

総説

植物の低温感知と馴化の制御: 植物の冬季感知の理解に向けて

開 勇人^{1,*}, 上村松生^{1,2}, 河村幸男^{1,2}

¹岩手大学大学院連合農学研究科

²岩手大学農学部植物生命科学科

*現 岩手医科大学医歯薬総合研究所

Temperate plants enhance their freezing tolerance before winter to survive in freezing environment. Plants use the cytosolic transient Ca^{2+} concentration change as a kind of signal to regulate gene expression in cold acclimation process. We developed the experimental system for observation of Ca^{2+} signal during cooling, and observed Ca^{2+} signal to understand “how plants sense cold and seasonal changes.” We found several characteristics of Ca^{2+} signal and cold sensing. For example, plants adjust the Ca^{2+} signal to the ambient temperature to response small temperature decrease, and then small temperature fluctuation induces the cold-inducible transcription factor DREB1/CBFs expression via Ca^{2+} signals.

Cold acclimation / Calcium signal / Cold sensing / Season / Cooling / Yellow Cameleon 3.60

1. はじめに

冬期に零下となる温帯以北で越冬する植物は、低温・凍結への耐性を上昇させる低温馴化という仕組みを持つ。自然条件では、秋や初冬の弱い低温や日長の短縮を植物が経験することで、低温馴化が誘導され、致死的な低温・凍結に備えて耐性を上昇させると考えられている¹⁾。

細胞内の凍結はどのような生物でも致死的であるため、凍結耐性のある植物は、例外なく、氷点下では細胞の外で氷晶が形成される。氷晶が形成されると、氷と水の化学ポテンシャル差により細胞内から細胞外への水の移動が生じる。その結果、細胞は脱水ストレスおよび氷晶成長による機械ストレスが組み合わさった複合的なストレスに曝される。しかし、植物は低温馴化プロセスにおいて細胞内糖濃度の上昇や細胞膜の脂質やタンパク質の質的变化などを進め、これらのストレスに対する耐性を獲得すると考えられている²⁾⁻⁶⁾。

低温馴化プロセスの最初のステップとして、低温の感知がある。植物では、依然、低温受容体タンパク質の報告はないが、低温による細胞膜の流動性の低下や⁷⁾、可逆的な代謝物質の温度によるバランスの変化などで温度を感知している可能性も考えられている。

したがって、植物がどのような分子メカニズムで低温を感知し季節を知るのか、という疑問に答えるには、低温感知に関する細胞レベルでの情報を一つずつ丁寧に集め、その特性を調べることが近道の一つである。

植物の細胞が温度低下を受けると細胞内 Ca^{2+} 濃度の一時的な変化 (Ca^{2+} シグナル) が誘導される⁸⁾⁻¹¹⁾。 Ca^{2+} シグナルは温度変化によって様々な波形を示すため、植物がどのように温度低下を感知しているかの大きな手がかりとなりうる。本稿では、 Ca^{2+} シグナルに着目した植物の低温感知・冬季感知について紹介したい。

2. カルシウムシグナルの観察方法

Ca^{2+} のライブイメージングにはいくつかの方法がある。簡便な方法として、Fura-2 などの蛍光試薬を用いる方法がある。動物細胞であれば、他にも多くの Ca^{2+} センサーとなる蛍光試薬が利用可能である。一方で、植物細胞は細胞壁や発達したクチクラ層の存在によって、蛍光試薬が細胞質に入りにくいという課題がある。1991年に、英国の Knight 博士らは、 Ca^{2+} センサーである発光タンパク質 Aequorin を発現させたシロイヌナズナを CCD カメラで捉える方式を確立した⁸⁾。

Cold Sensing in Cold Acclimation Process: for Understanding the Season Sensing of Plants

Hayato HIRAKI^{1,*}, Matsuo UEMURA^{1,2} and Yukio KAWAMURA^{1,2}

¹The United Graduate School of Agricultural Sciences, Iwate University

²Plant-bioscience, Faculty of Agriculture, Iwate University

*Present Address: Division of Biomedical Research & Development, Institute of Biomedical Sciences, Iwate Medical University

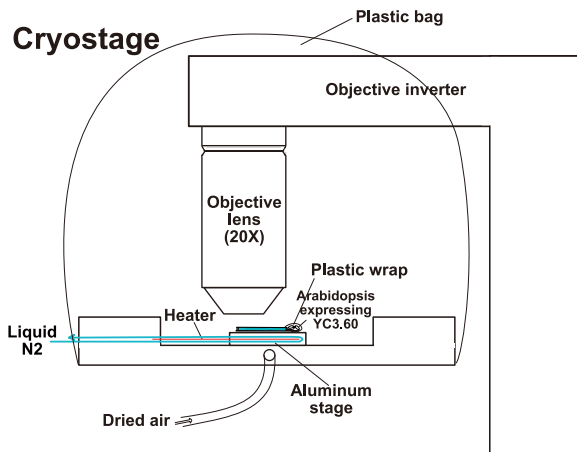


図 1
低温ステージの倒立型顕微鏡へのセッティング。

彼らの方法の利点は、観察視野が広く、植物体全体の Ca^{2+} シグナルを観察可能である点である。当初は冷水を加えることで低温刺激を与えていたが、後に Knight 博士らのグループは、温度変化をプログラムしたウォーターバスにフロートを取り付けた植物を浮かべて冷却する方法や、灌流する Buffer で根のみを冷却する方法を開発し、正確な温度制御の下で植物における低温誘導性 Ca^{2+} シグナルの観察に成功している^{9),10)}。

我々が採用したのは、蛍光タンパク質である Yellow Cameleon 3.60 を発現させたシロイヌナズナ¹²⁾を冷却装置を備えたレーザー共焦点顕微鏡で観察する方法であり、従来よりも高感度にシグナルを捉えられるようになった。ただし、 Ca^{2+} 濃度を定量するには、細胞内の Ca^{2+} 濃度を強制的に調節し、蛍光比の最大値 (R_{\max}) および最小値 (R_{\min}) を計測する必要がある。しかし、シロイヌナズナにおいて R_{\max} を求めることは、ionomycin や A23187 などのイオノフォアを用いても困難であった。そのため、我々を含み、植物で Yellow Cameleon を用いている研究者の多くは、蛍光強度比の経時変化を Ca^{2+} シグナルとして示している¹¹⁾⁻¹⁴⁾。

植物の冷却を行いつつ蛍光観察を行うため、低温ステージ (図 1; THMS600; Linkam Scientific Instruments, Ltd.) あるいは低温チャンバーを用いた (図 2)。低温ユニットは、エタノールサーキュレーター (Ministat 230 with Pilot ONE; Huber Kältemaschinenbau GmbH) と、ジャケットビーカー (Asahi Glassplant Inc.) を組み合わせた冷却装置である。これらの冷却装置をレーザー共焦点顕微鏡 (C2si, Nikon Co.) と組み合わせた。また、倒立型のレーザー共焦点顕微鏡を用いたため、オブジェクティブインバーター (300T; LSM TECH) により光路を 180° 反転させた。低温ステージは根の観察に用いられた。シロイヌナズナの根の部分は $100\ \mu\text{l}$ の緩衝液とともに 2 枚のライドガラスに封じ

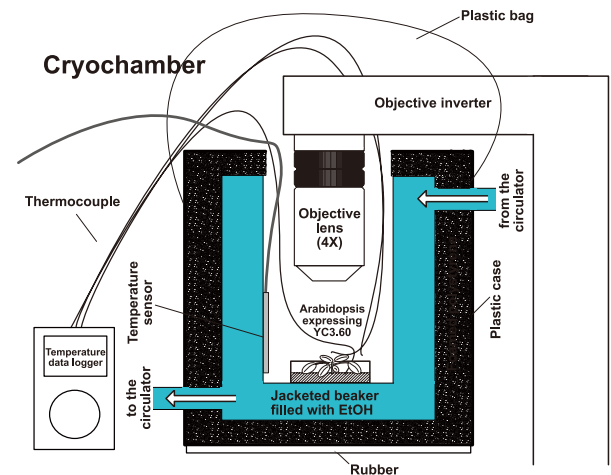


図 2
低温チャンバーの仕組みとセッティング。

られており、緩衝液と共に冷却される。地上部はライドガラスの外に出ており、プラスチックラップで乾燥を防いでいる。このサンプルは、液体窒素とヒーターによって温度が制御されるアルミ製ステージの上に置かれ、冷却・観察される。一方、低温チャンバーを用いた観察では、寒天培地ごとペトリ皿に移したシロイヌナズナの第 5 葉を直上から観察する。低温チャンバーは、植物の周囲を冷却されたエタノールが循環することで冷却を行う。いずれの方法も、植物を傷つけず、かつ低温以外の刺激を与えることがないため、自然の状態に近いまま冷却できる。したがって、得られる Ca^{2+} シグナルの信頼性は高いと考えられる。

3. カルシウムシグナルと低温馴化

色々な冷却パターンにより、植物細胞はそれぞれ異なる Ca^{2+} シグナルの波形を示す。その性質を利用し、我々は植物がどのように低温を感知しているかを、 Ca^{2+} シグナルを観察することで帰納的に明らかにすることを目標とし、研究を行ってきた。

Ca^{2+} シグナルの波形は、冷却の継続時間と、温度の下がり幅に大きく依存する。例えば、冷却が停止すると、それまで現れていた Ca^{2+} シグナルの一切が中断され、平常の Ca^{2+} 濃度まで急激に減少する。同様に、温度の下がり幅が小さく、すぐに冷却が終わってしまうと、 Ca^{2+} シグナルは大きく上昇する前に中断され、小さなピークを持つシグナルとなる。これらの結果は、主に低温ステージ (図 1) を用いた根の観察によって得られた。低温ステージでは、根は少量の液中に封じ込められ、熱伝導のよい状態で温度制御がなされている。そのため、僅かな温度変化による Ca^{2+} シグナルの変化も明確に観察できる。一方、低温チャンバーは空

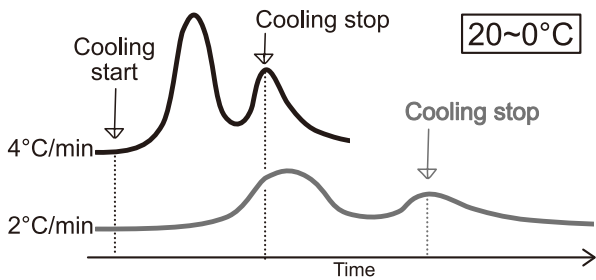


図3 異なる冷却速度で誘導される Ca^{2+} シグナルの特徴（模式図）。

気を介して植物体を冷却するため、冷却停止の時点を見極めるのが難しい。しかし、熱電対で計測した植物体周辺の温度から冷却速度を計算すると、確かに冷却速度が0になった直後に、葉における Ca^{2+} シグナルの急激な低下も観察された。したがって、植物にとっては、温度低下がどのくらい継続したか、という情報は極めて鋭敏に感知されていることが窺える¹³⁾。

ピークの数や温度の下がり幅によって決定される。温度の下げ幅を 20°C に固定し、冷却速度を 4°C 毎分から 2°C 毎分のように遅くすると、冷却時間は2倍に長くなるが Ca^{2+} シグナルの波形もおおよそ2倍程度に引き延ばされ、ピークの数に変化はない（図3）。

植物が周囲の温度環境に“どの程度順応しているか”，という生理状態も Ca^{2+} シグナルの波形に大きな影響を与える。 23°C で一週間生育したシロイヌナズナを 2°C の環境に置き、約10分後に -2°C まで冷却すると、小さなピークしか示さない。一方、 2°C の低温馴化を一週間行ったシロイヌナズナは、同じ冷却に対して倍以上の大きさのピークを示した。低温馴化により植物細胞は細胞膜脂質の構成成分を変え、低温下での膜の流動性を安定化させる⁴⁾⁻⁶⁾。すなわち、細胞膜の流動性が Ca^{2+} チャネルに影響し、その結果、 Ca^{2+} の流入が調節された可能性が考えられる¹³⁾。

上記の我々の実験系では、これまでの報告と比べるとはるかに緩やかな冷却条件で Ca^{2+} シグナルが観察されている。しかし、野外と比べると、依然、冷却速度は速い。9月から3月における野外気温の温度下げ幅は1分間に 0.5°C 以下がほとんどである。一方、野外での温度変化の特徴は、上下振動を伴いながら変化することである。そこで、毎分約 0.5°C の速さで、 20°C から 16°C の間で温度の上下振動を植物に与えながら、葉における Ca^{2+} シグナルの観察を行った。その結果、温度低下の度に僅かではあるがピークが観察された。

以上のように、植物は野外では温度低下に伴う温度振動を低温感知に利用し、低温馴化を調節している可能性が浮かび上がってきた。そのことを検証するため

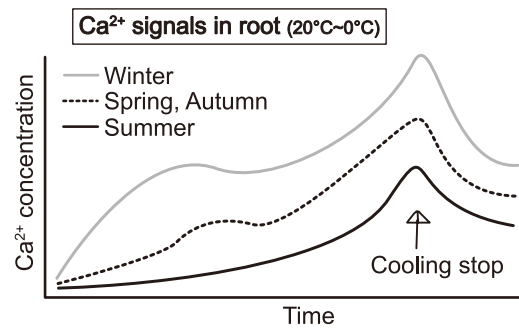


図4 Ca^{2+} シグナルが示す季節性（模式図）。

に、阻害剤を利用した野外実験を行った。冬季にペトリディッシュで生育したシロイヌナズナをそのまま野外に設置し、 Ca^{2+} シグナルを阻害した区とコントロール区で遺伝子発現を比較した。その結果、温度振動の激しい時期における *DREB1/CBF*（低温馴化のマスター転写因子）の発現制御は、 Ca^{2+} シグナルの影響を大きく受けていることが示唆された¹³⁾。温度振動の大きさや頻度は秋や春などの季節の変わり目で高いことから、 Ca^{2+} シグナルによる低温馴化の制御は、十分な低温になっていない秋や春に特に関与し、その時に、低温馴化の誘導もしくは維持に働いていると推察される。

4. 根におけるカルシウムシグナルの季節性

我々は、 20°C から 0°C 、 2°C 毎分の速さの冷却で誘導される Ca^{2+} シグナルを基準として、およそ5年にわたり様々な条件で観察を行ってきた。その中で、基準となる Ca^{2+} シグナルの波形が、季節により変化する現象を見出した。主に冬季においては、先行研究などでも報告のある、2つのピークを持つ Ca^{2+} シグナルが観察された^{9),14)}。これを冬型 Ca^{2+} シグナルとする。一方、夏季には、冬型 Ca^{2+} シグナルの1つ目のピークをなくし、2つ目のピークを半減させたような Ca^{2+} シグナルが観察された。これを夏型 Ca^{2+} シグナルとした。さらに、春秋において、冬型、夏型 Ca^{2+} シグナルの中間のような Ca^{2+} シグナルが誘導されることを認めた（図4）。また、 Ca^{2+} シグナルだけではなく、凍結試験での生存率にまで季節の影響が見られた¹⁴⁾。

上記の実験で注目すべきことは、これらの季節性が、我々の研究室内に設置された人工気象機内で生育された植物で見られたことである。すなわち、植物は光・温度・湿度以外の要素を用いて季節変化を感知していることが示唆される。外気に含まれ、植物に対し生理作用を持つ物質が原因物質であると考え、エチレンガスやエチレンの前駆体である1-アミノシクロプロパン-1-カルボン酸（ACC）の添加実験を行った。

その結果、完全ではないものの、冬型 Ca^{2+} シグナルの再現に成功した。したがって、 Ca^{2+} シグナルの季節性を誘導する物質の一つとして、エチレンが有力であると結論づけた¹⁴⁾。また、大気中のエチレン濃度は、日射による分解のために¹⁵⁾、冬季に高く夏季に低くなりがちであることも、我々の結論と矛盾しない。一方で、エチレンだけでは説明のできない観察例も散見されたため、 Ca^{2+} シグナルの季節性にはエチレン以外の物質の関与も考えられる。例えば、一酸化窒素 (NO) も季節によって大気中の濃度が変動し^{16),17)}、植物の凍結耐性の獲得プロセスに関与するとの報告があり¹⁸⁾⁻²⁰⁾、有力な候補となりうる。

以上の知見から、植物の冬季感知は、温度や日照時間の短縮などに限らず、大気中の化学物質なども併せた複合的なものである可能性が示唆された。

5. おわりに

植物は温度変化を厳密に Ca^{2+} シグナルに写し取って、その情報を基に遺伝子発現を制御していると考えられる。植物の言語とまで例えられる Ca^{2+} シグナルの解釈は、応用的にも価値があるように思う。

植物は低温だけではなく、大気中の化学物質の変化を感じ取り、遺伝子発現の制御に用いることが示唆された。ヒトで言うところの、冬の匂いとでも形容すべきもののさえ、植物は感知しているということになる。低温馴化に関する研究に取り組む植物生理学者の多くは、人工気象機を用いて年中低温馴化の研究を行っている。低温馴化の遺伝子発現の制御が、研究室内に侵入してくる空気に含まれている物質によって影響を受けるのであれば、それを考慮して結果を解釈していく必要があると考えられる。

本稿では低温感知・冬季感知を Ca^{2+} シグナルの視点から論じたが、他の視点や他の感知機構においても複数の経路によって遺伝子発現が制御されていることが予想される。冗長性に富むシステムは、移動することのできない植物が、その場所で生き抜くために進化した特徴だろう。

文 献

- Levitt, J. (1980) Academic Press, New York.
- Koster, K. L., Lynch, D. V. (1992) *Plant Physiol.* **98**, 108-113. DOI: 10.1104/pp.98.1.108.
- Steponkus, P. L. (1984) *Annu. Rev. Plant Physiol.* **35**, 543-584. DOI: 10.1146/annurev.pp.35.060184.002551.
- Uemura, M., Yoshida, S. (1984) *Plant Physiol.* **75**, 818-826. DOI: 10.1104/pp.75.3.818.
- Uemura, M., Yoshida, S. (1984) *Plant Physiol.* **75**, 31-37. DOI: 10.1104/pp.75.1.31.
- Lynch, D. V., Steponkus, P. L. (1987) *Plant Physiol.* **83**, 761-767. DOI: 10.1104/pp.83.4.761.
- Sangwan, V. *et al.* (2001) *Plant J.* **27**, 1-12. DOI: 10.1046/j.1365-313x.2001.01052.x.
- Knight, M. R. *et al.* (1991) *Nature* **352**, 524-526. DOI: 10.1038/352524a0.
- Knight, H., Knight, M. R. (2000) *J. Exp. Bot.* **51**, 1679-1686. DOI: 10.1093/jexbot/51.351.1679.
- Plieth, C. *et al.* (1999) *Plant J.* **18**, 491-497. DOI: 10.1046/j.1365-313X.1999.00471.x.
- Krebs, M. *et al.* (2012) *Plant J.* **69**, 181-192. DOI: 10.1111/j.1365-313X.2011.04780.x.
- Yuan, F. *et al.* (2014) *Nature* **514**, 367-371. DOI: 10.1038/nature13593.
- Hiraki, H. *et al.* (2019) *Plant Cell Physiol.* **60**, 303-317. DOI: 10.1093/pcp/pcy210.
- Hiraki, H. *et al.* (2019) *Physiol. Plant.* in press. DOI: 10.1111/ppl.13019.
- Altuzar, V. *et al.* (2001) *Anal. Sci.* **17**, s541-s543. DOI: 10.14891/analscisp.17icpp.0.s541.0.
- Ono, M. *et al.* (1987) *Nihon Eiseigaku Zasshi* **42**, 922-932. DOI: 10.1265/jjh.42.922.
- Kasparoglu, S. *et al.* (2018) *Atmos Pollut. Res.* **9**, 1009-1020. DOI: 10.1016/j.apr.2018.03.005.
- Catalá, R. *et al.* (2014) *Plant Cell* **26**, 3326-3342. DOI: 10.1105/tpc.114.127605.
- Shi, Y. *et al.* (2012) *Plant Cell* **24**, 2578-2595. DOI: 10.1105/tpc.112.098640.
- Costa-Broseta, Á. *et al.* (2019) *J. Exp. Bot.* **70**, 3283-3296. DOI: 10.1093/jxb/erz115.



開 勇人

開 勇人 (ひらき はやと)

岩手医科大学医歯薬総合研究所医療開発研究部門 助教

2019年岩手大学大学院連合農学研究科修了。博士(農学)。2019年より現職。

研究内容: 植物の低温馴化における Ca^{2+} シグナルと遺伝子発現 (現在ががん研究)

連絡先: 〒028-3694 岩手県紫波郡矢巾町医大通一丁目 1-1

E-mail: hiraki@iwate-med.ac.jp



上村松生

上村松生 (うえむら まつお)

岩手大学農学部植物生命科学研究科教授

1984年北海道大学理学研究科修了。理学博士。1999年より現職。

研究内容: 植物の寒冷適応分子機構

連絡先: 〒020-8550 岩手県盛岡市上田三丁目 18-8

E-mail: uemura@iwate-u.ac.jp
URL: <http://news7a1.atm.iwate-u.ac.jp/~crrdbbt/>



河村幸男

河村幸男 (かわむら ゆきお)

岩手大学農学部植物生命科学研究科准教授

2000年北海道大学地球環境科学研究科修了。博士(地球環境)。2005年より現職。

研究内容: 植物の低温生理学

連絡先: 同上

E-mail: ykawa@iwate-u.ac.jp

URL: 同上