

過冷却促進ポリフェノールと氷核タンパク質の相互作用

共生基盤学専攻 バイオマス転換学講座 資源植物創成学 出原 信大

1. 緒言

近年, 樹木の木部細胞に含まれる数種類のポリフェノールによって氷核活性が阻害され, 凍結温度が低下することが明らかにされた。これらは過冷却促進ポリフェノールと呼ばれ, 氷核細菌などの氷核形成物質の存在下で水溶液の凍結温度を低下させる効果を持つが, そのメカニズムは十分には明らかにされていない。特に, 氷核活性を阻害するメカニズムの解明には, 過冷却促進ポリフェノールと氷核形成物質との相互作用について精査することが必要である。しかし, 氷核細菌の場合は菌体のまま利用されてきたため, このような研究には不向きである。そこで, 活性本体である氷核タンパク質を利用できれば, 両者の相互作用の検証に用いることができると考えた。そこで本研究では, 氷核細菌由来の氷核タンパク質を組換えタンパク質として調製し, これが氷核形成物質として過冷却促進ポリフェノールとの相互作用の研究に利用可能であることを明らかにしようと試みた。

2. 方法

本研究では, 氷核細菌 *Erwinia ananas* の氷核活性の本体である氷核タンパク質 *inaA* を組換えタンパク質として調製することにした。まず, His タグを付加したタンパク質発現用プラスミドベクターに *E. ananas* 由来の氷核遺伝子 *inaA* を挿入して, それを用いて形質転換した大腸菌を LB 培地中で振盪培養し, 目的の組換え氷核タンパク質(His-*inaA*)の発現を誘導した。また, 対照区として, *inaA* の代わりに β -ガラクトシダーゼをコードする *lacZ* 遺伝子を用いた組換えタンパク質(His-*lacZ*)を同様の手順で発現誘導した。これらの菌体にバッファー[20 mM sodium phosphate buffer (pH 7.4), 500 mM NaCl, 20 mM imidazole]を加えて超音波処理を行った後, 9,000×g で 20 分間遠心分離した。そのうち, 上清はさらに 100,000×g で 1 時間超遠心し, 得られた上清を可溶性画分とした。次に, 可溶性画分はニッケルイオンを利用した金属アフィニティー精製に供試して精製画分を得た。一方, 封入体回収のため, 菌体破碎後の沈殿に 4%(w/v) Triton X-100 を含む洗浄バッファー[10 mM potassium phosphate buffer, 1 mM EDTA, 5 mM K₂S₂O₅ (pH 7.0)]を加えて懸濁し, 室温で 30 分間振盪した後, 9,000×g で 20 分間遠心分離する洗浄操作を 2 回繰り返した。その沈殿に超純水を加えて懸濁し, 遠心分離する洗浄操作を 3 回繰り返して得られた沈殿を封入体画分とした。

3. 結果と考察

アフィニティー精製で得られた組換えタンパク質画分の純度を SDS-PAGE で調べると, 夾雑物の混入がみられたものの高度に精製されていた。この精製画分の凍結温度は, バッファーのみの対照区と比べて 15°C 程度高くなったため, 氷核活性が検出された。さらに, His-*inaA* 存在下で過冷却促進ポリフェノールの Epigallocatechin gallate(EGCG)を添加すると, EGCG 無添加の対照区と比べて凍結温度が最大 8°C 程度低下したため, His-*inaA* に対する氷核形成阻害活性も検出された。さらに, EGCG の濃度を相対的に高めると氷核形成阻害活性も高まった。今後, 過冷却促進ポリフェノールと His-*inaA* との結合の有無を調べるために, さらに純度を高めた His-*inaA* 画分の調製を試みている。