

ダイコン子葉の葉緑体発生に対する4-チオウリジンの生理作用

ゲル電気泳動法によるリボ核酸分析

落合 英夫[※]・柴田 均[※]

Hideo OCHIAI and Hitoshi SHIBATA

Effect of 4-Thiouridine on Chloroplast Development in Radish Cotyledons

Analysis of Ribonucleic Acids by Polyacrylamide
Gel Electrophoresis

結 論

4-チオウリジン（以下4 SUと記す，図1）は，元来転位リボ核酸（tRNA）の微量成分として発見されたものであり¹⁾²⁾，このものは他の核酸塩基類とは異なった光化学的性質を有している³⁾。われわれはこの4 SUの光化学的知見に基づいて高等幼植物における光形態形成過程に対するこのものの生理作用を研究したところ，4 SUは黄化ダイコン子葉の緑化過程に対して特異的な遅延効果を有することを発見し報告してきた⁴⁾⁵⁾。すなわち0.5mM濃度の4 SU水溶液培養のダイコン種子は，水培養の正常体と同様に発芽し生育するにもかかわらず暗所で4日間発芽生育した黄化葉を明所に移すと，正常体では緑化（クロロフィル生成量，プロトクロロフィライド生成量）が迅速に進むのに対して，4 SU培養のものでは緑化が強く抑制される。しかしこの抑制作用はアクチノマイシンDなどが示すような完全阻害作用⁶⁾ではなく，光照射を続けることによって緑化は正常体と同じまでに回復する。一方4 SU培養の黄化子葉および光照射による緑化過程中的それぞれの子葉について，可溶性細胞質酵素としてグルコース-6-リン酸脱水素酵素活性，ミトコンドリア酵素としてのグルタミン酸脱水素酵素活性，およびクロロプラスト内酵素としてのリブコース-1,5-ジリン酸カルボキシラーゼ（カルボキシディスムターゼ）活性を比較検討した結果は，前二者の比活性につい

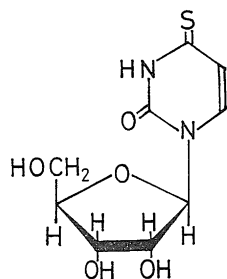


図1 4-チオウリジン (4 SU)

ては4 SU培養，水培養に差は認められなかったが，クロロプラスト固有のカルボキシディスムターゼの比活性は4 SU培養のものにおいて著しく低下していることが示された。このような生態学的酵素学的実験結果は，細胞内でのクロロプラストの発生分化に対して4 SUが選択的な抑制作用をあらわしていることを示すものと考えられる。この推察を確認する目的で今回は水培養，4 SU培養の子葉におけるリボゾーム RNAs，およびクロロプラスト RNAs の光誘起的生成を追跡検討したのでその結果をここに報告する。

実験材料および方法

実験材料

植物材料として，かいわれ大根 (*Raphanus sativus* LINN.) の子葉を用いた。4 SUは FOXら⁷⁾ の方法によりウリジンより合成し，SHIBAEVら⁸⁾ の方法によって精製したものをを用いた。種子をガラスシャーレ中の脱脂綿上にまき，0.5mM濃度の4 SUを含むリン酸緩衝液，pH 7.0，5mM水溶液を与えて，暗所22°C~25°Cで4日間発芽生育させた後，明所（三菱植物栽培用ランプ FH 252，20W×4）22°C~25°Cで生育させた。これらの植物体子葉をつみとり，実験に供した。

RNAの抽出

1gの子葉に1%ラウリル硫酸ナトリウムを含んだ10mMトリス緩衝液（pH 7.4）と，同じ緩衝液中に懸濁させたベントナイト調整液¹⁰⁾を，ベントナイト12mg/mlの濃度となるようにして，合計10ml加え，0.1%の8-オキシキノリンと10%のメタクレゾールを含んだフェノール（以下フェノール試薬と記す）を10ml加えて，日本精機 HA-2型ホモジナイザーにて，

※ 生物化学研究室

氷冷下 18,000rpm で 3 分間ホモジナイズする。得られた細胞破碎液を 4,000rpm で 5 分間遠心した。中間層を残すようにして、下層のフェノール層を捨て去り、最終濃度が 0.5M となるように NaCl 水溶液を加えて、DNA を沈殿させる。ついでこの液に同量のフェノール試薬を加えて、混合、遠心分離して上層の水層をとりだし、同様にフェノール試薬処理を行なう。遠心分離の後、上部水層をとりだして氷冷する。この際白濁を生じる時には、再び同様の操作を繰り返す。なお水層は操作の過程で減少するので、抽出用の緩衝液を適宜補充する。以上のように、フェノール処理した水層に、2 倍容の 99% エタノールを加えて、氷冷下に 30 分以上放置する。遠心分離によって RNA の沈殿を集め、この沈殿を少量の沈殿溶解液、すなわち、0.5% のラウリル硫酸ナトリウムを含んだ 0.15M 酢酸ナトリウム、pH 6.0 溶液に溶解し、2 倍容の 99% エタノールを加えて、再沈殿させる。遠心分離の後、完全にエタノールを除いてから、0.2~0.3ml の電気泳動用溶媒に溶解して、紫外部吸収スペクトルを調べ、その吸光度より、RNA 量を決定¹⁾した。図 2 に水培養および 4 SU 培養の子葉より抽出された RNAs 標品の紫外部吸収スペクトル図を示した。これら RNAs 標品での 260m μ /280m μ は 1.82~2.20、新鮮子葉 1g よりの RNA 収量は平均 0.63mg であった。

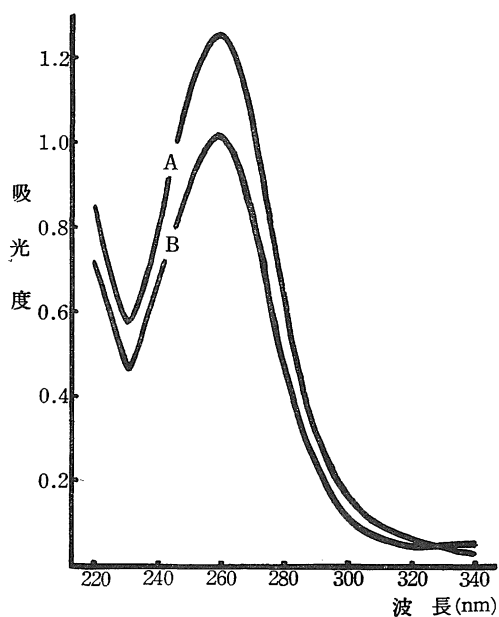


図 2 水培養 (—A—), 4 SU 培養 (---B---) の黄化だいこん子葉 (4 日間、暗所 22°C にて発芽生育) より調製された RNAs の紫外部吸収スペクトル

ゲルの作製¹²⁾¹³⁾

0.5% のアガロースを含んだ 3.0% のアクリルアミドゲルを使用した。15% のアクリルアミド (クロロホルムで再結晶させたもの) と 0.75% ビスアクリルアミド (アセトンで再結晶させたもの) の水溶液 3ml に、グリセロール 1.5ml、蒸留水 2.8ml を加え、約 40°C に加温しておく。一方、それぞれ 0.08M トリス、0.04M 酢酸ナトリウム、0.002M EDTA 混合溶液を酢酸で pH 7.2 に調製した緩衝液の 1% アガロース溶液 7.5ml を逆流冷却器を付けて 15 分間煮沸したのち、約 40°C まで放冷する。

アクリルアミド溶液に、アガロース溶液を加え、10% 過硫酸アンモニウム溶液 0.12ml、NNN'N' テトラメチルエチレンジアミン 0.015ml を加える。この液をす早く注射器にとり、一方をセロファンとパラフィルムで封じた 5mm×8cm のゲル管に、7cm の高さまで注入する。アクリルアミド重合促進のために、上部に蒸留水を重層して空気との接触を断する。一晚放置すればアクリルアミドの重合およびアガロースのゲル化は十分である。

電気泳動

ゲル精製のために、予備電気泳動を行なった。パラフィルムをとり去り、濾紙片で蒸留水を除き、ゲル管および電極槽に電気泳動用緩衝液、36mM トリス、30mM リン酸第一ナトリウム、1mM EDTA の混合液を満たして 5mA/tube、5°C で 30~40 分荷電をかける。ついで RNA 試料溶液 25 μ l をゲル上にのせて同一条件下で 150 分電気泳動させた。この泳動時間は、ブロムフェノールブルーを指標とした予備実験において決定した。

染色・脱染色

電気泳動後、ゲル管から抜き出したゲルを、1M 酢酸水溶液に 15 分間浸し、0.4M 酢酸と同量の 0.4M 酢酸ナトリウムの混合溶液に溶解したメチレンブルー染色液 (0.1%) に約 1 時間浸して RNA を染色する。脱染色は流水中で 20~30 時間行ないクロマトグラムが出現して、RNA 不在部分の青色が完全に抜けるまで行なった。脱染色後のゲルはほとんど透明となるので、ASUKA 製デンシトメーター OZUMOR 82 型により、610m μ のフィルター設置下、染色クロマトグラムを吸収曲線として表現した。

実験結果

図 3 に RNAs の経時的な電気泳動クロマトグラムを示してある。LOENING⁹⁾ の報告によれば、たとえば図 3 の C において、それぞれのピークは左から 25S、23S、18S、16S および 13S RNA である。ただし 23S RNA

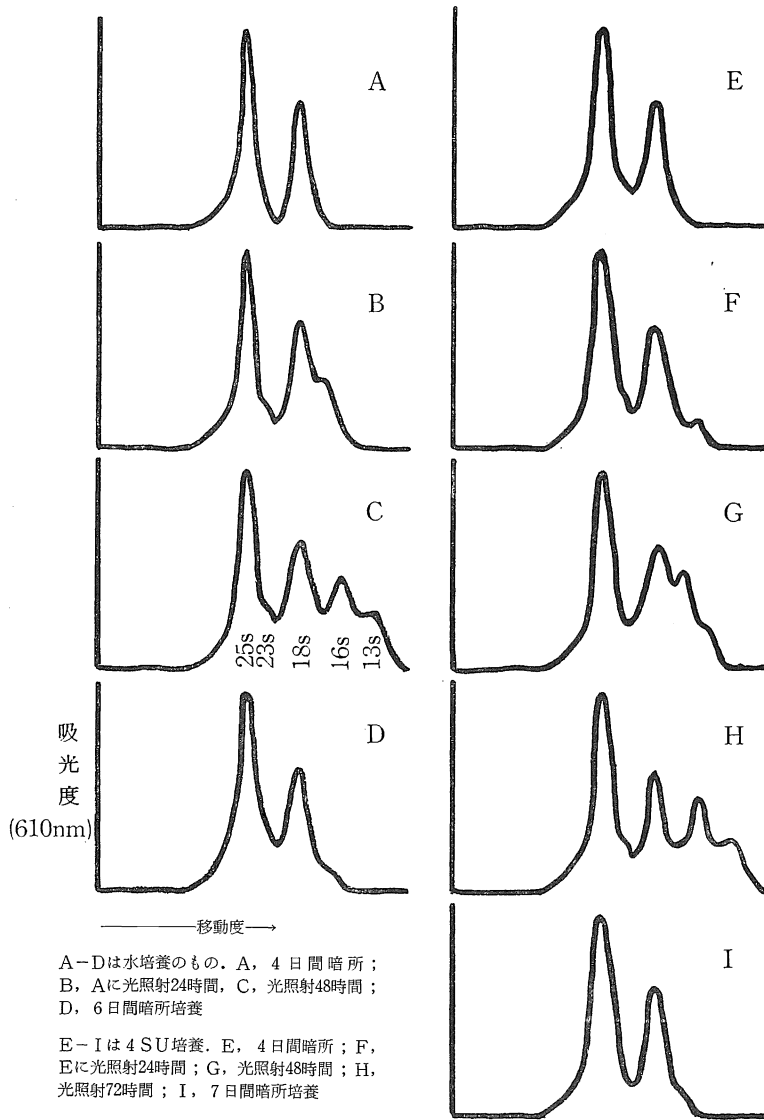


図3 RNAs の電気泳動クロマトグラム

は肉眼的には1つの独立したバンドとして検知できるにもかかわらず、25s RNA と移動度における距離がおたがいに接近しているために、用いたデンシトメーターにおいてはショルダーとしてしか表現されえなかった。リボゾーム RNA である 25s と 18s は水培養、4 SU 培養の子葉において明・暗いずれの条件下においても差はない(図A, E)。図B, Cはそれぞれ正常黄化めばえに対して24時間、48時間照射してえられる緑化子葉からの RNAs クロマトグラムである。また4 SU 培養子葉へ24時間、48時間および72時間照射した子葉からの、RNAs 分析図はそれぞれ図F, G, Hに示してある。一方連続的に暗所条件下で140時間(水培養)、148

かにされた。

考 察

核酸のアクリルアミドゲル電気泳動法はその分離能が従前よく用いられた超遠心分析法に比して遙かにすぐれているものである。したがって従前の超遠心分析法によっては均一のRNAと考えられていたものも電気泳動法によってさらに分画されることが示された例が多く、このことはRNAの生理的意義を考えるうえで重要な問題をなげかけている¹⁵⁾。われわれも光誘起によるクロロプラスト発生に対する4 SUの効果を分子レベルで把握するためにリボゾーム RNAs, クロロプラスト RNAs

時間(4 SU培養)生育させて採取した子葉からの RNAs 泳動クロマトグラムを図D, Iに示した。これから暗所条件下では生育時間と関係なく 23s RNA と 16s RNA の生成が認められないので、これらが LOENING らが指摘したと同様にクロロプラスト RNA であると判断される。これらクロロプラスト RNA である 23s と 16s は水培養のものにおいて照射24時間後にすでに見られ、48時間後では 16s がはっきりとピークとして表われてくるが、一方4 SU培養において照射24時間後では 16s のショルダーがわずかに認められてくるにすぎず、水培養のものと比較して常に約24時間の遅れが生じている。

しかもこの4 SUによるクロロプラスト RNA の生成抑制も、前に報告したクロロフィル量やリブローズ 1,5ジリン酸カルボキシラーゼ活性の場合⁵⁾と同様に照射を続けることによって水培養のものと同等にまで回復してきている。以上のようにリボゾーム RNA である 25s と 18s の RNA の生成は4 SU培養、水培養のもの間に差はないにもかかわらずクロロプラスト RNA である 23s と 16s の RNA の照射後の経時的生成は、4 SU培養の場合において抑制されていることが明

の光照射による経時的生成を追跡する手段として本法を採用した。実験結果の項において示したようにリボソームRNAと考えられる25S-RNA, 18S-RNAの生成は、4SU培養、正常培養のもの間に差がないにもかかわらず、クロロプラストRNA (23S-RNA, 16S-RNA)の光照射後の経時的生成は4SU培養の子葉において抑制されることがこの実験において示された。これらの結果は、4SUが暗所および光照射初期におけるクロロプラスト発生をRNAのレベルで選択的に抑制したことを示すものであり、以前に細胞内各器官固有の酵素活性の比較によって得られた結果を裏付けるものである。クロロプラスト内RNAの生理的意義についてはクロロプラストDNAの意義とともに、細胞質内RNA, 核DNAの中心的意義に対応してどの程度の自主的機能を持っているかという点で、現在植物生化学の最大の課題の一つとなっており、考察の仕方の大きく分れる点でもある^{16a, b)}。

われわれの実験結果から4SUは細胞質内リボソームRNAsの生成、したがって細胞質内酵素蛋白の合成経路には影響を与えないにもかかわらず、クロロプラストRNAの生成、クロロプラスト固有酵素蛋白、クロロプラスト構成成分の生合成に影響した事実を考えると、クロロプラストという独立器官の発生には絶対的ではないにしてもある程度の自主的生合成系が働いていると考えることができよう。このクロロプラストという独立器官の自主的生合成系はその代謝系(解毒系)の貧困さのゆえに、4SUによる抑制をおこしたのではないであろうか。これらの考察は放射活性な4SUを用いてのマイクロオートラジオグラフィにより観察実証される必要がある。もっとも4SUがそのままの形で作用しているのか、4SUがある程度代謝され、その代謝生成物が「有効物質」として働いているのかも今後検討されねばならない問題である。さらに4SUのこの選択的な抑制作用が光照射により消失してゆく機構についても考察されねばならない。われわれは以前に4SUの水溶液の光化学反応を研究した結果¹⁷⁾から、これは生体内で遊離または結合型の4SUが、ウリジン-4-スルホン酸への光酸化を経てウリジンへと変換し¹⁷⁾、解毒されるものと考えている。以上のように4SUが同一細胞内における器官に対してRNA生合成のレベルから選択的抑制をかけるという事実はそれ自身興味ある問題であると同時に、今後細胞内器官の発生分化機構を解明してゆくうえで重要な研究手段となりうるものと思われる。

さらにこの研究を通じて一つの重要な問題が残されて

いる。すなわち植物細胞よりのRNAの抽出方法としてわれわれは従前より用いられていた諸方法の中で、抽出過程におけるRNAの自己分解の最も少ないとされるLOENING⁹⁾法を採用している。しかし本法といえども全細胞中の全RNAを定量的に抽出しうるかどうかについて疑問があるし、さらにRNAの種類、あるいは器官に連帯しているRNAの物理的性状によってはその抽出のされ方に差が生じないのかも疑問とされねばならないであろう。われわれの場合のような比較生化学的研究においてはこのRNA抽出方法の妥当性は根本的に重要な問題である。今回の実験の場合その抽出結果に常に再現性があったがゆえに偏差は少ないとみているが抽出の完全性を期するためには、さらに改良法¹⁸⁾による抽出操作の検討等の重要性を認めねばならないであろう。

要 約

4-チオウリジンの存在下で発芽生長した「ダイコン」の黄化子葉では、クロロプラストに固有な色素蛋白、酵素の生成が正常体のものに比して著しく抑制されているが、今回はさらに細胞質内リボ核酸(主としてリボソームRNA)とクロロプラストRNAの生成量、ならびに光照射後のそれぞれのRNAの経時的生合成量を、ポリアクリルアミドゲル電気泳動法によって比較検討した。その結果4-チオウリジンの選択的抑制作用は、クロロプラストのリボ核酸生合成のレベルであらわれていることが明らかにされた。

参 考 文 献

1. LIPSETT, M. N.: J. Biol. Chem. **240**: 3975—3978, 1965.
2. GOODMAN, H. M., ABERSON, J., LANDY, A., BRENNEN, S. and SMITH, J. D.: Nature **217**: 1019—1024, 1968.
3. PLEISS, M., OCHIAI, H. and CERUTTI, P. A.: Biochem. Biophys. Res. Commun. **34**: 70—76, 1969.
4. 落合英夫・柴田 均: 日本農芸化学会昭和45年度大会講演要旨集 **45**: 171, 1E-01, 1E-02, 1970.
5. OCHIAI, H. and SHIBATA, H.: Agr. Biol. Chem. **34**: 1751—1753, 1970.
6. MELANDRI, B. A., BACCARINI, A. and FORTI, G.: Plant Physiol. **44**: 95—100, 1969.
7. FOX, J. J. et al.: J. Am. Chem. Soc. **81**: 178—187, 1959.
8. SHIBAEV, V. N., GRACHEV, M. A. and SPIRI-

※ OCHIAI, H. and CERUTTI, P. A.: unpublished results.

- DONOVA, S. M.: "Synthetic Procedures in Nucleic Acid Chemistry" eds. by ZORBACH, W. W. and TIPSON, R. S.: Interscience Publishers, New York N. Y., 1968. p. 503-505.
9. LOENING, U. E. and INGLE, J.: Nature **215**: 363-367, 1967.
 10. 木村孝一: 蛋白質核酸酵素 **11** (6): 457-469, 1966.
 11. 渡辺 格・三浦謹一郎: 実験化学講座 (23), 丸善東京 1957. p. 287-288.
 12. PEACOCK, A. C. and DINGMAN, C. W.: Biochemistry, **7**: 668-674, 1968.
 13. 河田いこひ: 蛋白質核酸酵素 **15** (10) 1025-1031, 1970.
 14. PEACOCK, A. C. and DINGMAN, C. W.: Biochemistry, **6**: 1818-1827, 1967.
 15. MAC GREGOR, R. R. and MAHLER, H. R.: Biochemistry, **8**: 3036-3048, 1969.
 - 16a. HIRAI, A. and WILDMAN, S. G.: Virology **38**: 73-82, 1969.
 - 16b. INGLE, J.: Plant Physiol. **43**: 1850-1854, 1968.
 17. ZIFF, E. B. and FRESCO, J. R.: J. Am. Chem. Soc. **90**: 7338-7342, 1968.
 18. SOLYMOSY, F. et al: European J. Biochem. **5**: 520-527, 1968.

Summary

Analysis by the use of polyacrylamide gel electrophoresis was worked out for the comparative studies on chloroplast ribonucleic acids from radish cotyledons grown in the presence and absence of 4-thiouridine, which had been shown to prevent the formation of the functional proteins proper to the chloroplast such as protochlorophyllideholochrome and ribulose 1, 5-diphosphate carboxylase. The rate of *de novo* biosynthesis of chloroplast ribonucleic acids on illumination in the cotyledons cultured with 4-thiouridine was significantly delayed as compared with that of chloroplast ribonucleic acids from the cotyledons without 4-thiouridine.

On the other hand there was no difference in the formation of ribosomal ribonucleic acids between the 4-thiouridine treated plants and the untreated. The results obtained indicate that 4-thiouridine must have inhibited the development of proplastid (precursor of chloroplast) during the germination stage followed by the growth in the dark.