

研究ノート

塩ストレスによるイネ芽生えタンパク質の変動

門間 美千子

Changes in proteins of rice seedlings under salt stress

Michiko Momma

Abstract

Proteins from rice seedlings grown on salt-containing medium were analyzed by two-dimensional electrophoresis. Heat-stable proteins including dehydrin (Group2 LEA protein) increased in seedlings with 0.5% NaCl, after incubation at low-temperature (10 °C) for 4 days. Growth of the seedlings was remarkably inhibited with 0.8% NaCl. The profile of two-dimensional electrophoresis of seedlings with 0.8% NaCl showed weaker spots for 16, 18, 27 kDa polypeptides and denser spots for 61kDa and 36-37kDa proteins than the control seedlings.

(Received Nov. 11. 3, 2003; Accepted Jan. 29, 2004)

登熟後期の種子や、乾燥や高塩濃度等の水分ストレス条件下にある植物体では、植物ホルモンであるアブシジン酸の誘導ならびにLEA (late embryogenesis abundant) タンパク質等のストレスタンパク質の蓄積がみられる¹⁾。前報では、イネ種子のアリュウロン層に由来する米糠を用い、完熟種子で分子量44kDaおよび23kDaの複数のデハイドリン(グループ2 LEAタンパク質)が集積していることを示した²⁾。本研究では、塩ストレスを与えたイネ芽生えのタンパク質を二次元電気泳動で解析し、塩濃度によるストレス応答性の違い、ならびにデハイドリンを含むタンパク質の変動について検討した。

実験方法

1. 実験材料およびイネ種子の発芽

玄米(平成13年産コシヒカリ)を蒸留水で洗浄後、70%エタノールに5分間浸し、さらにTween20を添加した次亜塩素酸ナトリウム溶液(有効塩素濃度1%)中で一晚殺菌した。殺菌処理した種子を、0、0.5、0.8%NaCl

を含むMSホルモンフリー培地(0.5%ゲルライト)70ml上に、容器当り30粒ずつ播種した。これを、湿度60%、明暗各12時間に設定した人工気象器内におき、25 °Cで12日間培養した。NaCl無添加および0.5%NaClでの芽生えは、さらに10 °Cで4日間培養した。採取した芽生えを液体窒素中で凍結し、使用時まで-80 °Cで保存した。

2. タンパク質の抽出

イネ芽生え200~500mgを4倍量(v/w)の抽出用緩衝液(50mM HEPES-NaOH pH7, 2mM PMSF, 0.1% Tween20)とともに乳鉢で磨砕し、12,000×gで15分間遠心し、上清を抽出液とした。耐熱性タンパク質の解析には、この抽出液を100 °Cで5分間加熱し、遠心分離した上清を使用した。

3. SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)および二次元電気泳動

上記抽出液を蒸留水で透析後、ウルトラフリーMC(ミリポア社)で5倍に濃縮し試料溶液とした。SDS-PAGEはLaemmliの方法³⁾に従い、5-20%グラジエント

ゲル (PAGEL 520G, アトー) を用いて行った。二次元電気泳動は前報²⁾と同様に, Multiphore System (アマシャムファルマシアバイオテック) を用いて機器説明書に準じて行った。すなわち試料溶液に等量の膨潤用溶液 (8 M尿素, 2 %CHAPS, 2.8mg/ml DTT, 痕跡量のプロモフェノールブルー, 20 μ l/ml Immobilized pH Gradient (IPG) 3-10 NL緩衝液) を加え, この溶液125 μ lをIPGストリップ (pH 3-10NL, 7cm) に膨潤させた。IPGストリップを装着し200~3500Vで90分間, 3500Vで65分間泳動し, SDS平衡化後, 縦型電気泳動装置 (AE6450, アトー) で2次元目の泳動を行った。泳動後のゲルはCBB R250またはSYPRO Ruby (バイオラッド) で染色した。

4. イムノプロットティング

デハイドリンのリジン保存モチーフ配列 (DQNEKKGIMDKIKEKLPGGH) に対するポリクローナル抗体を用い, 前報²⁾と同様にデハイドリンの検出を行った。

実験結果および考察

1. 低塩濃度 (0.5%) での芽生えのタンパク質の変動

播種後12日後の芽生えの生育状況を図1に示した。NaClを加えていない培地では, 芽生えは約20cmに成長したが, 塩濃度0.5%の培地では成長が遅れ, 8cm程度までしか成長しなかった。さらに高塩濃度の0.8%NaClを含む培地では, 播種した種子のうち発芽したものは半以下で, 芽生えの大きさは2~5cmだった。

塩濃度0.5%での芽生えの全タンパク質を, 細胞溶解液 (8 M尿素, 4 %CHAPS, 40mM Tris) で抽出し, そ

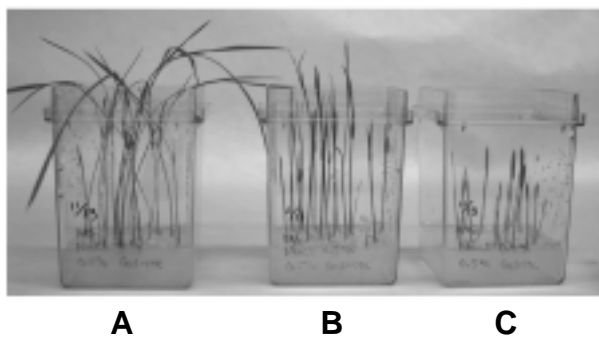


図1. 播種12日後のイネ芽生え状況

A, NaCl無添加; B, 0.5%NaCl; C, 0.8%NaCl

の二次元電気泳動パターンをコントロール (NaCl無添加) のものと比較したが差は見られなかった。次に, 塩ストレスを加えたことで, 低温ストレスに対する反応が異なるかどうかを検討するために, イネ芽生えを10に設定した人工気象器に移し, さらに4日間培養した。低温条件に移したことで, いずれの芽生えの外見にも顕著な変化は見られなかった。水溶性タンパク質を抽出しSDS-PAGEパターンを比較すると, NaCl添加培地のもので30.5kDaタンパク質のバンドがやや薄かった (図2, レーン5, 6)。デハイドリンを含むLEAタンパク質は耐熱性を示すことが知られている⁴⁾。そこで, これらの芽生えの耐熱性タンパク質を比較した (図2, レーン1, 3)。0.5%NaCl添加培地の芽生えでは分子量20~27kDaの複数のタンパク質が増加した。このうち, 23kDaのバンドは, イムノプロットティングで, デハイドリンモチーフ抗体と交差反応を示した。

図2 レーン5, 6の水溶性タンパク質の二次元電気泳動パターンを図3に示した。23kDaデハイドリン様タンパク質は酸性側に検出された (図3B, 矢印)。前報で報告した種子中のデハイドリンは中性付近に検出されており, 芽生えと種子ではデハイドリンの等電点が異なっていた。また, 中性付近に, コントロールの方で濃度が高いスポット (図3A, 矢印) が見いだされた。分子量から, SDS-PAGE (図2) のレーン1での30.5kDaタンパク質のバンドは, このタンパク質に相当

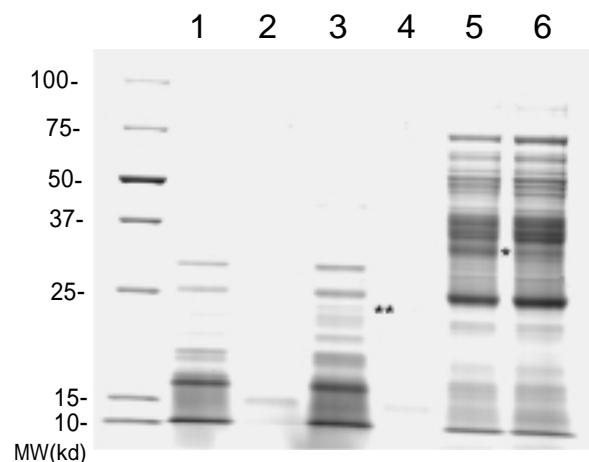


図2. 0.5%NaCl培地で生育後に低温処理した芽生えのタンパク質プロフィール

1~4, 耐熱性タンパク質

1, NaCl無添加 芽生え; 2, NaCl無添加 根;

3, 0.5%NaCl 芽生え; 4, 0.5%NaCl 根

5, 6, 水溶性タンパク質

5, NaCl無添加 芽生え; 6, 0.5%NaCl 芽生え

*, 30.5kDaタンパク質; **, 23kDaタンパク質

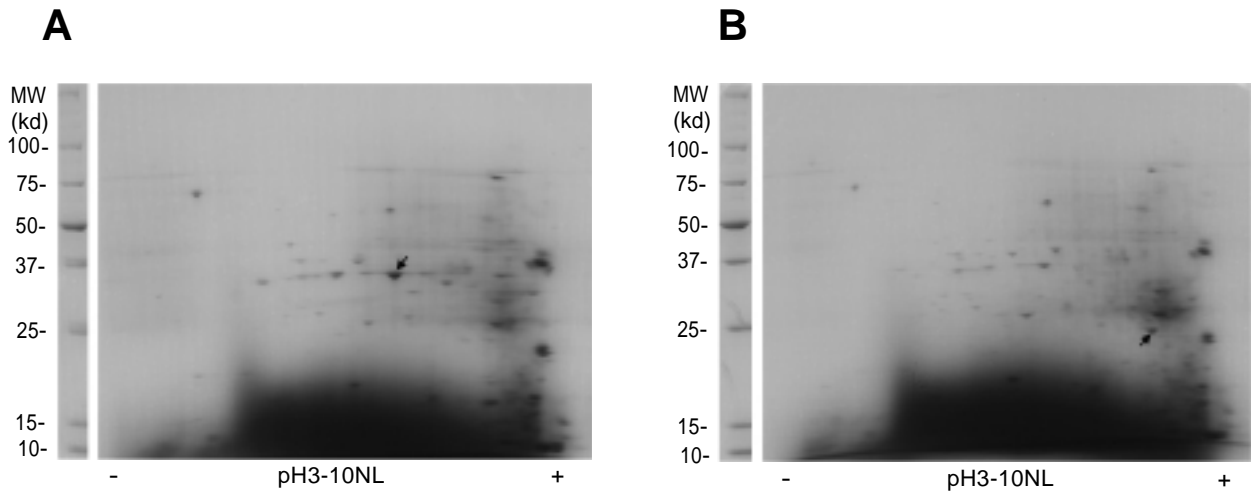


図3 . 0.5%NaCl培地で生育後に低温処理した芽生えタンパク質の二次元電気泳動図

A, NaCl無添加 水溶性タンパク質 ; B, 0.5%NaCl 水溶性タンパク質
(いずれもCBB染色)

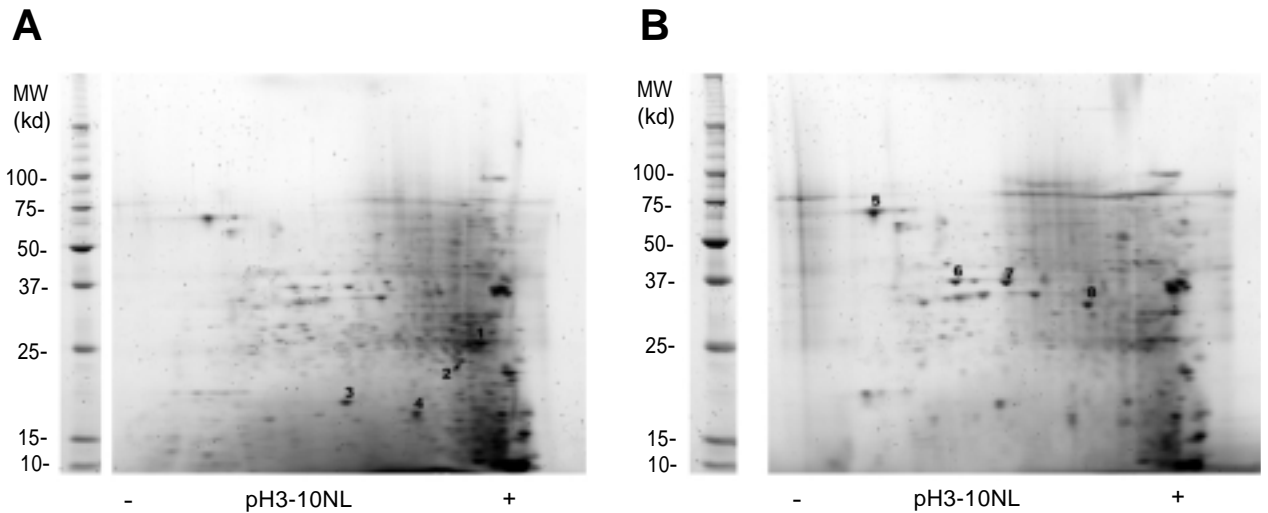


図4 . 0.8%NaCl培地での芽生えタンパク質の二次元電気泳動図

A, NaCl無添加 水溶性タンパク質 ; B, 0.8%NaCl 水溶性タンパク質
(いずれもSYPRO Ruby染色)

するものと推測された。

以上の結果から、低塩濃度培地ではタンパク質の変動は少ないが、芽生えを低温に移すことにより、デハイドリンを含む耐熱性タンパク質が増加することが示唆された。コムギ等で、低温馴化により酸性デハイドリンが誘導されることが知られている⁵⁾。イネデハイドリンについては、乾燥ストレス誘導に関する知見が多いが⁶⁾、前もって塩ストレス環境下におくことによって、低温でのデハイドリンの誘導が促進される可能性が考えられる。

2 . 高塩濃度 (0.8%NaCl) でのタンパク質の変動

高塩濃度培地では、図1に示したように、著しい生育阻害が見られ、発芽率も低下した。図4に、芽生え水溶性タンパク質を二次元電気泳動した結果を示した。高塩濃度による芽生えタンパク質組成の変化は、上に述べた低温による変動とはかなり異なっていた。すなわち、0.8%NaClを添加した培地の芽生えでは、コントロールの芽生えに比べると、酸性側の26kDaおよび23kDaのタンパク質(1,2)が少なくなっており、低分子

領域の18~20kDaスポット(3,4)も薄かった。一方、分子量61kDa(5)および33~37kDa付近のタンパク質(6,7,8)はコントロールに比べて増加していた。このように、高塩濃度の培地で生育した芽生えのタンパク質組成は、明らかに通常の芽生えと異なることが示された。今後これらの塩濃度により変動するタンパク質の同定を進めることにより、水分ストレスによる芽生えの生理的变化が明らかになっていくものと期待される。

要約

塩(0.5%および0.8%NaCl)を含む培地で生育した芽生えのタンパク質を二次元電気泳動で解析した。0.5%NaClで生育した芽生えを低温(10℃)に移すことにより、デハイドリンを含む耐熱性タンパク質の増加が見られた。0.8%NaClでは、芽生えの生育は著しく阻害された。二次元電気泳動パターンをコントロール(NaCl無添加)の芽生えと比較すると、16, 18, 27kDaタンパク質が少なく、61kDaおよび36~37kDaタンパク質が多かった。

謝辞

イネ種子の発芽について御指導いただいた食品素材部穀類特性研究室大坪研一室長ならびに中村澄子氏に深謝する。実験を御支援いただいた関友子氏に感謝する。

文献

- 1) Close, T. J., Dehydrins: A commonality in the response of plants to dehydration and low temperature, *Physiologia Plantarum*, **100**, 291-296 (1997).
- 2) 門間美千子, 米糠に含まれるグループ2LEAタンパク質(デハイドリン)の二次元電気泳動解析と乳酸脱水素酵素に対する凍結変性保護活性, 食品総合研究所研究報告, **67**, 15-20 (2003).
- 3) Leammli, U.K., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, **227**, 680-685 (1970).
- 4) Muthalif, M. M., Rowland, L. J., Identification of dehydrin-like proteins responsive to chilling in floral bud of blueberry (*Vaccinium*, section *Cyanococcus*), *Plant Physiol.*, **104**, 1439-1447 (1994).
- 5) Danyluk, J., Perron, A., Houde, M., Limin, A., Fowler, B., Benhaumou, N., Sarhan, F., Accumulation of an acidic dehydrin in the vicinity of the plasma membrane during cold acclimation of wheat, *The Plant Cell*, **10**, 623-638 (1998).
- 6) Reddy, A.R., Ramakrishna, W., Sekhar A.C., Ithal, N., Babu, P.R., Bonaldo, M.F., Soares, M.B., Bennetzen, J.L., Novel genes are enriched in normalized cDNA libraries from drought-stressed seedlings of rice (*Oryza sativa* L. subsp. *indica* cv. Nagina 22), *Genome.*, **45**, 204-211 (2002).