

ィクルガンを用いて長ネギ表皮細胞に GFP との融合タンパク質として一過的発現させた。導入の際、発現確認用に mRFP を共導入した。その結果、VTC2 および VTC5 とともに細胞質と核の両方に局在することが強く示唆された (図 2)。

### 3. VTC2/5 相互作用タンパク質の探索

VTC2 および VTC5 の核への局在が示唆されたことから、VTC2/5 タンパク質は他のタンパク質因子と相互作用し、核内で何らかの機能を発現していることが推測された。そこで、VTC2/5 の核内における役割を明かにするため、酵母 Two-Hybrid 法による相互作用タンパク質の探索を試みた。VTC2 および VTC5 をベイトにシロイヌナズナ cDNA ライブラリーから相互作用タンパク質を探索した結果、VTC2 および VTC5 に対してそれぞれ 7 個と 6 個の候補遺伝子を得、現在各候補タンパク質の相互作用性について確認を進めている。

## ミトコンドリア膜小胞を利用したザゼンソウ熱産生因子の生化学的解析

岩手大学農学部 稲葉(伊東)靖子

### 緒言

我が国の寒冷地に自生するザゼンソウは、氷点下を含む外気温の変動にもかかわらず、肉穂花序と呼ばれる生殖器官の体温を 20℃前後に維持できる発熱植物である。本植物の熱産生には、脱共役タンパク質 UCP とシアン耐性呼吸酵素 AOX の関与が示唆されており、ともにミトコンドリアに局在する膜タンパク質である<sup>1,2)</sup>。UCP や AOX はミトコンドリア呼吸鎖と連携して ATP の産生レベルを抑えるため、ミトコンドリアは恒常性を維持しようとしてさらに呼吸を活発化して、その結果、大きな代謝熱が発生すると考えられている。実際に、多くの発熱植物において発熱が観察される組織では呼吸が活発であり、発熱レベルと呼吸活性には正の相関が観られる。

発熱植物における UCP や AOX の役割は、単離ミトコンドリアの呼吸活性を詳細に解析することによりその一端が明らかとされてきた。ところが、現時点ではザゼンソウを含むすべての発熱植物において遺伝学的な解析を行うことが困難であるため、UCP や AOX を欠損したミトコンドリア呼吸鎖の解析はまったく行われていない。そこで本研究では、ザゼンソウの AOX および UCP に特異的な抗体カラムを作成して、AOX や UCP を生化学的にミトコンド

### 4. 今後の展望

今回、VTC2 および VTC5 の機能解析を進めた結果、両遺伝子プロモーターは顕著な光応答性を示すこと、VTC2/5 タンパク質は核への局在が認められることが明かになった。今後、プロモーター中の光応答性シス因子の同定・解析および、VTC2/5 タンパク質の核内での役割解明を進めていき、光による AsA 生合成調節の分子機構を明かにしたいと考えている。

最後に、本研究の遂行にあたりご援助いただいた財団法人農芸化学研究奨励会に深く感謝いたします。

### 参考文献

- 1) Dowdle, J., Ishikawa, T., Gatzek, S., Rolinski, S. and Smirnoff N. Plant J. **52**: 673-689 (2007).
- 2) Ishikawa, T. and Shigeoka, S. Biosci. Biotechnol. Biochem., **72**, 1143-1154 (2008).

リア膜から除去する方法の確立を目指した。

### 方法および結果

#### 1. 抗 UCP および抗 AOX 抗体カラムの作成

ザゼンソウで主として発現する UCP (SrUCPA) 遺伝子の全長を PCR により増幅して、pET-43.1a の *SmaI/XhoI* サイトに連結してプラスミド pET-NusA-SrUCPA を作成した。(SrUCPA の N 末端側には、TEV プロテアーゼ切断

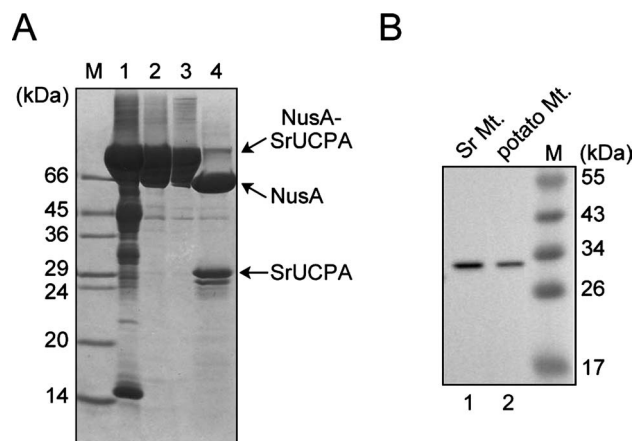


図 1 抗 SrUCPA 抗体の作成 (文献 3 より改変)

(A) NusA-SrUCPA の発現と精製。NusA-SrUCPA を発現させた大腸菌の粗抽出液 (レーン 1)、ニッケルカラムで精製した NusA-SrUCPA (レーン 2)、脱塩精製後 (レーン 3)、TEV プロテアーゼによる切断後 (レーン 4)。 (B) 抗 SrUCPA 抗体を使用したイムノブロットング。Sr Mt: ザゼンソウミトコンドリア, potato Mt: ポテトミトコンドリア。

サイトを挿入した。) 大腸菌 BL21(DE3) 株を pET-NusA-SrUCPA で形質転換して、IPTG 誘導により NusA-SrUCPA 融合タンパク質を発現させた。ニッケルカラムクロマトグラフィーにより NusA-SrUCPA 融合タンパク質を精製した後、TEV プロテアーゼにより切断して、SDS-PAGE により SrUCPA タンパク質を分離した (図 1A)<sup>3)</sup>。ゲルから切り出した SrUCPA タンパク質をウサギに免疫して、抗 SrUCPA 抗体を含む血清を得た。得られた血清を NusA-Sepharose および NusA-SrUCPA-Sepharose カラムに供して抗 SrUCPA 抗体を精製し、イムノブロッティングを行った。その結果、本植物のミトコンドリアのみでなく、ポテトのミトコンドリアにおいても抗 UCP 抗体特異的なバンドが検出された (図 1B)<sup>3)</sup>。ザゼンソウで主として発現する AOX (SrAOX) については、同様の方法により抗 SrAOX 抗体を調製した (投稿準備中)。

## 2. 抗体カラムを使用したミトコンドリアに含まれる UCP タンパク質の精製

発熱しているザゼンソウの肉穂花序からミトコンドリアを調製して凍結融解を行った後、浸透圧ショック法により可溶性画分と膜画分とに分画した。膜画分を 1% Triton X 100 で可溶化して pre-immune IgG-Sepharose に供し、フロースルー画分を anti-SrUCPA IgG-Sepharose に吸着させ、0.2 M Glycine-HCl (pH 2.2) で吸着したタンパク質を溶出した。可溶化した膜画分と pre-immune IgG および anti-SrUCPA IgG-Sepharose カラムから溶出した各画分を SDS-PAGE で分離して、抗 SrUCPA 抗体を使用したイムノブロッティングを行ったところ、anti-SrUCPA IgG-Sepharose カラムから主として精製されたタンパク質は抗 SrUCPA 抗体により検出された (図 2A および B)<sup>3)</sup>。さらにマスマスペクトル解析から、精製したタンパク質が SrUCPA であることが同定された (図 2C)<sup>3)</sup>。SrAOX についても、現在同様の方法でミトコンドリア膜画分からの精製を行っている。

## 今後の展開

上記の方法により、ミトコンドリア膜画分から特異的に目的タンパク質を除去することができた。今後は、目的タンパク質を特異的に欠損したミトコンドリア膜画分から膜

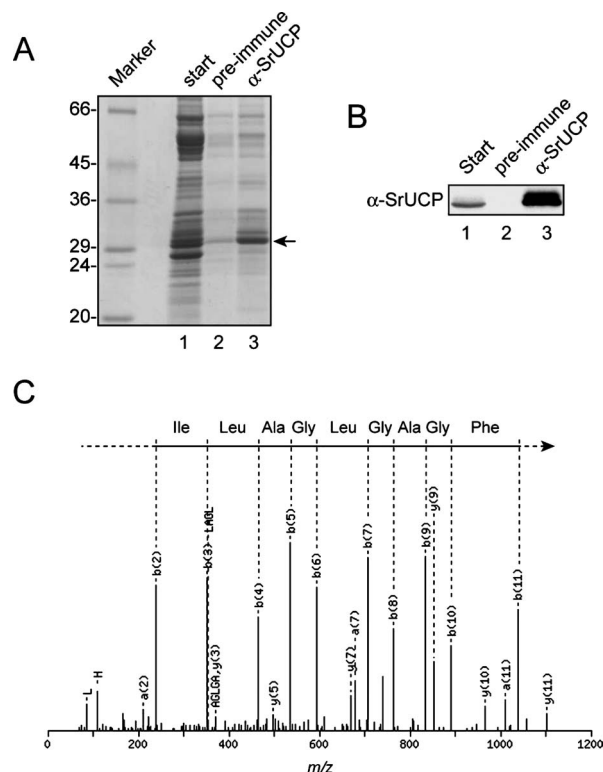


図 2 ザゼンソウミトコンドリアからの SrUCPA 精製 (文献 3 より改変)

(A) anti-SrUCPA IgG-Sepharose による SrUCPA の精製。TX100 で可溶化したミトコンドリア膜画分 (レーン 1)、pre-immune カラム溶出画分 (レーン 2)、 $\alpha$ -SrUCPA カラム溶出画分 (レーン 3)。各画分を SDS-PAGE で分離後 CBB 染色を行った。(B) 抗 SrUCPA 抗体を使用したイムノブロッティング。各レーンは (A) と同じ。(C) SrUCPA のマスマスペクトル解析。

の再構成を行っていきたいと考えている。

最後に、本研究を遂行するにあたり、研究奨励金を賜りました財団法人農芸化学研究奨励会に深く感謝いたします。また、ご推薦いただいた東北大学名誉教授の神尾好是先生に深く御礼申し上げます。

## 参考文献

- 1) Y. Ito-Inaba, Y. Hida, M. Ichikawa, Y. Kato and T. Yamashita, *J. Exp. Bot.*, **59**: 995–1005 (2008).
- 2) 稲葉(伊東)靖子, 齋藤茂, 化学と生物, **46**: 841–49 (2008).
- 3) Y. Ito-Inaba, Y. Hida, H. Mori and T. Inaba, *Plant. Cell. Physiol.*, **49**: 1911–16 (2008).