

## 甜菜主根の発育にともなうヌクレオチド類の 消長, 特にシヨ糖の生合成に関して

鈴木政安・岡崎重明  
増田宏志・菅原四郎  
(帯広畜産大学農産物利用学教室)

1972年5月30日受理

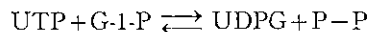
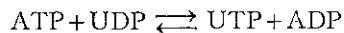
### Changes in Nucleic Acid Related Substances in the Developing Sugar Beets, with Reference to Sucrose Biosynthesis

Masayasu SUZUKI\*, Sigeaki OKAZAKI\*, Hiroshi MASUDA\*  
and Shiro SUGAWARA\*

#### 緒 論

甜菜根中のシヨ糖蓄積についての研究は作物学的には多く行なわれているが生化学的な面, すなわち, シヨ糖合成に関与する酵素系およびヌクレオチド, 糖ヌクレオチド系についての研究は少ないように思われる。シヨ糖合成の機構は LELOIR<sup>(1)</sup> の小麦胚芽を用いた研究によって明らかにされた。すなわち高等植物において, 次の2つの反応機構がある。UDP-glucose + D-fructose  $\rightleftharpoons$  sucrose + UDP, UDP-glucose + D-fructose-6-phosphate  $\rightleftharpoons$  sucrose-6-phosphate + UDP.

甜菜根中のシヨ糖合成酵素の存在を始めて明らかにしたのが OLDFIELD<sup>(2)</sup> である。これによると甜菜根中のシヨ糖合成機構は



である。これからでも明らかなようにシヨ糖合成には種々のヌクレオチド, 糖ヌクレオチド, 糖リン酸エステルなどが関与している。一方 RAVLINOVA<sup>(3)</sup> は甜菜の葉, 維管束および葉柄柔組織における酸可溶性ヌクレオチドおよび糖リン酸エステルについて報告している。しかし生育中の甜菜主根についてシヨ糖合成に関与する各成分についての総合的な研究の報告はない。

われわれは甜菜主根の生育中の各時期におけるシヨ糖, 還元糖含量の変化, ヌクレオチド,

\* Laboratory of Applied Biological Chemistry, Obihiro Zootechnical University, Obihiro, Hokkaido, Japan.

糖ヌクレオチド含量の変化およびシヨ糖合成に關与する2,3の酵素活性の変化を比較しシヨ糖の蓄積がどの時期に開始され種々の成分がどのような変化を示すかを検討したので報告する。

### 材料および方法

#### 1. 供試材料

甜菜は帯広畜産大学圃場で栽培し、適時主根を採取し実験に供した。供試材料として平均的な大きさの主根を選び洗浄し生重を秤量後、可溶性糖、ヌクレオチド類の分析および酵素の調製に用いた。

#### 2. 可溶性糖の抽出および分析

可溶性糖の抽出はエタノールで湯浴上還流・冷却法を用いた。すなわち、主根50gを80%エタノール中で湯浴上で還流・冷却し酵素活性を止め、さらに磨砕し、再び上記と同様の方法で処理し抽出液を合わせ減圧濃縮し、濃縮後80%エタノールを加え生じる不溶物を遠心分離で除去し、その上清液を以後の分析に供した。

全可溶性糖の定量はフェノール・硫酸法(DUBOIS<sup>(4)</sup>)、還元糖の定量はSOMOGYI<sup>(5)</sup>法を用いた。

#### 3. ヌクレオチドの抽出

ヌクレオチドの抽出方法としては過塩素酸抽出法、トリクロル酢酸抽出法およびエタノール抽出法などが知られているが、予備的実験で過塩素酸抽出法とエタノール抽出法について検討したが同様の結果を得たので今回はエタノール抽出法によって行なった。

甜菜主根800gを80%エタノール抽出を3回繰り返し抽出後濃縮し中尾<sup>(6)</sup>の方法により活性炭カラムで精製した。

#### 4. ヌクレオチドの分別

ヌクレオチドの分別は陰イオン交換カラムクロマトグラフィーによって行なった。カラムの調製、試料の添加度はBERGKVIST<sup>(7)</sup>法による中島<sup>(8)</sup>らの記載に準じた。すなわち陰イオン交換樹脂はDowex 1,X-8のギ酸型を用いた。試料溶液をアンモニアでpH9.4にしカラムに吸着させた。

溶出には次の展開液を用いた。

展開液組成

- |  |   |  |
|--|---|--|
| 1. 純水  | 2. 0.005N-HCOOH   | 3. 0.02N-HCOOH   |
| 4. 0.1N-HCOOH  | 5. $\begin{pmatrix} 0.1N-HCOOH \\ 0.05N-HCOONa \end{pmatrix}$ | 6. $\begin{pmatrix} 0.1N-HCOOH \\ 0.1N-HCOONa \end{pmatrix}$ |
| 7. $\begin{pmatrix} 0.1N-HCOOH \\ 0.3N-HCOONa \end{pmatrix}$ | 8. $\begin{pmatrix} 0.1N-HCOOH \\ 0.6N-HCOONa \end{pmatrix}$  | 9. $\begin{pmatrix} 0.2N-HCOOH \\ 0.8N-HCOONa \end{pmatrix}$ |

10.  $\begin{pmatrix} 0.2\text{N-HCOOH} \\ 1.0\text{N-HCOONa} \end{pmatrix}$       11.  $\begin{pmatrix} 2\text{N-HCOOH} \\ 2\text{N-HCOONa} \end{pmatrix}$       12. 2NHCl

スクレオチドのペーパークロマトグラフィーは東洋ロ紙 No. 51 を用い, 溶媒は一プロピルアルコール: アンモニア: 水 (60:30:10), スクレオチドの検出は紫外線ランプを用いた。

### 5. スクレオチドの同定および定量

イオン交換クロマトグラフィーで分別した 260 m $\mu$  の吸収パターンの画分を展開液を除くために活性炭処理した。スクレオチドの同定は活性炭処理液をペーパークロマトグラフィーすることにより行なった。さらにペーパークロマトグラフィーのスクレオチドのスポットを切り取り 0.01N-HCl, 0.01M NaOH で抽出し, 紫外線吸収スペクトルで測定し最大吸収, 最小吸収, 250/260, 280/260, および 290/260 の吸収比より同定した。

スクレオチドの定量は同定の場合と同じく処理し, ペーパークロマトグラフィーを行ないスポットを切り取り 0.1N-HCl で抽出し, 紫外線吸収スペクトルの測定によって塩基を定量<sup>(9)</sup>する方法で行なった。

### 6. 酵素の調製

100 g の主根を洗浄し等量の 0.5 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) とともにホモジネートしガーゼでろ過し, ろ液を 12,000 r.p.m., 20 分間遠心分離しその上清液に 100 ml に対し硫酸 60 g の割合で添加し 4 時間塩析した。その後, 遠心分離の沈澱物を 0.1 M Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.0) に溶解し, Sephadex G-50 で脱塩した。このときの溶出液は 0.1 M Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.0) で溶出を行なった。その試料をショ糖合成酵素活性およびホスファターゼ活性の測定に用いた。同様に Sephadex G-50 での脱塩で溶出液を McIlvaine 緩衝液 (pH 5.0) で溶出した試料でショ糖分解酵素活性を測定した。

#### ショ糖合成酵素活性の測定

反応液は UDPG 0.5  $\mu$  moles, フラクトース 2  $\mu$  moles, 2 M Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.2) 0.01 ml, 酵素液 0.1 ml で全容 0.15 ml にし 37°C, 30 分間反応した。反応後, 水を加えて 0.5 ml としこれに 5 N NaOH を 0.02 ml 加え混和し 100°C で 10 分間加熱した。生成したショ糖をレゾルシン塩酸法で測定した。酵素 1 単位は 1  $\mu$  mole のショ糖を 30 分間に生成する量とし, 生育にともなう酵素活性はこの単位を用いた。

#### ホスファターゼ活性の測定

反応液は最終濃度が  $\beta$ -グリセリンリン酸ナトリウム 0.02 M, ベロナールナトリウム—塩酸緩衝液 0.05 M および酢酸マグネシウム 0.001 M で容量 5 ml になるようにし 38°C に保温し酵素液を 0.1 ml 加えて 5 分間反応させる。反応後 30% トリクロール酢酸 2 ml を加えて反応を止め遠心分離し上清液を得, 沈澱物を 5% トリクロール酢酸 2 ml で洗浄し, その洗液と先の上清液と合わせ中村<sup>(10)</sup>の方法で無機リン酸を定量した。酵素 1 単位は 1  $\mu$ g の無機リン酸 5

分間を遊離する量とした。

### ショ糖分解酵素活性の測定

反応液は2%ショ糖1 ml, McIlvaine 緩衝液 (pH 5.0) 0.5 ml, 酵素液 0.5 ml にし 37°C, 30 分間反応し生成する還元糖を SOMOGYI<sup>(5)</sup>法により測定した。酵素1単位は1 μg のグルコースを生成する量とした。

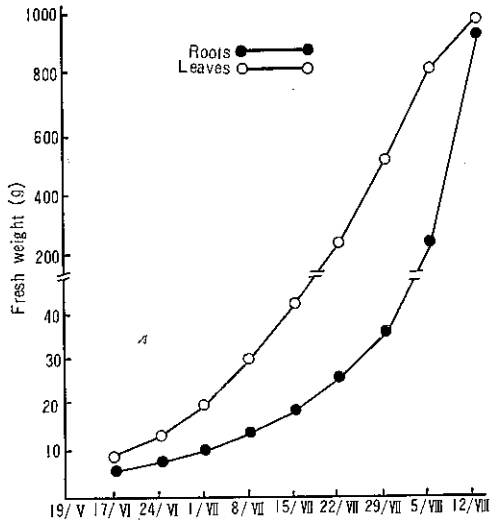


Fig. 1. Changes in Fresh Weight of Sugar Beet Roots and Leaves during Development.

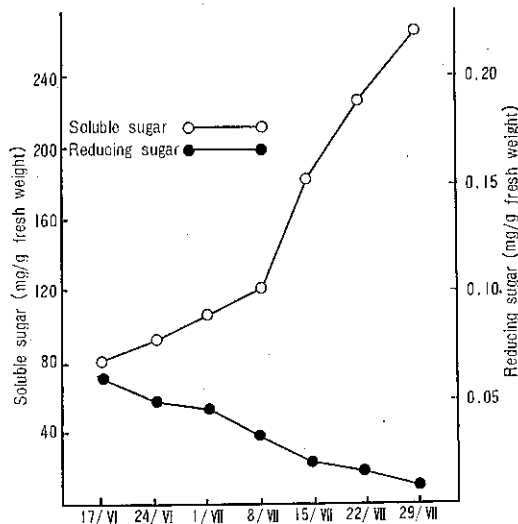


Fig. 2. Changes in Soluble and Reducing Sugar of Sugar Beet Roots during Development.

## 結 果

### 1. 甜菜主根の生育過程における可溶性糖含量の変動

主根の生育における根重および葉重の変化について Fig. 1 に示した。それともなる全可溶性糖および還元糖含量の変化を Fig. 2 に示した。この場合、ペーパークロマトグラフィー、ガスクロマトグラフ

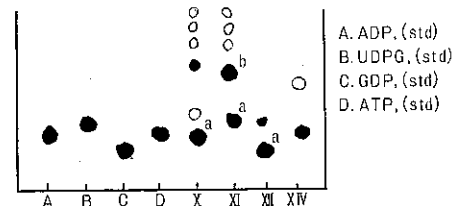
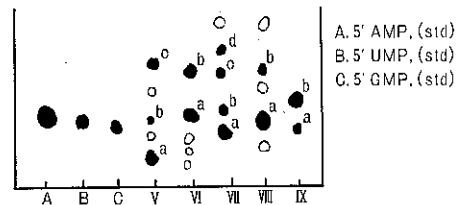
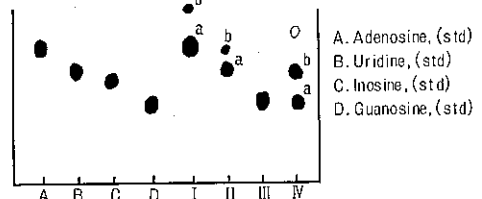


Fig. 3. Identification of Nucleotides in Sugar Beet Roots by paper chromatography. solvent system: n-propanol: NH<sub>4</sub>OH: H<sub>2</sub>O (60:30:10)

Table 1. Separation and Characterization of Soluble Nucleotides from Sugar Beet Roots

Peak No.	paper chromatography	R-AMP solvent	pH	absorption maximum	absorption minimum	absorption ratio 250/260	280/260	290/260	spectrum type	identification
I	I-a	1.914	2.0 12.0	259-260 260-261	231-232 228	0.643 0.772	0.268 0.217	0.098 0.069	adenosine	adenosine
	I-b	2.256	2.0 12.0	268 263	245-250 245	0.611 0.842	0.444 0.388	0.388 0.315	?	?
II	II-a	1.560	2.0 12.0	263 262	231 245	0.732 0.842	0.407 0.371	0.070 0.085	uridine	uridine
	II-b	1.743	2.0 12.0	252 -	225 -	1.238 -	0.333 -	0.185 -	?	?
III		1.024	2.0 12.0	251-254 254-262	221-224 230	1.175 0.964	0.578 0.464	0.421 -	guanosine	guanosine
IV	IV-a	1.024	2.0 12.0	252-256 -	- -	1.062 -	0.625 -	0.187 -	guanosine	guanosine
	IV-b	1.512	2.0 12.0	269 249	235-236 283	0.661 0.280	0.846 2.440	0.384 2.440	inosine	inosine
V	V-a	0.378	2.0 12.0	278 268-270	240 245-248	0.459 0.772	1.125 0.954	1.461 0.363	cytidine	3'CMP
	V-b	0.756	2.0 12.0	253 245	233 227	1.181 1.636	- 0.636	- 0.636	?	?
	V-c	1.036	2.0 12.0	265 265	232-235 237-240	0.750 0.777	0.700 0.666	0.400 0.277	?	?
VI	VI-a	1.000	2.0 12.0	259 -	227 -	0.768 -	0.685 -	0.555 -	adenosine	5'AMP
	VI-b	1.256	2.0 12.0	263 260	- 235	0.607 0.750	0.250 0.350	- 0.137	?	?
VII	VII-a	0.878	2.0 12.0	259 262	230 226	0.823 0.812	0.506 0.479	0.365 0.361	adenosine	3'AMP
	VII-b	1.000	2.0 12.0	260 262	232 230	0.785 0.766	0.421 0.338	0.190 0.105	adenosine	5'AMP
	VII-c	1.365	2.0 12.0	262 269	231 235	0.802 0.876	0.439 0.784	0.252 0.546	?	?
	VII-d	1.487	2.0 12.0	260-262 260-263	236-238 237-238	0.914 0.929	0.771 0.596	0.657 0.403	?	?
VIII	VIII-a	0.902	2.0 12.0	262 263	228 240	0.781 0.600	0.312 0.250	- -	uridine	5'UMP
	VIII-b	1.365	2.0 12.0	- 260	230 -	- -	- -	- -	?	?
IX	IX-a	0.768	2.0 12.0	254 260-268	225 228-230	1.046 0.438	0.755 0.712	0.558 0.273	guanosine	5'GMP
	IX-b	1.097	2.0 12.0	258-262 258-263	227 -	0.857 0.857	0.294 0.142	- -	?	?
X		0.731	2.0 12.0	- -	- -	- -	- -	- -	adenosine	ADP
XI	XI-a	0.878	2.0 12.0	260 265	230-232 235	0.866 0.775	0.560 0.510	0.266 -	uridine	UDPG
	XI-b	1.243	2.0 12.0	257 -	237 -	0.962 -	0.698 -	0.396 -	?	?
XII		0.609	2.0 12.0	254 -	227 -	1.025 -	0.620 -	0.367 -	guanosine	GDP
XIII		?	2.0 12.0	- -	- -	- -	- -	- -	?	?
XIV		0.707	2.0 12.0	256 258	227-228 228-230	0.893 0.876	0.540 0.369	0.262 0.075	adenosine	ATP

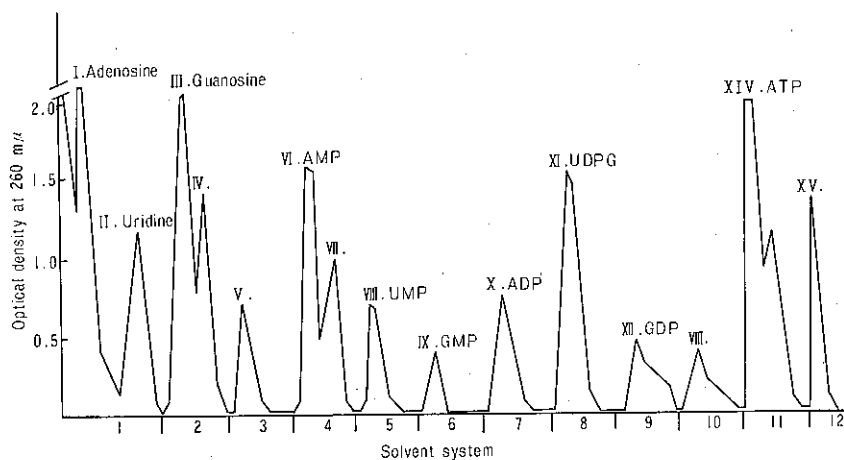


Fig. 4. Ion Exchange Column Chromatogram of Nucleotides from Sugar Beet Roots.  
Column: Dowex I, X-8, 200-400 mesh, Formate form, 1.2 × 15 cm

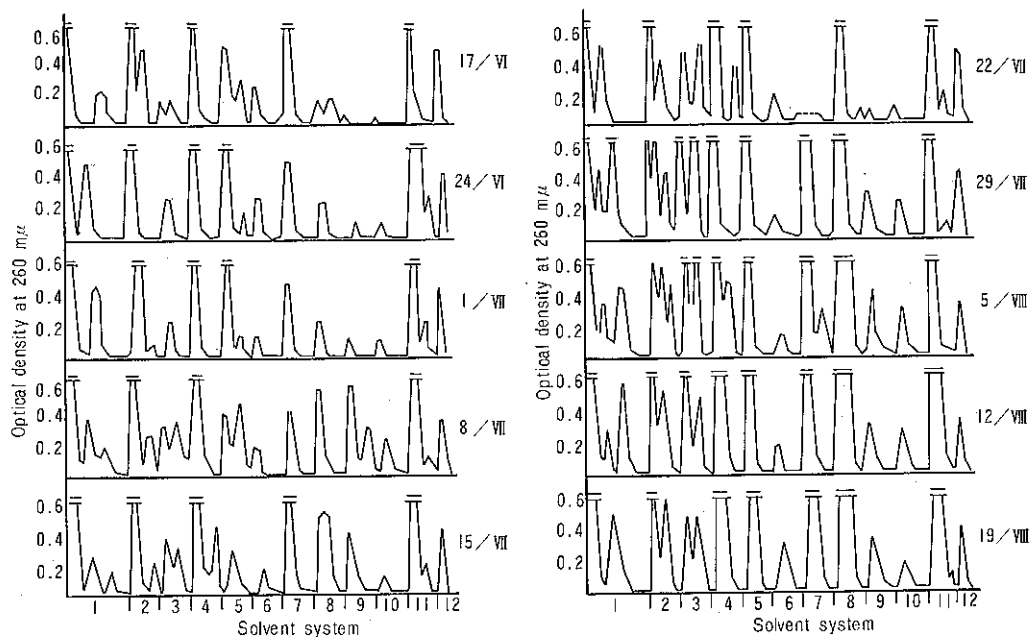


Fig. 5. Changes in Pattern of Soluble Nucleotides in Sugar Beet Roots at Different Stages of Development.

イ-の結果から生育初期の場合でも95%以上はショ糖であり、還元糖はグルコース、フラクトースで等量含まれている。主根が急速に肥大し始める7月末は還元糖はほとんど存在なくなり、ほとんどがショ糖であり急速に蓄積する。

ヌクレオチドおよび糖ヌクレオチドの同定

**Table 2.** The Amounts of nucleotides in Sugar Beet Roots Sampled at Different Stages of Development ( $\mu\text{g}/\text{kg}$  fresh weight)

	adenosine	uridine	guanosine	AMP	UMP	GMP	UDPG	ATP
17/VI		4222.6	1122.6	250.0	1271.1		36.7	796.8
1/VII	1074.6	988.5			601.5		480.1	
8/VII	3398.2	668.8	1301.6	1227.5		55.4	1426.8	1379.9
29/VII	1328.4		1126.9	1341.3			2796.5	
5/VIII	1299.2	1944.4		1570.6	1403.5	23.5	3386.8	2584.7

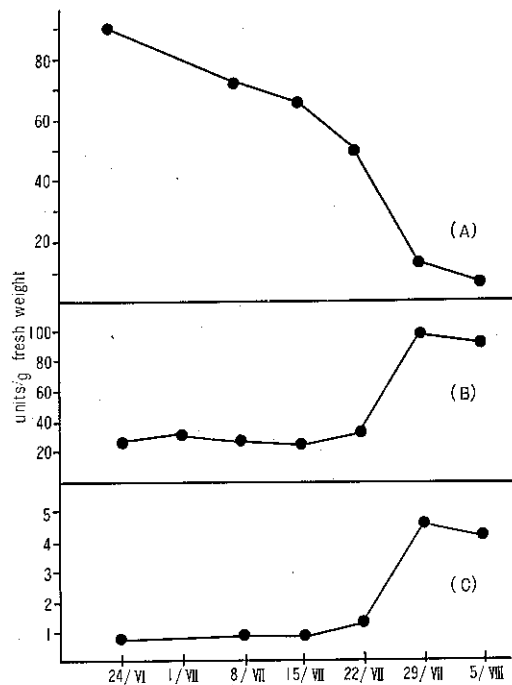
ヌクレオチド, 糖ヌクレオチドの同定は「材料および方法」で述べたように甜菜主根から抽出し, 活性炭処理し陰イオン交換樹脂で分別し 260  $m\mu$  の吸収を示す画分を活性炭処理し, ペーパークロマトグラフィーおよび紫外線吸収スペクトルで測定により同定した。ペーパークロマトグラフィーの結果を Fig. 3 に示した。紫外線吸収スペクトルにおける最大吸収, 最小吸収, 250/260, 280/260, 290/260 の吸収比を Table 1 に示した。以上の結果から陰イオン交換樹脂におけるヌクレオチドおよび糖ヌクレオチドの分別における各画分の同定は Fig. 4 に示したとおりである。

2. ヌクレオチドおよび糖ヌクレオチド含量の生育時期の変動

甜菜根の生育初期から生育盛期までのヌクレオチドおよび糖ヌクレオチド含量の変化を調べた。Fig. 5 に示したのは生育に

ともなうヌクレオチドおよび糖ヌクレオチドの陰イオン交換カラムクロマトグラフィーによる溶出パターンを示し, Table 2 にヌクレオチドおよび糖ヌクレオチド含量の変化を示した。これらのことから生育過程においてショ糖合成に参与する UDPG は主根が肥大し, ショ糖が急速に蓄積される時間に増加する傾向にある。さらに生育全過程を通じて AMP, ADP, ATP の含量は相対的に多いが生育が進むにしたがい増加する傾向にある。その他 GMP, GDP などの存在が確認された。ショ糖合成に参与する UDP, UTP の存在は確認されなかった。

3. 甜菜主根の発育にともなう各種酵素活性の変動



**Fig. 6.** Changes in Activities of some Enzymes in Sugar Beet Roots during Development. (A) Saccharase activity (B) Phosphatase activity (C) Sucrose synthetase activity

甜菜主根の発育にともなう 2, 3 の酵素活性の変化を Fig. 6 に示した。これによるとシヨ糖分解酵素は生育初期には酵素活性は高いが生育にともなうて酵素活性は減少しほとんど存在しなくなる。またシヨ糖合成酵素およびホスファターゼはシヨ糖合成時期に酵素活性が増加する傾向にある。

## 考 察

今回の報告は甜菜主根において、シヨ糖蓄積がどの時期に開始されるか、さらにその時期にシヨ糖合成に関するヌクレオチド、糖ヌクレオチド含量を中心にし可溶性糖含量、シヨ糖合成に関与する 2, 3 の酵素活性がどのような変化を示すかを検討することにあつた。実験結果から主根が急速に肥大する時期にシヨ糖の蓄積が開始され、それと同時に、シヨ糖合成に関与する UDP-glucose が急速に増大する。AMP, ATP も全生育過程を通じて相対的に多いが生育が進行するに従い増加する傾向にある。しかし UDP, UTP の存在は確認されなかつた。このことは以後さらに検討しなければならない。シヨ糖合成に関与する酵素では生育初期に高い活性を示したシヨ糖分解酵素はシヨ糖蓄積が開始される時期になると減少しほとんど存在しなくなる。それにともなうて還元糖も減少し存在しなくなる。シヨ糖合成酵素、ホスファターゼはシヨ糖蓄積に従い活性が高くなるように思われる。

このように甜菜主根が急速に肥大する時期にシヨ糖の蓄積が開始されるものと考えられるが、このことは主根の代謝系がこの時期にシヨ糖蓄積の方向に進行するように質的に転換するものと考えられ、さらに主根の肥大とシヨ糖合成の代謝系との関係が明らかにされるかもしれない。

## 要 約

甜菜主根の生育にともなう炭水化物、ヌクレオチド類および酵素などの量的変化を調べた。

1. 全可溶性糖（シヨ糖）の蓄積は甜菜主根の肥大にともなうて急速に増加し、それに反し還元糖は減少した。
2. 生育期主根から分離したヌクレオチド、糖ヌクレオチド類は AMP, ADP, ATP, UMP, UDPG, GMP, GDP, CMP である。これらのヌクレオチド類のうち UDPG は甜菜主根の生育初期には含量が少ないが生育にともなうて増加した。AMP, ADP, ATP, UMP は主根の生育とともに増加した。
3. シヨ糖分解酵素の活性は主根の生育初期に大きくしだいに低下するが、シヨ糖合成酵素活性およびホスファターゼ活性は主根の生育とともに増加した。以上の実験結果をもとに甜菜主根におけるシヨ糖合成の機構について考察した。



## 文 献

- 1) C. E. CARDINI, L. F. LELOIR and J. CHIRIEOGA: *J. Biol. Chem.*, **214**, 149 (1955).
- 2) J. V. DUFFON, A. CARRUTHERS and J. F. T. OLDFIELD: *Biochem. J.*, **81**, 266 (1961).
- 3) O. A. RAVLINOVA and T. P. AFANASEVA: *Soviet Plant Physiol.*, **9**, 106 (1962).
- 4) M. DUPOIS, K. A. GILLES, J. K. HAMILTON, R. A. REBERS and F. SMITH: *Anal. Chem.*, **28**, 350 (1956).
- 5) M. SOMOGYI: *J. Biol. Chem.*, **195**, 19 (1952).
- 6) 中尾 真: 蛋白質・核酸・酵素, **3**, 203 (1958).
- 7) R. BERGKVIST: *Acta. Chem. Scand.*, **10**, 1303 (1956).
- 8) 中島宜郎・市川恒平・鎌田政善・藤田栄一郎: 日本農芸化学会誌, **35**, 797 (1961).
- 9) 浮田忠之進: 核酸, ヌクレオチド, ヌクレオシド, 朝倉書店.
- 10) 中村道徳: 化学と生物, **3**, 39 (1965).

## Summary

Changes in the composition of carbohydrates, soluble nucleotides and enzymes were investigated during the development of sugar beet roots.

Total soluble sugars increased and accumulated during the stage of active development, whereas reducing sugars decreased. Throughout the periods of development, the compositions of nucleotides and related substances assayed by anion exchange column chromatography were adenosine monophosphate, adenosine diphosphate, adenosine triphosphate, uridine monophosphate, uridine diphosphate-glucose, guanosine diphosphate and cytidine monophosphate. Of these nucleotides, the level of uridine diphosphate-glucose was low in the initial developing stage, and then increased gradually. Adenosine monophosphate, adenosine diphosphate, adenosine triphosphate and uridine monophosphate increased throughout the stage of active development. Sucrose cleaving activity was high in young sugar beet roots and decreased gradually during later development. On the contrast, sucrose synthesizing and phosphatase activity increased throughout the stage of sugar beet root development.

The mechanism of sucrose biosynthesis in sugar beet roots is discussed with reference to changes in nucleotides.