

カラマツ木部由来のデハイドリンタンパク質の凍害保護活性について

北大農 ○加藤潤、坂本友陽、鈴木伸吾、宇梶慎子、荒川圭太

【緒言】

寒冷地に生育する樹木は、冬季に厳しい低温および凍結にさらされるため、樹木の細胞にとって致命的な細胞内凍結を防ぐ機構を備えている。寒冷地域に生育しているカラマツの木部柔細胞は、細胞内の水を準安定的に液体状態に保つ深過冷却と呼ばれる機構によって氷点下温度に適応している。この深過冷却能は、秋から冬にかけて季節的な低温馴化の過程において上昇するため、低温馴化で誘導される可溶性糖やタンパク質、遺伝子の種類や性質、それらの深過冷却能における役割について解析してきた (Kasuga et al. 2007, Takata et al. 2007, Arakawa et al. 2006, Takahashi et al, 2005)。カラマツ木部では、低温馴化で誘導される遺伝子群の中に、Late Embryogenesis Abundant (LEA) タンパク質の一種であるデハイドリン (DHN) をコードする7種類の遺伝子 (*LkDHN1~7*) が含まれていることがわかった (高田 2005)。一般的に DHN は、低温や乾燥などのストレス耐性に関わっていることが知られているため、カラマツ木部柔細胞における深過冷却能や越冬機構と関与することが考えられる。そこで、越冬機構に関する機能評価の一環として、デハイドリン遺伝子 (*LkDHN1~7*) を挿入した組換えタンパク質発現用のプラスミドベクター (高田 2005) を利用して LkDHNs の組換えタンパク質 (rLkDHN1~7) を大腸菌で発現させ、それらの精製標品を用いて凍害保護活性の測定を行うことにした。本研究では、凍結感受性の高いアイソフォームが存在する乳酸脱水素酵素 (LDH) を用い、凍結によって失活する LDH アイソフォームに対して、予め rLkDHN を添加することで LDH アイソフォームの凍結失活を防ぐ効果 (凍害保護活性) を調べた。なお、LDH アイソフォームに対する凍害保護活性の測定の際、rLkDHN の代わりにウシ血清アルブミン (BSA) やリゾチームを用い、rLkDHN を添加した時の活性と比較することにした。今回、7種類の rLkDHNs のうち最初に高度に精製できた rLkDHN6 の凍害保護活性の測定結果について示すことにした。

【実験方法】

・ rLkDHNs の大量発現及び精製

His タグ融合型組換えタンパク質の発現用プラスミドベクター (pET100/D-TOPO, Invitrogen) に *LkDHN6* を挿入して作成した rLkDHN6 発現用プラスミド (高田 2005) を増幅した後、組換えタンパク質発現用の大腸菌 [BL21 Star™ (DE) One Shot Cell, Invitrogen] に導入し、添付のプロトコルに従って rLkDHN6 を大量に発現させた。

rLkDHN6 を発現した大腸菌から可溶性画分を回収した後、His タグアフィニティカラム (His Trap HP, GE Healthcare) を用い、添付のプロトコルに従って rLkDHN6 を精製した。

・ 凍害保護活性の測定

凍結により著しく活性が低下することが知られている LDH を用いて凍害保護活性を測定した。LDH (Roche, from rabbit skeletal muscle) を 25 µg/ml に希釈した溶液と 0.2, 2, 20, 200 µg/ml に調製した各種試料溶液 [rLkDHN6, BSA (Boserol DEM®; Organon Teknika) またはリゾチーム (Wako, from Egg White) のいずれか1種類] を等量ずつ混合し、この混合溶液を -20°C のフリーザー内で 24 時間静置して凍結させ、その後 15 分間室温で解凍した。そして、分光光度計に前もってセットした石英キュベット中に、凍結融解後の混合溶液から 20 µl を分取し、ここに予め 25°C に保温した 1 ml の基質溶液 [80 mM Tris-HCl (pH 7.5), 100 mM KCl,

2 mM pyruvic acid, 0.3 mM NADH] を直ちに添加し、直ちに吸光度 (A_{340}) の低下を測定し、LDH活性によるNADH消費の初速度を求めた。そして、LDHと各種試料の混合溶液に、凍結前と比べて凍結融解後にどれだけLDH活性が残っているのかを算出することで凍害保護活性を求めた。なお、ここでは同じ試料を用いた活性測定を3回行い、その平均値を凍害保護活性とした。

【結果と考察】

これまでに Lin and Thomashow (1992) や Koda ら (2001) の方法に準じた凍害保護活性の測定では、Sigma 社製の凍結感受性の LDH アイソフォーム (from rabbit skeletal muscle, type V-S) を購入して使用してきたが、あいにく製造中止となり入手不可能となった。そのため、凍結感受性 LDH アイソフォーム単品での購入はあきらめ、他の市販品に凍結感受性の LDH アイソフォームが含まれている試薬を探すことから始めたが、同等品は見つからず、他の LDH 製品を活性測定に用いることにした。その結果、Roche 社製の LDH アイソフォーム (from rabbit muscle, タイプ不明) では -20°C で 24 時間静置して凍結融解処理をすると、凍結前のものに比べて LDH 活性が 50~60% 損なわれたため、この製品には凍結感受性の LDH アイソフォーム活性が 50% 強含まれていることが示唆された。そのため、以降の実験ではこの製品を使用することにし、凍害保護活性を求める際には、この製品に含まれる全 LDH 活性のうち凍結失活する 50% 強の LDH 活性が LkDHN6 などの試料の添加によってどれだけ凍結失活から保護されるのかについて調べることにした。

また、凍害保護活性を求める際、添加する試料として rLkDHN6 のほか、BSA やリゾチームを用いて活性を比較することにした。

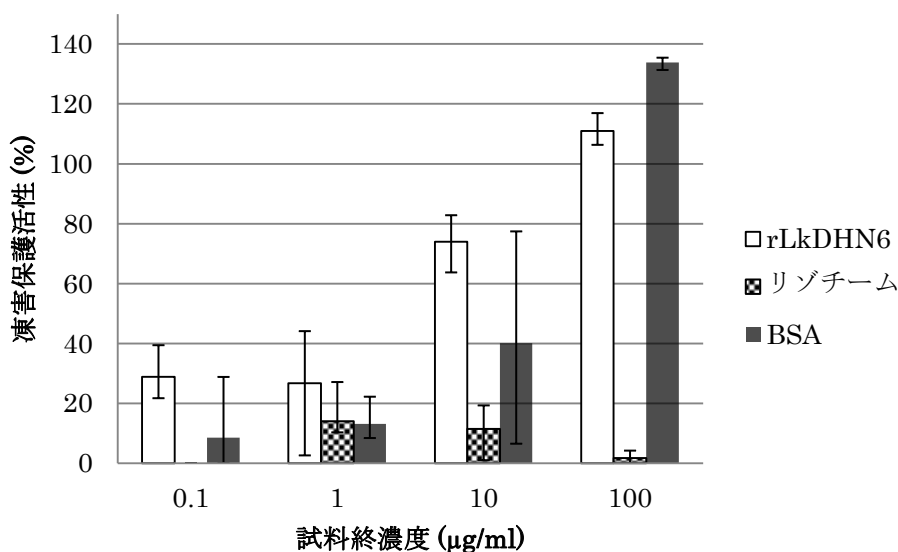


図 1. 各種試料における LDH に対する凍害保護活性の比較。各試料 (rLkDHN6、リゾチーム、BSA) をそれぞれ終濃度が 0.1~100 µg/ml となるように LDH 酵素溶液 (終濃度 12.5 µg/ml) に添加して混合溶液を調製した。この溶液について、凍結前と -20°C で 24 時間静置して凍結融解させた後の LDH 活性を比較し、凍害保護活性を求めた。

その結果、rLkDHN6 と BSA で凍害保護活性が検出された (図 1)。これまで報告された同様の研究でも、BSA は凍害保護活性を持つことが示されている一方で、リゾチームは活性をほとんど持たないことが示されている。結果をみると、rLkDHN6 は BSA と同程度の凍害保護活性を持ち、BSA に比べて、比較的低濃度域で効果的に活性を示す傾向があった。しかし、一部の試料で測定結果にばらつきが出たところがあったので、今後さらにデータを取って検証する必要がある。

これまでに行われてきたデハイドリンに関する研究のひとつとして、ウンシュウミカンのデハイドリンタンパク質 (CuCOR19) の機能評価に関する一連の研究が知られている。この CuCOR19 は凍害保護活性を持ち、さらに、この CuCOR19 遺伝子を過剰発現する形質転換タバコの苗を作出し、 -4°C で 3 時間静置させた後に 25°C で 8 時間静置して凍結融解させたところ、この形質転換株の細胞からの電解質漏出量が野生株のものに

比べて減ったことが示された (Hara et al. 2003)。電解質漏出の減少は、すなわち、凍結脱水などのストレスに起因する生体膜の傷害が緩和されたことを意味するため、CuCOR19 の蓄積には凍結脱水ストレスによる生体膜の不可逆的な構造変化を軽減する作用があることが示唆された。そのため、CuCOR19 と同様に低温誘導性デハイドリンである rLkDHN6 にも凍結傷害を緩和する働きがあることが期待されるため、LkDHNs の機能評価は継続しておこなっていきたい。今後、他の rLkDHNs についても精製でき次第、随時凍害保護活性を調べる予定である。