

凍結における機械的ストレスとその耐性機構

¹岩手大学 21世紀 COE, ²岩手大学農学部寒冷バイオシステム研究センター
河村 幸男¹, 山崎 誠和¹, 上村 松生^{1,2}

Freeze - Induced Mechanical Stress and the Enhanced Freezing Tolerance

Yukio KAWAMURA¹, Tomokazu YAMAZAKI¹ and Matsuo UEMURA^{1,2}

¹21st century COE program, Iwate University, Morioka, 020-8550, Japan

²Cryobiosystem Research Center, Faculty of Agriculture, Iwate University, Morioka, 020-8550, Japan

Freezing tolerance is an important character for plants living under subzero temperatures in winter season. The growth of ice crystals or the freeze-induced dehydration mechanically may disrupt the plasma membrane. Many studies have indicated that the freezing tolerance is correlated with the cryostability of plasma membrane. Although, in animal cells, the mechanically disrupted plasma membrane is rapidly repaired dependently on the extracellular calcium, no report has been published on the plasma membrane repair in plant cells. It is expected that the cryostability of plasma membrane is tightly associated with the membrane repair manner. We studied the calcium-dependent survival of plant cell for mechanical stresses using *Arabidopsis* protoplasts isolated from control and cold-acclimated leaves. The tolerance to electric shock by the electroporator treatment which directly disrupted plasma membrane was also dependent on the extracellular calcium. The enhanced freezing tolerance was remarkably dependent on the extracellular calcium during freezing. Interestingly, the tolerance to dehydration caused by hyperosmotic solution was hardly dependent on the extracellular calcium. Finally, we estimate that the tolerance to mechanical stress caused by the ice crystal growth is dependent on the extracellular calcium.

(Received Sept. 28, 2006; Accepted Nov. 17, 2006)

緒 言

凍結に対する耐性, すなわち耐凍性は寒冷地域に生育する植物にとって, 氷点下の冬を乗り切るため

第 52 回低温生物工学会研究報告 17.

[Key words: *Arabidopsis*, Freezing tolerance, Calcium, Mechanical stress, Membrane repair; シロイヌナズナ, 凍結耐性, カルシウム, 機械的ストレス, 細胞膜修復]

に必要な不可欠な生理的要素である。温帯以北で暮らす植物は秋から冬にかけての季節変化, 特に温度低下を感知し, 耐凍性を増し氷点下で生き延びることが出来る。この現象は低温馴化と呼ばれている。長年にわたり, これまで多くの研究者が凍結耐性機構の解明に取り組んできたが, 未だに不透明なところが多く, 特に遺伝的要素と耐凍性との関係が明らかになっていない。

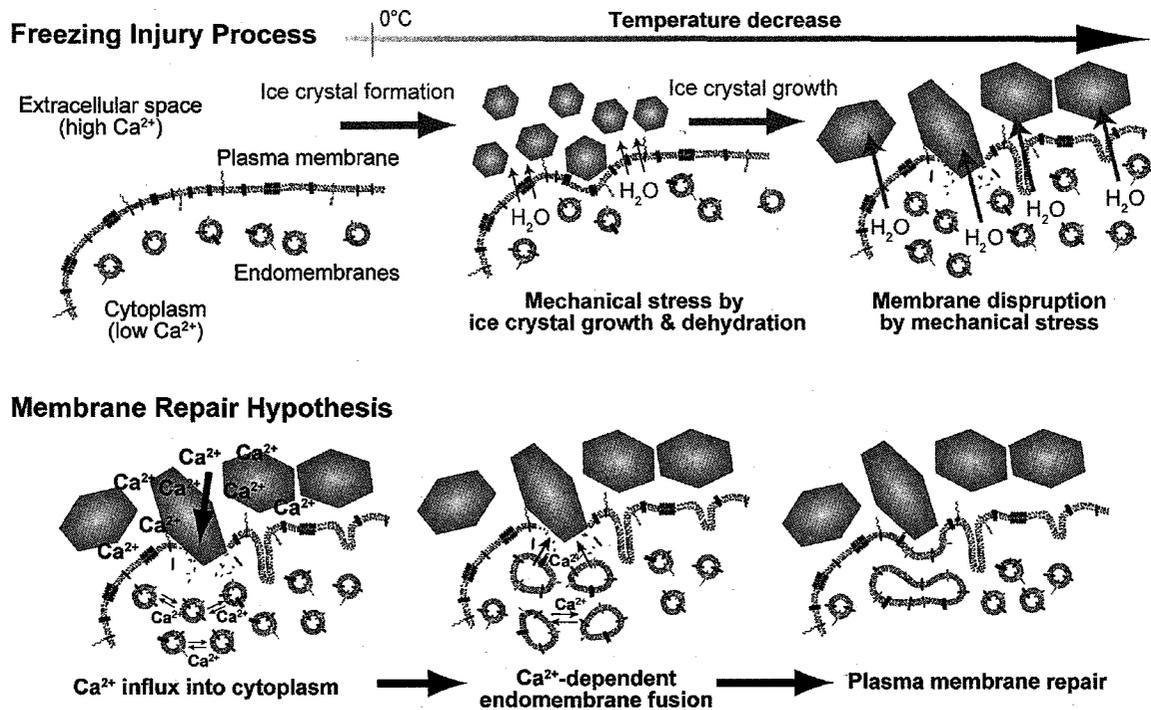


Fig. 1. Freezing injury and membrane repair hypothesis. During freezing, plant cells suffer mechanical stresses by ice crystal growth and freeze-induced dehydration, and the plasma membrane is mechanically disrupted. The result that synaptotagmin-like protein increases during cold acclimation leads to the hypothesis that the enhanced freezing tolerance is related to the repair of disrupted plasma membrane.

耐凍性機構の解明が困難である原因は2つ考えられる。まず、1) 凍結ストレスが3種の異なるストレス、すなわち、凍結脱水による乾燥ストレス、脱水・吸水もしくは氷晶成長による機械ストレス、そして低温ストレスを同時に植物細胞にもたらす複雑なストレスであることが挙げられる。事実、植物は、これらの複合的なストレスに対応するために色々な遺伝子を発現したり抑制したりしていることがマイクロアレイで確かめられている¹⁾。凍結過程において、これらのストレスを分けて考えることが難しく、傷害の原因を特定することが困難となり、更にその結果、凍結傷害回避のメカニズムを明らかにすることを困難にしている。次に、2) 耐凍性という性質が少数の遺伝的要素に支配されるものではなく、複数の要素が揃ってはじめて機能する複合的なものである、ということが挙げられる。実際に、耐凍性増大に大きく寄与するだろうと予想された低温誘導性遺伝子を、単一で植物体に導入しても、その形質転換体の耐凍性はほとんど上昇しない²⁾。その一方で、低温馴化に関わる転写因子を導入した形質転換体は、低温馴化を行わなくても十分な耐凍性を発揮することが報告されている³⁾。

その一方で、これまでの研究から、1) 細胞膜はある凍結温度以下では不安定になり、その結果凍結傷害が生じること、2) 耐凍性増大のためには細胞膜が凍結下で安定的になることが必須であること、がほぼ間違いのない仮説として支持されている⁴⁾。細胞膜は主に膜脂質と膜タンパク質により構成されているが、低温馴化による耐凍性の上昇と平行して、この両者は大きく変動することが報告されてきた。著者たちはこれまでタンパク質の網羅的同定が可能になったシロイヌナズナを用いて低温馴化中に量的変化を伴う細胞膜タンパクを、質量分析計を使用することにより多数の低温馴化中に変動する細胞膜タンパク質を明らかにしてきた⁵⁾。同定した低温馴化中に著しく増加する膜タンパク質の一つ、シナプトタグミン様タンパク質は、膜融合による細胞膜修復機構に深く関与する細胞膜タンパク質であることが報告されている。動物分野では、機械的ストレスによる細胞膜損傷とその細胞膜修復機構についてさかんに研究が行われてきている⁶⁾。これらの研究によれば、細胞膜修復機構とは、機械ストレスにより細胞膜に“穴”が生じた場合、1) 細胞外から流入したカルシウムにより“穴”の周辺に小胞が集まり、2)

融合を始め, 3) 融合した膜は細胞膜に生じた“穴”を被い, 4) 最終的に細胞膜を修復する, 一連の機構である. この機構の中で, シナプトタグミン様タンパク質は内膜系の膜が細胞膜に融合するために必要とされるタンパク質であると推定されている⁷⁾. この細胞膜修復の報告は動物細胞のみではあるが, 植物も自然条件下では常に風などによる物理的ストレスを受けていることを考えると, 同様な機構を持っている可能性は高い. また, 凍結下では植物細胞は, 組織内での氷晶成長に伴う圧迫と凍結脱水により, 必ず機械的ストレスを受ける (Fig. 1 upper). この様にして, 細胞膜修復機構が高い凍結耐性に関与している可能性は十分に考えられる (Fig. 1 lower). この報告では, 細胞膜修復仮説の観点から, 凍結耐性機構を考察する.

材料および方法

実験材料は播種後25日目 (light 12h:dark 12h) のシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana* L. (Heyn) Columbia) を用いた. プロトプラストは Uemura et al.⁸⁾の方法に従い単離した. 得られたプロトプラス

トを, 0.4 M (低温未馴化), 0.5 M (低温馴化1日) もしくは0.6 M (低温馴化7日) ソルビトールを含む溶液 (1 mM Mes/KOH (pH5.6), 1 mM CaCl₂ もしくは0 mM EGTA) に懸濁した.

耐凍性試験はプロトプラストを 100 μ L ずつ試験管に分注した後, アルコールバスを用いて行われた. 凍結融解過程は次の通りである. すなわち, 1) -2°Cで20分間静置した後, 試験管の外から液体窒素温度まで冷却したスパーテルをあて凍結を開始させる (氷核形成), 2) -2°Cで更に30分間置いた後, 目的の温度まで2°C/minのスピードで冷却する (平衡凍結), 3) 目的の温度に達した後, 試験管をアルコールバスから取り出し, 室温で5分間静置し, プロトプラスト懸濁液が融解したことを確認した後, 水中暗所に保存する (融解).

エレクトロポレーション処理は, 200 μ L プロトプラストを 4 mm キュベットに分注した後, 2 ms で square-wave により, 50, 75 もしくは 100 V の電圧で Gene Pulser (BioRad, USA) を用いて行われた.

浸透圧処理は, ソルビトール溶液 (1 mM Mes/KOH (pH 5.6), 1 mM CaCl₂ もしくは 0 mM EGTA, 4 M もしくは 0 M ソルビトール) を適量 0°C でプロトプラスト溶液に加えることにより行われた.

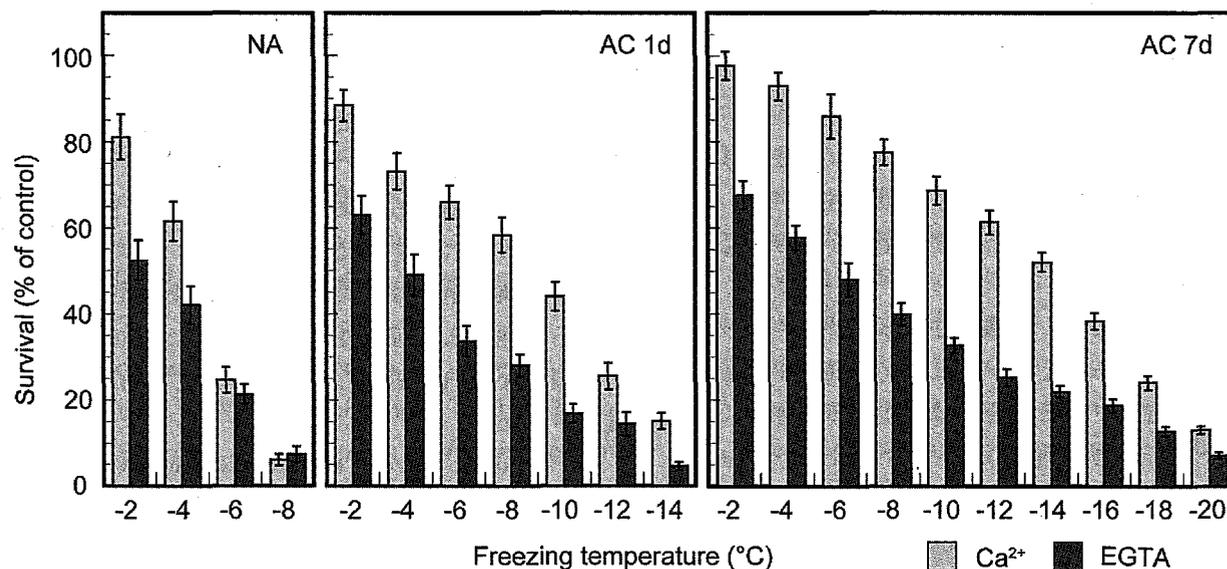


Fig. 2. Freezing tolerance test with *Arabidopsis* protoplasts. Protoplasts were isolated from *Arabidopsis* leaves non-acclimated (NA) or cold-acclimated for one day (AC 1d) or seven days (AC 7d). The survivals of protoplasts in the presence of 1 mM CaCl₂ or 1 mM EGTA were measured. The values of survival are means \pm s.e. (n=9).

それぞれの処理後、サンプルは直ちに、0.001% fluorescein diacetate (FDA) により染色され、血球計算板を用いて生存しているプロトプラストを数えた。生存率は処理前の生細胞の数を 100%として計算された。

結果および考察

序論でも述べたように、細胞膜修復には必ず細胞外からのカルシウムの流入が必要とされる。逆に、もし細胞膜修復機構が凍結耐性に関与するのであれば、少なくとも凍結耐性は細胞外カルシウムに依存する。この事を検証するために、細胞外の条件をコントロールしやすいプロトプラストの系を用いて、プロトプラスト懸濁溶液に 1mM CaCl₂、もしくは 1mM EGTA を加えて、凍結耐性試験を行った (図 2)。プロトプラストは低温未馴化、低温馴化 1 日目と 7 日目のシロイヌナズナから単離したものを用いた。その結果、凍結耐性の大きさは、低温馴化に関わりなく、どのプロトプラストでもカルシウムが凍結融解中に細胞外に存在しなければ、大きく凍結耐性が低下することが明らかとなった (図 2)。この事は、凍結融解中に細胞はカルシウムを用いて凍結耐性を上昇させていることを意味する。カルシウム依存性の凍結耐性は、カルシウム存在下と EGTA 存在下での生存率の差により示されるが、このカルシウム依存性凍結耐性は低温馴化と共に増加する。また低温馴化後は、カルシウム依存性凍結耐性はどの温度域でも全生存率のおおよそ 40 から 60%を示す。この様にして、低温馴化による凍結耐性増大も、細胞外カルシウム依存性凍結耐性の増大が関与することが示された。

上記の実験により、凍結耐性は細胞外カルシウムに大きく依存することが示されたが、植物が細胞膜修復機構を持っているか否かは今のところ明かではない。一方、動物細胞ではエレクトロポレーションによる直接的な機械ストレスに対する耐性は、カルシウム依存性の細胞膜修復に依存することが報告されており⁹⁾、またエレクトロポレーションは理論的にもまた実験的にも膜を直接破壊し穴を開けることが知られている^{10, 11)}。そこでエレクトロポレーターを用いて、プロトプラストに対して細胞膜修復の有無を検討した。その結果、この機械ス

トレスに対する生存率は細胞外カルシウムに依存することが明らかとなり (Table 1)、細胞膜を直接破壊するような機械ストレスに対する耐性はカルシウム依存性であることが示された。この様にして、植物においてもカルシウム依存性膜修復機構が存在する可能性が高いことが示された。

Table 1. Survivals after electroporation.

Voltage		50 V	75 V	100 V
Survival (% of control)	Ca ²⁺	102 ± 6	81 ± 5	60 ± 5
	EGTA	83 ± 6	59 ± 3	28 ± 3

細胞外における凍結、もしくは凍結融解過程では、下記の 3 つの原因により、細胞膜に機械的ストレスが与えられるものと推測される。すなわち、1) 凍結脱水による細胞収縮、2) 融解に伴う細胞膨張、そして 3) 氷晶成長による物理的な圧迫である。このうち、凍結脱水と融解過程の吸水は、これまでプロトプラストを用いた実験で、懸濁溶液の浸透濃度を変えることにより、非凍結下において模擬実験が行われてきた⁴⁾。-4℃の凍結は 2.15 M 相当の脱水を伴うことが予測されるため^{1, 2)}、プロトプラスト懸濁溶液のソルビトール濃度を変えることにより、凍結脱水と融解吸水の模擬実験を行った。脱水、もしくは脱水・吸水処理により生存率の低下は見られたが、カルシウム依存性の耐性は凍結時と比べその値は小さく (Table 2)、またその差には統計的有意な差はなかった (P < 0.05) この様にして、カルシウム依存性凍結耐性は、凍結脱水と融解過程の吸水に対する耐性である可能性は低く、また氷晶成長による物理的な圧迫が関与している可能性が高いことが推察された。

Table 2. Survivals after osmotic treatment.

Osmotic treatment		2.15 M	2.15 M -> 0.6 M
Survival (% of control)	Ca ²⁺	83 ± 4	51 ± 3
	EGTA	76 ± 3	40 ± 3

本実験により, 1) 凍結耐性の半分はカルシウム依存的事であること, 2) 細胞膜に対する機械ストレス耐性もカルシウム依存的事であること, 3) 浸透圧ストレスに対する耐性はカルシウム依存性が低いこと, が明らかとなった. 以上の結果を合わせて考えると, 耐凍性試験で観察された細胞外カルシウム依存性凍結耐性は, 氷晶成長が引き起こす物理的な細胞膜破壊に対する耐性, すなわち細胞膜修復機構である可能性が高い, と推察される. しかし, 今のところこの事を直接示すデータはない. 凍結耐性と細胞膜修復機構との関係は, 分子のメカニズムが明らかにならない限り, 明確にならないと考えられる. 今後, 細胞外カルシウム依存性凍結耐性と細胞膜修復機構との関係をシナプトタグミン様タンパクを中心として明らかにしていきたいと考えている.

謝 辞

本研究は日本学術振興会と岩手大学 21 世紀 COE プログラムの援助の下に行われた.

文 献

- 1) Seki, M., Narusaka, M., Ishida, J., Nanjo, T., Fujita, M., Oono, Y., Kamiya, A., Nakajima, M., Enju, A., Sakurai, T., Satou, M., Akiyama, K., Taji, T., Yamaguchi-Shinozaki, K., Carninci, P., Kawai, J., Hayashizaki, Y. and Shinozaki, K.: Monitoring the expression profiles of 7000 *Arabidopsis* genes under drought, cold and high-salinity stresses using a full-length cDNA microarray, *Plant J.*, **31**, 279-292 (2002)
- 2) Steponkus, P. L., Uemura, M., Joseph, R. A., Gilmour, S. J. and Thomashow, M. F.: Mode of action of the *COR15a* gene on the freezing tolerance of *Arabidopsis thaliana*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 14570-14575 (1998)
- 3) 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, *Nat. Biotechnol.*, **17**, 287-291 (1999)
- 4) Steponkus, P. L., Uemura, M. and Webb, M. S.: A contrast of the cryostability of the plasma membrane of winter rye and spring ort – two species that widely differ in their freezing tolerance and plasma membrane lipid composition, *In "Advances in Low-Temperature Biology, vol. 2"*, Steponkus, P. L., ed., JAI Press, London, p.211-312 (1993)
- 5) Kawamura, Y. and Uemura, M.: Mass spectrometric approach for identifying putative plasma membrane proteins of *Arabidopsis* leaves associated with cold acclimation, *Plant J.*, **36**, 141-154 (2003)
- 6) McNeil, P. L. and Kirchhausen, T.: An emergency response team for membrane repair, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **6**, 499-505 (2005)
- 7) Reddy, A., Caler, E. V. and Andrews, N. W.: Plasma membrane repair is mediated by Ca^{2+} -regulated exocytosis of lysosomes, *Cell*, **106**, 157-169 (2001)
- 8) 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)
- 9) Huynh, C., Roth, D., Ward, D. M., Kaplan, J. and Andrews, N. W.: Defective lysosomal exocytosis and plasma membrane repair in Chediak-Higashi/beige cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 16795-16800 (2004)
- 10) Chang, D. C. and Reese, T. S.: Changes in membrane structure induced by electroporation as revealed by rapid-freezing electron microscopy, *Biophys. J.*, **58**, 1-12 (1990)
- 11) Freeman, S. A., Wang, M. A. and Weaver, J. C.: Theory of electroporation of planar bilayer membranes: predictions of the aqueous area, change in capacitance, and pore-pore separation, *Biophys. J.*, **67**, 42-56 (1994)
- 12) Towill, L. E. and Mazur, P.: Osmotic Shrinkage as a factor in freezing injury in plant tissue cultures, *Plant Physiol.*, **57**, 290-296 (1976)