

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：11201

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24370018

研究課題名(和文)細胞膜の不均質性の意義：低温環境応答機構への関与を例として

研究課題名(英文)Involvement of plasma membrane microdomains in plant cold acclimation

研究代表者

上村 松生 (UEMURA, MATSUO)

岩手大学・農学部・教授

研究者番号：00213398

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、「細胞膜の不均質性」の環境ストレス応答機構への関与を調べる目的で、低温馴化過程で細胞膜マイクロドメイン組成の変動と細胞膜マイクロドメイン・低温応答性タンパク質が凍結耐性増大に果たす機能を解析した。その結果、1)細胞膜マイクロドメインプロテオームやリポドームは低温馴化過程で動的に変動し、しかも、種間の凍結耐性の違いに応じた特徴的な変動があること、2)エンドサイトーシスに關与するダイナミン様タンパク質1Eが凍結耐性増大に機能的に關与していること、そして、3)GPIアンカー型タンパク質・グルカナーゼ様タンパク質も細胞間物質輸送を介して凍結耐性増大に關与していることなどを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The aims of this study were to determine the involvement of plasma membrane heterogeneity in plant cold acclimation. Specifically, responses of plasma membrane microdomains to cold acclimation were investigated. We found that 1) proteomes and lipidomes of the plasma membrane microdomain from various plant species show considerably dynamic responses to cold acclimation but the responses in some parts were related to differences in the extent of cold acclimation capability of the species used, 2) dynamin-like protein 1E, a cold-responsible microdomain protein, was contributed to the increase in freezing tolerance probably via plasma membrane rearrangement through endocytosis process, and 3) a cold-responsible GPI-anchored protein, beta-1,3-glucanase like protein, was also a component associated with cold acclimation probably in controlling the callose deposition and the intercellular transport system through plasmodesmata.

研究分野：植物

キーワード：細胞膜 マイクロドメイン 低温応答 プロテオーム リポドーム タンパク質機能解析

1. 研究開始当初の背景

高等植物の多くは「移動しない」生活を選択し、多様な環境条件下で生きる戦略を獲得してきた。平均気温が上昇する地球温暖化時代にあっても、頻繁に起こる急な温度変化や、早霜や晩霜に対応するために必要な凍結耐性は重要な形質と考えられる。一方、温帯以北に生育する植物は、生存に不可欠な凍結耐性を低温に一定期間暴露されることにより獲得する(低温馴化)。低温馴化過程では、凍結傷害の初発部位である細胞膜の構造・機能の凍結下での安定性を維持するため、細胞膜に大幅な組成改変が起こることが多様な研究により証明されている。

最近、細胞膜の「不均質性」が多様な生物反応に重要な意味を持つことが明らかになってきた。つまり、細胞膜がリン脂質に富んだ流動的な領域にスフィンゴ糖脂質とステロール脂質に富んだ比較的固い微小領域(マイクロドメイン)を有し、この領域には、信号伝達、膜輸送、細胞骨格、膜融合といった重要な機能を担うタンパク質群が局在しているという事実である。しかし、細胞膜の不均質性と非生物学的ストレス応答機構の関係は未解明で、細胞膜が果たす凍結耐性機構への重要な役割を考えると、凍結耐性機構を例として細胞膜不均質性の持つ意味を探る研究は重要と考えられる。

当研究室では、植物細胞膜マイクロドメインと低温馴化機構の関連を調べてきた。ステロール脂質とスフィンゴ糖脂質(グルコセレブロシド)に富んだシロイヌナズナ細胞膜マイクロドメインは、低温刺激に応答し、膜輸送やエンドサイトーシス関連タンパク質や細胞骨格系タンパク質を変動させ、低温で起こる動的な細胞膜改変に深く関わっていることを提案した。しかし、細胞膜マイクロドメインが果たすタンパク質機能の「発現の場」としての凍結耐性機構への関与に関しては明らかになっていない。そこで、温帯性植物の生存と生産性を維持するために必須である凍結耐性機構を理解するためには、細胞膜マイクロドメインの機能を解析し、マイクロドメインが果たす細胞膜構造・機能に関する基盤的情報を得ることが必要であると考へ、本研究を立案した。

2. 研究の目的

本研究は、「細胞膜の不均質性」と環境ストレス応答機構との関係を理解することを目的とする。具体的には、細胞膜が第一義的な役割を果たし、植物の生存と生産性を支配する重要な要因である凍結耐性形質を取り上げ、凍結傷害発生回避に関わる細胞膜の機能的貢献について細胞膜マイクロドメイン脂質とタンパク質の組成と機能の面から理解することである。研究結果から、低温応答が起こる「反応場」としてのマイクロドメインの機能とマイクロドメインで働く膜輸送

系タンパク質による低温馴化過程における細胞膜改変機能を通じた凍結傷害発生の回避と凍結耐性の増大に果たす細胞膜マイクロドメインの重要性を明らかにする。

3. 研究の方法

本研究では、上記の研究目的を達成するため、以下のように研究を実施した。

(1) 植物材料として、単子葉植物で凍結耐性が大きく異なるライムギ(*Secale cereale* L. cv. Maskateer)とカラスムギ(*Avena sativa* L. cv. New Almighty)さらには、シロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana* L. ecotype Columbia)を用いた。ライムギ及びカラスムギは18°C(16時間日照)、シロイヌナズナは23°C(24時間日照)で育てられ、一定期間後に低温馴化処理(2°C、12時間日照)され、各実験に用いられた。

(2) 細胞膜および細胞膜マイクロドメインを単離精製した後、細胞膜マイクロドメインの脂質及びタンパク質組成を網羅的に解析し、低温馴化前後及び植物種間での比較を行った。

(3) シロイヌナズナ細胞膜マイクロドメインに存在する低温応答性タンパク質(DRP1E, Dynamin-Related Protein 1E)の低温馴化過程における機能を解析した。

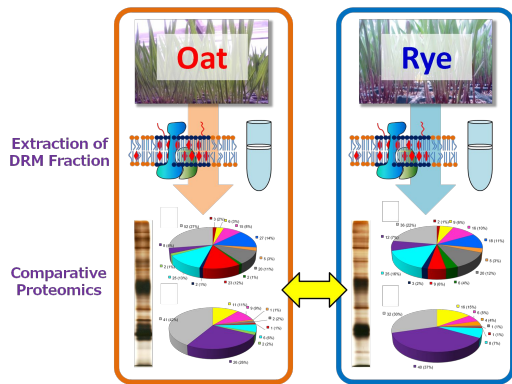
(4) 細胞膜に存在する GPI アンカー型タンパク質の網羅的組成解析を行い、Glycosylphosphatidylinositol アンカー型タンパク質(GPI-AP)の細胞内分布や低温馴化応答性などを解析した。さらに、低温に応答する GPI-AP(β -1,3-glucanase-like protein)の低温馴化過程における機能を解析した。

(5) マイクロドメイン脂質組成の凍結耐性機構に対する関与を調べるため、ステロール除去機能を持つ Methyl- β -cyclodextrin (M β CD) を単離プロトプラストに処理し、その後の凍結耐性を測定する実験系の確立を試みた。

4. 研究成果

(1) 細胞膜マイクロドメインプロテオーム: マイクロドメイン画分のショットガンプロテオーム解析により、カラスムギとライムギでそれぞれ、213種、219種の細胞膜マイクロドメインタンパク質を同定し、細胞膜マイクロドメインタンパク質の網羅的解析を可能にした細胞膜マイクロドメインには様々なトランスポーターやシグナル伝達関連タンパク質が存在し、双子葉植物である *Arabidopsis* とかなりの共通性が見られた。一方、低温馴化過程では ATPase や Aquaporin などのタンパク質の蓄積量の変動していた。興味深いことに、GPI-AP は凍結耐性の高いライムギにおいて増加し、凍結耐性の低いカラスムギでは変動が見られなかった。このことからマイクロドメインタンパク質は低温馴化に応答し、それらの変動パターンは凍結

耐性に関連していることが示唆された。



(2) 細胞膜マイクロドメインリポドーム：主要な結果は、細胞膜マイクロドメインにはステロール脂質、スフィンゴ脂質、および飽和型アシル基を持つリン脂質の含量が細胞膜（平均）よりも高いこと、ライムギの主要なステロール脂質が遊離型であるのに対し、カラスムギではアシル基結合型ステロール配糖体であること、そして、低温馴化過程におけるステロール脂質とスフィンゴ脂質の変動パターンがライムギとカラスムギで異なっていること、などを見いだした。これらの結果は、細胞膜マイクロドメインの熱力学的特性や生理学的機能、さらには両種の凍結耐性の違いにも影響を与えているものと考えられた。

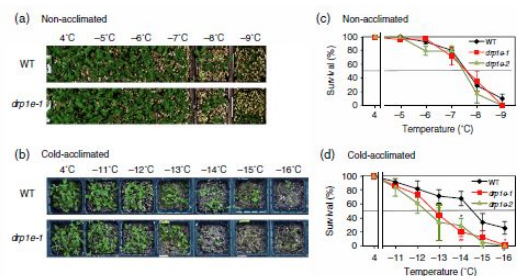
Lipid	PM		DRM	
	NA (n = 4)	CA (n = 3)	NA (n = 4)	CA (n = 5)
Sterols	39.2 ± 2.1 (105 ± 16)	40.1 ± 1.8 (122 ± 42)	63.8 ± 4.6 (156 ± 64)	64.5 ± 3.3 (190 ± 37)
FS	32.9 ± 1.9 (87 ± 13)	33.8 ± 5.0 (100 ± 22)	50.5 ± 2.4 (123 ± 48)	51.7 ± 4.1 (153 ± 36)
ASG	2.9 ± 1.5 (8 ± 4)	2.9 ± 2.3 (10 ± 11)	9.6 ± 1.1 (24 ± 10)	5.8 ± 2.3* (16 ± 4)
SG	3.2 ± 1.1 (10 ± 4)	3.4 ± 2.5 (12 ± 12)	3.7 ± 1.5 (9 ± 6)	6.9 ± 1.2* (20 ± 6*)
GlcCer	13.4 ± 1.5 (34 ± 2)	7.8 ± 1.8* (25 ± 14)	15.6 ± 3.7 (37 ± 17)	14.4 ± 3.1 (42 ± 11)
PLs	48.0 ± 0.9 (128 ± 17)	52.1 ± 0.7* (158 ± 52)	20.6 ± 1.0 (48 ± 15)	21.2 ± 3.0 (64 ± 29)
Total	100 (267 ± 28)	100 (305 ± 87)	100 (241 ± 79)	100 (296 ± 61)

Lipid	PM		DRM	
	NA (n = 3)	CA (n = 4)	NA (n = 3)	CA (n = 5)
Sterols	42.6 ± 3.1 (96 ± 23)	37.7 ± 2.5 (70 ± 10)	73.6 ± 3.8 (175 ± 37)	66.0 ± 3.7* (188 ± 28)
FS	10.2 ± 2.5 (22 ± 4)	7.4 ± 0.7* (14 ± 1*)	21.1 ± 2.5 (50 ± 6)	14.4 ± 2.8* (40 ± 6)
ASG	28.5 ± 2.2 (65 ± 18)	24.8 ± 2.4 (46 ± 8)	50.3 ± 4.2 (121 ± 32)	48.7 ± 2.6 (139 ± 25)
SG	3.9 ± 1.2 (9 ± 4)	5.6 ± 1.1 (10 ± 2)	2.2 ± 0.8 (5 ± 1)	2.9 ± 0.7 (8 ± 3)
GlcCer	15.5 ± 0.7 (35 ± 8)	12.6 ± 0.9* (24 ± 6)	15.0 ± 4.2 (35 ± 10)	18.3 ± 4.7 (53 ± 22)
PLs	41.9 ± 1.2 (94 ± 22)	49.7 ± 2.2* (94 ± 19)	11.4 ± 1.0 (28 ± 11)	15.7 ± 0.8* (46 ± 12)
Total	100 (225 ± 41)	100 (188 ± 29)	100 (238 ± 42)	100 (287 ± 48)

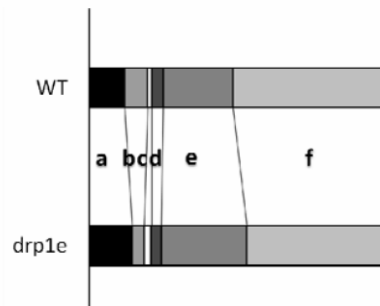
表：ライムギ（上）とカラスムギ（下）の細胞膜および細胞膜マイクロドメインの脂質組成

(3) DRP1E の低温馴化機構への関与：低温馴化過程で細胞膜マイクロドメイン中に誘導されるエンドサイトーシス関連のダイナミン様タンパク質（DRP1E）発現変異シロイ

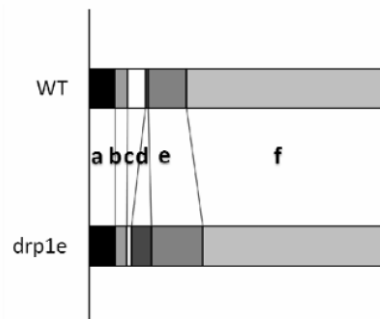
ヌナズナ（欠損体と相補発現体）を使い、凍結耐性や細胞膜プロテオームに与える DRP1E の影響を解析した。その結果、低温馴化後、DRP1E 欠損体では凍結耐性が野生型と同程度まで上昇しないこと、および、細胞膜プロテオームにおいても、特異的に DRP1E 欠損によって低温誘導性変動が押さえられるものが存在すること、さらには、DRP1E 欠損体に野生型 DRP1E 遺伝子を相補したものでは、低温馴化による凍結耐性上昇が野生型と同程度であることも明らかになった。また、生化学的および細胞学的に解析により DRP1E タンパク質は細胞膜に局在していることも観察できた。以上の結果から、DRP1E タンパク質が関わる低温下でのエンドサイトーシス系により細胞膜プロテオーム変化の一部が制御されており、それが機能しない場合に凍結耐性の上昇が十分に起こらないことが考えられた。



i) Cold-increased plasma membrane proteins



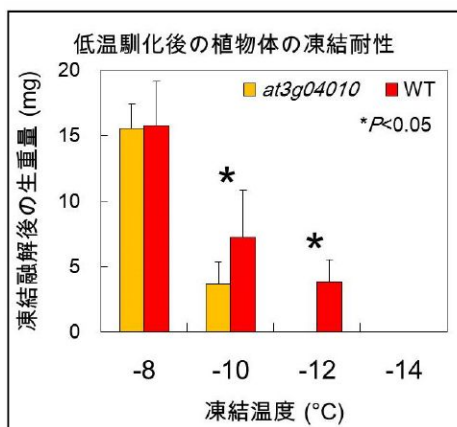
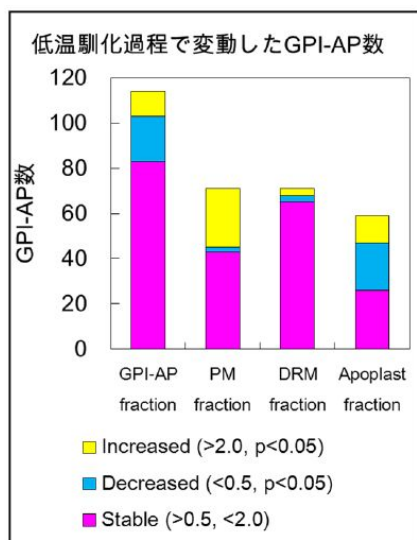
ii) Cold-decreased plasma membrane proteins



- membrane transport (a)
- vesicle trafficking (b)
- cytoskeleton (c)
- plasma membrane and cell wall reconstruction (d)
- signal transduction (e)
- others (f)

図：(上) 野生型 (WT) と DRP1E 欠損体の凍結耐性。(下) drp1e 変異体と野生型 (WT) の若い葉で見られる低温応答性タンパク質

(4) GPI アンカー型タンパク質の網羅的解析と β -1,3-glucanase-like protein の低温馴化過程への関与: 次に、植物の低温馴化機構との関係が全く調べられていなかった GPI アンカー型タンパク質について、シロイヌナズナ細胞膜画分を用いた網羅的同定および低温馴化過程における変動の検出を試みた。その結果、163 種の GPI-AP が同定され、多くの GPI-AP が低温馴化処理により増減していることを明らかにした。その中から、低温馴化に応答して発現量が増加する GPI-AP として β -1,3-glucanase-like protein (At3g04010) を選び出し解析を進めた。低温馴化後の At3g04010 ノックダウン変異体は野生型よりも凍結耐性が低かった。また、At3g04010 は維管束組織などの物質輸送に関与する組織で強く発現する遺伝子であった。さらに、低温馴化過程でカロースが原形質連絡系周辺に多く蓄積すること、などを見いだした。これらの結果は、低温馴化過程においてカロースが分解されることが原形質連絡系を介した物質輸送等に重要であることを示唆して



いるものと考えられる。

(5) その他の結果: 特異的ステロール除去剤 β CD により細胞膜ステロール脂質を除去、あるいは、含量低下させた場合の細胞の凍結耐性、凍結融解過程における細胞膜の挙動、さらには、細胞膜マイクロドメインタン

パク質の局在に対する影響を調査するための実験条件を検討したが、条件確立までには至らなかった。その理由として、 β CD 処理後の細胞膜単離および脂質抽出が十分その後の解析に耐えられる量的及び質的保証が得られなかったことがあげられる。さらに条件検討を進める必要がある。

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 30 件) 全て査読有り

Takahashi D, Imai H, Kawamura Y, Uemura M. 2016. Lipid profiles of detergent resistant fractions of the plasma membrane in oat and rye in association with cold acclimation and freezing tolerance. *Cryobiology* 72: 123-134 (doi:10.1016/j.cryobiol.2016.02.003)

Minami A, Furuto A, Kondo M, Kawamura Y, Uemura M. 2015. *Arabidopsis* plasma membrane microdomain protein, dynamin-related protein 1E, controls plasma membrane protein accumulation and is associated with freezing tolerance. *Plant Journal* 83: 501-514 (doi: 10.1111/tpj.12907)

Takahashi D, Kawamura Y, Uemura M. 2013. Changes of detergent-resistant plasma membrane proteins in oat and rye during cold acclimation. *Journal of Proteome Research* 12: 4998-5011. (doi: 10.1021/pr400750g)

Takahashi D, Kawamura Y, Yamashita T, Uemura M. 2012. Detergent-resistant plasma membrane proteome in oat and rye: similarities and dissimilarities between two monocotyledonous plants. *Journal of Proteome Research* 11: 1654-1665. (doi: dx.doi.org/10.1021/pr200849v)

Li B, Takahashi D, Kawamura Y, Uemura M. 2012. Comparison of plasma membrane proteomic changes of *Arabidopsis* suspension cells (T87 line) after cold and abscisic acid treatment in association with freezing tolerance development. *Plant and Cell Physiology* 53: 542-554. (doi: 10.1093/pcp/pcs010)

[学会発表] (計 114 件)

Uemura M. 2015. Plant strategies for survival in changing environment: adaptation to low temperature. *VICCA Conference on Plant Growth, Nutrition & Environment Interaction* (Vienna, Austria, June 25-26) (Invited talk)

Uemura M, Takahashi D, Nakayama T, Miki Y, Kawamura Y. 2014. Plasma membrane proteome dynamically and strategically responds to cold acclimation in plants. *6th International Symposium on Frontiers in*

Agricultural Proteome Research (Harbin, PRC, June 23-27) (Invited talk)

Tominaga Y, Kawamura Y, Uemura M. 2014. *In planta* monitoring of the regulation of cold-responsive genes under various temperatures and photoperiods. *10th International Plant Cold Hardiness Seminar* (Poznan, Poland, Aug 18-21) (Invited talk)

Nakayama T, Takahashi D, Kawamura Y, Uemura M. 2013. Cold-acclimation-induced changes of plasma membrane proteome in *Brachypodium distachyon*. *12th International Wheat Genetics Symposium* (Yokohama, Japan, September 8-14) (Invited talk)

Uemura M, Minami A, Kondo M, Miki Y, Kawamura Y. 2013. Plasma membrane plays a key role in plant cold acclimation/deacclimation: a proteomics perspective. *Chunnum National University Plant Stress Adaptation Symposium* (Kwangju, Korea, May 15) (Invited talk).

〔図書〕(計8件)

Shinozaki K, Uemura M, Bailey-Serres J, Bray EA, Weretilnyk E. 2015. Responses to abiotic stress. *In: Biochemistry and Molecular Biology of Plants*, 2nd Ed (Buchanan BB, Gruissem W, Jones RL and Vickers K, eds), John Wiley & Sons, Hoboken NJ, pp 1051-1100 (ISBN: 978-0-470-71422-5).

Takahashi D, Li B, Nakayama T, Kawamura Y, Uemura M. 2014. Shotgun proteomics of plant plasma membrane and microdomain proteins using nano-LC-MS/MS. *In: Methods in Molecular Biology (Plant Proteomics: Methods and Protocols*, 2nd Ed, Novo JVJ, Komatsu S, Weckwerth W, Wienkoopeds S, eds) vol 1072, Springer Science+Business Media, LLC, New York, NY, pp 481-498 (ISBN-13: 978-1-62703-630-6)

Takahashi D, Nakayama T, Miki Y, Kawamura Y, Uemura M. 2014. Proteomic approaches to identify cold regulated plasma membrane proteins. *In: Methods in Molecular Biology (Plant Cold Acclimation: Methods and Protocols*, Hinch DK, Zuther E, eds), Springer Science+Business Media, LLC, New York, NY, vol 1166, pp 159-170 (ISBN-13: 978-1-4939-0844-8).

Tanino K, Liu J, Kawamura Y, Kobayashi S, Borondics F, Uemura M. 2013. Using synchrotron FTIR and confocal cryo-microscopy to explore mechanisms of cold acclimation and freezing resistance using a single cell layer of *Allium fistulosum* L. *In: Proceedings of Plan-Microbe Interactions to the Cold 2012* (Imai R, Matsumoto H,

Yoshida M, eds), Springer, Berlin, Germany, pp 165-178 (ISBN-13: 978-1-4614-8253-6).

Kawamura Y, Uemura M. 2013. Plant low temperature tolerance and its cellular mechanisms. *In: Plant Abiotic Stress*, 2nd Ed (Jenks MA, Hasegawa PM, eds), John Wiley & Sons, Hoboken NJ, pp 109-132 (ISBN-13: 978-1-118-41217-6).

〔その他〕

ホームページ等

<http://news7a1.atm.iwate-u.ac.jp/~credbbt/index.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上村松生 (UEMURA, Matsuo)

岩手大学・農学部・教授

研究者番号 : 00213398

(2) 研究分担者

河村幸男 (KAWAMURA, Yukio)

岩手大学・農学部・准教授

研究者番号 : 10400186

(3) 研究協力者

富永陽子 (TOMINAGA, Yoko)

南 杏鶴 (MINAMI, Anzu)

アハメド・アリーファ (AHAMED, Arifa)

李 斌 (LI, Bin)

高橋大輔 (TAKAHASHI, Daisuke)

今井裕之 (IMAI, Hiroyuki)

中山貴人 (NAKAYAMA, Takato)

小林紫苑 (KOBAYASHI, Shion)

三木雄史 (MIKI, Yushi)

開 勇人 (HIRAKI, Hayato)

金谷真希 (KANAYA, Maki)