

ジャスモン酸結合タンパク質の同定およびその機能解析

高橋 公咲 [北海道大学大学院農学研究院 / 助教]

背景・目的

ジャスモン酸(以下JA)は、植物ホルモンの一種であり、シグナル伝達物質として植物の様々な生命現象に関与していることが明らかにされている。しかしながら、JAの受容から遺伝子発現までのシグナル伝達経路はほとんど解明されていない。本研究では、JA類縁体でありバレイショ塊茎誘導試験においてJAと同様の活性を示すツベロン酸グルコシドを基本としたアフィニティーカラム担体を作成し、シロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana*)JA結合タンパク質を同定することを目的とした。

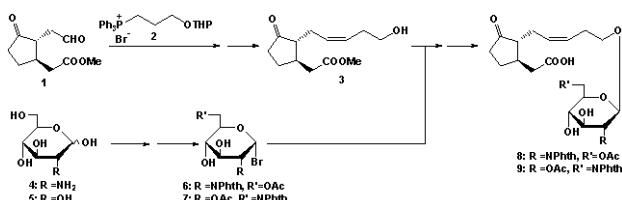
内容・方法

アフィニティープローブにおいては、ジャスモン酸としての生物活性を維持しつつ、担体に結合可能なプローブが求められる。ジャスモン酸類の化学修飾に関しては、5員環側鎖のカルボン酸部分を化学修飾すると生物活性が低下してしまうことが報告されている。そこで、ツベロン酸グルコシドをモデルとして[3-oxo-2-(2-oxo-ethyl)-cyclopentyl]-acetic acid methyl esterを出発物質に糖部分の2位また、6位の水酸基をアミノ基に置換したアフィニティープローブの合成を試みた。得られた誘導体をアフィニティーカラム担体に結合させ、JAアフィニティーカラム担体を作成した。このJAアフィニティーカラムにシロイヌナズナのタンパク質抽出液を供し、洗浄後溶出バッファーによりJA結合タンパク質を溶出させた。溶出されたタンパク質はSDS-PAGEに供した後、銀染色でタンパク質のバンドを確認した。

結果・成果

1) アフィニティープローブの合成

ジャスモン酸メチルから調製されたアルデヒド(1)とホスホニウム塩(2)のWittig反応とTHP基の脱保護により化合物3が得られた。化合物3と反応させる糖誘導体は、グルコサミン(4)及びグルコース(5)を原料として2位及び6位にそれぞれフタルイミド基を有する臭化物(6)及び(7)へ導いた。アフィニティープローブ(8)は、化合物3と化合物6をカップリングさせた後に脱保護することで得られた。



アフィニティープローブ(9)は化合物3と7とのカップリング後、アセチル基を加水分解した際に、グリコシド結合の切断が確認された。このため、脱保護条件や忠和条件を再検討する必要がある。

2) アフィニティクロマトグラフィー

アフィニティープローブ(8)を、Affi-gel 10(Biorad社)とカップリングさせてアフィニティーカラムを調製した。また、何もカップリングさせていないAffi-gel 10カラムをコントロールとして調製した。短日条件で播種後50日間栽培したシロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana*)の地上部からタンパク質を抽出した。本タンパク質抽出液をアフィニティーカラム及びコントロールカラムに供した。洗浄バッファーで非特異的にカラムに吸着したタンパク質を溶出後、塩濃度を上昇させたバッファーでカラムに特異的に吸着したタンパク質を溶出した。SDS-PAGEで分析した結果、50kDa及び25kDa付近にアフィニティーカラムに特異的に吸着されたと推定されるタンパク質が検出され、これらのタンパク質がジャスモン酸結合タンパク質である可能性が示唆された。

今後の展望

今後、本実験で得られたタンパク質を各種機器分析等により同定していく必要がある。そして本タンパク質のcDNAクローニング、大腸菌による大量発現及び本タンパク質とJAの結合実験において、本当にジャスモン酸類結合タンパク質であるか否かを確認しなければならない。この様に本実験の目的を達成するためには、いくつかの課題が残っている。しかし、植物の生命現象に深く関与しているJA結合タンパク質(受容体)を明らかにすることは、そのシグナル伝達経路の解明のみならず病害抵抗性品種の育種及び新たな農薬等の開発にもつながるものであり、今後も本研究を継続して行い目的を達成したい。