

ジペレリン合成酵素に関する
分子生物学的研究

山口 信次郎

①

ジベレリン生合成酵素に関する分子生物学的研究

Molecular Biological Studies on Gibberellin Biosynthetic Enzymes

応用生命化学専攻

平成5年度博士課程進学

山口信次郎

指導教官 室伏 旭

略語表

bp	base pair
cDNA	complementary DNA
CPP	copalyl pyrophosphate
CS	casbene synthase
EAS	5- <i>epi</i> -aristolochene synthase
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
FPP	farnesyl pyrophosphate
GA	gibberellin
GAx	gibberellin Ax
GGPP	geranylgeranyl pyrophosphate
HEPES	2-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl]ethanesulfonic acid
HPLC	high performance liquid chromatography
IPTG	isopropyl- β -D thiogalactopyranoside
kb	kilobase
kD	kilodalton
KSA	<i>ent</i> -kaurene synthase A
KSB	<i>ent</i> -kaurene synthase B
LS	limonene synthase
MBP	maltose binding protein
NTR	non-translated region
ODS	octadecylsilane
ORF	open reading frame
PAGE	poly acrylamide electrophoresis
PCR	polymerase chain reaction
RACE	rapid amplification of cDNA ends
Rf	relative flow rate
Rt	retention time

RT-PCR	combined reverse transcription-PCR	
SDS	sodium dodecyl sulfate	
SSC	standard sodium citrate	(20 x SSC = 3M sodium chloride, 0.3M sodium citrate)
TLC	thin layer chromatography	
Tris	tris (hydroxymethyl) aminomethane	

2-1-1 総論

2-1-1-1	RNAの抽出とRNAの定量	(27)
2-1-1-2	RNAの逆転写とcDNAの合成	(28)
2-1-1-3	RT-PCRの原理	(29)

2-1-2 装置

2-1-2-1	RT-PCRの装置	(30)
2-1-2-2	RT-PCRの試薬	(31)
2-1-2-3	RT-PCRの反応条件	(32)

2-1-3 実験手順

2-1-3-1	RNAの抽出とRNAの定量	(33)
2-1-3-2	RNAの逆転写とcDNAの合成	(34)
2-1-3-3	RT-PCRの反応	(35)

2-2 2-2-1 2-2-2 2-2-3 2-2-4 2-2-5 2-2-6 2-2-7 2-2-8

2-1-1 総論

2-1-1-1	RNAの抽出とRNAの定量	(37)
2-1-1-2	RNAの逆転写とcDNAの合成	(38)
2-1-1-3	RT-PCRの原理	(39)

2-1-2 装置

2-1-2-1	RT-PCRの装置	(40)
2-1-2-2	RT-PCRの試薬	(41)
2-1-2-3	RT-PCRの反応条件	(42)

2-1-3 実験手順

2-1-3-1	RNAの抽出とRNAの定量	(43)
2-1-3-2	RNAの逆転写とcDNAの合成	(44)
2-1-3-3	RT-PCRの反応	(45)

目次

序論

(1)

第1章 イネのカウレン合成酵素 A

1-1 緒言

(11)

1-2 結果

1-2-1 cDNA クローニング

(12)

1-2-2 サザンおよびノーザン解析

(15)

1-2-3 塩基配列の決定

(17)

1-3 考察

1-3-1 イネのカウレン合成酵素 A の cDNA クローニング

(24)

1-3-2 イネのカウレン合成酵素 A の発現制御とアイソザイム

(27)

1-3-3 イネにおけるジベレリン生合成部位の特定

(29)

1-4 実験の部

(33)

植物材料/ゲノム DNA の調製とサザン解析/cDNA ライブラリーの作製
/cDNA ライブラリーのスクリーニング/RNA の調製とノーザン解析
/DNA の塩基配列の決定/アミノ酸配列の比較、sequence alignment

第2章 カボチャのカウレン合成酵素 B

2-1 緒言

(36)

2-2 結果

2-2-1 PCR 断片の増幅

(37)

2-2-2 全長を含む cDNA クローンの単離

(40)

2-2-3 塩基配列の決定

(41)

2-2-4 大腸菌内での過剰発現

(44)

2-2-5 発現タンパク質の機能解析

(47)

2-2-6 ゲノムサザン解析

(50)

2-2-7 遺伝子発現の分布

(50)

2-2-8 遺伝子発現に及ぼす光の影響

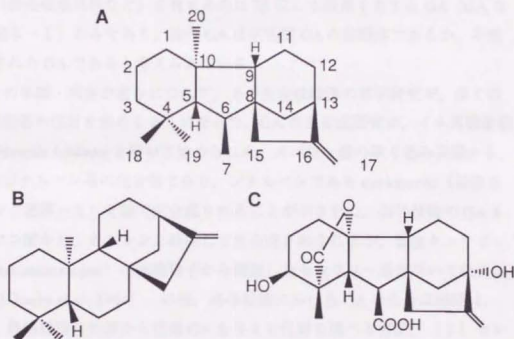
(53)

2-2-9	細胞内局在性	(55)
2-2-10	他のテルペン環化酵素との一次構造の比較	(58)
2-3 考察		
2-3-1	ジベレリン合成酵素のクローニングと機能解析	(63)
2-3-2	カウレン合成酵素 B とジベレリン 20- 酸化酵素の遺伝子発現	(65)
2-3-3	カウレン合成酵素 B 活性に欠陥をもつ突然変異体	(68)
2-3-4	カウレン合成酵素 A と B の遺伝子発現	(70)
2-3-5	プラスチドの分化とカウレン合成の制御	(72)
2-3-6	カウレン合成の細胞内局在性	(75)
2-3-7	テルペン環化酵素の一次構造	(78)
2-4 実験の部		
	植物材料/PCR による cDNA 断片の増幅/cDNA ライブラリーの作製/ cDNA ライブラリーのスクリーニング/cDNA の 5' 末端の単離/ cDNA の塩基配列の決定/大腸菌内での過剰発現/イムノブロット分析/ 融合タンパク質の機能解析/DNA の調製とサザン解析/ RNA の調製とノーザン解析/試験管内翻訳/ エンドウの葉緑体の単離と試験管内でのタンパク質取り込み実験/ カボチャの葉緑体の単離/アミノ酸配列の比較、sequence alignment	(83)
総括		(92)
参考文献		(94)
謝辞		(104)

序論

高等植物は、発芽、伸長生長、花芽形成、種子形成といった生活環を営む。この生活環は、光、温度、栄養条件等の環境要因、および自らの生育段階に応じて発現・進行しており、これらのいくつかの諸過程は、内生の生理活性物質である植物ホルモンにより制御されている。現在、6ないし7の化合物群が植物ホルモンとして考えられている。

これらのひとつであるジベレリン (GA; 図序-1) は、高等植物の伸長生長、長日植物の花芽誘導に関与していると考えられている他、穀類種子の発芽過程において一連の加水分解酵素を誘導することなどがよく知られている。



図序-1 カウレン、ジベレリンの化学構造

A; ジベレリンの基本骨格の炭素番号

B; ジベレリンの重要な生成中間体であるカウレン (*ent*-kaurene) の化学構造

C; 多くの高等植物で活性型であると考えられているジベレリン A₁ (GA₁) の化学構造

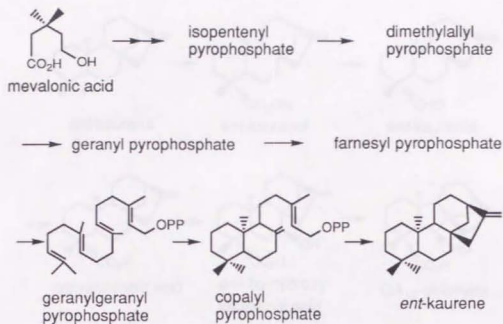
GA は、カビの一種 *Gibberella fujikuroi* によって起こるイネ馬鹿苗病の研究が端緒となって発見された。古くから、水田においてイネが徒長し、葉が黄

化する現象が認められており、これらは馬鹿苗、アホウ苗などと呼ばれていた。この病気（イネ馬鹿苗病）の発現に毒素（化学物質）が関与していることが報告され、この現象の原因となる毒素の化学的性質の研究が進められた。1938年、GAが結晶状に単離された（藪田、住木、1938）。その後、高等植物からの単離が相次ぐに至り（MacMillan and Suter, 1958； West and Phinney, 1959； Kawarada and Sumiki, 1959）、GAが植物ホルモンとして認識されるようになった。GAの単離・同定は、イギリスのプリストル大のグループ、東京大学のグループを中心に行われ、多くの植物材料から多種類の新ジベレリンの存在が報告された。現在までに、高等植物からは約100種類のGAが同定されている。現在では、これらのGAのうち実際に高等植物において生理活性（伸長促進活性など）を有するのは 3β 位に水酸基を有するGA（ GA_1 など；図序-1）のみであり、他のGAは活性型GAの前駆体であるか、不活性化されたGAであると考えられている。

GAの単離・同定が進むにつれて、その生合成経路の解明研究が、多くのGA研究者の注目を集めるようになった。GAの生合成研究は、イネ馬鹿苗病菌 *Gibberella fujikuroi* を用いて始められた。メバロン酸の取り込み実験から、GAはジテルペン系の化合物であり、ジテルペンである *ent-kaurene*（以後カウレン；図序-1）を経て生合成されることが示された。高等植物のGAもメバロン酸から、カウレンを経由して生合成されることが、野生キュウリ（*Marah macrocarpus*）の未熟種子から調製したセルフリー系を用いて証明された（Graebt et al., 1965）。以後、高等植物におけるGAの生合成経路は、（1）無傷植物に外部から標識GAを与えて代謝を調べる方法、（2）セルフリー系を用いた標識GAの変換実験などから、図序-2から図序-4のように考えられている。

GAの生合成は、それを触媒する酵素の性質から大きく三段階に分けられる（Garebe, 1987）。第一段階は、メバロン酸からカウレンまで（図序-2）、第二段階はカウレンから GA_{12} -アルデヒドまでであり（図序-3）、最終段階は GA_{12} -アルデヒド以降である（図序-4）。

メバロン酸からゲラニルゲラニルピロリン酸（geranylgeranyl pyrophosphate; GGPP）までは、他のジテルペン系化合物やカロチノイドとの共通の経路で

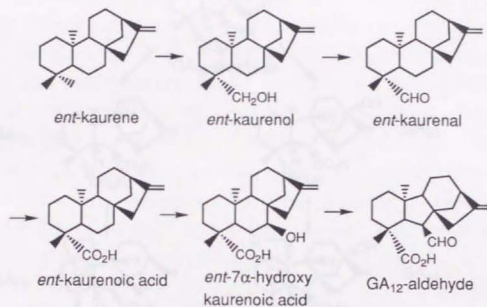


図序-2 メバロン酸からカウレンまでの生成経路

生成される。GGPPは二段階の環化反応によりカウレンに変換される。GGPPからカウレンへの環化反応は、クロマトグラフィーで分離可能な二つの酵素により触媒される (Duncan and West, 1981)。はじめの段階は二環性のコパリルピロリン酸 (copalyl pyrophosphate; CPP) ができる反応で、カウレン合成酵素 A により触媒される。CPPは、カウレン合成酵素 B によりさらに環化され、四環性炭化水素であるカウレンが生成する。メバロン酸からカウレンへの変換過程は、可溶性酵素により触媒される。また、カウレン合成酵素は、プラスチドに存在することが示唆されている (Railton et al., 1984; Aach et al., 1995; Sun and Kamiya, 1994)。

一方、カウレンからGA₁₂-アルデヒドへの変換は、膜結合酵素により触媒される (図序-3)。これらの酵素は、ミクロソーム画分 (おそらく小胞体膜) に存在する1原子酸素添加酵素でNADPHを補酵素とする cytochrome P450 酵素と考えられている (Graebe, 1987)。

GA₁₂-アルデヒドから活性型GAへと向かう経路は、初期にC-13位が水酸化を受ける「早期13位水酸化経路」(early-13-hydroxylation pathway)と水酸化

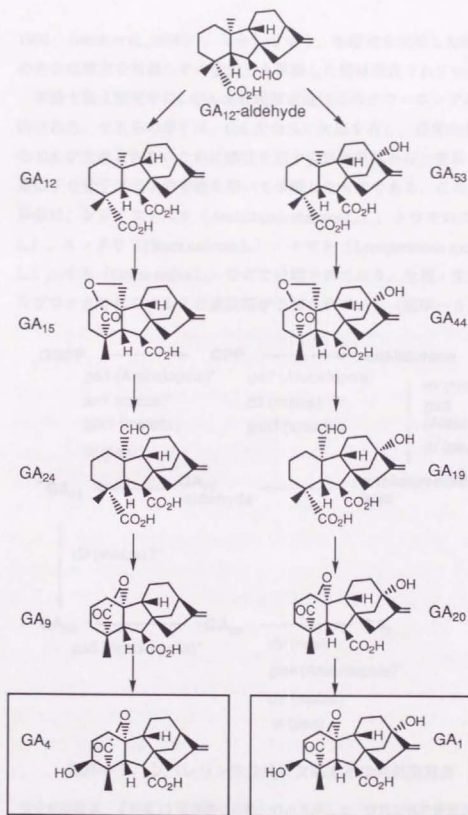


図序-3 カウレンから GA_{12} -アルデヒドまでの生合成経路

を受けない「非水酸化経路」(early-non-hydroxylation pathway) の二つに分けられる。多くの高等植物が、これらのいずれか、あるいは双方を主要 GA 生合成経路として持つことが示されていることから、これらは一般的に、高等植物における主要生合成経路であると考えられている。ジカルボン酸である GA_{12} あるいは GA_{33} は、超遠心分離により調製される可溶性酵素により触媒され、活性型である GA_4 、あるいは GA_7 へと変換される。これらの酵素は、細胞質に存在する 2-オキソグルタル酸要求性の酸素添加酵素であると考えられている (Hedden and Graebe, 1982)。

以上のように、GA の生合成経路はその構造から予想されるように、長く複雑であるが、植物細胞はこの複雑な生合成を合理的にかつ厳密な制御のもとに行っていると考えられる。

GA の生合成酵素、さらにその cDNA や遺伝子を単離することは、生育段階や環境の変化に応じてコントロールされていると予想される GA 生合成の調節機構の解明に大きく貢献するものと考えられる。GA の生合成酵素の精製は、主にイネ馬鹿苗病菌、高等植物の未熟種子など GA 生合成活性の高い材料を利用して精力的に行われてきた (Kwak et al., 1988; Jennings et al.,

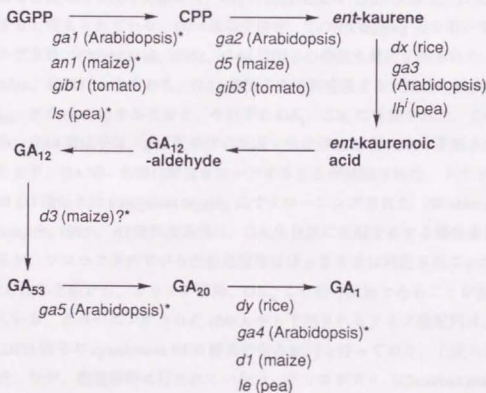


図序-4 GA₁₂-アルデヒドから各種 GA への高等植物における
 生合成経路

左に示したのが「早期非水酸化経路」、右が「早期 13 位水酸化経路」である。

1993, Smith et al., 1990)。しかしながら、本研究を開始した時点では、GAの生合成酵素を精製しその遺伝子を単離した例は報告されていなかった。

本博士論文研究中に、GA生合成酵素遺伝子のクローニングがいくつか報告された。それらの多くは、GA生合成に欠陥を有し、正常生長に必要な量のGAが生産されないために矮性を示す突然変異体から、変異の原因となる遺伝子を分子遺伝学的手法を用いて単離したものである。このような突然変異体は、シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana* L.)、トウモロコシ (*Zea mays* L.)、エンドウ (*Pisum sativum* L.)、トマト (*Lycopersicon esculentum* L.)、イネ (*Oryza sativa* L.) などで分離されており、生理・生化学的解析からブロックされている生合成段階が予想されている (図序-5)。



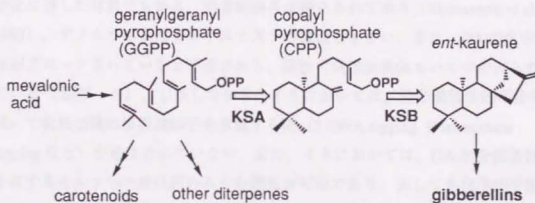
図序-5 ジベレリン生合成に欠陥をもつ突然変異体

生合成経路は、「早期 13 位水酸化経路」のみを示した。突然変異の原因遺伝子が単離されているものには*をつけて示した。基本的に、Reid (1993)を参考に作成した。*d3*突然変異体 (maize)の遺伝子は単離されているが、どの生合成段階がブロックされているかは明かではない。

シロイヌナズナの *ga1* 突然変異体は、カウレン以前の GA 生合成がブロックされていると考えられていた (Barendse et al., 1986) . Sun et al. (1992) は *ga1* 変異体のうち、欠失 (deletion) のアレルである *ga1-3* を用いて、genomic subtraction 法により、*GAI* 遺伝子座をクローニングした。Sun and Kamiya (1994) は、*GAI* 遺伝子に対応する cDNA を単離し、大腸菌での発現系を用いて KSA 活性を検出し、*GAI* 遺伝子が KSA をコードしていることを示した。トウモロコシの *An1* 遺伝子座は、transposon tagging 法によりクローニングされた (Bensen et al., 1995) . この遺伝子の機能は未知であるが、予想されるアミノ酸配列が、*GAI* 遺伝子と非常に高い相同性を示すことから、KSA をコードしていると考えられている。シロイヌナズナの *ga4* 変異体は、内生 GA の分析と各種 GA の投与実験から、GA の活性化段階 (3 β -水酸化) に欠陥を有すると考えられている。GA4 遺伝子座が、T-DNA tagging 法を用いてクローニングされ (Chiang et al., 1995) , GA4 遺伝子の機能も最近証明された (P. Hedden, 私信) . すなわち、GA4 遺伝子を過剰発現する大腸菌の抽出物に、GA₂₀、または GA₉ を与えると、それぞれ GA₁、GA₄ に変換された。この結果から、GA4 遺伝子は、*ga4* 変異体の生理・生化学的な研究から予想されていたとおり、GA 3 β -水酸化酵素をコードすることが証明された。トウモロコシの *D3* 遺伝子は transposon tagging 法でクローニングされた (Winkler and Helentjaris, 1995) . *d3* 突然変異体は、GA 生合成に欠陥を有する矮性変異体であるが、ブロックされている生合成段階ははっきりとは同定されていない。GA の投与実験から、カウレン以降、GA₃₃ より前の段階であることが推定されている。クローニングされた cDNA から予想されるアミノ酸配列は、NADPH 依存の cytochrome P450 酵素の保存配列を持っており、上記の推定を支持したが、機能解析は行われていない。クリカボチャ (*Cucurbita maxima* L.) の未熟種子胚乳は、GA の生合成活性が非常に高く、GA 生合成の研究に古くから利用されてきた (Graebe, 1987) . この材料を利用して GA 20-酸化酵素 (GA 20-oxidase) が精製された (Lange, 1994) . 精製タンパク質から抗体が調製され、cDNA 発現ライブラリーから cDNA がクローニングされた (Lange et al., 1994) . 予想されるアミノ酸配列は、2-オキソグルタル酸依存の酸素添加酵素の保存配列を含んでいた。単離された cDNA を含むファージ

の組み換え体は, $GA_{12/33}$ の 20 位のメチル基を数段階酸化した. GA 20-酸化酵素はシロイヌナズナからもクローニングされた. Phillips et al. (1995) は, クリカボチャの 20-酸化酵素と他の 2-オキソグルタル酸依存の酸素添加酵素のアミノ酸配列を参考にしてプライマーを合成し, PCR 法により 3 種類の cDNA をクローニングした. 大腸菌内でのこれらの発現産物は, GA_{12} を GA_9 に, GA_{33} を GA_{20} にそれぞれ変換した (図序-4). 以上の結果から, これらの 3 段階の酸化過程は, ひとつの酵素が触媒することが明らかとなった.

本博士論文研究は, GA 生合成の第一段階を担うカウレン合成酵素 (KSA, KSB) の cDNA クローニングを内容としている. GGPP からカウレンへの変換を触媒するこれらの酵素は, GA 生合成の制御の上で重要な役割を担っていると考えられる. GGPP は, カロチノイド, クロロフィル側鎖, 他のジテルペン系化合物との共通の前駆体である. 従って, GGPP からカウレンに至る環化反応は GA 生合成への分岐反応であり, KSA, KSB は多量に生合成されるカロチノイドなどの前駆体として存在する GGPP のごく一部を, 厳密なコントロールのもとでカウレンに変換していると考えられる (図序-6). 実際, カウレン合成が, 環境の変化や生育段階に依存してコントロー



図序-6 ジベレリン生合成経路におけるカウレン合成酵素の重要性

ルされている可能性が示されている. カウレン合成は, 温度 (Moore and Moore, 1991), 光 (Ecklund and Moore, 1974), 日長条件 (Zeevaart and Gage,

1993)などに依存して変化する。また、エンドウでは、若い組織の方が、カウレン合成能が高い (Chung and Coolbaugh, 1986)。

既に述べたように、カウレン合成はプラスチドで行われていると考えられている。Railton et al. (1984)は、エンドウの幼植物体から単離したクロロプラスト中に、KSB活性を検出した。また、Aach et al. (1995)は、KSAB活性 (GGPPからカウレンへの変換活性)を、コムギのプロプラスチド (原色素体; proplastids)、およびクリカボチャ胚乳の leucoplasts 中に検出した。

Duncan and West (1981)は、野性キュウリの未熟種子胚乳の粗酵素を用いて、KSAとKSBが相互作用している可能性を示した。これらの結果は、プラスチド内でKSAとKSBが複合体を形成している可能性を示唆している。

KSA, KSBのクローニングは、GA生合成の制御の解析に有用であるばかりでなく、それらの局在性や存在形態を詳細に解析するのに役立つはずである。

本研究は、これまで植物体内に存在するGAの分析等により追跡してきた、生理現象とGA生合成の関係を、GA生合成酵素の発現を調べることにより明らかにしようとする研究計画の第一歩である。その研究対象の一つとしてイネが挙げられる。筆者の属する研究室を中心としたグループにより、イネの内生GAの詳細な分析が行われてきた (Suzuki et al., 1981; Kobayashi et al., 1988; Choi et al., 1995)。イネは農業上有用な植物のなかで、分子生物学的研究に適した材料でもある。形質転換系が確立されており (Shimamoto et al., 1989)、ゲノムサイズはシロイヌナズナの数倍と小さい。また、GAの生合成がブロックされていると予想される、矮性の突然変異体もいくつか得られている (図序-5)。しかしながら、イネにおいては、分子遺伝学的手法を用いて突然変異の原因遺伝子を単離する系 (T-DNA tagging や transposon tagging など) が確立されていない。また、イネにおいては、GA生合成活性を有するセルフリー系は薬のみから調製が可能であり、決して生化学的手法によりGA生合成酵素を単離するのに有利な材料であるとはいえない。以上の観点から、現時点で、イネのGA生合成酵素をクローニングする唯一の方法は、既に他の植物から単離されている遺伝子のホモロジーを利用した方法であると考えられる。本論文の第1章では、既にクローニングされているシロイヌナズナのKSAのcDNAを利用して、イネのKSAのcDNAクローニン

グを試みた。

既に述べたように、GGPP からカウレンへの生合成の二段階目を触媒するカウレン合成酵素 B (KSB) は、KSA と様々な点で深く係わりあっていることが予想される。しかしながら、KSB のクローニングは現時点では報告されていない。以前、筆者の属するグループにより、カウレン合成酵素 B

(KSB) がクリカボチャの未熟種子胚乳より精製された (斎藤, 1993; Saito et al., 1995)。本博士論文研究の第 2 章では、精製酵素から解明された部分アミノ酸配列を基にして PCR プライマーを合成し、対応する cDNA をクローニングした。得られた cDNA を大腸菌で発現させた結果、KSB 活性を示したことから、単離した cDNA が KSB をコードするものであることが確認された。また、得られた cDNA クローンを用いて、KSB のクリカボチャにおける遺伝子発現と細胞内局在性について検討を加えた。さらに、以上の結果に基づいて、KSA, KSB の GA 生合成経路における重要性、単離した cDNA クローンの有用性などについて、現時点で得られている情報を最大限に利用して考察を加えた。

第1章 イネのカウレン合成酵素A

1-1 緒言

序論でも述べたように、イネはジベレリン (GA) 発見の端緒となった植物であり、また、農業上の有用性から、GA に関する研究がさかに行われてきた。

イネの内生 GA は精査されている。これまでに、イネの栄養成長期における主要 (量の多い) GA は、 GA_{19} であり、栄養成長期においては、生合成の早い段階に C13 位が水酸化される生合成経路 (早期 13 位水酸化経路) が主に機能していること (Kuroguchi et al., 1979; Suzuki et al., 1981)、薬においては逆に C13 位に水酸基が導入されない経路 (非水酸化経路) が機能しており、GA の含量も栄養組織と比較してかなり高いこと (Kobayashi et al., 1988)、栄養組織においては若く成長している部分に GA 含量が高いこと (Choi et al., 1995) などが明らかにされた。また、GA 生合成阻害剤を用いた研究から、伸長成長を制御している活性型 GA は GA_1 であると考えられている (Nakayama et al., 1992)。矮性品種 (突然変異体) である短銀坊主 (*dx* 突然変異体) と矮稲 C (*dy* 突然変異体) は、GA 生合成に欠陥を有するために矮性の表現型を示すと考えられている。短銀坊主は、カウレンの酸化段階、矮稲 C は、 3β 水酸化段階 (GA_{20} から GA_1) がそれぞれブロックされていると考えられている (S. Ogawa, H. Yamane, 私信; Kobayashi et al., 1989)。しかしながら、*dx*、*dy* 変異体ともに、薬においては、GA 欠損は認められない (Kobayashi et al., 1989; Kobayashi et al., 1990)。

これまでの GA の研究は、GA がイネの生理現象にどのように関わっているかを、主に内生 GA 量の変動や分布を調べることにより行ってきた。本研究は、イネにおける GA の生理的な役割を GA 生合成酵素の発現制御の解析から調べようとする研究の第一歩である。本章において述べた研究においては、イネのカウレン合成酵素 A (KSA) のクローニングを試みた。

KSA はカロチノイド、クロロフィル側鎖などの生合成と共通の前駆体である GGPP から CPP への変換を触媒する。KSA はプラスチドに局在すると考

えられている (Aach et al., 1995; Sun and Kamiya, 1994)。KSA に変異をもつ突然変異体は、矮化等、GA 欠損の表現型を示す。以上のことから、KSA は GA 生合成における最初の重要なステップを触媒する酵素であり、GA 生合成量の調節に重要な役割を担っていると推定される。イネのフィトアレキシンであるオリザレキシン (oryzaalexin) は、CPP を前駆体として生合成されると考えられていることから (Wickham and West, 1992)、イネにおけるカウレン合成酵素 (KSA, KSB) の発現は、他の植物のそれと比較してより精密な制御を受けている可能性も考えられる。KSA はシロイヌナズナから分子遺伝学的手法を用いてクローニングされた (Sun et al., 1992; Sun and Kamiya, 1994)。トウモロコシからも最近、KSA 様の遺伝子がクローニングされた (Bensen et al., 1995)。本章では、シロイヌナズナの KSA の cDNA をプローブとして用い、イネの KSA の cDNA クローニングを試みた。

1-2 結果

1-2-1 cDNA クローニング

シロイヌナズナの KSA の cDNA (Sun and Kamiya, 1994) をプローブとして、イネの KSA の cDNA クローニングを試みた。はじめに、low stringent な条件下でゲノムサザン解析を行い、ハイブリダイゼーションの条件検討を行った。ハイブリダイゼーションの温度、およびハイブリダイゼーション後の洗浄の条件を、まず、シロイヌナズナの全長の cDNA (pGA1-29 の cDNA インサート; 2.6 kb, Sun and Kamiya, 1994) をプローブとして検討した。その結果、HindIII で切断したイネのゲノム DNA に対して、56°C でハイブリダイゼーションを行い、同じ温度で最終的に 2x SSC で洗浄したところ、全体のバックグラウンドは高いものの、約 2.0 kb の特異的にハイブリダイズするバンドが検出された (図 1-1)。このバンドは、60°C 以上でハイブリダイゼーションを行った場合にはほとんど検出されず、洗浄の条件をより厳しくすると、バックグラウンドの減少と同様にこのバンドのシグナルも減少した。同じハイブリダイゼーション、および洗浄の条件下、プローブとして、cDNA の全長で

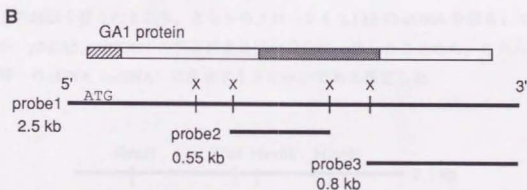
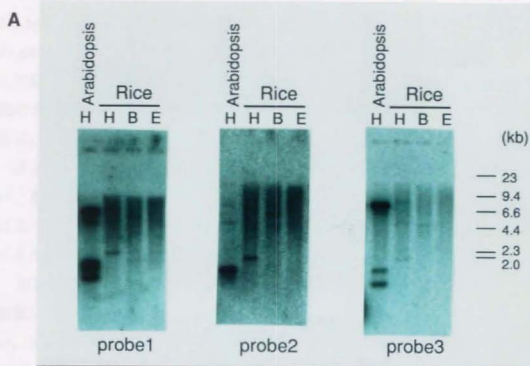


図1-1 イネのゲノムサザン解析

A ; シロイヌナズナの *GA1* cDNA (KSA) をプローブとして、制限酵素で切断したイネのゲノム DNA に対してハイブリダイゼーションを行った。いずれも、56°C でハイブリダイゼーションを行い、56°C、2 x SSC で洗浄した。H; HindIII, B; BamHI, E; EcoRI.

B ; *GA1* タンパク質の構造と A でプローブとして用いた領域を示した。影をつけた部分は、他のテルペン環化酵素と相同性の高い領域を示す。斜線で示した部分はプラスチドへの移行シグナルと予想されている領域を示す。X は、*Xho*I site を示す。

はなくある領域のみ用いた場合に、バンドの S/N 比 (signal to noise ratio) がどう変化するかを調べた。すなわち、シロイヌナズナの KSA の cDNA の 917 bp から 1464 bp (他のテルペン環化酵素との相同性が高い部分; 図 1-1 の probe2), または 1688 bp から 2494 bp (図 1-1 の probe3) をプローブとして用い、プローブとして全長の cDNA を用いた場合と比較した。その結果、他のテルペン環化酵素との相同性の高い部分 (probe2) をプローブとした場合に、2.0 kb のバンドは、最も明瞭に観察された (図 1-1)。

以上の結果から、probe2 を用いて、ハイブリダイゼーションを 56°C で行い、最終的に同じ温度で 2 x SSC を用いて洗浄するという条件を用いることにより、シロイヌナズナの KSA と相同性の高い遺伝子 (おそらく KSA) をイネからクローニングすることが可能であると考えた。

出穂直前のイネの葍より λZAPII をベクターとして、cDNA ライブラリーを調製した。ゲノムサザンにより決定したハイブリダイゼーションの条件に従い、2 x 10⁵ プラークをスクリーニングしたところ、2つの陽性クローンを得た (pRKA5, pRKA11)。pBluescriptSK(-) にサブクローニングしてインサートの確認を行ったところ、どちらのクローンも 2.1 kb の cDNA を保有していた。pRKA5, pRKA11 の制限酵素地図が完全に一致したことから、これらは同一の cDNA (mRNA) に由来するクローンである推定した。

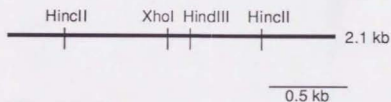


図 1-2 pRKA5, pRKA11 の cDNA insert の制限酵素地図

1-2-2 サザンおよびノーザン解析

pRKA5 の cDNA インサートをプローブとして、イネのゲノム DNA に対して high stringent な条件でサザン解析を行ったところ、PstI で切断したゲノムの場合は 8.0 kb, HindIII で切断した場合は 2.0 kb の断片がバンドとして検出された (図 1-3)。これらのバンドは、シロイヌナズナの cDNA をプロ-

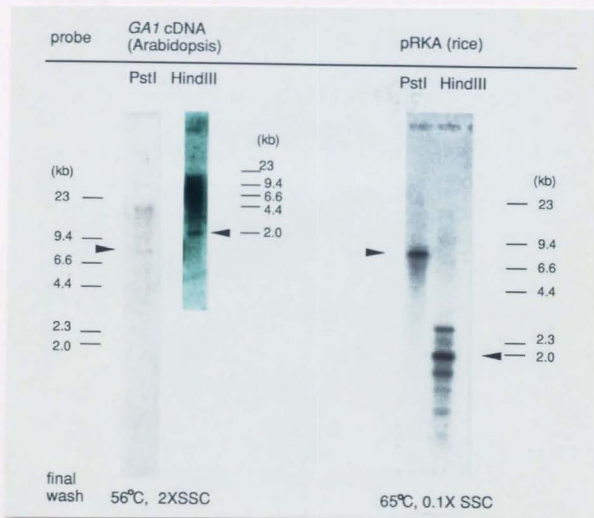


図 1-3 イネのゲノムサザン解析

PstI, または HindIII で切断したイネのゲノム DNA に対して、シロイヌナズナの KSA (GA1 cDNA), または pRKA の cDNA インサートをプローブとして用い、検出されるバンドを比較した。

ブとして、low stringent な条件でサザン解析を行った場合にも認められた。以上の結果から、単離した cDNA クローンはシロイヌナズナのプローブを用いたゲノムサザン解析において検出されたバンドに対応するクローンであると考えた。この結果は、pRKA5 がイネゲノム中で、シロイヌナズナの KSA と最も相同性の高い DNA 断片に対応する cDNA クローンであることを示している。単離した cDNA は KSA をコードするものである可能性が高いと判断した。

単離した cDNA をプローブとして、ノーザン解析を行った。イネの葯、および芽ばえの地上部より調製した全 RNA 30 μ g を用いて、ノーザン解析を行ったところ、転写物を検出することができなかった。そこで、全 RNA 500 μ g から poly(A)⁺RNA を調製し、ノーザン解析に供したところ、葯、芽ばえ（地上部）のいずれにおいても 2.8 kb の転写物が検出された（図 1-4）。この

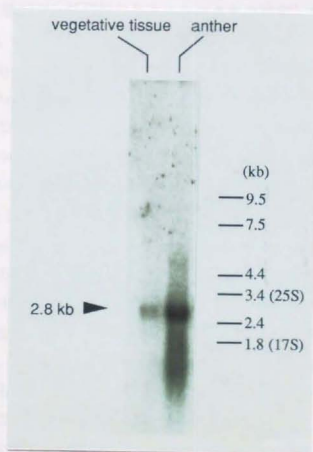


図 1-4 イネのノーザン解析

播種後 7 日目のイネの地上部、および出穂直前のイネの葯より調製した poly(A)⁺RNA 8 μ g を用いた。プローブは、³²P ラベルした pRKA5 の cDNA インサート (2.1 kb) を用いた。

転写物の分子量は、シロイヌナズナの KSA のそれと一致した (Sun et al., 1992) . 発現量は、芽ばえより薬で多かった.

1-2-3 塩基配列の決定

pRKA5 と pRKA11 のインサートの塩基配列を決定した. まず, これらの 5' 末端, 3' 末端の塩基配列を部分的に 200 bp ずつ決定したところ, 完全に一致したことから, これらはライブラリーの amplification により生じた同一のクローンであると考えた. pRKA5 のインサート cDNA の全塩基配列を決定した. poly(A) tail と考えられる配列は存在しなかった. ORF (open reading frame) を検索したところ, 最長のものは, 541 bp から 1974 bp に存在する ORF3 で, 478 アミノ酸より構成されていた (図 1-5) . データベースを用いてこの ORF のアミノ酸配列と相同性のあるタンパク質を検索したところ, シロイヌナズナの KSA (45.7 identity, 63.9% similarity) , トウモロコシの *An1* 遺伝子 (65.9% identity, 78.5% similarity) と非常に高い相同性を示した. このことから, pRKA5 の cDNA インサートは KSA をコードしている可能性が高いと考えた. しかしながら, 短い ORF である ORF1 (1 bp から 234 bp) , ORF2 (86 bp から 496 bp) のアミノ酸配列 (図 1-5) も, 部分的に KSA のアミノ酸配列と高い相同性を示した. すなわち, ORF1 においては 5' 側の領域 (1 bp から 210 bp に相当するアミノ酸配列) のみが, ORF2 においては中央部分の領域 (329 bp から 451 bp に相当するアミノ酸配列) のみが, 他の KSA のアミノ酸配列と高い相同性を示し, これらの ORF における残りの領域は KSA と有意な相同性を示さなかった. 以上のように, 他の KSA と相同性の高い領域が停止コドンにより分断されており, またフレームシフトが認められたことから, 211 bp から 328 bp, および 452 bp から 576 bp (図 1-5 で下線で示してある) は, スプライシングされずに残ったイントロンではないかと推定した. これらの領域を除いて得られる ORF4 (1 bp から 1974 bp) のアミノ酸配列 (658 アミノ酸よりなる) を, シロイヌナズナの KSA (Sun and Kamiya, 1994) と *An1* 遺伝子 (Bensen et al., 1995) のアミノ酸配列と比較した (図 1-6) .

10 20 30 40 50 60
TCAAAGGCATGATGCATATAGTCCCAACTTCAATCTGCATAGCCTTGAAGGGATGCTT
S K D M M H I V P T S I L H S L E G M P

ORF 1

70 80 90 100 110 120
GGGCTGGATTGGCAGAGGCTTCTGAAGCTCCCAATGCGATGGATGCCTTCTTGTTCCTC
G L D W Q R L L K L Q C S D G S F L F S
* S S N A V M D P S C S P

ORF 2

130 140 150 160 170 180
CCTTCAGCTACTGCTTATGCTCTCATGCAGACCGGTGACAGAAATGCTTCGGGTACATC
P S A T A Y A L M Q T G D K K C F A Y I
L Q L L L M L S C R P V T R N A S R T S

190 200 210 220 230 240
GACAGGATCATTAGAAGTTCGACGGAGGC GSTAAAAGATTCGTGGCATTTCAGTGACCA
D R I I K K F D G G G K R R F V A F H *
T G S L R N S T E A V K D S W H F T D Q

250 260 270 280 290 300
AGTTTCGAAATCTGGTGGTACAGTGCAGTGGCATTTTGTGGAGCTGATCTC
C F G N L V C Y S A L G A I L W Q L I S

310 320 330 340 350 360
AGATCATGTCATGTGAAAATTTTTTCA GTTCCGAACGTTTACC CGGTGCATCTTTTGA
D R V M L K I F S V F E

370 380 390 400 410 420
GCACATATGGGTTCGATCGGTGGAGCGTCTGGGATATCGGGTACTCCACAGAGA
H I N V V D R L E R L G I S R Y F Q R E

430 440 450 460 470 480
GATTGAACAGACATGCACTATGTCACAGG TTTTTCATATGTTTTTTTATAGGGC
I E Q N M D Y V N R F I M F C F I S A

490 500 510 520 530 540
AATTAATTTCTCAAAGTATATGTGTGGTCTCTGTAGTAACTTTAGGAACCTTATGA
I I F S N *

550 560 570 580 590 600
GCAGAGTTTTTAACCTGGTITCTCAGTGTAGG CACTGGACTGAGATGGGATTTGC
A E F E N L C F S L C R R H W T E D G I C

ORF 3

610 620 630 640 650 660
TGGCTAGGAATCCAAATGTAAGAAGTGGATGACACCCGCTATGGCTTCCGCTACTA
W A R N S N V K E V D D T A M A F R L L

670 680 690 700 710 720
CGCCTCCATGATACATGATCACCAGTGTGTCAAGATTTTGAAGAAGTGGGGAG
R L H G Y N V S P S V F K N F E K D G E

730 740 750 760 770 780
TTCITCTGTTTTTGGGGCAATCAACTCAAGCAGTCACTGGGATGATAAAGTGAACAGAGA
F F C F V G Q S T Q A V T G M Y N L N R

790 800 810 820 830 840
GCATCTCAGATAAGTTTTCCAGGAGAAGCAATTTTCAGCGTGAAGGAATTTCTCATAT
A S Q I S F P G E D I L Q R A R N F S Y

850 860 870 880 890 900
GAGTTCCTTAGAGAAAGAAGCCCAAGGGGACACTTTCATGATAAATGGATCATCTCCAAG
E F L R R E R E A Q G T L H D K W I I S K

910 920 930 940 950 960
GCACCTACCGAGAGGTACAATACACACTAGATTTTCTTGGTATGGAGCTTGGCACCC
D L P G E V Q Y T L D F P W Y A S L P R

(図1-5; 次ページに続く)

970 980 990 1000 1010 1020
 GTGAGGCAAGAACATACATAGGTCAATATGGTGGAAATGATGACGCTTGGATTGGAAG
 V E A R T Y I G Q Y G G N D D V W I G K
 1030 1040 1050 1060 1070 1080
 ACACTCTACAGGATGCCAATTGTGAATAACGCTACATATCTCGAGTTGGCGAAACAGGAT
 T L Y R M P I V N N A T Y L E L A K Q D
 1090 1100 1110 1120 1130 1140
 TTCACCGTTGCAAGCTCTACATCAGCATGAGTTGCAAGGCTTACAAAAGTGGTTCATT
 F N R C Q A L H Q H E L Q G L Q K W F I
 1150 1160 1170 1180 1190 1200
 GAGAATGGCCTGGAAGCTTTGGGATGACACCTGAAGATGTTTGAGAGCTTATTTTTG
 E N G L E A F G M T F E D V L R A Y F L
 1210 1220 1230 1240 1250 1260
 GCTGCCGGTGCATTTTCGAACCAACCGTCCCTGAGCGACTTGCATGGCGTAGAGTG
 A A A C I F E P N R A S E R L A W A R V
 1270 1280 1290 1300 1310 1320
 TCAGTCTGGCCCAACACTATTTCTAGGCATTTTACAGCGATATGCAAGCATGAAAAGG
 S V L A N T I S R H F Y S D M S S M K R
 1330 1340 1350 1360 1370 1380
 ATGGAGCCTTTCATGTGGAGCAGCCTCTATGAAGAAATGGCAATGTTTGGGGCTAGAA
 M E R E F M W S S L Y E E N G N V L G L E
 1390 1400 1410 1420 1430 1440
 GGATATGCAAAAGATGAATCCTTGGCAGGACACTTTGTCAACTTATAGATTTGTGTCT
 G Y A K D G I L A R T L C Q L I D L L S
 1450 1460 1470 1480 1490 1500
 CAAGGACACCCGACAGTTTCGAAAGGCTAAAAGTGATTCATAATCTCATAAGATGGCT
 Q E T P T V R E G Q K C I H N L I R C A
 1510 1520 1530 1540 1550 1560
 TGGATTGAATGGATGCAACAAATCAATATGAAGATGGCAGATGACAAAGCCAGA
 W I E W M M Q Q I N M K D G R Y D K G R
 1570 1580 1590 1600 1610 1620
 GTTATGCATCCAGGTCAGCACTGTCATAATAAGAAGACATGTTTACTTATGCTCAA
 V M H P G S C T V H N K E T C L L I A Q
 1630 1640 1650 1660 1670 1680
 ATTGTTGAAATTTGCTGGACGAATGAGGAGCGACATCTATGATAAATAACCCGAA
 I V E I C A G R I E E A A S M I N N T E
 1690 1700 1710 1720 1730 1740
 GGTTCTGGTTTATCAACTGCTTCTCTATTGGGATCTCTTCATGCCAAGATGTTA
 G S W F I Q L A S T C D S L H A R M L
 1750 1760 1770 1780 1790 1800
 CTTTCACAGGATACCCAAAGAAAATGAGACAACAATAAATCAAATTGACAAGGAAATTGAG
 L S Q D T Q E N E T T I N Q I D K E I E
 1810 1820 1830 1840 1850 1860
 TTGGGATGCAAGAACCTGCTCAATATCTTCTCCAAAGATGATGATAGAAGAATTAAC
 L G M Q E L A Q Y L E R V D D R R I N
 1870 1880 1890 1900 1910 1920
 AACAAACCAAGCAGACCTCTTGGCATTGCGAAAGTGTTACTATGCTGCCAATTGC
 N K T K Q T F L S I V K S C Y Y A A N C
 1930 1940 1950 1960 1970 1980
 TCACCACATATGCTTGACACACATTTCTGAAGTATTTTTGAGCAAGTATTTGAAAT
 S P H M L D Q H I S E V I F E Q V I *
 1990 2000 2010 2020 2030
 AAAGTTAGCCAAATAGACATTGTGCAGATTGCAATGCCATGTAATATTTCTG

図1-5 pRK5のcDNAの塩基配列とORF

*は停止コドンを示す。下線はイントロンと推定した領域を示す。

	1								50
KSAZm	...	MFVPHP	YFVQSSRRRR	RRRGRDGAPR	QPQARRVWR	AAAGS	CHATT		
KSAAT	MSLQYHVLNS	IPSTTFLSST	KTITSSSFLT	IGSGPLNVR	DKSRSGSICH				
				△					
	51								100
KSAZm	TQOPDNVSSA	KVFQTSRVET	ESKLRNGRKP	QDLEHQAE	EAEQLPLDQ				
KSAAT	SKLRTQEYIN	SQEVQHDLPL	IHEWQQLQGE	DAPOISVGSN	SNAFKEAVKS				
		△		△					
	101								150
KSAZm	VRAMLRSMD	EDTSPSAYDT	ANWAMVPKVG	GDGACDFF	ATWVWVDRK				
KSAAT	WKTILRNLT	SEITTSAYDT	ANVALI...	DADKTRAFF	SAMWVIAEK				
		1F →							
	151								200
KSAZm	LDGSGWGS	LFSAYDRWIN	TLACVVVLT	WSEBARCEA	GLSFLHNMW				
KSAAT	LDGSGWGD	LFSYDRWIN	TLACVVVALRS	WNSFHCCNK	GITFFRENIG				
				△					
	201								250
KSAZm	RJAEERBSM	PIGFERAPPS	LIQTARDLGV	VDEPVGHEAL	QSIYANREK				
KSAAT	RLEDBNDRM	PIGFERAPPS	LLEIARGIN	IDVPESEVL	KDIYAKREK				
	251								300
KSAO _s		SKDMMH	IVPTSLHSL	EGMPEGLDWR	LLKLOS	DGGS	FLFSPSATAY		
KSAZm		KRIPEDMMH	IVPTSLHSL	EGMPDLDP	LLKLOS	DGGS	FLFSPSATAY		
KSAAT		LRIPEIMH	KIPITLHSL	EGMPDLDEK	LLKLOS	DGGS	FLFSPSATAY		
		△		2F ↓					
	301								350
KSAO _s	ALMOTGDKKC	FEYIDRIKK	FNGGVPNVYF	VDLFEHIWV	DRLERLGISR				
KSAZm	ALMOTGDKKC	FEYIDRIKK	FNGGVPNVYF	VDLFEHIWV	DRLERLGISR				
KSAAT	ALMOTGDKKC	FEYIDRIKK	FNGGVPNVYF	VDLFEHIWV	DRLERLGISR				
				△					
		3F, 3R ←		4F, 4R →					
	351								400
KSAO _s	YFQREIEQCN	DYVNRHWTE	GICWARNSNV	REVDDTAMAF	RLRLRHGYNV				
KSAZm	YFQREIEQCN	DYVNRHWTE	GICWARNSNV	KDVEDDTAMAF	RLRLRHGYNV				
KSAAT	YFEEIEKCE	DYVNRHWTE	GICWARNSNV	QDVEDDTAMAF	RLRLRHGYNV				
		△		*					
	401								450
KSAO _s	SPSVFKNFER	DGEFFCFVGO	STQAVTGMYN	LNRASQISFP	GEDILCRARN				
KSAZm	SPSVFKNFER	DGEFFCFVGO	STQAVTGMYN	LNRASQISEP	GEDVLRARV				
KSAAT	SADVFKNFER	DGEFFCFVGO	STQAVTGMEN	LNRASCLAPP	REBIKNAKE				
		△		5R ←					
	451								500
KSAO _s	PSYEFLLRER	QCGILDKWI	TKNDLPGEVQ	YTLDFPFIYAS	LPRVEARTYI				
KSAZm	PSYEFLLRER	QCGMIRDKWI	VAKDLPGEVQ	YTLDFPFIYAS	LPRVEARTYI				
KSAAT	PSYNYLIRKR	QREELDKWI	TKNDLPGEIG	FALEFPFIYAS	LPRVETRYI				
			△						
				7R ←					
	501								550
KSAO _s	QYGGGDDVW	IGKTLYRMP	VNNNTYLELA	KODFNCOAL	HOLECGLQK				
KSAZm	QYGGGDDVW	IGKTLYRMP	VNNNTYLELA	TFENMCOAL	HOLECGLQK				
KSAAT	QYGGGDDVW	IGKTLYRMP	VNNNTYLELA	KODFNCOAL	HOLEWTFDR				
		△			△				

(図1-6; 次ページに続く)

```

551                                     600
KSAOs  WEIENCLDAF  GMTBEDVLR  YFLAAACIFE  ENRASERLAN  ARQSVLANIT
KSAZm  WKKNCLDAF  GVREQDVLRS  YFLAAACIFE  ESRAERLAN  ARQSMIANAI
KSAAT  WEYENFLSEW  GVRRELEEC  YFLAAAFIFE  SERSHSRVVA  AKSSVIVVAI

601                                     650
KSAOs  SPHFYSDMSS  MKRFDFEMMS  SLYEENGNVL  CTEGVMKGI  LARLFCGLID
KSAZm  SPFLRDISRD  MKRFDFVH  CLYEENLQWS  MKKRFEMVH  LERALRFIDN
KSAAT  SSSSESSSS  RRFSDQFHE  YI.....  ...ANARRSD  HFFNDRMRL

651                                     700
KSAOs  LLSDEPTVVR  EGQRCTRNLI  RCARHEWMM  QINMKDGRVD  KGRVMHFGSC
KSAZm  LLAQPALPIH  EGGRFTHSLL  SLAWHEWMLC  KANKEENKVI  KCSGIEPQ.Y
KSAAT  DRPGVQASR  LAGVLETHLN  QMSFDLESH  GRDVNNLML  SWGDWMEKWK

701                                     750
KSAOs  TVHNKFTGLL  IACVEICAG  RIEEASMIN  NTEGWFIOI  ASSICDSLHA
KSAZm  MVHRRGTMLL  IVCVEICAG  RICEAASMIN  NFNDFWIOI  TCATCDSLNH
KSAAT  LYGEGEGEHL  MVRM.....  .....ILMK  NNDITNETH  DHEVRLAEII

751                                     800
KSAOs  KMLLSQDTQE  NPTINCLDE  EIELSMOELA  CYLLERVDNR  RINKKRTPE
KSAZm  KMLLSQDTMK  NPTIRINMHE  EIELSMOELA  SLLLRQDEK  TSNFKKRTPL
KSAAT  NHCCLPRQYL  KARNDEMEH  THKSMERBMG  KMVELALSES  DTRFRDVTI

801                                     831
KSAOs  LSIKSPYYA  NCSPPHMDD  HISEVIFEN  I
KSAZm  LQVLESPYYA  THSDQHMEDR  HISEVIFEN  I
KSAAT  LQVLESPYYF  NCSPPHMLQT  HISEVIFEN  I

```

図1-6 カウレン合成酵素 A のアミノ酸配列の比較

GCG プログラムの PILEUP を用いて、イネ (KSAOs)、トウモロコシ (KSAZm)、シロイヌナズナ (KSAAT) の KSA の予想されるアミノ酸配列の sequence alignment を示した。2 つ以上の KSA で保存されているアミノ酸を白抜きで表した。シロイヌナズナにおいて固定されているイントロンの挿入位置を Δ で表した。▼ はイネの KSA (pRKA5) においてイントロン様の塩基配列の挿入が認められた位置を示す。矢印は、KSA における保存配列を利用したオリゴヌクレオチドプライマー (後にエンドウ、トマト、クリカボチャ等の KSA のクローニングに利用された) の作成に用いたアミノ酸配列を示す。

ORF4 のアミノ酸配列は、シロイヌナズナの KSA と高い相同性 (50.3% identity, 68.7% similarity) を、トウモロコシの *AnI* 遺伝子と非常に高い相同性 (71.3% identity, 82.4% similarity) を示した。Sequence alignment における

アミノ酸残基 250 から 600 の領域は特に保存性が高かった。アミノ酸残基 600 以降は、イネとトウモロコシでは比較的相同性が認められるが、シロイヌナズナの KSA とこれらイネ科植物の KSA の間での相同性は低かった。シロイヌナズナとトウモロコシの KSA においてプラスチドへの移行シグナルと予想されている領域 (N 末端から約 100 アミノ酸残基) は、それらの間で相同性はほとんど認められなかった。イネから得られた cDNA クローンは、5' 末端が欠けていたため、この領域に関する情報は得られなかった。シロイヌナズナの KSA において、基質のピロリン酸との結合に関与していると推定されている DXDDTA 配列 (アミノ酸残基 382 から 387, X は任意のアミノ酸を示す; Sun and Kamiya, 1994) は、イネにおいては EXDDTA という配列で保存されていた。DXDDTA 配列の周辺のアミノ酸配列は非常に良く保存されており、DXDDTA 配列が酵素活性に重要な役割を担っているという推定 (Sun and Kamiya, 1994) を支持している。イントロンと予想した塩基配列の挿入位置は、シロイヌナズナの KSA におけるイントロンの挿入位置と完全に一致していた (図 1-6)。この事実は、これらの領域がイントロンであるという推定を支持している。これら 3 種類の KSA の保存配列を利用して、他の植物由来の KSA のクローニングやイネにおける KSA のアイソザイムの検索のための PCR プライマーを設計した (図 1-6)。これらのプライマーを用いた RT-PCR により、エンドウ、トマト、クリカボチャ、スイバ (*Rumex palustris*) から、KSA をコードすると予想される cDNA 断片がクローニングされた (T. Ait-Ali, R. Imai, Y.Y. Yang, Y. Kamiya, 私信)。

ノーザン解析により 2.8 kb の転写物が検出されたこと、および他の KSA のアミノ酸配列の比較から、pRKA5 のインサート cDNA は、完全長の cDNA ではないと考えられる。完全長の cDNA を得る目的で、pRKA の cDNA インサートをプローブとしてイネ葯より調製した同じ cDNA ライブラリー、および同じくイネ葯より調製された別の cDNA ライブラリー (より若い生育段階の葯より調製された; 東京大学, 内宮教授より供与) をスクリーニングした。それぞれのライブラリーを 200 万プラークずつスクリーニングしたところ、今回調製したライブラリーからは新たに 9 個の陽性ク

クローンを得た。もう一つのライブラリーからは陽性クローンは得られなかった。新たに得られたクローンをプラスミドベクターにサブクローニングしてインサート cDNA を調べた。5 個のクローンが 2.1 kb の cDNA をもち、4 個のクローンが 1.5 kb の cDNA を持っていた。2.1 kb の cDNA の部分塩基配列を決定したところ、pRKA5 のそれと一致したことから、同一クローンであると判断した。1.5 kb の cDNA の両末端の塩基配列を 200 bp ずつ決定した。3' 末端には poly(A) tail と推定される配列が存在し、pRKA5 より約 100 bp 長い 3' 非翻訳領域を持っていた。5' 末端からの塩基配列は、pRKA5 の 611 bp からの塩基配列と一致していた。このことから、新たに得られた 1.5 kb の cDNA も、pRKA と同一の mRNA に由来する cDNA クローンであると考えた。

これらのクローンは、予想されるアミノ酸配列の相同性から KSA をコードすると思われるが、完全長の cDNA クローンを得るには至らなかった。第 1 章で行った実験の流れを図 1-7 に示した。

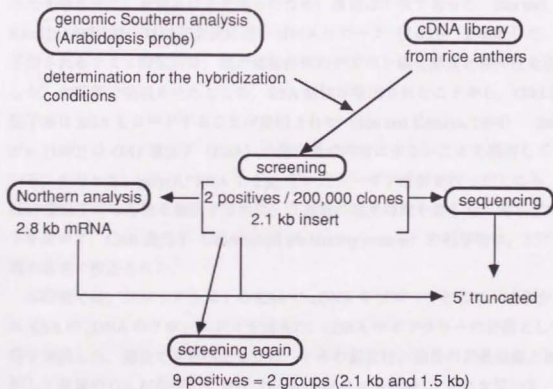


図 1-7 イネのカウレン合成酵素 A の cDNA クローニングの流れ

1-3 考察

1-3-1 イネのカウレン合成酵素 A の cDNA クローニング

これまでも述べたように、シロイヌナズナの KSA は、GA 生合成に欠陥を有する矮性変異体である *gal* 突然変異体を利用してクローニングされた。*gal* 突然変異体は、生理学的、生化学的な研究から、GA 生合成においてカウレン以降の生合成段階がブロックされていると考えられていた (Barendse et al., 1986)。*gal* 突然変異体の一つのアレルである *gal-3* は、遺伝学的解析から、DNA の欠失変異 (deletion mutation) であると考えられていた

(Koorneef et al., 1983)。Sun et al. (1992) は、genomic subtraction 法により、*gal-3* 突然変異体で欠失しているゲノム DNA 上の領域を、野生型のゲノム DNA からクローニングした。さらに、得られたゲノム DNA をプローブとして cDNA の単離を試みたが、*GAI* 遺伝子は発現量が非常に少なく、ひとつの部分的な cDNA クローン (0.9 kb; ノーザン解析から、完全長は 2.8 kb であると予想された) を得るにとどまったため、機能は不明であった。Sun and Kamiya (1994) は、ほぼ完全長に近い cDNA クローン (2.6 kb) を単離した。予想されるアミノ酸配列は、他の植物由来のテルペン環化酵素と相同性を示した。大腸菌で発現させたところ、KSA 活性が検出されたことから、*GAI* 遺伝子座は KSA をコードすることが証明された (Sun and Kamiya, 1994)。Sun et al. (1992) は *GAI* 遺伝子 (KSA) の発現量が非常に少ないことを報告している。すなわち、poly(A)⁺RNA を 2 μg 用いたノーザン解析を行ったところ、*GAI* 遺伝子の転写物を検出するのに、3 週間の露光時間を要した。同じプロットを用いて、CAB 遺伝子 (chlorophyll a/b binding protein) の転写物は、2 分間の露光で検出された。

本研究では、シロイヌナズナの KSA の cDNA をプローブとして、イネから KSA の cDNA のクローニングを試みた。cDNA ライブラリーの材料として、薬を選択した。緒言でも述べたように、イネの薬には、通常の榮変組織と比較して多量の GA が存在しており (Kobayashi et al., 1988)、それを用いて GA 生合成活性を有するセルフリー系を調製することが可能である。

(Kobayashi et al., 1990)。イネの薬中の GA₄ 量は、出穂直前に急激に増大す

る (Hasegawa et al., 1995) . 従って, その時期の葍中においては GA 生合成活性が高いと予想し, cDNA ライブラリー作成の材料に用いた. 今回調製した材料が, 実際にカウレン合成酵素の cDNA クローニングの材料として最適であったかどうかは明確ではない. 出穂直前の葍中で急激に増加するのは, GA_4 であり, カウレンの生合成がこの GA_4 の急激な増加にどれだけ関与しているかは明かではない. また, 酵素量と mRNA 量が必ずしも対応していない場合も予想される. しかしながら, ノーザン解析の結果から (図 1-4), 葍における KSA の mRNA 量は少なくとも通常の栄養組織 (幼植物体) よりは多かったことは事実である.

本研究においては, 全長を含む cDNA の単離には至らなかった. その原因として, KSA の予想される全長の cDNA が 2.8 kb と比較的長いこと, 発現量が非常に少なく, 得られる陽性クローンの数に限りがあることが挙げられる. 今回スクリーニングにより得られた陽性クローン (11 クローン) は, 2 種類に分類された. このことは, スクリーニングに用いた cDNA ライブラリーが amplification 後のものであることを考えると, もとのライブラリー中に 2 個しか存在していなかったことが推定される. もとのライブラリーは, 6×10^5 の独立ブラークを含んでいたことから, 出現頻度は, $1/(3 \times 10^5)$ ということになる. Sun et al. (1992) は, シロイヌナズナの鞘 (silique) の cDNA ライブラリーにおいて, *GAI* 遺伝子 (KSA) の cDNA クローンの出現頻度は, $1/(2 \times 10^5)$ と報告しており, 今回得られた値に近い. 今後, 全長を含む cDNA クローンの単離を達成するには, 第 2 章で用いた RACE 法 (Frohman et al., 1988) のような PCR を利用したクローニング法が必要であると考えている. また, ノーザン解析, 定量的 RT-PCR 法 (Chang et al., 1993) 等により, より発現量の多い材料の検討も必要かもしれない.

本研究の遂行中に, トウモロコシの *An1* 遺伝子が transposon tagging 法によりクローニングされた (Bensen et al., 1995) . *an1* 突然変異体が, シロイヌナズナの *gal* 突然変異体同様, カウレン合成以前の生合成段階がブロックされていると予想されている (Katsumi, 1964) ことと, 得られた cDNA から予想されるアミノ酸配列が, *GAI* 遺伝子と高い相同性を有していることから, *An1* 遺伝子は KSA をコードしていると考えられている. イネより得られた

KSA のホモログは、*An1* の cDNA と非常に高い相同性 (71.3% identity; 82.4% similarity) を示した。これは、同じイネ科植物という植物種の近縁性によるものと考えられる。

KSA のように発現量の少ない遺伝子の発現調節等を解析するためには、調べる植物自身の遺伝子をクローニングすることが必須である。他の植物由来のプロープ (heterologous probe) を用いたノーザン解析による検出は難しく、転写物の定量的な分析は困難であると考えられる。また、定量的 RT-PCR 法を用いる場合も、それぞれの遺伝子を単離し、シーケンスの情報を得ることが必要である。さらに、KSA の場合はアイソザイムの存在が示唆されていることから (Sun and Kamiya, 1994)、ひとつひとつの遺伝子を単離し、解析していくことは非常に重要である。イネの KSA と予想される cDNA を単離し、一次構造の一部を明かにしたことは、塩基配列の類似性を利用した他の植物からの KSA のクローニングに大きく貢献した。シロイヌナズナ、イネ、トウモロコシにおいて保存されているアミノ酸領域から、PCR 用の縮重したプライマーを設計した (図 1-6)。これらのプライマーを用いた RT-PCR 法により、エンドウ、トマト等から、KSA をコードすると予想される cDNA 断片がクローニングされている (T. Ait-Ali, R. Imai, Y.Y. Yang, Y. Kamiya, , 私信)。

イントロン様の配列の挿入が認められた cDNA クローンが得られたことは興味深い。トマトからも同様に、イントロンと予想される配列をもつ cDNA クローンが得られた (R. Imai, 私信)。トマトの場合もイントロン様の配列の挿入位置は、シロイヌナズナのそれと一致していた (同)。これらの結果は、KSA の未成熟 RNA は、比較的安定であり、KSA の遺伝子発現制御の一部はスプライシングの過程で行われている可能性を示唆しているのかもしれない。このような、イントロンの残った未成熟 RNA は、トマトのカロチノイド合成酵素 (phytoene desaturase; Mann et al, 1994; Badillo et al., 1995) に関しても認められている。図序-6 に示したように、カロチノイド合成はカウレン合成と同様、GGPP を前駆体としており、また phytoene desaturase は、KSA と同じようにプラスチドに存在すると考えられている (Bartley and Scolnik, 1995)。このような共通性を有する二つの酵素の転写物中に、イン

トロンの残った未成熟 RNA が検出されやすいという事実は興味深い。

1-3-2 イネのカウレン合成酵素 A の発現制御とアインザイム

イネのフィトアレキシンであると考えられているオリザレキシン (oryzalexin), モミラクトン (momilactone) はそれぞれ, CPP, あるいはその立体異性体である 9βH-labdadienyl pyrophosphate を經由して生合成されると考えられている (図 1-8)。このことは, イネの KSA, KSB の発現が, 他

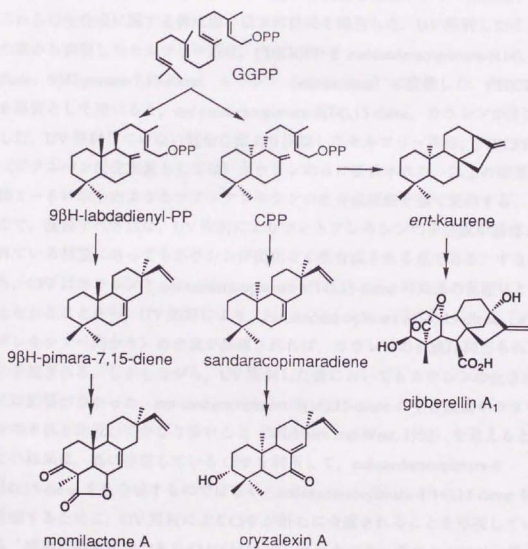


図 1-8 イネのフィトアレキシン生合成とジベレリン生合成

の植物のそれらと比較して、より複雑に制御されている可能性を示唆している。オリザレキシンは、いもち病菌 (*Pyricularia oryzae*) に感染したイネの葉より単離された (Akatsuka et al., 1985)。モミラクトンは、はじめ、イネの初から休眠促進物質のひとつとして単離された (Kato et al., 1973)。これらの物質は、健全な植物体からは検出されず、いもち病菌の感染や、UV 照射により生合成が誘導される。また、これらの物質は、いもち病菌の胞子発芽や、発芽管の伸長を抑制する。これらのことから、これらの物質は、イネのフィトアレキシンであると考えられている。

Wickham and West (1992) は、イネの葉より調製したセルフリー系を用いて、これらの生合成に関する興味深い以下の結果を報告した。UV 照射したイネの葉から調製したセルフリー系は、 $[^3\text{H}]$ GGPP を *ent-sandaracopimara-8(14),15-diene*, $9\beta\text{H-pimara-7,15-diene}$, カウレン (*ent-kaurene*) に変換した。 $[^3\text{H}]$ CPP を基質として用いると、*ent-sandaracopimara-8(14),15-diene*, カウレンが生成した。UV 照射していない健全な葉より調製したセルフリー系は、 $[^3\text{H}]$ CPP は、(ジテルペン炭化水素としては) カウレンのみに変換された。以上の結果は、図 1-8 に示したようなフィトアレキシンの生合成経路を強く支持する。ここで、注目すべき点は、UV 照射によりフィトアレキシンの生合成が誘導されている状態にあってもカウレンが変化なく生合成される点である。すなわち、CPP はカウレンと *ent-sandaracopimara-8(14),15-diene* の共通の前駆体と考えられることから、UV 処理により、*ent-sandaracopimara-8(14),15-diene* (オリザレキシンへ向かう) の合成が誘導されれば、カウレンの合成は抑えられると予想される。しかしながら、UV 照射した葉においてもカウレンの生合成には影響がなかった。*ent-sandaracopimara-8(14),15-diene* の生合成量がカウレンのそれと比較してかなり多いこと (Wickham and West, 1992) を考えると、この結果は、既に存在している CPP を利用して、*ent-sandaracopimara-8(14),15-diene* を生合成するのではなく、*ent-sandaracopimara-8(14),15-diene* を生合成するために、UV 照射により CPP が新たに合成されることを示唆している。植物生長調節剤である AMO-1618 は、クリカボチャ等のセルフリー系 (GGPP がジテルペン炭化水素としてはほとんどカウレンに変換される系) において、GGPP から CPP への変換を特異的に阻害する (Frost and West,

1977; Shechter and West, 1969). しかし, GGPP から, *ent-sandaracopimara-8(14,15-diene)* への変換過程は, AMO-1618 により阻害されなかった (Wickham and West, 1992). 以上の結果は, AMO-1618 に阻害されないような, 別のタイプの KSA (CPP synthase) が, UV 照射により誘導され, フィトアレキシンの生合成を担っていること示唆している. ただし, 後で詳しく述べるアビエタジエン合成酵素 (*abietadiene synthase*; 図 2-30) のように, GGPP から *ent-sandaracopimara-8(14,15-diene)* への変換をひとつの酵素が担っている可能性も否定できない.

シロイヌナズナの *gal-3* 突然変異体は, 欠失変異株 (deletion mutant) であり, KSA が完全に欠損している (Sun et al., 1992; Sun and Kamiya, 1994). しかしながら, *gal-3* 突然変異体は, 少量ではあるが, GA を生合成する (Sun and Kamiya, 1994). また, *GAI* cDNA をプローブとして用いた, low stringent な条件のゲノムサザン解析により, KSA のアイソザイムと予想されるバンドが, 検出されている (Sun and Kamiya, 1994). トウモロコシの *an1* 突然変異体は, さらに leaky である. *An1* 遺伝子は KSA をコードすると考えられている (Bensen et al., 1995). しかしながら, *an1* 突然変異体の欠失アレル (deletion mutant) においても, 完全な矮性の形質を示さず (半矮性), カウレン生合成能も部分的に失っているにすぎない (Bensen et al., 1995). これらの結果は, KSA のアイソザイムの存在を示唆している.

本研究においては, イネの KSA のアイソザイムを追求するには至らなかった. しかしながら, 以上のように, イネにおいては, GA 生合成を担う KSA のアイソザイムのみならず, フィトアレキシン合成に関与する別のタイプの KSA (CPP synthase) の存在も示唆されることから, イネにおける KSA のさらなる探索は今後追求されるべき重要な課題である.

1-3-3 イネにおけるジベレリン生合成部位の特定

これまでも述べたように, KSA は発現量が極めて少ないため, ノーザン解析により転写物の量を調べていくことは非常に困難である. シロイヌナズナの KSA に関しては, *GAI* 遺伝子のプロモーター領域をレポーター遺伝

子に繋いだ融合遺伝子を形質転換により導入することにより、プロモーター活性の分布が詳細に調べられている (A. Silverstone and T.-p. Sun, 私信)。イネにおいても、同様の手法、あるいは、*in situ* ハイブリダイゼーション、免疫組織化学的手法により、今後、GA 生合成酵素の発現部位 (GA 生合成細胞と考えられる) の特定が期待される。イネの GA 生合成酵素の cDNA クローニングは、KSA 以外にも進められている。GA₃₃ から GA₂₀、あるいは GA₁₂ から GA₉ への変換を触媒する GA 20-酸化酵素 (20-oxidase) の cDNA が最近イネからクローニングされた (T. Toyomasu and Y. Kamiya, 私信)。大腸菌で発現させた融合タンパク質は期待される GA 生合成活性を示した (同)。また、トウモロコシより transposon tagging 法によりクローニングされた D3 遺伝子 (機能は未知であるが、GA 生合成のカウレン以降、GA₃₃ 以前の生合成段階を触媒すると考えられている) のホモログがイネより単離された (R. Imai and Y. Kamiya, 私信)。GA 生合成における活性化段階を触媒する酵素である GA 3β-水酸化酵素は、シロイヌナズナから、T-DNA tagging 法によりクローニングされ、これをプローブとして、イネの cDNA クローニングが現在試みられている (M. Kobayashi, 私信)。

GA の生合成部位を特定することは非常に重要な課題である。動物ホルモンは、一般的に生産細胞と標的細胞が別であるとされている。植物ホルモンに関してこのようなことが証明された例は筆者の知る限りにおいては無い。GA に関して言えば、実際にどの細胞が GA の標的細胞 (GA に対して反応する細胞) であるかが同定されれば、現在クローニングが進められている GA 生合成酵素遺伝子の発現部位と照らし合わせるにより、この非常に重要な課題に対して有用な情報が得られるものと考えられる。イネにおいては、少なくとも以下に述べる二つの系において、ある特定の細胞のみが GA に対して反応するという可能性が示唆されている。

現在の時点で、GA の生産細胞と標的細胞の存在が仮定されている系は、イネ科植物の種子発芽過程における、GA による α-アミラーゼを中心とした加水分解酵素の誘導の系である。一般的に、胚で生合成された GA が糊粉層細胞に作用し、糊粉層細胞において GA により誘導された一連の加水分解酵素が胚乳組織に分泌され、同化産物の資化に利用されると推定されている。

糊粉層細胞は、いくつかのイネ科植物において、GAに対する反応性 (α -アミラーゼの誘導活性) を維持したまま単離することができることから、GAのシグナル伝達系の研究に専ら利用されている (Gilroy and Jones, 1994; Gubler et al., 1995)。イネの発芽過程におけるGA生合成酵素の時間的、空間的分布と、 α -アミラーゼ等のそれを詳細に調べ、比較することにより、古くから知られている上記の仮定に対する何らかの示唆が得られるものと期待している。

GAの最も一般的かつ顕著な生理作用は、茎葉部における伸長促進活性である。イネの幼植物体に、GAを投与すると特定の齡の葉鞘の基部のみがGAに反応して伸長する (Ogawa et al., 1980)。イネの節間伸長に関しては、ウキイネ [deepwater rice (*Oryza sativa* L.)] を用いて、GAに対して反応する細胞の同定が進められている。ウキイネは、水没により節間伸長 (internode elongation) が顕著に誘導される。これは、洪水などの冠水条件に対する植物の生存戦略の一つであろうと考えられている。この節間伸長の誘導にはGAが関与していると考えられている (Kende, 1987)。イネの節間伸長は、節間の下部3 mmほどに存在する介在分裂組織 (intercalary meristem) より出た細胞が、伸長することによる (図1-9)。GA₃処理した介在分裂組織から出

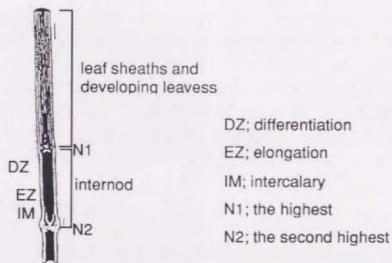


図1-9 ウキイネの節間のスケッチ (Sauter et al. (1993) より抜粋した。)

る細胞は、最終的に未処理の細胞の3倍の長さへ伸長する (Bleeker et al., 1986)。介在分裂組織を取り除くと GA_3 による伸長促進は認められない (Sauter et al., 1993)。以上のことから、介在分裂組織の細胞がイネの節間においては GA_3 に反応する細胞であると考えられている。介在分裂組織は、通常の双子葉植物の茎頂分裂組織と異なり、葉や花へは分化せず、伸長するだけである。したがって、 GA の伸長促進のメカニズムの研究材料としてより単純化された優れた系であると考えられる。ウキイネの介在分裂組織を材料にして GA により発現が誘導される遺伝子のクローニングも行われている (Knaap and Kende, 1995)。 GA による細胞伸長に直接関与する遺伝子と GA 生合成酵素遺伝子の発現パターンを細胞レベルで精査することにより、今後、伸長生長に関与する GA がどこで生合成されるのか、すなわち GA の生産細胞と標的細胞は独立して存在するのか否かという重要課題が明らかにされることが期待される。

1-4 実験の部

植物材料

イネの薬は、東京大学附属多摩農場において栽培されたツキノヒカリ (*Oryza sativa* L. cv. Tsukinohikari) より採取した。出穂直前の穂を止め葉の葉鞘から取りだし、さらに穎をピンセットで開いて薬を取りだし液体窒素を用いて急速凍結した。RNA 抽出まで -80°C 以下で保存した。イネの幼植物体は、2日間蒸留水中で吸水させた後、0.9% 寒天上で 30°C 、連続光下で生育させた。ゲノム DNA の抽出は、薬のサンプリングに用いたイネの成葉を材料に行った。

ゲノム DNA の調製とサザン解析

イネのゲノム DNA は CTAB 法 (杉浦, 1989) により抽出した。10 μg のゲノム DNA を、制限酵素で完全消化した後、1% アガロース電気泳動により分画し、ナイロン膜 (Hybond-N+; Amersham) に転写した。プローブの調製は、アガロースゲル電気泳動により精製した DNA 断片を鋳型として、 $[^{32}\text{P}]$ dCTP (Amersham)、Megaprime DNA labelling systems (Amersham) を用いて、ランダムプライミングにより行った。probe2 および probe3 の DNA 断片の調製は、pGA1-29 (Sun and Kamiya, 1994) を XhoI で消化して得られる複数のバンドのうち、それぞれ、0.45 kb, 0.8 kb のバンドをアガロースゲル電気泳動により分離、精製することにより行った。ハイブリダイゼーションは、Rapid-hyb buffer (Amersham) 中で行い、ハイブリダイゼーション後のナイロン膜は 0.1% SDS を含む SSC ($20\times$ SSC = 3 M 塩化ナトリウム, 0.3 M クエン酸ナトリウム) を用いて洗浄した。ハイブリダイゼーションと洗浄の温度、および洗浄に用いる SSC の濃度を変化させることにより、stringency を調整した。シグナルはオートラジオグラフィ、または BAS2000 (富士フィルム) により検出した。必要に応じて、検出後のナイロン膜を 0.1% SDS を含む沸騰水中に 10 分間おき、プローブの stripping を行った。

cDNA ライブラリーの作製

cDNA ライブラリーは、イネの薬より調製した 2 μg の poly(A)⁺RNA から、 λ ZAPII をベクターとして作製した。poly(A)⁺RNA は、磁気ビーズに結合した oligo(dT)₂₅ (Dynal) を用いたアフィニティークロマトグラフィにより、Dynal のプロトコールに従って精製した。逆転写反応は、2 μg の poly(A)⁺RNA を鋳型として、1 μg oligo(dT) primer, 200 U SuperscriptII (Gibco BRL)

を用いて、30 μ L の 50 mM Tris-HCl (pH 8.3), 3 mM MgCl₂, 75 mM KCl, 10 mM ジチオスレイトール, 0.67 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP 中、20 U の RNase inhibitor (東洋紡) の存在下で 42°C, 1 時間行った。二本鎖 cDNA の合成は、逆転写反応の反応液 (30 μ L) に、56 μ L の水, 5 μ L の 20 \times バッファー (100 mM Tris-HCl (pH 8.3), 100 mM MgCl₂, 500 mM KCl, 200 mM (NH₄)₂SO₄, 5 mM ジチオスレイトール), 2 μ L の 20 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP 混合液, 30 U の RNaseH (東洋紡), 21 U の DNA polymerase I (東洋紡) を加え、12°C, 1 時間、さらに 22°C, 1 時間保温することにより行った。二本鎖 cDNA の合成後、T4 DNA polymerase (東洋紡) を用いて、平滑末端化を行った。フェノール・クロロホルム抽出, クロロホルム抽出, エタノール沈殿の各操作により精製後、EcoRI/NotI アダプター (Pharmacia) とライゲーション反応を行い、続けて T4 DNA kinase (宝酒造) によるリン酸化を行った。反応後、フェノール・クロロホルム抽出を行い、続けて、Sephacryl S-300 のスパンカラム (Pharmacia) を用いて、未反応のアダプターを除去した。得られた EcoRI/NotI アダプター付きの cDNA 100 ng を EcoRI で切断済の λ ZAPII (Stratagene) 1 μ g とライゲーションを行った。反応液をエタノール沈殿後、5 μ L の水に溶解し、Gigapack II gold (Stratagene) を用いて、in vitro パッケージングを行った。得られた cDNA ライブラリー (6 \times 10⁸ 個の独立ブランクよりなる) を Stratagene のマニュアルにしたがって library amplification を行った。

cDNA ライブラリーのスクリーニング

プローブの調製、ハイブリダイゼーションは、サザン解析と同様に行った。陽性クローンは、オートラジオグラフィ、または BAS 2000 システム (富士フィルム) により検出し、3 回のスクリーニング操作により陽性ブランクを精製し、単離した。Stratagene のプロトコルに従い、ヘルパーファージ R408 と宿主大腸菌 XL1-Blue を用いて、pBluescript SK(-) にサブクローニングした後、インサート cDNA のサイズをアガロース電気泳動により分析した。必要に応じて、制限酵素地図の作製、塩基配列の決定を行った。

RNA の調製とノーザン解析

全 RNA の抽出は、SDS-フェノール法 (Ausbel et al., 1987) を用いて行った。poly(A)⁺RNA の調製は、「cDNA ライブラリーの調製」と同様に行った。Poly(A)⁺RNA を、ホルムアルデヒドを含む変性アガロースゲル電気泳動 (Sambrook et al., 1989) により分画した後、ナイロン膜 (Hybond-N+; Amersham) に転写した。プローブの調製は、サザン解析と同様に行った。

ハイブリダイゼーションは 65°C, Rapid-hyb buffer 中で行い, 最終的には 65°C, 0.1 x SSC (0.1% SDS を含む) で洗浄した. BAS 2000 (富士フイルム) を用いて検出した.

DNA の塩基配列の決定

DNA のシーケンシングは, pBluescriptSK(-) のサブクローンを鋳型として, Dye Primer Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems), ABI 373A DNA Sequencer (Applied Biosystems) を用いて行った. pRKA5 のシーケンシングは, Kilo Sequence Deletion Kit (宝酒造) を用いて, 一連のデリベーションクローンを作製することにより行った. センス鎖, アンチセンス鎖双方のシーケンシングを行い, 塩基配列を決定した.

アミノ酸配列の比較, sequence alignment

Genetics Computer Group programs (University of Wisconsin) を用いて, 相同性のあるタンパク質の検索 (TFASTA), アミノ酸配列の相同性の算出 (GAP), sequence alignment の作出 (PILEUP) を行った.

第2章 クリカボチャのカウレン合成酵素 B

2-1 緒言

第1章でも述べたように、KSAはシロイヌナズナからクローニングされ (Sun et al., 1992; Sun and Kamiya, 1994), トウモロコシからも KSA をコードすると考えられる *AnI* 遺伝子がクローニングされた (Bensen et al., 1995). また、本研究の第1章では、イネから KSA をコードすると予想される cDNA 断片を単離した。現在、さらにこれら KSA のアミノ酸配列の相同性を利用した PCR 法により、エンドウ、トマト等から、KSA をコードすると予想される cDNA 断片が得られている。これらは、今後、それぞれの植物において GA 生合成の制御の一部を研究する上で強力な武器になると予想される。しかしながら、KSA に続いてカウレン生合成を触媒する酵素である KSB のクローニングは報告されていない。KSA と KSB は共に、プラスチド内に存在すると考えられている (Aach et al., 1995). また、KSA と KSB は、相互作用する可能性が示唆されている (Duncan and West, 1981). 以上のように、KSB は、KSA に続く反応を触媒するというだけでなく、KSA と深く関わりあっていると予想されることから、これらの酵素の研究を同時に進めていくことは非常に重要であると考えられる。

これまでに、酵素活性を指標としたタンパク質精製により、KSB を単離しようとする試みが古くから行われてきた。Duncan and West (1981) は、野性キュリの胚乳から、KSB の精製を行い、KSA 活性と KSB 活性の分離を報告している。また、Spickett et al. (1994) は、トウゴマ (*Ricinus communis*) から KSB を精製し、粗酵素液から約 500 倍に比活性を上昇させるに至った。しかしながら、いずれの例においても、対応する遺伝子 (cDNA) の単離に利用できるほどの純度には至っていない。Saito et al. (1995) は、クリカボチャの未熟種子胚乳から、KSB を精製した。最終的に得られた精製酵素は、ほぼ SDS-PAGE 上で単一バンド (81 kD) を示した。バンドに対応するタンパク質のアミノ酸シーケンスを試みたところ、N 末端が修飾されていることがわかった。そこで、リジルエンドペプチダーゼで部分分解後、いくつかのペプチド断片のアミノ酸配列

を決定した (Saito et al., 1995) . 得られたアミノ酸配列のうち, ひとつを化学合成し, キャリアータンパク質と結合後, ウサギに免疫しポリクローナル抗体 (AbKB1) を得た. 得られたペプチド断片が, KSBに由来するものであることを示すために, この抗体が, (1) KSB 活性に影響を及ぼすかどうか, (2) KSB 活性を免疫沈降するかどうかを検討した. しかしながら, いずれの方法によっても, 得られたペプチドが KSB に由来するものであることを証明するに至らなかった (Saito et al., 1995) . AbKB1 を用いて, イムノブロット分析を行うと, SDS-PAGE 上では, 81 kD のタンパク質が認識されるものの, native-PAGE 上では認識されなかったことから, AbKB1 のエピトープは, おそらく, 折り畳まれたタンパク質のコアに位置していると予想された (Saito et al., 1995) .

以上のように, 精製酵素より得られた部分アミノ酸配列が, KSB に由来するものであることを確認するデータは得られていなかった. そこで, 本研究の第 2 章では, まず, Saito et al. (1995) により得られた精製酵素のアミノ酸配列の情報から対応する cDNA をクローニングすることを目的とした. 続いて, 得られた cDNA を大腸菌で発現させ, 発現産物の酵素活性を検討した. さらに, クリカボチャの KSB の遺伝子発現の制御, 細胞内の局在性について検討を加えた.

2-2 結果

2-2-1 PCR断片の増幅

精製されたタンパク質の部分アミノ酸配列 (図 2-1) から, PCR 用のプライマーを設計し, クリカボチャの未熟種子中の子葉から調製した全 RNA を鋳型として, RT-PCR を行った. これらのうち, シークエンス [5] の下線部分から設計した正方向のプライマー (forward primer) と [1] の下線部分から設計した逆方向プライマー (reverse primer) を用いた場合に, 比較的明瞭なバンド (0.45 kb) の増幅が認められた (図 2-2) .

この PCR 産物をプラスミドベクターにクローニングし, バンドと同じサイズ (0.45 kb) のインサートをもつクローンを選択し, 塩基配列を決定した. こ

[1] K/ASQIITHPDES~~V~~LENIN~~S~~WT

[2] K/RAMESYS~~G~~DIVRIS

[3] K/EAEWSTNK

[4] K/HGLSSDSVW

[5] K/LQDWSMVMQYQRK

図2-1 精製したタンパク質より得られたアミノ酸配列

矢印は、プライマーの設計に用いたアミノ酸配列を示す。合成ペプチド [1] は、抗体 (AbKB-1) の作製にも用いられた (Salto et al., 1995)。

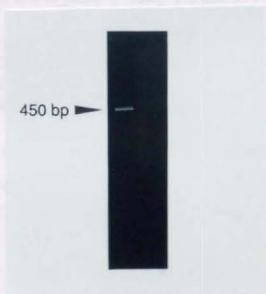


図2-2 RT-PCR産物の電気泳動

クリカボチャの未熟種子より調製したRNAを鋳型として、図2-1に示したプライマーを用いてRT-PCRを行い、PCR産物を8%ポリアクリルアミド電気泳動で分析した。DNAは、エチジウムブロミド染色により検出した。

のcDNA断片(472 bp)の予想されるアミノ酸配列を解析したところ、プライマーとして用いた配列に続くいくつかのアミノ酸配列(図2-3、白抜きで示してある)は、ペプチド[1]、[5]のアミノ酸シークエンスの結果(図2-1)に対応するものであったことから、このPCR断片は、アミノ酸シークエンス

```
                KSB MVMQYORHNGSLFNSPSTTAAAFMHR 26
                ..:..:|:|:| | | | | | | | | |
KSA KEIMHKIPTLLHSLGMRDLWEKLLKLQSQDGSPLFSPSSSTAFAMQT 300
                KSB NDDGCFDYLRSLQKFDGVSFTIYPLDIYARLHMVDSLQKFGIARHFKEE 76
                ..:..:| | | | | | | | | | | | | | | |
KSA RDSNCLEYLRNAVKRFRNGGVNFVVDLFEHIWIVDRQLRGISRYFEEE 350

                KSB IRSVLDETYRCWQMGEE....NIFLDASTCAMAFMLRVEGYDVSDDQL 121
                |:..|| ..:| :|:| :|:| :|:| :|:| :|:| :|:| :|:| :|:| :|:| :|:| :|:|
KSA IKECLDYVHRYWTNGICWARCSHVQDIDDTAMAFRLLRQHGYQVSADV 400

                KSB TQF.SEDIFPNCLEGGYLKDFGASLEYKASQIITHPD 157
                ..| | | | | | | | | | | | | | | | | |
KSA KNFEKEGEFFCFVGQSNQAVTGMFNLYRASQLAFPREIILKNAKEFSYNY 450
```

図2-3 PCR産物の塩基配列より予想されるアミノ酸配列 ("KSB"; 上段)と、シロイヌナズナの KSA ("KSA"; 下段) のアミノ酸配列の比較

GCGプログラムのGAPを用いて作成した。プライマーに用いたアミノ酸配列を太字で示した。ペプチドシーケンシングで得られたアミノ酸配列のうち、プライマーの作成に用いなかった部分を白抜きで示した。同一のアミノ酸を"|"で、性質の非常に類似したアミノ酸を"."で、類似したアミノ酸を"."で表してある。

に供した精製タンパク質の一部をコードするcDNA断片であると判断した。cDNAから得られたアミノ酸シーケンスに相同性の高いタンパク質をデータベースで検索したところ、最も相同性が認められたのは、シロイヌナズナのKSAであった(37.6% identity)。したがって、得られたcDNA断片がKSBではなくKSAの一部である可能性も考えられた。しかしながら、シロイヌナズナのKSAのアミノ酸配列は、*Ani*遺伝子(トウモロコシのKSAと考えられている)と本研究で得られたイネのKSA様のcDNA(第1章)に対してより高い相同性(70%以上のidentity)を示す。また、精製されたKSB活性をもつ最終的な画分には、KSAB活性(GGPPからカウレンへの変換活性)が認められなかった(Saito et al., 1995)。以上のことから、得られたPCR断片は、KSAではなく他のテルペン環化酵素(terpene cyclases)の一部をコードしている可能性が高いと考えた。KSBもKSA同様、テルペン環化酵素であることから、以上の結果は、このcDNA断片がKSBのcDNAの一部であることを強く支持し

ていた。得られたPCR断片をプローブとして、未熟種子中の子葉より調製した poly(A)⁺RNA を用いて、ノーザン解析を行ったところ、2.7 kb の転写物が検出された。精製されたタンパク質の分子量 (81 kD) を考えると、この mRNA のサイズは妥当であり、少なくとも、検出された mRNA は、精製されたタンパク質をコードするのに十分な大きさであった。以上の結果から、増幅された PCR 断片は、KSBの一部をコードする可能性が高いと考え、その全長を含む cDNA クローンの単離を試みた。

2-2-2 全長を含む cDNA クローンの単離

クリカボチャ未熟種子中の子葉より調製した poly(A)⁺RNA から、λZAPIII を用いて 1.2×10^6 の独立ブランクから成る cDNA ライブラリーを製作した。0.45 kb の PCR 断片をプローブとして、 5×10^5 個のブランクをスクリーニングしたところ、9 個の陽性クローンを得た。これらをサブクローニングして、インサート DNA のサイズを検討した。最も長いインサートをもつ二つのクローン (pKB3 および pKB16; それぞれ 2.4 kb) を用いて制限酵素地図を作成した (図 2-4)。その結果、これらは同一のクローンであると判断した。これ

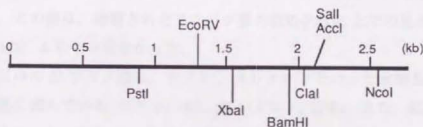


図 2-4 pCmKB-1 の cDNA インサートの制限酵素地図

らの cDNA のサイズ (2.4 kb) とノーザン解析により得られた mRNA のサイズ (2.7 kb) から考えて、単離された cDNA クローンは、5' 末端が欠けたものである可能性が示唆されたので、RACE (rapid amplification of cDNA ends; Frohman et al., 1988) の変法 (Edwards et al., 1991) を用いて、5' 末端のクローニングを試みた。その結果、742 bp の DNA 断片がクローニングされた。この断片は、もとの pKB16 と完全に一致する 479 bp と新たに 263 bp の 5' 末端を含ん

でいた。RACE で得られた DNA 断片ともとの pKB16 のインサート cDNA を制限酵素サイトを利用してつなぎ、ほぼ全長と考えられる 2.7 kb の cDNA を含むプラスミドクローンを得た (pCmKB-1)。

2-2-3 塩基配列の決定

得られた cDNA の全塩基配列を決定した (図 2-5)。単離された cDNA は、2658 bp であり、cDNA ライブラリーのスクリーニングに用いた PCR 断片の塩基配列を完全に含んでいた。図 2-5 に示した ORF は、789 アミノ酸から構成されており、終止コドンの 104 bp 下流には、ポリアデニル化付加シグナルと予想される配列 (AATAAA) が認められた。得られたアミノ酸配列には、精製されたタンパク質から得られたペプチドシークエンスが全て含まれていた (図 2-5)。ただし、ペプチドシークエンシングより得られた配列 [5] LQDWSMVM QYARK は、cDNA より予想されたアミノ酸配列では、LQDWDMVMQYARK となっていた。この 1 アミノ酸の違いは、アミノ酸シークエンシングに供したペプチドの量が十分でなかったために起こった、アミノ酸シークエンシングの読み間違えであると判断した。このタンパク質の予想される分子量は 89 kD であり、この値は、精製されたタンパク質の SDS-PAGE 上での見かけの分子量 (81 kD) よりやや大きかった。

はじめの 55 アミノ酸は、セリン、スレオニンといった水酸基をもつアミノ酸残基に富んでいる (セリン; 18%, スレオニン; 12%)。また、塩基性残基が多いために、この部分の pI 値は、9.8 である。これらは、プラスチドを標的とする transit peptide の典型的な特徴である (Keegstra et al., 1989)。図 2-6 に、はじめの 55 アミノ酸をこれらの特徴を強調して示した。また、シロイヌナズナの KSA における N 末端の 100 アミノ酸 (transit peptide と考えられている) も同時に示した (Sun and Kamiya, 1994)。

-137 GAAAGCGGTAGTTTTCG
-120 GCTCTGGCTGTTTTGTGACTGCCTATTCGTTCITATATGCACGAAITGGAAT
-60 GCCTCACCAGAGTTTGATGCTGCTTCGGCAATTCITGGATGCCTAAACATACCGTCC

1 ATGATCTTCCCGACCTACCGGGTTCGGCGTTTGGTCGCTCCTCCTCCTCGCTCC
M Y L S R P T G V A R F A A S S S S S S S

61 TCAGCTTCCCTATTCCTGGAGTGGATGGGACAACTAAACTGGAGCTTTGCAC
S A S L F P P G V D V D T T T T K T G A L H

121 TTTGAAGAACAAGAAAGAAATTAAGAAATTTGTGACAAGGTGAACCTTCAGTTCT
F E E T K E R I K K L F D K V E L S V S

181 GCATATGATATCGATGGGTGGCAATGGTCTCTCCAACTCTCTCAACCACTCTT
A Y D T A W V A M V P S P N S L N Q P L

241 TTCCCGAGTGATAAAGTGGGTATTAGATAGTCAACATGCTGATGGCTATGGGGCCTA
F P E C I N W V L D S Q H A D G S W G L

301 CTCACAACGATCAGTGTCTGATGAAGCCAACTCTTATCTACATTAGCATGTGTTCTT
L H N D Q L L M K A N L L S T L A C V L

361 ACTCTTAAGCGGTGGAAATTTGGCGATGATCATATGAGCAAGGCCCTGATTTATCAAG
T L K R W N I G S D H M S K A L D P I K

421 TCTAATATAGCTCAGCTACTGATGAGAACCAAGTTCCTCCGGTGGGATTTGACATTAT
S N I A S A T D E N Q R S P V G F D I I

481 TTCCTGGCATGATTGAGTATGCTAAAGACTTGAATTTGAATCTACCTTGGCACCAGC
F P G M I E Y A K D L N L N L P L A P T P2

541 AACGTGGATGCCTGGTTCGAAAGAAGAGTTGGAGCTGACAACTGGAGAAACACTCT
N V D A L V R K K E L E L R S C R S N S

601 GAAGGTGGAAAGCCTATTAGCGTATGTTTCAAGGAATTTGGAAGTTTACAGGACTGG
E G G K A Y L A Y V S E G I G R H Q Q Q P1

661 GATGGTCTATGCAATATCAAGGAAGAATGGATCACTGTTTAACTTCCATCCACTAGC
D G V W Q Y D E E N G S L F N S P S T T

721 GCAGCGGCTTTTATGCATAGAATGATAGGCTGTTTGGATTATCTTCGCTCACTCTTA
A A A F M H R N D D G C F D Y L R S L L

781 CAAAAGTTGATGGCTCAGTTCCCACAATATATCCTCTTGATATATGCTCGATTACAC
Q K F D G S V P T I Y P L D I Y A R L H

841 ATGGTGTATAGCTTCAAAAATTCGGAATTCCTCGGCAATTCGAAGAGAGATTAGAAGC
M V D S L Q K F G I A R H F K E E I R S

901 GTATTAGATGAACCTACAGGTGTTGGATGCAAGGAGGAAAAATATATCTTAGATGCT
V L D E T Y R C W M Q G E E N I F L D A

961 TCAACTGTGCAATGGCCTTCGAATGTACGTTTGAAGGATATGATGTTCTTCAGAC
S T C A M A F R M L R V E G Y D V S S D

1021 CAGTTGACTCAATTTCCAGAAGATATCTTCCCAATTCGCTGGAGGATATTTAAAGAC
Q L T Q F S E D I F P N C L G G Y L K D

1081 TTCGGTGCCTCGCTGGAGTTATATAAGGCTCTCAGATTATCAGCCAGCCGATGAATC
F G A S L E L Y K A S G T I T H P D E S

1141 GTCTGCAAAATATAAAGCTTCGGACTAGTCGTTCCGGAAGCATGGATTATCTAGTGTAT
V I E N N S W S R F L R H G L S S D

1201 TCAGTTTGGTCTGATAGAACCATAGTGTGTTTAAACAAGAGCGTCTTAATGCTCTTAG
S V W S D R T D S V V K Q E A V N A L E

(図2-5 次頁に続く)

1261 TTCCCCTATAATGCAACTCTAGAACGGCTAATAAGTAAGAGGGCAATGGAAAGTTACAGT
 F P Y N A T L E R L I S K H A M E S Y S
 1321 GGAGACATGTGAGGATTTCAAAATCGCCATATGCCTGCTTAAATTTGGCCATCAAGAT
G D I V R I S K S P Y A C L N F G H Q D
 1381 TTTCTGGAACTTGCCTAGAGGATTTCAATACCTCGAACGCATTCATCTAAAGAATCG
 F L E L A V E D F N T L O R I H K E L
 1441 GAAGAGCTTCAAGATGGGTGGTGAACAAATTTGGACGAGTTGAAATTTTTCAGACTG
 E E L Q R W V V E N K L D E L K F F R L
 1501 CACCTAGGCTACTGCTATTTTGCCTGCGGCAGCGACCTTACTGATCTGGAACCTCATGAT
 H L G Y C Y F A A A A T L T D P E L H D
 1561 GCTCGCATAGCATGGGCACAAAATGGTGTGCTCAGCACCGTGGTGTGATGATTTCTATGAT
 A R I A W A Q N G V L T T V V D D F Y D
 1621 GGTGGAGACTCTCAAGAGGAATGGATAACCTTATAGAATTTGGTGAAGAAGTGGATCTCT
 G G G S E E E L D N L I E L V E K W D P
 1681 GATGGGAAGTGGGTACTGTTCCAAAGGACGTTGAGATTGTATTTCTGCCTGCACAGC
 D G E V G Y C S K D V E I V F L A L H S
 1741 ACAGTTTGTGAAA TAGGAGAAGAGCTTTAGTATGGCAAGACCGAGTGTATGAGGAAAT
 T V C E I G R R A L V W Q G R S V M R N
 1801 GTTATCGATGGTGGTGGCTGCTGCTGAAGGTGATGAGAAAGGAAGCTGAATGGTGGACA
 V I D G W L A L L K V M R K K A E W S T
 1861 AATAAGGTAGTGCATCAATGGGTAAATATATGGAACAAGCCATGTATCATCTCGGGTGG
N K V V P S M G E Y M E Q A H V S F A L
 1921 GGACCTATAATCCTCCAAATGCTCTCTTTGTTGGACCTAAACTCTCAGAGGAAATGATT
 G P I I L F M L F F V G P K L S E E M I
 1981 GGAAGCTGTGAATACCGAAGTTATATAAGCTGATGAGCACTGCTGGTGCCTTAAAGAAT
 G S C E Y Q K L Y K L M S T A G R L K N
 2041 GATATCGATCTTACGATAGAGAATGCAAGAGGGGAAGCTGAATTTCTGCTCTGTGG
 D I R S Y D R E C K E G K L N I L S L W
 2101 ATGATGATGGCGGTGTAATGTCAACCAAGAGGAGCCATTGAAGCAATTAAGGGGAT
 M I D G G G N V T K E E A I E A I K G D
 2161 TTTGAGAGGGGATAAGAGAGCTGCTGGGGTTAGTTTGCAGGAGAACACTACAATTTCCA
 F E R A I R E L L G L V L Q E N T T I P
 2221 AGAGCTTGAAGGATTTGTTCTGGAATATGATGCCATTTGGAATCTATTTTACATGAGAA
 R A C K D L F F W K L M S I V N L F Y M E
 2281 GATGATGGGTACACTTCAAAATAGGTTGATGAACACTGTAAAAGCCATGTTGAACAACCC
 D D G Y T S N R L M N T V K A M F E Q P
 2341 ATGGATCTGGATGCACTATTGAACAAATCAACGAACAACAACGAAATAGTTGTAGTGG
 M D L D A L L N K *
 2401 GAAGCAGACGCCACCTATTCAGTCTCTCTCTGATGTCAGATGTCTATTGCTTTCTCAT
 2461 TGAGGAAATGGCAATTAACATTTTATGGAAACATTTCATGTTAAATTGAGACAGTCT
 2521 G

図2-5 pCmKB-1のcDNAインサートの塩基配列、および予想されるアミノ酸配列

精製タンパク質から得られた部分アミノ酸配列を四角で囲った。抗体調製に用いたアミノ酸配列には影をつけた。0.45 kbのPCR断片を得るのに用いたプライマーの領域を矢印で示した。RACE法に用いたプライマー (P1, P2) を破線の矢印で示した。停止コドンは*で示した。poly(A)付加シグナルと予想される配列を下線で示した。

KSB (*Cucurbita maxima* L.)

MYLGRF[■]IGVARFAA[■]SSSSSSA[■]SLFPGVDV[■]TTT[■]RTGALHFEET[■]KERIKKLF[■]FDK

KSA (*Arabidopsis thaliana* L.)

MSLQYHVLN[■]TPST[■]TF[■]LSST[■]K[■]WT[■]SS[■]FL[■]IT[■]SS[■]PLNVARDK[■]RR[■]CS[■]ITHC[■]KLRT[■]Q[■]EYIN[■]-
 SQEVQ[■]HDLPLI[■]HEWQLQGEDAP[■]QIS[■]VGS[■]SN[■]NAFKEAVK[■]SVK[■]ITLRNL

図2-6 KSA, および KSB の transit peptide と予想されるアミノ酸配列
 セリンまたはスレオニン残基を白抜きで表した。塩基性アミノ酸残基を太字で示した。

2-2-4 大腸菌内での過剰発現

クローニングした cDNA (pCmKB-1) が、実際に KSB をコードするものであるかどうかを検討するために、大腸菌内で過剰発現させ、発現産物の酵素活性を検討した。pCmKB-1 のコード領域を大腸菌の *malE* 遺伝子 (Guan et al., 1987) の下流に繋ぎ、maltose binding protein (MBP) との融合タンパク質 (MBP-KSB) として発現させるためのバクテリを構築した。また、この融合タンパク質の発現は、isopropyl-β-D thiogalactopyranoside (IPTG) 誘導性のプロモーターである、*tac* プロモーター (Amann and Brosius, 1985) によりコントロールされるように設計した (pMAL-KB; 図2-7)。対照 (コントロール) とし

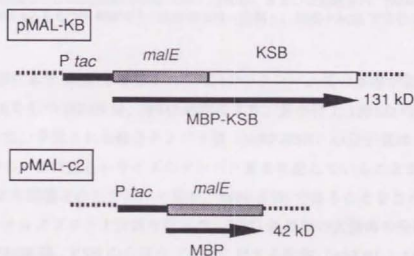


図2-7 大腸菌での発現ベクター

pMAL-KB は、KSB とマルトース結合タンパク質 (MBP) との融合タンパク質 (MBP-KSB) を発現させるために用いた。pMAL-c2 はコントロールとして用いた。

て、MBPのみを発現させるためのプラスミドベクター、pMAL-c2を用いた(図2-7)。まず、期待される分子量のタンパク質が、IPTG処理により誘導されるかを検討した。pMAL-c2またはpMAL-KBを持つ大腸菌(JM109)をIPTG処理前、または処理後4時間目にサンプリングし、全細胞抽出物をSDS-PAGEで分析した(図2-8)。その結果、pMAL-c2をもつ大腸菌の場合は、



図2-8 融合タンパク質の生産

IPTG (isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside) 処理前、あるいは処理後の、pMAL-KB、またはpMAL-c2をもつ大腸菌から全細胞抽出物を調製し、SDS-PAGEで分析した。

IPTG処理によりMBPと予想される42 kDのタンパク質の誘導が認められた。pMAL-KBをもつJM109は、IPTG処理により、見かけ上130 kDのタンパク質を生産した。予想される融合タンパク質(MBP-KSB)の分子量は131 kDであることから、ほぼ正しいサイズのタンパク質を生産していることが示された。IPTGにより誘導されたタンパク質が、MBP-KSBであることをさらに確認するために、イムノブロット分析を行った。IPTG処理後の大腸菌の全細胞抽出物をSDS-PAGE後、KSBの合成ペプチドに対する抗体(AbKB1; Saito et al., 1995)で染色した(図2-9)。その結果、IPTGにより誘導された130 kDのタンパク質がAbKB1と反応した。対照の大腸菌抽出物中には、AbKB1と反応

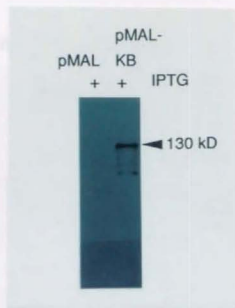


図2-9 イムノブロット分析による融合タンパク質の確認

IPTG (isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside) 処理後の、pMAL、または pMAL-KB をもつ大腸菌の全細胞抽出物を SDS-PAGE で分画後、抗 KSB 抗体 (Saito et al., 1995) を用いてイムノブロット法により検出した。

性を示すタンパク質は認められなかった。以上の結果から、大腸菌内での、MBP-KSB 融合タンパク質の発現が確認された。

クリカボチャの未熟種子胚乳の KSB 活性は、200,000 g の上澄に存在することから、KSB は可溶性タンパク質であると考えられる (Saito et al., 1995)。IPTG 処理 (4 時間, 37°C) により、MBP-KSB を生産している大腸菌をリン酸緩衝液で抽出したところ、12,000 g の上澄には MBP-KSB は分画されなかった。沈殿を SDS で可溶化し、SDS-PAGE で分析したところ、融合タンパク質の殆どは 12,000 g の沈殿画分に存在していることがわかった (図 2-10)。以上の結果は、過剰発現された融合タンパク質が、封入体 (inclusion body) を形成して不溶化している可能性を示唆している。不溶化した MBP-KSB は、0.5% Triton-X100 によっても可溶化されなかった。外来のタンパク質を大腸菌内で安定化させるひとつの方法は、IPTG 処理後の大腸菌を低温で培養することである (Bishai et al., 1987)。pMAL-KB をもつ大腸菌に IPTG 処理 (20 時間, 20°C) の後、12,000 g の上澄画分を調製し、イムノブロット分析を行ったところ、MBP-KSB が検出された。以上の結果から、低温下で誘導した MBP-KSB を用

いて酵素活性の評価を行うことにした。



図2-10 MBP-KSBの可溶性

IPTG 処理前後の大腸菌をリン酸緩衝液で抽出し、12,000 *g* の上澄 (sup.) と沈殿 (pellet) に分離し、SDS-PAGE で分析した。

2-2-5 発現タンパク質の機能解析

KSB 活性の測定は、基本的には Saito et al. (1995) の方法に従って行った。MBP-KSB を含む大腸菌の抽出物を [³H]CPP とインキュベートし、カウレンへの変換を調べた。インキュベーション後、反応液を *n*-ヘキサンで抽出し、シリカゲル薄層クロマトグラフィー (TLC) で分離し、カウレン画分を得た。カウレン画分を、逆相 HPLC で分析したところ、標品の [¹⁴C]カウレンの保持時間に単一の放射性物質のピークが認められた (図2-11)。この保持時間は、コントロールとして行った、[³H]CPP のクリカボチャの粗酵素液による代謝物のそれとも一致した。以上の結果から、MBP-KSB を生産している大腸菌の抽出物は KSB 活性を持つことが示された。この酵素活性が、MBP-KSB に由来することを確かめるために、以下の実験を行った。図2-11の HPLC のクロマトグラムにおいて、検出された放射活性はほとんどカウレンに対応するひとつのピークのみであり、このピークから全放射活性の90%を回収することができた。したがって、以下の実験では、TLC 後のカウレン画分に存在する放射活性 (dpm) を相対的な KSB 活性とした。IPTG 処理前、または処理後 (5 または 20

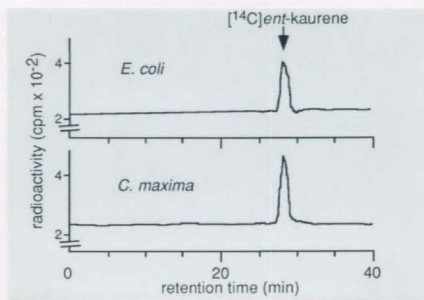


図 2-1-1 ODS-HPLCによる $[^{14}\text{C}]\text{CPP}$ の代謝物の分析

TLC 後のカウレン画分を ODS-HPLC により分析した。"E. coli"; MBP-KSB を含む大腸菌の抽出物。"C. maxima"; クリカボチャの未熟種子胚乳より調製した S 200 (200,000 g supernatant) 画分。

時間) の, pMAL-c2 (コントロールとして用いた), または pMAL-KB をもつ大腸菌の抽出物中の KSB 活性を測定した (図 2-1-2)。pMAL-c2 をもつ大腸菌は, 有意な KSB 活性を示さなかった。IPTG 処理後の pMAL-KB をもつ大腸菌は有意な KSB 活性を示し, 相対的な活性は, イムノブロットにより分析した MBP-KSB の発現量とよい相関が認められた (図 2-1-2)。以上の結果は, 抽出物中の KSB 活性が, 融合タンパク質, MBP-KSB に由来していることを示している。

2-1-1 で得られた PCR 産物の塩基配列から予想されるアミノ酸配列は, KSA と極めて高い相同性を示した。また, 後で詳しく述べるように, pCmKB-1 の予想される全アミノ酸配列をデータベースで検索すると, 最も相同性の高いタンパク質は, KSA であった。以上のことから, MBP-KSB が, KSB 活性のみを持ち, KSA 活性を持たないことを確認するための実験を行った。MBP-KSB が KSB 活性を持つことが示されたので (図 2-1-1, 1-2), KSA 活性の測定は, KSB 活性 (GGPP からカウレンへの変換活性) により評価するこ

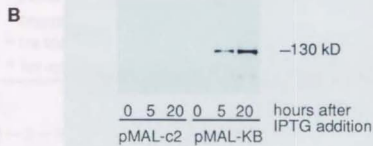
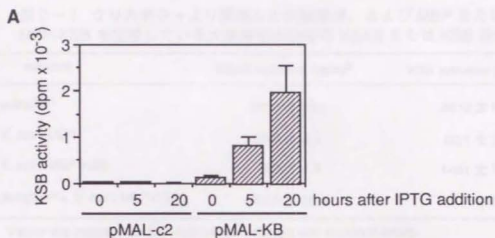


図2-1-2 pMAL-KB, または pMAL をもつ大腸菌の抽出物の KSB 活性
 IPTG 処理前 (0h), 処理後 (5, 10 h) の pMAL-KB, または pMAL をもつ大腸菌の抽出物の
 KSB 活性 (A), およびイムノブロットにより分析した MBP-KSB の発現 (B) を示した。

ととした。表2-1に示したように、MBP-KSBを含む大腸菌の抽出物は、KSAB活性を示さなかった。同じ抽出物は、有意なKSB活性を示した。また、クリカボチャ未熟種子胚乳より調製した粗酵素液は、明瞭なKSAB活性を示し、大腸菌の抽出物を与えてもKSAB活性に対する有意な影響は認められなかった。この結果は、少なくとも、大腸菌の抽出物由来の阻害的な影響のためにKSAB活性が検出されないのではないことを示している。以上のように、MBP-KSB融合タンパク質は、KSA活性を示さなかった。

以上の結果から、pCmKB-1のインサートcDNAは、KSBをコードするものであると結論した。

表2-1 クリカボチャより調製した粗酵素液、および MBP または MBP-KSB を生産している大腸菌抽出物中の KSAB または KSB 活性

extracts	KSAB activities (dpm) ^a	KSB activities (dpm) ^b
pumpkin ^c	5899 ± 252	2813 ± 94.3
<i>E. coli</i> / MBP	20.3 ± 2.0	22.1 ± 3.2
<i>E. coli</i> / MBP-KSB	18.3 ± 1.8	1461 ± 72.4
pumpkin ^c + <i>E. coli</i> / MBP-KSB	5923 ± 68.8	ND ^d

Values are means from four independent assays with standard errors

^a Overall enzymatic activity converting GGPP to *ent*-kaurene

^b Enzymatic activity converting CPP to *ent*-kaurene

^c The 200,000 g supernatant fraction prepared from pumpkin endosperm (Saito et al. 1995)

^d Not determined

2-2-6 ゲノムサザン解析

pCmKB-1 の cDNA インサートをプローブとして、制限酵素処理したクリカボチャのゲノム DNA に対してハイブリダイゼーションを行った。High stringency 条件で行った場合、それぞれの制限酵素処理に関して、一つのバンドのみが検出されたことから、pCmKB-1 をコードする遺伝子は、ハプロイドあたり 1 コピー存在することが示唆された (図 2-13)。Low stringency 条件で行っても、特異的にハイブリダイズする新たなバンドは検出されなかった (図 2-13)。同じ low stringency 条件で、クリカボチャの GA 20-酸化酵素 (Lange et al., 1994) の cDNA をプローブとして用いたところ、2 または 3 コピーに相当すると予想されるいくつかのバンドが検出された。

2-2-7 遺伝子発現の分布

pCmKB-1 の cDNA インサートをプローブとして、ノーザン解析を行った。まずはじめに、クリカボチャの幼植物体における KSB の mRNA の分布を調べた。同時に、既に同じくクリカボチャからクローニングされている GA 20-酸



図 2-1-3 クリカボチャのゲノムサザン解析

クリカボチャの DNA を制限酵素で切断後、pCmKB-1 のインサート cDNA をプローブとしてサザン解析を行った。ハイブリダイゼーション後のメンブレンを、最終的に 68°C、0.1 x SSC (High)、55°C、2 x SSC (Low) で洗浄した。B ; BamHI, E ; EcoRI, H ; HindIII

化酵素 (Lange et al., 1994) の発現状況も調べ、KSB のそれと比較した。GA 20-酸化酵素は、GA_{12/33} の 20 位のメチル基を数段階酸化する酵素で、GA 生合成の後のほうの段階を触媒する。ただし、クリカボチャより単離された GA 20-酸化酵素は、GA_{12/33} をトリカルボン酸である GA_{25/17} に変換する (Lange et al., 1994) ことから、活性型 GA に向かう生合成経路とは異なる。KSB の mRNA は、調べた全ての組織で検出された (図 2-1-4)。発現量は、未熟種子、茎頂を含む若い葉など、若く成長している組織で多かった。逆に、成熟した子葉では、非常に発現量が低かった。また、根においても発現が認められた。一方、GA 20-酸化酵素の mRNA は、未熟種子でのみ検出された。栄養組織での発現量は、ノーザン解析による検出限界以下であった (図 2-1-4)。

次に、発芽過程における KSB の遺伝子発現の変化を調べた (図 2-1-5)。子葉においては、登熟期と発芽過程で顕著な発現量の差が認められたが、発芽から初期生長の過程においては、ほぼ一定のレベルを維持していた。同様に、胚軸においても顕著な発現量の変化は認められなかった。

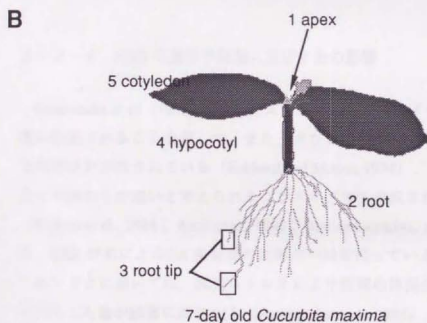
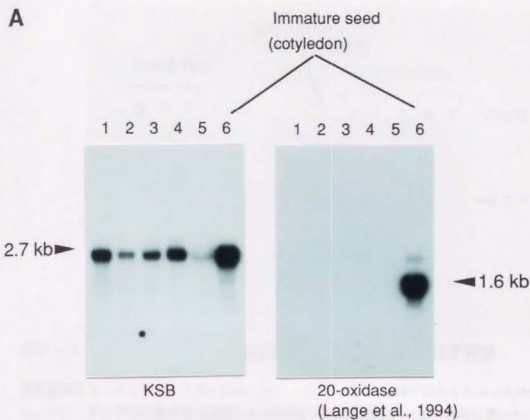


図 2-1 4 ノーザン解析：クリカボチャ幼植物体における KSB、
および GA 20-酸化酵素の発現

クリカボチャの幼植物体を 1；莖頂を含む未熟葉，2；根（全体），3；根端，4；胚軸，5；子葉，に分け，それぞれから poly(A)⁺RNA 4 μg を調製した。また，未熟種子中の子葉からも同様に poly(A)⁺RNA を調製した。これらのサンプルを用いて，pCmKB-1 の cDNA インサートをプローブとしてノーザン解析を行った（A；左）。プローブの stripping 後，カボチャの GA 20-酸化酵素（Lange et al., 1994）をプローブとしてハイブリダイゼーションを行った（A；右）。（B）はカボチャの幼植物体（吸水後 7 日目）のスケッチを示す。

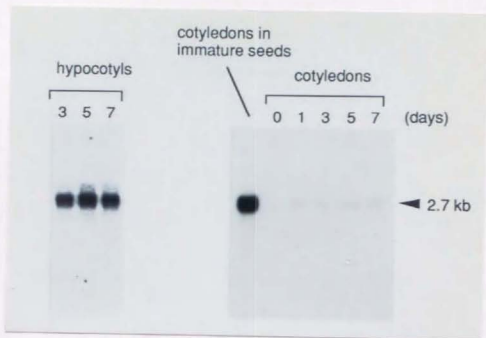


図2-15 クリカボチャの発芽過程におけるKSBの遺伝子発現

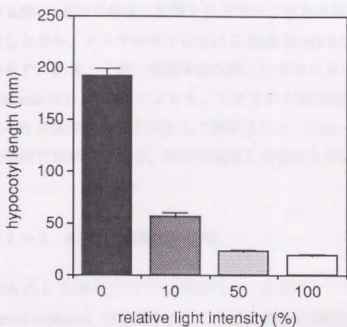
発芽過程のクリカボチャを子葉と胚軸に分け(0, 1日目は胚軸が認められないため全体を子葉とした), それぞれの部分から調製した poly(A)⁺RNA 4 μg をノーザン解析に用いた。"days" は吸水後の日数を示す。ここで用いた栽培条件では, 吸水後2日目に発芽が認められる。

2-2-8 KSBの遺伝子発現に及ぼす光の影響

Gawronska et al. (1995) は, 弱光ストレスによりエンドウのGA 生合成が顕著に促進されることを示した。また, カウレンの生合成が, 光により制御される可能性が示唆されている (Ecklund and Moore, 1974)。さらに, カウレンは光との関わりが深いと考えられるプラスチドで生合成されている可能性が高い (Railton et al., 1984; Aach et al., 1995; Sun and Kamiya, 1994)。以上のことから, KSB が光によるGA 生合成の制御の一端を担っていることが予想される。

エンドウにおいては, 弱光ストレスにより節間の伸長生長が促進され, 同時に内生GA 量が顕著に増加する (Gawronska et al., 1995)。まずはじめに, クリカボチャにおいて, 弱光による同様の伸長促進が認められるかどうかを調べた。クリカボチャは, bush type のため, エンドウとは, 栄養生長期の形態が非常に異なる。そこで, クリカボチャの場合は胚軸の伸長に注目した。エンドウの節間伸長と同様に, クリカボチャのはい軸の伸長は, 弱光により促進された (図2-16A)。同様の条件で栽培したクリカボチャの幼植物体を用いて, 光強

A



B

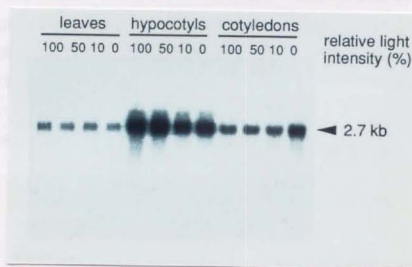


図2-16 クリカボチャの胚軸伸長とKSBの遺伝子発現に及ぼす光強度の影響

(A) クリカボチャを $220 \mu\text{E} \times \text{m}^{-2} \times \text{s}^{-1}$ の白色連続光下で7日間栽培し(100%)、胚軸の長さを測定した。0, 10, 50%は、それぞれ暗所、 $22 \mu\text{E} \times \text{m}^{-2} \times \text{s}^{-1}$ 、 $110 \mu\text{E} \times \text{m}^{-2} \times \text{s}^{-1}$ で栽培した場合である。

(B) 異なる光強度で栽培したカボチャの幼植物体の地上部を、茎頂を含む未熟葉(leaves)、胚軸(hypocotyls)、子葉(cotyledons)に分け、それぞれ poly(A)⁺ RNA を調製し、pCmKB-1 の cDNA インサートをプローブとしてノーザン解析を行った。未熟葉、胚軸、子葉から調製した、それぞれ、0.25, 2, 6 μg の poly(A)⁺ RNA をノーザン解析に用いた。

度がKSBの遺伝子発現に影響を及ぼすかどうかを調べた(図2-16B)。しかしながら、クリカボチャにおけるKSBのmRNA量は、光条件のいかんに関わらず、胚軸、子葉、茎頂を含む葉、いずれにおいてもほぼ一定であった。Gawronska et al., (1995)によると、エンドウを完全暗所で栽培した場合には、逆にGA合成は明条件と比較して抑制される。KSBの転写レベルでの発現量は、完全暗所で栽培した場合、明所で栽培した場合とでほとんど差が認められなかった。

2-2-9 KSBの細胞内局在性

KSBのN末端の55アミノ酸配列は、典型的なプラスチドへの移行シグナル(transit peptides)の特徴を有していた。KSBの細胞内局在性に関する実験的な証拠を得るために、クリカボチャの未熟葉から葉緑体を調製し、抗KSB抗体(AbKB1)を用いたイムノブロット法により、KSBタンパク質の検出を試みた。未熟葉より調製した全細胞抽出物中には、抗KSB抗体と反応性を示すタンパク質は、検出されなかった。葉緑体を単離した後、さらに可溶性画分(ストロマ)と膜画分(チラコイド、および包膜)に分画して調べたところ、76 kDのタンパク質が、膜画分に検出された(図2-17)。

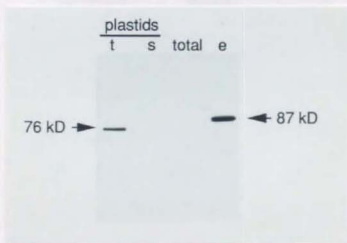


図2-17 抗KSB抗体を用いたイムノブロット分析

クリカボチャの若い葉より単離したプラスチド(s:stroma, t:thylakoids)、若い葉の全細胞抽出物(t)、および胚乳より精製したKSB(e)をSDS-PAGEにより分画後、抗KSB抗体(Saito et al., 1995)を用いたイムノブロット法により分析した。

シロイヌナズナの KSA は、N 末端にプラスチドへの移行シグナル (transit peptide) をもち、試験管内翻訳 (in vitro translation) により合成されたタンパク質は、エンドウの単離葉緑体に試験管内で取り込まれた (Sun and Kamiya, 1994)。クリカボチャの KSB も同様の移行シグナル様の配列をもつことから、エンドウの単離葉緑体を用いて、同様の実験を行った。

はじめに、試験管内翻訳の条件検討を行った。pCmKB-1 は、試験管内転写 (in vitro transcription) のプロモーターとして使用可能な T3, T7 プロモーターをクローニングサイトの両端にもつ、pBluescript SK (-) を用いてクローニングされた (図 2-18)。そこで、KSB の cDNA の上流に存在する T3 プロモ-



図 2-18 試験管内転写・翻訳反応に用いたプラスミド、および翻訳産物の SDS-PAGE

(A) ; プラスミドの構造

(B) ; (A) のプラスミドを鋳型として試験管内転写・翻訳反応を [^{35}S]メチオニンの存在下で行い、反応液の一部を SDS-PAGE により分画後、オートラジオグラフィーにより検出した。"-" は鋳型を含まないコントロール、"+" は (A) のプラスミドを鋳型として用いた場合を示す。

ターを利用して、試験管内転写を行い、続けて ^{35}S メチオニンの存在下、試験管内翻訳を行った。翻訳産物を SDS-PAGE で分析したところ、予想される分子量 (89 kD) とほぼ等しい、見かけ上 87 kD のバンドが観察された (図 2-18)。しかしながら、ほぼ、同等のシグナル強度で多くのバンドが認められた。これらのバンドは、RNA を加えないコントロールでは認められなかったことから、KSB に由来するペプチド断片であると考えた。これらのバンドが 87 kD のタンパク質 (全長の KSB と考えられる) の分解物である可能性を検討するため、試験管内翻訳の反応時間を変化させてバンドパターンが変化するかどうかを調べた。しかし、反応時間のいかに関わらず、ほぼ同一のバンドパターンが認められた。この結果から、翻訳産物が単一のバンドとして認められないのは、翻訳後にプロテアーゼ等による分解を受けた結果ではなく、タンパク質合成が複数の開始コドンから開始しているためであると考えた。以上の結果から、KSB タンパク質の翻訳開始点の ATG コドンの翻訳開始活性を人為的に強めることにより、試験管内翻訳による翻訳産物の改善を試みた。

Tobacco etch virus (TEV) の 5' 非翻訳領域 (5' nontranslated region; NTR) は、translational enhancer として機能することが知られている (Restrepo et al., 1990; Sun and Kamiya, 1994)。KSB の開始コドン周辺塩基配列を PCR により改変し、TEV-NTR に繋いだプラスミドベクターを構築した (pKB32; 図 2-18)。pKB32 を用いて、試験管内翻訳を行ったところ、翻訳産物は、SDS-PAGE 上で 87 kD のほぼ単一バンドを示した。試験管内翻訳により合成された KSB は、クリカボチャの胚乳において抗 KSB 抗体 (AbKB1) により検出されるタンパク質 (87 kD) と SDS-PAGE 上での見かけの分子量が同じであった (注; Saito et al., 1995 は、クリカボチャ胚乳において、SDS-PAGE 上で 81 kD のタンパク質を検出しているが、本研究では、87 kD という値が得られた)。

改善された翻訳産物を用いて、KSB が、エンドウの単離葉緑体に試験管内で取り込まれるかどうかを調べた。葉緑体への取り込み実験の陽性コントロールとして、既にこの実験系において葉緑体に取り込まれることが報告されているシロイヌナズナの KSA を用いた (Sun and Kamiya, 1994)。試験管内翻訳により合成された、シロイヌナズナの KSA に関しては、Sun and Kamiya (1994) に報告されている結果と同じ結果が得られた (図 2-19)。すなわち、86 kD

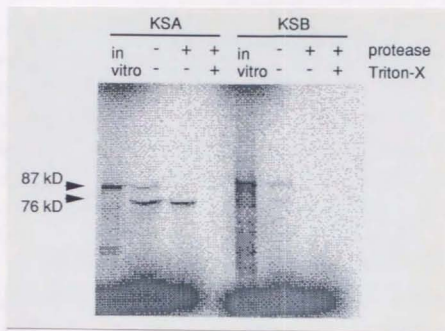


図 2-19 エンドウの単離葉緑体への取り込み実験

シロイヌナズナの KSA ("KSA"), クリカボチャの KSB ("KSB") をそれぞれ試験管内翻訳合成し、エンドウの単離葉緑体とインキュベート後、Triton-X の存在、あるいは非存在下でプロテアーゼ処理し、SDS-PAGE で分析した。"in vitro" は、葉緑体とインキュベートする前の試験管内翻訳産物を示す。

の KSA をエンドウの単離葉緑体とインキュベートすると、76 kD のタンパク質が検出された。76 kD のタンパク質は、外から与えたプロテアーゼによる分解を受けなかった。プロテアーゼ処理を葉緑体の膜構造を破壊するような濃度の界面活性剤の存在下で行うと、76 kD のタンパク質は、完全に分解された。以上の結果は、試験管内翻訳により合成された 86 kD の KSA が、葉緑体に取り込まれ、76 kD のタンパク質に限定分解 (processing) を受けたことを示唆している。同様の実験を KSB に関して行ったが、葉緑体に取り込まれたタンパク質を検出することはできなかった (図 2-19)。以上のように、in vitro での葉緑体への取り込み実験からは、KSB の細胞内局在性に関する情報を得ることはできなかった。

2-2-10 他のテルペン環化酵素との一次構造の比較

cDNA の塩基配列より予想される KSB の一次構造を、既にクローニングさ

れている他のテルペン環化酵素のそれと比較した。KSBのアミノ酸配列は、トウモロコシのカスベン合成酵素 (casbene synthase, 以下 CS; Mau and West, 1994), タバコ (*Nicotiana tabacum*) のアリストロケン合成酵素 (5-*epi*-aristolochene synthase, 以下 EAS; Facchini and Chappell, 1992), ミント (*Mentha spicata*) のリモネン合成酵素 (limonene synthase, 以下 LS; Colby et al., 1993), シロイヌナズナの KSA (Sun and Kamiya, 1994), トウモロコシの *An1* 遺伝子 (KSAをコードすると考えられている; Bensen et al., 1995) と同一性を示した (表2-2)。

表2-2 KSBのアミノ酸配列の他のテルペン環化酵素との同一性

enzyme	origin	identity (%)	similarity (%)
casbene synthase (CS)	<i>Ricinus communis</i>	23.5	48.3
5- <i>epi</i> -aristolochene synthase (EAS)	<i>Nicotiana tabacum</i>	20.7	46.7
limonene synthase (LS)	<i>Mentha spicata</i>	23.3	47.8
<i>ent</i> -kaurene synthase A (KSA)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	27.1	50.6

identity, similarity は、GCG プログラムの GAP を用いて算出した。

次に、GCGプログラムの PILEUP を用いて、これらのテルペン環化酵素のアミノ酸配列の sequence alignment を作製した (図2-20)。

DDXXD motif (X は任意のアミノ酸残基を示す) は、テルペン環化酵素において、ピロリン酸基との結合に関与していると考えられている配列である

(Mau and West, 1994; McGarvey and Croteau, 1995)。この motif は、テルペン環化酵素だけでなく、プレニル転移酵素 (GGPP 合成酵素など) にも存在する (Attucci et al., 1995; Scolnik and Bartley, 1994)。KSB には、DDXXD motif が存在していた (図2-20; アミノ酸 603 から 608)。また、KSB における

1 50
KSB M YLGGPTGVAR FAASSSSSS
KSA MSLQYVHMS IPSTTFLSST KTTISSSFLT IGGSPINVAR DKSRGSHHC

51 100
KSB ASL..... FPGVDV TTTKG... ALHFKTKER
KSA SKLRTOEYIN SQEVQHDLEL IHEWQIQGE DAPQISVGSN SNAFKCAVKS

101 150
KSB LKCLDKV.. SLVSAYDT AWVAWVSPN SIMGHEPCC INWLDQQA
KSA VKTILRNLD GKITISAYDT ANWALIDAGD ..KHEPESA VSHIAENQLS

151 200
KSB DGSWGLLRND QILMOANFLS TLACVILNFR WNHGHRMS ALDHRKSNIA
KSA DGSWG...DAY LFSYHFRIN TLACVAVRS WNLFFHQCN GITFFRNTG

201 250
CS MALPSAA MQSNPEKINL FHRSSLPPT SLEYGNRFP
LS MALKV LSVATQMAIP SNLITCLQPS HFKSSPKLLS
KSB SADDEN QAS FVGF DILFFG MIAKNDNL NGLAPTNV ALWRKRELL
KSA KLEENBEHM FVGEVAVFS LLTARGINI DWITQSPVLR DIYAKRELL

251 300
CS FFSSSAKSHF KKTQACLSS TTHQEVRELA YFPTWGNR FA.SLITNS
EAS MACAAVAN YEZEIVRVA DFGSGLWQDQ FL.SFIDWQ
LS STNSSRPRRL RUYCSSQILT E...RSG WYBGRDVA FQISLLDYK
KSB .RGRSNSEG GQAYLAYVE GIGELQWDM VMQYGRNGS LFNPSSTAA
KSA TRIPKEIMK IPTTLLASLE GQRLDWEK LMLQSQGS FIFPSSTAF

301 350
CS EFES..YDER VIVLKKVKD ILLSST... DSVETVILI DLLRGLVSY
EAS VAEKYIYAGE IEALKEQTRS MLLATGR...KIADTINLI DIERLGLSY
LS EDKHYIRASE LVTVK... MELEKET...DQIROLELI DLQRMGLSD
KSB AFMRNDNDC FDLRLSLQK FQGSVPTYP LDYARLHMV DSQKFGIAR
KSA AFMOTRDNCK LEYLRNVRK FNGQVNVFR VDLFEHIVV DLQRLGISR

351 400
CS HFENDIEELL SKI..FNSQ...FDLVEKE CDLYTAIVF RVFRGHFKM
EAS HFEEKIDEIL DQI..YNN...SN...C NDLCTALQF RLRRGHGNI
LS HFQNEFKEIL SSI..YLDHM YKNFPFKRE RDLYSTLAF RLRRGHGVV
KSB HFKEIRSVL DETYRWQGG EE....NIF LDASTCAMA FMLRGGYDV
KSA YFEKIEKCL DYVHRWTDN GICWARGSHV QDIDTAMAF RLRRGHGVV

401 450
CS SSVFSPKFD SDG..FKES LRGDARMLS LFEASHLSVH G.EDILEAF
EAS SFEIFSPFD ENG..FKES LADVGLLNL LYASHVRTH A.DDILEAF
LS AGEVTSFPK EGG..EFKES LSVDRGLLO LYASFLITE G.ETLIESAR
KSB SDQLTGF S EDLFWKLAG YACRQASLE LYASQITH PDESVELENH
KSA SADVFNFEK EGEFFCVGQ SWAVTOMFN LYASQ.LAF FPRELFNKX

451 500
CS AFTKQYLQSS AVE..LFPN.....IKRHI TNALQPPHS GVRLEARFT
EAS AFTIHLESA APH..LKSP.....LRQV THALEQLHK GVRVETRF
LS EFATHELEK VNEGVDGD.....LLTRI AYSLEPLRW RIKRNPAPW
KSB SWSRFLKHG LSSDSVNSDR TD.SVKQEA VNALEFPYA TLERLISKRA
KSA EFSYNILEX REREELDKW IIMKDLPEI GFALEIPYA SLRVRTRFY

(図2-20 次頁へ続く)

```

501                               550
CS IDLYEADIEC R.....NETLLEF ANLDYNRVQL LHQQLCGGFS
EAS ISSIYKDEQS K.....NNVLLRF AGLDENLQW LHQQLAQGVS
LS IESYKRRPD. M.....NEVYVLEL AILDENYVA QFSELEKSEF
KSB MESSYGD. IV RISESPYACL NPSHQGTELE AVEDNTELR THLEKLESLQ
KSA IDQYGGENDV WIGKTLRMP TVRNNGTLEL ASQDNRVQA QHLEWDIFQ

551                               600
CS KWKSDINLAS DIPYARDMA EIFFNAVAVY FEPYVHTRM IIAKVLLIS
EAS KWKSDIDFVT TLPYARDRV ECFNVALQVY FEPYQSGARV MIAVITSMIS
LS KWKSNTEGVE KLPFARCLIV ECFNVTGII EPQKASARI MCKGNALIT
KSB KWKVWKL. D ELKFFRHLG YCFYAAATL TDFEHDARI ANAQKGVLTQ
KSA KWKVENL. S EWGVRRELL ECFYLAATI FESERSHERM WKAKSSVLAK

601                               650
CS LDDTI. DAY ATMEETHILA EAVARWDMSC LKLEFD. YMK VIYKILNIF
EAS LVDDTF. DAY GTVKELEAYT DAIRWQDINE IDRLFD. YMK ISYKALIDLX
LS VDDTY. DAY GTLELELQFT DLIRWQDINS IDGLFD. YMQ LCFIALNSFV
KSB WDDTY. DGG GSKSELDNLI ELVEKWDPDG EVCYKSDIVE IVPFALRSTV
KSA AISSSFGESS DSRRSFSDQF HEYIANARRS DHHFNDRNMR LD.....RPGS

651                               700
CS SEPEKELTAE GKSYSVKYGR EAFQELVRGY YLEAVWDEG KIPSFDDVLY
EAS KDYEKELSSA GRSHIVCHRI ERKESVWRNY NVESTWIEG YMPFVSEKLS
LS DDTSYDVMKE KGVNVIPIYR QSWDLAKYI MVEASWYGG HPSLEKYLE
KSB CEIGRRALVW QGRSVGMNVI DGNLALKVM RKEARSTNK VPSMGEYME
KSA VQASRLAGVL IG.....TLN QMSDFLPMHR GRDWN...NL LYLSWGDVME

701                               750
CS NGSMTTGLEL. VSTASEMVV GELTICLNEQV MLETRKELSY ASCAFRLVN
EAS NALATTTTTY. LATTSYLGM KSATE. GQFE WLEKMKILE ASVITKVID
LS NSWQISGDC. MLTHIFFRV TDSPTKETVD SLYKHVELVR NSSFVRLAD
KSB ..QAHVFSAL GHIILPMLFF VQKLEKSEMI GCSQYKLYK IMSTAGRLGN
KSA KWKLYGEGE GEIMVRMIL MK.....NDLIT NFFTHTRFVR LAEINRI..

751                               800
CS DLISSHVTEQG RGHVAS. CID CYNMGHGVSK DEAVKILQRM ATDCWKEINE
EAS DIATYEVKRS RQGIAT. GIE CMRDYGTST KEAMAKFQNM AETAWKDINE
LS DLGTSVEEVS RGVDF. SLQ CYSMDYNASE KEARKHVKWL IAEVWKKNSA
KSB DIRSYDRECK EKCLNLSLW MIDGGGVNFK KEALAEIKGD FERALELLIG
KSA ...CLPQVYL KARRN..... DEKERTKS. MERENKRVVE

801                               850
CS ECM.RQSQVS VGHLMRIVNL ARLTDSVSKY G.DGYTDSQQ .LQFVKGLF
EAS GLL.RPFPVS TEFLLPILNL ARIVEVYTIH NLDGYTHPEK VIKPHIINLL
LS ERVSKDSPFG KDFIGCAVDL GRMAQIAY. H NGDGHGTORP LIHQMIRITL
KSB IWLQNTTPE RACKDLFWKL MSIVNLVYME DDGYTSNR... IANTVKAMF
KSA LALSSEDTE. ...RDVSITF LDVAKAFYTF ..ALOGDH... LQTHISRVL

851                               862
CS VDPISI
EAS VDSIKI
LS FEPPA
KSB EQPMOLEALL NK
KSA FQKV

```

図 2-20 テルベン環化酵素の sequence alignment

KSBのアミノ酸配列と、他の酵素においてKSBと同一のアミノ酸を太字で示した。KSAとKSBの間でのみ相同性を示す領域(アミノ酸残基112から250)において、両者で一致しているアミノ酸を白抜きで示した。DDXXD motif は棒で示した。CS; casbene synthase, EAS; 5-*epi*-aristolochene synthase, LS; limonene synthase, KSA; *ent*-kaurene synthase A from *Arabidopsis*. GCG program of the PILEUP を用いて作成した。"." は alignment のために導入した dot を示す。

DDXXD motif の位置は, CS, EAS, LS における位置と完全に一致していた。

KSB のアミノ酸配列は, GenBank データベースに登録されている全てのアミノ酸シーケンスのなかで, KSA と最も相関性が高い。他のテルペン環化酵素よりも KSA が高い相関性を示すのは, アミノ酸 112 から 250 までの KSA と KSB でのみ良く保存されている領域 (37.3% identity, 63.4% similarity) が存在することによる (図 2-20)。この領域に相当する配列は, CS, EAS, LS には存在しない。一方, KSA には DDXXD motif は存在しない (Sun and Kamiya, 1994; Bensen et al., 1995)。また, KSB の DDXXD motif 周辺, すなわち alignment におけるアミノ酸残基 603 から 627 までの配列は, CS, EAS, LS における対応する領域とある程度の相関性を示すが (7 から 10 アミノ酸が保存されている), KSA におけるこの部分のアミノ酸配列とは相関性を示さない (図 2-20)。

以上のように, KSB のアミノ酸配列には, KSA と特に相関性を示す領域と, 逆に KSA とは相関性をまったく示さないが, 他のテルペン環化酵素との間でよく保存されている領域が存在する。以上の内容を模式的に示した (図 2-21)。このように, KSB の一次構造は, KSA と他のテルペン環化酵素の一次構造の中間的な性質を持っているといえる。

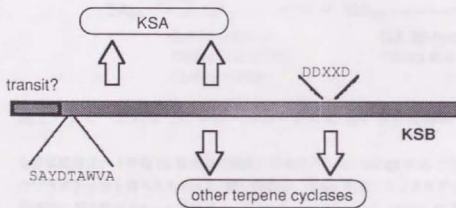


図 2-21 KSB と他のテルペン環化酵素との相関性

相関性の高い領域を矢印で示した。“other terpene cyclases”は, casbene synthase, 5-*epi*-aristolochene synthase, limonene synthase を指す。“SAYDTAWVA”は, KSA と KSB で保存されているアミノ酸配列の一部を示す。

2-3 考察

2-3-1 ジベレリン 生合成酵素のクローニングと機能解析

序論において述べたように、本研究の進行とはほぼ並行したかたちで、いくつかの GA 生合成酵素の遺伝子（または cDNA）がクローニングされた（図 2-22）。これらのいくつかは、GA 生合成経路に欠陥をもつ突然変異体から、分子遺伝学的手法を用いて単離された。

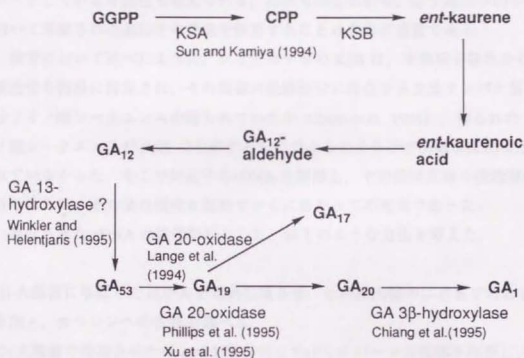


図 2-22 これまでにクローニングされた GA 生合成酵素

生合成経路は、「早期 13 位水酸化経路」のみを示した。Lange et al. (1994) によりクリカボチャから得られた GA 20-酸化酵素は、GA₅₃ を主にトリカルボン酸であり生理的に不活性な GA₁₇ へ変換する。Winkler and Helentjaris (1995) により単離されたトウモロコシの D3 遺伝子は、カウレン以降 GA₅₃ 以前のいずれかの生合成酵素をコードしていると考えられるが機能は不明である（ここでは GA 13-hydroxylase? としてある）。

このような方法により単離された遺伝子の機能は、もとの突然変異体において GA 生合成のどの段階がブロックされているかを生理・生化学的なアプローチ

から調べることによりある程度推察される場合もある。例えば、シロイヌナズナの *ga1* 突然変異体は、カウレンに対する反応性が野生型と変わらないこと、セルフリー系において [^{14}C] メバロン酸から [^{14}C] カウレンへの変換活性が野生型と比較して減少していることなどから、KSA あるいは KSB が欠損していると予想されていた (Barendse et al., 1986)。しかしながら、このようなアプローチからのみではブロックされている生合成段階を同定することが困難な場合もある。また、これらの突然変異の原因遺伝子が必ずしも生合成酵素をコードしているとは限らず、生合成酵素の発現・輸送などを調節しているタンパク質をコードしている可能性も考えられる。これらのことから、分子遺伝学的手法を用いて単離された遺伝子の機能を解析することは非常に重要である。

緒言において述べたように、クリカボチャの KSB は、未熟種子胚乳から酵素活性を指標に精製され、その精製の最終画分に存在する主要タンパク質の部分アミノ酸シーケンスが得られていたが (Saito et al., 1995)、得られたアミノ酸シーケンスが KSB に由来するものであることを示す明確な証拠は示されていなかった。そこで対応する cDNA を単離し、その発現産物の機能解析を行うことは、その後の研究を進めていくにあたって不可欠であった。

単離された cDNA の機能解析として、以下のような方法を考えた。

- (1) 大腸菌に単離した cDNA を過剰発現させ、その抽出物中に基質である CPP を加え、カウレンへの変換を調べる。
- (2) 大腸菌で発現させたタンパク質に対してポリクローナル抗体を作製し、クリカボチャの KSB 活性に影響を与えるかどうかを調べる。また、クリカボチャの KSB 活性が、免疫沈降操作により減少するかどうかを調べる。
- (3) KSB が欠損していると考えられている、シロイヌナズナの *ga2* 突然変異体において単離した cDNA を発現させ、矮性が回復するかどうかを観察する。また、鞘 (siliques) より調製したセルフリー系において KSB 活性が認められるかどうかを調べる (*ga2* 変異体では、鞘における KSB 活性が欠損している; Zeevaert and Talon, 1992)。

実際には、方法 (1) を用いることより、単離した cDNA が KSB をコードする

ことが証明できた(2-2-5)。方法(2)は、Saito et al. (1995) によって、合成ペプチドに対する抗体 (AbKB1) を用いて行われた。しかしながら、AbKB1 は、native な KSB を認識しないために成功しなかった。一方、大腸菌で発現させた KSB に対するポリクローナル抗体は、native な KSB を認識する可能性が高いと考えられる。この抗体の調製は現在進行中である。方法(3)を用いた場合、遺伝子導入により期待される表現型や KSB 活性の回復が認められても、厳密には導入された遺伝子が KSB であることの証明とはならない。すなわち、GA2 遺伝子が KSB をコードしていることが証明されていないことと、植物細胞においては KSB の発現や輸送等の機構が備わっていると考えられることから、期待される表現型が遺伝子導入により得られても、導入された遺伝子が KSB の発現や輸送等を調節するタンパク質をコードする可能性が否定できない。しかし、期待される結果が得られれば、発現させた cDNA が KSB をコードすることが強く示唆される。方法(3)は、KSB が大腸菌内でうまく発現しない場合を想定して計画された。この実験は、現在進行中であり(米国、デューク大、Tai-ping Sun 博士との共同研究)、方法(1)により KSB をコードすることが示された cDNA を発現させることにより *ga2* 突然変異体の表現型が回復するかどうか興味深い。

2-3-2 カウレン合成酵素 B とジベレリン 20-酸化酵素の遺伝子発現

KSB の mRNA 量は、若く成長している組織で多い傾向が認められた。成熟した子葉では、発現量は非常に少なかった。未熟種子中の子葉においては、調べた範囲では最も発現量が多く、cDNA ライブラリーの材料としてクローニングに有利な材料であったことが示された。栄養生長期における若い組織で発現量が多かったことは、これまでに調べられたカウレン合成活性の分布と一致する。すなわち、エンドウの栄養組織から調製したセルフリー系は、最も若い節間から調製した場合に最もカウレン合成活性 ($[^{14}\text{C}]$ メバロン酸から $[^{14}\text{C}]$ カウレンへの変換活性) が高く (Chung and Coolbaugh, 1986)、また、ホウレンソウにおいても、若い組織においてカウレン合成能(カウレンの酸化段階を阻害する生合成阻害剤を与えた植物におけるカウレンの内生量)が高かった

(Zeevaart and Gage, 1993) .

発現量の差はあるものの、KSBのmRNAはクリカボチャの未熟種子だけでなく、幼植物体の調べた器官全てにおいて検出された。一方、クリカボチャの胚乳から単離されたGA 20-酸化酵素 (Lange et al., 1994) のmRNAは、未熟種子においてのみ検出され、栄養組織での発現量は、ノーザン解析の検出限界以下であった。Lange et al. (1994) によりクリカボチャから単離されたGA 20-酸化酵素は、 $GA_{12/53}$ を主にトリカルボン酸である $GA_{25/17}$ に変換する(図2-23)。 $GA_{25/17}$ は生理的に不活性なGAと考えられており、これらのGAは活性型GAである $GA_{4/1}$ へは変換されない。この酵素の転写レベルでの発現が未熟種子という特定の部位に限られているのは、以上のような特殊な酵素活性をもつことが原因と考えられる。クリカボチャ未熟種子においても活性型GAは生合成されることから (Lange et al., 1993) , $GA_{12/53}$ を $GA_{9/20}$ へ変換する別のGA 20-酸化酵素がクリカボチャ未熟種子に発現していることが示唆される。また、栄養組織においても、活性型GAへ向かうタイプのGA 20-酸化酵素が発現していることが予想される。最近、シロイヌナズナから3種類のGA 20-酸化酵素のcDNAがクローニングされた (Phillips et al., 1995) 。これらはいずれも $GA_{12/53}$ を活性型GAに向かう $GA_{9/20}$ へ変換する活性を有しており(図2-23) , それらの転写レベルでの発現は、器官特異的に厳密な制御を受けている (Phillips et al., 1995) 。以上をまとめると、GA 20-酸化酵素は、活性型GAへの生合成を担うタイプのいくつかのアイソザイムと不活性型GA ($GA_{25/17}$) への変換を触媒するタイプの酵素が存在し、それらはいずれも器官特異的に発現している、ということが出来る。

これに対し、同じクリカボチャ未熟種子から精製、クローニングされたKSBのmRNAは調べた範囲のすべての器官で検出されたことから、KSBの転写レベルでの発現は、GA 20-酸化酵素のそれほど厳密な器官特異的の制御を受けていないと考えられる。KSBとGA 20-酸化酵素の以上のような発現パターンの違いは、これらの酵素のアイソザイムの重要性の違いを示しているのかもしれない。KSBのクリカボチャにおけるアイソザイムを追究する目的で、low stringentな条件で、クリカボチャのKSBをプローブとしてゲノムサザン解析を行ったが、high stringentな条件で行った場合と比較して新たなバンドは検出さ

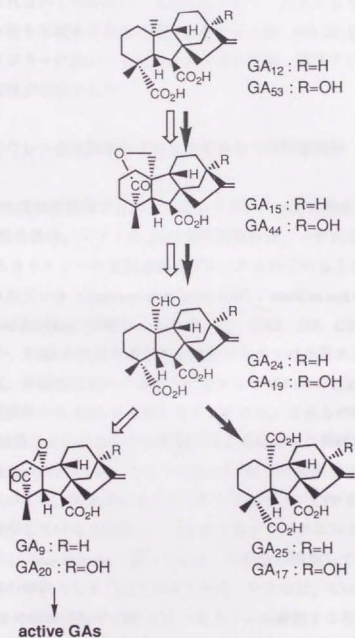


図 2-2-3 GA 20-酸化酵素により触媒される反応

Lange et al. (1994) によりクリカボチャから単離された GA 20-酸化酵素が主に触媒する反応を黒い太矢印 (\longrightarrow) で、シロイヌナズナより単離された GA 20-酸化酵素 (Phillips et al., 1995) が主に触媒する反応を白い矢印 (\longrightarrow) で表した。

れなかった。一方、同じ low stringent な条件でクリカボチャの GA 20-酸化酵素をプローブとしてゲノムサザン解析を行ったところ、2 または 3 コピーに相当すると予想されるいくつかのバンドが検出された。以上のように、KSB のアイソザイムの存在を示唆する結果は得られなかったが、GA 20-酸化酵素の遺伝子は、クリカボチャにおいてもシロイヌナズナ同様、遺伝子ファミリーを形成している可能性が示唆された。

2-3-3 カウレン合成酵素 B 活性に欠陥をもつ突然変異体

GA 欠損の矮性突然変異体であるシロイヌナズナの *ga2* 突然変異体、トウモロコシの *d5* 突然変異体、トマトの *gib-3* 突然変異体は、いずれも GA 生成における CPP からカウレンへの変換過程がブロックされていることがセルフリー系を用いて示されている (Zeevaart and Talon, 1992; Hedden and Phinney, 1979; Bensen and Zeevaart, 1990)。したがって、GA2, D5, *Gib-3* 遺伝子は、KSB そのものか、KSB の発現や輸送等を調節するタンパク質をコードしていると考えられる。本研究において単離されたクリカボチャの KSB を利用して、これらの突然変異体から KSB を単離することにより、これらの植物において、実際に KSB が変異しているかどうかを調べることは非常に興味深い。

Hedden and Phinney (1979) は、トウモロコシの *d5* 突然変異体より調製したセルフリー系においては、野生型におけるそれと比較して、CPP からカウレンへの変換活性が減少していると同時に、CPP からカウレンのエンドアイソマーであるイソカウレン (iso-kaurene; 図 2-24) の生成が増加していることを示した。この結果の解釈として二通り考えられる。ひとつは、KSB のミスセンス変異により KSB の酵素活性が CPP をイソカウレンに変換する活性に変化しているという可能性 (Hedden and Phinney, 1979) であり、もうひとつは、KSB が欠損しているために、CPP を共通の基質としてもつイソカウレン合成酵素の変換活性が見かけ上増加したという可能性である。*d5* 突然変異体から KSB をクローニングすることは、この突然変異体におけるイソカウレンの生成機構の解明に大きく貢献するものと考えられる。

D5 遺伝子が KSB をコードしているか否かを明確にすることは、以下に述べ

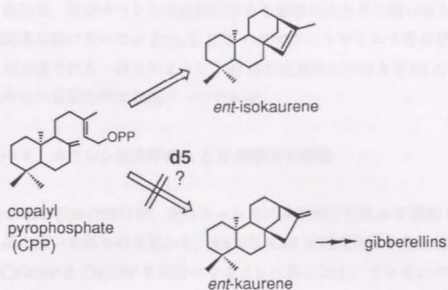


図2-24 CPP からカウレン, およびイソカウレンへの変換

る点からも重要である。第1章でも述べたように、トウモロコシの *An1* 遺伝子座は *KSA* をコードしていると考えられている (Bensen et al., 1995)。*an1* 突然変異体は, leaky であり, 半矮性の表現型を示し, カウレンの内生量は野生型と比較して部分的に減少しているに過ぎない (Bensen et al., 1995)。*An1* 遺伝子の欠失 (deletion mutation) アレルにおいても同様の leaky な性質を示すことから, トウモロコシの栄養組織においては, 少なくとも2種類の *KSA* が発現していると考えられる。一方, *d5* 突然変異体は極度の矮性であり, 栄養組織におけるカウレンの内生量は検出限界以下であった (Bensen et al., 1995)。カウレンの酸化段階 (代謝) をブロックする生合成阻害剤を与えた場合にもカウレンが検出されない (Bensen et al., 1995) ことから, *d5* 突然変異体の栄養組織においてはカウレンの合成能がほとんど失われていると考えられる。*an1* と *d5* 変異, 表現型, およびカウレン生合成能に与える影響の程度の違いは, (1) *D5* 遺伝子が *KSB* をコードしており, *KSB* の場合はアイソザイムが栄養組織においては発現していないこと, あるいは (2) *KSB* の発現を制御する因子を *D5* 遺伝子がコードしていること, のいずれかによると考えられる。このことは, *d5* 突然変異体における *KSB* をクローニングすることにより明らかになると考えられる。*D5* 遺伝子座が *KSB* をコードしていることが示されれば, *an1*, *d5* 変

異の、表現型、及びカウレン合成能に与える影響の大きさの違いからトウモロコシの栄養組織においては KSA と KSB の間でアイソザイムの存在様式が異なることが示唆される。以上のように、*d5* 突然変異体における KSB のクローニングは今後の重要な研究課題の一つである。

2-3-4 カウレン合成酵素 A と B の遺伝子発現

Duncan and West (1981) は、野生キュウリの未熟種子胚乳より調製したセルフリー系を用いた以下の実験から、KSA と KSB が相互作用する可能性を示した。[¹⁴C]GGPP と [³H]CPP を同時にセルフリー系に加え、インキュベーション後、生成した [¹⁴C]カウレンと [³H]カウレンの比を調べたところ、KSA により変換された [¹⁴C]CPP は、外から与えられた [³H]CPP よりも効率的にカウレンに変換された。この結果から、Duncan and West (1981) は KSA と KSB は相互作用しており、KSA により変換された CPP が、効率的に KSB の触媒部位に輸送されるような仕組みがあるのではないかと予想した。以上の内容をまとめた概念図を、図 2-25 に示した。このように、KSB は

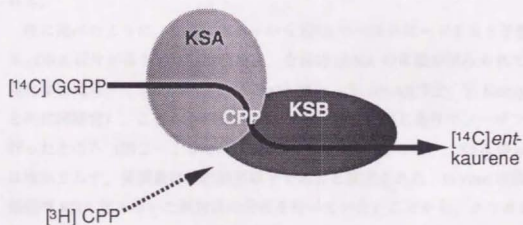


図 2-25 KSA と KSB の相互作用
Duncan and West (1981) の実験結果を概念的に示した。

KSA に続く反応を触媒するというだけでなく、これらの酵素は深く関わり合っ

ていることが示唆されていることから、これらの酵素の発現調節のメカニズム、すなわち KSA と KSB の遺伝子発現が協調的に制御されているのか、あるいは異なる様式で制御されているのかを解明することは非常に興味深い。

Railton et al. (1984) は、エンドウから単離した葉緑体中に、KSB 活性を検出した。しかし、同じ葉緑体中には、KSA 活性は検出されなかった。KSB 活性のみが検出され、同じ材料で KSA 活性が検出されなかったことは、KSA が発現していないためではなく、KSA の酵素活性が何らかの原因で検出されなかったためであると考えられている (Graebe, 1987; Aach et al., 1995)。しかし一方で、この結果は、KSA と KSB の発現様式が異なる可能性も示唆している。

Aach et al. (1995) は、コムギの栄養組織において、KSAB 活性 (KSA と KSB をあわせた酵素活性) はプロプラスチド (原色素体)、および発達途中の非常に若い葉緑体だけに局在し、成熟した葉緑体には KSAB 活性は存在しないことを示した。しかしながら、KSA、KSB それぞれの酵素活性は測定されていないことから、この結果は Railton et al. (1987) によりエンドウ葉緑体中に検出された KSB 単独の酵素活性を否定するものではない。すなわち、KSA は、プロプラスチド、および非常に若い葉緑体だけに存在するが、KSB は、プラスチドの分化によって、KSA ほど厳密な発現制御を受けていないという可能性も考えられる。

既に述べたように、クリカボチャから KSA の一部をコードすると予想される cDNA 断片が得られている (現在、全長の cDNA の単離が試みられている; 理化学研究所・フロンティア, M. Smith 博士, T. Ait-Ali 博士, Y. Kamiya 博士との共同研究)。これらをプローブとして、KSB と同じ条件でノーザン解析を行ったところ (図 2-16 と同様のノーザン解析を行った)、KSA の mRNA は検出されず、発現量は検出限界以下であると推定された。In vitro 合成した内部標準 RNA 等を用いた絶対量の分析を行っていないことから、クリカボチャにおける KSA、KSB の発現量の比較をノーザン解析の結果から行うことは厳密にはできない。しかしながら、この結果は、KSA の発現量は、KSB のそれよりもかなり少ないことを暗示している。

以上のように、KSA と KSB の発現制御が異なっている可能性や、発現レベルが異なっている可能性が示唆されているが、現時点では、KSA と KSB が同

調的に発現しているのか、あるいは異なった様式で発現しているのかを結論することはできない。今後、クリカボチャのみならずシロイヌナズナ（クリカボチャの cDNA をプローブとして KSB のクローニングが進められている；デューク大，T.-p. Sun, 博士，A. Silverstone 博士との共同研究）等の KSA, KSB の遺伝子発現を詳細に調べていくことにより，KSA, KSB の遺伝子発現が同調して制御されているのか，あるいは異なった様式で制御されているのかを明らかにしていく必要があると考えている。

2-3-5 プラスチドの分化とカウレン生合成の制御

KSA, KSB がプラスチドに局在していると考えられていることは (Railton et al., 1984; Sun and Kamiya, 1994; Aach et al., 1995), これらの遺伝子発現がプラスチドの分化と密接に関わり合っている可能性を示唆している。図 2-26 に高等植物の栄養組織におけるプラスチドの分化についてまとめた。

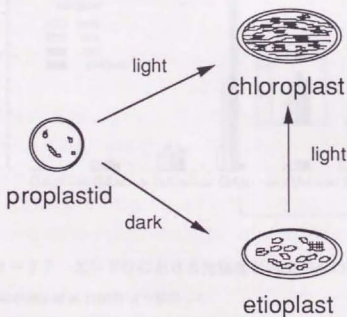


図 2-26 高等植物の栄養組織におけるプラスチドの分化と発達

これまでにカウレンの生合成が光により制御される可能性がいくつか報告されている。

Ecklund and Moore (1974) は、エンドウのセルフリー系を用いて、カウレン生合成が光により制御されている可能性を示した。[¹⁴C]メバロン酸から、[¹⁴C]カウレンへの変換活性は、de-etiolation 過程において12時間以内に、6.3倍に上昇した。暗所では、カウレン合成能は、低いレベルに抑えられていた。

Choinski and Moore (1980) はさらに、このカウレン合成活性の誘導には赤色光と青色光が有効であることを示した。近赤外光を赤色光に続いて照射すると、カウレン生合成の誘導が部分的に抑えられたことから、フィトクロムの関与も示唆された。

また、Gawronska et al. (1995) によると、栄養生長期のエンドウの GA 生合成は、照射される光の強度に依存して大きく変化する。主要な内生 GA の定量分析の結果を、Gawronska et al. (1995) より抜粋して、図2-27に示す。この結

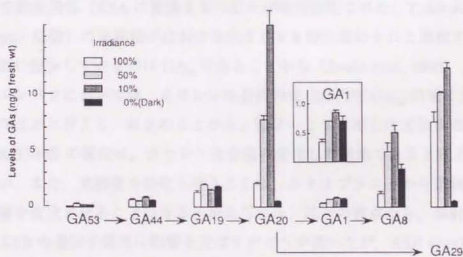


図2-27 エンドウにおける光強度と内生 GA の関係

Gawronska et al. (1995) より抜粋した。

果は、GA 生合成は、弱光により誘導され、暗所においては抑制されることを示している。最も劇的に変動するのは、活性型 GA の直前の前駆体である GA₂₀ である。この結果から、光強度の違いによる GA 生合成の制御の担い手として、

一つは、GA 20-酸化酵素 (GA₃₃ から GA₂₀ への酸化を順次触媒する) が考えられる。しかしながら、GA 20-酸化酵素と GA 3β-水酸化酵素 (GA₂₀ から GA₁ への酸化を触媒する) は、転写レベルで活性型 GA による負のフィードバック制御を受けることが示されている (Phillips et al., 1995; Xu et al., 1995; T. Toyomasu and Y. Kamiya, 私信; Chiang et al., 1995) ことから、GA₃₃ 以前を触媒する酵素がこれらの GA 量の変化を引き起こしている可能性も否定できない。すなわち、GA 20 位酸化酵素と GA 3β-水酸化酵素は、GA₁ 量が少ない状態 (例えば GA 生合成に欠陥を有する矮性突然変異体等) では発現が誘導されている。例えば、GA₃₃ 以前の生合成段階が抑制されると、最終的には活性型 GA の量が減少するので、GA 20-酸化酵素、GA 3β-水酸化酵素の発現が誘導される。これらの酵素が誘導されることは、GA₃₃ から GA₁ へ至る全てのステップが活性化されることを意味するので、GA₃₃ から GA₂₀ までの中間体は蓄積しない。このように、GA₃₃ から、GA₂₀ までの GA 量の増減は、GA₃₃ 以前の前駆体の生合成量を反映しているともいえる。実際、エンドウの矮性突然変異体である *ls* 突然変異体 (KSA に変異をもつことが最近証明された; T. Ait-Ali, Y. Kamiya, 私信) の未熟種子における内生 GA を野生型のそれと比較すると、最も顕著に減少しているのは GA₂₀ であることから (Swain et al., 1995), 少なくともエンドウにおいては、カウレン生合成の変化は内生 GA₂₀ の量に大きな影響を与えうる。以上のことから、図 2-27 に示した光強度の違いによる GA 生合成の変化は、カウレン生合成の変化した結果であると考えても矛盾しない。また、光強度を変化させることは、エチオプラストから葉緑体への発達段階を変化させることになると考えられる。以上の観点から、照射する光強度が KSB の遺伝子発現に影響を及ぼすがどうか調べたが、KSB の mRNA 量は光強度の違いの影響を受けず、また暗所においても明所の場合とほぼ同レベルで発現していた。したがって、少なくとも転写レベルにおいては、KSB の遺伝子発現は光強度の違いによる影響を受けないといえる。これらの光条件下における KSB のタンパク質量の変化を調べる目的で、イムノブロット法を試みた。しかしながら、葉、子葉、胚軸からの粗抽出物中における KSB 量はいずれも検出限界以下であり、分析できなかった。また、KSA をコードすると予想されるクリカボチャの cDNA 断片をプローブに用いてノーザン解析を行ったが、

発現量が少なく mRNA を検出することはできなかった。

以上のように、カウレン生合成が光強度の違いにより変化することを示唆する結果は得られなかった。しかしながら、本研究で追究したのは、播種後7日目のクリカボチャの幼植物体に限られていること、KSAの発現やタンパク質レベルでの発現に関する情報は得られなかったことから、カウレン生合成が光強度の違い（すなわちプラスチドの発達の違い）により変化する可能性について今後も追究する必要がある。エンドウのKSAが最近クローニングされた（T. Ait-Ali, S.M. Swain, Y. Kamiya, 私信）ことから、実際に内生GA量の変化が調べられているエンドウの節間を用いて、光強度の違いがKSAの遺伝子発現に及ぼす影響を調べてみることも興味深い。

プロプラスチド（原色素体）は、分裂組織の細胞中に存在する未分化のプロプラスチドである。茎頂分裂組織中のプロプラスチドは明所においては、細胞の分化に従って葉緑体へと分化する（図2-26）。Aach et al. (1995) は、コムギの栄養組織からプロプラスチド、葉緑体を調製し、 $[^{14}\text{C}]\text{GGPP}$ から $[^{14}\text{C}]\text{カウレン}$ への変換活性（KSAB 活性）はプロプラスチド、および発達中の葉緑体に局在しており、成熟した葉緑体にはKSAB 活性は存在しないことを示した。KSB の mRNA 量がプロプラスチドや発達途上の葉緑体を多く含むと考えられる未熟葉で多かったこと（図2-14）は、Aach et al. (1995) の結果と一致している。今後、タンパク質レベルでの解析を含め、プロプラスチドが葉緑体へ分化する過程におけるKSA、KSBの発現状況を詳細に追究していく予定である。

2-3-6 カウレン生合成の細胞内局在性

クリカボチャのKSBのN末端の50アミノ酸は、典型的なプラスチドへの移行シグナルの特徴を有していた（Keegstra, 1989）。この事実は、KSBがプラスチドに局在する可能性（Railton et al., 1984；Aach et al., 1995）を強く支持している。さらにKSBの細胞内局在性に関する実験的証拠を得るために、イムノブロット分析と、*in vitro*でのプラスチドへの移行実験を試みた。

イムノブロット分析により、クリカボチャの若い葉より調製した葉緑体の膜画分（チラコイド、あるいは包膜）にKSB抗体と反応性を示すタンパク質が

検出された。検出されたタンパク質は、76 kDであり、胚乳より調製された可溶性画分において検出された KSB (87 kD) とは、分子量が異なっていた。Aach et al. (1995) によると、クリカボチャの胚乳においても、KSAB 活性はプラスチド (leucoplasts) に存在する。葉緑体中に検出された 76 kD のタンパク質は、あたかも 87 kD の KSB が葉緑体に取り込まれて限定分解 (processing) を受けた結果であるように見える。しかし、この解釈によると、KSB は、leucoplasts では、限定分解を受けずに (87 kD)、葉緑体では限定分解を受ける (76 kD)、という結論になる。このような例は筆者の知る限りにおいては報告されていない。また、76 kD のタンパク質が KSB であると仮定すると、本来可溶性タンパク質である KSB が、ストロマ画分ではなく膜画分 (チラコイド、あるいは包膜) に検出されたことは KSB の性質とは一致しない。しかしながら、葉緑体の単離操作中、あるいは葉緑体の破碎の過程で変性し、不溶化した可能性、あるいは実際に、膜とある程度の相互作用をしており、通常の緩衝液では抽出されない可能性なども考えられる。抗体との反応性が認められた膜画分中の KSB 活性を検討したが、有意な KSB 活性を検出することはできなかった。このようなことから、イムノブロット分析の結果のみから KSB の局在性に関して結論するのは困難であると判断した。

これらの疑問点を解決するために、エンドウの単離葉緑体への *in vitro* での移行実験を試みた。この実験系は、多くの葉緑体タンパク質 (エンドウ以外のタンパク質を含む) に対して有効であることが知られている (Bartley et al., 1992; Sun and Kamiya, 1994)。試験管内翻訳により合成された ³⁵S 標識の 87 kD の KSB が、葉緑体に取り込まれて、76 kD のタンパク質としてチラコイド画分に検出されれば、イムノブロットにより検出されたタンパク質が KSB であると結論できると考えた。しかしながら、シロイヌナズナの KSA が、取り込まれる様な条件下においても、クリカボチャの KSB は、エンドウの単離葉緑体に取り込まれなかった。クリカボチャの KSB がエンドウの葉緑体に移行しなかった原因は不明であるが、エンドウの葉緑体であることが問題であった可能性、試験管内翻訳により合成された KSB が、移行に必要な立体構造を何らかの理由でとることができなかった可能性等が考えられる。クリカボチャの葉緑体を用いた、同様の移行実験を試みる必要もあるかもしれない。

試験管内翻訳により合成された KSB がエンドウの単離葉緑体に移行しなかったことは、KSB がプラスチドに局在する可能性を否定するものではないが、本研究においては、KSB の細胞内局在性に関する実験的証拠を得るには至らなかった。現在、大腸菌で発現させた KSB を免疫原として、ウサギのポリクローナル抗体を調製中である。この抗体を用いた同様のイムノプロット分析や免疫細胞化学的研究により、今後、KSB の細胞内局在性に関するより明確な実験的証拠が得られるものと期待している。

カウレンが、プラスチド内で生合成されることを間接的に示す様な実験結果が、最近報告された。KSA の基質の合成に関わる GGPP 合成酵素は、N 末端にプラスチドへの移行シグナルを持ち、さらに免疫細胞化学的手法を用いてプラスチドに局在することが示された (Kuntz et al., 1992)。プラスチドで合成される GGPP のほとんどは、カロチノイドやクロロフィル側鎖の前駆体として使われていると予想される。したがって、カウレン生合成は、前駆体である GGPP をこれらの生合成経路と共有していると推定される。PSY1 遺伝子は、カロチノイド生合成におけるフィトエン合成酵素 (phytoene synthase; GGPP から phytoene への変換を触媒する) をコードすることが証明された (Bartley et al., 1992)。PSY1 遺伝子を過剰発現させた形質転換植物 (トマト) を作出したところ、クロロフィルの減少と同時に、矮化した (Fray et al., 1995)。矮性は、活性型 GA の投与により回復した。内生 GA の分析を行ったところ GA 量が非形質転換体と比較して減少していた (Fray et al., 1995)。以上の結果は、GA、クロロフィル、カロチノイドの生合成が前駆体 (GGPP) を共有すること、すなわち GA 生合成の前駆体がプラスチド内に存在することを強く示唆している。既に述べたように、KSA と KSB は相互作用する可能性が示されている

(Duncan and West, 1981)。KSA と KSB が、プラスチド内で複合体を形成し、GGPP から効率的にカウレンを合成しているという仮説は、非常に興味深い。カウレンは炭化水素であり、非常に極性が低い化合物である。カウレンは、小胞体膜に存在する、NADPH 依存の一酸素原子添加酵素 (cytochrome P450 酵素と考えられている) により、数段階の酸化を受けると考えられている。したがって、プラスチド内で生合成されたカウレンが効率的に小胞体膜上に移動していくような仕組みが存在するかもしれない。電子顕微鏡を用いた免疫細胞化学的

手法により, KSA, KSB の細胞内, さらには (プラスチドに存在するなら) プラスチド内の局在性を詳細に追究することにより, この仮説に対する何らかの情報が得られるものと考えている。

2-3-7 テルペン環化酵素の一次構造

これまでにクローニングされたテルペン環化酵素 (CS; casbene synthase, EAS; 5-*epi*-aristolochene synthase, LS; limonene synthase, KSA; *ent*-kaurene synthase) のうち, CS, LS, KSA は, プラスチドに存在すると考えられており, N 末端にプラスチドへの移行シグナル (transit peptide) と予想される配列が存在する (Mau and West, 1994; Colby et al., 1993; Sun and Kamiya, 1994). KSB にもそのような配列が存在していた (前出). EAS は, 細胞質に存在すると考えられており, そのような移行シグナル配列は存在しない (Facchini and Chappell, 1992). プラスチドへの移行シグナルと予想される部分のアミノ酸配列は, CS, LS, KSA, KSB の間でほとんど相同性を示さない. プラスチドへの移行シグナルのアミノ酸配列は, 一般的に一次構造上の相同性をそれほど示さない. 例えば, エンドウにおいては, 20 以上の移行シグナル配列が同定されているが, それらの間に一次構造上の高い相同性は必ずしも認められない (Heijne et al., 1991). 全体のアミノ酸組成として, 水酸基を有するアミノ酸が多く, 酸性アミノ酸残基が少ないために等電点が高い (塩基性側である), という特徴を有している (Keegstra et al., 1989).

DDXXD motif (X は任意のアミノ酸残基を示す) は, プレニル転移酵素における共通配列であり, 2 価金属イオン (Mg^{2+} など) を介して基質のピロリン酸基との結合に関与していると推定されている (Ashby and Edwards, 1990). アスバラギン酸残基と Mg^{2+} イオンのこのような相互作用は, cAMP dependent protein kinase (Zheng et al., 1993), phosphofructokinase (Shirakihara and Evans, 1988) などの X 線結晶構造解析により証明されている. 酵母やラットの肝臓のファルネシルピロリン酸 (FPP) 合成酵素の DDXXD motif に人為的 point mutation が導入されると, 基質のひとつであるイソペンテニルピロリン酸との K_m 値が上昇した (Song and Poulter, 1994; Joly and Edwards, 1993). また, ニワトリの

FPP 合成酵素が結晶化され、DDXXD motif は重金属サマリウム (Mg^{2+} のミミックとして用いられた) との結合に関与することが示された (Tarshis et al., 1994) . 以上の結果は、FPP 合成酵素における DDXXD motif がピロリン酸基との結合に関与しているという推定を強く支持している。DDXXD motif は、植物由来の FPP 合成酵素や GGPP 合成酵素にも存在する (Attucci et al., 1995 ; Scolnik and Bartley, 1994) .

これまでにクローニングされた植物由来のテルペン環化酵素 (CS, EAS, および LS) にも DDXXD motif が存在している (Chappell, 1995) . プレニル転移酵素において DDXXD motif が基質のピロリン酸基との結合に関与していると考えられていること、およびこれらの環化酵素は、ピロリン酸の脱離を伴う環化反応を触媒することから、これらテルペン環化酵素における DDXXD motif は、2価金属イオン (Mg^{2+} など) を介して基質のピロリン酸と結合し、基質であるプレニルピロリン酸のカルボカチオン化を促進することに関与しているのではないかと予想されている (Mau and West, 1994 ; McGarvey and Croteau, 1995) . KSB にも、DDXXD motif が保存されていた (図 2-28) .

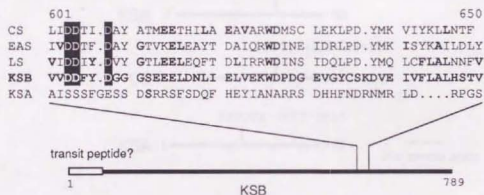
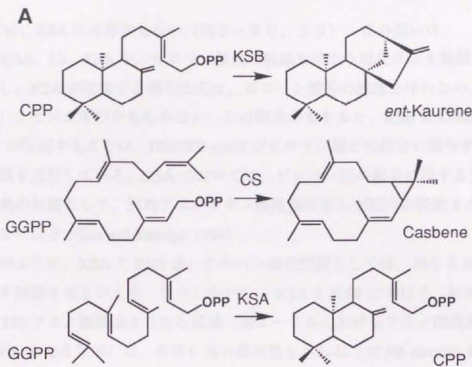


図 2-28 KSB と他のテルペン環化酵素のアミノ酸配列の比較
Sequence alignmentの一部を示した。KSBのアミノ酸配列と同じアミノ酸残基を太字で示した。DDXXD motif は、白抜きで表した。CS; casbene synthase (Caster bean), EAS; 5-*epi*-aristolochene synthase (tobacco), LS; limonene synthase (spearmint), KSB; *ent*-kaurene synthase B (pumpkin), KSA; *ent*-kaurene synthase A (Arabidopsis)

KSB の一次構造は、これまでにクローニングされた植物由来のテルペン環化酵素のなかで、KSA と最も高い相同性を示す。しかしながら、DDXXD



B

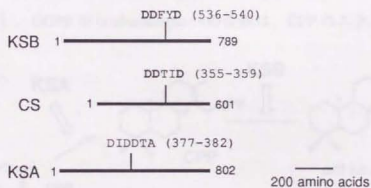


図 2-29 テルペン環化酵素が触媒する反応と
アスパラギン酸残基に富む配列の位置

(A) ; KSB (*ent*-kaurene synthase B) , CS (casbene synthase) , KSA (*ent*-kaurene synthase A) が触媒する環化反応。KSA はピロリン酸の脱離を伴わない環化反応を触媒する。

(B) ; KSB, CS の DDXXD motif と KSA におけるアスパラギン酸に富む配列 (DXDDTA) の位置。KSA には DDXXD motif は存在しない。逆に、DXDDTA 配列は、KSB, CS には存在しない。

motifは、KSAには存在しない(図2-20, 28)。この違いは、CS, EAS, LS, KSBが、ピロリン酸基の脱離を伴う環化反応を触媒するのに対し、KSAが触媒する環化反応は、ピロリン酸基の脱離を伴わない(図2-29)ことによるのかもしれない。この観点からすると、KSBにDDXXD motifが存在することは、DDXXD motifがピロリン酸との結合に関与するという仮説を支持している。KSAにおいては、ピロリン酸の結合に関するアミノ酸残基の候補として、別のアスパラギン酸残基に富んだ配列が提案されている(図2-29; Sun and Kamiya, 1994)。

このように、KSAとKSBは、テルペン環化酵素としては、異なるタイプの反応を触媒するといえる。しかしながら、KSAとKSBにおける、N末端に近い約150アミノ酸残基よりなる領域(図2-20におけるアミノ酸残基112から250にあたる領域)は、非常に高い相同性を示した(37.3% identity, 63.4% similarity)。この領域に相当する配列は、他のテルペン環化酵素(CS, EAS, LS)には存在せず、KSAとKSBの間でのみ保存されている。

Abietadieneは、GGPPからカウレン生合成とよく似た経路で生合成される(図2-30)。GGPPからabietadieneへの変換は、CPPのエナンチオマーで

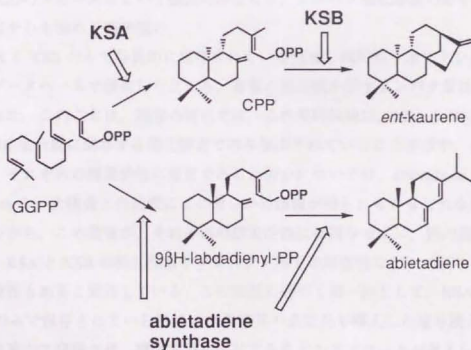


図2-30 アビエタジエン (abietadiene) 生合成とカウレン生合成

ある labdadienyl pyrophosphate ((+)-CPP) を經由することが知られている。Grand fir においては、GGPP から abietadiene への変換は、一つの酵素により触媒される (LaFever et al., 1994)。すなわち、abietadiene synthase (GGPP から abietadiene への変換を触媒する) は、KSA、KSB の両方に相当する活性を持つことになる。KSB の一次構造の一部が KSA に対して相同性を示したことが、および abietadiene synthase の触媒する環化反応を考えると、単離した KSB が KSA 活性を併せもつ可能性も考えられるが、単離した cDNA を発現させた大腸菌は KSB 活性のみを示し、KSAB 活性は示さなかった (表 2-2)。また、酵素の精製過程においても、KSB 活性は、KSA 活性と分離された (Saito et al., 1995)。以上の結果から、GGPP からカウレンへの変換過程は、二段階の環化反応が、別々の酵素で触媒されることが改めて確認された。最近、abietadiene synthase の cDNA がクローニングされた (McGarvey and Croteau, 1995)。塩基配列は公表されていないが、abietadiene synthase のアミノ酸配列は、これまでに報告されたテルペン環化酵素のなかで、KSA のそれと最も近いことが報告されている (注; KSB はこの時点では未発表である)。したがって、これら三者、KSA、KSB、および abietadiene synthase の一次構造の比較は、これらの環化反応のメカニズムという観点のみならず、テルペン環化酵素の分子進化という点からも極めて興味深い。

KSA と KSB のみで特異的に保存されている領域と相同性を示すタンパク質を、データベースで検索したところ、有意に相同性を示すタンパク質は存在しなかった。このことは、現在の時点では、この相同領域は、KSA と KSB という、GA 生合成に関与する環化酵素でのみ保存されていることを示す。この領域が、それぞれの酵素活性に重要であるか否かについては、abietadiene synthase の一次構造との比較により何らかの情報が得られるかもしれない。しかしながら、この領域が、それぞれの酵素活性には関与せずに、別の機能—例えば、KSA と KSB の相互作用やプラスチド内での局在性など—に関与している可能性もあると期待している。この仮説に近づく第一歩として、KSA と KSB のみで保存されている領域に欠失変異や点変異を導入した組み換え酵素を大腸菌内で発現させ、酵素活性を検討するなどのアプローチが考えられる。

2-4 実験の部

植物材料

クリカボチャ (*Cucurbita maxima* L. cv. "Riesensmelone gelp vernetzt") の種子は、Jan Graebe 教授 (ドイツ, ゲッチンゲン大) より供与された。1993年に埼玉県和光市の畑で栽培し、7月の中旬から8月のはじめにかけて未熟果実を収穫した。種子を取り出し、胚乳がほとんど消失している段階の種子を選択し、発達中の子葉を集めた。これらを液体窒素で急速凍結させ、 -80°C に保存した。クリカボチャの幼植物体は、基本的には、連続光下 ($220\ \mu\text{E}\ \text{x}\ \text{m}^2\ \text{x}\ \text{s}^{-1}$)、 25°C 、パーミキュライト上で育てた。光の照度を変える場合は、金属性のメッシュを光源と植物体の間に置くことにより、50% ($110\ \mu\text{E}\ \text{x}\ \text{m}^2\ \text{x}\ \text{s}^{-1}$)、または10% ($22\ \mu\text{E}\ \text{x}\ \text{m}^2\ \text{x}\ \text{s}^{-1}$) の照度条件を実現した。暗所で栽培する場合も他の条件は同じとした。各器官をカミソリ等で切り分けた後、液体窒素中で急速凍結させ、 -80°C に保存した。

葉緑体を単離するためのエンドウは、 20°C 、16時間明所、8時間暗所の条件で栽培し、播種後、7または8日後の植物を材料として用いた。

PCRによるcDNA断片の増幅

精製したタンパク質より得られたペプチド断片のアミノ酸シーケンス (Saito et al., 1995) を基にして、PCR用のプライマーをデザインした。アミノ酸配列、MVMQY、をもとに、正方向プライマー (forward primer)、 $5'\text{-ATGGT(ATGC)ATGCA(AG)TA-3}'$ を、QIHPDE、をもとに逆方向プライマー (reverse primer)、 $5'\text{-TC(AG)TCIGG(AG)TGIGT(ATG)AT(ATG)AT(TC)TG-3}'$ (Iはデオキシイノシン塩基を示す) を合成した。これらのプライマー、および Gene Amp RNA PCR Kit (Perkin Elmer Cetus) を用いて RT-PCR 反応を以下のように行った。逆方向プライマーを用いて、逆転写反応を 42°C 、30分行った後、 99°C 、5分の熱処理により酵素を失活させた。逆転写反応の反応液を鋳型として、 95°C (2分)、35サイクル \times [95°C (1分)、 40°C (1分)、 70°C (1分)]、 70°C (3分) という温度プログラムによる PCR 反応を行った。PCR 反応液の一部を 8% ポリアクリルアミド電気泳動により分析したところ、約 0.45 kb の DNA 断片の増幅が認められたので、PCR 反応液の一部をクローニング用ベクター、pCRII (Invitrogen) とライゲーション反応を行い、宿主大腸菌 (INV α F $^+$) を用いてクローニング後、約 0.45 kb のインサート DNA をもつクローンを選択した。2つのクローン (pKB1, および pKB2) について塩基配列を決定した。

cDNA ライブラリーの作製

cDNA ライブラリーは、クリカボチャの未熟種子中の子葉より調製した 2 μ g の poly(A)⁺RNA から、 λ ZAPII をベクターとして作製した。poly(A)⁺RNA の抽出、および cDNA ライブラリーの作製は、第 1 章と同様に行った。1.2 $\times 10^6$ プラークからなる cDNA ライブラリーが得られたので、半量を Stratagene のマニュアルにしたがって library amplification を行った。

cDNA ライブラリーのスクリーニング

プラークを転写させたナイロンメンブレン (Hybond N+; Amersham) を、PCR により得られた 0.45 kb の cDNA 断片 (pKB1 より EcoRI で切り出した cDNA インサート) をプローブとしてスクリーニングを行った。プローブの調製は、第 1 章で述べた方法に従った。ハイブリダイゼーションは、Rapid-hyb buffer (Amersham) 中、65°C で行った。ハイブリダイゼーション後のメンブレンは、最終的に、65°C で、0.1% SDS を含む 0.1 \times SSC で洗浄した。陽性クローンは、オートラジオグラフィック、BAS 2000 システム (富士フィルム) により検出した。3 回のスクリーニング操作により陽性プラークを精製し、単離した。ヘルパーファージ R408 と宿主大腸菌 XL1-Blue を用いて、pBluescript SK(-) にサブクローニングした後、インサート cDNA のサイズをアガロース電気泳動により分析した。最も長いインサート (2.4 kb) を含む 2 つのクローン (pKB3, および pKB16) の塩基配列を決定した。

cDNA の 5' 末端の単離

5' 末端の単離は、5' RACE (rapid amplification of cDNA ends; Frohman et al., 1988) の変法 (Edwards et al., 1991) により、5'-Amplifinder Race Kit (Clontech) を使い、Clontech のプロトコールに従って以下のように行った。クリカボチャの未熟種子中の子葉より調製した 2 μ g の poly(A)⁺RNA を鋳型として、P1 プライマー (5'-GCATGACCATATCCCAGTCTCTGTAAGT-3'; 図 2-31) を用いて、逆転写反応を行った。反応液中の RNA をアルカリ加水分解し、さらに、未反応のプライマーを吸着クロマトグラフィーにより除去することにより一本鎖 cDNA を精製した。精製した一本鎖 cDNA と一本鎖 DNA anchor を T4RNA ligase を用いてライゲーションさせた。この一本鎖 anchor DNA は、5' 末端がリン酸化されており、3' 末端はアミノ化されている。従って、一本鎖 cDNA の 3' 末端と一本鎖 anchor DNA の 5' 末端のみがライゲーションされる。Anchor が付加された一本鎖 cDNA を鋳型として、anchor に相補的な配列である anchor プライマーと、P2 プライマー (5'-CCTTCAGAGTTGCT

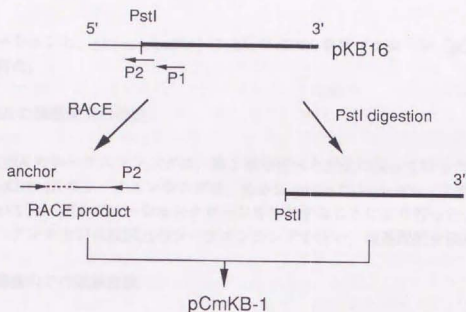


図 2-3 1 cDNA の 5' 末端の単離, および全長の cDNA を含む pCmKB-1 の作製

TCTGCAGCTTCTC-3' ; 図 2-3 1) を用いて PCR を行った。PCR 産物は、アガロース電気泳動上でスメアであった。PCR 産物を、pCRII ベクターとライゲーションし、形質転換により約 100 個の大腸菌 (INVαF⁺) の組み換え体を得た。KSB の 5' 末端を含む組み換え体は、155 bp から 175 bp に相当する正方向のプライマー (5'-TCGACAAGGTTGAACITTCAG-3') と P2 プライマーを用いた nested PCR により選抜した。すなわち、一晚培養した大腸菌の培養液 1 μL (培地、菌体を含む) を 50 μL の PCR 反応液 (10 mM Tris-HCl (pH8.3), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP 混合液, 0.5 μM プライマー, 1.25 U Taq polymerase) に混ぜ、95°C (2分), 30 サイクル x [95°C (1分), 58°C (1分), 70°C (2分)], 70°C (5分) の温度プログラムで PCR を行い、約 0.5 kb の DNA 断片が増幅されるかどうかをアガロースゲル電気泳動で分析した。PCR 増幅中に塩基置換が起こった場合を考慮して、2つの独立した PCR 反応由来の陽性クローンを4つずつ選抜し、塩基配列を決定した。すべてのクローンが、pKB16 と完全に一致する塩基配列 (479 bp) を 3' 側に有していたため、新たに得られた 5' 末端を pKB16 の 5' 末端と判断した。最も長い 5' 領域をもつクローン、pKB5'-13 (263 bp の新たな 5' 領域が含まれる) を P2 プライマー部分に存在する PstI site

(pKB16 のインサート cDNA にユニークに存在する) を利用して、pKB16 に組み込んだ。すなわち、pKB5'-13 を SacI, PstI 処理して得られる 0.75 kb の DNA 断片を、pKB16 を SacI, PstI 処理して得られる 5 kb の DNA 断片とライ

ゲーションし、pBluescriptSK(-)に全長のcDNAを持つクローン(pCmKB1)を得た。

DNAの塩基配列の決定

DNAのシーケンシングは、第1章で述べた方法に従って行った。pKB16とpKB5'-13のシーケンシングは、Kilo Sequence Deletion Kit(宝酒造)を用いて、一連のデリベーションクローンを作製することにより行った。センス鎖、アンチセンス鎖双方のシーケンシングを行い、塩基配列を決定した。

大腸菌内での過剰発現

pMAL-c2(New England Biolabs)を利用して、pCmKB-1のコード領域(coding region)を大腸菌の*malE*遺伝子の下流に繋いだプラスミドを以下のように調製した。開始コドンの直前にPstI siteを導入するために、正方向プライマー5'-TTATCTGCGAGATGTATCTTTCCCGACCTACCGCGC-3'(PstI siteを下線で示した)と、RACEで用いたP2プライマー(逆方向プライマー)を用い、pCmKB-1を鋳型として、PCR反応により0.6 kbのDNA断片を増幅した。このPCR産物をpCRIIベクター(Invitrogen)を用いてクローニングし(pKB21)、PCR増幅により塩基置換が起こっていないことをシーケンシングにより確認した。pCmKB-1のPstI-HindIII断片(2.0 kb)をpMAL-c2のPstI-HindIII切断部位に組み込んだ(pKB22)。pKB21をPstI処理することにより得られる0.6 kbのDNA断片を、PstIで切断後アルカリフォスファターゼ(CIAP; 東洋紡)処理したpKB22に組み込んだ(pMAL-KB)。このプラスミドは、大腸菌(JM109)で、maltose binding protein(MBP)とKSBの融合タンパク質(MBP-KSB)を発現させるのに用いた。融合タンパク質の発現誘導は、基本的には、New England Biolabsのプロトコールに従って行った。コントロールとして、MBPのみを発現させるためには、pMAL-c2を用いた。MBP-KSBの発現の確認実験は以下のように行った。大腸菌JM109の37°Cの液体振とう培養に、 $A_{600\text{nm}}$ が0.6になった時点で、0.3 mMのisopropyl- β -D-thiogalactopyranoside(IPTG)を加えた。IPTG添加後、同条件でさらに4時間培養を続けた。IPTG添加前、および添加後の大腸菌より全細胞抽出物を調製し、8%ポリアクリルアミド電気泳動(SDS-PAGE)により分画後、Coomassie Brilliant Blue R 250により染色した(Sambrook et al. 1989に従った)。また、同様のSDS-PAGEを行った後、抗KSB抗血清(AbKB1; Saito et al., 1995)を用いたイムノブロット分析を行った。

イムノブロット分析

イムノブロット分析は, Sambrook et al. (1989) に従って行った。SDS-PAGE を行った後, ニトロセルロース膜にタンパク質を転写し, 1% スキムミルクを含む TBST buffer (20 mM Tris-HCl; pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.05% Tween20) を用いて30分, 室温でブロッキングを行った。抗 KSB 抗血清 (AbKB1; Saito et al., 1995) を2000倍希釈になるように加え, 1時間室温でインキュベートした。TBST buffer で洗浄後, 5000倍希釈の peroxidase-conjugated anti-rabbit antisera (Promega) と1% スキムミルクを含む TBST buffer 中で1時間インキュベーションした。TBST buffer, TBS buffer (Tween 20 を含まない TBST buffer) による洗浄後, 化学発光試薬 (enhanced chemiluminescence reagent; Amersham) を用いてオートラジオグラフィにより検出した。コントロールとして, 免疫前抗血清を用いて同様の操作を行い, 抗 KSB 抗血清を用いた場合に検出されたバンドの特異性を確認した。

融合タンパク質の機能解析

融合タンパク質 (MBP-KSB), または MBP (コントロール) の発現誘導は以下のように行った。pMAL-KB, または pMAL-c2 をもつ大腸菌 (JM109) を10 mL の LB 培地 (100 µg/mL のアンピシリンを含む) 中, 37°C で振とう培養を行い, A_{600 nm} が0.6 になった時点で0.3 mM の isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) を加えた。IPTG 添加後は, 20°C で5, または20時間培養を続けた。3,500 g の遠心により集菌した後, 1 mL の50 mM リン酸緩衝液 (pH 8.0, 10% グリセロール, 2 mM ジチオスレイトールを含む) を加え, 氷上で, 超音波破碎した。破碎物を, 12,000 g, 10分間, 4°C で遠心し, 上澄みを回収し, タンパク質濃度を測定した。タンパク質 80 µg 相当を通常, 1回の酵素活性の測定に用いた。

KSB 活性の測定は, 基本的には Saito et al. (1995) に従って行った。[³H]CPP (1.0 kBq) を, 大腸菌の抽出物 (80 µg のタンパク質を含む), またはクリカボチャ胚乳より調製した可溶性タンパク質画分 (200,000 g の上澄; 50 µg のタンパク質を含む) を含む 200 µL の50 mM リン酸緩衝液 (pH 8.0, 10% グリセロール, 2 mM ジチオスレイトール, 5 mM MgCl₂, 20 µM ユニコナゾール; 住友化学より供与) に加え, 30°C で1時間保温した。200 µL のアセトンを加えて反応を停止させた後, *n*-ヘキサンを400 µL 加えて抽出した。*n*-ヘキサン層を300 µL とり, 減圧濃縮した後, シリカゲル薄層クロマトグラフィ (TLC) により分画した。展開溶媒として *n*-ヘキサンをを用いた。カウレン (*ent*-kaurene) 画分である, R_f 0.6 から1.0 の部分を掻き取った。HPLC

分析は、8 アッセイ分の TLC 後のカウレン画分をあわせて行った。HPLC 分析は、System Gold HPLC system (Beckman)、ODS カラム (Senshu-Pak ODS, 50 mm x 4.6 mm i.d., センシュウ科学) を用いて行った。60% から 100% のアセトニトリルのグラディエント (20 分から 5 分間) を用いて、流速 1 mL/分 で溶出した。検出は、固体シンチレーターを用いたオンライン・ラジオモニター (Beckman) により行った。クロマトグラム上では、カウレンの保持時間に対応するひとつのピークのみが観察された。そのピークに相当する溶出液を回収し、液体シンチレーションカウンターで測定したところ、TLC 後のカウレン画分の全放射活性のうちの約 90% の放射活性が回収されることがわかった。従って、以後の実験では、TLC 後のカウレン画分に存在する放射活性を KSB 活性とした。KSB 活性 (GGPP からカウレンへの変換活性) は、基質として、 $[^3\text{H}]\text{GGPP}$ (0.8 kBq; 17.5 Ci / mmol; Amersham) を用い、KSB アッセイと同様に行った。

DNA の調製とサザン解析

播種後、7 日目のクリカボチャの子葉から、ゲノム DNA を CTAB 法 (杉浦, 1989) により抽出した。20 μg のゲノム DNA を、BamHI, EcoRI, HindIII でそれぞれ完全消化した後、1% アガロース電気泳動により分離し、ナイロン膜 (Hybond-N+; Amersham) に転写した。 $[^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ で標識した pCmKB-1 のインサート cDNA をプローブとして、Rapid-hyb buffer (Amersham) 中、68°C でハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーション後のナイロン膜を、最終的に 0.1 x SSC (0.1% SDS を含む) を用いて 68°C で洗浄し、オートラジオグラフィによりシグナルを検出した。Low stringent な条件で行う場合は、55°C でハイブリダイゼーションを行い、同じ温度で 2 x SSC で洗浄後、同様の方法でシグナルを検出した。

RNA の調製とノーザン解析

全 RNA の抽出は、SDS-フェノール法 (Ausbel et al., 1987) を用いて行った。poly(A)⁺RNA の調製、ハイブリダイゼーション、洗浄は、第 1 章で述べた方法により行った。KSB のプローブは、サザン解析と同じものを用いた。必要に応じて、オートラジオグラフィ後のナイロン膜を、0.1% SDS を含む沸騰水中に 10 分間おき、プローブの stripping を行った。クリカボチャの GA 20-酸化酵素を検出するためには、全長の cDNA (約 1.6 kb; Theodore Lange 博士より供与) を同様の方法で標識し、プローブとして用いた。クリカボチャにおける内部標準プローブが入手できなかったことから、材料の調製から独立して 2 回以上繰り返し、再現性を確認した。

試験管内翻訳

Tobacco etch virus-non translated region (TEV-NTR; Restrepo et al., 1990) と KSB のコード領域 (coding region) を SP6 プロモーターの下流に繋いだプラスミド (pKB32) は、以下のように調製した (図 2-32)。開始 ATG コドンの周辺の塩基配列を、PCR を用いて改変し、NcoI site を導入した。同時に、KSB の cDNA にユニークに存在する NcoI site (2339-2344 bp) をアミノ酸が変化しないような塩基置換により消失させ、さらに、SacI site を停止コドンの直後に導入した。この改変のために、以下のプライマーを合成した：正方向のプライマー 5'-ACCAGCCATG GATCTTCCCACCTACCGGCG-3' (開始コドン を白抜きで、NcoI site を下線で示してある)、逆方向のプライマー 5'-TTGAGCTCATTGTTC AATAGTGCATCCAGATCCA TGGTT-3' (塩基置換 [G から A] を白抜きで、SacI site を下線で示してある)。これらのプライマーを用いて、pCmKB-1 を鋳型として PCR 反応を行い、2.4 kb の PCR 断片 (KSB のコード領域) を得た。PCR 断片を SacI / NcoI で消化した後、pRTL2 (Restrepo et al., 1990) の SacI / NcoI site に組み込んだ (pKB31)。pKB31 を EcoRI で消化し、続いて Klenow 酵素 (東洋紡) で平滑末端化した。さらに SacI で消化して得られる DNA 断片 (TEV-NTR-KSB coding; 約 2.5 kb) を、pSP64 (Promega) の SmaI-SacI site に組み込んだ。得られたプラスミド (pKB32) は、SP6 プロモーターの下流に、TEV-NTR を 5' 末端にもつ KSB のコード領域が繋がっており、これを、SP6 RNA polymerase による試験管内転写反応に用いた。

試験管内翻訳反応は、pKB32、または pGA1-84 (陽性コントロールとしてシロイヌナズナの KSA を発現させるために用いた; Sun and Kamiya, 1994) を鋳型として、TNT Coupled Wheat Germ Extract System (Promega)、 $[^{35}\text{S}]$ メチオニン (Amersham) を用い、Promega のプロトコールに従って行った。翻訳産物を SDS-PAGE により分画後、BAS 2000 システム (富士フィルム) により分析した。

エンドウの葉緑体の単離と試験管内でのタンパク質取り込み実験

葉緑体の単離は、0-4°C で行った。エンドウの若い葉を、氷上、Grinding Buffer (50 mM HEPES-KOH; pH 7.5, 0.33 M ソルビトール, 2 mM EDTA, 1 mM MgCl_2 , 1 mM MnCl_2 , 5 mM アスコルビン酸) 中でポリトロンを用いて部分的に破碎した。破碎物をナイロンメッシュでろ過した後、ろ液を 5,000 g 1 秒遠心して葉緑体を回収し、Grinding Buffer に懸濁後、予め調製しておいたパーコールのグラディエントに重層した。パーコールのグラディエントは、2 倍の濃度の Grinding Buffer とパーコール (Pharmacia) を等量混合した後、

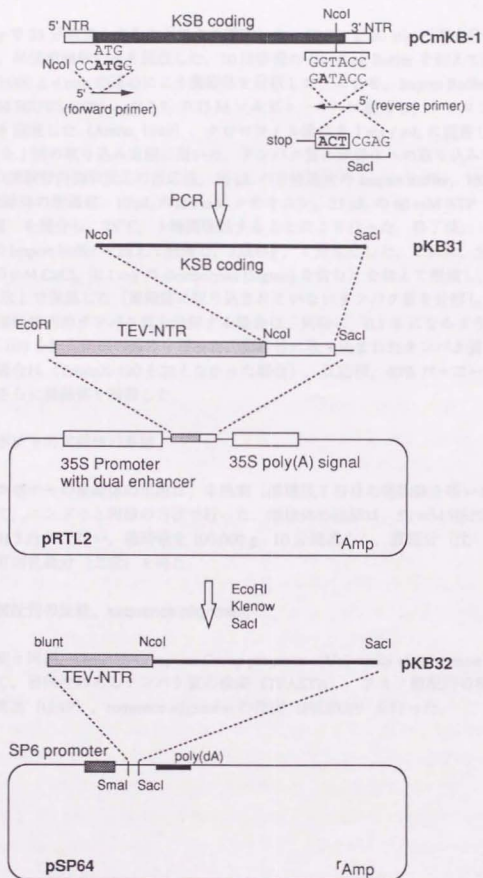


図 2-3-2 試験管内翻訳のためのプラスミド (pKB32) の作製

20,000 g で 25 分間遠心することにより調製した。10,000 g, 20 min の遠心分離を行い、無傷葉緑体のみを回収した。10 倍容量の Grinding Buffer を加えて懸濁後、3,000 g, 4 min の遠心により葉緑体を回収した。これを、Import Buffer (50 mM HEPES-KOH; pH 7.5, 0.33 M ソルビトール) に懸濁し、クロロフィル含量を定量した (Aron, 1949)。クロロフィル濃度を 1 mg/mL に調整し、160 μ L を 1 回の取り込み実験に用いた。タンパク質の葉緑体への取り込みは、30 μ L の試験管内翻訳反応の反応液、30 μ L の 2 倍濃度の Import Buffer, 160 μ L の葉緑体の懸濁液、10 μ L の 250 mM メチオニン、25 μ L の 60 mM ATP (Mg 塩) を混合し、25°C, 1 時間保温することにより行った。終了後、1 mL の Import buffer を加えて懸濁し、3,000 g, 4 分遠心した。これに、50 μ L の 50 mM CaCl₂ (0.1 mg の thermolysin [Sigma] を含む) を加えて懸濁し、30 分、氷上で保温した (葉緑体に取り込まれていないタンパク質を分解した)。葉緑体内のタンパク質を分解する場合は、同時に、0.1% になるように TritonX-100 を加え同様の操作を行った。葉緑体に取り込まれたタンパク質を調べる場合は (TritonX-100 を加えなかった場合)、反応後、40% パーコールによりさらに葉緑体を精製した。

クリカボチャの葉緑体の単離

クリカボチャの葉緑体の単離は、未熟葉 (播種後 7 日目の植物体を用いた) を用いて、エンドウと同様の方法で行った。葉緑体の破砕は、50 mM HEPES-KOH (pH 7.5) 中で行い、破砕液を 100,000 g, 10 分間遠心し、膜画分 (沈殿)、可溶性画分 (上澄) を得た。

アミノ酸配列の比較, sequence alignment

第 1 章と同様、Genetics Computer Group programs (University of Wisconsin) を用いて、相同性のあるタンパク質の検索 (TFASTA)、アミノ酸配列の相同性の算出 (GAP)、sequence alignment の作出 (PILEUP) を行った。

総括

本博士論文研究において、GA 生合成の重要な前駆体であるカウレンの生合成を担う KSA、KSB の cDNA クローニングを行った。

第1章では、シロイヌナズナより得られていた KSA の cDNA を利用して、GA の生合成研究に格好の対象のひとつであるイネから、KSA をコードすると予想される cDNA 断片をクローニングした。現在、筆者の属する研究グループにより、GA の他の生合成段階を触媒する酵素の cDNA クローニングも進められており、これらと組み合わせることにより、今後、イネにおける GA 生合成調節機構の詳細な解析が行われることが期待される。

第2章では、KSA に続く環化反応を触媒する酵素である KSB の cDNA クローニングを行った。KSA と KSB は、プラスチド中で相互作用している可能性が示唆されている (Duncan and West, 1981; Sun and Kamiya, 1994; Aach et al., 1995) ことから、これらの酵素の遺伝子発現を同時に解析していくことはカウレン生合成の制御機構を解明し、理解する上で非常に重要であると考えられる。しかしながら、KSB のクローニングは報告されていなかった。KSB は、筆者の属する研究グループにより、クリカボチャの未熟種子 (GA 生合成活性が非常に高い) より精製され、最終精製画分に存在する主要タンパク質の部分アミノ酸配列が解明されていた (Saito et al., 1995)。これらのアミノ酸配列から、PCR 法により対応する cDNA 断片を得、さらに全長の cDNA を含む cDNA クローンを単離した。得られた cDNA を大腸菌内で発現させたところ、発現産物は CPP をカウレンへ変換する活性を示したことから、単離した cDNA クローンは、KSB をコードするものであることが証明された。KSB のクローニングは、これが最初の例である。KSB の N 末端にはプラスチドへの移行シグナル (transit peptide) と予想される配列が存在しており、KSB がプラスチドに存在する可能性を強く支持している。また、KSB の一次構造はこれまでにクローニングされた他のテルペン環化酵素のそれと高い相同性を示し、ピロリン酸の結合に関与すると考えられている DDXXD motif (Mau and West, 1994) も存在していた。さらに、KSB の一次構造の一部が、KSA のそれと特異的な相同性を示したことなどから、KSB のタンパク質自身

の生化学的解析にも興味もたれる。本研究において KSB の cDNA クローンを単離し、大腸菌内や試験管内での KSB の発現系を確立したことは、GA 合成酵素としての発現制御の解析のみならず、KSB のタンパク質自身の生化学的解析にも大いに役立つはずである。

クリカボチャは、GA 合成酵素の精製のための材料としては優れているものの、植物体が大きく、実験室内での栽培に適さないことなどから、GA 合成酵素の発現制御を生理学的研究と結び付けて解析していくこととする場合には必ずしも適した材料とはいえない。今後、クリカボチャより得られた KSB の cDNA を利用することにより、他の GA 合成酵素遺伝子がいくつか単離されており、内生 GA も精査されているイネ、あるいは GA 合成に欠陥をもつ多くの突然変異体が得られており、形質転換の容易なシロイヌナズナ等から KSB をクローニングし、その発現制御をより詳細に解明していく必要があると考えられる。

GA の合成研究は、天然物化学的アプローチにより発展してきた。すなわち、GA の合成中間体を含めた各種 GA が単離・同定され、それらの標識体が調製されてきたことにより GA の合成研究は大いに進展した。他の植物ホルモンであるアブジジン酸やオーキシンに関しては、生理作用発現に至るシグナル伝達系の研究は進展しているものの、合成研究は GA に比較して遅れている。本研究は、化学的研究を基盤として進展してきた GA の合成研究に、分子生物学的なアプローチを導入することにより新たな研究展開の可能性を示したものであり、本研究で得られた知見は、今後の GA の合成研究に大きく貢献するものと考えられる。

参考文献

Aach, H., Böse, G., and Graebe, J.E. (1995). *Ent*-kaurene biosynthesis in a cell-free system from wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings and the localisation of *ent*-kaurene synthetase in plastids of three species. *Planta* **197**, 333-342.

Akatsuka, T., Kodama, O., Sekido, H., Kono, Y., and Takeuchi, S. (1985). Novel phytoalexins (oryzalexins A, B, and C) isolated from rice blast leaves infected with *Pyricularia oryzae*. Part I: Isolation, characterization and biological activities of oryzaalexins. *Agric. Biol. Chem.* **49**, 1689-1694.

Amann, E., and Brosius, J. (1985). 'ATG vectors' for regulated high-level expression of cloned genes in *Escherichia coli*. *Gene* **40**, 183-190

Arnon, D.I. (1949). Copper enzymes in isolated chloroplasts: Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol.* **24**, 1-15.

Ashby, M.N., and Edwards, P.A. (1990). Elucidation of the deficiency in two yeast coenzyme Q mutants: Characterization of the structural gene encoding hexaprenyl pyrophosphate synthetase. *J. Biol. Chem.* **265**, 13157-13164.

Attucci, S., Aitken, S.M., Gulick, P.J., and Ibrahim, R.K. (1995). Farnesyl pyrophosphate synthase from white lupin: Molecular cloning, expression, and purification of the expressed protein. *Arch. Biochem. Biophys.* **321**, 493-500.

Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., and Struhl, K., eds (1990). *Current Protocols in Molecular Biology*. (New York: Green Publishing Associates/Wiley-Interscience).

Badillo, A., Steppuhn, J., Deruere, J., Camara, B., and Kuntz, M. (1995). Structure of a functional geranylgeranyl pyrophosphate synthase gene from *Capsicum annuum*. *Plant Mol. Biol.* **27**, 425-428.

Barendse, G.W.M., Kepczynski, J., Karssen, C.M., and Koornneef, M. (1986). The role of endogenous gibberellins during fruit and seed development: Studies on gibberellin-deficient genotypes of *Arabidopsis thaliana*. *Physiol. Plant.* **67**, 315-319

- Bartley, G.E., Viitanen, P.V., Bacot, K.O., and Scolnik, P.A. (1992). A tomato gene expressed during fruit ripening encodes an enzyme of the carotenoid biosynthesis pathway. *J. Biol. Chem.* **267**, 5036-5039
- Bartley, G.E., and Scolnik, P.A. (1995). Plant carotenoids: Pigments for photoprotection, visual attraction, and human health. *Plant Cell* **7**, 1027-1038
- Bensen, R.J., and Zeevaart, A.D. (1990). Comparison of *ent*-kaurene synthetase A and B activities in cell-free extracts from young tomato fruits of wild-type and *gib-1*, *gib-2*, and *gib-3* tomato plants. *J. Plant Growth Regul.* **9**, 237-242.
- Bensen, R.J., Johal, G.S., Crane, V.C., Tossberg, J.T., Schnable, P.S., Meeley, R.B., and Briggs, S.P. (1995). Cloning and characterization of the maize *Anl* gene. *Plant Cell* **7**, 75-84
- Bishai, W.R., Rappuoli, R., and Murphy, J.R. (1987). High-level expression of a proteolytically sensitive diphtheria toxin fragment in *Escherichia coli*. *J. Bacteriology* **169**, 5140-5151.
- Bleecker, A.B., Schette, J.L., and Kende, H. (1986). Anatomical analysis of growth and developmental patterns of deepwater rice. *Planta* **169**, 490-497.
- Chang, P.-F., Narasimhan, M.L., Hasegawa, P.M., and Bressan, R.A. (1993). Quantitative mRNA-PCR for expression analysis of low-abundance transcripts. *Plant Mol. Biol. Reporter* **11**, 237-248.
- Chappell, J. (1995). The biochemistry and molecular biology of isoprenoid metabolism. *Plant Physiol.* **107**, 1-6
- Chiang, H.-H., Hwang, L., and Goodman, H.M. (1995). Isolation of the Arabidopsis *GA4* locus. *Plant Cell* **7**, 195-201
- Choi, Y.-H., Yoshizawa, K., Kobayashi, M., and Sakurai, A. (1995). Distribution of endogenous gibberellins in vegetative shoots of rice. *Plant Cell Physiol.* **36**, 997-1001.
- Choinski, J.S., and Moore, T.C. (1980). Relationship between chloroplast development and *ent*-kaurene biosynthesis in peas. *Plant Physiol.* **65**, 1031-1035.

- Chung, C.H., and Coolbaugh, R.C. (1986). *Ent*-kaurene biosynthesis in cell-free extracts of excised parts of tall and dwarf pea seedlings. *Plant Physiol.* **80**, 544-548
- Colby, S.M., Alonso, W.R., Katahira, E.V., McGarvey, D.J., and Croteau, R. (1993). 4S-Limonene synthase from the oil glands of spearmint (*Mentha spicata*). *J. Biol. Chem.* **268**, 23016-23024.
- Duncan, J.D., and West, C.A. (1981). Properties of kaurene synthetase from *Marah macrocarpus* endosperm: Evidence for the participation of separate but interacting enzymes. *Plant Physiol.* **68**, 1128-1134
- Ecklund, P.R., and Moore, T.C. (1974). Correlations of growth rate and de-etiolation with rate of *ent*-kaurene biosynthesis in pea (*Pisum sativum* L.). *Plant Physiol.* **53**, 5-10
- Edwards, J.B.D.M., Delort, J., and Mallet, J. (1991). Oligodeoxyribonucleotide ligation to single-stranded cDNAs: A new tools for cloning 5' ends of mRNAs and for constructing cDNA libraries by *in vitro* amplification. *Nucleic Acid Res.* **19**, 5227-5232
- Facchini, P.J., and Chappell, J. (1992). Gene family for an elicitor-induced sesquiterpene cyclase in tobacco. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 11088-11092
- Fray, R.G., Wallace, A., Fraser, P.D., Valero, D., Hedden, P., Bramley, P.M., and Grierson, D. (1995). Constitutive expression of a fruit phytoene synthase gene in transgenic tomatoes causes dwarfism by redirecting metabolites from the gibberellin pathway. *Plant J.* **8**, 693-701.
- Frohman, M. A., Dush, M.K., and Martin, G.R. (1988). Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: Amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 8998-9002
- Frost, R.G., and West, C.A. (1977). Properties of kaurene synthetase from *Marah macrocarpus*. *Plant Physiol.* **59**, 22-29.
- Gawronska, H., Yang, Y.-Y., Furukawa, K., Kendrik, R.E., Takahashi, N., and Kamiya, Y. (1995). Effects of low irradiance stress on gibberellin levels in pea seedlings. *Plant Cell Physiol.* **36**, 1361-1367.

Gilroy, S., and Jones, R.L. (1994). Perception of gibberellin and abscisic acid at the external face of the plasma membrane of barley (*Hordeum vulgare* L.) aleurone protoplasts. *Plant Physiol.* **104**, 1185-1192.

Graebe, J.E. (1987). Gibberellin biosynthesis and control. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **38**, 419-465

Graebe, J.E., Dennis, D.T., Upper, C.D., and West, C.A. (1965). Biosynthesis of gibberellins: The biosynthesis of (-)-kaurene, (-)-kauren-19-ol, and *trans*-geranylgeraniol in endosperm nucellus of *Echinocystis macrocarpa* Greene. *J. Biol. Chem.* **240**, 1847-1854.

Guan, C.d., Li, P., Riggs, P.D., and Inouye, H. (1988). Vectors that facilitate the expression and purification of foreign peptides in *Escherichia coli* by fusion to maltose-binding protein. *Gene* **67**, 21-30

Gubler, F., Kalla, R., Roberts, J.K., and Jacobsen, J.V. (1995). Gibberellin-regulated expression of a *myb* gene in barley aleurone cells: Evidence for Myb transactivation of a high-pI α -amylase gene promoter. *Plant Cell* **7**, 1879-1891.

Hasegawa, M., Nakajima, M., Takeda, K., Yamaguchi, I., and Murofushi, N. (1995). Endogenous levels of gibberellins in normal and male sterile anthers of rice (*Oryza sativa* cv. Nihonmasari). *Biosci. Biotech. Biochem.* **59**, 1716-1720.

Hedden, P., and Graebe, J.E. (1982). Cofactor requirements for the soluble oxidases in the metabolism of the C₂₀-gibberellins. *J. Plant Growth Regul.* **1**, 105-116.

Hedden, P., and Phinney, B.O. (1979). Comparison of *ent*-kaurene and *ent*-isokaurene synthesis in cell-free systems from etiolated shoots of normal and *dwarf-5* maize seedlings. *Phytochemistry* **18**, 1475-1479

Hejine, G., Hirai, T., Klosgen, R.-B., Steppuhn, J., Bruce, B., Keegstra, K., and Herrmann, R. (1991). CHLPEP-A database of chloroplast transit peptides. *Plant Mol. Biol. Reporter* **9**, 104-126.

Jennings, J.C., Coolbaugh, R.C., Nakata, D.A., West, C.A. (1993). Characterization and solubilization of kaurenoic acid hydroxylase from *Gibberella fujikuroi*. *Plant Physiol.* **101**, 925-930.

Joly, A., and Edwards, P.A. (1993). Effect of site-directed mutagenesis of conserved aspartate and arginine residues upon farnesyl diphosphate synthase activity. *J. Biol. Chem.* **268**, 26983-26989.

Kato, T., Kabuto, C., Sasaki, N., Tsunagawa, M., Aizawa, H., Fujita, K., Kato, Y., and Kitahara, Y. (1973). Momilactones, growth inhibitor from rice, *Oryza sativa* L. *Tetrahedron Lett.* 3861-3864.

Katsumi, M., Phinney, B.O., Jefferies, P.R., and Henrick, C.A. (1964). Growth response of the d-5 and an-1 mutants of maize to some kaurene derivatives. *Science* **144**, 849.

Kawarada, A., and Sumiki, Y. (1959). The occurrence of gibberellin A₁ in water sprouts of citrus. *Bull. Agric. Chem. Soc. Japan* **23**, 343-347.

Keegstra, K., Olsen, L.J. and Theg, S.M. (1989). Chloroplastic precursors and their transport across the envelope membranes. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **40**, 471-501

Kende, H. (1987). Studies on internodal growth using deepwater rice. In *Physiology of Cell Expansion During Plant Growth*: Cosgrove, D.J., Knievel, D.P., eds. American Society of Plant Physiologists, Rockville, Md., USA, pp. 227-238.

Knaap, E.V.D., and Kende, H. (1995). Identification of a gibberellin-induced gene in deepwater rice using differential display of mRNA. *Plant Mol. Biol.* **28**, 589-592.

Kobayashi, M., Yamaguchi, I., Murofushi, N., Ota, Y., and Takahashi, N. (1988). Fluctuation and localization of endogenous gibberellins in rice. *Agric. Biol. Chem.* **52**, 1189-1194.

Kobayashi, M., Sakurai, A., Saka, H., Takahashi, N. (1989). Quantitative analysis of endogenous gibberellins in normal and dwarf cultivars of rice. *Plant Cell Physiol.* **30**, 963-969.

Kobayashi, M., Kamiya, Y., Sakurai, A., Saka, H., Takahashi, N. (1990). Metabolism of gibberellins in cell-free extracts of anthers from normal and dwarf rice. *Plant Cell Physiol.* **31**, 289-293.

- Koornneef, M., van Eden, J., Hanhart, C.J., and de Jongh, A.M.M. (1983). Genetic fine-structure of the *GA-1* locus in the higher plant *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Genet. Res., Camb.* **41**, 57-68
- Kuntz, M., Römer, S., Suire, C., Huguency, P., Weil, J.H., Schantz, R., and Camara, B. (1992). Identification of a cDNA for the plastid-located geranylgeranyl pyrophosphate synthase from *Capsicum annuum*: Correlative increase in enzyme activity and transcript level during fruit ripening. *Plant J.* **2**, 25-34.
- Kuroguchi, S., Murofushi, N., Ota, Y., and Takahashi, N. (1979). Identification of gibberellins in the rice plant and quantitative changes of gibberellin A₁₉ throughout its life cycle. *Planta* **146**, 185-191.
- Kwak, S.S., Kamiya, Y., Sakurai, A., Takahashi, N., and Graebe, J.E. (1988). Partial purification and characterization of gibberellin 3 β -hydroxylase from immature seeds of *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Cell Physiol.* **29**, 935-943.
- LaFever, R.E., Stofer Vogel, B., and Croteau, R. (1994). Diterpenoid resin acid biosynthesis in conifers: Enzymatic cyclization of geranylgeranyl pyrophosphate to abietadiene, the precursor of abietic acid. *Arch. Biochem. Biophys.* **313**, 139-149
- Lange, T., Hedden, P., and Grabe, J.E. (1993). Biosynthesis of 12 α - and 13-hydroxylated gibberellins in a cell-free system from *Cucurbita maxima* endosperm and the identification of new endogenous gibberellins. *Planta* **189**, 340-349.
- Lange, T. (1994). Purification and partial amino-acid sequence of gibberellin 20-oxidase from *Cucurbita maxima* L. endosperm. *Planta* **195**, 108-115
- Lange, T., Hedden, P., and Grabe, J.E. (1994). Expression cloning of a gibberellin 20-oxidase, a multifunctional enzyme involved in gibberellin biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 8552-8556
- MacMillan, J. and Suter, P.J. (1958). The occurrence of gibberellin A₁ in higher plants: Isolation from seed of runner bean (*Phaseolus multiflorus*). *Naturwissenschaften* **45**, 46-47.
- Mann, V., Pecker, L., and Hischberg, J. (1994). Cloning and characterization of the gene for phytoene desaturase (*Pds*) from tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Plant Mol. Biol.* **24**, 429-434.

Mau, C.J.D., and West, C.A. (1994). Cloning of casbene synthase cDNA: Evidence for conserved structural features among terpenoid cyclases in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 8497-8501

McGarvey, D.J. and Croteau, R. (1995). Terpenoid metabolism. *Plant Cell* **7**, 1015-1026.

Moore, T.C., and Moore, J.A. (1991). Induction of *ent*-kaurene biosynthesis by low temperature in dwarf peas. *J. Plant Growth Regul.* **10**, 91-95

Nakayama, I., Kobayashi, M., Kamiya, Y., Abe, H., and Takahashi, N. (1992). Effects of a plant-growth regulator, prohexadione-calcium (BX-112), on the endogenous levels of gibberellins in rice. *Plant Cell Physiol.* **33**, 59-62.

Ogawa, M., Miyake, H., and Maeda, E. (1980). Light and electron microscope studies on synergistic interaction between gibberellic acid and 4-ethoxy-1-(*p*-tolyl)-5-triazine-2,6(1H,3H)-dione in growth of rice leaf sheaths. *J. Exp. Bot.* **31**, 533-544.

Phillips, A.L., Ward, D.A., Uknes, S., Appleford, N.E.J., Lange, T., Huttly, K.A., Gaskin, P., Graebe, J.E., and Hedden, P. (1995). Isolation and expression of three gibberellin 20-oxidase cDNA clones from *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **108**, 1049-1057

Phinney, B.O., and Spray, C. (1982). Chemical genetics and gibberellin pathway in *Zea mays* L. In *Plant Growth Substances*, P.F. Wareing, ed (New York: Academic Press), pp. 101-110.

Railton, I.D., Fellows, B., and West, C.A. (1984). *Ent*-kaurene synthesis in chloroplasts from higher plants. *Phytochemistry* **23**, 1261-1267

Reid, J.B. (1993). Plant hormone mutants. *J. Plant Growth Regul.* **12**, 207-226.

Restrepo, M.A., Freed, D.D., and Carrington, J.C. (1990). Nuclear transport of plant potyviral proteins. *Plant Cell* **2**, 987-998

Saito, T., Abe, H., Yamane, H., Sakurai, A., Murofushi, N., Takio, K., Takahashi, N., and Kamiya, Y. (1995). Purification and properties of *ent*-kaurene synthase B from immature seeds of pumpkin. *Plant Physiol.* **109**, 1239-1245.

Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. (Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory).

Sauter, M., Seagull, R.W., and Kende, H. (1993). Internodal elongation and orientation of cellulose microfibrils and microtubules in deepwater rice. *Planta* **190**, 354-362.

Scolnik, P.A., and Bartley, G.E. (1994). Nucleotide sequence of an *Arabidopsis* cDNA for geranylgeranyl pyrophosphate synthase. *Plant Physiol.* **104**, 1469-1470

Shechter, I., and West, C.A. (1969). Biosynthesis of gibberellins: IV. Biosynthesis of cyclic diterpenes from *trans*-geranylgeranyl pyrophosphate. *J. Biol. Chem.* **244**, 3200-3209.

Shimamoto, K., Terada, R., Izawa, T., and Fujimoto, H. (1989). Fertile transgenic rice plants regenerated from transformed protoplasts. *Nature* **338**, 274-276.

Shirahihara, Y., and Evans, P.R. (1988). Crystal structure of the complex of phosphofructokinase from *Escherichia coli* with its reaction products. *J. Mol. Biol.* **204**, 973-994.

Smith, V.A., Gaskin, P., and MacMillan, J. (1990). Partial purification and characterization of the gibberellin A₂₀ 3 β -hydroxylase from seeds of *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Physiol.* **94**, 1390-1401.

Song, L., and Poulter, C.D. (1994). Yeast farnesyl-diphosphate synthase: Site-directed mutagenesis of residues in highly conserved prenyltransferase domains I and II. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 3044-3048.

Spickett, C.M., Ponnampereuma, K., and Abell, C. (1994). The resolution of diterpene cyclase activities from *Ricinus communis*. *Phytochemistry* **37**, 971-973

Sun, T.-p., Goodman, H.M., and Ausubel, F.M. (1992). Cloning the *Arabidopsis* *GAI* locus by genomic subtraction. *Plant Cell* **4**, 119-128.

Sun, T.-p., and Kamiya, Y. (1994). The *Arabidopsis* *GAI* locus encodes the cyclase *ent*-kaurene synthetase A of gibberellin biosynthesis. *Plant Cell* **6**, 1509-1518.

- Suzuki, Y., Kuroguchi, S., Murofushi, N., Ota, Y., and Takahashi, N. (1981). Seasonal changes of GA₁, GA₁₉, and abscisic acid in three rice cultivars. *Plant Cell Physiol.* **22**, 1085-1093.
- Swain, S.M., Ross, J.J., Reid, J.B., and Kamiya, Y. (1995). Gibberellins and pea seed development. *Planta* **195**, 426-433.
- Tarshis, L.C., Yan, M., Poulter, C.D., and Sacchettini, J.C. (1994). Crystal structure of recombinant farnesyl diphosphate synthase at 2.6-Å resolution. *Biochemistry* **33**, 10871-10877.
- West, C.A., and Phinney, B.O. (1959). Gibberellins from flowering plants. I. Isolation and properties of gibberellin from *Phaseolus vulgaris* L. *J. Amer. Chem. Soc.* **81**, 2424-2427.
- Wickham, K.A., and West, C.A. (1992). Biosynthesis of rice phytoalexins: Identification of putative diterpene hydrocarbon precursors. *Arch. Biochem. Biophys.* **293**, 320-332.
- Winkler, R.G., and Helentjaris, T. (1995). The maize *Dwarf3* gene encodes a cytochrome P450-mediated early step in gibberellin biosynthesis. *Plant Cell* **7**, 1307-1317.
- Xu, Y.-L., Li, L., Wu, K., Peeters, A.J.M., Gage, D.A., and Zeevaart, J.A.D. (1995). The *GA5* locus of *Arabidopsis thaliana* encodes a multifunctional gibberellin 20-oxidase: Molecular cloning and functional expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 6640-6644.
- Zeevaart, J.A.D., and Gage, D.A. (1993). *Ent*-kaurene biosynthesis is enhanced by long day photoperiods in the long-day plants *Spinacia oleracea* L. and *Agrostemma githago* L. *Plant Physiol.* **101**, 25-29.
- Zeevaart, J.A.D., and Talon, M. (1992). Gibberellin mutants in *Arabidopsis thaliana*. In *Progress in Plant Growth Regulation*, C.M. Karssen, L.C. Van Loon and D. Vreugdenhil, eds (Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers), pp. 34-42.

Zheng, J., Knighton, D.R., Ten Eyck, L.F., Karlsson, R., Xuong, N.-H., Taylor, S.S., and Sadowski, J.M. (1993). Crystal structure of the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase complexed with MgATP and peptide inhibitor. *Biochemistry* 32, 2154-2161.

薮田貞次郎, 住木諭介 (1938) 馬鹿苗病菌の生化学 (統報) 植物を徒長せしむる作用ある物質 (gibberellin) の結晶に就いて. 日本農芸化学会誌, 14, 1526.

斎藤臣雄 (1993) ジベレリン生合成酵素の精製と阻害物質に関する研究, 東京大学, 博士論文

杉浦昌弘・編集 (1989) クローニングとシークエンス, 農村分化社

謝辞

本研究を行うにあたり、多くの方々にお世話になりました。ここにお礼申し上げます。終始懇切丁寧なる御指導、御鞭撻を賜りました東京大学大学院農学生命科学研究科、生物制御化学研究室の室伏旭教授、山口五十磨助教授に深く感謝の意を表します。東京大学生物生産工学研究センター・助教授、山根久和先生には常に暖かいご指導、ご教示をいただきました。心よりお礼申し上げます。理化学研究所、国際フロンティア、ホルモン機能研究チームの神谷勇治先生には、素晴らしい研究テーマを与えていただき、博士論文研究全般にわたり直接御指導いただいただけでなく、本当に多くのことを教えていただきました。心より感謝いたします。東京大学大学院農学生命科学研究科、生物制御化学研究室の鈴木義人先生、中嶋正敏先生には終始暖かい御助言、御指導をいただきました。ここにお礼申し上げます。プローブを御供与いただいただけでなく、共同研究者として常に適切なアドバイスをくださいました、米国、デューク大の Tai-ping Sun 博士に心よりお礼申し上げます。理化学研究所・植物生活環境制御研究室の斎藤臣雄博士、安部弘博士には、本研究の基盤を築いていただいただけでなく、終始懇切丁寧な御指導をいただきました。深く感謝いたします。また、同じく植物生活環境制御研究室の小林正智博士には、貴重な御助言、御指導をいただきました。ここにお礼申し上げます。

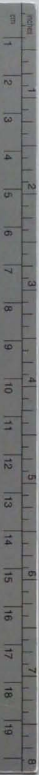
東京大学附属多摩農場の山岸順子博士には、イネの栽培で大変お世話になりました。ここに深くお礼申し上げます。酷暑のなか、東京大学附属多摩農場でイネの蒔の採取を手伝ってくださった東京大学生物制御化学研究室の大山直美氏、榎野真喜子氏、生物制御工学研究室の小川祥子氏、中川善一氏に感謝致します。また、カウレン合成酵素 B の機能解析でお世話になりました理化学研究所・ホルモン機能研究チーム、川出洋博士に心より感謝いたします。また、同・光合成科学研究室の藤木正見博士には、葉緑体への移行実験を御指導いただいただけでなく、論文作成に当たり貴重なご助言をいただきました。ここに深く感謝致します。カボチャの GA 20-酸化酵素のプローブを御供与いただきましたドイツ・ゲッチンゲン大の Theodore Lange 博士、ブラズミド pRTL2 を御供与いただきました米国・テキサス大の James Carrington 博士、イネの cDNA library を快く分与くださいました東京大学分子細胞生物学研究所の内宮博文教授に心よりお礼申し上げます。また、ウニコナゾールを御供与いただきました住友化学株式会社にお礼申し上げます。論文作成にあたり、英国・ブリストル大の Andy Phillips 博士、米国・ミシガン州立大の Stephen Swain 博士、同・デューク大の Aron Silverstone 博士には非常に有益なアドバイスをいただきました。ここに深くお礼申し上げます。

本研究は、理化学研究所・国際フロンティア・ホルモン機能研究チームにおいて行われたものであり、同研究室の博士研究員、研修生の方々の大きな支えによってここまでまとめることができました。姜鳳中博士、李海航博士、Stephen Swain 博士、梁泳烈博士、豊増知伸博士、Tahah Ait-Ali 博士、今井亮三博士、川出洋博士、関本弘之博士、Mariken Rebers 博士、Maria Smith 博士、Robert Brown 博士、Steve Smith 氏、Jan Rijnders 氏、古川浩二氏、遠藤文志郎氏には、常に暖かい御指導をいただいただけでなく、論文作成にあたり貴重なご助言をいただきました。本当にありがとうございました。また、同研究室のテクニカルスタッフである高木さつきさん、立山幸路さんにも大変お世話になりました。ここにお礼申し上げます。

最後になりましたが、6年間の長きにわたり様々な面でお世話になりました。東京大学・生物制御化学研究室（旧薬学研究室）の皆様、卒業生、諸先輩方にお礼申し上げます。ありがとうございました。

1996年 新春 山口信次郎





Kodak Color Control Patches

Blue Cyan Green Yellow Red Magenta White 3/Color Black



Kodak Gray Scale

A 1 2 3 4 5 6 M 8 9 10 11 12 13 14 15 B 17 18 19



© Kodak, 2007 TM Kodak