

## 2Da-1

## アミノフェークロマトグラフィーによるオーキシン結合蛋白質の単離

酒井慎吾 (埼大・理・生化)

M.A. Venis (1971)がアミノフェークロマトグラフィーを用いて、植物の可溶性オーキシン結合蛋白質の単離を報告して以来、2,4-D-結合 Sepharose 4B を用いてオーキシン結合蛋白質を単離しようという試みが幾つかなされてきた。しかし、Venisの報告を含め、アミノフェークロマトグラフィーで単離された蛋白質は、いずれもオーキシン結合能を持っていなかった。これらのことなどから、現在では、オーキシン結合能を持った蛋白質は、アミノフェークロマトグラフィーを用いて単離することはできないと考えられている。本実験では、これまでに報告されている実験条件を検討した結果、これらの条件を変えることにより、黄化ヤエナリ下胚軸抽出液から、オーキシン結合能を有した蛋白質を、アミノフェークロマトグラフィーを用いて単離することができたので、その結果について報告する。

indole-3-acetyl- $\epsilon$ -L-lysine (IAA-lysine)は Hutzinger and Kosuge (1968)の方法により、また、2,4-dichlorophenoxyacetyl- $\epsilon$ -L-lysine (2,4-D-lysine)は IAA-lysine合成の方法に準じて合成し、CNBr-活性化 Sepharose 4B に、常法により結合させた。3日間暗所で育てた黄化ヤエナリから下胚軸を切りとり、その600gを10 mM Na<sub>2</sub>-EDTA, 20 mM 2-メルカプトエタノールを含む600 mlの20 mM Tris-HCl 緩衝液(pH7.6)で抽出した。遠心分離後、その上澄液に100%飽和になるように固形硫酸を加え、粗蛋白質画分を得た。この粗蛋白質画分を、5 mM Na<sub>2</sub>-EDTA, 10 mM 2-メルカプトエタノール, 0.1 M NaClを含む10 mM Tris-HCl 緩衝液に透析後、同じ緩衝液で平衡化した Sepharose 4B カラム(2.3x5.0 cm)に通し、次に IAA-結合 Sepharose 4B または 2,4-D-結合 Sepharose 4B カラム(1.6x5.0 cm)にかけた。緩衝液で十分カラムを洗った後、アミノフェーカラムに保持された蛋白質を、50 mM K-IAA または Na-2,4-D を含む10 mM Tris-HCl 緩衝液(pH7.6)で溶出した。

これまでに報告されている方法(抽出液を遠心分離した後、直にアミノフェーカラムにかけ、保持された蛋白質を2 mM KOH, pH 11.2, で溶出)では、<sup>14</sup>C-IAA 結合能を持つ蛋白質は単離できなかった。次に、粗蛋白質画分を、IAA-結合 Sepharose 4B または 2,4-D-結合 Sepharose 4B カラムにかけ、50 mM K-IAA または Na-2,4-D で溶出すると、溶出される蛋白質量は、Sepharose 4B に結合させたオーキシンまたは溶出に用いたオーキシンの種類にかかわらず、ほぼ同じであった。IAA-結合 Sepharose 4B カラムから50 mM K-IAA で溶出された蛋白質と、2,4-D-結合 Sepharose 4B カラムから50 mM Na-2,4-D で溶出された蛋白質を、7.5%ポリアクリルアミド電気泳動(pH8.3)で調べると、それぞれ1つの主要なバンドと6つの微量なバンドが観察され、移動度はほぼ同じのものであった。この2種類のカラムを用いて単離した蛋白質はともに、<sup>14</sup>C-IAA 結合能を有していることが明らかになった。また、単離された蛋白質への IAA の結合は可逆的であり、2,4-D, NAA, 2,4,5-T で阻害された。以上の結果より、植物組織抽出液から粗蛋白質画分を硫酸死酸により集め、それをアミノフェーカラムにかけ、カラムに保持された蛋白質を、2 mM KOH (pH 11.2)ではなくて50 mM オーキシン (pH 7.6)で溶出することにより、オーキシン結合蛋白質が得られると考えられる。