



コムギ胚乳におけるアミラーゼアイソザイム

小野, 一
永吉, 照人
望月, 明

(Citation)

兵庫農科大学・神戸大学農学部研究報告, 8(2):107-110

(Issue Date)

1968

(Resource Type)

departmental bulletin paper

(Version)

Version of Record

(JaLCD0I)

<https://doi.org/10.24546/00171269>

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/00171269>



コムギ胚乳におけるアミラーゼアイソザイム

小野 一・永吉照人・望月 明

Amylase Isozymes in Wheat Endosperm

Hajime ONO, Teruto NAGAYOSHI and Akira MOCHIZUKI

緒 言

近年植物組織中のタン白質或は酵素タン白質を分割するために、デンブengel又はアクリルアミドゲルを担体とした電気泳動法が盛んに用いられ、多くの研究者が組織の違い又は品種の違いなどによってタン白質の泳動パターンが明瞭に異なることを観察した。その結果、この方法が植物の発生分化や系統類縁関係などの研究に極めて有用であることが認められてきた。

コムギ属においても、すでにJOHNSON & HALL (1965), JOHNSON (1967 a, b), BHATIA (1968)らが胚乳タン白質, Esterase, Alcohol dehydrogenaseなどの電気泳動パターンとゲノムとの関係について報告し、更にSHEPHERD (1968), BARBER et al (1968)らは異数性コムギを用いて胚乳タン白質とEsteraseのサイモグラムが染色体の欠失或は添加によって変化することを観察した。

筆者らもコムギ属植物の染色体の同祖関係やサイモグラムの遺伝的支配に関する知見を得るために、従来コムギでは報告のみられないアミラーゼの電気泳動による分析を行なったのでその結果の概要を報告する。

材 料 及 び 方 法

供試材料 この実験に用いた材料は次にあげる2倍種4倍種、及び6倍種コムギの未発芽種子(貯蔵種子)と発芽種子である。

2倍種 *Triticum monococcum* var. *vulgare* AA

4倍種 *T. timopheevi* AAGG

T. durum var. *Stewart* AA BB

6倍種 *T. aestivum* var. *Chinese Spring* AABBDD

これらの種子は1967年春自殖によって得た。

種子発芽にはしめった漏紙を敷いたペトリー皿を用い播種後3日目まで24時間おきに発芽状態の揃った種子を選んで凍結し、使用時まで -20°C で貯蔵した。未発芽種子は粉末として使用した。

酵素抽出法 酵素の抽出には各時期とも種子一粒(粉末の場合は一粒相当量)の胚乳が用いられた。即ち胚乳をトリスグリシン緩衝液(pH. 8.6) 0.2 mlと共に乳鉢にとり、すばやくすりつぶし、直ちに5000 rpmで5分間遠沈し、得られた上澄液を粗酵素液として用いた。

電気泳動法 アクリルアミドを担体とするディスク電気泳動法(ORNSTEIN & DAVIS, 1962)を用いたが2~3の点で原法と異なっている。即ち下層ゲルにおけるアクリルアミドの濃度は原法の7.5%に対し5.63%とし、これに最終濃度が0.25%になるようにデンブengelを加えた。また粗酵素液には等量の1モル蔗糖液を加え上層ゲル上に静かに注入した。泳動は 4°C の定温器内で行い、最初の25分間はカラム当り1.5 mAを、その後の約50分間(指示イオン, B P B, が最下段に達するまで)は3 mAを通电した。

呈色 泳動を終えたゲルはカラムから取出したのち、 37°C で1時間保温し、 $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 液に浸して染色した。この方法でアミラーゼ不活性部位は青色に染色されるが、活性部位は淡紫色又は無色のバンドとして示される。

※市販バレイショデンブengel 1 kgにアセトン 990 mlと濃塩酸10 mlを加え、 50°C で90分間処理したものを用いた。

実験結果及び考察

発芽に伴うアミラーゼアイソザイムの消長 アミラーゼはその分解生産物の旋光性から α -アミラーゼと β -アミラーゼに大別される。イネ科植物の発芽種子はアミラーゼの最も良い給源とされているが、その大部分は α -アミラーゼである。休眠中の種子或は貯蔵中の種子には α -アミラーゼは検出されない(西躰ら, 1958)。

BERNFELD(1951)及びKNEEN & SANDSTEDT(1941)の方法により4種の供試材料の α -及び β -アミラーゼの消長を調査した結果をまとめると第1表の通りである。

オオムギの場合(西躰ら, 1958)と同様に、コムギにおいても未発芽種子には α -アミラーゼは検出できなかった。発芽と共にアミラーゼ活性が急激にたかまるが、

Table 1. α - and β -amylase activity in endosperm of dry and germinating wheat seeds (Activity/Grain)

Triticum	Dry seed		Germinating seed			
	α	β	1 day after soaking		3 days after soaking	
	α	β	α	β	α	β
1. <i>T. monococcum</i>	—	6.5	3.65mg	8.0mg	115.78	9.8mg
2. <i>T. timopheevi</i>	—	12.3	—	13.6	26.28	19.5
3. <i>T. durum</i>	—	16.4	—	17.5	127.13	23.2
4. <i>T. aestivum</i>	—	6.0	0.80	13.0	230.78	18.0

それは主として α -アミラーゼによることが明瞭に示されている。

第1図I及び第2図左はそれぞれ未発芽種子の抽出液から得られたザイモグラムである。これらの図に見られる様に、種子中のアミラーゼ活性の高かった*T. timopheevi*と*T. durum*のザイモグラムには、それぞれ1本の弱い活性部位がある。これに反し種子中のアミラーゼ活性の低い*T. monococcum*と*T. aestivum*においては、全く活性部位は認められない。前述したように、未発芽種子に α -アミラーゼは検出されないので、ここでみられた*T. timopheevi*と*T. durum*のバンドはいずれも β -アミラーゼによるものと考えられる。またこれらの

バンドはお互いに易動度が異なるので、それぞれ別種のアイソザイムと考えることができる。

第1図II・IIIはそれぞれ播種後1日目と2日目におけるザイモグラムで、第1図IV及び第2図右は播種後3日目におけるザイモグラムである。発芽によるアミラーゼの急増に伴って、ザイモグラムにおいても未発芽種子中には認められなかった新しいバンドが漸次増加する。

播種後3日目の胚乳から、全部で9本の互いに易動度の異なるバンドを検出した。これらの中には極く活性の弱い不鮮明なバンドで時には検出できないものも含まれているが、便宜上易動度の小さいものから順にA, B, C, …… , Iと呼ぶことにする。A, B, G, H, Iの5つ

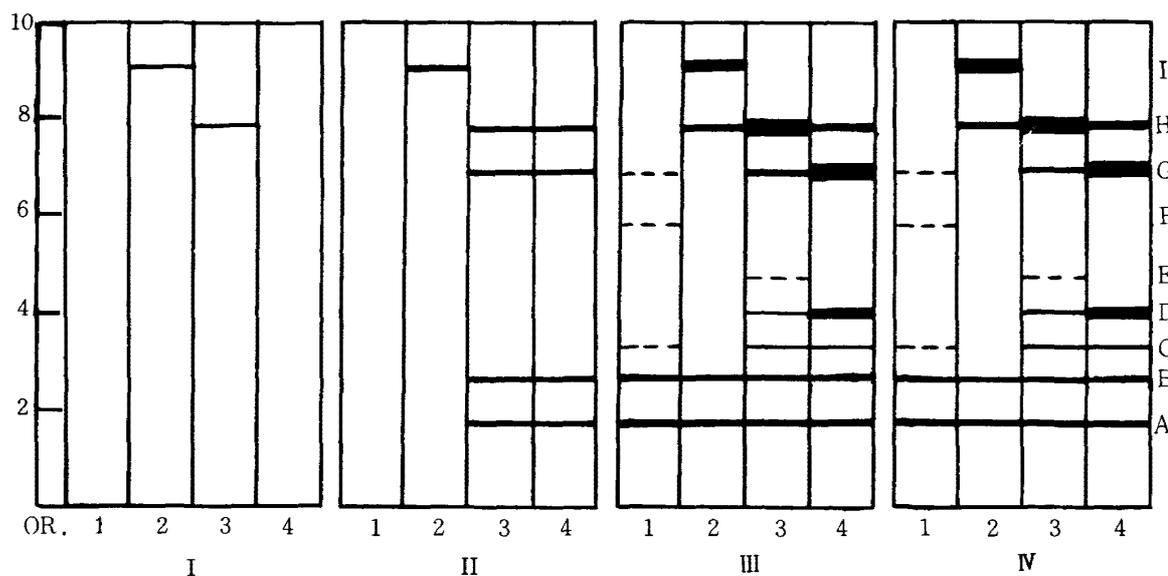


Fig. 1. Diagrammatic representation of the amylase zymograms from seeds of 2X, 4X and 6X wheats by the acrylamid gel disc electrophoresis. Solid black areas represent dense amylase activity and dotted lines show faint amylase activity. I. dry seed. II, III, and IV. germinating seeds at 1, 2, and 3 days after soaking, respectively. 1. *T. monococcum*, 2. *T. timopheevi*, 3. *T. durum*, 4. *T. aestivum*.

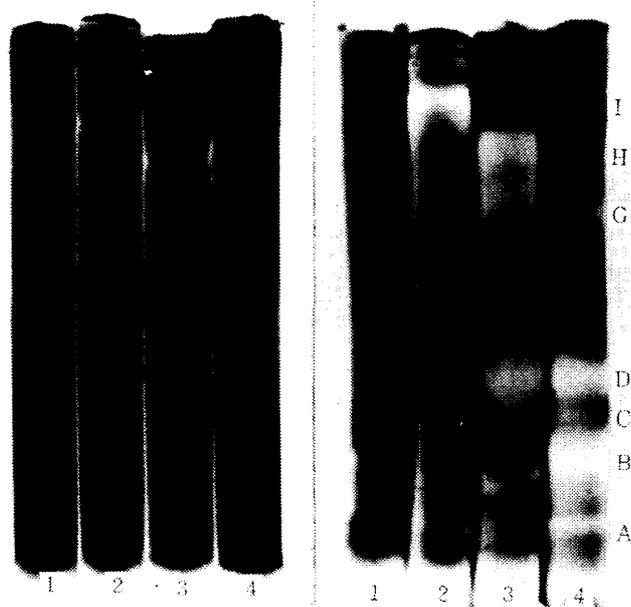


Fig. 2 Zymograms for amylase in wheat endosperm.

1. *T. monococcum*, 2. *T. timopheevi*,
3. *T. durum*, 4. *T. aestivum*.

Left : dry seed, Right : germinating seed
at 3 days after soaking.

のバンドは活性の高い太い鮮明な主バンドである。C, D, E, F, の4つは比較的活性が弱い不鮮明なバンドで、時として識別できない場合もある。

熱および ethylenediamin tetraacetate (EDTA)

処理 一般に α -アミラーゼは熱に安定であるが β -アミラーゼは熱に不安定で失活する。また α -アミラーゼはEDTAによって活性を失うかまたは活性が低下するが、 β -アミラーゼは影響を受けない (KNEEN *et al*, 1943, MOMOTANI & KATO, 1966)。この2つの性質を利用して2種類のアミラーゼを分離することができる。

泳動を終え保温する前のゲルを70°Cで15分間加熱処理を行うか又は0.01MのNaOHを含む0.01M EDTA液 (pH 5.7) に30°Cで1時間浸漬したのち、所定の方法で染色し、各バンドの変化を観察した。

A及びBの両バンドは熱に対して安定であったが、EDTA処理によって失活した。一方GとHは逆に熱処理に対して不安定で消失したが、EDTAに対しては安定であった。従って、A, Bの2つのバンドは恐らく α -アミラーゼアイソザイムであり、G, Hの両バンドは β -アミラーゼアイソザイムと考えられる。もう1つの主バンドIは前述したように *T. timopheevi* の未発芽種子から検出できることから、 β -アミラーゼと推定される。C, D, E, F, の4バンドはもともと活性が弱くいずれの処理によっても活性を失って確認がむづかしく

なるので、いずれとも判別しがたい。しかしこれらのうちでは比較的活性の強いC, Dの両バンドは α -アミラーゼの急に増加する2日目以降に現われること、バンドの位置或いは染色性などから α -アミラーゼの可能性が高いと考えられる。

ザイモグラムの種間変異 以上述べた9つのアイソザイムについて、各供試材料における構成を示せば次の通りである。

1. <i>T. monococcum</i>	ABC	FG
2. <i>T. timopheevi</i>	AB	HI
3. <i>T. durum</i>	ABCDE	GH
4. <i>T. aestivum</i>	ABCD	GH

即ち、A, B両バンドは4種のコムギに共通に認められ、またCとGの両バンドは *T. timopheevi* を除く、3種のコムギに共通に認められた。このことから、少なくともAゲノムがこれら4つのアイソザイムの形成に関与するであろうことが推察される。*T. timopheevi* にC, G両バンドが検出されないのは、*T. timopheevi* のもつAゲノムが他の3種のもつAゲノムと多少異っているためか或は *T. timopheevi* のもつもう1つのゲノム (Gゲノム) がこの2つのアイソザイムの形成に何等かの影響を与えるためと考えることができる。またバンドHは *T. monococcum* にだけ認められなかった。従ってこのアイソザイムはAゲノム以外のゲノムによって形成されると推察される。バンドIは *T. timopheevi* に個有のバンドで他の3種には存在しない。BATIA (1968) は Esterase と Alcohol dehydrogenase でも *T. timopheevi* は個有のザイモグラムを持つと報告しているが、今回のアミラーゼの場合も加えて、*T. timopheevi* が他の4倍種とは明らかに異なることを示すものである。

更に、Dは *T. durum* と *T. aestivum* に共存するバンドであり、EとFはそれぞれ、*T. durum* と *T. monococcum* に個有のバンドである。これらのアイソザイムは活性が弱く、時に発見できない場合があるが、先に述べた主バンドと共に、いずれも供試コムギ4種のザイモグラムを特徴づけている。

コムギ4群からそれぞれ1種のみを選んで行った今回の予備的な分析からも、この方法がコムギ属の類縁関係を知る上に極めて有効であることがわかった。引続きコムギ近縁植物を含めた多類の種について分析を行ないつつあるので改めて報告したい。

摘 要

1) アクリルアミドを担体としたディスク電気泳動を用いて、コムギの胚乳に含まれるアミラーゼの分析

を行なった。

- 2) 供試材料は *Triticum monococcum* var *vulgar*, *T. timopheevi*, *T. durum* var *Stewart*, および *T. aestivum* var *Chinese Spring* の4種である。
- 3) 貯蔵種子のアミラーゼ含量は低く, *T. timopheevi* と *T. durum* において, 僅かに1本の活性部位を検出できた。
- 4) 発芽後時間と共にアミラーゼ活性は急にたかまる。発芽後3日目の胚乳のサイモグラムから合計9つのアミラーゼアイソザイムを検出した。それらに易動度の小さいものからA, B, C, …… , Iと符号をつけた。
- 5) A, B, C, Dは α -アミラーゼ, G, H, Iは β -アミラーゼと推定した。
- 6) A, B, バンドは供試4種のコムギに共通の主バンドで, 各種が共通にもつAゲノムがこの形成に関与すると推察された。一方Iは *T. timopheevi* に個有の主バンドで恐らくGゲノムに由来すると考えた。(防疫遺伝学講座 昭和43. 8. 31 受理)

引用文献

- BARVER, H. N., C. J. DRISCOLL and R. S. Vickery, 1968 Enzymic markers for wheat and rye chromosome. *Proc. 3rd. Int. wheat. Genet. Symp.* 47-53.
- BERNFELD, P., 1951 Enzymes of starch detradation and synthesis. *Advances in Enzymology*, 12 : 379-424.
- BHATIA, C. R., 1968 Electrophoresis of analogous enzymes in *Triticinae*. *Proc. 3rd Int. Wheat*

Genet. Symp. 41-45.

- JOHNSON, B. L., 1967 Confirmation of the genome donors of *Aegilops cylindrica*. *Nature*. 216 : 859-862.
- _____, 1967 Tetraploid Wheats : Seed Protein Electrophoretic Patterns of the Emmer and Pimopheevi Groups. *Science*. 158 : 131-132.
- _____ and O. Hall, 1965 Analysis of phylogenetic affinities in *Triticinae* by protein electrophoresis. *Amer. J. Bot.* 52 : 506-513.
- KNEEN, E. and R. M. Sandstedt, 1941 Beta-amylase activity and its determination in germinated and ungerminated cereals. *Cereal Chem.* 18 : 237-252.
- KNEEN, E., R. M. SANDSTEDT and C. M. HOLLENBERK., 1943 The differential stability of the malt amylase. Separation of the alpha and beta components. *Cereal Chem.* 20 : 399-423.
- MOMOTANI, Y. and J. KATO., 1967. Hormonal regulation on the induction of α -amylase isozymes in the embryo-less endosperm of barley. *Plant & Cell Physiol.* 8 : 439-445.
- 西躰雄二郎・新家竜・麦林柄太郎, 1958麦芽アミラーゼに関する研究(11)。大麦の成熟, 休眠及び発芽期におけるアミラーゼの消長について(1)。兵庫農大研報, 3 (農化編) : 127-129.
- ORNSTEIN, L. and B. J. DAVIS., 1962 Disc electrophoresis, Part 1 and 2. *Distill Prod. Industries, N. Y.*
- SHEPHERD. K. W., 1968 Chromosomal control of endosperm proteins in wheat and rye. *Proce. 3rd Intern. wheat Genetics Symp.* 8-17.

Summary

1. The isozyme analysis of amylase in endosperm of wheat were undertaken by the method of acrilamid gel disc electrophoresis.
2. *Triticum monococcum* var. *vulgare*, *T. timopheevi*, *T. durum* var. *Stewart* and *T. aestivum* var *Chinese Spring* were examined as the representative species of four groups of genus *Triticum*.
3. Only a very slight amylase activity was observed as a faint band in dry seeds of *T. timopheevi* and *T. durum*. No bands were found in *T. monococcum* and *T. aestivum*.
4. After the seeds were wetted on blotting paper, the amylase activity increased with time. The samples obtained from 3 days plot showed nine bands in all four species. It was assumed that the bands A, B, C and D were marked as α -amylase and the bands G, H and I as β -amylase by means of heat and EDTA treatments.
5. The bands A and B were observed distinctly and common to all four species. The A genome which is common to all four spscies presumably contribute to produce these bands. The band I which appeared only in *T. timopheevi* may be of the G genome origin.

(Laboratory of Genetics, Received Aug. 31, 1968)