

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3 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

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。(1-3) その結果春化処理機構の解明にとつて最も主要な代謝系として、核酸および蛋白質を中心とする代謝系の問題が考えられるに致つた。以上の観点から前々報(7)においては春化処理期間中の胚の可溶性蛋白質が質的な変化を経過することを確認し、この変化の実体を解明するため、前報(8)においてはイオン交換セルローズを用いて胚の可溶性蛋白質を分離し、春化処理期間及び発芽期間のものについて各蛋白質の構成パターンを比較した。その結果、春化処理によつて、約7つの微量蛋白質成分が生成することが推定されるに致つた。本論文においては前報(8)と同じ観点のもとに更に前報における方法を精密化してなされた実験の結果を報告する。

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法(8)と同様である。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/200 pH 7.0 の磷酸緩衝液で数回洗つて平衡化した。用いたカラムは 2.2 cm × 12.0 cm の大きさのもので、これに DEAE セルローズを約 9.0 cm の厚さにつめて使用した。

胚は胚乳から分離し、水と海砂を加えてすりつぶし、これを 3000 r.p.m. で遠心分離して上澄液をとり、これに飽和硫酸アンモニウム液を等量加える。これを 3000 r.p.m. で遠心分離し、

蛋白質を分離する。分離された蛋白質に M/200 pH 7.0 磷酸緩衝液を加えて蛋白質を溶解し、この液を石油コロジオン膜をとおして M/200 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つた。透析後蛋白質液を 16000 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。吸着後、次の液を展開剤として順に用い、1 分間 1 ml の速さで蛋白質の溶出を行つた。

展 開 剤

1. 0.005 M pH 7.0 磷酸緩衝液
2. 0.010 M pH 7.0 磷酸緩衝液
3. 0.015 M pH 7.0 磷酸緩衝液
4. 0.025 M pH 7.0 磷酸緩衝液
5. 0.050 M pH 7.0 磷酸緩衝液
6. 0.100 M pH 7.0 磷酸緩衝液
7. 0.150 M pH 7.0 磷酸緩衝液
8. 0.200 M pH 7.0 磷酸緩衝液
9. 0.200 M pH 7.0
+0.88 g 塩化ナトリウム/100 ml
10. 0.200 M pH 7.0 磷酸緩衝液
+1.46 g 塩化ナトリウム/100 ml
11. 0.200 M pH 7.0 磷酸緩衝液
+2.05 g 塩化ナトリウム/100 ml
12. 0.200 M pH 7.0 磷酸緩衝液
+2.34 g 塩化ナトリウム/100 ml
13. 0.200 M pH 7.0 磷酸緩衝液
+2.63 g 塩化ナトリウム/100 ml
14. 0.200 M pH 7.0 磷酸緩衝液
+2.92 g 塩化ナトリウム/100 ml
15. 0.200 M pH 7.0 磷酸緩衝液
+3.21 g 塩化ナトリウム/100 ml
16. 0.200 M pH 7.0 磷酸緩衝液
+3.51 g 塩化ナトリウム/100 ml

17. 0.200 M pH 7.0 燐酸緩衝液
+4.09 g 塩化ナトリウム/100 ml
18. 0.200 M pH 7.0 燐酸緩衝液
+4.68 g 塩化ナトリウム/100 ml

溶出液を連続的に Light path 5 mm, 容量 0.3 ml のセルに通し, 2537 Å の吸収を 20 秒毎に自動的に記録した。紫外線の吸収および記録には UVICORD 紫外線吸収計の装置を使用した。

結 果

1. 発芽胚可溶性蛋白質の分割

発芽の進行にともなつて胚の可溶性蛋白質の含量は急速に増加する。展開剤によつて溶出する蛋白質の量を記録計の測定領域内に保つため発芽 1 日目では胚 1000 ケ, 2 日目では胚 700 ケ, 3 日目では胚 420 ケ, 4 日目では胚 200 ケをそ

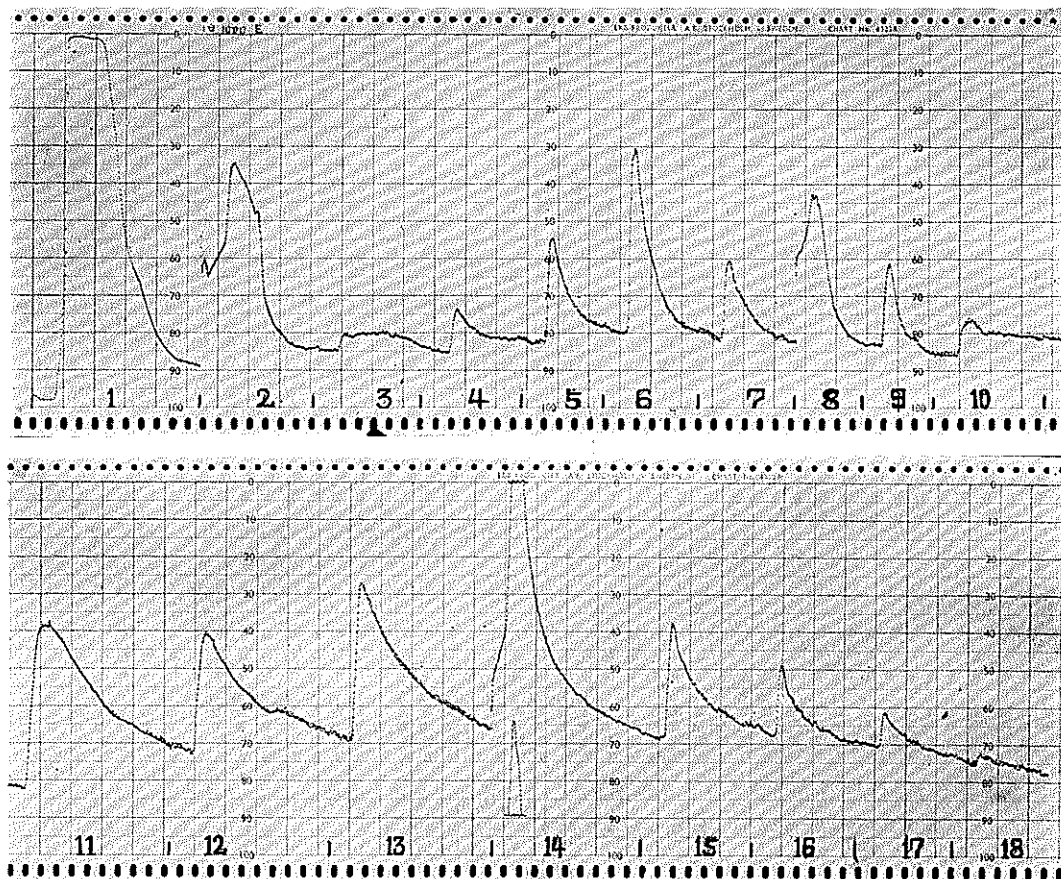


図 1 発芽 1 日目胚可溶性蛋白質の分割

れぞれ実験に用いた。図 1 は発芽 1 日目の実験結果を示す。1 番目から 2 番目の展開剤に移るときの曲線の切断は記録計の感度を上げるための Slit の開口によるもので、以後のすべての実験においても 1 番目の展開剤から 2 番目の展開剤に移るときに曲線の切断が同じ理由によつて

みられる。なお 7 番目から 8 番目および 13 番目から 14 番目の展開剤の移行のときにみられる曲線の切断は、夜間の実験の中止後再び実験を再開するときにみられるものである。図 2, 3, 4 においても同様である。

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

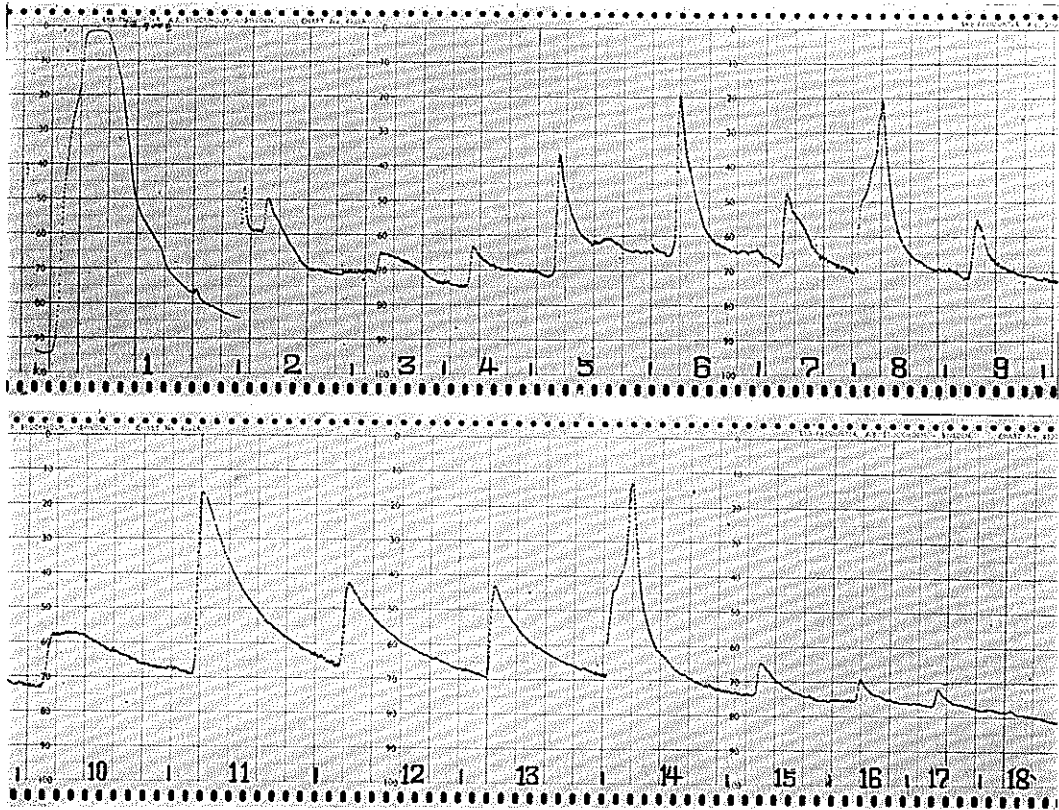
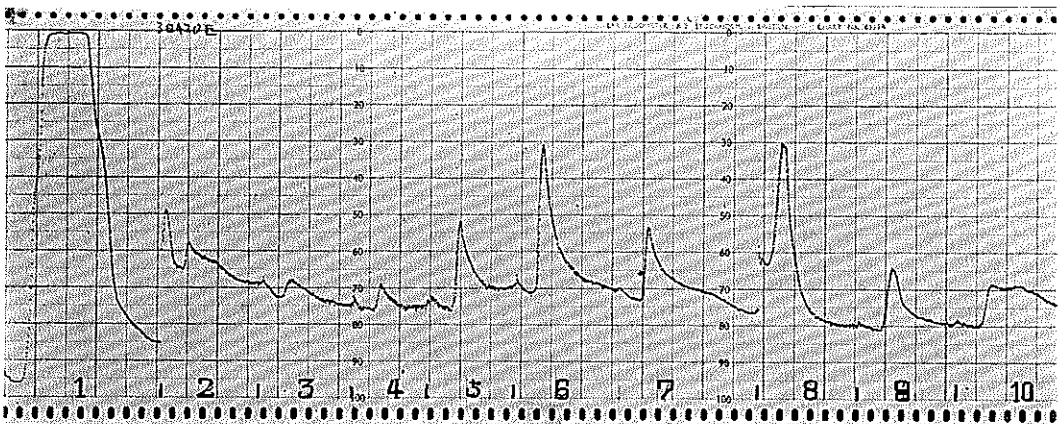


図2 発芽2日目胚可溶性蛋白質の分割

図2は発芽2日目の胚についての結果を示す。基本的なパターンの構成には変化はないが、5番目、6番目、8番目の展開剤によつて溶出す

る微量の蛋白質の存在、及び10番目の展開剤によつて溶出する蛋白質の増加などが特徴的な現象として指摘される。



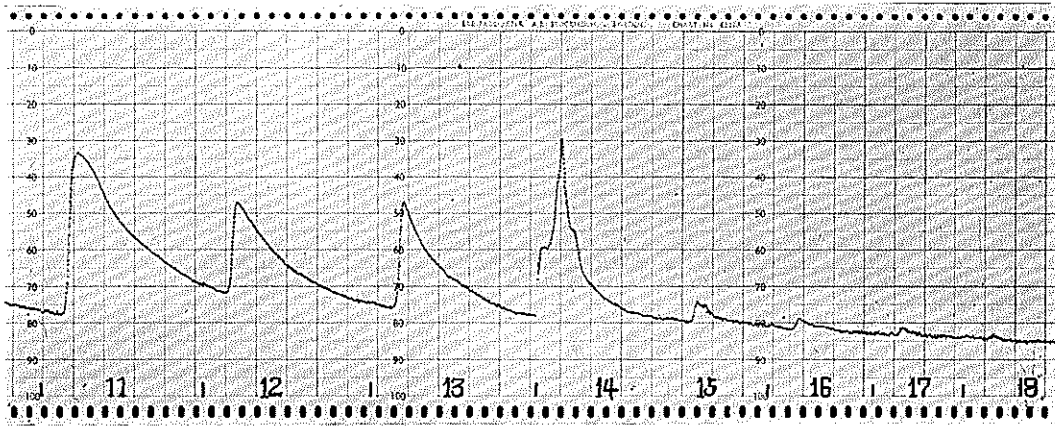


図 3 発芽 3 日目胚可溶性蛋白質の分割

図 3 は発芽 3 日目の胚についての結果を示す。発芽 1 日目及び 2 日目のカーブに比較して全体的に微量成分の生成が目立ち、特に 2 番目から 10 番目の展開剤にかけては発芽 1 目の結果

に比べていちぢるしい変化がみとめられる。又 15 番目から 18 番目までの展開剤によつて溶出される蛋白質部分は発芽の過程の進行にともない次第に減少してゆくのがみとめられる。

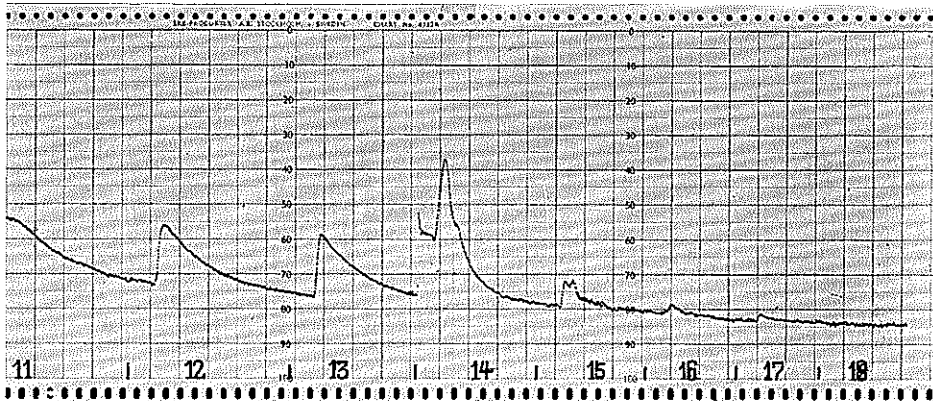


図 4 発芽 4 日目胚可溶性蛋白質の分割

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

第4図は発芽4日目での実験の結果を示す。全体的にみて発芽3日目でみられた特徴がそのまま持続してゆくのが見られる。第8番目の展開剤が溶出する微量成分の生成や、第15番目の展開剤によつて溶出するピークが先端を2分していることなどは、発芽3日目の胚ですでにわずかにみとめられた性質が更に明らかに特徴づけられてきた結果であるとみられる。

2. 春化処理胚可溶性蛋白質の分割

春化処理の期間中胚はわずかに生長し、処理

50~60日後には発芽1日目から2日目の中間に相当するような大きさを示す。根が10mm前後の発生を示すものが多いが、実験にはすべて胚のみを使用している。春化処理の進行にともなふ、胚の可溶性蛋白質の増加のため春化処理7日目のものでは、胚1000ヶ、処理14日目のものでは胚900ヶ、処理24日目のものでは胚660ヶ、処理55日目のものでは胚400ヶを実験に使用した。

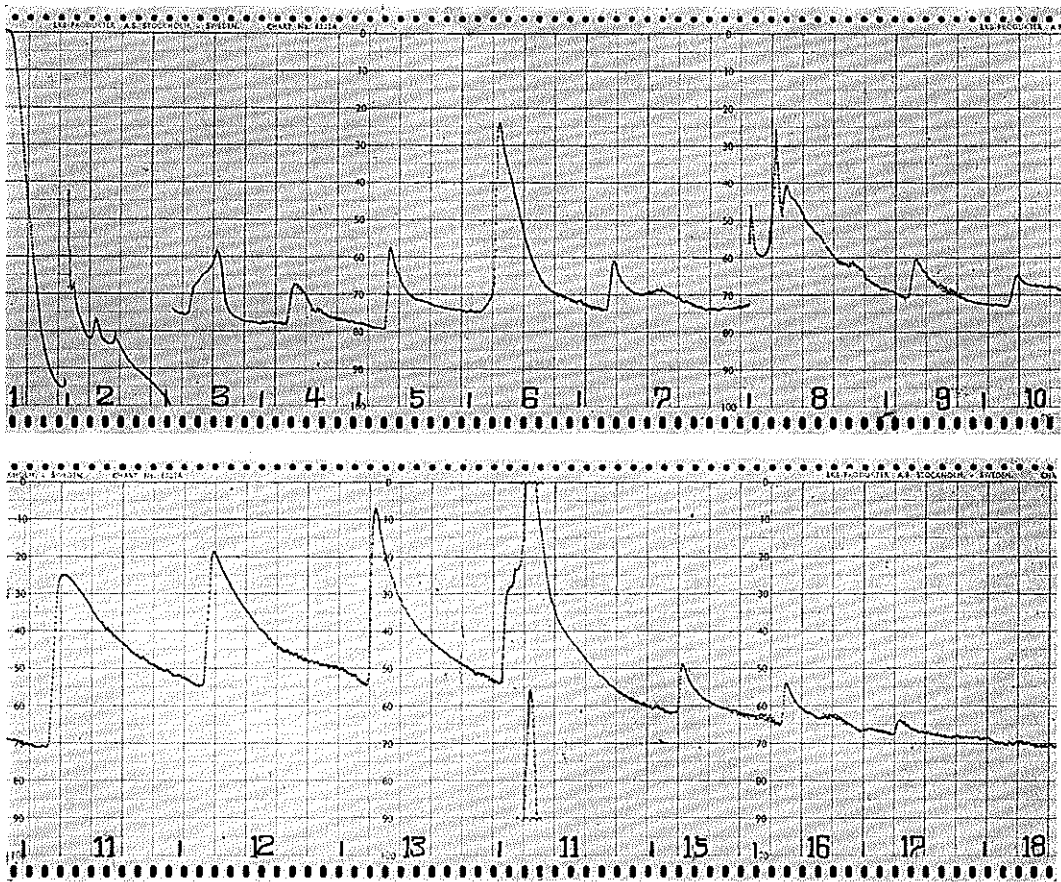


図5 春化処理7日目胚可溶性蛋白質の分割

図5は春化処理7日目の胚の実験の結果を示す。発芽1日目の胚の結果と比較して3番目の展開剤によつて溶出する蛋白質量が増加するこ

とが特徴的であるが、全体的にみて基本的な蛋白質の構成パターンは発芽1日目のものと大きな違いはみとめられない。

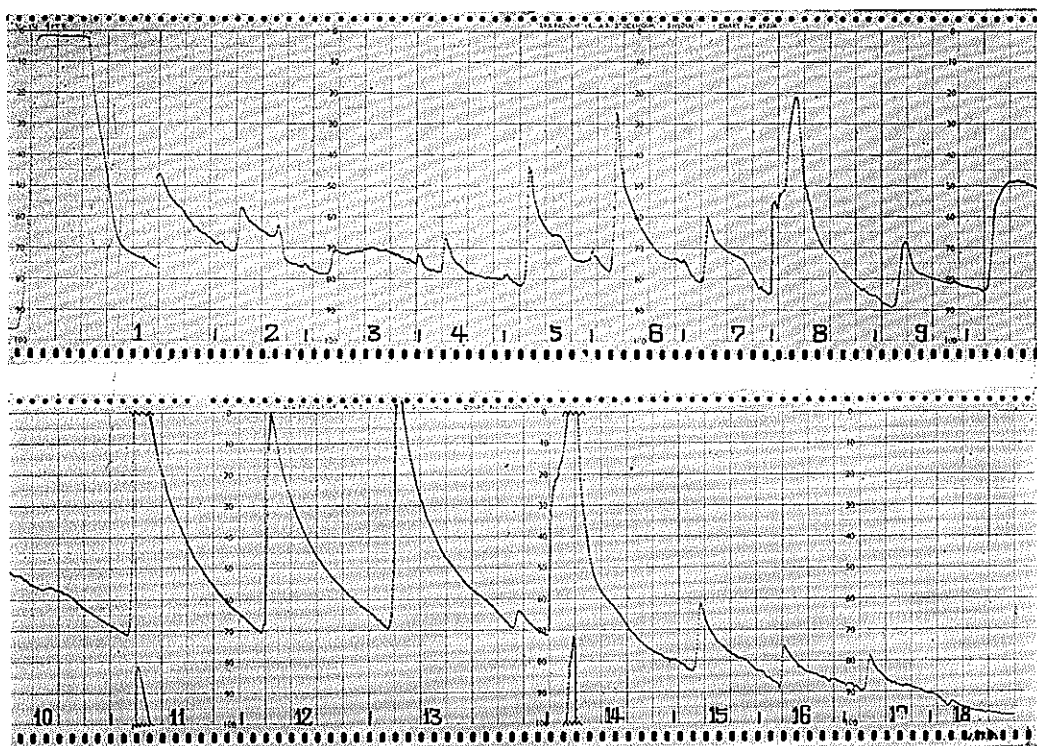
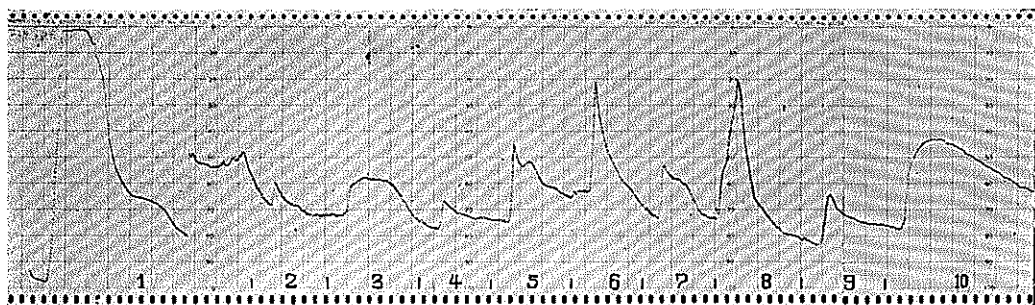


図 6 春化処理14日目胚可溶性蛋白質の分割

図6は春化処理14日目の胚の実験の結果を示す。図6の結果は春化処理7日目のものとは、いくつかの明白な相違を示す。第2、第3、第4の展開剤で溶出する蛋白質の溶出のされ方が前者と比べて違っていること、又2番目の展開剤から10番目の展開剤にいたるまでに溶出される

蛋白質の微量成分のあらわれ方が発芽3日目の胚でみられる結果とよく一致していることが特徴づけられる。又第10番目から第13番目までの展開剤によつて生ずるピークが春化処理7日目の値に比べていちぢるしく増加してくることも特徴的な現象である。



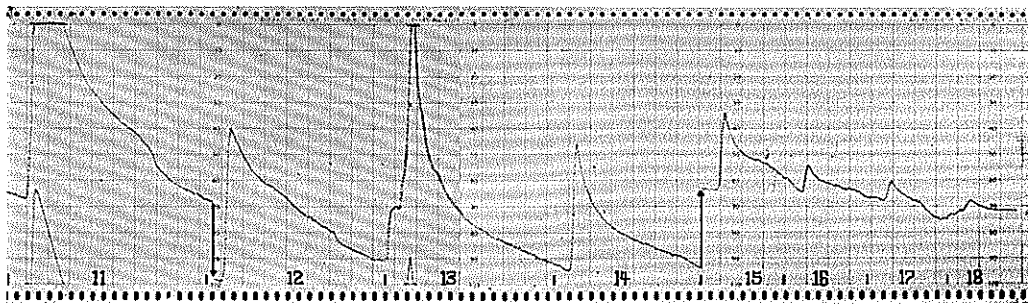


図 7 春化処理24日目胚可溶性蛋白質の分割

図7は春化処理24日目の胚の実験結果を示す。1番目の展開剤の終り部分に溶出する蛋白質が特徴的であること、3番目の展開剤によつて溶出する蛋白質量が増加することなどをのぞけば春化処理24日目で見られる基本的なパターンは春化処理14日目の特徴を大体保持しているといえる。第10番目及び11番目の展開剤によつて溶出される蛋白質は更に増加を示す。11番目

から12番目の展開剤への移行と、14番目から15番目の展開剤への移行のときにそれぞれみられる曲線の切断は、記録計の範囲内に曲線を入れるために基底線を上下した結果生じたものである。なおこの実験においては第12番目の展開剤から13番目の展開剤に移行する時に夜間のため実験を一時中断している。

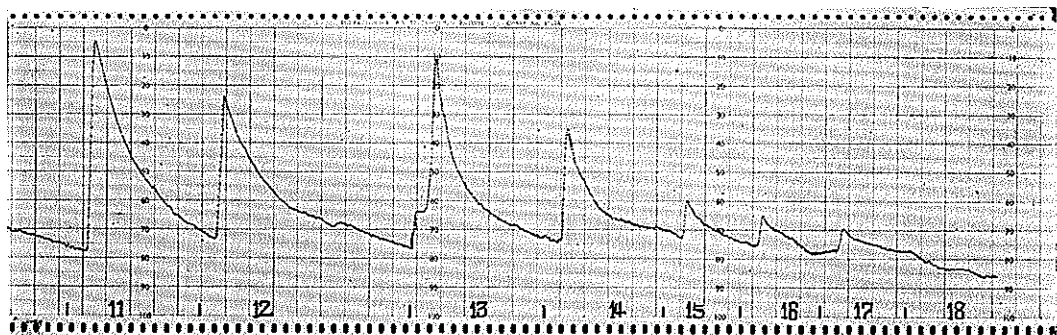
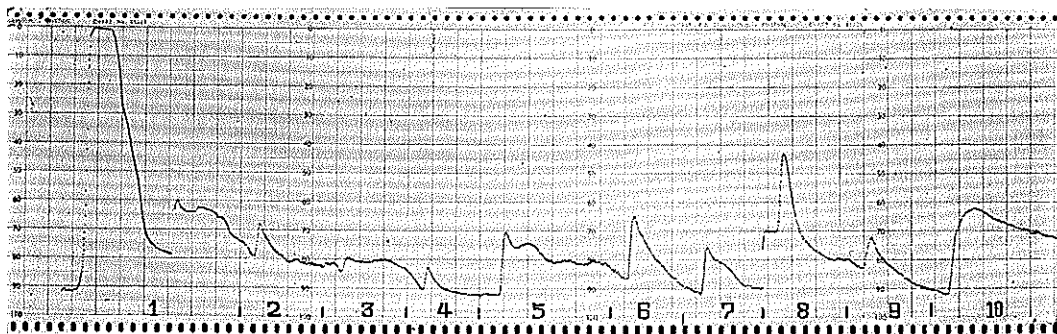


図 8 春化処理55日目胚可溶性蛋白質の分割

図8に春化処理55日目の胚における実験の結果を示す。春化処理55日をもつて春化処理は完了したとみなす。この材料で見られる蛋白質の

存在様式は春化処理24日目の材料で観察された特徴を殆んどすべて保つている。更に24日目になぜかみとめられた変化が一層明確に発現さ

れているものもある。即ち3番目の展開剤によつて溶出される部分が2つの頂点を示すこと、5番目の展開剤によつて溶出の後半部に2つの小さなピークがみられること、また8番目や12番目などの展開剤によつても溶出の終の部分に小さなピークがあらわれることなどすべて24日目にはわずかにみられた性質の明確化として認められる。実験に用いた胚の個数がことなるため直接的に処理24日目と55日目の値を比較することは出来ないが、処理24日目までの間に11番目から14番目までの展開剤によつて溶出する部分が可成り急激に増加したことに比較して24日目以後55日目までの間ではこれらの部分は差程増加しているとはみとめられない。また11番目から14番目までに生ずる4つの大きなピークの間、相対的なピークの高さについても、24日目以後は目立つた変化がないといえる。

考 察

高等植物の発育現象の解明は従来主として花芽の形成をめぐる、光週性の機構を解明する立場からなされてきたものが多かつた。これに対して著者達は、植物がその生長の第一の過程において経過すると考えられる春化処理段階を対象とし、この段階の生理学的特性を代謝系の変動をとおしてあきらかにし、高等植物における発育現象を解明しようとする立場をとつてきた。以上の観点において、秋まきコムギの春化処理過程における蛋白質代謝の変動を発芽過程におけるそれと比較し、前々報⁽⁷⁾および前報⁽⁸⁾においてそれらの間に量的ならびに質的な変化のあることを報告してきた。本論文においても前記の結果をさらに明確にするためにイオン交換セルローズよりの溶出蛋白質を18の分割にわけその構成パターンを明らかにした。この結果発芽過程においては、発芽1日目2日目と3日目、4日目との間に可成り明瞭な変化があらわれることがわかつた。これらの事実は著者が今迄のいくつかの論文^(8,9)において秋まきコムギの発芽過程を2日～3日を境としてその前期と後期との間には質的な相違が存在することを

述べてきた事実とも一致するものである。発芽過程において生ずる蛋白質構成パターンの変化は、実質的には Minor Component の生成であり、主要な蛋白質成分が消滅あるいは生成することはみられない。

次に春化処理過程の変化を要約すれば、処理7日目にみられるパターンはおおよそ発芽1日目のものに相当し、次の処理14日目にみられるパターンは発芽3日目のパターンに Minor Component の表われ方などが類似している。処理の進行にともない、処理の初期にみられた微細な変化が次第に増強されてくることがみられた。かかるいみから春化処理の過程において、蛋白質の代謝にかんして質的な変動が行われるのは、その前半の時期においてであつて、約20日目以後は前半にみられた変化が更に一層累積してゆくための必要期間であると考えられる。これらの考えは著者が今まで、春化処理過程を処理15～20日を境として前期と後期に区分し、代謝系の変動が行われるのは主として前期においてであるとのべてきた事^(2,3,4)とも一致することがらである。春化処理の進行にともない胚においては、ある面では発芽過程の進行において行われる現象と類似した現象が進行し、発芽胚の3、4日目に相当した内的状態に到達するとともに、さらに一面では、春化処理胚においてのみ、観察されるいくつかの現象が進行してゆくことが明らかにされた。以上の事実は、春化処理機構の生理的解明にとつてきわめて重要な意義を与える問題であると思われる。即ち春化処理という現象は、胚の伸長生長を低温という条件下で抑制しつつ、更に発芽にともなつて進行する代謝系の変動はこれを誘導し、そこに生長と発育との間に或る種の拮抗関係を成立させるものであると考えられる。そしてこの拮抗関係の成立を媒介として第二次的に代謝系の春化処理過程においてのみみられる変動を誘起させるものと考えられる。このことは春化処理過程に特有な代謝系の変動が胚で生起する時期は大体胚の代謝系の特性が発芽後期の状態に達した後の時期であることから考えられることであ

る。この問題に関しては更に今後の解明が必要であろうと思われる。

結 論

秋まきコムギ胚可溶性蛋白質をイオン交換セルローズによつて分割し、発芽過程および春化処理過程についてその構成パターンを明らかにした。その結果発芽胚においては、発芽の進行にともないしだいに Minor Components が生成し、その構成が複雑化してゆくが、とくに発芽2日目から3日目えの変化にいちぢるしいものがあつた。以上の事実から発芽過程を2日目から3日目を境としてその前期と後期に区分されることが考察された。

春化処理過程においても、その処理の進行にともないしだいに Minor Components があらわれ、構成パターンが複雑化してゆくことがみられた。この変化はおおよそ発芽過程におい

てみられる変化と類似したものと、さらに春化処理過程においてのみみられる変化とにわけられた。処理前半においては発芽過程においてみられる変化が春化処理胚においても優先的に生成し、処理後半には春化処理特有の変化が累積してゆくのがみられた。以上の結果をもととして春化処理機構について若干の考察をこころみた。

文 献

1. 宇佐美, 外: 生物科学, 特集号, (1955) 45.
2. 寺岡, 宇佐美: 生物科学, 特集号, (1956) 15.
3. 寺岡, 宇佐美: 生物科学, 特集号, (1957) 30.
4. 寺岡, 宇佐美: 農業技術, 12-2, (1957).
5. 寺岡: 北星短大紀要, 6, (1960) 55.
6. 寺岡: 北星短大紀要, 6, (1960) 62.
7. 寺岡: 北星短大紀要, 8, (1962) 13.
8. 寺岡: 北星論集 1, (1963) 123.
9. 寺岡: 北星短大紀要, 7, (1961) 25.