

登熟期に於ける大豆蛋白顆粒の電子顕微鏡的観察 とその含有蛋白質の性質について

宇 高 京 子*

Electron Microscopic Observation of Soybean Protein Bodies and
Characterization of the Protein Components with in the Bodies
during the Development.

Kyoko UDAKA

諸 言

種子貯蔵細胞内に蛋白質を含む顆粒が存在することは、1855年に Hartig¹⁾ により明らかにされた。しかし、顆粒そのものに対する詳細な解析がおこなわれ始めてから、まだ10数年しか経っていないし、とりわけ顆粒の由来と、その中への蛋白質の集積機構については不明な点が多い、この理由の1つとして、これまでにおこなわれてきたこの分野の研究手法の画一性があげられるであろう。すなわち、ほとんどの場合、電子顕微鏡による観察結果のみから問題を論じている。筆者は電子顕微鏡による組織学的観察の他に、生化学的アプローチが不可欠であるとの立場をとりこれらの結果を総合して、蛋白顆粒中への大豆蛋白質の集積機構について新しい仮説を考えた。ここで本論に入る前に、この分野の研究の現状について概説してみると、1921年 Mottier²⁾ はトウモロコシ、ヒマの蛋白顆粒を光学顕微鏡で観察し、それらはプラスチッド(plastid) から由来すると結論した。しかしながら、蛋白顆粒膜が単位膜であることから、こ

の説は現在、認められていない。現在最も有力と見られている説が、液胞由来説である。この説を支持する知見として、(1)植物液胞中に広く見出されるアントシアンやカルシウムオキザレート等が種子貯蔵細胞の蛋白顆粒中に見出されたこと³⁾、(2)顆粒は中性赤(neutral red)を蓄積出来る構造物、すなわち、植物液胞から由来するらしいこと^{4,5)}、(3)綿実やその他の種実の登熟過程で蛋白顆粒は単位膜で覆われており、この膜は原形質と液胞との間を隔てているトノプラスト(tonoplast)と呼ばれる膜と類似していたこと⁶⁾等があげられる。また、この液胞とその周りのリボゾームを含む小胞体に Morton⁷⁾ は小麦の蛋白顆粒の研究を通じてプロテオプラスト(proteoplast)と名付けた⁴⁾しかし、1966年に Engleman⁸⁾ は綿実の登熟過程における小胞体と液胞の関係を組織学的に研究した結果から、このプロテオプラストの膜はトノプラスト類似のもの、すなわち、液胞膜であることを明らかにした⁶⁾、一方 Bonnet と Newcomb⁷⁾ は蛋白様物質が大根の根の細胞中の小胞体がふくらんで袋状になった部分に蓄積されることを報告した。同様の知見は Khoo と Wolf⁹⁾ によっても登熟期のトウモロコシの胚

* 東京家政大学生活科学研究所所員

乳細胞中で得られている、また **Bils** と **Howell**⁹⁾ は登熟期の大豆子葉細胞中で粗面小胞体上に多数の小顆粒が付着していることを透過型電子顕微鏡により観察した。ただ彼等のいう小顆粒が単位膜で覆われているか否かについては言及していない。このように登熟期における蛋白顆粒の形成は1つではないようで、**Öpik**¹⁰⁾ は登熟期のエンドウの細胞中では蛋白質が液胞と小胞体内腔の両方に出現することを認めている。しかしながら、もし蛋白顆粒の起源が液胞、あるいは小胞体由来の小顆粒であるとしても、顆粒内含有蛋白質はどこで合成され、顆粒内にはど

のような機構で集積されるのかという疑問は依然として解決されていないのが現状である。筆者らは、このような研究の現状を背景として、本論文では大豆蛋白顆粒の形成と顆粒内蛋白質の集積機構の解明のため、組織学的ならびに生化学的方向からアプローチすることを試みた。

1. 蛋白顆粒形成の電子顕微鏡観察

1-1 試料および実験方法

本研究に用いた大豆種子は早生に属するボンミノリ種（遺伝子型 **IIa**）である。この品種は約65日で完熟黄化する。まず種子をライポンF

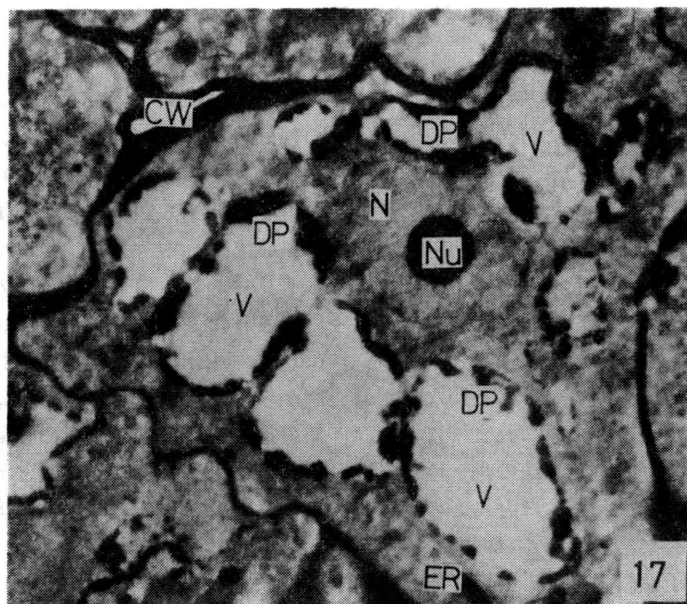


Fig. 1 Electron Micrograph of a Thin Section of Developing Soybean Cotyledonary Cell

- | | |
|-----------------------------------|--|
| CW : cell wall | Ve : vesicle |
| V : vacuole | PB : protein body |
| N : nucleus | St : starch granule |
| Nu : nucleolus | Ap : amyloplast |
| DP : dense particle of protein | Cyt : cytoplasm |
| ER : endoplasmic reticulum | Vm : vacuole membrane (tonoplast) |
| RER : rough endoplasmic reticulum | PB' : vacuole-like body with a scattering of electron-dense material |

宇高：登熟期に於ける大豆蛋白顆粒の電子顕微鏡的観察とその含有蛋白質の性質について

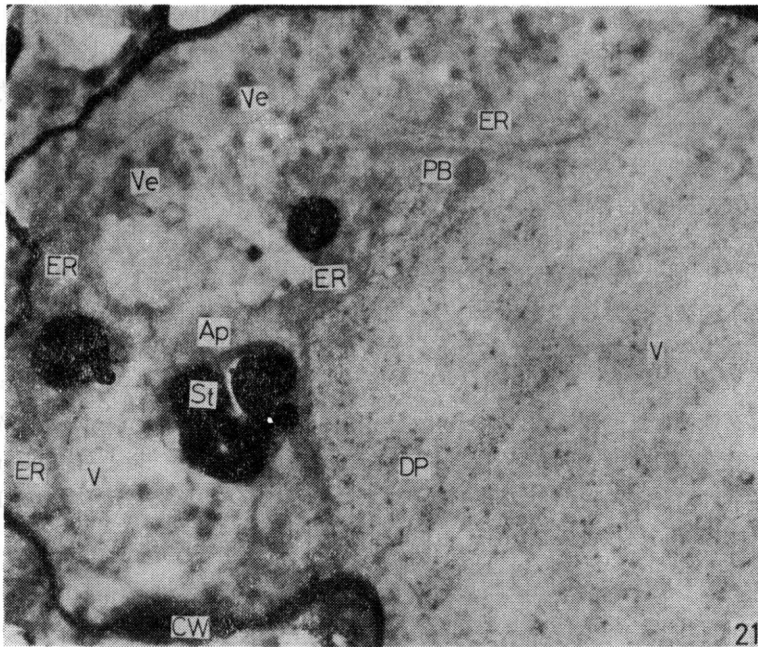


Fig. 2 Electron Micrograph of a Thin Section of Developing Soybean Cotyledonary Cell showing Endoplasmic Reticulum, Vacuole and Amyloplast

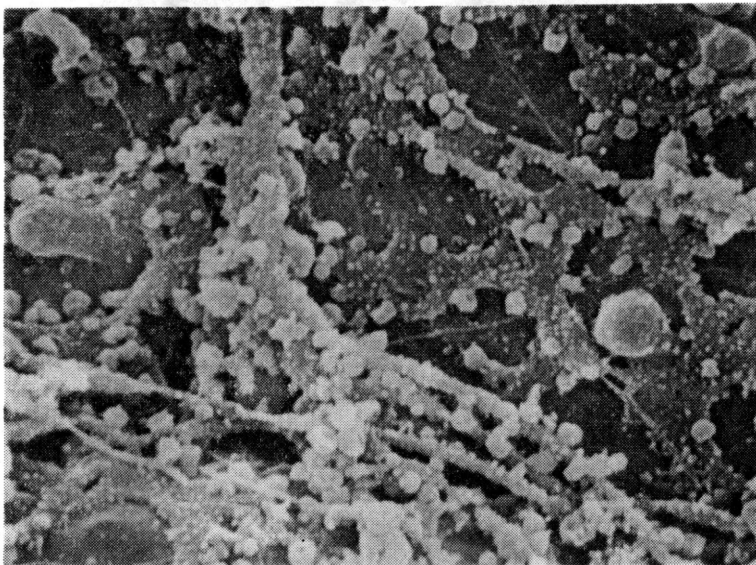


Fig. 3 Scanning Electron Micrograph showing Endoplasmic Reticulum and Vesicles in Soybean Cotyledonary Cell at 21 th Day after Flowering

でよく洗い、1.0% さらし粉液中で1時間、70% エタノール中で30分間、各々浸漬して滅菌処理後、ポット中で発芽させ、第一葉を得た時、圃場に移植した。圃場は東大農学部のものを利用した。種子の採取は開花後、17日、21日、28日、38日、48日および60日目におこなった。走査型電子顕微鏡による観察は、日立製走査型電子顕微鏡 HHS-2R 型で断面を観察した。また、透過型電子顕微鏡による観察は日本電子製透過型電子顕微鏡でおこなった。

1—2 実験結果および考察

登熟各時期（登熟初期は開花後17日目および開花後21日目、登熟中期は開花後28日目および38日目、登熟後期は開花後48日目および60日目）から採取した種子の子葉組織の観察から、組織

の細胞分裂はすでに開花後17日目では終了しており、種子の大きさは貯蔵細胞の肥大化、すなわち、蛋白顆粒の出現に起因すると考えられる。²⁴⁻²⁵⁾ 蛋白顆粒の形成は登熟初期にはほとんど認められず、中期の初めから認められるようになる。Fig. 1 および 2 は、登熟初期の子葉組織の透過型電顕像である。細胞中にはその大部分を占める液胞(V)が存在し、その周囲に小胞体が発達しているが、蛋白顆粒は認められない。しかしながら、Fig. 1 に示したように液胞中に電子密度の高い部分 (DP) がトノプラストの周囲に cluster を形成している。この知見は Briary¹¹⁾ がソラマメで、また Dieckert¹²⁾ がワタで認めている。やがて、この DP は液胞内に拡散してゆき、液胞内の電子密度が高くなる。

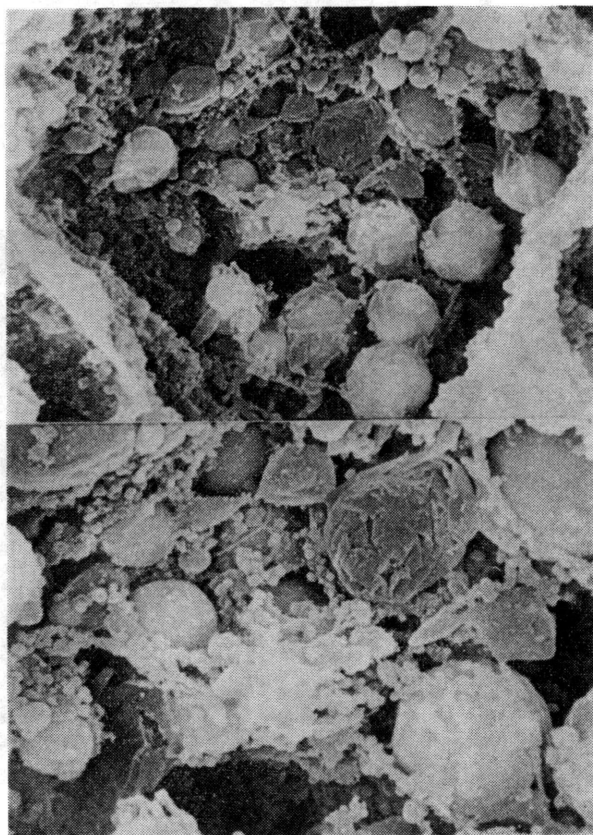


Fig. 4 Scanning Electron Micrographs of Inner Structure of Soybean Cotyledon Cells during Development (28 days after flowering)

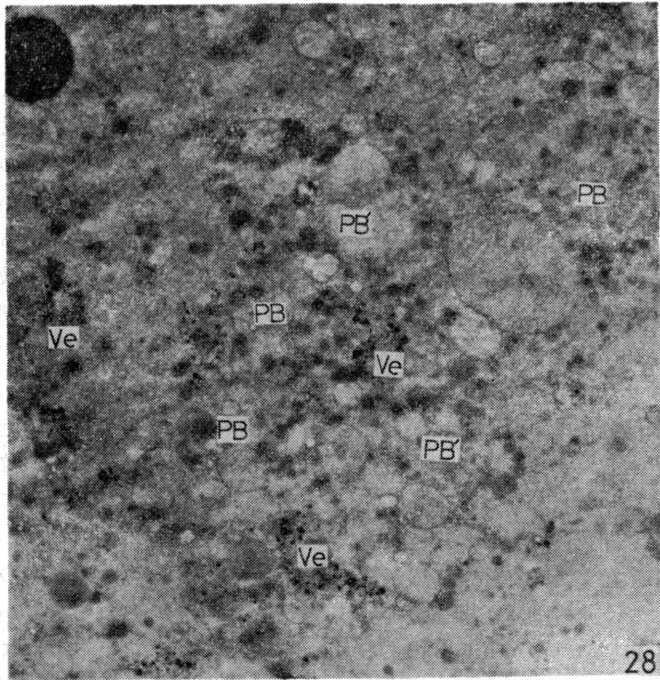


Fig. 5 Electron Micrograph of a Portion of Developing Soybean Cotyledonary Cell Showing Vesicles and Protein Bodies

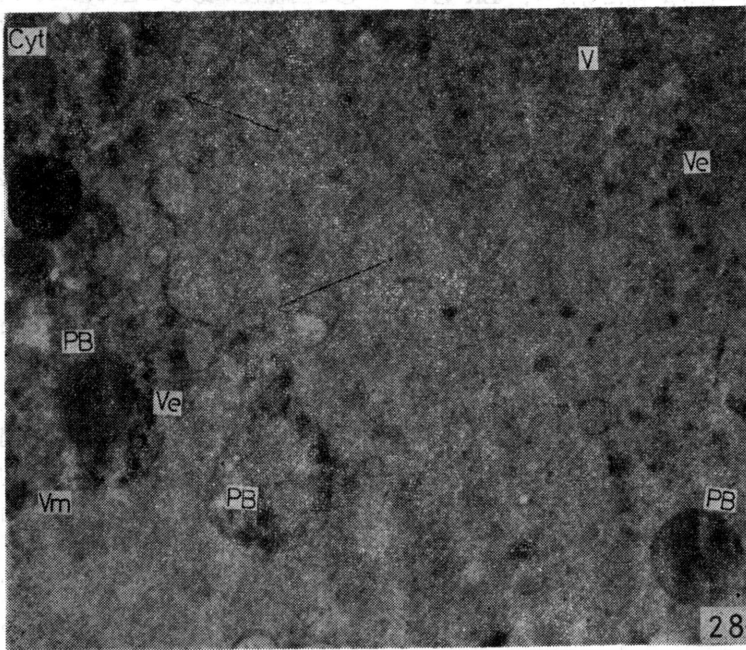


Fig. 6 Electron Micrograph of a Portion of Developing Soybean Cotyledonary Cell

このDPの拡散は溶液状で起るといふより、細かな顆粒状で起るものと思われる (Fig. 2 参照)。一方、細胞質中にプラステット (plastid; 色素体) の1つアミロプラスト (amyloplast) の形成が認められるが、含まれるデンプン様の顆粒は Fig. 8 で認められるデンプン粒と較べて電子密度が高い。この原因は不明であるが、アミロプラストグラナの形成過程で用いられる phytoferritin^{13), 14)} によるものと考えられる。一方、この時期に存在するクロロプラストの前駆体は、ほとんどシラコイド (thylakoid) を含まないので、組織が緑色である原因にはならないと言われており¹³⁾、したがって、組織中の電子密度の高い構造体はアミロプラストと考えてよいであろう。また、開花後21日目の細胞質中に電子密度の高い小顆粒が多数存在するのが認められている。そこで、走査型電子顕微鏡で、この時期の細胞内を観察したのが Fig. 3 である。小胞体 (ER) の発達が著しく、最も細いER糸の太さが約 80~120 m μ なのに対し、太いERのそれは約 0.5~1.5 μ 程にもなり、ERの一部が膨張するというよりも、かなりの長さにわたって太くなっているのが明らかである。また、太く発達したER上に多数の小顆粒 (vesicle, 直径約 0.5 μ 前後) が認められ、これが Fig. 2 で認めた小顆粒に相当するものと思われる。この時期の細胞内の形態は登熟中期に入ると著しく変化する。すなわち、細胞質 (原形質) と液胞の境界を形成している膜 (tonoplast) が液胞中に陥入してくる。その細胞質部分にはファイトフェリチンにより電子線不透過な構造体に見えるアミロプラストや小顆粒、蛋白顆粒 (ここでは直径 2 μ 以上の蛋白性顆粒から、この呼称をつけ、それ以上の直径をもつ顆粒を小顆粒とした)。および小胞体が認められる (Fig. 4 および Fig. 6 参照)。また、この陥入したトノプラストの先端から液胞内に膜構造をもった蛋白顆粒が形成される様子も示されている (Fig. 6)。この場合、陥入して長く伸びた細胞質内の小顆粒には膜細胞が認められない場合が

多い。そこで、更に、細胞質の状態を精査すると、Fig. 5 に示したように多数の電子密度の高い小顆粒が認められる。これらの小顆粒は次第に大きくなり、なかには融合したような連鎖球を示すものもみられ、この場合、顆粒の単位膜構造は認められない。しかし、他の小顆粒の多くは、膜構造を持っているようである。また顆粒内に蛋白質が集積され始めたような顆粒 (PB') も見られる。一方、細胞質と液胞の境界部位を観察したのが Fig. 6 である。トノプラスト (Vm) の存在が認められ、Fig. 4 と同様に液胞内にのびた袋状の細胞質には、膜構造を持った電子線密度の高い顆粒ならびに低い顆粒が存在し、かつ、その周囲に存在する電子線密度の高い小顆粒には膜構造が認められなかった。また、液胞中にも電子密度の高い小顆粒および蛋白顆粒も認められる。しかし、最も注目すべきことは、トノプラストによる液胞と細胞質の区別が不明になる部分 (矢印) があり、その部分から液胞内に顆粒が放出されてくると解釈できる可能性があることである。次に同じ時期の液胞と細胞質との関係を更に観察してみたのが Fig. 7 の電顕像である。液胞内に存在する大きな蛋白顆粒 (直径約 16 μ) の外側には単位膜構造が認められない。しかし、明らかな単位膜構造をもつ蛋白顆粒群 (直径 2~8 μ 前後) も認められる。後者は電子密度の高い部分と、それをとり囲むように電子密度の低い部分 (液胞のそれとほぼ同じとみられる) との2つの部分に分けられる。これは単離した登熟期の蛋白顆粒でも認められるものであり (Fig. 14 参照)、登熟期のトウモロコシでも見出しされている⁹⁾。また、液胞と細胞質の間トノプラスト構造は不明確である。しかし、切片作成中に小顆粒が脱落した部位とみられる白い部分と、脱落のほとんどみられない部分の2つに電顕像が識別されることから、何らかの“仕切り”がされているものと見做されるであろう。粗面小胞体の発達が著しく、その内腔には蛋白質が分泌されているのが認められる (Fig. 7 参照)。以

宇高：登熟期に於ける大豆蛋白顆粒の電子顕微鏡的観察とその含有蛋白質の性質について

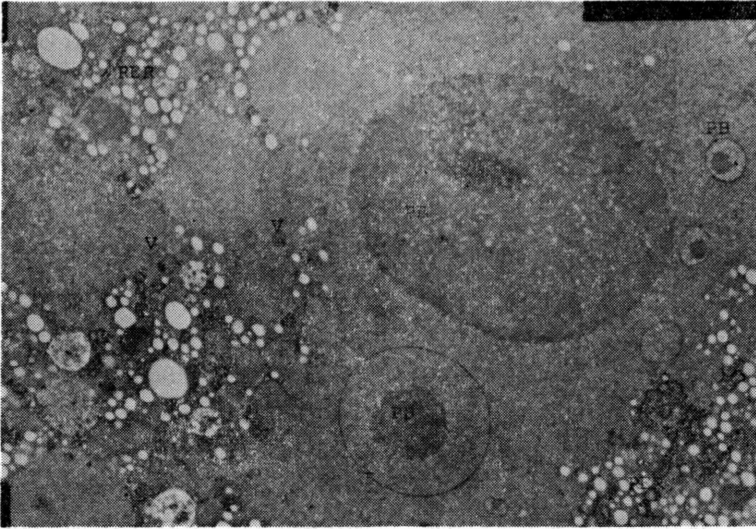


Fig. 7 Electron Micrograph of a Portion of a Thin-Section of Developing Soybean Cotyledonary Tissue (28 days after flowering)

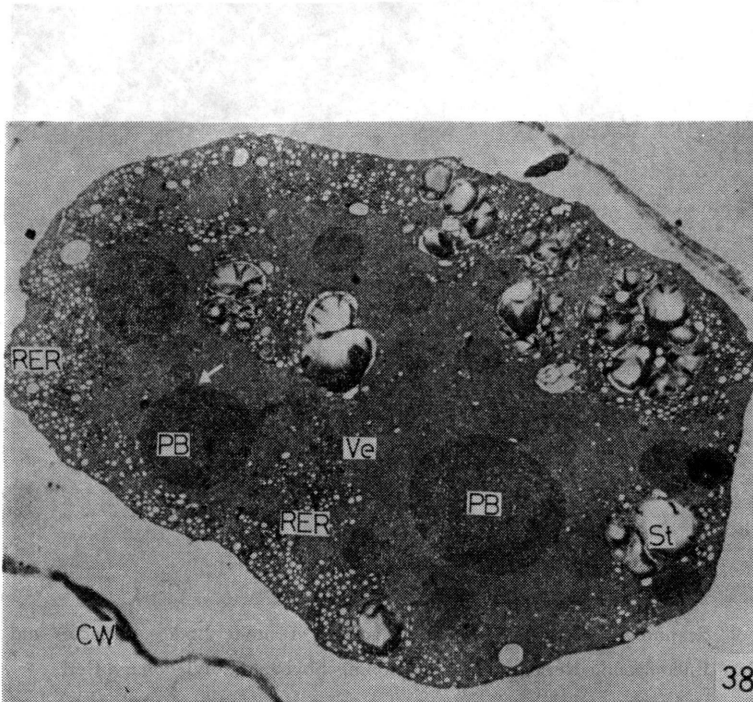


Fig. 8 Electron Micrograph of a Thin Section of Developing Soybean Cotyledonary Cell Showing Protein Body Fusion

上、登熟中期における細胞内の部分構造を透過型電子顕微鏡により観察してきたが、細胞の全体像についてみると、開花後38日目の超薄切片像を Fig. 8 に示した。登熟初期および中期前半 (Fig. 2, 4) の像と比較して、アミロプラストの電子密度が低いのは、アミロプラストグラナの形成により、ファイトフェリチンが分散したためと見られる。細胞質と液胞との境界膜 (トノプラスト) の存在は不明確であるが、前述の小顆粒の脱落部位 (空白部分) の位置から蛋白顆粒の存在位置が液胞領域でないかと推定できる。また、矢印部位は大蛋白顆粒と小蛋白顆粒の融合位置を示したものである。細胞質では小胞体の発達が著しく、粗面小胞体が多数存在しており、その一部は直接液胞と接しているように見受けられる。細胞質中にも蛋白顆粒は存

在するが、液胞中に存在する蛋白顆粒の方が大きく、かつ、数も多い。これら的大顆粒がそのすぐ周縁を膜で囲まれているか否かについて種々検討したが、認められない場合が多かった。次に、走査型電子顕微鏡で登熟中期の細胞内構造を観察してみた。Fig. 9 および Fig. 10 に示したのは開花後38日目の子葉細胞内部の観察像である Fig. 8 と対比すると走査型電顕像ではアミロプラストと蛋白顆粒を識別することは困難であるが、その個数と細胞内に占める容積からみて、観察される顆粒は蛋白顆粒と見做してよいと思われる。Fig 9 で観察されるように、小胞体全体が太くなり (Fig. 3 参照)、更にその一部分が膨張して袋状となっている。(矢印部分)。この小胞体の膨張部分は必ずしも蛋白質が内部に充満したために膨んだものではなく、

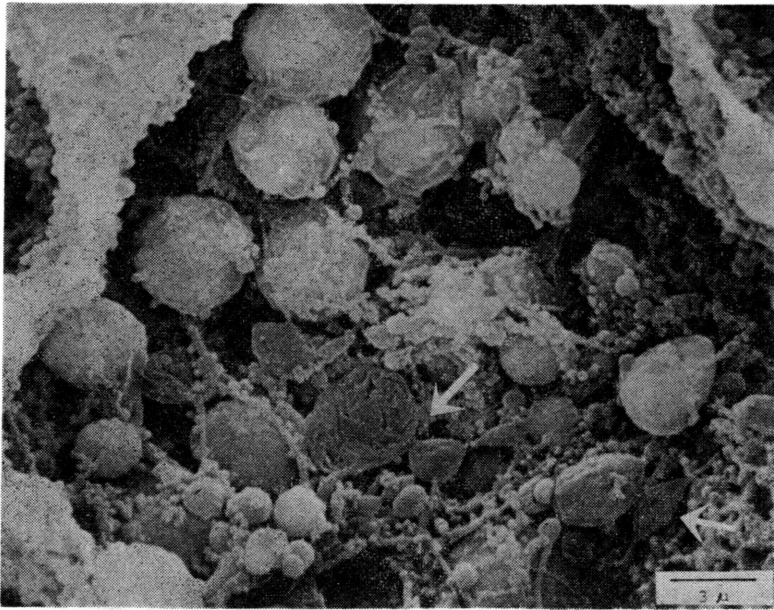


Fig. 9 Scanning Electron Micrograph showing Protein Bodies, Vesicles and Endoplasmic Reticulum in Developing Soybean Cotyledonary Cell

Arrow symbols indicate swollen portions of endoplasmic reticulum and some of them look like empty bodies, Not also the numerous protein vesicles clustered near endoplasmic reticulum and the larger protein bodies. The photograph shows a fractured surface of the cotyledon at about 38 days after flowering.

先づ、袋状構造ができて後、蛋白質の集積が起るものと思われる。また、小胞体の先端のみが膨張するのではなく、連鎖球状に膨む場合もある。登熟初期でも認められた像ではあるが、小胞体上に多数の小顆粒が存在し、かつ、大顆粒上にも小顆粒が付着している。同様な知見はBilsとHowell⁹⁾が登熟大豆子葉で、KhooとWolf⁹⁾が登熟トウモロコシ胚乳で、BainとMercier¹⁵⁾が登熟エンドウ子葉で、各々観察している。一方、Fig. 10は同じ登熟期の電顕像ではあるが、だいぶFig. 9とは異なり、顆粒の発達が著しい、大きな袋の中に顆粒が複数個存在しており、その袋の外側にも顆粒が存在している。この大きな袋状の構造体がアミロプラ

ストの発達したものか、あるいは液胞中の蛋白顆粒を示しているのか明確に識別することはできないが、袋の大きさが30~40 μ もあることと、Fig. 8のアミロプロストの大きさ(10~15 μ)とから、おそらく後者ではないかと推定している。このように、登熟期における貯蔵細胞内部の変化を走査型電子顕微鏡で観察した結果は文献的にはほとんどない。また、小胞体上に認められた小顆粒が大豆中性脂肪の貯蔵顆粒である脂肪球(Spherosome; 直径0.1~0.5 μ)ではないかという点に関しては分離顆粒の密度および生化学的研究から否定された(Fig. 11, Table 1参照)、脂肪球の形成は登熟後期から急速に始まる。

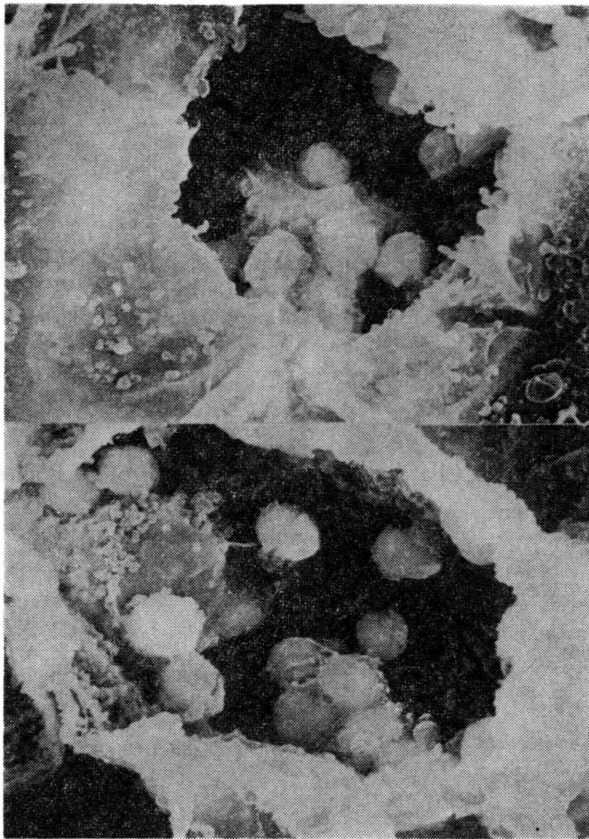


Fig. 10 Scanning Electron Micrographs of Inner Structure of Soybean Cotyledon Cells during Development

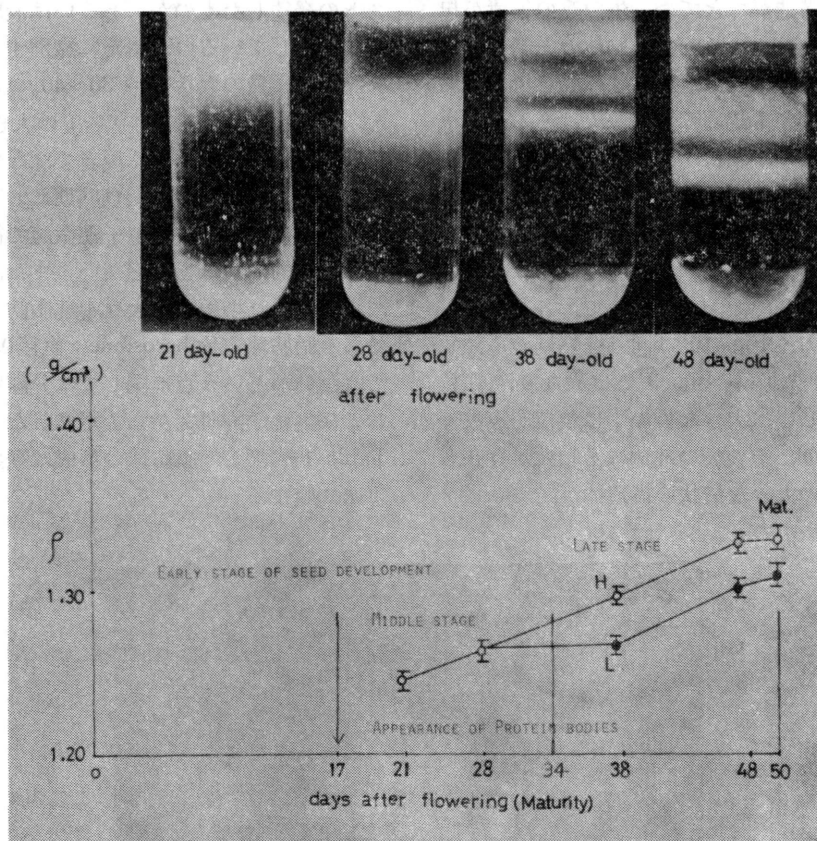


Fig. 11 Change of the Density of Soybean Protein Bodies during Development

Table I change in the Characteristics of Soybean Protein Bodies during seed Development

characteristic	stage		21	28	38		48		60	
	17	19			L	H	L	H	L	H
Density (g/cm³)			1.24—1.26	1.26	1.26	1.29	1.29	1.30	1.30	1.33
Ave. Diameter (μ)			0.5~2 μ	2~5 μ	4~10 μ	2~5 μ	15 μ	7~8 μ	8~16 μ	
Protein constituents (%)										
glycinin			1.8	4.8	18.6	38.2	48.4	54.8	58.1	56.3
β-conglycinin			10.2	40.6	36.1	28.6	24.7	13.5	19.0	20.7
γ-conglycinin			78.6	52.3	43.0	31.7	18.2	21.6	12.9	12.0
others			9.4	2.3	2.3	1.5	8.7	10.1	10.0	11.0

以上これまでに得た知見を整理してみると、次のようにまとめることができる。(1)登熟初期の細胞中にはその容積の大部分を占める液胞が存在し、その数は複数個存在することが多い。(2)この液胞の周囲には小胞体の発達が著しく、液胞内への蛋白質の分泌は液胞の回り全体からおこなわれる。(3)この蛋白質の液胞内への分泌は溶液状ではなく、微粉末状であり、いわゆる“floculent mass”状である。(4)この蛋白質は液胞全体に拡散してゆき、それに伴って液胞の電子密度は大きくなった。(5)一方、細胞質中では小胞体付近から小顆粒が出現し、アミロプラストの形成が始まる。(6)小胞体の変化をみると、小胞体の肥大化が起り、小胞体上に多数の小顆粒が認められるようになる。(7)やがて液胞内に細胞質の陥入が起り、著しい場合は、陥入の膜がのびて先端から膜に包まれた蛋白顆粒が液胞内に遊離してくる。(8)液胞内に陥入した膜内にはアミロプラスト、小顆粒、内容のつまっていない小液胞等が認められ、とりわけ、小顆粒には膜構造のないものもある。(9)この陥入した細胞質と液胞の境界膜(トノプラスト)の一部が消失して細胞質内の顆粒の一部が液胞内に入ると考えられる可能性がある。(10)登熟中期に観察される大きな蛋白顆粒の多くは、その周縁に膜構造を持たないものが多い。(11)しかし(10)の他に単位膜をもち、内部が二層になった蛋白顆粒も、しばしば認められる。(12)、(10)および(11)の蛋白顆粒はいずれも液胞中に存在するものとみられる。(13)大顆粒と小顆粒が融合していると見られる像も観察された。(14)小胞体の発達は登熟初期よりも登熟が進むにつれて一層著しいものとなり、小胞体の途中が膨張して袋状となり、その中に蛋白質が集積されているとみるものや、まだ中空であるとみられるもの等、種々の stage のものが観察される。(15)袋が大きく膨張して内部の顆粒は複数個である場合も認められる。これらの観察結果のうち、(1)(2)(3)(6)(10)の項目は他の種子の登熟過程においても、すでに認められている知見である。一方、Dieckert 夫妻³⁾はナズナ

の一種 Shepherd's Purse (*Capsella bursa PASTORIS*), 綿およびピーナッツの登熟過程を電子顕微鏡で観察した結果から、粗面小胞体上で合成された蛋白質は小胞体内腔に蓄積され、やがてディクチオゾーム(ゴルジ体)に運ばれて濃縮された後、ディクチオゾームの小顆粒の中に集積され、細胞質から液胞に運ばれ、膜融合によって液胞中に分泌されるという仮説を提出した。これは登熟の初期に形成される(1)の液胞に蛋白質が膜融合で分泌され、そのまま蛋白顆粒となるという。いわゆる蛋白顆粒の液胞直接由来説である。これに対して、Morton らのオーストラリア学派¹⁶⁾は小麦の登熟過程の研究から、protein body-forming plastid (proteoplast) と称する tonoplast, 粗面小胞体および蛋白顆粒からなる器官の存在を主張し、液胞内に直接連結した小胞体上のリボゾームで蛋白質が合成され、小胞体内腔から液胞内に分泌され蛋白顆粒となるという説を提出している。また、第3の説として、液胞の直接的関与は考えず、蛋白顆粒は小胞体の先端、あるいは中途から形成された小顆粒が発達して形成されるもので、この場合、ディクチオゾーム由来の小顆粒の関与も考えるとするもので、Khoo と Wolf により提唱されている説である⁹⁾。彼等はトウモロコシの登熟期における組織の変化の観察と、Bonnet と Newcomb⁷⁾ により示された大根の根細胞中における小胞体内腔の肥大化の知見とを合わせて、彼等の説を提出した。しかし、前記の2説と比較して、小顆粒から蛋白顆粒へ移行する機構については全く触れていない。第4の説として、Mottier らによるプラスチッド由来説がある²⁾。これらの従来から提出されている4つの蛋白顆粒の形成に関する説のうちで筆者の得た観察結果を最もよく説明できるのは、少なくとも第4の説は蛋白顆粒が単位膜構造をもつことから否定される。また第2の説は“protein body-forming plastid”と称する構造体の存在が Morris¹⁷⁾ らの追試により否定され、かつ、他の種子中에서도全く組織構造的に確

認されておらず、現在ではこの説も否定的な立場でみられることが多い。それで残りの2説、すなわち、(1)蛋白顆粒の液胞由来説と(2)小胞体およびディクチオゾーム説についてはどうであろうか。(1)の説が成立するには多数の液胞が細胞内に存在しなければならない。しかし、これまでの筆者の大豆に関する知見および Briary¹¹⁾らのソラマメにおける知見でも、液胞の数は登熟中期には、ほぼ1個であって多数の存在を認めることはできない。また(2)の説においても Fig. 8 に示したように蛋白顆粒は、確かに液胞中に存在しており、蛋白顆粒の形成過程での液胞の関与を全く無視することはできないように思われる。このように現時点における蛋白顆粒の形成機構に関する仮説は極めて不備なものであり、より確かな知見をもとにした新しい説の提案が望まれている。

2. 登熟各時期からの蛋白顆粒の分離とその含有蛋白質成分の定量

2-1 試料及び実験方法

本研究に用いた登熟期の種子は上記に述べたスケジュールにしたがって採取した後、液体窒素中で凍結後 -40°C で実験に供するまで保存した。

これらの種子から、蛋白顆粒の単離は、前報に示したフロチャートにしたがって行った¹⁸⁾¹⁹⁾。単離顆粒の密度の測定はメトリザミド中で密度勾配遠心〔メトリザミドの濃度勾配 25% (W/V) から 70% (W/V)〕を 60,500 xg, 3時間 5°C で行う際に、蛋白顆粒溶液中に density-marker (米国 Enobeck 社製) を混入して一語に遠心し、そのマーカー粒子の位置から決定した。

単離顆粒の電子顕微鏡による表面および内部構造の観察は各々、日立製走査型電子顕微鏡 HHS-2R 型、日本電子製透過型電子顕微鏡でおこなった。単離顆粒内含有蛋白質成分の個別定量は、単純放射状ゲル内拡散法 (Simple Radial Immunodiffusion 法²⁰⁾) によった。顆

粒からの蛋白質の抽出は超音波法によって行った。

蛋白顆粒膜の由来を検討する一方法として、この顆粒の膜構造蛋白質と小胞体膜構造蛋白質との類縁性について免疫化学的に検討した。先ず蛋白顆粒膜の調製は、深沢等の酵素法にしたがって完熟種子から蛋白顆粒を単離精製したのち、超音波法によって顆粒を破壊し、食塩—バルビタール緩衝液 (0.01 M, pH8.2) で蛋白質を可溶化した。次いで 1,500xg, 30分間遠心して顆粒膜を沈殿させた。この膜画分に上記の食塩バルビタール緩衝液を加えた後、Ultra-turrax[®] ホモゲナイザーで3分間懸濁し、沈殿させ、この操作を少なくとも4回くり返した。次いでこの蛋白顆粒膜に 0.1% SDS および 0.5 M 尿素を含む 0.02 M リン酸緩衝液 (pH7.2) を加えて上記ホモゲナイザーで懸濁し膜構造蛋白質 (membrane-structure proteins : MSP と略す) を抽出した。この蛋白顆粒の MSP の1回の免疫量を 3 mg/0.5 ml として同量の Freund の完全アジュバントを加え、前報¹⁹⁾に述べた免疫スケジュールでウサギに免疫し抗血清を得た。この抗血清は顆粒内含有蛋白質成分とはゲル内二重拡散法で全く交叉性を示さなかった。一方、小胞体膜の調製は、Blobel と Potter の方法²¹⁾ を Adelman²²⁾ らが改変した手法で得た粗面小胞体画分から、次の手順で行った。すなわち、粗面小胞体画分を緩衝液 (B) に懸濁し、Ultra-turrax[®] ホモゲナイザーで2回 (1回3分間) 懸濁し、遠心 (18,000xg, 20分間) した後、前記食塩バルビタール緩衝液中で同様に懸濁遠心した。この洗浄粗面小胞体画分に 0.1% SDS および 0.5 M 尿素を含む 0.02 M リン酸緩衝液 (pH7.2) を加えて、上記ホモゲナイザーで小胞体 MSP を抽出した。この MSP 画分中にはリボゾーム蛋白質も混入しているけれども、蛋白顆粒膜の MSP とは免疫化学的に交叉性をみるので、リボゾーム蛋白質の本研究に与える影響は無視できる (リボゾーム蛋白質と MSP とは交叉性がないと考えられる) ものと思われる

る。したがってこの MSP とリボゾーム蛋白質の混合画分を、ここでは単に小胞体 MSP とした。この二つの膜 MSP 画分の抗原分析は Ouchterlony のゲル内二重拡散法²³⁾にしたがって行った。

2-2 実験結果および考察

Fig. 11 に示したのはメトリザマイド層状密度勾配遠心終了後の顆粒のチューブ内における存在状態を示したものである。用いたチューブは写真撮影のためにニトロセルロースの透明チューブを用いた。チューブの底の白い部分は沈殿物ではなく光の反射によるものである。顆粒

の分布はチューブ上面近くに見られる白い層であって開花後は21日目においては、この遠心条件ではほとんど沈降しなかった。その密度は、Fig. 11 および Table. 1 に示したように約 1.24 g/cm^3 であった。開花後28日目の蛋白顆粒の場合は 1.26 g/cm^3 であったが登熟が進むにつれて次第に密度が増大し、かつ、二つの画分(重い画分, 軽い画分)に分かれた。すなわち、38日目の場合、軽い画分は28日目と同様に 1.26 g/cm^3 、重い画分は 1.29 g/cm^3 であった。48日目になると軽い画分は約 $1.29 \sim 1.30 \text{ g/cm}^3$ 、重い画分 1.33 g/cm^3 であった。この時期の顆

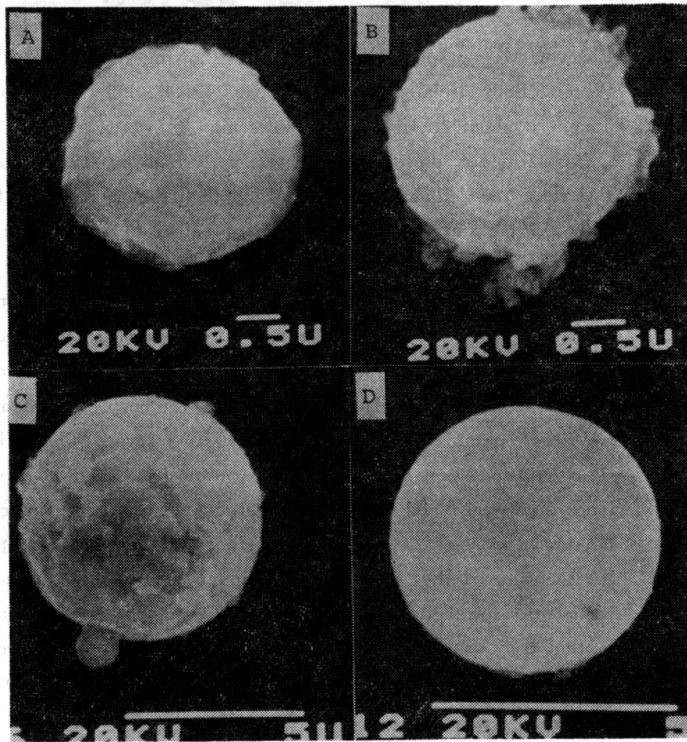


Fig. 12 Representative Scanning Electron Micrographs of Soybean Protein Bodies isolated from Cotyledon at Various Stages of the Development
A : protein body (PB) at 21 days after flowering ; B : PB at 28 days after flowering ; C : PB at 38 days after flowering ; D : PB at 60 days after flowering (mature stage). Bars indicated in A and B show the length of 0.5μ , whereas the length of 5μ is demonstrated in C and D.

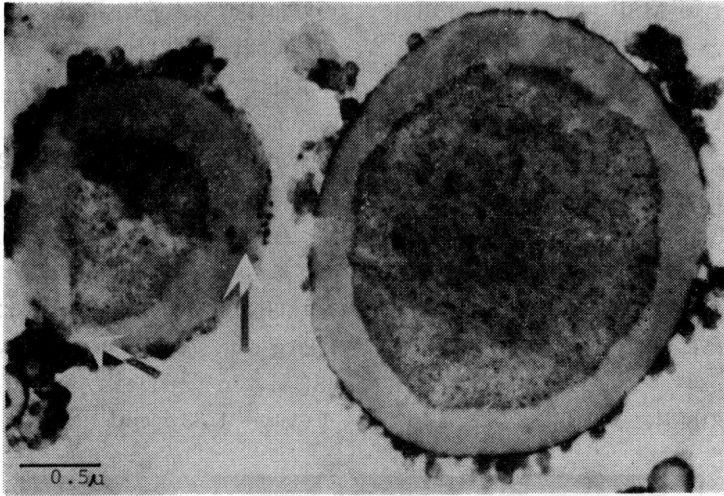


Fig. 13 Electron Micrograph of a Thin-Section showing Inner Structure of Protein Body isolated from Soybean Developing Cotyledonary Tissue at about 28 Days after Flowering

Isolation of protein bodies was performed by the method of "Macerozyme-Cellulase" digestion and then the bodies were fixed with 2.5% glutaraldehyde-2% osmium tetroxide for 1 hr at 0—3°C in the ice-bath. After washing with phosphate buffer (0.2 M, pH 7.2), the materials were dehydrated with successive treatment in acetone solutions. After embedded in Epoxy resin, a thin section was made by a ultramicrotome. Note the numerous protein vesicles attached on the unit membrane of the body. The deposits are finely granular and appear to be of two layers: Outer layer stain uniformly and has in intermediate intensity; Inner layer stain more intensively and has the numerous electron-dense materials have been considered as phytin particles. Arrow symbols point the inclusion of the electron-dense materials from the unit membrane into the body. In comparison with the case of mature protein body, it might be considered that the stain differences in the bodies are to the compositional differences during the development.

粒の密度はほぼ完熟期のそれと一致している (軽い画分 1.30 g/cm³ 重い画分 1.33~1.34 g/cm³)。次にこれらの単離した蛋白顆粒の表面を走査型電子顕微鏡で観察した。Fig. 12 は登熟各時期から単離した蛋白顆粒の表面を走査型電子顕微鏡で観察したものである。登熟初期(A)の顆粒は直径が2μ程あり、この時期の

顆粒としては大きな方である (Table. 1 参照)。顆粒の表面には0.2μ程の直径をもつ、小顆粒の付着が認められるが数は多くない。また、その形からもまだふくらみ切っていない印象をうける。やがて登熟中期の初め(開花後28日目)になると、顆粒のふくらみは増し、且つ、顆粒表面に付着する小顆粒の数もかなり多くな

ってきている。この時期は最も変化の著しい時期であって、種子の形態をみても、かなりの肥大化が起る。電子顕微鏡的観察では、液胞中へのトノプラストの陥入、細胞質中への多数の小顆粒、蛋白顆粒（この時期の蛋白顆粒の平均直径および密度は各々 $2\sim 5\mu$ および 1.26 g/cm^3 である）の出現（Fig. 6 および 7）が観察された。単離した顆粒の大きさ Fig. 12 (B) は 2.2μ 程であるがこの時期の蛋白顆粒としては小さい方である。登熟中期でも後半になると、Fig. 12 (C) に示したように顆粒もだいぶ大きくなった（直径は 7μ ）が、その密度は約 1.26 g/cm^3 であった。ところで、この時期から蛋白顆粒は密度的に二つのグループに分けることができるようになる。すなわち、Table. 1 に示したのは登熟各時期から単離した蛋白顆粒の密度、その平均的な直径、並びにその含有蛋白質各成分の量的関係である。この表からも明らかのように、Fig. 12 (C) の顆粒は密度の軽い顆粒画分に属する。この顆粒の表面を観察すると、まだ完全に膨み切っておらず、内部はまだ十分に、蛋白質が集積していないものと思われる。また直径 1μ 程の小顆粒が付着しているのが観察され、顆粒同志の接点の様子から融合状態のようにも見受けられる。一方、同じ時期の密度の大きな顆粒群の表面形態は、写真(B)とほぼ同じであった。また完熟期になると、これらの蛋白顆粒は完全に膨み切って球形になったものが多く見受けられるようになり、顆粒の表面も平滑になり小顆粒の付着はほとんど見られなくなった（Fig. 1 (D) および 15）。次に、登熟中期の初め（開花後28日目、Fig. 12 (B)）および完熟期（開花後60日目）から単離した蛋白顆粒の内部微細構造について透過型電子顕微鏡により観察したのが Fig. 13 および 14 である。Fig. 13 の電子顕微鏡像のうち大きい顆粒および小さい顆粒とも楕円体で各々の長軸の長さは 6.0 および 3.7μ で、且つその密度はいずれも約 1.26 g/cm^3 であった。顆粒内は2層に分かれており、顆粒の内部層は電子密度が外部層よ

りも高く且つ電子線不透過な小顆粒が多数認められる。顆粒には単位膜が認められ、その上に多数の小顆粒が付着している。この知見は Fig. 12 の走査型電子顕微鏡像でも明らかなことであるが、この小顆粒（直径 $0.05\sim 0.1\mu$ ）の電子密度は高く、また Cluster 状にかたまつて単位膜上に付着している。左側の写真の矢印の部分は、顆粒膜表面から内部に小顆粒群がとり込まれていると思われる部位を示したもので、とりわけ左側の矢印は顆粒の内部層に小顆粒が帯状になって流れ込んでいるような部位を示したものである。小顆粒の電子密度が高いことは、Fig. 5 および 6 に示した登熟期の組織の電顕像からも明らかなことである。これらの知見から、顆粒内の電子密度の高い内部層に認められる電子線不透過な顆粒はとり込まれた小顆粒（この小顆粒が膜構造をもつか否かをみると、少なくとも蛋白顆粒内にとり込まれたものは、もう膜を持っていないものと思われる。他方、蛋白顆粒膜上に付着している場合は膜が認められる小顆粒と、不明な小顆粒との両方が存在するものと思われる）内の蛋白質がまだ十分に蛋白顆粒内に分散しない状態ではないかと考えられた。すなわち、小顆粒内部の蛋白質は非常に濃く濃縮されるため溶液状というよりは、粘度の高い水飴状あるいは、半ば固形化した状態にあり、蛋白顆粒内にとり込まれた場合、密度が重いため内部にたまってゆき、やがて蛋白顆粒内に拡散してゆくものと推定した。そこで完熟期の蛋白顆粒内部を観察してみると、Fig. 13 で認められる顕著な二層構造がこの時期でははっきりしなくなっている。すなわち、蛋白質の集積により内部層が拡散している。しかしながら電子線不透過な部位がやはり散在しているのが認められた。一方、この完熟期の蛋白顆粒内微細構造を組織切片として観察した場合（Table. 1 参照）、顆粒の二層性は認められないが、電子線不透過な部位の散在はやはり観察された。また、単位膜の存在はこの状態では不明であるが、蛋白顆粒の周囲に組織の包埋に用いたエポキシ

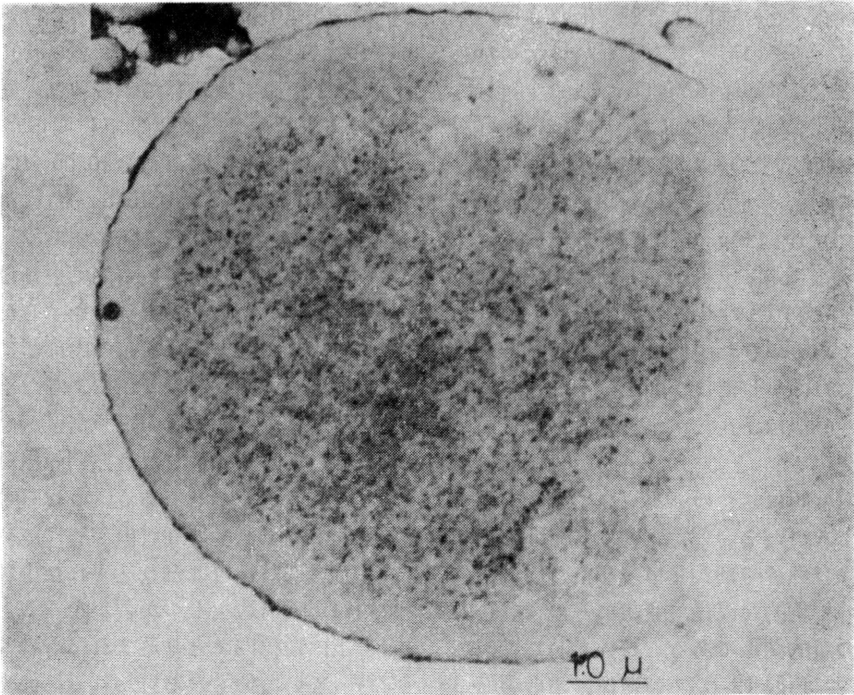


Fig. 14 Electron Micrograph of a Thin Section showing Inner Structure of Protein Body isolated from Soybean Mature Cotyledonary Tissue

Isolation of protein bodies was carried out by the method of "Macerozyme-Cellulase" digestion and then the bodies were fixed with 2.5% glutaraldehyde-osmium tetroxide for 1 hr at 0—3°C in the ice-bath. After washing by phosphate buffer, the material was dehydrated with successive treatment in acetone solutions. After embedded in Epoxy resin, a thin-section was made by a ultramicrotome. there are no vesicles attached on the unit membrane of the body.

樹脂の浸透が見られ、蛋白顆粒をとりまく脂肪球との間に明らかな境界を形成していることから、恐らく存在するものと見做すことが出来るであろう。もし、存在するとすれば、蛋白顆粒は Fig. 13 あるいは Fig. 14 の顆粒の外部層が種子の完熟に伴う脱水過程で濃縮されて薄くなり（この際、内部層も脱水濃縮されるものと思われるが、この部分に集積されている蛋白質の存在状態が前にも述べたように半固体状で粘度が高いと思われるので余り大きな萎縮は生じない）。顆粒を覆っていた膜には多少たわみが出来ているものと推測され、その膜の一部が組織の包埋の過程で壊れ樹脂が浸透したものと

われる。この事は逆に、蛋白顆粒内含有蛋白質が完熟時に固体として存在することを示したものである。ところで、登熟中期の初めの子葉細胞から単離した蛋白顆粒のなかに融合状態を示すような電顕像が見出された (Fig. 15)。このうち大きい顆粒は直径約 2μ である。二つの顆粒には膜が認められないが、(1)もともと膜をもっていなかったのか、(2)顆粒の固定操作の際に破れたのか、の少なくとも2つの理由が考えられるが詳細は不明である。しかし、この時期の細胞質中に見出される蛋白顆粒のなかに、単位膜をもたないものが、かなり認められる (Fig. 5 および Fig. 6) ことや、この融合して

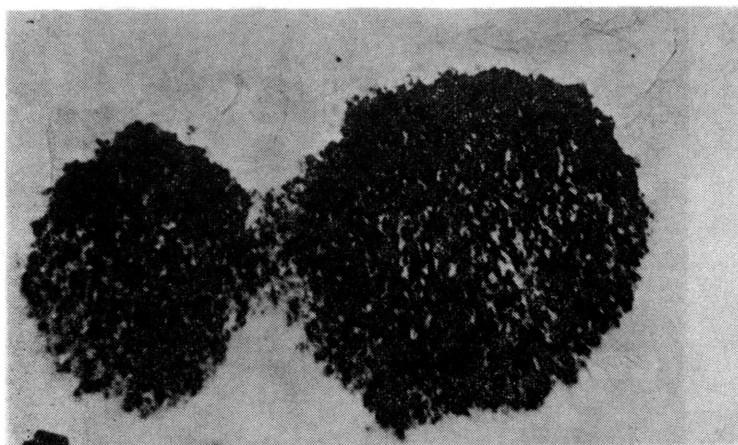


Fig. 15 Electron Microscopic Observation of Soybean Protein Body Fusion at Middle Stage of Development

Isolation of protein bodies was performed according to the method of "Macerozyme-Cellulase" digestion and the material was fixed with 2.5% glutaraldehyde-2% osmium tetroxide for 1 hr at 0-3°C. After dehydration with successive treatment in acetone solutions, the resultant material was embedded in Epoxy resin and cut into a thin-section by a ultramicrotome.

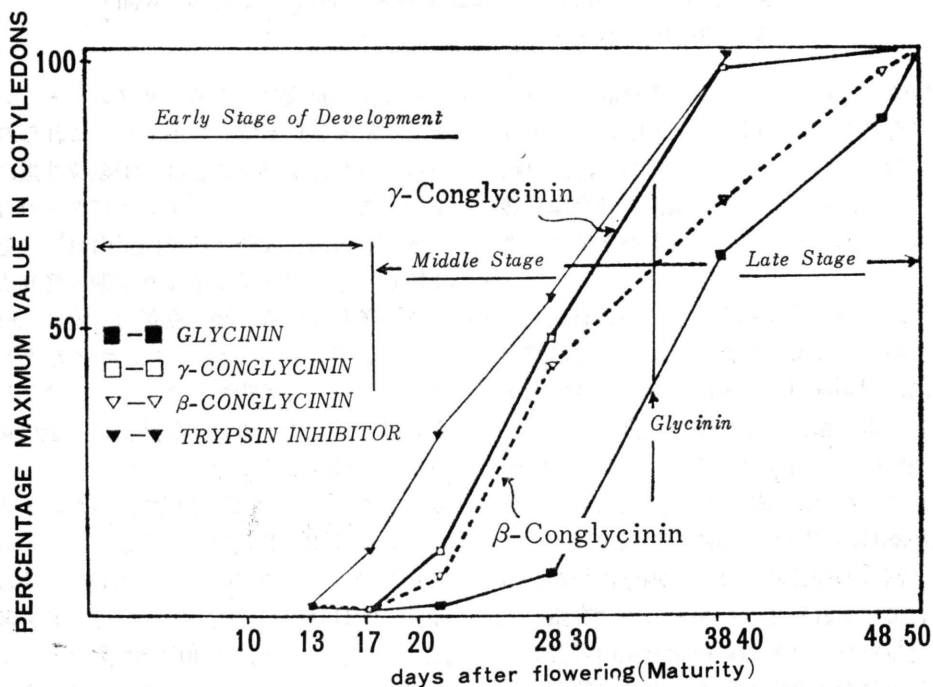


Fig. 16 Change on the Contents in Protein Bodies during Soybean Seed Development

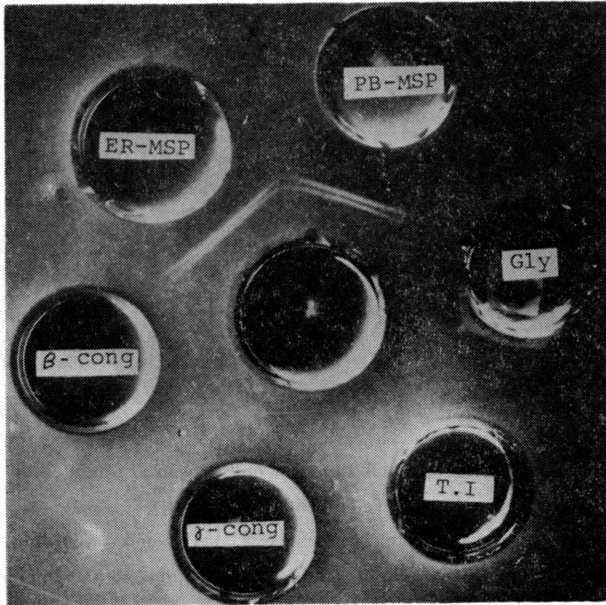


Fig. 17 Ouchterlony Double Diffusion Analysis of Membrane Structure Proteins (MSP) from PB and ER revealed with Anti-PB-MSP Serum.

PB-MSP was extracted from saline-washed isolated PB by 0.1% SDS-0.5 M urea-0.02 M Phosphate buffer (pH 7.2) Central Well ;
Anti-PB-MSP Serum

いると見做される単離顆粒と同様の電顕像が、細胞中でも見られる (Fig. 8の矢印) ことから、(1)の可能性が強い。これらのことから、蛋白顆粒同志の融合、蛋白顆粒と小顆粒の融合は登熟期の細胞中でかなり起っているものと推測出来る。

それで、この登熟期の蛋白顆粒内含有蛋白質成分はどのようなものであろうか。すでに述べたように、Table 1 に示したのは各登熟期から単離した蛋白顆粒の平均密度、直径ならびに含有蛋白質成分の組成比である。また、Fig. 16 に示したグラフは、前述の単離蛋白顆粒全体 (開花後38日目以降から単離した顆粒はメトリザマイド密度勾配遠心で2つの画分に分かれるが、ここではそれを1つにまとめて含有蛋白質成分の定量を行った) の顆粒含有蛋白質各成分の完熟時の量を100としたときの各登熟期の量を各々百分率で示したものである。参考として

顆粒外蛋白質成分であるトリプシン・インヒビターの量的変化も併せて示した。これらの結果から明らかになったことは、(1)顆粒外蛋白質の1つであるトリプシン・インヒビターの合成は主要大豆蛋白質成分 (顆粒内蛋白質) のそれと比較して、登熟初期に始まり中期の終りまでにはほぼ終了している。(2)大豆蛋白質主要三成分のうち、 γ -および β -コングリニンなどの7S糖蛋白質成分の合成時期がグリシニンのそれよりも5日程早く始まる。(3)登熟初期の蛋白顆粒内蛋白質の80%近くが γ -コングリニンであり、 β -コングリニンは10%程であった。一方グリニン量は2~3%程度にすぎない。(4)登熟が進むにつれてこの組成比は変化した。すなわち、開花後28日目の顆粒内蛋白質成分のうち55%が γ -コングリニン、約40%が β -コングリニンであり、グリニンも約5%程認められた。(5)登熟中期になると、顆粒は密度の異なる二つ

の画分に分けられるようになり、重い方の顆粒（密度 1.29 g/cm^3 ）の直径は $2\sim 5 \mu$ 程で軽い顆粒（L画分、密度 1.26 g/cm^3 ）よりも小さい。また含有蛋白質成分の組成をL画分と比較すると、グリシニン含有率が約2倍になっており、他の成分の含有率はそれに伴って低下した。(6)登熟後期になってもこの傾向は同じで、重い蛋白顆粒画分（H画分、直径 $7\sim 8 \mu$ ）の方がL画分と比較して直径が小さく且つグリシニン含有率が高いことなどである。

一方、蛋白顆粒膜および小胞体膜由来の構造蛋白質（MSP）の抗原性について免疫化学的に比較した結果は、認められた二本の沈降線は完全に融合し、二つの異った膜由来のMSPが同じ抗原性を有することを明らかにした（Fig. 17参照）。このことは、蛋白顆粒のうちで小胞体由来の顆粒が存在することを示したものと考えられる。

以上これまでに得た結果から、合成された蛋白質が先づ小顆粒中に集積され、それが蛋白顆粒の直径の小さい方に膜融合あるいは、micropinocytosis 現象によりとり込まれ、次いで大顆粒化してゆくのではないかと考えられた。

Summary

Soybean seed accumulates reserve proteins such as glycinin, β - and γ -conglycinins, utilized by the developing embryo on germination in cotyledonary tissue. These ergastic proteins occur as discrete, spherical bodies enclosed by a single lipo-protein membrane. Hitherto little was known of the biosynthesized stage of each ergastic protein during the development. Hence this paper describes the changes in the protein components and the fine structure of the developing cotyledonary tissue. By about 13 days after flowering cell division in the tissue is almost complete and the structures observed are the nucleus, ribonucleo-protein particles and endoplasmic reticulum

(ER), whereas protein bodies and spherosomes are absent.

After 21 days remarkable cell expansion and the appearance of cytoplasmic protein globules in association with a ribosome-rich ER were observed. These small vesicles enclosed by a single membrane (average density; 1.29 g/cm^3 , 2μ in average dia.) were isolated by the method of "macerozyme-cellulase system" for the purpose of the examination of the protein constitution within them. At the early stage of the development they mainly consist of 7S-proteins such as β_1 - and γ_1 -conglycinins, while glycinin molecules were almost absent. As it develops, these bodies increase in size and density and the change in the protein constitution within them was observed. During the development from middle stage to maturity these protein bodies were separated into 2 components on the metrizamide gradient centrifugation and by quantitative immunological analysis, the protein content of each component was examined.

By 38 days after flowering there is great difference in the content between protein vacuole (low-density protein bodies) and small vesicles which seem to be derived from the ER at early middle stage and or Golgi apparatus, whereas there is little difference between them at later stage of the development (after 48 days). Intensive 7S-proteins synthesis occurs during development from the early stage, while as seed ripen glycinin biosynthesis predominates. So it would be considered the small vesicles may transport of the proteins from the sites of synthesis into the site of deposition, "protein vacuole", by membrane fusion or micropinocytosis.

謝 辞

本研究をおこなうにあたり、終始懇切なる御指導ならびに御助力を賜った農林水産省食品総合研究所理化学部、深沢親房博士に深謝いたします。

文 献

- 1) T. Harting : *Botan. Zeit.*, 13, 881 (1855)
- 2) D. M. Mottier : *Ann. Bot.*, 35, 349 (1921)
- 3) A. Guilliermond : *The Cytoplasm of the Plant Cell*, Chronica Botanica Co., Waltham, Mass., 1941
- 4) J. S. D. Graham, A. C. Jennings, R. K. Morton, B. A. Palk, J. A. Raison : *Nature* 196, 967 (1962)
- 5) M. S. Buttrose : *Aust. J. Biol. Sci.*, 13, 505 (1963)
- 6) E. M. Engleman : *Am. J. Botany*, 53, 231 (1966)
- 7) H. J. Bonnet, Jr., E. H. Newcomb : *J. Cell Biol.*, 27, 427 (1965)
- 8) U. Khoo, M. J. Wolf : *Amer. J. Bot.*, 57, 1042 (1970)
- 9) R. F. Bills, R. W. Howell : *Crop Sci.*, 3, 304 (1963)
- 10) H. Öpik : *J. Exp. Botany* 19, 64 (1968)
- 11) L. G. Briary, D. A. Coult, D. Bouiter : *J. Exp. Bot.*, 20, 358 (1969)
- 12) J. W. Dieckert, M. C. Dieckert : *Symposium "Seed Protein"* (ed. G. E. Inglett) p 52.
- 13) B. B. Hyde, A. J. Hodge, A. Kahn, M. L. Birnstiel : *J. Ultrastruct. Res.*, 9, 248 (1963)
- 14) N. Kislev, H. Swift, L. Borograd : *In Biochemistry of Chloroplasts I* (ed. T. W. Goodwin) Academic Press, New York and London
- 15) J. M. Bain, E. V. Mercier : *J. Biol. Sci.*, 19, 49 (1966)
- 16) R. K. Morton, B. A. Polk, J. K. Raison : *Biochem. J.*, 91, 522 (1964)
- 17) G. F. I. Morris, D. A. Thurman, D. Boulter : *Phytochemistry*, 9, 1707 (1970)
- 18) 深沢親房 : 蛋白質・核酸・酵素別冊 (植物酵素・蛋白質研究法), p. 134 (1976)
- 19) 宇高京子 : 昭和52年度・東京大学学位論文
- 20) C. Mancini, A. O. Carbonara, J. H. Heremans : *Immunochemistry*, 2, 235 (1965)
- 21) G. Blobel, U. R. Potter : *J. Mol. Biol.*, 26, 279 (1967)
- 22) M. R. Adelman, G. Blobel, D. D. Sabatini : *J. Cell Biol.*, 56, 191 (1973)
- 23) O. Ouchterlony : *Proger. Allergy*, 6, 30 (1962)
- 24) K. Udaka : *Tenth International Congress of Biochemistry Abstract (Hamburg)* p. 627 (1976)
- 25) 宇高京子, 深沢親房 : *生化学*, 48(7), 432(1976)
- 26) 宇高京子, 深沢親房 : 日本細胞生物学会 ジンボジュウム講演要旨 p. 61 (1976)