

学 位 論 文 題 名

Characterization of Two Stress Proteins Accumulated
in Endoplasmic Reticulum of Cortical Parenchyma
Cells in Mulberry (*Morus bombycis* Koidz.) during
Seasonal Cold Acclimation

(季節的低温馴化によりクワ皮層柔細胞の小胞体に蓄積する
2種類のスเตรスタンパク質に関する研究)

学位論文内容の要旨

冬季に非常に高い耐凍性(-80℃)を獲得するクワ皮層柔細胞において、過去の電子顕微鏡を用いた形態観察により、小胞体(ER)が低温馴化及び凍結の影響により最も変化する細胞内器官であることが示されている。本研究では、クワ皮層組織細胞から季節的に ER 画分を調製しその蛋白質を解析することにより、凍結耐性獲得と平行的に発現する 2 種類の ER 局在性ストレス蛋白質の存在を明らかにしそれらの解析を行った。

粗ミクロソーム画分をショ糖連続密度勾配遠心法により分画し、それぞれのフラクションについて蛋白質量を測定した。その結果、ER の指標酵素活性が最も高い画分 (ER 画分) の蛋白質量が冬期に増加することを明らかにした。季節変化に伴う ER 画分の蛋白質組成の変化を SDS-電気泳動で解析し、季節的低温馴化による耐凍性獲得過程で蛋白質組成が大きく変化することを明らかにした。特に、低分子領域において夏季には全く存在しない 20kD と 27kD の 2 種類の蛋白質が冬季に顕著に蓄積した。これらの蛋白質をそれぞれ WAP(Winter-Accumulated-Protein)20 および WAP27 と名付けた。

二次元-SDS 電気泳動および特異抗体を用いた免疫ブロットの結果より、21kD に WAP20 の異性体と考えられる蛋白質の存在が明らかとなり、WAP21 と名付けた。WAP21(pI 6.8) も WAP20 (pI 7.0) と全く同様のパターンで低温馴化過程で蓄積した。同様の実験により、WAP27 も pI 5.0 前後に少なくとも 2 つの蛋白質を有することが確認され、それぞれを WAP27A および WAP27B と名付けた。また、これらの特異抗体を用いた免疫電子顕微鏡観察を行い、両蛋白質は ER のみに局在することを確認した。

WAP20 の N-末端アミノ酸配列は ER 局在性の低分子量熱ショック蛋白質と高い相同性を示した。非変性条件下の蛋白質の電気泳動による解析で、WAP20 は低分子量熱ショック蛋白質に共通してみられる高分子構造を保持することが明らかになった。また、cDNA の単離による全アミノ酸配列の決定により、WAP20 及び WAP21 は ER 局在性の低分子量熱ショック蛋白質そのものであることを明らかにした。

WAP27A および WAP27B の cDNA 塩基配列から予想されるアミノ酸配列が 11 アミノ酸が規則的に 12 回配列した構造を持つことから、WAP27 はグループ III の LEA 蛋白質に分類された。また、単純な α -ヘリックス構造を持つことから非常に親水性の高い構造を有することが予測されたが、実際に WAP27 は熱処理後でも変性しない熱安定性蛋白質であることを明らかにした。サザン解析によりクワ皮層組織、ゲノム中には WAP27 遺伝子が 2 コピーのみ、すなわち WAP27A 及び WAP27B のみが存在することを明らかにした。これらの構造的特徴は、多くの植物種で同定されている低温誘導性蛋白質に共通して見られる。

WAP20 及び WAP27cDNA を用いてノーザン解析を行った結果、WAP20 及び WAP27 遺伝子発現はいずれも低温条件下において誘導され、冬季において特異的に発現することが確認された。季節的遺伝子発現パターンについては WAP20 遺伝子は低温馴化の初期過程で強く発現したのに対し、WAP27 遺伝子は冬季間を通して誘導された。興味深いことに、低温以外の細胞外から与えた刺激に対する遺伝子の発現誘導パターンも両遺伝子で異なっており、WAP20 遺伝子は熱ショック及び ABA 処理により、また WAP27 遺伝子は脱水処理により著しく転写が誘導された。これらの結果は、WAP20 及び WAP27 遺伝子の発現誘導は、別々のカスケードを介して行われている可能性を示唆している。

WAP20 と WAP27 の組織レベルでの蓄積パターンは異なっていた。冬期において、WAP27 は皮層、木部、芽において蓄積が見られたが、WAP20 の蓄積は皮層に限定され、木部、芽ではほとんど検出されなかった。WAP20 及び WAP27 の両蛋白質が蓄積する皮層細胞のみが凍結により細胞外凍結を起こす、すなわち凍結脱水を受ける組織であり、これら蛋白質の蓄積が起らない木部、芽は凍結により過冷却を起こす、すなわち脱水の影響をほとんど受けない組織である点が注目される。

以上の結果から、クワ皮層柔細胞 ER には季節的な低温馴化の結果による耐凍性の獲得と平行して、低分子量熱ショック蛋白質(WAP20)、及びグループ III LEA 蛋白質(WAP27)が蓄積することが明らかになった。低分子量熱ショック蛋白質、及びグループ III LEA 蛋白質は、主に草本植物を用いた研究により、低温傷害や凍結脱水傷害から細胞を保護する役割が示唆されている。これらの蛋白質群は、様々な生物的及び非生物的ストレスにより多くの植物種の細胞内に蓄積することが知られているが、ER に局在するケースについては報告が非常に少ない。また、これらの蛋白質群は、主に草本植物種を用いた研究において低温で誘導されることが知られているが、木本植物についての報告例は極端に少ない。冬季のクワ皮層柔細胞において、凍結耐性の獲得に関与すると考えられる WAP20 および WAP27 が ER のみに蓄積する意義については今後の研究を待たねばならない。これら ER 局在性ストレス蛋白質は、クワ皮層柔細胞が高凍結耐性を獲得する上で重要な役割を担っているものと推測され、今後、WAP20 及び WAP27 導入形質転換植物体の作製により、これらストレス蛋白質の耐凍性に果たす役割の解析が期待できる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 田 中 歩

副 査 教 授 山 本 興太郎

副 査 助教授 藤 川 清 三

学 位 論 文 題 名

Characterization of Two Stress Proteins Accumulated in Endoplasmic Reticulum of Cortical Parenchyma Cells in Mulberry (*Morus bombycis* Koidz.) during Seasonal Cold Acclimation

(季節的低温馴化によりクワ皮層柔細胞の小胞体に蓄積する
2 種類のストレスタンパク質に関する研究)

冬季に非常に高い耐凍性(-80℃)を獲得するクワ皮層柔細胞において、過去の電子顕微鏡を用いた形態観察により、小胞体(ER)が低温馴化及び凍結の影響により最も変化する細胞内器官であることが示されている。本研究では、クワ皮層組織細胞から季節的に ER 画分を調製しその蛋白質を解析することにより、凍結耐性獲得と平行的に発現する 2 種類の ER 局在性ストレス蛋白質の存在を明らかにしそれらの解析を行った。

粗ミクロソーム画分をショ糖連続密度勾配遠心法により分画し、それぞれのフラクションについて蛋白質量を測定した。その結果、ER の指標酵素活性が最も高い画分 (ER 画分) の蛋白質量が冬期に増加することを明らかにした。季節変化に伴う ER 画分の蛋白質組成の変化を SDS-電気泳動で解析し、季節的低温馴化による耐凍性獲得過程で蛋白質組成が大きく変化することを明らかにした。特に、低分子領域において夏季には全く存在しない 20kD と 27kD の 2 種類の蛋白質が冬季に顕著に蓄積する事を明らかにし、これらの蛋白質をそれぞれ WAP(Winter-Accumulated-Protein)20 および WAP27 と名付けた。

二次元-SDS 電気泳動および特異抗体を用いた免疫ブロットにより、21kD に WAP20 の異性体と考えられる蛋白質の存在を明らかにし、WAP21 と名付けた。WAP21(pI6.8)も WAP20 (pI 7.0) と全く同様のパターンで低温馴化過程で蓄積した。同様の実験により、WAP27 も pI 5.0 前後に少なくとも 2 つの蛋白質を有することを確認し、それぞれを WAP27A および WAP27B と名付けた。また、特異抗体を用いた免疫電子顕微鏡観察を行い、両蛋白質は ER のみに局在することを確認した。

WAP20 の N-末端アミノ酸配列は ER 局在性の低分子量熱ショック蛋白質

と高い相同性を示した。非変性条件下の蛋白質の電気泳動による解析で、WAP20 は低分子量熱ショック蛋白質に共通してみられる高分子構造を保持することが明らかになった。また、cDNA の単離による全アミノ酸配列の決定により、WAP20 及び WAP21 は ER 局在性の低分子量熱ショック蛋白質そのものであることを確認した。

WAP27A および WAP27B の cDNA 塩基配列から予想されるアミノ酸配列が 11 アミノ酸が規則的に 12 回配列した構造を持つことから、WAP27 はグループ III の LEA 蛋白質に分類された。また、単純な α -ヘリックス構造を持つことから非常に親水性の高い構造を有することを予測し、実際に、WAP27 は熱処理後でも変性しない熱安定性蛋白質であることを明らかにした。サザン解析によりクワ皮層組織ゲノム中には WAP27 遺伝子が 2 コピーのみ、すなわち WAP27A 及び WAP27B のみが存在することを明らかにした。これらの構造的特徴は、多くの植物種で同定されている低温誘導性蛋白質に共通して見られる特徴であることを明らかにした。

WAP20 及び WAP27cDNA を用いてノーザン解析を行った結果、これらの遺伝子発現はいずれも低温条件下において誘導され、冬季特異的に発現することが確認された。季節的遺伝子発現パターンについては WAP20 遺伝子は低温馴化の初期過程で強く発現したのに対し、WAP27 遺伝子は冬季間を通して広く誘導された。興味深いことに、WAP20 遺伝子は熱ショック及び ABA 処理により、また WAP27 遺伝子は脱水処理により著しく転写が誘導された。これらの結果は、WAP20 及び WAP27 遺伝子の発現誘導は、別々のカスケードを介して行われている可能性を示唆している。さらに、WAP20 と WAP27 蛋白質の組織レベルでの蓄積パターンも異なっていた。冬期において、WAP27 は皮層、木部、芽において蓄積が見られたが、WAP20 の蓄積は皮層に限定され、木部、芽ではほとんど検出されなかった。

以上の結果から、クワ皮層柔細胞 ER には季節的な低温馴化の結果による耐凍性の獲得と平行して、低分子量熱ショック蛋白質(WAP20)、及びグループ III LEA 蛋白質(WAP27)が蓄積することが明らかになった。低分子量熱ショック蛋白質、及びグループ III LEA 蛋白質は、主に草本植物を用いた研究により、低温傷害や凍結脱水傷害から細胞を保護する役割が示唆されている。これらの蛋白質群は、様々な生物的及び非生物的ストレスにより多くの植物種の細胞内に蓄積することが知られているが、ER に局在するケースについては報告が非常に少ない。また、これらの蛋白質群は、主に草本植物種を用いた研究において低温で誘導されることが知られているが、木本植物についての報告例は極端に少ない。冬季のクワ皮層柔細胞において、凍結耐性の獲得に関与すると考えられる WAP20 および WAP27 が ER のみに蓄積する意義については今後の研究を待たねばならない。

しかし、これら ER 局在性ストレス蛋白質は、クワ皮層柔細胞が高凍結耐性を獲得する上で重要な役割を担っているものと推測され、今後、WAP20 及び WAP27 導入形質転換植物体の作製により、これらストレス蛋白質の耐凍性に果たす役割の解析が期待できる。このように、これら一連の研究は植物の低温馴化過程及び凍結凍結耐性獲得機構を解明するうえで極めて有用である。

よって審査員一同はこれらの成果を高く評価し、また研究者として誠実かつ熱心であり、大学院過程における研鑽や取得単位などとも併せ、申請者が博士（地球環境科学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。