



Title	水稻 Debranching 酵素に関する研究
Author(s)	山田, 次良; YAMADA, Jiro
Citation	北海道大学農学部邦文紀要, 13(1), 1-51
Issue Date	1981-09-01
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/11962
Type	departmental bulletin paper
File Information	13(1)_p1-51.pdf



水稲 Debranching 酵素に関する研究

山田 次良

(北海道大学農学部農芸化学科食品栄養学講座)

(昭和 56 年 2 月 19 日受理)

Studies on Rice Debranching-enzyme

Jiro YAMADA

(Laboratory of Food and Nutrition, Faculty of Agriculture,
Hokkaido University, Sapporo, 060, Japan)

目 次

序 論 Debranching 酵素に関する既往の研究 および本研究の目的	1	I. 不活性型酵素の存在とその定量	28
I. Debranching 酵素発見の歴史	1	II. 登熟時および発芽時の酵素活性変化	31
II. Debranching 酵素の分類	3	III. 乳熟期種子中での酵素の生成	33
III. 高等植物の Debranching 酵素	4	IV. 不活性型酵素の活性化	35
IV. 本研究の目的	5	第 3 節 要 約	38
第 1 章 水稲 Debranching 酵素の精製および二、 三の性質	6	第 4 章 総合論議	38
第 1 節 実験材料および方法	6	I. 酵素の精製について	38
第 2 節 実験結果および考察	8	II. 酵素の作用について	40
I. Debranching 酵素の活性測定法	8	III. 酵素の生成と変化について	42
II. 酵素の精製	8	IV. その他の二、三の問題	44
III. 酵素蛋白質の性質	10	摘 要	45
IV. 酵素反応の特性	12	引用文献	46
第 3 節 要 約	17	Summary	51
第 2 章 水稲 Debranching 酵素の作用様式	18	序論 Debranching 酵素に関する既往の研究 および本研究の目的	
第 1 節 実験材料および方法	18	I. Debranching 酵素発見の歴史	
第 2 節 実験結果および考察	19	Debranching 酵素 (枝切り酵素) とは澱粉様多糖の α -(1→6) D-グルコシド結合を加水分解する酵素の総称 である。 この種の酵素の研究としては西村 ⁸³⁾ (1930 年) がビール 酵母の浸出液に見出した "Amylosynthase" と命名 した酵素が最初である。彼はこの酵素が糯米澱粉に作用 してヨード呈色を赤色から青色に変え、またグリコーゲン に作用してヨード呈色を微褐色から赤紫色に変えること を認め、この酵素が澱粉合成酵素であると考えて "Amylosynthase" と命名した。皆川 ⁷¹⁾ (1932 年) も酵 母の酵素の存在を確認し、さらに "Amylosynthase" が馬鈴薯 ⁷²⁾ , 梗米 ⁷³⁾ , 糯米 ⁷³⁾ , 粟 ⁷⁴⁾ , および玉蜀黍 ⁷⁴⁾ 中 にも存在することを認めた。一方三宅ら ⁷⁵⁾ (1936 年) も	
I. ブランに対する作用	19		
II. ブラン分解生成オリゴ糖に対する作用	21		
III. 糯米澱粉およびその β - 限界デキストリン に対する作用	22		
IV. 水稲 Debranching 酵素の作用様式につい ての一仮説	24		
第 3 節 要 約	26		
第 3 章 不活性型 Debranching 酵素	26		
第 1 節 実験材料および方法	27		
第 2 節 実験結果および考察	28		

粳米から同じ作用を示す酵素を得たが、次の理由から澱粉合成作用に疑問を提示した。(1) この酵素は糯米澱粉のヨード呈色を赤から青紫に変えるが青までは変えないこと、(2) 生成物の粘度がもとの澱粉のそれよりも低いこと。しかし彼らはこの酵素の真の作用が分解反応であるという結論を得るまでには到らなかった。

その後、丸尾および小林 (1949年) はビール酵母の“Amylosynthase”の詳しい再検討を行なった。すなわち酵素作用により糯米澱粉から生成した“新澱粉”(ヨード呈色青)と、もとの糯米澱粉の粘度等を比較することにより真の酵素作用は合成ではなく分解であろうと推定した⁶⁴⁾。さらに、浸透圧法による分子量測定、 β -限界デキストリンに対する作用等からその作用が澱粉の構造中の分枝点 [α -(1 \rightarrow 6)D-グルコシド結合]の分解であると考へた⁶⁵⁾。またヨードによる電圧滴定から“新澱粉”はアミロース型の多糖であることを示した⁶⁶⁾。彼等は“新澱粉”が糯米澱粉の分解で生じた低分子糖に phosphorylase が作用して生成したのではないこと、および α -(1 \rightarrow 6) 結合を作る Q-酵素の逆反応による生成物でないことを確かめ、この酵素が澱粉様多糖の α -(1 \rightarrow 6) 結合の加水分解を行なう酵素であるという結論を得て、新たに“isoamylase”なる名称を与えた⁶⁷⁾。不破ら²¹⁾も“Amylosynthase”による生成物の X 線回折の研究からこの酵素の α -(1 \rightarrow 6) 結合の加水分解説を支持した。

CORI ら¹⁰⁾ (1951年) は兎の筋肉中に phosphorylase と共同してグリコーゲンの完全分解を行なう一つの酵素の存在を認めた。この酵素は phosphorylase 限界デキストリンに作用し D-グルコースを遊離することから“amylo-1,6-glucosidase”と呼ばれた。しかしその後の WALKER ら¹⁰¹⁾ (1960年)の研究によりこの酵素は phosphorylase 限界デキストリンのもつマルトテトラオシル側鎖からマルトトリオース鎖を切断、転移すると共に、その結果この多糖の枝分れとして残った D-グルコシル基を多糖から切り離す作用をも同時に行なうことがわかり、“amylo-1,6-glucosidase/oligo-1,4 \rightarrow 1,4-glucantransferase”と呼ばれるようになった。この種の作用を行なう酵素はパン酵母からも見出された⁴⁸⁾。

麦芽汁の醗酵の際に *Aspergillus* 属などのかびの抽出液を加えると澱粉利用率が高くなることが知られており、これは澱粉の α -および β -amylase による分解時に生成する限界デキストリンがさらに分解されることによることが確かめられた。この作用を行なう酵素は limit dextrinase と呼ばれた。UNDERKOFER ら⁹⁸⁾ は *As-*

pergillus oryzae の limit dextrinase を結晶状に精製したが、その後彼自身が「以前から“limit dextrinase”と呼んで来た酵素は amyloglucosidase によるものであろう」と述べている¹¹⁾。限界デキストリンに作用するこの種の酵素はその他の微生物からも得られている。北原ら⁴²⁾ は *Aspergillus niger* から1種の糖化型 amylase を得て、この酵素はその低い maltase 活性にもかかわらず澱粉から D-グルコースを遊離することを観察し、 β -amylase とは異なる酵素であるとしてこれを“ γ -amylase”と命名した。*Rhizopus delemar* から得た gluc-amylase もアミロペクチン、グリコーゲン、 β -限界デキストリンなどに作用してその90%以上に相当する D-グルコースを生成した⁸⁶⁾。このように糸状菌の糖化型 amylase は澱粉を分解して D-グルコースを生ずるので“amyloglucosidase”あるいは“gluc-amylase”などと呼ばれる。Amyloglucosidase は澱粉の非還元末端から α -(1 \rightarrow 4) 結合を切って D-グルコースを遊離するが、さらに α -(1 \rightarrow 6) 結合にも作用して分解を進行させる⁴¹⁾。*Clostridium acetobutylicum* のいわゆる“maltase”は澱粉に作用して D-グルコースを生ずる¹⁹⁾。以上述べて来た amyloglucosidase, gluc-amylase, γ -amylase, maltase 等と呼ばれる酵素は澱粉あるいは澱粉分解物の α -(1 \rightarrow 6) 結合を加水分解するが、 α -(1 \rightarrow 4) 結合に対する作用がより強力であることから、通常 debranching 酵素ではなく amylase の1種として分類される。

一方かびの抽出液を加えずに、煮沸しない麦芽汁を大量の酵母で醗酵させると、煮沸した場合よりも澱粉の分解率が高くなる。この作用を行なう酵素も“limit dextrinase”と呼ばれた。麦芽汁の“limit dextrinase”作用は HOPKINS ら³⁵⁾ (1955年)によって研究され、この酵素が限界デキストリンの α -(1 \rightarrow 6) 結合を分解して D-グルコースを遊離し、その時生成する枝分れをもたないデキストリンは α -および β -amylase によってさらに分解されることを示した。

HOBSON ら³⁴⁾ (1951年) は馬鈴薯およびそら豆から“R-酵素”を得た。R-酵素はアミロペクチンおよび β -限界デキストリンに作用して粘度を低下させ、 β -amylase による分解を助長し、ヨード呈色を増大させる³⁴⁾。またアミロペクチンおよびグリコーゲンから調製した α -限界デキストリン¹⁰⁵⁾、およびグリコーゲンの α -amylase による部分分解物にも作用するが、グリコーゲンそのものには作用しない⁸⁵⁾。

Pullularia pullulans は菌体外に1種のグルカンであるプルランを生成する⁴⁾。プルランは主として多数の

マルトトリオース単位がその両端の D-グルコース残基においてそれぞれ相互に α -(1 \rightarrow 6) 結合して出来た多糖である¹⁰³。BENDER ら⁵⁾ (1961 年) は *Aerobacter aerogenes* からプルランを分解する酵素を得てその作用がプルランの α -(1 \rightarrow 6) 結合の加水分解であることを示した。この酵素は可溶性澱粉およびアミロペクチンに作用しそのヨード呈色を強め青変させる等、高等植物の“R-酵素”と類似する性質を示した。一方“R-酵素”がプルランに作用することも示された¹³⁾。

澱粉様多糖の α -(1 \rightarrow 6) 結合を加水分解する酵素についてこれまでに報告されている諸酵素とその発見の歴史について列挙したが、これらの酵素の作用にはそれぞれ特徴があり、基質特異性にも差異があるので、次に debranching 酵素の分類について概観し、それぞれの酵素の作用について述べる。

II. Debranching 酵素の分類

IUPAC-IUB の酵素分類表 (1972 年) によると澱粉様多糖の α -(1 \rightarrow 6) 結合を加水分解する酵素として次の 5 種が挙げられている。

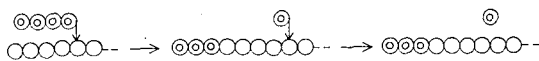
- EC 3.2.1.10 Oligo-1,6-glucosidase (Dextrin 6- α -glucanohydrolase)
- EC 3.2.1.33 Amylo-1,6-glucosidase (Dextrin 6- α -glucosidase)
- EC 3.2.1.41 Pullulanase (Pullulan 6-glucanohydrolase)
- EC 3.2.1.68 Isoamylase (Glycogen 6-glucanohydrolase)
- EC 3.2.1.69 Amylopectin 6-glucanohydrolase (Amylopectin 6-glucanohydrolase)

このほかに α -(1 \rightarrow 6) 結合を切るが α -(1 \rightarrow 4) 結合により速やかに作用する exo-1,4- α -glucosidase (EC 3.2.1.3) があるが、これは debranching 酵素ではなく amylase の 1 種とみなすことは前述した通りである。

Oligo-1,6-glucosidase は小腸粘膜から得られ、 α -限界デキストリンを完全分解するが^{46,47)}、この酵素が α -(1 \rightarrow 4) 結合に作用するか否かは明らかでない。Amylopectin 6-glucanohydrolase は pullulanase と基質特異性の異なる酵素として区別するには酵素の精製が不十分で⁶¹⁾、検討の余地があると思われる。したがって debranching 酵素をその作用から大別すると (1) amylo-1,6-glucosidase, (2) pullulanase, (3) isoamylase の 3 種となる。

Amylo-1,6-glucosidase は 4- α -glucanotransferase (EC 2.4.1.25) と共同して作用し phosphorylase 限界

デキストリンの α -(1 \rightarrow 6) 結合を加水分解する。CORI ら¹⁰⁾ はこの酵素の作用によってグルコースが遊離することから、この酵素を amylo-1,6-glucosidase と呼び、phosphorylase 限界デキストリンでは澱粉様多糖の A 鎖が D-グルコシル基にまで分解され α -(1 \rightarrow 6) 結合しているものと考えた。その後 phosphorylase 限界デキストリンの A 鎖はマルトテトラオンル基であることがわかり¹⁰¹⁾、そのため phosphorylase 限界デキストリンから D-グルコースが遊離する機作として、A 鎖からマルトトリオンル基が切断され、他の非還元末端に α -(1 \rightarrow 4) 結合を作って転移し、次に残った α -(1 \rightarrow 6) 結合した D-グルコシル基が切断されると考えられるようになり、酵素の名称も amylo-1,6-glucosidase/oligo-1,4 \rightarrow 1,4-glucantransferase と改められた。



Scheme 1. Action of amylo-1,6-glucosidase/oligo-1,4 \rightarrow 1,4-glucantransferase.

○: D-glucosyl residue, ⊙: D-glucosyl residue of side chain of phosphorylase limit dextrin, ↓: α -(1 \rightarrow 6)-D-glucosidic linkage.

BROWN ら⁶⁾ は十分精製した amylo-1,6-glucosidase がマルトトリオンル基あるいはマルトシル基を他の非還元末端に転移させ α -(1 \rightarrow 4) 結合で結合させる oligo-1,4 \rightarrow 1,4-glucantransferase 活性をもつことを示した。さらに彼ら⁷⁾ は精製の各段階で glucosidase 活性に対する oligo-1,4 \rightarrow 1,4-glucantransferase 活性の比が一定であることから、両活性は相伴って存在するか、精製操作中同じような挙動をとるものであろうと結論した。この酵素はグリコーゲンにも直接作用する^{1,6)} ことから、amylo-1,6-glucosidase/4- α -glucanotransferase とも呼ばれる。

Amylo-1,6-glucosidase/oligo-1,4 \rightarrow 1,4-glucantransferase は動物組織のほかパン酵母 *Saccharomyces cerevisiae* にも見出されたが⁴⁸⁾、遠慮心的に均一なまでに精製された場合でも glucosidase 活性と transferase 活性とを示すので、同一酵素蛋白質が二つの活性をもつものと考えられている⁵⁰⁾。

この種の酵素は高等植物からは見出されていない。以下に述べる pullulanase および isoamylase とは D-グルコースを遊離する点で明らかに区別される。

Pullulanase と isoamylase は基質特異性について対照的である。Pullulanase はプルランによく作用するほかアミロペクチンおよびグリコーゲンの α - および β -

限界デキストリンに作用する。アミロペクチンに対する作用は酵素の起源により異なるが一般に弱く、グリコーゲンにはほとんど作用しない。Isoamylase はグリコーゲンの α -(1→6) 結合を完全に分解し、アミロペクチンにも作用する。 β -限界デキストリンには作用するが、 α -限界デキストリンおよびプルランには作用しない。

Pullulanase は BENDER ら⁵⁾ によって *Aerobacter aerogenes* から見出され、その後 *Escherichia intermedia*⁹⁷⁾、*Streptococcus mitis*¹⁰²⁾、および *Streptomyces flavochromogenes*¹¹⁰⁾ などの微生物から見出されている。

高等植物の debranching 酵素の多くはプルランに作用しグリコーゲンにほとんどあるいは全く作用しない点で pullulanase に属する酵素として分類できるが、基質特異性の異なる酵素の報告もあり、種々の名称が用いられているので後述することにする。

Isoamylase ははじめ西村⁸³⁾ によってビール酵母から見出され、丸尾および小林⁶⁴⁻⁶⁷⁾ によりその作用が詳しく研究された結果、isoamylase の名称が与えられたものである。GUNJA ら²⁵⁾ はビール酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の isoamylase の性質を調べ、この酵素がグリコーゲンおよびアミロペクチンの α -(1→6) 結合を直接加水分解することから動物の debranching 酵素、amylo-1,6-glucosidase とともに高等植物の debranching 酵素、R-酵素とも異なる酵素であると結論した。Isoamylase と称する酵素は酵母のほか *Pseudomonas*²⁷⁾ や *Cytophaga*²⁶⁾ からも見出された。

Isoamylase は一般にイソマルトースやパノースには作用せず、 α -(1→6) 結合した D-グルコシル側鎖を切断しないとされている。しかし SAKANO ら⁸⁸⁾ は酵母の isoamylase はイソマルトースやパノースのような二糖あるいは三糖からは D-グルコースを遊離しないが、 α 、 β -限界デキストリンには作用してマルトースのみならず D-グルコースも遊離することを見出した。したがって isoamylase の基質特異性については今後研究すべき点が残されている。

高等植物の debranching 酵素にも isoamylase と呼ばれたものがあるが^{45,57)} 酵素の精製が十分とは言えず基質特異性についての再検討が必要であろう。

III. 高等植物の Debranching 酵素

高等植物の debranching 酵素に対してこれまでに用いられた名称を列挙すると「Amylosynthase」、「R-酵素」、「limit dextrinase」、「pullulanase」、および「isoamylase」がある。

「Amylosynthase」はこの酵素を澱粉合成酵素と誤解

して付けた名称で、同じ名称で呼ばれていたビール酵母の酵素が澱粉分解酵素であることがわかり「isoamylase」と改称されたので、この名称は用いられなくなった。

「R-酵素」は HOBSON ら³⁴⁾ により馬鈴薯およびそら豆の酵素について命名され、アミロペクチン、 β -限界デキストリン、および α -amylase による部分分解物の α -(1→6) 結合を加水分解すると報告された。一方「limit dextrinase」は α - および β -amylase の作用で生成した限界デキストリンの α -(1→6) 結合を切断する酵素に対して命名され、HOPKINS ら³⁵⁾ は麦芽汁中にこの酵素が存在することを報告した。

MACWILLIAM ら⁵³⁾ はアルミナカラムを用い麦芽およびそら豆からそれぞれ2種の debranching 酵素を分離し、その一つはアミロペクチンに作用してその青価を増大させるが α -限界デキストリンには作用せず (R-酵素)、他の一つは α -限界デキストリンを容易に分解するがアミロペクチンには見るべき作用を示さない (limit dextrinase) ことを報告した。MANNERS ら⁵⁵⁾ も連続電気泳動法により麦芽から α -限界デキストリンおよびプルランに作用しない酵素 (R-酵素) と、これらに作用する酵素 (limit dextrinase) とを分離した。

TAYLOR ら⁹⁵⁾ はスイートコーンからプルランに作用する酵素を見出し「pullulanase」と呼んだが、その基質特異性からこの酵素は「R-酵素」と類似の酵素であろうと考えた。MANNERS ら⁵⁶⁾ もスイートコーンの debranching 酵素を分離し、アミロペクチンに作用しグリコーゲンに作用しない「R-酵素」と両者に作用する debranching 酵素 (後に「isoamylase」と呼んだ⁵⁷⁾) とを得、両酵素共 α -限界デキストリンおよびプルランに作用しないにもかかわらず、スイートコーン抽出液中には α -限界デキストリンおよびプルランを分解する酵素活性が存在することから、第3の debranching 酵素として TAYLOR ら⁹⁵⁾ の報告した「pullulanase」が存在すると結論した⁵⁷⁾。

このように高等植物の debranching 酵素の名称は基質特異性を異にするそれぞれの酵素を区別するために用いられてきた。しかしこれまでの研究では酵素の精製が十分でなく、その基質特異性についても再検討が必要であると思われる。

MANNERS らは麦芽⁶²⁾、未発芽燕麦¹⁵⁾、未発芽稲¹⁵⁾、そら豆²²⁾、および発芽ソルガム²⁹⁾ の debranching 酵素を研究し、いずれの酵素も α -限界デキストリン、マルトシルまたはマルトリオシル基を枝にもつオリゴ糖、プルラン、およびアミロペクチンの β -限界デキストリン

に速かに作用し、グリコーゲンの β -限界デキストリンおよびアミロペクチンに対する作用は弱く、またグリコーゲンにはほとんど作用しないことを報告した。彼らはこれらの酵素を「limit dextrinase」と呼んだ¹⁴⁾。Limit dextrinase は高濃度ではアミロペクチンに作用した¹⁴⁾。一方 R-酵素はプルランに作用することが示されている¹³⁾。LEE ら⁴⁹⁾ はスイートコーンの pullulanase を精製し、この酵素がプルランのほか α -限界デキストリン、アミロペクチン、およびその β -限界および phosphorylase 限界デキストリンに作用することを報告した。したがって「R-酵素」、「limit dextrinase」、および「pullulanase」は同一の基質特異性をもつ酵素であると結論される。

高等植物の debranching 酵素について一方では基質特異性を異にする数種の酵素の存在が報告され、また他方ではそれらの酵素の基質特異性の類似が示されていることは、これらの酵素の精製が十分でなく、そのために基質特異性についての明確な結論が得られていないためと考えられる。高等植物の debranching 酵素は組織中では澱粉様多糖あるいはその amylase 分解物中の α -(1→6) 結合を加水分解するものと考えられ、したがって澱粉の分解が盛んな組織に存在することが多い。このような組織では amylase 活性が高いので酵素の精製が不十分な場合には amylase の混入が予想され、それが澱粉様多糖に作用するために debranching 酵素の基質特異性の研究に誤った結果をもたらす可能性がある。

最近馬鈴薯中にプルランに作用せずグリコーゲンを分解する debranching 酵素、isoamylase の存在が示されたが³⁶⁾、isoamylase を除くと高等植物の debranching 酵素は種々の名称で呼ばれながら類似した基質特異性を示している。それぞれの名称には歴史の意味もあり、いずれに統一すべきかは簡単に決定し得ないので、本研究においては一般的名称とも言うべき「debranching 酵素」を用いることにする。

IV. 本研究の目的

動物の debranching 酵素は amylo-1,6-glucosidase/oligo-1,4→1,4-glucoantransferase 1 種のみである。Oligo-1,4-glucosidase と呼ばれる酵素があるが^{46,47)}、この酵素が α -(1→4) 結合に作用するか否か明らかでない。微生物の debranching 酵素は基質特異性が明らかにされ、3 種に大別されている。高等植物の debranching 酵素は多くの場合、微生物の pullulanase に近い基質特異性が報告されながら、基質特異性の異なる酵素の存在も報告されている。このような混乱は酵素の精製が不

十分なためと思われる。

したがって本研究では高等植物の debranching 酵素の基質特異性を明確にすることを第 1 の目的とし、そのために酵素の精製、特に澱粉様多糖に作用する酵素の除去に意を用いた。高度精製酵素を得るためには酵素のよい給源を求める必要があるが、水稲乳熟期種子は高い debranching 酵素活性を含み amylase 活性が低いので、正にこの目的に適っていた。また水稲完熟種子はそれ自体は低い debranching 酵素活性しか含まないが、不活性型酵素を含みその活性化の方法が見出されたので¹¹⁹⁾、完熟種子も debranching 酵素の良い給源である。

第 2 の目的は水稲発芽種子と乳熟期種子との間の debranching 酵素の比較を目指したものである。水稲種子では発芽に際して高い debranching 酵素の活性と amylase 活性とが共同して澱粉の完全分解を行なっているものと考えられる。一方澱粉合成の盛んな乳熟期種子の debranching 酵素の果す役割については全く不明で、この点を解明すると同時に、発芽および乳熟期種子中の debranching 酵素について両者の異同を明らかにしようとした。

第 3 の目的は水稲種子での debranching 酵素の生成とその変化を明らかにすることである。一般に種子発芽時には急激な成分の変化、特に貯蔵成分の分解が起り、同時に各種の酵素活性が急速に増加することが知られている。ある酵素は *de novo* 合成され、あるものは zymogen 型から活性型に変化する。予備実験によると水稲完熟種子中には不活性型の debranching 酵素が存在することがわかったので、本実験では debranching 酵素が発熟過程において生成し、不活性型で蓄積し、発芽期に再び活性化されて *in vivo* で作用する過程を明らかにしようとした。

本研究を遂行するにあたり北海道大学伊沢正夫名誉教授の、また研究の初期には恩師故中村幸彦先生ならびに北海道大学下村得治名誉教授の御指導を仰いだ。ここに感謝の意を表します。

本論文を作成するにあたり北海道大学農学部農芸化学科生物化学講座千葉誠哉教授、農産物利用学講座坂村貞雄教授、作物栄養学講座田中明教授にそれぞれ適切な御指導と細部にわたる御校閲を賜わった。さらに千葉教授には貴重なパノースおよびイソマルトースを頂いた。ここに深甚の謝意を表します。

研究を行なうにあたり終始水稲試料を提供下さった農林水産省北海道農業試験場土壌肥料第二部、関矢信一郎氏、自らの研究試料の一部を提供下さった北海道大学農

学部農芸化学科作物栄養学講座大崎満氏、麦類種子を提供下さった北海道大学農学部付属農場の喜多富美治教授ならびに北海道立十勝および北見農業試験場に感謝致します。

さらに水稲 debranching 酵素の兔抗血清を調製下さった科研薬化工株式会社滋賀工場神林義憲博士、アミノ酸分析をお引受け下さった同工場木村新一氏、研究の遂行に御協力下さった北海道大学農学部農芸化学科食品栄養学講座の諸氏に謝意を表します。

第1章 水稲 Debranching 酵素の精製 および二、三の性質

高等植物の debranching 酵素の性質、特に基質特異性を明らかにするために、水稲種子から高度に精製した debranching 酵素を得ようとした。

Debranching 酵素は澱粉分解酵素の一種であるから、種子中で澱粉の分解が起る発芽期にその活性が高くなることが予想される。水稲種子においても発芽期に debranching 酵素活性の増大が認められた¹²⁰⁾。BAUN ら³⁾は水稲登熟時の種子中における澱粉の合成あるいは分解に関係すると思われる酵素の活性変化を研究し、debranching 酵素 (R-酵素) は加水分解酵素であるにもかかわらず乳熟期に高い活性を示すことを報告した。DUNN ら¹⁵⁾は未発芽稲が他の穀類に比し高い debranching 酵素 (limit dextrinase) 活性をもち、酵素の良い給源であると述べている。著者¹¹⁹⁾は後述 (第3章) するように水稲完熟種子中に不活性型の debranching 酵素が存在し、これがある種の還元剤の作用により活性化され可溶性酵素となることを見出した。

本章では水稲の乳熟期種子、発芽種子、および完熟種子から debranching 酵素を精製し、それらの性質について述べる。また、乳熟期種子、完熟種子、および発芽種子の debranching 酵素が同一の酵素であるか、それともそれぞれ異なる性質をもつ酵素であるか明らかにするために各酵素の性質の比較を行なった。

第1節 実験材料および方法

(1) 実験材料

実験材料には梗種水稲 (栽培品種「ユエカラ」) を用い、栽培は農林水産省北海道農業試験場 (札幌市羊ヶ丘) 土壌肥料第二部に依頼した。乳熟期種子は開花後23日目に採取し、 -20°C 以下で凍結貯蔵し使用した。完熟種子は籾を 4°C に貯蔵し、使用時に籾殻を除き搗精した。種子の発芽は 26°C 、暗所で行なった。 4°C に貯蔵した籾

を一夜流水に浸漬した後、大型バットに一層に敷きつめ、ほぼ冠水するように脱塩水を加えた。水は毎日交換し、試料の一部を採って pullulanase 活性を測定し、最大活性が得られた発芽8~10日目の試料を集め、十分水洗した後、 -20°C で凍結貯蔵した。

(2) 測定法

還元糖は SOMOGYI-NELSON 法^{82,93)} により測定した。

蛋白質は LOWRY ら⁵²⁾ の方法により牛血清アルブミンを標準として測定した。カラムクロマトグラフィーの溶出液の蛋白質の定量は、日立分光光度計 (139型) で10mmセルを用い測定し、280nmにおける吸光度で表示した。

(3) 基質

プルランは市販品 (林原生化学研究所製) を使用した。梗米澱粉および糯米澱粉はそれぞれ梗米 (栽培品種「ほうりゅう」) および糯米 (栽培品種「かむいもち」) の完熟種子から調製した。植物グリコーゲン^{68,78)} はスイートコーン (栽培品種「ゴールドクロスバンタム」) の乳熟期種子から水抽出し、クロロホルムで除蛋白して調製した。可溶性澱粉は市販品 (Merck 社製) を用いた。梗米澱粉からのアミロペクチンの調製は SCHÖCH のブタノール法の改良法¹⁰⁸⁾ によった。馬鈴薯澱粉からのアミロースの調製も同じ方法¹⁰⁸⁾ で行なった。Phosphorylase 限界デキストリンは梗米澱粉から調製したアミロペクチン、糯米澱粉、および植物グリコーゲンに市販の phosphorylase a (Boehringer Mannheim 社製) を繰返し作用させた後透析し、アルコールにより沈澱させて得た。 β -限界デキストリンは梗米澱粉から調製したアミロペクチン、糯米澱粉、および植物グリコーゲンに β -amylase (和光純薬製) を繰返し作用させた後透析し、アルコールにより沈澱させて得た。Phosphorylase 限界- β -限界デキストリンは糯米澱粉の phosphorylase 限界デキストリンに β -amylase を作用させることによって調製した。 α -Amylase 分解生成物は市販可溶性澱粉に対して α -amylase (弊廠:Boehringer Mannheim 社製) を作用させることにより調製した。 α -Amylase を十分作用させて得た生成物を活性炭セライト (1:1) カラムに吸着させ、水、および5%-, 10%-, 15%-, および20%-アルコールで順次溶出し、最後の20%-アルコールで溶出される区分を集め、 α -amylase 分解生成物として使用した。パノースおよびイソマルトースは北海道大学農学部千葉誠哉博士から恵与されたものを用いた。

(4) 試 薬

酵素の精製には DEAE-セルロース (0.92 meq/g; Brown 社製), CM-セルロース (0.65 meq/g; 東北パルプ(株)製), Sephadex G-100, および DEAE-Sephadex A-50 (3.5±0.5 meq/g) (Pharmacia Fine Chemical 社製) の市販品を購入して用いた。

分子量測定にはマーカーとして市販標準蛋白質 (Mann Research Laboratories 社製) を, 焦点電気泳動における pI-マーカーとしてはオリエンタル酵母工業(株)の pI-マーカーキットを, 蛋白質定量の標準には牛血清アルブミン (分子量 67,000; Boehringer Mannheim 社製) を使用した。

焦点電気泳動には LKB-アンホラインを用いた。免疫反応のプレートには同仁薬化学研究所製のアガロース I (ゲル強度 800 g/cm² 以上) を用いた。電気泳動および免疫反応後の蛋白質の染色にはアミドブラック 10 B, Coomassie brilliant blue, および Bio-Rad Protein Assay Kit の染色液を用いた。兎抗血清は水稲乳熟期種子から得た精製 debranching 酵素を抗原として科研薬化工(株) 神林義憲博士に調製を依頼した。

阻害剤は市販の試薬をそのまま使用した。基質の平均鎖長測定のための α -(1→6) 結合の分解には市販の isoamylase (*Pseudomonas*; 林原生化学研究所製) を使用した。

(5) 電気泳動

酵素蛋白質の均一性を調べるためにポリアクリルアミドを支持体としたディスク電気泳動を行なった⁸⁰⁾。ゲル濃度は 7.5% とし, 泳動は pH 9.4 で行ない, ゲル 1 本当たり (径 5 mm) 2 mA で 1 時間泳動させた。蛋白質の染色はアミドブラック 10 B で, 脱染色は 7% 酢酸で行なった。同時に同一条件で泳動を行なった別のディスクを 2 mm 幅に切断し, それぞれ 2 ml の McILVAINE 緩衝液 (pH 5.6) 中に入れ, 冷蔵庫中で一夜抽出を行なった後, 抽出液を用いて pullulanase 活性を測定し, 酵素活性の泳動位置を調べた。

酵素蛋白質の分子量を測定するために SDS-ポリアクリルアミドによる電気泳動⁸²⁾を行なった。ゲル濃度は 7.5% とし, ゲル 1 本当たり (径 5 mm) 8 mA で 5 時間泳動させた。蛋白質の染色には Coomassie brilliant blue を用いた。

酵素蛋白質の等電点を求めるために焦点電気泳動^{2,76,109)}を行なった。7.5% ポリアクリルアミドゲルを支持体とし, アンホライン濃度は 2% とした。pH 3.5~10.0 での泳動では上槽 (陽極) 液を 0.02 M りん酸, 下槽

(陰極) 液を 1 M 水酸化ナトリウムとした。pH 2.5~4.0 の場合は pH 3.5~10.0 のアンホラインを 20% 含むようにし, 上槽 (陽極) 液は 0.1 M りん酸, 下槽 (陰極) 液は 0.1 M 水酸化ナトリウムとした。泳動は 200 V の定電圧で 3 時間, 氷冷しながら行なった。泳動後の蛋白質は 5% トリクロル酢酸で 20 倍に希釈した Bio-Rad Protein Assay Kit の染色液中にゲルを浸して染色した。pH 勾配の決定は市販 pI-マーカー蛋白質およびブロムフェノールブルーペーパーを用いて行なった。

(6) 免疫反応

OUCHTERLONY の二重拡散法を行なった⁸⁹⁾。1% ナトリウムアザイドを含む 0.06 M ベロナール緩衝液 (pH 8.6) 中で 1.5% アガロースを固化し, その上で試料および兎抗血清を 37°C で 24 時間拡散させた。生理食塩水で 3 日間洗浄後, 蛋白質をアミドブラック 10 B で染色した。

(7) 超遠心分離

酵素蛋白質の均一性の確認と分子量の測定のために北海道大学医学部超遠心分離機室に依頼し超遠心分離を行なった^{31,40)}。溶媒は 0.1 M りん酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.2) とし, 56,100 rpm で沈降させ, 4 点から濃度 0 の外挿を行ない沈降定数を求めた。拡散定数の測定には同じ溶媒で合成界面セルを用いる低速回転法 (12,600 rpm) を行なった。

(8) 酵素活性の測定

Debranching 酵素の活性はプルランを基質として測定した。酵素液 0.2 ml に McILVAINE 緩衝液 (pH 5.6) 0.3 ml を加え, 25°C に保った後, 同温度の 0.2% プルラン液 0.5 ml を加え 25°C で反応させ, 生成する還元糖量を測定した。プルランを基質として測定した debranching 酵素の活性を pullulanase 活性と呼び, その 1 単位は上記条件下で 1 分間に 1 μ mol のマルトトリオースに相当する還元力の増加を起させる酵素の量とした¹¹³⁾。

Q-酵素活性の測定⁸¹⁾は 0.2 ml の酵素液に McILVAINE 緩衝液 (pH 7.2) 0.3 ml を加え, 25°C に保ち, これに同温度に保った 0.2% アミロース溶液 0.5 ml を加え反応させた。反応は 25°C で行ない 6% 酢酸 1 ml を加え反応を止めた後, 0.2% ヨード-2% ヨードカリの溶液 1 ml と水を加えて 50 ml とした。対照として, 反応液を含まない同様に処理した溶液を用い日立光電光度計 (FPW-IV 型), 10 mm セル, No. 66 フィルター (660 nm) により比色した。反応前後のアミロース-ヨード複合体の吸光度を比較した。Q-酵素の 1 単位は上記条件下でアミロース-ヨード複合体の 660 nm における吸光度を 1 分間に 1% 減少させる酵素量とした。

発芽種子中には amylase 活性が存在するので澱粉糖化力および澱粉液化力を測定した。前者は pullulanase 活性測定と同一の条件下で、基質をプルランの代りに可溶性澱粉(反応液中0.5%)とし、その1単位は上記条件下で1分間に1 μ molの還元糖を生ずる酵素量とした。後者は反応液のpHを5.6とした以外はQ-酵素活性測定と全く同様に測定を行ない、その1単位はこの条件下すなわちアミロース1mgに対し、アミロース-ヨード複合体の660nmの吸光度を1分間に1%減少させる酵素量とした。

第2節 実験結果および考察

I. Debranching 酵素の活性測定法

水稻乳熟期種子から得た精製 debranching 酵素を用い、反応液中の酵素濃度と生成還元糖量の関係を調べた(Fig. 1)。

MANNERS ら⁵⁹⁾は穀類種子の発芽時における debranching 酵素活性測定に基質としてプルランを用い、LEE ら⁴⁹⁾はプルランが amylase 作用を受けないことから debranching 酵素活性の測定の基質として適することを指摘した。高等植物の debranching 酵素が澱粉を含む組織中に存在し、そこには多くの場合 amylase 活

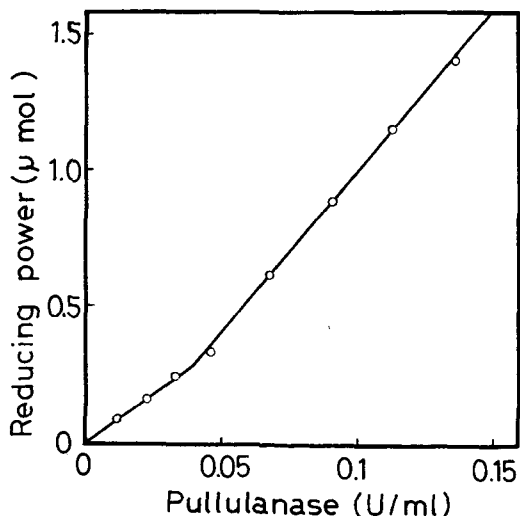


Fig. 1. Relation between pullulanase concentration and reducing power produced.

An incubation mixture (1 ml) of debranching enzyme (different concentrations, 0.2 ml), a McIlvaine buffer (pH 5.6, 0.3 ml) and pullulan (0.2%, 0.5 ml) was incubated at 25°C for 10 min, and then reducing power produced was determined by the Somogyi-Nelson method.

性が認められることから、プルランは確かに高等植物の debranching 酵素活性を測定する際の基質として適している。しかしながら Fig. 1 に示したように反応によって生成する還元力は反応液中の酵素濃度と比例しなかった。すなわち反応の初期には還元力の生成速度が遅く、後速かとなった。これは高分子のプルランよりもその分解によって生ずる中間生成物の酵素による分解が速いためと考えられる。したがって低分子量のプルラン分解物あるいはマルトトリオシルマルトトリオースを調製し、基質として用いれば生成還元力と酵素濃度の間に比例関係が得られるものと思われる。しかしそのような基質を多量に調製することは困難である。

反応液中の酵素濃度および反応時間を変え、その時に生成する還元力を測定した結果、生成還元力は(酵素濃度) \times (反応時間)によって決定されることがわかった。Fig. 1 の酵素単位は定義にしたがって1分間に1 μ molのマルトトリオースに相当する還元力を生ずる酵素量を1U(10分間で1 μ molの時0.1U)として目盛っている。以下の実験では Fig. 1 を用いて生成還元力から反応液中の酵素活性を求めたが、出来得る限り生成還元力が0.3~1.5 μ mol/反応液1mlの範囲に入るように酵素濃度を調整し、Fig. 1 の直線部分を用いるようにした。

II. 酵素の精製

水稻乳熟期種子、発芽種子、および完熟種子から debranching 酵素を抽出し、精製した。以下には主として最も容易に且つ高度に精製された完熟種子からの精製法について述べる¹²²⁾。

完熟種子中の debranching 酵素は胚乳中に存在したので¹¹⁶⁾搗精率12%の精白米(稈種;栽培品種「ユウカラ」)を用い、1mmの篩をつけた Wiley 粉砕機で粉砕し試料とした。

実験は全て0~5°Cで行なった。5kgの試料に10mM 亜二チオン酸ナトリウム水溶液25 ℓ を加え、約1時間膨潤させた後乳鉢で磨砕し、そのまま24時間保った。上澄を静かに傾瀉し吸引ろ過した。沈澱を布で搾って搾汁を得、遠心分離(10,000 \times g, 10分)した上澄を先のろ液と合した(粗抽出液, 22 ℓ)。0.01Mりん酸ナトリウム緩衝液(pH 6.2)で緩衝化した DEAE-セルロース100gを加え時々攪拌しながら数時間保った後吸引ろ過した。得られた DEAE-セルロースを0.01Mりん酸ナトリウム緩衝液(pH 6.2)で洗浄した後、0.1Mりん酸ナトリウム緩衝液(pH 6.2)1 ℓ ずつで溶出を行ない、8回までの溶出液を合した(DEAE-セルロース溶出液, 8.52 ℓ)。結晶硫酸1.4kgを加え生ずる沈澱を除き、上澄に1.2kgの結

晶硫酸を追加した。塩析物を遠心分離 (10,000×g, 10分) して集め、0.1 M りん酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.2) に溶解した (硫酸塩析物溶液, 117 mℓ)。0.01 M りん酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.2) に対して外液が SO_4^{2-} の反応を示さなくなるまで透析した (透析内液, 125 mℓ)。PM-30 限外ろ過膜をつけた Amicon 限外ろ過器を用いて濃縮し、溶媒を 0.25 M 食塩を含む 0.01 M りん酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.2) に交換した (濃縮液, 26.6 mℓ)。これと同じ緩衝液で緩衝化した Sephadex G-100 カラム (2.6×96 cm) によりゲルろ過した。溶出液 (流速 12 mℓ/hr) は 4 mℓ ずつ集め、活性の高いフラクション 69~87 番を集め、Amicon 限外ろ過器で濃縮した (Sephadex G-100 溶出濃縮液, 25 mℓ)。濃縮液を 0.01 M 酢酸ナトリウム液 (200 mℓ×5 回) に対して透析し、次いで 0.01 M 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.0) (200 mℓ×3 回) に対して透析した。これと同じ緩衝液で緩衝化した CM-セルロースカラム (2.0×5 cm) に通した。100 mℓ の同じ緩衝液で吸着されない蛋白質を洗浄した後、0.1 M 酢酸緩衝液 (pH 5.0) で酵素を溶出した。溶出液は 5 mℓ ずつ集め、フラクション 8~11 番に活性が認められたのでこの部分を集め等量の 0.1 M 酢酸ナトリウムを加え中和した (CM-セルロース溶出液, 40 mℓ)。Amicon 限外ろ過器およびイマーシブル限外ろ過器を用い濃縮し、数回水を加えて濃縮を続け、約 2 mℓ とした後凍結乾燥した。

酵素の精製の結果を Table 1 に示した。精製酵素の比活性は粗抽出液に対して 26 倍上ったに過ぎないが、粗抽出液の比活性が高いので、これまでに得られている高等植物の debranching 酵素としては最高の 29.8 pullulanase U/mg 蛋白質となった。後述するように水稲乳熟期種子の debranching 酵素 (比活性 16.5 U/mg 蛋白質)^{111,113} および水稲発芽種子の酵素 (10.0 U/mg 蛋白質)^{94,117} も比較的高度に精製された。他の研究者の報告では MAEDA ら⁵⁴) の麦芽の酵素の 10.0 U/mg 蛋白質と LEE ら⁴⁹) のスイートコーンの酵素の 6.45 U/mg 蛋白質がやや高い比活性を示したが、他は全て 1 U/mg 蛋白質あるいはそれ以下である。なおこれらの研究者は活性を 30°C で測定しており、25°C では活性の値は約 80% 位になる。

精白米からの酵素の精製は抽出液の大部分を傾瀉によって集めることが出来るため、一度に大量処理することが可能である。また抽出液の塩濃度を低くすることによって、抽出液から直接 DEAE-セルロースに酵素を吸着させることが出来るので、比較的容易に大量の抽出液を小容量の酵素液として、以後の操作を容易にしている。

水稲乳熟期種子からの酵素の抽出では抽出液を傾瀉によって集めることは出来ないので少量ずつに分けて処理した。0.1 M りん酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.2) で抽出した酵素蛋白質を硫酸分別沈澱させ、この段階で貯蔵し、数回分を合して次の操作に進んだ。以下の操作は精白米からの酵素と同様に DEAE-セルロース処理、CM-セルロースカラムクロマトグラフィーおよび Sephadex G-100 によるゲルろ過である。精製酵素の比活性は 16.5 U/mg 蛋白質¹¹³) であったが、蛋白質定量の標準に乳製カゼインを用いたので、これを精白米の酵素に用いた牛血清アルブミン標準に直すと約 20 U/mg 蛋白質となる。粗抽出液に対する酵素活性の回収率は 1.75% であった。乳熟期種子には高い Q-酵素活性があったが、Q-酵素は debranching 酵素に比し酸に不安定で、CM-セルロース処理の段階で完全に除くことができた。すなわち粗抽出液における pullulanase/Q-酵素の活性比 (U/U) は 0.002 であったが精製酵素では 727 となった。

粗抽出液に対して 26 倍上ったに過ぎないが、粗抽出液の比活性が高いので、これまでに得られている高等植物の debranching 酵素としては最高の 29.8 pullulanase U/mg 蛋白質となった。後述するように水稲乳熟期種子の debranching 酵素 (比活性 16.5 U/mg 蛋白質)^{111,113} および水稲発芽種子の酵素 (10.0 U/mg 蛋白質)^{94,117} も比較的高度に精製された。他の研究者の報告では MAEDA ら⁵⁴) の麦芽の酵素の 10.0 U/mg 蛋白質と LEE ら⁴⁹) のスイートコーンの酵素の 6.45 U/mg 蛋白質がやや高い比活性を示したが、他は全て 1 U/mg 蛋白質あるいはそれ以下である。なおこれらの研究者は活性を 30°C で測定しており、25°C では活性の値は約 80% 位になる。

Table 1. Purification process of debranching enzyme activated by sodium dithionite

Preparation	Volume (mℓ)	Total activity (U)	Recovery (%)	Specific activity (U/mg protein)
Crude extract*	22,000	26,000	100	1.15
DEAE-cellulose eluate	8,520	11,100	42.7	5.20
Ammonium sulfate ppt. solution	117	10,100	38.8	15.0
Dialyzed solution	125	10,400	40.0	22.2
Concentrate	26.6	9,470	36.4	23.0
Sephadex G-100 eluate	25.0	4,470	17.2	21.4
CM-cellulose eluate	40.0	1,205	4.63	29.8

* Polished-rice flour (5 kg) was used.

水稻発芽種子には他の穀類発芽種子と同様に高い amylase 活性が存在する。発芽種子からの debranching 酵素精製も完熟種子および乳熟期種子からの酵素の精製とはほぼ同様に行なった。しかしながら高い amylase 活性を除くために DEAE-セルロースを用いたバッチ法の代わりに DEAE-Sephadex A-50 によるカラムクロマトグラフィーを行なった。すなわち 0.1 M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.2) により抽出した酵素蛋白質を硫酸分別沈澱し、DEAE-Sephadex A-50 カラムクロマトグラフィーおよび Sephadex G-200 カラムによるゲルろ過を行って精製酵素を得た¹¹⁷⁾。

発芽種子からの精製酵素の比活性は 10.0 U/mg 蛋白質で、完熟種子および乳熟期種子からの精製酵素に比しやや低かった。しかし粗抽出液に対する pullulanase 活性の回収率 5.61% を澱粉液化力の回収率 0.0014% および澱粉糖化力の回収率 0.092% と比較すると、精製酵素は amylase 活性をほとんど含まないまでに精製されたことがわかる。実際 pullulanase 活性を測定する酵素濃度では長時間の反応でもアミロースからの還元力の生成は認められず、debranching 酵素の基質特異性の研究には何ら支障なく使用出来る精製酵素を得ることができた。

III. 酵素蛋白質の性質

水稻完熟種子から得た精製酵素を 7.5% ポリアクリルアミドを支持体とし、pH 9.4 で、1 本当たり 2 mA、60 分間のディスク電気泳動を行なった結果単一蛋白質バンドを示した [Fig. 2(B)]。また蛋白質バンド位置と酵素活性位置は一致した。乳熟期種子¹¹³⁾ [Fig. 2(A)] および発芽種子¹¹⁷⁾ [Fig. 2(C)] からの精製酵素もディスク電気泳動でほぼ単一蛋白質バンドを示し、それぞれの酵素蛋白質の移動距離はほぼ一致した。

三つの酵素蛋白質の同一性を確かめるために免疫反応を行なった。乳熟期種子の精製酵素を抗原として作った兎抗血清を用い、二重拡散法を行なった結果、完熟種子から亜二チオン酸ナトリウムにより活性化して得た酵素と乳熟期種子の酵素の沈降線は完全に融合し、両蛋白質の免疫学的同一性を示した [Fig. 3 (左)]。発芽種子の酵素も乳熟期種子の酵素と沈降線が融合し [Fig. 3 (右)]、それぞれの酵素蛋白質は免疫学的に一致することがわかった。完熟種子からジチオスレイトールで活性化した酵素も免疫学的な一致を示した [Fig. 3 (右) b]。また市販の微生物起源の 2 種の debranching 酵素についても調べたが、これらは水稻 debranching 酵素に対する抗血清とは反応せず、免疫学的に異なる蛋白質であることを示

した。

水稻種子から得られた 3 種の debranching 酵素はゲルろ過による溶出位置も一致した。したがってこれらの酵素蛋白質は分子量、荷電、および免疫学的性質が同一であるかあるいは極めて類似した蛋白質であることがわかった。

完熟種子から得た酵素を用い焦点電気泳動によって等電点を測定した。この酵素蛋白質の等電点は著しく酸性

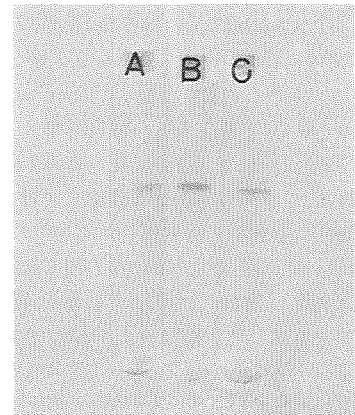


Fig. 2. Disc-electrophoresis of rice debranching-enzymes.

Thirty μ g of proteins per gel were disc-electrophoretically run for 60 min at pH 9.4 and 2 mA per tube. The proteins were located visually with Amido Black 10 B.

A: Immature-seed enzyme, B: mature-seed enzyme, C: germinated-seed enzyme.

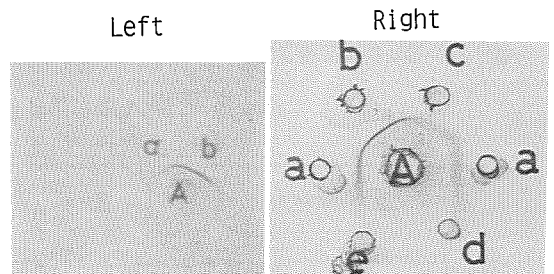


Fig. 3. Ouchterlony double diffusion analysis of rice debranching-enzymes.

A: Antiserum against the purified immature-seed enzyme, a: immature-seed enzyme, b: mature-seed enzyme after sodium-dithionite (left) or dithiothreitol (right) activation, c: germinated-seed enzyme, d: *Aerobacter pullulanase*, e: *Pseudomonas isoamylase*.

側にあり、市販 pI マーカー蛋白質との比較では測定出来なかった [Fig. 4 (A)]。pH 2.5~4.0 の pH 勾配で電気泳動を行なったゲルの pH をブロムフェノールブルーペーパーで直接測定した結果から、酵素蛋白質の pI として 3.4 が得られた [Fig. 4 (B)]。

酵素蛋白質の分子量は乳熟期種子から得た精製酵素を用いて測定した。SDS-ポリアクリルアミドゲルディスク電気泳動による測定結果を Fig. 5 に示した。メルカプトエタノールの添加の有無によって泳動距離に差が生じないことから、この酵素蛋白質は 1 本のポリペプチド鎖から成るものと思われる。分子量は標準蛋白質の泳動距離との比較から 90,000 と算出された。

酵素蛋白質の分子量はまた Sephadex G-100 カラムによるゲルろ過の溶出位置からも計算した。Fig. 6 に示すように、同じカラムで測定した標準蛋白質の溶出位置との比較から debranching 酵素の分子量は約 69,000 と推定された。前述したようにゲルろ過の溶出位置は完熟種子および発芽種子の酵素も乳熟期種子の酵素と同様に牛血清アルブミンより僅かに早く、これら 3 種の酵素蛋白質のゲルろ過的分子量は一致した。

Sephadex によるゲルろ過法で得た分子量と SDS-ポリアクリルアミド電気泳動法による値との間にはやや大きな差があった。Debranching 酵素は α -(1 \rightarrow 6) 結合による枝分れをもった α -(1 \rightarrow 4) グルカンの分枝点 [α -(1 \rightarrow 6) 結合] に作用する酵素である。一方ゲルろ過に用いた

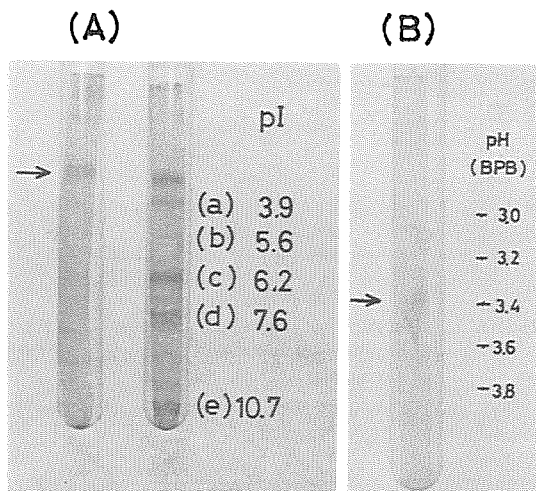


Fig. 4. Disc isoelectric focusing of rice debranching-enzyme.

Thirty μ g of proteins per gel was used. Constant voltage of 200 V was maintained for 3 hr in an ice box.

(A) pH 3.5-10.0: marker proteins, (a) acetylated cytochrome c (horse), (b) cytochrome c' (*Rhodospirillum rubrum*), (c) cytochrome c (*R. rubrum*), (d) myoglobin (horse), (e) cytochrome c (horse). (B) pH 2.5-4.0: pH gradient of the gel was directly tested with bromphenol-blue paper (BPB).

Sephadex 分子は D-グルコースが α -(1 \rightarrow 6) 結合したデキストランの架橋により作られた分子である。De-

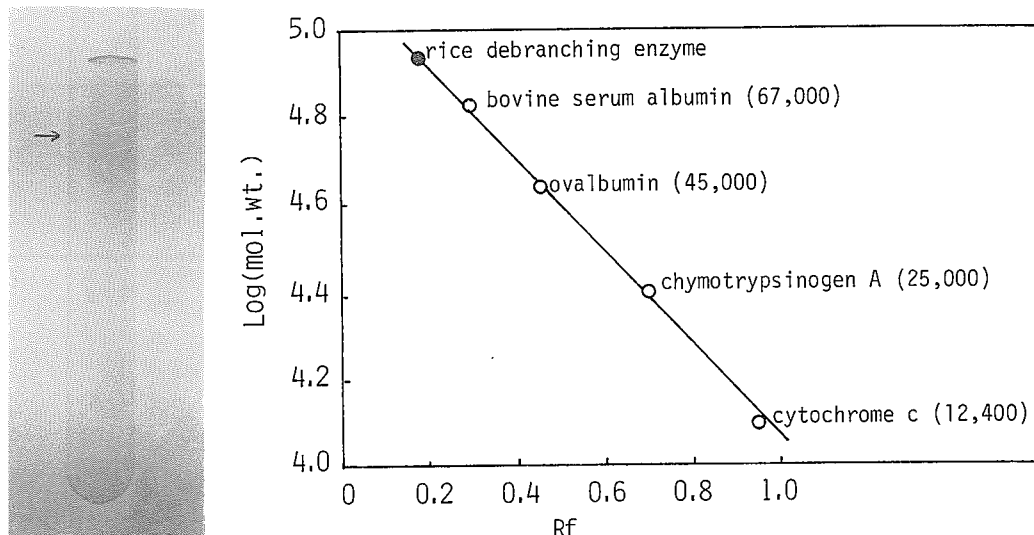


Fig. 5. SDS-Polyacrylamide gel disc-electrophoresis of rice debranching-enzyme.

Electrophoresis was performed at 8 mA per tube for 5 hr on 7.5% polyacrylamide gel. Proteins were located visually with Coomassie brilliant blue.

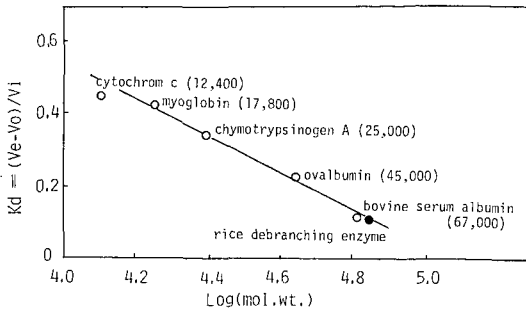


Fig. 6. Estimation of molecular weight of rice debranching-enzyme by Sephadex G-100 gel filtration.

Ve: elution volume, Vo: void volume, Vi: inner volume.

branching 酵素の基質と Sephadex 分子の構造に類似点が存在することは、酵素が Sephadex 分子と微弱な親和性をもつ可能性を暗示し、そのために Sephadex カラムからの酵素の溶出が遅れ、見掛け上分子量が低く算出される可能性がある。そこで debranching 酵素の基質と分子の構造上の類似性のないポリアクリルアミドのゲル (Bio-gel P-150) を用い水稻乳熟期種子から得た酵素のゲルろ過を行なった。その結果ポリアクリルアミドゲルカラムによっても酵素の溶出位置は牛血清アルブミン (分子量 67,000) より僅かに早く、Sephadex カラムからの溶出の場合と同様であることがわかった。

ゲルろ過法による分子量と SDS-ポリアクリルアミド電気泳動法による分子量とが異なるので、第三の方法と

して超遠心分離法による分子量の測定を行なった。0.1M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.2) 中で測定した結果から算出した沈降係数 $s_{20,w}^0$ は 7.81×10^{-3} , 合成界面セルを用いた低速度の回転から算出した拡散定数 D は 5.69×10^{-7} となり、偏比容を 0.74 と仮定すると分子量は 134,000 と算出された。この値は他の測定法によって得た値に比し著しく高いので、蛋白質の会合が起っている可能性が考えられる。そこで溶媒中に食塩を加えて沈降を行なったが結果に変わりはなく沈降パターンからも会合を示唆する結果は得られなかった。

このように三つの異なる分子量測定法によって三つの異なる値が得られるという結果になったが、この相違の原因としては蛋白質分子の形などが考えられるが現在のところ不明であり今後の検討に待たざるを得ない。

IV. 酵素反応の特性

水稻完熟種子、乳熟期種子および発芽種子から得た精製 debranching 酵素が蛋白質的に極めて類似していることがわかったので、次に酵素反応の特性の異同について検討した。特に天然に活性型で存在する乳熟期種子の酵素と発芽種子の酵素が同一の作用をする酵素であるか否かは興味深いことである。

Table 2 には乳熟期種子および発芽種子の酵素の基質特異性を比較した。両酵素ともアミロースには作用せず amylase を含まないことがわかる。プルランによく作用し植物グリコーゲンに作用せず、微生物の pullulanase [EC 3.2.1.41] と類似した基質特異性をもつ酵

Table 2. Substrate specificity of rice debranching-enzyme

Substrate	Milky stage seed enzyme		Germinated seed enzyme	
	Reducing power (as $\mu\text{mol D-glucose}/\text{m}\ell$)			
	increased after incubation* for			
	10 min	1 hr	10 min	1 hr
Amylose (potato)		0		0
Amylopectin (rice)		0.026		0.036
Glutinous rice starch		0.101		0.069
Phytoglycogen (corn)		0		0
Phytoglycogen β -dextrin		0.031		0.056
Amylopectin β -dextrin	0.150	0.420	0.171	0.391
Glutinous rice starch β -dextrin	0.188	0.471	0.209	0.440
Pullulan	0.541		0.997	
α -Amylolysis product (0.9 mg/m ℓ)	0.365		0.405	
Panose (0.5 mg/m ℓ)		0	0.006	0.006
Isomaltose (0.5 mg/m ℓ)		0	0	0

* Substrate concentration, 1 mg/m ℓ of reaction mixture unless otherwise noted; pH 5.6; 25°C.

素である。 α -Amylase による分解生成物すなわち枝分れをもったオリゴ糖によく作用する点でいわゆる limit dextrinase^{53,55)} 作用をもつ一方、アミロペクチンに作用し R-酵素³⁴⁾ としての作用をもつ。アミロペクチンの β -限界デキストリンにもよく作用した。これらの基質特異性は MANNERS らの調べた未発芽燕麦¹⁵⁾、未発芽稲¹⁵⁾、そら豆²²⁾、および発芽ソルガム²⁹⁾ の limit dextrinase の基質特異性と類似し、この種の debranching 酵素は高等植物中に広く分布するものと思われる。

水稲乳熟期種子の酵素と発芽種子の酵素は糯米澱粉の β -限界デキストリンに対する作用がほぼ同一になるように酵素濃度を調整して各種基質に作用させた時、発芽種子酵素のプルランに対する作用が乳熟期種子酵素に比しやや速かであったが、その他の基質に対する反応速度は両酵素の間でよく類似した。

両酵素の反応の最適 pH は 5.6 であった。

今回得られた酵素はディスク電気泳動的に単一であり^{1113,117)} 一つの酵素がプルランにもアミロペクチンおよびその β -限界デキストリンにも作用しているものと

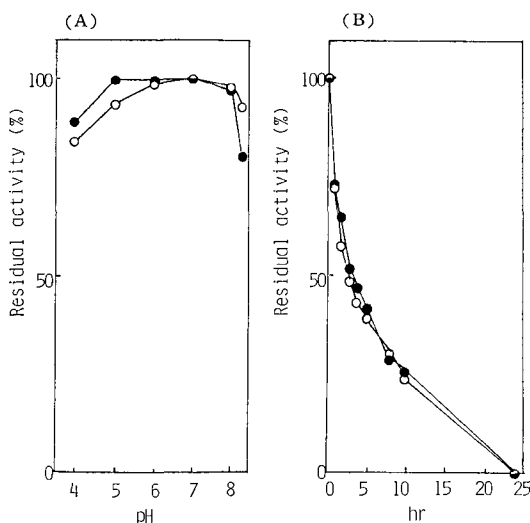


Fig. 7. pH Stability of rice debranching-enzyme.

The enzyme in McIlvaine buffer (1.75 U, different pH's, 0.2 ml) was allowed to stand at 4°C. The solution was diluted with water to 5 ml and its 0.2 ml-portion was incubated with 0.2% pullulan (0.5 ml, —○—) or 0.4% glutinous rice starch β -limit dextrin (0.5 ml, —●—) and McIlvaine buffer (pH 5.6, 0.3 ml). Residual enzyme activity: (A) after the treatment at 4°C for 60 min; (B) after the treatment at 4°C and pH 3.5 for various periods.

思われる。しかしながら MACWILLIAM ら⁵³⁾ および MANNERS ら⁵⁵⁾ は麦芽からアミロペクチンに作用し α -限界デキストリンおよびプルランに作用しない R-酵素と α -限界デキストリンおよびプルランを容易に分解するがアミロペクチンに対しては見るべき作用を示さない limit dextrinase を分離している。そこで水稲乳熟期種子の酵素を用いて、一つの酵素がプルランにも糯米澱粉の β -限界デキストリンにも作用することを示すために、両基質に対する作用の pH および温度安定性を比較した。

Fig. 7 (A) には 4°C に 60 分保った時の残存活性を示した。プルランおよび糯米澱粉 β -限界デキストリンに対する作用は共に pH 5~8 で安定であった。この酵素は pH 3.5 では失活したが、両基質に対する作用の失活の速度はよく一致した [Fig. 7 (B)]。Fig. 8 には pH 5.6 における酵素の熱安定性を示した。乳熟期種子の酵素は 30°C では安定で、40°C ではやや失活し、45°C では急速に失活し、50°C では 5 分間でほぼ完全に失活した。失活の速度はプルランに対する作用と糯米澱粉の β -限界デキストリンに対する作用の間でよく一致した [Fig. 8 (A)]。

発芽種子の酵素の熱安定性は Fig. 8 (B) に示した。40°C ではほとんど失活せず、乳熟期種子の酵素に比しや

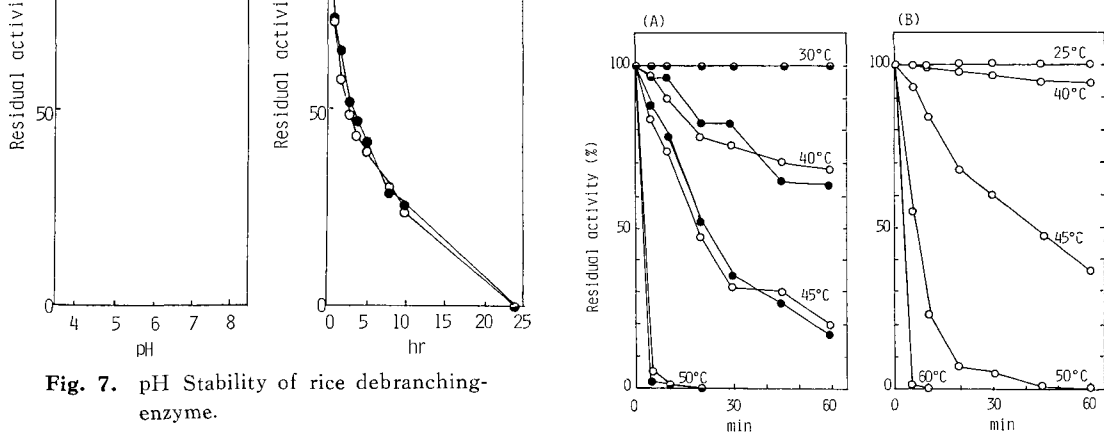


Fig. 8. Thermal stability of rice debranching-enzyme.

The enzyme solutions were allowed to stand at pH 5.6 and scheduled temperatures for various periods, respectively, and their residual enzyme activities (pullulan, —○—; glutinous rice starch β -limit dextrin, —●—) were determined. (A) Immature-seed enzyme, 0.113 U/ml; (B) germinated-seed enzyme, 0.073 U/ml.

や安定であったが、その差は大きくはなかった。発芽種子酵素は30°CでpH 5~8で安定で¹⁷⁾、これも乳熟期種子酵素と一致した。

酵素活性に対する金属塩の影響を乳熟期種子酵素と発芽種子酵素の間で比較した(Table 3)。両酵素ともHg²⁺により強く阻害され、10⁻⁵ Mではほぼ完全に阻害された。Cu²⁺では10⁻³ Mで90%以上の阻害を受けた。Hg²⁺とCu²⁺による阻害は基質としてプルランを用いた時と糯米澱粉のβ-限界デキストリンを用いた時で阻害率はほぼ一致し、これらの金属イオンの阻害が非拮抗的であることを示すものと思われる。Pb²⁺、Cd²⁺、Zn²⁺およびMn²⁺は酵素のプルランに対する作用と糯米澱粉のβ-限界デキストリンに対する作用では阻害率を異にした。このような関係は乳熟期種子酵素でも発芽種子酵素でも認められた。なお乳熟期種子酵素を用いて調べたこれらの金属イオンの阻害型式は拮抗的に近い関係を示した⁴³⁾。パラクロロマーキュリベンゼン(p-CMB)は10⁻⁴ Mで両酵素を阻害せず、したがってこの酵素の活性中心にはSH基は存在しないものと思われる。

以上の結果は乳熟期種子酵素と発芽種子酵素とが極めて類似した性質をもつ酵素であることを示し、恐らくは両者は同一の酵素であろうと考えられる。

基質の枝分れの程度および非還元末端の構造とdebranching酵素の作用との関係を明らかにするために動力学的研究を行なった。Fig. 9にはプルランの濃度と水稻乳熟期種子debranching酵素の作用の関係を示した。プルランは反応液中0.5 mg/ml以上の濃度では酵素反応を阻害し、2 mg/ml以上では阻害が著しかった。またFig. 1に示したようにプルランの分解は初速度と分解が進んだ段階の速度とが異なるので分解率の低い段階で初速度を求める必要がある。そのためには反応液中の酵素活性を低くする必要があった。LINEWEAVER-BURKプロットから求めたKm値は0.22 mg/mlであった。

Figs. 10および11には各種の澱粉様多糖について水稻乳熟期種子debranching酵素の作用におけるLINEWEAVER-BURKプロットを示した。植物グリコーゲンの限界デキストリン、糯米澱粉、および粳米アミ

Table 3. Inhibition of debranching-enzyme activity by metal ions

Metal ion	Concentration (M)	Relative activity (%)			
		Milky stage seed enzyme		Germinated seed enzyme	
		Pullulan*	β-Dextrin*	Pullulan*	β-Dextrin*
None	—	100	100	100	100
HgCl ₂	10 ⁻⁵	2.31	4.75	3.42	10.6
	10 ⁻⁶	32.4	50.0	88.6	83.9
	10 ⁻⁷	108	109	104	103
CuSO ₄	10 ⁻³	6.34	10.8	8.71	6.38
	10 ⁻⁴	38.9	20.9	32.3	36.1
	10 ⁻⁵	95.2	86.5	48.2	99.4
Pb(NO ₃) ₂	10 ⁻²	19.4	5.37	17.0	0
	10 ⁻³	43.8	17.5	48.0	9.22
	10 ⁻⁴	95.4	90.6	83.1	73.0
CdSO ₄	10 ⁻²	0	0	38.1	12.8
	10 ⁻³	52.1	21.8	69.2	38.3
	10 ⁻⁴	90.1	55.5	91.0	92.9
ZnSO ₄	10 ⁻²	23.9	1.64	20.1	0
	10 ⁻³	61.7	4.71	66.2	2.84
	10 ⁻⁴	95.2	33.3	97.2	60.8
MnSO ₄	10 ⁻²	29.5	0	57.2	24.1
	10 ⁻³	63.6	35.6	79.9	70.2
	10 ⁻⁴	99.8	91.6		

* Substrates: pullulan and glutinous rice starch β-limit dextrin.

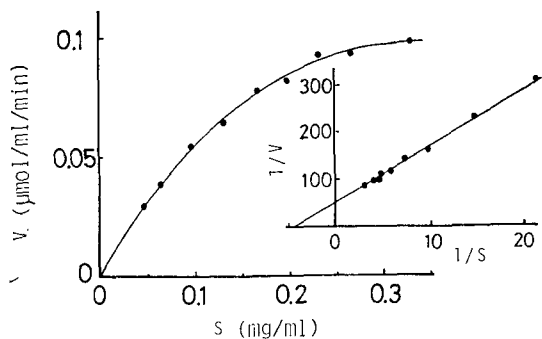


Fig. 9. Effect of pullulan concentration on enzyme activity.

Enzyme (0.013 U/ml) was incubated with pullulan (various concentrations) at pH 5.6 and 30°C for 10 min, and reducing power was determined by the Somogyi-Nelson method. Inset shows Lineweaver-Burk plot.

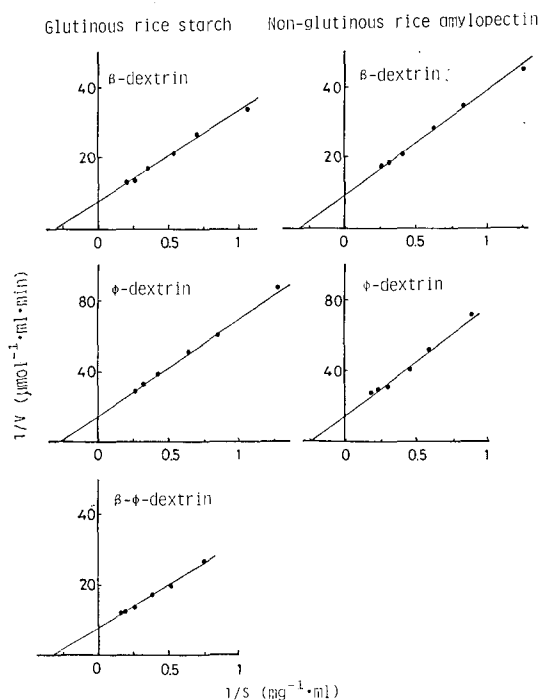


Fig. 10. Lineweaver-Burk plots of hydrolyses of amylose polysaccharides (1).

Enzyme (0.11 U/ml) was incubated with one of the substrates (various concentrations) at pH 5.6 and 30°C for 10 min for β-limit dextrans or β-limit phosphorylase limit dextrin and for 15 min for phosphorylase limit dextrans. Then, reducing power produced was determined.

ロベクチンは他の基質に比し酵素の反応が遅いので反応液中の酵素濃度を高めた (Fig. 11)。両図の横軸には基質濃度の逆数 (ml/mg) をとったが、これらの基質のもつ α-(1→6) 結合の含量はそれぞれ異なっている。Debranching 酵素が α-(1→6) 結合に作用する酵素であることを考慮して、各基質を *Pseudomonas isoamylase* で分解した後の還元力から各基質の平均鎖長を求め、反応液中の α-(1→6) 結合の濃度を算出した。Table 4 には Fig. 10 および Fig. 11 から求めた K_m 値を mg/ml および α-(1→6) 結合の濃度 (mM) で表示した値を示した。 K_m 値を mg/ml で示すとプルランは最も低い。その他の基質では糯米澱粉の phosphorylase 限界-β-限界デキストリン (3.1), 粳米アミロペクチンの β-限界デキストリン (3.1), 糯米澱粉の β-限界デキストリン (3.3) が低く、糯米澱粉および粳米アミロペクチンの phosphorylase 限界デキストリン (3.9 および 4.0) がこれに次ぎ、糯米澱粉および粳米アミロペクチン (共に 5.0) がやや高く、基質の A 鎖の長さに関連しているように見える。しかし A 鎖がマルトースおよびマルトトリオースであっても植物グリコーゲンの β-限界デキストリン (17) は他の β-限界デキストリンに比し著しく K_m 値が高く、

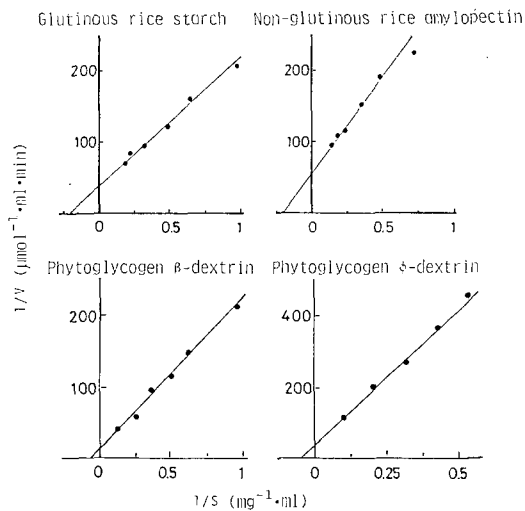


Fig. 11. Lineweaver-Burk plots of hydrolyses of amylose polysaccharides (2).

Enzyme (0.21 U/ml for glutinous rice starch and non-glutinous rice amylopectin; or 0.78 U/ml for β-limit and phosphorylase limit dextrans of phytoglycogen) was incubated with one of the substrates (various concentrations) at pH 5.6 and 30°C for 20 min for glutinous starch and 30 min for the other substrates. Then, reducing power produced was determined.

Table 4. Kinetic data of rice debranching-enzyme prepared from Figs. 10 and 11

Substrate	Chain length*	K_m		V_{rel}
		mg/ml	mM of α -(1→6)-linkage**	
Glutinous rice				
starch	19.5	5.0	1.6	11
β -dextrin	9.0	3.3	2.3	100
ϕ -dextrin	10.3	3.9	2.3	53
ϕ - β -dextrin	8.6	3.1	2.2	98
Non-glutinous rice				
amylopectin	24.1	5.0	1.3	7.0
β -dextrin	12.3	3.1	1.6	82
ϕ -dextrin	14.1	4.0	1.8	52
Phytoglycogen				
β -dextrin	9.4	17	11	8.2
ϕ -dextrin	10.8	21	12	2.9
Pullulan	(3)	0.22	0.45	127

Conditions of the incubation were given in Figs. 10 and 11.

* Chain length was calculated from the reducing power obtained after incubation with *Pseudomonas isoamylase* ($2U^{24}$)/ml of reaction mixture) at 30°C and pH 4.0. Chain length of pullulan was not determined.

** mM of α -(1→6)-linkage = $\frac{\text{mg polysaccharide/ml}}{\text{chain length} \times 162} \times 10^3$

植物グリコーゲンの phosphorylase 限界デキストリン (21) も他の phosphorylase 限界デキストリンに比し著しく高かった。このことは K_m 値が A 鎖の長さ、したがって基質の非還元末端構造と直接関係づけられないことを示している。 K_m 値を基質の α -(1→6) 結合の濃度で表わすと糯米澱粉の各限界デキストリンが 2.2~2.3, 粳米澱粉およびその限界デキストリンが 1.3~1.8, 植物グリコーゲンの限界デキストリンが 11~12 とそれぞれよく一致した値を示した。これらの関係は K_m 値が基質の非還元末端構造よりは基質全体の枝分れの程度に関係することを暗示している。 K_m を α -(1→6) 結合の濃度で示した場合にもプルランは最も低い値を示した。プルランはマルトトリオースの両端の D-グルコース基で α -(1→6) 結合を作って長く連なった直鎖分子とみなされる。粳米アミロペクチンは糯米澱粉に比し枝分れが少ない。植物グリコーゲンはこれらの基質のうちで最も枝分れが多い。このような見方からすると debranching 酵素の基質との親和力は基質分子の全体の構造と密接に関係し、枝分れの少ない分子ほど酵素との親和力が大きいものと考えられる。

水稲発芽種子の debranching 酵素の K_m 値¹¹⁷⁾ は乳熟期種子酵素の K_m 値と大きな差はなかった。完熟種

子の酵素の K_m 値もプルランが 0.20 mg/ml; 糯米澱粉の β -限界デキストリン, 2.5; phosphorylase 限界デキストリン, 3.0; 粳米アミロペクチンの β -限界デキストリン, 3.5; phosphorylase 限界デキストリン, 4.3 と乳熟期種子酵素の値と類似した。

酵素反応の最大速度 V は MICHAELIS-MENTEN の式において酵素-基質錯合体から生成物の生ずる反応の見掛けの一次反応定数を k , 酵素の総濃度を $[E_0]$ とすると

$$V = k[E_0]$$

で表わされるから、通常各基質の V 値は $[E_0]$ を一定として測定し、相対値 V_{rel} で表わす。酵素による反応性の著しく異なる基質では $[E_0]$ を一定として各基質についての反応初速度を測定することは困難なので、基質によって酵素量を変えざるを得ない。Debranching 酵素の各基質についての反応速度を比較する場合、これまでの報告ではプルランに対する反応速度を規準として相対値が求められている^{15,29)}。しかしプルランは酵素濃度を高くすると短時間で分解率が高くなり、測定値が真の初速度を示さないことになる (Fig. 1)。Debranching 酵素による糯米澱粉の β -限界デキストリンの分解では比較的広い範囲で還元糖の生成量が反応時間に比例した。さ

らに酵素濃度を変えて測定した V 値は酵素濃度に比例した (Fig. 12)。Table 4 には各基質についての V の相対値を示したが、各基質の V 値は同じ酵素濃度での反応で測定した糯米澱粉の β -限界デキストリンについての V 値との相対値で示した。

Table 4 から V 値は遊離される側鎖の長さに関係するように思われる。すなわちマルトシルおよびマルトリオシル基を遊離するものはプルランを含めて V_{rel} 値が 82~127 と高く、マルトテトラオシル基を遊離する phosphorylase 限界デキストリンは 52 および 53、さらに長い側鎖をもつ糯米澱粉と粳米アミロペクチンは 11 および 7 であった。植物グリコーゲンの限界デキストリンは短い側鎖をもつにもかかわらず V_{rel} 値が 8.2 および 2.9 と著しく低いのは極端に高い K_m 値をもつためであろう。

二、三の基質についての発芽種子酵素の V_{rel} 値¹⁷⁾ は乳熟期種子酵素のそれとよく類似した。また完熟種子の酵素の V_{rel} 値もプルランが 180 と高い値を示したが、粳米アミロペクチンの β -限界デキストリンの 90、糯米

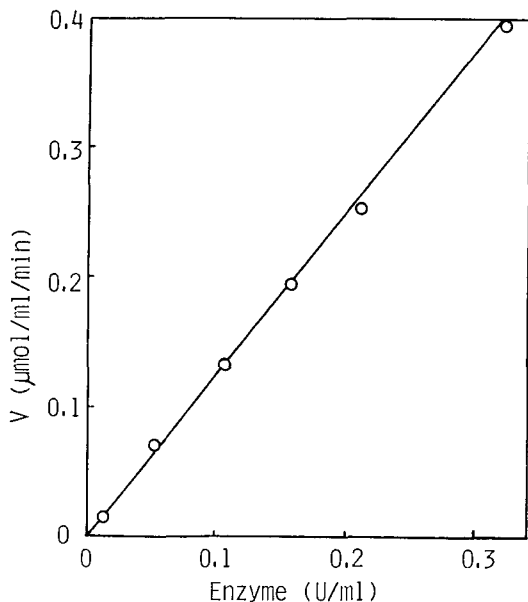


Fig. 12. V Values for β -limit dextrin of glutinous-rice starch at different concentrations of debranching enzyme.

Enzyme (different concentrations) was incubated with various concentrations of β -limit dextrin of glutinous-rice starch at pH 5.6 and 30°C. V Value at each enzyme concentration was estimated by Lineweaver-Burk plots.

澱粉および粳米アミロペクチンの phosphorylase 限界デキストリンの 46 および 42 は乳熟期種子酵素のそれらの V_{rel} 値と類似した。

第3節 要 約

1. プルランを基質として debranching 酵素活性を測定する方法について検討した。
2. 水稲完熟種子から亜二チオン酸ナトリウムによる処理、DEAE-セルロース吸着、硫酸塩析、Sephadex G-100 カラムによるゲルろ過、および CM-セルロースカラムクロマトグラフィーにより高度に精製した debranching 酵素を得た。
3. 精製酵素の比活性は 29.8 pullulanase U/mg 蛋白質でこれまでに得られている高等植物の精製 debranching 酵素に比し著しく高くディスク電気泳動で単一バンドを示した。
4. 乳熟期種子および発芽種子の debranching 酵素を完熟種子からの酵素と類似した方法で精製し、それぞれディスク電気泳動で単一バンドを示し、他の酵素活性をほとんど含まない酵素を得た。
5. 完熟種子、乳熟期種子、および発芽種子から得た debranching 酵素はディスク電気泳動の移動距離、ゲルろ過による分子量、および免疫学的性質が互に一致した。
6. 乳熟期種子の酵素を用いて測定した分子量は Sephadex G-100 カラムによるゲルろ過では 69,000、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動では 90,000、超遠心分離法による測定では 134,000 となった。この相違は酵素分子の形によるものであろうが、原因を明らかにすることは出来なかった。
7. 完熟種子酵素を用いた焦点電気泳動の結果、この酵素の等電点は著しく酸性で pI は 3.4 であった。
8. 酵素の基質特異性を調べた結果、プルラン、澱粉の α -amylase 分解物、糯米澱粉の β -限界デキストリン、および粳米アミロペクチンの β -限界デキストリンに速かに作用し、糯米澱粉、粳米アミロペクチン、および植物グリコーゲンの β -限界デキストリンには作用が遅く、植物グリコーゲン、パノース、およびイソマルトースには作用しなかった。
9. 酵素反応の最適 pH は 5.6、pH 5~8 で安定であった。pH 5.6 における熱安定性は 30°C で安定、40°C でやや失活、45°C では急速に失活、50°C では直ちに失活した。
10. Hg^{2+} は反応を強く阻害し、 Cu^{2+} も阻害を示し、これらの金属塩の阻害はプルランを基質とした時と糯米

澱粉の β -限界デキストリンを基質とした時の阻害率がほぼ一致した。Pb²⁺, Cd²⁺, Zn²⁺ および Mn²⁺ も反応を阻害したがプルランに対する反応と糯米澱粉の β -限界デキストリンに対する反応では阻害率を異にした。パラクロロマーキュリベンゼンは反応を阻害しなかった。

11. 種々の基質についての K_m および V_{rel} を測定した。 K_m は基質分子の全体の構造に関係し、直鎖分子であるプルランが最も低く、枝分れの少ない梗米アミロペクチンおよびその限界デキストリンがこれに次ぎ、やや枝分れの多い糯米澱粉およびその限界デキストリンは梗米アミロペクチンおよびその限界デキストリンよりやや高く枝分れの多い植物グリコーゲンの限界デキストリンは著しく高かった。

V_{rel} は遊離される側鎖の長さに関係し、マルトシルおよびマルトトリオシル基が速かに遊離され、マルトテトラオシルおよびアミロペクチンの側鎖はそれぞれ前者の1/2強および約1/10の V_{rel} 値を示した。

12. 完熟種子、乳熟期種子、および発芽種子の debranching 酵素の蛋白質的性質および酵素的性質は互によく類似し、恐らく同一酵素であろうと考えられた。

第2章 水稲 Debranching 酵素の作用様式

MANNERSら⁵⁸⁾は穀類の limit dextrinase によるプルランの分解物のペーパークロマトグラフィーの結果から、ヘキサオース、ノナオース、およびそれより大きいオリゴ糖が生成されることを認め、ランダム加水分解が起ると報告している。HARDIE と MANNERS²⁸⁾は麦芽の limit dextrinase をプルランに作用させた時の相対粘度の変化が反応時間と直線関係を示すことから、分解がランダムに行なわれると結論している。しかし分解物中のオリゴ糖のそれぞれを定量してはおらず、分解が真にランダムに行なわれているかどうかは明らかではない。

水稲 debranching 酵素は微生物の pullulanase と類似の基質特異性を示した (Table 2)。微生物, *Aerobacter aerogenes* の pullulanase のプルラン分解の作用様式については二つの異なった結果が報告されている。WALLENFELSら¹⁰⁴⁾は exo 型の分解であるとし、一方 DRUMMONDら¹²⁾は生成するマルトトリオースの量がランダム (endo 型) 分解を仮定した場合の分解率から計算されるマルトトリオース量に近い値となると報告している。

本章では水稲乳熟期種子から得た精製 debranching 酵素を用いプルランについての分解様式を調べ、さらに

これまでに報告のない澱粉様多糖の分解についての作用様式についても調べる^{114,116)}。

第1節 実験材料および方法

(1) 水稲 debranching 酵素

第1章で述べた水稲乳熟期種子から得た精製 debranching 酵素を用いた。

(2) 基質

プルランは市販品 (林原生化学研究所製、分子量 64,000) を、糯米澱粉、その β -限界および phosphorylase 限界デキストリンは糯米 (栽培品種「かむいもち」) から調製し当教室に保存の試料 (第1章) を用いた。

プルラン分解物はプルラン (10g) に *Aerobacter aerogenes* の pullulanase (Boehringer Mannheim 社製) 14.7 U を作用させて調製した。分解物にアルコールを加え 70% アルコール濃度で沈澱するものを除き (5.14g)、上澄を減圧濃縮して得た糖 3.95g を活性炭—セライトカラム (1:1, 4×21.5 cm) で分別した。水、および 2%, 5%, 7.5%, 10%, 15%, 20% のアルコールで順次溶出した。溶出物の薄層クロマトグラフィーによる検出で、10% アルコール溶出液 (35 ℓ) は主にヘキサオース (6³-O- α -マルトトリオシルマルトトリオース) を含んでいたのをこれを濃縮し、Bio-gel P-2 カラムクロマトグラフィーにより薄層クロマトグラフィーで単一スポットのヘキサオース区分 (乾燥量 150 mg) を得た。15% アルコール溶出では初期溶出液 (20 ℓ) には主としてノナオースを含んでいたのを、Bio-gel P-2 カラムクロマトグラフィーにより薄層クロマトグラフィーでほぼ単一のノナオース区分 (乾燥量 140 mg) を得た。またマルトトリオース (1g) は水抽出区分 (50 ℓ) から得た。

(3) 糖の定量

総糖量はアンスロン法⁹⁶⁾、還元力は SOMOGYI-NELSON 法^{82,93)} によって測定し、糖量を D-グルコースとして算出した。

プルラン分解の分解率は還元力をマルトトリオースとして算出した。基質溶液および反応液の多糖濃度は 1N 硫酸中 100°C、2.5 時間の加水分解の後の還元糖量から算出した。

(4) 薄層クロマトグラフィー

反応生成物の検出には Kieselgel G Type 60 (Merck) (層厚 0.25 mm) による薄層クロマトグラフィーを行なった。展開溶媒としてイソプロピールアルコール: エチルアセテート: 水 = 60:20:20 (v/v)⁹⁾、発色剤として 50% 硫酸 (噴霧後加熱) を用いた。

(5) 生成物の分離

プルランからの分解生成物の分析は Bio-gel P-2 (Bio-Rad Laboratories 製) カラムクロマトグラフィー (1.6×150 cm) によった。試料 10~15 mg を用い、約 20 ml/hr の流速で水溶出し、溶出液を 3 ml ずつ分取し、アンソロン法で糖量を測定した。高分子量のオリゴ糖を多量に含む試料では予め Bio-gel P-6 カラム (2.5×23 cm) を用い、流速 40~50 ml/hr で水溶出し、溶出液量 0~60 ml と 60~140 ml の 2 区分に分けそれぞれを定量した後、後者を濃縮して Bio-gel P-2 カラムによる分析に供した。

糯米澱粉およびその β -限界デキストリンからの分解生成物は Seamless Cellulose Tubing (Visking Co. 製) を用い冷蔵庫内で水に対して透析した。外液に新たに糖が透析されなくなるまで 10 回以上外液を交換し、透析された糖(外液)を集め減圧下に濃縮した後糖量および還元力を測定した。糯米澱粉の β -限界デキストリンからの生成物の透析外液については一部を用い、Bio-gel P-2 カラム (1.6×150 cm) によるゲルろ過分析(溶媒は水)を行なった。

第 2 節 実験結果および考察

I. プルランに対する作用

プルラン(反応液中 1 mg/ml)に水稲乳熟期種子 debranching 酵素(反応液中 0.07 U/ml)を加え pH 5.6, 25°C で反応させ、経時的に反応液の一部をとり、沸騰水中で 5 分間加熱して反応を止めた。この液の一部を用い還元力を測定し、還元力をマルトトリオースとした時の分解率を算出した。残りの液から 1 ml をとり減圧下に濃縮乾涸した後 20 μ l の水に溶解し、その 10 μ l を用い薄層クロマトグラフィーを行なった。

Fig. 13 に示したように分解の初期(10%分解)から既にヘキサオース、ノナオース、およびより高次のオリゴ糖が検出されるので、プルランの分解は endo 型であることがわかる。しかし分解の全段階を通じてマルトトリオースのスポットがヘキサオース、ノナオース等のスポットより大きいことから、反応は全ての α -(1-6) 結合のランダムな分解によって進行しているのではないことが示唆された。

Debranching 酵素の作用様式の詳細を調べるために、プルランからの反応生成物の Bio-gel P-2 カラムクロマトグラフィーによる定量分析を行なった^{112,114})。プルラン(反応液中 1 mg/ml)および酵素(反応液中 0.05 U/ml)を pH 5.6, 25°C で反応させ、それぞれ No. 1(反応時間、

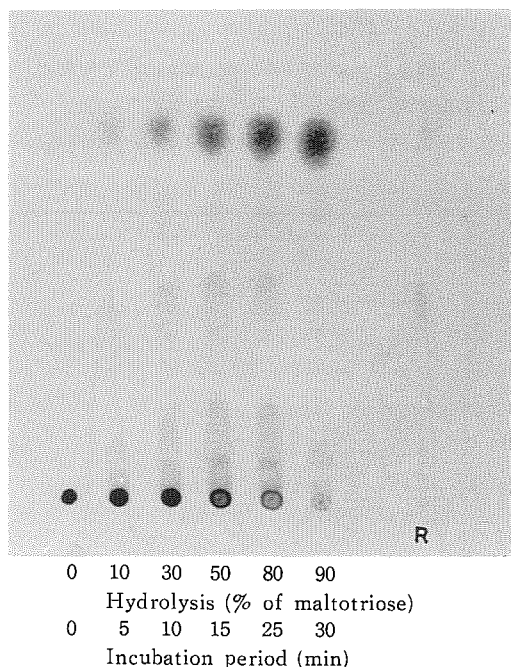


Fig. 13. Thin-layer chromatogram of debranching products from pullulan by rice debranching-enzyme.

Pullulan (1 mg/ml) was hydrolyzed at 25°C and pH 5.6 by the debranching enzyme (0.07 U/ml) and chromatographed. Solvent, isopropyl alcohol-ethyl acetate-water (60:20:20, v/v); spray reagent, 50% sulfuric acid. R, reference saccharides: maltotriose, hexaose (6³-O- α -maltotriosyl-maltotriose) and nonaose (6³-O- α -maltotriosyl-6³-O- α -maltotriosylmaltotriose).

3分) 100 ml, No. 2 (6分) 50 ml および No. 3~6 (12, 15, 18 および 21分) 各 25 ml を沸騰水中で 10分加熱して反応を止めた。各反応液の一部を用い総糖量および還元力(マルトトリオースとして算出)を測定し分解率を算出した。残りの液を減圧下に濃縮し、Bio-gel P-2 によるカラムクロマトグラフィーを行なった。但し試料 No. 1~3 は高分子量の糖を多く含むので、予かじめ Bio-gel P-6 によるカラムクロマトグラフィーを行ない、高分子部分を除いた後、低分子部分について Bio-gel P-2 による分析を行なった。各試料の低分子部分の収率はそれぞれ No. 1, 20.4%; No. 2, 36.4%; および No. 3, 67.7%であった。

Bio-gel P-2 カラムクロマトグラフィーの溶出パターンを Fig. 14 および Fig. 15 に示した。縦軸には 1 フ

ラクション (3 ml) 当りの糖の収率を示した。トリオース (図中の T), ヘキサオース (H), およびノナオース (N) はよく分離されたので, それぞれ別々に収量を求め, それ以上高分子の糖は一括して収量を算出し, ランダム分解に対する KUHN の式⁴⁾から算出される理論収量と共

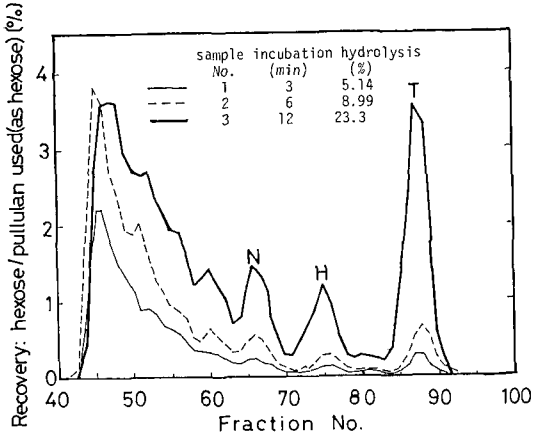


Fig. 14. Gel filtration of debranching products from pullulan (1).

An incubation mixture of the debranching enzyme (0.05 U/ml) and pullulan (1 mg/ml) was incubated at 25°C and pH 5.6 for scheduled periods. After pre-treatment with a Bio-gel P-6 column (2.5×23 cm), the digests were applied to a Bio-gel P-2 column (1.6×150 cm) and eluted with water at a flow rate of 20 ml/hr. Fractions of 3 ml were collected. Saccharides in the fractions were determined by the anthrone reagent and their recoveries were expressed in % of hexose based on pullulan used.

Peaks: T, maltotriose; H, hexaose; N, nonaose.

に Table 5 に示した。

実測値は理論収量に比し反応の初期から後期にいたるまでマルトトリオースの生成量が多く, endo 型の分解にもかかわらずマルトトリオースが生成し易いことを示している。ヘキサオースは反応の極く初期 (5.14% 分解) では理論量とほぼ等しい量で生じたが, 以後 (8.99% 分

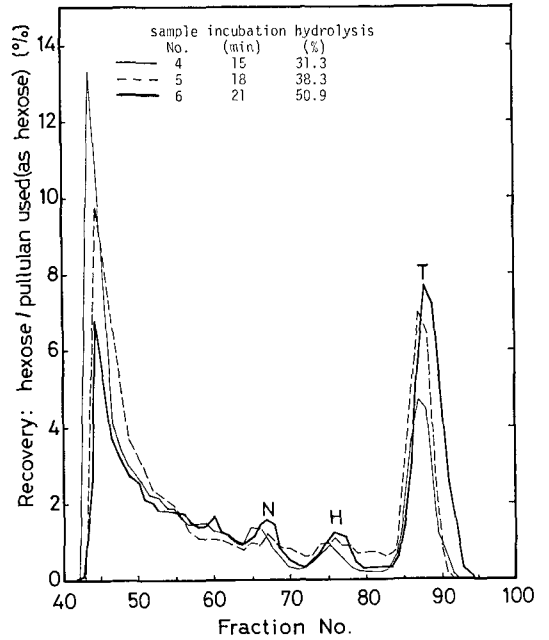


Fig. 15. Gel filtration of debranching products from pullulan (2).

Methods are the same as shown in Fig. 14 except for omission of the pre-treatment with Bio-gel P-6.

Peaks: T, maltotriose; H, hexaose; N, nonaose.

Table 5. Yields of debranching products from pullulan

Sample No.	Incubation (min)	Hydrolysis % of maltotriose	Yield of oligosaccharides (%)							
			Triose		Hexaose		Nonaose		Higher saccharides	
			Found	Calcd.*	Found	Calcd.*	Found	Calcd.*	Found	Calcd.*
1	3	5.14	1.19	0.26	0.66	0.50	1.22	0.71	96.93	98.53
2	6	8.99	2.29	0.81	1.26	1.47	2.52	2.01	93.30	95.71
3	12	23.3	14.28	5.43	5.52	8.33	6.15	9.58	74.05	76.66
4	15	31.3	20.38	9.80	5.88	13.47	8.81	13.88	64.93	62.85
5	18	38.3	27.79	14.67	6.55	18.10	8.28	16.75	57.38	50.48
6	21	50.9	35.75	25.91	6.79	26.38	8.41	19.43	49.05	28.28

* Theoretical yields (%) of n -mer of maltotriose: $Y_n = n \cdot s^2 (1-s)^{n-1} \times 100$, s : degrees of hydrolysis expressed as ratios.

解からは理論量より少なく、反応が進むにしたがって理論量に対する比が減少した。ノナオースも初期 (5.14% および 8.99% 分解) には理論量より多かったが、後理論量を下まわった。

プルラン分子をマルトトリオースがその両端で α -(1→6) 結合して出来た直鎖分子と考えると、上述の結果はこの酵素がプルランを endo 型に分解 [内部の α -(1→6) 結合を加水分解] するが、プルランの全 α -(1→6) 結合に対して同確率で作用する、いわゆるランダム分解ではなく、分子の末端に近い結合に作用し易いことを示している。すなわち反応の極く初期にすでに多量のマルトトリオースを生ずるが、この時ヘキサオースおよびノナオースも理論収量より多いことから、プルラン分子の末端ばかりではなく、末端に近い α -(1→6) 結合も全体から見ると相対的に作用を受け易いことがわかる。反応の進行に伴ってヘキサオースおよびノナオースの量が理論収量を下まわるのはこれらのオリゴ糖が酵素によって速かな分解を受けることによるものと思われる。

II. プルラン分解生成オリゴ糖に対する作用

プルランおよびその部分分解生成物に対する水稲 debranching 酵素の反応性を比較するために酵素の K_m 値および V 値を比較した。プルラン分解物としてはプルランに *Aerobacter aerogenes* の pullulanase を作用させ、分解率が 39.3% (還元力をマルトトリオースとして算出) になった時の生成物から、70% アルコールで沈澱する区分、ノナオース (6³-O- α -maltotriosyl-6³-O- α -maltotriosylmaltotriose), およびヘキサオース (6³-O- α -maltotriosylmaltotriose) を用いた。

反応は反応液中酵素濃度 0.023 U/ml, pH 5.6, 25°C で行ない、種々の基質濃度における反応液の生成還元力から反応速度 v ($\mu\text{mol maltotriose}/\text{ml}/\text{min}$) を求めた。LINEWEAVER-BURK プロット (Fig. 16) から求めた K_m 値および V 値を Table 6 に示した。

基質濃度を酵素が作用する α -(1→6) 結合の濃度とし

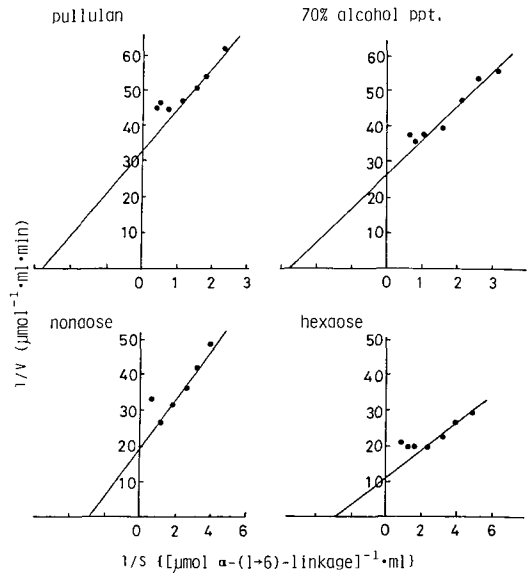


Fig. 16. Lineweaver-Burk plots of hydrolyses of pullulan and its related oligosaccharides by rice debranching-enzyme.

Enzyme (0.023 U/ml) was incubated with one of the substrates (various concentrations) at 25°C and pH 5.6 for 10 min. Then, reducing power produced was determined. For the preparation of hydrolysis products of pullulan, see text.

て表わした場合、これら 4 基質についての K_m 値は一致した。一方プルランについての V 値を 100 とした時の各基質についての相対的な V 値 (V_{rel}) は低分子の基質ほど大きく、この酵素は低分子のプルラン分解物ほど速かに分解することが示された。ヘキサオースはプルランに比し 3 倍の速度で分解されるから、プルランの分解中に生成したヘキサオースは急速に分解され、反応液中での蓄積がランダム分解で期待される理論量よりはるかに少ないという Table 5 の結果をよく説明している。ノナオースはヘキサオースよりは分解速度が遅いから反応

Table 6. K_m and V_{rel} for pullulan and its related oligosaccharides prepared from Fig. 16

Substrate	(DP)	K_m		V_{rel}
		$\mu\text{mol } \alpha$ -(1→6)-linkage/ml	mg/ml	
Pullulan	(ca. 400)	0.36	0.17	100
70% alcohol ppt. from pullulan hydrolyzate	(17.2)	0.36	0.21	122
Nonaose	(9)	0.36	0.26	174
Hexaose	(6)	0.36	0.35	300

液中の蓄積量は分解率 8.99% までは理論量より多いが、プルランに比し 1.7 倍の速度で分解されるから、分解が進み反応液中のノナース濃度が高くなるにしたがって、プルラン中の α -(1 \rightarrow 6) 結合と同じ速度での分解を期待したランダム分解の理論量に比し反応液中の蓄積量が下まわり、分解率 31.3% 以後は生成量を分解量が上まわって反応液中の濃度が減少したとして Table 5 の結果を説明することが出来る。

III. 糯米澱粉およびその β -限界デキストリンに対する作用

糯米澱粉およびその限界デキストリンに対し水稻乳熟期種子 debranching 酵素を作用させた時の還元力の生成の経時変化を Fig. 17 に示した。反応液中の基質濃度は 2.00 mg/ml, 酵素濃度は 0.039 U/ml とし、pH 5.6, 30°C で反応させ、分解率は還元糖生成量から求めた基質中の α -(1 \rightarrow 6) 結合の分解の割合 (%) で示した。

β -限界および phosphorylase 限界デキストリンの分解は半分以上の α -(1 \rightarrow 6) 結合が分解されるまで速かに進行し、その後ゆっくり反応が続いた。糯米澱粉では極く初期に速かな分解を示したが、反応過程の大部分はゆっくりした分解であった。これらの基質の構造の差は非還元末端にあるので反応速度の相違も非還元末端構造の差に由来するものと考えられる。

Fig. 18 には糯米澱粉の β -限界および phosphorylase

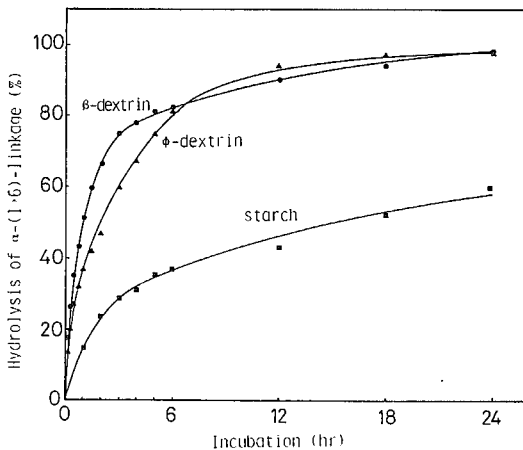


Fig. 17. Hydrolyses of glutinous-rice starch and its limit-dextrins by the debranching enzyme.

Enzyme (0.039 U/ml) was incubated with one of the substrates (2.00 mg/ml) at 30°C and pH 5.6. Reducing power was determined by the Somogyi-Nelson method.

限界デキストリン (反応液中 2.00 mg/ml) に水稻乳熟期種子 debranching 酵素 (反応液中 0.039 U/ml) を作用させ、反応生成物を経時的に薄層クロマトグラフィーにより分析した結果を示した。 β -限界デキストリンからの初期反応生成物はマルトースおよびマルトトリオースであり、phosphorylase 限界デキストリンからはマルトテトラオースが生じ反応が進んだ後もこれらのオリゴ糖が主要な生成物であった。すなわち限界デキストリンの初期の速かな分解は非還元末端の短い A 鎖の遊離 (exo 型分解) によるものであることがわかった。

同一の酵素がプルランに対しては endo 型に、糯米澱粉の β -限界デキストリンには exo 型に作用するとは考え難いので、糯米澱粉の β -限界デキストリンからの反応生成物を精査した。糯米澱粉の β -限界デキストリン (反応液中 2.00 mg/ml) と水稻乳熟期種子 debranching 酵素 (反応液中 0.039 U/ml) を pH 5.6, 30°C で反応させ、10分、30分、および45分反応後にそれぞれ 50 ml の反応液をとり、沸騰水中で10分間加熱して反応を止めた。反応液の一部をとり還元力を測定し、基質の α -(1 \rightarrow 6) 結合の分解率を測定した結果、それぞれ 19.4, 37.5, および 46.3% であった。

各反応液を水に対して透析し、透析外液を減圧濃縮し糖の回収率および平均重合度を求めた結果を Table 7

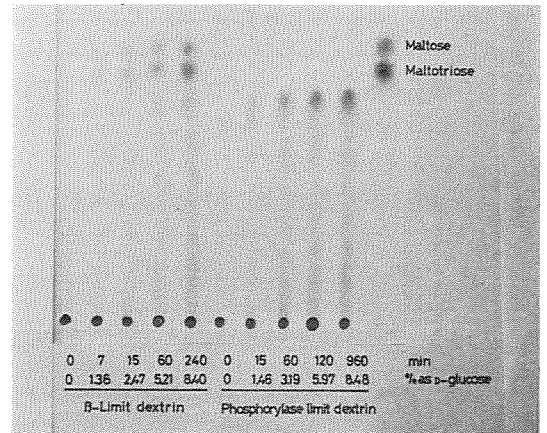


Fig. 18. Thin-layer chromatogram of debranching products from β -limit and phosphorylase limit dextrans of glutinous-rice starch by rice debranching-enzyme.

Substrate (2 mg/ml) was hydrolyzed at 30°C and pH 5.6 by the debranching enzyme (0.039 U/ml) and chromatographed. Solvent, isopropyl alcohol-ethyl acetate-water (60:20:20, v/v); spray reagent, 50% sulfuric acid.

Table 7. Dialyzate of debranching products from β -limit dextrin of glutinous-rice starch

Sample No.	Reaction period (min)	Hydrolysis of α -(1 \rightarrow 6)-linkage (%)	Dialyzate	
			Recovery (%)	Degree of polymerization
I	10	19.4	14.4	6.7
II	30	37.5	23.6	5.9
III	45	46.3	32.6	6.5

Enzyme (0.039 U/m ℓ) was incubated with β -limit dextrin of glutinous rice starch (2.00 mg/m ℓ) at 30°C and pH 5.6.

に示した。各反応液共平均重合度が3より大で、透析外液中に β -限界デキストリンのA鎖由来のマルトースおよびマルトトリオース以外の、重合度の大きい糖が存在することがわかった。各透析外液の糖を Bio-gel P-2 カラムを用いて分析した結果を Fig. 19 に示した。約 10 mg の糖を含む試料液を用い、流速約 20 m ℓ /hr で水溶出し、3 m ℓ ずつの溶出液を集め、各フラクションの糖含量をアンスロン法で測定した。反応初期から 80 番フラクション以降に溶出される低分子糖が多く、 β -限界デキス

トリンのA鎖の速かな遊離を示しているが、同時に反応の初期から高分子の透析性の糖が存在することも示されている。

各試料のゲルろ過のフラクションを41~50番, 51~70番, および71~90番の三つに分けて集め濃縮した。各濃縮液の糖濃度をアンスロン法で測定し、濃縮液に水稲乳熟期種子の debranching 酵素 (反応液中 0.04 U/m ℓ) を加え pH 5.6, 30°C で反応させ、反応の前後の還元力を SOMOGYI-NELSON 法で測定して、濃縮液中の糖の平均重合度および1分子当りの α -(1 \rightarrow 6) 結合数を算出した (Table 8)。41~50番フラクションの糖は初期反応生成物で1分子当り2個の α -(1 \rightarrow 6) 結合を含み、反応の進んだ段階では約1個の枝分れを含んでいた。71~90番フラクションの糖には枝分れの存在はなく、中間の分子量をもつ51~70番フラクションでは反応初期のものみに若干の分枝糖が含まれることが示された。

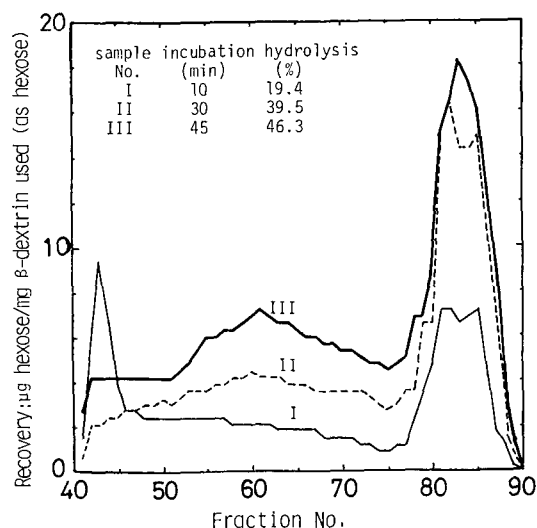


Fig. 19. Gel filtration of debranching products from beta-limit dextrin of glutinous-rice starch.

Debranching products shown in Table 7 were applied to a Bio-gel P-2 column (1.6 \times 150 cm) and eluted with water at a flow rate of 20 m ℓ /hr. Fractions of 3 m ℓ were collected. Saccharides in the fractions were determined by the anthrone reagent and their recoveries were expressed in % of hexose based on the β -limit dextrin used.

Table 8. Analyses of fractions obtained by gel filtration

Sample No.*	Fraction No.*	Degree of polymerization	α -(1 \rightarrow 6)-linkage per molecule**
I	41-50	33.0	1.9
	51-70	10.5	0.3
	71-90	3.62	0
II	41-50	40.1	0.7
	51-70	11.0	0.1
	71-90	4.00	0
III	41-50	42.7	0.9
	51-70	11.2	0
	71-90	4.00	0

* See Table 7 and Fig. 19.

** $\frac{\text{Reducing power after debranching}}{\text{Reducing power before debranching}} - 1$.

糯米澱粉の β -限界デキストリンに水稻乳熟期種子 debranching 酵素を作用させた時、反応生成物中に枝分れをもった糖が生成したことはこの酵素が β -限界デキストリンの内部の α -(1 \rightarrow 6)結合を切断したことを示している。特に興味深いことは反応初期に透析性ではあるが Bio-gel P-2 ゲルろ過でポイドボリュームの位置に溶出される高分子糖が多いこと、それが α -(1 \rightarrow 6)結合をもっており、その α -(1 \rightarrow 6)結合は水稻 debranching 酵素によって分解され得ることである。反応の進行に伴ってこの高分子糖の量が減りそれよりやや分子量の低い糖が増加した。これらの結果は β -限界デキストリンの最外部の α -(1 \rightarrow 6)結合よりも先に切断される内部の α -(1 \rightarrow 6)結合が存在すること、すなわち水稻 debranching 酵素が β -限界デキストリンを endo 型に分解することを示す。

糯米澱粉に対しても水稻乳熟期種子 debranching 酵素は endo 型の分解を行なった。糯米澱粉(反応液中 2.00 mg/ml)と水稻乳熟期種子 debranching 酵素(反応液中 0.039 U/ml)を pH 5.6, 30°C で反応させ、2.5 時間および 7 時間反応後の試料各約 80 ml ずつをとり、沸騰水浴中 10 分間加熱して反応を止めた。反応液の一部を用い還元力を測定した結果、それぞれの分解率は 26.9 および 37.0% であった。両試料を減圧濃縮し約 30 ml とした後水に対して透析し、透析外液を減圧濃縮した後、糖の回収率、平均重合度、 β -amylase による分解限度、および 1 分子当りの *Pseudomonas isoamylase* によって分解される α -(1 \rightarrow 6)結合の数を測定した(Table 9)。 β -Amylase による分解が 100% に達しないことおよび *isoamylase* によって分解される結合が存在することから、糯米澱粉の分解物中に枝分れをもつ透析性の糖が存在することが明らかにされた。1 分子当りの α -(1 \rightarrow 6)

結合の数が 1 に満たないことから透析性生成物の大部分は直鎖分子であり、 β -amylase による分解限度からも直鎖分子が多いことがわかる。したがって糯米澱粉に対する作用はその β -限界デキストリンに対する作用と同様に非還元末端に近い、分子の外側の α -(1 \rightarrow 6)結合の分解が多いものと考えられるが、同時に内部の α -(1 \rightarrow 6)結合も分解(endo 型分解)されていることがわかった。

IV. 水稻 debranching 酵素の作用様式についての一仮説

水稻 debranching 酵素のプルランに対する分解作用は endo 型であり、糯米澱粉およびその β -限界デキストリンに対しても endo 型の分解を行ない得ることがわかった。しかしプルランに対する作用では反応の初期から多量のマルトトリオースを生じ、糯米澱粉の β -限界デキストリンに対する作用でもマルトースおよびマルトトリオースの遊離が顕著であり、酵素が基質分子の末端に近い α -(1 \rightarrow 6)結合によく作用することがわかった。一方糯米澱粉およびそれから調製した種々の限界デキストリンおよび稷米アミロペクチンとその限界デキストリンに対する分解速度を比較すると(Table 4)、A 鎖がマルトシルおよびマルトトリオシル基である基質に対する反応速度が最も大で、マルトテトラオシル基のものに対する反応速度はその約 1/2、さらに長鎖長の多糖では前者の約 1/10 であった。

水稻 debranching 酵素の反応速度が酵素の作用によって遊離されるオリゴ糖の鎖長によって決まると考えると、二、三の結果と矛盾する。糯米澱粉の β -限界デキストリンの初期分解物中に比較的多量の高分子糖が見出される一方で、反応の後期にも新たなマルトースおよびマルトトリオースの生成が認められる。すなわち β -限界デキストリン中には遊離され易い A 鎖のほかに反応の後期まで遊離されずに残る A 鎖があり、一方では反応初期に遊離される長鎖の枝が存在する。

プルランの分解では反応の初期から高分子の分解生成物を生ずるが、反応速度は糯米澱粉の β -限界デキストリンに対する反応速度より大で、遊離されるオリゴ糖の鎖長が短いほど反応速度が大きいという結果にはならない。もっともプルランの分解で生ずる高分子生成物はマルトトリオースの非還元末端 D-グルコースの 6 番炭素に大きな置換基がついたものであり、このものは置換基のつかないマルトトリオシル基に近い速度で分解するとして説明することは可能である。

また短鎖長の A 鎖をもつ植物グリコーゲンの β -限界デキストリンおよび phosphorylase 限界デキストリン

Table 9. Dialyzate of debranching products obtained from glutinous-rice starch

Sample No.*	I	II
Recovery of dialyzable saccharides (%)	16.8	26.7
Degree of polymerization	12.1	14.2
β -Amylolysis limit (%)	70.4	91.1
α -(1 \rightarrow 6)-Linkage per molecule	0.2	0.4

* Enzyme (0.039 U/ml) was incubated with glutinous-rice starch (2.00 mg/ml) at 30°C, pH 5.6, for 2.5 hr (sample I; 26.9% hydrolysis) and for 7 hr (sample II; 37.0%).

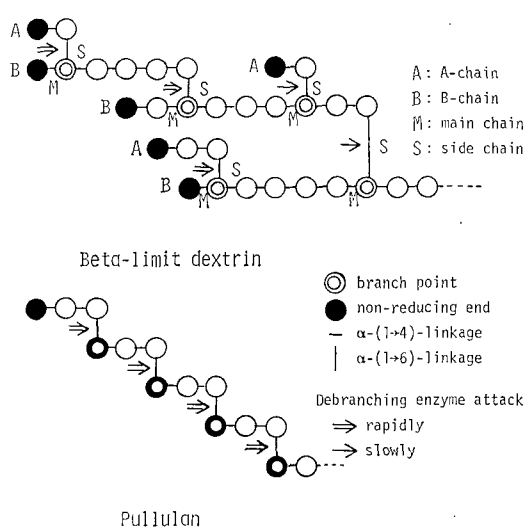
が著しく分解され難いことも遊離されるオリゴ糖の鎖長が短くても必ずしも速かに分解されるわけではないことを示している。この場合は植物グリコーゲンの限界デキストリンに関する酵素の K_m 値が著しく大きいために反応速度が遅くなるものと考えられる。これらのことから反応速度は必ずしも遊離される糖の鎖長と関連づけられない。

そこで糯米澱粉の β -限界デキストリン分子中に酵素の作用を受け易い A 鎖と受け難い A 鎖が存在し、また内部の α -(1-6) 結合にも反応を受け易いものが若干存在するという考え方をもとにして水稲 debranching 酵素の作用と基質の構造との関係について考察することにする。この仮定では反応速度を遊離されるオリゴ糖の構造と関連づけるわけにはいかないので、 α -(1-6) 結合のついている側のグルカンの構造に原因を求めなければならない。低分子基質に対する *Klebsiella* の pullulanase の作用³⁹⁾ においては反応速度は α -(1-6) 結合の切断によって遊離されるオリゴ糖 (A 鎖) の大きさばかりではなく、それを結合しているオリゴ糖 (C 鎖) の大きさも関係した。すなわち 6^3 -O- α -maltotriosylmaltotriose (相対速度 162; プルランの分解速度を 100 として) はよく分解されるが、 6^1 -O- α -maltotriosylmaltose (相対速度 0) は α -(1-6) 結合で結合したオリゴ糖がマルトトリオースであるにもかかわらず、全く分解されず、また 6^3 -O- α -maltosylmaltotetraose (相対速度 43) と 6^3 -O- α -maltosylmaltopentaose (相対速度 98) を比較すると両者共遊離されるオリゴ糖がマルトースであるが、結合しているオリゴ糖がテトラオースかペンタオースかで反応速度に 2 倍以上の差がみられた。

水稲 debranching 酵素の作用について、プルランの各結合が速かに分解されることも考慮して、 β -限界デキストリン中の α -(1-6) 結合に分解され易いものとされ難いものが存在するという仮定のもとに、 α -(1-6) 結合の周囲の構造と分解速度との関係を説明する一つの可能な仮説を次に提出する (Scheme 2)¹¹²⁾。

「酵素の反応速度は主鎖の外側の (D-グルコースの) 数によって決定し、その数が少ないほど速かである。」

この場合、「主鎖」(main chain; 図中 M) とは分枝点 (6 番炭素が置換された D-グルコース; 図中 \odot) の両側に α -(1-4) 結合して出来る鎖を呼び主鎖に α -(1-6) 結合で結合した鎖を側鎖 (side chain; 図中 S) と呼ぶことにする。また「外側の (D-グルコースの) 数」とは分枝点から非還元末端までの D-グルコースの数 (分枝点 D-グルコースを含まない) を言う。



Scheme 2. Hypothesis on action of debranching enzyme.

For details, see text.

この仮説に従うと、プルランの全ての結合は「外側の数」が 0 であって最も速かな分解を受け、且つ全ての結合が対等であるので結果的にランダムに近い endo 型の分解となる。 β -限界デキストリンでは Scheme 2 に示したように側鎖が A 鎖である分枝点でも主鎖の外側の D-グルコースの数が 1 または 2 で速かに分解される α -(1-6) 結合と、より長い外側の D-グルコース鎖のため反応を受け難い α -(1-6) 結合とが存在する。一方 B 鎖を側鎖とする分枝点の中にも外側の D-グルコースの数が 1 または 2 のものが存在し、この場合は B 鎖であっても速かに分解される。Phosphorylase 限界デキストリンでは外側の D-グルコースの数は 4 となり反応速度は低下する。糯米澱粉および粳米アミロペクチンでは一般に外側の数はさらに大となり、したがって反応速度は著しく小となる。

この仮説は水稲 debranching 酵素の反応速度と各基質の構造との関係についての実験結果をよく説明している。しかしこの他にも可能な仮説はあり得るであろう。またプルランおよびプルランの部分分解物に対する酵素の反応速度の比較では、これらの基質の外側の D-グルコースの数が同一であるにもかかわらず低分子の基質ほど速かに分解され、植物グリコーゲンの β -限界および phosphorylase 限界デキストリンは糯米澱粉および粳米アミロペクチンから調製した相当するデキストリンと同一の外側の D-グルコースの数をもつが著しく反応速度が遅かった。このことは基質の全体の構造を考えなけ

れば説明出来ず、分解されるべき α -(1→6) 結合と酵素の接近に対する基質自身の立体的障害が関与するものと考えられる。

真の酵素の反応機作の解明およびこの仮説の検討には主鎖の外側の D-グルコンル基の数と側鎖の D-グルコンル基の数の異なる種々の基質の調製とそれに対する酵素作用を研究する必要がある。

本章で用いてきた *exo* 型分解とは基質分子の A 鎖の遊離を意味し、*endo* 型分解とは作用を受ける時点で B 鎖であるような側鎖の遊離を意味した。しかし Scheme 2 における作用を受け易い B 鎖の α -(1→6) 結合を内部の結合と言うべきか否かについては用語の定義の検討が必要であろう。プルランをマルトトリオースから成る直鎖分子と考えた時、水稲 debranching 酵素は明らかに *endo* 型の分解を行なう。しかしもしも分解を受ける結合の主鎖の非還元末端が反応に直接関係しているならば分解される α -(1→6) 結合は分子の最も外側に位置することになるから *endo* 型分解と呼ぶことはできない。Debranching 酵素の作用様式についてはさらに詳細な研究が必要であり、その結果にしたがって分解様式の名称についても考える必要があろう。

第3節 要 約

1. 水稲乳熟期種子 debranching 酵素によるプルラン分解物の薄層クロマトグラフィーの結果、ヘキサオース、ノナオース、およびそれより高分子の糖が存在したことから、分解は *endo* 型に進むことがわかった。

2. 分解生成物のゲルろ過による定量分析の結果、ランダム分解の理論量に比しマルトトリオースが著しく多く、*endo* 型ではあるが全ての α -(1→6) 結合がランダムに分解されるわけではないことがわかった。

3. 反応の初期にはマルトトリオースのほかヘキサオースおよびノナオースもランダム分解の理論量より多く、酵素によるプルランの分解で末端に近い α -(1→6) 結合が分解され易いものと推定された。

4. 反応の全段階を通じ著量のマルトトリオースが存在し、反応が進むとヘキサオースおよびノナオースの量がランダム分解の理論量を下まわることから、プルランに比し低分子の中間生成物が酵素による分解を受け易いものと推定された。

5. プルランおよびその分解生成物について酵素の作用を調べた結果、*K_m* 値はいずれの基質についても同じ値となったが *V* 値は低分子基質ほど大となり、プルランに対する *V* 値を 100 とした時、ヘキサオース 300、ノナ

オース 174、平均重合度 17.2 の中間生成物 122 であった。このことによってプルラン分解物中にマルトトリオースが多量に生成する理由が説明された。

6. 水稲乳熟期種子 debranching 酵素による糯米澱粉およびその限界デキストリンの分解速度を調べた結果、限界デキストリンではその α -(1→6) 結合の半分以上が速かに分解され、その後緩徐な分解が続き、糯米澱粉では極く初期に速かな分解があるが、全体を通して緩徐に分解が進んだ。

7. 糯米澱粉の β -限界および phosphorylase 限界デキストリンの分解物を薄層クロマトグラフィーによって調べた結果、反応初期から前者からはマルトースとマルトトリオースが、後者からはマルトテトラオースが著量に生成し、限界デキストリンの速かな分解は A 鎖の遊離であることがわかった。

8. 糯米澱粉の β -限界デキストリンの分解生成物中の透析性の糖をゲルろ過分析した結果、反応初期に高分子糖が多く、この糖は α -(1→6) 結合を含んでいた。したがって水稲乳熟期種子 debranching 酵素は糯米澱粉の β -限界デキストリンの内部の α -(1→6) 結合の分解 (*endo* 型分解) を行ない得ることがわかった。

9. 糯米澱粉の分解生成物中の透析性の糖の β -amylase による分解限度および isoamylase による分解の結果、この糖が α -(1→6) 結合をもつことが明らかにされた。したがって水稲乳熟期種子 debranching 酵素は糯米澱粉も *endo* 型に分解し得ることがわかった。

10. 糯米澱粉の β -限界デキストリンに対する水稲 debranching 酵素の作用様式について一つの仮説を提出した。酵素の反応速度は分解される α -(1→6) 結合の主鎖の非還元性末端までの長さが短いものほど大であると仮定した。その結果 β -限界デキストリンの A 鎖に遊離され易いものとされ難いものが存在すること、B 鎖にも遊離され易いものがあること、プルランの全ての α -(1→6) 結合が分解され易く、その結果ランダム分解に近い *endo* 型分解が起ること、phosphorylase 限界デキストリンが β -限界デキストリンより分解され難く、糯米澱粉および稗米アミロペクチンは phosphorylase 限界デキストリンよりさらに分解され難いことがよく説明された。

第3章 不活性型 Debranching 酵素

大麦種子中には β -amylase が zymogen として存在し、発芽の際に活性化されることが知られている^{79,91)}。Debranching 酵素については豌豆で不活性型酵素が

存在し protease によって活性化されることが報告されている⁹⁰⁾。一方水稲⁸⁴⁾ および大麦^{60,63)} の発芽時の debranching 酵素の活性増加がジベレリンによって促進されることが報告されているが、ジベレリンは麦芽 α -amylase の *de novo* 合成を促進することが明らかにされているので^{30,33,100)}、水稲および大麦の結果は発芽の際に debranching 酵素が *de novo* 合成されることを示唆するものと思われる。

水稲の乳熟期種子および発芽種子中にはそれぞれ高い debranching 酵素活性が存在する。一方完熟種子中には低い debranching 酵素活性しか認められないが、ある種の還元剤あるいは protease の作用により酵素活性が発現することがわかった^{115,119)}。このことは完熟種子中に不活性型 debranching 酵素が存在し、それが還元剤あるいは protease の作用で活性化されることを意味していると考えられ、さらに不活性型酵素と乳熟期種子および発芽種子中の活性型酵素の直接的な関連を予想させる結果である。

本章では完熟種子の不活性型 debranching 酵素について、乳熟期種子および発芽種子中の活性型酵素との関係を考慮しながら、その存在の意味等について検討する。

第1節 実験材料および方法

(1) 実験材料

実験に用いた水稲(梗種, 栽培品種「ユーカーラ」)の栽培は農林水産省北海道農業試験場(札幌市羊ヶ丘)土壌肥料第二部に依頼した。また放射性アミノ酸取込み実験には、北海道大学農学部農芸化学科作物栄養学講座に依頼し、同大学附属農場(札幌市北区)で栽培した梗種水稲(栽培品種「インカリ」)を使用した。

登熟中の種子の採取日は開花の開始日を0日として数えた。午前10時~11時に各株の主穂および第1分げつの穂のみを採取し、直ちにポリエチレン袋に入れドライアイス-アセトン混液中で凍結させ実験室に持ち帰り、 -20°C 以下で貯蔵した。酵素活性の測定には各種の上半分の籾から不稔粒を除いて供試材料とした。

発芽には 4°C で貯蔵した完熟種子を用いた。水稲種子(籾)を一夜流水中に浸漬したものを発芽0日目とした。腰高シャーレー(径10cm×高10cm)にろ紙を敷き、その上に0日目の籾を互に接触しないように並べ、籾がほぼ冠水するように脱塩水を加え、 26°C 、暗所で発芽させた。

完熟種子の酵素活性の測定に際しては籾殻を除き、また必要に応じて精白した米を用いた。玄米および精白米

の粉碎は1mmの篩をつけた Wiley 粉砕機を用いたが、粉碎の程度が酵素の抽出に影響したので、磁製乳鉢を用いて十分細粉としてから使用した。

(2) 試薬

酵素活性測定に用いたプルラン(分子量64,000)は林原生化学研究所製のものを購入した。

Papain (Sigma Chemical 社製, 25 mg protein/ml; 30 U/mg protein), α -chymotrypsin (Sigma Chemical 社製, 牛脾臓 Type II; 40 U/mg protein), trypsin (Merck 社製; 0.2 Anson U/g), グルタチオン (Sigma Chemical 社製), ジチオスレイトール(和光純薬製), および 1-(4-Chloromercuriphenylazo)-2-naphthol (マキユリオレンジ; 東京化成工業(株)製)はそれぞれ市販品を購入した。システインおよびアスコルビン酸は市販特級試薬を使用した。

高比放射能 L-[^{14}C] アミノ酸混液 (57 mCi/m Atom carbon; the Radiochemical Centre Ltd., Amersham, Eng.) は日本アイソトープ協会から購入した。

Debranching 酵素に対する兎抗血清は抗原として梗種水稲(栽培品種「ユーカーラ」)乳熟期種子の精製酵素を用い調製した(第1章)。

(3) 酵素活性の測定法

Debranching 酵素の活性はプルランを基質とし 25°C で反応させた時の還元糖の生成量を測定し、第1章1 Fig. 1 を用いて求め、pullulanase 活性として表わした。

水稲種子中の酵素活性量を測定するためには、試料50粒を5mlの0.1Mりん酸ナトリウム緩衝液(pH 7.2)と共に磁製乳鉢中で磨砕し、10,000×gで15分遠心分離して上澄を得た。ここで得た上澄の pullulanase 活性は、不活性型酵素の量と区別するために「実在活性」と呼んだ。

不活性型酵素の量を測定するためには、活性化剤としてジチオスレイトールを用いた。試料50粒を5mMジチオスレイトールを含む0.1Mりん酸ナトリウム緩衝液(pH 7.2)5mlと共に磨砕し、 4°C に24時間保った後遠心分離した。この上澄の pullulanase 活性を「総活性」と呼んだ。総活性と実在活性の差を「潜在活性」と名付け、これは不活性型酵素の量に相当するものとみなした。

(4) 放射能の測定

放射能は試料液1mlと、Triton X-100と0.4% 2,5-diphenyloxazole (OPO) および0.03% 1,4-bis-[2-(5-phenyloxazolyl)]-benzene (POPOP) を含むトルエンの1:3 (v/v) 混合液10mlを混合した後、アロカ社製液体シンチレーションカウンター LSC-502型により測定し

た。カウントは外部標準法により dpm に換算した。

(5) アミノ酸分析

精製酵素蛋白質のアミノ酸アナライザーによる分析は、科研薬化工(株)滋賀工場の木村新一氏に依頼した。

酵素を十分脱塩水に対して透析し、この際不溶性となり沈澱を生ずるが、そのまま凍結乾燥した。加水分解は 6 N 塩酸中 110°C で行なった。24 時間、48 時間、72 時間および 96 時間加水分解した後の試料の分析値からそれぞれのアミノ酸の最大値あるいは 0 時間に対する外挿値を求めた。

システイン—シスチンは過巰酸酸化の後システイン酸として分析した⁷⁷⁾。

トリプトファンはグアニジン溶液中での紫外外部吸収値から算出した¹⁶⁾。

アミド態窒素は試料に濃塩酸を加え、37°C に 14 日間保った後¹⁰⁶⁾、水を加えて減圧蒸溜することによって塩酸を除き、CONWAY 装置によるアンモニアの拡散を行なった⁸⁾。アンモニアの定量はニンヒドリン法によった³⁸⁾。

全窒素量はマイクロケルダール法で測定した。

(6) システインの定量

蛋白質中のシステイン量はマーキュリオレンジを用いて定量した⁸⁷⁾。

試料溶液 1 ml (蛋白質 1~2 mg) に 9 ml の塩酸アセトン (純アセトン 10 ml に濃塩酸 2 滴加える) を加え蛋白質を沈澱させた。これにりん酸緩衝液 (pH 7.0) 中でマーキュリオレンジを加え蛋白質と結合させた。吸着されない色素を純アセトンで除いた後、蛋白質と結合した色素を塩酸性アセトン 5 ml で溶出させた。470 nm の吸光度を測定し次式によって SH の量を求めた。

$$SH(\mu\text{mol}) = OD_{470} \times 0.272$$

色素を溶出させた後に残った沈澱を 0.1 N 水酸化ナトリウムに溶解させ、LOWRY らの方法⁵²⁾ で蛋白質量を測定し、蛋白質 1 mg 当りの SH (μmol) を算出した。

(7) 免疫電気泳動¹⁰⁷⁾

電極液にペロナール緩衝液 (pH 8.6, $\mu=0.05$) を用い、スライドガラス上で 1/2 稀釈した電極液中で固化させた 1.5% アガロース (同仁薬化学研究所製: アガロース I, ゲル強度 800 g/cm² 以上) ゲルを用い、スライドガラス 1 枚当り 6 mA で 1 時間電気泳動させた。泳動後抗血清を添加し、37°C で 24 時間拡散させた。沈澱しない蛋白質を生理食塩水中で 3 日間洗って除いた後、アミドブラック 10 B で蛋白質を染色した。

(8) L-[U-¹⁴C] アミノ酸の取込み

1979年 8 月 4 日に先端付近が丁度開花している穂に印

をつけ、16 日後および 23 日後 (8 月 20 日および 27 日) に穂を採取した。先端から 10 粒つけて穂を切り取り、L-[U-¹⁴C] アミノ酸混液 20 μl (0.05 mCi/ml) を入れた小試験管 (4×20 mm) に挿した。約 2 時間で完全に吸収するので、穂を 5 ml の滅菌水を入れた小三角フラスコに移し、直射日光の当たらない明所に置いた。L-[U-¹⁴C] アミノ酸混液を吸収し終わった直後 (0 日目), 1 日目, 3 日目, および 7 日目に穂から種子 (各 10 粒) を取り、籾殻を除去した後、1 ml の 0.1 M りん酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.2) と共にメノウ乳鉢中で磨砕し、10,000×g, 10 分遠心分離した。この上澄を活性型酵素液と呼んだ。沈澱に同じ緩衝液 1 ml を加え遠心分離して残存する活性型酵素を除いた。この操作を 4 回繰返した後、沈澱に最初に得られた活性型酵素液と同じ容量の 10 mM ジチオスレイトールを含む 0.1 M りん酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.2) を加えた。4°C に 24 時間保った後遠心分離して得た上澄を不活性型酵素液と呼んだ。

活性型酵素液および不活性型酵素液はそれぞれ一部を用い pullulanase 活性を測定し、残りを 50 ml の 0.06 M ペロナール緩衝液 (pH 8.6) に対して 4°C で 20 時間透析した。透析内液を 4000 rpm, 10 分間遠心分離し、上澄 0.2 ml を小試験管にとり、0.1 ml の兔抗血清を加えた。対照として抗血清の代わりに水 0.1 ml を加えたものを用いた。混合液を 4°C に 20 時間置いた後、4000 rpm, 10 分間遠心分離した。上澄の酵素活性を測定し、試料と対照の酵素活性の差を抗血清によって沈澱した酵素活性とした。沈澱は 0.2 ml の生理食塩水で 5 回遠心分離による洗浄を行なった。残った沈澱を 0.2 ml の水に懸濁させ、液体シンチレーションカウンターの測定容器に移した。小試験管はさらに 0.2 ml ずつの水で 4 回洗い、沈澱を完全に測定容器に移した。試料と対照の放射能の差を抗血清により沈澱した放射能とした。

L-[U-¹⁴C] アミノ酸を直接胚乳中に入れるためには採取した乳熟期種子の籾殻を除き注射器を用い 10 粒当り 20 μl の L-[U-¹⁴C] アミノ酸混液 (0.05 mCi/ml) を注入した。種子は湿った紙上に並べ、所定の日数を経過した後、アミノ酸混液を穂に吸収させた場合と同様に処理した。

第 2 節 実験結果および考察

1. 不活性型酵素の存在とその定量

水稻種子粉末 1 g に種々の濃度の protease (papain, 0.001~0.125 mg/ml; α -chymotrypsin, 0.0052~0.65 mg/ml; trypsin, 0.1~12.5 mg/ml) を含む 0.1 M りん

酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.2) 5 ml を加え、30°C に 15 時間保った後、上澄の pullulanase 活性を測定したところ、papain では 0.025 mg/ml, α -chymotrypsin では 0.13 mg/ml, trypsin では 2.5 mg/ml の時に pullulanase 活性が最大となった。この濃度における各 protease による活性化を経時的に調べ Fig. 20 に示した。Protease を含まない緩衝液 (0.1 M, pH 7.2) を用いた場合に比し、いずれの protease とのインキュベーションの結果も明らかに高い debranching 酵素活性の生成を示した。

Debranching 酵素活性はまた水稲種子粉末をジチオスレイトールを含む 0.1 M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.2) 中でインキュベーションした場合にも発現した。Debranching 酵素の最大活性を得るのに必要な反応時間と還元剤濃度を調べ Fig. 21 に示した。4°C のインキュベーションでは 24 時間以上、還元剤濃度 6 mM 以上

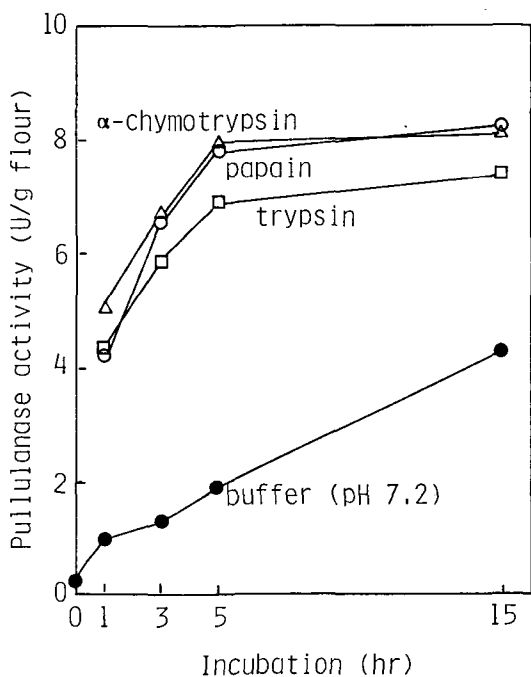


Fig. 20. Activation of debranching enzyme by protease.

Hulled rice flour (1g) was added to 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.2, 5 ml) or the same buffer containing one of the proteases (papain, 0.025 mg/ml; α -chymotrypsin, 0.13 mg/ml; trypsin, 2.5 mg/ml) and incubated at 30°C. After centrifugation, the resultant supernatant was assayed for pullulanase activity.

を要することがわかった。

水稲種子粉末中の debranching 酵素が protease によって活性化され、また protease とは全く作用の異なる試薬、還元剤によっても活性化されたことから、同一の不活性型酵素が両試薬によって活性化されるのか、あるいはそれぞれの試薬によって活性化される異なった酵素が存在するのかについて調べた。活性化剤としては protease は papain (0.025 mg/ml) を用い、還元剤は亜二チオン酸ナトリウム (10 mM) を用いた。それぞれ 0.1 M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.2) に溶解し、papain による活性化は 30°C で、亜二チオン酸ナトリウムでは 4°C でインキュベーションした。

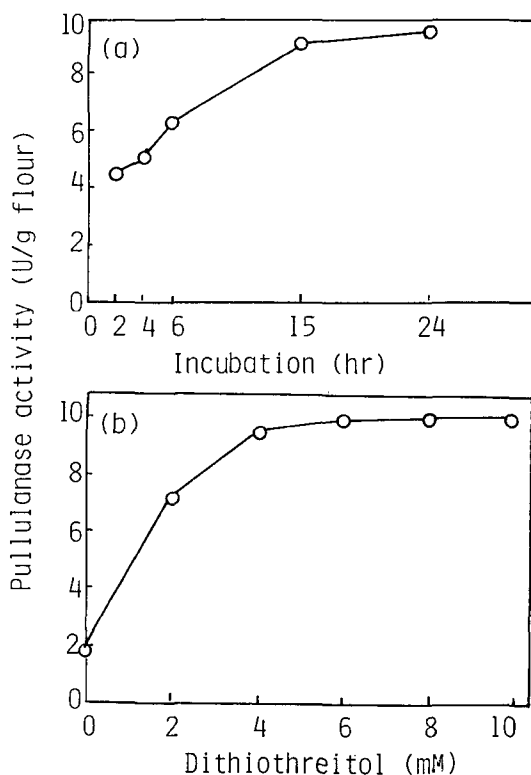


Fig. 21. Activation of debranching enzyme by dithiothreitol.

Hulled rice flour (1g) was added to 0.1 M sodium phosphate buffer containing dithiothreitol (pH 7.2, 5 ml) and incubated at 4°C. After centrifugation, the resultant supernatant was assayed for pullulanase activity.

(a) Activation by 5 mM dithiothreitol.

(b) Activation by dithiothreitol of various concentrations in 24-hr incubation.

水稲種子粉末 1g にそれぞれの活性化剤溶液を加え 5 ml に定容した。所定の時間 (Table 10) 保った後遠心分離し、上澄の酵素活性を測定した。この値は厳密にはそれぞれの活性化剤によって活性化された酵素活性と試料中に初めから存在する活性型酵素の活性との和であるが、後者は Fig. 20 に示した 0 時間の緩衝液による抽出時の酵素活性 (0.2 U/g flour) からみて無視出来る量である。沈澱に残存する活性化剤溶液およびそれに溶解している活性型酵素を除くために 0.1 M りん酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.2) 5 ml ずつで 6 回洗浄した。得られた沈澱に、papain を先に用いた場合は亜二チオン酸ナトリウム (亜二チオン酸ナトリウムの場合には papain) を 0.1 M りん酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.2) に溶解した液を加え 5 ml に定容し、4°C に 24 時間 (papain の場合は 30°C, 15 時間) 保った後遠心分離し、上澄の活性を測定した。第二回目の活性化は水稲種子粉末中の debranching 酵素に対するそれぞれの試薬による最大活性化条件なの

で、得られた値は第一回の活性化の後に沈澱中に残存する不活性型酵素の総量を示す。

Table 10 から次の結論が得られる。(1) Papain あるいは亜二チオン酸ナトリウムで十分活性化した (前者で 15 時間、後者で 24 時間) 後の沈澱には不活性型酵素の残存はほとんどない。(2) しかし不十分な活性化時間の後の沈澱には不活性型酵素が残存し、(3) その残存量と先の活性化で得られた酵素活性量との和はほぼ一定である。(4) さらに不十分な活性化によって不活性型酵素が残存する沈澱に対して、活性化剤を含まない緩衝液を加えた時は、上澄に僅かの活性が示されるのみで、酵素の活性化が使用した活性化剤の作用によって起っていることが示された。

Table 10 の実験とは別に 10 mM の亜二チオン酸ナトリウムと 0.025 mg/ml の papain を同時に含む緩衝液で 30°C, 15 時間の活性化を行なった結果は 9.34 U/g flour の活性が得られ、10 mM の亜二チオン酸ナトリウムのみ

Table 10. Activation of debranching enzyme by papain and dithionite

First activation		Second activation		Total
Incubation (hr)	Pullulanase activity (U/ml)	Incubation (hr)	Pullulanase activity (U/ml)	Pullulanase activity (U)
Papain (0.025 mg/ml) at 30°C		Dithionite (10 mM) at 4°C		
0.5	0.64	24	0.94	1.58
1	0.84	24	0.74	1.58
15	1.59	24	0.25	1.84
		Buffer at 4°C		
0.5	0.64	24	0.34	0.98
1	0.91	24	0.19	1.10
15	1.62	24	0.10	1.72
Dithionite (10mM) at 4°C		Papain (0.025 mg/ml) at 30°C		
1	1.10	15	0.89	1.99
3	1.28	15	0.87	2.15
24	1.94	15	0.31	2.25
		Buffer at 30°C		
1	1.10	15	0.34	1.44
3	1.26	15	0.32	1.58
24	1.94	15	0.22	2.16

After incubation of a mixture of hulled-rice flour(1g) and 0.1M sodium phosphate buffer containing the first activator (pH 7.2) (total vol., 5 ml), the mixture was centrifuged and the resultant supernatant solution assayed for pullulanase activity. The precipitate was washed six times with 0.1M sodium phosphate buffer (pH 7.2, 5 ml each), and the second activator, dissolved in the same buffer, was added to the precipitate until the total volume reached 5 ml. After incubation, the mixture was centrifuged and the resultant supernatant solution assayed for pullulanase activity.

の場合の 9.12 U/g flour と大差がなかった。

これらのことから papain および亜二チオン酸ナトリウムによる debranching 酵素の活性化は同一の不活性化型酵素に対する作用であると結論される。

Fig. 20 で debranching 酵素の活性化が 0.1 M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.2) のみとのインキュベーションによっても起ったことから、水稲種子粉末中には debranching 酵素を活性化させる内在的な系が存在することがわかる。Fig. 22 には精白米粉末を 0.1 M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.2), 10 mM 亜二チオン酸ナトリウムを含む同じ緩衝液、および 0.025 mg/ml papain を含む同じ緩衝液とそれぞれ 4°C および 30°C でインキュベーションした時の debranching 酵素活性の生成を示した。亜二チオン酸ナトリウムによる活性化は初期には 30°C の方が 4°C の時よりも速かであるが、24 時間のインキュベーションでは両者の差はほとんどなかった。一方 papain による活性化の速度は 30°C の時に比し 4°C では著しく低く、24 時間後の値は 50% にも満たなかった。種子に内在する系による活性化、すなわち緩

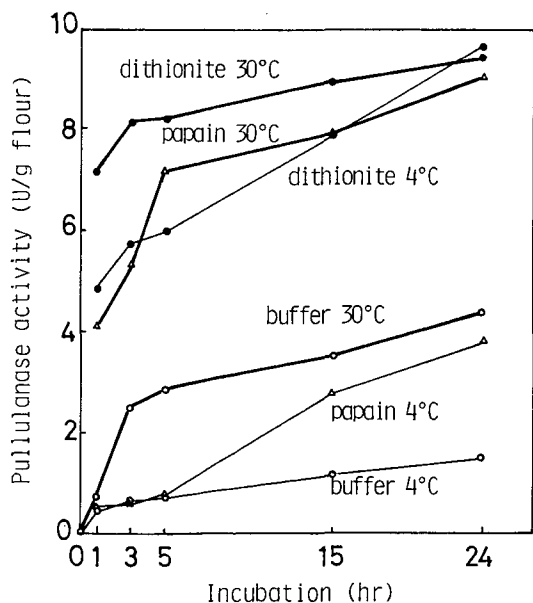


Fig. 22. Effect of temperature on activation of debranching enzyme.

A mixture of hulled rice flour (1 g) and 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.2, 5 ml) or the same buffer containing sodium dithionite (10 mM) or papain (0.025 mg/ml) was incubated at 4°C or at 30°C. After centrifugation, the resultant supernatant was assayed for pullulanase activity.

衝液のみを用いたインキュベーションでは亜二チオン酸ナトリウムおよび papain による活性化に比べて著しく低い値を示したが、30°C に対する 4°C の活性化速度の比較は papain の場合と類似し、4°C では著しく低かった。このことは種子に内在する debranching 酵素活性化系に酵素反応が関与している可能性を強く示唆している。

亜二チオン酸ナトリウムによる debranching 酵素の活性化が 4°C でも十分に進行することは、還元剤が種子中に内在する活性化系に作用して間接的に debranching 酵素の活性化を行なうという可能性を否定する結果であると考えられる。しかしこの点を明確にするために水稲種子粉末 5 g に 10 mM 亜二チオン酸ナトリウムを含む 0.1 M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.2) 25 ml を加え 4°C に 24 時間インキュベーションして得た上澄 (20 ml) を 0.1 M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.2) に対して透析した (200 ml, 5 回)。透析内液 5 ml を新たにとった水稲種子粉末 1 g に加え 30°C に 15 時間保った。このインキュベーションの後の上澄の debranching 酵素活性は透析内液それ自身のもつ debranching 酵素活性と水稲種子粉末を 0.1 M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.2) とインキュベーション (30°C, 15 時間) した後の酵素活性との和より低かった。したがって亜二チオン酸ナトリウムが種子中の内在酵素を活性化し、それが debranching 酵素を活性化するという可能性は少なく、還元剤は直接 debranching 酵素の活性化を行なうものと考えられる。

水稲種子粉末 (1 g) を MCLVAINE 緩衝液 (pH 5.6, 5 ml) 中で 0.1% プルランと 25°C で振とうしながら 10 分間反応させ、上澄の還元力を測定したところ 0.15 μmol の還元糖に相当する還元力を生じた。この値は 0.75 U/g flour に相当し、活性化剤による活性化後の活性、約 10 U/g flour に比し無視できるものである。また Table 10 からもわかるように不活性化型酵素は沈澱中に残存するから、水稲種子粉末中には不活性化で不溶性の debranching 酵素が存在し、これが endo-peptidase あるいはある種の還元剤の作用によって可溶性の活性化型酵素に変わるものと結論される。

II. 登熟時および発芽時の酵素活性変化

水稲完熟種子中には不活性化型 debranching 酵素が存在し、endo-peptidase あるいはある種の還元剤の作用によりそれが活性化され可溶性化されることがわかった。両試薬は同一の不活性化型酵素に作用するので、種子中に存在する不活性化型酵素の量 (潜在的 debranching 酵素活性) を測定するにはどちらか一方の試薬により活性化を行なえばよい。Protease による活性化は 30°C, 15 時間

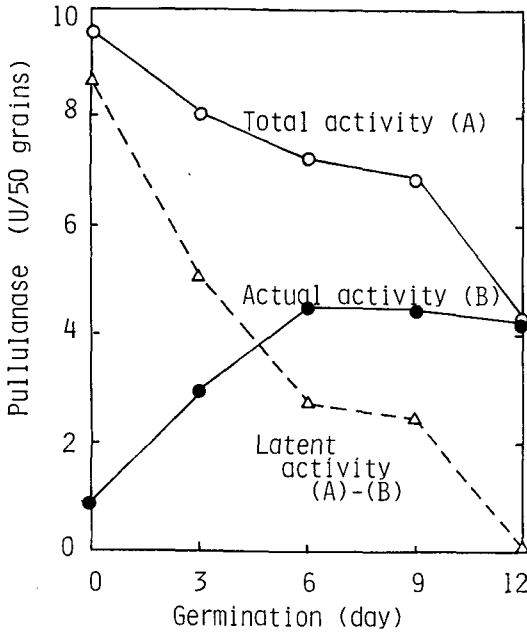


Fig. 23. Pullulanase activity in rice seeds during germination (non-glutinous, cult. var. "Yukara").

Total activity: Germinating rice seeds (50 grains) were homogenized with 0.1M sodium phosphate buffer containing 5 mM dithiothreitol (pH 7.2, 5 ml) and incubated at 4°C for 24 hr. After centrifugation, the resultant supernatant was assayed for pullulanase activity.

Actual activity: Germinating rice seeds (50 grains) were homogenized with 0.1M sodium phosphate buffer (pH 7.2, 5 ml). After centrifugation, the resultant supernatant was assayed for pullulanase activity.

Latent activity: Difference between total and actual activity.

のインキュベーションがよい結果を与え、還元剤による活性化は 30°C でも 4°C でも可能であった。インキュベーション中に他の反応が起る可能性を最小限にするために、以下の実験ではジチオスレイトールを活性化剤として用い、4°C, 24 時間のインキュベーションを行なうことにした。

Fig. 23 には水稲種子の発芽の際の debranching 酵素の活性を示した。この発芽条件での pullulanase の最大活性 (実在活性) は発芽 6~9 日目に得られた。一方総活性と実在活性の差として定義される潜在活性は 6 日目までに急速に減少した。この結果は潜在活性として示される不活性型の debranching 酵素が未発芽種子中に

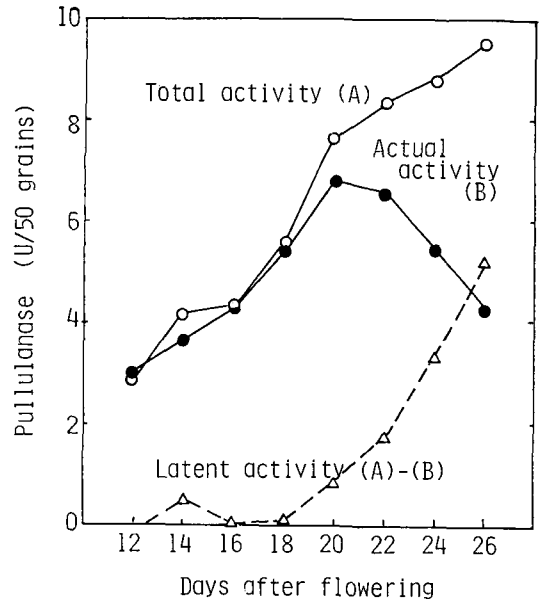


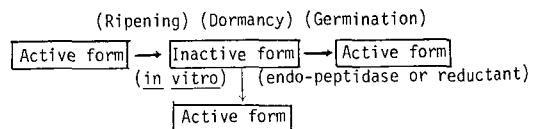
Fig. 24. Pullulanase activity in rice seeds during ripening (non-glutinous, cult. var. "Yukara").

For the expression of the activities, see Fig. 23.

存在し、発芽に伴って活性型酵素に変化することを示唆している。

Fig. 24 には水稲種子の登熟時の debranching 酵素の活性を示した。登熟時の種子中の pullulanase 活性 (実在活性) は開花後 20 日目まで増加し以後減少した。しかし総活性は 20 日目以後も増加し続け、潜在活性は開花後 20 日目から急速に出現した。したがって登熟中の水稲種子中では開花後 20 日目頃から不活性型の debranching 酵素の蓄積が始まり、実在活性の減少と潜在活性の増加の時期が一致することから、活性型酵素が不活性型酵素に変化して蓄積されるものと推論される。

水稲種子の debranching 酵素は種子の登熟中に活性型酵素として合成され、登熟が進むにつれて不活性型の酵素に変化して蓄積される。発芽の際には不活性型酵素が再び活性型酵素に変化する。このような仮説を図示すると次のようになる。



Scheme 3. Conversion of debranching enzyme between active and inactive forms.

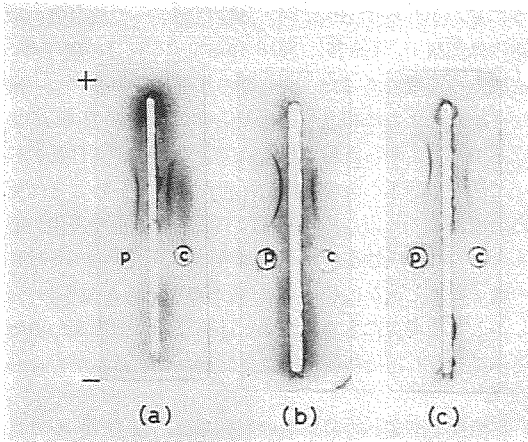


Fig. 25. Immuno-electrophoretic analysis of rice debranching-enzymes.

Enzyme proteins were electrophoretically run for 60 min at 6 mA per an agarose plate (veronal buffer, pH 8.6, $\mu=0.05$). After immunodiffusion at 30°C for 24 hr, the proteins were located visually with Amido Black 10 B.

(a) Immature-seed enzyme, (b) mature-seed enzyme after dithiothreitol activation, (c) germinated-seed enzyme. p: Spotting position of the purified enzyme, c: that of the crude extract.

この仮説が正しいとすれば3種の活性型酵素蛋白質は互に同一であるか、少なくとも非常によく類似したものになることが予想される。第1章で述べたように乳熟期種子、発芽種子、および完熟種子から得た精製 debranching 酵素は蛋白質の性質がよく一致した。特に免疫学的同一性はこれらの蛋白質の起源が同じであることを示すものと思われる。Fig. 25 には3種の精製 debranching 酵素とそれぞれの粗抽出液をアガロースゲル上で電気泳動させた後、抗血清との沈澱反応を起させた結果を示した。いずれの粗抽出液中にも抗血清と反応する蛋白質は1種のみ見出され、それは精製酵素と移動距離が一致した。また3種の酵素の間に差は認められなかった。完熟種子から還元剤処理によって抽出された粗抽出液中に抗血清と反応する蛋白質が1種のみ見出されたことは、この蛋白質が乳熟期種子の活性型酵素から生成した蛋白質であり、この蛋白質が発芽種子の活性型酵素に変化する可能性を強く支持する結果である。

III. 乳熟期種子中での酵素の生成

乳熟期種子中での活性型 debranching 酵素から不活性型酵素への変化を直接明らかにする目的で、L-[U-¹⁴C] アミノ酸混液を種子中に吸収させ、両酵素への放射能の

取込みを調べた。

L-[U-¹⁴C] アミノ酸を取込んだ酵素蛋白質を特異的に分離するために精製酵素を抗原として調製した兎の抗血清を用いる沈澱反応を利用した。抗血清の必要量を決めるために種々の量の酵素を含む精製 debranching 酵素溶液 0.1 ml と 0.06 M ベロナール緩衝液 (pH 8.6) 0.1 ml から成る混合液に種々の量の抗血清と水を加えて合計 0.3 ml とした。この混合液を 4°C に 20 時間保った後 4000 rpm で 10 分間遠心分離し、上澄の残存酵素活性を測った結果、0.280 U の酵素は 0.06 ml の抗血清で完全に沈澱し、0.1 ml の抗血清を用いると 0.056~0.56 U の酵素がほぼ完全に沈澱した (Table 11)。したがって以下の実験には debranching 酵素を沈澱させるために 0.1 ml の抗血清を用いた。

試料には活性型酵素の合成の盛んな開花後 16 日目のもの、および活性型酵素が減少し不活性型酵素が増加している 23 日目のものを用いた。種子 10 粒中の抗血清で沈澱した放射能 (R) は次式により算出した。

$$R = \frac{r-r_0}{e_0-e} \times E$$

ここで r , r_0 はそれぞれ抗血清を加えた場合および加えない場合の沈澱中の放射能を示し、したがって $(r-r_0)$ は抗血清によって沈澱した蛋白質中の放射能である。 E は抽出液の一部を用いて測定した debranching 酵素活性から算出した種子 10 粒当たりの酵素活性、 e_0 , e はそれぞれ抗血清を加えない場合および加えた場合の上澄の

Table 11. Precipitation of debranching enzyme with antiserum

Debranching enzyme (U)	Antiserum (ml)	Residual enzyme activity (%)
0.28	0.02	68.0
0.28	0.04	10.6
0.28	0.06	3.0
0.56	0.1	3.1
0.28	0.1	2.0
0.168	0.1	2.9
0.112	0.1	2.9
0.056	0.1	1.8

The purified debranching-enzyme obtained from immature-seeds was allowed to precipitate immunologically with antiserum at pH 8.6. After standing at 4°C for 20 hr, residual enzyme-activity in the supernatant was assayed.

debranching 酵素活性を示し、したがって $(e_0 - e)$ は抗血清によって沈澱した酵素活性を表わす。 $(r - r_0)/(e_0 - e)$ は抗血清によって沈澱した酵素活性 (U) 当りの抗血清によって沈澱した放射能 (dpm) となるので、この値に種子 10 粒中の酵素活性 E を乗ずることにより、種子 10 粒中に含まれる debranching 酵素中の放射能が算出される。

Table 12 の結果は L-[U- 14 C] アミノ酸の吸収後速かに (1 日目) 放射能が活性型酵素蛋白質中に取込まれたことを示している。開花後 16 日目の種子では活性型酵素への放射能の取込みは 3 日目まで直線的に進み、3 日目で 2143 dpm となり、その後減少して 7 日目で 1312 dpm となった。Fig. 24 からわかるように開花後 16 日目の種子では活性型酵素が急速に増加し、3 日後 (19 日目) までの活性の増加はほぼ直線的であって、放射能の取込みが直線的に進むのとよく一致する。この時期には不活性型酵素はほとんど存在せず、放射能の取込みも 1 日後には認められないが、その後は不活性型酵素の蓄積が始まり、放射能も徐々に不活性型酵素中へ取込まれた。活性型酵素中の放射能が減少した 3 日後から 7 日後の間にも不活性型酵素への取込みは続き、L-[U- 14 C] アミノ酸の取込みが活性型酵素で先に起り、後不活性型酵素で起ることが示された。

開花後 23 日目の種子ではさらに興味ある結果が得られた。この時期の種子では活性型酵素の量が減少してい

るにもかかわらず (Fig. 24)、活性型酵素への放射能の取込みは急激で、1 日後に 3816 dpm と 16 日目の種子の 5 倍以上の速度であった。両時期の水稲種子中のアミノ酸プールの大きさに相違があり 14 C-アミノ酸の稀釈が異なるであろうから直接の比較はできないが、23 日目の種子で活性型酵素の合成が盛んに行なわれていることは明らかである。一方この時期には不活性型酵素の蓄積が盛んであり、不活性型酵素への放射能の取込みも 16 日目の種子に比し速かに起り、1 日後から取込みが見られた。しかしこの場合にも放射能の取込みは活性型酵素への取込みが先行し、その後不活性型酵素への取込みが行なわれた。

不活性型酵素への放射能の取込みは、開花後 16 日目の種子においても 23 日目の種子においても誘導期が存在するように見える。したがって不活性型酵素への L-[U- 14 C] アミノ酸の取込みは直接的に行なわれるのではなく、L-[U- 14 C] を含む中間生成物が生じ、それが不活性型酵素へ変化するものと考えられる。中間生成物は恐らく 1 種の蛋白質であろうが、それが活性型酵素であると考えるのが最も確からしいように思われる。すなわち L-[U- 14 C] アミノ酸取込み実験では不活性型酵素への放射能の取込みに先立ち活性型酵素への取込みが認められた。活性型酵素中の放射能の減少と不活性型酵素中での増加の時期はほぼ一致した。開花後 23 日目の種子では総活性は増加しているが、これは不活性型酵素の増

Table 12. Incorporation of radioactivity into debranching enzymes

Days after absorption of [14 C] amino acids	Active enzyme		Inactive enzyme	
	Enzyme activity (U)	Radio-activity (dpm)	Enzyme activity (U)	Radio-activity (dpm)
The 16-day-old seeds				
0	1.46	183	0.12	30
1	0.92	703	0.37	0
3	0.60	2143	0.39	327
7	0.37	1312	0.43	717
The 23-day-old seeds				
0	1.15	145	0.48	23
1	0.71	3816	0.62	148
3	0.43	1453	0.71	914
7	0.39	617	0.75	2476

Twenty μ l of L-[U- 14 C] amino acid mixture (0.05 mCi/ml) was allowed to absorb into an ear bearing 10 rice-seeds on the 16th and 23rd days after flowering and to stand in the light for 0 to 7 days. Methods for the other experiments are given in Materials and Methods. Average values of duplicate experiments are given except for 0 day after the treatment.

Table 13. Incorporation of radioactive amino acids into debranching enzymes after injection into rice endosperm

Days after injection of [¹⁴ C] amino acids	Active enzyme		Inactive enzyme	
	Enzyme activity (U)	Radio-activity (dpm)	Enzyme activity (U)	Radio-activity (dpm)
0	1.11	370	0.46	62
1	0.59	2427	0.52	296
3	0.46	4583	0.72	823
7	0.42	2609	0.66	976

Twenty μl of L-[U-¹⁴C] amino acid mixture (0.05 mCi/ml) was injected into endosperm of 10 rice-seeds on the 23rd day after flowering. Details for the experiments, see Materials and Methods. Average values of duplicate experiments are given.

加によるもので活性型酵素は減少している。不活性型酵素がアミノ酸から直接合成されるならば、この時期には活性型酵素の合成は必要ではないように思われる。しかし16日目の種子よりも速かな活性型酵素の合成が認められた。

これらの結果と乳熟期種子の debranching 酵素と完熟種子の酵素とが蛋白質的に類似し、免疫的にも両蛋白質が一致することから、水稲種子中では debranching 酵素は活性型酵素として合成され、乳熟後期以後不活性型酵素に変化して完熟種子に蓄積されるものと結論した。

完熟種子中の不活性型 debranching 酵素は主に胚乳中に存在する(後述, Table 16)。活性型酵素は胚乳中で合成されそのまま不活性型となって蓄積するのか、あるいは糊粉層などの胚乳以外の組織で合成された後胚乳中に分泌され、そこで不活性型になるのかを明らかにするために、開花後23日目の乳熟期種子の胚乳中にL-[U-¹⁴C]アミノ酸混液を注入し、活性型および不活性型 debranching 酵素への放射能の取込みを調べた (Table 13)。その結果穂から吸取させた場合 (Table 12) に比べて活性型酵素への放射能の取込みが速かで、酵素の合成が胚乳中で行なわれることがわかった。

IV. 不活性型酵素の活性化

大麦では β -amylase が zymogen として存在し papain およびメルカプトエタノールにより活性化されると報告されている^{79,91)}。水稲種子の β -amylase についても同様の報告がある^{69,92)}。

Debranching 酵素については papain 処理により "Amylosynthase" の活性が増加するという古い報告^{74,75)} と、豌豆種子中の不活性型酵素が protease で活

性化されるという報告⁹⁰⁾ があるが詳細な研究はなされなかった。

前述したように水稲完熟種子中には不活性で不溶性の debranching 酵素が存在し、これは papain, α -chymotrypsin, および trypsin によって活性化された。Fig. 20 に示したようにこれらの endo-peptidase による活性化に誘導期が認められないことから、これらの endo-peptidase は不活性型 debranching 酵素蛋白質に直接作用して、可溶性の活性型酵素を遊離するものと思われる。

水稲完熟種子中の不活性型 debranching 酵素はまたジチオスレイトールによっても活性化され、可溶性酵素として遊離された。ジチオスレイトールはスルフヒドリル基をもった試薬であり、その作用はジスルフィド結合の切断である。Table 14 にはジスルフィド結合を切断する試薬とその他の二、三の還元剤による水稲種子粉末中の不活性型 debranching 酵素の活性化を示した。

システイン、ジチオスレイトール、メルカプトエタノール、およびグルタチオンはスルフヒドリル基をもち、いずれも不活性型酵素の活性化を行なった。亜二チオン酸ナトリウムにも活性化能があり、この試薬もジスルフィド結合の切断を行なう。水素化硼素ナトリウムは pH 7.2 では不安定なので水溶液 (pH > 10) として用いて活性化を行ない、遠心分離の直前に 5 ml の 0.1 M りん酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.2) を加えた。活性化の時の pH は酵素の安定性には不適当であるにもかかわらず、他の活性化剤の場合より程度は低かったが、水素化硼素ナトリウムによっても活性化された。亜硝酸ナトリウムとアスコルビン酸には活性化能はなかった。

亜二チオン酸ナトリウムの活性化能が高かったので、種々の硫黄酸化物のナトリウム塩の活性化能を比較した

Table 14. Activation of debranching enzyme by reductants

Reductant	Pullulanase activity (U/g flour)	Reductant	Pullulanase activity (U/g flour)
Control (0.1 M buffer)	1.76	Sodium sulfite	9.42
L-Cysteine	9.85	Sodium dithionite	9.77
1,4-Dithiothreitol	9.55	Sodium borohydride*	5.91
2-Mercaptoethanol	9.16	Sodium nitrite	0.17
Glutathione	7.39	Ascorbic acid	0

Hulled-rice flour (1 g) was added to 0.1 M sodium phosphate buffer containing 10 mM reductant (pH 7.2, 5 ml), and incubated at 4°C for 24 hr. After centrifugation, the resultant supernatant solution was assayed for pullulanase activity.

* Sodium phosphate buffer (0.1 M, pH 7.2) was added after activation with an aqueous solution of sodium borohydride.

Table 15. Activation of debranching enzyme by several sulfur compounds

Reagent	Pullulanase activity (U/g flour)
Na ₂ S ₂ O ₃	4.19
Na ₂ S ₂ O ₄	9.75
Na ₂ S ₂ O ₅	9.63
Na ₂ SO ₃	9.42
Na ₂ SO ₄	1.03
Control (buffer only)	1.50

One of the reagents (10 mM) in sodium phosphate buffer (0.1 M, pH 7.2, 5 ml) was added to rice flour (1 g) and allowed to stand at 4°C for 24 hr. After centrifugation, the resultant supernatant was assayed for pullulanase activity.

(Table 15). 不活性型酵素は主として胚乳中に存在した (Table 16) ので Table 15 では精白米を用いた。還元性のない硫酸ナトリウムを除く全ての試薬が精白米中の debranching 酵素を活性化したが、チオ硫酸ナトリウムの活性化能はやや低かった。

不活性型酵素がスルフヒドリル基をもつ化合物、亜硫酸塩とその関連化合物、および水素化硼素ナトリウムによって活性化されることは、活性化の機構にジスフィド結合の切断が関与していることを示している。そこで完熟種子から亜二チオン酸ナトリウムによって活性化した後得た精製 debranching 酵素 (第1章) を用い、酵素蛋白質のアミノ酸組成およびシステイン含量を調べた。

十分脱塩水に対して透析した試料を凍結乾燥して分析に供した。凍結乾燥試料の水分含量は12.21%であった。ミクロケルダール法による分析の結果乾物重量当り窒素

Table 16. Distribution of debranching enzyme in rice grains

Polishing (%)*	Pullulanase activity		
	U/g flour	U/mg protein**	U/grain
0***	9.1	0.55	0.20
10.46	9.6	0.79	0.19
15.32	8.7	1.15	0.16

Pullulanase activity was measured after the incubation of rice flour (1 g) with 0.1 M sodium phosphate buffer containing 10 mM sodium dithionite (pH 7.2, 5 ml) at 4°C for 24 hr.

$$* \text{ Polishing } (\%) = \left[1 - \frac{\text{Weight of polished rice (100 grains)}}{\text{Weight of hulled rice (100 grains)}} \right] \times 100.$$

** Protien in supernatant obtained after the incubation.

*** Hulled rice grains.

17.27%であった。LOWRY らの方法⁵²⁾による呈色を酵素の精製段階で標準蛋白質として使用した牛血清アルブミンの呈色と比較すると、同じ呈色値を示す牛血清アルブミンの重量100に対して精製 debranching 酵素の重量は108.7となった。

精製酵素のアミノ酸分析の結果を Table 17 に示した。酸性の強いアスパラギン酸の含量が高いことがこの酵素蛋白質の等電点を著しく酸性 (pI=3.4; 第1章) にしていると思われる。過燐酸酸化の後の分析で、ハーフシスチン含量は酵素 1 mol (分子量 70,000 として) 当り 6.5 mol となった。

マーキュリオレンジを用いて測定したスルフヒドリル

Table 17. Amino acid composition of rice debranching-enzyme

Amino acid	m mol/g N	mol/mol*
Asp	7.15	86.4
Thr	2.49	29.9
Ser	4.63	56.0
Glu	4.48	54.2
Ala	3.89	47.0
Cys acid**	0.54	6.5
Val	4.05	49.0
Met	0.75	9.1
Ile	2.84	34.3
Leu	4.51	54.5
Tyr	2.45	29.6
Phe	2.87	34.7
Trp***	0.75	9.1
Lys	2.42	29.3
His	1.54	18.6
Arg	3.03	36.6
Pro	2.77	33.5
Amide N****	4.00	48.4

* Calculated from the estimated molecular weight (70,000).

** Analyzed after performic acid oxidation.⁽⁷⁷⁾

*** Calculated from the UV-absorbances.⁽⁶⁵⁾

**** Ammonia-N liberated by 12 N hydrochloric acid at 37°C for 14 days.⁽⁶⁶⁾

基の含量を Table 18 に示した。この方法の信頼性を確かめるために市販品の入手が容易でこれまでに測定値の報告の多い牛血清アルブミンのスルフヒドリル基含量も測定した。その結果 0.67 mol SH/mol 蛋白質 (分子量 67,000 として) という値が得られたが、この値はこの方法について検討した SAKAI⁽⁸⁷⁾ の牛血清アルブミンに対する値 0.70~0.72 mol/mol に近かった。マーキュリオレンジを用いる方法以外の方法によって測定した牛血清アルブミンのスルフヒドリル基含量についての文献値 (mol/mol) と使用した試薬を挙げると、0.43⁽⁵¹⁾ (N-ethylmaleimide), 0.62~0.69⁽³⁷⁾ (p-chloromercuribenzoate), 0.65⁽²⁴⁾ (6,6'-dithiodipicolinic acid), 0.672⁽²³⁾ (2,2'-dithiodipyridine), 0.687⁽²³⁾ (4,4'-dithiodipyridine) となり、今回のマーキュリオレンジによる測定値とよく一致している。

亜二チオン酸ナトリウムによる活性化後に得た水稲の精製 debranching 酵素および乳熟期種子の精製 de-

Table 18. SH Contents of rice debranching-enzyme

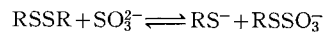
Protein	μmol/mg protein	mol/mol protein
Dithionite-activated enzyme	0.0459	3.21*
Immature-seed enzyme	0.0454	3.18*
Bovine serum albumin	0.0100	0.67**

Average of duplicate experiment.

* and **: Calculated from the molecular weight 70,000 and 67,000, respectively.

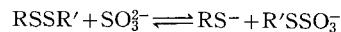
branching 酵素のスルフヒドリル基含量は共に約 3.2 mol/mol (分子量 70,000 として) であった。

亜硫酸塩によるジスルフィド結合の切断は



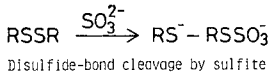
のように示される⁷⁰⁾。亜二チオン酸ナトリウムも同様であろう。不活性型酵素が亜二チオン酸ナトリウムによって活性化される時、不活性型酵素蛋白質の分子内ジスルフィド結合の切断が起こると仮定すると、生成したシステイン残基の半分は SH 化合物となり残りの半分は SSO₃⁻ 誘導体となる。一方天然の酵素、すなわち乳熟期種子から得た酵素は通常 SSO₃⁻ のような型はとらないものと思われる。両者のスルフヒドリル基含量が共に約 3.2 mol/mol であったことは上記の仮定、すなわち亜二チオン酸ナトリウムによる活性化が分子内ジスルフィド結合の切断によるという仮定が正しくないことを示している [Scheme 4 (a)]。

2 分子の debranching 酵素の間でジスルフィド結合を作って不活性型となっていたとしても結果は同じことである [Scheme 4 (b)]。したがって完熟種子中の不活性型酵素は酵素以外の蛋白質とジスルフィド結合して不溶性になっているものと思われる [Scheme 4 (c)]。この場合の亜硫酸塩による反応は

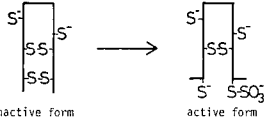


で示されるが、RSSO₃⁻ と R'SSO₃⁻ の一方の生成に優先性がなければ、やはり生成した酵素蛋白質のシステイン残基の半分は SH 化合物となり残り半分は SSO₃⁻ 誘導体となる。しかし非対称性の 15 種の RSSR' 化合物を用いたジスルフィド結合開裂実験の結果は 12 種まで優先的に一方の側の S に置換が起こった⁹⁹⁾。したがって酵素の活性化の際に非酵素側蛋白質に優先的に置換が起ることはあり得ることであり、そのように考えると実験結果と一致する。

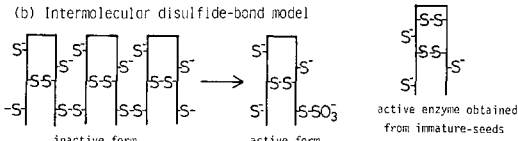
水稲完熟種子中の不活性型 debranching 酵素は不溶



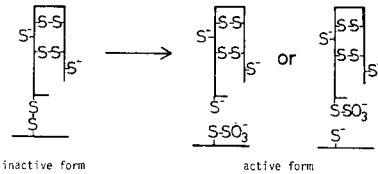
(a) Intramolecular disulfide-bond model



(b) Intermolecular disulfide-bond model



(c) Insoluble-protein binding model

**Scheme 4.** Activation of debranching enzyme by sulfite.

性の型で存在し、還元剤によるジスルフィド結合の開裂あるいは endo-peptidase によるペプチド結合の開裂によって容易に可溶性の活性型酵素となる。Endo-peptidase による活性化はジスルフィド結合の切断とは考えられないので、酵素以外の蛋白質とジスルフィド結合して不活性、不溶性の酵素として存在する不活性型酵素蛋白質分子のペプチド結合の一つ——恐らくはジスルフィド結合の近くの——が切断されることによって可溶性の活性型酵素を生ずるものであろう。

第3節 要 約

1. 水稲種子粉末に endo-peptidase あるいはジチオスレートルを作用させた時、debranching 酵素活性の発現が認められ、不活性型酵素の存在が明らかにされた。
2. Endo-peptidase および還元剤は同一の不活性型酵素に作用した。種子中の不活性型酵素の定量法としてジチオスレートルを用い、4°C、24時間のインキュベーションが適当であると結論した。
3. 水稲発芽種子中の活性型および不活性型 debranching 酵素を定量し、発芽の際に不活性型酵素が活性型酵素に変ることを推定した。
4. 水稲登熟時の種子中の debranching 酵素活性を調べ、活性型酵素は開花後20日目まで増加し以後減少

し、不活性型酵素は20日目以後増加し、両者の和は20日目以後も増加し続けることから、活性型酵素が不活性型酵素に変化するものと推定した。

5. 乳熟期水稲種子中での活性型酵素から不活性型酵素への変化を L-[U-¹⁴C] アミノ酸取込み実験により直接調べた。放射能ははじめ活性型酵素に取込まれ、活性型酵素の放射能の減少に伴って不活性型酵素中の放射能が増加した。種子中の活性型酵素量が減少している開花23日目の種子で、活性型酵素への放射能の取込みが速かであった。

これらの結果から乳熟期種子中で debranching 酵素は活性型酵素として合成され、不活性型に変化して完熟種子中に蓄積されると結論した。

6. 還元剤による不活性型酵素の活性化を調べた結果、スルフヒドリル基をもつ化合物、亜硫酸塩とその関連化合物、および水素化硼素ナトリウムが活性化能を示した。これらの試薬の作用の共通性から、活性化にはジスルフィド結合の開裂が関与することがわかった。

7. 精白米から亜二チオン酸ナトリウムで活性化した後得られた精製 debranching 酵素のアミノ酸分析を行なったところ、アスパラギン酸が多かった。過燐酸化法によるハーフシスチン含量は6.5 mol/mol (分子量70,000として)であった。

8. マーキュリオレンジを用いる方法でスルフヒドリル基含量を調べた。亜二チオン酸ナトリウムで活性化して得た酵素、乳熟期種子から得た天然の debranching 酵素共に約3.2 mol SH/mol (分子量70,000として)であった。

この結果から不活性型酵素は酵素以外の蛋白質とジスルフィド結合して不溶性、不活性の型で存在しているものと推定した。

第4章 総合論議

I. 酵素の精製について

高等植物の debranching 酵素はこれまで十分に精製された例が少ない。その名称も研究者によって種々異なる名称が用いられているばかりではなく、異なる名称で呼ばれる酵素が酵素の分類上同じ種類の酵素に属するのか、異なる酵素として分類されるのかさえ明らかでない。Table 19 には基質特異性が示されている高等植物の debranching 酵素についての報告を列挙した。Isoamylase と呼ばれる酵素はグリコーゲンに作用しプルランに作用しない点で明らかに他の酵素とは基質特異性を異にする。MACWILLIAM ら⁵³⁾ および MANNERS ら^{55,62)}

Table 19. Substrate specificities of higher plant debranching-enzymes

		Amylo- pectin	Amylo- pectin β - dextrin	Gly- cogen	Pullulan	α - dextrin	Specific activity (U/mg)	Purifi- cation (fold)	Literature
Amylosynthase	potato	+							72) MINAGAWA (1932)
	rice	+							
	rice	+							75) MIYAKE <i>et al.</i> (1936)
R-Enzyme	potato	+	+	-*					34) HOBSON <i>et al.</i> (1951) 85) and *PEAT <i>et al.</i> (1954)
	broad bean	+	+	-*					
	malt	+	+			-			53) MACWILLIAM <i>et al.</i> (1959)
	malt	+		-	-	-			55) MANNERS <i>et al.</i> (1966)
	sweet corn	+		-	-	-			57) MANNERS <i>et al.</i> (1969)
	potato	+	+	-	+				13) DRUMOND <i>et al.</i> (1970)
	malt	+			+		10.0	1000	54) MAEDA <i>et al.</i> (1978)
Limit dextrinase	malt	-				+			53) MACWILLIAM <i>et al.</i> (1959)
	malt	-			+	+			62) MANNERS <i>et al.</i> (1971)
	oats	+	+	-	+	+	0.8	400	15) DUNN <i>et al.</i> (1975)
	rice	+	+	-	+	+	0.6	15	
	broad bean	\pm	+	-	+	+	1.04	800	22) GORDON <i>et al.</i> (1975)
	malted sorghum	\pm	+	-	+	+	1.08	37	29) HARDIE <i>et al.</i> (1976)
	peas	+	+	-	+	+	1.08	2700	123) YELLOWLEES (1980)
Pullulanase	sweet corn	+	+	-	+	+	6.45	3800	49) LEE <i>et al.</i> (1971)
Isoamylase	sweet corn	+		+	-	-			57) MANNERS <i>et al.</i> (1969)
	potato	+	+	+	-				36) ISHIZAKI <i>et al.</i> (1978)
Debranching enzyme	rice (immature)	+	+	-	+	+	20	100	113) YAMADA <i>et al.</i> (1979)
	rice (germinated)	+	+	-	+	+	13	79	117) YAMADA <i>et al.</i> (1980)
	rice (dithionite-activated)	+	+	-	+	+	29.8	26	122) YAMADA (1981)
	oats (dithionite-activated)	+	+	-	+	+	16.8	420	121) YAMADA (1981)

は麦芽からアミロペクチンには作用するが α -限界デキストリンやプルランには作用しない R-酵素とアミロペクチンには作用せず α -限界デキストリンやプルランに作用する limit dextrinase を得ており、MANNERS ら⁵⁷⁾ はスイートコーンからもアミロペクチンに作用し α -限界デキストリンとプルランに作用しない R-酵素を得ている。しかしながら MAEDA ら⁵⁴⁾ が麦芽から得た高度に精製した R-酵素はアミロペクチンにもプルランにも作用し、LEE ら⁴⁹⁾ がスイートコーンから得た pullulanase もアミロペクチンとプルランの両者に作用した。したがってアミロペクチンに作用してプルランに作用しない debranching 酵素、およびその逆の基質特異性をもつ酵素の存在については再検討の必要があろう。

Debranching 酵素に関する初期の研究では酵素活性はアミロペクチンのヨード呈色の増加によって測定した。そのため基質および測定条件の相違により、異なる研究者の得た酵素の精製の程度を比較することができず、また精製酵素の比活性の表示のない場合が多い。高等植物の debranching 酵素がプルランを分解することがわかってから酵素活性測定の基質としてプルランが用いられるようになり^{49,59)}、異なった材料から得た酵素の比活性の比較が可能となった。

Table 19 に示したように一、二の例外を除いて精製酵素の比活性は約 1 pullulanase U/mg 蛋白質であり、これを今回得られた水稻種子の酵素の比活性と比較すると、これまでの報告にある精製酵素の多くのものは精製が不十分であったと考えられる。しかし各精製酵素の比活性を粗抽出液の比活性と比較すると一、二の例外を除いて精製の程度は 400~3,800 倍と非常に高い。白米から亜二チオン酸ナトリウムによる活性化後に得られた精製酵素の比活性は 29.8 pullulanase U/mg 蛋白質で、これまでに報告されている高等植物の debranching 酵素のうちでは最も高い値となったが、精製酵素は粗抽出液に対してわずか 26 倍の精製に過ぎなかった。これは白米からの粗抽出液が他の研究者の得た精製酵素よりも高い比活性、1.15 U/mg 蛋白質をもつため、水稻特に白米が酵素の非常に良い給源であることを示している。

II. 酵素の作用について

Table 2 に示したように水稻種子の debranching 酵素はプルランおよび α -amylase による分解生成物によく作用し、アミロペクチンおよび糯米澱粉の β -限界デキストリン、phosphorylase 限界デキストリン、phosphorylase 限界- β -限界デキストリンにも良く作用する。アミロペクチン、糯米澱粉、植物グリコーゲンの β -限界

デキストリンにも作用するが、植物グリコーゲンおよびその phosphorylase 限界デキストリンには全くあるいはほとんど作用しない。このような基質特異性は他の多くの高等植物の debranching 酵素の基質特異性と一致し (Table 19)、微生物の pullulanase (EC 3.2.1.41) とよく類似する。したがって今後微生物の pullulanase と高等植物の debranching 酵素の基質特異性の間に決定的な相違が見出されない限り、この種の高等植物の debranching 酵素は pullulanase (EC 3.2.1.41) として分類すべきであろう。

水稻 debranching 酵素が澱粉様多糖の α -(1-6) 結合を加水分解することは基質のヨード複合体の吸収極大の変化および基質の β -amylase 分解限度の増大によって示される。Fig. 26 には乳熟期種子から得た酵素を糯米澱粉および粳米アミロペクチン並びにそれらの β -限界デキストリンに作用させた時の多糖-ヨード複合体の吸収スペクトルの変化を示した¹¹³⁾。いずれの基質に対しても反応が進むにつれて多糖-ヨード複合体の吸光度が増大し、枝切りが行なわれていることが示されている。Table 20 には乳熟期種子から得た酵素を作用させた後の澱粉様多糖の β -amylase 分解限度を示した¹¹³⁾。Debranching 酵素反応前の多糖に比し反応後の多糖の β -amylase 分解限度が明らかに増大し、 α -(1-6) 結合の切断が示されている。

水稻 debranching 酵素はプルランを endo 型に分解した。Fig. 13 に示したようにプルランに対する作用では反応の初期からマルトトリオースのほかにはヘキサオース、ノナオース、およびそれより高分子の糖の生成が認められた。しかしながら FRENCH ら²⁰⁾ は *Aerobacter aerogenes* の pullulanase がマルトースから 6¹-および 6²-O- α -マルトシルマルトースを、そしてマルトトリオースから 6¹-、6²-、および 6³-O- α -マルトトリオシルマルトトリオースを生成することを報告した。そこで上記のヘキサオース、ノナオース、およびそれより高分子の糖の生成がプルランの endo 型分解によって直接生成したのか、それともプルランの exo 型分解によって生成したマルトトリオースの転移作用によって合成されたものであるかを確かめる必要がある。

基質としてマルトトリオースおよび 6³-O- α -マルトトリオシルマルトトリオースを用い、水稻乳熟期種子の酵素を作用させた時の生成物の薄層クロマトグラムを Fig. 27 に示した¹¹⁴⁾。この酵素はマルトトリオースからは何ら新しい生成物を生成せず、6³-O- α -マルトトリオシルマルトトリオースからはマルトトリオースのみを

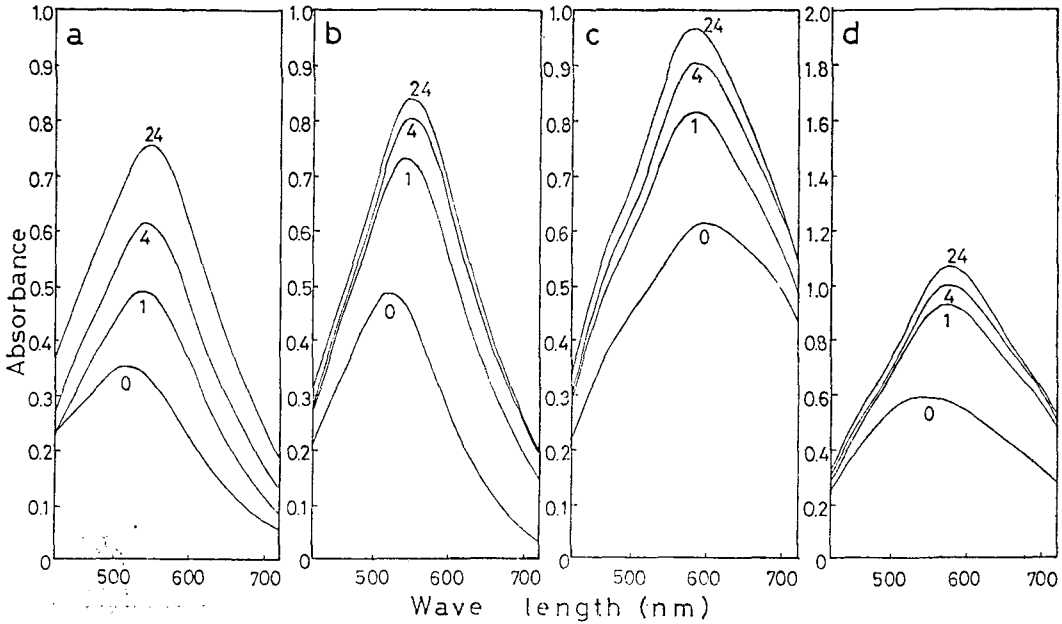


Fig. 26. Changes of iodine-staining of polysaccharides during reactions catalyzed by rice debranching-enzyme.

Incubation: Substrate, 1 mg/ml; debranching enzyme, 0.1 U/ml; pH 5.6; 25°C, for 0, 1, 4, and 24 hr; (a) glutinous rice starch, (b) glutinous rice starch β -limit dextrin, (c) non-glutinous rice amylopectin, (d) non-glutinous rice amylopectin β -limit dextrin.

Iodine-staining: Polysaccharide, 10 mg%; iodine, 4 mg%; potassium iodide, 40 mg%; acetic acid, 120 mg%.

Table 20. Beta-amylolysis limit of polysaccharides after debranching

Polysaccharide	Debranching* % of D-glucose	β -Amylolysis limit % of maltose
Amylopectin (rice)	3.77	90.2 (59.2)**
Amylopectin β -dextrin	10.57	81.5 (0)
Soluble starch (Merck)	2.64	72.6 (57.0)
Glutinous rice starch	4.11	84.3 (50.0)
Glutinous rice starch β -dextrin	12.72	81.1 (0)
Glutinous rice soluble starch	5.32	83.8 (49.2)

* Substrate (1 mg/ml) was incubated with the debranching enzyme (0.1 U/ml) at 25°C and pH 5.6 for 24 hr and reducing power increased was determined.

** Values in parentheses show those before debranching reactions.

生成した。したがって今回の実験条件ではプルランからの生成物中に見出されたオリゴ糖はプルランの加水分解によって直接生成したことになる。

プルランはマルトトリオースが両端で α -(1-6) 結合してできた直鎖分子と考えることによって、水稲 de-

branching 酵素の作用が endo 型に進むという言葉の意味が理解できる。しかしプルランのいわゆる末端以外の α -(1-6) 結合は 6 番炭素に置換のある D-グルコースで、その 4 番炭素は置換されていないから、澱粉様多糖でいう非還元末端に相当する。したがってプルランの

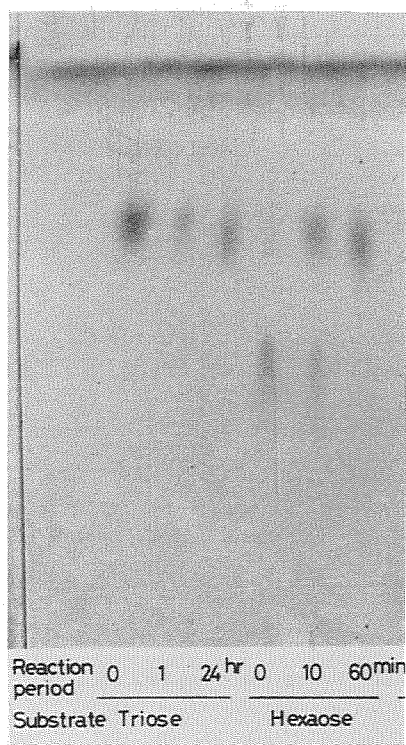


Fig. 27. Thin-layer chromatogram of debranching products from maltotriose and $6^3-0-\alpha$ -maltotriosylmaltotriose by rice debranching-enzyme.

Oligosaccharides (1 mg/ml) were incubated at 25°C and pH 5.6 with the rice debranching-enzyme (0.02 U/ml) and chromatographed. Solvent, isopropyl alcohol-ethyl acetate-water (60:20:20, v/v), spray reagent, 50% sulfuric acid. Substrates, triose (maltotriose) and hexaose ($6^3-0-\alpha$ -maltotriosylmaltotriose).

内部の α -(1→6) 結合の分解は考え方によっては exo 型の分解といえる。

アミロペクチンあるいはその β -限界デキストリンの枝切りでは endo 型分解という意味はさらに不明確である。 β -限界デキストリンを例にとると、その α -(1→6) 結合の分解によって A 鎖が遊離する反応は exo 型の分解と考えられるであろう。A 鎖を結合したままの B 鎖の遊離は endo 型であるかと言えばそうとも限らない。その α -(1→6) 結合が B 鎖の非還元末端に近い時にはむしろ exo 型の分解と言うべきかもしれない。

一つの酵素が 2 種以上の異なった基質に作用する時にその作用の機作は統一的に説明される必要がある。そのための一つの仮説を提出しその概要を Scheme 2 に

示した。この仮説によれば酵素の作用は切断される α -(1→6) 結合で結合した側鎖ではなく、主鎖の非還元末端側の鎖長に関する。主鎖の非還元末端側の鎖長が短いことは酵素が α -(1→6) 結合に接近する時に立体障害を起さず、そのため速かな反応が起るのではないかと考えられる。一方 isoamylase は主鎖や側鎖の短いもの (プルラン) には作用せず、長いもの (グリコーゲンやアミロペクチン) に良く作用するので、これら 2 種の debranching 酵素の作用機作の比較は今後の問題として興味深い。

III. 酵素の生成と変化について

Debranching 酵素は澱粉様多糖の α -(1→6) 結合を加水分解する酵素であり、*in vivo* での作用は amylase と共同して澱粉を完全に分解することにあると思われる。実際多くの種子中で発芽時に酵素活性が増加することが調べられており⁶³⁾、水稻でも発芽の際に種子中の酵素活性が増加した (Fig. 23)。

水稻では発芽種子ばかりでなく乳熟期種子にも高い debranching 酵素活性が示された (Fig. 24)。乳熟期種子では澱粉が盛んに合成されており分解酵素である debranching 酵素が乳熟期種子中でどのような役割を果しているかという一つの問題が提起された。

ERLANDER^{17,18)} は澱粉の合成機作として、はじめグリコーゲンが合成され、それが一種の debranching 酵素で分解されアミロペクチンになるという仮説を提出した。この仮説によれば澱粉合成の一段階に debranching 酵素の関与する反応が存在する。しかし水稻乳熟期種子の debranching 酵素は植物グリコーゲンに作用せず (Table 2)、したがってこの酵素の *in vivo* での役割が ERLANDER¹⁷⁾ の提起した澱粉合成の一段階に関与するものでないことは明らかである。

乳熟期種子の debranching 酵素の *in vivo* での役割が発芽種子の酵素と異なれば、酵素の性質にも何らかの相違があるものと期待される。しかしながら両酵素は蛋白質としての性質においても酵素作用の上からも見るべき差異がなく、免疫学的にも両者の同一性が示された (Fig. 3)。

水稻完熟種子中には debranching 酵素活性は低いが、不活性型酵素が多量に存在することがわかった。不活性型酵素はある種の還元剤によって活性化し定量することができたので、発熱過程および発芽過程における不活性型酵素の量を調べ、活性型酵素量の変化との関係について考察した結果、水稻種子中では発熱時に活性型 debranching 酵素が合成され、乳熟後期以後不活性型酵素

Table 21. Debranching enzyme activity of ungerminated cereals after treatment with sodium dithionite or papain

	Pullulanase activity (U/50 grains)*		
	Buffer	Dithionite	Papain
Barley	0.021	(100 mM) 0.075	0.120
Wheat	0.021	(10 mM) 0.045	0.040
Oats	0.067	(100 mM) 0.355	0.180
Rye	0.007	(20 mM) 0.042	0.020
Rice	1.70	(10 mM) 11.09	9.36

* Cereal flour from 50 grains (barley, 2.520 g; wheat, 1.785 g; oats, 1.301 g; rye, 2.075 g; rice, 1.135 g) was incubated at 4°C for 24 hr with 0.1 M sodium phosphate buffer or the same buffer containing sodium dithionite (5 mℓ). The similar incubation was conducted at 30°C for 15 hr with the same buffer containing 25 μg papain per mℓ. After centrifugation, the resultant supernatant was assayed for pullulanase activity.

に変化して蓄積され、発芽時には再び活性化されて澱粉分解を行なうものと考えられた (Scheme 3)。登熟過程での活性型酵素から不活性型酵素への変化は放射性アミノ酸の取込み実験によって確かめられた (Table 12)。

完熟種子から亜二チオン酸ナトリウムによって活性化した後得られた酵素も乳熟期種子および発芽種子から得られた酵素と蛋白質および酵素作用上の性質がよく類似し、免疫学的にも同一性を示した。したがってこれら三つの酵素は同一あるいはほとんど同一の蛋白質であると考えられ、乳熟期種子中の活性型 debranching 酵素は発芽時に酵素としての役割を果すためにあらかじめ不活性型酵素を合成しておく一段階としてその存在の意味が理解される。

Debranching 酵素が種子中で不活性型で蓄積されることは水稲の特殊な例なのかそれとも穀類種子一般に共通することであるかは興味深い問題である。数種の麦類を用い完熟種子粉末に亜二チオン酸ナトリウムまたは papain を作用させて debranching 酵素を活性化した時の酵素活性を測定した (Table 21)。亜二チオン酸ナトリウムは 10, 20 および 100 mM で活性化を行ない最大活性を示した場合を表に示した。亜二チオン酸ナトリウムによっても papain によっても、0.1 M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.2) による抽出に比べて明らかに高い活性を示し、麦類の完熟種子中に不活性型 debranching 酵素が存在することがわかった。しかしながらその活性を水稲種子の場合と比較すると著しく低い値に過ぎなかった。そこでこれら麦類の発芽時の pullulanase 活性を測定した。

Figs. 28 および 29 には発芽時の pullulanase 活性、

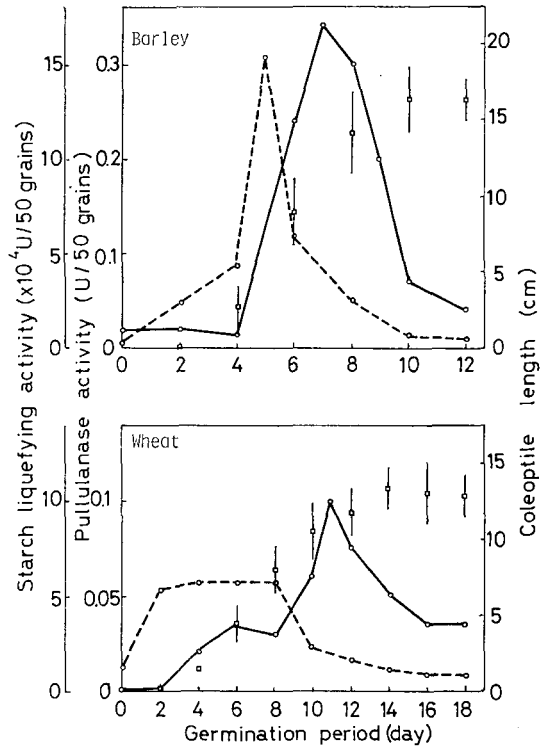


Fig. 28. Enzyme activity of barley and wheat during germination.

Germinating cereals (at 26°C, in the dark; 50 grains) were homogenized with 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.2, 5 mℓ) and centrifuged. Resultant supernatant was dialyzed against water, and assayed for pullulanase activity (—○—) and starch liquefying activity (---○---). —□—: Coleoptile length ($\bar{M} \pm \sigma$).

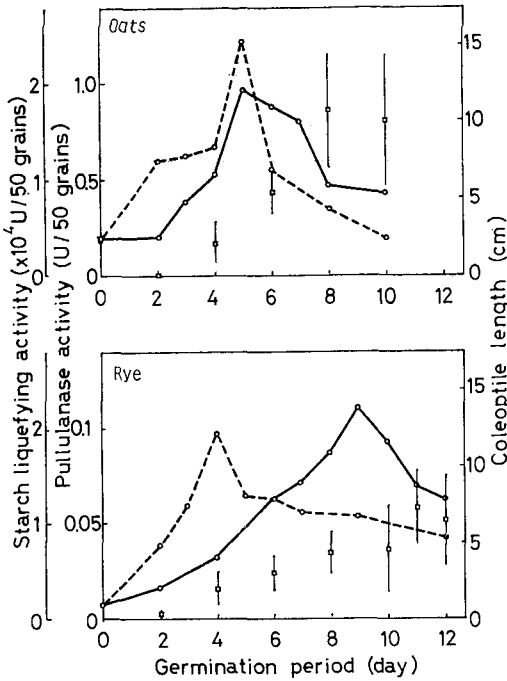


Fig. 29. Enzyme activity of oats and rye during germination.

Methods are the same as shown in Fig. 28.

Table 22. Maximum values of pullulanase and starch liquefying activity in germinating cereals prepared from Figs. 28 and 29

	Pullulanase activity (U/50 grains)	Starch liquefying activity (U/50 grains)
Barley	0.340	154,000
Wheat	0.100	57,000
Oats	0.965	24,500
Rye	0.111	19,500
Rice	4.75	7,750

澱粉液化酵素活性および芽の長さを示した。発芽は26°C暗所で行なった。酵素の抽出および酵素活性の測定は第一章と同様に行なった。4種の麦の酵素活性は著しく相違した。Table 22には各麦類および水稲の発芽時のpullulanaseおよび澱粉液化酵素の最大活性を示した。Pullulanase活性をTable 21に示した亜二チオン酸ナトリウムあるいはpapainによる活性化後の活性と比較すると2.6~2.8倍であった。しかし発芽種子の抽出液にはマルトトリオースに対する分解活性があり、プルラン

の分解によって生成したマルトトリオースが完全に分解されると還元力が3倍になることから、発芽種子中に見出されるpullulanase活性の大部分は完熟種子中に不活性型で存在すると思われる。

すなわちdebranching酵素が完熟種子中に不活性型で存在することは水稲の特殊な例ではなく、多くの麦類でも認められる一般的な現象であると言える¹²¹⁾。

IV. その他の二、三の問題

水稲には梗糯の2種が存在し両者の大きな相違点は澱粉の構造にある。すなわち糯種にはアミロースが存在せず、アミロペクチンも梗種に比し α -(1→6)結合の存在率が高い。Debranching酵素が α -(1→6)結合を切る酵素であることから、この酵素の梗糯両水稲の間での異同に興味もたれる。

糯種水稲(栽培品種「かむいもち」)の乳熟期種子から梗種の場合と全く同様に精製酵素を調製した。精製酵素の比活性は13.4 U/mg蛋白質となりamylase, maltase, およびQ-酵素活性を含まず、ディスク電気泳動およびゲルろ過においてほぼ均一となった。この酵素の性質を調べた結果は最適pH 5.6, 各種澱粉様多糖に対する基質特異性は梗種の酵素と同様であり、ディスク電気泳動およびゲルろ過でも梗種酵素との差は認められなかった。さらに乳熟期の水稲種子中のpullulanase活性にも両種間で有意の差はなかった。

種子が発芽すると多くの酵素の活性が増大する。ある酵素はde novo合成され、ある酵素は不活性型酵素が活性化される。不活性型酵素の蓄積は種子の休眠前に起る筈であり、de novo合成される酵素の素材となるアミノ酸も休眠種子中では蛋白質として貯蔵される場合が多いと考えられるので、種子の登熟、休眠、発芽を分子レベルで理解するために種子中の蛋白質の生合成と貯蔵を研究することは重要である。

種子中で一つの酵素が活性型で合成され、不活性型で蓄積され、再び活性化されて作用するという一連の変化が明らかにされたのは水稲debranching酵素が初めてであろう。現在のところ休眠種子中での不活性型酵素の貯蔵形態および不活性化の機構は明らかにされなかったが、本研究により種子中での蛋白質の蓄積、貯蔵を研究する一つの手掛りが得られた。ある種の酵素ははじめから不活性型で合成されるかもしれないが、そのような場合も含めて発芽時に必要な酵素蛋白質の種子中での合成と蓄積過程の解明は種子の休眠の機作を明らかにする手段となるであろう。

水稲種子中では乳熟期にdebranching酵素の生成が

Table 23. Debranching-enzyme activity of rice seeds in different maturity

Maturity*	Moisture (%)	Protein (% of dry matter)	Debranching enzyme activity	
			Active form (U/g seeds)	Inactive form (U/g seeds)
Small greenish seed	9.90	8.09	3.53	4.77
Large greenish seed	10.26	7.98	2.38	6.55
Mature seed	7.14	7.69	0.92	8.19

* Details, see text.

見られ、乳熟後期以後酵素の不活性化が起る。したがって活性型および不活性型酵素を定量することによって種子の登熟の程度を決めることが可能ではないかと思われる。乳熟後期以後の登熟度を細かく規定することは例えば米の食味と登熟度の間に関係があるか否かを調べる場合などに必要なことである。

刈入後の粳米(栽培品種「ユーカーラ」; 農林水産省北海道農業試験場, 1979年産)を用い、小型の青米、大きさは正常でやや青味を帯びた米、および完熟した米の3種に分け、それぞれの水分、蛋白質(N \times 6.25として)、活性型および不活性型 debranching 酵素量を測定した(Table 23)。その結果、未熟米では明らかに不活性型 debranching 酵素活性が低く、活性型のまま酵素が種子中に残っていることがわかった。今回は刈入後の乾燥における種子中での酵素の変化を調べていないが、Table 23の結果は水稲種子の登熟度を debranching 酵素の活性と関連づけることができる可能性を示している。

水稲 debranching 酵素の性質について二、三の未解決の問題が残った。その一つは酵素の分子量である。ゲルろ過による分子量、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動による値、および超遠心分離の結果からの計算値が全て異なった。これは恐らく酵素蛋白質のコンホメーションの問題であろうが、今後その理由を明らかにし、真の分子量を求めなければならない。

他の一つは不活性型酵素蛋白質の調製である。表面活性剤など種々の蛋白質可溶性剤を用いたが、不活性のままの可溶性は出来なかった。種子中での酵素の不活性化および活性化の機構を明らかにするためには不活性型酵素蛋白質の単離が望まれるが、これは今後の問題である。

摘 要

高等植物の debranching 酵素はこれまでに十分精製された例が少なく、その基質特異性は必ずしも明らかで

はない。Debranching 酵素の基質は澱粉様多糖であり、それは α -(1 \rightarrow 6) 結合よりも α -(1 \rightarrow 4) 結合を多く含むので、微量の amylase の混入は実験結果に大きな影響を与える。高等植物の debranching 酵素の *in vivo* での役割は澱粉の分解にあると考えられ、debranching 酵素の給源となる組織は amylase 活性も高いことが多い。したがって酵素の基質特異性を明確にするためには酵素の十分な精製が重要な課題である。

酵素の精製にはその良い給源の選択が必要である。水稲種子は debranching 酵素の良い給源であることがわかった。乳熟期の水稲種子は amylase 活性が低く debranching 酵素活性が高かった。完熟種子中には低い debranching 酵素活性しか存在しなかったが、多量の不活性型酵素が存在し、それが endo-peptidase あるいはある種の還元剤で活性化、可溶化されることがわかった。そこで乳熟期種子および完熟種子から高度に精製した酵素を調製した。水稲発芽種子は他の穀類発芽種子と同様高い amylase 活性を含み、debranching 酵素の給源としては適さないが、比較のために発芽種子からも酵素を精製し、事実上 amylase 活性を含まない debranching 酵素を得た。

精製酵素の比活性は完熟種子からの酵素が最も高く、29.8 pullulanase U/mg 蛋白質に達した。これらの酵素はディスク電気泳動、ゲルろ過で単一性を示し、3種の酵素の間に差異はなかった。基質特異性、反応の最適 pH 5.6、熱および pH 安定性、金属イオンによる阻害、免疫反応においても類似した性質を示し、これらの酵素が同一あるいは極めて類似した蛋白質であることがわかった。したがって澱粉合成の盛んな乳熟期種子の酵素が、澱粉分解を行なう発芽種子の酵素と異なる作用をもつ酵素である可能性は否定された。

酵素の基質特異性および種々の基質の K_m および V の測定を行なった。水稲 debranching 酵素はプルラン、澱粉の α -amylase 分解物、糯米澱粉および粳米アミロ

ベクチンの β -限界デキストリンに速かに作用し、糯米澱粉、粳米アミロベクチン、および植物グリコーゲンの β -限界デキストリンには作用が遅く、植物グリコーゲン、パノース、およびイソマルトースには作用しなかった。このような基質特異性は微生物の pullulanase (EC 3.2.1.41) の基質特異性と一致する。

高等植物の debranching 酵素のプルランに対する分解様式は endo-型のランダム分解であるという報告がある。しかし水稻 debranching 酵素によるプルラン分解物中には著量のマルトトリオースが見出されたので、分解様式を精査した。その結果プルランは endo-型に分解されるがランダム分解ではなく末端に近い結合がより速かに分解され、また反応の中間生成物がプルランよりも速かに分解され、そのために反応の初期から多量のマルトトリオースを生ずることがわかった。

この酵素は糯米澱粉およびその β -限界デキストリンの内部の α -(1 \rightarrow 6) 結合を分解したが、この場合にも外側の結合の分解がより速かであった。

種々の基質に対する酵素の作用を統一的に説明するために一つの仮説を提出した。すなわち「水稻 debranching 酵素は作用する α -(1 \rightarrow 6) 結合の主鎖の非還元末端までの長さが短いものほど速かに分解する。」と仮定した。それによるとプルランは全ての結合の主鎖の非還元末端までの長さが0で最も速かに且つ全ての結合がほぼ同様に分解される。 β -限界デキストリンではこの長さが1または2で速かに分解され、遊離されるのは主としてA鎖であるが、一部速かに分解されるB鎖も存在する。Phosphorylase 限界デキストリンはこの長さが4で、 β -限界デキストリンより反応が遅く、もとの澱粉およびアミロベクチンはさらに長いので反応を受け難くなる。この仮説によって実験結果がよく説明された。

水稻完熟種子中に不活性型 debranching 酵素が存在することを示し、不活性型酵素を活性化して定量する方法を確立した。登熟中および発芽時の水稻種子中の活性型および不活性型酵素を定量した。活性型酵素は開花後12日目頃から検出され、20日目に最大となり以後減少した。不活性型酵素は20日目頃から生成し、完熟種子では大部分が不活性型であった。発芽時には再び活性型酵素が生成し、不活性型酵素は減少した。

乳熟期種子に放射性アミノ酸を吸収させたところ、放射能ははじめ活性型酵素に取込まれ、次いで活性型酵素中の放射能が減少して不活性型酵素中の放射能が増加した。これらの結果から水稻種子中の debranching 酵素は登熟中に活性型酵素として合成され、不活性型に変化

して完熟種子中に蓄積され、発芽時に再び活性化されると結論した。したがって水稻乳熟期種子中の debranching 酵素は乳熟期に特有な作用——例えば澱粉合成の一段階——を行なうのではなく、発芽時に必要な酵素の前駆体として合成されるものと思われる。

不活性型酵素の活性化は endo-peptidase の作用あるいはジスルフィド結合の切断によって起った。完熟種子から亜二チオン酸ナトリウムで活性化して得た精製酵素中のスルフヒドリル基の含量が乳熟期種子からの精製酵素のスルフヒドリル基含量と一致したことから、不活性型酵素は活性型酵素が不溶性蛋白質とジスルフィド結合によって結合して生成するものと推定した。

種子中で一つの酵素蛋白質の生成、蓄積、再活性化が明らかにされ、種子の登熟、休眠、発芽の分子レベルでの研究の手掛りが得られた。

引用文献

1. ABDULLAH, M. and WHELAN, W. J.: A pathway in rabbit muscle for the enzymatic debranching of glycogen, *Nature*, **197**: 979-980. 1963
2. AWDEH, Z. L., WILLIAMSON, A. R. and ASKONAS, B. A.: Isoelectric focusing in polyacrylamide gel and its application to immunoglobulins, *Nature*, **219**: 66-67. 1968
3. BAUN, L. C., PALMIANO, E. P., PEREZ, C. M. and JULIANO, B. O.: Enzymes of starch metabolism in the developing rice grain, *Plant Physiol.*, **46**, 429-434. 1970
4. BENDER, H., LEHMANN, J. und WALLENFELS, K.: Pullulan, ein Extracelluläres Glucan von *Pullularia pullulans*, *Biochim. Biophys. Acta*, **36**, 309-316. 1959
5. BENDER, H. und WALLENFELS, K.: Untersuchungen an Pullulan II. Spezifischer Abbau durch ein bakterielles Enzym, *Biochem. Z.*, **334**: 79-95. 1961
6. BROWN, D. H., ILLINGWORTH, B. and CORI, C. F.: Combined action of oligo-1,4 \rightarrow 1,4-glucantransferase and amylo-1,6-glucosidase in debranching glycogen, *Nature*, **197**: 980-982. 1963
7. BROWN, D. H. and BROWN, B. I.: Dissociation of mammalian amylo-1,6-glucosidase having oligo-1,4 \rightarrow 1,4-glucantransferase activity into sub-units, *Biochem. J.*, **100**: 8 p. 1966
8. CHIBNALL, A. C., MANGAN, J. L. and REES, G. W. J.: The structure of pullulan, a branched polysaccharide from *Pullularia pullulans*, *Biochem. J.*, **100**: 1-10. 1966

- M. W.: Studies on the amide and C-terminal residues in proteins, *Biochem. J.*, **68**: 111-114. 1958
9. COLLINS, F. W. and CHANDORKAR, K. R.: Thin-layer chromatography of fructo-oligosaccharides, *J. Chromatogr.*, **56**: 163-167. 1971
10. CORI, G. T. and LARNER, J.: Action of amylo-1,6-glucosidase and phosphorylase on glycogen and amylopectin, *J. Biol. Chem.*, **188**: 17-29. 1951
11. DENAULT, L. J. and UNDERKOFER, L. A.: Conversion of starch by microbial enzymes for production of syrups and sugars, *Cereal Chem.*, **40**: 618-629. 1963
12. DRUMMOND, G. S., SMITH, E. E., WHELAN, W. J. and TAI, H.: Mechanism of action of pullulanase, *FEBS Letters*, **5**: 85-88. 1969
13. DRUMMOND, G. S., SMITH, E. E. and WHELAN, W. J.: On the specificity of starch debranching enzymes, *FEBS Letters*, **9**: 136-140. 1970
14. DUNN, G., HARDIE, D. G. and MANNERS, D. J.: Observations on the action of limit dextrinases on amylopectin-like polysaccharides, *Biochem. J.*, **133**: 413-416. 1973
15. DUNN, G. and MANNERS, D. J.: The limit dextrinases from ungerminated oats (*Avena sativa* L.) and ungerminated rice (*Oryza sativa* L.), *Carbohydr. Res.*, **39**: 283-293. 1975
16. EDLHOCH, H.: Spectroscopic determination of tryptophan and tyrosine in proteins, *Biochemistry*, **6**: 1948-1954. 1967
17. ERLANDER, S. R.: A proposed mechanism for the synthesis of starch from glycogen, *Enzymologia*, **19**: 273-283. 1958
18. ERLANDER, S. R.: The mechanism for the synthesis of starch and its relationship to the newly proposed structural model for DNA. Part I., *Stärke*, **22**: 352-362. 1970
19. FRENCH, D. and KNAPP, D. W.: The maltase of *Clostridium acetobutylicum*. Its specificity range and mode of action, *J. Biol. Chem.*, **187**: 463-471. 1950
20. FRENCH, D. and ABDULLAH, M.: Specificity of pullulanase, *Biochem. J.*, **100**: 6 p-7 p. 1966
21. 不破英次, 高岡研一, 二国二郎: 所謂アミロシンテアーゼの作用により生成した多糖類の X 線廻折的研究, *農化誌*, **23**: 299-304. 1950
22. GORDON, R. W., MANNERS, D. J. and STARK, J. R.: The limit dextrinase of the broad bean (*Vicia faba* L.), *Carbohydr. Res.* **42**: 125-134. 1975
23. GRASSETTI, D. R. and MURRAY, J. F. Jr.: Determination of sulfhydryl groups with 2,2'- or 4,4'-dithiodipyridine, *Arch. Biochem. Biophys.*, **119**: 41-49. 1967
24. GRASSETTI, D. R., MURRAY, J. F. Jr. and RUAN, H. T.: The interaction of 6,6'-dithiodinicotinic acid with thiols and with Ehrlich ascites tumor cells, *Biochem. Pharmacol.*, **18**: 603-611. 1969
25. GUNJA, Z. H., MANNERS, D. J. and MAUNG, K.: Studies on carbohydrate-metabolizing enzymes. 7. Yeast isoamylase, *Biochem. J.*, **81**: 392-398. 1961
26. GUNJA-SMITH, Z., MARSHALL, J. J., SMITH, E. E. and WHELAN, W. J.: A glycogen-debranching enzyme from *Cytophaga*, *FEBS Letters*, **12**: 96-100. 1970
27. HARADA, T., YOKOBAYASHI, K. and MISAKI, A.: Formation of isoamylase by *Pseudomonas*, *Appl. Microbiol.*, **16**: 1439-1444. 1968
28. HARDIE, D. G. and MANNERS, D. J.: A viscometric assay for pullulanase-type debranching enzymes, *Carbohydr. Res.*, **36**: 207-210. 1974
29. HARDIE, D. G., MANNERS, D. J. and YELLOWLEES, D.: The limit dextrinase from malted sorghum (*Sorghum vulgare*), *Carbohydr. Res.*, **50**: 75-85. 1976
30. HARRIS, G.: The enzyme content and enzymic transformation of malt, in "Barley and Malt. Biology, biochemistry and technology" ed. by COOK, A. H., Academic Press, New York and London, 1962, pp. 583-694.
31. 林 勝哉: "蛋白質の分子量・分子形" (瓜谷郁三他編, 生物化学実験法, C 蛋白質研究法 2), 東京大学出版会, 東京, 1971 年, 3-58 頁.
32. 林 健志, 大場義樹: SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動, 蛋白質・核酸・酵素, **17**: 304-311. 1972
33. HO, T.-H. D. and VARNER, J. E.: Density labeling of proteins with ¹³C-labeled amino acids. No accumulation of an inactive α -amylase precursor in barley aleurone cells, *Arch. Biochem. Biophys.*, **187**: 441-446. 1978
34. HOBSON, P. N., WHELAN, W. J. and PEAT, S.: The enzymic synthesis and degradation of starch. Part XIV. R-Enzyme, *J. Chem. Soc.*, **1951**: 1451-1459.
35. HOPKINS, R. H. and WIENER, S.: Limit dex-

- trinase. II. Action of limit dextrinase in brewing, *J. Inst. Brew.*, **61**: 493-500. 1955
36. ISHIZAKI, Y., TANIGUCHI, H. and NAKAMURA, M.: A debranching enzyme of the isoamylase-type from potato (*Solanum tuberosum* L.), *Agric. Biol. Chem.*, **42**: 2433-2435. 1978
37. ISLES, T. E. and JOCELYN, P. C.: The reaction of protein thiol groups with some disulphides, *Biochem. J.*, **88**: 84-88. 1963
38. JACOBS, S.: Determination of nitrogen in proteins by means of indanetrione hydrate, *Nature*, **183**: 262. 1959
39. KAINUMA, K., KOBAYASHI, S. and HARADA, T.: Action of *Pseudomonas* isoamylase on various branched oligo- and polysaccharides, *Carbohydr. Res.*, **61**: 345-357. 1978
40. 河原一男: 超遠心機による蛋白質の拡散係数および分子量の推定法, 蛋白質・核酸・酵素, **13**: 798-807. 1968
41. KERR, R. W., CLEVELAND, F. C. and KATZBECK, W. J.: The action of amyloglucosidase on amylose and amylopectin, *J. Amer. Chem. Soc.*, **73**: 3916-3921. 1951
42. 北原覚雄, 久留島通俊: 糸状菌類の Diastase 組成に関する研究 (第5報) 一新酵素 γ -Amylase の存在に就て, 醱酵工学誌, **27**: 254-257. 1949
43. 小嶋悦郎, 山田次良, 伊沢正夫: 水稲乳熟種子中の Debranching 酵素の安定性と活性阻害性, 日本農芸化学会北海道支部学術講演会, 札幌, 1977年12月10日, 5頁
44. KUHN, W.: Über die Kinetik des Abbaues hochmolekularer Ketten, *Ber.*, **63**: 1503-1509. 1930
45. 倉沢文夫, 早川利郎, 伊賀上郁夫: 米でんぶんの生化学的研究 (第12報) 水稲乳熟期籾中に存在する所謂イソアミラーゼ画分について, 農化誌, **34**: 183-187. 1960
46. LARNER, J. and MCNICKLE, C. M.: Action of intestinal extracts on branched oligosaccharides, *J. Amer. Chem. Soc.*, **76**: 4747-4748. 1954
47. LARNER, J. and MCNICKLE, C. M.: Gastrointestinal digestion of starch. I. The action of oligo-1,6-glucosidase on branched saccharides, *J. Biol. Chem.*, **215**: 723-736. 1955
48. LEE, E. Y. C., CARTER, J. H., NIELSEN L. D. and FISCHER, E. H.: Purification and properties of yeast amylo-1,6-glucosidase-oligo-1,4 \rightarrow 1,4-glucantransferase, *Biochemistry*, **9**: 2347-2355. 1970
49. LEE, E. Y. C., MARSHALL, J. J. and WHELAN, W. J.: The substrate specificity of amylopectin-debranching enzymes from sweet corn, *Arch. Biochem. Biophys.*, **143**: 365-374. 1971
50. LEE, E. Y. C. and CARTER, J. H.: Amylo-1,6-glucosidase/1,4- α -glucan: 1,4- α -glycosyltransferase: Specificity toward polysaccharide substrates, *Arch. Biochem. Biophys.*, **154**: 636-641. 1973
51. LESLIE, J., WILLIAMS, D. L. and GORIN, G.: Determination of mercapto groups in proteins with N-ethylmaleimide, *Anal. Biochem.*, **3**: 257-263. 1962
52. LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L. and RANDALL, R. J.: Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.*, **193**: 265-275. 1951
53. MACWILLIAM, I. C. and HARRIS, G.: The separation of limit dextrinase from R-enzyme and aspects of the activities of the separated enzymes, *Arch. Biochem. Biophys.*, **84**: 442-454. 1959
54. MAEDA, I., NIKUNI, Z., TANIGUCHI, H. and NAKAMURA, M.: Purification of a debranching enzyme (R-enzyme) from malted barley, and the role of the enzyme in the digestion of starch granules during the germination of barley seeds, *Carbohydr. Res.*, **61**: 309-320. 1978
55. MANNERS, D. J. and SPARRA, K. L.: Studies on carbohydrate-metabolizing enzymes. Part XIV. The specificity of R-enzyme from malted barley, *J. Inst. Brew.*, **72**: 360-365. 1966
56. MANNERS, D. J. and ROWE, K. L.: Hydrolysis of the interchain linkages in glycogen-type polysaccharides by a plant enzyme, *Arch. Biochem. Biophys.*, **119**: 585-587. 1967
57. MANNERS, D. J. and ROWE, K. L.: Studies on carbohydrate-metabolizing enzymes. Part XX. Sweet-corn debranching enzymes, *Carbohydr. Res.* **9**: 107-121. 1969
58. MANNERS, D. J., MARSHALL, J. J. and YELLOWLEES, D.: The specificity of cereal limit dextrinases, *Biochem. J.*, **116**: 539-541. 1970
59. MANNERS, D. J. and YELLOWLEES, D.: The development of limit dextrinase activity during the germination of cereals, *Biochem. J.*, **117**: 22 p-23 p. 1970
60. MANNERS, D. J., PALMER, G. H., WILSON,

- G. and YELLOWLEES, D.: Effect of gibberellic acid on the development of some cereal carbohydrases, *Biochem. J.*, **125**: 30 p-31 p. 1971
61. MANNERS, D. J. and ROWE, K. L.: Studies on carbohydrate-metabolizing enzymes. Part XXV. The debranching enzyme system in germinated barley, *J. Inst. Brew.*, **77**: 358-365. 1971
62. MANNERS, D. J. and YELLOWLEES, D.: Studies on carbohydrate metabolizing enzymes. Part XXVI. The limit dextrinase from germinated barley, *Stärke*, **23**: 228-234. 1971
63. MANNERS, D. J. and YELLOWLEES, D.: Studies on debranching enzymes. Part I. The limit dextrinase activity of extracts of certain higher plants and commercial malts, *J. Inst. Brew.*, **79**: 377-385. 1973
64. 丸尾文治, 小林恒夫: 澱粉の生成及び分解に関する酵素化学的研究 (第1報) Amylosynthase に関する検討 (1), 農化誌, **23**: 115-120. 1949
65. 丸尾文治, 小林恒夫: 澱粉の生成及び分解に関する酵素化学的研究 (第2報) Amylosynthase に関する検討 (2), 農化誌, **23**: 120-123. 1949
66. 丸尾文治, 小林恒夫, 塚野 豊, 山田覃洋: 澱粉の生成及び分解に関する酵素化学的研究 (第8報) 酵素による Amylopectin より Amylose の生成, 農化誌, **24**: 347-349. 1951
67. 丸尾文治, 小林恒夫, 塚野 豊: 澱粉の生成及び分解に関する酵素化学的研究 (第9報) Amylosynthase の作用機構に就て, 農化誌, **25**: 34-37. 1951
68. MATHESON, N. K.: The $\alpha(1-4)$ (1-6) glucans from sweet and normal corns, *Phytochemistry*, **14**: 2017-2021. 1975
69. MATSUI, H., CHIBA, S., SHIMOMURA, T. and TAKAHASHI, N.: Multiple forms of rice seeds β -amylases on zymogram, *Agric. Biol. Chem.*, **39**: 2239-2240. 1975
70. 松本 博, 国則登代: SH 基の定量法, 学会出版センター, 東京, 1978年, 140 頁
71. 皆川豊作: アミロシンテアーゼに就て (第一報) 西村氏が酵母中に発見せられた澱粉合成酵素, 農化誌, **8**: 176-183. 1932
72. 皆川豊作: アミロシンテアーゼに就て (第三報) 馬鈴薯アミロシンテアーゼ, 玄米アミロシンテアーゼ, 農化誌, **8**: 510-514. 1932
73. 皆川豊作: アミロシンテアーゼに就て (第十三報) 糯米アミロシンテアーゼに就いて, 農化誌, **9**: 549-552. 1933
74. 皆川豊作: アミロシンテアーゼに就て (第二十六報) Zymogen に関する研究 (其二) [高等植物の Amylosynthase Zymogen] 澱粉を蓄積する高等植物に於ける Amylosynthase の分布に就て, 農化誌, **11**: 374-376. 1935
75. 三宅 捷, 林 金雄: 米澱粉の生化学的研究 (第六報) 澱粉合成酵素に関する知見, 農化学誌, **8**: 185-191. 1936
76. 宮崎 香, 細井和雄, 鈴木康生, 長尾嘉信, 松尾雄志, 堀尾武一: 等電点分離法, 日本生化学会編“生化学実験講座1, タンパク質の化学I, 分離精製”, 東京化学同人, 東京, 1976年, 262-312 頁
77. MOORE, S.: On the determination of cystine as cysteic acid, *J. Biol. Chem.*, **238**: 235-237. 1963
78. MORRIS, D. L. and MORRIS, C. T.: Glycogen in the seed of *Zea mays* (variety Golden Bantam), *J. Biol. Chem.*, **130**: 535-544. 1939
79. 麦林橋太郎: 大麦の zymogen β -amylase 一発芽における活性化機構一, 化学と生物, **8**: 278-279. 1970
80. 永井 裕: デイスク電気泳動法, 別刷蛋白質・核酸・酵素, 生物化学実験法 IX, 物理化学の実験法(3), 共立出版, 東京, 1967年, 3-14 頁
81. 中村幸彦, 下村得治, 山田次良: 糯米 Q- 酵素の精製および二, 三の性質, 農化誌, **35**: 587-590. 1961
82. NELSON, N.: A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose, *J. Biol. Chem.*, **153**: 375-380. 1944
83. 西村資治: 澱粉合成酵素に就いて, 農化誌, **6**: 160-167. 1930
84. PALMIANO, E. P. and JULIANO, B. O.: Biochemical changes in the rice grain during germination, *Plant Physiol.*, **49**: 751-756. 1972
85. PEAT, S., WHELAN, W. J., HOBSON, P. N. and THOMAS, G. J.: The enzymic synthesis and degradation of starch. Part XIX. The action of R-enzyme on glycogen, *J. Chem. Soc.*, **1954**: 4440-4445.
86. PHILLIPS, L. L. and CALDWELL, M. L.: A study of the action of gluc amylase, a glucose-producing amylase, formed by the mold, *Rhizopus delemar*, *J. Amer. Chem. Soc.*, **73**: 3563-3568. 1951
87. SAKAI, H.: Quantitative microdetermination of total -SH groups in proteins, *Anal. Biochem.*, **26**: 269-276. 1968
88. SAKANO, Y., KOBAYASHI, T. and KOSUGI, Y.: Purification and substrate specificity of yeast isoamylase, *Agric. Biol. Chem.*, **33**: 1535-1540.

- 1969
89. 佐々木 実: 免疫学的方法, 日本生化学会編“生化学実験講座1, タンパク質の化学I, 分離精製”, 東京化学同人, 東京, 1976年, 313-351頁
90. SHAIN, Y. and MAYER, A. M.: Activation of enzymes during germination: amylopectin-1, 6-glucosidase in peas, *Physiol. Plant.*, **21**: 765-776. 1968
91. 新家 龍: 潜在型 β -アミラーゼとその活性化機構, 化学と生物, **10**: 426-434. 1972
92. SHINKE, R., NISHIRA, H. and MUGIBAYASHI, N.: Types of amylases in rice grains, *Agric. Biol. Chem.*, **37**: 2437-2438. 1973
93. SOMOGYI, M.: Notes on sugar determination, *J. Biol. Chem.*, **195**: 19-23. 1952
94. 丹波博之, 山田次良, 伊沢正夫: 水稲発芽種子のDebranching酵素の精製と性質, 日本農芸化学会北海道支部学術講演会, 札幌, 1977年7月9日, 1頁
95. TAYLOR, P. M. and WHELAN, W. J.: Enzymic transfer of 1 \rightarrow 6-linked α -maltosyl residues by an enzyme preparation from sweet corn, *Biochem. J.*, **95**: 26 p. 1965
96. TREVELYAN, W. E. and HARRISON, J. S.: Studies on yeast metabolism. 1. Fractionation and microdetermination of cell carbohydrates, *Biochem. J.*, **50**: 298-303. 1952
97. UEDA, S. and NANRI, N.: Production of isoamylase by *Escherichia intermedia*, *Appl. Microbiol.*, **15**: 492-496. 1967
98. UNDERKOFER, L. A. and ROY, D. K.: Crystallization of fungal alpha-amylase and limit dextrinase, *Cereal Chem.*, **28**: 18-29. 1951
99. VAN RENSBURG, N. J. J. and SWANEPOEL, O. A.: Reactions of unsymmetrical disulfides. I. Sulfitolysis of sulfur derivatives of cysteamine and cysteine, *Arch. Biochem. Biophys.*, **118**: 531-535. 1967
100. VARNER, J. E.: Gibberellic acid controlled synthesis of α -amylase in barley endosperm, *Plant Physiol.*, **39**: 413-415. 1964
101. WALKER, G. J. and WHELAN, W. J.: The mechanism of carbohydrase action. 8. Structures of the muscle-phosphorylase limit dextrans of glycogen and amylopectin, *Biochem. J.*, **76**: 264-268. 1960
102. WALKER, G. J.: Metabolism of the reserve polysaccharide of *Streptococcus mitis*. Some properties of a pullulanase, *Biochem. J.*, **108**: 33-40. 1968
103. WALLENFELS, K., KEILICH, G., BECHTLER, G. und FREUDENBERGER, D.: Untersuchungen an Pullulan IV. Die Klärung des Strukturproblems mit physikalischen, chemischen und enzymatischen Methoden, *Biochem. Z.*, **341**: 433-450. 1965
104. WALLENFELS, K., RACHED, I. R. und HUCHO, F.: Klassifizierung der Pullulanase als Exoenzym mit Hilfe der Gaschromatographie, *Europ. J. Biochem.*, **7**: 231-233. 1969
105. WHELAN, W. J. and ROBERTS, P. J. P.: Action of salivary α -amylase on amylopectin and glycogen, *Nature*, **170**: 748-749. 1952
106. WILCOX, P. E., COHEN, E. and TAN, W.: Amino acid composition of α -chymotrypsinogen, including estimation of asparagine and glutamine, *J. Biol. Chem.*, **228**: 999-1019. 1957
107. WILLIAMS, C. A. Jr. and GRABAR, P.: Immunoelectrophoretic studies on serum proteins. I. The antigens of human serum, *J. Immunol.*, **74**: 158-168. 1955
108. WILSON, E. J. Jr., SCHOCH, T. J. and HUDSON, C. S.: The action of macerans amylase on the fractions from starch, *J. Amer. Chem. Soc.*, **65**: 1380-1383. 1943
109. WRIGLEY, C. W.: Analytical fractionation of plant and animal proteins by gel electrofocusing, *J. Chromatogr.*, **36**: 362-365. 1968
110. YAGISAWA, M., KATO, K., KODA, Y. and UEDA, S.: Pullulanase of *Streptomyces* sp. No. 280, *J. Ferment. Technol.*, **50**: 572-579. 1972
111. 山田次良, 伊沢正夫: 水稲乳熟種子中のDebranching酵素について, 日本農芸化学会北海道支部・東北支部合同学術講演会, 盛岡, 1976年10月9日, 16頁
112. 山田次良, 小嶋悦郎, 丹波博之, 伊沢正夫: 水稲種子のDebranching酵素の性質—Pullulanに対する作用と β -Limit Dextrinに対する作用の比較, 日本農芸化学会大会講演要旨, 名古屋, 1978年4月6日, 87頁
113. YAMADA, J. and IZAWA, M.: A debranching enzyme of rice seeds at milky stage, its purification and substrate specificities, *Agric. Biol. Chem.*, **43**: 37-44. 1979
114. YAMADA, J. and IZAWA, M.: Mode of action of a rice debranching enzyme on pullulan and its related oligosaccharides, *Agric. Biol. Chem.*, **43**: 2515-2521. 1979
115. 山田次良, 伊沢正夫: 水稲種子中のDebranching酵素の活性化, 日本農芸化学会大会講演要旨, 東京, 1979年4月2日, 45頁

116. 山田次良, 伊沢正夫: 白米からの精製 Debranching 酵素の調製, 日本農芸化学会大会講演要旨, 福岡, 1980年4月1日, 2頁
117. YAMADA, J., TANBA, H. and IZAWA, M.: Purification and characterization of a debranching enzyme of germinated rice seeds, *J. Fac. Agric. Hokkaido University*, **60**: 10-22. 1980
118. YAMADA, J. and KOJIMA, E.: Action mode of rice debranching enzyme on starch-like polysaccharides, *Agric. Biol. Chem.*, **45**: 105-111. 1981
119. YAMADA, J.: Inactive debranching enzyme in rice seeds and its activation, *Carbohydr. Res.*, **90**: 153-157. 1981
120. YAMADA, J.: Conversion of active and inactive debranching enzymes in rice seeds, *Agric. Biol. Chem.*, **45**: 747-750. 1981
121. YAMADA, J.: Purification of oats debranching enzyme and occurrence of inactive debranching enzyme in cereals, *Agric. Biol. Chem.*, **45**: 1013-1015. 1981
122. YAMADA, J.: Purification of debranching enzyme from mature rice seeds, *Agric. Biol. Chem.*, **45**: 1269-1270. 1981
123. YELLOWLEES, D.: Purification and characterisation of limit dextrinase from *Pisum sativum* L., *Carbohydr. Res.*, **83**: 109-118. 1980
124. YOKOBAYASHI, K., MISAKI, A. and HARADA, T.: Purification and properties of *Pseudomonas* isoamylase, *Biochim. Biophys. Acta*, **212**: 458-469. 1970

Summary

1. Highly purified debranching-enzymes which were homogeneous in disc-electrophoresis and in gel-filtration were prepared from mature, immature, and germinated rice seeds, respectively. The highest specific activity, 29.8 pullulanase U/mg protein, was observed in the case of the enzyme preparation obtained from mature seeds after dithionite activation.

The characteristics of these enzyme proteins were similar to one another in disc-electrophoresis, gel-filtration, substrate specificities, optimum pH (5.6), thermal and pH stabilities, inhibition by metal ions, and immunological reaction.

2. K_m and V of the enzyme for several substrates were determined. The rice debranching-enzymes rapidly hydrolyzed pullulan, α -amylolysis products of starch, and β -limit dextrins of glutinous rice starch and non-glutinous rice amylo-

pectin, slowly hydrolyzed glutinous rice starch, non-glutinous rice amylopectin, and β -limit dextrin of phytoglycogen, and scarcely hydrolyzed phytoglycogen, panose, and isomaltose.

These substrate specificities are similar to those of microbial pullulanase (EC 3.2.1.41).

3. The enzyme hydrolyzed pullulan in an endo-fashion but not in the random degradation. Oligosaccharides intermediately produced were more rapidly degraded than pullulan, and maltotriose accumulated extraordinarily even at early stages of the hydrolysis.

The enzyme has been studied to determine its action on amylaceous polysaccharides. An endo-fashion degradation was demonstrated that produced branched saccharides.

A hypothesis on action mode of debranching enzyme, in which the above mentioned results have been taken into account, was proposed.

4. The occurrence of an inactive debranching-enzyme in mature rice seeds and its activation *in vitro* was demonstrated. The inactive enzyme could be activated and solubilized by the reagents capable of cleaving disulfide-bond and by endopeptidases.

5. Debranching-enzyme activity in rice seeds increased during the early stage of ripening and then decreased; maximum activity appeared on the 20th day after flowering, and the inactive enzyme accumulated rapidly in the seeds since then. The activity increased again during germination.

Radioactive amino acids were readily incorporated into the active debranching-enzyme after their absorption into the immature rice seeds. Subsequently, the radioactivity increased in the inactive enzyme, accompanying its decrease in the active enzyme.

These findings suggest that the debranching enzyme in rice seeds is synthesized during ripening in an active form and that it accumulates in an inactive form, which can be reactivated during germination.

6. Contents of sulfhydryl groups in the mature-seed enzyme obtained after dithionite activation was identical with that in the immature-seed enzyme. Therefore, it was supposed that the active debranching-enzyme was linked by a disulfide-bond to an insoluble protein and accumulated in the seeds as an inactive and insoluble enzyme.

正 誤 表

頁	行	誤		正	
p. 18	右下から5行 (3) 式	$\alpha = 0.193 t^{-1.533}$		$\alpha = 0.166 t^{-1.318}$	
p. 18	右下から4行 (3) 式	$\beta = 0.253 t^{0.310}$		$\beta = 0.261 t^{0.260}$	
p. 19	Table 3 中	8	12	8	12
		0.008	0.004	0.007	0.009
		0.470	0.549	0.493	0.445
		2.62	2.21	2.58	2.40