



# HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	バレイシヨ塊茎内 RNA 結合型サイトカイニンの変動について
Author(s)	高橋, 宣光; TAKAHASHI, Nobumitsu; 幸田, 泰則 他
Citation	北海道大学農学部邦文紀要, 13(3), 455-459
Issue Date	1982-11-10
Doc URL	<a href="https://hdl.handle.net/2115/11987">https://hdl.handle.net/2115/11987</a>
Type	departmental bulletin paper
File Information	13(3)_p455-459.pdf



# バレイショ塊茎内 RNA 結合型 サイトカイニンの変動について

高橋宣光・幸田泰則

喜久田嘉郎・岡澤養三

(北海道大学農学部)

(昭和57年4月30日受理)

## Changes in RNA-cytokinin Activity of Potato Tubers

Nobumitsu TAKAHASHI, Yasunori KODA, Yoshio KIKUTA  
and Yozo OKAZAWA

(Faculty of Agriculture, Hokkaido University,  
Sapporo, Japan)

### 緒言

植物ホルモンの一つであるサイトカイニンは、ゼアチンや、ゼアチンリポシドのような遊離型と、修飾塩基の一要素として tRNA 中に存在することが報告されている<sup>1,2,3)</sup>。

そこで、遊離型サイトカイニンが、tRNA の分解によって生成するという、tRNA 経由合成説が提示された<sup>4,5)</sup>。一方、これに対し、根端で遊離型サイトカイニンは、RNA 結合型の27倍も存在すること<sup>6)</sup>、tRNA 代謝回転速度が非常に遅いこと<sup>7)</sup>、遊離型の中に、tRNA には存在しない新しい種類のサイトカイニンが発見されたこと<sup>8)</sup>、など、*de novo* 合成を支持する事実も次々と明らかにされている。しかし、現在のところ、RNA 結合型と遊離型の関連性は全く不明である。

バレイショにおいては、塊茎内遊離型サイトカイニン含量は、休眠覚醒時と、新たに形成された塊茎の肥大生長期に、顕著な増加を示すことが知られており<sup>9,10)</sup>、また、剥皮の傷害効果により、24時間以内に顕著な増加が確認されている<sup>11)</sup>。このように、遊離型サイトカイニン活性の大きな変動は、それが、生理的に重要な役割を演じているものと推察されるが、他方、RNA 結合型サイトカイニンの変動については研究がなされていない。

本研究では、バレイショ塊茎を実験材料に用い、塊茎の生育及び貯蔵過程、並びに、剥皮処理による塊茎内 RNA 結合型サイトカイニン含量の変動について追求

し、遊離型サイトカイニンとの相互関係について検討した。

### 材料および方法

#### I) 実験材料

1980年5月9日に、北大附属農場の圃場に播種し、9月5日収穫したバレイショ塊茎、品種“男爵いも”( *Solanum tuberosum* L. cv. Irish Cobbler) を実験材料として使用した。

生育、及び、貯蔵過程における RNA 結合型サイトカイニン含量の変化を調べた際には、生育段階に応じて親いも及び生育中の塊茎を採取し、抽出材料とした。採取時期における外部形態は、Table 1 に示すとうりである。

剥皮処理による変動を調べた際には、4°C に貯蔵した休眠塊茎を、25°C に移し、5時間後剥皮処理を行い、これを、25°C の暗所湿室中に静置し、その皮層部を抽出材料とした。

#### II) 実験方法

##### 1) RNA 抽出

5個体の塊茎より計100gの組織片を採取し、これを冷室中で、20% naphthalene 1.5-disulfonate (w/v) を含む0.1M トリス緩衝液 (pH 7.3) 50 ml 及び、0.1% 8-hydroxyquinolin (w/v) を含むフェノール60 ml の中に入れ、5分間ポリロンで摩砕した。これを、室温で30分間攪拌し、2000×g 5分間遠心し上清を回収した。

Table 1. Sampling time and shape

growth stage	days after planted	description
planted seed tuber	0	tubers planted
	25	foliage was well developed and started to elongate stolon. planted tuber sampled
	42	stolon tip began to swell. planted tuber sampled
developmental period	47	stolon produced young tuber of 5 g and diameter 2 cm
	56	a young tuber of 14 g and diameter 3 cm
	67	a tuber was 64 g
rest period	85	a mature tuber was 120 g and harvested
	150	dormant tuber
sprouting period	185	sprout elongated
	220	sprout was 2 cm long. tuber planted

この操作を2回繰り返す、得られた水層に、10分の1量の20%酢酸カリウム(w/v)(pH 6.0)と、2倍量のエタノールを加え、冷凍保存した。これを5000×g 10分間遠心し、沈澱物を回収し、20 mM NaClを含む20 mM トリス緩衝液15 mlで溶解した。さらに、5000×g 10分間の遠心で不純物を取除き、上清に再度2倍量のエタノールを加え、冷凍沈澱させた。遠心により沈澱を回収した後、10 mM トリス緩衝液10 mlと、プロナーゼ1 mgを加え、37°C 1時間保温し、残存蛋白質を分解した。これに、等量のクロロホルムを添加し、酵素を除去し、その水層を回収した。さらにエタノールを加え沈澱させたものを、RNA分画とした。

#### 2) 核酸定量

RNA分画を、分光光度計(日立356型)を用い、波長260 nmの吸光度0.022を、核酸1 µg/mlとして定量した。

#### 3) RNA分解

RNAに0.3 N KOH溶液20 mlを加え、16時間、37°Cで分解を行った。その後、過塩素酸で中和し、さらにエタノールを加え冷凍沈澱させ、この濾液を蒸発乾固させた。これを1 mM酢酸マグネシウム及び、1 mM塩化亜鉛を含む50 mM トリス緩衝液(pH 8.8) 2 mlで溶解し、10 µg アルカリ性ホスファターゼにより、37°C 6時間作用させ、リン酸を除去し、等量のブタノールで3回振盪抽出し、ヌクレオシドを回収した。

#### 4) サイトカイニン定量

塊茎生重20 gに含まれる量のヌクレオシドをToyo 50濾紙に添加し、16時間、20°C展開溶媒イソプロパノ

ール:アンモニア:水(10:1:1)でペーパークロマトグラフィー法により分画した。展開後、Rf値に応じ濾紙を10等分した。これを用い、Miller大豆子葉カルス生物検定法<sup>13)</sup>でサイトカイニン活性の測定を行った。これより得られた。サイトカイニン活性は、ゼアチン標準曲線より、ゼアチン当量(ZE)として表示した。

### 実験結果

#### 1) 生育および貯蔵過程におけるRNA結合型サイトカイニンの変動

Table 1に示す時期に応じてそれぞれ採取した、塊茎内生重当りのRNA含量、RNA結合型サイトカイニン含量、および、RNA当りのRNA結合型サイトカイニン含量を、Fig. 2に示した。

塊茎生重当りのRNA含量は、親いもに関しては、萌芽後、地上部の生育に伴って減少した。他方、新塊茎は、その肥大開始直後の含量が最大で、その後、成熟に伴い、徐々に減少した。完熟後は、貯蔵期間から萌芽期にかけて、ほぼ一定の値を保った。

一方、生重当りのRNA結合型サイトカイニン含量も、RNA含量の変動と同様に、肥大開始直後に最大の活性を示した。その後、塊茎の成熟に伴い、最大時の半量(0.06 µg/kg)まで減少を続けた。この値は、貯蔵期間ほぼ一定で、萌芽時も顕著な変動はなかった。これに反し、RNA当りのRNA結合型サイトカイニン量は萌芽直後の僅かな増加以外は、全生育、および貯蔵期間を通じて、ほぼ一定値を示した。

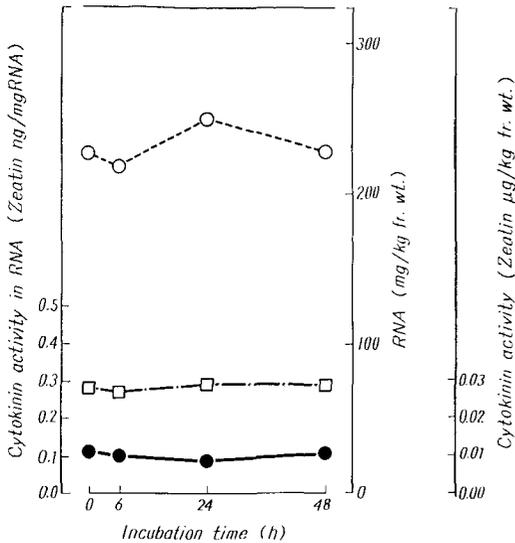


Fig. 1. Changes in RNA contents, cytokinin activity in RNA and RNA-cytokinin activity in fresh weight, after peeling treatment.

- cytokinin activity in RNA (Zeatin ng/mg RNA)
- RNA content in fresh weight (mg/kg fr. wt.)
- cytokinin activity of RNA in fresh weight (Zeatin µg/kg fr. wt.)

## 2) 剥皮処理による変動

Fig. 1 に示したように、皮層部における、RNA 含量は、生重 kg 当り 220~250 mg を示し、剥皮処理による顕著な変化は、みられなかった。また、RNA 結合型サイトカイニン含量は、生重 kg 当り、0.026 µg (ゼアチン当量) を示し、変化はなかった。したがって、RNA 1mg 中の、RNA 結合型サイトカイニン量も、0.11 ng で、剥皮処理による影響は認められなかった。

## 考 察

OKAZAWA<sup>9)</sup> は、生育中のパレイシヨの遊離型サイトカイニン含量は、塊茎形成直後著しい増加を示し、その後、肥大生長と共に減少し始め、暫時一定値を保ったが、完熟期に至って再び減少すると報告した。また、休眠中に低下した遊離型サイトカイニンは、休眠終了時に増加することが知られており<sup>10)</sup>、その増加は、休眠中の約 40 倍に達した<sup>12)</sup>。このように、遊離型サイトカイニンの、生育過程における変動は大きい、これに対し、生重当りの RNA 結合型サイトカイニンは、肥大開始直後に最大値を示し、その後、生育と共に、一定の割合で減少を示した。さらに完熟後は、休眠期を通じて、ほぼ一定値を保つことが確認された。また、RNA 含量も、類似した変動を示し、RNA 当りの RNA 結合型サイトカイニン含量は、全期間を通じて、一定値を示した。塊茎

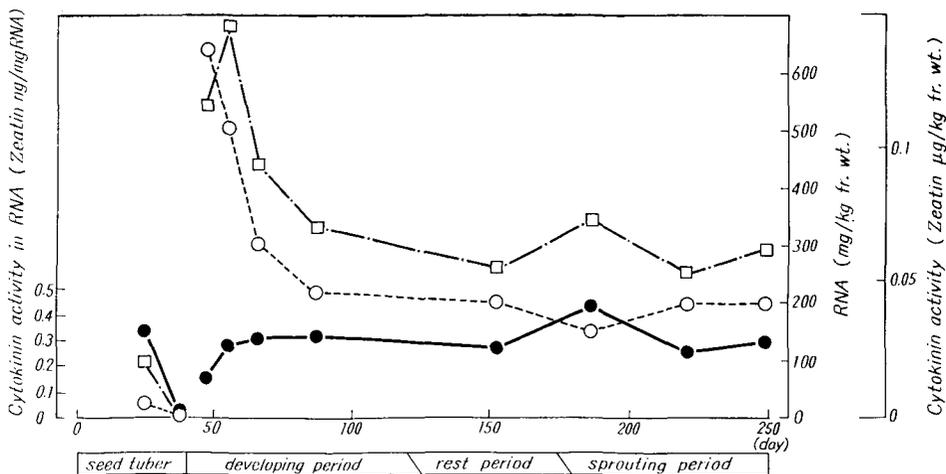


Fig. 2. Changes in RNA contents, cytokinin activity in RNA and RNA-cytokinin activity in fresh weight, during growth of potato tuber,

- cytokinin activity in RNA (Zeatin ng/mgRNA)
- RNA content in fresh weight (mg/kg fr. wt.)
- cytokinin activity of RNA in fresh weight (Zeatin µg/kg fr. wt.)

Sampling time and shape during growth of potato showed in table 1.

形成直後にみられる生重当りの RNA 含量の減少は、塊茎の体積増加と一致することから、これは、細胞の分裂活性の低下と、塊茎の個々の構成細胞の体積増加によるものと考えられる。一方、播種後の親しいもの RNA 含量の低下は、RNA が分解され、萌芽部に供給されたためと思われる。これらの結果より、遊離型サイトカイニンと RNA 結合型サイトカイニンとの量的変動の相互関係はみられず、RNA 当りの RNA 結合型サイトカイニン量も、塊茎の肥大、休眠萌芽の各時期を通じて一定であることから、RNA が、遊離型サイトカイニンと結合し、一時的なサイトカイニン貯蔵体とし働いている可能性は考えられない。

塊茎に傷害を与えると、遊離型サイトカイニンの一時的増加が報告されている<sup>11,14</sup>。しかし、本実験では、生重当りの RNA 結合型サイトカイニン含量、および、RNA 当りの RNA 結合型サイトカイニン含量は、共に変化は認められなかった。また、RNA 結合型サイトカイニンの存在量も、遊離型と比べわめて少く、後者の10分の1にすぎなく、RNA は代謝回転速度が遅いことを考慮すると<sup>7)</sup>、遊離型サイトカイニンの急激な増加は、RNA の分解にもとづくものとは考えられない。

このように本研究の成果から、RNA 結合型サイトカイニンと、遊離型サイトカイニンは、これらの変動量に相互関係がみられず、また、RNA 結合型サイトカイニン量が、僅少な点から、遊離型サイトカイニンは、RNA 分解に由来するものではなく、むしろ、*de novo* 合成による可能性が強い。しかし、sRNA 半減期は、生育相によって著しく異なるのみならず<sup>15)</sup>、休眠中のサイトカイニン活性の最低時では、遊離型と、RNA 結合型、それぞれのサイトカイニン含量はほぼ一致することから、RNA が、体内のホルモンレベルの調節に関与している可能性も否定できない。

### 摘 要

バレイシヨ塊茎を用い、遊離型サイトカイニンの顕著な変動を示す実験系を用い、RNA 結合型サイトカイニンの変化を調べた。

生育各期のバレイシヨ塊茎では、生重当りの RNA 結合型サイトカイニン含量は、肥大開始直後に最大値を示し、その後、塊茎の生育とともに漸減し、完熟後、休眠覚醒時にわたって、ほぼ一定値を示した。一方、RNA 当りの RNA 結合型サイトカイニン含量は、全期間通じて変動は認められなかった。

また、塊茎剥皮処理によると、生重当りの RNA 結合

型サイトカイニン含量、および、RNA 当りの RNA 結合型サイトカイニン含量は、いずれも、顕著な変化は認められず、ほぼ一定値を保った。

これより、RNA 結合型サイトカイニンは、遊離型にみられるような大きな変動は認められなかった。したがって RNA が、遊離型サイトカイニンと結合して、一時的な貯蔵体として働いている可能性は少い。同時に、遊離型サイトカイニンが、RNA 結合型サイトカイニンより由来する可能性も少く、遊離型サイトカイニンは、*de novo* 合成によるものと考えられる。

### 引用文献

- HALL, R. H., CSONKA, L., DAVID, H. and MCLENNAN, B.: Cytokinins in the soluble RNA of plant tissues, *Science*, **156**: 69-71. 1967
- BURROWS, W. J., ARMSTRONG, D. J., SKOOG, F., HECHT, S. M., BOYLE, J. T. A., LEONARD, N. J. and OCCOLOWITZ, J.: The isolation and identification of two cytokinins from *Escherichia coli* transfer ribonucleic acids, *Biochemistry*, **8**: 3071-3076. 1969
- VREMAN, H. J., SKOOG, F., FRIHART, C. R. and LEONARD, N. J.: Cytokinins in pisum transfer ribonucleic acid, *Plant Physiol.*, **49**: 848-851. 1972
- FITTLER, F., KLINE, L. K. and HALL, R. H.: Biosynthesis of N<sup>6</sup>-( $\Delta^2$ -isopentenyl) adenosin, the precursor relationship of acetate and mevalonate to the  $\Delta^2$ -isopentenyl group of the transfer ribonucleic acid of microorganisms, *Biochemistry*, **7**: 940-944. 1968
- CHEN, C. M. and HALL, R. H.: Biosynthesis of N<sup>6</sup>-( $\Delta^2$ -isopentenyl) adenosin in the transfer ribonucleic acid of cultured tobacco pith tissue, *Phytochemistry*, **8**: 1687-1695. 1969
- SHORT, K. C. and TORREY, J. G.: Cytokinins in seedling roots of pea, *Plant Physiol.*, **49**: 155-160. 1970
- KLEMEN, F. and KLÄBT, D.: Half-life sRNA from primary roots of Zea Mays. A contribution to the cytokinin production, *Physiol. Plant.*, **31**: 186-188. 1974
- BURROWS, W. J.: Evidence in support of biosynthesis *de novo* of free cytokinins, *Planta*, **138**: 53-57. 1978
- OKAZAWA, Y.: Physiological significance of endogenous cytokinin occurred in potato tubers during their developmental period, *Proc. Crop*

*Sci. Soc. Japan*, **39**: 171-176. 1970

10. VAN STADEN, J. and DIMALLA, G. G.: Endogenous cytokinins and the breaking of dormancy and apical dominance in potato tubers, *J. exp. Bot.*, **29**: 1077-1084. 1978
11. KODA, Y.: Effect of storage temperature and wounding on cytokinin levels in potato tubers, *Plant & Cell Physiol.*, **23**: in press. 1982
12. KODA, Y.: Changes in levels of butanol- and water-soluble cytokinins in potato tubers during their life cycle, *Plant & Cell Physiol.*, **23**: in press. 1982
13. MILLER, C. D.: Kinetin and kinetin-like compounds. *Modern Method of Plant Analysis*. Ed. by K. Peach and M. V. Tracey, Springer-Verlag. **6**: 194-202. 1963
14. CONRAD, K. and KÖHN, B.: Zunahme von cytokinin und auxin in verwundetem speichergewebe von *Solanum tuberosum*, *Phytochemistry*, **14**: 325-328. 1975
15. LEINWEBER, M. and KLÄMBT, D.: Half-life of sRNA and its consequence for the formation of cytokinins in *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4963 grown in the logarithmic and stationary phases, *Physiol. Plant.*, **30**: 327-330. 1974

### Summary

It was generally known that the levels of free cytokinin in potato tuber change dramatically under physiological conditions. In this experiments, the RNA-cytokinin activity in potato tubers was examined during their growth period and by peeling stress treatment.

During the growth period, the amount of RNA-cytokinin in fresh weight reached the maximum when stolon started to swell. As tubers developed, the activity decreased gradually before maturation. After that, the level of cytokinin activity remained constant during rest period until sprouting. On the contrary, the amounts of cytokinin in RNA were constant under the present analytical conditions. On the other hand, under the peeling treatment, which was known to change the free cytokinin content largely, there were no conspicuous increases in the amount of RNA-cytokinin in potato tuber.

These results showed that there were neither dramatic changes in RNA-cytokinin content nor correlation between free cytokinin and RNA-cytokinin levels. Thus, a physiological significance of the RNA as a cytokinin source, if any, looks exceedingly remote.