

水から氷へ：凍結傷害発生と回避

¹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, ²岩手大学 21 世紀 COE
河村 幸男¹, 金子 智志¹, 山崎 誠和², 小林 紫苑¹, 上村 松生¹

Water to ice: Occurrence of the freezing injury and freezing tolerance

Yukio KAWAMURA¹, Satoshi KANEKO¹, Tomokazu YAMAZAKI², Shion KOBAYASHI¹ and
Matsuo UEMURA¹

¹*Cryobiofrontier Research Center, Faculty of Agriculture, Iwate University, Morioka 020-8550, Japan*

²*21st Century Center of Excellence Program, Iwate University, Morioka 020-8550, Japan*

Freezing tolerance is one of the most important characteristics for plants living at subzero temperatures in winter. When ice crystals form and grow in the extracellular spaces they may bring cells, especially cell surface, to the dehydration and mechanical stresses. Many physiological studies have supported the hypothesis that the enhancement of freezing tolerance in plants during cold acclimation is closely associated with an increase in the cryostability of plasma membrane. In *Arabidopsis*, many of the plasma membrane proteins including dehydrins, lipocalin and synaptotagmin increase during cold acclimation. Although there was little information about the freeze-induced mechanical stress tolerance, we have revealed that the extracellular calcium increases the tolerance to freeze-induced mechanical stress, the mechanism of which is involved in the membrane resealing via plant synaptotagmin, SYT1. Recently, besides *Arabidopsis*, we confirmed the calcium-dependent freezing tolerance in three monocot and one dicot. In addition, freezing tolerance tests of three monocots in the presence of anti-SYT1 antibody demonstrated that the calcium-dependent freezing tolerance results in the membrane repair. Finally, our results support the idea that the calcium-dependent membrane repair is a common mechanism of freeze-induced mechanical stress tolerances for many angiosperms.

(Received Nov. 30, 2011; Accepted Jan. 10, 2012)

結 言

地球上の生物が“生き物らしい”活動を行うためには、水が液体であることが必須であり、水が固体になる、すなわち凍ると、成長や生殖などの一般的な生命活動が出来ないだけでなく、“耐える”ためのメカニズムがないと生存も危うくなる。本論考では、簡単に凍結傷害および凍結耐性について考察した後、近年、我々の研究室で分かりつつある凍結機械的ストレス耐性メカニズムについて述べる。

セミナー「水の動態と生命活動」7.

[Key words : Freezing tolerance, Mechanical stress, Membrane repair ; 凍結耐性, 機械的ストレス, 膜修復]

凍結傷害および凍結耐性

寒冷地に生息する植物は、細胞レベルで低温や凍結に対する耐性を備えている。例えば、細胞内に氷晶が形成されると（細胞内凍結）、細胞内の構造は破壊されるため¹⁾、凍結耐性のある植物細胞では氷晶は必ず細胞外に形成される。細胞内凍結を起こさせない、もしくは、細胞外に氷晶を作らせるには、特殊なメカニズムが必要であり、逆に、凍結耐性のない植物ではこのメカニズムが働かないため細胞内凍結を起こし、氷点下で生存できないと考えられている²⁾。一方、細胞内凍結が生じず細胞のすぐ外が凍結する場合においても（細胞外凍結）、細胞は細胞膜を介して細胞外の氷晶から脱水ストレスや物理的な圧迫による機械的ストレスを受けるため、これらのストレスにも耐えるシステムを細胞は持っていないと凍結下で生き抜くことは困難となる¹⁾。

これまでの凍結耐性機構に関する多数の文献を見ても、この機構は複雑であると想像できるが、このような考察からも、凍結耐性のある植物は、細胞レベルで様々な耐性メカニズムを持っていると推察される。加えて、これらのメカニズムは、さらに事前的なものとして事前のものに分類されると考えられる。事前的な耐性メカニズムの場合、傷害発生そのものを抑えるメカニズムとなる。例えば、細胞内凍結を抑えるメカニズムは事前的なものとなる。しかし、このシステムが働いている場合、観察できる現象（すなわち傷害）が生じないため、耐性メカニズムが働いている現場を直接観察することは困難となる。すなわち、どのような傷害を抑えているかの研究は、必ず、メカニズムが働いているときと働いていないときの2つの比較研究からでしか明らかとならない。例えば、後で述べる低温馴化前後における比較研究などが該当する。一方、事後的メカニズムの場合、傷害発生後にその傷害を直すもしくは軽減するメカニズムとして働く。この場合、このシステムが働いている現場、すなわち傷害に対して働いている様子を観察することは原理的には可能となる。しかし、傷害がどこでどのように生じているかが分からなければ、観察だけでなくメカニズムの解析も困難となるため、結局、メカニズムが働いているときと働いていないときの比較研究からが最もよいスタート地

点となるであろう。

次に、越冬という視点から考えると、時間的観点も非常に重要なものとなる。一般に、凍結耐性温度が何度であるか？というのとは最大凍結耐性のことであり、短時間その温度に曝したときのものである。実験材料や方法にもよるが、これまでのほとんどの研究では長くて半日程度である。一方、越冬となると凍結温度に曝される時間は、もっと長期間となる。実際に、長時間、ある凍結温度に曝すと短時間では問題なく生存できていた温度でも傷害が発生することが報告されている³⁾。このような研究報告はまだ少なく、傷害が助長される原因は細胞内外に濃縮される溶質によるものであろうと推定はされているが、短時間的な凍結耐性の研究と比較すると、傷害および耐性メカニズムはほとんど分かっていない。

さて、上記の記述だと耐性メカニズムを研究する場合、必ず傷害の研究とセットという考え方であり、実際、これまでの凍結耐性の研究は、ある特定の耐性メカニズムはある特定の傷害に対してのみ働くということが仮定されてきた。凍結耐性および凍結傷害に関する細胞生理学的な研究は、凍結に強い植物と弱い植物の比較研究であったが、それらの研究から示されたことは、凍結耐性の大きさと細胞膜に傷害が生じている率に高い相関関係が見いだされる、ということであった⁴⁻⁶⁾。そこから導き出される一つの可能性は、凍結傷害が生じる場合、初発部位は細胞膜であるがゆえに植物細胞の凍結ストレス耐性の高さは細胞膜の機能と構造に依存する、というものであった。確かに、細胞膜が壊れれば細胞の生存は困難となることは想像されやすく、この仮説は広く受け入れられてきた。さて次に、凍結傷害と凍結耐性メカニズムとの関係についての研究で、非常に重要な位置を占める「低温馴化」と呼ばれる現象について述べる。

低温馴化から凍結耐性メカニズムを考える

温帯以北や高地山岳地帯など、冬季に温度が氷点下になる地域は地球上に多数存在する。このような地域で暮らす植物は、秋から冬にかけての気温低下や日長短縮に反応し、様々な生理学的な変化が生じ、凍結下で生きることが可能になる¹⁾。この現象は低温馴化もしくはハードニングと呼ばれ、寒冷地域に

生育する植物にとって、必要不可欠な生理現象である。見た目の最も顕著な変化は、細胞壁が厚くなり、植物体そのものが堅くなることである（“ハードニング”の由来）¹⁾。また、細胞レベルでの変化も顕著であり、1) 細胞内での適合溶質すなわち、ベタイン、ショ糖やラフィノース等の糖類、プロリン等のアミノ酸などの蓄積、2) 低融点脂質の相対的な増加（脂肪酸側鎖における不飽和化増加など）、3) デハイドリン等の親水性タンパク質の増加、4) 細胞膜タンパク質の組成変化、5) 氷核形成阻害物質などの氷晶制御物質の増加、6) 小胞体の増加、などがこれまで報告されてきた^{1,5-10)}。このような生理学的変化は、基本的には特異的な遺伝子群の発現によりもたらされると考えられている。

これらの変化は凍結耐性の上昇や凍結中の生命活動に関係していると考えられる一方、どのような機構で働き、また、どの程度凍結耐性そのものに貢献しているかは未だによく分かっていない。しかし、これらの低温馴化における変化は、基本的には越冬に関与するものと考えられ、直接的に凍結耐性増大に関与するものもその一部として含まれるであろうと考えられる。いくつかの研究グループは、これまで「凍結傷害の初発部位は細胞膜である」という実験結果に基づく仮説より「植物の最大凍結耐性は、凍結下における細胞膜の安定性が重要である」という予想を立て、さらに「低温馴化過程における細胞膜の組成変化には、直接細胞膜の凍結安定性を増大させるものが含まれる」というアイデアを基に実験を進めてきた。

細胞膜は、大まかには脂質とタンパク質という2種の成分より構成されている。細胞膜成分と凍結耐性との関連性に着目した初期の研究は脂質成分の分析に集中していた。この理由としては、膜の物理化学的性質は脂質成分によりある程度説明できることもあったが、タンパク質解析が現実的ではなかったこと、すなわち、細胞膜を構成するタンパク質の種類があまりにも多いのに対し同定するためには多量のタンパク質量が必要であったことによる。しかし、シロイヌナズナのゲノム解析が終了したことにより、質量分析計を利用したタンパク質の微量同定が可能となり、タンパク質の網羅的解析、いわゆるプロテオーム解析が出来るようになったことにより状況は大きく変わった。加えて幸運なことに、シロイヌナ

ズナは低温馴化する植物であり、また、馴化日数も1週間あれば十分なものであった⁸⁾。

これまで我々は、低温馴化で増減する細胞膜タンパク質を多数同定し、その中で機械的ストレス耐性に関与するシナプトタグミンや脱水ストレス耐性に関与するデハイドリン等があることを見出してきた⁸⁾。特に、シナプトタグミンについては、ある程度分子的なメカニズムも含めて凍結耐性との関連性を明らかに出来たので次に述べる。

氷晶による機械的ストレスと耐性メカニズム

植物シナプトタグミン SYT1 は、シロイヌナズナの細胞膜画分中に、低温馴化過程において増加する膜タンパク質として見つかった⁸⁾。元々シナプトタグミンは動物細胞において研究されてきた膜タンパク質であり、カルシウム依存性エキソサイトーシスにおけるカルシウムセンサーとして働くことが示されてきた¹¹⁾。その後、機械的ストレス耐性に必須である細胞膜修復と呼ばれる現象にも関与することも報告された。細胞膜修復とは、機械的ストレスにより細胞膜に損傷（軽い損傷ではなく“穴”が開くという重い損傷）が生じた場合、1) 細胞外からカルシウムが流入し、2) カルシウム依存的なエキソサイトーシスが活性化し、3) 内膜小胞が“穴”もしくは“穴近傍”に融合し、その結果、4) 損傷した箇所が修復される、という細胞レベルでの生理現象である。今なお、修復に関するメカニズムは具体的には判明していないが、シナプトタグミンはカルシウム依存的なエキソサイトーシスに関与している。

低温馴化過程において、シナプトタグミンのような膜タンパク質が増加するという結果は、凍結耐性メカニズムに膜修復のような機構に関与する、という可能性を示唆する。そこで我々は、この可能性を作業仮説として、まずは、分子遺伝学的な実験も行ったやすいシロイヌナズナを用いて実験を進めてきた¹²⁾。最初に取り組んだ実験は、膜修復には必ずカルシウムが必要とされるため、凍結耐性におけるカルシウム依存性を調べることであった。その結果、シロイヌナズナにおける凍結耐性の約半分ほどがカルシウム依存性であることが明らかとなった。さらに解析を進めたところ、このカルシウム依存的な凍結耐性は、1) 凍結機械的ストレスに対する可能性が

Table 1. Effect of extracellular calcium and anti-SYT1 antibody on the cell survival (%) in leaf section after freeze/thaw treatment^{1,2}.

		Ca ²⁺	+	-	+	+
		anti-SYT1	-	-	+	+
		antigen	-	-	-	+
Winter rye	Nonacclimation (Survival at -12°C)		54 ± 5 ^a	11 ± 3 ^b	26 ± 4 ^b	58 ± 5 ^a
	Cold acclimation for 28 days (Survival at -20°C)		72 ± 4 ^a	34 ± 3 ^b	46 ± 5 ^b	74 ± 3 ^a
Winter wheat	Nonacclimation (Survival at -8°C)		50 ± 3	42 ± 3	43 ± 5	55 ± 5
	Cold acclimation for 28 days (Survival at -8°C)		75 ± 5 ^a	51 ± 3 ^b	57 ± 4 ^b	86 ± 4 ^a
Spring oat	Nonacclimation (Survival at -8°C)		59 ± 3 ^a	21 ± 3 ^b	26 ± 4 ^b	69 ± 3 ^a

¹Survivals were measured according to the method previously described¹¹⁾.

²Different letters indicate statistically significant differences between treatments by one-way ANOVA with Tukey-Kramer multiple comparison test (P < 0.01).

高いこと、2) 分子メカニズムとして膜修復である可能性が高いこと、3) 植物シナプトタグミン SYT1 が必須分子であることが明らかとなった。

研究当初、この凍結耐性における膜修復メカニズムは新奇な知見であったため、シロイヌナズナにおいてしか情報が得られていなかった。しかし、現在までに、少なくともカルシウム依存的凍結機械的ストレス耐性に関しては、双子葉植物ではクイモ、単子葉植物ではコムギ、ライムギおよびカラスミギと計5種の植物での存在が確認できた (Table 1 および文献¹³⁾)。また、そのメカニズムとして、シナプトタグミンを介した細胞膜修復であることが、抗シロイヌナズナ SYT1 抗体を用いた実験により、3種の単子葉植物においても確認された (Table 1)。それぞれの植物の凍結耐性に占めるカルシウム依存度についてはそれぞれ異なるものの、幅広い植物種において、凍結耐性メカニズムとしてのカルシウム依存的な細胞膜修復機構が示された。この事実は、凍結下において植物は普遍的に凍結機械的ストレスに曝され、また、その耐性のメカニズムとして細胞膜修復機構を用いている、という可能性をより確かなものとする。

今後、膜修復の観点から凍結耐性メカニズムの研

究を進める方向性としては、より一般性を広げる方向と、分子的メカニズムをより詳細に解析する方向の2つが考えられる。一般性に関しては、まだ木本植物では調べられていないのでそこまで広げること、また、進化的な視点を得るためには、凍結耐性のない熱帯・亜熱帯性植物においてもカルシウム依存的な機械的ストレス耐性を調べるのが興味深い課題となる。分子メカニズムとしては、シナプトタグミン以外の分子も多数関与すると予想されるため、それらの同定を進めることが重要な課題となる。加えて、膜修復は事後的な耐性メカニズムであるため“耐性”の現場を見られる可能性が非常に高く、修復の可視化もまた重要な課題となるであろう。

謝 辞

本研究の一部は、岩手大学21世紀COEプログラム、および、科学研究費補助金 (#22780288, #22120003) の援助により実施された。

文 献

- 1) Levitt, J.: "Responses of Plants to Environmental Stresses", Ed 2nd., Vol. 1, Academic Press, New York (1980)
- 2) Yamada, T., Kuroda, K., Jitsuyama, Y., Takezawa, D., Arakawa, K. and Fujikawa, S.: Roles of the plasma membrane and the cell wall in the responses of plant cells to freezing. *Planta*, **215**, 770-778 (2002)
- 3) Nagao, M., Arakawa, K., Takezawa, D. and Fujikawa, S.: Long- and short-term freezing induce different types of injury in *Arabidopsis thaliana* leaf cells, *Planta*, **227**, 477-489 (2008)
- 4) Fujikawa, S., Jitsuyama, Y. and Kuroda, K.: Determination of the role of cold acclimation-induced diverse changes in plant cells from the viewpoint of avoidance of freezing injury. *J. Plant Res.*, **112**, 237-244 (1999)
- 5) Steponkus, P.L., Uemura, M. and Webb, M.S.: A contrast of the cryostability of the plasma membrane of winter rye and spring ort-two species that widely differ in their freezing tolerance and plasma membrane lipid composition, *In* "Advances in Low-Temperature Biology, vol. 2", Steponkus, P.L., ed., JAI Press, London, p.211-312 (1993)
- 6) 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)
- 7) Takagi, T., Nakamura, M., Hayashi, H., Inatsugi, R., Yano, R. and Nishida, I.: The leaf-order-dependent enhancement of freezing tolerance in cold-acclimated *Arabidopsis* rosettes is not correlated with the transcript levels of the cold-inducible transcription factors of CBF/DREB1, *Plant Cell Physiol.*, **44**, 922-931 (2003)
- 8) 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)
- 9) Kasuga, J., Hashidoko, Y., Nishioka, A., Yoshida, M., Arakawa, K. and Fujikawa, S.: Deep supercooling xylem parenchyma cells of katsura tree (*Cercidiphyllum japonicum*) contain flavonol glycosides exhibiting high anti-ice nucleation activity, *Plant Cell Environ.*, **31**, 1335-1348 (2008)
- 10) Fujikawa, S. and Takabe, K.: Formation of multiplex lamellae by equilibrium slow freezing of cortical parenchyma cells of mulberry and its possible relationship to freezing tolerance, *Protoplasma*, **190**, 189-203 (1995)
- 11) McNeil, P.L. and Kirchhausen, T.: An emergency response team for membrane repair, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **6**, 499-505 (2005)
- 12) 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)
- 13) 金子智志, 山崎誠和, 上村松生, 河村幸男: 植物におけるカルシウム依存的凍結耐性の普遍性, *低温生物工学会誌*, **56**, 71-76 (2010)