

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9 核における酸性蛋白質について

寺 岡 宏

多くの高等植物において、開花は光週性ととも、春化処理によって規定される現象である。それゆえ発育現象の解明の一環として、春化処理の機構を明らかにすることが必要とされる。以上の観点から、本論文のシリーズにおいて、コムギ胚を用い、春化処理および発芽の各過程における蛋白質の変化を研究してきた。^(1,2)特に前報においては、秋まきおよび春まきコムギの発芽胚におけるヒストンの電気泳動のパターンを比較し、春化処理胚におけるヒストンのパターンとの関係について考察した。以上の結果から、春化処理の現象が、ヒストンの生理的機能、すなわち、DNAの情報発現機構の問題と関連性を有するものであることが推察された。しかし、DNAの情報発現の機構に関しては、ヒストンの量的変化とともに、生体内におけるヒストンの存在様式に変化をおよぼすいくつかの要因が関連をもつことが考えられる。一方、高等動物の核において、DNAと結合した非ヒストン性の酸性蛋白質の存在が報告されている。⁽³⁻⁶⁾これらの蛋白質はヒストンよりもより高い代謝回転速度をもつこと等から、^(7,8)ヒストンと同時にDNAの情報発現機構に対して何らかの影響をおよぼしていることが推察される。

本論文においては、以上の観点から、秋まきコムギおよび春まきコムギの発芽胚および春化処理胚から核の成分としてのクロマチンを分割し、これから酸性蛋白質を抽出した。またディスク電気泳動法による分離を行なって、酸性蛋白質の構成パターンについての比較を行なった。

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。これらの品種はともに北海道北見農業試験場において1967年に収獲されたもので、1968年4月以降12月までの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⁽⁸⁾と同様の方法を用いた。

クロマチンの分画：クロマチンは TUAN と BONNER の方法⁽¹⁰⁾にしたがって分離された。即ち酸性蛋白質を抽出するためには生体重量約40gの発芽2日目の胚をまた核酸の抽出のためには同じ胚を約7g用いた。胚を真空中で乾燥させた後粉砕機で粉末化し、これに0.25M サッカロースと0.001M MgCl₂ 0.001M βメルカプトエタノールをふくむ0.05M トリス緩衝液 (pH 8.0) を加え粉末を更に機械的に粉砕する。この液をチーズクロスをとおして濾し、液を4,000×gで30分間遠心する。沈澱物を再び上の液で洗い10,000×gで10分間遠心する。この操作で得られた沈澱物を上の液で2回洗った後0.01M βメルカプトエタノールをふくむ0.05M トリス緩衝液 (pH 8.0) で再び2回洗い得られたペレットをクロマチン分画として実験に用いた。なおヒストン、DNA、RNAを抽出するときには、上記の方法でえられたクロマチンを1.9M サッカロース溶液上にのせ、22,000 r.p.m. で2時間遠心分離してえられた沈澱物を用いた。

クロマチンから酸性蛋白質の抽出方法：上記の方法で得られたクロマチンを0.025M NaOH中に浮遊させ4℃で60分間放置した。(酸性蛋白質の定量を行なうときにはこの操作を40分ずつ2回くりかえした)その後10,000×gで10分

間遠心する。得られた上澄液は pH11.6 を示すが、これを 1 M 醋酸で pH を 7.0 に調整する。この際生ずる不溶性蛋白質を遠心分離によって除去し、上澄液を再び 1 M 醋酸で pH を 5.5 に調整する。その後この液を 10,000 × g で 10 分間遠心し沈澱物を 0.025 M NaOH に溶解させる。この液では酸性蛋白質が核酸と結合した状態で存在する。酸性蛋白質を定量するときには、上記の液が用いられたが、ディスク電気泳動法では、分離が鮮明に行なわれず不適當であった。そのため蛋白質と核酸との結合を切断することを目的として次のような方法を用いた。即ち上記の液に最終濃度が 4 M になるように CsCl を加えこれを 15,000 r.p.m. で 10 分間遠心分離する。その結果、酸性蛋白質はペレットとなって上澄液の上部に浮き、これを回収して、4 M 尿素、0.004 M EDTA 0.01 M βメルカプトエタノールをふくむ 0.025 M NaOH に溶解させ同一溶液に対して 1 夜冷蔵庫中で透析する。なお CsCl による遠心分離の上澄液は 260 mμ の吸収を示し、核酸部分が酸性蛋白質から分離されたことが確認される。

ディスク電気泳動法による酸性蛋白質の分別：次の溶液を用いて 7.5% ポリアクリルアミドゲルを調整しこれを媒体として酸性蛋白質の分離を行なった。

A 液：0.25 M NaOH 8 ml + TEMED 8% 1 ml + 0.4 M βメルカプトエタノール 1 ml + 60 mg EDTA

B₁ 液：過硫酸ソーダ 60 mg を水 1 ml にとかしたもの

B₂ 液：B₁ 液を 10 倍にうすめたもの

C 液：Bis. 0.8 g とアクリルアミド 40 g をとくして 100 ml としたもの

D₁ 液：10 M 尿素液（脱イオン化したもの）

D₂ 液：D₁ 液を 8 M になるようにうすめたもの

Sample gel のつくり方：A 液 0.8 ml + B₁ 液 0.1 ml + C 液 0.7 ml + D₁ 液 3.2 ml + 試料液 3.3 ml

上記の混合液 0.2 ml をカラムに入れ光照射の

もと約 20 分間でゲル化させる。

Large pore gel のつくり方：A 液 1 ml + B₂ 液 1 ml + C 液 0.7 ml + D₂ 液 4 ml + 水 1.3 ml 上の混合液 0.2 ml を sample gel 上にのせ同様にゲル化させる。

Small pore gel のつくり方：A 液 1 ml + B₂ 液 1 ml + C 液 1.5 ml + D₂ 液 4 ml + 水 0.5 ml 上記混合液を Large pore gel 上にのせ光照射のもと約 10 分間でゲル化させる。

電極液としては、4 M 尿素、0.002 M EDTA、0.005 M βメルカプトエタノールをふくむ 0.025 M NaOH 液を用いた。

泳動は ORNSTEIN と DAVIS の方法⁽¹¹⁾により 1 カラム当たり 4 ミリアンペアの電流を 50 分間流して行なった。泳動後ゲルをカラムからとり出し、1% アミドブラック—7% 醋酸液で固定染色を行ない、その後 1 カラム当たり 12.5 ミリアンペアの電流をゲルに流して脱色を行なった。

ヒストンの抽出方法：クロマチンを 0.2 N HCl 中に浮遊させ、4°C 中で 40 分間放置する。この液を遠心分離して上澄液を集め、沈澱物について再び上と同様 0.2 N HCl で抽出を行なう。この液の遠心分離による上澄液を集め、最初の上澄液と合わせてこれをヒストン含有液とし定量に用いた。

RNA と DNA の抽出方法：クロマチンを SCHMIDT, THANNHAUSER, SCHNEIDER の方法⁽¹²⁾によって処理し RNA DNA を抽出した。

蛋白質の定量には LOWRY による FOLIN-フェノール⁽¹³⁾試薬を用い 660 mμ の吸収量を測定し、前報と同様の方法によって N 量の計算を行なった。

核酸の定量には ALLEN による湿式灰化⁽¹⁶⁾を行なった後中村の方法⁽¹⁸⁾にしたがって無機の正リン酸の定量を行ない、P 量を 10.6 倍して RNA 量 また 10.1 倍して DNA 量とした。

結果と考察

秋まきおよび春まきコムギ各発芽 2 日目の胚を用いて、クロマチン酸性蛋白質を抽出し、これをディスク電気泳動法によって分離した。ま

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

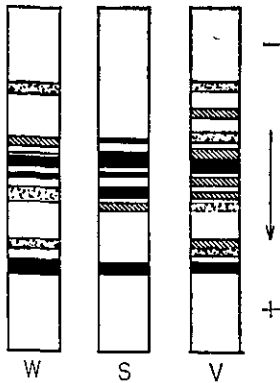


図1 酸性蛋白質の電気泳動パターン

W: 秋蒔きコムギ発芽2日目

S: 春蒔きコムギ発芽2日目

V: 秋蒔きコムギ春化処理65日目

+, -, → は電極および泳動の方向を示す

た春化処理65日目の秋蒔きコムギ胚からも同様に酸性蛋白質を抽出分離し、その泳動のパターンを比較した(図1)。

図1の結果より、春化処理胚において最も顕著にバンドの分離が行なわれ、約11本のバンドの区別がなされることが判明した。これに比べて発芽胚では春化処理胚で観察された幾つかのバンドが検出されなかった。また春蒔きと秋蒔きの発芽胚の間でもバンドの構成に相違がみとめられる。しかしこれらの相違が両者の間のパターンの質的な相違を示すものか否かについては判断し難い。即ち実験においては出来るだけ多くの胚を用いた濃厚な試料を用いて電気泳動による分離を行なったが、しかし、なお量的に微量なバンドの検出が行なわれたか否かは疑問として残されている。それゆえ春化処理胚に比べて、発芽胚でいくつかのバンドが検出されない理由が、これらのバンドの含量が他のバンドの含量に比較して相対的に少量であるため、本実験の染色による方法では確認できないという可能性が残されている。これらの点に

ついては分後の実験によって更に明らかにしてゆく計画である

マウスとラットの肝臓からのクロマチン酸性蛋白質の電気泳動パターンが BENJAMIN と GELLHORN⁽⁶⁾によって報告されている。その結果と本実験でえられたパターンを比較すると、濃厚なバンドのあらわれ方などに類似性をみる事ができる。

次に酸性蛋白質の含量を他のクロマチンの構成成分と比較するため、秋蒔きコムギ発芽2日目の胚からクロマチンを分画し、DNA、RNA、ヒストン、酸性蛋白質等を抽出し定量を行なった。表1にその結果を示す。

表1の結果から、本実験で用いられたクロマチンはDNA:ヒストンの含量比が一般に報告されているように約1であることが確認される。これに対して酸性蛋白質は極めて少量でありDNAに対して約7%にすぎないことが見出された。1.9M サッカロース液での沈澱としてえられたクロマチンに比較して、この処理を行なわなかった粗クロマチン分割においては、酸性蛋白質の含量は発芽2日目の胚100ヶ当り150~300 μ gであり、これらの結果から、本実験でみられた酸性蛋白質は核内においてDNAと結合しない状態で存在するものであることが推察される。これらの酸性蛋白質の核内での存在の様式およびそれらが発芽および春化処理の過程において、どのような変化を示すかについては、目下実験中であり、後報において明らかにしたい。

結 論

コムギ胚の核から酸性蛋白質を抽出し、ディスタ電気泳動法によってその構成パターンを明らかにした。その結果、いくつかのバンドについて、発芽胚と春化処理胚の間で量的な相違が

表1 コムギ胚クロマチンの構成成分含量(胚100ヶについての値)

材 料	生体重量 g	乾燥重量 g	胚可溶性 蛋白質 N mg	ク ロ マ チ ン			
				DNA μ g	RNA μ g	ヒストン μ g	酸性蛋白質 μ g
秋蒔きコムギ発芽2日	2.07	0.306	10.6	205	108	236	15

存在することがみとめられた。また酸性蛋白質の含量はクロマチンにおいては、DNA含量の約7%に相当すること、そして酸性蛋白質は核内においては、クロマチンと結合しない状態で存在するものが、多いことが推察された。

本実験を行なうに当り、秋まきコムギおよび春まきコムギを提供して下さい。北海道北見農業試験場に対し、あつく御礼申し上げます。また、本実験にご協力下さった本学副手奥村様さんに感謝いたします。

引 用 文 献

1. 寺岡：1967、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、北星短大紀要、**13**、1~6。
2. H. TERAOKA：1968、Histones of wheat embryos during the period of vernalization. *Plant and Cell Physiol.*, **9**-4, 819,
3. E. STEDMAN and E. STEDMAN:1944, *Nature*, **153**, 500.
4. E. STEDMAN, and E. STEDMAN: 1947, In *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, Vol 12, p. 244.
5. A. E. MIRSKY, and A. W. POLLISTER: 1946, *J. Gen. Physiol.*, **30**, 117.
6. W. BENJAMIN, and A. GELLHORN: 1968, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **59**, 262.
7. W. J. STEELE and H. BUSCH: 1963, *Cancer Res.*, **23**, 1153.
8. M. M. DALY, V. G. ALLFREY, and A. E. MIRSKY: 1953, *J. Gen. Physiol.*, **36**, 173.
9. 寺岡：1962, 北星論集, **1**, 123.
10. D. Y. H. TUAN, and J. BONNER: 1964. *Plant Physiol.*, **39**, 768.
11. L. ORNSTEIN, and B. J. DAVIS: 1961, *Disc electrophoresis*. Preprint by Canal Industrial Cop, Bethesda, Maryland.
12. VOLKIN, E., and COHN, W. E.: 1954, " *Methods of Biochemical Analysis* " Vol. 1, p. 287.
13. O. H. LOWRY, N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR, and R. J. RANDALL: 1951, *J. Biol. Chem.*, **193**, 265.
14. 寺岡：1962, 北星短大紀要, **8**, 13.
15. R. J. L. ALLEN: 1940, *Biochem. J.* (London) **34**, 858.
16. 中村：1950, 農化誌, **24**, 1.
17. J. BONNER *et. al.*: 1968, *Science*, **159**, 47.