

(花粉学実験講座)

7 酵素核酸実験法

(1) 酵素学実験

どのような生物試料由来であろうと、取り出した酵素を扱うのに試料に依拠する特殊な方法はない。酵素の活性測定法や精製法については専門書を参考にしていただくことにして、ここでは花粉の採集、花粉の破壊法および花粉の特性に関わると考えられるいくつかの酵素研究のテーマを取り上げる。

(a) 花粉の採集

研究の目的によって花粉の必要性が決まるが、発芽実験を伴う場合は、採集した花粉の保存が可能かどうか重要なポイントとなる。アイソザイムを電気泳動によって調べる程度なら、100mg程度あればその抽出液で充分に実験できるし、1gの花粉には大抵の加水分解酵素は試験管中で数千回の活性測定が可能に量含まれている。

酵素を精製し、性質を調べるような研究では多量の花粉が必要であるが、その場合扱える植物種が限定されてくる。マツ、スギおよびソテツのような裸子植物の花粉は集めやすい。裂開寸前のマツの雄花をホーローバット上に集めて、2、3日、日陰におくと花粉囊から花粉がほぼ完全に飛散してくる。それを100メッシュのふるいで処理し、通過した花粉を冷凍(-20°C)すれば、少なくとも1年は正常な発芽や花粉管伸長の能力を維持できる。

スギ花粉採集法については井手等によって本誌で報告されている⁽¹⁾が、同じ手法で温室中に栽培しているトウモロコシから花粉を集めることができる。ガマ花粉も多量に集めることが可能であり、また保存も容易である。花粉が飛散しかけた雄花を底の深いホーロー容器の壁に軽く叩きつけることによって、条件がよければ1本の雄花から1g以上の花粉を集めることができる。

どのような植物であろうと花粉が多量に集まるかどうかは、花の数、人手および時間の関数によって決まる。

(b) 花粉の破壊

花粉の外壁紋様は「花粉分析」で示されるように、植物の種類によって多様性を示すが、外壁の強さもまた様々である。3細胞(核)性であるイネ科の花粉は、外壁が弱く水にけんたくさせるだけで壊れてくる。著者らは壊しにくい花粉の破壊には専らテフロン-ガラスホモジナイザーを使用している(図1)。テフロン棒を市販の適当なモーターに真空ゴム管を介して接続するかまたは専用のモーターに接続し、2,000回転/分程度で氷冷下回転させる(両モーターとも井内盛栄堂から人手可能)。この場合使用頻度が高いときには、専用のものよりはトルクの大きいモーターを使用する方が長持ちする。花粉は5~10%濃度(w/v)とし、50mlサイズのガラス容器(テフロンとの擦り合わせはきつい程度がよい)に10mlの花粉けんたく液を加える。トウモロコシの花粉はこの条件で1分も処理すれば充分に破壊される。マツ、ガマ、ソテツ、スギなどの花粉は充分に破壊するのに10分間は処理が必要である。

著者らは300ml程度(一人で処理すると6時間を要する)まではこの方法によるが、それ以上ではガラスビーズの摩擦を利用したダイノミル(DYNO-MILL Willy A. Bachofen AG Maschinenfabrik 社製)

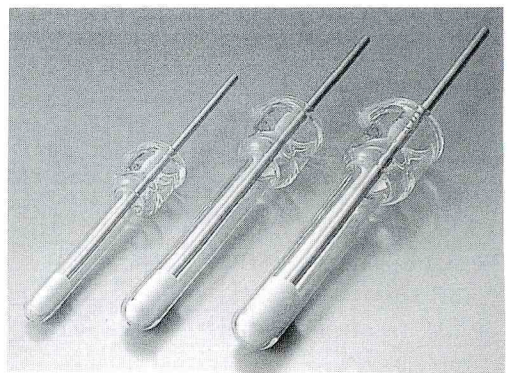


図1 テフロン-ガラスホモジナイザー。50ml容量ガラス容器には10ml程度の花粉けんたく液を入れるのが適量である。

を使用している。この機器は高価であること、破壊力が大きい¹ため酵素が失活したり、ビーズの洗浄が必要なために容量が増える欠点はあるが、時間が大幅に節約できる。同じく高価ではあるが、フレンチプレスは試料の処理に特別な工夫を必要としない点では楽である。

(c) 表在性酵素の検出と溶出

花粉の細胞表層に存在する酵素を表在性酵素として定義する。表在性の酵素およびタンパク質は、花粉自体に由来して内壁 (intine) に存在するものと、タペータム組織に由来して外壁 (exine) に存在するものがある。intine に酵素が存在することを組織化学的手法を用いて証明したのは Knox と Heslop-Harrison らのグループである。彼らは50種類の被子植物と裸子植物1種について、エステラーゼ、アミラーゼ、ホスファターゼおよびリボヌクレアーゼなどの酵素が intine 部に存在することを報告している^(2,3)。酵素の組織化学的検出法については、前記文献および成書⁽⁴⁾を参考にさせていただくことにして、ここでは表在性酵

素の溶媒による溶出について述べる。この実験では、溶媒にけんだくしても壊れない花粉を選ばなければならないので、細胞壁の弱いイネ科の花粉は材料として適さない。

ソテツの10%花粉けんだく液を30分間かくはん後、遠心分離し上清と沈殿について、活性を測定した。結果を表1に示した、上清の活性は溶出した表在性酵素活性を示し、沈殿に検出される活性は残存表在性活性とみなせる。この実験を行う場合に、細胞内酵素が流出していないことを証明する必要があるが、細胞内マーカー酵素として Mg^{2+} -依存性アルカリピロホスファターゼを選んでいる。この酵素は花粉において活性が強く、また最適 pH が9.0付近にあり、Mg の絶対的的要求性があるので、非特異的ホスファターゼの影響をほとんど受けない。

表1から、プロテアーゼ、リボヌクレアーゼ、ホスファターゼが0.5 M NaCl (pH 5.0) および pH 8.0 緩衝液によって溶出されたが、pH 5.0 緩衝液、pH 5.0 の0.1 MEDTA および0.5 M シュクロースによっては溶出されなかった。この結果は表在性酵素の細胞表層

表1 ソテツ花粉表在性酵素の溶媒による溶出

溶 媒	酵素活性 (単位/10ml)									
	プロテアーゼ		アルカリ ピロホスファターゼ		リボヌクレアーゼ		ホスファターゼ		インペルターゼ	
	上清	沈殿	上清	沈殿	上清	沈殿	上清	沈殿	上清	沈殿
50 mM acetate (pH 5.0)	31	403	0.03	0.20	0.75	4.10	0.07	0.78	0.1	16.9
0.1 M EDTA in 50 mM acetate (pH 5.0)	17	416	0.02	0.22	0.50	3.85	0.07	0.78	0.1	16.6
0.5 M sucrose in 50 mM acetate (pH 5.0)	22	426	0.01	0.29	0.55	4.05	0.07	0.82	0	14.8
0.5 M NaCl in 50 mM acetate (pH 5.0)	1128	190	0.11	0.13	5.30	2.55	0.74	0.47	0.2	17.9
50 mM Tris-HCl (pH 8.0)	1102	148	0.06	0.15	6.45	2.05	0.29	0.73	0.3	17.1
全細胞活性	1762		58.13		9.75		4.50		107.5	

* 上清の数値は0.5 g の花粉の細胞表層より溶出された活性を示し、沈殿の数値は細胞表層に残存した活性を示す。また全細胞活性は0.5 g 花粉ホモジネートによる活性を示す。

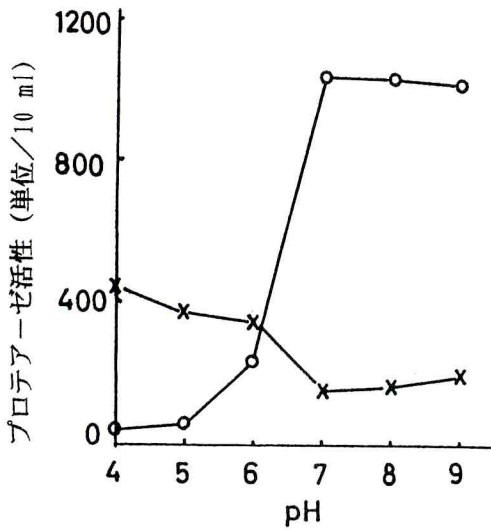


図2 ソテツ花粉プロテアーゼの細胞表層からの溶出のpH依存性。10%花粉けんだく液5 mlに5 mlの緩衝液(pH 4-6, 100 mM acetate, pH 7-9, 100 mM Tris-HCl)を加え, 30分間かくはん後遠心分離を行った。上清の活性(○—○)は細胞表層より溶出された活性を示し, 沈殿の活性(×—×)は細胞表層に残存した活性を示す。

への結合がイオン結合的であることを予想させたが, 図2に示すように, 酵素の溶出はpH依存性であり, また再吸着実験もpH依存性を示した⁽⁶⁾。

全ての表在性酵素が0.5 M NaCl および pH 8.0 緩衝液によって溶出されるのではなく, 表1のインベルターゼは表在性であるにも拘らず, 無傷の花粉から直接は溶出されなかった。インベルターゼの溶出は細胞を破壊して得られた細胞壁断片を0.5 M NaCl に浸漬することにより初めて可能となる。このインベルターゼはペクチン質と強固に結合した状態で安定に保持されていることがわかった⁽⁶⁾。

これまで報告された表在性酵素の種類は限定されているので, さらに研究を進めてもよいテーマであると思うが, 表在性のタンパク質については2つの今日の課題と関わり再吟味してみる価値があるかも知れない。その1つは自家不和合性に関するものである。配偶体型の不和合性では intine に存在するタンパク質が認識物質として作用し, 胞子体型の不和合性では exine に存在する物質が関与するという⁽⁷⁾。最近, 配偶体型自家不和合性を示すタバコの花柱からS糖タン

パク質が精製され, それがりボヌクレアーゼであることが明らかにされ, 少なくともナス科では配偶体型不和合性に関わるタンパク質がりボヌクレアーゼであると結論されている⁽⁸⁾。胞子体型不和合性の場合, タペータム細胞から花粉にS遺伝子の産物(タンパク質)が移送され, それがり柱頭の認識に関与しているとされている^(9,10)。その物質が何であるかは同定されていないが, 胞子体型のSタンパク質と同様酵素であってもおかしくはないだろう。2つ目は花粉症の原因物質としてのアレルゲンタンパク質に関するものである。スギ花粉のアレルゲンとして *Cry J I* が知られているが, 最近その起源および存在部位について新たな報告^(11,12)があった。アレルゲンが花粉の外壁に存在し, タペータム由来であることを示唆するものであったが, intine にもアレルゲンが認められるので, *Cry J I* は酵素であるという別の情報も加味して結論が出るのはまだ先のことになるだろう。

(d) 花粉と糖代謝

花粉を材料にして考えられる酵素学的研究の中で, 糖代謝はもっとも取り組みやすい課題である。一般に, 植物における糖の貯蔵形態はデンプンかシュクロースであるが, 両者は相互転換によって植物体を移動する。花粉は貧欲な細胞であり, 両者を同時に含有する花粉も少なくない。図3にデンプン-シュクロース転換経路とイノシトール酸化経路を示した。

デンプン-シュクロース転換経路に関わる酵素をクロマトグラフィで確認するには, 3 g 程度の花粉で充分である。花粉を通常 pH 7.5 (Tris-HCl または Tris-acetate を使用) 緩衝液にけんだくさせ氷冷下ホモジナイズし, 遠心分離によって上清を得る。これを同緩衝液によって透析し, DEAE-基をもつ陰イオン交換カラム (1.5×20cm) にアプライすると, ほとんどの酵素は吸着する。酵素は常法にしたがって食塩の濃度勾配で溶出し, フラクションについて活性を測定する。(pH 5.0程度酸性下での抽出や陽イオン交換クロマトグラフィではかなりの酵素が失活するために, 様々な酵素の溶出プロフィールを調べるには適さない。) 著者らはガマ花粉を材料にして, デンプンからシュクロース合成への経路に関わる全ての酵素について調べた。その結果, ホスホリラーゼ, UDP-グルコースピロホスホリラーゼ, シュクロース合成酵素の存在が確認されたが, シュクロースリン酸合成酵素も検出された。この経路でシュクロース合成方向へ反応が進行するには, ピロリン酸が除去されなけれ

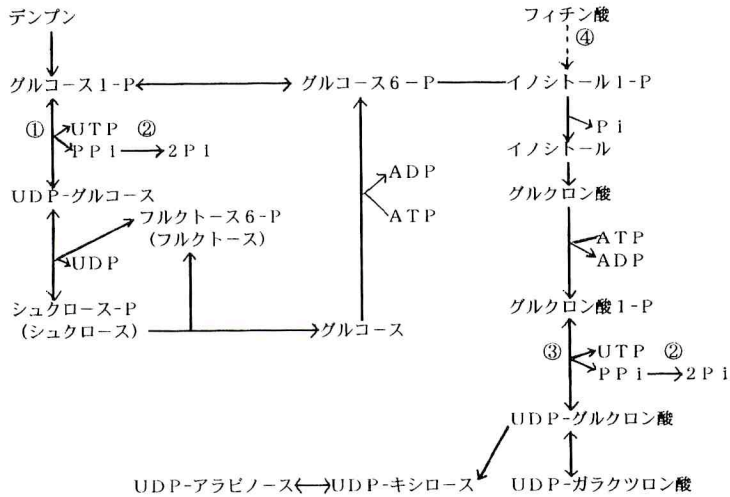


図3 デンブun-シュクロース転換経路とイノシトール酸化経路。①UDP-グルコースピロホスホリラーゼ、② Mg^{2+} -依存性アルカリピロホスファターゼ、③UDP-グルクロン酸ピロホスホリラーゼ、④フィターゼ。

ばならないが、花粉には強力な Mg^{2+} -依存性ピロホスファターゼが存在している^(13,14)。ピロホスファターゼはソテツ花粉の表在性花粉を証明するときに、細胞内マーカー酵素として利用したが、著者らはこの酵素の花粉における生理的役割の1つはデンブunからシュクロース合成方向へ反応を進行させることであると考えている。また花粉には PPi -依存性ホスホフルクトキナーゼも存在している^(15,16)が、強力なピロホスファターゼの存在を考えると、この酵素はフルクトース 1,6-ジリン酸と Pi とからフルクトース 6-リン酸とピロリン酸を合成する役割を担っているかも知れない。イノシトール酸化経路に含まれる、UDP-グルクロン酸ピロホスホリラーゼも報告の少ない酵素であるが、著者らはガマ花粉の酵素について報告した⁽¹⁷⁾。

花粉は均一性、生物活性および同調性に優れた材料であり、吸水-発芽-花粉管伸長の一連の過程でドラチックな代謝変動が観察される。この材料としての特殊性を生かして、様々な角度から酵素研究を行えば新たな知見が得られることが期待される。

(e) 花粉に特異的な酵素の存在

配偶体としての極めて限定された目的性をもつ花粉細胞は、胞子体細胞に比べて花粉あるいはタンパク質レベルで差異が見られるだろうか。

この問いに対して、アイソザイムを利用して調べた

報告がある。barley では調べられたアイソザイムの60%が両細胞種に共通に存在し、配偶体(花粉)特異的なアイソザイムは10%であった⁽¹⁸⁾のに対して、maize では72%が共通であり6%が花粉特異的である⁽¹⁹⁾。

Bryce らは、mutant を用いて花粉と胚乳のシュクロース合成酵素、ホスホリラーゼ、インペルターゼ、ADP-グルコースピロホスホリラーゼ等の糖代謝酵素の活性比較を行った。その結果、花粉と胚乳とではADP-グルコースピロホスホリラーゼは両者間で異なる遺伝子によってコードされていることを推定している⁽²⁰⁾。 β -グルコシダーゼについても同様の報告がある⁽²¹⁾。花粉の mRNA から調製されたライブラリーより花粉特異的な cDNA の塩基配列が決定されている⁽²²⁾。また、maize から得られた Zmc 58 はペクチン酸リアラーゼの cDNA の塩基配列とのホモロジーが指摘されている⁽²²⁾。花粉に特異的な酵素が普遍的に存在するかどうかまたその種類については今後の研究に待たねばならない。

(f) 発芽後に翻訳される酵素

花粉は多量の mRNA と多数の酵素を発芽前に蓄積しており、発芽後にタンパク質が新たに合成される例は少ないとされている。その僅かな例の1つとして、フィターゼ (phytase) がある。ユリ花粉には3種類

のフィターゼが存在しており、それぞれ pH 5.0, pH 6.5⁽²³⁾ および pH 8.0⁽²⁴⁾ に最適 pH をもつ。このうち、最適 pH 6.5 の酵素が発芽後に合成される⁽²³⁾。

ガマ花粉のフィチン酸代謝を調べた結果、イノシトール-三リン酸を分解するホスファターゼがやはり発芽後に生産された。酵素の生産はシクロヘキシミドによって阻害されるので、やはり成熟花粉にすでに準備されていた mRNA を介して合成されるのであろう。マツ花粉の培養前後の抽出液について陰イオン交換クロマトグラフィにより分画し、得られたフラクションについて12種類の基質に対する特異性を比較した結果、培養前後で特異性パターンが大きく異なることがわかった⁽²⁵⁾。これらの結果から、発芽後に新たに合成される酵素はもっと多く存在するように思われる。

発芽後に合成される酵素ではないが、著者らはこれまで報告されていたフィターゼとは異なる酵素をガマ花粉中に発見した⁽²⁶⁾。この酵素はフィチン酸に作用してイノシトール-1, 2, 3-三リン酸を生ずるものであるが、その後この酵素が特殊な存在ではないことはユリ花粉においても同じ性質をもった酵素があることから証明された。前述の最適 pH 8.0 のフィターゼがそれである⁽²⁴⁾。このように、花粉の酵素についての研究は未知の酵素の発見にもつながる可能性がある。

本項は現在著者らが興味をもっている限られた課題について独断的に記載したものである。花粉の生化学的研究としては、アカマツ花粉について斗ヶ沢・勝又ら(岩手大学)による多数の論文があり、また花粉管伸長における細胞壁合成なども重要な課題であるが、紙面の都合で割愛したことをお断りする。

引用文献

- (1) 井手 武, 松村有嘉子, 岡崎 旦, 芦田恒雄, 藤幸男, 吉川恒男: 風媒花樹木の成熟花粉採集法. 花粉誌 35, 39-42 (1989).
- (2) Knox, R. B. and J. Heslop-Harrison: Cytochemical localization of enzymes in the wall of the pollen grain. *Nature* 223, 92-94 (1969).
- (3) Knox, R. B. and J. Heslop-Harrison: Pollen-wall proteins: localization and enzymic activity. *J. Cell Sci.* 6, 1-27 (1970).
- (4) 竹内忠男, 小川和朗: 新酵素組織化学 朝倉書店 pp 1-587 (1985).
- (5) Hara, A., K. Matsugano and A. Kobayashi: Protease associated with the cell surface of cycad pollens. 花粉誌 15, 41-44 (1975).
- (6) Hara, A., A. Sakamoto and A. Kobayashi: Stabilization of invertase at the cell wall-site of cycad pollens by complex-formation with pectic substances. *Agric. Biol. Chem.* 38, 2287-2289 (1974).
- (7) Heslop-Harrison, J., Y. Heslop-Harrison and R. B. Knox: Pollen-wall proteins: 'gametophytic' and 'sporophytic' fractions in the pollen walls of the Malvaceae. *Ann. Bot.* 37, 403-412 (1973).
- (8) 崎山文夫: 配偶体型自家不和合性に関与するリボヌクレアーゼ. 化学と生物 29, 211-213 (1991).
- (9) 日向康吉, 西尾 剛: 自家不和合性の認識物質. 化学と生物 17, 691-696 (1979).
- (10) 盧 一燮, 日向康吉: アブラナ科の受粉反応. 花粉生理学実験法 花粉誌 37, 107-108 (1991).
- (11) 中村純夫, 安技 浩, 信太隆夫, 三木寿子: スギ花粉におけるアレルゲンの局在一免疫細胞化学的検討. 日本花粉学会第32会大会講演要旨 p 22 (1991).
- (12) 高橋優三, 井手 武, 芦田恒雄, 田端司郎, 荒木恒治: ヒノキ花粉におけるアレルゲンおよび共通抗原の局在. 日本花粉学会第32会大会講演要旨 p 23 (1991).
- (13) 原 彰, 船隈 透: ソテツ花粉の Mg^{2+} 依存性無機ピロホスファターゼについて. 花粉誌 21, 1-7 (1978).
- (14) Hara, A., K. Kawamoto and T. Funaguma: Inorganic pyrophosphatase from pollen of *Typha latifolia*. *Plant Cell Physiol.* 21, 1475-1482 (1980).
- (15) Funaguma, T., Y. Hibino, S. Fukumori and A. Hara: Pyrophosphate and ATP-dependent phosphofructokinases in pollen of *Typha latifolia*. *Agric. Biol. Chem.* 51, 2601-2602 (1987).
- (16) Funaguma, T., K. Fujisawa, K. Yamaguchi, Y. Tohma, K. Kawahara and A. Hara: pyrophosphate dependent phosphofructokinase from pollen of *Typha latifolia*. 名城大学農学部学術報告 28, 29-34 (1992).

- (17) Hondo, T., A. Hara and T. Funaguma: Purification and properties of UDP-glucuronate pyrophosphorylase from pollen of *Typha latifolia* Linne. *Plant Cell Physiol.* 24, 1535-1543 (1983).
- (18) Pederson, S., V. Simonsen and V. Loeschcke: Overlap of gametophytic and sporophytic gene expression in barley. *Theor. Appl. Genet.* 75, 200-206 (1987).
- (19) Gorla, M. S., C. Frova, G. Binelli and E. Ottaviano: The extent of gametophytic-sporophytic gene expression in maize. *Theor. Appl. Genet.* 72, 42-47 (1986).
- (20) Bryce, W. H. and O. E. Nelson: Starch-synthesizing enzymes in the endosperm and pollen of maize. *Plant Physiol.* 63, 312-317 (1979).
- (21) Frova, C., G. Binelli, E. Ottaviano: Isozyme and hsp gene expression during male gametophyte development in maize. In isozymes: *Current topics in Biological and Medical Research*. Vol. 15, Genetics, Development and Evolution. pp 97-120. New York: Liss (1987).
- (22) Mascarenhas, J. P.: Gene activity during pollen development. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 41, 317-338 (1990).
- (23) Lin, J.-J., D. B. Dickinson and T.-H. D. Ho: Phytic acid metabolism in lily (*Lilium longiflorum* Thunb.). *Plant Physiol.* 83, 408-413 (1987).
- (24) Baldi, B. G., J. J. Scott, J. D. Everard and F. A. Loewus: Localization of constitutive phytases in lily pollen and properties of the pH 8 form. *Plant Science* 56, 137-147 (1988).
- (25) 原 彰, 伊藤 聖, 柳 宏美, 船隈 透: マツ花粉ホスファターゼ群の基質特異性—培養前後における特異性変動とATPに高い活性を有するホスファターゼ. 名城大学農学部学術報告 28, 19-27 (1992).
- (26) Hara, A., S. Ebina, A. Kondo and T. Funaguma: A new type of phytase from pollen of *Typha latifolia* L. *Agric. Biol. Chem.* 49, 3539-3544 (1985).

(原 彰, 船隈 透)

著者紹介

◇ 原 彰

昭和17年7月, 満州生まれ, 九州大学農学部農芸化学科卒業, 鹿児島大学助手, 名城大学助教授を経て平成2年より同大学農学部教授(生物化学研究室). 農学博士.

◇ 船隈 透

昭和23年1月, 鹿児島県生まれ, 九州大学大学院農学研究科博士課程単位取得退学. 名城大学農学部助手, 講師を経て平成元年より助教授(生物化学研究室). 農学博士.

(2) 核酸・遺伝子実験法

(a) はじめに

花粉発育における遺伝子発現を研究するために花粉または葯から mRNA を単離してその cDNA の解析が行われている (総説^(1,2))。たとえば、異種器官での転写産物の差異を利用したディフェレンシャルスクリーニング法により花粉や未成熟の葯に特異的な cDNA がいくつか報告されている。また、花粉の cDNA ライブラリーから花粉アレルゲンに対する抗体を用いて、花粉アレルゲンをコードする cDNA も単離されている。成熟花粉から単離された遺伝子の機能を推定すると、花粉管の発芽伸長に関与すると思われるものが多い。未成熟葯から単離された遺伝子は、機能はわからないがタペート細胞に局在するものが多く報告されている。

このような花粉における遺伝子発現を研究する際、微量の葯または花粉から mRNA を単離して解析できることが望ましい。この実験講座では、1.5ml チューブに集めた葯からキットを用いて簡単に mRNA を単離する方法について紹介する。なお、この方法は米国コーネル大学の大学院実験コース (Bio. Sci. 641) で Nasrallah 博士が教授している方法を基にしており、ここではイネの葯を材料として我々が行っている具体例を示す。

(b) mRNA 単離キットの概要と注意点

Invitrogen 社の Fast Track mRNA Isolation Kit ver. 2.1 (フナコシで扱っている) を用いる。植物組織には大量の RNase が含まれているので、RNase を不活性化することが重要である。そのため、組織を液体窒素で破壊し、SDS とプロテイナーゼ K (proteinase K) を含むタンパク質変性バッファーで核酸の抽出を行う。次に、抽出物からポリ (A) RNA をオリゴ (dT) セルロースに選択的に吸着させることで mRNA だけを分離する。抽出後に RNase が混入するのを防ぐために、滅菌済みのディスポーザブルプラスチックピペットやチューブを用い、さらにディスポーザブル手袋を着用して実験することが望ましい。

(c) 葯の集め方

イネの葯を材料とする。目的とする発育ステージの穎花の先端をはさみで除去し、ピンセットを用いて葯を取り出した後、すぐに液体窒素に浸した 1.5ml チューブ

の中に入れる (図 1)。チューブはプラスチックの磨砕棒が隙間なくフィットするものを選び、あらかじめジュワービンに液体窒素を満たしてチューブの下が常に液体窒素に浸るようにしておく。そして、ピンセットで葯をつまみ出したらその都度チューブに入れる。Nasrallah 博士によれば、試料をすぐに液体窒素に入れることが良質の mRNA を単離するコツだそうである。

このようにして、1本のチューブに集めた葯の体積が 0.1~0.2ml になるように葯を集める。そして、mRNA を単離するまで -80℃ で保存する。温度が上がると液体窒素が沸騰して葯がチューブの外に飛び出すので注意する。チューブが破裂するのを防ぐため、蓋に注射針で穴をあけておくが良い。

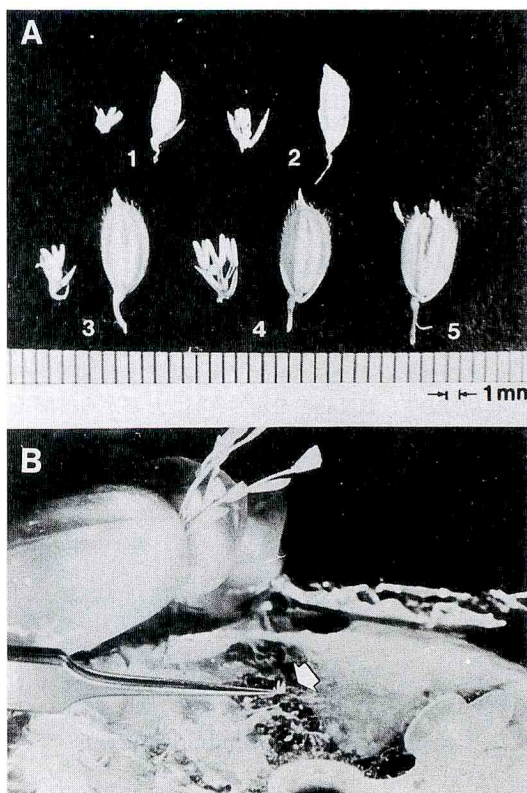


図 1 (A)異なる花粉の発育ステージにおけるイネの葯と穎花。1, 減数分裂~四分分子期; 2, 1核期; 3, 2核期; 4, 3核期; 5, 開花中。(B)イネの葯集め。先端を切り取った穎花からピンセットで葯を取り出し (矢印), 液体窒素に浸した 1.5ml チューブに入れる。

(d) mRNA の抽出

1. 薬の磨砕と核酸の抽出

1.5mlチューブ2本に集めた薬(生重量500mg以下)を扱う場合について述べる。

- (1) ストックバッファー(表1)6mlに、プロテイナーズK(表1)を120 μ l加えて細胞溶解液を準備する。このうち4mlを15mlのポリプロピレンチューブ(Corning No. 25319など)に分注しておく。以下細胞溶解液に懸濁するまでの操作はチューブ1本ごとに素早く行う。
- (2) 1.5mlチューブにフィットするディスパーザブルポリプロピレン製攪拌ペッセル(1.5ml用の pellet pestle: 家田貿易 No. 9993など)を準備する。
- (3) 薬の入ったチューブを液体窒素から取り出しポリプロピレンのチューブラックに立て、液体窒素で冷却したペッセルで薬を粉砕する。チューブをときどき液体窒素に浸し、冷やしながら完全に粉砕する。
- (4) 粉砕した薬に細胞溶解液を1ml加え、ペッセルで攪拌する。
- (5) 18~21ゲージのシリンジを用いて薬溶解液を吸い取り、予め4mlの細胞溶解液を分注しておいた15mlチューブに移す。この操作は、高分子DNAを小断片化するために行うもので、これによりクリアーなRNA抽出を行うことができる。
- (6) (3)~(5)をもう1本のtubeについても繰り返し、合計6mlの薬溶解液を得る。
- (7) 薬溶解液の入ったチューブを45 $^{\circ}$ Cで2時間穏やかに攪拌して、RNaseを変性分解させながら核酸を抽出する。

2. オリゴ(dT)セルロースの活性化

この操作は1-(7)の間に行う。

- (1) 25mgのオリゴ(dT)セルロース(表1)を15mlのポリプロピレンチューブに分取し、結合バッファー(表1)を1ml加えて混合し、室温で1時間放置する。
- (2) 3,000 rpmで3分間遠心して上清を除く。10mlのプラスチックメスピペット(Falcon No. 7551など)を用いると良い。なおオリゴ(dT)セルロースを吸い上げないように注意する。
- (3) 2.5mlの結合バッファーを加えて再懸濁した後、(2)と同様に遠心して上清を除く。
- (4) 250 μ lの結合バッファーを加えて室温で放置する。

3. mRNAの精製

- (1) 1-(7)の薬溶解液を2,000 rpmで10分間遠心し、細胞壁などの残渣を沈澱させる。
- (2) 上清を新しい15mlのポリプロピレンチューブに移し、5 MのNaCl(表1)を317 μ l加える。NaClの終濃度が0.5 Mとなる。
- (3) NaClを加えた薬溶解液を2-(4)のオリゴ(dT)セルロースに加え、室温で1時間穏やかに混合する。
- (4) mRNAはオリゴ(dT)セルロースに吸着されるので、3,000 rpmで3分間遠心して上清を除く。この時オリゴ(dT)セルロースを吸い上げないように注意する。
- (5) 沈澱に10mlの結合バッファーを加えて再懸濁した後、(4)と同様に遠心して上清を除く。
- (6) 結合バッファーを5ml加えて再懸濁し、遠心して上清を除く。この操作を上清が透明になるまで繰り返す。

表1 キットに含まれている試薬類

ストックバッファー (Stock Buffer)	0.2 M Tris-HCl, pH 7.5 0.2M NaCl 1.5 mM MgCl ₂ 2 % SDS
結合バッファー (Binding Buffer)	0.5 M NaCl
溶出バッファー (Elution Buffer)	0.01 M Tris-HCl, pH 7.5
プロテイナーズ K (RNase Protein Degradar)	0.01 M Tris-HCl, pH 7.5
オリゴ (dT) セルロース (Oligo (dT) ₂₀₋₃₀ Cellulose)	
5 M NaCl	
2 M 酢酸ナトリウム	
スピнкаラム	

返す。

- (7) 最後にオリゴ (dT) セルロースを300 μ lの結合バッファーに懸濁する。
- (8) 懸濁液をスピнкаラム (表1) に移し, 7,500 rpm で10秒間遠心する。以後スピнкаラムを遠心するときカラムとチューブがずれないように注意する。
- (9) チューブに貯った溶液を除き, カラムに300 μ lの結合バッファーを加え(8)と同様に遠心する。これを2回繰り返す。
- (10) カラムを新しいチューブに移し, 溶出バッファー (表1) を150 μ l加え(8)と同様に遠心する。
- (11) さらに150 μ lの溶出バッファーを加えて遠心し, 300 μ lの溶出液を得る。
- (12) 2 M の酢酸ナトリウム溶液 (表1) を45 μ l (0.15倍量) 加え, さらに690 μ l (2倍量) の冷99%エタノールを加える。-20°Cで一晩放置する。
- (13) 遠心機の最高速度 (15,000 rpm) で15分間遠心し, 沈澱を吸い上げないように注意しながらエタノールを除く。
- (14) フラッシングによりチューブの壁に残っているエタノールを落とし完全に取り除く。
- (15) 真空ポンプで乾燥し, 10 μ lの溶出バッファーまたは RNase フリーの水に溶解する。

(e) おわりに

以上の方法で500mgの薬から数 μ g の mRNA が単離できる。イネの異なる発育ステージ別の薬から集めた mRNA を材料とし, イネのアクチン遺伝子をプローブとして行ったノーザンハイブリダイゼーションの例を図2に示す。いずれのレーンの mRNA プロットも明瞭な1本のバンドを示し, アクチンの mRNA が無傷であることがわかる。また, アクチンの発現量は花粉が成熟するにしたがって増加する。

このように mRNA が単離できれば, その後は一般的な遺伝子工学のテキストに従って, cDNA を合成することができる。筆者らはイネの小孢子初期の薬から cDNA ライブラリーを作製し, その薬に特異的な cDNA を単離して解析している^(3,4)。

なお, ここで紹介したキットは最近バージョンアップされて若干方法が改良されたので詳しくはキットの説明書を見てほしい。

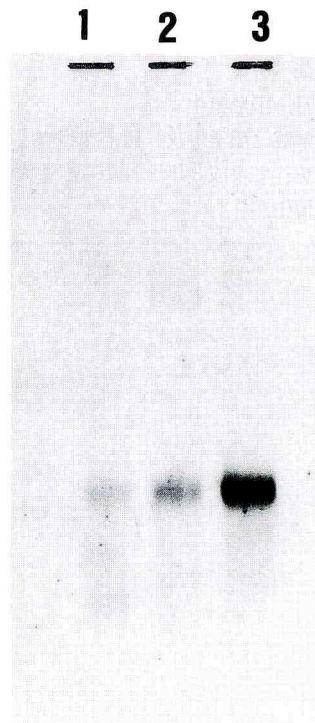


図2 ノーザンハイブリダイゼーションによる mRNA の確認。1核期(1), 2核期(2), および, 3核期(3)の花粉を含む薬から単離した mRNA を各々 1 μ g 電気泳動に供し, イネのアクチン遺伝子の cDNA をプローブとして, その mRNA を検出した。

引用文献

- (1) Scott, R., Hodge, R., Paul, W. and Draper, J.: The molecular biology of anther differentiation. *Plant Sci.* 80, 167-191 (1991).
- (2) McCormick, S.: Molecular analysis of male gametogenesis in plants. *Trends Genet.* 7, 298-303 (1991).
- (3) 鳥山欽哉, 土屋 亨, Nasrallah, J. B. and Nasrallah, M. E.: イネの薬特異的遺伝子の単離, *育種* 42 (別1), 212-213 (1992).
- (4) 土屋 亨, 鳥山欽哉, 江尻慎一郎: イネの薬特異的遺伝子の解析, *育種* 42 (別1), 214-215 (1992).

(鳥山欽哉, 土屋 亨, 天谷正行)

著者紹介

◇ 鳥山 欽哉

昭和35年5月，山形県生まれ。

東北大学大学院（農学専攻）博士課程修了。東北大学農学部助手をへて平成3年2月から岩手大学農学部助教授。農学博士。

◇土屋 亨

昭和42年10月，岩手県生まれ。

岩手大学大学院連合農学研究科（生物機能開発学）在学中。

◇天谷 正行

昭和37年9月，栃木県生まれ。

東北大学農学部（農芸化学科）卒業。栃木県農業試験場生物工学部研究員。
