

発芽コムギ胚におけるサッカラーゼ 活性について

1. サッカラーゼ活性と生長との関係

寺 岡 宏

高等植物における発育現象の解明は今迄主として光週性及び春化処理の面から形態学的方法を中心としてなされてきたが、著者達はこの現象を代謝生理学の面から段階的発育として特徴づけることを目的とし研究をつづけてきた。この目的のもとに、発育の第一段階としての発芽過程をえらび、コムギの発芽胚を用いて呼吸系、核酸、炭水化物、蛋白質などの代謝系についてその時間的変化を解明してきた(1,2,3,4,5,6)。
ここでは同じ観点から炭水化物の代謝系に関する研究を進め、サッカラーゼ活性と生長との関係についてなされた実験の結果を報告する。

前報(6)において24°C発芽におけるコムギ発芽胚の生理的特性を発芽2~3日を堺として、発芽前期と後期とに特徴づけた。そして発芽前期にはサッカロース、ラフィノース、などが、又発芽後期にはグルコース、フラクトースが胚において主要な炭水化物として存在することを明らかにした。この発芽の進行にともなう炭水化物の存在様式に直接影響を及ぼす要因として、サッカラーゼ活性が考えられる。そして発芽胚の生理的特性を炭水化物代謝の面から解明する場合、サッカラーゼ活性は一つの重要な特性として考えられてくる。以上の観点から発芽過程における胚のサッカラーゼ活性を胚の生長との関係を通して研究した。

方 法

実験材料としては主として秋まきコムギ赤さび不知、1号を用い、別
に比較のため春まきコムギ農林75号を用いた。ウスプルソ溶液で滅菌し

た種子をシヤールに入れ水にひたして24~26°Cで暗中で発芽させた。発芽2日目から幼根を生ずるが、実験には幼根を切除し、胚盤、子葉、子葉鞘をふくむ部分を発芽胚として用いた。

サッカラーゼ活性の測定には、発芽胚をすりつぶし、3500r. p. m.で5分間遠心分離した上澄液を粗酵素液として用いた。反応液は基質として最終濃度3%サッカロース溶液3~9ml(酵素活性の強弱によつて適当に調節した)、pH5.2 燐酸緩衝液又はクエン酸緩衝液1ml、粗酵素液0.5~1.0mlをふくむ。反応温度は38°C、反応時間は30~60分とし、反応終了後は加熱によつて酵素活性を止め、反応液中における還元糖の生成量mg/min、によつてサッカラーゼ活性を示した。

還元糖の定量はハーネス法(7)を用い、窒素の定量にはフェノール法(8)又は微量の場合にはローリー法(9)を用いた。

結 果

1. サッカラーゼ活性に及ぼす種々の反応条件の影響

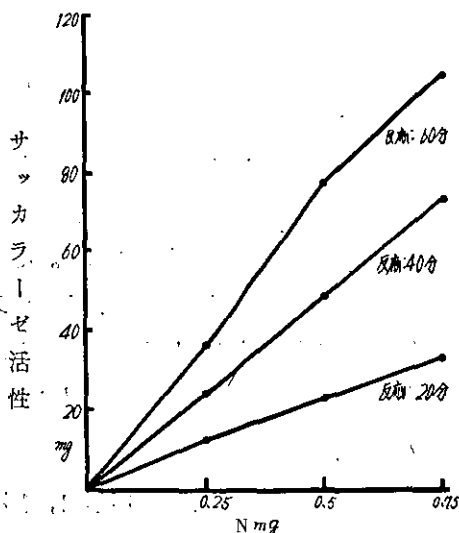


図1 粗酵素N量とサッカラーゼ活性との関係

発芽胚から抽出した粗酵素液は常温において比較的安定な活性を示し、反応1時間以上にわたって活性の減少はみられない。3%サッカロース溶液を基質とし発芽3日目の胚からの粗酵素液を用いた場合窒素量と酵素活性との間には、図1にみられるような直線関係が存在する。

図2は基質濃度と粗酵素活性との関係を示す。基質濃度が約0.5%のとき最大活性に対して1/2の活性を示し、基質濃度が約10%のとき最大活性を示す。

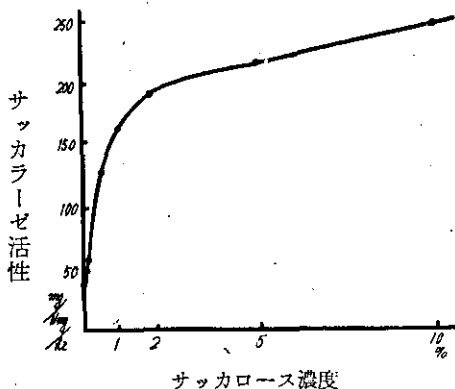


図2 基質濃度とサッカラーゼ活性との関係

図3、図4は粗酵素活性に対する反応温度と反応pHの影響を示す。

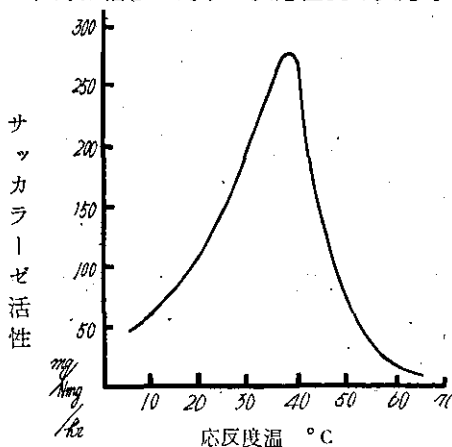


図3 反応温度とサッカラーゼ活性との関係

この結果最適温度は39°C, 最適 pH4.9 であることがわかる。以上の諸結果は既報の値とほぼ一致する (10)。

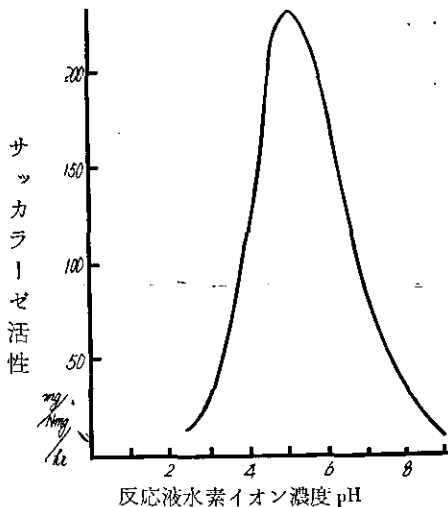


図4 反応液水素イオン濃度とサッカラーゼ活性との関係

同一 pH の場合には磷酸緩衝液を用いてもクエン酸緩衝液を用いても酵素活性には差がみられない。又生成する還元糖量はサッカロースの減少量とひとしい。これらの結果はこの反応がフオスホオリラーゼによるものではないことを示すものと考えられる。

2. 芽発過程におけるサッカラーゼ活性

24°C 発芽胚においては発芽 2日目から 3日目にかけていちじるしいサッカラーゼ活性の増加がみられる。表 1 は秋まきコムギと春まきコムギの発芽胚における、胚 1 コ当り及び N 1 mg 当りのサッカラーゼ活性を示す。

春まきコムギと秋まきコムギは発芽過程においてことなつたサツカラゼ活性を示すが、これは播種性の相違にもとづくものか、あるいは種子の貯蔵条件などの相違にもとづくものかは断定し難い。表 1 では胚全体のサッカラーゼ活性が示されているが、胚は形態的に子葉、子葉鞘、胚盤の部分をふくんでいる。これらの部分のうちサッカラーゼ活性は特

に子葉鞘部分に強く局在する。例えば発芽4日目の胚では全活性の93.3%が子葉鞘, 6.4%が子葉, 0.3%が胚盤の部分に存在する。

表1 発芽コムギ胚のサッカラーゼ活性

発芽 日数	還元糖mg/胚1ヶ/40分		還元糖mg/Nmg/40分	
	春まきコムギ	秋まきコムギ	春まきコムギ	秋まきコムギ
1	0.138	0.395	2.9	6.6
2	0.88	2.15	12.2	28.8
3	11.5	20.9	73.0	133.6
4	36.5	38.8	244.0	218.0
5	45.5	32.5	326.0	134.0

図5は発芽過程における子葉鞘と子葉の部分のサッカラーゼ活性の変化を示す。発芽5日目位に子葉鞘は伸長生長を停止し、子葉は子葉鞘の先端を突破して伸長をつづける。その頃から子葉鞘のサッカラーゼ活性は次第に減少する傾向を示す。以上の結果から発芽胚においては胚の伸長生長とサッカラーゼ活性との間には相互に関連性を有することがわかる。

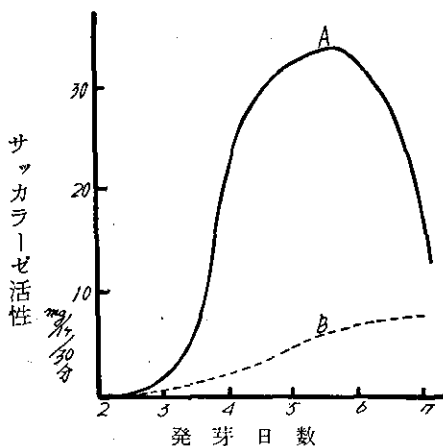


図5 発芽過程における子葉鞘と子葉のサッカラーゼ活性
A: 子葉鞘 B: 子葉

3. 子葉鞘におけるサッカラーゼ活性

図5において発芽3日目から4日目にかけて子葉鞘の部分でいちじるしいサッカラーゼ活性の増加がみられたが、この時期に子葉鞘の伸長生長も最大値を示す。子葉鞘の伸長生長は発芽3日目の長さ30mm位のものでは先端5~15mm位の部分が最もさかんであり基部では殆んど伸長はみられない。これらの子葉鞘における伸長生長がサッカラーゼ活性とどのような関連性を有するかを明らかにするために、次の実験を行なった。発芽3日目の長さ30mmの子葉鞘を用い、先端から5mm間かくの目盛をつけてこれを6等分する。これを24°Cでさらに24時間発芽を進行させた後、各区分の長さ及びサッカラーゼ活性を測定し初めの値と比較した。

表2 子葉鞘におけるサッカラーゼ活性の変化

子 葉 鞘 部 位			0~5	5~10	10~15	15~20	20~25	25~30	
mm									
4 日 目 伸 長	目 長 さ	mm	9.6	11.2	11.0	7.8	5.5	5.0	
	長 率	%	92	124	120	56	10	0	
一 ヶ 当 り 量	3 日	μg	4.55	6.05	6.93	6.50	5.83	6.05	
	4 日	μg	7.15	8.90	9.05	8.90	7.44	7.44	
	増 加 率	%	57	47	30	37	28	23	
サ ッ カ ラ ー ゼ 活 性	mg/1ヶ/40分	3 日	2.22	2.25	2.45	2.40	2.07	1.63	
		4 日	4.22	6.10	6.25	4.27	2.17	1.23	
	増 加 率		%	90	171	155	78	5	-25
	mg/Nμg/40分	3 日	0.486	0.371	0.354	0.376	0.356	0.270	
		4 日	0.590	0.685	0.690	0.480	0.290	0.165	
	増 加 率		%	21	85	95	31	-18	-39

以上の実験の結果は表2及び図6に示されているように、子葉鞘においてはその伸長とサッカラーゼ活性の増加との間にきわめて密接な関連性の存在することが明らかにされた。

更に同様の関係をより明らかにするため、3日目長さ30mmの子葉鞘先端10mmを切断し、残った部分に5mm間かくの目盛をつけて4等分し、

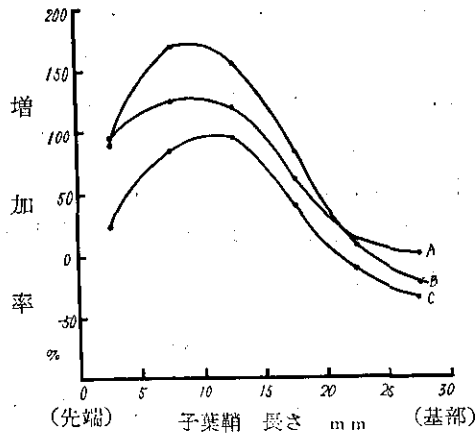


図6 子葉鞘の伸長とサッカラーゼ活性の変化

- A. 子葉鞘の伸長
- B. サッカラーゼ活性 mg/1ヶ/40分
- C. サッカラーゼ活性 mg/Nμg/40分

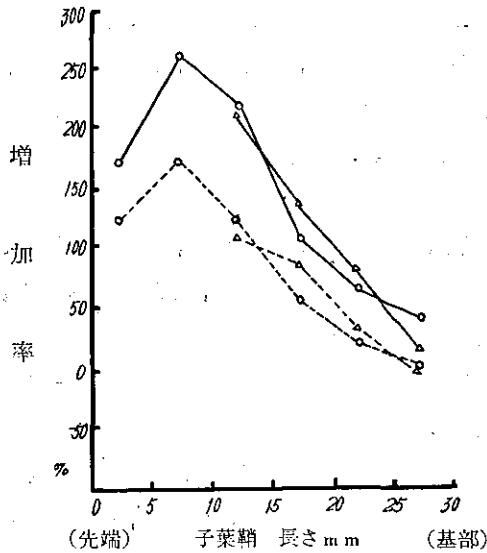


図7 子葉鞘の伸長とサッカラーゼ活性の変化

- サッカラーゼ活性, 子葉鞘伸長
- 正常のもの
- △— 先端10mmを切除したもの

これを24°C 24時間発芽を進行させた後各区分の長さ及びサッカラーゼ活性を測定した。なお対照としては先端を切徐しないものの区分を用いた。その結果は図7に示されているように先端を切徐したものでは2節目、3節目の伸長が正常のものに比べて大きいと同様の関係はサッカラーゼ活性の増加の様式についてもみとめられる。

以上の結果から子葉鞘の伸長はサッカラーゼ活性の増加と共軛した現象であることが考えられる。

4. 子葉におけるサッカラーゼ活性について

今迄の実験では胚全体又は子葉鞘の部分について伸長生長とサッカラーゼ活性との関係がしらべられてきたが、子葉の部分についても同様の観点からの実験を行った。その結果は正常な発芽胚においては子葉の部分についても伸長とサッカラーゼ活性との間には共軛的な関係の存在することがみられた。しかし子葉の生長は子葉鞘の部分からの種々の影響を受けることが考えられるので、発芽3日目に子葉鞘を切徐し、子葉鞘のない状態で発芽をつづけさせた子葉について伸長生長とサッカラーゼ活性との関係をしらべた。なお対照としては正常の発芽胚における子葉を用いた。

実験の結果は図8に示されているように、子葉鞘を切徐したものでは子葉の伸長はいちじるしく阻害されるが、それに比べてサッカラーゼ活性は正常のものより高い値を示す。同様の現象2日目の胚から子葉鞘を切徐した場合の発芽3日目及び4日目の伸長とサッカラーゼ活性との関係についてもみられる。

以上のような関係は子葉鞘においてみられた伸長とサッカラーゼ活性との間の共軛的関連性とはことなるものであり、子葉鞘でみられる生長と子葉での生長と子葉での生長との間の相違点を暗示するものではないかと考えられる。

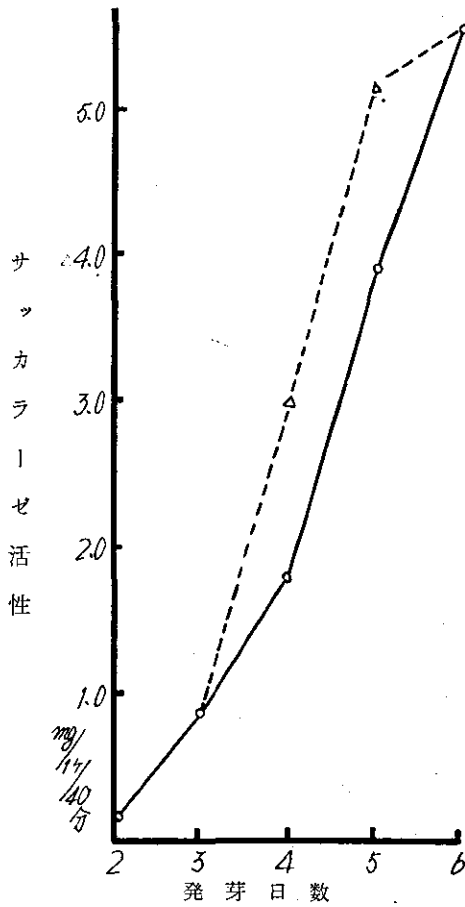


図 8 A : 子葉におけるサッカラーゼ活性の変化
 —○— 正常のもの …△… 子葉鞘を切除したもの

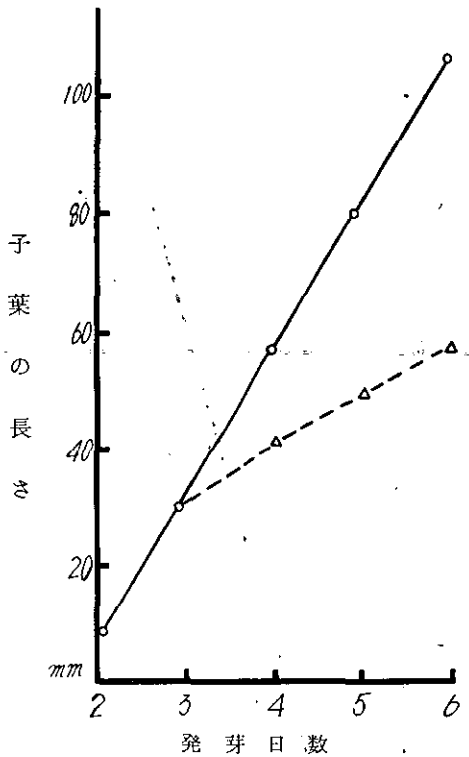


図 8 B: 子葉の伸長
 —○— 正常のもの …△… 子葉鞘を切除したもの

5. 可溶性及び不溶性サッカラーゼ活性

今迄の実験において用いられた粗酵素液は、すべて胚の Homogenate の 3000 r.p.m. の遠心分離による上澄液であつたが、遠心分離による沈澱部分にもサッカラーゼ活性が存在することがみられた。この沈澱部分の活性は沈澱物を数回水で洗つても殆んど変化することがない。

それ故に細胞壁の部分に付着して存在するものと考えられる（便宜的にこの活性を不溶性と名づける）。発芽過程における胚一ケに存在する水溶性および不溶性サッカラーゼ活性は表 3 に示されている。

表3において明らかなように発芽2日目から3日目を堺として水溶性対不溶性のサッカラーゼ活性比は変化し、3日目以後は水溶性のものの活性が全サッカラーゼ活性に対して、2/3以上をしめるようになる。

表3 発芽胚における水溶性及び不溶性サッカラーゼ活性

発芽日数	サッカラーゼ活性 還元糖 mg/30胚/30分		全活性に対する活性比 %	
	水溶性	不溶性	水溶性	不溶性
1	6.0	5.8	51	49
2	19.0	34.7	35	65
3	336	108	76	24
4	1050	208	83	17
5	1200	200	86	14

発芽4日目の子葉鞘では先端20mmの部分では水溶性の活性は全活性の87%をしめるが、基部20mmの部分では水溶性の活性は70%をしめる。

以上のような結果から胚における伸長生長の促進と水溶性サッカラーゼ活性の増大とは相関関係を有することが考えられる。

6. 発芽過程のサッカラーゼ活性に及ぼす低温の影響

24°C発芽胚を低温の条件のもとにおくと胚の生長は停止する。このような状態のもとで胚のサッカラーゼ活性がどのような変化を示すかを研究した。発芽2日目、3日目、4日目、5日目の、それぞれの発芽胚を0~2°Cの低温下に数日間たもちその期間中におけるサッカラーゼ活性を測定した。実験の結果は図9に示されている。

発芽3日目の胚では低温のもとでも多少の胚の伸長がみられそれに共軛してサッカラーゼ活性の増加がみとめられる。これに比較して発芽2日、4日、5日目のものでは低温下では胚の伸長はみられず、サッカラーゼ活性の増加も行われぬ。これらの事実から発芽3日目の胚における生長能力が最も強く、それ故に低温という不適當な条件下においても多少の伸長とそれに共軛したサッカラーゼ活性の増加がみられるもの

と考えられる。

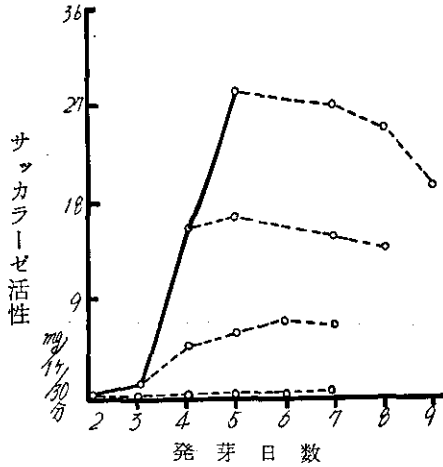


図9 発芽胚のサッカラーゼ活性に及ぼす低温の影響
 —○— 発芽胚 …○… 低温処理をしたもの

7. サッカラーゼ活性に対する重金属イオンの影響

胚のサッカラーゼ活性は Ag^+ 、 Cu^{++} 、 Hg^{++} 等の重金属イオンによつ

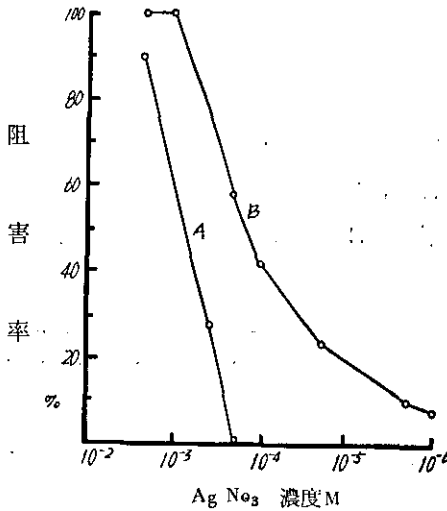


図10 発芽胚のサッカラーゼ活性及び呼吸におよぼす Ag^+ の影響
 A : 呼吸 B : サッカラーゼ活性

て阻害されるが、同一濃度の場合は Ag^+ 、 Cu^{++} が Hg^{++} よりも強い阻害を示す。 Ag^+ として $AgNO_3$ を用い、 $AgNO_3$ の各濃度におけるサッカラーゼ活性の阻害率を求めた。対照としては Ag^+ の胚の呼吸に対する阻害率を求めた。実験の結果は図10に示されているように Ag^+ は胚の呼吸を阻害しないような低濃度においても更にサッカラーゼ活性を阻害することがみられた。

考 察

前報(6)において $24^{\circ}C$ におけるコムギ胚の発芽過程を発芽2日目～3日目を界として前期と後期とに区別し、前期においてはサッカロース、後期においてはグルコースとフラクトースが胚における主要な炭水化物として存在することを明らかにしたが、今回の実験においてみられた発芽3日目以後の胚におけるサッカラーゼ活性の増加は以上の事実と一致するものである。更に今回の実験において発芽胚の前期と後期とを特徴づける一つの要因として、サッカラーゼ活性の強弱が明らかにされた。即ちサッカラーゼ活性が増加することによつて発芽胚は前期から後期の状態に移行する。更にサッカラーゼ活性の増加は胚の伸長生長と共軛した現象であることがみられた。これらの共軛現象の説明としては一つはサッカラーゼがサッカロースを分解することによつて呼吸基質を供給し、呼吸の促進を通して伸長に影響するといった考え、又はサッカロースの分解によつて細胞の透滲圧に影響を及ぼし、このことが伸長を促進するといったようなことが考えられる。しかし著者は更に積局的なサッカラーゼ活性と伸長生長との間の関係が存在するのではないかと推察する。即ち今回の実験においてサッカラーゼ活性には水溶性のものと細胞壁に付着した不溶性の型のものが存在し、この両活性の比が伸長生長と関連性を有することが明らかにされた。これらの事実からサッカラーゼは単にサッカロースを分解する反応に参与するのみならず、その存在様式によつては細胞膜が関係する伸長生長の反応に何らかの積極的な関連

を有するのではないかと考えられる。以上のような観点からのサッカラーゼの生理的意義については今後の課題として残されている。

なお伸長とサッカラーゼ活性との関係について、胚の伸長を促進する要因が同時にサッカラーゼの活性化をも促進するのではないかと考えられる。そのような要因としては生長ホルモンのような物質が考えられてくるが、この点に関しては次の論文において取り扱われる。

結 論

発芽コムギ胚におけるサッカラーゼ活性を粗酵素液の状態で測定し、次の事柄を明らかにした。

反応の最適pH4.9, 又最適温度は39°Cである。

発芽過程においては発芽3日目以後サッカラーゼは急激に活性の増加を示す。

サッカラーゼは子葉鞘の特に伸長生長の盛んな部分に強い活性を示す。又伸長生長とサッカラーゼ活性との間には共軛的關係が左右する。

サッカラーゼ活性には水溶性と不溶性の型のものが左右し、両者の活性比が胚の伸長と関係をもつ。

子葉の伸長及びサッカラーゼ活性に及ぼす子葉鞘の影響を明らかにした。

サッカラーゼ活性に及ぼす低温の影響及び重金属の影響を明らかにした。

以上の結果を通してサッカラーゼ活性と発芽過程における胚の生理的特性との関係について考察した。又サッカラーゼ活性と胚の伸長生長との関係について考察を行なった。

文 献

1. 宇佐美外 生物学 特集号45 (1955)
2. 寺岡, 宇佐美 生物学 特集号15 (1956)

3. 寺岡, 宇佐美 生物科学 特集号30 (1957)
4. 宇佐美 日本植物生理学会報 1~3 10 (1960)
5. 寺岡 北星短大紀要 6, 55, (1960)
6. 寺岡 北星短大紀要 6, 62, (1960)
7. C.S.Hanes: Biochem.J.23, 99 (1929)
8. 八木, 奥田 蛋白質, 核酸, 酵素 4-2, 57, (1959)
9. O.H.Lowry, etal: Jur.Biol.Chem. 193, 265 (1951)
10. J.B.Sumner and G.F.Somers: Chemistry and Methods of Enzymes. (1955)