

植物におけるカルシウム依存的凍結耐性の普遍性

¹岩手大学農学部寒冷バイオフィロンティア研究センター, ²岩手大学21世紀COE
金子 智志¹, 山崎 誠和², 上村 松生^{1,2}, 河村 幸男^{1,2}

Generality of Calcium-Dependent Freezing Tolerance in Plants

Satoshi KANEKO¹, Tomokazu YAMAZAKI², Matsuo UEMURA^{1,2}, Yukio KAWAMURA^{1,2}

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

²*21st century COE program, Iwate University, Morioka, 020-8550, Japan*

Freezing tolerance of plants growing in temperate and frigid zones has a crucial feature to survive in cold winter. Interestingly, in *Arabidopsis* cells, about half of the freezing tolerance depends on extracellular calcium. Furthermore, extracellular calcium increases tolerance to the mechanical stress caused by electroporation, which disrupts the plasma membrane, but it does not increase tolerance to the simple osmotic stress. It has also been indicated that calcium-dependent freezing tolerance involves plasma membrane resealing via SYT1 in *Arabidopsis*. However, the generality of this phenomenon in freezing-tolerant plants remains unknown. Here, we hypothesize that plants which survive in cold winter generally possess the calcium-dependent freezing tolerance. To test this hypothesis, winter wheat (*Triticum aestivum* L. cv. Chihokukomugi) leaves were used as a representative of monocots, and Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) tubers were used as a dicot other than *Brassica* species. The calcium-dependent freezing tolerance was measured with protoplasts or tissue sections by calculating as the difference between survivals in the presence and absence of calcium. Our results indicate wheat leaves and Jerusalem artichoke tubers possess the calcium-dependent freezing tolerance. Thus, it is possible that the calcium-dependent freezing tolerance is a common mechanism for many angiosperms. On the other hand, the level of calcium-dependent freezing tolerance was quite different between wheat leaves and Jerusalem artichoke tubers. This suggests that the strategy of freezing tolerance is different among plants or their organs.

(Received Nov. 27, 2009; Accepted Jan. 15, 2010)

緒 言

温帯以北に生息する生物は、冬の間、気温が氷点下まで下がる厳しい環境を乗り越えねばならない。氷点下においては、多くの水分が凍結するものと考えられるが、冬期に生存できる植物では細胞内は凍結せず、細胞の外のみが凍結している(細胞外凍結)

と考えられている。これは、一般に、細胞内が凍結を起こすと(細胞内凍結)、細胞内の構造は破壊され、

第46回国際低温生物学会(CRYO2009)研究報告14.
[Key words: Freezing tolerance, Calcium, Mechanical stress, Membrane resealing; 凍結耐性, カルシウム, 機械ストレス, 細胞膜修復]

細胞は生存することができないからである¹⁾。

一方、細胞間隙などの限られた空間の中で、氷晶が形成し成長すると、細胞は物理的に圧迫され、機械ストレスを受けることが予想される。実際に、凍結状態下の植物を融解せずに固定した試料を電子顕微鏡により観察した報告では、細胞間隙に氷晶が形成され、細胞壁ごと変形している細胞の様子が写し出されている²⁾。機械ストレスを受けると、細胞膜は、その負荷を一時的に緩和することはできるものの³⁾、ある一定以上の負荷が加わると耐えきれなくなり、細胞膜に局所的な“穴”が開いてしまうことが、間接的に示されている⁴⁾。現在までのところ、最終的に植物個体の死につながる細胞レベルの凍結傷害は、細胞膜の不可逆的な傷害であることが、これまで数多くの研究から指摘されている⁵⁾。従って、植物が冬を越し、再び春に成長するためには、凍結誘導性の機械ストレス(凍結機械ストレス)に対する耐性を獲得することが必要不可欠な要素であると言える。

越冬する植物には、秋から初冬にかけて、凍結耐性を含めた冬の生活に適した生理的形質を獲得する低温馴化と呼ばれる現象がある¹⁾。シナプトタグミン様タンパク質 SYT1 は、シロイヌナズナにおいて低温馴化中に著しく増加する細胞膜タンパク質として報告された⁶⁾。これまで、シナプトタグミンは哺乳類の神経細胞においてカルシウムセンサーとして同定され、また、機械ストレス耐性機構である細胞膜修復に関与していることが報告されている。細胞膜修復とは、機械ストレスによって細胞膜に“穴”が生じた場合、1)細胞外からカルシウムが流入する、2)細胞膜に局在するシナプトタグミンがカルシウムを受け取る、3)それをきっかけとしてエキソサイトシスが起こる、4)融合した膜が細胞膜に生じた“穴”を覆い、細胞膜を修復する、という仮説である⁷⁾。最近のシロイヌナズナにおける詳細な研究の結果、1)細胞外カルシウムの存在下において凍結機械ストレス耐性が上昇すること、2)この細胞外カルシウム依存的凍結耐性には SYT1 が必要であること、3) SYT1 変異体では凍結耐性が著しく低下すること、が分かっている⁴⁾。これらの結果は、細胞膜修復機構が凍結耐性機構としてシロイヌナズナに備わっていることを示している。

しかし、カルシウムに依存した凍結機械ストレス

耐性としての細胞膜修復機構に関する研究・報告はシロイヌナズナのみであり、この機構が凍結耐性を有する植物に一般的な現象か否かは明らかにされていない。このことを明らかにするために必要な遺伝学的実験は、非常に時間を要するか技術的困難を伴う。一方、細胞膜修復には必ず細胞外にカルシウムが必要であることが示されており、シロイヌナズナでは、細胞外カルシウム依存的な凍結耐性は、すべて細胞膜修復によることが確認されている⁴⁾。そこで、本研究では、単子葉類から、冬コムギであるチホクを、またシロイヌナズナと同じ双子葉類の中から、キクイモを試料として選択し、細胞外カルシウムに依存した凍結耐性が高等植物に普遍的に存在するか否かの生理学的検証を行った。

材料および方法

実験材料として、コムギ (*Triticum aestivum* L. cv. Chihokukomugi) の場合、播種後 7 日目 (light 16h : dark 8h) の第 2~3 葉を用いた。低温馴化は 2°C (light 12h : dark 12h) で行った。キクイモ (*Helianthus tuberosus* L.) の場合、東北農業研究センター内で生育している塊茎を 12 月中旬に採取した。プロトプラストは Uemura ら⁸⁾の方法に従い単離した。コムギプロトプラストは、0.75 M ソルビトールを含む調整液 (1 mM 2-(*N*-morpholilino)ethanesulfonic acid (Mes)/KOH (pH5.6), 1 mM もしくは 0 mM CaCl₂) に、キクイモプロトプラストは、0.65 M ソルビトールを含む調整液に懸濁した。プロトプラストおよび組織切片による耐凍性試験は、Yamazaki ら⁴⁾の方法に従った。生存細胞を 0.001% 2',7-biscarboxyethyl-5(6)-carboxyfluorescein acetoxymethyl ester (BCECF-AM)により染色し、生存率を凍結前の生細胞の数を 100%として計算した。

結 果

1. プロトプラストによる検証

コムギにおける結果— 低温馴化一週目、二週目、三週目、四週目のコムギより単離したプロトプラストに対し、-2°C、-8°C、-14°Cで凍結処理を行い、生存率の測定を行った (Fig. 1)。まず、カルシウム存在下での結果より、50%生存率 (LT₅₀)を計算した

ところ、低温馴化一週目で-8.4°C、二週目で-11.7°C、三週目で-11.2°Cであった。四週目では-14°Cで50%を越えていたため、LT₅₀は-14°C以下であると考えられた。次に、各実験区においてカルシウムの有無による凍結耐性の差を検討したところ、一部の実験区においてはわずかなカルシウム依存的な凍結耐性が確認されたものの、基本的に、どの実験区においても統計的に有意な差は見られなかった。

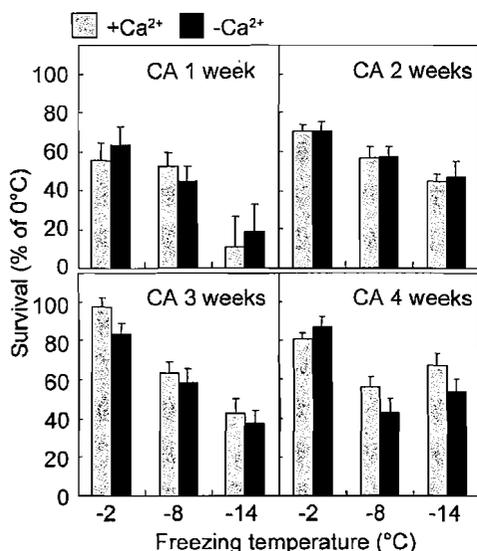


Fig. 1. Survival rates of protoplasts isolated from cold-acclimated wheat leaves. Freezing tolerance tests were performed in the presence or absence of 1 mM calcium using protoplasts isolated from leaves cold-acclimated (CA) for 1, 2, 3 and 4 weeks.

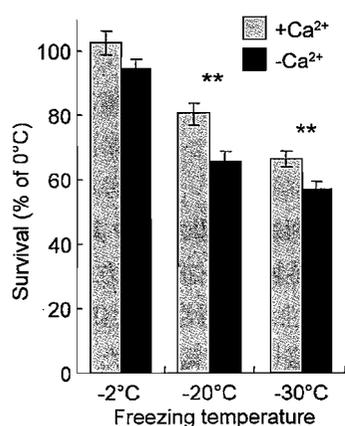


Fig. 2. Survival rates of protoplasts isolated from Jerusalem artichoke tubers. Freezing tolerance tests were performed at -2, -20 and -30°C in the presence or absence of 1 mM calcium. Asterisk indicates a statistically significant difference based on a Student's *t* test (**, $P < 0.01$).

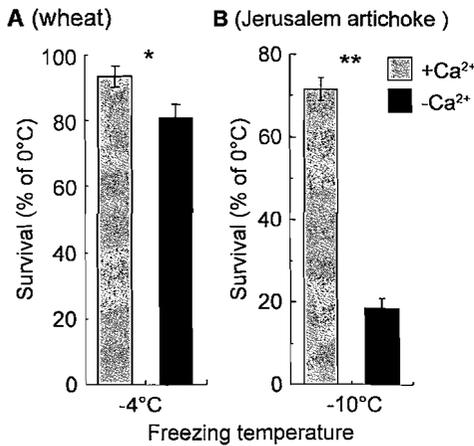
キクイモにおける結果— キクイモ塊茎より単離したプロトプラストを用いて、-2°C、-20°C、および-30°Cにおいて凍結耐性試験を行い、生存率の測定を行った (Fig. 2)。まず、カルシウム存在下での結果であるが、-20°Cおよび-30°Cの凍結処理において、おおよそ80%および70%の生存率が見られ、コムギと比較して非常に高い凍結耐性を有することが確認された。次に、各実験区においてカルシウムの有無による凍結耐性の差を検討した。実験を行ったどの温度区においてもカルシウム依存的な凍結耐性が確認されたが、-20°Cおよび-30°Cにおいて統計的に有意な差が見られた。また、これらの結果から、-20°Cにおいては14.9%、-30°Cにおいては9.4%のカルシウム依存的な凍結耐性が確認された。

2. 組織切片による検証

プロトプラストによる検証では、プロトプラストをソルビトール溶液に浸しているため、凍結による溶液濃縮の結果、機械ストレスよりも浸透圧ストレスを主に受けている可能性がある。一方、細胞膜修復は浸透圧ストレス耐性には関与しない⁴⁾。そこで、低温顕微鏡を用いた組織切片による生存率の測定を行った。この方法は、多数の実験を短時間で行えない欠点はあるものの、浸透圧調節物質のない系において測定できる大きな利点がある。

コムギにおける結果— 低温馴化二週間目のコムギ第2葉から厚さ約70 μmの生きた組織切片を作成し凍結実験に用いた。シロイヌナズナでは、組織切片を浸透圧調節物質のない状態で凍結融解を行うと、プロトプラストと比較して著しく凍結耐性が低下することが報告されている⁴⁾。そこで、本実験では凍結温度を-4°Cとした。まず、凍結融解前後における BCECF 染色した細胞の蛍光顕微鏡画像の比較を行い、凍結融解前後で生きている細胞を計数し、生存率を計算した。その結果、まず、カルシウム存在下においては、生存率は93.4%であった (Fig. 3A)。プロトプラストでは-4°Cの凍結実験を行っていないが、組織切片とプロトプラストの間では、大きな凍結耐性の差はないものと考えられた。次に、カルシウム非存在下における生存率の計算を行ったところ、生存率は80.7%であり、カルシウム存在下と比較して12.7%ほど生存率が低くなっていた (Fig. 3A)。また、この差は統計的に有意な値であり、Fig. 1で示した

プロトプラストの結果と異なり、組織切片を用いた凍結耐性試験ではカルシウム依存的凍結耐性が確認された。



キクイモにおける結果— 厚さ約 70 μm の生きた

Fig. 3. Survival rates of tissue sections. Tissue sections 70 μm in thickness were prepared from wheat leaves cold-acclimated for 2 weeks (A) or Jerusalem artichoke tubers (B). Survivals of tissue sections were measured in no osmoticum solution containing either 1 mM or 0 mM calcium. Asterisk indicates a statistically significant difference based on a Student's *t* test (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$).

組織切片を作成後、それらを凍結実験に用いた。また、プロトプラストで非常に高い凍結耐性が観察されたことを考慮し、本実験では凍結温度を -10°C とした。まず、カルシウム存在下における凍結融解後の生存率を測定したところ 65.7%であった (Fig. 3B)。この値は、明らかに、プロトプラストによる凍結耐性試験で得られた生存率の値よりも低いものであった。次に、カルシウム非存在下で生存率を測定したところ、その値は18%であり、カルシウム存在下の結果と比べて47.7%低いものであった。この差は統計的に優位なものであり、Fig. 2で示したプロトプラストの結果よりも大きなカルシウム依存的凍結耐性が確認された。

考 察

1. コムギにおけるカルシウム依存的凍結耐性

コムギ葉では、プロトプラストを用いた実験系においてカルシウム依存的凍結耐性が確認されなかった (Fig. 1)。コムギ葉では、低温馴化後、プロトプ

ラスト懸濁液のソルビトール濃度を0.75Mとする必要がある、この濃度はキクイモやシロイヌナズナのものに比べて高い濃度であった。溶液の凍結においては、氷晶から溶質が排除されるため、氷晶成長と同時に濃縮溶液が形成される。また、この氷晶成長は、濃縮溶液の水の化学ポテンシャルと同じになるまで続き、それぞれの体積の割合は、温度と初期溶液濃度により決定される。すなわち、温度が高いほど、また初期溶液濃度が高いほど、氷晶の体積の割合は小さくなる。この様にして、プロトプラスト懸濁液の浸透圧調節物質の濃度が高くなると、凍結下における濃縮溶液の体積の割合が増加する。この状態では、プロトプラストにかかるストレスは、主に浸透圧ストレスのみとなり、本実験の目的である機械ストレスを受ける確率が低くなっている可能性が考えられる。カルシウム依存的凍結耐性は浸透圧ストレスには関与しないことから⁴⁾、プロトプラストを用いた実験系で、カルシウム依存的凍結耐性が見られなかったのは、そのことが原因であることが考えられた。そこで、浸透圧調節物質を使わない組織切片による観察では、カルシウム存在下と非存在下での生存率の差、すなわちカルシウム依存的凍結耐性は12.7%であり、カルシウム依存的凍結耐性がコムギにおいて確認された (Fig. 3A)。しかし、この値は全凍結耐性の内、13.6%しか占めない(12.7%/93.4%)。シロイヌナズナ組織切片では、カルシウム依存的凍結耐性は、全凍結耐性のおおよそ50%占めることが分かっていることから⁴⁾、コムギにおいてはシロイヌナズナと比較して、備わっているカルシウム依存的凍結耐性は、非常に小さなものと考えられる。

2. キクイモにおけるカルシウム依存的凍結耐性

キクイモ塊茎においては両方の方法でカルシウム依存的凍結耐性が確認された (Fig. 2 および Fig. 3B)。一方、組織切片で観察した時よりもプロトプラストで観察した時の方が、カルシウム依存的凍結耐性が比較的小さくなっていた (Fig. 2 および Fig. 3B の比較)。この原因として、先に述べたように、浸透圧調節物質を使わない組織切片を用いた実験系の場合、細胞にかかるストレスは、主に凍結機械ストレスである可能性が高いことが考えられる⁴⁾。一方、Murai らはキクイモの耐凍性が組織とプロトプラ

トとで大きく異なることを示し、細胞壁の存在が凍結融解過程において細胞膜に有害に働くことを示唆している⁹⁾。また、組織細胞が急速融解する際に、細胞壁が細胞膜に対して機械なストレスを発生するという仮説がある¹⁾。この仮説は、凍結によって細胞は収縮し、また氷晶によって押しつぶされるが、融解時に細胞壁は自身の弾性によって急速に元に戻るのに対し、プロトプラストは細胞膜の水透過性による制約のため、徐々にしか吸水できないので、細胞壁が細胞膜を引き裂くというものである。細胞壁が存在する状態の方が、カルシウム依存的凍結耐性、つまり機械ストレス耐性が大きかったことは、細胞膜修復は、前述の細胞壁による傷害に対する耐性機構としても働いているかもしれない。

ま と め

本研究結果およびシロイヌナズナにおける過去の研究結果を考えると、カルシウム依存的凍結耐性は高等植物に普遍的である可能性は十分にあり得る。一方、今回観察されたように、カルシウム依存的凍結耐性は植物によってその程度が異なることが示唆された。このことは、いくつかの可能性を意味する。例えば、1)植物により全凍結耐性における脱水ストレス耐性と機械ストレス耐性の占める割合が異なることや、2)カルシウム依存的凍結耐性以外の機械ストレス耐性が存在すること、などが考えられる。もしそうであれば、これは、その植物の生息地や、その器官において、水の状態や凍結様式が異なるため、凍結耐性の様式に多様性がもたらされた結果かもしれない。さらに、組織によっても差がある可能性がある。今後は他の植物種や、また他の器官においても同様の検証を行い、その凍結様式や冬期の様子などを比較することにより、植物が越冬するための戦略の一端を解明する必要がある。

謝 辞

本研究の一部は、岩手大学学長裁量経費および岩手大学農学部重点領域プロジェクトの支援により実施された。

文 献

- 1) Levitt, J.: "Responses of Plants to Environmental Stresses", Ed 2nd., Vol. 1, Academic Press, New York (1980)
- 2) Fujikawa, S. and Takabe, K.: Formation of multiplex lamellae by equilibrium slow freezing of cortical parenchyma cells of mulberry and its possible relationship to freezing tolerance. *Protoplasma*, **190**, 189-203 (1995)
- 3) Yamazaki, T. Kawamura, Y. and Uemura, M.: Cryobehavior of the plasma membrane in protoplasts isolated from cold-acclimated *Arabidopsis* leaves is related to surface area regulation, *Plant Cell Physiol.*, **49**, 944-957 (2008)
- 4) Yamazaki, T. Kawamura, Y. Minami, A. and Uemura, M.: Calcium-Dependent Freezing Tolerance in *Arabidopsis* Involves Membrane Resealing via Synaptotagmin SYT1, *Plant Cell.*, **20**, 3389-3404 (2008)
- 5) 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)
- 6) 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)
- 7) McNeil, P.L. and Kirchhausen, T.: An emergency response team for membrane repair, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **6**, 499-505 (2005)
- 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) Murai, M., and Yoshida, S.: Evidence for the cell wall involvement in temporal changes in freezing tolerance of Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) tubers during cold acclimation, *Plant Cell Physiol.*, **39**, 97-105 (1998)