

平成 30 年 5 月 25 日現在

機関番号：10105

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K18641

研究課題名(和文) 出芽直後のバレイシヨの耐霜性評価と耐霜性に関わる細胞膜タンパク質の探索

研究課題名(英文) Investigation of frost tolerance and proteomic changes in shoot-emerging potatoes

研究代表者

春日 純 (Kasuga, Jun)

帯広畜産大学・畜産学部・助教

研究者番号：40451421

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：凍結感受性のバレイシヨ栽培種と耐霜性野生種を用いた比較解析により、耐霜性に関わるタンパク質の特定を試みた。低温馴化前後の耐凍性は、栽培品種ニシユタカで-1.4℃と-2.5℃、耐霜性の*S. acaule*で-3.3℃と-4.8℃、同じく耐霜性の*S. commersonii*で-3.7℃と-5.8℃であった。可溶性タンパク質のプロテオーム解析によって、活性酸素除去への関与が予想される複数のタンパク質が耐霜性野生種2種で特徴的に蓄積していることが示唆された。また、細胞膜タンパク質をSDS-PAGEに供試することで、それぞれの種について、低温馴化前後で量的な変化を示すいくつかのタンパク質バンドを特定した。

研究成果の概要(英文)：We searched proteins which involved in frost tolerance in potato plants by comparative analyses between frost-susceptible cultivated species and frost-tolerant wild species. Values of freezing tolerance of *S. tuberosum* cv. Nishiyutaka were -1.4C and -2.5C for non-acclimated and cold-acclimated leaves, respectively. Those of *S. acaule* and *S. commersonii* were -3.3C and -3.7C before acclimation, and -4.8C and -5.8C after cold-acclimation. A shotgun proteomics analysis on soluble fractions suggested that some proteins which were expected to involve in cellular antioxidant activities were accumulated characteristically in the two wild potato species. In addition, we identified several plasma membrane protein bands which showed quantitative changes during cold acclimation for each species in an SDS-PAGE analysis.

研究分野：植物生理学

キーワード：バレイシヨ 耐霜性 細胞膜 プロテオーム ミニチューバー

1. 研究開始当初の背景

長崎や鹿児島といった国内の暖地のバレイシヨの産地では、春作と秋作の二期作栽培が行われている。このような地域では、春作の出芽直後、もしくは秋作の収穫直前にバレイシヨが霜にあたることもあるが、バレイシヨの栽培種である *Solanum tuberosum* は耐霜性を持たず、霜により植物体の地上部は甚大な傷害を受ける。春作期の降霜では、生長点を含む出芽した茎葉が傷害を受けても地下部は生き残り、腋芽から分枝が起こるため個体として枯死することは少ないが、生育の遅延による塊茎肥大の遅れや減収が起こるとともに、収穫時期が遅れるために早期収穫による市場価値が高い時期での出荷が難しくなるため、栽培農家は経済的な損失を被ることになる。そのため、バレイシヨの二期作栽培を行う地域では、出芽直後の茎葉への耐霜性の付与は、バレイシヨの生産性の安定化だけでなく、作付時期の前進化、作期拡大につながる重要な育種目標の一つとなっている。

栽培種のバレイシヨは耐霜性を持たないのに対し、バレイシヨ野生種の中には *Solanum acaule* や *Solanum commersonii* といった耐霜性を持つものも存在する。これまで、バレイシヨ野生種の耐霜メカニズムについては、細胞膜脂質に占める不飽和脂肪酸の構成割合の上昇やデハイドリンと呼ばれる環境ストレス誘導性タンパク質の蓄積などの関与が示唆されている。また、バレイシヨの低温馴化過程で見られるタンパク質組成の変化については、バレイシヨ栽培種 *S. tuberosum* と耐霜性野生種 *S. commersonii* を用いて、可溶性タンパク質のゲルベースのプロテオーム解析も行われている。しかしながら、これらの研究のみでバレイシヨの耐霜メカニズムの全貌を解明できたとは考え難く、さらなる解析が必要とされている。

2. 研究の目的

本研究では、バレイシヨの二期作を行う地域での春作における霜害発生を念頭に置いて、「バレイシヨ栽培種 (*S. tuberosum*) と耐霜性野生種 (*S. acaule*, *S. commersonii*) の低温馴化前後でのタンパク質の比較プロテオーム解析による耐霜性に関わるバレイシヨのタンパク質の特定」、および「早春の降霜を模したバレイシヨのポット育成法と耐霜性評価実験系の確立」を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 試験管培養体由来の植物体の耐凍性評価

バレイシヨ栽培種としては、長崎県の主要な栽培品種であるニシユタカを用いた。ニシユタカ、*S. acaule*、および *S. commersonii* の試験管培養体を市販の培養土を入れたポ

ットに移植し、14時間日長(明期20/暗期18)で3週間育成した。低温馴化処理は、上記の条件で育成した植物体の育成温度を明期4/暗期2に変え、さらに10日間育成することで行った。低温馴化前後の植物体から展開葉を収集し、電解質漏出法により細胞の耐凍性の評価を行った。本実験では、組織に含まれる細胞の50%が傷害を受けたと推定される温度LT₅₀を植物体の耐凍性の指標とした。

(2) 試験管培養体由来の植物体を用いた可溶性タンパク質のプロテオーム解析

ニシユタカ、*S. acaule*、および *S. commersonii* を前述の方法で育成し、低温馴化前後の植物体の展開葉から可溶性タンパク質を抽出した。得られた可溶性タンパク質はトリプシンでゲル内消化し、Nano LC-ESI-LTQ orbitrap 質量分析計によるゲルフリーのショットガンプロテオーム解析を行った。MSおよびMS/MSのデータを用いてNCBIの *Solanum* 属のデータベースに対してMASCOTサーチをすることでタンパク質を同定し、Progenesis QIソフトウェア(Nonlinear Dynamics)によって同定したタンパク質の半定量解析を行った。

(3) 試験管培養体由来の植物体を用いた細胞膜タンパク質の組成分析

本実験では、明期20/暗期18での育成期間を4週間とした。低温馴化は、他の実験と同様の条件で行った。細胞膜は、低温馴化前後の植物体の展開葉から調製したマイクロソーム画分からデキストランとポリエチレングリコールを用いた水性二層分配を行うことで精製した。得られた細胞膜画分はSDS-PAGEによって組成比較を行った。

(4) 栽培種および耐霜性系統(野生種、育種系統)のミニチューバーの調整

多くのバレイシヨの耐霜性の研究は、試験管培養体由来の植物体を用いて行われてきた。しかし、それらの植物体の成長段階は、出芽直後のバレイシヨとは大きく異なる。早春期の霜害を模した耐霜性の評価系を確立するために、エアロポニックによってミニチューバーの作出を試みた。

材料には、ニシユタカ、*S. acaule*、*S. commersonii* に加えて、長崎県農林技術開発センターで作出された耐霜性育種系統を用いた。エアロポニックは、市販の噴霧式水耕栽培装置「ため太郎 AERO(京都ネット)」を用いて行った。水耕液にはOATハウス(OATアグリオ)肥料をA処方を用いた。育成は室温をおよそ23に維持した植物育成室で行い、光源として蛍光灯を用いた(14時間日長)。野生種については、塊茎肥大を誘導するため、着蕾後に日長を12時間に変更した。

4. 研究成果

(1) 試験管培養体由来の植物体の低温馴化による耐凍性変化及びタンパク質の組成変化

実験に用いたそれぞれの系統の低温馴化前後の LT₅₀ 値は、ニシユタカで-1.4 と-2.5、*S. acaule* で-3.3 と-4.8、*S. commersonii* で-3.7 と-5.8 であった。

ショットガンプロテオーム解析によって、369種の可溶性タンパク質の変動が明らかになった。実験に用いた耐霜性野生種の LT₅₀ 値は低温馴化前であっても-3以下であり、低温馴化したニシユタカよりも耐凍性が高かったことから、まず、低温馴化前後で共にニシユタカに比べて野生種で蓄積量の多いタンパク質に注目した。そのようなタンパク質は*S. acaule*では18種類、*S. commersonii*では26種類見出され、二つの野生種で共にニシユタカに比べて蓄積量が多かったのは、フルクトース二リン酸アルドラーゼ、ピルビン酸デヒドロゲナーゼ E1 のサブユニット、セドヘプツロース-1,7-ビスホスファターゼ、2-メチレン-フラン-3-オンレダクターゼ、トリオースリン酸イソメラーゼ、20 kDa シャペロニン、フルクトース-1,6-ビスホスファターゼの7種類であった。これらの多くは、エネルギー代謝に関わるものであるが、抗酸化物質であるフラネオール代謝に関わる2-メチレン-フラン-3-オンレダクターゼやシロイヌナズナホモログスーパーオキシドジスムターゼの活性化に参与することが示されているシャペロニンなど、抗酸化活性への関与が予想されるものについても増加が見られた。次に、ニシユタカ、*S. acaule*、*S. commersonii*のそれぞれについて、低温馴化で有意に量的な変化を示したタンパク質に注目した。低温馴化で有意に減少、もしくは増加したタンパク質数をまとめたベン図を図1に示す。低温馴化によって3種で共に、もしくは野生種2種で有意に減少するタンパク質は見られなかったが、2種類のタンパク質が3つのバレイショ種で、2種類のタンパク質が野生種2種で共に増加した。3種のバレイショで増加が見られたのは、ピルビン酸

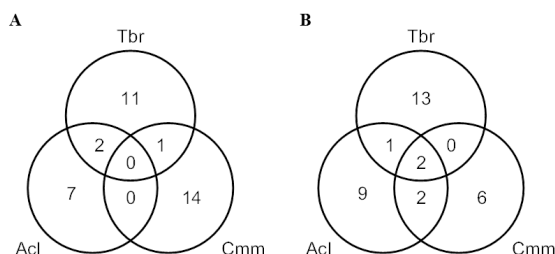


図1 各バレイショ種における低温馴化前後で有意に変動したタンパク質の種類数。(A)低温馴化で減少したタンパク質。(B)低温馴化で増加したタンパク質。Tbr: ニシユタカ; Acl: *S. acaule*; Cmm: *S. commersonii*。

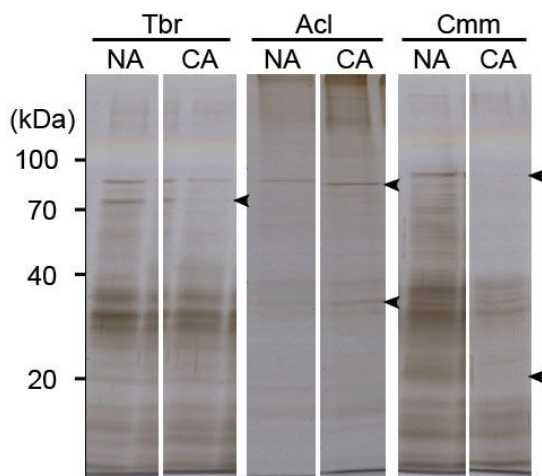


図2 低温馴化前後の細胞膜タンパク質組成比較。Tbr: ニシユタカ; Acl: *S. acaule*; Cmm: *S. commersonii*; NA: 低温馴化前; CA: 低温馴化後。矢頭は、馴化前後で量的な変化が見られたタンパク質バンドを示す。

キナーゼと光化学系 I の反応中心のサブユニットであり、野生種2種で増加が見られたのはプロトダーマルファクターとリン脂質-ヒドロペルオキシドグルタチオンペルオキシダーゼであった。リン脂質-ヒドロペルオキシドグルタチオンペルオキシダーゼは、脂質の過酸化抑制に関与することが示唆されており、バレイショの耐霜性の向上に、抗酸化作用が関与することが予想された。栽培種と耐霜性野生種の比較においても耐霜性への抗酸化作用の関与が示唆されていることから、今回検出されたタンパク質量を増加させることで、耐霜性を向上できる可能性がある。

細胞膜タンパク質については、低温馴化前後のニシユタカ、*S. acaule*、および *S. commersonii* の展開葉から調製し、SDS-PAGE で組成比較を行った(図2)。それぞれのバレイショ種において、低温馴化前後で大きな組成変化は見られなかったが、少数のタンパク質バンドの量的な変化が観察された。今後、質量分析によりこれらの量的な変化を示したタンパク質の同定を行う予定である。

(2) ミニチューバーの作出

ニシユタカのミニチューバーは、特段の工夫を必要とせずに前述の方法で作出することができた。後の実験材料として使用するためには、ミニチューバーのサイズを均一にそろえる必要があるが、塊茎が適当なサイズまで肥大したところで収穫することで、ほぼ均一なサイズのミニチューバーを準備できることを確認した。一方、耐霜性野生種である *S. acaule* および *S. commersonii* では、塊茎の肥大が開始するとされる着蕾期から日長を短日条件に変えてもミニチューバーの肥大を確認することはできなかった。そこで、長崎県農林技術開発センターで作出された耐霜性育種系統を用いてミニチューバーの作出を試みた。本系統は、ニシユタカと同様



図 3 エアロポニックで作出したミニチューバー。発芽誘導のため、浴光催芽を行っている。

の条件でミニチューバーを形成した(図 3)。しかしながら、植物体一株に 4 個程度の塊茎ができたのみで収量が非常に低く、今後、一株当たりの塊茎数を増やす方法を検討しなくてはならない。本研究では、ミニチューバーの作出が難航し、塊茎由来の早春の降霜を模した耐霜性評価系の確立には至らなかった。エアロポニックによる耐霜性系統のミニチューバーの作出は現在も試みており、十分な試料が準備でき次第、耐霜性試験を開始する予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Maya TAKEUCHI, Jun KASUGA (2018) Bark cells and xylem cells in Japanese white birch twigs initiate deacclimation at different temperatures. *Cryobiology* 80: 96-100 (DOI: 10.1016/j.cryobiol.2017.11.007). 査読有.

〔学会発表〕(計 1 件)

勝又理絵, 平土井悟, Jiwan P. Palta, 今井裕之, 上村松生, 波部一平, 坂本悠, 春日純. Comparative proteomics analysis of frost susceptible cultivated and tolerant wild potato leaves. 第 59 回植物生理学会年会 (2018).

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.obihiro.ac.jp/~plantphysiol/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

春日 純 (KASUGA, Jun)

帯広畜産大学・グローバルアグロメディシン研究センター・助教

研究者番号：4 0 4 5 1 4 2 1

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

上村 松生 (UEMURA, Matsuo)

岩手大学農学部・教授

研究者番号：0 0 2 1 3 3 9 8

茅野 光範 (KAYANO, Mitsunori)

帯広畜産大学・グローバルアグロメディシン研究センター・講師

研究者番号：2 0 5 9 0 0 9 5

(4) 研究協力者

ジワン・パルタ (Jiwan P. PALTA)

ウィスコンシン大学マディソン校農学生命科学部・教授