



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	果樹組織におけるオーキシンの作用機構に関する研究
Author(s)	大宮, あけみ
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(農学)
Dissertation Number	乙第4375号
Issue Date	1993-09-30
DOI	https://doi.org/10.11501/3074880
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/49963
Type	doctoral thesis
File Information	000000269619.pdf



果樹組織におけるオーキシンの
作用機構に関する研究

Mechanism of Auxin Action in Tissues of Fruit Trees.

鹿林水産省果樹試験場 大宮・おけみ
OHMURA, Akemi

①

果樹組織におけるオーキシンの 作用機構に関する研究

Mechanism of Auxin Action in Tissues of Fruit Trees.

農林水産省果樹試験場 大宮 あけみ
OHMIYA, Akemi

目次

第1章	序論	 1
第2章	モモ果肉組織の肥大成長および成熟に及ぼすオーキシンの効果	
第1節	緒論	 4
第2節	材料と方法	 5
第3節	結果	 6
	(1)モモ果実の成長に伴うオーキシン含量の変動	4
	(2)果肉ディスクの形態変化	
	(3)果肉ディスクの肥大に及ぼすオーキシンの効果	
	(4)果肉ディスクの硬度に及ぼすオーキシンの効果	
	(5)果肉ディスクのアントシアニンの生成に及ぼす オーキシンの効果	
第4節	考察	 15
第3章	免疫電子顕微鏡法による果樹組織における I A A の細胞内局在性の解析	
第1節	緒論	 22
第2節	材料と方法	 23
第3節	結果	 25
	(1)抗 I A A 抗体の特異性	
	(2)対称染色	
	(3)成長過程のモモの葉の光顕観察	
	(4)モモの葉の成長に伴う I A A 含量の変化	
	(5)モモの葉における I A A の細胞内局在性	
	(6)トウモロコシの葉における I A A の細胞内局在性	
	(7)モモ芽生えの葉肉細胞および根端細胞における I A A の細胞 内局在性の差	
	(8)茎、果肉および茎端分裂組織における I A A の細胞内局在性	
第4節	考察	 35

第4章 果樹組織からのオーキシン結合タンパク質の単離・精製

第1節 緒論	4 1
第2節 材料と方法	4 2
第3節 結果	4 6
(1)モモ茎頂部からのオーキシン結合タンパク質の精製	
1. s A B P 1 の精製	
2. s A B P 1 の分子量	
3. s A B P 1 の結合の性質	
4. s A B P 2 の精製	
5. s A B P 2 の結合の性質	
(2)モモ未熟果からのオーキシン結合タンパク質の精製	
第4節 考察	5 7

第5章 モモ茎頂部から単離したオーキシン結合タンパク質 (s A B P 1) の器官特異性および細胞内局在性の解析

第1節 緒論	6 2
第2節 材料と方法	6 3
第3節 結果	6 4
(1) s A B P 1 のN末端アミノ酸配列	
(2) s A B P 1 の抗体の作製および精製	
(3)ウェスタンブロットによる器官特異性の解析	
1.モモ茎頂部における s A B P 1 の器官特異性	
2.成長過程のモモ果実における s A B P 1 の消長	
3.種々の芽生えにおける s A B P 1 の存在	
(4) s A B P 1 の細胞内局在性	
第4節 考察	6 9

摘要	7 7
----	---------

Summary	7 9
---------	---------

謝辞	8 1
----	---------

引用文献	8 2
------	---------

第1章 序論

オーキシンは植物成長調節物質のひとつで、茎の伸長促進、維管束分化の促進、果実の肥大促進、発根の促進、根の伸長抑制、細胞分裂促進等、多種多様な生理作用を植物体に及ぼしている。また、これらの作用は植物の種類や成長段階、外部環境によっても大きく変化する。

主要な天然オーキシンであるindole-3-acetic acid (IAA)は分子量が175である。このような低分子量化合物がどのような機構で植物体に対し、多様な生理反応を引き起こすのか、という疑問が生じる。このことを考えるために、まず、オーキシンの作用機構に関して現在考えられているモデルを図I-1に示す(1)。オーキシンは細胞内の特定の部位に存在するオーキシン受容体と結合することにより、その情報を作用部位に伝達すると考えられている。オーキシン受容体はオーキシンと結合した後、直接、あるいは2次的な情報伝達系を活性化することにより特異的な遺伝子の発現を誘導し、最終的に植物体に生理変化を引き起こすものと推察されている。このモデルに基づいて、オーキシン作用の多様性に関わる要因について推考した結果、以下に示すような可能性が挙げられた。

まず、オーキシン分子の植物体における挙動に関する要因として、

1) オーキシンの濃度：生体内におけるオーキシンの濃度が変化することによってオーキシン作用の強さが変化する。また、反応Iと反応II(図I-1)ではオーキシンの至適濃度が異なる場合、オーキシン濃度が変化することにより、植物体にもたらされるオーキシンの作用の種類が変わる。

2) オーキシンの局在性：オーキシンが作用部位に局在する場合と、非作用部位に局在する場合とでは、組織内における存在量が同じでも、作用の強さが異なる。また、作用部位Iに存在する場合と作用部位II(図I-1)に存在する場合とでは作用の種類が異なる。

次に、植物側の反応性に関する要因として

3) オーキシン受容体：オーキシン受容体の数が変化することによってオーキシンに対する感受性の強弱が変化する。また、オーキシン受容体の種類の違いによって植物にもたらされるオーキシン作用の種類が異なる。

4) オーキシンの情報伝達系：オーキシン受容体から生理反応に至るまでの情報伝達系の多様性によって様々な生理反応を植物体にもたらす。また情報伝達系の個々のステップが活性化や不活性化を受けることによって反応の強弱が変化する。

植物体におけるオーキシン濃度の変化がオーキシンの作用をコントロールしている、すなわち1)の仮説を支持する実験結果が数多く報告されている(2)。例えば、芽の先端部の光屈性は光の反対側の方が光の当たる側よりオーキシン濃度が高くなり、光の反対側の方がより多く成長するために起こると考えられている。また、組織培養においてサイトカイニン(C)とオーキシン(A)の割合(C/A)により形態形成が制御され

ていることはよく知られている。高いC/Aではシュートの形成、低いC/Aでは根の形成が誘導され、その中間のC/Aではカルスが誘導される。

しかし、オーキシン濃度の変化だけでオーキシン作用の多様性を説明できないことも事実である。上述の芽の先端部の光屈性は、近年ではオーキシン作用の阻害物質の局在の変化によってもたらされる可能性が指摘されている(3)。また、オーキシンの濃度より植物側の反応性が重要な要因になっていることを示す実験結果が数多く報告されている(4)。例えば、コムギ幼葉鞘やエンドウ上胚軸のような比較的均一な器官においても、成長段階によってオーキシンの成長促進効果が著しく変化する。また、クイモの塊茎組織では、その生理齢によってオーキシンが細胞肥大を誘導する場合と、細胞分裂を誘導する場合がある。

そこで上述のオーキシン濃度以外の要因2) - 4) についても考慮する必要が生じてくる。オーキシンは細胞内の特定の部位に結合して作用を及ぼすと考えられるようになり、細胞内の様々な部位にオーキシン結合部位が見いだされた。それ以来オーキシンの細胞内における局在性、すなわち2) の要因の重要性が指摘されるようになったが、技術的に困難であるためほとんど調べられていない。3) に関しては、現在盛んにオーキシンに特異的に結合するタンパク質（オーキシン結合タンパク質）の探索が進められ、トウモロコシやマメ科植物の膜および可溶性画分からいくつかのオーキシン結合タンパク質が単離された(5,6)。しかし、現在のところ単離されたオーキシン結合タンパク質の中でオーキシン作用との関わりが明確になり、オーキシン受容体としての地位を確立したものはない。したがって4) で述べたオーキシン受容体から生理反応にいたる情報伝達系はほとんど明らかにされておらず、推測の域を出ないのが現状である。

オーキシンは果樹園芸の現場において、単為結実の誘導、成長・成熟促進、摘果、発根促進等に広く利用されている。このようなオーキシンの利用は勘に頼り、試行錯誤の繰り返しにより行われているのが現状で、基礎的知見に基づいた利用技術の開発が必要であると考えられる。特に上に述べたようなオーキシン作用の多様性がオーキシンの利用やオーキシン作用の制御を難しいものにしており、原因の究明が望まれている。そこで本論文では果樹組織におけるオーキシンの作用機構を明らかにし、オーキシン作用の多様性をもたらす要因を解明することを目的とした。そのために、上述の背景をもとに、オーキシンの細胞内局在性の解析および果樹組織からのオーキシン結合タンパク質の単離・精製とその性質の解析に主眼をおいた。

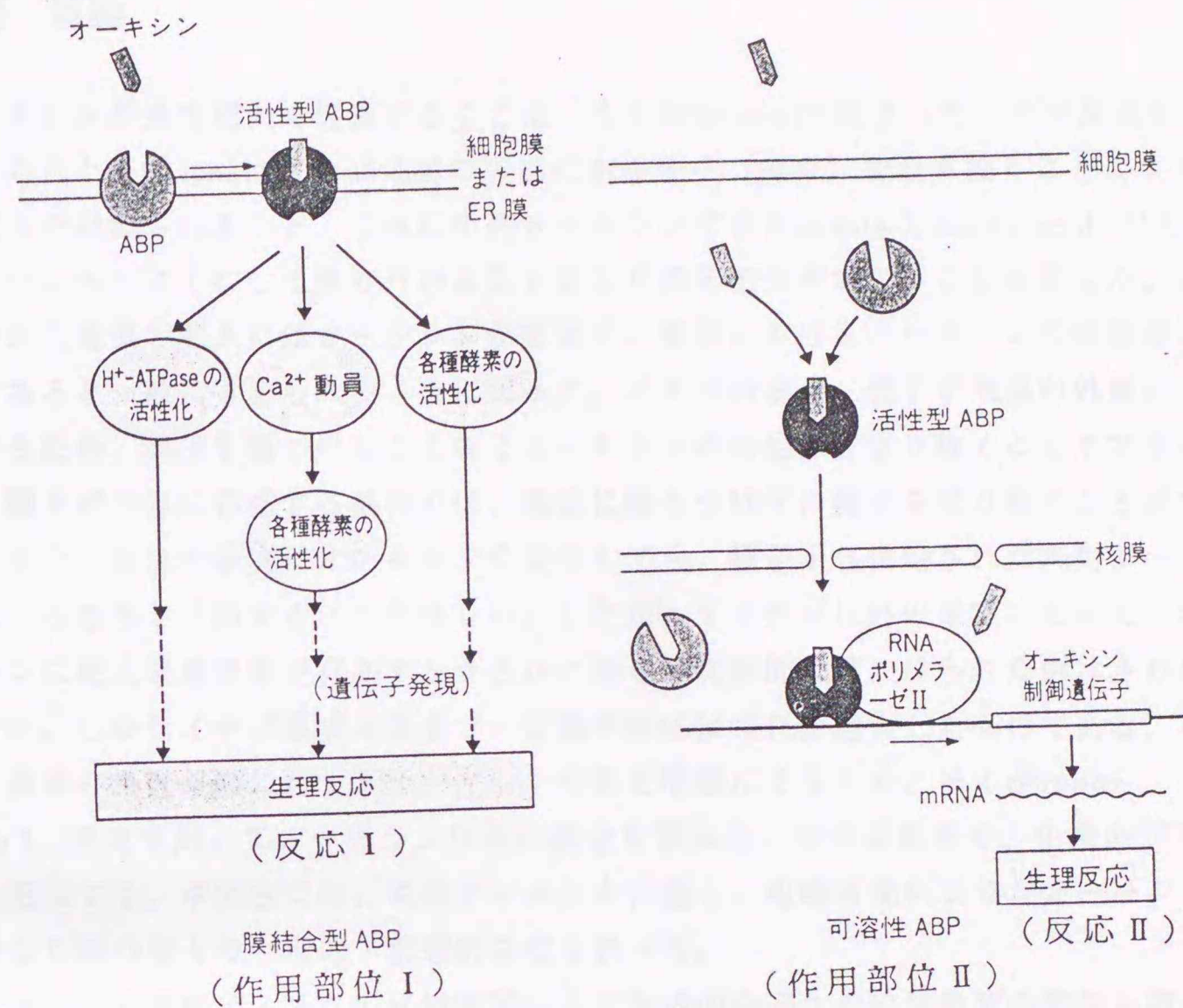


Fig.I-1 Two possible signal transduction pathway of auxin (ref.1).
Two different types of ABPs, membrane-bound and soluble types, are speculated as auxin receptors. ABP-auxin complexes are thought to regulate the transcription of specific genes or generate an intracellular signal that alter the behavior of the target cell.

第2章 果肉組織の肥大成長および成熟に及ぼすオーキシンの効果 組織培養法によるオーキシン作用の検定

第1節 緒論

オーキシンが果実肥大を促進することは、古くはNitche(7)によってイチゴ果実を用いて示された。Nitcheはイチゴ果実の表面にある種子（瘦果）を取り除くことにより果実肥大が抑制されること、これに天然オーキシンであるindole-3-acetic acid (IAA)をラノリンペーストにして塗り付けることにより果実肥大が起こることを示した。この実験から果実の肥大にはオーキシンが必要で、果実におけるオーキシンの供給源は種子であると一般に考えられるようになった。イチゴの場合、種子が果実の外側についているため、果実を傷つけることなくオーキシンの供給源を取り除くことができる。しかし種子が内部に存在する果実では、果実に傷をつけずに種子を取り除くことができず、また、無傷の果実にオーキシシンを投与しても、種子から供給された内生オーキシンによる効果と区別することが難しい。したがってイチゴ以外の果実において、オーキシシンに肥大促進効果が存在するか否かに関して実験的に確かめられた例はきわめて少ない。しかしイチゴ果実は偽果で、組織学的には果托が肥大したものである。そこで、真果の果肉組織に対するオーキシン作用を明確にするため、モモ(*Prunus persica* L.)果実を用いてオーキシン作用の検定を試みた。モモは真果で、中果皮が可食部に相当する。本実験では、果肉ディスクを作製し、組織培養により、オーキシシンを投与した際の種々の生理的・形態的变化を調べた。

これまでも果肉ディスクの組織培養により生理的な変化や投与物質の影響を調べた例が数多く報告されている(8-11)。この方法には、1) 果肉組織を切り離すことにより他の組織の影響を無くすことができる、2) 光環境、温度、栄養などの条件を均一にできる、3) 一定量の物資を均一に供給できる、などの利点がある。特に果樹のように植物体が大きく、多くの個体数を処理したり、あるいは果実毎に均一の処理を施すのが難しい場合には有効な手段である。また、オーキシンの効果を検定する場合は、果肉をオーキシンの供給源である種子から切り離すことにより、内生オーキシンの影響を少なくすることができるものと期待される。

モモは一般にダブルシグモイド曲線を描いて成長し、成長の過程を発育第1期（細胞分裂期；FW I）、発育第2期（硬核期；FW II）、発育第3期（細胞肥大期；FW III）の3つの時期に分けられる(12)。Millerら(13)によって、成長過程で果肉組織のIAA量が大きく変動し、FW IやFW IIの発育の盛んな時期にオーキシンが多量に存在することから、モモ果実の成長がオーキシンによる制御を受けている可能性が示唆された。そこで、本章ではそれぞれの時期における果肉のディスクを作製し、オーキシンが果肉組織の肥大成長に及ぼす影響を解析した。また、成熟の指標となる果肉硬度やアントシアニンの生成量についても調べ、オーキシンが果実の成熟に及ぼす

影響についても併せて検討した。

第2節 材料と方法

材料：果樹試験場千代田圃場で栽培したモモ (*Prunus persica* L. 'あかつき') 果実を材料に用いた。成長過程 (1992年5月25日：FWI、6月15日：FWII、7月15日：FWIII) の果実を午前7-8時の間に採取し、5℃に保存して、2日以内にディスクを調製した。7-10日おきに採取した果実30個の重量を測定して果実の平均重量を求め、成長曲線を作成した。果実の成長率 (α) は以下の式により求めた。

$$\alpha = \frac{\log w_2 - \log w_1}{t_2 - t_1}$$

t_2 、 t_1 ：開花後日数

w_2 、 w_1 ： t_2 、 t_1 における果実の平均重量

IAAの定量：1-2 gの果肉組織と50 ngのindole-3-propionic acid (内部標準) に5 mlの65%-isopropanol-imidazole緩衝液 (pH 7.0) を加えポリトロンで磨碎し、4℃、暗所で一晩静置した。これに2 N HCl溶液を滴下してpHを2.0に調整した後、酸性化合物をdichloromethaneで3回抽出した。次いで dichloromethane 画分 0.1 M imidazole 緩衝液 (pH 7.0) で3回抽出し、水溶性画分を'Baker'-10SPE NH₂ カラム (J.T.Baker Inc. USA) にかけた。カラムを5% acetic acid/methanol で溶出し、減圧乾固した。これを70% methanol に溶かし、HPLC (島津LC-9A) にかけた。カラムは逆相C-18カラムを用い、蛍光検出器で検出した。

ディスクの調製および培養：果実を剥皮して0.7% sodium hypochlorideで12分間殺菌した後、滅菌水で3回洗浄した。ナイフで赤道部の果肉を切り取り、直径1 cmのコルクボーラーで打ち抜いた。これを両刃カミソリで3 mm厚にスライスし (0.21 g/ディスク)、果皮側を上にして寒天に載せた。1枚のシャーレにつき4個のディスクを用い、1つの処理区に対して100ディスク以上とした。これらの操作は無菌的に行った。

寒天培地は、MS培地(14)に0.3%ゲルライトを加えたものを基本培地とし、これに種々の濃度の合成オーキシシン (1-naphthaleneacetic acid(NAA)または2,4-dichlorophenoxyacetic acid(2,4-D)) を添加して用いた。

培養は23℃で4週間行った。明所はシャーレ底部の光強度が5,000 lxとし、明期16時間、暗期8時間のサイクルで照明した。暗所は観察の時以外は光が当たらないようにした。

肥大量の測定：重量は1週目と4週目にシャーレからとりだし測定した。重量測定後のディスクは、アントシアニンと硬度の測定に用いた。

アントシアニンの測定：乳鉢を用い、1% HCl/methanol中で1-3 gのディスクをすりつぶした。ディスクのばらつきを考慮し、それぞれの処理区で4個以上のディスクから抽出した。遠心して上清をとり、10 mlにメスアップし、吸光度（528 nm）を測定した。Blaricomら(15)によってモモに含まれる主要なアントシアニンは薄層クロマトグラフィーのR_f値からcyanidin-3-monoglucosideであると推定された。したがって市販されているアントシアニンのなかでこれに最も近い構造をしているKeracyanin (Extrasynthese, France) を用いて検量線を作製した。

硬度の測定：培養開始時と培養1週後、4週後のディスクの硬度をレオメーター（レオナ-RE-3305、（株）山電）により測定した。プランジャーは直径3 mm、培養開始時と1週後は20 kg、4週後は2 kgの圧縮荷重を用い、圧縮距離は2 mmで測定した。4週後の肥大したディスクは、コルクボーラーと両刃カミソリで直径1 cm、厚さ3 mmにトリミングしてから測定した。1週後は10個、4週後は15個以上のディスクを測定した。レコーダーに記録されたピークの高さから求めた最高圧縮荷重をディスクの破断強度とした。

第3節 結果

（1）モモ果実の成長に伴うオーキシン含量の変化

‘あかつき’は中生種で、開花（満開日；4月9日）から収穫（7月23日）まで105日を要し、モモに特徴的なダブルシグモイド曲線を描いて成長した（図II-1）。また、成長率は開花後36～50日と収穫直前の時期にピークが認められ、硬核期にはきわめて低い値を示した（図II-2）。成長曲線と内果皮が硬化する時期から‘あかつき’のステージをFWI：開花後0-50日、FWII：51-83日、FWIII：84-105日とした。

成長過程で果実のIAA含量は大きく変動した。IAAの濃度は開花直後に高くその後次第に減少し、開花後35日から97日にかけて低い値を示した（図II-2）。収穫直前に急激に増加し、収穫時に最大値を示した。果実1個体あたりのIAA量は収穫直前に急激に増加して（図II-1）収穫時に最大に達し、収穫後4℃で1週間貯蔵した果実は収穫時の約60%に減少した。

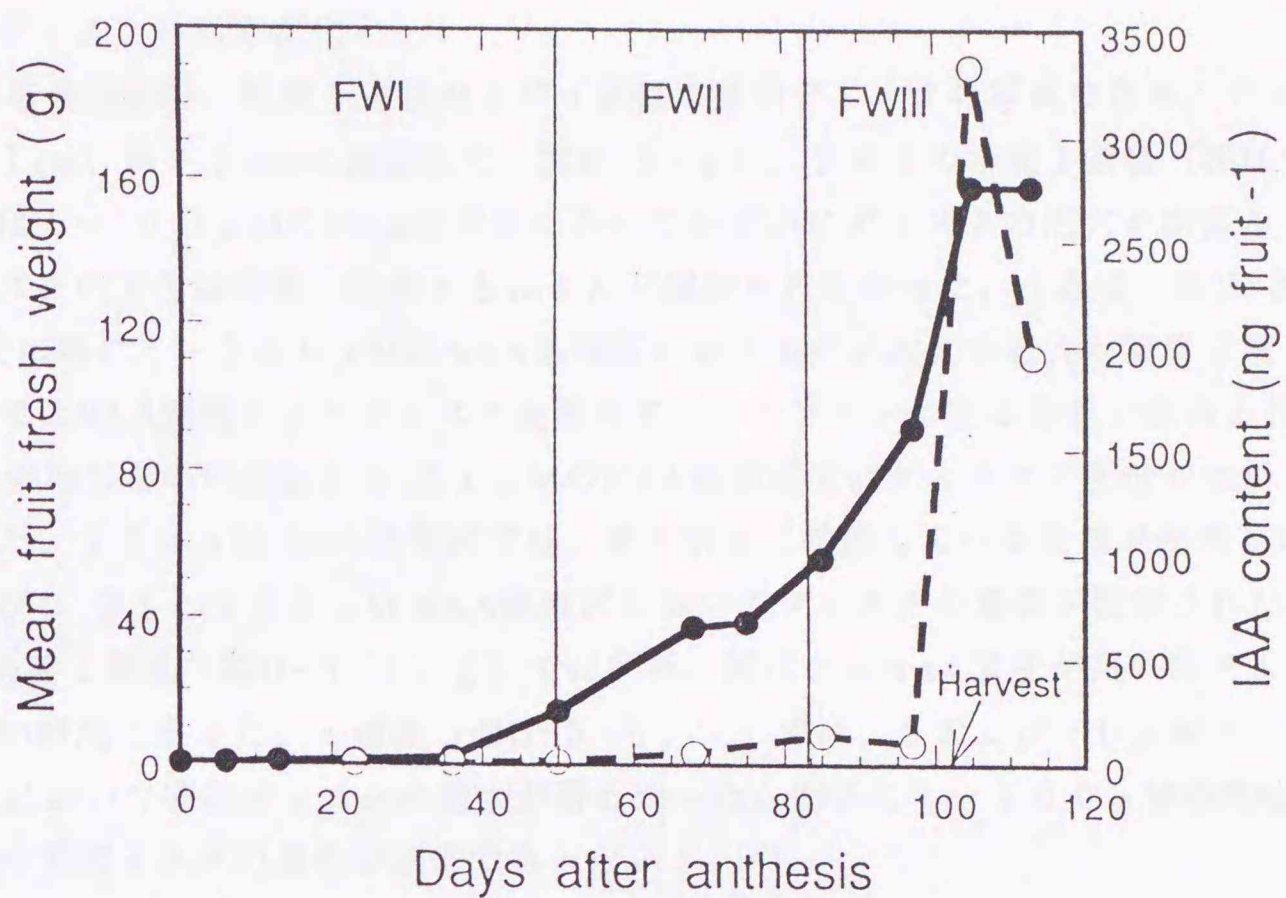


Fig.II-1 IAA content (○) and flesh weight growth curve (●) of peach fruit cv.Akatsuki.

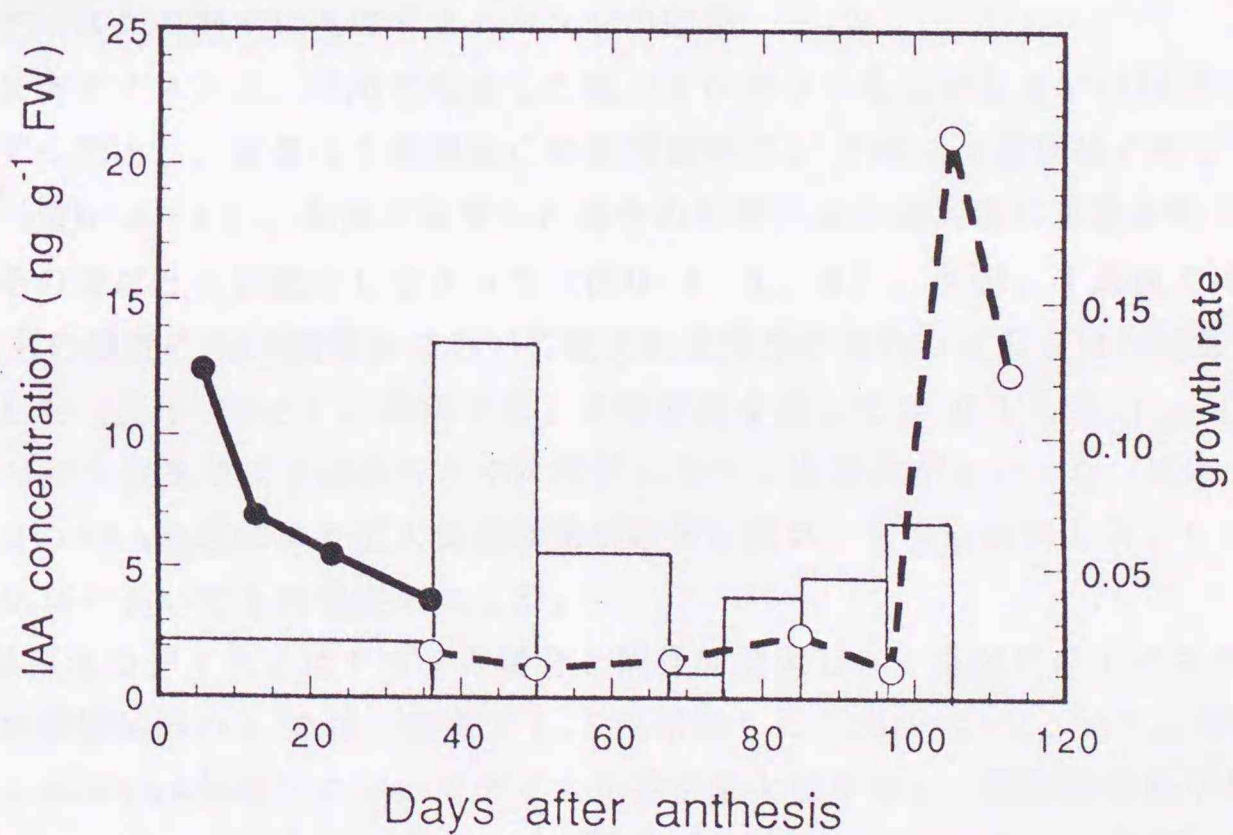


Fig.II-2 IAA concentration (●, whole fruit; ○, mesocarp) and growth rate (open bars) of developing peach fruit cv.Akatsuki.

(2) 果肉ディスクの形態変化

図II-3は培養開始時、培養1週間および4週後の果肉ディスクの写真である。ディスクは直径1cm、厚さ3mmに調製した(図II-3-a)。FWIの培養1週間(図II-b、c)には1-100 μ MのNAA処理区においてわずかにディスクの肥大が観察された。ディスクの着色は明所、暗所ともほとんど認められなかった。4週間(図II-3-d、e)では特に1-100 μ MのNAA処理区におけるディスクの肥大が顕著であった。明所ではNAA処理によりディスク表面のアントシアニンによる着色が促進された。NAAを添加しない対照区と0.01 μ MのNAA処理区ではディスクの褐変が認められた。また、100 μ M NAA処理区では、寒天培地に接触している底部が褐変した。対照区および0.01、100 μ M NAA処理区においてディスクの褐変が観察された。

FWIIの培養1週間(図II-3-f、g)では明所、暗所ともNAA濃度が高い程ディスクが大きい傾向にあった。4週間(図II-3-h、i)では、1および10 μ MのNAA処理区において特にディスクの肥大が著しかった。明所の1-100 μ MのNAA処理区においてディスクの着色が顕著であった。

FWIIIでは1週間において(図II-3-j、k)、明所、暗所ともNAA添加によりディスクの肥大と着色が促進された。しかし4週間では(図II-3-l、m)明所、暗所とも全てのディスクが一様に着色・肥大し、処理による差は認められなかった。10 μ Mおよび100 μ MのNAA処理区においてディスクの褐変が顕著に観察された。

(3) 果肉ディスクの肥大に及ぼすオーキシンの効果

FWIの果肉ディスクは、明所で培養した場合オーキシンを添加しない対照区においても少しずつ肥大し、重量は1週間後に培養開始時の1.5倍、4週間後に約2.4倍になった(図II-4-a)。暗所で培養した場合の対照区は1週間後に重量が約1.5倍になり、その後ほとんど肥大しなかった(図II-4-b、d)。明所、4週間では、0.1 μ M以上の濃度のNAA処理区において肥大促進効果が現れ、10 μ Mの時重量が最大値を示した(図II-4-c)。暗所では、培養期間を通して0.01と0.1 μ MのNAA処理では肥大促進効果が認められず対照区に比べて有意差がなかった(図II-4-d)。1 μ MのNAA処理により肥大促進効果が顕著に現れ、10 μ Mおよび100 μ MのNAA処理においても同程度肥大した。

FWIIの対照区のディスクはFWIの場合と同程度肥大し、4週間目のディスク重は、明所で培養開始時の2.7倍、暗所で1.5倍増加した(図II-4-c、d)。明所4週間では1 μ MのNAA処理区においてディスク重が最大値を示し、開始時の約7倍に達した(図II-4-c)。暗所ではFWIの場合と同様1-100 μ MのNAA処理の場合に肥大促進効果が顕著に現れた(図II-4-d)。

FWIIIの果肉ディスクは、対照区における重量の増加がFWIやFWIIの場合より大きく、4週間には明所で3.5倍、暗所で2.7倍に達した(図II-4-c、d)。1週間には明所、暗所ともNAAによる肥大促進効果が認められ、それぞれ10 μ MのNAA

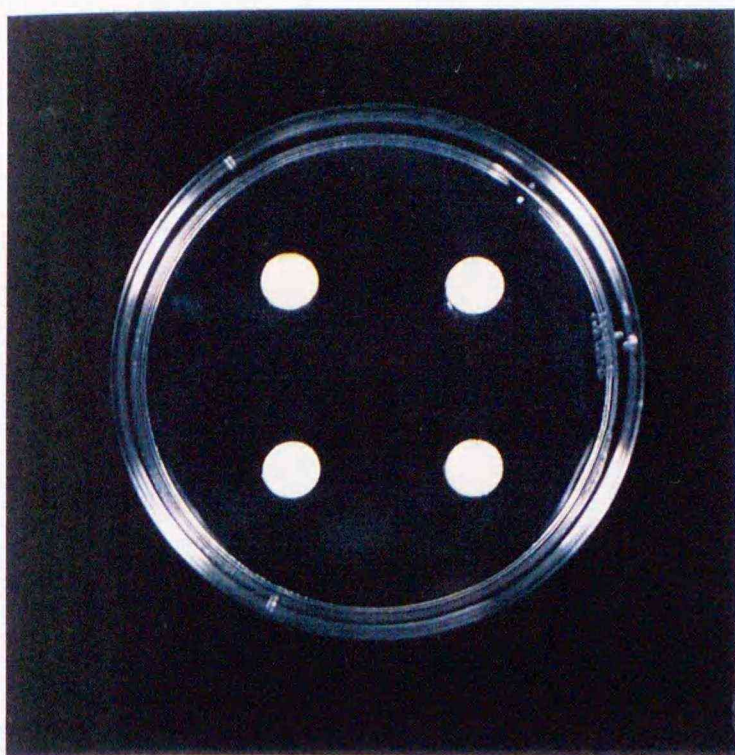
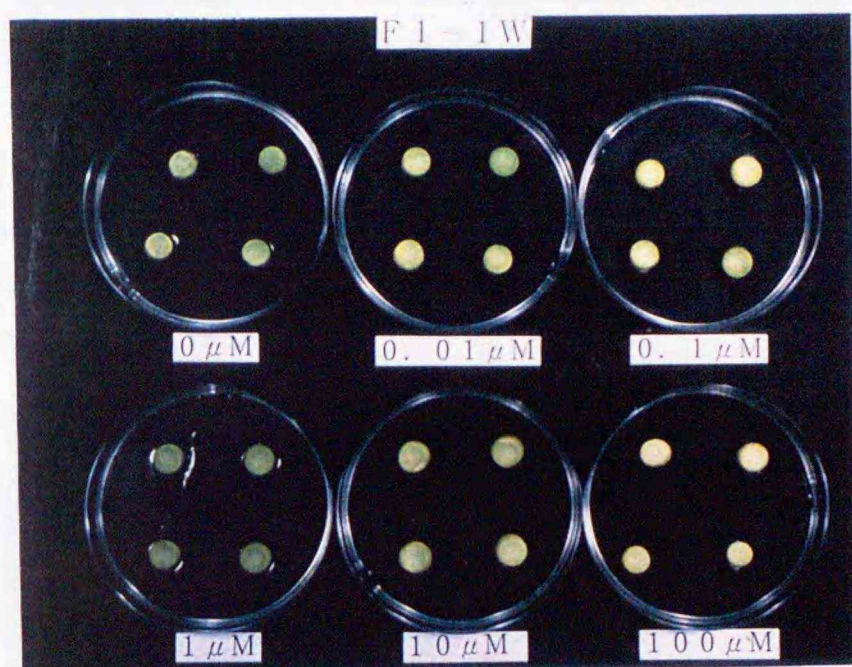


Fig.II-3 Photographs of mesocarp discs of peach fruit treated with different concentration of NAA.

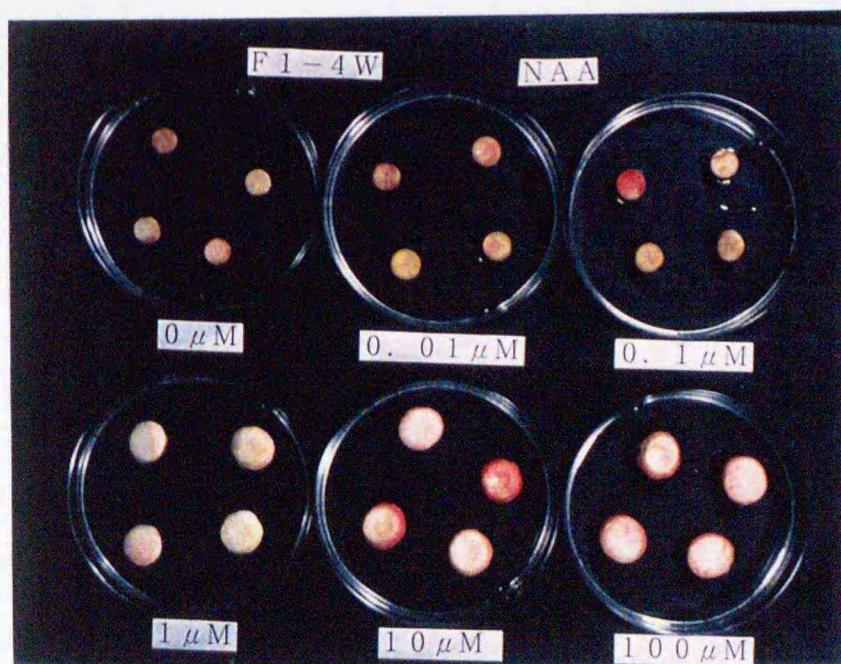
- a, prior to incubation.
b,f,j, incubated for 1 week in the light ;
c,g,k, incubated for 1 week in the dark ;
d,h,l, incubated for 4 weeks in the light ;
e,i,m, incubated for 4 weeks in the dark.
b-e, FWI ; f-i , FWII ; j-m, FWIII.



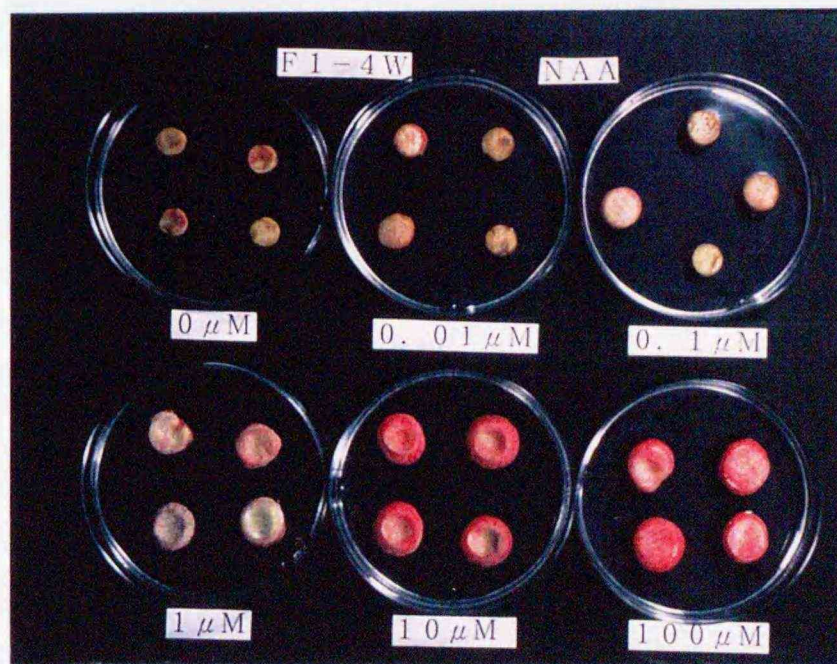
b



c



d



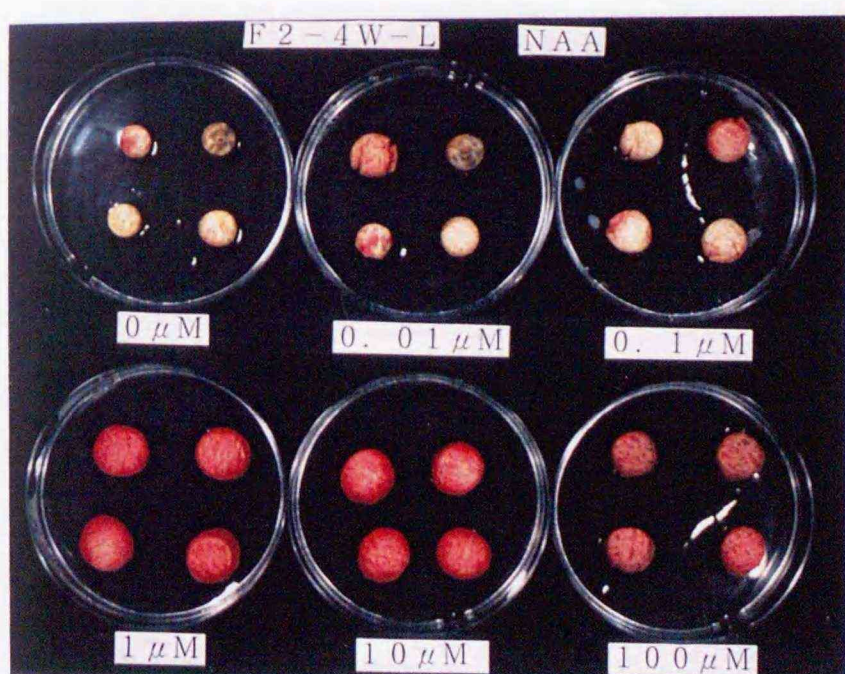
e



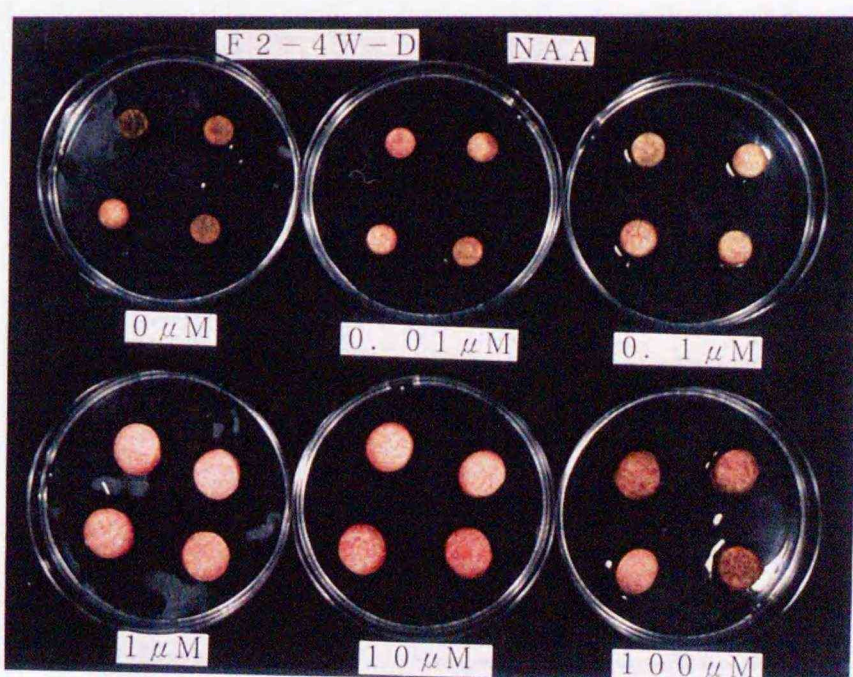
f



g



h



i



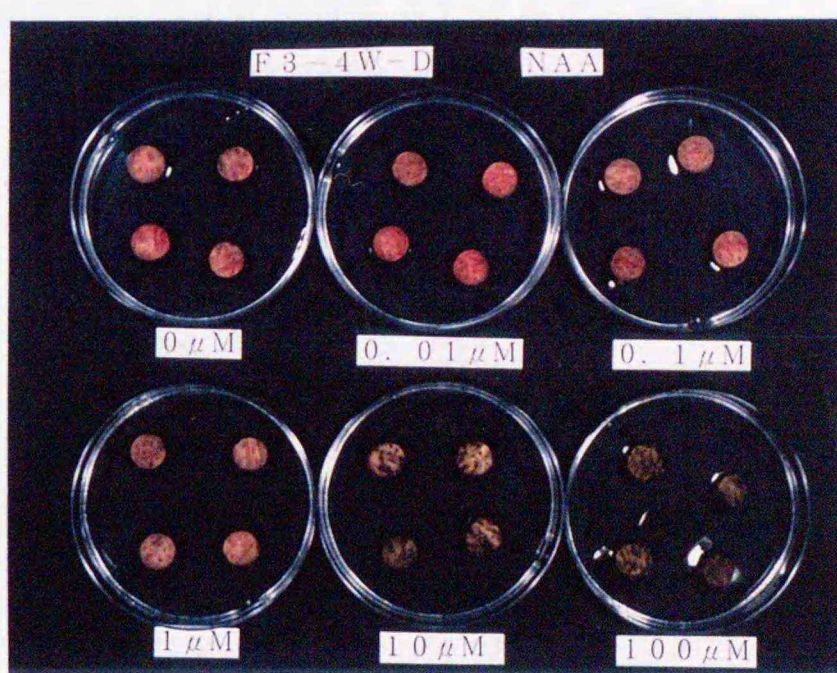
j



k



l



m

処理の時直径、重量とも最大であった（図II-4-a、b）。しかし、1週後以降は対照区の肥大の方がNAA処理区の肥大を上回り、明所4週後のディスク重は $1\mu\text{M}$ 以上のNAA処理区において対照区より有意に低い値を示した（図II-4-c、 $P<0.001$ ）。暗所、4週後のディスク重は明所と同様の傾向を示したが、対照区とNAA処理区との差は小さかった（図II-4-d）。

各時期とも明所で培養した場合の方が、暗所で培養した場合よりディスクが大きい傾向にあった。また、 $500\mu\text{M}$ 以上のNAA処理では数時間から数日間の間にディスクが褐変し肥大は完全に阻止された。

2,4-Dによる果肉ディスクの肥大促進効果はNAAの場合と同様の傾向が認められた（図II-5）。明所および暗所の4週後のディスク重量は、FWIでは $10\mu\text{M}$ 、FWIIでは $1\mu\text{M}$ の2,4-D処理の場合それぞれ最大値を示した。FWI、FWIIとも $100\mu\text{M}$ の2,4-D処理の時のディスクは同濃度のNAA処理の場合と比べて著しく小さく、ディスクの褐変の度合も大きかった。FWIIIにおけるディスク重量は対照区が最も大きく、2,4-D濃度が高い程、小さな値を示した。

（4）果肉ディスクの硬度に及ぼすオーキシンの効果

FWIにおける培養開始時の果肉ディスクの硬度は2.2であった。1週後の対照区におけるディスク硬度は開始時よりやや低く2.0で、1週後ではNAA処理区との間に有意差はなかった（図II-6-a）。4週後では対照区における硬度が1.26で、NAA処理区ではNAA濃度が上昇するにしたがい小さな値を示した（図II-6-b）。

FWIIにおける培養開始時のディスク硬度（2.1）および1週後の対照区のディスク硬度（2.0）はFWIとはほぼ同じ値を示した。1週後では 10 および $100\mu\text{M}$ のNAA処理区において対照区より有意に（ $P<0.01$ ）低かった（図II-6-a）。4週後では対照区における硬度が0.85で、FWIの4週後より低かった（図II-6-b）。FWIの場合と同様NAAの濃度が上昇するにしたがい小さな値を示した。

FWIIIでは、培養開始時において、ディスク硬度がFWIやFWIIの場合より著しく低い値を示した（1.35）。1週後にNAA添加の効果が認められ、NAA濃度の上昇とともに果肉硬度は減少した（図II-6-a）。4週後には対照区の硬度もきわめて小さな値を示し（0.16）、NAA添加区との差がなくなった（図II-6-b）。

果肉硬度に及ぼすNAAの効果は、明所の場合も暗所の場合（データ未掲載）も同様の傾向を示し、有意な差は認められなかった。

（5）果肉ディスクのアントシアニン生成に及ぼすオーキシンの効果

アントシアニンの生成は明所で培養した場合と暗所で培養した場合とでは異なる傾向を示した。

FWIの1週後では、明所で培養した場合、対照区、NAA処理区ともにアントシアニンの生成は認められなかったが（図II-7-a）、暗所で培養した場合、対照区にお

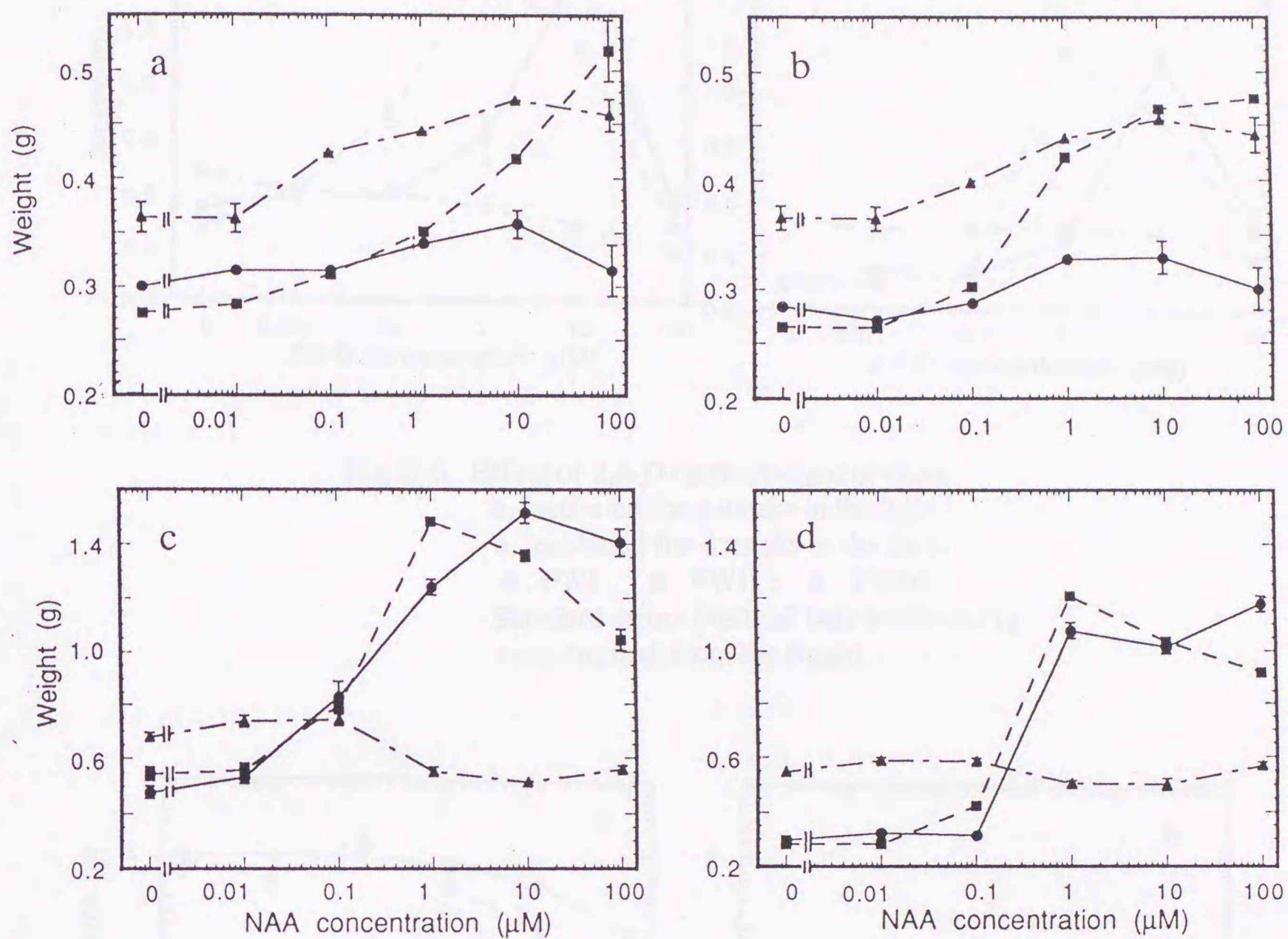


Fig.II-4 Effect of NAA on the weight of discs.
a, incubated for 1 week in the light ;
b, incubated for 1 week in the dark ;
c, incubated for 4 weeks in the light ;
d, incubated for 4 weeks in the dark.
●, FWI ; ■, FWII ; ▲, FWIII.
Standard errors (vertical bar) within 0.01g
were omitted from the figure.

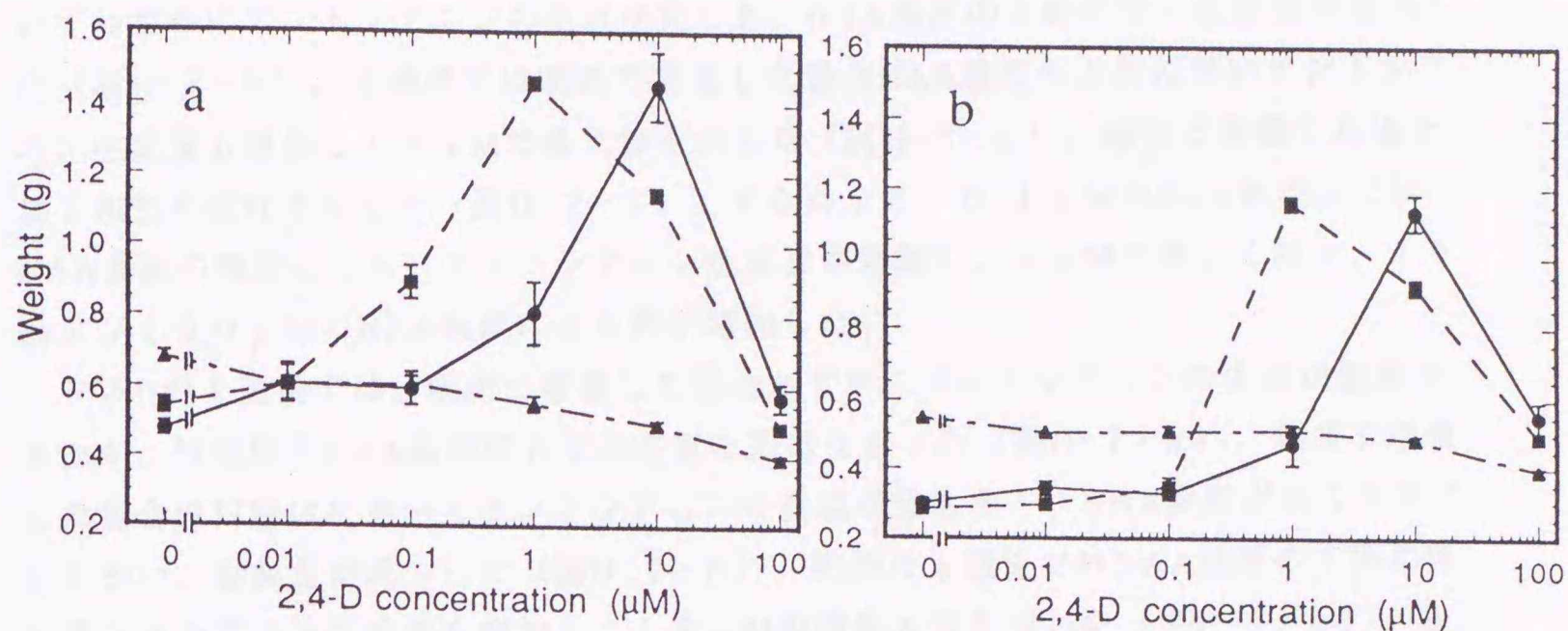


Fig.II-5 Effect of 2,4-D on the weight of discs.
a, incubated for 4 weeks in the light ;
b, incubated for 4 weeks in the dark.
●, FWI ; ■, FWII ; ▲, FWIII.
Standard errors (vertical bar) within 0.01g
were omitted from the figure.

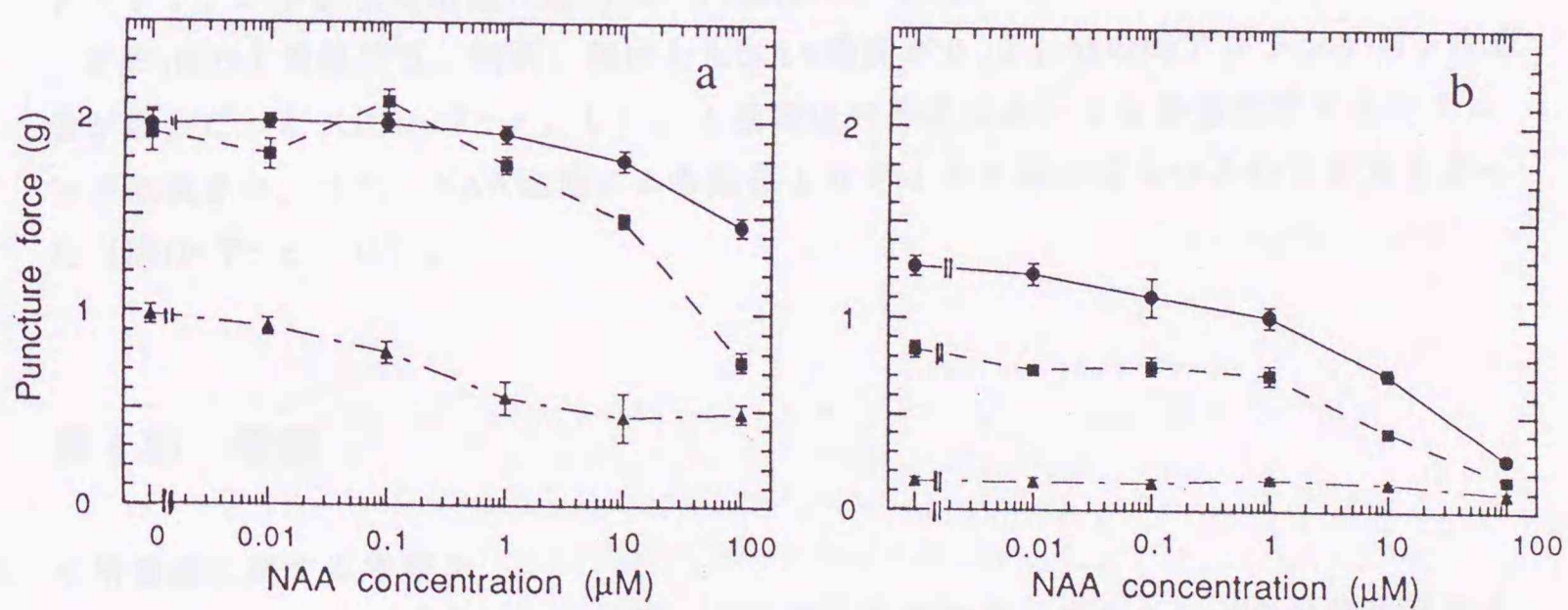


Fig.II-6 Effect of NAA on the firmness of discs.
a, incubated for 1 week in the light ;
b, incubated for 4 week in the light.
●, FWI ; ■, FWII ; ▲, FWIII.

いてわずかにアントシアニンの生成が見られ、NAA濃度の上昇に伴い生成量が増加した（図II-7-b）。4週後では明所で培養した場合NAA濃度の上昇に伴いアントシアニン生成量も増加し $10\mu\text{M}$ で最大値を示した（図II-7-c）。暗所で培養した場合は2相性の変化を示した（図II-7-d）。すなわち $0-0.1\mu\text{M}$ のNAA処理区ではNAA濃度の増加とともにアントシアニン生成量が増加し、 $1\mu\text{M}$ で著しく減少、 10 および $100\mu\text{M}$ のNAA処理により再び増加した。

FWIIの1週後では、明所で培養した場合わずかにアントシアニンの生成が観察されたが、対照区とNAA処理区とでは有意な差はなかった（図II-7-a）。暗所で培養した場合は対照区においてアントシアニンの生成が最も多く、NAA濃度が高くなるにしたがい、生成量が減少した（図II-7-b）。明所の4週後ではNAA濃度の上昇に伴いアントシアニン生成量も増加し、 $10\mu\text{M}$ の時最大値を示した（図II-7-c）。各処理区における生成量はFWIの場合より多かった。暗所の4週後ではFWIの場合と同様2相性の変化を示し、 $0.01\mu\text{M}$ のNAA処理では対照区よりアントシアニン生成量が多かったが、 $0.1\mu\text{M}$ で減少し、 $1\mu\text{M}$ から $100\mu\text{M}$ にかけて再び増加した（図II-7-d）。

FWIおよびFWIIにおいて明所で培養した場合、アントシアニンの生成はおもにディスク表面に認められた。暗所では、対照区や低濃度のNAA処理の際のアントシアニン生成は主にディスク内部に認められたが、高濃度のNAA処理ではディスク表面にアントシアニンによる着色が見られ、内部は白かった。

FWIIIの1週後では、明所、暗所ともNAA濃度が $0.1\mu\text{M}$ の時アントシアニン生成量が最大だった（図II-7-a、b）。4週後は対照区においても多量のアントシアニンが生成され、また、NAA処理による効果よりディスク間のばらつきの方が大きかった（図II-7-c、d）。

第4節 考察

<培養法に関する考察>

オーキシン作用の検定に一般に用いられているカラスムギやエンドウの黄化芽生えは、オーキシン添加後数時間で子葉鞘や茎切片に対する伸長促進効果を肉眼で観察することができる。しかし、モモ果肉の場合、肥大や色素の生成などの変化が確認できるまでに数日間を要するため、長期間にわたる検定法を用いる必要がある。

Parkinら(8)によってトマト果肉ディスクの長期間にわたる培養実験の方法が開発された。彼らは、無菌操作により取り出した果肉ディスクを寒天の中に埋めることにより、収穫後の追熟過程の生理変化を1ヵ月間にわたり観察することができた、と報告している。また、この方法により無傷の果実と同様の追熟に伴う生理変化が、ディスクにも認められた。本実験ではParkinらの方法に、いくつかの改変を加えて行った。

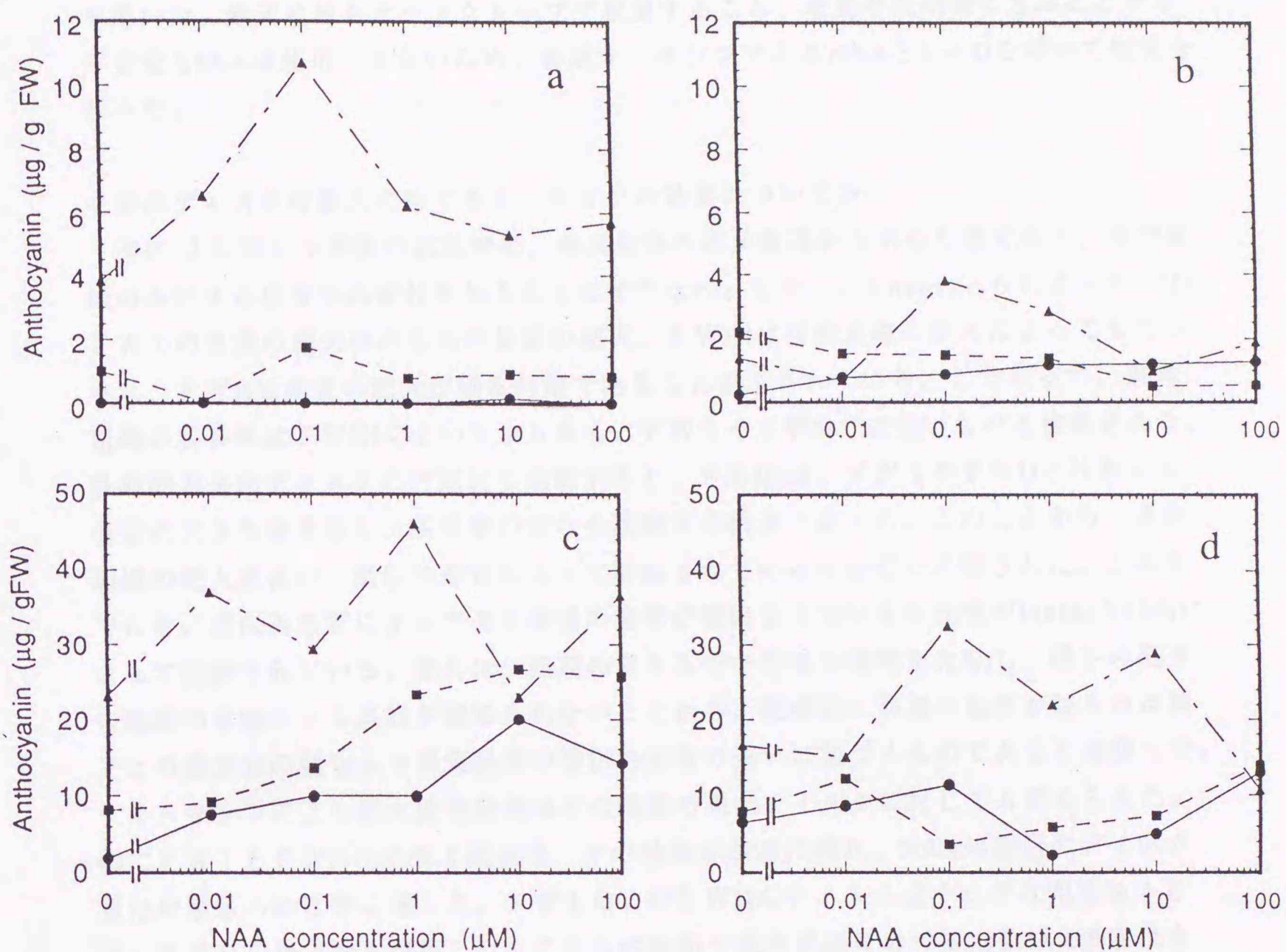


Fig.II-7 Effect of NAA on the anthocyanin content of discs.

a, incubated for 1 week in the light ;
 b, incubated for 1 week in the dark ;
 c, incubated for 4 weeks in the light ;
 d, incubated for 4 weeks in the dark.

●, FWI ; ■, FWII ; ▲, FWIII.

特に本実験では成長過程の果実を用い、培養過程でディスクの肥大成長を観察するため、寒天培地の中に埋めずに上に載せ、成長に必要な栄養を補給するためにMS培地を用いた。寒天培地をオートクレーブで殺菌すること、培養が長期間に及ぶことから不安定なIAAは使用できないため、合成オーキシンであるNAAと2,4-Dを用いて検定を行った。

<果肉ディスクの肥大に対するオーキシンの効果について>

図II-2に示した果実の成長率は、果実全体の成長曲線から求めた値であり、果肉組織のみによる成長率の変化を知ることはできない。しかし、Chalmersらによって(12)、FWIの果実の肥大はおもに内果皮の肥大、FWIIIは果肉組織の肥大によってもたらされ、FWIIは両者の肥大が鈍る時期であることが示されている。したがって、果肉組織の成長率はFWIIIにおいて最も高く、FWIやFWIIでは低いものと推察される。各時期の果肉ディスクの対照区を比較すると、FWIIIは、FWIやFWIIと比較して有意に大きな値を示し、成長率の変化を反映する結果となった。このことから、果肉組織の肥大成長は、遺伝的形質によって制御されている可能性が示唆された。これまでも、遺伝的形質によってモモ果実の発育が制御されている可能性がIshidaら(16)によって指摘されている。彼らは、熟期の異なるモモ果実の発育を比較し、種子の発達に熟期の早晚による差異が認められないことから、硬核期に果実の発育が鈍るのは種子との養水分の競合より果実発育の遺伝的形質の違いに基づくものであると推察した。

オーキシンによる肥大促進効果はどの時期の果肉ディスクに対しても認められた。特にFWIとFWIIの培養4週後は、その効果が顕著に現れ、NAA処理区のディスク重は対照区の約3倍に達した。FWIおよびFWIIのディスクはそれぞれ開花後46日と67日の果実から調製した。これらの時期の果肉組織における内生IAA濃度はきわめて低いことから(図II-2)、FWIやFWIIの果肉組織の成長率の低い原因として、遺伝形質の他に、オーキシンの濃度も関与している可能性が示唆された。一方FWIIIでは、果実の成長率の上昇はIAA濃度の増加に先だって起こった。したがって、FWIIIではオーキシンの効果より、遺伝的形質が大きな役割を果たしているものと考えられた。

FWIに比べ、FWIIの方がディスクの肥大促進に対するオーキシンの至適濃度が低かった。その傾向は特に2,4-D処理において顕著に現れ、明所も暗所もFWIIのディスクではFWIの場合の10分の1の濃度でディスク重が最大に達した。この差は、オーキシンの取り込み能力か、あるいは、果肉組織のオーキシンに対する感受性の変化によってもたらされるものと考えられた。Wernickeら(17)はトウモロコシの葉に対するオーキシンの効果を組織培養法により調べ、オーキシンによる細胞分裂の誘導は若い部位ほど効果が大きく現れることを示した。さらに組織に取り込まれた2,4-Dの量を測定し、成長過程による差がないことから、成長に伴いオーキシンに対する感受性が低下するものと推察した(18)。本実験においてモモ果肉ディスクに取り込まれたNAA

量を測定し、取り込み量と感受性のどちらの要因が至適濃度の差の原因になっているかを調べる必要がある。

＜果肉硬度に対するNAAの効果について＞

モモの果肉の軟化は細胞壁中層を構成するポリガラクトuron酸がポリガラクトuronナーゼによって分解され低分子化することによって引き起こされると考えられている(19)。またポリガラクトuronナーゼはエチレンによって活性化されること(20)、エチレンは比較的高濃度のオーキシンによって生成が促進されることが知られている(21)。本実験ではディスクのエチレン生成量は測定していないが、オーキシンはエチレン生成を介して間接的に果肉の軟化に関与しているものと考えられる。

どの時期もオーキシン濃度が高い程ディスク硬度は低い値を示した(図II-6)。オーキシンによって引き起こされる生理変化は、多くの場合至適濃度が存在し、ある一定濃度のオーキシンが最大の効果を発揮し、その前後は効果が少ない。ディスク硬度の減少のように至適濃度が存在しない生理変化はまれである。しかし、近年オーキシンによって発現が誘導される遺伝子が数多く報告されており(22)、その中にはきわめて高濃度のオーキシンによって誘導される遺伝子や(23)、飽和点が認められなかったもの(24)も報告されている。これらの遺伝子の機能は未だ明らかにされていないが、高濃度のオーキシンによって誘導される生理変化が存在することを示唆している。

＜アントシアニン生成に対するNAAの効果について＞

アントシアニンの生成は光や、ホルモン、植物の成長段階など様々な要因により制御されることが知られている。モモ果実では成熟に伴いアントシアニンを生成し、特に実験に用いた‘あかつき’は果肉組織におけるアントシアニン生成量が多い品種である。モモ果肉ディスクにおいても上記の要因によりアントシアニン生成量は大きく変動した。明所ではNAAによりアントシアニンの生成が促進され、全体的に暗所より生成量が多い傾向にあった。また、FW I と FW II の果肉ディスクにおいて内部と表面に生成するアントシアニンは、各々がNAA処理や光に対して異なる挙動を示した。すなわちディスク内部のアントシアニンは、オーキシンによって生成が阻害され、明所も暗所も $1 \mu\text{M}$ 以上のNAA処理区ではほとんど生成されなかった。一方、ディスク表面のアントシアニンは高濃度の ($1 \mu\text{M}$ 以上) のNAAおよび光によって生成が促進された。これらの結果から、モモ果肉にはアントシアニン合成を制御する二つの系が存在しているものと考えられる。一つは光とオーキシンによって発現が促進される系、もう一つは光とオーキシンによって発現が抑制される系である。光とオーキシンは単独でも促進または抑制の効果があるが、両者が共存すると相乗効果があるものと推察された。また、前者の系ではディスク表面にのみアントシアニンが生成されるため、発現には酸素濃度の影響を受けている可能性も考えられる。各々の系はNAA量と光の有無により、図II-8-a、bに示すパターンでアントシアニンの生成を促進または抑

制するものと仮定すると、両者を合成した系は図II-8-cに示すパターンになる。これはFWIとFWIIの4週後の明所および暗所におけるアントシアニン生成パターンと一致した。本実験では表面と内部組織を分けずにディスク全体のアントシアニン量を求めているため、二つの系を合成したパターンと一致したものと考えられる。両者を分けて測定した場合どのようなパターンを示すか今後検討する必要がある。

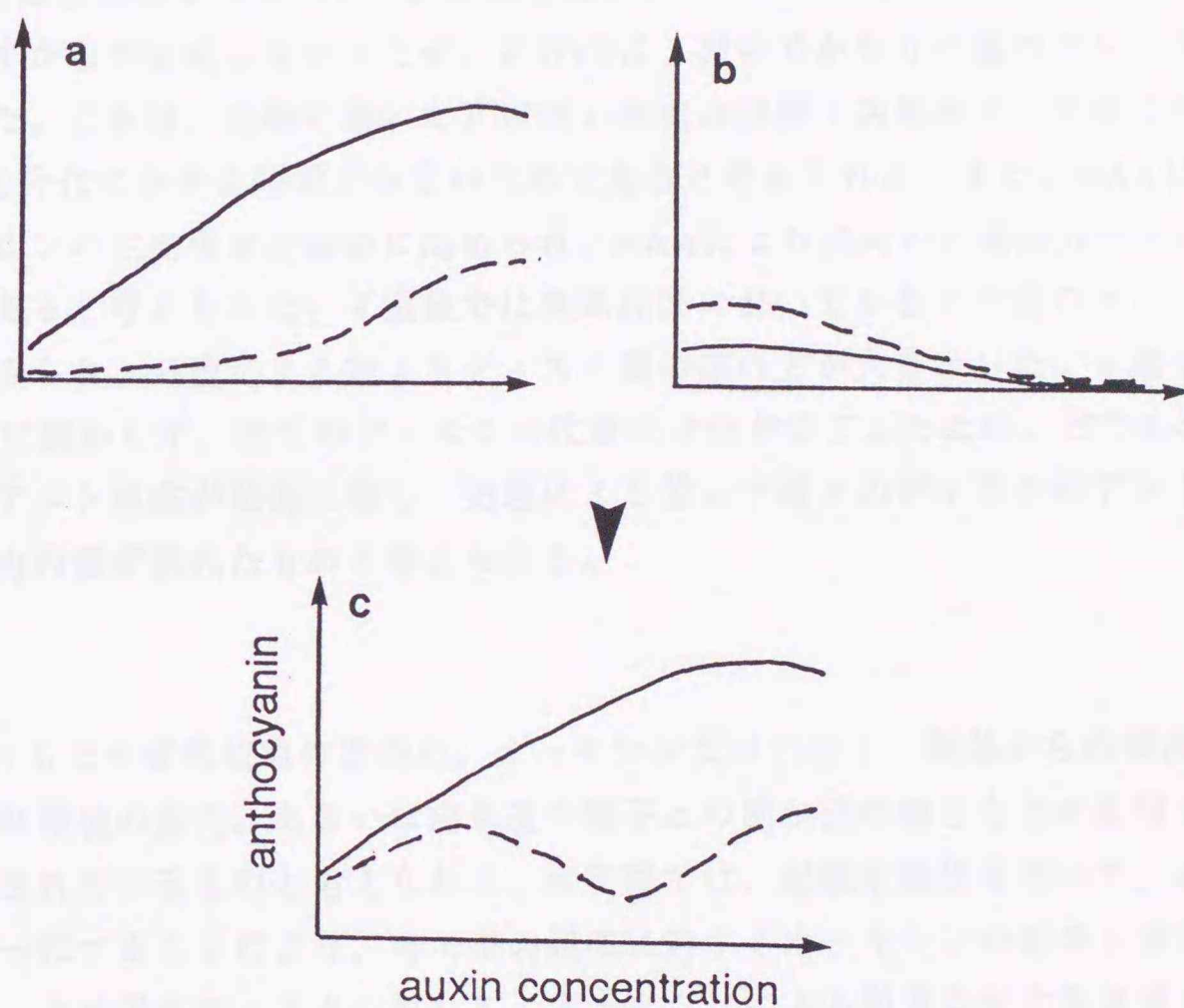


Fig.II-8 The model of regulation of anthocyanin formation.
 — , light ; ----, dark.

Ozekiら(25)はニンジン培養細胞にはアントシアニン合成に関与する酵素である phenylalanine ammonia-lyase (PAL)に2つの発現制御系が存在することを明らかにした。すなわちアントシアニン合成という代謝的分化時に誘導され、2,4-Dにより発現が制御されるPAL核遺伝子と培地の希釈効果により誘導されるPAL核遺伝子が異なることを示した。モモ果肉細胞では同一のシグナル(光、オーキシン)に対してアントシアニン合成が促進される系と、抑制される系が存在することが示された。様々な植物においてオーキシンによりアントシアニンの生成が促進あるいは抑制される例が報告されているが、同一組織内で同一のシグナルにより抑制と促進がおこる例は報告がない。ニンジン培養細胞のようにこれらの系に制御される遺伝子が別個に存在しているのかどうか興味深い。FWIIIの果肉ディスクにおけるアントシアニン合成はFWIやFWIIの場合と異なったパターンを示した。FWIやFWIIの1週後ではアントシアニンはわずかしかな生成しなかったが、FWIIIは1週後でかなりの量のアントシアニンが生成した。これは、実験に用いたFWIIIの果実は収穫1週間前で、FWIやFWIIより代謝的分化にかかる時間が少ないためであると考えられる。また、NAAによるアントシアニンの生成促進が顕著に認められ、NAAにより果肉の代謝的分化が促進されたためであると考えられた。4週後では各処理区においてかなりの量のアントシアニン生成がみられ、処理による差よりディスク間の差の方が大きかった。4週後ではNAAの有無に関わらず、全てのディスクの代謝的分化が完了したため、どの処理区でもアントシアニン生成が最高に達し、処理による差より個々のディスクのアントシアニン生成能力の差が表れたものと考えられる。

<まとめ>

樹上におけるモモ果肉組織の成長は、オーキシンだけでなく、樹体からの養水分の供給量や外部環境の変化、あるいは内果皮や種子との養水分の競合などの影響を受け、複雑に制御されているものと考えられる。本実験では、組織培養法を用いて、これらの要因を均一にすることにより、モモ果肉組織に対するオーキシンの効果を解析した。

その結果、モモ果肉ディスクに対して、オーキシンによる顕著な肥大促進効果が観察された。同時に、アントシアニンの生成や軟化などの成熟に伴う変化にも直接あるいは間接的に作用していることが明らかになった。オーキシンの至適濃度はそれぞれの生理作用によって異なり、また、光の有無などの環境要因や果実の成長段階によって大きく変化することが示された。オーキシン作用のこのような多面性をもたらす要因として以下に記すような3つの可能性が考えられる。

- 1) オーキシンの取り込まれ方や分解のされ易さ、あるいは組織内における移動度が植物の成長段階や外部環境によって異なり、オーキシンの濃度や局在性に差が生じる。
- 2) 反応の種類によってそれぞれ異なるオーキシン受容体が存在し、その受容体が、あるいは受容体から生理変化に至るまでの情報伝達系が植物の成長段階や外部環境に対応して変化する(図II-9-a)。

3) オーキシンによって引き起こされる生理変化がエチレンの生成等を介した2次的、3次的なもので、エチレンの生成やエチレンの情報伝達系が植物のステージや外部環境で変化する(図II-9-b)。

いずれにしても、オーキシンが植物体に作用してから目に見える生理変化として確認できるまでには数多くのステップを経ることは確かである。それらのステップの一つ一つが様々な要因によって制御され、多面的なオーキシン作用をもたらすものと考えられる。

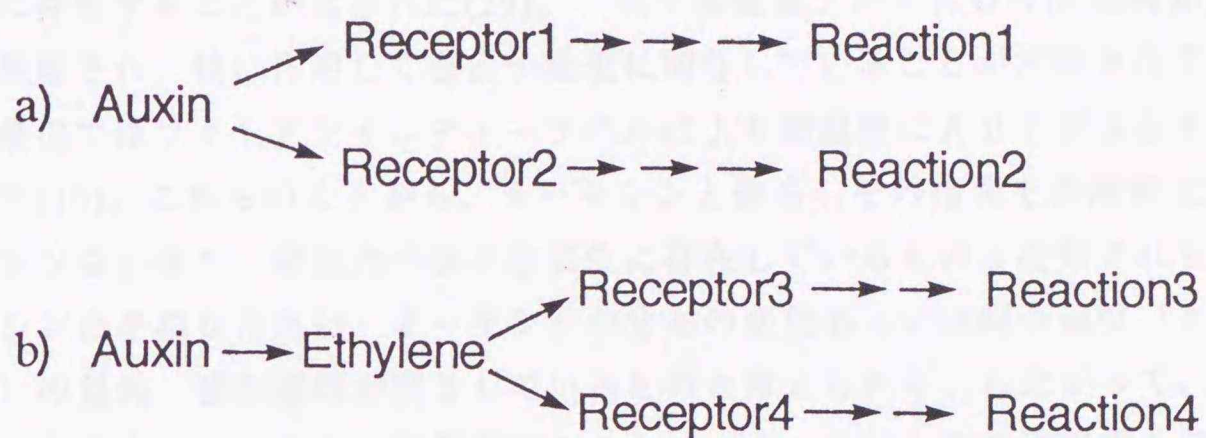


Fig.II-9 Hypothetical signal transduction pathway of auxin.

第3章 免疫電子顕微鏡法による果樹組織における IAAの細胞内局在性の解析

第1節 緒論

近年、オーキシン結合部位が細胞内の様々な部位に見いだされ、それらの部位からオーキシン結合活性を有するタンパク質（オーキシン結合タンパク質：ABP）を単離する試みがなされた。トウモロコシ幼葉鞘の膜画分では細胞膜、小胞体膜および液胞膜にオーキシン結合活性が存在することが見いだされ(26)、同組織から膜結合型のABPが単離された(27、28)。その後このタンパク質はShimomuraらによって細胞膜と小胞体膜に存在することが示された(29)。核や細胞質ゾルを含む可溶性画分からもABPが単離され、核に作用して遺伝子発現に関与していることが示唆されている(5)。さらに、最近ではフォトアフィニティーラベルにより細胞壁にABPが存在することが示された(30)。これらのことから、オーキシンと結合しその情報を作用部位に伝えるオーキシン受容体が、細胞内の様々な部位に存在しているものと推察される。そしてオーキシンの多様な作用は、オーキシンの分布の変化あるいは結合部位（オーキシン受容体）の量的・質的变化が関与しているものと考えられる。したがって、種々の組織における内生オーキシンの挙動を知ることは、オーキシンの作用機構を明らかにする上で重要である。

IAAは水、有機溶媒の両者に可溶性であるため一般的な細胞分画法ではIAAの流出や再分配が起こり、細胞内における正確な分布を知ることはできない。したがって内生オーキシンであるIAAの細胞内における分布様式に関してはほとんど明らかにされていない。これまでわずかにSandbergら(31)とFregeauら(32)がそれぞれ特殊な細胞分画法とHPLCやGC-MSによる分析によって細胞内における内生IAAの分布や合成部位を調べているにすぎない。

免疫電子顕微鏡法（免疫電顕法）は、分子の細胞内局在性を知る上できわめて有効な手段である。しかし、抗原が水や有機溶媒に可溶性の場合は、固定・包埋の過程で流出や分布の変化が起こる可能性があるため、抗原を細胞内の存在部位に固定する処理が必要になる。IAAの生体内固定法はすでにPerbalら(33)によって報告されている。彼らは、投与した ^{14}C -IAAが細胞内に取り込まれた後、キレート剤でC1の位置が、そしてglutalaldehydeでインドール環のイミノ基の位置がそれぞれ細胞内の巨大分子に固定されることを示した。また、Sottaら(34)は内生のアブシジン酸（ABA）がキレート剤によって生体内に固定されることをImmunotitration-plate model systemと免疫組織化学により明らかにした。

IAAは分子量175の低分子量化合物であるが、タンパク質などの巨大分子に結合させることにより、抗体を作製することができる。これまでIAAの1) カルボン酸基のC1 (IAA-C1) (35)、2) インドール環のイミノ基 (IAA-N) (36)、3) ベンゼン

環のC5 (IAA-C5) (37)の位置でそれぞれタンパク質と結合させたものを抗原として、IAAに対する特異的抗体が作られた (図III-1)。これらの抗体は酵素免疫測定法 (E L I S A 法) やradioimmunoassay (R I A 法) による分析に応用されているが、免疫電顕法に用いられた例は報告されていない。

上述のように固定・包埋の前処理においてIAAはC1またはイミノ基のところで細胞内のタンパク質に固定することができるので、免疫電顕法にはIAA-C1かIAA-Nに対する抗体が好ましい。しかし、IAA-C1の抗体はメチル化したIAAのみを認識し、遊離のIAAとは結合しないことが知られており、免疫電顕法に用いることはできない。そこでIAA-Nに対するポリクローナル抗体を作製し、アルデヒド固定した組織の超薄切片を免疫染色した。モモの種々の組織におけるIAAの細胞内局在性を解析した結果、組織特異的であり、かつ成長の過程で変化することが明らかになった。

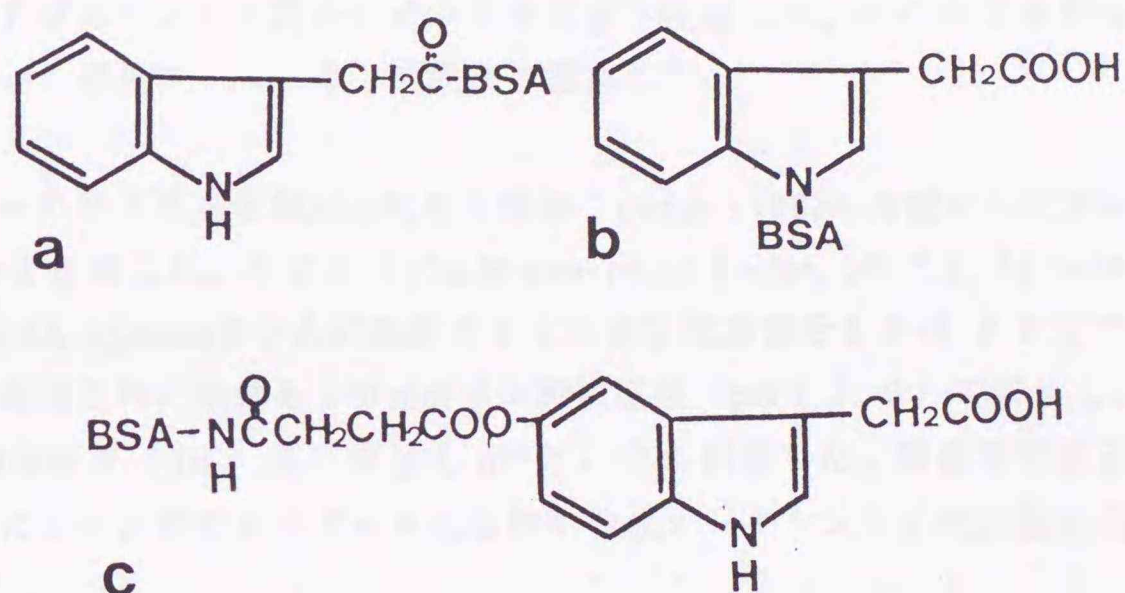


Fig. III-1 IAA-BSA conjugates.

IAA linked to BSA via a, the carboxy group; b, the indole nitrogen; c, the C5.

第2節 材料と方法

植物試料：モモ (*Prunus persica* L. '白鳳') は温室で育てた接き木後1年の木を用いた。茎の頂端部から2～3番目の未展葉 (L1)、6～7番目の展葉 (L2) およ

び11番目から12番目の肥大成長が終了した展葉(L3)を採取した。葉の長さはそれぞれ、2、8および11cmだった。

IAAの細胞内局在の組織特異性はモモの芽生えの根および葉を用いて調べた。モモ‘筑波4号’の種子を0.5% sodium hypochlorideで5分間滅菌した後、種皮を取り除いた。ペトリ皿の中の滅菌水で湿らせた濾紙の上に滅菌した種子を置床し、25℃暗所で2日間発芽させた。これをバーミキュライトに移し25℃、5,000lxで10日間育てた。

IAAの定量：0.2～1gの葉を用い、第2章と同様の方法により定量した。

抗IAA抗体の作成：Pengelleyら(36)の方法に従い、マンニッヒ反応によりIAAのインドール環のイミノ基に牛血清アルブミン(BSA)を結合させた。1molのBSAあたり約30molのIAAが結合した。これを生理食塩水に溶解し(1mg/ml)、等量のフロイント完全アジュバントと混合してウサギに皮下注射した。その後2週間毎に4回ブーストを行い、最終ブーストの1週間後に採血した。

アフィニティーカラムによる抗IAA抗体の精製：Penceら(38)の方法にしたがいIAA-agaroseカラムを作成した。PBS (10mM phosphate buffer, pH 7.2, 150mM NaCl)で平衡化したIAA-agaroseカラムに血清の45%硫酸沈澱画分をかけPBSで洗浄した。カラムに保持された抗体を10mMリン酸緩衝液(pH 11.6)で溶出し、直ちに1M Tris-HCl緩衝液(pH 7.0)を加えpHを7.0に調整した。酵素免疫測定法(ELISA法)により天然のインドール化合物や合成オーキシンとの交差反応性を調べた(表III-1)。

Immunotitration-plate model system：組織の固定・包埋と同じ条件でIAAが細胞内のタンパク質に固定されることをimmunotitration-plate model systemにより確認した。また、同様の方法でtryptophanと抗IAA抗体との交差反応性を調べた。

モモ茎頂部のタンパク質をSottaら(34)の方法に従い抽出し、0.05M NaHCO₃ (pH 9.6)に10mg/mlの濃度になるように溶解した。これをELISA用96穴プレートのウェルに200μlずつ加えて4℃で16時間培養し、ウェルの表面をタンパク質でコートした。これに50ng/mlのIAAと4% paraform-aldehydeを含む0.1M カコジル酸緩衝液(pH 7.2)を加え4℃で24時間培養した。次に、抗IAA抗体と種々の濃度のIAA(またはtryptophan)を加え室温で1時間培養した後、biotin標識抗ウサギIgG、alkaline phosphatase標識avidinの順にそれぞれ室温で1時間培養した。ウェルに1mg/ml 4-nitrophenylphosphate/diethanol amine緩衝液(pH 9.8)を加えて発色させ、405nmの吸光度をMTP-02 (Corona Electric)で測定した。各反応

の間は0.05% Tween 20-PBS (TPBS) でウェルを3~4回洗浄した。

電顕試料の作成：試料を細切後、固定液（4% paraformaldehyde、7.5% sucrose、0.1M カコジル酸緩衝液、pH 7.2）に侵漬し、4℃、暗所で24時間放置した。0.1M カコジル酸緩衝液で水洗後、エタノール系列で脱水し、EPON 812に包埋した。ウルトラミクロトーム（Nova、LKB）で超薄切片を作成し、ニッケルグリットに載せた。

免疫染色：超薄切片をまず4% ヤギ血清で20分間培養し、非特異抗原をブロックした。ついで抗IAA抗体（50 μ g/ml）で1.5時間培養し、TPBSで洗浄後、金コロイド標識抗ウサギ抗体で1時間培養した。TPBSで洗浄後、切片を酢酸ウランおよびレイノルズ鉛液で電子染色した。電顕はJEM 1200 EX（日本電子）を用い80 kVで観察した。培養および染色はすべて室温で行った。

以下に示す3種類の方法により対称染色を行った。。

- (1) 抗IAA抗体の代わりに正常ウサギ血清で培養する。
- (2) 抗IAA抗体で培養する過程を省く。
- (3) 抗IAA抗体に過剰量のIAAを加えて4℃で24時間培養した後、1次抗体として用いる。

金コロイド密度の計測：15,000倍に引き延ばした電顕写真の上にトレース用紙（40 g/m²）を載せ、細胞内小器官を鉛筆で型どり、切り取った。重量から面積を算出し、各細胞内小器官の単位面積当り（ μ cm²）の金コロイドの数を算出した。試料によるばらつきを考慮し、各組織について少なくとも3個体から試料を採取し、各個体2個以上のブロックから切片を作成し、各ブロックから3枚以上の切片を免疫染色した。

第3節 結果

(1) 抗IAA抗体の特異性

本実験により得られた抗IAA抗体の交差反応性を表III-1に示す。調べた中で最も大きな交差反応性を示したのは、合成オーキシンであるNAAであった。天然のインドール化合物の中で比較的大きな交差反応性を示したのはindole-3-acetyl-DL-aspartateである。しかし、この化合物のモモの葉の各成長段階における存在量はIAAに比べてきわめて微量で、HPLCによる分析では検出限界以下だった（図III-2）。そのほかの天然インドール化合物は、どれも低い交差反応性を示した。

Tryptophan はIAAの前駆体であり、植物体にIAAの数百倍～数千倍含まれる、という報告がある(39)。Tryptophanは抗IAA抗体との交差反応性はほとんど認められなかったが、免疫電顕において抗体の一部が多量に存在するtryptophanを認識している可能性がある。そこで immunotitration-plate model system により免疫電顕法と類似の条件下でのtryptophanと抗体との反応性をさらに詳細に検討した。図III-3に示すように、tryptophan は100 pmol添加してもほとんどウェルに固定されたIAAと競合しなかった。また、同様の方法でtryptophanをプレートに固定した場合も、遊離のtryptophanとの競合は認められなかった(データ未掲載)。一方遊離のIAAは、0.1 pmolから100 pmolの間でプレートに固定されたIAAと競合した。このことから、組織の固定・包埋と同じ条件で生体濃度のIAA (50 ng/ml、60 pmol/well) が効率よくウェルのタンパク質に固定されること、さらに固定されたIAAが抗IAA抗体により特異的に認識されることが示された。

(2) 対称染色

免疫染色の特異性を確認するために、3種類の方法で対称染色を行った。抗IAA抗体で培養するかわりに正常ウサギ血清で染色した場合、液胞や細胞間隙を含む種々の部位に非特異的に金コロイドが認められたが(図III-4)、密度はきわめて低かった。また、抗IAA抗体で培養するステップを省いた場合や、抗IAA抗体を予め過剰のIAAで吸収させた場合も同様の結果になった。

(3) 成長過程のモモの葉の光学顕微鏡観察(40)

図III-5にL1、L2およびL3の切片の光顕写真を示した。L1は組織が未分化の状態で、海綿状組織と柵状組織の区別がつかず、維管束も未発達であった。一方L2では各々の組織が分化し光顕下で明らかに区別された。柵状組織は表皮の下に2層に密に並び、細胞は細長く中央に核が位置し、細胞質が比較的豊富だった。海綿状組織は球形に近く、中は一つの大きな液胞で占められ、細胞質は少なかった。L3では細胞はL2よりさらに肥大し、海綿状組織の細胞間隙も大きかった。今回の実験において、電顕写真はL1の場合葉肉細胞からランダムに、L2とL3は柵状、海綿状組織からそれぞれ別々に撮影した。

(4) モモの葉の成長に伴うIAA含量の変化

図III-2および表III-2に各ステージの葉のIAA含量をHPLCにより定量した結果を示した。IAAは葉が成熟するにつれて減少した。特に、L2からL3にかけて急激に減少し、L3はL1の約10分の1であった。

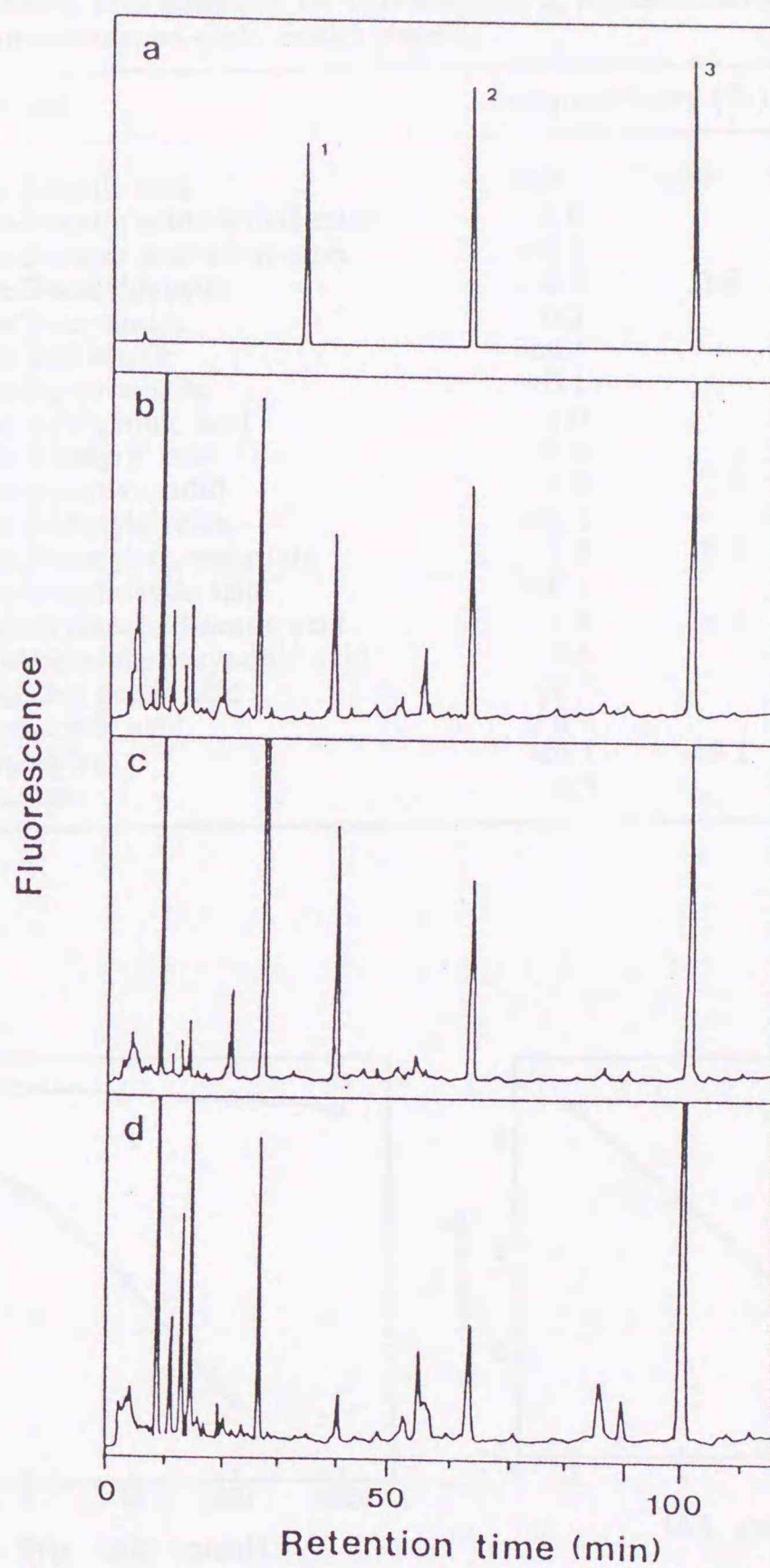


Fig.III-2 Reverse-phase HPLC analysis of a: standard solution containing 10 ng of indole-3-acetyl-DL-aspartate (1), IAA (2), and indole-3-propionic acid (3, internal standard); b-d: semi-purified extract from L1 (b), L2 (c) and L3 (d).

Tab. III-1 Cross-reactivity of anti-IAA-N antibody. a, Assayed by competition with adsorbed IAA-ovalbumin; b, measured with an immunotitration-plate model system.

Compound	cross-reactivity (%)	
	100 ^a	100 ^b
Indole-3-acetic acid	100 ^a	100 ^b
Indole-3-acetic acid methyl ester	1.0	
Indole-3-acetic acid ethyl ester	<0.1	
Indole-3-acetaldehyde	0.9	0.8
Indole-3-acetamide	0.2	
Indole-3-aldehyde	<0.1	
Indole-3-acetonitrile	<0.1	
Indole-3-propionic acid	1.0	
Indole-3-butyric acid	0.6	
Indole-3-pyruvic acid	4.9	2.8
Indole-3-acetyl glycine	<0.1	
Indole-3-acetyl-DL-aspartate	7.9	9.3
Indole-2-carboxylic acid	<0.1	
5-Hydroxyindole-3-acetic acid	1.4	1.2
2,4-Dichlorophenoxyacetic acid	0.8	
1-Naphthyl acetic acid	68.7	
Phenyl acetic acid	0.8	
L-Tryptophan	<0.1	<0.1
Tryptamine	0.7	

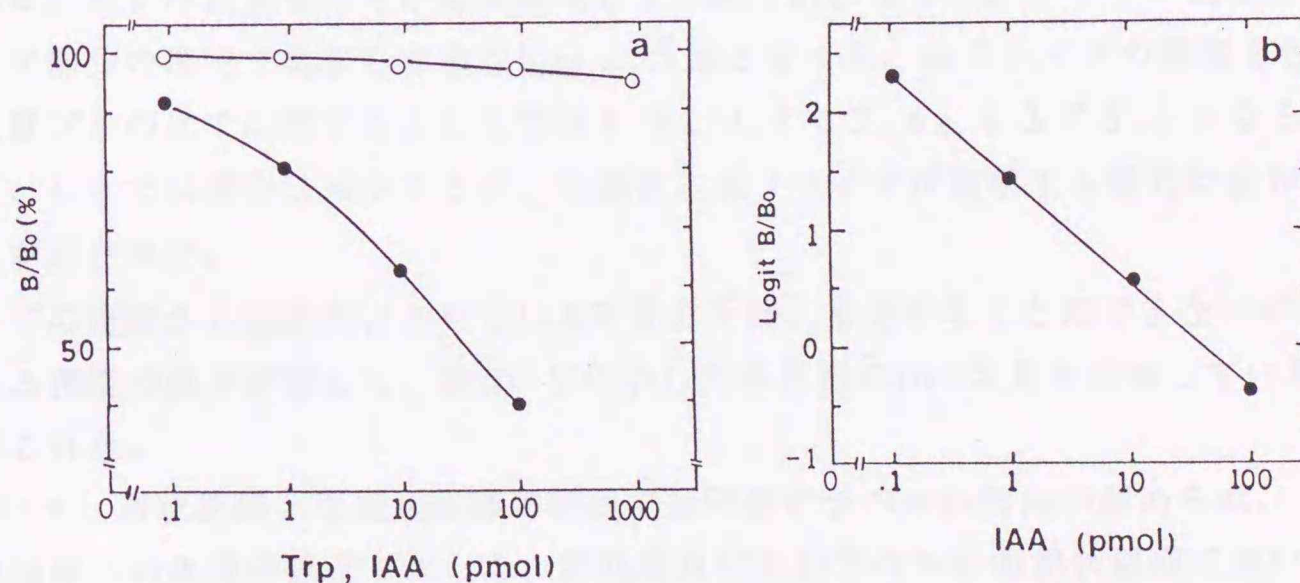


Fig. III-3. Immunotitration-plate model system. a: Standard curve for IAA (●) and tryptophan (○). b: The logit transformation of the standard curve of IAA.

(5) モモの葉におけるIAAの細胞内局在性

L 1 を抗IAA抗体で免疫染色した結果を図III-6-aに示す。L 1 の細胞は核が大きく、核小体も頻繁に認められた(図III-6-a)。小さな液胞が細胞あたり数個存在していた。色素体(前色素体)は小さく膜の発達は不十分であった。金コロイドは液胞、及び細胞間隙を除く細胞全体、すなわち核、細胞質ゾル、前色素体、細胞壁に分布し、きわだった集積部位は認められなかった。

L 2 の細胞は柵状及び海綿状組織とも色素体(葉緑体)および液胞の発達が顕著だった。海綿状組織の細胞は球形に近く、細胞内は一つの大きな液胞が中央に位置し、細胞質は少なく、その大半が澱粉粒を数個含む葉緑体によって占められていた(図III-6-b)。柵状組織の細胞は細胞質が比較的豊富で、核が中央に位置しそれを挟むように液胞が存在していた(図III-6-c)。両者の細胞において、特に葉緑体における金コロイドの集積が顕著であった。細胞質ゾルや核および細胞壁は一様にラベルされた。また、L 1 と比較してこれらの部位のラベルの密度に有意な変化はなかった。

L 3 の細胞は液胞や色素体がさらに肥大し、色素体のチラコイド膜の発達も顕著であった(図III-6-d)。L 2 と比較して金コロイドの密度が全体的に低かった。

表III-2にL 1、L 2 およびL 3 の葉肉細胞における金コロイドの密度を示した。細胞質ゾル、核および細胞壁の密度はL 1 とL 2 は同様の値を示し有意な差がなかったが、L 3 において有意に低い値を示した。液胞は各細胞ともバックグラウンドに相当する極めて低い値を示した。最も顕著だったのは、色素体における金コロイドの密度の変化である。L 2 の色素体における密度はL 1 の約2倍になった。デンプン粒を除いたストロマ部分の密度で比較した場合には2.5倍となった。金コロイドの密度を色素体/細胞質ゾルの比で比較するとL 1 では1.6、L 2 で3.4、L 3 で3.1となる。したがって、L 3 では密度は減少するが、色素体に金コロイドが集積する傾向は変わらないことが示された。

金コロイドの密度から細胞内におけるIAAの量を正確に推定することはできないが、L 3 における密度の減少が著しく、表III-2に示した各組織のIAA含量を反映しているものと推察された。

L 2 において、柵状組織と海綿状組織の細胞では同様のラベルの傾向が認められ、両者とも葉緑体への集積が顕著であった。細胞質及び核のラベルが海綿状組織において有意に高い値を示したが、それ以外の部位では有意な差はなかった(表III-3)。したがって、表III-2のL 2 とL 3 の金コロイドの密度はそれぞれの組織から同じ枚数の写真を選び、計測した結果を示した。

(6) トウモロコシの葉におけるIAAの細胞内局在性

オーキシン結合タンパク質としてエンドウマメからribulose-1,5-bisphosphate carboxylase (Rubisco)が単離された(41)。従って葉緑体に存在するIAAはRubisco

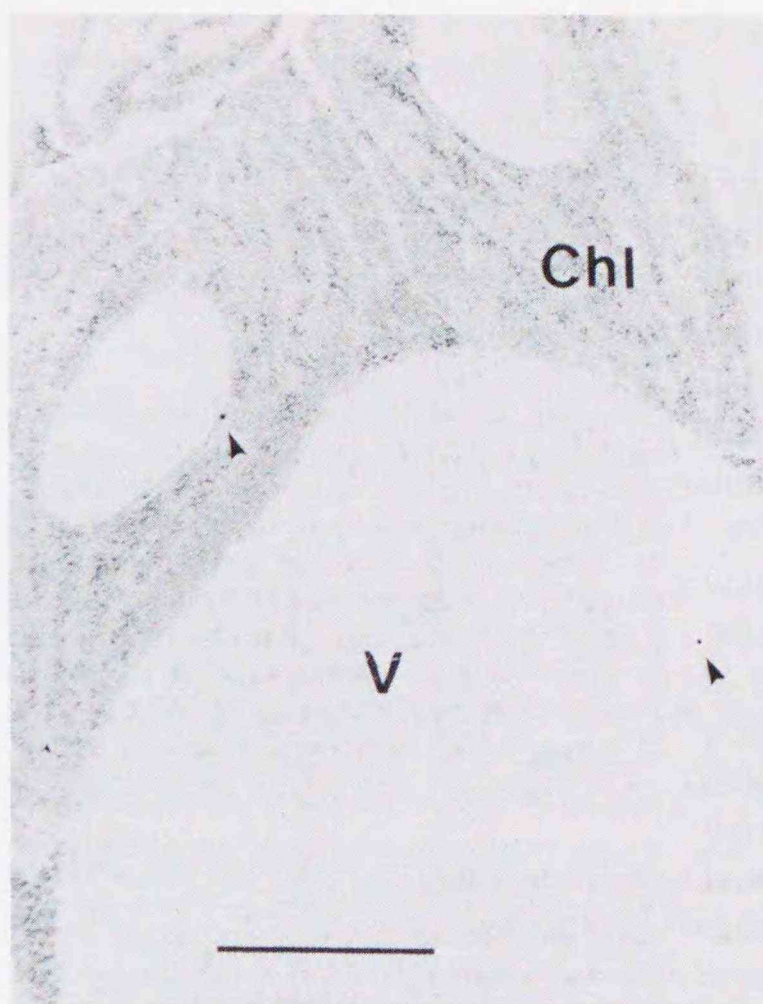


Fig.III-4 Control staining. Ultrathin section of L1 incubated with preimmune rabbit serum instead of anti-IAA antibody. Very few gold particles (arrow heads) are randomly distributed over the sections. Chl, chloroplast ; V, vacuole. Bar= $1\mu\text{m}$; $\times 22,000$.

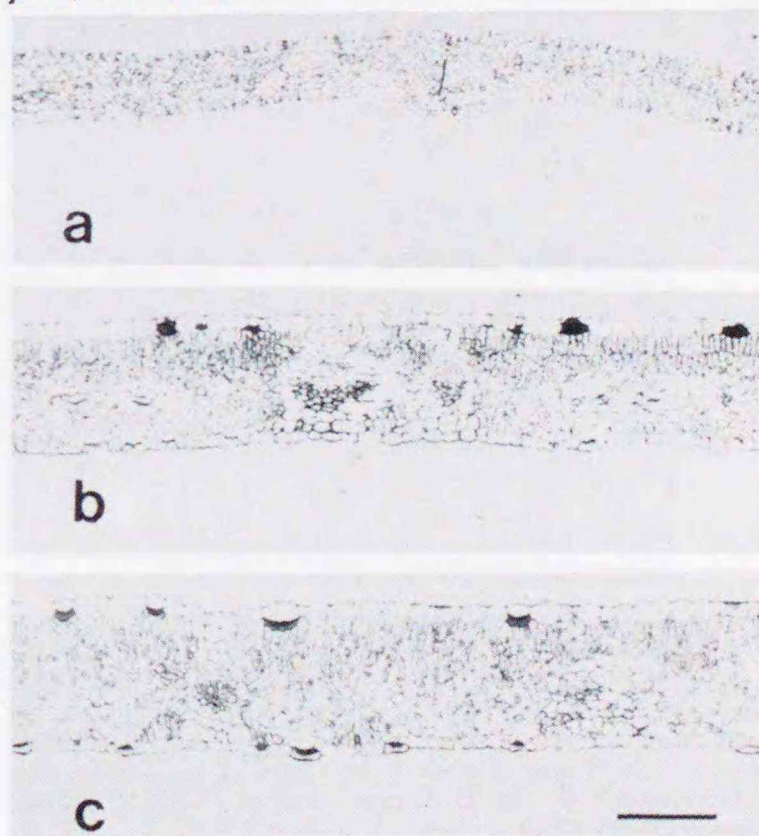


Fig.III-5 Micrographs of transverse sections through the peach leaves at different stages of development. a, L1 leaf is poorly differentiated with densely packed small cells. b, The cells of L2 leaf become larger. Bundle sheath, palisade parenchyma and spongy parenchyma are completely differentiated. c, L3 leaf reached the final size. The anatomical arrangement is similar to that of L2. Bar= $50\mu\text{m}$; $\times 100$.

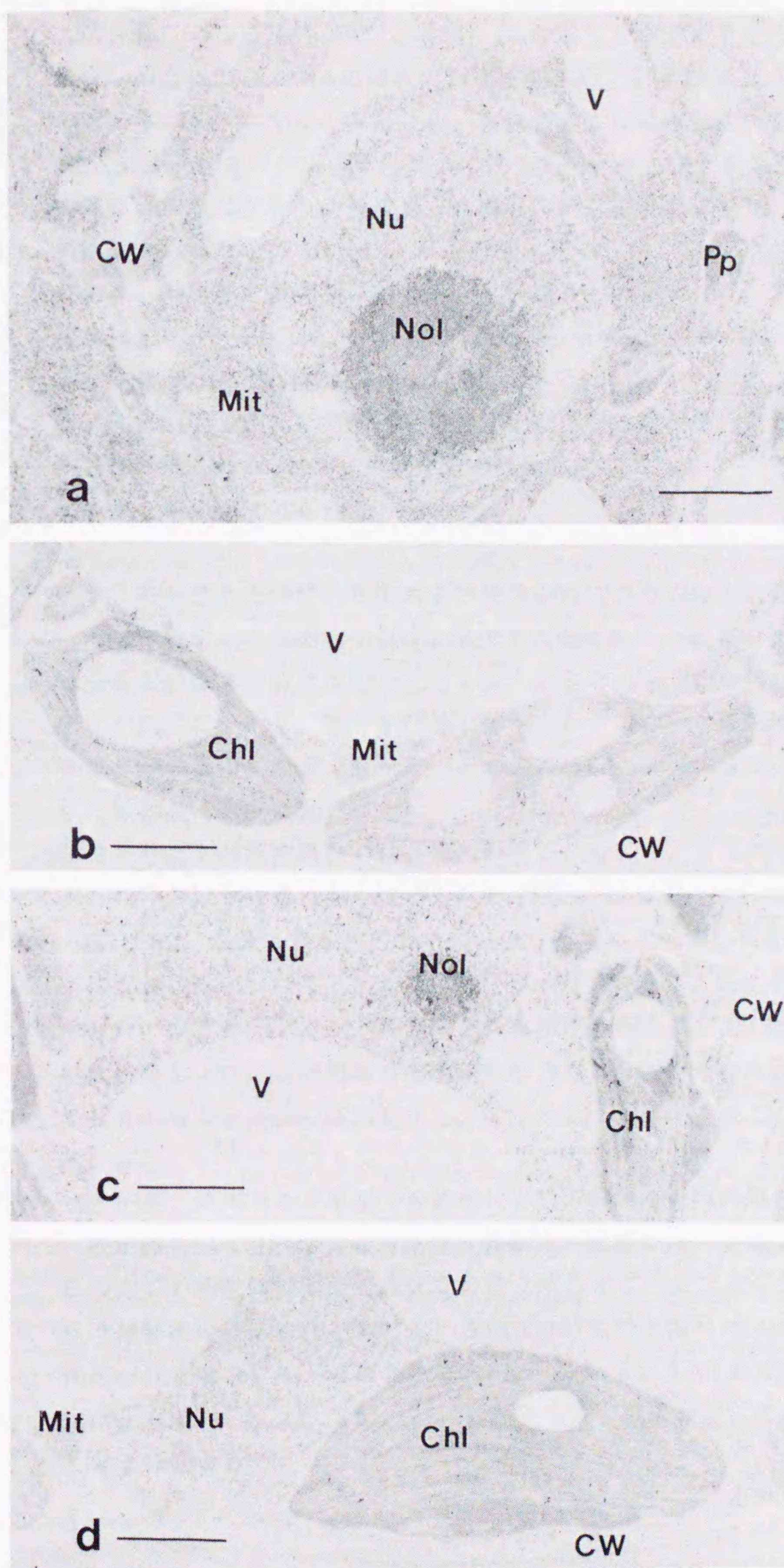


Fig.III-6 Sections of peach leaves of various stages of development, which are treated with anti-IAA antibody. a, In the parenchyma cells of L1, gold particles are distributed throughout the cytoplasm, nucleus and cell wall. b,c, spongy (b) and palisade (c) parenchyma cells of L2. Significant amount of gold particles is observed in chloroplasts. d, The palisade parenchyma cells of L3, the labeling density of the chloroplasts is higher than that of cytosol, although the level is low. Bar=1 μ m; x22,000. Chl, chloroplast; CW, cell wall; Mit, mitochondrion; Nu, nucleus, Nol, nucleolus; Pp, proplastid; V, vacuole.

と結合している可能性が考えられた。このことを確かめるためC 4 植物であるトウモロコシの葉におけるIAAの細胞内局在を調べた。C 4 植物ではRubiscoは維管束鞘細胞の葉緑体のストロマにのみ局在し、葉肉細胞には存在しないことが知られている(42,43)。トウモロコシの葉において維管束鞘細胞と葉肉細胞の葉緑体の形態の差異は明確で、前者はグラナ構造が見られず澱粉粒が発達していた。一方後者はグラナ構造が顕著であった(図III-7)。モモの葉と同様、金コロイドは葉緑体に集積する傾向にあり、細胞質や細胞壁にはわずかしき認められなかった。葉緑体におけるラベルの程度は表III-2に示したモモの葉肉細胞より低かったが、葉緑体/細胞質ゾル比は葉肉細胞で7.9、維管束鞘細胞で11.0とモモのL 2やL 3より高い値を示した。維管束鞘細胞の葉緑体における金コロイドの密度は葉肉細胞における密度より高かった(表III-4、 $P < 0.05$)。維管束鞘の葉緑体の中ではストロマよりチラコイド膜上に局在する傾向が認められた。

(7) モモ芽生えの葉肉細胞および根端細胞におけるIAAの細胞内局在性の差(44)

モモ芽生えの根端細胞を抗IAA抗体で免疫染色した結果を図III-8に示す。根端細胞は分裂細胞に特徴的な様相を呈していた。すなわち、細胞壁は薄く、小さな液胞が数個、細胞質に分散し、核および核小体が大きかった。この細胞では核小体における金コロイドの集積が顕著であった。その他の部位にも金コロイドが認められたが、核小体と比較して密度は低かった。

モモ芽生えの葉肉細胞では、成木の茎頂部のL 2、L 3の場合と同様の傾向を示し、金コロイドは葉緑体に多く認められた(図III-9)。

表III-5に根端細胞と葉肉細胞における金コロイドの密度を示した。根端細胞の核小体における金コロイドの密度は $33.45/\mu\text{m}^2$ で、細胞質ゾルの6.8倍高い値を示した。核質とミトコンドリアにおける密度も細胞質ゾルの密度より有意に高かった。柵状組織および海綿状組織の葉肉細胞におけるIAAの細胞内局在性は、上述の茎頂部のL 2の場合と同様の傾向を示し、葉緑体とミトコンドリアにおける密度が特に高かった。

(8) 茎、果肉および茎頂分裂組織におけるIAAの細胞内局在性

核小体にIAAが集積する現象が分裂細胞や成長の盛んな細胞に特徴的な現象なのか、根の全ての細胞に特徴的な現象なのかを明らかにするために、茎頂分裂組織、未熟果、根の伸長部の組織の核小体におけるIAAの局在性を調べた(図III-10)。各々の核小体における金コロイドの密度は28.1、19.9、16.2で、核小体/細胞質ゾルの比は3.1、2.8、2.2だった。これらの値は根端細胞において得られた値と比較して有意に低かった。

Tab.III-2 . Effect of peach leaf maturation on immuno-gold labelling of anti-IAA-N antibody and IAA content measured by HPLC. Values are expressed as the mean number of gold particles $\mu\text{m}^{-2} \pm \text{SE}$. n = Number of areas for which the values were obtained. a, Starch area was omitted; b, data were obtained from proplastid area.

	L1	L2	L3
Cytosol	4.4 $\pm$ 0.5 (n=10)	4.0 $\pm$ 0.5 (n=14)	1.1 $\pm$ 0.1 (n=16)
Chloroplasts ^a	6.8 $\pm$ 1.0 ^b (n=9)	15.5 $\pm$ 1.2 (n=14)	3.5 $\pm$ 0.4 (n=16)
Nucleoplasm	5.0 $\pm$ 0.5 (n=8)	3.7 $\pm$ 0.8 (n=7)	2.2 $\pm$ 0.6 (n=7)
Nucleoli	9.9 $\pm$ 1.8 (n=5)	11.3 $\pm$ 2.9 (n=3)	1.7 $\pm$ 0.8 (n=4)
Mitochondria	5.3 $\pm$ 1.0 (n=9)	15.4 $\pm$ 1.2 (n=13)	3.2 $\pm$ 0.6 (n=12)
Cell wall	6.8 $\pm$ 0.4 (n=10)	5.1 $\pm$ 0.6 (n=12)	1.4 $\pm$ 0.2 (n=16)
Vacuole	0.5 $\pm$ 0.1 (n=10)	0.4 $\pm$ 0.1 (n=13)	0.3 $\pm$ 0.1 (n=16)
IAA content (ng FW g ⁻¹)	121.5	68.3	11.4

Tab.III-3. Difference in immuno-gold distribution between spongy parenchyma cells and palisade parenchyma cells of L2. Values are expressed as the mean number of gold particles per μm^2 +standard errors; n=number of areas for which the values were obtained

	Spongy parenchyma	Palisade parenchyma	Significance (P<)
Cytosol	5.6 $\pm$ 0.6 (n=7)	2.4 $\pm$ 0.3 (n=7)	0.01
Chloroplasts	17.9 $\pm$ 1.5 (n=7)	13.1 $\pm$ 1.5 (n=7)	NS ^a
Nuclei	6.6 $\pm$ 1.2 (n=2)	2.6 $\pm$ 0.2 (n=5)	0.001
Cell Wall	5.1 $\pm$ 0.9 (n=7)	5.1 $\pm$ 0.8 (n=5)	NS
Vacuole	0.4 $\pm$ 0.04 (n=6)	0.4 $\pm$ 0.1 (n=7)	NS

a : not significant

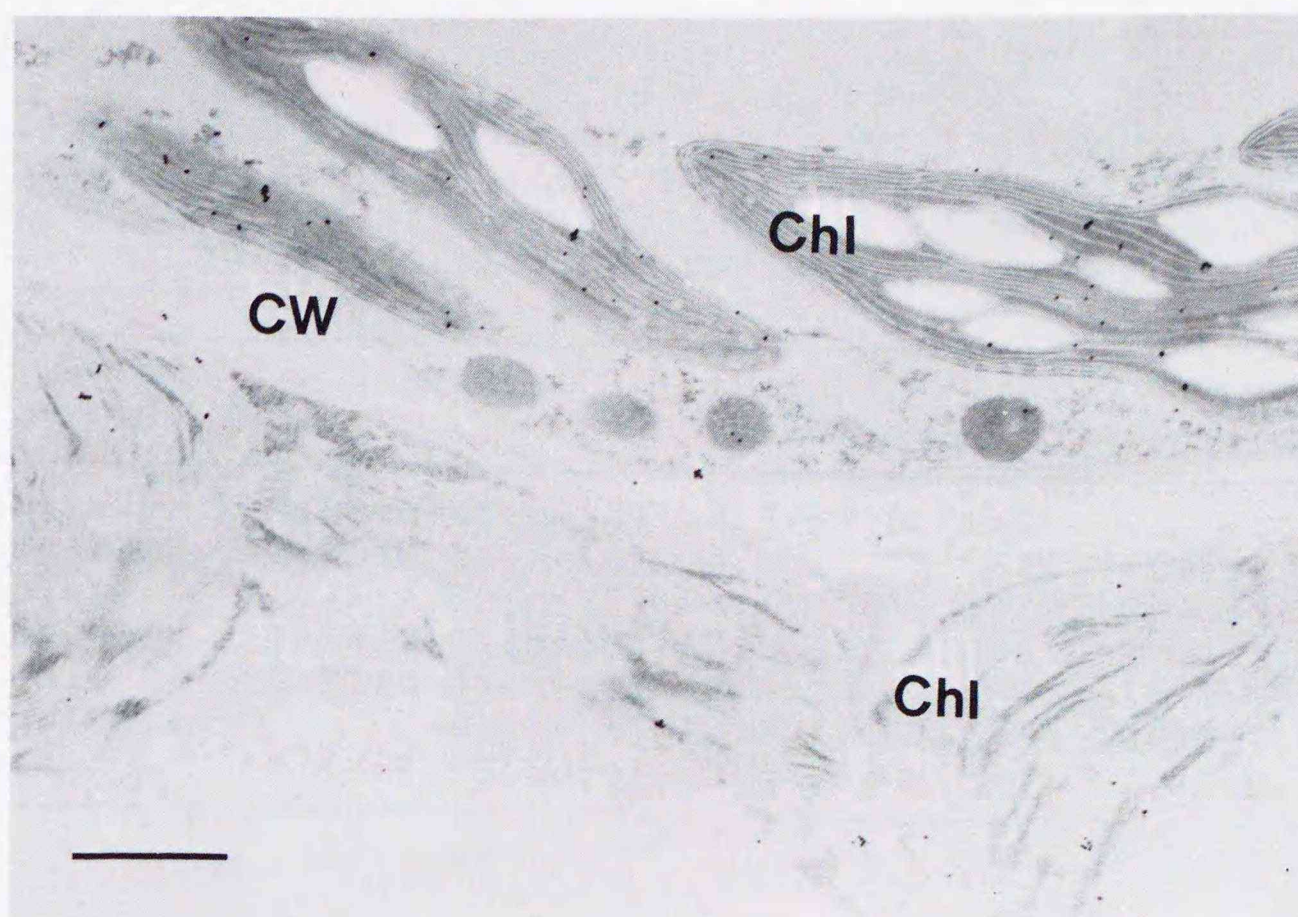


Fig.III-7. A section of a maize leaf treated with anti-IAA antibody. Gold particles are found in chloroplasts of both mesophyll (lower) and bundle sheath (upper) cells. CW, cell wall; Chl, chloroplast. bar=1 μ m, x15,300.

Tab.III-4. Difference in immuno-gold distribution between in mesophyll cells and bundle sheath cells of maize leaf. Values are expressed as the mean number of gold particles per $\mu\text{m}^2 \pm$ standard erros; n=number of areas over which the values obtained

	Mesophyll cells	Bundle sheath cells	Significance (P<)
Cytosol	0.30+0.09 (n=4)	0.58+0.13 (n=8)	NS
Chloroplasts ^a	2.39+0.34 (n=4)	6.41+1.97 (n=9)	0.05
Mitochondria	-	3.10+0.81 (n=5)	-
Nucleoplasm	2.92 (n=1)	1.97+0.27 (n=5)	-
Nucleoli	-	3.18+0.62 (n=3)	-
Cell Wall	0.63+0.19 (n=3)	0.72+0.23 (n=9)	NS
Vacuole	0.06+0.02 (n=2)	0.09+0.03 (n=9)	NS

a : starch area was omitted.

Tab.III-5 Difference in immuno-gold distribution between in meristematic cells of root tip and parenchymal cells of leaf of peach seedlings. Values are expressed as the mean number of gold particles per μm^2 $\pm$ standard errors ; n=number of observation

	Root tip	Spongy parenchyma	Palisade parenchyma
Cytosol	4.89 $\pm$ 0.46 (n=10)	3.57 $\pm$ 0.51 (n=6)	3.57 $\pm$ 0.36 (n=6)
Nucleoplasm	8.38 $\pm$ 0.54 (n=10)	4.96 $\pm$ 1.52 (n=2)	4.31 $\pm$ 0.54 (n=5)
Nucleolei	33.45 $\pm$ 2.60 (n=10)	—	7.90 $\pm$ 2.15 (n=2)
Mitochondria	11.94 $\pm$ 2.01 (n=10)	10.21 $\pm$ 3.15 (n=5)	12.62 $\pm$ 2.02 (n=5)
Cell wall	2.21 $\pm$ 0.34 (n=10)	2.05 $\pm$ 0.45 (n=6)	1.34 $\pm$ 0.26 (n=6)
Chloroplasts	—	13.43 $\pm$ 1.81 (n=6)	12.28 $\pm$ 1.01 (n=6)
Vacuole	0.48 $\pm$ 0.05 (n=10)	0.44 $\pm$ 0.09 (n=6)	0.66 $\pm$ 0.11 (n=6)

第4節 考察

<抗体の特異性>

本実験ではモモの種々の組織におけるIAAの細胞内局在性を免疫細胞化学的手法を用いて明らかにした。生体内にはIAAの前駆体や代謝産物であるインドール化合物が数多く存在し、その中にはIAAより多量に存在する化合物もある。したがってIAAのような低分子化合物をハプテンとした抗体を本手法に応用する場合、抗体の特異性が最も重要な問題となる。しかし、本実験で作製した抗IAA抗体はこれらの化合物に対する交差反応性はきわめて低く、合成オーキシンであるNAAにのみ高い交差反応性を示した(表III-1)。

<IAAの固定>

IAAは水および有機溶媒に可溶であり、試料を樹脂に包埋する過程で、流出や分布の変化がおこっている可能性がある。しかしPerbalら(33)によってIAAはglutalaldehydeにより細胞内の巨大分子にインドール環のイミノ基の位置で固定されることが示された。また、組織の固定・包埋と同様の条件において生体濃度のIAAが茎頂部から抽出したタンパク質に固定されることがimmunotitration-plate model system

Fig.III-8. Immuno-gold localization of IAA in meristematic cells of root tip. Gold particles are accumulated in nucleolus (No). Nu, nucleus; Mit, mitochondrion; V, vacuole; bar=1 μ m, $\times 15,300$.

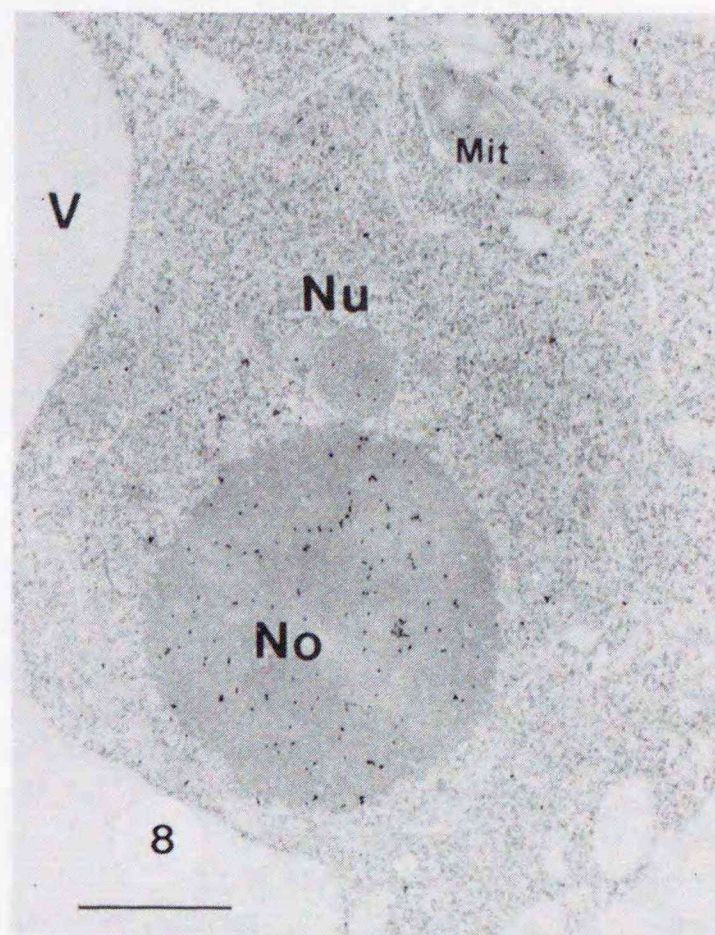
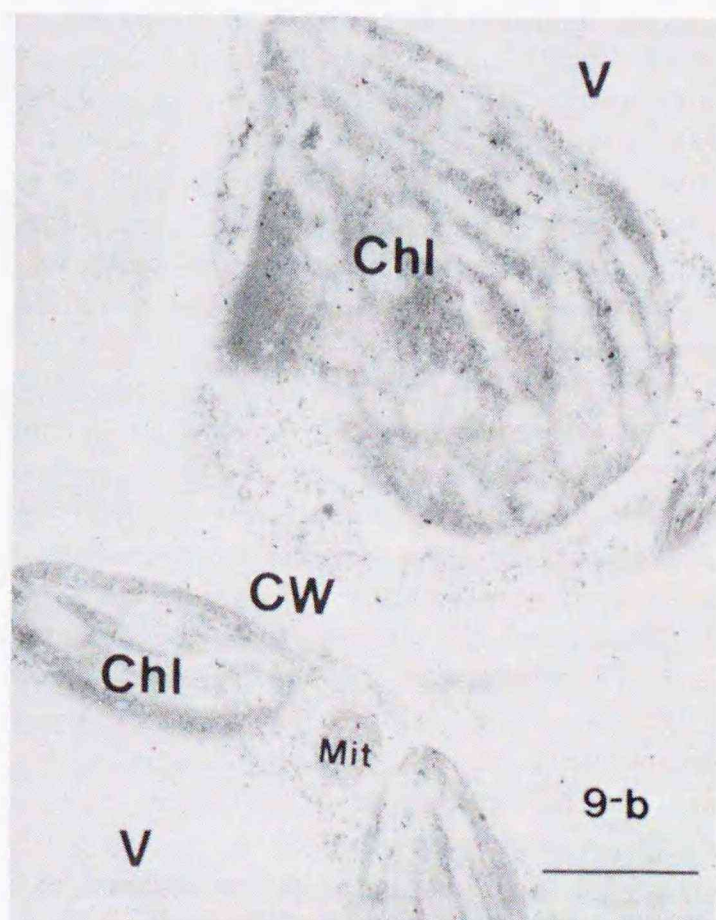
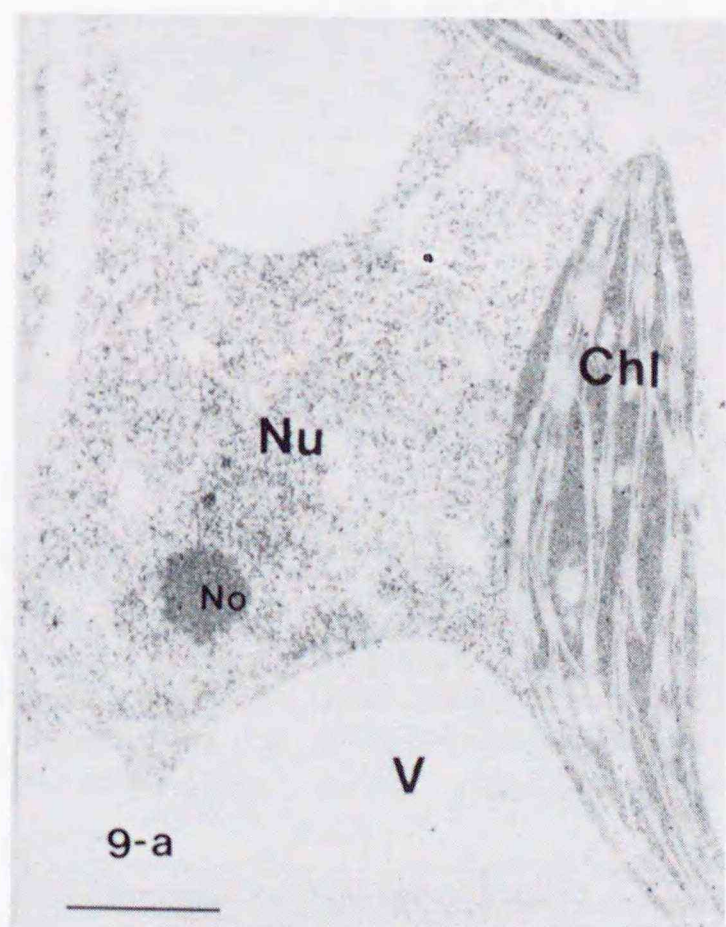


Fig.III-9. In leaf cells, gold particles are mainly associated with chloroplasts (Chl) and nucleus (Nu) in cells of both palisade parenchyma (a) and spongy parenchyma (b). Mit, mitochondrion; Nu, nucleus; V, vacuole; CW, cell wall; bar=1 μ m, $\times 15,300$.



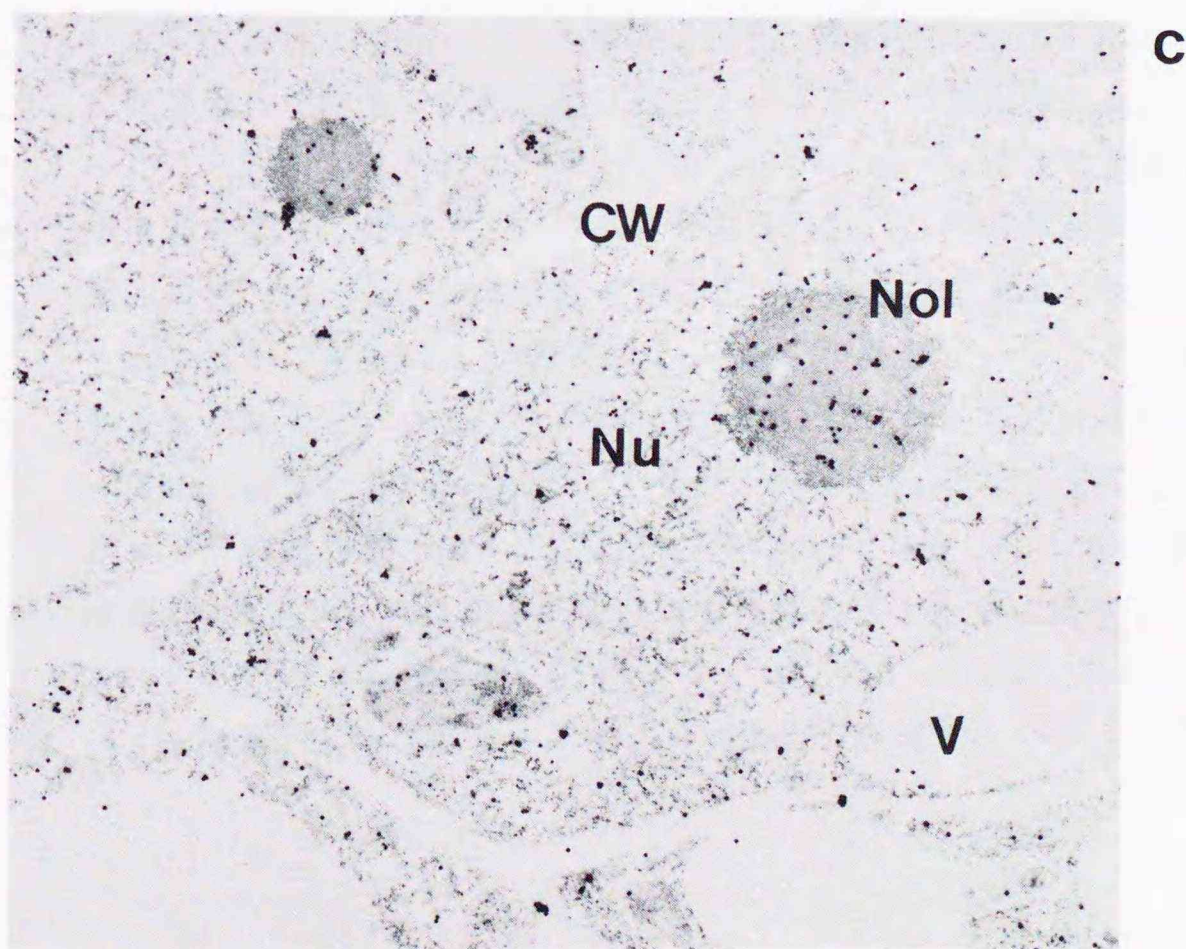
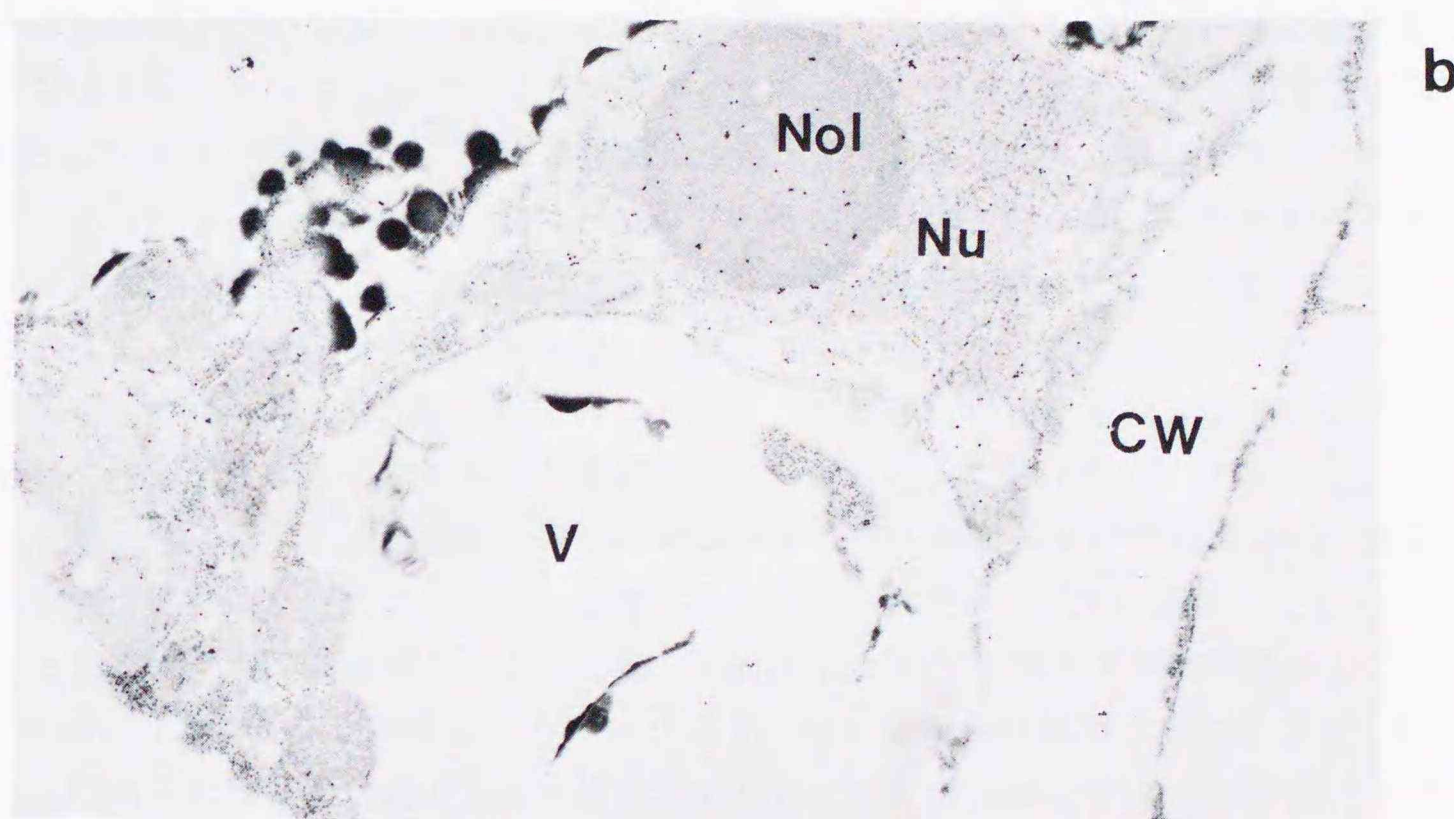
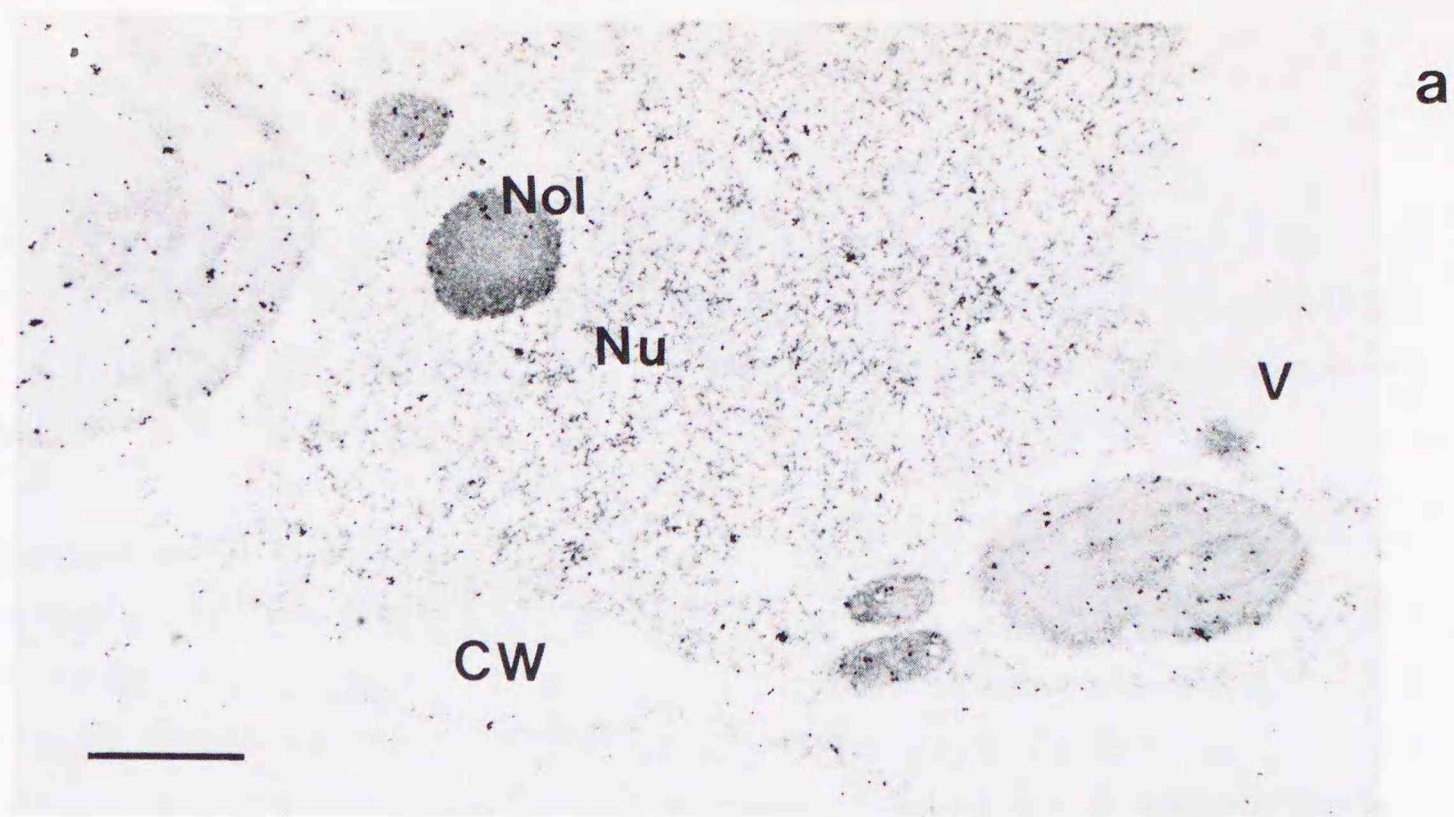


Fig.III-10. Immuno-gold localization of IAA in cells of a, elongation zone of root; b, mesocarp of a immature fruit; c, shoot meristem. Nol, nucleolus; Nu, nucleoplasm; V, vacuole; CW, cell wall; bar=1 μ m, x15,300.

によっても確認することができた。さらにHPLCによるIAAの定量値を反映し、金コロイドの密度はL1およびL2において高く、L3において著しく低い傾向にあった。これらのことから免疫電顕によって得られた結果は生体内における局在の傾向を反映しているものと考えられる。

<葉肉細胞におけるIAAの局在について>

葉肉細胞では、IAAは液胞を除く様々な部位に散在していた。単位面積当りの金コロイドの数で比較した場合、特に顕著だったのは葉の成熟に伴うIAAの葉緑体への集積である。細胞当たり各細胞内小器官の占める割合は成長の過程で大きく変化し、未展葉(L1)では核が大きく細胞質ゾルも豊富だが、展葉(L2、L3)では細胞質の大半が葉緑体で占められていて、このことを考慮した場合、IAAは若い葉の葉肉細胞では核や細胞質ゾルに多く、そして葉が成長するにしたがい葉緑体に集積するという傾向は、より顕著になる。葉の葉緑体における内生IAAの存在は機器分析によっても示されている。Sandbergら(31)はヒマワリの葉の葉緑体と細胞質ゾルのそれぞれの画分の内生IAA量を測定した結果、30~40%のIAAが葉緑体に存在することを示した。また、IAAの放射性前駆体を用いてIAAの生合成活性が細胞質ゾルに存在することを明らかにした(45)。彼らはこのことから、葉緑体に存在するIAAは細胞質で合成されたIAAが取り込まれたものと推察した。一般にIAAの生合成活性は若い葉ほど高く、成長するにしたがい低くなる。したがって、モモの葉において成長に伴い葉緑体に存在するIAAが増加するのは細胞質ゾルで合成されたIAAが取り込まれたためと考えられた。同様の現象がアブシジン酸(ABA)においても認められている。

Sossountzovらは免疫電顕法によりABAが成長に伴い葉緑体に集積することを示した(46)。ABAの合成は細胞質で行われると考えられており(47,48)、細胞質で合成されたABAが成熟に伴い取り込まれた可能性が指摘された。また、ABAが光合成に関与しているのはこれまで多くの報告があり(49)、葉緑体におけるABAの集積はABAが光合成に直接働いていることを示唆した。オーキシンの葉緑体における役割に関しては現在のところ明らかにされていない。葉においてオーキシンは細胞分裂を誘導し、その効果は若い葉ほど高い、という報告がある(17)。この場合オーキシンは直接あるいは間接的に核へ作用し、細胞分裂を誘導しているものと考えられる。したがって成長に伴う葉緑体への集積は、葉緑体でIAAが働いているというより、成長に伴いオーキシン要求量が減少し、必要以上のIAAをとりこんでいるのではないかと考えられる。

Wardropら(41)によってエンドウマメからRubiscoがABPとして単離された。したがって、葉緑体中のIAAがRubiscoと結合して存在している可能性が考えられた。C4植物ではRubiscoは維管束鞘細胞の葉緑体のストロマに局在し、葉肉細胞には存在しないことが示されている(42,43)。そこでこれらの細胞におけるIAAの局在を調べた。IAAは両者の葉緑体のグラナおよびストロマに存在した。すなわちIAAはRubiscoの存

在しない葉肉細胞の葉緑体にも存在していることが明らかになった。単位面積当りの金コロイドの密度は維管束鞘細胞の方が高かったが、葉緑体の中ではストロマよりもチラコイド膜上に存在する傾向にあり、Rubiscoとは局在を異にしていた。

<種々の組織におけるIAAの細胞内局在性について>

本実験で調べた種々の細胞のなかで根端細胞にのみ認められたのは核小体におけるIAAの集積である。核小体における金コロイドの密度は $33/\mu\text{m}^2$ で、細胞質ゾルの約7倍と、調べた中では最も高い値を示した。未熟な葉や果実の細胞、あるいは茎端の分裂組織のように分裂・成長が盛んな細胞は核や核小体が根端細胞と同様きわめて大きく、タンパク質の合成が活発な細胞に特徴的な様相を呈していた。しかし、これらの細胞の核小体における金コロイドの密度や核小体/細胞質ゾルの比は根端細胞に比べて低かった。また、根端細胞以外の根の細胞の核小体にはIAAの集積は認められなかった。したがって核小体におけるIAAの集積は根端細胞に特異的な現象であると考えられる。核小体はrRNAの合成の場であり、IAAは根端細胞の核小体においてこの細胞に特異的なrRNAの発現に関与している可能性が示唆された。

<核におけるオーキシンの局在について>

また、最近オーキシンが特異的なmRNAの発現やタンパク質の合成を誘導することから、核におけるIAAの直接的あるいは間接的な作用が示唆されている(22)。オーキシンが核に作用する場合、オーキシン受容体がオーキシンの情報を核に伝達しているものと考えられる。この仮説は核や細胞質ゾルを含む可溶性画分からいくつかのABPが見いだされていることから支持される。Sakaiらによりヤエナリマメから単離された2種類の可溶性ABP (ABPI、ABPII) は、IAAとともに単離核に作用させることにより特異的mRNAの合成を促進することが示された(6)。本研究により内生のIAAが核に存在することが明らかになり、オーキシン受容体と共にIAAが核に移動し作用を及ぼしている可能性が示唆された。

核におけるIAAの存在量は根端細胞や未熟葉などの若い細胞に多かった。外生オーキシンの取り込み実験によっても同様の現象が報告されている。Driss-Ecoleら(50)はトマトの茎頂部において、分裂組織の細胞では、核や細胞質ゾルにとりこまれる割合が高く、細胞が分化するにつれて同部位における取り込み量が低くなることを示した。また、タマネギの根端細胞では核に特異的にIAAが取り込まれることが示されている(51)。これらの結果から未分化の細胞においてオーキシンが核に強く働き遺伝子発現に関与し、分化を誘導する可能性が示唆された。

<膜結合型ABPとの関係について>

前述した核以外にもオーキシンの結合部位は種々の膜系—すなわち液胞膜、細胞膜、

そして粗面小胞体ーに見いだされている(26)。しかし免疫電顕の結果では、これらの膜における金コロイドの密度は低かった。本実験で用いたアルデヒドのみの単固定法ではオスミウム酸による後固定の過程を省いているため膜構造の保持が悪く、電顕写真では白く抜けて見える。したがって、膜に存在するIAAは流出してしまっている可能性がある。あるいは結合部位とIAAとの結合が一時的であるためにわずかししか検知できなかったのかもしれない。

<まとめ>

IAAは基本的にはどの組織、どの細胞にも遍在する植物ホルモンであり、細胞の中においても液胞を除く部位に広く分布していた。しかし、それぞれの細胞内小器官におけるIAA濃度、すなわち金コロイドの密度を詳しく解析すると、IAAは組織特異的で、かつ組織の成長段階により異なる細胞内局在性を示すことが明らかになった。最も特徴的だったのは、葉肉細胞において成長に伴いIAAが葉緑体に集積することと、根端細胞において核小体に集積していることであった。これらの現象とオーキシンの作用を直接結び付けることはできなかったが、組織特異的なオーキシンの細胞内局在性は、オーキシンがもたらす多様な生理作用の1要因となっていることが示唆された。

第4章 果樹組織からのオーキシン結合タンパク質の 単離・精製

第1節 緒論

オーキシンの刺激は細胞内に存在するタンパク質（オーキシン受容体）がオーキシンと結合することによって作用部位に伝えられると考えられている。この仮説を元に、標識オーキシンを用いて細胞内のオーキシン結合部位を検索する試みが多く研究者によってなされてきた。1978年、Dohrmannら(26)はトウモロコシ芽生えの膜画分には細胞膜（Site I）、粗面小胞体（Site II）、液胞膜（Site III）にオーキシン結合部位が存在することを最初に示した。それ以後様々な植物の膜画分（Site I～III）にオーキシン結合活性が存在することが示されている(52)。また、核や細胞質ゾルを含む可溶性画分にもオーキシン受容体の存在が示唆されてきた。これらのことから細胞内には複数のオーキシン受容体が存在し、多様なオーキシン作用を生み出しているものと推察された。

1980年代になるとこれらの結合部位からオーキシンに特異的に結合するタンパク質（オーキシン結合タンパク質；ABP）を単離する試みがなされるようになった。ABPの精製には研究者によって様々な手法が用いられているが、大きく次に示すような3通りの方法に分けられる。1）イオン交換やゲル濾過によるカラムクロマトグラフィー、2）合成オーキシンをリガンドにしたアフィニティークラムクロマトグラフィー、3）抗体カラムクロマトグラフィーによる精製。

トウモロコシ黄化芽生えから膜結合型ABPを単離する試みがこれら3種類の方法で異なる研究者によりそれぞれ行われた。Venisら(53)は1）の方法でABPの精製に取り組み、サブユニットの分子量が20 kDaのタンパク質にオーキシン結合活性が存在することを明らかにしたが、完全精製には至らなかった。Löbnerらが3）の方法によりそのABPの単離に成功した(28)。しかしこの方法は煩雑で多大な労力を要し、再現性に乏しいという欠点があり、彼ら以外に成功した例は報告されていない。その後Shimomuraら(27)は2）の方法、すなわちNAA-Sepharoseカラムを用いて、より簡便に同タンパク質を単離することに成功した。可溶性画分に存在するABPは酒井らが2,4-D-Sepharoseをアフィニティークラムを用いて、ヤエナリマメの黄化芽生えから単離している(54,55)。Shimomura、Sakai 両者ともアフィニティークラムのステップにおいて著しく比活性の上昇が認められた、と報告している。ABPの植物体における存在量はわずかで、かつ不安定な場合が多いため、なるべく少ないカラム操作で比活性を上げる必要がある。したがって現在ではオーキシンのみならず、他の植物ホルモンにおいてもアフィニティークラムを用いた方法が最も多く用いられている。

これまでABPの研究は黄化芽生えや培養細胞など特殊な条件のもとに生育した特殊

な状態の植物に限られていた。また、植物の種類も草本植物がほとんどで、木本植物では調べられていない。しかし、植物のオーキシンに対する反応は環境やステージ、組織、あるいは植物の種類によって様々であり、このような多様性がオーキシン受容体の多様性によってもたらされている可能性がある。そこで、本章では自然条件下のもとに生育したモモ成木の新梢の茎頂部および成長過程の未熟な果実から、アフィニティークロマトグラフィーによるABPの単離・精製を試みた。これらの器官はモモ成木において最も成長の盛んな部位である。

予備実験においてオーキシン結合活性は茎頂部の膜画分と可溶性画分の両者に認められた。しかし、総活性は可溶性画分の方が圧倒的に多いこと、また、成長中の若い組織では核や細胞質ゾルなどの可溶性画分に内生オーキシンであるIAAが豊富に存在することから、可溶性画分からABPの精製を試みた。その結果、茎頂部には2種類のオーキシンに対する結合の性質の異なるABP (sABP1、sABP2) が存在することが明らかになった。また、果実に存在するABP (sABP3) はsABP1と同じタンパク質である可能性が示唆された。

第2節 材料と方法

本章において用いた緩衝液の組成を以下に示す。

T 緩衝液	;	0.1M	Tris-HCl (pH 8.0)
		1M	NaCl
		10mM	2-ME (2-mercaptoethanol)
A 緩衝液	;	0.1M	Acetic acid (pH 4.0)
		10M	NaCl
		10mM	2-ME
B 緩衝液	;	0.1M	Boric acid (pH 8.0)
		1M	NaCl
		10mM	2-ME
抽出用緩衝液	;	50mM	Tris-HCl (pH 7.6)
		1mM	EDTA(ethylenediaminetetraacetic acid)
		20mM	2-ME
		1mM	PMSF(phenylmethylsulfonylfluoride)
		20mM	sodium ascorbate
M E M 緩衝液	;	10mM	MES(2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid)(pH6.0)
		1mM	EDTA
		10mM	2-ME

	0.5mM	PMSF
B A 緩衝液 ;	10mM	HEPES(N-2-hydroxyethylpiperazine-N-2-ethane-sulfonic acid)(pH 7.0)
	0.25mM	EDTA
	1mM	2-ME
	0.5mM	PMSF
H E M 緩衝液 ;	10mM	HEPES (pH 7.0)
	1mM	EDTA
	10mM	2-ME
H K 緩衝液 ;	20mM	HEPES (pH 7.0)
	1mM	EDTA
	10mM	2-ME
	150mM	KCl
T E M 緩衝液 ;	10mM	Tris-HCl (pH 7.6)
	1mM	EDTA
	10mM	2-ME

< 茎頂部からの A B P の精製 >

試料：果樹試験場で栽培しているモモ‘あかつき’の茎頂部を実験に用いた。茎端から約 3 cm のところの、未熟な葉を数枚含む部位を切取り、水洗後 - 8 0 ℃ に保存した。

2,4-D-Sepharose 4B カラムの作成：Hutzinger ら (56) の方法に従い、2,4-D-lysine を合成した (図 IV-1)。これを 0.4 M NaOH 溶液に溶解し、1 0 m M の冷 HCl 溶液で洗浄した CNBr-activated-Sepharose 4B (pharmacia, Sweden) と混合した。4 ℃ で 1 6 時間振とう後カラムに充填し、T、A、B 緩衝液で順次洗浄した。

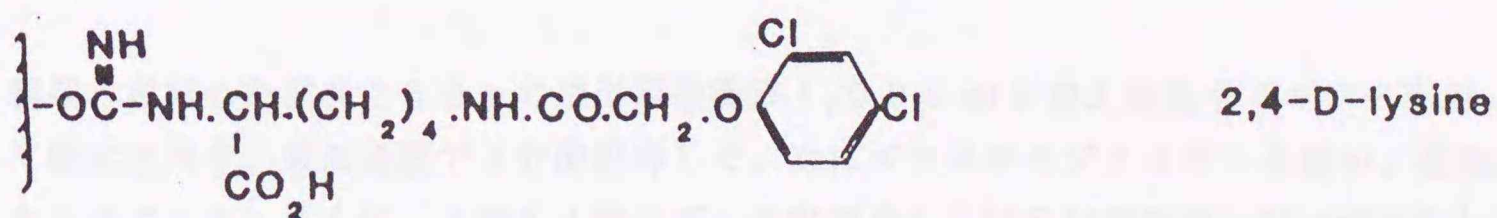


Fig.IV-1. The matrices of 2,4-D-Sepharose column.

s A B P 1 の精製；グラスホモゲナイザーを用い、茎頂部 50 g に 15 g の polyvinyl-polypyrrolidone (PVPP) を加え、抽出用緩衝液 200 ml 中ですりつぶした。遠心後、上清を 4 層のガーゼで濾過して MEM 緩衝液 (20mM KCl) で平衡化した Sephadex G-25 に通した。タンパク質画分を MEM 緩衝液 (20mM KCl) で平衡化した CM-Toyopearl につけ、同緩衝液で洗浄後、0.02 から 0.6 M の濃度勾配の KCl / MEM 緩衝液で溶出した。オーキシン結合活性を含む画分を集め、100% 硫酸沈澱によりタンパク質を集め BA 緩衝液に溶解した。これを BA 緩衝液で平衡化した Sephacryl S-200 カラムにつけ、同緩衝液により溶出した。オーキシン結合活性を含む画分を、HEM 緩衝液で平衡化した 2,4-D-Sepharose につけた。カラムを HEM 緩衝液で洗浄後、さらに 0 から 0.6 M の濃度勾配の KCl / HEM 緩衝液で洗浄した。ついで 50 mM の 2,4-D と 0.5 M KCl を含む HEM 緩衝液でオーキシン結合活性を溶出した。この画分を限外濾過 (モルカット L, ミリポア) により濃縮し、HK 緩衝液で平衡化した Sephadex G-25 に通しタンパク質画分を得た。これを HK 緩衝液で平衡化した Con A-Sepharose につけた。カラムを同緩衝液で洗浄後 0 から 0.4 M の濃度勾配の α -methyl-D-glucoside / HK 緩衝液で溶出した。

s A B P 2 の精製；CM-Toyopearl カラム素通り画分を TEM 緩衝液 (20mM KCl) で平衡化した Sephadex G-25 カラムに通し、タンパク質画分を得た。これを TEM 緩衝液 (20mM KCl) で平衡化した DEAE-Toyopearl につけ、同緩衝液で洗浄後、0.02 から 0.6 M の濃度勾配の KCl / TEM 緩衝液で溶出した。オーキシン結合活性を含む画分を集め、s A B P 1 と同様の方法で Sephacryl S-400、2,4-D-Sepharose のカラムクロマトグラフィーにより精製した。

< 果実からの A B P の精製 >

試料：果樹試験場で栽培しているモモ ‘あかつき’ の未熟果 (5月25日採取) を実験に用いた。果実は水洗後、液体窒素で凍結し、-80℃に保存した。

精製：凍結した試料 250 g に抽出用緩衝液 1,000 ml を加え家庭用ミキサーを用いて窒素気流中、最高速度で 3 分間粉碎した。次にグラスホモゲナイザーを用い、微細にすりつぶした。遠心後、上清を 4 層のガーゼで濾過し、MEM 緩衝液 (20mM KCl) で平衡化した Sephadex G-25 につけた。タンパク質画分に MEM 緩衝液 (20mM KCl) で平衡化した CM-Toyopearl を 200 ml 加え 1 時間攪拌した。グラスフィルターでゲルを回収し、MEM 緩衝液 (20mM KCl) で洗浄後、1 M KCl / MEM 緩衝液で溶出した。100% 硫酸沈澱によりタンパク質を集め HEM 緩衝液に溶解した。これを HEM 緩衝液で平衡化した Sephadex G-25 につけ、同緩衝液により溶出した。タンパク質画分を、

H E M緩衝液で平衡化した2,4-D-Sepharoseにかけた。カラムをH E M緩衝液で洗浄後、1 M KCl (または5 0 mM オーキシン) を含むH E M緩衝液でオーキシン結合活性を溶出した。この画分をB A緩衝液に透析し、結合活性を測定した。

<タンパク質の定量および分子量の測定>

タンパク質の定量；B S Aを標準とし、Lowryら(57)の方法にしたがい測定した。

分子量の測定；未変性の蛋白の分子量は、Sephacryl S-200カラムクロマトグラフィーにより、aldolase (158 kDa)、bovine serum albumin (67 kDa)、ribonuclease A (13.7 kDa)、を分子量マーカーとして用い、推定した。

サブユニットの分子量は、Laemliら(58)の方法に従い、SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) により測定した。分子量マーカーとしてbovine serum albumin (67 kDa)、ovalbumin (43 kDa)、chymotrypsinogen (25 kDa)、ribonuclease A (13.7 kDa)を用いた。

2次元電気泳動：2次元電気泳動は、1次元目をnative-PAGE(59)、2次元目はSDS-PAGE(58)により展開した。

<オーキシン結合活性の測定>

オーキシンの結合活性は平衡透析法または硫酸沈澱法により測定した。

平衡透析法；中央を透析膜 (spectrapor 2, spectrum, USA)で隔てられた平衡透析セル (サンブラテック) の片側にB A緩衝液に溶解したタンパク質、もう片側にB A緩衝液をいれ、両側に ^{14}C -2,4-Dを添加した。4℃で4時間振とうした後、各々の放射活性を測定し、両者の差を結合活性 (a) とした。過剰量の非標識 2,4-Dを両側に加えて測定した際の値を非特異的結合活性 (b) とし、aとbの差を2,4-D特異的な結合活性とした。

硫酸沈澱法；シリコン樹脂でコートした超遠心チューブにB A緩衝液に溶解したタンパク質と ^{14}C -2,4-Dを加え全量を500 μl とし、25℃の水浴中で10分間培養した。これに硫酸で飽和した20 mM HEPES緩衝液 (pH 7.0) を2 ml加え、攪拌後氷上に30分以上静置した。遠心分離 (20,000 rpm, 20分間) によりタンパク質を沈澱させ、上清をアスピレーターで吸引した。沈澱を1 mlの20 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.6) に溶解し、液体シンチレーション用バイアルに移した。これにシンチラント (シンチゾルI、半井化学) を10 ml加え、液体シンチレーションカウンター (アロカ LC 3000) で放射活性を測定した。

第3節 結果

(1) モモ茎頂部からのオーキシン結合タンパク質の精製

CM-Toyopearlカラムクロマトグラフィーでは、粗抽出液中に含まれた総活性の約40%がカラムに保持され、残りの活性はカラムを素通りした(表IV-1)。素通り画分のkinetic parameterは溶出画分と異なるため、別のABPが存在するものと考えられた。そこで図IV-2に示す精製のフローチャートにしたがって、それぞれの画分からABPの単離を試みた。CM-Toyopearlカラム溶出画分および素通り画分から得られたABPをそれぞれsABP1、sABP2とした。

1. sABP1の精製

CM-Toyopearlカラムに保持されたオーキシン結合活性はKC1の濃度勾配による溶出によって非対称的なピークとして溶出された(図IV-3)。結合活性をもつフラクション(fr. 13-22)を全て集め、Sephacryl S-200カラムにかけた。Sephacryl S-200ではオーキシン結合は1つの大きなピークと、2つの小さなピークに分かれた(図IV-4)。大きなピークに相当するフラクション(fr. 23-28)を集め2,4-D-Sepharoseにかけた(図IV-5)。試料を流した後、カラムは0から0.6 MのKCl濃度勾配で洗浄した。高塩濃度の緩衝液による洗浄は、非特異的にカラムに結合していたタンパク質を洗い流すのに効果的だった。オーキシン結合活性は50 mMの2,4-Dを含む緩衝液で溶出した。溶出液を結合活性の測定に用いる場合は2,4-DをSephadex G-25のゲル濾過により取り除き、さらにBA緩衝液で一晩透析した。1 M KClによってもオーキシン結合は溶出することができたが収率は低く、2,4-D溶出の場合の半分以下だった。

2,4-D-Sepharoseカラムクロマトグラフィー後のSDS-PAGEでは1本のメジャーなバンドと数本のマイナーなバンドが認められた。メジャーなバンドはPAS染色に陽性であることから(データ未掲載)糖タンパク質であると考えられた。そこで最後のステップとしてConA-Sepharoseカラムによる精製を試みた(図IV-6)。 α -methyl-D-glucosideによる溶出で、280 nmのピークと結合活性のピークが一致した。

sABP1の精製表を表IV-1に示した。

2. sABP1の分子量

未変性のsABP1はSephacryl S-200カラムのゲル濾過により分子量が約80 kDaから100 kDaと推定された(図IV-4)。SDS-PAGEでは、分子量20 kDaのところに単一のバンドとして認められた(図IV-7)。したがってsABP1は4~5個のサブユニットによって構成されているタンパク質であると推定された。

Table IV-1. Purification of sABP1 from shoot apices of peach trees.

Purification step	Protein (mg)	2,4-D-binding activity (pmol/mg prot.)	Total 2,4-D binding (nmol)	Yield (%)
Crude protein	615	36	22.1	100.0
CM-Toyopearl	96.3	94	9.1	41.2
Sephacryl S-200	24.3	247	6.0	27.1
2,4-D-Sepharose	0.92	7371	6.8	30.8
ConA-Sepharose	0.28	14132	4.0	18.1

2,4-D-binding activity was determined by equilibrium dialysis with 5×10^{-7} M [14 C]-2,4-D and 2×10^{-5} M unlabeled 2,4-D.

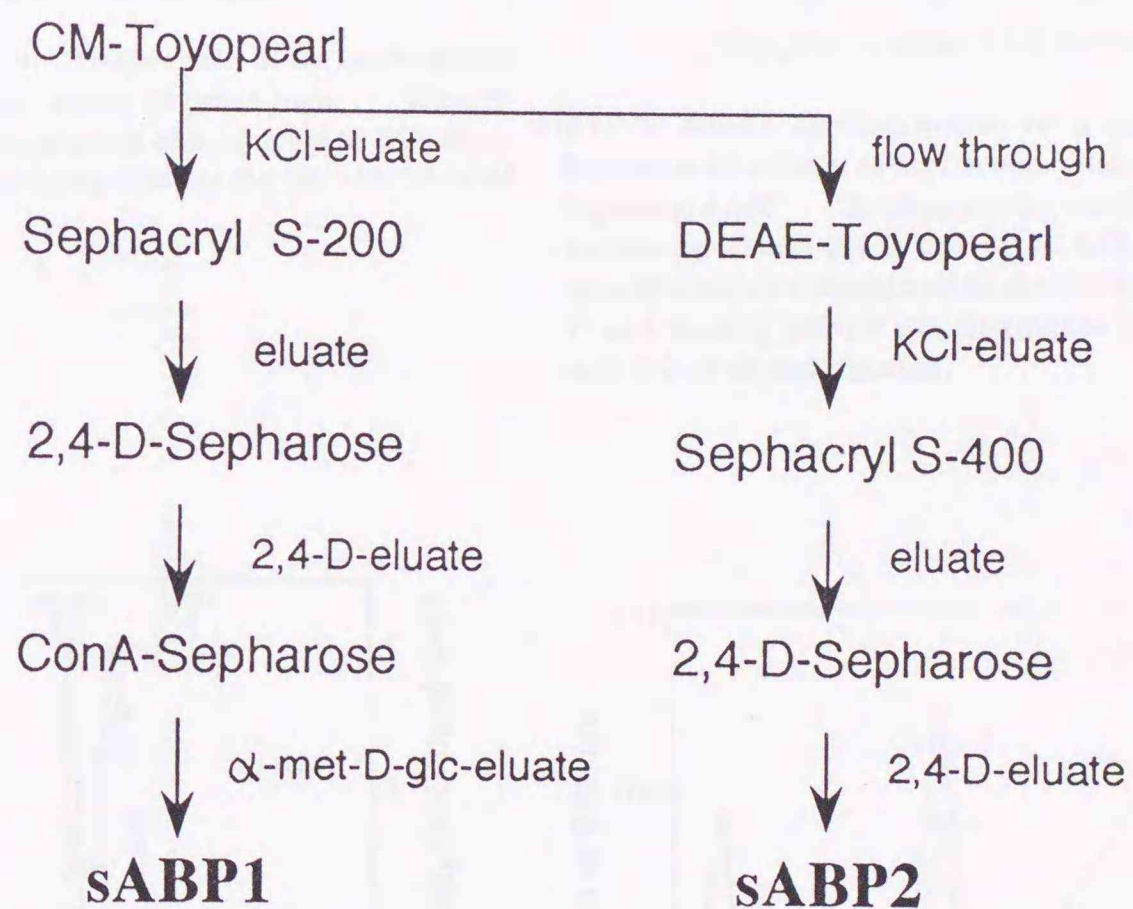


Fig. IV-2 Purification diagram for the auxin-binding proteins from shoot apex of peach tree.

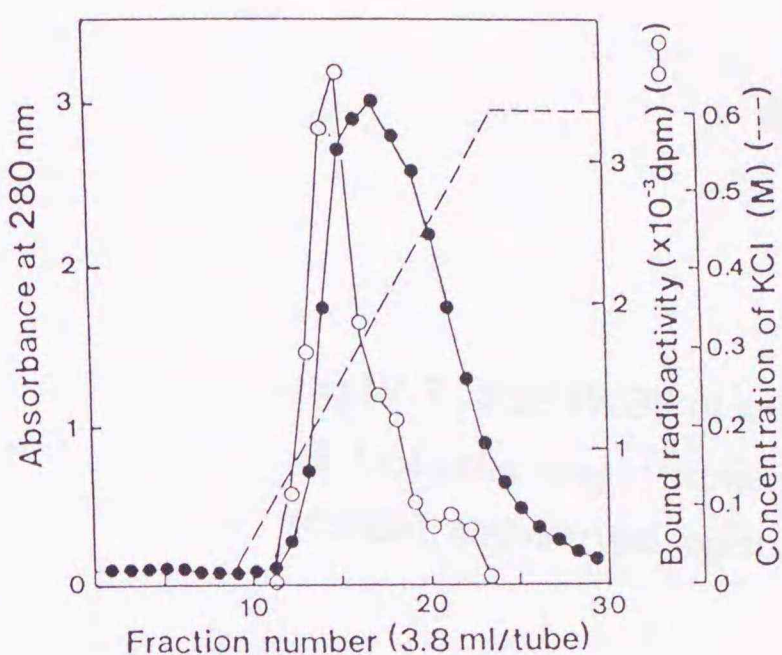


Fig. IV-3 Chromatography on CM-Toyopearl of the crude extract obtained from 50 g of shoot apices of peach trees. The column was eluted with a linear gradient of 0.02 to 0.6 M KCl. Binding of 2,4-D was determined by equilibrium dialysis with 0.2 ml of each fraction.

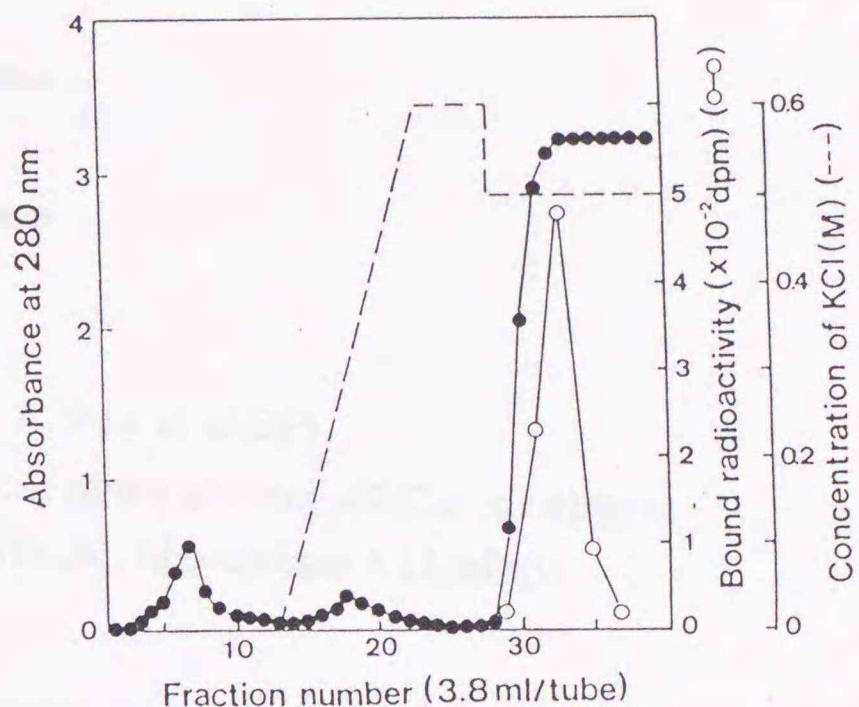


Fig. IV-5. Affinity chromatography on a column of 2,4-D-linked Sepharose 4B column of the fraction obtained from the column of Sephacryl S-200. Binding activity was eluted with HEM buffer containing 40 mM 2,4-D and 0.5 M KCl. The eluted fractions were thoroughly dialyzed against the binding buffer to remove 2,4-D and binding activity was determined by equilibrium dialysis with 0.2 ml of each fraction.

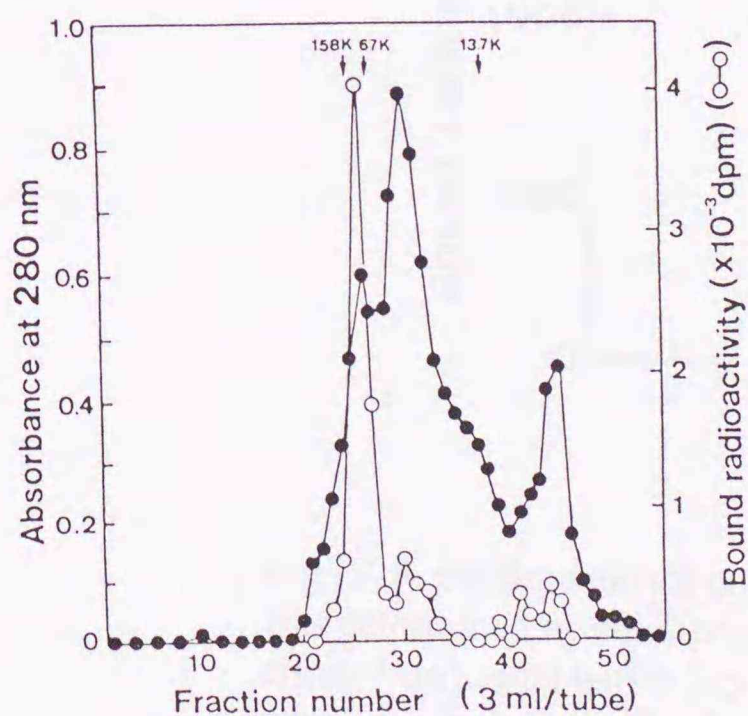


Fig. IV-4. Chromatography on Sephacryl S-200 of the fraction obtained from the column of CM-Toyopearl. The column was eluted with the binding buffer. The binding of 2,4-D was determined by equilibrium dialysis with 0.2 ml of each fraction.

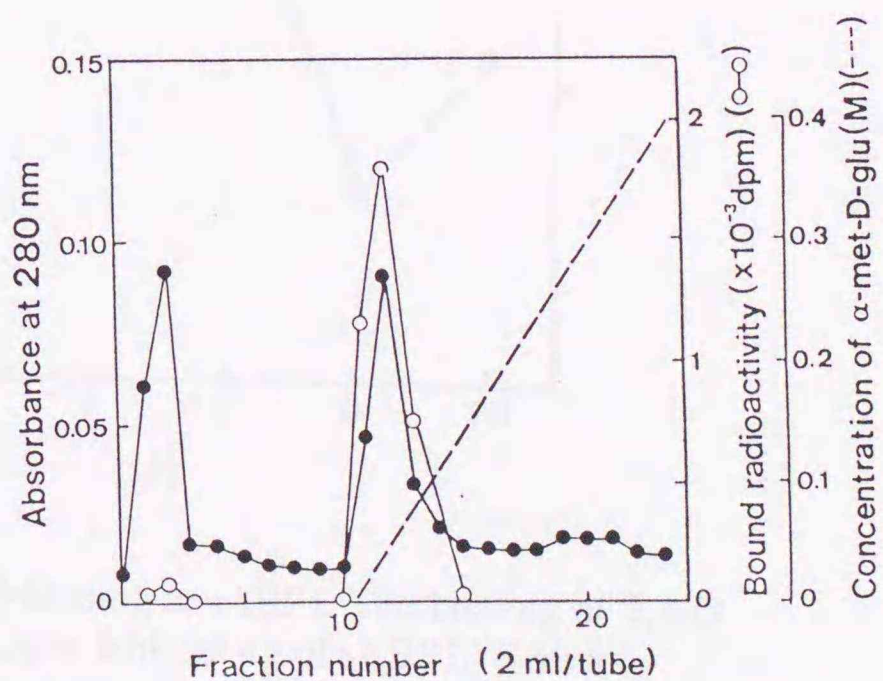


Fig. IV-6 Chromatography on ConA-Sepharose of the fraction eluted with 2,4-D from the column of 2,4-D-linked Sepharose 4B. The column was eluted with a linear gradient of 0 to 0.4 M α -methyl-D-glucose. The binding of 2,4-D was examined by equilibrium dialysis with 0.2 ml of each fraction.

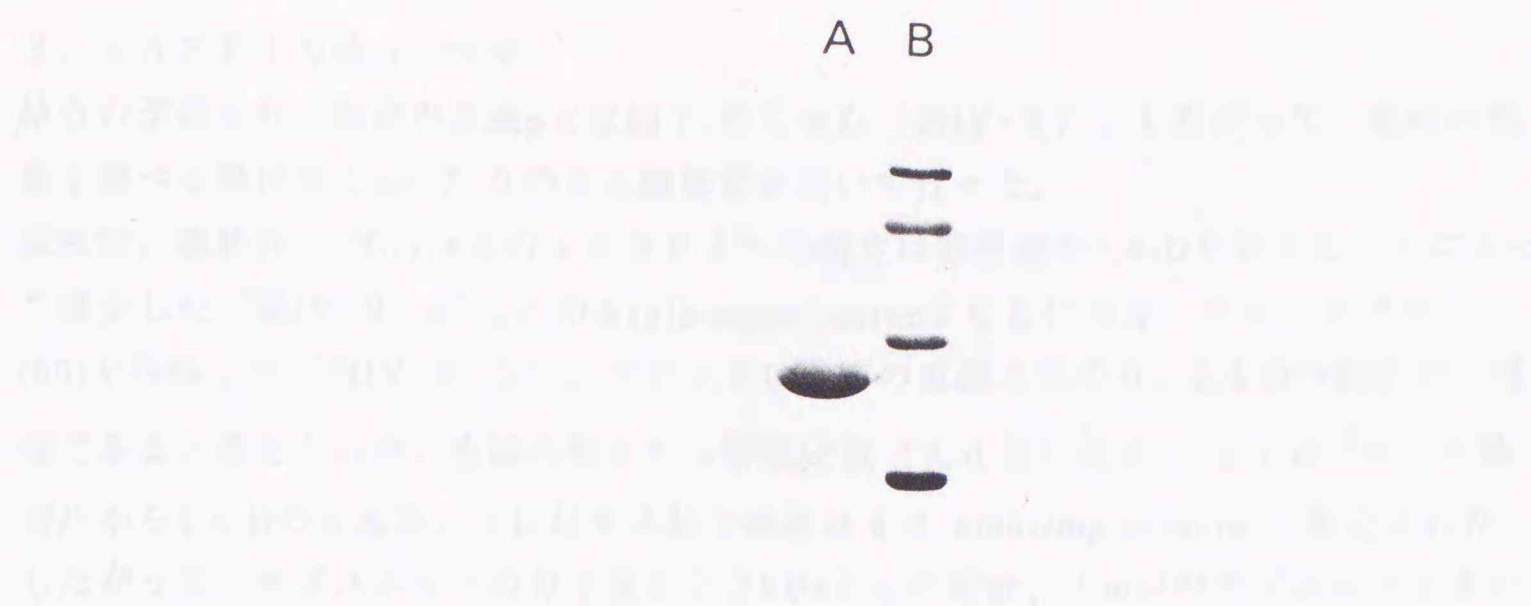


Fig.IV-7. SDS-PAGE of sABP1. A, 9 μ g of sABP1. B, Molecular weight markers, bovine serum albumin (67kDa), ovalbumin (43kDa), chymotrypsinogen A (25.7kDa), ribonuclease A (14kDa).

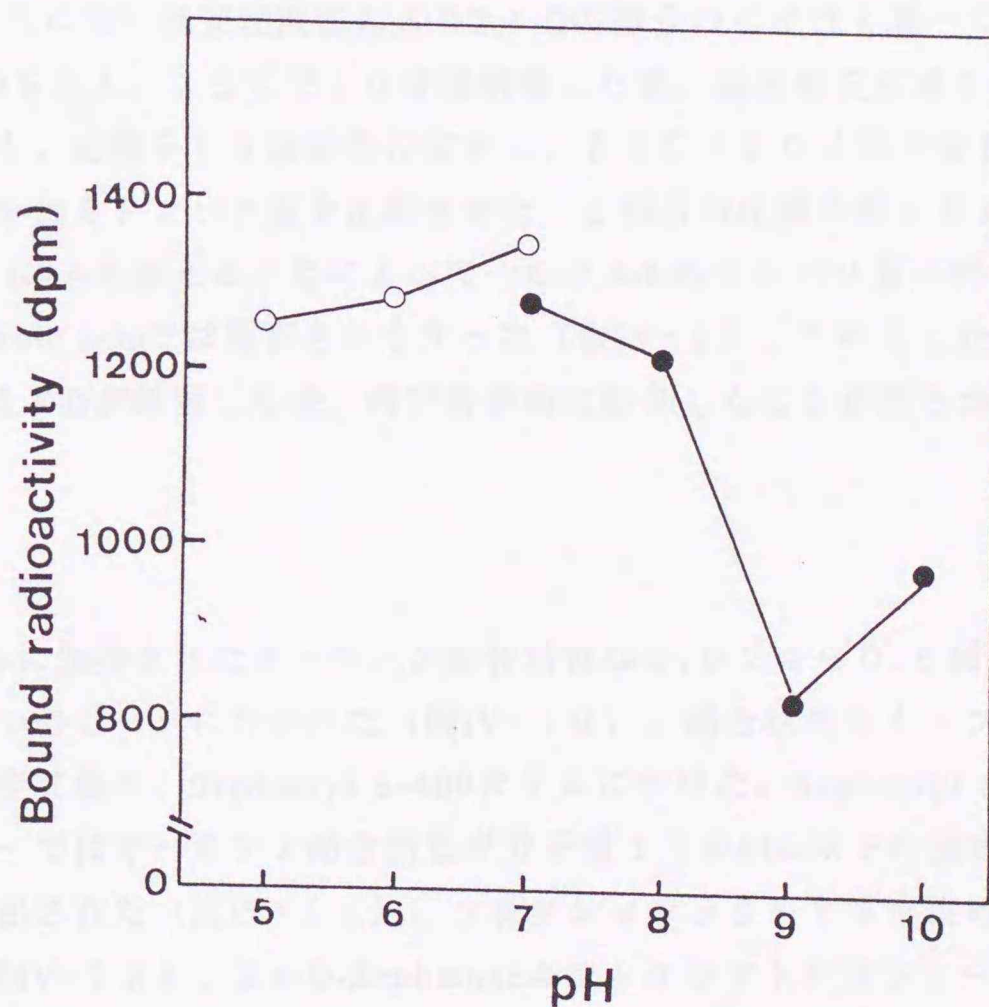


Fig.IV-8. pH dependence of 2,4-D-binding to sABP1. The binding of 2,4-D was determined by equilibrium dialysis with 29 μ g of sABP1. Sodium citrate / citric acid buffer (-○-) or tris / citric acid buffer (-●-) was used to obtain the indicated pH values.

3. s A B P 1 の結合の性質

結合の至適 pH : 結合の至適 pH は約 7.0 だった (図 IV-8)。したがって、結合の性質を調べる際は全て pH 7.0 の B A 緩衝液を用いて行った。

親和性、飽和性 : ^{14}C -2,4-D の s A B P 1 への結合は非標識の 2,4-D を加えることによって減少した (図 IV-9-a)。この displacement curve をもとにスカッチャードプロット (60) を作成した (図 IV-9-b)。プロットは 1 本の直線上にのり、2,4-D の結合が 1 種類であると考えられた。直線の傾きから解離定数 (K_d 値) は $4.1 \times 10^{-5} \text{M}$ 、X 軸切片から 2,4-D の s A B P 1 に対する結合総数は $42 \text{ nmol/mg protein}$ と推定された。したがって、サブユニットの分子量を 20 kDa とした場合、 1 mol のサブユニットあたり 0.84 mol の 2,4-D が結合するものと推測された。

特異性 : ^{14}C -2,4-D の s A B P 1 への結合は、他のオーキシン (NAA, IAA) やアンチオーキシン (p-chloroisobutyric acid; PCIB) によって阻害された。しかし、これらの化合物による結合阻害は非標識 2,4-D の場合より小さかった (表 IV-2)。オーキシンの構造類似化合物である tryptophan や bezoic acid では全く阻害されなかった。

可逆性 : Sakai ら (61) の方法に従い硫安沈澱法により 2,4-D の結合の可逆性を調べた。s A B P 1 溶液に ^{14}C -2,4-D を加え、 25°C で 10 分間培養した後、飽和硫安溶液を加えてタンパク質を沈澱させた。沈澱を B A 緩衝液に溶かし、 25°C で 10 分間培養した。これに再び飽和硫安溶液を加えてタンパク質を沈澱させた。2 回目の沈澱の際に B A 緩衝液に非標識 2,4-D や IAA, NAA を加えることによって ^{14}C -2,4-D のタンパク質に対する結合は阻害されたが、bezoic acid では阻害されなかった (表 IV-3)。このことから 1 度 s A B P 1 に結合した 2,4-D が解離した後、再び特異的に結合したことが明らかになった。

4. s A B P 2 の精製

DEAE-Toyopearl カラムに保持されたオーキシン結合活性は 0.02 から 0.6 M の KCl 濃度勾配による溶出で 4 つのピークに分かれた (図 IV-10)。結合活性をもつフラクション (15 ~ 35) を全て集め、Sephacryl S-400 カラムにかけた。Sephacryl S-400 カラムクロマトグラフィーではオーキシン結合活性が分子量 158 kDa 以下の領域にブロードなピークとして溶出された (図 IV-11)。フラクション 58 ~ 74 を集め 2,4-D-Sepharose にかけた (図 IV-12)。2,4-D-Sepharose カラムクロマトグラフィーにおいて、 50 mM の 2,4-D で溶出したオーキシン結合活性を有する画分は、SDS-PAGE では分子量 32 - 34 kDa 付近にメジャーなバンドが 2 本、それ以外の位置にマイナーなバンドが数本認められた (図 IV-13)。このメジャーなバンドがオーキシン結合活性をもったタンパク質かどうかを、さらに精製を進め検討する必要がある。

s A B P 2 の精製表を表 IV-4 に示した。

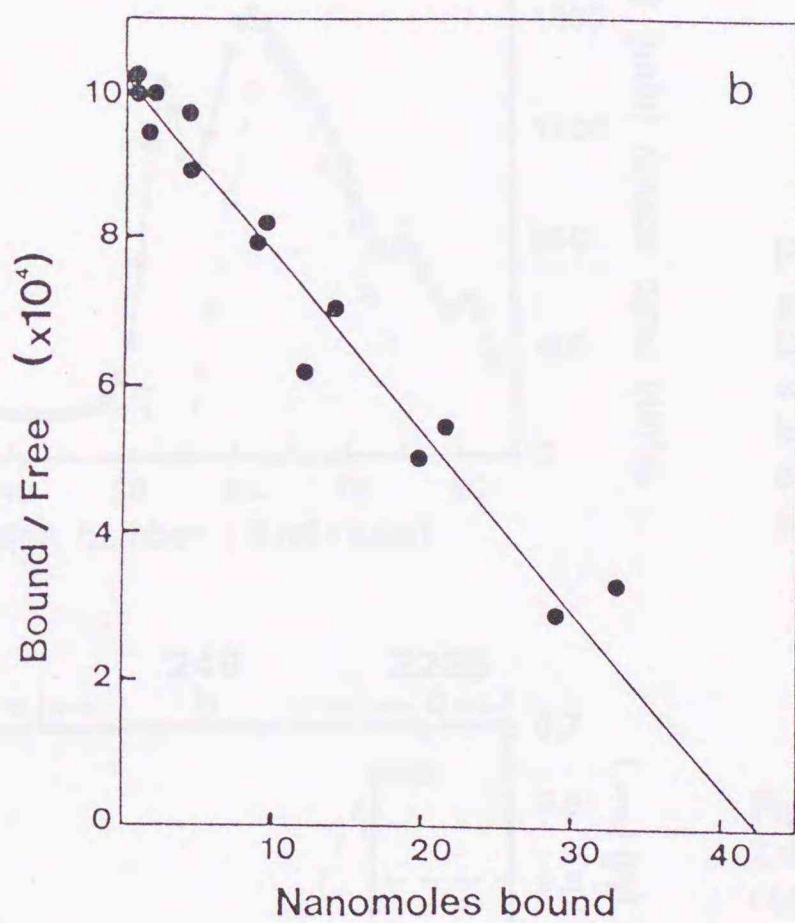
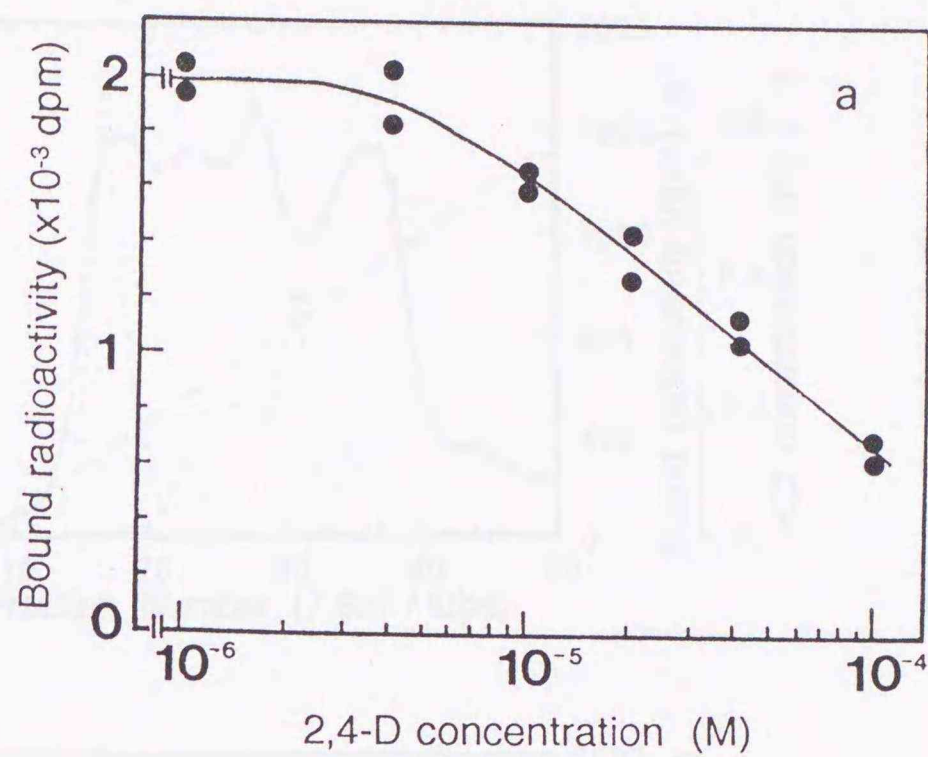


Fig.IV-9. a, Effect of increasing concentration of unlabeled 2,4-D on the binding of ^{14}C -2,4-D to sABP1. b, Scatchard plot of the ^{14}C -2,4-D-binding. Equilibrium dialysis was performed for ^{14}C -2,4-D at $5 \times 10^{-7}\text{M}$ and an increasing amount of unlabeled 2,4-D with $30 \mu\text{g}$ of sABP1.

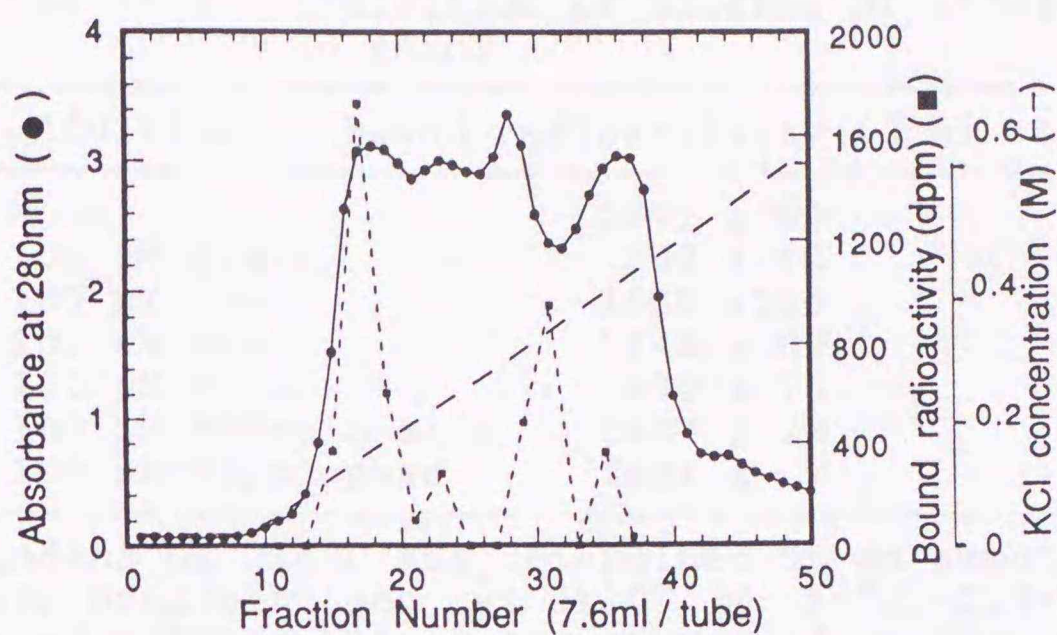


Fig.IV-10. DEAE-Toyopearl chromatography of the fraction passed through the CM-Toyopearl column. The column was eluted with a linear gradient of 0.02 to 0.6 M KCl. The binding of 2,4-D was determined by equilibrium dialysis with 0.2ml of each fraction.

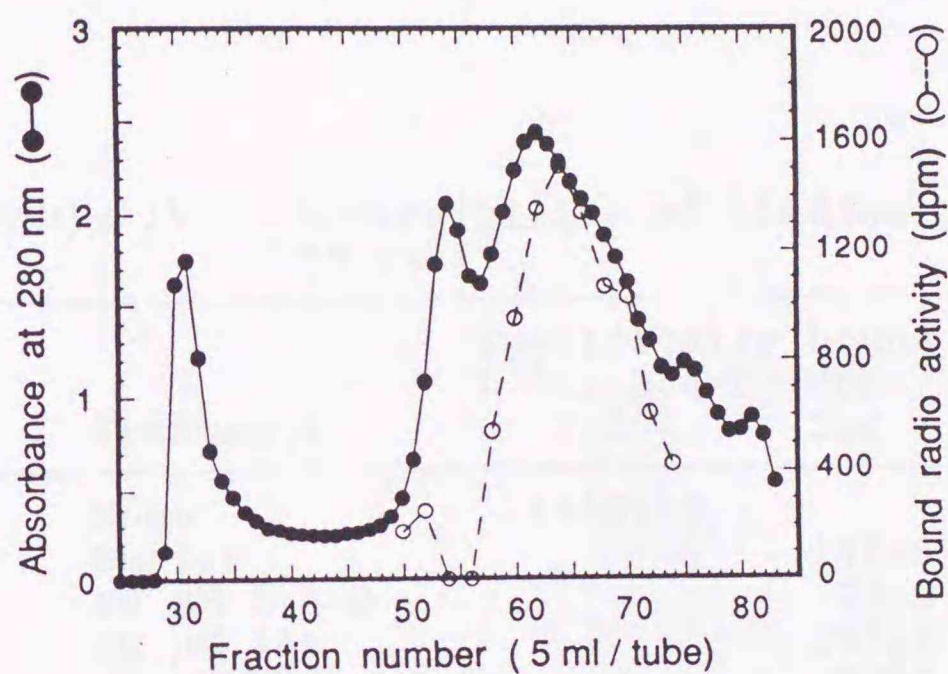


Fig.IV-11. Sephacryl S-400 chromatography of the fraction obtained from the DEAE-Toyopearl column. The column was eluted with BA buffer. The binding of 2,4-D was determined by equilibrium dialysis with 0.2 ml of each fraction.

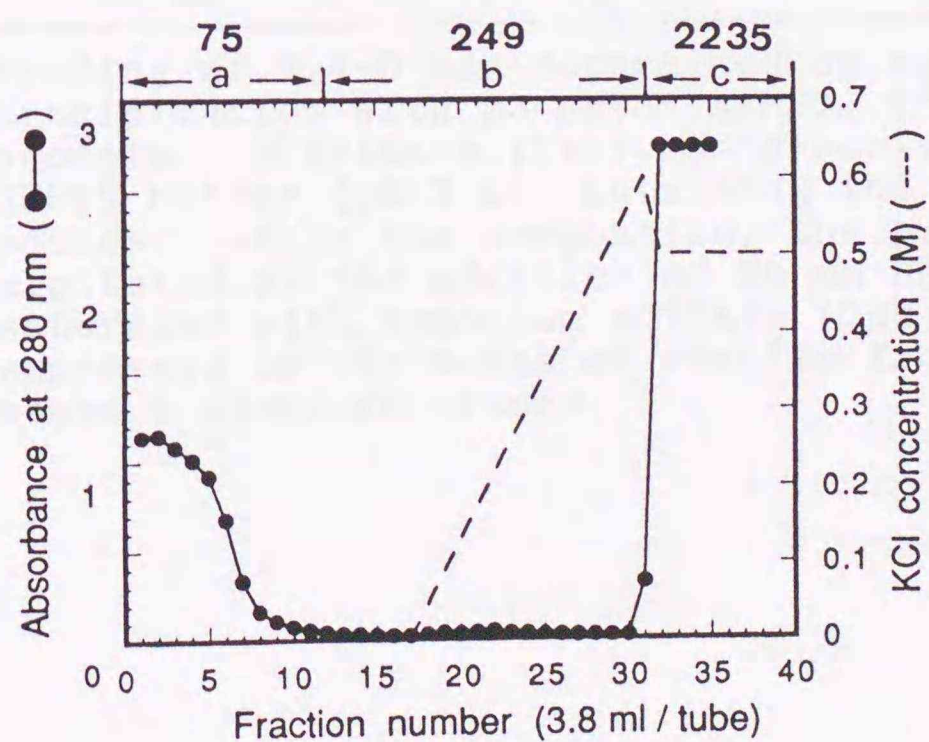


Fig.IV-12. Affinity chromatography on a 2,4-D-Sepharose column of the fraction obtained from the Sephacryl S-400 column. The binding activity was eluted with HEM buffer containing 40mM 2,4-D and 0.5M KCl. The eluted fractions were thoroughly dialyzed against the BA buffer to remove 2,4-D and the binding of 2,4-D was determined by equilibrium dialysis with 0.2ml of each fraction. Specific binding activity (pmol/mg protein) of a, passed through ; b, KCl eluted ; c, 2,4-D-eluted fractions are presented at the top of the graph.

Table IV-2 . Inhibition of binding of [^{14}C]-2,4-D to sABP1

Addition	Bound radioactivity (dpm)	%inhibition
None	2371 $\pm$ 58	-
100 μM 2,4-D	502 $\pm$ 12	78.8
100 μM IAA	1850 $\pm$ 106	22.0
100 μM NAA	1843 $\pm$ 69	22.3
100 μM PCIB	1470 $\pm$ 75	38.0
100 μM Benzoic acid	2437 $\pm$ 28	0
100 μM Tryptophan	2421 $\pm$ 7	0

Binding of 2,4-D was determined by an ammonium sulfate precipitation at 5×10^{-7} M [^{14}C]-2,4-D with 42 μg of sABP1. Values are expressed as the means of results from three experiments $\pm$ standard errors.

Table IV-3 Reversibility of binding of [^{14}C]-2,4-D to sABP1.

Treatment	Specifically bound [^{14}C]-2,4-D (dpm)		%
	1st	2nd	
None	1202 $\pm$ 29		
Buffer		140 $\pm$ 5	11.6
20 μM 2,4-D		72 $\pm$ 2	5.9
20 μM IAA		107 $\pm$ 3	8.9
20 μM NAA		92 $\pm$ 4	7.6
20 μM Benzoic acid		145 $\pm$ 8	12.0

Binding of 2,4-D was determined by ammonium sulfate precipitation with 23 μg of sABP1. [^{14}C]-2,4-D-bound protein precipitate (1st) was dissolved in 10 mM HEPES buffer (pH 7.0) containing the indicated compounds. After the incubation, the protein was reprecipitated by the addition of 20 mM HEPES (pH 7.0) saturated with ammonium sulfate (2nd). Values are expressed as the means of results from three experiments $\pm$ standard errors.

Table IV-4 Purification of sABP2 from shoot apices of peach trees.

Purification step	Protein (mg)	2,4-D-binding activity (pmol/mg prot.)	Total 2,4-D-binding (nmol)	Yield (%)
Crude protein	615	36	22.14	100
CM-Toyopearl ^{a)}	416	33	13.73	62.0
DEAE-Toyopearl	199	53	10.55	47.6
Sephacryl S-400	94.9	104	9.87	44.6
2,4-D-Sepharose	1.1	2235	2.46	11.1

2,4-D-binding activity was determined by equilibrium dialysis with 5×10^{-7} M $[2-^{14}\text{C}]2,4\text{-D}$ and 2×10^{-5} M unlabeled 2,4-D.
a) passed fraction of the column.

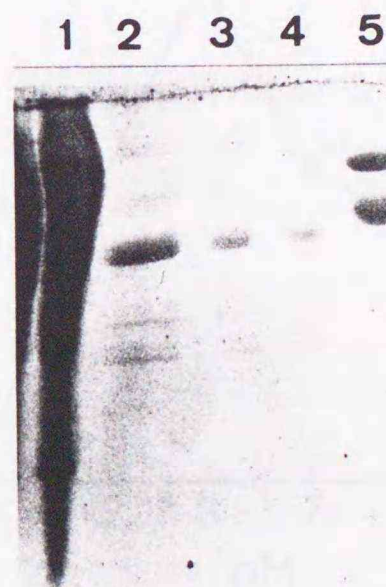


Fig.IV-13. SDS-PAGE of the fraction obtained by 2,4-D-Sepharose column chromatography.

lane 1 : 12.5 μg of the fraction passed through the column.
lane 2,3,4 : 12, 6 and 3 μg of the fraction eluted by 50mM 2,4-D.
lane 5 : molecular weight markers, bovine serum albumin (67kDa), ovalubumin (43kDa).

5. sABP2の結合の性質

結合の至適pH: 2,4-DのsABP2に対する結合の至適pHは約6.0で、sABP1より低かった(図IV-14)。したがってsABP2に対する結合活性は全てpH6.0で測定した。

親和性、飽和性: スカッチャードプロットからKd値が 2.9×10^{-6} M、結合総数が0.93 nmol/mg proteinと推定された(図IV-15)。プロットは傾斜の急な直線と緩い直線から構成され、親和性の低い結合が混和している可能性が示唆された。

特異性: ^{14}C -2,4-DのsABP2への結合は、非標識の2,4-DやNAA、IAAによって阻害されたがbenzoic acidでは阻害されなかった(表IV-5)。オーキシンによる阻害はsABP1の場合と同様の傾向を示し、2,4-Dが最も強く、NAAとIAAがほぼ同じ程度阻害した。しかし、どのオーキシンもsABP1の場合より阻害の程度が強かった。

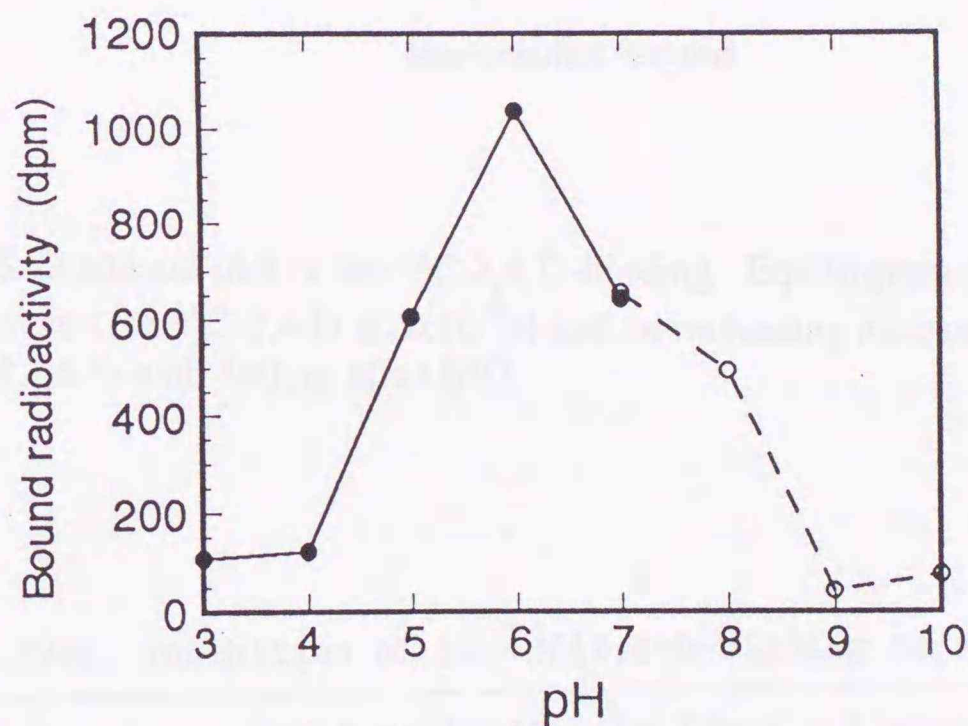


Fig.IV-14. pH dependence of 2,4-D-binding to sABP2. The binding of 2,4-D was determined by equilibrium dialysis with 78 μg of sABP2. Sodium citrate / citric acid buffer (-●-) or tris / citric acid buffer (-○-) was used to obtain the indicated pH values.

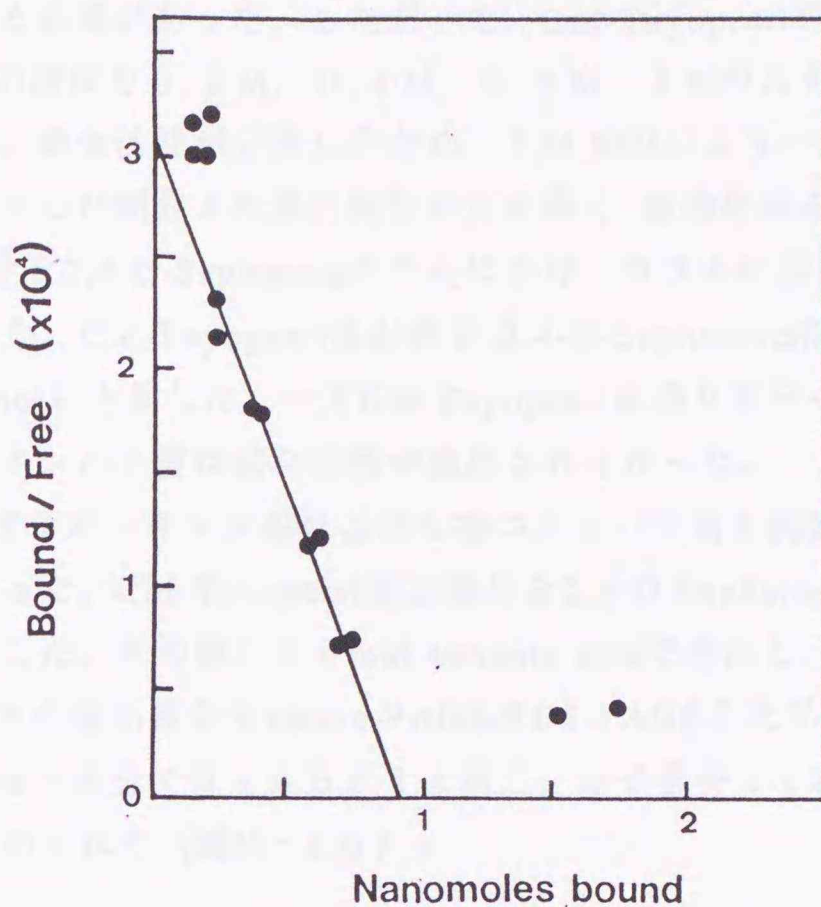


Fig.IV-15. Scatchard plot of the ^{14}C -2,4-D-binding. Equilibrium dialysis was performed for ^{14}C -2,4-D at $5 \times 10^{-7}\text{M}$ and an increasing amount of unlabeled 2,4-D with 160 μg of sABP2.

Table IV-5 Inhibition of $[2-^{14}\text{C}]2,4\text{-D}$ -binding to sABP2.

Addition	Bound radioactivity (dpm)	%inhibition
None	2536 $\pm$ 16	-
100 μM 2,4-D	192 $\pm$ 2	92.4
100 μM IAA	801 $\pm$ 11	68.4
100 μM NAA	1036 $\pm$ 3	59.1
100 μM benzoic acid	2400 $\pm$ 4	5.4

2,4-D-binding was determined by ammonium sulfate precipitation at $5 \times 10^{-7}\text{M}$ $[2-^{14}\text{C}]2,4\text{-D}$ with 175 μg of sABP2. Values are expressed as the means of three experiments $\pm$ standard errors.

(2) モモ未熟果からのオーキシン結合タンパク質の精製

果実は茎頂部に比べ、新鮮重あたりに含まれるオーキシン結合活性が少なく、多量の試料を用いて精製する必要があった。したがって、CM-Toyopearlのカラム操作はバッチ処理で行った。KCl濃度を0.2 M, 0.4 M, 0.6 M, 1 Mのステップワイズでタンパク質を溶出したが、結合活性が分散したため、1 M KClにより一括して溶出した。比活性はカラムを素通りした画分より溶出画分の方が高く、粗抽出液の約7倍になった(表IV-6)。各々の画分を2,4-D-Sepharoseカラムにかけ、カラムに保持されたタンパク質を1 M KClで溶出した。CM-Toyopearl溶出画分-2,4-D-Sepharose溶出画分(s A B P 3)は比活性が316 pmolに上昇した。一方CM-Toyopearl素通り画分-2,4-D-Sepharose溶出画分から得られたタンパク質は結合活性が検出されなかった。

s A B P 3に存在するオーキシン結合活性を持つタンパク質を同定するため、以下のような操作を行った。CM-Toyopearl溶出画分を2,4-D-Sepharoseカラムにかけ、H E M緩衝液で洗浄した。その後、50 mM benzoic acidで溶出し、次いで50 mM IAAで溶出した。各々の溶出画分をnative-PAGE-SDS-PAGE 2次元電気泳動により展開した。その結果IAA溶出画分ではs A B P 1と同じ、分子量が20 kDaの位置にタンパク質のスポットが認められた(図IV-16)。

第4節 考察

<茎頂部からのA B Pの精製>

本研究において、モモの茎頂部には2,4-D-Sepharoseカラムに保持され、2,4-Dによって溶出される2種類の性質の異なるA B Pが存在することが明らかになった。

Sakaiら(54)は、ヤエナリマメの可溶性画分からA B Pを単離する際、粗抽出液を直接2,4-D-Sepharoseカラムにかけ、一挙に比活性を上げることに成功している。しかし、本実験に用いたモモの茎頂部の場合この方法では茎頂部の粗抽出液に存在する総活性の10分の1しか保持されず、また、カラムの損傷も早かった。粗抽出液中にA B Pの結合を阻害するものが存在するか、カラムのリガンドが非特異的吸着によって占められてしまうためであろうと推測された。したがって、s A B P 1およびs A B P 2の場合アフィニティークロマトグラフィーの前にイオン交換とゲル濾過クロマトグラフィーにより部分精製を行った。これらの操作により比活性の顕著な上昇は認められなかったが、アフィニティークロマトグラフィーの効果を上げるには必要不可欠なステップであると考えられる。

2,4-D-Sepharoseカラムによるアフィニティークロマトグラフィーでは、高塩濃度の緩衝液によるカラムの洗浄が、非特異的結合を除去するのに効果的だった。洗浄液の量を多くする程、より比活性の高い溶出液が得られたが、洗浄過程で少しずつ活性が流出

Table IV-6 Purification of sABP3 from immature peach fruits.

Purification step	Protein (mg)	Binding activity ^a (pmol/mg protein)	Total binding (nmol)
Crude protein	800	7.0	5.6
CM-Toyopearl			
passed	412	6.9	2.8
eluted	148	35.6	5.3
2,4-D-Sepharose ^b	1.2	316	0.38

a. Binding activity of 2,4-D was determined by equilibrium dialysis with $5 \times 10^{-7} \text{M}$ ^{14}C -2,4-D and $2.5 \times 10^{-6} \text{M}$ unlabeled 2,4-D.

b. Eluted fraction of CM-Toyopearl column was applied.

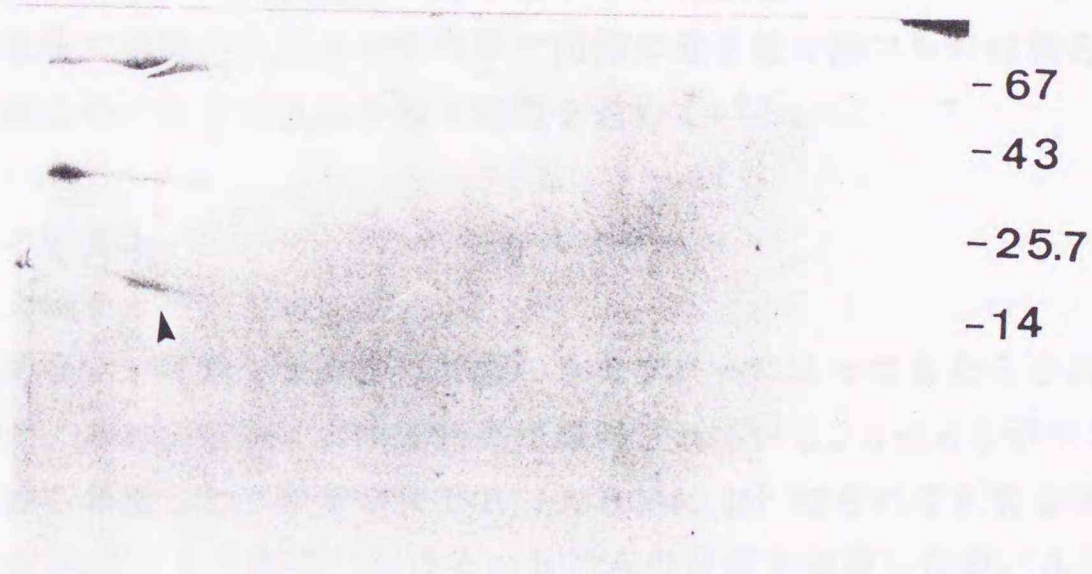


Fig.IV-16. Two-dimensional PAGE of sABP3. An arrow indicates the peptide which has the same Rm value as sABP1.

し、収率は減少した。オーキシン結合活性の溶出は50 mMの2,4-Dにより行った。1 M KClでも溶出されたが、収率は2,4-Dによる溶出の半分以下だった。

単離したsABP1は、PAS染色に陽性で、かつCon A-Sepharoseカラムに保持されることから糖鎖をもったタンパク質であることが明らかになった。したがって、このタンパク質は可溶性画分よりも、むしろ膜画分に存在するタンパク質で、抽出の際に膜から外れて可溶性画分に移行してきたものと推察された。この現象はShimomuraらがトウモロコシから単離した膜結合型ABPの場合においても指摘されている(27)。sABP1はSDS-PAGEによる推定分子量が20 kDaで、Shimomuraらが単離した膜結合型ABPと近似しており、タンパク質の相同性が問題になった。しかし、膜結合型ABPに対する抗体を用いてウェスタンブロットで調べた結果、交差しなかった。また、Kd値や結合の至適pHが異なること、N末端アミノ酸配列に相同性が認められないこと(第5章、図V-1)からも異なるタンパク質であると考えられる。

sABP2は完全精製には至っていない。精製の最終段階(2,4-D-Sepharose)の試料のSDS-PAGEでは分子量が約32-34 kDa付近にメジャーなバンドが2本、それ以外の領域にマイナーなバンドが数本認められた。このメジャーなバンドはDEAE-ToyopearlやSephacryl S-400における活性画分にも存在していることからオーキシン結合活性を持つタンパク質である可能性が高い。また、sABP2はSephacryl S-400クロマトグラフィーの結果から、分子量が158 kDa以下のタンパク質であると推定された。いままで単離されたABPの中で同様の分子量を持つものは報告されていない。そこで現在このバンドに焦点を絞り精製を進めている。

<結合の性質>

1. スカッチャードプロット

多面的なオーキシンの作用は複数のリセプターによってもたらされている可能性がある。また、それを示唆する実験結果が報告されている。Sakaiらがヤエナリマメの可溶性画分から単離した2種類のABP(ABPI、II)はそれぞれKd値が異なっていた(54,55)。両者とも単離核におけるmRNAの合成を促進したが、ABPIとIIでは誘導される遺伝子が異なっていた(6)。このことからヤエナリマメの可溶性画分にはオーキシンに対する親和性や機能の異なるオーキシン受容体が少なくとも2つ存在している可能性が示唆された。また、本論文第2章の果肉組織の培養実験において、アントシアニン生成促進と肥大促進に働くオーキシンの至適濃度はそれぞれ異なっていた。これは果肉組織に複数の受容体が存在し、それぞれオーキシンに対する親和性が異なるためではないかと考えられる。

スカッチャードプロットから求めたsABP1およびsABP2の2,4-Dに対するKd値はそれぞれ 4.1×10^{-5} Mと 2.9×10^{-6} Mで、sABP1のKd値よりもsABP2のKd値の方が10倍以上小さかった(親和性が高い)。このことから、こ

これらのABPが異なるオーキシン作用を媒介している可能性が示唆された。

2. 阻害反応

阻害反応により、ラベルした2,4-Dの結合は、オーキシン (IAA, NAA) やアンチオーキシン (PCIB) によって阻害を受けるが、オーキシン活性のない構造類似化合物であるbenzoic acidやtryptophanではほとんど阻害されなかった。したがって2,4-Dの結合はオーキシン特異的であると考えられる。阻害の程度から、ABPに対する親和性はオーキシンの種類によって異なることが示された。sABP1では2,4-Dが最も親和性が高く、ついでPCIB, NAA=IAAの順に高い値を示した。sABP2ではsABP1と同様2,4-Dが最も強く、ついでIAAとNAAが同程度阻害した。IAAやNAAはsABP1よりsABP2に対して、強い阻害効果が認められた。このようなオーキシンのABPに対する親和性の傾向は他のABPにおいても報告されている。しかし、オーキシンの種類による阻害の程度の傾向はsABP1やsABP2の場合とは異なっていた。トウモロコシから単離された膜結合型ABPではNAAに対する親和性が最も強く(28)、ヤエナリマメから単離された可溶性ABPIは2,4-D、IAA、NAAに対して同程度の親和性を示した(58)。

これまで動物のホルモン—ホルモン受容体システムにおいて、ホルモンの生理活性の強さとリセプターに対する親和性が相関することが示されている(62,63)。オーキシンに関しても同様の試みがなされているが、動物ホルモンの場合のような高い相関性は得られていない。これまで報告された中で最も高い相関が得られたのはイチゴ果実の場合で、膜に対する種々のオーキシンの結合活性と、果実肥大をもたらす活性の強さとの間の相関係数は0.74であった(64)。トウモロコシの幼葉鞘に対する伸長促進効果と膜画分に対する親和性の関係では0.3から0.5の相関しか得られなかった(65)。低い相関の原因として、動物ホルモンと植物ホルモンの生体内における存在形態の違いが挙げられる。動物ホルモンの場合血液中に均一に分散して作用部位に運ばれるのに対し、植物ホルモンは単純拡散や極性移動、キャリアタンパク質による能動輸送などの複雑な機構により組織内に取り込まれる。したがって、化合物により、組織への取り込まれ易さが異なり、また、組織内での安定性や移動の仕方も異なる。さらに、第2章で示したように細胞内の部位により存在量が異なり、作用部位における局部濃度が投与した植物ホルモンの濃度や組織の平均的な濃度とは必ずしも一致しない。単離したABPがオーキシン受容体であることを証明するためには、オーキシン化合物によるABPの親和性の傾向が、オーキシン活性の強さと一致するかどうか重要な鍵になる考えられているが、上述のような要因を充分考慮して判断する必要がある。

3. 可逆性

s A B P 1 および 2 は 2,4-D-Sepharose カラムに保持された後、高濃度の 2,4-D によって溶出されること、さらに溶出されたタンパク質が、結合活性を測定する際に再び 2,4-D に結合すること、その際の結合はオーキシン特異的であることから、2,4-D と

s A B P 1 および 2 との結合は可逆的であると考えられる。単離した s A B P 1 に関しては、硫酸沈澱法によりさらに結合の可逆性を確認した。その結果一度 A B P に結合した 2,4-D が、解離した後再び s A B P 1 に結合すること、2 度目の結合もオーキシン特異的であることから 2,4-D の結合は可逆的であることが示された。

<未熟果からの A B P の精製>

モモ未熟果の場合は茎頂部と異なり CM-Toyopearl カラム素通り画分に移行したオーキシン結合活性の割合は小さかった。また、この画分を 2,4-D-Sepharose カラムにかけ、カラムに保持されたタンパク質には平衡透析法でオーキシン結合活性が検出されなかった。したがって CM-Toyopearl カラム素通り画分に認められたオーキシン結合活性は非特異的結合で、粗抽出液に含まれる A B P は大半が CM-Toyopearl カラムに保持されたものと考えられる。茎頂部では CM-Toyopearl カラム素通り画分にも溶出画分に存在する A B P (s A B P 1) とは異なる A B P が存在したが (s A B P 2)、果実の可溶性画分には s A B P 2 に相当するタンパク質は存在しないものと推察された。

CM-Toyopearl 溶出画分-2,4-D-Sepharose 溶出画分 (s A B P 3) には native-PAGE の電気泳動で展開すると数本のバンドが認められた。これらのバンドの中で、オーキシン結合活性を持つタンパク質を同定するために高濃度のオーキシンによる溶出を試みた。その結果、benzoic acid では溶出されず IAA で溶出される画分に s A B P 1 と同じ電気泳動的挙動を示すタンパク質が存在することが明らかになった。

<まとめ>

モモ茎頂部の可溶性画分から得られた 2 種類の A B P (s A B P 1 および 2) は、オーキシンに対する結合の”特異性、親和性、可逆性、飽和性”は受容体としての条件を満たしていることが確認された。また、分子量およびオーキシンに対する結合の性質から、これまで報告されているものとは異なる A B P であると考えられる。s A B P 1 と s A B P 2 ではオーキシンに対する結合の性質が異なることから、モモ茎頂部の可溶性画分には複数のオーキシン受容体が存在し、各々が異なるオーキシン作用を媒介している可能性が示唆された。今後これらの A B P の植物体における働きを明らかにし、オーキシン受容体であることを証明していく必要がある。それによって受容体から生理反応に至るオーキシンの情報伝達機構の解明への端緒が開けるものと期待される。

第5章 オーキシン結合タンパク質 (sABP1) の 器官特異性および細胞内局在性

第1節 緒論

オーキシンは植物の分化・成長の過程で様々な生理作用を植物体に及ぼす。また作用の強さも植物の成長段階や外部環境により大きく変化する。オーキシンは植物体に遍在する植物ホルモンであり、このようなオーキシン作用の多面性をオーキシンの生成や移動、不活性化等による量的変化だけで説明することは難しい。もう一つの要因として植物のオーキシンに対する反応性の変化が大きく関与しているものと考えられる。

オーキシンの刺激は植物体に存在するオーキシン受容体によって細胞内の作用部位に伝達されると考えられている。したがって、このオーキシン受容体の質的・量的変化が植物体のオーキシンに対する反応性に大きな影響を及ぼすものと考えられる。すなわち、オーキシン受容体の組織特異性や細胞内局在性あるいは成長過程の量的挙動は、そのオーキシン受容体によってもたらされるオーキシン作用と相関して変動するものと推測される。この仮説に基づいて、単離されたオーキシン結合タンパク質 (ABP) のオーキシン受容体としての作用を類推する試みがなされた。トウモロコシの膜画分から単離されたABPは黄化幼葉鞘の成長の盛んな時期に特異的に出現するタンパク質であること(29)、幼葉鞘の表皮組織の細胞膜に局在するタンパク質であること(66)が特異的抗体を用いて示され、このことから膜結合型ABPがオーキシンによって誘導される伸長促進に関与している可能性が示唆された。また、実際にトウモロコシ幼葉鞘切片にこの抗体を作用させることにより、オーキシンで誘導される細胞伸長が特異的に阻害されることが示された。

第3章においてモモの茎頂部および未熟果からオーキシン結合タンパク質の単離・精製を試み、これまで報告されているものとは異なるABP (sABP1) を電気泳動的に単一なバンドにまで精製した(67)。さらにオーキシンに対する結合の性質の特異性、可逆性、親和性および飽和性を調べ、オーキシン受容体としての条件を満たしていることを示した。本章ではsABP1の植物体における働きを明らかにすることを目的とし、sABP1に対する特異的抗体を用いて、sABP1の器官特異性、細胞内局在性を解析し、オーキシン作用との関わりを考察した。

第2節 材料と方法

N末端アミノ酸配列；Hiranoら(68)の方法に従いN末端アミノ酸配列を決定した。低Bis濃度のSDS-PAGEにより単離したsABP1を展開した。この方法で、sABP1は2本のバンドに分かれた(図V-1)。ゲルのタンパク質をPVDF膜に転写後、CBBで染色し、各々のバンドを切取った。これを気相シーケンサー(473A、Applied BioSystems)にかけ、N末端アミノ酸配列を決定した。

抗体の作成；SDS-PAGEのゲルからsABP1のバンドを切り取り、少量(1~2 ml)の生理食塩水中で細かく砕いた。これを等量のフロイント完全アジュバントと混合し、ウサギに皮下注射した。その後2週間おきに4回ブーストし、最終ブーストの1週間後に採血した。

抗体の精製；Satoら(69)の方法によりBromeline-Sepharoseカラムを作製した。血清の33%硫酸画分を、PBS(10mM phosphate, pH7.2, 0.15M NaCl)で平衡化したBromeline-Sepharoseカラムにかけ、素通り画分を得た。カラムをPBSで洗浄後、カラムに保持されたタンパク質を20 mM glycine-HCl緩衝液(pH 2.8)により溶出した(溶出画分)。溶出画分は、1 M Tris-HCl緩衝液(pH 7.0)を加え速やかに中和した。各々の画分にsodium azideを0.02%になるように添加し4℃で保存した。

ウェスタンブロット；タンパク質溶液を低Bis濃度のSDS-PAGEで展開し、Hiranoら(68)の方法にしたがいニトロセルロース膜に転写した。sABP1の検出は以下の順序により行った。

(1) 25% isopropanol-10%acetic acid溶液中で30分間培養し内生パーオキシダーゼを失活させる。

(2) ブロッキング緩衝液に浸し5℃で一晩、または室温で2時間振とうする。

(3) 0.5% Tween 20-PBS (TPBS) で洗浄後、TPBSで希釈した抗sABP1抗体溶液に浸し、室温で1時間30分振とうする。

(4) TPBSで4回洗浄し、TPBSで3,000倍に希釈したパーオキシダーゼ標識抗ウサギ抗体(ヤギ)(バイオラッド社製)溶液に浸し、室温で1時間振とうする。

(5) TPBSで5回洗浄後、0.05% 3,3'-diaminobenzidine (DAB) と0.015% H₂O₂を含む50 mM Tris-HCl緩衝液(pH 7.6)溶液に浸し発色させる。

試料に存在するsABP1の量は、精製したsABP1の希釈系列と試料のウェスタンブロットの結果を比較することにより推定した。計測はデンシトメーター(TIAS電気泳動システム、ACIジャパン)を用いて行った。

細胞壁タンパク質の調整；モモ‘あかつき’茎頂部を、ガラスホモジナイザーを用いて2倍量の冷純水中で1分間磨碎し、5,000 gで10分間遠心分離した。上清を可溶性画分、沈澱を細胞壁画分とし、各々の画分から以下に示す方法でタンパク質溶液を調製した。

細胞壁画分に2 M KClを含むTEM緩衝液を加え4℃で16時間振とうした。遠心分離し(10,000 g、10分間)、得られた上清に硫酸を100%飽和になるように加えた。4℃で1時間以上放置した後、遠心分離によりタンパク質の沈澱を集めた。得られた沈澱をhalf-strength TEM緩衝液(5mM Tris-HCl, pH 7.6, 0.5mM EDTA, 5mM 2-ME)に溶解し、同緩衝液で一晩透析した。透析中に生じた沈澱を遠心分離により取り除き、上清をウェスタンブロットに用いた。可溶性画分も同様に硫酸沈澱と透析によりタンパク質溶液を得た。

第3節 結果

(1) sABP1のN末端アミノ酸配列

単離したsABP1はLaemliのSDS-PAGEでは1本のバンドとして検出されたが(図IV-7)、低Bis濃度のSDS-PAGEでは分子量が20 kDaと19 kDaの2本のバンドに分かれた。各々のN末端アミノ酸配列は近似していた(図V-1)。ホモロジー検索(ペプチド研究会)をしたところ、このN末端アミノ酸配列と50%以上の相同性を示すタンパク質はなかった。

(2) sABP1の抗体の作製および精製

分子量19 kDaのバンドを切り取りウサギに注射してポリクローナル抗体を作成した。得られた血清は、モモ茎頂部粗抽出液のウェスタンブロットにおいてsABP1の両方のバンドを認識した。sABP1より分子量の大きい領域に非特異的結合が多く、硫酸分画とProtein A-Sepharose カラムクロマトグラフィーにより血清中のIgGを精製しても減らなかった(図V-2)。sABP1は糖タンパク質なので、糖鎖に対する抗体が粗抽出液中に存在する他の糖タンパク質を認識している可能性が考えられた。そこでSatohら(69)の方法に従い植物由来糖タンパク質であるBromelineをリガンドにしたアフィニティーカラムを作成し糖鎖の抗体とペプチドの抗体の分離を試みた。血清の20-33%硫酸沈澱画分をこのカラムに通し、素通り画分を得た。カラムに保持された抗体はglycine-HCl緩衝液で溶出した。素通り画分のウェスタンブロットはsABP1の位置に濃いバンドが認められ、それ以外の非特異的結合はほとんど消失した。

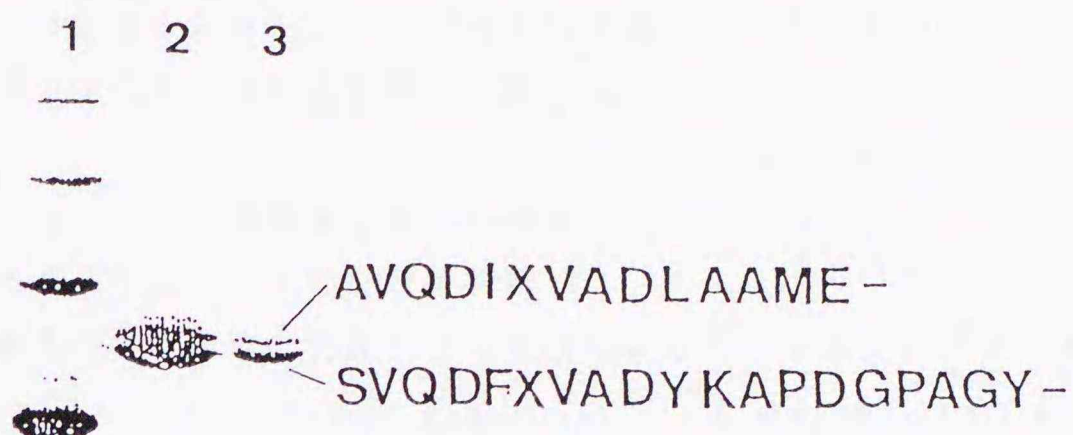


Fig.V-1 N-terminal amino acid sequence of sABP1.

lane1, molecular weight markers, bovine serum albumin (67 kDa), ovalbumin (43 kDa), chymotrypsinogen A (25.7 kDa), ribonuclease A (14 kDa).

lane2,3, 10 and 5 μ g of sABP1.

Proteins were subjected to low-Bis SDS-PAGE and electroblotted.

Nineteen kDa and 20kDa subunits of sABP1 were sequenced, respectively.

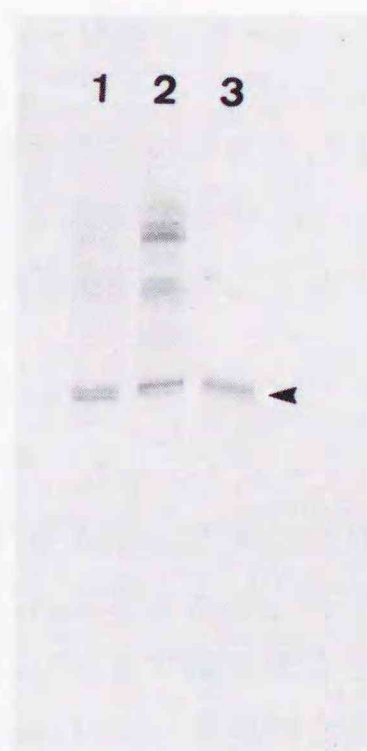


Fig.V-2. Comparison of the immunoblots of the proteins from shoot apex between fractions of the antiserum. Proteins were subjected to SDS-PAGE and immunoblotted, using antiserum purified by protein-A column (lane 1) ,and bound (lane 2), pass-through (lane 3) fractions of the antiserum separated by bromelain-Sepharose column. The arrow head indicates the position of sABP1.

一方溶出画分のウェスタンブロットは、未精製の血清の場合と同様のパターンが得られた。これらの結果から素通り画分にはペプチドに対する抗体、溶出画分には糖鎖に対する抗体が存在するものと考えられた。したがって以下に示す s A B P 1 の器官特異性や細胞内局在性はペプチドに対する抗体を用いて調べた。

(2) ウェスタンブロットによる器官特異性の解析

1. モモ茎頂部における s A B P 1 の器官特異性

単離した s A B P 1 の希釈系列を作製し、本実験におけるウェスタンブロットの力価を検定した(図V-3、4)。その結果、抗 s A B P 1 抗体は 0.5 ng 以上の s A B P 1 を検出できることがわかった。茎頂部の茎および葉の異なる成長段階における s A B P 1 の存在量を、s A B P 1 の希釈系列から推測した(表V-1)。その結果、茎や未展葉(L1)に比べ、展葉(L2、L3)に多く存在する傾向にあった。組織重あたりで比較した場合、葉ではL2、茎ではS2において存在量が多かった。

2. 成長過程のモモ果実における s A B P 1 の消長

成長過程の果実における s A B P 1 の消長をウェスタンブロットにより調べた。成長過程を通して果肉のタンパク質抽出液の中には茎頂部に比べわずかの s A B P 1 しか認められなかった(図V-4)。調べた中では開花後36日目の果実に最も多く、可溶性タンパク質1mgあたり約0.146 μ g存在するものと推測された。これは茎頂部可溶性画分の約4分の1相当した。その他の時期の果実には0.02-0.038 μ gの s A B P 1 が存在するものと推定された。組織重あたりで比較した場合、成長前期(開花後14日、36日)に多く、後期(開花後68日、97日)に少ない傾向にあった。

3. 種々の芽生えにおける s A B P 1 の存在

図V-5はトウモロコシ(蒔種後4日目)、ヤエナリマメ(蒔種後3日目)およびモモ(蒔種後10日目)の芽生えの粗抽出液のウェスタンブロットの結果である。

s A B P 1 は明所で育てたモモ芽生えには存在したが、暗所で育てたモモ芽生えには検出されなかった。トウモロコシやヤエナリマメでは両者ともに認められなかった。明所で育てたモモ芽生えの場合、芽生え全体のタンパク質抽出液には存在したが子葉と根から抽出したタンパク質液中には検出されなかった。

(4) s A B P 1 の細胞内局在性

葉における s A B P 1 の細胞内局在性を免疫電顕法により調べた結果を図V-6に示す。L1では表皮細胞の細胞壁における金コロイドの密度が顕著に高かったが(a)、葉肉細胞の細胞壁はわずかしかならべられなかった(b)。L3では、表皮細胞(c)

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14



Fig.V-3. Immuno-reactivity of the antiserum against proteins of stems and leaves at different stages of development.

lane 1-5 : 1, 5, 10, 20 and 40 ng of sABP1;

lane 6-8 : 10 μ g of proteins from the soluble fractions of stem tissues of shoot apex. Stem samples were obtained at the position of 0-1 (S1, lane6), 1-2 (S2, lane7) and 8-9 (S3, lane8) cm from the shoot tip;

lane 9, 10 : 1 and 10 μ g of proteins from the soluble fraction of L1*;

lane 11, 12 : 1 and 10 μ g of proteins from the soluble fractions of L2*;

lane 13, 14 : 1 and 10 μ g of proteins from the soluble fractions of L3*.

* L1, L2, L3 : see materials and methods in chapter 3.

Tab.V-1. Estimated content of sABP1 in various tissues of peach trees

	μ g/mg protein	μ g/g FW
Cell Wall a)	2.47	4.2
Soluble	0.61	3.5
S1 b)	0.63	2.8
S2	0.90	7.6
S3	0.17	0.48
L1	0.44	3.7
L2	2.10	23.3
L3	1.65	4.5
Fruit 14d c)	0.020	0.61
36d	0.146	0.55
68d	0.026	0.016
97d	0.038	0.023

Data were obtained from a), Fig.V-7; b), Fig.V-3; c), Fig.V-4.

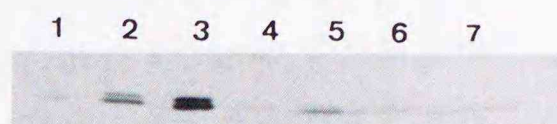


Fig.V-4. Immuno-reactivity of antiserum against proteins of peach fruit at different stages of development.

lane 1-3 : 1, 5 and 25 ng of sABP1.

lane 4-7 : 25 μ g of proteins from the soluble fractions of fruits obtained at 14, 36, 68 and 97 days after anthesis.

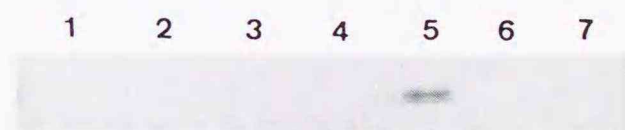


Fig.V-5. Immuno-reactivity of the antiserum against proteins of seedlings.

lane 1,2; Maize seedlings grown in the light (lane1) and dark (lane2).

lane 3,4; Mung bean seedlings grown in the light (lane3) and dark (lane4).

lane 5,6; Peach seedlings grown in the light (lane5) and dark (lane6).

lane 7; Cotyledones and roots of peach seedlings grown in the light.

One hundred μ g of proteins from soluble fractions were subjected to each lane. lane1-6, Proteins were obtained from whole seedlings.

と葉肉細胞 (d、e) の両者の細胞壁が同程度ラベルされた。表皮細胞の細胞壁における金コロイドの密度はL 1より低かった。また、どの組織においても細胞壁以外の部位にはバックグラウンドレベルの金コロイドしか認められなかった。茎組織においても表皮細胞の細胞壁における金コロイドの密度が高かった (f)。

s A B P 1 が細胞壁に存在することをウェスタンブロットにより確認した (図V-7)。すなわち、細胞壁画分から得られたタンパク質抽出液中には、タンパク質あたりで比較した場合、可溶性画分の約4倍のs A B P 1が存在することが示された。組織重あたりで比較した場合、両画分にはほぼ等量のs A B P 1が存在するものと推定された (表V-1)。

第4節 考察

<抗s A B P 1抗体の作製>

低Bis濃度のSDS-PAGEは分離能が優れており、通常のLaemliのSDS-PAGEでは1本のバンドとして認められるタンパク質が低Bis濃度のSDS-PAGEでは2本のバンドに分かれる場合がある、とHiranoら(66)によって報告されている。s A B P 1もLaemliのSDS-PAGEでは分子量20 kDaの位置に単一のバンドとして認められたが、低Bis濃度SDS-PAGEでは分子量が20 kDaと19 kDaの2本のバンドに分かれた。これらのタンパク質はSephacryl S-200カラムによるゲル濾過において異なる挙動をとることから (データ未掲載) それぞれ別のタンパク質を構成しているサブユニットであると推察された。各々のN末端アミノ酸配列は近似しており、多重遺伝子ファミリーを形成しているタンパク質であると考えられる。

低Bis濃度SDS-PAGEで2本に分かれたバンドのうち19 kDaのバンドを切り取って、抗体を作成した。得られた抗体は茎頂部の粗抽出液のウェスタンブロットにおいて両者を認識した。したがってこれらのタンパク質はN末端領域だけでなく、内部領域のアミノ酸配列も似通っており、共通のエピトープ構造を有しているものと考えられる。

<抗体の精製>

未精製の抗s A B P 1血清は、ウェスタンブロットにおいてs A B P 1に相当するバンド以外の非特異的結合がきわめて多く、硫酸分画やProtein A-Sepharoseクロマトグラフィーにより精製したI g Gを用いてウェスタンブロットを行っても減らすことができなかった。

植物の糖タンパク質の糖鎖はキシロースやフコースが付加した特殊な構造をしている場合がある。このような糖鎖は動物には存在しないため、ウサギに注射した場合抗原となり、糖鎖に対する抗体が作られる(70)。したがって、植物の糖タンパク質の抗体を

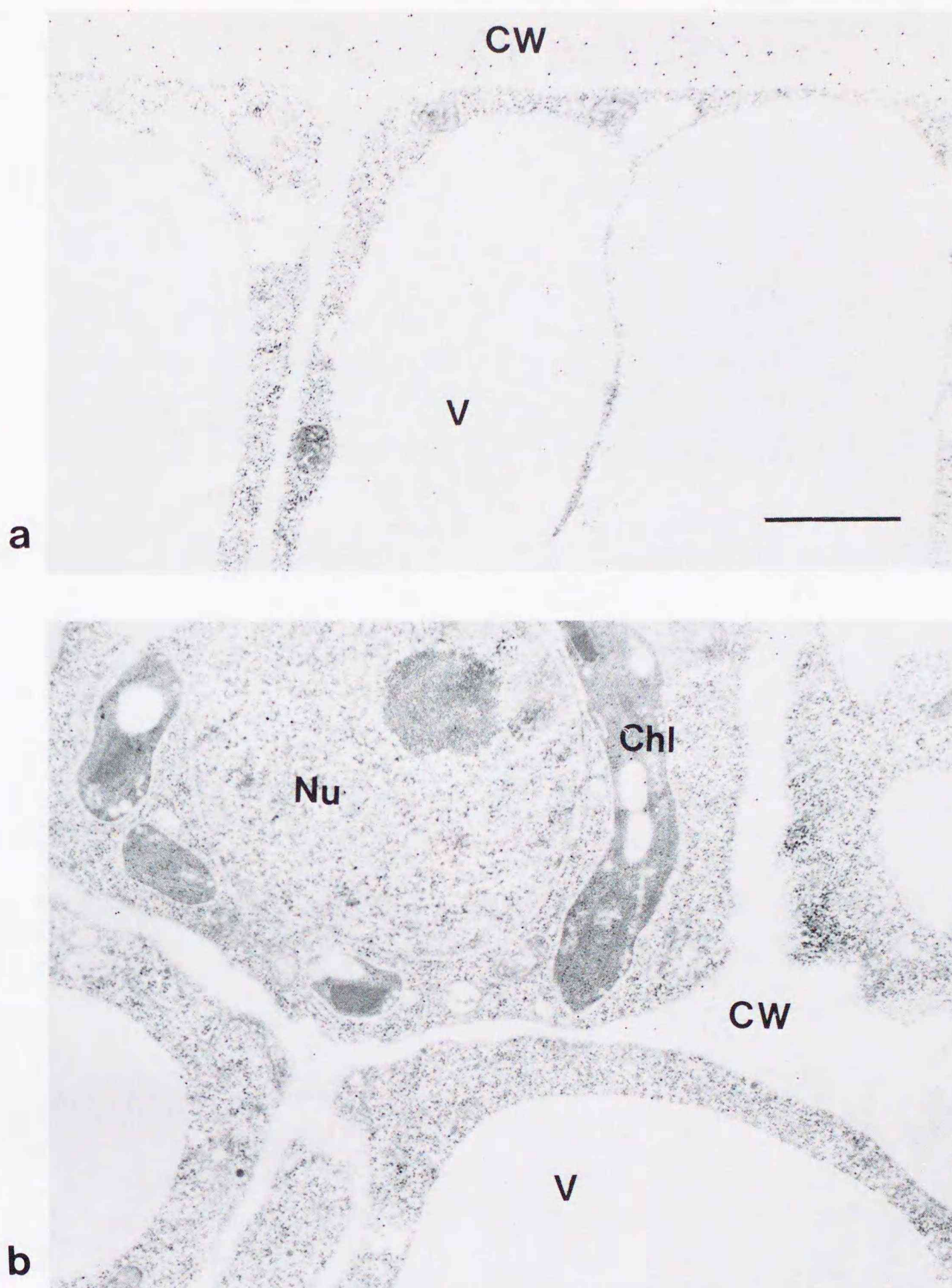


Fig.V-6 Immuno-gold localization of sABP1 in cells of stems and leaves. The gold particles are mainly associated with outer cell wall of epidermal cells of the immature leaf (a), mature leaf (c) and stem (f). In parenchyma cells of immature leaf (b), gold particles are scanty in both cytoplasm and cell wall, while they are distributed throughout the cell wall of both palisade(d) and spongy (e) parenchyma cells of mature leaf. Bar = 1 μ m; x19,800. Chl, chloroplast; CW, cell wall; V, vacuole; Nu, nucleus.

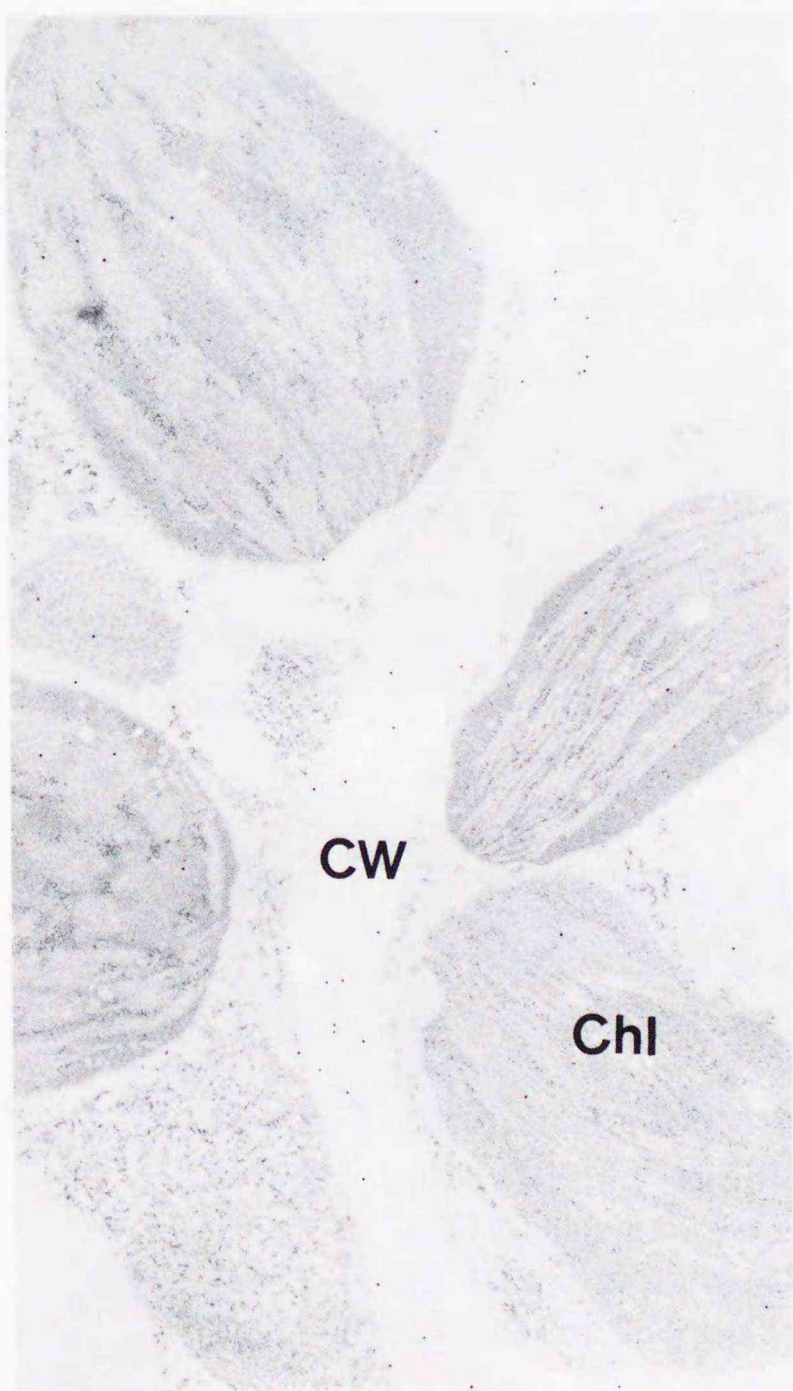
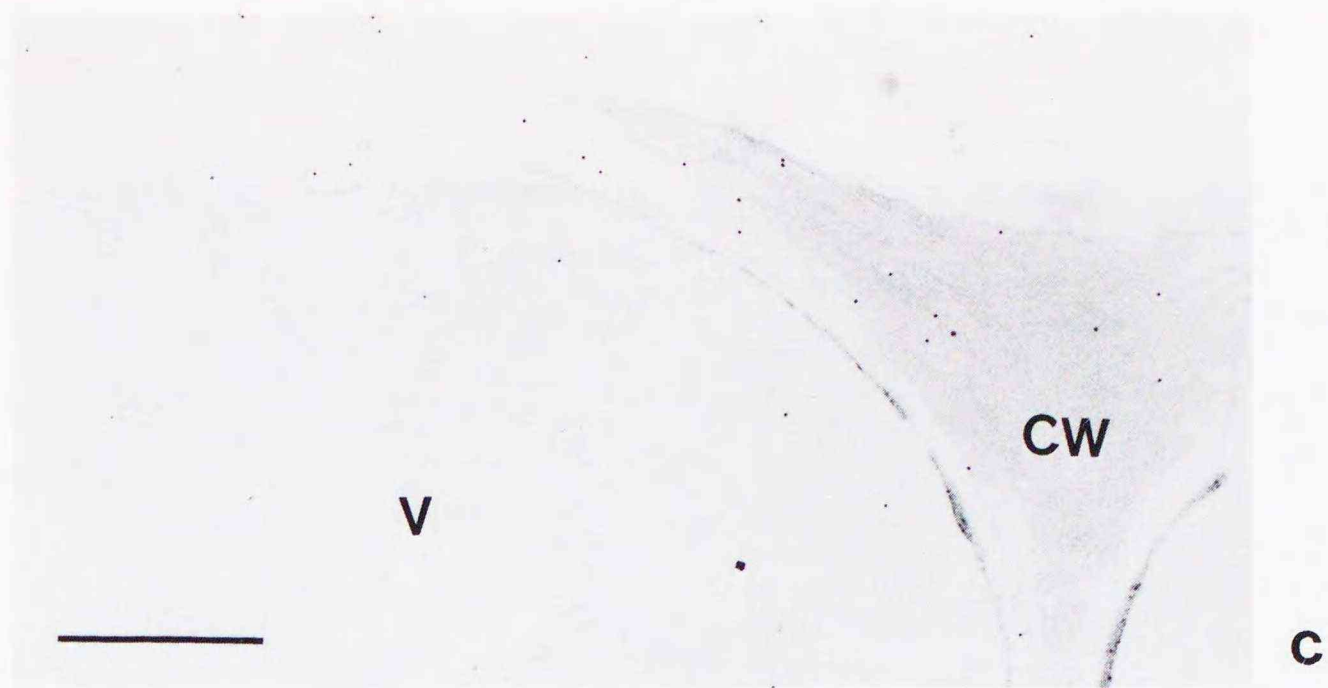


Fig.V-6

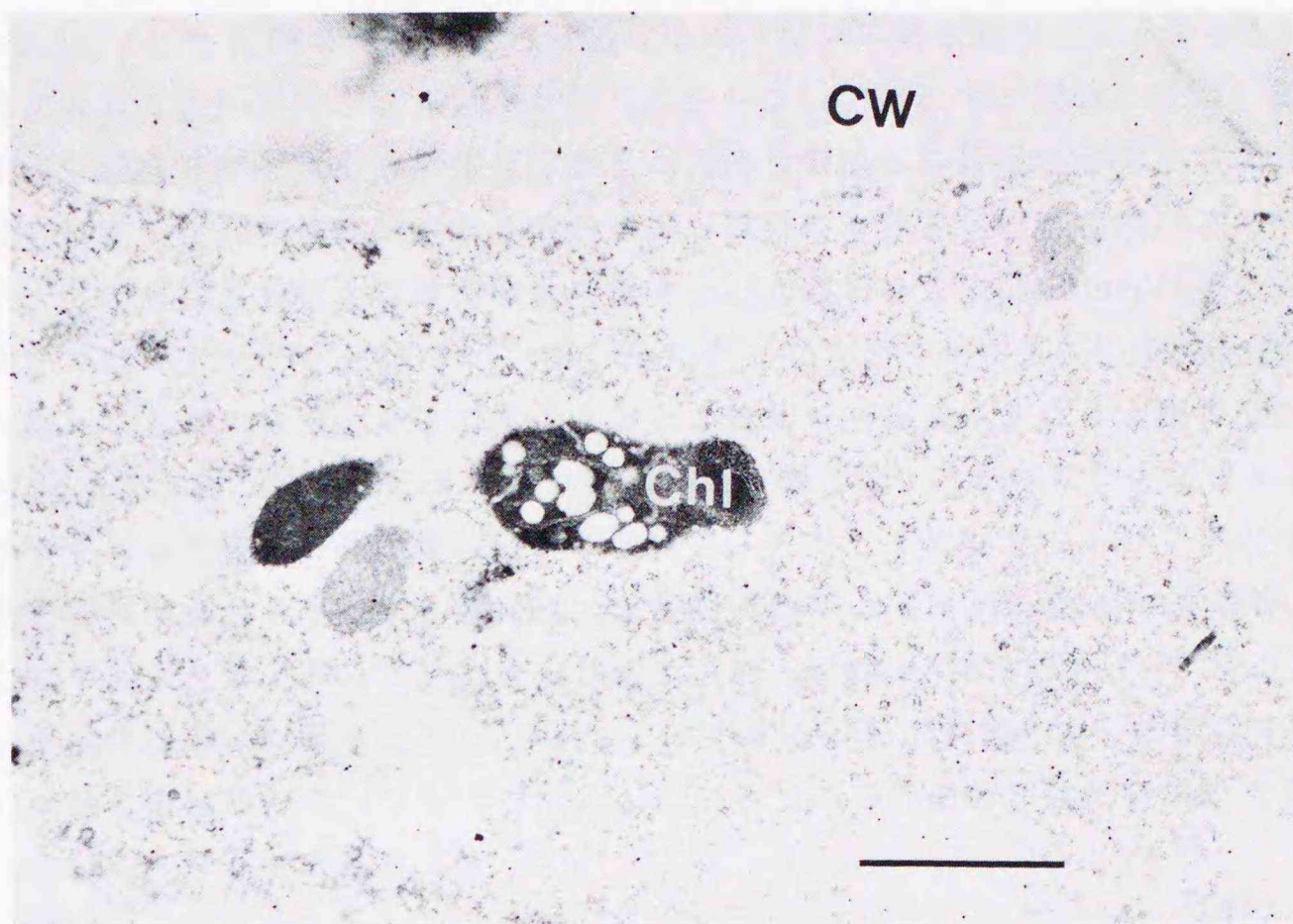


Fig.V-6-f

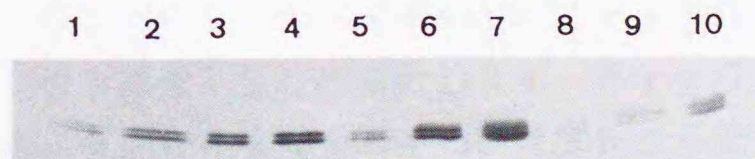


Fig.V-7. Immuno-reactivity of antiserum against the purified sABP1, cell wall and soluble proteins of shoot apex.
 lane 1-4 : 5,10,20 and 40 ng of sABP1.
 lane 5-7 : 2.5, 10 and 25 μ g of cell wall protein of shoot apex.
 lane 8-10 : 2.5, 10 and 25 μ g of soluble protein of shoot apex.

作製する場合、糖鎖を除いたペプチドの部分のみを抗原とすることが望ましい、と Satohら(69)によって指摘されている。Satohらはニンジンの培養細胞にオーキシンを添加した際に培地に放出される糖タンパク質 (GP 57) に対して、糖鎖を除いた場合と、除かなかった場合とでそれぞれ抗体を作製した。前者の抗体は特異性が高く GP 57 のみを認識したが、後者の抗体は GP 57 のバンド以外にも非特異的結合のバンドが多数存在した。この非特異的結合は植物由来の糖タンパク質である Bromeline(パイナップルから単離されたペプチダーゼ)をリガンドとしたアフィニティーカラムに血清を通すことにより除くことができた。そこで抗 sABP 1 抗体も同様の方法による精製を試みた。図 V-2 に示すように、アフィニティーカラム素通り画分を 1 次抗体に用いてウェスタンブロットを行った場合、非特異的結合が除かれ sABP 1 に相当するバンドのみが認められた。これは GP 57 の場合と同様、糖鎖を認識する抗体が Bromeline の糖鎖に吸着したためであると考えられる。カラムに保持され、glycine-HCl 緩衝液で溶出された画分を 1 次抗体に用いた場合は sABP 1 に相当するバンドが薄くなった他は未精製の血清の場合と同様のパターンを示した。したがって、この画分には糖鎖に対する抗体が含まれているものと考えられる。

<モモにおける sABP 1 の器官特異性>

sABP 1 のペプチドに対する抗体を用いてウェスタンブロットを行い、モモにおける sABP 1 の器官特異性や成長過程における消長を調べた。その結果、茎や葉に特異的に存在するタンパク質で、特に未分化の若い葉 (L 1) や茎 (S 1-3) に比べ、分化した葉 (L 2、3) に多く存在することが明らかになった。また、緑化芽生えには存在するが黄化芽生えには存在しなかった。これらのことから sABP 1 は器官特異的で、かつ、植物の成長段階や環境によっても発現が制御されているタンパク質であることが明らかになった。オーキシンの作用は外部環境の変化や植物の成長段階によって変化する。それはオーキシンの合成や不活性化を介したオーキシンの量的変化だけでなく、オーキシン受容体の量的・質的变化も関わっている可能性が示唆された。

モモ果実の成長過程では、開花後 36 日目の果実に最も多く sABP 1 が検出された。第 4 章においてこの時期の果実から ABP を単離する試みをした。その際、2,4-D-Sepharose カラムに保持され、IAA で溶出されたタンパク質の中に sABP 1 と同じ電気泳動の挙動を示すタンパク質が認められたが、ウェスタンブロットにおいても果実に sABP 1 が存在することが確かめられた。ウェスタンブロットの結果から、開花後 36 日の果実の可溶性画分に存在する sABP 1 の量はタンパク質 1 mg あたり約 $0.146 \mu\text{g}$ と推測された。これは 2,4-D の結合数 6.1 pmol に相当し、果実の可溶性画分に存在するタンパク質 1 mg あたりの 2,4-D 結合数 (表 V-6) の 87% を占めるものと推定された。

<モモ以外の植物における s A B P 1 の存在>

トウモロコシやヤエナリの芽生えの粗タンパク質抽出液のウェスタンブロットでは明所で育てた場合も暗所で育てた場合も検出されなかった。また、ナシやリンゴの成長した葉ではわずかながら検出された(山木; 未発表データ)。これらのことから s A B P 1 は 1) バラ科植物に特異的なオーキシン結合タンパク質かあるいは 2) 木本植物において特異的なオーキシン結合タンパク質である可能性が考えられる。しかし、ナシやリンゴの葉の場合、存在量が少なく粗抽出液の段階では検出されなかったが、アフニティーカラムクロマトグラフィーにより A B P を濃縮することによってようやく検出された。したがってトウモロコシやヤエナリマメの芽生えも A B P を濃縮するかウェスタンブロットの感度を上げて調べ直す必要がある。トウモロコシから単離された膜結合型 A B P ではポリクローナル抗体のエピトープが近接した位置に 3 箇所存在することがエピトープマッピングにより明らかにされた(71)。エピトープは数個のアミノ酸によって構成され、タンパク質全体に占める割合は小さいかった。s A B P 1 に類似のタンパク質が存在していてもエピトープの部分が異なっているために抗体によって認識されない可能性もあり、ウェスタンブロットの結果だけから存在の有無を結論づけることはできない。s A B P 1 に対する c D N A をプローブにした遺伝子レベルの解析の方がより確実な情報が得られるものと考えられる。

< s A B P 1 の細胞内局在性>

免疫電顕法によりモモの葉や茎における s A B P 1 の細胞内局在性を調べた結果、細胞壁に存在することが明らかになった。このことはさらにウェスタンブロットでも確かめられた。すなわち茎頂部を純水中で磨砕し、遠心分離により細胞壁画分と可溶性画分に分け各々の画分の s A B P 1 の存在量をウェスタンブロットにより調べた結果、可溶性画分より細胞壁画分に多量の s A B P 1 が検出された。可溶性画分に認められた s A B P 1 は純水中で試料を粉碎した際に可溶化し、細胞壁から可溶性画分に移行したものと考えられる。s A B P 1 の精製の際は高塩濃度の抽出用緩衝液を用いたため、純水で抽出した場合より、多くの s A B P 1 が可溶性画分に移行したものと推察された。

細胞壁に対するオーキシンの作用に関する研究は数多く報告されている。オーキシンによって細胞の肥大成長が促進される際は、細胞壁が部分分解され「ゆるみ」が生じることが必要であると考えられている。実際、オーキシンによって細胞壁多糖類の分解酵素である β -glucanase が活性化されること(72)、 β -glucanase に対する特異的抗体を細胞壁に作用させることによりオーキシンによる伸長促進が抑えられること(73)、さらには細胞壁多糖類にたいする特異的抗体によってもオーキシンによる伸長促進が抑制されることが確かめられている(74)。また、オーキシンの伸長促進作用は特に表皮組織に現れることが古くは van Overbeek らにより最初に報告された(75)。彼らはエンドウの黄化芽生えの茎を縦に引き裂き、オーキシンを含む培養液に浸漬すると、茎が内側に湾曲す

ることからオーキシンによる伸長促進は表皮の方が内部組織より強いことを示した。以後この方法はオーキシン活性の生物検定法として広く用いられるようになった。近年ではオーキシンが表皮細胞の細胞壁に特異的に作用することが生化学的および生理学的手法を用いて確かめられている(76-78)。

s A B P 1 は特に成長の盛んな若い組織の表皮細胞の細胞壁に多く存在することからオーキシンの伸長促進作用に関与している可能性が示唆された。また、s A B P 1 の精製に用いたモモ茎頂部の茎に対する伸長促進効果は2,4-Dが最も強く(林; 未発表データ)、s A B P 1 の結合の特異性(第3章)と同じ結果が得られたことからこの可能性は支持される。ウェスタンブロットでは若い葉や茎より成長した葉に多量のs A B P 1 が検出されたが、これは成長した葉では表皮細胞の他に葉肉細胞にも発現するためであると考えられる。この現象の生理的な意味に関しては不明で、今後検討を要する課題である。

これまで単離されたオーキシン結合タンパク質のなかで、トウモロコシの黄化芽生えから得られた膜結合型のA B P (A B P 1) は、その細胞内局在性が詳しく調べられている。A B P 1 はShimomuraらによって最初に全アミノ酸配列が決定され、C末端にK D E L (Lys-Asp-Glu-Leu) という小胞体のretention signalが存在することが明らかにされた(79)。さらに細胞分画法においてcytochrome Cと挙動を共にすることからも、A B P 1 の90%は小胞体中存在することが示された(29)。一方Löbnerらは、同タンパク質の局在性に関して、Shimomuraらとは異なる結果を報告した(66)。すなわち、間接蛍光抗体法によりトウモロコシの幼葉鞘における局在性を調べ、A B P 1 が表皮細胞の細胞膜に局在することを示した。その後、Jonesらが免疫電顕法によりA B P 1 の細胞内局在性を詳細に調べ、このタンパク質が小胞体、ゴルジ複合体、細胞膜、細胞壁といった細胞の分泌系小器官に遍在することを報告した(80)。さらにトウモロコシの培養細胞を用い、A B P 1 が細胞外へ分泌されることを明らかにした。細胞壁画分に存在するA B P はフォトアフィニティーラベルによっても示された。Jonesらは*Hyoscyamus muticus*の培養細胞の細胞壁画分にazido-IAAによってラベルされるタンパク質が存在することを明らかにした。このA B P は分子量が31 kDaで、タンパク質としての性質が β -glucanaseと一致していた(30)。これらのことから細胞壁の伸長は細胞壁や細胞膜に存在する複数のタンパク質の協調的な作用によってもたらされ、その中のあるものはオーキシンによって直接活性化され、またあるものはオーキシン受容体として働き2次的な情報伝達系を刺激することによって、オーキシンによる伸長促進が引き起こされるものと考えられる。これまで細胞壁はオーキシンの作用部位として、特に上述のような細胞壁の伸展とオーキシンとの関係に関して詳細な研究がなされてきたが、オーキシンの情報伝達の間としても重要な役割を果たしているものと推察される。したがって、今後A B P の研究は膜および可溶性画分に限らず、細胞壁に存在するA B P に関してもさらに探索する必要があると考えられる。

<まとめ>

本章において s A B P 1 が細胞壁に存在することが示されたが、このタンパク質の N 末端アミノ酸配列は、これまで報告されている A B P や細胞壁タンパク質のアミノ酸配列とのホモロジーはなく、A B P としても、また、細胞壁タンパク質としても新しく見いだされたものである。s A B P 1 が細胞壁においてどのような働きをしているのか、細胞壁の伸長に対してどのような役割を担っているのかは今後さらに詳細な研究が必要である。現在 s A B P 1 の c D N A のクローニングおよび 1 次構造の解析を行っている。得られた c D N A のセンスまたはアンチセンス遺伝子を導入して表現形の解析を行うことにより、s A B P 1 の機能に関する重要な知見が得られるものと期待される。

摘要

本論文では植物ホルモンのひとつであるオーキシンの果樹組織における作用および作用機構を明らかにし、オーキシン作用の多様性をもたらす要因を解明することを目的とした。

まず、果実に対するオーキシンの作用を明確にするため、果肉ディスクを用いた組織培養法によるオーキシン作用の検定法を確立し、成長過程のモモ (*Prunus persica* L.) 果肉組織に対するオーキシンの作用を解析した。その結果、細胞分裂期、硬核期、細胞肥大期に採取したモモ果実の果肉ディスクに対し、オーキシンによる顕著な肥大促進効果が認められた。同時にオーキシンは軟化やアントシアニンの生成などの果実の成熟に伴う変化も促進した。それぞれの反応に対するオーキシンの至適濃度は異なっていた。また、反応の大きさや至適濃度は環境要因（光の有無）や果実の成長段階によって大きく変化することが明らかになった。したがって、果肉組織にはオーキシンの情報伝達系が複数存在し、それぞれが成長段階や外部環境によって制御されている可能性が示唆された。

オーキシンは細胞内の特定の部位に結合し、作用を及ぼすと考えられている。したがってオーキシンの作用機構を明らかにする上でオーキシンの細胞内局在性は重要な情報になりうるものと考えられた。そこで、生体内の主要なオーキシンであるIAAに対する特異的抗体を作製し、これを用いて免疫電顕法によりモモの種々の組織におけるIAAの細胞内局在性を解析した。その結果、葉肉細胞では成長に伴いIAAが葉緑体に集積することが明らかになった。これは、葉の成長に伴い細胞のIAA要求量が減少し、過剰になったIAAを葉緑体に取り込むためであると考えられる。根では根端の分裂細胞の核小体にIAAの集積が観察された。この現象は他の分裂細胞や根の伸長部の細胞の核小体には認められず、根端の分裂細胞に特異的であると考えられる。核小体はrRNAの合成の場であることから、オーキシンが根端の分裂細胞に特異的なrRNAの合成に関与している可能性が示唆された。このようなIAAの細胞内局在性の組織特異性や成長に伴う変化が多様なオーキシン作用の1要因になっているものと推察された。しかし、基本的にはIAAはどの細胞にも存在し、細胞内においては腋胞を除く部位に遍在しており、血中と標的細胞の作用部位にのみ局在する動物ホルモンとは性質を異にしていた。オーキシン作用の特異性や多様性はオーキシンの局在性の違いだけでなく、オーキシンの情報を伝達するオーキシン受容体、あるいは受容体から生理変化に至るまでの情報伝達系の性質の違いも深く関わっているものと考えられる。

そこで、オーキシンの情報伝達系の第1段階である、オーキシン受容体によるオーキシンの情報の受容機構を明らかにするため、モモ茎頂部および未熟果の可溶性画分からオーキシン結合タンパク質 (ABP) の単離・精製を試みた。

モモ茎頂部の可溶性画分には、CM-Toyopearlカラムに保持される画分と、素通りす

る画分にそれぞれ性質の異なるABP (sABP1、sABP2) が存在した。両画分のABPをそれぞれ2,4-D-Sepharoseカラムにより精製し、オーキシンの結合の性質を調べた。スカッチャードプロットから推測されたsABP1およびsABP2の解離定数はそれぞれ $4.1 \times 10^{-5} \text{M}$ と $2.6 \times 10^{-6} \text{M}$ で、タンパク質1mgあたりの2,4-D結合数はそれぞれ42nmolと0.92nmolだった。 ^{14}C -2,4-Dのタンパク質に対する結合はオーキシン化合物によって阻害されるが、オーキシン活性のない構造類似化合物では阻害されなかった。また、IAAやNAAはsABP1よりsABP2に対して、より強い阻害を示した。両タンパク質は2,4-D-Sepharoseカラムに保持された後、高濃度の2,4-Dで溶出されることから2,4-Dとの結合は可逆的であると考えられた。これらの結果から、sABP1およびsABP2はオーキシン受容体としての条件であるを特異性、飽和性、親和性、および可逆性を満たしていることが示された。sABP1とsABP2は、分子量やオーキシンに対する結合の性質が異なっていることから、それぞれ異なるオーキシン作用を媒介しているものと考えられた。このことからオーキシン受容体は細胞内に複数存在し、オーキシンが異なった受容体と結合することにより、異なった情報伝達系が活性化され、多様な生理変化を植物体にもたらすものと推察された。

モモ未熟果の可溶性画分からもABPを部分精製した。2,4-D-Sepharoseに保持され、IAAで溶出される画分にsABP1と同様の電気泳動的挙動を示すタンパク質が存在した。また、sABP2に相当するタンパク質は認められなかった。

sABP1は電気泳動的に単一なバンドにまで精製し、特異的抗体を作製して器官特異性および細胞内局在性を調べた。ウェスタンブロットにより、sABP1は緑化した茎や葉に特異的に存在するタンパク質であることが明らかになった。根や子葉および黄化した茎や葉の粗抽出液中には検出されなかった。また、果実には成長過程を通して、茎や葉に比べわずかのsABP1が認められた。免疫電顕法および細胞分画法によりsABP1は細胞壁に局在するタンパク質であることが示された。特に未熟葉や伸長部の茎の表皮細胞の細胞壁に局在することからオーキシンによる細胞の肥大促進に関与している可能性が示唆された。

以上の結果から、オーキシン作用の多様性の要因として、植物体におけるオーキシンの情報伝達系の多様性が重要な役割をはたしているものと考えられる。すなわち複数のオーキシン受容体が存在し、それぞれが様々な制御を受け、多様な生理反応を植物体にもたらす、という仮説が成立する。この仮説を証明するためには、まず、植物体におけるABPを逐一明らかにし、それらタンパク質のオーキシン受容体としての機能を解明する必要がある。本論文ではこれまでABPに関する報告のない果樹組織を材料とし、可溶性画分に新たな2種類のABPを見いだした。さらに、膜画分や細胞壁画分に存在するABPを検索することによって果樹組織に存在するオーキシン受容体の候補が揃うことになる。これらのABPのオーキシン受容体としての機能や、オーキシン受容体から生理反応にいたる情報伝達機構を解明することができれば、オーキシンの作用機構の全貌が明らかになるものと期待される。

Summary

This study was carried out in an attempt to reveal the mechanism of auxin action in tissues of fruit trees.

II. Effect of Auxin on the Enlargement and Ripening of the Mesocarp Discs of Peach Fruits.

Effects of auxin on the physiology of fruit tissues were investigated using a bio-assay system in mesocarp discs of peach fruits (*Prunus persica* L. cv. Akatsuki) at different stages of development. Auxin promoted the enlargement of the discs at all stages of development as well as ripening. Differences in the optimum concentration of auxin for each effect were observed. In addition, the effects changed among the stages of fruit tissues and environmental conditions. These results indicate that there may be several mechanisms of auxin action in the tissues which are influenced by the stage of the fruit tissues and environmental conditions.

III. Immuno-Gold Localization of IAA in Tissues of Fruit Trees.

Subcellular localization of IAA in tissues of peach trees was investigated using immuno-gold electron microscopy in order to identify the target of auxin action in cells. In parenchyma cells of peach leaves, the accumulation of gold label in the chloroplasts took place as the cells matured. Although the physiological significance of IAA in the chloroplasts remains unknown, it is possible to consider that the excess IAA in the cells is trapped in the chloroplasts and inactivated. In the meristematic cells of the root tips, the most prominent feature was the accumulation of the gold particles in the nucleoli. It is likely that auxin plays an important role in the rRNA synthesis and/or processing in root tip cells. This tissue-specific, stage-dependent localization of auxin may be one of the courses of the diversity of the effect of auxin.

VI. Purification and Properties of Auxin-Binding Proteins from Tissues of Fruit Trees.

Several candidates for auxin receptors, namely, proteins with specific auxin-binding activity (auxin-binding proteins), have been isolated from both membrane fractions and soluble fractions of some plants. Studies on auxin-binding proteins, however, have been restricted to etiolated seedlings or cultured cells of non-woody plants and information about auxin-binding proteins in naturally growing plants or woody plants is limited. From the soluble fractions of the

shoot apex of peach trees, two different types of auxin-binding proteins (referred to as sABP1 and sABP2) were highly purified by affinity chromatography, ion-exchange chromatography and gel filtration chromatography. The inhibition test revealed that the binding sites of these proteins enabled to discriminate between auxins and non-auxins. IAA and NAA were significantly stronger inhibitors to sABP2 than to sABP1. Based on the Scatchard analysis, the dissociation constants of sABP1 and sABP2 were estimated to be $4.1 \times 10^{-5} \text{M}$ and $2.6 \times 10^{-6} \text{M}$ and the number of binding sites per mg protein were 42 nmol and 0.92 nmol, respectively. The differences in the auxin-binding properties between sABP1 and sABP2 suggest that they mediate different auxin-actions on the plant tissues.

Auxin-binding activity was also detected in the soluble fraction of tissues of immature peach fruits. The protein which has the same R_m value as sABP1 in two-dimensional PAGE was detected in the IAA-eluted fractions from affinity column.

V. Localization of sABP1 in Tissues of Peach Trees.

Organ-specificity and subcellular distribution of sABP1 were examined using immunochemical assay and immuno-gold electron microscopy. Immunoblot analysis revealed that sABP1 was located in the leaves and stems of both seedlings and shoot apex grown under light conditions. Little immunoreactivity was detected in the crude extracts of tissues of seedlings grown under dark conditions. A very low level of immunoreactivity was detected in the crude extracts of mesocarp tissues of peach fruits compared to leaves and stems. The gold particles which detected sABP1 were mainly associated with the outer cell wall of epidermal cells of leaves and stems. Since the cell wall is known to be the site of action of auxin-induced growth, these results suggest that sABP1 plays a direct role in the cell wall.

謝辞

本論文をまとめるにあたり、ご校閲とご教示を賜った北海道大学教授、市原耿民博士、同本間 守博士、同原田 隆博士に謹んで感謝の意を表します。

本研究を遂行するにあたり、終始ご懇意なご助言を賜り、また、本論文のご校閲の労をとられた農林水産省果樹試験場 林 建樹博士、筑波大学 酒井慎吾博士に深く謝意を表します。

そして、実験を実施するにあたりご援助賜った佐々木智子氏、西内明子氏をはじめ、果樹試験場の皆様に心よりお礼申し上げます。

特にオーキシン結合タンパク質の精製に関しては、果樹試験場 菊地幹之氏の多大なる尽力があったことを記して、深く感謝の意を表します。

北海道大学在学中、農産物利用学講座において懇切なるご指導を賜り、研究への端緒を開いてくださった坂村貞雄博士（現帯広畜産大学）、葛西隆則博士をはじめ、農産物利用学講座の皆様に深甚なる謝意を表します。

また、本研究を始めるにあたり、ご啓発とご激励を賜り、電子顕微鏡の技術を伝授下さった筑波大学 内山安男博士（現岩手医科大学）をはじめ、筑波大学基礎医学系形態部門の皆様に衷心よりお礼申し上げます。

最後に、本研究を遂行するにあたり、終始激励、ご助言を賜わると同時に、研究に対する刺激に満ちた生活の場を共有して下さった環境庁国立環境研究所 竹中明夫博士に心から感謝いたします。

引用文献

- (1)菅谷純子 (1992) オーキシン受容体の分子機構 - オーキシン結合タンパク質研究の現状 - 秀潤社「植物細胞工学」 4:153-162
- (2)R.E.Cleland (1983) Is plant development regulated by changes in the concentration of growth substance or by changes in the sensitivity to growth substances? Trend in Biol. Sci. 354-357.
- (3) M.Sakoda, K.Hasegawa and K.Ishikawa (1992) Mode of action of natural growth inhibitors in radish hypocotyl elongation -influence of raphanusanin on auxin-mediated microtubule orientation. Physiol. Plant. 84: 509-513.
- (4)増田芳雄 (1984) 植物生長ホルモンとオーキシン、培風館「植物生理学」 257-283
- (5)D.Klämpt (1990) A view about the function of auxin-binding proteins at plasma membranes. Plant Mol. Biol. 14:1045-1050
- (6)S.Sakai(1992) Regulatory functions of soluble auxin-binding proteins. Int.Rev. Cytol. 135:239-267
- (7)J.P.Nitch (1950) Growth and morphogenesis of strawberry as related to auxin. Amer.J.Bot.37:211-215
- (8)K.L.Parkin (1987) A new technique for the long-term study of physiology of plant fruit tissue slices. Physiol.Plant. 69:472-476
- (9)T.A.M.Geelen, A.Varga, J.Peeters and J.Bruinsma (1988) A pericarp disc system as a bio-assay for tomato fruit ripening. J.Plant Physiol. 133 :107-109
- (10)M.E.Saltveit,Jr. (1989) Effect of alcohols and their interaction with ethylene on the ripening of epidermal pericarp discs of tomato fruit. Plant Physiol. 90:167-174
- (11)A.D.Campbell, M.Huysamer, H.U.Stotz, L.C.Greve and J.M.Labavitch (1990) Comparison of ripening processes in intact tomato fruit and excised pericarp discs. Plant Physiol. 94:1582-1589
- (12)D.J.Chalmers and B.van den Ende (1975) A reappraisal of the growth and development of peach fruit. Aust.J.Plant Physiol. 2:623-624
- (13)A.N.Miller, C.S.Walsh and J.D.Cohen (1987) Measurement of indole-3-acetic acid in peach fruits (*Prunus persica* L.Batch cv. Redhaven) during development. Plant Physiol. 84:491-494
- (14)T.Murashige and F.Skoog (1962) A revised medium for rapid growth and bio-assay with tobacco tissue cultures. Physiol.Pantarum 15:473-497

- (15)L.O.V.Blaricom and T.L.Senn (1967) Anthocyanin pigment in freestone peaches grown in the southeast. *Am.Soc.Hort.Sci.* 90:541-545
- (16)石田雅士、稲葉昭次、傍島善次 (1963) モモ果実の発育に関する生理学的研究 I 果実発育に伴う組織学的変化 京都府立大学農学部紀要、1-7
- (17)W.Wernicke, J.Gorst and L.Milkovits (1986) The ambiguous role of 2,4 dichlorophenoxyacetic acid in wheat tissue culture. *Physiol.Plant.* 68:597-602
- (18)W.Wernicke and L.Milkovits (1987) Rates of uptake and metabolism of indole-3-acetic acid and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid by cultured leaf segments at different stages of development in wheat. *Physiol. Plant.* 69:23-28
- (19)C.G.Downs and C.J.Brady (1990) Two forms of exopolygalacturonase increase as peach fruits ripen. 13:523-530
- (20)D.Grierson and G.A.Tucker (1983) Timing of ethylene and polygalacturonase synthesis in relation to the control of tomato fruit ripening. *Planta* 157:174-179
- (21)S.F.Yang and N.E.Hoffman (1984) Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. *Annu.Rev.Plant Physiol.* 35:155-189
- (22)A.Theologis (1986) Rapid gene regulation by auxin. *Annu.Rev.Plant Physiol.* 37:407-438
- (23)K.T.Yamamoto, H.Mori and H.Imaseki (1992) cDNA cloning of indole-3-acetic acid-regulated genes: Aux22 and SAUR from mung bean (*Vigna radiata*) hypocotyl tissue. *Plant Cell Physiol.* 33:93-97
- (24)B.A.McClure and T.Guilfoyle (1987) Characterization of a class of small auxin-inducible soybean polyadenylated RNAs. *Plant Mol.Biol.* 9:611-623
- (25)小関良宏 (1992) アントシアニン合成系酵素遺伝子の発現制御機構 天然色素アントシアニンの化学・生物と応用シンポジウム講演要旨集 20-21
- (26)U.Dohrmann, R.Hertel and H.Kowalik (1978) Properties of auxin binding sites in different subcellular fractions from maize coleoptiles. *Planta* 140:97-106
- (27)S.Shimomura, T.Sotobayashi, M.Futai and T.Fukui (1986) Purification and properties of an auxin-binding protein from maize shoot membrane. *J.Biochem.* 99:1513-1524
- (28)M.Löbner and D.Klämbt (1985) Auxin-binding protein from coleoptile membranes of corn (*Zea mays* L.) 1.Purification by immunological methods and characterization. *J. Biol. Chem.* 260:9848-9853
- (29)S.Shimomura, N.Inohara, T.Fukui and M.Futai (1988) Different properties of two types of auxin-binding sites in membranes from maize coleoptiles. *Planta*

175: 558-566

- (30)H.Macdonald, A.M.Jones and P.J.King (1991) Photoaffinity labeling of soluble auxin-binding proteins. *J.Biol.Chem.* 266:7393-7399
- (31)G.Sandberg, P.Gardestrom, F.Sitbon and O.Olsson (1990) Presence of indole-3 acetic acid in chloroplasts of *Nicotiana tabacum* and *Pinus sylvestris*. *Planta* 180:562-568
- (32)J.A.Fregeau and F.Wightman (1983) Natural occurrence and biosynthesis from sun flower leaves. *Plant Sci.Lett.* 32:23-34
- (33)G.Perbal, Y.Leroux and D.Driss-Ecole (1982) Mise en évidence de l'IAA-5-3H par autoradiographie dans le coléoptile de Blé. *Physiol. Plant.* 54:167-173
- (34)B.Sotta, L.Sossountzov, R.Maldiney, I.Sabbagh, P.Tachon and E.Miginiac (1985) Absciscic acid localization by light microscopic immunohistochemistry in *Chenopodium polyspermum* L. *J.Histochem. Cytochem.* 33:201-208
- (35)R.Mertens, J.Eberle, A.Arnscheidt, A.Ledebur and E.W.Weiler (1985) Monoclonal antibodies to plant growth regulators. II.Indole-3-acetic acid. *Planta* 166:389-393
- (36)W.Pengelly and F.Meins (1977) A specific radioimmunoassay for nanogram quantities of the auxin, indole-3-acetic acid. *Planta* 136:173-180
- (37)J.Marcussen, P.Ulvskov, C.E.Olsen and R.Rajagopal (1989) Preparation and properties of antibodies against indoleacetic acid (IAA)-C5-BSA, a novel ring-coupled IAA antigen, as compared to two other types of IAA-specific antibodies. *Plant Physiol.* 89:1071-1078
- (38)V.C.Pence and J.L.Caruso (1987) ELISA determination of IAA using antibodies against ring-linked IAA. *Phytochem.* 26:1251-1255
- (39)E.Epstein, J.D.Cohen and R.S.Bandurski (1980) Concentration and metabolic turnover of indoles in germinating kernels of *Zea may* L. *Plant Physiol.* 65:415-421
- (40)A.Ohmiya and T.Hayashi (1992) Immuno-gold localization of IAA in leaf cells of *Prunus persica* at different stages of development. *Physiol.Plant.* 85:439-445
- (41)A.J.Wardrop and G.M.Polya (1980) Co-purification of pea and bean leaf soluble auxin-binding protein with ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase. *Plant Physiol.* 66:105-111
- (42)P.W.Hattersley, L.Watson and C.B.Osmond (1977) *In situ* immunofluorescent labelling of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase in leaves C3 and C4 plants. *Aust. J. Plant Physiol.* 4:523-539

- (43) P.J. Shaw and J.A. Henwood (1985) Immuno-gold localization of cytochrome f, light-harvesting complex, ATP synthase and ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase. *Planta* 165::333-339
- (44) A. Ohmiya, T. Hayashi and N. Kakiuchi (1990) Immuno-gold localization of Indole-3-acetic acid in peach seedlings. *Plant Cell Physiol.* 31:711-715
- (45) G. Sandberg, E. Jensen and A. Crozier (1982) Biosynthesis of indole-3-acetic acid in protoplasts, chloroplasts and cytoplasmic fraction from barley (*Hordeum vulgare* L.) *Planta* 156:541-545
- (46) L. Sossountzov, B. Sotta, R. Maldiney, I. Sabbagh and E. Miginiac (1986) Immuno-electron-microscopy localization of abscisic acid with colloidal gold on Lowicryl-embedded tissues of *Chenopodium polyspermum* L. *Planta* 168:471-481
- (47) B.V. Milborrow (1979) Antitranspirants and regulation of abscisic acid content *Aust. J. Plant Physiol.* 6:249-254
- (48) J.A.D. Zeevaart. (1977) Sites of abscisic acid synthesis and metabolism in *Ricinus communis* L. *Plant Physiol.* 59:788-791
- (49) D.C. Walton (1980) Biochemistry and physiology of abscisic acid. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 31:453-489
- (50) D. Driss-Ecole and G. Perbal (1987) Intracellular localization of ³H-IAA in the apical bud of *Lycopersicon esculentum*. *J. Exp. Bot.* 38:1362-1372
- (51) S. Liao (1966) Intracellular localization of growth hormones in plants. *Nature* 151:822-824
- (52) K.R. Libbenga, A.C. Mann, P.C.G.v.d.Linde and A.M. Mennes (1986) in "Hormones, Receptors and Cellular Interactions in Plants" ed. by C.M. Chadwick and R. Garrod, Cambridge Univ. Press, Cambridge. 1-68.
- (53) M.A. Venis (1977) Solubilisation and partial purification of auxin-binding sites of corn membranes. *Nature (London)* 266:268-269
- (54) S. Sakai and T. Hanagata (1983) Purification of an auxin-binding protein from etiolated mung bean seedlings by affinity chromatography. *Plant Cell Physiol.* 24:685-693
- (55) S. Sakai (1985) Auxin-binding protein in etiolated mung bean seedlings Purification and properties of auxin-binding protein-II. *Plant Cell Physiol.* 26:185-192
- (56) O. Hutzinger and T. Kosuge (1968) Microbial synthesis and degradation of indole-3-acetic acid. The isolation and characterization of indole-3-acetyl-L-lysine. *Biochemistry* 7:601-605

- (57)O.H.Lowry, N.J.Rosebrough, A.L.Farr and R.J.Randall (1951) Protein measurement with Folin phenol reagent J.Biol.Chem. 193:265-275
- (58)U.K.Laemmli (1970) Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227:680-685
- (59)Davis,B.J. (1964) Disc electrophoresis II. Method and application to human serum protein. Ann.N.Y.Acad.Sci. 121: 404-427.
- (60)G.Scatchard (1949) The attraction of proteins for small molecules and ions. Annu.N.Y.Acad.Sci. 51:660-672
- (61)S.Sakai (1984) Characterization of 2,4-D binding to the auxin-binding protein purified from etiolated mung bean seedlings. Agric. Biol. Chem. 48:257-259
- (62)D.Koerner, H.L.Schwartz, M.I.Surks, J.H.Oppenheimer and E.C. Jorgensen (1975) Binding of selected iodothyronine analogues to receptor sites of isolated rat hepatic nuclei. High correlation between structural requirements for nuclear binding and biological activity. J.Biol.Chem. 250:6417-6423
- (63)L.L.Brunton, R.A.Wiklund, P.M.van Arsdale and A.G.Gilman (1976) Binding of [³H]prostaglandin E to putative receptors linked to adenylyl cyclase of cultured cell clones. J.Biol.Chem. 251:3037-3044
- (64)K.R. Narayanan, K.W.Mudge and B.W.Poovaiah (1981) Demonstration of auxin binding to strawberry fruit membranes. Plant Physiol. 68:1289-1293
- (65)P.M.Ray (1977) Specificity of auxin-binding sites on maize coleoptile membranes as possible receptor sites for auxin action. Plant Physiol. 60:585-591
- (66)M.Löbler and D.Klämbt (1985) Auxin-binding protein from coleoptile membranes of corn (*Zea mays* L.) II. Localization of a putative auxin receptor. J.Biol.Chem. 260:9854-9859
- (67)A.Ohmiya, M.Kikuchi, S.Sakai and T.Hayashi (1993) Purification and properties of an auxin-binding protein from shoot apex of peach tree. Plant Cell Physiol. 34:177-183
- (68)H.Hirano (1989) Microsequence analysis of winged bean seed proteins electroblotted from two dimensional gel. J.Protein Chem. 8:115-130
- (69)S.Satoh (1990) Improvement of the specificity of an antiserum raised against carrot glycoprotein by eliminating the anti-glycan antibody. Agri.Biol.Chem. 54:3201-3204
- (70)M.Lauriere, C.Lauriere, M.J.Chrispeels, K.D.Johnsson and A.Sturm (1989) Characterization of a xylose-specific antiserum that react with the complex asparagine-linked glycans of extracellular and vacuolar glycoproteins. Plant Physiol. 90:1182-1188

- (71) R.M. Napier and M.A. Venis (1992) Epitope mapping reveals conserved regions of an auxin-binding protein. *Biochem.J.* 284:841-845
- (72) T. Hayashi and G. Maclachlan (1984) Pea xyloglucan and cellulose III. Metabolism during lateral expansion of pea epicotyl cells. 76:739-742
- (73) M. Inouhe and D.J. Nevins (1991) Inhibition of auxin-induced cell elongation of maize coleptiles by antibodies specific for cell wall glucanases. *Plant Physiol.* 96:426-431
- (74) T. Hoson and D.J. Nevins (1989) β -D-Glucan antibodies inhibit auxin-induced cell elongation and changes in the cell wall of *Zea* coleoptile segments. *Plant Physiol.* 90:1353-1358
- (75) J. van Overbeek and F.W. Went (1937) Mechanism and quantitative application of the pea test. *Bot. Gaz.* 99:22-41
- (76) Y. Masuda and R. Yamamoto (1972) Control of auxin-induced stem elongation by epidermis. *Physiol. Plant.* 27:109-115
- (77) R. Firn and J. Digby (1977) The role of peripheral cell layers in the geotropic curvature of sunflower hypocotyls : a new model of shoot geotropism. *Aust. J. Plant Physiol.* 4:337-347
- (78) D.G. Pope (1982) Effect of peeling on IAA-induced growth in *Avena* coleoptiles. *Ann. Bot.* 49:493-501
- (79) N. Inohara, S. Shimomura, S. Fukui and M. Futai (1989) Auxin-binding protein located in the endoplasmic reticulum of maize shoots: molecular cloning and complete primary structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:3564-3568
- (80) A.M. Jones and E.M. Herman (1993) KDEL-containing auxin-binding protein is secreted to the plasma membrane and cell wall. *Plant Physiol.* 101:595-606



