

チューリップ球根リン片内における貯蔵デンプン分解の 低温による誘導

小宮山智*・山崎拓也*・堀 恵美*・志田由起子*・村山明信*・五十嵐太郎*・大山卓爾*

キーワード チューリップ, デンプン, α -アミラーゼ, 低温, 球根

1. はじめに

高等植物は種々の貯蔵炭水化物を種子, 地下茎, 塊根, 球根, その他の器官に集積貯蔵する。これらの炭水化物は発芽後や萌芽時に分解され, 植物の初期生長を支えるために利用される。しかしそれだけではなく, 温度が氷点下になる冬期間あるいは低温貯蔵中にも分解され, 低分子量の化合物に変換することにより浸透圧を上げ, 凍結によるダメージから身を守る役割も果たすと考えられている。植物の種類や貯蔵器官により貯蔵炭水化物の形態はデンプン, イヌリン, マンナンなどと異なり, その分解様式も様々である¹⁾。

高等植物におけるデンプンの分解機構はイネ科穀物種子において詳細に調べられ, 植物ホルモンのジベレリンにより α -アミラーゼの発現が遺伝子レベルで制御されていることが明らかにされている²⁾。しかしながらイネ科種子以外の植物の貯蔵器官(塊茎, 塊根, 球根など)におけるデンプン分解機構はまだ未解明である部分が多い³⁾。

秋植え球根植物であるチューリップは大量の炭水化物を球根リン片に集積し, その主要貯蔵炭水化物はデンプンでありスクロースや低重合度のフラクトオリゴ糖も含むが, タマネギやヒヤシンスなどに多量に集積するイヌリンはごく僅かしか認められていない⁴⁾。チューリップは春の萌芽後, 茎葉部の正常な伸長と開花のために比較的長期間低温にさらされる必要がある。チューリップの低温要求性の機構は完全には理解されていないが, 低温期間中に貯蔵炭水化物やタンパク質などの高分子成分が糖やアミノ酸といった利用しやすい低分子成分に転換され^{5,6)}, ジベレリン含量の増加が伴うこと⁷⁾が示唆されている。チューリップ球根リン片における低温期間中のデンプン分解には α -アミラーゼが関与していると推察さ

れるが, このアミラーゼは貯蔵デンプンと同一の生細胞内に存在している点でイネ科種子と大きく異なっている。このためデンプンの分解機構はイネ科植物種子とは全く異なる可能性がある。

本研究では, チューリップ球根リン片におけるデンプン分解機構について基礎的知見を得るため, チューリップの新球肥大時から, 収穫, 低温処理, 植え込み, 開花までのリン片内の α -アミラーゼ活性および炭水化物成分に対する低温処理の影響について調べ, さらにリン片中の α -アミラーゼの局在性についても検討を行った。

2. 材料および実験方法

1) 栽培および処理区

本研究では処理区は低温処理区と対照区の二つを設け, 1区4連で行った。なお, 対照区の球根は低温処理を行わず室温で保存した。

チューリップ (*Tulipa gesneriana*) は新潟県中条町の圃場で栽培した品種「マルタ」を用いた。1991年5月7日に摘花した後, 6月11日に球根を収穫した。収穫した球根は処理を始めるまで室温(約20°C)で保存した。低温処理区は8月9日から3週間15°Cで予備冷蔵を行ったのち, 8月30日から2°Cで本冷蔵を2カ月間行った。10月30日に処理を終了し, 低温区, 対照区ともに新潟大学農学部の温室内で室温を約20°Cに設定して土耕栽培を開始した。低温処理区は12月下旬に正常に開花したが, 対照区の成長は遅れ, 茎葉部はロゼッタ状を呈し, その一部は1992年2月中旬に花茎の短い矮化した状態で開花した。5月7日(摘花), 5月24日, 6月11日(収穫), 8月9日(予冷蔵開始), 8月30日(本冷蔵開始), 9月25日(本冷蔵4週間目), 10月30日(土耕栽培開始), 11月25日(土耕4週間目), 12月25日(低温区開花時), 2月24日(対照区開花時)に試料を採取して分析に供した。

2) 炭水化物含有量の測定

球根試料は採取後解体し, ノーズ, 根盤, 新球が混入

* 新潟大学農学部 (950-21 新潟市五十嵐 2-8050)
1996年2月9日受付・受理
日本土壤肥科学雑誌 第68巻 第1号 p.23~29 (1997)

しないようにリン片を切り出した。切り出したリン片は脱塩水で洗浄後、試料水分量の約 4 倍容のエタノールを加えて乳鉢および乳棒を用いて磨砕抽出を行った。磨砕液は 70°C、15 分間加温してから遠心分離 (10000×g 10 分間) し、上澄み液と残さに分離した。残さはさらに 80% エタノールで 2 回洗浄し、上澄み液と洗液は併せて 25 mL に定容し、80% エタノール可溶性画分とした。残さは 80% エタノール不溶性画分とした。エタノール可溶性画分に含まれる遊離のフラクトース、グルコース、スクロースはガスクロマトグラフィーにより定量を行った⁴⁾。フラクトオリゴ糖はフェノール硫酸法から可溶性全糖を求めた⁴⁾後、この値からフラクトース、グルコース、スクロース量を差し引いて求めた。デンプンはエタノール不溶性画分を DMSO 塩酸により抽出した後、食品分析酵素試薬：F キットスターチ (ベーリンガー・マンハイム山之内社製) を用いて測定した⁴⁾。

3) α -アミラーゼの活性測定

低温処理した球根と対照区での球根リン片の抽出液の α -アミラーゼの活性測定は、着色デンプン法 (ネオ・アミラーゼテスト「第一」, 第一化学薬品) によった。球根を解体した後リン片のみとし、リン片組織を新鮮重の 5 倍容の 10 mM メルカプトエタノールを含むトリス塩酸緩衝液 (pH 7.5) 中で少量の石英砂を加えて磨砕した。遠沈管に移して 15000×g 20 分間遠心分離し、得られた粗酵素溶液を用いてネオ・アミラーゼテスト「第一」で測定した。本法は基質である不溶性青色デンプンポリマーに α -アミラーゼが作用すると、加水分解を受け、可溶化した青色色素の吸光度 (620 nm) の測定値から活性を求める方法である。吸光度から酵素活性 (IU) への換算は試薬に付属している検量線によった。

4) 等電点電気泳動による α -アミラーゼのザイモグラム

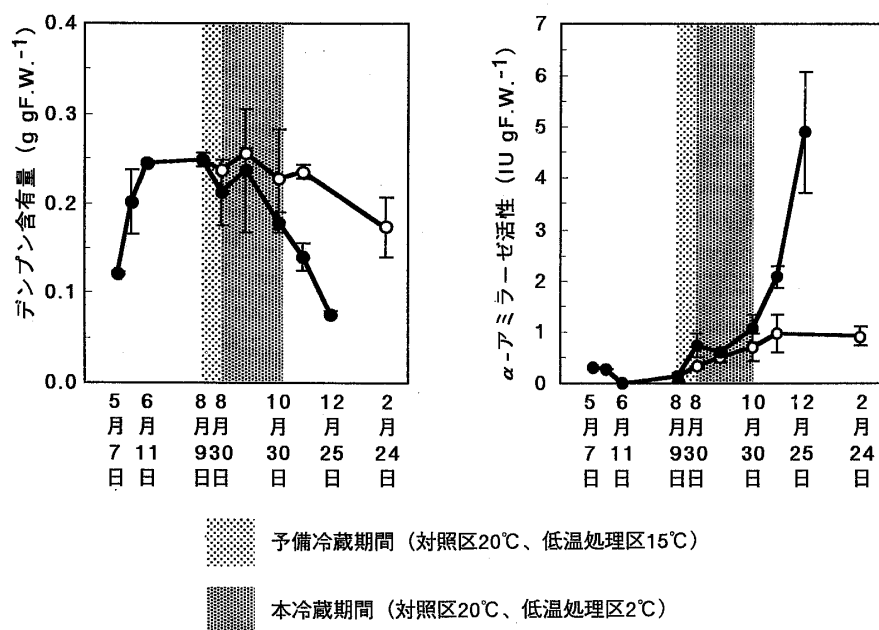
各時期におけるチューリップ球根リン片の α -アミラーゼイソザイム組成を検討するため等電点電気泳動を行った。2.4% アンフォライン pH 3.5~5 (ファルマシア), 9.75 mg L⁻¹ リボフラビンを含む 7 g kg⁻¹ アクリルアミド溶液でスラブゲルを作成した。陽極に 352.2 mg L⁻¹ 酢酸カルシウムを含む 12 mL L⁻¹ 酢酸溶液、陰極に 12 mL L⁻¹ エチレンジアミン溶液を用い、4°C、12 時間電気泳動を行った。電気泳動終了後、ゲルを 2 mM 塩化カルシウムを含む 20 mM 酢酸緩衝液で数回洗浄した後、10 g kg⁻¹ 可溶性デンプンと 2 mM 塩化カルシウムを含む 20 mM 酢酸緩衝液中で 1 時間反応させ、ヨウ素ヨウ化カリウム溶液でゲルを染色して α -アミラーゼを検出した。

5) リン片組織内におけるデンプンと α -アミラーゼの局在性

デンプンの局在性を検討するため、低温処理終了時の低温区および対照区の球根を 2 mM 塩化カルシウムを含む 50 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.5) 中でマイクロスライサーを用いて厚さ 200 μ m の切片を作成した後、ヨウ素ヨウ化カリウム溶液で切片を染色して光学顕微鏡でデンプン粒の分解状況を観察した。

また、in situ の酵素活性について検討を行うため、リン片をマイクロスライサーで 500 μ m 厚にスライスし、この切片を可溶性デンプンを含む 7.5 g kg⁻¹ ポリアクリルアミドゲル薄膜に密着させ 30°C で 30 分間反応させた。反応後ヨウ素ヨウ化カリウム溶液 (ヨウ素 0.12 g L⁻¹, ヨウ化カリウム 1.2 g L⁻¹) で未分解デンプンを検出し、アミラーゼの存在部分を特定した。

低温処理期間終了後の対照区と低温区の α -アミラーゼの局在性については、球根を構成する 4 枚のリン片を各々表皮部と中心部に分割した後、それぞれの α -アミラーゼの活性を測定した。一枚ずつ分離したリン片は、2 mm 厚にスライスした後、メスを用いて表皮部 (約 1 mm) を切り出し中心部 (厚さ約 1~2 mm 程度) と分割した。各組織新鮮重 0.2 g をマイクロチューブに採り、0.5 mM トリス塩酸緩衝液 (2 mM 塩化カルシウムを含む) を加え、Cool Unit CB-20 (IKEDA SCIENTIFIC CO., LTD.) で冷却しながら Homogenizer S-205 (IKEDA SCIENTIFIC CO., LTD.) でホモジュナイズし、15000 rpm で遠心分離し粗抽出液を得た。粗抽出液はヨウ素法により以下のように活性を測定した⁹⁾。粗抽出液を適切な濃度に希釈した後、試験管に 0.4 mL 採り、37°C で 5 分間プレインキュベーションを行った。続いて 2 mM 塩化カルシウムおよび 0.15% 可溶性デンプン (片山化学：特級) を含む 50 mM 酢酸緩衝液 (pH 5.0) 0.4 mL を添加し、37°C で正確に 5 分間酵素反応を行った。反応終了後、反応停止液 (ヨウ素 0.12 g L⁻¹, ヨウ化カリウム 1.2 g L⁻¹ を含む 0.025 N 塩酸溶液) 1 mL を加え反応を停止させた。脱塩水を 4 mL 加えた後、620 nm の吸光度を測定した。酵素溶液の代わりに脱塩水で同様の反応を行ったものをブランクとした。37°C、5 分間で可溶性デンプンの吸光度を 10% 低下させる活性を 1 酵素単位とした。チューリップリン片抽出液の実測結果では、本法の 1 酵素単位は 0.0067 IU に相当した。



第1図 チューリップ球根リン片内のデンプン含有量と α -アミラーゼ活性におよぼす低温処理の影響
○ 対照区, ● 低温処理区, エラーバーは標準誤差 (SE, $n=4$) を示す。

3. 結果および考察

1) 各種炭水化物含有量および α -アミラーゼ活性に対する低温処理の影響

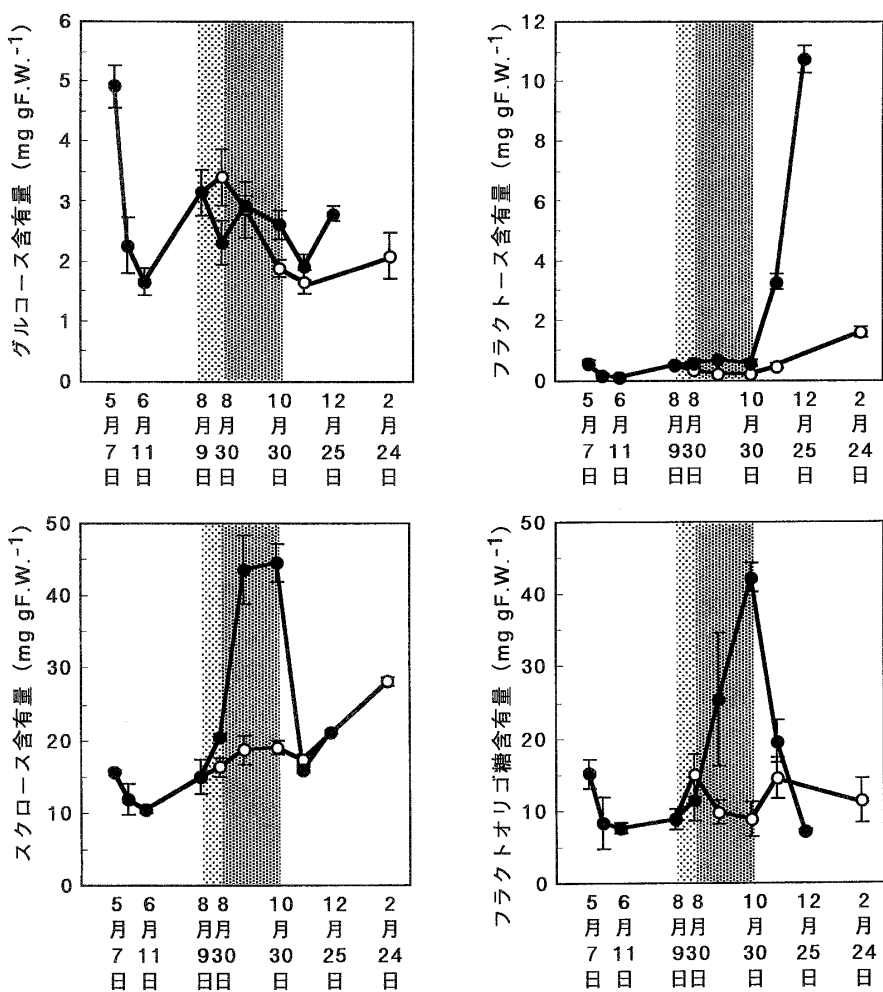
第1図に新球肥大時から開花までの球根リン片中のデンプン含有量と α -アミラーゼ活性に対する低温処理の影響を示した。リン片に多量のデンプンを集積しつつある登熟中の新球リン片にも若干の α -アミラーゼ活性が検出されたが、収穫時点では活性は検出されなかった。その後低温処理区では予備冷蔵開始後 α -アミラーゼ活性が高まり、本冷蔵中も一定レベルを維持した。さらに、10月末の植え込み後に著しい活性の上昇が見られた。これらの活性の変動はデンプンの減少と対応しており、低温処理が α -アミラーゼの誘導あるいは活性化を引き起こしていることを示唆した。また、第2図に示すように低温処理期間中、低温処理区球根リン片にデンプンの減少に伴いスクロースおよびフラクトオリゴ糖の集積が認められた。このことは、低温により誘導されたデンプンの分解産物であるグルコースやマルトオリゴ糖がそのままリン片に集積するのではなく、スクロースやフラクトオリゴ糖へ転換して集積することを示す。植え込み後茎葉部の伸長に伴いスクロースとフラクトオリゴ糖が速やかに減少したことから、これらの糖は茎葉部や根の生長に利用されたと考えられる。植え込み後にフラクトース濃度の上昇が見られたが、これは、フラクトオリ

ゴ糖のフラクトース残基の加水分解により生じたものと予想される。一方、対照区においても予冷開始時期以降 α -アミラーゼ活性は徐々に高まり、植え込み時には低温処理区の活性とほぼ同程度にまで上昇した(第1図)。ただしこの際デンプンの減少およびそれに伴う可溶性糖の上昇はほとんど見られなかったことから実際にはデンプンの分解はほとんど起こらなかったと考えられる。また対照区では植え込み後の著しい活性の上昇は認められなかった。

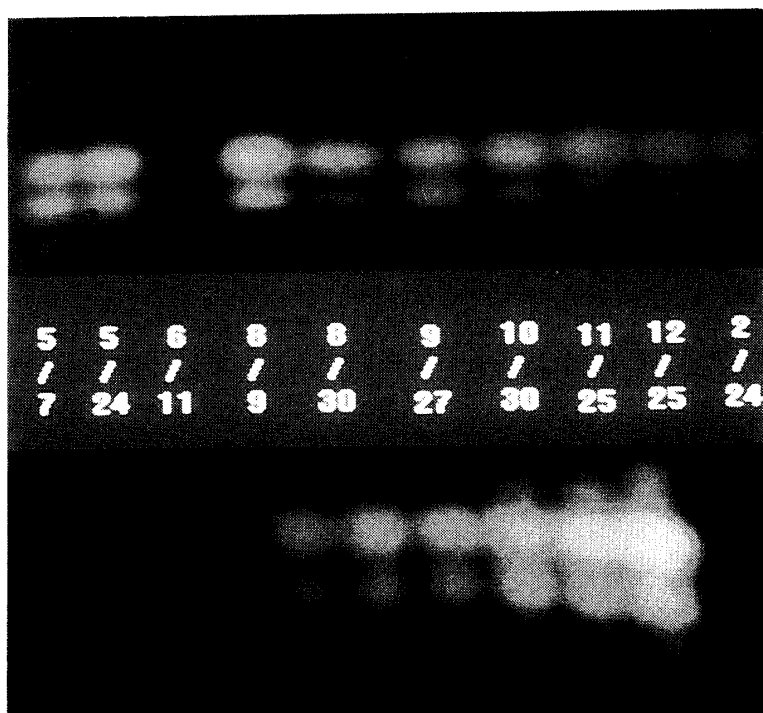
酵素粗抽出液を等電点電気泳動後、 α -アミラーゼ活性染色によりアイソザイムパターンを調査した結果(第3図)、本冷蔵開始から植え込みまでは低温区、対照区とも2本の同様のバンドパターンが認められた。したがって低温処理中、低温により通常と異なるアイソザイムが新たに誘導される可能性は低いと判断された。ただし低温処理区では植え込み後、植え込み前から見られた2本のバンドの活性が著しく高まり、さらにそれ以外に2~3本の弱い活性バンドが現れた。

2) リン片組織におけるデンプン粒および α -アミラーゼの局在性

低温処理期間中、対照区の α -アミラーゼ活性が上昇し、低温区と大きな差がないにも関わらず、デンプンの減少および可溶性糖の上昇が認められない理由は、貯蔵デンプン粒と α -アミラーゼが物理的に隔離され接触しない可能性が考えられる。そこでリン片組織におけるデ



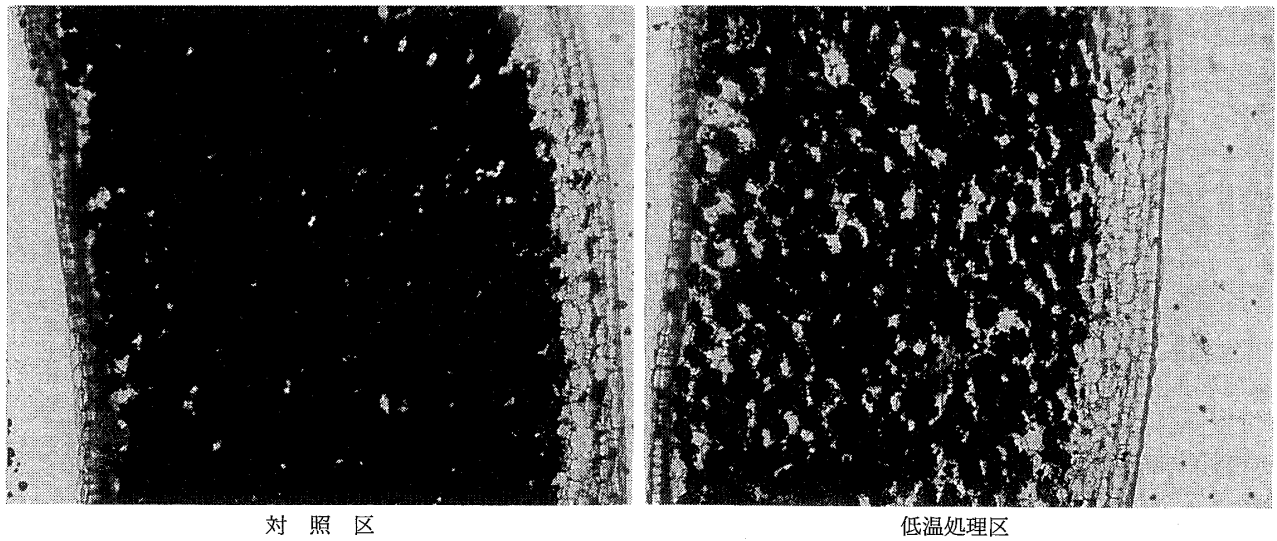
第2図 チューリップ球根リン片内可溶性糖含有量に対する低温処理の影響
シンボルは第1図と同じ。



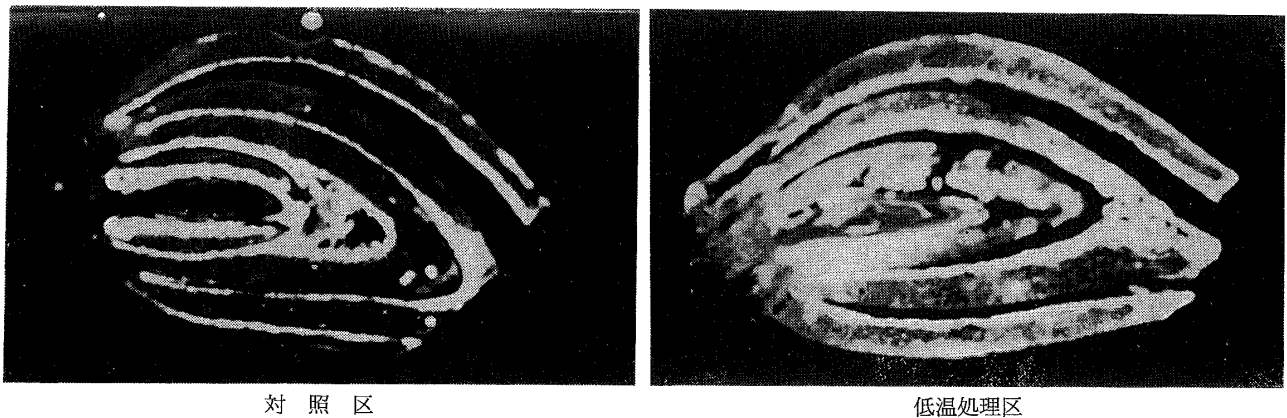
対照区

低温処理区

第3図 チューリップリン片 α -アミラーゼイソザイムパターン処理別および時期別変化
中央の数字は月/日を示す。対照区は5/7～2/24の試料を、低温処理区は8/9～12/25の試料を分析した。



第4図 光学顕微鏡によるチューリップリン片内デンプンの観察
デンプンはヨウ素ヨウ化カリウム溶液で染色した。両区ともに切片の左側が内側表皮で右側が外側表皮である。



第5図 デンプン薄膜法によるチューリップリン片内 α -アミラーゼ活性の局在性

ンブ粒および α -アミラーゼの局在性について検討を加えた。

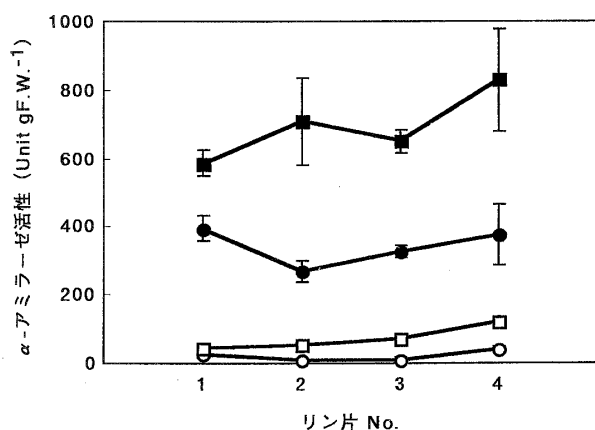
植え込み時のリン片組織切片をヨウ素ヨウ化カリウム溶液でデンプン染色し、光学顕微鏡で観察したところ、対照区において表皮部にデンプン粒の認められない細胞群の層が認められたが、中心部には多量のデンプン粒を含んでいた。低温処理区ではデンプン粒を含まない外側の細胞層は対照区よりやや厚く、またリン片中心部にもデンプン粒の認められない透明な細胞がランダムに観察された(第4図)。

リン片における *in situ* の酵素活性をデンプン薄膜法で検討したところ(第5図)、対照区、低温区ともにリン片表皮組織に高い α -アミラーゼ活性が認められた。対照区のリン片内部にはほとんど活性が検出されなかったが、低温区のリン片内部にはデンプン分解活性が認め

られた。

酵素タンパク質の局在性について定量的に確認するため、球根を構成している4枚のリン片を1枚ずつ分けて、各々のリン片組織を表皮部と中心部に分割し、各部位の酵素溶液を抽出して活性を測定した。その結果、第6図に示すように、対照区ではデンプン集積部位のリン片中心部では α -アミラーゼ活性が著しく低く、表皮部の活性の方が有意に高かった ($p < 0.1\%$)。低温処理区の α -アミラーゼ活性は、表皮部、リン片中心部ともどのリン片でも対照区より有意に高かった(リン片1の中心部は $p < 5\%$ 、それ以外の部位では $p < 0.1\%$)。低温区の中心部では、内側のリン片ほど α -アミラーゼ活性が高く、内側のリン片ほどデンプンの分解が早いという観察結果と一致した。

以上の結果から α -アミラーゼは低温処理の有無にか



第 6 図 低温処理期間終了後の対照区と低温処理区におけるチューリップ球根リン片内 α -アミラーゼの局在性
リン片 No. は 4 枚の球根リン片を外側から 1, 2, 3, 4 と番号をつけた。

● 対照区リン片表皮部, ○ 対照区リン片中心部, ■ 低温処理区リン片表皮部, □ 低温処理区リン片中心部。

かわらず 8 月下旬ころから表皮部組織で発現するが、これはリン片中心部組織内に貯蔵された多量のデンプン粒を分解できないと考えられる。一方、低温処理はデンプンを貯蔵している中心部組織の細胞において α -アミラーゼの発現およびデンプン粒の分解を誘導していると考えられた。

イネ科植物種子は解剖学的に生きた細胞からなる胚と死細胞で構成される胚乳に大別され、貯蔵デンプン顆粒は胚乳に集積する⁸⁾。デンプン顆粒を分解する α -アミラーゼは、胚盤の最外郭に位置する胚盤上皮細胞と胚乳を覆うアリーロン層細胞で合成された後、細胞外に分泌されて胚乳で作用する細胞外分泌型酵素である。イネ科種子の発芽時に誘導される α -アミラーゼは、まず胚組織で、続いてアリーロン層で合成されることがデンプン薄膜法を用いた酵素組織化学的研究⁹⁾、そして in situ ハイブリダイゼーション法を用いた mRNA の組織化学的研究¹⁰⁾ により明らかにされた。チューリップリン片組織はイネ科植物種子と異なり、生きた細胞内に貯蔵デンプンが存在しており、おそらくデンプンを貯蔵した細胞自身の合成する α -アミラーゼがデンプン分解に寄与すると予想された。

4. 要 約

チューリップ球根の α -アミラーゼ活性および各種炭水化物成分濃度変化におよぼす低温処理の影響について調べ、さらに α -アミラーゼのリン片内における局在性を検討した。

低温区では処理期間中、 α -アミラーゼ活性が徐々に

高まり、それに伴いデンプンの減少とスクロースおよびフラクトオリゴ糖の増加が見られた。定植後、茎葉部の伸長に伴い α -アミラーゼ活性は急増し、デンプンの分解は加速され、同時に可溶性糖も消費された。一方、低温に曝されなかった対照区でも夏期にリン片新鮮重あたりの α -アミラーゼ活性が上昇した。しかし、このときデンプンの減少および可溶性糖の増加は認められなかった。

等電点電気泳動により α -アミラーゼのアイソザイムパターンを調べたところ、対照区、低温区ともに 2 本の主要なバンドが確認された。植え込み後、低温処理区ではすでに存在した 2 本のバンドの活性が著しく高まるとともに新たな活性バンドも現れた。

植え込み時のリン片組織を光学顕微鏡で観察したところ、低温処理区および対照区ともに表皮部にデンプン粒の認められない細胞群の層が認められ、低温処理区では中心部も一部デンプン粒の認められない細胞が観察された。リン片における in situ の酵素活性をデンプン薄膜法で検討したところ、リン片中心部に比べ表皮部の方が活性が高い傾向が見られた。リン片組織を表皮部と中心部に分割後、粗酵素溶液を抽出し活性を測定したところ、対照区では表皮にのみ α -アミラーゼ活性が高かったが、デンプンが大量に集積している中心部では活性が低かった。一方、低温処理区においても表皮部の活性が高かったが、リン片内部の活性も高まり、デンプン粒の分解に寄与したと考えられた。

以上の結果から、低温処理はデンプンを貯蔵しているリン片中心部細胞の α -アミラーゼ活性を誘導しデンプンを分解すると考えられた。

謝 辞 本研究の一部は文部省科学研究費の助成により行われましたので謝意を表します。

文 献

- 1) HALMER, P. and BEWLEY, J. D.: Control by external and internal factors over the mobilization of reserve carbohydrates in higher plants; in Encyclopedia of plant physiology, New series, Volume 13A, Plant carbohydrates, I Intracellular carbohydrates, p. 748~793, Springer-Verlag, Berlin (1982)
- 2) 中村道徳: アミラーゼ, 生物工学へのアプローチ, p. 141~248, 学会出版センター, 東京 (1986)
- 3) STEUP, M.: Starch degradation, The biochemistry of plant, A comprehensive treatise, Vol. 14, Carbohydrates, p. 255~296, Academic Press, San Diego (1988)
- 4) 大山卓爾・五十嵐太郎・馬場 昂: 秋植え球根植物りん片中の貯蔵炭水化物の分析, 土肥誌, 57, 119~125 (1986)
- 5) OHYAMA, T., IKARASHI, T., MATSUBARA, T. and BABA, A.: Behavior of carbohydrates in mother and daughter

- bulbs of tulips (*Tulipa gesneriana*). *Soil Sci. Plant Nutr.*, **34**, 405~415 (1988)
- 6) OHYAMA, T., IKARASHI, T. and BABA, A.: Effect of cold storage treatment for forcing bulbs on C and N metabolism of tulip plants. *ibid.*, **34**, 519~533 (1988)
- 7) DE HERTHOUGH, A. A., AUNG, L. H. and BENSOP, M.: The tulip: Botany, usage, growth and development. *Hortic. Rev.*, **5**, 45~125 (1988)
- 8) 山口淳二・光永伸一郎：蛋白質核酸酵素, **37**, 1239~1248 (1992)
- 9) OKAMOTO, K. and AKAZAWA, T.: Enzymic mechanism of starch breakdown in germinating rice seeds: Amylase formation in the epithelium. *Plant Physiol.*, **63**, 336~340 (1979)
- 10) RANJHAN, S., KARRER, E. E. and RODRIGUEZ, R. L.: Localizing α -amylase gene expression in germinated rice grains. *Plant Cell Physiol.*, **33**, 73~79 (1992)

Degradation of Storage Starch in Tulip Bulb Scales Induced by Cold Temperature

Satoshi KOMIYAMA, Takuya YAMAZAKI, Emi HORI, Yukiko SHIDA,
Akinobu MURAYAMA, Taro IKARASHI and Takuji OHYAMA
(*Fac. Agric., Niigata Univ.*)

The effects of cold temperature on the activity of α -amylase and on carbohydrate composition were investigated in the bulb scales of tulip plants (*Tulipa gesneriana*). Some bulbs were stored at 15°C for 3 weeks from August 30, 1991, and subsequently at 2°C for 8 weeks. Another group of control bulbs was stored at room temperature during the same period. Both groups of bulbs were planted in a green house at about 20°C from October 30, 1991.

The α -amylase activity in cold-stored bulb scales increased gradually during the cold-storage period and the degradation of starch and the concomitant accumulation of sucrose and fructans were observed. After planting, the α -amylase activity of cold-treated bulbs increased dramatically and the degradation of starch was accelerated. On the other hand, the α -amylase activity also increased in control bulbs, although starch degradation did not occur.

After separated by isoelectric focusing gel electrophoresis, α -amylase isozyme patterns were compared between cold-treated and control bulbs. The same two α -amylase isozymes occurred in bulbs receiving both treatments during the cold storage period.

Starch was stained with iodine solution and the distribution of starch in the scales was observed microscopically. In control bulb scales, no starch was observed in the few cell layers immediately below the epidermis, but starch granules were filled in the inner cells. In cold-treated bulb scales, some inner cells lost their starch granules.

By *in situ* observation of α -amylase activity by starch-film method and by the separate measurement of α -amylase activity in the outer and inner cells of scales, it was suggested that outer cells without starch contained higher activity of α -amylase both in control and cold-treated bulbs. The activity was also detected in the inner cells of cold-treated bulbs, but not in the inner cells of the control bulbs.

Based on the results obtained, it was suggested that low temperature treatment induces α -amylase activity in inner cells which store a large amount of starch. Although control bulb scales also had high α -amylase activity, it was restricted to a few layers of outer cells and did not occur in the inner cells.

Key words α -amylase, bulb, cold temperature, starch, tulip

(*Jpn. J. Soil Sci. Plant Nutr.*, **68**, 23-29, 1997)