

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Ⅶ 可溶性蛋白質のディスク電気泳動法による分離

寺 岡 宏

著者はコムギ春化処理過程の胚における生理的な変化を追求することを目的として、胚の可溶性蛋白質をイオン交換セルロースによって分離し、春化処理過程と発芽過程において、その構成パターンを比較してきた。その結果、発芽過程の胚においては、春まきコムギにのみ見出され秋まきコムギではみられない蛋白質が存在すること、そしてこの蛋白質は春化処理によってはじめて、秋まきコムギで生成されてくることを見出した(1, 2)。以上の実験結果を更に別の角度から確認することおよび下記の二点を明らかにすることを目的として、可溶性蛋白質に対してディスク電気泳動法による実験を行なった。即ち

1. 前報でみられた新しい蛋白質の生成が胚のどの部分で行なわれるか。
2. イオン交換セルロースからの蛋白質の示す溶出曲線のピークが、単一蛋白質あるいは複数の蛋白質の存在によるものかどうか。

以上の目的のためになされた実験の結果、イオン交換セルロースとディスク電気泳動法による実験結果の間に共通の現象がみとめられたこと、また上記2点についてもあらたな知見がえられた。本論文においては以上の実験の結果について報告する。

材 料 と 方 法

実験に用いられた材料は、秋まきコムギ赤錆不知1号(*Triticum vulgare* L.) および春まきコムギ農林75号(*Triticum vulgare* L.)である。赤錆不知1号は秋まき性の強い品種で開花

のために約65~70日間の低温処理を必要とするものである。これらの実験材料は北海道北見農業試験場において1965年収穫されたもので1966年6月以降10月までの期間に本実験に用いた。

発芽および春化処理の方法は前報(3)と同様であるが、発芽は $27.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 、春化処理は $1.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$ の条件下で行なった。

胚可溶性蛋白質の抽出

胚を胚乳から分離しよく水洗いした後、約2倍重量の海砂を加えてM/200 pH 7.0 磷酸緩衝液中ですりつぶす。これを7000 r.p.m. 5分間の遠心分離を行いその上澄液を集める。最初に加える磷酸緩衝液の液量は遠心分離によって得られる上澄液の液量が約15 mlになる程度に調節する。上澄液に等量の飽和硫酸アンモニウム溶液を加え7000 r.p.m. 5分間の遠心分離を行い、得られた沈澱物をふたたびM/200 pH 7.0 磷酸緩衝液にとかし、M/200 pH 7.0 磷酸緩衝液に対して約18時間透析を行う。この透析の内液を可溶性蛋白質として実験に用いた。

ディスク電気泳動法について

ゲルの調整用として次の液を用意し、下記の割合に混合してSample gel, Stacking gel およびSeparating gelをつくった(4)。

A液: INHCl 48 ml + Tris 36.3 g + Temed (N, N, N', N' Tetramethylethylenediamine) 0.23 ml に水を加えて100 ml にしたもの

B液: INHCl 約48 ml (液のpHを6.6~6.8にするよう調整する) + Tris 5.98 g + Temed 0.46 ml に水を加えて100 ml にしたもの

C液: Acrylamide 28.0 g + Bis (N, N'-Methylenebisacrylamide) 0.735 g に水を加えて 100 ml にしたもの

D液: Acrylamide 10.0 g + Bis 2.5 g に水を加えて 100 ml にしたもの

E液: Riboflavin 4.0 mg を水 100 ml にとかしたもの

F₁液: Sucrose 4 g を水 10 ml 中にとかしたもの

F₂液: Sucrose 4 g を水 5 ml 中にとかしたもの

G液: Ammo Persulphate 0.14 g を水 100 ml にとかしたもの

(i) *Sample gel* のつくり方: B液 1 : D液 2 : E液 1 : F₂液 2 : 可溶性蛋白質液 3 の割合で混合したもの 0.2 ml を泳動用カラムに入れ, 光重合せる。

(ii) *Stacking gel* のつくり方: B液 1 : D液 2 : E液 1 : F₁液 4 の割合で混合したものを *Sample gel* の上に 0.20 ml 入れ更に光重合させる。

(iii) *Separating gel* のつくり方: A液 1 : C液 1 : G液 2 の割合で混合したものを *Stacking gel* の上に入れ自然の状態です 30 分間かけて重合させる。

(iv) 電気泳動法について: *Tris-Glycine buffer system* を用い 1 column 当り 3 m. amp の電流を流し約 90 分間泳動を行なった。

(v) 蛋白質の染色について: 泳動後ゲルをカラムから取り出し 0.5% *Aniline Black*—7% *acetic acid* 液で染色し, その後 1 column 当り 12.5 m. amp の電流をゲルに通して脱色を行なった。

可溶性蛋白質のイオン交換セルロースによる分画について

イオン交換セルロースとしては DEAE セルロースを用い前報 (1, 2) と同様の方法によって溶出を行ない, 溶出液は前報 (1, 2) と同様 UVICORD UVABSORPTIOMETER によって測定を行なった。

結 果

1. 発芽および春化処理過程における胚可溶性蛋白質の分離

発芽および春化処理胚の可溶性蛋白質をディスク電気泳動法によって分離した。発芽過程の胚では発芽 1~2 日目と 3~5 日目との間で蛋白質のバンドの表われ方に相違がみられるため, 発芽 1 日目と 3 日目の材料でえられた結果を示す (図 1)。春化処理 45~60 日目の胚は形態的には発芽 2 日目位の状態を示す。

以上の実験結果から, 発芽過程の胚では秋まきコムギに比べて春まきコムギではより移動性の大きい 2 つのバンドが存在することがみとめられる。1 日目の材料と 3 日目の材料において春まきコムギ特有な 2 つのバンドのあらわれ方に多少の差がみられるが, これが 3 日目と 1 日目の胚で種類のことなる蛋白質があらわれるためであるか, あるいは実験条件によってあらわれる相違であるかについては不明である。

秋まきコムギ発芽 1 日目の蛋白質バンドを春化処理 45 日, 60 日目のそれと比較すると, 発芽胚ではみられない移動性の大きい 2 つのバンドが春化処理によって胚に出現することがみとめられた。この 2 つの春化処理によるバンドは

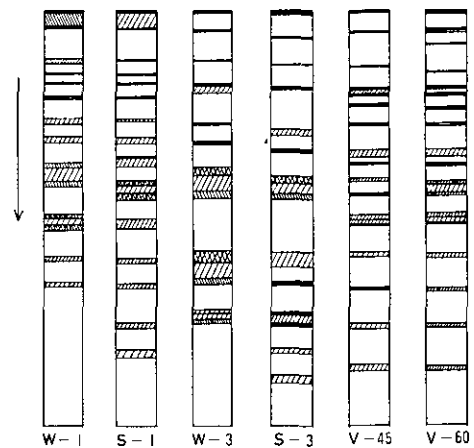


図 1 発芽秋まきコムギ(W), 春まきコムギ(S) および春化処理秋まきコムギ(V) 可溶性蛋白質のディスク電気泳動法による分離: 数字は発芽および春化処理日数, 矢印は泳動の方向を示す。

春まきコムギ発芽胚でみられた2つのバンドと類似のものであることが考えられるが、この点については以下の更に詳細な実験によって確認された。

2. 胚盤、子葉鞘、および子葉の可溶性蛋白質の分離

上記の実験においては胚乳から分離された胚を全体として扱い、胚の部分間の相違は問題としなかった。しかし胚においては、胚盤、子葉鞘および子葉といった生理的機能の異なる部分が存在するため、胚をこれらの各部分にわけ、これらの部分ごとに可溶性蛋白質

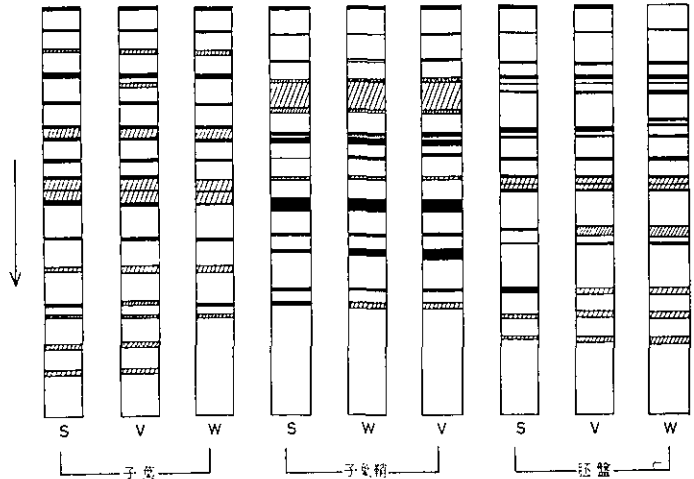


図2 発芽秋まきコムギ(W)、春まきコムギ(S)および春化処理春まきコムギ(V)の子葉、子葉鞘および胚盤の可溶性蛋白質：矢印は泳動の方向を示す。

を抽出し、ディスク電気泳動法によって蛋白質を分離した。なお実験に用いた材料は春まきコムギおよび秋まきコムギ各3日発芽のものと同程度にしたものを用いた。実験結果を図2に示す。

以上の実験の結果から、春化処理胚と春まきおよび秋まき各発芽胚を比較すると、子葉鞘と胚盤ではほとんど相違がみとめられないことがわかった。これに反して、子葉部分では移動性の大きい2つの蛋白質バンドが春まき発芽胚と春化処理胚でみとめられるのに対して、秋まきコムギ発芽胚ではこのバンドが存在しないことが判明した。

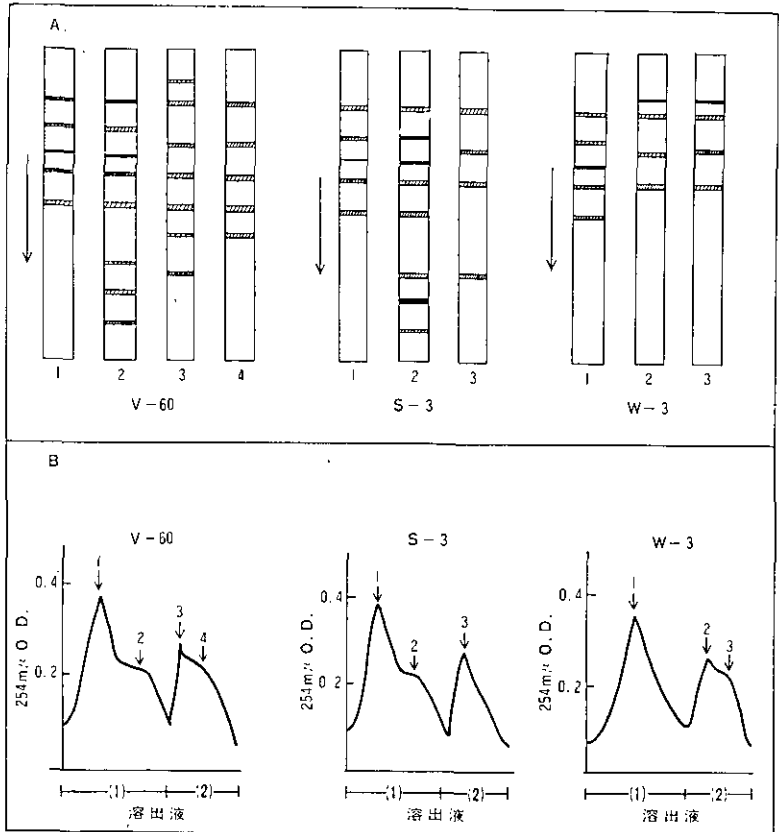


図3 DEAEセルロースからの溶出液のディスク電気泳動法による分離
 A. 溶出液の電気泳動による分離：図中 1, 2, 3, 4はB図溶出曲線に示されている試料を採取した部分を示す。
 B. 胚可溶性蛋白質のDEAEセルロースからの溶出曲線：図中の数字は電気泳動に用いた試料を採取した部分を示す。矢印およびV-60, S-3, W-3の記号は図1と同様である。

以上の実験の結果、春化处理の効果は胚の子葉部分に集中的にあらわれること、および秋まきコムギの春化处理の結果としての2つの新しい蛋白質は春まきコムギ発芽胚では潜在的に存在しているものであることが確認された。

3. DEAE セルロースからの溶出蛋白質のディスク電気泳動による分離

前報(1, 2)において DEAE セルロースを用いて胚可溶性蛋白質を分画した結果、M/40 Hp 7.0 磷酸緩衝液によって溶出される部分に春化处理の効果とみなされる蛋白質のピーク(或は肩部形を示す)があらわれること、そしてこのピークは発芽春まきコムギ胚にも存在することが見いだされた。上記 1, 2 の実験の結果からこの胚出曲線にあらわれる春化处理効果の部分には、上記の移動性の大きい2つの蛋白質がふくまれているものと推察される。この点を明らかにするために、図 3, B の溶出曲線上の 1, 2, 3, 4 に相当する部分の溶出液を各 5 ml ずつ採取し、凍結乾燥法によってこの液を約 1/5 に濃縮し、これを試料としてディスク電気泳動を行った。実験の結果を図 3, A に示す。

以上の実験の結果、春まきコムギおよび春化处理胚に特徴的な溶出曲線の部分には、問題とされた移動性の大きい2つの蛋白質がふくまれていることが明らかにされた。すなわち、M/40 pH 7.0 磷酸緩衝液による溶出曲線の特徴的な変化は、これら2つの蛋白質の存在に由来することが確認された。

考 察

以上の実験から前報において春化处理効果の一つとして報告されてきた蛋白質の *minor Component* が移動性の大きい二種類の蛋白質であったことが明らかにされた。これらの蛋白質が他の蛋白質と比較して特に移動性が大きいことから、他の蛋白質と比較してより低分子量のものであることが推察される。なおこれらの蛋白質のもつ生理的機能については不明であるが、これらの蛋白質をゲルから溶出させその紫線吸収を測定した結果(5)によれば、これら

の蛋白質が核蛋白質としての性質をもつことが推察されたが、この点については、別報において詳細な報告を行う。

低温処理の蛋白質構成パターンにおよぼす影響については、最近 STEWARD の報告がある(6)。その結果によればチューリップの球根の低温処理によってディスク電気泳動において移動性の大きい蛋白質が 2~3 種類新たに生成することが知られた。この事実は現在のコムギにおける低温処理の結果と一致するものであり、低温処理の花芽形成への効果が、高等植物のかなり広い範囲にわたって共通性をもつものであることを推察させる事実である。

なおコムギの葉の可溶性蛋白質のディスク電気泳動については、WRIGLEY 達の報告がある(7)。その実験に用いられた材料は 30 日の生長を行なった葉であり、本実験において用いられた子葉とは生理的な年齢をことにするものではあるが、検出された蛋白質バンドの数は本実験でえられた結果とほぼ一致するものである。

結 論

1. 発芽過程における秋まきコムギと春まきコムギの蛋白質構成をディスク電気泳動法によって比較した結果、移動性の大きい二種類の蛋白質が春まきコムギ胚にのみ見出された。そしてこの蛋白質は春化处理によって秋まきコムギ胚に出現することが見出された。

2. 春まきコムギおよび春化处理胚を特徴づける移動性の大きいそれらの蛋白質は胚の子葉部分に存在することが明らかにされた。

3. 春まきコムギおよび春化处理胚からの可溶性蛋白質のしめす溶出曲線の特徴は、ディスク電気泳動における移動性の大きい二種類の蛋白質の存在に由来することが明らかにされた。

本実験を行うにあたって、秋まきコムギおよび春コムギを提供して下さった北海道北見農業試験場に対してあつく御礼申し上げます。

文 献

1. 寺岡：北星短大紀要, 10, (1964) 3.
2. 寺岡：北星短大紀要, 11, (1965) 1.
3. 寺岡：北星論集, 1, (1962) 123.
4. L. ORNSTEIN and B. J. DAVIS. 1961. *Disc electrophoresis*. preprint by DISTILLATION PRODUCTS INDUSTRIES, ROCHESTER, N.Y.
5. 寺岡：未発表
6. F. C. STEWARD. 1966. Protein synthesis and turn-over; Its relation to the induction of growth in plant cell. *The U.S.-Japan Seminar on plant growth Regulation in Kyoto*.
7. C. W. WRIGLEY, H. L. WEBSTER and J. F. TURNER. 1966. Electrophoresis of the soluble proteins of wheat leaf. *Nature*, 209, (1966) 1133.