

カラマツ木部由来の冬季誘導性デハイドリンに関する研究

バイオマス転換学講座 資源植物創成学分野

安達 正博

(背景と目的)

北方に生息する樹木は、冬季に厳しい低温および凍結に曝される。そのため、樹木は細胞にとって致命的な細胞内凍結を防ぐ機構を発達させており、木部柔細胞では細胞内の水が細胞外に脱水せず、長期間・準安定的に過冷却状態を保つ「深過冷却」という凍結適応機構を示す。この深過冷却機構は、細胞壁の構造的特性と細胞内成分によるものだと考えられている。近年、深過冷却能に関与する細胞内成分として、フラボノール配糖体(Kasuga *et al.* 2008)や加水分解性タンニン(Wang *et al.* 2011)がカツラの木部柔細胞から単離され、過冷却促進物質であることが示された。しかし、この過冷却促進物質の季節変動は、木部柔細胞の深過冷却能の季節変動に対応しておらず、その他の細胞内成分が深過冷却機構に関与していることが示唆される。また、これまでの研究で、木部柔細胞において可溶性糖やタンパク質、遺伝子群が、木部柔細胞の深過冷却能の季節変動と対応するように冬季特異的に誘導されることが報告されている。そこで本研究では、木部柔細胞の深過冷却機構と細胞内成分の関連性を明らかにすることを目的として、冬季誘導性カラマツデハイドリン(LkDHNs)に注目し、カラマツ木部におけるLkDHNsの季節変動やLkDHNsの組換えタンパク質(rLkDHNs)を用いた深過冷却に関連する機能評価を行った。

(実験)

○木部柔細胞内におけるLkDHNsの季節変動の観察

北大構内の苗畑からカラマツの2~5年生のカラマツの枝を採取し、夏季試料(7月)と冬季試料(1月)を得た。この試料からタンパク質を抽出し、タンパク質の定量や、SDS-PAGEとウェスタンブロッティングを用いてのタンパク質組成変動を解析した。

○LkDHNsの機能評価

高田(2005)の研究によって作製された組換えタンパク質発現用プラスミド(pET100-LkDHN1~7)を利用して得られた組換えタンパク質rLkDHN1~7に対し、深過冷却能に関連する3つの機能評価[不凍活性(氷晶阻害活性)、凍害保護活性、過冷却促進活性(氷核形成阻害活性)]を行った。

(結果と考察)

タンパク質定量の結果、カラマツの冬季試料の生重量(FW)当たりのタンパク質含量は、夏季試料と比べて約10倍となった。また、SDS-PAGEやウェスタンブロッティングを用いた解析より、分子量が約32.5 kDa付近の2種類のLkDHNと、約25.0 kDaの1種類のLkDHNが冬季に多く蓄積することが観察された。また、約32.5 kDaのLkDHNは、100°Cで10分間の煮沸後でも観察され、熱安定性のタンパク質であることが明らかになった。次に、rLkDHN1, 5を用いた深過冷却に関連する機能評価として不凍活性を測定した結果、rLkDHN1, 5の活性は共に検出されなかった。また、凍害保護活性については、rLkDHN5が既知の凍害保護タンパク質として知られているBSAと同程度の凍害保護活性を示した。さらに、2 μ lの小容量の試料に対するrLkDHN1, 5の過冷却活性を測定した結果、単独では過冷却活性を持たないが、既知の過冷却促進物質ケルセチン 3-O- β -D-グルコシドと共存することでわずかな過冷却活性の補助効果を示した。また、この効果はLkDHNに限らず他のタンパク質でも検出された。