

マツ種子の休眠打破に伴う生理現象
および貯蔵型 mRNA の貯蔵形態と挙動

益 守 眞 也

①

1994年度 東京大学博士学位論文

マツ種子の休眠打破に伴う生理現象
および貯蔵型mRNAの貯蔵形態と挙動

1991年進学 林学専攻

益守 眞也

目次

目次

略語

I 緒言

I-1	研究の目的と概要	1
I-2	実験材料	5

II マツ種子の低温湿層処理

II-1	低温湿層処理	7
1	低温湿層処理とその意義	7
2	低温湿層処理中の変化	9
II-2	クロマツでの低温湿層処理の効果と遺伝子発現	13
1	クロマツの低温湿層処理	13
2	〈実験 II A, B〉の材料と方法	14
3	〈実験 II A〉低温湿層処理の効果	16
4	〈実験 II B〉低温下での rRNA の生合成	19
5	実験結果のまとめと考察	23
II-3	チョウセンゴヨウでの低温処理の効果	28
1	チョウセンゴヨウの発芽処理	28
2	〈実験 II C, D〉の材料と方法	28
3	〈実験 II C〉種皮除去発芽試験	29
4	〈実験 II D〉無酸素下での発芽試験	31
5	実験結果のまとめと考察	31
II-4	吸水に伴うチョウセンゴヨウの種皮の変化	32
1	種皮の物理性による休眠	32
2	〈実験 II E~G〉の材料と方法	37
3	〈実験 II E〉機械的強度	38
4	〈実験 II F〉水透過性	40
5	〈実験 II G〉気相透過性	43
6	実験結果のまとめと考察	46
II-5	吸水に伴うチョウセンゴヨウの胚と胚乳中の変化	52
1	〈実験 II H, I〉の材料と方法	52
2	〈実験 II H〉RNA 量	53
3	〈実験 II I〉ABA 量	54
4	実験結果のまとめと考察	54
II-6	マツの低温湿層処理についての考察	59

III	クロマツの貯蔵型 mRNA	
III-1	貯蔵型 mRNA	62
III-2	貯蔵型 mRNA の cDNA クローン	63
1	cDNA クローン	63
2	〈実験 III A〉の材料と方法	65
3	〈実験 III A〉 cDNA クローンの選抜	69
4	実験結果のまとめ	80
III-3	古種子の RNA	82
1	貯蔵型 mRNA の寿命	82
2	〈実験 III B, C〉の材料と方法	83
3	〈実験 III B〉古種子の発芽率	85
4	〈実験 III C〉古種子中の mRNA	85
5	実験結果の考察	85
III-4	貯蔵型 mRNA の貯蔵形態	89
1	リボ核タンパク質	89
2	〈実験 III D~H〉の材料と方法	91
3	〈実験 III D〉低塩濃度緩衝液中の貯蔵型 mRNA の沈降係数	93
4	〈実験 III E〉高塩濃度緩衝液中の貯蔵型 mRNA の沈降係数	93
5	〈実験 III F〉発芽種子のポリソームのビューロマイシンによる解離	95
6	〈実験 III G〉乾燥種子のポリソーム画分のビューロマイシン処理	97
7	〈実験 III H〉ポリソーム画分の翻訳活性	100
8	実験結果のまとめと考察	102
III-5	発芽に伴う貯蔵型 mRNA の消長	107
1	発芽前後の遺伝子発現	107
2	〈実験 III I〉の材料と方法	108
3	〈実験 III I〉発芽10日目までの貯蔵型 mRNA の消長	109
4	実験結果の考察	109
III-6	貯蔵型 mRNA についてのまとめ	112
1	存在意義	112
2	存在形態	113
IV	総括	114
V	謝辞	116
	引用文献	117

略語

本論文で用いる，物質名などの日本語表記，略語は，(社)日本生化学会編「英和英生化学用語辞典」に従った。同辞典で定義せずに用いてよいとしている略号以外のものや，本文中で定義しない主な略号を以下に挙げる。

ABA :	Abscisic Acid アブシジン酸
DTT :	Dithiothreitol ジチオトレイトール
EDTA :	Ethylenediaminetetraacetic Acid エチレンジアミン四酢酸
DNA :	Deoxyribonucleic Acid デオキシリボ核酸
RNA :	Ribonucleic Acid リボ核酸
mRNA :	Messenger Ribonucleic Acid 伝令RNA
mRNP :	Messenger Ribonucleoprotein リボ核タンパク質
rRNA :	Ribosomal Ribonucleic Acid リボソームRNA
ポリ(A) ⁺ RNA :	ポリアデニル鎖が付加されたRNA，真核生物のmRNA
ポリ(A) ⁻ RNA :	ポリアデニル鎖をもたないRNA
SDS :	Sodium Dodecyl Sulfate ドデシル硫酸ナトリウム
1×デンハルト溶液 :	0.02% ファイコール，0.02% ポリビニルピロリドン， 0.02% ウシ血清アルブミンの1倍溶液
1×SSC :	0.3M 塩化ナトリウム，0.03M クエン酸ナトリウムの1倍溶液

I 緒言

I-1 本研究の目的と概要

動物は生存繁殖に不適な環境に遭遇した場合、自ら好適な環境を選び移動することができる。さらにヒトでは好適な環境の創造までする。それに対し植物は自分自身で移動することができない。光の多い方へ地上部を伸長させ、水や酸素の多い方へ根系を発達させるし、ユリなどでは特殊な根の収縮により球根を地中に移動することができるが、その移動は微々たるものである。基本的に植物は不適な環境にさらされた場合、その場で耐えることによって生き残る。耐えられなかった個体は死ぬ。

高等植物が生活環の中で長距離移動できるのは花粉と種子だけである。生活環の大部分を占める孢子体だけに限ってみれば種子の散布が唯一移動できる機会といえる。種子の場合、空間的に移動できるのみならず、時間的にも好適な環境を選ぶ能力をもつ。不適な環境の期間を休眠して過ごし、好適な環境になった時に休眠を打破し発芽する。

農林業では植物体を任意の場所に任意の時に生育させる必要があるが、貯蔵・移動させるために、種子の段階の植物体がいられる。休眠している種子は、人為的に不適な環境に種子をおいておくことによって、発芽せずに休眠状態に保つことができる。逆に、不適な環境においても生命を維持できる段階が種子であるということもできる。また、種子は発芽して光合成を開始するまでの期間、独立栄養的生活を営むことができないので、母植物体が同化したエネルギーを濃縮して貯蔵養分の形で貯蔵している。そのため食糧としてエネルギーを効率よく摂取する際に穀物をはじめとして種子を用いる。

種子は農林業上重要であり、多くの技術が開発されてきたが、貯蔵技術に関してはまだ開発途上である。種によっては休眠が浅いため貯蔵中に発芽してしまうものや発芽能を失い死亡してしまうものがある。このような種の種子についても生命を維持したまま長期間貯蔵する技術を開発することは、近年重要性が論じら

れている遺伝子資源の保存の面からも必要なことである。

本研究では、種子の休眠の仕組みを解明し貯蔵技術の開発に資するべく、比較的深い休眠を示すマツ種子についておこなった生理学的・分子生物学的な実験研究の結果を述べる。

種子を用いたこのような研究は農林学上のみならず、生物学一般にも重要な情報を与えることができると考えられる。休眠種子は温度、水分、光などの環境要因が好適になるのを検知する機構をもっている。さらに低温や高温などを検知してその後の環境を予知する種もある。植物が環境を検知する機構を研究することは植物というものを把握する上での一つの課題であり、種子休眠やその打破の機構を知ることは植物の環境検知機構の解明の一助となる。

また、近年、人類の驚異的な増殖に起因する社会的な要請により、本来、植物の生存にとって不適であるはずの環境下で植物を生育させることが必要になってきた。造林学の立場からは、過酷な環境に対する耐性をもつ種の検索と共に耐性を付与する育成方法の開発と育種が課題である。そのためには植物の耐性機構を知ることが重要である。植物は様々なストレスに対して少なからず耐性をもっているが、最も過酷な環境下で生命を維持しているのが種子であり、種子の休眠機構は、すなわち様々な環境に対する耐性の機構である。

ここで一般的な種子休眠と発芽について概観する。母植物体の一組織である胚珠から分化・発達した種子は、母植物体から分離するまでに、胚の分化・成長や貯蔵物質の蓄積、種皮の形成などがおこなわれる。この期間を成熟期あるいは登熟期とよぶ。種子は成熟すると一時成長を休止 arrest する。多くの場合この時に種子内の生理活性が低下・休止する。種子の成熟後発芽までは、種子の外見に顕著な変化が見られないので(もっとも広義の)休眠期 quiescency とよばれる。

発芽とは孢子や花粉、休眠芽の場合のように、休眠していた成長点が成長を再開する点をさすが、種子では幼根が種皮から突出し胚が直接吸水し始める点を発芽とする。実際には種子の場合、成長点の成長が始まってから幼根が種皮から出てくるまでにいくらかの時間を要するため本来の発芽と時間差がある。なお本論文Ⅲ章では発芽に適した条件下に移した日から起算して発芽幾日目と表記するが、各個体が実際に発芽してからの日数とは異なる。

さらに、胚内の生理活性の復活は、成長の再開という胚の形態的变化より前に起きていると考えられる。生理活性の極めて低い状態をもって休眠 dormancy と

するならば、生理活性が回復した時が(広義の)休眠期の終了点である。回復は暫時的なものであり、点というより期間というべきであろう。この期間を休眠打破 breaking of dormancy とよぶことにする。また休眠打破後の期間を発芽期とよぶことにする。休眠打破という語は一般に、農林業の実務上の処理として、種子にとっては受動的な意味で用いられることも多いが、本論文では種子内で生じる変化をさす語として用い、人為的な処理には発芽処理という語を用いる。

休眠後の胚の成長すなわち発芽には、他の器官と同じように適当な水分と温度、酸素が必要である。この他、多くの種では光が必要である。母体を離れた直後の種子の環境が水分、温度、酸素、光の4条件を満たしているとは限らず、乾燥していたり、低温だったり、水中など酸素が足りなかったり、暗かったりする場合がある。そのような場所では発芽後の成長にとっても不適であるので、環境が好適になるまで休眠を続ける。ところが4条件が好適になっただけでは発芽がみられない種がある。このような種子の休眠は、胚の成長に直接必要でない環境にさらされないと打破されない。この場合の休眠が狭義の休眠である。すなわち広義の休眠は、休眠後の成長に好適な環境だけで打破される休眠と、それ以外の条件が打破に必要な休眠とに分けることができる。種子は概ね種によって狭義の休眠を示すものと示さないものに分けることができるが、同じ種の中でも4条件が満たされた時に一部が発芽し、他の条件を与えたときに残りが発芽するような場合がある。つまり2つの休眠は現象としてははっきりと分けられるが、実際の種子の状態としては連続的なものと考えられる。本論文ではこれらの休眠を区別する必要のない時にはすべてを含めて、つまり広義の休眠を単に休眠と表記する。

狭義の休眠を示す種子を発芽させるためには、何らかの発芽処理を施す必要がある。発芽処理法としては、種皮に傷をつける、高温にさらす、硫酸やアルカリ溶液、有機溶媒に浸漬する、ジベレリンなど発芽促進ホルモン溶液に浸漬する、常温あるいは高温で乾燥させる、低温で吸水させる、など様々な方法がある。いくつかの処理法については、その休眠打破機構が解明されつつあるが、低温湿層処理をはじめ、処理がもたらす特異な環境をいかにして種子が検知し、どのように休眠が打破されるかについて不明な点が多い。低温湿層処理中の種子内では、水分条件と低温条件という2つの条件下においてのみ進行する変化が生じると考えられるが、実際に種子のどの部分でどのような変化を生じているかを、本論文II章で考究する。

通常の植物の器官では、成長に不適な環境にさらされると、個体全体あるいは

その器官が死亡してしまうが、種子や休眠芽では休眠することによってある程度過酷な環境を克服することができる。特に狭義の休眠状態にある場合には環境が好転しても成長せずに休眠し続ける。環境が休眠打破に必要な環境に変わったことを検知する機構は興味ある研究対象であるが、休眠打破の機作を知るためにも、休眠を引き起こしている要因を探ることが重要である。

発芽に必要な条件が満たされても発芽しない休眠の要因は、胚にとっての外的な要因と内的な要因にわけて考えることができる。種子全体としては発芽に必要な温度、水分、酸素条件等が満たされたとしても、実際に成長する組織である胚にとっての条件が成長に適しているとは限らない。種皮や胚乳など胚を取り囲む組織が胚の成長を阻んでいる場合、この休眠を外的休眠 *exogenous dormancy* という。外的休眠を示す種子では種皮あるいは胚乳がある環境刺激を受けて変化することによって初めて胚が成長を再開する。また種皮に要因がある場合は種皮を除くことによって発芽がみられるので外的休眠であることがわかる。具体的な要因としては、機械的強度、不透水性、酸素不透過性など種皮あるいは胚乳の物理性が胚の環境を成長に不適な状態に保つ場合と、発芽抑制物質の含有など化学的に成長に要する生理活性を阻害する場合とがある。前者は *coat-imposed dormancy* とよばれることがある。特に不透水性が主要因となって休眠している種子は硬実種子 *hard seed* という。本論文Ⅱ-4ではこの外的要因についての実験をおこなった。

内的休眠 *endogenous dormancy* は胚自身の中の成長に必要な遺伝子の発現や酵素活性などが抑えられており発芽できない状態をいう。内的休眠を示す種子では種皮を除いても成長を再開しない。Ⅱ-5で述べるように活性を抑えている要因としてアブジジン酸をはじめとして抑制物質の存在がよく研究されているが、まだその抑制機作など不明な点が多い。休眠中の遺伝子発現の制御についてはほとんど解明されておらず、本論文Ⅲ章ではこのことについて研究した。遺伝子の転写も翻訳もおこなわれていないと考えられる休眠種子中に、mRNAが貯蔵されていることが知られているが、この貯蔵型mRNAの検出の道具として、まずⅢ-2でcDNAの選抜をおこなった。得たcDNAを用いて、どの程度の時間的規模で貯蔵型mRNAが貯蔵されているかや、その貯蔵形態についてⅢ-3、4で実験研究をおこなった。さらに貯蔵型mRNAの機能を考察すべくⅢ-5で発芽期での消長を調べた。

なお、発芽抑制物質は胚の遺伝子発現や酵素活性などの生理活性を直接阻害し

て、胚の成長を抑制する物質であるから、内的要因に含むのが妥当だと考えられるが、実際には胚を包む組織が多量に含有している場合が多く、それらの組織を除いた時に抑制物質が漏出して結果的に生理活性が増加することもあり、このような場合、外的休眠との判別が困難である。

I-2 実験材料

どのような機構が種子休眠を制御しているのかを調べるために、本研究ではマツ属 *Pinus* の2種を材料とした。マツ種子は成熟の過程で含水率が10%以下にまで低下し、乾燥状態に保つことによって比較的長期にわたり、発芽能を維持したまま貯蔵しておくことが可能である。このような比較的深い休眠を示す種子についてその制御要因を調べることによって種子休眠の機構を解明することができると考えた。

マツ属は針葉数が1~3本の複維管束亜属 *Diploxylo* と5本の単維管束亜属 *Haploxylo* に細分される。材料に用いたのは複維管束亜属に属するクロマツ *P. thunbergii* Parl. と単維管束のチョウセンゴヨウ *P. koraiensis* Sieb. et Zucc. である。

クロマツ

クロマツは、本州、四国、九州および韓半島南部の、主に海浜地域に天然分布する。中国でも中・南部に生育するとされている。塩分に富む海風に対する強い耐性をもつことから、海岸の防砂林や風致林として造林されている。日本における造林面積は近年減少傾向にあるが、1987年では全国で151ha造林された(農林水産省統計情報部, 1991)。韓国でも防砂林や風致林としての利用の他、材は建築・土木用、樹皮や花粉、樹脂、針葉は食用・薬用として用いられる有用樹種であり、1992年までの20年間に年平均2,800haで造林された(山林廳, 1983-1992)。

造林上の重要性から、日本においても韓国においても、クロマツの採種園が設けられており、毎年、比較的安定に結実するので、毎年多量の実験材料を得ることができ、古くから種子発芽に関しても多くの研究がなされている。

チョウセンゴヨウ

一方、チョウセンゴヨウは、中国東北部から韓半島、日本に天然分布する。日

本では本州および四国の産地に分布する希少種であるが、中国東北部、特に長白山脈、小興安嶺山脈では優占する森林が広がっていた。しかしながら、樹幹が通直であることや耐久性などの点で優れた用材となるため、重要な経済樹種として大量に伐採され、黒龍江省での優占林分面積2.1%、蓄積で3.5%にまで減少してしまっている(姜, 1982)。90年ほど前から大規模に造林されてきたが、造林技術はまだ確立されておらず、中国東北部における造林研究の重要な対象樹種である。その名の示すとおり、韓半島においても特に北部に広く分布する郷土樹種である。1991年では韓国の造林面積の27.1%を占める(山林廳, 1991)。用材としての他、種子は食用にもされる重要な経済造林樹種である。

チョウセンゴヨウの種子はたいへん大きく、合点とへそを結ぶ長径で15mm以上ある。後述するように発芽のためには長期間の発芽処理を要するため造林上発芽の段階でも改良育種の余地がある。実験研究上も発芽率がクロマツと異なり低く、つまり発芽能の個体差が大きいと、生理学的な研究材料として扱いにくい点もあるが、その大きさは、個体ごとの解析を比較的容易にするものであり、II-4に記した実験のように個体ごとの組織別の解析が可能である。

なお *P. koraiensis* の和名をチョウセンマツとしている図鑑もあるが、本論文では大井(1992)に従い、チョウセンゴヨウと記す。

種子の構造

マツ属の種子は球果の中で成熟し、秋に球果が乾燥し種鱗が開いた後に散布される。クロマツでは翼がついているため、着地までに長距離を移動することができる。チョウセンゴヨウには翼がない。種子は、種皮、雌性配偶体、胚の3つの組織に大きく分けることができる。種には、さらに外種皮と内種皮との2層からなっている。内種皮の中に雌性配偶体があり、養分を貯蔵する組織となっている。本論文では、岩波「生物学辞典」を参考にして、マツの貯蔵組織である雌性配偶体のことを胚乳と記述する。内種皮と胚乳の間には珠心の痕跡組織が薄膜状に存在する。胚乳のさらに内側に胚がある。休眠種子中の胚には、幼根と子葉が既に分化している。胚には養分が足りないものの正常に分化する能力が備わっており(Sasaki and Kozłowski, 1969)。また周囲の雌性組織から容易に分離して解析することができるので、遺伝子発現に関する研究の材料として便利である。

II マツ種子の低温湿層処理

II-1 低温湿層処理

II-1-1 低温湿層処理とその意義

農林業等で種子を発芽させる際、実際に発芽をさせる環境に種子を置く前に、人為的に発芽処理をおこなうことがしばしばある。発芽処理には休眠打破、発芽促進、発芽同調、耐性付与の4つの効果がある。前節で述べたように、種子によっては発芽に適した温度、水分、酸素、光条件が整っても発芽しない。このような狭義の休眠状態にある種子を発芽させるためには、発芽処理をおこなう必要がある。狭義の休眠を示さない種子でも広義の休眠状態にある種子は発芽環境においても発芽して芽生えが定着するまでにある程度の時間がかかる。この時間をなるべく短くし、かつ個体間の差をなくすことが発芽後の手入れの省力化や収量増加のために重要である場合にも、発芽処理をおこなう。また発芽処理を施すことによって、処理しない種子より低温あるいは乾燥した環境でも発芽できるようになることがある。

International Seed Testing Association (1985) は発芽処理を12挙げている。その内、次の6つの処理法を発芽試験の際に推奨されている種を数え上げた。

	作物・園芸種	花卉・薬草等	木本種
列挙されている総種数	300	355	120
0.2%硝酸カリウム	94	109	
濃硫酸	10		2
ジベレリン(GA ₃)	7	2	
低温湿層処理	132	237	33
高温処理(後熟)	12		
光	6	102	

人工的に休眠を打破するための発芽処理として、播種前に水分に触れた状態で低温にさらすことを低温湿層処理という。処理が比較的簡単である上、適用できる種が多いため、古くから用いられてきた。元来、湿った砂や酸性泥炭などの培土中に幾層にも種子を並べることから英語で stratification といい、日本語でも湿層という語を用いるが、積層しなくても湿潤条件下で低温にさらせば同じ効果があるので moist-chilling あるいは単に冷処理、低温処理、chilling と記されることもある。発芽のための前処理という意味で prechilling という語も同じ処理に用いられる。また低温湿層処理によってのみ発芽が誘導される種の場合には、単に後熟処理 after-ripening あるいは発芽処理、pretreatment という語を低温湿層処理を指して使っている文献もある。樹木などで耐寒性・耐凍性を高めるために成長停止後に低温にさらすことを hardening というが、この語を種子の低温湿層処理にあてている研究者もいる。

処理温度について最適温度を調べる試験が古くから為されているが、International Seed Testing Association (1985) によれば、草本では 5℃～10℃、木本で 1℃～5℃でおこない、零下にならないよう留意すべしとされている。本研究における実験では、播種した種子を 4℃に設定した冷蔵庫あるいは低温室内に置くことで低温湿層処理とした。処理期間は種によってまちまちであるが、一般に数日～数カ月で、概して大きさの大きい種子ほど長期間を要するようである。

休眠打破に低温湿層処理を要する種は多いが、処理に適した温度が芽生えの成長の最適温度であるものではなく、処理中の発芽も希である。ほとんどの種が低温湿層処理後 20～30℃の常温に移されてから発芽する。一般に、種子は水分と温度と酸素の条件が好適な場合にはじめて発芽するが、低温湿層処理を要する種子は、温度に関して不適な環境にさらされることによって休眠が打破されるという性質をもつ。

合目的的には冬の低温を検知することによって、温度が上昇した時、すなわち春になった時にすぐに発芽するための機構であると説明されている。生活史の中で種子の段階は他と比べて生存できる環境条件の幅が広く、低温に対しても大きな耐性をもっている種が多い。逆に発芽したばかりの芽生えは木化など低温に対する機構が未発達で耐性が最も低い段階である。生き残るためには温度の低い時期を種子で過ごし、発芽直後しばらくの間は常温下にあるのが望ましい。地球上の寒帯～温帯では通常低温の期間(冬)と成長に適した温度の期間(春～夏)が周期的に巡ってくるので、低温の期間が終了した直後に発芽することによって生存の

可能性を高めることができる。低温湿層処理要求性の種は、ある程度の期間の低温を検知した上で成長に適した温度条件になった時に直ちに発芽するよう適応進化したと考えられる。

休眠打破に低温湿層処理を要する種は多くの属、科にわたっており、同属内でも要する種と要さない種とがある。種内でもその要求性が、個体や休眠していた期間の長さによって異なる。表 II 1 にマツ属 *Pinus* の低温湿層処理要求性と共に短枝上に束生する針葉の数と天然分布とを示した。単維管束亜属の種は *P. aristata* と *P. peuce* を除いて、低温湿層処理をしなければ発芽しない。複維管束亜属の種は、いくつかの例外があるが、特に新鮮な種子の場合低温湿層処理なしでも発芽がみられる。採取してから貯蔵しておく処理を要するようになる種もあるが、処理不要の種も多い。分布との関係を見ると、冬の低温が過酷であると思われる高緯度地方や高地に分布する種で低温湿層処理要求性が高いことがわかる。同種でも例えば *P. ponderosa* のように緯度あるいは標高の高い地方に分布する亜種が低温湿層処理を要する。この分布との関係も、低温湿層処理要求性が芽生えを低温にさらす危険を避けることによって生存率をあげる機構であるという説の傍証となろう。

II-1-2 低温湿層処理中の変化

生物を構成している分子を特に生体分子といい、元素を生元素ということがある。生命の神秘はその編制のみにあり、個々の生体分子や生元素は無生物の分子と同じ普遍的な化学的法則に則った性質をもち反応をおこなう。一般に化学反応は温度が高いほど速く進む。生体内の反応の多くを触媒する酵素においても温度が高いほど反応は速くすすむが、ある温度以上になるとその構造を維持できなくなり、触媒として機能できなくなるので、固有の最適温度をもつ。低温側でも、一般の温度反応法則に従って活性が低下するほか、タンパク質の高次構造を維持している疎水結合力が低下し構造が消失して活性を失う場合がある。そのため生理活性には最低温度、最適温度、最高温度があり、多くの生理反応の最適温度は 30℃ 前後である。ところが生理反応の内にはもっと低い温度でのみ進む反応がある。植物では冷温障害やそれに対する耐凍・耐寒性の誘導、そして低温湿層処理による休眠打破などが知られている。一般の温度反応法則に逆らって、低温でのみ生じる反応の誘導機構は生物学上、たいへん興味ある対象であるが、未だ解明

表 II 1 マツ属の低温湿層処理要求性と分布 低温湿層処理日数は USDA Forest Service (1974) で推定される低温湿層処理期間としてまとめられているデータによる。英語の標準名と分布は同書を、日本語標準名と短枝の針葉数は上原 (1959) を参考にした。針葉数の明記されていないものは ? 印を付した。学名の括弧内は異名。

学名 (命名者名は省略)	標準名	針葉数	低温湿層処理日数 新鮮種子 貯蔵種子		天然分布
<i>Pinus edulis</i>	ビニヨン	(1)-2-(3)	0	0-60	メキシコ~米, 半乾地
<i>P. banksiana</i>	バンクスマツ	2	0-7	0-7	米北部~カナダ
<i>P. brutia</i>	カラブリアマツ	2	0	0-45	南欧~西亜
<i>P. clausa</i>	sand pine	2	21	21	米東岸, 砂地
<i>P. contorta</i> var. <i>contorta</i>	shore pine	2	0	(20-30)	米東部~アラスカ, 低地
<i>P. contorta</i> var. <i>latifolia</i>	lodgepole pine	2 ?	0	30-56	米東部~カナダ, 山地
<i>P. contorta</i> var. <i>murrayana</i>	lodgepole pine	2	0	28	米西部~アラスカ, 高地
<i>P. densiflora</i>	アカマツ	2	0	0-20	東亜
<i>P. echinata</i>	shortleaf pine	2	0-15	15-60	米中部~南部, 沿岸
<i>P. glabra</i>	spruce pine	2	28	28	米東岸, 沿岸
<i>P. heldreichii</i>	Heldreich pine	2	30-42	30-42	東南欧, 高地
<i>P. merkusii</i>	メルクシマツ	2	0	0	東南亜
<i>P. mugo</i> (montana)	モンタナマツ	2	0	0	欧州中部南部, 亜高山
<i>P. muricata</i>	ビショップマツ	2	0	20-30	米西部, 沿岸
<i>P. nigra</i> (laricio)	ヨーロッパクロマツ	2	0	0-60	西アジア~南欧
<i>P. pinaster</i> (maritima)	カイガンショウ	2	0	60	地中海沿岸
<i>P. pinea</i>	イタリアカラカサマツ	2	0	0	南欧
<i>P. resinosa</i>	red pine	2	0	60	米東部
<i>P. sylvestris</i>	ヨーロッパアカマツ	2	0	15-90	欧州~東北亜
<i>P. thunbergii</i>	クロマツ	2	0	30-60	日本, 沿岸
<i>P. virginiana</i>	virginia pine	2	0	0-30	米東岸
<i>P. halepensis</i>	アレップマツ	2-(3)	0	0	地中海沿岸
<i>P. pungens</i>	ブンゲンスマツ	2-3	0	0	米東部
<i>P. gerardiana</i>	ジラードマツ	(2)-3	0	0-30	南亜, 山地
<i>P. radiata</i>	モントレーマツ	(2)-3	0-7	7-20	米西岸
<i>P. caribaea</i>	キューバマツ	(2)-3	0	0	米東岸~中米
<i>P. attenuata</i>	knobcone pine	(2)-3	60	60	米西部
<i>P. cembroides</i>	メキシコマツ	(2)-3	0	0-30	北米西南部, 半乾地
<i>P. jeffreyi</i>	ジェフリーマツ	(2)-3-(5)	0	0-60	米西部, 山地
<i>P. canariensis</i>	キャナリーマツ	3	0	0-20	キャナリー島, 乾地
<i>P. coulteri</i>	Coulter pine	3	0	21-90	米東南部~メキシコ, 山地
<i>P. elliotii</i> var. <i>densa</i>		3 ?	0	0	フロリダ南部
<i>P. elliotii</i> var. <i>elliottii</i>	slash pine	3 ?	0	15-60	米南部, 沿岸
<i>P. insularis</i> (khasya)	カシアマツ	3	0	0	東南亜~南亜
<i>P. palustris</i>	ダイオウショウ	3	0	0-30	米南部
<i>P. ponderosa</i> var. <i>ponderosa</i>		(2)-3-(5)	0	30-60	米東南部~カナダ南部
<i>P. ponderosa</i> var. <i>arizonica</i>	Arizona pine	3 ?	0	0	メキシコ~米東南部
<i>P. ponderosa</i> var. <i>scopulorum</i>		3 ?	0	20-60	メキシコ~米東南部, 山地
<i>P. rigida</i>	リギダマツ	3	0	0-30	米東北部~東南部, 山地
<i>P. roxburghii</i> (longifolia)	ヒマラヤマツ	3	0	0	南亜モンスーン地帯

表 II 1 マツ属の低温湿層処理要求性と分布 (つづき)

学名	標準名	針葉数	低温湿層処理日数		天然分布
			新鮮種子	貯蔵種子	
<i>P. sabiniana</i>	サビンマツ	3	60-120	60-120	全米乾燥地
<i>P. taeda</i>	テーダマツ	3	30-60	30-60	米東南部, 沿岸
<i>P. serotina</i>	pond pine	3-(4)	0	0-30	米東部, 沿岸
<i>P. engelmannii</i>	Apache pine	3-(4-5)	0	0	メキシコ
<i>P. patula</i>	Mexican weeping pine	3-4-5	60	60	メキシコ
<i>P. cembroides</i> var. <i>parryana</i>	Parry pinyon	4 ?	0	0-30	米西南部, 半乾山地
<i>P. monophylla</i>	アメリカヒトツバマツ	1-(2)	28-90	28-90	全米, 半乾山地
<i>P. albicaulis</i>	シロカワゴヨウ	5	90-120	90-120	米西南部, 亜高山
<i>P. aristata</i>	bristlecone pine	5	0	0-30	米南部, 亜高山
<i>P. armandii</i>	タカネゴヨウ	5	90	90	台湾~中国北部, 中高地
<i>P. balfouriana</i>	foxtail pine	5	90	90	米西部, 亜高山
<i>P. cembra</i>	ヨーロッパハイマツ	5	90-270	90-270	アルプス
<i>P. cembra</i> var. <i>sibirica</i>	siberian stone pine	5 ?	60-90	60-90	シベリア
<i>P. flexilis</i>	シナヒマツ	5	21-90	21-90	米東部山地~カナダ, 亜高山
<i>P. flexilis</i> var. <i>reflexa</i> (<i>strobiformis</i>)		5 ?	60-120	60-120	メキシコ~米東南部, 山地
<i>P. koraiensis</i>	チョウセンマツ	5	90	90	東北亞, 山地
<i>P. lambertiana</i>	ナガミマツ	5	60-90	60-90	北米南西部, 山地
<i>P. monticola</i>	モンティコラマツ	5	30-120	30-120	米西部
<i>P. parviflora</i>	ヒメコマツ	5	90	90	日本, 山地
<i>P. peuce</i>	マケドニアマツ	5	0-60	60-180	バルカン半島, 高山
<i>P. pumila</i>	ハイマツ	5	120-150	120-150	東北亞
<i>P. strobus</i>	ストロブマツ	5	60	60	米北東部
<i>P. torreyana</i>	Torrey pine	5	30-90	30-90	カルフォルニア
<i>P. wallichiana</i> (<i>excelsa</i>)	ブータンマツ	5	0-15	15-90	ヒマラヤ

されていない。

Drost-Hansen and Thorhaug (1969) は植物の様々な生理現象の転換点が15°C付近にあることと、純水の高次相転移点が15, 30, 45, 60°Cにあることとの関連を推論している。生体膜を形成する脂質も高温では流動性の高い液晶状態にあるが温度が下がるとゲル状態に相転移する。相転移を起こす温度は脂肪酸鎖の組成によって異なってくるが、15°C付近で生じることもあり得る。H⁺-ATPアーゼが低温でサブユニットに分かれることが知られている。H⁺-ATPアーゼが失活することによって細胞質から液胞へのH⁺の輸送がなくなり細胞質が酸性化すると考えられる (Yoshida *et al.*, 1989)。作物の耐凍・耐寒性については多くの研究がなされており、低温によってのみ誘導される遺伝子もいくつか同定されている。遺伝子の発現を含め、これらの相転移やタンパク質の構造変化との関連で低温によって生じる反応がいろいろ調べられているが(例えば Lyons and Raison, 1970; Murata and Yamaya, 1984)、現在のところ、低温がそれらの反応を誘導する機作はわかっていない。

低温湿層処理によって休眠が打破される機構を知るために、古くから処理中に生じる種子内の変化が研究されてきた。今までに知られている変化としては、貯蔵物質の分解などに関する酵素活性の増加、呼吸の増加、遺伝子の発現、発芽抑制効果をもつアブシジン酸の減少、発芽促進効果をもつジベレリンの増加、pHの低下などがある。いずれの研究でも、ある特定の種についてある特定の変化を追ったもので、その種子の処理中に生じている変化を総合的に調べたものは少ない。対象としてカエデ属 *Acer*、ハシバミ属 *Corylus avellana*、リンゴ *Malus domestica*、セイヨウナシ *Pyrus communis* を用いた研究は多く、様々な変化が報告されているが、一つの研究グループが一つの種について検討した例はほとんどない。

低温湿層処理の場合、処理前と比べ処理中の種子は低温という条件だけでなく湿潤条件にもさらされている。様々な変化の内には、低温条件によって誘導されるものと湿潤条件によって誘導されるものとが混在しており、低温湿層処理によってのみ誘導される変化を調べるには常温で湿潤という条件での対照実験が必要である。ところが様々な変化を調べた研究にはこの対照が欠如しているものが多い。例えば酵素について、低温条件下で活性が高くなる酵素はいくつか報告があるが、低温湿潤条件下にあった組織内で高い酵素活性が生じているのを示したものがほとんどである。低温湿層処理中に種子が低温を検知して初めて生じた変化なのか、

単に吸水によって生じた変化なのか定かでないものも多い。

本研究では、実験材料をクロマツとチョウセンゴヨウの種子に限り、それらの種子で低温湿層処理中にどのような変化が生じているかを、常温で吸水させた場合と比較しつつ検討する。

II-2 クロマツでの低温湿層処理の効果と遺伝子発現

II-2-1 クロマツの低温湿層処理

クロマツ種子は低温湿層処理をしなくても発芽する(表II 1)。しかしながら、低温湿層処理の他の効果である発芽促進効果はクロマツにおいても認められるといわれている。

クロマツの低温湿層処理に関しての古い報告としては Barton (1930) のものがあり、それ以降のいくつかの文献に引用されているが、最終的な発芽率が40%以下で一般的にいわれている発芽率より低いので、そこに示されているデータは信頼性に乏しい。

郷 (1956) のデータでは、平均発芽日数が無処理で10.1日だが、低温湿層処理の期間が長いほど短くなり3か月の処理で6.3日になる。また最終的な発芽率も無処理より高くなる(90%以上)。他にも発芽促進効果についていくつか報告があるが(Asakawa, 1959b; 浅川・桂司, 1966), 発芽条件などによって発芽速度が変わるので効果の程は報告によってまちまちである。

低温湿層処理がクロマツの発芽におよぼす影響としては光処理との相関も知られている。長谷川・古川 (1955) や Asakawa (1959b) は、低温湿層処理をすると暗黒下での発芽(暗発芽)が増加すると報告している。Asakawa and Inokuma (1961) は光質と発芽の関係を調べ、低温湿層処理をすると遠赤色光照射による発芽阻害が見られないことから、低温湿層処理によって光感受経路以外の経路がすすむと考察している。Sasaki and Asakawa (1974) は発芽処理以前の種子の調製も暗黒下でおこなった場合、暗発芽しなくなることから、クロマツ種子は光感受性種子であり乾燥状態でも露光に感応することを見だし、それ以前の実験は光前歴を考慮にいれていないものであると指摘したが、低温湿層処理をすると発芽率は低いものの暗発芽することも記している。低温湿層処理によって光処理の効果が増幅さ

れ、また一部代換経路がすすむのは確かであろう。

処理中の変化として、低温湿層処理中に発現してくる遺伝子があることがいくつかの種で報告されている。しかしながら、その内のいくつかの実験はRNA総体の量的変化をみたものであったり、翻訳産物を比較したものであったりして、実際に低温下で生合成されたものであるか疑念をさしはさむ余地のあるものもある。Ⅲ章でみるように予め生合成されたRNAが翻訳活性を抑えられた形で休眠種子に存在しており、このRNAの翻訳活性が増加しただけの可能性もある。またRNAの抽出収率が吸水前後あるいは発達段階で異なる可能性もあり、蓄積量の増加だけを生合成の根拠とするのは危険である。

本節では、まず、本実験で用いるクローンの種子と処理条件における、発芽日数と発芽後の成長におよぼす低温湿層処理の影響を調べた(実験ⅡA)。次に低温下でも遺伝子の発現があるかどうかを、RNAの標識前駆体を取り込ませるといふ、生合成をより直接的にみる方法で調べた(実験ⅡB)。

Ⅱ-2-2 <実験ⅡA, B>の材料と方法

種子と発芽試験

1988年10月に茨城県林業試験場のクロマツ精英樹採種園で採取したクロマツ *Pinus thunbergii* Parl. のクローン高萩1号の種子を用いた。採取した球果を温室で乾燥し種鱗を開かせ、種子を集めた。種子は翼を取り除いた後、密閉容器に入れ、実験に供するまで冷蔵庫(4℃)に貯蔵した。

乾燥種子の個々の重さを計測し、10mg以下の種子は不充実種子(シイナ)であるとみなし除いた。充実種子52粒ずつをプラスチック容器内の0.8%寒天培地上に播種した後、乾燥しないよう容器に蓋をして冷蔵庫(4℃)において低温湿層処理とした。0日、11日間、26日間、177日間の低温湿層処理をおこなった後、植物育成チャンバー(25℃、18時間明 5,000lx/6時間暗)内で発芽させた。各個体の発芽した日を記録した。各処理の発芽数が増えなくなった時点で発芽試験をやめ、寒天培地の表面を境にして芽生えを地上部と地下部に分け、水滴や寒天を拭き直ちにそれぞれの生重を測定した。なお117日間低温湿層処理した種子は他の処理種子と異なり、処理前の重さを計らなかつた。またこの117日間低温湿層処理種子にかぎり、防菌のため低温湿層処理前に0.5%ベンレート(Dupont社)懸濁液中で1時間室温で攪拌した後、1時間水道水で水洗した。

胚内への標識ウリジン吸収

種子から胚を傷つけないよう留意しながら摘出し、18.5MBq/mlの $[5,6-^3\text{H}]$ ウリジン水溶液、あるいは28MBq/mlの $5'-[^{32}\text{P}]$ ウリジン三リン酸水溶液に浸して吸水させた。純水で胚の表面を洗浄した後、RNAを抽出した。

RNAの抽出

RNAはYamamoto *et al.* (1991)の方法で抽出した。①0.2~1.0gの試料を、液体窒素存在下で破碎せずに1.5ml抽出用緩衝液[0.1Mトリス-塩酸(pH9.0), 1% SDS, 1%アスコルビン酸ナトリウム, 5%メルカプトエタノール]および1.5mlフェノール・クロロホルム混液中で、超高速ホモジナイザー(ポリトロン)を用いて破碎、懸濁した。②遠心分離した後、水相を等容量のフェノールでさらに2回抽出した。③最後に得られた水相を、5.7M塩化セシウム溶液に重層し、BECKMAN TLA 100.3ローター、100,000rpmで、10°C、20時間遠心分離した。④生じた沈澱を20Mトリス-塩酸(pH7.5)、1mMEDTAに溶解し、2M塩化リチウムによる塩析をおこない、-20°CのエタノールでRNAを沈澱させた。この操作を2度繰り返しRNAを精製した。

オートラジオグラフィー

抽出したRNAの一部をFourney *et al.* (1988)の方法に従ってホルマリン・アガロースゲル電気泳動で分離し、ナイロン膜(PAL社 BIODYNE)に転移させた。ナイロン膜を2時間80°Cに熱してRNAを定着させた後、エックス線フィルム(FUJIRX)に密着させて感光させた。 ^3H で標識したRNAの場合は増感させるため、EN³HANCE Spray(DUPONT社)を3回吹き付けた後、同様にエックス線フィルムを感光させた(厳密にはフルオログラフィーと呼ばれる手法)。

RNA-DNAハイブリダイゼーション

8つのプラスミド(pPS1, pPS5, pPS13, pPC27, pPDSSU4, pPDLHC2176, pKS25S, pPR36)0.6 μg から適当な制限酵素で挿入部分を切りだしアガロース電気泳動法で分離しナイロン膜に転移させ、2時間80°Cに熱して定着させた。ナイロン膜を50%ホルムアミド、5 \times SSPE[0.2Mリン酸一ナトリウム, 3M塩化ナトリウム, 20mMEDTA], 0.1%SDS, 0.1mg/mlサケ精子DNA, 5 \times デンハルト溶液に

浸して、減圧し脱気した。42℃で数時間保温した後、抽出した標識RNAをさらに加え、42℃でナイロン膜上のRNAとの対合をおこなわせた。2×SSC、0.1% SDS 溶液中で短時間洗浄した後、50℃の0.5×SSC、0.1% SDS 溶液中で30分、42℃の0.1×SSC、0.1% SDS 溶液中で30分間振盪しながら洗浄。風乾後、エックス線フィルム(FUJI RX)に密着させオートラジオグラフィをおこなった。

II-2-3 〈実験II A〉 低温湿層処理の効果

クロマツについて、低温湿層処理が発芽速度、最終的な発芽率、発芽後の成長に及ぼす影響を調べた。

播種した種子を植物育成チャンバーに入れ、発芽に適した光・温度環境下においても幼根の出現(この時点を発芽とする)まで、しばらく時間を要する。この時間は個体差があるが、低温湿層処理の期間が長い程、発芽までに要する時間が短くまた均一であった(図II 1)。特に117日間処理したものではたいへん早く発芽した。吸水前の乾燥種子重と発芽に要する時間に相関はみられなかった(図II 2上)。

各処理のすべての個体は、発芽日に関わらず同時に発芽試験を終了し、生重量と地上部 地下部比とを測定した。すなわち同じ処理の中でも個体によって発芽後の日数が異なる時点の値を得ている。そこで発芽後の日数の順に各測定値を並べることによって各処理の個体群の発芽後の変化を見ることができると考えた(図II 2)。

生重量は、次第に増加していくが、乾燥時に重い種子ほど発芽後も重くなり、乾燥種子重が軽いものは80mg程で増加しなくなり頭打ちの様相を呈した(図II 2上)。この段階ではまだ子葉が胚乳から抜け出しておらず、胚乳からの養分に頼って成長しているため、胚乳の蓄えの少ない個体、すなわち乾燥時重が軽い個体ほど十分に成長できないのだろう。発芽後の生重の増加パターンに低温湿層処理の影響はみられなかった。

地上部生重の地下部生重に対する比率は、3倍から10倍以上まで幅広い個体差があり、発芽後の時間経過に伴うばらつきの違いはほとんどみられなかった(図II 2下)。また低温湿層処理の影響も乾燥時重との相関もみられなかった。

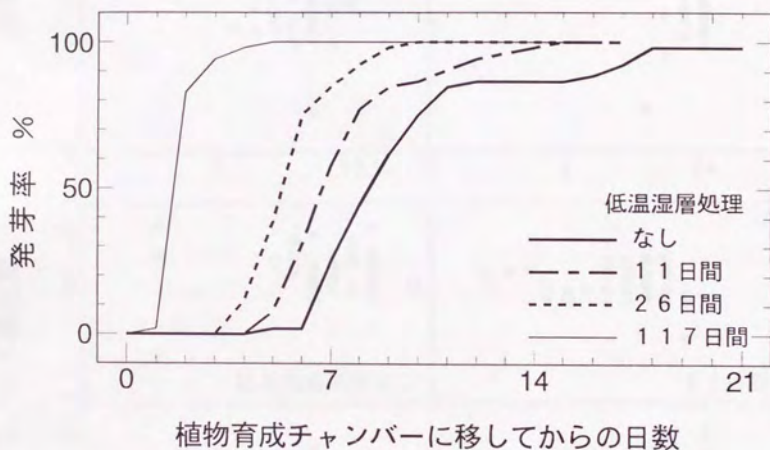
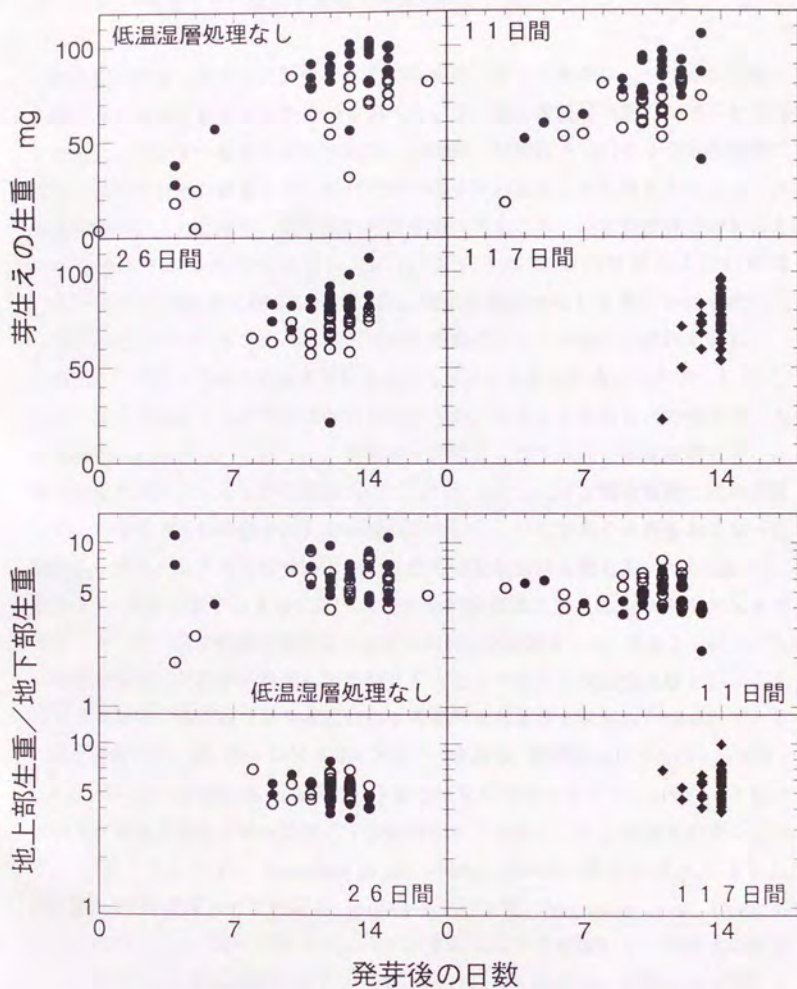


図11 低温湿層処理による発芽促進効果 0~117日間の低温湿層処理(4℃)の後、植物育成チャンパー内(25℃)で発芽させた。低温湿層処理117日のものについては処理前に室温で防菌処理をおこなった。



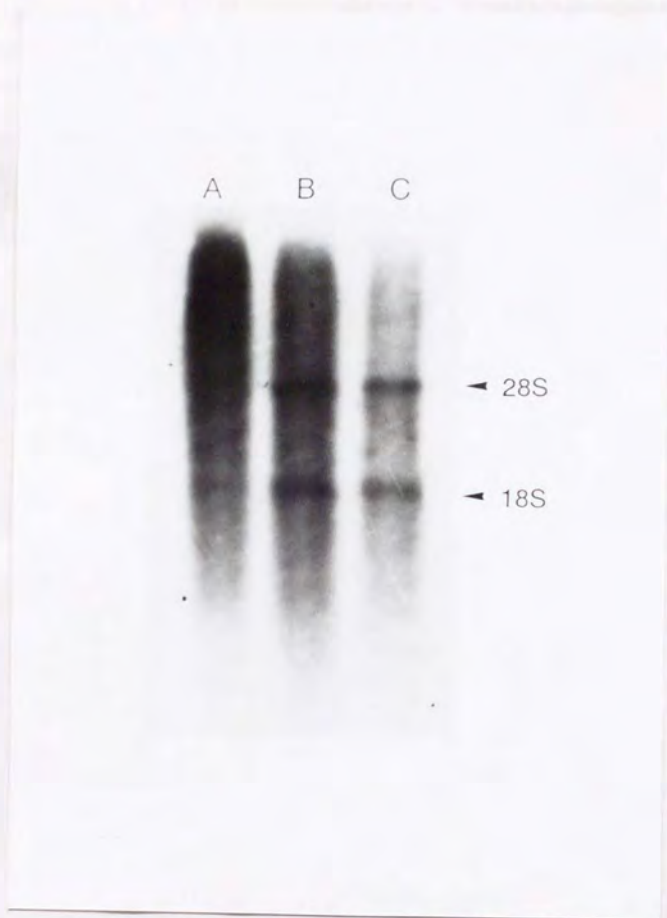
図Ⅱ 2 発芽後の成長と低温湿層処理との関係 図Ⅱ 1 に記した発芽試験の最終日に芽生えの地上部と地下部の生重を測定し、芽生え全体の生重(上)と地上部/地下部比(下)を各個体の発芽後の日数に対してプロットした。乾燥時の重量が20mg以上の個体は●、20mg未満の個体は○で表した。低温湿層処理117日のもの(◆)は乾燥種子重を測定しなかった。

II-2-4 〈実験 II B〉低温下での rRNA の生合成

雌性配偶体から抽出した胚をウリジン水溶液に浸した場合に、ウリジンが取り込まれ RNA が合成されるか否かを調べた。5 日間低温湿層処理した種子から胚を抽出し、30 粒ずつをそれぞれ 6 時間、12 時間、24 時間 [^3H]ウリジン水溶液に浸して 25°C の暗所に静置した。それぞれの種子から抽出した RNA をアガロース電気泳動法により分画し、放射能の分布を調べたところ、いずれの種子の RNA にも標識ウリジンが取り込まれていた(図 II 3)。また 12 時間および 24 時間 [^3H]ウリジン水溶液に浸した種子では、電気泳動度からして明らかにリボソーム RNA [rRNA] と考えられる RNA に標識ウリジンが取り込まれていた。

抽出した胚でも標識前駆体を取り込んで RNA を生合成することが判ったので、次に低温下でも RNA が生合成されるかどうか、されるとしたらどのような RNA を抽出した胚を用いて調べた。乾燥種子 20 粒および 1 週間の低温湿層処理した種子 20 粒の胚を 3~4°C の低温室内で [^{32}P]ウリジン三リン酸水溶液に 22 時間浸した。乾燥種子 20 粒の胚を 25°C で同様に処理した。25°C で取り込みをおこなった胚から一番多くの RNA が抽出でき、またその比放射能も最も高かった(表 II 2, 図 II 4)。低温で取り込ませた胚では予め低温湿層処理をした方が多く RNA が抽出できたが、比放射能は処理をしなかった胚の方が高かった(表 II 2, 図 II 4)。

低温で標識した胚から抽出した標識 RNA と 7 つの cDNA および rDNA との対合を試み、各々の cDNA に対応する RNA および rRNA が含まれているか否かを調べた。用いた cDNA は以下の 7 つである。貯蔵型 mRNA の cDNA ; pPS1, pPS5, pPS13(III-2 参照), 子葉の mRNA の cDNA ; pPC27, クロマツの光合成関連遺伝子の cDNA ; pDSSU4(リブローズニリン酸カルボキシラーゼの小サブユニット; Yamamoto *et al.*, 1988b), pPR36(同大サブユニット), pDLHC2176(集光性クロロフィル *a/b* 結合タンパク質; Yamamoto *et al.*, 1988a) および rDNA ; pKS25S(リボソームの大サブユニットを構成する rRNA の鋳型となる DNA)。低温湿層処理をした種子胚の RNA はどの cDNA や rDNA とも対合が検出されなかった(図なし)。予め低温湿層処理をしなかった乾燥種子の RNA は、低温で吸水させたものも 25°C で吸水させたものも rDNA との対合が見られた(図 II 5)。



図II 3 25°Cで標識ウリジンを吸収した摘出胚で生合成されたRNA 5日間低温湿層処理した後、摘出した胚に、 $[^3\text{H}]$ ウリジンを25°Cの暗所で6時間(A)、12時間(B)あるいは24時間(C)吸収させた。抽出したRNAをホルマリン・アガロース電気泳動で分画しオートラジオグラフィーで可視化した。矢尻は分子量標準用のrRNAの泳動位置を示す。

表 II 胚内へのRNAへの ^{32}P ウリジンの取り込み 5日間低温湿層処理後の種子あるいは乾燥種子から胚を抽出し ^{32}P ウリジン溶液に22時間浸した。胚から抽出したRNAの量を A_{260} から算出し、またトリクロロ酢酸沈澱物の放射能を測定した。

低温湿層処理	取り込み時の温度	RNA収量	^{32}P 取り込み量	RNAの比放射能
無処理	3~4℃	9.5 μg	$1.00 \times 10^6 \text{cpm}$	$1.05 \times 10^4 \text{cpm}/\mu\text{g}$
1週間	3~4	1.38	0.24×10^6	0.17×10^4
無処理	25	1.56	2.33×10^6	1.50×10^4

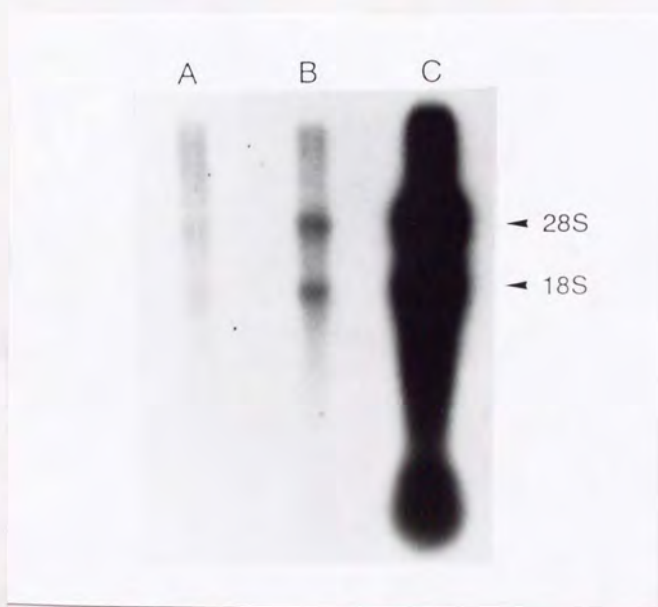
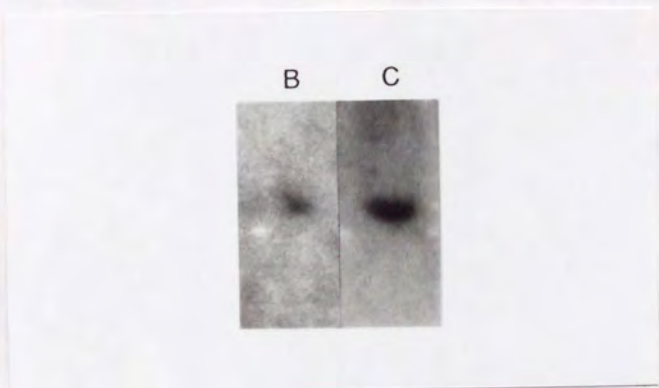


図 II 4 抽出胚で生合成されたRNA 1週間低温湿層処理した種子(A)および乾燥種子(B,C)から抽出した胚に、 ^{32}C ウリジン三リン酸を3~4℃(A,B)あるいは25℃(C)の暗所で22時間吸収させた。抽出したRNA $2 \mu\text{l}$ ずつをホルマリン・アガロース電気泳動で分離しオートラジオグラフィーで可視化した。矢尻は分子量標準用のrRNAの泳動位置を示す。



図II 5 低温で生合成された rRNA 乾燥種子から抽出した胚に, $[^{36}\text{C}]$ ウリジン三リン酸を $3\sim 4^\circ\text{C}$ (B)あるいは 25°C (C)の暗所で 2 時間吸収させた(図 II 4 と同じ)。抽出した RNA と rDNA (pKS25S) とのハイブリダイゼーションをおこない対合した rRNA をオートラジオグラフィーで可視化した。

II-2-5 実験結果のまとめと考察

従来言われているようにクロマツの発芽においても低温湿層処理は効果があることが示された。温度と光の環境が発芽に好適になってから発芽する(幼根の出現)までの時間は個体差があるが、低温湿層処理をすると個体差が減少しその時間が短くなった(図9)。しかし郷(1956)の報告とは異なり、最終的な発芽率の向上は見られなかった。またIII-3で述べるように、低温湿層処理によって古種子の発芽率を上げることもできなかった(表III 6)。

郷(1956)はクロマツの発芽過程を、その吸水比が1)急速に上昇をしめす過程 2)ゆっくり上昇する過程 3)急激に上昇する過程の3段階に分けている。このうち発芽日数の個体差は第2段階の長短にあり低温湿層処理によって発芽日数が均一になる理由として、処理中にこの第2段階が進行し終わり、好適な温度になった時に揃って第3段階に進むためであるとしている(郷, 1956)。重さの小さい種子ほど胚と種皮の比率が大きく吸水比が大きいため(郷, 1956)、種子の重さによって低温湿層処理の影響が異なる可能性が考えられたが、本実験では種子の重さと発芽日数とは相関が見られなかった(図II 2)。ただ軽い種子では芽生えの重さも大きくなれないことが明らかになった(図II 2)。これは軽い種子は胚乳が小さいので(郷, 1956)、胚乳に貯蔵されている養分だけで成長している段階の芽生えの成長が制限されるためであろう。

Asakawa (1959a)はサトウマツの胚の上長成長と幼根の成長を調べた結果から低温湿層処理の主要な効果は幼根の成長にあずかる代謝系を活性化することでであると結論している。クロマツにおいても低温湿層処理が発芽後の成長に何らかの影響を及ぼす可能性があると考えたが、本実験では発芽後の生重の変化あるいは地上部(胚軸+子葉)と地下部(幼根)の生重比に低温湿層処理の影響は表れなかった(図II 2)。クロマツ種子の発芽に及ぼす低温湿層処理の効果は発芽前の変化にのみあり、発芽後の成長は処理の有無に影響されならしい。

クロマツでは低温湿層処理をしなくても発芽することや、少なくとも本実験の結果を見る限り発芽力にほとんど影響がないこと、発芽後の成長にも影響がないことを考え合わせると、クロマツ種子の場合の低温湿層処理は、何らかの生理的变化を積極的に誘導するのではなく、処理しない場合も起こる休眠から発芽への変化のうち、吸水さえしていれば低温でも起こり得る変化を起こしているだけであると考えられる。

本実験では低温湿層処理中に起きる変化としてRNAの生合成を調べた。低温湿層処理前のクロマツ種子には既にrRNAや貯蔵型mRNAが存在することがわかっているが(Yamamoto, 1982), 既に存在している物質の新たな生合成の有無を調べるには、蓄積量の変化を調べるか、標識した前駆体の取り込みを調べるかの2つの方法が考えられる。RNAの蓄積量を推測する方法としては、抽出したRNAの吸光による定量、抽出したRNAとDNAとの対合形成量の測定等があるが、低温下で生合成されるRNAはあったとしてもわずかであると考えられ、またクロマツ種子の場合、RNA抽出の収率が安定しないので、どの方法も有為な蓄積量の変化が求められないと考えられる。もう一方の標識前駆体の取り込みは、生合成量を求めるにはふさわしくないが、わずかな量でも生合成されていれば検出できると考えられる。ただクロマツ種子の場合は種皮と胚乳が胚を厚く覆っているため、標識前駆体が胚まで吸収されていくか定かでない。マツ種子の胚は胚乳から取り出しても正常に分化する能力をもっている(Sasaki and kozlowski, 1969)。遺伝子発現に関しては胚を胚乳から取り出してもあまり違いがないと考え、摘出した胚に標識前駆体を取り込ませる実験をおこなった。

標識前駆体にはウリジンとウリジン三リン酸を用いた。ウリジンはウリジンキナーゼが触媒してウリジル酸になり、さらにウリジン二リン酸キナーゼとウリジン三リン酸キナーゼによりウリジン二リン酸を経てウリジン三リン酸になる。ウリジン三リン酸は、RNAの直接の前駆体で、RNAポリメラーゼの働きによって他のリボヌクレオチドと共にRNAへ取り込まれる。放射性同位元素で標識したウリジンあるいはウリジン三リン酸を吸収させた組織から放射性のRNAが抽出されれば、この組織はRNAを生合成しているといえる。

実験の結果、摘出した胚から放射性のRNAが検出された(図II 3, 表II 2)。つまりウリジンは摘出した胚に吸収され、前述の諸酵素が正常に機能してRNAが生合成されることが明らかになった。Brocklehurst and Fraser (1980)はニンジン種子を用いた実験で放射性ウリジンの吸収・取り込みに失敗したことを述べているが、本実験では放射性ウリジンを胚が吸収しRNAに取り込んだ。既に1週間吸水してあった種子より乾燥種子の胚の方が標識前駆体を多く含むRNAを生合成したのは、1週間吸水させた種子はゆっくり吸水する段階にあり、標識前駆体が細胞内にあまり吸収されなかったためであろう。

低温下で同様にウリジン三リン酸を吸収させた実験でも放射性RNAが検出された(図II 4)。低温下でもRNAポリソームが機能してRNA生合成がおこなわ

れていることが証明された。同じくらい吸収したと思われる乾燥種子でも25℃で取り込みをおこなった胚の方が低温で取り込ませた胚より標識前駆体のRNAへの取り込み量が多かったのは、高温の方がより多くRNAを生合成するためと考えられる。

貯蔵タンパク質はタンパク質分解酵素が触媒してアミノ酸に分解されて転流する。低温湿層処理中の変化として、貯蔵タンパク質の減少や可溶アミノ酸の増加がシナノキ属 *Tilia americana* (Pitel *et al.*, 1989) や *Pinus lambertiana* (Stanley, 1958), *P. strobus* (Koblet, 1932), ハナウド属 *Heracleum sphondylium* (Stokes, 1953) で報告されている。*Maizs domestica* では貯蔵タンパク質が分解することが組織化学的に観察されており (Dawidowicz-Grzegorzewska and Zarska Maciejewska, 1979), タンパク質分解酵素の活性の増加も報告されている (Lewak *et al.*, 1989)。同酵素活性の増加は *Acer fiatanoides* でも示されている (Davies and Pinfield, 1980)。脂肪種子の貯蔵養分の分解を触媒するリパーゼ活性とグリオキシル酸回路の酵素イソクエン酸リアーゼ活性の増加がハシバミで示されている (Li and Ross, 1990)。Zarska-Maciejewska *et al.* (1976) はリンゴの酸性リパーゼ活性の最適温度が5℃であることや、発芽促進ホルモンであるジベレリンによって同酵素活性が増加することから、酸性リパーゼによる貯蔵脂肪の分解促進が低温湿層処理の主効果であると推察している (Zarska-Maciejewska *et al.*, 1980)。分解されて生じた糖などの異化に関する酵素活性の増加も低温湿層処理中の変化として報告されている。種子の休眠打破に伴う変化として、通常解糖系ではなくペントースリン酸回路を経由する系の賦活化が知られているが、*Tilia americana* (Pitel *et al.*, 1989) や *Corylus avellana* (Gosling and Ross, 1990) ではペントースリン酸回路の酵素、グルコース6リン酸脱ヒドロゲナーゼとホスホグルコン酸脱水素酵素の活性が処理中のみ増加する。低温湿層処理中の酵素活性の増加としては上述の酵素の他、様々な好氣的な酸化反応に共役的に寄与すると考えられるカタラーゼとペルオキシダーゼの活性増加が今世紀初頭から知られており (畑野, 1967 の総説)、近年では *Pyrus communis* などで報告されている (Rychter and Lewak, 1971; Lewak *et al.*, 1975; Tao and Khan, 1976)。しかしながら、いずれも低温でのみ増加するのか常温吸水でもみられる現象なのかは報告されていない。

このように発芽に関連する酵素の活性が低温湿層処理中に増加する。酵素活性の増加は、既に合成され貯蔵されていた酵素の活性化あるいは、遺伝子発現による新たな酵素の生合成を示唆している。休眠打破前に不活性化された酵素の存在

を調べた報告は見あたらない。一方、遺伝子の発現に関してはいくつかの植物種で調べられている。

抽出したタンパク質の解析から、モモ *Prunus persica* では低温湿層処理前後でタンパク質の構成が変化しており、遺伝子が発現していることが示唆された (Mahhou and Dennis, 1994)。処理に伴うタンパク質合成能の増加は *Acer saccharum* (Hance and Bevington, 1992) や *Pyrus communis* (Alscher-Herman and Khan, 1980) でみられる。Whitmore(1991)は *Pinus strobus* から抽出した mRNA の翻訳産物を比較して低温湿層処理前後であまり変化のないことから、翻訳活性の増加が低温湿層処理の主要な効果であると考察している。一方、ダグラスファー *Pseudotsuga menziesii* 種子で同様の実験をした Taylor *et al.* (1993) は翻訳産物の構成に大きな変化があったことから、mRNA の構成の変化も低温湿層処理の効果であるとしている。

処理中に全核酸量が増加することは *Acer platanoides* (Davies and Pinfield, 1979), *Pyrus communis* (Jarvis and Shannon, 1981), トネリコ属 *Fraxinus excelsior* (Villiers, 1972) で報告されている。特にハシバミ属 *Corylus avellana* では RNA が生合成されていることが示された (Wood and Bradbeer, 1967)。

本研究でも、常温吸水時よりも少量ではあるが、低温湿層処理中にクロマツ種子胚内で RNA が生合成されていることを示唆する結果が得られた。休眠種子中にも RNA が存在しているが(Ⅲ章参照)、発芽期に RNA が新たに合成されることによって、発芽が速やかにおこなわれると考えられる。常温吸水でも RNA が多量に合成されるが、低温湿層処理中にも RNA が生合成されれば、常温に移した後の発芽までに要する期間は短くなると考えられる。クロマツにおける発芽促進に関与する低温湿層処理中の変化は、常温でも低温でも生じ得るものであると考察したが、その変化の候補として RNA の生合成は有力である。

また rDNA とのハイブリダイゼーション実験により、抽出した胚で低温下で生合成された RNA には rRNA が含まれていることが明らかになった(図Ⅱ 4, Ⅱ 5)。同時に貯蔵型 mRNA 等の mRNA の検出も試みたが、確認できなかった。rRNA は一般に mRNA より多量に生合成されているものなので、本実験の結果 rRNA だけが検出されたからといって、実際に rRNA だけが生合成され mRNA が生合成されていないということとはできない。実験の検出限界を下回る量の mRNA が生合成されている可能性がある。

Corylus avellana では低温湿層処理中に転写酵素が増加し、RNA が合成され

ているものの、その大部分は rRNA であり (Wood and Bradbeer, 1967)、また *Acer platanoides* では mRNA はむしろ減少していることから (Slater and Bryant, 1982)、低温湿層処理の効果は mRNA の情報を翻訳シタンパク質の生合成をする機構の増加にあるという説がある (Wood and Bradbeer, 1967; Slater and Bryant, 1982)。トマト *Lycopersicon esculentum* でも低温湿層処理中に rRNA が増加するという報告があり (Coolbear *et al.*, 1990)、また rRNA 前駆体の貯蔵部位である核小体が低温湿層処理中に発達するという *Fraxinus excelsior* での研究 (Villiers, 1972) も低温湿層処理中に rRNA が合成されるという説を支持するものであろう。ただトマト種子では処理中の転写酵素の活性が低いことから処理前に断片化していた rRNA の補填が低温湿層処理中になされると Coolbear *et al.* (1990) は考察している。低温湿層処理が直接 rRNA の合成を誘導しているとは限らない。コムギ *Triticum aestivum* では処理中に RNA の前駆体であるヌクレオシド三リン酸が増加するという報告があり (Cheung and Sukdolnik, 1978)、前駆体の欠乏が解消されて RNA の合成が始まるのかもしれない。

またタンパク質合成に関与するアミノアシル tRNA 合成酵素活性の増加も *Pyrus communis* で示されている (Tao and Khan, 1974)。

ライムギ *Secale cereale* (Roberts *et al.*, 1973) やアカエンドウ *Pisum arvense* (Bray and Chow, 1976)、タバコ *Nicotiana tabacum* (Brocklehurst and Fraser, 1980) の種子内 rRNA の崩壊の程度と、発芽率あるいは発芽速度とに相関があり、無傷の rRNA が多いほど速く発芽することが示されている。これらの結果は、rRNA の増加が発芽促進に寄与することを示唆している。発芽時に機能するタンパク質の生合成が正常なリボソームによって滞りなく進むためであろう。

本実験は摘出胚を用いたため低温湿層処理中の種子内での変化とは異なる可能性もあるが、摘出した胚でさえ生じていた低温下での RNA の生合成が無傷胚の中でもおこなわれていることは十分に考えられ、特に rRNA が生合成されているという結果は、クロマツにおいても、低温湿層処理の効果は、RNA 生合成の活性化や、mRNA の情報を翻訳シタンパク質の生合成をする機構の増加にあるという説があてはまることを証明するものであろう。

以上を要するに、クロマツ種子において、低温湿層処理は発芽を促進し発芽日を揃える効果をもつ。処理中には吸水さえしていれば低温でも進む変化が種子内で起きていると考えられ、その変化の候補として rRNA の生合成が示唆された。リボソームの生合成がおこなわれることによって、光と温度の条件が好適になっ

た時に速やかに発芽が進むと考えられる。

II-3 チョウセンゴヨウでの低温処理の効果

II-3-1 チョウセンゴヨウの発芽処理

チョウセンゴヨウ種子は、発芽処理をおこなわなくては発芽しない。処理方法としては、低温湿層処理が有効であるが、長時間を要する。概して処理期間が長いほど発芽率は高くなるが、浅川の研究によると、採種年や母樹によってその効果は異なり、2℃で処理した場合、2カ月の処理で発芽率30%に達することもあれば、5カ月でも20%に満たないこともある。さらに発芽率を上げるには高温と低温に交互にさらす変温処理が効果があり(浅川, 1963)、播種後2カ月25℃においてから2℃に移し、3カ月経てから25℃に移すと65%以上の発芽率が得られる(Asakawa, 1955)。

変温処理を施した種子の場合、処理後の温度は8℃~25℃の範囲で高いほど発芽率が高い(浅川, 1963)。また低温に長期間おいても発芽しないが、寒天床に播種後25℃においた後に4℃に移すとわずかながら4℃下でも発芽が観察される。

これらの発芽特性は、クロマツとは異なりチョウセンゴヨウの場合、休眠している種子が発芽に到るには、低温で生じる変化と常温で生じる変化の両方が起きなければならないことを示している。本研究では低温で生じる変化について、胚および胚乳で生じるものと、それらを取り囲む種皮で生じるものと、それぞれを調べた。

まず本節では種皮を除去した場合と無酸素条件下での発芽を低温湿層処理の影響とともに調べた。

II-3-2 <実験II C, D>の材料と方法

種子と発芽

東京大学農学部附属北海道演習林の外国樹種見本林で1991年10月に採取したチョウセンゴヨウ *Pinus koraiensis* Sieb. et Zucc. の母樹クローンV-138あるいは1992年10月に拾取した母樹混合の球果を用いた。球果を風乾した後、種鱗を開いて種

子を取り出した。実験に供するまで透明な瓶に容れ、1991年採取の種子は4℃で、1992年採取の種子は-20℃に貯蔵した。

防菌のため低温湿層処理前に0.5%ベンレート(Dupont社)懸濁液に約1時間室温で浸した後、水道水で水洗した。

乳白色のプラスチック容器内の0.8%寒天培地上に種子あるいは摘出した胚乳をおき、乳白色の蓋をして植物育成チャンパー内(25℃, 12時間明 4000lx / 12時間暗)で発芽させた。低温湿層処理をする種子については、容器ごとクロマトチャンパー(4℃)においた。

無酸素条件

播種した容器を蓋をせずに透明なチャック付きビニル袋にいれ、窒素ガスを充満させてから密封した。さらに酸素吸収剤として亜二チオン酸ナトリウムと酸化還元指示薬として無色の還元型メチレンブルーとの溶液を0.4%寒天でペトリ皿内に固化し同封した。実験期間中メチレンブルーが青色化することはなかった。

II-3-3 〈実験II C〉種皮除去発芽試験

低温湿層処理によって打破される休眠が種皮によるものか否かを明らかにするために、種皮から胚を内包する胚乳を取り出してから低温湿層処理をおこない、25℃に移してからの発芽数を調べた。種皮を除去しない種子は、低温湿層処理をしないものと17日間だけ処理したものは発芽せず、73日間低温湿層処理したもので2週間後から、147日間低温湿層処理したもので1週間後から発芽がみられ、最終的に半数近くが発芽した(表II 3上)。種皮を除去したものでは、低温湿層処理をしなくても発芽するものがあった。なお種皮を除去した場合、胚が伸長して胚乳から突出した時点を発芽として計上した。

低温湿層処理後に種皮を除去したもので半数以上の発芽がみられた。69日間25℃で吸水させた後に種皮を除去した14個体中1個体が発芽した(表II 3下)。種皮を除去した場合、25℃におくと胚乳が軟化して構造を失ったり異常に膨張したりし、さらにそこが腐敗し、菌が増殖してしまうものが多くみられた。1カ月に1回ほど0.5%ベンレート懸濁液を散布したが、腐敗を抑えることはできなかった。胚乳が腐敗してしまった個体は胚が成長できず発芽を確認することができなかったので、種皮除去して25℃においたものの発芽数は内的な発芽力を表してい

表 II 3 低温湿層処理あるいは外種皮を除去したチョウセンゴヨウの発芽数

1991年採取の種子 4℃で吸水（低温湿層処理）させた後25℃で発芽させた。図 II 9 と同じ発芽試験。

低温湿層処理	外種皮	供試粒数	25℃に移してからの日数				
			8	14	26	38	70
0日間	あり	20	0	0	0	0	0
	除去	10	0	1	3	3	0
17	あり	10	0	0	0	0	0
	除去	10	2	3	4	5	5
73	あり	10	0	2	4	4	4
	除去	10	0	0	0	0	0
147	あり	20	2	3	9	10	11
	除去	10	0	1	1	1	1

1992年採取の種子 4℃あるいは25℃で吸水させた種子の外種皮を片面剥離し、25℃で発芽試験をおこなった。

種皮除去前吸水条件	外種皮	供試粒数	試験日数			
			7	16	24	55
日数	温度					
0日間	あり	11	0	0	0	0
	除去	10	0	1	4	4
69日間	25℃	あり	11	0	0	0
		除去	14	1	1	1
	4℃	あり	10	0	0	0
		除去	10	3	5	9
262日間	25℃	あり	10	0	0	0
		除去	10	0	0	0
	4℃	あり	10	3	3	4
		除去	10	1	2	5

ない。

発芽までの時間あるいは発芽するかしないかと乾燥種子時重とには相関がみられなかった(図表に示さず)。

II-3-4 <実験II D> 無酸素下での発芽試験

チョウセンゴヨウの発芽には酸素呼吸が必要であることを確認するために、無酸素条件下で発芽試験をおこなった。25℃に6カ月間おいたが発芽はみられなかった。種皮を除去したり、低温湿層処理をしても発芽する種子はなかった。

無酸素下でも種皮を除去したものでは胚乳が軟化したものが多くみられた。

II-3-5 実験結果のまとめと考察

自然状態の無傷種子の場合、発芽前の胚乳は種皮を通して吸収した水分を胚に養分と共に供与するが、その間は常に硬い種皮の中にある。発芽して幼根が水分を吸収できるようになると種皮から抜け出すが、胚乳は子葉に付随して培地から離れ、消耗するまで水分ポテンシャルの低い大気中にさらされる。胚乳は細胞間の接着が弱く構造が緩いため、種皮を除去して水分ポテンシャルの高い寒天に直におかれるという自然状態とは異なる状況にさらされると、膨潤して構造が崩れてしまうのだろう。種皮はこの構造の崩壊を抑え、胚乳が正常に機能できるようにするという役割も担っているといえる。

低温湿層処理を施さない無傷種子は発芽しないことが確かめられた。低温湿層処理は2カ月以上で休眠打破の効果があり、処理期間が長いほど発芽までに要する時間が短くなった。

種皮を除去した種子では低温湿層処理なしでも発芽がみられた。低温湿層処理をおこなった方が種皮除去種子でも発芽率が高くなる傾向があったが、本実験では腐敗するものがあったので確かなことはわからない。25℃で2カ月以上吸水させた後、種皮を除去したものでも発芽がみられた。常温吸水しても発芽能が失われたのではなく、何らかの発芽抑制機構が働いているため発芽できず、低温湿層処理あるいは種皮除去によって発芽抑制が外れるのだと考えられる。

これらの結果から、チョウセンゴヨウ種子の低温湿層処理によって打破される休眠の要因の一部は種皮にあることが示された。しかしながら種皮を除去しても

腐敗もせず発芽もしなかった個体があり、種皮だけが発芽を抑えているのではなく、種皮以内の胚乳あるいは胚にも休眠の要因があることが明らかになった。種皮による外的要因と胚あるいは胚乳の内的要因について、それぞれⅡ-4とⅡ-5で調べる。チョウセンゴヨウではいずれの処理でも発芽率は100%にならず、発芽能に個体差が大きい。発芽抑制している要因が個体毎にかなり異なっていると考えられる。多数の個体をまとめて解析すると個体毎の変化を見過ごす恐れがあるので、チョウセンゴヨウを用いた以降の実験でも、なるべく個体毎の変化が追えるように個体あるいは少数の個体を用いた測定を繰り返し、得られたデータの平均値ではなく個々の値を評価の対象とした。

Barnett (1976) は *P. elliptii*, *P. echinata*, *P. × sondereggeri*, *P. taeda* について種子重と発芽するまでの時間に相関があるとしているが、チョウセンゴヨウではそのような関係はみられなかった。

水中では酸素の拡散が空気中と比べ1/100程に抑えられる。そのため水中の酸素濃度は極めて低くなるが、水中に播種しても発芽する能力をもつ種が高等植物の内にもいくつかある (Morinaga, 1926)。酸素濃度を2%以下にした気相で発芽するものもあり (Siegel and Rosen, 1962; Heichel and Day, 1972; Al-Ani *et al.*, 1985)、特に栽培イネ *Oryza sativa* や野生イネ *Zizania aquatica* (Campiranon and Koukkari, 1977)、イヌビエ *Echinochloa crus-galli* (Kennedy *et al.*, 1980) は無酸素条件下でも発芽することができる。これらの種子は酸素を消費しない発酵系でエネルギーを得ている (Rumpho and Kennedy, 1981)。また多くの種子で、休眠打破直後には酸素を必要としないエネルギー獲得系であるペントースリン酸回路が空気中でも活性化されていることが知られている。チョウセンゴヨウ種子は無酸素条件下で発芽しなかった。種皮を除去したものでも発芽しなかった。ペントースリン酸回路が作動している可能性もあるが、それだけのエネルギーでは発芽に到らなかったと考えられる。無酸素状態でなくても、水分が過剰にある条件下ではマツ属の種子は発芽しない。マツ類はもともと乾燥地に適応した植物であるといわれるが、種子発芽の段階でも湛水による酸素供給の減少に敏感な種なのかも知れない。

Ⅱ-4 吸水に伴うチョウセンゴヨウの種皮の変化

Ⅱ-4-1 種皮の物理性による休眠

マメ科の多くの種子は硬い種皮をもっており、種皮を取り去ったり、傷つけたりしないと発芽しない。種皮が水分や酸素の透過を妨げ、あるいは物理的に胚の伸長を妨害することによって発芽を抑えていると考えられており、このような種子は硬実種子 *hard seed* とよばれる。特に水分透過が阻害されている種子だけを硬実種子というべきとする主張もある。

水分の拡散透過の障壁は、種子の登熟時の脱水に伴って種皮の表層に形成される不透水層によるものであることが知られている (Ballard, 1973)。種皮の不透水層はその薄さと耐久性ゆえに工業的応用の面からも興味もたれている。

硬実種子の種皮の構造が電子顕微鏡により詳細に調べられ、種皮の表層を形作る個々の柵状細胞のさらに外側に種衣様の非細胞層を形成していることがわかっている。この層が、例えばシャジクソウ属 *Trifolium subterraneum* ではコルク質であり (Bhalla and Slattery, 1984)、*Prosopis farcata* では非常に硬いペクチン質であり (Werker et al., 1973)、化学的組成は様々であるが疎水性の物質からなっていて、水分の透過を妨げていると考えられている。ギンネム *Leucaena leucocephala* では最外層が多糖質の親水部分とフェノール質の疎水部分からなり不透水層が複雑な構造を成していることが観察されている (Serrato-Valenti et al., 1994)。

水分の透過性のみならず、酸素の透過性も種皮によって妨げられることによって休眠している種子もある。発芽に酸素を必要としない種もあるが、チョウセンゴヨウを含む多くの種子は酸素がないと胚が成長できない。酸素の拡散透過が種皮に妨げられていると、そのような種子は胚が生理活性を復活できず休眠を続ける。

種皮の酸素不透過性による休眠はオナモミ属 *Xanthium* (Thornton, 1935)、カラスムギ (Hay, 1962)、クサヨシ *Phalaris arundinacea* と *P. tuberosa* (Vose, 1956)、*Sinapis arvensis* (Edwards, 1969)、*Cyanoglossum officinale* (Qi et al., 1993) などで報告されている。透水性の研究では、染色液を吸わせたり組織の含水量を調べることによって、種皮中の水の動きを直接把握することができるが、酸素の場合、小さく薄い種皮中の透過を測定するのは困難である。そこで多くの研究は種子の外側の酸素濃度の変化すなわち呼吸量を測定し、それが種皮を剥離した際に大きな値を示すことをもって、種皮の酸素不透過性の根拠としている。しかしながら、種皮の剥離が中の胚や胚乳の呼吸におよぼす影響は看過できるものとは限らない。剥離の際に傷つくことによる障害呼吸や、後述する光照射などの要因により生理

活性の活性化によって呼吸量が増加する可能性がある。呼吸量が増加することだけから酸素透過性を判断するには注意を要すると考えられる。

光環境は休眠打破に大きな影響をおよぼす。多くの種子が光照射がないと発芽がみられず、休眠打破にフィトクロームが関与していると考えられている。このような種子ではフィトクローム分子が存在するところまで光が達する必要があるが、種皮が光の透過を妨げている可能性が容易に考えられる。またたとえ透過していても光波長に対する選択を種皮がおこなっている可能性もある。しかしながら種皮の光透過性に関する研究は Richardson (1959) の論文以外に見あたらない。Richardson (1959) は *Pseudotsuga menziesii* の種皮の光透過性を調べているが、方法が詳細に記載されておらず外種皮よりも内種皮の透過率が低いという結果も納得しがたい。このような研究が少ないのは種皮のような小さく透過率の低いものの光透過を測定することが困難であるためであろう。Ballard (1973) も種皮が光照射に誘導される発芽に影響する可能性について言及しているが、発芽を阻害することはなさそうだと結論している。

硬実種子を人工的に発芽させるためには、機械的に傷つけたり、熱湯や硫酸溶液に漬けることによって不透水層を破壊・溶解することが必要である。自然状態でも不透水層が障害を受けることによって吸水が始まる。が、それ以外の環境の刺激によりへそ付近にある組織の透水性が増すことが知られている。例えば *Aspalathus linearis* (Kelly and Van Staden, 1987) やクサネム *Sesbania punicea* (Manning and Van Staden, 1987) では縫線上に生じた種衣の構造が変化し、水分がそこから吸水されるようになる。*Dichrostachys cinerea* では珠孔や臍の構造も変化することがわかっている (Van Staden *et al.*, 1994)。

硬実種子の種皮が胚の伸長の機械的な障壁になっているという考えは古くからあり、多くの教科書や論文の緒言に述べられているが、実際に種皮の機械的な強度について実験研究した報告はほとんど引用されていない。わずかに Esashi and Leopold (1968) が草本のオナモミ *Xanthium* 種子について種皮の通貫に要する力を測定している。実際に測定した研究は少ないものの、例えば Welbaum and Bradford (1990) がマスクメロン *Cucumis melo* 種子の発芽時の水ポテンシャルを測定した結果から示したように、硬実種子に限らず胚を覆っている種皮などの組織が機械的に胚の伸長や吸水を少なからず抑制しているであろう。

硬実種子の構造に関する研究はマメ科を扱ったものが多い。これは、発芽の均一性や有効な発芽処理の開発が求められる農林業上の重要な種が多いからである。

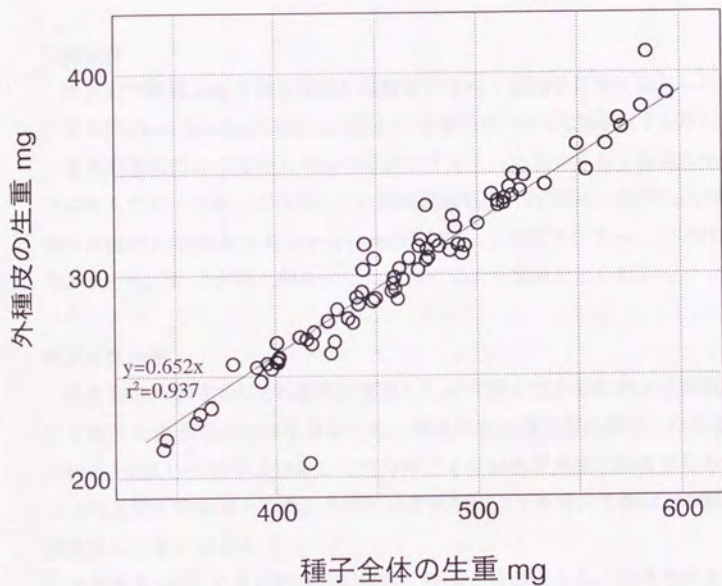
う。マメ科以外にも Ballard (1973) の総説によれば、18科で硬実種子を形成する種が知られており、草本も木本も、裸子植物から被子植物まで広く、存在している。最近では18科に加え、Thanos *et al.* (1992) によってミカン科の203種が硬実種子形成種として挙げられている。

カエデ科も上記18科に含まれていないが、*Acer pseudoplatanus* などは種皮を除くと発芽率が増加するので、種皮によって発芽が抑えられているといえる (Pinfield *et al.*, 1987)。しかし種皮を除いてもすべてが発芽するわけではなく、低温湿層処理をおこなうことによって発芽率がさらに向上する。このような種子は種皮による外的要因と胚の内的要因との両方が休眠に関与していると考えられる。

マツ科も Ballard (1973) の総説に挙げられていないが、実験ⅡCでチョウセンゴヨウについてみたように、種皮を外すと休眠が打破されることがいくつかの種で知られている。*Pinus jeffreyi* や *P. storobus*, *P. elliotii*, *P. echinata*, *P. × sandergeri*, *P. taeda* (Stone, 1957; Kozłowski and Gentile, 1959; Barnett, 1976) そしてチョウセンゴヨウ (Asakawa, 1964) の場合は、種皮の酸素不透過性が休眠の要因となっていることが報告されているが、上述のように呼吸を測定しただけのものであり酸素不透過性を証明しきれていない。

チョウセンゴヨウ種子も非常に強く重い外種皮をもっている。クロマツの外種皮は爪で割ることができ、チョウセンゴヨウはペンチ等を用いなければ割ることができない。図Ⅱ6に乾燥種子全体の生重と外種皮の生重の関係を示した。種子重はシイナでなくても350mgと軽いものから600mgと倍近く重いものまで幅広い値をもつ。種子重のうち7割程を外種皮が占めていた。この割合は種子重に関わらずほぼ一定であった。チョウセンゴヨウはマツ類の中でも比較的重い種子を形成する種であり、母樹の娘個体への投資が多い方であるが、娘個体である胚とその成長に直接寄与する胚乳の2倍以上のバイオマスを種皮に投資しているといえる。本節では、このように大きな重量をもつ種皮の、休眠におよぼす影響を知るために、外種皮の物理的な変化について調べる。

本項では種皮が発芽を妨げる要因として、物理的なものだけを記してきたが、ある硬実種子の休眠の要因が上記要因のどれか一つだけとは限らずに複合的に作用している場合もあるであろう。またABAなど発芽阻害物質が種皮に含まれる種子も知られており化学的な要因も関与している場合もある。種皮を除去することによって発芽が誘導される種子の休眠は種皮に要因があるといっても、上述の物理的な要因だけではなく化学的な要因を含む複合的な要因によって、発芽を抑



図II 6 種子全体の重さに占める外種皮の重さ 1991年に採取したチョウセンゴヨウの乾燥種子重を個体毎に計測した後、外種皮を剥離してその重さを計測した。

制している場合もあり、さらにカエデのように内的要因によっても抑制されている種もある。個々の研究はある種のある一つの要因について調べたものが多い。本節では、チョウセンゴヨウ種子について種皮の物理性のうちの一つではなく機械的強度、透水性、酸素透過性の3つの要因を調べた。

II-4-2 〈実験II E~G〉の材料と方法

圧縮試験

東京大学附属北海道演習林の外国樹種見本林で1991年10月に採取したチョウセンゴヨウ *Pinus koraiensis* Sieb. et Zucc. の母樹クローンv-138の種子を用いた。

種子の幼根側の末端から5mmの位置で2点に力が加わるような器具をアルミニウム板とアクリル材とで作製した。圧縮試験機(ORIENTEC社, TENSILON)を用いて、種子を固定した器具の上下から10mm/分のヘッド速度ではさみ、その時の応力をモニターし、応力が極大値を示した時点で種皮が割れたとした。

吸水と含水率

乳白色の容器中の0.8%寒天に播種し、随時寒天床から取り上げ表面の水滴を拭き取った後直ちに生重を測定した。測定値から播種前に測定した生重(乾燥種子時重)を減じ乾燥時重で除した百分率、すなわち乾燥種子時重あたりの吸水による増加量を吸水量とした。なお、発芽試験中、1カ月に1回ほどの頻度で寒天床を新しいものに替えた。

各組織を105℃で1日乾燥させた後、秤量し乾重とした。生重を乾重で除した値を含水率とする。

酸素消費量

葉片の光合成速度測定用の気相酸素電極(HANSATECH社, D*1)を用いて、試料の酸素消費速度を測定した。電極の制御と計測値の解析にも同社の装置(CB1-Dと"LEAFDISC")を用いた。試料室は同社製(LD-2)を利用したが、高さが低く種子が入らないので、容量が大きくなるようにアクリル製の蓋を作製し、付属の部品に代えた。試料室の温度は、電子冷却装置(小松エレクトロニクス社, CIR210)で定温にした水を循環させて25℃あるいは4℃に保った。25℃での酸素消費量を測定する時は室温もなるべく25℃とし、4℃での測定はクロマトチャンバー内でおこ

なった。

種皮の酸素透過性も同装置を用いて測定した。種子のへそ側末端を電動やすりで削除して中の胚乳と胚を掻き出し、外種皮のみとした。外種皮に亜二チオン酸ナトリウムを注入し直ちに1%寒天溶液を加えて中で固化させた。削除された部分にシリコン板を宛て、アクリル材で作製した器具で固定した後、上記酸素電極で種皮外部の酸素濃度の変化を測定した。

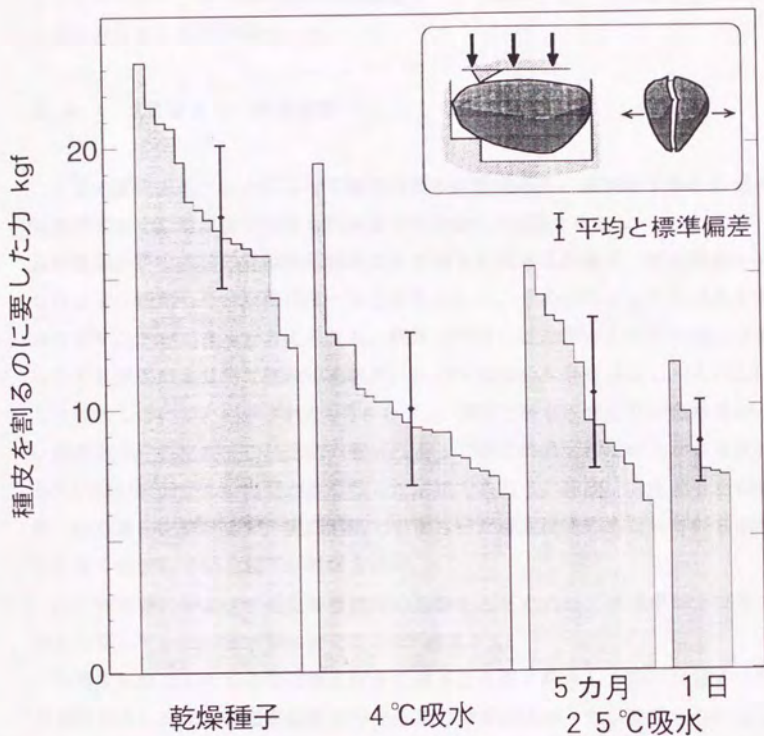
II-4-3 〈実験II E〉 機械的強度

チョウセンゴヨウの種子は、胚孔のあった部分すなわち幼根側の末端[へそ]とその反対側すなわち胚の子葉側末端[合点]を結ぶ線で最も径が長い倒卵形に近い形をしている。胚の軸に対して垂直な面で種子を切ると、その断面は3つあるいは4つの稜をもっている(図II 7挿入図参照)。種皮の内側もほぼ相似形だが、2つ稜が鋭角で種皮が薄くなっている。薄い部分は軸に対してほぼ平行な面に沿って外種皮を一周しており、へそで特に薄くなっている。胚が成長し発芽する際、内側の圧力で幼根側末端から押し開けられるような形で薄くなっている部分が裂けて外種皮が2つに割れ、幼根が出てくる。また発芽前の種子のこの外種皮の薄い部分を外から中心に向かって圧迫すると、種皮が歪み発芽時と同じ部分で種皮が裂け、加えた力に対して垂直な方向に種皮が離れる。本研究で用いた胚や胚乳はクロマツもチョウセンゴヨウもすべてこの方法で摘出している。

本実験では、圧迫して種皮を割るのに要する力を測定することによって、幼根突出の妨げとなっている可能性のある外種皮の割れにくさを調べた。外から圧迫して歪ませて割る力は、発芽時に幼根が内側から種皮を押し開く力とまったく異なる力ではあるが、2つに裂ける部分は同じであるので、2つに割れる部分の離れやすさ、裂けやすさを反映する指標となり得ると考えられる。

へそから、あまり離れた部分で圧迫すると種皮が裂けずに発芽時とは異なる形で潰れてしまうので、末端から5mmの位置だけに力が加わるような器具を作製した。

実験の結果、乾燥種子を割るには12~23kgfの力が要するが、吸水した種子では10kgf程度の力で割れることが明らかになった(図II 7)。吸水の温度には影響されず、また1日の吸水時間でも5カ月間吸水させたものと同じくらい割れやすくなった。



図Ⅱ 7 外種皮の割れにくさ 乾燥種子および4°Cで5カ月間低温湿層処理した種子、25°C明所で5カ月あるいは1日だけ吸水種子を、挿入図に示したような装置にはさみ、圧縮試験機で圧縮し(↓↓)、外種皮が割れた(←→)ときの応力を測定した。

末端近くに力を加えることによって、不規則な割れ方は減るが、しばしば裂け目が外種皮の薄くなっている部分に沿って進まずに末端部分だけが潰れてしまうことがあった。うまく裂けなかった時のデータは除いたが、乾燥種子でこのような割れ方をするものが多かった。

II-4-4 〈実験II F〉水透過性

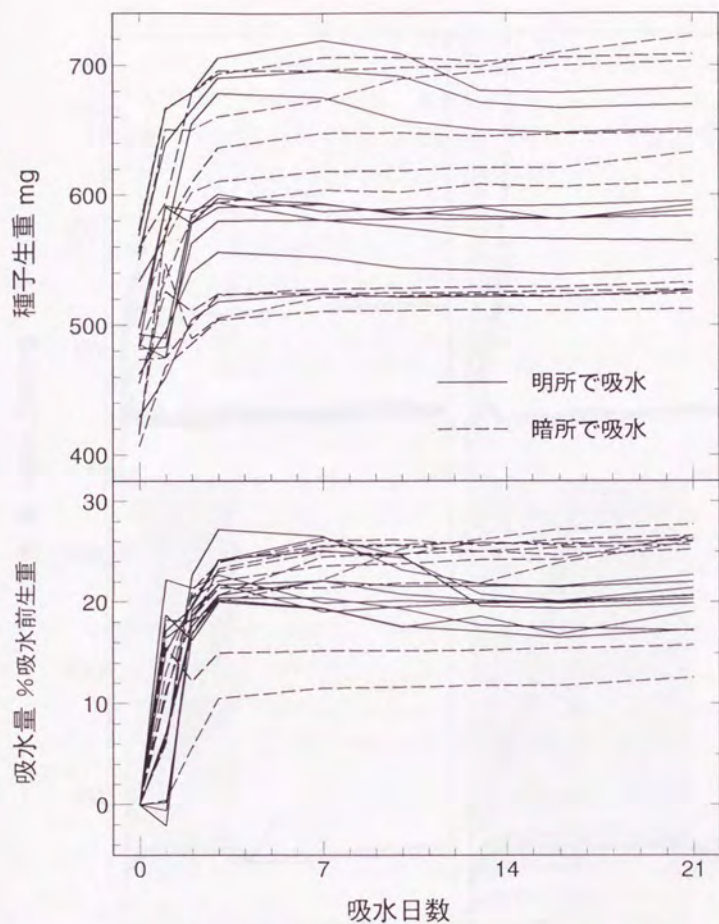
生重の変化を追うことによって種子の吸水状態をみた。乾燥種子時の重量の個体差が大きく、吸水後の生重も個体差が大きかった(図II 8上)。しかしながら重量の増加分を吸水前の乾燥種子重あたりでみると個体差が減り、吸水開始から3日目までに増加しそれ以降ほぼ一定の値を示した。この値によって各個体の吸水量を表すことができると考えられる。明所で吸水させた場合も暗所で吸水させた場合でも最初の3日間で乾燥種子重あたり20%前後の水分を吸収し、それ以降あまり吸水しないことが示された(図II 8下)。明所で吸水させた方が吸水量が小さい傾向がみられたが、これは光の照射によって種皮の表面温度が上がり寒天に接していない表面からの蒸発が多くなった結果であろう。種皮は吸水すると褐色が濃くなり黒みを帯びるが、実際明所で吸水させた種皮は光のあたっている面の黒みが淡く乾燥している様子が観察された。

次に吸水量におよぼす低温湿層処理の影響をみるために、処理中およびその後25℃に移してからの吸水量の変化をみた(図II 9)。

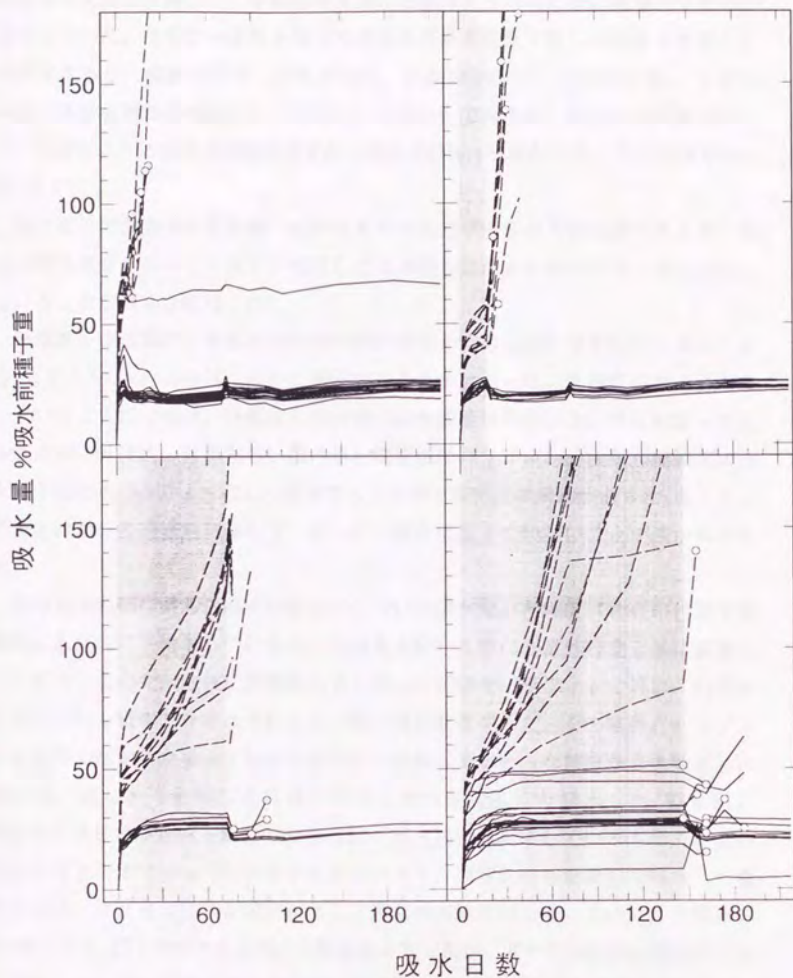
外種皮を除去したものでは種皮付きの種子より多く吸水し、25℃に移すとすぐに発芽がみられた。低温湿層処理中は重量の増加が遅かった。発芽しないものでも吸水しているが、前節で述べたようにこれらの個体の胚乳は構造が崩れかけており、正確な生重が測定できていないといえない。

外種皮を除去しない無傷種子では、はじめの3日間に急速に吸水した後5日間ほどゆっくり吸水し、それ以降吸水しなくなった。低温下で吸水させた個体ははじめの吸水は早いとその後の吸水が25℃にすぐ移した個体より遅く吸水しなくなるまで3週間程かかった。4℃から25℃に移した日を境に急激に減量しているが、これは低温湿層処理中は暗所にあったものを25℃の明所に移したため、上述した理由により乾燥したためと考えられる。25℃に移すといくつかの個体で発芽がみられたが、発芽直前の含水量は発芽しない個体のもとの違いはなかった。

214日間吸水させても発芽しなかった種子について、種皮と胚乳、胚それぞれ



図Ⅱ 8 吸水曲線 25℃の暗所あるいは明所で吸水させたときの各個体の生重の測定した(上)。吸水前の乾燥種子時の生重で除した百分率から100を減じた値を吸水量とした(下)。3週間の試験期間中に発芽はみられなかった。



図Ⅱ 9 低温湿層処理した種子の吸水曲線 無傷種子(—)および外種皮を除去したもの(---)を、0日、17日、73日、147日間低温湿層処理した後25℃明所で吸水させた。陰の部分か低温湿層処理期間を、○印が幼根の突出(発芽)が視認された個体の1回前の測定時の値を表す。

の生重と乾重を計測した。各組織の生重には個体差があったが、乾重と生重とが比例していた。生重から乾重を減じて得た水分量を乾重で除した値を含水率として算出すると、種皮が37%、胚乳が40%、胚が138%であった(図Ⅱ10)。これらの値は低温湿層処理の長さに関係がなくほぼ一定であった。吸水前の乾燥種子について同じように含水率を算出すると、種皮が13%、胚乳が4%、胚も4%であった(図Ⅱ10)。

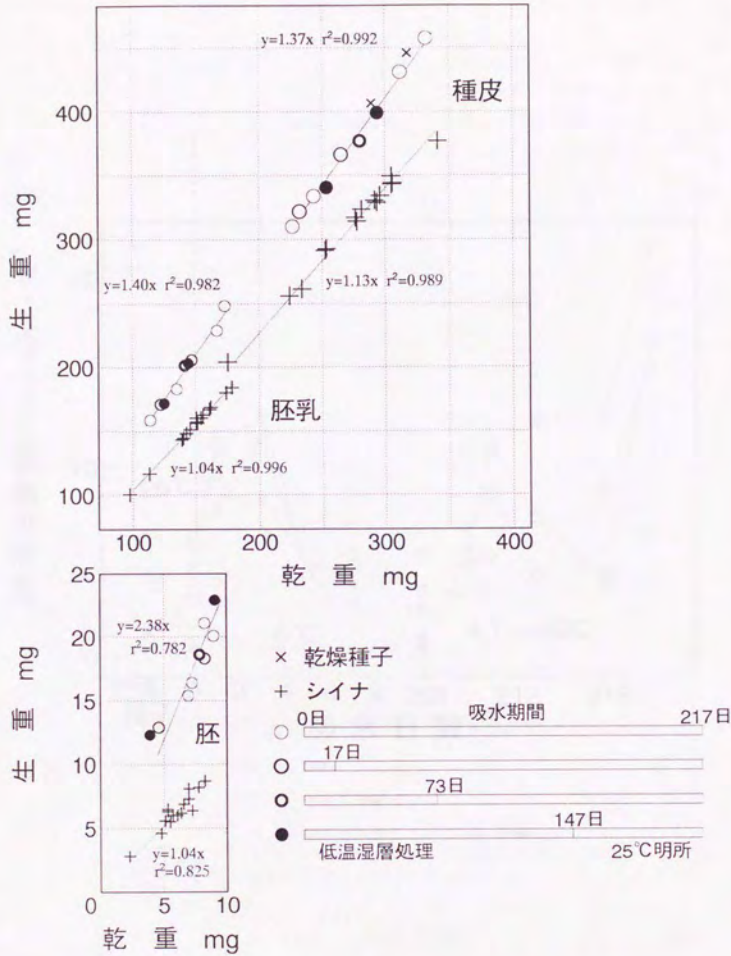
吸水種子の含水率と乾燥種子時の含水率との差がすなわち吸水量であるが、低温湿層処理をしなかった種子や処理しても発芽しなかった種子でも十分に吸水していることが明らかになった。

外種皮を2日間だけ吸水させた時の吸水量も4℃でも25℃でも24%を超えており(表Ⅱ4)、水分は容易に種皮に浸透することがわかった。外種皮の吸水量が多いということだけでは、外種皮の最内層の水分透過性が低いという可能性も考えられたが、外種皮の外側あるいは内側と切断面にパラフィンを塗布し反対側の面だけから吸水できるようにした場合でも2日間で同程度の吸水があった(表Ⅱ4)、外種皮は水分の透過性に関して、まったく障害になっていないことが確かめられた。

外種皮の内側にある内種皮の透水性について調べた。内種皮は合点の付近で外種皮にも胚乳にも密着しているので外種皮を除いた際に一部外種皮と共に剥離してしまう。そこで、内種皮が剥離してしまった部分をパラフィンで覆い、内種皮を通してのみ吸水できるようにして、吸水量の変化をみた。その結果、パラフィンを塗布しなかった場合すなわち内種皮が剥離してしまった部分からも吸水した場合は、はじめ1週間ほど急速に吸水しその後ゆっくり吸水した(図Ⅱ11)。図Ⅱ9に示した外種皮を除去したものは一部内種皮も剥離しているもので、このまま発芽するまでゆっくり吸水するのであろう。内種皮のみを通して吸水した場合の方は、はじめの急速な吸水がなく3週間の実験期間を通してゆっくり吸水した(図Ⅱ11)。25℃明所でも同様の実験をおこなったが、すべての胚乳が構造を失って腐敗してしまい正確な吸水量が得られなかった。少なくとも低温においては、内種皮が水分の透過を遅らせていることが明らかになった。

Ⅱ-4-5 〈実験ⅡG〉気相透過性

実験ⅡDで発芽には酸素が必要であることがわかったので、低温湿層処理をし



図II 10 各組織の含水率 図II 9で示した発芽試験で発芽がみられなかった種子を用いて、各器官の生重を計測した後、1日間105°Cで乾燥させ乾重を計測した。

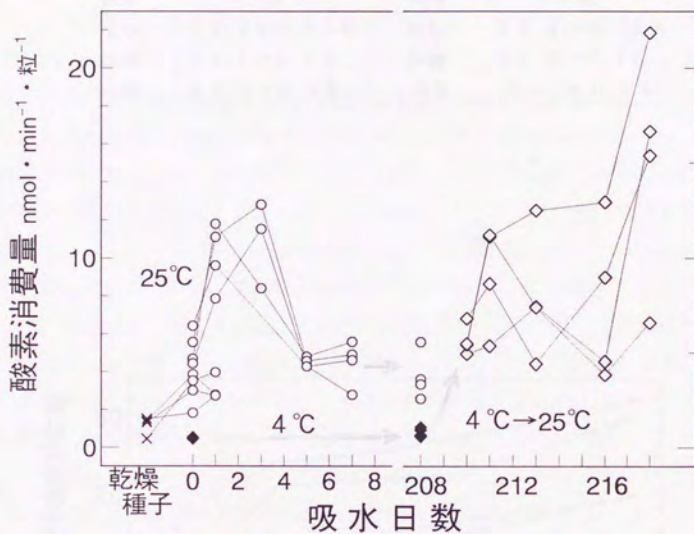


図 12 種子の呼吸速度の変化 5 個体ずつを入れた酸素電極のチャンバー内の酸素減少量を計測した。明所 25°C あるいは暗所 4°C で吸水させた。チャンバー内の温度も吸水温度にあわせた。

表 II 4 外種皮の吸水量 外種皮片の片面をパラフィンで被覆し、反対面から2日間暗所で吸水させた。各処理2~4片の吸水前の重量に対する重量の増加量の百分率の平均と標準誤差。

25℃で吸水		4℃で吸水	
被覆	吸水量	被覆	吸水量
なし	25.2 ± 0.75%	なし	23.5 ± 0.75%
外側	24.1 ± 0.75	外側	26.0 ± 0.75
内側	24.0 ± 0.75	内側	24.1 ± 0.75

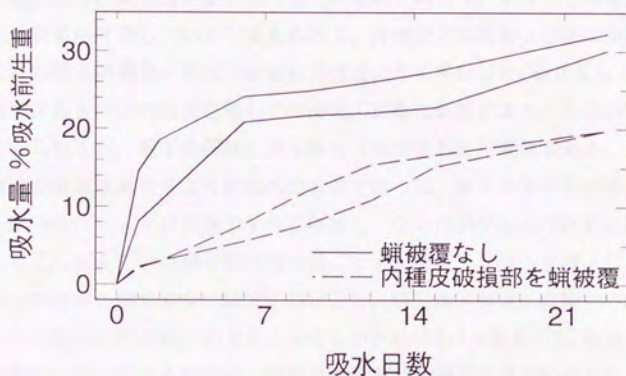


図 II 11 内種皮の透水性 乾燥種子の外種皮のみを除去し、内種皮の破れた部分をパラフィンで被覆して4℃暗所で吸水させた。

ない種皮が、酸素の透過性に関して障害になっている可能性が考えられる。種皮の酸素透過性を検討するために、まず種子全体の呼吸速度を調べた。

乾燥種子はほとんど酸素を消費しなかった(図 II 12)。また低温下では吸水開始日にも208日目にも酸素消費はみられなかった(図 II 12)。低温で吸水させた(低温湿層処理)後、25°Cに移すと酸素を消費しはじめ、1週間後ぐらいから消費速度が大きく増加するものがあった(図 II 12)。5個体ずつを1まとまりとして測定したが、消費速度が大きく増加したまとまりではその後発芽がみられた。

低温湿層処理をせずにはじめから25°Cで吸水させたものでは、すぐに酸素を消費しはじめ、吸水開始の翌日から3日目にかけて高い値を示した後、減少した(図 II 12)。25°C吸水208日目でも酸素消費がみられた(図 II 12)。

種子全体の酸素消費速度を測定した後、種皮と胚乳とに分けた。種皮の剥離に伴う胚乳の障害呼吸をできるだけ抑えるために、種子を圧迫せずに外種皮の外周の稜を電動やすりで削り取ってから剥離した。外種皮と胚を内包する胚乳それぞれの酸素消費速度を測定したところ、外種皮のみでも酸素を消費することが示された(表 II 5)。しかしながら種子全体の酸素消費量は外種皮のみの消費量より多く、外種皮より内側での消費も寄与しているのであろう。すなわち外種皮より内側にまで酸素が透過していると考えられる。外種皮と胚乳および胚に分けた後のそれぞれの酸素消費量の和は分解前の消費量よりも多かった(表 II 5)。このことは、外種皮あるいは内種皮を通しての酸素の拡散に抵抗があることを示唆していると考えられるが、種子の解体に伴う障害呼吸が生じた可能性もある。

外種皮の酸素透過性をより直接的な方法で調べた。種子の末端を切断面以外の種皮が傷つかないように電動やすりで削除し、中の内種皮および胚乳と胚を取り出す。そこに水あるいは酸素吸収剤の亜二チオン酸ナトリウムを封入し、酸素電極で種子の外側の酸素濃度の低下を測定した。低温湿層処理した種子で酸素吸収剤を入れた場合の酸素減少が大きくなるものがみられた(表 II 6)。外種皮を通しての酸素の拡散に対する抵抗が、低温湿層処理した種子の場合に減少することがあることを示している。

II-4-6 実験結果のまとめと考察

II-3でみたように、チョウセンゴヨウの無傷種子の発芽には低温湿層処理が必要だが、種皮を除去すると処理しない種子でも発芽する。低温湿層処理によっ

表 II 5 各器官の酸素消費量 無傷種子の酸素消費量を測定した後、外種皮と胚を内包する胚乳とを分けそれぞれの酸素消費量を測定した。

	全種子	外種皮	胚+胚乳
	(nmol・分 ⁻¹ ・粒 ⁻¹)		
低温吸水222日目	12.6	4.6	11.5
25℃吸水4日目	9.2	3.9	7.4
	13.9	6.3	4.6
25℃吸水10日目	4.0	3.9	6.9
	4.9	2.6	7.2
	4.6	3.0	6.1
	2.8	2.0	5.2

表 II 6 種皮内に亜二チオン酸ナトリウムを封入した際の酸素減少量

乾燥種子			25℃吸水			4℃吸水		
H ₂ O	Na ₂ S ₂ O ₄	差	H ₂ O	Na ₂ S ₂ O ₄	差	H ₂ O	Na ₂ S ₂ O ₄	差
nmol min								
132	66	-66	24	13	-11	18	216	198
24	24	0	12	36	24	12	6690	6678
12	54	42	42	51	9	6	12	6
6	30	24	48	48	0	0	18	18
			0	6	6			
			2	6	4			

て解除される休眠要因のうち少なくとも一部が種皮にあり、種皮を除去するとその要因が解除されて発芽するのだと考えられる。本節では低温湿層処理によって解除される休眠打破の抑制機構が種皮の物理性にあると考え、機械的強度と透水性、酸素透過性について調べた。

機械的強度については外側から圧迫して種皮が裂けるのに要する力を測定した。発芽時と同じ部分で割れるように工夫して圧迫したが、乾燥種子の外種皮には想定した部分と異なるところで不規則に割れてしまうものがあった。発芽時と同じ部分で裂けたものでも、割れるのに17kgf前後の力を要した(図Ⅱ7)。吸水した種皮では不規則に割れるものはほとんどなく、10kgf前後の力で割れた(図Ⅱ7)。吸水前は外種皮全体が硬く外からの力に対して破壊されにくくなっており、中の胚乳や胚を保護しているといえる。発芽の必須条件である水分が豊富な環境におかれると種皮が吸水して特定部位、すなわち外種皮内側の幼根末端から反対側末端に向かって走る2本の溝の部分の機械的強度が低くなり、幼根の出現が容易になるのだと考えられる。

1日だけの吸水でも5カ月吸水した種皮と同じくらい割れ易くなっており(図Ⅱ7)、機械的強度の低下は吸水に伴い急速に生じる変化であるといえる。

乾燥種子の外種皮は胚の成長を機械的に阻害しているとも考えられるが、しかしながら25℃で吸水した場合でも4℃で吸水した場合と同じように割れ易くなることから、機械的阻害は低温湿層処理によって解除される発芽抑制要因でない。

次に種皮が水分の透過を阻害している可能性について検討した。

マメ科などの硬実種子では外種皮の最外層の外側に疎水性の層が形成されておりそれ以内に水分が吸収されないようになっている(Ⅱ-4-1)。チョウセンゴヨウの外種皮では内側からの吸水をパラフィン塗布によって遮っても吸水がみられた(表Ⅱ4)。吸水量は2日間の吸水で飽和と考えられる量まで達しており、外種皮の外側には吸水を抑える層はないといえる。外側にパラフィンを塗布した場合でも同じように吸水がみられ(表Ⅱ4)、内側の方にも吸水を妨げる層はない。外種皮は水分の透過性に関して、まったく障害になっていないことが確かめられた。

内種皮についても透水性を調べた。内種皮は非常に薄い組織なので外種皮について用いた方法は使えない。そこで内種皮が破れないよう留意しながら外種皮を外し、胚を内包する胚乳の吸水量の変化をみた。内種皮は大部分外種皮とは分離しているが、合点の内側で外種皮と密着おり、その部分だけは外種皮を除去する際に破れて外種皮と共に剥がれてしまうので破損した部分にはパラフィンを塗

布してそこから水が浸透しないようにした。その結果、内種皮があることによって吸水が遅くなることが示された。しかしながら完全に阻害されることはなく徐々に吸水した。

外種皮、内種皮それぞれについて透水性を調べたが、どちらも内側への吸水を阻害していないことは、無傷種子全体の発芽までの吸水量の変化からも示唆される(図Ⅱ 8, 9)。乾燥種子重あたりの生重増加量を吸水量としてみると、吸水開始後急速に20%以上まで吸水し、それからしばらく吸水せず、最後にまた急速な吸水がみられる。この経過は Asakawa (1956) の結果とほぼ一致する。また吸水過程に3つの段階がみられることは他のマツでも報告されている (Hatano, 1951; 郷, 1951)。ただし彼らの論文では3段階目の急速な増加は発芽前に生じているような記載があるが、本実験の観察では、種皮が割れ幼根が見えるようになった時点が発芽としているが、チョウセンゴヨウのような大きな種では発芽しても発芽床に幼根が達するまで多少時間がかかる。その間は急速な吸水がみられなかった。但し置床の向きによっては発芽後すぐに幼根あるいは露出した胚乳が寒天に接する場合もありその個体は急速に吸水した。3段階目の急速な吸水は、発芽後出現した幼根によるものであるようだ。

発芽する能力のない種子でも1段階目の急速な吸水がみられることから(郷, 1951)、この吸水は生理活性を必要としない、ただ吸水前から水ポテンシャルが低かった種子内に水が浸透する現象だと考えられている。一度飽和状態に達した後、次に幼根が直接吸水するようになるまでほとんど吸水しない定常状態に入る。1段階目を細かくみると、25℃の場合すぐに飽和状態にまで吸水して2段階目の定常状態になるが、4℃の場合は、はじめの3日間に吸水量20%ほどまで急速に吸水した後、3週間ほどかけてゆっくり吸水する期間を経て定常状態に入る(図Ⅱ 9)。外種皮は4℃でも2日間で25%ほどまで吸水することから(表Ⅱ 4)、乾燥種子重の65%が外種皮だとすると(図Ⅱ 6)、はじめの急速な吸水期の吸水量の内16%が外種皮によるものである。この時期に外種皮は飽和状態に達していると考えられる。次の定常状態前のゆっくり吸水する期間に胚乳+胚が吸水してゆっくりと定常状態に達する。内種皮が破損していると胚乳+胚の吸水がやや早くなることから、内種皮の透水性が低いことが考えられる(図Ⅱ 11)。実際、乾燥種子から取り出した内種皮に水滴をたらすと、すぐにしみ込まず疎水性を示す。25℃で吸水させると定常状態前のゆっくり吸水する期間がみられないことから、内種皮の不透水性が25℃では減少する可能性が考えられる。高温と低温の変温処理が

発芽促進に効果があるのは、高温期に内種皮の不透水性がなくなることが関与しているのかもしれない。

いずれにせよ低温湿層処理をしない種子が発芽しない原因は透水性にないことが明らかになった。つぎに酸素透過性について検討した。

まず種子全体の呼吸量を測定した(図Ⅱ12)。呼吸量の測定はワーブルク検圧計による方法が古くから用いられている。この方法は試料を容れた閉鎖系内で発生した二酸化炭素を水酸化カリウム溶液に吸収させた場合とさせない場合とでそれぞれ一定時間における圧力の変化を計測することによって、試料からの二酸化炭素放出量と酸素吸収量を測定する優れた方法である。しかし、酸素発生量を測定するには試料室内の二酸化炭素濃度が0という自然条件とは異質の環境下での代謝を測定することになり、また試料の体積に比して呼吸量が少ないと検出限界を下回る恐れがある。本実験では空気中の酸素濃度を測定することができる酸素電極を用いて呼吸量の測定を試みた。

乾燥種子や4℃で吸水中の種子はほとんど酸素を消費しなかった。25℃で吸水させると、吸水開始直後から酸素消費がみられるが、これはおもに種皮内の還元的な条件にあった部分に、吸水と共に酸素が供給され酸化した可能性がある。吸水5日目まで酸素消費は減少する。吸水前に還元状態にあった部分が一通り酸化されたためだろう。25℃で吸水208日目でもほぼ同じ値を示した。この時の値が胚乳と胚の実際の呼吸を表していると考えられる。

4℃で吸水させた種子は208日目でも酸素を呼吸しなかったが25℃に移すと消費し始め、発芽する個体では発芽前に呼吸が増加する。

種皮および胚を内包する胚乳それぞれの酸素消費を計測した結果、種皮が酸素を消費すること、その消費量が、特に吸水10日目では、種子全体の消費量より小さいことが示された。このことから、種子全体の酸素消費量のうち一部は種皮より内側の消費によるものであることが明らかである。ただし各組織に分けた場合の消費量の和は種子全体で測定した値より大きかった。この理由は、一つには、組織を分ける際に種皮を割ったため種皮中の還元的だった部分の多くが空気に触れたためと考えられる。また、やはり種皮を除いたことによる胚乳の障害呼吸によるものとも考えられる。もう一つ、種皮が酸素透過をやや阻害しているため、胚乳や胚の呼吸速度が抑えられていたものが解除された可能性も考えられる。

種子を破壊して得た種皮だけでも酸素消費がみられたことは、破壊前の種子内は還元的であったことを示唆している。外種皮より内側では酸素の供給が充分で

なく、酸素を要求する発芽が抑制されているとも考えられる。

低温湿層処理をしない種子でも外の酸素を胚乳や胚がある程度消費していると考えられるが、酸素透過性をより直接的な方法で調べた。その結果、低温湿層処理によって透過性が増す場合があることが示された。

本実験では低温湿層処理をした種皮のどの部分の酸素透過性が高くなるのかを明らかにしなかった。吸水に伴い外種皮が割れ易くなることから稜の部分の機械的構造が変化すると考えられ、その部分の透過性が高くなることが考え易い。しかしながら、この変化は温度に関わらない変化であり、低温湿層処理をした場合のみ透過性が高くなることを説明できない。外種皮のどこか他の部分に微細な隙間が生じるのか、あるいは外種皮全体の構造が変化し透過性が高くなるのであろう。

II - 5 吸水に伴うチョウセンゴヨウの胚と胚乳中の変化

II-5-1 <実験II H, 1>の材料と方法

RNAの定量

実験II Cと同じチョウセンゴヨウの種子のRNAを、SDS-フェノール法によって抽出した。①5個体の胚および胚乳をそれぞれ1.5あるいは3mlのRNA抽出用緩衝液[0.1Mトリス-塩酸(pH9.0), 1% SDS, 1% アスコルビン酸ナトリウム, 5%メルカプトエタノール]および1.5mlフェノール・クロロホルム混液中で、超高速ホモジナイザー(ポリトロン)を用いて破碎、懸濁。②遠心分離した後、水相を等容量のフェノールでさらに2回抽出し、核酸に富む最後の水相を-20℃のエタノールで塩析した。③生じた沈澱を20mMトリス-塩酸(pH7.5), 1mM EDTAに溶解し、DNAと低分子RNAを除くため、2M塩化リチウムによる塩析をおこない、再びエタノールでRNAを沈澱させた。この操作を2度繰り返してRNAを精製した。④溶液の260nmの吸光度を測定し、 $A_{260} = 45 \mu\text{g/ml RNA}$ としてRNA量を算出した。

ABAの定量

実験II Cと同じチョウセンゴヨウの種子を用い、各組織の内生ABAを定量し

た。

胚と胚乳はTBS緩衝液[0.5Mトリス-塩酸(pH7.8), 1.5M塩化ナトリウム, 10mM塩化マグネシウム]とメタノールの1:9混液中で, 超高速ホモジナイザー(ポリトロン)を用いて破碎, 懸濁。種皮は乳鉢で破碎した後, 同混液に懸濁した。一晚振盪した後, 遠心して上清を得た。沈澱に同混液を加えさらに抽出した。遠心して得た2度の上澄をまとめて凍結乾燥してメタノールを揮発させた。乾化物をTBS緩衝液に溶かし, ABA抽出液とした。

ABAの定量は, Walker-Simmons (1987)に従い, 固相化抗原を用いる間接競合型の酵素免疫測定法によって定量した。概要のみを記す。① Wailer (1980)の方法で, (+)-2-シス, 4-トランス-ABA(東レ社)とチロシルヒドラゾンとの複合体と, *p*-アミノ馬尿酸のウシ血清アルブミン置換体とを合成し, この二つを結合させ, ABA-C₄-ウシ血清アルブミン複合体を作製した。②過剰量の抗ABAのマウス・モノクローン抗体(Idetek社)溶液[0.0015%抗体と0.2%ウシ血清アルブミンをTBS緩衝液に加えたもの]と試料のABA抽出液とを混合し4℃暗所で23時間反応させた。同時に①で作製したABA-C₄-ウシ血清アルブミン複合体をマイクロプレートに注入し吸着させる。③マイクロプレートを洗浄液[TBS緩衝液に0.05%ツイーン20, 0.1%ウシ血清アルブミンを加えたもの]で洗浄した後, ②の抗体, 試料混液を注入し, 2時間室温暗所で反応させた。この時, マイクロプレート上に固相化されたABAと試料中の遊離のABAとが抗ABA抗体によって競合的に捕捉される。④洗浄液で洗浄後, マイクロプレートに抗マウス免疫グロブリンのアルカリホスファターゼ標識ウサギ抗体溶液を注入し, 2時間室温暗所で反応させた。この時, 固相化ABAを捕捉した抗ABA抗体をさらにアルカリホスファターゼで標識した抗体が捕捉する。⑤洗浄液で洗浄後, アルカリホスファターゼの基質である0.1%*p*-ニトロフェニルリン酸-2-ナトリウムの0.05M炭酸ナトリウム(pH9.6)溶液を注入し, 室温で30分~1時間反応させた。⑥マイクロプレートリーダーを用いて, 酵素反応で生じた*p*-ニトロフェノールによる405nmの吸光度を測定した。⑦ABA濃度の対数と吸光度との用量反応関係が直線関係にあると仮定して, 既知濃度の(+)-2-シス, 4-トランス-ABAを同様に処理して求めた検量線から試料中のABAを定量した。

II-5-2 <実験IIH> RNA量

低温湿層処理中のチョウセンゴヨウの胚および胚乳で生じる変化の候補として全RNA量を測定した。II-2では標識前駆体の取り込み実験によりクロマト胚の処理中にrRNAが生合成されることが示されたのが、ここでは個体毎の全RNAを求めるために、抽出はSDS-フェノール抽出のみとし、量を溶液のA260から求めた。

RNAは胚乳と胚とのいずれからも検出された。生重あたりのRNA量をみると胚乳より胚に多く含まれていた(図III13)。しかしながら、処理によるRNA量の明らかな変化はみられなかった。乾燥種子を4日間25°Cにおくと減少する傾向があるようだが、低温湿層処理をした後25°Cに移した種子でも同じ傾向がみられた。

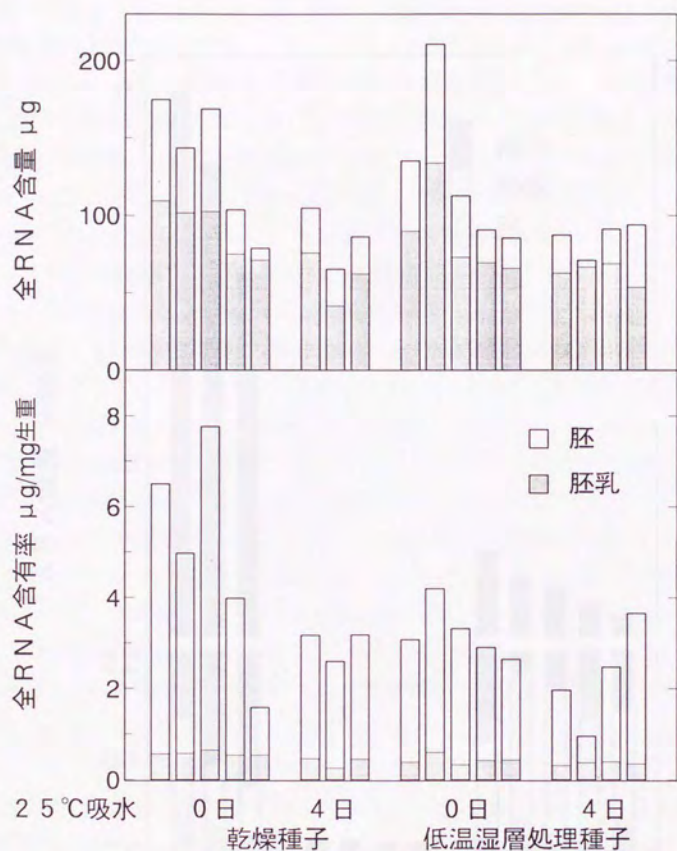
II-5-3 <実験II> ABA量

種皮と胚乳、胚それぞれの5個体ずつのABA含量を測定したところ(図III14)、種皮に極めて多く、胚で最も少なかった。組織毎の順番は乾燥種子でも低温湿層処理種子でも変わらなかったが、6カ月低温湿層処理した種子では種皮の含量が1/5以下に少なくなっていた。胚の含量は変化なく、胚乳ではやや増加していた。

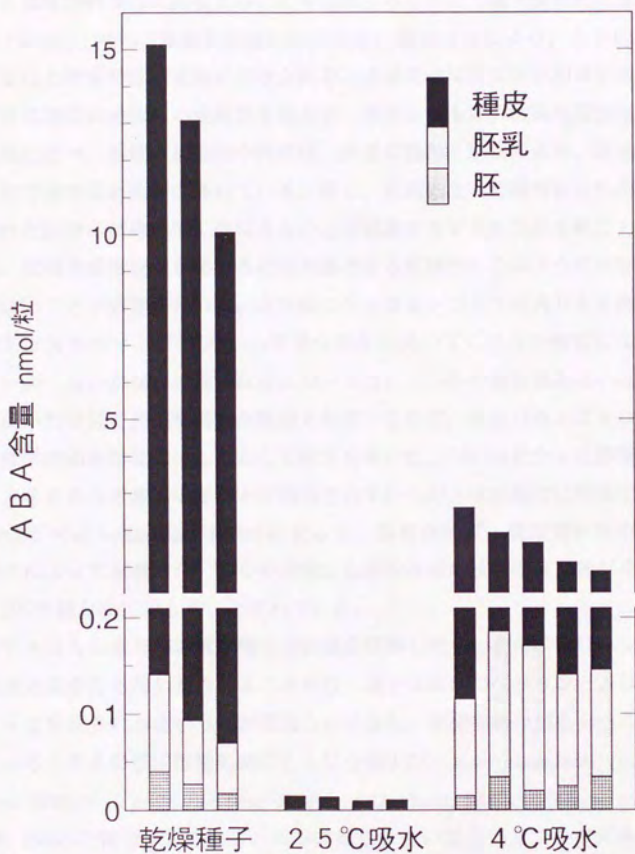
25°Cで吸水させた種子の胚と胚乳からはABAが検出できなかった。種皮の含量も他の2処理と比べて極めて低かった。

II-5-4 実験結果のまとめと考察

ABAの定量法には、いくつかの方法がある。古くから用いられているのはアオウキクサ *Lemma* やコムギ子葉鞘の成長あるいはワタ外植体の落枝をみる生物検定法で、ABAの成長抑制作用や落枝作用を利用する。この方法による検出限界はアオウキクサで3pg/ml、コムギで200ng/ml程度である。光化学的な性質を利用するものとしては旋光分散法と紫外線分光光度法があり検出限界はどちらも μ g規模である。その他、質量分析計や水素炎イオン化検出器、電子捕獲型検出器を併用するガスクロマトグラフィー、高圧液体クロマトグラフィーがあり、100ng規模の検出限界をもつ。現在最も信頼性の高い方法はガスクロマトグラフィー/質量分析法といわれているが、種子の内生ABAを測るには多数の個体を



図II 13 各組織の全RNA量 142日間4°Cで吸水させた種子と乾燥種子，さらにそれらを4日間25°Cで吸水させた種子，各個体の胚と胚乳から全RNAを抽出した。



図II 14 各組織のABA量 乾燥種子と6カ月4°Cあるいは25°Cで吸水させた種子。5個体ずつを種皮、胚乳、胚の3組織に分け、それぞれに含まれるABA量を定量した。

試料としなければ検出限界を下回ると考えられる。本研究では個体差がなるべく反映されるように、さらに検出限界の低い標識免疫測定法を用いた。この方法は抗原と抗体が特異的に結合することを利用するもので、様々な研究で用いられている (Weiler, 1984)。標識免疫測定法は抗原の標識方法により、さらに放射線免疫測定法と酵素免疫測定法に分けられる。本研究では放射線を利用することによる特殊な施設の必要性や危険性を鑑みて、後者を選んだ。標識免疫測定法は、他の方法と比べ、感度・検出能や再現性、必要な機器・試薬の価格、迅速・簡便さ等の点で同程度あるいは優れている。但し、抗原による認識部位以外の部分が置換された抗原の誘導体は、異なるものとは認識できず交差反応を起こしてしまうため、標識免疫測定法を用いるには対象とする試料中にこのような免疫学的相似体がないことが前提とされる。本実験でチョウセンゴヨウのABAを測定する場合にもガスクロマトグラフィー/質量分析法を用いてこの点を検定しなければならないが、用いたIdetek社の抗体についてはいくつかの植物種あるいは合成誘導体を用いた研究で反応特異性が検証されているので、チョウセンゴヨウにおいても免疫学的相似体はないものとして検定を省いた。Idetek社からは酵素免疫測定法によるABA定量用のキットが販売されているが、本実験では同社の抗体だけを用いて Walker-Simmons (1987) に従って、固相化抗原・間接競合型の酵素免疫測定法によって定量した。彼らの方法は比較的高価な抗体の使用量がキットと比べ1/100で済み検出能も高いとされている。

外生ABAの施与が非休眠種子の休眠を誘導したり、またジベレリンによる発芽促進効果を打ち消したりすることから、種子休眠はジベレリンとABAの均衡によって左右されるという説が議論されてきた。発芽抑制作用をもつことが知られているABAの低温湿層処理にともなう減少が、*Acer platanoides* (Pinfield and Davies, 1978) や *A. saccharum* (Enu-Kwesi and Dumbroff, 1978)、*Fraxinus* (Sondheimer et al., 1968) で報告されている。リンゴ種子についてもいくつかのグループの報告があるが (Rudnicki, 1969; Lee and Looney, 1978; Balboa-Zavala and Dennis, 1977; Barthe and Bulard, 1978)、それぞれ値が異なっており、また常温温水させた対照が示されていないものが多い。Subbaiah and Powell (1992) は詳細な定量をおこなひ、温度に関わらず種皮のABAは減少するが胚では変化がないことを示した。温度に関わらず吸水に伴い種皮のABAが減少する一方、胚のABA減少はみられない。*Acer platanoides* 種子は低温湿層処理中にABAが減少するものの、発芽がみられない17℃吸水でも減少する (Tillberg and Pinfield, 1982; Pinfield et al.,

1987)。キハダ属 *Phellodendron wilsonii* でも吸水にともないABAが減少するものの低温でなくても減少することが認められている (Lin *et al.*, 1994)。

ABAは乾燥に対する耐性に関与するホルモンとしても多くの研究がある。乾燥ストレスにさらされた器官や組織で内生ABA含量が増加したり、外生ABAの施与によって乾燥耐性や乾燥耐性に寄与すると考えられる物質、さらにその物質生成に関与する遺伝子の発現が誘導されることが知られている。休眠種子には他の組織より極めて含水率の低い状態にあるものが多く、乾燥に対する耐性が高い組織からなっているといえる。休眠種子に多く含まれるABAは休眠に直接関与するだけでなく、休眠に伴う乾燥に対する耐性を各組織に付与する機能を持っているとも考えられる。

本研究でもチョウセンゴヨウマツの休眠種子の種皮に多量のABAが含まれていた。乾燥状態での休眠になんらかの役割を果たしていると考えられる。

登熟期のABA量の増加が休眠を誘導することや発芽処理によって内生ABA量が減少することが多くの植物種で示されており、内的休眠はABAが主要因となっているという考えは古くからあるが、ABAの減少によって必ずしも休眠が打破されるとは限らない。例えば、休眠打破に変温処理を要する *Phellodendron wilsonii* では低温処理期間中にABAが減少するがそれだけでは発芽しない (Lin *et al.*, 1994)。これらの結果は内生ABAの低下だけでは休眠が打破されないことを示している。内生ABAの減少のみによって説明できない休眠打破の機構に関して、ABAに対する胚の感受性の低下が最近コムギなどで研究されている (Waker-Simmons, 1987 など)。

本実験でもリングの場合 (Subbaiah and Powell, 1992) と同様に、温度に関わらずチョウセンゴヨウ種皮のABAは吸水に伴い減少するものの低温湿層処理をした種子の胚乳や胚のABAは減少しなかった。しかしながら、吸水前の時点での胚の含量を他の植物の場合と比べると1/10から1/100程度と少なかった。本研究では発芽した種子あるいは必ず発芽するに違いない種子のABA含量というものを測定していないが、乾燥種子の時点で胚や胚乳に含まれているABA量は発芽を抑制するに十分ではないと考えられる。25℃で吸水した胚や胚乳にABAがなかったことから示唆されるように、胚自身もつ内的な発芽抑制要因として、チョウセンゴヨウにおいては、ABAが関与している可能性は低いと考えられる。

種皮のABAの減少は発芽床への浸出によるものであろう。水分が豊富な環境に置かれた時に、ABAなどの発芽抑制物質が浸出することによって発芽が誘導

されるという考えが一般に認められている (Yambe *et al.*, 1992 やそこに引用されている文献等)

低温湿層処理に伴うABA量以外の変化としてRNA量の定量を試みたが、温度に関わらず吸水に伴う量の変化はみられなかった。II-2-5で述べたように本実験でおこなった様な方法ではRNA量の変化を正確に追えない可能性がある。実験II Bで用いたような取り込み実験をすればRNAの変化も検出できたかも知れない。定量性はないものの乾燥種子の胚にも胚乳にもRNAが存在することは確かである。

II-6 マツの低温湿層処理についての考察

本研究では、いままで様々な種で知られている低温湿層処理にともなう生理的变化の内、どのような変化がマツ属2種の種子において生じているかを調べた。胚の成長には温度(常温)と水分(湿潤)、酸素、光の4条件が必要であるのが一般である。マツでは乾燥種子時に光照射を受ければ発芽時は暗黒下でもかまわない。残る3条件が揃えば、マツの複維管束類の多くの種子は発芽するが、単維管束類では、常温にさらされる前に湿潤条件と低温条件とが発芽のために必要である。前者の種、例えばクロマツの種子でも発芽促進のために低温湿層処理をすることがあるが、処理中には湿潤条件によって誘導される変化が起きていると考えられる。一方、単維管束類に属するチョウセンゴヨウでは低温条件で誘導される変化と湿潤条件で誘導される変化の両方が休眠打破に必要であると考えられる。このことは低温湿層処理のみよりも変温処理の方が発芽率が高いことから推察される。

実験II Aの結果、クロマツでは低温湿層処理の発芽促進効果が確かめられ、休眠状態から発芽までの変化の内、低温でも進行し得る変化が低温湿層処理中に生じていることが示唆された。処理中に温度条件が満たされなくても湿潤条件さえ満たされればそのような反応が進み、あとは常温によって誘導される反応だけが抑制された状態になり、温度条件が満たされたときには常温で誘導される反応だけが進めばよく、発芽までに要する時間が短くて済む。低温でも進行し得る変化の候補として、RNA生合成について実験II Bで調べた。RNA生合成は常温で促進され、かつ発芽に必須の変化である。実験の結果、低温下で湿潤条件にさら

した場合にRNAが生合成されることがわかった。さらに低温下で生合成されるRNAにはrRNAが多く含まれていることも確かめられた。クロマツ乾燥種子中にもリボソームが存在するが(Ⅲ章参照)、低温湿層処理中にさらに合成されることによって発芽に必要な変化、タンパク質の合成が促進されるのであろう。

一方、チョウセンゴヨウ種子の発芽には、常温にする前に低温下で湿潤条件を経験しなければならないことと、酸素が必須であることが実験ⅡC、Dで確かめられた。さらに種皮を除去すると低温にさらさなくても発芽する場合があることが確認された。発芽には常温と湿潤条件で誘導される変化の他に低温湿潤条件で誘導される変化が必要であるが、低温湿潤条件で誘導される変化は種皮を除いた場合に要らないことを示している。発芽に必要な変化をすなわち発芽を抑制している要因の解除と考えれば、種皮には発芽抑制する要因があり、それが低温かつ湿潤条件によって解除されるのだと考えられる。実験ⅡE～Gでは種皮による発芽抑制の機構として、機械的障壁、不透水性、酸素不透過性の3点を検討した。機械的障壁については、抑制している可能性が示されたが、その解除には低温条件は不要で、湿潤条件だけで充分であった。透水性はほとんど発芽の抑制要因になっていなかった。内種皮がやや疎水性を示し吸水を遅らせているが、温度条件に関わらず湿潤条件さえ満たされれば、発芽に十分な吸水がおこなわれた。低温条件下でのみ生じる変化は酸素の透過性に関してみられた。常温でも酸素は種皮を透過しているようであったが、低温で吸水させた場合に透過性が増大することがあった。

種皮に関しては実験ⅡIでABAの定量もおこなった。吸水した種子の種皮で含量が大幅に減少していた。この減少は培地への漏出によるものと考えられ、湿潤条件というより水分が周りに十分にあることによる変化といえるが、いずれにせよ低温条件は関与しない変化であった。むしろ、低温で吸水した種子より常温吸水した種子の方がより減少しており、低温条件はABAの減少に関して抑制的であったといえる。

実験ⅡCの結果、種皮を除去した場合でも発芽しないものがあり、また種皮を除去した種子の発芽率が低温湿層処理によって高くなる傾向があった。このことは種皮より内側にも低温湿層処理の条件によって何か変化が生じることを示している。胚と胚乳でも変化の候補としてABAとRNAの量的変化を実験ⅡH、Iで調べた。しかしながら、どちらもほとんど変化がみられなかった。チョウセンゴヨウの場合、ABAは発芽抑制要因になっていないようである。Ⅱ-4-7でも

述べたようにRNAについてははっきりしたことはいえないが、休眠打破直後の成長に量的に必要なだけのRNA、特にrRNAが休眠種子に含まれていると考えることができる。

種皮より内側で生じる変化として、低温条件と湿潤条件によって誘導されるものを見出すことができなかった。可能性としては、種皮だけではなく胚乳の機械的強度も発芽を抑制していることが考えられるが、実験ⅡCで観察されたように胚乳の物理性が発芽の阻害要因になっているとは考えにくい。そのほかABA以外の発芽阻害物質の減少あるいはジベレリン等の発芽促進物質の増加が挙げられる。また、遺伝子の発現に関してRNAの量的な変化はなくても、転写活性や翻訳活性が変化することによる、質的な変化が考えられる。次章ではRNAの内、mRNAについて質的な変化を考究する。

III クロマツの貯蔵型 mRNA

III-1 貯蔵型 mRNA

生物個体の遺伝情報はその個体の全ての細胞のDNAに記録されている。それらの遺伝情報の全てが無秩序に発現するのではなく、綿密な発現制御をうけて個々の細胞が必要な遺伝情報が随時発現してくる。真核生物の遺伝子の発現は転写、mRNAの化学修飾、翻訳、ポリペプチドの翻訳後修飾等の段階で制御される。生物体内の物質とエネルギーの経済を考えると、最初の転写制御が主要な段階であると思われる。一般にmRNAは不安定で翻訳された後崩壊していく。核内のDNA上の遺伝情報を、細胞質内でのタンパク質合成の場であるリボソームまで運ぶというmRNAの役割を考えれば、これは当然のことである。細胞の恒常性を維持するためには翻訳後の用無しになったmRNAは速やかに消失すべきであるといえる。しかし翻訳されていないmRNAが細胞質中に存在することがあり、このmRNAは翻訳段階の制御を受けているといえる。翻訳段階での遺伝子の発現制御に関する研究が近年盛んになってきている。翻訳段階の発現制御機構を研究する上で、翻訳されずに存在するmRNAの動態や存在形態を調べることは重要である。

吸水開始直後から種子内でタンパク質とRNAが盛んに生合成されることは多くの植物で知られていた。この時期にタンパク質合成阻害剤を与えると発芽しなくなることから、タンパク質生合成が発芽に必要であることがわかる。ところがRNA合成阻害剤を与えてもタンパク質生合成が完全に阻害されない。このことから発芽初期に必要なタンパク質の情報を担うmRNAの少なくとも一部が吸水前の休眠種子に存在していることが示唆された。このように予め合成され休眠種子に存在していると考えられるmRNAは *performed mRNA* あるいは *stored mRNA* とよばれるようになった。しかしながらこの時期の実験に対して、Barker *et al.* (1971) は阻害剤の作用が確定していない等の理由で貯蔵型mRNAの存在の証明にはならないとしている。その後、無細胞タンパク質合成系の確立に伴い、

いくつかの植物で休眠種子中に翻訳活性をもつ mRNA が存在することの証が立てられた (Payne, 1976 に総説)。

さらに休眠種子から抽出した mRNA を無細胞タンパク質合成系で反応させた時の翻訳産物の解析の結果、貯蔵タンパク質と同じものが見いだされた。登熟期に機能した mRNA が休眠開始後も残存しているという意味でこのような mRNA は remnant mRNA あるいは residual mRNA という場合もあった。

タンパク質合成が長期間にわたり休止している休眠状態の種子に mRNA が存在することが、現在多くの植物で知られている (Payne, 1976 に総説)。本論文ではその機能に関わらず休眠種子内に存在する mRNA と同じ情報をもつ mRNA の総称として貯蔵型 mRNA と記述する。貯蔵型 mRNA についての研究の多くは上記の研究の延長で発芽期に機能するものであるのか、あるいは登熟期に機能したものの残余物であるのか、といった観点からおこなわれてきた。近年の分子生物学の技術的な進歩によって、個々の情報を担う mRNA 種の cDNA が作製できるようになった結果、それぞれの mRNA 検出できるようになり、また塩基配列からその情報が解読できるようになったため、貯蔵型 mRNA の機能が明らかになりつつある。

クロマツについても休眠状態にある乾燥種子の胚内に貯蔵型 mRNA が存在することが知られており (Yamamoto, 1982)、その cDNA ライブラリーが作製されている。本章では、cDNA クローンをを用いて、まず長期間休眠状態にある種子にも貯蔵型 mRNA が存在しているか否かを調べた(Ⅲ-2)。その結果、貯蔵型 mRNA は乾燥種子内で安定に維持されていることがわかったので、次にどの様な形態で貯蔵型 mRNA が乾燥種子内で存在しているかを調べた(Ⅲ-3)。さらに貯蔵型 mRNA の発芽過程での消長を調べ(Ⅲ-4)、その存在意義を考察する(Ⅲ-5)。

Ⅲ-2 貯蔵型 mRNA の cDNA クローン

Ⅲ-2-1 cDNA クローン

本章の研究では、クロマツの貯蔵型 mRNA を検出する方法として、mRNA と相補的塩基配列を持つ DNA [cDNA] を合成し、大腸菌のプラスミド(小さ

な環状2本鎖DNA)に組み込んで作製したcDNAクローンをを用いた。大腸菌 *Escherichia coli* は無性生殖によって増殖するので、遺伝的に均一な大腸菌[クローン]を大量に得ることができる。ある1つの情報を担った貯蔵型mRNAのcDNAを組み込んだ大腸菌を培養して、そこからcDNAを抽出すれば、不安定なmRNAに代わって、相補的塩基配列を持つcDNAが大量に得られる。さらに、相補的塩基配列を持つ核酸どうしが特異的に水素結合することを利用した手法[ハイブリダイゼーション]を用いて解析をおこなった。大腸菌から抽出した2本鎖cDNAは、初めの貯蔵型mRNAと同じ塩基配列を持つmRNA(あるいはそのcDNA)と特異的に対合するので、あらかじめ放射性同位元素 ^{32}P でどちらかの核酸[プローブ]を標識しておけば放射能写真法[オートラジオグラフィ]によって相補的塩基配列を持つ核酸の存在が調べられる。こういった手法を用いれば、様々なmRNAの中から特定の配列のmRNAだけを検出することができるので、従来のように貯蔵型mRNAを全体として扱うのではなく、それぞれの機能を担った個々のmRNAについて調べることができる。Harada *et al.* (1988)は、同様な手法を用い、アブラナのcDNAライブラリーのうち15クローンをを用いて、対応するmRNAの濃度変化を胚発生から発芽6日目までについて調べている。

クロマツのcDNAクローンは乾燥種子と芽生えに含まれるmRNAについて作製したものを利用した。これらのcDNAクローンはGubler and Hoffman法(1983)により次のようにして作製された。元の鋳型になるmRNAは乾燥種子の胚と播種後14日間明所で発芽させた芽生えの子葉から抽出し、オリゴ(dT)セルロース・アフィニティー・クロマトグラフィーによって生成したポリ(A)⁺RNAである(後述の実験方法参照)。真核生物のmRNAは転写後に3'末端にポリアデニル酸鎖が付加されたRNA[ポリ(A)⁺RNA]となって細胞質中に存在する。逆転写酵素で合成させた二本鎖DNAをプラスミドpUC8の *Pst*I 切断部位に組み込み、大腸菌に感染させてクローン化した。

クロマツの乾燥種子胚の貯蔵型mRNA、および発芽2週間目の芽生えの子葉のmRNAから作製したcDNAクローンを、それぞれ胚のクローン、子葉のクローンと呼ぶ。個々のクローン名は、plasmidの"p"を冠し、胚のクローンではpine seedの意で"PS"、子葉のクローンではpine cotyledonの意で"PC"と、ライブラリー中の通し番号によって命名した。

本節では、胚のクローンのうちの122クローンと、子葉のクローンのうちの100

の胚と発芽の2週間目とではどのように変化しているかを、各々の時期の全mRNAのcDNAをプローブとして、まずコロニー・ハイブリダイゼーションおよびサザン・ブロット・ハイブリダイゼーションによって調べた。さらにその結果を元に以降の実験に用いるcDNAクローンの選抜をおこなった。

Ⅲ-2-2 〈実験ⅢA〉の材料および方法

種子および発芽

茨城県林業試験場のクロマツ精英樹採種園で1987年10月に採種したクロマツ *Pinus thunbergii* Parl. のクローン北相馬2号の種子を用いた。採取した球果を温室で乾燥し種鱗を開かせ、種子を集めた。翼を取り除いた後、密閉容器に入れ、実験に供するまで冷蔵庫(4℃)に貯蔵した。

室温の0.5%ベンレート懸濁液中で1時間攪拌した後、1時間水道水で水洗した。プラスチック容器内の0.8%寒天培地上に播種した後、植物育成チャンパー内(25℃, 18時間明 5,000lx/6時間暗)で発芽させた。チャンパーに入れた日を発芽に適した環境に移した日の意味で発芽0日目とする。以降この日から起算して発芽幾日目と表記する。低温湿層処理をする種子については、培地に播種後、乾燥しないよう容器に蓋をして冷蔵庫(4℃)に一定期間おいてから発芽させた。

乾燥種子の種皮をピンセットで割って胚乳を取り出し、胚乳を剃刀で軸方向に切開して中の胚を摘出した。発芽14日目の芽生えは子葉と胚軸に分けそれぞれを供試した。各器官は直ちに液体窒素で凍結させ、実験に供するまで-80℃に保存した。

RNAの調製

RNAは向井ら(1987)のSDS-フェノール/塩化セシウム法によって抽出した。①胚100個体を1.5mlのRNA抽出用緩衝液[0.1Mトリス-塩酸(pH9.0), 1% SDS, 1%アスコルビン酸ナトリウム, 5%メルカプトエタノール]および1.5mlフェノール・クロロホルム混液中で、超高速ホモジナイザー(ポリトロン)を用いて破碎、懸濁。②遠心分離した後、水相を等容量のフェノールでさらに2回抽出した。最後の水相を5.7M塩化セシウム($\rho=1.70$)に重相し、日立SPR-28ローターを用い、27,000rpmで、10℃, 24時間、遠心をおこなった。③生じた沈澱を20mMトリス-塩酸(pH7.5), 1mMEDTAに溶解し、DNAと低分子RNAを除

20mM トリス-塩酸(pH7.5), 1mM EDTA に溶解し, DNA と低分子RNA を除くため, 2M 塩化リチウムによる塩析をおこない, -20°C のエタノールでRNA を沈澱させた。この操作を2度繰り返してRNA (主にリボソームRNA と mRNA) を精製した。

ポリ(A)⁺RNA の調製と翻訳

オリゴ(dT)セルロース(Sigma社およびPharmacia社)のカラムに, 全RNA を結合用緩衝液[0.5M 塩化ナトリウム, 10mM トリス-塩酸(pH7.6), 1mM EDTA]と 共に通してポリ(A)⁺RNA だけを結合させ, ポリ(A)⁻RNA を流出させた後, 溶出用緩衝液[10mM トリス-塩酸(pH7.6), 1mM EDTA]でポリ(A)⁺RNA を溶出させた[1回目溶出液]。初めにポリ(A)⁻RNA として流出した液を再びカラムに通しポリ(A)⁺RNA を完全に抽出した[2回目溶出液]。エタノール沈澱によりポリ(A)⁺RNA とポリ(A)⁻RNA をそれぞれ回収した。

精製したポリ(A)⁺RNA 1 μg を, L-[³⁵S]メチオニンの存在下でタンパク質の試験管内合成に供した。翻訳はウサギ網状赤血球ライセート(Amersham社, Pelham and Jackson, 1976)と, コムギ胚抽出液(Watanabe and Price, 1982)の2つの無細胞タンパク質合成系でおこなった。対照として, マツのポリ(A)⁻RNA と, ホウレンソウのポリ(A)⁺RNA も翻訳した。

80分間, 30°C で反応させた後, 2 μl をガラス濾紙に点滴。濾紙を氷冷した5%トリクロロ酢酸に10分間浸しタンパク質を沈澱させた後, 37°C の0.3M 水酸化ナトリウムに10分間浸しアミノアシル tRNA を分解。さらに5%トリクロロ酢酸で1分間2回洗浄し, タンパク質に取り込まれなかったアミノ酸を除いた。順次エタノールとエチルエーテルに浸し, 風乾した後, 液体シンチレーション計数器で濾紙上の³⁵S の放射能を測定した。

翻訳産物は Laemmli (1970) の方法に従って SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分画し, フルオログラフィーにより, 翻訳産物の比較をおこなった。

1本鎖cDNAプローブの合成

ポリ(A)⁺RNA を鋳型とし, 逆転写酵素を用いて5'-[³²P]デオキシシチジン三リン酸[dCTP]の存在下でファーストストランドのみを合成した。反応液の組成は, 50mM トリス-塩酸(pH 8.3), 100mM 塩化カリウム, 10mM 塩化マグネシウム, 10mM ジチオトレイトール, 1mM デオキシアデノシン三リン酸, 1mM デオキシ

グアノシン三リン酸, 1 mMデオキシチミジン三リン酸, オリゴ(dT)プライマー, ヒト胎盤RNアーゼ阻害剤, 0.1 unit/ μ l逆転写酵素(宝酒造)にポリ(A)⁺RNA および5'-[³²P]dCTP, 非標識dCTPを加えたものとした。

10mMEDTAを加えて反応を止めた後, 2 μ lをガラス濾紙に点滴。濾紙を氷冷した5%トリクロロ酢酸に10分間浸し合成されたcDNAを沈殿させた後, 順次エタノールとエチルエーテルに浸し, 風乾した後, 液体シンチレーション計数器で濾紙上の³²Pの放射能を測定した。

cDNAに取り込まれなかったdCTPを除かずに, 反応液をcDNAクロウニングのスクリーニングの際のcDNAプローブ溶液として用いた。

コロニー・ハイブリダイゼーション

①cDNAライブラリーの大腸菌を拾い, 培地上にコロニーを形成させた。②コロニーをニトロセルロース・フィルターに移しとり, フィルターを順次10% SDS, 0.5M水酸化ナトリウム-1M塩化ナトリウム, 2M塩化ナトリウム-1Mトリス-塩酸(pH5)に浸して溶菌, DNAの変性, 中和した後, フィルターを80°Cに熱してDNAを定着した。③前述の1本鎖の標識cDNAプローブ(およそ10⁸cpm)とハイブリダイゼーションをおこなった。ハイブリダイゼーションは硫酸デキストランを加えない点を除いて, Wahl *et al.* (1979)の方法に従った。すなわち, プレハイブリダイゼーション溶液の組成は, 50%ホルムアミド, 5 \times SSC, 5 \times デンハルト溶液, 50mMリン酸ナトリウム, 250 μ g/ml サケ精子DNA。ハイブリダイゼーション溶液の組成は, 50%ホルムアミド, 5 \times SSC, 1 \times デンハルト溶液, 20mMリン酸ナトリウム, 100 μ g/ml サケ精子DNAとした。④対合していない標識cDNAを除去するため, 2 \times SSC, 0.1%SDS溶液中, 室温で15分間ずつ2回, さらに0.1 \times SSC, 0.1%SDS溶液中で15分間2回振盪しながら洗浄した。⑤風乾後, エックス線フィルム(FUJIRX)に密着させ, オートラジオグラフィーをおこなった。

サザン・プロット・ハイブリダイゼーション

①各クロウニングの大腸菌を培養し, プラスミドDNAを小規模あるいは中規模な方法で抽出した。②プラスミドDNAを制限酵素EcoRIおよびHindIIIあるいはPstI単独で切断して2本鎖cDNAを切り離し, アガロースゲル電気泳動で分離した後, ③アガロースゲルを0.25M塩酸, 0.5M水酸化ナトリウム-1.5M塩化ナト

リウム、2 M塩化ナトリウム-1 Mトリス-塩酸(pH 5)、 $20\times$ S S Cで順次処理して、DNAの脱プリン化、変性、中和をおこない、ニトロセルロース・フィルターへ転移させた。④コロニー・ハイブリダイゼーションと同じ条件で、標識cDNAプローブ(およそ 10^8 cpm)とハイブリダイゼーションをおこなった。⑤ $2\times$ S S C、0.1% SDS溶液中、 42°C で15分間ずつ2回振盪しながら洗浄した。⑥風乾後、コロニー・ハイブリダイゼーションと同様にオートラジオグラフィーをおこなった。

なお、プラスミドDNAの抽出は中規模と小規模との2通りで行なった。小規模抽出は従来の方法である。すなわち、①大腸菌を1.5ml L-broth培地で培養後、15,000rpmで、15秒間遠心分離し、②沈澱した大腸菌を $500\mu\text{g}/100\mu\text{l}$ リゾチームで溶菌、タンパク質を $200\mu\text{l}$ の0.2N水酸化ナトリウム-1% SDSで変性、 $150\mu\text{l}$ の5 M酢酸カリウムで塩析させ、15,000rpmで、10分間遠心分離した。③上清を、フェノールとフェノール/クロロホルム混液で1回ずつ抽出をおこなった後、エタノール沈殿をおこなった。

プラスミドDNAの中規模抽出法は次の手順でおこなった。①大腸菌を40ml TB培地で培養後、日立 RPR20ローターで、5000rpm、10分間遠心分離し、②沈澱した大腸菌を $10\text{mg}/\text{ml}$ リゾチームで溶菌、タンパク質を4 mlの0.2N水酸化ナトリウム-1% SDSで変性、3 mlの5 M酢酸カリウムで塩析させ、1,500rpm(日立 RPR20ローター)、10分間遠心分離した。③上清をとり、0.6容量(5.4ml)のイソプロパノールを加え、日立 RPR20ローター 15,000rpmで、20分間遠心分離した。④沈殿を2.3mlの純水に溶き、2.5g塩化セシウム($\rho = 1.58$ になる)と $50\mu\text{l}$ の $10\text{mg}/\text{ml}$ 臭化エチジウム溶液を加えた。⑤日立 RPR20ローター 15,000rpmで、10分間遠心分離して不純物を取り除いた後、BECKMAN TLA 100.2ローター 100,000rpmで、24時間遠心した。⑥遠心によって生じた密度勾配中のプラスミドDNAの層を抜き取り、 $20\times$ S S Cに飽和させたイソプロパノールによって臭化エチジウムを除去、透析をしてプラスミドDNAを精製した。

制限酵素切断地図

①プラスミドDNAを5つの制限酵素 *Bam*HI, *Eco*RI, *Hind*III, *Pst*I, *Rsa*Iの一つあるいは複数の酵素の組み合わせで処理し、DNAを切断した。②切断後、アガロース電気泳動あるいはポリアクリルアミドゲル電気泳動によって分画した。③臭化エチジウム染色により可視化したDNA断片の泳動距離から断片長を推定

し、酵素の組み合わせによる長さの違いや、プラスミド中の既知の切断部位から、プラスミドに挿入されているcDNAの各酵素による切断部位を決定した。

III-2-3 <実験 III A> cDNAクローンの選抜

ポリ(A)⁺RNAの翻訳

各コロニーと対合させる標識cDNAプローブを合成するためには良質のmRNAが必要なため、まず乾燥種子の胚および発芽2週間目の子葉と幼根のそれぞれからポリ(A)⁺RNAを精製した。このポリ(A)⁺RNAの純度を見るため試験管内でタンパク質合成をおこない、翻訳生成物を電気泳動で分離した後、フルオログラフィーをおこなった(図 III 1)。タンパク質に取り込まれた[³⁵S]メチオニンの割合(表 III 1)および図 III 1を見ると、胚および子葉から精製したポリ(A)⁺RNAは、対照として供試したハウレンソウのポリ(A)⁺RNAよりは低いものの十分な鋳型活性があることがわかり、cDNAを合成する際の鋳型としても充分であると考えた。しかし、幼根から精製したポリ(A)⁺RNAには鋳型活性がほとんど見られなかった。

図 III 1で胚のポリ(A)⁺RNAと子葉のポリ(A)⁺RNAとの翻訳産物の分子量を較べると、どちらもさまざまな分子量のものがあるが、胚の方がその分布が広く翻訳産物の種類が多い。子葉の方には、55kDaおよび25kDa付近に特に多く存在しているタンパク質が見られた。

1 本鎖cDNAプローブの合成

コロニー・ハイブリダイゼーションに供する標識cDNAプローブを合成する前に、合成反応液中の[³²P]dCTPと非標識dCTPの濃度が、プローブとして適当な標識cDNAを合成するためには、どれくらいがよいかの検討をおこなった。反応液中の、鋳型とするポリ(A)⁺RNAと[³²P]dCTPの濃度をそれぞれ25ng/μl、0.083μMに定め、非標識dCTPの濃度を100μM、10μMおよび0μMの3つの条件で合成をおこなった。シンチレーションカウンターによって測定したそれぞれの標識dCTPの取り込み率からcDNAの収量を算出し、適当な非標識dCTP濃度を検討した(表 III 2, 図 III 2)。

基質濃度として非標識dCTPの濃度が高いほど、cDNAの収量は高くなった。全dCTP濃度が低いとcDNAの合成が進まず、特に長いcDNAが合成

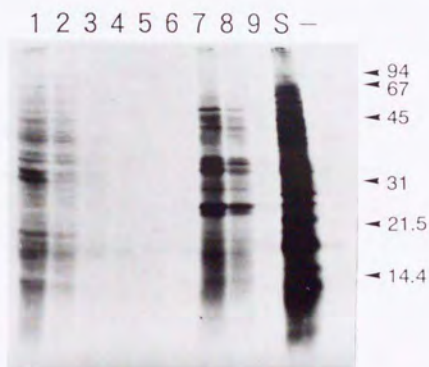
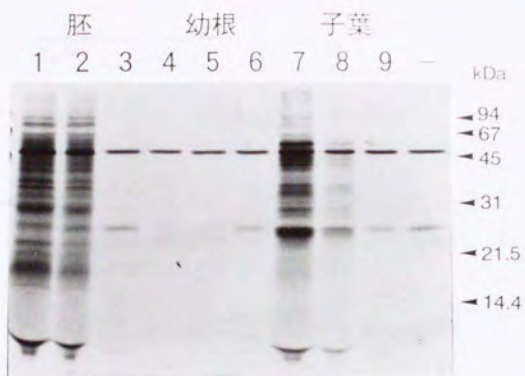


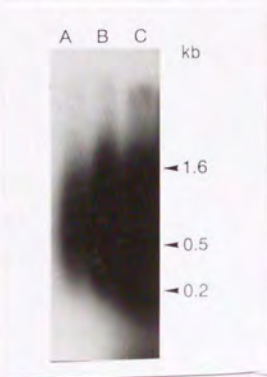
図 III 1 各組織から抽出したRNAの翻訳産物 乾燥種子の胚(1~3)と発芽2週間目の幼根(4~6)、子葉(7~9)から抽出した全RNAをオリゴ(dT)セルロース・アフィニティー・クロマトグラフィーに供した。ポリ(A)⁺RNA画分の1回目(1, 4, 7)と2回目(2, 5, 8)の流出液、およびポリ(A)⁺RNA画分(3, 6, 9)から精製したRNA 1 μ gをウサギ網状赤血球ライセート(上)あるいはコムギ胚抽出液(下)に加え翻訳反応をさせた後、反応液の4/5容量をSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動で分した。対照としてホウレンソウのポリ(A)⁺RNA 1 μ gを反応させたもの(S)とRNAを加えずに反応させたもの(-)も同様に分画した。

表Ⅲ 1 抽出したポリ(A)⁺RNAの鋳型活性 乾燥種子の胚と発芽2週間目の子葉と幼根とから抽出したRNAをオリゴ(dT)セルロース・アフィニティー・クロマトグラフィーによってポリ(A)⁺RNAとポリ(A)⁻RNAに分画し、それぞれをコムギ胚抽出液あるいはウサギ網状赤血球ライセートに加えた。^[35S]メチオニン存在下で反応させた後、トリクロロ酢酸沈澱物の放射能を測定した。

鋳型としたRNA		^[35S] メチオニンの取り込み率			
		コムギ胚抽出液		ウサギ網状赤血球ライセート	
クロマツ 胚	ポリ(A) ⁺	50 × 10 ³ cpm/μgRNA	4.3%	44 × 10 ³ cpm/μgRNA	5.8%
	ポリ(A) ⁻	8 × 10 ³	0.6	16 × 10 ³	2.1
子葉	ポリ(A) ⁺	6 × 10 ³	0.5	10 × 10 ³	1.3
	ポリ(A) ⁻	6 × 10 ³	0.5	11 × 10 ³	1.4
幼根	ポリ(A) ⁺	56 × 10 ³	4.5	20 × 10 ³	2.6
	ポリ(A) ⁻	4 × 10 ³	0.4	11 × 10 ³	1.2
ハウレンソウ	ポリ(A) ⁻	129 × 10 ³	10.4		
RNA無添加対照			0.3		1.4

表Ⅲ 2 cDNAの合成 反応溶液中の非放射性dCTP濃度を変え、合成されたcDNAの比放射能と収量を測定した。

非放射性dCTP濃度	$[^{32}\text{P}]\text{dCTP}/\text{全dCTP}$	cDNAの比放射能	合成cDNA収量
100 μM	8.3×10^{-5}	$2.5 \times 10^6 \text{cpm}/\mu\text{g}$	95.3 ng
10	8.3×10^{-4}	2.4×10^7	22.6
0	0	3.1×10^9	0.56



図Ⅲ 2 反応液中の非標識dCTP濃度を変えて合成させた1本鎖cDNA

非標識dCTP濃度を100 μM (A), 10 μM (B), 0 μM (C)の3条件下、乾燥種子胚から抽出したポリ(A)⁺RNA 1 μg を鋳型にしてcDNAを合成させた。1.1 $\times 10^5$ cpm分の反応液からフェノール抽出とエタノール沈澱により精製したcDNAをアルカリアガロース電気泳動で分画しオートラジオグラフィーで可視化した。



図Ⅲ 3 プローブに用いるcDNA

乾燥種子胚および発芽2週間目の子葉から抽出したポリ(A)⁺RNA 1 μg を鋳型にして非標識cDTPを加えずにcDNAを合成させた。反応液の1/2500容量からフェノール抽出とエタノール沈澱により精製したcDNAをアルカリアガロース電気泳動で分画しオートラジオグラフィーで可視化した。

され難いと考えられる。そのため、図Ⅲ 2で、レーンCよりレーンBのほうが全体の黒化度の差に比べ高分子側での差が少なくなっているが、長いcDNAも存在はしている。プローブに用いる標識cDNAとしては、比放射能が高いことが重要なので、実際に用いる標識cDNAプローブの合成は非標識dCTPは加えず、ポリ(A)⁺RNAを200ng/ μ l, [³²P]dCTPを0.67 μ Mとした(図Ⅲ 3)。

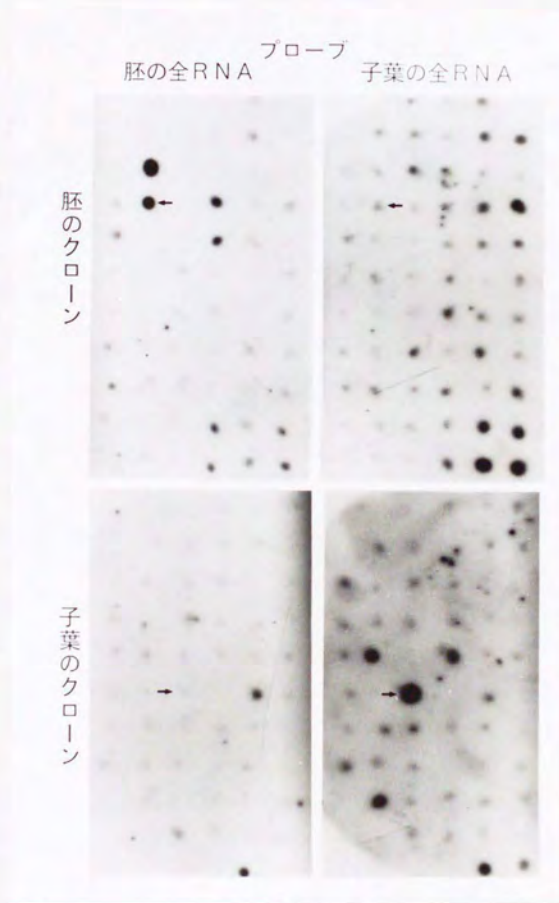
コロニー・ハイブリダイゼーション

乾燥種子の胚から抽出した全ポリ(A)⁺RNAを鋳型として合成した標識cDNA[胚の全cDNA]、および発芽2週間目の子葉から抽出した全ポリ(A)⁺RNAを鋳型として合成した標識cDNA[子葉の全cDNA]をプローブとして、各cDNAクローンについて、コロニー・ハイブリダイゼーションをおこない、オートラジオグラフィによってどのクローンがどの程度プローブと対合したかを見た。

図Ⅲ 4にその結果の一部を示す。オートラジオグラム上に比較的はっきりと黒化している斑[シグナル]が見られたコロニーの数を表Ⅲ 3に示す。胚のクローンのうち44クローンが胚の全cDNAと対合し、それより多い63クローンが子葉の全cDNAと対合した。子葉のクローンでは7クローンが胚の全cDNAと、子葉の全cDNAとは21クローンが対合した。

サザン・プロット・ハイブリダイゼーション

オートラジオグラム上のシグナルの濃度は、当該クローンと相同の塩基配列を持つmRNAの、量的な違いを反映すると考えられる。しかし、コロニーの大きさが不均一だったことや、ハイブリダイゼーション・洗浄の条件がフィルター毎に微妙に異なってしまった可能性もあるため、黒化度によって定量的に判断することは難しい。またコロニー・ハイブリダイゼーションでは、標識cDNAプローブが、プラスミドに挿入されているマツのcDNAとだけでなく、プラスミドの他の部分(ベクター)や大腸菌自身の染色体DNAとも非特異的に対合してしまい、偽のシグナルが生じる可能性も考えられる。そこで、少なくともシグナルが生じていたクローンのうち胚のクローンから42クローン、子葉のクローンから11クローンを任意に選び、同じcDNAプローブを用いてサザン・プロット・ハイブリダイゼーションをおこなうことにした。この手法を用いれば挿入部分を切断してからハイブリダイゼーションをおこなうので、染色体DNAやベクターと非特



図Ⅲ4 コロニー・ハイブリダイゼーションのオートラジオグラム (一部)
 胚の全cDNAあるいは子葉の全cDNAをプローブとして胚のクローンあるいは子葉のクローンの大腸菌コロニーとハイブリダイゼーションをおこなった。矢印はpPS13(←)とpPC27(→)のコロニーを示す。

表Ⅲ 3 コロニー・ハイブリダイゼーションで対合したクローンの数 胚のクローンあるいは子葉のクローンの大腸菌コロニーを用い、標識した胚および子葉の cDNA をプローブとしたコロニー・ハイブリダイゼーションをおこない、オートグラム上に明瞭な黒化斑がみられたクローンを選抜した。

供試したクローン	全クローン数	対合したクローン数		
		胚の cDNA とだけ	胚と子葉の両方	子葉の cDNA とだけ
胚のクローン	122	31	13	50
子葉のクローン	100	4	3	18

異的に対合したものかどうか確かめることができる。

小規模抽出法によって得たプラスミドを制限酵素 *EcoRI* と *HindIII* で処理してマツの cDNA を切り離し、電気泳動で分画した後、標識した胚および子葉の全 cDNA プローブ(コロニー・ハイブリダイゼーションに用いたのと同じ標識 cDNA)を用いてハイブリダイゼーションをおこなった。オートラジオグラフィによってどの程度対合したかを見た(図 III 5)。

cDNA 断片が少しでもプローブと対合していたクローンの数を表 III 4 に示す。選んだ 4 2 の胚のクローンのうち 1 8 クローンはコロニー・ハイブリダイゼーションの際に子葉の全 cDNA プローブとだけ対合したが、サザン・ブロット・ハイブリダイゼーションの結果では、子葉の全 cDNA プローブとだけ対合した胚のクローンはなかった。一方の子葉のクローンでも、1 1 クローンのうち胚の全 cDNA プローブとだけ対合したものはなかった。

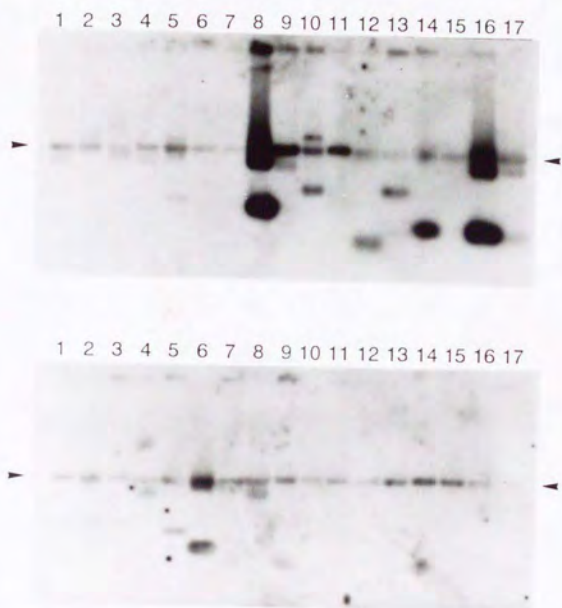
予想したとおりコロニー・ハイブリダイゼーションのオートラジオグラムには、偽のシグナルがかなり含まれていると推察される。

中規模抽出法によって cDNA を得た場合

挿入部分との対合が確認できたクローンのうち、任意に選んだ 2 5 クローンについてさらに定量的な分析をするために、胚および子葉の全 cDNA をプローブとして再びサザン・ブロット・ハイブリダイゼーションをおこなうことにした。定量性を増すためには、RNA などの混入が無い、精製度の高い cDNA が必要なので、塩化セシウム密度勾配遠心法を用いた中規模抽出をおこなった。

得られた各クローンの cDNA プラスミドを A_{260} から定量し、一定量(0.2 μ g)ずつを *PstI* で切断した後、サザン・ブロット・ハイブリダイゼーションをおこなった。用いる標識 cDNA を合成する際に、反応液中のポリ(A)⁺RNA および 5' - α -³²P]dCTP の濃度をそれぞれ 100ng/ μ l, 0.66 μ M とし、非標識 dCTP は加えなかった。

オートラジオグラフィの結果を図 III 6 に、対合が確認できたクローンを表 III 5 に示す。胚のクローンの 1 7 クローンのうち 7 クローンが胚の標識 cDNA プローブと対合した。特に pPS13 は多量に対合した。子葉の標識 cDNA プローブと対合したものはなかった。一方、子葉のクローンの 8 クローンのうち 5 クローンは子葉の標識 cDNA プローブだけと対合した。特に pPC82 と pPC86 は多量に対合した。pPC29 と pPC32 は胚と子葉のどちらの標識 cDNA プローブとも対合して



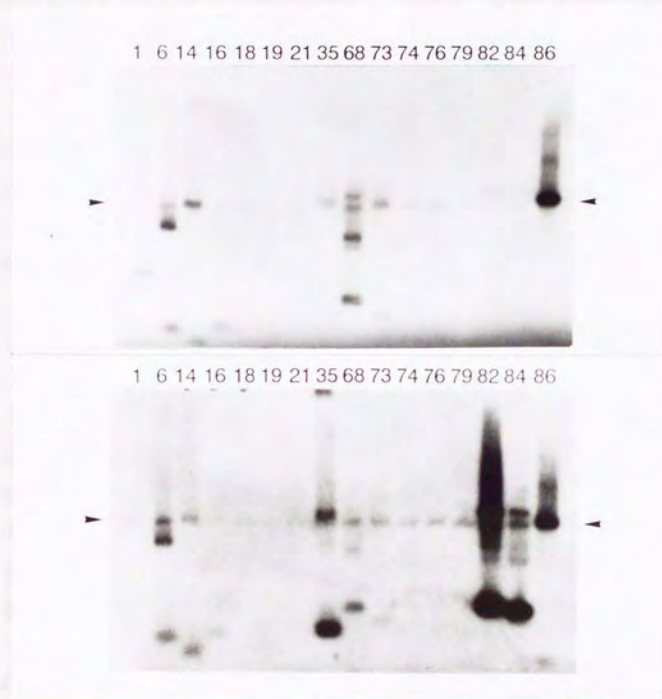
図Ⅲ5 小規模抽出法で得たcDNAを用いたサザン・ブロット・ハイブリダイゼーション(一部) 胚のクローンおよび子葉のクローンから小規模抽出法で抽出したプラスミドのcDNA挿入断片を切り出しアガロース電気泳動で分画した後、胚の全cDNA(上)あるいは子葉の全cDNA(下)をプローブとしてハイブリダイゼーションをおこなった。矢印は何も挿入させていないpUC8プラスミドのサイズ(2.7kb)を示す。各レーンの数字はクローン名の最後の数字を表す。

表Ⅲ 4 サザン・プロット・ハイブリダイゼーションで対合したクローンの数 小規模抽出法で調製したプラスミドを用いて、標識した胚および子葉のcDNAをプローブとしたサザン・プロット・ハイブリダイゼーションをおこない、オートグラム上で、挿入cDNA断片の部分が黒化していたクローンを選抜した。

供試したクローン	全クローン数	対合したクローン数		
		胚のcDNAとだけ	胚と子葉の両方	子葉のcDNAとだけ
胚のクローン	42	14	6	0
子葉のクローン	11	0	2	6

表Ⅲ 5 サザン・プロット・ハイブリダイゼーションで対合したクローン 中規模法で調製したプラスミドを用いて、標識した胚および子葉のcDNAをプローブとしたコロー・ハイブリダイゼーションをおこない、オートグラム上で、挿入cDNA断片の部分が黒化していたクローンを選抜した。黒化の程度が弱いものを-, 強いものを+, 特に強いものを++で表す。

	プローブとしたcDNA			プローブとしたcDNA	
	胚	子葉		胚	子葉
胚のクローン	pPS1	+	子葉のクローン	pPC27	++
	pPS2	+		pPC29	±
	pPS5	+		pPC32	±
	pPS13	++		pPC33	+
	pPS14	+	+	pPC35	++
	pPS16	±	±	pPC82	++
	pPS68	++	+	pPC84	++
	pPS73	±	±	pPC86	±



図Ⅲ6 中規模抽出法で得たcDNAを用いたサザン・プロット・ハイブリダイゼーション(一部) 胚のクローンおよび子葉のクローンから中規模抽出法で抽出したプラスミドのcDNA挿入断片を切り出しアガロース電気泳動で分画した後、胚の全cDNA(A)あるいは子葉の全cDNA(B)をプローブとしてハイブリダイゼーションをおこなった。矢印→←は何も挿入させていないpUC8プラスミドのサイズ(2.7kb)を示す。各レーンの数字はクローン名の最後の数字を表す。

いることが確認できたが、子葉の標識 cDNA とはわずかしは見られなかった。cDNA の抽出を小規模法でおこなった時のサザン・ブロット・ハイブリダイゼーションで対合した量が比較的少なかったクローンは、対合していることが確認できなかった。

制限酵素切断地図

サザン・ブロット・ハイブリダイゼーションの結果、多量に対合し、かつ比較的長い cDNA が挿入されている 7 クローンについて、互いに異なる遺伝子のクローンであることを確かめるために、制限酵素切断地図を作製した(図 III 7)。

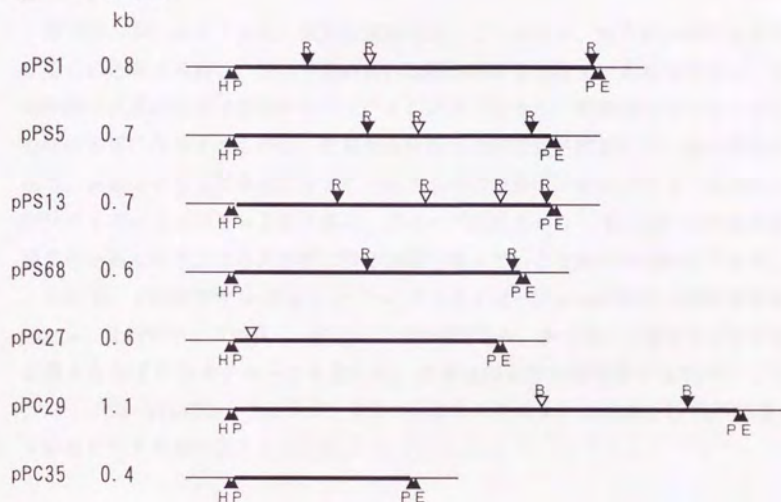
一意的に定められない箇所があったが pPC35 を除けば、それぞれのクローンが異なる遺伝子の転写産物を鋳型にして作られた cDNA から成っていることが確かめられた。pPC35 の cDNA は用いたどの制限酵素でも切断されなかったので、pPC27 あるいは pPC29 と同じ mRNA の一部分を鋳型として合成されたものである可能性がある。

III-2-4 実験結果のまとめ

クロマツの胚内には、様々な塩基配列を持つ mRNA が含まれており、その貯蔵型 mRNA は除タンパク質を伴う方法で抽出した場合、鋳型活性を持っていることが確かめられた(図 III 1)。

芽生えの幼根からは鋳型活性のあるポリ(A)⁺RNA が抽出できなかった。原因として、幼根には mRNA が含まれていないことが考えられる。しかしながら、幼根は活発に分化・成長している組織であり、遺伝子が発現していないとは考えにくい。もう一つの可能性として活性のある RNA が抽出できていないことが考えられる。一般に木本植物の組織は、草本に比べ、細胞壁が強固であることのみならず、液胞の発達が著しく核酸分解酵素活性が高いこと、ポリフェノール類(島田・樋口, 1974)やテルペン類、多糖類が多く含まれていることにより、核酸の抽出が困難であるとされている。これらの物質は核酸と非特異的に複合体を形成しフェノール抽出の際の水相への抽出を妨げ、さらに抽出後の酵素反応をも阻害する。本実験で用いた方法は、草本植物用に開発された SDS/フェノール法と塩化セシウム法を組み合わせ、純度の高い RNA を精製しようというものだが(向井ら, 1987)、それでも酵素反応を阻害する物質の混入を阻止しきれなかった

クローン サイズ



図Ⅲ 7 制限酵素切断地図 各クローンのプラスミドを制限酵素で処理した際の切断片から推定した切断部位を▼▽印で示した。利用した制限酵素は *Bam*HI(B), *Eco*RI(E), *Hind*III(H), *Rsa*I(R)。▽印の両側の断片は相互の位置関係が決定できなかったので両断片が入れ替わっている可能性もある。クロマツの cDNA は pUC8 プラスミドの *Pst*I で切断される部位に挿入させており、その両わきにそれぞれ *Eco*RI と *Hind*III で切断される部位がある。

可能性がある。

貯蔵型 mRNA の多くは、発芽 2 週間目の子葉では減少あるいは消失していることがわかった。逆に子葉に多く含まれる mRNA は乾燥種子胚にほとんど含まれていなかった。これらの結果は発芽後に機能する mRNA が貯蔵型 mRNA に含まれていないことを示唆しているが、このことは III-5 で詳細に調べる。

貯蔵型 mRNA の cDNA クローンが得られたので、次節以後の実験では、貯蔵型 mRNA の検出にこの cDNA クローンを用いて、個々の mRNA について調べる。

蓄積量の多い mRNA は、重要な機能を持っているため、たくさん転写されているものと考えられる。特に子葉あるいは胚のみに含まれている mRNA は、その時期の成長に必須の情報を担っていることが予想され、貯蔵型 mRNA の中でも胚に多量に存在するものは、貯蔵型 mRNA の諸性質を代表していると考えられる。実験をする上で多量に含まれているものほど検出が容易であり、またハイブリダイゼーションをおこなう際に、プローブにする cDNA は長い方が対合の特異性が高くなり、より高感度と同じ情報を持っているものだけを検出できる。

そこで、上記のサザン・ブロット・ハイブリダイゼーションの結果と制限酵素地図から、比較的サイズが長く、多量に対合が確認され、かつ互いに異なる cDNA が挿入されている 4 クローンを選んだ。貯蔵型 mRNA を代表するものとして pPS1、pPS5、pPS13 の 3 クローン、子葉の mRNA を代表するものとして pPC27 を、実験 III C ~ I で用いることにした。

III - 3 古種子の RNA

III - 3 - 1 貯蔵型 mRNA の寿命

真核生物の RNA は原核生物の RNA に比べ安定で長命であるとされ、例えば核を失った後の網状赤血球のヘモグロビンの遺伝情報を担う mRNA は数日間の寿命を持つ (Singer and Penman, 1972)。数年間にわたって新たな転写がおこなわれていないと考えられる休眠状態の乾燥種子に存在する mRNA ははるかに長命といえよう。休眠状態の乾燥種子に存在する mRNA を本論文では貯蔵型 mRNA と記すが、論文によって stable mRNA あるいは長寿命 mRNA long-lived mRNA

と記述することがあるのは、一般的に知られるmRNAより安定で長命だと考えられるからであろう。

しかし、貯蔵型mRNAが実際にどれくらい安定であるか、どれくらい長命であるのかについての研究は見当たらない。貯蔵型mRNAのほとんどの研究は採種したばかりの種子を用いておこなわれている。わずかにMaherchandani and Naylor (1971)が採種してから4年経過したカラスムギ *Avena fatua* の種子でmRNAの存在を示唆する結果を得ている。

もし、貯蔵型mRNAが発芽に必須なものであるならば、長期間貯蔵した種子でも発芽力があるかぎり貯蔵型mRNAを含んでいるはずである。もし、貯蔵型mRNAが発芽に不必要なものであるならば、貯蔵型mRNAが貯蔵中に消失していてもまだ発芽力を維持している種子の存在が考えられる。本節では、長期間貯蔵してあったクロマツ種子の中に貯蔵型mRNAが存在するかどうかを調べた。

多くの場合、種子は低温に保存すると長く貯蔵できるとされるが、種子の寿命は種によって異なり、さらに貯蔵条件によっても変わる。クロマツの種子は他の針葉樹と共に比較的長命とされており、具体的に何年間発芽力を維持できるかということについては、様々な貯蔵条件と様々な発芽条件での結果が報告されている。しかしながらクロマツに関するほとんどの報告は4年以内の低温貯蔵で70%以上の発芽率が得られるというもので、5年以上貯蔵したもの、あるいは全ての種子が発芽力を失うまでの年数について調べた例は少ない。白澤・小山(1918)によると、硝子瓶に密栓をして冷蔵庫(1~3℃)に貯蔵し5年後に20~24℃の発芽床に播種、4週間後の発芽率が43.3%であった。Schubert(1954)によれば、密封した罐に5℃で貯蔵、60日の低温湿層処理後昼24℃夜13℃で発芽、12週間後の発芽率は11~20年貯蔵の種子で8%、21年貯蔵で0%であった。

本実験では、まずクロマツの古種子の発芽力を調べた上で、貯蔵型mRNAが含まれているか否かを調べた。

なお、白澤・小山(1918)は採取後2、3年以上経過した種子を古種子、それより新しい種子を新種子と記しているが、本節は1年半貯蔵したものを新種子、7年間および14年間低温室に貯蔵したものを古種子と記す。

III-3-2 <実験III B、C>の材料と方法

種子および発芽

茨城県立林業試験場のクロマツ精英樹採種圃で1988年10月に採集したクロマツ *Pinus thunbergii* Parl. の母樹クローン、高萩1号と、古種子として、同試験場で1983年に採種した双葉1号、および1976年に採種した種子(クローン名不明)を用いた。古種子は密閉容器に入れ、冷蔵庫に貯蔵されていた。採種後の処理や発芽条件は実験ⅢA(Ⅲ-2-2)と同じである。

RNAの調製

RNAはSDS/フェノール法によって抽出した。①胚100個体を1.5mlのRNA抽出用緩衝液[0.1Mトリス-塩酸(pH9.0), 1%SDS, 1%アスコルビン酸ナトリウム, 5%メルカプトエタノール]および1.5mlフェノール・クロロホルム混液中で、超高速ホモジナイザー(ポリトロン)を用いて破碎、懸濁。②遠心分離した後、水相を等容量のフェノールでさらに2回抽出した。③最後に得られた水相からDNAと低分子RNAを除くため、2M塩化リチウムによる塩析をおこない、 -20°C のエタノールでRNAを沈澱させた。この操作を2度繰り返しRNA(主にrRNAとmRNA)を精製した。

ノーザン・ブロット・ハイブリダイゼーション

①中規模抽出法(Ⅲ-2-2)により得たプラスミドDNAに挿入されているクロマツのcDNAを、制限酵素PstIによって切り出した。②熱を加えて1本鎖にしたcDNAを鋳型として、クレノウ酵素(Amersham社マルチプライムDNAラベリングシステム)を用い、 $5' - [^{32}\text{P}] \text{dCTP}$ の存在下でプローブとするDNAを合成した。③全RNAをFourney *et al.* (1988)の方法に従ってホルマリン・アガロースゲル電気泳動で分画し、ナイロン膜(PAL社BIODYNE A)に転移させ、2時間 80°C に熱して定着させた。④ナイロン膜を50%ホルムアミド、 $5 \times \text{SSPE}$ [0.2Mリン酸一ナトリウム, 3M塩化ナトリウム, 20mMEDTA], 0.1%SDS, 0.1mg/mlサケ精子DNA, $5 \times \text{デンハルト}$ 溶液に浸して、減圧し脱気した。⑤ 42°C で数時間保温した後、①で標識したDNAをさらに加え、 42°C でナイロン膜上のRNAとの対合をおこなわせた。⑥ $6 \times \text{SSC}$, 0.1%SDS溶液で2回短時間洗浄した後、 $2 \times \text{SSC}$, 0.1%SDS溶液中で50分間室温、さらに 42°C の $0.1 \times \text{SSC}$, 0.1%SDS溶液中で20分間2回振盪しながら洗浄した。⑦風乾後、エックス線フィルム(FUJI RX)に密着させオートラジオグラフィをおこなった。

Ⅲ-3-3 〈実験ⅢB〉古種子の発芽率

実験の14年前(1976年)および7年前(1983年)に採種し乾燥後、罐に容れ約4℃の低温室に貯蔵されていたクロマツ種子(およそ100粒ずつ)の発芽力を調べた。全ての種子はベンレートで殺菌してから発芽させたが、多くの種子から菌が発生し、幼根が出現してもその後の成長を止めてしまうものもあった。

低温湿層処理をしなかった種子の植物育成チャンパーにいれて21日後の発芽率は、7年前のもので17%、14年前のもので15%であった(表Ⅲ6)。3週間の低温湿層処理をしても、植物育成チャンパーに移して16日後の発芽率は、7年前のもので12%、14年前のもので17%であった(表Ⅲ6)。

Ⅲ-3-4 〈実験ⅢC〉古種子中のmRNA

実験ⅢBで用いた古種子および実験の1年半前(1988年)に採種貯蔵してあったクロマツ種子からRNAを抽出した。得られたRNAを電気泳動して分画した結果を図Ⅲ8上に示す。RNAの抽出収率が安定していないので量的な判断はできないが、古種子からのRNAと新種子からのRNAとの泳動パターンに違いは見られない。泳動度と量比から判断して明らかにリボソームRNAと考えられるRNAのバンドが見られた。

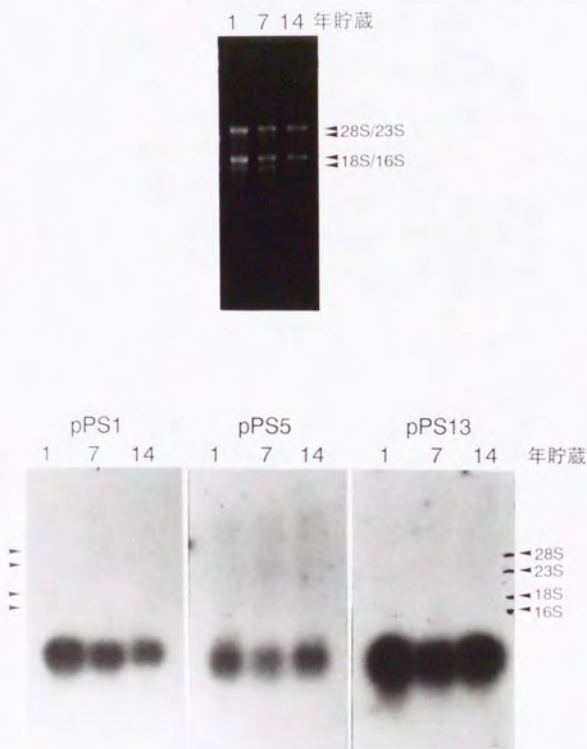
次にこれら古種子のRNAに貯蔵型mRNAが含まれるか否かを調べるために、貯蔵型mRNAのcDNA(pPS1, pPS5, pPS13)とのノーザン・ブロット・ハイブリダイゼーションをおこない、オートラジオグラフィによって対合したかどうかを見た(図Ⅲ8下)。その結果、3クローンのcDNAとも、貯蔵期間の長短に関わらずほぼ同程度に対合した。また、それぞれのcDNAが対合したmRNAの泳動度も貯蔵期間の長短によって異ならなかった。

Ⅲ-3-4 実験結果の考察

防菌に用いたベンレートは組織浸透性の殺菌剤であるので、種子表面だけでなく種子内部に潜んでいる菌も殺すと考えたが、古種子をベンレートで処理してから植物育成チャンパーに入れたところ、菌が種子の周りに増殖した。新種子でも、希に発芽培地に菌が増殖してしまうことがあるが、空気中の菌が混入したものと

表Ⅲ 6 古種子の発芽数 7年間あるいは14年間冷暗所に貯蔵されていた種子を、低温湿層処理後あるいは処理せずに植物育成チャンバー内で発芽させた。

貯蔵期間	低温湿層処理	全播種数	植物育成チャンバーに移してからの日数			
			4	13	16	21
7年	0日間	102	0	15		17
	21	104			12	
14年	0	110	3	14		16
	21	101			17	



図Ⅲ 8 古種子のRNA 1年間半および7年間、14年間貯蔵してあった種子から抽出した全RNAを2 μ gずつホルマリン・アガロースゲル電気泳動によって分画し臭化エチジウムで染色、可視化した(上)。分画したRNAをフィルター膜に転移させ、貯蔵型mRNAのcDNAをプローブとしたノーザン・ブロット・ハイブリダイゼーションをおこなった(下)。矢印は分子量標準用のRNAの泳動位置を示す。

思われ、また芽生えの成長に影響を及ぼしているようには見えない。古種子の場合、1時間のベンレート処理では十分に殺菌しきれない種子内部にまで菌が侵入しており、それが増殖したと考えられる。

本実験の場合、菌の増殖が古種子の発芽力低下にかなり影響したと考えられる。本研究では、外種皮が割け幼根が出現した時点で発芽したとし、その後、菌に覆われて成長を止めてしまった個体は発芽数に入れている。しかし、菌は種子内部にも増殖していて、幼根出現以前に成長を止めてしまった個体も多くあると考えられる。種子自身の発芽力は本実験で得られた値より高いのに、菌が内部に侵入してしまっていたために発芽が抑えられた可能性がある。ただ、貯蔵期間が長いために古種子に限り菌が内部まで侵入していたのか、あるいは新種子でも菌は侵入しているが種子の抗菌能力が高く菌の増殖が抑えられて発芽成長に影響が出ないのか、本実験の結果からは明らかでない。

発芽力を維持している種子と発芽力を失った種子とのRNAを分けて解析できず、また種子胚からのRNA抽出の収率が不安定で、さらに上述したように発芽力の値も種子自身の能力を表わしていない可能性があるので、種子の発芽力とRNA含量との関係は詳細に考察することができない。しかしながら、発芽力のある程度維持している古種子には貯蔵型mRNAやリボソームRNAが存在していることが明らかになった(図Ⅲ8)。

全RNA量を揃えて電気泳動し、貯蔵型mRNAのcDNAと対合させた結果から、全RNA量に対する貯蔵型mRNAの比率は3つのmRNAとも貯蔵期間の長短によってあまり変化がなかった(図Ⅲ8)。貯蔵型mRNAの電気泳動度が古種子でも新種子と同じであることは、貯蔵期間中に断片化や部分的分解による分子量の低下も起きていないことを示している。

本研究では、14年以上古いクロマツ種子が手に入らなかったため、発芽力を完全に失うのと貯蔵型mRNAが消失するのとどちらが先に起きるのが調べられなかったが、本実験で調べた範囲では、貯蔵型mRNAが消失しても発芽力がある。すなわち発芽には貯蔵型mRNAは不要であるという結果は得られなかった。古種子においても、全RNAに対する割合と分子量に関して新種子と同じように貯蔵型mRNAが維持されているという結果から、発芽に必要なmRNAが貯蔵型mRNAとして乾燥種子の中に貯蔵されている可能性が考えられる。

貯蔵されているmRNA分子が全て種子の登熟期に合成されてそのまま維持されているのか、あるいは分解と生合成が同時に起きていて総量として維持されて

いるように見えるだけなのかは明らかでない。しかし、含水量が極めて少なく、呼吸もほとんどなく (Hatano, 1963), エネルギー源である ATP もほとんどない (Mori, 1979) という乾燥種子内で、RNA がたとえわずかずつとはいえ生合成されているとは考え難い。おそらく、登熟期に生合成された RNA 分子が長期間分解されることなく保持されているのであろう。

種子の貯蔵型 mRNA は長命であるといわれながらも、本実験で明らかになったように 14 年間にもわたり貯蔵されていることは今まで示されていなかった。クロマツ種子だけが特別に長期間 mRNA が貯蔵しているのか、あるいは他の植物種でも種子が長期間保存できるものであれば、同様に長く貯蔵されている mRNA が存在するのかわからない。次節では、化学的に極めて安定な状態に保持されているといわざるをえないクロマツの貯蔵型 mRNA の、貯蔵形態について述べる。

III - 4 貯蔵型 mRNA の貯蔵形態

III - 4 - 1 リボ核タンパク質

真核生物の mRNA は、ヒストン mRNA 等の特殊な例を除き、まず hnRNA (異質核内 RNA) として核内で生合成される。hnRNA は核内でタンパク質と結合して hnRNP と呼ばれリボ核タンパク質複合体を形成していると考えられている。hnRNA はポリアデニル化や選択的破断などの修飾を受け、mRNA となって核から細胞質に出てくる。この時も裸の RNA 鎖ではなくタンパク質と結合してメッセンジャー・リボ核タンパク質複合体 [mRNP] を形成していると考えられている。mRNA にはタンパク質を合成するために複数のリボソームが結合し、ポリソームとよばれる複合体を形成する。ポリソームも一種の mRNP であるが、本論文ではリボソーム以外のタンパク質との複合体のみを mRNP と記すことにする。また mRNP のことを informosome とよぶ研究者もいたが、近年ではこのよび方は一般的でないようだ (Spirin and Ajtkhozhin, 1985)。

mRNP は初めドジョウの胚で発見され、続いてバフンウニの胚でも確認された。まだリボソーム RNA が合成されていない胞胚期ないし囊胚期で生成される mRNA の沈降係数をショ糖密度勾配遠心法で調べたところ、リボソーム (80S)

より小さい値(20-70 S)を持っていた。塩化セシウム勾配遠心法によりその mRNA の浮遊密度を調べたところ、リボソームのサブユニットの $1.52\text{g}/\text{cm}^3$ に対し、 $1.42\text{-}1.45\text{g}/\text{cm}^3$ と小さい値を示し、その値からタンパク質 : RNA の比が約 3 : 1 とリボソームよりタンパク質の割合が大きい RNA-タンパク質複合体を形成していることが明らかになった (Perry and Kelley, 1966; Spirin and Memer, 1965)。

その後、様々な動物で mRNP の存在が報告された (Dreyfuss, 1986)。mRNP の沈降係数は様々であるが浮遊密度がいずれもリボソームより小さい値を持つことが mRNP の証拠となる。ポリソームに組み込まれている mRNP はウサギ網状赤血球 (Lebleu *et al.*, 1971) やラット肝細胞 (Henshaw, 1968) などで知られている。この場合ポリソームを EDTA で処理することによって、ポリソームを形成しているリボソームを解離させた後の浮遊密度が脱タンパク質した mRNA より小さい値を持つことから mRNP の存在がわかった。EDTA 処理の他にもビューロマイシンで処理する方法 (Blobel and Sabatini, 1971)、細胞を飢餓状態にする方法 (Lee *et al.*, 1971) などによってポリソームからリボソームを解離させた報告もある。

ハウネンエビモドキ科 *Artemia salina* は陰蔽状態の休眠胚に mRNP が貯蔵されており、吸水に伴う代謝の再開と同時に直ちにポリソームに組み込まれ翻訳されることが示唆されている (Grosfeld and Lettauer, 1975)。このようにタンパク質合成のための鋳型活性を持つ mRNA が休眠状態の細胞の中で、mRNP を形成して貯蔵されている例はウニでも知られている (Spirin and Memer, 1965)。

フェノールによってタンパク質を除かれた状態で抽出すると鋳型活性を持つ mRNA がクロマツの乾燥種子にも存在しており (Yamamoto, 1982)、しかもそれが 14 年間も貯蔵されていることが実験 III C で示された。そこで本節ではこの貯蔵型 mRNA がどのような形態で細胞質に存在しているのかを調べた。

従来の mRNP の研究では、放射性同位元素で標識した RNA の前駆体を目的の組織や細胞に取り込ませて RNA を標識した後、細胞の分画などをおこない放射能の分布を調べることによって mRNP の解析をするという方法が一般的であった。しかしクロマツ種子の場合、休眠状態の種子内の mRNA を標識することは不可能であり、また堅い球果の中にある登熟期の種子に標識前駆体を取り込ませることもきわめて困難である。人工的な水溶液の中でも比較的容易に正常な成長をさせることができる動物の細胞に比べ、植物細胞の mRNP の研究が少ないの

は、RNAの標識が困難であることが一つの大きな要因であろう。本実験では mRNAを検出するために、従来のように直接mRNAを標識するのではなく、ノーザン・ブロット・ハイブリダイゼーション法を用いた。それによって、乾燥種子胚内のmRNAについてその存在形態を調べることができ、また個々のmRNAについて調べる事が可能となる。

Ⅲ-4-2 <実験ⅢD~H>の材料と方法

種子および発芽

実験には、茨城県立林業試験場のクロマツ精英樹採種圃で1988年10月に採集したクロマツ *Pinus thunbergii* Parl.の母樹クローン高萩1号の種子を用いた。採取後の処理と発芽条件は実験ⅡA(Ⅱ-2-1)と同じである。

リボソーム画分の調整

リボソーム画分の調整は Yamamoto *et al.* (1975)の方法を若干改変しておこなった。①胚を約40倍量の0.25Mショ糖+低塩濃度緩衝液[20mM H e p e s -水酸化カリウム(pH7.8), 24mM塩化カリウム, 3mM塩化マグネシウム, 1mM D T Tから成る低塩濃度緩衝液に0.25Mのショ糖を加えたもの]中で、テフロン・ホモジナイザーを用いて破碎。②懸濁液を12,000×g, 15分間, 0℃で遠心し、脂肪分や破碎されなかった組織等を除去した。③得られた水相を1mlずつの1.5Mショ糖および0.5Mショ糖+低塩濃度緩衝液の不連続層の上に重層し、日立RPR-65Tローターで41,000rpm(147,000×g), 2.5時間, 4℃で遠心して、核やミトコンドリア、小胞体、膜等を除いた。生じた沈殿をリボソーム画分とする。調整中のRNA分解酵素の活性を抑えるために、全ての作業は低温室内あるいは氷上でおこなった。

ショ糖密度勾配遠心法およびRNAの回収

①低塩濃度緩衝液あるいは高塩濃度緩衝液[20mM H e p e s -水酸化カリウム(pH9.0), 500mM塩化カリウム, 50mM塩化マグネシウム]に濃度を数段階に変えて調整したショ糖溶液を、ニトロセルロース遠心管内に重層し一晩静置することによって直線的な密度勾配を作製した。4.8mlの15-60%密度勾配は60%-0.8ml, 45%-1.6ml, 30%-1.6ml, 15%-0.8mlのショ糖溶液の重層によって作製した。4.8mlの10-30%密度勾配は30%-0.6ml, 25%-1.2ml, 20%-1.2ml, 15%-1.2ml,

10%-0.6mlのショ糖溶液の重層によって作製した。②適当な緩衝液に懸濁したりボソーム画分を2分間12,000×gで遠心し、緩衝液に懸濁されなかったものを沈殿除去した。上清を密度勾配の上に重層し、日立RPS-55T-2ローターで42,600rpmあるいはRPS-50で45,000rpm(いずれも221,000×g)、4℃で遠心した。③遠心後、ISCO社のフラクションコレクターと分光光度計を用いて遠心管内の254nmの吸光の分布を調べた。254nmはリボソームとRNAの特異的吸光波長である。④RNAの回収は③で用いたものとは別の遠心管で遠心したものを用いた。遠心管の底に注射針で穴を穿け、そこから試料を含んだショ糖溶液を滴下させ0.5mlずつ10本の試験管に分画回収した。⑤各画分からショ糖を除くと同時にRNAに結合しているタンパク質を除くため、5.7M塩化セシウム0.9mlに重層しBECKMAN TLA-100.2ローターで100,000rpm(435,700×g)、20時間、2℃で遠心。⑥生じた沈殿を10Mトリス-塩酸(pH8.0)、1mMEDTAに溶かし、エタノール沈殿を2回繰り返してRNAを精製した。

回収したRNAを用い、実験ⅢC(Ⅲ-3-2)と同様の方法でノーザン・ブロット・ハイブリダイゼーションをおこなった。プローブにはⅢ-2で選抜したpPS1、pPS5、pPS13、pPC27の他、クロマツのリボソームDNA[rDNA]のクローンpKS25Sも用いた。rDNAは、リボソームを構成するrRNAに対応するプローブで、これを用いることによって分画およびRNA回収の実験操作に関する正の対照とした。

ポリソーム画分の翻訳活性

①ショ糖密度勾配によって分画したポリソーム画分からショ糖を除くために、日立RPR65Tローターで41,000rpm、2.5時間、遠心をおこない、生じた沈殿を低塩濃度緩衝液に懸濁した。②このポリソーム画分0.17A₂₆₀ユニット/2μlに20μlウサギ網状赤血球ライセート無細胞タンパク質合成系(Amersham社)、3.5μl L-³⁵S-メチオニンを加え、鑄型活性を調べた。阻害実験では、さらに0.1mM オーリントリカルボン酸を加えた。③80分間、30℃で反応させた後、2μlをガラス濾紙に点滴。濾紙を氷冷した5%トリクロロ酢酸に10分間浸しタンパク質を沈殿させた後、37℃の0.3M水酸化ナトリウムに10分間浸しアミノアシルRNAを分解。さらに5%トリクロロ酢酸で1分間2回洗浄し、タンパク質に取り込まれなかったアミノ酸を除いた。④順次エタノールとエチルエーテルに浸し、風乾した後、液体シンチレーション計数器で濾紙上の³⁵Sの放射能を測定した。

Ⅲ-4-3 〈実験ⅢD〉 低塩濃度緩衝液中の貯蔵型mRNAの沈降係数

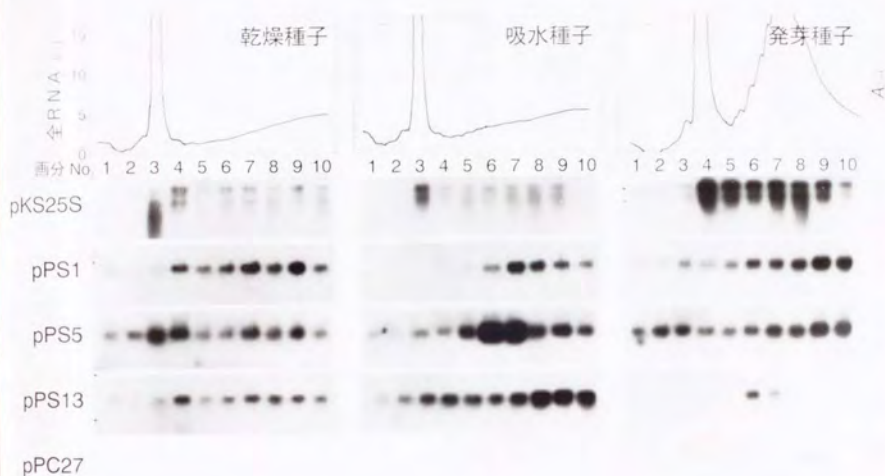
まず、貯蔵型mRNAが細胞質中でどのような沈降係数をもつ物質として存在しているかを調べた。

乾燥種子、およびベンレートによる防菌と3週間の低温湿層処理をした吸水種子、さらに低温湿層処理の後、幼根出現まで植物育成チャンパー内においた発芽種子から各々リボソーム画分を調整し、低塩濃度緩衝液に懸濁した。これを15-60%ショ糖密度勾配にのせ、1時間遠心し画分した。リボソームの画分を知るために254nmの吸光の分布を調べた。10の画分に分取し、各画分から全RNAを抽出し貯蔵型mRNAのcDNA(pPS1, pPS5, pPS13)およびrDNA(pKS25S)とのノーザン・ブロット・ハイブリダイゼーションをおこなった。ハイブリダイゼーションに供したRNAの量は、抽出されたRNA量の各画分間の比率をそのままにして、総量が20 μ gとなるようにした。それぞれのcDNAに対応するmRNAによって最も多く含まれる画分は異なったが、いずれの種子の場合でも3つの貯蔵型mRNAともモノソーム(70S)よりはるかに大きい沈降係数をもつ画分[ポリソーム画分]に存在した(図Ⅲ9)。

乾燥種子や吸水種子と異なり、発芽種子ではポリソーム画分に254nmの吸収の山が見られ、明らかにポリソームが形成されていることがわかった(図Ⅲ9)。発芽に伴い出現し増加するmRNAのcDNA(pPC27)は、おそらく発芽期に必要な情報を担っているため発芽種子内ではポリソームに組み込まれていると考え、貯蔵型mRNAの分布と比較した。発芽種子での貯蔵型mRNAとほぼ同じような画分に分在しており(図Ⅲ9)。貯蔵型mRNAもポリソームを形成していることが示唆された。

ノーザン・ブロット・ハイブリダイゼーションによる電気泳動度から(図Ⅲ8)、pPS1やpPS5、pPS13に対応するmRNAの分子量は16S rRNAよりもはるかに小さいことがわかり、いずれのmRNAも沈降係数はモノソームより小さいと予想される。それに関わらず、ポリソーム画分に検出されたということは何か結合しているためであると考えられる。このポリソーム画分にみられる複合体の実体を考察するために実験ⅢE~Gをおこなった。

Ⅲ-4-4 〈実験ⅢE〉 高塩濃度緩衝液中での貯蔵型mRNAの沈降係数



図Ⅲ 9 貯蔵型 mRNA の沈降 乾燥種子および吸水種子、発芽種子のリボソーム画分を低塩濃度緩衝液中で15-60%ショ糖密度勾配遠心法により分画した。遠心時間は1.5時間。矢印は沈降の方向を実線は遠心管内の254nmの吸光の分布を示す。分取した10画分からRNAを精製し、貯蔵型 mRNA の cDNA (pPS13, pPS5, pPS13) および子葉の mRNA の cDNA (pPS27) および rDNA (pKS25S) をプローブとしたノーザン・ブロット・ハイブリダイゼーションをおこなった。ハイブリダイゼーションに供した各画分のRNA量を棒グラフで表す。

リボソームは、ポリソームを形成している場合は高塩濃度緩衝液中でも解離しないが、モノソームの場合は高塩濃度緩衝液中で5分間30℃に温めることによって2つのサブユニットに解離する(Yamamoto and Sasaki, 1979)。貯蔵型mRNAの沈降係数を大きくしている物質が高塩濃度処理によって解離するものかどうかを調べた。

リボソーム画分を高塩濃度緩衝液に懸濁し、5分間30℃の加温の後に低塩濃度緩衝液中の15-60%ショ糖密度勾配遠心法によって分画した。実験ⅢDと同様にして貯蔵型mRNAの分布を調べたところ、モノソームより沈降係数の大きいポリソーム画分に分布していたが、高塩濃度処理をしない場合よりは沈降係数が小さくなっていった(図Ⅲ10)。

貯蔵型mRNAに結合している物質の一部は高塩濃度処理によって解離することが示された。しかしながら、高塩濃度処理をしてもなお沈降係数がモノソームより大きいことは、乾燥種子内のポリソーム画分に存在するmRNAはポリソームを形成している可能性を示唆している。

Ⅲ-4-5 〈実験ⅢF〉 発芽種子のポリソームのピューロマイシンによる解離

リボソームをmRNA(あるいはmRNP)から解離させるには、EDTAによって溶液の2価陽イオン濃度を低下させる方法と高塩濃度下でピューロマイシンを加え加温する方法が知られているが、前者の方法ではリボソーム以外の物質も解離する可能性がある。そこで本実験ではピューロマイシン処理をおこなうことにした。まずクロマツのポリソームに対するピューロマイシンの作用条件を調べた。

発芽種子はポリソームに富むため、このリボソーム画分を用いれば、ショ糖密度勾配遠心分離をした後の254nmの吸光の分布からポリソームの存在を容易に知ることができる。発芽種子から調整したリボソーム画分を下に示した諸条件でピューロマイシン処理した後、ショ糖密度勾配遠心分離をおこない254nmの吸光を走査しポリソームの有無を調べた。ラット肝臓のポリソームの場合、塩化マグネシウム濃度が2mM以下、塩化カリウム濃度が500mM、10分間37℃にするとリボソームがmRNAから離れ、サブユニットに分かれる(Blobel and Sabatini, 1971)。ウサギ網状赤血球(Blobel, 1971)およびマウスのガン化細胞L細胞(Blobel, 1973)のポリソームもほぼ同じ条件で解離する。一方、クロマツの発芽種子のモノソームは500mM塩化カリウム、50mM塩化マグネシウムの高塩濃度緩衝液中で30℃に温め

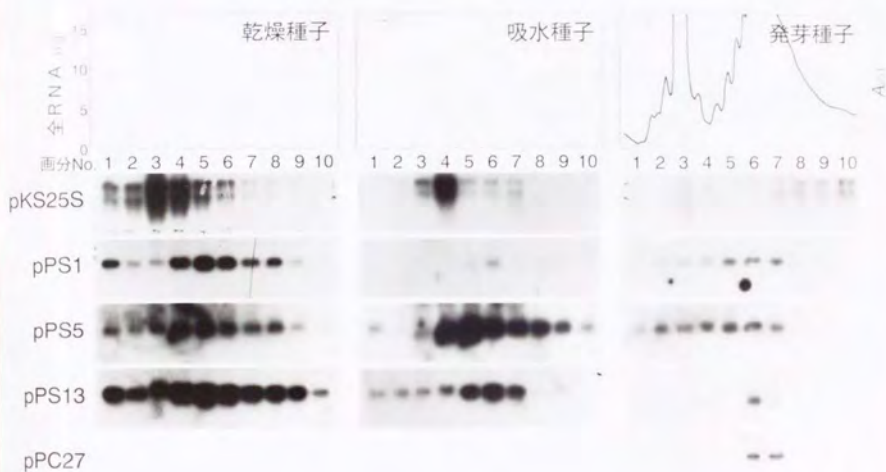


図 10 高塩濃度処理後の貯蔵型 mRNA の沈降 乾燥種子および吸水種子、
 発芽種子のリボソーム画分を高塩濃度処理した後、高塩濃度緩衝液中で 15-60%
 ショ糖密度勾配遠心法により分画した。遠心時間は 1.5 時間。矢印は沈降の方向
 を実線は遠心管内の 254nm の吸光の分布を示す。分取した 10 画分から RNA を精
 製し、貯蔵型 mRNA の cDNA (pPS13, pPS5, pPS13) と子葉の mRNA の cDNA
 (pPS27) および rDNA (pKS25S) をプローブとしたノーザン・ブロット・ハイブリ
 ダイゼーションをおこなった。ハイブリダイゼーションに供した各画分の RNA
 量を棒グラフで表す。

ると2つのサブユニットに分かれることが分かっているので (Yamamoto and Sasaki, 1979), 本実験では塩化カリウムの濃度は500mMに固定し, 塩化マグネシウムの濃度と反応の温度を変えた。すなわち, 次の6つの条件を設定した。

処理	ピューロマイシン	塩化マグネシウム	反応温度	ショ糖密度勾配
A	1 mM	2 mM	0 °C	高塩濃度
B	1 mM	2 mM	37 °C	高塩濃度
C	1 mM	50 mM	0 °C	高塩濃度
D	1 mM	50 mM	37 °C	高塩濃度
E	1 mM	50 mM	37 °C	低塩濃度
F	0 mM	50 mM	37 °C	高塩濃度

37°Cの加温の有無に関わらず, 塩化マグネシウム濃度が2 mMでも50 mMの場合と同じように単体のリボソームが大小2つのサブユニットに解離した(図 III 11)。ただし低塩濃度緩衝液中に作製したショ糖密度勾配で遠心分離すると, サブユニットの一部は再び会合し単体のリボソームとなる。ピューロマイシンを添加し2 mM塩化マグネシウム存在下, 37°Cで加温した場合にポリソームが消失した(図 III 11)。

クロマツのポリソームにおいても, 他の生物種で知られるように, 500 mM塩化カリウム, 2 mM塩化マグネシウム存在下でピューロマイシンを加え37°Cで反応させると, リボソームがmRNAから2つのサブユニットに解離することが明らかになった。

III-4-6 〈実験 III G〉 乾燥種子のポリソーム画分のピューロマイシン処理

乾燥種子のポリソーム画分に存在する複合体がピューロマイシン処理によって解離するかどうかを調べた。乾燥種子のリボソーム画分を次の3条件で処理した後, 前項の実験と同様にショ糖密度勾配遠心分離をおこない, 254 nmの吸光の分布を調べた。なお塩化カリウム濃度はすべて500 mMとした。

処理	ピューロマイシン	塩化マグネシウム	反応温度	ショ糖密度勾配
A	1 mM	2 mM	37 °C	高塩濃度
B	0 mM	2 mM	37 °C	高塩濃度
C	0 mM	50 mM	37 °C	高塩濃度

2 mM塩化マグネシウム中でも50 mMの場合と同様にリボソームはサブユニットに

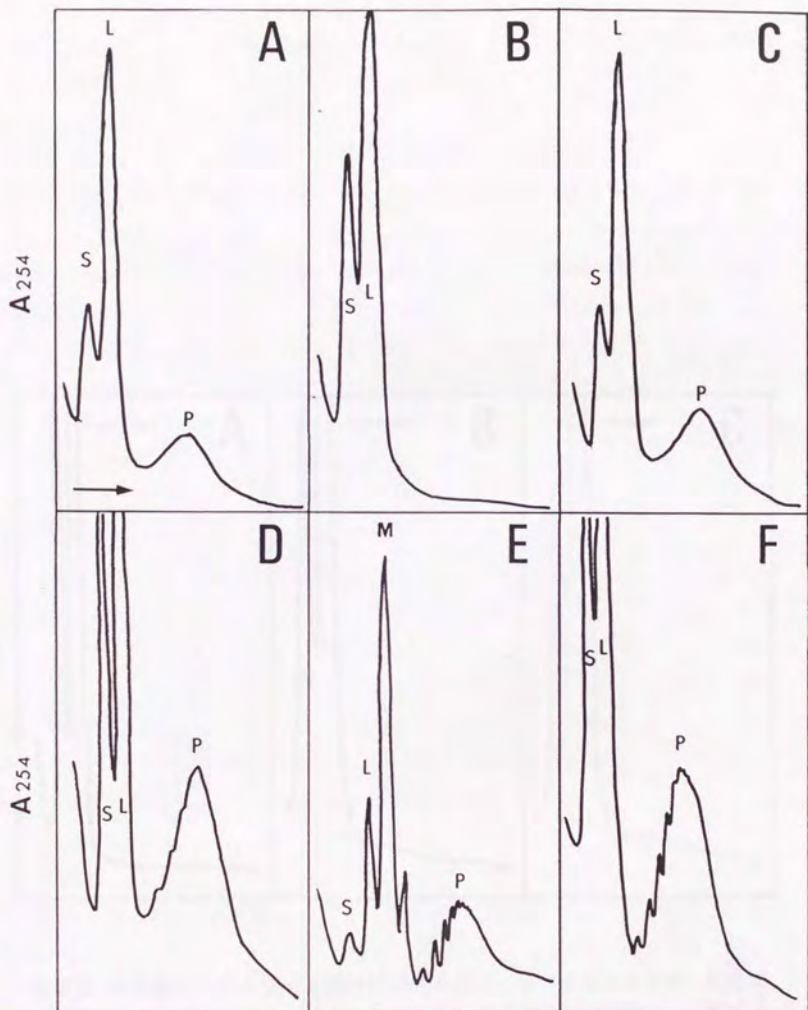
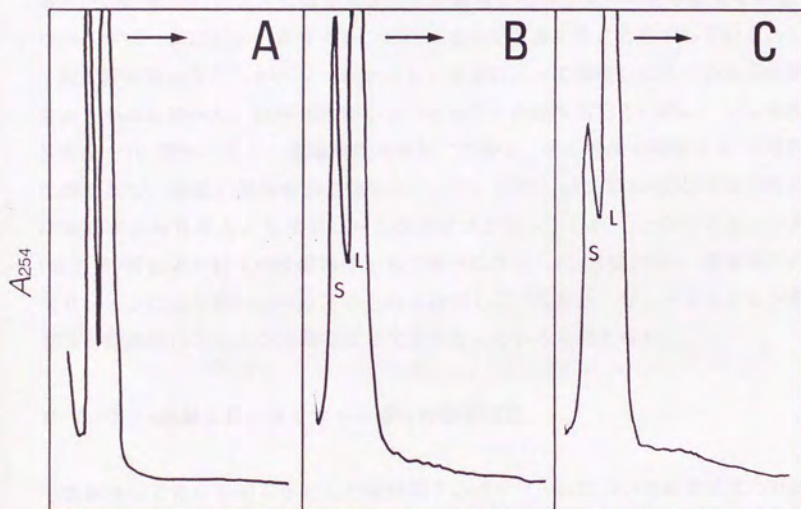


図11 発芽種子のポリソームのピューロマイシンによる解離 発芽種子のリボソーム画分をA~Fの6条件で処理し(本文参照), 15-60%ショ糖密度勾配遠心法により分画した。A~Eは1.5時間, Fのみ1時間の遠心をおこなった。矢印は沈降の方向を実線は遠心管内の254nmの吸光の分布を示す。M, L, S, Pは, それぞれ単体のリボソーム, リボソームの大サブユニット, 小サブユニット, ポリソームによる吸光の極大を示す。



図Ⅲ12 乾燥種子のリボソーム画分に対するピューロマイシンの影響 乾燥種子のリボソーム画分をA～Cの3条件で処理し(本文参照), 15-60%ショ糖密度勾配遠心法により分画した。遠心時間は1時間15分。矢印は沈降の方向を実線は遠心管内の254nmの吸光の分布を示す。LとSは、それぞれリボソームの大サブユニット, 小サブユニットによる吸光の極大を示す。

解離した。ピューロマイシンを加えない場合にはポリソーム画分に相当する画分に254nmの吸光が見られたが、ピューロマイシンで処理するとこの吸光がなくなった(図Ⅲ12)。

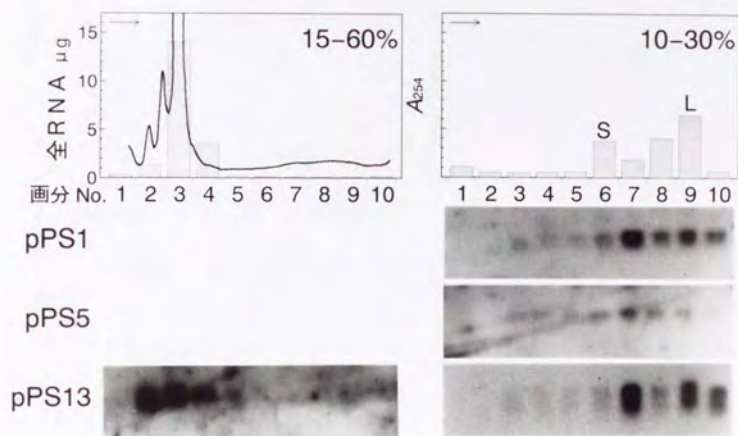
乾燥種子のリボソーム画分を上記Aの条件でピューロマイシン処理した後、15-60%ショ糖密度勾配遠心分離法で分画、各画分から回収・抽出したRNAと貯蔵型mRNAのcDNA(pPS1, pPS5, pPS13)とのノーザン・ブロット・ハイブリダイゼーションをおこなった。但し、ショ糖密度勾配は実験ⅢDに合わせて低濃度緩衝液中に作製した。貯蔵型mRNAはピューロマイシン処理をしない場合に比べてはるかに小さい沈降係数を持つ画分に存在した(図Ⅲ13左)。このことは乾燥種子内の貯蔵型mRNAにはリボソームが結合してポリソームを形成しており、そのリボソームはピューロマイシン処理によって解離することを示している。

次に貯蔵型mRNAがピューロマイシン処理によって移行した画分の沈降係数をより詳細に調べた。沈降係数の小さい部分の分離能を高めるために、ショ糖密度勾配を10-30%に変え、高塩濃度緩衝液に作製し、遠心分離の時間も2.5時間に長くして、同様の解析をおこなった。pPS1, pPS5, pPS13のいずれのcDNAに対応するmRNAともリボソームの大サブユニット(60S)と小サブユニット(40S)の間およそ45Sの沈降速度をもつ画分に存在した(図Ⅲ13右)。乾燥種子のポリソームにはリボソーム以外のものも結合しているため、ピューロマイシン処理後も貯蔵型mRNAの沈降速度が大きくなっていると考えられる。

Ⅲ-3-7 <実験ⅢH> ポリソーム画分の翻訳活性

実験ⅢGで存在を明らかにした乾燥種子のポリソームについて翻訳活性の有無を調べた。乾燥種子のリボソーム画分を低塩濃度緩衝液に懸濁し、低塩濃度緩衝液中に作製した15-60%ショ糖密度勾配遠心法により5つに分画し、沈降係数の大きい方の3つの画分を遠心分離してショ糖を除いた。得られたポリソーム画分には、アミノ酸や転移RNA、ATPなど、タンパク質合成に必要な物質が含まれていないと考えられるので、無細胞タンパク質合成系(ウサギ網状赤血球ライセート)を加えて $[^{35}\text{S}]$ メチオニン存在下で反応させた。タンパク質を明らかに生成していると考えられる発芽種子も対照として、同様に処理しポリソーム画分の翻訳活性を調べた。

乾燥種子、発芽種子いずれのポリソーム画分を加えた場合でも、タンパク質へ



図Ⅲ13 貯蔵型mRNAのピューロマイシン処理後の沈降 乾燥種子のリボソーム画分をピューロマイシンで処理した後、低塩濃度緩衝液中の10-60%ショ糖密度勾配(左)で1時間15分あるいは高塩濃度緩衝液中の10-30%ショ糖密度勾配(右)で2時間30分遠心分画した。矢印は沈降の方向を実線は遠心管内の254nmの吸光の分布を示す。分取した10画分からRNAを精製し、貯蔵型mRNAのcDNA (pPS1, pPS5, pPS13)をプローブとしたノーザン・ブロット・ハイブリダイゼーションをおこなった。ハイブリダイゼーションに供した各画分のRNA量を棒グラフで表す。LとSは、それぞれリボソームの大サブユニット、小サブユニットが含まれる画分を示す。

のメチオニンの取り込みが、ライセート内在のmRNAによる取り込みの2~3倍に増加した(表Ⅲ7)。

その取り込みが既にmRNAに結合していたクロマツのリボソームに依るものか、反応を始めてから結合したライセート中のリボソームに依るものかを明らかにするために、反応液にオーリントリカルボン酸を加えて反応させた。オーリントリカルボン酸はmRNAの40Sリボソームサブユニットへの結合を阻害し、0.1mM以下の低濃度でペプチドの延長反応に影響なく翻訳開始反応をほぼ完全に阻害する(Fresno and Vazquez, 1980)。

発芽種子の沈降係数の一番大きい画分のメチオニンの取り込みはオーリントリカルボン酸を加えても低下しなかった(表Ⅲ7)。その他の画分では取り込みが低下し、乾燥種子では3つのポリソーム画分とも阻害されメチオニンが取り込まれなかった(表Ⅲ7)。

乾燥種子のポリソームに組み込まれているmRNA自身には鋳型活性があるが、そこに結合していたリボソームに依ってはタンパク質の生合成が進まないことが明らかになった。

Ⅲ-4-8 実験結果のまとめと考察

mRNPの検出法の一つに、予め標識前駆体を取り込ませてmRNAを標識しておき、その沈降係数と浮遊密度を求めるという方法がある。動物の場合は、水相中でも休眠を誘導したり組織培養することが可能なので、容易に標識前駆体を取り込ませることができるが、植物では特に種子胚の場合、湿润状態で休眠させることは不可能であり、正常な機能を保ったまま組織を培養することも困難である。コムギ *Triticum vulgare* 種子のmRNPについて Ajtkhozhinらが研究しており、発芽過程で転写されるmRNAがmRNPを形成すること(Ajtkhozhin *et al.*, 1973, 1976)、種子の成熟に伴いmRNAがmRNPに変化することを報告している(Ajtkhozhin and Akhanov, 1974)。但し成熟に伴うといっても、彼らの実験は登熟期の種子から摘出した胚にRNAの標識前駆体を取り込ませた後に人為的に乾燥させたものであり、自然に乾燥した種子の胚と同様に発芽するとはいうものの、実験の結果は実際の乾燥種子胚内の状態を反映しているとは限らない。Silverstein (1973)もコムギ種子のmRNPを調べているが彼の研究は発芽時に標識前駆体を取り込ませたもので休眠中のmRNAについてはない。ライムギ

表Ⅲ 7 ポリソーム画分の翻訳活性 乾燥種子と発芽種子のリボソーム画分を低塩濃度緩衝液中に作成した15-60%ショ糖密度勾配遠心法により分画した。画分の番号は図Ⅲ 13の画分に対応する。各画分をウサギ網状赤血球ライセートに加え、 $[35S]$ メチオニン存在下で反応させた。ライセートに含まれるリボソームの活性を抑えるため、 $0.1mM$ オーリントリカルボン酸 (ATA) を加えた。反応後トリクロ酢酸沈澱物の放射能を測定した。

種子	画分	$[35S]$ メチオニンの取り込み $[x10^3cpm/25\mu l$ 反応液]	
		ATA無添加	ATA添加
乾燥種子	5 & 6	0.63	0.75
	7 & 8	2.75	1.00
	8 & 10	4.02	0.79
発芽種子	5 & 6	3.30	1.19
	7 & 8	4.10	2.04
	9 & 10	2.41	2.47
RNA無添加対照		1.41	0.89

Secale creale についても同様に摘出胚を標識した研究がある (Peumans *et al.*, 1979)。

植物の mRNP の解析には、分画後の各画分の鋳型活性の分布によって mRNA を検出するという方法も採られている。ダイズ *Glycine max* (Mori and Matsushita, 1970) やコムギ (Peumans *et al.*, 1978) などの種子の研究をはじめ、いくつかの報告がある。しかしながら、この場合も mRNP が必ずしも鋳型活性をもっていないという恐れがある。

本研究では貯蔵型 mRNA の検出に標識 cDNA を用いて、球果の中で無傷のまま乾燥した種子中の mRNA がどのような状態にあるかを調べた。Pramanik *et al.* (1992) は同様な cDNA を用いたノーザン・ブロット・ハイブリダイゼーションによってムラセキウマゴヤシ *Medicago sativa* 種子の登熟期の mRNA が mRNP を形成していることを報告している。本実験の結果、クロマツにおいてもコムギなどで報告されていると同様に、遊離した mRNA 分子や単体のリボソームより沈降係数の大きいポリソーム画分に mRNA は存在した (図 III 9)。

このポリソーム画分に存在する複合体がポリソームであるかどうかを調べるために一連の実験をおこなったところ、複合体を形成しているものの一部はリボソームであるが、他にも何かか結合していることが明らかになった (実験 III E, III G)。その物質がタンパク質であるかどうかは明らかにできなかったが、mRNP を形成している可能性がある。

mRNP が存在することを証明するには、mRNA が遊離のものより沈降係数が大きく、さらに浮遊密度が小さいことを示す必要がある (Spirin and Memer, 1965)。本研究にあたり、浮遊密度の測定も試みたが、浮遊密度を調べるにはその複合体をホルムアルデヒドで固定しなければならず (Spirin *et al.* 1965)、そうするとその後 mRNA 回収・抽出が困難となり、ノーザン・ブロット・ハイブリダイゼーションでの検出ができなかった。複合体の固定方法や mRNA の回収方法を改良する必要がある。

Baltimore and Huang (1970) によると、非特異的に mRNA に結合しているタンパク質は高塩濃度 (0.5M 塩化ナトリウム) 液中で解離してしまう。本章の実験 III G で 0.5M 塩化カリウム溶液中で貯蔵型 mRNA はおよそ 4.5 S の沈降係数をもつことが明らかになった。このことは貯蔵型 mRNA が形成している複合体はリボソーム画分の抽出中などに生じた非特異的結合ではなく、実際の乾燥種子の中で特異的に形成されたものであると考えられる。

前述したように、mRNP にリボソームが結合した状態のものは他の生物種で

も知られているリボソームをはずした後のそれらのmRNPの沈降係数は、マウス肉腫細胞 (Lee *et al.*, 1971) では30~150 S, ラット肝細胞 (Henshaw, 1968) では20~100 Sと広い範囲にわたっている。これは一つのmRNA分子に結合するタンパク質が多様であるため、あるいは結合するタンパク質の数が不均一であるためであろう。一方クロマツ乾燥種子のリボソーム画分に存在する複合体のリボソームをはずした後の沈降係数は、少なくとも本研究で調べた3つのmRNA種ではすべて45 S付近の値をもっていた。このことから、クロマツ乾燥種子の貯蔵型mRNAの各分子に40 Sぐらいの沈降係数をもつものが結合していると考えられる。その物質は一つで40 Sの沈降係数をもつものなのか、あるいは沈降係数のより小さい物質が一定の数だけ個々のmRNA分子に結合して総計で40 Sになるのかは不明である。

複合体を形成している物質が40 Sの沈降係数をもつ一つのものとすると、その候補としてリボソームの40 Sサブユニットが考えられる。タンパク質合成の際、mRNAの翻訳開始部位を認識するのはいくつかの開始因子と結合した40 Sサブユニットであり、その後60 Sサブユニットが結合して活性型80 Sリボソームを形成するとされている。クロマツ乾燥種子内の貯蔵型mRNAではmRNAの翻訳開始部位に一つの40 Sサブユニットが強固に結合した状態で止められており、タンパク質の生合成が抑制されていると考えることも可能である。mRNAを含む複合体で45 Sの沈降係数をもつものは動物の細胞で存在していることが見い出されている (Spirin, 1969 や Isakov and Madin, 1994 の引用文献)。そのうちいくつかは浮遊密度などから40 Sサブユニットとの複合体であると考えられている。植物での研究は少ないが、コムギの胚の鋳型活性が40 S付近の画分で高いことが報告されており (Schultz *et al.*, 1972), 近年では Isakov and Madin (1994) がコムギの胚のmRNAが45 Sの複合体を形成していることを示し、40 Sサブユニットや開始因子との複合体であろうと推察している。

複合体を形成しているものを明らかにするためには、タンパク質が結合していると仮定して、ピューロマイシン処理後に分画し、各画分のタンパク質を電気泳動法で分画して45 S画分に特異的なタンパク質を調べるといった方法が考えられるが、リボソーム画分に多量に含まれるリボソームのタンパク質の混入は避けられず、リボソームタンパク質に比べ少量であると考えられる結合タンパク質を判別することは困難であろう。

複合体を形成している物質はmRNAの情報のタンパク質への翻訳を阻害して

いる可能性がある。ピューロマイシンはアミノアシル転移RNAの類似体として機能し、翻訳をおこなっているリボソームをサブユニットに解離させるという作用をもつものであるが、貯蔵型mRNAに結合しているリボソームがピューロマイシンによって解離するということから、乾燥種子中の貯蔵型mRNAは翻訳されると同じ形態でリボソームが結合していると考えられる。しかしながら、実験ⅢHの結果、mRNA自身は鋳型活性があるが、そこに結合しているリボソームに依ってはタンパク質が生合成されないことが明らかになった。このことから、リボソームのペプチド延長反応を阻害する物質がmRNA上に結合している可能性が考えられる。このようなタンパク質合成を阻害するRNPの存在はブラインシュリンプ (Piot *et al.*, 1984) などで知られている。

分子生物学の興隆に伴い遺伝子の発現制御に関する研究が盛んにおこなわれた。その結果、DNA上に設計図が記録されている酵素の量は、多くの場合その酵素のmRNA量に対応しており、mRNAの生合成すなわち転写段階での制御が重要であることが示された。転写段階での研究が集中的になされその制御機構がかなり解明されている。しかしながら転写後の制御、特に翻訳段階での制御機構も近年注目されはじめた。例えば酵母 *Saccharomyces cerevisiae* では翻訳過程のうちペプチド延長反応ではなく翻訳開始因子が制御を司っていることが明らかにされた (Muller and Trachsel, 1990)。高等植物での翻訳段階の遺伝子発現制御はまだ研究例が少ない。例えばヒユ属 *Amaranthus* の光合成関連遺伝子 *rbcS* の翻訳産物である酵素は明所から暗所に移された直後2時間以内に生合成されなくなるが、mRNAは6時間以上存在する。この時mRNAはポリソームに組み込まれていることから (Berry *et al.*, 1988)、延長因子が翻訳制御をおこなっていると推測される (Berry *et al.*, 1990)。 *rbcS* 以外でも葉緑体など色素体の遺伝子発現は転写段階よりそれ以降の段階での制御を強く受けていることが認められている (Deng and Gruijssem, 1987; Mullet and Klein, 1987)。

転写以降の段階の発現制御にはmRNAの安定化機構の解明が重要な課題であり、いくつかの機構が探求されている (Atwater *et al.*, 1990 に総説)。微生物ではペプチドの延長を抑える翻訳阻害剤を施与するとmRNAが分解され難くなることが分かっている (例えば Lundberg *et al.*, 1988)。その機構は解明されていないが、mRNAに結合したリボソームがRNA分解酵素の作用を邪魔しているという説がある。リボソーム以外でも、mRNAのポリアデニル鎖に特異的に結合しmRNAの分解を抑制する働きのある、mRNA安定化タンパク質とよばれるタ

ンパク質が知られている (Bernstein and Ross, 1989)。mRNA 安定化タンパク質は mRNA 一分子に複数結合してはじめて機能するので、沈降係数は 45S よりはるかに大きくまた不均一になる。クロマツ乾燥種子で見い出された mRNP 様複合体は mRNA 安定化タンパク質ではないであろう。

しかしながら、クロマツ乾燥種子中の mRNA も mRNP 様複合体を形成することによってペプチド延長反応が阻害され、そのためリボソームが結合したままになり、mRNA が安定化されていると考えることができる。

III - 5 発芽に伴う貯蔵型 mRNA の消長

III - 5 - 1 発芽前後の遺伝子発現

休眠期から発芽期にかけて物質代謝の面で大きな転換が生じ、それを反映してこの時期には種子に含まれる物質の構成が変化する。

Dure *et al.* (1981) はワタの種子の研究から、休眠前後に生合成されるタンパク質を、登熟期までに合成されるもの、登熟期と発芽初期に合成されるもの、登熟期から発芽期にわたり恒常的に合成されるものなどのタイプ分けをおこなっている。mRNA についても、Dure (1985) は登熟期から発芽期にかけての蓄積量の変化に基づいていくつかの組にわけた模式図を示している。休眠期に存在するものとしては、アクチンやチューブリン、カルモジュリンの mRNA など恒常的に発現しているもの、まだ機能不詳の Lea タンパク質の mRNA、登熟後期から発芽期まで存在する mRNA の 3 組を挙げている。登熟期に豊富にある mRNA は休眠種子にほとんど含まれていないことがダイズを扱った Goldberg *et al.* (1981) によって示されているが、例えばイネ *Oryza sativa* のレクチン mRNA は登熟後期に減少するもののわずかに存在する (Wilkins and Raikhel, 1989)。エンドウ *Pisum sativum* でも貯蔵型 mRNA の約 0.1% がレクチンの mRNA であると報告されている (Peumans *et al.*, 1980)。Lea タンパク質は登熟後期に蓄積するタンパク質でその mRNA は休眠期に最も多く存在することがいくつかの種で知られている (例えば Almoguera and Jordano, 1992)。その機能はまだ解明されていないが ABA (Galau *et al.*, 1986) や種子以外でも高浸透圧ストレスによって誘導されることがわかっている (Marcotte *et al.*, 1989 に総説)。アブラナ *Brassica napus* 種子

を材料としてcDNAを用いた実験からイソクエン酸リアーゼやリンゴ酸合成酵素をはじめ(Comai *et al.*, 1989), 他にも機能はまったく未明だが発芽期に機能すると考えられるいくつかのmRNAが登熟後期から発芽期にかけて蓄積されることが明らかになっている(Harada *et al.*, 1988)。さらにHarada *et al.* (1988)は14のcDNAクローンを用いた実験でアブラナの種子発芽前後のmRNAの消長を器官毎に調べ、発芽後胚軸に多く蓄積するmRNAは登熟期初期にも多く、子葉に多いmRNAは登熟後期に蓄積するという、2つの発現制御パターンを見いだしている。発芽後の器官別に増加するという事は、これらのmRNAが発芽期にもそれぞれの器官で機能していることを示唆している。

クロマツの貯蔵型mRNAは、転写活性がほとんどないと考えられる乾燥種子に含まれていることから、休眠期に入る前に生合成されたものであると考えられる。そして登熟期に生合成されたmRNAのうち少なくとも一部は分解されず休眠期間中にも維持されているのであろう。このような貯蔵型mRNAは登熟期以降もなんらかの機能をはたしていると考えられる。休眠期には翻訳活性はなく、その期間にmRNAが機能しているとは考えにくい。では発芽期に機能しているのだろうか。このことを考察するために、本節では実験ⅢAで選抜したcDNAクローンをもちいて、貯蔵型mRNAを代表する3つのmRNAの発芽期の消長をノーザン・ブロット・ハイブリダイゼーションによって調べた。

Ⅲ-5-2 〈実験ⅢI〉の材料と方法

種子と発芽

茨城県立林業試験場のクロマツ精英樹採種園で1987年10月に採種したクロマツ *Pinus thunbergii* Parl. の母樹クローン北相馬2号の種子を用いた。球果採取後の処理と発芽条件は実験ⅢA(Ⅲ-2-2)と同じである。

種子を植物育成チャンバーに移してから2日おきに発芽10日目までの芽生えと乾燥種子から試料を抽出した。発芽4日目までは胚全体を、発芽4日目からは子葉のみを供試した。直ちに液体窒素で凍結させ、実験に供するまで-80℃に保存した。

RNAの抽出とノーザン・ブロット・ハイブリダイゼーション

RNAの抽出は実験ⅡC(Ⅱ-2-2)と同様の方法(Yamamoto *et al.*, 1991)によっ

ておこなった。ノーザン・ブロット・ハイブリダイゼーションは実験ⅢC(Ⅲ-3-2)と同じである。

Ⅲ-5-3 〈実験ⅢI〉発芽10日目までの貯蔵型mRNAの消長

休眠打破後の娘植物体内での貯蔵型mRNAの蓄積量をノーザン・ブロット・ハイブリダイゼーションによって調べた。実験ⅢAで幼根からポリ(A)⁺RNAが抽出できなかったのは、幼根に含まれているポリフェノール類や多糖類が活性のあるRNAの抽出を阻害した可能性を示唆している。そこで、手作業で子葉と幼根とを容易に分けられるほどに成長している発芽4日目からは、幼根を除き子葉のみを試料とした。但し、2日目と4日目との間でmRNAの著しい量的変化が見られた場合、そのmRNAが子葉あるいは幼根に局在しているためなのか、芽生え全体で急激な変化がその時期に起きるためなのかを確かめるために、4日目は芽生え全体(子葉+幼根)をも試料とした。

発芽0日目から10日目までの、胚ないし子葉、および乾燥種子の胚から全RNAを抽出し、それぞれの全RNAを1 μ gにそろえ、各クローンの標識cDNAをプローブとしてノーザン・ブロット・ハイブリダイゼーションをおこなった。

それぞれのクローンに対応するmRNAの各時期の全RNAに含まれる濃度変化をオートラジオグラムの黒化度から判断した(図Ⅲ14)。pPS1の相当するmRNAは、3週間の低温湿層処理中(乾燥種子~発芽0日目)に減少し、その後も減りつづけて発芽6日目に消失している。4日目には子葉のみに見られる。pPS5は低温湿層処理中に増加し発芽8日目まで徐々に減少している。発芽4日目の胚全体と発芽6日目にはほとんど見られない。pPS13は低温湿層処理中に増加した後減少し、4日目に消失している。一方、pPC27は発芽0日目からわずかに見られるが、6日目から高濃度に存在する。

Ⅲ-5-3 実験結果の考察

もし貯蔵型mRNAが種子の発熟期に機能したmRNAの残余物であるならば、休眠打破後には壊され消失していくであろう。発芽に必要なため予め用意されたものならば、休眠打破後に消失することなく、そのまま維持されるか、あるいは同じ機能を持つmRNAが新しく合成されて増加するであろう。そのように

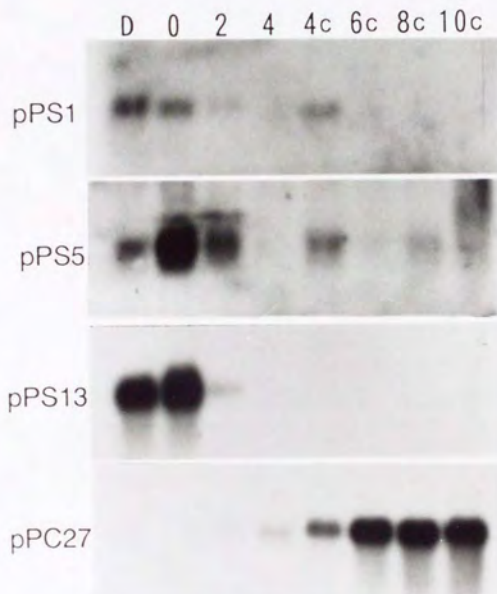


図 III 14 発芽に伴う mRNA の蓄積量の変化 貯蔵型 mRNA の cDNA (pPS1, pPS5, pPS13) および子葉の mRNA の cDNA (pPS27) をプローブとして乾燥種子(D) および発芽 0 ~ 10 日目の胚から抽出した全 RNA とのノーザン・ブロット・ハイブリダイゼーションをおこなった。発芽 4 日目以降は子葉のみを試料とした(c)。

考え、本節では個々のmRNAについてその消長を調べた。

pPS5およびpPS13に対応するmRNAは低温湿層処理中に増加していることが示唆された(図Ⅲ14)。低温湿層処理についてはⅡ章で考察したが、クロマツでは、低温湿層処理中には外見上の変化はなく、処理を3週間以上おこなっても幼根の出現は見られず、この期間には著しい代謝は起きていないと考えられる。本実験では種子の調整および防腐処理は明所でおこなったので、低温湿層処理中は暗所に置かれていたが種子は既に光を受けている。mRNAの少なくとも一部は光あるいは吸水が引き金となって転写が開始され、その後温度や明暗に関わらず転写は進められるのだろう。25℃では一度光を照射すればその後暗所におかれてもポリソームを形成するが(Yamamoto *et al.*, 1975)、ポリソームの形成は温度にも制限されており、低温湿層処理中にmRNAが転写されたとしても、そのmRNAが同時にタンパク質に翻訳されているとは考えられない。

本実験では個々のmRNAの量的変化を全RNAに対する濃度変化として調べたが、絶対量は全RNAについても調べなかった。RNA抽出の収率が安定しないためである。発芽直後からRNAが合成され増加することは一般的に認められており、例えばSasaki and Brown (1969)によれば*Pinus resinosa*の胚の全RNA量も発芽に伴い漸次増加していく。もし、クロマツの全RNA量も同様に増加するとすれば、pPS1およびpPS5に対応するmRNAは、絶対量でみると発芽初期にかえて増加していることになる(図Ⅲ14)。これらのmRNAがどのような機能を担っているのかは、本実験の結果だけでは分からないが、発芽の初期に機能しているものなのであろう。pPS5に対応するmRNAは発芽8日目まで維持されているが、本実験で見ているのは合成量と分解量との差の積算である蓄積量であり、必ずしも乾燥種子中にあった分子そのものが存在しているとは限らない。Delseny *et al.* (1977)によれば、発芽が始まってからの貯蔵型mRNAの半減期は2時間である。pPS5 mRNAも、同じ分子が保持されているのではなく、この時期にも転写がおこなわれているものと考えられる。

pPS13に対応するmRNAは、低温湿層処理中に増加し、発芽が始まると急速に減少している(図Ⅲ14)。このmRNAは発芽の開始に関する機能を担っているか、あるいは発芽に関する機能は担っていない単なる残余物のどちらかであろう。後者だとすると、この貯蔵型mRNAは種子形成の期間に転写され、機能を果たしていたが、乾燥に伴い種子の代謝活性が低下した際に、壊されることなく保持されたものであると考えられる。実験ⅡB(Ⅱ-2-4)では標識前駆体を取り込み

によって貯蔵型 mRNA が低温湿層処理中に生合成するか否かを確認することができなかったが、本実験では pPS13 の mRNA が処理中に、少なくとも全 mRNA 量に対する蓄積量が増加しているのが確認された。実験 II B の方法では検出できない程度の生合成があったと考えられる。

pPC27 に対応する mRNA は、子葉の緑化に伴って増加することや、4 日目の胚全体と子葉のみとで含まれる量を比べると子葉に多いことから(図 III 14)、光合成に関与する機能を担っている可能性が高い。アブラナでは子葉に偏在する mRNA で、胚形成の初期に転写され乾燥種子に貯蔵されているものもあるが(Harada *et al.*, 1988)、本研究で調べた mRNA (pPC27) は乾燥種子の胚からは検出できなかった。pPC27 mRNA の場合は発芽後にはじめて転写され同時に機能しているであろう。

以上要するに、実験 III A のサザン・ブロット・ハイブリダイゼーションでは、多くの貯蔵型 mRNA が発芽 2 週間目には減少あるいは消失していたが、その消長を詳細にみると消失時期は個々の mRNA 種によって異なっていることが明らかになった。

III - 6 貯蔵型 mRNA についてのまとめ

III - 6 - 1 存在意義

一般に mRNA は短命なものであるので、転写活性のみられない休眠種子内で長期間存在している mRNA は特殊なものであると考えられてきた。そのため、この mRNA 分子群は特に貯蔵型 mRNA stored mRNA あるいは long-lived mRNA などと命名され、あたかも固有の機能・情報を担っているかのように扱われたようである。また休眠の前後には物質の代謝が大きく転換するので、その過渡期に当たるともいえる休眠期に存在する mRNA が、登熟期に機能するものなのか、発芽期に機能するものなのかを追究する研究が多くおこなわれてきた。

たしかにマツの貯蔵型 mRNA は他の植物組織では考えられないほど長寿命であることが III - 3 で示された。特殊な機構があって保持されていると考えられる。貯蔵型 mRNA には多数の mRNA 種が含まれており、それらすべてが保持されている。しかしながら、発芽期の消長をみると必ずしも一律にその蓄積が制御さ

れているのではなく、個々のmRNA種で異なる消長を示すことがⅢ-5で明らかになった。他の植物種の最近の研究でも貯蔵型mRNAには登熟期に機能したものと発芽期に必要なものとが混在していると考えられている。

貯蔵組織における代謝は休眠の前後で養分の蓄積から分解へと劇的な転換がおこなわれる。胚でも常に成長するための代謝がおこなわれているとはいえ休眠時の成長停止や乾燥に伴う変化は大きい。また登熟途上のまだ発芽能のない未熟種子を人工的に乾燥させると発芽能が獲得することがクロマツでも知られており(山本・栢田, 1979), 発芽に向けての転換が乾燥休眠によって誘導されることが考えられる。しかしながら、必ずしも転換・変化は突然生じるのではなく特に胚では暫時的に生じると考えられる。その転換・変化の途上で休眠したため、貯蔵型mRNAの中には様々な段階で機能するmRNAが存在しているのだろう。本研究では胚の貯蔵型mRNAを扱ったので遺伝子発現の変化の過渡期のmRNAが含まれていると考えられる。mRNA分子は翻訳に供されないと安定性を増すことが知られているが、種子の休眠に伴い翻訳活性が低下して、登熟期に機能したmRNAも分解されずに休眠種子に残ってしまったとも考えられる。

Ⅲ-6-2 存在形態

休眠種子では過酷な環境下でも生命を維持するために様々な機構が存在していると考えられる。Ⅲ-4では遺伝子発現の途中の段階であるmRNAが、不必要であると考えられる休眠種子中に存在していることに注目し、貯蔵型mRNAがどのような機構で崩壊せずに維持されているかを研究した。

今まで貯蔵型mRNAの存在やその意義については比較的多くの研究が報告されてきたが、その存在形態については研究はあまりなされていなかった。本研究によって、貯蔵型mRNAはmRNP様の形態をとっていることが明らかになった。乾燥などの内的環境の変化に対応したなんらかの機構が働いて、mRNAが長期間保持されている。mRNPの形態をとることによって翻訳が阻害されると同時に分解されにくくなるのが他の生物種でも知られている。クロマツの貯蔵型mRNAについても、おそらくmRNPの形態をとっていることによって、翻訳もされず分解もされないのだろう。ただし、発芽に必要なものだけが貯蔵されているのでなく発芽期に機能していないとみられるmRNAも貯蔵されており、安定化の機構はmRNA種に特異的な機構ではないようである。

IV 総括

以上の実験研究で得られた結果を今一度まとめてみる。

チョウセンゴヨウを用いた実験では、まず無傷種子の場合は低温湿層処理が発芽に必須であること、種皮を除去すると処理なしでも一部発芽することを確認した(II-3-1)。低温湿層処理によって解除される休眠要因が種皮とその内側の両方にあることを示めている。また外種皮は胚乳の構造を支え、また内部の腐敗を抑えていることが示唆された。

種皮の要因を明らかにするために、種子が大きいことを利用して、まず外種皮の機械的強度を測定した。その結果、温度に関わらず吸水によって減少することが明らかになった。低温湿層処理によってもたらされる水分条件と低温条件の内、機械的強度は少なくとも水分条件だけによって解除され、低温条件は無関係であることが示された(II-4-3)。

次に、種皮の水分不透過性が発芽を抑制している可能性を検討したが、吸水には低温条件は必要でないことが示された(II-4-4)。

発芽には酸素が必要であることを確認した上で(II-3-4)、種皮の酸素透過性についても検討した。その結果、休眠種子内が還元状態になっていることを示唆する結果がえられた(II-4-5)。また低温条件が満たされた時に外種皮の酸素透過性が増加することが明らかになった(II-4-6)。

外的要因としては、外種皮が酸素不透過性の点で発芽を抑制しており、低温湿層処理を施すとそれが解除されることによって発芽するようになると考察した。

内的要因としては、発芽抑制物質ABAについて量的変化を調べた。種皮のABA含量は吸水にともない大きく減少するが、ABAが直接機能すると考えられる胚内の含量はほとんど変化しなかった(II-5-3)。チョウセンゴヨウにおいて、内生ABAは発芽を抑制している可能性は低いと考えられる。

低温湿層処理中の遺伝子発現についてもクロマツ種子を用いて検討した。その結果、低温湿層処理中に遺伝子の転写活性が復活しており、特にrRNAが合成されることが示された(II-2-4)。少なくともクロマツでは低温湿層処理中に遺伝子の翻訳装置が準備されることによって、発芽が促進されると考えられる。

クロマツについては、休眠種子の胚内に存在するmRNA(貯蔵型mRNA)についても研究した。

まず、貯蔵型mRNAの検出に用いるcDNAクローンの選抜をおこなった(Ⅲ-2-3)。選抜した貯蔵型mRNAのcDNAを用い、古種子内のmRNAを検出したところ、14年間保存してあった種子内でも貯蔵型mRNAが貯蔵されていることが明らかになった(Ⅲ-3-4)。

次に、14年もの間安定的に貯蔵されているmRNAの形態を調べた。その結果、貯蔵型mRNAにはリボソームとその他の何かが結合して、沈降速度が大きくなっていることが明らかになった(Ⅲ-4)。mRNP様の形態をとることによって安定化が図られていると考えられる。

最後に、貯蔵型mRNAの発芽期の量的変化を追ったところ、発芽と共に減少していくが、消失時期は個々のmRNA種によって異なることがわかった。貯蔵型mRNAの蓄積は単一の因子によって制御されているのではなく、mRNA種によって異なる制御要因が存在していると考えられる。

チョウセンゴヨウの外種皮はその機械的強度により胚乳の構造を支え、内部の腐敗を抑えていることが示唆された。また酸素の透過を抑えており、さらに低温を感知する機構をもっていることが示唆された。内種皮は水分の浸透を抑えている。クロマツを用いた実験ではmRNAの維持機構が存在することが示唆された。

本研究により明らかにされたこれらの機構を今後さらに詳細に調べ、その機作を解明することは、劣悪な環境に対する植物の耐性を知る上で重要な情報となるであろう。造林上種子の貯蔵は重要な問題であるが、貯蔵が困難であるとされる種子の貯蔵法の開発のためにも有用な情報を与えるものである。また、酸素や水分に対する種皮の不透過性をもたらしめる機構ならびに水分や低温を検知する機構は、低温や乾燥などの過酷な条件下でも長期間機能するものであり、その解明は工業的にも期待される。

種子の発芽前後は生理的に劇的な変化が起きており、遺伝子発現の制御機構の研究材料としても興味深い。転写段階での遺伝子発現の制御機構はかなり解明されたが、転写以後の制御機構の解明はまだ緒についたばかりであるといえる。休眠種子の中に存在しているmRNAは転写以後の制御を受けているといえ、植物に限らず生物の遺伝子の発現制御機構を調べる上で有用な対象であろう。このような研究は造林学のみならず、生物学の発展に資するものである。

V 謝辞

本論文は東京大学農学部林学科造林学講座担任教授佐々木恵彦博士の指導の下に実験研究をおこない作成したものであるが、その過程においては、他にも多くの方々の指導と助力を賜った。

Ⅱ-2 およびⅢに記したクロマツ種子の研究に関しては、農林水産省森林総合研究所遺伝子発現研究室の山本直樹博士(現在・同省生物資源研究所光合成研究室)に、実験の設計段階から実際の実験、実験結果の取りまとめにまでわたり、終始、懇切丁寧な指導を賜った。同研究室の篠原健司博士ならびに向井謙氏にも、実験などに関して多くの有用な助言と助力をいただいた。

Ⅱ-4 に記した圧縮試験は、同学部林産学科高分子材料化学講座の林元雨^{イム フォンフ}氏の助力のもと、同講座の圧縮試験機を借用しておこなった。Ⅱ-5 に記したABAの定量に関しては横浜市立大学木原生物学研究所の川上直人博士の指導を受けた。実際のABAの定量に際しては、同学部農芸化学科食糧化学研究室の中井雄治氏の協力のもと、同研究室のマイクロプレートリーダーを借用した。

同学部林学科森林植物学講座助教授の寶月岱造博士と同学科造林学講座助手の小島克己博士には、しばしば示唆に富む助言をいただいた。

同造林学講座助手の丹下健博士や金坂基智^{キム マツモ}博士をはじめ、同講座の諸氏には、論文の作成にあたって、様々な迷惑をおかけした。

ここに記し、甚深なる謝意を表する。

引用文献

- Ajtkhozhin, M. A. and A. U. Akhanov (1974) Release of mRNP-particles of the informosome. Type from polyribosomes of higher plant embryos. FEBS Lett. 41(2):275-279
- Ajtkhozhin, M. A., A. U. Akhanov and Kh. I. Doschanov (1973) Informosomes of germinating wheat embryos. FEBS Lett. 37(1):104-106
- Ajtkhozhin, M. A., Kh. J. Doschanov and A. U. Akhanov (1976) Informosomes as a stored form of mRNA in wheat embryos. FEBS Lett. 66(1):124-126
- Al-Ani, A., F. Bruzau, P. Raymond, V. Saint-Ges, J. M. Leblanc and A. Pradet (1985) Germination, respiration, and adenylate energy charge of seeds at various oxygen partial pressures. Plant Physiol. 79:885-890
- Almoguera, C. and J. Jordano (1992) Developmental and environmental concurrent expression of sunflower dry-seed-stored low-molecular-weight heat-shock Protein and Lea mRNAs. Plant Mol. Biol. 19:781-792
- Alscher-Herman, R. and A. A. Khan (1980) polyribosomes and protein synthesis in after-ripening pear seeds. Physiol. Plant. 48:285-391
- Asakawa, S. (1955) Hastening the germination of *Pinus koraiensis* seeds. - preliminary study on chemical changes during pretreatments. J. Jpn For. Soc. 37(4):127-132
- Asakawa, S. (1956) On the water absorption by *Pinus koraiensis* seeds. J. Jpn For. Soc. 38(4): 125-129
- Asakawa, S. (1959a) physiology of embryo dormancy. J. Jpn For. Soc. 41(10):389-395
- Asakawa, S. (1959b) germination behavior of several coniferous seeds. J. Jpn For. Soc. 41(11): 430-435
- 浅川 澄彦 (1963) 三葉松類のタネの発芽促進. 林試研報 100: 41-50
- Asakawa, S. (1964) A brief report on the respiration of *Pinus koraiensis* seeds. J. Jpn For. Soc. 46(10):335-338
- 浅川 澄彦・藤田 桂治 (1966) 採種林造成に関する試験(1)アカマツ, カラマツ試験地の設定と3年間の調査結果. 林試研報 184: 81-134
- Asakawa, S. and T. Inokuma (1961) Light sensitivity in the germination of *Pinus thunbergii* and *Picea glehnii*. J. Jpn For. Soc. 43:331-335
- Atwater, J. A., R. Wisdom and I. M. Verma (1990) Regulated mRNA stability. Ann. Rev. Genet. 24:519-541
- Balboa-Zavala, O. and E. G. Jr. Dennis (1977) Abscisic acid and apple seed dormancy. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 102(5):633-637

- Ballard, L. A. T. (1973) Physical barriers to germination. *Seed Sci. & Technol.* **1**:285-303
- Baltimore, D. and A. S. Huang (1970) Interaction of HeLa Cell proteins with RNA. *J. Mol. Biol.* **47**:263-272
- Barker, G. R., C. M. Bray and M. A. Detlefsten (1971) An examination of the evidence for stable messenger ribonucleic acid in seed. *J. Biochem.* **124**:5P-6P
- Barnett, J. P. (1976) Delayed germination of southern pine seeds related to seed coat constraint. *Can. J. For. Res.* **6**:504-510
- Barthe, P. and C. Bulard (1978) bound and free abscisic acid levels in dormant and after-ripening embryos of *Pyrus malus* L. cv Golden Delicious. *Z. Pflanzenphysiol.* **90**:201-203
- Barton, L. V. (1930) Hastening the germination of some coniferous seeds. *Amer. J. Bot.* **17**:88-115
- Bernstein, P. and J. Ross (1989) Poly(A), poly(A) binding protein and the regulation of mRNA stability. *Trends in Biochem. Sci.* **14**:373-377
- Berry, J. O., D. E. Breinding and D. F. Klessig (1990) Light-mediated control of translational initiation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase in amaranth cotyledons. *Plant Cell* **2**:795-803
- Berry, J. O., J. P. Carr and D. F. Klessig (1988) mRNAs encoding ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase remain bound to polysomes but are not translated in amaranth seedlings transferred to darkness. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **85**:4190-4194
- Bhalla, P. L. and H. D. Slattery (1984) Callose deposits make clover seeds impermeable to water. *Ann. Bot.* **53**:125-128
- Blobel, G. (1971) Release, identification, and isolation of messenger RNA from mammalian ribosomes. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **68**(4):832-835
- Blobel, G. (1973) A protein of molecular weight 78,000 bound to the polyadenylate region of eukaryotic messenger RNAs. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **70**(3):924-928
- Blobel, G. and D. Sabatini (1971) Dissociation of mammalian polyribosomes into subunits by puromycin. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **68**(2):390-394
- Bray, C. M. and T. Y. Chow (1976) Lesions in the ribosomes of non-viable pea (*Pisum arvense*) embryonic axis tissue. *Biochem. Biophys. Acta* **442**:14-23
- Brocklehurst, P. A. and R. S. S. Fraser (1980) Ribosomal RNA integrity and rate of seed germination. *Planta* **148**:417-421
- Campiranon, S. and W. L. Koukkari (1977) Germination of wild rice, *Zizania aquatica*, seeds and the activity of alcohol dehydrogenase in young seedlings. *Physiol. Plant.* **41**:293-297
- Cheung, C. P. and R. J. Sukadolnik (1978) Regulation of RNA synthesis in early germination of isolated wheat (*Triticum aestivum* L.) embryo. *Nature* **271**:357-358
- Comai, L., R. A. Dietrich, D. J. Maslyar, C. S. Baden and J. J. Harada (1989) Coordinate expression of transcriptionally regulated isocitrate lyase and malate synthase genes in *Brassica napus* L. *Plant Cell* **1**:293-300

- Coolbear, P., R. J. Slater and J. A. Bryant (1990) Changes in nucleic acid levels associated with improved germination performance of tomato seeds after low temperature presowing treatment. *Ann. Bot.*65:187-195
- Davies, H. V. and N. J. Pinfield (1979) RNA and protein synthesis during after-ripening of seeds of *Acer platanoides* L. *Z. Pflanzenphysiol.*92:85-90
- Davies, H. V. and N. J. Pinfield (1980) Utilization of food reserves by embryos of *Acer platanoides* L. during after-ripening. *Z. Pflanzenphysiol.*96:59-65
- Dawidowicz-Grzegorzewska, A. and B. Zarska-Maciejewska (1979) Anatomy, histochemistry and cytology of dormant and stratified apple embryos. II. Storage protein degradation and correlated nucleoli development. *New Phytol.*83:385-393
- Delseny, M., L. Aspart and Y. Guitton (1977) Disappearance of stored polyadenylic acid and mRNA during early germination of radish (*Raphanus sativus* L.) embryo axes. *Planta*135:125-128
- Deng, X.-W. and W. Gruissem (1987) Control of plastid gene expression during development: The limited role of transcriptional regulation. *Cell*49:379-387
- Dreyfuss, G. (1986) Structure and function of nuclear and cytoplasmic ribonucleoprotein particles. *Ann. Rev. Cell. Biol.*2:459-498
- Drost-Hansen, W. and A. Thorhaug (1969) Temperature effects in membrane phenomena. *Nature*215:506-508
- Dure III, L. (1985) Embryogenesis and gene expression during seed formation. *Oxford. Surv. Plant Mol. Cell Biol.*2:179-197
- Dure III, L., S. C. Greenway and G. A. Galau (1981) Developmental biochemistry of cotton seed embryogenesis and germination: Changing mRNA population as shown by *in vitro* and *in vivo* protein synthesis. *Biochem.*20:4162-4168
- Edwards, M. M. (1969) Dormancy in seeds of charlock. III Occurrence and mode of action of an inhibitor associated with dormancy. *J. Exp. Bot.*20:876-894
- Enu-Kwesi, L. and E. B. Dumbroff (1978) Changes in abscisic acid in the embryo and covering structures in *Acer saccharum* during stratification. *Z. Pflanzenphysiol*86:371-377
- Esashi, Y. and A. C. Leopold (1968) Physical forces in dormancy and germination of *Xanthoxum* seeds. *Plant Physiol.*43:871-876
- Fourney, R. M., J. Miyakoshi, R. S. Day and M. C. Paterso (1988) Northern blotting: Efficient RNA staining and transfer. *Focus*10(1):5-7
- Fresno, M. and D. Vazquez (1980) Inhibitory of 'cap' analogue on globin mRNA translation in a reticulocyte cell-free system. *Eur. J. Biochem.*103:125-132
- Galau, G. A., D. W. Hughes and L. Dure III (1986) Abscisic acid induction of cloned cotton late embryogenesis-abundant (Lea) mRNAs. *Plant Mol. Biol.*7:155-170
- 郷 正士 (1951) 二・三林木種子の吸水経過. 東大演報39: 55-60
- 郷 正士 (1956) 吸水曲線にもとづく針葉樹のタネの発芽生理. 東大演報51: 159-236

- Goldberg, R. B., G. Hoschek, S. H. Tam, G. S. Ditta and R. W. Breidenbach (1981) Abundance, diversity, and regulation of mRNA sequence sets in soybean embryogenesis. *Develop. Biol.* 83:201-217
- Gosling, P. G. and J. D. Ross (1980) Pentose phosphate metabolism during dormancy breakage in *Corylus avellana* L. *Planta* 148:362-366
- Grosfeld, H. and U. Z. Littauer (1975) Cryptic form of mRNA in dormant *Artemia salina* cysts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 67(1):176-181
- Gubler, U. and B. J. Hoffman (1983) A simple and very efficient method for generating cDNA libraries. *Gene* 25:263-269
- Hance, B. A. and J. M. Bevington (1992) Changes in protein synthesis during stratification and dormancy release in embryos of sugar maple (*Acer saccharum*). *Physiol. Plant.* 86:365-371
- Harada, J. J., C. S. Baden and L. Comai (1988) Spatially regulated genes expressed during seed germination and postgerminative development are activated during embryogeny. *Mol. Gen. Genet.* 212:466-473
- 長谷川 正男・古川 忠 (1955) 林木種子の光発芽 (第II報) クロマツ, アカマツ種子の発芽に及ぼす光と低温の影響. *日林誌* 37(1): 6-7
- Hatano, K. (1951) On the absorption of water by seeds of *Larix kaempferi* and *Pinus thunbergii*. *J. Jpn For. Soc.* 33:426-430
- Hatano, K. (1963) Respiration of germinating pine seeds. *Plant Cell Physiol.* 4:129-134
- 畑野 健一 (1967) 林木種子の冷処理 (湿層処理) とその生理学的意義. *日林誌* 49(12): 444-447
- Hay, J. R. (1962) Experiments on the mechanisms of induced dormancy in wild oats, *Avena fatua* L. *Can. J. Bot.* 40:191-202
- Heichel, G. H. and P. R. Day (1972) Dark germination and seedling growth in monocots and dicots of different photosynthetic efficiencies in 2% and 20.9% O₂. *Plant Physiol.* 49:280-283
- Henshaw, E. C. (1968) Messenger RNA in rat liver polysomes: Evidence that it exists as ribonucleoprotein. *J. Mol. Biol.* 36:401-411
- International Seed Testing Association (1985) International rules for seed testing, Rules 1985. *Seed Sci. & Technol.* 13:299-355
- Iskakov, B. K. and K. I. Madin (1994) Characterization of 45S ribonucleoprotein particles detected in wheat embryo cytoplasm. *Plant Sci.* 96:99-108
- Jarvis, B. C. and P. R. M. Shannon (1981) Changes in poly(A) RNA metabolism in relation to storage and dormancy-breaking of hazel seed. *New Phytol.* 88:31-40
- 姜 孟霞 (1982) 黑竜江省森林資源歴史変遷的初歩研究. 黑竜江省森林資源管理局等
- Kelly, K. M. and J. Van Staden (1987) The lens as the site of permeability in the papilionoid seed, *Aspalathus linearis*. *J. Plant Physiol.* 128:395-404

- Kennedy, R. A., S. C. H. Barrett, D. Vander Zee and M. E. Rumpho (1980) Germination and seedling growth under anaerobic conditions in *Echinochloa crus-galli* (Barnyard grass). *Plant Cell Environ.* 3:243-248
- Koblet, R. (1932) Über die Keimung von *Pinus strobus* unter besonderer Berücksichtigung der Herkunft des Samens. *Ber. Schweiz. Bot. Gesellsch.* 41:199-283
- Kozłowski, T. T. and A. C. Gentile (1959) Influence of the seed coat on germination, water absorption, and oxygen uptake of eastern white pine seed. *For. Sci.* 5:389-395
- Laemmler, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature* 227:680-685
- Lebleu, B., G. Marbaix, G. Huez, J. Temmerman, A. Burney and H. Chantremue (1971) Characterization of the messenger ribonucleoprotein released from reticulocyte polyribosomes by EDTA treatment. *Eur. J. Biochem.* 19:264-269
- Lee, J. M. and N. E. Looney (1978) Changes in abscisic acid in apple seeds during stratification and their relationship to genetic compaction. *Can. J. Plant Sci.* 58(3):761-767
- Lee, S. K., V. Krsmanovic and G. Brawerman (1971) Initiation of polysome formation in Mouse Sarcoma 180 ascites cells. Utilization of cytoplasmic messenger ribonucleic acid. *Biochem.* 10:895-900
- Lewak, St., A. Rychter and B. Zarsk-Maciejewska (1975) Metabolic aspects of embryonal dormancy in apple seeds. *Physiol. Vég.* 13(1):13-22
- Li, L. and J. D. Ross (1990) Lipid mobilization during dormancy breakage in oilseed of *Corylus avellana*. *Ann. Bot.* 66:501-505
- Lin, T.-P., M.-H. Chen and C.-H. Lin (1994) Dormancy in seeds of *Phellodendron wilsonii* is mediated in part by abscisic acid. *Plant Cell Physiol.* 35(1):115-119
- Lundberg, U., G. Nilsson and A. von Gabain (1988) The differential stability of the *Escherichia coli ompA* and *bla* mRNA at various growth rates is not correlated to the efficiency of translation. *Gene* 72:141-149
- Lyons, J. M. and J. K. Raison (1970) Oxidative activity of mitochondria isolated from plant tissues sensitive and resistant to chilling. *Plant Physiol.* 45:386-369
- Maherchandani, N. and J. M. Naylor (1971) Onset of synthesis of RNA and protein in mature aleurone of wild Oats (*Avena fatua*). *Can. J. Bot.* 50:305-313
- Mahhou, A. and F. G. Dennis Jr. (1994) Protein changes in peach seeds during chilling are not associated with breaking dormancy. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 119(1):131-135
- Marcotte, W. R. Jr., S. H. Russell and R. S. Quatrano (1989) Abscisic acid-responsive sequences from the Em gene of wheat. *Plant Cell* 1:969-976
- Mori, T. (1979) Effect of light on adenosine triphosphate levels in *Pinus thunbergii* seeds during imbibition. *J. Jpn For. Soc.* 61(11):399-4044

- Kennedy, R. A., S. C. H. Barrett, D. Vander Zee and M. E. Rumpho (1980) Germination and seedling growth under anaerobic conditions in *Echinochloa crus-galli* (Barnyard grass). *Plant Cell Environ.* 3:243-248
- Koblet, R. (1932) Über die Keimung von *Pinus strobus* unter besonderer Berücksichtigung der Herkunft des Samens. *Ber. Schweiz. Bot. Gesellsch.* 41:199-283
- Kozlowski, T. T. and A. C. Gentile (1959) Influence of the seed coat on germination, water absorption, and oxygen uptake of eastern white pine seed. *For. Sci.* 5:389-395
- Laemmler, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685
- Lebleu, B., G. Marbaix, G. Huez, J. Temmerman, A. Burney and H. Chantremue (1971) Characterization of the messenger ribonucleoprotein released from reticulocyte polyribosomes by EDTA treatment. *Eur. J. Biochem.* 19:264-269
- Lee, J. M. and N. E. Looney (1978) Changes in abscisic acid in apple seeds during stratification and their relationship to genetic compaction. *Can. J. Plant Sci.* 58(3):761-767
- Lee, S. K., V. Krsmanovic and G. Brawerman (1971) Initiation of polysome formation in Mouse Sarcoma 180 ascites cells. Utilization of cytoplasmic messenger ribonucleic acid. *Biochem.* 10:895-900
- Lewak, St., A. Rychter and B. Zarsk-Maciejewska (1975) Metabolic aspects of embryonal dormancy in apple seeds. *Physiol. Vég.* 13(1):13-22
- Li, L. and J. D. Ross (1990) Lipid mobilization during dormancy breakage in oilseed of *Corylus avellana*. *Ann. Bot.* 66:501-505
- Lin, T.-P., M.-H. Chen and C.-H. Lin (1994) Dormancy in seeds of *Phellodendron wilsonii* is mediated in part by abscisic acid. *Plant Cell Physiol.* 35(1):115-119
- Lundberg, U., G. Nilsson and A. von Gabain (1988) The differential stability of the *Escherichia coli ompA* and *bla* mRNA at various growth rates is not correlated to the efficiency of translation. *Gene* 72:141-149
- Lyons, J. M. and J. K. Reason (1970) Oxidative activity of mitochondria isolated from plant tissues sensitive and resistant to chilling. *Plant Physiol.* 45:386-369
- Maherchandani, N. and J. M. Naylor (1971) Onset of synthesis of RNA and protein in mature aleurone of wild Oats (*Avena fatua*). *Can. J. Bot.* 50:305-313
- Mahhou, A. and F. G. Dennis Jr. (1994) Protein changes in peach seeds during chilling are not associated with breaking dormancy. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 119(1):131-135
- Marcotte, W. R. Jr., S. H. Russell and R. S. Quatrano (1989) Abscisic acid-responsive sequences from the Em gene of wheat. *Plant Cell* 1:969-976
- Mori, T. (1979) Effect of light on adenosine triphosphate levels in *Pinus thunbergii* seeds during imbibition. *J. Jpn For. Soc.* 61(11):399-4044

- Pramanik, S. K., J. E. Krochko and J. D. Bewley** (1992) Distribution of cytosolic mRNAs between polysomal and ribonucleoprotein complex fractions in alfalfa embryos. Stage-specific translational repression of storage protein synthesis during early somatic embryo development. *Plant Physiol.* **99**:1590-1596
- Qi, M. Q., M. K. Upadhyaya, N. H. Furness and B. E. Ellis** (1993) Mechanism of seed dormancy in *Cynoglossum officinale* L. *J. Plant Physiol.* **142**:325-330
- Richardson, S. D.** (1959) Germination of Douglas-fir seed as affected by light, temperature, and gibberellic acid. *For. Sci.* **5**(2):174-181
- Roberts, B. E., P. I. Payne and D. J. Osborne** (1973) Protein synthesis and the viability of rye grains. Loss of activity of protein synthesizing systems *in vitro* associated with a loss of viability. *Biochem. J.* **131**:275-286
- Rudnicki, R.** (1969) Studies on abscisic acid in apple seeds. *Planta* **86**:63-68
- Rumpho, M. E. and R. A. Kennedy** (1981) Anaerobic metabolism in germinating seeds of *Echinochloa crus-galli* (barnyard grass). metabolism and enzyme studies. *Plant Physiol.* **68**:165-168
- Rychter, A. and S. Lewak** (1971) Apple embryos peroxidases. *Phytochem.* **10**:2609-2613
- 山林廳** [大韓民国] (1977-1993) 林業統計要覽.
- Sasaki, S. and S. Asakawa** (1974) Effect of monochromatic light on the germination of pine seeds processed in darkness. *J. Jpn For. Soc.* **56**(10):361-365
- Sasaki, S. and G. N. Brown** (1969) Changes in nucleic acid fractions of seed components of red pine (*Pinus resinosa* Ait.) during germination. *Plant Physiol.* **44**:1729-1733
- Sasaki, S. and T. T. Kozłowski** (1969) Utilization of seed reserves and currently produced photosynthates by embryonic tissues of pine seedlings. *Ann. Bot.* **33**:473-482
- Schubert, G. H.** (1954) Viability of various coniferous seeds after cold storage. *J. For.* **52**:446-447
- Schultz, G. A., D. Chen and E. Katchalski** (1972) Localization of a messenger RNA in a ribosomal fraction from ungerminated wheat embryos. *J. Mol. Biol.* **66**:379-390
- Serrato-Valenti, G., L. Cornara, P. Ghisellini and M. Ferrando** (1994) testa structure and histochemistry related to water uptake in *Leucaena leucocephala* Lam.(De Wit). *Ann. Bot.* **73**:531-537
- 島田 幹夫・樋口 隆昌** (1974) リグニン合成における α -メチルトランスフェラーゼ. 蛋白質, 核酸, 酵素 別冊:420-425
- 白澤 保美・小山 光男** (1918) 林木種子ノ貯蔵試験竝播種用トシテノ古種子ノ價値. 林試研報 **17**:1-18
- Siegel, S. M. and L. A. Rosen** (1962) Effects of reduced oxygen tension on germination and seedling growth. *Physiol. Plant.* **15**:437-444
- Silverstein, E.** (1973) Subribosomal ribonucleoprotein particles of developing wheat embryo. *Biochem.* **12**(5):951-958

- Singer, R. H. and R. H. Penman (1972) Stability of HeLa cell mRNA in actinomycin. *Nature* 240:100-102
- Slater, R. J. and J. A. Bryant (1982) RNA metabolism during breakage of seed dormancy by low temperature treatment of fruits of *Acer platanoides* (Norway maple). *Ann. Bot.* 50:141-149
- Sondheimer, E., D.-S. Tzou and E. Galson (1968) Absciscic acid levels and seed dormancy. *Plant Physiol.* 43:S52
- Spirin, A. S. (1969) Informosomes. *Eur. J. Biochem.* 10:20-35
- Spirin, A. S. and M. A. Ajtkhozhin (1985) Informosomes and polyribosome-associated proteins in eukaryotes. *Trend Biochem. Sci.* 10:162-165
- Spirin, A. S., N. V. Belitsina and M. I. Lerman (1965) Use of formaldehyde fixation for studies of ribonucleoprotein particles by caesium chloride density-gradient centrifugation. *J. Mol. Biol.* 14:611-615
- Spirin, A. S. and M. Memer (1965) Messenger RNA in early sea-urchin embryos: Cytoplasmic particles. *Science* 150:214-217
- Stanley, R. G. (1958) Gross respiratory and water uptake patterns in germinating sugar pine seed. *Physiol. Plant.* 11:505-515
- Stokes, P. (1953) A Physiological study of embryo development in *Heracleum sphondylium* L. III. The effect of temperature on metabolism. *Ann. Bot.* 17(65):158-169
- Stone, E. C. (1957) Embryo dormancy of *Pinus jeffreyi* Murr. seed as affected by temperature, water uptake, stratification, and seed coat. *Plant Physiol.* 32:93-99
- Subbaiah, T. K. and L. E. Powell (1992) Absciscic acid relationships in the chill-related dormancy mechanism in apple seeds. *Plant Growth Regulat.* 11:115-123
- Tao, K.-L. and A. A. Khan (1976) Changes in isoperoxidases during cold treatment of dormant pear embryo. *Plant Physiol.* 57:1-4
- Tao, K. L. and A. A. Khan (1974) Increase in activities of aminoacyl-tRNA synthetases during cold treatment of dormant pear embryos. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 59:764-770
- Taylor, M. A., H. V. Davies, S. B. Smith, A. Abruzzese and P. G. Gosling (1993) Cold-induced changes in gene expression during dormancy breakage in seeds of Douglas fir (*Pseudotsuga menziesii*). *J. Plant Physiol.* 142:120-123
- Thanos, C. A., K. Georghiou, C. Kadis and C. Pantazi (1992) Cistaceae: A plant family with hard seeds. *Isr. J. Bot.* 41:251-263
- Thornton, N. C. (1935) Factors influencing germination and development of dormancy in cocklebur seeds. *Contr. Boyce Thompson Inst. Plant Res.* 7:477-496
- Tillberg, E. and N. J. Pinfield (1982) Changes in absciscic acid levels during after-ripening and germination of *Acer platanoides* L. seeds. *New Phytol.* 92:167-172
- 上原 敬二 (1959) 樹木大図説 一巻 有明書房, 東京 1300 pp.

- U. S. Department of Agriculture, Forest Service (1974) Seeds of woody plants in the United States. Agriculture Handbook No.450. 883 pp.
- Villiers, T. A. (1972) Cytological studies in dormancy III. Changes during low-temperature dormancy Release. *New Phytol.* 71:153-160
- Vose, P. B. (1956) Dormancy of seeds of *Phalaris arundinacea* and *Phalaris tuberosa*. *Nature* 178:1006-1007
- Wahl, G. M., M. Stern and G. R. Stark (1979) Efficient transfer of large DNA fragments from agarose gels to diazobenzyloxymethyl-paper and rapid hybridization by using dextran sulfate. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 76:3683-3687
- Walker-Simmons, M. (1987) ABA levels and sensitivity in developing wheat embryos of sprouting resistant and susceptible cultivars. *Plant Physiol.* 84:61-66
- Watanabe, A. and C. A. Price (1982) Translation of mRNAs for subunits of chloroplast coupling factor 1 in spinach. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 79:6304-6308
- Weiler, E. W. (1980) Radioimmunoassay for the differential and direct analysis of free and conjugated abscisic acid in plant extracts. *Planta* 148:262-272
- Weiler, E. W. (1984) Immunoassay of plant growth regulators. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 35:85-95
- Welbaum, G. E. and K. J. Bradford (1990) Water relations of seed development and germination in muskmelon (*Cucumis melo* L.) V. Water relations of imbibition and germination. *Plant Physiol.* 92:1046-1052
- Werker, E., A. Dafni and M. Negbi (1973) Variability in *Prosopis farcata* in Israel: Anatomical features of the seed. *Bot. J. Linn. Soc.* 66:223-232
- Whitmore, F. W. (1991) Stored messenger RNA and stratification in eastern white pine (*Pinus strobus* L.). *Seed Sci. & Technol.* 19:341-346
- Wilkins, T. A. and N. V. Raikhel (1989) Expression of rice lectin is governed by two temporally and spatially regulated mRNAs in developing embryos. *Plant Cell* 1:541-549
- Wood, A. and J. W. Bradbeer (1967) Studies in seed dormancy II. The nucleic acid metabolism of the cotyledons of *Corylus avellana* L. seeds. *New Phytol.* 66:17-26
- Yamamoto, N. (1982) Preformed mRNA and light-induced germination of pine (*Pinus thunbergii*) seed. *Plant Cell Physiol.* 23(5):865-869
- Yamamoto, N., M. Hasegawa, S. Sasaki and S. Asakawa (1975) Red-far red reversible effect on polysome formation in the embryos of *Pinus thunbergii* seeds. *Plant Physiol.* 56:734-737
- Yamamoto, N., Y. Kano-Murakami, M. Matsuoka, Y. Ohashi and Y. Tanaka (1988b) Nucleotide sequence of a full length cDNA clone of ribulose Bisphosphate Carboxylase Small Subunit Gene from green dark-grown pine (*Pinus thunbergii*) seedling. *Nucleic Acid Res.* 16:11830
- 山本 直樹・舛田 淳子 (1979) クロマツ種子の発芽能力の獲得について. 宇大演報 15:75-79

- Yamamoto, N., M. Matsuoka, Y. Kano-Murakami, Y. Tanaka and Y. Ohashi (1988a) Nucleotide sequence of a full length cDNA clone of light harvesting chlorophyll *a/b* binding protein gene from green dark-grown pine (*Pinus thunbergii*) seedling. *Nucleic Acid Res.* **16**: 11829
- Yamamoto, N., Y. Mukai, M. Matsuoka, Y. Kano-Murakami, Y. Tanaka, Y. Ohashi, Y. Ozeki and K. Odani (1991) Light-independent expression of *cab* and *rbcS* genes in dark-grown pine seedlings. *Plant Physiol.* **95**:379-383
- Yamamoto, N. and S. Sasaki (1979) Protein synthesis in the embryo of *Pinus thunbergii* seed III. Abnormal dissociation of the ribosomes from the dry (non-imbibed) seed embryos. *Bot. Mag. Tokyo* **92**:31-38
- Yambe, Y., Y. Hori and K. Takeno (1992) Levels of endogenous abscisic acid in rose achenes and leaching with activated charcoal to improve seed germination. *J. Jpn Soc. Hort. Sci.* **61**(2) : 383-387
- Yoshida, S., C. Matsuura and S. Etani (1989) Impairment of tonoplast H⁺-ATPase as an initial physiological response of cells to chilling in mung bean (*Vigna radiata* [L.] Wilczek). *Plant Physiol.* **89**:634-642
- Zarska-Maciejewska, B. and St. Lewak (1976) The role of lipases in the removal of dormancy in apple seeds. *Planta* **132**:177-181
- Zarska-Maciejewska, B., I. Sinska, E. Witkowska and St. Lewak (1980) Low temperature, gibberellin and acid lipase activity in removal of apple seed dormancy. *Physiol. Plant.* **48**:532-535

