

作成者	所属（専攻）・氏名 21世紀COEプログラム 河村 幸男 連絡先（内線・メール）6200 ykawa@iwate-u.ac.jp
研究課題名 （英語名）	細胞膜修復機構に注目した植物耐凍性機構の解明とその応用 Understanding of freezing tolerance from the viewpoint of the plasma membrane repair and its application
研究分野及びキーワード	研究サブグループ：21世紀COE「熱—生命システム相関学」特別研究分野 研究キーワード：（耐凍性）（細胞膜）（膜修復）
研究協力者 （氏名・所属等）	

研究成果報告

目的

耐凍性機構の解明は寒冷地における農業生産にきわめて重要である。細胞外が凍結すると、植物細胞は凍結脱水ストレスと氷晶成長による極度の機械ストレスに曝される。しかし、耐凍性を身につけた細胞は、これらのストレスに耐えながら細胞内を過冷却状態に保つ。凍結傷害は細胞膜がある凍結温度以下では不安定になることで生じることが、これまで多くの研究から支持されてきた。低温馴化中に著しく増加する膜タンパク質の一つ、synaptotagmin-like タンパク質は、膜融合による細胞膜修復機構に深く関与する細胞膜タンパク質である。これまでの植物凍結傷害の研究では、細胞膜の傷害回避機構の観点からは研究されてきたが、細胞膜修復という観点は全くなかった。しかし動物分野での研究を考慮すると細胞膜が破壊された瞬間に細胞は死ぬのではなく、迅速に修復されれば生存可能であり、凍結傷害による細胞膜損傷も迅速に修復されれば、生存可能であることは十分に予想される。本研究では凍結傷害回避メカニズムを細胞膜修復機構の観点から解析することを目的とする。

研究結果

申請者は平成17年1月15日より岩手大学農学部COE助教授として赴任することになったが、それ以前は、日本学術振興会特別研究員として岩手大学農学部附属寒冷バイオシステム研究センターにて、本研究課題と同じ研究テーマ、すなわち低温馴化後の細胞の凍結に対する安定性上昇のメカニズムを細胞膜修復機構の観点から研究を行っていた。本報告書ではその時の成果とまとめて報告する。

これまでの研究では細胞修復には必ず Ca^{2+} が必要とされることが報告されてきた（Steinhardt et al. 1994）。そこでまず Ca^{2+} の効果を検討するために、低温未馴化、低温馴化1日目、7日目のシロイヌナズナ葉から単離されたプロトプラストを用いて、1 mM Ca^{2+} もしくは1 mM EGTAの存在下において蛍光試薬による生存率の測定を試みた（図1）。その結果、低温馴化前後に関係なく、 Ca^{2+} が存在しなければ、著しく耐凍性が低下することが明らかとなった。例えば、50%生存率温度（LT50）は、 Ca^{2+} 存在下であれば、低温未馴化で-4.5℃、低温馴化1日目で-9.2℃、低温馴化7日目で-14.3℃であるのに対し、EGTA存在下においては、低温未馴化で-2.4℃、低温馴化1日目で-3.7℃、低温馴化7日目で-5.8℃であった。 Ca^{2+} 存在下とEGTA存在下での生存率の差は Ca^{2+} 依存性の耐凍性である。この Ca^{2+} 依存性の耐凍性を図1のデータをもとに計算した。低温未馴化では、-2℃から-4℃にかけて Ca^{2+} 依存性の耐凍性のピークが見られた。次に、このピークの温度領域は低温馴化と共に低温側に大きく広がっていくことが示された。この事は低温馴化により Ca^{2+} 依存性の耐凍性が増加することを意味する。次に、低温馴化7日目のサンプルを用いて-8℃における耐凍性の Ca^{2+} 濃度依存性について検討した。プロトプラスト調製液中の Ca^{2+} 濃度を0 mM、0.1 mM、0.5 mM、1 mMと変えて検討したところ、0.5 mMと1 mMでは差が見られなかったが、0.1 mM以下ではEGTA処理と同程度の大きな生存率の低下が観察された（図2）。この事は、 Ca^{2+} 依存性の耐凍性機構が働くには最低でも0.5 mM以上の Ca^{2+} が必要であることを示す。

またさらに、EGTAによる著しい耐凍性の低下はEGTAによる直接的な阻害作用ではなく、EGTAが Ca^{2+} をキレートした結果であることも示す。以上の結果まとめると、1) 耐凍性の半分以上は Ca^{2+} 依存性であり、2) 少なくとも Ca^{2+} は0.5 mM以上必要であることが明らかとなった。

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

本年度は、耐凍性の半分が Ca^{2+} 依存性であるという今までにない新しい知見が発見され、研究も前進した。しかし、実験室の移動セッティングに伴う環境変化により効率よく研究が進んだとは言い難い状況でもあった。来年度は実験環境もおおた整い、また新たに研究員を一名雇うことになるので、効率よく研究が進むものと期待できる。

来年度研究計画の概略

来年度計画は、大きく3つのテーマ、すなわち、1) Ca^{2+} 依存性耐凍性についての生理・生化学的解析、2) 凍結下での細胞生理学的観察、3) 細胞膜修復因子に対するRNAi変異体の作製、で研究を行っていく。具体的には下記のとおりである。

1) Ca^{2+} 依存性耐凍性についての生理・生化学的解析

1-1) プロトプラストを用いた更なる Ca^{2+} 依存性耐凍性の解析

これまで、 Ca^{2+} とEGTAのみで解析を行って来たが、これらに加え、 Mg^{2+} (Ca^{2+} 依存性膜修復の拮抗阻害)、ボツリヌス毒素 (細胞膜修復に関与するSNAREsタンパク質の特異的分解)、C2 ドメインペプチド (細胞膜修復に関与するのsynaptotagminタンパク質の機能ドメインの拮抗阻害)の有無で検討し、生理学的な方向から細胞膜修復因子を推定する。

1-2) 組織切片を用いた Ca^{2+} 依存性耐凍性の解析

プロトプラストの実験では、細胞壁を取り除いた状態なので通常の細胞とは異なる挙動を示す可能性がある。しかし、これまで組織の耐凍性は電解質漏出法などによる間接的な方法でしか測定できなかった。そこで、組織切片を用いて直接蛍光色素により生存率を測定する系を開発する。

1-3) Ca^{2+} 依存性耐凍性に関わる膜タンパク質の同定

細胞膜修復に関わる因子として、これまで SNAREs と synaptotagmin が候補として挙げられてきたが、シロイヌナズナにはこれらのタンパク質のアイソフォームが多数存在する。この中から細胞膜修復に関わる因子を絞り込む。具体的にはこれらのタンパク質にはいくつか共通配列が見られるのでそれに対するペプチド抗体を作製しウェスタンブロットにより、低温馴化前後増加するもの、凍結前後で小胞画分から細胞膜画分に移行するものを検索し、最終的には TOF-MS によりこれらのタンパク質を同定する。

2) 凍結下での細胞生理学的観察

2-1) 蛍光試薬による膜融合の観察

いくつかの内膜系を染める蛍光試薬 (例えば、FM1-43 や ER-Tracker など) を検討し、直接凍結下での細胞膜修復を観察できるか否かを検討する。

2-2) GFP による膜融合の観察

生化学的な実験から凍結耐性に関わる膜タンパク質が特定できれば、GFP により特に内膜系の膜タンパク質の観察を行う。

2-3) 凍結下での Ca^{2+} 流入の観察

もし凍結下に於いて細胞膜修復が生じているなら、凍結中の細胞で一時的な Ca^{2+} の増加が観察できるはずである。そこで、蛍光試薬 (Fluo-3/AMなど) を用いて凍結下での Ca^{2+} 流入の観察を試みる。

3) RNAi (Synaptotagmin-like のみ) の作製

現在、低温馴化で細胞膜画分に増加する synaptotagmin-like タンパク質が分かっているので、この RNAi 変異体を作製し、凍結耐性を解析する予定である。

本研究拠点形成に関連して受けた研究助成

なし

その他特記すべき事項

なし

研究成果

原著論文

Padmanaban, S., Lin, X., Perera, I., Kawamura, Y. and Sze, H. 2004. Differential expression of vacuolar H⁺-ATPase subunit c genes in tissues active in membrane trafficking and their roles in plant growth as revealed by RNAi. *Plant Physiol.* **134**:1514-1526.

著書

Tominaga, Y., Nakagawara, C., Kawamura, Y. and Uemura, M. 2005. Effect of plasma membrane-associated proteins on acquisition of freezing tolerance in *Arabidopsis thaliana*. In: *Plant Cold Hardiness*, edited by T.H.H. Chen, M. Uemura and S. Fujikawa, CABI, Oxon (UK) (in press).

国際学会発表

Kawamura, Y. and Sze, H. 2004. Understanding the mechanism of chilling-induced cytoplasmic acidification in a chilling-sensitive plant: 1. Introduction of mathematical model to the H⁺-accumulation into vacuole. *7th International Plant Cold Hardiness Seminar*.

Kawamura, Y. and Sze, H. 2004. Understanding the mechanism of chilling-induced cytoplasmic acidification in a chilling-sensitive plant: 2. Chilling-induced breakdown of PPI-dependent DpH_{vac}-stat system directly results in the cytoplasmic acidification. *7th International Plant Cold Hardiness Seminar*.

国内学会発表

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. 第46回日本植物生理学会年会.

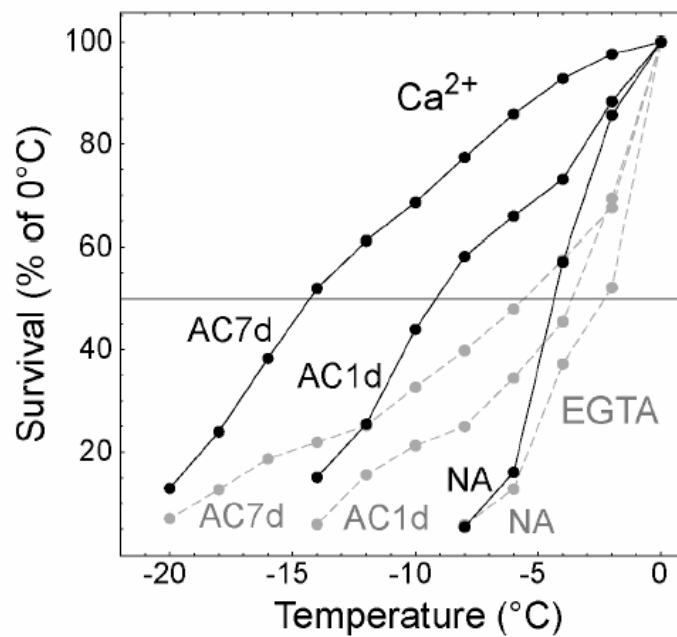


図1 シロイヌナズナ葉から単離されたプロトプラストの耐凍性とそのCa²⁺依存性

Ca²⁺の効果を検討するために、低温未馴化(NA)、低温馴化1日目(AC1d)、7日目(AC7d)のシロイヌナズナ葉から単離されたプロトプラストを用いて、1 mM Ca²⁺もしくは1 mM EGTAの存在下において蛍光試薬による生存率の測定が行われた。50%生存率温度(LT₅₀)は、Ca²⁺存在下の場合、低温未馴化で-4.5°C、低温馴化1日目で-9.2°C、低温馴化7日目で-14.3°C、EGTA存在下の場合、低温未馴化で-2.4°C、低温馴化1日目で-3.7°C、低温馴化7日目で-5.8°Cであった。

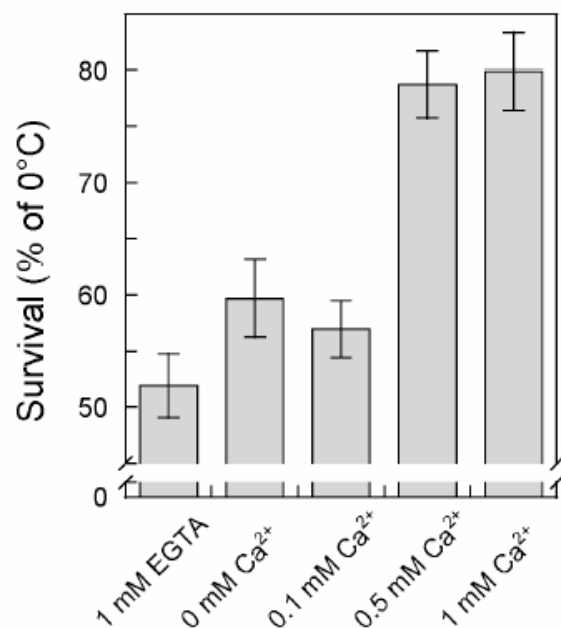


図2 耐凍性のCa²⁺濃度依存性

耐凍性のCa²⁺濃度依存性について調べるために、低温馴化7日目のサンプルを用いて-8°Cにおいて、プロトプラスト調製液中のCa²⁺濃度を0 mM、0.1 mM、0.5 mM、1 mMと変えて生存率を測定した。