

植物細胞膜マイクロドメインタンパク質の低温応答性

¹岩手大学 21 世紀 COE プログラム²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南 杏鶴¹, 古戸あかり², 上村松生^{1,2}

Cold Response of Plant Microdomain-associated Proteins

Anzu MINAMI¹, Akari FURUTO² and Matsuo UEMURA^{1,2}¹The 21st Century Center of Excellence Program and ²Cryobiofrontier Research Center,
Iwate University, Morioka 020-8550, Japan

Arabidopsis thaliana increases freezing tolerance upon exposure to low, non-freezing temperatures, which is known as cold acclimation (CA). CA results in significant changes in the lipid and protein compositions in the plasma membrane and these changes affect the freezing tolerance of plants. Recently, domains in the plasma membrane (called as microdomains), which contain membrane specific proteins associated with membrane trafficking and signal transduction, are isolated as detergent-resistant plasma membrane fractions (DRM). To investigate the role of DRM-associated proteins in CA, we characterized cold-responsive DRM-associated proteins in *Arabidopsis* seedlings during CA. Two-dimensional differential gel electrophoresis and subsequent mass spectrometric analyses revealed that many proteins quantitatively changed during CA, among which P-type H⁺-ATPase, aquaporin and endocytosis-related proteins increased and tubulin, actin and V-type H⁺-ATPase subunits decreased in DRM. Gene expression analysis indicated that the protein accumulation levels in DRM during CA were not regulated at levels of transcription. These results suggest that (1) *Arabidopsis* plasma membrane microdomains play a role as a platform for membrane transport, membrane trafficking and cytoskeleton interaction and (2) the changes in these proteins are not correlated with the changes in gene expression levels during CA.

(Received Oct. 16, 2008; Accepted Dec. 11, 2008)

結 言

温帯域の植物は、凍らない程度の低温にある期間さらされると、より低い凍結温度に対する耐性能力

第 54 回低温生物工学会研究報告 15.

[Key words: *Arabidopsis*, 低温馴化, 細胞膜, マイクロドメイン, タンパク質]

(耐凍性) を獲得する。この過程は低温馴化機構と呼ばれる。モデル植物シロイヌナズナ植物体は、数日間の低温 (2°C) 馴化处理によって、凍結耐性 (LT₅₀: 半数個体致死温度) が -4°C から -10°C 程度まで上昇する¹⁾ 低温馴化過程では、遺伝子発現変動やタンパク質の蓄積変化, 代謝レベルでの変動を経て, 生理学的・形態学的な応答が起こり, これら一連の変化が耐凍性の増大に密接に関係していると考えられて

いる^{2,3)}。一般的に、凍結にさらされた植物細胞は、細胞外（アポプラスト）領域に形成される氷晶に起因する脱水ストレス、および機械的ストレスを受ける。この時、細胞外と細胞内を隔てる細胞膜の機能・構造維持が細胞の生存に最も重要であることが知られている⁴⁾。このことから、低温馴化過程で起こる植物細胞膜の構成成分の変化と凍結ストレス下での細胞膜の構造・機能維持との関連性に焦点を当てた研究が進められてきた。

細胞膜はリン脂質、ステロール脂質、スフィンゴ脂質からなる脂質二重層と膜タンパク質から構成されており、細胞膜構成成分は、細胞骨格タンパク質などの裏打ちタンパク質により動きが制限され、不均一に分布していると考えられている。また、膜脂質の数%を占めるスフィンゴ脂質は、膜脂質の大半を占めるリン脂質と比較して融点が高い、ステロール脂質と高い親和性をもつ、互いに会合しやすいという物理的特性を持つ。このことから、細胞膜のスフィンゴ脂質はステロール脂質とともに、リン脂質からなる比較的流動的な液晶相とは異なる領域に分布し、流動性が抑制された秩序液晶相として細胞膜上に微小ドメインを形成すると考えられている。このようなスフィンゴ脂質の物理的特性を流動モザイクモデルに取り入れて生まれたのが、“細胞膜マイクロドメイン”の概念である⁵⁾。スフィンゴ脂質とステロール脂質に富むマイクロドメインは、これら脂質と親和性が高い膜タンパク質とともに、非イオン性界面活性剤不溶性膜（DRM: detergent-resistant plasma membrane）画分として生化学的に単離される。DRM画分には様々な受容体や、細胞骨格、メンブレントラフィッキング、膜輸送や細菌感染に関するタンパク質が含まれていることから、膜機能の中心的な場としてのマイクロドメインの重要性が指摘されている。

低温馴化過程で耐凍性を増した多くの植物では、細胞膜のスフィンゴ脂質含量が低下する⁶⁾。また、低温は膜脂質の物理的性質を変化させることから、スフィンゴ脂質を主成分として形成されるマイクロドメインが低温馴化過程で何らかの影響を受けていることが考えられる。そこで、植物の細胞膜マイクロドメイン構成成分が低温応答性を示すか否かを調べるために、シロイヌナズナ細胞膜由来の DRM 画

分に存在するタンパク質及び脂質の網羅的解析を行った（Minami et al., submitted）。本研究では、低温馴化過程におけるマイクロドメイン局在タンパク質の変動と低温馴化との関連性について考察するとともに、DRM画分におけるタンパク質の蓄積変化と転写レベルでの制御との関係について報告する。

略 語

- CA: cold acclimation or cold acclimated (低温馴化)
 CHC: clathrin heavy chain (クラスリン重鎖)
 DRM: detergent-resistant plasma membrane (非イオン性界面活性剤不溶性細胞膜)
 DRP: dynamin-related protein (ダイナミン様タンパク質)
 LC-MS/MS: liquid chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry (液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析)
 MALDI-TOF/MS: matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析)
 P-ATPase: P-type H⁺-ATPase (細胞膜プロトンポンプ)
 PIP: plasma membrane intrinsic protein (細胞膜型アクアポリン)
 TUA: α -tubulin (α -チューブリン)
 TUB: β -tubulin (β -チューブリン)
 2D-DIGE: two-dimensional difference gel electrophoresis (蛍光標識ディファレンスゲル二次元電気泳動)
 V-ATPase: V-type H⁺-ATPase (液胞膜プロトンポンプ)

材料および方法

1. 生育方法及び低温馴化処理条件

シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh ecotype Columbia) 植物体は、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 3~4 週間生育させたものを用いた。また、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) で行った。

2. 細胞膜及び DRM 画分の調製

低温馴化処理前後のシロイヌナズナ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⁶⁾。得られた細胞膜画分を用い、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⁷⁾。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の終濃度が 52% (w/w) になるよう調製し、その上に 35, 30, 5% (w/w) スクロース溶液を重層した。スクロース密度勾配遠心 (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、超遠心分離によりペレットとして回収し、非イオン性界面活性剤不溶性細胞膜 (DRM) 画分とした。

3. タンパク質解析

ウェスタンブロット解析には低温馴化 0, 2, 4 日目の植物体から調製した等量の DRM タンパク質を SDS-PAGE によって展開後、PVDF 膜に転写し、一次抗体に抗 clathrin heavy chain 抗体 (CHC antibody [4A8]; Abcam), 抗細胞膜型アクアポリン (PIP)⁸⁾, 抗 P-type H⁺-ATPase 抗体 (P-ATPase)⁹⁾, 抗 α -及び β -tubulin 抗体 (TUA, TUB; DM1A, Tub2.1; Sigma-Aldrich), 抗 band-7 protein 抗体 (Minami et al., submitted), ならびに HRP 標識二次抗体を反応させて行った。

DRM タンパク質の低温馴化過程におけるタンパク質蓄積量の差異の解析には、蛍光標識ディフェレンスゲル二次元電気泳動 (2D-DIGE: two-dimensional difference gel electrophoresis) 法を用いた。GE Healthcare 社のプロトコールを元に蛍光標識したタンパク質を固定化 pH 勾配ゲル (pH 3-11NL, 18 cm; GE Healthcare) によって等電点電気泳動した後、SDS-PAGE による二次元目電気泳動を行った。泳動後、Molecular Imager FX (Bio-Rad) を用いてゲルイメージを取得後、PDQuest V 8.0 (Bio-Rad) ソフトウェアによりタンパク質の蓄積量を定量的に解析した。DRM タンパク質の同定には、MALDI-TOF/MS (Voyager-DE STR, Applied Biosystems), 及び Q-TOF LC-MS/MS (Waters) 法を用いた。

4. 遺伝子発現解析

低温馴化 0, 0.5, 1, 2, 4, 7 日目の植物体の葉から全 RNA を抽出し、キット (ReverTra Ace- α ; TOYOBO) を用いて cDNA を合成した。その際、外部標準として λ poly A⁺ RNA-A (TaKaRa) を加えた。Real-time PCR は Table 1 の primer セットを元に SYBR Green I (SYBR Premix Ex TaqTM II; TaKaRa) を用いて行った。目的遺伝子の発現量はリファレンスコントロールとして同様に解析した λ poly A⁺ RNA-A の相対的濃度値をもとに補正し相対定量法により求めた。

DNA マイクロアレイ解析は、NASCArrays (<http://affymetrix.arabidopsis.info/>) から本実験

Table 1. List of real-time PCR primers

Target	AGI Code No.	Nucleotide Sequence (5' to 3')
Dynamamin-related protein 1A (DRP1A)	At5g42080	for acactccattttcgaccgctaca
		rev ttcaatagcgacgagagcct
Dynamamin-related protein 1E (DRP1E)	At3g60190	for gcttctccttctgtctgcaac
		rev ctctcttctgtgatctgagag
Dynamamin-related protein 2A (DRP2A)	At1g10290	for tcacacacatgtgtggcag
		rev tttacccaacagttcagattca
Dynamamin-related protein 2B (DRP2B)	At1g59610	for gtttggtttccaggattgttat
		rev acacacgcaagtacatcatca
Remorin family protein	At2g45820	for cttcttcggctgagagacaa
		rev tatgctcctcgatgggtttt
Clathrin heavy chain-1 (CHC1)	At3g08530	for atagagtgcggccaatttgc
		rev cgaatggaatgaaatgctga
Clathrin heavy chain-2 (CHC2)	At3g11130	for ttctttggaggagagaggaga
		rev tcgaagcaagaacaagagga
External standard (λ poly A ⁺ RNA-A)		Real Time Primer for λ polyA (TaKaRa)

条件と類似した低温馴化処理条件のものを検索した。遺伝子発現解析に使用した NASCARRAYS-404 は、シロイヌナズナ約 24,000 遺伝子の塩基配列が含まれている Affymetrix ATH1 Arabidopsis Genome Array, 及び播種後 3 週間目の植物体を 4°C で 9 時間日長の低温条件下で 0, 1, 6, 12 時間及び 1, 2, 4 日間処理した植物体から調製された RNA を用いて行った¹⁰⁾。また、低温馴化処理過程における遺伝子発現量の経時的変化は、データベース検索により得られた遺伝子発現プロファイルから各々の遺伝子の signal value の平均値を算出し、その後、低温馴化処理 0 日目の平均値に対する相対値として算出した。

結果と考察

1. シロイヌナズナ細胞膜及び DRM タンパク質

低温馴化処理前後のシロイヌナズナ細胞膜画分からスフィンゴ脂質とステロール脂質に富む非イオン性界面活性剤不溶性細胞膜 (DRM) 画分を単離した (Minami et al., submitted)。DRM タンパク質は細胞膜タンパク質の約 5~10%の割合で回収された。

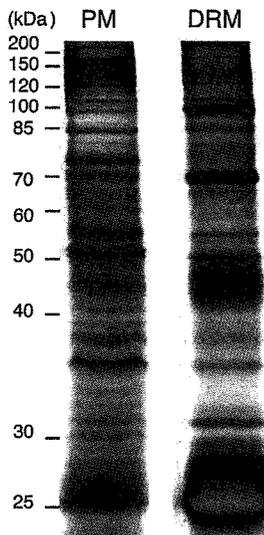


Fig. 1. SDS-PAGE analysis of the plasma membrane and DRM proteins from *Arabidopsis*. Plasma membrane and DRM proteins (3 µg each) were analyzed by electrophoresis on a 10% SDS-polyacrylamide gel. Protein patterns were visualized with the silver-staining method.

また、細胞膜画分と DRM 画分のタンパク質の泳動パターンが異なることから、特異的な細胞膜タンパク質が DRM 画分において濃縮されていることが明らかとなった (Fig. 1)。さらに、低温馴化過程では、細胞膜タンパク質あたりの DRM タンパク質の収量の低下がみられ、7 日間の低温馴化処理により回収率が 9.5%から 5.7%へと未処理の場合の 60%まで低下することが明らかとなった。

2. 低温馴化過程におけるシロイヌナズナ DRM タンパク質の質的変動

MS 解析により DRM 画分への局在が示されたタンパク質の低温応答性をウエスタンブロット解析によって調べたところ、CHC, PIP は低温馴化処理 2 日後に、P-ATPase は 4 日後に DRM 画分において増加し、TUA, TUB は共に減少することがわかった (Fig. 2)。また、band-7 タンパク質は低温馴化処理 2 日目ではわずかではあるが蓄積量の増加がみら

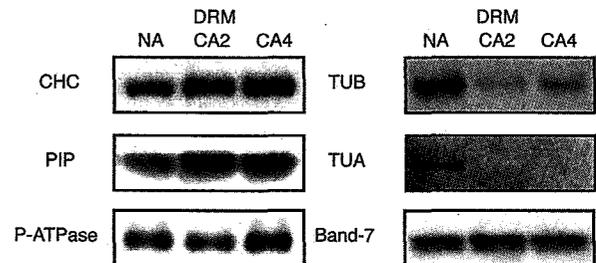


Fig. 2. Western blot analysis of DRM proteins. DRM proteins (1.5 µg each) were analyzed by SDS-PAGE. NA, non-acclimated; CA2 and CA4; cold-acclimated for 2 and 4 days, respectively.

れた。

さらに、低温馴化処理過程における DRM タンパク質の質的变化を詳細に解析するため、2D-DIGE 法を用いてタンパク質の蓄積変化を比較解析した。その結果、解析が可能であった 160 個余りの DRM タンパク質スポットの約 40%が低温馴化過程で蓄積変動していることが明らかとなった (Minami et al., submitted)。低温馴化処理後に DRM 画分で蓄積量の増加がみられたタンパク質として、dynamin 様タンパク質群 (DRP1A, 1E, 2A, 2B) や remorin タンパク質が同定された (Table 2)。また、減少す

Table 2. Identified proteins in DRM fractions

Separation ^a	Protein Name	Accession No.	AGI Code	Protein Accumulation Level ^b			Gene Expression Level ^c					
				CA0d	CA2d	CA4d	CA0d	CA1h	CA6h	CA12h	CA1d	CA2d
Increased Protein												
2D	DRP1A (Dynamin-related protein 1A)	P42697	At5g42080	1.00 ± 0.09	1.91 ± 0.15	1.00	0.96	0.94	0.95	1.05	1.09	1.03
2D	DRP1E (Dynamin-related protein 1E)	Q9FNX5	At3g60190	1.00 ± 0.11	1.85 ± 0.11	1.82 ± 0.18	1.00	0.99	1.24	1.97	1.99	1.99
2D	DRP2A (Dynamin-related protein 2A)	Q9SE83	At1g10290	1.00 ± 0.21	1.84 ± 0.28	1.83 ± 0.23	1.00	1.12	1.19	1.44	1.67	1.21
2D	and DRP2B (Dynamin-related protein 2B)	Q9LQ55	At1g59610	1.00 ± 0.15	1.84 ± 0.14	1.84 ± 0.14	1.00	0.90	0.98	0.96	1.07	1.07
2D	Remorin family protein	O80837	At2g45820	1.00 ± 0.15	1.84 ± 0.14	1.84 ± 0.14	1.00	1.31	1.57	1.89	1.44	0.74
W	CHC1 (Clathrin heavy chain-1)	Q0WNJ6	At3g11130	-	-	-	-	-	-	-	-	-
W	CHC2 (Clathrin heavy chain-2)	Q0WLB5	At3g08530	-	-	-	-	-	-	-	-	-
W	PIP aquaporin family	-	13 genes	-	-	-	-	-	-	-	-	-
W	P-ATPase (P-type H ⁺ -ATPase) family	-	11 genes	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Decreased Protein												
2D	VHA-A (V-type H ⁺ -ATPase subunit A)	O23654	At1g78900	1.00 ± 0.19	0.63 ± 0.12	0.99 ± 0.08	1.00	1.00	0.98	1.07	1.06	1.22
2D	VHA-B1 (V-type H ⁺ -ATPase subunit B1)	P11574	At1g76030	1.00 ± 0.16	0.67 ± 0.07	0.98 ± 0.07	1.00	1.00	0.98	1.07	1.06	1.22
2D	VHA-C (V-type H ⁺ -ATPase subunit C)	Q9SDS7	At1g12840	1.00 ± 0.10	0.65 ± 0.06	0.99 ± 0.07	1.00	1.01	0.87	0.88	0.81	0.94
2D	VHA-E (V-type H ⁺ -ATPase subunit E)	Q39258	At4g11150	1.00 ± 0.25	0.35 ± 0.05	0.25 ± 0.04	1.00	0.98	1.00	1.04	1.18	1.24
2D	ACT2 (Actin-2)	Q96292	At3g18780	1.00 ± 0.13	0.71 ± 0.08	0.48 ± 0.03	1.00	0.98	0.92	0.73	0.72	0.85
W	or ACT8 (Actin-8)	Q96298	At1g49240	1.00 ± 0.13	0.71 ± 0.08	0.48 ± 0.03	1.00	0.79	0.75	0.62	0.64	0.54
W	TUA (α-tubulin) family	-	6 genes	-	-	-	-	-	-	-	-	-
W	TUB (β-tubulin) family	-	9 genes	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Unchanged Protein												
2D	SKU5	Q9SU40	At4g12420	1.00 ± 0.38	0.70 ± 0.23	1.14 ± 0.45	1.00	1.08	0.83	0.92	0.92	0.56
2D	Hsc70.1	P22953	At5g02500	1.00 ± 0.14	0.92 ± 0.12	0.95 ± 0.10	1.00	1.09	1.05	1.13	1.45	1.00
2D	or Hsc70.2	P22954	At5g02490	1.00 ± 0.14	0.92 ± 0.12	0.95 ± 0.10	1.00	0.92	1.05	1.41	1.94	0.89
2D	or Hsc70.3	O65719	At3g09440	1.00 ± 0.10	1.16 ± 0.16	1.63 ± 0.22	1.00	0.90	0.91	1.66	1.24	0.77
2D	PIRL4	Q9SYW8	At4g35470	1.00 ± 0.10	1.16 ± 0.16	1.63 ± 0.22	1.00	0.72	0.54	0.33	0.38	0.53
2D	Remorin family protein	Q9M2D8	At3g61260	1.00 ± 0.10	1.42 ± 0.05	1.22 ± 0.07	1.00	1.05	1.50	1.50	0.92	0.79
2D	Remorin family protein	Q9FFA5	At5g23750	1.00 ± 0.08	1.19 ± 0.14	1.21 ± 0.15	1.00	1.22	0.84	0.53	0.45	0.60
2D, W	Band 7 family protein	Q9CAR7	At1g69840	1.00 ± 0.26	1.06 ± 0.22	1.15 ± 0.36	1.00	1.43	1.49	1.77	1.40	0.87
2D, W	Band 7 family protein	Q9FM19	At5g62740	1.00 ± 0.15	0.93 ± 0.22	1.04 ± 0.17	1.00	0.96	1.10	1.49	1.61	1.70
2D, W	Band 7 family protein	Q9SRH6	At3g01290	1.00 ± 0.15	1.39 ± 0.30	1.37 ± 0.30	1.00	1.34	1.32	1.32	1.46	1.29
2D	Endomembrane-associated protein	Q2L6T2	At4g20260	1.00 ± 0.25	1.47 ± 0.24	0.82 ± 0.15	1.00	1.05	1.50	1.50	0.92	0.79

^aSeparation, 2D mean proteins identified by 2D-PAGE. W means proteins identified by western blot analysis using SDS-PAGE.

^bFluorescence intensity of each protein spot separated by 2D-DIGE was normalized to the intensity of the non-acclimated sample. The extent of changes was calculated with intensities on each gel by PDQuest software (Bio-Rad). 2-fold increased and 0.5-fold decreased proteins during cold acclimation were highlighted in ■ and ▨, respectively.

^cgene expression levels during cold acclimation were calculated using NASCArray database (NASARRAYS-404).

2-fold increased and 0.5-fold decreased genes during cold acclimation were highlighted in ■ and ▨, respectively.

るタンパク質には、V-type H⁺-ATPase (V-ATPase) サブユニット群や actin, tubulin タンパク質が含まれていた。SKU5, Hsc70 や band-7 タンパク質などは低温馴化処理過程を通じて DRM 画分への蓄積パターンに大きな変動は見られなかった。

以上の結果から、CHC や dynamin 様タンパク質など、エンドサイトーシスに関わる細胞内小胞輸送関連タンパク質群として分類されるものは低温馴化処理後 DRM 画分への蓄積量の増加がみられ、tubulin や actin などの細胞骨格系タンパク質群、及び V-ATPase サブユニット群は低温馴化処理後 DRM 画分への蓄積量が著しく減少することが明らかとなった。これは、同一の機能分類群として類推されるタンパク質が、DRM 画分内で同様の低温応答性を示すことを意味している。スフィンゴ脂質によって構成される細胞膜上のマイクロドメインには機能的に関連しあうタンパク質群が集合し、各々クラスターを形成していると考えられることから、これらタンパク質群の量的な変動が低温馴化後にみられる膜機能に影響を及ぼしていることが考えられた。

3. DRM タンパク質の遺伝子産物の低温応答性

次に、DRM 画分における低温馴化処理に伴うタンパク質の蓄積変動と遺伝子発現変化の関係について調べた。まず、低温馴化過程で DRM 画分への蓄積が見られたタンパク質をコードする 7 つの遺伝子の低温馴化過程における発現変化を real-time PCR 法により解析した (Fig. 3)。*DRP1E* 遺伝子は低温馴化処理過程で転写レベルでの増加がみられたが、*DRP1A*, *2A*, 及び *2B* 遺伝子の発現量はほとんど変化せず、また、*remorin* や *CHC1*, *2* 遺伝子は数日間の低温馴化処理によって発現量が減少する傾向を示した。

さらに公開されているシロイヌナズナの DNA マイクロアレイのデータ (NASCARRAYS-404) を利用し、DRM タンパク質の転写産物の低温応答性を調べた (Table 2)。低温馴化処理 0, 1, 6, 12 時間目及び 1, 2, 4 日目における遺伝子の発現変化を調べたところ、低温馴化過程で変動するタンパク質の DRM 画分への蓄積量と遺伝子発現レベルの変動には明確な相関関係がみられないものが多く含まれていることがわかった。

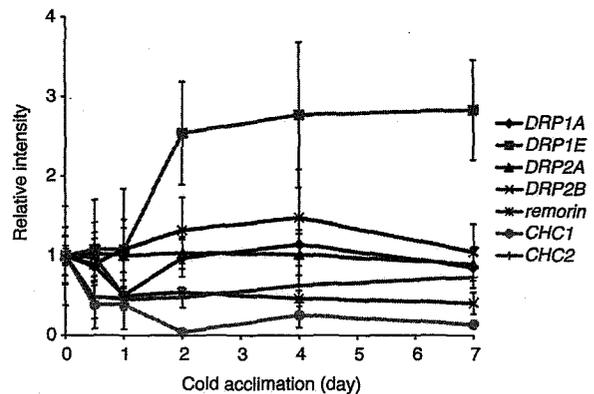


Fig. 3. Relative expression profiles of genes encoding cold-increased DRM proteins. mRNA levels were measured using real-time PCR analysis at 0, 0.5, 1, 2, 4 and 7 days during CA.

次に、ウエスタンブロット解析によって低温馴化過程で増減がみられたタンパク質ファミリーの遺伝子発現変化を調べた。シロイヌナズナのゲノム上には PIP, P-ATPase, TUA, TUB, actin タンパク質をコードする遺伝子がそれぞれ 13, 11, 6, 9, 10 個存在する。そのうち、マイクロアレイデータベースで検索が可能であったそれぞれ 9, 11, 4, 7, 8 個の遺伝子について低温馴化処理 4 日間における発現変化を調べた (Fig. 4)。その結果、低温馴化過程で DRM 画分でのタンパク質の蓄積量の増加がみられた PIP ファミリーの遺伝子発現レベルは一過的に上昇する一部の遺伝子を除き、その多くは減少傾向を示した。また、DRM 画分においてタンパク質レベルでの蓄積量の増加がみられた P-ATPase や減少した tubulin をコードする遺伝子の一部は、転写レベルにおいて増加が見られたものも存在したが、その多くは大きな変動を示さなかった。一方、actin 遺伝子も転写レベルでの大きな増減は見られなかったものの、低温馴化処理 1 日目及び 2 日目で比較的发現量が減少する傾向のある遺伝子が多く存在した。

まとめ

細胞膜タンパク質は、mRNA の情報をもとに小胞体で合成され、ゴルジ装置、輸送小胞系を経て膜脂質とともに細胞膜まで運ばれる。一方、不必要になった膜構成成分は、輸送小胞系を介して細胞膜から

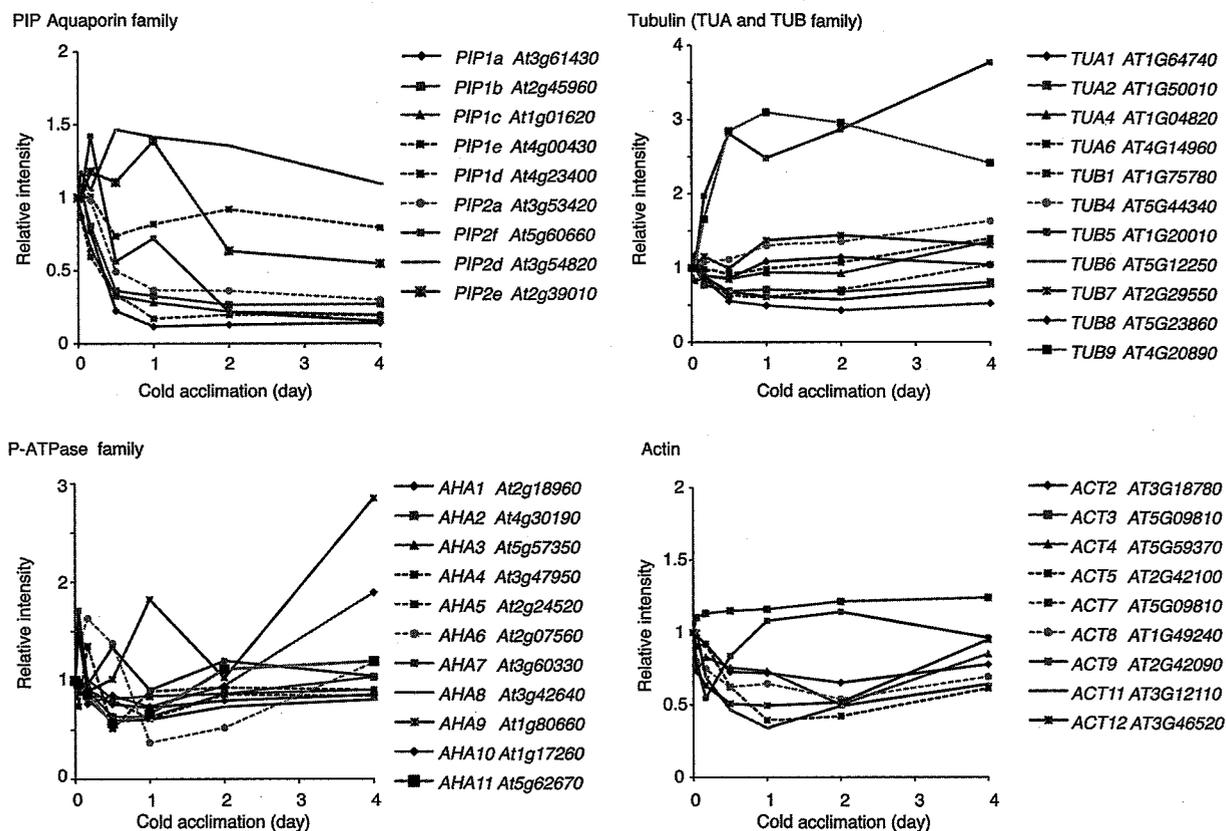


Fig. 4. Relative expression profiles of genes encoding DRM proteins. Changes in mRNA levels during cold acclimation were estimated using *Arabidopsis* microarray database (NASCARRAYS-404).

除去されていると考えられている。本研究では、低温馴化過程におけるマイクロドメインを構成する DRM タンパク質の多くが、見かけ上転写レベルでの増減とは一致せず蓄積量を変化させていることを明らかにした。このことは、遺伝子発現レベル以外の制御機構によって低温馴化過程における細胞膜マイクロドメインへのタンパク質の蓄積量が調節されていることを示している。プロテオーム解析では、細胞内小胞輸送経路の中でも特に細胞膜上や細胞外の物質を細胞内へ輸送するエンドサイトーシスに関与する CHC や dynamin 様タンパク質が低温馴化過程の DRM 画分において増加することが示された。従って、これらタンパク質を介した小胞輸送経路が低温馴化過程における細胞膜構成成分の変動に関与していることが考えられる。

一方、低温馴化過程の DRM 画分では脂質レベルにおいても組成変化が見られた (Minami et al., submitted)。膜タンパク質の中には、近傍の膜脂質の組成により活性調節を受けるものが存在する¹¹⁾。

このことから、低温下で変動するマイクロドメイン構成脂質が、マイクロドメインにおけるタンパク質の蓄積量や機能にまで影響を与える可能性も十分考えられた。今後は低温馴化過程におけるマイクロドメイン局在タンパク質及び脂質における分子レベルでの質的変動と、低温馴化過程で増大する凍結耐性における膜機能との関連性について、より詳細な解析を行う予定である。

謝 辞

本研究は科学研究費補助金 (#17380062, #18880005)、及び岩手大学21世紀COEプログラム (K-3) の援助によって行われた。また、LC-MS/MS 解析は、奈良先端大学 藤原正幸博士、深尾陽一郎博士との共同研究による。

文 献

- 1) Gilmour, S.J., Hajela, R.K. and Thomashow, M.F.: Cold acclimation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.*, **87**, 745-750 (1988)
- 2) Thomashow, M.F.: Plant cold acclimation: freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **50**, 571-599 (1999)
- 3) Guy, C., Kaplan, F., Kopka, J., Selbig, J. and Hincha, D.K.: Metabolomics of temperature stress. *Physiol. Plant.*, **132**, 220-235 (2008)
- 4) Uemura, M., Tominaga Y., Nakagawara C., Shigematsu S., Minami A. and Kawamura Y.: Responses of the plasma membrane to low temperatures. *Physiol. Plant.*, **126**, 81-89 (2006)
- 5) Simons, K. and Ikonen, E.: Functional rafts in cell membranes. *Nature*, **387**, 569-572 (1997)
- 6) 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)
- 7) 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)
- 8) Ohshima, Y., Iwasaki, I., Suga, S., Murakami, M., Inoue, K. and Maeshima, M.: Low aquaporin content and low osmotic water permeability of the plasma and vacuolar membranes of a CAM plant *Graptopetalum paraguayense*: comparison with radish. *Plant Cell Physiol.*, **42**, 1119-1129 (2001)
- 9) Morsomme, P., Dambly, S., Maudoux, O. and Boutry, M.: Single point mutations distributed in 10 soluble and membrane regions of the *Nicotiana plumbaginifolia* plasma membrane PMA2 H⁺-ATPase activate the enzyme and modify the structure of the C-terminal region. *J. Biol. Chem.*, **273**, 34837-34842 (1998)
- 10) Kaplan, F., Kopka, J., Sung, D.Y., Zhao, W., Popp, M., Porat, R. and Guy, C.L.: Transcript and metabolite profiling during cold acclimation of *Arabidopsis* reveals an intricate relationship of cold-regulated gene expression with modifications in metabolite content. *Plant J.*, **50**, 967-981 (2007)
- 11) Kasamo, K.: Regulation of plasma membrane H⁺-ATPase activity by the membrane environment. *J. Plant Res.*, **116**, 517-523 (2003)