

## 3Da-2

ヒマ種子胚乳および胚軸からの核の単離

○前島 正義、小島 浩司、野村 典子、旭 正

(名大・農・生化)

【目的】 乾燥種子は、生命活動を極度に抑えた状態にある。これがひとたび吸水すると数日のうちに発芽し、新しい個体への成長を始める。ヒマ種子では、発芽初期に必要な養分を胚乳が供給する。吸水後、胚乳は酵素タンパク質、リン脂質を合成するとともにオルガネラを形成して、貯蔵脂肪を分解代謝する。そして、シヨ糖、アミノ酸、ヌクレオチドを子葉、胚軸、幼根へ供給する。吸水・発芽時に胚乳細胞の分裂は起こらない。事実、吸水後4日めまでのDNA量は一定で、以後減少する。一方、RNA量は乾燥種子にはわずかしか存在せず、吸水後急激に増加し、4日めでピークに達し以後減少する。酵素活性も同様の変化を示す。吸水は胚乳細胞での転写活性全開の引き金になっている。細胞分裂なしに急激な遺伝情報発現の活性化を示す胚乳組織を材料とし、その活性化を支える核(核構成成分)の変化を解析することを研究の目的とした。その第一歩として、吸水後のヒマ種子胚乳から転写活性を有する純度の高い核を単離することを試みた。また、細胞分裂を伴いつつ高い転写活性を示す胚軸からも核を単離し、比較の対象とした。

【実験方法と結果】 1日間の吸水後、30°C暗所で数日間インキュベートしたヒマ種子から胚乳あるいは胚軸を取り、これを出発材料として以下の方法で核を単離した。

(1) 胚乳核の単離 胚乳を、デキストラン40、フィコール400などを含む緩衝液中で磨砕し、ろ過した後、300g 5分間の遠心によって沈澱を得た。この沈澱を、洗浄後粗核画分として不連続パーコール密度勾配(40, 60, 80%パーコール、2Mシヨ糖)遠心にかけた。80%パーコールの核画分を希釈し、遠心して沈澱させ、洗浄した後これを精製核標品として分析に供した。得られた標品は、光学顕微鏡下で核の存在・形態を観察でき、タンパク質とDNAの量比は20:1であった。この標品に、ミトコンドリア、グリオキシソームなどの指標酵素の混入は認められなかったが、ヒマ種子胚乳の貯蔵タンパク質が一部混入していた。また、単離核を[<sup>3</sup>H]UTPとインキュベートしRNAへの取込み活性を測定したところ、核に依存した高い転写活性が確認され、さらに、in vitro転写産物の大部分が25S以上の大きさを示した。

(2) 胚軸核の単離 吸水後10日以上経過した種子の胚軸を用いた。胚軸磨砕液をろ過した後、分画遠心(140xg 10分間の上清、570xg 20分間の沈殿)した。得られた沈殿を80%パーコール溶液に懸濁し、これを遠心管中の2Mシヨ糖溶液層の上にのせた。さらに、その上に60%、40%パーコール溶液を重ねて、浮遊法による不連続パーコール密度勾配遠心を行った。40%と60%パーコールの境界面に浮遊してきた核を回収して、洗浄後、精製核標品とした。光学顕微鏡観察によって、この標品は純度の高い核であることが確認できた。

両単離核のタンパク質組成の相違、あるいは吸水後の時間経過に伴う胚乳核の転写活性の変化等についても、併せ述べたい。