

大豆蛋白質に関する研究 (第3報)

——大豆子葉組織の単細胞化並びにプロトプラスト化について——

宇高京子*

Studies on the Soybean Proteins (3)

——Single Cells and Protoplasts Derived from Soybean Cotyledon——

Kyoko Udaka

〔内容抄録〕 大豆子葉組織には種子貯蔵蛋白質の局在部位である蛋白顆粒が存在している。この顆粒はリボプロテインの単位膜から出来ており、大豆の場合、その直径は $2\sim 23\mu$ と変化に富んでおり他の油糧種子中のそれと比較して、かなり大顆粒のことが多い。本論文はこの蛋白顆粒を intact に分離するために子葉組織の酵素処理による単細胞化およびプロトプラスト化について検討し、次のような結果を得た。すなわち、

1) マセロチーム R-10 セルラーゼ (ONOUZUKA, P-1500) を 0.33 M マンニット及び 1% 硫酸デキストラン、 3 mM 塩化カルシウムを含む酢酸緩衝液 (0.05 M , $\text{pH } 5.3$) に溶かし、大豆子葉組織を加えて、 31°C . $5\sim 21.5$ 時間振盪せずに処理することによって生単細胞及びプロトプラストを得た。

2) 本法によるプロトプラストの収率は約 10% であった。

I 緒 言

種子主要蛋白質は ergastic な物質の 1 つであり、被子植物の場合、内胚乳または子葉中の蛋白顆粒中に局在^{1), 2)} している。筆者らはこれらの顆粒の形成機構並びに蛋白質の蓄積機構^{3), 4)}, ⁵⁾, また顆粒内貯蔵蛋白質に対する mRNA 群の生合成とその制御機構について検討している⁶⁾ が、この研究の 1 過程として蛋白顆粒の intact な分離法の確立が必須となった。従来、四塩化炭素あるいはショ糖中での種子の機械的摩砕により大豆子葉から蛋白顆粒が分離された例があるが 20μ 前後の大顆粒は処理の途中で破壊されて得ることが出来なかった。そこで筆者らは蛋白顆粒の分離法の第一段階として酵素

による単細胞化およびプロトプラスト化をおこなうことにより大顆粒の機械的破壊を少なくすることを試みた。本論文はその条件について検討したものである。

II 実験方法

1. 試料およびその前処理

使用大豆 (Glycine max var. Okuhara No. II) は低温保存 2 年以内のものがよい。いわゆる石豆は避けた。乾燥種実を 1% 洗剤で種皮の汚れを落した後、 70% エタノール中で 30 秒、ついで 5°C で 5% さらし粉液中に 1 時間浸漬した。これを滅菌水で十分にさらし粉液を洗い流した後、さらに 2 時間、 5°C で滅菌水に浸漬し、種子の膨潤を認めてからカステン中で無菌的に種

* 食品学第 3 研究室

皮を除去し、子葉部分を切り出し、約 5 mm 角のブロックを作る。

2. 組織の酵素処理

まず細胞の単細胞化並びにプロトプラスト化を次の手順でおこなった。

Table 1.

Reaction Mixture for Preparation of Soybean Cotyledonary Protoplasts

reagents	conc.
Macerozyme	2%
Cellulase "ONOZUKA" P-1500	2%
Dextran sulfate	1%
CaCl ₂	3 mM
D-Mannitol	0.33 M

- 1) 表 1 に示した酵素液をオートクレーブ処理 (10ポンド, 15分間) で滅菌したミリポアフィルター (GS(0.22 μ)) を通し、汙過滅菌する。
- 2) 無菌コルベンに入れた滅菌大豆子葉ブロック (乾重量 15~25 g) にこの酵素液 30 ml を加える。

3) 真空ポンプで 1 分間程吸引し、酵素液を子葉組織中に充分浸透させた後、31℃ の水浴中に静置する。

4) 最初の 10 分間に子葉の切り口から細胞の破片が遊離してくるので反応液を捨て同量の新しい滅菌酵素液を加えて 5~21.5 時間反応させる。反応中、時々手で軽く振盪してやる。

5) 反応終了後、酵素液を 3 重のガーゼおよびスチールメッシュ (200 μ) を通した後、350 \times g 15 分間遠心し、子葉プロトプラストを得る。

III 実験結果および考察

上述した大豆子葉組織の単細胞化並びにプロトプラスト化の手順は基本的には建部ら⁷⁾ がタバコ葉細胞の単細胞化並びにプロトプラスト化に用いている *Rhizopus* sp. 由来のマセロチーム (この酵素はポリガラククロン酸を endo-型で水解する特徴がある) を用いた方法と同様なものであるが、タバコ葉細胞と異なり、大豆子葉組織の細胞壁はきわめて厚く、建部らの方法では、ほとんどプロトプラストを得ることが出来なかった。そこで表 2 で示したように反応混

Table 2.

Several Treatments for Isolation of the Cotyledon Protoplasts from Soybean Seed

	I				II				III		IV	V
enzyme solution (%)												
Macerozyme												
R-10	1				2				2		2	2
Cellulase												
"ONOZUKA" R-10	0.5				2				—		—	—
P-1500	—				—				2		2	2
Pectinase	—				2				(2)		—	—
Dextran sulfate	—				1				1		1	—
CaCl ₂ (mM)	3				3				3		3	3
pH	5.3				5.3				5.3		5.3	5.3
Mannitol (M)	0.33	0.6	0.33	0.6	0.33	0.6	0.33	0.33	0.33	0.33	0.33	0.33
temperature (°C)	30	30	30	30	37	37	35	31	35	31	31	31
time (h)	20	20	2	3	3	3	21.5	21.5	5	5	5	21.5
shaking	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—



Fig. 1 Single Cells derived from Soybean Cotyledon

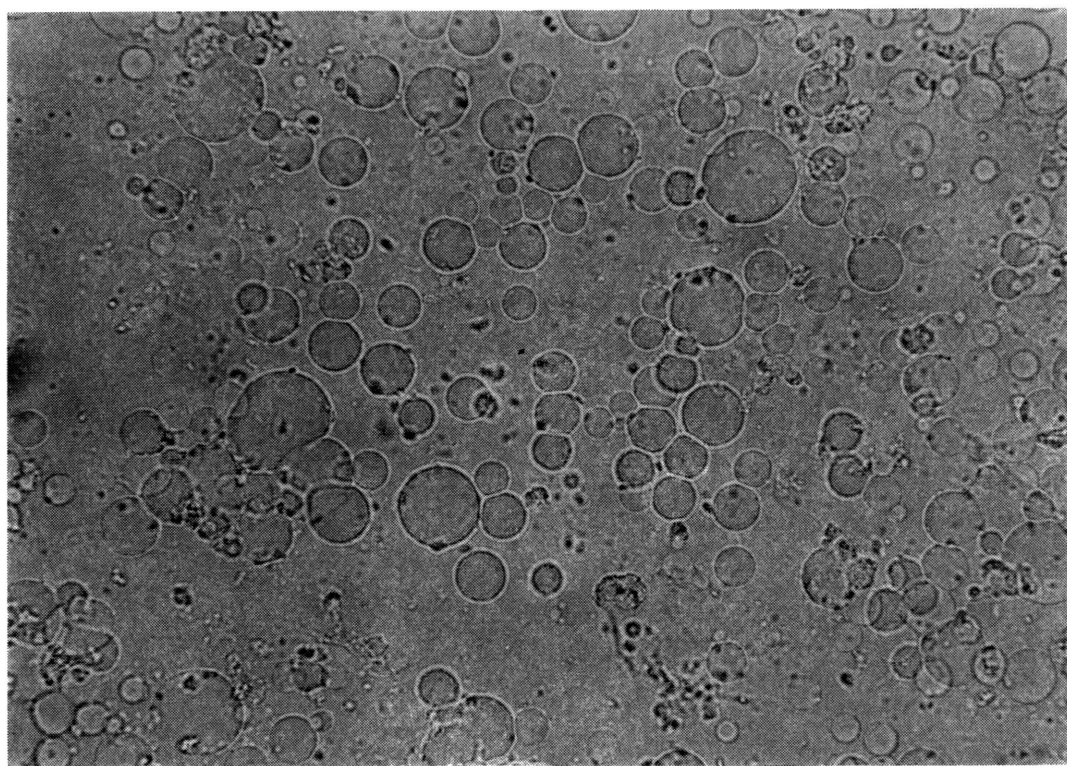


Fig. 2 Protoplasts derived from Soybean Cotyledonary Single Cells

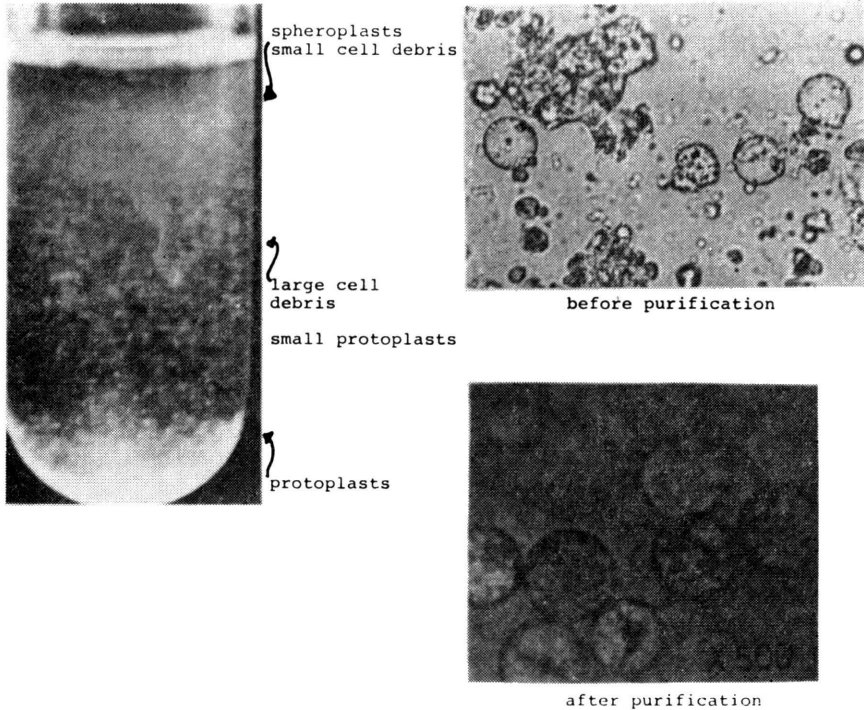


Fig. 3 Purification of Cotyledon Protoplasts in 10% Ficoll Solution

合液，温度，反応時間，振盪の有無についての条件検討を行った。その結果，カラムⅢの場合がプロトプラスト化の効率が最つともよかった。すなわち，単細胞化の割合は5時間のインキュベーションで約20%，さらに，そのプロトプラスト化の割合は5～10%であった。反応時間21.5時間の場合は単細胞化の割合が56%，プロトプラスト化の割合は5%であった。他の場合はいずれも単細胞化の割合が20%，プロトプラスト化は3%以下であった。従って前述した酵素処理の手順は最つとも効率のよかったカラムⅢのみについて記述した。図1及び図2に示したのが各々大豆子葉の単細胞及びプロトプラストである。

次に，一般にプロトプラスト溶液には細胞の破片，スフェロプラスト，単細胞等が混入しているので図3に示した如く，10%フィコール溶液にプロトプラストを含む反応液を重層して，5℃約12時間垂直に放置し，沈殿区分を取る。この操作を2～3回くり返すことにより容易に精

製できた。

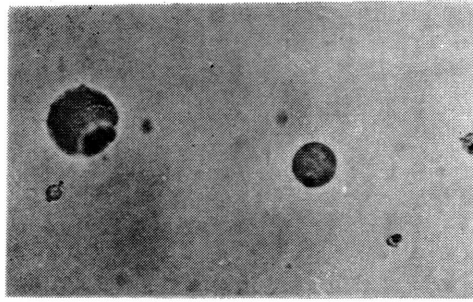
得られたプロトプラストは低張溶液中で超音波により容易に破壊されるので細胞内顆粒の温和な分離法として有効であると推測される。なお本法を用いて比較のため種々の組織からプロトプラストの分離を試みた。図4に示したのは，それらの光学顕微鏡像である。なお，本論文は昭和52年生化学会発表論文の一部である。また，本研究遂行のための費用は文部省特定研究「生物の生産機能の開発」C系 科学研究費補助金による。

謝 辞

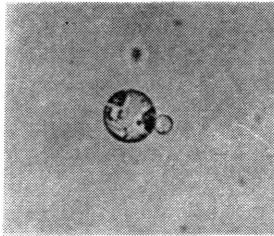
本研究は農林省食品総合研究所理化学部，深澤親房博士との共同研究成果の一部であり，博士の御指導に対しここに深く感謝致します。

引用文献

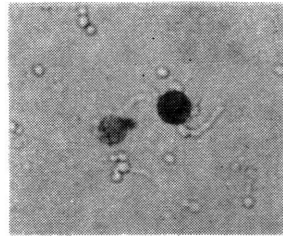
- 1) 深澤親房：植物酵素蛋白質研究法（蛋白質，核酸，酵素別冊，共立出版，p. 134（1976））
- 2) K. Udaka & C. Fukazawa：Tenth Interna-



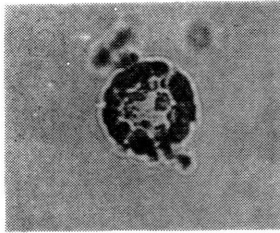
Soybean Cotyledon



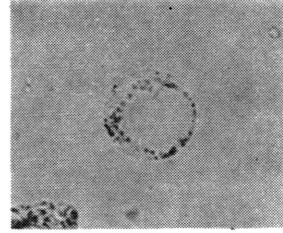
Soybean
Cotyledon



Soybean
Leaf



Spinach



Carrot

Fig. 4 Protoplasts isolated from Various Tissues

tional Congress of Biochemistry Abstracts (Hamburg) p. 627 (1976)

- 3) K. Udaka & C. Fukazawa : Abstract of International Conference on Regulation of Developmental Processes in Plants p. 11 (1977)

- 4) 宇高 京子, 深澤 親房, 貝沼圭二, 鈴木繁男 : 日本農芸化学会, 昭和 51 年度大会. 講演要旨集

p. 302

- 5) 宇高京子, 深澤親房, 原田久也, 貝沼圭二, 鈴木繁男 : 日本農芸化学会, 昭和52年度大会, 講演要旨集, p. 67

- 6) 宇高京子, 深澤親房, 原田久也 : 生化学, 49 (8), 737 (1977)

- 7) 建部到 : 生化学 46, 22 (1974)