

植物の耐凍性と細胞膜の凍結脱水下における安定性： 細胞膜以外の要因の影響

¹岩手大学農学部附属寒冷バイオシステム研究センター

²Department of Soil, Crop & Atmospheric Sciences, Cornell University

上村 松生¹, Peter L. Steponkus²

Relationship between Freezing Tolerance in Plant and the Stability of the Plasma Membrane during Freeze-Induced Dehydration

Matsuo UEMURA¹ and Peter L. STEPONKUS²

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

²*Department of Soil, Crop & Atmospheric Sciences, Cornell University, Ithaca, New York 14853, U.S.A.*

Effect of lipid alterations in the chloroplast envelope, manipulation of cytosolic sugar content, and expression of the cold-regulated (*COR*) genes on the cryostability of the plasma membrane was determined. All of these three factors were shown to contribute to the increase in the cryostability of the plasma membrane during freeze-induced dehydration, which consequently results in an increase in the freezing tolerance. The results suggest that the action mechanism (s) of each factor to increase the cryostability of the plasma membrane must be determined in detail.

はじめに

植物の低温馴化過程では、様々な反応が植物体内で同時進行する。それらの反応は、一見、統制もなく起こっているように見えるが、究極的には、凍結傷害発生に最も重要な鍵を握っている生体膜の凍結脱水下での安定化に寄与して、凍結耐性増大に貢献していると考えられる。全ての生体膜は凍結脱水ストレスにより影響を受けるが、その中でも、細胞膜はその選択透過性維持が細胞生存に最も重要であることから、凍結傷害発生を決定する部位であると考えられている¹⁾。今までに、我々は、低温馴化過程における細胞膜脂質組成の変動と凍結耐性増大の関

連を凍結傷害機構出現頻度の変化から解析し、その両者の密接な関係を明らかにしてきた²⁾。この報告では、細胞膜以外の要因による細胞膜の凍結脱水下での安定性増大に関して検討を行った。

結果と考察

細胞膜の凍結脱水下での安定性は、(1)低温馴化過程で起こる葉緑体包膜の脂質組成変化、(2)低温誘導遺伝子 (*COR15a*) の発現、(3)細胞質内の糖の蓄積、の3つの細胞膜以外の要因によっても大きな影響を受けることが判明した。

葉緑体包膜脂質組成：葉緑体包膜は、強度の凍結脱水により膜上から水分子が取られる過程で細胞膜と物理的に接触し、2つの膜間で致命的なヘキサゴナルII相転移や融合を引き起こすことが観察されている³⁾。膜間相互作用の発生には、膜脂質組成の物理的な性質が大きく関与することが知られていること⁴⁾から、葉緑体包膜脂質組成の低温馴化過程における

第45回低温生物工学会研究報告5。

[Key words: Cold acclimation, Freezing injury, Freezing tolerance, Membrane cryostability, Plasma membrane ; 低温馴化, 凍結傷害, 耐凍性, 低温下 (凍結下) での膜安定性, 細胞膜]

変動について、秋まきライムギ (*Secale cereale* cv. Puma) を用いて詳細に調べられた⁵⁾。

葉緑体包膜は、外膜と内膜の2つの膜からなっている。低温馴化前の植物から単離された葉緑体包膜は、糖脂質 (モノガラクトシルジアシルグリセリド [MGDG], ジガラクトシルジアシルグリセリド [DGDG], スルフォキノボシルジアシルグリセリド [SQDG]) とリン脂質 (ホスファチジルグリセロール [PG], ホスファチジルコリン [PC] など) からなる。外膜、内膜ともに、MGDGがDGDGより多く存在する。また、PCの含量は外膜の方が内膜に比べかなり多い。低温馴化後には、MGDGの減少と、それに伴うDGDGの増加が観察される。外膜のPCは若干減少する。

低温馴化過程で起こるこれら葉緑体包膜の脂質組成変化は、ヘキサゴナルII相をとりやすい脂質 (MGDG) の減少とラメラ (二重) 相をとりやすい脂質 (DGDG 及び PC) の増加を示していた。この結果は、低温馴化過程において、葉緑体包膜は凍結脱水過程で起こりうる致命的な膜-膜相互作用を押さえるように脂質組成を変化させていることを示している。

低温誘導遺伝子 *COR15a* 遺伝子産物 (COR15am) : シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) における低温誘導遺伝子 (*COR*) の一つ *COR15a* の最終産物 COR15am は、葉緑体可溶性画分に存在する熱安定性の高い酸性蛋白質である⁶⁾。 *COR15a* 遺伝子を導入し構成的に発現するようにしたシロイヌナズナ形質転換体を低温馴化することなく育成し、その葉から単離されたプロトプラストは、-4.5から-7℃の温度範囲で野生型から単離されたプロトプラストよりかなり高い生存率を示す⁷⁾。この温度範囲における凍結傷害は、ヘキサゴナルII相転移を伴う細胞膜の透過性損失によることから、*COR15a* 遺伝子産物による耐凍性増大はヘキサゴナルII相転移を押さえていることによることが示唆された。

事実、フリーズフラクチャーを用いた電子顕微鏡観察の結果は、*COR15a* 遺伝子導入形質転換体では、ヘキサゴナルII相の出現頻度が-4.5から-7℃の温度範囲で野生型より低くなっていることを示してい

た⁸⁾。従って、葉緑体中に蓄積していると考えられる COR15am は、何らかの機構により、直接接触することのない細胞膜に起こるヘキサゴナルII相の出現を押さえているということが示された。

その作用機作はいかなるものであろうか? 葉緑体包膜内膜はヘキサゴナルII相をとりやすい MGDG を大量に含むため、細胞膜-葉緑体包膜間で起こる凍結脱水で誘導されるヘキサゴナルII相転移の発生を決定していると考えられること、及び、両親媒性 α -ヘリックスをとるタンパク質 (COR15am もその一種) は、脂質と相互作用してラメラ-ヘキサゴナルII相転移温度に影響があることが知られている⁹⁾、ことを考慮に入れると以下のような仮説が浮かんでくる。つまり、凍結脱水の進行に伴い COR15am と葉緑体包膜内膜脂質の相互作用が強まり、葉緑体包膜内膜を安定化して細胞膜-葉緑体包膜間で起こるヘキサゴナルII相転移を押さえていることである。

X線回折による実験結果は、この仮説を裏付けるものであった。すなわち、COR15am とホスファチジルエタノールアミン (PE) を混合し、PE のヘキサゴナルII相の特徴をX線回折で調べた。COR15am を加えた場合、ラメラ-ヘキサゴナルII相転移温度付近でのPEのヘキサゴナルチューブの直径が大きくなることが示された⁸⁾。つまり、COR15am は、PE のラメラ相を安定化してヘキサゴナルII相転移を起りにくくしていることを示している。ただし、この差は温度が高くなるにつれてみられなくなることから、COR15am の効果はラメラ相からヘキサゴナルII相転移温度付近でのみ (つまり、相転移が開始するときのみ) で認められることになる。

細胞質に蓄積される糖: 低温馴化過程で細胞内に糖が蓄積することはよく知られている¹⁰⁾。しかし、耐凍性増大に関するその作用機作はまだはっきりしていない。 *In vitro* 実験系では、糖が脂質相挙動に大きく影響することや、糖を入れることにより脂質の液晶相-固相転移やラメラ-ヘキサゴナルII相転移温度に影響を与えることが示されている¹¹⁾。さて、細胞内での糖の効果はどのように説明できるのであろうか?

Tumanov と Trunova¹²⁾ は、コムギの実生を暗黒、2℃でショ糖溶液に浸すことにより耐凍性が上昇することを報告している。今回、この方法をシロイヌナズナ実生に応用して実験したところ、その実生から単離されたプロトプラストの耐凍性は、①ショ糖処理によって高まること、②23℃で処理したときにも耐凍性は増大するが、その増大の程度は2℃処理に比べ小さく、効果が見られる温度範囲は-5℃から-10℃に限られていること、③耐凍性増大の程度及び温度範囲はショ糖の濃度によって異なること、などが明らかになった¹³⁾。これらの結果を総合して考えてみると、①細胞が融解中に破裂して傷害を受ける機構は、低濃度のショ糖によって（つまり、様々な代謝系に必要なエネルギー源となることで）低温下で膜脂質変動が起こり、その傷害発生が減少すること、②ヘキサゴナルII相を伴う細胞膜の透過性損失による傷害機構は、糖が細胞内にたまることにより、膜-膜間相互作用が妨げられるため、減少すること、③しかし、ヘキサゴナルII相出現は、低温で起こる膜脂質変動と細胞内に蓄積する糖の両者が起こるとその防止効果が高まること、などが示唆された。

ま と め

植物細胞の凍結傷害発生を決定する第一の要因が細胞膜にあることは異論のないところであるが、傷害発生は細胞膜以外の要因によっても大きく影響を受けることが示された。従って、一見無関係に見える低温馴化過程で起こる細胞内の様々な変化は、細胞膜の凍結脱水中での不安定化を押さえる方向に働いていることを示している。今後、耐凍性増大の分子的機構を考えると、各々の要因と膜安定性の関連を詳しく検討することが必要なのかもしれない。

謝 辞

この研究の一部は、アメリカ合衆国農務省研究補助金（United States Department of Agriculture National Research Initiative Competitive Grants Program #96-35100-3163）及びアメリカ合衆国エネルギー省研究補助金（United States Department of Energy Grant #DE-FG01-84ER13214）の援助により行われた。

参 考 文 献

- 1) Steponkus, P. L.: *Annu. Rev. Plant Physiol.*, **35**, 543 (1984).
- 2) Steponkus, P. L., M. Uemura and D.V. Lynch: *Philos. Trans. R. Soc. London*, **B326**, 571 (1990).
- 3) Uemura, M., R. A. Joseph and P. L. Steponkus: *Plant Physiol.*, **109**, 15 (1995).
- 4) Marsh, D.: *Chem. Phys. Lipids*, **57**, 109 (1991).
- 5) Uemura, M. and P. L. Steponkus: *Plant Physiol.*, **114**, 1493 (1997).
- 6) Lin, C. and M. F. Thomashow: *Plant Physiol.*, **99**, 519 (1992).
- 7) Artus, N. N., M. Uemura, P. L. Steponkus, S. J. Gilmour and M. F. Thomashow: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 13404 (1996).
- 8) Steponkus, P. L., M. Uemura, J. A. Joseph, S. J. Gilmour and M. F. Thomashow: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 14570 (1998).
- 9) Epand, R. M., Y. Shai, J. P. Segrest and G. M. Anantharamaiah: *Biopolymers*, **37**, 319 (1995).
- 10) Levitt, J.: *Responses of plants to environmental stresses*, 2nd ed., Academic Press, New York (1980).
- 11) Crowe, J. H., L. M. Crowe, J. F. Carpenter, A. S. Randolph, C. A. Wistrom, B. J. Spargo and T. J. Anchordoguy: *Biochim. Biophys. Acta*, **947**, 367 (1988).
- 12) Tumanov, I. I. and T. I. Trunova: *Sov. Plant Physiol.* **10**, 140 (1963).
- 13) Uemura, M. and P. L. Steponkus: *Cryobiology* **35**, 336 (1997).