

植物細胞における小胞体凍結動態の観察

¹岩手大学農学部附属寒冷バイオフィロンティア研究センター²Department of Plant Sciences, University of Saskatchewan小林 紫苑¹, Karen Tanino², 上村 松生¹, 河村 幸男¹

Dynamics of endoplasmic reticulum during freezing in living plant cells

Shion KOBAYASHI¹, Karen TANINO², Matsuo UEMURA¹ and Yukio KAWAMURA¹¹Cryobiofrontier Research Center, Faculty of Agriculture, Iwate University, Morioka 020-8550, Japan²Department of Plant Sciences, University of Saskatchewan, Saskatoon, SK S7N 5A8, Canada

Many plants living under subzero temperatures in winter increase freezing tolerance by exposure to non-freezing temperature, which is known as cold acclimation. In cold-acclimated cells, unique cryobehaviors of the plasma membrane and endoplasmic reticulum (ER) have been reported but their physiological meaning or mechanism is largely unknown. *Allium fistulosum* a cold-hardy Welsh onion which survives winter of -40°C in Saskatchewan, Canada, and intact cells in the single epidermal layer, which is easily peeled from leaf sheath, were observed. The cryobehavior of ER in these epidermal cells that were stained with ER-selective fluorescent dye (ER-Tracker) was observed using a confocal fluorescent microscope with cryostage. According to our observations, cold acclimation increased ER volume per cell and extracellular freezing induced ER vesiculation through the breakdown of the ER network. Freeze-induced ER vesicles in cold-acclimated cells were larger and more abundant than those in non-acclimated cells. ER vesiculation may be associated with extracellular calcium because freeze-induced ER vesicles tended to be more abundant in the presence of calcium than in the absence of calcium. Furthermore, ER vesiculation also occurred in *Arabidopsis* root cells, suggesting a possibility that ER vesiculation is conserved in monocotyledonous and dicotyledonous plants. After thawing, the ER network was recovered only in cold-acclimated cells, suggesting that the dynamics of ER during freeze/thaw cycles are associated with freezing tolerance.

(Received Aug. 24, 2011; Accepted Oct. 21, 2011)

結 言

第 56 回低温生物工学会研究報告 21.

[Key words : Endoplasmic reticulum, Dynamics, Cryobehavior, Freezing ; 小胞体, 動態, 低温挙動, 凍結]

温帯以北の多くの地域では、植物は冬季に氷点下の外気温に曝される。一般に細胞内が凍結する(細胞内凍結)と、細胞内の構造が破壊され、その結果、細胞は死に至る¹⁾。この致死的な細胞内凍結の回避法のひとつとして細胞外凍結が存在し、氷点下でも生存が可能な植物において、一般的な凍結様式である

と考えられている。細胞間隙などの細胞外で氷晶が形成されると、水と氷の化学ポテンシャルの差により細胞内から細胞外へと水が移動し、細胞は脱水ストレスを受けると考えられている。さらに温度低下によって氷晶は成長し、細胞は物理的に圧迫され、機械ストレスも受けることが予想されている²⁾。

一方、越冬する植物は、秋から初冬にかけての気温や日長の変化を感知し、凍結耐性を獲得することが知られており、この現象は低温馴化と呼ばれている¹⁾。低温馴化によって凍結耐性を獲得した植物細胞においては、細胞外凍結の際にダイナミックな細胞の形態的变化が起こることが報告されている。低温馴化したシロイヌナズナの葉から、プロトプラストを単離し凍結させた実験では、細胞外凍結に従って細胞膜が細胞内に陥入し小胞状の構造を形成することが観察されている。この現象は氷晶圧迫による機械的ストレスと関係していることが報告されており、細胞膜の表面積調節機構である可能性が示唆されている²⁾。また、クワの皮層柔細胞においては、凍結によって小胞体由来の多重層構造が形成されることが電子顕微鏡により観察されており、この構造が凍結傷害の原因となる膜同士の融合を回避するために役割を果たしている可能性が示唆されている³⁾。そこで本研究では、特に小胞体に着目し、生きた細胞における小胞体の凍結動態を観察するため、ネギの単層細胞から構成される表皮を用いて、可変温度システムを有した低温ステージと共焦点レーザー顕微鏡による蛍光観察を行い、経時的な小胞体の凍結動態の観察を試みた。

材料および方法

ネギ(*Allium fistulosum* L.)は、カナダ・サスカチュワンで育成していたものを当研究室培養室において23°C (light 24h)でおよそ20cm程度まで生育させた後、個体の葉鞘部から剥離した表皮細胞を1.5 cm×1.0 cm程度のおよそ長方形に切り用いた。小胞体の蛍光染色は、dimethyl sulfoxideを溶媒とするER-Tracker™ Green (Invitrogen)を水で希釈した終濃度5 μMの溶液で20分処理して行った。低温馴化は2°C(light 12h:dark 12h)で4週間行った。シロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana* L.)は、小胞体にGFPタンパク質が特異的に局在する形質転換体(ER-GFP)⁴⁾を用いて、播種後10日目(light

16 h:dark 8 h)の根を先端から約1.5 cm切って用いた。低温馴化は2°C(light 12h:dark 12 h)で1週間行った。それぞれのサンプルを、18 mm×24 mmのカバーガラスにのせた約100 μlの調整液(1 mM2-(*N*-morpholilino)ethanesulfonic acid(MES)/KOH (pH 5.6), 0.0005%FM4-64 (Invitrogen), 1 mM CaCl₂もしくはethylene glycol-bis-(beta-aminoethylether)-*N,N,N',N'*-tetracetic acid(EGTA))中に置き、同サイズのカバーガラスを被せて封入した後、低温ステージ上にセットした。その後、ネギ表皮細胞は0.08°C/min、シロイヌナズナの根は0.05°C/minで2°Cから温度を低下させてサンプルを凍結させ、ネギ表皮細胞は-15°C、シロイヌナズナの根は-3°Cに到達するまでの小胞体の構造変化を観察した。その後1.0°C/minで温度を再び2°Cまで上昇して融解し、観察を継続した。ネギ表皮細胞における凍結耐性試験は、生存率を凍結前の生細胞の数を100%として計算した。その際、凍結融解後2°CにおいてFM4-64によって細胞内が染色されていたものを死細胞として判断した。ネギ表皮細胞における小胞体の体積割合は、凍結前2°Cにおいて、単一細胞の上端から下端まで3 μmごとの断面を撮影し、Slidebook ver. 5.0 (Intelligent Imaging Innovations, Inc.)を用いた3次元イメージングによって細胞および小胞体の体積を算出し、細胞の体積を100%として計算した。これらの撮影はすべて共焦点レーザー顕微鏡にて行った。

結 果

1. ネギ表皮細胞の低温馴化による凍結耐性および小胞体に対する影響の検証

まず、低温馴化によって細胞にどのような変化が生じるかを検証した。凍結融解後の2°Cにおける細胞の生存率を測定したところ、低温馴化後で、生存率がおおよそ51%増加することが確認され、その差は有意であった(Table1)。従って、低温馴化によってネギ表皮細胞において凍結耐性が十分に上昇していることが確認された。また、単一細胞中の小胞体の体積を測定したところ、低温馴化後に約13%増加することが確認された。従って、低温馴化によって小胞体が増加していることが示唆された(Table1)。

Table 1. Cell survival rates at -15°C and endoplasmic reticulum (ER) volume rates per one cell of epidermal cells from leaf sheath of Welsh onion non-acclimated (NA) and cold-acclimated for 28 days (CA).

	NA	CA
Cell survival at $-15^{\circ}\text{C}^{\text{a}}$	$48.2 \pm 2.5\%$	$99.2 \pm 0.3\%$
ER volume per one cell ^b	$21.5 \pm 2.7\%$	$34.0 \pm 3.1\%$

^a Freezing tolerance tests with FM4-64 were performed in MES buffer containing 1 mM CaCl_2 .

^b ER volume rates per one cell in MES buffer at 2°C were calculated by using an image analysis program.

2. 小胞体の凍結動態の観察

次に、ネギ表皮細胞における凍結時の小胞体の動態を観察したところ、約 -2°C で細胞外が凍結するのにともなって、活発に細胞内を流動していた小胞体がおおよそ停止した (Fig. 1). さらに、フィラメントを形成していた小胞体は、そのネットワークが一部分断され、さらに小胞化するという現象が観察された。形成された小胞状の小胞体は、温度の低下とともに、その一部がさらに融合、分裂をするものも観察された (Fig. 1 矢印)。なお、凍結前では細胞質が活発に流動しており、一点で小胞体をとらえることは難しかったため、Fig. 1 では流動が停止した凍結直後の約 -2.0°C からの動態を示した。この小胞化現象は、低温未馴化区と低温馴化区のどちらでも観察されたが、低温馴化区の方が形成された小胞のサイズが大きく、その発生頻度も高い傾向にあった (Data not shown).

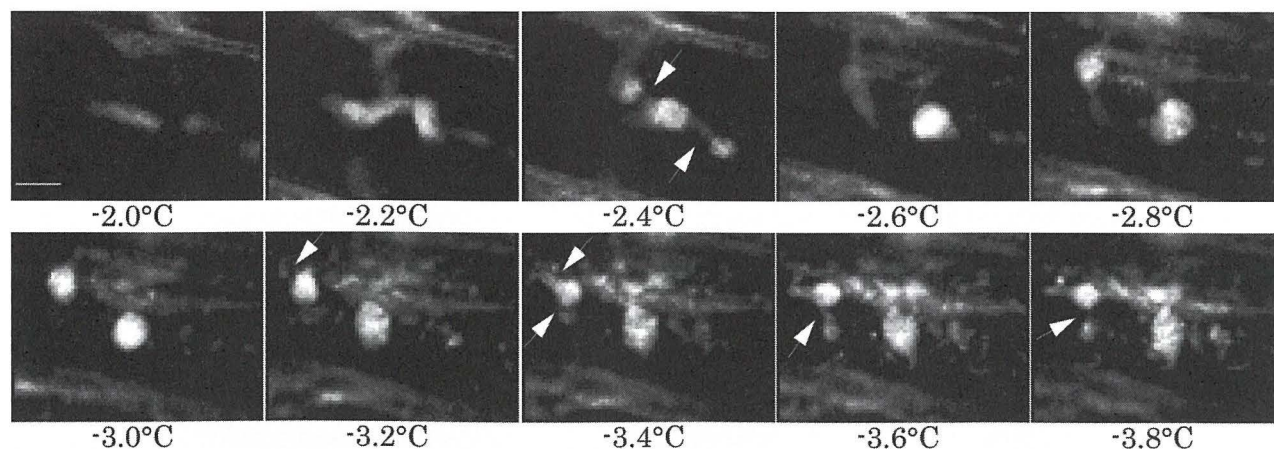


Fig. 1. Dynamics of ER in epidermal cells from leaf sheath of Welsh onion cold-acclimated for 28 days (CA) during cooling at $0.08^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Extracellular freezing occurred at approximately -2.0°C . Arrows indicate fusion or division of ER vesicles. Bar indicates 10 μm .

さらに、調整液にカルシウムイオンのキレート剤である EGTA を加えて同様の凍結実験を行ったところ、カルシウム添加区と比べて、小胞体の小胞化が阻害される傾向にあった (Fig. 2).

また、この小胞化現象が他の植物細胞においても観察される現象であるかどうかを確認するため、モデル植物であるシロイヌナズナの根を用いて、同様の凍結実験を行った。蛍光観察のために、小胞体に GFP タンパク質が特異的に局在する形質転換体 (ER-GFP)⁴⁾ を使用した。ER-GFP の根の細胞においても、凍結前では小胞体は細胞内を流動しているのが観察されたが、細胞外凍結によってその流動はおおよそ停止し、ネギ表皮細胞で観察されたものと同様の小胞状の小胞体が形成されるのが観察された (Fig. 3).

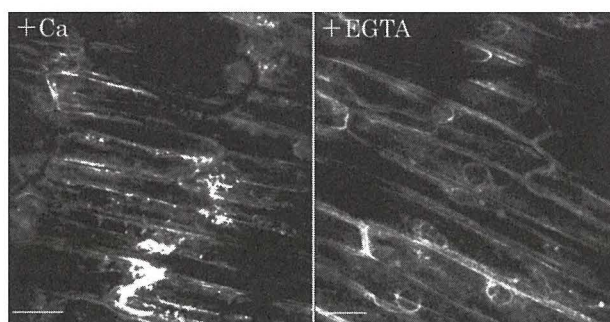


Fig. 2. Cryobehavior of ER in epidermal cells from leaf sheath of Welsh onion cold-acclimated for 28 days (CA) under freezing at -15°C in MES buffer containing either 1 mM CaCl_2 or 1 mM EGTA. Bars indicate 50 μm .

3. 小胞体の凍結融解後動態の観察

続いて、ネギ表皮細胞における凍結融解後の小胞体の経時的観察を行った。低温未馴化区においては、

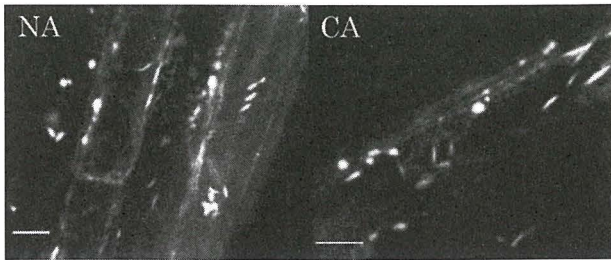


Fig.3. Cryobehavior of ER in root cells from non-acclimated (NA) and cold-acclimated for 7 days (CA) *Arabidopsis* under freezing at -3°C in MES buffer containing 1 mM CaCl_2 . Bars indicate 10 μm .

融解後も凍結中とほぼ同様の形態を維持し、流動は停止した状態のままであったのに対して (Data not shown), 低温馴化区では、多くの細胞で、小胞状であった小胞体が次第に近傍の小胞体同士とネットワークを再構築し、流動を再開するという現象が観察された。最終的には凍結融解前のような活発な細胞内流動を開始した (Fig. 4).

考 察

細胞外凍結によって、小胞体の流動が停止し、ネットワークの分断による小胞化が確認されたことから、小胞体の動態が何らかの形で凍結ストレスの影響を受けていると考えられる。また、低温馴化区に限らず、低温未馴化区でも流動停止および小胞化が確認されたこと、シロイヌナズナの根でも同様の凍結動態が確認されたことを鑑みると、この現象が凍結耐性の強度に関わらず単子葉および双子葉植物で広く観察される可能性も考えられるが、今後さらなる検証が必要である。低温馴化したネギ個体の表皮細胞では、融解後にネットワークの再構築や流動開始が観察されたことから、凍結ストレスによって引き起こされた小胞体の流動停止および小胞化から復帰できることが凍結耐性と何らかの関わりをもつことが示唆される。さらに、細胞外に存在するカルシ

ウムによって、凍結時の小胞体の小胞化現象が促進される傾向にあったことに加え、オオセキショウモを用いた研究では、機械的刺激に応答したカルシウム流入に依存して原形質流動の停止が誘導されることが報告されており⁵⁾、凍結時の小胞体動態が何らかの形でカルシウムの影響を受けている可能性がある。小胞体の流動の停止や小胞化が何故起こるのか、あるいはこういった生理的役割をもつかといったことに関しては、今後さらなる検証が必要である。

謝 辞

本研究で使用した ER-GFP シロイヌナズナ変異体は、京都大学大学院理学研究科西村いくこ先生より分譲していただいた。また、本研究の一部は、科学研究費補助金 (#22780288, #22120003) の援助により実施された。

文 献

- 1) Levitt, J.: "Responses of Plants to Environmental Stresses", Ed 2nd., Vol. 1, Academic Press, New York (1980)
- 2) 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)
- 3) 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)

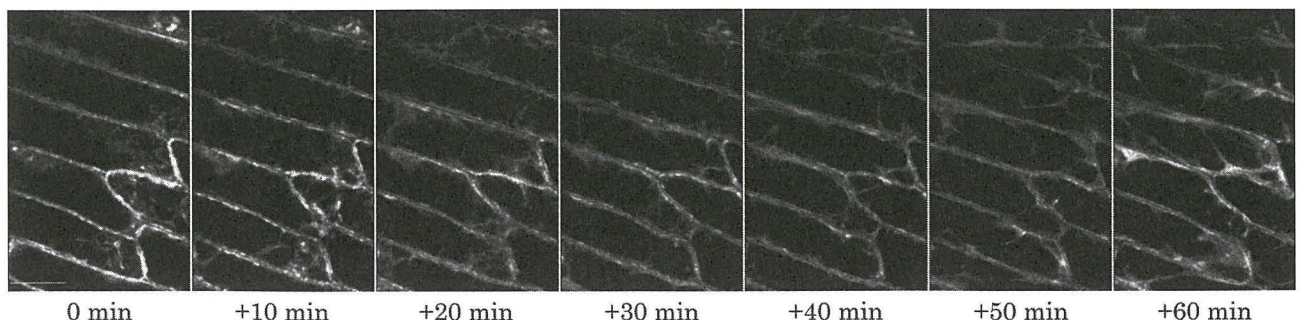


Fig. 4. Dynamics of ER in epidermal cells from leaf sheath of Welsh onion cold-acclimated for 28 days (CA) after thawing at 2°C . Bar indicates 50 μm .

- 4) Matsushima, R. Hayashi, Y. Kondo, M. Shimada, T. Nishimura, M. and Hara-Nishimura, I.: An endoplasmic reticulum-derived structure that is induced under stress conditions in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.*, 130, 1807-1814 (2002)
- 5) Hayashi, T. and Takagi, S.: Ca^{2+} -dependent cessation of cytoplasmic streaming induced by hypertonic treatment in *Vallisneria* mesophyll cells: possible role of cell wall-plasma membrane adhesion. *Plant Cell Physiol.*, 44, 1027-1036 (2003)