

# 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4 春化処理によつて生ずる蛋白質の変化

寺 岡 宏

著者は春化処理のおよぼす生理的な意義を解明するため、秋まきコムギの胚を用いて、春化処理期間中の胚の代謝系の変動を研究してきた。その結果、胚における可溶性蛋白質の構成パターンに春化処理の影響がみとめられることがわかつた(1, 2, 3)。特に前報(3)においては、胚可溶性蛋白質をイオン交換セルローズを用いて分割し、発芽過程における胚と春化処理過程における胚の間で、可溶性蛋白質の存在様式を比較した。その結果、春化処理前半においては、発芽過程で進行する変化と共通な現象がみられるが、しかし処理後半になると、春化処理に特有な変化が累積してゆき、新しい蛋白質の存在を示すピークがあらわれることがみられた。本論文においては、この蛋白質の生成を再確認するためになされた実験および、この蛋白質の生成におよぼす、核酸アナログの影響についてなされた実験の結果を報告する。またこの蛋白質のもつ、生理的意義を考察するためには、春まきコムギにおいて、この蛋白質が存在するか否かが問題になる。この点を解明するためになされた実験の結果をあわせて報告する。

### 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号および、春まきコムギ農林75号で、いづれも、北海道北見農業試験場1963年度産のものである。

秋まきコムギの発芽および春化処理の方法は前報(2)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 pH7.0の磷酸緩衝液で数回洗つて平衡化した後 2.2cm×12.0cm のカラムに約 9.0cm の厚さにつめた。

胚は胚乳から分離し、M/200 pH7.0の磷酸緩衝液と海砂を加えてすりつぶし、これを 3,000 r.p.m. で遠心分離し、その上澄液をとる。これに飽和硫酸アンモニウム溶液を等量加える。これを 1,600r.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 pH7.0の磷酸緩衝液を約 7.0ml 加えて蛋白質を溶解させこの液を石油コロイド膜をとおして M/200 pH7.0磷酸緩衝液中で約20時間透析した。透析は冷蔵庫中で行なつた。透析後、蛋白質液を 1,600r.p.m.で約10分間、遠心分離し、この上澄液を1分間 1ml 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用い1分間 1ml の速さで蛋白質の溶出を行なつた。

#### 展 開 剤

1. M/200 pH7.0 磷酸緩衝液 約200ml
2. M/40 pH7.0 磷酸緩衝液 約120ml
3. M/20 pH7.0 磷酸緩衝液 約100ml

溶出液を連続的に Light path 5 mm, 容量 0.3 ml のセルに通し、2537A の吸収を20秒毎に自動的に記録した。記録用紙は1時間 20mm の度速で移動させた。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。なお上記紫外線吸収計を安定化させるため実験は20~25°Cの間の温度でほとんど一定温度条件のもとでなされた。

核酸アナログを使用した実験においては、8アザグアニン(8-AG)および5ブロモウラ

シル (5-BU) をそれぞれ最終濃度  $2 \times 10^{-4} M$  になるように White の 2% 蔗糖をふくむ培養液に加えた。

春まきコムギは発芽は  $26^{\circ}C$ 、また低温処理の影響をしらべるためには、秋まきコムギの春化処理と同様の方法を用いた。

## 結 果

### 1. 春化処理期間中における変化

春化処理の進行にともない、胚はわずかに伸長生長を示し、春化処理50日目には約発芽2日目ぐらいの大きさになる。そのため処理0日、7日、14日の胚を実験に用いるときは、400ヶ、21日、30日、40日、54日の胚を実験に用いるときは300ヶをそれぞれ使用した。特に重要な変化がみられるのは M/40 pH7.0 磷酸緩衝液による溶出部分であるので、実験結果の記録に

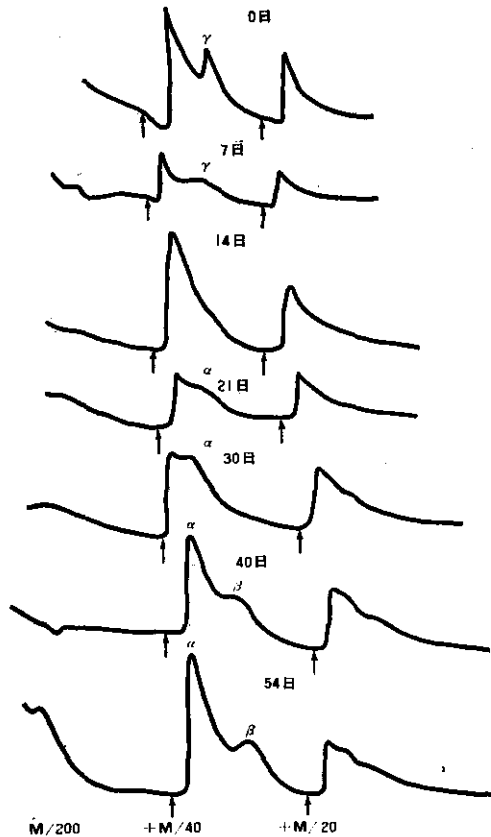


図1 春化処理期間中における秋まきコムギ胚の蛋白質

は M/200 pH7.0 磷酸緩衝液による溶出の後半部分からはじめて、M/40 pH7.0 磷酸緩衝液と M/20 pH7.0 磷酸緩衝液による溶出部分とを記入した。展開剤をとりかえたところは失印を用いた。春化処理胚における蛋白質の構成パターンの変化を図1に示す。

図1の結果から、低温処理開始後14日までに、1つの蛋白質 (図中 $\gamma$ ピーク) が消失してゆき、その後これに代つて、別な新たな蛋白質 (図中 $\alpha$ ピーク) が生成してくることがみられる。処理40日目以後になると、この蛋白質量が増加するため、最初から存在していた蛋白質を示すピークがこれにかくされカーブの形は単一の蛋白質を示すようなものとなるのではないかと考えられる。また処理40日目頃からさらに1つの新しいピーク (図中 $\beta$ ピーク) が現われてくることになる。M/20 pH 7.0 磷酸緩衝液による溶出部分にも処理30日目頃から2種類の minor components が生成してくることがみとめられる。

### 2. 胚培養下における春化処理期間中の変化

コムギ胚の春化処理については、これを胚乳から分離し、2%蔗糖をふくむ White の培養液にひたして低温処理を行なつても、春化処理の効果が発現することは、すでに幾多の報告がなされている事実である。この場合蔗糖をふくまない培養液においては春化処理効果がみられないことから、蔗糖をふくむ液とふくまない液でみられる変化を比較することによつて、春化処理の効果に関連をもつ変化と、そうでない変化とを区別することができる。

以上のような目的のもとに、蔗糖をふくむ液 (以後+Sと略す) とふくまない液 (-Sと略す) とでみられる低温処理による変化を比較した。実験にはすべて500ヶの胚を用いた。実験の結果を図2にまとめた。

図2の結果から、-Sの場合は $\gamma$ ピークの消失はみられるが、しかし $\alpha$ ピークおよび $\beta$ ピークの生成はまったくみとめられない。これに比較して+Sのものでは、処理30日目以後に $\alpha$ ピークおよび $\beta$ ピークの生成がみとめられる。

## 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

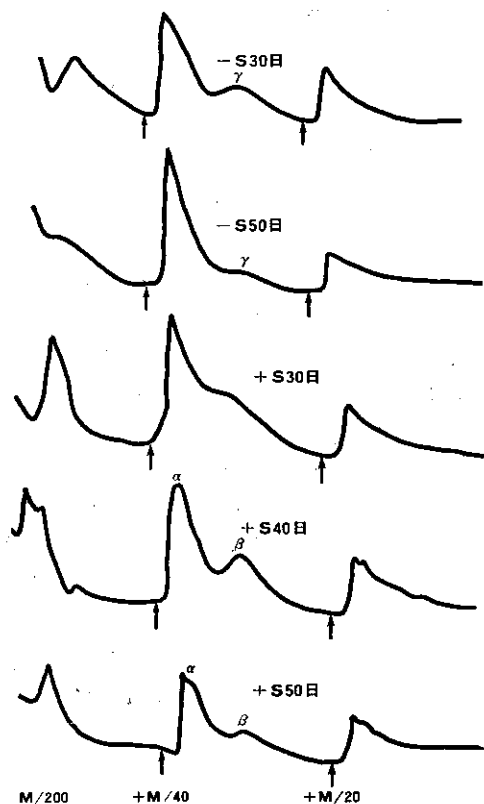


図2 胚培養低温処理期間中における秋まきコムギ胚の蛋白質

+S 処理40日のものでは、新たに生成した $\alpha$ ピークと既存のピークとが重なり合い、そのためにピークの先端が丸い形を示している。単一蛋白質の存在を示すピークの先端がとがつた形を示すのに比較すれば、この違いは明らかである。処理50日目頃になると、胚の蛋白質は多少分解して量的に減少するため、各ピークの高さは40日目頃のものに比較して低くなってくる。しかし、 $\alpha$ ピークおよび $\beta$ ピークの存在は明らかにみとめられる。なお処理40日目以後+Sのもので、M/20 pH7.0 磷酸緩衝液で溶出される部分にも minor component の存在がみとめられるが-Sのものではこれらはまったくみとめられない。以上の実験の結果から、これら components の生成が春化処理効果と何らかの関連を有する現象であることが考えられる。

### 3. 胚培養春化処理におよぼす、核酸アナログの影響

+S White の培養液に  $10^{-4}M$  程度の 8-AG を入れておくと、この培養液で春化処理を受けた胚は、処理後発芽生長は行なうが、春化処理の効果はあらわさない。これに比較し  $10^{-4}M$  程度の 5-BU を入れて同様の処理を行なった場合には、処理後、胚は発芽生長を行ない、さらに花芽の形成へと春化処理の効果が発現しゆくことが石川、宇佐美(4)によつて報告されている。以上の結果にもとづき  $2 \times 10^{-4}M$  8-AG および 5-BU をふくむ +S White の培養液で胚培養、低温処理を行ない、胚における蛋白質の変化を比較した。実験には胚 540ヶを使用した。実験の結果を図3に示す。

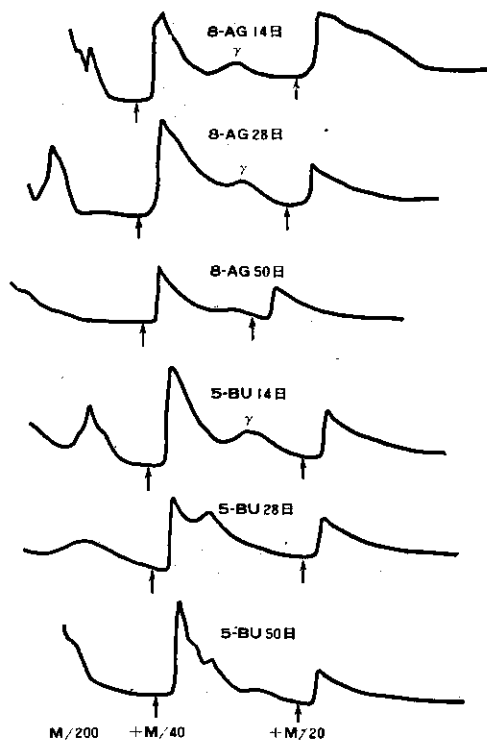


図3 核酸アナログ存在下の胚培養低温処理期間中における秋まきコムギ胚の蛋白質

図3の結果から 8-AG の場合には、 $\gamma$ ピークの消失がみられるが、これに代つて $\alpha$ ピークおよび $\beta$ ピークの生成はみとめられない。これは春化処理効果が発現しない -S 胚培養でみられた結果と同様であり、8-AG 胚培養においても春化処理効果の発現がみられないこととま

つたく一致する事実である。

5-BU の場合には処理28日目には $\gamma$ ピークの消失とそれに代つて新たなピークの生成がみられる。さらに処理50日目には $\alpha$ ピークおよび $\beta$ ピークと推察されるものの生成がみられるが、M/40 pH7.0 磷酸緩衝液溶出部分に3つの minor components の存在がみとめられるためそのいずれが $\alpha$ および $\beta$ ピークに該当するかは判断されない。50日目における8-AGと5-BUのピークの生成の比較から、M/40 pH7.0 磷酸緩衝液溶出部分にみられる minor components の生成が春化処理の効果とある関連性を有するものであることが考えられる。

#### 4. 秋まきコムギの発芽過程における変化

1—3の実験は春化処理効果が発現される条件のもとでの変化を明らかにしたが、これらの結果と比較して、秋まきコムギの発芽過程においてみられる現象を対照としてあつかつた。発芽1日目は胚500ヶ、2日目は330ヶ、3日目および4日目は200ヶをそれぞれ実験に使用した。実験の結果は図4に示す。

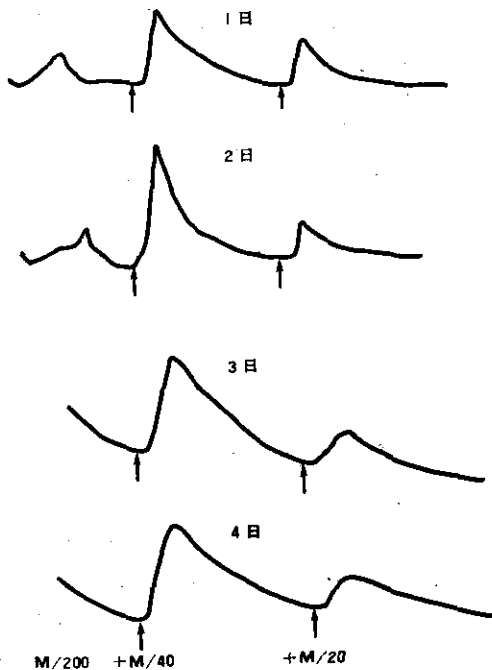


図4 発芽期間中における秋まきコムギ胚の蛋白質

図4の結果は前報(3)における結果と同様、正常な発芽過程においてはM/40 pH7.0 磷酸緩衝液による溶出蛋白質はただ1つの大きなピークを示すのみで、春化処理過程においてあらわれるような minor components の存在はまつたくみとめられないことが再確認された。なお春化処理過程においては、0日と7日にみられた $\gamma$ ピークは発芽1日目の胚ですでに完全に消失しており、その存在はまつたくみとめられない。

#### 5. 春まきコムギの発芽過程における変化

秋まきコムギ発芽過程および春化処理過程においてみられる現象の対照として、春まきコムギ発芽過程においてみられる現象が1つの意味をもつことが考えられる。以上の目的で春まきコムギの発芽過程における変化を追跡し図5にまとめた。図5においては発芽1日目のものは胚520ヶ2日目のものは胚420ヶ3日目のものは胚250ヶ3.5日目のものは胚175ヶ4日目のものは胚200ヶを実験に用いた。

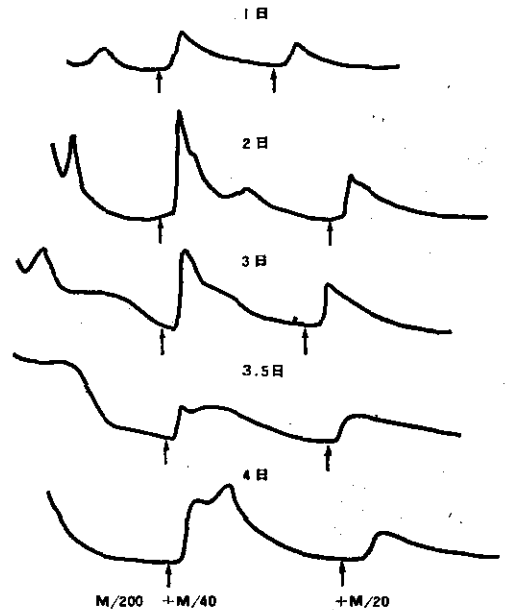


図5 発芽期間中における春まきコムギ胚の蛋白質

図5の結果から秋まきコムギの発芽過程とことなり春まきコムギにおいては、2日目以後に新しい蛋白質の生成を示すピークがあらわれ既

存のピークを量的に凌駕することがみられた。特に発芽2日目にみられるパターンが秋まきコムギの春化処理効果をあらわす胚におけるパターンと類似していることが特徴的である。

#### 6. 春まきコムギに対する低温処理の影響

春まきコムギが低温の影響を受けた場合に胚でどのような変化が生ずるかをしらべるため、秋まきコムギの春化処理と同様な方法で低温処理を行ない7日目および20日目における蛋白質の存在様式をしらべた。実験には胚540ケを用いた。実験の結果を図6に示す。

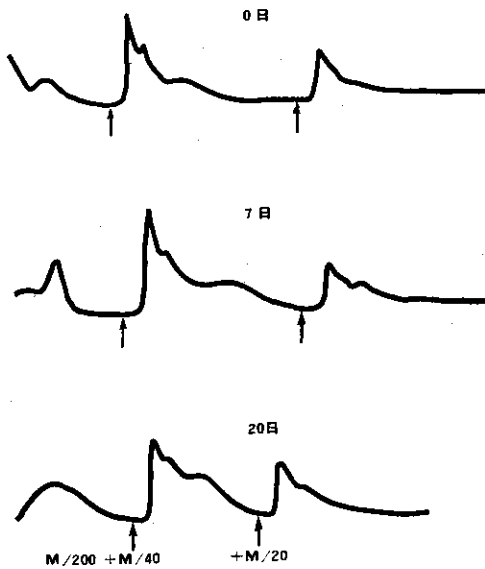


図6 低温処理期間中における春まきコムギ胚の蛋白質

図6の結果から春まきコムギに低温を作用させても、胚の蛋白質の構成パターンには変化がなく、春まきコムギ発芽2日目にみられる特徴がそのまま持続することがわかった。そしてこのパターンは秋まきコムギが春化処理の効果を発現する場合の蛋白質の構成パターンと共通なタイプのものであることがみとめられた。

#### 考 察

前報(3)において、秋まきコムギの春化処理の結果、胚の構成蛋白質のパターンにある特徴的なピークが生成し、このピークの生成と春化処理の効果との間に何か関連性があるのではない

かと考えられたが、本論文においては上記の事柄をさらには明確化することができた。すなわち秋まきコムギが春化処理効果を発現し得る条件下、すなわち正常の春化処理を受けた場合、蔗糖存在下胚培養による春化処理を受けた場合、および胚培養低温処理の条件下にさらに $2 \times 10^{-4}M$  5-BUを加えた場合のいずれの場合にも共通して、M/40 pH7.0 磷酸緩衝液によつて溶出される蛋白質部分にある minor componentsの生成がみとめられたことである。さらに本論文では、前報ではつきりみとめられなかつた新しい事実として、この minor componentsには2種類あるということが見出された。このことの意義としては、次の事柄が考えられる。すなわち春まきコムギの発芽過程および低温処理過程でみられる minor componentsの生成のパターンと秋まきコムギでみられたこれらの minor componentsの生成のパターンとが類似していることから、秋まきコムギ春化処理過程における変化は、春まきコムギの性格を決定づける状態への変化として特徴づけられるものと考えられる。すなわち秋まきコムギにおいては、春化処理によつてはじめて、春まきコムギがもっている状態に到達し得るのであり、この状態への進行が、Whiteの培養液中の蔗糖の消失や8-AGの存在などによつて阻害されるものと考えられる。

以上の事実から低温処理のもつ一つの機構として、秋まきコムギに特徴的な代謝パターンの春まきコムギに特徴的な代謝パターンへの転換ということを取り上げることができると考えられる。そして春まきコムギは秋まきコムギに比較して一段階進んだ発育の状態をもっているものとして特徴づけられるのではないかと推察させられる。

今まで著者は、秋まきコムギの春化処理胚でみられる種々の代謝系の変動を観察してきた結果、それらの中には2種類の性格的にことなつた現象が進行していることがわかつてきた。すなわちその一つは、正常な秋まきコムギ発芽胚においてみられるものと同様な現象が低温の影

響のもとで緩慢に進行してゆくといつたものである。そして正常な発芽胚では、胚の伸長生長をともなつていとなまれるこれらの変化が、低温処理の条件ではほとんど胚の生長をとらなないで進行するが特徴的であつた。これに対してもう一種の現象とは、低温処理によつてのみ特徴的に生ずる変化であつて、正常の発芽胚では、みとめられないものであつた。そしてこの現象がもつ意義については、本考察においてのべられたように、春まきコムギが潜在的に保有している状態への変化として考えることができるのではなからうか。そしてこのような変化が明確にみとめられるようになるのは、低温処理の後半においてであり、これに比較して、低温処理の前半においては、発芽過程においてみとめられるものと共通した現象が徐々に進行してゆく期期として特徴づけられる。これらのことは著者が今まで春化処理過程を処理15~20日を境として、代謝系の変動に意義の相違があることを主張してきた立場と一致するものである。春化処理の進行は、胚の伸長生長を低温という条件下で抑制しつつ一方では発芽にともなつて発現する代謝系の変動はこれを誘発し、そこに伸長生長と胚の代謝機構との間にある種の拮抗関係を成立させるものではないかと考えられる。そしてこのような状態の成立を媒介として、次に春化処理の後半にいたつて春まきコムギに特徴的な代謝パターンへの変化が進行してゆくものと考えられる。

これらの事実を推察させる現象として、春化処理効果が発現しない -S White 培養液での胚培養春化処理や +S White 培養液に 8-AG を加えた条件下での胚培養春化処理においても、 $\gamma$ -ピークの消失はみとめられ、秋まきコムギ発芽1日目にみられたものと類似した状態に

変つてゆくことがみとめられた。しかし、これ以上の代謝系の進展が、これらの条件のもとでは阻害され、そのために春化処理の効果の発現がないものと考えられる。

なお、春化処理効果の発現にともなつてみられる、蛋白質 minor components の生理的役割については今後の実験によつて明らかにしていきたい。

## 結 論

秋まきコムギの春化処理によつて M/40 pH 7.0 磷酸緩衝液によつて DEAE セルローズから溶出される、蛋白質の minor components が生成されることが確認された。これは正常な秋まきコムギの低温処理や、蔗糖をふくむ White の培養液での胚培養低温処理によつて生成されるが、蔗糖をふくまない White の培養液での胚培養低温処理や、 $2 \times 10^{-4}$ M 8-AG の存在下での胚培養低温処理によつては生成されない。この秋まきコムギの春化処理によつてみられた蛋白質の minor components は春まきコムギ発芽2日目および春まきコムギ低温処理によつてみられる minor components のパターンと類似している。これらの事実をもととして秋まきコムギの春化処理機構について、いくつかの考察をこころみた。

本実験を行なうにあつて、秋まきコムギおよび春まきコムギを提供して下さつた北海道北見農業試験場の方々に対して深く感謝の意を表します。

## 文 献

1. 寺岡：北星短大紀要，8，(1962) 13.
2. 寺会：北星論集，1，(1963) 123.
3. 寺岡：北星短大紀要，9，(1963) 1.
4. 石川，宇佐美：第29回植物学会大会報告 (1964).