

## 0-1. カラマツ(*Larix kaempferi*)木部柔細胞の過冷却能に関与する冬季誘導性タンパク質(LkDRP1及びLkDRP2)に関する研究

北大院農 ○能美彩香、森本和成、藤川清三、荒川圭太

### 【緒言】

北方に生育する樹木は冬季に厳しい寒さに曝される。厳しい寒さの中で生き抜くために氷点下温度すなわち凍結に対する適応機能を発達させることは樹木にとって必要不可欠な生理応答である<sup>1)</sup>。樹木の凍結適応機構は組織によって異なっており、師部、形成層では細胞外凍結、木部柔細胞では深過冷却、また一部の樹種の冬芽では器官外凍結という凍結適応機構を示すことが知られている。なかでも深過冷却は木部柔細胞に特徴的な凍結挙動で、細胞内の水分が脱水されずに準安定的かつ長期的に過冷却状態を維持するものである。これまでの研究では、細胞壁が細胞内部の水を隔離して細胞外氷晶の伝播や細胞内水分の脱水を防ぐことが過冷却能の主要因として挙げられていた。しかし、近年、本研究グループは、カツラ木部から抽出した4種類のフラボノール配糖体が過冷却促進活性(氷核形成阻害活性)をもつことを明らかにし、これらの細胞内成分が細胞内部の水の過冷却維持に貢献することを強く示唆した<sup>2)</sup>。一方で、低温順化過程を経ると細胞内部で様々な形態学的、生理的变化を生じ、なかでも可溶性糖や低温誘導性遺伝子、タンパク質の一部は、過冷却能の変化と高い相関性を示すことも指摘されている<sup>3,4)</sup>。これまで本研究グループでは、木部柔細胞の深過冷却機構の解明のため、過冷却促進物質の単離、同定をはじめ、可溶性糖や可溶性タンパク質、低温応答性遺伝子群に関する研究をおこなってきたが<sup>3,4)</sup>、木部柔細胞の凍結抵抗性機構の全体像を把握するにはまだ不明な点が多く残されている。そこで本研究では、木部の凍結抵抗性機構における低温誘導性タンパク質の役割を調べるため、カラマツ木部の深過冷却能の変動と対応して発現する木部の可溶性タンパク質の同定や機能評価を目指して研究を開始した。これまでに、低温順化や脱順化による過冷却能の変動に対応して発現量が増減するタンパク質を16個見いだした。これらを過冷却関連タンパク質(*Larix kaempferi* Deep-supercooling Related Proteins : LkDRPs)候補とし、タンパク質の単離ならびに同定を進めた。これによってすべてのLkDRPsの部分アミノ酸配列が予測できたので、既知のタンパク質との相同性を調べたところ、15個のLkDRPsに対して相同性を示す遺伝子またはタンパク質が見つかった。このうちLkDRP1、2はカナダトウヒのlate embryogenesis abundant (LEA)タンパク質と高い相同性を示した。LEAタンパク質の中には、低温誘導性で不凍活性を示すものなど耐凍性に関わるようなものも報告されている<sup>5)</sup>。そこでLkDRP1、2の構造や機能を明らかにして過冷却能への関わりを調べるため、まずはこれらのタンパク質をコードする遺伝子の単離を試みた。

### 【実験方法】

## 遺伝子の単離と塩基配列の分析

既知の部分アミノ酸配列を元に以下のような **degenerate primer** を設計し、冬季のカラマツ木部柔細胞の cDNA ライブラリーをテンプレートに用い、PCR にて目的遺伝子断片の増幅をおこなった。

**forward primer: 5'-GCNAARGARAAYACNAARAARATHCC-3'**

**reverse primer: 5'-GTAATACGACTCACTATAGGGC-3'**

forward primer は N 末端の部分アミノ酸配列をもとに、reverse primer は pBluescript ベクターの Xho I サイトの配列をもとに設計した。

PCR にて増幅した DNA 断片をアガロースゲル電気泳動した後、目的の長さの DNA 断片をゲルから抽出し、TA クローニング (**pGEM T-easy vector System, Promega**) によって目的の DNA 断片をサブクローニングした。TA クローニングで得られた目的のプラスミドを大腸菌 JM109 株 (**competent cell, TOYOBO**) に導入してプラスミドを増幅した。サブクローニングした遺伝子断片の塩基配列を調べるために **Big Dye Terminator Cycle sequencing kit Version3.1 (Applied Biosystems)** を用いてシーケンス解析をおこなった。得られた塩基配列の情報をもとに新たに以下のようなプライマーを設計し、上記と同様の方法で目的遺伝子の 5' 側の部分断片の塩基配列を調べた。

**forward primer:5'-CTATGACCATGATTACGCCAA-3'**

**reverse primer:5'-AAGATTATCGTAGAATTGGCTGCC-3'**

forward primer は pBluescript ベクターの EcoR I サイトの配列をもとに、reverse primer は先の実験で得られた塩基配列をもとに設計した。

## 【結果および考察】

LkDRP1 の等電点や分子量に加え、N 末のアミノ酸配列が LkDRP2 と非常に類似していることから(図 1)、両者の遺伝子を区別して増幅させるための **degenerate primer** の設計は難しいと判断し、N 末端のアミノ酸配列がより長く明らかになっている LkDRP2 の部分アミノ酸を利用して遺伝子を単離することにした。N 末端アミノ酸配列の分析結果(図 1)をもとに **degenerate primer** を用いて増幅した LkDRP2 の候補遺伝子断片の塩基配列を解析したところ、既知の部分アミノ酸配列と完全に一致する配列を含むものと、既知の部分アミノ酸配列と 1 残基のみ異なるものの 2 つが見いだされた。

LkDRP1	ATDTKFVSAQXNTKKIPXGSQFY-----
LkDRP2	ATDTKFVSAKENTKKIPRGSQFYDNL----
PgLEA	MSMGSGFGALAVMVLAVLVAAGAAPTNLVSSACNGNKIPSGNPFNNL----
	* * * * *

図 1. LkDRP1, 2 ならびにカナダトウヒの LEA タンパク質(PgLEA)の N 末端アミノ酸配列の相同性比較。LkDRP1, 2、PgLEA の N 末端のアミノ酸配列の相同性を比較した。X: 未同定アミノ酸、-: 未解析のアミノ酸。LkDRP1, 2 は以前におこなった N 末端アミノ酸分析の結果を示した。PgLEA (*Picea glauca* LEA)は相同性検索の結果、LkDRP1, 2 と高いホモロジーを示した遺伝子翻訳産物。\*: 全ての配列に共通したアミノ酸。

今回明らかになったアミノ酸配列には終止コドンが含まれていたことから、LkDRP2 の N 末端の一部を残したほぼ全長が明らかになったと思われる。そこで、当該遺伝子の全長を調べるために、今回明らかになった塩基配列を元にして新たにプライマーを設計し、上記の方法に準じて再びシーケンス解析をおこなって 5'側の塩基配列を調べることにした。

新たなプライマーを用いて PCR で増幅した DNA 断片の塩基配列を調べたところ、既知の部分アミノ酸配列と非常に良く似たアミノ酸配列をコードする遺伝子断片が 8 個得られた。しかし既知の部分アミノ酸配列と完全に一致するアミノ酸配列を含む遺伝子は単離できなかった。

次に NCBI の BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) によってこれら遺伝子翻訳産物の N 末端のアミノ酸配列の相同性を調べたところ、8 個ともシトカトウヒ (*Picea sitchensis*) の機能未知タンパク質 (ADE75852) と高い相同性を示した。これらの 8 個のうち 3 個の部分アミノ酸は特に *P. sitchensis* と高い相同性を示した (図 2)。

LkDRP2	ATDTKFVSAKENTKKIPRGSQFYDNL----
LkDRP2-1	MSCSSVALLVALVIVVMGGAAEATNTKFVSAACNSKKIPRGSQFYDNL----
LKDRP2-2	MSCSSVALLVALVIVVMGGAADATNTKFVSAACNTKKIPQGSQFYDNL----
LkDRP2-3	MSCSSVALLVALVIVAMGGAAEATNTKSVSSACNSKKIPRGSQFYDNL----
ADE75852	MSPSSVALLAAVIVVMGGAAEAANTKFVSASCNTEKIARGSPFFNLL----
	* ** * ** * ** * ** *

図 2. *LkDRP2* 候補遺伝子から予測される N 末端アミノ酸配列の相同性比較。

*LkDRP2* 遺伝子を単離する過程で見つかった 8 種類の *LkDRP2* 候補遺伝子群から予測されたアミノ酸配列を用いて相同性検索をおこなった結果、PgLEA (図 1) よりもシトカトウヒ (*Picea sitchensis*) の機能未知タンパク質 (ADE75852) とより高い相同性を示した。ここでは特に *Picea sitchensis* と相同性を示した 3 つの遺伝子断片 (*LkDRP2-1*、*LkDRP2-2*、*LkDRP2-3*) に由来する N 末端のアミノ酸配列を示した。LkDRP2: 以前におこなった N 末端アミノ酸分析の結果を示す。ADE75852 (*Picea sitchensis*: unknown protein) を示す。\*: 全ての配列に共通したアミノ酸を示す。

今回、LkDRP2 の遺伝子の同定を試みたが、既知の部分アミノ酸を含む遺伝子はまだ単離できていない。しかし、アミノ酸ならびに遺伝子レベルで非常に良く似た配列をもつものが複数見つかったことから、LkDRP2 には複数のアイソフォームが存在することが考えられた。実際、LkDRP1 と LkDRP2 は、分子量、等電点が類似していることから、両者はアイソフォームと考えられる。

これらの LkDRP1 や LkDRP2 のアイソフォームタンパク質群は シトカトウヒの機能未知なタンパク質と相同性が高いため、これらの機能を予想することは難しい。しかし、当初、LkDRP1 や LkDRP2 の N 末端のアミノ酸配列と相同性の高かったカナダトウヒの LEA タンパク質と一次構造が類似するタンパク質の中には抗菌活性を示すものがあるため<sup>6)</sup>、LkDRP1 や LkDRP2 についてもその機能解析は興味深い。もちろん、これらのタンパク質は過冷却能に関与する可能性が考えられるため、可能な限り LkDRP2 と同様に遺伝子全長を求め、過冷却活性や不凍活性の測定などを通じてその機能解析をおこないたい。

## 【参考文献】

- (1) 酒井昭 植物の耐寒戦略 (2003) 北海道大学図書刊行会
- (2) J. Kasuga, D. Kanmi, K. Arakawa, S. Fuzikawa (2008) *Cryobiology* 57 : 242-245
- (3) J. Kasuga, K. Arakawa, S. Fuzikawa, (2007) *New phytologist* 174 : 569-579
- (4) N. Takata, J. Kasuga, D. Takezawa, K. Arakawa, S. Fuzikawa (2007) *Journal of Experimental Botany* 58 : 3731-3742
- (5) M. Wisniewski, R. Webb, R. Balsamo, T. J. Close, X. Yu, M. Griffith (1999) *Physiologia Plantarum* 105 : 600-608
- (6) Y. Sawano, T. Miyakawa, H. Yamazaki, M. Tanokura, K. Hatano (2007) *Biol. Chem* 388 : 273-280