

| | |
|---------|---|
| 氏名 | ヒサキ ハヤト 開 勇人 |
| 本籍（国籍） | 岩手県 |
| 学位の種類 | 博士（農学） |
| 学位記番号 | 連研第 739 号 |
| 学位授与年月日 | 平成 31 年 3 月 22 日 |
| 学位授与の要件 | 学位規則第 5 条第 1 項該当課程博士 |
| 研究科及び専攻 | 連合農学研究科 寒冷圏生命システム学 |
| 学位論文題目 | Mechanism of how plants sense cold in natural environments（植物の自然環境における低温感知メカニズム） |
| 学位審査委員 | 主査 岩手大学准教授 河村 幸男 副査 上村 松生(岩手 教授), 笹部 美知子(弘前 准教授), 春日 純 (帯広 助教), 三橋 渉(山形 教授) |

論文の内容の要旨

Plants enhance their freezing tolerance by exposure to low-temperature. This phenomenon is known as cold acclimation (CA). Transient concentration change in cytosolic Ca^{2+} (i.e., Ca^{2+} signal) is widely accepted as a second messenger in CA process, especially in the response to the cooling. Several reports have been shown the characteristics of the Ca^{2+} signal, and signal transduction. On the other hand, these studies based on the artificial cooling and CA treatment, which hardly happens in the field. Therefore, it was difficult to conclude that Ca^{2+} signals could be used in response to small and slow temperature changes in the field. To observe the Ca^{2+} signal which may be induced in the field condition, I developed the experimental system of cryomicroscope with Yellow Cameleon 3.60 expressing Arabidopsis. The cryomicroscope consists of laser scanning confocal microscope and cryostage / cryochamber. Since the fluoresce proteins are affected by the low-temperature, the correction formula was also established to compare the peak value of Ca^{2+} signal in different temperature. Using this system, I investigated the Ca^{2+} signal under several temperature conditions by combining the cooling rate, the start temperature and the cooling time duration. Although the clear Ca^{2+} signal has not been observed by the cooling with $3^{\circ}\text{C min}^{-1}$ of cooling rate in root in the previous study, I succeeded to observe the Ca^{2+} signal with about $0.5^{\circ}\text{C min}^{-1}$ of cooling rate in leaf. Since a leaf is less responsiveness to cooling than that of root, the result updated our knowledge, and strongly supports the hypothesis that the Ca^{2+} signal is used as a messenger to relay the information of cooling. Subsequently, in both root and leaf cells, Ca^{2+} signal rapidly disappear after stopping of the cooling and thereafter under a constant low-temperature; and no Ca^{2+} signal was observed after that. This result suggests that if the temperature is stable and constant, no Ca^{2+} signal is induced even during 2°C constant CA treatment except the initial temperature change from room temperature to the acclimation temperature. Thus, CA in the field, rich in temperature fluctuation, was performed in Morioka during the winter season to investigate the effect of the temperature changes during the CA process. In CA under field conditions, the expression patterns of *CBF/DREB1s* was distinctly different from

in artificial CA. Pharmacological studies with Ca^{2+} channel blockers, LaCl_3 and ruthenium red, showed that the Ca^{2+} -induced expression of *CBF/DREB1s* was closely correlated with the amplitude of temperature fluctuation in minutes, suggesting that Ca^{2+} signals regulate *CBF/DREB1s* expression during CA under natural conditions.

To see the effect of the temperature fluctuation in minutes and the temperature cycle of day and night in the controlled environment, the special temperature settings of CA were established. I used the conventional CA at constant 2°C , 10°C -day and 2°C -night of temperature cyclic CA (C-CA), and the temperature fluctuating cyclic CA (FC-CA). The Ca^{2+} channel blockers were used to examine the role of Ca^{2+} signal in each acclimation treatment. Freezing tolerance of the plants after C-CA and CA was almost same, and FC-CA resulted weakest freezing tolerance. On the other hand, the expression level of *CBF/DREB1s* was tended to be higher in order of CA, FC-CA and C-CA plants. In addition, the contribution of Ca^{2+} signal was higher in FC-CA and C-CA for freezing tolerance and FC-CA for gene expression. Furthermore, the Ca^{2+} signal enhanced *CBF1/DREB1B*, *CBF2/DREB1C* and *CBF3/DREB1A* in FC-CA, but suppressed the expression of *CBF2/DREB1C* and *CBF3/DREB1A* in C-CA. These results consistent with the results of experiments of the field CA described above. It had not been reported that Ca^{2+} signaling inhibited the gene expression level of *CBF/DREB1s* so far. Therefore, the experiments of FC-CA and C-CA suggested the existence of a novel Ca^{2+} -*CBF/DREB1s* pathway.

Surprisingly, despite using plants grown in a laboratory chamber, the cold-induced Ca^{2+} signal clearly showed the season specificity in *Arabidopsis* roots. In winter, two Ca^{2+} signal peaks were observed during a cooling treatment from 20°C to 0°C , but in summer only one small peak was observed, even under the same growth and cooling conditions. In the spring and autumn seasons, an intermediate type of Ca^{2+} signal, which had a delayed first peak and smaller second peaks compared with the those of winter type, was observed. Volatile chemicals and/or particulates in the air from the outside may affect plants in the growth chamber; this idea is supported by the fact that incubation of plants with activated carbon changed the intermediate-type Ca^{2+} signal to the summer type. There was also a weak correlation between the seasonal characteristics of the Ca^{2+} signal and the solar radiation intensity. It has been reported that the ethylene concentration in the atmosphere seasonally changes depending on the solar radiation intensity. Ethylene gas and 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid treatment changed the Ca^{2+} signals from the intermediate to the winter type in autumn, and the summer to the intermediate type in summer, respectively, indicating that ethylene from the atmosphere may be one of the factors influencing the cold-induced Ca^{2+} signal in the winter.

Additionally, to study the change of the accumulation level of Ca^{2+} in the Ca^{2+} pools before and after the CA treatments, the soft X-ray spectromicroscopy beamline at the Canadian Light Source is equipped with a state-of-the-art scanning transmission X-ray microscope was used. CA treatment induced the Ca^{2+} accumulation in the extracellular space and vacuole, where is the main Ca^{2+} pools. It is considered that the influx of Ca^{2+} channel may be enhanced by increasing the osmolarity difference between cytosol and Ca^{2+} pools. In addition, Ca^{2+} channel blockers, LaCl_3 and ruthenium red, were sprayed to investigate the role of Ca^{2+} signals for the Ca^{2+} accumulation. The Ca^{2+} channel blockers tended to decrease the Ca^{2+} accumulation after CA treatment, but

increased after FC-CA. These results suggest that the cooling without the Ca^{2+} signals may induce the Ca^{2+} accumulation in the extracellular space and the vacuole to fix the Ca^{2+} signaling. Taken together, Plants might adapt Ca^{2+} signaling to the ambient temperature by regulating the Ca^{2+} concentration in the Ca^{2+} pools.

In conclusion, this study suggested that: (1) the Ca^{2+} signal is induced by the field-like cooling; (2) Ca^{2+} signals regulate the gene expression of *CBF/DREB1s* positively and negatively depending on the amplitude of temperature fluctuation; (3) the Ca^{2+} signal is suppressed during the summer and modified in the winter by exposure to volatile chemicals such as ethylene; and (4) the exist of the feedback between Ca^{2+} accumulation in the pools and Ca^{2+} signaling. Therefore, the Ca^{2+} signaling deeply contribute the sensing of the cold to regulate the physiological process of the CA, and will become a clue to understand how plant sense cold in natural environment.

和訳

植物は、弱い低温にさらされることでより強い低温に耐えられるようになる仕組みをもつ。これを「低温馴化」という。急激な細胞質内 Ca^{2+} イオン濃度の変化 (Ca^{2+} シグナル) は低温馴化過程、特に低温感知において、セカンドメッセンジャーとして働いていると考えられている。先行研究において、 Ca^{2+} シグナルの特徴や、シグナル伝達の経路が報告されてきた一方、これらの研究は自然条件と乖離した極端な温度条件でのみ行われてきた。したがって、 Ca^{2+} シグナルが実際の自然環境下で用いられていると結論することはまだできない。そこで、自然環境で起こりうる温度変化によって Ca^{2+} シグナルが誘導されることを確かめるために、Yellow Cameleon 3.60 を発現したシロイヌナズナを、低温顕微鏡で観察する実験系を確立した。低温顕微鏡は、レーザー共焦点顕微鏡と低温ステージあるいは低温チャンバーの組み合わせから出来ている。蛍光タンパク質は温度による影響を受けるため、温度補正式を作成することで、異なる温度における Ca^{2+} シグナルの濃度変化について比較できるようになった。この実験系を用い、冷却速度、冷却開始温度、冷却時間などの要素について詳細に検討を行った。先行研究においては、 3°C 毎分の速さでは明確な Ca^{2+} シグナルが根で観察出来なかったが、本研究において、およそ 0.5°C の速さでの葉における Ca^{2+} シグナルの観察に成功した。葉は根より低温に対する反応性が鈍いため、この結果は新たな知見であることはもちろん、 Ca^{2+} シグナルが自然環境において温度の情報を伝える役割を担っていることという仮説を支持するものである。さらに、根と葉の両組織において、温度低下が停止すると Ca^{2+} シグナルが急激に減少し、それ以降低温を保ったとしても Ca^{2+} シグナルは現れないことを示した。これは、室温から低温に植物を移したときに起こる温度変化以外では従来の低温馴化処理では Ca^{2+} シグナルが誘導されないことを示唆する。したがって、低温馴化中の温度変化の影響を評価するために、野外での低温馴化処理を盛岡の冬期に行った。野外環境では、低温誘導性の転写因子 *CBF/DREB1s* の発現パターンが従来の低温馴化処理とは大きく異なった。さらに、その際に誘導される Ca^{2+} シグナルの影響を調べるために、 Ca^{2+} チャネルブロッカーの LaCl_3 と Ruthenium red を処理すると、*CBF/DREB1s* の発現量の阻害と数分における温度振動の程度に相関関係が認められた。したがって、*CBF/DREB1s* の発現は、特に野外環境においては Ca^{2+} シグナルの制御を受けることが明らかとなった。

数分における温度振動と昼夜の温度サイクルを、人工的な環境で再現し、その役割を生理学的に明らかにするために、特殊な低温馴化処理法を確立した。通常の 2°C 一定の低温

馴化処理(CA)、昼 10°C/夜 2°C の温度サイクルがある低温馴化処理(C-CA)、温度サイクルに加え、昼に温度振動のある低温馴化処理(FC-CA)を用いた。それぞれで、Ca²⁺チャンネルブロッカーの LaCl₃ と Ruthenium red を処理し、これらの低温馴化処理における Ca²⁺シグナルの役割について検討した。C-CA と CA 後の植物の凍結耐性はほぼ同程度であったが、FC-CA 後の植物は一番弱い凍結耐性を示した。一方で、*CBF/DREB1s* の発現量は CA、FC-CA、C-CA の順で高かった。Ca²⁺シグナルによる凍結耐性上昇の寄与率は FC-CA、C-CA で高く、遺伝子発現への寄与率は FC-CA で高い傾向にあった。FC-CA において誘導される Ca²⁺シグナルは *CBF1/DREB1B*、*CBF2/DREB1C*、*CBF3/DREB1A* のすべての発現を促進するが、C-CA における Ca²⁺シグナルは *CBF2/DREB1C* と *CBF3/DREB1A* の発現を抑制する働きを持つ。これらの結果は、野外における低温馴化実験で観察された各遺伝子の挙動と一致した。現在までに、Ca²⁺シグナルが *CBF/DREB1s* の発現を阻害したという報告はない。したがって、本研究は Ca²⁺シグナル-*CBF/DREB1s* 発現経路における新たな経路の存在を示唆する。

興味深いことに、すべての植物サンプルは研究室内に設置した人工気象機内で生育したにも関わらず、根における低温誘導による Ca²⁺シグナルには明確な季節性があった。全く同じ冷却条件を用いたにもかかわらず、冬には Ca²⁺シグナルには 2 つのピークが見られ、夏には 1 つの小さなピークのみが観察された。春と秋にはその中間型の Ca²⁺シグナルが観察された。活性炭を植物とともにペトリ皿に入れて植物を生育すると、冬にも夏型の Ca²⁺シグナルが観察された。このことから、活性炭が吸着する揮発性の化学物質や粉塵などが Ca²⁺シグナルの季節性をもたらした原因物質であると考えられた。また、積算日射量と Ca²⁺シグナルの形に相関が見られたことから、太陽光によって分解され、季節性を示すとの報告のある植物ホルモンであるエチレンが候補にあげられた。エチレンガスやエチレンの前駆体である 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid を植物に処理すると、中間型の Ca²⁺シグナルが冬型に、夏型が中間型の Ca²⁺シグナルに変化した。したがって、冬期中に上昇するというエチレン濃度が、低温誘導性の Ca²⁺シグナルに影響していると考えられた。

さらに、Ca²⁺シグナルへの関与が考えられる Ca²⁺プールへの Ca²⁺蓄積量を CA 前後で比較した。観察には Canadian Light Source が所有する Scanning Transmission X-ray Microscope を用いた。CA 後に、細胞質外と液胞の主要 Ca²⁺プールへの Ca²⁺の蓄積が観察された。これは、Ca²⁺プールと細胞質内の浸透圧濃度差を上昇させることによって、Ca²⁺チャンネルを通して流入する Ca²⁺シグナルの増強を行うことが目的と考えられる。さらに、Ca²⁺シグナルの Ca²⁺プールへの Ca²⁺蓄積量への関与がないか、Ca²⁺チャンネル阻害剤の LaCl₃ と Ruthenium red を用いて観察を行った。すると、CA 後では、Ca²⁺プールの Ca²⁺蓄積量は CA 前より減少する傾向があったが、FC-CA 後では上昇した。これは、本来 Ca²⁺シグナルが誘導される温度変化があるにもかかわらず Ca²⁺シグナルが誘導されないため、Ca²⁺プールへの Ca²⁺蓄積量を増加させることで解消を図ったのではないかと考えられた。これらの結果から、植物は Ca²⁺プールの Ca²⁺蓄積量を調節することにより、周囲の温度環境に適応して Ca²⁺シグナルを誘導すると考えられる。

総括すると、本研究において主に以下 4 点の重要なことを示唆した。(1) Ca²⁺シグナルは自然環境においても誘導されること、(2) Ca²⁺シグナルは温度振動の程度に応じて *CBF/DREB1s* の発現を正・負の両方向に制御すること、(3) Ca²⁺シグナルは冬期になるとエチレンなどの揮発性の化学物質によって変化すること、(4) Ca²⁺プールの Ca²⁺蓄積量と

Ca²⁺シグナルの間にフィードバックの関係があること。したがって、Ca²⁺シグナルは植物の低温感知に深く関与し、凍結耐性の上昇の上昇に寄与することが示唆された。また、Ca²⁺シグナルは植物がどのように低温を感知しているかを知る手掛かりとなるだろう。

論文審査の結果の要旨

植物は秋から冬の季節変化を感知し、その後、凍結耐性を上昇させることにより零下における越冬が可能となる。「低温馴化」と呼ばれるこの一連のプロセスは、遺伝子発現を介した生理形質の変化の場合、①低温感知、②CBF/DREB1 転写因子の発現、③低温誘導性遺伝子およびタンパク質の発現、という流れで生じる。CBF/DREB1 を介する経路が低温馴化プロセスの主経路であることが解明されて以降、この転写因子を中心とした研究が幅広い植物において展開されてきた。一方、低温感知に関する研究は、植物を急激に冷やすと一過的なカルシウム濃度の上昇が観察されることから、初期の低温感知にカルシウムシグナルが関与することが指摘されてきた。しかし、観察系が特殊なことから研究例が少なく、また、自然環境では生じない急激な低温処理下での結果であるため、実際に、野外での低温馴化においてカルシウムシグナルが使われているかは、全く分かっていない。加えて、カルシウムシグナルと CBF/DREB1 の発現制御に関しては、これまで全く報告されていなかった。

この様な背景のもと、本研究では、自然環境における低温感知の理解に向けて、特にカルシウムシグナルの観点から実験を行っている。まず、植物全体をインタクトな状態で精密に温度制御をしながら、カルシウムシグナルを高感度で経時観察出来る系が開発された。さらに得られたシグナル結果に対し温度補正行われた。次に、自然環境下における低温誘導性カルシウムシグナルを評価するため、様々な温度条件下においてシグナル観察が行われた。その結果、①シグナル開始には冷却速度が重要であること、②シグナル停止は冷却停止により生じること、③1℃の温度低下や冷却速度 0.47℃/min という野外でも一般に生じる冷却でもシグナルが発生すること、④シグナル強度は植物周囲の温度環境に依存する、ということが明らかとなった。次に、野外における CBF/DREB1 遺伝子の発現制御とカルシウムシグナルとの関係性が薬理的に解析された。23℃で育てたシロイヌナズを、冬の異なる時期に1週間野外でカルシウムシグナル阻害剤処理下で馴化した。3種の CBF/DREB1 遺伝子の発現解析を行ったところ、カルシウムシグナルが関与する CBF/DREB1 遺伝子の発現制御は、温度変化が頻繁に生じる時に行われ、また、正の制御だけでなく負の制御があることも明らかとなった。次に、温度振動はノイズ的な温度振動と昼夜の温度サイクルの2つ考えら、これらを人工的に再現することにより解析された。その結果、人工的な環境においても、野外における低温馴化実験で観察された CBF/DREB1 遺伝子の発現挙動が確認された。次に、以上の実験はすべての植物サンプルは研究室内に設置した人工気象機内で生育したにも関わらず、根における低温誘導によるカルシウムシグナルには明確な季節性が見られた。この原因物質は活性炭により吸着される物質であることが示され、揮発性の化学物質や粉塵などがカルシウムシグナルの季節性をもたらした原因であると考えられた。加えて、原因物質の一つとしてエチレンである可能性が示された。最後に、Canadian Light Source が所有する Scanning Transmission X-ray Microscope を用いて、カルシウムプールの蓄積量を低温馴化前後で測定がおこなわれ、馴化後に細胞質外と液胞の主要カルシウムプールへのカルシウム蓄積が観察された。

以上の結果、本研究によりカルシウムシグナルが植物の低温馴化プロセスにおける低温感知に深く関与することが示唆された。よって、本審査委員会は、「岩手大学大学院連合農学研究科博士学位論文審査基準」に則り審査した結果、本論文を博士（農学）の学位論文として十分価値のあるものと認めた。

学位論文の基礎となる学術論文

主論文

1. Hiraki H, Uemura M and Kawamura Y. (2018)
Calcium signaling-linked *CBF/DREB1* gene expression was induced depending on the temperature fluctuation in the field: views from natural condition of cold acclimation. *Plant and Cell Physiology*. doi:10.1093/pcp/pcy210 (in press)
2. Hiraki H, Tanino K, Watanabe E, Mano S, Uemura M and Kawamura Y. (2019)
Effect of temperature fluctuating cold acclimation treatment on freezing tolerance in three *Arabidopsis* accessions. *低温生物工学会誌* (in press)

参考論文

1. 開勇人, 上村松生, 河村幸男 (2016)
短時間の温度変化による植物のカルシウムイオンシグナル変化. *低温生物工学会誌* 62:67-70.
2. 金谷真希, 富永陽子, 開勇人, 上村松生, 河村幸男 (2018)
植物の季節変化の感知：低温馴化制御と光受容体フィトクロムの役割. *低温生物工学会誌* 64:35-38.
3. Hiraki H, Liu N, Wang J, Stobbs J, Karunakaran C, and Tanino K. (2018)
Soft X-ray Spectromicroscopy: A Versatile Tool to Probe Pristine Plant Cell Walls. *Microscopy and Microanalysis* 24 (Suppl. 2):358-359.