

## クロマツ花粉のデンプン合成酵素

丸井 正樹

Starch Synthases from Pollen of *Pinus thunbergii* Parl.

MASAKI MARUI

Properties of two diverse starch synthases, starch-bound and soluble types, from pollen of *Pinus thunbergii* Parl. were compared. ADP-glucose was used as a glucosyl donor for the formation of starch by both enzymes. They had similar  $K_m$  values for ADP-glucose (2.51 mM and 2.43 mM), and had the same optimal pH value of 7-8. The addition of  $K^+$ ,  $Mg^{++}$ ,  $Ca^{++}$  and  $Mn^{++}$  ions accelerated the activity of bound starch synthase, whereas  $Mg^{++}$ ,  $Ca^{++}$  and  $Mn^{++}$  ions inhibited the activity of soluble starch synthase, which was not effected by  $K^+$  ions. Properties of soluble enzyme were not changed by the adsorption on amylose.

高等植物のデンプン合成酵素はデンプン粒に結合している顆粒型と細胞質に遊離している可溶性の二つの存在形態をもつが、これらは一般に同一酵素と考えられる。しかし、中村ら<sup>5)</sup>によれば、テッポウユリ花粉では花粉の発芽初期と管伸長期に形成されるデンプン粒の形状とヨード染色性が異なり、二つの異型酵素の酵素的特性が互いに異なる。これらの事実は、二つの酵素が互いに異なる酵素である可能性を示唆している。

このような現象が他の花粉においても認められるか否かは興味ある問題である。発芽の時間が長い花粉を材料とすれば、発芽初期と管伸長期でみられる相違をより明確にすることが期待できる。マツ属の花粉は発芽・管伸長期に長時間を要することが知られている。

本研究ではクロマツ花粉を材料として、これら二つの型の酵素を調製し、それらの特性について比較検討を行なった。

## 実験方法

## 1. 植物材料

自生しているクロマツ (*Pinus thunbergii* Parl.) から開葯直前の雄蕊を採取し、それをプラスチック容器内におき、赤外線照射により開葯させた。花粉は篩(メッシュ170)を用いて夾雑物を除き、デシケーター中で24時間乾燥した。乾燥花粉は使用時までシリカゲルと共に $-15^{\circ}\text{C}$ で保存した。この方法により花粉はその90%以上が1年間生存した。

## 2. 酵素標品の調製

5%シュクロースを含む2.5%寒天培地上に、花粉を $1.5\text{mg}/\text{cm}^2$ の割合で均一になるように塗布して、 $27 \pm 2^{\circ}\text{C}$ の恒温器中で培養した。培養後、花粉300mgに対し50mMメルカプトエタノールを含む50mMトリス塩酸緩衝液(pH7.5) 10mlを用いて洗い出し、その懸濁液をポッター型テフロンホモジナイザーで氷冷しながら磨砕し、花粉磨砕液とした。この磨砕液を以下に述べる各操作に供した。

Key words: pollen, starch synthase

### (1) 顆粒型酵素の調製

24時間培養した花粉から調製した花粉磨砕液を遠心分離 ( $15,000 \times g$ , 20分) した。その沈殿を前述のトリス-塩酸緩衝液に懸濁させた後、脱脂綿カラム ( $1 \times 1.5\text{cm}$ ) を通過させて、デンプン以外の夾雑物を取り除いた。通過液を再び遠心分離 ( $15,000 \times g$ , 20分) してデンプン粒を集め、トリス-塩酸緩衝液で3回洗浄し、さらに $-15^\circ\text{C}$ アセトンで5回洗浄してデンプン粒に吸着しているホスホリラーゼ活性を消失させた。洗浄後のデンプン粒はデシケーター中で減圧乾燥して、使用時まで $-15^\circ\text{C}$ で保存した。

### (2) 可溶性酵素の調製

3時間培養した花粉から調製した花粉磨砕液を遠心分離 ( $15,000 \times g$ , 20分) し、その上澄液を脱脂綿カラムで濾過した。この濾液に硫安溶液 ( $639\text{g/l}$ ,  $\text{pH}7.5$ ) を40%飽和になるまで加え、45分間攪拌放置した後、遠心分離 ( $15,000 \times g$ , 30分) した。この沈殿をトリス-塩酸緩衝液 2 ml に溶解し、セファデックス G-25 カラム ( $1 \times 25\text{cm}$ ) で脱塩を行ない、280nm吸光度によるタンパク画分を酵素液とした。

### (3) 可溶性酵素のアミロース吸着法

赤沢らの方法<sup>2)</sup>に準じて行なった。すなわち、可溶性酵素液 1 ml に対してアミロース 150mg の割合で、アミロースカラム (直径 0.4cm) に酵素液を通過させた。吸着後のアミロースは $-15^\circ\text{C}$ アセトンで3回、冷水で3回それぞれ洗浄し、デシケーター中で減圧乾燥して、使用時まで $-15^\circ\text{C}$ で保存した。

### 3. 酵素活性の測定

反応液は  $\text{ADP-}^{14}\text{C}$ -グルコース  $0.3 \mu\text{mol}$  ( $22.6 \mu\text{Ci/mmol}$ )、フッ化ナトリウム  $2 \mu\text{mol}$ 、トリス ( $\text{pH}7.5$ )  $7.5 \mu\text{mol}$ 、それに顆粒型酵素の場合は調製したデンプン粒 2 mg、可溶性酵素の場合はアミロペクチン 2 mg と酵素液  $50 \mu\text{l}$  を含み、総量を  $150 \mu\text{l}$  とした。アミロースに吸着させた可溶性酵素の場合は、 $\text{ADP-}^{14}\text{C}$ -グルコース  $0.2 \mu\text{mol}$ 、トリス  $5 \mu\text{mol}$ 、調製したアミロース 6 mg を含み、総

量を  $100 \mu\text{l}$  とした。反応は  $37^\circ\text{C}$  で30分間行ない、75%メタノール (1%塩化カリウムを含む) 2 ml を加えて反応を停止させた。反応終了後、反応液を遠心分離 ( $1,300 \times g$ , 5分) し、デンプン粒、アミロペクチン、あるいはアミロースをそれぞれ集め、遠心法により75%メタノールで3回洗浄して  $\text{ADP}$ -グルコースを除去した。この沈殿に蒸留水  $0.2\text{ml}$  を加え、沸騰水中で加熱することにより溶解させ、ガスフロー用アイソトープ試料皿上にて蒸発乾固した。 $\text{ADP-}^{14}\text{C}$ -グルコースから転移した $^{14}\text{C}$ -グルコースを日本無線アロカ-SC-1 C型ガスフローカウンターで測定した。酵素活性は、花粉300mg相当の酵素が30分間に転移した $^{14}\text{C}$ -グルコース量  $\mu\text{mol}$  で表した。

## 実験結果および考察

### 1. 顕微鏡的観察

クロマツ花粉では、発芽前の培養 2~3 時間にヨード液で赤黒色に染色されるデンプン様微粒子が現われた。なお、この微粒子の形成が認められない花粉は発芽しないことがわかった。管伸長期の培養20時間付近から新たに通常観察されるような大型デンプン粒が形成され、以後このデンプン粒は増加した。

この結果から、可溶性酵素は培養3時間の花粉から、顆粒型酵素は培養24時間の花粉からそれぞれ調製した。

### 2. 基質特異性

$\text{ADP}$ -グルコースと  $\text{UDP}$ -グルコースを基質とした場合の顆粒型酵素と可溶性酵素によるデンプンへのグルコースの取り込みを経時的に測定した (Fig. 1)。いずれの酵素も  $\text{ADP}$ -グルコースを基質として利用するが、 $\text{UDP}$ -グルコースは利用しなかった。また、いずれの酵素でもグルコースの取り込み量は反応時間40分まで直線的に増加し、この範囲内では反応速度がほぼ一定であった。したがって、以後の実験では、反応時間は30分とした。

二つの本酵素のこれらの基質に対する選択性は新井ら<sup>3)</sup>が報告した同化組織の顆粒型酵素のそれと類似していた。つまり、クロマツ

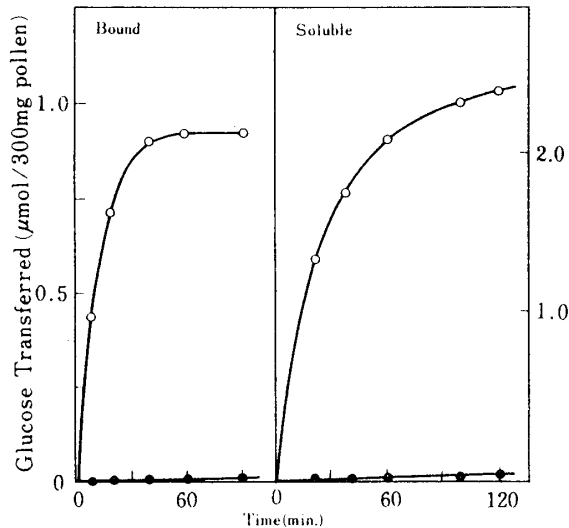


Fig. 1 Time Course of the Incorporation of Glucose, from ADP-glucose into Starch.

The reaction mixture containing  $7.5 \mu\text{mol}$  of Tris-HCl buffer, pH7.5,  $2 \mu\text{mol}$  of NaF,  $0.3 \mu\text{mol}$  of ADP- $^{14}\text{C}$ -glucose ( $22.6 \mu\text{Ci}/\text{mmol}$ ) and  $2\text{mg}$  of starch granules (or  $2\text{mg}$  of amylopectin, and  $50 \mu\text{l}$  of enzyme solution) in a final volume of  $150 \mu\text{l}$ . ○ : ADP-glucose, ● : UDP-glucose.

花粉の発芽に伴うデンプンの合成は、ADP-グルコースをグルコース供与体として顆粒型酵素および可溶性酵素によって行なわれると考えられる。

### 3. pHの影響

トリス緩衝液 (pH 5 ~ 9), HEPES緩衝液 (pH 6 ~ 10), グリシン緩衝液 (pH 9 ~ 11) を用いて酵素活性におよぼすpHの影響を調べた (Fig. 2)。顆粒型酵素と可溶性酵素の至適pHはいずれもpH 7 ~ 8にあった。しかし、顆粒型酵素ではHEPES緩衝液を用いた場合の活性の強さがトリス緩衝液の場合の約1/2であるのに対して、可溶性酵素では約2倍の活性を示した。このように、緩衝液の種類により異なる影響を示すことから、顆粒型酵素と可溶性酵素が異なる酵素であることが示唆された。

### 4. 基質濃度の影響

基質であるADP-グルコースの濃度と反応生成物量の関係をFig. 3に示した。顆粒型酵素と可溶性酵素はほぼ同型の曲線を描き、Lineweaver-Burkプロットにより求めたKm

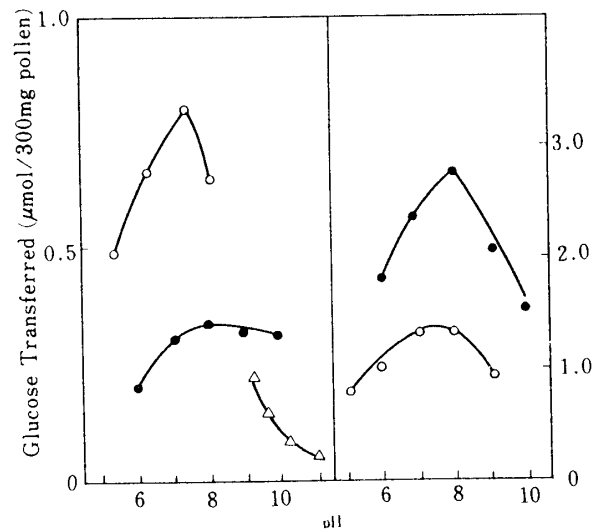


Fig. 2 Effect of pH on the Incorporation of Glucose into Starch.

Experimental condition was the same as that of Fig. 1 except buffer. ○ : Tris buffer, ● : HEPES buffer, △ : Glycine buffer.

値も顆粒型酵素が $2.51 \times 10^{-3}\text{M}$ で、可溶性酵素が $2.43 \times 10^{-3}\text{M}$ で、ほぼ同じ値が得られた。

### 5. イオンの影響

各イオンを終濃度10mMになるように加えて反応し、酵素活性におよぼす影響を調べた (Fig. 4, 5)。顆粒型酵素では、 $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{++}$ ,  $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{Mn}^{++}$ とピロリン酸, EDTAが促進効果を示し、 $\text{Zn}^{++}$ が著しく阻害した。一方、可溶性酵素では、 $\text{Mg}^{++}$ ,  $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{Mn}^{++}$ ,  $\text{Zn}^{++}$ , がともに阻害的に働き、 $\text{K}^+$ とその他のイオンは影響しなかった。 $\text{K}^+$ は一般に顆粒型デンプン合成酵素の活性化剤として知られており<sup>1), 4)</sup>, 可溶性酵素は顆粒型酵素を含めた一般のデンプン合成酵素とこの点で異なっていた。 $\text{Mg}^{++}$ ,  $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{Mn}^{++}$ , EDTAにおいても顕著な差が認められたことから、顆粒型酵素と可溶性酵素が異なる酵素であると考えられる。

### 6. アミロース吸着可溶性酵素の性質

アミロースに吸着させた可溶性酵素について、その活性に対する基質濃度, pH, 各種イオンなどの影響を調べた。Km値は $2.38 \times 10^{-3}\text{M}$ , 至適pHは7 ~ 8, 目立った促進効果を示すイオンはなく、 $\text{Mg}^{++}$ ,  $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{Mn}^{++}$ ,

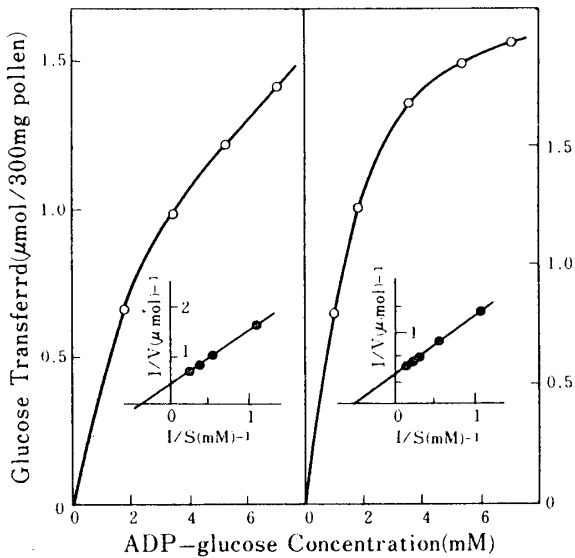


Fig. 3 Relation between ADP-glucose Concentration and the Incorporation of Glucose. Experimental condition was the same as that of Fig.1 except ADP-glucose concentration.

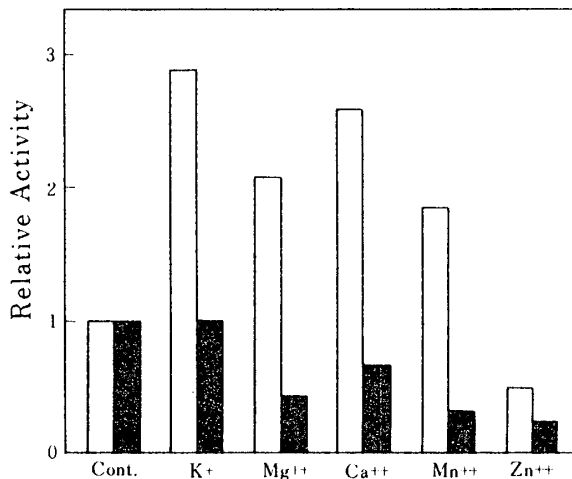


Fig. 4 Effect of Cations on ADP-glucose-Starch Glucosyltransferase. Experimental condition was the same as that of Fig.1. □ : Bound enzyme, ■ : Soluble enzyme.

Zn<sup>++</sup>がやや阻害的であった。これらの結果は、アミロースに吸着する前の可溶性酵素の性質とほぼ同じものであった。

一般には、顆粒型酵素と可溶性酵素は同一のもので、それらの性質が互いに異なる場合については、可溶性酵素がデンプン粒に吸着することによりその性質が変化して、顆粒型酵素の特性を示すものと考えられてきた。しかし、本酵素においてはアミロースに吸着することによる性質の変化は認められず、顆粒

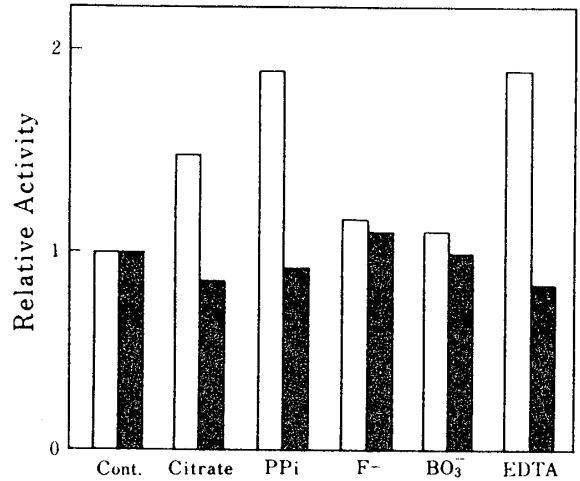


Fig. 5 Effect of Anions on ADP-glucose-Starch Glucosyltransferase.

Experimental condition was the same as that of Fig.1. □ : Bound enzyme, ■ : Soluble enzyme.

型酵素と可溶性酵素が異なる酵素であることがさらに強く示唆された。

## 要 約

1) クロマツ花粉の発芽時にみられる二つのデンプン合成酵素、すなわち、顆粒型酵素と可溶性酵素の異同を明らかにするために、それらの酵素的性質を調べた。至適pHはいずれも7~8であったが、顆粒型酵素はトリス緩衝液で、可溶性酵素はHEPES緩衝液でそれぞれ高い活性を示した。

2) 顆粒型酵素の活性は、K<sup>+</sup>、Mg<sup>++</sup>、Ca<sup>++</sup>、Mn<sup>++</sup>などにより促進された。一方、可溶性酵素の活性は、K<sup>+</sup>では影響がなく、Mg<sup>++</sup>、Ca<sup>++</sup>、Mn<sup>++</sup>などにより阻害された。

3) 可溶性酵素をアミロースに吸着させたが、その特性に変化は認められず、顆粒型酵素と可溶性酵素は異なる酵素であると推定された。

4) クロマツ花粉のデンプン合成反応はADP-グルコースをグルコース供与体として行なわれ、ADP-グルコースの生成の進行に応じて調節されると考えられた。

本研究に当たり、終始指導をいただいた筑波大学応用生物化学系新井勇治教授に厚く感謝の意を表します。

## 文 献

- 1) AKATSUKA, T. and NELSON, O. E. : J. Biol. Chem., 241, 2280 (1964).
  - 2) AKAZAWA, T. and MURATA, T. : Biochem. Biophys. Res. Comm., 19, 21 (1965).
  - 3) ARAI, Y. and FUJISAKI, M. : Bot. Mag. Tokyo, 84, 169 (1971).
  - 4) MURATA, T. and AKAZAWA, T. : Arch. Biochem. Biophys., 126, 873 (1968).
  - 5) 中村紀雄, 須山芳明, 新井勇治 : 1973年度日本植物生理学会年会講演要旨集, p.120 (1973).
-