

# ダイズ種子デハイドリン（グループ2 LEAタンパク質）の種子内蓄積，乳酸脱水素酵素に対する凍結変性保護活性および品種間分子量分布

著者	門間 美千子，金子 成延，松倉 潮
雑誌名	食品総合研究所研究報告
巻	66
ページ	21-28
発行年	2002-03-01
URL	<a href="http://doi.org/10.24514/00002650">http://doi.org/10.24514/00002650</a>

doi: 10.24514/00002650

## 報 文

ダイズ種子デハイドリン（グループ2 LEAタンパク質）の種子内蓄積、  
乳酸脱水素酵素に対する凍結変性保護活性および品種間分子量分布

門間美千子・金子成延\*・松倉潮\*

Characterization of soybean dehydrin (group2 LEA protein); Localization  
and accumulation in seed, cryoprotective activity on lactate dehydrogenase,  
and molecular weight diversity among Japanese soy varieties.

Michiko MOMMA, Shigenobu KANEKO\* and Ushio MATSUKURA\*

National Food Research Institute

\*Current affiliation is National Institute of Crop Science

## Abstract

In order to characterize and evaluate the function of soybean dehydrin, we have investigated its accumulation profile in the seeds, cryoprotective activity to lactate dehydrogenase, and molecular weight diversity among soybean varieties. From the results of immunoblotting and direct membrane blotting of seeds, soybean 26kDa dehydrin (Group2 LEA protein) was found to accumulate in cotyledons and hypocotyls homogeneously during late stage of seed maturation. Soybean dehydrin showed cryoprotective activity to lactate dehydrogenase in the similar level as bovine serum albumin and ovalbumin. Its CP50 value was estimated to be  $0.2 \mu^{\circ}\text{M}$  ( $5.2 \mu^{\circ}\text{g/ml}$ ). Molecular weight diversity of seed dehydrins among 50 Japanese soybean varieties/lines and 12 lines of *Glycine soya* was examined by immunoblotting and SDS-PAGE. These soybean varieties/lines were separated into two groups by their molecular weight of dehydrins, 26kDa or 27kDa though relationship between the distribution and soybean quality, such as physiological character was unclear. Two lines of *Glycine soya* contained intermediate polypeptide between 26kDa and 27kDa.

(Received Nov.5,2001; Accepted Dec. 27, 2001)

## 緒 言

ダイズ種子には20~40%のタンパク質が含まれており、その約70%が主要貯蔵タンパク質（グリシニン及び $\beta$ -コングリシニン）である。これら主要貯蔵タンパク質は酸沈殿タンパク質であるため、抽出液をpH5程度に酸性化したり酸性緩衝液で抽出すると沈殿し、上澄みに

ダイズホエー画分が得られる。ダイズホエー画分には $\beta$ -アミラーゼ、リポキシゲナーゼ、トリブシンインヒビター、レクチン等の酵素や生理活性をもったタンパク質が多く含まれる。

われわれは前報で、ダイズ種子ホエー画分タンパク質のSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS-PAGE）パターンにおける26kDa付近の品種間変異を見だし、

\*現：農業技術研究機構 作物研究所

2001年11月5日受付，2001年12月27日受理

この26kDaポリペプチドがデハイドリンと呼ばれるLEA(Late Embryogenesis Abundant)タンパク質の一つであることを明らかにしたり。LEAタンパク質は登熟後期の種子および乾燥や塩ストレス下の組織で蓄積される熱可溶性タンパク質であり、一般に植物ホルモンのアブシジン酸で誘導され、細胞の脱水耐性に関与すると考えられている<sup>2)</sup>。LEAタンパク質は一次構造上の特徴からいくつかのグループに分けられる。デハイドリンはそのうちのグループ2に分類され、リジンリッチモチーフ、セリントラクトN末端近くのモチーフ構造等いくつかの特徴的な一次構造をもっている。

本研究ではダイズデハイドリンの特性と機能を検討するために、精製デハイドリンに対するポリクローナル抗体を用いて、デハイドリンのダイズ種子内での分布、登熟期の蓄積、品種間分子量分布ならびに、LEAタンパク質の機能の指標とされる、酵素の凍結変性に対する保護作用について検討した。

## 実験方法

### 1. イムノブロットティング

種子各部位の分析には、ダイズ種子(品種:エンレイ)を、種皮、胚軸、子葉の各部分に分け、メノウ乳鉢で粉碎した粉末試料を用いた。試料40mgに抽出緩衝液(0.2M 酢酸ナトリウム pH5.2)を加え、ボルテックスで混合し、氷上に10分間静置した。これを12,000rpmで10分間遠心分離し、上澄み液を等量の試料調製液(4%SDS, 20%グリセロール, 10% 2-メルカプトエタノール, 0.02%プロモフェノールブルー, 0.125M トリス塩酸緩衝液 pH6.8)と混合し、95℃で10分間加熱して泳動試料とした。

登熟種子試料としては、ガラス室で栽培したダイズ(品種:エンレイ)の開花期に花に印をつけ、登熟前期(開花後25日)、中期(開花後32日)、後期(開花後50日)および完熟期(開花後60日以降)に採取したものをを用いた。種子子葉を液体窒素中で粉碎し-80℃で保存したのから上記と同様に電気泳動試料を調製した。

国産ダイズ及びツルマメのデハイドリン分子量分布の分析には、兵庫県立北部農業技術センターならびに農林水産省(現:独立行政法人)農業生物資源研究所より供与されたダイズ(*Glycine max*)及びツルマメ(*Glycine soya*)の種子を用いた。種子を実験用小型ミル(Sicer Type I)で粉碎後、60メッシュの篩を通したものを試料粉末とし、上記と同様にSDS-PAGE試料を調製した。このうち、4品種(エンレイ、納豆小粒、丹波黒、皮青大豆)についてイムノブロットティングを行い、その他の試料に

ついては、SDS-PAGEの泳動パターンからデハイドリンの分子量を推定した。

上記方法で調製した試料溶液10~20 $\mu$ lを5-20%ポリアクリルアミドゲル(PAGEL 520L, アトー)に添加し、20mAで80分間電気泳動した<sup>3)</sup>。泳動後、ゲルをブロッキング緩衝液(25mM トリス塩酸緩衝液 pH9.5, 40mM  $\epsilon$ -アミノカプロン酸, 20%メタノール, 0.05%SDS)中で20分間振とうした後、Hiranoらの方法<sup>4)</sup>に従って、セミドライブロッキング装置(Sartoblot II -S, ザルトリウス社)を用い、PVDFメンブレン(Immun-Blot PVDF membrane, バイオラッド)に2.5mA/cm<sup>2</sup>で30分間ブロッキングした。このPVDFメンブレンを、3%牛血清アルブミン(BSA)を含む20mM TBS(トリス塩酸緩衝液 pH7.5, 500mM NaCl)中で4℃、一晩ブロッキング処理し、一次抗体(1/200(v/v)ウサギ抗26kDaデハイドリン血清/1%BSAを含むTBS)中で60分間振とうし、TBS-t(0.05% tween20を含むTBS)で20分間3回、TBSで1回洗浄した。これを、二次抗体(1/2000(v/v)パーオキシダーゼ結合抗ウサギヤギ抗体/1% BSAを含むTBS)で1時間処理しさらに、TBS-tで3回、TBSで1回洗浄し、パーオキシダーゼ発色キット(イムノステイン HRP1000, コニカ)を用いて検出した。

### 2. 種子のメンブレンブロッキング

ダイズ種子(品種:納豆小粒)を図1Bに示すように、それぞれの方向からカミソリで切断し、その断面にPBS(9.57mM リン酸緩衝液 pH 7.5, 8g/l 塩化ナトリウム, 200mg/l 塩化カリウム)で湿らせたニトロセルロース膜(NitroPlus2000 フナコシ)を1分間密着し、切断面のタンパク質をメンブレンに吸着させた。このメンブレンを、ブロッキング液(SuperBlock, Pierce社)中で90分間振とうした。次に、一次抗体(1/200(v/v)ウサギ抗26kDaデハイドリン血清/1%BSAを含むPBS)と60分反応させ、PBS-t(0.05% tween20を含むPBS)で20分間、3回洗浄し、二次抗体(1/2000(v/v)パーオキシダーゼ結合抗ウサギヤギ抗体/1% BSAを含むPBS)で1時間処理した。これをPBS-tで3回、PBSで1回洗浄し、上記発色キットで検出した。一次抗体の代わりに正常ウサギ血清を用いたものを対照とした。

### 1. 乳酸脱水素酵素の凍結融解による失活に対する保護活性

乳酸脱水素酵素の凍結融解による失活に対する保護活性をLinらの方法<sup>5)</sup>に従って測定した。試料タンパク質(ダイズデハイドリン、牛血清アルブミン(BSA)、卵白

アルブミン、ラクトアルブミン)を $2 \times 10^{-4} \sim 2 \times 10^2 \mu\text{M}$ になるよう10mMリン酸カリウム緩衝液(pH7.5)で段階的に希釈した。この試料溶液100  $\mu\text{l}$ を、等量のウサギ筋由来乳酸脱水素酵素溶液(typeV-S L5132, シグマ, 2.5  $\mu\text{g/ml}$  同緩衝液)と混合した。これを $-20^\circ\text{C}$ で20時間保存した後の酵素活性を、乳酸脱水素酵素測定キット(LDH 2 ショット DG1340K, シグマ)を用いて測定し、混合直後に測定したコントロール値に対する百分率で残存活性を示した。

## 実験結果および考察

### 1. デハイドリンの種子内分布

ダイズ種子種皮, 胚軸, 子葉の各部分のイムノブロットティングを行ったところ, 図1Aに示すように, 種子の大部分を占める子葉, および発芽後根や茎となる胚軸部分にデハイドリンの存在が確認され, 種皮では検出されなかった。

種子断面からニトロセルロースメンブレンにタンパ

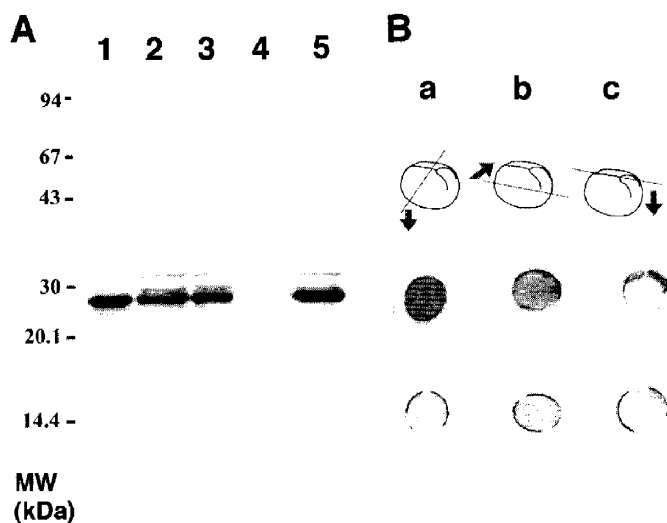


図1. 26kDaデハイドリンの種子における分布

A 種子各部分における26kDaデハイドリンの検出

レーン 1, 精製デハイドリン; 2, 子葉; 3, 胚軸; 4, 種皮; 5, 種子全体

B 種子断面からの直接吸着によるデハイドリンの検出

上, 種子切断方向; 中, 抗体によるデハイドリンの検出; 下, コントロール

ク質を吸着させ, イムノブロットティングと同様に抗体と反応させた(図1B)。図のaとbは子葉の2方向からの断面であるが, 子葉断面では均一な反応が見られた。また, 図c右側の胚軸の断面でもデハイドリン抗体に対する反応が確認された。(図cの左側の反応は子葉表面の一部が切断されて断面が露出したものである。)

Marttilaらは, オオムギのグループ3 LEAタンパク質であるHVA1の局在性を解析した研究において, HVA1が胚乳, 胚, アリユーロン層等生きた組織全体に存在すると報告している<sup>6)</sup>。単子葉植物であるオオムギと双子葉植物のダイズでは種子の構造が違い, また, デハイドリンはLEAタンパク質のグループ2に属し, HVA1とは特徴となるモチーフ構造等が異なっているが, HVA1と同様に, 発芽後に成長部位となり, また光合成

を行う組織(子葉, 胚軸)全体に広く分布していた。

オオムギのHVA1は種子の表面近く, 特にアリユーロン層に多く分布するが<sup>6)</sup>, ダイズデハイドリンについてはメンブレンブロットティングの結果で見ると組織切片中の分布は均質であった。図1B a~cにみられる種皮部分の発色は, 対照でも同程度に発色していることやイムノブロットティングの結果からタンパク質以外の非特異的な反応と考えられる。

図1Aにおいて, 胚軸及び子葉で, 26kDaより高分子側(約30kDa)に, 薄いバンドが検出された。Robertsonら<sup>7)</sup>は, エンドウの種子子葉で, トウモロコシデハイドリンに対する抗体に反応するが, デハイドリンモチーフ構造の一つを模した合成ペプチドに対する抗体には反応しない, 主要デハイドリン(27kDa)よりやや分子

量の高い29kDaポリペプチドを検出している。このほかにもエンドウではデハイドリンの一部のモチーフ構造しか持たない40kDaポリペプチドも種子中に見いだされている。アブシジン酸によって誘導されるダイズの耐熱性のLEA様タンパク質も複数あることから<sup>8)</sup>, 主要なデハイドリンに類似した構造をもつ複数のデハイドリン様タンパク質がダイズ種子内で蓄積すると推定される。

## 2. デハイドリンの種子登熟における蓄積時期

登熟前期(開花後25日), 中期(開花後32日), 後期(開花後50日)及び完熟種子子葉のイムノプロットティングを行ったところ, デハイドリンは登熟段階のいずれの種子でも検出されず, 完熟種子でのみ蓄積が見られた(図2)。LEAタンパク質は, その名称にあるように, 一般に登熟後期に集積されるのが特徴である。この実験に用いたエ

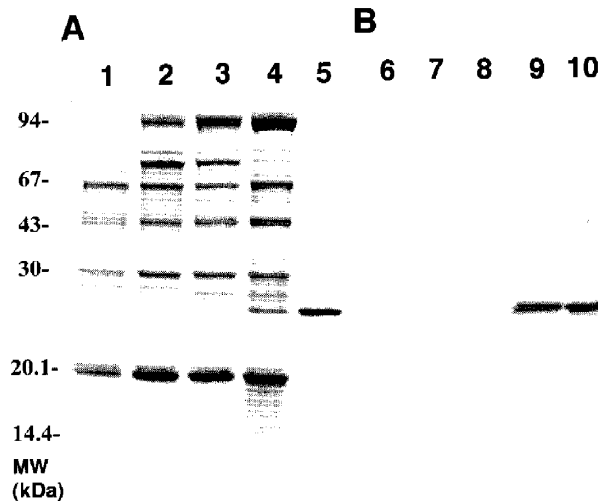


図2. 登熟期ダイズ種子におけるデハイドリンの集積

A 登熟期種子SDSポリアクリルアミド電気泳動パターン(CBB染色)

B 登熟期種子イムノプロットティング

レーン1および6, 登熟初期(開花後25日); 2および7, 登熟中期(開花後32日); レーン3および8, 登熟後期(開花後50日); レーン4および9, 完熟種子; レーン5および9, 精製デハイドリン

ンレイ品種では, 通常, 開花後40日までの登熟初~中期にタンパク質, 脂質等の貯蔵物質が顕著に蓄積し, 開花後40~60日の登熟後期にクロロフィルやデンプンが代謝され, 種子が乾燥していく<sup>9)</sup>。今回の開花後50日の乾燥途中にある種子では, デハイドリンが検出されなかったことから, ダイズ種子デハイドリンは組織の乾燥がかなり進んでから集積するものと推定された。LEAタンパク質の生体内での機能について, そのアミノ酸配列の特徴から, 乾燥や低温により脱水ストレス条件下にある細胞で, 細胞内で親水的な環境を作り, 植物細胞を乾燥によるダメージから守ると推定されている。乾燥が進む登熟後期に, 種子組織内にデハイドリンが集積し, 子葉, 胚軸といった発芽後成長を行う部位を保護している可能性が考えられる。

## 3. 乳酸脱水素酵素の凍結融解による失活に対する保護活性

Linらは, *in vitro* 転写翻訳したアラブドプシスCOR15を用い乳酸脱水素酵素の凍結融解による失活に対する保護活性を調べ, LEA関連タンパク質の中で最初に具体的な機能を示した<sup>4)</sup>。同様の活性は, クロレラのグループ3 LEAタンパク質であるHIC6<sup>10)</sup>や, 氷核細菌タンパク質<sup>11)</sup>等でも調べられ, 低温や乾燥条件下で誘導されるタンパク質の機能の指標とされている。図3にLinらの方法<sup>4)</sup>に従ってダイズデハイドリンの乳酸脱水素酵素の凍結融解による失活に対する保護活性を検討した結果を示した。ダイズデハイドリンはBSAと同レベルの保護活性を示し, 乳酸脱水素酵素の凍結融解後の残存活性を50%にまで高めるのに必要な濃度(CP<sub>50</sub>値)は0.2  $\mu$  M(5.2  $\mu$  g/ml)であった。Kodaらが単離精製した氷核

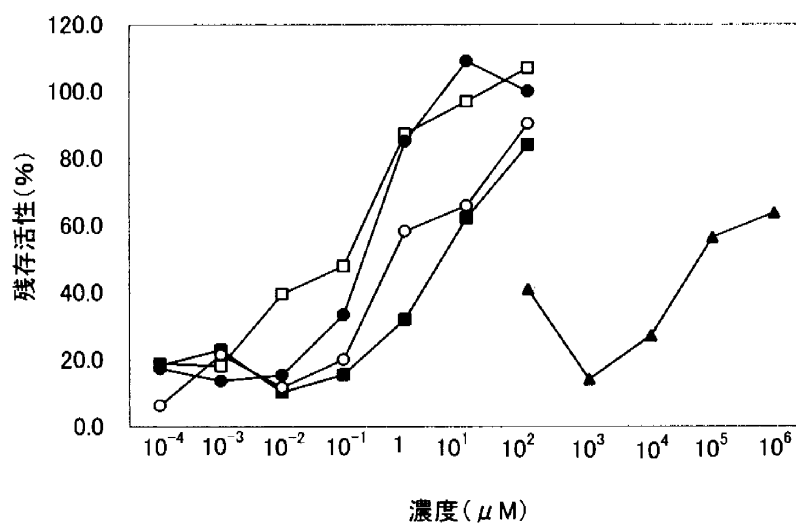


図3. ダイズデハイドリンの乳酸脱水素酵素活性保護作用

●, ダイズデハイドリン; □, 牛血清アルブミン (BSA);  
○, 卵白アルブミン; ■, ラクトアルブミン; ▲, ショ糖

細菌の凍結保護タンパク質IFO12686はBSAの約一万倍の活性を示すと報告されている<sup>11)</sup>。植物のLEAタンパク質の保護活性は様々であるが、BSAやラクトアルブミンと同程度のものが多い。

ストレス条件下の組織でLEAタンパク質が原形質膜や小胞体に局在する報告があり<sup>12,13)</sup>、親水性の高いLEAタンパク質が膜タンパク質の保護や核内を親水条件に保つ作用をもつと考えられている。ダイズデハイドリンは親水性アミノ酸含量が高く<sup>1)</sup>、また、分子中央部分にグリシンに富んだ親水領域があり、乾燥や低温条件下で膜組織やタンパク質の保護に作用していると推定される。今後、その細胞内での局在性やストレス耐性にたいする分子内のモチーフ構造の効果を検討することにより、その生理的機能が明らかになるであろう。

#### 4. 国産ダイズおよびツルマメにおけるデハイドリンの分子量分布

前報で報告したダイズ11品種の種子ホエー画分タンパク質の電気泳動パターンでは26kDaのデハイドリンのバンドを欠失したものが3品種あった<sup>1)</sup>。このうちの丹波黒、皮青大豆を含む4品種について、26kDaデハイドリ

ン抗体を用いてイムノブロットティングを行った(図4)。その結果、丹波黒と皮青大豆では27kDaのバンドが交差反応を示し、デハイドリンと免疫学的に相同性のあるタンパク質であることが明らかとなった。この27kDaポリペプチドはアミノ酸配列等からデハイドリンであることが確認された(未発表データ)。次に、種子ホエー画分タンパク質の電気泳動パターンから国産大豆50品種についてデハイドリン分子量の品種間分布を調査した。その結果、国産大豆は含有するデハイドリンの分子量によって26kDaタイプと27kDaタイプの2種類に分けられた(表1)。育成品種の黄大豆では、27kDaデハイドリンを含有するものはなくすべて26kDaタイプであった。青大豆20種のうち半数の10種が27kDaデハイドリンを含有していた。また種皮にアントシアニンを含む赤大豆や黒大豆では、丹波黒のみが27kDaタイプであった。種皮色が黄色の丹波黒突然変異体も27kDaタイプだった。ダイズの起源種であるツルマメ (*Glycine soya*) については、農業生物資源研究所に収集されていた12種のうち7種が27kDaタイプであり、2種で26kDaと27kDaの中間の位置にバンドが見出された。

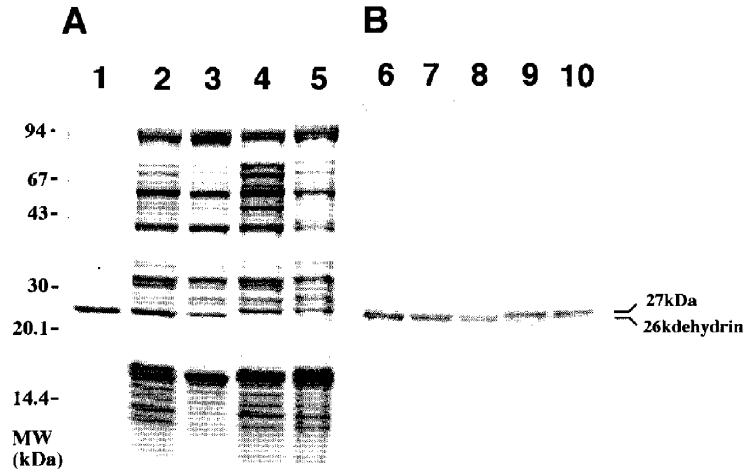


図4. ダイズ種子デハイドリンの品種による分子量の違い

A SDSポリアクリルアミド電気泳動パターン (CBB染色)

B イムノプロットティング

レーン1および6, 精製デハイドリン; 2および7, 納豆小粒; レーン3および8, エンレイ; レーン4および9, 丹波黒; レーン5および10, 皮青大豆

表1 ダイズ及びツルマメにおけるデハイドリン分子量の分布

試料大豆/ツルマメ	デハイドリン分子量		
	26kDa	27kDa	中間型
黄大豆 (育成品種)	エンレイ オオツル, タマホマレ 兵系1号, ミスズダイズ スズユタカ コスズ ボンミノリ フクユタカ 農林2号		
黄大豆 (在来または在 来選抜品種)	和田山白目 小糸在来 砂糖いらす 毛振 納豆小粒 ライデン 白莢1号 甘露		
有色大豆 (赤または茶 色)	セレベス大豆 夏大豆 岡山赤 茶かおり 晩生ダダチャ 茶豆 (岐阜県下呂町) 赤大豆 (岐阜)		
黒大豆	棚原早生黒 黒平豆	丹波黒 (丹波黒突然変異体)	
青大豆	日高青 宮城丸森黄緑 八鹿浅黄 筒江 平床豆 信濃青豆 青平豆 もち大豆岡山 八鹿青 山形くらかけ	春日青 中町青 皮青大豆 青大豆飯山 天津青 岩手みどり 青大豆大湯 宮城丸森青緑 滋賀水くぐり (晩生・早生)	
ツルマメ	マダラ大葉ツルマメ 東北名取市 400020	110001 30011 145 147 東北伊豆沼 90010 90014	40008 中堤2

デハイドリンは、一般にカロテノイドの代謝過程で生成される植物ホルモンのアブシジン酸によって誘導されることが知られている。ダイズ種子成熟期にはプラスチド内のデンブンやクロロフィルが代謝され、ルテインを主成分とするカロテノイドを生成する<sup>14)</sup>。黄大豆に比べて青大豆のカロテノイド組成や微細構造は未熟種子に近く<sup>14)</sup>、カロテノイドの代謝があまり進んでいないといえる。今回用いた青大豆20種において、青大豆の半数が27kDaタイプであったが、カロテノイドやクロロフィル含量と、デハイドリン分子量タイプに明らかな相関は見いだされなかった。前報で26kDaデハイドリンの精製試料とした納豆小粒はダイズの中で最も26kDaデハイドリンの含量が高いものの一つであるが、大豆の中でも著しく小粒である。また色大豆で唯一27kDaタイプであった丹波黒は大粒で、晩生であることが特色の一つであり、上に述べた青大豆は在来品種の特色として、種子の登熟に要する期間が長い傾向にある。これら種子成熟特性、粒の大きさ等と27kDaを含有する遺伝特性と何らかの関係がある可能性も考えられる。

以上に述べたように、ダイズデハイドリンは乳酸脱水素酵素の凍結融解による失活に対して保護作用をもち、種子の乾燥が進む成熟後期に胚軸や子葉の組織に蓄積されることから、乾燥種子で組織を親水性に保ち、膜やタンパク質を保護するといったはたらきがあるものと推定された。種子に含有するデハイドリンの分子量の違い(26kDaまたは27kDa)によって国産ダイズは二つのタイプに分けられ、ツルマメでは中間型の分子量のものが存在した。

## 要 約

登熟種子子葉および完熟種子の子葉、胚軸、種皮の各部位について、デハイドリン抗体を用いてイムノブロットティングを行った結果、デハイドリンは開花後50日までの登熟期には検出されず、それ以降のさらに乾燥が進む時期に集積するものと推定された。完熟種子では子葉と胚軸で検出され、その組織内の分布は均質であった。またダイズデハイドリンは、これまでに報告されているいくつかのLEAタンパク質と同様に、牛血清アルブミンや卵白アルブミンとほぼ同程度の乳酸脱水素酵素の凍結融解による失活に対する保護活性をもっており、そのCP50値は $0.20 \mu\text{M}$  ( $5.2 \mu\text{g/ml}$ )であった。

さらに、国産ダイズ50種とツルマメ12種についてデハイドリンの分子量分布を調べた。ダイズはデハイドリンの分子量が26kDaか27kDaであるかによって二つのグ

ループに分けられた。晩生・大粒で知られる丹波黒や、成分や組織構造が未熟種子に近い青大豆の一部が27kDaグループに含まれた。ツルマメでは中間型の分子量のグループがあった。

## 謝 辞

試料に用いたダイズ (*Glycine max*) 及びツルマメ (*Glycine soya*) の種子を供与いただきました兵庫県立北部農業技術センター曳野亥三夫博士ならびに千葉大学農学部原田久也博士に深く感謝いたします。

本研究の一部は農林水産省 2 世紀フロンティアイネゲノムプロジェクト (プロテオーム) 課題として実施された。

## 文 献

- 1) Momma, M., Haraguchi, K., Saito, M., Chikuni, K., Harada, K., Purification and characterization of the acid soluble 26-kDa polypeptide from soybean seeds, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **61**, 1286-1291 (1997)
- 2) 今井亮三, 植物のストレス耐性とLEAタンパク質, 化学と生物, **34**, 294-303 (1996)
- 3) Leammli, U.K., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, **227**, 680-685 (1970)
- 4) Hirano, H., Watanabe, T., Microsequencing of proteins electrotransferred onto immobilizing matrices from polyacrylamide gel electrophoresis: Application to an insoluble protein, *Electrophoresis*, **11**, 573-580 (1990)
- 5) Lin, C., Thomashow, M.F., A cold-regulated Arabidopsis gene encodes a polypeptide having potent cryoprotective activity, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **183**, 1103-1108 (1992)
- 6) Marttila, S., Tenhola, T., Mikkonen, A., A barley (*Hordeum Vulgare* L.) LEA3 protein, HVA1, is abundant in protein storage vacuoles, *Planta*, **199**, 602-611 (1996)
- 7) Robertson, M., Chandler, P.M., A dehydrin cognate protein from pea (*Pisum sativum* L.) with an atypical pattern of expression, *Plant Mol. Biol.*, **26**, 805-816 (1994)
- 8) Blackman, S.A., Obendorf, R.L., Leopold, A.C., Desiccation tolerance in developing soybean seeds: The role of stress proteins, *Physiologia Plantarum*, **93**, 630-638 (1995)



- 9) Monma, M., Sugimoto, T., Monma, M., Kawamura, Y., Saio, K., Starch breakdown in developing soybean seeds (*Glycine max* cv. Enrei), *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **55**, 67-71 (1991)
- 10) Honjoh, K., Matsumoto, H., Shimizu, H., Ooyama, K., Tanaka, K., Oda, Y., Tanaka, R., Joh, T., Suga, K., Miyamoto, T., Iio, M., Hatano, S., Cryoprotective activities of group 3 late embryogenesis abundant protein from *Chlorella vulgaris* C-27, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **64**, 1656-1663 (2000)
- 11) Koda, N., Asaeda, T., Yamade, K., Kawahara, H., Obata, H., A novel cryoprotective protein (CRP) with high activity from the ice-nucleating bacterium, *Pantoea agglomerans* IFO12686, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **65**, 888-894(2001)
- 12) Danyluk, J., Perron, A., Houde, M., Limin, A., Fowler, B., Benhamou, N., Sarhan, F., Accumulation of an Acidic dehydrin in the vicinity of the plasma membrane during cold acclimation of wheat, *The Plant Cell*, **10**, 623-638(1998)
- 13) Ukaji, N., Kuwabara, C., Takezawa, D., Arakawa, K., Fujikawa, S., Cold acclimation-induced WAP27 localized in endoplasmic reticulum in cortical parenchyma cells of mulberry tree was homologous to group 3 late embryogenesis abundant proteins, *Plant Physiology*, **126**, 1588-1597 (2001)
- 14) Momma, M., Terao, J., Ito, M., Saito, M., Chikuni, K., Carotenoid components in soybean seeds varying with seed color and maturation stage, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **58**, 926-930 (1994)