

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580468

研究課題名(和文)植物種子に脱水耐性をもたらすゲノム機能の解明

研究課題名(英文)Dissection of the genome functions that confer the dehydration tolerance to plant seeds.

研究代表者

鷲尾 健司(Washio, Kenji)

北海道大学・地球環境科学研究科(研究院)・助教

研究者番号：50241302

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：種子は高等植物の主な繁殖手段であり、移動手段をもたない植物が生育に適さない環境を回避するのに秀でた手法である。種子は将来の植物体となる胚を含んでいるが、過去の研究において乾燥種子の細胞核に凝集するヌクレオソームや特殊なクロマチン構造を見出しており、これらの特徴は吸水後速やかに消失して脱水などに対する環境ストレス耐性も失われるので、植物種子にはゲノム機能を安定に保持する特別なしくみがあると想定した。シロイヌナズナ種子よりクロマチン成分を調整して高感度質量分析を実施したところ、先行する学術情報を支持発展させる特徴的な種子機能の制御因子や特殊なタンパク質修飾反応を検出することができた。

研究成果の概要(英文)：Seed formation is a survival strategy of higher plants that protect the juvenile embryo from unfavorable conditions and facilitates the dispersion of offspring into a new habitat. The chromatin structures play important roles in a variety of nuclear functions by influencing the assembly of nuclear factors through epigenetic modifications. In the pioneer works of plant seed science, the relationships between structure and function of seed nuclei have been well documented, and the microscopic analyses have confirmed morphological changes of chromatin structures between the quiescent and germinated embryos, including the highly condensed state of chromatin structures. These observations demonstrate that the protective mechanisms of genome integrity must be mobilized in the plant seeds. In this study, we have purified the chromatin components from Arabidopsis dry seeds and conducted the subproteome analyses by the use of 2D-PAGE in conjunction with mass spectrometric technology.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：境界農学・応用分子細胞生物学

キーワード：種子 細胞核 クロマチン ヒストン タンパク質修飾反応 成長制御 シロイヌナズナ 環境応答

1. 研究開始当初の背景

種子は高等植物の主な繁殖手段であり、水分含量を低く保ち代謝活性を極端に抑えることであたかも物質のような状態になって優れた環境ストレス耐性を獲得する。3 万年前の化石種子の組織再生に成功した報告もあり、通常の種子でも条件さえ良ければ数年間は発芽能力を維持できる。そのため移動手段をもたない植物が生育に適さない環境を回避するのに秀でた手法であり、陸上に進出した植物に現在の繁栄をもたらした大きな要因であるといえる。

種子は将来の植物体となる胚を成熟した状態で含んでいるが、種子の形成過程や保存期間に生じるゲノム DNA への損傷が胚の生存や寿命を大きく左右することが知られている。植物種子を取り扱った過去の研究では乾燥種子に特徴的な細胞構造を見出しており、特に遺伝情報が刻まれた DNA が存在する細胞核では凝集するヌクレオソームや特殊なクロマチン構造を確認している。これらの特徴は吸水後速やかに消失して脱水などに対する環境ストレス耐性も同時に失われるので、植物種子にはゲノム機能を安定に保持する特別なしくみがあると想定して本研究を計画した。

2. 研究の目的

種子の外観や特徴は植物の種類によって大きく異なるが、モデル植物 *Arabidopsis* を用いた研究により休眠維持や発芽制御、寿命決定などの種子機能を調節するしくみが理解されつつある。van Zanten 等は細胞イメージング操作により種子の形成に伴い細胞核の大きさが次第に縮小する現象を報告している。種子機能に異常がある様々な突然変異体の解析から種子の形成過程で見られる核サイズの変化は種子の休眠性とは連動しておらず、脱水耐性などの植物種子が普遍的にもつ細胞機能との関係性を指摘している。

動物細胞の研究では凝集クロマチン構造をもつゲノム DNA は γ 線や重金属、化学ストレスに対する耐性がより強くなることが知られており、植物種子で見られる核サイズの縮小はストレス耐性獲得の一環であると予測できる。細胞核ではクロマチン繊維や核ドメインを複雑に配置して、それらが動的に変化することで遺伝子機能を高次に調節している。クロマチン構造の基本単位であるヌクレオソームを構成するヒストンの成分変化や翻訳後に受ける修飾状態の変動が核内因子との相互作用を促してクロマチンの高次構造に影響を与えるので、近年の質量分析技術の普及により可能になったタンパク質分子の直接解析を *Arabidopsis* 種子より調整したクロマチン成分に施すことで、植物種子が示す特徴的な核構造の変化と機能性との関係を検証することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 種子クロマチン成分の調整

DNA はマイナスの電荷を帯びた長大な生体高分子であるが、プラスに帯電した H2A, H2B, H3, H4 が 2 組ずつ組み合わさったコアヒストンを巻くことで安定なヌクレオソーム構造を形成する。さらに個々のヒストンが様々なタンパク質修飾反応を受けることで核内構造に変化を引き起こす。

過去の研究では実験対象である *Arabidopsis* を実験室条件下で栽培した場合にタンパク質分解や回収率の低下でクロマチン成分の調整に不具合が生じる報告があったので、細胞内のタンパク質の修飾状態を保ったままで分析に供する必要がある現代の実験手法に適合させるため、過去の文献情報をよく検証して種子クロマチン成分の調整法の再検討を行った。

(2) 種子ヒストンの精製

様々な保護剤の存在下で細胞を破碎した後、遠心分離にて粗核画分を得た上で強力なタンパク質変性剤であるグアニジン塩酸で核タンパク質の可溶化を行い、塩酸処理によって酸不溶性のタンパク質を除去した上澄み溶液にコアヒストンを含むクロマチン成分を回収した。更に Bio-Rad 社の Bio-Rex 70 を用いた弱酸性陽イオン交換カラムを利用してヒストン画分の精製を行った。

(3) 種子ヒストンの単離と質量分析

得られたタンパク質試料は Triton X-100/酢酸/尿素ゲルを 1 次元に用いた 2 次元電気泳動により個々の成分に分離した。各々のタンパク質スポットを切り出してトリプシン消化を施した後、得られたペプチド断片を Thermo 社の nano-LC/orbitrap-MS を利用した高感度微量質量分析に供することでアミノ酸配列の同定とタンパク質修飾状態を把握するための質量分析データを取得した。得

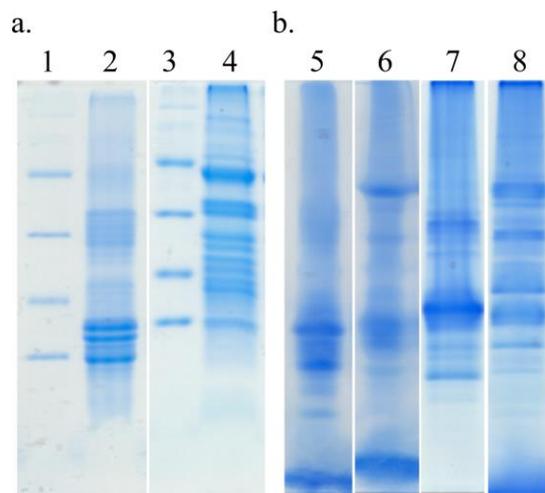


Figure 1. *Arabidopsis* histones purified from the dry quiescent seeds.

a) 15% SDS-PAGE

1, molecular weight marker; 2, calf thymus histones; 3, molecular weight marker; 4, *Arabidopsis* seed histones

b) 15% Acetic acid/Urea PAGE without (5, 7) or with Triton X-100 (6, 8)

5 and 6, calf thymus histones; 7 and 8, *Arabidopsis* seed histones

られた MS/MS データを利用して Proteome Discoverer, Mascot Software を用いたデータベース検索を行い、Arabidopsis 種子に含まれるクロマチン成分の同定と特徴を把握した。

4. 研究成果

(1) 種子クロマチン成分調整法の検討

種子は極度に乾燥しており強度も高いので細胞成分をうまく抽出するためには効率的な細胞破碎法の検討が必要になる。様々な手法の検討の結果、液体窒素で凍結した種子をテフロンカプセル内で金属球の高速往復運動で粉末化することで比較的良好的な粗核画分を得ることができた。強力なタンパク質変性剤であるグアニジン塩酸で核タンパク質の可溶化を行い、塩酸処理にて酸不溶性のタンパク質を除去した上澄み溶液にコアヒストンを含むクロマチン成分を回収した。

更に Bio-Rad 社の Bio-Rex 70 を用いた弱酸性陽イオン交換カラムを用いてヒストン画分の精製を行った。タンパク質試料の濃縮には通常 TCA 沈澱などを利用するが、植物ヒストンを扱う場合に高分子成分が消失する報告があったので、限外濾過膜を利用した遠心濃縮操作により最終的な分析試料を取得した。これら一連の実験操作で少量の種子サンプルから十分量のクロマチン成分を再現性良く調整できる実験系を確立できた(Fig. 1a)。

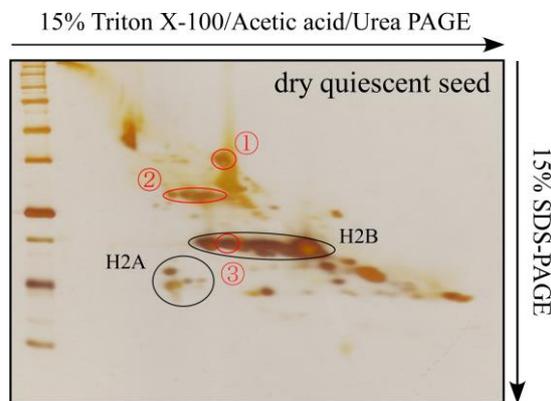


Figure 2. 2-D PAGE of the chromatin components purified from Arabidopsis dry quiescent seeds.

- ① monoubiquitinated histone H1-1 and H1-2
- ② monoubiquitinated histone H2B
- ③ PEBP family proteins

(2) 種子ヒストンの単離精製

通常の 2 次元電気泳動では 1 次元目に等電点電気泳動を 2 次元目に SDS-PAGE を行い個々のタンパク質スポットに分離するが、酸性の DNA 分子と相互作用するヒストンは塩基性の性質が強いため pI は著しく高くなり通常の等電点電気泳動では分離は困難となる。Triton X-100/酢酸/尿素ゲルは塩基性タンパク質を変性状態でアミノ酸残基の電荷の違いに応じて明確に分離できる電気泳動法である(Fig. 1b)。ゲル中に含まれる Triton X-100 と尿素がタンパク質分解酵素の活性を阻害する危険性があるので、スポット回収後

に行うトリプシン処理を考慮して 1 次元目に Triton X-100/酢酸/尿素ゲルを 2 次元目に SDS-PAGE を採用した。この実験系を用いて Arabidopsis, Columbia 株の乾燥種子より調整したクロマチン成分を分離してみると約 60 前後のタンパク質スポットを検出することができた(Fig. 2)。

(3) 種子クロマチン成分の質量分析

個々のタンパク質スポットを切り出してトリプシン消化を施した後、得られたペプチド断片を高感度質量分析に供することで質量分析データを順次取得した。解析ソフトを用いてデータベース検索することで個々のタンパク質スポットの同定と翻訳後に受けている修飾状態を把握した。

また塩基性タンパク質であるヒストンにはタンパク質分解に用いたトリプシンの標的アミノ酸である lysine が数多く含まれているので、消化後のペプチド断片が小分子化して質量分析が困難になる場合が多い。これらの対処として propionic anhydride による処理により lysine 残基を予め propionyl 化しておき arginine 残基だけでトリプシン分解がおこるようにした反応系も併用して質量分析を進めた。

(4) 研究結果と今後の展望

解析の結果 Arabidopsis の種子には特定のヒストン亜種(H2A, H2B)が特徴的な修飾反応を受けた状態で存在することが分かった(Fig. 2)。また H1, H2B に関してはモノユビキチン化された融合タンパク質を検出しており、突然変異体を用いた遺伝学的解析で同定されたヒストンのユビキチン修飾を介して種子の休眠性や核構造の動態を調節するとされている Histone Mono Ubiquitination 1 and 2 (HUB1/2)の種子機能に関わる実作用を検証する実験系を提供できそうである。

更に PEBP family proteins が生理代謝活動をほとんど行っていない乾燥種子に豊富に蓄積していることも分かった。PEBP family proteins は小分子の核内タンパク質であり、植物の成長調節や発生段階に重要な働きをすることが知られているが、実際の機能についてはよく理解されていない。今回の研究によりヒストンと生化学的な挙動を同じにして休止状態にある乾燥種子に豊富に存在することが分かったので、核内構造の構築や維持に関与する可能性を強く示唆している。

最後に同定された種子クロマチン成分は発芽の進行に伴い大きく変動するようなので、今後は得られた分子情報を利用して休眠維持、発芽制御、寿命決定などの種子の機能性との関連付けや性質の異なる他の植物種と比較することで、植物種子がもつ優れた環境適応能力を深く追及してゆく予定である。

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 7 件)

- ① Washio K. The chromatin structure and seed function of land plants. *Int J Plant Biol & Res*, 査読あり, 2: 1004 (2014)
<http://www.jsccimedcentral.com/PlantBiology/index>
- ② Kaneko K, Washio K., Umezawa T, Matsuda F, Morikawa M, Okino T. cDNA cloning and characterization of vanadium-dependent bromoperoxidases from the red alga *Laurencia nipponica*. *Biosci Biotechnol Biochem*, 査読あり, 78: 1-10 (2014)
DOI: 10.1080/09168451.2014.918482
- ③ Washio K. The prediction of climate change and rice production in Japan. *J Rice Res*, 査読あり, 2: e103 (2013)
DOI: 10.4172/jrr.1000e103
- ④ Iijima S, Okahara R, Washio K., Morikawa M. Unique microbiological characteristics of *Pseudoalteromonas* spp. that form biofilms in the sea water environment. *Bull Soc Sea Water Sci Jpn*, 査読あり, 66(4): 186-190 (2012)
DOI: 10.11457/swsj.66.186
- ⑤ Shimada K, Itoh Y, Washio K., Morikawa M. Efficacy of forming biofilms by naphthalene degrading *Pseudomonas stutzeri* T102 toward bioremediation technology and its molecular mechanisms. *Chemosphere*, 査読あり, 87(3): 226-233 (2012)
DOI: 10.1016/j.chemosphere.2011.12.078
- ⑥ Washio K., Lim SP, Roongsawang N, Morikawa M. A truncated form of SpoT, including the ACT domain, inhibits the production of cyclic lipopeptide arthrfactin, and is associated with moderate elevation of guanosine 3',5'-bispyrophosphate level in *Pseudomonas* sp. MIS38. *Biosci Biotechnol Biochem*, 査読あり, 75(10): 1880-1888 (2011)
DOI: 10.1271/bbb.110042
- ⑦ Roongsawang N, Washio K., Morikawa M. Diversity of nonribosomal peptide synthetases involved in the biosynthesis of lipopeptide biosurfactants. *Int J Mol Sci*, 査読あり, 12(1): 141-172 (2011)
DOI: 10.3390/ijms12010141

[学会発表] (計10件)

- ① 金子賢介、鷺尾健司、梅澤大樹、松田冬彦、森川正章、沖野龍文. 紅藻ウラボソ *Laurencia nipponica* 由来バナジウム依存型プロモペルオキシダーゼの性状解析、平成26年度日本水産学会春季大会、2014年3月30日、北海道大学函館キャンパス、函館市
- ② Kaneko K, Washio K., Umezawa T, Matsuda F, Morikawa M, Okino T. Vanadium dependent

bromoperoxidase from the red alga *Laurencia nipponica*. 14th

- International Symposium on Marine Natural Products, 16th Sep 2013, Hotel Hesperia La Toja, Galicia, Spain
- ③ 湯曉蓉、金子賢介、鷺尾健司、森川正章、沖野龍文. 紅藻ミツデソソ *Laurencia okamurae* のバナジウム依存型プロモペルオキシダーゼの性質、日本化学会北海道支部2013年夏季研究発表会、2013年7月20日、北見工業大学、北見市
- ④ 金子賢介、鷺尾健司、梅澤大樹、松田冬彦、森川正章、沖野龍文. 紅藻ウラボソ *Laurencia nipponica* 由来バナジウム依存型プロモペルオキシダーゼの性状解析、第15回大会マリンバイオテクノロジ学会大会、2013年6月1日、沖縄県市町村自治会館、那覇市
- ⑤ 金子賢介、鷺尾健司、森川正章、沖野龍文. 紅藻ウラボソ (*Laurencia nipponica*) 由来のハロゲン化酵素の解析、日本農芸化学会2012年度大会、2012年3月24日、京都女子大学、京都市
- ⑥ 金子賢介、鷺尾健司、梅澤大樹、森川正章、松田冬彦、沖野龍文. 紅藻ウラボソ (*Laurencia nipponica*) 由来の臭素付加酵素の解析、第7回化学生態学研究会、2012年6月29日、湯の川プリンスホテル、函館市
- ⑦ Kaneko K, Washio K., Umezawa T, Morikawa M, Matsuda F, Okino T. Study on bromination enzyme from the red alga *Laurencia nipponica*. Gordon Research Conferences, Marine Natural Products, oral, 27th Feb 2012, Ventura Beach Marriott Hotel, CA, USA
- ⑧ Kaneko K, Washio K., Umezawa T, Morikawa M, Matsuda F, Okino T. Study on bromination enzyme from the red alga *Laurencia nipponica*. Gordon Research Conferences, Marine Natural Products, poster, 26th Feb - 2nd Mar 2012, Ventura Beach Marriott Hotel, CA, USA
- ⑨ 森川正章、栄木悠、柞木田なつみ、鷺尾健司. *Marinobacter* 属細菌と共存する新属海洋細菌の混合バイオフィルム形成、第63回日本生物工学会大会、2011年9月26-28日、東京農業大学小金井キャンパス、小金井市
- ⑩ 金子賢介、鷺尾健司、沖野龍文. 紅藻ウラボソ由来の Laurencin のハロゲン化酵素、第6回化学生態学研究会、2011年6月17日、湯の川プリンスホテル、函館市

[その他]

ホームページ等
<http://noah.ees.hokudai.ac.jp/emb/HP/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鷺尾 健司 (Washio Kenji)
北海道大学・地球環境科学研究所・助教
研究者番号: 50241302