

<p>作成者</p>	<p>所属（専攻）・氏名 連合農学研究科生物資源科学専攻 上村 松生 （農学部附属寒冷バイオシステム研究センター） 連絡先（内線・メール） 6253 uemura@iwate-u.ac.jp</p>
<p>研究課題名 （英語名）</p>	<p>植物生存戦略（傷害回避）の分子機構 Molecular mechanism of plant survival under cold environment</p>
<p>研究分野及び キーワード</p>	<p>研究サブグループ：熱に対する生物の生存戦略メカニズム 研究キーワード：（植物の寒冷応答）（細胞膜）（シグナル応答分子機構）</p>
<p>研究協力者 （氏名・所属等）</p>	<p>原 道広（連合農学研究科生物環境科学専攻・教授） 河村 幸男（日本学術振興会特別研究員、平成16年12月まで） 鎌田 崇（COE 研究員） Moustafa M.M. Yasser（連合農学研究科生物資源科学専攻博士3年） Bikash C. Sarker（連合農学研究科生物環境科学専攻博士3年） 佐々木 裕（農学研究科農業生命科学専攻修士2年） 重松 智美（農学部農業生命科学科4年）</p>
<p><b>研究成果報告</b></p> <p><b>目的</b></p> <p>植物細胞における凍結・冷温傷害の初発部位は細胞膜である。従って、植物の寒冷適応機構や寒冷耐性獲得機構を理解するためには、低温下における細胞膜の安定性獲得機構を調べる必要がある。本研究では、低温下における細胞膜安定性に影響を与える要因（細胞膜構成物質や細胞内物質の変動や機能、それを司る遺伝子発現変動）を調べ、細胞膜の低温下における挙動への影響を解析することにより、植物細胞の寒冷条件における適応分子機構を明らかにする。また、凍結下で細胞にかかる主要なストレスが脱水ストレスであることを鑑み、脱水ストレス下における植物の挙動を調べ、凍結ストレスとの比較考察を試みる。</p> <p><b>研究結果</b></p> <p>(1) 低温応答性細胞膜タンパク質の凍結耐性増大に関わる役割（図1、2）</p> <p>シロイヌナズナは、短時間（&lt;6時間）で低温馴化が可能な植物で、低温馴化や凍結傷害機構と分子生物学知見を結びつける最適材料の一つである。本年度は、低温馴化初期過程で特異的に出現するシロイヌナズナ細胞膜タンパク質の中から lipocalin-like タンパク質（AtLCN）をコードする遺伝子を恒常的に発現したシロイヌナズナ形質転換体を作成し、このタンパク質の凍結耐性に対する機能評価を行った。その結果、AtLCN 形質転換体では低温馴化なしでも葉の耐凍性が増加していた。しかし、個体レベルの凍結耐性には大きな違いが見られなかった。さらに、葉から単離されたプロトプラストを用いて各凍結温度で発生する凍結傷害機構を検討したところ、AtLCN は比較的高い凍結温度で出現する凍結傷害発生機構を抑える効果があることが明らかになった。さらに、低温馴化後の植物体を凍結したところ、AtLCN 形質転換体は野生型と比較して高い凍結耐性を示した。これらの結果に対する分子的説明はまだ確定していないが、AtLCN と他の要因の相互作用によって効果を示している可能性も存在する。そこで、現在、細胞レベルでの解析を進めるとともに、組み換えタンパク質を用いた試験管内での脂質-タンパク質の相互作用を解析する実験を進めている。本研究結果は、7th International Plant Cold Hardiness（口頭発表採択）および Gordon Research Conference on Temperature Stresses in Plants（招待講演）として発表した。</p>	

#### (2) 細胞レベルにおける低温応答分子機構 (図3、4)

シロイヌナズナ植物体の低温応答分子機構に関しては多くの研究結果が蓄積されているが、細胞レベルでどのような応答が起こり、それが集積されて凍結耐性として表現される機構に関してはほとんど研究が行われていない。本研究室では、シロイヌナズナ培養細胞を用いて細胞レベルでの低温応答分子機構の解析を行っている。本年度は、培養細胞を低温馴化したところ、誘導期終期の細胞を2日間低温馴化した場合に限って、一過的に凍結耐性が增大すること、植物体の低温馴化過程で見られる細胞内変動(浸透濃度や糖含量の増加)が培養細胞では起こらないことを明らかにし、他に凍結耐性に関連した要因が存在していることを示した。さらに、マイクロアレイ実験を行い、培養細胞と植物体の低温馴化過程における遺伝子発現プロファイルの比較を行ったところ、植物体では低温馴化期間中継続的に発現が誘導されるが、培養細胞では一過的に発現が誘導された後、急激に発現低下が起こる遺伝子を多数見つけた。これらの遺伝子が、培養細胞における低温誘導性凍結耐性増大を一過的にしている可能性がある。現在、プロテオーム的手法を用いたタンパク質解析と発現変動する遺伝子を培養細胞に形質転換し、機能解析を進めている。

#### (3) 低温に应答して蓄積する適合溶質の細胞内局在性の解析 (図5)

凍結傷害の初発部位である細胞膜の構造・機能を凍結過程で維持するには、細胞内に適合溶質を蓄積することが大きな役割を果たしている。そのためには、適合溶質は細胞質に蓄積することが望ましいが、未だ、低温馴化過程で蓄積する適合溶質の細胞膜局在性に関する報告はほとんど存在しない。本研究室では、凍結耐性の異なるコムギ品種を用いた低温馴化過程で細胞内に蓄積される適合溶質の細胞内局在性を決定したが、本年度は、その方法をシロイヌナズナに応用した。改良疎水性溶媒密度勾配分画法により、細胞内各画分に存在する適合溶質を分画した後に適合溶質を定量した。その結果、従来推定されていたような適合溶質の特異的な細胞内局在性は余り認められないことが判明した。しかし、細胞質に多量の糖が蓄積していることから、凍結脱水ストレスの緩和に大きな効果を持っていることが示唆された。この結果は、まだ予備的であるが、単子葉類であるコムギとほぼ同様の傾向を示しており、低温馴化に対する植物の応答が広い範囲で保存されていることを示唆している。

#### (4) 水分不足状態におかれた植物の生理的応答

水分ストレス耐性が異なる2種の植物(ナスとトマト)を用いて、異なる水分ストレスをかけた場合の植物体内における水分分布、気孔抵抗などを測定し、さらに乾燥状態における保護物質として知られているプロリン含量を調べた。水分ストレスの程度と植物体内での水分状態およびプロリン含量は強い相関が見られることが判明した。これらの結果は、低温馴化過程で起こる乾燥状態に誘導されるプロリンなどの適合溶質含量増大による凍結脱水に対する細胞膜保護機構に通じるものがある。

### **来年度以降に向けての反省点、改善すべき点、そして、対策方法**

今年度は、年度途中からの研究開始であったために、研究環境の整備(低温顕微鏡の設置、研究スタッフの充実など)に労力を割かれてしまい、研究室外の協力者との研究成果の論文発表が種になってしまった。来年度は、揃ったスタッフの成果を積極的に公開していくことに努力したい。また、研究項目を絞り込む(細胞膜タンパク質の機能解析、および、低温誘導性遺伝子発現の違いから見た細胞レベルでの凍結耐性獲得機構解析)のと同時に、新規で独自性の高い研究項目(細胞膜ラフトの低温応答への関わり、凍結感受性の異なる植物の耐性分子機構解析)を考えてみたい。卒業研究生や大学院生が増える予定なので、さらに活発な研究活動が進められると考えている。

### **来年度研究計画の概略**

昨年度から継続する項目と新たな研究分野を開拓する研究項目を以下のように立て、研究を進める。

(1) 低温応答性細胞膜タンパク質の凍結耐性増大に関わる役割

AtLCNと細胞膜の相互作用の実態を明らかにし、細胞膜の凍結脱水下における安定性増大機構について研究を進める。具体的には、AtLCN分子自身の構造（GPIアンカーの有無）、AtLCNのタンパク質相互作用因子の探索（Two-hybrid系、in vivo架橋法など）、AtLCNと細胞膜に存在する脂質成分との相互作用（Liposomeの融合や崩壊など）を調べていく。

(2) 低温誘導性遺伝子発現パターンから見た細胞レベルにおける低温応答分子機構

シロイヌナズナ懸濁培養細胞（T87）の低温とアブシジン酸（ABA、低温処理によって一過的に増加し、凍結などの環境ストレス耐性に関連していることが植物体で知られている）に対する応答機構（遺伝子発現、凍結耐性、生理学的特性など）を解析し、細胞レベルでの低温やABA受容機構及びそれによって引き起こされる凍結耐性獲得機構を考察する。同時に、既に文献に発表されている個体レベルでの低温およびABAによる凍結耐性分子機構との比較により、細胞レベルと個体レベルでの凍結耐性獲得機構を分離して考察できるものと考えられる。

(3) 細胞膜ラフトと低温馴化分子機構

動物細胞で広く知られるようになった細胞膜上に存在する特定の脂質・タンパク質成分から構成される微小領域（ラフト）は、信号伝達や膜合成・修飾に重要な役割を果たしていることが明らかになってきた。植物細胞では、シロイヌナズナなどの細胞膜に存在するらしいことは報告されているが、詳細な知見は乏しく、ましてや、環境シグナル受容についての報告は全く存在しない。そこで、シロイヌナズナを材料に、i) 細胞膜におけるラフトの存在確認、ii) ラフトに存在するタンパク質成分の同定、iii) 低温馴化過程におけるラフトタンパク質組成の変化、などを調べる。将来的には、ラフト脂質成分の解析（動物細胞膜ラフトには、植物の低温馴化過程で減少することが知られているスフィンゴ脂質と類似した脂質が存在することが報告されている）、ラフトタンパク質の低温馴化への関与分子機構（形質転換体やミュータントを利用）の解析を目指す。

(4) 低温感受性の異なる植物における耐性機構の差異

植物界には、広い範囲で低温耐性が異なる種が存在する。さらに、同種の中にも、異なった耐性を持つ品種や系統が存在する。これらの差異に関する分子機構、さらには、植物進化を考慮して、低温耐性後外を解析することは興味深い。そこで、本研究室で行われてきた知見を利用し発展させ、トマト、イネ、ジャガイモなどを用いて冷温から凍結温度にかけての耐性機構を幅広く解析する。その際には、低温誘導性転写因子の関与、低温下で発生する活性酸素の関与、低温耐性と凍結耐性を結びつける因子の探索、などに注目して研究を進める。本研究項目は、survey的な様相を含むが、本プロジェクトが目指す植物進化を考慮した環境適応（特に、寒冷適応）機構の解析に貢献できるものと考えられる。

**本研究拠点形成に関連して受けた研究助成**

農林水産省：

形態・生理機能の改変による新農林水産生物の創出に関する総合研究「バイオデザイン計画」

“低温応答性細胞膜タンパク質の凍結耐性増大過程における機能の解析”（2,000千円）

**その他特記すべき事項**

3年に一度開催される **International Plant Cold Hardiness Seminar（第7回、札幌）の組織実行委員会委員長**を務めるとともに、低温応答性細胞膜タンパク質の凍結耐性増大に関わる役割について口頭発表（採択）を行った。さらに、2年に一度開催され最先端の研究成果が発表される **Gordon Research Conference on Temperature Stresses in Plants（Ventura, USA）に招待**され、低温応答性細胞膜タンパク質の凍結耐性増大に関わる役割について講演を行った。

## 研究成果

### 原著論文

- Tanaka, D., Niino, T., Isuzugawa, K., Hikage, T. and Uemura, M. 2004. Cryopreservation of shoot apices of in-vitro grown Gentian plants: comparison of vitrification and encapsulation-vitrification protocols. *CryoLetters* **25**:167-176.
- Kamata, T. and Uemura, M. 2004. Solute accumulation in wheat seedlings during cold acclimation: contribution to increased freezing tolerance. *CryoLetters* **25**:311-322.
- Tanaka, N., Fujita, M., Handa, H., Murayama, S., Uemura, M., Kawamura, Y., Mitsui, T., Mikami, S., Tozawa, Y., Yoshinaga, T. and Komatsu, S. 2004. Proteomics of the rice cell: systematic identification of the protein populations in subcellular compartments. *Mol. Genet. Genomics* **271**:566-576.
- Sarker, B.C., Hara, M. and Uemura, M. 2004. Comparison of response of two C3 species to leaf water relation, proline synthesis, gas exchange and water use under periodic water stress. *J. Plant Biol.* **47**: 3-41.
- Sarker, B.C., Hara, M. and Uemura, M. 2005. Proline synthesis, physiological responses and biomass yield of eggplants during and after repetitive soil moisture stress. *Sci. Hort.* **103**:387-402.
- Wagatsuma, T., Uemura, M., Mitsuhashi, W., Maeshima, M., Ishikawa, S., Kawamura, T., Maruyama, T., Shiono, Y., Khan, Md.S.H. and Tawaraya, K. 2005. A new and simple technique for the isolation of plasma membrane lipids from root-tips. *Soil Sci. Plant Nutr.* **51**:135-139.

### 解説

- 上村松生. 2004. 植物細胞の凍結過程の解析. 冷凍 **79**:18-23.
- 上村松生, 富永陽子, 鎌田崇, 中河原千早, 河村幸男, 小島研一. 2004. 細胞の凍結適応. 低温生物工学会誌 **50**:15-20.

### 国際学会発表

- Sasaki Y., R. Yoshida, K. Shinozaki and M. Uemura. 2004. Temporary increase in freezing tolerance of Arabidopsis T87 suspension cultured cells during cold acclimation. *7th International Plant Cold Hardiness Seminar.*
- Kamata, T. and M. Uemura. 2004. Subcellular localization of the compatible solutes in wheat seedlings during the first- and second-phase of cold hardening: comparisons among cultivars with different freezing tolerance. *7th International Plant Cold Hardiness Seminar.*
- Tanaka, D., S. Fujikawa, T. Niino and M. Uemura. 2004. Ultrastructural observation of plant shoot apices under liquid nitrogen in the vitrification protocol using Cryo-SEM and TEM combined with non-aqueous freeze-substitution method. *7th International Plant Cold Hardiness Seminar.*
- Tominaga, Y., C. Nakagawara and M. Uemura. 2004. Effect of plasma membrane-associated proteins on acquisition of freezing tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *7th International Plant Cold Hardiness Seminar (Selected as an oral presentation).*
- Saruyama, H., H. Onodera and M. Uemura. 2004. Expression of wheat catalase in the transgenic rice plants reduces chilling-induced damage to membranes. *7th International Plant Cold Hardiness Seminar.*
- Saruyama, H. Onodera and M. Uemura. 2004. The transgenic rice plants expressing wheat catalase shows improved tolerance against chilling-induced damage in membranes. *The World Rice Research Conference.*

### 国内学会発表

- 上村松生, 富永陽子, 中川原千早. 2004. 低温誘導性細胞膜タンパク質の凍結耐性増大に関する作用機構. 第50回低温生物工学会年会・セミナー.
- 佐々木裕, 吉田理一郎, 関原明, 篠崎一雄, 上村松生. 2005. 培養細胞と植物体が示す低温応答の比較による低温馴化機構の解析. 日本植物生理学会 2005 年度年会.
- 河村幸男, 上村松生. 2005. 細胞膜修復機構から凍結耐性の仕組みを考える. 日本植物生理学会 2005 年度年会.

50%電解質漏出温度 (°C)	
<i>AtLCN</i> (At5g58070)	-6.9 ± 0.3
Wild type	-6.0 ± 0.3

The gene was introduced into ecotype Columbia with CaMV35S promoter.  
 $T_{EL50}$  values were determined by electrolyte leakage assays (5+ independent freezing tests) with detached leaves of 8+ independent lines.

図1 シロイヌナズナ低温応答性細胞膜タンパク質AtLCN過剰発現形質転換体の凍結耐性

低温馴化過程で急速に増加する細胞膜タンパク質AtLCNをコードする遺伝子を過剰発現させた形質転換体と野生型の葉の凍結耐性を凍結融解後の電解質の漏出から判定した。50%電解質が漏出する温度は形質転換体で約1°C低く、統計的にも有意であった。

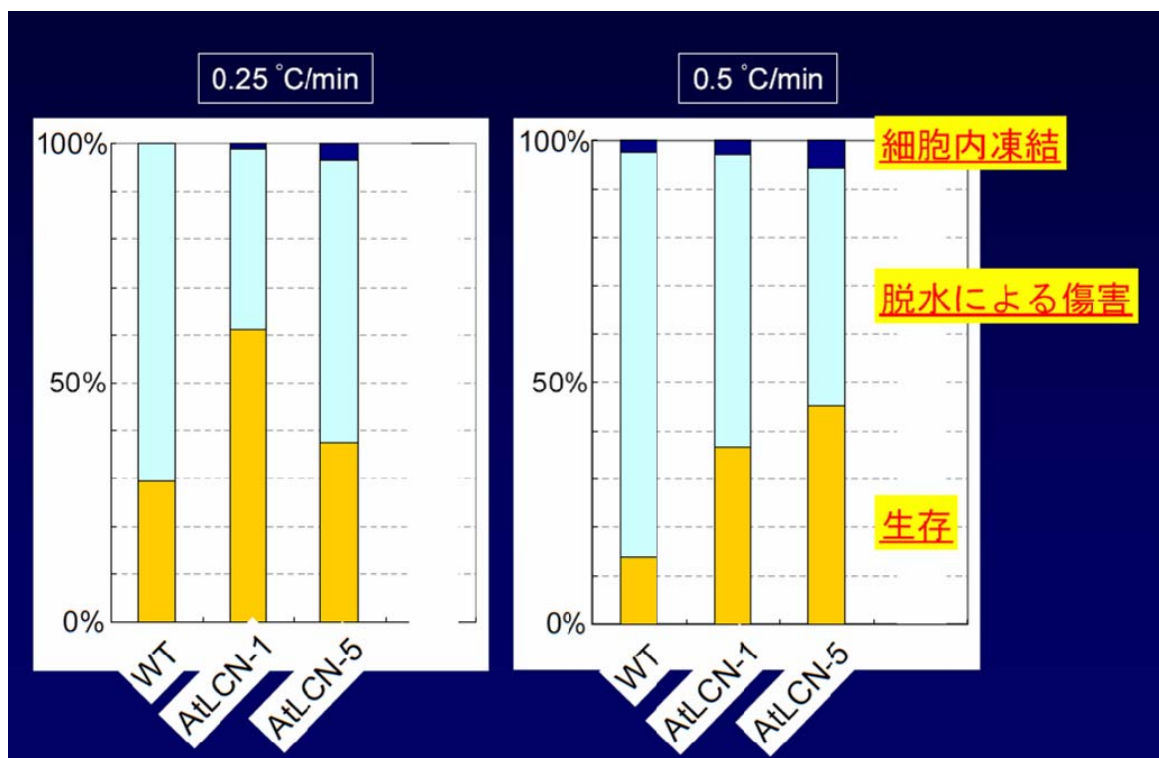


図2 シロイヌナズナ低温応答性細胞膜タンパク質AtLCN過剰発現形質転換体の凍結耐性

細胞膜タンパク質AtLCNをコードする遺伝子を過剰発現させた形質転換体と野生型の葉からプロトプラストを単離し、細胞レベルでの凍結耐性を-10°Cまで凍結後の生存率により測定した。2つの冷却速度(0.25°C/min、0.5°C/min)でAtLCN形質転換体2系統ともに有意に生存率が高かった。

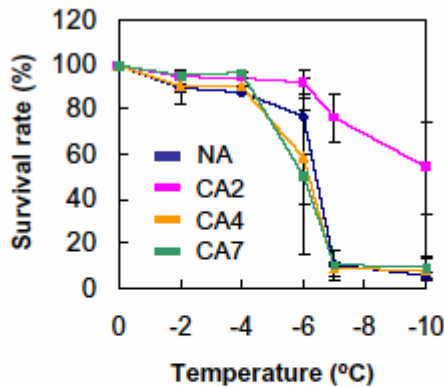


図3. 誘導期の培養細胞の低温馴化処理における凍結耐性の変動

誘導期培養細胞の凍結耐性を凍結融解後に再成長させた場合の生重量の増加に基づいて解析した。生存率は、再成長開始後15日目の未馴化培養細胞の生重量を100%として計算した。凡例は、◆:低温未馴化(NA)、■:低温馴化2日(CA2)、▲:低温馴化4日(CA4)、●:低温馴化7日(CA7)、である。データは、3回の独立した測定の前平均±SDである。

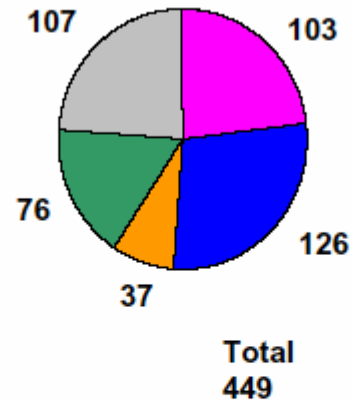


図4. 低温馴化過程で発現誘導された遺伝子の変動パターン

マイクロアレイ解析 (total 21,500 遺伝子) により得られた低温誘導性遺伝子 (449 遺伝子) の発現変動パターンについて解析した。凡例は、■:低温馴化1日で発現ピークを示し、その後衰退する変動パターンを示す遺伝子、■:低温馴化1日のみ3倍以上誘導される遺伝子、■:低温馴化2日のみ3倍以上に誘導される遺伝子、■:低温馴化4日のみ3倍以上に誘導される遺伝子、■:その他の変動パターンを示す遺伝子を示した。周りの数字は確認された遺伝子の数(個)を示す。

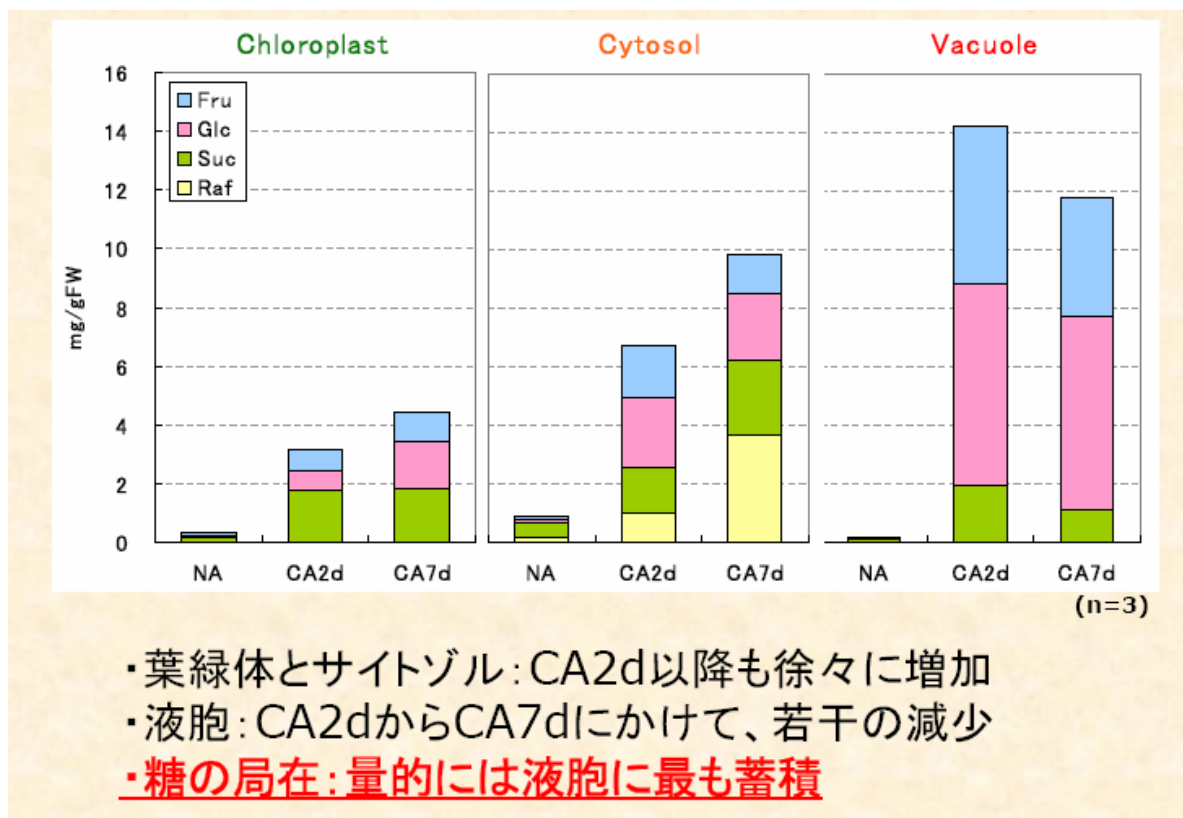


図5 シロイヌナズナの低温馴化過程における糖の細胞内局在性変動