

植物における γ -アミノ酪酸 (GABA) の生理機能の解明 —GABA の受容および分解に関わる新奇タンパク質の単離・同定—

秋廣高志・大島朗伸

目 的

植物において γ -アミノ酪酸 (以下 GABA) は、細胞内 pH の調節、浸透圧の調節、食餌に対する防御物質として働いていると考えられているが、最近になって、シグナル物質としての機能も有することを示唆する実験結果が得られている。しかしながらこれまでに、GABA がシグナル物質として機能する上で重要だと考えられる GABA の受容および速やかな分解に関与するタンパク質は単離・同定されていない。本研究ではこれらのタンパク質の探索を行った。

方 法

植物材料としてイネ (*Oryza sativa* cv Nipponbare) の種子および培養細胞を用いた。種子は開花後 3~30 日目のものを用いた。培養細胞は N6D 培地に継代後 1~6 日目のものを用いた。各サンプルはサンプリング後速やかに液体窒素で凍結させ、使用まで -80°C で保存した。

GABA の受容に関与するタンパク質の同定には、放射性ラベルした ^{14}C -GABA を用い、以下の二通りの方法を行った。一つ目の方法：植物から全タンパク質を抽出し、これを 10% SDS-PAGE で分画する。分画したタンパク質を PDVF 膜に転写し、この膜を 1.8 または $18\mu\text{M}$ の ^{14}C -GABA を含む TBS-T バッファー中で 12 時間振とうする。最後に TBS-T バッファー中で振とうし、未反応の ^{14}C -GABA を除去した後、BASS1500 を用いて GABA 結合タンパク質を検出する。二つ目の方法：植物から全タンパク質を抽出し、抽出したタンパク質溶液 ($50\mu\text{g}$) に終濃度 $1.8\mu\text{M}$ になるように ^{14}C -GABA を加え、 4°C で 2 時間振とうする。続いて、ゲルろ過クロマトグラフィー (Sephadex-G25) を行い、未反応の ^{14}C -GABA を除くと共に ^{14}C -GABA とタンパク質の複合体を含む分画を回収し、液体シンチレーションカウンターで放射活性を測定する。

GABA の分解に関与するタンパク質の同定では、植物において機能が未知である α -ケトグルタル酸依存型 GABA アミノ基転移酵素 (以下 GABA-TK) を GABA の速やかな分解の鍵酵素と推定し、このタンパク質の探索を行った。全タンパク質を抽出した後、ゲルろ過クロマトグラフィー (Sephadex-G25) を行い、抽出液中に含まれる GABA を除去する。続いて、GABA-TK 反応液 (GABA,

α -ケトグルタル酸を含む) に抽出したタンパク質 ($50\mu\text{g}$) を加え、 37°C で 1 時間反応させた後、反応を停止し、反応産物であるグルタミン酸量を測定した。

結果および考察

GABA の受容に関与するタンパク質の探索を行った結果、PVDF 膜を用いた方法では ^{14}C -GABA と結合するタンパク質の存在を明らかにすることはできなかった。一方、試験管内で行った ^{14}C -GABA の結合実験では、 ^{14}C -GABA と結合するタンパク質が存在することを示唆する結果が得られたため、 ^{14}C -GABA を用いた競合実験を行ったところ、競合が起こっていることを示すデータが得られた。しかし、測定値はサンプル間で大きなばらつきがあり、競合が起こっていることを統計データから示すことは出来なかった。本実験により、イネには GABA を受容するタンパク質が存在している可能性が高まった。今後は実験系のスケールアップを行い同タンパク質の単離を目指す予定である。

GABA-TK タンパク質の単離を行ったところ、開花後 15 日目の種子に GABA-TK 活性が存在することがわかった。しかし、その酵素活性は極めて低かったため、検出感度の高い新たな GABA-TK 酵素活性測定法を考案し、この方法の確立を行った。その結果、従来法 (Akihiro et al., 2008) よりも約 500 倍測定感度が高い方法を確立することに成功した。今後は、この方法を用いて GABA-TK タンパク質の精製を行う予定である。

引用文献

Akihiro T, Koike S, Tani R, Tominaga T, Watanabe S, Iijima Y, Aoki K, Shibata D, Ashihara H, Matsukura C, Akama K, Fujimura T, Ezura H. Biochemical Mechanism on GABA Accumulation During Fruit Development in Tomato. *Journal of Plant Cell Physiol.* **49**: 1378-1389, 2008