects of adding isoamylase and alpha-amylase on amylolysis by the glucoamylase fractions. *Stärke*, **26**, 374-378 (1974)
- 19) Varner, J. E.: Seed development and germination. In Bonner, J. and Varner, J. E. (ed.), *Plant Biochemistry*. p. 763-792, Academic Press Inc., New York and London (1965)
- 20) Wilson, E. J., Schoch, T. J. and Hudson, C. S.: Action of marcerans amylase on the fractions from starch. *J. Amer. Chem. Soc.*, **65**, 1380-1383 (1943)

### Summary

A raw starch-degrading activity was found in the water extract of ungerminated azuki seeds. After dialyzing the extract against maleate-NaOH buffer, pH 6.8, the activity was enhanced about two folds by the addition of inorganic phosphate. The main degradation products of raw starch with the extract were determined to be oligosaccharides or dextrans (80 % and 40 % of the total solubilized products both in the absence and in the presence of inorganic phosphate, respectively). Strong phosphorylase activity was found in the extract, but it appeared to be not involved in the starch-degrading activity since the crystalline phosphorylase purified from the extract was incapable of degrading raw starch by itself or cooperatively with  $\alpha$ -amylase in the extract. In the absence of inorganic phosphate, the degradation was accompanied by a lag period which was to be overcome by the addition of inorganic phosphate. The degradation activity was labile, and was lost by being incubated at 45°C for 10 min at pH 4.8. From the properties of the activity, it was inferred to be a sort of new amylase.