

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10 クロマチンのヒストンの分割

寺 岡 宏

春化処理の生理的機構の解明を目的とした本論文のシリーズにおいて、コムギ胚のタンパク質代謝についての研究を行ってきた。特に前報^(1,2)においては、秋まきコムギ、春まきコムギおよび春化処理コムギの各胚における塩基性タンパク質の電気泳動パターンを解明し、春化処理過程において、その構成成分に量的な変化がおこることを明らかにした。しかし前報^(1,2)の実験においては、乾燥させた胚を粉末化し、これから直接に塩基性タンパク質を抽出する⁽³⁾方法を用いたため、クロマチンを構成するヒストン以外の塩基性タンパク質も抽出されたものと考えられる。春化処理の現象をDNAの情報発現機構のレベルで考えるためには、胚からクロマチンを分離し、これを用いた研究がなされねばならない。以上の観点から、本論文においては、発芽および春化処理コムギ胚からクロマチンを分離し、これを用いてヒストンを抽出し、その電気泳動パターンを比較した。その結果、春化処理期間中にヒストンのバンドの量的な変化がみられること、またそれは、春まきコムギの特徴に類似した方向への変化であることが見出された。

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。赤錆不知1号は秋まき性の強い品種で約60日間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1967年に収穫されたもので、1968年4月以降1969年1月までの期間中に実験に用いら

れた。

方法：春化および発芽の方法は前報⁽⁴⁾と同様の方法によった。

クロマチンの分離、発芽および春化処理を行なった種子から胚を分離し、水洗した後 -20°C に保存し、凍結させた材料からクロマチンを分離した。分離の方法は主として BONNER *et al*⁽⁵⁾にしたがった。すなわち、胚を生体重量5~10g程度用い、これに0.25 M サッカロース、0.001 M MgCl_2 、0.01 M β メルカプトエタノールをふくむ0.05 M トリス緩衝液 (pH 8.0) 約20 ml を加えてすりつぶす。この液を3枚のナイロンを重ねた布で濾し、濾液を4,000×gで30分間遠心する。沈澱物を再び、上の液約20 ml で洗い、10,000×gで10分間遠心する。この操作でえられた沈澱物を0.01 M β メルカプトエタノールをふくむ0.25 M サッカロース溶液で洗い、10,000×gで10分間遠心する。沈澱物を再び上の液で洗い同様に遠心する。沈澱物を0.01 M β メルカプトエタノールをふくむ0.05 M トリス緩衝液で洗い10,000×gで10分間遠心する。この操作を2回くりかえす。以上の操作で得られた沈澱物を再び上の液に懸濁させ、これを55% サッカロース溶液上に静かにのせて層をつくる。

これを25,000×gで70分間遠心し、えられた沈澱物を0.01 M トリス緩衝液 (pH 8.0) に懸濁させ、同一溶液に対して約20時間、 2°C 中で透析する。透析後、この液を再び遠心し、えられた白色の沈澱物をクロマチンとして以下の実験に用いた。

ヒストンの抽出、クロマチンを2 M 食塩水中に懸濁させ 0°C で1時間放置する。その後0.3

N になるように塩酸を加え、時々攪拌しながら、0°Cで1時間放置する。次に10,000×gで10分間遠心し、えられた上澄液をヒストン抽出液として用いた。

ヒストンの定量は⁽⁶⁾LOWRYによるFOLIN-フェノール試薬を用い、660 m μ の吸収量を測定した。

RNAとDNAの抽出はSCHMIDT, THANN-HAUSER, SCHNEIDER⁽⁷⁾の方法を用い、定量は⁽⁸⁾ALLENの湿式灰化を行なったのち、中村の⁽⁹⁾方法にしたがって無機リン酸の定量を行なった。

ヒストンの電気泳動、泳動層には7.5%ポリアクリルアミドゲルを用いた。ゲルは下記A液、B液、C液を2:1:1の割合でまぜ、光重合させてつくった。

A液 TEMED 4.6 ml, 氷酢酸 213 ml,

INKOH 48 ml, 尿素192g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, N,N'-メチレンビスアクリルアミド 0.8 g に脱イオ

ン水を加えて100 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。

ヒストン溶液1に対して8M尿素溶液2, 1.8Mサッカロース溶液1の割合で加えた溶液を試料液とし、これを直接、泳動層の上のせ泳動を行なった。電極液はpH 4.0グリシン酢酸緩衝液を用い、1カラム当たり4 m ampの電流を90分間流し泳動を行なった。

泳動後ゲルをカラムからとり出し、0.5%アニリンブラック-7%酢酸液で固定、染色を行ない、その後1カラム当たり12.5 m ampの電流を流して脱色を行なった。

結果と考察

発芽秋まきおよび春まきコムギ胚と春化処理秋まきコムギ胚より、クロマチンを分離し、クロマチンにおけるDNA, RNA, ヒストンの含量の量比を求めた。表1にその結果を示す。

表1 コムギ胚クロマチンにおけるDNA, RNA, ヒストンの含量比

材 料	胚生体重量1g当りの含量 μ g			ヒストン/ DNA	RNA/ DNA
	ヒストン	DNA	RNA		
春まき発芽2日目	138	127	49	1.09	0.39
秋まき発芽2日目	117	100	53	1.17	0.53
秋まき発芽3日目	108	87	17	1.24	0.20
春化処理15日目	171	166	85	1.03	0.51
春化処理45日目	240	191	59	1.26	0.31
春化処理60日目	237	224	68	1.07	0.30

表1の結果から本実験で用いられたクロマチンにおいて、ヒストン:DNAの割合が1.06~1.26の範囲にあり、他の材料からのクロマチンの分析値とはほぼ一致していることがわかる。

すなわちBONNER *et al*⁽⁶⁾によれば、本実験で用いられた方法とはほぼ同じ操作(最後のサッカロース溶液での遠心において65%サッカロース溶液を用い20,000回転30分の遠心を行なっている点だけは相違する)によって豆の胚からクロマチンを分離し、そのヒストン:DNAの割合

が1.08, RNA:DNAの割合が0.55であることを報告している。これらの値は、本実験におけるコムギ胚でえられた値とほとんど一致している。

生体重量当たりのヒストン, DNA含量は、秋まきコムギ発芽胚に比べて、春まきコムギ発芽胚での値は約20%位多い。これに対して、春化処理胚では、ヒストン, DNA含量が高く、春化処理60日の胚では秋まきコムギ発芽2日目の胚に対して約2倍の含量を有するようになる。

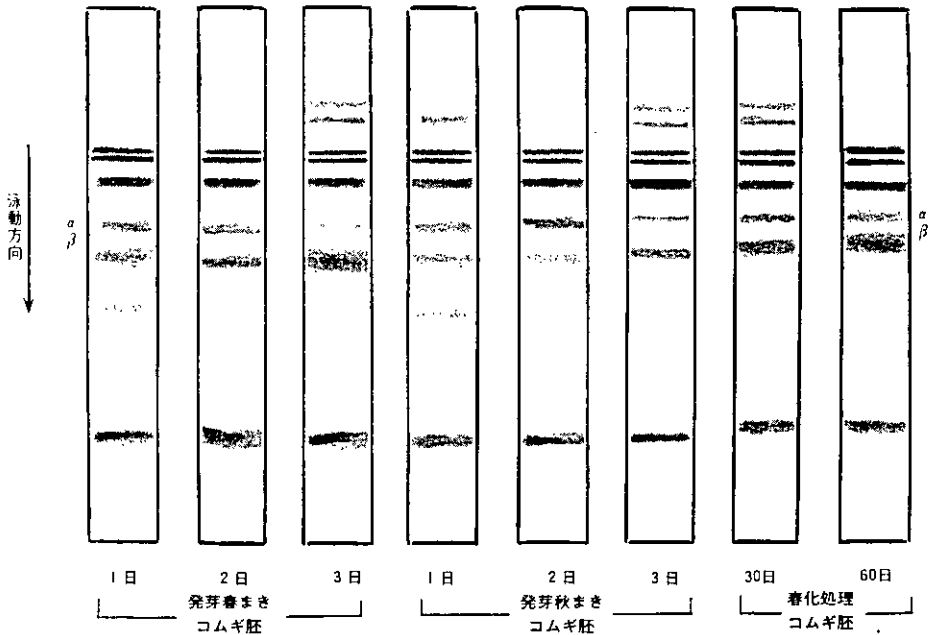


図1 コムギ胚ヒストンの電気泳動パターン

次にクロマチン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。(図1)

図1の結果より、発芽の進行にともない、図中βの記号で示されているバンドが次第に濃厚になり、αのバンドが次第にうすくなること、そしてこの傾向は、秋まきコムギより春まきコムギにおいて一層顕著にあらわれることがわかる。春化処理胚では、春化処理の進行にともない、βのバンドが濃厚になり、βバンドの他のバンドに対する相対的量は春まきコムギでみられる関係に類似することがみとめられる。また春化処理胚の特徴はαバンドも比較的濃厚に存在し、秋まきコムギ発芽2日目で見られる程度の量比をしめす。春化処理60日の胚が形態的には発芽秋まきコムギ2日目位のものに相当することを、あわせて考えると、春化処理胚が、発芽初期のもつ秋まきコムギの特性を一面ではそなえながら、他面では発芽春まきコムギのもつ特徴に向かって、変化していることが推察される。以上のような春化処理過程にみられるヒストンバンドの変化は、春化処理胚でみられる他の生理的变化についても共通して言及される

関係であり、^(10,11,12)春化処理の機構を解明するうえで重要な意味をもつものと考えられる。なおαバンドの上部にみられる3本の明白なバンドは、春まき、秋まき発芽胚および春化処理胚においてほとんど量的な変化をしめすことなく恒常的に存在し、α、βバンドとことなる他の生理的意義をもつものと考えられる。本論文でみられたこれらのヒストンバンドの氨基酸組成および、DNAとの関係については、今後、研究の課題として追求したい。

結 論

発芽コムギ胚および春化処理コムギ胚よりクロマチンを分離し、クロマチンにおけるヒストン、DNA および RNA 含量を定量した。

その結果、胚の生体重量当たりのヒストン、DNA 含量は、秋まきコムギ胚に比べて、春まきコムギ胚では約20%、また春化処理胚では約2倍程度多いことが見出された。

またヒストンの電気泳動パターンを比較した結果、次の事柄が明らかにされた。発芽の進行にともない、ヒストンバンドのあるものは量的

に変化すること、また春化処理の進行にともない、同様にヒストンバンドのあるものが量的に変化することが見出された。春化処理胚でみられるヒストンバンドの変化の方向性は、春まきコムギ胚でみられる特徴に向かっているものであることが確認された。

この実験を行なうに当たり、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。また本実験に協力し、コムギ胚の分離に当たられた、本学副手・奥村稔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**, 819.
3. 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.
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1, 可溶性タンパク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. RU-CHIN C. HUANG and J. BONNER: 1962, Histone, a suppressor of chromosomal RNA synthesis. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **48**, 1216.
6. O. H. LOWRY, N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR and R. J. RANDALL: 1951, *J. Biol. Chem.*, **193**, 265.
7. VOLKIN, E. and W. E. COHN: 1954, "Methods of Biochemical Analysis" Vol. 1, p. 287.
8. R. J. L. ALLEN: 1940, *Biochem. J.* (London) **34**, 858.
9. 中村：1950, 農化誌, **24**, 1.
10. 寺岡：1963, 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3, 北星短大紀要, **9**, 1~9.
11. 寺岡：1964, 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4, 北星短大紀要, **10**, 3~8.
12. 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7, 北星短大紀要, **12**, 5~9.

Nitrogen metabolism of wheat embryos during the period of germination or vernalization

10. Electrophoretic separation of histones

HIROSHI TERAOKA

(*Bulletin of Hokusei Gakuen Junr. College*, 1969, **15**, 1.)

Abstract

Chromatin was isolated from wheat embryos during the period of germination or vernalization, and histones, DNA and RNA were extracted from the chromatin. Amounts (μg /fresh wet. of embryos) of histones and DNA were higher about 20% in spring wheat than in winter wheat. Vernalization enhanced the twofold increase in the amounts of histones and DNA.

Histones were separated by disc electrophoresis in the acrylamide gel. Some quantitative differences in band pattern due to the progress of germination or vernalization were observed, that is, a band (marked as β in Fig. 1) became deeper in color in the period in question. And it is much more distinct in spring wheat and vernalized winter wheat than in unchilled winter wheat. And another band (marked as α in Fig. 1) is remarkable in vernalized material but it is faint in both the unchilled spring and winter wheat except in spring wheat germinated for 1 day and in winter wheat germinated for 2 days.