

“米質”に関する研究

第3報 ろ紙電気泳動法による米粒蛋白の検索*

高野圭三・野津幹雄・西川省三** (作物学研究室)

Keizo TAKANO, Mikio NOZU and Shozo NISHIKAWA

Studies on the Characters of Rice Kernel-“Beisitu”

No. 3 Detection of the Protein by mean of the
Paperelectrophoresis in Rice Kernels

緒言

前報¹⁾においては貯蔵中の米粒内遊離アミノ酸の消長を中心に米質の物理化学的特性について若干の推論を加え、筆者らは米粒内遊離アミノ酸の変動はおそらく蛋白の分解によるものであろうとのべた。本報で特にこれら蛋白についてろ紙電気泳動法による解析をとりあげたのは蛋白の分解の機作と米質に関する研究を進めるにあたって何等かの指標を持ちたいと考えたからである。一般に米の水分含量と貯蔵中の変質とは密接な関係があるといわれていることから貯蔵中の米粒蛋白の行動は含有する水分によって変動していることが想像される。ここに水で抽出される蛋白を検討した目的があり、また試料液の調製も他の方法に比較して容易であることにもよる。しかし一方蛋白の行動をろ紙電気泳動法で観察することは理論的には説明できても実験の結果として再現性に多少の問題があるとされているので簡単に結論を出すのはむずかしい。しかし本法で蛋白を検索することは特に窒素化合物の面において従来の分析化学による量的検討以外に生的考察を与え“米”を把握しようとする一助になると考えるからである。したがってここでは現在の方法と結果を概観し、若干の考察を加えるだけにとどめた。なお泳動の基本的事項はBlock²⁾にしたがい実験操作の細部については各位の見解³⁾を参考にした。

I 実験材料および方法

供試米は昭和32年~36年の各年に収穫した農林17号(いずれも玄米貯蔵)、また昭和36年に普通栽培した農林44号および愛知旭の出穂後1週間目からの登熟過程における米粒である。玄米10gを乳鉢で磨砕し30ccの水を加えて冷蔵庫内に24時間放置して遠沈(4,000r.p.m.10分)

し、上澄液(約25cc)をVisking透析膜に入れ、カーボワックス1,500に挿入し、冷蔵庫内で低温濃縮した。濃縮液はさらに遠沈(4,000r.p.m.10分)し、その上澄(1cc)を供試液とし、0.01ccを採ってろ紙原点2cm中に添加した。泳動には東洋ろ紙No.51(12.5cm×26.0cm)を使用し、泳動部分は巾2cm、長さ16cmである。ろ紙をはる枠の長さは16cm、原点は中央より陰極側へ4cmである。極槽には1% kcl 溶液、電極は銀、Buffer はペロナール液(pH8.6, $\mu=0.05$)を用いた。ろ紙上の電流は0.5 mA/cm、電圧は15~20 Volt/cm、泳動時間は5時間である。泳動後、枠のままただちに100°Cで乾燥し、1% B.P.B.一昇汞飽和アルコール液にて染色、0.5% 酢酸で洗い、風乾後、アンモニアガスで発色させ、パラフィン(58°~60°C)を通して、日立分光光度計にて吸光度を測定した($\lambda=5,800\text{Å}$)。

II 観察結果および考察

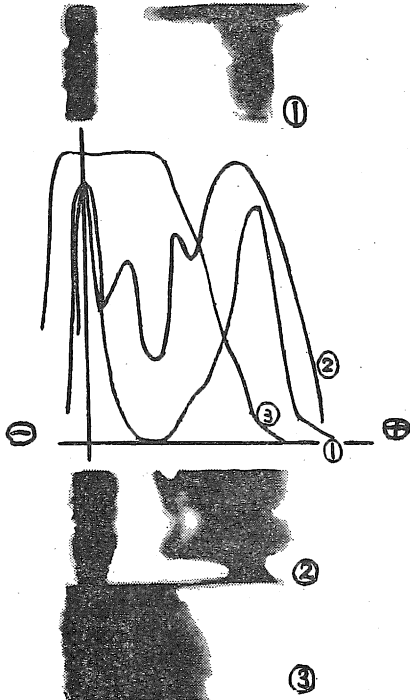
1. 抽出法と泳動蛋白

従来、組織蛋白はその抽出法によって、水にとけるもの(Albumine)、水にとけないで10%塩化ナトリウム溶液にとけるもの(Globuline)、水および塩水にとけないで70%アルコールにとけるもの(Plolamine)、水、10%塩化ナトリウム液70%アルコールにとけないで、0.2%苛性ソーダ液にとけるもの(Gluterine)の4種に分類されている。米の場合はGluterineをOryzenineと呼び、他の3つの蛋白に比較して3倍あるいは5倍以上の量を含んでいる²⁾とされている。元来、ろ紙電気泳動には透析の必要はないといわれているけれども、イオン強度に大きな影響を与えるような抽出法はさげなければならぬ。すなわち第1図でもわかるように0.2%苛性ソーダ液抽出による試料ではかなりの泳動蛋白量が見られるけれども、抽出法においてすでに生的でなく、不可逆的変性をおこしていると考えられ、そのため泳動像は再現性

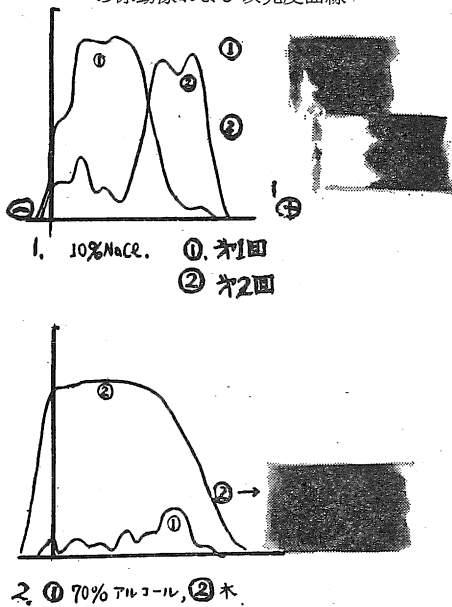
* 1961年10月132回日本作物学会において発表。文部省科学研究費の補助による。 ** 現在島根県立農事試験場

に乏しいものとなった。しかし泳動される蛋白量が多いので、今後 Buffer の種類、そのイオン強度、電流電圧の強さと時間、等々泳動条件のくみあわせによって検討することが望まれるわけであるので、ここでは事実だけ

を提出しておく。第2図の1は10%塩化ナトリウムによる蛋白の泳動像を示したものである。これによると2つの分画がある。実験1と実験2の結果が一致しないのはおそらく多量に加えた塩のために泳動しにくい状態になって、実験上の誤差から泳動距離に差がでてくると思われる。70%アルコール抽出において分画は1つしか認められないし蛋白量もまた少なく泳動には不適當であるように思われる。水抽出によるものは他の3蛋白に比較して再現性の点ですぐれているようであり(第2図、2(0.04cc添加))には分画は認められないが0.01cc添加することによって、分画が認められるような泳動像を示した。



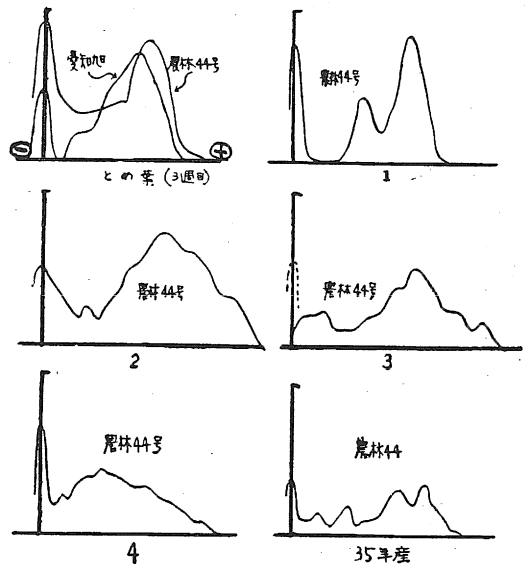
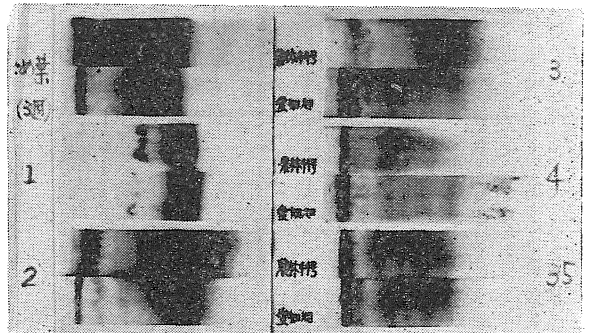
第1図 0.2%苛性ソーダ抽出による米粒蛋白の泳動像および吸光度曲線



第2図 1. 10%塩化ナトリウム。2. 70%アルコール、水、抽出による米粒蛋白の吸光度曲線ならびに泳動像

2. 登熟過程における米粒泳動蛋白の変化

第3図は出穂完了後1週間目からの米粒、出穂完了後3週間目のとめ葉、35年産玄米の蛋白泳動像である。これから明らかなように、とめ葉では1つの分画、出穂完

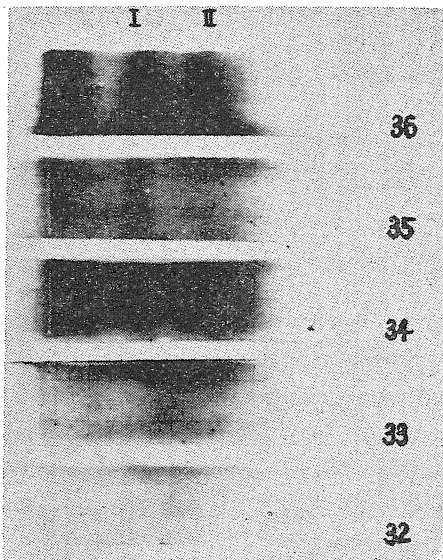


第3図 登熟過程における米粒蛋白の変化
1~4 : 出穂完了後1~4週間目の米粒
35 : 昭和35年収穫玄米貯蔵(昭和36年10月実験)

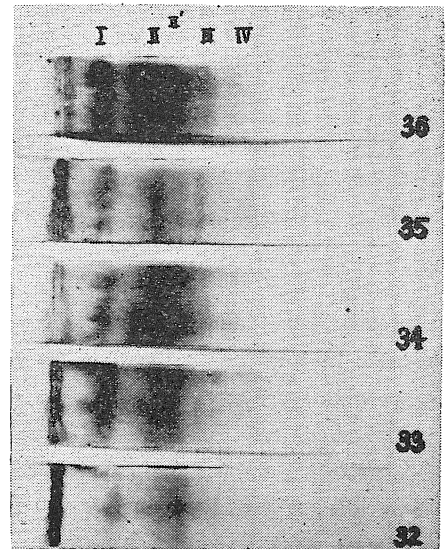
了後1週間目の米粒(乳熟期)には2つの分画があり、すでに同一の作物体でありながら組織と機能のことなる部分としての差を生じている。これが登熟するにつれて原点側にのこる蛋白ができ、分画も多くなる。愛知旭は出穂完了後4週間目に4分画(第3図の4)が観察され、35年産米とおなじような泳動像になった。すなわち登熟過程における米粒組織の泳動蛋白はこのように、つねに動いている。本報の範囲では米粒蛋白は登熟過程において機能的に“葉”の蛋白状態から“米”の蛋白状態うつりかわるのである。

3. 貯蔵中における米粒泳動蛋白の変化

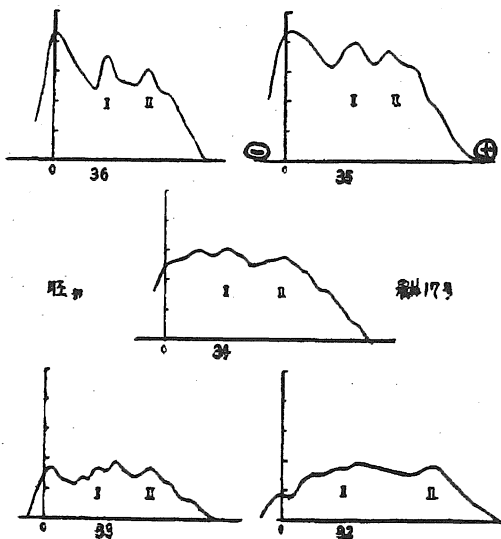
前述のように形成された蛋白をもつ玄米は貯蔵時間の経過につれて変質し、そのあらわれとして発芽率が落ちていくのである。玄米の水溶性全窒素は貯蔵期間中に減少するが、泳動の結果においても、水溶性蛋白量の減少が示される。新玄米の蛋白泳動像には4つの分画があり(第3図4, 35), 玄米を胚部と胚乳部に分けて観察すると胚部には2つの分画がある(第4図, 第5図)。米が古くなると胚部蛋白も次第に吸光度曲線のピークはすたさきを失い、収穫後3年目には胚元米の泳動像とはこ



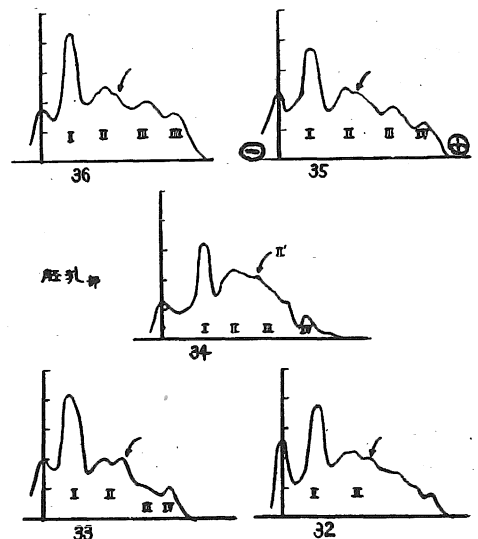
第4図 米粒胚部蛋白の貯蔵中の変化(農林17号)
32~36: 収穫年次, 昭和32年~昭和36年



第6図 米粒胚乳部蛋白の貯蔵中の変化(農林17号)
32~36: 収穫年次, 昭和32年~昭和36年



第5図 第4図の吸光度曲線



第7図 第6図の吸光度曲線

となった型になり、蛋白量も減少してくるようである。玄米から胚をとり、のぞいた胚乳部分の泳動像は玄米と同じく分画数は原点を除いて4つであるが、収穫後2年目になるとピークのするどきは次第に失われ、特にⅢ、Ⅳが消失して来る。Ⅱの分画には↓印部分に胚乳部蛋白としての特質があるかもしれない。このように収穫後の蛋白は貯蔵中に変化していくが、登熟過程を逆にした型の泳動像を示さない。以上実験結果の概要をのべたが、出穂完了後4週間目から収穫後1年目までの米粒蛋白は胚乳部には4分画、胚部には2分画の蛋白があることを確認した。

Ⅲ 要 約

ろ紙電気泳動によって登熟過程および貯蔵中における米粒蛋白の変化について検討した。登熟初期には2分画が認められるが、出穂完了後4週間目には4分画が認められた。登熟玄米の4分画は収穫後(玄米貯蔵)1年目

まで存在するが、貯蔵年次が経過するにつれて泳動像の分画は次第に明瞭さを欠いて消失する。本実験法の範囲内では“米”(出穂完了後4週間目から収穫後1年目まで)の蛋白泳動像の分画は玄米胚部に2分画、胚乳部に4分画が確認された。登熟過程においては急速に、貯蔵中においては緩徐に、つねに米粒蛋白は動的である。

参 考 文 献

1. BLOCK, R. J., DURRUM, E. L. and ZWEIG, G. : Annual of paper chromatography and paper electrophoresis, Second edition, 1958 N. Y. P 508-576
2. 岩田久敬: 食品化学, 1958 東京 P249
3. 宮本璋・杉本良一: ろ紙電気泳動シンポジウム, 第1集 1958 東京 P 1-124
4. 高野圭三・野津幹雄・日作紀 29(2): 216-218, 1961

Summary

The present paper deals with investigations on the changes of water soluble proteins of the rice kernels in relation to the changes in ripening and during storage.

The proteins were extracted from rice kernels (10 g) with distilled water (30 cc) and after centrifugation (4,000 r.p.m.—10 min.), the supernatant (25 cc) was concentrated with Visking seamless cellulose tubing against polyethylen glycol—1,500. Given conditions for paper electrophoresis were 0.5 mA/cm current and 15~20 V/cm voltage in barbiturate buffer (pH 8.6 ionic strength 0.05) and the changes of the optical densities in that pattern were measured by Hitachi's densitometer after staining with 1% B.P.B. ethanol solution and 0.5% acetic acid solution.

In younger fruits of rice, even at 7 days after heading, 2 peaks in the pattern were clearly divided, though in the leaf extract, 1 peak was only found. At final stage of ripening (brown rice), 4 peaks were observed in the electrophoretic pattern. So far as this experiment was concerned, the water soluble proteins seem to be composed of 4 proteins in endosperm and 2 proteins in embryo and these peaks seem to disappear in later storage.