

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月 5日現在

機関番号：11201

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22780288

研究課題名（和文）植物に高凍結ストレス耐性をもたらす細胞膜修復の分子メカニズムの解明
 研究課題名（英文）Molecular mechanism of the plant membrane repair system which brings high freezing tolerance

研究代表者

河村 幸男（KAWAMURA YUKIO）

岩手大学・農学部・准教授

研究者番号：10400186

研究成果の概要（和文）：複数の植物で細胞膜修復による凍結耐性が存在し、その機構に SYT1 タンパク質が関与することが示された。免疫沈降およびショットガンプロテオーム解析により、SYT1 相互作用分子には細胞膜マイクロドメインタンパク質が多数存在し、また、チューブリンアイソフォームやアクチンアイソフォーム、小胞輸送に関与する RAB が低温馴化後に特異的に現れることが明らかとなった。欠損株実験からは、VAMP721 および SYP122 が膜修復に関与する可能性が示された。

研究成果の概要（英文）：We confirmed that some plants possess the calcium-dependent freezing tolerance, the mechanism of which includes SYT1. The combination of immunoprecipitation and shotgun proteomics showed that the interacting proteins with SYT1 include many plasma membrane microdomain proteins and, only after cold acclimation, tubulin isoforms, actin isoforms and RAB. Mutant analyses supported the possibility that VAMP721 and SYP122 are involved in the membrane repair in freezing tolerance mechanism.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：境界農学・環境農学

キーワード：植物、凍結耐性、細胞膜、膜修復、プロテオーム解析、マイクロドメイン

1. 研究開始当初の背景

植物は、温度や湿度などの環境条件の変化に対し、柔軟に対応する能力を有する。一方、

地球温暖化は激しい気象変動を伴い、その変動は植物の環境適応能力を超える場合がある。例えば、農作物の凍霜害は地球温暖化に

より減少すると考えられているが、実際には、東日本以北などでは増える傾向にあることが報告されている(杉浦ら 2007)。このように、植物の凍結耐性機構を、分子から深く理解することは農業的にも生態学的にも急務である。凍結は、複合的なストレス、すなわち、乾燥や塩濃縮を伴う凍結脱水ストレス、および氷晶成長による機械的ストレス、を植物にもたらす。また、耐凍性増大のためには細胞膜が凍結下で安定的になることが必須である(Steponkus et al. 1993)。すなわち、凍結耐性機構の解明には、脱水ストレス、もしくは機械ストレスに対する細胞膜の安定性を理解することが鍵となる。これまでは凍結脱水ストレスにおける細胞膜の安定性のみ焦点が当てられ、凍結機械ストレス耐性機構に関する研究はほとんど無かった。しかし近年、申請者のグループは、植物における凍結機械ストレス耐性として、細胞膜修復が重要な働きをすることを明らかにしてきた(Yamazaki et al. 2008)。細胞膜修復は、次の3つのステップ、i)細胞膜の損傷箇所からの細胞外カルシウム流入、ii)カルシウムセンサーであるシナプトタグミンによるカルシウム感知、iii)カルシウム依存的エキソサイトシス関連分子による、小胞と細胞膜の融合、からなる。細胞膜修復の分子機構は、動物細胞においては、複数の分子が関与する複雑な機構であることが示されている。しかし、植物細胞においては、細胞膜に局在するシナプトタグミン SYT1 が関与すること以外は分かっていなかった(Yamazaki et al. 2008; Schapire et al. 2008)。

2. 研究の目的

以上の背景を踏まえると、植物における凍結ストレス耐性を明らかにするためには、細胞膜修復の全体像を分子レベルで解明することは必須である。一方、SYT1 が細胞膜修復で

機能する上で、細胞膜マイクロドメイン領域が、非常に重要な場であることを示す、我々の実験結果がある。植物の凍結耐性は、冷温に一定期間さらすと上昇する。この現象は低温馴化と呼ばれている。細胞膜修復による凍結耐性は、低温馴化初期から急上昇する(Yamazaki et al. 2008)。一方、この時、SYT1 は細胞膜におけるタンパク質量としてはほとんど増加しないが、細胞膜のマイクロドメイン領域において急激に増加する(Minami et al. 2009)。本研究課題の目的は、細胞膜マイクロドメイン領域における SYT1 の分子相互作用と、凍結下における細胞膜修復との関連を明らかにすることにある。

3. 研究の方法

(1) 植物凍結耐性における膜修復の一般性

当初の計画では、シロイヌナズナのみを用いて行う予定ではあったが、相互作用するタンパク質の一般性をより確かなものにするには、複数の植物で共通なものを見つけるのが良いと考えられた。そこで、シロイヌナズナ以外の植物で、凍結耐性がありかつプロテオーム解析が可能な植物に対し、凍結耐性における膜修復の一般性の検討を試みる。具体的には、細胞膜修復には細胞外カルシウムが必須であり、既に、「カルシウム依存的凍結耐性=SYT1 が関与する細胞膜修復による凍結耐性」、が示されているため、組織切片を用いた系で、カルシウム依存的凍結耐性を測定する。また、Yamazaki ら(2008)の方法に基づき、anti-SYT1 抗体存在下でカルシウム依存的凍結耐性を測定することにより、細胞膜修復の存在も検討する。

(2) 細胞膜マイクロドメイン領域で SYT1 と相互作用するタンパク質の網羅的解析

① 細胞膜修復による凍結耐性は、低温馴化初期から急上昇するが、この時、SYT1 は細胞

膜におけるタンパク質量としてはほとんど増加せず、細胞膜マイクロドメイン領域において急増する(Yamazaki et al. 2008; Minami et al. 2009)。すなわち、細胞膜修復の上昇には、SYT1 のマイクロドメイン領域での量的・質的变化が重要であると考えられる。そこでまず、低温馴化前後の植物より、細胞膜マイクロドメイン画分の単離を行う。この方法は、既に確立されている(Minami et al. 2009)。次に、既存の SYT1 抗体を用いて、マイクロドメイン画分に対し免疫沈降を行い、沈殿した画分に対し電気泳動を行い、最終的に得られたタンパク質を質量分析計により同定を行う。

② ①の実験がうまくいかなかった場合、TX-100 よりも強力な界面活性剤オクチルチオグルコシド(OTG)、もしくはそれよりも強力な界面活性剤リゾホスファチジルコリン(LPC)で可溶化後、SYT1 抗体による免疫沈降を行う。得られた免疫沈降画分に対し1次元電気泳動を行い、得られる各バンドに対しLC-MS/MSによる同定を行う。

③ さらに、②で得られる免疫沈降画分に対し、LC-MS/MSを用いたショットガンプロテオーム解析を行う。

(3) SYT1 相互作用因子欠損株における、凍結耐性および細胞膜修復能の測定

SYT1 相互作用因子に着目し、それらの遺伝子をノックアウトした T-DNA 挿入株を取得し、ホモ接合体の分離を行う。その後、まず、得られた T-DNA 挿入株を用いて、植物体による凍結耐性を評価する。次に、凍結下における細胞膜修復能の評価を行う。具体的には、上記の T-DNA 挿入株について、組織切片を用いた系で、カルシウム依存的凍結耐性を測定する。また、組織切片の凍結耐性だけでなく、植物体そのものの凍結耐性試験も行う。

(4) SYT1 相互作用因子と SYT1 の相互作用の、低温下における動的観察

SYT1 相互作用因子と SYT1 の相互作用を低温下において観察するために、蛍光タンパク質を融合したタンパク質を発現する変異体を作成し、凍結下における観察技術を確立する。

4. 研究成果

(1) 植物凍結耐性における膜修復の一般性と SYT1 と相互作用するタンパク質の網羅的解析

植物材料としては、これまで凍結耐性の研究で比較的良好に使われてきたコムギ、オートムギ、ライムギを用いた。これらについて、低温馴化前後の葉切片を用いて凍結耐性試験を行ったところ、三つ全てにカルシウム依存的凍結耐性が存在することが確認できた(図1)。次に、それぞれの植物種において、

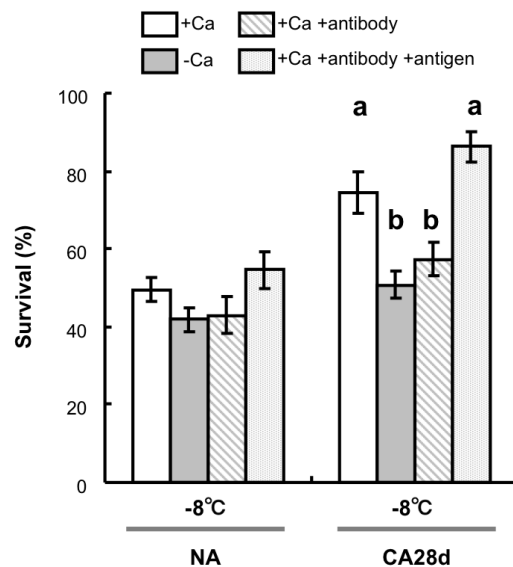


図1. コムギ葉切片におけるカルシウム依存的凍結耐性およびそれに対する SYT1 抗体の効果。縦軸は生存率、横軸は凍結温度を示す。カルシウム依存的な凍結耐性は SYT1 抗体によって打ち消され、抗体の抗原処理により回復した。有意差検定としてチューキー検定を用いている (P < 0.01)。データは平均±SE。

anti-SYT1 抗体に対し特異的に反応する細胞膜タンパク質が発現していることを確認した。3 つの植物全てにおいてシロイヌナズナ SYT1 の分子量に近いバンドが得ることができた。カルシウム依存的凍結耐性の存在が確認されたこれらの植物における、SYT1 に非常に相同性の高いタンパク質の存在が示された。さらに、今回のイネ科単子葉類では複数のバンドが得られたことから、複数の SYT 遺伝子種がカルシウム依存的凍結耐性に関与している可能性が考えられる。また、その発現変動についても検証を行った結果、コムギでは低温馴化によって SYT の発現量が上昇しており、その結果は凍結耐性や機械的ストレス耐性におけるカルシウム依存性と一致して説明できるものであった。さらに、anti-SYT1 抗体を用いて凍結耐性試験を行うことで、これら単子葉植物における SYT のカルシウム依存的凍結耐性への関与を確認した。切片に抗体および抗原を加えた凍結試験を行うことで、カルシウム依存的凍結耐性に対する抗体の阻害効果を確認することができた (図 1)。anti-SYT1 抗体が SYT の細胞質側にある C2A ドメインに反応するものであることを考慮すると、この抗体実験の結果は、カルシウム依存的凍結耐性が SYT を介した細胞膜修復によるものであることを意味する。

(2) 細胞膜マイクロドメイン領域で SYT1 と相互作用するタンパク質の網羅的解析

① まず、研究計画通りに、低温馴化前後のシロイヌナズナより、細胞膜マイクロドメイン画分の単離を行った。次に、我々が作成した既存の anti-SYT1 抗体を用いて、マイクロドメイン画分に対し免疫沈降を行い、沈殿した画分に対し 1 次元電気泳動を行った。その結果、この免疫沈降により取れてきたタンパクは全くなく、細胞膜マイクロドメイン画分

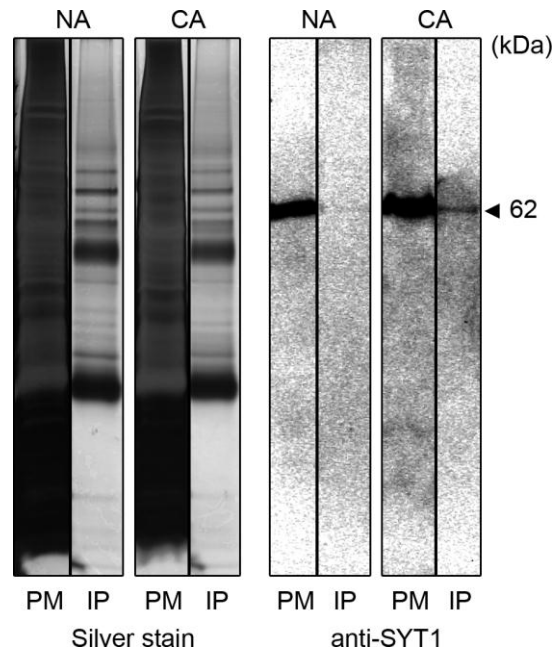


図 2. シロイヌナズナ細胞膜画分 (PM) と anti-SYT1 抗体による免疫沈降画分 (IP)。低温未馴化 (NA) および低温馴化 7 日目 (CA) の植物よりそれぞれの画分を単離した後、電気泳動を行った。染色は銀染色およびイムノブロットティングによる。

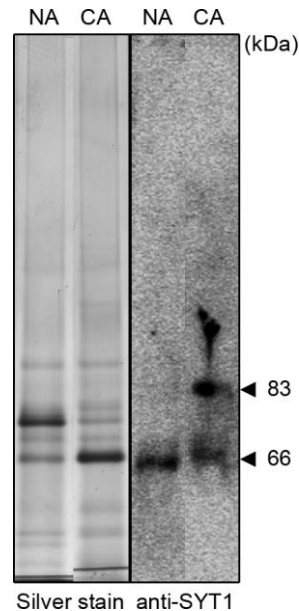


図 3. コムギ細胞膜画分 (PM) と anti-SYT1 抗体による免疫沈降画分 (IP)。低温未馴化 (NA) および低温馴化 28 日目 (CA) の植物よりそれぞれの画分を単離した後、電気泳動を行った。染色は銀染色およびイムノブロットティングによる。

に対し anti-SYT1 抗体が反応できないことが判明した。

② 次に、界面活性剤としては LPC より弱い TX-100 よりも強力な OTG を用いて、できるだけマイクロメインタンパクが SYT1 より離れないような条件で細胞膜画分より可溶化を行い、anti-SYT1 抗体を用いた免疫沈降を試みた。この実験では、植物材料はシロイヌナズナおよびデータベースサーチが利用しやすいコムギを用いた。免疫沈降画分を 1 次元電気泳動にかけた結果、両植物ともに数十種類のみバンドが得られ、また、anti-SYT1 抗体を用いたイムノブロッティングでは SYT バンドが確認された(図 2&図 3)。興味深いことに、低温馴化前後でカルシウム依存的な凍結耐性が確認されたシロイヌナズナでは、馴化前後のバンドパターンはほぼ同じであったが(図 2)、低温馴化後でのみ大きなカルシウム依存的な凍結耐性が確認されたコムギでは馴化前後のバンドパターンは明らかに異なった(図 3)。次に、それぞれのバンドに対し LC-MS/MS にかけてが、1) 細胞膜型水チャンネル(PIP)が分子量と異なる場所に多数検出され、2) anti-SYT1 が反応したバンドも含め SYT1 が検出されなかった。PIP は SDS が入っている 1 次元電気泳動でもアグリゲーションを起こしやすく、バックグラウンドとして出やすいことが考えられた。SYT1 が検出されなかった原因は分からなかったが、一つの可能性としてアグリゲーションを起こしたタンパク質のバックグラウンドに埋もれたことが考えられる。いずれにせよ、信頼性の欠ける結果となった。この問題を解決する一つの有効手段は 1 次元電気泳動による分離を行わない LC-MS/MS によるショットガンプロテオーム解析が考えられた。

③ 次に、OTG よりも強力な界面活性剤であ

るリソfosファチジルコリンも加えて解析を行った。低温馴化前後のシロイヌナズナより細胞膜画分を回収した後、OTG もしくは LPC を用いて可溶化を行い、その後、anti-SYT1 抗体による免疫沈降を行った。次に、コンタミネーションを避けるため、ショットガンプロテオーム解析を行った。その結果、マイクロメインタンパク質が多数同定された。さらに、低温馴化後の LPC 画分のみに見られたタンパク質として、チューブリンやアクチンなどの細胞骨格や小胞輸送に関与する RAB が存在することが確認された。

(3) SYT1 相互作用因子欠損株における、凍結耐性および細胞膜修復能の測定

細胞膜修復には必ず膜の融合装置である SNARE タンパク質が必要となるが、プロテオーム解析においては、SNARE タンパク質は検出されなかった。そこで、これらの関与も考察するために、VAMP721、VAMP722、VAMP723、および、SYP122 の T-DNA 欠損株のホモ接合体を作成した。これらの植物を用いて、カルシウム依存的凍結耐性および植物体レベルでの凍結耐性を測定し結果、VAMP721 および SYP122 に関しては、細胞膜修復に関与する可能性を示す結果が得られた。

(4) SYT1 相互作用因子と SYT1 の相互作用の低温下における動的観察

既に当研究室で所有している SYT1 ネイティブプロモーターによる SYT1-GFP を発現する植物において、低温未馴化のみでの観察であるが、SYT1 はアクチンフィラメントと似た配向で、細胞膜上に不均一に分布することを確認している。(2) および (3) の実験で見つかった SYT1 相互作用因子の候補は、既に、GFP ラベルされたものが報告され、利用でき

る状況にある。そこで、赤色蛍光タンパク質である mCherry を利用し、SYT1-mCherry を発現する植物の作成を試み、現在作成中である。一方、SYT1 は発現量が少なく感度の高い観察が要求されるが、これまでの凍結下における観察技術では、解像度が低く暗い長作動型のレンズしか使用できなかった。そこで、一般の明るいレンズが使用できる凍結観察の技術を開発した。

(5) 得られた成果のインパクトと今後

植物における膜修復の研究は現在でもほとんど無い。そのため、植物の凍結耐性における膜修復の一般性を示した結果は評価され、国内学会である第 56 回低温生物工学会大会では、招待講演として発表した。現在、凍結耐性における膜修復の一般性に関する論文は国際誌に投稿するための準備中である。また、低温未馴化のみでの実験ではあるが、SYT1-GFP を用いた SYT1 局在性に関する論文は、国際的に高く評価されている Journal of Biological Chemistry 誌に掲載された。SYT1 と相互作用するタンパク質の網羅的解析は、実験的にはまだまだ改善の余地があり、今回得られた結果を基にさらに改善をしていく予定である。

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 3 件)

- ① 小林紫苑、Karen Tanino、上村松生、河村幸男、植物細胞における小胞体凍結動態の観察、低温生物工学会誌、58、111-115、2012、査読有、責任著者
- ② 河村幸男、金子智志、山崎誠和、小林紫苑、上村松生、水から氷へ：凍結障害発生と回避、低温生物工学会誌、58、53-57、2012、査読有、責任著者
- ③ Yamazaki T.、Takata N.、Uemura M.、

Kawamura Y.、Arabidopsis synaptotagmin SYT1, a type I signal-anchor protein, requires tandem C2 domains for delivery to the plasma membrane、Journal of Biological Chemistry、285、23165-23176、2010、査読有、責任著者

[学会発表] (計 4 件)

- ① 小林紫苑、Karen Tanino、上村松生、河村幸男、植物細胞におけるオルガネラ凍結動態とその機構へのアプローチ、第 53 回日本植物生理学会年会、2012. 3. 16、京都産業大学 (京都)
- ② 小林紫苑、Karen Tanino、上村松生、河村幸男、植物細胞における小胞体凍結動態の観察、第 56 回低温生物工学会大会、2011. 7. 8、岩手県民情報交流センター (岩手)
- ③ 河村幸男、金子智志、山崎誠和、小林紫苑、上村松生、水から氷へ：凍結障害発生と回避、第 56 回低温生物工学会大会、2011. 7. 7、岩手県民情報交流センター (岩手)、招待講演
- ④ 金子智志、上村松生、河村幸男、凍結機械ストレスに対する単子葉植物の応答とその機構、第 52 回日本植物生理学会年会、2011. 3. 22、(仙台)

[その他]

ホームページ等

<http://news7a1.atm.iwate-u.ac.jp/%7Ecrcdbbt/index.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

河村 幸男 (KAWAMURA YUKIO)

岩手大学 農学部・准教授

研究者番号：10400186