

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 朴 昇玟

本論文は、黄化したアズキ胚軸中に検出されたジベレリン結合タンパク質の本体特定に関するもので、序章につづき三章より構成されている。

多くの植物ホルモン受容体の構造が明らかになっている状況下、ジベレリン (GA) の受容体はまだ特定されていない。申請者は、所属する研究室の前任者等によって黄化アズキ (*Vigna angularis*) 地上部より検出された活性型 GA に高い親和性を示す可溶性タンパク質 (GBP) の単離を目指した精製を引継ぎ、更に精製を加速する種々の検討を行うと共に、その途上で見出された「GBP が活性型 GA の代謝酵素である可能性」について、分子生物学的手法・生化学的手法を用いて検討し、それらの異同を明らかにすることを目的として以下の研究を行った。

序章で、植物ホルモンの受容に関する研究の最近の動向ならびにアズキ GBP 研究の背景と本研究の目的について言及した後、第二章ではアズキ GBP の大量精製と最終精製画分中に存在するタンパク質のアミノ酸配列分析について述べている。まず、材料中の存在量から、アミノ酸配列分析に必須な量の活性本体を得るには、約 130kg の材料を用いて精製を行う必要性を唱えた。また、精製ルートを再構築して、活性の回収率を向上させた。活性の回収率から最終精製段階を定め、ルーチン化した精製を計画的に行って、約 130kg の材料からの最終精製画分を得た。この画分中に含まれるタンパク質を網羅的にアミノ酸配列分析に供したが、配列情報だけから受容体候補を特定することはできなかった。新たに構築した精製法の中で、陽イオンカラムクロマトグラフィーにおける GBP の挙動から、GBP が単一の成分ではない可能性や、他に相互作用する分子が共存する可能性を示した。一方、活性の検出感度向上を狙って GA 結合活性に与える各種添加剤の効果についても並行して検討した。その結果、 Co^{2+} イオンや 2-オキシグルタル酸 (2-OG) の添加効果が大きく、GBP と GA 代謝酵素 (GA2ox) の性状と多くの類似点を明らかにした。

第三章では、アズキの GA2ox 遺伝子の単離と、そのリコンビナントタンパク質の調製について述べている。既知 GA2ox 遺伝子と高い相同性を示す 5 種 (*VaGA2oxA1*, *A2*, *B1*, *B2*, *B3*) の全長配列情報を得るとともに、いずれのリコンビナントタンパク質も酵素としての代謝変換活性を有することを明らかにした。次に、ノーザン解析を行い、GBP 抽出材料中で 5 種の GA2ox うちクローン *A1*, *A2* のみ発現を認めた。一方、酵素活性を有するリコンビナントを用いて酵素活性強度を揃えて GA 結合活性を比較した結果、クローン *A1* では明瞭な結合活性が認められたが、クローン *A2* の活性は極めて微弱であった。従って、GBP 活性画分中に含まれる可能性のある GA2ox としては、クローン *A1* が最も有力な候補であろうと予想し、以降、クローン *A1* に照準をあわせて、GBP との性状比較を行った。GBP 画分中にクローン *A1* と同様の酵素活性が検出されるかという検討においては、当初はその活性を検出できなかったが、反応時間を延長することにより微弱な代謝変換反応が認められ、少なくとも同画分中にそのような酵素活性を示す成分が含まれることを明確にした。GBP 画分およびクローン *A1* について、酵素活性および GA 結合活

性に関する各種添加物の影響、各種 GA の添加によるトレーサーとの競合等の比較を行ったところ、いずれの検討においても GBP 画分とクローン *AI* の性状は似ており、GBP 画分中に含まれる GA 結合活性及び酵素活性の各本体として、クローン *AI* を主成分とする GA2ox がジベレリン結合活性を示していると考えても大きく矛盾しないことを明らかにした。

第四章では、リコンビナント GA2ox に対する抗体調製と、それらを用いての GBP 画分中に GA2ox が含まれることを証明する試みを中心に展開している。リコンビナントを免疫原に用いて抗体を調製し、クローン *AI*、*A2* の双方に反応する抗血清が得られた。第 1 の証明方法としてウェスタン解析を行い、最終精製画分を用いて抗体と反応性を示すタンパク質が存在するか検討した。しかし、抗体と反応性を示すバンドは確認できなかった。そこで、第 2 の証明方法として、当該抗体による酵素反応の阻害効果の有無を検討した。その結果、抗体はクローン *AI* の示す酵素活性を明瞭に阻害するが、GBP 画分の酵素活性はほとんど阻害しなかったことから、GBP 活性本体はこの抗体に認識されないと結論づけ、GBP が GA2ox ときわめて類似した性質を持つ一方、同一のタンパク質ではない可能性が高いことを示している。

以上、本論文は、アズキ GBP の精製法を組み直し、活性本体の単離に必要な約 130kg の材料を処理して、最終精製画分中に存在するバンドの N 末端アミノ酸配列情報を得るとともに、GBP と GA2ox との異同について、詳細な検討を行ったもので、アズキのジベレリン結合タンパク質の解明における重要な知見を得たもので、学術上、貢献するところが少なくない。よって、審査委員一同は、本論文が博士 (農学) の学位論文として価値あるものと認めた。