

平成22年 6月8日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20780229
 研究課題名（和文） 植物の凍結耐性に関与する細胞膜タンパク質の相互作用因子同定と機能解析
 研究課題名（英文） Identification and functional analysis of interacting factors with a protein involved in freezing tolerance in plant
 研究代表者
 山崎 誠和（YAMAZAKI TOMOKAZU）
 東北大学・大学院生命科学研究科・COEフェロー
 研究者番号：40400189

研究成果の概要（和文）：植物は、発芽した場所から動くことができない。目まぐるしく変わる周囲の環境から受けるストレスに耐える能力を進化の過程で獲得してきた。冬は、特に植物にとって厳しい環境である。日本を含む温帯地域やそれより北の地域では、冬の気温は氷点下を下回る。氷点下では、植物内の水が凍結し、致命的なダメージを受ける。本研究では、植物が凍結に耐える能力の一つに、傷害を受けた細胞膜を修復するメカニズムがあり、それに関わる分子を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Plants do not move after germination. However, they have acquired several capabilities to stand upon stresses in environment during their evolution. Winter season is very severe for plants. In the temperate zone, the temperature is lower than zero degree. In such subzero temperature, water is frozen in plant, which gives lethal damage upon plants. This study revealed a new molecular mechanism to stand upon freezing with repairing the ruptured the plasma membrane of cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,900,000	870,000	3,770,000
2009年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：境界農学・遺伝子資源

キーワード：植物環境適応、凍結耐性、細胞膜、タンパク質

1. 研究開始当初の背景

気温は、植物の生存にとって最も重要な環境要因の一つである。特に氷点下の環境では、植物体内の水が凍結することで植物に致命的な傷害が発生する。この様な冬に待ち受けている氷点下の過酷な環境を何かしらの方

法で植物は生きぬかなくてはならない。温帯以北に生育する植物の多くは、常に高い凍結耐性を持つわけではなく、秋や初冬の気温低下を感知し、冬の凍結に備えて高い凍結耐性を獲得する。この現象は低温馴化と呼ばれている。低温馴化では様々な生理的な変化が生

じる。例えば、遺伝子発現の消長やそれにもなう特異的なタンパク質の増減、可溶性糖やアミノ酸の一種プロリンの蓄積、さらには、小胞体の断片化などの細胞構造の変化が挙げられる。低温馴化でおこる生理的な変化の中でも特に細胞膜の脂質組成の変化は重要である。低温馴化では、細胞膜の脂質の飽和度が上昇することがわかっているが、それと相関するかたちで凍結下における細胞膜の傷害様式が変化する。低温未馴化の植物体を氷点下に曝し、植物体内の水が凍結した際の細胞膜を観察すると通常のラメラ構造だけではなく、シリンジが連なった様なヘキサゴナルIIと呼ばれる構造が認められる。このヘキサゴナルII構造は、低温未馴化の細胞膜に生じる傷害と考えられている。ところが、低温馴化後の植物では、そのような傷害は認められない。低温馴化では、細胞膜の脂質組成が変化し、不飽和度の高いリン脂質の割合が増加する。生体膜を構成するリン脂質の構造は、脂肪酸の不飽和度などと関係することから、低温馴化過程において細胞膜でおこるリン脂質の組成変化が、低温馴化後の高い凍結耐性獲得に重要だと考えられている。一方で、低温馴化過程では、細胞膜のタンパク質組成も大きく変化することがわかっていた。しかしながら、それら低温馴化過程で増減するタンパク質の凍結耐性における役割については、ほとんど明らかにされていなかった。

これまでにシロイヌナズナを用いた先行研究で、低温馴化で細胞膜への蓄積量が増大するタンパク質の中にカルシウム依存的な膜融合を制御するセンサータンパク質であるシナプトタグミン SYT1 が存在することが明らかになっていた。また、動物細胞では、シナプトタグミンの一種が破損した細胞膜を修復する細胞膜修復機構に関与していることが示されていた。それらを踏まえて、凍結耐性とカルシウムとの関係について解析を行ったところ、シロイヌナズナの凍結耐性にカルシウム依存性があり、それが、低温馴化後で劇的に増加することを明らかにした。さらに、SYT1 の RNAi 変異体株の作出を行い、SYT1 の発現量が低下した植物体における凍結耐性のカルシウム依存性について解析を行った。その結果、RNAi 変異体株ではカルシウム依存性が認められなかった。このことは、SYT1 の凍結耐性のカルシウム依存性への関与を強く示唆していた。このシロイヌナズナの凍結耐性のカルシウム依存性への細胞膜タンパク質 SYT1 の関与は、細胞膜の傷害をカルシウム依存的に認識・修復する細胞膜修復機構と極めて類似しており、これまでの研究結果は、植物細胞における細胞膜修復機構の凍結耐性への関与を強く示唆している。

2. 研究の目的

本研究では、凍結耐性のカルシウム依存性の鍵分子である SYT1 の相互作用因子を探索し、それらの凍結耐性への寄与を解析することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、細胞膜修復仮説をもとに鍵分子である SYT1 について、相互作用因子とそれらの凍結耐性における機能を解析する。これまでに知られている哺乳類のシナプトタグミンに関する知見から膜融合装置 SNARE タンパク質との相互作用が予測されるが、植物では実証例はなく、凍結耐性への関与も不明である。今回の研究期間内では、①相互作用因子をシロイヌナズナのゲノム情報と生化学的な手法を組み合わせることで、動物細胞との類似点と相違点を明らかにし、さらに、②同定した相互作用因子の凍結耐性のカルシウム依存性への寄与を遺伝学的な方法で解析することを予定していた。

4. 研究成果

研究の開始当初、細胞膜修復の凍結耐性への寄与は不明確であったため、初めに SYT1 が実際に細胞膜修復によって凍結耐性に寄与しているかどうかについて詳細な解析を行った。RNAi 変異体株を用いた解析では、SYT1 と凍結耐性のカルシウム依存性に関連性が見いだされた。また、T-DNA 挿入変異体株の植物体レベルにおける凍結耐性を電解質漏出法と再成長法によって評価したところ、どちらの場合でも低温馴化後の植物体で

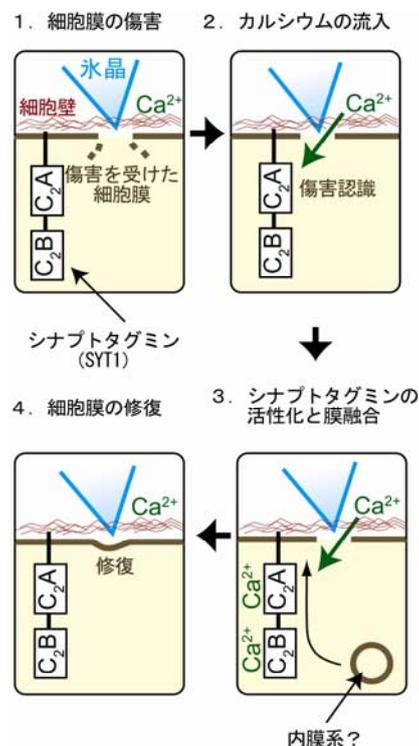


図1. シナプトタグミンの関与する凍結耐性のカルシウム依存性の分子機構のモデル

凍結耐性の低下が認められた。これは、RNAi 変異体株でも同様の結果であった。それらの結果は、SYT1 が細胞レベルだけでなく、植物体レベルでも凍結耐性に寄与していることを示唆している。また、細胞膜の凍結耐性への寄与を解析するために、SYT1 の C₂A ドメイン特異的な抗体を用いて、細胞レベルにおける凍結耐性を評価した。その結果、カルシウム依存的な凍結耐性は、細胞外への特異的抗体の添加によって阻害されることから、それが細胞膜の傷害が生じた後に発動する機構で、また、抗体が細胞膜を透過できないことをから、凍結によって破損した細胞膜の修復が起っていることを強く示唆している（雑誌論文：Yamazaki et al., Plant Cell 誌, 2008； 図 1）。この研究成果は、植物科学分野では最も権威のある Plant Cell 誌に掲載され、同誌の掲載号で重要な論文を紹介する In Brief でピックアップされたことなどから、当該分野における本研究のインパクトは非常に大きいと考えられる。

これらを踏まえて、SYT1 の更なる解析を行うために、特異的抗体や緑色蛍光タンパク質を用いた生化学的な解析を行った（雑誌論文：Yamazaki et al., Journal of Biological Chemistry, 2010、印刷中）。まず、SYT1 に緑色蛍光タンパク質を付加した融合タンパク質を発現するシロイヌナズナ形質転換体を作成し、その融合タンパク質の局在を免疫ブロット解析によって調べたところ、野生型の SYT1 と同様に細胞膜にのみ局在することがわかった。共焦点蛍光顕微鏡法による詳細な観察から、SYT1 は細胞内小器官の一つである小胞体で合成され、ゴルジ体、トランスゴルジを経て、細胞膜に輸送されることがわかった。シナプトタグミンは N 末端側に膜貫通ドメインを一つ、C 末端側に 2 つのカルシウム結合ドメイン（C₂A と C₂B）を持つが、トポロジー解析から、SYT1 も N 末端側は細胞質側に配向していることがわかった。次いで、SYT1 のアミノ酸配列を部分的に欠失するタンパク質をシロイヌナズナプロトプラストで発現させ、その局在性を調べた。解析の結果、C₂A と C₂B が並列に並んでいること、さらに、C₂B ドメインのカルシウム結合モチーフが細胞膜への局在に重要であることがわかった（図 2）。さらに、このことは、細胞膜のリン脂質もしくはタンパク質と相互作用していることを示唆する。

植物においては、これまでにいくつかのゲノムの全塩基配列が明らかになっている。データベースを BLAST 検索すると、SYT1 と相同なタンパク質をコードする遺伝子を多数同定することができた。シロイヌナズナには SYT1 と相同なタンパク質をコードする 3 つの相同な遺伝子が存在していた (SYT2, SYT4, SYT5)。得られた塩基配列をもとに分子系統

樹を作成したところ、大きく分けて 3 つのクレードに分類されることがわかった。興味深いことに、それらの SYT1 と相同なタンパク質のアミノ酸配列の中で、特に C₂B ドメインを比較すると、SYT1 の属するクレードにおいてのみカルシウム結合モチーフが欠失していることが明らかとなった。そこで、SYT1 の C₂B ドメインのカルシウム結合モチーフの欠失を補ったタンパク質に緑色蛍光タンパク質を連結した融合タンパク質をシロイヌナズナのプロトプラストでカリフラワーモザイクウイルスのプロモーターを用いて一過的に発現させると、細胞膜に局在していた SYT1 が内膜系に移行することがわかった。この変化は、植物のシナプトタグミンの分子進化の過程でおこっており、双子葉植物と単子葉植物の種分化の前に生じた変化であると考えられる。このことは SYT1 と細胞膜の相互作用が植物の進化の過程における高い凍結耐性の獲得に極めて役割を果たしたことを強く示唆する。

2 つ C2 ドメインと細胞膜との相互作用

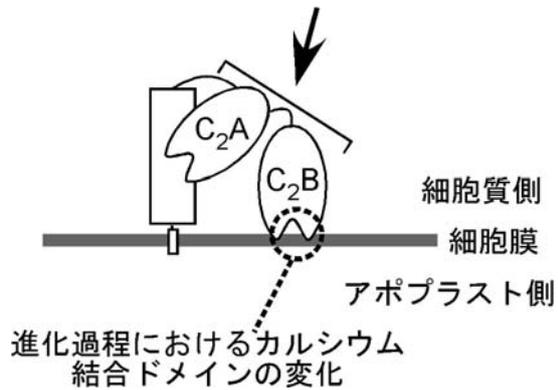


図 2. シナプトタグミン (SYT1) と細胞膜との相互作用の様式

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 6 件)

- ① 山崎 誠和、高田 直樹、上村 松生、河村 幸男 *Arabidopsis* synaptotagmin SYT1, a type I signal-anchor protein, requires tandem C2 domains for delivery to the plasma membrane. *Journal of Biological Chemistry*, 査読有、未定、2010 年、印刷中
- ② 金子 智志、山崎 誠和、上村 松生、河村 幸男 Generality of calcium-dependent freezing tolerance in plants. *Cryobiology and*

Cryotechnology、査読有、未定、2010年、印刷中

- ③ 上村 松生、南 杏鶴、山崎 誠和、河村 幸男 Freezing stresses in plants. Cryobiology and Cryotechnology、査読有、55巻、2009年、27-34
- ④ 山崎 誠和、河村 幸男、上村 松生 Extracellular freezing-induced mechanical stress and surface area reduction on the plasma membrane in cold-acclimated plant cells. Plant Signaling & Behavior、査読有、4巻、2009年、231-233
- ⑤ 山崎 誠和、河村 幸男、南 杏鶴、上村 松生、Calcium-Dependent Freezing Tolerance in *Arabidopsis* Involves Membrane Resealing via Synaptotagmin SYT1. Plant Cell、査読有、20巻、2008年、3389-3404
- ⑥ 山崎 誠和、河村 幸男、上村 松生 Cryobehavior of the plasma membrane in protoplasts isolated from cold-acclimated *Arabidopsis* leaves is related to surface area regulation. Plant Cell & Physiology、査読有、49巻、2008年、944-957

[学会発表] (計5件)

- ① 山崎 誠和、河村 幸男、上村松生 植物シナプトタグミンSYT1の細胞局在メカニズム 第51回日本植物生理学会大会、2010年3月18日-3月21日、熊本
- ② 山崎 誠和 植物の凍結耐性における細胞膜タンパク質の役割 植物生理若手の会2010(第29回講演会)-高等植物の環境ストレス適応戦略-、2010年3月18日、熊本
- ③ 金子 智志、山崎 誠和、上村 松生、河村 幸男 Generality of calcium-dependent freezing tolerance in plants. The 46th Annual Meeting of the Society for Cryobiology、2009年7月19日-23日、札幌
- ④ 河村 幸男、山崎 誠和、上村 松生 Plant freezing tolerance and calcium-dependent membrane resealing under freezing. The 46th Annual Meeting of the Society for Cryobiology、2009年7月19日-23日、札幌
- ⑤ 山崎 誠和、河村 幸男、南 杏鶴、上村松生 A plant synaptotagmin is involved in freezing tolerance. XVI Congress of the Federation of European Societies of Plant Biology 2008、2008年8月18日-8月22日、Tampere、Finland

[図書] (計2件)

- ① L. Gusta, M. Wisniewski and K. Tanino 編 上村 松生、南 杏鶴、山崎 誠和、古戸 あかり、河村 幸男 CAB International, Oxfordshire, Plant Cold Hardiness. Plasma Membrane Microdomains in association with Plant Cold Tolerance. 2009年、pp62-71、総ページ数317
- ② 岩手大学21世紀COEプログラム事業編 山崎 誠和、河村 幸男 東海大学出版会、温度と生命システムの相関学 第7章「凍結ストレスと植物の凍結耐性」2009年、pp139-162、総ページ数330

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者 山崎 誠和 (YAMAZAKI TOMOKAZU) 東北大学・大学院生命科学研究科・COEフェロー
研究者番号：40400189

(2) 研究分担者 ()

研究者番号：

(3) 連携研究者 ()

研究者番号：