

P-2 樹木冬芽の越冬過程における可溶性タンパク質の組成変化

(北大農) ○鈴木伸吾、遠藤圭太、岡田香織、荒川圭太
(岩大農寒冷バイオ) 高橋大輔、上村松生

緒言

温帯や亜寒帯に生育する樹木は夏から秋にかけて冬芽を形成する。翌春に成長するための冬芽は秋に日長が短くなるにつれて、芽自身が成長を抑制して自発休眠状態に入る。さらに、気温が低下して冬へ移行すると、適度な低温(4°C前後)に一定の期間さらされたことによって、冬芽の自発休眠は解除されるが、代わりに成長に不適な低温条件によって芽の成長が抑制されるという強制休眠状態に入る。このような秋から冬にかけて成長が停止して冬芽が休眠する過程とほぼ時期を同じくして、気温の低下によって冬芽の凍結抵抗性が向上する。やがて初春を迎え気温が上昇し始めると、強制休眠状態におかれていた冬芽は次第に開芽する。このような冬芽の越冬過程の特徴を生理的に調べるため、すでに凍結挙動が細胞レベルで詳しく調べられているカラマツ冬芽を用いてその越冬機構の解明を試みることにした。

特に本研究では、冬芽の自発休眠が解除される時の生理的な変化を調べるための指標として、冬芽の可溶性タンパク質に注目し、その組成変動を LC-MS/MS によって解析し、自発休眠解除前後で蓄積量に大きな変化のあるものを探索した。

材料と方法

北海道大学北方生物圏フィールド科学センター苗畑内に生育するカラマツ (*Larix kaempferi*) 成木の枝から冬芽を採取した。

<休眠状態の判定>

採取した枝を水挿しし、23°Cで明期 14 時間/暗期 10 時間の条件にて 14 日間処理した後に開芽している芽の割合を求めた。本実験では開芽率が 75%以上となる時点を目安とした。

<凍結抵抗性の測定>

切り取った芽(図 1)を少量の純水が入った試験管に入れ、-3.0°Cに予冷したプログラムフリーザーに入れて、約 30 分後に植氷した。その後、毎時 2.4°Cの速度で冷却し、目的の温度に達した時点で試験管を取り出して、4°Cの暗所で融解させた。また、液体窒素で急速凍結後に融解させる操作を 3 回繰り返した試料(生存率 0%)と凍結させずに 4°Cの暗所で処理した試料(生存率 100%)を用意し、電解質漏出法による生存率算出のための基準とした。融解させた試料が入った試験管に純水を 1 mL ずつ加えてから減圧状態にして組織に水を浸潤させた。さらに、試料が入った試験管を遮光して 3 時間振とうしてから、水溶液の電気伝導率を計測した。計測に用いた水溶液を試験管に戻してから、沸騰水中で 10 分間加熱処理して細胞を死滅させた。室温に冷却後、さらに 2 時間振とうしてから再度電気伝導率を計測した。この結果から各凍結温度での細胞の生存率を計算し、凍結抵抗性(LT₅₀: 生存率が 50%となる温度)を見積もった。

<可溶性タンパク質の抽出、分析>

芽鱗を除いて原基のみにした芽(図 1、白点線内)を液体窒素中で破碎し、試料重量に対しておよそ 10 倍量の氷冷した抽出液(0.1 M Tris-HCl pH 7.8, 0.2 M sucrose, 5 mM EDTA, 1 mM benzamidine, 1 mM PMSF)を加え、よく攪拌した後に遠心分離(2,600×g, 10 min, 4°C)して上清を回収した。その上清をさらに二回遠心分離(15,000×g, 10 min, 4°C)を行った後に上清を超遠心(200,000×g, 30 min, 4°C)に供試して得られた上清を可溶性タンパク質抽出液とした。この抽出液のタンパク質組成の分析を LC-MS/MS で行うため、試料の前処理は Li et al. (2012) の方法に準じて行った。タンパク質の濃縮とトリプシン処理をして得られたタンパク質断片(ペプチド)は LC-MS/MS にて分析した。なお LC-MS/MS による分析は、岩手大学農学部附属寒冷バイオフロンティア研究センターの共同研究者に依頼した。得られたペプチドの配列を NCBI の BLAST (blastp) に



図 1. カラマツ冬芽の縦断面。
白点線内: 冬芽原基部分

かけて植物の既知のタンパク質配列と照合してタンパク質を同定した。また抽出液を一次元の SDS-PAGE (Laemmli 法) にかけて、その組成分析を行った。

結果

カラマツの枝を経時的に採集し、開芽率を測定して自発休眠の状態を調べるとともに、凍結抵抗性について調べた。すると、12月中旬頃に開芽率が急激に上昇したことから、この時期に自発休眠が解除されていることが解った (図2: 緑線)。このため可溶性タンパク質の分析は自発休眠中で開芽率が0%であった時点と自発休眠解除後に開芽率がほぼ100%となる時点で行った。一方、凍結抵抗性は12月下旬までにはほぼ最高の値を示した状態で、一定していた (図2: 青線)。

可溶性タンパク質画分の SDS-PAGE による組成分析では、自発休眠解除前後ではバンドの有無や濃淡などの目に見えるような大きな変化は見られなかった (図3)。

タンパク質の LC-MS/MS による解析では、ペプチドに由来するシグナル強度が蓄積量を反映するものとし、蓄積量が増減したと判断する基準を自発休眠中のシグナル強度と比較して、自発休眠解除後のシグナル強度が2倍以上になったもの、もしくは半分以下になったものとした。蓄積量の変化が多かったペプチド由来の配列をもとにデータベース解析すると、蓄積量が増加したタンパク質は35個、減少したタンパク質は16個がそれぞれ同定された。蓄積量が増減したタンパク質では代謝に関わるタンパク質 (酵素) が多くを占めた。中でも一次代謝 (カルビン回路、TCA回路、解糖系、アミノ酸合成など) に関わるタンパク質の数が多かった (表1)。このことから自発休眠が解除される際に何らかのエネルギーが必要となることが考えられた。

特に蓄積量が大きく増加したタンパク質にはアコニターゼ、クエン酸合成酵素 (いずれも TCA 回路の主要酵素)、フルクトース二リン酸アルドラーゼ (解糖系の酵素)、活性酸素除去酵素などがあつた。

例えば、アコニターゼ遺伝子やクエン酸合成酵素は種子が休眠から覚めて発芽するときに発現が増加することが知られている^{2),3)}。また、活性酸素除去酵素は種子の休眠を解除する処理をしたときに活性が増加することが報告されている⁴⁾。種子と芽はいずれも休眠が解除されると成長を開始するという点で共通している。そのため器官は異なるものの休眠を解除して成長するためには同じような代謝系の酵素群が作用する可能性が考えられるため、さらに詳細に蓄積量などの分析をして確認する必要がある。今後は、今回変化のあつたタンパク質群の詳細な蓄積量の測定や休眠解除に鍵となるタンパク質の同定を試みたい。

参考文献

- 1) B. Li et al.: Plant & Cell Physiology 53, 543-554 (2012)
- 2) H. Zehler & C. Schnarrenberger: Physiologia Plantarum 60, 9-15 (1984)
- 3) J. R. Stephen et al.: New Phytologist 161, 401-413 (2004)
- 4) U. Krasuska & A. Gniazdowska: Acta Physiologiae Plantarum 34, 683-692 (2012)

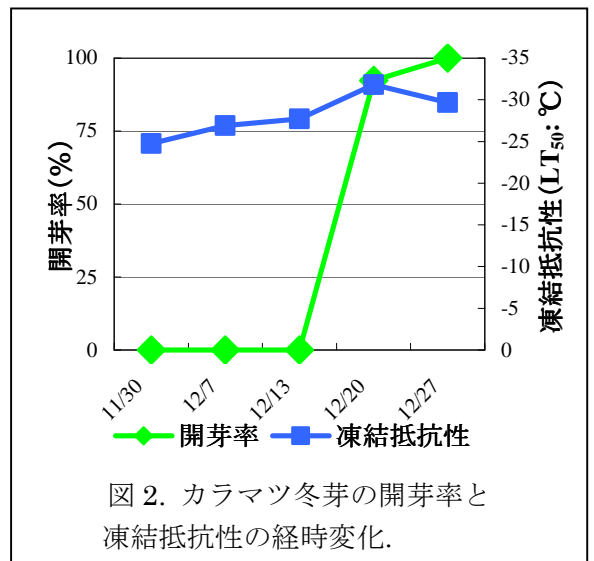


図2. カラマツ冬芽の開芽率と凍結抵抗性の経時変化。

表1. カラマツ冬芽において自発休眠解除前後で変化したタンパク質の分類。

	増加	減少
一次代謝	14	9
二次代謝	4	2
ストレス応答	7	2
転写	4	2
その他	6	1
	35	16

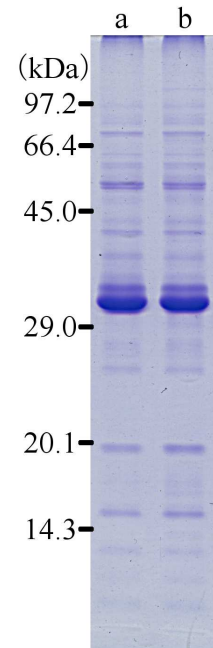


図3. 休眠過程におけるカラマツ冬芽の可溶性タンパク質の組成比較。
a: 自発休眠中 (12/7)
b: 自発休眠解除後 (12/27)