

トマトとイヌホウズキのキメラの代謝的研究

その4 イオン交換セルローズによる可溶性蛋白質の分割

熊 谷 孝 美

著者はこれまでトマトとイヌホウズキの接木によつて作ったキメラ雑種の代謝生理的性質を追究してきた。(1-4) 前報(4)においてはキメラと対照(起源)植物の可溶性蛋白質の性質を比較するために、種々の pH における凝固性を調べて報告した。既報のようにこの一連の実験をするにあつて最も大きな障害となつたのは、キメラ雑種の材料難であつた。昨年(1963)の冬に温室のある事故によつて不運にもこのキメラを全部失つてしまい、蛋白質の性質についてさらに詳しく追究しようとする計画に狂いが生じた。今年の6月頃再び接木によつてキメラを作ることを試み二株ほどできたが、実験に用いるためにはそれを少なくとも10株以上に殖さねばならず、結局、今年はキメラを実験材料として用いることができなかつた。そのため今年是对照(起源)植物だけについて、できるだけ詳細に調べておこうと考え、トマトとイヌホウズキの各発育 age における葉と茎の可溶性蛋白質の性質をイオン交換セルローズによる分割によつて比較的に研究したので、その結果をここに報告する。

材料および方法

実験に用いた材料は、トマト (*Lycopersicon esculentum* var. *kinnari*) とイヌホウズキ (*Solanum villosum*) で、種子を始め移植鉢に播種し、約1カ月で6寸鉢に植え代えて温室で育てた。発育 age というのは、播種してからの期間であり、両植物いずれも2.5カ月頃から花をつけ始め、3カ月以後に結実をみた。実験に用いた葉、茎は個体差を考慮して少なくとも三株以上の植物体からとつたものを用いた。茎

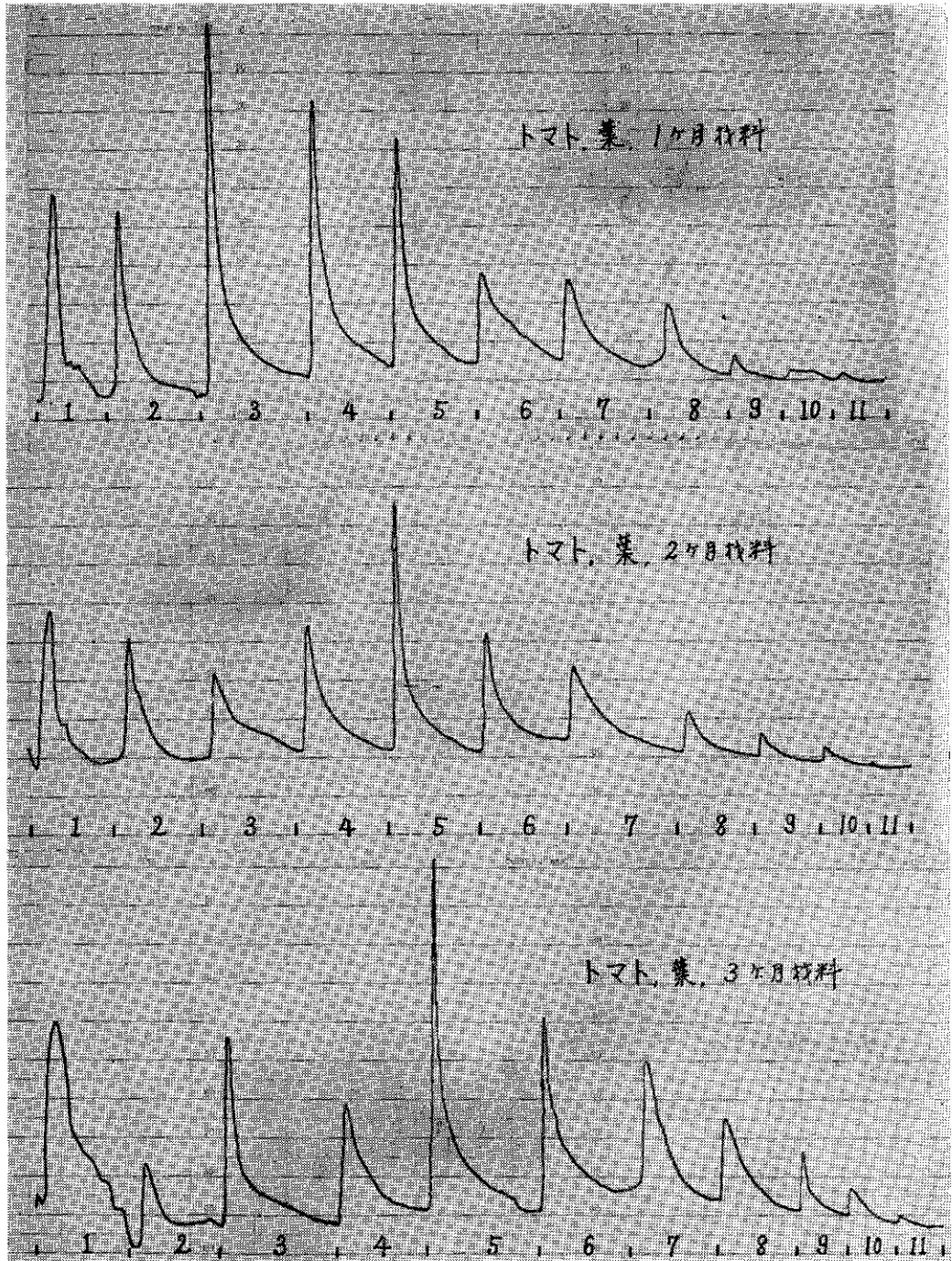
の場合にはまず葉柄を基部から取除き、発育 age によつても違ふが、頂部から10~15cm くらいの部分を数本、生体重量で6~7gのものを、また、葉の場合には、数株の植物から一株4,5枚の割合で比較的若い頂部の葉を切り取り、主脈を除いた残りの部分を生体重量で約2g用いた。

これらの材料を乳鉢に入れ、これに茎では15ml、葉では10mlの0.02M pH7.0 磷酸緩衝液を加えて海砂とともにすりつぶし、4層のガーゼでしばつたろ液を10,000r.p.m. で10分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0.7飽和になるように加え、30分冷蔵庫に放置してから15,000r.p.m. で10分遠心分離して蛋白質を分離した。分離された蛋白質に0.02M pH7.0 磷酸緩衝液10mlを加えて蛋白質を溶解し、この液を石油コロジオン膜を透して上と同じ磷酸緩衝液中で約20時間透析した。透析は2°Cの冷蔵庫中で行なつた。蛋白質の吸着に用いたイオン交換セルローズは塩基性陰イオン交換体である DEAE セルローズ (Diethyl-aminoethyl-cellulose (Brown)) で、これを0.02M pH7.0 磷酸緩衝液で数回洗つて平衡化したものを2.2cm×12.0cmのカラムに約7cmの厚さにつめて使用した。このカラムに透析を終えた蛋白質溶液を吸着させ、次に示す液を展開剤として順に用い、1分間1.3mlの速さで蛋白質の溶出を行なつた。1つの分割における展開液量は70~150mlである。

展 開 剤

1. 0.02M pH7.0 磷酸緩衝液
2. 0.10M pH7.0 磷酸緩衝液
3. 0.20M pH7.0 磷酸緩衝液

- | | |
|---------------------------------|----------------------------------|
| 4. 0.20M pH7.0 磷酸緩衝液+0.10M NaCl | 8. 0.20M pH7.0 磷酸緩衝液+0.50M NaCl |
| 5. 0.20M pH7.0 磷酸緩衝液+0.20M NaCl | 9. 0.20M pH7.0 磷酸緩衝液+0.60M NaCl |
| 6. 0.20M pH7.0 磷酸緩衝液+0.30M NaCl | 10. 0.20M pH7.0 磷酸緩衝液+0.80M NaCl |
| 7. 0.20M pH7.0 磷酸緩衝液+0.40M NaCl | 11. 0.20M pH7.0 磷酸緩衝液+1.0M NaCl |



1 図 各発育に age おけるトマトの葉の可溶性蛋白質の分画

トマトとイヌホウズキのキメラの代謝的研究

溶出液を連続的に Light path 5 mm, 容量 0.3ml のセルに通し, 波長 2537 Å の紫外線を 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 紫外線吸収計を使用した.

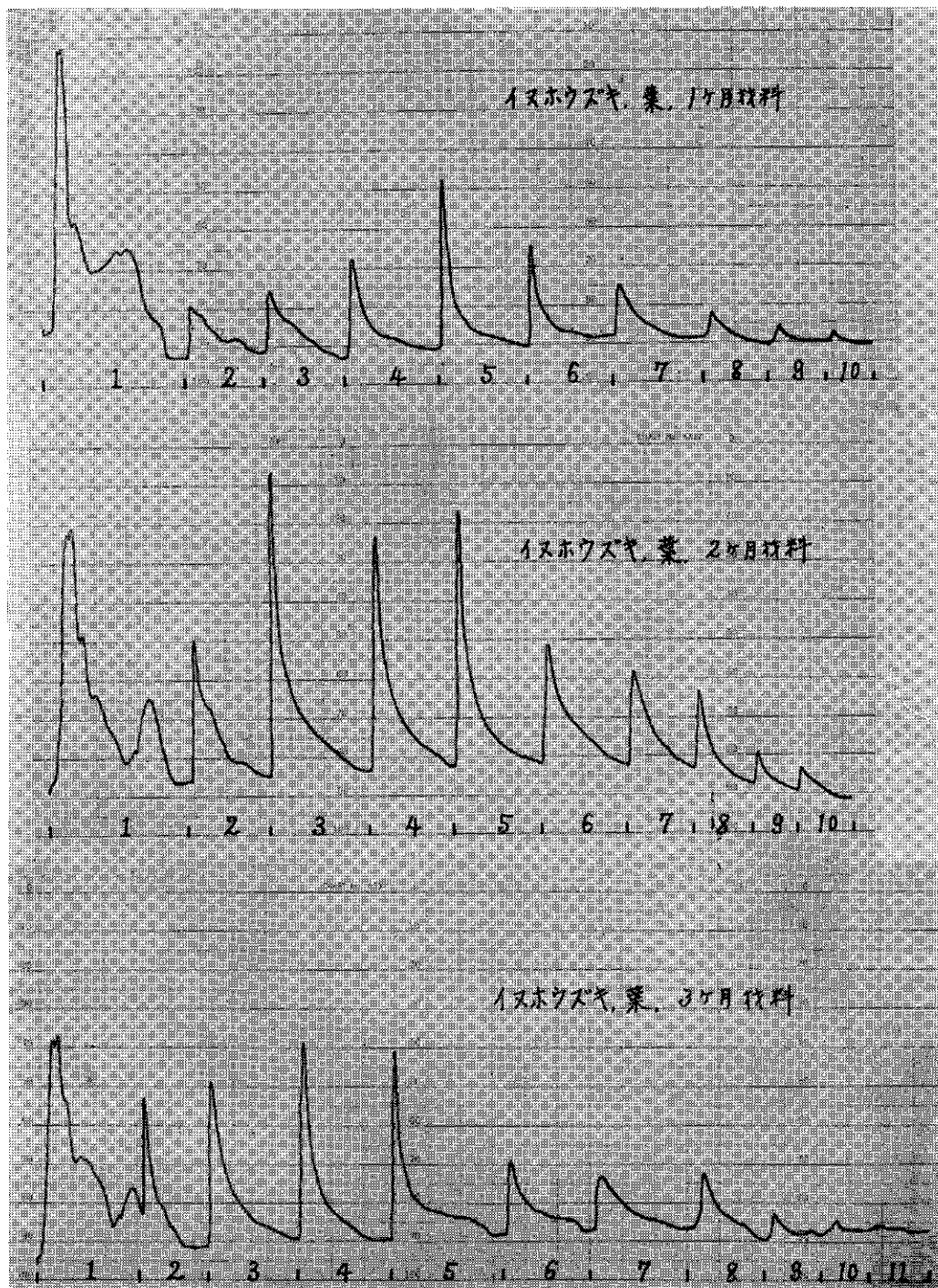


図2 各发育 age におけるイヌホウズキの葉の性蛋白質の分割

結 果

1. 葉の可溶性蛋白質の分割

図1, 2は, それぞれトマトおよびイヌホウズキの葉の可溶性蛋白質の分割結果を示す. まず各分割の可溶性蛋白質の量的関係についていえば, トマトの場合で発育 age の進行にともなつて2, 3, 4分割に溶出される蛋白質量は次第に減少してくる傾向があるに対して, 5, 6, 7分割のそれは増加する傾向がみられる. またイヌホウズキの場合では, トマトの場合と逆に2, 3, 4分割に溶出される蛋白質量は, 発育 age の進むにともない増加する傾向がみられる. しかし, 発育 age にともなう溶出蛋白質のパターンの質的な相違, 例えば新しい Minor Components が生ずるとかの変動は両植物ともにみられない.

トマトとイヌホウズキを比較してみると, 発育 age に関係なく明らかなパターンの相違が1番目の分割に認められる. すなわちトマトの場合では, 発育 age によつても異なるが Main Component に付随して1つないし2つの小さな肩 (Minor Component) ができるだけであるのに対して, イヌホウズキの場合では, そのほかに独立的に相当大きな Component が存在することと, Main Peak の先端が小さく2つに分れたパターンを示すことである. イヌホウズキの3カ月材料でこの1番目の分割の

第2の山が幾分不明瞭となつているのは, 次の展開剤に移る時期が少し早過ぎたためであり, もう少し続けていればより明確な山ができたと思われる.

この1番目の分割は最初カラムに吸着させるときに蛋白質を溶解している磷酸緩衝液と同じ濃度の展開剤で溶出される蛋白質であり, カラムもこれと同じ緩衝液で平衡化してあるから, 本来ならば吸着されない蛋白質と考えられる部分であるが, 溶出パターンの様式から考えて恐

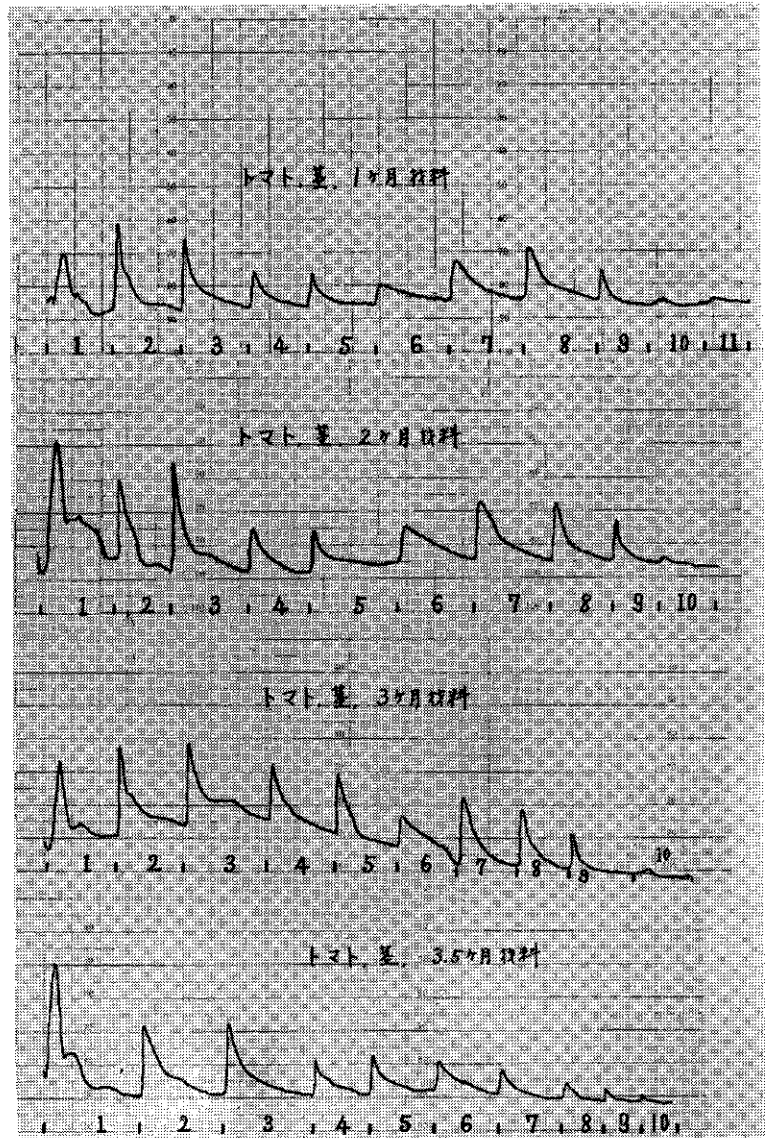


図3 各発育 age におけるトマトの茎の可溶性蛋白質の分割

らく弱い力で吸着されている蛋白質と思われる。いづれにもせよ、この分割に両植物の葉で明瞭な差異があつたことは注目すべき現象と考える。

2. 茎の可溶性蛋白質の分割

茎の可溶性蛋白質量は葉に比べて非常に少ないので、生体重量で6~7g用いている。

図3, 4はそれぞれトマトおよびイヌホウズキの茎の可溶性蛋白質の分割結果を示す。図からみられるように発育 age の違いによる蛋白質の溶出パターンは、両植物ともに概して大きな変動は認められない。あえていえば、トマトでは発育 age の進行にともない1番目の分割の蛋白質量が増加してくることと、同じ分割の Minor Component が多少強調されて現われてくることなどであり、イヌホウズキでは、1および2番目の分割の Minor Component が発育 age の進行にともない、トマトの場合とむしろ逆に減少あるいは消滅する傾向がみられることと、3および3.5カ月の age では蛋白質量が全般的に減少してくることである。

しかるに、トマトとイヌホウズキを比べた場合には、発育 age に関係なく明らかな相違として指摘されるのは、3番目の分割の溶出パターンである。すなわち、イヌホウズキのこの分割で溶出される蛋白質がト

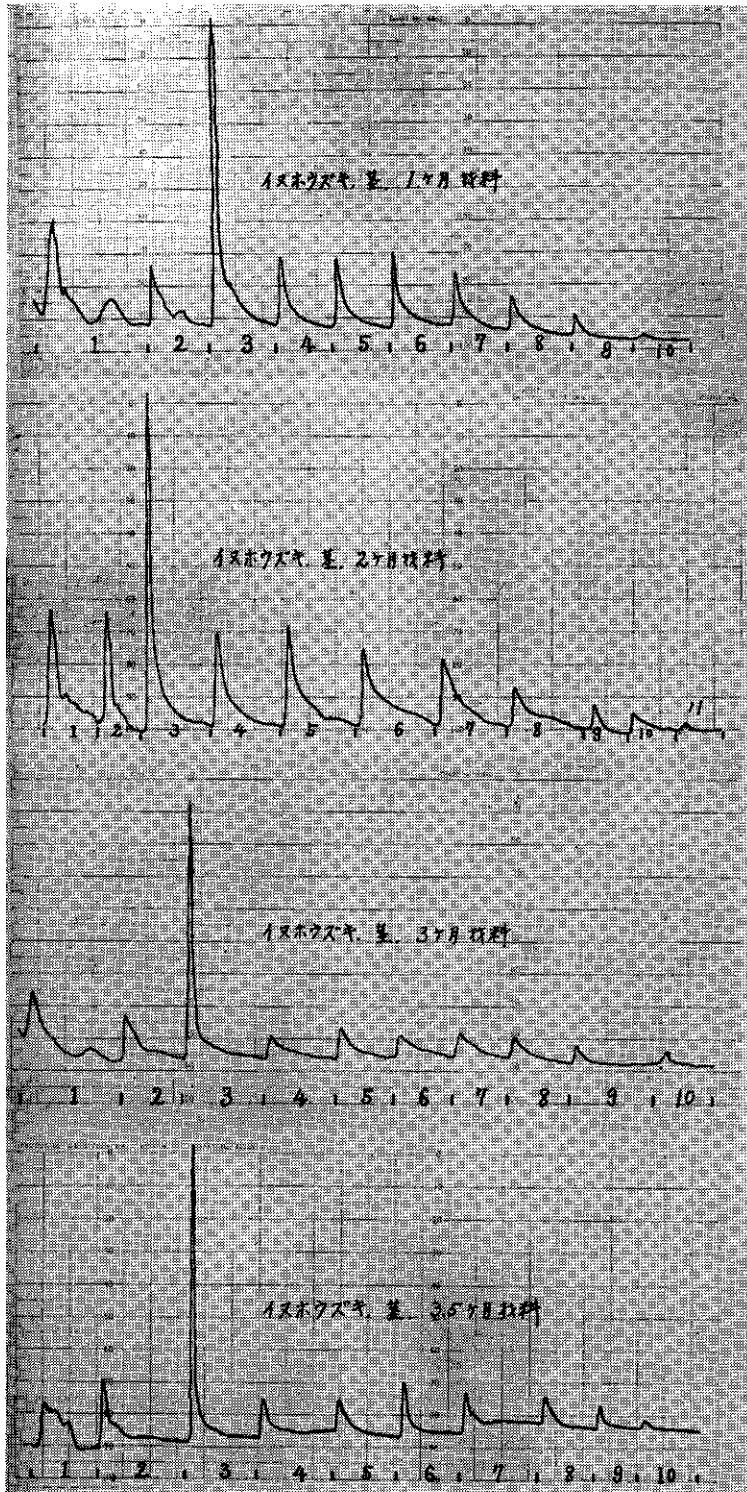


図4 各発育 age におけるイヌホウズキの茎の可溶性蛋白質の分割

マトに比べて著しく多いこと、表現を変えれば、この分割で極めて鋭敏迅速に溶出される蛋白質がイヌホウズキに特徴的に存在することである。いま一つの相違点は、特に1, 2カ月の age のものでいえることであるが、トマトでは4, 5, 6分割の蛋白質より7, 8分割のそれの方がかなり多くなっているのに対して、イヌホウズキではむしろ逆の関係になつてゐることである。

考 察

序論にも述べたように、著者の研究の目的はあくまでもキメラ雑種の代謝生理的特質をその対照(起源)植物であるトマトとイヌホウズキのそれと比較することである。そしてこれまで主に葉と茎の呼吸の面をとりあげ、キメラが対照植物に比して呼吸活性的に優位な特質をそなえていることを報告した。^(2,8) 前報⁽⁴⁾においては、葉および茎の可溶性蛋白質の性質を解明する一手段として、種々の pH における凝固性について研究し、対照植物であるトマトとイヌホウズキでかなり異なつた性質を示すこと、およびキメラがその中間的なパターンを示すことを報告したが、この論文では、同じ可溶性蛋白質の性質をさらに詳細に追究する目的でイオン交換セルローズによる分割を試みたものである。しかし、前述のようにここではキメラを実験に用いることができなかつたので、止むを得ずその前段階としてトマトとイヌホウズキについて実験したに止つた。

しかし仮にキメラのことを別問題としても、同科異属の比較的近縁な両植物の蛋白質構成に如何なる差異があるかを示したこの論文の意義は失なわれたいと考える。

この実験において、種々の発育 age の植物体からの葉や茎を用いたが、それは必ずしも厳密な意味での葉や茎の発育 age ではない。すなわち、葉についていえば、それぞれの発育 age における植物から比較的若い頂部の葉を用いたのであつて、葉それ自体についていえば、各発育 age によつて多少の差はあつてもそれ

ほど大きな違いはない。つまり、この実験の終局の目的はあくまでもキメラと対照植物の比較ということであつて、一つの植物の発育 age による変動に主眼があるのではない。しかしながら、その比較する場合においてもやはり、どの発育 age のものを用いるべきかの問題が必然的に起つてくる。

実験結果からみて、葉および茎ともに各発育 age によつての顕著な相違はみられない。各分割における溶出蛋白質の量的な変動は多少みられるとしても、それほど問題となるような質的な相違は認められない。したがつて、トマトとイヌホウズキさらにキメラの可溶性蛋白質の性質を比較的に検討する場合においては、発育 age をそれほど問題にしなくともよいという結論に達することができた。

実験結果から明らかのように、トマトとイヌホウズキの可溶性蛋白質の顕著な相違として注目されるのは、葉では1番目の分割、茎では3番目の分割の溶出パターンである。すなわちトマトの葉では1番目の分割の Main Component に付随して小さな Minor Component が2つほどみられるだけに対して、イヌホウズキではそのほかに比較的大きな別の Component が1つの Minor Component をともなつて現われることと、Main Component の Peak が小さく2つに分れることである。また、茎ではイヌホウズキの3番目の分割がトマトのそれに比べて著しく大きな Peak を示すことである。

この実験で用いられた展開スケジュールは、あくまでも1つの試みであつて、用いた可溶性蛋白質の分割に最適の条件であるとはいひ難いが、予備実験として磷酸緩衝液の最初の展開濃度を0.005Mとし、それから比較的小刻みな濃度のものを用いて行なつた結果では分離があまりよくなかつたのでこの条件に落着いたわけだが、緩衝液の pH を変えたステップを入れるなどさらに適切なスケジュールを組めば、なお明確な相違を見出し得たかも知れない。ともあれここで用いた条件下で、葉、茎ともに両植物の可溶性蛋白質のパターンに、特定の分割につい

トマトとイヌホウズキのキメラの代謝的研究

てではあるが、明確な相違を認めることができたことは、意義あることと考える。これらの分割の蛋白質が如何なる機能をもつものであるかは今後の問題にゆずるとしても、既報^{(2),(3)}の葉や茎で示されたある種の呼吸基質に対する両植物の酸化様式の相違、換言すれば、両植物のある種の呼吸酵素の量的または質的相違と関連づけて考えられる種類のものであるかも知れない。

対照植物間で認められたこれらの相違を目印として、キメラがいかなる分割パターンを示すかをみることは興味ある問題であり、キメラを用いての実験が非常に待たれる現在である。

要 約

1. トマトおよびイヌホウズキの葉と茎の可溶性蛋白質を DEAE セルローズによつて分割した。

2. 発育 age (1~3.5カ月) にともなう溶出蛋白質分割のパターンには、両植物ともに注目すべき相違は認められなかつた。
3. トマトとイヌホウズキの葉では、1番目の分割に質的な相違が認められた。
3. トマトとイヌホウズキの茎では、3番目の分割にかなり著しい量的な相違が認められた。

この研究にあたり、懇切なるご指導を下された北大理学部教授、宇佐美正一郎氏、および本学教授、寺岡宏氏に謝意を表する。

文 献

1. 増淵, 熊谷, 核と細胞質, 2, 12 (1961).
2. 熊谷, 宇佐美, *Plant Cell Physiology*, 5-3, 193~203 (1964).
3. 熊谷, 宇佐美, 北星短大紀要, 9, 25~30 (1963).
4. 熊谷, 宇佐美, 北星短大紀要, 9, 31~34 (1963).