

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 12. 発芽および春化処理コムギ胚のヒストン

寺 岡 宏

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

12. HISTONES OF GERMINATED OR VERNALIZED EMBRYOS

HIROSHI TERAOKA

(*Bulletin of Hokusei Gakuen Junr. College.* 1971, 17, 1)

Abstract

The size of nuclei in somatic cells increases about twofold during the period of vernalization. The average cell length is 33μ in non-vernalized coleoptile and 50μ in vernalized coleoptile. Although the amount of chromatin increases about twofold during the period of vernalization (7), it seems reasonable to assume that cell divisions don't take place in vernalized embryos.

Histones are extracted from chromatin and fractionated into three main complements. Ratio of lysine to arginine in whole histone is 1.29 in spring wheat embryos, 1.47 in winter wheat embryos, 1.91 in 40-days vernalized embryos and 1.72 in 60-days vernalized embryos. As a result of disc electrophoresis of histone fractions, it was found that vernalization increases F-1 and F-2a2 fractions more than other fractions.

春化処理の現象は、光週性ととも高等植物における発育現象の一段階をなすものである。本論文においては、春化処理の生理的機構を DNA の情報発現の制御として解明することを目的とし、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、秋まきおよび春まきコムギ発芽胚、および春化処理胚から岩井の方法²⁾によって、ヌクレオヒストンを抽出し、これをさらに JOHNS の分別抽出沈澱の第 2 法³⁾にしたがって、ヒストンの分画を行なった。その結果、春化処理胚と発芽胚からのヒストンについて、それらのディスク電気泳動パターンに質的な相違はみとめられなかったが、各分画間には、量的な相違があることが見出された。

しかし、前報¹⁾においては、乾燥させた胚から

直接ヌクレオヒストンを抽出する方法を用いたため、クロマチン以外の細胞構成物に由来する塩基性タンパク質が混在して検出されることが考えられる。ヒストンをより正確に分析するには、クロマチンを分離し、これからのヒストンの抽出、分別が行なわれることがのぞまれる。本論文においては、以上の観点から、春化処理胚および発芽胚からそれぞれ BONNER *et al.*⁴⁾の方法によってクロマチンを分離し、精製したのうち、基本的には JOHNS の方法を用いつつヒストンの分別を行なった。またヒストンのアミノ酸分析ならびにディスク電気泳動パターンの比較を行なった。以上の結果、春化処理胚におけるヒストンの特徴的な変化を明らかにすることが出来た。

材 料 と 方 法

材料: 本実験に用いた材料は秋まきコムギ、ムカ (*Triticum vulgare* L.) および春まきコムギ、キタミハル 17 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处理として約 60 日間の低温処理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 1970 年に収穫されたものである。これらの種子を 1971 年 4 月以降 1972 年 1 月までに実験に用いた。

方法: 発芽および春化处理は、前報と同様の方法を用いた。

発芽および春化处理を行なった種子から胚を分離し、これを水洗いした後、 -20°C に保存し、凍結させる。凍結させた胚からクロマチンを分離するために、基本的には BONNER の方法⁴⁾に従い、これを多少変更して用いた。すなわち、生体重量約 10 g 程度の胚をクロマチンの分離のために用いた。これに海砂を加え、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 $4,000 \times g$ で 30 分間遠心分離する。沈澱物を再び上の液約 30 ml で洗い、 $10,000 \times g$ で 10 分間遠心分離する。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、 $10,000 \times g$ で 10 分間遠心分離を行ない、沈澱物を集める。沈澱物を再び上の液で洗い、同様に遠心分離を行なう。次に沈澱物を 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 (pH 8.0) で洗い、 $10,000 \times g$ で 10 分間遠心分離を行なう。この操作を 2 回くりかえす。以上の操作でえ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のせて層をつくらせる。これを $22,000 \times g$ で 70 分間遠心分離し、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、懸濁液を $10,000 \times g$ で 10 分間遠心分離し、えられた白色沈澱物を 0.9% 食塩水で 2°C 中でよく攪拌しながら 40 分間洗う。次に $10,000 \times g$ で 10 分間遠心分離し、えられた沈澱物を再び 0.9% 食塩水で洗い、遠心分離する。以上の操作によってえられた白色沈澱物をクロマチンとして以下の実験に用いた。

全ヒストンの抽出について

クロマチンを 0.30 N HCl 約 5 ml で洗い、 2°C で数時間放置する。次に $10,000 \times g$ で 10 分間遠心分離し、えられた上澄液を全ヒストン抽出液として、ディスク電気泳動およびアミノ酸分析に用いた。

ヒストンの分画について

Fraction C. クロマチンを 1.25 N 塩酸・エタノール (1:4) 液で約 40 分間洗い、遠心分離し、えられた上澄液をエタノールに対して 2°C 中約 20 時間の透析を行なう。透析後溶液を遠心分離し、えられた沈澱物を Fraction C とした。

Fraction A. Fraction C を抽出したクロマチン残滓を 0.25 N 塩酸約 10 ml で洗い、次に遠心分離によって上澄液を得る。この上澄液に 3 倍量のアセトンを加え、遠心分離によってえられる沈澱物を Fraction A とした。

Fraction B. Fraction A をのぞいた液に 2 倍量のアセトンを加え、遠心分離によってえられる沈澱物を Fraction B とした。

以上の Fraction はそれぞれ LOWRY による Folin-Phenol 試薬⁶⁾を用いる方法によって定量した。

ディスク電気泳動⁷⁾およびゲル染色脱色等の操作はすべて前報と同様の方法を用いた。

アミノ酸分析には、次の方法を用いた。ヒストンを 6 N 塩酸約 10 ml 中に溶解させ、これを 100°C で約 20 時間加水分解を行なう。

加水分解液を日立 034 形アミノ酸自動分析装置⁸⁾を用い、規定の方法に従って分析した。

結果と考察

7) 前報によれば、コムギ胚クロマチンにおけるヒストン/DNA 値は春化処理胚で 1.03~1.26、発芽胚で 1.09~1.24 の値をしめし、両者の間に殆ど相違がみられない。しかし生体重量当りのヒストン含量、および DNA 含量は春化処理胚では発芽胚の約 2 倍の値をしめす。以上の事実は、春化処理過程において、クロマチン量が約 2 倍に増加することを示すものである。その結果、春化処理胚では、細胞数が約 2 倍に増加しているか、または、分裂が行なわれず、胞胞核の大きさが約 2 倍に増大しているか、以上二つのうちいずれかの状態にあることが推察され

る。これらの点を明らかにするため、秋まきおよび春まきコムギ発芽 2 日目の胚、および春化処理 60 日目の胚にアセトカーミンを加えてスライドガラス上でおしつぶし、核の長径を測定した。測定の結果を図 1 にしめす。

図 1 の結果、春化処理胚では、発芽胚に比べて、細胞核の大きさが約 2 倍に増大していることが知られる。また子葉鞘を構成する細胞の大きさを、その長軸の長さで比較すると、秋まきコムギ発芽 2 日目の材料では 30~35 μ (平均 33 μ)、春化処理 60 日の材料では 50~55 μ (平均 50 μ) の値をしめす。春化処理胚と発芽 2 日目の胚の子葉鞘の長さの比が約 3:2 の関係にあることから春化処理胚と発芽胚においては子葉鞘を構成する細胞数には殆ど相違がないものと推察される。以上の結果から、春化処理期間中には、クロマチンの増加にもかかわらず、細胞分裂は殆ど停止した状態にあることが知られる。SHVEDSKAYA, KRUZHLINE によって、cabbage plant の春化処理期間中、生長点において核酸含量が増加し、核の大きさが増大することが報告されている⁹⁾。本実験の結果は、これ

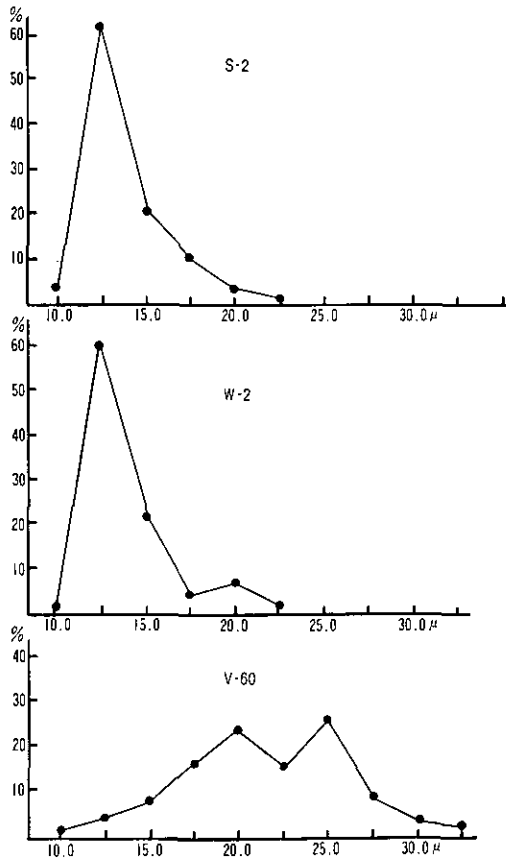


図 1 発芽および春化処理コムギ胚における核の大きさの分布
S-2 春まきコムギ発芽 2 日目 W-2 秋まきコムギ発芽 2 日目 V-60 春化処理 60 日目

表 1 コムギ胚のヒストンのアミノ酸組成 (Mole %)

アミノ酸	材料 春まき発芽 2 日目	秋まき発芽 2 日目	春化処理 40 日目	春化処理 60 日目
Asp. Acid	7.39	7.36	6.47	6.43
Treonine	4.20	4.56	4.80	4.97
Serine	6.16	5.98	5.66	6.36
Glut. Acid	11.43	10.98	9.78	10.45
Proline	3.40	4.18	4.60	5.04
Glycine	9.67	9.43	8.48	10.81
Alanine	10.43	11.28	12.33	11.98
Valine	5.40	5.29	5.21	5.19
Methionine	0.08	0.09	0.07	0.05
iso-leucine	3.24	3.27	3.36	3.36
Leucine	5.96	6.16	6.06	6.06
Tyrosine	0.96	0.99	0.55	0.44
Phenylala	2.60	2.71	2.18	2.34
Lysine	11.47	12.05	13.97	12.71
Histidine	2.48	1.94	1.77	1.97
NH ₃	6.27	5.51	7.36	4.46
Arginine	8.87	8.22	7.33	7.38
Lysine/Arg.	1.29	1.47	1.91	1.72
塩基性/酸性ア ミノ酸/ミノ酸	1.21	1.21	1.42	1.31

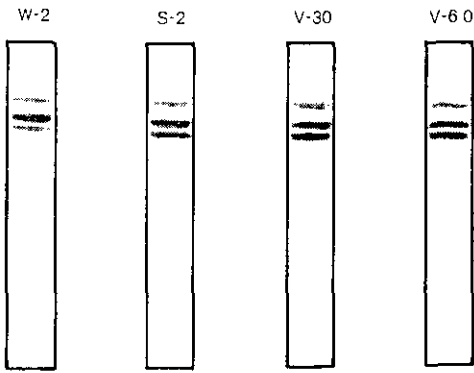


図 2-A Fraction A のディスク電気泳動パターン
W-2: 秋まき 2 日目 S-2: 春まき 2 日目
V-30: 春化处理 30 日目 V-60: 春化处理 60 日目

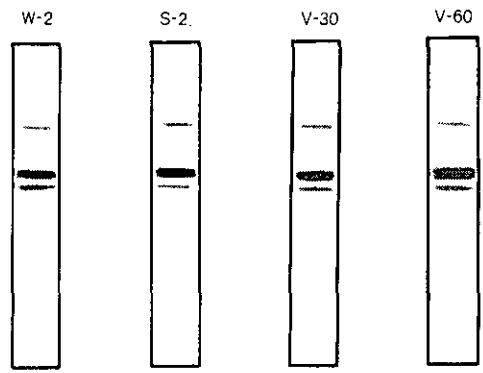


図 2-B Fraction B のディスク電気泳動パターン
(記号は図 2-A と同じ)

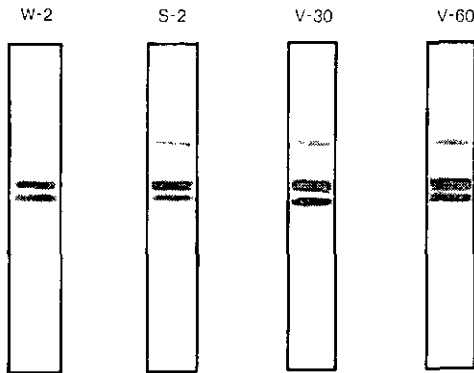


図 2-C Fraction C のディスク電気泳動パターン
(記号は図 2-A と同じ)



図 2-D 全ヒストンのディスク電気泳動パターン
(材料は春化处理 60 日目のもの)

表 2 ヒストン Fraction の Lysine/Arginine 値

	Fraction A	Fraction B	Fraction C
Lysine/Arg.	5.3	1.7	1.0

らの結果と一致するものである。

次にクロマチンより 0.30 N 塩酸によって抽出されたヒストンについて、そのアミノ酸組成を分析した。

表 1 の結果、ヒストンのリジン/アルギニン値および酸性アミノ酸に対する塩基性アミノ酸の量比が、春化处理の進行にともない変化することが見出された。以上の結果は、春化处理過程におけるヒストンの増加がヒストン分画の均等な増加によるものではなく、他のヒストンに比して Lysine-rich histone の増加がより大で

あることを示すものである。以上の点を明らかにするため、ヒストンの分画についてディスク電気泳動を行ない、各分画についての染色性の濃淡を比較した。

ヒストンの分画については、おのこの fraction が純粹に分離されず、互いに混在するため各 fraction についての正確なアミノ酸分析を行なうことは困難であるが、春化处理 60 日の材料でえられた、比較的分離のよい分画についてのリジン/アルギニン値を表 2 にあげた。

表 2 の結果、および分別沈澱の方法¹⁰⁾から Fraction A は JOHNS, BUTLER の命名による F-1, Fraction B は F-2b, Fraction C は F-2a に相当するものであることが知られる。

JOHNS, BUTLER によってコムギ胚では F-3 に相当する arginine-rich-histone は検出され¹¹⁾ないことが報告されている。本実験で用いられた

方法と JOHNS, BUTLER の方法とは同一ではないが、本実験においても、同様に F-3 の存在は認められなかった。

図2の結果、春化処理によって、F-1を構成する一つの分画と、F-2aと推定される分画が特に顕著な増加をしめすことが知られる。

前報¹⁾での F-3 分画が本論文では観察されなかった点が両者の相違として指摘される。その原因としては、ヒストン抽出に用いられた材料の状態および抽出方法の相違によるものと考えられる。すなわち、本論文においては、胚を冷凍して保存したものが用いられたが、前報¹⁾では乾燥した状態のものが用いられた。また本論文ではクロマチンを分離し、クロマチンからのヒストン抽出が行なわれたのに比して、前報¹⁾では胚から直接ヌクレオヒストンを抽出し、ヌクレオヒストンからヒストンの分別が行なわれた。このため、塩酸・エタノール抽出液に、F-1、F-2b 分画が混入し、これらがエタノール透析によって沈澱し、外見的には JOHNS による F-3 分画の分別沈澱と類似した結果をしめしたものと考えられる。

春化処理にともなうヒストンの特徴的な変化として、F-1 および F-2a2 と推定されるヒストン分画の増加が観察された。発芽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 fraction の変化については、多くの材料について報告されている。特に lysine-rich histone である F-1 については、生物種組織、発育の段階等に対応した、量的ならびに質的な相違がみられることが知られている(例えば12~17)。本論文での結果も、これらの知見と一致するものである。

ヒストンの各 fraction の生理的機能については、現在、正確な認識はえられていない。しかし、本論文および他の多くの論文でみられるように、ヒストン fraction の量的、ならびに質的な状態が、生物種、組織、細胞レベル等でみられる生物学的特異性の発現に重要な関連を有することが考えられる。以上のような観点から、春化処理機構の解明のために、ヒストン

fraction の更に明細な量的ならびに質的な変動の解明がのぞまれる。

結 論

発芽2日目、秋まきコムギおよび春まきコムギ、春化処理60日目秋まきコムギの胚における、細胞核の大きさを観察した。その結果、春化処理胚では細胞核の大きさが発芽胚の核に比べて約2倍の大きさにあることが知られた。また細胞の大きさの観察などから春化処理の期間中、クロマチン量は約2倍に増加するが、細胞分裂は殆ど行なわれないことが明らかにされた。

胚から分離されたクロマチンを用いてヒストンの抽出を行ない、そのアミノ酸組成ならびにディスク電気泳動パターンを明らかにした。その結果、春化処理期間中におけるヒストンの増加は、各 fraction について均等に行なわれるものではなく、F-1 および F-2a2 の増加が特に顕著であることが明らかにされた。

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の種子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。また本学副手高井稜さんの本実験に対する御協力に感謝の意を表します。

文 献

- 1) 寺岡: 北星短大紀要, 16, 1, 1970.
- 2) IWAI K.: *The Nucleohistones.*, (ed. J. BONNER and P. T'SO) 59, 65, 1964. Holden-Day, San Francisco.
- 3) JOHNS, E. W.: *Biochem. J.*, 92, 55, 1964.
- 4) HUANG, RU-CHIN C. and J. BONNER: *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* 48, 1216, 1962.
- 5) 寺岡: 北星短大紀要, 8, 13, 1962.
- 6) LOWRY, O. H., N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR and R. J. RANDALL: *J. Biol. Chem.*, 193, 265, 1951.
- 7) 寺岡: 北星短大紀要, 15, 1, 1969.
- 8) *Instruction manual for 034 Liquid Chromatograph. Analytical. Procedure.* Hitachi Ltd. Tokyo.
- 9) SHVEDSKAYA, Z. M. and KRUSHILIN, A. S.: *Fiziol. Rast.* 15, 798, 1968.

- 10) JOHNS, E. W. and BUTLER, J. A. V.: *Biochem. J.* **82**, 15, 1962.
- 11) JOHNS, E. W. and BUTLER, J. A. V.: *Biochem. J.* **84**, 436, 436, 1962.
- 12) PANYIM, S. and CHALKLEY, R.: *Biochemistry*, **8**, 3972, 1969.
- 13) KINKADE, J. M., Jr.: *J. Biol. Chem.*, **244**, 3375, 1969.
- 14) PANYIM, S., BILEK, D. and CHALKLEY, R.: *J. Biol. Chem.* **246**, 4206, 1971.
- 15) STELLWAGEN, R. H. and COLE, R. D.: *J. Biol. Chem.*, **244**, 4878, 1969.
- 16) KUSANAGI, A. and YANAGI, Y.: *Protoplasma*, **69**, 279, 1970.
- 17) NEZGOVOROVA, L. A. and BORISOVA, N. N.: *Fiziol. Rast.*, **17**, 322, 1970.