

# エンドウ豆幼葉由来の mRNAによる無細胞 タンパク合成系での翻訳実験

宇高京子

(昭和58年9月30日受理)

## In vitro translation products of pea seedlings mRNA.

Kyoko UDAKA

(Received September 30, 1983)

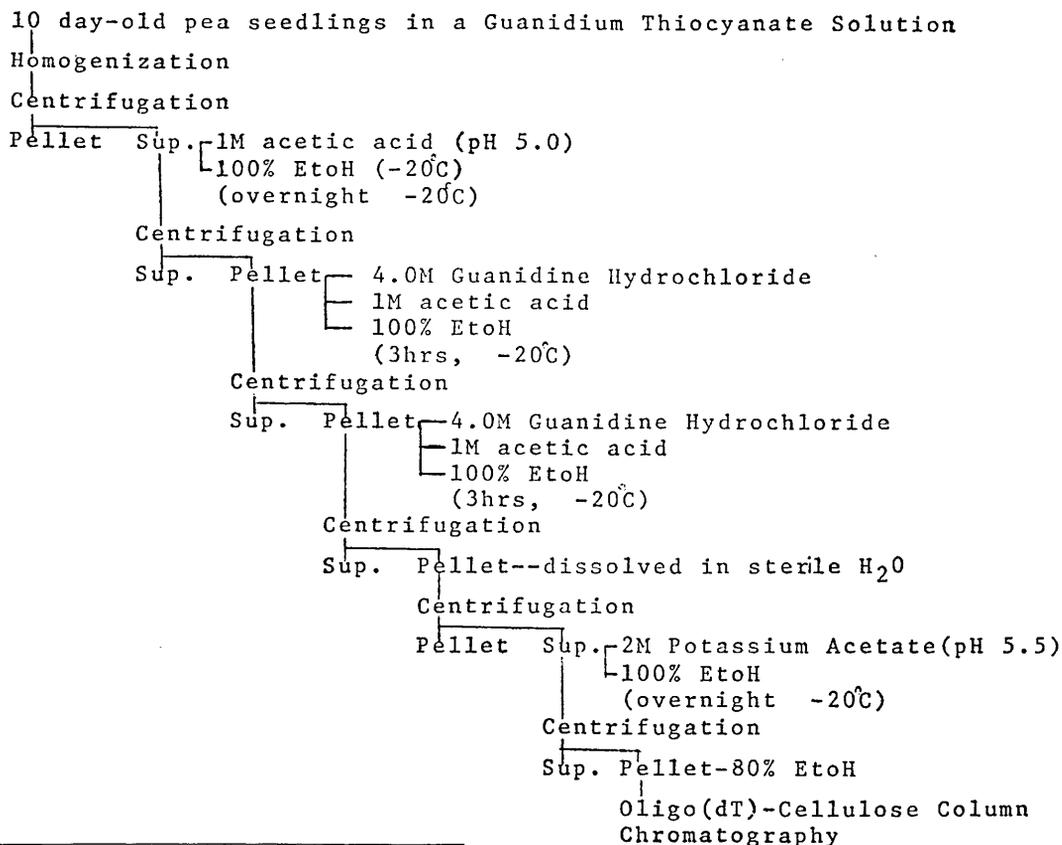
### 緒言

In Vitro で Intact Pea Chloroplast の中に Pea クロモソームで作られた mRNA の翻訳産物がどのような過程

を経て取り込まれるか知るための基礎実験として、発芽10日頃の Pea (エンドウ豆) 幼葉からの効率的な mRNA 抽出方法およびその翻訳活性について検討したので報告する。

Fig. 1

### Guanidium Thiocyanate Method (Chirgwin et al)



### 実験方法

1. 試料：ウィスコンシン州立大学植物学科グリーンハウスにおいて発芽10日目の Pea (*Pisum sativum* var Laxton's Progress No. 9)の幼葉である
2. mRNA の調製：total RNA 抽出は図1に示した如く Guanidium Thiocyanate 法<sup>1)</sup>を用いた。Poly A<sup>+</sup> RNA (mRNA) の精製は Oligo (dT)-Cellulose Column Chromatography 法<sup>2)</sup> で2回抽出をおこなった。
3. 無細胞タンパク合成系の調製と翻訳：mRNA の in Vitro での翻訳はコムギ胚芽無細胞タンパク合成系 (S-23)<sup>3)</sup> およびウサギ赤血球無細胞タンパク合成系<sup>4)</sup> を用いた。
4. SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動<sup>5)</sup>：上記3. で得た mRNA をコムギ胚芽無細胞タンパク合成系およ

びウサギ赤血球無細胞タンパク合成系で翻訳し、その翻訳産物を SDS-ポリアクリルアミドゲル (10~15%) 電気泳動で分画した。泳動条件は試料が stacking gel が出るまで 50V で、その後、電圧を 120V にあげてマーカーがゲルから抜け出るまで行なった。泳動バッファーはトリス-グリシン (pH 8.0) である。0.1% クマシー青で染色し、次いで7%酢酸で脱色した後、ただちにゲル乾燥をおこなった。

5. オートラジオグラフィー：乾燥したゲルは XAR-Kodax の X線フィルム上に固定し、-70°C の冷凍庫に10時間以上放置した後、現像する。タンパク質の明瞭なバンドとして認められるまで同条件で放置しておいた。表3は <sup>14</sup>C, <sup>3</sup>H 等を使用する場合に用いると早く感光する感光促進剤 En<sup>3</sup>hance を用いたオートラジオグラフィーの概略である。

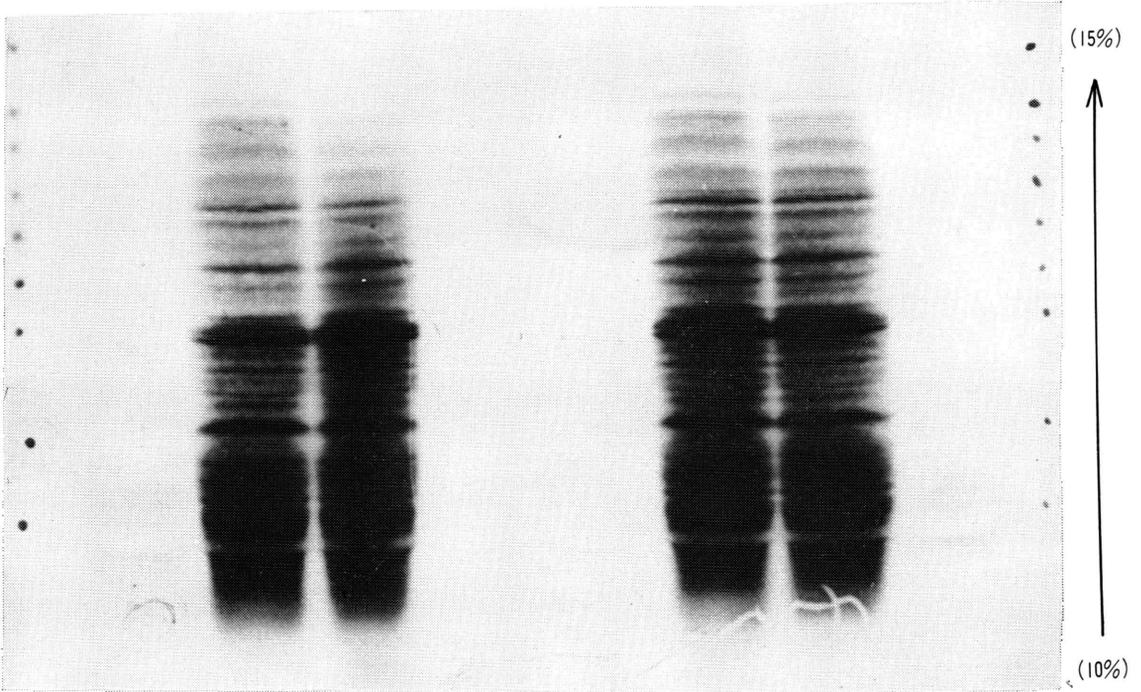


Fig. 2 In vitro translation products of pea seedling mRNA in a wheatgerm cell-free system.

Molecular weight makers [ phosphorylase b(94,000), bovine serum albumin(68,000), catalase(57,000), fumarase(49,000), aldose(40,000), malate dehydrogenase(34,000), carbonic anhydrase(29,000), soybean trypsin inhibitor(21,500), and hemoglobin(14,800) ]

実験結果および考察

図1に示したのは Chirgwin 等の GTC 法での total RNA 抽出法の概略を示したものであるが、この方法からは他の2方法 (Chua et al<sup>6)</sup> および Paul et al<sup>7)</sup> よりも高収量を得ることが出来た<sup>8)</sup> (total RNA は平均値 0.45 mg/1 g tissue). これを用いて Oligo(dT)-Cellulose

Column Chromatophy に2回通すことによってリボソーム mRNA 等が除かれ純度の高い mRNA が得られた。これを以下の実験に供した。表1および表2はコムギ胚芽無細胞タンパク合成系と赤血球無細胞タンパク合成系の組成である。この翻訳系で合成したタンパク質を示したのが図2および図3に示したオートラジオグラフィー

Table 1

Wheat Germ Lysate (S-23) Protein Synthesis--Modified

[ Translation Mix. (50 $\mu$ l) ]

S-23	30 $\mu$ l	
Premix*	5 $\mu$ l	* ATP
Salts	5 $\mu$ l--K <sup>+</sup> , Mg <sup>++</sup>	GTP
mRNA	0-10 $\mu$ g (4 $\mu$ g/4 $\mu$ l)	Phosphocreatine
H <sub>2</sub> O	to 50 $\mu$ l	CPK
<sup>3</sup> H-Leu.	10 $\mu$ ci dry up	DTT
		Amino Acid (-Leu.)

Table 2

Reticulocyte Lysate Protein Synthesis--Modified

[ Translation Mix. (50 $\mu$ l) ]

<sup>3</sup> Lysate*	33 $\mu$ l	<u>*250<math>\mu</math>l Lysate</u>
<sup>3</sup> H-Leu.	7 $\mu$ l	Hemin
mRNA	0-10 $\mu$ l (4 $\mu$ g/4 $\mu$ l)	CPK
H <sub>2</sub> O	to 50 $\mu$ l	Glucose
		DTT
		Amino acid
		CaCl <sub>2</sub>
		<u>Micrococcal nuclease</u>
		incubate 20C, 10min,

Table 3

To do Autoradiography with Enhance	EGTA
1) gel into solution of fixer for 1 hour.	Energy
fixer is 10% TCA, 10% acetic acid, 30% methanol.	tRNA
2) Stain gel in 0.1% comaisse blue.	
3) Destain several change at R.T. (overnight)	
4) Add 50ml Enhance for 1 hour.	
5) Add 200-300ml cold water for 1 hour.	
6) Dry gel (2 hours).	
7) Autoradiograph against XAR-kodak at -70C.	

である。これから明らかなようにコムギ胚芽無細胞タンパク合成系が液体シンチレーションカウンターでも高い

カウントを示し、かつ、*in vitro* におけるタンパク質翻訳産物の強い明瞭なバンドを認めることが出来た。

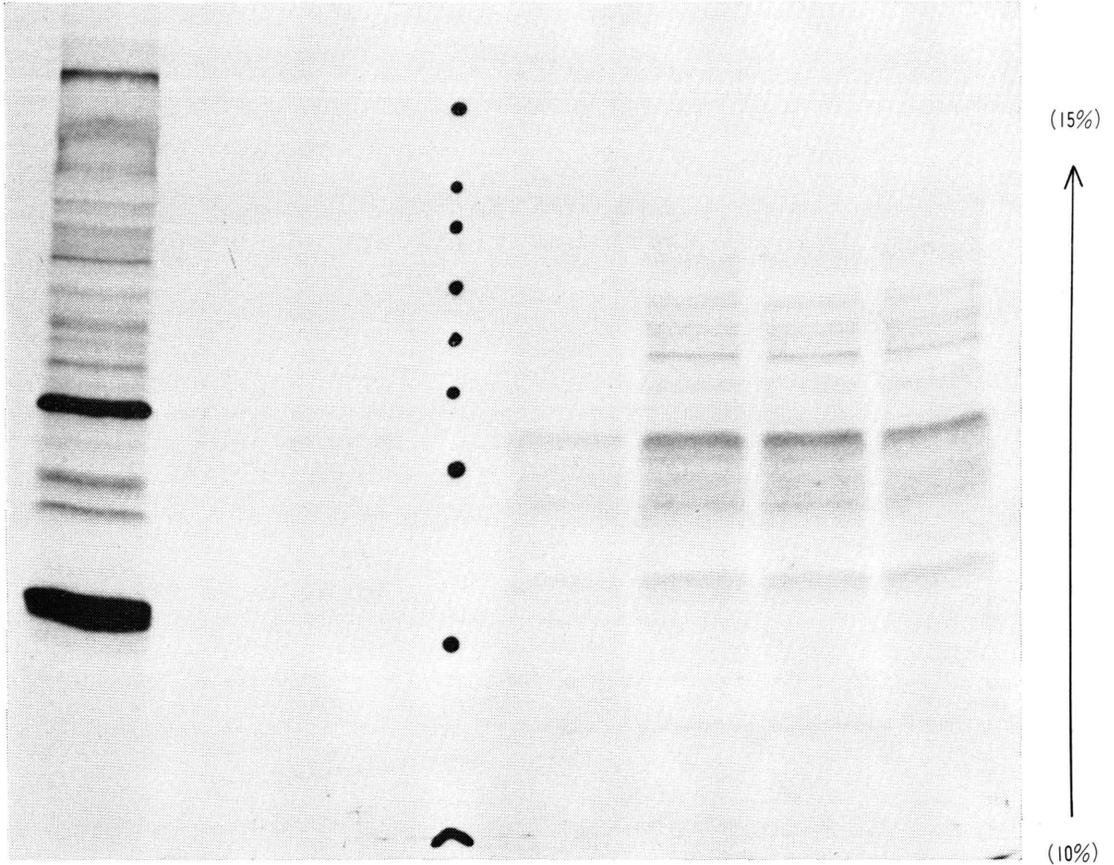


Fig. 3 In vitro translation products of pea seedling mRNA in a reticulocyte lysate cell-free system.

Left was Bromo Mosaic Virus RNA for the standard marker.

要 約

1. 発芽10日目の Pea 幼葉からの効率的な total RNA 抽出は Chirgwin 等の Guanidium Thiocyanate 法 (GTC 法) が平均値 0.45 mg/g tissue と高い収量を得た。
2. *in vitro* における翻訳活性はコムギ胚芽無細胞タンパク合成系の方がウサギ赤血球無細胞タンパク合成系よりも高い活性を示した。

謝 辞

この研究は米国ウイスクンシン州立大学植物学科植物生理学研究室でおこなった実験の一部である。有効な示唆を賜った Dr. K. Keegstra および Dr. E. Newcomb に感謝の意を表します。

文 献

1) John M. Chirgwin, Alan E. Przybyla ; *Biochem-*

*istry*, **18**, 5294—5299 (1979)

- 2) John A. Bantle, Ian H. Maxwell and Willam E. Haln ; *Anal. Biochem.*, **72**, 413—427 (1976)
- 3) Arthur Grossman, Sue Bartlett and Nam-Hi Chua ; *Nature* **285**, 625—628 (1980)
- 4) Pelham, H. R. B., and R. J. Jackson ; *Eur. J. Biochem.*, **67**, 247—256 (1976)
- 5) Laemmli, U. K. ; *Nature (London)* **227**, 680—685 (1970)
- 6) Nam-Hi Chua G. W. Schmidt ; *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* **75**, 6110—6114 (1978)
- 7) Paul, M. Lizardi and Alan Engelberg ; *Analytical Biochem.*, **98**, 116—122 (1979)
- 8) in press.