

タカハシ ダイスケ	
氏 名	高橋 大輔
本籍（国籍）	秋田県
学 位 の 種 類	博士（農学）
学 位 記 番 号	連研第638号
学位授与年月日	平成27年3月23日
学位授与の要件	学位規則第5条第1項該当課程博士
研究科及び専攻	連合農学研究科 寒冷圏生命システム学専攻
学位論文題目	Responsiveness of plasma membrane and microdomain to cold acclimation in association with freezing tolerance(細胞膜および細胞膜マイクロドメインの低温馴化応答性と凍結耐性)
学位審査委員	主査 教 授 上村 松生 副査 准教授 河村 幸男 副査 教 授 加藤 清明 副査 准教授 笹部 美知子 副査 教 授 川合 真紀（埼玉大学）

論文の内容の要旨

温帯性植物は、秋の気温の低下とともに凍結耐性を上昇させ、本格的な寒さを迎える冬に向けて凍結ストレスを回避する、あるいは、凍結に耐える機構を整える（低温馴化）。低温馴化過程においては、細胞を凍結から守るための様々なタンパク質の変動や適合溶質の蓄積が報告されているが、とりわけ重要であると考えられているのが細胞膜の変動である。低温下では、細胞膜は外界の刺激を内部に伝える役割があるだけでなく、物質輸送をはじめとした様々な生理機能に関わっている一方、細胞膜は細胞を形作る膜であり、凍結傷害の主要な原因であると言われている。実際に、凍結過程では、細胞外の氷晶による物理的ダメージや凍結に伴う脱水作用、他のオルガネラ膜との膜間融合による機能不全などが起こっていることが明らかになってきた。したがって、低温馴化過程での細胞膜の特性や機能の変化は、植物の凍結耐性上昇機構に重要な意味を持つと考えられ、様々な研究が行われてきた。

細胞膜は従来、構成成分であるタンパク質と脂質がモザイク状に入り混じる流動モザイクモデルで表されてきた。近年、このモデルを補完する形で、特定の脂質やタンパク質が高密度に集積しているマイクロドメインと呼ばれる領域があることが示唆されてきた。動物細胞においては、マイクロドメインは広く研究され、膜輸送系やシグナル伝達などに重要な役割を果たすことが分かってきたが、植物細胞においてはその機能はほとんどわかっていない。

そこで、本研究では、凍結耐性の異なる二種の単子葉植物（カラスムギとライムギ）を用い、定量的ショットガンプロテオーム解析と呼ばれる手法による大規模なマイクロドメインタンパク質の同定手法の確立を試みた。その結果、マイクロドメインには、トランスポーターやシグナル伝達関連タンパク質がマイクロドメインに集積していることを明らかにした。さらに、低温馴化過程における変動を見てみると、これらのタンパク質がダイナミックに変動していた。

以上の結果は、双子葉植物であるシロイヌナズナを用いた先行研究の結果とほぼ一致していた。一方で、Heat shock protein 70をはじめとしたいくつかのマイクロドメイン集積タンパク質は、凍結耐性の低いカラスムギと高いライムギで、低温馴化による変動パターンが異なっていた。したがって、これらのタンパク質の変動が凍結耐性の差異に影響していることが考えられる。一方で、脂質組成に関しても、リピドミクスの手法により、マイクロドメインにはステロールやスフィンゴ脂質が集積しており、それらも低温馴化により変動することを明らかにした。脂質組成に関しても、カラスムギとライムギで特にステロール組成が異なっていたことから、これらの組成の違いが、細胞膜の安定性やマイクロドメインタンパク質の活性調節に影響しているものと考えられる。

さらに、マイクロドメインの構成成分と考えられ、カラスムギとライムギで低温馴化による変動パターンが異なっていた GPI アンカー型タンパク質 (GPI-AP) に着目した。GPI-AP は糖脂質修飾タンパク質の一種で、細胞膜外表面やマイクロドメインに存在すると考えられている。さらには、内在性ホスホリパーゼ活性により脂質部分から切断されてアポプラストに放出される例も報告されている。そこで、本研究では、モデル植物シロイヌナズナを用いて細胞膜、マイクロドメイン、アポプラスト、さらには GPI-AP 濃縮画分を抽出し、大規模な GPI-AP の同定および低温馴化過程における変動の検出を試みた。その結果、163 種の GPI-AP が同定され、多くの GPI-AP が細胞膜、マイクロドメイン、アポプラストで低温馴化処理により増加・減少していることが明らかになった。したがって、これらは新奇の凍結耐性関連タンパク質であることが予想された。

そこで、今回同定された GPI-AP から、低温馴化応答性 GPI-AP として At3g04010 を選び出し、詳細な生理学的解析を行った。その結果、At3g04010 は低温馴化初期で一過的に発現が上昇する遺伝子であり、維管束組織などの物質輸送に関与する組織で強く発現する遺伝子であることが明らかになった。一方で、低温馴化後の At3g04010 ノックダウン変異体は野生型よりも凍結耐性が低く、凍結融解後の再生長が遅延することから、At3g04010 は低温馴化過程で凍結耐性上昇機構に関与していることが明らかになった。さらに、At3g04010 は、アミノ酸配列から、細胞間輸送に関与するカロースを分解する活性を持つことが予想され、実際に低温馴化過程における師部組織のカロース蓄積量が野生型に比べ多かった。このことから、At3g04010 は低温馴化過程でのカロースの分解を促し、低温馴化過程および凍結融解過程での適切な物質輸送の調節を行っていると考えられる。

以上の結果から、マイクロドメインおよび GPI-AP が低温馴化過程で凍結耐性の上昇に関与する可能性を明らかにした。本研究結果は、マイクロドメインや GPI-AP の低温馴化過程における機能を解明していくデータベースとしての役割を果たすとともに、低温馴化機構を理解する上での新奇の知見を提供している。今後は、細胞レベルでの At3g04010 のカロース分解機構の解明やマイクロドメインとの関連性を明らかにするとともに、今回得られたその他の低温馴化応答性のマイクロドメイン関連タンパク質や GPI-AP の機能解明が必要である。

論文審査の結果の要旨

温帯性植物は、秋の気温の低下とともに凍結耐性を上昇させる（低温馴化）。低温馴化過程においては、細胞膜の組成変化が植物の凍結耐性上昇機構に重要な意味を持つと考えられて

きた。近年、細胞膜には特定の脂質やタンパク質が高密度に集積しているマイクロドメインと呼ばれる領域があることが示唆され、動物細胞においてはその生理機能が報告されている。一方、植物細胞におけるマイクロドメインの機能はほとんど解明されておらず、さらに、低温馴化との関連も明らかになっていない。加えて、動物細胞におけるマイクロドメインの主要構成成分である糖脂質修飾タンパク質の一種 GPI アンカー型タンパク質 (GPI-AP) の機能や GPI-AP と低温馴化機構との関連も解明されていない。そこで、本研究では、(1) マイクロドメイン構成成分の低温馴化応答性の網羅的解析と (2) GPI-AP の低温馴化過程における網羅的・生理学的解析を行った。

(1) マイクロドメイン構成成分の低温馴化応答性の網羅的解析

凍結耐性が異なる二種の単子葉植物 (カラスムギとライムギ) を用い、マイクロドメインタンパク質と脂質の大規模網羅解析を行った。その結果、両種において、各種トランスポーターやステロール、スフィンゴ脂質などがマイクロドメインに集積していることを明らかにした。さらに、低温馴化過程で、これらの成分がダイナミックに変動しており、中でも、Heat shock protein 70 やステロールを始めとしたいくつかのマイクロドメイン構成成分の低温馴化過程における変動パターンは、凍結耐性の低いカラスムギと高いライムギで異なっていた。従って、マイクロドメイン組成や低温応答性の違いが細胞膜の安定性やマイクロドメイン機能の調節に影響し、植物の凍結耐性の差異に関与していることが示唆された。

(2) GPI-AP の低温馴化過程における網羅的・生理学的解析

次に、シロイヌナズナを用いて、GPI-AP が存在する細胞膜、細胞膜マイクロドメイン、アポプラスト画分、および、細胞膜画分から GPI-AP 濃縮画分を調製して、GPI-AP の網羅的同定および低温馴化過程における変動の検出を試みた。その結果、163 種の GPI-AP が同定され、多くの GPI-AP が低温馴化処理により増減していることを明らかにした。さらに、低温馴化応答性 GPI-AP として At3g04010 を選び出し、詳細な解析を行ったところ、低温馴化後の At3g04010 ノックダウン変異体は野生型よりも凍結耐性が低かった。また、At3g04010 は維管束組織などの物質輸送に関与する組織で強く発現する遺伝子であり、低温馴化過程において物質輸送に重要な師部組織のカロース分解に関与する遺伝子であることも明らかにした。これらの結果から、At3g04010 は低温馴化過程や凍結融解過程で物質輸送を適切に調節し、凍結耐性獲得に貢献しているものと考えられる。

以上の結果は、植物の低温馴化過程における凍結耐性増大機構に細胞膜マイクロドメインおよび GPI-AP が関与していることを明らかにしている。本研究成果は、今後、植物の凍結耐性機構を解明する際に有効な低温馴化応答性細胞膜マイクロドメインタンパク質のデータベースを提供するとともに、細胞膜上で GPI-AP が果たす凍結耐性増大への機能的関与を明らかにした新奇の知見を提供している。以上の貢献から、本審査委員会は、「岩手大学大学院連合農学研究科博士学位論文審査基準」に則り、本論文を博士 (農学) の学位論文として十分価値のあるものと認めた。

学位論文の基礎となる学術論文

1. Takahashi D, Kawamura Y, Yamashita T, Uemura M. (2012)

Detergent-resistant plasma membrane proteome in oat and rye: similarities and dissimilarities

- between two monocotyledonous plants. *Journal of Proteome Research* 11: 1654-1665.
2. Takahashi D, Kawamura Y, Uemura M. (2013)
Changes of detergent-resistant plasma membrane proteins in oat and rye during cold acclimation: association with differential freezing tolerance. *Journal of Proteome Research* 12: 4998-5011.
 3. Takahashi D, Kawamura Y, Uemura M. (2013)
Detergent-resistant plasma membrane proteome to elucidate microdomain functions in plant cells. *Frontiers in Plant Science* 4: 27.
 4. Takahashi D, Li B, Nakayama T, Kawamura Y, Uemura M. (2013)
Plant plasma membrane proteomics for improving cold tolerance. *Frontiers in Plant Science* 4: 90.

参考論文

1. Li B, Takahashi D, Kawamura Y, Uemura M. (2012)
Comparison of plasma membrane proteomic changes of *Arabidopsis* suspension cells (T87 line) after cold and abscisic acid treatment in association with freezing tolerance development. *Plant and Cell Physiology* 53: 543-554.
2. Takahashi D, Li B, Nakayama T, Kawamura Y, Uemura M. (2013)
Shotgun proteomics of plant plasma membrane and microdomain proteins using nano-LC-MS/MS. *In: Plant Proteomics: Methods and Protocols*, 2nd Ed (Novo JVJ, Komatsu S, Weckwerth W, Wienkoop S, eds), Springer Science+Business Media, New York, NY, USA, pp 481-498 (ISBN-13: 978-1-62703-630-6).
3. Takahashi D, Nakayama T, Miki Y, Kawamura Y, Uemura M. (2014)
Proteomic approaches to identify cold regulated plasma membrane proteins. *In: Plant Cold Acclimation: Methods and Protocols* (Hinch DK, Zuther E, eds), Springer Science+ Business Media, New York, NY, USA, pp 159-170. (ISBN-13: 978-1-4939-0844-8).
4. Gutierrez-Carbonell E, Takahashi D, Lattanzio G, Rodríguez-Celma J, Kehr J, Soll J, Philipp K, Uemura M, Abadía J, López-Millán A-F. (2014)
The distinct functional roles of the inner and outer chloroplast envelope of pea (*Pisum sativum*) as revealed by proteomic approaches. *Journal of Proteome Research* 13: 2941-2953.
5. Rani TS, Takahashi D, Uemura M, Podile AP. (2014)
Proteins associated with oxidative burst and cell wall strengthening accumulate during citrus-*Xanthomonas* non-host interaction. *Plant Molecular Biology Reporter* (DOI 10.1007/s11105-014-0817-y).