

ダイコン子葉の葉緑体発生に関する研究 (5)

黄化植物体における 4-チオウリジンの代謝

柴田 均^{*}・藤原俊典^{*}・内田 勇^{*}・落合英夫^{*}

Hitoshi SHIBATA, Toshinori FUJIHARA, Isamu UCHIDA
and Hideo OCHIAI

Studies on Chloroplast Development in Radish Cotyledons (5).
Metabolism of 4-Thiouridine in Etiolated Radish Seedlings.

緒 言

葉緑体の発生過程とは種子が暗中で吸水発芽して黄化植物体内でプロプラスチッドを形成し、さらに植物体への光照射に誘発されて、同化器官としての機能を備えた葉緑体を形成する過程である。

葉緑体の発達にはクロロフィル等の光合成色素の合成、DNA や RNA の合成、タンパク合成と協調した葉緑体に固有な酵素系の発現および活性増大、葉緑体脂質の合成、微細構造の変化等がそれぞれに相関しながら関与している。通常の緑葉から得られるいわゆる成熟葉緑体が示す光化学的、生物化学的な機能に関する知見に比較して、プロプラスチッドの形成過程は未解明の分野であり、発達段階にある葉緑体が示す生物化学的性質および成熟葉緑体へと発達する過程の詳細についても未だ不明な点が多い。葉緑体の発達過程の研究には(1)タンパク質または核酸の合成を阻害する抗生物質または(2)除草剤等の薬剤で処理した植物体と未処理のものでの葉緑体の発達を比較する場合、さらに(3)葉緑体の特異成分を欠損した変異植物体を用いる場合等が採用されて来た。われわれは核酸関連化合物である 4-チオウリジン (以下 4SU) が吸水発芽時のプロプラスチッドの発生を抑制し、したがって高等幼植物での葉緑体の発達を抑制することを発見し、葉緑体発達過程のメカニズムを解明する手段として 4SU 処理した植物体を用いて来た。⁽¹²⁻¹⁶⁾

しかしながら吸収された 4SU の代謝経路および 4SU の作用の形式については不明であった。本報では 4SU を含む水溶液中で吸水発芽させた黄化ダイコン芽生えより調製した RNA 中に 4SU が含有されていることを実

証し、黄化植物体での 4SU の代謝経路について考察した。

実験材料と方法

植物材料

ダイコン (*Raphanus sativus* L.) の発芽生育条件および 4SU の合成は既法の方法で行った。⁽¹³⁾

RNA の調製

ダイコン子葉を新鮮重量の 5 倍量の緩衝液 [50mM トリス塩酸 (pH 7.8), 4mM MgCl₂, 5μg/ml ポリビニール硫酸カリウム, 1% (w/v) ドデシル硫酸ナトリウム, 0.2% (v/v) トリトン X-100] とともに氷冷下で磨砕し、遠心 (20,000×g) 後の上澄を 2M トリス溶液で pH 9.0 とし、等量のあらかじめ pH 9.0 に調製しておいたフェノールで 2 回処理した。水層より RNA を 2 倍量のエタノールで沈殿させ、蒸留水に対して一晚透析した。RNA 量は RNA 1mg/ml の溶液の 260nm での吸光度が 20 であるとして計算した。⁽¹⁷⁾

酸可溶性画分の調製

ダイコン芽生えを氷冷した 4 倍量の 5% (w/v) トリクロロ酢酸と少量の海砂で十分に磨砕し、遠心 (20,000×g, 20分) 後の上澄を 5 倍量のジエチルエーテルで 2 回振とうしてトリクロロ酢酸を除き水層の pH をトリスで 4~4.5 としたものを酸可溶性画分とした。

水銀化セルロースによるアフィニティクロマトグラフィー

セルロースを支持体とし水銀を共有結合させた水銀化セルロースは SHAINOFF の方法で調製した。⁽¹⁹⁾ チオールを含む化合物はこの水銀化セルロースに親和性を示し、高濃度の SH 化合物によって溶出される。⁽¹⁹⁾ 4SU は水銀

※ 生物化学研究室

と1対1に反応し、調製後のセルロース 1g 当り 0.2~0.7m mole の水銀が結合しているの、同程度の 4SU ないし 4SU 関連化合物を吸着することが出来る。

水銀化セルロースをカラムにつめて、洗浄用緩衝液〔4mM トリス塩酸 (pH 7.4), 4mM EDTA, 0.5M KCl〕で平衡化させた。RNA 溶液または酸可溶性画分をカラムにかけ、260nm での吸光度が0.05以下になるまで洗浄し、吸着しない画分を分離した。吸着した画分は上記緩衝液に 50mM 2-メルカプトエタノールを含む溶液で溶出させた。RNA の場合は透析によって共存するメルカプトエタノールを除いた。

結 果

暗所で4日間 4SU を含むリン酸緩衝液で発芽生育させたダイコン芽生えの子葉よりアルカリ性フェノール法⁽¹⁷⁾で調製した RNA 画分の吸収スペクトルを図1に示した。2gの子葉より得られた RNA を 5ml に溶解して測定した場合、4SU 濃度 1.0mM で発芽生育させた子葉からの RNA は近紫外部の 330nm 付近に明確な吸収ピークを示すが、4SU を含まない培地で発芽生育させた対照からの RNA はこのようなピークを示さない。希釈して測定した場合 260nm 付近に極大を示す吸収スペクトルには両者に差は認められなかった。

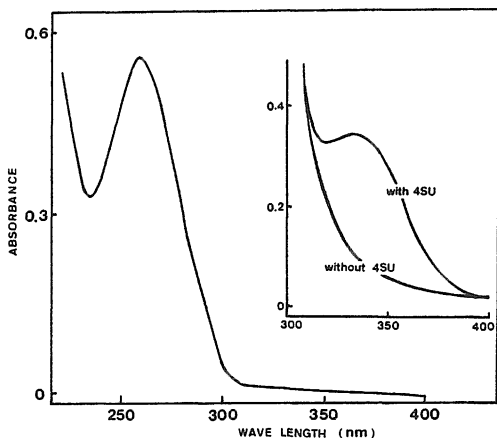


Fig. 1 Absorption spectra of RNA from radish cotyledons. Radish seeds were germinated and grown with 1 mM K-phosphate buffer (pH 7) with or without 1 mM 4-thiouridine in the dark at 22–25°C for 4 days, respectively. RNA isolated from 2g of cotyledons was dissolved in 5 ml of water. The solution was diluted 100-fold with water. The insert shows the spectra of the original solution in the 300–400 nm region.

4SU 培養した子葉では 260nm での吸光度に対して、330nm に0.68%の吸光度を示す RNA が得られた。4SU は他の核酸構成成分と異なり 330nm 付近に特徴的な吸収を示すので、RNA 中の 330nm 付近の吸収ピークは植物体に吸収された 4SU が RNA にとり込まれたことを示唆している。

4SU 又は大腸菌 t-RNA 中の 4SU は過酸化水素⁽²¹⁾またはヒドロキシルアミンによってそれぞれウリジンまたは N-ヒドロキシシチジンへと化学変換することが知られている。4SU 培養後の植物体から調製した RNA を過酸化水素、ヒドロキシルアミンで処理した後の近紫外部の吸収スペクトルの変化を図2に示した。過酸化水素またはヒドロキシルアミンで処理すると 330nm 付近に存在していた吸収ピークは処理時間とともに減少した。これらの化学修飾法は 4SU に特異的で他の核酸構成成分には作用しないので、RNA 標品が示す 330nm 付近の吸収は存在する 4SU によるものであると結論される。

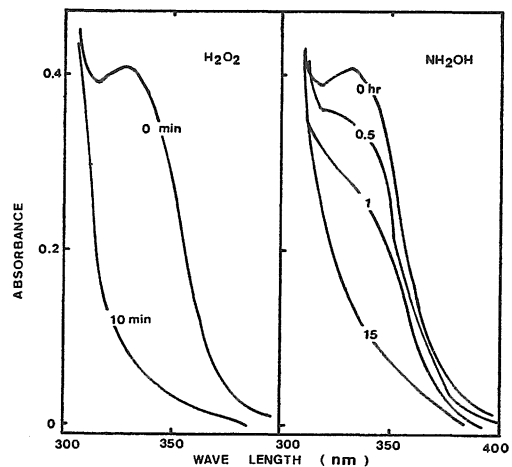


Fig. 2 Effect of selective chemical modification on the UV-absorption spectra of RNA from 4-thiouridine treated radish cotyledons.

(A) treated with 0.176 M hydrogen peroxide (pH 8.0)

(B) treated with 0.5 M hydroxylamine (pH 7.0)

4SU 培養したダイコン子葉より得られた RNA を水銀化セルロースによってアフィニティクロマトグラフィーにかけた結果が図3である。13.4mg の RNA を水銀化セルロースのカラムに通し、素通り画分を非吸着画分とし、吸着した RNA はメルカプトエタノールで溶出し 330nm での吸光度で調べた。非吸着画分の RNA は

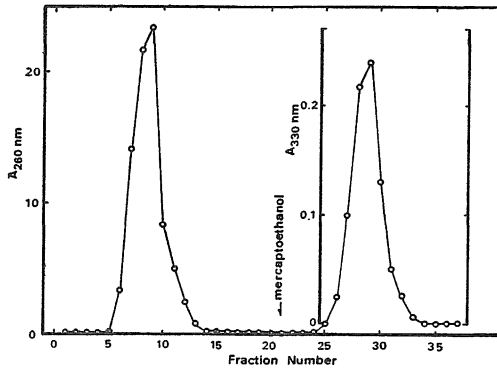


Fig. 3 Affinity chromatography of RNA on mercurated cellulose. RNA prepared from treated cotyledons was applied to the mercurated cellulose column equilibrated with the 4 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) containing 4 mM EDTA and 0.5 M KCl. Thiol-containing RNA bound to the column was eluted with 50 mM 2-mercaptoethanol contained in the same buffer. Elution of the bound RNA was monitored at 330 nm.

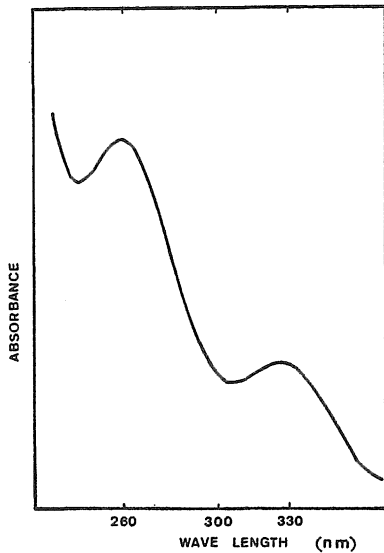


Fig. 4 Absorption spectrum of thiol-containing RNA isolated by the affinity chromatography on mercurated cellulose.

もはや近紫外域の吸収を示さなかったが、吸着画分では図4に示すように260nmと330nmに吸収極大を示すスペクトルが得られた。吸着されたRNA量は2.2mgであり全RNAの16.4%であった。しかしながら対照の植物体のRNA中には吸着される成分がほとんど認められなかった。以上の結果からもRNA中に4SUが存

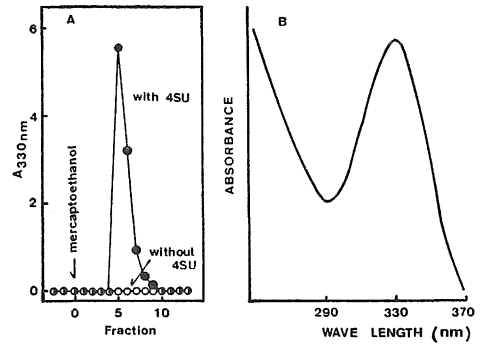


Fig. 5 (A) Affinity chromatography of acid-soluble fraction on mercurated cellulose. (B) Absorption spectrum of acid-soluble fraction bound to mercurated cellulose.

Radish seedlings were extracted with cold 5% (w/v) trichloroacetic acid (TCA). TCA in the acid-soluble fraction was removed by repeated partitioning with water-saturated ether and then pH of the fraction was adjusted with Tris to 4.0. Conditions for chromatography were the same as in Fig. 3.

在していることは明らかであり、また4SUを含むRNAは水銀化セルロースを用いるアフィニティクロマトグラフィーによって容易に単離出来ることが示された。

つぎに4SU培養したダイコン子葉より調製した酸可溶性画分を水銀化セルロースによって処理し、この画分中の4SU関連化合物を分離した。図5(A)に示すように4SU培養後の子葉から得られる酸可溶性画分には水銀化セルロースに吸着される成分が存在しているが、対照のものではこの成分が認められない。この成分は330nm付近に吸収極大を示し図5(B)、またあらかじめ過酸化水素またはヒドロキシルアミンで化学修飾しておくとも水銀化セルロースに吸着されなくなる。これらの結果は4SU培養した子葉中には低分子の4SU関連化合物が存在していることを示している。したがって種子の吸水発芽時に吸収された4SUは低分子性の4SU関連化合物を経てRNAへととり込まれているものと考えられる。

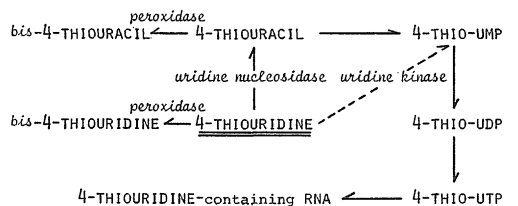


Fig. 6 Possible metabolic pathways of 4-thiouridine in germinating radish seedlings.

考 察

動物の系、すなわちハムスターの培養細胞を 4SU または 6-チオグアノシンとともにインキュベートすると、4SU または 6-チオグアノシンが RNA 中へとり込まれるとの報告がある。植物の系、すなわち 4SU 共存下で発芽生育したダイコン芽生えでも 4SU が RNA へとり込まれることを以下の事実によって実証した。(1) 4SU 培養した植物体より調製した RNA は 4SU に特徴的な 330nm 付近に吸収ピークを示すが対照のものでは認められない。(2)この吸収ピークは 4SU に特異的な化学修飾法によって処理時間とともに減少する。(3) 4SU 培養後の植物体の RNA は水銀化セルロースに親和性を示す成分を含有するが、対照のものでは認められない。(4)また 4SU 培養した芽生え中にはその酸可溶性画分に水銀化セルロースに吸着され、330nm 付近に吸収ピークをもつ 4SU 関連化合物が存在しているが、対照のものではこの成分が存在していない。

以上の結果とわれわれがこれまでに植物体での 4SU の代謝について得た知見を総合すると図 6 のようになる。植物体に吸収された 4SU はまずウリジンヌクレオシダーゼの作用により 4-チオウラシルとなる。4-チオウラシルは UMP フォスホリラーゼの作用によって 4-チオ UMP へと変換される。ウリジンを直接リン酸化して UMP を与えるウリジンキナーゼの活性は緑化芽生えで検出されるのに対して、黄化芽生えではその活性がほとんど検出されない。一方ウリジンヌクレオシダーゼは吸水直後にすでに高い活性が認められるので、種子の吸水発芽時には吸収された 4SU は一旦 4-チオウラシルとなつてからフォスホリボシルピロリン酸の共存下で、4-チオ UMP へと変換されるものと考えられる。4-チオ UMP はその後 4-チオ UDP、4-チオ UTP を経て RNA へとり込まれるのであろう。したがってウリジンから RNA へ至る合成系路のそれぞれの酵素はウリジンの代りに 4SU をも基質とすることが出来ると考えられる。4SU が初発の酵素、ウリジンヌクレオシダーゼの基質となりうることはすでに確認されている。このような 4SU のリン酸化された化合物および 4SU または 4-チオウラシルが水銀化セルロースに吸着される低分子成分であると考えられる。なお 4SU または 4-チオウラシルはベルオキシダーゼによってそれぞれのビス体へと酸化される。しかしこれらビス体は水銀化セルロースに対する親和性を持っていない。

4SU 培養した植物体では葉緑体独自のタンパク合成系で合成される成分のみが減少しており、葉緑体内成分で

ありながら細胞質系で合成される成分は影響を受けていない。したがって 4SU の葉緑体発生に対する抑制効果を解明するには葉緑体での核酸・タンパク合成系と細胞質での系を区別して考える必要がある。ハムスターの培養細胞では 4SU は RNA へとり込まれるが、RNA の合成能およびタンパク合成能にはほとんど影響を及ぼさない。この事実は植物の細胞質系においても成立するものと考えられる。一方、葉緑体系では 4SU を含む RNA では正常な翻訳機能が発現されにくい、または 4SU 関連化合物によって転写機能が阻害されて、プロプラステットの形成が抑制されるものと考えられる。

要 約

葉緑体の発生過程を特異的に抑制する 4-チオウリジン (以下 4SU) の黄化植物体での代謝経路について調べた。1mM の 4SU 共存下で発芽生育させたダイコン子葉から調製した RNA は 330nm 付近に特徴的な吸収ピークを示すが、4SU を含まない条件下で発芽生育させた対照からの RNA ではこのようなピークは認められない。4SU が 330nm 付近に吸収をもつので RNA 中のピークが 4SU に由来するものと推定された。事実このピークは 4SU に特異的に作用する化学修飾剤、過酸化水素またはヒドロキシルアミンで処理すると消失した。また 4SU 処理後の子葉から得られた RNA 標品中の約 15~20%が、チオール化合物に親和性を示す水銀化セルロースに吸着され、メルカプトエタノールで溶出された。これらの結果は吸水発芽時に吸収された 4SU が通常の核酸構成成分であるウリジンと同様に代謝されて、4-チオ UMP、4-チオ UDP、4-チオ UTP を経て RNA にとり込まれることを示している。また 4SU 関連化合物が葉緑体系での転写を阻害するかまたは 4SU が葉緑体の RNA へとり込まれて、翻訳の機能が低下することによって葉緑体の発生が抑制されるものと考察した。

参 考 文 献

1. MARGULIES, M. M. : *Plant Physiol.*, **41** : 579-585, 1964.
2. REGER, B. J., SMILLIE, R. M. and FULLER, R. C. : *ibid.*, **50** : 19-23, 1972.
3. BURNS, E. R., BUCHANAN, G. A. and CARTER, M. C. : *ibid.*, **47** : 144-148, 1971.
4. BENNETT, J. : *Phytochemistry*, **15** : 263-265, 1976.
5. KONIS, Y., KLEIN, S. and OHAD, I. : *Photo-*

- chem. Photobiol., **27** : 177–182, 1978.
6. RIDLEY, S. M. : Plant Physiol., **59** : 724–732, 1977.
 7. BOARDMAN, N. K. and HIGHKIN, H. R. : Biochim. Biophys. Acta, **126** : 189–199, 1966.
 8. BENEDICT, C. R., MCCREE, K. J. and KOHEL, R. J. : Plant Physiol., **49** : 968–971, 1972.
 9. OCHIAI, H. and SHIBATA, H. : Agr. Biol. Chem., **34** : 1751–1753, 1970.
 10. OCHIAI, H., SHIBATA, H. and SUEKANE, T. : *ibid.*, **35** : 1259–1266, 1971.
 11. 落合英夫・柴田均・末包孝広・河野泰久 : Amino Acid and Nucleic Acid, **24** : 1–13, 1971.
 12. 柴田均・河野泰久・落合英夫 : 島大農研報, **5** : 1–9, 1971.
 13. SHIBATA, H. and OCHIAI, H. : Agr. Biol. Chem., **37** : 471–476, 1973.
 14. 柴田均・落合英夫 : 島大農研報, **7** : 123–128, 1973.
 15. 柴田均・末包孝広・落合英夫 : 農化, **50** : 49–54, 1976.
 16. SHIBATA, H. and OCHIAI, H. : Plant & Cell Physiol., **17** : 281–288, 1976.
 17. MORI, T., WAKABAYASHI, Y. and TAKAGI, S. : J. Biochem., **84** : 1103–1111, 1978.
 18. HARTLEY, M. R. and ELLIS, R. J. : Biochem. J., **134** : 249–262, 1973.
 19. SHAINOFF, J. R. : J. Immunol., **100** : 187–193, 1968.
 20. LIPSETT, M. N. : J. Biol. Chem., **240** : 3975–3978, 1965.
 21. SHUGART, L. : Arch. Biochem. Biophys., **148** : 488–495, 1972.
 22. IIDA, S., CHUNG, K. C. and HAYATSU, H. : Biochim. Biophys. Acta, **308** : 198–204, 1973.
 23. MELVIN, W. T., MILNE, H. B., SLATER, A. A., ALLEN, H. J. and KEIR, H. M. : Eur. J. Biochem., **92** : 373–379, 1978.
 24. 柴田均・落合英夫 : 未発表.
 25. SHIBATA, H. and OCHIAI, H. : 投稿中.

Summary

We have reported previously the inhibitory effect of 4-thiouridine (4SU) on chloroplast development in greening radish cotyledons. In this paper we present the results on metabolism of 4SU in germinating radish seedlings. Radish seeds were germinated and grown with (treated) or without (untreated) 4SU in the dark for 4 days. RNA prepared from the treated cotyledons had an absorption peak near 330 nm; however RNA from the untreated ones did not show any significant peak in this region. Selective modification of RNA from the treated cotyledons with hydrogen peroxide or hydroxylamine, which are known to react specifically with 4SU or 4SU moiety in RNA, resulted in the disappearance of the peak near 330 nm. About 15–20% of RNA from the treated cotyledons bound to mercurated cellulose and was eluted with mercaptoethanol. These results indicated that 4SU is metabolized to 4-thioUMP, 4-thioUDP and 4-thioUTP and then incorporated into RNA through the same pathways as is uridine in the germinating radish seedlings. We consider that the action of 4SU on chloroplast development may be through the depressed activity of translation or an abnormal translation due to the 4SU-containing RNA or the inhibition of RNA synthesis by the 4SU moiety in developing plastids.