

報告番号 ※ 甲 第 2329 号

# 主論文の要旨

題名

傷害誘導エチレン生合成に関する研究

氏名 中嶋信美

# 主論文の要旨

報告番号

※甲第

号

氏名

中嶋信美

植物ホルモンの1つであるエチレンは植物の環境応答反応を調節する中間信号物質として働いており、傷害刺激やオーキシンによって、その生成速度が著しく変化する。したがってエチレン生成の調節機構を解析することは、植物ホルモンの作用機作あるいは傷害反応のメカニズムの解明にもつながると考えられる。

高等植物のエチレンは、S-アデノシルメチオニン (SAM) から1-アミノシクロプロパン-1-カルボン酸 (ACC) を経て合成され、SAM から ACC が生成する反応が律速段階となっている。この反応を触媒する ACC合成酵素が傷害刺激やオーキシンの作用によって新たに合成されて、エチレン生成が促進されると推定されている。本研究は ACC合成酵素の誘導機構を分子レベルで解明することを目的とし、傷害誘導 ACC合成酵素の精製から開始した。本研究を始めた時点でACC合成酵素はいずれの組織からも精製されていなかった。

通常のカラムクロマトグラフィー操作の組合せでは完全精製標品を得ることはきわめて困難と判ったので、まず 20kg の傷害カボチャ果肉から、いくつかのカラムクロマトグラフィーや HPLC の組合せで、約 1,300 倍に部分精製した。

部分精製した標品を用いてその酵素学的性質を調べた。カボチャ果肉の ACC合成酵素の至適 pH は 9.5 で PLP をコファクターとする。基質 SAM に対する  $K_m$  は  $12.1 \mu\text{M}$  で、SAM と反応すると酵素の一部が不可逆的に失活することが明らかとなった。拮抗阻害剤 AVG に対する  $K_i$  は  $2.5 \mu\text{M}$  であった。この他に AOA、SAH が拮抗阻害剤として作用した。

ACC合成酵素を完全精製するため、部分精製標品を非変性ゲル電気泳動で分離し、活性のあるバンドを抗原として ACC合成酵素に対する親和性の低い抗体 (AsII) を得た。次に 50kg の組織から ACC合成酵素を AsII の抗体カラムを用いて酵素を特異的に濃縮し、この濃縮標品をさらに HPLC 等で電気泳動的にも免疫化学的にも単一の標品まで精製した。SDS ゲル電気泳動及びゲル濾過の結果から、精製した酵素は 50kDa のサブユニットからなり、見かけの大きさは 160kDa であった。精製標品を用いて新たな抗体 (AsIII) を作製した。また、N末端のアミノ酸配列をエドマン分解法により決定しようとしたが、分解され

なかったことから、N末端は修飾されていると推定した。

傷害刺激が ACC合成酵素の mRNA の転写を高めているかどうかを調べるため、傷害刺激を与えたカボチャ果肉及び無傷組織から調製した Poly(A)<sup>+</sup> RNA のコムギ胚芽無細胞翻訳産物を解析した。翻訳産物の大きさは約 58kDa であり、傷害刺激を与えることによって mRNA の翻訳活性が著しく増加した。その変動は活性の変動と一致していた。したがって、ACC合成酵素の翻訳可能な mRNA は傷害刺激によって増加すると結論した。傷害刺激を与えた組織をエチレン処理すると、ACC合成酵素の活性増加が抑制されるが、この抑制が転写段階の抑制であることを無細胞翻訳系で確認した。すなわち、ACC合成酵素に対する mRNA は傷害刺激を与えたのちエチレン処理したカボチャ果肉中では減少し、エチレン作用の拮抗阻害剤である 2,5-ノルボルナジエン処理した果肉組織では著しく増加した。mRNA の翻訳産物の大きさは 58kDa であるが、精製した ACC合成酵素の大きさは 50kDa であった。この大きさの違いを酵素の<sup>35</sup>S-メチオニン標識で検討した結果、58kDa タンパク質は抽出液中で徐々に 50kDa に変化することが明らかとなった。このことから、カボチャ果肉の傷害誘導 ACC合成酵素は 58kDa のタンパク質として合成されるが、精製操作中に分解を受けて 50kDa になったものと推論した。本酵素の N末端は修飾されていたことから、部分分解は C末端側で起こっている可能性を指摘した。しかし、プロセッシングを受けている可能性も否定できない。

ACC合成酵素の誘導機構を解析するため、ACC合成酵素 cDNA をクローン化した。ベクター・プライマー法で発現プラスミドを用いて cDNA ライブラリーを作成し、AsIIIで選抜した結果、AsIIIと強く反応する1つのクローン (pCMW33) を得た。pCMW33 の形質転換菌を誘導条件下で培養した菌体の抽出液は ACC合成酵素活性を示した。したがって、pCMW33 は ACC合成酵素をコードしていることが証明された。pCMW33 をプローブとしたノーザンハイブリダイゼーション分析の結果、ACC合成酵素の mRNA の大きさは約 1.9kb で傷害刺激によって著しく増加すること、その増加はエチレン処理によって抑制されることが明らかとなった。これらの結果から、ACC合成酵素の傷害刺激による誘導及びエチ

レンによる誘導の抑制は転写段階で調節されていることが証明された。

pCMW33 の全塩基配列を決定した結果、cDNA の大きさは 1748bp、そのうち連続してアミノ酸をコードしている部分の大きさは 1479bp で、493 アミノ酸残基からなり、その計算される分子量は 55,900 であった。塩基配列から推定されるアミノ酸配列には、精製した ACC合成酵素の部分アミノ酸配列と一致する部分が確認され、ACC合成酵素は 58kDa のタンパク質として合成されることが証明された。

pCMW33 の3'側からの欠失変異体 DNA 群を作成し、それらの形質転換菌抽出液の酵素活性を測定した結果、C末端から 39 アミノ酸を他のアミノ酸に置き換えても強い酵素活性が検出できた。しかし、80 アミノ酸欠失させると酵素活性は検出できなかつた。以上の結果から、C末端側の 5kDa は酵素活性の発現には必ずしも必要でないと推定した。したがって精製された ACC合成酵素の部分分解は C末端側で起こっていた可能性が高いと推論した。