

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：11201

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25650090

研究課題名(和文) イネ科新規モデル植物実験系の確立とその検証：環境応答研究をモデルケースとして

研究課題名(英文) Establishment of a novel Poaceae model system: a case study of environmental stress response

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) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：環境応答機構研究におけるモデル植物実験系開発を目的にイネ科植物ミナトカモジグサのストレス耐性評価を行った。その結果、凍結耐性は-4℃から低温馴化1週間で-7.5℃まで増加する、低温馴化に重要なCBF転写因子やその標的遺伝子COR、LEA遺伝子の発現が低温応答性を示す、凍結傷害発生に重要な細胞膜のプロテオームが大きく変動する、塩ストレス(100 mM NaCl、2週間)や乾燥ストレス(10日間の灌水停止)耐性を有する、ことを明らかにした。これらの結果は、ミナトカモジグサが環境ストレス耐性機構研究における単子葉モデル植物として利用できることを示している。

研究成果の概要(英文)：To develop a novel model plant experimental system, stress responses of *Brachypodium distachyon* was evaluated. The results obtained revealed that 1) freezing tolerance increased from -4°C in non-acclimated plants to -7.5°C in 1-week-cold acclimated plants, 2) CBF transcription factors and their target genes, CORs and LEAs, were upregulated during cold acclimation, 3) the proteomes of the plasma membrane that is the primary site of freezing injury changed considerably in response to cold, and 4) the plant can be tolerated for the treatment of 100 mM NaCl for 2 weeks or even after stopping of water for 10 days. These results clearly show that *B. distachyon* is promising as a monocotyledonous model plant experimental system for research of environmental stress responses.

研究分野：植物分子生理学

キーワード：環境応答 モデル植物 ミナトカモジグサ *Brachypodium* 細胞膜 低温馴化 乾燥ストレス 塩ストレス

### 1. 研究開始当初の背景

モデル植物として世界中に広まった双子葉植物シロイヌナズナと単子葉植物イネは、植物科学を急速に発展させた。しかし、農業への応用を念頭に置いた環境応答研究においては、熱帯起源であるイネは冷涼気候での作物への応用は難しい点が多いこと、シロイヌナズナは概して環境ストレス耐性が低いこと等により、新しいモデル植物の確立が強く望まれていた。イネ科植物 *Brachypodium distachyon* (ミナトカモジグザ) は冷涼環境でも生存可能なコムギなどと進化的に近縁であり、さらに、シロイヌナズナと比較して高い環境ストレス耐性を有していると考えられる (Physiologia Plantarum 141: 19-26, 2011)。現在までにバイオマス研究に関連して大規模な *B. distachyon* ゲノム配列決定や突然変異体系統の作成が行われている (Nature 463: 763-768, 2010) が、環境ストレス耐性評価や環境応答分子機構を明らかにする研究は驚くほど少ない。従って、トランスレショナル研究をコアとした植物科学研究の次ステップを切り開くためにも、*B. distachyon* 実験系の確立が必要不可欠であった。

### 2. 研究の目的

植物の環境応答機構研究に新しい展開を可能にするモデル植物の開発と実験系の検証を目的に、近年注目を浴びているイネ科植物 *B. distachyon* の環境応答に関わる生理的特徴とストレス応答に深く関与する細胞膜組成の関係を理解するため、本研究室が世界を先導している凍結耐性獲得機構と細胞膜プロテオーム解析を行う。得られた結果と既知のモデル植物 (シロイヌナズナ) の結果を比較することにより、*B. distachyon* の実験植物としての優位性や特徴を明らかにする。さらに、他の環境ストレス (乾燥) 応答機構を解析し、*B. distachyon* の環境応答機構研究における汎用性を検証し、新規モデル植物として位置を確立する。

### 3. 研究の方法

本研究では、環境応答研究における *B. distachyon* のモデル植物としての特徴と汎用性を検証するため、広く用いられている系統 (Bd21) を主に用いて実験を行った。まず、凍結耐性を環境因子への応答事例としてとりあげ、(1) 個体レベルや細胞レベルでの凍結耐性を調べるため、細胞レベルでの生存を評価する電解質漏出法と個体レベルでの生存を評価する再成長測定法の二つを用い、低温未馴化個体と低温馴化個体と比較した、(2) 凍結融解過程における細胞挙動を調べるため、*B. distachyon* 葉から単離したプロトプラストを低温ステージ付き共焦点レーザー顕微鏡を用い凍結融解過程をリアルタイムで観察する計画を立てた、(3) 低温誘導性遺伝子発現

挙動について、植物の低温馴化過程において重要な貢献をする低温誘導性遺伝子群 (*CBFs*、*CORs*、*LEAs*) の相同遺伝子発現を低温馴化過程で継時的に決定した、(4) 凍結傷害発生に深く関わる細胞膜タンパク質組成を shotgun proteomics 法を用いて網羅的に解析し、*B. distachyon* の低温応答機構を解明した (下図参照)。さらに、他の環境因子 (乾燥や塩) への応答について、灌水停止や各種飽和塩溶液雰囲気での処理、あるいは、塩水処理後の生存率を再成長法で調べることで解析した。

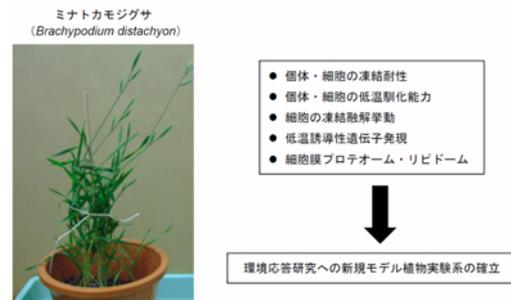


図1 研究の構想図

### 4. 研究成果

#### 凍結耐性の評価

細胞膜の Integrity を評価する電解質漏出法で低温処理前後の植物体の凍結耐性を評価したところ、低温馴化前では-4°C程度までしか耐えられなかったものが低温処理1週間で-7.5°C程度まで耐えられるようになった。それ以降4週間の低温処理では凍結耐性は増加しなかった (図2)。従って、*B. distachyon* はシロイヌナズナ同様に比較的急速に低温馴化することが示唆された。

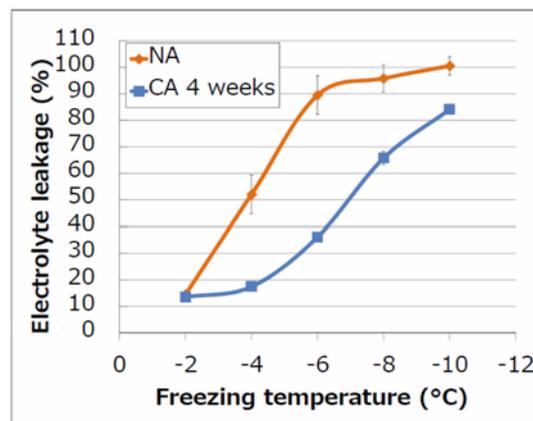


図2 低温馴化前後での *B. distachyon* の凍結耐性 (NA、低温未馴化；CA、低温馴化後)

また、細胞の凍結融解過程における挙動解析を試みたが、*B. distachyon* 葉からのプロトプラスト単離法の確立が当初計画通りに進まず、未だに様々な方法を試しながらプロトコルを探している状況である。

Accession No.	Fold change	Description	Category
Bradi3g51200.1	Infinity	dehydrin COR410-like	disease/defence
Bradi2g42260.1	39.07	probable glutathione S-transferase GSTU6-like	disease/defence
Bradi2g47400.1	28.41	ABC transporter B family member 4-like	transporter
Bradi2g55690.1	23.98	glucan endo-1,3-beta-glucosidase 14-like	cell structure
Bradi2g47020.1	19.32	uncharacterized LOC100836861	unclassified
Bradi5g10860.1	17.77	dehydrin COR410-like	disease/defence
Bradi4g24197.1	15.67	uncharacterized protein LOC100835269	unclassified
Bradi3g37830.1	14.31	glutamate decarboxylase-like isoform 1	metabolism
Bradi1g67730.1	11.54	phosphoenolpyruvate carboxykinase [ATP]-like	energy
Bradi2g47330.1	8.85	ABC transporter B family member 11-like	transporter
Bradi2g22480.1	0.041	PRA1 family protein B4-like	signal transduction
Bradi4g26700.1	0.090	protein transport protein Sec61 subunit beta-like	intracellular traffic
Bradi1g13900.1	0.130	uncharacterized amino acid permease YfmA-like	transporter
Bradi2g56890.1	0.148	bidirectional sugar transporter SWEET1a-like	transporter
Bradi4g30540.1	0.149	cellulose synthase A catalytic subunit 9 [UDP-forming]-like	cell structure
Bradi1g38687.1	0.173	spermine synthase-like	metabolism
Bradi2g17290.1	0.189	ATP synthase subunit beta, mitochondrial-like	transporter
Bradi2g00800.1	0.196	40S ribosomal protein S25-2-like	protein synthesis
Bradi2g55600.1	0.207	60S ribosomal protein L10a-1-like	protein synthesis
Bradi5g25950.1	0.214	BTB/POZ domain-containing protein At3g19850-like	transcription

### 低温誘導性遺伝子発現

低温馴化初期期間（48 時間）でシロイヌナズナなどの植物の低温馴化過程において報告されている低温誘導性遺伝子（*CBFs*、*CORs*、*LEAs* など）と相同な遺伝子の発現を RT-PCR 法により解析したところ、転写因子 *CBFs* は低温処理開始後 1~2 時間後に、*COR* や *LEA* 遺伝子は低温処理開始後 4~8 時間後に発現が増加することが判明した。従って、植物界に広く見られる転写因子 *CBFs* によって支配される低温誘導性遺伝子発現系が *B. distachyon* に存在することが示唆された。

### 細胞膜プロテオーム解析

凍結傷害発生の初発部位である細胞膜を対象に shotgun proteomics 法によりプロテオーム解析を実施したところ、低温馴化の時間によって発現誘導あるいは抑制されるタンパク質はかなり異なっていたが、低温馴化期間を通じて変動しているものも多くみられた（表 1）。低温馴化期間を通じて増加していたタンパク質にはデハイドリンや熱ショックタンパク質などが含まれており、*B. distachyon* の低温応答性も他の植物と同様にストレス応答性タンパク質は関与している可能性が示された。

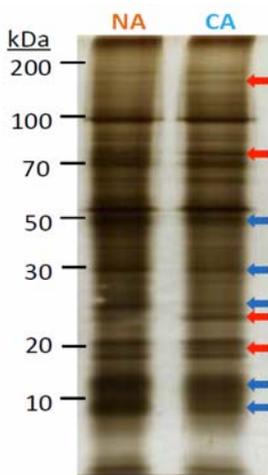


図 3 低温馴化前 (NA) と馴化後 (CA) における *B. distachyon* 細胞膜タンパク質の変動

表 1 低温馴化前後で変動する細胞膜タンパク質  
青色、低温馴化で増加するもの  
赤色、低温馴化で減少するもの

### 乾燥ストレスおよび塩ストレス耐性の評価

凍結ストレス耐性以外に、乾燥ストレスおよび、塩ストレス (NaCl) に対する耐性も評価した。その結果、(1) 3 週間育てた芽生えでは 10 日間の灌水停止に耐える能力を持つこと、(2) 4 日間生育させた芽生えでは相対湿度 75% (飽和 NaCl 溶液共存下) で 2 日間の処理には耐えられること、(3) 3 週間育てた芽生えは 100 mM NaCl 処理に 2 週間は耐えられることなどを明らかにした。

### まとめ

凍結耐性と乾燥、塩ストレスに関する研究成果を考え合わせると、*B. distachyon* は凍結、乾燥、塩ストレスなど環境ストレス耐性機構を研究する実験材料として利用できる単子葉モデル植物であり、イネ科植物を対象とした生理学的・生化学的な環境ストレス応答分子機構を理解する上で有効な実験材料となり得ることが明らかになった。さらに、遺伝子組換えが比較的容易に利用でき、変異体ライブラリーが充実してきていることから、環境ストレス応答に関連した Omics 解析や遺伝子機能解析にも十分応えられるものと判断される。今後、*B. distachyon* で得られた知見が、イネ科作物の環境ストレス耐性増大に関する研究に大きく貢献していくことが期待される。

### 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 3 件)

- ① 上村松生. 2014. 植物の低温馴化および凍結耐性メカニズムに関する基礎研究. 低温生物工学会誌 60 : 1-8. (第 3 回低温

生物工学会学会賞受賞論文) (査読あり)

- ② 中山貴人、高橋大輔、河村幸男、Abidur Rahman、上村松生。2013. 低温馴化過程における *B. distachyon* 細胞膜タンパクの組成変動の解析。低温生物工学会誌 59: 61-65. (査読あり)
- ③ Takahashi D, Li B, Nakayama T, Kawamura Y, Uemura M. 2013. Plant plasma membrane proteomics for improving cold tolerance. *Frontier in Plant Science* 4: 90 (mini-review) (査読あり) (doi: 10.3389/fpls.2013.00090)

[学会発表] (計 6 件)

- ① 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)
- ② 中山貴人、高橋大輔、河村幸男、上村松生。2014. 新規単子葉モデル植物・ミナトカモジグサにおける低温馴化機構。第 55 回日本植物生理学会。(富山県富山市、3 月 18~20 日)
- ③ 中山貴人、高橋大輔、河村幸男、上村松生。2013. 単子葉モデル植物ミナトカモジグサを用いた低温馴化機構の解析。東北植物学会第 3 回大会。(秋田県秋田市、12 月 14~15 日)
- ④ Takahashi D, Nakayama T, Miki Y, Kawamura Y, Uemura M. 2013. Involvement of the plasma membrane in plant cold adaptation: a proteomics perspective. 12th Human Proteome Organisation Congress (Yokohama, Japan, September 14-18)
- ⑤ 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)
- ⑥ Nakayama T, Kawamura Y, Uemura M. 2013. Plasma membrane proteomics in association with cold acclimation. 1st International *Brachypodium* Conference (Modena, Italy, June 19-21) (Selected as an oral presentation)

[図書] (計 2 件)

- ① Takahashi D, Nakayama T, Miki Y, Kawamura Y, Uemura M. 2014.

Proteomic approaches to identify cold regulated plasma membrane proteins. *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: 978-1-4939-0844-8). (査読あり)

- ② 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. *Methods in Molecular Biology (Plant Proteomics: Methods and Protocols, 2nd Ed, Novo JVVJ, Komatsu S, Weckwerth W, Wienkoopeds S, eds)*, Springer Science+Business Media, LLC, New York, NY, vol 1072, pp 481-498 (ISBN: 978-1-62703-630-6) (査読あり)

[その他]

ホームページ等

[http://news7a1.atm.iwate-](http://news7a1.atm.iwate-u.ac.jp/~crcdbbt/index.htm)

[u.ac.jp/~crcdbbt/index.htm](http://news7a1.atm.iwate-u.ac.jp/~crcdbbt/index.htm) (日本語)

[http://news7a1.atm.iwate-](http://news7a1.atm.iwate-u.ac.jp/~crcdbbt/English_pages/Index/index.htm)

[u.ac.jp/~crcdbbt/English\\_pages/Index/index.htm](http://news7a1.atm.iwate-u.ac.jp/~crcdbbt/English_pages/Index/index.htm) (英語)

受賞

上村松生

平成 24 年度低温生物工学会賞

「植物の低温馴化および凍結耐性メカニズムに関する基礎研究」

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) 研究協力者

中山 貴人 (NAKAYAMA, Takato)

高橋 大介 (TAKAHASHI, Daisuke)