

凍結ストレスと植物

岩手大学農学部附属寒冷バイオフィロンティア研究センター

上村 松生, 南 杏鶴, 河村 幸男

Freezing Stresses in Plants

Matsuo UEMURA, Anzu MINAMI, Tomokazu YAMAZAKI and Yukio KAWAMURA

Cryobiofrontier Research Center, Faculty of Agriculture, Iwate University, Morioka 020-8550, Japan

Plant freezing tolerance is one of the most important factors which determine the productivity and distribution in the world. Temperate plants including many crop species have an ability to increase their freezing tolerance when exposed to low but non-freezing temperatures for certain periods, which is known as cold acclimation. Cold-acclimation-induced increase in freezing tolerance is associated with diverse changes occurring in the plasma membrane, which ultimately results in an increase in the cryostability of the plasma membrane to withstand various abiotic stresses imposed by freezing (i.e., dehydration, high-salt, and mechanical stresses) and an acceleration of the recovery process after thawing. We have intensively investigated alterations in the plasma membrane composition and accumulated evidences that indicate dynamic responses of protein and lipid compositions in the plasma membrane to low temperatures. Recently, we have initiated analysis of microdomains in the plasma membrane during cold acclimation and found that both the protein and lipid compositions of the microdomains significantly altered after cold acclimation. A microdomain-localized protein, synaptotagmin-like protein 1 (SYT1), which becomes concentrated in microdomains after cold acclimation, is likely to functionally involve in calcium-associated membrane repair process that is essential to maintain high survival after a freeze/thaw cycle. These results confirm that plant plasma membrane is the most important factor to determine how plant cells tolerate freezing conditions.

(Received Apr. 15, 2009; Accepted Jun. 1, 2009)

緒 言

地球上に生育する植物は、常に植物体を取り巻く環境から様々なストレスを受けて暮らしている。環境ストレスの中でも凍結を含む低温ストレスは、植物の生育地域を制限し、農作物の生産量に影響を与える最も重要なストレスの一つである¹⁾。さらに、

低温ストレスは、曝される時間が非常に短い場合でも被害が甚大になる可能性が高いため盛んに研究が

セミナー「低温と生物・食品」

[Key words: Plasma membrane, Plant, Cold acclimation, Freezing tolerance; 細胞膜、植物、低温馴化、凍結耐性、マイクロドメイン]

行われてきた。

熱帯や亜熱帯に生育する植物は低温に対する耐性をほとんど持たないが、温帯以北に生育する植物は、氷点下の気温で発生する凍結ストレスによる傷害発生を回避、あるいは、遅延する能力を持ち、その能力は秋から冬にかけての温度の低下と日長の短縮を感知して増大させる（低温馴化）²⁾。それぞれの植物が生存できる温度以下に曝されると、植物は被害を受けることになる。地球温暖化が徐々に進む状況では、農作物の低温傷害は減少すると単純に考えられるが、実際には、東日本以北などでは果樹類をはじめとした農作物の低温による被害（晩霜による被害など）は依然として脅威であることが懸念されている³⁾。従って、植物の低温耐性の増強は、解決すべき重要な植物学上の課題の一つと考えられる。

では、植物はどのように凍結ストレスに対処し、その生存を可能にしているのであろうか？最近の分子生物学および生理生化学的研究手法の進展により、植物が示す凍結耐性分子機構に関する知見は急速に蓄積し、その理解が進んでいる。本論文では、凍結ストレスに対する植物の応答を概説し、その後、我々の研究室において得られた凍結耐性獲得機構に関する知見を中心に、凍結ストレスによる傷害発生に重要な役割を果たしている生体膜系の凍結融解過程における挙動、凍結傷害の発生の分子機構、さらには、低温馴化過程における膜系の変化と凍結耐性に果たす役割等を示し、今後の研究の方向やその実用的な貢献などについて考えてみたい。

氷点下の温度ストレスに対する植物の応答

植物細胞の凍結過程の最初の観察は、19世紀末に論文として報告されている⁴⁾。この報告では、冬の野外や手作りの凍結装置中に光学顕微鏡を設置し、細胞やコロイド溶液が凍結する過程をリアルタイムで記録した。この実験方法は論理的で、得られた結果は示唆に富んでおり、100年以上たった現在においても、この報告にある最終的な結論は科学的に正しいものが多い⁵⁾。

植物は、凍結温度に遭遇した際に多様な適応戦略を取る。熱帯や亜熱帯に生息する植物は低温に全く耐えられないものが多いが、温帯以北の気候帯に生息する植物は一生の間に低温に遭遇する可能性が高

く、それに耐えて生存する機構を有しているものがほとんどである⁶⁾。Figure 1は凍結温度での生存戦略を分類したものであるが、凍結温度で生育する植物が多様な適応様式を有していることがわかる。

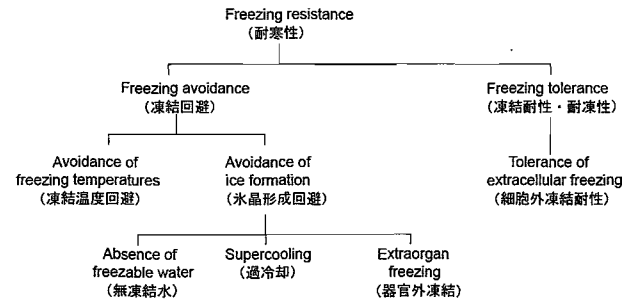


Fig. 1. Diversity of plant freezing resistance.

周囲の気温が凍結温度に下がっても、自分自身の温度を氷点以上に保つ植物が存在する（凍結温度回避）^{2,6)}。これらの植物は、気温が下がらないような生息場所を選んだり、自分自身で発熱あるいは太陽光などを集めて氷点以下になることを避けている。さらに、氷点以下の温度になっても、植物体内に氷晶を形成しない機構を持つ植物も存在する（氷晶形成回避）^{2,6)}。乾燥して凍結水がほとんど無い状態で生存するもの（無凍結水）、体内のある部分の水分を異なった部分に移動し（脱水濃縮されることになる）凍結を防ぐもの（器官外凍結）、あるいは、水分は移動しないが何らかの機構で氷晶形成を防いでいるもの（過冷却）が知られている⁷⁾。

一方、温帯以北に生育する多くの植物は、気温が氷点下になると体内に氷晶を積極的に形成し、生存する機構を有する（凍結耐性）。しかし、氷晶は細胞内で形成されるのではなく、必ず細胞外にできる（細胞外凍結）。植物組織は、細胞が隙間無く密に存在しているのではなく、細胞と細胞の間に水蒸気をはじめとする様々な物質を含んでいる空間（細胞間隙）が存在する。細胞間隙には氷晶核となる細菌や物質が存在し、さらに、細胞内に比較すると溶質濃度も低いことから、気温が氷点下になるとまずそこに氷が形成される。水と氷が共存する温度においては、液体の水分子が有する化学ポテンシャルが氷を形成する水分子のそれより高いため、細胞内の水は細胞膜を通過して細胞間隙の氷表面に移動する。このような機構で氷晶は温度低下に伴って成長し、それによって細胞内は次第に脱水される。その結果、細胞

内溶液の氷晶形成開始温度ますます低下し、細胞内での氷晶形成（細胞内凍結）を防ぐことになる。以上をまとめると、細胞外凍結によって生存している植物は、温度の低下に加えて、水から氷への状態変化による体積増加に伴う機械的ストレス、細胞内からの水の移動に伴う脱水ストレスなどの複数のストレスに耐えることが必須となる。以下にこの細胞外凍結している植物が示す生存戦略について概説する。

凍結融解過程における生体膜挙動と凍結傷害発生機構

植物細胞が細胞外凍結した場合には、細胞内からの脱水によって発生する脱水ストレスが大きな影響を与える^{8,9)}。発生する傷害の種類や傷害発生の度合いは、細胞の生理的状況（凍結に強いか弱いか）や試料が凍結される温度によって大きく異なる（Fig. 2）。

植物細胞に細胞壁を溶出させて得られたプロトプラストを用いた実験では、低温馴化前の凍結に弱い細胞の場合、凍結すると細胞内の水分が細胞外に移動して細胞が収縮し、その結果、細胞膜の余剰分が細胞内に陥没し、小胞として切り出される¹⁰⁾。この小胞（Endocytotic vesicles）は細胞膜とは離れた状態で存在し、融解中に起こる細胞の膨張過程で細胞膜に戻ることができず、その結果、細胞は破裂してしまう（Expansion-Induced Lysis; EIL）。さらに低い凍結温度まで凍結した場合は、強い脱水の影響で膜表面に存在する水分子が除去されてしまい、その結果、細胞膜と細胞内膜系（葉緑体包膜や液胞膜など）が相互作用して膜の独立性を失うことになる。そのような膜は、融解中の細胞体積が元に戻らず、細胞膜の半透性が崩壊してしまうため、細胞は死に至る（Loss of Osmotic Responsiveness; LOR）。低温馴化した凍結に強い細胞においては、Endocytotic vesicles は全く観察されず、それに変わって、細胞膜の外側に細胞膜由来の突起物（Exocytotic extrusions）が観察される。この突起物は細胞膜と連続しており、プロトプラストが生存する場合は、融解過程で再び細胞膜に吸収される。しかし、プロトプラストが傷害を受ける場合には、凍結温度に関わらず、細胞膜の半透性を失うことが原因と見られる融解過程での細胞体積増加の応答が見られず、細

胞は死んでしまう。これは、低温馴化前の細胞に見られる LOR と同様の現象であるが、低温馴化前後で見られる LOR では細胞膜と細胞内膜系の相互作用の結果表れる微細構造に違いが見られる（低温馴化前にはヘキサゴナル II 相転移が観察され、低温馴化後にはフラクチャージャンプ現象が観察される）。

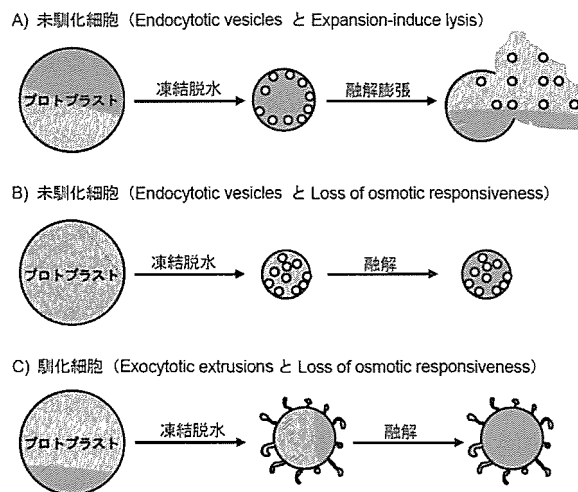


Fig. 2. Diversity of cryobehavior of the plasma membrane isolated from non- and cold-acclimated protoplasts.

さらに、最近、細胞のまわりに形成された氷晶による機械的ストレスも傷害の発生を導く可能性が示された¹¹⁾。組織内で水が凍結する場合に起こる水から氷への変換は急激な体積増加をもたらし、その結果、細胞は圧迫される。さらには、また、氷晶によって細胞の最も外側にある細胞膜が傷つけられてしまうことも考えられる。事実、カルシウム感受性の凍結耐性を測定することにより、脱水ストレスによって発生する傷害と機械的ストレスによって発生する細胞膜に関連した傷害が区別できることも示されている。

以上のように、植物細胞を凍結した場合、複数のストレスによって傷害が発生することがわかる。しかも、傷害発生は細胞膜の性質に依存することから、植物細胞は細胞膜のストレス耐性を増加させる、あるいは、細胞膜を凍結過程で発生するストレスから保護することによって、凍結状態でも細胞が生存できるように対応しているものと考えられる。

低温馴化過程における膜系の変化と凍結耐性機構

凍結傷害の発生が最も早く起こるのが細胞膜であるという事実に基づき、低温馴化過程における細胞膜の組成と機能の変動が明らかにされてきた⁸⁾。たとえば、低温馴化処理(2~5°C 処理を1日~数週間)を行うと温帯性植物の多くは凍結耐性を増大する。世界中で広く使用されているモデル植物・シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) は、2°C の低温馴化で急速に凍結耐性を増大させ、24 時間処理後には生存可能温度が-4°C から-8°C に低下することが示されている。さらに低温馴化を継続すると、凍結耐性は徐々に増加し、3 日後に-10°C、7 日後には-13°C に達する。しかし、そのまま低温馴化を28 日続けても凍結耐性の増加は見られない。このように、シロイヌナズナは非常に早く低温に応答し凍結耐性を増加させるが、他の多くの植物は凍結耐性の増加を示すにはより長い期間の低温馴化を必要とする。ライムギなどのイネ科植物では1 週間ほどの期間を要し、その後少なくとも4 週間は凍結耐性を増大させ、ライムギは-20~-30°C 程度まで、オートムギは-10~-12°C 程度まで生存が可能になる¹²⁾。これらの植物が示す最大耐凍性は、遺伝子にコードされている情報を基にして遺伝的に決定されていると考えられている。

低温馴化過程で起こる凍結耐性増大に関連した細胞膜の重要な変動の一つは、リン脂質含量の増加である。多くの植物(ライムギ、シロイヌナズナ、キクイモ、クワ、オーチャードグラスなど)において、低温馴化過程で細胞膜のリン脂質含量が共通して増加する¹⁰⁾。リン脂質はその極性基の部分に水分子を結合する能力が他の脂質と比べて強く、低温馴化過程におけるリン脂質の増加は、凍結過程で起こる膜表面からの脱水を防ぎ、脱水による細胞膜構造の不安定化を防止しているものと考えられている。なかでも、主要なリン脂質であるホスファチジルコリンは1 分子あたり数個の水分子を結合することができる。リン脂質の増加が凍結耐性を増大させている実験的証拠は、プロトプラストと特定の脂質組成からなる脂質小胞(リポゾーム)の融合実験によって得られている^{13,14)}。不飽和脂肪酸を含むホスファチジルコリンから構成される脂質小胞をプロトプラスト

と融合させ、人工的に細胞膜リン脂質組成を変化させると、プロトプラストの凍結耐性は大きくなる。同時に、この融合プロトプラストでは、前述した Endocytotic vesicles の発生が見られず、それに変わって Exocytotic extrusions が見られることから、低温馴化前のプロトプラストの細胞膜リン脂質含量を低温馴化後の状態に近づけると、細胞膜の凍結融解過程における挙動も低温馴化後のものと同様になり、その結果、凍結傷害の発生頻度の減少と発生機構の変動が起こることが示された。従って、低温馴化過程で起こる細胞膜脂質変動が凍結傷害発生機構の変換が強く関連していることがわかる。

さらに、低温馴化過程で起こる細胞膜タンパク質組成も大きく変動することが示された^{15,16)}。シロイヌナズナ細胞膜のタンパク質は、低温馴化1 日目で大きな変動を示し、その後も7 日目まで徐々にいくつかのタンパク質が変化した。それら変動するタンパク質を質量分析し、得られた結果とシロイヌナズナを初めとする遺伝子情報から得られたタンパク質データベースに照らし合わせて同定を試みたところ、38 個の低温応答性細胞膜タンパク質を同定することに成功した。これら低温誘導性細胞膜タンパク質には、脱水や酸化ストレスなどから膜を保護すると考えられるタンパク質(リポカリンなど)や膜修復に関与するタンパク質(シナプトタグミン様タンパク質など)が含まれ、凍結融解過程で細胞膜にかかるストレスを緩和、あるいは、ストレスによって引き起こされる傷害から回復する機構に関わるタンパク質が存在していることが示された。また、これらの低温誘導性細胞膜タンパク質の多くは、低温馴化1 日目に急速に変動しており、凍結耐性の増大時期とよく一致していた。

生体膜は1972 年に発表された流動モザイクモデルで示された構造を有し、非常に柔軟性に富んだ、しかも、よく制御された状態で機能していると考えられている¹⁷⁾。しかし、様々な研究結果から、生体膜の上には構成分子の流動性が異なる領域が存在し、厳密には一様ではなく分割された領域から構成されているという考え方が提唱されるに至った^{18,19)}。1997 年には、細胞膜上にはスフィンゴ脂質とステロールに富む微小領域(マイクロドメイン)が存在し、そこには小胞輸送タンパク質やシグナル伝達などの重要な細胞機能に関わる特異的なタンパク質が局在

し、機能性ドメインとして存在しているというモデルが提唱されるに至った (Fig. 3)²⁰⁾. 細胞膜マイクロドメイン研究は動物細胞で先行しているが、近年、植物細胞でも組成解析が報告され始めている²¹⁻²⁵⁾. 植物ではウイルスの侵入ポイントとして細胞膜マイクロドメインの関与が報告されており、動物細胞と同様に機能的にも重要な役割を果たしていると考えられ²⁶⁾, 植物細胞でも動物細胞と同様の機能を有するマイクロドメインが存在していると推測される. しかし、低温馴化や凍結耐性と細胞膜マイクロドメインの関係についての報告はなかった.

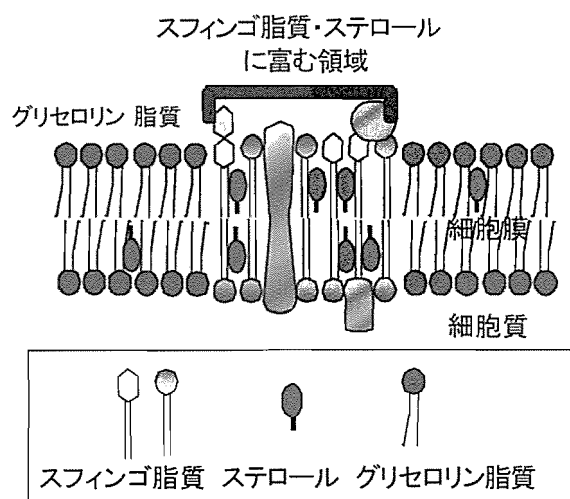


Fig. 3. Schematic illustration of a microdomain in the plasma membrane.

低温馴化過程では、様々な植物に共通して、細胞膜に含まれるスフィンゴ脂質(グルコセレブロシド)含量が低下する¹⁰⁾. 例えば、シロイヌナズナでは7日間の低温処理によって、グルコセレブロシドは全脂質の7.3 mol%から4.3 mol%へと40%以上減少する²⁷⁾. グルコセレブロシドは疎水性が非常に強く結合水の数も少ないことから、低温馴化中に見られる含量低下は低温下での膜の流動性の低下や脱水下での膜機能不全を防ぐことに意味があると考えられてきた. しかし、マイクロドメインの組成や機能を合わせて考えると、グルコセレブロシドの減少が異なった意味で凍結耐性に影響を与えている可能性も示唆される.

事実、単離精製されたシロイヌナズナ細胞膜マイクロドメインは、全細胞膜画分とは異なる脂質・タンパク質組成を示し、特定の成分が凝集する特異的な領域を形成していることが判明した^{28,29)}. さらに、

低温馴化前後のシロイヌナズナから細胞膜マイクロドメインを単離したところ、一定量の細胞膜タンパク質当たりのマイクロドメインタンパク質回収量は低温馴化とともに減少することが明らかになった. この結果は、低温馴化前後で細胞膜に存在するマイクロドメインの大きさや数が減少していることを示唆しており、その減少が低温馴化とともに起こるグルコセレブロシド(スフィンゴ脂質)含量の低下の影響を受けているようにも見える. さらに、マイクロドメインに存在するタンパク質のうち、低温馴化に応答して量的変動を示すものを質量分析法によって同定したところ、膜輸送関連タンパク質、小胞輸送関連タンパク質、細胞骨格タンパク質、およびマイクロドメイン関連タンパク質群などに属するタンパク質が同定された. 以上の結果は、低温馴化に細胞膜マイクロドメインが応答し、低温馴化過程における細胞膜の作りかえ、細胞膜-細胞壁の相互作用などに細胞膜マイクロドメイン局在性タンパク質が関わっている可能性を示唆している. 今後は、低温に応答するマイクロドメインタンパク質の機能を変異体や遺伝子組み換え体を用いて解析し、細胞膜マイクロドメインが果たす凍結耐性機構への関与をさらに追求していくことが必要である.

マイクロドメインの中には、凍結耐性に関係する興味深いタンパク質が存在する. それは、動物細胞では機械的ストレスで生じた膜傷害をカルシウムに依存して修復するタンパク質・シナプトタグミンに類似したタンパク質(シナプトタグミン様タンパク質)である^{11,15,30)}. シロイヌナズナの細胞膜マイクロドメインに存在するシナプトタグミン様タンパク質は、低温馴化で急速に増加する. 植物細胞を凍結した場合、氷晶が細胞膜と接触する、あるいは、細胞膜の近傍に共存する状況が生じた場合、細胞膜に“孔”が生じる可能性がある. シナプトタグミン様タンパク質は、この孔を修復する機構に関与し、凍結耐性増大に関わっているという仮説を立てた. 様々な実験をしたところ、(1)シロイヌナズナプロトプラストおよび葉組織切片ではカルシウムに依存した凍結耐性機構が存在する、(2)カルシウム依存凍結耐性は脱水ストレスや浸透圧ストレスでは見られない、(3)凍結中に細胞外から細胞内へのカルシウム流入が観察される、(4)抗体処理によってシナプトタグミン様タンパク質を不活性化するとカルシ

ウム依存凍結耐性は消失する、などが明らかになってきた。これらの結果は、実際に、シロイヌナズナシナプトタグミン様タンパク質が、カルシウムに依存した膜修復機構で機械的ストレスによる影響を緩和し、凍結耐性増大に貢献していることを示唆している。

他にも、最近、マイクロドメインに存在するエキソサイトシス関連のダイナミン様タンパク質も凍結耐性に関与する可能性が示唆された³¹⁾。従って、マイクロドメインの中には凍結耐性を決定する複数のタンパク質が存在し、凍結耐性獲得には重要な役割を果たしていることが考えられる。

まとめと今後の展望

植物が、季節の移り変わりを認識し、夏から冬にかけて凍結耐性を増大する機構は、非常に巧妙で解明されていないことも多く残っている。最近の分子生物学的手法の進歩や生理生化学的解析技術の改良などによって、複雑な寒冷適応様式が明らかになっている。しかし、上述したように、凍結に対する耐性はいくつかのストレスに同時に曝される複合的な様相を帯びており、それらのストレスを全て考慮に入れた場合の耐性機構は解明するにはあまりにも複雑すぎる。各ストレスを分離し、単一ストレスに対する応答を明らかにした上で、複数のストレスを組み合わせて実験を進めるといったアプローチが盛んに用いられている。

植物細胞の凍結傷害発生が細胞膜の損傷に起因することはほぼ間違いないと考えられるが、その原因となるストレスによって傷害発生機構は異なっている。さらに、凍結が原因で細胞膜が構造的・機能的損傷を受ける機構(傷害発生機構)、あるいは、低温馴化過程における凍結耐性が増大する分子機構(凍結耐性獲得機構)に関する解明はいまだ十分であるとは言えず、多くの領域で残された点が見られる。強力な武器となり得る分子生物学的解析手法に限らず、従来から用いられている生理・生化学的アプローチを使用し、基礎となる現象をきちんと理解した上で研究を進めていくことが重要である。また、植物の凍結耐性機構や低温馴化速度、さらには、凍結様式などは植物種や組織・器官によって異なっている。従って、一つの材料に偏ることなく、様々な角

度から多くの材料を用いて研究を行うことが凍結耐性機構の理解には必要不可欠である。

謝 辞

本報告は、岩手大学農学部附属寒冷バイオシステム研究センター生体機能開発研究分野(平成20年4月より附属寒冷バイオフィロンティア研究センター生命適応機能研究分野に改組)所属の役員及び学生諸君によって得られた結果を基にしている。特に、古戸あかりさん(現・コスモテック)に感謝する。また、山下哲郎博士(岩手大学)、加茂政晴博士(岩手医科大学)、深尾陽一朗博士(奈良先端科学技術大学院大学)及び藤原正幸博士(奈良先端科学技術大学院大学)には、タンパク質解析で共同研究をしていただいた。本報告の基になった研究は、生研機構(現・生研センター)基礎研究推進事業、文部科学省21世紀COEプログラム、科学研究費補助金(基盤研究(B)、若手研究(Bおよびスタートアップ))、農林水産省バイオデザインプロジェクト、岩手大学長および岩手大学大学院連合農学研究科長裁量経費の支援により実施された。

文 献

- 1) Boyer, J.S.: Plant productivity and environment. *Science*, **218**, 443-448 (1982)
- 2) Levitt, J.: Responses of Plants to Environmental Stresses. Academic Press, New York (1980)
- 3) 独立行政法人農業・生物系特定産業技術研究機構果樹研究所. 平成15年度果樹農業生産構造に関する調査報告書—果樹農業に対する気象変動の影響に関する調査— (2004)
- 4) Molisch, H.: Untersuchungen fiber das Erfrieren der Pflanzen (Translated into and reprinted in English in *Cryo-Letters*, **3**, 332-390, 1982) (1897)
- 5) Schwabe, W.W.: Investigations into the freezing of plants by H.Molisch. *J. Exp. Bot.*, **34**, 1250 (1983).
- 6) Sakai, A. and Larcher, W.: Frost Survival of Plants: Responses and Adaptation to Freezing Stress. Springer-Verlag, Berlin, 321pp. (1987)
- 7) 藤川清三: 樹木の凍結抵抗性—凍らない水, 低温生物工学会誌 **55**, 35-39 (2009)

- 8) Steponkus, P.L.: Role of the plasma membrane in freezing injury and cold acclimation, *Annu. Rev. Plant Physiol.*, **35**, 543-584 (1984)
- 9) Uemura, M. and Steponkus, P.L.: Cold acclimation in plants: relationship between the lipid composition and the cryobehavior of the plasma membrane, *J. Plant Res.*, **112**, 245-254 (1999)
- 10) Steponkus, P.L., Uemura, M., Webb, M.S.: A contrast of the cryostability of the plasma membrane of winter rye and spring oat—two species that widely differ in their freezing tolerance and plasma membrane lipid composition, *In "Advances in Low Temperature Biology"*, P.L. Steponkus, ed., Vol. 3, JAI Press, London, 211-312 (1993)
- 11) Yamazaki, T., Kawamura, Y., Minami, A. and Uemura, M.: Calcium-dependent freezing tolerance in *Arabidopsis* involves membrane resealing *via* synaptotagmin SYT1, *Plant Cell*, **20**, 3389-3404 (2008)
- 12) Webb, M.S., Uemura, M. and Steponkus, P.L.: A comparison of freezing injury in oat and rye: two cereals at the extremes of freezing tolerance, *Plant Physiol.*, **104**, 467-478 (1994)
- 13) Steponkus, P.L., Uemura, M., Balsamo, R.A., Arvinte, T., Lynch, D.V.: Transformation of the cryobehavior of rye protoplasts by modification of the plasma membrane lipid composition, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **85** 9026-9030 (1988).
- 14) Uemura, M. and Steponkus, P.L.: Effect of cold acclimation on the incidence of two forms of freezing injury in protoplasts isolated from rye leaves, *Plant Physiol.*, **91**, 1131-1137 (1989)
- 15) Kawamura, Y., and Uemura, M.: Mass spectrometric approach for identifying putative plasma membrane proteins of *Arabidopsis* leaves associated with cold acclimation, *Plant J.*, **36**, 141-154 (2003)
- 16) Uemura, M., Tominaga, Y., Nakagawara, C., Shigematsu, S., Minami, A. and Kawamura, Y.: Responses of the plasma membrane to low temperatures, *Physiol. Plant.*, **126**, 81-89 (2006)
- 17) Singer, S.J. and Nicolson, G.L.: The fluid mosaic model of the structure of cell membranes, *Science*, **175**, 720-731 (1972)
- 18) Jain, M.K. and White, H.B., 3rd: Long-range order in biomembranes, *Adv. Lipid Res.*, **15**, 1-60 (1997)
- 19) Simons, K. and van Meer, G.: Lipid sorting in epithelial cells, *Biochemistry*, **27**, 6197-6202 (1988)
- 20) Simons, K. and Ikonen, E.: Functional rafts in cell membranes, *Nature*, **387**, 569-572 (1997)
- 21) Berczi, A. and Horvath, G.: Lipid rafts in the plant plasma membrane? *Acta Biol. Szeged*, **47**, 7-10 (2003).
- 22) Mongrand, S., Morel, J., Laroche, J., Claverol, S., Carde, J.P., Hartmann, M.A., Bonneu, M., Simon-Plas, F., Lessire, R. and Bessoule, J.J.: Lipid rafts in higher plant cells: purification and characterization of Triton X-100-insoluble microdomains from tobacco plasma membrane, *J. Biol. Chem.*, **279**, 36277-36286 (2004)
- 23) Borner, G.H., Sherrier, D.J., Weimar, T., Michaelson, L.V., Hawkins, N.D., Macaskill, A., Napier, J.A., Beale, M.H., Lilley, K.S. and Dupree, P.: Analysis of detergent-resistant membranes in *Arabidopsis*: evidence for plasma membrane lipid rafts, *Plant Physiol.*, **137**, 104-116 (2005)
- 24) Laloi, M., Perret, A.M., Chatre, L., Melsner, S., Cantrel, C., Vaultier, M.N., Zachowski, A. Bathany, K., Schmitter, J.M., Vallet, M., Lessire, R., Hartmann, M.A. and Moreau, P.: Insights into the role of specific lipids in the formation and delivery of lipid microdomains to the plasma membrane of plant cells, *Plant Physiol.*, **143**, 461-472 (2007)
- 25) Lefebvre, B., Furt, F., Hartmann, M.A., Michaelson, L.V., Carde, J.P., Sargueil-Boiron, F., Rossignol, M., Napier, J.A., Cullimore, J., Bessoule, J.J. and Mongrand, S.: Characterization of lipid rafts from *Medicago truncatula* root plasma membranes: a proteomic study reveals the presence of a raft-associated redox system, *Plant Physiol.*, **144**, 402-418 (2007)
- 26) Bhat, R.A., Panstruga, R., Lipid rafts in plants, *Planta*, **223**, 5-19 (2005)
- 27) Uemura, M., Joseph, R.A. and Steponkus, P.L.: Cold acclimation of *Arabidopsis thaliana*: effect on

(36)

- plasma membrane lipid composition and freeze-induced lesions, *Plant Physiol.*, **109**, 15-30 (1995)
- 28) Minami, A., Fujiwara, M., Furuto, A., Fukao, Y., Yamashita, T., Kamo, M., Kawamura, Y. and Uemura, M.: Alterations in detergent-resistant plasma membrane microdomains in *Arabidopsis thaliana* during cold acclimation, *Plant Cell Physiol.*, **50**, 341-359 (2009)
- 29) 南杏鶴, 古戸あかり, 上村松生: 植物細胞膜マイクロドメインタンパク質の低温応答性, *低温生物工学会誌*, **54**, 155-162 (2008)
- 30) 河村幸男, 山崎誠和, 上村松生: 凍結における機械的ストレスとその耐性機構, *低温生物工学会誌*, **52**, 169-173 (2006)
- 31) Minami, A. and Uemura, M.: Dynamin-related protein 1E, a plant plasma membrane microdomain protein, is associated with freezing tolerance of *Arabidopsis*, *Cryobiology*, **59** (in press)