

大豆蛋白質に関する研究 (第2報)

——登熟過程に於けるプロテインボディ (蛋白顆粒) 形成の走査型
電子顕微鏡的観察——

宇 高 京 子

Studies on the Soybean Proteins (2)

——Scanning Electron Microscopical Observation of the Formation
Process of Protein Bodies during the Development——

Kyoko Udaka

〔内容抄録〕 (1)本研究は大豆主要種実蛋白質 (グリシニン, β -および γ -コングリシニン等)の細胞内貯蔵器官 (storage organelle) であるプロテインボディ (Protein bodies; タン白顆粒) の登熟期に於ける形態形成を走査型電子顕微鏡により観察したものである。

(2)観察は早生種大豆であるボンミノリ種を用い, 開花後13日目, 17日目, 21日目, 28日目, 38日目, 48日目および完熟期 (60日目) の各時期に種実を採取した。各子葉組織は細断固定後脱水し, 凍結割断法により試料を調製した。各試料を日立製HHS-2R型走査型電子顕微鏡により観察した結果, タン白顆粒は開花後21日目から認められるが顆粒はまだ小さく (2~5 μ のものが多い), 38日目頃から完熟大豆で認められる大きな顆粒 (15 μ ~20 μ) も現われ, 48日目でほぼ完熟期と同様の細胞内形態を示した。

(3)細胞内網目構造 (endoplasmic reticulum) の発達は開花後21日目から顕著になり, この頃から細胞の肥大化も急速に進み貯蔵顆粒の形成が始まる。

緒 論

種子主要蛋白質は ergastic な物質の1つであり, ダイズ種実の場合, 子葉 (cotyledon) 細胞中の貯蔵器官 (プロテインボディ, タン白顆粒) に局在している。^{1~3)} これら蛋白顆粒はリポ蛋白 (lipo-protein) からなる単位膜に囲まれている。¹⁾ 現在これら貯蔵顆粒の形成過程についてはまだ不明な点が多いが, 小胞体 (endoplasmic reticulum) から形成されるものと考えられている。⁴⁾ 今回は登熟過程に於ける, 大豆蛋白顆粒の形成を走査型電子顕微鏡を用いて観察したので報告する。

実 験 方 法

1. 試 料 調 製

大豆 (*Glycine max* var. Bonminori, IIa) を圃場で栽培し, 開花後13日, 17日, 21日, 28日, 38日, 48日および60日目種子をに採取し, 直ちにカミソリで子葉組織を切り出し2.5% グルタル

アルデヒド液中で5 mm角のブロックに細断した後、そのまま氷室中で2時間、前固定した。リン酸緩衝液(0.2M, pH7.2)で30分間液を換えながらよく洗浄した後、2%オスミウム酸—緩衝液に1時間浸漬した(後固定)。なおこれらの固定操作はすべて4°Cで行なった。二重固定を行った各試料は冷リン酸緩衝液で充分洗浄した後、アセトン濃度を50%から100%に段階的に変えながら脱水した。脱水操作は室温で行った。各試料を各々セメダイン1500(主剤)の満ちたゼラチンカプセルに入れ、-20°Cに保存した。検鏡時、ドライアイス—アセトンで十分に凍結させた後タガネで試料を割断した。ついで試料をプロピレンオキサイド液に入れてセメダインを溶解した後、酢酸イソアミル液に移しよくプロピレンオキサイドを洗浄した後、臨界点乾燥法により乾燥させた。これを白金蒸着した後日立製走査型電子顕微鏡HHS-2R型で断面を観察した。

実験結果および考察

図1-aに示したのが本研究に用いた登熟各時期の種実の大きさである。21日目から急速に種実が大きくなっているのが明らかである。これら種実の大きさの変化は細胞分裂による細胞数の増加によるものではなく各子葉細胞の肥大化によるものである。すなわち、図1-bは登熟初期の子葉単細胞の大きさを示したものであるが、各時期の種実の大きさと単細胞の大きさの変化はほぼ一致している。従ってこれら細胞の肥大化の度合は細胞の成熟度を示すものと考えられる。すなわち図1から開花21日目頃から子葉細胞内に大きな変化が生じて来ていることが予測された。

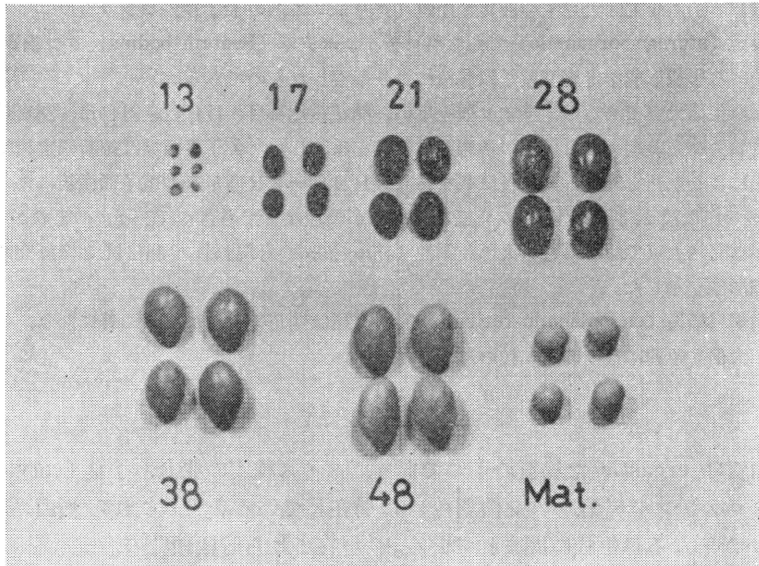


Fig.1-a. Morphological Aspect of Soybean Seed during Ripening

そこで細胞内変化を走査型電顕で観察したのが図2～図6である。すなわち、図2は開花後13日および17日目の子葉細胞内部であるが、細胞の大きさは5~10 μ 程度で顆粒の存在はほとんど認められず、17日目の細胞にわずかに顆粒が認められるが、この時期の細胞の生化学的分析から認められた顆粒のほとんどはでん粉粒でありタン白顆粒ではないことが明らかとなっている。^{4, 5)} 同様に、

大豆蛋白質に関する研究 (第2報)

図3は開花21日目および28日目のそれを示したものであるが、細胞の大きさも15~20 μ 以上であり、開花17日目のその少なくとも2倍以上となっている。細胞内の顆粒数も多く、直径2~3 μ のものが多く。この顆粒成分のほとんどがプロティンボディ(タン白顆粒)であることが生化学的分画法により明らかとなっている。⁴⁾ この時期の急激な細胞内変化を詳しく観察する為、細胞剖面をリン酸緩衝液で洗浄し顆粒の一部を溶脱した後固定脱水したのが図4である。endoplasmic reticulumが発達しており、図4の下に拡大して示したように、この管腔のまわりに多数の小顆粒が存在している。この小顆粒は脂質の貯蔵顆粒であるスフェロゾームではなく、むしろ蛋白顆粒であった。⁴⁾ 更に開花後38日目になると顆粒は数を増し、その直径も7~8 μ のものが多く認められ、なかには完熟種子で見られるような大顆粒も認められるようになった(図5)。ついで開花後48日目では2~15 μ 程の顆粒が多く完熟子葉細胞中のそれとほとんど同様な内部構造であり、ただ完熟細胞では蛋白顆粒のまわりには多数のスフェロゾームが存在していた。以上の様にプロティンボディ(蛋白顆粒)の形成は開花後21日目前後から始まり顆粒の直径も2~3 μ が多いが、登熟が進み細胞の肥大化と共に細胞内の蛋白顆粒数も増加し且つそれらの直径も2~20 μ と変化に富み、完熟時に至ると顆粒の大きさの平均は8~12 μ 程度のものである。この様に登熟が進むにつれて、蛋白顆粒が大きくなっていく機構として小顆粒同志の膜融合現象などが考えられるが、⁴⁾ その詳細については更に各方面からの研究の積み上げが必要である。

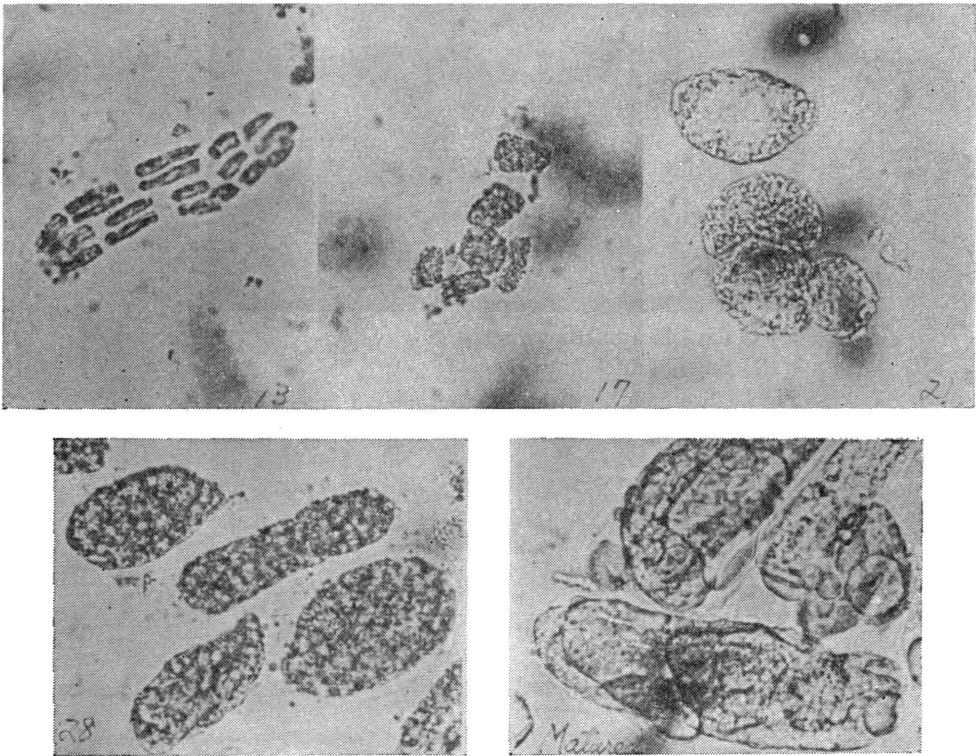
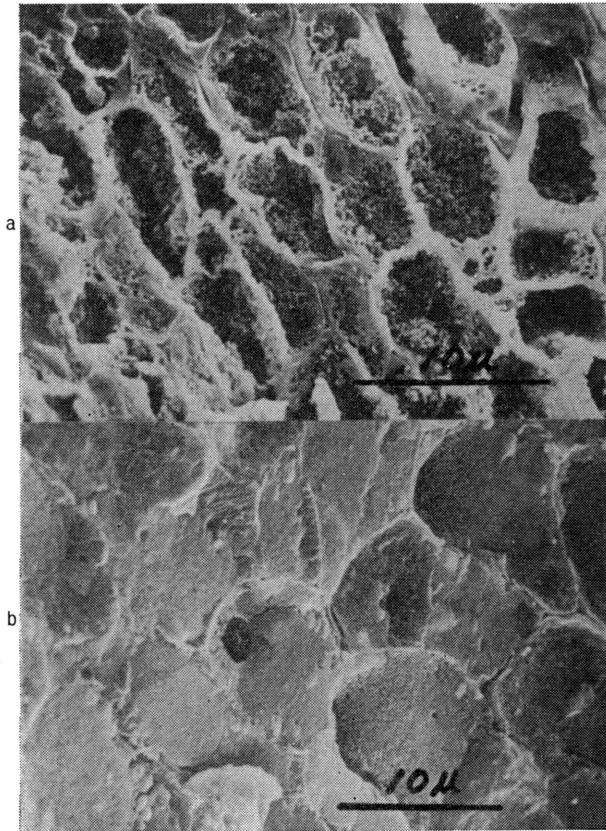


Fig.1-b. Change in the Size of Soybean Cotyledonary Unicells during Development (x280)

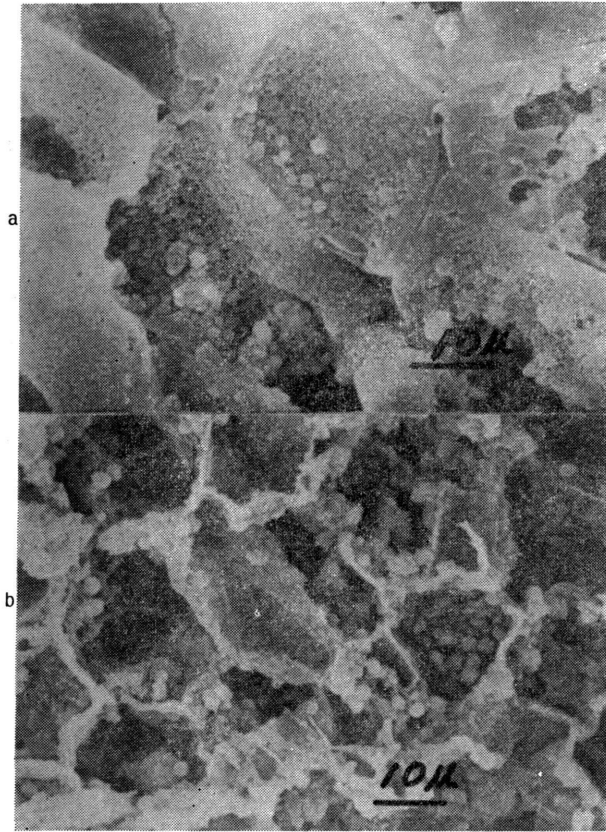
現在著者らは形態的，細胞生理的，生化学的方向からその機作について検討中である。なお本論文は昭和51年度日本農芸化学会および生化学会での発表論文の一部である。



a : 13 day-old after flowering

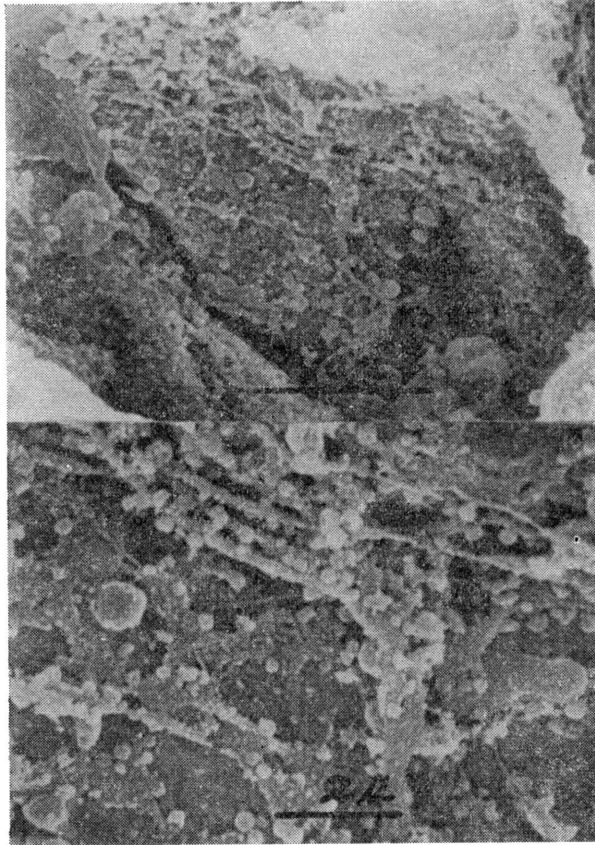
b : 17 day-old after flowering

Fig.2. Scanning Electron Micrographs of Inner Structure of Soybean Cotyledon Cells during Development



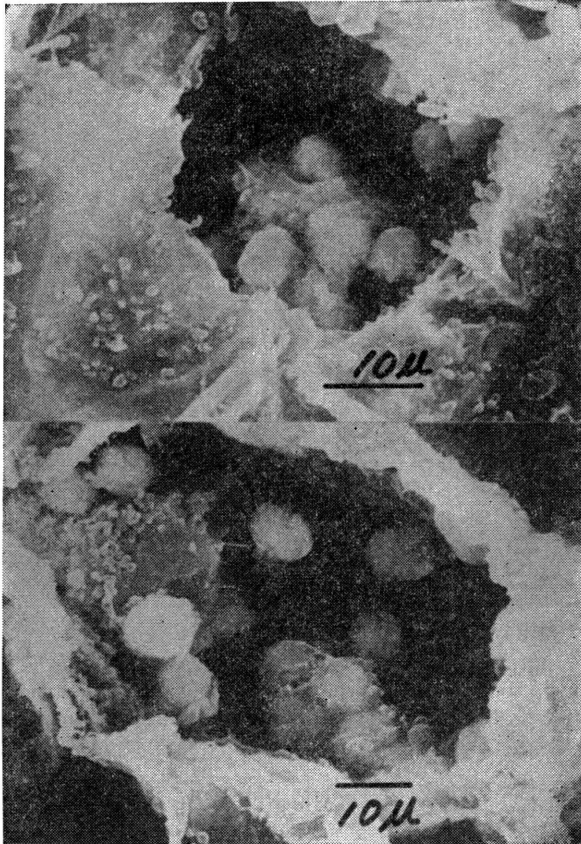
a : 21 day-old after flowering
b : 28 day-old after flowering

Fig.3. Scanning Electron Micrographs of Inner Structure of Soybean Cotyledon Cells during Development



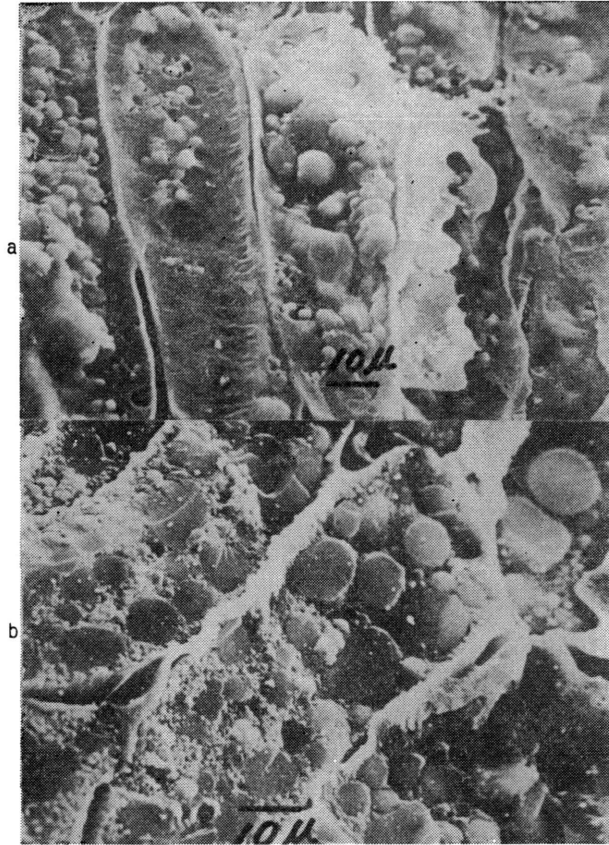
21 day-old after flowering

Fig.4. Scanning Electron Micrographs of Inner Structure of Soybean Cotyledon Cells during Development



38 day-old after flowering

Fig.5. Scanning Electron Micrographs of Inner Structure of Soybean Cotyledon Cells during Development



a : 48 day-old after flowering

b : matured

Fig.6. Scanning Electron Micrographs of Inner Structure of Soybean Cotyledon Cells during Development

謝 辞

本研究は農林省 食品総合研究所理化学部 深沢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) 宇高京子：東京家政大学研究紀要，16，25（1976）
- 3) K. Udaka & C. Fukazawa：Tenth International Congress of Biochemistry Abstracts (Hamburg)，p.627（1976）
- 4) 宇高京子，深澤親房：生化学，48(7)，432（1976）
- 5) 宇高京子，深澤親房：日本細胞生物学会シンポジウム講演要旨，p.61~62（1976）