

シロイヌナズナの花芽に対する過重力の影響についてのプロテオーム解析

須藤宇道 (富山大・理・生物), 浅野智哉 (金沢大・学際センター・ゲノム),
玉置大介 (富山大・院・理工), 唐原一郎 (富山大・院・理工),
西内巧 (金沢大・学際センター・ゲノム), 神阪盛一郎 (富山大・院・理工)

Proteome analysis of hypergravity effect on *Arabidopsis* flower buds

Takamichi Sutoh¹, Tomoya Asano², Daisuke Tamaoki³, Ichirou Karahara³, Takumi Nishiuchi², Seiichiro Kamisaka³

¹Department of Biology, Faculty of Science, University of Toyama, Gofuku, Toyama, 930-8555 Japan

²Division of Functional Genomics, Advanced Science Research Center, Kanazawa University Takara-machi, Kanazawa, 920-0934 Japan

³Graduate School of Science and Engineering, University of Toyama, Gofuku, Toyama, 930-8555 Japan

E-Mail: karahara@sci.u-toyama.ac.jp

Abstract: Proteome analysis was performed to examine the effect of hypergravity on reproductive growth of *Arabidopsis* plants. Plants were grown for 20-26 days under continuous light, and then exposed to hypergravity at 300 g or placed at 1 g for 24 h in the dark. Proteins extracted from the flower buds with a buffer containing Triton X-100 were subjected to two-dimensional electrophoresis. It was turned out that hypergravity up-regulated the expression of nine spots of polypeptides and down-regulated that of five spots. These peptides were subjected to matrix-assisted laser desorption ionization time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry, to compare the present proteome results with our previous transcriptome results.

Key words; Life cycle, Reproductive growth, Hypergravity, Proteomics, *Arabidopsis*

1、序論

陸上植物は動物と違い置かれた環境の変化から逃げることができないため、変化した環境に自らの生活環をうまく順応させる必要がある。植物は水中から陸上進出することで、その体にかかる重力は増加したが、またその環境変化に対応して進化することで、生活環を全うできるようになった。重力環境が植物の形態形成や代謝過程に与える影響を調べることは、陸上植物の進化の仕組みを探る上で重要である。

一方、人類は月や火星へ進出するプランを進めており、これらの長期有人探査のためには宇宙で作物を生産することは重要な課題であり、具体的な検討が必要な段階にきている。宇宙での作物生産の実現には、植物が地上とは異なる重力環境で生活環を全うできるかが問題である。高等植物の生活環ではまず栄養成長が起こり、その後に生殖成長が起こる。重力が栄養成長にあたえる影響は細胞壁を中心としてこれまでに研究が進められているが(保尊ら 2003)、生殖成長に与える影響についてはまだよくわかっていない。

生殖成長において花芽の発達は細かいステージに分かれており、その発達の過程で多くの遺伝子やタ

ンパク質の発現が関与すると考えられている。重力環境が植物の生殖成長に与える影響について解析するために、遺伝子レベルにおいては遠心機による過重力処理を植物に比較的与える実験系を用いて、トランスクリプトーム解析が行われている(玉置ら 2007)。タンパク質レベルで生殖成長が重力によりどのような制御を受けているかについては、調べられていない。そこで我々は生殖成長が重力によりタンパク質レベルでどのような制御を受けているかを調べるため、過重力処理 (300 g) したシロイヌナズナの花芽よりタンパク質を抽出し、二次元電気泳動により分離し、300 g 条件と 1 g 条件で発現量に差があるスポットを検出した。これらのスポットをトリプシンで消化したペプチド断片を Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight (MALDI-TOF) 質量分析で同定することで、過重力環境が生殖成長におけるタンパク質の発現に与える影響についてプロテオーム解析を試みた。まだ予備的ではあるが、これまでに得られた結果について報告する。

2、材料と方法

植物材料

シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana* L. Heynh

ecotype Columbia) 種子を、試験管に入れたムラシゲ・スクーグ寒天培地上に播種し、低温処理後、20-26 日間、23°Cで白色光下 (130 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}^{-1}$) で生育させた。花茎が 5 mm の長さになった植物体{Boyes ら (2001)の発達段階の分類によれば Stage No. 5 に相当する。また Smyth ら(1990)の花の発達段階の分類によると Stage 1-12 に相当する。}を選び、遠心機を用いて暗所 25°Cの条件で 300 g の過重力を茎から根の方向に向けて 24 時間与えた (過重力処理区)。1 g 対照区としては、25°Cの条件で暗所で 24 時間静置した。

タンパク質抽出

過重力処理および 1 g 対照区における植物体 (過重力処理区は 19 個体、1 g 対照区は 25 個体) から花芽 (頂芽) を切り出し、液体窒素中で組織を破砕し、PBS、1% TritonX-100、1 mM PMSF、プロテアーゼインヒビターカクテル等を含むバッファーを加えてタンパク質を抽出した。この抽出液に TCA (最終濃度 5%) を加え、タンパク質を沈殿させ、アセトン洗浄後、泳動用バッファーに溶かした。

二次元電気泳動

Immobiline DrvStrip pH 3-10 (GE Healthcare Bio-Sciences KK, Tokyo, Japan) を用いた等電点電気泳動および SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った。二次元電気泳動後、ゲルは Coomassie Brilliant Blue R-250 (CBB) を用いて染色を行った後、さらに銀染色キット MS (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan) を用いて銀染色を行った。

MALDI-TOF 質量分析

高解像度スキャナーを用いてスポット解析を行い、発現量に差異が見られたタンパク質のスポットを検出し、20 のタンパク質スポットを含むゲル片を切り出した。Sequencing Grade Modified Trypsin (Promega KK, Tokyo, Japan) を用いてタンパク質をペプチド断片へと消化し、Zip TipC18 カラム (Nihon Millipore KK, Tokyo, Japan)を用いて脱塩と濃縮を行った。その後 MALDI-TOF 型質量分析計 4800 Plus MALDI TOF/TOF Analyzer (Applied Biosystems Japan Ltd., Tokyo, Japan) 、Protein Pilot ソフトウェア 2.0 (Applied Biosystems Japan Ltd.)を用いてタンパク質の同定を行った。

3、結果と考察

過重力処理直後の花芽において、対照区と比べていくつかのタンパク質のスポットで変化がみられた。変化がみられたスポットのうち変化が大きいものから 20 スポットを質量分析した結果、17 のスポット

でタンパク質が同定でき、3 スポットでは同定できなかった。同定できたもののうち 9 つのスポットで過重力条件下でタンパク質の増加が、8 つのスポットで減少がみられた。17 スポットから同定されたタンパク質のうち、いくつかのタンパク質は重複していた。これは同じタンパク質が、翻訳後修飾により分子量や等電点の異なる複数のスポットとして検出されていたためであった。

過重力により発現が増加したスポットにおいてのみ見られたタンパク質は、2 種類の ATP synthase subunit、enolase、actin-7(actin-2)、elongation factor Tu、5-methyltetraapteroyltryglutamate-homocysteine methyltransferase (MetE)、Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) の 7 種類であった。これらのうち多くは代謝経路や解糖系に関わるタンパク質であった。また Enolase および GAPDH の遺伝子は、玉置ら (2007) が行ったマイクロアレイ解析の結果において過重力によりその発現が 2 倍以上増加した遺伝子の中に含まれていた。解糖系に関わる酵素である GAPDH は酸化ストレスにตอบสนองするタンパク質としても知られており、過重力によって酸化ストレスが引き起こされることが示唆された。GAPDH の場合、アミノ酸の翻訳後修飾の違いによる等電点の異なる 2 つのスポットが、共に過重力により増加したものととして同定された。MetE はホモシステインをメチル化しメチオニン合成するメチオニン合成酵素であり、メチオニンはエチレンの前駆体である。MetE 遺伝子は、玉置ら (2007) のマイクロアレイ解析の結果において過重力によりその発現が 2 倍以上増加した遺伝子の中には含まれていなかった。一方、Martzivanou ら (2003)が行った、シロイヌナズナのカルスに対する過重力の影響のトランスクリプトーム解析においては、過重力により MetE 遺伝子の発現が増加することが示されている。従って、過重力によってエチレン合成が促進される可能性がある。MetE は vitamin B12-independent methionine synthase のアイソザイムであり、シロイヌナズナの根に水平刺激を与えた場合のプロテオーム解析 (Kamada et al. 2005)において、vitamin B12-independent methionine synthase は水平刺激により減少しており、また Elongation factor 1-alpha は水平刺激により増加していた。様々な重力環境の変化によりこれらのタンパク質の発現が調節されている可能性が示唆された。

過重力により発現が減少したスポットにおいてのみ見られたタンパク質は chlorophyll a-b binding protein 2、ribosome recycling factor chloroplast precursor、およびストレス応答に関わる myrosinase、Vegetative Storage Protein2 (VSP2)の 4 種類であった。これらのタンパク質をコードする遺伝子は玉置ら (2007) が行ったマイクロアレイ解析の結果において発現が 1/2 以下に発現した遺伝子の中には認められなかつ

た。一方、*VSP2* 遺伝子は玉置ら (2007) のマイクロアレイ解析の結果ではその発現が増加していた。この理由については現時点では不明である。*myrosinase* の場合、減少が見られた2つのスポットのうち1つのスポットでは、重力条件によってアミノ酸の翻訳後修飾の違いも検出された。

今回の解析は生物学的には1回の実験でありまだ予備的であるため、今回得られた結果は検証していく予定である。

本研究は宇宙環境利用科学委員会研究ワーキンググループの研究支援を得て行われたものである。

参考文献

- 1) Boyes D. C., Zayed A. M., Ascenzi R., McCaskill A. J., Hoffman N. E., Davis K., Goslach J. *Plant Cell* **13**, 1499–1510 (2001)
- 2) Kamada M., Higashitani A., Ishioka N. *Biol. Sci. Space* **19**, 148-154 (2005)
- 3) Martzivanou M., Hampp R. *Physiol. Plant* **118**, 221–231 (2003)
- 4) 保尊隆享, 若林和幸, 曾我康一 *宇宙生物科学* **17**, 135–143 (2003)
- 5) 玉置 大介, 唐原 一郎, 西内 巧, 若杉 達也, 山田 恭司, 山口 和男, 神阪 盛一郎 *Space Utiliz. Res.* **23**, 382-384 (2007)