オーキシン受容体とオーキシンの作用機構†

酒 井 慎 吾

(筑波大学生物科学系)

1. はじめに

植物ホルモンの一種であるオーキシンの生理作用は、細胞分裂促進、細胞伸長促進、木質部分化促進、側芽生長抑制、根生長抑制、不定根形成、カルス形成、単為結実、果実肥大、老化抑制、酵素誘導など、じつに多種多様である。

天然のオーキシンはインドール酢酸 (IAA) であるが、IAA と同じ作用を持つオーキシン類や IAA の作用を抑える抗オーキシン類が多数合成されている (図 1)。これらの合成オーキシンや抗オーキシンの研究により、その化学構造と作用性の関係が明らかにされてきて、タンパク質性の細胞内受容体の存在が推測され、1955 年には Muir-Hansch により 2 点接着説が出された。その後、オーキシンの受容体を追求めて細胞内のオーキシン結合部位の検索がなされ、1970 年代にはいつてから、膜系に存在するオーキシン結合部位と可溶性オーキシン結合タンパク質の研究が本格的に進められ、最近になってようやく、オーキシンの作用機構を解明する端緒が開かれてきた^(1,2)。

2. 仮想オーキシン受容体

単離したタンパク質について、オーキシンとの結合の特異性、可逆性、飽和性を調べ、これらの必要条件を満たすものがオーキシン受容体の候補とされてきた。しかしながら、真の受容体であることを証明するためには、オーキシンと受容体候補との結合が、オーキシンに特異的な生物反応を導くことを証明しなければならない。これまでにオーキシン受容体候補であるオーキシン結合タンパク質はいくつか単離されているが^(1,2)、受容体であると証明されたものは現在までなく、すべてが仮想オーキシン受容体である。

3. オーキシンによる遺伝子発現の調節

オーキシンによる生理作用の多くが、RNA 合成阻害剤やタンパク質合成阻害剤を用いることにより抑えられることから、オーキシンの作用に RNA 合成、タンパク質合成が関与していることが実証されてきた。さらに最近の遺伝子レベルでの研究の進展により、植物組織をオーキシンの処理すると、処理後短時間に特異的な遺伝情報が発現していることが明らかにされ⁽³⁾、オーキシンの作用機構の 1 つとして、遺伝子発現の調節が明確になってきた。これらの cDNA クローンや遺伝子が数多く単離されてきており^(3,4)、塩基配列も決定されている。

4. 膜系に存在するオーキシン結合タンパク質

小胞体 (ER) 膜、液胞膜、細胞膜のそれぞれに、オーキシン結合部位が存在することが明らかにされている^(4,5,6)。ER 膜からは 21 kDa のオーキシン結合タンパク質が単離、精製され⁽⁷⁾、その遺伝子も明らかにされているが⁽⁸⁾、機能については明確になっていない。膜系に存在するオーキシン結合タンパク質の研究を行っている人たちの多くは、膜上の受容体はオーキシンが結合することにより活性化され、そのことにより 2 次的な情報伝達系が活性化されて、最終的に特定の遺伝子発現が引き起こされると考えている。しかしながらこのことについては、いまだ推測の域を出ていない。

5. 可溶性オーキシン結合タンパク質

ここで動物ホルモんと植物ホルモンの相違を考えてみたい。動物ホルモンは多くの場合、作られる場所と作用する場所が異なり、ホルモンは体液系に分泌されて移動し、ステロイドホルモン以外は作用する器官や組織の細胞表面に存在する受容体によって認識される。しかし植物の場合は、動物の腺のようなホルモンの合成、分泌する特定の器官や組織がなく、しかも動物のような体液系もない。さらに、植物ホルモンの合成場所は局在している例もあるが、ほとんどすべての植物組織で量の多少はあっても合成され、ホルモンが合成された場所で作用し

† Auxin Receptors and Mode of Action of Auxin.
Shingo SAKAI (Institute of Biological Sciences,
University of Tsukuba, Tsukuba, Ibaraki 305)

図 1 オーキシンおよび抗オーキシン

ている例もある。また植物ホルモンはいずれも低分子物質で、細胞内にとりこまれやすい。これらの植物ホルモンの特徴の一部を考えただけでも、動物ホルモンとはかなり異なっていることがわかる。このようなことから筆者らは、植物ホルモンの一種であるオーキシンが特定の遺伝子発現の調節をする場合、細胞内の可溶性受容体によりまず認識され、その複合体が核に働くことにより、特定の遺伝子発現を引き起こしているのではないかと推測し、研究を進めている⁽²⁾。

これまでに 10 ほどのグループが可溶性オーキシン結合タンパク質の単離、精製をめざしてきたが、オーキシン結合タンパク質は非常に不安定なタンパク質であり、精製されてその性質が明らかにされたものは少ない^(1,2)。しかしながら、部分精製されたオーキシン結合タンパク質でも、多くは受容体としての必要 3 条件を備えていることが明らかにされている^(1,2)。筆者らは、黄化ヤエナリから 2 種類の可溶性オーキシン結合タンパク質 (ABP-I, ABP-II) を単離、精製し、それらの機能を調べてきた⁽⁹⁻¹⁴⁾。以下にそれらの結果をも含めて、可溶性オーキシン結合タンパク質の機能について紹介したい。

6. 可溶性オーキシン結合タンパク質による RNA 合成の促進

1970 年代に Biswas とその共同研究者は^(15,16)、未熟なココナツ胚乳から単離したオーキシン結合タンパク質

(nIRP) と IAA の複合体が、大腸菌の RNA polymerase を添加したココナツのクロマチンでの RNA 合成を促進することを発表した。その後この論文についてはいくつかの疑問点が出され⁽¹⁾、ほとんど引用されなくなっていた。しかし最近になって、可溶性オーキシン結合タンパク質の機能として、単離核における RNA 合成の促進が一般的に認められるようになってきた^(12,17-19)。

黄化ヤエナリから単離、精製した ABP-I と ABP-II も、ともに単離核での mRNA 合成を促進する⁽¹²⁾。ABP 単独、あるいは ABP と IAA をともに与えた単離核で合成された全 RNA から、poly(A)⁺RNA を調製し、それらの *in vitro* 翻訳産物を 2 次元電気泳動で分離して比較検討した。対照区の単離核から調製した poly(A)⁺RNA の翻訳産物として検出された大部分のポリペプチドは、IAA 有無の条件下で ABP-I または ABP-II を処理した核からの poly(A)⁺RNA の翻訳産物にも検出された。また ABP-I あるいは ABP-II を単独で核に与えた場合には、翻訳可能な mRNA の構成には変化が検出されなかった。しかし、単離核を ABP-I と IAA で処理した場合に、分子量 79,000、等電点 5.2 のペプチドが、また ABP-II と IAA で処理した場合に、分子量 18,000 の塩基性ペプチドが増加していることが見出された⁽¹³⁾。また IAA あるいは 2,4-ジクロロフェノキシ酢酸 (2,4-D) を処理した黄化ヤエナリ胚軸切片から poly

(A)⁺RNA を調製し、それらの *in vitro* 翻訳産物を 2 次元電気泳動で分離した結果、ABP-I と IAA, ABP-II と IAA を単離核に処理したときに検出された、それぞれの翻訳産物と同じ分子量と等電点を持つ翻訳産物が、いずれの場合にも増加していることが明らかになった⁽¹³⁾。以上の結果から、ABP-I および ABP-II ともに、黄化ヤエナリ組織において、オーキシンの受容体としてそれぞれ特異的な遺伝情報発現の調節に関与していることが考えられた。

7. ABP-I と核構成成分との相互作用

オーキシン結合タンパク質がどのようにして特定の遺伝子の発現を引き起こしているかを明らかにするために、核構成成分と ABP-I との相互作用を、アフィニティークロマトグラフィーの手法により調べた。まず黄化ヤエナリから得られた粗クロマチン画分から、次の 3 画分を調製した。①EDTA を含む緩衝液でクロマチンを洗浄して得られた画分。②そのクロマチンを 2 M NaCl を含む緩衝液で可溶化し、透析後、不溶物を遠心分離で除いて得られた可溶性画分。③不溶物を 0.1% Triton X-100 で溶かしたもの。これらの画分を ABP-I を結合させたセファロース 4B カラムにかけ、十分に洗浄した後、1 M NaCl を含む緩衝液でカラムに保持された物質を溶出した。その結果、②の可溶性画分をかけた場合のみ 280 nm に吸収を持つ物質が溶出され、その画分に RNA polymerase II 活性が検出された⁽¹⁴⁾。またその画分に核酸の存在も認められた。さらに、ヤエナリ単離核から部分精製した RNA polymerase II や小麦胚芽から精製した RNA polymerase II も、ABP-I と結合することが明らかになった⁽¹⁴⁾。また、ヤエナリ DNA と小麦胚芽から精製した RNA polymerase II を用いた RNA 合成系に ABP-I を加えることにより、RNA 合成は約 2 倍に促進された⁽¹⁴⁾。

前述したように、クロマチン可溶性画分を ABP-I-結合セファロース 4B カラムにかけた場合、1 M NaCl で溶出された画分に核酸の存在も認められた。当初この核酸は RNA polymerase II が結合していた DNA が混入してきたのではないかと考えていた。しかし ABP-I による mRNA 合成促進の機構がだんだんと明らかになるにつれ、ABP-I が DNA に対しても親和性を有している可能性が考えられた。そこで、ヤエナリ DNA を制限酵素 (Sau 3A 1) で切断し、その断片を 50 mM KCl を含んだ緩衝液で平衡化した ABP-I-結合セファロース 4

図 2 可溶性オーキシン結合タンパク質の機能⁽⁴⁾

B カラムにかけてみた。その結果、ほとんどの DNA 断片はカラムを素通りするが、100 mM, 300 mM および 800 mM KCl で溶出されるような、かなり強固に ABP-I と結合する DNA 断片が存在することが明らかになった⁽²⁾。また IAA の存在下でカラム操作を行うと、高濃度 KCl で溶出されるピークにわずかな変化がみられた。現在、ABP-I のみでも結合する DNA 断片と、IAA と結合した ABP-I が結合する DNA 断片とが、質的に異なった DNA 断片であるのかを明らかにしようとしている。

8. おわりに

植物細胞のなかには、IAA や合成オーキシンを特異的に認識する可溶性オーキシン結合タンパク質が、かなりの種類存在しているようで、これらのオーキシン結合タンパク質がオーキシン受容体として機能し、遺伝子発現の調節に関与している可能性が高くなってきた。オーキシンによる遺伝子発現レベルでの多面的作用も、オーキシンが異なった受容体と結合することで、異なった特異性が付与され、最終的には異なった遺伝子発現を制御しているという仮説で説明できるのではないかと考えられる。

最近の遺伝子レベルでの研究のめざましい進展により、オーキシンの調節を受ける遺伝子が数多くクローニングされ、その発現に関与する領域がプロモーター領域に存在すること、さらに、その領域に結合するタンパク

質もあることが明らかにされてきた。筆者らは、オーキシンで調節を受ける遺伝子のプロモーター領域にオーキシン結合タンパク質が結合することにより、その遺伝子の発現を調節しているのではないかという作業仮説(図2)をたてて研究を進めている。

- (1) K. R. Libbenga, A. C. Mann, P. C. G. v. d. Linde, and A. M. Mennes : in "Hormones, Receptors and Cellular Interactions in Plants," ed. by C. M. Chadwick and D. R. Garrod, Cambridge Univ. Press, Cambridge, 1986, pp. 1—68.
- (2) S. Sakai : *Int. Rev. Cytol.*, **135**, 239—267 (1992).
- (3) A. Theologis : *Annu. Rev. Plant Physiol.*, **37**, 407—438 (1986).
- (4) 菅谷純子 : 植物細胞工学, **4**, 153—162 (1992).
- (5) U. Dohrmann, R. Hertel, and H. Kowalik : *Planta*, **140**, 97—106 (1978).
- (6) M. Jacobs and R. Hertel : *Planta*, **142**, 1—10 (1978).
- (7) S. Shimomura, T. Sotobayashi, M. Futai, and T. Fukui : *J. Biochem.*, **99**, 1513—1524 (1986).
- (8) N. Inohara, S. Shimomura, T. Fukui, and M. Futai : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 3564—3568 (1989).
- (9) S. Sakai and T. Hanagata : *Plant Cell Physiol.*, **24**, 685—693 (1983).
- (10) S. Sakai : *Agric. Biol. Chem.*, **48**, 257—259 (1984).
- (11) S. Sakai : *Plant Cell Physiol.*, **26**, 185—192 (1985).
- (12) S. Sakai, J. Seki, and H. Imaseki : *Plant Cell Physiol.*, **27**, 635—643 (1986).
- (13) M. Kikuchi, H. Imaseki, and S. Sakai : *Plant Cell Physiol.*, **30**, 765—773 (1989).
- (14) S. Sakai, M. Kikuchi, and N. Nakajima : *Biosci. Biotech. Biochem.*, **56**, 1225—1229 (1992).
- (15) H. Mondal, R. K. Mandal, and B. B. Biswas : *Nature (New Biol.)*, **240**, 111—113 (1972).
- (16) P. Roy and B. B. Biswas : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **74**, 1597—1606 (1977).
- (17) P. C. G. Van der Linde, H. Bouman, A. M. Mennes, and K. R. Libbenga : *Planta*, **160**, 102—106 (1984).
- (18) H.-J. Jacobsen, K. Hajek, R. Mayerbacher, and B. Herber : in "Plant Hormone Receptors," ed. by D. Klämbt, Springer-Verlag, Berlin, 1987, pp. 63—69.
- (19) S. Kaur and H. C. Kapoor : *Plant Sci.*, **72**, 151—159 (1990).