

2Bp-11

ササゲ発芽種子のポリ(A)ポリメラーゼ:

性質及び発芽に伴う活性変動

樽井 裕, 南川 隆雄 (都立大・生)

真核生物のほとんどの mRNA は転写後いくつかの修飾を受け、核外でタンパク質に翻訳されることが知られている。この修飾の中で最も顕著なものの一つに 3'-末端のポリアデニル化〔ポリ(A)化〕がある。このポリ(A)化を触媒するポリ(A)ポリメラーゼは高等動物や原生動物から抽出、精製されており、その性質についてもいくつかの報告があるが、植物からの精製例はない。そこで本研究では、ササゲ発芽種子を用いて高比活性の酵素標品を調製し、次の様な酵素学的性質を明らかにした。

(1) 2日間吸水させたササゲ (*Vigna unguiculata*) 種子は 3% PVP を含む 20 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 8.0) で抽出し、遠心上清を 40% 飽和硫酸で沈澱させ、これをリン酸セルロース、ブチルトヨパール等のカラムクロマトグラフィーで高度に精製した。当酵素はプライマー-RNA に、オリゴ(dT)セルロースに吸着をおこす程度の長さのポリ(A)鎖を付加した。酵素活性は *exogenous* なプライマーに完全に依存しており、また、基質として ATP に特異的なことや阻害剤実験等から、標品中の活性は DNA 依存性 RNA ポリメラーゼによるものではないことが示された。

(2) ポリ(A)ポリメラーゼ活性には Mn^{2+} イオンが必要であり、 Mg^{2+} イオンでは活性は阻害された。 Mn^{2+} イオンの標準反応液中の最適濃度は約 $1mM$ であったが、この最適濃度は反応液中の ATP 濃度に比例し、等モル濃度のときにポリ(A)ポリメラーゼの最大活性がみられた。このことは、ポリ(A)ポリメラーゼの本来の基質が ATP-Mn 錯体であることを示唆している。

(3) 次に酵素活性に対する ATP 以外のヌクレオチド三リン酸の影響を調べた。UTP は当酵素の基質にはならず、またポリ(A)化を阻害した。この阻害効果は UTP と等モルの Mn^{2+} を同時に加えても抑えられなかった。GTP、CTP にも UTP と同程度の阻害効果がみられた。これらから核内で当酵素活性が NTP によって制御されている可能性が示された。

(4) プライマー-RNA の選択性について検討したところ、人工ポリマーとしてポリ(A)が高いプライマー活性を示した。しかし一方で、加水分解等によりポリ(A)の鎖長を短かくすると、単位 RNA 量当りの ATP 取り込み活性が増大することから、プライマー活性は従来言われていたような塩基配列のみによって決定されるのではなく、3'-OH 末端数が重要な要因であることがわかった。

(5) 発芽に伴う種子中のポリ(A)ポリメラーゼ活性の変動を追跡した。胚全体の活性は 2 日目に最大になるが、乾燥種子中にもその 1/2 程度の活性がみられた。この変動パターンは子葉中の活性変動と類似しており、当酵素活性が吸水直後の mRNA 合成または保存 mRNA のポリ(A)化に働いていることが示唆された。また吸水と同時に種子にシクロハキシミド (200 $\mu g/ml$) を与えると、吸水後 0-2 日目の酵素活性の増加はほぼ完全に抑えられた。