

## カラスムギとライムギ細胞膜マイクロドメインの組成と凍結耐性との関連性

<sup>1</sup>岩手大学農学部附属寒冷バイオフィロンティア研究センター,<sup>2</sup>岩手医科大学歯学部,<sup>3</sup>岩手大学農学部高橋大輔<sup>1</sup>, 古戸あかり<sup>1</sup>, 南杏鶴<sup>1</sup>, 加茂政晴<sup>2</sup>, 山下哲郎<sup>3</sup>, 上村松生<sup>1</sup>**Relationship of Plasma Membrane Microdomain Composition and Freezing Tolerance in Oat and Rye**Daisuke TAKAHASHI<sup>1</sup>, Akari FURUTO<sup>1</sup>, Anzu MINAMI<sup>1</sup>, Masaharu KAMO<sup>2</sup>,Tetsuro YAMASHITA<sup>3</sup> and Matsuo UEMURA<sup>1</sup><sup>1</sup>*Cryobiofrontier Research Center, Faculty of Agriculture, Iwate University, Morioka 020-8550, Japan*<sup>2</sup>*Department of Biochemistry, Iwate Medical University School of Dentistry, Morioka 020-0023, Japan*<sup>3</sup>*Department of Biochemistry and Food Sciences, Faculty of Agriculture, Iwate University,**Morioka 020-8550, Japan*

Cold acclimation (CA) results in alterations of plasma membrane (PM) lipid and protein compositions in plants, which is critical to increase their freezing tolerance. Recent studies indicate that PM is considered not homogeneous and contains sterol/sphingolipid-enriched microdomains. In plant cells, however, the function of plasma membrane microdomains is not yet fully understood. The present study aims to investigate lipid and protein compositions of microdomains isolated from non-acclimated (NA) and cold-acclimated (CA) leaves of oat and rye that differ considerably in freezing tolerance. We found that there are considerable differences in lipid and protein compositions in total PM and DRM (detergent-resistant plasma membrane) between the two species as well as before and after CA. From these results, we will discuss potential roles of plasma membrane microdomains in CA and freezing tolerance in plants.

(Received Aug. 18, 2010; Accepted Sep. 28, 2010)

## 結 言

第 55 回低温生物工学会研究報告 20.

[Key words: Cold acclimation, Plasma membrane, Microdomain, Freezing tolerance; 低温馴化, 細胞膜, マイクロドメイン, 凍結耐性]

日本を含む温帯に生育する植物は、秋から冬にかけて低温に曝されると凍結耐性を上昇させ、本格的な低温を迎える冬に向けて低温、凍結傷害を回避する耐性を整える(低温馴化)。低温馴化過程では、細胞膜 (PM) 中の脂質やタンパク質の組成が変動することが明らかになっており、それは植物の凍結耐性に深く関わっていることが知られている<sup>1)</sup>。PMは、

流動モザイクモデルで表されるように、脂質やタンパク質が均質に混ざり合っているとされてきたが、近年ではこの仮説に加えて細胞膜中のステロールやスフィンゴ脂質などの脂質や特定のタンパク質に富んでいる領域—細胞膜マイクロドメイン (PM-MD)—の存在が示唆されている<sup>2)</sup>。そこで、本研究では近縁でありながら凍結耐性が弱いカラスムギと強いライムギを用いて<sup>3)</sup>、マイクロドメインの脂質とタンパク質組成を解析し、低温馴化および凍結耐性と、マイクロドメインとの関連性の解明を試みた。

## 材料および方法

### 1. 実験材料

実験材料としてカラスムギ (*Avena sativa* L. cv. New almighty) とライムギ (*Secale cereale* L. cv. Maskateer) を用いた。種子を土に播種後、23°C 連続光 (50-100  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ ) 下で 10~12 日間生育させた植物体を実験に用いた。低温馴化処理は人工気象器 (2°C, 12 時間日長, 100  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ ; CU-351A; トミー精工) で 4 週間行った。

### 2. 細胞膜およびマイクロドメインの単離

低温馴化処理前後のカラスムギおよびライムギ植物体地上部から、水性二層分配法により細胞膜画分を調製した<sup>3)</sup>。得られた細胞膜画分 (PM 画分) を用い、2 mg のタンパク質に対して 3 ml の 1% (w/v) Triton X-100 を含む緩衝液にて氷上で 30 分間の処理を行った<sup>4)</sup>。Triton X-100 処理した細胞膜画分は、65% (w/w) スクロース溶液と混ぜてスクロース終濃度が 52% (w/w) になるよう調製し、その上に 48, 35, 30, 5% (w/w) スクロース溶液を重層した。超遠心 (141,000 g, 20 h, 4°C) 後、35-45% (w/w) スクロース濃度付近に浮遊した 2 本の白濁した不透明な層を集め、超遠心によって不溶性のペレットとして回収したものを非イオン性界面活性剤不溶性細胞膜 (DRM: detergent-resistant plasma membrane) 画分とした。

### 3. 脂質組成解析

単離した PM 画分および DRM 画分より Bligh and Dyer 法<sup>5)</sup>を用いて脂質抽出を行った。シリカゲル薄層クロマトグラフィで展開した後 (chloroform-methanol-water = 65:25:4, v/v/v), Primulin で脂質を可視化し、それぞれの脂質のスポットをプレートから分取した。ステロールはステロール骨格、グルコセレブロシド (GlcCer) は糖、リン脂質はリン酸基を定量することにより、組成を割り出した<sup>1)</sup>。

### 4. タンパク質解析

DRM タンパク質は、一次元電気泳動を行った後、銀染色で可視化した<sup>6)</sup>。その後、バンドパターンに関わらず、ゲルを 5mm 間隔で計 20 個の画分に切り出し、トリプシンでタンパク質をゲル内消化した後、nano-LC-MS/MS (ADVANCE UHPLC, AMR/ LTQ Orbitrap, Thermo Scientific) を用いてタンパク質を同定した<sup>7)</sup>。

## 結 果

### 1. 細胞膜マイクロドメインの脂質組成

低温馴化前後のカラスムギおよびライムギから単離された DRM において、脂質含量 (nmol/100  $\mu\text{g}$  protein) を定量し、全脂質量に占める各脂質の割合 (mol%) を算出して比較した (Fig. 1)。両者の組成を比較すると、それぞれの脂質で割合が異なり、低温前後での変動パターンも異なっていた。特に遊離ステロール (FS)、アシルステリルグルコシド (ASG)、ステリルグルコシド (SG) といったステロール脂質およびリン脂質で顕著であった。両種のステロール組成においては、特徴的な違いがあり (Fig. 2)、カラスムギにおいては、ステロールの中でも ASG の割合が大きな部分を占めていたが、一方でライムギでは FS の割合が最も大きかった。さらに、低温馴化後には、カラスムギでは ASG の割合が増加していたのに対し、ライムギでは減少していた。全リン脂質 (PL) を見てみると、カラスムギ DRM では低温馴化により増加を示すのに対し、ライムギでは変動がなかった (Fig. 3)。さらに、ライムギではリン脂質の割合がすでに未馴化の時点でカ

ラスムギよりも高く、低温馴化後においてもそのまま高い割合を保っていた。

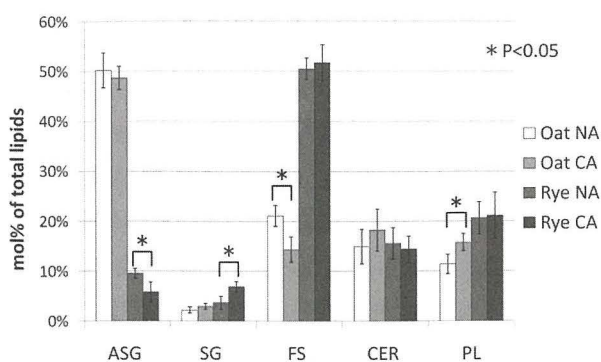


Fig. 1 Lipid compositions of PM and DRM in oat and rye leaves before (NA) and after (CA) cold acclimation.

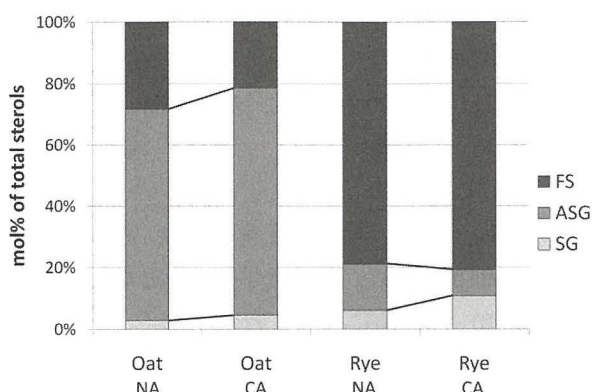


Fig. 2 Sterol compositions of DRM in oat and rye leaves before (NA) and after (CA) cold acclimation.

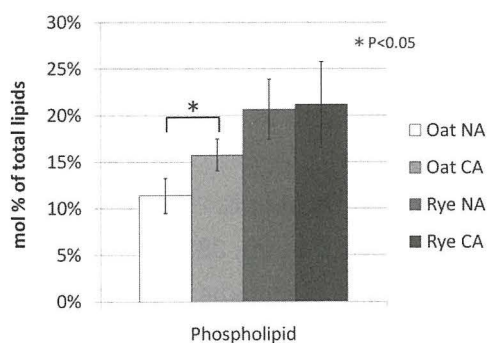


Fig. 3 Proportions of phospholipid in oat and rye DRM before (NA) and after (CA) cold acclimation.

## 2. 細胞膜マイクロドメインのタンパク質組成

脂質解析と並行して、電気泳動 (SDS-PAGE) と質量分析 (nano-LC-MS/MS) を利用してタンパク質組成も解析した。タンパク質の泳動パターンから (Fig. 4), DRM では PM に比べて蓄積量が多いタンパク質や少ないタンパク質が存在することが明らかになった。また、カラスムギとライムギともに、低温馴化前後で PM と DRM いずれにおいても泳動パターンが変化していたが、低温馴化により蓄積量が増加するものや減少するもの、新たに見られるものや見られなくなるものなど、様々な変化が見受けられた。中には、低温馴化前後でのタンパク質の増減パターンがカラスムギとライムギで異なるものも見られた。次いで、DRM タンパク質を SDS-PAGE で分離した後、トリプシン消化を行い、nano-LC-MS/MS を用いて網羅的なタンパク質の同定を試みた。その結果、カラスムギとライムギで 100 から 400 個程度の DRM タンパク質が同定できた。2 種の植物に共通して、P-type ATPase や Aquaporin などのような膜輸送体や、アクチンやチューブリンなどの細胞骨格タンパク質、シグナル伝達に参与するリン酸化酵素やダイナミンやクラスリンといった小胞輸送に参与するタンパク質など、多くの機能性タンパク質が同定された。これらの多くはシロイヌナズナマイクロドメインでも同定されている<sup>6)</sup>。

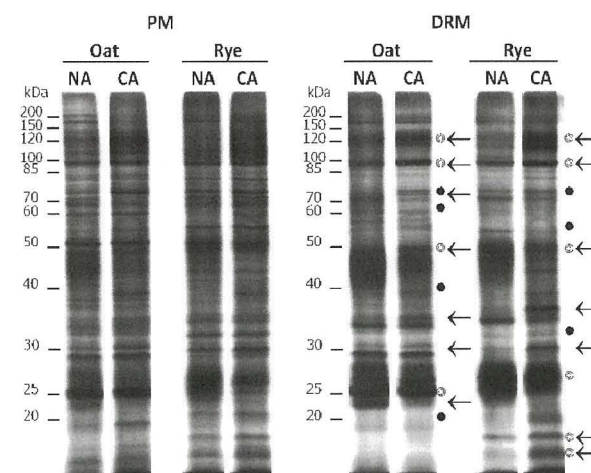


Fig. 4 Protein compositions of PM and DRM in oat and rye during CA. In DRM, compared with PM, some proteins were less detected (⊙) but others were enriched in DRM (●). Furthermore, some DRM proteins changed after cold acclimation in both species (←).

一方で、カラスムギとライムギで同定されたタンパク質の中でも、一方のみで同定されたものもあった。例えば、カラスムギでは、ステロール脂質である ASG や SG の生合成に関わる UDP-glucose:sterol glucosyltransferase が同定され、ライムギでは細胞膜修復に関与する Synaptotagmin や Syntaxin, その他各種のリン酸化酵素も同定された。

## 考 察

脂質組成解析の結果から、カラスムギマイクロドメインは ASG を主要ステロールとして、低温馴化後には ASG の割合が増加する一方で、ライムギは ASG の割合が少なく低温馴化後には減少することが明らかになった。ASG は凍結傷害を導きやすい脂質であることが示唆されており<sup>8)</sup>、マイクロドメインの ASG の割合がカラスムギとライムギで凍結耐性の差を生み出す一因であることが示唆される。また、リン脂質は細胞膜の流動性を保ち、凍結傷害を回避することが知られり、ライムギマイクロドメインのリン脂質含量がカラスムギより多いという今回の結果と一致している。それに加えて、マイクロドメインには特定のタンパク質が蓄積していることや、低温馴化過程で大きく変動することが示され、さらに質量分析から、マイクロドメインは多くの機能性タンパク質を含んでいる特定の機能を持つ領域である可能性が示唆された。

そのタンパク質組成は 2 種の植物で異なり、ライムギはいくつかの細胞膜修復関連タンパク質やさまざまなリン酸化酵素を含んでいた。これらのタンパク質は細胞膜修復過程やシグナル伝達経路を介してライムギの凍結耐性に寄与している可能性がある。対照的に、カラスムギマイクロドメインでは ASG や SG の生合成に関わる UDP-glucose:sterol glucosyl-transferase が同定され、この結果はカラスムギのステロール組成と一致しているのかもしれない。したがって、このタンパク質が間接的にカラスムギの比較的弱い凍結耐性に関わっているのかもしれない。しかし、これらタンパク質の質量分析では低温馴化過程での量的変動を調べていないため、今後はタンパク質の半定量解析を行い、マイクロドメインタンパク質の変動パターンと 2 種の植物の凍

結耐性の違いとの関連性について研究を進めることが必要である。

## ま と め

凍結耐性が大きく異なる 2 種の植物 (カラスムギとライムギ) を用いて、細胞膜中にある微小領域 (マイクロドメイン) の脂質およびタンパク質組成解析を行った。これらの結果から、その組成は 2 種の植物で大きく異なり、さらに低温馴化過程でも大きく変動することが明らかになった。同定された脂質およびタンパク質成分の特性および機能を考慮すると、それらの割合および変動パターンがカラスムギとライムギの凍結耐性の違いに何らかの寄与をしている可能性が示唆された。

## 謝 辞

本研究の一部は、科学研究費補助金 (#17380062 および #22120003), 岩手大学 21 世紀 COE プログラム (K-3) の援助によって行われた。

## 文 献

- 1) 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)
- 2) Simons, K. and Ikenen, E. : Functional rafts in cell membranes, *Nature*, **387**, 569-572 (1997)
- 3) Uemura, M. and 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)
- 4) Peskan, T., Westermann, M. and Oelmüller, R. : Identification of low-density Triton X-100-insoluble plasma membrane microdomains in higher plants, *Eur. J. Biochem.*, **267**, 6989-6995 (2000)
- 5) Bligh, E.G. and Dyer, W.J. : A rapid method of total lipid extraction and purification, *Can. J.*

- Bot., 37, 911-917 (1959)
- 6) Minami, A., Fujiwara, M., Furuto, A., Fukao, Y., Yamashita, T., Kamo, M., Kawamura, Y. and Uemura, M. : Alterations in detergent-resistant plasma membrane microdomains in *Arabidopsis thaliana* during cold acclimation, *Plant Cell Physiol.*, 50, 341-359 (2009)
- 7) Morel, J., Claverol, S., Mongrand, S., Furt, F., Fromentin, J., Bessoule, J.J., Blein, J.P. and Simon-Plas, F. : Proteomics of plant detergent resistant membranes, *Mol. Cell. Proteomics*, 5, 1396-1411 (2006)
- 8) Webb, M.S., Green, B.R., Irving, T.C. and Steponkus, P.L. : Effect of plant sterols on the hydration and phase behavior of DOPE:DOPC mixtures. *Biochim. Biophys. Acta*, 1239, 226-231 (1995)