

## シロイヌナズナ低温応答性細胞膜タンパク質の機能解析

<sup>1</sup>岩手大学農学部附属寒冷バイオシステム研究センター,<sup>2</sup>カナダ・ケベック大学  
重松 智美<sup>1</sup>, 富永 陽子<sup>1,2</sup>, 上村 松生<sup>1</sup>

**Functional Analysis of an *Arabidopsis* Cold-responsive Plasma Membrane Protein  
in Association with Cold Acclimation**

Satomi SHIGEMATSU<sup>1</sup>, Yoko TOMINAGA<sup>2</sup> and Matsuo UEMURA<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Cryobiosystem Research Center, Faculty of Agriculture, Iwate University, Morioka 020-8550, Japan*

<sup>2</sup>*Département des Sciences Biologiques, Université du Québec à Montréal, Québec, Canada H3C 3P8*

In many temperate plants, cold acclimation, which is achieved by exposure to non-freezing, low temperatures, results in a significant increase in freezing tolerance as a consequence of the physicochemical stabilization of the plasma membrane, which is the primary determinant of the cell survival under freezing conditions. Although the causal relationship between an increase in freezing tolerance and changes in plasma membrane lipid composition during cold acclimation has been well established, there have been only a few studies on the role of plasma membrane proteins in acquirement of freezing tolerance. To investigate it, we have determined the effect of cold-responsive plasma membrane proteins on the freezing tolerance of *Arabidopsis* plants. One of the cold-responsive plasma membrane proteins that has domains with high similarity to proteins in the lipocalin family (*Arabidopsis* lipocalin, AtLCN) was chosen. Transgenic *Arabidopsis* plants that overexpress *AtLCN* showed enhanced freezing tolerance compared to wild type plants. Using protein-lipid overlay assay, we found that recombinant AtLCN protein had a high affinity for acidic phospholipids found in the plasma membrane. Taken together, AtLCN protein may contribute to increase in freezing tolerance by accumulating adjacent to the plasma membrane and binding to the acid phospholipids.

(Received Oct. 14, 2006; Accepted Nov. 17, 2006)

緒 言

植物の凍結時における細胞膜の物理化学的安定化

第 52 回低温生物工学会研究報告 18.

[Key words: *Arabidopsis thaliana*, plasma membrane protein, cold acclimation, lipocalin, phospholipids; シロイヌナズナ, 細胞膜タンパク質, 低温馴化, リポカリン, リン脂質]

は、細胞の生存と密接に関連していることが知られている<sup>1)</sup>。細胞膜の安定化に関連して、凍結耐性が増大する低温馴化過程では動的に脂質組成変化が起こることが多くの研究により示されている<sup>2, 3)</sup>。しかし、細胞膜に局在、または、その近傍に存在するタンパク質と低温馴化によって誘導される凍結耐性増大との関係に着目した研究は非常に限られている<sup>4, 5)</sup>。我々は、モデル植物であるシロイヌナズナを用いて植物の低温馴化に関する分子機構の解明を目指

して研究を続けており、これまでに、低温馴化過程で量的変動を示す細胞膜関連タンパク質をプロテオーム解析により同定した<sup>6)</sup>。それら低温馴化に応答して変動する細胞膜関連タンパク質の中から、大腸菌の細胞膜に存在し、飢餓条件、高浸透濃度条件など種々のストレスに応答する lipocalin タンパク質と相同性が高い lipocalin 様タンパク質 (以下, AtLCN と略す) に注目し、その機能解析を進めている。本報告では、AtLCN 過剰発現形質転換シロイヌナズナを用いた凍結耐性評価、および、AtLCN と細胞膜との相互作用様式などを解析した結果について示す。

## 材料および方法

### 1. 実験に用いた植物とその生育、低温馴化

シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana* L. Heyhn.) を実験材料に用いた。野生型として Columbia ecotype を用いた。AtLCN 過剰発現形質転換体は、定法に従ってクローニングされた AtLCN 遺伝子を恒常発現プロモーター (カリフラワーモザイクウイルス 35S プロモーター) の下流に繋げ、それを pIG121Hm ベクターに組み込んだものを *Agrobacterium* に導入し、Floral Dip 法によってシロイヌナズナに形質転換した<sup>7)</sup>。その後、得られた種子をカナマイシン含有培地での選抜を繰り返して得られた T3 世代の種子を用いて発芽させた形質転換体を実験に用いた。

シロイヌナズナの種子は、バーミュキュライト/パーライト上に播種し、23°C、連続光 (125  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{sec}$ ) で約 3 週間生育させた。必要に応じて、Hoagland 水耕液を与えた。この試料を低温未馴化とし、低温馴化は、低温未馴化個体を人工気象器 (2°C, 日長 12hr : 100  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{sec}$ ) 中で 2 日間処理した。

### 2. プロトプラストの低温顕微鏡観察

プロトプラストは、低温未馴化の葉から Uemura らの方法<sup>8)</sup>によって単離された。等張液に懸濁された単離プロトプラストは、温度可変ステージを備えた倒立型顕微鏡ステージに載せられ、一定速度 (0.25 ~ 10°C/min) で冷却した。植氷は自然に行われ、おおよそ、-1 ~ -3°C の範囲内で観察された。-10°C ま

で冷却した後、1.0°C/min で温度を上昇させ、プロトプラストが完全に融解するまで 3 ~ 5°C で 3 分間程度静置した。プロトプラストの凍結融解過程は顕微鏡に取り付けた CCD カメラ (C2400-08 : 浜松ホトニクス) により撮影し、ビデオテープ記録された画像からプロトプラストの凍結融解後の生存率 (凍結前を 100% として計算した) を求めた。なお、融解後一定時間経過した後に凍結前と同様の細胞膜の状態を保っていること (すなわち、プロトプラストが球形を保っていること) を生細胞の基準としたが、なお、予備的な実験から、上記により得られた生存率は蛍光染色によって得られた生存率とほぼ一致することが確かめられている (データは示していない)。

### 3. 植物体の凍結耐性評価

超純水で洗浄した後にキムタオル上で水気を切った植物体 5 ~ 6 個体を 50 ml プラスチックチューブに入れ、その上に 3 x 4 cm 角のキムワイブを載せ 0.4 ml の純水で湿らせて乾燥を防いだ。凍結はプログラムフリーザー (PRO COOL BATH NCB-3400, EYELA) を用いて行った。サンプルを -2°C で 15 min 冷却して平衡した後、50  $\mu\text{l}$  の純水から作成された氷晶を加えて植氷を行った。さらに、-2°C で 2 hr 置いた後、2°C/hr の冷却速度で凍結させた。4°C で一晚融解後、植物を土に植え直し、2 週間後の生存率を調べた。

### 4. Protein-lipid overlay assay

組換え AtLCN タンパク質は、5' 末端に 6 x His Tag 配列を付加した *AtLCN* 全長を含むプラスミドを用いて形質転換した大腸菌で発現させ、定法に従って His-Tag と親和性のあるニッケルカラムを用いて精製した。ニトロセルロース膜に目的脂質をプロットした後、1 次反応として 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  AtLCN 溶液と、引き続き 2 次反応では西洋ワサビ過酸化酵素を結合した His-Tag 抗体と反応させ、最終的には化学発光試薬処理によって検出した<sup>8)</sup>。AtLCN に対する親和性は、低温未馴化、低温馴化 2 日の植物から単離した細胞膜 (Uemura らの方法<sup>8)</sup>によって単離された)、細胞膜から抽出した細胞膜全脂質、さらには、市販のリン脂質 [ホスファチジン酸 (PA)、ホスファチジルコリン (PC)、ホスファチジルエタノールアミン (PE)、ホスファチジルグリセロール (PG)、ホ

スファチジルイノシトール (PI), ホスファチジルセリン (PS)] (Avanti Polar Lipids, USA; Doosan Serdary Reserach Laboratories, S. Korea) について調べた。

## 結果および考察

### 1. *AtLCN* 過剰発現体の凍結耐性評価

*AtLCN* は低温馴化過程で蓄積することから、凍結耐性の増大に関与するのではないかと考え、*AtLCN* 過剰発現体を用いて凍結耐性評価を行った。低温顕微鏡を用いて、葉から単離されたプロトプラストを  $-10^{\circ}\text{C}$  まで凍結し、その後の融解過程を観察した結果は、形質転換体のプロトプラストが野生型 (WT) に比べて生存率が約2倍高いことを示した<sup>9)</sup>。また、植物個体を用いた凍結耐性検定は、低温馴化後でも、形質転換体の  $-9^{\circ}\text{C}$  での生存率が野生型と比較して有意に高かった (Table 1)。低温馴化した WT と形質転換体の葉を凍結融解した後に電解質漏出率を測定した実験においても、 $-5$  から  $-9^{\circ}\text{C}$  の範囲で形質転換体のからの漏出率が WT より減少していた<sup>8)</sup>。従って、ある特定の凍結温度範囲で *AtLCN* が凍結傷害発生を抑え、生存率を向上させていることが考えられる。つまり、*AtLCN* はこの温度範囲で起きる凍結傷害を回避または修復する作用を持つことが予想される。

**Table 1.** Effect of *AtLCN* overexpression on the survival of *Arabidopsis* plants.

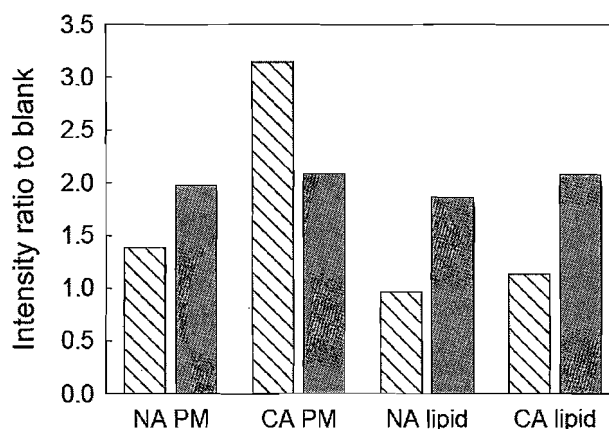
Temperature	Wild type	<i>AtLCN</i> overexpressor
	Survival (%)	
$0^{\circ}\text{C}$	100	100
$-8^{\circ}\text{C}$	$97.2 \pm 2.8$	$96.7 \pm 3.3$
$-9^{\circ}\text{C}$	$45.0 \pm 14.7$	$93.9 \pm 3.9$
$-10^{\circ}\text{C}$	$49.4 \pm 18.1$	$58.9 \pm 7.8$
$-11^{\circ}\text{C}$	$20.6 \pm 9.4$	$6.1 \pm 3.9$
$-12^{\circ}\text{C}$	$20.0 \pm 16.3$	$2.8 \pm 2.8$

Plants were cold-acclimated for 2 days at  $2^{\circ}\text{C}$  before freezing. Survival was determined based on whole plant regrowth test described in the text. Note that there was no decrease in survival after freezing over the range of  $-2$  to  $-7^{\circ}\text{C}$  both in wild type and *AtLCN* overexpressor.

低温馴化前後の植物における凍結過程では、凍結時の脱水によって細胞膜が機能的な損傷を受ける Loss of Responsiveness (LOR) と呼ばれる傷害が見られる<sup>2)</sup>。LOR とは、脱水の進行に伴って、十分な距離を保っていた生体膜同士が異常接近により融合し、細胞膜の半透性が失われ、細胞は活動を維持できなくなるというものである。したがって、*AtLCN* は生体膜の異常接近を緩和する効果があり、低温馴化過程で起こる他の細胞内における変動とあいまって、 $-9^{\circ}\text{C}$  付近に起こる程度の脱水に伴う生体膜の異常接近を防ぐ効果があるのかもしれない。

### 2. *AtLCN* と細胞膜との親和性

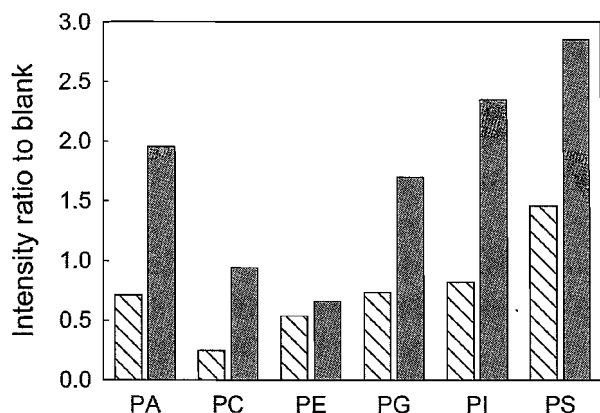
実際に *AtLCN* が細胞膜と相互作用するか否かを調べるため、*AtLCN* と細胞膜の親和性を protein-lipid overlay assay により調査した。その結果、低温未馴化植物体からの細胞膜とその抽出全脂質、及び、*AtLCN* の間では親和性が低いことが判明した (Fig. 1)。一方、低温馴化後の試料では、細胞膜とはほとんど反応しないが、細胞膜から抽出された全脂質との間で反応が見られることが明らかになった。



**Fig. 1.** *AtLCN* affinity to plasma membrane or plasma membrane phospholipids. Assays were performed in the presence (grey bars) or absence (hatched bars) of Ca ion (1 mM). All samples were adjusted to  $0.26 \mu\text{g}$  phospholipid. Plasma membranes and total lipid extracts were prepared with seedlings before (NA PM and NA lipid, respectively) or after (CA PM and CA lipid, respectively). *AtLCN* affinity was expressed as the ratio of signal intensity of each sample to that of blank area where no lipids were blotted on the membrane.

シロイヌナズナを含む植物の低温馴化過程で  $\text{Ca}^{2+}$

濃度が一過的に上昇すること<sup>11)</sup>, さらには, *in vitro* で  $\text{Ca}^{2+}$  が酸性脂質である PS と作用することが報告されている<sup>12)</sup>. そこで, 1 mM  $\text{Ca}^{2+}$  存在条件下において protein-lipid overlay assay を試みた (Fig. 1). その結果, AtLCN は低温未馴化の細胞膜, および, 細胞膜全脂質, 低温馴化後の細胞膜, および, 細胞膜全脂質の全てと親和性を示した. 従って, AtLCN は低温馴化過程で  $\text{Ca}^{2+}$  を介して細胞膜脂質と相互作用することが推測される.



**Fig. 2.** AtLCN affinity to phospholipids. Assays were performed in the presence (grey bars) or absence (hatched bars) of Ca ion (1 mM). All samples were adjusted to 0.26  $\mu\text{g}$  phospholipid. AtLCN affinity was expressed as the ratio of signal intensity of each sample to that of blank area where no lipids were blotted on the membrane.

### 3. AtLCN とリン脂質との親和性

以上の解析から, AtLCN が細胞膜脂質と高い親和性を持つことが考えられるため, 次に親和性を持つ脂質分子種の検証を行った. シロイヌナズナ細胞膜脂質の約半分はリン脂質で占められている<sup>3)</sup>. 一般に, 低温馴化過程において細胞膜リン脂質含量が増加することが知られていることから<sup>3, 13)</sup>, AtLCN が低温馴化後のシロイヌナズナ細胞膜脂質と高い親和性を示したこととリン脂質増加が相関している可能性があると考え, 様々なリン脂質を用いて protein-lipid overlay assay を行った (Fig. 2).  $\text{Ca}^{2+}$  非存在下では, AtLCN とリン脂質間の相互作用は, ホスファチジルセリン (PS) を除いてほとんど観察されなかった. 一方, 1 mM  $\text{Ca}^{2+}$  存在下では, PS の他にもホスファチジン酸 (PA), ホスファチジルグリセロール (PG), および, ホスファチジイノシトール (PI) でもシグナルが見られ, AtLCN と相互

作用することが確認された. しかし, 細胞膜の主要なリン脂質であるホスファチジルコリン (PC) とホスファチジルエタノールアミン (PE) に関しては, いずれの条件下においてもシグナルはほとんど観察されず (バックグラウンドに比べてもシグナル強度が低い場合が多い), AtLCN との親和性が低いことが判明した.

AtLCN との高い親和性が確認された PA, PG, PI, および, PS は, 電気的に酸性を示す (つまり, 生理的 pH では負電荷を持つ) ことから (Table 2), AtLCN は細胞膜に存在する酸性リン脂質と相互作用すると考えられる. なお, 細胞膜に存在する主要なリン脂質 PC と PE は, 中性リン脂質であり, 生理的 pH では電荷を帯びていない.

**Table 2.** Polar head group structure of phospholipids in plant plasma membrane.

Phospholipids	Polar group	
PA	$-\text{PO}_4\text{-H}$	acidic
PS	$-\text{PO}_4\text{-CHCOONH}_3$	acidic
PG	$-\text{PO}_4\text{-CH}_2\text{CH(OH)CH}_2\text{OH}$	acidic
PI	$-\text{PO}_4\text{-C}_6\text{(OH)}_5$	acidic
PC	$-\text{PO}_4\text{-N(CH}_3)_3$	neutral
PE	$-\text{PO}_4\text{-NH}_3$	neutral

AtLCN と同様に低温で誘導されるトウモロコシ<sup>14)</sup> やコムギ<sup>16)</sup> デハイドリントタンパク質は細胞膜に存在し, *in vitro* では, それらのデハイドリントタンパク質は  $\alpha$ -ヘリックス構造を取り, PA で構成された脂質二重膜と強く結合することが報告されている<sup>17)</sup>. このことから, 著者らは, デハイドリントタンパク質は, 負電荷を帯び, かつ, ヘキサゴナル  $\square$  相を形成しやすい PA に結合することで膜の安定化に働くのではないかと推測している<sup>17)</sup>. 今回得られた結果も, AtLCN が低温馴化過程で細胞膜近傍に蓄積し,  $\text{Ca}^{2+}$  を介して酸性リン脂質と結合することにより細胞膜を安定化し, 究極的には, 凍結耐性の増大に貢献していることを示しているのかもしれない. 現在, 様々な組成からなる人工脂質小胞 (リポゾーム) の凍結融解課程における安定性に対する AtLCN が与える影響を引き続き調査している.

## 謝 辞

本研究は、科学研究費補助金 (#17380062), および、岩手大学 21 世紀 COE プログラム (K-3) の援助の下で行われた。

## 文 献

- 1) Steponkus, P. L.: Role of the plasma membrane in freezing injury and cold acclimation, *Annu. Rev. Plant Physiol.*, **35**, 543-583 (1984)
- 2) Steponkus, P. L., Uemura, M. and Webb, M. S.: A contrast of the cryostability of the plasma membrane of winter rye and spring oat: two species that widely differ in their freezing tolerance and plasma membrane lipid composition, *In "Advances in Low-Temperature Biology"*, P. L. Steponkus, ed., JAI Press, London (UK), Vol. 2, p. 211-312 (1993)
- 3) Uemura, M., Joseph, R. A. and Steponkus, P. L.: Cold acclimation of *Arabidopsis thaliana*: effect on plasma membrane lipid composition and freeze-induced lesions, *Plant Physiol.*, **109**, 15-30 (1995)
- 4) Goodwin, W., Pallas J. A. and Jenkins, G. I.: Transcripts of a gene encoding a putative cell wall-plasma membrane linker protein are specifically cold-induced in *Brassica napus*, *Plant Mol. Biol.*, **31**, 771-781 (1996)
- 5) Brenton, G., Vazquez-Tello, A., Danyluk, J. and Sarhan, F.: Two novel intrinsic annexins accumulate in wheat membranes in response to low temperature, *Plant Cell Physiol.*, **41**, 177-184 (2000)
- 6) Kawamura, Y. and Uemura, M.: Mass spectrometric approach for identifying putative plasma membrane proteins of *Arabidopsis* leaves associated with cold acclimation, *Plant J.*, **36**, 141-154 (2003)
- 7) Clough, S. J. and Bent, A. F.: Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*, *Plant J.* **16**, 735-743 (1988)
- 8) Deak, M., Casamayor, A., Currie, R. A., Downes, C. P. and Alessi, D. R.: Characterization of a plant 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 homologue which contains a pleckstrin homology domain, *FEBS Lett.*, **451**, 220-226 (1999)
- 9) Tominaga, Y., Nakagawara, C., Kawamura, Y. and Uemura, M.: Effect of plasma membrane-associated proteins on acquisition of freezing tolerance in *Arabidopsis thaliana*, *In "Plant Cold Hardiness"*, T. H. H. Chen, M. Uemura and S. Fujikawa, eds., CAB International, Oxfordshire (UK), p.235-246 (2006)
- 10) Frenette-Charron, J. B., Breton, G., Badawi, M. and Sarhan, F.: Molecular and structural analyses of a novel temperature stress-induced lipocalin from wheat and *Arabidopsis*, *FEBS Lett.*, **517**, 129-132 (2002)
- 11) Knight, H., Trewavas, A. J. and Knight, M. R.: Cold signaling in *Arabidopsis* involves two cellular pools and a change in calcium signature after acclimation, *Plant Cell*, **8**, 489-503 (1996)
- 12) Düzgünes, N., Wilschut, J., Fraley, R. and Papahadjopoulos, D.: Studies on the mechanism of membrane fusion: role of head-group composition in calcium- and magnesium-induced fusion of mixed phospholipid vesicles, *Biochim. Biophys. Acta*, **642**, 182-195 (1981)
- 13) Uemura, M., Steponkus, P. L.: A contrast of the plasma membrane lipid composition of oat and rye leaves in relation to freezing tolerance, *Plant Physiol.*, **104**, 479-496 (1994)
- 14) Asghar, R., Fenton, R. D., DeMason, D. A. and Close, T. J.: Nuclear and cytoplasmic localization of maize embryo and aleurone dehydrin, *Protoplasma*, **177**, 87-94 (1994)
- 15) Egerton-Warburton, L. M., Balsamo, R. A. and Close, T. J.: Temporal accumulation and ultrastructural localization of dehydrins in *Zea mays* L., *Physiol. Plant.*, **101**, 545-555 (1997)
- 16) Danyluk, J., Perron, A., Houde, M., Limin, A., Fowler, B., Benhamou, N. and Sarhan, F.: Accumulation of an acidic dehydrin in the vicinity of the plasma membrane during cold acclimation of wheat, *Plant Cell*, **10**, 623-638 (1998)
- 17) Koag, M. C., Fenton, R. D., Wilkens, S. and Close, T. J.: The binding of maize DHN1 to lipid vesicles: gain of structure and lipid specificity, *Plant Physiol.*,

(104)

131, 309-316 (2003)