

細胞の凍結適応

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, ²岩手大学大学院連合農学研究科
上村 松生^{1, 2}, 富永 陽子¹, 鎌田 崇², 中川原千早¹, 河村 幸男¹, 小島 研一¹

Adaptation and Responses of Plant Cells to Freezing

Matsuo UEMURA^{1,2}, Yoko TOMINAGA¹, Takashi KAMATA², Chihaya NAKAGAWARA¹,
Yukio KAWAMURA¹ and Ken-ichi KOJIMA¹

¹*Cryobiosystem Research Center, Faculty of Agriculture and*
²*United Graduate School of Agricultural Sciences, Iwate University, Morioka 020-8550, Japan*

The process of cold acclimation in plants, which elicits an increase in freezing tolerance, is a complex developmental phenomenon that involves the orchestration of many different processes. Although seemingly desperate, many of the cold acclimation-associated processes ultimately contribute to the increase in cryostability of the plasma membrane, destabilization of which is the primary cause of freezing injury. To understand cold acclimation process comprehensively, we need to characterize the freeze-induced lesions that determine the freezing tolerance and then the mechanism of minimization of these freeze-induced lesions during cold acclimation. In this review, we describe the specific freeze-induced lesions in isolated protoplasts and then several important changes occurring during cold acclimation, which are associated with the minimization of the freeze-induced lesions and, hence, the increase in freezing tolerance. This approach allows us to make strategic plans for molecular breeding of cold-tolerant agricultural plants efficiently.

(Received August 18, 2004; Accepted August 25, 2004)

1. 緒 言

温帯以北を起源とする植物の多くは、秋から冬にかけての低温（0℃以上の凍結しない温度）と短日に反応して、耐凍性を増大させることはよく知られている。この現象は低温馴化（Cold Acclimation）と呼ばれ、特定の遺伝子発現を通じた様々な生理的反応が一度に起こる非常に複雑な過程である¹⁻³⁾。それらの生理的反応のうち耐凍性増大に重要なものとして、生体膜組成・機能の変動、細胞内における適合溶質（糖、アミノ酸、グリシンベタインなどの中

性低分子化合物）の蓄積、特定の凍結現象に影響を与えるタンパク質や低分子化合物の合成、などが挙げられる⁴⁾。これらの反応は、一見、多様性に富んでいるが、究極的には、植物細胞の凍結傷害が発生する際に初発部位である細胞膜の凍結脱水下での安定性の維持に貢献しているものと考えられている。

植物細胞が凍結脱水過程でどのように振る舞うかを考える際には、傷害発生と傷害回避を考慮する必要がある。植物組織（葉や塊茎など）から単離されたプロトプラスト（酵素を用いて細胞壁を分解し、細胞膜が露出した単離細胞）を材料に、凍結融解過程で発生する傷害機構の解析が精力的に行われてきた^{4, 5)}。単離プロトプラストを用いた実験系は、細胞壁を持つ細胞系や異なった細胞の集団である組織・器官系とは異なる傷害機構を持つ可能性も存在するが、凍結融解過程で細胞膜の挙動を解析するに

セミナー「生物の凍結及び凍結回避の分子機構」3.
[Key words : Freezing tolerance, Cold acclimation, Plasma membrane, Cryobehavior, Freezing injury ; 耐凍性, 低温馴化, 細胞膜, 凍結挙動, 凍結傷害]

(16)

は非常に有効な実験系である。さらに、低温馴化過程で特定の凍結傷害機構の発生頻度の変動とその発生頻度に影響を与える因子を解析することにより、複雑な植物の低温馴化機構を具体的に理解することが可能になる。本稿では、数種の植物を材料に凍結傷害、低温馴化機構を解析した今までの結果を基に、植物細胞の凍結融解過程に対する応答とその分子機構について考察してみたい。

2. 植物の凍結傷害機構

通常、野外で起こる凍結は冷却速度が比較的遅い。その場合、組織内では細胞と細胞の間にある細胞間隙に氷晶が最初に形成される（細胞外凍結）ことが多い（注：植物の組織、器官などによっては、凍結様式が異なり、器官外凍結、過冷却などを起こす植物も知られている）。はじめに細胞間隙に氷晶が形成されるのは、細胞間隙液の浸透濃度が細胞内液より低いこと、細胞間隙には氷晶核となる物質が多く存在していること、などの理由が考えられている⁶⁾。一旦氷晶が形成されると、氷晶表面に水分子が引きつけられ、氷晶は成長する。これは、同じ温度では、氷の表面における化学ポテンシャルが液体の水の化学ポテンシャルよりも低いためである。その結果、細胞内の水は細胞が気引き出され、細胞は脱水収縮を受けることになる。

細胞が凍結過程で脱水収縮すると、様々なストレスがかかる。主なものとして、温度ストレス、脱水ストレス、機械ストレス、塩濃縮ストレス、それに、酸化的ストレスなどがある⁷⁾。その中でも、脱水ストレスが細胞に生死を決定する主要なストレスであると考えられている⁸⁾。単離プロトプラストは、脱水ストレスに対して非常に良く反応し、ストレスの変動と相関して体積を変える。従って、脱水によってどの程度の物理的、化学的ストレスがかかっているのかを調べるには格好の材料と言える。

プロトプラストを用いた研究により、細胞外凍結によって起こる傷害機構が細胞レベルでは複数存在することが明らかになった^{4, 5)}。低温馴化前の耐凍性の低い細胞では、2つの凍結傷害機構が観察される。第一は、凍結温度が比較的高い場合（50%の細胞が傷害を受ける程度）で、凍結過程で収縮した細

胞が融解過程で膨張する際に破裂してしまう現象である（Expansion-Induced Lysis ; EIL）。さらに凍結温度が低くなると、細胞にかかる脱水ストレスは非常に強いものとなり、細胞の各膜系表面に結合していた水分子が失われることにより、細胞膜と細胞小器官の膜系の相互作用が発生する。その結果、膜の独立性を失い、ついには、細胞膜が本来持っている半透過性がなくなり細胞は死に至る（Loss of Osmotic Responsiveness ; LOR）。この時、細胞膜と他の細胞内膜系との相互作用の結果、生体膜が通常形成している脂質二重層が崩れ、膜内タンパク質の凝縮やタンパク質が排除された領域では通常は見られないヘキサゴナルII相という脂質相が観察される⁹⁾。

一方、低温馴化を行い耐凍性が增大すると、EIL発生頻度は急減し、凍結温度にかかわらず、細胞はLORにより傷害を受ける。しかし、傷害が発生する場合でも、低温馴化する前の細胞で観察されたヘキサゴナルII相は全く観察されない。それに変わって、明らかに2つ以上の膜系が融合した結果だと思われる微細構造（フラクチャー・ジャンプ構造）が、細胞膜近傍において高頻度で観察される¹⁰⁻¹²⁾。これらの結果は、低温馴化前後で起こる細胞内外での変動が細胞膜に関連した凍結傷害発生頻度を減少させ、その結果、耐凍性の増大がおこるということを示している。では、低温馴化過程ではどのようなことが起こっているのだろうか？

3. 低温馴化における細胞膜脂質の役割

凍結下における細胞膜の挙動を規定する要因の一つは、細胞膜組成である。細胞膜は、脂質とタンパク質の混合物である。そのうち、低温馴化（耐凍性増大）と脂質組成の関係については、多くの研究報告がある。例えば、低温馴化する多くの植物（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）では、共通して、細胞膜リン脂質含量が、単位タンパク質量当たり、20~70%も増加する（表1）。その増加は、主に、主要なリン脂質であるホスファチジルコリンとホスファチジルエタノールアミンの増加によるものであることが知られている¹³⁻¹⁵⁾。ホスファチジルコリンは水和度の高い極性基を持っていることから、その含量の増加は凍

Table 1. 低温馴化過程で見られる細胞膜リン脂質の増加

植 物	$\mu\text{mol/mg protein}$		mol% of total lipids		出 典
	馴化前	馴化後	馴化前	馴化後	
Winter rye	1.04	1.26	38.7	43.4	Uemura & Yoshida (1984)
	1.07	1.46	31.7	41.9	Lynch & Steponkus (1987)
			36.6	43.3	Uemura & Steponkus (1993)
Oat			28.9	39.5	Uemura & Steponkus (1993)
Orchard grass	1.11	1.38	50.2	53.1	Yoshida & Uemura (1984)
Jerusalem artichoke	1.15	1.50	46.9	46.9	Ishikawa & Yoshida (1985)
Arabidopsis			46.8	57.1	Uemura et al. (1995)
	0.94	1.12	51.5	55.2	Kawamura & Uemura (2000)
Mulberry	1.02	1.72	57.1	69.0	Yoshida (1984)

結脱水過程で膜表面に多くの水分子を引きつけることに貢献し、ほかの膜との相互作用の回避をもたらしているものと考えられる。ホスファチジルエタノールアミンはヘキサゴナルII相を形成しやすい脂質として知られているが、その含量増加はホスファチジルエタノールアミン単独での意味を持つものではなく、細胞膜脂質全体における構成比やタンパク質との相互作用などの点において何らかの意味を持つものと予想される。

以上の結果から、細胞膜リン脂質の増加は凍結過程における膜安定性に寄与していると考えられるが、それを直接証明したのは、プロトプラストと特定の脂質から構成された脂質小胞（リボゾーム）を融合させ、細胞膜脂質組成を人工的に変化させた研究である^{5, 10)}。低温馴化前の耐凍性の低い植物から単離されたプロトプラストに、不飽和脂肪酸を含むホスファチジルコリンからなる脂質小胞（リボゾーム）を融合して、細胞膜脂質組成を低温馴化後に近い状態に人工的に操作すると、耐凍性は増加し、さらに、低温馴化前に見られたEILの発生は完全に回避された。また、細胞膜で見られたヘキサゴナルII相も発生頻度が低下した¹⁰⁾。従って、低温馴化前後で見られる細胞膜におけるホスファチジルコリン含量の増加は、凍結傷害発生機構の変動と直接関連していることが示された。

さらに、低温馴化過程では、細胞膜の糖脂質（グルコセブレロシド）の含量が複数の植物で共通して

減少する⁴⁾。グルコセブレロシドは水和度が低い脂質であり、さらに融点も高く、温度低下や脱水に伴って、水和度が高く融点が高いリン脂質と相分離の状態になると考えられる¹⁰⁾。その結果、異なった脂質相の境界面から細胞内容物の漏出が起こり、傷害が発生する。さらに、グルコセブレロシドが多く含まれる細胞膜領域では、ヘキサゴナルII相が形成されやすい、あるいは、膜融合が起こりやすいことが試験管内の実験により示されており、凍結傷害発生に関わっていることが示唆される⁴⁾。従って、低温馴化過程で細胞膜に含まれるグルコセブレロシドが減少することは、凍結傷害発生を回避し、耐凍性増大に貢献しているものと考えられる。

細胞膜には、ステロール脂質も多く含まれている。ステロール脂質は、遊離ステロール、ステリルグルコシド、および、アシルステリルグルコシドの3つのグループに大きく分けられる。低温馴化過程におけるこれらステロール脂質の変化は規則性が認められず、植物により異なっている⁴⁾。しかし、耐凍性の高い植物（ライムギ）と低い植物（カラスムギ）を比べると、ステロール組成が大きく異なっている¹⁰⁾。主要ステロール脂質として、ライムギの細胞膜は遊離ステロールを含んでいるが、カラスムギの細胞膜にはアシルステリルグルコシドが多い。リン脂質共存下で作成されたりボソームの脱水過程における挙動を調べてみると、これら二つのステロール脂質の挙動は大きく異なっている¹⁰⁾。つまり、ヘキサゴナ

(18)

ルII相転移を引き起こす脱水度は、アシルステリルグルコシドを含むリポソームにほうが遊離ステロールを含むリポソームに比べ大きい。すなわち、アシルステリルグルコシドは脂質安定性を低下させる働きがある。従って、ライムギとカラスムギの耐凍性の違い、言い換えれば、細胞膜の脱水下での安定性の違いの一部は、ステロール脂質組成に依存しているのかもしれない。

4. 低温馴化における細胞膜タンパク質の役割

それでは、細胞膜に含まれる重要なもう一つの成分であるタンパク質の耐凍性増大に対する貢献はどうか？低温馴化過程における細胞膜タンパク質（単離細胞膜画分に存在するタンパク質という意味で用いる）の変動については、二次元電気泳動による解析によって示されていた^{13, 14)}。しかし、それらの変動するタンパク質の実体や機能を詳細に研究した報告はほとんど存在していない。一方、近年急速に発展した分子生物学的解析方法を用いて報告されたものを検索しても、細胞膜タンパク質の変動を記述したものは、2, 3の論文に限られている^{20, 21)}。このような状況の中、我々は、シロイヌナズナ細胞膜における低温馴化に応答して変動するタンパク質を網羅的に同定することに成功した²²⁾。

その結果、低温馴化に応答して約40の細胞膜タンパク質が変動することが明らかになった（図1）。それらのタンパク質は、シロイヌナズナが大きく耐凍性を増大させる馴化1日目に既に変動していることも明らかになった。おもしろいことに、馴化1日目では細胞膜脂質に大きな変動がないことも明らかになっており、その時期に起こる細胞膜の凍結挙動の変化には細胞膜タンパク質が関与している可能性も示唆される。ついで、低温馴化過程で変動するタンパク質を質量分析（マトリックス支援型レーザーイオン化飛行時間型質量分析、MALDI/TOF-MS）によって同定した。その結果、低温馴化応答細胞膜タンパク質には、膜修復、浸透ストレス防御タンパク質、タンパク質分解、それに、低温や乾燥に応答して出現するタンパク質（デハイドリンなど）などが含まれていることが判明した。

低温馴化応答細胞膜タンパク質の機能を解析する

ために、変動するタンパク質をコードする遺伝子を導入した過剰発現形質転換シロイヌナズナを作成し、耐凍性やプロトプラストの凍結挙動を調べた。その結果、リポカリン様タンパク質（AtLCN）やデハイドリンの一種（ERD14）を過剰発現する形質転換体は野生型に比べて耐凍性が高いことが明らかになった²³⁾。耐凍性増大程度は小さいが、再現性のある結果が得られた。さらに、冷却速度を変えて-10℃までの凍結過程とその温度からの融解過程について低温顕微鏡観察してみると、AtLCN形質転換体は凍結脱水によって引き起こされる傷害発生頻度が低下していること、ERD14形質転換体はそれに加えて比較的早い冷却速度で凍結した際に発生する致死的な細胞内凍結の発生が抑えられていることが示唆された。ついで、凍結脱水によって起こる2つの傷害機構（EILとLOR）を実験的に区別してみると、AtLCNはEILの発生を抑える傾向があることがわかった。以上の結果は、低温馴化過程で細胞膜に蓄積されるAtLCNおよびERD14が耐凍性増大に何らかの貢献をしていることを示している。今後、さらにこれらの細胞膜タンパク質の作用分子機構に関する研究を進めていきたい。

5. 低温馴化における適合溶質蓄積の役割

以上述べたように、細胞膜脂質とタンパク質の組成変化が、低温馴化で起こる耐凍性増大に貢献していることは疑いのない事実である。しかし、細胞膜組成変化だけで、低温馴化過程における耐凍性増大を全て説明することはできないことも明らかである。では、ほかにはどのようなことが考えられるのであろうか？

植物が低温に曝されると、細胞内に低分子可溶性物質を蓄積することはよく知られている。これらの物質の中には、浸透濃度の上昇の際に生じる有害物質の濃縮を防ぐ目的で蓄積される電氣的に中性で、多量に蓄積しても代謝系を攪乱しない物質（適合溶質）が含まれている。その代表例は、糖、プロリン、グリシンベタインなどである。事実、シロイヌナズナやコムギなど多くの植物で、耐凍性増大と関連して、適合溶質が細胞内に大量に存在することが報告されている²⁴⁻²⁶⁾。

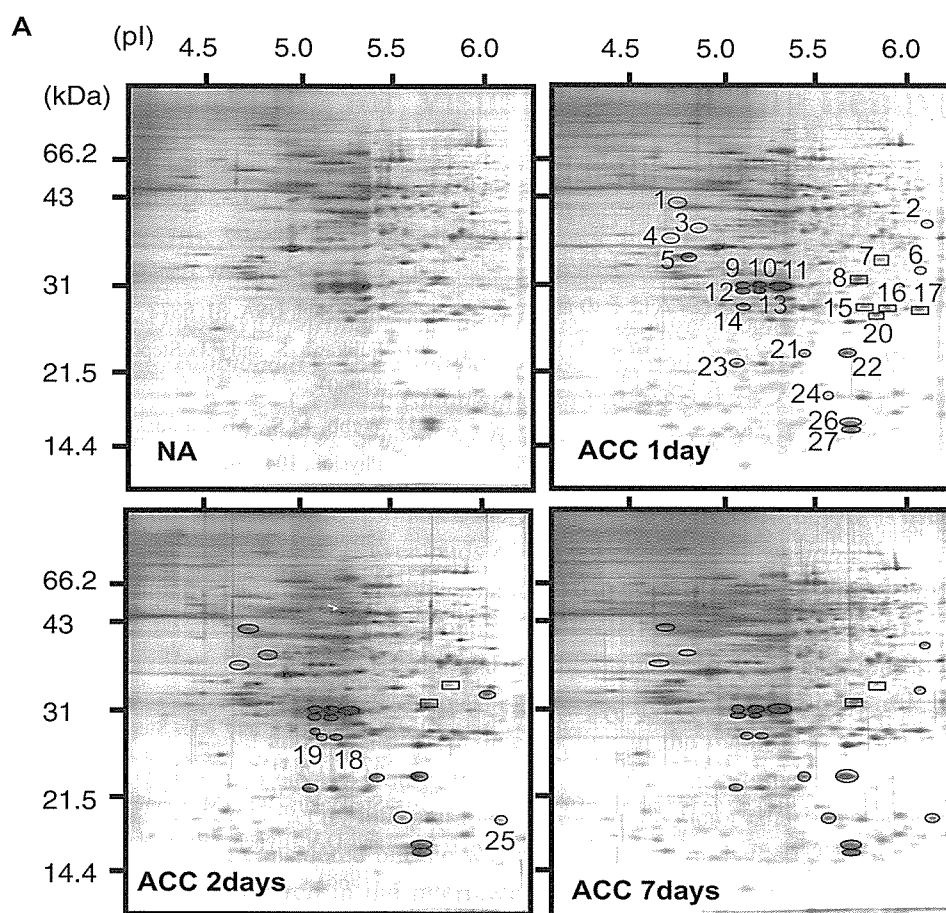


Fig. 1. 低温馴化過程におけるシロイヌナズナ細胞膜タンパク質の変動。

シロイヌナズナ葉より細胞膜を単離した後、等電点電気泳動試料調整可溶化液によって可溶化したものを2次元電気泳動にかけて分離した。NA, 未馴化；ACC 1 day, 低温馴化1日目；ACC 2 days, 低温馴化2日目；ACC 7 days, 低温馴化7日目。図中の丸で囲まれたスポットは低温馴化過程で増加するもの、四角で囲まれたものは減少するものを示している。

適合溶質の蓄積は、大きく分けて2つの効果が期待できる。一つは、濃度に依存して生じる効果である。すなわち、適合溶質の蓄積による細胞内浸透濃度の上昇は、凍結温度を低下させる、凍結過程における脱水ストレスを緩和する、あるいは、凍結脱水過程で細胞内に濃縮する有毒代謝産物の影響を希釈する、などの効果を持つ。一方、蓄積する物質に依存した質の効果もある。そのうち、糖は、生体膜安定性に影響を与え、凍結脱水過程における膜安定性を増大させることに貢献していると考えられてきた。

事実、*in vitro* 実験では、脂質人工膜と糖を共存させた条件で凍結、あるいは、脱水した際に、糖によって膜の安定性が増加することが多くの実験により

示されている²⁷⁾。さらに、*in planta* においても、シロイヌナズナ植物体に人工的にショ糖を取り込ませた後、プロトプラストの凍結耐性を調べたところ、細胞に取り込んだ糖の量に依存して凍結耐性が高まること、また、影響が生じる凍結傷害発生様式は取り込んだ糖の量に依存していることが明らかになった²⁸⁾。これらの結果は、低温馴化過程で細胞内に蓄積する糖が、細胞膜の安定性を増大することを通して、植物体の凍結耐性を増大していることを直接的に示している。以上の結果は、細胞膜の凍結下での安定性維持を考える際には、細胞膜の組成変動だけではなく、細胞内に起こる生理的状況の変化も考慮に入れる必要があることを明確に示している。

6. お わ り に

植物の耐凍性形質は、多くの反応が一度に起こった結果として表現される解析が難しい複雑な形質である。しかし、近年の分子生物学的手法の急速な発達によって、耐凍性獲得に関わっている因子が詳細に解析されつつある。低温下で起こる遺伝子発現を網羅的に解析するトランスクリプトームはその良い例であるが、遺伝子発現プロファイルの解析だけでは耐凍性形質は理解できない。それらの遺伝子にコードされるタンパク質の機能やタンパク質の働きによって生成される物質の影響を精力的に解析していく必要がある。今回紹介したタンパク質や代謝産物の耐凍性形質に対する解析に加えて、それらを網羅的に解析する手法（プロテオーム、あるいは、メタボローム）を用いて、耐凍性形質をより広範に、しかも、より深く理解することができる。そのような植物の耐凍性形質を詳細に理解すれば、耐凍性を増大、あるいは、付与した有用作物の育種も効率的に行えるようになると思われる。

謝 辞

本稿に記された研究の一部は、著者の一人（上村）が、アメリカ・コーネル大学 Peter L. Steponkus 教授の研究室において行った研究である。また、岩手大学における研究は、農学部附属寒冷バイオシステム研究センターに所属する教職員、学生諸君の協力を得て進められた。また、独立行政法人農業・生物系特定産業技術研究機構生物系特定産業技術研究支援センター研究費、並びに、岩手大学長裁量経費の援助によって行われた研究成果を含んでいる。この場を借りて全ての方に感謝したい。

参 考 文 献

- 1) Weiser, C.J. : *Science*, **169**, 1269 (1970).
- 2) Guy, C.L. : *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **41**, 187 (1990).
- 3) Thomashow, M.F. : *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **50**, 571 (1999).
- 4) Steponkus, P.L., M. Uemura and M.S. Webb : *In "Advances in Low Temperature Biology"*, P.L. Steponkus, ed., JAI Press, London, Vol. 2, p. 211 (1993).
- 5) Uemura, M. and P.L. Steponkus : *Plant Physiol.*, **91**, 1131 (1989).
- 6) 酒井：植物の耐凍性と寒冷適応，学会出版センター，東京，469 pp.(1982).
- 7) Levitt, J. : *Responses of Plants to Environmental Stresses*, 2nd Ed., Vol. 1, Academic Press, New York, 497pp.(1980).
- 8) Steponkus, P.L. : *Annu. Rev. Plant Physiol.*, **35**, 543 (1984).
- 9) Gordon-Kamm, W.J. and P.L. Steponkus : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 6373 (1984).
- 10) Fujikawa, S. and P.L. Steponkus : *Cryobiology*, **27**, 665 (1990).
- 11) Webb, M.S., M. Uemura and P.L. Steponkus : *Plant Physiol.*, **104**, 467 (1994).
- 12) Uemura, M., R.A. Joseph and P.L. Steponkus : *Plant Physiol.*, **109**, 15 (1995).
- 13) Yoshida, S. and M. Uemura : *Plant Physiol.*, **75**, 31 (1984).
- 14) Uemura, M. and S. Yoshida : *Plant Physiol.*, **75**, 818 (1984).
- 15) Uemura, M. and P.L. Steponkus : *Plant Physiol.*, **104**, 479 (1994).
- 16) Steponkus, P.L., M. Uemura, R.A. Balsamo, T. Arvinte and D.V. Lynch : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 9026 (1988).
- 17) Sugawara, Y. and P.L. Steponkus : *Cryobiology*, **27**, 667 (1990).
- 18) Cahoon, E.B. and D.V. Lynch : *Plant Physiol.*, **95**, 58 (1991).
- 19) Webb, M.S., T.C. Irving and P.L. Steponkus : *Biochim. Biophys. Acta*, **1239**, 226 (1995).
- 20) Goodwin, W., J.A. Pallas and G.I. Jenkins : *Plant Mol. Biol.*, **31**, 771 (1996).
- 21) Brenton, G., A. Vazquez-Tello, J. Danyluk and F. Sargan : *Plant Cell Physiol.*, **41**, 177 (2000).
- 22) Kawamura, Y. and M. Uemura : *Plant J.*, **36**, 141 (2003).
- 23) Tominaga, Y., C. Nakagawara, Y. Kawamura and M. Uemura : *In "Plant Cold Hardiness"*, T.H.H. Chen, M. Uemura and S. Fujikawa, eds., CAB International, Oxon (UK), in press (2005).
- 24) Wanner, L. and O. Junttila : *Plant Physiol.*, **120**, 391 (1999).
- 25) 上村，鎌田：低温生物工学会誌，**47**, 49 (2000).
- 26) Kamata, T. and M. Uemura : *CryoLetters*, **25**, in press (2004).
- 27) Crowe, J.H. and L.M. Crowe : *In "Membranes, Metabolism, and Dry Organisms"*, A.C. Leopold, ed., Cornell University Press, Ithaca, 188 (1986).
- 28) Uemura, M. and P.L. Steponkus : *Plant Cell Environ.*, **26**, 1083 (2003).