

	スギタ ケンジ
氏 名	杉田 健史
本籍（国籍）	滋賀県
学位の種類	博士（農学）
学位記番号	連研第 867 号
学位授与年月日	令和 6 年 9 月 2 5 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 生物資源科学専攻
学位論文題目	Mechanism of how plants survive freezing temperatures in winter ～ The effects of freezing and light on cold acclimated plants ～ （植物が冬の凍結を耐えるメカニズム ～低温馴化植物における明所での凍結処理が凍結耐性に及ぼす影響 ～）
学位審査委員	主査 岩手大学准教授 河村 幸男 副査 岩手大学准教授 川原田 泰之 副査 弘前大学准教授 笹部 美知子 副査 山形大学准教授 宮城 敦子 副査 岩手大学名誉教授 上村 松生 副査 埼玉大学助教 高橋 大輔

論 文 の 内 容 の 要 旨

英語

Overwintering plants have a mechanism called cold acclimation (CA), in which freezing tolerance is enhanced by low temperatures as a trigger. CA plants acquire further freezing tolerance when they experience mild sub-zero temperatures such as -2, -3 °C. This phenomenon has been known as second-phase cold hardening (2PH) or sub-zero acclimation (SZA). Several studies have revealed details of the CA process at the molecular level. For example, rapid transient expression of C-repeat binding factors (CBFs, a type of transcription factor) induces the expression of cold-regulated (COR) genes to acquire freezing tolerance. Furthermore, light is one of the physiological conditions to induce CA by requiring not only for pathways involving photosynthesis, but also as a signal for pathways triggered by photoreceptors including phytochrome (PHYB) and cryptochromes for enhanced freezing tolerance. In addition, it has been reported that the plants accumulate sugars as compatible solutes through photosynthesis during CA process. However, compared to studies on CA study, there have been few reports on 2PH and SZA, and it has not been clarified whether the molecular pathway is the same or different from that of CA process. For example, no previous studies have examined the effect of light on the 2PH and SZA process. One of the slow research projects is that it is difficult to construct a experimental system such as maintaining plants at sub-zero temperatures and freezing them under light conditions. For this study, we constructed a chamber capable of maintaining negative temperatures even under light conditions. Using this chamber, we have shown that freezing itself, rather than sub-zero temperatures, contributes more to this phenomenon and I termed second phase freezing acclimation (2PFA). Here, I explored the physiological conditions and molecular mechanism of 2PFA plants.

To confirm the physiological conditions required for 2PFA, the model plant *Arabidopsis thaliana* was subjected to 1 week of CA at 2°C under a 12-h light/12-h dark photoperiod, followed

by freeze treatments with different number of treatment days under a 12-h light/12-h dark photoperiod or dark conditions at -2°C . As a Freezing tolerance test, plates growing plants were placed vertically in the dark in an controlled-temperature chamber, in which were rotated at 1 rpm to equalize all plates temperatures through air circulation by the fan. The temperature was gradually lowered to -22°C at $-2^{\circ}\text{C h}^{-1}$ in the dark, then plates were taken out at the specified temperature. Plants were transferred to a growth chamber at 23°C with a 16-h light/8-h dark photoperiod. The plants were kept under these conditions for 1 day to allow thawing, and then the survival rate was measured. The survival rate of plants was based on the percentage decrease in the area where photosynthetic activity was calculated from the maximum photochemical efficiency of photosystem II (PSII) (F_v/F_m) after the plants were allowed to recover for 1 day under 23°C and 16 h daylength. LT_{50} was calculated by linear regression using data from the two temperatures spanning the interval from less to more than 50% damage. As a photosynthetic electron transfer inhibitor, 3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea (DCMU) treatment, the CA plants were misted twice with 0.5% v/v ethanol with or without $50\ \mu\text{M}$ DCMU. After 1 h, the plants were transferred into the freezing chamber at -2°C for 3 days under dark conditions or a 12-h light/12-h dark photoperiod as 2PFA treatment.

The results show that, to achieve the 2PFA effect, 1 days of 2PFA treatment in the dark conditions and 3 days of 2PFA treatment under the light conditions are required. Interestingly, compared with a freezing treatment in the dark conditions, a freezing treatment under light conditions had a stronger effect to enhance freezing tolerance, achieving an LT_{50} value below -20°C . Comparisons of the transcriptional profiles of several *CBF* and *COR* genes among the treatments revealed a clearly different transcriptional profile of *CBF* genes in the 2PFA treatment under the light conditions. These results indicate that the process of 2PFA and CA are different, and the 2PFA treatment induce a unique mechanism that leads to increased freezing tolerance.

To confirm the contribution of photosynthesis to the effects of light to strengthen freezing tolerance after the 2PFA treatments, I conducted experiments using photosynthetic electron transfer inhibitor DCMU. The results revealed that the plants subjected to 2PFA treatments under the light conditions in the presence of DCMU exhibited lower freezing tolerance. These results suggest that the photosynthetic electron transport pathway is involved in the effect of light to strengthen the freezing tolerance acquired after a 2PFA treatment. In addition, the results showed that, compared with wild-type plants, photoreceptor mutants *phyb* and *phototropin1,2* showed lower freezing tolerance after 2PFA treatment. Since phototropins act as positioning chloroplasts in an optimal position for photosynthesis, it is possible that phototropins relocate chloroplasts to positions with moderate light levels during 2PFA process under the light conditions. Interestingly, photosynthetic products, sugars in 2PFA plants under the light conditions were increased. Sucrose and galactinol were increased in only the 2PFA plants under light conditions. Consistently, the osmotic concentration were also increased in the 2PFA plants under light conditions, indicated that 2PFA plants under light conditions accumulate sugars as compatible solutes such as osmotic regulators to cope with freezing-induced drought stress. To investigate whether changing in sugar and osmotic concentration is involved in the photosynthetic electron transport pathway, DCMU were used during 2PFA process under light conditions. When the plants were treated with DCMU prior to 2PFA under the light conditions, the increasing of sugars and osmotic concentration was not observed. These results suggested that the 2PFA plants under light conditions increase sugar and osmotic concentration via photosynthetic electron transport pathway. Consistently, to verify the state of electron transfer under freezing by observing chlorophyll fluorescence, I constructed an experimental system using a chlorophyll fluorescence spectrometer that could measure photosynthetic activity in intact (non-destructive) frozen plants. The results showed that chloroplast electron transfer has been functioning under freezing conditions, suggesting that photosynthesis may be taking place under freezing conditions. Finally, I conducted comprehensive gene expression analysis using RNA sequencing. The RNA-seq data showed that the transcript level of genes associated with drought stress and sugar metabolism were regulated during 2PFA under the light conditions. Furthermore, 2PFA plants under light conditions regulated the transcript level of genes related to cell wall, indicated that sugars may be used for cell wall polysaccharide synthesis.

Collectively, these results showed that exposure to freezing under light conditions after CA

lead to a dramatic enhancement of freezing tolerance. Increasing of sugar concentration *via* photoreceptors and photosynthetic pathway were involved in the increasing of this significant freezing tolerance by function as osmotic regulators. It will be interesting to investigate the effect of cell wall on the increasing freezing tolerance during this phenomenon.

Most plants experience low temperatures under light conditions during the fall and early winter. After midwinter, depending on the location, some plants overwinter under snow with little light but relatively warm temperatures, while others overwinter under light conditions with little snow and severe cold. The features of the 2PFA revealed in this study are adapted to the natural conditions in which these multiple patterns occur.

日本語

越冬性草本植物には、晩秋からの0℃以上の低温を感じると凍結耐性を向上させる、低温馴化と呼ばれる機構が備わっている。また、低温馴化した植物は0℃よりも低いが傷害を受けない程度の比較的穏やかな氷点下を経験すると、更なる凍結耐性を獲得することが知られている。氷点下に伴う凍結耐性を獲得するこの現象は「Second phase of cold hardening (2PH)」や「Sub-zero acclimation(SZA)」と呼ばれてきた。しかし、室内実験での人工気象器内では、植物を氷点下で維持することや凍結させること、さらには光条件下での凍結処理といった、野外と同様の環境を構築することが難しい。そのため、低温馴化に関する研究と比較すると、2PH や SZA に関する報告はほとんど無く、低温馴化と同様の分子経路を経由するのか、もしくは異なるのかなども解明されておらず、基礎知見においても未だ不明な点が多い。このような課題を背景に、当研究室では安定して氷点下温度を制御し、さらに光環境も制御できる人工気象器の系を作成し、簡便に植物を凍結できる実験系を構築した。近年、我々はこの人工気象器を用いた生理条件の検証実験を行った結果、シロイヌナズナにおいて、氷点下に曝されることによって凍結耐性を獲得する 2PH や SZA の現象について、零下温度よりも凍結そのものが凍結耐性獲得に重要であることが示された。このことから、この現象を凍結馴化と呼ぶこととした。本博士論文では、シロイヌナズナにおける、凍結馴化の生理条件の確認とその分子メカニズム解明についてまとめた。

凍結馴化に必要な生理条件を確認するため、モデル植物シロイヌナズナを2℃12時間日長の低温馴化を1週間経験させた後、処理日数や明暗条件を変えた凍結処理を行った。また、凍結馴化後の凍結耐性の測定は、23℃16時間日長の下で植物を1日間回復させた後、光合成最大収率(F_v/F_m)をもとに光合成活性の見られる面積を測定し、その減少率を基準に行った。

実験の結果、シロイヌナズナにおいて、それぞれ暗条件で1日、明条件で3日、-2℃の凍結温度に曝すことで、凍結耐性を大幅に獲得することが判明した。興味深いことに、凍結馴化中に明所に置いた植物は、暗所での植物と比較して、より大きく凍結耐性を獲得することが判明した。そこで、明所での凍結馴化に葉緑体が関与するか否かを確認するため、光合成電子伝達阻害剤 DCMU [3-(3,4-ジクロロフェニル)-1,1-ジメチ

ル尿素]を与えた条件で、凍結馴化処理を行った。その結果、光条件下での凍結馴化中の植物に DCMU を与えた場合、凍結耐性の低下が観察された。また、明所で凍結馴化した植物の浸透圧や糖濃度を測定した結果、低温馴化植物と比較すると大幅な浸透圧及び糖濃度の上昇が見られたことから、浸透圧調節物質といった適合溶質として糖を蓄積することが示唆された。一方で DCMU の処理を行ったときにはこれらの濃度上昇が観察されなかったことから、明所での凍結馴化植物は光合成を介した適合溶質を蓄積することで凍結耐性を高めている可能性が示唆された。そこで、凍結馴化中の植物のクロロフィル蛍光測定が出来る実験系を作成し、クロロフィル蛍光を観察することにより、凍結下での電子伝達の状態を検証した。その結果、凍結環境下で葉緑体の電子伝達が機能していることが確認されたことから、凍結環境下での光合成が行われている可能性が示唆された。さらに、RNA シーケンスを用いた網羅的遺伝子発現解析を行った結果、糖代謝に関連する遺伝子の発現量が明所の凍結馴化中で上昇していることがわかった。

以上から、凍結馴化の生理条件として、暗所よりも明所でより高い凍結耐性を獲得することがわかった。また明所での凍結馴化プロセスでは、糖合成遺伝子の発現制御を介した糖の蓄積や浸透圧濃度が上昇した。

ほとんどの越冬性草本植物は、秋から初冬にかけて、明るい条件下で低温を経験する。これは、低温馴化の生理条件として光が必要であることを証明した室内実験に裏付けられる。一方で、真冬になると、場所にもよるが、雪の下で越冬するパターンもあれば、雪の少ない明るい条件下で凍結を経験しながら越冬するパターンもある。本研究で明らかになった凍結馴化の生理条件は、こうした複数のパターンが発生する自然条件に適応したものである。

論文審査の結果の要旨

越冬性草本植物は晩秋から低温を感じると低温馴化プロセスを介して凍結耐性を向上させる。さらに、低温馴化した植物は傷害を受けない程度の凍結を経験するとさらに馴化し凍結耐性を向上させる。しかし、この凍結による馴化、すなわち、凍結馴化は人工気象器による室内実験が難しいため研究報告が限定的であり、そのため、分子メカニズムや分子経路だけでなく基礎知見においても未だ不明な点が多い。このような課題を背景に、当研究室では安定して氷点下温度を制御し、さらに光環境も制御できる人工気象器の系を作成し、簡便に植物を凍結できる実験系を構築した。本研究では、シロイヌナズナを用いて凍結馴化の生理条件の確認とその分子メカニズム解明に取り組んだ。

まず、凍結馴化に必要な生理条件を確認するため、シロイヌナズナを 2°C で低温馴化させた後、処理日数や明暗条件を変えて -2°C で凍結馴化を行った。その結果、暗所でも明所でも凍結に曝すことで凍結耐性を大幅に向上させ、さらに明条件の植物は暗条件の植物よりも大きく凍結耐性を向上させることが判明した。そこで、明所での凍結馴化に葉緑体が関与するか否かを

確認するため、光合成電子伝達阻害剤 3-(3,4-ジクロロフェニル)-1,1-ジメチル尿素 (DCMU) を与えた条件で、凍結馴化を行った。その結果、DCMU 処理は明所での凍結馴化による凍結耐性の向上を阻害した。次に、明所で凍結馴化した植物の浸透圧や糖濃度を測定したところ、低温馴化植物と比較しても両者ともに大幅な上昇が見られた。その一方で DCMU の処理を行ったときにはこれらの濃度上昇が観察されなかった。以上より、明所での凍結馴化植物は光合成を介した糖を中心とした適合溶質を蓄積することで凍結耐性を高めている可能性が示唆された。次に、凍結馴化中の光合成活性を測定できる系を作成し、凍結下での電子伝達の状態を検証した。その結果、植物が凍結した状態でも葉緑体での電子伝達が機能していることが確認され、凍結下で光合成が行われている可能性が示唆された。最後に、RNA シーケンスによる網羅的遺伝子発現解析を行った結果、糖代謝に関連する遺伝子の発現量が明所の凍結馴化中で上昇していることが確認された。

以上より、凍結馴化の条件として、暗所よりも明所でより高い凍結耐性を獲得することが明らかとなった。また、この明所での凍結耐性の向上には、光合成や糖合成遺伝子の発現制御を介した糖の蓄積や浸透圧濃度が関与することが明らかとなった。本成果は、凍結馴化の分子メカニズムの解明に大きく貢献し、また、寒冷地農業への応用の基礎知見となる。

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. [Sugita K](#), Takahashi S, Uemura M, Kawamura Y (2024)

Freezing treatment under light conditions leads to a dramatic enhancement of freezing tolerance in cold-acclimated *Arabidopsis*

Plant Cell and Environment 47(8): 2971-2985

doi: 10.1111/pce.14917