

1Aa-2

Cold acclimation 過程における精製したライムギ芽生
之細胞膜の質的变化

上村 松生・吉田 静夫・酒井 昭(北大・低温研)

昨年の本大会において、水性二層分配法を用いて照明下で育てた秋まきライムギの芽生之から細胞膜を分離・同定する方法について報告した。PTA染色法による電子顕微鏡観察では60-70%の純度と判定されたが、PTAに染色されない小胞、特に葉緑体由来の膜断片がかなり混入しており、耐凍性の増大過程における細胞膜の質的变化を分析するにはさらに純度を上げる必要であると考えられた。今回は、この水性二層分配法に改良を加え、同時にいくつかの新しい同定法を組み合わせて検討した結果、比較的短時間かつ容易に純度の高い(90%以上)細胞膜画分を得ることができた。を報告する。さらに、この方法により分離・精製された細胞膜を用いて耐凍性増大過程における細胞膜の質的变化を分析した。を併せて報告する。

材料は、滝川市にある北海道立中央農業試験場原産種農場に播種されたライムギ(*Secale cereales* L. cv. Puma) 発生を10月から12月にかけて採集し実験に用いた。耐凍性は10月から12月にかけて -5°C から -22°C まで増大した(電気伝導度試験による50%生存温度)。0.5Mソルビトールを含む緩衝液中で破砕し超遠心により粗細胞膜画分を得た。これを5.6%(w/v) Dextran T500及びPEG4000、30mM NaClを含む0.25Mショ糖-10mMリン酸緩衝液(pH7.8)中で2度水性二層分配を行ない、その上下層で回収した。上層に含まれている小胞はPTA染色法により90%以上の純度を持つ細胞膜画分と同定された。一方、下層には細胞膜はほとんど含まれていなかった。この上下層を、NPA(ナフチルトラミン酸)・ズイオン・低いpH(2-3)で処理したところ著しい差異が認められた。すなわち、上層(細胞膜)はNPA結合性タンパク質富集りにして約2倍高く、ズイオン及び低いpHにさらすまでも何ら変化を起さなかった。一方、下層(細胞膜以外)はNPAとほとんど結合せず、さらにズイオン及び低いpHで処理すると下層には凝集しはじめた。この現象は位相差顕微鏡で容易に観察できることから、細胞膜を同定する方法として極めて有効である。さらに、二層分配法やショ糖密度勾配と組み合わせることにより細胞膜を精製することも可能と考えられる。次に、膜結合性ATPaseの分析したところ、その特性が著しく異なることから、ATPaseを結合している膜成分が細胞膜以外に少くとも2成分存在することが示唆された。細胞膜結合ATPaseと他の膜結合ATPaseは基質特異性やカチオン特異性などが大きく異なっている。以上の結果から、水性二層分配法において上層に分配された細胞膜画分はかなり高い純度を持つ標品であると判断できる。

このように精製された細胞膜を用いて耐凍性増大過程と膜脂質及び膜タンパク質の変化との関連を調べた。耐凍性の変動と平行して細胞膜のリン脂質とタンパク質の比率変化し、耐凍性の増大とともに細胞膜はリン脂質に富んだ状態に変化することが認められた。しかし他の脂質成分も分析したところ、個々のリン脂質組成及びそれらの脂肪酸組成に大きな変化は認められなかった。一方、細胞膜のタンパク質をSDS-PAGEで分析したところ、いくつかのペプチド成分に変化が認められた。耐凍性の増大と関連して細胞膜にさまざまな変化が起きていることが示唆された。