

## 発芽および春化処理過程におけるコムギ胚の窒素代謝について

その8 ヒストンのディスク電気泳動法による分離

寺 岡 宏

高等植物における発育現象の解明を目的として、著者は秋まきコムギの春化処理についての研究を行ってきた。春化処理の期間中、秋まきコムギの胚では、正常な発芽過程でみられる現象がより緩慢に行はれるのに加えて、さらに春化処理に特有な変化とみられる現象が行はれる。そしてその結果、秋まきコムギの胚の代謝パターンは春まきコムギのそれに類似したものへと変化してゆくことが今までの研究の結果推察された。前報<sup>(1,2,3)</sup>では、胚の可溶性蛋白質をイオン交換セルロースによって分画し、新しい蛋白質が春化処理の進行にともなって生成すること、および、胚のヒストンのイオン交換セルロースによる分画の結果、春化処理期間中に特有の変化を示すことなどを報告した。しかし前報<sup>(2)</sup>におけるイオン交換セルロースによる分画では、分画された各ピークに数種類のことなるヒストンが混在し、それらの総合された結果としてピークの形があらはされるため、ヒストンの各成分の変化を直接的に知ることはできなかった。以上の点を解明するため、本論文においては、春化処理期間中および発芽1日目の、秋まきおよび春まきコムギの胚からヒストンを抽出し、これをディスク電気泳動法によって分離し、ヒストンの構成パターンを比較した。また、対照として、発芽3日目の秋まきコムギおよび春まきコムギを根、胚盤、子葉、子葉鞘の部分に分け、各部分ごとにヒストンを抽出しその構成パターンを比較した。以上の結果から、ヒストンの構成パターンが春化処理の進行にともない変化すること、および発芽コムギにおいて、各部分間でヒストンの構成パターンに相違のあることがみられた。

これらの結果は、高等植物の発育現象に対してヒストンがこれと関連をもった要因であることを示すものである。

### 材 料 と 方 法

材料：本実験に用いられた材料は、秋まきコムギ赤錆不知1号 (*Triticum vulgare* L.) および春まきコムギ農林75号 (*Triticum vulgare* L.) である。赤錆不知1号は秋まき質の強い品種で約60日以上<sup>(4)</sup>の春化処理が必要であるとされている。これらの品種は北海道北見農業試験場において1966年に収獲されたもので、1967年4月以降11月までの期間に実験に用いられた。発芽および春化処理の方法は前報<sup>(4)</sup>と同様の方法によった。

ヒストンの抽出：発芽および春化処理を行った種子から胚のみを分離し、水洗した後、約2～3日真空中で乾燥させる。実験には春化処理胚および発芽1日目の胚は約300ケを用い、発芽3日目のものは150ケを根、子葉、子葉鞘、胚盤の部分にわけて、ヒストンの抽出を行った。乾燥した材料を粉碎機で海砂を加え約15分間にわたって粉末状にする。これを、アセトン次に、アセトンとエーテルの混合液で洗い、乾燥させた後、0.35N塩酸を加え、約20分間攪拌してヒストンを抽出した<sup>(5)</sup>。遠心分離によってえられた上澄液をpH 3.0の水に対して約20時間透析し、その後ディスク電気泳動法に用いた。

ヒストンの電気泳動：透析の終わった液を凍結乾燥し、粉末化したのち、これにpH 4.0 グリシン酢酸緩衝液を加えてとかす。さらに、1.3 M蔗糖 5.3 M尿素をふくむ液を上<sup>(6)</sup>の緩衝液Iに対して3の割合で加える。この液 0.2 ml を1

column 当りの試料として用いた。泳動層として7.5%の下層ゲルを次のA, B, C液を2:1:1の割合で混ぜて重合させてつくった。

A液: TEMED 4.6 ml, 水酢酸 213 ml, INKOH 48 ml, 尿素 192 g に脱イオン水を加えて 400 ml とする。

B液: アクリルアミド 30 g, ビス 0.8 g, 脱イオン水を加えて 400 ml とする。

C液: 過硫酸アンモニウム 700 mg に脱イオン水を加えて 25 ml とする。この液は1週間ごとにつくりかえる。

泳動には下層ゲルの上に直接試料液をのせ、上層ゲルは用いなかった。電極液は pH 4.0 グリシン酢酸緩衝液を用い、1 column 当り 4 m. amp. の電流を流し70分間の泳動を行った。

泳動後ゲルを column からとり出し、0.5%アニリンブラック7%酢酸液で固定、染色を行い、その後1 column 当り 12.5 m. amp. の電流をゲルに流して脱色を行った。

ヒストンのイオン交換セルロースによる分画について: イオン交換セルロースとしてはCMセルロースを用い、前報と同様の方法によって溶出を行った。試料としては、塩酸によるヒストン抽出液を透析を行わず 1N NaOH によって pH 4.2 に調整したものをを用いた。

## 結 果

### 発芽および春化処理期間中の胚のヒストン

秋まきコムギ春化処理10日目、20日目、30日目、40日目および50日目の胚からヒストンを抽出し、その電気泳動のパターンを比較した。また、春化処理に対する対照として春まきコムギおよび秋まきコムギの各発芽1日目の胚から同様にヒストンを抽出し、その構成パターンを比較した。

図1の結果にみられるように春化処理の進行にともない、

胚のヒストンの構成パターンは、基本的な変化はしめさないが、しかし各バンドごとにもるとき、量的な変化をしめすことが見出される。特にディスク電気泳動法における、泳動距離の短いバンド(たとえば、図1中の3, 4, 5, 6など)については、春化処理の進行にともない、次第に量的に減少してゆくものと、増大しゆくものとを区別することができる。春化処理50日目の胚は、形態的に、発芽1~2日目のものに相当する大きさにある。それゆえ、春化処理期間中にみられる変化が、春化処理にのみ、特異的に起因するものか、あるいは、無処理の発芽胚でみられる変化が、低温の作用によって、時間的に遅延されてあらはれたものであるかは、結論し難いものである。以上のような観点から春化処理胚のヒストンパターンと発芽胚のヒストンパターンとを比較すると、両者の間にはその基本的な構成には殆んど相違がみとめられないが、各バンドの間には量的な変化のあることが知られる。すなわち、4, 5のバンドは、発芽胚では秋まきコムギ春まきコムギともに明瞭にみとめられるが、春化処理胚ではこれが減少していること、また、春化処理の進行にともなってみられる10のバンドは春まきコムギでは発芽胚でこれがみられるが、秋まきコムギ発芽胚ではほとんどみとめられないこと、さらに11と12のバンドは秋まきコムギ発芽胚では、濃くあ

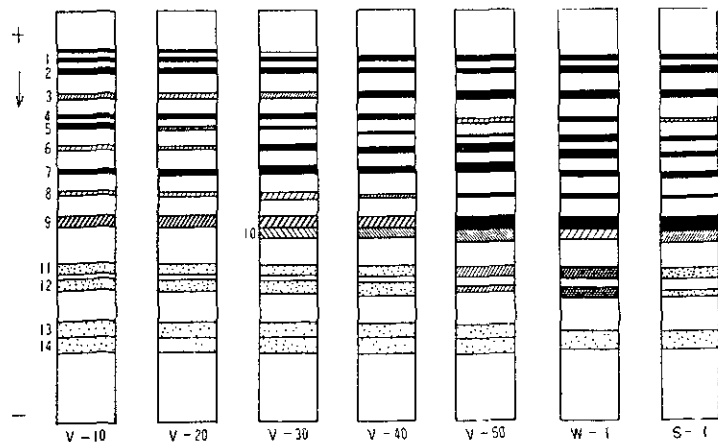


図1 コムギ胚のヒストン。記号V: 春化処理, W: 秋まきコムギ, S: 春まきコムギ 数字は春化処理日数または発芽日数(図上方が+, 下方が-の極, 矢印は泳動の方向を示す。以下図2, 4, 7も同様)

らられるのに比較して、春化処理胚や春まきコムギ発芽胚ではこれがやすいことなどが指適される。以上のような結果から、春化処理胚でみられるヒストンの構成パターン<sup>(1)</sup>の量的な変化は、その一部のものについては、春まきコムギのパターンへの転換としての意味をもつものであることが推察される。

#### 胚盤、子葉、子葉鞘、幼根部分のヒストン

発芽1日目および春化処理を行った胚については、胚全体が実験に用いられた。しかし胚は形態的および機能的には、胚盤、子葉、子葉鞘、幼根部分などに区別され、これらの異質性はヒストンの構成においても、その相違をしめすものではないかと考えられる。以上の観点から胚を3~4cmの長さ<sup>(2)</sup>に発芽させ(発芽胚では発芽4日目位のものがこれに相当する)これをそれぞれの部分に分離し、各部分について、ヒストンのパターンを比較した。なお春化処理胚についても、処理57日のものを27°Cで発芽させ、3~4cmに伸長したのものについて実験を行った。以上の結果を図2にしめす。

図2にみられるように、子葉、胚盤に存在する移動距離の短いバンドのうち、子葉鞘、幼根ではその存在のみとめられないものがあり、部分の間でヒストンの構成に相違のあることがわかった。これに対して、図中6、7および9のバンドのように、すべての部分にわたってほぼ同量の関係で存在するものもみられる。次に各

部分毎に、発芽春まきおよび秋まきコムギと春化処理を行ったものについて比較すると、一般的にみて、春化処理胚でみられるパターンは、秋まき発芽のものより、春まきの材料に類似していることがわかる。特に9のバンドに接してみられる10のバンドが、春化処理によって生じ、これが春まき発芽胚にみられることは上記の関係をしめすものである。また胚盤の移動距離の短いバンドについては、春化処理のものが春まきコムギと秋まきコムギの両者の性質を共有するようなバンドの構成をしめしている。

#### イオン交換セルローズによって分画されたピークに存在するヒストン

ヒストン抽出液をpH4.2に調整し、これをcarboxy-methyl-celluloseに吸着させ、1. 0.1M酢酸-0.03MNaOH pH4.2溶液、2. 2.17M酢酸-0.05MNaOH-0.42MNaCl溶液、3. 0.01NHCl、4. 0.02NHCl、5. 0.1NHClの順で溶出を行った。溶出液の紫外線吸収のピークをしめす部分を集め、凍結乾燥によって濃縮し、上記と同様の方法にしたがってヒストンのパターンを比較した。なおCMセルローズに吸着前のヒストン抽出液は図3にしめすように260~265m $\mu$ に吸収極大をもち、この中には核酸が混存していることが考えられる。この核酸部分は第1の溶出液によって溶出されるものであり図3にみられるようにこの溶出液は265m $\mu$ に吸収極大をもつ核酸の特徴をしめしている。ヒ

ストンの溶出はそれゆえ第2以降の溶出液によってなされる。図3に例として、第2番目の溶出液の吸収スペクトルをしめす。図3にみられるように、これらの液は275~200m $\mu$ の間に吸収の極大をしめす。なお前報で報告した

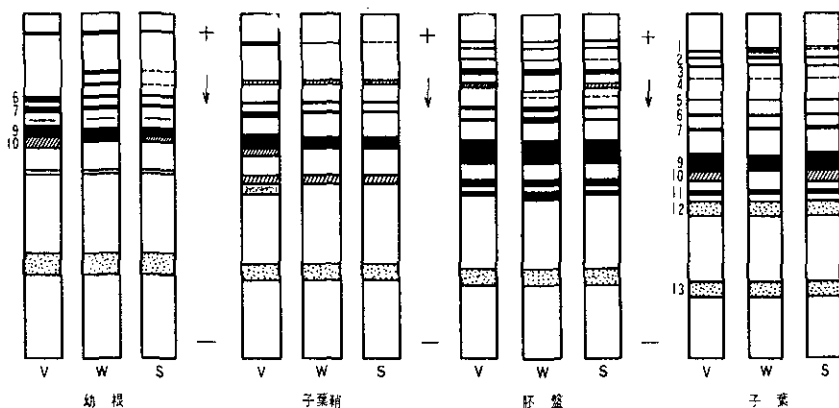


図2 幼根、子葉鞘、胚盤、子葉のヒストン。V:春化処理57日後発芽させたもの、W:秋まきコムギ発芽4日、S:春まきコムギ発芽4日。

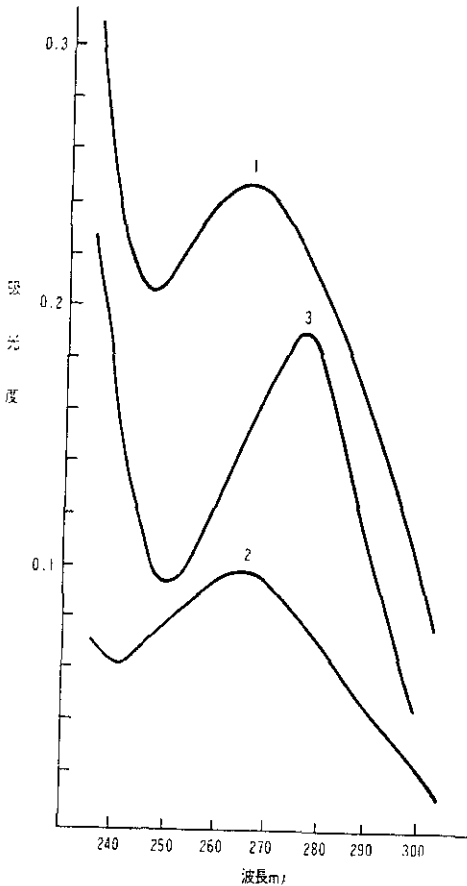


図3 ヒストン抽出液およびCMセルロースよりの溶出液の吸収スペクトル。1. ヒストン抽出液、2. 1番目の溶出液によって溶出される液、3. 2番目の溶出液によって溶出される液。

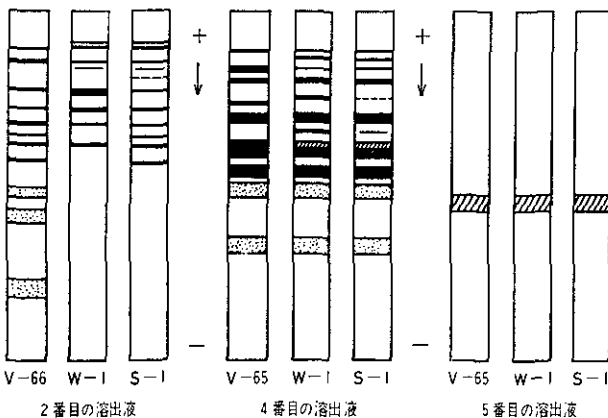


図4 CMセルロースよりの溶出液中のヒストン (記号は図1と同じ)

ように、第3番目の溶出液によっては殆んど、ヒストンの溶出がみられないため、第2番目、第4番目および第5番目の溶出液によって溶出される部分について、ヒストンの検出を行った。以上の実験の結果を図4に示す。

図4の結果にみられるように、ヒストンは0.17M酢酸-0.05MNaOH-0.42MNaCl溶液および0.02NHClによって溶出される部分にその大部分のものが検出される。0.1NHClによって溶出される部分に前段階0.02NHClによって溶出されなかったものが微量混在しているのがみられるが、0.1NHClによってのみあらたに溶出されるものは1種類である。第2番目溶出液中のヒストンの構成を秋まきコムギ発芽1日目、春化処理65日目および春まきコムギ発芽1日目のそれについて比較すると、春化処理胚と春まき発芽胚では、バンドの構成には殆んど差がみられない。それに対して、秋まき発芽胚には、春まきおよび春化処理胚に比べて、移動性の大きいところに見出される2つのバンドが欠けているのが特徴的である。次に第4番目溶出液中にみられるヒストンのバンドについては、三者とも殆んど相違をしめさないことが判明した。ただし、ごく微量存在するものについては、バンドが不鮮明になり、その存在が十分に確認し難いため、三者間に相違があるようにみえるが、しかしこの点については、今後実験

方法を改めて、確認する必要があると思はれる。第5番目の溶出液中にみられるヒストンについては、三者の間に差はみとめられない。

以上の実験はすべて発芽初期の材料について行はれたものである。しかし植物体が更に生長し成体として花芽の形成を行う段階に達した状態において、植物体の各部分でこれらのバンドがどのような存在様式をもつかはヒストンの生理的意義を解明するためにも興味ある問題である。これらの点をしらべるための予備的段階の実験として、次の材料を用いてヒストンのバンドの構成をしらべた。すな

## 発芽および春化処理過程におけるコムギ胚の窒素代謝について

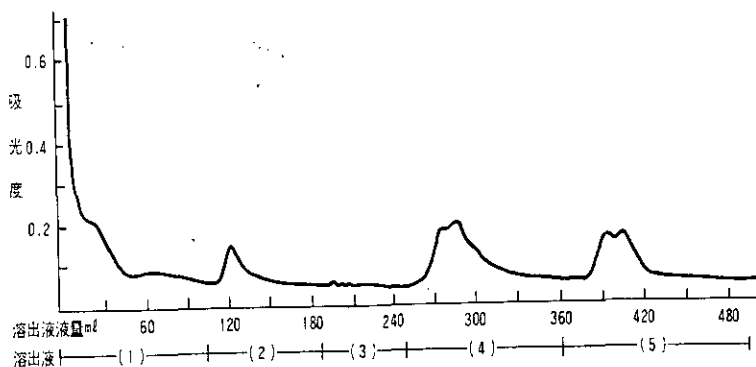


図5 春まきコムギの葉のヒストンのCMセルロースよりの溶出パターン

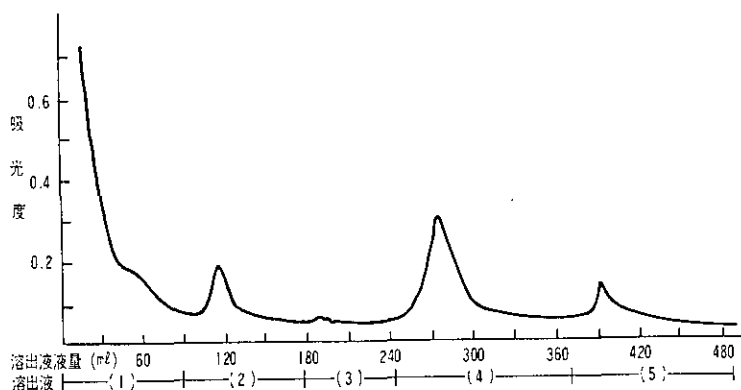


図6 春まきコムギ花芽部分のヒストンのCMセルロースよりの溶出パターン

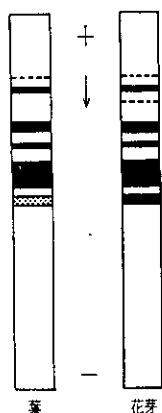


図7 春まきコムギ葉、花芽のヒストン (CNセルロースの4~10 mm 位の第4番目の溶出液のもの)

はち、春まきコムギを27°C 16時間15,000ルクスの照明と18°C 8時間暗黒中の環境のもとで35日間生育させた。このとき春まきコムギは第6葉から第7葉をつけている状態にあった。この材料について、花芽部分

はち、春まきコムギを27°C 16時間15,000ルクスの照明と18°C 8時間暗黒中の環境のもとで35日間生育させた。このとき春まきコムギは第6葉から第7葉をつけている状態にあった。この材料に

ついて、花芽部分

大きになっていると第6または第7葉の部分からヒストンを抽出し、これをCMクロマトグラフィーによって分画した。その結果は第5および第6図に示すように、第3のピークが大きく他のものは微

量である。この第3のピークにふくまれるヒストンについて、そのパターンをしらべた。実験の結果を図7に示す。

図7にみられるように花芽部分と葉の部分のヒストンパターンは第3ピークにおいては殆んど差がみとめられない。そして、図4の結果と比較するとき、発芽胚でみとめられる構成が殆んど変化なくもたれていることをみる事ができる。しかし各バンド間の量的な関係については、変化がみとめられ発芽胚では微量存在していたものが葉および花芽部分には鮮明なバンドとして判定されるようになるものがある。

## 考 察

高等植物における春化処理の問題は、発育現象の一環をなすものであり、花芽形成という植物体にとっては最も基本的な形質発現のための反応に因与する問題である。高等植物に限らず、広く生物体一般について、形質発現機構の解明には、現在、分子生物学の成果にもとづく新しい知見が作業仮説として提出されている。これらの仮説において、特に核酸に関する諸問題とともに、核酸合成の調節機構をになうものとしてのヒストンの重要性がのべられている。現在高等植物の花芽形成に対して、ヒストンが直接的な作用を示すという主張(例えば8)はすくないが、著者は、春化処理の問題が基本的には形質発現機構の問題であるとの考え方から、春化処理とヒストンとの関係を明らかにすることを目的として本実験を行った。

これらの実験の結果、春化処理にともないヒストンの構成パターンに質的な変化を認めるこ

とは困難であったが、各ヒストンの構成要素間に量的な変動の生ずることをみとめることができた。そして発芽胚と35日間の生長を行った材料についての比較などでみられるように、ヒストンの構成パターンは可成りの安定性をもったものであり、生理的年齢の変化によっても大きな変動を示すものではないことがわかった。それゆえ、ヒストンの作用の様式として問題となることは、既存のヒストンが完全に消失したり新しいヒストンが合成されて、形質発現に関係するといった仕方ではなく、既成のヒストンの構成要素間の量的および質的な変化にともなうて、何らかの作用を発現するのではないかと推察される。

なお、本実験における問題点として、ヒストンバンドの検出を染色法によって行っているため、可成り高濃度に試料を調整して実験を行ったが、しかし、微量に存在するものについてはなお検出が不十分であったと考えられる。たとえば、春化処理胚などでは、胚全体として約15種位のヒストンのバンドが確認されているが、しかしこれが胚に存在するヒストンのすべてであるか否かについては断言できない。また根、子葉鞘には、子葉、胚盤部分に存在する成分のうち、そのいくつかのものが検出されないが、これも、子葉鞘、根部分に、これらのヒストンが存在しないのか或いは本実験の方法によっては検出されない程度の微量存在するものかについては確定的なことはわからない。いづれにせよ、ヒストンの構成パターンの間の量的な変化のあることはほぼ確実な事実であると思はれる。

本実験において、特に量的な変化を示しやすいいくつかのヒストンがみられたが、これらのヒストンのうち、あるものは、春化処理の機構に関連をもつものではないかと、推察される。この点については、更に今後の研究の課題として明らかにしてゆきたい。

## 結 論

1. 発芽秋まきコムギおよび春まきコムギ胚のヒストンの構成パターンを明らかにし春化処理胚のそれと比較した。

2. コムギの幼根、子葉鞘、子葉、胚盤のヒストン構成パターンを秋まき、春まきおよび春化処理の材料について明らかにし、その比較を行った。
3. CMクロマトグラフィーによるヒストンピーク中のその構成パターンを秋まき、春まきおよび春化処理の材料について明らかにし、その比較を行った。
4. 35日発芽春まきコムギの葉および花芽部分のヒストンパターンを明らかにし、その比較を行った。
5. 以上の結果をもととして、春化処理におけるヒストンの問題についての考察を行った。  
本実験を行うにあたり、秋まきコムギおよび春まきコムギを提供して下さった北海道北見農業試験場に対し、あつく御礼申し上げます。終りに本実験に対してご協力下さった本学副手、奥村稜さんに対して感謝申し上げます。

## 引 用 文 献

1. H. TERAOKA: 1967, Proteins of wheat embryos in the period of vernalization. *Plant and Cell Physiol.*, 8, 87~95.
2. 寺岡: 1966, 発芽および春化処理過程におけるコムギ胚の窒素代謝について。そのVI, ヒストンの分画。北星短大紀要, 12, 1~4.
3. 寺岡: 1966, 発芽および春化処理過程におけるコムギ胚の窒素代謝について。そのVII, 可溶性蛋白質のディスク電気泳動法による分離。北星短大紀要, 12, 5~9.
4. 寺岡: 1962, 発芽および春化処理過程におけるコムギ胚の窒素代謝について。そのI, 可溶性蛋白質の熱凝固および等電点の変化について。北星短大紀要, 8, 13~24.
5. K. IWAI: 1964, Histones of rice embryos and of *Chlorella*. In *The Nucleohistones*, Edited by J. Bonner and P. T'so. p. 59~65. Holden-Day, Inc. San Francisco.
6. 青木, 中塾: 1966, アクリルアミドゲル電気泳動, 電気泳動実験法より, 132~164頁, 広川書店, 東京
7. L. ORNSTEIN and B. J. DAVIS: 1961, *Disc electrophoresis*. Preprint by Canal Industrial Corporation, Bethesda, Maryland.
8. R. MITRA and S. P. SEN: 1966, The dependence of flowering on nucleic acid and protein synthesis. *Plant and Cell. Physiol.*, 7, 167~170.