

## カラマツ木部の冬季誘導性デハイドリンタンパク質の機能評価

共生基盤学専攻 バイオマス転換学講座 資源植物創成学 坂本友陽

### 1. はじめに

寒冷地に生育する樹木は、冬季に厳しい低温ストレスやそれに伴う凍結ストレスに曝される。樹木の凍結適応能力は、秋から冬にかけての季節的な低温馴化過程で高くなることが知られている。その過程において、カラマツ木部柔細胞においてデハイドリン (LkDHN) と呼ばれるタンパク質をコードする7種類の冬季誘導性遺伝子が同定された。デハイドリンは植物の乾燥や低温・凍結耐性に関与するタンパク質であると考えられており、その生理活性についてはこれまでも多くの研究がなされてきた。それらの結果によって、デハイドリンには氷晶成長阻害活性、凍結傷害による酵素失活の抑制、活性酸素による脂質二重膜構造の過酸化分解抑制などの活性を持つことが示唆されている。そこで、本研究では大腸菌のタンパク質発現系によって His タグ融合型組換えタンパク質 (rLkDHNs) を調製し、凍害保護活性ならびに抗酸化活性について調べることにした。

### 2. 方法

1) 組換えデハイドリン rLkDHNs の大量発現 His タグ融合型カラマツデハイドリン rLkDHN1 ~ 7 を発現する大腸菌 BL21 株を LB 培地で培養し、大腸菌に rLkDHNs を大量に発現させた。

2) rLkDHNs の精製 大腸菌粗抽出液を His タグタンパク質精製用カラムを用いてアフィニティー精製した。続いて、更なる精製のためイオン交換カラムクロマトグラフィーによる精製を行った。rLkDHNs の濃縮・精製効率を SDS-PAGE とイムノブロットングで適宜確認した。

3) rLkDHNs の機能評価 凍結感受性の高い乳酸脱水素酵素 (LDH) を用いた凍害保護活性の測定と、デオキシリボース法による抗酸化活性の測定に、rLkDHNs を供試した。

### 3. 結果と考察

His タグタンパク質精製用カラムによるアフィニティー精製と、イオン交換カラムクロマトグラフィーによる精製を行うことで、rLkDHN2, 7 を単離することができた。単離した rLkDHN2, 7 について、乳酸脱水素酵素 (LDH) を用いて凍害保護活性の測定を行った。その結果、ここで用いた2種の rLkDHNs は終濃度 1 µg/ml という低濃度域でも比較的高い凍害保護活性を示すことが分かった。その活性は凍害保護活性を持つタンパク質として知られるウシ血清アルブミン (BSA) よりも高いものであった。このことから、rLkDHNs は低濃度で効率よく酵素の凍結失活を防ぐことが示唆された。

抗酸化活性の測定には、アフィニティー精製した rLkDHN1, 3, 5, 6, 7 をサンプルに用いて実験を行った。その結果、rLkDHN3 のみ抗酸化物質として知られるチオ尿素と同等の高い抗酸化活性があることが明らかになった。このことから、一部の rLkDHNs は抗酸化活性を示し、低温ストレスにより発生した活性酸素に対してラジカルスカベンジャーとして機能する可能性が示唆された。

### 4. 今後の課題

本研究では、カラマツ木部のデハイドリン LkDHNs の組換え体の単離標品を作製し、それぞれの活性測定を行う予定であったが、rLkDHN2, 7 以外の5種類の rLkDHNs の単離ができなかった。そのため、今後も引き続きこれらの精製条件を検討していく必要がある。そして、最終的には全ての rLkDHNs の単離標品について凍害保護活性、抗酸化活性の測定を行い、LkDHNs の機能を明らかにしていきたい。