

## 《日本農芸化学会功績賞》



## ジベレリンの生理作用の多様性解明に関する研究

東京大学大学院農学生命科学研究科・応用生命化学専攻 教授 山口 五十磨

ジベレリン (GA) は、発芽、茎葉部の伸長、花成誘導など植物の生活環における多様な生理現象の制御にかかわっている植物ホルモンである。GA がどのようにして、このように多様な生理作用にかかわっているのかについては、いまだ明らかにされていないといつてよい。GA は、単離・構造決定された順番に従って番号が割り振られ、現在までに 136 種類が登録されている。1970 年代、すでに 50 種類を超える GAs が登録されていたことや、植物によって最も強い活性を示す GA の種類が異なることなどから、GA の構造の多様性が生理作用の多様性を生む可能性、換言すれば構造を異にする GA がそれぞれ異なった生理現象の制御にかかわっている可能性も指摘されていた。しかし、生合成研究の進展とさまざまな変異体に対する効果が詳細に明らかにされるに従って、受容体に認識されて生理作用を示すいわゆる活性型 GA は、 $3\beta$ -水酸基、 $4\rightarrow 10\gamma$ -ラクトン、 $6\beta$ -カルボキシル基をもつ GAs に限定されることが明らかになった。

1970 年代の後半から、GA の局在や輸送、あるいは異なる受容体の存在が生理作用の多様性に深くかかわっている可能性が高いと考え、GA 特有の生理現象の観察される部位と時期に、部位特異的ならびに時期特異的に GA が検出されるか否か、また、その GA がその部位で合成されるか否かを調べることを開始した。分子生物学的手法が導入される以前の研究においては、活性型 GA および、その生合成前駆体、不活性型代謝産物の量的・時間的変化を機器分析ならびに免疫化学的手法により明らかにすることにした。

## 1. GA 分析法の体系化

微量の GA の正確な分析手法の確立が必須であった。当時から今日に至るまで、最も信頼性の高い GA 分析法は、安定同位体標識した内部標準を用いる GC/MS 分析である。

多種類の同族体から構成される GAs を 2 種類の分離モードの異なるカラムを巧みに組み合わせて、GAs の構造の類似性に基づくグルーピングを行う方法を編み出した。これにより、植物抽出液に含まれる微量の GAs を効率よく精製・グルーピングし、GC/MS による高感度分析を行う GA の体系的分析法を確立した。

この手法を用いて、イネの葍などのごく微量しか得ることのできない組織の内生ジベレリン GAs を精密に分析することが可能となり、イネの葍で機能している GA 生合成系、代謝系は茎葉部において機能している系と異なることを明らかにすることができた。この体系的分析法は、その後の器官や組織の成長過程における GA の動態解析研究に貢献した。

## 2. 抗体を用いた分析、組織化学、生長調節

HPLC による精製と GC/MS による定性・定量は、分析精度において非常に優れているが、予備精製に相応の時間を要し、煩雑さも伴う。また、組織内部における存在部位を明らかにすることはできない。分析の簡略・迅速化、さらには組織内部の局在をも明らかにすることを目的として、イムノアッセイ、免疫組織化学による GA の高感度分析と局在を明らかにする研究を展開した。GA のイムノアッセイは、1969 年 Fucks らにより報告されていたが、検出感度は GC/MS に遠く及ばなかった。その後、Weiler らにより、検出感度の高いイムノアッセイが報告された。演者らはスパーサーを利用した独自の免疫原を調製し、特異性が高く、検出感度において従来のイムノアッセイや GC/MS の感度を大きくしのぐ、10 fmol の GA の検出を可能にするエンザイムイムノアッセイを確立した。また、Weiler との共同研究により、GA に対するモノクローナル抗体の調製に初めて成功した。

これらの抗体を用いた免疫組織化学・免疫細胞化学を展開し

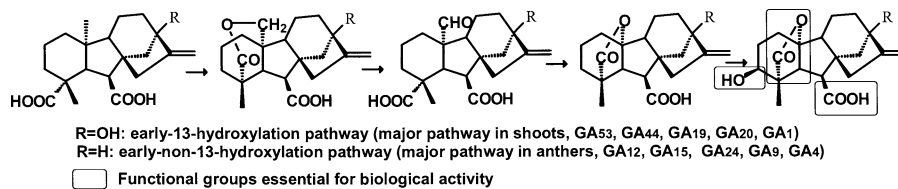


図 1 イネにおける主たる GA 生合成経路

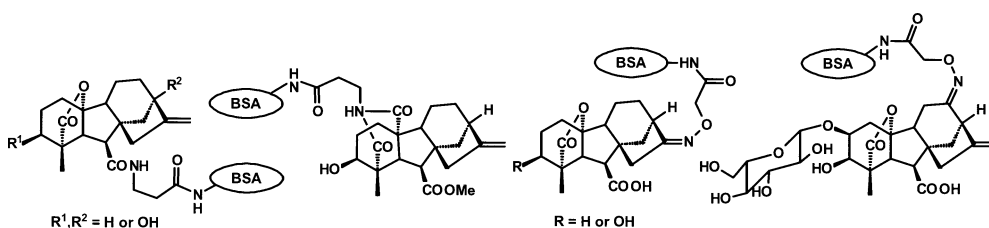


図 2 調製した免疫原

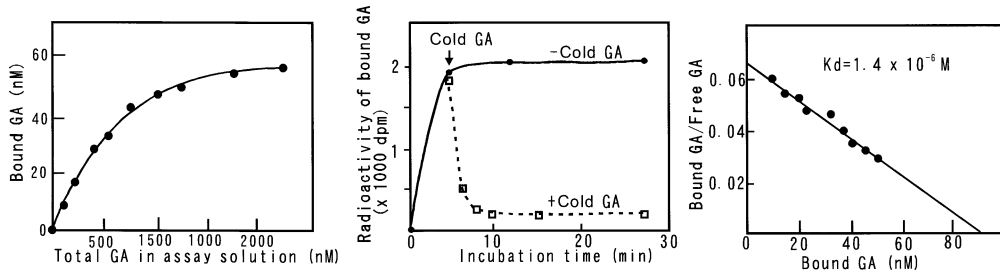


図3 OsGID1のGAとの結合

た。イネの蒴を材料とした抗GA<sub>4</sub>抗体、抗GA<sub>24</sub>抗体を用いた免疫電顕においては、核やミトコンドリアをはじめとするオルガネラの構造が保持されるとともに、これらの小器官にGA<sub>4</sub>やGA<sub>24</sub>のシグナルが明瞭に検出された。一方、それまでの知見からGA<sub>24</sub>は活性型GAであるGA<sub>4</sub>の生合成前駆体であり、受容体では認識されないこと、GA<sub>24</sub>をGA<sub>9</sub>に変換する酵素であるGA 20oxidaseは、細胞質で機能することが明らかであったことから、GA固定の過程でGAが本来の存在部位から移動し、タンパク質密度の高い核やミトコンドリアで固定された可能性が高いと考えられた。細胞化学における固定においては、脱水が必須であり、液体ヘリウムで凍結した後、ドライアイスアセトン中の脱水とオスミウムによる固定を行ったが、この過程でGAが移動した可能性が高いと危惧された。細胞化学レベルでの脱水とGA固定の条件検討を行ったが、GAの移動を十分に抑える方法を見いだすことはできなかった。しかし、この条件検討の過程において、試料を液体窒素温度で凍結後、低温での凍結乾燥、減圧下での気体カルボジミドによる固定を行うことにより、組織レベルにおいては、試料の破壊やGAの移動が問題にならないとみなせることが明らかとなった。この方法では、GAは6位のカルボキシル基から組織タンパク質のアミノ基にアミド結合される。そこで、出穂直前の穂を凍結、凍結乾燥、イソプロピルカルボジミドを用いる減圧下でのGA固定、パラフィン包埋を行った。切片を調製し、定法に従い脱パラフィン、スキンミルクによるブロッキングを行った後、アミド結合したGAを認識するウサギ抗GA-Me抗体を用いる一次染色、ビオチン標識抗ウサギIgG抗体による二次染色、ペルオキシダーゼ標識アビディンで染色した後、ジアミノベンジدينを反応させて可視化した。GAのシグナルは、花粉、蒴の双方に認められた。この結果は、オスミウム固定を用いた細胞化学で花粉とタペート細胞の両細胞内にGAのシグナルを検出した結果と一致した。これにより、信頼性に乏しいと言われていた低分子の免疫組織化学の問題点を克服できた。

免疫組織化学を用いた研究を進めるとともに、分子生物学的手法を用いた *in situ* ハイブリダイゼーションによるジベレリン生合成酵素の発現部位の解析と組み合わせて、アサガオならびにシロイヌナズナの結実から種子成熟過程におけるジベレリンの動態を組織化学的に明らかにし、双子葉植物の種子成熟過程においては、受精後まもなく珠皮においてGAが生合され、つづいてGAによって $\alpha$ -アミラーゼが誘導され、珠皮に蓄積されたデンプンを分解し、種皮の形成を促進することを明らかにした。シロイヌナズナを用いた *in situ* ハイブリダイゼーションでは、胚乳周辺においてもGA生合成酵素遺伝子が活発に発現しており、胚成熟にもGAが機能している可能性が示され

た。

未熟種子には比較的高い濃度のGAが存在することは知られていたが、その生理的役割を示唆するデータを具体的に示した。

また、抗GA<sub>19/24</sub>一本鎖抗体遺伝子を作製し、植物で発現させ、植物の草丈を抑制することにも成功した。将来、抗GA抗体を任意の器官で発現させ、器官特異的なGAの作用を観察する方法を編み出すことができるのではないかと期待される。

### 3. GA受容体の同定

GAの作用の多様性を明らかにするには、受容体の解明も必須であることから、その同定に向けた研究を積極的に展開した。黄化アズキ芽生えを材料として、活性型GAに特異的に結合するタンパク質の精製を積極的に進め、活性画分を22万倍まで濃縮し、検出される主要なタンパク質のN-末端アミノ酸配列分析を行ったが、有益な情報は得られなかった。このような状況のなか、名古屋大学の松岡らがイネのジベレリン非感受性変異体を作成し、その原因遺伝子のGID1、GID2のいずれかがジベレリン受容体をコードしている可能性を指摘した。松岡らとの共同研究により、GID1のGST融合タンパク質が活性型GAと特異的に結合することを証明し、GID1がGA受容体の一つであることの根拠を示した。

この特異的結合の証明には、申請者らがアズキのGA結合タンパク質の研究を続けてきた実績と知見の貢献が大きい。このGA受容体の同定により、GAが受容体GID1と結合し、さらにGAシグナル伝達の負の調節因子であるGRASファミリーのタンパク質SLR1と結合し、SLR1のプロテアソームでの分解にかかわるという重要なステップが明らかになった。

また、アズキのGA結合タンパク質の精製画分が抗GID1抗体で染色されたことから、アズキのGA結合タンパク質がGID1類似のタンパク質である可能性が強く示された。GID1の発現解析やGRASファミリーのタンパク質との相互作用の解析をさらに進めることにより、GAの生理作用の多様性解明に向けた新たな知見が蓄積されるとともに、GAのシグナル伝達の解明がいつそう進展すること、さらには農業的利用に発展することを期待している。

### おわりに

本研究は、東京大学農学生命科学研究科応用生命化学専攻生物制御化学研究室(旧 農芸化学科農薬学研究室)においてかかわってきた研究である。研究の手ほどきを受けた高橋信孝先生、室伏 旭先生、多くのご助言をいただいた先輩の方々、共に研究に取り組んできた同僚、卒業生に深く感謝申し上げます。また、共同研究をはじめとして、多大なご支援をいただいた先生方、研究者の方々に心からの謝意を表します。