

原 著

数種花粉のデンプン合成酵素

中村紀雄^{*1}・新井勇治^{*2}

Starch synthetase from mature pollen grains

Norio NAKAMURA^{*1} and Yuji ARAI^{*2}

(受付：1981年10月30日)

緒 言

澱粉合成酵素には可溶性型と澱粉粒に結合した顆粒型とがあり、可溶性酵素はADP-グルコース(ADPG)を、顆粒性酵素は、同化組織に存在する酵素ではADPGのみを、貯蔵組織に存在する酵素はADPGとUDP-グルコース(UDPG)を基質として利用するものが多い⁽¹⁾。澱粉合成酵素は多くの種類の植物の、種々の部位から得られ、その性質が調べられているが、花粉の澱粉合成酵素については、トウモロコシ花粉⁽²⁾でその存在が調べられているだけである。

一方、花粉が葯中で完熟する過程で、また花粉の発芽や管伸長過程で、澱粉の形成あるいは消失が観察されているが⁽³⁾⁽⁴⁾その様子は花粉の種類によって異なっている。ただこのような花粉における澱粉の消長はヨード反応による観察であり、生化学的な研究はなされていない。

筆者らは花粉の澱粉生成について生化学的な面よ

り調べているが、今回は9種類の完熟花粉粒を材料に、その澱粉含有と澱粉合成酵素の活性の有無、および酵素の若干の性質について検討したので、その結果を報告する。

材 料 と 方 法

1. 材料

シュロ、トウモロコシ(ゴールデンクロスバンタム種)花粉は室内で開葯させて採取し、またムクゲ、タチアオイ花粉は当日開葯した花から直接採取した。これらの花粉は直ちに実験に使用した。テッポウユリ花粉は開葯した葯をエチルエーテル中で洗い、花粉を葯より離脱沈殿させて集めた。葯とエーテルを除いたあと、さらにアセトンで花粉を洗い、減圧下で乾燥させた花粉を実験に使用した。ツバキ、チャ、サザンカ、クロマツ花粉は採取後使用するまでフリーザー中にシリカゲルと共に保存しておいた。

花粉の培養は前報⁽⁵⁾に準じて行った。

*1 〒236 横浜市金沢区瀬戸22-2 横浜市立大学 生物学教室

*2 〒305 茨城県新治郡桜村 筑波大学 応用生物化学系

*1 Department of Biology, Yokohama City University, Yokohama 236, Japan.

*2 Institute of Applied Biochemistry, The University of Tsukuba, Sakura-mura, Ibaraki 305, Japan.

2. 酵素の調製

a) 顆粒性澱粉合成酵素

花粉 1 g を冷水に懸濁させ、ポッター型ガラスホモゲナイザー管または乳鉢を用いて、花粉を破碎し、抽出液を遠心分離 (3,000×g、10 分間、0°C) して白色沈殿を集めた。しばしば白色沈殿の上に褐色の沈殿が重層していたが、この部分はミクロスパーテルで取り除いた。沈殿を再び冷水に懸濁させ、遠心分離した。この操作を 3 回繰り返した。沈殿に冷水 50 ml を加えよく懸濁させ、この液を脱脂綿をつめたカラム (1.5×15 cm) にかけて濾過した。白色の濾液を集め、遠心分離 (2,000×g、5 分、0°C) し、得られた沈殿を冷アセトンで洗滌した。ホスホリラーゼ活性を除くためアセトン処理を 3 回繰り返した後、沈殿を減圧下で乾燥した。こうして得られた澱粉顆粒を酵素標品とした。

b) 可溶性澱粉合成酵素とホスホリラーゼ

花粉 0.1~0.3 g を 10 mM EDTA と 1%メルカプトエタノールを含む 10 mM トリス緩衝液 (pH 7.5) と共にホモゲナイザー管で磨砕した。この液を遠心分離 (1,200×g、20 分間、0°C) して上澄液を得、それに 0.4 飽和になるまで固形硫酸を加えた。再び遠心分離して得られた沈殿を集め、緩衝液に溶かしたものを可溶性澱粉合成酵素液とした。またその上澄液にさらに 0.8 飽和になるまで硫酸を加え、得られた沈殿をホスホリラーゼ液とした。なお可溶性酵素はこれまでの報告⁽¹⁾では 0~0.4 硫酸飽和画分として得られている。本実験においても、硫酸 0~0.4 飽和と 0.4~0.8 飽和沈殿画分について、可溶性酵素とホスホリラーゼの活性を比較したところ、前者画分には可溶性澱粉合成酵素のみが、後者にはホスホリラーゼの活性のみが検出された。

3. 反応液組成

澱粉合成の標準反応液の組成は、0.5 μmole の ADP-¹⁴C-グルコースまたは UDP-¹⁴C-グルコース、10 μmoles の緩衝液 (pH 8~9)、5 μmoles の KCl と澱粉顆粒 2 mg または可溶性酵素液 100 μl とアミロペクチン 2 mg を含み、全容は 200 μl とした。

ホスホリラーゼ反応液の組成は、0.5 $\mu\text{mole}^{14}\text{C}$ -G1P、10 μmoles 酢酸緩衝液 (pH 6.1)、アミロペクチン 2 mg と酵素液 100 μl を含み、全容は 200 μl とした。

4. 酵素活性の測定

37°Cで一定時間反応させた後、2 ml の 1% KCl を含む 75%メタノール液を加えて反応を停止させ、1,000×gで 5 分間遠心分離した。沈殿に再び上記メタノール液を加えて懸濁させ、再び遠心分離した。この操作を 3 回繰り返して得た沈殿に 0.5 ml の水を加えて懸濁させ、その全量を試料皿に移して蒸発乾固した。それについて、その放射能の強さを、薄窓ガスフローカウンター (Aloka JDC-120) で測定した。

5. 蛋白質の定量

酵素液について 260 と 280 nm の吸光度を測定し、Kalcker の式⁽⁶⁾により蛋白質量を求めた。

6. 試薬

¹⁴C-G1P と UDP-¹⁴C-グルコースは Radiochemical Centre (England) から購入した。ADP-¹⁴C-グルコースは Roseman ら⁽⁷⁾の方法にしたがって、¹⁴C-G1P と AMP より化学的に合成した。

結果と考察

これまでに報告されている澱粉合成酵素の多くは顆粒性酵素についてである。そこで花粉の澱粉合成酵素については、まずヨード反応により澱粉が検出された花粉粒より顆粒性酵素の抽出を試みた。しかし、シュロとテッポウユリについては花粉の澱粉含有量と採取した花粉の量が少なかったため、実験に必要な量の澱粉粒を得ることができず、これら花粉とカメラリア属花粉については、可溶性酵素の存在を調べた。表 1 はその結果を示している。酵素活性は反応 3 時間までのタイムコースを求めて調べた。いずれの花粉においても澱粉合成酵素活性が検出され、澱粉の検出されないカメラリア属花粉にも活性が認められた。しかし、いずれも葉や貯蔵組織の酵素⁽¹⁾に比

Table 1. Activities of starch granule-bound starch synthetase and soluble starch synthetase from various kinds of mature quiescent pollen grains

| Pollen | I ₂ -KI reaction | Starch granule-bound : n mol glucose incorp. /hr/mg starch glucose | Soluble : n mol granule incorp. /hr/mg protein |
|-----------------------------|-----------------------------|--|--|
| <i>Trachyanthus excelsa</i> | + | | 1.5 (0.3) |
| <i>Camellia japonica</i> | - | | 1.1 (0.2) |
| <i>Camellia sinensis</i> | - | | 1.2 (0.2) |
| <i>Camellia sasanqua</i> | - | | 0.1 (0.02) |
| <i>Lilium longiflorum</i> | + | | 4.0 (0.8) |
| <i>Hibiscus syriacus</i> | +++ | 3.6 (0.7) | |
| <i>Althaea rosea</i> | +++ | 42.1 (8.4) | |
| <i>Zea mays</i> | +++ | 18.2 (3.6) 12.0 (2.4)* | |
| <i>Pinus thunbergii</i> | + | 37.5 (7.5) | |

Reaction mixtures contained (in μ mole) : ADP-¹⁴C-glucose or UDP-¹⁴C-glucose (*), 0.5 ; Tris-malate (pH 8.6) or Tris-HCl (pH 8.0) buffer, 10 ; KCl, 5 ; and 2 mg of starch granules or 100 μ l soluble enzyme containing 2 mg of amyloplast, in final volume of 200 μ l.

Figures in parentheses are the percentages of ¹⁴C-glucose transferred from the substrate to the primer.

Table 2. Changes in activities of soluble starch synthetase and phosphorylase during the growth of *Camellia* pollens

| Incubation time of pollen (hr) | <i>Camellia japonica</i> | | <i>Camellia sasanqua</i> | | <i>Camellia sinensis</i> | |
|-----------------------------------|--|---------------|--------------------------|------------------|--------------------------|------------------|
| | Starch synthetase | Phosphorylase | Starch synthetase | Phosphorylase | Starch synthetase | Phosphorylase |
| | Activity | | | | | |
| | n mole ¹⁴ C-glucose incorporated/ hr / mg protein | | | | | |
| 0 | 2.2±0.3 | 0.7±0.4 | 0.2±0.0 | 0.6±0.1 | 2.4±0.6 | 1.7±0.3 |
| 1 | 0.6±0.4 | 1.2±0.2 | 1.1±1.3 | 1.5±0.6 | 2.7±1.9 | 2.7±0.9 |
| 3 | 0.8±0.5 | 0.9±0.3 | 3.8±1.0 | 2.9±1.2 | 4.0±2.3 | 3.3±1.4 |
| 15 | - | - | 1.3±0.2 | 3.2±0.1 (0.6) | 0.1±0.1 | 4.2±0.7 (0.8) |

Pollens were incubated on 0.3 M sucrose-1.2 % agar-plate medium at 25°C. Figures in parentheses are the percentage of ¹⁴C-glucose transferred from ADP-¹⁴C-glucose or ¹⁴C-glucose-1-P to amylopectin.

べると活性が低く、グルコースの転移は数%以下であった。活性が低かった理由としては、反応条件が最適でなかったこと、酵素の抽出法に問題があることなどが考えられる。また花粉の澱粉合成酵素について、2品種のトウモロコシについてだけ報告⁽²⁾がなされているが、それらの顆粒性酵素の活性値も、この実験の値と近似している。ただ、トウモロコシでは顆粒性酵素よりも可溶性酵素において高い値が報告されている。したがって今回顆粒性酵素を調べた花粉については、可溶性酵素について調べなかったが、あるいは可溶性酵素の方が活性が強いことも考えられる。また完熟花粉粒内の澱粉量は花粉の種類により異なることから、澱粉含有量の多いものでは酵素活性が強いことも推測される。テッポウユリ花粉は生長にともない澱粉含有量が高くなるので、生長花粉について調べれば、高い酵素活性が得られたかも知れない。

カメリア属花粉は澱粉粒が検出されないにもかかわらず、澱粉合成酵素活性が認められたので、花粉の生長にともなう可溶性酵素の活性変化を調べた(表2)。その結果花粉の生長にともなう可溶性酵素の活

性変化は、どの花粉においても活性が低く、ほとんど認められなかった。このことはカメリア属花粉では、その生長過程においては、可溶性酵素は澱粉の合成に関与していないことをしめしている。また低いながらも活性が認められたことは、花粉の形成あるいは完熟過程の初期では澱粉の合成がおこなわれたことをしめしているのかも知れない。一方、in vitroでは、ホスホリラーゼもG1Pより澱粉を合成することが知られている。ホスホリラーゼ活性はツバキでは変化がみられず、チャとサザンカ花粉で、生長にともない比活性が増加する傾向が認められた。しかし、プライマーへ転移したグルコース量は1%以下の大へん低い値であり、ホスホリラーゼは澱粉の合成には関与していないと思われる。

表3はトウモロコシとクロマツの顆粒性酵素の性質を示している。トウモロコシ完熟未発芽花粉からは比較的少量の澱粉粒が得られたので、酵素の若干の性質について検討した。クロマツ完熟未発芽花粉からはごくわずかの澱粉粒しか得られなかったので、5%ショ糖寒天培地で41時間培養した花粉より澱粉粒を抽出した。トウモロコシの顆粒性酵素は基質と

Table 3. Properties of starch granule-bound starch synthetase from *Zea mays* and *Pinus thunbergii* pollens

| Experiment | <i>Zea mays</i> | | <i>Pinus thunbergii</i> |
|--------------------|------------------------|------------------------|-------------------------|
| | for ADP-glucose | for UDP-glucose | for ADP-glucose |
| Effect of ion | | | |
| KCl | 163* | 157 | 129 |
| ZnCl ₂ | 99 | 50 | 60 |
| CaCl ₂ | 127 | 78 | 98 |
| MnCl ₂ | — | 72 | — |
| MgCl ₂ | 99 | 81 | 95 |
| CuSO ₄ | — | 64 | — |
| NaF | 127 | 98 | 105 |
| EDTA | 126 | 106 | 90 |
| Optimum pH | 7.5-8.5 | 7.5-8.0 | 9.0-9.5 |
| Michaelis constant | 2.0×10 ⁻³ M | 1.5×10 ⁻³ M | — |

Assay conditions are the same described in table 1, except that the kind of ions, the pH of buffer or the concentration of substrate are modified in each experiment. *; % control without ion.

してADPGとUDPGを利用したが(表1)、クロマツではUDPGを利用しなかった。イオンの影響においては両花粉の酵素活性を K^+ のみが促進した。最適pHは両花粉では異なっていたが、共にアルカリ側に存在した。Km値はトウモロコシにおいてのみ Lineweaver - Burk プロット法により求めたが、ADPG、UDPGの両基質に対してともに約2 mMであった。生葉と貯蔵組織から得られた顆粒性酵素は最適pHがアルカリ側にあり、 K^+ で活性が促進されるものが多く、Km値は 10^{-2} ~ 10^{-5} Mの範囲に存在した⁶⁾そし

て花粉酵素の性質もそれらとほぼ同じであった。

花粉粒より顆粒性酵素を得ることは困難が多く、種々の実験に対して十分な量の澱粉粒は、トウモロコシ花粉からのみしか得ることができなかった。ただクロマツ花粉で、花粉の生長にともなって著しい澱粉形成がみられ、それより多量の澱粉粒が得られた。クロマツ花粉は培養も容易であり、むしろ花粉の澱粉合成機構を調べる上では適した材料と思われる。

文 献

1. 新井勇治：東京教育大学農学部紀要 17, 1—38 (1971).
2. Bryce, W. H. and Nelson, O. E. : Plant Physiol. 63, 312—317 (1979).
3. 森隆也, 坂野順子, 高橋元子, 武内侑子：愛知学芸大研究報告 9, 155—167 (1960).
4. Iwanami, Y. : J. Yokohama City Univ. 116, 1—137 (1959).
5. Nakamura, N. : J. Yokohama City Univ. Biol. Ser. 5, 1—100 (1978).
6. 菅原潔, 副島正美：蛋白質の定量法 P 132—138. 東大出版会 (1977).
7. Roseman, S., Distler, J. J., Moffatt, J. G. and Khorana, H. G. : J. Am. Chem. Soc. 83, 659 (1961).

Summary

Occurrence of starch granules and starch synthetase in 9 kinds of mature pollen grains was studied. The higher activities of starch granule - bound starch synthetase and a large number of starch granules were found in *Althaea rosea*, *Zea mays* and *Pinus thunbergii* pollens. Properties of the starch granule - bound starch synthetase from *Zea mays* and *Pinus thunbergii* were studied; their enzyme activities were enhanced by potassium ion and their optimal pHs were found in alkaline side. For both ADP - and UDP - glucose, each Km value of the enzyme from *Zea mays* was. ca. 2mM. On the other hand, weak activity of soluble starch synthetase was detected in *Camellia japonica*, *C. sinensis* and *C. sasanqua* pollen grains in which starch granules could not found. However, in each pollen, the activity of soluble starch synthetase scarcely changed with pollen growth.

