

カラマツのデハイドリンタンパク質と樹木の耐寒性機構との関係 について

共生基盤学専攻 バイオマス転換学講座 資源植物創成学 加藤 潤

1. 緒言

寒冷地に生育する樹木は、植物にとって致命的な細胞内凍結を防ぐ機構を備えている。木部柔細胞では、冬季に細胞内の水を長期間安定的に液体状態に保つ深過冷却によって細胞内凍結を回避する。カラマツ (*Larix kaempferi*) では、秋から冬にかけての低温馴化の過程で、木部柔細胞内に LEA タンパク質のデハイドリン (DHN) をコードする 7 種類の遺伝子 (*LkDHN1~7*) が誘導されることがわかった。本研究では、これら 7 種のデハイドリンタンパク質 (LkDHNs) の機能評価を通じて、LkDHNs とカラマツ木部の越冬機構との関係を明らかにすることを目的として、LkDHNs の機能評価を行うことにした。

2. 方法

1) rLkDHNs の大量発現と精製 機能評価にはヒスチジンタグを付加した *LkDHN1~7* の組み換えタンパク質 (rLkDHN1~7) を大腸菌で大量発現させた後、親和性カラムクロマトグラフィーによって 7 種類の rLkDHN をそれぞれ精製した。rLkDHNs を用いる実験の対照区として用いる β -ガラクトシダーゼの組み換えタンパク質 (rlacZ) についても同様に発現・精製を行った。

2) 機能評価 熱分析法によって水溶液の凍結温度に対する LkDHNs の影響の有無を調べた。本研究では、予め氷核細菌の *Erwinia ananas* を添加して、凍結温度を安定させた水溶液に対し、rLkDHNs や既知の氷核形成阻害物質であるケンフェロール-7-O-グルコシド (K7G) などを添加して、水溶液の凍結温度を比較した。なお、rLkDHNs の対照区として牛血清アルブミンや rlacZ を用いた。これらを添加して調製した水溶液を 2 μ l ずつチューブに分注してふたを閉めた後、チューブの外壁面に熱電対を固定した。これをプログラムフリーザーにセットして、4°C から 0.2°C/min の速度で冷却した。このとき、水溶液が凍結する際に生じる潜熱の放出を熱電対で検知し、その発熱開始温度を各試料の凍結温度とみなした。

3. 結果と考察

7 種の rLkDHN を添加しても、単独ではいずれも *E. ananas* の氷核活性に起因する水溶液の高い凍結温度 ($-4.7^{\circ}\text{C} \pm 0.1^{\circ}\text{C}$) に対して影響を及ぼさなかった。既知の氷核形成阻害物質である K7G を 1 mg/ml 含む条件では水溶液の凍結温度が $-8.4 \pm 0.1^{\circ}\text{C}$ に低下したが、例えばこれに rLkDHN6 または rLkDHN7 を添加すると、rLkDHN6 では $-9.4 \pm 0.4^{\circ}\text{C}$ 、rLkDHN7 では $-9.3 \pm 0.3^{\circ}\text{C}$ に、それぞれわずかながら凍結温度が低下した。したがって、rLkDHN6 や rLkDHN7 はそれ自体には *E. ananas* の氷核活性を阻害しないにもかかわらず、氷核形成阻害物質である K7G の氷核形成阻害活性を助長する効果があるという可能性が示唆された。