

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5 イオン交換セルローズによつて
分割された蛋白質の性質

寺 岡 宏

春化処理の生理的機構の解明は、高等植物の発育現象を明らかにしてゆく上に重大な意義をもつ課題の一つである。著者はこの問題について、秋まきコムギの春化処理胚の代謝系の変動を明らかにするための研究をつづけてきた。その結果胚の呼吸系^(1,2)、炭水化物の存在様式^(3,4)、核酸含量⁽⁵⁾などに低温の影響があらわれることを報告してきたが、さらに本論文のシリーズにおいて、蛋白質の存在様式に低温処理の影響が特異的にあらわれることを報告してきた^(6,7,8)。即ち胚の可溶性蛋白質をイオン交換セルローズを用いて分割し、発芽過程と春化処理過程の材料について比較をおこなつた結果、発芽過程の胚ではみられない minor components⁽⁷⁾ が春化処理胚で生成することを見出した。更にこの minor components が春化処理の効果と何らかの関連を有するものであることを明らかにするため、胚培養条件下で春化処理をおこない、サツカロースを胚培養液に加えない場合や、核酸アナログを培養液に加えて、春化処理効果の発現が阻止された胚においては、これらの minor components⁽⁸⁾ の生成がおこらないことなどを見出した。更にこの minor components が春まきコムギ発芽胚でみられるものと類似性をもつことを基礎として、春化処理の機構について、蛋白質の存在様式を中心としてみた場合、それは秋まきコムギに特徴的なパターンから春まきコムギのパターンへの転換をいみするものではないかということを述べてきた。その後著者は更に実験をすすめ、前報の方法によつて分割された蛋白質が核蛋白質を主とするものであり、更にその核酸成分の比較によつて、春化処理胚では、

春まきコムギに特徴的と考えられる核酸成分が、新たに生成してくることを見出した。本論文においてはこれらの内容を明らかにするために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号および、春まきコムギ農林75号で、いずれも北海道北見農業試験場において1964年につくられたものを1965年3月以降に用いた。

発芽および春化処理の方法は前報と同様であるが、発芽には電気低温度恒温器を用いて26.5±0.5°C 春化処理には電気冷蔵庫に発振形調節計を組み合わせて1.5±0.5°Cの条件下で実験を行なつた。

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 (Diethylaminoethyl-cellulose) Serva 0.62~0.63meq/g を用いた。これを M/200 pH7.0 のゼーレンゼン磷酸緩衝液を用いて数回洗つて平衡化し、2.2cm×12.0cm のカラムに約9cmの厚さにつめた。

胚の可溶性蛋白質の分離の方法は前報と同様である。蛋白質溶液を DEAE セルローズ中にとおしてこれに吸着させ、その後次の液を展開剤として用い1分間約1mlの速さで液を流した。

展 開 剤

M/200 pH 7.0 磷酸緩衝液 約200ml

M/40 pH 7.0 磷酸緩衝液 約200ml

M/20 pH 7.0 磷酸緩衝液 約200ml

溶出液を連続的に Light path 5 mm, 容量

0.3mlの石英セルに通し、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の速度で移動させた。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の室温のもとで行なわれた。

胚培養を行なった場合の培養液としてはM/50pH7.0の磷酸緩衝液中にサッカロースを2%硝酸ナトリウムを0.8%の濃度になるようにとかけたものを用いた。本実験に使用したストレプトマイシンは「万有」硫酸ジヒドロストレプトマイシン1gを脱イオン水4mlにとかけたものである。

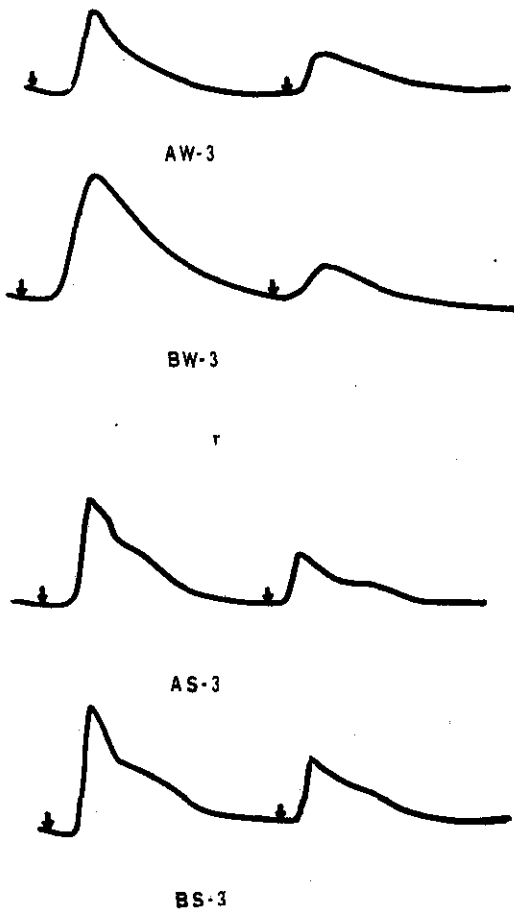


図1 1964年産および1963年産材料の胚の可溶性蛋白質の比較 (A:1964年産材料 B:1963年産材料 W3:発芽3日目秋まきコムギ S3:発芽3日目春まきコムギ)

結 果

1. 1963年産と1964年産の材料の比較

(8) 前報で報告された秋まきコムギ春化処理胚や、

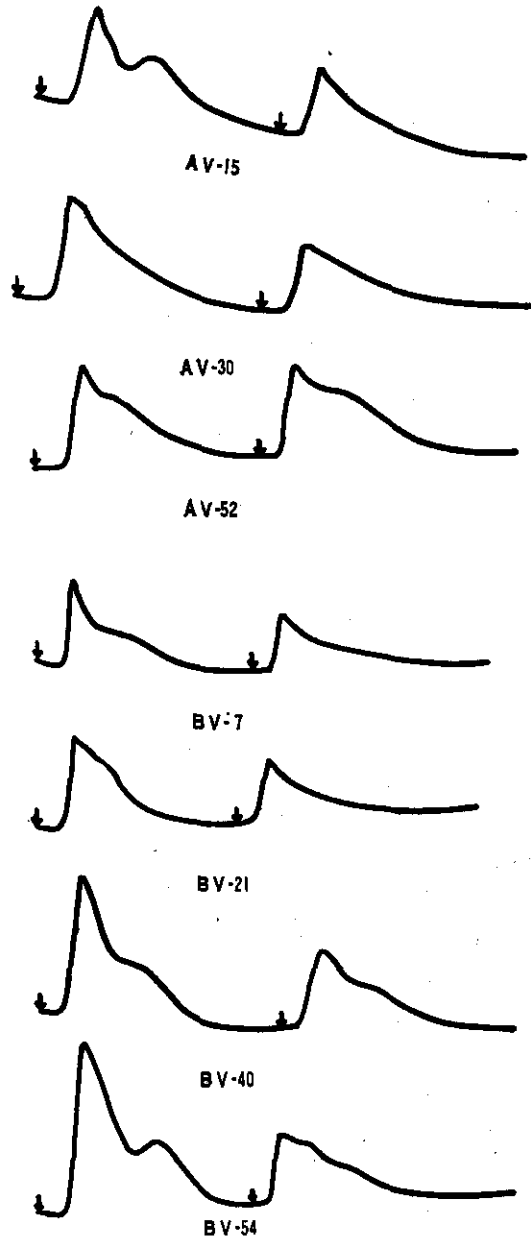


図2 1964年産および1963年産春化処理秋まきコムギ胚可溶性蛋白質の比較 (A:1964年産材料 B:1963年産材料 V15:春化処理15日目以下同様にVの数字は処理日数を示す)

春まきコムギ発芽胚でみられた minor components は溶出液の非常に微小な吸収曲線の変化によつてえられたものであるため、その再現性については厳密な検討がなされる必要があるものと思われる。本実験を行なうに当つて、新たな年度につくられた種子を使用するため、先ず最初に昨年材料についてみられたものと同様の minor components が今年度使用の材料についてもみとめられるか否かについて実験を行なつた。その結果を図1、図2に示す。実験結果の記録には、特に重要な変化がみられるのが M/40 および M/20 磷酸緩衝液の溶出部分であるため、特定の場合をのぞいては、M/200 磷酸緩衝液による溶出部分の後半からはじめた。そして展開剤をとりかえたところは矢印を用いた。

以上の実験の結果として、昨年度の春まきコムギでみられた特徴が今年度の材料についてもみられること、また春化処理の過程についても同様のことが言えることがわかつた。

ただ変化の発現の時期にずれがみとめられ本年度の材料の方が昨年度のもの比べて、約7~12日位のおくれがみとめられる。しかし、春化処理期間中の胚の水分含量の相違や低温の温度差などのため、この程度の形質発現のずれは、本質的なものであるとは考えられない。以上の結果、前報⁽⁸⁾でみられた minor components は本実験で使用される種子についても同様に発現するものであることが結論された。

2. 春化処理胚抽出液の秋まきコムギ発芽胚蛋白質におよぼす影響

春化処理過程の進行にともない、胚に新たな minor components が生成することが明らかにされたが、このような現象の原因の一つとして、春化処理の進行にともない、胚に或る生理的な活性をもつた物質がつくられ、この物質の影響のもとにこれらの minor components の生成が支配されるのではないかという可能性が考えられる。このような物質としてホルモン性のものや、核酸系の物質などが推察されるが、一応その問題は本論文においては取り上げないこととし、ただそのような物質が熱可溶性物質である

と仮定した上で、次の実験をおこなつた。春化処理15日、30日、50日、60日の胚それぞれ250ヶに M/200 pH 7.0 磷酸緩衝液を加えてすりつぶし、遠心分離した上澄液を加熱して、蛋白質を凝固させその上澄液を春化処理胚抽出液として用いた。胚250ヶから最終液が約10ml とれる程度にした。発芽1日目の胚を胚乳から分離し、胚培養液中に抽出液が $1/5 \sim 1/10$ 程度にうすまるように加えたものに胚をひたして、26.5°Cで3日間培養をおこなつた。培養液は1日毎に新たにとりかえた。3日後にこれらの胚の蛋白質の構成を上記の方法にしたがつて分析した。なお対照として、胚抽出液を加えない胚培養液中で培養をおこなつたもの、および、春まきコムギの胚を同様に胚抽出液の存在下で胚培養したものを用いた。実験の結果を図3に示す。

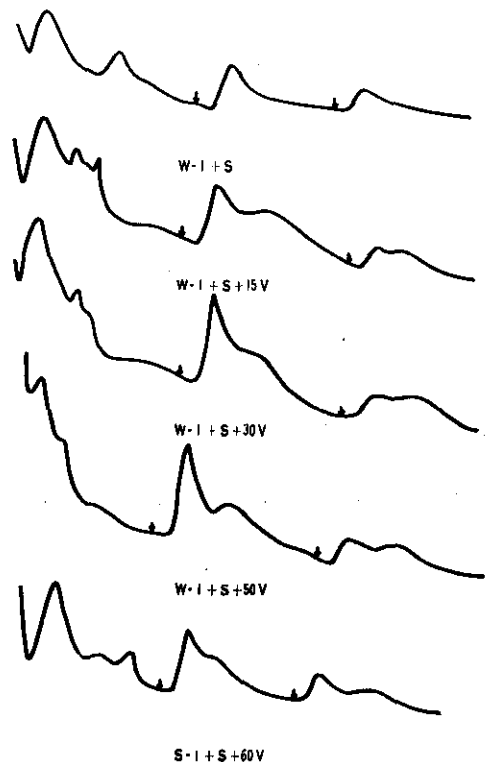


図3 春化処理抽出液の胚可溶性蛋白質におよぼす影響 (W-1: 秋まき発芽1日目胚 S-1: 春まき発芽1日目胚 +S: 2% サッカロースをふくむ胚培養液 +15V: 春化処理15日目胚抽出液 以下同様)

以上の実験の結果から、春化処理胚抽出液を加えることにより、低温の影響なしで、胚の蛋白質の minor components を生成することができることがわかった。このような結果は胚の抽出液中にこの minor components の生成に関連した何かある物質が存在していたことを示すものと考えられる。

3. 胚可溶性蛋白質におよぼすストレプトマイシンの影響

上記の実験によってみられた minor components 生成の原因について考察するには基礎的事柄として、DEAE セルローズによつて分割された蛋白質がどのようなものであるかを知ることが必要になる。このため特に春まきコムギ発芽2日目の胚をえらび、分割された各ピークの240 m μ から300 m μ にわたる吸収を測定した。実験の結果を図4、図5に示す。

以上の測定の結果、各ピークとも280m μ にはつきりした吸収極大を示すものがなく、これらの吸収曲線の性質から、各ピークとも核蛋白質を主成分とするようなものであることが推察される。それ故、この点を明らかにするためDEAEセルローズに吸着させる前の蛋白質溶液にストレプトマイシン溶液3mlを加え遠心分離した。遠心分離による上澄液を透析した後、DEAEセルローズに吸着させ同様の溶出操作をおこなつた。そして溶出された各ピークの240 m μ から300m μ までの吸収を測定した。実験の結果を図6および図7に示す。

以上の実験の結果から図4でみられた各ピー

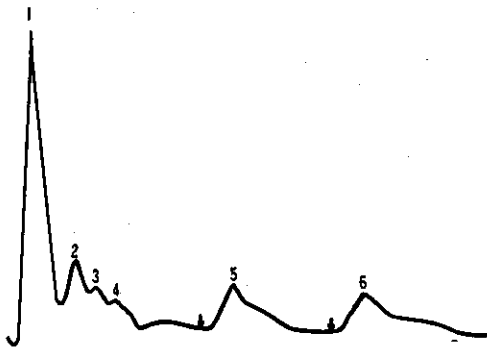


図4 春まきコムギ発芽2日目胚可溶性蛋白質の分割および各ピーク番号

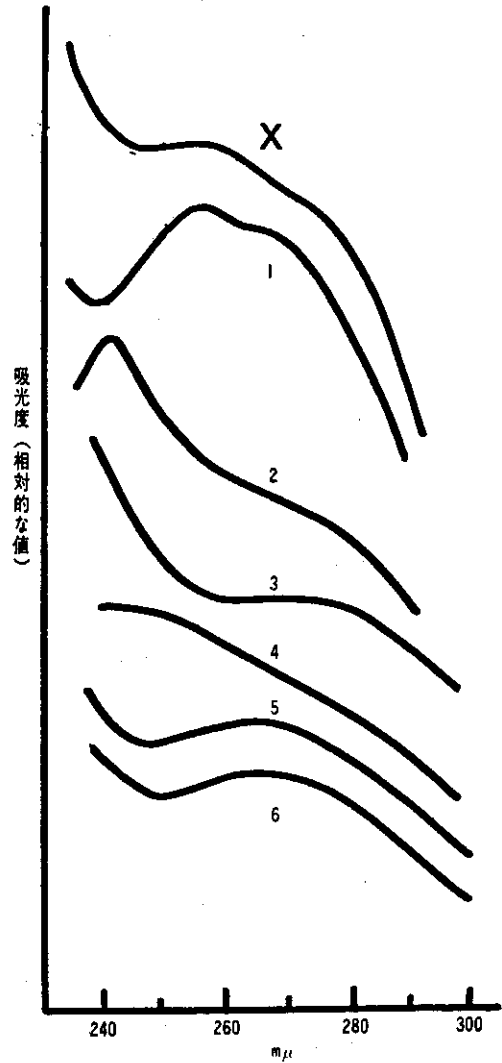


図5 春まきコムギ発芽2日目胚可溶性蛋白質の各ピークの240 m μ から300m μ までの吸収曲線 (Xは吸着前の蛋白質溶液、図中の番号は図4のピークの番号を示す)



図6 春まきコムギ発芽2日目胚可溶性蛋白質にストレプトマイシンを加えた上澄液の分割および各ピーク番号

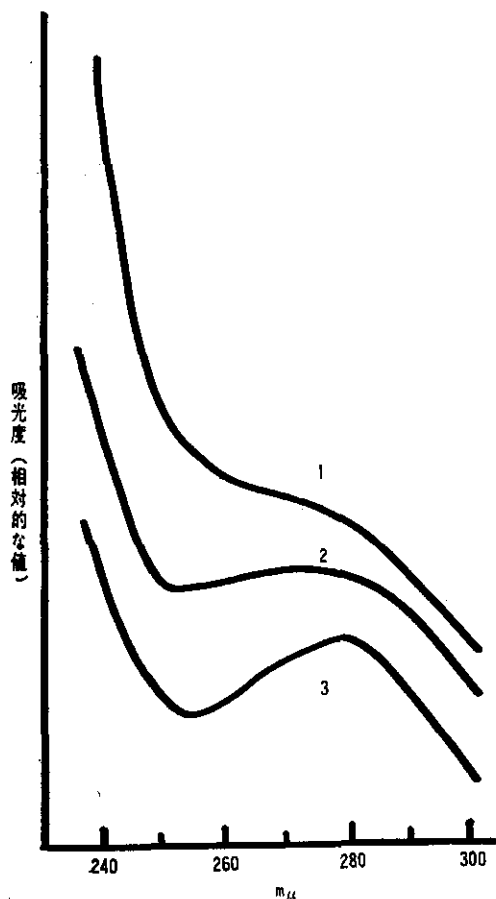


図7 春まきコムギ発芽2日目胚可溶性蛋白質にストレプトマイシンを加えた上澄液の分割各ピークの240 $m\mu$ から300 $m\mu$ までの吸収曲線 (图中番号は図6のピークの番号を示す)

クは殆んど、ストレプトマイシンによつて沈澱し、残つた上澄液中の蛋白質は図5にみられる結果と多少ことなつた、280 $m\mu$ およびその付近に吸収をもつものであることがわかつた。このような実験の結果は各ピークとも核蛋白質を主成分とするものであるとした前述の推察により確実な証拠をあたえるものである。

4. 0.5 飽和硫酸アンモニウムによる沈澱蛋白質の熱可溶性部分について

上記の実験の結果をさらに明らかにするため、核蛋白質から核酸部分を分離することを目的として、次の実験をおこなつた。即ち、DE

AEセルローズに吸着させる前の蛋白質溶液を加熱し、凝固した蛋白質は遠心分離によつて取りのぞき、上澄液の部分を DEAE セルローズに吸着させ、同様の溶出操作をおこなつた。材料としては、春まきコムギおよび秋まきコムギの各発芽2日目の胚を約250ヶ用いた。春まきコムギの溶出ピークの240 $m\mu$ から300 $m\mu$ までの吸収を測定した。実験の結果を図8および表1に示す。

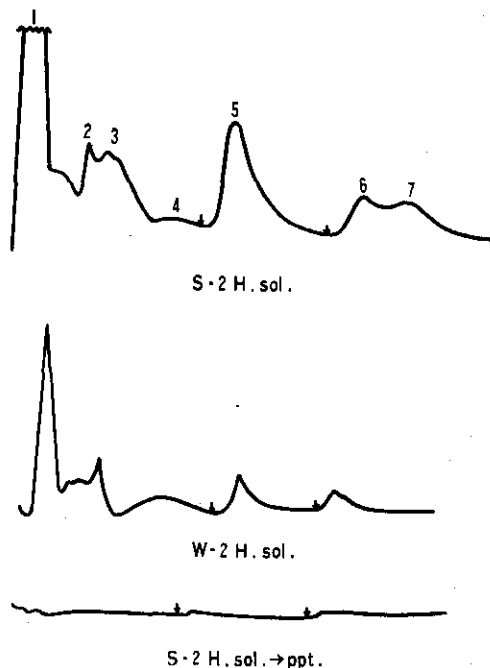


図8 蛋白質溶液加熱上澄液の分割と各ピーク番号 (S-2: 春まき発芽2日目胚 W-2: 秋まき発芽2日目胚) および加熱上澄液の0.5飽和硫酸アンモニウム沈澱部分の分割 (S-2H. sol→ppt: 春まき発芽2日目胚加熱上澄液の硫酸アンモニウム沈澱部分)

表1 胚蛋白質溶液の熱可溶性部分の各分割ピークの最大吸収波長および260 $m\mu$ 吸収量と280 $m\mu$ 吸収量の比

ピーク番号	1	2	3	4	5	6	7
最大吸収の波長 $m\mu$	260	255	255	265	260	260	260
260 $m\mu$ /280 $m\mu$ 吸収量/吸収量	2.0	1.8	1.8	1.6	2.0	2.0	2.0

(表中のピーク番号は図8, S-2における番号を示す)

表1にみられるように各ピークとも $255\text{m}\mu\sim 265\text{m}\mu$ に明瞭な吸収の極大をもち、核酸を主成分とするものであることが明らかにされた。

しかしこれらの核酸が、加熱によつて核蛋白質から分離したのか、それとも、0.5飽和硫酸アンモニウム沈澱物中に、はじめから混在していたものかについては、この実験の結果からは何も判定することができない。この点を明らかにするため、図8でみられた核酸が0.5飽和硫酸アンモニウムによつて沈澱するかどうかについて実験をおこなつた。即ち蛋白質溶液を加熱して得られた、熱可溶性溶液に0.5飽和になるように硫酸アンモニウムを加え、その沈澱物をM/200 pH 7.0 磷酸緩衝液にとかした後、これを1晩透析し、その後 DEAE セルローズに吸着させ同様の溶出操作をおこなつた。実験の結果は図8の下に図示されてあるように、これらの核酸は0.5飽和硫酸アンモニウムによつては、殆んど沈澱しないことが明らかになつた。以上の実験の結果は、蛋白質溶液加熱によつてみられた核酸が、もともとこの溶液中に混在していたものでなく、核蛋白質から分離されたものであるという推論を支持するものである。

以上の推論を更に確認するため、ストレプトマイシンを加えて遠心分離した上澄液を同様に加熱し、その熱可溶性部分を DEAE セルローズに吸着させ同様の溶出操作をおこなつた。その結果図9に示されているように、この部分には図8でみられたような核酸はみとめられなかつた。以上のことは、もし0.5飽和硫酸アンモニウムによつて沈澱した部分に核酸がふくまれているとしたら、この蛋白質溶液にストレプトマイシンを加えることによつて核酸は沈澱したと考えなければ説明されない、そこで遊離の核酸がストレプトマイシンを加えることにより沈澱するかどうかを実験した。実験の結果は図9に示されてあるように、遊離の核酸はストレプトマイシンによつて殆んど沈澱しないことが明らかになつた。

以上図9にある結果を総括して、ストレプトマイシンによつて、遊離の核酸は沈澱しないこ

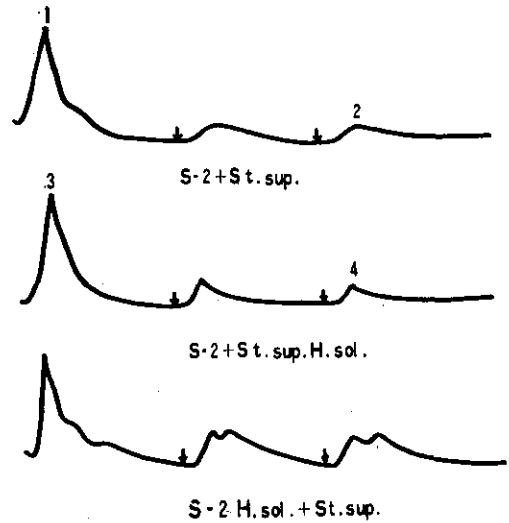


図9.A. 上. 胚可溶性蛋白質にストレプトマイシンを加えた上澄液の分割
中. 胚可溶性蛋白質にストレプトマイシンを加えた上澄液の熱可溶性部分の分割
下. 熱可溶性溶液にストレプトマイシンを加えた上澄液の分割 (S-2 : 春まき発芽2日目胚)

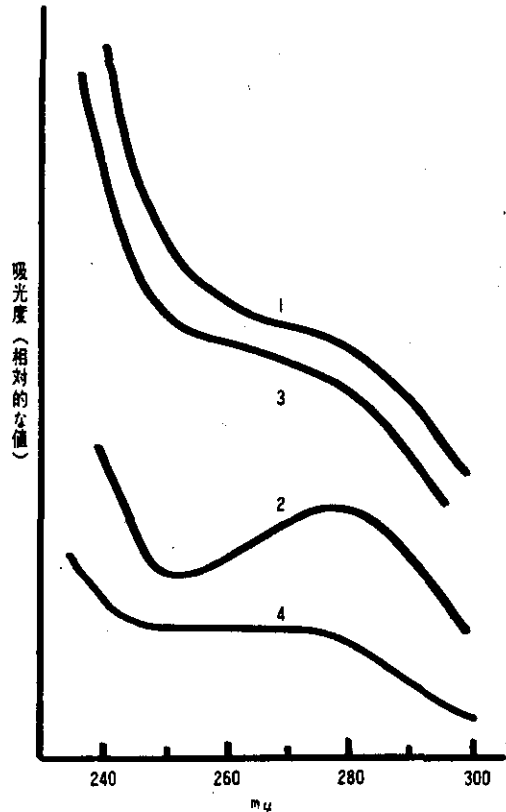


図9.B. 図9.A.1,2,3,4. 各ピークの $240\text{m}\mu$ から $300\text{m}\mu$ までの吸収曲線 (図中数字は図9.Aのピーク番号を示す)

と、そしてストレプトマイシン上澄液に核酸が存在しないことから0.5飽和硫酸アンモニウムによる沈澱物の中には核酸がふくまれていないことを推論することができた。

5. 熱可溶性溶液中の核酸ピークの比較

以上の実験から、蛋白質溶液を加熱することにより、核蛋白質の核酸部分が分離し、これがDEAEセルローズによつて分割溶出することがわかつたので、同様の操作を秋まきコムギ、春まきコムギの各発芽胚および、春化処理秋まきコムギ胚についておこない、各核酸のピークを比較した。実験の結果を図10に示す。

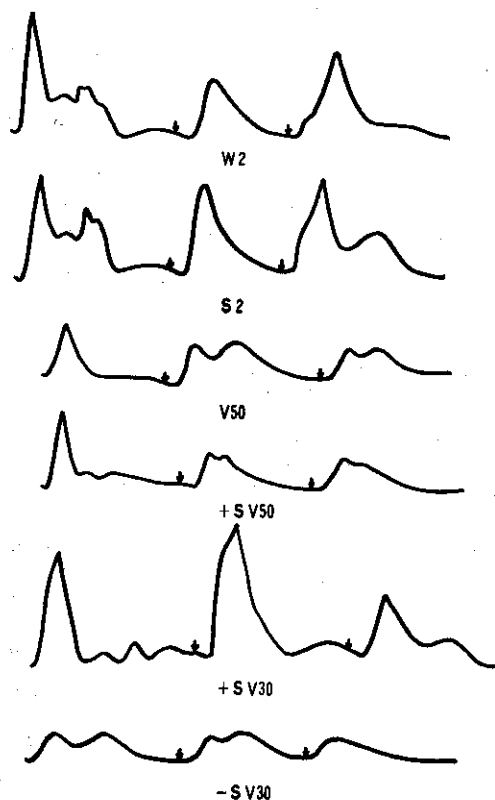


図10 熱可溶性溶液の分割 (W2:秋まき2日発芽胚 S2:春まき2日発芽胚 V50:春化処理50日胚 +SV50:胚培養春化処理50日胚 +SV30:胚培養春化処理30日胚 -SV30:サッカロースをふくまない胚培養春化処理30日胚)

図10にみられるように、春まきコムギには秋まきコムギにない、特有のピークが一つみとめられること、そしてこのピークは春化処理効果

をもつた秋まきコムギでは春まきコムギと同様にみとめられることが明らかにされた。又春化処理を受けた秋まきコムギ胚には春まきコムギにみられなかつた、新しいピークが一つ出現することも明らかにされた。

考 察

春化処理期間中の胚で進行する生理的な変化には大別して2種類のものがみとめられる。即ちその一つは発芽胚においても進行する変化が、低温の影響のもとで、緩慢に進行してゆくといったものであり、他の一つは、低温の影響によつてのみ特徴的にみられる変化である。この後者の変化の総合の結果としてはじめて秋まきコムギは春まき性という新たな生理的な性格を得るわけである。それ故、低温によつて秋まきコムギ胚に誘発される特徴的な変化はその内容として、春まきコムギに特徴的な代謝系への転換を意味するものであることが推察される。このような考え方を支持する実験結果として、本論文のシリーズの3報⁽⁷⁾および4報⁽⁸⁾で明らかにされた蛋白質の構成のパターンをあげることができる。即ち春化処理によつて、春まきコムギに類似性をしめす、minor components が生成することが見出された。本論文においては、以前の結果を更に明確化してゆくためのいくつかの実験が報告された。即ち、春化処理胚の熱可溶性溶液が核蛋白質から分離された核酸をふくんだ液であり、この液を秋まきコムギ発芽胚に加えることにより、春化処理胚に特有の minor components がつくられることが見出された。そして、本論文の方法によつて得られた蛋白質の各分割が核蛋白質をその主成分とするものであることが推察された。しかし、上記の推察にはなおいくつかの問題が残されている。即ち本論文において核蛋白質の存在を明らかにするために用いられた方法として240 μ mから300 μ mの吸収、ストレプトマイシンによる沈澱、蛋白質溶液の加熱による核酸の分離といったものであつた。しかし、本論文の結果の中でものべられたように、0.5飽和硫酸アンモニウムによる沈澱

物中に遊離の核酸がふくまれておれば、上記の実験結果から直ちに核蛋白質であると結論づけることができなくなる。

この点を明らかにするために、加熱によつてえられた核酸溶液にストレプトマイシンを加えて、核酸が沈澱しないことを見出しているが、しかし、加熱によつて得られた核酸溶液と加熱前の遊離の核酸溶液との間には物理的諸性質に相違があることが考えられるので、本実験の結果のみからはなお蛋白質溶液中の遊離の核酸の存在を完全に否定できるものとは思われない。これらの点に関してはなお今後の研究の課題である。

次の問題として、各ピークが核蛋白質を主成分とするものであることを認めたとして、これらの核蛋白質が細胞内において、本来的に存在していたものであるか、それとも本実験で用いられた蛋白質溶液を調整するための操作のいずれかの段階において、人為的に核酸と蛋白質が結合したものであるかという可能性が指摘される。この点も今後の研究によつて明らかにされるべき問題である。

以上いくつかの問題が今後の課題として残されてはいるが、しかし本論文において明らかにされた点として、核酸の構成における春まきコムギ、秋まきコムギ、および春化処理秋まきコムギの間の関係が明確化されたことをあげることができる。即ち、春まきコムギに比較したとき秋まきコムギには欠けていた核酸のピークが春化処理効果の発現によつておぎなわれ、春まきコムギと類似した構成を示すようになることであり、これは著者が今迄いくつかの論文においてのべてきた春化処理機構についての基礎的な考え方を更に裏づけたものである。

最後に春化処理胚の熱可溶性抽出液の影響については、この抽出液中にふくまれる春化処理にともなつて特徴的に生成する核酸が発芽胚に吸収され minor component の生成に用いられ

たのではないかと推察される。そして本実験の溶出操作によると、春化処理に特徴的な核酸ピークの溶出するところと、春化処理に特徴的な蛋白質の minor component が溶出するところが一致していることから、これらの核酸が胚に吸収された後、直接に胚の或る種の蛋白質と結合して、minor component となり、これが同様の溶出操作の結果、再び同じところに溶出されてきているのではないかと考えられる。この点に関してもなお今後の研究の課題である。

結 論

1. 1963年産と1964年産の秋まきコムギおよび春まきコムギを用いて蛋白質溶出液の示す変化について再現性を検討した。その結果蛋白質 minor components の生成について、再現性がみとめられた。
2. 春化処理秋まきコムギ胚からの熱可溶性抽出液を発芽秋まきコムギ胚に加え胚培養をおこなつた結果、春化処理による特徴的な minor components が発芽胚でも生成することが見出された。
3. 本論文における方法によつて分割された蛋白質は核蛋白質を主成分とするものであることが推察された。
4. 秋まきコムギ、春まきコムギ、および春化処理秋まきコムギの各胚における核酸の構成の一部分を比較し、これらの間の関係について明らかにすることができた。

文 献

1. 宇佐美, 寺岡外: 生物科学, 特集号, 45, (1955).
2. 寺岡, 宇佐美: 生物科学, 特集号, 30, (1957).
3. 寺岡, 宇佐美: 生物科学, 特集号, 15, (1956).
4. 寺岡: 北星短大紀要, 6, 62, (1960).
5. 寺岡: 北星短大紀要, 8, 13, (1962).
6. 寺岡: 北星論集, 1, 123, (1962).
7. 寺岡: 北星短大紀要, 9, 1, (1963).
8. 寺岡: 北星短大紀要, 10, 3, (1964).