

氏名・(本籍)	たき 瀧	ざわ 澤	みのる 稔
学位の種類	理	学	博 士
学位記番号	理博第1226号		
学位授与年月日	平成3年3月28日		
学位授与の要件	学位規則第5条第1項該当		
研究科専攻	東北大学大学院理学研究科 (博士課程) 生物学専攻		
学位論文題目	ニンジン培養細胞のオーキシン結合タンパク質に関する研究		
論文審査委員	(主査)		
	教 授 駒 嶺	穆	教 授 広 瀬 忠 樹 助 教 授 福 田 裕 穂

論 文 目 次

略語表

序 章

参考文献

第一章 ニンジン培養細胞のオーキシン結合タンパク質の精製

序 論

材料と方法

結 果

考 察

参考文献

表

図

第二章 ニンジンオーキシン結合タンパク質 ABPC1 の量的変動と局在

序 論

材料と方法

結 果

考 察

参考文献

表

図

第三章 ニンジンオーキシシン結合タンパク質 ABPC1 の cDNA クローニングと遺伝子発現

序 論

材料と方法

結 果

考 察

参考文献

図

まとめと展望

謝 辞

論文内容要旨

序章

植物ホルモンの一つであるオーキシンは、植物の成長、増殖、分化などの制御において重要な役割を果たしており、多くの研究者によってその作用機作の研究がなされてきた。しかし、その分子レベルでの作用機作及び細胞内への情報伝達機構は、オーキシンの発見以来半世紀以上経た今なお解明されていない。

植物細胞が分子量200ほどのオーキシン類を他の低分子から識別する能力を持つことを説明するために、タンパク質性の受容体の存在が考えられている。このようなオーキシン受容体の研究は1960年代から行われ、オーキシン結合タンパク質の存在が多種類の植物において報告されている。そのうち、精製され、機能に関する研究もある程度進んでいるものは数種類しかなく、さらに多くの実験系でオーキシン結合タンパク質の単離精製を行い、その作用について調べる必要がある。

オーキシンの作用機構の研究をするとき、オーキシンに対する植物細胞の反応がよく制御されている実験系を用いることが重要である。培養細胞は比較的均一な細胞集団から成り、培地中のオーキシンによってその反応が制御できるのでオーキシンの作用機構の研究に適していると考えられる。ニンジン懸濁培養細胞は、オーキシンにより増殖が誘導され、オーキシン除去により不定胚あるいは二次代謝産物であるアントシアニンの合成を誘導することができるので、オーキシンの作用機構を調べるのに優れた実験系であると考えられる。

本研究はこの培養細胞系を用いてオーキシン情報の受容機構を明らかにすることを目的とした。その為にまず、他の系でオーキシン受容体の可能性が強く示唆されてきているオーキシン結合タンパク質に関する研究を行った。

第一章 ニンジン培養細胞のオーキシン結合タンパク質の精製

ニンジン培養細胞におけるオーキシンの作用機構の解明の第一段階として、オーキシン存在下で増殖しているニンジン懸濁培養細胞からオーキシン結合タンパク質の精製を行った。粗タンパク質画分に対して2,4-D結合 Sepharose 4B によるアフィニティークロマトグラフィーを行いオーキシンに対して結合性が強いと考えられるタンパク質の画分を集め、そのうち主要なもの1種類を CM Sephadex C-50 カラムによる陽イオン交換クロマトグラフィーを行うことによって精製し、ABPC1 (auxin-binding protein carrot 1) と名付けた。ABPC1 の分子量は98,000で、サブユニットの分子量は46,000であり、同一のサブユニット2個からなると考えられた。現在までに精製が報告されているオーキシン結合タンパク質のどれとも分子量、サブユニット構造が異なるのでこれらのオーキシン結合タンパク質とは異なる新しいオーキシン結合タンパク質であると考えられた。ABPC1 の2,4-D に対する解離定数は $7.7 \times 10^{-6} \text{M}$ であり結合部位数はタンパク質 1 mg あたり $1.2 \times 10^{-8} \text{mol}$ であった。ABPC1 の分子量98,000からタンパク

質1分子あたり1分子の2,4-Dが結合すると計算された。2,4-DとABPC1の結合はオーキシンや抗オーキシンでは強く阻害されたがオーキシン活性がない類似物ではあまり阻害されずオーキシンに対する特異性が示された。また、ABPC1と2,4-Dとの結合は可逆的であった。以上のことよりABPC1はオーキシン受容体としての性質を持つと考えられた。

第二章 ニンジンオーキシン結合タンパク質のABPC1の量的変動と局在

精製したABPC1をウサギに注射しABPC1に対する抗体を作成した。抗血清からABPC1タンパク質を用いて抗体を精製することによって、ABPC1を特異的に認識する抗体を得ることができた。この抗ABPC1抗体を用いてABPC1の細胞内局在について調べた。その結果、1)細胞を緩衝液中で破碎し超遠心によって膜画分を分離した場合、低塩濃度の緩衝液を用いると膜画分中にABPC1が存在していたが高塩濃度のものでは検出されなかった。2)また、プロトプラスト中にはABPC1はほとんど存在しなかった。3)さらに細胞を緩衝液や培地で洗浄するとABPC1が溶出された。以上のことよりABPC1は原形質膜の外側(細胞壁側)に弱く結合しているか、細胞壁中に存在すると考えられた。

ニンジン培養細胞の培養過程でのABPC1量の変動について調べた。ABPC1はオーキシン存在下で継代している細胞では常に存在し、増殖過程ではあまり変動しなかった。不定胚形成誘導時には急激に減少し検出できなくなった。それに対し、アントシアニン合成誘導時にはABPC1の存在量が著しく増加した。また幼植物体中では根に多く存在した。以上のことからABPC1の存在量は細胞のタイプや器官によって異なり、発現に特異性のある事が示された。

アントシアニン合成は2,4-Dによって抑制されるが、このときにABPC1が作用している可能性を調べるためにアントシアニン合成が誘導されている細胞を緩衝液で洗浄し、細胞中のABPC1を除いた。そして、その後2,4-Dを与え、アントシアニン合成の阻害を行った。コントロールではアントシアニン合成が阻害されたが、EDTAを含む緩衝液で洗浄しABPC1を除去した細胞ではオーキシンによるアントシアニン合成阻害が抑えられた。このことから、2,4-Dによるアントシアニン合成抑制に、このABPC1が働いている可能性が示唆された。

2,4-Dが細胞からのABPC1の溶出に効果があるかどうか調べた。アントシアニンを合成している細胞では、2,4-Dを含む培地によりABPC1が多く溶出された。トウモロコシのオーキシン結合タンパク質において、オーキシンと結合することでそのタンパク質の立体構造が変化することが知られており、ABPC1は2,4-Dと結合することによって立体構造が変化し、それによって原形質膜との結合性が弱くなり溶出され易くなった可能性が考えられた。

第三章 ニンジンオーキシン結合タンパク質ABPC1のcDNAクローニングと遺伝子発現

抗ABPC1抗体を用いてニンジン幼植物体の根のcDNAライブラリーに対してイムノスクリーニングを行った。約80,000個のブラークをスクリーニングし2個のクローンを得た。この

クローン同士はクロスハイブリダイズし同一の mRNA に由来することがわかった。インサートの長い方の cDNA をプラスミドベクターにサブクローニングし、pABPC1 と名付けた。pABPC1 の一部の塩基配列を決定し、EMBL 核酸データベース (release 23.0) 及び SWISS タンパク質データベース (release14.0) を検索したが、pABPC1 と有意なホモロジーのある配列は見いだされなかった。

得られた cDNA をプローブとして用い ABPC1 の mRNA の発現について調べた。ニンジン幼植物体の各器官での ABPC1 の mRNA の発現は、第二章で述べた ABPC1 タンパク質の発現とは異なり、これらの器官における ABPC1 の転写後の調節が異なることが示唆された。継代培養時及び不定胚形成誘導時には、ABPC1 の mRNA 量の変動は第二章で示された ABPC1 タンパク質の変動と同様であった。このことから継代培養時と不定胚形成誘導時には、ABPC1 タンパク質量は mRNA レベルで制御されていると考えられた。アントシアニン合成時には、ABPC1 タンパク質量は誘導後急速に増加したが、ABPC1 の mRNA 量は誘導開始時に最も多く、培養にともなって減少した。したがってアントシアニン合成誘導時における ABPC1 量の変動は転写レベルよりもむしろ翻訳レベルまたは翻訳後の調節を受けていると考えられた。

まとめと展望

本研究はニンジン懸濁培養細胞におけるオーキシンの作用機構を解明することを目的として、オーキシン結合タンパク質の研究を行った。オーキシン存在下で継代している細胞から、2,4-D のアフィニティークロマトグラフィーを用いてオーキシン結合タンパク質 1 種類を精製し ABPC1 と名付けた。精製した ABPC1 をウサギに注射し ABPC1 に対する抗体を作成した。その抗体を用いて ABPC1 の cDNA のクローニングを行った。精製した ABPC1、抗 ABPC1 抗体、ABPC1cDNA を用いた研究から ABPC1 はオーキシンの受容体である可能性が高いと考えられた。さらに、ABPC1 はオーキシンによるアントシアニン合成の阻害に関与することが示唆された。

今後、精製した ABPC1、抗 ABPC1 抗体、ABPC1cDNA を用いた研究をさらに行うことによって ABPC1 の機能の解析をする事ができると考えられる。そして ABPC1 を通してのオーキシンの作用機構を解明できると考えられる。

論文審査の結果の要旨

本論文はニンジン懸濁培養細胞におけるオーキシンの作用機構，特にオーキシンの受容機構を解明することを目的としたものである。

一般に，オーキシンの情報はタンパク質性の受容体を介して伝達されると考えられており，受容体の可能性があるオーキシン結合タンパク質の存在が報告されている。そこで，ニンジン懸濁培養細胞から，2,4-Dのアフィニティークロマトグラフィーを用いてオーキシン結合タンパク質を精製し ABPC1 と名付けた。ABPC1 の分子量は98,000で，サブユニットの分子量は46,000であった。ABPC1 の2,4-D に対する解離定数は $7.7 \times 10^{-6} \text{M}$ であり，結合部位数はタンパク質1分子あたり1であると計算された。2,4-D と ABPC1 の結合は可逆的であり，オーキシンに対する特異性が示された。

精製した ABPC1 をウサギに注射し ABPC1 に対する抗体を作成した。この抗 ABPC1 抗体を用いて ABPC1 の細胞内局在について調べた結果，ABPC1 は原形質膜の外側（細胞壁側）に弱く結合しているか，細胞壁中に存在すると考えられた。

ニンジン培養細胞の培養過程での ABPC1 量の変動について調べたところ，ABPC1 は増殖過程ではあまり変動しなかったが不定胚形成誘導時には急激に減少し検出できなくなった。それに対し，アントシアニン合成誘導時には ABPC1 の存在量が著しく増加した。また幼植物体中では根に多く存在した。

細胞を EDTA を含む緩衝液で洗浄し ABPC1 を除去するとオーキシンによるアントシアニン合成阻害が抑えられた。

抗 ABPC1 抗体を用いて ABPC1 の cDNA のクローニングを行い，得られた cDNA をプローブとして用い ABPC1 の mRNA の発現について調べた。その結果，継代培養時と不定胚形成誘導時には，ABPC1 タンパク質量は mRNA レベルで制御されていると考えられたが，アントシアニン合成誘導時における ABPC1 量の変動は翻訳レベルまたは翻訳後の調節を受けていると考えられた。以上の研究より ABPC1 はオーキシンによるアントシアニン合成の阻害に関与するオーキシンの受容体である可能性が示唆された。

これらの結果は，植物生理学における重要な新知見で，博士論文の内容に値するものである。以上，瀧澤稔提出の論文は，本人が自立して研究活動を行うに必要な高度な研究能力と学識を有することを示している。

よって，瀧澤稔提出の論文は理学博士の学位論文として合格と認める。