

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11 ヒストン分画の定量と電気泳動パターン

寺 岡 宏

NITROGEN METABOLISM OF WHEAT EMBRYOS DURING THE PERIOD OF GERMINATION OR VERNALIZATION

11. THE CONTENT AND DISC ELECTROPHORETIC PATTERN OF HISTONE FRACTIONS.

HIROSHI TERAOKA

(*Bulletin of Hokusei Gakuen Junr. College.* 1970, 16, 1.)

Abstract

The nucleohistones were prepared from winter wheat seedlings, spring wheat seedlings, and winter wheat embryos from seeds chilled for 60 days. Then they were fractionated into four main complements (F-1, F-2a, F-2b and F-3) using the procedure by Johns. Quantitative determination and disc electrophoresis of the individual fraction were carried out to examine the changes of histone fractions in relation to vernalization. The following results were observed as difference in the amounts of whole histones and corresponding fraction from the materials.

1. Vernalization enhanced the twofold increase in the amount of whole histone.
2. F-1, F-2b and F-3 increase 2.3 to 2.5 fold during the period of vernalization, while the F-2a content increase 1.4 fold. The remarkable difference is found in the F-3 content of the materials.
3. There are quantitative difference in the relative amounts of histone fractions in materials used.
4. The electrophoretic patterns of individual fraction from vernalized materials are very similar to those from germinated spring and winter wheat seedlings. However some quantitative differences are found in band pattern. As compared to F-2a2 band, F-2a1 band is more deeper in color in vernalized embryos or spring wheat seedlings than in winter wheat seedlings.

春化処理の生理的機構を解明することを目的として、本論文のシリーズにおいては、コムギ胚のヒストンについての分析的研究を行ってきた。特に前報(1)においては、秋まきコムギ、春まきコムギの発芽胚および春化処理を行った秋まきコムギの胚からそれぞれクロマチンを分離し、これを用いてヒストンを抽出した。これ

らのヒストンについてその電気泳動パターンを比較した結果、春化処理期間中にヒストンの特定のバンドの量的な変化がみられること、およびその変化の方向が、春まきコムギ発芽胚で見られる特徴に類似したものであることが見出された。

しかし前報(1)においてクロマチンから抽出

されたヒストンを全体として定量し、また全体として電気泳動に用いたため、ヒストンを構成する各分画のそれぞれについては明細な結果を得るに至らなかった。それゆえ、前報(1)までにみられた、春化処理にともなうヒストンの変化の内容をさらに明らかにしてゆくため、ヒストンを各分画に分別し、それぞれについてその定量と電気泳動のパターンを解明することがのぞまれる。一方ヒストンの分別法については、現在いくつかの方法が報告されているが(2)、JOHNS, PHILLIPS は子ウシ胸腺核物質からヒストン分画を分別抽出し、それをさらに分離沈澱法によって5つの分画に細分別する方法を報告している(3a,b)。

本論文においては、基本的にはJOHNS, PHILLIPS による方法を用いつつ、これを多少修正した分離沈澱法によってヒストンの分画を行った。

コムギ発芽胚と春化処理胚からのヒストンについて、以上の方法によってえられた分画を定量し、その電気泳動パターンを比較した。

その結果、春化処理胚と発芽胚のヒストンについて、その質的な相違はみとめられなかったが、ヒストン分画の量的な相違が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、ムカ (*Triticum vulgare* L.) および春まきコムギ、北見春17号 (*Triticum vulgare* L.) 農林75号 (*Triticum vulgare* L.) である。秋まきコムギ・ムカは秋まき性の強い品種で春化処理として約60日間の日数が必要である。

これらの品種は北海道北見農業試験場において1969年および1970年に収穫されたものである。発芽胚のヒストンについての実験は主として1970年収穫されたものを1970年11月から1971年1月にかけて用いたが、農林75号については1969年に収穫されたものを1970年1月に用いた。また春化処理胚のヒストンについての実験は1969年に収穫されたものを1970年4

月から8月にかけて用いた。

方法：発芽および春化処理は、前報(4)と同様の方法を用いた。ヒストンの抽出は、胚を十分に乾燥させた後、ヌクレオヒストンの段階までの操作を岩井による、核タンパク質を経る分離法(5)によって行ない、それ以後の操作は、JOHNS の分別抽出沈澱の第2法(3a)にしたがった。ヒストンの定量はLOWRY(6)によるFolin-Phenol 試薬を用い、660 m μ の吸収量を測定することによって行なった。ヒストン分画の電気泳動およびゲルの染色・脱色等の操作はすべて前報(1)と同様の方法を用いた。

ヒストンの分別について、岩井の方法(5)によってえられたヌクレオヒストンの凝固物に1.25 N塩酸エタノール(4:1)を加え2°C 中で45分間攪拌しつつ抽出を行なった。懸濁液を遠心分離(10,000 r.p.m. 10分間)し、その上澄液をエタノールに対して約15時間、2°C 中で透析した。透析後、この液を遠心分離(10,000 r.p.m. 10分間)しえられた沈澱物をF-3分画とした。遠心分離による上澄液にアセトン3倍量を加え、このとき生ずる沈澱物を遠心分離し、これをF2a分画とした。F2aはさらに、0.35N 塩酸にこれをとかけた後、アセトン3.25倍量を加えこのとき生ずる沈澱物をF2a1とし、上澄液にさらに1.1倍量アセトンを加えたとき

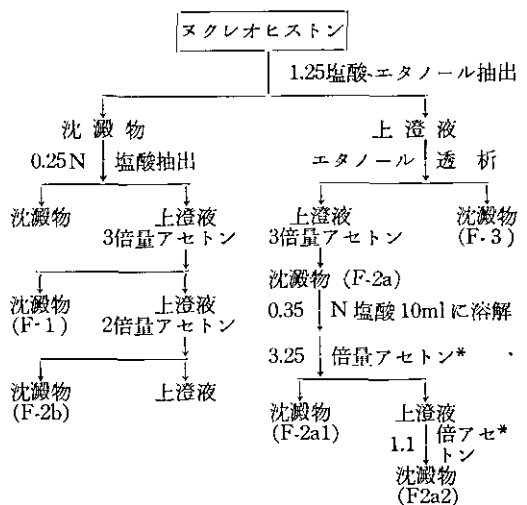


図1 ヒストンの分別抽出沈澱法
(*部分は Johns の方法と相違するところ)

ず生る沈澱物を F2a 2 分画とした。一方 1.25N 塩酸エタノールによる抽出の残渣に 0.25N 塩酸を加え 2°C で約 15 時間抽出を行なった。抽出液に 3 倍量のアセトンを加え、遠心分離 (10,000 r.p.m. 10 分間) によってえられた沈澱物を F-1 分画とした。更にこの上澄液に 2 倍量のアセトンを加え遠心分離 (10,000 r.p.m. 10 分間) によってえられる沈澱物を F2b 分画とした。

以上のヒストン分別の方法は、図 1 のように図示される。(図 1)。

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コムギ胚よりヒストンを抽出し、これを F-1, F-2a, F-2b, F-3 に分別して定量した。表 1 にその結果を示す。なお定量は同一材料につき 2 回以上行ないその代表的な結果を示した。

表 1 にみられるように乾燥重量当りのヒストンの含量は、春化処理胚では高く、秋まき発芽胚での値の約 2 倍の値を示している。これは、前報 (1) においても同様にみとめられた事実である。また春まきコムギの北見ハル 17 号と農林 75 号での値を比較するとき、F-1, F-2a, F-2b の含量には殆んど相違がみられないが、F-3 含量には顕著な差がみられる。この差が品種の相違によるものか、貯蔵期間の相違によるかは、今後の研究の課題である。また秋まきコムギ発芽胚において F-3 分画がすくなくこれが春化処理によって特に増加することも一つの特徴である。全ヒストンに対する各分画の含量

パーセントについては、特に顕著な相違はみとめられないが、いくつかの量的な相違が指適される。たとえば、F-3 分画が秋まき発芽胚では少く、春化処理によって増加すること、F-2b 分画は秋まきおよび春化処理胚では春まき発芽胚に比べて多いことなどである。

次に F-2a 分画について、これを F2a1 と F2a2 に分別するための方法を検討した。PHILLIPS, JOHNS (3b) によれば F-2a 分画を 0.35N 塩酸にとかした溶液に 2.75 倍のアセトンを加えることによって F-2a1 分画を沈澱させる方法がとられているが、コムギ胚ヒストンにおいては、この方法によっては F-2a1 分画を十分に沈澱させることが出来ない (電気泳動像によって確認)。

そのため加えるアセトン量を 2.50 倍 2.75 倍 3.00 倍 3.25 倍 3.50 倍として F-2a1 分画の沈澱の状態を比較した。その結果、加えるアセトン量は 3.25 倍を用いることが最適であり、それ以下では F-2a1 分画を十分沈澱させることができないこと、また 3.25 倍以上のアセトンを加えるときには F2a2 の分画も同時に沈澱することが見出された。次に F2a1 分画を沈澱させた残りの液から F2a2 分画を分別させるための方法を検討した結果、加えるアセトン量は 1.1 倍のときが最適であることが見出された。以上の方法を用いてヒストンを F-1, F-2a1, F-2a2, F-2b, F-3 の 5 つの分画に分別し、それぞれの分画についてディスク電気泳動を行なった。1 カラム当り約 15 μ g のヒストンを試料として用いた。図 2 に代表的な例として、秋まきコムギ発芽胚

表 1 ヒストンの各分画の定量値

材 料	乾燥重量 1g 当りの含量 μ g					総量に対する %			
	全ヒストン	F-1	F-2a	F-2b	F-3	F-1	F-2a	F-2b	F-3
春まき 4 日 ¹⁾	1826	280	493	173	880	15.3	26.8	9.5	48.2
春まき 4 日 ²⁾	1521	281	426	177	637	18.4	27.9	11.6	42.4
秋まき 4 日	1168	240	330	165	433	20.6	28.4	14.2	36.8
春化処理 60 日	2484	538	472	394	1080	21.6	19.0	15.3	43.3

1) キタミハル 17 号での値 2) 農林 75 号での値

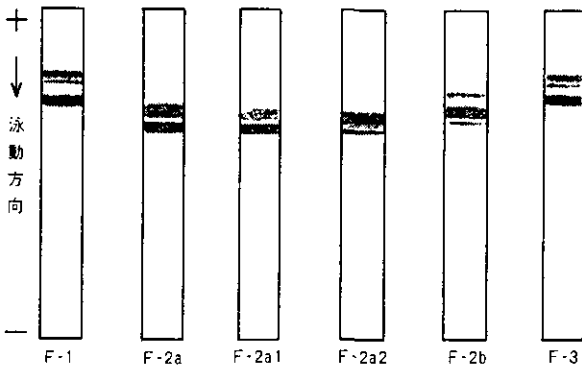


図2 秋まきコムギ発芽胚からのヒストン分画のディスク電気泳動パターン

からの結果を図示する。図2にみられるようにF-2a分画における2a1と2a2の分別は完全には行なはれていないが2つの分画の量比は、泳動バンドの染色の濃度からは2a1の方が相対的の量比の多いことがわかる。発芽秋まきコムギ胚、春まきコムギ胚、および春化処理胚から抽出分別されたヒストンの各分画についてその泳動のパターンを比較した結果、三者の間には質的な相違を認めることができなかった。ただ春化処理胚のF-2a分画においてF-2a1の分画がF-2a2の分画に比較して、相対的の量比が高いことが特徴として認められた。

同様の事実は春まきコムギ発芽胚からのF-2a分画においても観察された。これは春まきコムギ胚と春化処理コムギ胚の間の類似性として注目される。前報(1)において便宜的に β として規定されたバンドが、春化処理過程で次第に濃厚になり、春まきコムギ胚でみられる関係と類似することが春化処理における特徴の一つとして報告された。この β -バンドのは本論文の結果からF-2a1分画であることが明らかにされた。

以上本論文で明らかにされたようにJOHNSの方法によって分別されるヒストン分画の存在については、用いられた材料間に質的な相違を見出すことができなかった。以上のようなヒストン分画の存在における類似性、普遍性については、高等動植物の組織器管について広く認められている。(7~10)。しかし発育および生理

的機能のことなる細胞、組織等におけるヒストン分画の相対的の量比については、有意な相違があることが知られている。特に(very) lysine rich histoneとみなされるF-1分画については、生物種、組織、および発育の段階等に相応して量的な変化があることが報告されている(例えば11~19)

ヒストンが遺伝情報の発現を制御する一つの有力な因子とされている現在、以上のような生物学の特異性とヒストン分画の相対的の量比との関連性を定量的に明

らかにしてゆくことは、発育現象を解明するための有力な手段であると考えられる。このような観点から、春化処理における発育現象の進行が、ヒストン分画の量的平衡関係によって制御されるのではないかと推察される。以上の推察について、今後さらに検討してゆくこととする。

結 論

発芽秋まきコムギ、春まきコムギおよび春化処理秋まきコムギの胚よりヌクレオヒストンを調整し、これらをさらにF-1、F-2a、F-2b、F-3の分画に分別し定量ならびに電気泳動を行なったその結果次のことが明らかにされた。

1. 春化処理にともない全ヒストン含量は約2倍に増加する。
2. 春化処理にともないF-1、F-2b、F-3分画は2.3~2.5倍の増加を示すが、F-2a分画は1.4倍の増加にとどまる。F-3分画の含量は用いられ材料間で顕著な相違がみられる。
3. ヒストン分画の相対的の量比については、F-2a、F-2b、F-3分画などで材料間の相違が見出された。
4. 各分画のディスク電気泳動パターンは、発芽および春化処理材料間で質的な相違は認められなかった。しかし量的な相違として、F-2a2に対するF-2a1の量比が、春化処理および春まきの材料で秋ま

きコムギ発芽胚より高いことが見出された。

以上の結果から、春化処理にともなうヒストン分画の含量変化が、低温処理期間中における発育を制御する一つの要因として作用するのではないかと推察された。

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の方々に対し、厚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、高井稜さんに感謝の意を表します。

引用文献

1. 寺岡：1969. 北星短大紀要, 15, 1~4.
2. J. BONNER *et al* : 1968, *Methods in Enzymology* (ed. S.P. COLOWICK, N.O. KAPLAN), XIIB, 3, Academic Press Inc., N.Y.
- 3a. E.W. JOHNS.: 1964 *Biochem. J.*, 92, 55~59.
- 3b. D.M.P. PHILLIPS and E.W. JOHNS: 1965 *Biochem. J.*, 94, 127.
4. 寺岡：1962. 北星短大紀要, 8, 13~24.
5. K. IWAI: 1964, *The Nucleohistones*. (ed. J. BONNER and P. T'SO). 59, 65, Holden-Day, San Francisco.
6. O.H. LOWRY, N.J. ROSEBROUGH, A.L. FARR and R.J. RANDALL: 1951, *J. Biol. Chem.*, 193, 265.
7. D.M. FAMBROUGH and J. BONNER : 1966, *Biochemistry*, 5, 2563~2570.
8. L.S. HNILICA: 1967, *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, 7, 25.
9. J.A.V. BUTLER, E.W. JOHNS, D.M.P. PHILLIPS: 1968, *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, 18, 209~244.
10. D.M. FAMBROUGH and J. BONNER: 1969, *Biophys. Biochem. Acta.*, 175, 113~122.
11. D.M. FAMBROUGH, A. FUJIMURA and J. BONNER: 1968, *Biochemistry*, 7, 575.
12. M. BUSTIN and R.D. COLE : 1968, *J. Biol. Chem.* 243, 4500~4505.
13. M. BUSTIN and R.D. COLE : 1968, *Arch. Biochem. Biophys.*, 127, 457.
14. R.H. STELLWAGEN and R.D. COLE : 1968, *J. Biol. Chem.*, 243, 4456~4462.
15. T.C. SPELSBERG and I.V. SARKISSIAN: 1968, *Phytochemistry*, 7, 2083~2088.
16. J.M. KINKADE: 1969, *J. Biol. Chem.*, 244, 3375~3386.
17. R.H. STELLWAGEN and R.D. COLE: 1969, *J. Biol. Chem.*, 244, 4878~4887.
18. A. KUSANAGI and T. YANAGI : 1970, *Protoplasma*, 69, 279~282.
19. L.A. NEZGOVOROVA and N.N. BORISOVA : 1970, *Fiziol. Rast.*, 17, 322~329.