

氏名(本籍)	菅谷純子(千葉県)		
学位の種類	博士(理学)		
学位記番号	博乙第1,172号		
学位授与年月日	平成8年3月25日		
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当		
審査研究科	生物科学研究科		
学位論文題目	Biochemical Analysis of Auxin-Binding Proteins Purified from Etiolated Mung Bean Hypocotyls (黄化ヤエナリ胚軸から精製したオーキシン結合タンパク質の生化学的解析)		
主査	筑波大学教授	理学博士	藤伊正
副査	筑波大学教授	農学博士	酒井慎吾
副査	筑波大学教授	農学博士	田仲可昌
副査	筑波大学教授	理学博士	平林民雄

## 論文の要旨

植物ホルモンの一種であるオーキシンは植物細胞内において、受容体(タンパク質)との結合を介して生理作用を引き起こすと考えられている。本論文は、新たなオーキシン結合タンパク質(ABP)の単離・精製とその特性解析を行い、オーキシン→ABP→生理作用の因果関係を提唱している。

最初に黄化ヤエナリ芽生えを用い、オーキシン結合タンパク質の検出、および単離、精製を行っている。黄化ヤエナリ胚軸より抽出した可溶性画分をオーキシンの一種である2,4-ジクロロフェノキシ酢酸(2,4-D)を結合させたアフィニティーカラムに添加した。天然オーキシンであるインドール酢酸(IAA)を含む溶液や2,4-Dを含む溶液によってそれぞれ溶出を行い、交換反応により溶出されるABP画分を、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動に供し、IAA溶出画分と2,4-D溶出画分に共通に存在する約40 kDa(ABP 40)と約39 kDa(ABP 39)のポリペプチドを検出した。オーキシンを認識するタンパク質の候補と考えられるこれら2種類のタンパク質を、数種のカラムクロマトグラフィーにより、電気泳動的に単一なバンドにまで精製することに成功している。ABP 40とABP 39はnativeな状態における分子量は、それぞれ約80 kと約77 kと推定され、2量体で存在する新規のABPであることを明らかにした。

次にABP 40とABP 39の特性解析を行っている。まず、 $[^{14}\text{C}]$  2,4-Dを用いた結合実験から、ABP 40の2,4-Dに対する $K_d$ 値は $1 \times 10^{-5} \text{M}$ と推定された。ラベルした2,4-DとABP 40との結合に対するオーキシン類の影響を調べ、ABP 40がオーキシンを特異的に認識していることを示した。次に、部分アミノ酸配列を決定し、データベースのホモロジー検索を行った結果、アルコールデヒドロゲナーゼ(ADH)の一種であるグルタチオン依存性ホルムアルデヒドデヒドロゲナーゼ(FDH)と相同性が高いことを明らかにした。精製したABP 40には明らかなFDH活性が検出され、また、各精製過程においてABP 40量とFDH活性が一致していることなどからABP 40がFDHであることを明らかにした。一方、ABP 39については、ABP 39の部分アミノ酸配列の決定を行い、ADHと相同性が高いことを見出した。ABP 39にはエタノールを基質とする一般的なADH活性が検出されないことや、相同性の最も高いADHの基質特異性、IAAとの親和性などから、ABP 39がインドールエタノール(IET)やインドールアセトアルデヒド(IAA 1d)を基質とする酵素である可能性を考察し、これらを基質とした酵素反応の生成物を高速液体クロマトグラフィー(HPLC)と薄層クロマトグラフィー(TLC)によって検討している。

結果、ABP 39がIAA 生合成経路で重要とされる NADPH 依存性の IAA 1 dレダクターゼ活性を有していることを明らかにし、さらに、各精製過程の ABP 39量と酵素活性が一致することなどから、ABP 39が IAA 1 dレダクターゼであることを示している。

さらに ABP 40と ABP 39のそれぞれに対する抗体を用いて、ヤエナリ胚軸における ABP 40と ABP 39の分布と、発達に伴う量的変動を調べている。ABP 40と ABP 39は胚軸に多く存在し、成長に伴い増加することを明らかにしている。また、ABP 40と ABP 39が免疫学的に明らかに異なるタンパク質であることを示している。

最後に、それぞれの ABP の有する酵素活性に対するオーキシンの影響を検討している。ABP 40における FDH 活性は、2,4-D により阻害され、この阻害が補酵素である NAD<sup>+</sup>との競争阻害であることを明らかにしている。また、ABP 39の IAA 1 dレダクターゼ活性は、IAA 及び、2,4-D による酵素反応が阻害され、その阻害は、基質である IAA 1 d との競争阻害であることを示している。これらの結果は、植物においてオーキシンが直接 FDH や IAA 1 dレダクターゼに結合することにより活性調節を行う可能性を示唆するものであると結論している。

## 審 査 の 要 旨

これまで、オーキシンの生理作用に関する研究は、オーキシンによる遺伝子発現にのみ力点がおかれ受容体の検索が続けられてきた。しかし、本研究でオーキシンが酵素に結合することによりその活性を調節し、生理作用を引き起こしている可能性が明らかになったことは、オーキシンによる多種多様な生理作用発現機構を明らかにするための糸口になるものと高く評価される。また、オーキシン結合タンパク質の単離・精製、および特性解析に成功した例は数少なく、オーキシン結合タンパク質の研究において、重要な結果を提示するものと考えられる。さらに、これまでにほとんど知見の無かった、植物の FDH や IAA 1 dレダクターゼの単離・精製に成功したことも、非常に意義のあることであると考えられる。

よって、著者は博士（理学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。