

## 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：10105

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26892002

研究課題名(和文) プロテオーム解析に基づく低温条件下での樹木の低温脱馴化機構の解明

研究課題名(英文) Investigation of deacclimation process of trees at low temperatures based on proteomic analyses

研究代表者

春日 純 (Kasuga, Jun)

帯広畜産大学・畜産学部・助教

研究者番号：40451421

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：樹木の低温脱馴化の初期過程を明らかにするため、比較的高い氷点下温度で人為的に脱馴化処理をしたシラカンバ (*Betula platyphylla*) の枝で起こるタンパク質の組成変化を調べるとともに、屋外に生育するセイヨウハコヤナギ (*Populus nigra*) の枝を用いて季節的な脱馴化過程におけるプロテオーム変動を調べた。本研究により、北方樹木の地上部に含まれる2000種を超えるタンパク質について脱馴化過程における半定量的な変動データを収集することができ、このデータから低温化で起こる脱馴化の初期過程は、タンパク質の新規合成ではなく、タンパク質の局在の変化などの他の要因で進行することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：To understand the early step of cold-deacclimation process in boreal trees, changes in proteins in artificially-deacclimated twigs of *Betula platyphylla* and seasonally-deacclimated twigs of *Populus nigra* were investigated. In this research, semiquantitative data on the contents of more than 2,000 independent proteins in twigs of boreal trees during deacclimation were collected. These data indicated the involvement of other factors, including changes in protein localization, than de novo protein synthesis in the early step of deacclimation process.

研究分野：植物生理学

キーワード：低温脱馴化 樹木 細胞膜タンパク質 可溶性タンパク質 樹皮 木部

## 1. 研究開始当初の背景

現在、大気中の温室効果ガス濃度の上昇による地球温暖化が世界的な問題となっている。この気候変動のひとつの影響として、冬期の気温の上昇によって植物の低温脱馴化の時期が早まり、早春期の低温による凍霜害が増加することが懸念されている。

このような状況において、近年、植物の脱馴化過程に関する研究が世界的に増加している。しかしながら、これまでの脱馴化過程で起こる植物の生理的な変化についての研究は、温度制御ができない屋外環境、もしくは15以上の温度に設定された人工気象機で脱馴化させた植物を用いて行われてきた。植物の脱馴化による耐寒性の低下は5以下の温度でも進行することが知られており、申請者の以前の研究においても屋外で生育するセイヨウハコヤナギの枝で日平均気温が0以下(日最高気温が5以下)である2月下旬に組織中のタンパク質の変動が観察されたことから、寒冷地で生育する北方樹木ではさらに低い温度で脱馴化の過程が進行することが示唆されている。そのため、早春期に北方樹木で起こる脱馴化機構を理解するためには、摂氏数度以下の低温条件下での植物の応答を明らかにする必要がある。

## 2. 研究の目的

本研究は、早春期に起こる低温脱馴化の初期段階において、樹木がおかれる温度環境とその温度で起こる生理変化との関連性を組織に含まれるタンパク質の変動から体系的に理解することを目的とした。材料としてシラカンバ及びセイヨウハコヤナギの枝を用い、凍結条件下で生細胞が細胞外凍結をする樹皮と深過冷却をする木部に分け、それぞれから調製したタンパク質画分についてプロテオーム解析を行った。

## 3. 研究の方法

(1) シラカンバの枝からの可溶性タンパク質画分及び細胞膜タンパク質画分の調製法の検討: 屋外で生育するシラカンバから枝を採取し、各画分の調製方法を検討した。細胞膜画分については、マイクロソーム画分からポリエチレングリコール(PEG)-デキストラン水性二層分配法により精製し、得られた画分についてP型ATPアーゼやV型ATPアーゼ、NADH cyt cレダクターゼと言ったマーカー酵素の活性をもとに画分の純度を評価して高純度の細胞膜画分を得られる方法を決定した。

(2) 恒温チャンバーを用いて比較的高い氷点下温度(-8及び-3)で脱馴化処理した際のシラカンバの可溶性タンパク質変動の解析: 厳冬期(2月中旬)に採取して-20で保存したシラカンバの枝を冷凍庫から取り出し、-8もしくは-3に設定した恒温チャンバーに入れて、暗黒条件下で1~7日間、

一定温度処理を行った。その後、枝を樹皮と木部に分け、それぞれの組織から可溶性画分を調整した。得られた可溶性画分に含まれるタンパク質の変動をSDS-PAGEで調べた。

(3) 季節的な脱馴化過程でセイヨウハコヤナギの枝で起こるプロテオーム変動の解析: 2月中旬から5月初旬にかけて3週間毎に屋外で生育するセイヨウハコヤナギの枝を採取し、樹皮と木部に分割した後、それぞれの組織から細胞膜画分及び可溶性画分を調整した。得られた画分は、nano-LC MS/MSを用いたショットガンプロテオーム解析を行い、Progenesis LC-MS software (Nonlinear Dynamics)により各画分に含まれるタンパク質の同定と半定量解析を行った。得られたデータについて、主成分分析やk平均法によるクラスター解析などのデータ解析を進めた。

## 4. 研究成果

(1) シラカンバの枝からの可溶性タンパク質画分・細胞膜タンパク質画分の調製法の検討: 可溶性画分は液体窒素で凍結して粉碎した各組織をトリス-塩酸バッファー中でホモジェナイズし、超遠心機などにより不溶性の成分を除去することで調製することとした。細胞膜画分は、採取した試料を液体窒素で凍結することなく細片化した後にバッファー中でホモジェナイズし、遠心分離により調整したマイクロソーム画分から5.8%(w/w)PEGと5.8%(w/w)デキストランを用いた水性2層分配法により調整することとした。本手法を用いて調製した細胞膜画分の純度をいくつかのオルガネラのマーカー酵素の活性をもとに評価したところ、本画分が、高い純度で細胞膜を含むことが確認できた。

(2) 恒温チャンバーを用いて比較的高い氷点下温度(-8及び-3)で脱馴化処理した際のシラカンバの可溶性タンパク質変動の解析: 厳冬期に採取して-20で保存したシラカンバの枝について、保存期間中に組織中の細胞の質の低下が起きていないか確認するため、採取から8か月後にフルオレセインジアセテートを用いた生体染色とSDS-PAGEによるタンパク質の組成分析を行った。生体染色では、8か月間保存した試料でも樹皮及び木部に含まれる細胞の生存が採取直後と同様に確認できた。また、採取後すぐに抽出した可溶性タンパク質と8か月間保存した枝から抽出した可溶性タンパク質の組成をSDS-PAGEで比較したところ、CBB染色後のゲルでは明瞭な変化は見られなかった。これらの結果から、厳冬期に採取した枝は、-20の冷凍庫で保存することで、枝に含まれる生細胞に大きな影響を与えることなく、休眠状態のまま維持できることが示唆された。

-20で保存した枝を-8もしくは-3に設定した恒温チャンバーに入れ、1~7日間、一定温度処理を行い、可溶性タンパク質の組

成変化を調べたところ、これらの温度では、処理後 7 日までいずれの組織でも SDS-PAGE で明瞭な変化は見られなかった。これは、氷点下温度では、脱馴化に伴う新規のタンパク質合成が盛んではないことを示唆している。現在、0、4、10 と行った冷温域での脱馴化過程におけるタンパク質の変動の評価を行っている。

(3) 季節的な脱馴化過程でセイヨウハコヤナギの枝で起こるプロテオーム変動の解析: 2 月中旬から 5 月上旬に採取したセイヨウハコヤナギの枝から抽出したタンパク質画分について nano-LC MS/MS を用いてショットガン解析を行ったところ、樹皮の細胞膜画分と可溶性画分ではそれぞれ 1156 個と 983 個のタンパク質が、木部では 988 個と 946 個のタンパク質が同定された。これらのタンパク質の半定量的な蓄積量データについて Sparce 主成分分析をおこなったところ、組織の違い及び画分の違いによってそれぞれ独立したクラスターが形成された。

同定されたタンパク質の中で、樹皮の細胞膜画分と可溶性画分ではそれぞれ 341 個と 422 個のタンパク質で、木部では 254 個と 211 個のタンパク質で脱馴化過程において有意な (ANOVA  $p < 0.01$ ; max fold change  $> 2$ ) 変動が見られた。これらの変動を示したタンパク質を、k 平均法を用いて 10 個のクラスターに分割した (図 1A)。得られたクラスターの中で、クラスター 1~3 に含まれるタンパク質は脱馴化に伴って減少傾向を示し、クラスター 7~9 に含まれるタンパク質は増加傾向を示した。また、これらのクラスターの中でも、クラスター 3 及び 9 に含まれるタンパク質は 4 月中旬から 5 月初旬にかけて大きく変動する傾向を示した。図 1B には、クラスター 1 及び 2 に含まれるものを脱馴化初期・中期に減少するタンパク質、クラスター 3 に含まれるもの脱馴化後期に減少するタンパク質、クラスター 7 及び 8 に含まれるものを脱馴化初期・中期に増加するタンパク質、クラスター 9 に含まれるもの脱馴化後期に増加するタンパク質として、各画分に含まれるタンパク質の種数を示した。組織の違いに関わらず、脱馴化初期や中期に変動 (増加及び減少) するものの多くは細胞膜画分に含まれるタンパク質であり、可溶性画分に含まれるタンパク質は脱馴化後期に変動するものが多かった。これは、脱馴化初期及び中期の気温が低い時期には、いずれの組織においても新規のタンパク質合成はあまり盛んではなく、この時期に細胞膜画分で見られたタンパク質の組成変化は、主にタンパク質の局在性の変化によって起こった可能性を示唆している。

(4) 全体を通して: 屋外で生育する樹木を用いた実験で、脱馴化初期の低温環境下では盛んなタンパク質合成が行われていないことが示唆されたが、これは恒温チャンバーで氷

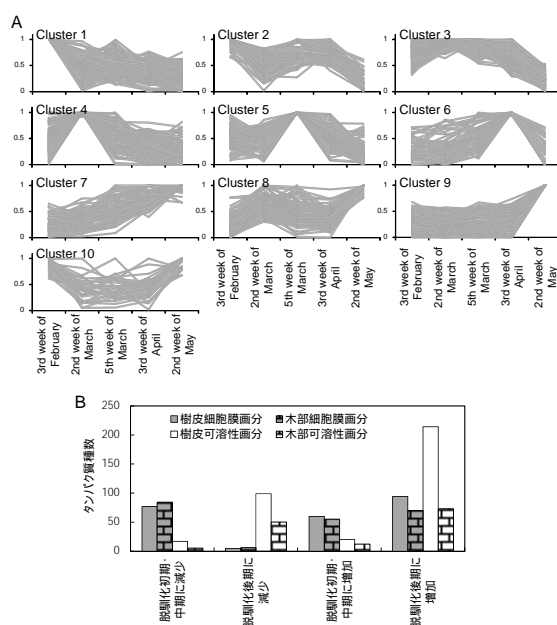


図 1 セイヨウハコヤナギの枝において脱馴化過程で有意に変動するタンパク質のクラスター解析.

点下温度処理をした枝を用いて行った実験で見られた結果と一致する。このことから、北方樹木における脱馴化初期過程はタンパク質の局在の変化や酵素活性の変化など、新規のタンパク質合成以外の要因によって進行する可能性がある。現在行っている恒温チャンバーを用いた 0~10 の冷温域での脱馴化過程におけるタンパク質変動の評価によって、今後、どの温度域で局在の変化や翻訳の活性化が起こるのかが明らかになると予想している。

本研究では、北方樹木の地上部に含まれる 2000 種を超えるタンパク質について、脱馴化過程における半定量的な変動データを収集することができた。このデータは、学術論文として発表することで公開していく。

## 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 1 件)

Jun KASUGA, Guillaume CHARRIER, Matsuo UEMURA, Thierry Ameglio, Characteristics of ultrasonic acoustic emissions from walnut branches during freeze-thaw-induced embolism formation, Journal of Experimental Botany, 査読有, Vol. 66, No. 7, 2015, pp. 1965-1975, DOI:10.1093/jxb/eru543

〔学会発表〕(計 1 件)

春日 純, Proteomic changes in soluble and plasma membrane proteins during seasonal cold-deacclimation and acclimation processes in poplar twigs, 第 57 回日本植物生理学会, 2016 年 3 月

18～20日、岩手大学（岩手県盛岡市）

〔図書〕（計 0件）

〔産業財産権〕

出願状況（計 0件）

取得状況（計 0件）

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

春日 純 (KASUGA, Jun)

帯広畜産大学・畜産学部・助教

研究者番号：40451421

### (2) 研究分担者

### (3) 連携研究者

### (4) 研究協力者

上村 松生 (UEMURA, Matsuo)

岩手大学・農学部・教授

研究者番号：00213398

茅野 光範 (KAYANO, Mitsunori)

帯広畜産大学・畜産学部・講師

研究者番号：20590095