

プロテオミクス解析から探る植物の重力応答機構

鎌田源司¹, 東谷篤志², 石岡憲昭¹

¹宇宙航空研究開発機構 宇宙科学研究本部 ISS 科学プロジェクト室

²東北大学大学院生命科学研究所

Gravity response mechanisms in plants searched for proteomics analysis

Motoshi Kamada¹, Atsushi Higashitani² and Noriaki Ishioka¹

¹ISS Science Project Office, Institute of Space and Astronautical Science (ISAS), Japan Aerospace Exploration Agency (JAXA), 2-1-1 Sengen, Tsukuba, Ibaraki, 305-8505

²Graduate School of Life Sciences, Tohoku University, 2-1-1 Katahira, Sendai, 980-8577

E-Mail: kamada.motoshi@jaxa.jp

Abstract: Gravity direction and force exert a profound influence on plant growth. When vertically growing plants are placed in a horizontal orientation, the so-called gravitational stimulation acts on the plants, resulting in the upward and downward growth of the apical shoot and root tip, respectively. This phenomenon in plants is called gravitropism. Proteomics may be the most promising technique to identify the proteins that are induced, repressed, or post-transcriptionally modified during gravity response in plants. In this study, the root proteins induced and/or changed by gravitational stimulation were analyzed using a proteomic method. As a result, the β subunit of the E1 component of pyruvate dehydrogenase, fructose biphosphate aldolase, and 20S proteasome β subunit E1 protein appeared in two different molecular weight types during gravitational stimulation. The transitory changes in molecular weight in these three identified proteins were important findings although their functions in the gravity response remain uncertain.

Key words: Arabidopsis, Maize, gravity, root gravitropism, proteomics

現在まで、植物の重力応答に機能する分子の網羅的研究を挙げてみると、マイクロアレイやDNAチップといった遺伝子(mRNA)の発現レベルで行った例は、少なからず報告されているが、発現タンパク質の網羅的なプロテオミクス解析に関する報告は、ほとんど行われていない。

そこで、本研究では、植物の重力応答、とくに根の重力屈性に機能するタンパク質分子の探索を目的として、モデル植物であるシロイヌナズナ芽生えに重力刺激を処理した後に回収した根部分およびシロイヌナズナよりも大型であるトウモロコシ芽生えに重力刺激を処理した後に回収したコルメラ細胞部分を材料としてプロテオミクス解析を行った。

【材料および方法】

野生型シロイヌナズナ種子(Columbia)を0.5xMS寒天培地上に無菌播種し、4℃・暗黒下で2日間、種子への吸水を行った後、23℃・光条件下で1週間芽生えを生育させた。その後、シロイヌナズナ根に重力刺激を与えるために、寒天培地ごと90度横転させた。重力刺激を与えたシロイヌナズナ根

から根冠および屈曲部位を含む先端から10mm部分を液体窒素を用いて凍結・回収した。また、トウモロコシ種子(パートナーズスイート;丸種株式会社,京都市)を湿潤したろ紙上に播種し、25℃・暗黒下で芽生えを生育させた。根が2cmほど伸長したところで、根の伸長方向が重力方向と平行になるように揃え、さらに1日生育させた後、芽生えを90度横転させ重力刺激を与えた。なお、最終的な根の長さは約3cmであった。重力刺激を与えたトウモロコシ根から根冠(コルメラ細胞)を含む先端から1mm部分を液体窒素を用いて凍結・回収した。

次に、回収した植物組織から全タンパク質を7M Urea, 2 M Thiourea, 界面活性剤として1% (w/v) ASB-14を含む40 mM Tris緩衝液(pH8.0)を用いて抽出した。さらに、抽出液中に含まれる核酸・糖・脂質・塩を除去するために、Ready Prep 2-D clean up kit (Bio-rad)を用いてタンパク質の精製を行った。精製後、50~100 μ gのタンパク質を等電点5~8までのIPG strip ゲル (Bio-Rad)を用いて等電点電気泳動を行い、10~20%濃度勾配ゲル(第一化学薬品)を用いてSDS-PAGE電気泳動した。泳動終了後、

ゲルを CBB 染色または Pro-Q Diamond (Molecular Probes) / SYPRO Ruby (Bio-Rad)を用いた蛍光多重染色に供しタンパク質を検出し、PDQuest software (Bio-rad)によりスポット解析を行った。

スポット解析により差異のみとめられたタンパク質スポットおよび興味のあるタンパク質スポットを同定するために、タンパク質スポットを含むゲル片を切り出した。まず、30%アセトニトリル / 25 mM 重炭酸アンモニウムに続いて、50%アセトニトリル / 25 mM 重炭酸アンモニウムで処理し、ゲル片を脱色した。ゲル片の乾燥後、ゲル内のタンパク質を修飾トリプシン(Promega)によりペプチド断片へと消化し、C₁₈樹脂を充填した Zip Tip ペットチップ(Millipore)を用いてサンプルを調製した。

次に、MALDI-TOF 型分子質量計、Voyager-DE-STR (Applied Biosystem)を用いて、試料を測定・解析し、得られたデータをトリプシン自己消化ピークを用いてキャリブレーションした後、Protein Prospector ホームページ (<http://prospector.ucsf.edu/>) の MS-Fit プログラムによりタンパク質データベースとの検索を行い、peptide mass fingerprinting (PMF)を行った。

【結果および考察】

シロイヌナズナ根におけるプロテオミクス

シロイヌナズナ根を供試した 2 次元電気泳動とその後のスポット解析の結果、常に発現がみとめられるタンパク質として、重力刺激により発現量の減少するタンパク質を 10 個、逆に増加するタンパク質を 6 個見出した。これらのうちの半数以上の分子は、Kimbrough ら(2004)の行ったマイクロアレイデータの結果と一致し、遺伝子発現の結果をプロテオミクス解析からタンパク質レベルでも支持する結果となった。とくに、アクチン系、チューブリン系のタンパク質の発現は重力刺激の処理とともに減少し、これは、マイクロアレイデータとも一致した。また、過去のマイクロアレイデータでは得られなかった分子も得られ、プロテオミクス解析とマイクロアレイ解析のデータの共通性と相違性も明らかとなった。

さらに、詳細なスポット解析を行なうと、重力刺激後の経過に伴って分子量の異なるタンパク質が一過性的に発現していることも分かった(図 1)。図 1 上段 A のパネル群では、重力刺激処理前 (0 h)

と重力刺激処理 3 時間後では、a1 のタンパク質スポットが検出されるが、重力刺激処理 0.5 時間後では、a1 のスポットは消失する反面、分子量のより低いシフトダウンした a2 のスポットが新たに検出された。このスポットは、重力刺激処理 3 時間後にはほぼ消失していた。TOFMS/PMF 解析の結果、a1, a2 のスポットは、ともに、生体内のエネルギー (ATP) を合成する代謝経路、解糖系に機能する pyruvate dehydrogenase E1 component β subunit であることが分かった。図 1 中段 B のパネル群では、重力刺激処理 0.5 時間後では、検出される b1 のタンパク質スポットが、重力刺激処理 3 時間後では、b2 の位置に分子量がシフトアップしていた。TOFMS/PMF 解析の結果、b1, b2 のスポットは、ともに、解糖系に機能する fructose-bisphosphate aldolase であった。さらに、図 1 下段 C のパネル群では、重力刺激処理 0.5 時間後では、検出される c1 のタンパク質スポットが、重力刺激処理 3 時間後では、c2 の位置に分子量がシフトアップしていた。TOFMS/PMF 解析の結果、c1, c2 のスポットは、ともに、ユビキチン化されたタンパク質の分解系に関与する 20S proteasome β subunit E1 (PBE1)であった。

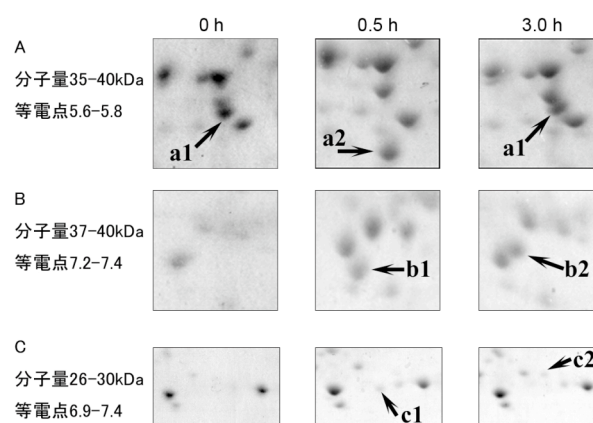


図 1. 重力刺激処理後のタンパク質スポット群の経時的変化。重力刺激処理前 (0 h) および処理後 (0.5 h, 3 h) を比較し、パネル A, B, C 群ごとに分子量が変化したタンパク質スポットを矢印で示した。

重力刺激によりこれら 3 種のタンパク質分子量が一過性的に変化する要因の 1 つとして、タンパク質のリン酸化・脱リン酸化修飾が考えられたので、リン酸化タンパク質を特異的に染色する ProQ Diamond により染色したが、これらの 3 種のタンパク質においてリン酸化はみとめられなかった。

しかしながら、重力刺激を処理すると、総タンパク質の発現様式はほとんど変わらないが、リン酸化タンパク質の発現様式が著しく変化していた。すなわち、重力刺激を処理して15分におけるリン酸化タンパク質の量は無処理区に比較して、半数以下であった。したがって、重力刺激に伴うフォスファターゼ活性の上昇、または、キナーゼ活性の低下という可能性が考えられた。

次に、重力刺激処理によって分子量が一過性的に変化する3種のタンパク質のアミノ酸配列を解析したところ、pyruvate dehydrogenase E1 component β subunit および fructose-bisphosphate aldolase は、ともに配列内に糖鎖結合部位を2ヵ所有することが明らかになった。したがって、重力刺激による pyruvate dehydrogenase E1 component β subunit および fructose-bisphosphate aldolase の一過性的な分子量変化は、重力刺激によって糖鎖修飾が制御されている可能性が考えられた。これらの2つのタンパク質は、ともにエネルギー合成系回路に機能する酵素であるが、大腸菌を用いた研究から分子シャペロン DnaK-ClpB システムによる凝集タンパク質の再生基質になるタンパク質であることが明らかになっている (Mogk ら 1999)。したがって、重力刺激による分子シャペロンの関与が示唆された。一方、20S proteasome β subunit E1 は、糖鎖結合部位を有さなかったが、N末側の57アミノ酸が生体内の水素イオン濃度 (pH) 変化により自己消化され、活性化することが報告されていた (Baumeister ら 1998, Ditzel ら 1998, Fu ら 1998)。したがって、重力刺激によるコルメラ細胞内の pH 塩基性化により 20S proteasome β subunit E1 の N 末

側ペプチド解離が誘導され、活性型になったプロテアソームが、重力制御に関与するタンパク質 (例えば、重力制御ストリームの進行を停止しているリプレッサータンパク質など) の分解を促進するという可能性が考えられた。なお、本記述に関する詳細は、Kamada M. et al. "Proteomic analysis of *Arabidopsis* root gravitropism" *Biol. Sci. Space* (in press)を参照されたい

トウモロコシのコルメラ細胞におけるプロテオミクス

トウモロコシ根を供試した2次元電気泳動とその後のスポット解析の結果、2次元電気泳動によるタンパク質の分布は、シロイヌナズナ根を用いたそれとは大きく異なった。スポット解析の結果、すべてのゲルにおいて約750個のタンパク質スポットを検出し、重力刺激処理前(0分)と重力刺激処理後10分と30分、さらには、重力刺激を与えて10分後と30分後の2次元電気泳動像を比較すると、2倍以上発現量の増加するタンパク質スポットおよび減少するタンパク質スポットが数十個ずつ見出された(図2)。これらのタンパク質スポットは、今後、TOFMS/PMF解析により同定する予定である。

一方、ProQ Diamond染色によりリン酸化タンパク質を検出すると、シロイヌナズナ根プロテオミクスと同様に、重力刺激処理に伴って、リン酸化タンパク質の発現量は減少することが分かった。したがって、トウモロコシのコルメラ細胞においても重力刺激に伴うフォスファターゼ活性の上昇、または、キナーゼ活性の低下という可能性が考え

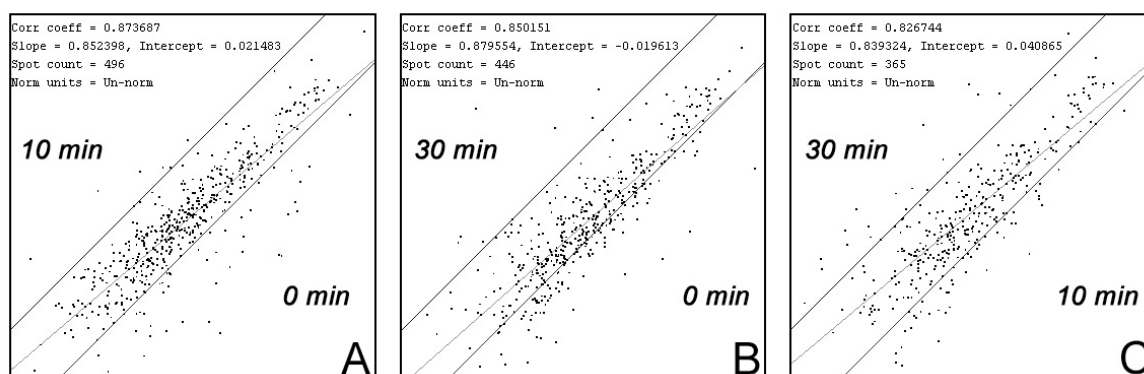


図2.重力刺激処理により発現したトウモロコシのコルメラ細胞におけるタンパク質スポットのスクアッタープロット
A: 重力刺激処理前(0分)と重力刺激処理後10分の発現タンパク質の比較, B: 重力刺激処理前(0分)と重力刺激処理後30分の発現タンパク質の比較, C: 重力刺激処理後10分と30分の発現タンパク質の比較。

られた。

フォスファターゼやキナーゼのような酵素活性は、一般に pH に依存するため、‘重力刺激に伴うフォスファターゼ活性の上昇、または、キナーゼ活性の低下’は、重力刺激によるコルメラ細胞内 pH の一過性的な塩基性が関与している可能性が考えられ、重力刺激を処理するとリン酸化タンパク質の量が減少するという事は、植物一般に普遍している可能性も考えられた。

今後は、重力刺激によってリン酸化タンパク質が減少するメカニズムおよびリン酸化タンパク質が減少することにより、植物の一連の重力応答スキームにどのような影響を及ぼしているのかを、リン酸化阻害剤あるいは脱リン酸化阻害剤などを使用して解析する予定である。

参考文献

Baumeister, W., Walz, J., Zuhl, F., Seemuller, E. (1998) The proteasome: paradigm of a

self-compartmentalizing protease. *Cell*, **92**, 367-380.

Ditzel, L., Huber, R., Mann, K., Heinemeyer, W., Wolf, D.H., Groll, M. (1998) Conformational constraints for protein self-cleavage in the proteasome. *J. Mol. Biol.*, **279**, 1187-1191.

Fu, H., Doelling, J.H., Arendt, C.S., Hochstrasser, M., Vierstra, R.D. (1998) Molecular organization of the 20S proteasome gene family from *Arabidopsis thaliana*. *Genetics*, **149**, 677-692.

Kimbrough, J.M., Salinas-Mondragon, R., Boss, W.F., Brown, C.S., Sederoff, H.W. (2004) The fast and transient transcriptional network of gravity and mechanical stimulation in the *Arabidopsis* root apex. *Plant Physiol.*, **136**, 2790-2805.

Mogk, A., Tomoyasu, T., Goloubinoff, P., Rüdiger, S., Röder, D., Landen, H., Bukau, B. (1999) Identification of thermolabile *Escherichia coli* proteins: prevention and reversion of aggregation by DnaK and ClpB. *EMBO J.*, **18**, 6934-6949.