

論文の内容の要旨

応用生命化学専攻
平成 12 年度博士課程入学
氏 名 朴 昇玟
指導教官名 山口 五十磨

論文題目

アズキ黄化胚軸のジベレリン結合タンパク質に関する研究

植物ホルモンの一つであるジベレリン (GA) は、茎部の伸長促進や発芽促進・性の分化など、植物の様々な生理現象に関わっている。GA のシグナル伝達機構に関しては、ここ数年で急速に新しい知見が蓄積され、受容体以外の主要な伝達因子が多く植物種で明らかにされてきている。一方、エチレンやサイトカイニン、ブラシノステロイドなど他の植物ホルモンでは受容体遺伝子が単離され、それに関する報告が続く状況下、GA の受容体の特定に結びつく情報は全く報告されていない。所属する研究室では黄化アズキ (*Vigna angularis*) 地上部より活性型 GA に高い親和性を示す可溶性タンパク質 (GBP) が検出され、GA 結合活性に関して詳細な性状解析を行った結果、(i) アズキ上胚軸切片に対する伸長促進効果の高い GA には高い親和性を示すこと、(ii) 特に活性型 GA である GA₄ に対して高い親和性 (解離定数 $\sim 10^{-10}$ M) を示すこと、また、(iii) アズキ上胚軸切片に対する GA の伸長促進効果は 10^{-10} M 付近から有意に確認することが可能であり、その生理的濃度と解離定数が合致すること、さらに、(iv) 結合に関する可逆性や飽和性なども認められたことから、受容体として機能するための必要条件は備えているとの判断に立って単離に向けた検討が継続されてきた。

この研究の過程で、GA 結合活性の検出効率や精製効率の向上が図られてきたが、本活性が 2-オキソグルタル酸 (2-OG) の共存下で増幅されることや金属イオンの影響を受けて変動することが確認された。特に、2 価の金属イオンが

GBP の GA 結合活性に大きな影響を与える点では、活性型 GA を不活化する代謝変換酵素で 2-OG 要求性ジオキシゲナーゼに分類される GA 2-oxidase (GA2ox) との類似性が認められた。

そこで、本研究においては精製手法の改良を検討し、GBP の単離にむけた更なる精製を進めると共に、アズキ GBP 活性画分中に GA2ox が含まれる可能性、さらには、アズキ GBP と GA2ox との異同について検討を加えることを目的とした。

1. アズキ GBP の部分精製と活性画分中のペプチドの部分アミノ酸配列解析

結合活性測定に用いる ^3H -16,17-dihydroGA₄ の比放射活性と結合量に基づいて GBP 含有量を推定した。これにより、活性本体の N 末端アミノ酸配列分析には約 130kg の抽出材料 (黄化芽生え) に由来する活性画分が必要と考えられた。そこで、その 1/10~1/20 量を用いて回収率や諸性質を検討すると共に、並行して活性画分の集積を行った。

上述の量的な検討結果から、精製段階の数をさらに減ずる必要があること、即ち各段階あたりの精製効率を可能な限り高めることが要求されると判断し、GBP に関する精製法の改良を行った。こうして新たに構築された精製法を用いて精製を行った結果、GBP はそれぞれの画分中に主に存在するタンパク質の保持時間に重なって溶出されることが判明し、活性成分がこの精製段階では単一成分ではなく、幾つかの分子種が混在するのではないかと考えられた。GBP の多様なバリエーションに対する説明としては、GA 結合能を持つタンパク質自体にバリエーションがある可能性、単一の GA 結合タンパク質に対し強い相互作用を持つ他の分子が存在し、その分子にバリエーションがある可能性などが考えられた。いずれにしても画分中に認められるバンドのいずれかが GBP 本体あるいは、それと相互作用するタンパク質に該当すると考え、最終精製画分中に認められるバンドの網羅的な N 末端アミノ酸配列分析を行った。その結果、Germin-like protein や putative lipase に相同性のあるタンパク質などの部分配列情報が得られた。

一方、少しでも活性の検出感度が増大すれば、精製を有利に進められると考え、GBP の GA 結合活性に与える各種添加剤の影響について検討を行った。Co²⁺イオンや 2-OG の添加により GA 結合活性強度が大きく影響を受けることから、GA2ox の酵素活性が 2-OG や 2 価金属イオンの影響を強く受けるという事実とよく似た点が多いことが判明した。

2. VaGA2ox 遺伝子の単離と活性型リコンビナントタンパク質の調製

常法に従い、既知情報をもとに縮重プライマーを合成し、アズキ胚軸由来

の cDNA を用いて PCR 反応を行い増幅断片を得た。5'-及び 3'-RACE を行い、最終的に 5 種の GA2ox 相同遺伝子 (*VaGA2oxA1*、*A2*、*B1*、*B2*、*B3*) の全長配列情報を得た。相同検索の結果、いずれも他の植物で報告されている GA2ox 遺伝子と高い相同性を有していた。ノーザン解析を行ったところ、黄化アズキ地上部では 5 種のうち *VaGA2oxA1*、*A2* が主に発現していることが判明した。

続いて、各々のクローンについて大腸菌発現系を用いて可溶性のリコンビナントタンパク質を調製し、³H-16,17-dihydroGA₄ を基質として酵素活性の有無を調べたところ、いずれのクローンについても明瞭な酵素活性が確認された。そこで、反応条件を酵素活性検定条件から GBP の GA 結合活性検定条件に変えて GA 結合活性を測定したところ、いずれのクローンのリコンビナントタンパク質も ³H-16,17-dihydroGA₄ との特異的結合活性を有することが示された。なお、クローン間で検出される GA 結合活性には明瞭な差が認められた。しかし、GBP 検出系において GA2ox は GBP としての性状を示すと考えてもさしつかえない結果であった。

これにより、アズキ胚軸中に含まれる GBP 活性本体として、これら VaGA2ox のいずれかが含まれる可能性が浮上したため、VaGA2ox の性状とアズキ GBP の性状を比較検討した。まず、GBP について酵素活性検出系を用いて検討したところ、微弱ながら GBP 活性画分を用いた場合においても同様の代謝変換反応が認められた。そこで、VaGA2ox 及びアズキ GBP を対象として酵素活性ならびに GA 結合活性に対する比較検討を行った。その結果、Co²⁺イオンが GA 結合活性を増大させる代わりに酵素活性を阻害すること、逆に Fe²⁺イオンが GA 結合活性を阻害し酵素活性を増大させることや、³H-16,17-dihydroGA₄ の水酸化反応に対する阻害の強さから GA₄ > GA₃ = GA₁ >> GA₉ の順に親和性を示すことが示された。この傾向は GBP 活性画分の結合の基質選択性についても認められるものであり、この中に含まれる GA 結合活性及び酵素活性の各本体として、いずれも GA2ox がその役を担うと考えると大きく矛盾しない結果であった。

3. 各種抗体を用いた GBP 候補タンパク質同定の試み

VaGA2ox のリコンビナントタンパク質を免疫原に用いて抗体を調製し、SDS-PAGE 後のウェスタンブロットで VaGA2oxA1、A2 の双方に反応する抗血清を得た。そこで、GBP 活性画分中にこの抗血清との反応物が存在するか検討した。まず VaGA2oxA1 について、ウェスタンブロットによるバンドの検出が可能な量のタンパク質を含む酵素活性量及び GA 結合活性量を決定し、ウェスタンブロット検出におけるポジティブコントロールとした。その上でこれと同じ酵素活性量または GA 結合活性量を有する GBP 活性画分についてウェスタンブロットを行ったが、いずれの場合においても抗体との反応性を示すバンドを確認

することはできなかった。

次に、酵素としての比活性が極めて高く量的にウェスタンブロット検出が到底困難な場合においても酵素活性の阻害の検出により、そのタンパク質と抗体との相互作用を検出し得ることを期待して、GBP 活性画分中に認められる酵素活性を抗 VaGA2ox 抗体を用いて阻害することが出来るか否か検討することにした。その結果、抗 VaGA2ox 抗体を VaGA2ox を用いた酵素反応系に加えた場合、対照の正常抗体添加区には認められない阻害効果が明瞭に認められたのに対し、GBP 画分の酵素活性はほとんど阻害されなかった。このことから、GBP は抗 VaGA2ox 抗体に認識されないと考えられた。

一方、最終精製段階において、GBP 活性と同一保持時間に溶出される 26kDa 及び 36kDa のバンドに着目し、これらの部分アミノ酸配列情報を得、これらの N 末端領域の合成ペプチドに対する特異抗体を調製した。現在、これらの抗体による GBP 活性の阻害などが認められるか否か検討を行っている。

4. まとめ

GBP 活性本体が酵素活性を持つと考えられることから、Native な GBP 活性本体は GA2ox の一種であるものの、糖鎖を有するなどして、抗 GA2ox 抗体との反応が生じない可能性も考えられる。また、本研究でクローニングした 5 つの VaGA2ox 以外にまだアズキの中には異種の GA2ox が存在する可能性、GBP が持つ酵素活性が GA2ox でなく、他の水酸化酵素活性を持つ可能性も考えられる。いずれにしろ、GBP 活性画分を用いた酵素反応阻害試験の結果を明瞭に説明することは現段階では困難である。酵素活性や GA 結合活性における Fe^{2+} イオンや Co^{2+} イオンに対する応答から、アズキ GBP と VaGA2oxA1 が同一である可能性も依然として少なくないと考えるが、ポリクローナル抗体である抗 GA2ox 抗体が、抗原である VaGA2oxA1、A2 の特定の部位に対する抗体のみを含んでいるとも考え難く、更なる検討が必要である。