

プロテオミクス解析から探る植物の重力応答機構

Gravity response mechanisms in plants searched for proteomics analysis

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, Arabidopsis root apices and Maize columella cells 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 bisphosphate aldolase, and 20S proteasome β subunit E1 protein appeared in two different molecular weight types during gravitational stimulation in Arabidopsis. The transitory changes in molecular weight in these three identified proteins were important findings although their functions in the gravity response remain uncertain. In addition, the phospho-protein was found remarkably decreasing by the gravitational stimulation in Arabidopsis and Maize, so, it was suggested that the phospho-protein was important in gravity response mechanisms.

Keywords : Arabidopsis, Maize, gravity, root gravitropism, proteomics

概 要

近年、多くの生物種のゲノム配列が明らかにされるにつれ、遺伝子発現後の生体内でのタンパク質の動態を明らかにするためのプロテオミクス解析が多く行われている。植物においてもステータス毎や、塩や乾燥などのストレスに対するタンパク質の発現解析がシロイヌナズナ、イネ、トウモロコシ、エンドウを用いて行われている。本研究では、植物の根の重力屈性に関わるタンパク質を解析するために、シロイヌナズナ根およびトウモロコシコルメラ細胞を用いてプロテオミクス解析を行った。その結果、シロイヌナズナ根において、pyruvate dehydrogenase E1 component β subunit, fructose-bisphosphate aldolaseおよび20S proteasome β subunit E1の3分子種が、重力刺激の経過時間に伴って、一過性的に分子量変化を起こしていることが明らかになった。また、重力刺激を処理すると、シロイヌナズナおよびトウモロコシの両植物とも、リン酸化タンパク質の発現が著しく減少していることも明らかになり、植物の重力屈性機構において、同一タンパク質の分子量変化およびリン酸化タンパク質が、重要な意義を持つ可能性が示唆された。

1. はじめに

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。

2. 成果の概要

2.1. シロイヌナズナ根におけるプロテオミクス

2.1.1. 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。

次に、回収した植物組織から全タンパク質を7M Urea, 2M Thiourea, 界面活性剤として1% (w/v) ASB-14を含む40mM 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 (BioRad)を用いてタンパク質の精製を行った。精製後、50~100 μg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 / 25mM 重炭酸アンモニウムに続いて、50%アセトニトリル / 25mM 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ピペットチップ (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。

2.1.2. 結果

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らの行ったマイクロアレイデータの結果[1]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 (0h) 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。

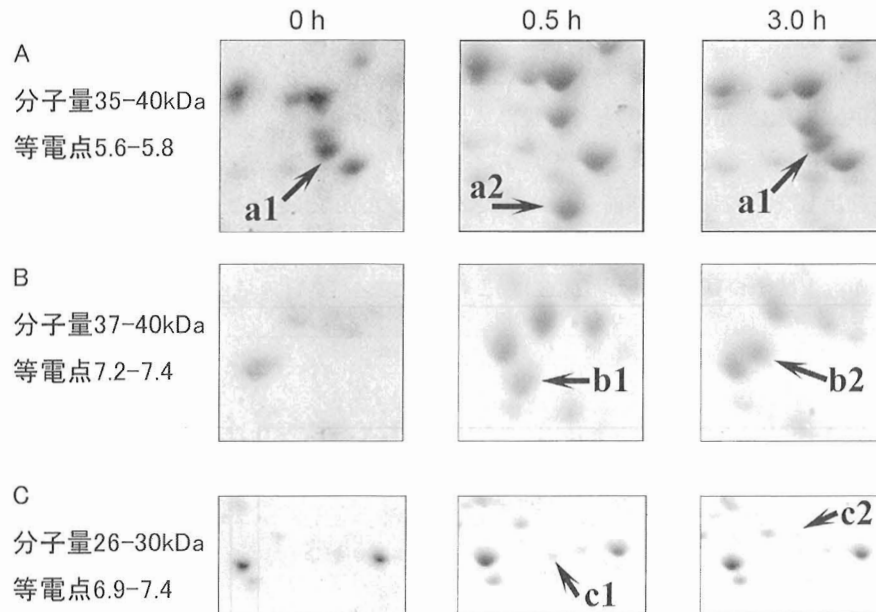


図1 重力刺激処理後のタンパク質スポット群の経時的変化
重力刺激処理前 (0 h) および処理後 (0.5 h, 3 h) を比較し、パネルA, B, C群ごとに分子量が変化したタンパク質スポットを矢印で示した。

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[2]。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[3-5]。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。

2.2. トウモロコシのコルメラ細胞におけるプロテオミクス

2.2.1. 材料および方法

トウモロコシ種子（パートナースイート；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。その後の，タンパク質抽出および2次元電気泳動は，シロイヌナズナを供した実験と同様に行った。

2.2.2. 結果

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。

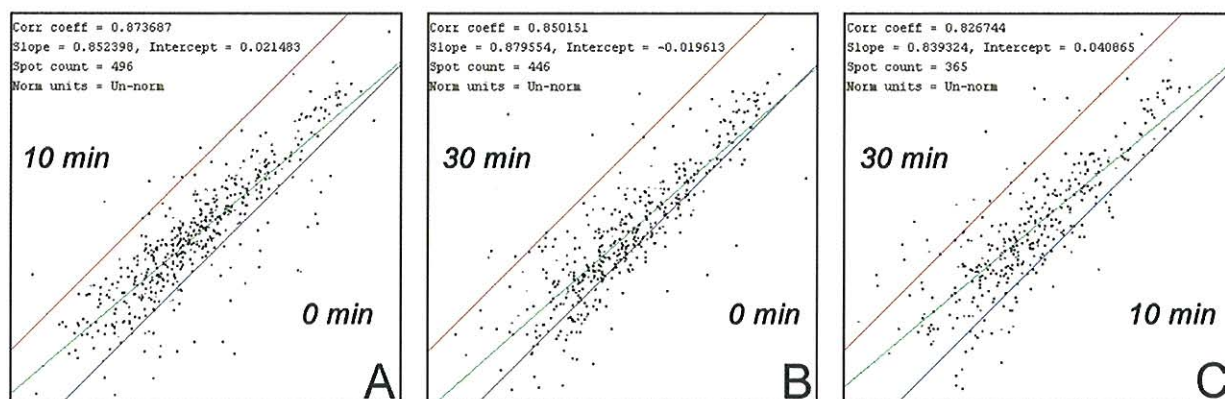


図2 重力刺激を処理したトウモロコシコルメラ細胞のタンパク質のスカッタープロット解析
重力刺激処理前（0min）および処理後（10min, 30min）の2次元電気泳動により検出されたスポットの発現強度を比較した。A: 0minと10minの比較，B: 0minと30minの比較，C: 10minと30minの比較。

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られた。

3. まとめ

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。

成 果 発 表

学術論文

- [1] Kamada, M., Higashitani, A, Ishioka, N. "Proteomic analysis of Arabidopsis root gravitropism." Biol. Sci. Space, 19, 148-154, 2005

学会発表

- [1] 鎌田源司, 東谷篤志, 石岡憲昭 "重力刺激を与えたシロイヌナズナの根におけるプロテオミクス解析" 日本宇宙生物科学会第19回大会 2005年9月 東京
- [2] 鎌田源司 "プロテオミクス解析から探る植物の重力応答制御機構" 平成17年度宇宙環境利用科学委員会研究班WG (代表者: 保尊隆享, 高橋秀幸, 神阪盛一郎) の合同の会 2005年12月 東京
- [3] 鎌田源司, 東谷篤志, 石岡憲昭 "プロテオミクス解析から探る植物の重力応答機構" 第22回宇宙利用シンポジウム 2006年1月 東京

参 考 文 献

- [1] Kimbrough, J.M., Salinas-Mondragon, R., Boss, W.F., Brown, C.S., Sederoff, H.W. "The fast and transient transcriptional network of gravity and mechanical stimulation in the Arabidopsis root apex." Plant Physiol., 136, 2790-2805, 2004
- [2] Mogk, A., Tomoyasu, T., Goloubinoff, P., Rudiger, S., Roder, D., Landen, H., Bukau, B. "Identification of thermolabile *Escherichia coli* proteins: prevention and reversion of aggregation by DnaK and ClpB." EMBO J., 18, 6934-6949, 1999
- [3] Baumeister, W., Walz, J., Zuhl, F., Seemuller, E. "The proteasome: paradigm of a self-compartmentalizing protease." Cell, 92, 367-380, 1998
- [4] Ditzel, L., Huber, R., Mann, K., Heinemeyer, W., Wolf, D.H., Groll, M. "Conformational constraints for protein self-cleavage in the proteasome." J. Mol. Biol., 279, 1187-1191, 1998
- [5] Fu, H., Doelling, J.H., Arendt, C.S., Hochstrasser, M., Vierstra, R.D. "Molecular organization of the 20S proteasome gene family from *Arabidopsis thaliana*." Genetics, 149, 677-692, 1998