

ツバキ花粉UDP-グルコースピロホスホリラーゼの性質

尼野和生¹⁾・中村紀雄¹⁾・鈴木 恕²⁾¹⁾横浜市立大学文理学部生物学教室

〒236 横浜市金沢区瀬戸22-2

²⁾湘南短期大学

〒238 横須賀市稲岡町82

(1992年4月11日受理)

Properties of UDP-Glucose Pyrophosphorylase from *Camellia japonica* PollenKazuo AMANO¹⁾, Norio NAKAMURA¹⁾ and Hiroshi SUZUKI²⁾¹⁾Department of Biology, Yokohama City University,
Kanazawa-ku, Yokohama 236, Japan²⁾Shonan Junior College,
Yokosuka 238, Japan

UDP-glucose pyrophosphorylase was partially purified from *Camellia japonica* pollen grains and its properties were studied. The enzyme had a molecular weight of 51 KDa and a pH optimum at 8.0. It required Mg^{2+} or Mn^{2+} for activity and its *Km* values for UDP-glucose, pyrophosphate, glucose-1-phosphate and UTP were 54, 30, 450 and 270 μ M, respectively. The enzyme activity was inhibited by nucleoside triphosphates and stimulated by fructose-1,6-bisphosphate and fructose-2,6-bisphosphate; the stimulation by fructose bisphosphates was particularly found in the reaction of UDP-glucose pyrophosphorolysis in the presence of Mg^{2+} . These properties of UDP-glucose pyrophosphorylase were discussed in relation to camellia pollen tube growth.

Key words: *Camellia japonica*, Sugar metabolism, Pollen tube growth, UDP-glucose pyrophosphorylase.

緒 言

ショ糖は一般に花粉発芽と花粉管伸長に最も有効な糖であり、フルクトースやグルコースも花粉の成長に利用される。そしてショ糖の代謝経路としては次の2経路が考えられている。(1)ショ糖はインベルターゼによりフルクトースとグルコースに分解され、生成した

それぞれの糖はリン酸化された後、G1Pを経てUDPGとなり、UDPGは多糖合成系基質として利用される。またリン酸化された糖はF6Pを経て解糖系にも入る。(2)ショ糖はショ糖合成酵素の作用でフルクトースとUDPGとなる。生成したUDPGはPPiと反応してG1Pとなり、さらにG6P、F6Pを経て解糖系に入るか、あるいは直ちに多糖合成の基質として利

Table 1. Summary of UDPG pyrophosphorylase purification

Step	Volume (ml)	Total protein (mg)	Total activity (U)	Specific activity (U/mg protein)	Yield (%)
Crude extract	92	322	684	2.12	100
50-80% Ammonium sulfate precipitation	4	56.6	486	8.59	71.1
Sephadex G-75 gel filtration	55	17.5	286	16.3	41.8
Q Sepharose fast flow ion exchange chromatography	50	0.975	49.8	51.1	7.3

Activity in the direction of UDPG synthesis was assayed in the reaction mixture (see Table 2), and expressed in unit ($\mu\text{mole product min}^{-1} \text{ ml}^{-1}$).

用される。フルクトースは前述のように代謝され、解糖系に入る。

これらの系で共通している $\text{UDPG} + \text{PPi} \rightarrow \text{UTP} + \text{G1P}$ の反応は UDPG ピロホスホリラーゼにより可逆的に触媒される。この酵素は経路(1)においては UDPG 生成に関与する。UDPG は花粉管細胞壁の多糖の先駆体であり、花粉管伸長は UDPG の生成に影響されると考えられる。反対に経路(2)においては、この酵素は UDPG 分解に関与し、高等植物細胞のショ糖分解系として注目されている^(1,2)。また近年、植物の解糖系は PPi 依存ホスホフルクトキナーゼにより調節を受けることが知られており^(3,4)、この場合 UDPG ピロホスホリラーゼの働きはこの酵素の働きに大きく影響されよう。このように UDPG ピロホスホリラーゼは糖代謝の重要な位置を占め、その活性調節は花粉管伸長と密接に関係していると考えられる。

植物の UDPG ピロホスホリラーゼについては、これまで多くの報告⁽⁵⁾がみられ、花粉についてはテッポウユリ⁽⁶⁾、ガマ⁽⁷⁾花粉でその性質が調べられている。この論文においてはツバキ花粉のこの酵素の性質について報告し、花粉管伸長におけるこの酵素の働きについて考察した。

材料と方法

1. 材料と花粉の培養

前報⁽⁸⁾に準じて、ツバキ (*Camellia japonica*) の未開の花より葯を集め、恒温器中 (30°C) で開葯させて花粉を集めた。花粉は冷凍庫中に貯蔵し、適時使用した。花粉の培養は、0.1M グルコース-1.3%寒天培地を用い、25°Cで行った。

2. 酵素の抽出と精製

アセトンで洗い、花粉外壁の油脂成分を除いた花粉 (1-5g) を使用し、操作はすべて 2-6°Cで行った。

花粉粒を 10mM Tris-HCl 緩衝液 (pH8.0) に懸濁し、フレンチプレス (130-150MPa) にかけて破碎したものを遠心分離 (12000g, 0°C, 20分間) して上清を集めた。沈澱は再度緩衝液に懸濁し、フレンチプレス、遠心分離操作を繰り返した。このようにして集めた上清を花粉粗抽出液とした。

粗抽出液に固形硫酸を加えて 50-80% 飽和分画の沈澱を遠心分離して集めた。それを少量の緩衝液に溶かし、緩衝液で平衡化した Sephadex G-75カラム (5.3cm²×90cm) に上層し、同じ緩衝液で溶出した。集

Abbreviations: F6P, Fructose-6-phosphate; F1,6BP, Fructose-1,6-bisphosphate; F2,6BP, Fructose-2,6-bisphosphate; G1P, Glucose-1-phosphate; G6P, Glucose-6-phosphate; G1,6BP, Glucose-1,6-bisphosphate; HEPES, N-2-Hydroxyethylpiperazine N'-2-ethanesulfonic acid; Ka, Activation constant, i. e. concentration of effector that gives half-maximum activation; MES, 2-(N-Morpholino) ethane-sulfonic acid; NAD, Nicotinamido adenine dinucleotide; Tris, Tris (hydroxymethyl) amino-methane; PPi, Inorganic pyrophosphate; UDPG, UDP-glucose.

めた活性分画を緩衝液で平衡化した Q Sepharose fast flow カラム (2 cm² × 34.5 cm) に吸着させ、さらに同じ緩衝液でカラムを洗った後、0-0.5 M KCl 直線濃度勾配により溶出した。分画は 5 ml ずつ集め、活性分画を -20°C で保存し、適時使用した。

3. 酵素活性の測定

すべて反応液量は 1 ml とし、反応は pH 8.0、30°C で行い、活性は生成物 $\mu\text{mol}/\text{min}$ の反応をおこす酵素量を単位として表した。

(a) UDPG 分解反応 (G1P 生成反応)

生成した G1P を NAD 還元反応と共役させ、340 nm の吸光度変化により測定した。標準反応液組成は、50 mM Tris-HCl 緩衝液、1 mM UDPG、1 mM PPI、2 mM MgCl₂、2 U ホスホグルコムターゼ、2 U G6P 脱水素酵素 (Sigma G-5885)、0.4 mM NAD とした。なお、この方法を UDPG ピロホスホリラーゼ活性測定の標準法とした。

酵素の最適 pH を求める際には、緩衝液として 100 mM MES-KOH (pH 6 - 7)、HEPES-KOH

(pH 7 - 8)、または Tris-HCl (pH 7.5 - 9) を用い、UDPG、PPI それぞれ 2 mM、MgCl₂ 2.5 mM を加えて、30 分間反応させ、煮沸して反応を停止した。この液より 200 μl を取り、Tris-HCl 100 mM、MgCl₂ 2.5 mM、ホスホグルコムターゼ 2 U、G6P 脱水素酵素 2 U、NAD 0.4 mM を加えて反応させた。

(b) UDPG 合成反応 (PPI 生成反応)

Hara et al⁽⁶⁾ の方法に従い、生成した PPI を無機ピロホスファターゼでリン酸に分解し、そのリン酸を定量した。標準反応液組成は、50 mM Tris-HCl、1 mM G1P、1 mM UTP、2 mM MgCl₂、0.4 U 無機ピロホスファターゼ (Sigma I-4503) とし、10 分間反応させた後、0.3 M 過塩素酸 0.5 ml を加えて反応を停止した。

4. 分子量の測定

酵素の分子量は Sephadex G-75 カラム (5.3 cm² × 93 cm) を用いて Andrews⁽¹⁰⁾ の方法により推定した。標準蛋白質として、アルブミン (MW 67000)、オボアルブミン (45000)、キモトリプシノーゲン (25000)、

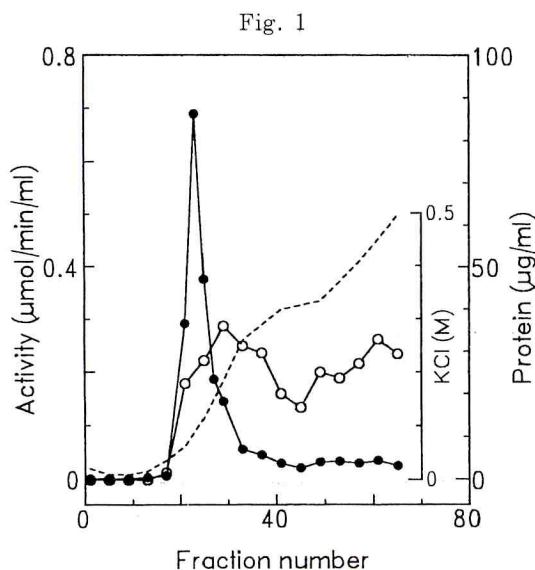


Fig. 1. Elution pattern of camellia pollen UDPG pyrophosphorylase by Q Sepharose fast flow ion exchange chromatography. The fraction through the gel-filtration step was loaded onto a Q Sepharose fast flow column (2 cm² × 34.5 cm), eluted with a 0-0.5 M KCl gradient at a flow rate of 4 ml/min and collected by 5 ml fractions. Symbols: ●, enzyme activity; ○, protein content; broken line, KCl concentration.

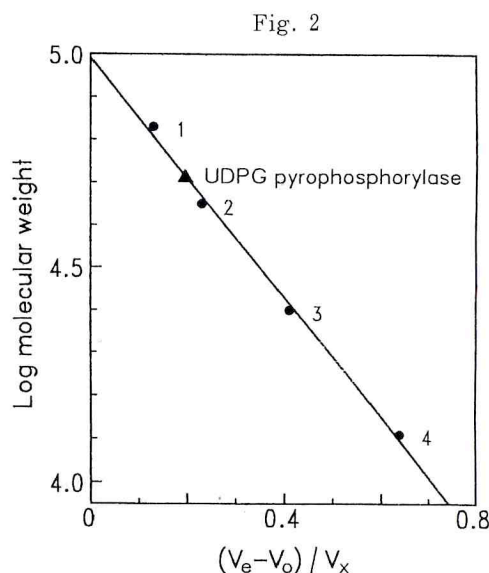


Fig. 2. Estimation of molecular weight of camellia pollen UDPG pyrophosphorylase by Sephadex G-75 gel filtration. Proteins for calibration: bovine serum albumin (1), hen ovalbumin (2), chymotrypsinogen (3), and cytochrome C (4).

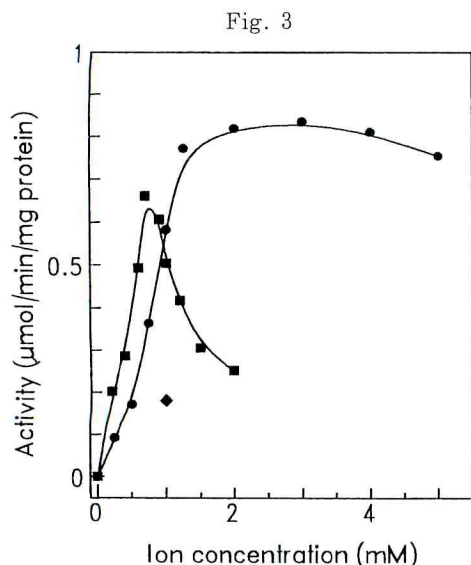


Fig. 3. Effect of cations on the activity of camellia pollen UDPG pyrophosphorylase. The enzyme activity in the direction of UDPG synthesis was measured in the presence of $MgCl_2$ (●), $MnCl_2$ (■), or $ZnCl_2$ (◆).

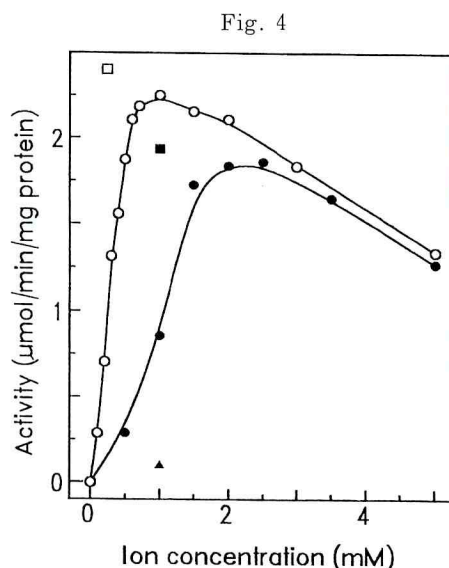


Fig. 4. Effect of cations and PPI on the activity of camellia pollen UDPG pyrophosphorylase. The enzyme activity in the direction of UDPG pyrophosphorolysis was assayed in the presence of $MgCl_2$ (●, ○), $MnCl_2$ (■, □) or $CaCl_2$ (▲) at 1mM (filled symbols) or 0.2mM (open symbols) PPI.

チトクロムC (12300) を用いた。

5. 蛋白質量とKCl濃度の測定

蛋白質量は Lowry⁽¹¹⁾ または Bradford⁽¹²⁾ の方法、KCl 濃度は塩素電極法により測定した。

結 果

1. 酵素の精製

Table 1は1gのツバキ花粉からUDPGピロホスホリラーゼを硫酸分画, Sephadex G-75ゲルろ過分画, Q Sepharose fast flow イオン交換クロマトグラフィー (Fig. 1) により約25倍に精製した結果を示している。この酵素標品にはG6P脱水素酵素, ホスホグルコミターゼ, ヘキソキナーゼ, インベルターゼ, 無機ピロホスファターゼは含まれておらず, ごく僅かのホスホグルコイソメラーゼ活性がみられた。この標品を $-20^{\circ}C$ で50日保存した際の活性低下は約5%程度であった。

2. 酵素の性質

MES-KOH, HEPES-KOH, Tris-HCl 緩衝液を用いてUDPG分解(G1P生成)活性とpHの関係調べた(データは示していない)。最適pHは8.0であったが, Tris-HCl 緩衝液においてやや高い活性を示した他は, どの緩衝液においてもpH6.5-9.0の範囲では活性に大きな違いはみられなかった。Sephadex G-75カラムを用いて推定した酵素の分子量は51kDaであった (Fig. 2)。この値はガンマ花粉⁽⁷⁾UDPGピロホスホリラーゼの分子量53kDaとほぼ同じ値であった。

Fig. 3はこの酵素のUDPG合成方向における反応におよぼす陽イオンの効果を示している。反応には陽イオンが必須であり, Mg^{2+} と Mn^{2+} が最も活性を促進した。両イオンの作用の様子は異なっており, Mg^{2+} はその最適濃度が2-4mMであったが, Mn^{2+} は1mM以下では Mg^{2+} より高い活性を与え, さらに高濃度になると急速に活性を減少させた。なお, この反応系に用いた無機ピロホスファターゼは2価陽イオンを必要とし, Mg^{2+} により最も高い活性を示す。したがってとくにイオン濃度が低い場合に得られた

UDPG ピロホスホリラーゼの活性値には、無機ピロホスファターゼの活性が大きく影響していると思われる。これに対して、UDPG 分解方向の反応 (Fig. 4) においては、 Mg^{2+} と Mn^{2+} により著しい活性促進が、また Ca^{2+} により僅かの活性がみられたが、他のイオンでは活性がみられなかった。そしてこの場合も Mg^{2+} と Mn^{2+} では影響が異なり、図には示していないが Mn^{2+} は 1 mM 以上の濃度では急速に活性を減少させた。また酵素活性は PPI 濃度の影響を受け、PPI 0.2 mM では Mg^{2+} 1 mM が、PPI 1 mM では Mg^{2+} 2 mM の時が最も活性が高かった。そして Mg^{2+} 濃度 2 mM 以上では PPI 濃度の影響はみられなかった。 Mn^{2+} は PPI 0.2 mM では 0.25 mM の時に、PPI 1 mM では 1-1.25 mM の時に最も活性を促進した。

この酵素の両方向の反応に対する糖の影響を調べた。10 mM のグルコース、フルクトース、マルトース、1 mM F 6 P は両方向の反応に影響を与えなかったが (データは示されていない)、F1,6BP と F2,6BP は UDPG 分解方向の反応を約 2 倍促進した (Fig. 5)。またデータは示していないが G1,6BP もフルクトースビスリン酸と同じ活性促進を示した。この活性促進は酵素濃度が高い場合のみにみられ、また UDPG 合成反応に対しては促進効果は認められなかった。さらに Mg^{2+} が存在する場合に 2-3 倍の促進がみられたが、 Mn^{2+} の場合は 1.3 倍程度の促進であった。

Table 2 は UDPG、ヌクレオシドリ酸および糖代謝産物のこの酵素に対する影響を示している。テッ

ポウユリ花粉⁽⁶⁾で UDPG がこの酵素をフィードバック阻害することが知られている。いずれの化合物も 0.1 mM 濃度では酵素活性に影響を与えなかったが、1 mM 濃度では UDPG とヌクレオシドリ酸が活性を阻害した。とくにヌクレオシドリ酸は両方向の反応を阻害した。糖代謝産物は大きな影響を与えなかった。

3. 反応速度定数

Mg^{2+} 2 mM 存在下で、UDPG と PPI に関してはいずれも 0-0.01 mM 濃度範囲で、UTP と G1P に関しては 0-1 mM 濃度において酵素活性を測定し、Lineweaver-Burk プロット法により K_m 値を求めた (Table 3)。UDPG, PPI, UTP, G1P に対してそれぞれ 54, 30, 270, 450 μ M の値が得られた。ガマ⁽⁷⁾やテッポウユリ⁽⁶⁾花粉の酵素で得られた値と比較して、この酵素の UDPG と PPI に対する K_m 値は一桁小さく、UTP と G1P に対する値はほぼ同じであった。また F2,6BP と F1,6BP に対する K_a 値を濃度 0-3 mM の範囲の実験で求めたところ、それぞれ 20, 48 μ M であった。

4. 花粉管伸長にともなう酵素活性の変化

タバキ花粉の発芽の管伸長時の酵素活性の変化を調べた (Table 4)。タバキ花粉は培養 1 時間で発芽し、以後ほぼ一定の速度で成長した。酵素活性は培養時間にともない減少し、蛋白質量も減少した。

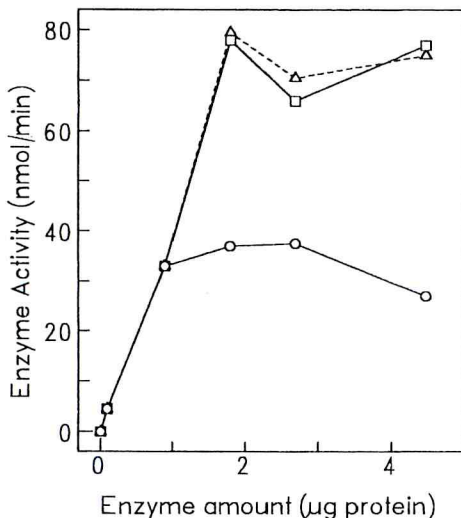


Fig. 5. Enhancement of the activity of camellia pollen UDPG pyrophosphorylase in the direction of UDPG pyrophosphorolysis by fructose-1,6-bisphosphate and fructose-2,6-bisphosphate. The activity was assayed with changing amounts of enzyme under standard conditions (○) and in the presence of 50 μ M fructose-1,6-bisphosphate (△) or fructose-2,6-bisphosphate (□).

Table 2. Effect of metabolites on the activity of camellia pollen UDPG pyrophosphorylase

Metabolite (1 mM)	Relative activity (%)	
	(a) UDPG synthesis	(b) UDPG pyrophosphorolysis
None	100	100
UDPG	69	
UTP		59
UDP	61	76
UMP	83	91
ATP	74	70
GTP	69	60
CTP	71	69
3-Phosphoglycerate	88	84
Phosphoenolpyruvate	91	82
Pyruvate	100	97

Reaction mixtures: (a) 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), metabolite indicated above, 1 mM G1P, 1 mM UTP, 2 mM MgCl₂ and 0.4 U inorganic pyrophosphatase; (b) 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), metabolite indicated above, 1 mM UDPG, 1 mM PPi, 2 mM MgCl₂, 2 U phosphoglucomutase, 2 U G6P dehydrogenase and 0.4 mM NAD.

考 察

Table 3. Affinities of camellia pollen UDPG pyrophosphorylase for the substrates and effectors

Substrate or effector	Km or Ka value (μ M)
UDPG	54 \pm 1.1
PPi	30 \pm 8.5
G1P	450 \pm 160
UTP	270 \pm 94
F 2, 6 BP	20 \pm 6.5
F 1, 6 BP	48

The values, means \pm SD of three experiments, were determined from Lineweaver-Burk plots of data obtained from assays under standard conditions.

ツバキ UDPG ピロホスホリラーゼは活性に Mg²⁺ または Mn²⁺ が必須であった。Mg²⁺ が UDPG ピロホスホリラーゼ活性に最も有効なイオンであることは多く報告^(13,14)され、Mg²⁺ は PPi または UTP と複合体を形成し⁽⁶⁾、この複合体が真の基質として作用すると考えられている。モロコシ⁽¹³⁾の酵素では UDPG 分解 (G1P 生成) 方向の反応は PPi と Mg²⁺ の比が 1 : 1 の時に、UDPG 合成方向では UTP と Mg²⁺ の比が 1 : 2 の時に活性が最大となり、*γ*花粉⁽⁷⁾では PPi と Mg²⁺ の比が 1 : 1 の時に活性が最大になることが報告されている。ツバキ酵素の場合、PPi 濃度の 2 倍以上の Mg²⁺ が存在したときに活性が最大になる傾向がみられた (Fig.3 と 4)。一方 Mn²⁺ は Mg²⁺ よりむしろ低濃度でより高い活性を示し、Mn²⁺ と PPi の比は 1 : 1 の時に最も高い活性がみられた。ただ Mn²⁺ は有効濃度範囲が狭く、最適濃度を過ぎると急激に活性が減少し、Mg²⁺ の作用とは異なっている。

Table 4. Changes in the UDPG pyrophosphorylase activity during camellia pollen growth

Incubation time (hr)	Activity ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg protein}$)	Pollen tube length (mm)	Protein content ($\text{mg}/1.9 \times 10^6 \text{ pollen}$)
0	6.970 \pm 2.249	0	26.8 \pm 2.6
2	4.187 \pm 2.317	0.6 \pm 0.1	20.3 \pm 2.0
4	3.390 \pm 1.414	1.8 \pm 0.3	13.7 \pm 3.3
6	2.553 \pm 1.011	3.7 \pm 0.5	11.1 \pm 4.6

Pollen (0.1-0.2g) were incubated on a 0.1 M glucose-1.3% agar medium at 25°C and the growing pollen were collected and homogenized in a glass homogenizer. To the supernatant obtained by centrifuging the homogenate, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ was added up to 80% saturation. After collection by centrifugation, the precipitate was dissolved, desalted by Sephadex G-25 gel filtration, and immediately assayed for the enzyme activity. The values are the means \pm SD of three experiments.

F1,6BP は ADPG ピロホスホリラーゼ活性を促進すること⁽¹³⁾, また F2,6BP は PPI 依存ホスホフルクトキナーゼ活性を促進すること⁽³⁾が知られている。これらフルクトースビスリン酸はツバキ UDPG ピロホスホリラーゼ活性を促進した (Fig. 5)。これらの物質の作用機構は不明であるが, G1,6BP によって同様の効果がみられたので, 化合物のリン酸部分が反応に関与しているのかも知れない。酵素濃度が高い場合に効果がみられること, UDPG と PPI の反応に対して最も効果が大きいことはその作用機構を考える際に考慮する点であり, さらに精製した酵素を用いて調べる必要がある。

ツバキ UDPG ピロホスホリラーゼは UTP や G1P よりも UDPG と PPI に対して親和性が高く (Table 3), また UDPG の加ピロリン酸分解はフルクトースビスリン酸によって促進された。これらのことは $\text{UDPG} + \text{PPI} \rightarrow \text{UTP} + \text{G1P}$ の反応が進みやすいことを示している。ツバキ花粉の貯蔵糖はショ糖であるので, このピロホスホリラーゼ反応はショ糖合成酵素反応と共役することでショ糖の分解に関与していることが考えられる。このようなショ糖合成酵素-UDPG ピロホスホリラーゼ系は培養細胞などにおけるショ糖から解糖系に連なるショ糖分解代謝系とされている^(1,2)。一方, 花粉管細胞壁多糖の先駆体である UDPG もショ糖から生成されるのかも知れない。しかしグルコースやフルクトースが管伸長に有効であることはこれらの糖からも花粉管壁多糖が作られるはず

であり, UDPG ピロホスホリラーゼによって UDPG が形成されなければならない。この反応が進行するには, 相対的に UTP と G1P の濃度が高く, UDPG と PPI の濃度が低くなければならない。その為には UDPG が壁多糖合成に積極的に利用され, また PPI が解糖系の PPI 依存ホスホフルクトキナーゼや無機ピロホスファターゼなどの基質として利用されるような代謝共役がなければならない。とりわけ UDPG ピロホスホリラーゼ反応と PPI 依存ホスホフルクトキナーゼ反応との共役があれば花粉管伸長に好都合であろう。実際に UDPG ピロホスホリラーゼがどちらの方向の反応を触媒しているかを知るには, 細胞内のそれぞれの基質の濃度や代謝調節物質の有無などを調べなければならない。また花粉の PPI 依存ホスホフルクトキナーゼや無機ピロホスファターゼについてはガマ花粉^(15,16)の報告がみられるだけであり, 関連する酵素の諸性質についてもさらに検討する必要がある。

ツバキ花粉の管伸長はマルトースにより阻害される。この阻害はグルコースから G1P, G6P を経て UDPG が形成される代謝過程のどこかがマルトースにより直接あるいは間接的に阻害されるために生じることが推定されている⁽¹⁷⁾。予備的な研究ではあるが, マルトースは UDPG ピロホスホリラーゼ活性に影響せず, また 10mM マルトースを含むグルコース培地で培養した花粉の UDPG ピロホスホリラーゼ活性はマルトースを含まない場合 (Table 4) と同じであった。したがってグルコース培養花粉におけるマルトースの成長

阻害は、このピロホスホリラーゼ反応に対するものではなく、別の観点からの解析が必要である。

引用文献

- (1) Huber, S. C. and T. Akazawa: A novel sucrose synthase pathway for sucrose degradation in cultured sycamore cells. *Plant Physiol.* **81**, 1008-1013 (1986).
- (2) Yamashita, Y. and H. Ashihara: Characterization of hexokinase and fructokinase from suspension-cultured *Catharanthus roseus* cells. *Z. Naturforsch.* **43**, 827-834 (1988).
- (3) Cséke, C., A. Balogh, J. H. Wong and B. B. Buchanan: Pyrophosphate fructose-6-phosphate phosphotransferase (PFP); an enzyme relating fructose-2,6-bisphosphate to the control of glycolysis and gluconeogenesis in plants. *Physiol. Vég.* **23**, 321-327 (1985).
- (4) Stitt, M.: Fructose-2,6-bisphosphate as a regulatory molecule in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **41**, 153-185 (1990).
- (5) Feingold, D. S.: Aldo (and keto) hexoses and uronic acids. -In Encyclopedia of plant physiology new series. Vol. 13A (F. A. Loewus and W. Tanner, eds). pp. 3-76. Springer-Verlag (1982).
- (6) Hopper, J. E. and D. B. Dickinson: Partial purification and sugar nucleotide inhibition of UDP-glucose pyrophosphorylase from *Lilium longiflorum* pollen. *Arch. Biochem. Biophys.* **148**, 523-535 (1972).
- (7) Hondo, T., A. Hara and T. Funaguma: The purification and some properties of the UDP-glucose pyrophosphorylase from pollen of *Typha latifolia* Linné. *Plant Cell Physiol.* **24**, 61-69 (1983).
- (8) Nakamura, N., M. Sado and Y. Arai: Sucrose metabolism during the growth of *Camellia japonica* pollen. *Phytochemistry* **19**, 205-209 (1980).
- (9) Hara, A., T. Hondo and T. Funaguma: A simple assay method for determination of NDP-glucose pyrophosphorylases. *Agric. Biol. Chem.* **47**, 413-414 (1983).
- (10) Andrews, P.: Estimation of the molecular weight of proteins by Sephadex gel filtration. *Biochem. J.* **91**, 222-233 (1964).
- (11) Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275 (1951).
- (12) Bradford, M.: A rapid and sensitive method for protein utilizing the principle of protein dyebinding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-259 (1976).
- (13) Gustafson, G. L. and J. E. Gander: Uridine diphosphate glucose pyrophosphorylase from *Sorghum vulgare*. *J. Biol. Chem.* **247**, 1387-1397 (1972).
- (14) Vell, J. and L. Copeland: UDP-glucose pyrophosphorylase from the plant fraction of nitrogen-fixing soybean nodules. *Physiol. Plant.* **78**, 140-146 (1990).
- (15) Funaguma, T., Y. Hibino, S. Fukumori and A. Hara: Pyrophosphate- and ATP-dependent phosphofructokinase in pollen of *Typha latifolia*. *Agric. Biol. Chem.* **51**, 2601-2602 (1987).
- (16) Hara, A., K. Kawamoto and Funaguma: Inorganic pyrophosphatase from pollen of *Typha latifolia*. *Plant Cell Physiol.* **21**, 1475-1482 (1980).
- (17) Nakamura, N. and H. Suzuki: Inhibition of *Camellia japonica* pollen tube growth by maltose. *Plant Cell Physiol.* **26**, 1011-1018 (1985).