



Title	ジャガイモの塊茎形成過程における RNA の合成について
Author(s)	佐々木, 久視; SASAKI, Hisami; 岡沢, 養三 他
Citation	北海道大学農学部邦文紀要, 7(3), 412-415
Issue Date	1970-03-31
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/11802
Type	departmental bulletin paper
File Information	7(3)_p412-415.pdf



ジャガイモの塊茎形成過程における RNA の合成について

佐々木久視・岡沢養三

(北海道大学農学部)

On RNA synthesis of cultured stem segment of potato plant
during the course of its tuberization

By

Hisami SASAKI and Yozo OKAZAWA

(Department of Botany, Faculty of Agriculture,
Hokkaido University, Sapporo)

Received November 13, 1969

緒 言

ジャガイモの暗所徒長芽の茎断片を組織培養すると、その側芽に塊茎の形成がみられた⁸⁾。しかしながら、培養中期に核酸合成阻害剤である 2-thiouracil, 6-azauracil 及び chromomycin-A₃ を与えると側芽の伸長生長には殆んど影響がみられなかったが、塊茎形成を顕著に阻害した。また 2-thiouracil, あるいは 6-azauracil による阻害は同時に添加した uracil, あるいは uridine により回復された⁹⁾。これらの結果は、培養過程の中期に塊茎形成に必要な DNA dependent RNA の合成がなされることを示唆している。

本研究はこの RNA に関しさらに検討を加える目的で RNA 合成パターンの変化を蔗糖濃度勾配遠心法により分析した。

なお本研究の遂行にあたり御懇篤な御指導を賜った北海道大学農学部田川隆教授、ならびに Isotop の使用にあたり有益な助言と指導を賜った喜久田嘉郎博士に対し深甚な謝意を表する。

I. 実験材料および実験方法

培養茎断片より得た側芽 1g を glycine-¹⁴C, 20 μ C を含む磷酸緩衝液 (pH 5.6) 1.5 ml に浸漬し、25°C にて 4 時間 incubate した。そのごこれを取り出し直ちに水洗し、石炭酸 (10 mM トリス緩衝液 pH 6.7 飽和)、およびベントナイト 20 mg を加え摩砕した。これを遠心 (10,000 rpm \times 10 min.) し水層をとり、石炭酸層にはトリス緩衝

液を含む 0.5% ラウリル硫酸ナトリウムを等量加え攪拌したのち再び遠心し水層を分離した。先の水層と合せ等量の石炭酸液で除蛋白したのち、エーテルで石炭酸を除去した。この水層に酢酸カリを 0.15 M になるように添加し 2 倍容の冷 95% エタノールを加え -20°C にて数時間放置した。そのご低速遠心 (2,500 rpm \times 5 min.) にて沈澱を得、これを磷酸緩衝液 1 ml に再溶出し分析に供した。蔗糖濃度勾配遠心法は CLICK および HACKETT³⁾らの方法に準じ、25 ml の 3%、および 20% の直線的蔗糖濃度勾配で行なった。これに試料 1 ml をのせ遠心した。遠心は Spinco SW 25-1 ローターを用い、24,500 rpm \times 15hr. (8°C) で行なった。そのご 1 ml 宛に分画し、これに蒸留水 2 ml を加え O.D 260 μ で吸光を測定した。また取込まれた glycine-¹⁴C の放射活性は Aloka (Model PDC-307) gas flow counter にて測定した。

II. 実験結果および考察

培養側芽の塊茎形成に伴う各 RNA への取込み率について Table 1 に示した。また蔗糖濃度勾配法による培養各時期の RNA 合成パターンの変化は Figure 1 および 2 に示した。

培養後 8 日目より 12 日目にわたり側芽の旺盛な伸長生長がみられたが、ribosomal RNA の合成は極めて弱く、12 日目の取込み率はかなり減少した。そののち 14 日目に到り取込みは顕著に増加し、各時期を通じ最大の放射活性を示した。とくに ribosomal RNA への取込み増加は著しく、8 日目に比し、heavy ribosomal RNA

Table 1. Comparison of incorporation rates of glycine-¹⁴C into RNA of cultured potato stem segments at different stage of culture

Time in days	Specific activity cpm/O.D		
	H-rRNA	L-rRNA	sRNA*
8	1091 (100)	2362 (100)	17760 (100)
12	455 (42)	1587 (67)	11750 (66)
14	4341 (397)	7347 (311)	38123 (214)
16	1410 (129)	2872 (121)	14500 (82)
19	895 (82)	1302 (55)	8649 (42)
20	874 (80)	1695 (72)	21659 (122)

* The three fractions were obtained; sRNA = soluble RNA, L-rRNA = light ribosomal RNA and H-rRNA = heavy ribosomal RNA.

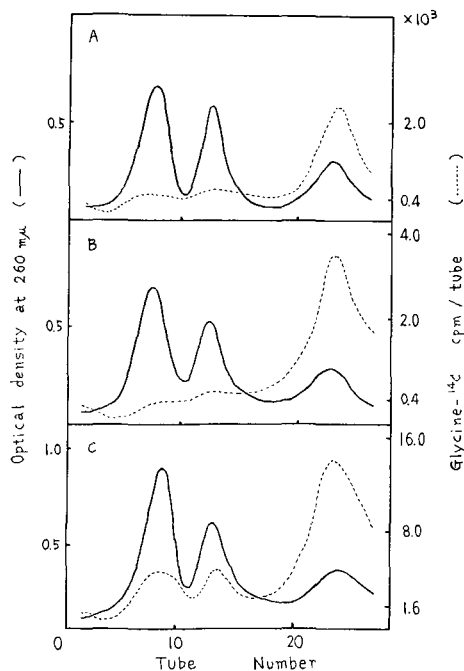
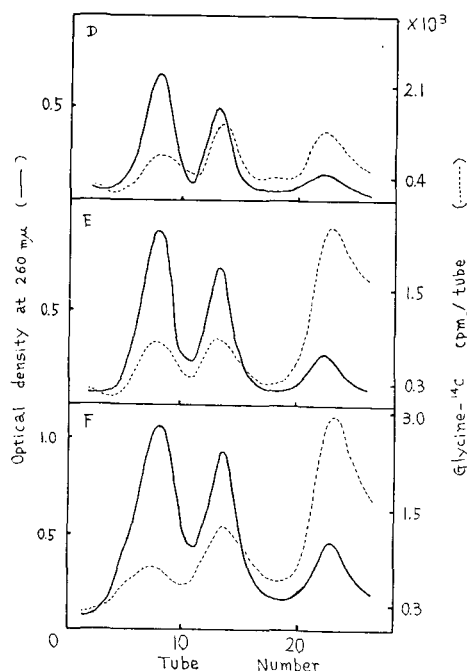
(H-rRNA) は約4倍, light ribosomal RNA (L-rRNA) は3倍の増加がみられた。しかし16日目に到り減少し, 同時に soluble RNA (sRNA) の取込みの急減もみられた。これに対し ribosomal RNA は8日目より高い合成を示した。19日目には各 RNA への取込み率はさらに減

少した。この時期は側芽の先端部の若干の肥大による塊茎化の徴候がみられ, したがって塊茎化に必要な RNA の合成はこの時期にはすでに完了したものと考えられる。そのご22日目に到り完全な塊茎の形成が認められたが, この時期には sRNA および L-rRNA の取込み率が再び増加したことは, 形成された塊茎の肥大生長に伴いさらに核酸合成がなされることを示すものと思われる。

LI 及び FOX⁶⁾らはジャガイモの植物体より 28 S, 18 S および約 5 S の ribosomal RNA を MAK カラム, Sephadex カラム, ならびに蔗糖濃度勾配法などにより分離している。しかし蔗糖濃度勾配法では 5 S の ribosomal RNA と soluble RNA を区別することは出来なかった。

本実験において全体的に sRNA 分画が著しく高い取込み率を示したことは, このような低分子の rRNA や glycyl-tRNA の混在に基づくものと思われる。

一方, 核酸合成阻害剤を用いた結果⁹⁾より, 14日目あるいは16日目の培養中期において, 塊茎形成に必要な RNA 合成があると推察されるが, 本実験結果よりこの

**Fig. 1.** Sedimentation patterns in the sucrose density gradient of RNA from the cultured stem segments on the 8th (A), 12th (B) and 14th (C) day after inoculation.**Fig. 2.** Sedimentation patterns in the sucrose density gradient of RNA from the cultured stem segments on the 16th (D), 19th (E) and 22th (F) day after inoculation.

時期には rRNA の顕著な合成のあることをみとめた。

CHROBOCZEK²⁾らは発芽種子において messenger RNA の合成を認め、LOENING⁷⁾は根端生長において、また桂⁵⁾らはジャガイモの組織培養における不定根形成に際し特異的な核酸合成がなされることを報告している。しかしながら、本実験においてはこのような特異的な RNA の合成は認められなかった。したがって培養中期に与えた核酸合成阻害剤による塊茎形成の阻害は、この時期に認められた rRNA の合成阻害に帰因するものと考えられる。

他方、DURE⁴⁾、CHEN¹⁾らは発芽種子において安定な messenger RNA の存在を報告している。

これらの結果より、この培養中期にみられた ribosomal RNA の顕著な合成は塊茎形成に重要な役割を演ずるものと思われる。

III. 摘 要

本実験はジャガイモ暗所徒長芽の茎断片を無菌培養しその塊茎形成過程に伴う RNA 合成について検討した。

1. 培養後、8, 12, 14, 19 および 22 日目の培養側芽を glycine-¹⁴C, 20 μ C を含む磷酸緩衝液で incubate し、label した RNA を phenol 法により抽出した。これを蔗糖濃度勾配遠心法で分析した。

2. 側芽の旺盛な伸長がみられる 8 日目および 12 日目における取込み率は light および heavy ribosomal RNA の両分画ともに極めて低かった。

3. 14 日目より 16 日目に到り、その取込み率は急激に増加し、14 日目では 8 日目の light ribosomal RNA の 3 倍、heavy ribosomal RNA の約 4 倍の取込み率を示した。

4. そのご、側芽の先端部が若干肥大する 19 日目に到り、各 RNA 分画の取込み率は著しく減少した。塊茎形成を完了した 22 日目には heavy ribosomal RNA のほかの RNA 合成は再びわずかな増加を示した。

5. 培養過程を通じ、塊茎化に特異的な messenger RNA の合成は認められなかった。しかしながら、核酸合成阻害剤の結果より⁹⁾、14 日目あるいは 16 日目にみられた ribosomal RNA の著しい合成は塊茎形成のために重要な役割を演ずるものと考えられる。

引用文献

1) CHEN, D., SARID, S., and E. KATCHALSKI (1968): Studies on the nature of messenger RNA in germinating wheat embryos. Proc. Nat. Acad.

Sci. U. S., **60**, 902-909.

2) CHROBOCZEK, H., and J. H. CHERRY (1965): Production of messenger RNA during seed germination. Biochem. Biophys. Res. Comm. **20**, 774-779.

3) CLICK, R. E., and D. P. HACKETT (1966): The isolation of ribonucleic acid from plant, bacterial or animal Cells. Biochim. Biophys. Acta, **129**, 74-84.

4) DURE, L., and L. WATERS (1965): Long-lived messenger RNA; Evidence from cotton seed germination. Science, **147**, 410-412.

5) 桂 直樹・岡沢養三・田川 隆 (1969): ジャガイモ組織培養の RNA 合成について. 日本植物生理学会講演要旨, 56-57.

6) LI, P. H., and R. H. FOX (1969): Characterization of potato ribosomal RNA Biochim. Biophys. Acta, **182**, 255-258.

7) LOENING, U. E. (1965): Synthesis of messenger ribonucleic acid in excised pea-seedling root segments. Biochem. Jour. **97**, 125-133.

8) OKAZAWA, Y. (1967): Physiological studies on the tuberization of potato plants. Jour. Fac. Agr., Hokkaido Univ. Sapporo, **55**, 267-336.

9) 岡沢養三・佐々木久見 (1969): ジャガイモの塊茎形成に及ぼす核酸・蛋白質合成阻害剤の影響, 日作紀, **38**, 419-424.

Summary

In order to know the changes with time in the incorporation of glycine-¹⁴C into RNAs of the cultured stem segment of potato, the present investigation was designed by means of the sucrose density gradient centrifugation.

When the stem segments derived from the etiolated potato shoots were routinely cultured on the nutrient medium, the lateral shoots emerged from the stem segments have been grown vigorously within 12 days after inoculation. On the 19th day of culture, the apical tips of the shoots started to swell in advance of initiation of tuberization.

Thus the tuberization eventually completed on the 22th day of culture. With regard to RNA synthesis of the growing stem segment, the incorporation rate of glycine-¹⁴C into both the heavy and light ribosomal RNA was kept at relatively low level as compared to that into sRNA. Afterward further decline of the incorporation of active carbone into each fraction of RNAs occurred more or less con-

sistently on the 12th day of culture. The activities of RNA synthesis in all fractions in the segments were found to have three to four folds increased temporarily on the 14th days, prior to starting tuberization.

Subsequently, their activities progressively succeeded to decline but was still in active as course of tuberization advanced. Once the tuberization had

been completed until 22 days after inoculation, the activities of RNA synthesis rised again except that of the heavy rRNA.

It is quite possible that the initiation of tuberization in potato stem segments may be mediated through the synthesis of some rRNAs prior to starting tuberization, while it failed to detect some specific mRNA required for tuberization.