

発芽および春化処理過程における コムギ胚の窒素代謝について

その2 イオン交換セルローズによる
可溶性蛋白質の分離

寺 岡 宏

Nitrogen Metabolism of the Wheat Embryo in the
Period of Germination and Vernalization

II. Isolation of Soluble Protein by Ion Exchange Cellulose

Hiroshi Teraoka

著者は春化処理の生理的機構を解明することを目的として、コムギ胚の呼吸系および種々の代謝系を発芽過程と春化処理過程にわたって比較検討してきた。⁽¹⁻¹⁰⁾ 特に前報⁽¹⁰⁾では、胚の可溶性蛋白質の等電点および熱凝固性が春化処理によって特徴的な変化を示すことを報告した。本論文においては前報における蛋白質の変化を更に詳細に解明するために、これをイオン交換セルローズを用いて各成分に分離し、可溶性蛋白質がどのような構成成分を示すかを発芽および春化処理過程のコムギ胚について比較検討した。

材 料 と 方 法

実験に用いた材料は秋まきコムギ赤錆不知1号である。発芽及び春化処理の方法は前報⁽¹⁰⁾と同様である。胚培養の状態で低温処理を行なう場合は、滅菌した種子を吸水させた後、胚乳から胚を分離した。培養液としては White

発芽および春化処理過程におけるコムギ胚の窒素代謝について

の培養液⁽¹¹⁾から窒素源をのぞいたもの、及びこれに2%の sucrose を加えたものを用いた。

イオン交換セルローズとしては、塩基性陰イオン交換体である DEAE セルローズ (Diethyl-aminoethyl-cellulose) を用いた。これを M/150 pH 7.0 磷酸緩衝液で数回洗って平衡化した。用いたカラムは 2.2cm×12.0cm の大きさのもので、これに DEAE セルローズを 9.0cm の厚さにつめた。

胚は M/150 pH 7.0 磷酸緩衝液を加えてすりつぶし、これを 6,000 r.p.m で遠心分離する。遠心分離による上澄液を石油コロジオン膜をとおして M/150 pH 7.0 磷酸緩衝液中で約20時間透析した。透析は冷蔵庫中低温のもとで行なった。透析後この液を再び 16,000 r.p.m で約10分間遠心分離し、この上澄液を1分間 1 ml の速さでカラムをとおして、蛋白質を DEAE セルローズに吸着させた。蛋白質の展開剤としては次のものを順に用いた。

- | | | | | |
|-----|--------------------|-----------------|-------|---|
| 1. | M/150 pH 7.0 磷酸緩衝液 | 60 ml | | |
| 2. | M/60 | 80 ml | 〃 | 〃 |
| 3. | M/30 | 〃 | 〃 | 〃 |
| 4. | M/15 | 〃 | 〃 | 〃 |
| 5. | M/15 pH 7.0 磷酸緩衝液 | +0.05 M 塩化ナトリウム | 80 ml | |
| 6. | 〃 | +0.10 M | 〃 | 〃 |
| 7. | 〃 | +0.15 M | 〃 | 〃 |
| 8. | 〃 | +0.20 M | 〃 | 〃 |
| 9. | 〃 | +0.25 M | 〃 | 〃 |
| 10. | 〃 | +0.30 M | 〃 | 〃 |
| 11. | 〃 | +0.40 M | 〃 | 〃 |
| 12. | 〃 | +0.50 M | 〃 | 〃 |

溶出速度は1分間 1 ml の速さに調節した。溶出液は 10 ml ごとに試験管に分注し、各試験管中の蛋白質の濃度を Lowry の方法によって定量した。⁽¹²⁾

結 果

1. 発芽胚可溶性蛋白質の分離

発芽過程の進行にともない、胚の全窒素含量は次第に増加する。特に発芽3日目から4日目にかけて子葉鞘、子葉のいちぢるしい伸長生長と関連して、胚の全窒素含量も急激に増加する。胚の全窒素化合物のうち、可溶性蛋白質の構成は発芽過程の進行にともない図1. 2. 3に示されているような変化を示す。すなわち各展開剤によって溶出される蛋白質の量は発芽の進行にともない次第に増加する傾向を示す。高濃度の展開剤によって溶出される微量の蛋白質の部分をとぞいては、蛋白質の基本的な構成パターンにあまり変化はなく、発芽1日目でみられる特徴が発芽5日目まで持続する。例外として発芽5日目のもので M/60 磷酸緩衝液と M/30 磷酸緩衝液でそれぞれ2つづつのピークを生ずる。この傾向は発芽4日目の胚の蛋白質からあらわれる現象である。

2. 春化処理胚可溶性蛋白質の分離

春化処理胚の可溶性蛋白質の構成は図4. 5. 6に示されてある。春化処理胚では M/150 磷酸緩衝液で溶出する蛋白質がいちぢるしく増加することが特徴的であるが、これをのぞいては蛋白質の構成パターンは春化処理によってほとんど変化することなく、春化処理0日目にみられる特徴が保持されている。各展開剤によって溶出される蛋白質量は処理0日から24日目までの間は可成急速に増加を示すものもあるが24日目以降は M/150 磷酸緩衝液による部分をとぞいてはあまりはげしい増加を示さない。24日目以降の蛋白質の増加は M/150 磷酸緩衝液によって溶出される部分とその大部分をしめる。

発芽及び春化処理胚可溶性蛋白質の各展開剤による溶出量を表1にまとめた。この結果明らかなように春化処理46日目の胚は M/150 磷酸緩衝液の部分をとぞいて他の部分では発芽2日目から3日目の中間の値を示す。これに対して M/150 磷酸緩衝液の部分だけは発芽5日目の状態よりも更に高い値

発芽および春化処理過程におけるコムギ胚の窒素代謝について

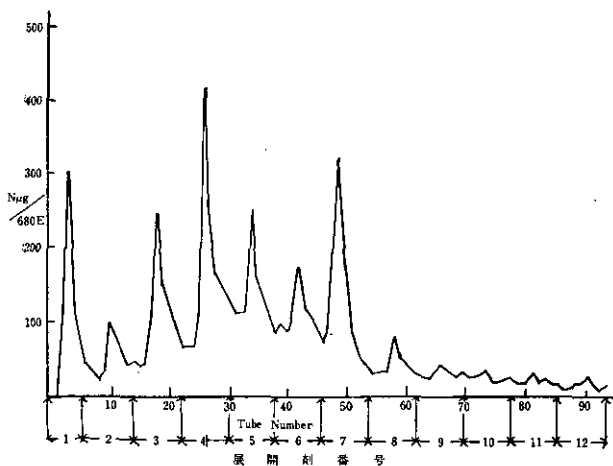


図1 発芽1日目胚可溶性蛋白質の分離

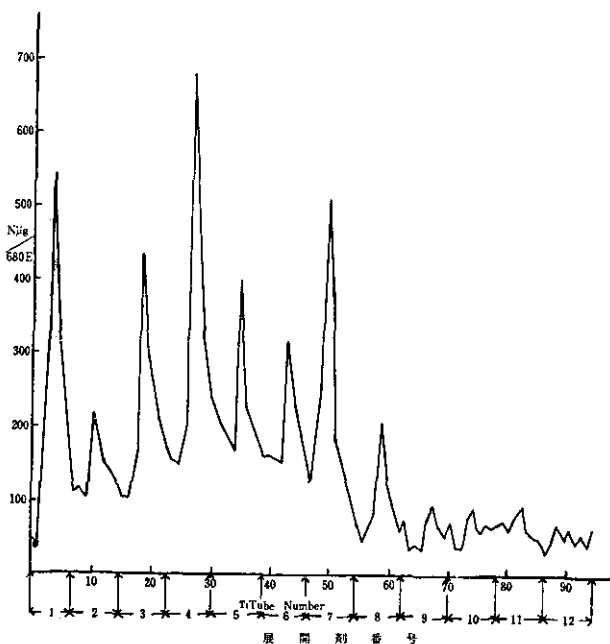


図2 発芽3日目胚可溶性蛋白質の分離

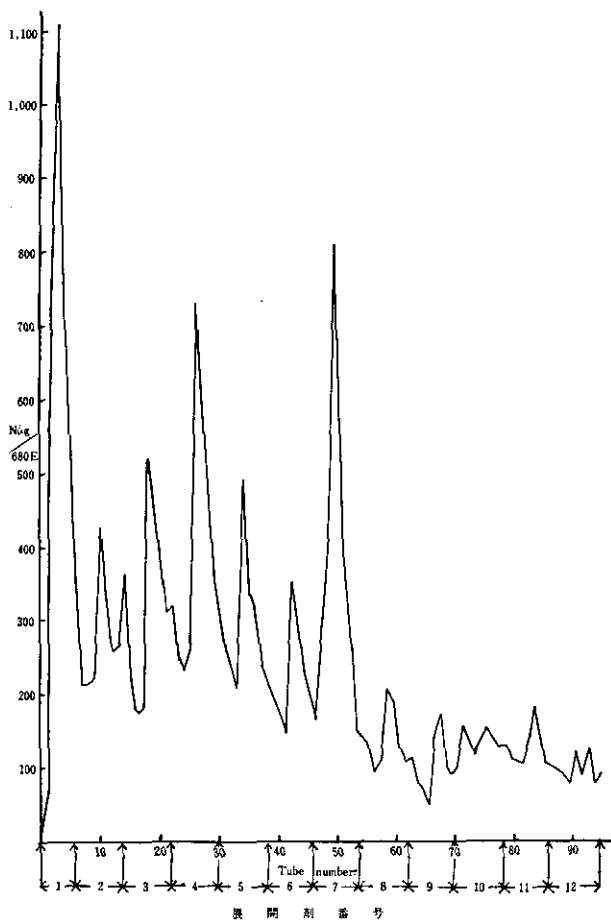


図3 発芽5日目胚可溶性蛋白質の分離

を示す。

3. 胚乳を切除した春化処理胚可溶性蛋白質の分離

春化処理開始前に胚を胚乳から切除し、これを sucrose をふくむ White の培養液と sucrose をふくまない White の培養液にひたしてそれぞれ50日間低温処理を行なった。これらの胚における可溶性蛋白質の構成は図7.8に

発芽および春化処理過程におけるコムギ胚の窒素代謝について

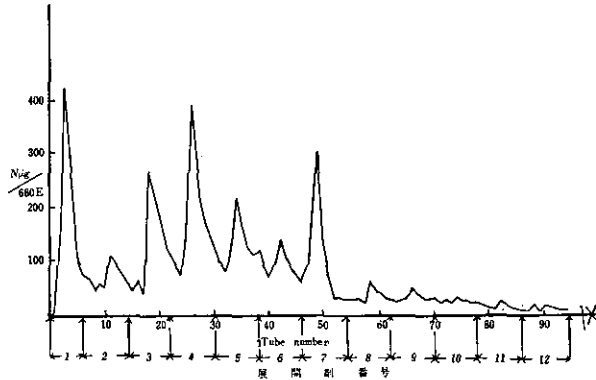


図4 春化処理0日目胚可溶性蛋白質の分離

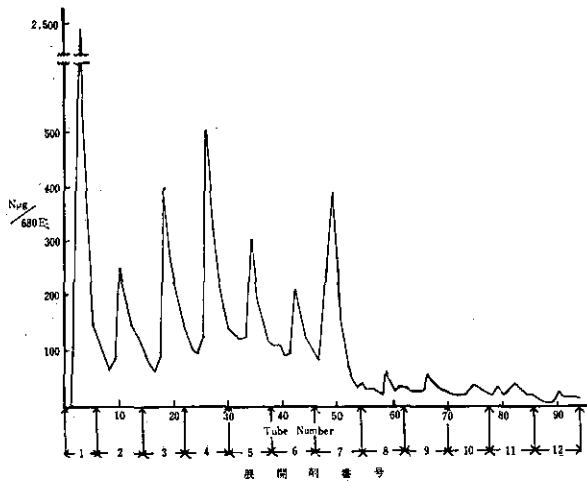


図5 春化処理24日目胚可溶性蛋白質の分離

示されてある。第4図の春化処理0日目の状態のものに比較して、各ピークとも量的に減少している。蛋白質の構成パターンは春化処理0日目のもの比べていちぢるしい変化はみられないが、しかし sucrose をふくむ White の培養液で春化処理を受けた胚では、いくつかの変化が認められる。すなわち、M/60 磷酸緩衝液、M/30 磷酸緩衝液、M/15 磷酸緩衝液+0.05 M塩化

発芽および春化処理過程におけるコムギ胚の窒素代謝について

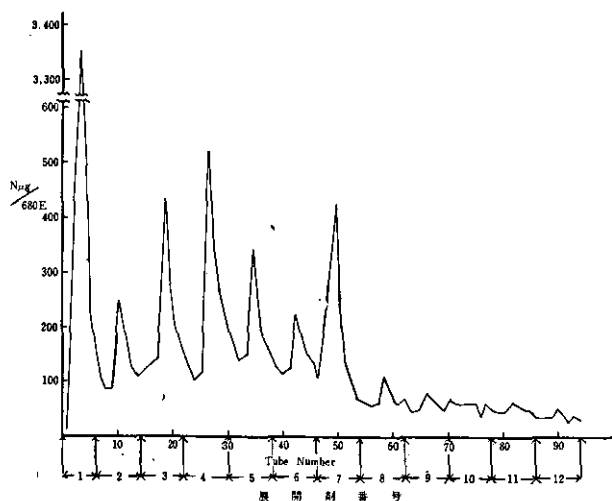


図6 春化処理46日目胚可溶性蛋白質の分離

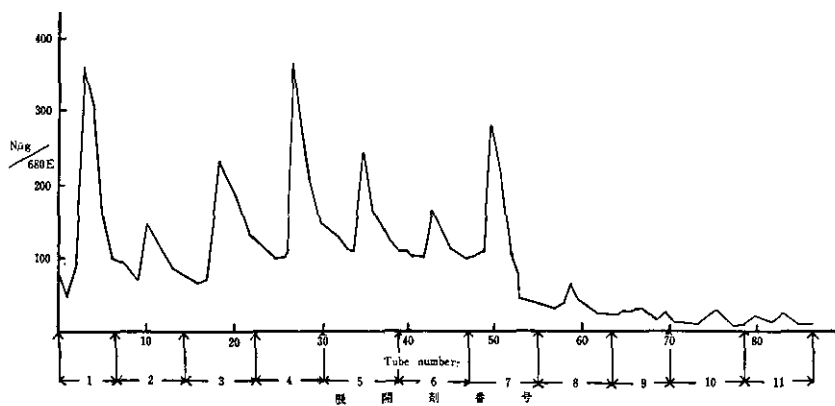


図7 胚乳を分離して50日間春化処理を行った胚の可溶性蛋白質の分離
(サツカロースをふくまない White の培養液を使用)

発芽および春化処理過程におけるコムギ胚の窒素代謝について

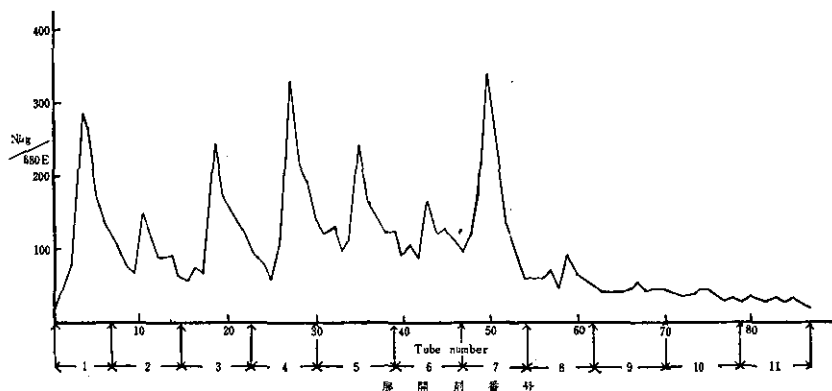


図8 胚乳を分離して50日間春化処理を行った胚の可溶性蛋白質の分離
(2%サツカロースをふくむ White の培養液を使用)

表1 発芽および春化処理過程におけるコムギ胚可溶性蛋白質の分離
Nµg/680 胚

展開剤番号	発 芽 過 程					春 化 処 理 過 程		
	1 日	2 日	3 日	4 日	5 日	0 日	24 日	46 日
1	607	1,105	1,307	2,173	3,098	938	3,467	4,980
2	288	409	667	1,165	1,244	378	690	678
3	619	786	1,126	1,499	1,532	732	1,011	1,083
4	959	1,110	1,593	2,150	2,129	973	1,210	1,250
5	662	725	981	2,009	1,390	665	802	934
6	524	486	926	1,845	1,043	433	608	693
7	799	872	1,300	1,781	2,265	693	941	1,088
8	218	250	513	693	636	178	161	317
9	146	158	295	446	504	157	175	263
10	106	146	299	541	556	117	137	233
11	100	82	293	516	572	75	133	233
12	84	62	234	354	334	60	94	176

ナトリウム, M/15 磷酸緩衝液+0.20 M 塩化ナトリウムでの溶出部分にそれぞれ sucrose をふくまない胚でみられる蛋白質の成分の外に, 更にもう一つの微量の蛋白質成分がみられる。又 M/15 磷酸緩衝液+0.10 M 塩化ナト

リウムの部分では3つの微量蛋白質成分が認められる。なお正常の種子の状態では春化処理を行なった胚では M/150 磷酸緩衝液によって溶出する蛋白質がいちぢるしく増加したのに反して胚乳分離の胚では M/150 磷酸緩衝液によって溶出する蛋白質は50%以下に減少する。

考 察

著者は春化処理の現象を代謝生理学的に解明することを目的として過去、呼吸系 (1.3.4) 炭水化物 (2.7.8.9) 蛋白質 (2.10) 等の代謝系についていくつかの報告をしてきた。この結果明らかにされたことは、春化処理によってコムギ胚の代謝系にある種の質的な変化が誘発されるということである。これらの変化のうち、特に核酸及び蛋白質代謝に関する変化が春化処理の効果に対してより直接的な重要な役割を有するものであろうとの考えのもとに本論文においては胚の可溶性蛋白質の変化を取りあつかった。

先ず春化処理の対照として26°Cでの発芽胚での変化を明らかにした。その結果、胚における可溶性蛋白質の構成は発芽過程の進行にともない、ほとんどいちぢるしい変化を示すことなく、発芽1日目にみられる特徴をそのまま持続してゆくことがわかった。すなわち発芽胚における蛋白質の構成パターンは可成り安定なものであり、発芽期間中の窒素量の増加は主として、1日目のパターンの量的増加にもとづくものであり、蛋白質の構成に関する基本的なパターンの転換はみとめられないと考えられる。ただし例外的にいくつかの微量の蛋白質成分が発芽4日目以降にみられるようになる。このことは発芽4日目以降の胚ではそれ以前の胚と幾分生理的状态を異にすることを示すものと考えられる。これはすでに炭水化物代謝をとおして考察された。⁽⁷⁾ 発芽過程を発芽3日目を境としてその前期と後期との間で質的な相違を認めようとする考えとも一致するものであるといえる。

次に春化処理胚における変化については、M/150 磷酸緩衝液で溶出する蛋白質がいちぢるしく増加することが特徴的である。しかしこれ以外の部分

の蛋白質はほとんど発芽2日目から3日目の中間の量的状態を示し、春化処理によって蛋白質の構成成分に大幅な変化がひきおこされることはないと考えられる。M/150 磷酸緩衝液によって溶出する蛋白質は胚乳から分離し White の培養液に蔗糖を加えた状態で春化処理を行なった胚では逆に50%以下に減少することから、正常な状態の種子でみられるこれらの現象は春化処理の効果に直接関係する現象とは考えられない。そしてこの部分の蛋白質は胚乳から胚に移行した蛋白質の胚における生理的に不活性な貯蔵型としての存在形態ではないかと推察される。

最後に胚乳を切除した胚の春化処理においては蔗糖の存在の有無が春化処理の効果を決定することがすでに明らかにされている。⁽¹⁸⁻¹⁹⁾

この実験においては春化処理の効果が発現する蔗糖の存在する条件のもとでは胚に微量の蛋白質の構成成分が新たに生成されることが認められた。これに対して蔗糖をのぞいた条件のもとではこれらの微量成分がみられないことから、蔗糖存在下の胚でみられるこれらの変化は、春化処理の効果に対して何らかの関連を有する現象であると考えられる。これらの微量の蛋白質の構成成分は正常な春化処理胚の実験ではみとめられなかったが、これは方法上の不完全さによるものであり、今後溶出方法を更に綿密にすることによって、これらの微量成分を確認することが必要であると考えられる。

結 論

イオン交換セルロースを用いて発芽胚、春化処理胚、胚乳を切除した春化処理胚などの可溶性蛋白質の分離を行ないその構成パターンを比較検討した。

1. 発芽胚においては蛋白質の構成の基本的パターンは発芽期間中ほとんど変化なく、発芽第1日目の特徴がそのまま持続する。
2. 春化処理胚においてはほとんどの蛋白質は発芽2日目から3日目までの胚の量的状態にあることが明らかにされた。また春化処理後半における蛋

白質の増加は大部分が M/150 磷酸緩衝液によって溶出する蛋白質部分にあることが明らかにされた。

3. 胚乳を切除し、蔗糖の存在下で春化処理を行なった胚については約7つの微量の蛋白質の構成成分が生成することが認められた。これらの成分の生成が春化処理の効果を決定する上に重要な意義を有するものであると考えられる。

文 献

1. 宇佐美外: 生物科学, 特集号, 45, (1955).
2. 寺岡, 宇佐美: 生物科学, 特集号, 15, (1956).
3. 寺岡, 宇佐美: 生物科学, 特集号, 30, (1957).
4. 寺岡, 宇佐美: 農業技術, 12-2, (1957).
5. 寺岡, 渡会: 北星短大紀要, 5, 10, (1959).
6. 寺岡: 北星短大紀要, 6, 55, (1960).
7. 寺岡: 北星短大紀要, 6, 62, (1960).
8. 寺岡: 北星短大紀要, 7, 25, (1961).
9. 寺岡: 北星短大紀要, 7, 40, (1961).
10. 寺岡: 北星短大紀要, 8, 13, (1962).
11. White, P. R.: Plant Phys., 9, 585, (1934).
12. Lowry, O. H. et al: Jur. Biol. Chem., 193, 265, (1951).
13. Gregorgy, F. G. and Purvis, O. N.: Nature 138, 249, (1936).
14. Gregorgy, F. G. and Purvis, O. N.: Ann. Bot., 2, 237, (1938).
15. Purvis, O. N.: Ann. Bot., 31, 219, (1939).
16. Purvis, O. N.: Nature 145, 462, (1940).
17. Nutman, P. S.: Ann. Bot., 5, 353, (1941).
18. 山崎: 科学, 13, 159, (1943).
19. Hatcher, E. S. J. and Purvis, O. N.: J. Agr. Reserch, 35, 117, (1945).