農研機構
NARO 国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構

米糠に含まれるグループ2LEAタンパク質(デハイドリン)の二次元電気泳動解析と乳酸脱水素酵素に対する凍結変性保護活性

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2019-12-20 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 門間, 美千子 メールアドレス: 所属:
URL	https://doi.org/10.24514/00002659

報　文

米糠に含まれるグループ2LEAタンパク質（デハイドリン）の二次元電気泳動解析と乳酸脱水素酵素に対する凍結変性保護活性

門間美千子

Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis and cryoprotective activity on lactate dehydrogenase of rice dehydrin

Michiko MOMMA

Abstract

Dehydrin, a group2 LEA protein, in rice bran, was analyzed by immunoblotting of two-dimensional electrophoresis gel using antibody raised against a conserved lysine-rich motif sequence of dehydrin. In the water-soluble fraction of rice bran, 10 spots for 44kDa and 23kDa dehydrin-like polypeptides were detected on the immunoblotted membrane. Isoelectric points for the polypeptides were estimated to be 6.6-7.4. A 23kDa dehydrin polypeptide was purified, and its cryoprotective activity on freeze/thaw inactivation of lactate dehydrogenase was examined. Its CP_{50} value, protein amount necessary to keep 50% of enzyme activity, was 0.78 μM (15.6 μg/ml), which indicated rice dehydrin had slightly lower activity than 26kDa soybean dehydrin.

(Received Nov. 21, 2002; Accepted Feb. 5, 2003)

緒　言

登熟後期の種子や乾燥条件下あるいは塩ストレス下にある植物組織ではLEA(late embryogenesis abundant)タンパク質と呼ばれる熱可溶性タンパク質が蓄積される．LEAタンパク質は，細胞の脱水耐性に関与すると推定されている一次構造上の特徴により、いくつかのグループに分けられる[1]．デハイドリンはそのうちのグループ2に分類され[2]，N末端近くのDEYGNP配列，ポリセリン，分子中央部分のグリシンを多く含む親水性領域といったモチーフ構造をもつが，特にC末端近くのリジンに富む配列(KIKEKLPG)は保存性が高く，デハイドリン固有の配列であると知られている．デハイドリンは非常に親水性が高く，乾燥や低温等脱水ストレス条件下の植物組織で，タンパク質や膜を保護する機能をもつと推定されている．一方，近年きのこに含まれる不凍タンパク質等の，凍結に対する組織保護作用を食品の劣化防止等に利用する研究が報告されている[3]。デハイドリン等LEAタンパク質は，通常，種子の水溶性タンパク質画分の1～数%程度含まれており，食品加工利用分野での応用の可能性が考えられる．そこで本研究ではイネ種子デハイドリンの特性と機能を明らかにするために,まず米糠層に含まれるデハイドリンを二次元電気泳動およびデハイドリン保存配列に対する抗体を用いて解析した．さらにデハイドリンを精製し，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．

2002年11月21日受付，2003年2月5日受理

実験方法

1. 実験材料

玄米（平成11年度産コシヒカリ）1kgを90%精白し糠層を回収した．この米糠50gを10倍量(v/w)のヘキサンで3回洗浄した．脱脂した米糠から水流ポンプで過剰のヘキサンを除くとともに脱気し，使用時まで−20℃で保存した．脱脂米糠20gに緩衝液（20mM HEPES-NaOH, pH7.0）を加えヒスコトロン（NS-50，日音）で3分間ホモジナイズした後，8000×g，20分間遠心分離し，上清を回収した．さらに上清を10,000×gで20分間遠心分離し，得られた上清を水溶性画分とした．その一部を沸騰水中で10分間加熱し12,000×gで20分間遠心分離した上清を米糠熱可溶性画分とした．

2. SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)および二次元電気泳動

SDS-PAGEは,前報[4]と同様に，Laemmliの方法[5]に従い5-20%グラジエントゲル(PAGEL 520G, ATTO)を用いて行った．二次元電気泳動はMultiphore II System(アマシャムファルマシアバイオテク社)を用い，機器添付説明書に準じて行った．すなわち，上記の米糠抽出液および米糠熱可溶性画分溶液200μlに等量の膨潤用溶液（8M尿素，2%CHAPS，痕跡量のブロモフェノールブルーを含む保存溶液に7mg/2.5ml DTTと50μl/2.5mlのIPG（Immobilized pH Gradient）緩衝液(3-10 NL: non linear)を加えたもの）を混合し試料液とした．膨潤トレイに試料液125μlを滴下し，IPGストリップ(pH3-10NL, 7cm)を一晩膨潤させた．膨潤後のIPGストリップを蒸留水で軽く水洗した後，Multiphore II水平型電気泳動装置に装着し，200〜3500Vで90分間，3500Vで65分間泳動した．泳動後IPGストリップをSDS平衡化緩衝液（50mM Tris-HCl, pH8.8，6M尿素，30%(w/v)グリセロール，2%SDS，痕跡量のブロモフェノールブルー，10mg/ml DTT）中で15分間振とうし，封入用アガロース溶液（0.5%アガロース，痕跡量のブロモフェノールブルーを含むSDS泳動緩衝液を加熱溶解したもの）で5-20%グラジエントゲル(PAGEL NPG-D520L，ATTO)に固定し，縦型電気泳動装置（AE6450/6440， ATTO）を用いて泳動しCBB R250で染色した．

3. イムノブロッティング

電気泳動後のゲルをブロッティング緩衝液 (25mM トリス塩酸緩衝液 pH9.5，40mM ε-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，セミドライブロッティング装置（Sartoblot II-S，ザルトリウス社）を用い，PVDFメンブレン（Immun-Blot PVDF membrane，Biorad）に2.5mA/cm²で30分間ブロッティングした．このPVDFメンブレンを，3%牛血清アルブミン（BSA）を含む20mMトリス塩酸緩衝液 pH7.5，500mM NaCl（TBS）中で4℃，一晩ブロッキング処理した。デハイドリンの検出には，C末端側の保存リジンモチーフ配列を含む20残基（DQNEKKGIMDKIKEKLPGGH）を合成し，これに卵白アルブミンを結合させたものを抗原として作成したウサギポリクローナル抗体を使用した．一次抗体（1/200ウサギ抗血清及び1%BSAを含むTBS）中でゲルを60分間振とうし，TBS-t（0.05% tween20を含むTBS）中で20分間3回，TBSで1回洗浄した．これを，二次抗体（1/2000 パーオキシダーゼ結合抗ウサギヤギ抗体及び1% BSAを含むTBS）で1時間処理し，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, Konica）を用いて検出した．

4. 米糠に含まれるデハイドリンの単離と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

米糠からのデハイドリンの単離は，ダイズデハイドリンの精製方法[6]に準じて行った．脱脂米糠50gから10〜50%飽和硫酸アンモニウム画分を調製し，S Sepharose Fast Flow樹脂（Amerciam Bioscience）を用いたイオン交換クロマトグラフィーを行った．7mlずつ分画した各フラクションを上に述べたSDS-PAGEおよびイムノブロッティングで分析し，デハイドリン画分を分取した．米糠の水溶性画分，熱可溶性画分と，この精製デハイドリンを蒸留水で透析，凍結乾燥し試料タンパク質とした．

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は，前報[4]と同様にLinらの方法[7]に従って測定した．試料タンパク質を10mMリン酸カリウム緩衝液（pH7.5）で2×10^{-4}〜20mg/mlに希釈し，この試料溶液100μlを，等量のウサギ筋由来乳酸脱水素酵素溶液（typeV-S, Sigma，2.5μg/ml 同緩衝液）と混合した．これを-20℃で凍結し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（DG1340K，Sigma）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表示した．

実験結果および考察

1．米糠層に含まれるデハイドリン

図１に示すように，米糠水溶性画分および熱可溶性画分には44kDaおよび23kDaにデハイドリン合成ペプチド抗体に交差反応を示すバンドが検出された．Stillら[8]は本実験と同様のデハイドリンの保存モチーフ配列に対する抗体を用いて，登熟期のイネ種子でのデハイドリンの集積と種子の乾燥との関連を調べた．開花後15～39日の登熟期のイネ種子には21kDaと38kDaのデハイドリン様タンパク質が検出され，そのうち21kDaタンパク質が主成分となっていた．乾燥ストレス条件下のイネ芽生えでは，組織の乾燥にともない21kDaのデハイドリンが集積することが示されており[9]，その他の諸性質からStillらは21kDaポリペプチドをデハイドリンと結論付けている．また，高分子量のデハイドリン様タンパク質については上記の登熟期種子の38kDaポリペプチドのほかに，Jayaprakashら[10]が乾燥ストレス条件下の芽生えで，微量の60kDaおよび45kDaポリペプチドを検出している．また，エンドウやコムギ等にも主要デハイドリン成分のほかに，同様のタンパク質が見出され，N末端側のモチーフ配列DEYGNPを持たないデハイドリン様タンパク質であることが明らかになっている[11,12]．これらのことから，図１で検出された２つのバンドのうち，低分子側のポリペプチドが,未熟種子や芽生えで見出されている21kDaのイネデハイドリンに相当するものと推定した．また，高分子側の44kDaポリペプチドは，上に述べた高分子量デハイドリン様タンパク質と同様のデハイドリン類縁タンパク質である可能性が考えられる．Stillらの報告[8]ではイネ種子で高分子量デハイドリン様タンパク質の含量は微量であったが，今回，完熟種子のアリューロン層に由来する米糠では，44kDaおよび23kDaのデハイドリン様タンパク質はほぼ同程度の量が見出された。

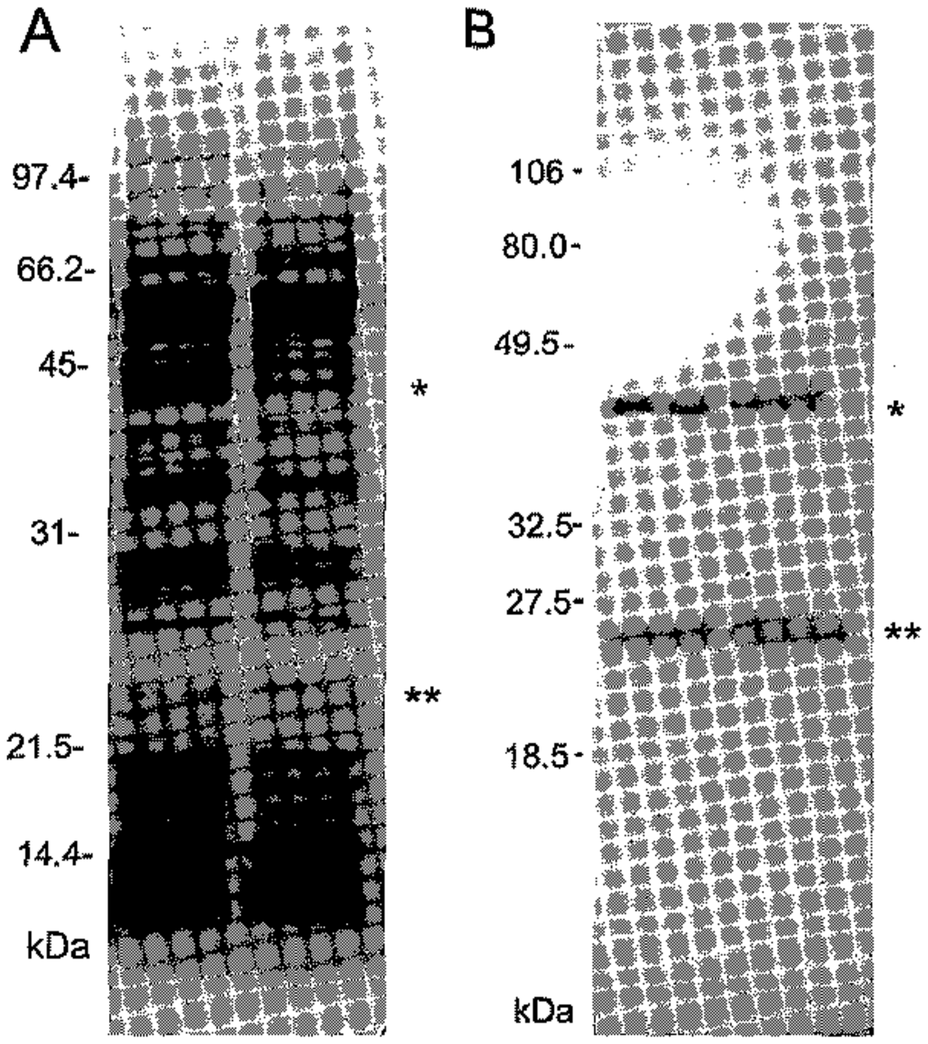
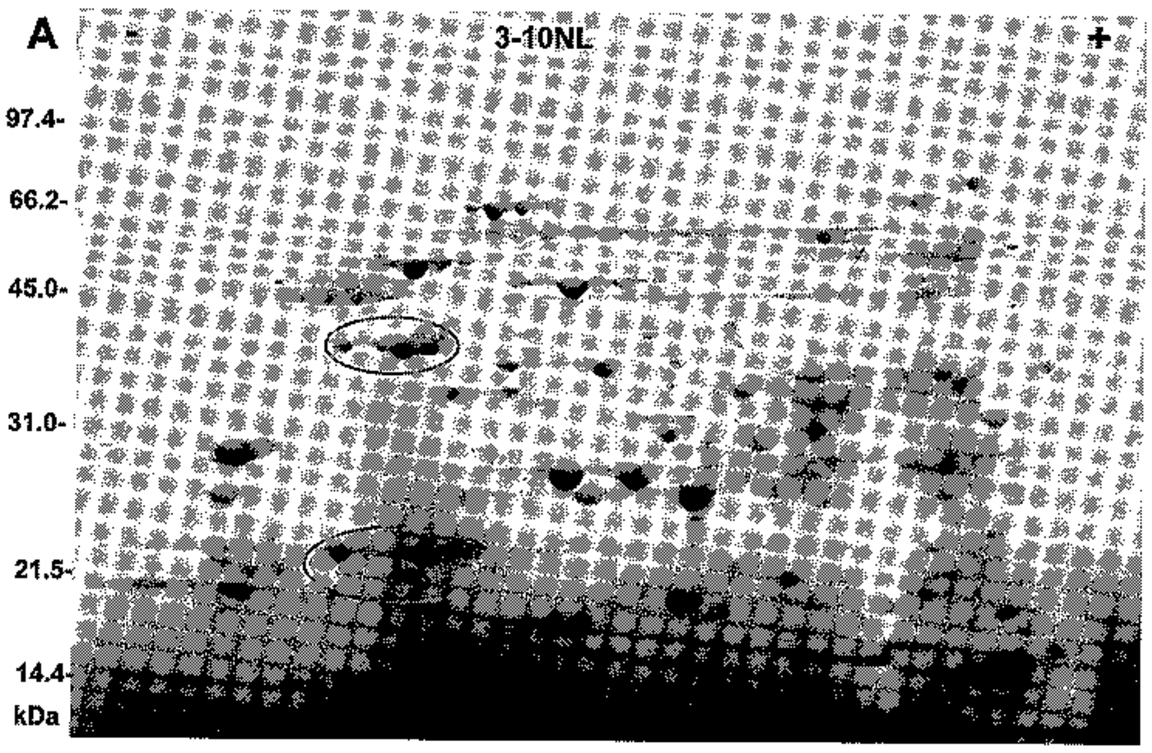
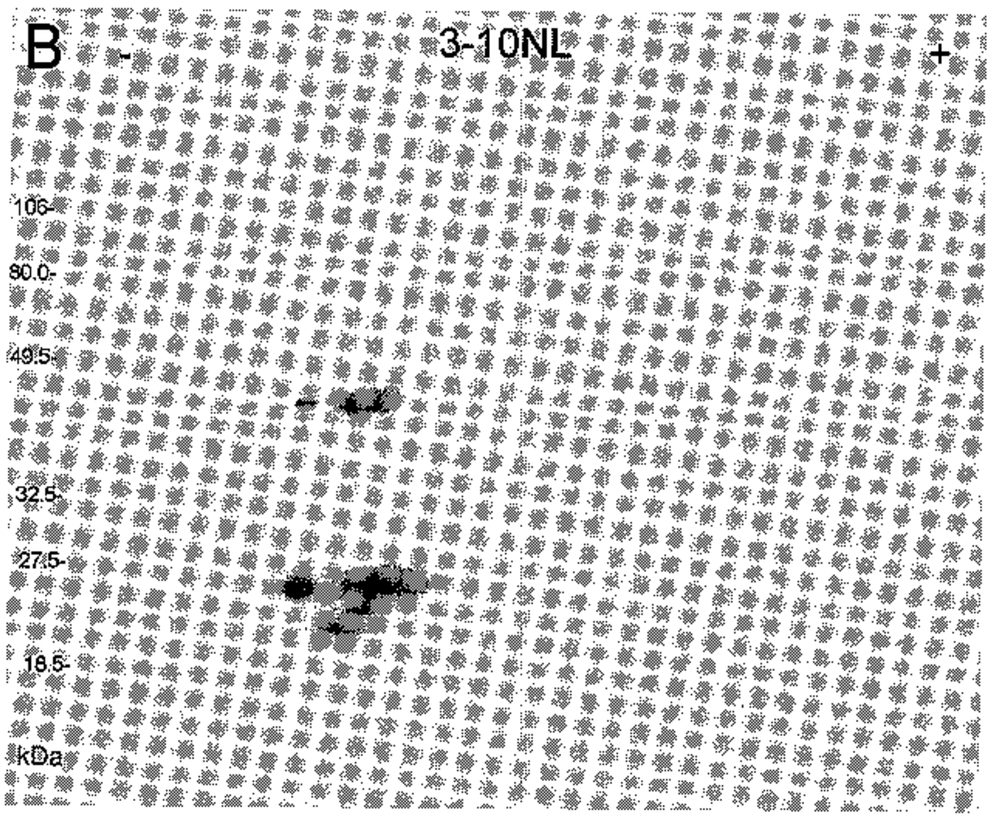


図１．米糠タンパク質の電気泳動とイムノブロッティング

A，SDS-PAGE；B，デハイドリン保存配列抗体に対するイムノブロッティング
レーン左,水溶性画分；右,熱可溶性画分
＊，44kDa；＊＊，23kDa

米糠抽出液画分および米糠熱可溶性画分を二次元電気泳動で解析した結果を図2に示した．SDS-PAGEでは，加熱によるタンパク質組成の違いは明確でなかったが，二次元電気泳動像では米糠抽出画分と熱可溶性画分のパターンはかなり異なっていた(図２A，C)．加熱処理により，総体的にスポット数は減少したが，酸性側に含量が増加したスポット(図2C矢印)がいくつか見られた．上記SDS-PAGEと同様にデハイドリンのリジンモチーフ配列に対する抗体を用いてイムノブロッティングを行ったところ，水溶性画分では分子量44kDaに等電点約6.8の2つのスポットが検出され，その他に等電点7.3に微弱なスポットが検出された．また，分子量23kDaに相当するスポットは等電点6.6付近に5個，また等電点7.4に1個検出された(図２B)．これらのデハイドリン保存配列抗体と反応するスポットは図２Aでは○で囲ったスポットに対応する．これらは熱可溶性画分では図２Cの○で囲った部分に相当し，等電点の移動が見られた．また，熱可溶性画分ではスポット間の分離が困難になり，加熱により他の成分との相互作用が影響しているものと考えられた．二次元電気泳動ゲル上のタンパク質をPVDF膜に転写し，デハイドリンポリペプチドに相当するスポットを切り出し，ペプチドシークエンサーによるアミノ酸配列分析を試みたが，いずれもN末端がブロックされているものと推定されアミノ酸配列は解読できなかった．Tsugitaらはイネの様々な成長段階および部位に含まれるタンパク質の二次元電気泳動を行い，米糠では約577～785個のスポットを検出している[13]．そのうち6個のスポットについて部分アミノ酸配列を解読しているがデハイドリン由来と考えられるものは含まれていなかった．





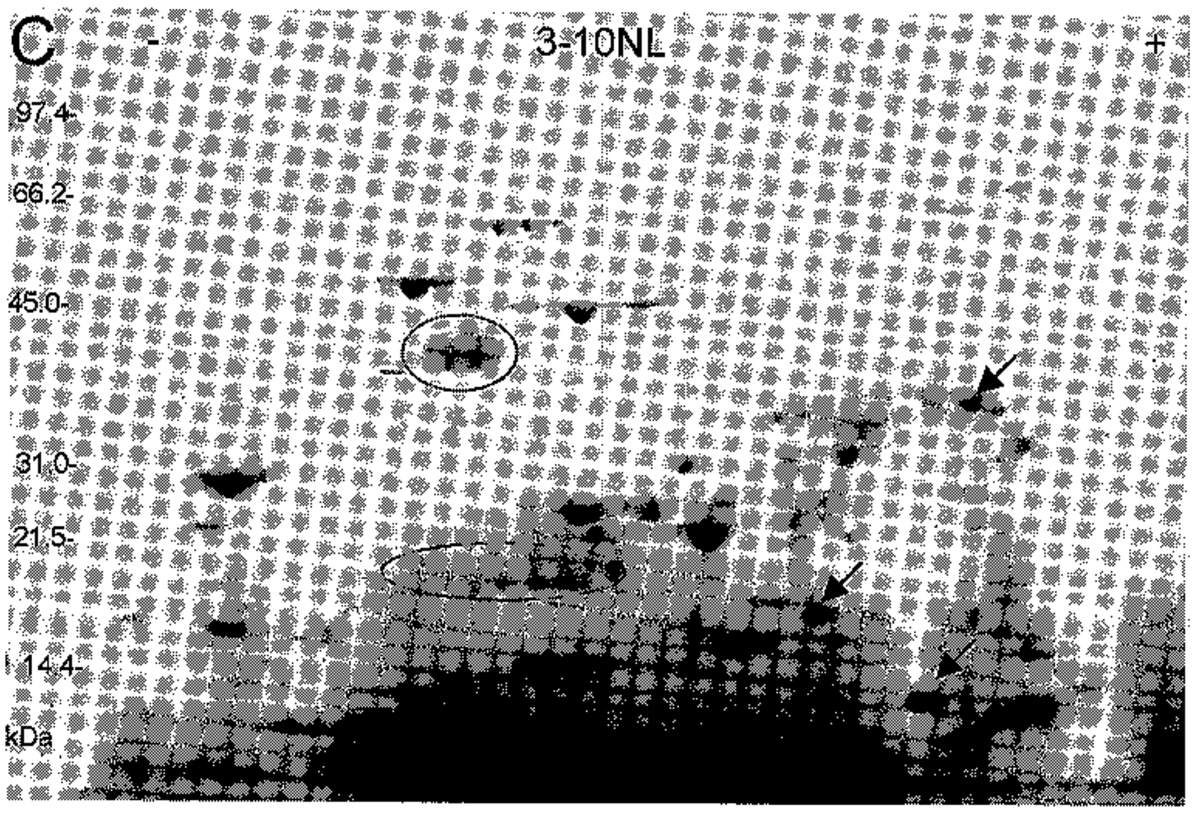


図２．米糠タンパク質の二次元電気泳動とイムノブロッティング

A，水溶性画分の二次元電気泳動；B，水溶性画分，デハイドリン保存配列抗体に対するイムノブロッティング；C，熱可溶性画分の二次元電気泳動

○で囲った部分，デハイドリン抗体と反応したスポット；←，熱可溶性画分で濃いスポット

2．デハイドリンの単離と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らが，in vitro転写翻訳したシロイヌナズナ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有することを報告したのが，LEA関連タンパク質に機能があることを示した最初の例である[7]．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[14]や，氷核細菌タンパク質[15]等でも認められ，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らの方法に従って米糠水溶性画分，熱可溶性画分，単離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．乳酸脱水素酵素の凍結融解後における残存活性を50%まで高めるのに必要な濃度（CP_{50}値）は，水溶性画分では43 μg/ml，熱可溶性画分では29 μg/ml，23kDaデハイドリンでは15.6 μg/ml(0.78 μM)で，前報[4]で計測した，卵白アルブミンやラクトアルブミンなどのアルブミン類とほぼ同程度の活性を示した．前報で報告した精製ダイズデハイドリンのCP_{50}値は5.2 μg/ml(0.2 μM)であった．したがって，米糠から単離した23kDaデハイドリンの酵素保護活性は，ダイズのデハイドリンに比べるとやや低いといえる．乾燥や低温等の脱水ストレス条件下にある植物組織では，親水性の高いLEAタンパク質がタンパク質や膜組織を保護する作用をもつと考えられている．イネデハイドリンも親水性アミノ酸含量が高く，また，分子中央部分にグリシンに富んだ親水領域があり，タンパク質の凍結変性を防ぐ機能があるものと推定される．

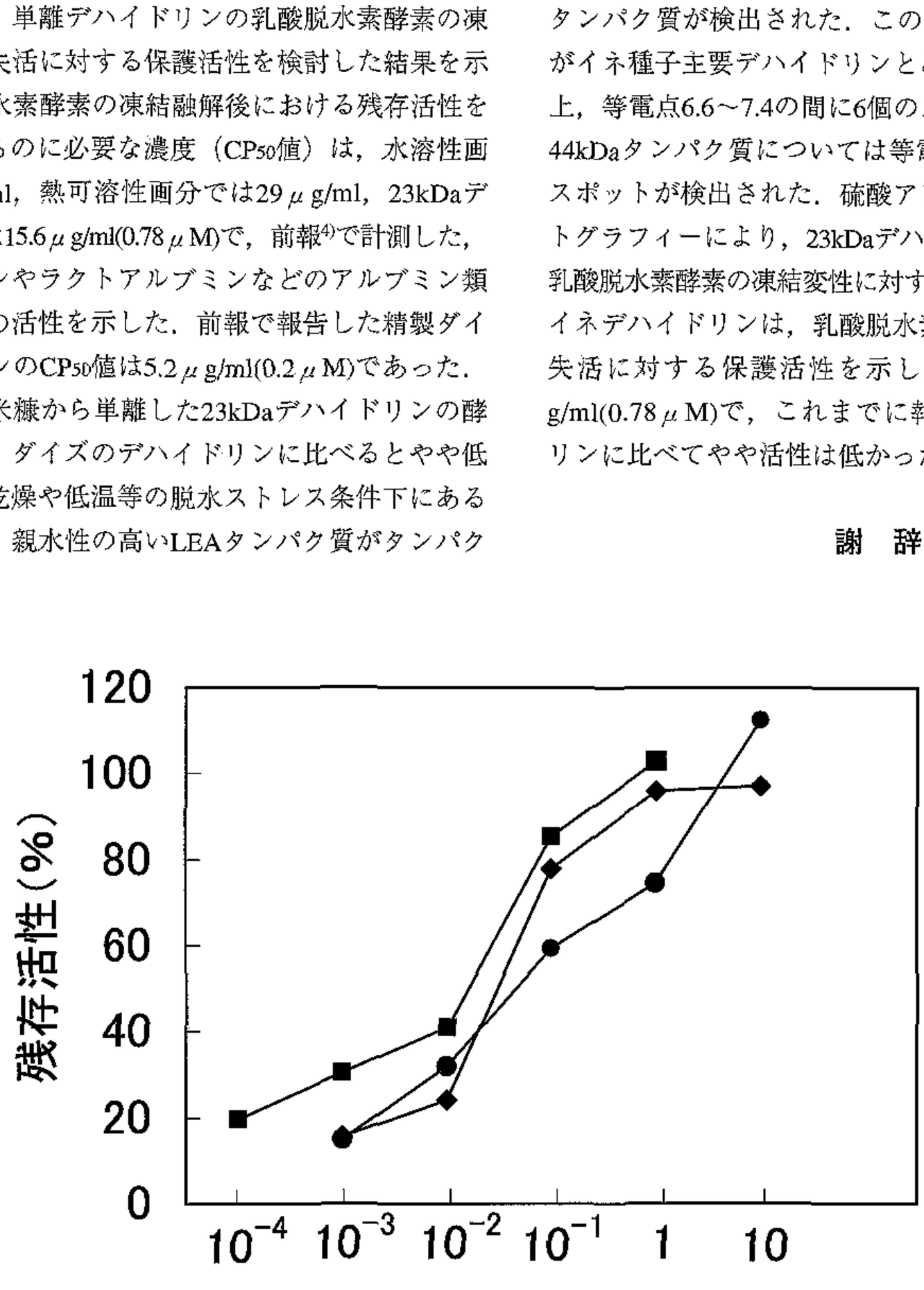


図3．米糠熱可溶性画分ならびにデハイドリンの乳酸脱水素酵素活性保護作用

●，水溶性画分；◆，熱可溶性画分；■，23kDaデハイドリン

要　約

デハイドリン保存配列に対する抗体を用いたイムノブロッティングにより，米糠の水溶性画分ならびに耐熱性タンパク質画分に44kDaおよび23kDaのデハイドリン様タンパク質が検出された．このうち，23kDaタンパク質がイネ種子主要デハイドリンとみられ，二次元電気泳動上，等電点6.6～7.4の間に6個のスポットが検出された．44kDaタンパク質については等電点6.8～7.3の間に4個のスポットが検出された．硫酸アンモニウム分画とクロマトグラフィーにより，23kDaデハイドリンを部分精製し，乳酸脱水素酵素の凍結変性に対する保護活性を測定した．イネデハイドリンは，乳酸脱水素酵素の凍結融解による失活に対する保護活性を示し，そのCP_{50}値は15.6 μg/ml(0.78 μM)で，これまでに報告したダイズデハイドリンに比べてやや活性は低かった．

謝　辞

文　献

1) Close, T. J., Dehydrins: A commonalty in the response of plants to dehydration and low temperature, *Phsiologia Plantarum,* **100**, 291-296 (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) 河原秀久，渡辺昭江，小幡斉，きのこ由来不凍タンパク質の検索とその所性質，2002年度日本農芸化学会講演要旨集, **259** (2002)
4) 門間美千子，金子成延，松倉潮，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及び品種間分子量分布，食品総合研究所研究報告，**66**，21-28 (2002)
5) Leammli, U.K., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature,* **227**, 680-685 (1970)
6) 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)
7) 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)
8) Still, D.W., Kovach, A., Bradford, K. J., Development of desiccation tolerance during embryogenesis in rice (*Oryza sativa*) and wild rice (*Zizania palustris*) Dehydrin expression, abscisic acid content, and sucrose accumulation, *Plant Physiol.,* **104**, 431-438 (1994)
9) Bradford, K.J., Chandler, P.M., Expression of "dehydrin-like" proteins in embryos and seedlings of *Zizania palustris* and *Oryza sativa* during dehydration, *Plant Physiol.,* **99**, 488-494 (1992)
10) Jayaprakash, T.L., Ramamohan, G., Krishnaprasad, B.T., Ganeshkumar, Prasad, T.G., Mathew, M.K., Udayakumar, M., Genotypic variability in differential expression of lea2 and lea3 genes and proteins in response to salinity stress in fingermillet (*Eleusine coracana* Gaertn) and rice (*Oryza sativa* L.) seedlings, *Annals of Botany* **82**, 513-522 (1998)
11) 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)
12) Danyluk, J., Houde, M., Rassart, E., Sarhan, F., Differential expression of a gene encoding an acidic dehydrin in chilling sensitive and freezing tolerant graminease species, *FEBS letters* **344**, 20-24 (1994)
13) Tsugita, A., Kawakami, T., Uchiyama, Y., Kamo, M., Miyatake, N., Nozu, Y., Separetaion and characterization of rice proteins, *Electrophoresis,* **15**, 708-720 (1994)
14) 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)
15) 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)