

ジペレリン受容タンパク質の
検索および性状解析

中 嶋 正 敏

ジベレリン受容タンパク質の検索および性状解析

Screening and Characterization of Receptor-like Gibberellin-binding Proteins

中嶋 正敏

目次

略語表

図表題目一覧

ページ

.... (3)

.... (4)

第1章: 本研究の背景と目的

1-1: オーキシシン結合タンパク質研究の歴史 1
1-2: サイトカイニン結合タンパク質研究の歴史 8
1-3: アブシジン酸結合タンパク質研究の歴史 9
1-4: エチレン結合タンパク質研究の歴史 10
1-5: フシコキシシン結合タンパク質研究の歴史 12
1-6: ジベレリン結合タンパク質研究の歴史 13
1-7: ジベレリン受容体を対象とする種々のアプローチ 16
1-8: 本博士論文研究の目的 18

第2章: 活性型ジベレリンに特異的に結合する抗体の調製とその応用

2-1: 緒言 19
2-2: 活性型ジベレリンに特異的に反応する抗体の調製	
2-2-1: 免疫原の調製 23
2-2-2: 活性型ジベレリンに特異的に反応する抗体の調製 25
2-2-3: 抗GA ₁ メチルエステル抗体を用いた定量分析法との比較 30
2-3: 特異抗体の応用(1) イムノアフィニティークラムの検討	
2-3-1: 遊離状態の抗体を用いた解離促進要因の検討 32
2-3-1-1: カオトロピックイオンの影響	
2-3-1-2: 有機溶媒による影響	
2-3-1-3: pH環境の変化による影響	
2-3-2: イムノアフィニティークラムを用いた溶出系の検討 37
2-3-3: イネの蒴中のジベレリン分析への応用 40
2-4: 特異抗体の応用(2) 抗イディオタイプ抗体の調製	
2-4-1: 抗イディオタイプ抗体の生成についての確認 42
2-4-2: 各種抗イディオタイプ抗体における識別領域の差異 42
2-5: 実験の部 45

第3章: ヤエナリ幼植物体からのGBPの抽出・精製とその性状解析

3-1: 緒言 53
3-2: ヤエナリGBPの抽出・精製および単離	
3-2-1: アフィニティークラムによる精製 55
3-2-2: 陰イオン交換ゲルによる精製 56
3-2-3: ゲル濾過カラムクロマトグラフィーによる精製 56
3-2-4: ヤエナリGBPの精製効率 56
3-2-5: ヤエナリGBPのサブユニット解析とアミノ酸の部分配列の解析 61
3-3: ヤエナリGBPの性状解析	
3-3-1: 電気泳動ゲルからの電気的回収法によるヤエナリGBPの特定 63
3-3-2: ヤエナリGBPのGA ₄ に対する親和性 63
3-3-3: ヤエナリGBPの基質選択性 66
3-3-4: ヤエナリGBPのpH依存性 66
3-4: ヤエナリ種子中の内生ジベレリンの分析 71
3-5: ヤエナリGBPについての総括 74
3-6: 実験の部 75

第4章: アブラナ幼植物体からのGBPの抽出・精製とその性状解析	
4-1: 緒言 80
4-2: アブラナGBPの抽出・精製	
4-2-1:疎水性カラムクロマトグラフィーによる精製 81
4-2-2:陰イオン交換カラムクロマトグラフィーによる精製 82
4-2-3:疎水性カラムを用いたHPLCによる精製 82
4-2-4:アブラナGBPの精製効率 82
4-3: アブラナGBPの性状解析	
4-3-1:アブラナGBPのサブユニット構造の解析 87
4-3-2:アブラナGBPの親和性 87
4-3-3:アブラナGBPのpH依存性 91
4-3-4:アブラナGBPの基質選択性 91
4-4: アブラナGBPについての総括 95
4-5: 実験の部 96
第5章: アズキ幼植物体からのGBPの抽出・精製とその性状解析	
5-1: 緒言100
5-2: ゲル濾過カラムを用いたGBP検出系の構築	
5-2-1:ジベレリン標識体の調製103
5-2-2:ゲル濾過カラムを用いた結合活性測定法の確立と検証106
5-2-2-1:結合活性測定法の確立	
5-2-2-2:ゲル濾過法と硫酸沈殿法との比較	
5-3: アズキGBPの抽出・精製および性状解析	
5-3-1:各種ジベレリンに対する胚軸切片の応答と生育条件, pHの影響110
5-3-2:アズキGBPの抽出・精製114
5-3-2-1:GBP抽出材料としてのアズキの至適生育条件	
5-3-2-2:アズキ上胚軸の調製とGBPの抽出	
5-3-2-3:疎水性カラムクロマトグラフィーによる精製	
5-3-2-4:イオン交換カラムクロマトグラフィーによる精製	
5-3-2-5:ゲル濾過カラムHPLCによる精製および分子量の推定	
5-3-2-6:アズキGBPの精製効率	
5-3-3:アズキGBPの性状解析121
5-3-3-1:アズキGBPのpH依存性	
5-3-3-2:アズキGBPのGA ₄ に対する親和性	
5-3-3-3:アズキGBPの基質選択性	
5-4: アズキGBP精製法としてのアフィニティーゲルの活用	
5-4-1:アフィニティーゲルの調製127
5-4-2:抗体を用いた各種アフィニティーゲルの有効性の検討129
5-4-3:アフィニティーゲル活用の可能性の検証(1)132
5-4-4:アフィニティーゲル活用の可能性の検証(2)135
5-5: アズキGBPについての総括137
5-6: 実験の部138
第6章: 本研究の構成および概要145
参考文献149

略語表

ABA	abscisic acid
ABP	auxin-binding protein
AcOH	acetic acid
AcOEt	ethyl acetate
BA	N^6 -benzylaminopurine
BSA	bovine serum albumin
CAPS	cyclohexylaminopropanesulfonic acid
CBB	coomassie brilliant blue
CBP	cytokinin-binding protein
CMA	carboxymethylcellulose
CMO	carboxymethylcellulose
CNBr	cyanogen bromide
2,4-D	2,4-dichlorophenoxyacetic acid
DCC	N,N' -dicyclohexylcarbodiimide
DEA	diethylaminoethyl
DMF	N,N -dimethylformamide
DW	distilled water
EBP	ethylene-binding protein
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
eq.	equivalent
FAB/MS	fast atom bombardment mass spectrometry
FBP	fusicoccin-binding protein
fr. wt.	fresh weight
GA	gibberellin
GBP	gibberellin-binding protein
GC/MS	gas chromatography/mass spectrometry
GTP γ S	guanosine-5'- γ -(3-thiophosphate)
HAT	hypoxanthine-aminopterin-thymidine
HEPES	N -(2-hydroxyethyl)piperazine- N' -2-ethanesulfonic acid
HPLC	high performance liquid chromatography
IAA	indoleacetic acid
IAC	immunoaffinity chromatography
i.d.	inside diameter
Ig	immunoglobulin
KSCN	potassium thiocyanate
LC/APCI-MS	liquid chromatography/atmospheric chemical pressure ionization-mass spectrometry
NHSI	N -hydroxysuccinimide
2-ME	2-mercaptoethanol
MeOH	methanol
MES	2-(N -morpholino)ethanesulfonic acid
MW	molecular weight
NMR	nuclear magnetic resonance
NAA	naphthaleneacetic acid
NPA	(2-naphthoxy)propionic acid
ODS	octadecylsilane
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
PBS	phosphate buffered saline
PMSF	phenylmethylsulfonyl fluoride
PTH	N -phenylthiohydantoin
PVDF	polyvinylidene difluoride
PVPP	polyvinylpyrrolidone
RIA	radio-immunoassay
rpm	revolutions per minute
Rt	retention time
SDS	sodium dodecyl (lauryl) sulfate
SIMS	secondary ion mass spectrometry
TIBA	2,3,5-triiodobenzoic acid
TLC	thin layer chromatography
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethane
UB	unspecific binding
UV	ultra violet

■図表題目一覧

表1-1	トウモロコシABP1の検出・精製に関する報告
表1-2	ABP1以外のオーキシン結合タンパク質の検出・精製に関する報告
表1-3	フォトアフィニティー標識法により検出されたオーキシン結合タンパク質
表1-4	サイトカニン結合タンパク質の検出・精製に関する報告
表1-5	アブジシン酸結合タンパク質の検出・精製に関する報告
表1-6	エチレン結合タンパク質の検出・精製に関する報告
表1-7	フシコキシン結合タンパク質の検出・精製に関する報告
表1-8	ジベレリン結合タンパク質の検出・精製に関する報告
図2-1	植物におけるジベレリンの代表的な生合成経路
図2-2	ジベレリンの基本骨格構造
図2-3	免疫原の調製方法
図2-4	モノクローナル抗体の調製方法
図2-5	基質選択性の検討に用いたジベレリンの構造式
図2-6	二つの免疫原の構造式
図2-7	塩の抗原抗体反応に与える影響
図2-8	塩濃度と抗体の安定性
図2-9	有機溶媒の抗原抗体反応に与える影響
図2-10	有機溶媒濃度と抗体の安定性
図2-11	pH環境の抗原抗体反応に与える影響
図2-12	抗GA ₁ -Me抗体を用いた場合のpH環境変化が抗原抗体反応に与える影響
図2-13	pH環境変化と抗体の安定性
図2-14	イムノアフィニティークラムにおける標識GA ₁ の挙動
図2-15	確立した溶出系を用いた場合の標識GA ₁ の溶出状況
図2-16	イネ葯中の活性型ジベレリンの精製および定量分析法
図2-17	免疫原の構造についての比較
図2-18	抗イディオタイプ抗体における力価の算出方法
表2-1	抗体のGA ₄ に対する親和性
表2-2	抗体における基質選択性の比較
表2-3	イネ葯中の活性型ジベレリンの定量結果
表2-4	イムノアフィニティークラムにおける溶出系の検討
表2-5	活性型ジベレリンの精製におけるイムノアフィニティークラムの有効性の検討
表2-6	抗イディオタイプ抗体の生成確認(1)
表2-7	抗イディオタイプ抗体の生成確認(2)
表2-8	各種抗イディオタイプ抗体の交差反応性
図3-1	GBPの抽出に用いた黄化ヤエナリ幼植物体
図3-2	GA ₃ およびアフィニティークラムの構造
図3-3	アフィニティークラムを用いた精製後のGBP活性
図3-4	陰イオン交換カラムを用いた精製後のGBP活性
図3-5	ゲル濾過カラムクロマトグラフィーによるヤエナリGBPの精製
図3-6	ゲル濾過カラムクロマトグラフィーにより得られた活性画分のSDS-PAGE
図3-7	活性画分のタンパク質量と結合活性量の関係
図3-8	ヤエナリGBPのサブユニット構造
図3-9	ヤエナリGBP23kDaサブユニットのN末端アミノ酸配列分析
図3-10	電気的回収法によるヤエナリGBPの特定
図3-11	ヤエナリGBPのGA ₄ に対する親和性

図3-12	基質選択性の検討に用いたジベレリンの構造式
図3-13	ヤエナリGBPのpH依存性
図3-14	内生ジベレリンの定量分析を行った各種植物材料
図3-15	ヤエナリ幼植物体中の内生ジベレリンの定量分析
表3-1	ヤエナリGBPの回収・結合活性ならびに精製効率
表3-2	ヤエナリGBPの基質選択性
図4-1	GBPの抽出に用いた黄化アブラナ幼植物体
図4-2	疎水性カラムを用いた精製後のGBP活性
図4-3	陰イオン交換カラムを用いた精製後のGBP活性
図4-4	疎水性カラム-HPLCにおけるUV吸収クロマトグラム
図4-5	疎水性カラム-HPLCにより得られた画分のGBP活性
図4-6	疎水性カラム-HPLCによる精製で得られた画分についてのSDS-PAGE
図4-7	陰イオン交換カラムによる精製で得られた画分についてのSDS-PAGE
図4-8	アブラナGBPのGA ₃ に対する親和性
図4-9	アブラナGBPのpH依存性
図4-10	基質選択性の検討に用いた化合物の構造式
表4-1	アブラナGBPの回収・結合活性ならびに精製効率
表4-2	アブラナGBPの基質選択性
図5-1	種々のGBPの検出方法
図5-2	³ H ₄ -16,17-dihydroGA ₄ の調製
図5-3	特異抗体を用いた活性型標識ジベレリンの特定
図5-4	ゲル濾過カラムを用いたGBP検出法の構築
図5-5	二種のGBP検出法における抗体の性状比較
図5-6	光環境の変化とアズキの切片伸長
図5-7	pH環境の変化とアズキの切片伸長
図5-8	GBPの抽出に用いた黄化アズキ幼植物体
図5-9	ゲル濾過カラム-HPLCにより得られた画分のGBP活性
図5-10	アズキGBPの分子量の算出
図5-11	ゲル濾過カラム-HPLCによる精製で得られた画分についてのSDS-PAGE
図5-12	アズキGBPのpH依存性
図5-13	アズキGBPのGA ₄ に対する親和性(1)
図5-14	アズキGBPのGA ₄ に対する親和性(2)
図5-15	基質選択性の検討に用いたジベレリンの構造式
図5-16	GA ₄ ノルケトンのおキシム体の構造
図5-17	調製された各種アフィニティーゲルの構造
図5-18	アフィニティーゲルにおける特異抗体の吸着・溶出状況
図5-19	アフィニティーカラムとイムノアフィニティーカラムとの比較
図5-20	アズキGBPに対するGA ₄ 誘導体の親和性の比較
表5-1	ジベレリンによる伸長促進活性
表5-2	種々の生理活性検定法におけるジベレリンの伸長促進活性
表5-3	光環境とアズキGBP活性
表5-4	アズキGBPの回収・結合活性ならびに精製効率
表5-5	アズキGBPの基質選択性
表5-6	アズキGBP精製のためのアフィニティーカラムの有効性の検討
表6-1	本研究において追究されたGBPと既報GBPとの比較

■■■■第1章■■■■

本研究の背景と目的

植物ホルモンをはじめとして植物の生長を制御する種々の生理活性物質が現在までに数多く知られている。また、それらの動態と生理現象との関連性についても多くの知見が蓄積されている。特に現在では、それらのシグナル伝達機構あるいは遺伝子発現調節機構についての解明が重要な課題として注目を集めている。近年、こうした機構を解析すべく、対応する受容体タンパク質の探索が盛んに行われるようになった。その端緒として、各物質と結合するタンパク質が現在までに数多く報告されている。そこで本研究を着手するにあたり、ジベレリンに先行して結合タンパク質の研究が展開されている他の生理活性物質について触れ、それぞれの研究の歴史と現状について紹介する。ここではオーキシシン、サイトカイニン、アブシジン酸、エチレンなどの植物ホルモンと、植物毒素のフシコキシンの計5種類の生理活性物質を取り上げた。それに続いて本研究で取り扱うジベレリン結合タンパク質に関する国内外の研究の進展状況の把握を行い、それらの状況をふまえた上での本研究のねらいについて述べる。

1-1: オーキシシン結合タンパク質研究の歴史

オーキシシンは茎部伸長の制御や細胞の分裂促進など種々の局面で重要な役割を果たす植物ホルモンである。オーキシシンの結合タンパク質(ABP)に関する報告のうち、オーキシシン受容体の筆頭候補と考えられ、現在までに最も多くの知見が得られているのはトウモロコシの子葉鞘から検出されたABP1である。1972年、Hertelらにより子葉鞘の膜画分中よりその存在が初めて報告され、インドール酢酸(IAA)以外に合成オーキシシンである1-NAAなどに高い親和性を示す一方、ベンジルアデニン、アブシジン酸、ジベレリンA₃などの他の植物ホルモンや、オーキシシンの輸送阻害剤であるナフトキシプロピオン酸等には親和性を示さないことが示された。その後、Venis(1977)により未変性状態におけるABP1タンパク質の分子量は約40~45kDaであることが示され、ABP1の精製方法についても界面活性剤の使用により若干の進展が見られたものの、最終的に単離には至らなかった。ABP1の単離は1985年、LoeblerとKlaembtにより、また翌年にはShimomuraら(1986)により相次いで報告された。その性状として、ナフトレン酢酸(1-NAA)に対する解離定数が $5 \sim 6 \times 10^{-8}$ M程度、結合に関する至適pH

は5.5、未変性条件下では22kDaサブユニットのホモ2量体として存在し、糖鎖付加部位が存在することなどが判明した。それ以降、ABP1の検出に関する報告は現在も続いており、これまでの報告例についてまとめて表1-1に示す。

現在、このABP1がオーキシンの受容体であると強く支持される根拠として、Barbierらの研究グループを中心とする一連の植物電気生理学的な実験の成果がある。Barbierらは1989年に、活性型オーキシシンにより有意に、タバコ葉肉細胞の原形質膜電位が過分極をひきおこす実験系を用いて、ABP1に対するポリクローナル抗体が活性型オーキシシンによる過分極を抑制したと報告している。さらにこの過分極現象については、 H^+ -ATPaseに対する抗体を用いた場合でも同様の抑制効果が認められたことから、それ以降、ABP1は H^+ -ATPaseの活性発現と深く関連づけて考えられるようになった。また、1991年に彼らは同様の実験系を用いて、抗体ではなくABP1を添加した場合にはABP1を添加しない条件と比較して1-NAAに対する感受性が約1000倍上昇したと報告している。さらにVenisら(1992)はABP1の部分配列に相当するペプチドに対するモノクローナル抗体を幾つか調製しているが、その中には前述のタバコ葉肉細胞の応答系において、オーキシシンと同様に過分極をひきおこすアゴニスト活性を有する抗体が存在したと報告している。また、Thielら(1993)は、ABP1のC末端13個のアミノ酸からなるペプチドが、 K^+ イオンチャンネルの活性を阻害したとも報告している。この様な状況から、ABP1が生理的に重要な役割を担っている可能性は極めて高く、受容体候補として多くの研究者から支持されている。しかし、一部には未だ疑問を抱いている研究者も存在する。最近になって、ABP1の生みの親とでも言うべき Hertelすらも、ABP1を受容体として盲信することへの警鐘を鳴らしている(Hertel, 1995)。彼が危惧する最大のポイントはABP1の基質選択性についてであり、検討したオーキシシン関連物質のABP1に対する親和性と植物体に対する生理的な活性とが必ずしも対応しない点を挙げている。例えば、4-Cl-IAAは1-NAAと比較して、葉鞘の伸長生理活性は約10倍と極めて強い活性を示すのに対し、ABP1への親和性は1/100程度と低い値しか示さない。これについては代謝速度などの観点から反論が展開されているが、いずれも説得に足るものは報告されていない。また、細胞内におけるABP1の局在部位についても情報が錯綜している。Inoharaら(1989)、Tillmannら(1989)、また Hesseら(1989)によりABP1のC末端には4つのアミノ酸(-K-D-E-L)の配列からなる小胞体停滞シグナル配列が認められたことから、ABP1の主要な局在部位については当初、小胞体膜と推定された。また、細胞の構成成分の系統的な分画においてもABP1

表1-1 トウモロコシABP1の検出・精製に関する報告

植物材料	存在場所	分子量	分子量	存在量	解離定数	検出手段(注)	
		未変性条件	変性条件		(pmol/)		
		(kDa)	(kDa)	mg prot.)	(M)		
Maize coleoptile	ミトコンドリア画分	---	---	---	1.2×10^{-6}	超速心	(Hertelet al., 1972)
Maize coleoptile	ミトコンドリア画分	40-45	---	14	1.7×10^{-7}	平衡透析	(Venis, 1977)
Maize coleoptile	ミトコンドリア画分	40-45	---	51	1.4×10^{-6}	平衡透析	(Venis, 1977)
Maize coleoptile	ミトコンドリア画分	40	20	17	5.7×10^{-8}	平衡・超速心・硫酸	(Loebler & Kilaembt, 1985)
Maize shoot	小胞体膜	42	21	48	5.9×10^{-8}	ゲル濾過	(Shimomura et al., 1986)
Maize shoot	小胞体膜	---	20	---	---	---	(Shimomura et al., 1986)
Maize coleoptile	小胞体膜	44	22	74	---	平衡・ゲル濾過	(Napier et al., 1988)
Maize coleoptile	小胞体膜	---	21	---	---	---	(Napier et al., 1988)
Maize	小胞体膜	---	22	---	---	フットリノイターベ	(Jones & Venis, 1989)
Maize	小胞体膜	---	24	---	---	フットリノイターベ	(Jones & Venis, 1989)
Maize coleoptile	ミトコンドリア画分	---	22	---	2.4×10^{-7}	---	(Campos et al., 1991)
Maize root	ミトコンドリア画分	---	18.6	28	7×10^{-10}	平衡透析	(Radermacher et al., 1993)
Maize root	ミトコンドリア画分	---	18.6	180	6.9×10^{-9}	平衡透析	(Radermacher et al., 1993)
Maize shoot	ミトコンドリア画分	---	22	---	---	フットリノイターベ	(Brown & Jones, 1994)
(Spodoptera)	小胞体膜	---	22	---	1.4×10^{-7}	硫酸沈殿	(MacDonald et al., 1994)
(Ces? cell)	小胞体膜	---	---	---	---	フットリノイターベ	(Tian et al., 1995)

(---): No Dataを意味する。(注): 平衡は平衡透析法、硫酸は硫酸沈殿法を意味する。

表1-2 ABP1以外のオーキシン結合タンパク質の検出・精製に関する報告

植物材料	存在場所	分子量	分子量	存在量	解離定数	検出手段(注)	
		未変性条件	変性条件		(pmol/)		
		(kDa)	(kDa)	mg prot.)	(M)		
Mung bean seedling	細胞質	390	47/15	4.2	3.2×10^{-6}	硫酸沈殿	(Sakai & Hanagata, 1983)
Mung bean seedling	細胞質	190	48	4.9	9.5×10^{-6}	硫酸・平衡	(Sakai, 1985)
Mung bean seedling	細胞質	---	---	---	---	硫酸沈殿	(Kikuchi et al., 1989)
Rice coleoptile	ミトコンドリア画分	---	---	---	---	NC膜濾過	(Zaina et al., 1990)
(various plant)	細胞質・核	---	65	---	---	抗イリゲ抗体	(Prasad & Jones, 1991)
Carrot embryo	ミトコンドリア画分	---	---	430	5×10^{-8}	イリゲ抗体	(Lo Schiavo et al., 1991)
Wheat coleoptile	原形質膜	---	---	---	1.1×10^{-8}	---	(Darzinsviciene et al., 1992)
Peach shoot apex	細胞質	100	20	36	4×10^{-6}	平衡透析	(Ohnishi et al., 1993)
Pea epicotyl	細胞質	82	44	---	7.5×10^{-9}	平衡透析	(Reinard & Jacobsen, 1995)

(---): No Dataを意味する。(注): 平衡は平衡透析法、硫酸は硫酸沈殿法、NC膜濾過はニトロセルロース膜を用いたフィルター濾過法を意味する。

は小胞体膜由来の画分中に検出されるケースが多かった(Shimomura, 1986; Napier *et al.*, 1988; Jones and Venis, 1989)。さらにNapierら(1992)も、ABP1に対するモノクローナル抗体を用いた免疫染色により小胞体膜上にABP1が存在することを報告している。ところがこれらの実験結果と異なる報告も存在する。LoeblerとKlaemdt(1985)は、ABP1に対する抗体を用いてトウモロコシの子葉鞘の伸長が阻害されることを示している。抗体の様な高分子は少なくとも分解されなければ原形質膜を通過することは不可能と考えられており、このことは抗ABP1抗体を受容する部位が少なくとも原形質膜表面に存在することを意味している。また、前述のBarbierらの植物電気生理学的な実験結果はプロトプラスト細胞を用いて行われたものであり、すべて原形質膜を介した応答系であると考えられる。更にJonesとHerman(1993)は金コロイド標識抗体を用いた免疫細胞化学的アプローチにより、主に原形質膜表層や細胞壁にABP1の分布を認めている。同様にDiekmannら(1995)も活性型オーキシンにより特異的に原形質膜表層におけるABP1のクラスター(集合)化現象が引き起こされることを報じており、オーキシンのシグナル伝達系を考える上でも小胞体膜より原形質膜上にABP1が存在すると考える方が合理的であると唱えた。これに追い打ちをかけるように、最近になってTianら(1995)は小胞体内での環境条件(pH7.0)では、本来至適pHが5.5付近であるABP1はほとんどオーキシンに対する結合能がないことを報じている。また、彼らは小胞体膜にも原形質膜にもABP1が存在することの整合性を説明すべく、(1)翻訳されて成熟したABP1が一旦小胞体膜上に停滞し、(2)原形質膜を通過したオーキシンが小胞体膜上のABP1に捕捉されて、(3)ABP1のコンフォメーションが変化してC末端に存在する小胞体内停滞シグナルがマスクされ、(4)ABP1が原形質膜上へ分泌される、という仮想モデルを設定した。ミドリザルのCOS7細胞を用いたタンパク質発現系を用いてその検証を行っているが、想定したような変化は観察されていない。従って、ABP1が植物体内で生理的に重要な役割を担っている可能性は極めて高いものの、受容体であるか否かの真偽やその存在部位についての確定にはさらに多くの時間を費やすことになるだろう。

ABP1の他にも種々のオーキシン結合タンパク質が検出されている(報告例についてまとめて表1-2に示す)。Sakaiらのグループはヤエナリの胚軸を用いて細胞質画分中より2種類のタンパク質(ABP-I, ABP-II)を検出している。それらの基質選択性としては天然のオーキシンであるIAAよりも合成オーキシンである2,4-Dに、より高い親和性を示すことが明らかとなっている。また、2,4-Dに対する解離定数も 10^{-6} M程度と他のABPと比較して低い親和性しか示さないことから受容体候補としてABP1ほどには

期待されていない。しかしこのABPを単離核と共存させた場合、ABP-I・ABP-IIともにRNAポリメラーゼおよびDNAへの結合能を有し、RNA合成活性が上昇することが報告されている(Sakai and Hanagata, 1983; Sakai, 1985; Kikuchi *et al.*, 1989)。両者とも未だ単離には至っておらず、その後の詳細は報告されていない。また、Zainaら(1990)はイネの子葉鞘のミクロソーム画分中に新たなABPを検出しているが、このABPは同時にGTP γ Sとの結合能も有し、GTP γ S共存下でオーキシシンに対する親和性が上昇することや逆にオーキシシン共存下でGTP γ Sの結合量が增大することを報告している。この他、PrasadとJones(1991)は抗オーキシシン抗体のイディオトープに対する抗体(抗イディオタイプ抗体)を用いて様々な植物体から共通の分子量を持つABPを検出している。これらのABPは単離され、アミノ酸の配列分析の結果、グルタチオン-S-トランスフェラーゼと高い相同性を有することが明らかとなっている。また、Lo Schiavoら(1991)はニンジン細胞のミクロソーム画分中にABPを検出しているが、事前に2,4-D処理をするとこのABP量が増加することを報告している。Ohmiyaら(1993)はモモの茎頂から2,4-Dに高い基質特異性を示すABP19を報告している。このABP19は他の報告と異なり細胞壁に存在することが免疫組織化学的に示されている。最近、ReinardとJacobsen(1995)はインゲンの上胚軸の細胞質画分中よりABP₄₄と称するタンパク質を検出している。これは2,4-DやNAAなどにも中程度の親和性を示すが、IAAに最も高い親和性を示す一方、TIBAやNPAのようなオーキシシンの輸送に関する阻害剤には親和性を示さないことから、これまでのABPの中でも生理的な活性強度と良く対応するため注目に値する。また、その分布は上胚軸の基部や細胞分裂を停止した部位には存在せず、茎頂部だけに存在するらしく非常に興味深い。

一般に結合タンパク質は、その存在量の少なさからリガンドとの結合活性を指標にして精製・単離をすすめるためにはかなりの労力と時間を要する。そこで、IAAの光親和性標識体を用いて、比較的精製の初期段階でABPを標識・検出しようとする試みも多い(表1-3に光親和性標識IAAによるABPの検出例をまとめた)。JonesとVenis(1989)、Camposら(1991)、そしてBrownとJones(1994)が報告するように、トウモロコシのABP1もこの標識法により検出されているが、すでに活性本体の単離が報告された後でありインパクトは少なかった。むしろ注目すべきはABP1以外に検出されたABPである。Hicksら(1989a,b)はトマトとズッキーニの膜画分を用いて、それぞれABPを検出しているがABP1との相同性は低く、その基質特異性からオーキシシンの取り込みに関与するキャリアータンパク質であろうと推測している。Feldwischら(1992)も、トウモロコシの子葉鞘の原形質膜画分から同様にキャリアータンパク質をABPと

して検出している。MacDonaldら(1991)はヒヨスの培養細胞を用いて標識した結果、3種のポリペプチドを特定したが、うち2種はグルカナーゼ、残る1種はグルタチオン-S-トランスフェラーゼであることをアミノ酸配列分析から明らかにしている。また、Zettlら(1994)もアラビドプシスの原形質膜を用いて、グルタチオン-S-トランスフェラーゼに高い相同性を有するABPを標識している。Camposら(1992)は、トウモロコシの細胞質画分およびミクロソーム画分から、同一分子量の β -グルコヒドロラーゼをABPとして検出している。また、Feldwischら(1995)がトウモロコシの子葉鞘のミクロソーム画分から検出したABPはマンガン・スーパーオキシドディスムターゼに相同性を有していた。これら光親和性標識法により検出されたABPは総じてキャリアータンパク質や酵素が多く、おそらくこれらABPのオーキシシンに対する親和性は本来の受容体と比較してかなり低いものの、その存在量の豊富さゆえに頻繁に標識・検出されるものと推察される。このことは、精製の比較的早い段階における光標識により受容体を検出することの困難さを物語っている。このように様々な植物体から種々のABPがこの標識法により検出されているが、ABP1以外に微量であって単離されたものは少なく、受容体としての特性の有無を論ずるに足る証拠もほとんど示されていないのが現状である。

表1-3 フォトアフィニティー標識法により検出されたオーキシシン結合タンパク質

植物材料	存在場所	温度 (℃)	時間 (sec.)	Mr (kDa)	標識物の特定結果	
Zucchini hypocotyl	原形質膜	-196	15	40	auxin uptake carrier	(Hicks et al., 1989b)
Zucchini hypocotyl	原形質膜	-196	15	42	auxin uptake carrier	(Hicks et al., 1989b)
Tomato hypocotyl	ミクロソーム画	-196	10	40	auxin uptake carrier	(Hicks et al., 1989a)
Tomato hypocotyl	ミクロソーム画	-196	10	42	auxin uptake carrier	(Hicks et al., 1989a)
Miaze coleoptile	ミクロソーム画	0	15	22	ABP1	(Jones & Venis, 1989)
Miaze coleoptile	ミクロソーム画	0	15	24	unknown	(Jones & Venis, 1989)
Hyoscyamus culture	細胞質	0	30	24	glucanase	(MacDonald et al., 1991)
Hyoscyamus culture	細胞質	-196	60	25	glutathione S-transferase	(MacDonald et al., 1991)
Hyoscyamus culture	細胞質	0	30	31	glucanase	(MacDonald et al., 1991)
Maize	細胞質	-196	600	60	β glucosylhydrolase	(Campos et al., 1992)
Maize	ミクロソーム画	-196	600	60	β glucosylhydrolase	(Campos et al., 1992)
Miaze coleoptile	原形質膜	-196	600	23	auxin efflux carrier	(Feldwisch et al., 1992)
Miaze coleoptile	原形質膜	-196	600	24	unspecific?	(Feldwisch et al., 1992)
Arabidopsis	原形質膜	-196	600	24	glutathione S-transferase	(Zettl et al., 1994)
Miaze shoot	原形質膜	0	60	22	ABP1	(Brown & Jones, 1994)
Miaze coleoptile	ミクロソーム画	4	600	23	Mn superoxide dismutase	(Feldwisch et al., 1995)

表1-4 サイトカニン結合タンパク質の検出・精製に関する報告

植物材料	存在場所	分子量	分子量	存在量	解離定数	検出手段(注)
		未変性条件 (kDa)	変性条件 (kDa)		(pmol/ mg prot.) (M)	
Tobacco leaf	細胞質	---	4.3	---	4.5×10^{-5}	ゲル濾過 (Yoshida & Takegami, 1977)
Wheat embryo	細胞質	---	---	---	---	平衡透析 (Erion & Fox, 1981)
Wheat embryo	細胞質	160	54	---	5×10^{-7}	平衡透析 (Brincat et al., 1985)
Barley leaf	細胞質	---	46	1-2	1.5×10^{-8}	平衡-硫酸 (Romanov et al., 1988)
Barley leaf	細胞質	---	28.30	---	---	抗 <i>デイタ</i> 抗体 (Kulavova et al., 1990)
Tobacco leaf	細胞質	---	31	0.9	1.1×10^{-7}	平衡透析 (Momotani & Tsuii, 1992)
Mund bean seedling	細胞質	200	45/48	2.3	7.5×10^{-7}	硫酸沈殿 (Sakai & Kamei, 1992)
Tobacco leaf	細胞質	130	36/57	0.5	2.1×10^{-5}	ゲル濾過 (Mitsui & Sugisara, 1993)
Mund bean seedling	細胞質	21	---	0.003	3×10^{-10}	ゲル濾過 (Nagata et al., 1993)

(---): No Dataを意味する。(注): 平衡は平衡透析法、硫酸は硫酸沈殿法を意味する。

表1-5 アブシジン酸結合タンパク質の検出・精製に関する報告

植物材料	存在場所	分子量	分子量	存在量	解離定数	検出手段(注)
		未変性条件 (kDa)	変性条件 (kDa)		(pmol/ mg prot.) (M)	
Vicia guard cell	原形質膜	---	20-25	240	3×10^{-9}	カラムクロマトグラフィー (Harnberg & Weiler, 1984)
Barley cell culture	---	---	---	---	1.3×10^{-6}	フィルター濾過 (Ferraz et al., 1994)

(---): No Dataを意味する。

1-2: サイトカニン結合タンパク質研究の歴史

サイトカニンに対する結合タンパク質(CBP)として現在までに報告されたものについてまとめて表1-4に示す。1981年にErionとFoxによってコムギの胚から検出されたCBF-1は存在量が多く、胚の中の全可溶性タンパク質の約9%を占め、精製は比較的容易であった。同グループのBrinegarら(1985)によれば、CBF-1は発芽とともに急速に減少することから胚におけるサイトカニンの量的な調節に関わっている可能性が示唆された。さらに、CBF-1の推定分子量として未変性条件では160kDa、おそらく54kDaのポリペプチドの3量体として存在すると考えられており、その構造的類似性からビシリン等の貯蔵タンパク質ファミリーに属するのではないかと考えられている。また、Romanovら(1988)はオオムギの第1葉を用いて別のCBPを検出しているが、このCBPは1M程度の高塩濃度環境においてのみ結合能を有することが明らかにされている。サイトカニンに特異的な結合でありながら、なぜこの様に特殊な環境条件下でのみ親和性を示すのか現段階では未解明だが非常に興味深い。同グループのKulaevaら(1990)は、活性型サイトカニンであるベンジルアデニン(BA)を用いてアフィニティーカラムを調製し、BAに対する抗体の抗イディオタイプ抗体を用いたイムノアフィニティーカラムについても別途調製して、両方のカラムクロマトグラフィーから同一と思われるタンパク質の濃縮に成功している。しかし、精製に関してその後の進展はみられていない。この他にもYoshidaとTakegami(1977)、MomotaniとTsuji(1992)、SakaiとKamei(1992)らにより異種のCBPの検出例が報告されている。近年、MitsuiとSugiura(1993)は、タバコの葉の可溶性画分から新たにCBP130を検出し単離に至っている。このCBP130はBAに対する解離定数が 10^{-5} M程度と低い親和性を示し、サイトカニン以外のATPやcAMPにも結合性を示すことから、その基質選択性について疑問視する声もある。構成成分である2種のポリペプチド、CBP57とCBP36のうちCBP57についてのアミノ酸配列分析から、S-アデノシル-L-ホモシステインヒドロラーゼに高い相同性を有することが報じられ(Mitsui *et al.*, 1993b)、仮にCBP130がその様な酵素活性を有するならば、DNA等のメチル化に関与すると想定されることから遺伝子の発現調節を考える上で重要な役割を果たす可能性が期待されている。ただし現段階ではサブユニットCBP57が実際にそのような酵素活性を有するか否かは不明である。また最近、Nagataら(1993)は高い放射活性を有するピリジルウレア誘導体を用いてヤエナリの胚軸における可溶性画分中よりCSBPを精製している。これまでのCBPに関する報告と比較して2~3オーダー、親和性が高く(解離定数については 10^{-10} ~ 10^{-11} M)、ま

た存在量も極端に少ない。ウレア型、プリン型すべての活性型サイトカイニンに高い親和性を有し、さらにアンチサイトカイニンとも結合することから、現在受容体候補として最も注目されている。

1-3: アブシジン酸結合タンパク質研究の歴史

種子や芽の発芽阻害や気孔の開閉等の制御に関わるアブシジン酸について、その結合タンパク質(ABA-BP)として現在までに検出されたものをまとめて表1-5に示す。最初の報告はHornbergとWeiler(1984)らによって行われ、ABA-BPの検出に光親和標識法が用いられた。アブシジン酸は分子内に α, β -不飽和ケトンを包有するため、分子自身が光親和標識能を有する。彼らは報告の中で、孔辺細胞の細胞膜上にアブシジン酸の結合部位が存在し、アブシジン酸類縁体を用いて検討したABA-BPの基質選択性と用いたアブシジン酸類縁体の生理的な活性強度との間に良い相関関係を認めている。このことから現在においても有力な受容体候補と考えられているが単離には至っておらずその後の進展がみられない。Perrasら(1994)も別のABA-BPの検出を報告しているが、受容体である可能性が示唆されるような性状は有していなかった。この分野における最近の研究対象としては、受容体の存在部位の特定に関する報告が多い。Andersonら(1994)はツユクサの孔辺細胞を用いてマイクロインジェクション法によりアブシジン酸を細胞内に注入しても気孔の閉鎖を生じないことから、受容体は細胞膜外側の表層に存在すると結論づけている。同様に、GilroyとJones(1994)はオオムギ種子の糊粉層より調製したプロトプラストを用いて、細胞内に注入されたアブシジン酸はジベレリンによる α -アミラーゼの誘導を阻害しないことを示した。従って、受容体の存在部位に関してはAndersonらと同様の結論を導いている。このように異なる材料からアブシジン酸の受容体がともに細胞膜の外側に存在することが示唆されており信憑性は高いと考えられる。しかし、これに反駁する報告もある。Allanら(1994)は、光のエネルギーを受けて開裂反応により活性型アブシジン酸を生じるような不活性型誘導体(Caged ABA)を調製して、これを孔辺細胞に注入してからの気孔の開閉活性を観察している。これによれば、光照射により新たに生成する細胞内のアブシジン酸により気孔の開閉が認められたことから、受容体は細胞内に存在すると報告している。双方の主張がともに真実であれば、アブシジン酸の受容体は細胞膜内外の最低2カ所に存在することになる。

1-4: エチレン結合タンパク質研究の歴史

植物ホルモンの中で唯一、常温で気体として存在するエチレンについても結合タンパク質(EBP)が想定されている。表1-6にEBPとして現在までに検出されたものについてまとめて示す。SislerとWood(1988)らは、ヤエナリの膜画分を用いてEBPの存在を初めて報告している。さらにHallら(1990)はエチレン受容体の性状として、おそらく銅イオンを含有する糖タンパク質であろうと推測している。同様に、金属イオンがエチレンの受容に何らかの形で介在し、遷移状態の金属イオンがエチレン等のオレフィンと相互作用することにより活性の発現に影響を及ぼしている、とする説が現在でも強く支持されている(Burg and Burg, 1967; Beyer, 1979)。その後、EBPとして幾つか検出例が報告されたものの単離には至らなかった。ところが最近、SchallerとBleecker(1995)により*ETRI*と呼ばれる遺伝子がエチレン受容体をコードしている可能性が極めて高いという実験結果が報告された。もともと*ETRI*遺伝子は、エチレン非感受性変異体の変異部位として想定されたもので、応答系に関する各種の変異体との交雑結果により、エチレンのシグナル伝達経路上のかなり上流に*ETRI*遺伝子は関与すると推定されていた。この様なことから受容体の変異である可能性が以前から指摘されていたこともあって、遺伝子自体は同グループのChangら(1993)によりクロモソームウォーキングにより単離され塩基配列も決定されたが、機能については不明のままであった。*ETRI*は優性遺伝子で、その塩基配列からtwo component systemを形成する可能性を有しており、中央部に膜貫通領域とC末端側に膜貫通型ヒスチジンキナーゼ相同領域およびリン酸化に関する調節領域と思われる配列が存在していた。そこで専ら焦点は、酵母などで報告例の多いtwo component systemに照らし合わせ、おそらくN末端側に存在するはずのエチレンの受容に関与する領域の特定に注目が集まっていた。この*ETRI*産物の植物体内におけるエチレンとの結合能については未だ不明であるが、前出のSchallerとBleecker(1995)は出芽酵母内で発現させた*ETRI*タンパク質が2量体として存在し、 10^{-9} M程度の高い親和性でエチレンとの結合能を有することを報告したことから、かなりの高い確率で植物体内においても*ETRI*遺伝子産物がエチレンの受容に関与していると推察している。以上の状況から受容体としての期待は高まる一方であるが、Hallらが指摘したような金属イオンとの親和性を示す領域については全く見い出されていない。この点については、互いに全く異なる受容体をターゲットとして解析している可能性も考えられ今後の展開が注目される。他に、Wilkinsonら(1995)もトマトから*ETRI*に高い相同性を有する*Ni(Never-ripe)*遺伝子の単離について同

表1-6 エチレン結合タンパク質の検出・精製に関する報告

植物材料	存在場所	分子量	分子量	存在量	解離定数	検出手段(注)	
		未変性条件 (kDa)	変性条件 (kDa)	($\mu\text{mol}/\text{mg prot.}$)	(M)		
Mung bean	膜画分	---	---	---	---	超遠心	(Sisler & Wood, 1988)
Bean cotyledon	膜画分	---	---	---	---	---	(Hall et al., 1990)
Arabidopsis	---	---	---	1-2	7×10^{-11}	in vivoで取込	(Sanders et al., 1991)
Arabidopsis	膜画分	二量体	83	---	2.4×10^{-9}	---	(Schaller & Bleecker, 1996)
Tomato	---	142	71	---	---	---	(Wilkinson et al., 1995)

(---): No Dataを意味する。

表1-7 フシコキシ結合タンパク質の検出・精製に関する報告

植物材料	存在場所	分子量	分子量	存在量	解離定数	検出手段(注)	
		未変性条件 (kDa)	変性条件 (kDa)	($\mu\text{mol}/\text{mg prot.}$)	(M)		
Spinach leaf	ミクロソーム画分	---	---	---	7.5×10^{-9}	---	(Ballio et al., 1980)
Maize coleoptile	ミクロソーム画分	---	---	---	3×10^{-10}	---	(Aducci et al., 1984)
Vicia leaf	原形質膜	---	35	5	5×10^{-9}	超遠心	(Feverabend & Weiler, 1988)
Arabidopsis callus	ミクロソーム画分	---	---	1-2	1.3×10^{-8}	超遠心	(Stout, 1988)
Arabidopsis shoot	原形質膜	---	34	5.6	1.5×10^{-9}	超遠心	(Meyer et al., 1989)
Oat root	原形質膜	92	30/31	50	---	PEI処理膜	(De Boer et al., 1989)
Carydalis culture	ミクロソーム画分	---	33	0.63	2.8×10^{-9}	超遠心	(Schultz et al., 1990)
Radish seedling	ミクロソーム画分	---	---	6.3	1.7×10^{-9}	シオ糖密度勾配	(De Michelis et al., 1991)
Radish seedling	---	---	---	---	2×10^{-9}	---	(Cocucci & Marre, 1991)
Commelina leaf	原形質膜	80	32/33	6-8	5.2×10^{-9}	超遠心・PEI膜	(Oecking & Weiler, 1991)
Vicia mesophyll	原形質膜	---	---	---	2×10^{-9}	ゲル濾過	(Abramychewa et al., 1991)
Maize shoot	原形質膜	---	30	---	---	PEI処理膜	(Aducci et al., 1993)
Maize shoot	原形質膜	---	90	---	---	PEI処理膜	(Aducci et al., 1993)
Maize root	原形質膜	---	---	4	8×10^{-10}	PEI処理膜	(Abramychewa et al., 1993)
Arabidopsis shoot	ミクロソーム画分	---	---	---	1.9×10^{-10}	PEI処理膜	(Hollanderczyk et al., 1994)
Oat root	原形質膜	---	30	---	3×10^{-9}	超遠心	(Korthout & De boer, 1994)
Oat root	原形質膜	---	31	---	---	---	(Korthout & De boer, 1994)

(---): No Dataを意味する。(注): PEI膜はポリエチレンイミン処理膜を用いたフィルター吸着法を意味する。

時期に報告している。今後もこの様にETRIに相同性を有する遺伝子の単離が種々の植物体から報告されることになるだろう。さらにシグナル伝達系についても、two component systemの解析で先行する酵母で見いだされている因子に相同性を有するものか植物にも幾つか検出されており、酵母では概ねMAPキナーゼカスケードを利用することなどが明らかになっていることから、エチレンのシグナル伝達系カスケードに含まれるキナーゼ類についても今後、急速に知見が集まるものと思われる。

1-5: フシコキシン結合タンパク質研究の歴史

フシコキシンはナシの葉などに萎縮症状を引き起こすカビ(*Fusicoccum amygdali*)が分泌するファイトトキシンとして広く知られている。植物ホルモンには属さないが、植物中からフシコキシンと特異的に結合するタンパク質(FBP)が盛んに報告されており、各種の生長制御物質に関する受容を考える上で非常に興味深いので触れておく。表1-7にFBPとして現在までに検出されたものをまとめた。FBPはいずれも膜画分から検出されている。KorthoutとDeboer(1994)は、1989年に彼らがオートムギから検出していたFBP(SDS-PAGE上で30kDaと31kDa)のうち、30kDaのポリペプチドが哺乳類の脳内タンパク質として多様な生理活性に関与している14-3-3タンパク質に高いホモロジーを有することを明らかにした。14-3-3タンパク質は真核生物に広く分布し、脳内において通常の生理的条件下で2量体として存在することから、30kDaのFBPも恐らく2量体で存在すると推測されている。最近では、c-Rafなどのキナーゼと14-3-3タンパク質が相互作用することなども明らかとなっており、シグナル伝達系に関与する可能性も指摘されている。一方、Adduchiら(1993)もトウモロコシを用いてフォトアフィニティー標識により30kDaと90kDaの2種類のポリペプチドをFBPとして報告している。その後の報告で30kDaポリペプチドに関してはKorthoutとDeboerの報告と同様に14-3-3タンパク質に高いホモロジーを認めているが、30kDaポリペプチドに対する特異抗体が90kDaポリペプチドに反応せず、光親和標識法における光照射が極めて短時間の場合には90kDaポリペプチドだけが選択的に標識され、30kDaポリペプチドを標識する為にはかなりの照射時間を要求することなどから、生理的に意味のあるFBPは30kDaポリペプチドではなく、90kDaポリペプチドの方ではないかという見解を示している。

1-6: ジベレリン結合タンパク質研究の歴史

これまでに触れた5種類の生理活性物質に対する結合タンパク質の研究では、エチレン受容体と考えられるETR1やオーキシン受容体と考えられるABP1のように、シグナル伝達系に深く関与すると考えられる候補タンパク質をコードする遺伝子がすでに単離されている段階や、サイトカイニンのCSBPなどのように受容体候補タンパク質の単離には至っていないものの有力な候補が検出されている段階にまで追究は進展している。これらと比較してジベレリンに対する結合タンパク質(GBP)に関する知見は未だ混沌としているのが現状である。表1-8にGBPに関する報告例をまとめて示す。受容体を念頭においた研究は1960年代後半より始められた。GBPの検出に際してこれまでにジベレリンの受容部位として2種類の応答系が注目されてきた。一つは、茎部の伸長促進現象であり、もう一つは穀類種子の糊粉層(アリューロン層)における加水分解酵素誘導現象である。

茎部伸長に関与する受容体の単離を最終目的としてGBPの検出を行った報告は、Stoddartら(1974)がレタスの胚軸の可溶性画分中に、活性型ジベレリンに対する結合能があると報告したのが最初である。その後、彼らはエンドウなどを用いて同様にGBPを検出している(Stoddart, 1979)。しかし、その後の報告は不明である。この応答系に関するGBPが盛んに報告されたのは1980年代に入ってからである。とりわけカナダ・サイモンフレーザー大学のSrivastavaらの研究グループを中心に報告が行われた。彼らはエンドウ上胚軸もしくはキュウリの胚軸を用いて細胞質画分中からGBP活性を検出している(Keith and Srivastava, 1980; Keith *et al.*, 1981; Keith *et al.*, 1982; Yalpani and Srivastava, 1985)。こうした報告から、胚軸伸長に関わる受容体は専ら細胞質中に存在すると考えられるようになった。しかし、80年代後半になりグループの中核をなす研究者が各地へ分散し(Keith and Rappaport, 1987; Yalpani *et al.*, 1989)、その後の継続的な報告が途絶えてしまい、結局いずれのGBPに関しても単離には至らなかった。最近になって、そのグループにいた台湾のLiuらにより、再度エンドウの上胚軸中に存在するGBPについての追加報告が為されたが、やはり単離には至っていない(Liu and Lee, 1995; Liu and Ger, 1995)。

胚軸の伸長応答系に焦点をあてたGBP研究が膠着状態に陥りはじめていた1990年代初頭、英国・ブリストル大学のHooleyらのグループが、オートムギ種子のアリューロン層を用いて受容体の存在部位に関する興味深い知見を報告した(Hooley *et al.*, 1991; Beale *et al.*, 1992)。アリューロン層では胚で合成されたジベレリンにより各種の加水分解酵素が誘導され、近傍の胚乳中に蓄積された澱粉の解糖を促している。この応答

表1-8 ジベレリン結合タンパク質の検出・精製に関する報告

植物材料	存在場所	分子量		存在量	解離定数 (M)	検出手段(注)	
		未変性条件	変性条件				
		(kDa)	(kDa)	mg prot./			
Lettuce hypocotyl	細胞壁	---	---	---	---	シロ糖密度勾配	(Stoddart et al., 1974)
Wheat aleurone	---	---	---	0.45	1.5×10^{-6}	超遠心	(Jelsema et al., 1977)
Pea(Dwarf) epicotyl	細胞質	60/500	---	---	---	ゲル濾過・平衡	(Stoddart, 1979)
Pea(Dwarf) epicotyl	細胞質	40-70/600	---	0.9	6×10^{-8}	ゲル濾過	(Keith & Srivastava, 1980)
Cucumber hypocotyl	細胞質	---	---	0.4	1×10^{-7}	ゲル濾過・平衡	(Keith et al., 1981)
Cucumber hypocotyl	細胞質	---	---	0.4	7×10^{-8}	DEAEフィルター	(Keith et al., 1982)
Cucumber hypocotyl	細胞質	---	---	0.4	7×10^{-8}	DEAEフィルター	(Yalpani & Srivastava, 1985)
Maize leaf sheath	細胞質	40-90/500	---	---	---	ゲル濾過	(Keith & Rappaport, 1987)
Cucumber hypocotyl	細胞質	---	---	0.25	3.0×10^{-8}	DEAEフィルター	(Yalpani et al., 1989)
Bean epicotyl	核・葉緑体	80-100	---	330	---	FEI処理フィルター	(Tevzadze et al., 1991)
Wild oat aleurone	ミトコンドリア	---	60	---	---	フットアプ(フットアプ)	(Hooley et al., 1993)
Maize mesocotyl	細胞質	---	---	0.62	5×10^{-7}	硫酸沈殿	(Sakai et al., 1994)
Wild oat aleurone	細胞質	---	50	---	---	フットアプ(フットアプ)	(Walker et al., 1994)
Pea(Dwarf) epicotyl	細胞質	---	---	0.66	1.3×10^{-7}	DEAEフィルター	(Liu & Lee, 1995)
Pea(Dwarf) epicotyl	細胞質	40-110	---	0.21	1.2×10^{-7}	DEAEフィルター	(Liu & Ger, 1995)

(---): No Dataを意味する。(注): 平衡は平衡透析法を、FEI処理はポリエチレンイミン処理膜を用いたフィルター吸着法を意味する。

系については、すでにJelsemaらが1977年にコムギのアリユーロン層の破碎断片を用いてジベレリンに対する結合活性を検出している。この知見を元にHooleyらはアリユーロン層からプロトプラスト細胞を調製し、細胞膜を通過できないように修飾したGA₄誘導体を用いてジベレリンによる誘導酵素である α -アミラーゼの誘導を認めたと報告している。このことは、少なくとも細胞膜の外側にジベレリンの受容体が存在することを意味している。また、GilroyとJones(1994)はオオムギのアリユーロン層のプロトプラスト細胞を用いて、マイクロインジェクション法により細胞内に導入されたジベレリンでは α -アミラーゼの誘導が観察されないことを報告している。これらの報告はこの応答系に関与する受容体が、生理的応答を根拠として細胞膜上に存在することを意味しており、胚軸伸長に関与する受容体がGBPの検出部位を根拠に細胞質に存在すると考えられているのと比較して、より強力で決定的な証拠とされている。Hooleyらはその後、オオムギのアリユーロン層のミクロソーム画分を用いて、フォトアフィニティー標識により特異的に標識される約60kDaのポリペプチドがGBPであろうと推測している(Hooley *et al.*, 1993)。しかし、量的な少なさから現段階では単離には至っていない。また同様の手法により細胞質画分から約50kDaのポリペプチド(Walker *et al.*, 1994)を標識しており、これもGBPであろうと推測したことからフォトアフィニティー標識に関する特異性について疑問の声も上がっている。オーキシン結合タンパク質の検索においてこうした手法が頻繁に使用されていることはすでに1-1項で述べたが、基質に対する親和性が中程度であっても量的に豊富であれば、本来受容体とは考えにくい結合タンパク質でも優先的に検出された例も存在することから、検出結果については慎重に対応する必要があるだろう。このように代表的な2種のジベレリン応答系においてGBPの単離報告は皆無であり、知見に乏しいのが現状である。

1-7: 受容体を研究対象とする種々のアプローチ

存在量の少ないはずの受容体の精製・単離を行うことは一般的に容易ではない。その為に近年、急速に進展を遂げた遺伝子工学的手法やあるいは免疫学的手法を用いたアプローチにより受容体の追究を行おうとする報告が幾つか存在する。穀類種子のアリューロン層における α -アミラーゼ誘導系はジベレリンに対する応答系として現在、最も解析が進んでいることは前項で述べた。いくつかの研究グループでは、その酵素の発現誘導に至るカスケード系について順に上流へ進めば、最終的にはジベレリンからのシグナルを受容する物質、すなわち受容体に達すると考えている。例えば、ジベレリンにより誘導される α -アミラーゼの遺伝子について、そのプロモーター領域と相互作用を示すトランス制御因子の特定が注目されている。Ouら(1988)はイネ種子を用いて予め低濃度のジベレリン処理した種子から可溶性タンパク質を得てゲルシフトアッセイを行い、無処理区との比較からプロモーター領域との相互作用を示すタンパク質が量的に増加することを報告している。これによりトランス制御因子の存在がより具体的になり、シスエレメントの特定と共に興味が増された。幾つかの報告(Rushton *et al.*, 1992; Kim *et al.*, 1992)により、シスエレメントにはジリミジボックスが含まれているとか共通配列(GARE: Gibberellin Responsive Element)が存在するといった報告が相次いだ。トランス制御因子についても、Sutliffら(1993)によりオオムギ種子から2種類のタンパク質が検出されており、その内の一つがジベレリンにより特異的に誘導されることが報告されている。また、Goldmanら(1994)はイネ種子におけるトランス制御因子が約22kDaであり、一般的に想定されているような核内のDNA結合タンパク質の範疇にあるらしいと報告している。最近になってGublerら(1995)はオオムギにおけるトランス制御因子の単離(GAmyb)に成功し、その配列の一部が癌遺伝子であるmyb遺伝子の産物に相同性を有することやジベレリンにより誘導されることを報告している。しかし、GAmyb遺伝子の誘導に関してはタンパク質合成阻害剤存在下でもジベレリンによる誘導が認められたことから、GAmyb遺伝子のプロモーター領域と相互作用するさらに上流のトランス制御因子については、少なくとも誘導性タンパク質ではなく常駐する物質がタンパク質ではない可能性が指摘されている。

同様に遺伝子工学的な手法を用いた解析としては、ジベレリン非感受性変異体の解析がある。シグナル伝達系の変異により発生する形質異常として主に2種の系統が報告されている。一方は、矮性で外生的に与えられたジベレリンに応答しない系統(GA-insensitive dwarf mutant)、もう一方は常時ジベレリンを与えているかのごとく継続して徒長する系統(constitutive GA-response mutant)である。前者については、コムギの

Rht3(Gale and Marshall, 1975)、トウモロコシの *Dg*(Harberd and Freeling, 1989)、アラビドプシスの *gai*(Peng and Harberd, 1993)などの報告がある。また、後者については、オオムギの *sln1*(Foster, 1977)、エンドウの *la cry*^S(Potts *et al.*, 1985)、トマトの *proce*_{ra}(Jones, 1987)、アラビドプシスの *spy*(Jacobsen and Olszewski, 1993)などの報告がある。エチレンの *ETR1* のようにいずれこの中から受容体に関する遺伝子が特定されるかも知れない。

また、免疫学的手法を用いたアプローチとしては、Knoxら(1995)による興味深い報告がある。彼らは、エンドウの孔辺細胞の原形質膜表層を抗原としてそれらに対するモノクローナル抗体を調製している。孔辺細胞の原形質膜にはアブシジン酸により引き起こされる気孔の開閉に関与する受容体が存在すると考えられている。したがって、得られた抗体の中には想定される受容体に結合するものが含まれる可能性がある。彼らはオオムギ種子におけるアブシジン酸誘導性遺伝子 *Rab-16* の発現を阻害するモノクローナル抗体や、逆に発現量を増幅させる抗体をスクリーニングすることに成功している。こうしたアプローチはジベレリン誘導性遺伝子に関しても適用可能であり、ターゲットとして明確になってきたアリューロン細胞の原形質膜表層に存在する受容体の特定に大きく寄与する可能性を秘めている。また、Hooleyらは活性型ジベレリンに特異的に結合するモノクローナル抗体の調製を報告しているが、それらを免疫原に用いた抗イディオタイプ抗体を調製し、アベナのアリューロン層より調製したcDNAライブラリーより、この抗イディオタイプ抗体との結合能を有する発現タンパク質のスクリーニングを行っている(ReynoldsとHooley, 1992)。この系によりユビキチン遺伝子を単離しているが、ユビキチンタンパク質がジベレリンと結合するという報告はなく今後の展開が期待される。この様に、受容体をターゲットにした種々のアプローチが存在することから、今後はタンパク質レベルで、あるいは遺伝子レベルで多角的に様々な知見が急速に蓄積されると期待される。

1-8: 本博士論文研究の目的

これまで述べたように、ジベレリン受容体に関しては多岐にわたる植物材料を用いて多くの研究グループによりその追究が行われながらいまだ判然としないのが現状である。Hooleyらの研究グループを中心として精力的に進められているアリューロン細胞からの結合タンパク質あるいは受容体タンパク質の単離・精製に関しては、その存在部位に関しても異論がなく、タンパク質ないしは遺伝子として単離される可能性は単に今後の技術面の向上にのみ依存する様相を呈してきている。従って、現有の技術を改良し駆使することにより今世紀内に決着を見るのではないかと予測している。一方、莖部伸長に関与する受容体については、90年代に入りGBPに関する報告を継続して行っている研究グループもほとんど無く極めて膠着した状態である。そこで、今一度、ジベレリンの受容体として、とりわけ莖部伸長に関与する受容体の検出および精製・単離と機能解析を最終目標に据え、ジベレリンに応答して伸長する部位から新たなGBPを検索し、その精製を行うことを考えた。

ABPの研究例などから、関連する生合成酵素群や、シグナル伝達系には関与しないものをGBPとして検出する可能性は十分に考えられる。従って、そのようなGBPも含めて幾つかのGBPが検出された場合、それが受容体候補としてさらに追究する価値があるか否かの判断を下さねばならない。そこで受容体であるための必要条件を設定し、検出されたGBPについてその性状から受容体としての可能性を持つタンパク質を選別し、効率的に受容体候補となり得るGBPの検索にあたるように配慮した。設定した条件としては、(1)結合に関して可逆的であり、(2)飽和性を有し、(3)活性型ジベレリンに対して高い親和性を有し、(4)基質選択性に優れ活性型ジベレリンに特異的に結合能を有すること、の四点を挙げた。これらの条件を満たしていればさらに解析を進め、そうでなければ追究に値しないものとしてその時点で別のGBPの検索に移ることにした。

植物体からのGBPの検出に先立ち、活性型ジベレリンに特異的に結合能を有するGBPのモデルとして特異抗体の調製を検討し、得られた抗体を用いてGBP検出系の構築を行い、さらには性状を解析して基質選択性に関する具体的な把握を行った。本研究により検出されるGBPがこれまでに報告されているGBPの掘り返しになる可能性も多く、全く新たな分子種を検出することは難しいかもしれないが、いずれにしても未解明な領域に何らかの新たな知見を加えることができるはずであると確信して以下に述べる研究を展開した。

■■■■第2章■■■■

活性型ジベレリンに特異的に結合する 抗体の調製とその応用

2-1: 緒 言

ジベレリンの受容体の候補となるジベレリン結合タンパク質(GBP)を検索し、精製を進めるに当たっては、そのための選択的、かつ高感度な検出法が必要となる。また、GBPを精製するに当たっては、イオン交換クロマトグラフィーやゲル濾過などの一般的なタンパク質の精製に用いられるクロマトグラフィーの他に、アフィニティークロマトグラフィーが有効であることが期待される。GBPの有効な検出法の検討、およびアフィニティゲルの調製とその効果の検討を行う際に、期待されるGBPと類似の基質選択性を具備したようなモデルタンパク質を得ることができれば、大変有用であると期待される。

リガンドとの結合に関して選択性が高いタンパク質としては、抗体および酵素がその候補として考えられる。抗体は通常、リガンドに対する高い選択性を有すると共に、高い親和性を有する。一方、酵素は基質選択性は高いものの、親和性は抗体のそれより千分の一以下と推測される。受容体とリガンドとの親和性は大変大きいと考えられていることや、ジベレリンの生合成・代謝に関わる酵素は、それらの検討のために十分量を得ることは現段階では不可能であることから、抗体をモデルタンパク質として用いて、検出法や精製法について検討を加えることとした。

GBPのモデルとなる抗体を得るに当たっては、現在知られている100余種のジベレリンの中から、受容体が特異的に結合し得ると考えられる適切なジベレリンを選択し、これをハプテンとする免疫原を調製する必要がある。また、免疫原の調製に当たっては、ハプテンとなるジベレリンの適当な官能基を利用して、キャリアタンパク質に安定に共有結合させる必要がある。特に、ジベレリン分子のいずれの部位からタンパク質に結合させるかは、得られた抗体の基質選択性に決定的な影響を与えると推測されることから十分な吟味が必要である。

ハプテンとなるジベレリンの選択においては、これまでに蓄積されたジベレリンの構造-活性相関ならびに、生合成に関する情報を参考にすることができる。

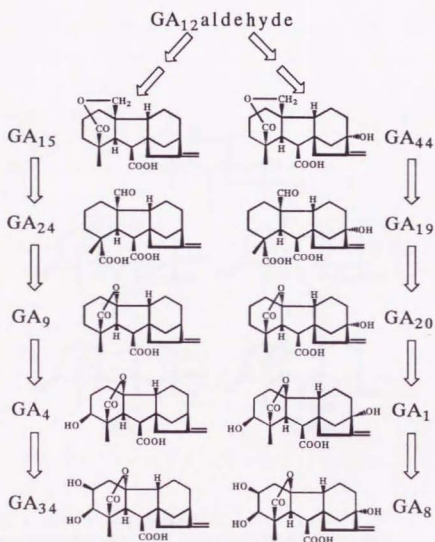


図2-1 植物におけるジベレリンの代表的な生成経路

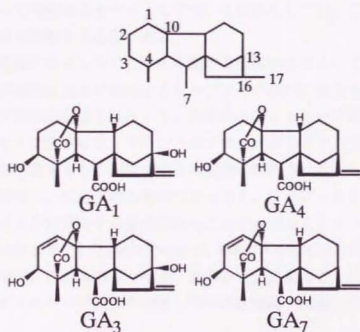


図2-2 ジベレリンの基本骨格構造

数字は炭素の番号を示す。また、下には代表的な活性型ジベレリンである GA₁, GA₃, GA₄, GA₇ の構造式を示す。いずれも3位のβ面(紙面上)に水酸基、6位に遊離のカルボキシル基、4位と10位との架橋によりγ-ラクトン環構造を共通して有していることが判る。

植物中で機能している代表的なジベレリンの主要生成経路を図2-1に示し、ジベレリンの基本骨格構造については図2-2に示す。これらの情報によれば、ジベレリンが活性を発現するためには、3 β 位の水酸基、4 \rightarrow 10位の γ -ラクトン、6位カルボキシル基を有する炭素数19のジベレリンであることが必要であり、これらの条件をすべて満足するGA₁, GA₃, GA₄, GA₇等がいわゆる活性型ジベレリンと呼ばれている。また、ジベレリン受容体はこれらの官能基を厳密に認識していると考えられている。従って受容体のモデルとして用いる抗体としては、これらの部位をよく認識する抗体を調製する必要がある。

ところで、受容体に焦点をあてた研究に関する抗体の応用として、近年ワクチンの設計や動物の神経伝達系に關与するレセプターの検出に威力を発揮している抗イディオタイプ抗体の調製も検討した。抗体のイディオトープに特異的に結合する抗イディオタイプ抗体には、リガンドのアナログとしてアンタゴニスト活性やアゴニスト活性を有するものが生成する可能性が期待される。リガンドがペプチド性のものではなく、低分子性のものであっても、抗イディオタイプ抗体がアナログとしての結合活性を有する場合があることが、アセチルコリンやドーパミンなどについて報告されている(Schreiber *et al.*, 1983; Wasserman *et al.*, 1982; Cleveland *et al.*, 1983)。これらのことから、ジベレリンに関しても活性型ジベレリンに対する抗イディオタイプ抗体を調製してGBPの検出・精製への応用について検討を加えた。

本章では、活性型ジベレリンを特異的に認識する抗体の調製および、抗イディオタイプ抗体の調製について述べる。また、得られた抗体を利用した免疫学的定量法の確立とその応用についても検討したので、これらについても触れる。

2-2:活性型ジベレリンに特異的に反応する抗体の調製

2-2-1:免疫原の調製

一般に抗ハブテン抗体の特徴として、ハブテン分子とキャリアタンパク質との結合部位近傍に対する識別能は低く、この部位から距離的に離れた部位に関する識別能は高くなることが知られている。従って、受容体の認識部位として重要な官能基と推定される3β位の水酸基、4→10位のγ-ラクトン、6位カルボキシル基を良く認識する抗体を調製するためには、これらの官能基のあるA環やB環以外のC, D環に存在する官能基を利用してキャリアタンパク質に結合させるのが適していると考えられる。活性型ジベレリンの中で比較的多量に入手可能なものとしては、GA₁, GA₃, GA₄, GA₇が挙げられる。この中で官能基の導入の容易さ、化学的安定性を考慮してGA₄を用いるのが最も適していると判断した。

キャリアタンパク質であるBSAとGA₄との結合は図2-3に示すように行った。即ち、GA₄をOsO₄とNaIO₄で処理して17-ノルケトンとし(Cross and Gatfield, 1971; House and Melillo, 1973)、これをカルボキシメトキシアルミンと反応させて、GA₄-16-カルボキシメトキシム(GA₄-16-CMO)に導いた。このGA₄-16-CMOを0.89当量のDCCおよびNHSIと反応させて活性エステルとし、これをBSAにカップリングさせて免疫原を調製した。

調製に関するポイントとは、GA₄-16-CMOの16位末端に存在するカルボキシル基だけを選択的に活性エステル化することであった。すなわちオキシム体には2つのカルボキシル基が存在するため、活性型ジベレリンに特異的に結合するような抗体を調製するには、6位カルボキシル基はそのまま保存して、16位の末端カルボキシル基だけを選択的に活性化することが要求された。仮に6位を修飾してキャリアタンパク質と結合した免疫原を用いたならば、ジベレリンの活性発現に不可欠とされる6位カルボキシル基周辺に関する抗体の識別能が著しく低下することがすでに判明していたからである(Yamaguchi *et al.*, 1990)。最終的には、双方のカルボキシル基に関する反応性について比較し、縮合剤を1当量未満に制限することにより立体障害のより少ない末端カルボキシル基だけを優先的に活性化して免疫原の調製を達成することができた。

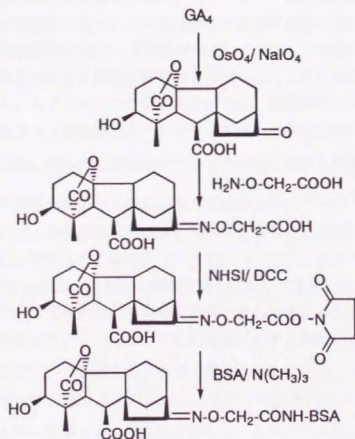


図2-3 免疫原の調製方法

GA₄より四酸化オスミウムとメタ過ヨウ素酸ナトリウムを用いて、GA₄-17-ノルケトンを調製し、更にピリジン中でCMAと反応させてGA₄-17-ノルケトンのオキシム体を調製した。末端カルボキシル基を選択的に活性エステル化してBSAと結合して免疫原とした。

2-2-2: 活性型ジベレリンに特異的に反応する抗体の調製

常法に従い、ウサギ1羽あたり 0.5 mg、マウス1匹あたり 0.03mgの免疫原を用いてリン酸緩衝液に懸濁し、Freund's Complete Adjuvantを用いてwater-in-oilのエマルジョンを調製して免疫に用いた。経時的に採血し、血清を調製してラジオトレーサーを用いて抗体の生成の確認を行った。モノクローナル抗体の調製に関しては、抗体の生成が確認されたマウスの脾臓細胞と骨髄腫細胞の両者を融合して調製した。その手順を図2-4に示す。細胞融合を行ったのち、2段階のスクリーニングを経て特異抗体を分泌する融合細胞だけを選択した。これを限界希釈法を用いてクローン化した。スクリーニング段階においては、抗血清中に活性型ジベレリンに特異的に反応する抗体の存在をトリチウム標識したGA₄を用いて硫酸沈殿法により確認を行った。得られた各抗体についてのGA₄に対する親和性を表2-1に示す。

一般に抗原抗体反応における結合に関してはおよそ 10^{-6} ~ 10^{-9} Mの解離定数を示すといわれている。今回得られた抗体についても示された解離定数は概ねこの範囲内であることが判明した。結合タンパク質についてのこれまでの検出例を、第1章において紹介したが、それらの解離定数と比較しても親和性に関しては遜色なく、モデルGBPとして検出系の設定等に活用できると考えられた。

また、GA₄以外のジベレリンについても各抗体に対する親和性を同様に検討し、基質の選択性について比較した。その一覧表を表2-2に示す。用いた各ジベレリンの構造式は図2-5に示す。これによれば、すべての抗体においてGA₄のメチルエステル体よりもGA₄の方に高い親和性を示した。このことは免疫原の調製時に6位カルボキシル基に対する活性エステル化を回避し、カルボキシル基が遊離状態の免疫原を調製したことを強く反映していると考えられる。さらにそれ以外の構造上の違いに対応して抗体ごとに異なった特徴が認められた。すなわちライン(8)/E9ではGA₂₀に対して全く親和性を示さず、他と比較して3β位の水酸基の有無に関する識別が極めて厳しいことが判明した。一方、ライン(1)/B8のように、この部位に関する識別能が低い抗体も存在していた。ラクトン環の構造の差異については、GA₃₇とGA₄とが同程度の親和性を有することから、今回得られたマウス由来の抗体については、一様にラクトン環の構造の差異に関する識別能が著しく低いことが明らかとなった。ウサギ由来の抗体ではこれと異なり厳しい識別能を有することから、おそらくマウス抗体の識別領域がウサギ抗体と比較して狭い傾

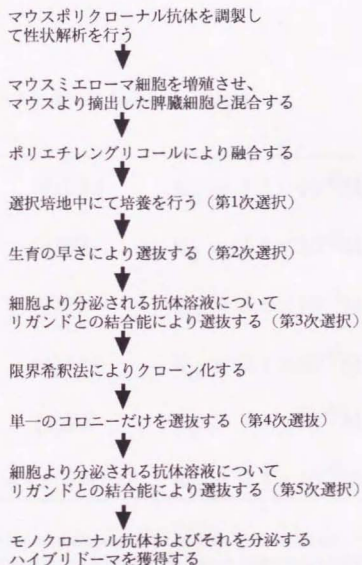


図2-4 モノクローナル抗体の調製方法

表2-1 抗体のGA₄に対する親和性

マウスモノクローナル	(5)D12	$K_d = 1.4 \times 10^{-8} \text{M}$
	(8)E9	$K_d = 1.8 \times 10^{-8} \text{M}$
	(2)F1	$K_d = 5.6 \times 10^{-9} \text{M}$
	(4)A11	$K_d = 9.1 \times 10^{-9} \text{M}$
	(1)B8	$K_d = 7.1 \times 10^{-9} \text{M}$
ウサギポリクローナル		$K_d = 7.1 \times 10^{-9} \text{M}$

活性画分とトリチウム標識GA₄の混合溶液に段階希釈した非標識GA₄を添加して、破安沈殿法を用いて画分中の結合放射活性量を測定した。解離定数(K_d)を算出する簡便法として、全交換可能な結合部位のうちの50%が非標識GA₄で置換されるときに添加した非標識体の濃度を用いた。

表2-2 抗体における基質選択性の比較

	マウスモノクローナル					ウサギ ポリクローナル	
	(5)	(8)	(2)	(4)	(1)		
	D	E	F	A	B		
	12	9	1	11	8		
GA ₄	100	100	100	100	100	100	100
GA ₁	20	128	67	63	110	200	330
GA ₃	6	17	15	11	3	16	8
GA ₇	76	64	67	81	33	58	37
GA ₁₃	3	10	9	5	2	14	5
GA ₂₀	84	<0.01	21	220	270	4	0.9
GA ₃₀	8	26	7	2	0.3	14	22
GA ₃₅	16	3	7	6	4	0.8	0.8
GA ₃₇	220	150	130	230	190	0.6	0.9
GA ₁ Me	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	0.4	0.9

各抗体とトリチウム標識GA₄の混合溶液に任意の量の各非標識ジベレリンを添加して、硫酸沈殿法を用いてベレット中の結合放射活性量を測定した。標識GA₄の結合が50%阻害されるのに必要な各非標識ジベレリン量を算出し、その逆数を比較して相対的親和性を求めた。従って値が大きい程、親和性が高い。GA₄を基準として記す。

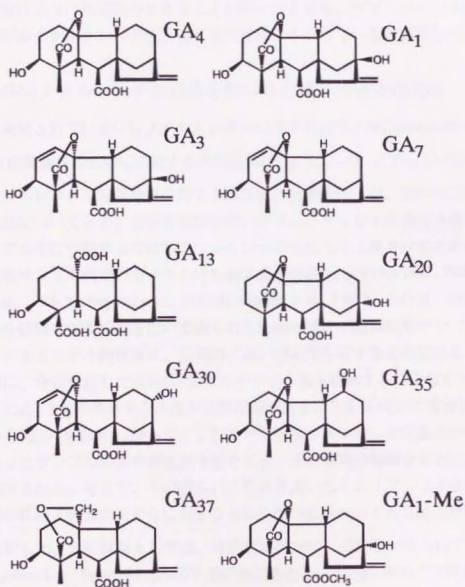


図2-5 基質選択性の検討に用いたジベレリンの構造式

域を対象とするのではないかと考えている。これらの結果から、ジベレリンの抗体に対する親和性と生理的な活性との相関については、ラクトン環に関する構造の差異を除けば良い相関性を有することが明らかとなり、中でもライン(8)/E9抗体が最もGBPのモデルタンパク質として適当な性状を有していると判断した。

2-2-3: 抗GA₁メチルエステル抗体を用いた定量分析法との比較

すでに調製されているGA₁メチルエステルに対する特異抗体(Yamaguchi *et al.*, 1990)と今回調製されたGA₄に対する特異抗体について、イムノアッセイ法を用いた活性型ジベレリンの定量分析に関する応用面の比較を行った。図2-6に双方の免疫原の構造について示す。従来の抗体を用いたイムノアッセイ法を行う場合には、サンプル中に存在する活性型ジベレリンとの反応性を上昇させるために、すべての対象サンプルについてメチル化を施す必要があった(Weiler *et al.*, 1981; Atzorn *et al.*, 1983; Yamaguchi *et al.*, 1987; Kuroguchi *et al.*, 1987)。これは、6位カルボキシル基を修飾して免疫原を用いて得られた抗体の性状が遊離状態のジベレリンよりもメチルエステル誘導体に、圧倒的に高い親和性を有するためである。これと対照的に、今回調製した抗体は6位カルボキシル基を修飾することなく免疫原を調製したため、6位カルボキシル基が遊離状態のままの方が圧倒的に親和性が高くなっている(表2-2を参照)。従って、これまで活性型ジベレリンの定量を行う際に必要であったサンプルのメチル化が不要となり、分析時間の短縮と省力化につながるかと期待された。そこで、今回得られた抗体を用いたイムノアッセイ法により、従来のGA₁メチルエステルに対する抗体を用いた定量法で得られる結果との比較を検討した。分析材料としては、活性型ジベレリンの蓄積が知られているイネ(*Oryza sativa* L cv. Sasanishiki)の葉を用いることとし、2段階のHPLCで精製した画分について等分して一方はメチル化を施してから抗GA₁メチルエステル抗体を用いたイムノアッセイ法で定量し、もう一方は無処理のまま今回調製された抗体を用いたイムノアッセイ法で定量した。2つの定量分析系による最終的なイネ・葉中の活性型ジベレリンに関する定量結果を表2-3に示す。この結果より多少の誤差を許容すれば双方の定量値はよく一致することが判明した。従って、今回調製された抗体を用いることによりこれまで必要であったサンプルのメチル化が不要となり、イムノアッセイを行うための分析時間の短縮と省力化が可能になった。

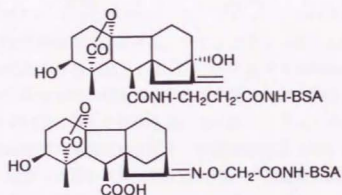


図2-6 二つの免疫原の構造式

(上)GA₁メチルエステルに対する特異抗体(Yamaguchi *et al.*, 1990)の調製に用いた免疫原。

(下)GA₄に対する特異抗体の調製に用いた免疫原。

表2-3 イネ葯中の活性型ジベレリンの定量結果

	定量値(ng/g fr. wt)	
	定量法(1)	定量法(2)
GA ₁	135	360
GA ₄	930	940

従来の精製方法として用いてきたサンプルのメチル化を事前に必要とするGA₁メチルエステルに対する抗体を用いたイムノアッセイ法(定量法2)と、サンプルのメチル化を省略できるGA₄に対する抗体を用いたイムノアッセイ法(定量法1)の2つの定量法により算出されたGA₁およびGA₄の定量値を比較して示す。定量値に関してはGA₁およびGA₄の各々について、用いた各抗体に対する親和性を考慮して算出した。

2-3:特異抗体の応用(1)

イムノアフィニティーカラムの調製

植物ホルモンに対する抗体を用いたイムノアフィニティーカラムの調製に関しては、Fuchsら(1974)の報告をはじめとしていくつか存在する(Mertens *et al.*, 1982; MacDonald *et al.*, 1985; Sayavedra-Soto *et al.*, 1988; Sundberg *et al.*, 1986)。しかし、一般にそのような低分子物質に対する抗体を用いたイムノアフィニティーカラムの利用については他の分野での報告例は少なく、有効な溶出系に関する知見に乏しい。その観点から、低分子物質の抗原抗体反応についての性状に関して更に興味深い知見が得られるものと期待してイムノアフィニティーカラムの有効利用の検討に着手した。

ジベレリンに対する抗体を用いたイムノアフィニティーカラムは、Durleyら(1989)がポリクローナル抗体を用いて調製を試みている。また同年、SmithとMacMillan(1989)により遊離型ジベレリンに親和性を持つモノクローナル抗体の適用が報告されている。しかし、いずれの報告においても溶出効率などに多くの課題が残る必ずしも従来からの精製法と比較して効率的な精製が為されたとは言えない。そこで、今回調製したモノクローナル抗体を用いてはじめは担体に固定しない遊離状態の抗体を用いて抗原抗体反応についての解離促進要因を検討し、続いて担体に固定された状態の抗体を用いて溶出系を検討して有効利用への可能性を探った。

2-3-1:遊離状態の抗体を用いた解離促進要因の検討

2-3-1-1:カオトロピックイオンの影響

抗体抗原反応が主にイオン結合による場合はイオン強度を高める方法が解離のためには有効である。また疎水結合が関与する場合にはカオトロピックイオンが効果的とされている(Mizel *et al.*, 1983; Caldwell *et al.*, 1977)。カオトロピックイオンは水の構造を不安定化させ疎水性領域に水をなじませる効果があり、結果的に疎水結合が弱まると考えられている。そこで、イオン強度を高める塩として塩化カリウムを、またカオトロピック塩としてチオシアン酸カリウムを用いて抗原抗体反応に与える影響を検討した。図2-7に塩濃度の上昇が抗原抗体反応の解離に与える影響について示す。縦軸は蒸留水中での抗原抗体結合量を100とした時の相対結合率を示す。この結果、塩化カリウムについては1.5Mまで濃度を上げてほとんど

と解離しないことから効果なしと判断した。一方、チオシアン酸カリウムによる影響では、0.5M以上で甚だしく解離を生じ、また抗体の安定性においても図2-8に示すように0.5Mでの失活は少なく、極めて有効な解離方法であると判断した。

2-3-1-2:有機溶媒による影響

有機溶媒は一般に極性が低く、疎水結合が弱まるとされている。そこで水に溶けやすい有機溶媒としてメタノールを使用して抗原抗体反応に与える影響を検討した。図2-9には有機溶媒の添加による抗原抗体反応の解離に与える影響について示す。縦軸は蒸留水における結合量を100とした時の相対結合率を示す。この結果、メタノールによる影響は40~50%以上ではほとんど解離することが明らかになった。また抗体の安定性においては図2-10に示すように、メタノール濃度40%以内での失活は少なく、ある程度の耐久性を有することが分かった。従ってこの付近の濃度範囲での使用がイムノアフィニティカラムの有効性および経済性に最も寄与すると考えられる。

2-3-1-3:pH環境の変化による影響

第3の要因として、pH環境の変化による影響を検討した。イムノアフィニティークロマトグラフィーでは緩衝液のpHを変化させた溶出例が幾つか存在する(Douvas *et al.*, 1979; Robb *et al.*, 1976; Movicar *et al.*, 1984; Letarate-Muirhead *et al.*, 1975)。今回調製した抗体はジベレリンの6位カルボキシル基を強く識別することから、非解離型(-COOH)と解離型イオン(-COO⁻)を識別する可能性が高い。そこで各種緩衝液を調製し、それぞれの環境における抗原抗体反応について検討した。図2-11にpH環境の変化による抗原抗体反応の解離に与える影響について示す。縦軸はpH7.0における結合量を100とした時の相対結合率を示す。これによれば、pHを5.0以下に下げれば効率よく抗原と抗体は解離されることが判明した。図2-12には比較のためにGA₁メチルエステルに対する特異抗体(Yamaguchi *et al.*, 1990)を用いた場合のpH環境の変化による抗原抗体反応の解離に与える影響を示す。この抗体は6位カルボキシル基について遊離状態よりもメチルエステルとして修飾された誘導体に、より高い親和性を示すため結合能についてもpHに依存しないものと推測している。したがってこの両者を比較することにより、pH環境の変化が抗原抗体反応における解離に有効となる可能性は、抗体の調製方法にも依存することが示された。また、図2-13に示すように今回調製された抗体の安定性に関しては、

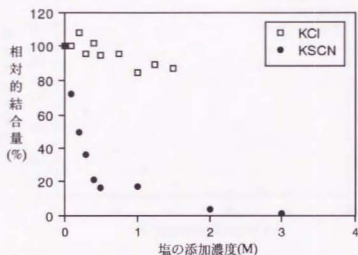


図2-7 塩の抗原抗体反応に与える影響

塩の添加濃度は終濃度を示す。また、無添加時の抗体に対するGAI標識体の結合量を基準(100%)として、それぞれの環境における結合量を相対的な結合量として表した。

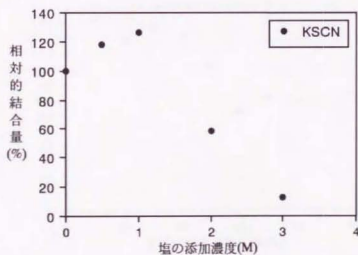


図2-8 塩濃度と抗体の安定性

抗体の安定性を評価するため、初めに設定された環境下に3時間、抗体をおき、脱塩処理により塩強度を下げた状態でGAI標識体との結合能を調べた。塩の添加濃度は終濃度を示す。また、無添加時の抗体に対するGAI標識体の結合量を基準(100%)としてそれぞれの環境における結合量を相対的な結合量として表した。

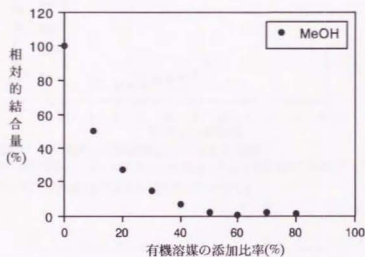


図2-9 有機溶媒の抗原抗体反応に与える影響
メタノール無添加時の抗体に対するGA₁標識体の結合量を基準(100%)として、それぞれの環境における結合量を相対的に表した。

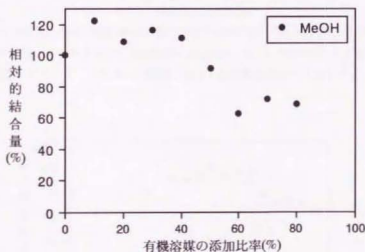


図2-10 有機溶媒濃度と抗体の安定性
抗体の安定性を評価するため、初めに設定された環境下に3時間、抗体をおき、メタノール濃度を下げた状態でGA₁標識体との結合能を調べた。メタノール無添加時の抗体に対するGA₁標識体の結合量を基準(100%)としてそれぞれの環境における結合量を相対的な結合量として表した。

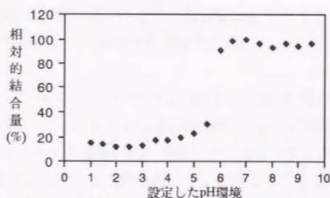


図2-11 pH環境の抗原抗体反応に与える影響
pH7.0の環境下における抗体とGA₁標識体の結合量を基準(100%)として、それぞれの環境における結合量を相対的に表した。

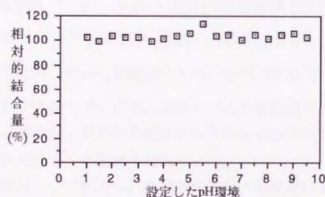


図2-12 抗GA₁-Me抗体を用いた場合のpH環境変化が抗原抗体反応に与える影響
pH7.0の環境下における抗GA₁-Me抗体(Yamaguchi *et al.*, 1990)とGA₁-Me標識体の結合量を基準(100%)として、それぞれの環境における結合量を相対的に表した。

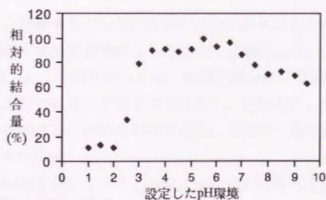


図2-13 pH環境変化と抗体の安定性
抗体の安定性を評価するため、初めに設定された環境下に3時間、抗体をおき、pH7.0に調整して抗体とGA₁標識体の結合量を測定した。初めからpH7.0の環境にいた場合の抗体とGA₁標識体の結合量を基準(100%)として相対的な結合量を示した。

pH4.5~5.0付近ならば抗体もジベレリンも安定して存在すると考えられることから、溶出条件の1要因として実用性が期待される。

2-3-2: イムノアフィニティーカラムを用いた溶出系の検討

ヒドロキシアパタイトのカラムを用いたHPLCにより抗体を精製し、担体にはCNBr活性化セファロースを用いた。常法によりカップリング反応を終了した後、グリシンによるブロッキング処理を行った。対照として牛血清アルブミン結合カラムも調製した。双方のカラムを用いてGA₁標識体のカラムへの吸着状況を比較した。遊離状態の抗体を用いた検討より得られた知見をもとに、種々の溶出液を組み合わせて調製し、カラムにおけるGA₁標識体の溶出効率を検討した。

抗体カラムと対照カラムにおけるGA₁標識体の吸着状況を図2-14に示す。これによると双方のカラムで明らかにGA₁標識体の挙動が異なっていることが示された。対照カラムでは供したGA₁標識体のうち60分間の洗浄で85%、テーリングを考慮しても80分間の洗浄によりほとんどがカラムから溶出されることが明らかとなった。一方、抗体カラムでは90%程度がカラムに保持されており、洗浄によるカラムからの漏出もほとんど認められなかった。

遊離状態の抗体を用いて解析された抗原抗体反応の解離に有効な要因を組み合わせ、計6種類の溶出液を調製し、各々についてカラムに保持されたGA₁標識体に対する溶出効率を検討した。その結果について表2-4に示す。これによればカラム内に固定化された状態の抗体と遊離状態の抗体において、抗原抗体反応についてはかなり状況が異なっているものと推測された。すなわち遊離状態の抗体とGA₁標識体との結合を解離するのに有効と判断された各条件を組み合わせてもカラムにおける抗原抗体反応の解離条件としてほとんど機能しない場合があった（溶出系(1)~(4)を参照）。この理由としては、抗原と抗体の結合様式あるいは親和性の変化に由来すると思われるが詳細は不明である。最終的に、カオトロピック塩を用いることにより効率良い溶出系が確立され、実用化への可能性を示すことができた（溶出系(5,6)を参照）。

確立された溶出系を用いてアフィニティーカラムにおけるGA₁標識体の回収率を検討した。溶出状況について図2-15に示す。この結果、分析に供したGA₁標識体の約90%が溶出画分に回収されたことからイムノアフィニティーカラムが十

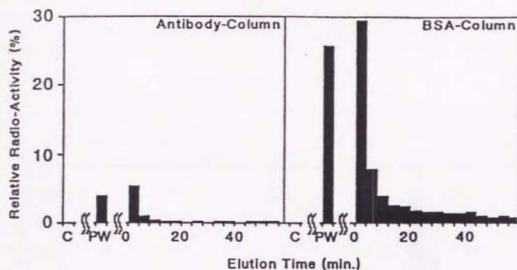


図2-14 イムノアフィニティーカラムにおける標識GA₁の挙動

(左図)は抗ジベレリン抗体を結合したイムノアフィニティーカラムにおけるGA₁のカラムからの漏出状況を示す。(右図)は対照カラムとして調製したウシ血清アルブミン(BSA)を結合したカラムを用いた場合のGA₁のカラムからの漏出状況を示す。標識GA₁溶液をカラムにアプライした状態(図中C)で3時間静置し、それから洗浄用緩衝液で8分間の洗浄(図中PW)を行って更に20分間静置した。それから60分間の洗浄を行った際の溶出画分中の放射活性を測定した。

表2-4 イムノアフィニティーカラムにおける溶出系の検討

溶出系	NaCl	KSCN	MeOH	Tween20	溶液のpH	溶出効率
	終濃度(M)	終濃度(M)	% (v/v)	% (v/v)		%
(1)	0.5		40		7.4	2
(2)	0.5		40	0.5	7.4	2
(3)	0.5			0.5	4.0	1
(4)	0.5		40	0.5	4.0	2
(5)		0.5	40		4.0	89
(6)		0.5	40	0.5	4.0	89

溶出効率は洗浄操作後のカラムに保持された標識ジベレリン量を100(%)とした時の、各溶出系を用いて得られた溶出区の放射活性量を基に算出した。

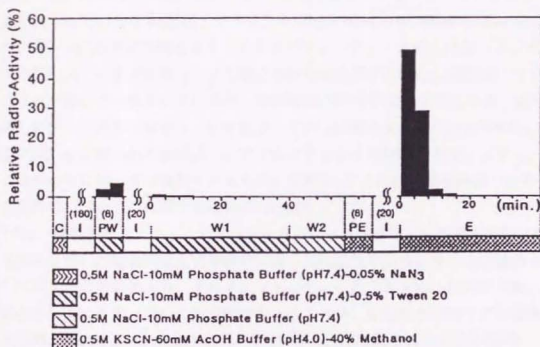


図2-15 確立した溶出系を用いた場合の標識GA₁の溶出状況

標識GA₁溶液をカラムにアプライした状態(図中C)で3時間静置(図中I)し、それから洗浄用緩衝液で8分間の洗浄(図中PW)を行って更に20分間静置した。それから2段階に洗浄操作(図中W1とW2)を60分間行なって、溶出用緩衝液で8分間の溶出(図中PE)を行い、更に20分間静置した。最後に溶出(図中E)を40分間行った。その際の溶出画分中の放射活性を測定して示す。

分実用に耐え得るものと判断した。

2-3-3:イネの葯中のジベレリン分析への応用

実際に天然物の分析にイムノアフィニティーカラムを応用し、その有効性について検討した。材料は、前項においてHPLCによる精製とイムノアッセイ法による定量が終了しているイネ(品種:ササニシキ, *Oryza sativa* L. cv. Sasanishiki)の葯を用いた。図2-16に分析の手順を示す。イムノアフィニティーカラムにおけるジベレリンの溶出はこれまでの検討により確立された溶出系を用いた。溶出液にはカオトロピック塩が多く含まれているが、溶出液のpHは中性を示すことから、直ちに濃縮し析出したカオトロピック塩を除去してからODSカラムを用いたHPLCによる精製に供した。得られた画分についてイムノアッセイを行い、アフィニティーカラムのかわりに陰イオン交換カラムを用いたHPLCによる精製法を適用した場合との活性型ジベレリンに関する定量値の比較を行った。

表2-5に、精製手順にアフィニティーカラムクロマトグラフィーを組み入れた場合と従来法を用いた場合の双方で最終的に得られた活性型ジベレリンの定量値を比較して示す。この結果より、イムノアフィニティーカラムを用いた方が全般に高い値を示しているが、用いた検量線が異なることや、従来法では陰イオン交換カラム-HPLCにより得られた画分のうち7~12分の保持時間の画分だけをODS-HPLCに供しているため、それ以降にテーリングを起こして溶出されるGA₁およびGA₄が存在した場合には双方の精製法で定量値にその分だけ差を生じる可能性がある。しかし、GA₁とGA₄の比率などは保存されておりイムノアフィニティーカラムが充分実用に耐えうるものであることが示された。

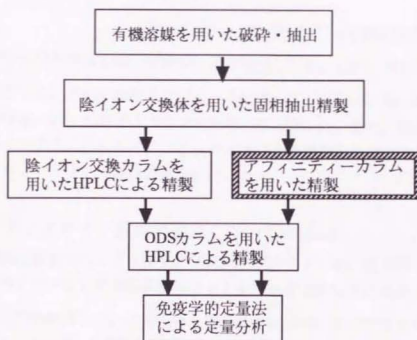


図2-16 イネ薬中の活性型ジベレリンの精製および定量分析法

表2-5 活性型ジベレリンの精製におけるイムノアフィニティーカラムの有効性の検討

	定量値(ng/g fr. wt)	
	精製法(1)	精製法(2)
GA ₁	466	360
GA ₄	1140	940

イムノアフィニティーカラムを用いた精製方法を組み込んだ場合(精製法1)と、従来の精製方法として用いてきた陰イオン交換カラムを用いたHPLCを組み入れた場合(精製法2)とを比較して示す。定量値に関しては用いた抗体に対する親和性をGA₁およびGA₄の各々について考慮して算出した。

2-4:特異抗体の応用(2)

抗イディオタイプ抗体の調製

GA₄に対する特異抗体を硫酸沈殿法により精製した後、透析・凍結乾燥してこれを免疫原とした。常法の免疫スケジュールに従って、1回の免疫においてウサギ1羽あたり5mg、マウス1匹あたり0.6mgを用いて免疫した。また、抗血清中に抗イディオタイプ抗体の存在をイムノアッセイ法により確認した後、上述の細胞融合法によりモノクローナル抗体の調製を行った。

2-4-1:抗イディオタイプ抗体の生成についての確認

得られた抗血清中の抗イディオタイプ抗体を検出するため、免疫原として用いた活性型ジベレリンに対する特異抗体とトリチウム標識GA₄との抗原抗体反応に対する阻害活性を検討した。その結果、得られた抗血清のすべてにおいて阻害活性を検出した。そこで、2種類の対照区を設定し抗イディオタイプ抗体の生成についての確認を行った。一つは、正常血清中の成分に阻害活性を有する物質が含まれていないことを確かめた(表2-6を参照)。もう一つは、抗イディオタイプ抗体とトリチウム標識GA₄との間に直接には親和性がないことを確かめた(表2-7を参照)。これら二つの結果から、血清中に抗イディオタイプ抗体が存在すると結論づけた。

2-4-2:各種抗イディオタイプ抗体における識別領域の差異

ウサギを用いて抗血清を調製する際に2種類の抗体画分を免疫原として用いた。双方とも活性型ジベレリンに対する抗体を含むが、一方はウサギより調製したポリクローナル抗体であり他方はマウス由来のモノクローナル抗体である。両者はともにジベレリンの生理的な活性発現に重要な部位への識別能に優れているがラクトン環構造の差異に対する識別能については、ウサギポリクローナル抗体だけが非常に厳しい識別能を有している(表2-2を参照)。よってジベレリン受容体との相関性で言えば、本来はウサギポリクローナル抗体を免疫原として用いることが最も妥当と考えられる。しかし、ポリクローナル抗体であるため無関係な物質が混在しており、その中から検出限界以上の目的の抗イディオタイプ抗体が調製されるか否かは疑問であった。このため、単一のクローンであり免疫原としても量

表2-6 抗イディオタイプ抗体の生成確認(1)

希釈倍率	結合放射活性量(dpm)
10倍	3679
50倍	3477
250倍	3611
1250倍	3505
無添加時	3560
UB	94

正常血清中の成分に抗ジベリン抗体と標識GA₄との結合を阻害する物質が含まれていないことを確認するため、マウス正常血清を適宜希釈して添加した場合の抗ジベリン抗体と標識GA₄との結合量を測定した。正常血清を添加しない場合とした場合で結合量に変動が認められないことから阻害する物質は含まれていないと考えられる。

表2-7 抗イディオタイプ抗体の生成確認(2)

希釈倍率	結合放射活性量(dpm)
50倍	104
250倍	101
UB	94

抗イディオタイプ抗体とトリチウム標識GA₄との間に直接、親和性がないことを確かめるため、抗イディオタイプ抗体を適宜希釈して標識GA₄との反応性を調べた。

表2-8 各種抗イディオタイプ抗体の交差反応性

	用いた抗ジベリン抗体	
	ウサギポリクローナル抗体	マウスモノクローナル抗体
添加した抗イディオタイプ抗体		
ウサギポリクロ由来	69	284
マウスモノクロ由来	167	99
免疫原の種類		
無添加時	3972	3582

2種類の抗ジベリン抗体と標識GA₄の結合に対して、それぞれの抗ジベリン抗体を免疫原として用いて調製した抗イディオタイプ抗体を添加して、その阻害状況を比較した。

的な供給が十分可能であるマウス由来のモノクローナル抗体も別途併用した。

それぞれを独立に免疫して得られた抗血清において、表2-8に示すように交差した反応系を用いて認識部位の構造の比較を行った。いずれの検定系においても、抗イディオタイプ抗体は、もともと免疫原として用いた抗体により高い親和性を示すことが明らかとなった。そうした若干の差は存在するものの異なる免疫原を用いても相互に作用することから、得られた2種類の抗イディオタイプ抗体が有する識別領域は非常に似通っていることが推測された。

また、モノクローナル抗体の調製に関しては、細胞融合後のハイブリドーマのスクリーニングにおいて、ポジティブコロニーを1ライン選抜しクローン化に至った。スクリーニングにおける一般的な抗体の検出法と比較して、抗体とトレーサーとの結合量ではなく、免疫原とトレーサーとの結合に対する阻害量をもってポジティブコロニーの選択を行わねばならず、その選抜は非常に困難であった。今後、さらに抗体の調製を継続して行いその中からジベレリン受容体に関する研究に応用可能なラインの選抜を行いたい。

2-5: 実験の部

■■■免疫原の調製■■■

●GA₄-17-ノルケトンの調製

GA₄/GA₉の混合物(約9:1) 513.4mgをテトラヒドロフラン-水(1:1)の溶媒50mlに溶解した。四酸化オスミウム 68.5mgを加えたのち、メタ過ヨウ素酸ナトリウム 664.4mgを粉末状にして、30分間かけて徐々に添加した。N₂ガス置換後、常温にて12時間攪拌した。シリカゲルTLC(DC-Fertigplatten Kieselgel 60, Merck, Germany; 展開溶媒系[AcOEt: CHCl₃: AcOH=20: 12: 1 (v/v)])により反応の進行を確認した。反応液を濾過した後、ろ液を濃縮し酸性条件下でAcOEtによる溶媒抽出を行った。この画分について脱水処理した後、シリカゲルカラム吸着クロマトグラフィー(溶出系: CHCl₃-AcOEt)に供してGA₄-17-ノルケトンを分離・精製した。収量は113.1mgであった。¹H-NMR δ (D₄-methanol): 3.17 (d, $J=9.6$ Hz, C-5), 2.63 (d, $J=9.6$ Hz, C-6), 2.39 (m, C-13), 2.11 (m, C-15); LC/APCI-MS m/z (括弧内の数字はベースピークを基準(100)とした時のイオンの相対強度を示す): 384([M+NH₄]⁺, 23), 352([M+MeOH+NH₄]⁺, 100).

●GA₄-16-カルボキシメトキシシムの調製

CMA塩酸塩24.7mg (0.226 mmol)を0.68mlのピリジンに溶解し、これにGA₄-17-ノルケトン30.4mg (0.091 mmol)を加え50℃に加温して12時間静置した。シリカゲルTLC(展開溶媒系は[AcOEt: CHCl₃: AcOH =20: 12: 1 (v/v)])により反応の進行を確認した。酸性条件下、AcOEtによる溶媒抽出を行い濃縮物46.0mgを得た。¹H-NMR δ (D₄-MeOH): 3.17 (d, $J=9.6$ Hz, C-5), 2.63 (d, $J=9.6$ Hz, C-6), 2.72 (m, C-13), 2.18 (m, C-15), 4.49 (s, *anti*-NOCH₂CO), 4.48 (s, *syn*-NOCH₂CO); FABMS [negative] m/z : 813([M₂-H]⁻, 8), 406([M-H]⁻, 100), 390([M-OH]⁻, 2), 362([M-COOH]⁻, 2), 348([M-CH₂COOH]⁻, 4), 332([M-OCH₂COOH]⁻, 7)

●選択的活性エステル化およびキャリアタンパク質との結合

GA₄-16-CMO粗画分46.0mgを300 μ lの無水アセトニトリルに溶解し、NHSI 13.0mg[1当量]を加えた。続いてDCC 20.8mg[0.89当量]を加えて、N₂ガス置換後、室温にて12時間攪拌した。シリカゲルTLC(展開溶媒系はEtOAc: CHCl₃: AcOH=20:12:1 (v/v))により反応の進行を確認した。沈殿物を除去した上清を濃縮乾固し濃縮物56.4mgを得た。これをDMF 300 μ lに溶解し、別個にBSA 119.4mgをDW 600 μ lに溶解し、両者を混合した。更に25 μ lのトリエチルアミンを加えた。N₂ガス置換して常温で3日間攪拌した。反応物についてDWによる透析を行い120.8mgの免疫原を得た。

■■■■モノクローナル抗体の調製■■■■

●免疫用エマルジョンの調製

予備免疫用のエマルジョンは、免疫原1mgをPBS (K₂HPO₄ 1.392g, NaH₂PO₄ \cdot 2H₂O 0.312g, NaCl 5.844gをDW 1 Lに溶解, pH 7.4)600 μ lに溶解した。一方、免疫増強剤(complete typeのFreund adjuvant)を 600 μ l用意して、双方を混合してW/Oタイプのエマルジョンを調製した。追加免疫の場合は免疫増強剤としてincomplete typeのadjuvantを用いた。

●イムノアッセイ法による抗体の検出

抗血清またはハイブリドーマの培養上清のPBS(pH7.2)希釈溶液0.1mlに、ウシ血清 0.1ml, PBS 0.3ml, 標識GA4溶液(1,2-³H₂]GA₄, 1.39 TBq/mmol, 170 fmol) 0.1mlを混合して常温で3時間静置した。これに終濃度50~60%(v/v)になるように飽和硫酸アンモニウム水溶液を添加し、4℃で30分間静置してから遠心操作(3,500 rpm, 20分間, Kokusan)によりペレットを得る。50%(v/v)飽和の硫酸アンモニウム溶液を用いてペレットの洗浄を行ったのち、ペレット中の放射活性を測定した。

●脾臓細胞の調製方法

マウスの頸骨を砕いて70%エタノールで全身を消毒し、腹部左側より脾臓を摘出した。細胞培養用培地で洗浄しミクロスパーテルで脾臓細胞を少量ずつ取り出した。シリンジを用いてさらに細かく分離し、遠心操作(1000rpm, 5分間)により細

胞ペレットを調製した。0.85%の塩化アンモニウム溶液により細胞懸濁液を10倍希釈して赤血球を破壊した後、さらにリン酸緩衝液で10倍に希釈してからヘマサイトメーターを用いて全細胞数の算出を行った。

●ミエローマ細胞の調製方法

脾臓細胞と同様に培養液をよく懸濁してヘマサイトメーターにより全細胞数を算出した。細胞融合に用いるミエローマと脾臓細胞の混合比率を1:10とした。

●細胞融合法

脾臓細胞とミエローマ細胞を混合し、遠心操作(1000rpm, 5分間)により混合細胞を得た。37℃の恒温槽内で50%ポリエチレングリコール溶液を正確に1分間かけて添加したのち、更に1分間経過してから9倍量の培地を5分間かけてかき混ぜながら添加した。遠心操作(1000rpm, 5分間)により融合細胞を得た後、最終的に1mlあたり 4×10^6 個になるように培地を加えて96穴培養用プレートに100 μ lずつ入れた。

●HAT培地によるスクリーニング方法

ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン入り選択培地を細胞融合から24時間後に100 μ lずつ各ウエルに添加した。3~4日後、培養上清を捨て各ウエルに通常の培地を入れた。1週間後に直径が0.75mm以上のコロニーが存在するウエルだけを選択して上清を得て、イムノアッセイ法による抗体の検出を行った。

●クローニング方法

フィーダー細胞を調製するため、正常マウスの脾臓細胞ペレットを調製し、ヘマサイトメーターにより細胞数を算出して1mlあたり 2×10^6 個の懸濁液にした。さらに限界希釈法によりハイブリドーマ懸濁液を調製して、理論的にウエル1個につき細胞が1個入るように各プレートへの植え付けを行った。約2週間の培養の後、コロニーがウエル内に唯一存在し、コロニーの直径が1.7mm以上に成長しているウエルを選択し、その培養上清についてイムノアッセイ法により抗体の検出を行った。

●硫酸沈殿法による抗体検出法

標識ジベレリン溶液($7.5\text{ nM } 1,2\text{-}^3\text{H}_2\text{-GA}_4$ [33.6 Ci/mmol , Amersham], PBS, pH7.2) 0.1ml (ca.10,000dpm, 160Bq)と抗体溶液0.1mlと、対照として非標識ジベレリン溶液(1 mM GA_4)またはPBSのみを0.1ml添加して、キャリアータンパク質としてウシ血清溶液(PBSで15倍希釈)0.3ml添加して、12時間反応させた。これに飽和硫酸溶液 0.75mlを加えて30分間、4℃で静置した後、遠心分離($5,000\times g$, 4℃, 20分間)によりペレットを得て、2mlの液体シンチレーションカクテル(ACSII, Amersham)に混合して放射能カウントを測定した。

●抗体のpH依存性

DWで溶解した抗体溶液0.1mlと、標識ジベレリン溶液($7.5\text{ nM } 1,2\text{-}^3\text{H}_2\text{-GA}_4$) 0.1ml (ca.10,000dpm, 160Bq)と、最終的に目的のpHを維持するように設定された各緩衝液0.3mlを添加して計500 μl の溶液にして4℃、12時間反応させた。これにPBSで15倍希釈したウシ血清溶液0.1mlを加えて、4℃、30分静置した。以下は通常の硫酸沈殿法による抗体検出法に準じてペレット中の放射能カウントを測定した。各設定pH緩衝液の調製方法(pH4.0~pH5.5 : 0.2M フタル酸水素カリウム溶液, 0.1M NaOHで調整; pH6.0~pH7.0 : 0.2M KH_2PO_4 溶液, 0.1M NaOHで調整; pH7.5~pH8.5 : 0.2M Tris 溶液, 0.1M HClで調整; pH9.0~pH9.5 : 0.2M $\text{H}_3\text{PO}_3\text{-KCl}$ 溶液, 0.1M NaOHで調整)。

●抗体の GA_4 に対する親和性および基質選択性

抗体溶液0.1mlと標識 GA_4 溶液0.1ml(ca.20,000dpm, 333Bq)に加えて、任意の量の各非標識ジベレリン溶液0.1mlを混合して、通常の硫酸沈殿法による結合活性を測定した。過剰量の非標識 GA_4 により交換可能な標識 GA_4 の全結合量のうち、非標識 GA_4 を添加した場合の50%置換に必要な添加量については、反応溶液量(1.35ml)から濃度を算出し解離定数とした。基質選択性に関しては、50%を置換するのに必要な添加量を各非標識ジベレリンについて算出し、濃度の逆数を比較して相対的親和性を求めた。

■■■応用面における抗GA₁メチルエステル抗体との比較■■■

●植物材料

分析に用いたイネの蒴は、ササニシキ(*Oryza sativa* L. cv. Sasanishiki)の正常種から開花3~4日前に採取した。

●ジベレリンの抽出および粗精製

イネの蒴(29.8mg)を80%アセトン水溶液中で乳鉢を用いて抽出した。濃縮したものをMeOHに溶解し、Bond Elut DEAカートリッジ(Analytichem International, 40 μ m)に供し、0.1%(v/v)AcOH入りMeOH溶液で溶出を行い、濃縮した画分をNucleosil N(CH₃)₂カラムを用いたHPLC分析、およびODSカラムを用いたHPLC分析に供した。

●Nucleosil N(CH₃)₂カラムを用いたHPLC分析

サンプルを100 μ lのMeOHに溶解し、うち60 μ lを分析に供した。1分ごとに分画して減圧濃縮した後、5%(v/v)MeOHを含むリン酸緩衝液に溶解してイムノアッセイ用試料とした。残りは減圧濃縮しODSカラムを用いたHPLCに供した。(カラム, Sensyu-Pak Nucleosil N(CH₃)₂, 4.6mm i.d. \times 100mm; 溶媒, 0.05%(v/v)AcOH入りMeOH, isocratic; 流速 2.0ml/分; 検出, UV(210nm); 分取, 2.0ml/fr.)

●ODSカラムを用いたHPLC分析

サンプルを100 μ lのMeOHに溶解し、うち60 μ lを分析に供した。分画した後、減圧濃縮して5%(v/v)MeOH入りリン酸緩衝液に溶解してイムノアッセイ用サンプルとした。(カラム, Capcell pak C18 SG120, 4.6mm i.d. \times 250mm, Shiseido; 溶媒A (20%(v/v)acetonitrile / 0.5%(v/v)AcOH), 溶媒B (80%(v/v)acetonitrile / 0.5%(v/v)AcOH), A100% \rightarrow B100%, 30分間, linear gradient; 流速 1.0ml/分, 検出 UV(215nm); 分取 1.0ml/fr.)

■■■イムノアフィニティークラムで用いる溶出系の検討■■■

●塩濃度・有機溶媒・pH環境の変化による影響

KCl溶液は初めに4.5M溶液を調製し順次希釈して用いた。KSCN溶液の調製も初めに15.0M溶液を調製した。解離状況の検討は、GA₁標識体(20,000dpm,

274fmole)溶液200 μ lと抗体溶液200 μ lを加えて攪拌し、1時間、4℃で静置した。各濃度の塩溶液200 μ lを添加して攪拌し、更に1時間静置した。牛血清溶液100 μ lを加えて飽和硫酸アンモニウム溶液750 μ lを添加して、4℃に30分間静置してから遠心分離(5,000 \times g, 20分間)により得られたペレットの放射活性量を測定した。MeOH溶液を用いた場合や異なるpH緩衝液を用いた場合についても同様に検討を行った。ただし、用いた緩衝系として、pH1.0 \sim 2.0は0.2MのKCl-HCl系、pH2.5 \sim 4.0は0.2MのKH phthalate-HCl系、pH4.5 \sim 5.5は0.2MのKH phthalate-NaOH系、pH6.0 \sim 7.0は0.2MのKH₂PO₄-NaOH系、pH7.5 \sim 8.5は0.2MのTris-HCl系、pH9.0 \sim 9.5は0.2MのH₃BO₃-NaOH系をそれぞれ用いた。

●ヒドロキシアパタイトカラムを用いた抗体の精製

使用したカラムはHydroxyapatite TAPS-050805 (Tonen, 7.5mm i.d. \times 50mm)、展開溶媒として溶媒A(0.01Mリン酸緩衝液, pH7.1)、溶媒B(0.3Mリン酸緩衝液, pH6.7)を調製しておき、5分間はA100%、次の5分間でA44%:B56%までlinear gradientを行い、10分間はA44%:B56%を維持し、次の5分間でB100%までlinear gradientを行い、10分間はB100%を維持した。流速は1.0ml/分、検出はUV(280nm)で行った。

●イムノアフィニティークラムの調製

抗体溶液3.3ml(20mg)とカップリング用緩衝液(0.75M NaCl-0.1M炭酸緩衝液(pH8.3))4.7mlを加えた。これにCNBr-activated Sepharose 4B(Pharmacia) 1.15gを添加し2.5時間振盪してカップリングを行った。反応を終了してゲル懸濁液をガラスフィルターに移して洗浄した後、0.2Mのグリシン溶液(pH8.3)を8ml加えて2時間振盪した。再びガラスフィルター上に移し、0.5M NaCl-0.1M炭酸緩衝液(pH8.3)および0.5M NaCl-0.1M 酢酸緩衝液(pH4.0)で交互に洗浄した。それからミニカラム(生化学工業, セパコール・ミニ, 7.5mm i.d.)の先端にマルチフレックスチップ(フナコシ)を取り付け、ゲル懸濁液をカラムに入れた。カラムのブロッキングを行うため、0.5%BSA-PBS溶液(pH7.2) 500 μ lをカラムに流した。その後、0.5M NaCl-0.1M炭酸緩衝液(pH8.3)および0.5M NaCl-0.1M 酢酸緩衝液(pH4.0)で交互に洗浄した。

●イムノアフィニティークラムを用いた溶出系の検討

[1,2-³H]₂-GA₁溶液100 μ l(20,000dpm, 274fmole)を1滴ずつカラムに充填した後、

1mlの試料充填用緩衝液(0.15M NaCl-5%(v/v)MeOH-PBS(pH7.4))を1滴ずつ流して3時間静置した。洗浄用緩衝液(0.15M NaCl-0.5%(v/v)Tween20-PBS(pH7.4))を流速350 μ l/分で8分間流した後、20分間静置した。洗浄用緩衝液を40分間流してから溶出用緩衝液(0.5M KSCN-40%(v/v)MeOH-0.06M酢酸緩衝液(pH4.0))を8分間流した後、20分間静置した。溶出用緩衝液を40分間流して溶出を行った。

■■■イネの葯中のジベレリン分析への応用■■■

イムノアフィニティーカラムへの試料の充填および溶出に関しては以下の要領で行った。その他の分析条件に関しては「応用面における抗GA₁メチルエステル抗体との比較」の項を参照。Bond Elut DEA処理後の濃縮乾固物を1mlの試料充填用緩衝液(0.15M NaCl-5%(v/v)MeOH-PBS(pH7.4))に溶解した。うち0.5mlをイムノアフィニティーカラムによる精製に供した。0.6mlの試料充填用緩衝液を流し、常温で3時間静置した。以下の手順は前項に従った。溶出用緩衝液による溶出液をあわせて濃縮し、100 μ lの20%acetonitrile-0.5%AcOH溶液を添加して溶解し遠心操作(20,000 \times g, 10分間)して上清を獲得し、これをODS-HPLCによる精製に供した。

■■■抗イディオタイプ抗体の調製時の力価の算出■■■

イムノアッセイ法による検定系においてトレーサー(1,2-[³H₂]GA₄, 1.39

TBq/mmol, 170 fmol)の30%と結合する濃度の免疫原抗体を用いて、両者の結合を30%阻害する時の、抗イディオタイプ抗体溶液の最終希釈倍率をもって力価と定義した。すなわち、図2-17に示すようなシグモイド曲線を作成して、抗イディオタイプ抗体を全く含まない反応系での結合放射活性量の70%を維持する時点の抗イディオタイプ抗体溶液の希釈率を外挿により求めた。

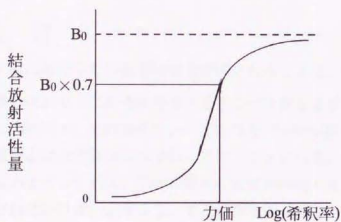


図2-17 抗イディオタイプ抗体における力価の算出方法

抗血清中の抗イディオタイプ抗体の存在量を示す指標(力価)の算出方法として、抗血清の希釈率と、その希釈溶液を抗ジベリン抗体と標識GA₄の混合液に添加して両者の結合に対する阻害状況をプロットした。そして30%の阻害を引き起こす抗イディオタイプ抗体の希釈率を外挿により求めて力価とした。

■■■■第3章■■■■

ヤエナリ幼植物体からのGBPの 抽出・精製とその性状解析

3-1: 緒言

GBPを検索するにあたりその初期段階で要求されることは、 GA_1 あるいは GA_4 といった活性型ジベレリンに結合能を有するタンパク質をまず検出することである。検出されたGBPについて精製を行い、どの画分にGBPが存在するか直ちに検出するため、精製と結合活性検出は平行して行うことになる。従って精製を短時間で効率的に進めようとするれば、GBPの検出に要する時間・労力はできるだけ最小限に抑えなければいけない。そこで、すでに活性型ジベレリンに特異的に反応する抗体の調製時に検出系として導入し、即時にGBPの検出系としても対応させることが可能な硫酸沈殿法を採用した。また、利用する放射性標識体としてトリチウム標識した GA_4 を用いた。硫酸沈殿法では一般的に高い塩濃度の環境下で偶発的に形成される結合部位を検出する危険性があり、使用に際してはこのことに十分に留意しなければならない(Venis, 1984)。しかし、極めて簡便な方法であるため未知物質を大量の画分から迅速に検出する方法として、それらの危険性を考慮してもまだ魅力のある方法であると判断し検討を継続した。

一方、GBPの抽出材料としては、ヤエナリ(別名マングベーン、*Vigna radiata* cv. Wilczek)幼植物体(収穫直前の形態について図3-1参照)を採用した。ヤエナリは他と比較して生育速度が速く、廉価で量的な充足が得やすい優れた抽出材料である。受容体に関連したGBPであれば、その存在量は微量と考えられるため、単離に至るには大量の材料が必要と予測されることからGBP精製の為の格好の材料と考えた。

検出されたGBPについては、精製途上においてその性状を解析し、追究に値するか否かの判断を下さなければならない。その為の判断材料として、活性型ジベレリンに対する親和性や、特異抗体で示されたような活性型ジベレリンへの基質選択性などの性状について尺度として活用すべく以下の検討を行った。

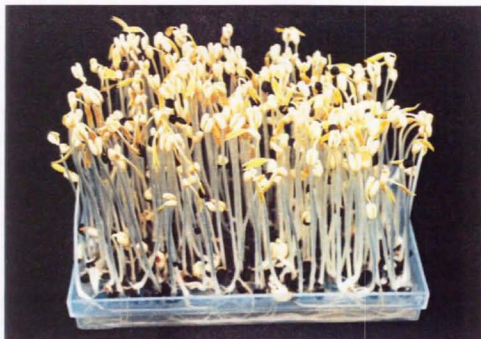


図3-1 GBPの抽出に用いた黄化ヤエナリ幼植物体

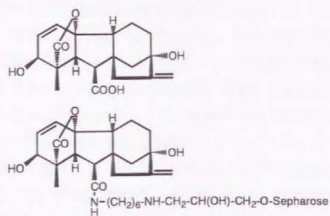


図3-2 GA_3 およびアフィニティーゲルの構造

(上)は GA_3 、(下)はヤエナリGBPの精製に用いたアフィニティーゲルの構造式を示す。 GA_3 の6位カルボキシル基を修飾して担体と結合した。

3-2:ヤエナリGBPの抽出・精製および単離

タンパク質を抽出する材料として子葉を含めて抽出した場合、抽出物の粘性が高くなりカラムクロマトグラフィーに長い時間を要するので、子葉は除去した。また、凍結による保存方法はとらず新鮮な状態で直ちに抽出を行った。

抽出にはpHを7.6に設定したトリス緩衝液を用い、GBPが核内タンパク質または膜付着性(ペリプラズミック)タンパク質である可能性も考慮し、それらの抽出を可能にすると言われる高濃度のNaClを添加した。また、SH基保護剤(2-ME)やプロテイナーゼインヒビター(PMSF)も適量添加した。精製については、破碎・抽出液を過心処理して上清画分を得て、これを硫酸アンモニウムを用いて塩析し、緩衝液に可溶性タンパク質画分(可溶性タンパク質画分)を沈殿として得た。この画分を図3-2に示す様な構造を有するアフィニティーゲルおよび陰イオン交換ゲルを用いたパッチ方式による精製に供し、続いてゲル濾過カラムクロマトグラフィーを行った。アフィニティーゲルによる精製後、溶出画分を二次元(Native-SDS)電気泳動で展開し、サブユニット構成を調べた。また、各サブユニットの部分アミノ酸配列を分析し既知タンパク質との相同性を調べた。

3-2-1:アフィニティーゲルによる精製

精製段階が進んでもGBPがジベレリン結合活性を保持するためには、それだけ短時間で効率の良い精製方法を組みあわせることが必要である。そこで、ジベレリンのアフィニティーカラムの使用について検討し、効果的な精製法としてその活用を図った。Sakaiら(1985)はオーキシンの結合タンパク質ABP-IおよびABP-IIの精製においてアフィニティーカラムを用いた効率的な精製を報告している。彼らは合成オーキシンである2,4-ジクロロフェノキシ酢酸(2,4-D)の構造のうち、活性発現に重要な末端カルボキシル基を敢えて修飾し、アフィニティーリガンドと結合タンパク質との親和性を適度に低下させ、ABP-IおよびABP-IIの溶出効率の向上に成功している。そこで、同様に活性型ジベレリンにおいても活性発現に重要な6位カルボキシル基を用いて、本来保存されるべきこの部位からの修飾により低親和性のアフィニティーゲルを調製した。

パッチ式のアフィニティーカラムに保持されたタンパク質について、塩強度を上昇させて順次、段階的に溶出した。得られた画分(順に、S200区、S300区、S500区、S800区)について、硫酸沈殿法によるジベレリン結合活性を測定したところ、図3-3に示す様にS500区、S800区の2区に主な結合活性が認められた。一方、抽

出直後の可溶性画分や予備精製用のプレカラム通過区には、結合活性は微弱にし
か認められなかった。

3-2-2:陰イオン交換ゲルによる精製

アフィニティーカラムにより得られた活性画分を合わせ、塩強度が0.1M程度に
なるよう透析を行ってからバッチ方式による陰イオン交換ゲル(DEAE Sephadex A-
50)を用いた精製に供した。溶出は順次、塩強度を上げて行い、計5画分(順にS100
区, S300区, S500区, S700区, S1000区)を得た。ジベレリン結合活性を測定したところ、
図3-4に示す様にS500区からS1000区までに活性が認められたのでこの3画分を
合わせた。

3-2-3:ゲル濾過カラムクロマトグラフィーによる精製

陰イオン交換カラムによる精製で活性の認められた画分を合わせてゲル濾過カ
ラム(Sephacryl S-400)クロマトグラフィーに供した。一定時間毎に分画し、各画分
についてジベレリン結合活性を測定した。その結果を図3-5に示す。標準タンパク
質を用いて作成した検量線から約500kDaと約150kDaに相当する溶出位置に活性の
ピークが認められた。そこで約500kDaの活性ピークを含むfr.60-67(高分子画分)、
および約150kDaの活性ピークを含むfr.68-82(低分子画分)の二つのグループを
Native-PAGEに供した。その結果、図3-6に示す様に双方のレーンともに同一の移
動度を持つヤエナリGBPとみられるバンドを認めた。このことから高分子画分と
低分子画分はともに構成成分が同一であり、高分子画分中のGBPは複数の分子が
会合したものと考えている。

3-2-4:ヤエナリGBPの精製効率

各精製段階におけるヤエナリGBPの回収と結合活性ならびに精製効率を表3-1に
示す。これによればアフィニティーゲルによる精製が最も効果的であり比活性に
おいて約20倍程度に上昇することが判明した。電気泳動の結果からGBPと思われる
タンパク質が単一のバンドとして検出されるまでに精製することはできなかったが、
当該バンドが一貫して結合活性に対応して認められることから、注目して
いるバンドを示すタンパク質が活性本体であろうと考えている。また、活性画分
におけるタンパク質量とGA₄結合活性量との関係について図3-7に示す。これによ

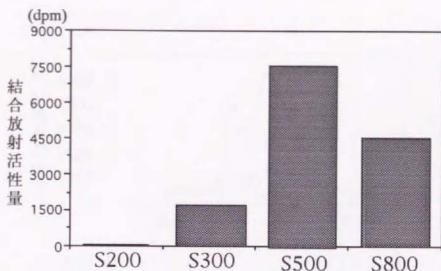


図3-3 アフィニティーゲルを用いた精製後のGBP活性
アフィニティークラム(GA₃-Sephrose 4B)に保持されたタンパク質について、塩強度を上昇させて順次、段階的に溶出した。得られたS200区(NaCl 0.2M添加区), S300区(NaCl 0.3M添加区), S500区(NaCl 0.5M添加区), S800区(NaCl 0.8M添加区)について、硫酸沈殿法によるジベレリン結合活性測定を行った。

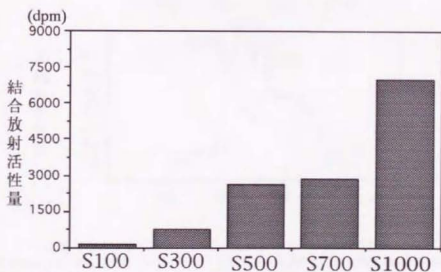


図3-4 陰イオン交換カラムを用いた精製後のGBP活性
陰イオン交換(DEAE Sephadex A-50)カラムに保持されたタンパク質について溶出は順次、塩強度を上げて行い、S100区(NaCl 0.1M添加区), S300区(NaCl 0.3M添加区), S500区(NaCl 0.5M添加区), S700区(NaCl 0.7M添加区), S1000区(NaCl 1.0M添加区)を得た。各画分について硫酸沈殿法によるジベレリン結合活性測定を行った。

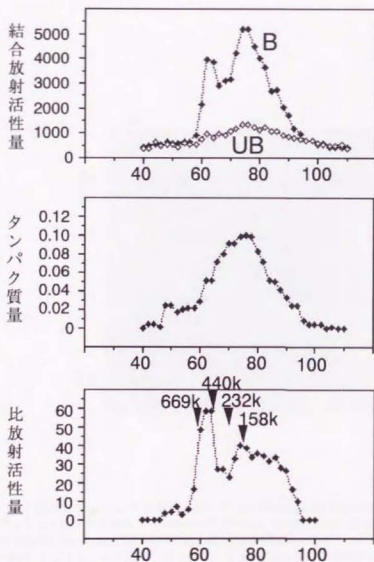


図3-5 ゲル濾過カラムクロマトグラフィーによるヤエナリGBPの精製
 (上段)Sephacryl S-400を用いたカラムクロマトグラフィーにより得られた各画分における結合放射
 能活性量(B)および非特異的結合放射活性量(UB)。(中段)タンパク質量により算出された各画分
 のタンパク質量。(下段)活性型ジベレリンに特異的な結合放射活性量(B-UB)を示す。また、分子量
 算出のために以下のマーカータンパク質を用いてそれぞれの保持時間を測定した。Thyroglobulin
 (669kDa), Apoferritin (440kDa), Catalase (232kDa), Aldolase (158kDa)。

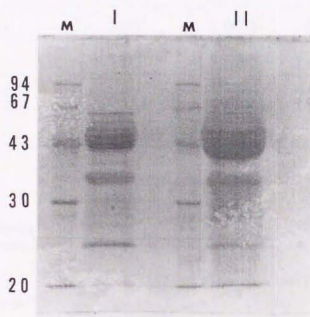


図3-6 ゲル濾過カラムクロマトグラフィーにより得られた活性画分のSDS-PAGE
ゲル濾過カラムクロマトグラフィー(Sephacryl S-400)による精製を行って得られた各画分につ
いて、結合活性の認められたfr.60-67(画分I)、およびfr.68-82(画分II)の二つのグループについ
てNative-PAGEに供した。その結果、双方ともに共通の成分を含むことが示唆された。

表3-1 ヤエナリGBPの回収・結合活性ならびに精製効率

精製段階	総タンパク質量 (mg)	総結合活性量 (kdpn)	比活性 (dpm/mg)	精製度
硫酸沈殿粗画分	4,400	2,120	480	1
アフィニティーカラム	200	1,820	9,100	19
陰イオン交換カラム	110	1,530	14,000	29
ゲル濾過カラムHPLC	17	380	22,000	46

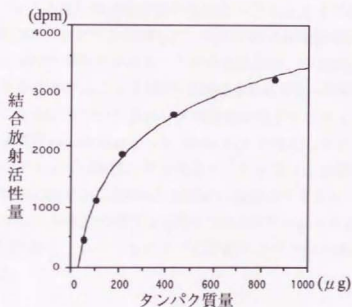


図3-7 活性画分のタンパク質量と結合活性量の関係
ヤエナリGBPを含む活性画分におけるタンパク質量の変動に対する結合活性量を示す。これにより、量的な換算・評価を行う場合には、比較的一次相関の認められるタンパク質量の範囲内(200 μ g以下)で活性量の算出を行うことが望ましいと判明した。

り一次相関の認められる範囲内、すなわち溶液中のタンパク質量は常に200~300 μ g以下で検定を行うことにした。

3-2-5:ヤエナリGBPのサブユニット構造とアミノ酸の部分配列の解析

アフィニティーゲルにより得られた活性画分を二次元(Native-SDS)電気泳動により展開し、GBPと思われるバンドのサブユニット構造を調べた。その結果、図3-8に示す様に分子量が23kDaと36kDaの二種類のサブユニットから構成されていることが判明した。そこでPVDF膜へのブロッティングを行い各サブユニットのアミノ酸配列分析を試みた。23kDaサブユニットについては、N末端から25残基までの配列が図3-9に示す様に推定された。そこで、この配列についてホモロジー検索を行ったところ、ダイズのグリシニン(約71%)やエンドウのレグミン(約57%)のsmallサブユニットに高い相同性を持つことが判明した。また、36kDaサブユニットについてもアミノ酸配列の分析を試みたが、エドマン分解の各ステップにおいて複数のアミノ酸が検出され、試料が単一のペプチドではないことが明らかとなり、部分配列の決定には至らなかった。

23kDaサブユニットと高い相同性が認められたレグミンタイプの貯蔵タンパク質は、沈降係数11Sのグロブリンに属し、一般に等電点が酸性側(40kDa程度)と塩基性側(20kDa程度)の2種類のサブユニットから構成され、両者がジスルフィド結合により会合した中間サブユニット6個から構成される300~400kDaのタンパク質とされている。この貯蔵タンパク質はマメ科植物の種子中に多く含まれており、酵素活性を持たず発芽時の窒素源として利用されると考えられている。

以上の結果からヤエナリGBPは、ゲル濾過カラムを用いた未変性条件下で約150kDa、SDS-PAGEの結果から23kDaと36kDaの2種類のサブユニットから構成されており、サブユニット構造に関する情報や23kDaサブユニットのアミノ酸部分配列に関する相同性から、レグミンタイプの貯蔵タンパク質と極めて高い関連性を持つと考えられた。



図3-8 ヤエナリGBPのサブユニット構造
Native-SDSによる二次元電気泳動図。矢印はそれぞれ23, 36kDaのヤエナリGBPのサブユニットを示す。

ヤエナリGBP(23kDa)

GLEETICSSKLQFNIARPKSADFYNPKA

ダイズグリシニンB3

GVEENICTLKLHENIARPSRADFYNPKA

エンドウレグミンb

GLEETVCTAKLRLNIGPSSSPDIYNPEA

図3-9 ヤエナリGBP23kDaサブユニットのN末端アミノ酸配列分析
相同性の比較においてヤエナリGBP(23kDa)の配列と同一の箇所にはアンダーラインを付した。この結果、図中に示した部分配列に関して、ダイズグリシニンのB3サブユニットと71%、エンドウのレグミンbサブユニットと57%の相同性が確認された。

3-3: ヤエナリGBPの性状解析

アフィニティーカラムによる精製後の画分を用いて、電気泳動において濃縮が認められた幾つかのタンパク質について電気的に回収し、それぞれの画分におけるGA₄結合活性を調べ、GA₄との結合に関する親和性を解析した。結合活性は、標識GA₄のみを添加した場合の総結合活性量(B区と称する)と、過剰量の非標識GA₄をこれに共存させて交換可能な結合部位を非標識体で置換した場合の非特異的結合活性量(UB区と称す)をそれぞれ算出し、その差分(B-UB)をもってジベレリンに特異的な結合活性量と定めた。他のジベレリンとの結合に関する親和性についてもGA₄の場合と同様にして算出し基質選択性についても検討した。また、最終的に目的のpHになるように調製された緩衝液を用いGBPの結合に関するpHへの依存性についても解析した。さらに、ゲル濾過カラムクロマトグラフィーにより得られた各溶出画分についてGA₄との結合活性を測定し、未変性状態におけるヤエナリGBPの分子量の推定を行った。

3-3-1: 電気泳動ゲルからの電気的な回収法によるヤエナリGBPの特定

アフィニティーカラムにより濃縮されたことが確認されたNative-PAGE上のバンドをゲルから電気的に回収し、それぞれのGA₄結合活性を測定した。その結果を図3-10に示す。この結果、濃縮されたバンドのうち、レーン2に示された位置に移動度を持つバンドすなわち当初よりヤエナリGBPと推定したバンドを含む画分にジベレリン結合活性があることが判明した。このバンドについてはすでに、23kDaと36kDaの2種類のサブユニットから構成されていることが明らかになっている(図3-8を参照)が、結合活性を示すために双方のサブユニットとも必須であるか否かについては不明である。

3-3-2: ヤエナリGBPのGA₄に対する親和性

アフィニティーゲルによる精製画分を用いてヤエナリGBPのGA₄に対する解離定数を調べた。活性画分とトリチウム標識GA₄の混合溶液に段階希釈した非標識GA₄を添加して、硫酸沈殿法により得られたペレット中の結合放射活性を測定した。その結果を図3-11に示す。見かけ上の解離定数(K_d)を算出する一般的な方法

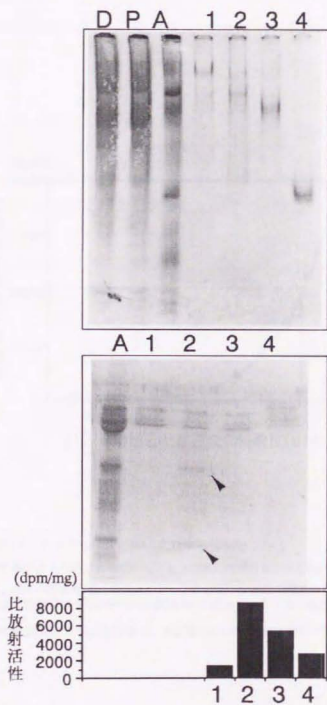


図3-10 電気的回収法によるヤエナリGBPの特定
 最上段の図中(1~4)はアフィニティーゲルを用いた精製画分について、分取用電気泳動ゲル(7.5% Native-PAGE)による展開の後、電気的にタンパク質を回収して再度、泳動したもの。中段は同画分のSDS-PAGE(12.5%)。下段は各画分のGBP活性を示す。これによりレーン2で認められるバンドがGBP活性を有することが示された。なお(D)は抽出後の粗画分、(P)は前処理用ゲルからの溶出画分、(A)はアフィニティーゲルを用いた精製画分を示す。

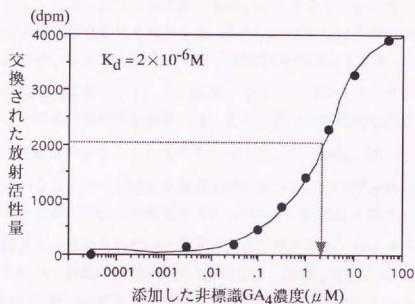


図3-11 ヤエナリGBPのGA₄に対する親和性

活性画分とトリチウム標識GA₄の混合溶液に任意の量の非標識GA₄を添加して、硫酸沈殿法を用いてペレット中の結合放射活性量を測定した。交換可能な全結合部位のうちの50%が非標識GA₄で置換されるときに添加した非標識体の濃度(矢印で示す)を算出し、その濃度から $K_d=2 \times 10^{-6} M$ と算出された。

として、全交換可能な結合部位のうちの50%が非標識GA₄で置換されときの添加した非標識体の濃度が用いられるが、この簡便法からK_dは 2×10^{-6} Mと算出された。

3-3-3: ヤエナリGBPの基質選択性

アフィニティーカラムによる精製画分を用いてヤエナリGBPに関して各種のジベレリンに対する基質選択性を検討した。図3-12に検討した各種ジベレリンの構造式を示す。また、表3-2にはGA₄に対する親和性を100%とした時の各ジベレリンの相対的な親和性をまとめた。この結果、ヤエナリGBPは活性型ジベレリンであるGA₄やGA₇に高い親和性を示す一方、それ自身では生理的な活性を持たないGA₉にも高い親和性を示すことが明らかとなった。このGA₄、GA₇、GA₉の構造上の共通点の一つとして特に13位に水酸基を持たないことが挙げられる。活性型ジベレリンでありながら13位に水酸基を有するGA₁やGA₃ではヤエナリGBPに対する親和性がほとんど認められないことと合わせて考えると、ヤエナリGBPはジベレリン分子の中の、特にC/D環の構造の特徴をよく認識しているものと推測される。またGA₃₇やGA₁₃に対する親和性については総じて低いことから γ -ラクトンなどの4位→10位の環構造は選択的に識別することも判明した。

3-3-4: ヤエナリGBPのpH依存性

pH環境の変化に伴うヤエナリGBPとGA₄との親和性に与える影響について解析した。その結果について図3-13に示す。これによるとpH6.0で至適条件となっているが、ピークの左右の形状がやや異なることから複数の要因が関与していると考えられる。pH5.5以下での結合活性の急落については、ヤエナリGBP自体の安定性も考慮する必要があるが、pH5.5付近の環境下では反応溶液中にタンパク質の沈降は特に認められなかったことから、ジベレリンの6位カルボキシル基がpKaに相当し、解離状態で存在する確率が低下したことに起因すると考えられる。第2章で述べたように活性型ジベレリンに特異的に結合する抗体の性状に関してpHへの依存性を検討した際にも、これと類似して、調製された抗体がpH5.5近傍でGA₄への親和性が激変することが示されている(図2-12を参照)。

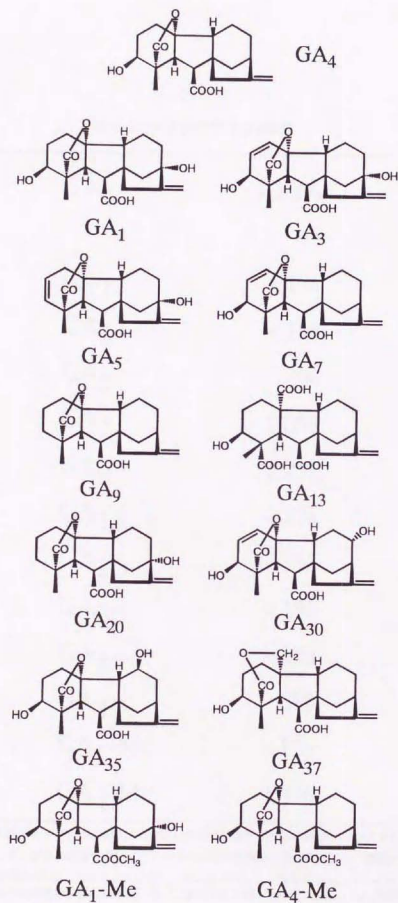


図3-12 基質選択性の検討に用いたジベレリンの構造式

表3-2 ヤエナリGBPの基質選択性

GA ₄	100%
GA ₁	<1%
GA ₃	<1%
GA ₅	2%
GA ₇	70%
GA ₉	22%
GA ₁₃	<1%
GA ₂₀	<1%
GA ₃₀	<1%
GA ₃₅	<1%
GA ₃₇	3%
GA ₁ -Me	<1%
GA ₄ -Me	18%

活性画分とトリチウム標識GA₄の混合溶液に任意の量の各非標識ジベレリンを添加して、硫酸沈殿法を用いてペレット中の結合放射活性量を測定した。標識GA₄の結合が50%阻害されるのに必要な各非標識ジベレリン量を算出し、その逆数を比較して相対的親和性を求めた。従って値が大きい程、親和性が高い。GA₄を基準として記す。

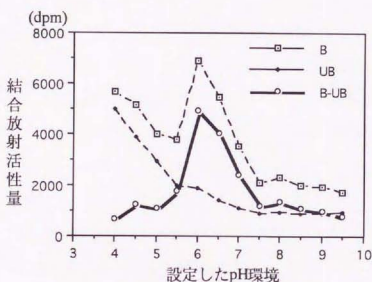


図3-13 ヤエナリGBPのpH依存性

蒸留水で溶解しゲル濾過カラムで脱塩処理した活性画分100 μ lを標識ジベレリンA₄溶液50 μ l(ca.20,000dpm, 333Bq)と、過剰の非標識ジベレリン溶液50 μ l(図中UB区)または非標識ジベレリンを含まない緩衝液(図中B区)を添加して、目的のpHを維持するように設定された各緩衝液300 μ lを添加して4℃、3時間反応させた。以下、通常の硫酸沈殿法に準じてベレット中の放射カウントを測定した。

また、ジベレリンの結合活性の測定の際にはpH7.6の緩衝液をこれまで用いていたので、少し酸性側にシフトさせたpH環境にすることにより、更に効率的に活性の検出を行うことが可能になると期待される。

3-4:ヤエナリ種子中の内生ジベレリンの分析

黄化したヤエナリについて、子葉部(C区)と胚軸部(H区)に分けたもの、さらに吸水前の種子(S区)および一夜吸水させた種子(Q区)の計4区(それぞれ設定区については図3-14を参照)を準備し、各々を独立にMeOH中で破碎した後、溶媒分画を行いAcOEt可溶性性区を得た。これを陰イオン交換能を有する固相抽出用カートリッジに供して精製を行い、陰イオン交換能を有するN(CH₃)₂カラムおよび二種類のODS系のカラムを用いたHPLCによる精製に供し、得られた精製物をそれぞれ特異抗体を用いたイムノアッセイ法による定量分析に供して各画分中のGA₁、GA₄、GA₉、GA₂₀等の定量を行った。それぞれに関する定量結果を図3-15に示す。この結果から子葉部と胚軸部との比較では、共に活性型ジベレリンであるGA₁とGA₄に関してはいずれも胚軸部に10倍以上が存在することが判明した。一方、乾燥した種子と吸水させた種子との比較では、GA₁あるいはその前駆体であるGA₂₀に関してはほとんど増減が認められなかったのに対し、GA₄では短時間の吸水による劇的な増加が認められた。GA₄の前駆体であるGA₉に関しては増減がほとんど認められないことから、急増したGA₄について*de novo*で生合成された可能性以外に、GA₄の誘導体(例えば配糖体など)が予め貯蔵されていて、吸水に伴ってGA₄に再変換された可能性も考えられる。多くのマメ科植物の未熟種子中にはGA₄が高濃度に存在し、その後の成熟過程を経て完熟状態ではその含有量が低下することが知られている。成熟過程でのGA₄の役割は不明であるが、ヤエナリGBPの生理的役割をこれらの観点から考えるとすれば、発芽時に必要なGA₄等の貯蔵を担い、それらの迅速な供給に関与する可能性が考えられる。

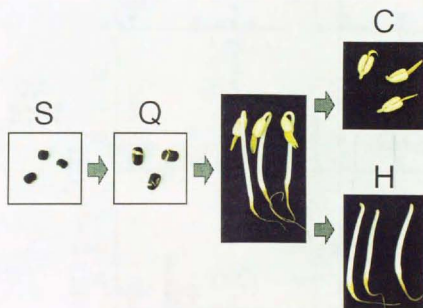


図3-14 内生ジベレリンの定量分析を行った各種植物材料
 (S区)は乾燥したヤエナリ種子、(Q区)は一夜吸水させて膨潤した種子、
 (C区およびH区)は黄化幼植物体の子葉部(C区)と胚軸部(H区)。各区につ
 いてジベレリンの抽出を行い、内生量についての定量分析を行った。

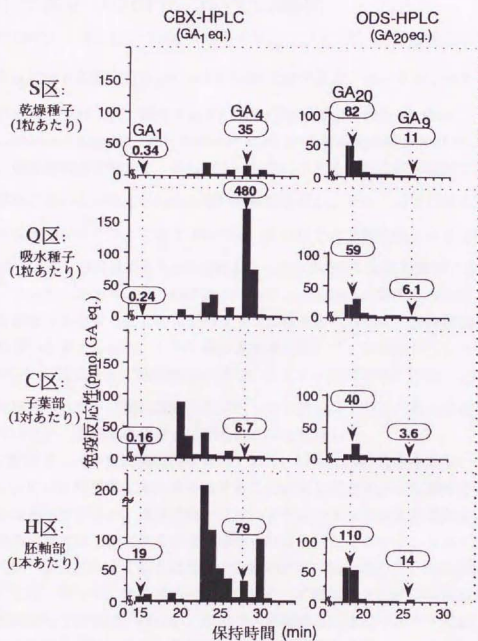


図3-15 ヤエナリ幼植物体中の内生ジベレリンの定量分析
二種類のHPLCにより精製を行い、第2章で調製したGA₄に対する特異抗体およびGA₂₀-Meに対する特異抗体(Yamaguchi *et al.*, 1987)を用いてそれぞれの抗体に反応性を示すジベレリンについての定量分析を行った。図中の囲み数字はそれぞれの定量値を示す。(S区)は乾燥したヤエナリ種子、(Q区)は一夜吸水させて膨潤した種子、(C区およびH区)は、黄化幼植物体の子葉部(C区)と胚軸部(H区)を示す。

3-5: ヤエナリGBPについての総括

ヤエナリGBPは、活性型ジベレリンの中でGA₄やGA₇に高い結合活性を示し

た。またGA₄に対する親和性($K_d=2 \times 10^{-6}M$)を比較すると、オーキシンやサイトカイニンの結合タンパク質で報告されている中に同程度のものを見出すことができる(Loebler and Klaemt, 1985; Romanov *et al.*, 1988; Hamaguchi *et al.*, 1985)。ところが、基質選択性に関して、GA₄やGA₇以外にこれらの生合成前駆体で活性発現には関与しないとされるGA₉にも高い親和性を有し、その一方で13位に水酸基を有する活性型ジベレリンであるGA₁やGA₃にはほとんど親和性を示さないことから、ジベレリンの構造のうちA/B環側よりもむしろB/C/D環側を識別することが明らかになった。このヤエナリGBPはジベレリンとの結合に関する可逆性、飽和性、基質選択性を有することからジベレリンに特有の何らかの生理的役割を担う可能性を持つと考えられる。しかし基質選択性に関して、活性型ジベレリンであるGA₁やGA₃にはほとんど親和性を示さないことから生理的な活性強度との間に相関性が認められず、当初に設定したジベレリン受容体であるための必要条件を満たさないため、受容体の候補とは考えにくいと判断した。

本GBPが貯蔵タンパク質に相同性を有しており、13位に水酸基を持たない一群のジベレリンだけに特異的に親和性を有することに関してどのような意味を持っているのかは不明であるが、事後の検討においてヤエナリGBPは硫酸沈殿法以外の結合活性測定法では明確な結合活性が認められなかったことから、ヤエナリGBPがジベレリンと結合する場合は周辺の環境が非常に塩強度の高い所に限定されることになる。従って、植物体内の中でGBPとして機能するためには極めて特殊な環境を想定しなければいけない。他のマメ科植物と同様にヤエナリにおいても、吸水後の種子中でGA₄の内生量が增大することが定量分析により示された。

一方、サイトカイニンの結合タンパク質の中には、ヤエナリGBPと同様に全可溶性タンパク質の主要成分であって、貯蔵タンパク質であるとともにサイトカイニンの量的な調節を担う可能性が高いとされているCBPも存在する(Brinegar *et al.*, 1985)。これと本GBPとは状況的に類似しており、GA₄などの一時的な貯蔵や迅速な供給を図る可能性も残されている。いずれにしても、受容体とは考えにくいことから、新たなGBPの検索を行う必要性が明確になった。

3-6: 実験の部

■ ■ ■ ヤエナリ GBP の抽出・精製および単離 ■ ■ ■

● 植物材料の調製

ヤエナリ (*Vigna radiata* cv. Wilczek) の種子を次亜塩素酸ナトリウム水溶液 (有効塩素 1%) で約 3 分間処理した後、暗黒下 (28℃) で一晩吸水させて約 1 時間風乾した後、寒天プレート上 (0.4%) に播種して、暗黒下 (28℃) で 2 日間培養して幼植物体 (子葉を除く) を収穫した (収量は乾燥種子 1 kg あたり 2~3 kg である)。

● 可溶性タンパク質の抽出

特に断らない限りすべての作業は 4℃ で行った。ヤエナリ幼植物体と同重量の抽出用緩衝液 (60mM Tris-HCl, pH7.6, 10mM EDTA- Na_2 , 30mM 2-ME, 1mM PMSF, 0.5M NaCl) とをミキサー内で混合し、計 5 分間粉砕した。途中、材料の新鮮重の 20% にあたる PVPP (ポリクラーラル AT、五協産業) を順次加えた。4 重に重ねたガーゼにより破砕物を濾過し、濾液を集めて遠心分離 (9,500×g, 30 分間) により上清画分を集めた。この画分に 60% (w/v) の硫酸アンモニウムを攪拌しながら徐々に添加した。120 分間攪拌を継続した後、遠心分離 (9,500×g, 30 分間) により沈殿区を集めてこれを可溶性タンパク質画分とした。

● 予備精製の為の透析

可溶性タンパク質画分を新鮮重の 10% (v/w) 程度の透析用緩衝液 (10mM Tris-HCl, pH7.6, 1mM EDTA- Na_2 , 10mM 2-ME, 0.1mM PMSF, 0.1M NaCl) に溶解し、同緩衝液に対して透析 (各 10L, 交換計 3 回, [3, 3, 12 時間]) を行った。透析終了後、遠心操作 (20,000×g, 30 分間) により不溶物を除去して予備精製用試料とした。

● 予備精製用ゲルによる精製

2,4-D のアフィニティーゲルは、Sakai らの方法に従って調製した (Sakai, 1985)。予備精製用試料に半量 (v/v) の洗浄用緩衝液 (10mM Tris-HCl, pH7.6, 10mM 2-ME, 0.1M NaCl) を加えて、さらに洗浄用緩衝液で平衡化させた予備精製用ゲルを 30% (v/v) 程度加え、60 分間緩やかに振盪した後、グラスフィルターを用いて濾液を集めた。これをアフィニティーゲル精製用試料とした。

●アフィニティーゲルを用いた精製

EAH-Sepharose 4B(Pharmacia) 50ml相当の膨潤ゲルと、水溶性脱水剤EDC(1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩, 480mg)、 GA_3 (346mg)を混合し、pHを5付近に調整して室温で17時間振盪した。各3LのDW、重曹水、AcOH水溶液で順次洗浄して用いた。グラスフィルター上にアフィニティーゲルを充填し、その上から粗タンパク質画分を静かに重層して、更にゲルの5倍量の洗浄用緩衝液(10mM Tris-HCl, pH7.6, 10mM 2-ME, 0.1M NaCl)でゲルの洗浄を行った。それから、ゲル体積と同量の溶出用緩衝液S200(50mM Tris-HCl, pH7.6, 10mM 2-ME, 0.2M NaCl), S300(NaCl 0.3Mである以外の条件はS200と同じ), S500, S800で順次アフィニティーゲルへの吸着物を溶出した。

●陰イオン交換ゲルによる精製

硫酸アンモニウムの飽和緩衝液(20mM Tris-HCl, pH7.6, 10mM 2-ME, ca.4.6M 硫酸アンモニウム)に対して透析(逆透析, 12時間)を行い、遠心操作によりアフィニティーゲル吸着画分を濃縮した。これを洗浄用緩衝液S100(10mM Tris-HCl, pH7.6, 10mM 2-ME, 0.1M NaCl)に対して透析して(各5L, 計3回交換, [2, 2, 13時間])陰イオン交換ゲル精製用試料とした。20%(v/v)の陰イオン交換ゲル(DEAE Sephadex A-50, Pharmacia)をこれに懸濁し、パッチ方式による精製を行った。溶出用緩衝液には、洗浄用緩衝液の各成分に加えて0.3, 0.5, 0.7, 1.0MのNaClを含むものをそれぞれ使用した(順にS300, S500, S700, S1000と称す)。各溶出液は逆透析により濃縮した。

●ゲル濾過カラムクロマトグラフィーによる精製

精製した画分を3.0mlの展開用緩衝液(10mM Tris-HCl, pH7.6, 10mM 2-ME, 0.1M KCl)に溶解し、ゲル濾過用カラム(Sephacryl S-400, Pharmacia, 26mm i.d. \times 1,000mm)に重層した。流速は27ml/hrの定流量とし、143滴(約5.0ml)を1フラクションとして分画した。また、280nmのUV吸収(BioMini UV Monitor, アトー)により溶出状況を把握した。

●ポリアクリルアミドゲル電気泳動(Native-PAGEまたはSDS-PAGE)

Laemmliの方法(Laemmli 1970)に従って行った。Native-PAGEでは7.5%濃度ゲルを、SDS-PAGEでは12.5%濃度ゲルを使用した。染色は0.25%のCBB R-250で染色

した。また、二次元(Native-SDS)電気泳動の際には、ディスクゲル(2.5mm i.d. × 11cm)にてNative-PAGEを行った後、スラブゲル(11cm × 13.5cm × 1mm)でSDS-PAGEを行った。

●GBPのアミノ酸配列分析

電気泳動後のゲルからPVDF膜(ProBlott TM, Applied Biosystem)へGBPを転写して(転写装置: NA-1511、日本エイドー; 転写用緩衝液10mM CAPS-NaOH, pH11, 10%(v/v)MeOH; 条件: 30V定電圧, 0°C, 45分間)、CBB染色して23kDaサブユニットを切り抜き、エドマン分解によるアミノ酸配列分析装置(477Aプロテインシーケンサー・120A PTH-アミノ酸アナライザー, Applied Biosystem)に供した。

■■■ヤエナリGBPの性状解析■■■

●Native-PAGEからの濃縮バンドの電気抽出

分取用電気泳動ゲル(7.5%のNative-PAGE, 11cm × 13.5cm × 1mm)による展開の後、CBB染色によりバンドを確認してこれを切り出し、電氣的にタンパク質を回収する装置(NA-1710, Nippon Eido)および抽出用緩衝液(25mM Tris, 192mM Glycine)を用いてゲルからヤエナリGBPを透析膜上に回収した(8mA定電流, 18時間, 4°C)。

●タンパク質の定量

各試料について、高濃度のTrisの混入による発色の妨害を防ぐため、終濃度5%となるようにトリクロロ酢酸を加えてタンパク質を沈澱させ、遠心分離(20,000 × g, 10分間, 4°C)して得たペレットを0.1N NaOHで溶解したものをを用いた。定量はBSAを標準タンパク質としてローリー法により行った。

●硫酸沈殿法によるジベレリン結合活性測定法

エッペンチューブ内で標識ジベレリン溶液(7.5nM $1,2\text{-}^3\text{H}_2\text{-GA}_4$ [33.6Ci/mmol, Amersham], 125mM Tris-HCl, pH7.6, 25mM 2-ME) 40 μl (ca.22,000dpm, 367Bq)とタンパク質溶液(10mM Tris-HCl, pH7.6, 10mM 2-ME, 0.1M NaCl) 100 μl を混合し、室温で40分間反応させた。次に非標識ジベレリン溶液(1mM GA_4 , 10mM Tris-HCl, pH7.6, 10mM 2-ME, 0.1M NaCl)または非標識ジベレリンを含まない緩衝液(10mM Tris-HCl, pH7.6, 10mM 2-ME, 0.1M NaCl)を50 μl 添加して100分間反応させた。これ

に飽和硫酸溶液 0.8mlを加えて60分間、4℃で静置した後、遠心分離(20,000×g, 4℃, 20分間)によりペレットだけを回収した。このペレットを600 μ lの0.1N NaOHで溶解して、5mlの液体シンチレーションカクテル(ACSII, Amersham)に混合して放射能カウントを測定した。ジベレリンによる特異的結合活性量の算出は、GA₄の非標識体を添加した区としなかった区との差、すなわち非標識体により交換可能な結合量をもって結合活性とした。

●ヤエナリGBPの結合に関するpH依存性

対象となる活性画分をDWで溶解し、さらにゲル濾過カートリッジ(Nap-10, Sephadex G-25, Pharmacia)で脱塩処理をした。この水溶液100 μ lと、標識ジベレリン溶液(7.5nM 1,2-³H₂-GA₄ [33.6Ci/mmol], 125mM Tris-HCl, pH7.6, 25mM 2-ME)50 μ l (ca.20,000dpm, 333Bq)と、非標識ジベレリン溶液(1mM GA₄, 10mM Tris-HCl, pH7.6, 10mM 2-ME, 0.1M NaCl)または非標識ジベレリンを含まない緩衝液(10mM Tris-HCl, pH7.6, 10mM 2-ME, 0.1M NaCl)を50 μ l添加して、最後に目的のpHを維持するように設定された各緩衝液300 μ lを添加して、計500 μ lの溶液にして4℃、12時間反応させた。以下、通常の硫酸沈殿法に準じてペレット中の放射能カウントを測定した。各設定pH緩衝液の調製方法(pH4.0~pH5.5 : 0.2M フタル酸水素カリウム溶液, 0.1M NaOHで調整; pH6.0~pH7.0 : 0.2M KH₂PO₄溶液, 0.1M NaOHで調整; pH7.5~pH8.5 : 0.2M Tris 溶液, 0.1MHClで調整; pH9.0~pH9.5 : 0.2M H₃PO₃-KCl 溶液, 0.1MNaOHで調整)。

●ヤエナリGBPのGA₄に対する親和性および基質選択性

活性画分100 μ lに対して標識GA₄溶液50 μ l (ca.20,000dpm, 333Bq)と、任意の量の各非標識ジベレリン溶液50 μ lを混合して、硫酸沈殿法による結合活性量を測定した。非標識体により交換可能な標識GA₄の全結合量のうち、非標識GA₄を添加した場合の50%置換に必要な添加量については、反応溶液量(1ml)から濃度を算出し解離定数とした。基質選択性に関しては、50%を置換するのに必要な添加量を各非標識ジベレリンについて算出し、濃度の逆数を比較して相対的親和性を求めた。

■ ■ ■ ヤエナリ種子中の内生ジベレリンの分析 ■ ■ ■

分析材料として、以下の4区を設定した。すなわち、乾燥したヤエナリ種子(S区)150.0g、一夜だけ吸水(30℃, 暗黒下)させた種子(Q区)333.0g、ヤエナリGBP精製の幼植物体のうち子葉部(C区)332.2gと、それ以外の胚軸部(H区)574.8gを調製した。これらについて独立に新鮮重の3倍量[v/w]のMeOH中で破碎・抽出を行った。これを通常の溶媒分画に供してAcOEt可溶性区(AE区)を得て、それぞれを減圧濃縮した(S区, 176.3mg; Q区, 336.3mg; C区, 275.7mg; H区, 67.8mg)。つづいて、陰イオン交換能をもつ固相抽出カートリッジ(Bond Elut DEA, Analytichem) 500mgを充填したものにそれぞれのAE区のMeOH溶液を重層し、2%AcOH入りMeOHにより溶出画分を得た。そのうちの1/4を、続くN(CH₃)₂カラムを用いたHPLCに供した(分析条件: Nucleosil N(CH₃)₂ column [4.6mm i.d. × 100mm], 0.05%[v/v]AcOH/MeOH, isocratic mode, flow 2.0ml/分)。溶出時間6~26分までの画分を一括して濃縮し、ODS-HPLC用試料とした(S区, 1.6mg; Q区, 2.6mg; C区, 3.0mg; H区, 1.9mg)。試料を二等分し、一方はODSカラムによる分析に供し、他方はODS様の分離を呈するカーボネクスカラム(CBX-HPLC)による分析に供した。(分析条件1: Carbonex column, Tonen, 4.6 mm i.d. × 100 mm; flow rate 1.0mm/分; linear gradient mode, solvent(A): 20%acetonitrile/0.5%AcOH/80%DW, solvent(B): 80%acetonitrile/0.5%AcOH/20%DW; 0分, (A)100%; 20分, (A)75%(B)25%; 25分, (B)100%)、(分析条件2: CapCell Pak C18 (ODS) column, Shiseido, 4.6 mm i.d. × 250 mm; flow rate 1.0mm/分; linear gradient mode, solvent(A): 20%acetonitrile/0.5%AcOH/80%DW, solvent(B): 80%acetonitrile/0.5%AcOH/20%DW, 0分, (A)100%; 2分, (A)70%(B)30%; 30分, (B)100%)。それぞれの分析で得られた画分は減圧により濃縮乾固して5%MeOHに溶解した。これを等分し、それぞれGA₁およびGA₄に特異的に結合する抗体およびGA₉およびGA₂₀のメチルエステルに特異的に結合する抗体(Yamaguchi *et al.*, 1987)を用いて免疫学的定量法により画分中のジベレリンを定量した。溶媒分画および各種HPLC分析による回収率を別途算出してそれぞれの係数を考慮し、それぞれの区における単位数あたり(種子ならば1粒あたり、子葉ならば1対あたり、胚軸ならば1本あたり)の内生ジベレリン量を換算した。

■■■■第4章■■■■

アブラナ幼植物体からの GBPの抽出・精製とその性状解析

4-1: 緒言

前章ではヤエナリ幼植物体より検出されたGBPが厳しい基質選択性を有し、比較的存在量の多い貯蔵タンパク質に相同性を有することを明らかにした。そしてその結果から、ヤエナリGBPが伸長に關与する受容体候補である可能性は低いと判断した。当初の目的に照らして伸長生長に關与した存在量の少ないGBPを新たに追究する場合、こうした貯蔵タンパク質様のGBPはできるだけ除外し、影響の無い画分について改めて検討する必要がある。しかし、アフィニティーゲル等によりヤエナリで検出されたGBPを徹底的に吸着・除去して、残った非吸着画分を得た場合でも存在量の豊富さからかそれらを完全に除去することは難しく、また同時に別種のGBPもゲルに吸着して除去される可能性も否定できないことから、現状のままでこうしたアプローチは行えないと判断した。そこで、ヤエナリGBPがGA₄標識体を用いた硫酸沈殿法により検出されるものの、同じ活性型ジベレリンでありながらGA₁にほとんど親和性を示さないことを利用して、GA₁標識体をトレーサーとして用いることにより貯蔵タンパク質様のGBPが混在した状態においても新たなGBPを検出し得る可能性があると考えた。すなわち伸長生理に關係する受容体であればGA₁およびGA₄のいずれの活性型ジベレリンに対しても高い親和性を示して結合するはずであり、GA₁の標識体を用いてこれに結合するGBPを検索すれば、少なくとも貯蔵タンパク質様のGBPが検出される危険性から回避されて、新たなGBPを硫酸沈殿法で検出することが可能になると期待した。こうした検討を行う中、アブラナ(*Brassica campestris* L. cv. 農林2号)幼植物体よりGA₁の標識体に対する微弱な結合活性を検出した。予備検討においてGA₄標識体をトレーサーとして用いた場合、アブラナにおいてもヤエナリGBPと同様に大量のGBP活性が検出されたが、GA₁結合活性はこれらGA₄結合活性とはカラムクロマトグラフィーにおいて挙動が異なることから、新規のGBPとしてその精製および性状の解析を行った。

4-2: アブラナGBPの抽出・精製

アブラナ幼植物体(収穫時の形状を図4-1に示す)の子葉部は小さく、ヤエナリと異なり除去に手間がかかること、また子葉部を含む抽出溶液に関してもそれほど粘性が上昇しないことを考えあわせて、GBPの抽出には根を除く幼植物全体を使用した。また凍結・融解による活性の低下を考慮し、すべて新鮮な状態で使用した。

抽出にはヤエナリGBPの精製時と同様、pHを7.6に設定したトリス緩衝液を用い、SH基保護剤(2-ME)やプロテイナーゼインヒビター(PMSF)も適量添加した。破砕後の抽出液から遠心分離により上清だけを得た後、30%~60%(w/v)飽和の硫酸アンモニウム水溶液により塩析された可溶性タンパク質画分を得た。

アブラナGBPの精製には、アフィニティーゲルなどの特異な精製方法は用いず、すべて常式的に用いられるカラムクロマトグラフィーを組み合わせて行った。すなわち、塩析により得られた可溶性タンパク質画分を疎水性ゲルを用いたカラムクロマトグラフィーに供し、他の精製法を用いる場合に必要な透析処理の手間を省いた。更に、疎水性ゲルを用いたカラムクロマトグラフィーに続く精製手段として、陰イオン交換ゲルを用いたカラムクロマトグラフィー、HPLC用の疎水性カラムを用いて順次、精製に供した。



図4-1 GBPの抽出に用いた黄化アブラナ幼植物体

4-2-1:疎水性カラムクロマトグラフィーによる精製

可溶性タンパク質画分を30%(v/v)飽和硫酸アンモニウムトリス緩衝液に溶解し、遠心操作により非溶解物を除去してから疎水性カラム(Butyl-Toyopearl 650M)を用いたクロマトグラフィーに供した。溶出は硫酸アンモニウム25%(v/v)を含むトリス緩衝液から始めて、硫酸アンモニウム濃度を順次5%(v/v)刻みで下げて行った。得られた計5画分(順にA25区, A20区, A15区, A10区, A0区)について、ジベレリン結合活性を測定した結果を図4-2に示す。この結果よりA20区を中心として計3区に相対的に高い結合活性が認められた。

4-2-2:陰イオン交換カラムクロマトグラフィーによる精製

疎水性カラムにより精製された活性画分について、透析により硫酸アンモニウム濃度を0.1M以下に下げた。その透析液を陰イオン交換カラム(DEAE Sephadex A-50)を用いたクロマトグラフィーに供し、溶出は硫酸アンモニウム濃度を順次上げて行った。計4画分(順にS100区, S300区, S500区, S700区)を得た。この4画分についてジベレリン結合活性を測定しS500区とS700区に結合活性が認められた(図4-3を参照)。そこで、この2画分をあわせて疎水性カラムを用いたHPLC分析に供した。

4-2-3:疎水性カラムを用いたHPLCによる精製

陰イオン交換カラムクロマトグラフィーにより得られた活性画分について、遠心処理をして不溶物を除去した後、疎水性カラム(Shodex HIC PH2014)を用いたHPLCに供した。280nmのUV吸収によりピーク検出を行い計4区画に分画した。それぞれの画分についてジベレリン結合活性を測定した。その結果に関するUV吸収のクロマトグラムを図4-4に、また活性の測定結果を図4-5に示す。これにより第3番目の画分に結合活性が認められた。また、アブラナGBPは疎水性カラムを用いたHPLC分析において、その溶出位置から疎水性が比較的高く、カラムに保持されやすいタンパク質であろうと推測された。

4-2-4:アブラナGBPの精製効率

各精製段階におけるアブラナGBPの回収と比活性・精製効率を表4-1に示す。比活性の上昇を精製効率の指標として見た場合、疎水性カラムを用いたHPLCが最も精製効率が良いことが判明した。また、最終段階における精製度は可溶性タン

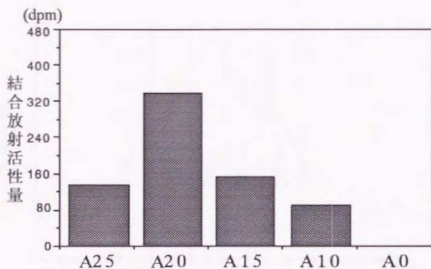


図4-2 疎水性カラムを用いた精製後のGBP活性

疎水性カラム(Butyl-Toyopearl 650M)に保持されたタンパク質について溶出は順次、硫酸アンモニウム濃度を上げて行った。その結果、A25区(飽和硫酸溶液25%(v/v)添加区)、A20区(飽和硫酸溶液20%(v/v)添加区)、A15区(飽和硫酸溶液15%(v/v)添加区)、A10区(飽和硫酸溶液10%(v/v)添加区)、A0区(飽和硫酸溶液無添加区)を得た。各画分について硫酸沈殿法によるジベレリン結合活性測定を行った。

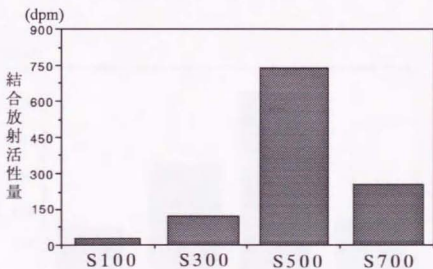


図4-3 陰イオン交換カラムを用いた精製後のGBP活性

陰イオン交換(DEAE Sephadex A-50)カラムに保持されたタンパク質について溶出は順次、硫酸アンモニウム濃度を上げて行った。その結果、S100区(NaCl 0.1M添加区)、S300区(NaCl 0.3M添加区)、S500区(NaCl 0.5M添加区)、S700区(NaCl 0.7M添加区)を得た。各画分について硫酸沈殿法によるジベレリン結合活性測定を行った。

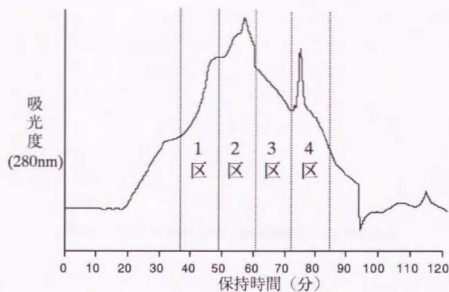


図4-4 疎水性カラム-HPLCにおけるUV吸収クロマトグラム
陰イオン交換クロマトグラフィーにより得られた活性画分について、疎水性カラム(Shodex HIC PH2014)を用いたHPLCによる精製に供した。戻開溶媒(A), 10mM Tris-HCl, pH7.6, 10mM 2-ME, 0.1M NaCl, 30%(v/v)飽和硫酸アンモニウム水溶液; (B), 10mM Tris-HCl, pH7.6, 10mM 2-ME, 0.1M NaCl, 溶媒組成(0分→60分, (B)0%→100%; linear gradient mode), 分画条件(1fr./4分)。

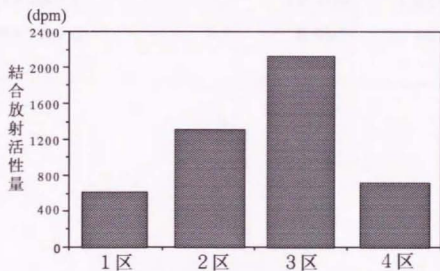


図4-5 疎水性カラム-HPLCにより得られた画分のGTP活性
疎水性カラム(Shodex HIC PH2014)を用いたHPLCによる精製により得られた画分について4つのグループに統合し、それぞれについて硫酸沈殿法によりジベリン結合活性を測定した。

表4-1 アブラナGBPの回収・結合活性ならびに精製効率

精製段階	総タンパク質量 (mg)	総結合活性量 (dpm)	比活性 (dpm/mg)	精製度
60%飽和硫酸沈殿区	600	64,800	110	1
疎水性カラム	110	50,700	440	4
陰イオン交換カラム	11	12,100	1,600	15
疎水性カラムHPLC	1.8	6,900	12,500	110

パク質画分を基準として約110倍であったことも判明した。実際の精製度は見積もられた数値よりもさらに高いのではないかと考えている。その根拠として、キャリアタンパク質を使用しない硫酸沈殿法では極端に低濃度のタンパク質溶液の活性測定を行う場合、塩析効果は小さくタンパク質の沈降およびベレットの形成が不完全なことがある。したがって遠心処理後の浮遊した上清中にGBPが塩析されずに残る可能性が高く、結果として結合活性量が実際より小さくなる可能性が高い。ゲル濾過カラムを用いたHPLCによる精製の場合には、細かく分画することにより精製度の高い画分が得られるが、それだけタンパク質量も減少して非常に結合活性の検定が難しくなる。予備検討においてキャリアタンパク質としてBSAを適宜、添加してタンパク質量を増加させることも検討したが、非特異的な結合活性が急激に上昇するため不適当と結論した。従って、キャリアタンパク質の添加以外の方法により希薄なタンパク質溶液に適応可能な測定方法が設定できれば、より細かい分画も可能であり更に精製度の高い画分を特定することができると期待される。

4-3: アブラナGBPの性状解析

陰イオン交換カラムクロマトグラフィーおよび疎水性カラムを用いたHPLCによる精製を終了した後、得られた画分のジベレリン結合活性を測定し、また同時にSDS変性条件の電気泳動を行って活性に対応するバンドを検索した。さらに陰イオン交換カラムによる精製後の活性画分を用いて、アブラナGBPとジベレリンとの結合に関する親和性および基質選択性、pH依存性等の解析を行って受容体候補の可能性を判定する材料とした。

4-3-1: アブラナGBPのサブユニット構造の解析

疎水性カラムを用いたHPLCにより得られた計12画分についてSDS-PAGEを行った。図4-6に示すように、結合活性に関する比活性が最も高かった第3グループに属する保持時間64~68分と68~72分の2つの画分に特異的に濃縮されているバンドを検出した。分子量マーカーとの比較により50kDaの単一バンドであることが判明した。現段階ではアブラナGBPがこの50kDaのタンパク質なのかどうかは判然としないが、図4-7に示すように前段階の精製手段として用いた陰イオン交換カラムクロマトグラフィーにより得られた活性画分中にもその存在が認められ、活性との対応からアブラナGBPである可能性が高い。しかし、アブラナGBPはヤエナリGBPのように多量には存在せず、ヤエナリGBPのバンドの特定に用いたような分取用の電気泳動ゲルからの電気的な回収および活性の検出は不可能であった。

4-3-2: アブラナGBPの親和性

陰イオン交換カラムクロマトグラフィーによる精製画分を用いてアブラナGBPのGA₁に対する解離定数を調べた。活性画分とトリチウム標識GA₁の混合溶液に任意の量の非標識GA₃を添加して、硫酸沈殿法により得られたペレット中の結合放射活性を測定した。その結果を図4-8に示す。全交換可能な結合部位のうちの50%が非標識GA₃で置換されるとき、非標識体の添加濃度は 7×10^{-6} Mと算出された。ヤエナリGBPのGA₄に対する相対的親和性は、同様にして求めた非標識体の添加濃度より 2×10^{-6} Mと算出されており、共に活性型ジベレリンに対してほぼ同程度の相対的親和性をもって結合することが明らかになった。

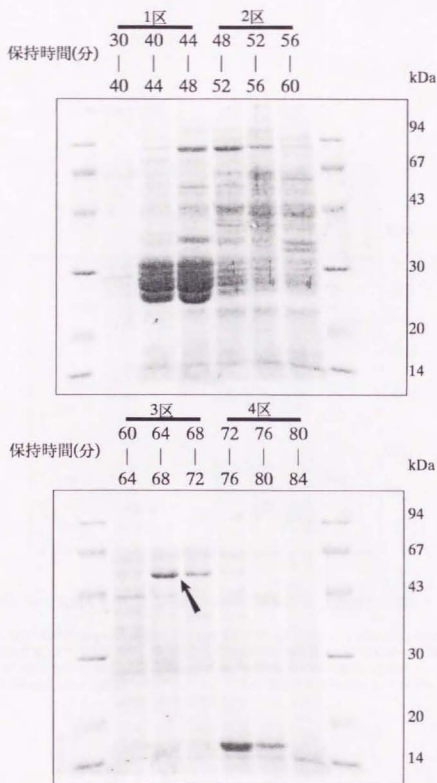


図4-6 疎水性カラム-HPLCによる精製で得られた画分についてのSDS-PAGE
 疎水性カラム(Shodex HIC PH2014)を用いたHPLCにより得られた画分について保持時間で
 4分間毎にあわせて濃縮してSDS-PAGE(12.5%)に供した。矢印はジベレリン結合活性が強く
 認められた第3グループ(保持時間60~72分)で濃く染色されたバンドを示す。

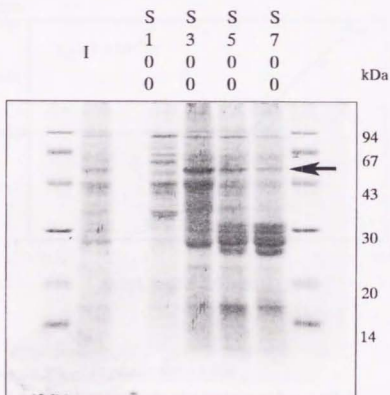


図4-7 陰イオン交換カラムによる精製で得られた画分についてのSDS-PAGE

陰イオン交換(DEAE Sephadex A-50)カラムに保持されたタンパク質(レーンIで示す)について順次、塩強度を上げて溶出を行い、得られたS100区(NaCl 0.1M添加区), S300区(NaCl 0.3M添加区), S500区(NaCl 0.5M添加区), S700区(NaCl 0.7M添加区)について濃縮してSDS-PAGE(12.5%)に供した。泳動図中の矢印はヤエナリGBPと推定される50kDaバンドを示す。

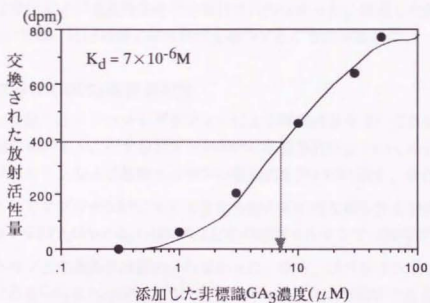


図4-8 アブラナGBPのGA₃に対する親和性

活性画分100 μ lに対して標識GA₁溶液50 μ l (ca. 16,000 dpm, 267 Bq)と、任意の量のGA₃溶液50 μ lを混合して、硫酸沈殿法による結合活性量を測定し、交換可能な標識GA₁の全結合量のうち50%を置換するのに必要な添加量を算出した。その濃度(矢印で示す)から、概数値として $K_d = 7 \times 10^{-6} M$ と算出された。

4-3-3: アブラナGBPのpH依存性

陰イオン交換カラムクロマトグラフィーにより得られた活性画分を用いて、GA₁とアブラナGBPとの結合に関する至適pH条件を検討した。その結果を図4-9に示す。pH5付近では多くのタンパク質がそれぞれの等電点に合致し不溶化し、標識GA₁が沈降物に非特異的に取り込まれて結合活性の検出が困難になることから、極端な酸性および塩基性条件での検討は行わなかった。検定した範囲(pH5.5~7.5)においては、ほぼ同様の結合活性を維持することが示された。

4-3-4: アブラナGBPの基質選択性

陰イオン交換カラムクロマトグラフィーによる精製画分を用いて各種ジベレリンおよび植物ホルモンに対するアブラナGBPの基質選択性について検討した。用いた各種ジベレリンおよび植物ホルモンの構造式を図4-10に示す。またGA₃を基準(100%)としてアブラナGBPに対する各化合物の相対的な親和性を表4-2にまとめた。アブラナGBPとGA₁の結合はIAAなど他の植物ホルモンでは阻害されず、これらのホルモンとの親和性は認められなかった。他方、ジベレリンでは活性型ジベレリンであるGA₃またはGA₄より、むしろGA₁の生合成前駆体であるGA₂₀や不活性型ジベレリンであるGA₂₇に高い親和性を有することが明らかになった。このことからアブラナGBPについてはジベレリンに特異的に結合する可能性は示されたが、伸長生長における生理活性との相関性は全く認められないことからヤエナリGBPと同様に受容体候補とは考えにくいと判断した。

GA₄を除く4種のジベレリンの構造を比較するとCD環の構造に特徴的な共通点が認められる。しかし、ヤエナリGBPと比較して13位水酸基の有無をそれほど厳密に識別する様子は認められず、また6位カルボキシル基の識別も厳密に行っていないことから、アブラナGBPとジベレリンとの結合が、ジベレリンのいかなる構造要因に基づいているかは明らかではない。アブラナGBPの存在量はヤエナリGBPと比較して圧倒的に少ないものの、広範囲におよぶ基質選択性を示しており生理的な役割については推定することすら難しい。

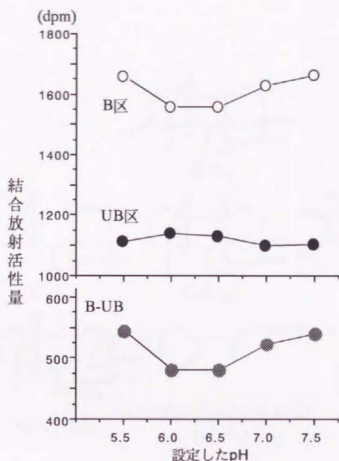


図4-9 アブラナGBPのpH依存性

蒸留水で溶解しゲル濾過カラムで脱塩処理をした活性画分40 μ lを、標識ジベレリンA₁溶液30 μ l(ca.16,000dpm, 267Bq)と、非標識ジベレリン溶液30 μ l(1mM GA₃)または非標識ジベレリンを含まない緩衝液を添加して、さらに目的のpHを維持するように設定された各緩衝液200 μ lを添加して4℃、3時間反応させた。以下、通常の硫酸沈殿法に準じてペレット中の放射カウントを測定した。各設定pH緩衝液について、pH5.5~pH6.5はMES-NaOH; pH7.0はHEPES-NaOH; pH7.5はTris-HClでそれぞれ調製した。

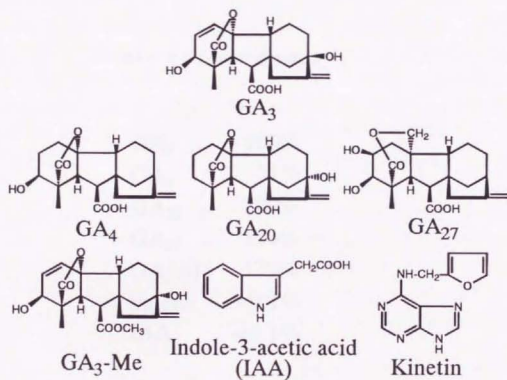


図4-10 基質選択性の検討に用いた化合物の構造式

表4-2 アブラナGBPの基質選択性

GA ₃	100%
GA ₄	31%
GA ₂₀	200%
GA ₂₇	120%
GA ₃ -Me	170%
kinetin	<0.1%
IAA	<0.1%

活性画分とトリチウム標識GA₁の混合溶液に任意の量の各非標識ジベレリンを添加して、破安沈殿法を用いてペレット中の結合放射活性量を測定した。トリチウム標識GA₁の結合が50%阻害されるのに必要な各非標識ジベレリン量を算出し、その逆数を比較して相対的親和性を求めた。従って値が大きい程、親和性が高く、GA₃を基準として記す。

4-4: アブラナGBPについての総括

受容体のようなジベレリンのシグナル伝達に関わっているGBPは、動物ホルモンの受容体の場合と同様にその存在量は極めて少ないと予測される一方、有効にシグナルを伝達するため、非常に高い親和性と厳しい基質選択性を有するものと推測されている。

アブラナGBPは比較的存在量が少ないために、数段階の精製を行って共存する他の多量なタンパク質による非特異的結合の影響を可能な限り避けてから、結合に関する基質選択性や解離定数の測定を行う必要があった。そこで、陰イオン交換カラムクロマトグラフィーあるいは疎水性HPLCによる精製を行い、得られた活性画分を用いて基質選択性および解離定数の測定を行った。これらの精製により得られた活性画分を用いても、非特異的結合量は全結合量の70%程度を占め、受容体の可能性を持つ極微量のタンパク質の検定には必ずしも十分な条件とは言えないものであった。

さらに、検出されたGBPの基質選択性はオーキシシンやサイトカイニンに対しては親和性は認められないものの、ジベレリン相互間では生理活性に対応するような特異的親和性は認められなかった。また、ゲル濾過や平行透析による結合活性の検出も試みてはみたが、結合活性自体の検出も困難であった。これは、アブラナGBPの含量が非常に少なく、これらの検定方法における検出に必要な量を満たしていなかった可能性も考えられる。

これらのことから、アブラナGBPはヤエナリGBPの場合と同様に高濃度の硫酸アンモニウム存在下という特殊な条件下でのみ検出される結合活性である可能性が高い。従って、本実験により検出されたアブラナGBPも、ジベレリン受容体としての特性を有するものではないと判断した。

4-5:実験の部

■■■アブラナGBPの抽出・精製■■■

●植物試料の調製

アブラナ(*Brassica campestris* L. cv. 農林2号)の種子を次亜塩素酸ナトリウム水溶液(有効塩素1%)で約3分間処理した後、常温で3時間吸水させ、湿らせたペーパータオル上に播種した。暗条件(25°C)で7日間培養して幼植物体を収穫した。約260gの乾燥種子より約1kgのGBP抽出用試料が得られた。

●可溶性タンパク質の抽出

アブラナ幼植物体と同重量の抽出用緩衝液(60mM Tris-HCl, pH7.6, 10mM EDTA-Na₂, 30mM 2-ME, 1mM PMSF, 0.5M NaCl)とをミキサー内で混合し、用いた幼植物体の新鮮重の10%(w/w)にあたるPVPP(ポリクラールAT、五協産業)を順次加えて、5分間破砕を行った。4重に重ねたガーゼにより破砕物を濾過し、濾液を集めて遠心分離(9,500×g, 30分間; Himac CR21, 日立)により上清画分を集めた。この画分に終濃度が30%(w/v)になるように硫酸アンモニウムを攪拌しながら徐々に添加し、60分間攪拌した後に遠心分離(9,500×g, 30分間)により上清区を回収した。さらに硫酸アンモニウムを添加して60%(w/v)濃度にした溶液を120分攪拌して、再度、遠心分離(9,500×g, 30分間)により得られた沈殿区を集めて、これを可溶性タンパク質画分とした。

●疎水性カラムクロマトグラフィーによる精製

可溶性タンパク質画分を、30%(v/v)の飽和硫酸アンモニウム溶液(10mM Tris-HCl, pH7.6, 10mM 2-ME, 0.1M NaCl)で溶解し、遠心操作(9,500×g, 30分間)により不溶物を除去してから、上清だけを疎水性クロマトグラフィー(Butyl-Toyopearl 650M, 東ソー, 27 mm i.d. × 150 mm)に供した。自然流速によりすべてがカラムに入った段階で、洗浄用溶液(30%(v/v)飽和硫酸アンモニウム溶液)をゲル体積の5倍量程度使用して、洗浄操作をおこない、順次5%(v/v)刻みで硫酸アンモニウム濃度を下げた溶出液を用いて溶出を行った。得られた各画分は塩析処理(20mM Tris-HCl, pH7.6, 10mM 2-ME, ca.4.6M 硫酸アンモニウム)に対して12時間透析により濃縮して保存した。

●陰イオン交換クロマトグラフィーによる精製

疎水性カラムクロマトグラフィーにより得られた活性画分を洗浄用緩衝液(10mM Tris-HCl, pH7.6, 10mM 2-ME, 0.1M NaCl)に対して透析(各5L、計3回交換、[2, 2, 13時間])して陰イオン交換ゲル精製用試料とした。陰イオン交換カラム(DEAE Sephadex A-50, Pharmacia, 27 mm i.d. × 50 mm)にこれを供し、自然流速により展開した。ゲル体積の5倍量の洗浄用緩衝液で洗浄を行った後、溶出を行った。溶出用緩衝液として、洗浄用緩衝液の各成分にそれぞれNaClを0.3, 0.5, 0.7Mとなるように添加した緩衝液を調製して使用した。各溶出画分は逆透析により濃縮して保存した。

●疎水性カラムを用いたHPLCによる精製

陰イオン交換カラムクロマトグラフィーにより得られた活性画分について、限外ろ過処理(セントリコン-10, アミコン, 排除限界20,000)によって、塩強度等の環境を洗浄用緩衝液(10mM Tris-HCl, pH7.6, 10mM 2-ME, 0.1M NaCl)に30%(v/v)の飽和硫酸アンモニウム水溶液を混合したものと同様に設定した。これを疎水性カラム(Shodex HIC PH2014, 20 mm i.d. × 300 mm, 昭和電工)を用いたHPLCに供した。展開溶媒((A), 10mM Tris-HCl, pH7.6, 10mM 2-ME, 0.1M NaCl)に30%(v/v)の飽和硫酸アンモニウム水溶液を混合したもの:(B), 10mM Tris-HCl, pH7.6, 10mM 2-ME, 0.1M NaCl, 溶媒組成(0分→60分, (B)0%→100%; linear gradient mode), 流速(3.0ml/分, 40kg/cm²)。分画(1fr./4分)。

■■■■アブラナGBPの性状解析■■■■

●ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)

Laemmliの方法(Laemmli 1970)に従った。SDS-PAGEでは12.5%濃度ゲルを使用した。染色は0.25%のCBB R-250で染色した。

●タンパク質の定量

試料には終濃度5%となるようにトリクロロ酢酸を加えてタンパク質を沈澱させ、遠心分離(15,000×g, 10分間, 4℃)して得たペレットを0.1N NaOHで溶解したものを用いた。ウシ血清アルブミン(BSA)を標準タンパク質として用い、ローリー法またはブラッドフォード法により行った。

● 硫酸沈殿法によるジベレリン結合活性測定法

標識ジベレリン溶液($7.5\text{ nM } 1,2\text{-}^3\text{H}_2\text{-GA}_1$ [33.6 Ci/mmol], 125 mM Tris-HCl , $\text{pH } 7.6$, $25\text{ mM } 2\text{-ME}$) $50\text{ }\mu\text{l}$ (ca. $16,000\text{ dpm}$, 267 Bq)とタンパク質溶液(10 mM Tris-HCl , $\text{pH } 7.6$, $10\text{ mM } 2\text{-ME}$, 0.1 M NaCl) $100\text{ }\mu\text{l}$ を混合し、室温で20分間反応させた。次に非標識ジベレリン溶液(1 mM GA_3 , 10 mM Tris-HCl , $\text{pH } 7.6$, $10\text{ mM } 2\text{-ME}$, 0.1 M NaCl)または非標識ジベレリンを含まない緩衝液(10 mM Tris-HCl , $\text{pH } 7.6$, $10\text{ mM } 2\text{-ME}$, 0.1 M NaCl)を $50\text{ }\mu\text{l}$ 添加して3時間反応させた。これに飽和硫酸アンモニウム溶液 1.0 ml を加えて60分間、 4°C で静置した後、遠心分離($15,000\times\text{g}$, 4°C , 15分間, 遠心器 2231M (BHG HERMLE))によりペレットだけを回収した。このペレットを $500\text{ }\mu\text{l}$ の 0.1 N NaOH で溶解して、 3 ml の液体シンチレーションカクテル(ACSII, Amersham)に混合して放射能カウントを測定した。ジベレリンによる特異的結合活性量の算出は、非標識体を添加した区としなかった区との差、すなわち非標識体により交換可能な結合量をもって特異的結合活性とした。

● アブラナGBPの GA_1 に対する親和性および基質選択性

活性画分 $100\text{ }\mu\text{l}$ に対して標識 GA_1 溶液 $50\text{ }\mu\text{l}$ (ca. $16,000\text{ dpm}$, 267 Bq)と、任意の量の各非標識ジベレリン溶液 $50\text{ }\mu\text{l}$ を混合して、硫酸沈殿法による結合活性量を測定した。非標識体により交換可能な標識 GA_1 の全結合量のうち、50%を置換するのに必要な添加量を各非標識ジベレリンについて算出した。その濃度の逆数について比較し、相対的親和性を求めた。

● アブラナGBPの結合に関するpH依存性

対象となる活性画分をDWで溶解し、さらにゲル濾過カートリッジ(Nap-10, Sephadex G-25, Pharmacia)で脱塩処理をした。この水溶液 $40\text{ }\mu\text{l}$ と、標識ジベレリン溶液($7.5\text{ nM } 1,2\text{-}^3\text{H}_2\text{-GA}_1$ [33.6 Ci/mmol], 125 mM Tris-HCl , $\text{pH } 7.6$, $25\text{ mM } 2\text{-ME}$) $30\text{ }\mu\text{l}$ (ca. $16,000\text{ dpm}$, 267 Bq)と、非標識ジベレリン溶液(1 mM GA_3 , 10 mM Tris-HCl , $\text{pH } 7.6$, $10\text{ mM } 2\text{-ME}$, 0.1 M NaCl)または非標識ジベレリンを含まない緩衝液(10 mM Tris-HCl , $\text{pH } 7.6$, $10\text{ mM } 2\text{-ME}$, 0.1 M NaCl)を $30\text{ }\mu\text{l}$ 添加して、最後に目的のpHを維持するように設定された各緩衝液 $200\text{ }\mu\text{l}$ を添加して、計 $300\text{ }\mu\text{l}$ の溶液にして 4°C 、3時間反応させた。以下、通常の硫酸沈殿法に準じてペレット中の放射能カウントを測

定した。各設定pH緩衝液の調製方法(pH5.5~pH6.5 : 0.65M MES, 2M NaOHで調整; pH7.0 : 2M HEPES, 2M NaOHで調整; pH7.5 : 1M Tris, 2M HClで調整)。

■■■■第5章■■■■

アズキ幼植物体からのGBPの 抽出・精製とその性状解析

5-1:緒言

本研究の目的はジベレリンの生理作用の一つである伸長生理現象に関与する受容体を単離すべく、まずGBPの検出を行い、各種の性状解析を通じて絞り込みを行って受容体の関連するGBPを効率よく選択し、その単離を行うことにある。この観点からすでに報告したように、ヤエナリやアブラナの幼植物体から異なる性状を示すGBPを検出したが、それらのもつ性状からいずれも受容体とは考えにくいと判断した。抗体を用いたラジオイムノアッセイ法などにおいて、遊離状態の標識体と、抗体と結合して複合体を形成している標識体との分離に有効であった硫酸沈殿法を用いたGBPの検出は、ヤエナリやアブラナのGBPの追究結果より、受容体の候補となるような高い基質特異性と親和性をもつ微量のタンパク質の検出は困難であると判断した。そこで、あらためて有効なGBPの検出法を検討することにした。イムノアッセイ法を参考にすると、標識体としてラジオトレーサーの他に酵素標識トレーサーを候補に挙げることができる。ラジオトレーサーの特徴は、高い検出感度と共に、トレーサーの構造が受容体と結合するジベレリンと同一か、あるいは近似したものを利用できる点にある。一方、酵素標識トレーサーはラジオトレーサーに劣らぬ検出感度を持つが、構造的にはジベレリン分子よりはるかに大きな酵素タンパク質が結合しているため、受容体との結合において立体的な障害を受け、これを検出できない可能性がある。従って、酵素標識トレーサーを用いる場合には、ラジオトレーサーと同一のGBPを検出していることを予め確認しておく必要がある。そこで本研究においては、ラジオトレーサーを用いることを前提として、GBP-標識体の複合体と遊離標識体との有効な分離法、すなわちGBPの検出法の検討を行った。

すでに第1章でも紹介したように、植物ホルモン等の生理活性物質に対する結合タンパク質を有意に検出するために様々な検出方法が報告されている(表1-1~1-8を参照)。例えば図5-1に示す様に、タンパク質を吸着するフィルターを利用してそのフィルター上に残存する標識リガンド量を検出する「フィルター吸着法」や、限外ろ過膜を利用して高分子だけを選択的に捕捉する「フィルター濾過法」、ある

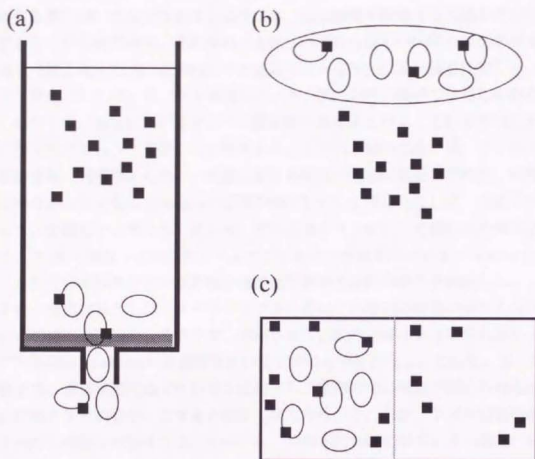


図5-1 種々のGBPの検出方法

(a)ゲル濾過法: 分子ふるい効果を利用して高分子が低分子よりも先行して溶出されることを利用して、タンパク質に結合した放射性標識ジベレリン量(図中■)を高分子画分中の放射活性量に反映させて測定する。

(b)フィルター濾過法またはフィルター吸着法: 限外濾過膜を用いて、排除限界よりも大きな分子量をもつ分子だけを膜上にトラップし、膜の放射活性量を測定することによりタンパク質に結合した放射性標識ジベレリン量(図中■)を算出する方法をフィルター濾過法と呼ぶ。また、ニトロセルロース膜や陰イオン交換膜などタンパク質吸着能を有する膜上にタンパク質だけをトラップし、膜の放射活性量を測定する方法をフィルター吸着法と呼ぶ。

(c)透析膜で仕切られた2つの部屋の片方にタンパク質と放射性標識ジベレリン(図中■)を入れ静置することにより、低分子の放射性標識ジベレリンだけが透析膜を通過して拡散する。従って、タンパク質が入った部屋(図中左)と入っていない部屋の両者の放射活性量を差引きすることにより、タンパク質に結合した放射性標識ジベレリン量を算出する。

いは透析膜を利用する「平衡透析法」やゲル濾過の原理を利用して高分子画分を得る「ゲル濾過法」などが報告されている。これらはヤエナリGBPやアブラナGBPを検出する際に用いた硫酸沈殿法とは異なり、低塩強度の環境下での結合活性を測定することが可能である。それぞれの方法はいずれも新しいGBPの検出手段として適用可能と考えたが、最終的にゲル濾過カラムを用いた検出法を採用した。その主な理由としては、唯一ゲル濾過法だけが、仮にGBPが極めて微量しか存在しない場合でも、検定に用いるタンパク質溶液の濃度を上げることにより対応することが可能であろうと予測したためである。すなわち他の方法では、フィルターへの吸着量に制限があったり、処理に要する時間が極端に延長されたり、非特異的な結合が大きくなってかえって活性が検出しにくくなったりして、うまく対応することが難しいと考えた。従って、ゲル濾過カラムを用いた検出法を確立するため、第2章で調製した活性型ジベレリンに対する抗体をGBPのモデルとして用い、本法での非特異的結合量の最小化や活性検出の為の効率化を検討した。

また、抽出材料としてヤエナリやアブラナをはじめ数種の植物の芽生えを用いてGBPの検出を試みた。その中で、微弱ながら比較的明瞭な結合活性の認められたアズキ(*Azuki angularis*)幼植物を用いてGBPの追究を行うことにした。多くの幼植物では、無傷状態ではジベレリンに応答し、茎部の伸長促進が認められるが、その胚軸を切り出し切片にすると応答しなくなる。ところが、アズキ幼植物の胚軸上部から調製した切片では、オーキシン共存下においてジベレリン濃度に依存して伸長促進効果が認められる(Shibaoka, 1972)。このことは、アズキ胚軸切片にはジベレリン応答系が存在することを示している。従って、これを材料として活性型ジベレリンに特異的結合活性を示すGBPを得ることが出来れば、それが伸長成長の制御に関するジベレリン受容体である可能性を期待することができる。

新しい結合活性測定法では、硫酸沈殿法で検出されたヤエナリやアブラナのGBPは検出されないことから、アズキから検出されたGBPは高い親和性を持つことが期待された。また、このアズキ胚軸のGBPは極微量しか存在せず、単離には至っていないが、本章では、その部分精製と生化学的性質、ならびに有効な精製法について追究した結果について述べる。

5-2:ゲル濾過カラムを用いたGBP検出系の構築

5-2-1:ジベレリン標識体の調製

微量のGBPを検出するためには、用いるラジオトレーサーの比放射活性は可能な限り高い方が望ましい。従来用いてきた $^3\text{H}_2\text{-GA}_1$ や $^3\text{H}_2\text{-GA}_4$ はジベレリン分子の構造のうち、A環の1位と2位の水素が ^3H に置換されたもので、その比放射活性は30~40Ci/mmolであった。これら以上に比放射活性の高いトレーサーを調製するには、さらに他の部位にも ^3H を導入する必要がある。ジベレリンの活性発現に必須な構造要因を損なうことなく、また比較的容易に ^3H を新たに導入し得る方法としては、接触還元により16, 17位に ^3H を導入する方法が考えられる。そこで図5-2に示す方法で、 GA_7 から $^3\text{H}_4\text{-16,17-dihydroGA}_4$ の調製を行った。

$^3\text{H}_2$ による接触還元はデュポン社に委託し、その粗画分を得た。これを陰イオン交換カラムを用いたHPLCにより精製し、ラジオアナライザーにより5つの放射性ピークを検出した。各々のピークの溶出画分を第2章で調製した活性型ジベレリンに結合する抗体とインキュベートし、硫酸沈殿法による結合活性の検出を行った。抗体との反応性および16,17-dihydro GA_4 標品を用いた保持時間の確認から、図5-3に示すように、ピーク3およびピーク4が ^3H 標識16,17-dihydro GA_4 由来であると判定した。保持時間の異なる2つのピークが16,17-dihydro GA_4 として観測されるのは、17位メチル基に α, β の異性体が存在するためと考えられる。抗体との反応性が低いその他のピークについては加水素分解により生成した副産物であると推定している。なお、得られた $^3\text{H}_4\text{-16,17-dihydroGA}_4$ の比放射活性は約120 Ci/mmolであった。

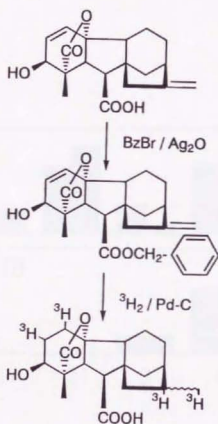


図5-2 $^3\text{H}_4$ -16,17-dihydroGA₄の調製

GA₇のカルボキシル基をベンジルプロマイドにより保護してから、Pd-Cを触媒としてトリチウムガスにより接触還元して16,17-dihydroGA₄標識体を調製した。

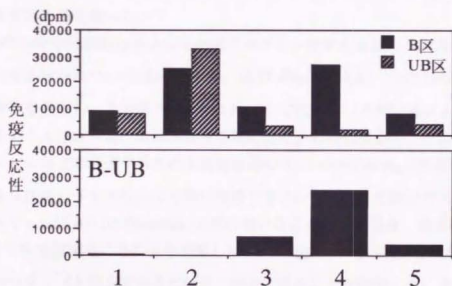


図5-3 特異抗体を用いた活性型標識ジベレリンの特定

水素付加反応生成物について陰イオン交換カラムを用いたHPLCによる精製を行い、目的とするトリチウム標識16.17-dihydroGA₄の特定を行った。標識化合物の溶出状況についてはラジオアナライザーで放射活性をモニターして行い、このうちピークとして認められた5画分について分取して保持時間の短い方から順に画分1～画分5とした。それぞれについて活性型ジベレリンに特異的に反応する抗体を用いて硫酸沈澱法により結合活性を測定した。

5-2-2:ゲル濾過カラムを用いた結合活性測定法の確立と検証

5-2-2-1:結合活性測定法の確立

ゲル濾過カラムを使用してGBPの検出を効率よく行うために、GBP-標識体の複合体を含む高分子画分と遊離の標識体との分離状況の把握を行った。そこで、市販のゲル濾過カラムカートリッジを用いて、標識ジベレリンと、高分子のモデルとして牛血清アルブミンについてのカラムカートリッジからの溶出状況について検討して、遊離の標識体の混入を極力抑え、かつ画分中のタンパク質含量が最も多くなる溶出条件を探った。

16,17-dihydroGA₄標識体および牛血清アルブミンのゲル濾過カラムカートリッジからの溶出状況について図5-4に示す。16,17-dihydroGA₄については各溶出画分の放射活性を測定し、牛血清アルブミンについてはタンパク質量により含有量を算出することにより各々の溶出状況を解析した。この結果から、ゲルとのインタラクションなどが起因するためか遊離状態の16,17-dihydroGA₄と牛血清アルブミンのような高分子との完全な分離は期待できないものの、市販のゲル濾過カラムカートリッジ(NAP-10, Pharmacia)を常に用いることにした場合、溶出開始から650 μ lまでを分取することにより遊離した16,17-dihydroGA₄の漏出を最小限に食い止め、かつタンパク質をできるだけ多く溶出できることが判明した。よって、以降の分析では常にこの定型カラムを用い、650 μ lの溶出画分についての放射活性量を測定することにした。

また、硫酸沈殿法の場合と同様に、標識体だけを反応系内に添加した場合の高分子画分中の放射活性量(B区)と、過剰量の非標識ジベレリンをさらに添加した場合の放射活性量(UB区)の算出も行い、両者の差(B-UB)に相当する非標識ジベレリンにより可逆的に交換可能な結合量をもってジベレリンに特異的な結合活性量を定義した。

5-2-2-2:ゲル濾過法と硫酸沈殿法との比較

GBPがゲル濾過法や硫酸沈殿法など異なる検出方法により検出された場合に、それぞれの方法で算出された親和性を直接比較してその大小を論ずることは極めて危険である。そこで、同一の抗体を用いてそれぞれの方法により解離定数を算出して、比較を行い差異を検討した。すなわち標識体と活性型ジベレリンに特異的に結合する抗体と混合し、これに任意の量の非標識ジベレリンを添加して標識

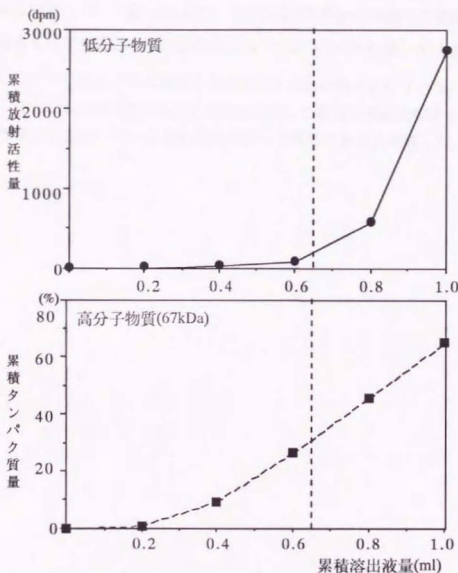


図5-4 ゲル濾過カラムを用いたGBP検出法の構築

ゲル濾過カラムカートリッジ(NAP-10, Pharmacia)における溶出状況について(上図): 低分子リガンド(16,17-DihydroGA₄)については各溶出画分の放射活性を測定し、(下図): 高分子タンパク質(牛血清アルブミン, 67kDa)についてはタンパク質定量により含有量を算出することにより各々の溶出状況を解析した。この結果から、遊離状態のdihydroGA₄と牛血清アルブミンのような高分子との完全な分離は期待できないものの、市販のゲル濾過カラムカートリッジを常に用いる場合、溶出開始から650 μ lまでを分取することにより遊離したdihydroGA₄の漏出を最小限に食い止め、かつタンパク質をできるだけ多く溶出できると判断した。

体と抗体との結合に関する阻害曲線を求めた。

得られた曲線について図5-5に示す。全結合量の50%が非標識体で交換される時の添加濃度を比較すると、硫酸沈殿法においては 2×10^{-8} M程度、ゲル濾過カラム法では 4×10^{-8} M程度と非常に近似した値を示すことが明らかになった。以上の結果から、双方の検出法で算出される親和性に関して数値を直接比較することは、大きく見積っても1オーダー以内の誤差を伴って許容できると判断した。

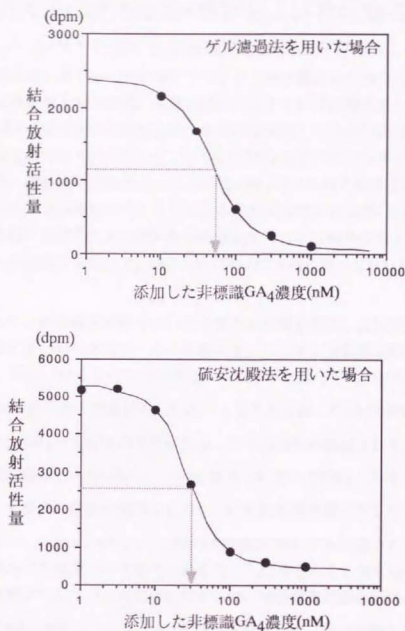


図5-5 二種のGBP検出法における抗体の性状比較

活性型ジベレリンに特異的に反応するモノクローナル抗体を用いて、従来からのGBP検定法である硫酸沈殿法と、ゲル濾過カラムを用いた検定法の2つの方法を用いて算出される解離定数を比較した。抗体と、標識dihydro GA_4 (ca. 20,000dpm, 33.3kBq)の混合溶液に任意の量の非標識 GA_4 を添加して、それぞれの方法により画分中の結合放射活性量を測定して、全交換可能な結合部位のうちの50%(破線で示す)が非標識 GA_4 で置換されるときに添加した非標識体の濃度を求め、解離定数を算出した(双方ともに反応液量は1ml)。この結果、ゲル濾過法では K_d は $5 \times 10^{-8}M$ 、硫酸沈殿法では $3 \times 10^{-8}M$ と算出された。

5-3:アズキGBPの抽出・精製および性状解析

5-3-1:各種ジベレリンに対する胚軸切片の応答と生育条件、pHの影響

GBPの検定に用いるトレーサー等のジベレリン種の選択のための知見、ならびにGBPの基質選択性と材料に用いる胚軸切片に対する伸長促進効果との比較から対象とするGBPが受容体の可能性を持つか否かを検証するための知見、などを得ることを目的として個々のジベレリンについて胚軸切片に対する伸長促進活性の測定を行った。連続光下で生育させた上胚軸上部より1cm長の切片を調製して、オーキシン共存下での各種ジベレリンによる伸長促進効果を比較した。また、GBP抽出用の材料を得るための栽培条件を設定するために明条件および暗条件で生育させた上胚軸切片を用いて、Shibaoka (1972)の方法に従ってGA₃に対する応答を比較した。

各種ジベレリンの段階希釈液を用いて伸長促進活性を測定した結果を、ジベリンの生物検定に用いられる矮性イネ「短銀坊主」に対する伸長促進活性と共に、表5-1に示す。GA₁, GA₃, GA₄等の活性型ジベレリンは総じて高い活性を示している。また、GBP検出用の標識体として用いることを計画した16,17-dihydroGA₄も期待した通り、GA₄と同程度の活性を示し、その妥当性が確認された。一方、GA₄の生合成前駆体であるGA₉や、不活性型とされているGA₄メチルエステル、3-epiGA₄等にも多少の活性が認められるが、いずれも活性型ジベレリンに比較すると弱い。また、これらの活性は、他の生物検定においても言及されているように、検定植物内で活性型への代謝・変換を受けた結果であると考えるのが妥当である。不活性型ジベレリンとみなされながら強い伸長促進活性が認められたGA₃₇については表5-2に示すように、イネ・短銀坊主をはじめ、他の植物を用いた生物検定においても、一様に強い活性を示すことが多く、検定植物による活性型への変換を受けやすいためであると考えられる。

また、生育時の光条件が胚軸切片のジベレリン応答性に与える影響を明らかにするために、連続光下(約2,500lux, 25℃)および暗黒下(25℃)で生育させた芽生えから調製した胚軸切片のGA₃による伸長促進の結果を図5-6に示す。なお、双方の生育条件下では茎部の伸長速度が異なるため、播種時期をずらして採取時の平均長が揃っているものの上胚軸上部より切片を調製して用いた。この結果、連続光下で生育した胚軸の方が暗黒下で生育したものより応答が大きいものの、暗黒下で

表5-2 種々の生理活性検定法におけるジベレリンの伸長促進活性

	Lettuce* hypocotyl	Cucumber* hypocotyl	Barley* aleurone
GA ₄	++	+++	+++
GA ₁	+++	++	++++
GA ₃	+++	++	++++
GA ₉	+++	+++	+
GA ₃₄	0	0	0
GA ₃₇	++	+++	++
GA ₁₃	+	0	+

(*)印: Hoad(1983)の報告から各種の検定系におけるジベレリンの生理活性を抜粋して示す。(ND: No Data)

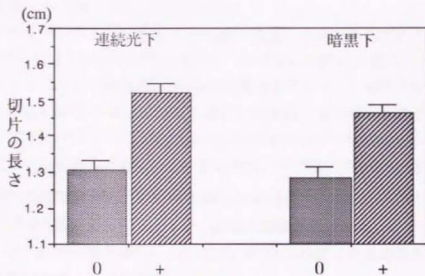


図5-6 光環境の変化とアズキの切片伸長

明条件(約2,500ルクスの連続光)および暗条件下で生育させた上胚軸上部を1cm長の切片にした。これをIAA(終濃度で 10^{-4} M)共存下、 10^{-4} Mの GA_3 溶液を添加して切片を浸し、連続光条件下で20時間培養し、切片の伸長を測定した。図中の(+)区は GA_3 を終濃度で 10^{-4} M添加した場合、(0)区は GA_3 を添加しなかった場合を示す。

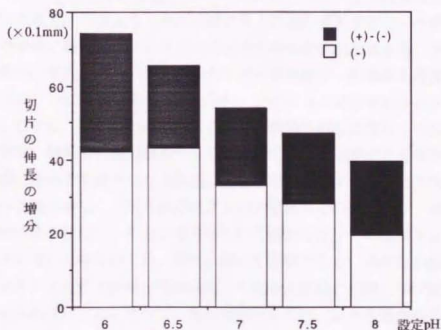


図5-7 pH環境の変化とアズキの切片伸長

連続光で生育させた上胚軸上部を1cm長の切片にし、IAA(10^{-4} M)共存下で GA_3 溶液(10^{-4} M)および目的のpHを維持するように設定された各種緩液を添加してから切片を浸し20時間培養後の切片の伸長を測定した。図中の(-)区は GA_3 を添加しない場合の切片の伸びを示し、(+)-(-)区は GA_3 を添加した場合の増分を示す。各pH緩液の調製についてはすべてリン酸緩液を用いた。

生育した胚軸でも応答することが示された。

また、ジベレリンの応答に関してpH環境の変化による影響も解析した。Shibaoka (1972)により報告されているアズキ胚軸切片を用いた検定法では、インキュベーションに用いる緩衝液はpH6.2に設定されている。一般にGBPの活性測定においては低いpH条件ほど非特異的結合(UB)が高くなる傾向があり、通常、検定はpH7~8で行われる。そこで、pH6.0~8.0の範囲のリン酸緩衝液を用いて、切片のGA₄に対する応答性の変化について調べた。その結果を図5-7に示す。最大の伸長促進効果の観察される至適条件はpH6.0~6.5付近であることが明らかであるが、pH7.0~8.0の範囲においても十分な応答が観察されていることから、GBPとジベレリンとの結合活性の測定においては、pH6~8の範囲で至適条件を設定しても差し支えないものと考えられる。

5-3-2:アズキGBPの抽出・精製

5-3-2-1:GBP抽出材料としてのアズキの至適生育条件

アズキ芽生え(収穫直前の写真を図5-8に示す)は、ヤエナリ等と異なり胚軸の伸長は非常に小さく、子葉より上部に位置する上胚軸が伸長するという特徴を有する。アズキ切片におけるジベレリンの伸長促進効果の検定結果から、連続光条件、暗黒条件いずれの条件で生育させたアズキ幼植物の上胚軸にも程度の差はあるが、ジベレリンに対する応答が認められ、ジベレリン受容体が存在することが示された。しかし、受容体の候補となるGBPの精製を行うに当たっては、その含量、抽出効率、材料の調製の難易等をも考慮して材料を選定する必要がある。そこで、連続光条件で生育させた上胚軸、および暗黒下で生育させた上胚軸から可溶性タンパク質を抽出し、得られた粗タンパク質画分中のジベレリン結合活性をゲル濾過法により検出し、その含量等について検討した。その結果を表5-3に示す。粗画分を用いた検定のため、活性は極めて微弱であり、測定毎の偏差は大きい。光条件下生育の上胚軸と暗黒条件下生育の上胚軸との間にGBP量に大きな差異は認められなかった。よって、抽出材料としては、より生育が容易な暗黒条件下で生育させた芽生えの、子葉以下を除いた上胚軸全体を用いた。また、予備実験により凍結・融解による結合活性への影響は殆ど認められなかったことから、収穫後、直ちに凍結して保存した。

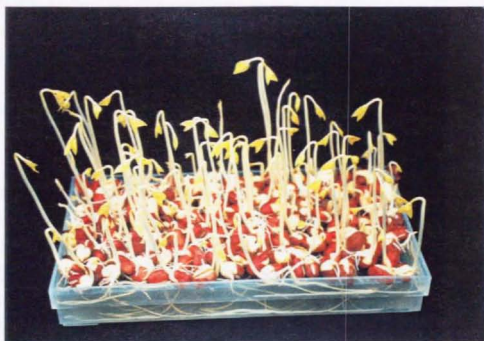


図5-8 GBPの抽出に用いた黄化アズキ幼植物体

表5-3 光環境とアズキGBP活性

	タンパク質1mgあたりの 特異的結合活性 (dpm/mg protein)	抽出材料1gあたりの 特異的結合活性(dpm/g fw)
連続光下	13	37
暗黒下	32	52

明条件(約2,500ルクスの連続光)および暗黒下で生育させた上胚軸部を抽出し、塩析により可溶性画分を得て、ゲル濾過法により各画分中の結合放射活性を測定した。連続光下で生育させた材料179gからは522mgのタンパク質が得られた。一方、暗黒下で生育させた材料207gからは338mgのタンパク質が得られた。

5-3-2-2:アズキ上胚軸の調製とGBPの抽出

可溶性タンパク質の抽出にはpH7.6のトリス緩衝液を用い、SH基保護剤やプロテイナーゼインヒビターも適量添加した。破砕後の抽出液から遠心分離により上清を得た後、60%(w/v)飽和の硫酸アンモニウム水溶液により塩析を行って可溶性タンパク質画分を得た。尚、1回の精製には約0.5~3.0kg新鮮重の上胚軸を用いた。

5-3-2-3:疎水性カラムクロマトグラフィーによる精製

可溶性タンパク質画分におけるアズキGBPの結合活性は非常に微弱にしか検出することができず、明瞭な活性検出のためにはゲル濾過カラムのサイズを大きくするが精製度を上げることが要求された。可溶性タンパク質画分は塩析の影響を受けて高濃度の硫酸アンモニウム塩を含んでいる。従って、疎水性カラム(Butyl-Toyopearl 650M)を用いたクロマトグラフィーをこの後の精製手段に用いることにより時間的な効率化を検討した。すなわち、イオン交換カラムなどと異なり疎水性カラムでは精製に供するタンパク質溶液中の塩強度を極端に下げる必要が無く、透析処理などを省略することが可能となった。一方、カラムからの溶出は塩強度を段階的に下げるにより行い、各溶出画分についてゲル濾過カラムを用いた測定法によりジベレリン結合活性区を特定し次の精製に供した。

5-3-2-4:イオン交換カラムクロマトグラフィーによる精製

疎水性クロマトグラフィーにより得られた活性画分についてpH 5.0に下げて、等電点により沈殿したタンパク質を遠心分離により除去した。残った上清について陽イオン交換カラム(SP Sepharose)による精製に供して、十分に洗浄した後、塩強度を上げて溶出を行った。

ジベレリンの結合活性が認められた画分についてpHを7.6に戻し、陰イオン交換カラム(Q Sepharose)を用いたクロマトグラフィーに供した。50mMの塩強度ではアズキGBPは陰イオン交換カラムに吸着しないことが予備検討で判明したので、カラムに対する非吸着画分を得て、遠心式限外濾過により濃縮を行った。

以上の結果から、アズキGBPの等電点は通常の主要なタンパク質と比較してやや高い可能性が示唆された。

5-3-2-5:ゲル濾過カラムHPLCによる精製および分子量の推定

陰イオン交換カラムによる精製で得られた活性画分をゲル濾過カラム(Shodex KW-803)を用いたHPLCに供した。分画は1分ごとに行い、各画分についてジベレリン結合活性を測定した。その結果を図5-9に示す。また分子量マーカータンパク質を用いて作成した溶出時間と分子量との関係を示す検量線から約25kDaに相当する溶出位置にジベレリン結合活性のピークが認められた(図5-10を参照)。このことは分画分子量が20kDa程度の限外濾過膜を用いてGBPの濃縮を行った場合に結合活性が膜に残ったこととも合致する。ところで他の植物ホルモンで受容体に関連する結合タンパク質は概ね100kDa以下であることが多い。例えばオーキシン結合タンパク質の場合、トウモロコシABP1は22kDaのホモダイマーとされている(Loebler and Kjaer, 1985; Shimomura *et al.*, 1986)。また、サイトカイニンではヤエナリCSBPが未変性状態で約21kDaと推定されている(Nagata *et al.*, 1993)。一般に核内タンパク質は20~30kDaの分子量を示すものが多いが、アズキGBPについてもこの範囲にあることから、核内にターゲットを持つ可能性についても検討に値すると思われる。

5-3-2-6:アズキGBPの精製効率

各精製段階におけるアズキGBPの回収と比活性・精製効率を表5-4に示す。非平衡のゲル濾過法により検出されたアズキGBPは陰イオン・陽イオン双方のイオン交換カラムを用いたクロマトグラフィーにより極めて効率よく精製されることが比活性の上昇により明らかとなった。また、ゲル濾過カラムを用いたHPLCを終えた時点で約2,200倍の精製が達成されていることも判明した。精製状況を電気泳動レベルで解析するため、HPLCにより得られた各画分を用いてSDS-PAGEを行い、銀染色法により得られた染色結果について図5-11に示す。これによれば約25kDa近辺の他に幾つかジベレリン結合活性の強度に対応して染色量が変動するバンドが検出されているが、アズキGBPを特定するには至らず、更に少なくとも数倍から数十倍の精製が要求されると推測された。また、同様の泳動ゲルをCBB染色した際には明瞭な染色はほとんど認められなかった。検出感度の高いとされる銀染色法を用いてもその存在量の少なきゆえにアズキGBPを明瞭に検出するためには、抽出時に用いる材料についてもさらに数倍多く用いる必要があると考えられている。

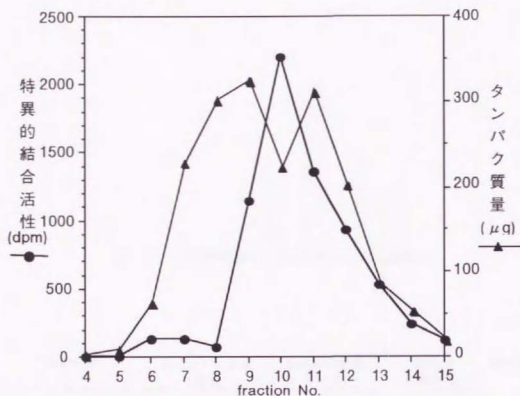


図5-9 ゲル濾過カラム-HPLCにより得られた画分のGBP活性
Shodex KW-803(8mm i.d.×300mm)により0.3ml/minの流速にて1fr/minで分画し、各画分についてゲル濾過法により特異的結合活性を測定した。また、同様の画分についてタンパク質の定量も行った。

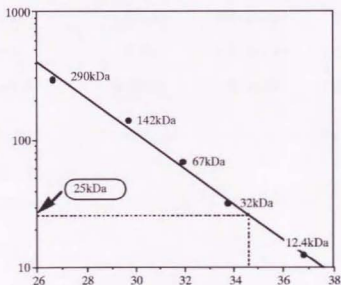


図5-10 アズキGBPの分子量の算出
ゲル濾過HPLC(Shodex KW-803)による精製を行って、最も特異的結合活性の認められたフラクション10は溶出時間に換算して34.6分に相当する為、各分子量マーカーのカラムへの溶出時間を測定して検量線を作成してアズキGBPの分子量の推定を行った。その結果、約25kDaと見做もられた。分子量マーカーとしては、glutamate dehydrogenase(290kDa), lactate dehydrogenase(142kDa), enolase(67kDa), myokinase(32kDa), cytochrome c(12.4kDa)。

表5-3 アズキGBPの回収・結合活性ならびに精製効率

精製段階	総タンパク質量 (mg)	総結合活性量 (dpm)	比活性 (dpm/mg)	精製度
硫酸沈殿粗画分	8630	150,000	17.4	1
疎水性カラム	1060	71,000	67.2	3.9
陽イオン交換カラム	65.6	69,700	1060	61
陰イオン交換カラム	4.33	63,700	14700	840
ゲル濾過カラムHPLC	0.025	8,700	38700	2200

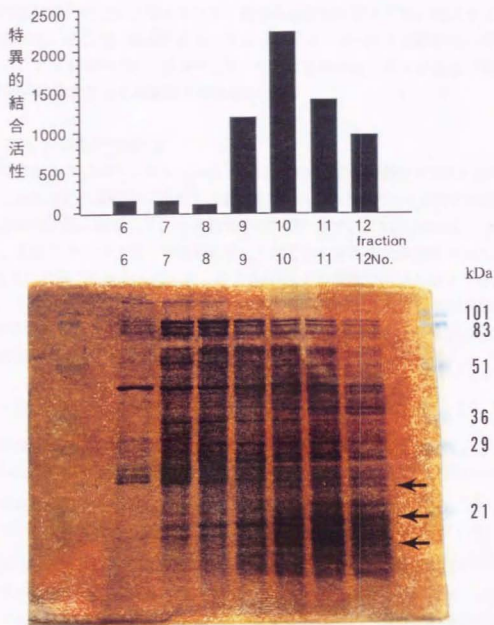


図5-11 ゲル濾過カラム-HPLCによる精製で得られた画分についてのSDS-PAGE
 ゲル濾過HPLC (Shodex KW-803) による精製を行い、ゲル濾過カラムを用いた検定法により特異的結合活性の認められたフラクション10(上図)を中心に6~12までについて、同画分を濃縮してSDS-PAGE(12.5%)を行った(下図)。銀染色法により染色を行い特異的結合活性に対応するバンドを検索した。矢印は現段階で対応すると考えられるバンドを示す。

5-3-3: アズキGBPの性状解析

ゲル濾過カラムによる結合活性測定法は、精製度の低い粗精製画分を用いても非特異的な結合がほとんど検出されず、微弱な結合活性でも有意に検出することが可能である。そこで、疎水性カラムクロマトグラフィーによる精製後の活性画分を用い、アズキGBPの活性型ジベレリンに対する親和性、および基質の選択性、pH環境の変化による影響等の評価を行った。

5-3-3-1: アズキGBPのpH依存性

疎水性カラムクロマトグラフィー終了後の活性画分を、最終的に目的のpHになるように設定された緩衝液に溶解し、各pH環境下におけるアズキGBPの標識リガンドとの結合状況を解析した。その結果を図5-12に示す。これによれば、pH6.0以下では、主要なタンパク質の等電点近傍にあたるためか不溶物が認められたのでpH6.5以上の環境での検討を行った。またpH10以上の環境ではジベレリン自体が構造的に不安定になると考えられるので対象から除外した。得られた結果によれば、pH7.5付近が至適条件であり、抽出時の緩衝液のpH環境をこの付近に設定したのは結果的に最善の環境であることが判明した。

5-3-3-2: アズキGBPのGA₄に対する親和性

疎水性カラムクロマトグラフィーにより精製された活性画分を用いて、アズキGBPとGA₄との親和性(解離定数)を検討した。その結果を図5-13および図5-14に示す。解離定数の算出方法として2通りの異なる方法を採用して比較した。すなわち図5-13に示すようにScatchardプロットを作成する方法と、図5-14に示すように全結合量の50%が交換される非標識体濃度を用いる簡便法である。前者では $6 \times 10^{-10} \text{M}$ という値が算出され、後者からも同様の値が示された。両者の値がほぼ一致するのでアズキGBPの活性型ジベレリンに対する親和性に関しては、これまでGBPの報告例と比較して類を見ないほど高い値を示すことが明らかとなった(表1-8を参照)。

さらに幼植物体中のアズキGBPの含有量についても2種類の方法を用いて試算した。まず用いた標識体の比放射活性を指標にした場合、約2.5kgの材料から可溶性タンパク質画分を調製し、その画分中の総結合放射活性量が約120,000dpmであった。これは標識体の比放射活性から換算して約500fmoleに相当することが判明し

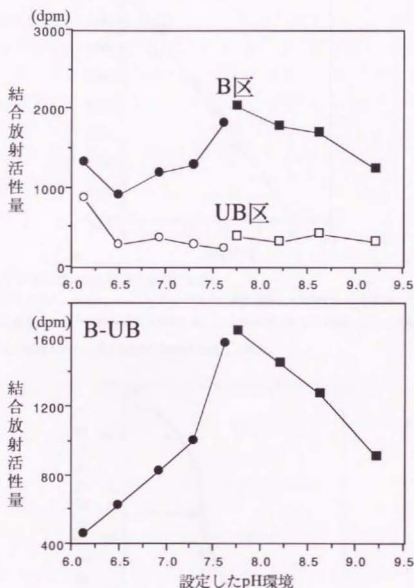


図5-12 アズキGBPのpH依存性

活性画分を蒸留水で溶解しゲル濾過カラムで脱塩処理をし、標識dihydroGA₄ (4,400,000 dpm, 73.3kBq)と、非標識GA₄ (1mM)溶液または非標識GA₄を含まない緩衝液を添加してから目的のpHを維持するように設定された各緩衝液を添加して、4℃、3時間反応させた。それぞれについてゲル濾過法を用いて結合放射活性を測定した。各pH緩衝液の調製についてはpH6.0~pH7.5はリン酸緩衝液(図中●印で示す)、pH7.5~pH9.0はTris-HCl緩衝液(図中■印で示す)を用いた。

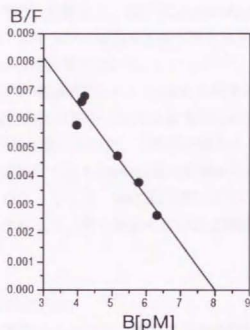


図5-13 アズキGBPのGA₄に対する親和性(1)

活性画分とトリチウム標識dihydroGA₄の混合溶液に段階希釈した非標識GA₄を添加して、ゲル濾過法を用いて画分中の結合放射活性量を測定した。Scatchardプロットを作成して、その傾きからK_dは 6×10^{-10} Mと算出された。またBmaxは8pMと見積もられた。

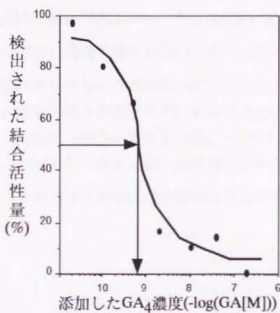


図5-14 アズキGBPのGA₄に対する親和性(2)

活性画分とトリチウム標識dihydroGA₄(4,400,000 dpm, 73.3kBq)の混合溶液に任意の量の非標識GA₄を添加して、ゲル濾過法を用いて画分中の結合放射活性量を測定した。全交換可能な結合部位のうちの50%が非標識GA₄で置換されときの添加した非標識GA₄の濃度(破線で示す)を求め、概数値としてのK_dは 6×10^{-10} Mと算出された。

た。精製上の回収率を50%と見積もり、図5-4に示されたように活性検出に用いたゲル濾過カラムからのアズキGBPの回収率を約30%と見積もった場合、1mgのタンパク質あたり1~2fmol程度と算出された。

もう一つの試算としてScatchardプロットをx軸に外挿する方法(Bmax)を利用した。これにより約2.5kgの抽出材料中における最大結合部位数は、1mgのタンパク質あたり0.1~0.2fmol程度と算出された。これらの値から判断して、アズキGBPの単離を完遂するためには少なくとも100kg程度の材料からの効率的な精製を構築することが必要と推測された。そして、存在量に関してもこれまでに報告されている他のGBPの存在量と比較して、全く類を見ないほど微量にしか存在しないことが明らかとなった。

5-3-3-3:アズキGBPの基質選択性

表5-5にGA₄を基準(100%)とした各化合物のアズキGBPに対する相対的な親和性を示した。構造式については図5-15に示す。これらの結果からGA₄と同様に16,17-dihydroGA₄に対しても高い親和性を示すと共に、GA₁やGA₃といった一般に活性型と呼ばれるジベレリンに高い親和性を示すことが明らかとなった。これに対しGA₄の生合成上の直前の前駆体であるGA₉や不活性化の代謝を受けたGA₃₄などには親和性が低く、また僅かに構造の異なるGA₄メチルエステル、GA₃₇、3-*epi*-GA₄などにもほとんど親和性を示さないことが明らかとなった。これらの結果はアズキGBPがジベレリンが生理活性を発現するのに必須であるとされている構造要因、すなわち3β位の水酸基、6位カルボキシル基、γ-ラクトン環といった構造要因をすべて満たすC₁₉-ジベレリンのみに高い親和性を有する傾向をうかがわせるものである。以上のことからアズキGBPは生理的な茎部伸長活性と密接な関連性があるものと期待された。

表5-5 アズキGBPの基質選択性

GA ₄	100%
16,17-dihydroGA ₄	55%
GA ₁	25%
GA ₃	5%
GA ₉	1%
GA ₄ -Me	1%
GA ₃₄	0.5%
GA ₃₇	0.5%
GA ₁₃	0.1%
3- <i>epi</i> -GA ₄	<0.1%

活性画分とトリチウム標識dihydroGA₄の混合溶液に任意の量の各非標識ジベレリンを添加して、ゲル濾過法を用いて画分中の結合放射活性量を測定した。トリチウム標識dihydroGA₄の結合が50%阻害されるのに必要な各非標識ジベレリン量を算出し、その逆数を比較して相対的親和性を求めた。従って値が大きい程、親和性が高い。GA₄を基準として記す。

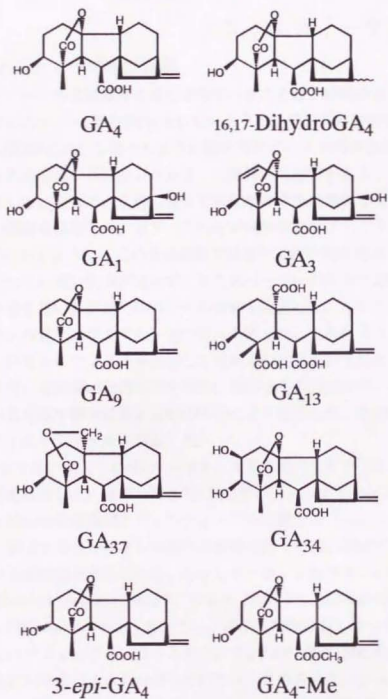


図5-15 基質選択性の検討に用いたジベレリンの構造式

5-4:アズキGBP精製法としての

アフィニティーゲルの活用

5-4-1:アフィニティーゲルの調製

アフィニティーゲルの調製時に最も留意すべきことは、精製の対象すなわちGBPとのアフィニティー(親和性)を失わないようにリガンドの修飾を行うことである。すでに第2章において述べたように活性型ジベレリンの構造的特徴について検討し、得られる抗体が活性型ジベレリンに特異的に反応するような免疫原の調製方法を確立した。そこで、これに倣って免疫原の構造に類似したアフィニティーゲルの調製を検討した。以下、これを16位修飾型アフィニティーゲルと称する。図5-16に示すように、この合成経路では途中で選択的活性エステル化が要求され、そのために高い収率が望めず、またスパーサーの長さの調節も難しいので、別の化合物を用いて同様に16位からの修飾を検討した。すなわち、16位末端にはカルボキシル基ではなくアミノ基の導入を図った。これにより、ジベレリン誘導体に唯一存在するアミノ基を利用して担体との結合を行うため、免疫原の調製時のような用いる試薬の量的比率を微妙に調節する必要がなくなった。また、精製された合成中間体は質量分析(SIMS)により確認した。都合2種の合成中間体によりアフィニティーゲルを調製した。

一方、第3章で用いたような6位カルボキシル基を利用したアフィニティーゲルについても再度検討した。以下これを7位修飾型アフィニティーゲルと称する。このタイプは上述の16位修飾型アフィニティーゲルと異なりジベレリンの生理活性の発現に深く関与するカルボキシル基への修飾を伴うため、GBPとの親和性を大きく低下させる危険性を有している。しかしオーキシン結合タンパク質のトウモロコシABP1(Shimomura *et al.*, 1986)や、ヤエナリABP-IおよびABP-IIの精製(Sakai and Hanagata, 1983; Sakai, 1985)においては、活性の発現に深く関与するカルボキシル基を修飾したアフィニティークラムを用いて、ABPへの親和性を適度に下げることにより溶出効率を向上させた例も存在する。これらのことから、16位修飾型と7位修飾型の2種類の構造を持つアフィニティーゲルの調製を試み、その利用の可能性についての検討を行った。

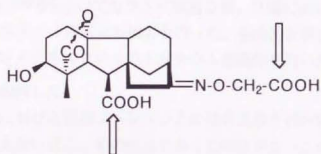


図5-16 GA₄ノルケトンのオキシム体の構造

矢印で示すように分子内に2つのカルボキシル基が存在しており、これらのうち17位末端のカルボキシル基のみを選択的に活性化することが要求された。

5-4-2:抗体を用いた各種アフィニティーゲルの有効性の検討

調製したアフィニティーゲルの構造式を図5-17に示す。これらの有効性の検討は、16位修飾型アフィニティーゲルに関してはカートリッジカラムに充填し、第2章にて調製した活性型ジベレリンに特異的に結合する抗体をこれに供した。十分に洗浄して、結合しなかった抗体をカラムから除去したのち、塩強度を高くした溶出系と非標識リガンドを用いたアフィニティー溶出系による2つの溶出条件の検討を行った。各溶出条件により得られた溶出画分についてトリチウム標識ジベレリンを用いた硫酸沈殿法により画分中に存在する特異抗体の存在量を測定して、ゲルの有効性を検討した。

一方、7位修飾型アフィニティーゲルに関しても、抗GA₁メチルエステル抗体(Yamaguchi *et al.*, 1990)を用いてカラムに吸着させ、同様に高い塩強度を利用した溶出系とアフィニティー溶出系の検討を行った。各溶出条件により得られた溶出画分についてGA₁メチルエステルのトリチウム標識体を用いた硫酸沈殿法によりゲルの有効性を検討した。

各溶出画分における標識ジベレリンとの結合活性を図5-18に示す。グラフでは免疫反応性が大きいほど、その時点で多くの抗体がカラムから溶出されていることを示している。この結果、ジベレリンによる溶出方法はいずれも効果的であることが明らかとなり、16位修飾型および7位修飾型のいずれも抗体タンパク質の精製に関しては有効に活用できることが示された。

実際にアズキGBPをアフィニティーカラムに吸着させて効果的な溶出を行うことを想定した場合、やはりジベレリンによるアフィニティー溶出が最も確実にGBPの失活の危険性が少ない穏和な溶出方法と考えられる。しかし、この溶出系の最大の難点は溶出画分中に過剰量の非標識ジベレリンが混入するため、これらの徹底的な除去を行わない限りジベレリン結合活性の測定が困難になると予想されることである。従ってアフィニティー溶出以外の方法により活性を保ったままでGBPの溶出が行えれば最も都合がよい。しかし一般に効果的とされる溶出系はタンパク質の失活を代償にカラムからの溶出を行う場合が多く、設定は微妙で難しいとされている。第2章において活性型ジベレリンに特異的に結合する抗体を用いたイムノアフィニティーカラムを調製し、活性型ジベレリンの効率的な精製方法について検討した際には、標識GA₄と抗体との結合がチオシアン酸カリウムなどカオトロピック塩により解離し、塩濃度を下げることにより繰り返し両者の結

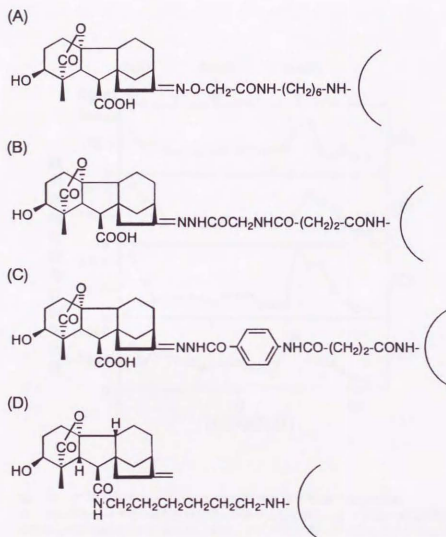


図5-17 調製された各種アフィニティーゲルの構造

タイプ(A~C): すべて16位修飾型のアフィニティーゲルで、特にタイプ(A)は第2章において調製した活性型ジペレリンに特異的に反応する抗体の調製時に用いた免疫原の構造に酷似している。一方、タイプ(B)または(C)に関しては合成中間体においてタイプ(A)に要求されるような選択的活性エステル化を必要としない。タイプ(D): 7位修飾型のアフィニティーゲル。

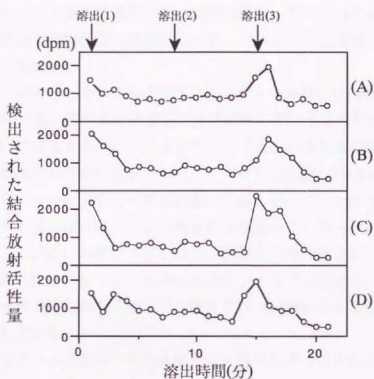


図5-18 アフィニティーゲルにおける特異抗体の吸着・溶出状況
 各アフィニティーゲル1mlをカートリッジカラムに充填し、タイプ(A)~(C)に関しては抗GA₁抗体溶液をこれに供した。また、タイプ(D)に関してはGA₁のメチルエステルに対する抗体(Yamaguchi *et al.*, 1990)溶液をこれに供した。PBSで洗浄(溶出(1)の矢印で示す)した後、0.5M KSCN入りPBSで溶出(溶出(2)の矢印で示す)し、0.5mM GA₃入りPBSで溶出した(溶出(3)の矢印で示す)。タイプ(D)に関してはGA₃の代わりにGA₃メチルエステルを用いた。各画分は1mlごとに分画して硫酸沈殿法により抗体の検出を行った。従って、画分中に検出される結合放射活性量が多いほど多量の抗体がカラムより溶出されたことを示す。なお、用いたアフィニティーゲルの構造は図5-17のタイプ(A)~(D)に対応している。

合が復活することを示した。従って、このカオトロピック塩を利用した溶出系の検討を今回調製したアフィニティーカラムに対しても行ってみたが、図5-18における溶出状況から明らかなように、いずれのカラムにおいてもほとんど溶出効果を示さないことが明らかとなった。同様の抗原抗体反応でありながら、イムノアフィニティーカラムで極めて有効であった溶出系が、アフィニティーカラムでの溶出系としては全く機能しない理由について、ジベレリンと抗体との親和性に着目して検討してみたい。

イムノアフィニティーカラムおよびアフィニティーカラム(双方の構造については図5-19を参照)において抗原抗体反応により結合しているジベレリンと抗体の複合体構造について考えてみると、イムノアフィニティーカラムにおいては抗体が担体と部位非特異的に共有結合しており、ジベレリンに関しては全く修飾をうけていない。一方、アフィニティーゲルにおいては、ジベレリンが担体に結合しており、しかもその結合様式は免疫原の構造により近いことから、遊離状態のジベレリンよりもさらに高い親和性を示しながら抗体との複合体を形成しているのではないかと予想される。従って、両者におけるジベレリンと抗体の複合体を形成する上での親和性の違いからチオシアン酸カリウム溶液による溶出効果に差が生じたものと考えている。

このことよりアフィニティーカラムを用いて特異抗体の効果的溶出を行う場合には、イムノアフィニティーカラムよりもさらに強力な溶出条件が要求されるものと推測する。ただし、アズキGBPと抗体とは性状が異なることからこれらの溶出方法がアズキGBPに対しても無効かどうかは全く別問題であり、現段階で予測はできない。今後、実用化に向けてチオシアン酸塩などがアズキGBPのジベレリン結合活性に与える影響などを細かく検討する必要があるだろう。

5-4-3:アフィニティーゲル活用の可能性の検証(1)

16位修飾型および7位修飾型アフィニティーゲルの部分構造に類似した2つの疑似合成中間体を用いて、アズキGBPに対する親和性をゲル濾過カラムを用いて測定し、アズキGBPの精製にアフィニティーカラムを活用できるか否かの可能性を検討した。その結果について図5-20に示す。これにより、16位修飾型ではアズキGBPに対してほとんど親和性を失うことが判明した。この裏付けとして側鎖をさらに短くした16 α ,17-dihydroxy-16,17-dihydroGA₄(Hasegawa *et al.*, 1994)の親和性についても検討を行ったが、同様にほとんど親和性を失うことが判明した。このこ

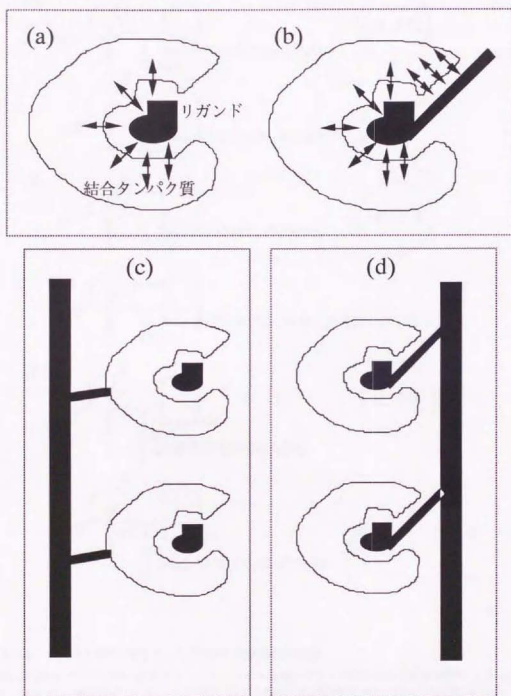


図5-19 アフィニティークロマトグラフィーとイムノアフィニティークロマトグラフィーとの比較
 上段に示す様にリガンドに対する結合タンパク質が特異抗体である場合を想定すると、抗ジペレリン抗体のように抗ハプテン抗体の場合、リガンド自身(a図)よりも免疫原の構造に近い(b図)ほど、より高い親和性を有すると考えられる。そこで、特異抗体を結合タンパク質のモデルとして用いてアフィニティークロマトグラフィーおよびイムノアフィニティークロマトグラフィーを行う場合を考えると、アフィニティークロマトグラフィーの場合(d図)の結合様式は(b図)に近く、イムノアフィニティークロマトグラフィー(c図)の場合の結合様式(a図)よりも、更に高い親和性をもって両者は結合すると推測される。

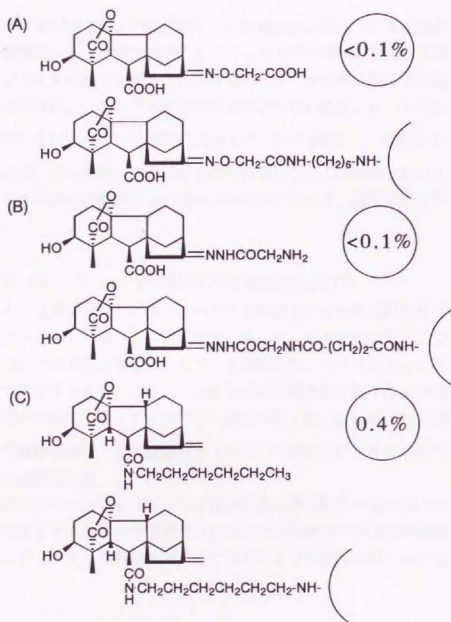


図5-20 アズキGBPに対するGA₄誘導体の親和性の比較

(A)~(C)それぞれの下段に示すアフィニティーゲルを用いたアズキGBPの効果的な精製を念頭におき、3種のGA₄誘導体についてアズキGBPに対する親和性の検討を行った。GA₄の親和性を基準(100%)として示す。

とからアズキGBPでは、17位末端メチレン構造の近傍についても結合に非常に関与する領域であると推測される。したがってアズキGBPの精製に有効なアフィニティーカラムを調製するためには16位以外からの修飾を行うことが得策ではないかと示唆された。一方、アズキGBPの基質選択性の検討においてGA₄メチルエステルに対してGA₄の約1%の親和性を示した(表5-5を参照)。7位修飾型の疑似合成中間体においても同様に微弱ながら親和性を示したことから、少なくとも7位修飾型とアズキGBPとは結合する可能性が示唆されたので、以下これを用いて検討を行った。

5-4-4:アフィニティーゲル活用の可能性の検証(2)

陰イオン交換クロマトグラフィーによる精製を行った活性画分を用いて、7位修飾型アフィニティーカラムによる精製に供した。また対照カラムとして、ジベレリンの代わりに安息香酸を用いたゲルを調製した。ペリスタリックポンプにより低流速で循環させた後、カラムへの非特異的な吸着物を洗浄により除去し、続いて高濃度のGA₃によるアフィニティー溶出を行った。溶出画分および非吸着画分について濃縮を行い、ゲル濾過カラムを用いた測定法によりジベレリンに対する結合活性を測定した。

非吸着画分についてのジベレリン結合活性の測定結果を表5-6に示す。これによると、対照カラムからの非吸着画分においては明瞭なGBP活性が検出されたが、アフィニティーカラムの非吸着画分ではそのような活性は認められなかった。こ

表5-6 アズキGBP精製のためのアフィニティーカラムの有効性の検討

カラムの種類	B区(dpm)	UB区(dpm)	B-UB(dpm)
アフィニティーカラム	621 ± 71	581 ± 50	40
対照カラム	1003 ± 86	587 ± 31	416

7位修飾型GA₄アフィニティーカラム(図5-20のタイプ(C)下段)および対照として調製した安息香酸カラムの双方にアズキGBPを含む活性画分を12時間、循環させた後、非吸着画分中の特異的結合活性(B-UB)をゲル濾過法により検討した。すべての測定は独立に4連で行った。

のことから、GBPがアフィニティーカラムに吸着された可能性は高いと考えられる。一方、アフィニティー溶出画分には過剰量のリガンドが混入しており、現段階ではGBP活性を検定するには至っていない。また、SDS-PAGEおよび銀染色においても現段階では明瞭なバンドの差は認められなかった。今後、活性炭等を用いてアフィニティー溶出画分中に過剰に混入したジベレリンの効率的な除去方法について検討し、溶出画分中のGBP活性について測定を行って、アフィニティーカラムの有効活用によりアズキGBPに関する精製効率の飛躍的向上を達成したいと考えている。

5-5:アズキGBPについての総括

非平衡のゲル濾過カラムによるジベレリンの結合活性測定法は硫酸沈殿法のように高濃度の塩を要求せず、植物体内により近似した環境条件下で測定が行える。ヤエナリGBPやアブラナGBPの活性画分を別途調製してこのゲル濾過カラムによる活性検定に供したが全くジベレリン結合活性を検出することはできなかった。すなわち、高濃度の塩が存在しない環境下ではこれらはGBPとしての機能を消失するのか、あるいは低い親和性のためにゲル濾過カラム内で標識リガンドがGBPから解離するからではないかと推測する。

アズキGBPの精製に関しては、特にイオン交換カラムによる精製が効果的であり、常套的手段を組み合わせると2,200倍の比活性の上昇を達成することができた。しかし、考察においても指摘したようにアズキGBPの存在量は極めて微量であり、現在の量的な見積もりが正しいとすればその単離には少なくとも100kg程度の材料からの更なる効率的な精製を検討しなければならない。

各種ジベレリンを用いたアズキGBPの性状解析の結果は、いずれもが受容体としての必要条件を満たすものであった。しかし、いろいろな性状を持つGBPの中から受容体タンパク質を選抜するための決定的な方策が存在するわけではなく、これらをもってアズキGBPが受容体であるとは断定できない。このことは、オーキシンやサイトカイニンの受容体を結合タンパク質から選別しようとする他の研究グループでも同様の問題を抱えている。ジベレリンの場合、少なくとも伸長に関与した受容体であれば、伸長生理活性と親和性あるいは基質選択性との間にある程度の相関性を保っていてしかるべきであるというのが、当初からの筆者の基本的立場である。今回検出したアズキGBPはまさにこの基本的条件を満たすものと考えている。残る課題、すなわち受容体であることの証明はそれらの変異体の作出や*in situ*でのシグナル伝達系の構築などを待つ必要があるかもしれない、あるいは環境の変化に伴うアズキGBPの時期的・空間的変動を解析することにより新たな必要条件を設定することが可能であるかもしれない。またさらには、アズキGBPの分子量に関する知見から核内にターゲットを持つ可能性もあり、そのあたりから解析への糸口が見つかるかもしれない。いずれにしてもこのアズキGBPの単離を図り、分子情報に関する解析が切望される。

5-6:実験の部

■■■ゲル濾過カラムを用いたGBP検出系の構築■■■

●ジベレリン標識体の調製

GA₇/isoGA₇/GA₄混合物 80.0mgを1.0mlのDMFに溶解し、100mgの酸化銀および、20mgのベンジルブロマイドを添加して、常温で72時間攪拌した。反応の進行はシリカゲルTLC[AcOEt:CHCl₃:AcOH=20:12:1 (v/v)]により確認した。GA₇ベンジルエステルの精製は、シリカゲルカラムクロマトグラフィー(溶出はヘキサナーAcOEt系)とODS-HPLCにより行った。

HPLCの各条件は、Column, PEGASIL ODS, 6mm i.d. × 150mm, Senshu; Solvent(A), 50%(v/v)acetonitrile; Solvent(B), 80%(v/v)acetonitrile; 0分(A)100% → 30分(B)100%, linear gradient; 流速, 1.0ml/分。最終的に17.1mgのGA₇ベンジルエステルを得た。

パラジウム・炭素を触媒としてトリチウムガスによる接触還元反応をDu Pont社に委託した。FAB-MS: 343[M+H]⁺ (16,17-dihydroGA₄の[M+H]⁺は335に検出されることから³H₄ラベル体が生成したことを示している)。反応混合物について陰イオン交換カラム(N(CH₃)₂-3151, 8mm i.d. × 150mm, Senshu)を用いて精製を行った。Solvent, MeOH/0.05%(v/v)AcOH, isocratic; Flow rate, 2.0ml/分。調製された1,2,16,17-³H₄]-16,17-dihydroGA₄の比放射活性は、4.55TBq/mmol (122Ci/mmol)であった。

●非平衡ゲル濾過法によるジベレリン結合活性測定法

被検タンパク質画分を洗浄用緩衝液(10mM Tris-HCl, pH7.6, 2-ME 10mM, NaCl 50mM)で溶解し遠心分離(15,000×g, 15分間, 4℃)により不溶化物を除去した。この溶液1mlをエッペンチューブに入れ、標識ジベレリン溶液(330nM 1,2,16,17-³H₄]-16,17-dihydroGA₄ [123 Ci/mmol], 125mM Tris-HCl, pH7.6, 25mM 2-ME)50μl (ca. 4,400,000 dpm, 73.3kBq)と混合し、室温で10分間反応させた。次に非標識ジベレリン溶液(1mM GA₄あるいはGA₃, 10mM Tris-HCl, pH7.6, 10mM 2-ME, 0.1M NaCl)または非標識ジベレリンを含まない緩衝液(10mM Tris-HCl, pH7.6, 10mM 2-ME, 0.1M NaCl)を50μl添加して12時間反応させた。予め洗浄用緩衝液で平衡化させたゲル濾過カラムカートリッジ(Nap-10カラム, Pharmacia)に上記の1ml混合溶液

を供し、溶液がゲル上端部に入った段階から、さらに洗浄用緩衝液650 μ lがゲル上端部に入った段階までに溶出した画分を採取して評価試料とした。また、pH依存性の検討時には各設定pH緩衝液を調製し、カラム環境を平衡化した。

■■■アズキ胚軸切片におけるジベレリンの伸長促進活性の測定■■■

パーミキュライト上に殺菌・吸水させたアズキ種子を蒔き、明条件(25℃、約2,500ルクスの連続光)および暗条件(25℃、暗黒下)で生育させて、4~8日間経たのち、8~12cmになった上胚軸上部を1cm長の切片にした。これを、2% sucrose入りリン酸緩衝液(100mM、pH6.2)とIAA(終濃度で 10^{-4} M)共存下、被検ジベレリン溶液を添加してこの中に切片(通常10本)を浸し、25℃の連続光照射(約4,000ルクス)条件で20時間振盪培養した。切片の伸長を測定し、最大値・最小値それぞれ2つずつを削除して平均値を算出した。

■■■アズキGBPの抽出および精製■■■

●植物材料の調製

アズキ(*Azuki angularis*)の種子を次亜塩素酸ナトリウム水溶液(有効塩素1%)で約3分間処理した後、暗黒下(25℃)で1晩吸水させ、寒天プレート上(0.8%)に播種して、暗黒下(25℃)で6日間培養して幼植物体を収穫した(1kgの種子あたり2kg新鮮重の収量であった)。

●可溶性タンパク質の抽出

特に断らない限りすべての作業は4℃で行った。アズキ幼植物体と同重量の抽出用緩衝液(60mM Tris-HCl, pH7.6, 10mM EDTA- Na_2 , 30mM 2-ME, 1mM PMSF, 0.15M NaCl)とをミキサー内で混合し、計5分間粉碎した。途中、用いた材料の新鮮重の10%にあたるPVPP(ポリクラールAT、五協産業)を順次加えた。4重に重ねたガーゼにより破砕物を濾過し、濾液を集めて遠心分離(17,000 \times g, 30分間)により上清画分を集めた。この画分に60%(w/v)の硫酸アンモニウムを攪拌しながら徐々に添加した。120分間攪拌を継続した後、遠心分離(17,000 \times g, 30分間)により沈殿区を集めて、これを可溶性タンパク質画分とした。

●疎水性カラムクロマトグラフィーによる精製

可溶性タンパク質画分を、16%(v/v)の飽和硫酸アンモニウム溶液(10mM Tris-

HCl, pH7.6, 10mM 2-ME, 0.1M NaCl)で溶解し、遠心操作(17,000×g, 30分間)により不溶物を除去して、上清だけを疎水性カラム(Butyl-Toyopearl 650M, 東ソー, 27 mm i.d.×200 mm)に供した。洗浄用液(20%(v/v)飽和硫酸アンモニウム溶液)をゲル体積の5倍量程度使用して洗浄操作を行い、硫酸アンモニウム濃度を5%(v/v)に下げた溶出液を用いて溶出を行った。得られた各画分は塩析処理((20mM Tris-HCl, pH7.6, 10mM 2-ME, ca.4.6M 硫酸アンモニウム)に対して12時間透析)により濃縮して保存した。流量はペリスタリックポンプにより約300ml/時間程度に調節した。

●陽イオン交換カラムクロマトグラフィーによる精製

疎水性クロマトグラフィーにより得られた活性画分のペレットを開始緩衝液(50mM AcOH(pH5.0), 10mM 2-ME, 10% (v/v) グリセリン)にて溶解し、同緩衝液を用いて透析し(2L, 2~3時間を2回)、遠心分離(27,000×g, 30分間)により等電点沈殿したタンパク質を除いた。上清をタンパク質濃度が5mg/ml以下になるように開始緩衝液で希釈し、予め平衡化しておいた陽イオン交換カラム(SP Sepharose Fast Flow, Pharmacia; 25 mm i.d.×300 mm)に添加して、流速100ml/hr. にてタンパク質を吸着させ開始緩衝液を用いて流速270ml/hr. にて洗浄した。その後、塩強度を0.20M, 1.0Mと上げて段階的に溶出した。1.0Mの塩化ナトリウムを添加した溶出液で得られた画分について飽和硫酸アンモニウム溶液中で3時間以上透析し、遠心分離(27,000×g, 30分間)によりペレットを得た。

●陰イオン交換カラムクロマトグラフィーによる精製

陽イオン交換クロマトグラフィーにより得られた活性画分を開始緩衝液(50mM NaCl, 20mM Tris/HCl (pH 7.6), 10mM 2-ME, 10% (v/v) グリセリン)にて平衡化させておいたゲル濾過カラム(Nap-10, Pharmacia; 13 mm i.d.×26 mm)を用いて脱塩した。脱塩したタンパク質溶液の濃度が5mg/ml以下になるように開始緩衝液で希釈し、陰イオン交換カラム(Q-Sepharose Fast Flow, Pharmacia; 15 mm i.d.×300 mm)にて流速40ml/hr. にて添加して、70ml/hr. にて洗浄した。非吸着画分をCentriprep-10, Centricron-30(Amicon)を用いた遠心式限外濾過により110 μ lまで濃縮した。

●ゲル濾過カラムクロマトグラフィーによる精製および分子量の算定

陰イオン交換カラムで精製した活性画分をゲル濾過用カラム(Shodex KW-803, 8 mm i.d.×300 mm, 排除限界 1.5×10^5 , 昭和電工)を用いたHPLCに供した。流速は

0.3 ml/分の定流量とし、1fr./分で分画した。また、280nmのUV吸収(BioMini UV Monitor(アトー))により溶出状況を把握した。また、検量線作成用の標準タンパク質はゲル濾過HPLC用のカリブレーションキット(Amersham USB; glutamate dehydrogenase (290 kDa), lactate dehydrogenase (142 kDa), enolase (67 kDa), myokinase (32 kDa))を用いた。

●ポリアクリルアミドゲル電気泳動および銀染色法

電気泳動は12.5%ポリアクリルアミドゲルを用いたSDS-PAGEを行った。また、銀染色法は以下の要領で行った。初めに、ゲルを[MeOH: DW: AcOH= 50: 40: 10 (v/v)]の混合溶液に1時間浸漬・振盪した後、[MeOH: DW: AcOH= 5: 88: 7 (v/v)]の組成溶液と置換して、1夜振盪した。これを、10%グルタルアルデヒド水溶液に30分間浸漬・振盪してタンパク質の固定を行った。3時間かけて計3リットルのDWを用いてゲルの洗浄を行い、調製直後のアンモニア性硝酸銀溶液(AgNO_3 0.78g, NH_3 aq. 1.44ml, 1N NaOH 2.0ml, DW 96.6ml)で15分間の振盪により染色を行った。直ちに大量のDWで洗浄操作を行い、ホルマリン溶液(0.02% formaldehyde, 0.01% citric acid)中での短時間の振盪により発色させた。

■■■アズキGBPの性状解析■■■

●タンパク質の定量

Protein assay kit(Bio-Rad)を用いて行った。BSA溶液(1.35mg/ml)を希釈して、9 $\mu\text{g/ml}$, 18 $\mu\text{g/ml}$, 30 $\mu\text{g/ml}$, 50 $\mu\text{g/ml}$, 75 $\mu\text{g/ml}$ の5段階のスタンダード溶液を調製した。スタンダード溶液およびDWで適宜希釈したサンプル溶液を360 μl ずつ分注し、定量用試薬(Bio-Rad)を90 μl 加えて攪拌した後、5分間以上室温で放置した。マイクロタイタープレートに定量用試薬入りのタンパク質溶液を200 μl ずつ2連分入れて、マイクロプレートリーダーにより595nmにて測定した。

●アズキGBPのGA₄に対する親和性および基質選択性

活性画分に対して標識16,17-dihydroGA₄溶液50 μl (ca. 4,400,000 dpm, 73.3kBq)と、任意の量の各非標識ジベレリン溶液50 μl を混合して、ゲル濾過カラムを用いた結合活性量を測定した。過剰量の非標識GA₄により交換可能な標識GA₄の全結合量のうち50%を置換するのに必要な添加量について、反応溶液量(1ml)から濃度

を算出し、その逆数を比較して相対的親和性を求めた。

■■■アフィニティーゲルによるアズキGBPの効率的な精製の可能性■■■

●GA₄-16-アミノベンゾイルヒドラゾンの調製

4-アミノベンゾイルヒドラジド 291.6mg(1.93mmole)およびGA₄-17-ノルケトン 117.2mg(0.35mmole)の双方を、別個に10%(v/v) AcOH/MeOHに溶解し、混合した。遮光条件下、常温で16時間攪拌した。シリカゲルTLC[AcOEt: CHCl₃: AcOH =20: 12: 1 (v/v)]により反応の進行を確認した。MeOHを留去して、酸性条件下、AcOEtによる溶媒抽出を行い、上清区についてアセトンによるブロッキング処理後、濃縮物を得た。SIMS [positive] m/z: 468([M+H]⁺, 100), 490([M+Na]⁺, 35)。

●GA₄-16-グリシルヒドラゾンの調製

グリシンメチルエステル塩塩410mg(3.26mmole)をMeOHに溶解し、含水ヒドラジン 584 μ l(1.2当量)を加えた。3日間、常温で攪拌した後、シリカゲル TLC[MeOH: AcOEt: NH₃ =3: 20: 1 (v/v)]により反応の進行を確認した。5%AcOH/MeOHにこれを溶解し、同様の溶媒に溶解したGA₄-17-ノルケトン 245.2mg (0.73mmole)を加えて混合した。常温、17時間攪拌した後、シリカゲルTLC[AcOEt: CHCl₃: AcOH =20: 12: 1 (v/v)]により反応の進行を確認した。乾固するまで完全に溶媒を留去したのち、AcOH臭が無くなったことを確認してからMeOHに溶解させた。白濁する不溶物を除去して溶液だけを取り、濃縮し、SIMSにより目的物の精製を確認した。SIMS [positive] m/z: 406([M+H]⁺, 100)

●16位修飾型アフィニティーゲルの調製

担体として2種類のゲルを用いた。すなわち、FMP活性化セルロファイン(フルオロメチルピリジニウム活性化セルロファイン、生化学工業)と活性化キトパール(K-20、富士紡績)である。FMP活性化セルロファインを用いる場合は、各種GA₄ヒドラゾン 0.22mmoleをアセトンに溶解し、これにトリエチルアミン 100 μ l、ゲル乾燥粉末 2gを添加して、室温で2日間攪拌した。これをゲル体積の5倍量の[アセトン:DW=1:0, 3:1, 1:3, 0:1 (v/v)]の各組成洗浄液で順次洗浄を行い、0.01MTris-HCl緩衝液を用いて6時間、室温にてブロッキング処理を行った。

活性化キトパールを用いる場合は、これをグラスフィルター上でMeOHにより予め洗浄しておき、GA₄ヒドラゾン 0.22mmoleをMeOHに溶解し、さらにトリメチルアミン 100 μ lを添加して、その中に膨潤したゲル 20mlを懸濁した。常温で2日間攪拌した後、ゲル体積の5倍量の[MeOH: DW=1: 0, 3: 1, 1: 3, 0: 1 (v/v)]の各組成洗浄液で順次洗浄を行い、0.01M Tris-HCl緩衝液を用いて6時間、室温にてブロッキング処理を行った。いずれのゲルも使用時は開始用の緩衝液で平衡化してから用いた。(対照カラムの調製の際には、GA₄ヒドラゾンの代わりに終濃度0.01MのTris-HCl緩衝液を反応させて用いた)

●GA₄-7-ヘキシルアミドの調製

GA₄ 75.4mg(0.23mmole)を無水アセトニトリルに溶解して、NHSI 34.6mg(0.30mmole)を加えた。続いて、DCC 75.0mg(0.36mmole)を加えて、窒素ガス置換後、室温にて12時間攪拌した。シリカゲルTLC(展開溶媒系は[EtOAc: CHCl₃: AcOH=25: 15: 1 (v/v)])によりGA₄-7-活性エステルの生成を確認した。沈殿物を除去した上清を濃縮乾固し濃縮物139mgを得た。このうち27.8mgについて無水アセトニトリルに溶解し、ヘキシルアミン120 μ gを添加して常温で12時間攪拌した。シリカゲルTLC(展開溶媒系は[EtOAc: CHCl₃: AcOH=25: 15: 1 (v/v)])により反応の進行を確認した。濃縮を行い、1%塩酸溶液でpH3に調製してからAcOEtによる分配を行った。酸性AcOEt可溶区を回収し、シリカゲルカラムクロマトグラフィーによる精製に供した。溶出は[EtOAc: CHCl₃=1: 1 (v/v)]で行った。得られた画分についてシリカゲルTLC(展開溶媒系は[EtOAc: CHCl₃: AcOH=25: 15: 1 (v/v)])により目的物質の溶出の確認を行い、その精製画分についてSIMSにより確認を行った。

SIMS [positive] m/z: 416([M+H]⁺, 100)

●7位修飾型アフィニティーゲルの調製

担体としてキトパールBCW(BCW-3001, 富士紡績)を用いた。これをグラスフィルター上でMeOHにより予め洗浄しておき、GA₄-7-活性エステル 0.22mmole相当をMeOHに溶解し、さらにトリメチルアミン 100 μ l添加して、その中に膨潤したゲル 5mlを懸濁した。常温で2日間攪拌した後、ゲル体積の5倍量のMeOH: DW=1: 0,

3:1, 1:3, 0:1の各組成洗浄液で順次洗浄を行い、0.01M Tris-HCl緩衝液を用いて6時間、室温にてブロッッキング処理を行った。

●アフィニティーゲルの有効性の検討

膨潤した各種ゲル1mlをカートリッジカラム(セパコール・ミニ, 7.5mm i.d., 生化学工業)に充填し、抗ジベレリン抗体溶液とPBS(pH7.2)で5倍希釈したウシ血清溶液を混合してこれに供した。ゲル上端まで溶液が入った段階で、流速を止めて3時間静置した。洗浄操作として、まずDW 1mlおよび0.5M NaCl入りリン酸緩衝液(pH7.2) 1mlで洗浄した後、一旦流速を止めて1時間静置してから、再び0.5M NaCl入りリン酸緩衝液(pH7.2) 5mlで洗浄した。続いて、第1段階の溶出操作として、0.5M KSCN入りリン酸緩衝液(pH7.2) 1mlで溶出し、一旦流速を止めて、1時間静置してから、再び0.5M KSCN入りリン酸緩衝液(pH7.2) 5mlで溶出した。第2段階の溶出操作として、初めに0.5M NaCl入りリン酸緩衝液(pH7.2) 4mlで洗浄して、カラム内のKSCNの除去を図った上で、16位修飾型の場合はGA₃ (0.5mM), NaCl (0.5M)入りリン酸緩衝液(pH7.2) 1mlで、また7位修飾型の場合はGA₃メチルエステル(0.5mM), NaCl(0.5M)入りリン酸緩衝液(pH7.2) 1mlで溶出して、一旦流速を止めて1時間静置してから再び溶出し、さらに0.5M NaCl入りリン酸緩衝液(pH7.2) 3mlで洗浄した。洗浄画分および溶出画分は1mlごとに分画して硫酸沈殿法により画分中の特異抗体の定量分析に供した。

●アズキGBPに対するアフィニティーゲルの効果的活用への可能性

カートリッジガラスカラム(10mm i.d. × 150mm)に7位修飾型アフィニティーゲルを充填した。これに、陰イオン交換カラムによる精製を終了した活性画分を供した。試料は洗浄用緩衝液(50mM Tris-HCl, pH7.6, 10mM 2-ME, 0.1M NaCl)で80mlに希釈してからペリスタリックポンプを用いて60ml/hrの低流速で1夜還流させた。洗浄は、洗浄用緩衝液を用いて、280nmのUV吸収で追跡しながら行い、さらに徹底的な洗浄として1.0MのNaClを含む洗浄用緩衝液により引き続き洗浄した。その後、溶出用緩衝液(1mM GA₄, 50mM Tris-HCl, pH7.6, 10mM 2-ME, 1.0mM NaCl)を用いて溶出させた。

■■■■第6章■■■■

本研究の構成および概要

本研究の目的とするジベレリン結合タンパク質(GBP)を追究するにあたり、どのような結合活性検定法を用いて活性を検出・評価するかということと、植物材料として何を用いるのが最も適当であるか、の二点については全く手探りの状態で始めねばならなかった。また、GBPの検出系を具体的に構築していく上で、ジベレリンに対する親和性および基質の選択性に関してGBPのモデルとなるようなタンパク質がどうしても必要であった。そこで生理的に機能を有するGBPであれば数あるジベレリン同族体の中でもGA₁やGA₄といった生理的に活性型のジベレリンに特異的に結合するはずであると考え、そのような活性型ジベレリンに共通して認められる構造的特徴を特異的に識別して、それらに選択的に結合するような抗体の調製を試みた。得られた抗体について各種の性状解析を行い実際にGBPのモデルとなるような抗体を調製することができた。そして、受容体に関連するGBPであれば具有していると推定されるいくつかの性状について具体的に把握することにより、検出されるGBPが受容体関連であるか否かを判定する上での基礎的な知見を得ることができた。また、GBPの役割を検討する際にリガンドであるジベレリンについての量的な解析も行えるように、調製した抗体を用いた免疫学的定量法の確立を行うとともに、ジベレリンの精製手段として、また抗原抗体反応についての詳細な検討の必要性からイムノアフィニティカラムを作出し、その有効利用の可能性についても検討した。

また、GBPを検出する上でいかなるジベレリン結合活性測定法を用いる場合においても、それが活性型ジベレリンに特有の結合でなければ意味を為さないと考えて、活性の評価を行う際には常に対照として過剰量のリガンドによる交換可能な結合量を算出し、その内のジベレリンに特異的な結合量をもって常に結合活性を評価することにした。

伸長に關与するGBPの検出について、いくつかの幼植物体を用いて試験的に精製を試みた。その中で、ヤエナリ(マングビーン)幼植物体は生育速度も速く、優れた抽出材料であることが判明した。そこで最初は、黄化ヤエナリを用い硫酸沈殿法をジベレリン結合活性測定法としてGBPの検出を行った。この方法は、高塩濃度条件下で偶然生じる結合部位を検出する可能性があり使用に際しては注意が必要である

が、簡便かつ迅速な検定法でありそのような危険性を考慮してもまだ魅力ある方法と判断して採用した。ヤエナリGBPは最終的に単離され、部分的なアミノ酸配列分析からダイズなどのマメ科植物の種子中に存在する主要な貯蔵タンパク質に高い相同性を持つことが判明した。さらに各種の性状解析より、胚軸中以外に子葉や生長を終了した莖葉部などにも多量に存在し、基質選択性に関しては活性型ジベレリンであるGA₄に親和性を示すものの、GA₁やGA₃のような13位に水酸基を有する活性型ジベレリンには全く親和性を示さず、一部の非活性型ジベレリンとも高い親和性を示したことから、量的な豊富さや、伸長生理活性と対応しない基質選択性などから考えて伸長生長に直接関与する可能性は極めて低い結合タンパク質、すなわち伸長に関与する受容体とは無関係であろうと判断した。

別のGBPの検索に取りかかる上で、ヤエナリGBPのようにGA₄に親和性を有し、しかも大量に存在するようなGBPは他の植物体からも同様に多量に検出され、GA₄に対する結合活性を指標にした検出方法ではこれらGBPの妨害により別種のGBPを検出することはほとんど不可能な状況になった。そこで植物における伸長活性に着目し、代表的な活性型ジベレリンであるGA₁やGA₄では多少の差はあるものの概して双方ともに伸長活性を示すことが多いことに注目した。すなわち、ヤエナリGBPのように貯蔵タンパク質に相同性を有するGBPではGA₁には結合せず、専らGA₄だけに結合能を有しているが、伸長生理に関与する受容体であればGA₁あるいはGA₄のいずれの活性型ジベレリンに対しても結合能を有するはずであると考えた。

そこで、GA₄標識体の代わりにGA₁標識体を用いて、再度、硫酸沈殿法によりGBPの検索を開始した。これによりヤエナリをはじめとして他の植物体でも広く認められる貯蔵タンパク質タイプのGBPを全く検出することなく別種のGBPを追うでける体制が整った。幾つかの植物体を用いて検索している中でアブラナ幼植物体より微弱な結合活性を検出したのでその精製を進めた。アブラナGBPは存在量がヤエナリGBPと比較して非常に少なく単離には至らなかった。しかし、精製途上で各種の性状解析を行った結果、GA₁とは結合するものの親和性が期待されたほど高くなく、また基質選択性の観点からも不活性型ジベレリンに強く結合することから、ヤエナリGBPと同様に伸長に関与する受容体とは考えにくいと判断した。アブラナGBPは存在量がかかなり少なく生理的に何らかの役割を持つと推測されるが、研究対象とはやはり異なるものと考えざるを得ない。従ってこの時点でGBPの検定法である

硫酸沈殿法の見直しを余儀なく迫られた。

いくつかある結合活性測定法の中から、ゲル濾過カラムを用いた測定法を採用し、生体内の環境により近い条件での活性測定を試みることにした。また抽出材料としてアズキ幼植物体を選定した。アズキの上胚軸切片はオーキシン共存下でジベレリンに应答して伸長することが知られており、ジベレリンの伸長効果に対する応答系について材料面から追究するには格好の材料と判断したからである。新しいGBP検出法と新しい抽出材料を用いてGA₁およびGA₄のいずれの標識体を用いた場合でも上述のヤエナリGBPのような貯蔵タンパク質は検出されず、それ以外の極めて微弱な結合活性が検出された。精製度の低い画分でも活性を評価することのできる本検定法の利点を生かしてアズキGBPに関して各種の性状解析を行った結果、ヤエナリGBPやアブラナGBPと比較して活性型ジベレリンに対して3~4オーダーも高い親和性を示すと共に、基質選択性に関しても生理的に伸長活性を有する活性型ジベレリンには総じて高い親和性を示し、不活性型ジベレリンには総じて低い親和性しか示さず、各ジベレリンのアズキGBPへの親和性は伸長生理活性と極めてよい相

表6-1 本研究において追究されたGBPと既報GBPとの比較

植物材料	存在場所	分子量		存在量	解離定数	検出手段	
		未変性条件	変性条件	($\mu\text{mol}/$	(M)		
		(kDa)	(kDa)	mg prot.)			
Lettuce hypocotyl	細胞壁	---	---	---	---	シロ精密度勾配	(Stoddart et al., 1974)
Wheat aleurone	---	---	---	0.45	1.5×10^{-6}	超遠心	(Jeltema et al., 1977)
Pea (Dwarf) epicotyl	細胞質	60/500	---	---	---	ゲル濾過・平衡	(Stoddart, 1979)
Pea (Dwarf) epicotyl	細胞質	40-70/600	---	0.9	6×10^{-8}	ゲル濾過	(Keith & Srivastava, 1980)
Cucumber hypocotyl	細胞質	---	---	0.4	1×10^{-7}	ゲル濾過・平衡	(Keith et al., 1981)
Cucumber hypocotyl	細胞質	---	---	0.4	7×10^{-8}	DEAEフィルター	(Keith et al., 1982)
Cucumber hypocotyl	細胞質	---	---	0.4	7×10^{-8}	DEAEフィルター	(Yalpani & Srivastava, 1985)
Maize leaf sheath	細胞質	40-90/500	---	---	---	ゲル濾過	(Keith & Rappaport, 1987)
Cucumber hypocotyl	細胞質	---	---	0.25	3.0×10^{-8}	DEAEフィルター	(Yalpani et al., 1989)
Bean epicotyl	核・葉緑体	80-100	---	330	---	PE処理フィルター	(Tevzadze et al., 1991)
Wild oat aleurone	ミクロソーム画分	---	60	---	---	フットアイニテューブ	(Hooley et al., 1993)
Maize mesocotyl	細胞質	---	---	0.62	5×10^{-7}	硫酸沈殿	(Sakai et al., 1994)
Wild oat aleurone	細胞質	---	50	---	---	フットアイニテューブ	(Walker et al., 1994)
Pea (Dwarf) epicotyl	細胞質	---	---	0.66	1.3×10^{-7}	DEAEフィルター	(Liu & Lee, 1995)
Pea (Dwarf) epicotyl	細胞質	40-110	---	0.21	1.2×10^{-7}	DEAEフィルター	(Liu & Ger, 1995)
Mung bean hypocotyl	細胞質	150-200	23/35	---	2×10^{-6}	硫酸沈殿	●ヤエナリGBP
Rape hypocotyl	細胞質	---	50	---	7×10^{-6}	硫酸沈殿	●アブラナGBP
Azuki bean epicotyl	細胞質	25	---	0.0001	6×10^{-10}	ゲル濾過	●アズキGBP

関性を有することが判明した。アズキGBPの存在率はアブラナGBPよりも遙かに微量であり、これまでの内外の研究者により報告されたGBPと比較しても全く類を見ないほど少ないことから、単離に至るためには2200倍まで達成された現在の精製方法に加えて更に効率的な精製法の確立が不可欠と考えられる。そこで、ジベレリンのアフィニティーカラムを用いた精製手段の活用についてもその可能性を検討した。表6-1には、本研究により検出され精製がすすめられた3種のGBPについて、これまでに報告されているGBPの性状と対比させて表した。20余年にわたるGBPの追求を通じて、どれ一つとして単離に至っているものは存在しないが、本研究により検出したそれぞれのGBPはいずれも類似するものが見あらず、受容体に関連するか否かの判定はともかくとして全く新しい知見と含んでいると考えられる。特に、アズキより検出したGBPは受容体の可能性を有しており、精製を進めるにつれてさらに有用な知見が得られるものと思われる。

このように本研究は、ターゲットとするGBPが生理的機能を有する受容体タンパク質である可能性を常に高めるべく、植物材料および結合活性における評価方法において多大の改良を加えたものである。それらの成果は今後、受容体を經由したシグナル伝達系の解明に向けての重要な情報を提供すると確信している。

参考文献

Abramycheva, N. Y., Babakov, A. V., Bilushi, S. V., Danilina, E. E. and Shevchenko, V. P. (1991). Comparison of the biological activity of fusicoccin in higher plants with its binding to plasma membranes. *Planta*, **183**: 315-320.

Abramycheva, N. Y., Nesterenko, M. V. and Babakov, A. V. (1993). Factors affecting the binding between fusicoccin and plasma membrane from maize roots. *Planta*, **189**: 301-305.

Aducci, P., Ballio, A., Fogliano, V., Fullone, M. R., Marra, M. and Proietti, N. (1993). Purification and photoaffinity labelling of fusicoccin receptors from corn. *European J. Biochem.*, **214**: 339-345.

Aducci, P., Coletta, M. and Marra, M. (1984). An improved scatchard analysis of fusicoccin binding to maize coleoptiles membranes. *Plant Sci. Lett.*, **33**: 187-193.

Allan, A. C., Fricker, M. D., Ward, J. L., Beale, M. H. and Trewavas, A. J. (1994). Two transduction pathways mediate rapid effects of abscisic acid in *Commelina* guard cells. *Plant Cell*, **6**: 1319-1328.

Anderson, B. E., Ward, J. M. and Schroeder, J. I. (1994). Evidence for an extracellular reception site for abscisic acid in *Commelina* guard cells. *Plant Physiol.*, **104**: 1177-1183.

Atzorn, R. and Weiler, E. W. (1983). The immunoassay of gibberellins I. Radioimmunoassays for the gibberellins A₁, A₃, A₄, A₇, A₉ and A₂₀. *Planta*, **159**: 1-6.

Ballio, A., Federico, R., Pessi, A. and Scalorbi, D. (1980). Fusicoccin binding sites in subcellular preparation of spinach leaves. *Plant Sci. Lett.*, **18**: 39-44.

Barbier, B. H., Ephritikhine, G., Klaemdt, D., Ghislain, M. and Guern, J. (1989). Functional evidence for an auxin receptor at the plasmalemma of tobacco mesophyll protoplasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **86**: 891-895.

Barbier, B. H., Ephritikhine, G., Klaemdt, D., Maurel, C., Palme, K., Shell, J. and Guern, J. (1991). Perception of the auxin signal at the plasma membrane of tobacco mesophyll protoplasts. *Plant J.*, **1**: 83-93.

Beale, M. H., Ward, J. L., Smith, S. J. and Hooley, R. (1992). A new approach to gibberellin perception in aleurone: novel, hydrophilic, membrane-impermeant, GA-sulphonic acid derivatives induce α -amylase formation. *Physiol. Plant.*, **85**: A136.

Beyer, E. M. (1979). Effect of silver ion, carbon dioxide and oxygen on ethylene action and metabolism. *Plant Physiol.*, **63**: 169-173.

- Brinegar, A. C., Stevens, A. and Fox, J. E. (1985). Biosynthesis and degradation of a wheat (*Triticum durum*) embryo cytokinin-binding protein during embryogenesis and germination. *Plant Physiol.*, **79**: 706-710.
- Brinegar, A. C., Cooper, G., Stevens, A., Hauer, C. R., Shabanowitz, J., Hunt, D. F., and Fox, J. E. (1988). Characterization of a benzyladenine binding-site peptide isolated from a wheat cytokinin-binding protein: Sequence analysis and identification of a single affinity-labeled histidine residue by mass spectrometry. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **85**: 5927-5931.
- Brown, J. C. and Jones, A. M. (1994). Mapping the auxin-binding site of auxin-binding protein 1. *J. Biol. Chem.*, **269**: 21136-21140.
- Burg, S. P. and Burg, E. A. (1967). Molecular requirements for the biological activity of ethylene. *Plant Physiol.*, **42**: 144-152.
- Caldwell, H.D. and Kuo, C. (1977). Purification of a chlamydia trachomatis-specific antigen by immunoadsorption with monospecific antibody. *J. Immunol.*, **118**: 437-441.
- Campos, N., Bako, L., Feldwisch, J., Schell, J. and Palme, K. (1992). A protein from maize labeled with azido-IAA has novel β -glucosidase activity. *Plant J.*, **2**: 675-684.
- Campos, N., Feldwisch, J., Zettl, R., Boland, W., Schell, J. and Palme, K. (1991). Identification of auxin-binding proteins using an improved assay for photoaffinity labeling with tritiated 5-N₃-7-indole-3-acetic acid. *Technique*, **3**: 69-75.
- Chang, C., Kwok, S. F., Bleecker, A. B. and Meyerowitz, E. M. (1993). *Arabidopsis* ethylene-response gene *ETR1*: similarity of product to two-component regulators. *Science*, **262**, 539-544.
- Cleveland, W. L., Wasserman, N. H., Sarangarajan, R., Penn, A. S. and Erlanger, B. F. (1983). Monoclonal antibodies to the acetylcholine receptor by a normally functioning auto-anti-idiotypic mechanism. *Nature*, **305**: 56-57.
- Cocucci, M. and Marre, E. (1991). Co-sedimentation of one form of plasma membrane proton-ATPase and of the fusicoccin receptor from radish microsomes. *Plant Sci.* **73**: 45-49.
- Cross, B. E. and Gatfield, I.L. (1971). New metabolites of *Gibberella fujikuroi*. Part. XVII. The partial synthesis of gibberellin A₁₅ norketone from 7-hydroxykaurenolide. *J. Chem. Soc.*, 1539-1541.
- Crozier, A. and Durley, R. C. (1983). Modern methods of analysis of gibberellins. In *The Biochemistry and Physiology of Gibberellins*, Vol. 1, (Ed. Crozier, A.), Praeger, New York, pp. 485-560.

Darginaviciene, J. V., Merkys, A. J., Vleviciene, R. R., Zemenas, J. A. and Maksimov, G. B. (1992). IAA-binding properties of the plasmalemma of wheat coleoptiles. *Soviet Plant Physiol.*, **39**: 151-157.

De Boer, A. H., Watson, B. A. and Cleland, R. E. (1989). Purification and identification of the fusicoicin-binding protein from oat root plasma membrane. *Plant Physiol.*, **89**: 250-259.

De Michelis, M. I., Rasi-Caldogno, F., Pugliarello, M. C. and Olivari, C. (1991). Fusicoicin binding to its plasma membrane receptor and activation of the plasma membrane H^+ -ATPase. II. Stimulation of H^+ -ATPase in a plasma membrane fraction purified by phase-partitioning. *Botanica Acta*, **104**: 265-271.

Dickmann, W., Venis, M. A. and Robinson, D. G. (1995). Auxins induce clustering of the auxin-binding protein at the surface of maize coleoptile protoplasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **92**: 3425-3429.

Douvas, A.S., Stumph, W.E., Reyes, P. and Tan, E.M. (1979). Isolation and characterization of nuclear ribonucleoprotein complexes using human anti-nuclear ribonucleoprotein antibodies. *J. Biol. Chem.*, **254**: 3608-3616.

Erion, J. L. and Fox, J. E. (1981). Purification and properties of a protein which binds cytokinin-active 6-substituted purines. *Plant Physiol.*, **67**: 156-162.

Feldwisch, J., Zettl, R., Campos, N. and Palme, K. (1995). Identification of a 23 kDa protein from maize photoaffinity-labelled with 5-azido-[7- H_3]indol-3-ylacetic acid. *Biochem. J.*, **305**: 853-857.

Feldwisch, J., Zettl, R., Hesse, F., Schell, J. and Palme, K. (1992). An auxin-binding protein is localized to the plasma membrane of maize coleoptile cells: Identification by photoaffinity labeling and purification of a 23-kDa polypeptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **89**: 475-479.

Feyerabend, M. and Weiler, E. W. (1988). Characterization and localization of fusicoicin-binding sites in leaf tissues probed with a novel radioligand. *Planta*, **174**: 115-122.

Foster, C. A. (1977). *Slender*: an accelerated extension growth mutant of barley. *Barley Genet. Newslett.*, **7**: 24-27.

Fuchs, Y. and Gertman, E. (1974). Insoluble antibody column for isolation and quantitative determination of gibberellins. *Plant Cell Physiol.*, **15**: 629-633.

Gale, M. D. and Marshall, G. A. (1975). The nature and genetic control of gibberellin insensitivity in dwarf wheat grain. *Heredity*, **35**: 55-65.

- 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.
- Goldman, S., Mawal, Y. R., Tanida, I. and Wu, R. (1994). Studies of a gibberellin-dependent DNA-binding protein related to the expression of a rice α -amylase gene. *Plant Sci.*, **99**: 75-88.
- 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-pl α -amylase gene promoter. *Plant Cell*, **7**: 1879-1891.
- Hall, M. A., Connern, C. P. K., Harpham, N. V. J., Ishizawa, K., Roveda-Hoyos, G., Raskin, L., Sanders, I. O., Smith, A. R., Turner, R. and Wood, C. K. (1990). Ethylene: receptors and action. In *Hormone Perception and Signal Transduction in Animals and Plants*, Vol. 44, (Eds. Roberts, J. A., Kirk, C. and Venis, M. A.), SEB Symposium, The Company of Biologist Ltd., Cambridge, pp. 87-110.
- Hamaguchi, N., Iwamura, H., and Fujita, T. (1985). Fluorescent anticytokinins as a probe for binding: Isolation of cytokinin-binding proteins from the soluble fraction and identification of a cytokinin-binding site on ribosomes of tobacco (*Nicotiana tabacum* cultivar Wisconsin No. 38) callus cells. *European J. Biochem.*, **153**: 565-572.
- Harberd, N. P. and Freeling, M. (1989). Genetics of dominant gibberellin-insensitive dwarfism in maize. *Genetics*, **121**: 827-838.
- Hasegawa, M., Nakajima, M., Takeda, K., Yamaguchi, I. and Murofushi, N. (1994). A novel gibberellin glucoside, 16 α ,17-dihydroxy-16,17-dihydrogibberellin A₄-17-O- β -D-glucopyranoside, from rice anthers. *Phytochemistry*, **37**: 629-634.
- Hertel, R., Thomson, K.-S. and Russo, V. E. A. (1972). In vitro auxin binding to particulate cell fractions from corn coleoptiles. *Planta*, **107**: 325-340.
- Hertel, R. (1995). Auxin binding protein 1 is a red herring. *J. Exp. Bot.*, **46**: 461-462.
- Hesse, T., Feldwisch, J., Balshuesemann, D., Bauw, G., Puype, M., Vandekerckhove, J., Loebler, M., Klaembt, D., Schell, J., and Palme, K. (1989). Molecular cloning and structural analysis of a gene from *Zea mays* (L.) coding for a putative receptor for the plant hormone auxin. *Embo J.*, **8**: 2453-2462.
- Hicks, G. R., Rayle, D. L., Jones, A. M. and Lomax, T. L. (1989a). Specific photoaffinity labeling of two plasma membrane polypeptides with an azido auxin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **86**: 4948-4952.
- Hicks, G. R., Rayle, D. L. and Lomax, T. L. (1989b). The diageotropica mutant of tomato lacks high specific activity auxin binding sites. *Science*, **245**: 52-54.

Hoad, G. V. (1983). Gibberellin bioassays and structure-activity relationships. In Biochem. Physiol. Gibberellins vol.2, (Ed. Crozier, A.), Praeger, New York, pp. 57-94.

Hollanderczytko, H. and Weiler, E. W. (1994). Isolation and biochemical characterization of fusicoccin-insensitive variant lines of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Planta*, **195**: 188-194.

Hooley, R., Beale, M. H. and Smith, S. J. (1990). Gibberellin perception in the *Avena fatua* aleurone. *Symp. Soc. Exp. Biol. Plant*, **44**: 79-86.

Hooley, R., Beale, M. H. and Smith, S. J. (1991). Gibberellin perception at the plasma membrane of *Avena fatua* aleurone protoplasts. *Planta*, **183**: 274-280.

Hooley, R., Smith, S. J., Beale, M. H. and Walker, R. P. (1993). *In vivo* photoaffinity labelling of gibberellin-binding proteins in *Avena fatua* aleurone. *Aust. J. Plant Physiol.*, **20**: 573-584.

Hornberg, C. and Weiler, E. W. (1984). High-affinity binding sites for abscisic acid on the plasmalemma of *Vicia faba* guard cells. *Nature*, **310**: 321-324.

House, H. O. and Melillo, D. G. (1973). Perhydroindan derivatives. XVI. The synthesis of racemic epiallo-gibberic acid. *J. Org. Chem.*, **38**: 1398-1403.

Inohara, N., Shimomura, S., Fukui, T., and Futai, M. (1989). Auxin-binding protein located in the endoplasmic reticulum of maize shoots: Molecular cloning and complete primary structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **86**: 3564-3568.

Jacobsen, S. E. and Olszewski, N. E. (1993). Mutations at the *SPINDLY* locus of *Arabidopsis* alter gibberellin signal transduction. *Plant Cell*, **5**: 887-896.

Jelsem, C. L., Ruddat, M., Morre, D. J. and Williamson, F. A. (1977). Specific binding of gibberellin A₁ to aleurone grain fractions from wheat endosperm. *Plant Cell Physiol.*, **18**: 1009-1019.

Jones, A. M. and Herman, E. M. (1993). KDEL-containing auxin-binding protein is secreted to the plasma membrane and cell wall. *Plant Physiol.*, **101**: 595-606.

Jones, A. M. and Venis, M. A. (1989). Photoaffinity labeling of IAA-binding proteins in maize. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **86**: 6153-6156.

Jones, M. G. (1987). Gibberellins and the *procera* mutant of tomato. *Planta*, **172**: 280-284.

Keith, B., Brown, S. and Srivastava, L. M. (1982). *In vivo* binding of gibberellin A₄ to extracts of cucumber measured by using DEAE-cellulose filters. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **79**: 1515-1519.

- Keith, B., Foster, N. A., Bonnettemaker, M. and Srivastava, L. M. (1981). *In vitro* gibberellin A₄ binding to extracts of cucumber hypocotyls. *Plant Physiol.*, **68**: 344-348.
- Keith, B. and Rappaport, L. (1987). *In vitro* gibberellin A₁ binding in *Zea mays* L. *Plant Physiol.*, **85**: 934-941.
- Keith, B. and Srivastava, L. M. (1980). *In vivo* binding of gibberellin A₁ in dwarf pea epicotyls. *Plant Physiol.*, **66**: 962-967.
- Kikuchi, M., Imaseki, H. and Sukai, S. (1989). Modulation of gene expression in isolated nuclei by auxin-binding proteins. *Plant Cell Physiol.*, **30**: 765-773.
- Kim, J. K., Cao, J. and Wu, R. (1992). Regulation and interaction of multiple protein factors with the proximal promoter regions of a rice high pl α -amylase gene. *Mol. Gen. Genet.*, **232**: 383-393.
- Knox, J. P., Peart, J. and Neill, S. J. (1995). Identification of novel cell surface epitopes using a leaf epidermal-strip assay system. *Planta*, **196**: 266-270.
- Korthout, H. A. A. J. and Deboer, A. H. (1994). A fusicoccin binding protein belongs to the family of 14-3-3 brain protein homologs. *Plant Cell*, **6**: 1681-1692.
- Kulaeva, O. N., Karavaiko, N. N., Moshkov, I. E., Selivankina, S. Y. and Novikova, G. V. (1990). Isolation of a protein with cytokinin-receptor properties by means of anti-idiotypic antibodies. *FEBS*, **261**: 410-412.
- Kuroguchi, S., Yamaguchi, I., Feyerabend, M., Murofushi, N., Takahashi, N., Kuyama, S. and Weiler, E. W. (1987). A radioimmunoassay for the dimethyl esters of GA₂₄ and GA₁₉. *Phytochemistry*, **26**: 2895-2900.
- Lashbrook, C. C., Keith, B. and Rappaport, L. (1987). *In vitro* gibberellin A₁ binding to a soluble fraction from dwarf pea epicotyls. In *Molecular Biology of Plant Growth Control*, (Ed. Fox, E. J. and Jacobs, M), Alan R. Liss, New York, pp. 299-308.
- Laemmli, U. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. *Nature*. **227**: 680-685.
- Letarte-Muirhead, M., Barclay, A. N. and Williams, A. F. (1975). Purification of the Thy-1 molecule, a major cell-surface glycoprotein of rat thymocyte. *Biochem. J.*, **151**: 685-697.
- Liu, Z.-H. and Srivastava, L. M. (1987). *In vitro* binding of gibberellin A₄ in epicotyls of dwarf pea and tall pea. In *Molecular Biology of Plant Growth Control*, (Ed. Fox, E. J. and Jacobs, M), Alan R. Liss, New York, pp. 315-322.

- Liu, Z.-H. and Lee, B.-H. (1995). *In vitro* binding of gibberellin A₄ in epicotyls of dwarf pea. *Bot. Bull. Acad. Sin.*, **36**: 73-79.
- Liu, Z. H. and Ger, M. J. (1995). Partial purification of gibberellin-binding proteins from dwarf pea. *Plant Physiol. Biochem.*, **33**: 675-681.
- Lo Schiavo, F., Filippini, F., Cozzani, F., Valhøne, D. and Terzi, M. (1991). Modulation of auxin-binding proteins in cell suspension. I. differential responses of carrot embryo cultures. *Plant Physiol.*, **97**: 60-64.
- Loebler, M. and Klaemdt, D. (1985). Auxin-binding protein from coleoptile membranes of corn (*Zea mays* cv. Mutin): 1. Purification by immunological methods and characterization. *J. Biol. Chem.*, **260**: 9848-9853.
- MacDonald, E. M. S. and Morris, R. O. (1985). Isolation of cytokinins by immunoaffinity chromatography and analysis by high-performance liquid chromatography radioimmunoassay. *Methods Enzymol.*, **110**: 347-358.
- MacDonald, H., Henderson, J., Napier, R. M., Venis, M. A., Hawes, C. and Lazarus, C. M. (1994). Authentic processing and targeting of active maize auxin-binding protein in the baculovirus expression system. *Plant Physiol.*, **105**: 1049-1057.
- MacDonald, H., Jones, A. M. and King, P. J. (1991). Photoaffinity labeling of soluble auxin-binding proteins. *J. Biol. Chem.* **266**: 7393-7399.
- Mertens, R., Stuning, M. and Weiler, E. W. (1982). Metabolism of tritiated enantiomers of abscisic acid prepared by immunoaffinity chromatography. *Naturwissenschaften*, **69**: 595-596.
- Meyer, C., Feyerabend, M. and Weiler, E. W. (1989). Fusicoccin-binding proteins in *Arabidopsis thaliana* L. Heyn. Characterization, solubilization and photoaffinity labelling. *Plant Physiol.*, **89**: 692-699.
- Mitsui, S. and Sugiura, M. (1993a). Purification and properties of cytokinin-binding proteins from tobacco leaves. *Plant Cell Physiol.*, **34**: 543-547.
- Mitsui, S., Wakasugi, T., and Sugiura, M. (1993b). A cDNA encoding the 57 kDa subunit of a cytokinin-binding protein complex from tobacco: The subunit has high homology to S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase. *Plant Cell Physiol.*, **34**: 1089-1096.
- Mizel, S. B., Dukovich, M. and Rothstein, J. (1983). Preparation of goat antibodies against interleukin 1: Use of an immunoadsorbent to purify interleukin 1. *J. Immunol.*, **131**: 1834-1837.
- Momotani, E. and Tsuji, H. (1992). Isolation and characterization of a cytokinin-binding protein from the water-soluble fraction of tobacco leaves. *Plant Cell Physiol.*, **33**: 407-412.

- Movicar, J. P., Kunitake, S. T., Hamilton, R. L. and Kane, J. P. (1984). Characteristics of human lipoproteins isolated by selected-affinity immunosorption of apolipoprotein A-I. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**: 1356-1360.
- Nagata, R., Kawachi, E., Hashimoto, Y. and Shudo, K. (1993). Cytokinin-specific binding protein in etiolated mung bean seedlings. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **191**: 543-549.
- Nakajima, M., Sakai, S., Kanazawa, K., Kizawa, S., Yamaguchi, I., Takahashi, N. and Murofushi, N. (1993). Partial purification of a soluble gibberellin-binding protein from mung bean hypocotyls. *Plant Cell Physiol.*, **34**: 289-296.
- Nagatani, A., Yamamoto, K. T., Furuya, M., Fukumoto, T. and Yamashita, A. (1984). Production and characterization of monoclonal antibodies which distinguish different surface structures of pea (*Pisum sativum* cv. Alaska) phytochrome. *Plant Cell Physiol.*, **25**: 1059-1068.
- Napier, R. M., Fowke, L. C., Hawes, C., Lewis, M. and Pelham, H. R. B. (1992). Immunological evidence that plants use both HDEL and KDEL for targeting proteins to the endoplasmic reticulum. *J. Cell Sci.*, **102**: 261-271.
- Napier, R. M., Venis, M. A., Bolton, M. A., Richardson, L. I. and Butcher, G. W. (1988). Preparation and characterization of monoclonal and polyclonal antibodies to maize membrane auxin-binding protein. *Planta*, **176**: 519-526.
- Oecking, C. and Weiler, E. W. (1991). Characterization and purification of fusicoccin-binding complex from plasma membrane of *Commelina communis*. *European J. Biochem.*, **199**: 685-689.
- Ohmiya, A., Kikuchi, M., Sakai, S. and Hayashi, T. (1993). Purification and properties of an auxin-binding protein from the shoot apex of peach tree. *Plant Cell Physiol.*, **34**: 177-183.
- Ou, L. T. M., Turgeon, R. and Wu, R. (1988). Interaction of a gibberellin-induced factor with the upstream region of and alpha-amylase gene in rice aleurone tissue. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **85**: 6366-6369.
- Peng, J. and Harberd, N. P. (1993). Derivative alleles of the *Arabidopsis* gibberellin-insensitive (*gai*) mutation confer a wild-type phenotype. *Plant Cell*, **5**: 351-360.
- Perras, M. R., Abrams, S. R. and Balsevich, J. J. (1994). Characterization of an abscisic acid carrier in suspension-cultured barley cells. *J. Exp. Bot.*, **45**: 1565-1573.
- Potts, W. C., Reid, J. B. and Murfet, I. C. (1985). Internode length in *Pisum sativum*: Gibberellins and the slender phenotype. *Physiol. Plant.*, **63**: 357-364.

Prasad, P. and Jones, A. M. (1991). Putative receptor for the plant growth hormone auxin identified and characterized by anti-idiotypic antibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **88**: 5479-5483.

Radermacher, E. and Klaemdt, D. (1993). Auxin-dependent growth and auxin-binding proteins in primary roots and root hairs of corn (*Zea mays* L.). *J. Plant Physiol.*, **141**: 698-703.

Reinard, T. and Jacobsen, H.-J. (1995). A soluble high affinity auxin-binding protein from pea apex. *J. Plant Physiol.*, **147**: 132-138.

Reynolds, G. J. and Hooley, R. (1992). cDNA cloning of a tetraubiquitin gene, and expression of ubiquitin-containing transcripts, in aleurone layers of *Avena fatua*. *Plant Mol. Biol.*, **20**: 753-758.

Robb, R. J. and Strominger, J. L. (1976). Rapid purification of detergent-solubilized HLA antigen by affinity chromatography employing anti- β 2-microglobulin serum. *J. Biol. Chem.*, **251**: 5427-5428.

Romanov, G. A., Taran, V. Y., Chvojka, L. and Kulaeva, O. N. (1988). Receptor-like cytokinin-binding protein(s) from barley leaves. *J. Plant Growth Regul.*, **7**: 1-18.

Rushton, P. J., Hooley, R. and Lazarus, C. M. (1992). Aleurone nuclear proteins bind to similar elements in the promoter regions of two gibberellin-regulated alpha-amylase genes. *Plant Mol. Biol.*, **19**: 891-901.

Sakai, S. and Hanagata, T. (1983). Purification of an auxin-binding protein from etiolated mung bean seedlings by affinity chromatography. *Plant Cell Physiol.*, **24**: 685-693.

Sakai, S. (1985). Auxin-binding protein in etiolated mung bean seedlings: purification and properties of auxin-binding protein-II. *Plant Cell Physiol.*, **26**: 185-192.

Sakai, S. and Kamei, N. (1992). Purification of a soluble cytokinin-binding protein from etiolated mung bean seedlings. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **56**: 504-507.

Sakai, S., Nakajima, M. and Yamaguchi, I. (1994). Isolation of gibberellin-binding proteins by affinity chromatography. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **58**: 963-964.

Sanders, I. O., Harpnam, N. V. J., Raskin, I., Smith, A. R. and Hall, M. A. (1991). Ethylene binding in wild type and mutant *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Ann. Bot.*, **68**: 97-103.

Sayavedra-Soto, L. A., Durley, R. C., Trione, E. J. and Morris, R. O. (1988). Identification of cytokinins in young wheat spikes (*Triticum aestivum* cv. Chinese Spring). *Plant Growth Regul.*, **7**: 169-178.

- Schaller, G. E. and Bleecker, A. B. (1995). Ethylene-binding sites generated in yeast expressing the *arabidopsis ETR1* gene. *Science*, **270**: 1809-1811.
- Schreiber, M., Fogelfeld, L., Souroujon, M. C., Kohen, F. and Fuchs, S. (1983). Antibodies to spiriperidol and their anti-idiotypes as probes for studying dopamine receptors. *Life Sci.*, **33**: 1519-1526.
- Schulz, S., Oelgemöeller, E. and Weiler, E. W. (1990). Fusicoccin action in cell suspension culture of *Corydalis sempervirens*. *Planta*, **183**: 83-91.
- Sechley, K. A. and Srivastava, L. M. (1991). Gibberellin-enhanced transcription by isolated nuclei from cucumber hypocotyls. *Physiol. Plant.*, **82**: 543-550.
- Shimomura, S., Sotobayashi, F., Futai, M. and Fukui, T. (1986). Purification and properties of an auxin-binding protein from maize shoot membranes. *J. Biochem.*, **99**: 1513-1524.
- Shibaoka, H. (1972). Gibberellin-colchicine interaction in elongation of azuki bean epicotyl sections. *Plant Cell Physiol.*, **13**: 461-469.
- Sisler, E. C. and Wood, C. (1988). Competition of unsaturated compounds with ethylene for binding and action in plants. *Plant Growth Regul.*, **7**: 181-191.
- Stoddard, J. L. (1979a). Interaction of [³H] gibberellin A₁ with a sub-cellular fraction from lettuce (*Lactuca sativa* L.) hypocotyls. I. Kinetics of labelling. *Planta*, **146**: 353-361.
- Stoddard, J. L. (1979b). Interaction of [³H] gibberellin A₁ with a sub-cellular fraction from lettuce (*Lactuca sativa* L.) hypocotyls. II. Stability and properties of the association. *Planta* **146**: 363-368.
- Stoddard, J. L., Breidenbach, W., Nadeau, R. and Rappaport, L. (1974). Selective binding of [³H] gibberellin A₁ by protein fractions from dwarf pea epicotyls. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **71**: 3255-3259.
- Stout, R. G. (1988). Fusicoccin activity and binding in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.*, **88**: 999-1001.
- Sundberg, B., Sandberg, G. and Crozier, A. (1986). Purification of indole-3-acetic acid in plant extracts by immunoaffinity chromatography. *Phytochemistry*, **25**: 295-298.
- Sutliff, T. D., Lanahan, M. B. and Ho, T. H. (1993). Gibberellin treatment stimulates nuclear factor binding to the gibberellin response complex in a barley alpha-amylase promoter. *Plant Cell*, **5**: 1681-1692.

Tevzadze, N. N. and Dzhokhadze, D. I. (1991). Gibberellin-binding proteins from cell nuclei of bean epicotyls and their effect on transcription in nuclei. *Fiziologiya Rastenii*, **38**: 890-896.

Thiel, G., Blatt, M. R., Fricker, M. D., White, I. R. and Millner, P. (1993). Modulation of K⁺ channels in *Vicia* stomatal guard cells by peptide homologs to the auxin-binding protein C terminus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **90**: 11493-11497.

Tian, H. C., Klaemdt, D. and Jones, A. M. (1995). Auxin-binding protein 1 does not bind auxin within the endoplasmic reticulum despite this being the predominant subcellular location for this hormone receptor. *J. Biol. Chem.*, **270**: 26962-26969.

Tillmann, U., Viola, G., Kayser, B., Siemeister, G., Hesse, T., Palme, K., Loebler, M., and Klaemdt, D. (1989). Complementary DNA clones of the auxin-binding protein from corn coleoptiles (*Zea mays* L.): Isolation and characterization by immunological methods. *EMBO J.*, **8**: 2463-2468.

Venis, M. A. (1977). Solubilisation and partial purification of auxin-binding sites of corn membranes. *Nature*, **66**: 268-269.

Venis, M. (1984). Hormone-binding studies and the misuse of precipitation assay. *Planta*, **162**: 502-502.

Venis, M. A., Napier, R. M., Barbier, B. H., Maurel, C., Perrot, R. C. and Guern, J. (1992). Antibodies to a peptide from the maize auxin-binding protein have auxin agonist activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **89**: 7208-7212.

Walker, R. P., Waterworth, W. M., Beale, M. H. and Hooley, R. (1994). Gibberellin-photoaffinity labelling of wild oat (*Avena fatua* L.) aleurone protoplasts. *Plant Growth Regul.*, **15**: 271-279.

Wasserman, N. H., Penn, A. S., Freimuth, P. I., Treptow, N., Wentzel, S., Cleveland, W. L. and Erlanger, B. F. (1982). Anti-idiotypic route to antiacetylcholine receptor antibodies and experimental myasthenia gravis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **79**: 4810-4812.

Weiler, E. W. and Wiczorek, U. (1981). Determination of femtomol quantities of gibberellic acid by radioimmunoassay. *Planta*, **152**: 159-167.

Wilkinson, J. O., Lanahan, M. B., Yen, H.-C., Giovannoni, J. J. and Klee, H. J. (1995). An ethylene-inducible component of signal transduction encoded by *Never-ripe*. *Science*, **270**: 1807-1809.

Yalpani, N. and Srivastava, L. M. (1985). Competition for *in vitro* tritiated gibberellin A₄ binding in cucumber by gibberellins and their derivatives. *Plant Physiol.*, **79**: 963-967.

Yalpani, N., Suttle, J. C., Hultstrand, J. F. and Rodaway, S. J. (1989). Competition for *in vitro* tritiated gibberellin A₄ binding in cucumber by substituted phthalimides: Comparison with *in vivo* gibberellin-like activity. *Plant Physiol.*, **91**: 823-828.

Yamaguchi, I., Nakagawa, R., Kurogochi, S., Murofushi, N., Takahashi, N. and Weiler, E. W. (1987). Radioimmunoassay of gibberellins A₅ and A₂₀. *Plant Cell Physiol.*, **28**: 815-824.

Yamaguchi, I., Nakazawa, H., Nakagawa, R., Suzuki, Y., Kurogochi, S., Murofushi, N., Takahashi, N. and Weiler, E. W. (1990). Identification and semi-quantification of gibberellins from the pollen and anthers of *Zea mays* by immunoassay and GC/MS. *Plant Cell Physiol.*, **31**: 1063-1069.

Yoshida, K. and Takegami, T. (1977). Isolation of cytokinin-binding protein from tobacco leaves by bioaffinity chromatography and its partial characterization. *J. Biochem.*, **81**: 791-799.

Zaina, S., Reggiani, R. and Bertani, A. (1990). Preliminary evidence for involvement of GTP-binding protein(s) in auxin signal transduction in rice (*Oryza sativa* L.) coleoptile. *J. Plant Physiol.*, **136**: 653-658.

Zettl, R., Schell, J. and Palme, K. (1994). Photoaffinity labeling of *Arabidopsis thaliana* plasma membrane vesicles by 5-azido-(7-³H)indole-3-acetic acid: Identification of a glutathione S-transferase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **91**: 689-693.

■謝 辞■

本研究を行うにあたり多くの方々のご助言、ご協力をいただきました。

モノクローナル抗体の調製に際しては、理化学研究所・国際フロンティア・植物制御研究チームの古谷 雅樹・東京大学名誉教授、長谷 あきら博士に施設の提供と、調製法をご教授していただきました。

ヤエナリGBPの検出・精製に関しては、筑波大学生物科学系の酒井 慎吾教授にご指導いただきました。また、ヤエナリGBPのアミノ酸配列分析に関しては東京大学農学部片岡 宏誌助教授にお世話になりました。

ゲル濾過カラムを用いたGBP検出系の確立に際しては、農水省農業生物資源研究所の下村 正二博士、東京大学薬学部首藤 紘一教授、永田 龍二博士、ならびに東京大学分子細胞生物学研究所の橋本 祐一助教授に有益なご助言をいただきました。

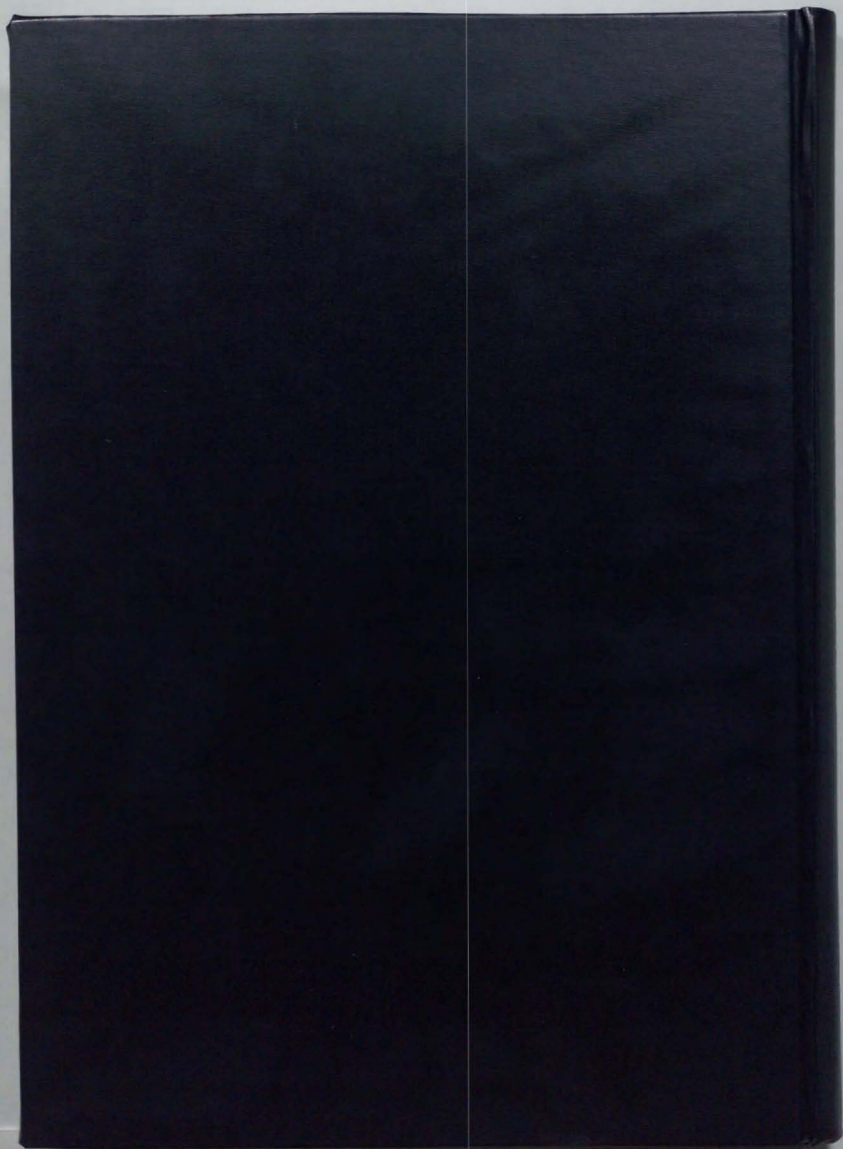
アズキ幼植物体の生育および上胚軸切片を用いた伸長生理実験に関しては大阪大学理学部柴岡 弘郎教授にご助言をいただきました。

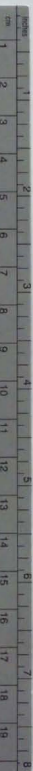
そして、研究全般にわたり方向性をご指示いただくと共に、様々な面でご支持していただきました、高橋 信孝・東大名誉教授、室伏 旭教授、直接ご指導いただきました山口 五十磨助教授に感謝致します。また、各テーマにおいて共に研究をすすめた生物制御化学研究室(旧農薬学研究室)に在籍された皆さんに感謝致します。

最後に、研究への夢を応援してくれた両父母、そして妻・裕佳子に感謝いたします。本研究に関連する領域が、今後、更に発展していくよう努力してまいりたいと思います。ありがとうございました。

1996年 9月

中 嶋 正 敏





Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TM Kodak

Blue Cyan Green Yellow Red Magenta White 3/Color Black



Kodak Gray Scale



© Kodak, 2007 TM Kodak

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

