The Japanese Society of Plant Physiologists

21. タバコ葉核酸のクロマト分画と^{32}Pのとりこみ

新田 敏・天笠 準子・代谷 次夫（東大・理）

Messenger RNA（m-RNA）については、その実体が微生物および動物細胞でとらえられつつあるが、高等植物ではまだその存在も示されていない。我々は高等植物の遺伝情報伝達機構を解明する第一歩として、タバコ葉を用いて^{32}Pですみやかに標識されるRNA、いわゆる"pulse-labelled RNA（p-RNA）の分離を試み、この実で微生物におけるm-RNAに対応するようなRNAの存在を確認し、遠心分画を行ってその細胞内での分布をしらべた。

〔材料と方法〕

材料：Nicotiana tabacum L. var. Xanthi（日本専売公社秦野たばこ試験場の温室で生育した2ヶ月めの植物）の茎頂から4~5枚めの葉（生量は主脈とも2~3g）を用いた。

^{32}Pのとりこみ：あらかじめ水切したタバコ葉を25°C、自然光のもとで2mc/mlの^{32}Pを含む酢酸緩衝液（pH 5）1~2mlにさし、葉柄を通じて1時間、^{32}Pを摂取させた。

核酸の抽出：SDS-フェノール法を用いた。SDS処理の際にはタバコ葉に含まれるフェノール性物質の酸化物が核酸、とくにDNAと結合しやすいので、それを防ぐためアスコルビン酸を加えた（10^{-3}M）。SDS処理は10分、フェノール処理は20分、いずれも4°C以下で行った。フェノール層との分離は遠心（10,000 r.p.m. 20分）によった。

クロマト分画：Mandell-Hersheyの方法に準じた。子牛血清アルブミンをMandellらの方法に従ってメチル化したのち、ハイフロスーパーセルに吸着させ均一な層としてカラムを作った。カラムは長さ17cm、直径2cm、約50mgのメチル化アルブミン（MBSA）を含む。0.2Mから1.0Mまでの食塩-燐酸緩衝液（pH 6.7）500mlにより連続的に溶出した。溶出速度は1時間約50ml、これを4mlずつに分画し、その紫外部吸収と^{32}Pの放射能を測定した。そのほか、遠心分画、RNase処理などは常法に従った。

〔結果〕

タバコ葉核酸のMBSAクロマト分画は図1に示すように、食塩濃度0.30M~0.35M附近で転移RNA（s-RNA）、0.90M~0.95M附近でDNA、0.52Mおよび0.56M附近でそれぞれ18s, 28sと思われるリボソームRNA（r-RNA）が溶出された。^{32}P 1時間のとりこみによってとらえられるp-RNAのクロマト分画は、s-RNAの位置に中の広いピークと、18s, 28s r-RNAにそれぞれ僅か先行する極めてシャープな2つのピークとが現れる（図1）。これに対して^{32}Pのとりこみを6時間にすると、r-RNA溶出分画での紫外部吸収と^{32}Pの放射能とは完全に一致する（図2）。

^{32}Pを1時間摂取させた葉について、r-RNA溶出分画に現われるp-RNAはその細胞内での分布について、150xg, 1500xg, 10,000xg, 40,000xg（それぞれ核、葉緑体、ミトコンドリア、リボソームに対応して）のいずれの分画にも見出される（図3）。遠心分画のクロマト図型はタバコ葉ではかなりの量のRNAが細胞質顆粒に分布することを示していたが、それぞれの遠心分画について含まれるRNA全量を基準にしてp-RNAの量を比べると、核に対応する150xgの分画に最も多く、以下1500xg 10,000xg, 40,000xgの順に減少する傾向が見られた。上澄部については、p-RNAはs-RNAのクロマト溶出分画のみに認められた。

これらの結果については、p-RNAの会合および分解を充分に考慮する必要があるが、代謝回転の極めて早い微量の核酸がタバコ葉細胞内にひろく

NII-Electronic Library Service

The Japanese Society of Plant Physiologists

分布することを示している。

〔現在の問題点〕

1) p-RNAの塩基組成

2) p-RNAのDNAおよびリボソームとの会合性

3) 抗生物質、とくにActinomycinの影響

〔将来の問題点〕

1) p-RNAの二次構造と機能

2) 各細胞分画におけるp-RNAの異同性

3) 葉緑体におけるリボソーム、p-RNAの存在意義、とくに細胞質遺伝との関係

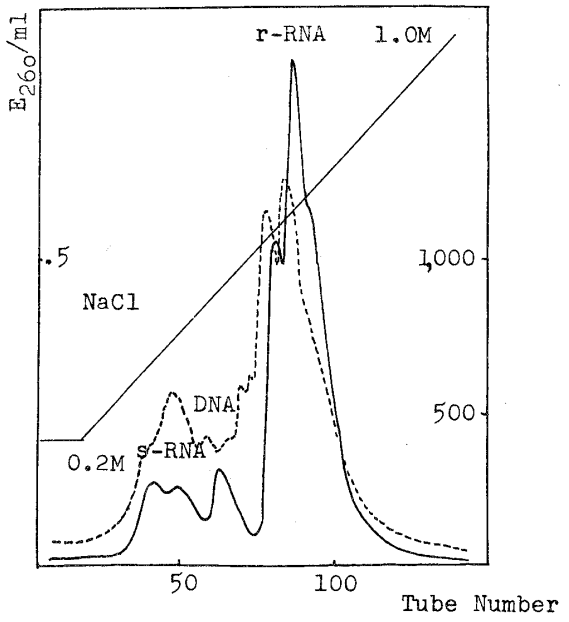

Fig.1 Chromatography of "Pulse-labelled RNA"(1 hour)

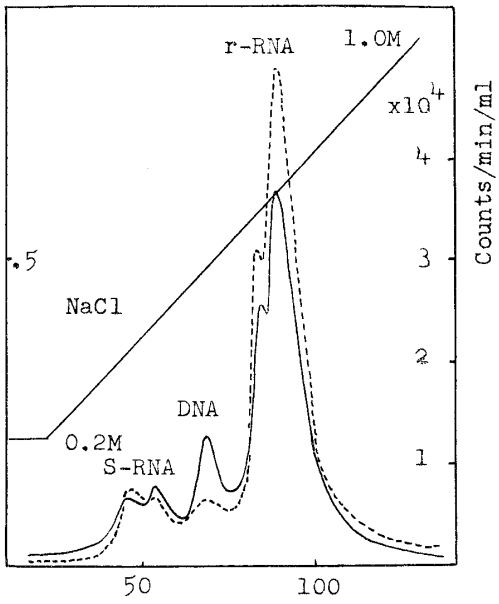

Fig.2 Chromatography of ^{32}P-labelled nucleic acids (6 hours)

SDS-phenol prepared nucleic acids labelled randomly with $^{32}PO_4^{---}$

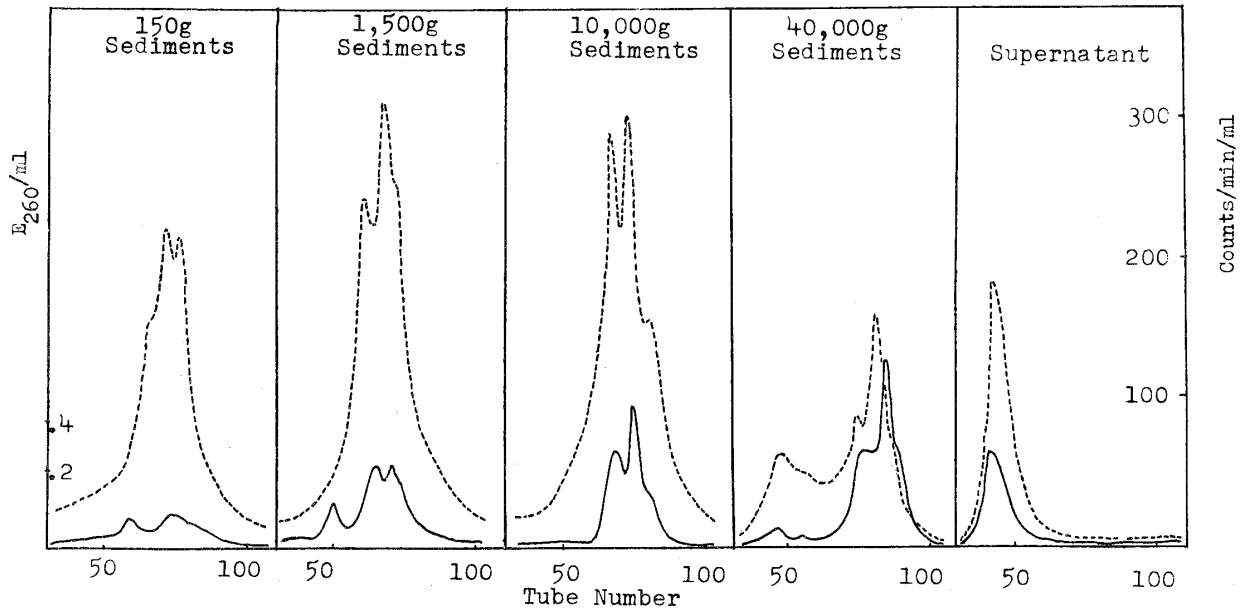

Fig.3 Fractionation of the "Pulse-labelled RNA" of Cell Fractions with column chromatography on methylated serum albumin. 4 ml/tube/4 min were collected at room temperature (25 C) ——, absorbancy at 260 m per ml; ----, counts/min/ml.

NII-Electronic Library Service