

シロイヌナズナ低温馴化過程における 細胞膜ダイナミン関連タンパク質の機能

¹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

²名古屋大学大学院理学研究科生命理学専攻

近藤 万里子¹, 高橋 大輔¹, 南 杏鶴², 河村 幸男¹, 上村 松生¹

Function of *Arabidopsis* dynamin-related protein 1E during cold acclimation

Mariko KONDO¹, Daisuke TAKAHASHI¹, Anzu MINAMI²,
Yukio KAWAMURA¹ and Matsuo UEMURA¹

¹*Cryobiofrontier Research Center, Faculty of Agriculture, Iwate University, Morioka 020-8550, Japan*

²*Division of Biological Science, Graduate School of Science, Nagoya University, Nagoya 454-8602, Japan*

Arabidopsis thaliana increases its freezing tolerance upon exposure to chilling temperature (e.g., cold acclimation, CA). CA results in changes of lipid and protein compositions in the plasma membrane. We recently found that one of the dynamin-related proteins (DRP1E) that are associated with endocytosis pathway accumulated in the plasma membrane during CA. Thus, we hypothesize that DRP1E involves in CA-induced modification of the plasma membrane. To address this question, we characterized a T-DNA insertion mutant of DRP1E (*drp1e*) in the CA process. CA increased freezing tolerance in both wild type and *drp1e* plants but the extent was much less in *drp1e* mutant. Furthermore, the effect of DRP1E knockout on the extent of cold acclimation was more apparent in younger leaves than in older (and mature) leaves and considerable differences in cold-responsive proteins were found in the plasma membrane of younger leaves between the wild type and *drp1e* plants. These results suggest that DRP1E have critical roles in freezing tolerance in young leaves.

(Received Aug. 31, 2011; Accepted Sep. 10, 2011)

結 言

植物を凍らない程度の低温に暴露すると凍結耐性が上昇する(低温馴化)。低温馴化過程では、細胞膜組成変動や細胞内における糖・プロリン・不凍タンパク質の蓄積等が起こり、これらの変化が凍結耐性の上昇に関与していると考えられている。事実、低温馴化過程では細胞膜の脂質・タンパク質の組成変化や¹⁾細胞膜機能の変動²⁾が示されており、低温馴

第56回低温生物工学会研究報告20.

[Key words: Cold acclimation, Freezing tolerance, Plasma membrane, Dynamin, Leaf order; 低温馴化, 凍結耐性, 細胞膜, ダイナミン, 葉序]

化過程における凍結耐性の増大には、細胞膜の変動が大きく関わっているものと考えられている。一方で、これらの結果から、細胞膜では全ての成分が変動するのではなく、一部の構成成分が変動する選択的な膜改変が行われていることが推測される。低温馴化過程における細胞膜改変は、例えば、エンドサイトーシスにおいて細胞膜の一部が小胞として細胞内に切り離され、この小胞に含まれる特定の成分が取り除かれることなどによって膜の組成が変動することが考えられる。

最近、低温馴化前後のシロイヌナズナ細胞膜を用いたプロテオーム解析により、エンドサイトーシスに関連するダイナミン様タンパク質 (DRP1E) が低温馴化に伴って細胞膜の特定部位に蓄積することが明らかになり、DRP1E が低温馴化過程で起こる細胞膜改変に関わっている可能性が示唆された³⁾。そこで本研究では、シロイヌナズナ植物体の野生型株と DRP1E 欠損株を用い、DRP1E と低温馴化後の凍結耐性、及び細胞膜タンパク質組成の変動パターンの関連を解析した。

材料および方法

1. 実験材料

実験材料として *Arabidopsis thaliana* L. の野生型 (ecotype Columbia) と同生態型を背景として T-DNA 挿入によって得られた DRP1E 欠損株 (*drp1e*, SALK_060080) を用いた。

電解質漏出法を用いた凍結耐性試験、及び細胞膜単離に利用する植物体は、種子を土に播種後、人工培養室内 (23°C, 24 時間明期, 56 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) で成育させた。播種後 21 日目のものを低温未馴化 (Non-acclimated ; NA) 区として各々の実験に用いた。また、播種後 21 日経過した未馴化個体 (NA) を人工気象器 (2°C, 湿度 60%, 日長 12 時間明期, 光量 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, CU-351A : トミー精工) に置き、7 日低温処理したものを低温馴化 (Cold-acclimated for 7 days ; CA7) 区として各々の実験に用いた。

再成長法を用いた凍結耐性試験に利用する植物体は、ムラシゲ・スクーグ培地 (MS 培地) に播種後、人工気象器 (23°C, 24 時間明期, 56 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)

で成育させた。14 日目のものを低温未馴化 (NA) 区として実験に用いた。また、成育 14 日目の未馴化個体を前述の低温馴化方法に則って処理し実験に用いた。

2. 再成長法を用いた凍結耐性試験

低温未馴化区 (NA) と低温馴化区 (CA7) の植物を用いて凍結耐性を定量した。これらの植物を育成しているシャーレの角を液体窒素に浸して植氷を行い、その後、予め目的温度にセットした低温チャンバー (SU-641 : エスペック株式会社) にシャーレを入れ、2 時間インキュベートして凍結処理を行った。凍結処理終了後、シャーレを人工気象器 (23°C, 24 時間明期, 56 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) に 3 日間静置し、その後枯死した部分が植物体全体の 3 分の 1 以下の個体を生存とみなし、生存率を計算した。

3. 電解質漏出法を用いた凍結耐性試験

シロイヌナズナ植物体の子葉を除く本葉に古い葉から順に 1~10 の番号をつけ、番号ごとに区別して電解質漏出法を用いた凍結耐性試験を行った。試験管に MQ とシロイヌナズナの本葉 1 枚を入れ、そこに MQ 水で作った氷を入れ -2°C で 2 時間インキュベートして植氷した。その後 1 時間あたり 2°C ずつ温度を下げ、-5°C (NA), または -12°C (CA7) に達した時点で 4°C に移し、一晩かけて融解した。その後電気伝導度計 (ELECTRODE, B-173 : HORIBA) で電解質量を測定した。その後、各サンプルを煮沸し、再び電解質量を測定した。この 2 回の測定結果から以下の式に基づいて電解質度を計算した。

$$\text{電解質漏出度 (\%)} = \frac{1 \text{ 回目の測定値}}{2 \text{ 回目の測定値}} \times 100$$

4. 細胞膜の単離

低温馴化前後 (NA と CA7) のシロイヌナズナ植物体の野生型株, *drp1e* 株の新葉 (6~10 葉) から、ポリエチレングリコール/デキストランを用いた水性二層法に⁴⁾ より細胞膜画分を調製した。得られた細胞膜タンパク質は、タンパク質解析に使用するまで -80°C で保存した。

5. タンパク質解析

細胞膜タンパク質は一次元電気泳動を行った後トリプシンでタンパク質をゲル内消化し, nano-LC-MS/MS (LTQ Orbitrap XL, Thermo Fisher) を用いてペプチドシグナルを検出した. これらのペプチドデータを progenesis LC-MS (Nonlinear dynamics, Ver. 3.0) を用いて, 低温馴化後に 2 倍以上に増加, または 0.5 倍以下に減少したペプチドを選抜した. 得られたペプチドリストは MASCOT MS/MS ion search server (Matrix Science, <http://www.matrixscience.com>) を用いて National Center for Biotechnology Information の *A. thaliana* のタンパク質データベースから検索した. 得られたペプチドのリストは, 以下の条件に従って同定を行った: Allow up to 1 missed cleavages; Peptide tol., ± 5 ppm; MS/MS tol., 0.6 Da; Peptide charge, 2+, 3+ and 4+; fixed modification, Carbamidomethyl (C); variable modification, Oxidation (M). さらに得られたタンパク質データの推定機能を報告³⁾を参考に機能ごとに分類した.

結 果

1. 再成長法を用いた凍結耐性試験

MS 培地で育成した野生型株と *drp1e* 株を用いて低温馴化前後の凍結耐性を比較した (Table 1). 低温未馴化区では, 野生型株と *drp1e* 株の凍結耐性に統計的に有意な差は見られなかった. しかし低温馴化 7 日目の個体では, -10°C で野生型株の方が *drp1e* 株よりも統計的に有意に凍結耐性が高かった. この結果から, DRP1E はシロイヌナズナの凍結耐性の増大に関与していると考えられる. しかし, *drp1e* 株においても不完全ではあるが, 低温馴化後に凍結耐がある程度上昇していた.

Table 1. Regrowth test in *Arabidopsis thaliana* plants non-acclimated (NA) and cold-acclimated (CA) for 7 days.

NA		-3°C	-4°C	-5°C
Survival rate (%)	WT	100 \pm 0	100 \pm 0	42.5 \pm 26.2
	<i>drp1e</i>	96.7 \pm 2.92	100 \pm 0	32.2 \pm 18.4
CA7		-8°C	-10°C	-12°C
Survival rate (%)	WT	100 \pm 0	78.9 \pm 4.57	0 \pm 0
	<i>drp1e</i>	94.2 \pm 5.4	46.6 \pm 9.0	0 \pm 0

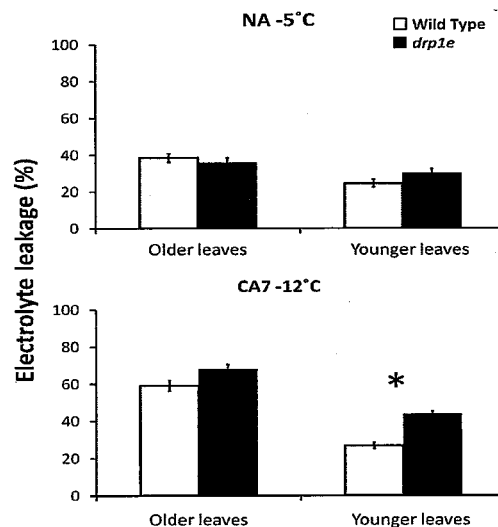


Fig. 1. Electrolyte leakage test of rosette leaves from *Arabidopsis thaliana*. Older leaves, 1st to 5th leaves; Younger leaves, 6th to 10th leaves. Asterisk indicates a statistically significant difference based on a Student's *t* test (*, $P < 0.05$).

2. 電解質漏出法を用いた凍結耐性試験

電解質漏出法を用いて, 野生型株と *drp1e* 株の新葉・古葉の凍結耐性を比較した (Fig. 1). 低温馴化前 (NA) では, 野生型株と *drp1e* 株の間に凍結耐性に差は見られなかった. しかし, 低温馴化後 (CA7) では新葉区において, 野生型株のほうが *drp1e* 株よりも優位に凍結耐性が高かった. この結果から, DRP1E は低温馴化過程において凍結耐性の増大に関与しており, さらにその機能は若い葉を中心に機能していると推測される.

3. 細胞膜タンパク質組成の変化

一次元電気泳動と質量分析 (nano-LC-MS/MS) を組み合わせて細胞膜タンパク質の同定を行い, 低温馴化前後 (NA と CA7) で量的な変動のあったタンパク質を選別した. 野生型株では低温馴化によって増加したタンパク質は 212 個, 減少したタンパク質は 118 個であった. 一方 *drp1e* 株では, 低温馴化によって増加したタンパク質は 176 個, 減少したタンパク質は 258 個であった (Table 2). これらの低温馴化で増減するタンパク質を膜輸送, 細胞内小胞輸送, 細胞骨格タンパク質, 細胞膜・細胞骨格の再構築, シグナル伝達, その他の 6 つのカテゴリーに分類した (Fig. 2). 各カテゴリーで増減したタンパク質の個数に着目すると, 小胞輸送に関与するタン

パク質は野生型株では低温馴化後の増加が著しかったが、*drp1e*株ではあまり増加しなかった。一方、細胞骨格に關与するタンパク質は野生型株でよく減少していたが、*drp1e*株ではあまり減少が見られなかった。逆に、細胞膜・細胞骨格の再構築に關連するタンパク質は、野生型株ではあまり減少しなかったが、*drp1e*株では著しく減少していた。これらの結果は、細胞膜タンパク質の変動パターンに野生型株と *drp1e*株の間に違いがあることを示している。

Table 2. The number of cold-increased (max fold >2) and decreased (max fold <0.5) plasma membrane proteins in younger leaves of wild type and *drp1e*.

Cold increased plasma membrane proteins (>2 fold)

	WT	<i>drp1e</i>
membrane transport (a)	25	25
vesicle trafficking (b)	16	7
cytoskeleton (c)	3	4
plasma membrane and cell wall reconstruction (d)	8	6
signal transduction (e)	49	50
others (f)	111	84
total	212	176

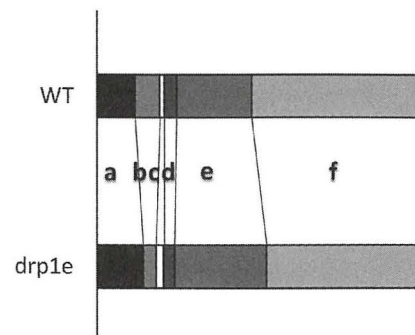
Cold decreased plasma membrane proteins (<0.5 fold)

	WT	<i>drp1e</i>
membrane transport (a)	10	22
vesicle trafficking (b)	5	10
cytoskeleton (c)	7	4
plasma membrane and cell wall reconstruction (d)	1	17
signal transduction (e)	15	44
others (f)	80	161
total	118	258

考 察

野生型株と *drp1e*株の凍結耐性を比較すると、低温馴化前では両者の凍結耐性に差は見られなかったが、低温馴化後では -10°C において *drp1e*株は野生型株よりも有意に低い凍結耐性を示した。この結果から、DRP1Eは低温馴化過程における凍結耐性

i) Cold-increased plasma membrane proteins



ii) Cold-decreased plasma membrane proteins

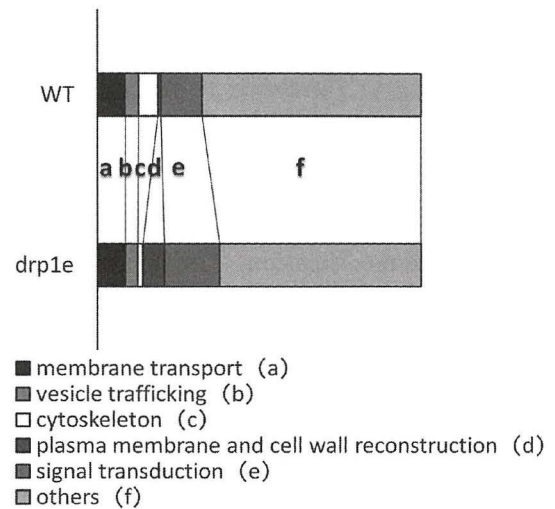


Fig. 2. Functional classification of cold-increased (max fold >2) and decreased (max fold <0.5) plasma membrane proteins in younger leaves of wild type and *drp1e*.

の上昇に關与していると推測される。一方で、低温馴化後であっても -8°C では野生型株と *drp1e*株の間に凍結耐性に有意な差は見られなかった。また、*drp1e*株においても野生型株と比較して不完全ではあるが、低温馴化後に凍結耐性がある程度上昇していた。以前の研究において、凍結耐性の上昇には細胞膜組成の変化以外にも細胞質への適合溶質蓄積⁵⁾や LEA タンパク質などの凍結傷害の緩和と關連性のあるタンパク質の増加⁶⁾が關与している可能性が示唆されている。これらの実験結果等から、DRP1Eの欠損により凍結耐性の増加は抑えられたものの、DRP1Eが關与しない他の凍結耐性増大機構は機能したため部分的に凍結耐性が上昇したものと考えられる。

それに加えて、電解質漏出法を用いた葉序別凍結耐性試験の結果から、DRP1E は主に若い葉を中心に凍結耐性の増大に影響を与えている可能性が示唆された。シロイヌナズナでは低温馴化時に若い葉を中心に凍結耐性が増大し、これには若い葉を中心とした糖やプロリンの蓄積が関係している可能性がある⁷⁾ことが報告されている。今回、これらの糖やプロリン以外にも DRP1E が若い葉の凍結耐性増大に大きく影響を与えているということが示された。しかしながら、DRP1E がなぜ若い葉を中心に機能しているのか、その原因はまだ明らかにされていない。これには様々な可能性が考えられる。例えば、DRP1E の発現レベルが葉序ごとに異なる可能性や、DRP1E が関与するカスケードに作用する別の因子が葉序依存的である可能性等がある。この問題に関しては、今後さらに研究を進める必要がある。

一方で、低温馴化前後で量的な変化があったタンパク質を野生型株と *drp1e* 株と比較したところ、両者の変動パターンにはいくつかの違いが見られた。まず、低温馴化後に増加した細胞膜タンパク質は野生型株で 212 個、*drp1e* 株で 176 個と個数に大きな差は見られなかったが、低温馴化後に減少した細胞膜タンパク質の個数は野生型株で 118 個、*drp1e* 株で 258 個と 2 倍以上の差が見られた。さらに低温馴化後に増減のあったタンパク質を機能ごとに比較すると、小胞輸送に関与するタンパク質の増加は野生型株で著しかったが、*drp1e* 株ではあまり増加が見られなかった。一方、細胞骨格タンパク質は野生型株で減少していたが、*drp1e* 株ではあまり減少しなかった。逆に、細胞膜・細胞骨格の再構築に関連するタンパク質は野生型株ではあまり減少しなかったが、*drp1e* 株では著しく減少していた。これらのタンパク質の中で、細胞骨格タンパク質は低温馴化中に減少し、このタンパク質の減少が凍結耐性の増大に関与する可能性が先行研究で示唆されている⁸⁾。さらに今回の実験では、*drp1e* 株は野生型株に比べて低温馴化後に小胞輸送系に関与するタンパク質があまり増加しなかったことから、DRP1E の欠損により低温馴化時の細胞膜構成成分の変動が影響を受けた可能性や細胞骨格タンパク質の減少が引き起こされなくなったことにより凍結耐性に差が見られた可能性が考えられる。一方で、近年動物細胞で dynamin が細胞膜修復に関与している可能性が示唆されてい

る⁹⁾ことから、植物においてもダイナミン関連タンパク質が細胞膜修復に関与し、DRP1E もまた細胞膜修復に関与している可能性も考えられる。

ま と め

本研究結果及びシロイヌナズナにおける過去の研究結果を考えると、DRP1E が低温馴化過程において凍結耐性増大に関与しているということは十分に考えられる。さらに今回、DRP1E は葉序依存的に凍結耐性を増大させていることが示唆された。この結果は、DRP1E に依存的な凍結耐性の増大に関して、1) DRP1E の発現レベルが葉序ごとに異なる可能性や 2) DRP1E が関与する凍結耐性増大機構に作用する別の因子の影響が葉序に依存的である可能性を示している。今後 DRP1E と相互作用する他のタンパク質の探索や、DRP1E の影響が葉序依存的である理由の検証を行うことで、低温条件下における植物の生存戦略の一端を解明することが可能になる。

謝 辞

本研究の一部は、科学研究費補助金 (#22120003) の支援により実施された。

文 献

- 1) Yamazaki, T. Kawamura, Y. and Uemura, M.: Cryobehavior of the plasma membrane in protoplasts isolated from cold-acclimated *Arabidopsis* leaves is related to surface area regulation. *Plant Cell Physiol.*, **49**, 944–957 (2008)
- 2) Uemura, M. and Steponkus, P.L.: Effect of cold acclimation on the incidence of two forms of freezing injury in protoplasts isolated from rye leaves. *Plant Physiol.*, **91**, 1131–1137 (1989)
- 3) 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)
- 4) 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)
 - 5) Koster, K.L. and Lynch, D.V.: Solute accumulation and compartmentation during the cold acclimation of Puma Rye. *Plant Physiol.*, **98**, 108–113 (1992)
 - 6) Welin, B.V., Olson, A., Nylander, M. and Palva, E.T.: Characterization and differential expression of *dhn/lea/rab* like genes during cold acclimation and drought stress in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.*, **26**, 131–144 (1994)
 - 7) Takagi, T., Nakamura, M., Hayashi, H., Inatsugi, R., Yano, R. and Nishida, I.: The leaf-order-dependent enhancement of freezing tolerance in cold acclimated *Arabidopsis* rosettes is not correlated with the transcript levels of the cold inducible transcription factors of *CBF/DREB1*. *Plant Cell Physiol.*, **44**, 922–931 (2003)
 - 8) Kerr, G.P. and Carter, J. V.: Tubulin isotypes in rye roots are altered during cold acclimation. *Plant Physiol.*, **93**, 83–88 (1990)
 - 9) Idone, V., Tam, C., Goss, J. W., Toomre, D., Pypaert, M. and Andrews, N. W.: Repair of injured plasma membrane by rapid Ca²⁺-dependent endocytosis. *J. Cell Biol.*, **180**, 905–914 (2008)