

## 植物体の細胞レベルにおける凍結ストレス耐性獲得機構

<sup>1</sup>岩手大学大学院連合農学研究科, <sup>2</sup>筑波大学大学院生命環境科学研究科,  
<sup>3</sup>(独) 理化学研究所横浜研究所ゲノム科学総合研究センター,  
<sup>4</sup>(独) 理化学研究所横浜研究所植物科学研究センター,  
<sup>5</sup>岩手大学農学部附属寒冷バイオシステム研究センター  
 佐々木 裕<sup>1</sup>, 大野 陽子<sup>2</sup>, 関 原明<sup>3</sup>, 篠崎 一雄<sup>3,4</sup>, 上村 松生<sup>1,5</sup>

### Mechanism of Freezing Stress Tolerance Induction in Plants at the Cellular Level

Yutaka SASAKI<sup>1</sup>, Yoko OONO<sup>2</sup>, Motoaki SEKI<sup>3</sup>, Kazuo SHINOZAKI<sup>3,4</sup> and Matsuo UEMURA<sup>1,5</sup>

<sup>1</sup>United Graduate School of Agricultural Sciences, Iwate University, Morioka 020-8550, Japan

<sup>2</sup>Graduate School of Life and Environmental Science, University of Tsukuba, Tsukuba 305-0074, Japan

<sup>3</sup>RIKEN Genomic Sciences Center, RIKEN Yokohama Institute, Yokohama 230-0045, Japan

<sup>4</sup>RIKEN Plant Science Center, RIKEN Yokohama Institute, Yokohama 230-0045, Japan

<sup>5</sup>Cryobiosystem Research Center, Faculty of Agriculture, Iwate University, Morioka 020-8550, Japan

It is well known that an application of low temperature for a certain period induces freezing tolerance in plants including *Arabidopsis* plant. Although many studies have been conducted to elucidate molecular mechanisms of the acquisition of freezing tolerance, it is still difficult in some cases to determine how *Arabidopsis* responds to these treatments at the cellular level. To study such responses, we initiated characterization of kinetics of cold acclimation process with *Arabidopsis* T87 suspension cultured cells. In this study, we describe the changes of freezing tolerance, sugar content and gene expression during cold acclimation. These results may provide new information about molecular mechanism of cold acclimation in plants at the cellular level.

(Received Oct. 17, 2005; Accepted Oct. 25, 2005)

### 緒 言

凍結温度を含む低温は、植物の生存を制限する最も重要な要因である。特に、農作物を考慮した場合、低温による被害の発生は農業生産上、危機的な事象と言える。世界中には多くの植物が生育するが、低

温に対する耐性の程度からいくつかのグループに分類される。約 12°C 以下の凍結しない温度でも生理的障害を受ける植物は、低温感受性植物 (Chilling-sensitive plants) と呼ばれ、一方、低温で生存することが可能な植物は、低温耐性植物 (Chilling-tolerant plants) と分類される<sup>1)</sup>。低温耐性植物の中には、凍結状態でも生育が可能な植物 (凍結耐性植物, Freezing-tolerant plants) も多く存在する。このような植物は、秋から冬にかけての低温 (0°C 以上の凍結しない温度) と短日条件に反応して、様々な生理的応答を変化させ凍結耐性を増大させる

第 51 回低温生物工学会研究報 2.

[Key words : *Arabidopsis*, Cold acclimation, Freezing tolerance, Gene expression, Suspension cultured cells ; シロイヌナズナ, 低温馴化, 凍結耐性, 遺伝子発現, 懸濁培養細胞]

機構を持つ。この現象は低温馴化 (Cold acclimation) と呼ばれ、モデル植物であるシロイヌナズナを用いて積極的に研究が行われている。

シロイヌナズナでは、低温馴化開始後 2 日で急激な凍結耐性の増大が起こり、7 日後には最大凍結耐性が付与される<sup>2)</sup>。また、低温馴化過程では、リン脂質の組成変化、適合溶質 (糖やプロリン) の蓄積、そして、低温誘導性遺伝子の発現、などが起こることが示されてきた<sup>3-5)</sup>。近年では、低温誘導性遺伝子発現に関わるマスタースイッチである *CBF/DREB* (*C-repeat/DRE binding factor*) が同定され、その過剰発現形質転換体では低温未馴化状態で野生型と比べて凍結耐性が増大することが明らかとなっている<sup>6,7)</sup>。しかし、この形質転換体を低温馴化するとさらに凍結耐性が増大すること、プロリンを過剰に産生する突然変異体 (*eskimol*) では、低温未馴化でも低温馴化した野生型よりも凍結耐性が高いことなどから、これまで解析されてきた低温誘導性遺伝子以外の様々な要因が低温馴化機構に働いていることが示唆されている<sup>6,8)</sup>。

この様に、低温馴化に関する多くの現象解明がなされている一方で、凍結耐性を人工的に増大させるための効率的なアプローチ確立には至っていない。その原因の一つに、植物体が持つ複雑性が挙げられる。植物体には様々な器官、組織、細胞が混在しており、それらの低温に対する応答が異なること、また、それらの低温に対する応答の相互作用が低温馴化過程で起こり凍結耐性付与に大きく関係してしまうことが考えられる。従って、低温馴化機構の詳細な解明には、単純化した系を用いた解析、つまり、培養細胞系を用いて、器官や組織間に起こる相互作用を出来るだけ排除し解析を行うことが必要不可欠となる。そこで、本研究では、低温馴化機構の研究が多くなされているシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) の懸濁培養細胞 (T87) を用いて、低温馴化による凍結耐性誘導機構の研究を行い、細胞レベルでの低温馴化機構を考察する。

## 材料および方法

### 1. 培養細胞の育成

懸濁培養細胞 (T87) は、シロイヌナズナ (ecotype Columbia) 芽生えから誘導された。12 日間培養し

た細胞を JPL 培地<sup>9)</sup> に継代 (2 ml/40 ml) し、連続白色光 (約 100  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$ ), 23°C で振とう培養 (120 rpm) した。

### 2. 成長曲線の作製

継代後 3 日おきに湿重量を測定し、成長曲線を作製した。測定法として各日数培養した細胞 (1 ml) をブフナーロート上の濾紙 (直径 70 mm, アドバンテック) に取り 30 秒間吸引した (バキュームポンプ V-503, 柴田科学) 後、重量を測定した。水を同様に処理したコントロールの重量からその値を差し引いて細胞の湿重量とし、成長曲線を求め、誘導期、対数増殖期、定常期を決定した。

### 3. 低温馴化法

各成長段階まで培養した細胞を 4°C に移し、12 時間日長 (約 150  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$ ), 120 rpm で振とう培養し、低温馴化処理を行った。

### 4. 凍結耐性の測定

凍結耐性は凍結融解後の細胞を再成長させて測定した。培養細胞を 50 ml チューブに移し遠心 (225  $\times g$ , 5 分間) し、細胞を沈殿させた。培地を取り除いた後、滅菌水 50 ml による洗浄を 3 回行い、細胞外に付着した糖を取り除いた。濾紙上で細胞外の水を十分に取り除いた後、0.3 g の細胞を 15 ml チューブに量り取り、300  $\mu\text{l}$  の滅菌水を加え凍結させた。凍結はプログラムフリーザー (PRO COOL BATH NCB-3400, EYELA) を用いて行った。サンプルを -2°C で 15 分間平衡した後、液体窒素で予め冷却された金属棒を用いて植氷した。-2°C で 2 時間さらに平衡した後、-2°C/hour の冷却速度で凍結させた。各温度まで凍結後、4°C で 1 日間融解し、新しい液体培地に移し変え再成長させた。15 日後の細胞の湿重量を測定し、0°C 処理の細胞重量を生存率 100% として、各凍結温度における細胞重量と比較することで生存率を求めた。

### 5. 糖含量の測定

3 つの異なる成長段階の培養細胞を各期間低温馴化し、上述した様に洗浄処理を行った。洗浄後、細胞を吸引処理により回収し、100 mg の細胞を 1.5 ml エッペンチューブに回収した。次に、プラステ

ック pestle を用いて細胞を破碎し, Kamata and Uemura と同様の方法で糖の抽出, 定量を行った<sup>10)</sup>.

## 6. マイクロアレイ

マイクロアレイ解析は, 独立行政法人理化学研究所横浜研究所に依頼し, アジレント社 22k オリゴアレイを用いて行った. 解析に用いたサンプルは誘導期の培養細胞を NA, CA1, CA2, CA4 処理したものである. この培養細胞から TRIZOL Reagent (Invitrogen) を用いて total RNA を抽出し, 電気泳動と吸光度測定により RNA の質を確認した.

マイクロアレイデータは, 以下に述べる 2 つの条件を両方満たすものについて解析を行った.

- ① 各コンディションの Raw (Cy5 Intensity) もしくは Control (Cy3 Intensity) 値の平均値のどちらかが, CA1, CA2, CA4 処理の 3 点全てで 1,000 以上である.
- ② CA1, CA2, CA4 処理の内, どれか一点でも誘導強度が 3 倍以上になるもの, 或いは 0.3 倍以下に抑制されるもの.

また, 得られたデータの解析は, Micro Array Expression Datasearch ([http://rarge.gsc.riken.go.jp/microarray/microarray\\_expgene.pl](http://rarge.gsc.riken.go.jp/microarray/microarray_expgene.pl))及び Genevestigator (<https://www.genevestigator.ethz.ch/~w3pb/genevestigator/index.php?page=home>) を用いて行った.

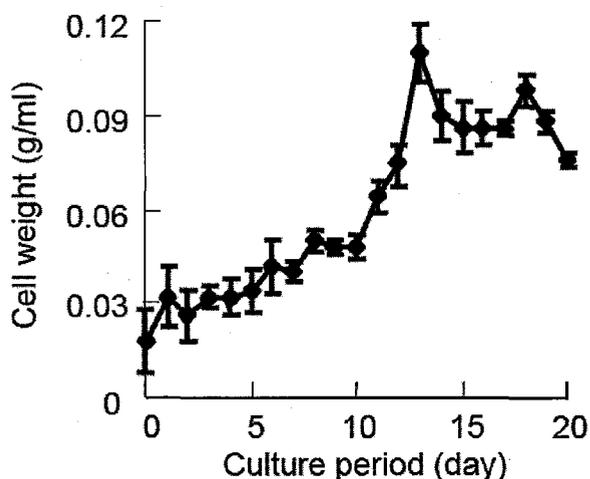


Fig. 1 Growth curve of *Arabidopsis* T87 suspension cultured cells.

## 結果および考察

### 1. 成長曲線

T87 懸濁培養細胞は, 継代後 10 日目までの生重量増加は小さかった (Fig. 1). 11 日目から 14 日目にかけて生重量は急激に直線的に増加した. しかし, その後培養日数を長くしても, 生重量の増加はほとんど見られなかった. 以上のことから, 培養開始後 0~10 日が誘導期, 11~14 日までが対数増殖期, 15 日以降が定常期であると決定した.

### 2. 凍結耐性の変化

細胞レベルにおける凍結耐性を明らかにするため, 誘導期 (継代後 8 日目), 対数増殖期 (継代後 12 日目), 定常期 (継代後 15 日目) における培養細胞の低温馴化処理 (未馴化: NA, 低温馴化 2, 4, 7 日: CA2, CA4, CA7) による凍結耐性の変動を解析した (Fig. 2). NA 区では, 全ての培養細胞において  $-6^{\circ}\text{C}$  まで 50%以上の生存率を示した. しかし, 生存率は  $-7^{\circ}\text{C}$  以下になると 10%以下まで急速に減少した. つまり, NA 培養細胞の生存可能な温度は  $-6^{\circ}\text{C}$  であることが分かった (Fig. 2a). 低温馴化 2 日の細胞においては, 対数増殖期, 定常期では NA 細胞と比べ凍結耐性の増大は見られなかった. しかし, 誘導期の培養細胞は約  $-10^{\circ}\text{C}$  まで凍結耐性が増大した. そこで, 低温馴化時間を延ばし 4 日間, 7 日間低温処理を行ったところ, 凍結耐性は  $-6^{\circ}\text{C}$  となり, NA 区と同様の耐性に戻ってしまうことが分かった.

この結果より, 培養細胞 (誘導期) は低温馴化機構を持つことが示唆された. しかし, シロイヌナズナ植物体が CA2 までの間に急速に凍結耐性を増大させ CA7 では最大凍結耐性が得られる<sup>2)</sup>のに対し, 培養細胞では誘導期に限って CA2 までの間に急速に凍結耐性が増大するが, 長期間の低温馴化では凍結耐性が減少するという違いが明らかになった. これは, 培養細胞では長期的な耐性維持機構が欠けているため生じた現象であるのかもしれない.

### 3. 糖含量の変化

細胞レベルにおける凍結耐性の変動と細胞内糖含量の変動との関係を明らかにするため, 各成長段階の培養細胞における低温馴化過程での糖含量の

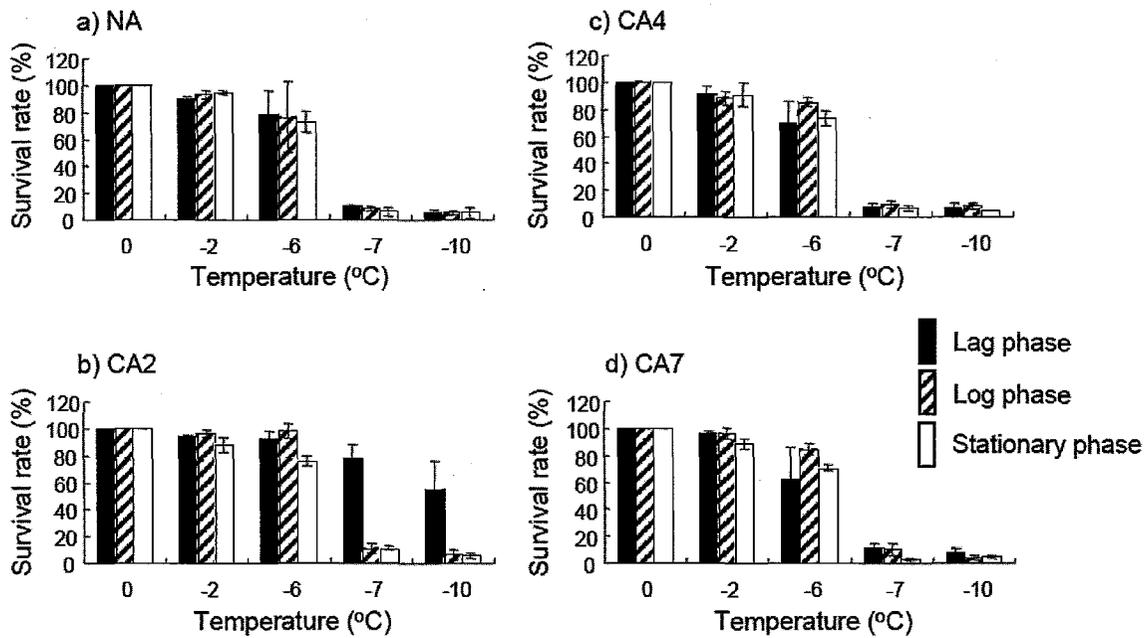


Fig. 2. Changes in freezing tolerance of *Arabidopsis* T87 suspension cultured cells at different growth stages during cold acclimation. NA means nonacclimated and CA2, CA4 and CA7 means cold-acclimated for 2, 4 and 7 days, respectively.

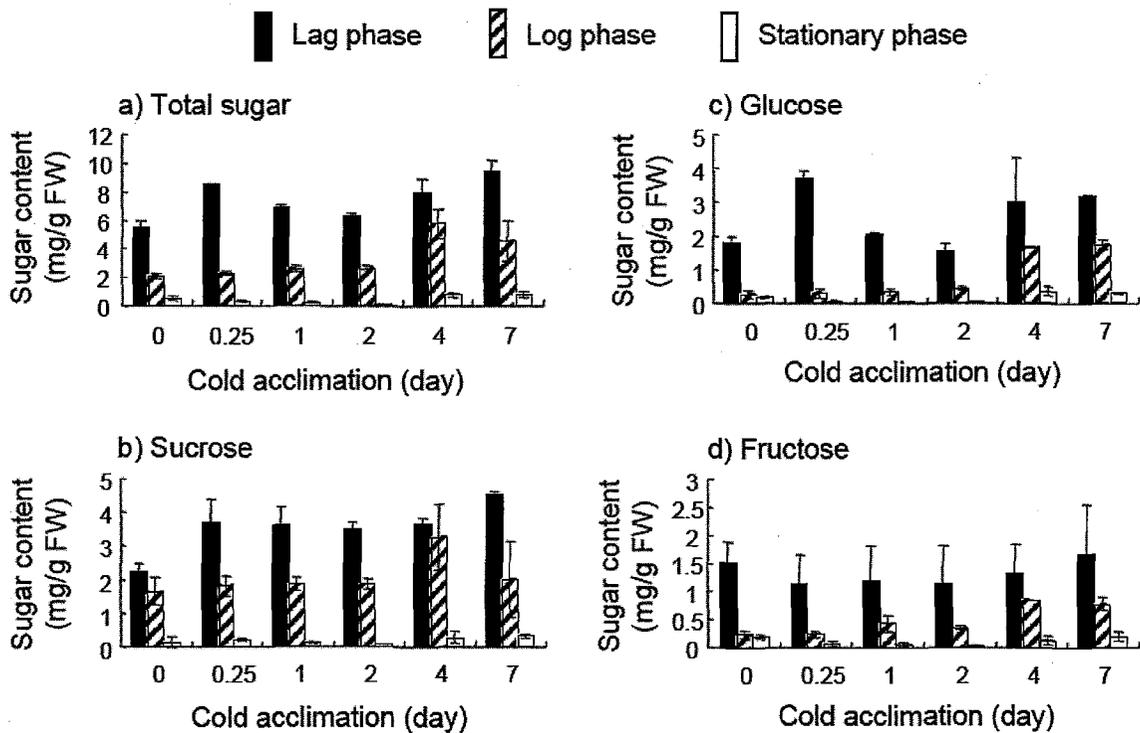


Fig. 3. Changes in sugar contents in *Arabidopsis* T87 suspension cultured cells at different growth stages during cold acclimation.

変動を解析した (Fig. 3). NA 区における細胞内の全糖含量は、誘導期 (5.55 mg/g FW), 対数増殖期 (2.13 mg/g FW), 定常期 (0.53 mg/g FW) であり、

誘導期の細胞は他の成長段階の細胞より顕著に糖が細胞内に蓄積していることが分かった (Fig. 3a). 低温馴化過程での全糖含量の変動を見ると、誘導

期の細胞では低温馴化 6 時間 (CA6h) で急速に細胞内に蓄積し、それ以降の低温馴化では顕著な変動は見られなかった。一方、対数増殖期の細胞では CA4 以降に顕著な糖の蓄積が見られ、定常期の細胞では全ての低温馴化過程で目立った変動は示さなかった。次に、糖の種類 (sucrose, glucose, fructose) の変動を見ると、誘導期の細胞における sucrose と glucose 含量は全糖含量で見られた傾向と類似しており、CA6h で急速に蓄積した後、程度の大小はあるものの CA2 まで減少傾向を示し、CA2 から CA7 にかけて再び蓄積した。しかし、fructose の含量は、低温馴化過程でほぼ変わらない傾向を示した。対数増殖期における各糖含量の変動は全て CA4 以降に起こることが分かった。また、定常期の細胞では全ての糖で顕著な変動は見られなかった (Fig. 3b-d)。

誘導期の細胞で他の 2 つ成長段階の細胞と比べて顕著に糖が蓄積していることから、細胞内に糖が一定量存在していることが低温馴化機構を獲得するために重要な要因であるかもしれない。今後は、細胞内糖含量と凍結耐性の関係を明らかにするためにも、対数増殖期や定常期といった NA 状態で糖含量が少ない細胞に糖を添加した時の凍結耐性の変動を解析する必要がある。

#### 4. マイクロアレイ解析

誘導期の培養細胞において、低温馴化過程で変動する遺伝子の網羅的解析を行った。低温処理により 448 個の遺伝子発現が誘導され、438 個の遺伝子発現が抑制されていた。上述した様に本培養細胞の凍結耐性は、誘導期の培養細胞を CA2 処理した時に一過的に増大することが分かっている。この凍結耐性を制御する可能性を持つ遺伝子には次の変動を示すものが考えられる：①CA1 以降、発現が衰退する遺伝子 (一過的な誘導)、②CA1 のみ発現誘導される遺伝子、③CA1 以降、発現の抑制が緩和される遺伝子 (一過的な抑制)、④CA1 のみ発現が抑制される遺伝子。これは、凍結耐性を増大、或いは抑制させる最終産物が多くの中間産物によって制御を受けている場合である。①の変動を示す遺伝子は 104 個 (*glycosyltransferase*, *MYB-related transcription factor* など)、②は 62 個 (*2-oxoglutarate-dependent deoxygenase* など)、③は 53 個 (*GATA zinc finger protein*, *auxin-regulated protein* など)、④は 10 個

(*WRKY family transcription factor*, *glucosyltransferase* など) 存在することが分かった。興味深いことに、このような変動パターンを示す遺伝子群のうち、シロイヌナズナ植物体では見られない細胞特異的な誘導、或いは抑制を示す遺伝子が存在していた。つまり、植物体では変動しない、又は、抑制される遺伝子が培養細胞では誘導されている、或いは、その逆のパターンを示す遺伝子である。細胞特異的な変動を示す遺伝子のうち、①の変動パターンを示すものは 7 個、②は 3 個、③は 5 個、④は 3 個であった。このような細胞特異的な遺伝子は、細胞レベルにおける低温馴化機構に重要な遺伝子であることが考えられる。今後、これらの遺伝子について凍結耐性を指標とした機能解析を行う予定である。

#### 摘 要

シロイヌナズナ培養細胞の成長曲線から誘導期、対数増殖期、定常期を決定した。低温馴化処理による各成長段階の培養細胞の凍結耐性変動を解析したところ、誘導期の培養細胞を低温馴化 2 日した時のみ凍結耐性が約 -6°C から -10°C まで増大した。糖含量は、既に NA の状態において誘導期の細胞で最も多かったが、低温馴化との関連は明らかではなかった。マイクロアレイ解析は、低温馴化処理により、448 個の遺伝子発現が誘導され、438 個の遺伝子発現が抑制されることを明らかにした。また、凍結耐性と関連した変動パターンを示す遺伝子のうち、培養細胞で特異的な変動を示すものも観察された。

#### 謝 辞

本研究の一部は、岩手大学 21 世紀 COE プログラムの支援を受けて行われた。

#### 文 献

- 1) Levitt, J.: *Response of Plants to Environmental Stress*, 2<sup>nd</sup> Ed., Vol. 1, Academic Press, New York, 497pp. (1980)
- 2) Gilmour, S.J., Hajela, R.K. and Thomashow, M.F.: Cold acclimation in *Arabidopsis thaliana* L. *Plant Physiol.*, **87**, 745-750 (1988)

- 3) Uemura, M., Joseph, R.A. and Steponkus, P.L.: Cold acclimation of *Arabidopsis thaliana*: effect on plasma membrane lipid composition and freeze-induced lesions. *Plant Physiol.*, **109**, 15-30 (1995)
- 4) Wanner, L.A and Junttila, O.: Cold-induced freezing tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.*, **120**, 391-400 (1999)
- 5) Thomashow, M.F.: Plant cold acclimation: freezing tolerance gene and regulatory mechanisms. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **50**, 571-599 (1999)
- 6) Gilmour, S.J., Sebolt, A.M., Salazar, M.P., Everard, J.D. and Thomashow, M.F.: Overexpression of the *Arabidopsis* CBF3 transcriptional activator mimics multiple biochemical changes associated with cold acclimation. *Plant Physiol.*, **124**, 1854-1865 (2000)
- 7) Kasuga, M., Liu, Q., Miura, S., Yamaguchi-Shinozaki, K and Shinozaki, K.: Improving plant drought, salt and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor. *Nature Biotechnol.*, **17**, 287-291 (1999)
- 8) Xin, Z and Browse, J.: *eskimo1* mutants of *Arabidopsis* are constitutively freezing-tolerant. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 7799-7804 (1998)
- 9) Axelos, M., Cune, C., Mazzolini, L., Bardet, C. and Lescure, B.: A protocol for transient gene expression in *Arabidopsis thaliana* protoplasts isolated from cell suspension cultures. *Plant Physiol. Biochem.*, **30**, 123-128 (1992)
- 10) Kamata, T and Uemura, M.: Solute accumulation in wheat seedlings during cold acclimation: contribution to increased freezing tolerance. *CryoLetters*, **25**, 311-322 (2004)