

論 説

ライ麦の糖質分解酵素 I

花粉のインベルターゼ、ペクチナーゼおよびセルラーゼ

原 彰*・船隈 透*・斉藤 豊*・塚本康雄*

Carbohydrases of rye I

Invertase, pectinase and cellulase from rye pollen

Akira HARA*, Tooru FUNAGUMA*, Yutaka SAITO* and
Yasuo TSUKAMOTO*

緒 言

成熟した花粉粒は、発芽、花粉管の伸長、受精に至る過程に関与するすべての酵素群を含んでいるか、合成する能力をもっている。しかし、検出される花粉の酵素量は、植物の種類によって著しい差がみられる。受粉された花粉がその任務を全うするまでには、数多くの酵素の消長があるだろうが、それらの酵素の量と性質はまた、花粉と柱頭、花柱組織との相互作用にも大きな影響を与えるであろう。

イネ科の柱頭は花粉がつくと、付着部が色素に良く染まるようになる。この柱頭反応⁽¹⁾は渡辺⁽²⁻⁴⁾によって詳細に観察されている。渡辺はこの柱頭反応の強さが、花粉からの液滲出、いわゆる花粉の汗かきと密接に関係していることを明らかにし、花粉に含まれる何らかの酵素が関与している可能性を示唆

している⁽⁴⁾

著者らは柱頭反応を生化学的に理解する目的で、手初めとしてライ麦花粉中の糖質分解酵素について検索した。本報では主に、強力な活性の認められたインベルターゼの分離精製と諸性質について報告し、またペクチン、ペクチン酸およびセルロースを分解する酵素の存在について言及する。

実験材料および方法

1. 材 料

花粉は名城大学農学部において栽培したライ麦 (*Secale cereale* cv. *petkus*) **から採集し、デンケーター中で乾燥させたのち、使用するまで-20°C以下で保存した。

2. 試 薬

* 名城大学農学部生物化学教室 〒468 名古屋市天白区天白町八事裏山

Faculty of Agriculture, Meijo University, Tenpaku-ku, Nagoya 468, Japan.

** ライ麦種子は鳥取大学佐々木睦男教授から京都家政短大渡辺光太郎教授を介して分譲を受けたものである。

シュクロース (AnalaR) は BDH Chemicals、ペクチン (特級、without sucrose or other sugars) およびペクチン酸 (特級) は半井化学薬品製、セルロース (薄層用アピセル S F) は旭化成製を使用した。DEAE-Sephadex A-50 および Sephadex G-100 は Pharmacia 製、焦点電気泳動用 Ampholine (pH 3.5-10.0) は LKB 製を使用した。

3. 酵素活性測定法

インペルターゼは、適当に希釈した酵素液 0.1 ml に 0.2 M リン酸緩衝液 0.2 ml を加え、37°C に 5 分間放置したのち、別に保温した 0.25 M シュクロースを加え、15 分間の反応によって測定した。反応は 0.3 ml の 0.1 M 炭酸ナトリウムを加えて停止させ、生じた還元糖を Somogyi 法⁽⁵⁾によって比色定量した。インペルターゼの 1 単位は、37°C で 1 分間に 1 μ mol のグルコースを遊離する酵素量として定義した。比活性は蛋白質 1 mg あたりの酵素単位であらわし、蛋白質量は 280 nm (液層 1 cm) における吸光度が 1.0 を示すときの濃度を 1 mg/1 ml と仮定して表示した。

ペクチン、ペクチン酸およびセルロース分解活性は、インペルターゼ活性測定法に準じ、シュクロースの代わりにそれぞれ 10 mg/ml の濃度の基質を添加した。この方法では、発色試薬中の銅塩がペクチンやペクチン酸とゲルを形成することがあるので良い方法ではないが、生じた沈殿は測定前に遠心分離して除去し、上清について比色定量した。反応は 1 時間および 24 時間行った。

ペクチン分解酵素には糖化型 (exo-type) と液化型 (endo-type) が知られているので、液化型の酵素活性を粘度法によって測定した。すなわち Ostwald の粘度計に 0.4 ml の酵素液、0.8 ml の 0.2 M リン酸緩衝液 (pH 5.5)、および 0.8 ml の 0.5% ペクチンを加え、37°C に保温し、一定時間ごとに落下速度を測定し、リン酸緩衝液に対する相対粘度を求めた。

実験結果

1. ライ麦花粉ホモジネートの自己消化による還元糖の生産

ライ麦花粉中の還元糖量が自己消化によってどのように変化するかを次の方法で測定した。すなわち、50 mM リン酸緩衝液 (pH 5.5) を含む 1% 新鮮花粉けん濁液を、前処理として 10 分間沸騰水中に保持した画分と、前処理しない画分とに分け、テフロンガラスホモジナイザーで 10 分間磨砕した後、37°C で 1 時間自己消化させた。それぞれを遠心分離 (3,000 回転、5 分間) し、上清について Somogyi 法⁽⁵⁾によって還元糖量を測定した。

結果を Table 1 に示した。熱処理した画分の還元糖量 (3.8 mg/100 mg 花粉) は、新鮮花粉中の既存量を示していると考え、熱処理していない画分の還元糖量 (18.3 mg/100 mg 花粉) との差 (14.5 mg) は、自己消化の結果生じた還元糖とみなすことができる。換言すれば、花粉中には 37°C、1 時間の反応で新鮮重の約 15% に達する還元糖を生産せしめるのに十分量の酵素が存在していることを示している。自己消化上清について薄層クロマトグラ

Table 1. Reducing sugar content of rye pollen homogenate

Fraction homogenized after heat treatment	Fraction homogenized without heat treatment
3.8 mg	18.3 mg

After autolysis for an hr at 37°C, the reducing sugar content of each fraction was measured and represented as the content per 100 mg fresh weight of pollen.

フィーによる糖の分析を行った結果、グルコース、フルクトースを検出したのでインベルターゼの存在を推定するに至った。

2. インベルターゼの精製

ライ麦花粉 6.8 g に水を加えて 5%けん濁液とし、テフロン-ガラスホモジナイザーで 10 分間処理し、ホモジネートを遠心分離することなく直接透析膜に入れ（この方法は比活性を上昇させるのに有効であった）、水に対して 2 昼夜透析した。透析内液を遠心分離（10,000 回転、10 分間）し、上清 138 ml を得た。

上清に 1 M 食塩および 50 mM トリス-塩酸緩衝液、pH 7.0（以下 T-緩衝液と称する）を加えて、食塩濃度を 0.1 M、緩衝液濃度を 10 mM とするよう調整したのち、同濃度の溶液によって平衡化した DEAE-Sephadex A-50 カラム（2×25 cm）に通した。50 ml の同濃度液によって洗浄したのち、200

ml の 0.1 M 食塩を含む 10 mM T-緩衝液と 200 ml の 0.6 M 食塩を含む同緩衝液とから構成される食塩の直線の濃度勾配によって溶出した (Fig. 1)。

酵素活性画分 (No. 86~94, 44.2 ml) をコロジオンバッグによって約 0.5 ml になるまで濃縮し、0.1 M 食塩を含む 10 mM T-緩衝液によって平衡化した Sephadex G-100 カラム（2×100 cm）に通し、ゲルろ過を行った。Fig. 2 に示すように、酵素活性は 1 つのピークで溶出された。

酵素活性画分 (No. 42~46, 14.6 ml) を 5 mM の T-緩衝液に対して透析し、焦点電気泳動を行った。泳動用カラムは LKB 8100-1、110 ml カラム (LKB Produkter) を使用し、0~50% のグリセロール密度勾配下で、3.5~10.0 の pH 勾配をもつ 1% Ampholine を添加した。泳動は 900 V で 44 時間行った。Fig. 3 に示すように、最高の活性はフラクション No. 12 で示され、焦点 pH は約 4.3 であった。

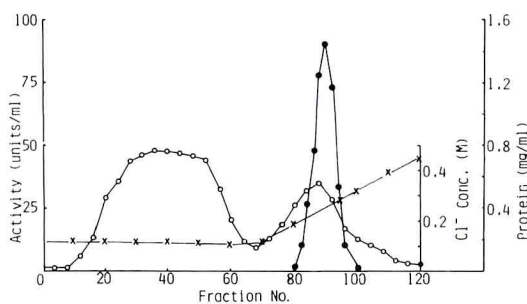


Fig. 1. Chromatography of invertase on DEAE-Sephadex A-50.

Crude invertase fraction was loaded on a column (2×25 cm) of DEAE-Sephadex A-50 and washed with 50ml of 10mM Tris-HCl, pH 7.0, containing 0.1M NaCl. Elution was carried out with a molarity gradient (0.1—0.6M) of NaCl in the presence of 10mM Tris-HCl buffer. Fractions of 4.9 ml per tube were collected.

○—○, protein., ●—●, invertase activity., x—x, Cl⁻ concentration.

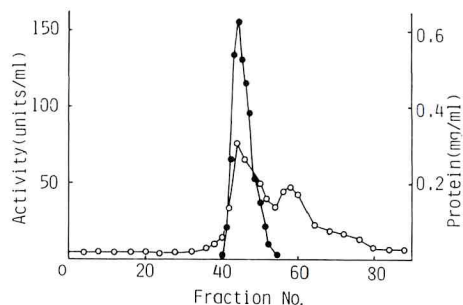


Fig. 2. Gel-filtration of invertase through a Sephadex G-100.

Invertase fractions obtained from a DEAE-Sephadex A-50 chromatography were concentrated to about 0.5ml in a collodion bag and loaded on a column (2×100cm) of Sephadex G-100. Elution was carried out with 10mM Tris-HCl buffer, pH 7.0, containing 0.1M NaCl. Fractions of 2.9ml per tube were collected.

○—○, protein., ●—●, invertase activity.

酵素活性画分、No. 11~13はそれぞれ10mM T-緩衝液に対して透析した。以上の精製過程を Table 2 に示した。酵素は最高25倍に精製され、焦点電気泳動までの収率は23%であった。

3. インペルターゼの一般的性質

(1) 至適 pH インペルターゼの至適 pH は Fig. 4 に示すように、pH 5.3~6.0 にあった。至適 pH からはずれると活性が大きく低下するのは、それらの pH 範囲では熱安定性が低いためであると思われる。

(2) 温度および pH 安定性 精製した酵素は、

Table 2. Summary of purification procedure of invertase

Step		Volume (ml)	Protein (mg)	Activity (units)	Specific activity (units/mg protein)	Yield (%)
Crude extract		138	236	5017.7	21.3	100
DEAE-Sephadex A-50		44.2	21.7	3073.6	142	61.2
Sephadex G-100		14.6	3.75	1725.3	460	34.4
Isoelectric focusing, after dialysis	No. 11	5.8	0.638	343.6	538	
	12	5.6	1.130	554.9	491	23.1
	13	5.6	0.795	263.0	331	

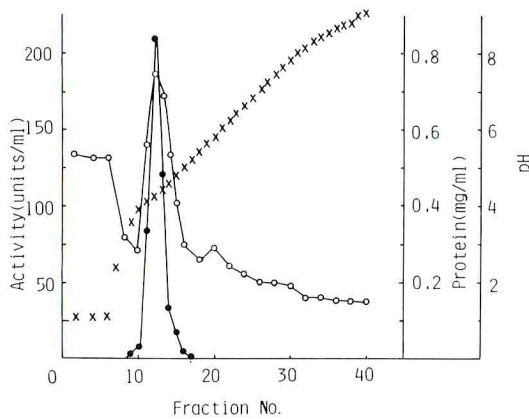


Fig. 3. Isoelectric focusing of invertase.

Invertase fractions from gel-filtration through a Sephadex G-100 was applied to a LKB column (110ml) for isoelectric focusing. Electrophoresis was carried out with Ampholine carrier ampholyte giving a pH gradient of 3.5-10.0 at 900 V for 44 hrs.

○—○, protein., ●—●, invertase activity., x, pH.

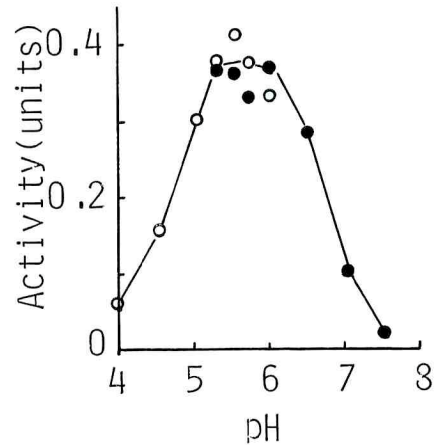


Fig. 4. Effect of pH on invertase activity.

The buffer systems employed were: 40 mM acetate (○), pH 4.0-6.0; 40 mM phosphate (●), pH 5.3-7.5.

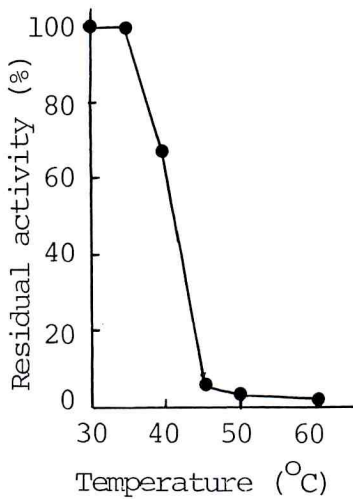


Fig. 5. Effect of temperature on invertase stability.

The enzyme preparation was incubated with 10 mM phosphate buffer, pH 5.5, at various temperatures for 10 min and residual activities were measured.

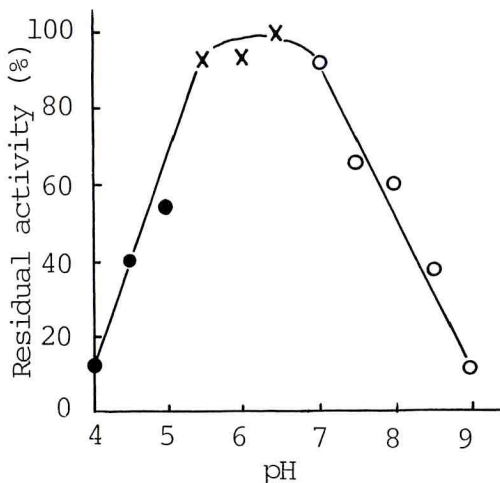


Fig. 6. Effect of pH on invertase stability.

The enzyme preparation was incubated with various buffers at 4°C for 24 hrs and residual activities were measured. The buffer systems employed were: 10 mM acetate (●), pH 4.0-5.0; 10 mM phosphate (x), pH 5.5-6.5; 10 mM Tris-HCl (○), pH 7.0-9.0.

希釈、温度、pH の影響をうけやすく、しばしば活性測定値に乱れを生じた。Fig. 5 に示すように、酵素は 45°C 以上の加熱で活性のほとんどを失った。また、Fig. 6 に示すように、4°C における放置下で酵素の安定 pH 領域は狭く、pH 5.5~7.0 の範囲内においてのみ 90% 以上の残存活性が認められた。

(3) Michaelis 定数 (K_m 値) シュクロースに対する K_m 値は、37°C、pH 5.5 における反応によって得られた測定値を Lineweaver-Burk の式によりプロットして求められた。その結果、この酵素の K_m 値はほぼ 4.0 mM であった。

4. ペクチン、ペクチン酸およびセルロースに対する分解活性

(1) 還元力の測定 予備的試験において細胞破壊液の上清は、3種の基質に対する活性をほとんど示さなかったため、本試験においては5%花粉けん濁液を10分間テフロン-ガラスホモジナイザーで処理後、2昼夜透析(多量の還元糖を除去)した細胞破片および顆粒を含む全液を酵素液として使用した。

その結果、pH 5.5、37°Cでの1時間反応と24時間反応のどちらも活性値は極めて低く、両者の差はほとんど認められなかった。そこで pH 4.0 および pH 8.0、 Mg^{2+} または Ca^{2+} の存在下あるいは非存在下の条件で反応を行ったが、いずれにおいても明確な酵素作用は示されなかった。

(2) 粘度法によるペクチン分解活性の測定 液化型ペクチナーゼの場合には、還元力測定よりも粘度低下による測定の方がはるかに感度が良い。この場合、酵素液は上記(1)で使用した酵素液を遠心分離(10,000回転、10分間)した上清を使用した。Fig. 7 に示すように、1時間の反応で粘度低下は全く認められなかった。なお、用いたペクチンが酵素作用の結果粘度低下を示すかどうかを確認するために0.01%セルロシン PG(上田化学工業製)を用いて、同じ条件下で測定したところ、反応初期に急激な粘度低下が認められた。

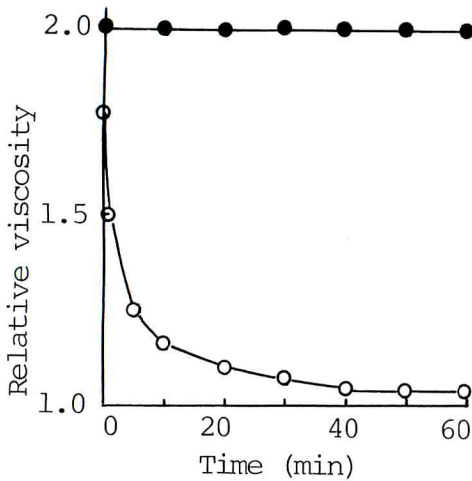


Fig. 7. Pectinase activity of the supernatant obtained from rye pollen homogenate.

Ten ml of 5% rye pollen suspension was treated with teflon-glass homogenizer for 10 min and centrifuged at 10,000 rpm for 10 min. The supernatant was employed for pectinase assay by an Ostwald viscosimeter. The activity was represented as a relative viscosity against control run with phosphate buffer. As an example of hydrolysis of pectin, the result with Cellulose PG (Ueda Kagaku Kogyo) was shown.

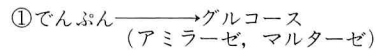
●—●, supernatant from rye pollen homogenate., ○—○, 0.01% Cellulose PG.

考 察

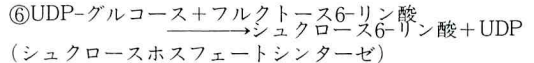
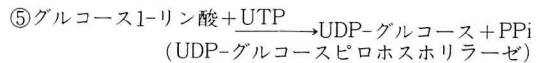
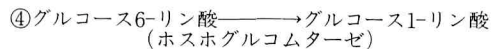
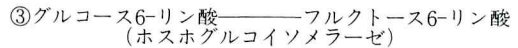
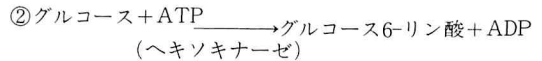
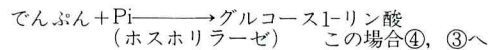
ライ麦花粉 100 mg 中には 37°C、15 分間の反応で約 200 mg のシュクロースを還元糖に変える量のインベルターゼを含んでいる。Table 1 に示した、非熱処理画分の熱処理画分に対する還元糖量の増加分は、シュクロースの分解に由来するものであるとすれば、花粉 100 mg 中には約 15 mg のシュクロースが存在するが、それは細胞中でインベルターゼが活性化されると 2 分間以内で分解される量である。植物起源のインベルターゼは、結合型(または不溶性)として報告されているものが多いが、花粉において

も同様の例がある⁽⁶⁻⁸⁾ライ麦花粉のインベルターゼは、ホモジネートの遠心分離上清にほとんどの活性が検出されるので、結合型ではなく遊離型である。これはライ麦花粉自体が多量のシュクロースを含んでいるので、細胞外(雌ずい)からシュクロースを吸収する必要がなく、従って細胞壁結合型としてよりも、細胞内の可溶性酵素として存在すること十分であるためであろうか。

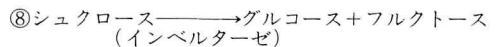
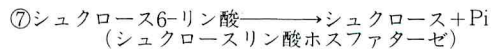
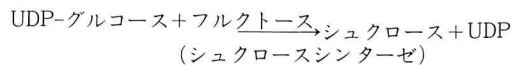
渡辺はイネ科花粉がでんぷん型から糖型へ変化するにつれて、花粉の発芽率が高くなる⁽⁴⁾ことを述べているが、自然開花した花粉は自己消化によって還元糖が大量に増加し、かつグルコースとフルクトースが検出されることを考え合せると、花粉が成熟するにつれて次のような糖代謝反応が起こっていることになる。



または



または



最終的に生じたグルコースとフルクトースはエネルギー源として利用されるにせよ、細胞構成成分になるにせよ、いずれにしてもリン酸化される。大まかに言えば④~⑧の一連の反応は①~③の反応の重複になるように思われるが、どのような合目的性を有しているのであろうか。このようにでんぷんが他の糖(特にシュクロース)に転化する現象は、花

粉⁽⁹⁾のみならず、多くの植物⁽¹⁰⁾において観察されている。また、花粉におけるシュクロースの合成酵素については、中村⁽¹¹⁾により報告されている。

ライ麦花粉のインペルターゼは、DEAE-Sephadex A-50 によるクロマトグラフィー、Sephadex G-100 によるゲルろ過、焦点電気泳動法によって最高25倍に精製された。精製度が低いのは花粉ホモジネートの“丸ごと”の透析の際に多量の不純物を沈でんとして除去できたので、粗酵素の比活性が高くなったためである。最終精製酵素標品は、ディスク電気泳動の結果、均一ではなかった。酵素の至適pHは報告された他のほとんどのインペルターゼ同様、酸性側にあったが、精製した酵素は熱、希釈およびpHに対し著しい不安定性を示した。

柱頭に付着した花粉が分泌した酵素の作用によって、柱頭細胞に透過性の増大その他の生理的变化(柱頭反応)が起こるのであるとすれば、そのような酵素としてペクチナーゼ、セルラーゼ類があげられよう。ライ麦花粉については古くは、J. B. Paton による記載⁽¹²⁾があり、セルラーゼ(Cytase)、ペクチナーゼの存在を確認している。しかし、結果は定性的に示されているにすぎず、またデータの記載もなかったりであるが、何よりも彼の測定法では正確な酵素力を示しているかどうか疑問である。著者らはペクチン、ペクチン酸およびセルロースを基質として、酵素の抽出条件、反応条件および測定法をいろいろと変化させて酵素活性を調べたが、いずれの場合も柱頭反応に関与しうると確信できるような酵素の存在を見出すことはできなかった。

事実著者らの調製した花粉粗酵素液によって柱頭反応が起こるかどうかを、二年間にわたり渡辺は検討したが、酢酸カーミンやメチレン青の色素滴下で

明確な反応を得るに至らなかった(渡辺光太郎、未発表)。

これらの結果は柱頭反応に対するライ麦花粉の酵素の関与を否定するかのようと思われるが、正しくは柱頭反応の原因物質を酵素として、花粉から直接取り出すことはできなかったと言うべきであろう。花粉が柱頭に付着すると明らかに“汗かき”は観察されるし、1分内外で柱頭反応が起こることは厳然たる事実である。元々花粉と柱頭の接触下で起こる反応を、切り離れた条件下で解明しようとするところに無理があるのだろうか。

本稿を終えるにあたり、研究の遂行に終始適切な御助言を与えて下さいました京都家政短期大学教授渡辺光太郎博士に深謝致します。

後記 著者らは1977年、第18回日本花粉学会において「ライ麦花粉のペクチナーゼと柱頭反応」というタイトルで、京都家政短大渡辺光太郎氏と連名で口答発表を行った。その要約は、本誌第20号(1977)、46ページに記載されているが、そのペクチナーゼに関する部分を削除訂正致すことを御許し願いたい。

理由は基質として使用したN社製一級ペクチンに20%以上のシュクロースが混在していたために、花粉中のインペルターゼが作用しペクチナーゼ活性と混同したことによる。シュクロースは還元性を示さないために、ブランクテストでチェックできず、誤りに気づくのが遅れてしまった。著者らの全くの初歩的なミスを恥じるとともに、一級試薬と言えども信用できない場合があることを、改めて思い知らされた次第である。

Summary

Carbohydrases from rye pollen were investigated. In the pollen homogenate, invertase activity was strongly detected, but the enzyme activities which hydrolyzed pectin, pectic acid or cellulose were scarcely detected.

Invertase was purified about 25-fold by the procedures of chromatography on a column of DEAE-cellulose, gel-filtration through a Sephadex G-100 and finally isoelectric focusing. It had a pH optimum between 5.3 and 6.0, and was stable in the pH range of 5.5-7.0 and by 10 minutes' heating below 35°C.

It was discussed whether or not the crude enzymes extracted from rye pollen could induce the stigma reaction.

文 献

1. K. Kato. *Mem. Coll. Sci. Univ. Kyoto, Ser B.*, **20**, 203 (1953)
2. K. Watanabe. *Bot. Mag. Tokyo*, **68**, 40 (1955)
3. K. Watanabe. *Bot. Mag. Tokyo*, **74**, 131 (1961)
4. 渡辺光太郎 京都家政短大紀要, 第 13 集, 26 (1974)
5. M. Somogyi. *J. Biol. Chem.*, **195**, 19 (1952)
6. D. B. Dickinson. *Physiol. Plant.*, **20**, 118 (1967)
7. K. Lenzian and E. Schäfer. *Phytochemistry*, **12**, 1227 (1973)
8. A. Hara, M. Yamamoto, Y. Horita and T. Watanabe. *Mem. Fac. Agr. Kagoshima Univ.*, **8 No. 2**, 27 (1972)
9. 岩波洋造 花粉学大要, 風間書房, p 38~42 (1964)
10. J. F. Turner and D. H. Turner. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **26**, 159 (1975)
11. N. Nakamura. *J. Yokohama City Univ. Biol. Ser.*, **5, No. 1**, 74 (1978)
12. J. B. Paton. *Amer. J. Botany*, **8**, 471 (1921)