

発芽過程におけるマメ科種子貯蔵蛋白質に関する 生理生化学的研究

第五報 大豆種子貯蔵蛋白質の分解過程の免疫化学的分析法による検索

宇高 京子, 酒井 弥生

(平成 16 年 9 月 30 日受理)

Physiological Biochemical Studies on legumes Stored Protein in Germination Process Part 5 Examination in Germination Process of Soybean Seed Stored Protein by Immunochemical Analysis Method

UDAKA, Kyoko SAKAI, Yayoi

(Received on September 30, 2004)

キーワード :

Key words : soybean, germination, immunochemistry

緒 言

種子植物は乾期や冬期などの厳しい環境を乗り越えるために、親植物から離れて生き延びられるだけの栄養を蓄えた種子を形成し、長い乾燥、休止期を過ごす。そして水、光、温度など適度な環境が与えられると、休眠が解除され種子内休眠器官の代謝系が活発化し、貯蔵物質の分解利用が始まり、胚が成長を続げる。ついに「幼根が種皮を破る」という形態的な現象を最終過程として、それに先立って起こる一連の細胞内生理生化学的变化を一般に「発芽」という。このような種子休眠および発芽は、生体内における遺伝的機構に組み込まれた高位の制御によってもたらされた特殊な生理の状態にあると考えられる^{1~2)}。従来から宇高らは、分解過程における異化作用に関与するプロテアーゼとの関連について検討している^{3~15)}。本報では、前報に続き、分解過程の免疫化学的分析法による検索を行ったので報告する。

実験方法

(1) 試料の調製

大豆乾燥完熟種子 (*Glycine max.* (L.) Merr.) は低

温貯蔵2年以内のものをを用いた。大豆種子を1%洗剤で洗った後、70%エタノール中で30秒、次に5%晒し粉液中に60分浸漬し、殺菌する。これを滅菌水で完全に晒し粉液を洗い流した後、滅菌シャーレ上で滅菌水を浸み込ませたガーゼを敷き、恒温器(20℃)で発芽さす。

(2) 発芽大豆種子からの粗酵素液の抽出

発芽0日目、発芽1日目、発芽3日目、発芽4日目、発芽5日目、発芽6日目、発芽7日目、発芽8日目、発芽9日目にそれぞれ種子を採取し、胚軸および幼根を取り除いた後、1.0M食塩を含む0.01Mバルビタール緩衝液(pH8.0; 緩衝液Aとする。)を約15倍加え、Ultra-Turraxホモゲナイザーで3分間摩砕した(4℃)。次に日立高速冷却遠心機(20PR-52)で15,000rpm、30分間遠心し、その上澄み液を粗酵素液として以下の実験に供した。

(3) 抗血清の作成

大豆トリブシンインヒビター(市販のもの)、 β -コングリニシン(大豆FF画分一沈殿区分)、 γ -コングリニシン(大豆FF画分)、グリニシン(大豆WIS+FA-II-b区分)、大豆レクチン(市販のもの)の抗血清を次の方法

で作成した。すなわち、白うさぎを用いて、皮下、皮内、足、筋肉内および静脈内などに免疫する。静脈内には抗原溶液をそのまま接種するが、他の部位には完全アジュバンドと良く混和・乳濁化し、少量ずつ接種する。

(a) 免疫スケジュール

- a-1 週一回接種し、これを3週間続げる。
- a-2 その後、2～3週間放置する。
- a-3 その後、1～2回接種する。
- a-4 試採血（採取した血清を56℃で30分間保温し、非動化させ、これを血清原液とし、緩衝液Aで2, 4, 8, 16倍に希釈する。これを寒天ゲル（1%アガロース、0.1%チメロサル）上で拡散させる。抗体が十分な抗体価を持っていれば全採血を行う。不十分であれば、上記(a)の免疫スケジュールに従って、同様の操作を繰り返す。

(4) 単純ゲル内拡散法

(a) 寒天ゲルの調製

ガロース 2.5 g とチメロサル 0.25 g を緩衝液 A 250 ml で加熱溶解する。

(b) ゲルの作成

ガラス板を水平に置き、上記(a)の寒天ゲル溶液を厚さ 3 mm 位になるよう均一に流しゲル化さす。

(c) 寒天ゲルが完全に固化すると、溝と穴を開ける (図1)

(d) 溝に上記(3)の抗血清を入れ、穴に上記(2)の試料をそれぞれ入れる。恒温・恒湿器 (20℃) 中で拡散反応させた。

(e) 十分に沈降線が現れると写真撮影する。

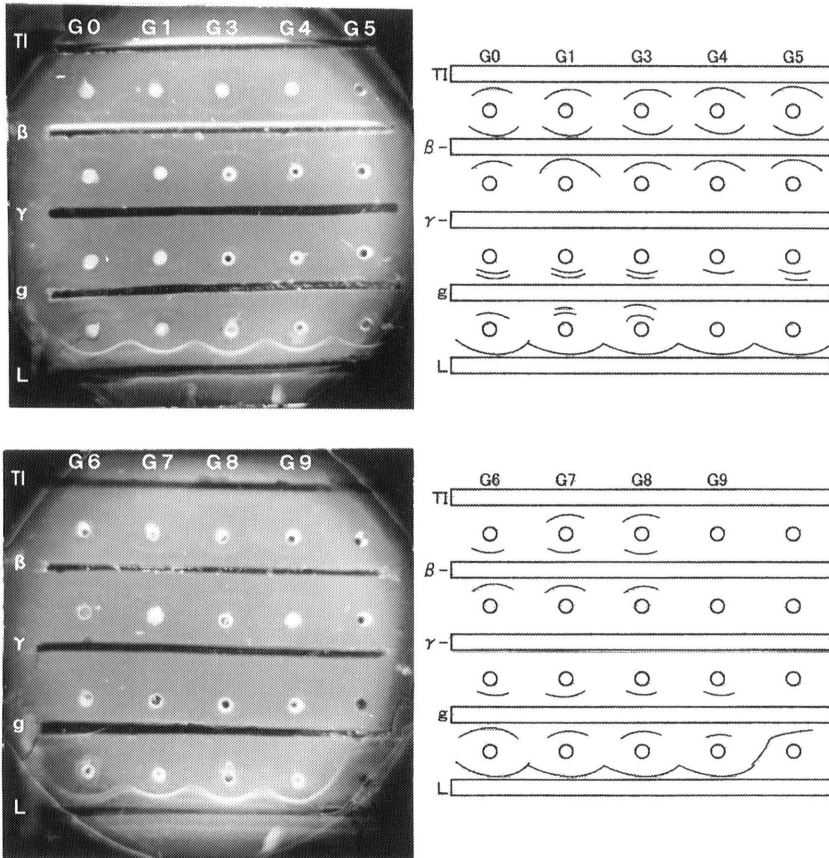


図1 単純ゲル内拡散法による免疫反応の観察

TI ; trypsin inhibitor β - ; β - conglycinin

γ - ; γ - conglycinin g ; glycine

表 1 免疫化学的分析法の反応結果

	G0	G1	G2	G4	G5	G6	G7	G8	G9	
Trypsin inhibitor(TI)	△	△	△	△	△	×	⊗	⊗	×	
β -conglycinin(FF-ppt)	○	○	○	○	○	△ ○	△ ○	△ △	×	×
γ-conglycinin	×	×	×	×	×	×	×	×	×	
Glycinin(WIS+FA-II-b)	○	○	○	△ ×	△ ×	△ △	△ ⊗	△ ⊗	△ ⊗	
lectin	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎	

◎ ○ △ ※
多 → 少

実験結果と考察

発芽0日目(G0)～発芽9日目(G9)までを本報では発芽全過程という。図1および表1よりTrypsin-inhibitor(TI)は発芽6日目(G6)頃から抗血清と反応が見られなくなり消失している。β-conglycininは発芽6日目(G6)から抗血清との反応が減退し始め、発芽9日目(G9)では反応が見られず消失している。γ-conglycininは発芽全過程に抗血清との反応は見られなかった。Glycininは発芽4日目(G4)頃から抗血清との反応が減退し始めたが発芽9日目(G9)までは存在した。Lectinは抗血清との反応が発芽全過程で見られ発芽9日目(G9)までは存在した。以上の結果から、抗血清との反応が見られなくなり、消失するという事は、各々発芽過程において、その蛋白質が分解し、胚軸や幼根などの成長に利用されたものと思われる。

要 約

- (1) Glycininは発芽3日目を過ぎると分解が始まるわずかではあるが最後まで存在した。
- (2) 7S蛋白質の1つであるβ-conglycininは発芽6～7日目頃から分解が始まり、発芽9日目では完全に消失している。他方の7S蛋白質であるγ-conglycininは初めから存在していなかったのか、抗血清とは反応せず、再度検討しなければならない。
- (3) Trypsin-Inhibitorは初めから僅かながら分解をしているが、発芽6日目頃から消失していった。
- (4) Lectinは発芽全過程、反応が見られ分解されず最後まで存在した。

文 献

- 1) 旭正編：分子生物科学12(植物の機能) 岩波書店(1993)
- 2) 岡本龍史, 南川隆雄：化学と生物, Vol. 40, No. 12 日本農芸化学会
- 3) 宇高京子：東京家政大学生生活科学研究所報告, 第13集(1990)
- 4) 宇高京子：東京家政大学研究紀要, 第35集(1995)
- 5) 宇高京子：東京家政大学研究紀要, 第36集(1996)
- 6) 宇高京子, 川名広子：東京家政大学研究紀要, 第37集(1997)
- 7) 宇高京子, 森永真希子：東京家政大学研究紀要, 第38集(1998)
- 8) 森永真希子, 宇高京子：東京家政大学研究紀要, 第38集(1998)
- 9) 宇高京子, 星野かほり：東京家政大学研究紀要, 第39集(1999)
- 10) 宇高京子, 北村陽子, 田口亜紀子：東京家政大学研究紀要, 第40集(2000)
- 11) 星野かほり, 宇高京子：東京家政大学研究紀要, 第41集(2001)
- 12) 宇高京子, 北村陽子, 田口亜紀子, 星野かほり：東京家政大学研究紀要, 第41集(2001)
- 13) 宇高京子, 北村陽子, 酒井弥生：東京家政大学研究紀要, 第42集(2002)
- 14) 宇高京子, 北村陽子, 酒井弥生：東京家政大学研究紀要, 第43集(2003)
- 15) 宇高京子, 酒井弥生：東京家政大学研究紀要, 第44集(2004)

Abstract

decomposition started when glysinin passed the third germination day. However, existed to the last minute though it was a little afterwards.

β -conglycinin started during the sixth germination day decomposition, and disappeared completely by the ninth germination day.

Trypsin-inhibitor decomposed slightly from G0.

However, decomposed during about the sixth germination day, and then, disappeared completely.

Lectin was seen the reaction in the germination all processes, was not decomposed and existed.