

シロイヌナズナ懸濁培養細胞における成長段階に依存した

ストレス耐性誘導機構

2008

岩手大学大学院
連合農学研究科
生物資源科学専攻
(岩手大学)

佐々木 裕

目次

I. 序論	1
I-1) 植物の凍結様式	2
I-2) 温度ストレス	3
I-3) 脱水ストレス	3
I-4) 塩ストレス	4
I-5) 機械的ストレス	5
I-6) 低温馴化	6
I-7) 培養細胞における凍結耐性誘導機構	8
I-8) 植物細胞における細胞周期の進行と細胞分裂	9
I-9) 細胞周期とストレス応答	11
I-10) 本研究の目的	13
II. 材料と方法	
II-1) 生育方法	14
II-2) 成長曲線測定法	16
II-3) 低温処理	16
II-4) 凍結耐性評価法	16
II-5) 糖含量測定法	17
II-6) 糖含量増加培地の作製及び培養法	18
II-7) ABA 含量の測定法	18
II-8) RNA 抽出法	19
II-9) 低温誘導性遺伝子の発現解析 (半定量的 RT-PCR 法)	19
II-10) 44k オリゴアレイ解析法	20
II-11) 細胞周期の同調化法	21
II-12) 同調化の評価法	21
II-12-1) 細胞周期特異的プライマーを用いた半定量的 RT-PCR	21
II-12-2) 有糸分裂率測定法	22
II-13) 同調化細胞を用いた低温処理	22
II-14) 同調化細胞における低温誘導性遺伝子の発現解析	23
II-15) 同調化細胞における ABA 含量測定	23
II-16) 同調化細胞における糖含量の測定	23
II-17) 異なった細胞周期における凍結耐性	23

III. 結果	
III-1) 懸濁培養細胞の成長曲線	24
III-2) 凍結耐性の評価	24
III-3) 糖含量の変動	25
III-4) 糖添加による凍結耐性	26
III-5) ABA 含量の変動	26
III-6) 低温誘導性遺伝子の発現変動	26
III-7) 44k オリゴアレイ解析	27
III-8) 培養過程における細胞周期の変動	28
III-9) 細胞周期の同調化の評価	29
III-10) 異なった細胞周期における低温誘導性遺伝子の発現	30
III-11) 異なった細胞周期における ABA 含量	30
III-12) 異なった細胞周期における糖含量	31
III-13) 異なった細胞周期における凍結耐性	32
IV. 考察	
IV-1) 凍結耐性	33
IV-2) 糖含量の変動	34
IV-3) 糖添加による凍結耐性	35
IV-4) ABA 含量の変動	36
IV-5) 低温誘導性遺伝子の発現変動	37
IV-6) 44k オリゴアレイ	38
IV-7) 培養過程における細胞周期の変動	42
IV-8) 細胞周期の同調化	43
IV-9) 異なった細胞周期における低温誘導性遺伝子の発現	43
IV-10) 異なった細胞周期における ABA 含量	44
IV-11) 異なった細胞周期における糖含量	45
IV-12) 異なった細胞周期における凍結耐性	46
IV-13) 総合考察	48
V. 摘要	51
VI. 謝辞	57
VII. 参考文献	58
VIII. 図表	76

I. 序論

凍結温度を含む低温は、多くの植物、特に農作物の分布や生産性を制限する危機的な要因の一つである。事実、平成15年に発生した全国的な冷夏による農作物の被害総額は3,800億円を越えるものと推定されている（全国農業新聞2003年11月7日版）。地球温暖化が進行している近年においても、かなりの頻度で起こる局所的な低温による農作物への被害を最小限にとどめることは重要な課題といえる。そのためには、低温に対する植物の応答機構を詳細に解析し、その知見を利用した低温・凍結耐性付与を進めることが有効であると考えられる。

低温によってもたらされる傷害には、0~12°C程度の凍らない温度領域で起こる冷温障害（Chilling injury）と0°C以下の温度領域で起こる凍結傷害（Freezing injury）がある。冷温障害は、低温によって起こる生体膜構造や生理代謝反応の脱機能化などの結果として生じる様々な細胞内の機能障害と考えられている（吉田1999）。一方、凍結傷害は、温度低下に加えて、水が凍結することが原因で生じる多様なストレスによって引き起こされる。凍結状態では、大きく分けて、温度ストレス、脱水ストレス、塩ストレス、及び、機械的ストレスが発生する（Levitt 1980）。凍結による傷害を受けた細胞からは、融解後、細胞内容物の漏出が認められることから、凍結傷害の初発部位は原形質膜であると考えられている（Steponkus 1984）。細胞は凍結脱水（I-1）植物の凍結様式参照）により収縮され、その結果、原形質膜と細胞内小器官が異常接近し、ついには、膜同士の融合が起こる場合がある。これにより、生体膜の構造及び機能が失われ、細胞は不可逆的な傷害を受け、枯死してしまう。以上のことから、脱水ストレスは凍結傷害の中で最も重要なストレスであると考えられている。

しかし、温帯以北を起源とし、そこに生育する植物は、凍らない程度（約10°C以下）の低温にある期間曝されることにより、このような凍結ストレスに対する防御機構を獲得する（低温馴化、Cold acclimation）。この低温馴化機構は、生理生化学、形態学、細胞学、及び、分子生物学の面から多くの研究がなされてきた（Levitt 1980、酒井1982、篠崎2003）。特に、近年では、比較的短時間で低温馴化が起こり（Gilmour *et al.* 1988）、全塩基配列がすでに決定されている（THE ARABIDOPSIS GENOME INITIATIVE 2000）という優れた特徴を持つシロイヌナズナが、モデル植物として低温馴化の研究に多く用いられている。また、植物体だけではなく、様々な種の植物培養細胞を用いて細胞レベルにおけるストレス応答の研究も多く報告されている（Leborgne *et al.* 1995、Koike *et al.* 1997、Tabaei-Aghdaei *et al.* 2003）。さらに、植物体、及び、培養細胞ともに、ストレス応答性はその成長段階で異なる

こと (Sugawara & Sakai 1974、Withers & Street 1977、Takagi *et al.* 2003、Ishikawa *et al.* 2006、Masclaux-Daubresse *et al.* 2007) が知られている。生物の細胞は、細胞周期で厳密に制御された細胞分裂により細胞数を増加し成長する。そのため、ストレス応答に及ぼす成長段階の影響は、細胞周期と密接な関係があると考えられる。事実、近年、細胞周期がストレス応答の制御に重要に関わっていることが明らかになり始めている (Kadota *et al.* 2005)。

ここで、本研究が解明することを目的とした植物の細胞レベルにおける凍結ストレス応答と細胞周期の影響に関わる現時点までの知見を概説することにする。まず、1) 項で植物の凍結様式について述べ、2、3、4 及び 5) 項で温度ストレス、脱水ストレス、塩ストレス及び機械的ストレスが植物に与える影響、6) 項でシロイヌナズナ植物体を中心とした低温馴化機構の研究の現状、7) 項で植物の培養細胞を用いた凍結耐性誘導機構の研究、8) 項は植物細胞における細胞周期の進行と細胞分裂、そして、9) 項で細胞周期とストレス応答について説明する。また、最後に、以上のことを踏まえて 10) 項で本研究の目的について言及する。

I-1) 植物の凍結様式

気温が低下していくと、植物の葉表面などに水滴が付着する。その水滴はマイナス温度に達すると凍り始め、組織内部の細胞間隙にある水分の凍結を引き起こす。細胞間隙の水分が先に凍結する原因として、細胞間隙の水分は細胞内の水分よりも浸透濃度が低いことや氷核となりうる物質(氷核活性物質)が細胞外に多いことなどが挙げられる(朝比奈 1971、酒井 1982)。通常、細胞外に形成された氷晶は、原形質膜の存在により細胞内に侵入できない。その結果、細胞内の水分は過冷却状態となり(朝比奈 1971、酒井 1982、藤川 1996)、その結果、細胞間隙における氷表面の水分が持つ蒸気圧が過冷却状態の細胞内水分より低くなってしまう。このため、細胞間隙と細胞内で気体になる水の量に差が生じる。この差を解消するため、細胞内の水分は細胞膜と細胞壁を通過して細胞間隙に移動する。これにより細胞内は脱水され収縮し、細胞外に移動した水は細胞外にできた氷晶をさらに成長させる。この凍結様式は細胞外凍結 (Extracellular freezing) と呼ばれ、自然界における植物に広く起こる現象である。細胞外凍結が長期間続くと、細胞は過度の脱水ストレスを受けることになる。

凍結脱水を受けた植物細胞では、膜タンパク質を含まない膜脂質層だけの平滑な部位が形成される(吉田 2002)。これは、膜脂質と膜タンパク質は水との親和性が異なるため、より水に対する親和性が高い(言い換えると、分子表面により多くの水分子を結合してい

る) 膜タンパク質が横方向に押しやられ、その結果、タンパク質が凝集する部分と、逆に、わずかのタンパク質しか存在しない部分が生ずる現象である。このように膜脂質と膜タンパク質が不均一な分布状態になると、タンパク質間での相互作用やタンパク質に富んだ部分と脂質に富んだ部分の境界面に物理的な“段差”のようなものが生じ、植物細胞の原形質膜はその半透性を失うことがある。膜の半透性が失われると、植物が凍結温度に曝された後、温度が上昇し氷の融解が起こっても、細胞は収縮したまま元の形状に戻ることが出来なくなり、細胞は不可逆的な傷害を受けることとなる。

1-2) 温度ストレス

凍結傷害における主なストレスの一つに温度ストレスが挙げられる。温度ストレスは植物の代謝経路に大きな影響を与えることが知られている (Yoshida 1995, Ensminger *et al.* 2006)。植物の代謝は、主に酵素反応系によって成り立っている。酵素反応は、それぞれの反応を司る酵素に至適温度があり、その温度範囲から外れると酵素はその活性が低下し、結果として、植物細胞の機能に大きな影響を与える。例えば、0°C に曝されたヤエナリの培養細胞では、24 時間以内に液胞膜の H⁺-ATPase 活性が可逆的に失活し、24 時間後にはエチレンの前駆体である 1-アミノシクロプロパン-1-カルボン酸の分解やタンパク質合成機能の低下が起こることが知られている (Yoshida 1995)。また、低温は光と組み合わせることで複合的なストレスとなり、障害を増大させることも知られている。例えば、タバコを用いた研究では、5°C の低温下においた時の光合成活性の阻害は光環境下に曝される時間、あるいは、光強度に依存することが分かっている (Moon *et al.* 1995)。これは、低温により PSI 光合成反応中心複合体のサブユニットである *psaB* 転写産物の分解が起こり、その結果として PSI の光合成反応中心が破壊されることが原因であると考えられている (Sonoike 1996)。また、低温がチラコイド膜脂質の粘性を増大させ電子伝達系を阻害するとともに、炭素、窒素、硫黄元素の代謝に関わる酵素反応を低下させることも、低温による光障害の大きな要因であると考えられている (Ensminger *et al.* 2006)。

1-3) 脱水ストレス

上述したように、細胞外凍結が長期間続くことで細胞は脱水ストレスを受ける。これまでの研究から、凍結脱水ストレスにより引き起こされる傷害機構は複数存在することが分かっている (Uemura & Steponkus 1989, Steponkus *et al.* 1993, Nagao *et al.* 2008)。一つは、凍結温度が比較的高い場合に起こる現象である (Expansion-Induced Lysis; EIL)。EIL は、凍結脱水により細胞が収縮することで余分の細胞膜が細胞内へ小胞として切り離される現象

で、細胞膜のサイズは凍結脱水される前の細胞における細胞膜面積よりも小さくなる。その結果、融解過程で膨張する際に、細胞は元のサイズに戻ることができず、細胞膜にかかる張力が限界を超えた際に破裂してしまう。さらに温度の低下が起これば凍結脱水が進むと、細胞の各膜系表面に結合している水分子が失われ、細胞膜と葉緑体などの細胞小器官の膜系が相互作用する。この時、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排除、それに引き続く複数の膜系の相互作用によりヘキサゴナル II 相という脂質相が観察される (Gordon-Kamm & Steponkus 1984)。ヘキサゴナル II 相が形成されると、それぞれの膜の自己同一性 (identity) は不可逆的に失われてしまう。さらに、ヘキサゴナル II 相が細胞膜を含む複数の膜の相互作用で形成されることから、細胞内の溶質が細胞外に流出してしまい、融解しても元通りの大きさの細胞にはもどらず、細胞は不可逆的な傷害を受け死に至る。これが二つ目の傷害機構である (Loss of Osmotic Responsiveness; LOR)。LOR には、ヘキサゴナル II 相を伴わない場合も報告されている (Uemura *et al.* 1995)。低温馴化後に凍結耐性が高くなった植物では、上述した膜相互作用が起こる温度が既にヘキサゴナル II 相形成温度より低くなっているため、生じた膜相互作用は膜融合を引き起こし、凍結切断法を用いた電子顕微鏡画像の上では断面が片方の膜から他方の膜へジャンプする画像となって表れる。これは Fracture-jump lesion と呼ばれる。

さらに、最近の報告は、長期間の凍結によって引き起こされる傷害は脱水の進行によるものではなく、ある程度の脱水により誘導された塩の濃縮により起こることを示唆している (Nagao *et al.* 2008)。Nagao らは、シロイヌナズナの葉を -2°C という比較的高い温度で 2 から 4 日程度の長期間凍結させた場合、細胞内の氷晶サイズに変化が見られない一方、凍結脱水で観察されるような膜タンパク質の凝集によって起こる脂質のみで構成される相が観察されることを示した。同時に、同様の変化が塩溶液に浸した葉においても起こることから、凍結過程で見られる傷害発生が脱水の結果起こる塩濃縮が原因であると結論づけている。このように、脱水ストレスによる傷害発生には様々な機構が存在し、凍結下でこれらの現象が複合的に生ずることで、植物は大きな傷害を受けているものと考えられる。

I-4) 塩ストレス

先に述べたように、凍結脱水によって細胞内に存在する水溶液が濃縮され、細胞内無機イオン濃度の上昇 (塩濃縮) がもたらされる。凍結による塩ストレスは、Lovelock によって初めて提唱された (Lovelock 1953a, 1953b, 1954)。Lovelock は、赤血球を用いて溶質の凍害防御作用について解析し、等張の食塩溶液中で赤血球を異なる温度まで凍結した場合の溶血量が、その凍結温度に対応した氷点を持つ食塩溶液に赤血球を曝した場合の溶血量

と対応することを明らかにした。このことから、凍結傷害が細胞内外の溶液中の塩が濃縮されることによって引き起こされる可能性を示した。また、植物を用いた研究では、凍結によりチラコイド膜から ATPase の F_1 サブユニット (CF_1) が遊離する主な原因が、塩濃度の増大によるものであることが示されている (Garber & Steponkus 1976, Steponkus *et al.* 1977)。これらの報告では、ハウレンソウから単離したチラコイド膜に存在する Ca^{2+} -ATPase の活性が、-1 から -4°C の温度で 2 時間凍結することにより急速に低下することが示されている。また、これらの凍結処理の最終温度で曝される塩濃度に相当する濃度の塩溶液に浸したチラコイドでも著しく Ca^{2+} -ATPase の活性が低下することから、凍結により濃縮された塩が凍結傷害の要因であると結論した。一方、低温馴化した植物では、凍結下で起こるこのような塩ストレスによる葉緑体機能の低下が、チラコイド膜に存在する cryoprotective plant protein (cryoprotectin) というタンパク質の蓄積によって緩和されていることが報告されている (Volger & Herber 1975, Hinch 1986, Hinch *et al.* 1990, Hinch 2002)。これらの報告の中に、一定濃度の塩溶液中でスクロースを加えることによって反応液中の浸透濃度を変化させた場合、cryoprotectin が存在しない条件下でチラコイドを凍結させると傷害は凍結温度あるいは浸透濃度に依存して大きくなるが、cryoprotectin 存在下では凍結温度に依存した傷害が緩和されることが示されている (Hinch 2002)。つまり、凍結脱水で助長される塩濃縮による傷害を cryoprotectin が緩和していることを意味している。このように、凍結傷害において塩ストレスは植物の生存を決める重要な要因であるとともに、低温馴化によってその傷害を緩和するような機構が存在することが推測される。

I-5) 機械的ストレス

細胞は、細胞外凍結の進行に伴って成長した氷晶により、細胞壁ごと、あるいは、原形質膜越しに圧迫され、ねじれるような変形を受ける (藤川 1996)。一方で、高浸透濃度の溶液に曝された細胞では、ねじれるような形態は示さず、左右対称の収縮が起こる (Olien & Smith 1977, Mazur & Rigopoulos 1983)。つまり、凍結下で起こる細胞の収縮は、脱水に加えて細胞外にできた氷晶による圧迫 (物理的力) によって生じていることが示唆されている (Mazur & Rigopoulos 1983)。実際に、シロタモギタケを用いた研究から、凍結下で生じるヘキサゴナル II 相の形成は凍結によって生じる物理的な力が関与していることが示されている (Fujikawa 1991)。この報告は、シロタモギタケを緩慢凍結すると液胞膜においてヘキサゴナル II 相の形成が起こるが、浸透ストレスによる脱水や過冷却による温度低下ではヘキサゴナル II 相の形成が起こらないことを示している。つまり、凍結下で起こる細胞の収縮とそれに伴う傷害は、細胞外の氷晶による物理的な力、言い換えると機械的ストレスが 1 つの要因であることを明らかにした。

一方で、細胞外の氷晶が細胞膜を破壊した後、膜の修復が正常に行われなければ細胞は致命的な傷害を受けることになるかと推測される（河村ら 2006、2007）。以前、Kawamura & Uemura (2003) は、シロイヌナズナの葉から単離した細胞膜画分において、低温馴化過程で量的増大が起こるタンパク質の一つとして、シナプトタグミン様タンパク質を同定した。動物細胞を用いた研究から、シナプトタグミンは機械的ストレスによる細胞膜の損傷を細胞外のカルシウムを用いて修復する機構に関わっていることが分かっている（Reddy *et al.* 2001、Chakrabarti *et al.* 2003、McNeil & Kirchhausen 2005、Shen *et al.* 2005）。そこで、河村らは植物におけるカルシウム依存的な膜修復の可能性を検証し、エレクトロポレーションを用いて直接的に細胞膜を破壊した時、及び、凍結処理を行った時にカルシウム依存的な耐性の増大が見られることを明らかにした（河村ら 2006、2007）。このことから、植物における凍結傷害には機械ストレスも大きな影響を与える要因の一つであることが示唆される。

I-6) 低温馴化

上述したように、低温馴化とは、植物が凍らない程度の低温にある期間曝されることで凍結耐性を増大させる現象をいう。これまでの多くの研究から、低温馴化過程では、細胞膜の脂質組成が変化すること（Uemura & Steponkus 1994、Uemura *et al.* 1995）、糖などの細胞内適合溶質が蓄積すること（Koster & Lynch 1992、Wanner & Junttila 1999、Kamata & Uemura 2004）、植物ホルモンであるアブシジン酸（ABA）含量が一過的に増大すること（Lang *et al.* 1994）、及び、多くの低温誘導性遺伝子の発現が起こること（Thomashow 1999）などが明らかにされている。

例えば、ライムギ、オートムギ、及び、シロイヌナズナでは、共通して、低温馴化過程において細胞膜脂質のうち水和性の大きいリン脂質の含量が増加すること、そして、その一方で、水和性の小さいセレブロシドが減少することが示されている（Lynch & Steponkus 1987、Uemura *et al.* 1994、1995）。このような低温馴化過程における細胞膜脂質の変化は、脱水過程で引き起こされる水との親和性に依存した膜脂質の相分離（Lyotropic phase separation）を起りにくくし、凍結脱水過程における逆ミセル構造中間体の形成が抑制され、それに引き続くヘキサゴナル II 相形成や Fracture-jump lesion の発生を防止するものと考えられている。その結果として、細胞における凍結傷害の発生が低下するのであろう。

低温馴化による凍結耐性の増大には、適合溶質の蓄積も重要な要因の一つとして挙げられている（Levitt 1980、Koster & Lynch 1992、Wanner & Junttila 1999、Kamata & Uemura 2004）。適合溶質とは、細胞内に高濃度蓄積しても細胞の代謝反応に害を及ぼさない主に糖類、プ

ロリンなどのアミノ酸、及び、ベタインなどの浸透圧調節物質の一群である。これらの物質が細胞内に蓄積すると、細胞内の浸透濃度が上昇し、モル氷点降下を起こす。その結果、凍結脱水の程度が緩和されると考えられている (吉田 1999)。さらに、適合溶質は、浸透圧調節機能に加えて、酵素活性の維持 (Incharoensakdi *et al.* 1986)、膜構造の安定化 (Crowe *et al.* 1987)、及び、活性酸素種の除去 (Smirnov & Cumbes 1989) といった機能も持ち合わせていることも報告されている。実際に、シロイヌナズナ植物体を 1 日暗所で処理することによって細胞内の糖やデンプンを減少させた後、様々な濃度のスクロース溶液に浸すことで、細胞内糖含量を人工的に増加させた葉から単離したプロトプラストの凍結耐性が、低温馴化処理を行わなくても高くなっていることが報告されている (Uemura & Steponkus 2003)。これは、LOR の発生が抑制された結果であることがわかっている。また、シロイヌナズナの葉の凍結耐性が葉齢に依存していることを報告した論文でも、糖含量の蓄積が大きくその違いに貢献していることが明らかになっている (Takagi *et al.* 2003)。この報告では、低温馴化による凍結耐性の増大は若葉において最も高くなり、この時の糖含量も耐性変動の程度と相関した挙動を示すことを明らかにしている。さらに、糖類以外の適合溶質も凍結耐性の増大に重要な働きをすることが示されている (Sakamoto *et al.* 2000)。例えば、ベタインを合成できないと考えられているシロイヌナズナ植物体にアルスロバクター由来のベタイン合成酵素 *codA* を発現させた形質転換体では、葉緑体にベタインが蓄積し凍結耐性の増大が起こるとともに、凍結融解後の光合成活性が野生型に比べ高くなることが明らかになっている。これらのことから、適合溶質の蓄積が凍結耐性の増大に大きく寄与していることが考えられる。

低温処理過程では細胞内の ABA 含量が一過的に増大する (Daie & Campbell 1981, Chen *et al.* 1983, Laik & Dorffling 1985, Guy & Haskell 1988, Lang *et al.* 1994)。また、逆に、ABA が凍結耐性の増大に関与していることを示す報告も多くなされている (Chen & Gusta 1983, Heino *et al.* 1990, Mantyla *et al.* 1995)。例えば、冬コムギ、冬ライムギ、及び、プロモグラスの培養細胞、あるいは、シロイヌナズナ植物に細胞外から ABA を添加すると、低温処理を行わなくても凍結耐性が増大する (Chen & Gusta 1983, Mantyla *et al.* 1995)。また、シロイヌナズナの ABA 欠損突然変異体 (*aba-1*) では低温馴化能が弱まるとともに、この突然変異体に細胞外から ABA を添加すると低温馴化能が相補されることが分かっている (Heino *et al.* 1990, Mantyla *et al.* 1995)。上述したような ABA による凍結耐性の誘導は、ABA が低温あるいは乾燥誘導性遺伝子の発現、あるいはそれに伴うタンパク質の蓄積を誘導するためであると考えられている (Mantyla *et al.* 1995, Zhang *et al.* 2004)。実際に、シロイヌナズナ植物体において低温あるいは ABA 処理による凍結耐性の増大と相関して乾燥誘導性の RAB18 が蓄積する。また、この蓄積は低温及び ABA 処理で凍結耐性が増大しない ABA 非

感受性突然変異体 (ABA insensitive: *abi*) では観察されないことが知られている (Mäntylä *et al.* 1995)。これらのことから、低温馴化過程で増大する ABA は低温馴化による凍結耐性の増大に重要な働きをしていると考えられる。

さらに近年、低温に応答した遺伝子発現の解析が積極的に行われ、低温馴化の遺伝子レベルにおける制御経路が明らかになりつつある (Chen *et al.* 2002, Fowler & Thomashow 2002, Kreps *et al.* 2002, Seki *et al.* 2002, Hannah *et al.* 2005, 2006, Lee *et al.* 2005, Oono *et al.* 2006)。これらの解析から、シロイヌナズナが持っている約 24,000 個の遺伝子のうち、939 個の遺伝子が低温誘導されることや 655 個の遺伝子が低温抑制されることが判明し、多くの遺伝子の発現が低温で変動することが明らかになっている。低温で誘導される遺伝子の中で、*CBF3/DREB1A* は低温馴化のマスタースイッチと考えられており、*CBF3/DREB1A* を過剰発現したシロイヌナズナ植物体では、その下流にある標的遺伝子の発現を介して糖やプロリンなどの適合溶質の増大などが起こり、植物体の凍結耐性が顕著に増大することが知られている (Gilmour *et al.* 2000, Yamaguchi-Shinozaki & Shinozaki 2001)。凍結耐性の増大に関与している *CBF3/DREB1A* の下流標的遺伝子の中に *cold-responsive (COR)* 遺伝子がある (Lin & Thomashow 1992, Wilhelm & Thomashow 1993)。*COR* 遺伝子は、低温馴化過程で強く誘導されることがわかっている。*COR* 遺伝子の一つである *COR15a* を過剰発現した形質転換シロイヌナズナでは、事実、野生型と比べ凍結耐性が高いことが報告されている (Artus *et al.* 1996)。*COR15a* にコードされるストロマタンパク質 *COR15am* は、葉緑体と細胞膜との相互作用を緩和し、ヘキサゴナル II 相の形成を防いでいると考えられている (Steponkus *et al.* 1998)。また、近年、*CBF3/DREB1A* の上流で機能する遺伝子 *inducer of CBF expression 1 (ICE1)* が発見され、*ice1* 突然変異体では野生型に比べ *CBF3/DREB1A* とその下流にある標的遺伝子の発現が減衰するとともに、凍結耐性が低くなることが報告されている (Chinnusamy *et al.* 2003)。一方で、*ice1* 突然変異体を用いたマイクロアレイ解析から、1594 個の低温馴化過程で変動する遺伝子のうち、*ice* 変異体で発現が変動する遺伝子は 369 個であり、低温馴化過程では *CBF3/DREB1A* 非依存的な経路も多く存在する可能性が示されている (Lee *et al.* 2005)。このように、低温馴化過程は少数の遺伝的な要素に支配されているのではなく、様々な機構により制御されていると考えられる。

I-7) 培養細胞における凍結耐性誘導機構

これまでも、植物の培養細胞系は、器官、組織、細胞間の相互作用が少なく、細胞レベルにおける反応が観察できるという利点を有するため、実験材料にしばしば用いられてきた。凍結耐性誘導機構に関する研究においても、様々な植物種の培養細胞を用いて以下

のような研究がなされている。

例えば、オオムギの培養細胞では、低温馴化による凍結耐性が増大する割合が細胞外へ糖を高濃度で添加した場合に、低濃度添加した時と比べて大きくなることが明らかにされている (Tabaci-Aghdaei *et al.* 2003)。つまり、細胞外の糖が低温馴化機構に影響することを示している。また、ユーカリの様々な系統の培養細胞を用いた研究は、凍結耐性の最も高い系統で糖含量が高いこと、フルクトースやラフィノースが存在する条件で培養した場合に凍結耐性が顕著に増大することを示しており、培養細胞においても凍結耐性の誘導と糖含量の間に密接な関係があることを示している (Leborgne *et al.* 1995)。さらに、培地中にABAを付加し細胞を培養すると、植物体と同様に、低温馴化処理を行わなくても凍結耐性が増大することが分かっている (Chen & Gusta 1983, Koike *et al.* 1997)。このように、培養細胞においても植物体と同様の応答が起こることから、凍結耐性を誘導する機構は細胞レベルでも存在していることが推測される。

さらに、培養細胞における凍結保存効率、及び、ストレス耐性が、細胞の成長段階によって影響を受けることも分かっている (Sugawara & Sakai 1974, Withers & Street 1977, Ishikawa *et al.* 2006)。Sugawara & Sakai (1974) と Withers & Street (1977) は、セイヨウカジカエデの培養細胞を液体窒素により凍結保存する際、誘導期の後期、あるいは、細胞分裂早期の細胞が、それ以降の成長段階の細胞に比べて高い生存能力を持つことを示した。また、Ishikawa ら (2006) は、ブロモグラスの培養細胞を用いて、凍結保存効率、あるいは、いくつかの環境ストレス耐性 (凍結耐性、塩耐性、熱耐性) が、浸透濃度の増大と関連して対数増殖期の細胞において高くなることを明らかにしている。上述したように、成長段階に依存してストレス耐性が異なる現象は、シロイヌナズナ植物体でも知られていることから (I-6 参照; Takagi *et al.* 2003)、培養細胞が示すストレス応答機構は、多くの部分で植物体のストレス応答機構を反映しているのかもしれない。しかし、どのような理由で成長段階に依存したストレス耐性機構が見られるのかについては、多くの部分で解明されていない点が残されている。

I-8) 植物細胞における細胞周期の進行と細胞分裂

どのように成長段階の違いがストレス耐性に影響するのかを解明するためには、各成長段階の細胞の特徴を知る必要がある。その理由は、植物細胞は細胞分裂による細胞数の増加と吸水や伸長による細胞サイズの増大によって成長し、この両者において細胞の状態は大きく異なっているためである (Fry 2004, Inze 2005, Sampedro & Cosgrove 2005, Fiorani &

Beemster 2006)。また、トウモロコシでは、それぞれの成長ステージの細胞で低温に対する応答が異なる (Rymen *et al.* 2007) ことが分かっていると同時に、タバコの培養細胞を用いた研究から、ストレス応答の制御が細胞周期に依存していることを示唆する報告もなされている (Kadota *et al.* 2005; 後述)。細胞分裂は細胞周期の進行により制御されており、植物を含めた生物全般において、細胞周期は成長の制御に関して、普遍的、かつ、必要不可欠な生物現象である。

細胞周期は、細胞分裂で生じた娘細胞が、再び母細胞となって細胞分裂を行い、新しい娘細胞になるまでの過程をいう。細胞周期は M、G1、S、及び、G2 期の 4 期に分けられる。M 期では有糸分裂が起こり、細胞が分裂する。G1 期は DNA の複製準備期間で、M 期のような視覚的な変化は観察されない。しかし、G1 期と S 期の間には細胞周期のチェックポイントがあり、DNA に傷害を受けた場合など細胞周期の進行に異常がある場合には、細胞周期の進行を停止させる制御機構が存在する。S 期は DNA の複製が起こる時期である。G2 期は有糸分裂の準備を行う時期であり、この時期においてもチェックポイントにより、正確な遺伝情報を娘細胞に伝達する機構が備わっている (Voet *et al.* 2000; 図 1)。

植物における細胞周期の進行機構に関する研究は、タバコやシロイヌナズナを用いて積極的に行われている (町田と福田 2000)。G1 期から S 期、あるいは、G2 期から M 期への移行といった細胞周期の進行において中心的な役割を果たすのは、サイクリン (cyclin; Cyc)、及び、サイクリン依存性キナーゼ (cyclin-dependent kinase; CDK) である (町田と福田 2000)。CDK はセリン/スレオニンプロテインキナーゼの一種で、S 期への進行においては retinoblastoma susceptibility (Rb) タンパク質をリン酸化すること、M 期への進行においては細胞周期の進行に関わる Myb 等の転写因子や MAP キナーゼカスケードを活性化することによって、細胞周期の進行を制御している重要な因子であり、その活性化には特定の Cyc との結合が必要である (町田と福田 2000)。また、CDK の活性は、CDK のリン酸化 (Morgan 1997, De Veylder *et al.* 2003) や KRPs/ICK (Kip Related Proteins/Inhibitor or Interactor of CDK) により負に制御されることで厳密に行われている (Zhou *et al.* 2003, Coelho *et al.* 2005, Verkest *et al.* 2005, Weinl *et al.* 2005, Bisbis *et al.* 2006, Nakai *et al.* 2006, Pettko-Szandtner *et al.* 2006)。そこで、次に、細胞周期の実行因子である CDK 及びその制御に重要な KRPs/ICK の植物における役割について説明する。

植物の CDK は、いくつかの点において酵母や動物の CDK とは異なっている。植物の CDK の数は酵母に比べ多く、シロイヌナズナではアミノ酸配列を基に CDKA から F まで 6 タイプに分類されている (Adachi *et al.* 2006)。また、CDKA は酵母の *Cdc2/Cdc28p* と同様、

細胞周期を通して恒常的に発現し、G1 から S 期、及び、G2 から M 期への進行に関わっている (Hemerly *et al.* 1995)。一方、CDKB は植物に特異的な CDK で CDKB1 と CDKB2 の 2 種類に分類される。また、その発現は酵母や動物の CDK とは異なり、特定の時期に発現する。つまり、*CDKB1* は S 期から M 期にかけ、*CDKB2* は G2 期から M 期にかけ発現することが知られている (Magyar *et al.* 1997、Umeda *et al.* 1999、Porceddu *et al.* 2001、Menges *et al.* 2005)。また、CDKB は CDKA と異なり、酵母の *cdc2/cdc28* 突然変異体を相補できないため、植物に特異的な機能を有するものと考えられている (Imajuku *et al.* 1992、Fobert *et al.* 1996)。CDKC はシロイヌナズナの分裂組織で転写産物が検出されないとともに、その機能欠損株では花の成長、トリコームの発達、及び、花成に影響がでることから、細胞分裂反応ではなく植物の発達に関与していると考えられている (Barroco *et al.* 2003、Cui *et al.* 2007)。CDKD 及び CDKF は、動物や酵母の CDK 活性化キナーゼ (CKA) と相同性を有する因子で、実際にその活性を持つことが示されている (Shimotohno *et al.* 2006)。このことから、CDKD、及び、CDKF は細胞周期の進行に関わる因子であると考えられるが、その詳細については不明である。さらに、CDKE は雄しべ、及び、心皮の形成に関与することから、細胞分化に関わると考えられている (Wang & Chen 2004)。

細胞周期の進行過程の厳密な制御には、KRPs/ICK が重要な働きを担っている。動物では、INK4、及び、Kip/Cip という二つの異なった CKIs (CDK inhibitors) ファミリーが存在する。これらは、G1 期/S 期特異的な CDK と結合し、細胞周期の進行を抑制している (Toyoshima & Hunter 1994、Lee *et al.* 1995)。近年、シロイヌナズナにおいても 7 個の CKI 様分子である KRPs/ICK (*KRP1-7*) が見つかった (Wang *et al.* 1997、Lui *et al.* 2000、De Veylder *et al.* 2001、Zhou *et al.* 2002)。これらの KRPs/ICK は、CDKA、あるいは、CDKB 活性を阻害することが報告されている (Zhou *et al.* 2003、Coelho *et al.* 2005、Verkest *et al.* 2005、Bisbis *et al.* 2006、Nakai *et al.* 2006、Pettko-Szandtner *et al.* 2006)。さらに、KRPs/ICK ファミリーの一つである *KRP1/ICK1* あるいは *KRP2/ICK2* を過剰発現したシロイヌナズナ植物体では、細胞周期の進行が阻害されることで細胞のサイズが縮小し、その結果として、植物体が矮化することが分かっている (Wang *et al.* 2000、De Veylder *et al.* 2001)。このように、KRPs/ICK は CDK の活性を制御することで細胞周期の進行を決定していると考えられる。

I-9) 細胞周期とストレス応答

また、植物の生長は、細胞分裂による細胞数の増大と吸水、伸長による細胞サイズの増大により決定されている。その中で、細胞の分裂は細胞周期により厳密に制御されている。成長段階の違いがストレス応答に影響することを考えると、細胞周期の進行がストレス応

答に関与していることが大いに予想される。近年、細胞周期とストレス応答性に関する報告がいくつかなされてきた (Wang *et al.* 1998、Kadota *et al.* 2005、Pettko-Szandtner *et al.* 2006、Rymen *et al.* 2007)。例えば、シロイヌナズナの *KRP1/ICK1* 遺伝子の発現が ABA や低温により誘導されるという報告がある (Wang *et al.* 1998)。また、アルファルファの *KRPs/ICK* である *KRPMi* 遺伝子の発現も ABA や塩処理で誘導される (Pettko-Szandtner *et al.* 2006)。これらの結果は、ストレスへの適応を効果的に行うため、*KRPs/ICK* が細胞を特定の細胞周期に同調させているという可能性を示唆している。トウモロコシを用いた研究では、低温に曝された時に CDK 活性を強く抑制する *KRP1* 及び *KRP3* 遺伝子の発現が誘導される一方で、比較的抑制が弱い *KRP2* 遺伝子の発現は抑制されることを示した。著者らは、これらの結果から、低温による細胞周期の制御系が再構成されている可能性を示唆している (Coelho *et al.* 2005、Rymen *et al.* 2007)。さらに、タバコの培養細胞を用いた Kadota らの報告では、酸化ストレスで働く膜電位依存型のカルシウムチャンネル (*NITPC1A*、及び、*NITPCB*) 遺伝子の発現が細胞周期の M~G1 期にかけて高くなり、それと相関して酸化ストレスによる細胞質のカルシウムイオン濃度、及び、抗酸化酵素遺伝子 (アスコルビン酸ペルオキシダーゼ : *APX*、及び、グルタチオンペルオキシダーゼ : *GPX*) の発現も細胞周期に依存して高くなることを示している (Kadota *et al.* 2005)。以上の知見をまとめると、ストレス環境に対する応答と細胞周期の進行には密接な関係があるとともに、2 次的な要因で細胞周期が停止するというよりもむしろ、ストレスに適応するために積極的に細胞周期を改変しているとも考えられる。

このように、植物の培養細胞を用いた細胞レベルの研究は、様々な視点から解析がなされている。しかし、低温馴化のモデル植物として用いられているシロイヌナズナの培養細胞を用いた細胞レベルでの解析は、植物体に比べ非常に限られている。本研究で用いたシロイヌナズナ懸濁培養細胞 (T87 株) では、環境シグナル、特に、高浸透圧シグナル (Takahashi *et al.* 2001) や ABA シグナル (Yoshida *et al.* 2002) に関する報告がされている。例えば、Yoshida らの報告ではシロイヌナズナ T87 培養細胞を ABA 処理した時に蓄積増大するタンパク質の一つに、タンパク質リン酸化酵素 SNF1-related protein kinase 2 (SRK2) があることを明らかにした。また、シロイヌナズナ植物体を用いて、このタンパク質をコードする遺伝子を破壊すると、ABA を介した乾燥誘導性遺伝子の発現が減衰するとともに、低温条件における気孔の閉鎖が阻害されることで、野生型に比べ突然変異体は傷害が顕著に現れることを示している。しかし、現在までの所、凍結耐性に関わる報告はなされていない。

I-10) 本研究の目的

今まで述べてきたように、シロイヌナズナ植物体を用いた低温馴化過程における凍結耐性誘導機構の研究は、積極的に行われている。しかし、未だに、明確な低温馴化機構の解明、そして、得られた知見を利用して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を確立するまでには至っていない。植物個体には、様々な異なった細胞、組織、及び、器官が混在しており、これらの異なったものの低温に対する応答の違いや多様な応答反応が相互作用することによって複雑な耐性増大の仕組みが備わっていることもその原因の一つと考えられる。この問題を解決し、凍結耐性の増大、あるいは、獲得分子機構を解明し、効率的に凍結耐性を増大させる技術を開発するためには、細胞における低温に対する応答を解析し、低温馴化の素過程で重要な変化を明らかにする必要があると考えた。そこで、本研究は、低温馴化のモデル植物であるシロイヌナズナから誘導された培養細胞 (T87株) を用いて、細胞レベルにおける低温馴化による凍結耐性誘導機構を明らかにすることを目的とした。本研究では、2つの異なった成長段階 (誘導期及び対数増殖期) の細胞を用いて、低温処理による凍結耐性の変動、細胞内糖や ABA 含量の変動、低温誘導性遺伝子の発現変動を詳しく解析し、低温馴化機構が成長段階によって制御されることを明らかにした。また、低温馴化する能力がある誘導期の細胞では、細胞周期が盛んに進行していることを示すとともに、細胞周期に依存した低温応答性があることを明らかにした。ここで得られた結果は、細胞周期が低温馴化機構に重要な限定要因であるという新しいことを示唆している。

II. 材料と方法

II-1) 生育方法

T87 懸濁培養細胞はシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana* L. Hyne ecotype Columbia) seedling 由来の培養細胞である (Axelos *et al.* 1992)。本懸濁培養細胞は、理化学研究所ゲノム科学総合研究センター植物ゲノム機能情報研究グループより提供していただいた。

本培養細胞の液体培養培地 (JPL Medium、Axelos *et al.* 1992 : 組成は下記参照) は、200 ml の三角フラスコに 40 ml 入れ、オートクレーブにより滅菌処理を行うことで作製した。培養細胞を回収するための濾過器具は、20 ml プラスチックシリンジの先端部をカッターナイフで切り取り、切り口をバーナーであぶった後、シリンジとメッシュを 1 mm のメッシュに押し付け接合して作成した。シリンジからはみ出たメッシュをはさみで切り取り、シリンジを 300 ml の三角フラスコに備え付け、アルミホイルで口部分を包みオートクレーブにより滅菌処理を行い、使用した。

継代培養には、まず、クリーンベンチ内でこの器具を用いて 12 日間培養した培養細胞を濾過した。回収された細胞 2 ml を滅菌した培地に入れ、アルミホイルで口部分を包んだ後、23°C、連続白色光 (約 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$)、120 rpm で振とう培養した。また、培養細胞の一部は、コンタミネーションなどによる損失に備えて、寒天培地上で継代培養した。

T87 培養培地

ストック A (500 ml)		ストック D (100 ml)	
KNO ₃	32.75 g	myo-inositol	1 g
CaCl ₂ · 2H ₂ O	2.2 g	glycine	20 mg
MgSO ₄ · 7H ₂ O	1.85 g		
KH ₂ PO ₄	0.85 g		

ストック B (500 ml)

H ₃ BO ₃	3.1 g
MnSO ₄ · 4H ₂ O	11.15 g
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	5.3 g
KI	0.415 g
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0.125 g
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0.0125 g
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.0125 g

ストック VT (100 ml)

nicotinic acid	50 mg
pyridoxine-HCl	50 mg
thiamine-HCl	40 mg

ストック C (500 ml)

FeSO ₄ · 7H ₂ O	1.39 g
Na ₂ · EDTA	1.86 g

100 mM リン酸 buffer pH 7.0

0.2 M Na ₂ HPO ₄	30.5 ml
0.2 M KH ₂ PO ₄	19.5 ml

100 ml にメスアップ

全てのストックを調整後オートクレーブ

T87 培地

ストック A	15 ml
ストック B	0.15 ml
ストック C	1 ml
ストック D	5 ml
ストック VT	0.5 ml
vitamine assay	0.05 g
casaminoacids	
sucrose	7.5 g
100 mM リン酸 buffer	0.5 ml
500 μM 1-NAA (α-NAA)	1 ml
MQ	X ml
全量	500 ml

KOH で pH 5.7 に調整後、オートクレーブした。

寒天培地は、液体培地に agar を 0.6% (w/v) になるよう加え、オートクレーブした。その後、滅菌済みシャーレ (深型 90 × 20 mm、IWAKI) に流し込み、固まるまでクリーンベンチ内に静置した。作製した寒天培地に培養開始後 12 日目の細胞を 200 μl 広げ、連続白色光下 (約 100 μmol m⁻² sec⁻¹)、23°C で静置して培養した。継代は約 1 ヶ月に 1 回行った。

II-2) 成長曲線測定法

成長曲線の測定は下記のように行った。

40 ml の培地に 2 ml の細胞を入れて継代し、培養開始後 3 日おきに生重量を測定した。まず、測定に使用した濾紙の重量を決定するため、1 ml の MQ 水をブフナロートに設置した濾紙に浸し、30 秒間バキュームポンプ (V-503、柴田科学) を用いて吸引処理された濾紙の湿重量を電子天秤により測定し、得られた生重量をコントロール (サンプルなし) とした。次に実験区 (細胞+濾紙) の湿重量を測定するため、培養している細胞懸濁液を 1 ml 量り取り、濾紙に浸し、コントロール区と同様に 30 秒間吸引処理し、その重量を測定した。実験区で得られた重量からコントロールで得られた重量を差し引くことにより、細胞の重量を計算し、それをグラフ化して細胞の成長曲線を決定した。実験は 3 回繰り返し、その平均をデータとして示した。

次に、得られた成長曲線より、比較的重量の増大が見られない培養初期の期間を誘導期、引き続き見られる直線的な重量の増加が起こる期間を対数増殖期、その後に見られる再び重量の増加が起こらなくなる期間を定常期として三つの異なった成長段階を決定した。

II-3) 低温処理

二つの異なった成長段階 (誘導期及び対数増殖期) まで培養した細胞を 2°C の人工気象器 (CU-351A、TOMY) に入れ、12 時間明期/12 時間暗期条件 (明期: 約 $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$)、120 rpm で一定期間振とう培養することにより低温処理を行った。

II-4) 凍結耐性評価法

凍結耐性は再成長法を用いて測定した (下記参照)。未処理 (以下 NA)、低温 2 日 (以下 CA2) 処理した培養細胞をクリーンベンチ内で 50 ml プラスチックチューブに入れ、卓上多本架遠心機 (LC-122、TOMY) を用いて 225 g で 5 分間遠心し、細胞を沈殿させた。クリーンベンチ内でデカントにより培地を取り除いた後、滅菌水を 50 ml 入れ、転倒混和により細胞を軽く懸濁することで細胞の洗浄を行った。その後、再び遠心分離により細胞を沈殿させ、クリーンベンチ内で上清を除去した。この操作を合計 3 回行い、細胞外に付着した糖を取り除いた。滅菌済みの薬さじを用いて、洗浄した細胞を滅菌済み濾紙 (90 mm) の上に置き細胞外の水分を取り除いた。再び、新たな濾紙に細胞を移しかえ、十分に水を切っ

た。その後、重量を量った 15 ml プラスチックチューブに培養細胞 (0.3 g) を電子天秤 (AB204-S、METTLER TOLEDO) を用いて量りとった。次いで、植氷時に直接細胞に冷却した金属棒が触れるのを避けるため、0.5×3 cm 程度に切った滅菌済み濾紙をチューブ内に滅菌ピンセットを用いて入れ、300 µl の滅菌水を加えた。各低温馴化処理区及び凍結温度区で同様の方法を用いサンプリングを行った。

凍結は、エタノールを冷媒としたプログラムフリーザー (PRO COOL BATH NCB-3400、EYELA) を用いて行った。サンプルの入ったプラスチックチューブを-2°C で 15 分間インキュベーションした後、液体窒素であらかじめ冷却しておいた金属棒をプラスチックチューブの外壁に触れることによってチューブ内の濾紙を冷却し、植氷を行った。植氷後、-2°C でさらに 2 時間インキュベートし、試料の凍結を十分に行った。その後、1 時間あたり 2°C の冷却速度で温度を下げた。目的温度まで冷却した後、細胞の入ったチューブを取り出し、チューブの外に付いたエタノールをふき取り、冷蔵庫で 1 日置いて融解した。翌日、融解した細胞をクリーンベンチ内で新しい液体培地 (100 ml 三角フラスコに 20 ml の T87 液体培地を入れ、オートクレーブ処理したもの) に全量移し換え、前述の培養条件で再成長させた。再成長させた細胞の湿重量を上述した方法に従い測定することで成長曲線を作成し、各凍結温度区で細胞が増殖するものを生存サンプルとして細胞の凍結耐性を決定した。生存率は、再成長開始後 10 日目の生重量を測定し、0°C 処理の培養細胞の生重量を 100%とした時の各温度区における生重量を%で表示した。

II-5) 糖含量測定法

誘導期及び対数増殖期それぞれの培養細胞について低温処理を行い、すでに述べられた吸引処理により細胞を回収した。回収した細胞 100 mg を 1.5 ml のエッペンチューブに入れ、エッペンチューブごと液体窒素に入れ細胞を凍結し、プラスチック pestle を用いて細胞を破碎した。破碎した細胞に 500 µl の 80% (v/v) エタノールを加えてプラスチック pestle を用いてさらにすりつぶし、内部標準として 200 µg fucose を付加後、さらに 500 µl の 80% (v/v) エタノールを加えてすりつぶした。破碎物を vortex し、加熱したヒートブロックにのせ、80°C で 30 分間処理した。その後、遠心分離 (20,400 g、5 分、室温) を行い、上清を別のエッペンチューブに回収した。回収した上清を 80°C のヒートブロックで風乾させ、その後、1 ml の 80% (v/v) エタノールを加えた。この操作 (下線部) を 3 回繰り返した。その後、乾燥させた沈殿物に、メタノール : クロロホルム : MQ 水混合液 (400 µl : 400 µl : 360 µl) を加え、vortex した。さらに、遠心分離 (9,100 g、10 分、室温) して、上清を別のエッペンチューブに回収した。エッペンチューブを 80°C のヒートブロックにのせて、抽出液を風

乾させた。乾燥後、乾固物に MQ 水を 1 ml 加え完全に溶かし、0.2 μm membrane filter (Millex® -LH, MILLIPORE) で濾過した後、HPLC (高速液体クロマトグラフィー) で分析を行った (カラム: Shodex Asahipak KS-800、流速 0.8 ml/min、分析時間 90 分、HPLC 装置: 全て SHIMADZU 製、液送ユニット: LC-10ADVP、オートインジェクター: SIL-10ADVP、カラムオープン: CTO-10AVP、示差屈折計検出器: RID-10A、システムコントローラ: SCL-10AVP、データシステム: CLASS-VP)。定量は、あらかじめ目的とする糖 (本研究では sucrose、glucose、fructose) の検量線を市販の各糖を用いて求めておき、それに対するピーク面積比から計算によって求めた。

II-6) 糖含量増加培地の作製及び培養法

Sucrose を用いて糖含量増加培地の作製を行った。作製方法は、T87 液体培地を作製する際に、sucrose 量を通常液体培地の 2 倍量 (3%) に相当するように 500 ml あたり 15 g 加えた後、通常培地と同様の作製方法 (II-1) 参照) で作製した。また、細胞の培養も通常培養法 (II) -1 参照) で対数増殖期まで行った。

II-7) ABA 含量の測定法

誘導期及び対数増殖期の培養細胞を低温処理し、吸引処理により細胞を回収した。回収した細胞 0.3 g を液体窒素で凍結させた後、乳鉢と乳棒を用いて破碎した。破碎した細胞に 5 ml の 80% (v/v) メタノールを加え、さらに破碎した。15 ml プラスチックチューブに破碎液を回収し、1 日 4°C で振とうした。振とう後、遠心分離 (6,000 g、10 分、4°C) し、上清を新しい 15 ml プラスチックチューブに回収した。下層 (ペレット) に 80% (v/v) メタノールを加えて懸濁し、1 時間 4°C で振とうした。再び、遠心分離 (6,000 g、10 分、4°C) を行い、上清を上述した 15 ml プラスチックチューブに回収した。回収後、80% (v/v) メタノールを加え全量を 10 ml とし、さらに、MQ を 1.43 ml 加え溶液のエタノール濃度を 70% とした。このサンプルから 4 ml を Sep-Pak (C₁₈, Waters) に通し、ガラス試験管に回収した。さらに、1 ml の 70% (v/v) メタノールを Sep-Pak に通すことで完全にサンプルを回収した。窒素ガスを用いてサンプル中のメタノールを除いた後、水相に 1 N の塩酸を加えて pH を 2 ~3 に調製し、MQ を加え全量を 5 ml とした。ABA の定量は、ELISA Kit (Phydotek ABA、SIGMA) に示されているプロトコルに従い行った。また、Kit で使用されている抗体は、ウシ血清アルブミン (BSA) と *trans*, *cis*-ABA の結合物質に対するものを用いており、*trans*, *trans*-ABA には反応しないことが分かっている (Weiler 1979)。吸光度の測定はマイクロプレートリーダー (Multiskan JX、Labsystems) を用いて 405 nm で行った。

II-8) RNA 抽出法

低温処理前後の培養細胞を吸引処理によって回収し、液体窒素で凍結した。そこから 100 mg 量り取り、プラスチック pestle を用いて細胞を破碎した。RNA の抽出は RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) に示されているプロトコルに従って行った。

II-9) 低温誘導性遺伝子の発現解析 (半定量的 RT-PCR 法)

半定量的 RT-PCR は Kit を用いて行った (Advantage RT-for-PCR Kit, BD Biosciences; PCR Kit, Takara)。

用いた各プライマーの配列は以下の通りである。

DREB1A (At4g25480.1)

Fwd-5' ATGAACTCATTCTGCTTTCTG 3'

Rev-5' TTAATAACTCCATAACGATACGTC 3'

COR15a (At2g42540.1)

Fwd-5' ATGGCGATGTCTTTCTCAGG 3'

Rev-5' CTACTTTGTGGCATCCTTAGC 3'

RD29A (At5g52310.1)

Fwd-5' ATGGATCAAACAGAGGAACCACC 3'

Rev-5' TGCTTCTCGTCGACAAGTCTC 3'

ACTIN2 (At3g18780.1)

Fwd-5' CTAAGCTCTCAAGATCAAAGGCTTA 3'

Rev-5' ACTAAAACGCAAAACGAAAGCGGTT 3'

低温処理前後の培養細胞から抽出した total RNA 1 µg を含む RNA 溶液を PCR 用プラスチックチューブにとり、滅菌水で全液量を 12.5 µl にした。次に、1.0 µl の oligo (dT) プライマー (Kit に含まれる製品) を加え、PCR 反応機 (Gene Amp PCR System 2700, Applied Biosystem) を用いて 70°C で 2 分間加熱し、その後、氷上で急冷した。このチューブに混合液 (Kit に含まれる製品の 5× reaction buffer 4.0 µl, dNTP mix 1.0 µl, Recombinant RNase inhibitor 0.5 µl, MMLV reverse transcriptase 1.0 µl) を加え、ピペッティングにより混和した。混和後、PCR 反応機を用いて 42°C で 1 時間、94°C で 5 分間加熱した後、遠心によってチューブの縁に付いている液を完全に落とした。PCR 産物 (cDNA) に 80 µl の滅菌水を加えて液量を 100 µl にし、ピペッティングによって混和した。混合液 (cDNA 1 µl, Ex Taq 1 µl, 10× Ex Taq Buffer 5 µl, dNTP Mixture 4 µl, *ACTIN2* プライマー forward 及び reverse 各終濃

度 1 μ M、滅菌水で 50 μ l にメスアップ) を加え、ピペッティングにより混和した後、PCR 反応機を用いて 95°C・15 分、(95°C・30 秒、59°C・30 秒、72°C・1 分) × 30 サイクル、引き続き、72°C・5 分、4°C・ ∞ で反応を行った。反応が終了したサンプルを 2%アガロースゲルを用いて電気泳動を行い、遺伝子発現を解析システム (BioDoc-It™ Imaging System、Funakoshi) を用いて解析した。cDNA 濃度を正確に揃えるため、発現量が各実験区で同程度になる希釈率で cDNA を希釈し、再び PCR と電気泳動を行うことにより確認した。希釈率を決定した後、目的遺伝子のプライマーを用いて上述した組成で混合液を調整し、94°C・5 分、(94°C・45 秒、各プライマーのアニーリング温度 (CBF3/DREB1A 51°C、COR15a 54°C、RD29A 56°C)・45 秒、72°C・2 分) × サイクル数 (各遺伝子はそれぞれ 24、28、32)、72°C・5 分、4°C・ ∞ で反応を行った。電気泳動後、遺伝子発現が飽和していないサイクルを選択し、低温誘導性発現量の比較を行った。

II-10) 44k オリゴアレイ解析法

オリゴアレイ解析は、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 44k 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、対数増殖期の培養細胞を NA、低温処理 1 日 (以下 CA1) 及び CA2 処理したものである。この培養細胞から上述した方法を用いて RNA を抽出し、電気泳動と吸光度測定により RNA の品質を確認した。オリゴアレイ解析は独立した 3 サンプル (biological replicates) について行い、1 サンプルに対し 3 回の繰り返し実験 (technical replicates) を行った。オリゴアレイへのハイブリダイズ実験は、アジレント社のインストラクション (<http://www.chem.agilent.com/Scripts/PCol.asp?IPage=494>) に従って行った。

マイクロアレイデータは以下の条件を満たすものについて解析を行った。

1. 処理したサンプル (Cy5 Intensity) のシグナル値の平均値が >1000 である。
2. 処理したサンプルのシグナル強度が 2 倍以上に誘導されるもの、あるいは 0.5 倍以下に抑制されるもの。
3. GeneSpring (アジレント社) を用いた解析で独立した 3 サンプルから得られた *t*-test P-value の値が <0.05 のもの。

また、オリゴアレイデータは ArrayExpress database に登録した (accession number: E-MEXP-1347)。

II-11) 細胞周期の同調化法

細胞周期の同調化には DNA ポリメラーゼ α の阻害剤であるアフィディコリン (Wako) を用いて行った (Menges & Murray 2002)。定常期 (継代後 15 日目) の培養細胞を II-1) で記した濾過器具に通した。濾過されずにメッシュ上に残った細胞を新しい液体培地 (40 ml) に懸濁し、DMSO に溶解したアフィディコリンを添加した (終濃度 30 μ M)。添加後、通常培養条件下で 20 時間培養することで細胞周期を停止させた。その後、50 ml プラスチックチューブに培養液ごと回収し、卓上多本架遠心機 (LC-122、TOMY) を用いて 225 g で 90 秒間遠心し上清を取り除いた。さらに、アフィディコリンを完全に除去するため、液体培地 50 ml を用いて再懸濁し、遠心分離により上清を取り除く操作を 3 回繰り返した。洗浄後、ピペットマンを用いて完全に液体培地を取り除き、40 ml の新しい液体培地に再懸濁、その後、通常培養条件下で培養することで細胞周期を同調化させた。

II-12) 同調化の評価法

細胞周期の同調化は細胞周期特異的プライマーを用いた半定量的 RT-PCR 及び有糸分裂率の測定により評価した。

II-12-1) 細胞周期特異的プライマーを用いた半定量的 RT-PCR 法

Histone H4、*CDKB1;1*、*CDKB2;2* 及び *KRP2/ICK2* をそれぞれ S、G2、M 及び G1 期のマーカー遺伝子として用いた (Menges & Murray 2002)。

用いられた各プライマーの配列は以下の通りである。

Histone H4 (At3g45930.1)

Fwd-5' ATTCAAGTTCCTTTAGAAAATGTCAGG 3'

Rev-5' ATACTAAACAAGCATCGAGAAACTG 3'

CDKB1;1 (At3g54180.1)

Fwd-5' AGAAGGTCGGAGAAGGAACATAC 3'

Rev-5' TCAGCAAAGATACAACCAACAGAC 3'

CDKB2;2 (At1g20930.1)

Fwd-5' TGGACAACAATGGAGTTAAACCC 3'

Rev-5' AGACAAGCAAAGACAGAGATAGAAC 3'

KRP2/ICK2 (At3g50630.1)

Fwd-5' AAGGTGACGTCGTAGGAGATTATG 3'

Rev-5' TCTTCTAACTCAGCTTCCTTCAC 3'

同調培養開始後、3時間ごとに30時間まで細胞をエッペンチューブに回収し、液体窒素で凍結させた後、-80°Cで保存した。保存した細胞を用いて半定量的RT-PCRを上述した方法により行った。各プライマーのアニーリング温度は全て58.4°CでPCR反応を行った。

II-12-2) 有糸分裂率測定法

有糸分裂率の測定はDNA蛍光色素の propidium iodide (PI, SIGMA) と蛍光顕微鏡 (システム顕微鏡 BX51, OLYMPUS) を用いて行った。同調培養開始後、3時間から30時間までエッペンチューブに回収した細胞に1mlの10%ホルマリン (in PBS; 137 mM NaCl, 8.1 mM Na₂HPO₄ · 12H₂O, 2.68 mM KCl, 1.47 mM KH₂PO₄) を加え、1時間以上常温において回転混和することで細胞を固定した。固定された細胞を遠心分離 (225 g, 5分, 常温) し、上清を除去した。そこに1mlのPBSを加え懸濁した後、再び遠心分離 (225 g, 5分, 常温) し、上清を除去することでホルマリンを完全に取り除いた。そこから20 µlの懸濁液を新しいエッペンチューブに移し、終濃度0.5%になるようにRNaseA (Invitrogen) を添加し、ピペッティングにより混和、引き続いて37°Cのヒートブロック上でRNA消化を行った。反応後、PIを終濃度40 µg/mlで添加し、ピペッティングにより混和した後、遮光条件下で15分間静置した。次いで、1ml PBSに懸濁し、遠心分離 (225 g, 5分, 常温) により上清を除去することで洗浄操作とした。この洗浄操作を計3回行った後、20 µlのPBSに懸濁し、蛍光顕微鏡を用いて核DNAを観察した (励起光535 nm、半値幅15 nm、吸収580 nm、フィルターセットU-MWIG2 (Olympus))。有糸分裂率の測定は、顕微鏡で観察されたM期中期と後期の数を全核数 (約1,500個) で割ることにより算出した。

II-13) 同調化細胞を用いた低温処理

各細胞周期 (S、G2/M、G1期) まで培養した細胞を、上述した (II-3参照) 低温チャンバーに入れ低温処理とした。

II-14) 同調化細胞における低温誘導性遺伝子の発現解析

NA、CA1 処理した各細胞周期の培養細胞から RNA 抽出及び低温誘導性遺伝子 (*CBF3/DREB1A*、*COR15a*、*RD29A*) の発現解析を上述した方法に従い行った (II-7、II-8 参照)。

II-15) 同調化細胞における ABA 含量の測定

NA、CA0.25 (以下 CA6 hr)、CA1、CA2 処理した各細胞周期の培養細胞から ABA 含量の測定を上述した方法に従い行った (II-6 参照)

II-16) 同調化細胞における糖含量の測定

NA、CA0.25、CA1、CA2 処理した各細胞周期の培養細胞から糖含量の測定を上述した方法に従い行った (II-5 参照)。

II-17) 異なった細胞周期における凍結耐性

NA、CA2 処理した各細胞周期の培養細胞から凍結耐性の評価を上述した方法に従い行った (II-4 参照)。

III. 結果

III-1) 懸濁培養細胞の成長曲線

T87 懸濁培養細胞の成長曲線を測定した (図 2)。懸濁培養細胞の成長曲線は 3 回測定した湿重量の平均をグラフにしている。その結果、継代後 10 日目までの生重量増加は小さかった。11 日から 14 日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。これらの結果より、本実験条件下においては培養開始後 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った。

III-2) 凍結耐性の評価

定常期の細胞は成長の後半段階の細胞であり、誘導期及び対数増殖期の細胞に比べ死細胞が多く観察された (データは示していない)。このような状態の細胞では、正確に低温応答機構を解析することが困難であると考えられたため、本解析では誘導期と対数増殖期の細胞に絞り解析を行った。シロイヌナズナ T87 懸濁培養細胞が低温に应答し、凍結耐性が増大するか否か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) の培養細胞における低温処理前後の凍結耐性の変動を再成長法を用いて解析した (図 3A, B)。その結果、誘導期の細胞は低温処理により凍結耐性が増大することが分かった (図 3A)。誘導期の細胞では、NA 区で -4°C まで約 100%の生存率を示す一方で、 -4°C から -7°C の温度区において生存率が約 10%まで直線的に減少した。しかし、CA2 処理区では、 -8°C においても約 50%の生存率を維持していた。本解析から、誘導期の培養細胞では低温処理を 2 日間行うことにより、半数細胞致死温度 (LT_{50}) が約 -6°C から -8°C まで低くなることが明らかとなった。特に、 -7°C において誘導期の細胞は対数増殖期の細胞に比べ有意に生存率が高かった ($P<0.05$)。

誘導期の細胞が低温処理によって凍結耐性を増大させるのと対照的に、対数増殖期の細胞は低温処理を行っても凍結耐性は増大しなかった (図 3B)。NA 区では、誘導期と同様 -4°C まで約 100%の生存率を示した。対数増殖期の細胞においても、 -4°C から -7°C の温度区において約 10%まで生存率が減少したが、 -6°C では生存率が 77%となり、有意差はないものの誘導期の細胞に比べ生存率が高い傾向を示した。NA 区と同様、CA2 処理区でも -7°C で約 10%まで生存率が減少し、 LT_{50} は NA 区、CA2 区ともに -7°C であった。従って、対数増殖期の細胞では、低温処理による凍結耐性の増大は見られないことが明らかとなった。

III-3) 糖含量の変動

以上のように、誘導期と対数増殖期の培養細胞において、低温処理による凍結耐性誘導の様相が異なることから (図 3A, B)、これら二つの成長段階の細胞における低温応答機構が異なることが予想される。そこで、シロイヌナズナ植物体の低温馴化過程で見られ、凍結耐性の増大に重要な関係を持っていることが知られている (Levitt 1980, Wanner & Junttila 1999) 細胞内の可溶性糖含量の変化について解析を行った (図 4A, B, C)。NA 区における全可溶性糖含量 (スクロース、グルコース及びフルクトース含量の合計) は、対数増殖期に比べ誘導期の培養細胞で有意に多かった ($P < 0.05$; 図 4A)。誘導期の細胞における全糖含量 (5.56 mg/g FW) は、対数増殖期の細胞における全糖含量 (2.14 mg/g FW) の約 2.5 倍であった。低温処理過程において測定された全糖含量も、常に誘導期の細胞で多くなる傾向を示し、特に、CA0.25 (6 時間後) 及び CA2 処理では有意に誘導期で多かった ($P < 0.05$)。さらに、誘導期の細胞における糖含量は、CA0.25 処理で一過的に増大し ($P < 0.05$)、それ以降 (CA1 及び CA2 処理) では NA 区と同程度まで減少することが明らかとなった。しかし、対数増殖期の細胞では低温処理過程における全糖含量の増大は、調べられた低温処理時間では確認されなかった。

次に低温処理過程におけるスクロース、グルコース及びフルクトースのそれぞれの含量を解析した (図 4B, C)。NA 区の誘導期の細胞では、解析した 3 種の糖含量に顕著な違いは見られなかった (図 4B)。しかし、スクロースとグルコース含量は、NA (スクロース: 2.27 mg/g FW; グルコース: 1.78 mg/g FW) に比べ CA0.25 処理 (スクロース: 3.71 mg/g FW; グルコース: 3.70 mg/g FW) 後に有意に増大した ($P < 0.05$)。さらに、スクロース含量は CA2 処理 (3.47 mg/g FW) まで高い含量を維持した。一方、グルコース含量は CA0.25 処理以降 NA 区と同程度まで減少することが分かった (CA1: 2.05 mg/g FW; CA2: 1.57 mg/g FW)。また、フルクトース含量は、低温処理過程で若干減少するものの、大きな変化は観察されなかった (NA: 1.51 mg/g FW; CA0.25: 1.11 mg/g FW; CA1: 1.18 mg/g FW; CA2: 1.15 mg/g FW)。

対数増殖期の細胞では、低温処理過程を通じて、スクロース (NA: 1.66 mg/g FW; CA0.25: 1.82 mg/g FW; CA1: 1.88 mg/g FW; CA2: 1.88 mg/g FW)、グルコース (NA: 0.25 mg/g FW; CA0.25: 0.29 mg/g FW; CA1: 0.33 mg/g FW; CA2: 0.43 mg/g FW)、及び、フルクトース (NA: 0.23 mg/g FW; CA0.25: 0.23 mg/g FW; CA1: 0.42 mg/g FW; CA2: 0.35 mg/g FW) の含量に顕著な変化は見られなかった (図 4C)。従って、誘導期の細胞のみで低温に応答した糖含量の増大が起こることが分かった。

III-4) 糖添加による凍結耐性

上述したように、NA 区において、対数増殖期の細胞は誘導期の細胞に比べ細胞内の糖含量が少なかった (図 4A, B, C)。低温処理過程では、様々な生理的あるいは分子生物的变化が起こり、それに伴いエネルギーが消費されると考えられる。従って、NA 区の糖含量が対数増殖期の細胞において誘導期の細胞よりも少なくなっていることが、低温処理に対する応答反応を制限し凍結耐性が増大しない原因であるとも考えられる。そこで、培地中のスクロース含量を通常 (1.5%) の 2 倍量 (3%) にして、対数増殖期まで培養した細胞の低温処理による凍結耐性の変化を評価した (図 5)。

解析の結果、糖含量を増加させた培地で対数増殖期まで培養した細胞においても低温処理による凍結耐性の増大は観察されなかった (図 5)。-4°C までは、NA (-2°C: 90.5%; -4°C: 81.3%)、CA2 処理 (-2°C: 88.0%; -4°C: 81.9%) とともに、80%以上と高い生存率を示した。また、-6°C 以下の温度区では NA 及び CA2 処理とともに、50%以下の生存率となった (NA -6°C: 43.5%; -8°C: 7.82%、CA2 -6°C: 45.1%; -8°C: 30.8%)。-8°C で CA2 処理の細胞は NA 細胞に比べ若干、耐性が増大する傾向が観察されたが、有意差は見られなかった。

III-5) ABA 含量の変動

シロイヌナズナ植物体における低温馴化による凍結耐性の誘導に細胞内 ABA 含量が重要な役割を果たしていることが知られている (Heino *et al.* 1990、Lang *et al.* 1994、Mantyla *et al.* 1995)。そこで、上述された二つの成長段階の細胞における低温応答性の違いをさらに調べるため、低温処理過程における培養細胞内 ABA 含量の変動を解析した (図 6)。NA 区においては、誘導期が対数増殖期より ABA 含量が多いことが分かった (誘導期: 58.8 ng/g FW、対数増殖期: 39.0 ng/g FW; $P < 0.05$)。また、低温処理を行うと、誘導期の細胞のみで ABA 含量が増大する傾向が観察された (誘導期; CA0.25: 77.8 ng/g FW; CA1: 86.0 ng/g FW; CA2: 96.4 ng/g FW)。しかし、対数増殖期ではそのような増加傾向は見られなかった (CA0.25: 37.9 ng/g FW; CA1: 35.6 ng/g FW; CA2: 54.3 ng/g FW)。従って、低温処理過程における細胞内 ABA 含量の増大も誘導期の細胞のみにおいて起こることが分かった。

III-6) 低温誘導性遺伝子の発現変動

以上のような誘導期と対数増殖期に見られる低温に対する生理生化学的応答の違いに加えて、分子生物学的な見地から研究を進めることを計画し、シロイヌナズナ植物体など

でよく調べられている低温誘導性遺伝子 (*CBF3/DREB1A*, *COR15a*, *RD29A*) の低温処理過程における発現を半定量的 RT-PCR 法を用いて解析した (図 7)。基本的に、誘導期、対数増殖期ともに、低温処理過程における低温誘導性遺伝子の発現変動は、CA1 処理で発現がピークとなり、CA2 処理にかけて減衰するというパターンとなっており、両者で類似していた。しかし、より詳細に発現プロファイルを比較すると、CA0.25 あるいは CA2 処理において発現強度は誘導期のほうが対数増殖期よりも強くなることが明らかとなった。本解析条件では、*CBF3/DREB1A* の発現が誘導期の細胞において CA0.25 処理から CA1 処理の間で確認された。一方、対数増殖期の細胞では CA1 処理のみで確認されるという違いが見られた。誘導期の細胞における *COR15a* の発現は、CA0.25 処理で確認され、CA2 処理まで高かった。しかし、対数増殖期の細胞では、CA1 処理で発現が確認されたが、CA2 処理では発現が減衰する傾向を示した。さらに、*RD29A* の発現は、CA0.25 及び CA2 処理で対数増殖期の細胞に比べ誘導期の細胞で高いことが見受けられた。

III-7) 44k オリゴアレイ解析

上記の実験結果は、低温誘導性遺伝子 (*CBF3/DREB1A*, *COR15a*, *RD29A*) の発現が対数増殖期に比べ誘導期で高くなっていることを示唆しているが、これらの低温誘導性遺伝子は対数増殖期の細胞においても発現していることも事実である。そこで、次に、44k オリゴアレイ (アジレント社) を用いて、誘導期の細胞のみで低温によって発現が変動する遺伝子を網羅的に解析することを試みた (図 8A, B、表 1-6)。その結果、誘導期の細胞において低温で誘導 (≥ 2 倍) あるいは抑制 (≤ 0.5 倍) される遺伝子が合計 1,607 及び 1,625 個あることが明らかとなった (図 8A, B)。これらの遺伝子のうち、CA1 及び CA2 処理に共通して誘導あるいは抑制される遺伝子が 1,225 及び 966 個、CA1 処理のみで誘導あるいは抑制される遺伝子が 53 及び 58 個、そして、CA2 処理のみで誘導あるいは抑制される遺伝子が 329 及び 601 個あることが分かった。

本細胞の凍結耐性は、誘導期の細胞を CA2 処理することにより増大する (図 3)。従って、凍結耐性の増大に重要と考えられる遺伝子は、少なくとも CA2 処理以前に低温によって変動し、タンパク質レベルでの質的及び (あるいは) 量的変動をもたらしているものと考えられる。これを考慮してさらに解析を行ったところ、CA2 処理以前に低温で変動する遺伝子は、上述した CA1 及び CA2 処理に共通して低温で誘導あるいは抑制される 1,225 個及び 966 個の遺伝子と CA1 処理のみで低温で誘導あるいは抑制される遺伝子 53 個及び 58 個の遺伝子が該当する。さらに、誘導期の細胞のみが凍結耐性を増大させることから、CA2 処理以前に低温変動する遺伝子のうち、誘導期の細胞のみで低温によって変動する遺伝子

(つまり、対数増殖期の細胞では低温処理過程で発現変動しない遺伝子)が凍結耐性の増大に重要であると考えられる。そこで、誘導期の細胞のみで低温変動する遺伝子を探索したところ、誘導期の細胞のみで CA1 及び CA2 処理に共通して低温で誘導あるいは抑制される遺伝子が 43 個及び 26 個、そして、CA1 処理のみで低温によって誘導あるいは抑制される遺伝子が 11 個及び 8 個あることが分かった (表 1-4)。

次に、これらの遺伝子群を The Arabidopsis Information Resource (TAIR) データベースを用いて、予想される機能に基づいて分類した (表 1~4)。その解析の結果、CA1 及び CA2 処理に共通して低温で誘導される遺伝子には、signal transduction 関連遺伝子 (At2g05940.1、At2g39360.1、At2g46600.1、At3g55450.1、At4g17530.1 及び At5g12940.1) が 6 個含まれ最も多く、次に metabolism 関連遺伝子 (At1g56670.1、At1g73010.1、At3g02040.1 及び At3g58490.1)、transcription factor (At2g40140.1、At3g15030.1、At5g51190.1 及び At5g61600.1)、transporter 関連遺伝子 (At1g76430.1、At3g22600.1、At5g03555.1 及び At5g17860.1) 及び protein fate 関連遺伝子 (At2g24540、At3g13820.1、At5g09800.1 及び At5g64660.1) がそれぞれ 4 個あることが分かった (表 1)。CA1 処理のみで低温により誘導される遺伝子では、transporter 関連遺伝子 (At1g19450.1、At1g22550.1 及び At4g39390.1) が 3 個と最も多く、その他には metabolism 関連遺伝子 (At4g13350.1)、cell rescue and defense 関連遺伝子 (At1g32090.1)、cell wall 関連遺伝子 (At3g56000.1) 及び cell-cell signaling 関連遺伝子 (At4g15800.1) がそれぞれ 1 個あった (表 2)。また、CA1 及び CA2 処理で共通して低温により抑制される遺伝子では、transcription factor (At1g08320.1、At1g30210.1、At1g62370.1、At5g06710.1、At5g59000.1 及び At5g59460.1) が 6 個と最も多く、metabolism 関連遺伝子 (At3g24590.1、At5g19290.1 及び At5g62740.1) が 3 個、translation 関連遺伝子 (At1g77840.1 及び At5g12110.1) が 2 個であった (表 3)。CA1 処理のみで低温により抑制される遺伝子には顕著に多く抑制される遺伝子機能カテゴリーはなく、metabolism 関連遺伝子 (At5g46180.1)、transporter 関連遺伝子 (At1g63440.1)、signal transduction 関連遺伝子 (At4g17890.1) 及び development 関連遺伝子 (At4g36630.2) がそれぞれ 1 個であった (表 4)。

III-8) 培養過程における細胞周期の変動

誘導期に比べ対数増殖期では細胞の生重量が直線的に増大することから (図 2)、対数増殖期において細胞数の増大が起こっていることが考えられる。つまり、対数増殖期で細胞分裂が盛んに行われている可能性が考えられる。細胞分裂の程度における違いが、誘導期と対数増殖期における低温処理による凍結耐性の増大に影響しているかもしれない。そこで、細胞周期の進行を二つの成長段階で比較し、細胞分裂の程度の違いを解析した (図 9A,

B)。培養過程における細胞周期の変動は、各細胞周期特異的プライマー（S 期：*Histone H4*；G2 期：*CDKB1;1*；M 期：*CDKB2;2*；G1 期：*KRP2/ICK2*、Menges & Murray 2002）を用いた半定量的 RT-PCR 法、及び、有糸分裂率測定法を用いて測定した（図 9A, B）。RT-PCR の結果、誘導期（継代後 0～10 日）では対数増殖期（継代後 11～14 日）に比べ、全ての細胞周期特異的遺伝子の発現が高くなる傾向が示された。特に、S、G2 及び G1 期マーカー遺伝子の発現は、継代後 2 日から 6 日の間で対数増殖期に比べ顕著に高くなっていた。また、これまで誘導期として解析に用いた細胞（継代後 8 日目）では、同じく解析に対数増殖期として用いた細胞（継代後 12 日目）に比べ、G1 期のマーカー遺伝子が高発現していた（図 9A）。さらに、有糸分裂率の測定から、誘導期で対数増殖期に比べ有糸分裂を起こしている細胞数が多くなることが明らかとなった（2 日：1.89；4 日：1.80；6 日：2.55、8 日：1.24；10 日：0.83；12 日：0.51；14 日：0、図 9B）。これらの結果から、誘導期の細胞は対数増殖期の細胞に比べ細胞分裂が盛んに進行していることが明らかとなった。

III-9) 細胞周期の同調化の評価

上述したように、低温処理により凍結耐性が增大する誘導期の細胞において細胞周期が盛んに進行していた（図 9A, B）。つまり、細胞周期と低温処理による凍結耐性の誘導との間には密接な関係があると考えられる。そこで、細胞周期と低温応答の関係を明確にするため、まず本細胞を用いて細胞周期の同調化を試みた。細胞周期の同調化の評価は、各細胞周期特異的プライマーを用いた半定量的 RT-PCR 法、及び、有糸分裂率の測定法を用いて行った（図 10A, B）。RT-PCR の結果、*Histone H4*（S 期）の発現はアフィディコリン除去後、0～21 時間及び 27～30 時間において確認された。また、その発現量は、アフィディコリン除去後 3 時間で最も高くなることが分かった。*CDKB1;1*（G2 期）の発現は *Histone H4* の発現が減衰し始める 9～30 時間において、*CDKB2;2*（M 期）の発現は *CDKB1;1* の発現に少し遅れて 12～30 時間において確認された。これら両遺伝子の発現パターンは非常に類似しており、18～21 時間で発現のピークに達することが分かった。*KRP2/ICK2*（G1 期）の発現は 3～30 時間の広範囲で確認されたが、18～30 時間にかけて発現量が增大することが示された（図 10A）。

さらに、有糸分裂率を測定した結果（図 10B）、有糸分裂を起こしている細胞数は 15～21 時間にかけて直線的に増加（15 時間：2.17%；18 時間：3.33%；21 時間：6.26%）した後、徐々に減少し、30 時間（1.07%）では低い分裂率となった。以上の結果から、*Histone H4* の発現が最も高くなるアフィディコリン除去後 3 時間を S 期、有糸分裂率が最も高くなる 21 時間を G2/M 期、及び、有糸分裂率が低くなり、*KRP2/ICK2* の発現が確認される 30 時間を

G1 期と決定した。

III-10) 異なった細胞周期における低温誘導性遺伝子の発現

異なった細胞周期の細胞を用い、低温処理前後における低温誘導性遺伝子 (*CBF3/DREB1A*, *COR15a*, *RD29A*) の発現を半定量的 RT-PCR 法を用いて解析した (図 11)。NA 区では、解析した全ての低温誘導性遺伝子の発現は確認されなかった。一方、CA1 処理後に、全ての細胞周期の細胞において低温誘導性遺伝子の発現が確認された。しかし、*CBF3/DREB1A* 及び *RD29A* の発現は、G2/M 期に比べ S 及び G1 期の細胞で高くなることが確認された。一方、*COR15a* の発現は S 期の細胞で高発現していたが、G2/M 期及び G1 期の細胞における発現は弱かった。このことから、分子種により発現が高くなる周期は異なるが、解析した三つの低温誘導性遺伝子の発現は細胞周期に影響されることが分かった。

III-11) 異なった細胞周期における ABA 含量

異なった細胞周期の細胞を用い、低温処理過程における細胞内 ABA 含量を測定した (図 12, 13)。NA 区の ABA 含量は、G2/M 期と G1 期の細胞では同調化に用いた定常期 (継代後 15 日目) の細胞と同程度であった (定常期: 14.8 mg/g FW; G2/M 期: 13.6 mg/g FW; G1 期: 18.5 mg/g FW) が、S 期では他の細胞に比べ高くなる傾向が観察された (32.7 mg/g FW)。しかし、低温処理過程における ABA は S 期の細胞では増大することなく (CA0.25: 25.2 mg/g FW; CA1: 22.5 mg/g FW; CA2: 23.5 mg/g FW)、G2/M 期の細胞では減少する傾向を示した (CA0.25: 9.3 mg/g FW; CA1: 8.5 mg/g FW; CA2: 3.6 mg/g FW)。一方、G1 期の細胞では、CA1 処理で細胞内 ABA 含量が高くなる傾向が観察された (CA0.25: 12.7 mg/g FW; CA1: 27.8 mg/g FW; CA2: 14.8 mg/g FW)。しかし、同調化細胞を用いた ELISA 法による細胞内 ABA 含量の測定は 1) 毎回の同調率には多少の違いがあり、同調率に依存した ABA 含量の違いが観察されてしまう、2) ELISA を用いた ABA 含量の測定は抗体反応により行われるため、その感度が毎回の実験ごとに異なる、3) ABA 含量の測定に用いている検量線は対数値で用いるため、1 で述べた同調率の違いによる ABA 含量の変化が顕著に現れてしまう、といった点から絶対値の安定性に問題があることが分かった。上記の問題点は、各 ELISA 実験間において起こる原因が主であることから、この問題を極力少なくするため、NA 区の ABA 含量を 1 基準にして低温処理過程での ABA の増大率を相対値で検討することとした (図 13)。解析の結果、G1 期の CA1 処理を行った細胞において低温に応答した ABA 含量の増大が確認された (NA: 1; CA0.25: 1.19; CA1: 2.16; CA2: 0.81)。また、S 期と G2/M 期の細胞では低温に応答した ABA 含量の増大は起こらないことが分かった (S 期; NA: 1; CA0.25: 0.87; CA1: 1.06;

CA2: 0.89、G2/M 期: NA: 1; CA0.25: 1.06; CA1: 0.95; CA2: 1.43)。

III-12) 異なった細胞周期における糖含量

異なった細胞周期に同調化した細胞を用いて、低温処理過程における細胞内糖含量の測定を行った (図 14、15)。NA 区における全可溶性糖含量 (スクロース、グルコース及びフルクトース含量の合計) は、G2/M 期の細胞 (6.60 mg/g FW) に比べ S 期の細胞 (14.3 mg/g FW) 及び G1 期の細胞 (14.0 mg/g FW) で有意に高かった ($P < 0.05$; 図 14)。低温処理過程において測定された全糖含量も、G2/M 期の細胞 (0.25 d: 7.22 mg/g FW; 1 d: 6.06 mg/g FW; 2 d: 7.61 mg/g FW) に比べ S 期の細胞 (0.25 d: 13.6 mg/g FW; 1 d: 13.7 mg/g FW; 2 d: 15.7 mg/g FW) 及び G1 期の細胞 (0.25 d: 13.0 mg/g FW; 1 d: 13.0 mg/g FW; 2 d: 13.2 mg/g FW) の細胞で常に多くなる傾向を示した。しかし、低温処理過程における細胞内糖含量の増大は、解析した全ての細胞周期の細胞で観察されなかった。

次に低温処理過程におけるスクロース、グルコース及びフルクトースのそれぞれの含量を解析した (図 15A, B, C)。NA 区における S 期 (スクロース: 12.1 mg/g FW; グルコース: 1.75 mg/g FW; フルクトース: 0.418 mg/g FW)、G2/M 期 (スクロース: 5.96 mg/g FW; グルコース: 0.570 mg/g FW; フルクトース: 0.0726 mg/g FW) 及び G1 期 (スクロース: 12.1 mg/g FW; グルコース: 1.60 mg/g FW; フルクトース: 0.324 mg/g FW) の細胞における細胞内可溶性糖の主成分は、スクロースであった。また、全ての細胞周期の細胞における低温処理過程においても、スクロース含量 (S 期 0.25 d: 11.6 mg/g FW; 1 d: 11.8 mg/g FW; 2 d: 13.7 mg/g FW、G2/M 期 0.25 d: 6.46 mg/g FW; 1 d: 5.42 mg/g FW; 2 d: 6.30 mg/g FW、G1 期 0.25 d: 11.3 mg/g FW; 1 d: 11.5 mg/g FW; 2 d: 11.9 mg/g FW) は、グルコース (S 期 0.25 d: 1.61 mg/g FW; 1 d: 1.51 mg/g FW; 2 d: 1.60 mg/g FW、G2/M 期 0.25 d: 0.650 mg/g FW; 1 d: 0.507 mg/g FW; 2 d: 0.808 mg/g FW、G1 期 0.25 d: 1.44 mg/g FW; 1 d: 1.19 mg/g FW; 2 d: 0.953 mg/g FW)、及び、フルクトース含量 (S 期 0.25 d: 0.367 mg/g FW; 1 d: 0.336 mg/g FW; 2 d: 0.351 mg/g FW、G2/M 期 0.25 d: 0.112 mg/g FW; 1 d: 0.126 mg/g FW; 2 d: 0.502 mg/g FW、G1 期 0.25 d: 0.294 mg/g FW; 1 d: 0.290 mg/g FW; 2 d: 0.307 mg/g FW) より常に高かった。しかし、全ての細胞周期の細胞で、低温処理によるスクロース、グルコース及びフルクトース含量の増大は観察されなかった。従って、細胞周期に依存した低温処理による糖含量の増大は起こらないことが分かった。

III-13) 異なった細胞周期における凍結耐性

これまでの結果から、S、G1期の細胞は低温処理により低温誘導性遺伝子が高発現すること(図11)、G1期の細胞では、細胞内ABAが増大する傾向を示す(図12、13)ことが明らかになり、低温応答を示さないG2/M期の細胞に比べ低温処理による凍結耐性の増大が起こる可能性が考えられる。そこで、異なった細胞周期の細胞(S、G2/M、G1期)の細胞を用いて、低温処理前後における凍結耐性の測定を行った(図16-18)。その結果、2日間の低温処理を行うことで、S及びG1期の細胞で凍結耐性が増大する傾向が観察された。S期の細胞では-9°Cの凍結温度においてNA区の細胞に比べCA2処理細胞で生存率が高かった(NA: 8.65%; CA2: 47.3%、図16)。また、G1期の細胞では-4°C、-5°Cの凍結温度において、NA区の細胞に比べCA2処理の細胞で生存率が高くなる傾向を示した(図18)。-4°Cの凍結温度では低温処理前後どちらの細胞も50%以上の生存率を示したが、NA区では55.9%であるのに対し、CA2処理区では90.0%と高い生存率であった。また、-5°CではNA区の細胞は生存率が37.2%まで低下したが、CA2処理を行った細胞では62.0%と比較的高い生存率を維持した。それ以下の温度区では、低温処理前後どちらの細胞も生存率が50%以下となったが、生存率は常にNA区の細胞(-6°C: 12.3%; -7°C: 15.9%)に比べCA2処理を行った細胞(-6°C: 35.3%; -7°C: 37.9%)で高くなる傾向を示した。一方、G2/M期の細胞では解析した全ての凍結温度区においてNA区の細胞(0°C: 100%; -4°C: 44.3%; -5°C: 26.2%; -6°C: 31.8%; -7°C: 19.6%)とCA2処理の細胞(0°C: 100%; -4°C: 59.4%; -5°C: 37.2%; -6°C: 36.4%; -7°C: 32.1%)間で大きな生存率の違いは見られなかった。以上の結果から、S期及びG1期の細胞で低温処理により凍結耐性が増大する傾向を示すことが分かった。

IV. 考察

IV-1) 凍結耐性

シロイヌナズナ T87 懸濁培養細胞を用いて、誘導期、及び対数増殖期細胞の低温処理前後における凍結耐性の変動について比較を行った (図 3)。NA 区の細胞では、 -6°C において、対数増殖期の LT_{50} が誘導期と比べ高くなる傾向が示された。しかし、CA2 処理をしたところ、誘導期の細胞のみで LT_{50} が -6°C から -8°C まで増大した。従って、誘導期の細胞だけが低温処理により凍結耐性が増大する能力を有することが明らかとなった。これまでの研究において、植物培養細胞の成長段階がストレス耐性、あるいは、凍結保存効率に影響を及ぼすという報告がなされている (Sugawara & Sakai 1974, Ishikawa *et al.* 2006)。Sugawara と Sakai の報告では、セイヨウカジカエデの培養細胞を凍結保存した場合の効率が、誘導期において高くなることが示されている。一方、Ishikawa らの報告は、プロモグラスの培養細胞におけるストレス耐性 (凍結耐性、塩耐性及び熱耐性)、及び、凍結保存効率が、対数増殖期の後期から定常期の初期において増大することを示している。

一見すると、両報告は、異なった成長段階の細胞 (つまり、誘導期と対数増殖期から定常期) が高いストレス耐性を持つことを示しており、理解が難しいかもしれない。しかし、細胞分裂の視点から見ると、凍結保存、あるいは、ストレス耐性能が増大する時期は、細胞分裂の盛んな時であることが推測される。それはセイヨウカジカエデ培養細胞において、誘導期の細胞 (継代後 5~8 日目) は、細胞数、及び、有糸分裂率の増大が顕著に起こる時期であることが示されており、その時期の細胞は細胞分裂が盛んに起こっていると考えられる (Henshaw *et al.* 1966, Withers 1978)。Sugawara と Sakai の報告では、この時期の細胞で凍結保存効率が最も良くなることから、セイヨウカジカエデ培養細胞においては細胞分裂期の細胞が凍結保存に適していることが示唆される。実際に、Withers の報告は、細胞分裂が盛んに起こっている時期と凍結保存能力が増大する時期の間に相関関係があることを示している (Withers 1978)。また、プロモグラス培養細胞では、継代後 4 から 10 日までは細胞内の水分含量が変化しないにも関わらず、生重量が直線的に増大する (Ishikawa *et al.* 2006)。この結果は、この時期の細胞における生重量の増大は、細胞分裂によるものが主であることを示唆している。細胞分裂が盛んであると考えられるこの時期でストレス耐性が顕著に増大する傾向が示されており (Ishikawa *et al.* 2006)、プロモグラス培養細胞における凍結保存効率、あるいは、ストレス耐性も、細胞分裂期の細胞で高くなっていると考えられる。さらに、ナシの培養細胞においても細胞分裂と熱耐性の関係が示されている (Wu *et al.* 1984)。この報告では、上に示した報告とは異なり、有糸分裂率が高くなる時期において熱

ストレスに対する感受性が高くなることを示している。しかし、培養過程における乾燥重量の増大は有糸分裂が最も高くなる時期（継代後3日目）より後に（5日～9日目）見られることから、この時期では吸水などによる細胞の膨張は起こっておらず、有糸分裂期以外の間期の細胞であると考えられる。このことから、細胞分裂が進行している時期においても、特定の時期の細胞がストレスに対し耐性を示すかもしれない。本研究においても、低温処理による凍結耐性の増大は細胞分裂が盛んな誘導期の細胞でのみ観察された（図3,9）。また、低温馴化による凍結耐性の増大も特定の細胞周期の細胞で起こることから、様々な植物の培養細胞で観察されている成長段階に依存したストレス耐性の変動には、細胞分裂（特に細胞周期）に関係する制御機構があるものと推測される。

IV-2) 糖含量の変動

シロイヌナズナ培養細胞で観察された成長段階に依存した凍結耐性の増大が、どのような低温馴化機構によるものであるかを明らかにするため、誘導期と対数増殖期の細胞を低温処理したときの糖含量の変動について解析した（図4A, B, C）。全糖含量は、誘導期の細胞のみにおいて、CA0.25処理で一過的に増大することが明らかとなった（図4A）。この変動は、グルコースの変動と非常に相関していた（図4B）。シロイヌナズナ植物体を用いた研究から、グルコースは様々な植物ホルモンのシグナル伝達を制御していることが分かっている（Arenas-Huertero *et al.* 2000、Yanagisawa *et al.* 2003）。例えば、グルコース非感受性突然変異体 *gin6* では、ABA シグナルの制御因子である *ABI4* の発現が見られなくなる（Arenas-Huertero *et al.* 2000）。また、グルコースは、エチレンシグナルの重要な制御因子である EIN3 の分解を促進することで、エチレンシグナルを負に制御していることが明らかとなっている（Yanagisawa *et al.* 2003）。ABA やエチレンシグナルは、凍結を含む多様な非生物学的ストレス耐性の増大に重要であることが知られており（Lang *et al.* 1994、Mantyla *et al.* 1995、Tamminen *et al.* 2001、Zhang *et al.* 2005、Lee *et al.* 2007、Tang *et al.* 2007、Wu *et al.* 2007）、本研究で示された低温処理過程における一過的なグルコース含量の増大は、これらの植物ホルモン調節によるストレス耐性の増強に寄与しているのかもしれない。

一方、誘導期の細胞におけるスクロースは、低温処理期間を通して常に高い含量を維持していた（図4B）。シロイヌナズナ植物体では、スクロースは凍結脱水による細胞膜と葉緑体膜との融合を防ぐことにより、凍結傷害の緩和に寄与していることが示唆されている（Uemura & Steponkus 2003）。また、その効果は本研究で解析した他の糖（グルコース及びフルクトース）より高いことも分かっており、低温処理過程で誘導期の細胞におけるスクロース含量が他の糖より多く蓄積していることは、凍結耐性の増大に重要な変化であると

考えられる。

本研究で行ったマイクロアレイ解析で、誘導期の細胞を低温処理した場合だけに発現誘導される遺伝子の中に糖のトランスポーター (At1g19450.1、At4g39390.1) を見出した (表 2)。この遺伝子にコードされるトランスポーターが培地中の糖の取り込みに関与しているとすれば、誘導期の細胞は対数増殖期の細胞に比べ糖の取り込み活性が高くなっていることも考えられ、このことが誘導期の細胞だけに見られる凍結耐性の増大に寄与している可能性がある。また、両者の細胞が有する糖の取り込み活性に違いがないとすれば、高スクロース培地で対数増殖期まで培養した細胞で凍結耐性の増大が観察されなかった原因は細胞の形態的な違いに起因するのかもしれない。対数増殖期の細胞では、細胞分裂の頻度が誘導期の細胞に比べ低くなる (図 9)。その一方で、生重量は増大していることから (図 2)、対数増殖期の細胞では、細胞の膨張と伸張により湿重量が増大しているものと考えられる。細胞の膨張・伸張の時期では液胞が肥大する (Dolan & Davies 2004) ことから、細胞中における細胞質の占める割合が小さくなり、細胞質に存在するスクロースによる細胞膜と細胞小器官の間で起こる膜融合の緩和に対する効果が、細胞質の割合が大きい誘導期の細胞に比べ小さくなることも推測される。また、液胞の肥大化は葉緑体やミトコンドリアなどの細胞小器官を細胞膜近傍に押しやり、その結果として、細胞小器官は可動性を失うかもしれない。可動性を失った細胞小器官は細胞膜近傍に“固定”されることになり、凍結脱水による細胞膜との膜融合が起こりやすくなることも考えられる。これらのことが対数増殖期の細胞においてスクロース添加による耐性増大が起こらない原因になっているかもしれない。

さらに、本解析では低温処理過程におけるフルクトース含量は、誘導期、対数増殖期どちらの細胞においても増大することは観察されなかった (図 4B, C)。この原因は不明であるが、本細胞における凍結耐性の増大にはフルクトースは関与していない可能性が考えられる。

IV-3) 糖添加による凍結耐性

本細胞の NA 区において対数増殖期の細胞は誘導期の細胞に比べ細胞内の糖含量が少ないことが分かっている (図 4)。低温処理による凍結耐性の増大が起こる誘導期の細胞では、これまで示したように凍結耐性を増大させるために重要と考えられる様々な生理的及び分子生物学的変化が起こっている。これらの変化にはエネルギーの消費が起こると考えられる。従って、NA 区の糖含量が対数増殖期の細胞において誘導期の細胞よりも少なくなっ

いることが (図 4)、低温処理によるこれらの変化を制限してしまい、凍結耐性が増大しない原因であるとも考えられる。そこで、培地中のスクロース含量を通常 (1.5%) の 2 倍量 (3%) にして、対数増殖期まで培養した細胞の低温処理による凍結耐性を評価した (図 5)。

解析の結果、糖を増加した培地で対数増殖期まで培養した細胞においても低温処理による凍結耐性の増大は観察されなかった (図 5)。培地中に添加した糖が実際に細胞内に取り込まれているかは不明であるが、これまでの報告で、培地中の糖含量を増大させることで細胞内の糖含量も増大することが示されている (Jitsuyama *et al.* 2002、Tabaei-Aghdaci *et al.* 2003)。Jitsuyama らは、アスパラガスの培養細胞を高スクロース培地で培養した場合、細胞内の糖含量も増大しその結果、凍結耐性が増大することを明らかにしている。従って、本解析においても高スクロース培地で数増殖期まで培養した細胞では細胞内糖含量が増大している可能性が高い。つまり、対数増殖期の細胞が低温処理により凍結耐性が増大しない原因は、低温応答に必要なエネルギーが不足しているためではなく、凍結耐性を増大させる機構そのものに欠損があることが示唆される。

IV-4) ABA 含量の変動

ABA 含量もまた、低温処理過程において誘導期の細胞のみで増大する傾向が確認された (図 6)。シロイヌナズナ植物体を用いた研究においても、低温馴化により細胞内の ABA 含量が増大することが知られている (Lang *et al.* 1994)。しかし、シロイヌナズナ植物体における低温馴化で誘導される細胞内 ABA 含量の増大は一過的であるのに対し、本解析では培養細胞における ABA 変動は CA2 処理まで緩やかに増大する傾向を示した。植物体では、ABA が維管束系を通して様々な器官へと輸送されることにより植物全身へストレスシグナルが伝達されると考えられている (Jackson 1993、Wilkinson & Davies 2002、Christmann *et al.* 2005)。植物体とは違って、異なったタイプの細胞・組織・器官間の相互作用を持たない培養細胞の場合、植物体では他所へ輸送されるはずの ABA が輸送されず、低温処理過程で合成場所である各細胞内に蓄積したのかもしれない。

また、本研究で行ったマイクロアレイ実験の結果によると、ABA 合成に関わる酵素遺伝子の一つである *ABA1* (At5g67030.1) が、誘導期の細胞では低温処理 2 日まで恒常的に誘導されるのに対し、対数増殖期の細胞では低温処理 1 日のみでしか誘導されていなかった (ArrayExpress; accession number: E-MEXP-1347)。*ABA1* は、合成された ABA により正のフィードバックを受けることで ABA 合成を活性化することが知られており (Barrero *et al.* 2006)、対数増殖期の細胞で *ABA1* の発現が維持されないのは、誘導期の細胞と比べ、ABA

合成経路に何らかの欠損がある可能性が示唆される。このことが、対数増殖期の細胞で低温による ABA 合成が起こらない原因となっていることも考えられる。

さらに、対数増殖期の細胞は、ABA 合成能力だけでなく、凍結耐性を増大させるために必要な ABA シグナル伝達を欠いている可能性も示唆される。誘導期の細胞では、シロイヌナズナ植物体と同様、細胞外からの ABA 処理により凍結耐性が増大する (高橋 2006)。しかし、対数増殖期の細胞では、培地中に ABA を添加しても、凍結耐性は未処理と同程度であった (高橋 2006)。細胞外へ添加した ABA は、細胞膜上、あるいは、細胞質内にあるレセプターにより認識され、下流にシグナルが伝達されて様々な生理現象が活性化される (Razem *et al.* 2006、Shen *et al.* 2006、Grill & Christmann 2007)。細胞外に添加された ABA が細胞内に取り込まれているか否か、あるいは、どのようにして ABA シグナルが認識されているかについては不明なところも多いが、細胞膜上の ABA レセプターを欠損したシロイヌナズナ植物体において ABA 応答が完全に消失しないこと (Grill & Christmann 2007) を考えると、細胞内に ABA が取り込まれ、細胞質のレセプターと反応している可能性が高い。本培養細胞においては、ABA 添加処理による細胞内 ABA の蓄積が、誘導期、及び対数増殖期の両方の細胞で観察されていること (高橋 2006) を考え合わせると、対数増殖期の細胞では細胞内 ABA レセプターの機能が失われているため、細胞内に ABA が蓄積しても凍結耐性の増大が起こらないことも考えられる。

IV-5) 低温誘導性遺伝子の発現変動

本研究で解析した低温誘導性遺伝子 (*CBF3/DREB1A*、*COR15a*、*RD29A*) の発現は、低温処理により誘導期、及び対数増殖期ともに誘導されることが分かった (図 7)。しかし、対数増殖期に比べて誘導期の細胞で、その誘導強度は強く、発現時間は長くなる傾向が観察された。*CBF3/DREB1A* 遺伝子は、誘導期では CA0.25 から CA1 処理にかけ発現が確認されたが、対数増殖期の細胞では CA1 処理のみでしか検出されなかった (図 7)。*CBF3/DREB1A* は、シロイヌナズナ植物体を低温馴化した場合にも誘導され、さらに、*CBF3/DREB1A* 過剰発現形質転換体を用いた解析により凍結耐性の増大に重要な働きをすることが分かっている (Gilmour *et al.* 2000、Yamaguchi-Shinozaki & Shinozaki 2001)。誘導期の細胞では、*CBF3/DREB1A* が低温処理初期に発現することによって、下流にある標的遺伝子の転写産物が蓄積し、その結果、凍結耐性の増大に寄与している可能性が考えられる。実際に、*CBF3/DREB1A* の発現誘導と相関して、その下流標的遺伝子である *COR15a* 及び *RD29A* の発現も、CA0.25 処理では対数増殖期に比べ誘導期の細胞で高発現していることが示されている (図 7)。また、誘導期の細胞においては、*COR15a* 及び *RD29A* の発現が CA1 及び CA2

処理で同程度発現しているのに対し、対数増殖期の細胞では CA1 処理に比べ CA2 処理でその発現が減衰する傾向が確認された (図 7)。シロイヌナズナ植物体においては、*COR15a* 及び *RD29A* 遺伝子は CA0.25 処理で発現し、CA2 処理までその発現が維持されることが分かっている (Ishitani *et al.* 1998)。以上の結果は、対数増殖期の細胞で低温処理により凍結耐性が增大しない原因の一つに、これらの低温誘導性遺伝子の発現・蓄積機構が、植物体や誘導期の細胞と比べて弱くなっていることを示しているのかもしれない。

IV-6) 44k オリゴアレイ

以上で述べたように、低温処理を行った場合、誘導期の細胞で対数増殖期の細胞に比べ低温誘導性遺伝子 (*CBF3/DREB1A*, *COR15a*, *RD29A*) が高発現していることから、低温に対する感受性が誘導期細胞で高くなっている可能性が考えられる。しかし、これらの低温誘導性遺伝子は、対数増殖期の細胞においても低温処理による発現誘導が見られることから、発現量の違いだけで誘導期と対数増殖期の細胞における低温応答性の違いを説明することはできない。さらに、今回調べられた三つの低温誘導性遺伝子以外に、低温処理過程で誘導期の細胞のみで発現が変動する遺伝子、すなわち、遺伝子発現のシステムとしての質的変動が誘導期の細胞のみで見られる凍結耐性の増大に寄与している可能性が考えられる。

そこで、44k オリゴアレイを用いて誘導期の細胞のみで低温条件下で変動する遺伝子を網羅的に解析した (図 8、表 1-6)。低温処理によって凍結耐性が増大する誘導期の細胞において、低温誘導 (≥ 2 倍) される遺伝子は 1,607 個、低温抑制 (≤ 0.5 倍) される遺伝子は 1,625 個存在し、誘導、抑制どちらも同程度変動することが分かった (図 8)。また、誘導期細胞における凍結耐性が CA2 処理で増大することから、凍結耐性増大に重要な遺伝子は少なくとも CA2 処理以前に発現が変動し、翻訳産物であるタンパク質の蓄積が起こっていると考えられる。すなわち、CA1、及び、CA2 の両処理で誘導あるいは抑制される遺伝子、及び、CA1 処理のみで誘導あるいは抑制される遺伝子群が、誘導期の細胞における低温処理後に見られる凍結耐性増大に寄与しているものと考えられる。また、凍結耐性は誘導期の細胞のみで観察されるため、これらの遺伝子群のうち、誘導期の細胞でのみ低温処理によって変動する遺伝子群が本細胞の凍結耐性増大に質的な寄与をしているものと考えられる。このような基準で低温処理によって発現が変動する遺伝子群を見直したところ、先に述べた低温応答性遺伝子群の中には、限られた数の遺伝子しか存在しないことが明らかになった (CA1 と CA2 処理の両方で誘導 : 2.7% ; CA1 処理でのみ誘導 : 0.68% ; CA1 と CA2 処理の両方で抑制 : 1.6% ; CA1 処理でのみ抑制 : 0.49%、表 1-4)。

低温処理過程で恒常的に誘導された遺伝子群には、signal transduction 関連遺伝子や transcription factor といったシグナル伝達の上流で機能する遺伝子が多く見られた。Signal transduction 関連遺伝子の一つに *leucin-rich repeat family protein* (At5g12940.1) が存在していた。*Leucin-rich repeat family protein* は、乾燥、ABA 及び病原菌応答といった多様なストレスシグナルに関与していることが知られている (Chini *et al.* 2004、Osakabe *et al.* 2005、Shanmugam 2005)。また、本解析で見出された transcription factor の中に、*ethylene responsive element binding factor* (ERF、At5g61600.1) があった。以前の報告では、ERF の発現は、低温、ABA、乾燥、あるいは、塩といった様々な非生物的なストレスによって誘導され、この因子が DRE/CRT シスエレメントに結合することでストレス耐性を付与することが示唆されている (Zhang *et al.* 2005、Lee *et al.* 2007、Wu *et al.* 2007)。これらのことは、誘導期の細胞では、ストレス耐性を付与するために必要なシグナル伝達経路が活性化されていることを示唆しているのかもしれない。さらに、興味深いことに、いくつかの protein fate 関連遺伝子が誘導期のみで低温誘導されていた。これらの遺伝子の誘導は、低温馴化過程における細胞の再構成に関与しているのかもしれない。実際に、以前の報告の中で、ユビキチン E3 リガーゼである SIZ1 が ICE1 (inducer of CBF/DREB1 expression) のスモイル化を介して、低温馴化による凍結耐性の増大に影響していることが分かっている (Miura *et al.* 2007)。*siz1* 突然変異体では、CBF/DREB1 転写因子やその下流にある標的遺伝子 (*COR15a* や *COR47*) の発現が減衰し、その結果、野生型と比べ凍結耐性が低下する。このように、低温馴化過程では、タンパク質の修飾等により低温環境に順応するための細胞の再構成がなされると考えられる。従って、本研究で得られた結果は、誘導期の細胞は、対数増殖期の細胞に比べ、低温に順応するための細胞の再構成が盛んに行われている可能性を示唆している。

以前の報告で、Hannah らは、シロイヌナズナ近縁種間における低温馴化による凍結耐性の増大能力の違いに関わる重要な機能変化をマイクロアレイで得られた低温馴化過程で変動する遺伝子群を基に Fisher exact tests を用いて明らかにした (Hannah *et al.* 2006)。そこで、本研究においても、誘導期と対数増殖期の細胞間の低温処理過程で、シグナル伝達や細胞の再構成に関する遺伝子発現に変化が起こっているかについて、Fisher exact tests を用いて検証した。その解析は、CA1 処理で誘導される遺伝子を総計とし、その中から誘導期あるいは対数増殖期の細胞のみで誘導される遺伝子数を抽出した後、誘導期でのみ誘導されるシグナル伝達に関わる遺伝子 (signal transduction 関連遺伝子 + transcription factor)、及び、細胞の再構成に関わる遺伝子 (protein fate 関連遺伝子) が対数増殖期に比べ有意に多くなっているかについて調べた。その結果、シグナル伝達に関わる遺伝子数 ($P < 0.05$)、及び、細胞の再構成に関わる遺伝子数 ($P < 0.05$) は、誘導期で有意に多くなっていることが分かった。このことから、誘導期の細胞では、低温処理により、低温シグナル伝達、及び、細

胞の再構成が活性化されることで凍結耐性を増大させている可能性が強く示唆された。

低温処理を1日行った場合に限り、誘導期の細胞のみで誘導される遺伝子群の中に transporter 関連遺伝子 (3 個) が比較的多く見出された (表 2)。三つの transporter 関連遺伝子のうち、2 個が sugar、及び、sugar-phosphate transporter family protein であった。これら 2 個の遺伝子が誘導期の細胞でのみ低温処理によって誘導されることは、誘導期の細胞でのみ観察された低温処理に応答した可溶性糖の増大 (図 4) と関連しているのかもしれない。シロイヌナズナ植物体で知られているように、低温下で起こる可溶性糖の蓄積が低温馴化の一要因であること (Levitt 1980、Wanner & Junttila 1999、Gilmour *et al.* 2000) を考えると、これらの transporter 関連遺伝子は細胞内への糖の取り込み (蓄積) に関与し、その結果として、誘導期の細胞でのみ見られる低温処理による凍結耐性の増大という現象に寄与していることも考えられる。

さらに、1 個と数は少ないが、cell rescue and defense 関連遺伝子の *early-responsive to dehydration stress 4 (ERD4, At1g32090.1)* が誘導期のみに低温により誘導されていた (表 2)。多くの *ERD family* 遺伝子の機能については未だ不明であるが、近年、*ERD15* が ABA シグナルの負の制御因子であることが明らかとなった (Kariola *et al.* 2006)。この報告は、*ERD15* を過剰発現したシロイヌナズナ植物体で ABA に対する感受性が減少し、乾燥や凍結ストレス耐性が低下することを明らかにしている。*EDR15* は凍結耐性に対して負に機能しているが、機能未知である多くの *ERD family* 遺伝子がストレスシグナル伝達、及び、ストレス耐性獲得に関与していることが考えられ、本研究で見出された *ERD4* も誘導期の細胞におけるストレス応答、及び、耐性付与に関与している可能性が推測される。

誘導期の細胞のみで低温処理によって恒常的に抑制される遺伝子の中には、transcription factor が 6 個と最も多く存在していた (表 3)。その中の一つに *scarecrow-like transcription factor (SCL11, At5g59460.1)* があった。*SCL* は、根の内皮や皮層細胞形成の不等分裂に関与することが知られている (Wildwater *et al.* 2005、Dello Ioio *et al.* 2007、Welch *et al.* 2007)。また、その作用機構は、*SCR* が *KIP-related proteins (KIPs)* の抑制、あるいは、*cyclin D3 (CYCD3)* を誘導することにより、RETINOBLASTOMA-RELATED (RBR) 経路の抑制を引き起こし、細胞周期を進行させることによると考えられている (Wildwater *et al.* 2005、Dello Ioio *et al.* 2007、Welch *et al.* 2007)。このような機能を有する遺伝子ファミリーの一つが誘導期の細胞で低温により抑制されることは、細胞周期の G1 期から S 期にかけての進行が低温処理過程で遅延することを示しているのかもしれない。実際に、トウモロコシやヒマワリでは、低温処理により細胞周期の G1 期から S 期へ、あるいは、G2 期から M 期への進行が遅延する

ことが明らかとなっている (Tardieu & Granier 2000、Rymen *et al.* 2007)。低温環境に曝された植物では、活性酸素が発生し細胞の生理機能の低下を引き起こすだけでなく (Prasad *et al.* 1994、O’Kane *et al.* 1996、Zhou *et al.* 2007)、DNA の損傷も引き起こされる (Breen & Murphy 1995、Molinier *et al.* 2004、Pitzschke *et al.* 2006)。誘導期の細胞は細胞周期の進行が盛んに行われているため(図9)、低温で発生した活性酸素によって引き起こされるかもしれないDNAの損傷と異常DNAの複製を細胞周期の調節によって未然に回避している可能性が考えられる。

低温処理1日のみで抑制される遺伝子は4個あったが(表4)、それらに目立って強く抑制されているものはなく、また、それぞれの遺伝子に関して詳細な機能やストレス応答との関係が明らかとなっているものはなかった。ここで得られた遺伝子は誘導期の細胞のみで低温処理によって変動するため、低温馴化機構に何らかの機能を持っているものであると考えられるが、その詳細についてはさらなる研究が必要である。

本研究から、誘導期の細胞は、シロイヌナズナ植物体と類似した低温馴化機構を有することが示され、凍結耐性を増大させるために必要な変化を誘導期の細胞も有していることが考えられた(図3, 4, 6, 7)。このことから、誘導期の細胞のみで低温によって変動する遺伝子群の中で、シロイヌナズナ植物体においても同様に低温によって変動する遺伝子は、植物の低温馴化機構に重要な機能を持っていることが推測される。そこで、誘導期の細胞のみで低温変動する遺伝子がシロイヌナズナ植物体の低温処理過程でも同様の変動を示すかどうかについて、公開されている三つのシロイヌナズナ植物体の遺伝子発現データベース (<http://cold.stanford.edu/cgi-bin/data.cgi>、http://rarge.gsc.riken.go.jp/microarray/microarray_expgene.pl 及び http://tabacum.agr.nagoya-u.ac.jp/dart/ma_expression.php) を用いて、本研究で得られた結果と比較した(表5, 6)。その結果、誘導期の細胞を低温処理した場合に誘導された遺伝子では54個中34個の遺伝子、抑制された遺伝子では34個の遺伝子中15個がシロイヌナズナ植物体においても共通して低温によって誘導、あるいは、抑制されていることがわかった。特に、低温で誘導される **transcription factor** 及び **protein fate** 関連遺伝子全てが植物体でも共通に低温で誘導されることが明らかとなった。また、多くの **signal transduction** 関連遺伝子、**transporter** 関連遺伝子、**metabolism** 関連遺伝子、及び、**cell rescue & defense** 関連遺伝子も、植物体で低温によって誘導されていた。抑制された遺伝子では、全ての **transporter** 関連遺伝子、**protein fate** 関連遺伝子、及び、**translation** 関連遺伝子が植物体で共通して抑制されていた。誘導期の細胞で活性化されているシグナル伝達経路 (**signal transduction** 関連遺伝子、及び、**transcription factor**) と細胞の再構成 (**protein fate** 関連遺伝子) が、植物体においても大

部分が共通して低温によって誘導されていることを考えると、誘導期の細胞と植物体での低温馴化機構は基本的に共通の経路を有していることが示唆される。一方で、いくつかの遺伝子に関しては、植物体では低温変動しないことが示されている。これらの遺伝子の中には、*Ras-related GTP-binding protein*、及び、*scarecrow-like transcription factor (SCL11)* のような細胞周期に関わる遺伝子が見られた (Wildwater *et al.* 2005、Chambard *et al.* 2007、Dello Iorio *et al.* 2007、Welch *et al.* 2007)。誘導期の多くの細胞では細胞周期の進行が盛んな状態であると考えられるため、特定の部分でしか細胞分裂していない植物体に比べて、低温が細胞周期に与える影響が顕著に現れた可能性が考えられる。しかし、これらの変化は、複雑な相互作用を有する植物体を用いた場合には微小で検出できない細胞レベルにおける重要な変化であるのかもしれない。実際に、本研究で得られた結果は、各細胞周期 (S、G2/M、及び、G1 期) で低温シグナル伝達の感受性が異なっていることを示唆している (図 11, 12, 13)。

IV-7) 培養過程における細胞周期の変動

細菌類や動物細胞の対数増殖期では、世代時間に対応して細胞分裂を繰り返すことにより増殖する。本細胞においても、対数増殖期の細胞で細胞分裂が盛んに行われている可能性が示された。また、細胞分裂頻度の違いが、本細胞の誘導期と対数増殖期における低温応答機構の違いと関係しているのかもしれない。そこで、各細胞周期に発現する特異的な遺伝子に対するプライマーを用いた半定量的 RT-PCR 法及び有糸分裂率の測定法により、培養過程における細胞周期の変動を解析した (図 9A, B)。細胞周期の進行は、誘導期 (継代後 10 日まで) において対数増殖期 (継代後 11~14 日) より盛んであることが示された。特に、継代後 2 日から 6 日の細胞において、各細胞周期に特異的な遺伝子が高発現しているとともに、有糸分裂率も高くなっていた。しかし、今まで述べられてきた実験に実際に用いた細胞について見ると、誘導期の細胞 (継代後 8 日目) では対数増殖期の細胞 (継代後 12 日) に比べ、G1 期の遺伝子発現は高くなっていたものの、S、G2、M 及び G1 期の遺伝子発現に目立った違いは見られなかった。有糸分裂率は、8 日目の細胞において 12 日目の細胞より高くなっている (8 日目: 1.24%、12 日目: 0.51%) ことを考えると、M 期のマーカーとして用いた遺伝子が有糸分裂以外にも、別の機能を有し、対数増殖期の細胞でこの現象が活性化しているため、対数増殖期の細胞でも M 期のマーカー遺伝子が高発現したものと考えられる。M 期のマーカーとして用いた *CDKB2:2* は G2 期から M 期にかけて発現する遺伝子であり、M 期への進行に重要であると考えられている (Huntley & Murray 1999、Mironov *et al.* 1999)。しかし、シロイヌナズナ植物体を用いた研究から、*CDKB* 遺伝子の一つである *CDC2b* は細胞周期の進行ではなく、胚軸や子葉細胞の伸張や発達に関わっていることが知られている (Yoshizumi *et al.* 1999)。*CDKB2:2* が細胞伸張にも関わっているかは不

明であるが、対数増殖期の本細胞では、M 期以外の細胞周期マーカー遺伝子の発現が低いこと、及び、有糸分裂を起こしている細胞の割合が低頻度であることを考え合わせると、*CDKB2:2* の遺伝子発現が対数増殖期の細胞においても比較的高いのは、*CDKB2:2* 細胞の膨張あるいは伸張期に機能している可能性が考えられた。

IV-8) 細胞周期の同調化

細胞周期を同調することを試みた結果、アフィディコリン処理から解放して3、21、及び、30 時間後に S、G2/M、及び、G1 期の細胞が多くなることが明らかとなった (図 10)。有糸分裂率も M 期のマーカー遺伝子が高発現している時間帯に高くなった。この結果は、Menges と Murray により報告されたものと一致していた (Menges & Murray 2002)。これまで植物の細胞周期に関する研究の多くは、同調率の高さからタバコ BY-2 細胞を用いて行われている (Nagata *et al.* 1992、Samuels *et al.* 1998、Kumagai-Sano *et al.* 2006)。BY-2 細胞の同調率は、アフィディコリン処理で同調化を行った時において約 70%の有糸分裂率が観察され、非常に高いことがわかる。また、他の植物種から誘導された培養細胞においても細胞周期の同調化が試みられており、いずれも、比較的高い同調化に成功している (Dolezel *et al.* 1999、Planchais *et al.* 2000)。シロイヌナズナの培養細胞においてもアフィディコリンを用いて細胞周期の同調化に成功している (Menges & Murray 2002) が、その同調率は他の植物種と比べると極めて低く、例えば、MM1 及び MM2d ラインを用いた研究では、同調化処理後でも約 12%の有糸分裂率しか観察できていない。本研究で得られた同調化後の有糸分裂率 (6.3%)は、他の植物種やシロイヌナズナ懸濁培養細胞の異なったライン (MM1 及び MM2d) よりも低かった。同調化効率を上げることに 대해서는今後の課題ではあるが、本細胞の培養過程において最も分裂が盛んになる継代後 6 日目の細胞における有糸分裂率は 2.6%であり (図 9)、アフィディコリンによる同調化後にこの値の 2 倍以上の細胞が分裂期に見られたことを考えると、本細胞の同調化系は誘導期の細胞で観察された低温応答の評価材料として十分有用であると考えられる。

IV-9) 異なった細胞周期における低温誘導性遺伝子の発現

異なった細胞周期に同調化した細胞を用いて、低温処理前後における低温誘導性遺伝子 (*CBF3/DREB1A*、*COR15a*、*RD29A*) の発現を比較した (図 11)。その結果、*CBF3/DREB1A* 及び *RD29A* の発現が、S 及び G1 期の細胞において G2/M 期の細胞よりも高くなることが分かった。シロイヌナズナ植物体においては、*CBF3/DREB1A* の発現は *SIZ1* による ICE タンパク質のスモイル化により正に制御されていることが知られている (Miura *et al.* 2007)。し

かし、*SIZ1* の発現は低温処理によって変動しないことから、転写後あるいは翻訳後制御が行われていると考えられている。本研究においては、*CBF3/DREB1A* の発現は、S、及び、G1 期の特定の細胞を低温処理した時に高発現していた。これは、S、及び、G1 期において、低温下で起こる *SIZ1* による *ICE1* のスモイル化が活性化しているためと推測される。一方、*COR15a* は *CBF3/DREB1A* の下流にある標的遺伝子であるにも関わらず、その発現は S 期のみで高くなっていた (図 11)。これは、G1 期において遺伝子発現と関連した翻訳が行われておらず、*CBF3/DREB1A* タンパク質の合成が S 期に比べ少なくなっているためとも考えられるが、もう一つの下流標的遺伝子である *RD29A* の発現は G1 期でも高くなっていることを考慮すると別の理由があるのかもしれない。考えられる原因の一つとして、*COR15a* 自身のスプライシングが G1 期において十分に行われていないことが挙げられる。シロイヌナズナ植物体では、*COR15a* は低温馴化過程でスプライシングファクターである *STABILIZED1* (*STA1*) を介してスプライシングを受けることが分かっている (Lee *et al.* 2006)。本研究で用いた *COR15a* のプライマーは成熟 mRNA のみを認識するため、スプライシングが完了していない未成熟な mRNA は認識されない。S 期に比べ G1 期の細胞では、クロマチン構造が凝縮している状態であると考えられるため、*STA1* の発現は S 期に比べ G1 期で抑制される傾向になり、その結果として G1 期で *COR15a* の発現が低くなっているのかもしれない。

IV-10) 異なった細胞周期における ABA 含量

異なった細胞周期の細胞を用いて低温処理過程における ABA 含量の変動について解析した (図 12, 13)。その結果、G1 期の CA1 処理において ABA 含量が増大する傾向が示された。これまでの報告から、G1 期の細胞は他の周期の細胞に比べ、ストレスに対する適応能力が高くなることが示唆されている (Withers 1978、Kadota *et al.* 2005)。Kadota らの報告では、細胞周期を同調化させたタバコの BY-2 細胞を用いて、各周期の細胞に過酸化処理を行うと、G1 期の細胞において膜電位依存型カルシウムチャネル *TPC1* の発現が他の周期と比べ高発現することを示した。また、G1 期の細胞では *TPC1* を介して、細胞内カルシウム濃度の増大率が他の周期の細胞と比べ高くなるとともに、抗酸化酵素遺伝子の発現も高くなることを示している。*TPC1* を介したカルシウムの流入は低温によっても起こることが知られており (Lin *et al.* 2005)、低温による細胞質カルシウム濃度の増大が G1 期の細胞で高くなっている可能性が考えられる。さらに、カルシウムシグナルと ABA シグナルの間にはクロストークが存在すると考えられている (Allen *et al.* 1999、Kim *et al.* 2003、Zhu *et al.* 2007)。例えば、孔辺細胞に ABA を添加すると細胞質カルシウム濃度が増大する (Allen *et al.* 1999) ことやカルシウムシグナルに重要な因子である *CaM domain-containing protein kinase 4, 11* (*CDPK4, 11*)、*CBL-interacting protein kinase 3* (*CIPK3*) を欠損した突然変異体では ABA

応答性遺伝子の発現が野生型に比べ減衰することが知られている (Kim *et al.* 2003、Zhu *et al.* 2007)。本細胞において G1 期の細胞で低温処理により ABA 含量が増大したのは、低温によるカルシウムの選択的な流入により ABA の合成が活性化されたためかもしれない。また、S 期の細胞の NA 区で ABA 含量が他の周期の細胞と比べ高くなったのは、アフィディコリン除去後、新培地に再懸濁したことが原因であるかもしれない。実際に、再懸濁直後の細胞の ABA 含量は同調化に用いた定常期の細胞における ABA 含量よりも高くなることが分かっている (定常期: 14.8 mg/g FW; 再懸濁直後: 20.5 mg/g FW、データは示していない)。再懸濁により ABA 含量が増大する原因は、糖含量が豊富に存在する新培地に再懸濁することによる浸透ストレスを介した ABA 合成系の活性化によるものであるかもしれない。実際、浸透ストレスは ABA 合成系の遺伝子を誘導し、その結果として ABA 含量を増大させる (Xiong *et al.* 2002)。

IV-11) 異なった細胞周期における糖含量

異なった細胞周期に同調化した細胞を低温処理した場合の細胞内可溶性糖含量の変動について解析した (図 14, 15)。その結果、NA 区においては、G2/M 期の細胞は S 期あるいは G1 期の細胞に比べ細胞内糖含量が少なかった。本細胞の細胞周期の同調化は、定常期の細胞を用いて、アフィディコリンにより細胞周期を停止させた後、新しい培地に再懸濁することで行っている。つまり、細胞内の糖含量が非常に低い細胞 (佐々木 2005) をスクロース含量が豊富な培地 (すなわち、新鮮な JPL 培地) に懸濁している状態となる。このことから、新たな培地に再懸濁された細胞では、積極的に培地中の糖を細胞内に取り込む応答が起こると考えられる。しかし、クロマチン構造が凝集した状態にある M 期の細胞では、細胞内への糖を取り込むために必要なトランスポーターの遺伝子発現が抑制されているものと考えられる。さらに、M 期への進行はエネルギーの要求が特に高いと考えられており (西 1979)、G1/S 期の細胞で取り込まれた細胞内の糖は M 期の進行に際し、消費されると考えられる。このことにより、G2/M 期の細胞では糖含量が低くなっているのかもしれない。

また、本解析では、全ての細胞周期において、低温処理による細胞内糖含量の増大は観察されなかった (図 14, 15)。これは、細胞周期が低温誘導性の糖含量増大に関与していない可能性を示唆しているのかもしれない。しかし、上述したように、低温処理による細胞内 ABA 含量の増大は細胞周期に依存している (図 12, 13)。以前の報告で、ABA は細胞内糖含量を増大させることが分かっている (Sharma *et al.* 2004、Nagao *et al.* 2005)。タバキやコケでは、細胞外への ABA の添加はデンプンの分解を引き起こし、細胞内糖含量の増大を引き起こす。これらのことから、本細胞においても、細胞周期に依存した ABA 含量の増大

により細胞内糖含量の増大が起こるものと考えられる。本解析においてこの相関関係が観察されない原因は、少なくとも以下の二つが考えられた。一つ目は、前述したように、細胞周期を同調化させるためにアフィディコリン処理をした細胞は、糖含量の豊富な新鮮培地に再懸濁される。これにより細胞内へ培地中の糖が取り込まれ、結果として細胞内糖含量が高くなると考えられる。この細胞内の糖含量増大が、低温処理過程における細胞内の糖含量増大の可視化を困難にしているかもしれない。二つ目は、本細胞の同調率は 6.3% であり、それ以外の細胞の多くは定常期の特徴を有したままであると考えられる。つまり、低温処理により起こる細胞周期依存的な変化は、全体の細胞数の中では低い割合を占めているにすぎない。ABA の定量は ELISA 法、つまり、抗原抗体反応を用いて行っており、全体の細胞数のうち低割合である特定の細胞周期で起こる ABA 含量の増大に対しても感度よく検出できると考えられる。一方で、糖含量の測定では少数の特定細胞周期で起こる糖含量の増大が全体の糖含量の中では微量な変化となってしまう、目立った増大が観察されなかったのかもしれない。以上のような原因で、低温処理によって ABA 含量の増大が起こっても、それによって引き起こされると考えられる糖含量の増大が検出されないことも考えられる。さらに詳細な研究が必要である。

IV-12) 異なった細胞周期における凍結耐性

これまでの解析から、G1 期と S 期の細胞は低温に応答して、低温誘導性遺伝子が高発現することが分かっている (図 11)。さらに、低温に応答した細胞内 ABA 含量の増大は G1 期の細胞で起こる傾向が示されている (図 12, 13)。つまり、S 期及び G1 期の細胞は、G2/M 期の細胞に比べ、低温処理に応答し、凍結耐性が増大する可能性が考えられる。そこで、低温処理前後における異なった細胞周期の細胞の凍結耐性を再成長法により評価した。その結果、S 期及び G1 期の細胞において CA2 処理を行うことにより凍結耐性が増大する傾向が観察された (図 16-18)。

S 期の細胞では低温処理を行うことで、 -9°C において生存率が高くなった (図 16)。S 期の細胞では解析した低温誘導性遺伝子 (*CBF3/DREB1A*、*COR15a*、*RD29A*) が高発現していたこと、*COR15a* の発現が S 期の細胞のみで高発現していたことから、他の細胞周期の細胞に比べ多くの低温誘導性遺伝子が S 期の細胞のみで高発現していることが考えられる。この結果、多くの低温誘導性のタンパク質が蓄積し、凍結脱水の度合いが大きい -9°C で傷害が緩和されたものと考えられる。

G1 期の細胞に低温処理を行うと、 $-4^{\circ}\text{C}\sim-5^{\circ}\text{C}$ の温度区で凍結傷害の発生を抑える効果が比較的大きく現れた。シロイヌナズナ植物体では、 $-4^{\circ}\text{C}\sim-5^{\circ}\text{C}$ の温度範囲は凍結傷害の主要因の1つである expansion-induced lysis (EIL; I-3 参照) や loss of osmotic responsiveness (LOR; I-3 参照) の発生が急増する温度区であることが分かっている (Uemura & Steponkus 2003)。この報告のなかで、NA の葉から単離されたプロトプラストを異なった温度で凍結させると、 -4°C において EIL の発生が最も高くなり、 $-4^{\circ}\text{C}\sim-5^{\circ}\text{C}$ の温度区では LOR の発生が約 60% 増加することが示されている。また、これらの傷害の発生は CA2 処理を行うことで緩和されることが分かっている。従って、本研究において CA2 処理を行った細胞で NA 区の細胞に比べ $-4^{\circ}\text{C}\sim-5^{\circ}\text{C}$ の温度区の生存率に違いが見られたのは、G1 期の細胞を低温処理することによって EIL と LOR の発生が抑制されたことによるのかもしれない。以上のように低温処理による凍結耐性の増大は特定の細胞周期の細胞で起こり、各細胞周期の細胞は異なった低温応答により、凍結傷害を緩和させる温度に違いを持つことが示唆された。

IV-13) 総合考察

これまで述べてきたように、シロイヌナズナ植物体を用いて、低温馴化による凍結耐性の誘導機構が積極的に研究されてきている。しかし、植物体には、様々な異なった器官、組織、細胞が存在しており、これらの異なったものが示す低温に対する応答の違い、あるいは、多様な低温に対する応答反応が相互作用することによって、複雑な凍結耐性増大の仕組みが備わっているものと考えられる。このような植物体が持つ「複雑性」が低温馴化過程で起こる変化を多様化させてしまい、低温馴化で鍵となる変化の解明を困難にしている。このようなことが原因で、凍結耐性を人工的に増大させる効率的なアプローチの確立には未だに至っていないのが現状である。この問題に取り組むため、本研究ではシロイヌナズナ T87 懸濁培養細胞を用いて、凍結耐性の増大に細胞レベルで重要となる変化について解析した。

本研究から、シロイヌナズナ培養細胞においても、シロイヌナズナ植物体と同様、低温処理を行うことで細胞内糖含量の増大、細胞内 ABA 含量の増大、あるいは、低温応答性遺伝子の発現が起こることが明らかとなり、シロイヌナズナ植物体とシロイヌナズナ培養細胞の低温馴化機構は多くの点で共通であることが分かった。つまり、低温馴化による凍結耐性の増大は細胞レベルにおいても起こる現象であることが明らかになった。一方で、マイクロアレイを用いた解析は、培養細胞のみで低温変動する遺伝子群のなかに細胞周期の進行に関わる遺伝子がいくつかあることが分かった。つまり、シロイヌナズナ植物体の細胞レベルにおける応答には、細胞周期が関与している可能性が示唆された。詳細を以下に記す。

本細胞における低温処理による凍結耐性の誘導は、成長段階に依存して起こることが分かった (図 3)、凍結耐性が増大する誘導期の細胞では、細胞内糖含量の増大、細胞内 ABA 含量の増大、あるいは、低温誘導性遺伝子 (*CBF3/DREB1A*, *COR15a*, *RD29A*) の高い発現が見られることが明らかになった (図 4, 6, 7)。様々な種の植物体においても、低温馴化により細胞内糖含量の増大 (Koster & Lynch 1992, Wanner & Junttila 1999, Kamata & Uemura 2004)、細胞内 ABA 含量の増大 (Daie & Campbell 1981, Chen *et al.* 1983, Lalk & Dorffling 1985, Guy & Haskell 1988, Lang *et al.* 1994)、あるいは、低温誘導性遺伝子の発現誘導 (Thomashow 1999, Chen *et al.* 2002, Fowler & Thomashow 2002, Kreps *et al.* 2002, Seki *et al.* 2002, Hannah *et al.* 2005, 2006, Lee *et al.* 2005, Oono *et al.* 2006) が起こる。つまり、植物体で報告された低温馴化機構は細胞レベルにおいて起こっている応答であることが示唆される。実際にマイクロアレイ解析から、本誘導期の細胞で見られた低温処理過程で変動する遺伝子の多くは、

シロイヌナズナ植物体の低温馴化過程でも同様の変動を示すことが分かった (表 5, 6)。このことから、植物体で起こる低温馴化機構が細胞レベルにおいて起こっている現象である可能性が強く示唆される。

一方で、本細胞において低温処理過程で変動が見られた遺伝子のなかには、植物体の低温馴化過程では変動が見られないものが存在していた (表 1-6)。これらの遺伝子には、細胞周期の制御に関わる遺伝子が存在していた。この結果は、誘導期の細胞では細胞周期が盛んに進行していることと関連していると考えられ、特定の部分でしか分裂が起こらない植物体全体を対象として研究を行った場合には検出しにくい低温が細胞周期に与える影響が、培養細胞を用いた本研究では顕著に現れたのかもしれない。近年報告されているように、細胞周期と ABA やカルシウムといった植物体における低温馴化機構に重要な因子との間に相関した制御関係があることを考えると (Wang *et al.* 1998、Kadota *et al.* 2005、Pettko-Szandtner *et al.* 2006、Rymen *et al.* 2007)、本培養細胞で低温により変動することが明らかになった細胞周期の制御に関わる遺伝子は、低温処理による植物細胞における凍結耐性の誘導に重要であることが示唆される。特定の部位でしか分裂が起こらない植物体では、培養細胞に比べ低温による細胞周期への影響が限られた部分にしか現れず、その結果、非分裂組織がほとんどを占める植物体を用いたマイクロアレイ解析では、低温馴化過程における発現変動が検出しにくい遺伝子が存在する可能性が考えられる。もし、このように植物体を用いた低温馴化の研究では解析しにくい部分があるとするならば、培養細胞を用いた本研究のように単純化した実験系で得られた遺伝子群は、これまで未解明であった細胞レベルにおける低温馴化分子機構を詳細に解明するための格好の切り口になるかもしれない。

また、本研究では、植物体との比較を行うことにより細胞レベルでの低温応答を解析できただけでなく、異なった成長段階の細胞を用いることで誘導期特異的に低温変動する遺伝子あるいは細胞分裂頻度の違いなど、低温処理による凍結耐性の増大に関わる可能性を示す変化を見出すことができた。これまで述べてきたように、本細胞の凍結耐性増大は誘導期の細胞を低温処理した時のみ観察される (図 3)。つまり、誘導期の細胞のみで低温処理により活性化が見られる現象が低温処理による本培養細胞の凍結耐性の誘導に重要な変化であると考えられる。マイクロアレイを用いた本研究から、誘導期の細胞では対数増殖期の細胞に比べ、低温に応答したシグナル伝達系や細胞の機能変換に関わる現象の活性化が示唆されており、これらの機能を有する遺伝子群が低温馴化機構において重要な働きを持つかもしれない。

以上をまとめると、本研究から考えられる低温処理によるシロイヌナズナ植物体の細胞レベルにおける応答には、次の2つの機構が考えられる。

1. 低温環境に曝されたシロイヌナズナ細胞は、本マイクロアレイ解析で得られたようなシグナル伝達や細胞の機能変換に関連した遺伝子の活性化によって、低温環境に馴化し、凍結耐性が誘導される。
2. 低温環境に曝されたシロイヌナズナ細胞、特に分裂が起こっている細胞は、特定の細胞周期で、あるいは特定の細胞周期に停止することで、ABA等の低温馴化シグナル伝達が増強し、低温環境に馴化することにより凍結耐性が誘導される。

このように、植物体を用いた研究では、植物体に非常に複雑な低温応答が存在するため、凍結耐性増大に重要な限定要因を決定することが困難であると考えられる。また、様々な異なった細胞を有する植物体を用いた研究では特定の細胞で起こる重要な変化が見出せないことも凍結耐性増大の鍵となる要因を決定できない一要因であるかもしれない。従って、異なった器官、組織、細胞間で起こるであろう複雑な低温応答の相互作用を持たず、同じ特徴を有する細胞集団である培養細胞を用いた細胞レベルでの解析は、植物体の研究では見出せない低温馴化の素過程を解析することができると考えられる。また、培養細胞を用いた解析から新たに見出された低温処理による凍結耐性の増大に関わる遺伝子を植物体で過剰発現、あるいは、抑制させることにより、細胞自身が有する低温馴化能力を高めることで、究極的には植物体全体の凍結耐性を増大させる効率的なアプローチを提供することができるかもしれない。

V. 摘要

V-1) 和文

温帯性植物は、低温馴化することで凍結温度に曝された後も生育できるようになる。低温馴化機構の解析は、シロイヌナズナ植物体を用いて積極的に行われている。植物個体には、様々な異なった細胞、組織、及び、器官が存在しており、これらの低温に対する応答が異なることや応答反応が相互作用することによって、複雑な耐性増大の仕組みが備わっている。そのため、多くの研究があるにも関わらず、未だに、明確な低温馴化機構の解明、そして、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を確立するまでには至っていない。この問題を解決し、凍結耐性獲得機構を詳細に解明するためには、細胞における低温に対する応答を解析し、低温馴化の素過程で重要な変化を明らかにする必要があると考えた。そこで、本研究では、シロイヌナズナ T87 懸濁培養細胞を用いて、低温処理によって引き起こされる細胞レベルにおける凍結耐性誘導機構を明らかにすることを目的として、主に以下 6 つの実験を実施した。

1) 培養細胞の低温処理による凍結耐性の変動

本細胞の成長曲線を湿重量により測定し、誘導期、対数増殖期、定常期を決定した。異なった成長段階の細胞（誘導期及び対数増殖期）を用いて低温処理による凍結耐性の変動を解析した。その結果、誘導期の細胞のみで低温処理を 2 日行うことにより凍結耐性の増大が観察された。特に、 -7°C まで凍結した場合、誘導期の細胞は対数増殖期の細胞に比べ有意に凍結耐性が高くなることが明らかとなった。

2) 生理的変化の解析

植物体では低温馴化過程で細胞内可溶性糖及びアブシジン酸 (ABA) 含量が増大する。そこで、本細胞の凍結耐性誘導に、これらの生理的変化が関与しているかについて解析した。その結果、低温処理過程における可溶性糖及び内生 ABA 量は、誘導期の細胞のみで蓄積増大することが明らかとなった。このことから、誘導期の細胞は植物体と共通の低温馴化機構を有している可能性が示唆された。

3) 低温誘導性遺伝子の発現変動

植物体の低温馴化過程では低温誘導性遺伝子が発現上昇し、凍結耐性の増大に寄与している。そこで、低温誘導性遺伝子 (*CBF3/DREB1A* とその下流の標的遺伝子である *COR15a* 及び *RD29A*) の発現が本細胞の凍結耐性増大と相関しているか否かについて調べた。その

結果、低温処理により誘導期の細胞でこれらの遺伝子が高発現していることが明らかとなった。しかし、対数増殖期の細胞においてもこれらの遺伝子の発現が見られたことから、発現量の違いだけで成長段階に依存した凍結耐性の誘導を説明できない。そこで、44k オリゴアレイを用いて、誘導期の細胞のみで低温によって発現が変動する遺伝子を網羅的に解析した。その結果、誘導期の細胞のみで、凍結耐性の変動と相関した挙動を示す低温誘導遺伝子が 54 個、抑制遺伝子が 34 個見出された。これらの遺伝子の多くは、植物体の低温馴化過程でも同様の挙動を示すことが分かり、誘導期の細胞と植物体は多くの点で共通の低温応答機構を有していることが示唆された。また、対数増殖期の細胞に比べ、誘導期の細胞ではシグナル伝達の上流で機能する遺伝子及びタンパク質の修飾に関わる遺伝子が多く発現誘導されることが明らかとなり、これらの遺伝子が誘導期の細胞あるいは植物体の耐性増大に重要であることが考えられた。一方で、植物体では低温変動しない遺伝子もいくつか見られたことから、本細胞の低温応答は植物体と共通なものと培養細胞を用いた場合にしか見られない応答があるものと示唆された。

4) 細胞周期の進行

生物の成長は細胞の分裂により行われる。細胞分裂は細胞周期の進行により制御されていることから、本細胞の成長段階に依存した低温処理によって誘導される凍結耐性の違いが細胞周期により影響を受けていることが推測される。そこで、二つの異なった成長段階の細胞を用いて、細胞周期の進行の違いを解析した。その結果、誘導期の細胞では対数増殖期の細胞に比べ細胞周期が盛んに進行していることが明らかとなった。つまり、誘導期の細胞で観察された凍結耐性の増大には細胞周期が関与していると考えられる。

5) 細胞周期に依存した低温応答性

次に、本細胞の細胞周期を同調化させた後、異なった周期 (S、G2/M 及び G1 期) にある細胞に対して低温処理を行い、遺伝子発現及び生理的变化を解析した。その結果、低温誘導性遺伝子の高発現は S 及び G1 期の細胞で、内生 ABA 量の増大は G1 期の細胞で観察された。このことから、低温応答機構は細胞周期に影響を受けることが示唆された。

6) 細胞周期に依存した凍結耐性

次に、異なった細胞周期における凍結耐性の変動を解析した。その結果、S 期の細胞では -9°C 処理区で G1 期の細胞では、-4~-5°C 処理区で低温処理 2 日間行うことで未処理に比べ、耐性が高くなる傾向が観察された。このことから、細胞周期は本細胞の低温応答を介した凍結耐性の増大に関与していることが明らかになった。

以上のことから、本研究では、細胞レベルにおける低温馴化機構は植物体で起こる応答を保持することを明らかにした。さらに、細胞周期のなかでも S 及び G1 期の細胞が低温処理により低温誘導性遺伝子を高発現して、あるいは、内生 ABA 量を増大させることで、誘導期の細胞における凍結耐性増大に寄与していると考えられた。細胞周期による低温応答機構の制御は様々な異なった細胞を有する植物体では微小な変化となってしまう解明が困難であったが、細胞レベルの解析を行うことにより低温馴化機構に重要となる新たな現象を明らかにした。

V-2) Summary

Many temperate plants acquire their freezing tolerance upon exposure to low, non-freezing temperatures for a certain period, which is known as cold acclimation. Studies of cold acclimation process have been extensively carried out using the *Arabidopsis thaliana* whole plant system. Although we have been able to accumulate much knowledge in responses of plants to low temperatures, it is quite possible that overall outcome of the increase in freezing tolerance after cold acclimation is a result of complex, close communication between cells, tissues and/or organs occurring uninterruptedly at low temperatures. Thus, determination of responses of individual cells at various aspects including physiological, structural, molecular biological ones is clearly desirable to understand the mechanism of plant cold acclimation comprehensively. For this purpose, suspension cultured cells are an excellent model due to the lack of inter-tissue and -organ communications. In order to characterize the responses of *Arabidopsis thaliana* T87 suspension cultured cells to cold temperatures, in this study, I carried out six experiments as described below.

1) Changes of freezing tolerance of *Arabidopsis* cultured cells by cold treatment

First, I determined a growth curve of *Arabidopsis* T87 suspension cultured cells during the course of culture period by measuring fresh weight of cells. The growth curve indicated that cells were at the lag phase from 0 to 8 days, the log phase from 9 to 14 days, and the stationary phase from 15 days or later. To analyze whether *Arabidopsis* suspension cultured cells respond to low temperature and increase freezing tolerance, I next determined freeze-thaw survival of the cells before or after cold treatment using lag and log phase cells. As a result, induction of freezing tolerance after 2 days of cold treatment was detected in cells only at the lag phase but not at the log phase. Especially, the freezing tolerance after freezing to -7°C was significantly higher in cells at the lag phase than at the log phase. Thus, cold responses of *Arabidopsis* cultured cells were strongly dependent on the growth phase.

2) Physiological changes of *Arabidopsis* cultured cells during cold treatment

It is well known that endogenous soluble sugar and abscisic acid (ABA) accumulate during cold acclimation in *Arabidopsis* plants. Thus, I determined whether these physiological changes also occur in cultured cells during cold treatment. Accumulation of endogenous soluble sugar and ABA did occur only in cells at the lag phase but not at the log phase. These results suggest that the cold acclimation process resulting in induction of freezing tolerance occurs both in *Arabidopsis* plants and cultured cells at the lag phase.

3) Changes of gene expression of *Arabidopsis* cultured cells during cold treatment

Expression of cold-inducible genes is important for induction of freezing tolerance by cold acclimation in *Arabidopsis* plants. Whether the expression of cold-inducible genes (*CBF3/DREB1A*, *COR15a* and *RD29A*) is also related to induction of freezing tolerance in *Arabidopsis* cultured cells was determined. Essentially, expression kinetics of these genes during cold treatment was similar in cells at the two distinctive growth phases but the extent of expression was apparently stronger in lag phase cells in some cases. Although the extent of cold-responsive gene expression seemed to be stronger in cells at the lag phase than at the log phase, these genes were eventually expressed in log phase cells after cold treatment to some extent. Because these results did not quite correspond with difference in the capacity of freezing tolerance induction, genes that change the expression level by cold treatment only in cells at the lag phase may be additionally required for cold-induction of freezing tolerance in *Arabidopsis* cultured cells at the lag phase. Thus, I next performed a comprehensive gene expression profiling analysis with an Agilent 44k oligonucleotide array for determination of genes which are up- or downregulated only cells at the lag phase. As a result, I found that there were 54 cold-upregulated and 34 cold-downregulated genes, respectively. The expression of these genes commonly changed during cold acclimation in *Arabidopsis* plants. Furthermore, genes with estimated function in signal transduction pathway or protein modifications were more upregulated in cells at the lag phase than at the log phase. These results may indicate that these genes contribute to induction of freezing tolerance by cold treatment both lag phase cells and *Arabidopsis* plants. However, there were genes that changed during cold treatment of *Arabidopsis* cultured cells at the lag phase but not in *Arabidopsis* plants. From these results, lag phase cells likely have at least two cold-responsive pathways that are common to and distinctively observed in *Arabidopsis* plants.

4) Determination of cell cycle phase in *Arabidopsis* cultured cells at different growth phases

Cell division is essential for growth of organisms. Because cell division is strictly regulated by cell cycle progression, differential freezing tolerance depending on the growth phase in *Arabidopsis* cultured cells found in this study may be associated with difference in the phase of cell cycle. Thus, I determined the frequency of cell cycle progression of *Arabidopsis* cultured cells at different growth phases. Lag phase cells had high frequency of cell cycle progression than log phase cells. Therefore, it is suggested that different freezing tolerance depending on the growth phase observed in this study is likely related to the cell cycle progression.

5) Cold response of cells depending on the phase of cell cycle

To analyze whether cold response is affected by cell cycle progression, I next examined the gene expression and physiological changes by cold treatment at cells with different cell cycle phase (S, G2/M and G1 phase). Cell cycle synchronization was achieved by the addition of aphidicolin to stationary phase cells. The extent and timing of the synchronization was confirmed by specific cell cycle marker gene expression and mitotic index. Cold-responsive gene expression was higher in cells at the S and G1 phases than at the G2/M phase. Furthermore, accumulation of endogenous ABA was detected only in cells at the G1 phase. These results are consistent with the notion that cold response of cultured cells is dependent on cell cycle in *Arabidopsis* T87 cultured cells.

6) Freezing tolerance of cells depending on the phase of cell cycle

Lastly, I evaluated the freezing tolerance of cells at different cell cycle phase before or after cold treatment. Increase in freezing tolerance after cold treatment was observed in S and G1 phase cells at -9°C and -4°C or -5°C, respectively. However, there was no effect of cold treatment on freezing tolerance in G2/M phase cells. From these results, cells at the S and G1 phase responded to cold temperature and increased in freezing tolerance.

From these results, it is suggested that in many aspects, cold acclimation process of plant occurs commonly at cellular level. Furthermore, because S and G1 phase cells highly responded to cold such as high expression of cold-inducible genes or accumulation of endogenous ABA, induction of freezing tolerance in cells at the lag phase may be dependent on the response of S and G1 phase cells to cold. Furthermore, because plants, which consist of many different types of cells, are too complex to see the influence of cell cycle in cold response, it might have been not revealed the cell cycle regulation of cold acclimation process using the whole plant system. Thus, cell cycle regulation of cold response that was determined with suspension cultured cells in this study will provide a new insight in understanding plant cold acclimation process.

VI. 謝辞

本研究の遂行に当たり、研究を指導して頂いた岩手大学農学部附属寒冷バイオシステム研究センター生体機能開発研究分野 上村松生教授、及び、伊藤菊一教授に心から感謝申し上げます。そして、本学位論文の審査及び研究指導をして頂きました山形大学農学部生物資源学科 三橋渉教授に謹んで感謝申し上げます。さらに、本学位論文の審査に際しましては、弘前大学農学生命科学部 杉山修一教授、及び、独立行政法人 農業生物資源研究所遺伝資源研究グループ限界機能研究チーム 石川雅也氏にお世話になりました。

本研究に対し様々な助言、助力を頂きました岩手大学農学部附属寒冷バイオシステム研究センター細胞複製研究分野 堤賢一先生、斉藤靖史先生、寒冷シグナル応答研究分野 木藤新一郎先生、岩手大学 21 世紀 COE プログラム 河村幸男先生、稲葉丈人先生に深く感謝申し上げます。

また、本培養細胞の提供及び取り扱い等をご指導下さいました独立行政法人理化学研究所植物科学研究センター 篠崎一雄氏、筑波大学遺伝子実験センター 吉田理一郎氏、さらに、マイクロアレイ解析全般の面倒を見て頂きました独立行政法人理化学研究所植物科学研究センター 関原明氏、石田順子氏及び大野陽子氏に心からお礼申し上げます。また、培養細胞の継代等、研究の補助をして頂きました岩手大学農学部附属寒冷バイオシステム研究センター生体機能開発研究分野 高橋和恵氏及び深澤直美氏に深謝申し上げます。

最後に、本研究に対する様々な助言、援助、激励を下さいました附属寒冷バイオシステム研究センターの先輩、同輩、後輩の皆様に、この場を借りまして深くお礼を申し上げます。

この研究は、独立行政法人日本学術振興会特別研究員奨励費及び岩手大学 21 世紀 COE プログラム「熱-生命システム相関学拠点創成」の支援を受けて行われました。

VII. 参考文献

- Adachi S., Uchimiya H. & Umeda M. (2006) Expression of B2-type cyclin-dependent kinase is controlled by protein degradation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* **47**, 1683-1686.
- Allen G.J., Kuchitsu K., Chu S.P., Murata Y. & Schroeder J.I. (1999) *Arabidopsis* *abi-1* and *abi-2-1* phosphatase mutations reduce abscisic acid-induced cytoplasmic calcium rises in guard cells. *Plant Cell* **11**, 1785-1798.
- Arenas-Huertero F., Arroyo A., Zhou L., Sheen J. & Leon P. (2000) Analysis of *Arabidopsis* glucose insensitive mutants, *gin5* and *gin6*, reveals a central role of the plant hormone ABA in the regulation of plant vegetative development by sugar. *Genes Dev* **14**, 2085-2096.
- Artus N.N., Uemura M., Steponkus P.L., Gilmour S.J., Lin C. & Thomashow M.F. (1996) Constitutive expression of the cold-regulated *Arabidopsis thaliana* *COR15a* gene affects both chloroplast and protoplast freezing tolerance. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**, 13404-13409.
- 朝比奈英三 (1971) 細胞の凍結. 低温生物学概説 (根井外喜男 編)、東京大学出版会、pp.21-49.
- Axelos M., Curie C., Mazzolini L., Bardet C. & Lescure B. (1992) A protocol for transient gene expression in *Arabidopsis thaliana* protoplasts isolated from cell suspension cultures. *Plant Physiol Biochem* **30**, 123-128.
- Barrero J.M., Rodriguez P.L., Quesada V., Piqueras P., Ponce M.R. & Micol J.L. (2006) Both abscisic acid (ABA)-dependent and ABA-independent pathways govern the induction of *NCED3*, *AAO3* and *ABA1* in response to salt stress. *Plant Cell Environ* **29**, 2000-2008.
- Barroco R.M., De Veylder L., Magyar Z., Engler G., Inze D. & Mironov V. (2003) Novel complexes of cyclin-like protein from *Arabidopsis thaliana* with a function unrelated to cell division. *Cell Mol Life Sci* **60**, 401-412.

- Bisbis B., Delmas F., Joubes J., Sicard A., Hernould M., Inze D., Mouras A. & Chevalier C. (2006) Cyclin-dependent kinase inhibitors regulate the CDK/cyclin complex activities in endoreduplicating cells of developing tomato fruit. *J Biol Chem* **281**, 7374-7383.
- Breen A.P. & Murphy J.A. (1995) Reaction of oxyl radicals with DNA. *Free Radic Biol Med* **18**, 1033-1077.
- Chakrabarti S., Kobayashi K.S., Flavell R.A., Marks C.B., Miyake K., Liston D.R., Fowler K.T., Gorelick F.S. & Andrews N.W. (2003) Impaired membrane resealing and autoimmune myositis in synaptotagmin VII-deficient mice. *J Cell Biol* **162**, 543-549.
- Chambard J.C., Lefloch R., Pouyssegur J. & Lenormand P. (2007) ERK implication in cell cycle regulation. *Biochim Biophys Acta* **1773**, 1299-1310.
- Chen T.H.H. & Gusta L.V. (1983) Abscisic acid-induced freezing tolerance in cultured plants cells. *Plant Physiol* **73**, 71-75.
- Chen W., Provar N.J., Glazebrook J., Katagiri F., Chang H.S., Eulgem T., Mauch F., Luan S., Zou G., Whitham S.A., Budworth P.R., Tao Y., Xie Z., Chen X., Lam S., Kreps J.A., Harper J.F., Si-Ammour A., Mauch-Mani B., Heinlein M., Kobayashi K., Hohn T., Dangl J.L., Wang X. & Zhu T. (2002) Expression profile matrix of *Arabidopsis* transcription factor genes suggests their putative functions in response to environmental stresses. *Plant Cell* **14**, 559-574.
- Chini A., Grant J.J., Seki M., Shinozaki K. & Loake G.J. (2004) Drought tolerance established by enhanced expression of the *CC-NBS-LRR* gene, *ADR1*, requires salicylic acid, EDS1 and ABI1. *Plant J* **38**, 810-822.
- Chinnusamy V., Ohta M., Kanrar S., Lee B.H., Hong X.H., Agarwal M. & Zhu J.K. (2003) ICE1: a regulator of cold-induced transcriptome and freezing tolerance in *Arabidopsis*. *Genes Dev* **17**, 1043-1054.
- Christmann A., Hoffmann T., Teplova I., Grill E. & Muller A. (2005) Generation of active pools of abscisic acid revealed by *in vivo* imaging of water-stressed *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **137**, 209-219.

- Coelho C.M., Dante R.A., Sabelli P.A., Sun Y., Dilkes B.P., Gordon-Kamm W.J. & Larkins B.A. (2005) Cyclin-dependent kinase inhibitors in maize endosperm and their potential role in endoreduplication. *Plant Physiol* **138**, 2323-2336.
- Crowe J.H., Crowe L.M., Carpenter J.F. & Aurell Wistrom C. (1987) Stabilization of dry phospholipids bilayers and proteins by sugar. *Biochem J* **242**, 1-10.
- Cui X., Fan B., Scholz J. & Chen Z. (2007) Roles of *Arabidopsis* cyclin-dependent kinase C complexes in cauliflower mosaic virus infection, plant growth, and development. *Plant Cell* **19**, 1388-1402.
- Daie J. & Campbell W.F. (1981) Response of tomato plants to stressful temperature. *Plant Physiol* **67**, 26-29.
- De Veylder L., Beeckman T., Beecher G.T., Krols L., Terras F., Landrieu I., vander-Scheren E., Maes S., Naudts M. & Inze D. (2001) Functional analysis of cyclin-dependent kinase inhibitors of *Arabidopsis*. *Plant Cell* **13**, 1653-1668.
- De Veylder L., Joubes J. & Inze D. (2003) Plant cell cycle transitions. *Curr Opin Plant Biol* **6**, 536-543.
- Dello Ioio R., Linhares F.S., Scacchi E., Casamitjana-Martinez E., Heidstra R., Costantino P. & Sabatini S. (2007) Cytokinins determine *Arabidopsis* root-meristem size by controlling cell differentiation. *Curr Biol* **17**, 678-682.
- Dolan L. & Davies J. (2004) Cell expansion in root. *Curr Opin Plant Biol* **7**, 33-39.
- Dolezel J., Ciháliková J., Weiserová J. & Lucretti S. (1999) Cell cycle synchronization in plant root meristems. *Methods Cell Sci* **21**, 95-107.
- Ensminger I., Busch F. & Huner N.P. (2006) Photostasis and cold acclimation: sensing low temperature through photosynthesis. *Physiol Plant* **126**, 28-44.

- Fiorani F. & Beemster G.T. (2006) Quantitative analyses of cell division in plants. *Plant Mol Biol* **60**, 963-979.
- Fobert P.R., Gaudin V., Lunness P., Coen E.S. & Doonan J.H. (1996) Distinct classes of *cdc2*-related genes are differentially expressed during the cell division cycle in plants. *Plant Cell* **8**, 1465-1476.
- Fowler S. & Thomashow M.F. (2002) *Arabidopsis* transcriptome profiling indicates that multiple regulatory pathways are activated during cold acclimation in addition to the CBF cold response pathway. *Plant Cell* **14**, 1675-1690.
- Fry S.C. (2004) Primary cell wall metabolism: tracking the careers of wall polymers in living plant cells. *New Phytol* **161**, 641-675.
- Fujikawa S. (1991) Lamellar to hexagonal II phase transitions in tonoplasts of mushroom hyphae caused by mechanical stress resulting from the formation of extracellular ice crystals. *Cryobiology* **28**, 191-202.
- 藤川清三 (1996) 凍結に植物細胞はどのように適応するか. *化学と生物* **34**, 656-666.
- Garber M.P. & Steponkus P.L. (1976) Alteration in chloroplast thylakoids during an *in vitro* freeze-thaw cycle. *Plant Physiol* **57**, 673-680.
- Gilmour S.J., Hajela R.K. & Thomashow M.F. (1988) Cold acclimation in *Arabidopsis thaliana* L. *Plant Physiol* **87**, 745-750.
- Gilmour S.J., Sebolt A.M., Salazar M.P., Everard J.D. & Thomashow M.F. (2000) Overexpression of the *Arabidopsis* CBF3 transcriptional activator mimics multiple biochemical changes associated with cold acclimation. *Plant Physiol* **124**, 1854-1865.
- Gordon-Kamm W.J. & Steponkus P.L. (1984) Lamellar-to-hexagonal II phase transition in the plasma membrane of isolated protoplasts after freeze-induced dehydration. *Proc Natl Acad Sci USA* **81**, 6373-6377.
- Grill E. & Christmann A. (2007) A plant receptor with a big family. *Science* **315**, 1676-1677.

- Guy C.L. & Haskell D. (1988) Detection of polypeptides associated with the cold acclimation process in spinach. *Electrophoresis* **9**, 787-796.
- Hannah M.A., Heyer A.G. & Hinch D.K. (2005) A global survey of gene regulation during cold acclimation in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Genet* **1**, e26.
- Hannah M.A., Wiese D., Freund S., Fiehn O., Heyer A.G. & Hinch D.K. (2006) Natural genetic variation of freezing tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **142**, 98-112.
- Heino P., Sandman G., Lang V., Nordin K. & Palva E.T. (1990) Abscisic acid deficiency prevents development of freezing tolerance in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Theor Appl Genet* **79**, 801-806.
- Hemerly A.S., de Almedia Engler J., Bergounioux C., Van Montagu M., Engler G., Inze D & Ferreira P. (1995) Dominant negative mutants of the Cdc2 kinase uncouple cell division from iterative plant development. *EMBO J* **14**, 3925-3936.
- Henshaw G.G., Jha K.K., Mehta A.R., Joan D., Shakeshaft D.J. & Street H.E. (1966) Studies on the growth in culture of plant cells. I. Growth patterns in batch propagated suspension cultures. *J Exp Bot* **17**, 362-377.
- Hinch D.K. (1986) Sucrose influx and mechanical damage by osmotic stress to thylakoid membranes during an *in vitro* freeze-thaw cycle. *Biochim Biophys Acta* **861**, 152-158.
- Hinch D.K. (2002) Cryoprotectin: a plant lipid-transfer protein homologue that stabilizes membranes during freezing. *Phil Trans R Soc Lond B* **357**, 909-916.
- Hinch D.K., Heber U. & Schmitt J.M. (1990) Proteins from frost-hardy leaves protect thylakoids against mechanical freeze-thaw damage *in vitro*. *Planta* **180**, 416-419.
- Huntley R.P. & Murray J.A (1999) The plant cell cycle. *Curr Opin Plant Biol* **2**, 440-446.

- Imajuku Y., Hirayama T., Endoh H. & Oka A. (1992) Exon-intron organization of the *Arabidopsis thaliana* protein kinase genes *CDC2a* and *CDC2b*. *FEBS Lett* **304**, 73-77.
- Incharoensakdi A., Takabe T. & Akazawa T. (1986) Effect of betaine on enzyme activity and subunit interaction of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase from *Aphanothece halophytica*. *Plant Physiol* **81**, 1044-1049.
- Inze D. (2005) Green light for the cell cycle. *EMBO J* **24**, 657-662.
- Ishikawa M., Suzuki M., Nakamura T., Kishimoto T., Robertson A.J. & Gusta L.V. (2006) Effect of growth phase on survival of bromegrass suspension cells following cryopreservation and abiotic stresses. *Ann Bot* **97**, 453-459.
- Ishitani M., Xiong L., Lee H., Stevenson B. & Zhu J.K. (1998) *HOS1*, a genetic locus involved in cold-responsive gene expression in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **10**, 1151-1161.
- Jackson M.B. (1993) Are plant hormones involved in root to shoot communication? *Adv Bot Res* **19**, 103-187.
- Jitsuyama Y., Suzuki T., Harada T. & Fujikawa S. (2002) Sucrose incubation increases freezing tolerance of asparagus (*Asparagus officinalis* L.) embryogenic cell suspensions. *CryoLetters* **23**, 103-112.
- Kadota Y., Furuichi T., Sano T., Kaya H., Gunji W., Murakami Y., Muto S., Hasezawa S. & Kuchitsu K. (2005) Cell-cycle-dependent regulation of oxidative stress responses and Ca²⁺ permeable channels NtTPC1 A/B in tobacco BY-2 cells. *Biochem Biophys Res Commun* **336**, 1259-1267.
- Kamata T. & Uemura, M. (2004) Solute accumulation in wheat seedlings during cold acclimation: contribution to increased freezing tolerance. *CryoLetters* **25**, 311-322.
- Kariola T., Brader G., Helenius E., Li J., Heino P. & Palva E.T. (2006) *Early responsive to dehydration 15*, a negative regulator of abscisic acid responses in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **142**, 1559-1573.

- Kawamura Y. & Uemura M. (2003) Mass spectrometric approach for identifying putative plasma membrane proteins of *Arabidopsis* leaves associated with cold acclimation. *Plant J* **36**, 141-154.
- 河村幸男、山崎誠和、上村松生 (2006) 凍結における機械的ストレスとその耐性機構. 低温生物工学会誌 **52**, 169-173.
- 河村幸男、山崎誠和、南杏鶴、上村松生 (2007) 植物の凍結耐性機構における細胞膜蛋白質の役割. 蛋白質 核酸 酵素 **52**, 517-523.
- Kim K.N., Cheong Y.H., Grant J.J., Pandey G.K. & Luan S. (2003) *CIPK3*, a calcium sensor-associated protein kinase that regulates abscisic acid and cold signal transduction in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **15**, 411-423.
- Koike M., Takezawa D., Arakawa K. & Yoshida S. (1997) Accumulation of 19-kDa plasma membrane polypeptide during induction of freezing tolerance in wheat suspension-cultured cells by abscisic acid. *Plant Cell Physiol* **38**, 707-716.
- Koster K.L. & Lynch D.V. (1992) Solute accumulation and compartmentation during the cold acclimation of puma rye. *Plant Physiol* **98**:108-113.
- Kreps J.A., Wu Y., Chang H.S., Zhu T., Wang X. & Harper J.F. (2002) Transcriptome changes for *Arabidopsis* in response to salt, osmotic, and cold stress. *Plant Physiol* **130**, 2129-2141.
- Kumagai-Sano F., Hayashi T., Sano T. & Hasezawa S. (2006) Cell cycle synchronization of tobacco BY-2 cells. *Nat Protoc* **1**, 2621-2627.
- Lalk I. & Dorffling K. (1985) Hardening, abscisic acid, praline and freezing resistance in two winter wheat varieties. *Physiol Plant* **63**, 287-292.
- Lang V., Mantyla E., Welin B., Sundberg B. & Palva T. (1994) Alterations in water status, endogenous abscisic acid content, and expression of *rab18* gene during the development of freezing tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* **104**, 1341-1349.

- Leborgne N., Teulieres C., Travert S., Roles M.P., Teissie J. & Boudet A.M. (1995) Introduction of specific carbohydrates into *Eucalyptus gunnii* cells increases their freezing tolerance. *Eur J Biochem* **229**, 710-717.
- Lee B.H., Henderson D.A. & Zhu J.K. (2005) The *Arabidopsis* cold-responsive transcriptome and its regulation by ICE1. *Plant Cell* **17**, 3155-3175.
- Lee B.H., Kapoor A., Zhu J. & Zhu J.K. (2006) STABILIZED1, a stress-upregulated nuclear protein, is required for pre-mRNA splicing, mRNA turnover, and stress tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **18**, 1736-1749.
- Lee H.E., Shin D., Park S.R., Han S.E., Jeong M.J., Kwon T.R., Lee S.K., Park S.C., Yi B.Y., Kwon H.B. & Byun M.O. (2007) Ethylene responsive element binding protein 1 (StEREBP1) from *Solanum tuberosum* increases tolerance to abiotic stress in transgenic potato plants. *Biochem Biophys Res Commun* **353**, 863-868.
- Lee M.H., Reynisdottir I. & Massague J. (1995) Cloning of *p57^{KIP2}*, a cyclin-dependent kinase inhibitor with unique domain structure and tissue distribution. *Genes Dev* **9**, 639-649.
- Levitt J. (1980) Response of plants to environmental stresses. 2nd Edition. Academic Press.
- Lin C. & Thomashow M.F. (1992) A cold-regulated *Arabidopsis* gene encodes a polypeptide having potent cryoprotective activity. *Biochem Biophys Res Commun* **18**, 1103-1108.
- Lin C., Yu Y., Kadono T., Iwata M., Umemura K., Furuichi T., Kuse M., Isobe M., Yamamoto Y., Matsumoto H., Yoshizuka K. & Kawano T. (2005) Action of aluminum, TPC1-type channel inhibitor, against salicylate-induced and cold-shock-induced calcium influx in tobacco BY-2 cells. *Biochem Biophys Res Commun* **332**, 823-830.
- Lovelock J.E. (1953a) The haemolysis of human red blood cells by freezing and thawing. *Biochim Biophys Acta* **10**, 414-426.
- Lovelock J.E. (1953b) The mechanism of protective action of glycerol against haemolysis by freezing and thawing. *Biochim Biophys Acta* **11**, 28-36.

- Lovelock J.E. (1954) The protection of neutral solutes against haemolysis by freezing and thawing. *Biochem J* **56**, 265-270.
- Lui H., Wang H., DeLong C., Fowke L.C., Crosby W.L. & Forbert P.R. (2000) The *Arabidopsis* Cdc2s-interacting protein ICK2 is structurally related to ICK1 and is a potent inhibitor of cyclin-dependent kinase activity *in vitro*. *Plant J* **21**, 379-385.
- Lynch D.V. & Steponkus P.L. (1987) Plasma membrane lipid alterations associated with cold acclimation of winter rye seedlings (*Secale cereale* L. cv Puma) *Plant Physiol* **183**, 761-767.
- 町田泰則、福田裕穂 (2000) 植物細胞の分裂. (大山莞爾ら 編集)、秀潤社
- Magyar Z., Meszaros T., Miskolczi P., Deak M., Feher A., Brown S., Kondorosi E., Athanasiadis A., Pongor S., Bilgin M., Bako L., Koncz C. & Dudits D. (1997) Cell cycle phase specificity of putative cyclin-dependent kinase variants in synchronized alfalfa cells. *Plant Cell* **9**, 223-235.
- Mantyla E., Lang V. & Palva E.T. (1995) Role of abscisic acid in drought-induced freezing tolerance, cold acclimation, and accumulation of LT178 and RAB18 proteins in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* **107**, 141-148.
- Masclaux-Daubresse C., Purdy S., Lemaitre T., Pourtau N., Taconnat L., Renou J.P. & Wingler A. (2007) Genetic variation suggests interaction between cold acclimation and metabolic regulation of leaf senescence. *Plant Physiol* **143**, 434-446.
- Mazur P. & Rigopoulos N. (1983) Contributions of unfrozen fraction and of salt concentration to the survival of slowly frozen human erythrocytes: influence of warming rate. *Cryobiology* **20**, 274-289.
- McNeil P.L. & Kirchhausen T. (2005) An emergency response team for membrane repair. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**, 499-505.
- Menges M. & Murray J.A. (2002) Synchronous *Arabidopsis* suspension cultures for analysis of cell-cycle gene activity. *Plant J* **30**, 203-212.

- Menges M., de Jager S.M., Gruissem W. & Murray J.A.H. (2005) Global analysis of the core cell cycle regulators of *Arabidopsis* identifies novel genes, reveals multiple and highly specific profiles of expression and provides a coherent model for plant cell cycle control. *Plant J* **41**, 546-566.
- Mironov V.V., De Veylder L., Van Montagu M. & Inze D. (1999) Cyclin-dependent kinases and cell division in plants- the nexus. *Plant Cell* **11**, 509-522.
- Miura K., Jin J.B., Lee J., Yoo C.Y., Stirn V., Miura T., Ashworth E.N., Bressan R.A., Yun D.J. & Hasegawa P.M. (2007) SIZ1-mediated sumoylation of ICE1 controls *CBF3/DREB1A* expression and freezing tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **19**, 1403-1414.
- Molinier J., Stamm M.E. & Hohn B. (2004) SNM-dependent recombinational repair of oxidatively induced DNA damage in *Arabidopsis thaliana*. *EMBO Rep* **5**, 994-999.
- Moon B.Y., Higashi S., Gombos Z. & Murata N. (1995) Unsaturation of the membrane lipids of chloroplasts stabilizes the photosynthetic machinery against low-temperature photoinhibition in transgenic tobacco plants. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**, 6219-6223.
- Morgan D.O. (1997) Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors. *Annu Rev Cell Dev Biol* **13**, 261-291.
- Nagao M., Arakawa K., Takezawa D. & Fujikawa S. (2008) Long- and short-term freezing induce different types of injury in *Arabidopsis thaliana* leaf cells. *Planta* **227**, 477-489.
- Nagao M., Minami A., Arakawa K., Fujikawa S. & Takezawa D. (2005) Rapid degradation of starch in chloroplasts and concomitant accumulation of soluble sugars associated with ABA-induced freezing tolerance in the moss *Physcomitrella patens*. *J Plant Physiol* **162**, 169-180.
- Nagata T., Nemoto Y. & Hasezawa S. (1992) Tobacco BY-2 cell line as 'HeLa' cell in the cell biology of higher plants. *Int Rev Cytol* **132**, 1-30.
- Nakai T., Kato K., Shinmyo A. & Sekine M. (2006) *Arabidopsis* KRPs have distinct inhibitory activity toward cyclin D2-associated kinases, including plant-specific B-type cyclin-dependent kinase. *FEBS Lett* **580**, 336-340.

- 西荒介 (1979) 新植物組織培養. (竹内正幸ら 編集)、朝倉書店、pp.103-116.
- Olien C.R. & Smith M.N. (1977) Ice adhesions in relation to freeze stress. *Plant Physiol* **60**, 499-503.
- Oono Y., Seki M., Satou M., Iida K., Akiyama K., Sakurai T., Fujita M., Yamaguchi-Shinozaki K. & Shinozaki K. (2006) Monitoring expression profiles of *Arabidopsis* genes during cold acclimation and deacclimation using DNA microarray. *Funct Integr Genomics* **6**, 212-234.
- Osakabe Y., Maruyama K., Seki M., Satou M., Shinozaki K. & Yamaguchi-Shinozaki K. (2005) Leucine-rich repeat receptor-like kinase1 is key membrane-bound regulator of abscisic acid early signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **17**, 1105-1119.
- O'Kane D., Gill V., Boyd P. & Burdon R. (1996) Chilling, oxidative stress and antioxidant responses in *Arabidopsis thaliana* callus. *Planta* **198**, 371-377.
- Pettko-Szandtner A., Meszaros T., Horvath G.V., Bako L., Csordas-Toth E., Blastyak A., Zhiponova M., Miskolczi P. & Dudits D. (2006) Activation of an alfalfa cyclin-dependent kinase inhibitor by calmodulin-like domain protein kinase. *Plant J* **46**, 111-123.
- Pitzschke A., Forzani C. & Hirt H. (2006) Reactive oxygen species signaling in plants. *Antioxid Redox Signal* **8**, 1757-1764.
- Planchais S., Glab N., Inze D. & Bergounioux C. (2000) Chemical inhibitors: a tool for plant cell cycle studies. *FEBS Lett* **30**, 78-83.
- Porceddu A., Stals H., Reichheld J.P., Segers G., De Veylder L., Barroco R.P., Casteels P., Van Montagu M., Inze D. & Mironov V. (2001) A plant-specific cyclin-dependent kinase is involved in the control of G2/M progression in plants. *J Biol Chem* **39**, 36354-36360.
- Prasad T.K., Anderson M.D., Martin B.A. & Stewart C.R. (1994) Evidence for chilling-induced oxidative stress in maize seedlings and a regulatory role for hydrogen peroxide. *Plant Cell* **6**, 65-74.

- Razem F.A., El-Kereamy A., Abrams S.R. & Hill R.D. (2006) The RNA-binding protein FCA is an abscisic acid receptor. *Nature* **439**, 290-294.
- Reddy A., Caler E.V. & Andrews N.W. (2001) Plasma membrane repair is mediated by Ca^{2+} -regulated exocytosis of lysosomes. *Cell* **106**, 157-169.
- Rymen B., Fiorani F., Kartal F., Vandepoele K., Inze D. & Beemster G.T. (2007) Cold nights impair leaf growth and cell cycle progression in maize through transcriptional changes of cell cycle genes. *Plant Physiol* **143**, 1429-1438.
- 酒井昭 (1982) 植物の耐凍性と寒冷適応 —冬の生理・生態学—. 学会出版センター、pp.4-9.
- Sakamoto A., Valverde R., Alia., Chen T.H. & Murata N. (2000) Transformation of *Arabidopsis* with the *codA* gene for choline oxidase enhances freezing tolerance of plants. *Plant J* **22**, 449-453.
- Sampedro J. & Cosgrove D. (2005) The expansin superfamily. *Genome Biol* **6**, 242.
- Samuels A.L., Meehl J., Lipe M. & Stachelin L.A. (1998) Optimizing conditions for tobacco BY-2 cell cycle synchronization rapid communication. *Protoplasma* **202**, 232-236.
- 佐々木裕 (2005) シロイヌナズナ懸濁培養細胞における凍結耐性の誘導機構. 岩手大学大学院農学研究科 修士論文.
- 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. & Shinozaki K. (2002) 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.
- Shanmugam V. (2005) Role of extracytoplasmic leucine rich repeat proteins in plant defense mechanisms. *Microbiol Res* **160**, 83-94.

- Sharma P., Pandey S., Bhattacharya A., Nagar P.K. & Ahuja P.S. (2004) ABA associated biochemical changes during somatic embryo development in *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze. *J Plant Physiol* **161**, 1269-1276.
- Shen S.S., Tucker W.C., Chapman E.R. & Steinhardt R.A. (2005) Molecular regulation of membrane resealing in 3T3 fibroblasts. *J Biol Chem* **280**, 1652-1660.
- Shen Y.Y., Wang X.F., Wu F.Q., Du S.Y., Cao Z., Shang Y., Wang X.L., Peng C.C., Yu X.C., Zhu S.Y., Fan R.C., Xu Y.H. & Zhang D.P. (2006) The Mg-chelatase H subunit is an abscisic acid receptor. *Nature* **443**, 823-826.
- Shimotohno A., Ohno R., Bisova K., Sakaguchi N., Huang J., Koncz C., Uchimiya H. & Umeda M. (2006) Diverse phosphoregulatory mechanisms controlling cyclin-dependent kinase-activating kinases in *Arabidopsis*. *Plant J* **47**, 701-710.
- 篠崎和子 (2003) 植物の低温・乾燥ストレス応答と耐性獲得の分子機構. 低温生物工学会誌 **49**, 21-27.
- Smirnoff N. & Cumbes Q.J. (1989) Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. *Phytochemistry* **28**, 1057-1060.
- Sonoike K. (1996) Photoinhibition of photosystem I: its physiological significance in the chilling sensitivity of plants. *Plant Cell Physiol* **37**, 239-247.
- Steponkus P.L. (1984) Role of the plasma membrane in freezing injury and cold acclimation. *Annu Rev Plant Physiol* **35**, 543-584.
- Steponkus P.L., Garber M.P., Myers S.P. & Lineberger L. (1977) Effect of cold acclimation and freezing on structure and function of chloroplast thylakoids. *Cryobiology* **14**, 303-321.
- Steponkus P.L., Uemura M. & Webb M.S. (1993) A contrast of the cryostability of the plasma membrane of winter rye and spring oat. In: *Advances in Low-temperature Biology*, Ed. Steponkus P.L., J.A.I. Press, Vol 2, pp.211-312.

- Steponkus P.L., Uemura M., Joseph R.A., Gilmour S.J. & Thomashow M.F. (1998) Mode of action of the *COR15a* gene on the freezing tolerance of *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**, 14570-14575.
- Sugawara Y. & Sakai A. (1974) Survival of suspension-cultured sycamore cells cooled to the temperature of liquid nitrogen. *Plant Physiol* **54**, 722-724.
- Tabaei-Aghdai S.R., Pearce R.S. & Harrison P. (2003) Sugar regulate cold-induced gene expression and freezing-tolerance in barley cell cultures. *J Exp Bot* **54**, 1565-1575.
- Takagi T., Nakamura M., Hayashi H., Inatsugi R., Yano R. & Nishida I. (2003) The leaf-order-dependent enhancement of freezing tolerance in cold-acclimated *Arabidopsis* rosettes is not correlated with the transcript levels of the cold-inducible transcription factors of *CBF/DREB1*. *Plant Cell Physiol* **44**, 922-931.
- 高橋和恵 (2006) アブシジン酸によるシロイヌナズナ懸濁培養細胞の凍結耐性獲得機構の解析. 岩手大学農学部 卒業論文.
- Takahashi S., Katagiri T., Hirayama T., Yamaguchi-Shinozaki K. & Shinozaki K. (2001) Hyperosmotic stress induces a rapid and transient increase in inositol 1,4,5-trisphosphate independent of abscisic acid in *Arabidopsis* cell culture. *Plant Cell Physiol* **42**, 214-222.
- Tamminen I., Makela P., Heino P. & Palva E.T. (2001) Ectopic expression of *ABI3* gene enhances freezing tolerance in response to abscisic acid and low temperature in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **25**, 1-8.
- Tang M., Sun J., Liu Y., Chen F. & Shen S. (2007) Isolation and functional characterization of the *JcERF* gene, a putative AP2/EREBP domain-containing transcription factor, in the woody oil plant *Jatropha curcas*. *Plant Mol Biol* **63**, 419-428.
- Tardieu F. & Granier C. (2000) Quantitative analysis of cell division in leaves: methods, developmental patterns and effects of environmental conditions. *Plant Mol Biol* **43**, 555-567.

- THE ARABIDOPSIS GENOME INITIATIVE. (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **408**, 796-815.
- Thomashow M.F. (1999) Plant cold acclimation: freezing tolerance gene and regulatory mechanisms. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **50**, 571-599.
- Toyoshima H. & Hunter T. (1994) p27, a novel inhibitor of G1 cyclin-Cdk protein kinase activity, is related to p21. *Cell* **78**, 67-74.
- Uemura M. & Steponkus P.L. (1989) Effect of cold acclimation on the incidence of two forms of freezing injury in protoplasts isolated from rye leaves. *Plant Physiol* **91**, 1131-1137.
- Uemura M. & Steponkus P.L. (1994) A Contrast of the plasma membrane lipid composition of oat and rye leaves in relation to freezing tolerance. *Plant Physiol* **104**, 479-496.
- Uemura M. & Steponkus P.L. (2003) Modification of the intracellular sugar content alters the incidence of freeze-induced membrane lesions of protoplasts isolated from *Arabidopsis thaliana* leaves. *Plant Cell Environ* **26**, 1083-1096.
- Uemura M., Joseph R.A. & Steponkus P.L. (1995) Cold acclimation of *Arabidopsis thaliana*: effect on plasma membrane lipid composition and freeze-induced lesions. *Plant Physiol* **109**, 15-30.
- Umeda M., Umeda-Hara C., Yamaguchi M., Hashimoto J. & Uchimiya H. (1999) Differential expression of genes for cyclin-dependent protein kinases in rice plants. *Plant Physiol* **119**, 31-40.
- Verkest A., Manes C.L., Vercruyssen S., Maes S., Van Der Schueren E., Beeckman T., Genschik P., Kuiper M., Inze D. & De Veylder L. (2005) The cyclin-dependent kinase inhibitor KRP2 controls the onset of the endoreduplication cycle during *Arabidopsis* leaf development through inhibition of mitotic CDKA;1 kinase complexes. *Plant Cell* **17**, 1723-1736.
- Voet D., Voet J.G. & Pratt C.W. (2000) ヴォート基礎生化学. (田村信雄ら 訳)、東京化学同人、pp.600-631.

- Volger H.G. & Herber U. (1975) Cryoprotective leaf proteins. *Biochim Biophys Acta* **412**, 335-349.
- Wang H., Fowke L.C. & Crosby W.L. (1997) A plant cyclin-dependent kinase inhibitor gene. *Nature* **386**, 451-452.
- Wang H., Qi Q., Schorr P., Cutler A.J., Crosby W.L. & Fowke L.C. (1998) ICK1, a cyclin-dependent protein kinase inhibitor from *Arabidopsis thaliana* interacts with both cdc2a and cycd3, and its expression is induced by abscisic acid. *Plant J* **15**, 501-510.
- Wang H., Zhou Y., Gilmer S., Whitwill S. & Fowke L.C. (2000) Expression of the plant cyclin-dependent kinase inhibitor ICK1 affects cell division, plant growth and morphology. *Plant J* **24**, 613-623.
- Wang W. & Chen X. (2004) HUA ENHANCER3 reveals a role for a cyclin-dependent protein kinase in the specification of floral organ identity in *Arabidopsis*. *Development* **131**, 3147-3156.
- Wanner L.A. & Junttila O. (1999) Cold-induced freezing tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **120**, 391-400.
- Weiler E.W. (1979) Radioimmunoassays for the determination of free and conjugated abscisic acid. *Planta* **144**, 255-263.
- Weinl C., Marquardt S., Kuijt S.J., Nowack M.K., Jakoby M.J., Hulskamp M. & Schnittger A. (2005) Novel functions of plant cyclin-dependent kinase inhibitors, ICK1/KRP1, can act non-cell autonomously and inhibit entry into mitosis. *Plant Cell* **17**, 1704-1722.
- Welch D., Hassan H., Blilou I., Immink R., Heidstra R. & Scheres B. (2007) *Arabidopsis* JACKDAW and MAGPIE zinc finger proteins delimit asymmetric cell division and stabilize tissue boundaries by restricting SHORT-ROOT action. *Genes Dev* **21**, 2196-2204.
- Wildwater M., Campilho A., Perez-Perez J.M., Heidstra R., Blilou I., Korthout H., Chatterjee J., Mariconti L., Grissem W. & Scheres B. (2005) The *RETINOBLASTOMA-RELATED* gene regulates stem cell maintenance in *Arabidopsis* roots. *Cell* **123**, 1337-1349.

- Wilhelm K.S. & Thomashow M.F. (1993) *Arabidopsis thaliana cor15b*, an apparent homologue of *cor15a*, is strongly responsive to cold and ABA, but not drought. *Plant Mol Biol* **23**, 1073-1077.
- Wilkinson S. & Davies W.J. (2002) ABA-based chemical signaling: the co-ordination of responses to stress in plants. *Plant Cell Environ* **25**, 195-210.
- Withers L.A. & Street H.E. (1977) Freeze preservation of cultured plant cells. III. The pregrowth phase. *Physiol Plant* **39**, 171-178.
- Withers L.A. (1978) The freeze-preservation of synchronously dividing cultured cells of *acer pseudoplatanus* L. *Cryobiology* **15**, 87-92.
- Wu L., Chen X., Ren H., Zhang Z., Zhang H., Wang J., Wang X.C. & Huang R. (2007) ERF protein JERF1 that transcriptionally modulates the expression of abscisic acid biosynthesis-related gene enhances the tolerance under salinity and cold in tobacco. *Planta* **226**, 815-825.
- Wu M.T., Wallner S.J. & Waddell J.W. (1984) Heat stress responses in cultured plant cells. *Plant Physiol* **74**, 944-946.
- Xiong L., Lee H., Ishitani M. & Zhu J.K. (2002) Regulation of osmotic stress-responsive gene expression by the *LOS6/ABA1* locus in *Arabidopsis*. *J Biol Chem* **277**, 8588-8596.
- Yamaguchi-Shinozaki K. & Shinozaki K. (2001) Improving plant drought, salt and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor. *Novartis Found Symp* **236**, 176-186.
- Yanagisawa S., Yoo S.D. & Sheen J. (2003) Differential regulation of EIN3 stability by glucose and ethylene signaling in plants. *Nature* **425**, 521-525.
- Yoshida R., Hobo T., Ichimura K., Mizoguchi T., Takahashi F., Aronso J., Ecker JR. & Shinozaki K. (2002) ABA-activated SnRK2 protein kinase is required for dehydration stress signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol* **43**, 1473-1483.
- Yoshida S. (1995) Low temperature-induced alkalization of vacuoles in suspension-cultured cells of mung bean (*Vigna radiate* [L.] Wilczek). *Plant Cell Physiol* **36**, 1075-1079.

- 吉田静夫 (1999) 極限温度に対する生理応答. 植物環境応答: 生存戦略とその分子機構. (渡邊 昭ら 監修)、秀潤社、pp.24-35.
- 吉田静夫 (2002) 植物が未来を拓く: 寒さと戦う植物たち. (駒嶺穆 編集)、共立出版、pp.109-123.
- Yoshizumi T., Nagata N., Shimada H. & Matsui M. (1999) An *Arabidopsis* cell cycle-dependent kinase-regulated gene, *CDC2b*, plays a role in regulating seedling growth in darkness. *Plant Cell* **11**, 1883-1895.
- Zhang J.Z., Creelman R.A. & Zhu J.K. (2004) From laboratory to field: using information from *Arabidopsis* to engineer salt, cold, and drought tolerance in crops. *Plant Physiol* **135**, 615-621.
- Zhang X., Zhang Z., Chen J., Chen Q., Wang X.C. & Huang R. (2005) Expressing TERF1 in tobacco enhances drought tolerance and abscisic acid sensitivity during seedling development. *Planta* **222**, 494-501.
- Zhou Y., Huang L., Zhang Y., Shi K., Yu J. & Nogues S. (2007) Chill-induced decrease in capacity of RuBP carboxylation and associated H₂O₂ accumulation in cucumber leaves are alleviated by grafting onto figleaf ground. *Ann Bot* **100**, 839-848.
- Zhou Y., Li G., Brandizzi F., Fowke L.C. & Wang H. (2003) The plant cyclin-dependent kinase inhibitor ICK1 has distinct functional domains for in vivo kinase inhibition, protein instability and nuclear localization. *Plant J* **35**, 476-489.
- Zhou Y., Wang H., Gilmer S., Whitwill S., Keller W. & Fowke L.C. (2002) Control of petal and pollen development by the plant cyclin-dependent kinase inhibitor ICK1 in transgenic *Brassica* plants. *Planta* **215**, 248-257.
- Zhu S.Y., Yu X.C., Wang X.J., Zhao R., Li Y., Fan R.C., Shang Y., Du S.Y., Wang X.F., Wu F.Q., Xu Y.H., Zhang X.Y. & Zhang D.P. (2007) Two calcium-dependent protein kinases, CPK4 and CPK11, regulate abscisic acid signal transduction in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **19**, 3019-3036.

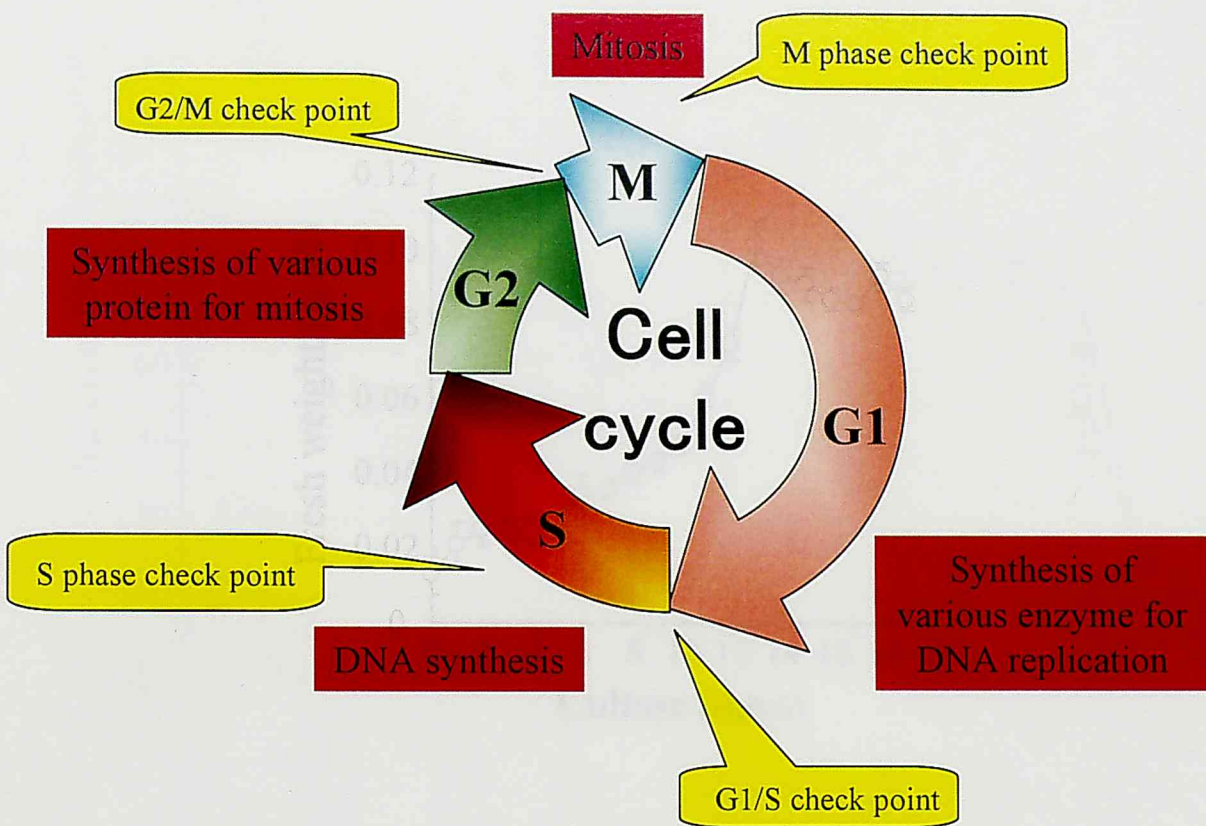


Figure 2. Growth curve of TH7 suspension cells with 10% serum maintained in JPL medium at 23°C on a rotary shaker (120 rpm) under continuous light (100 μmol photons m⁻² s⁻¹).

Figure 1. Schematic presentation of the cell cycle. Each cell cycle phase (red) and check point (yellow) are indicated.

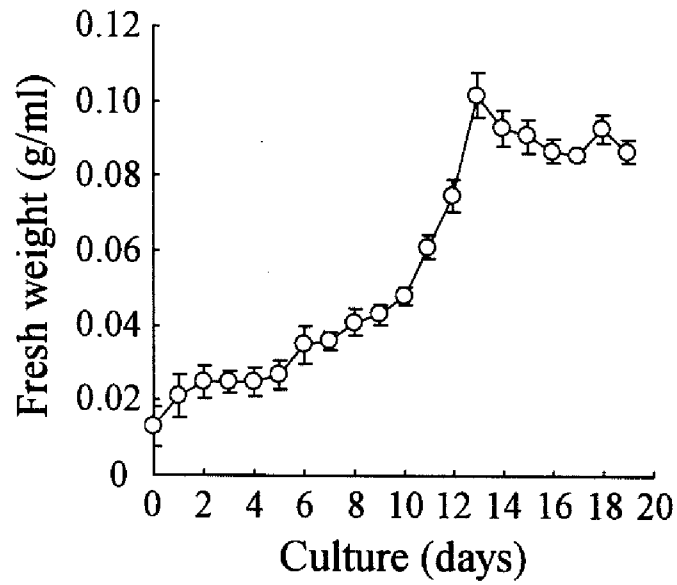


Figure 2. Growth curve of T87 suspension cultured cells. Cells were maintained in JPL medium at 23°C on a rotary shaker (120 rpm) under continuous light ($100 \mu \text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$). Growth curve was determined by fresh weight of cells harvested daily for 19 days.

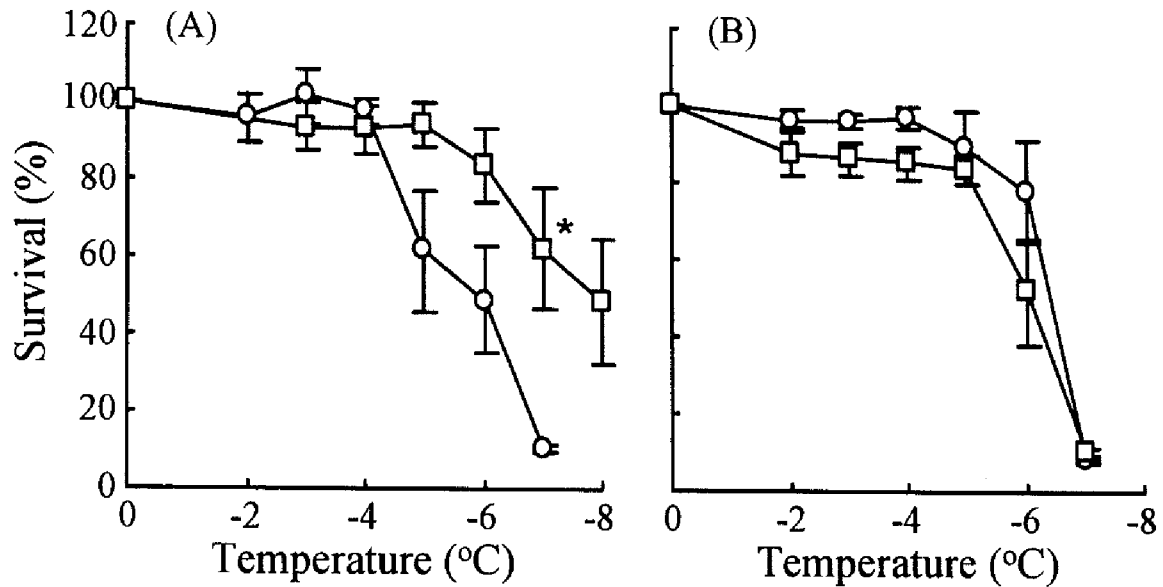


Figure 3. Freezing tolerance of *Arabidopsis* T87 suspension cultured cells at different growth phases. Cultured cells were collected at the lag (A) or log phase (B) and subjected to freezing before (○) or after (□) 2 days of cold treatment. Freezing tolerance of cells was evaluated by regrowth assay after a freeze/thaw cycle. Survival was expressed as a ratio of fresh weight of frozen cells to unfrozen cells (see text). Data were the mean and SD of three or more biological replicates. Survival significantly different from that of the sample before cold treatment is marked with an asterisk ($P < 0.05$).

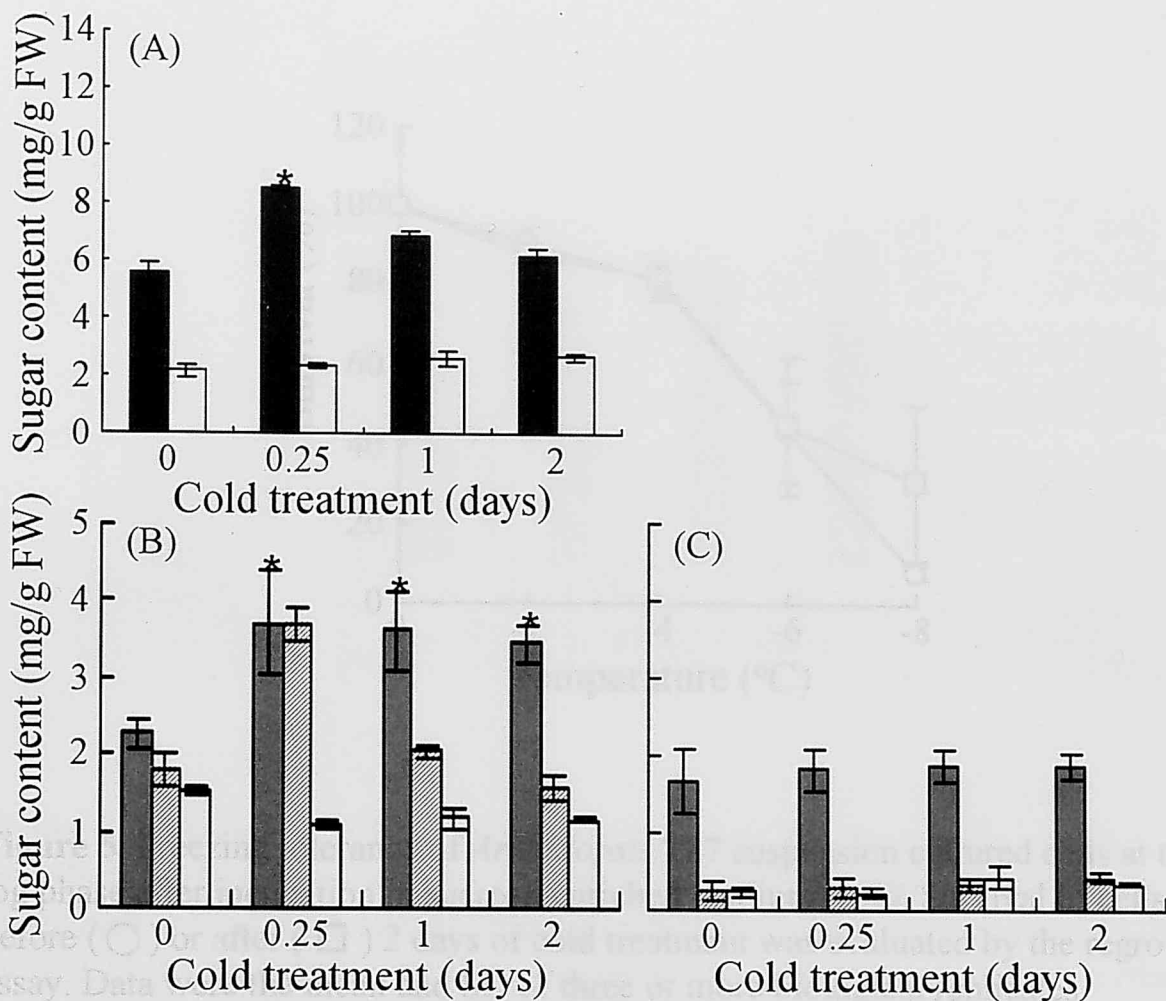


Figure 4. (A) Changes of total soluble sugar content in *Arabidopsis* T87 suspension cultured cells during cold treatment. Cultured cells at the lag (black bar) or log (white bar) phase were subjected to cold treatment (2°C) for 0, 0.25 (6 hr), 1, or 2 d. (B and C) Changes of sucrose, glucose and fructose contents in *Arabidopsis* T87 suspension cultured cells during cold treatment. Cultured cells were collected at the lag (B) or log phase (C). Sucrose, black bar; glucose, gray bar; fructose, white bar. Cold treatment was performed in the same way as described in (A). Data were the mean and SD of three or more biological replicates. Values significantly different from those of samples before cold treatment are marked with an asterisk ($P < 0.05$).

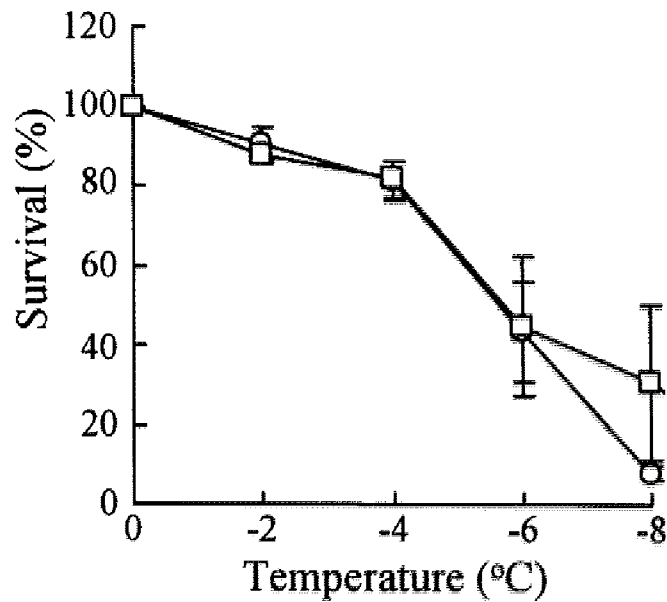


Figure 5. Freezing tolerance of *Arabidopsis* T87 suspension cultured cells at the log phase after incubation in sucrose-enriched medium (3%). Survival of cells before (○) or after (□) 2 days of cold treatment was evaluated by the regrowth assay. Data were the mean and SD of three or more biological replicates. Student's t-test indicated no significant difference between samples before and after sugar treatment ($P < 0.05$).

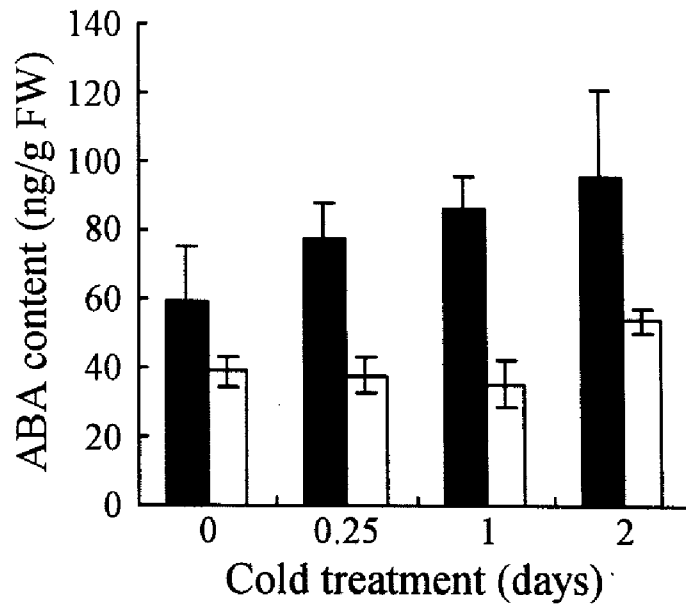


Figure 6. Endogenous ABA content in *Arabidopsis* T87 suspension cultured cells during cold treatment. ABA was extracted from cultured cells at the lag (filled bar) or log (white bar) phase after subjecting them to cold treatment (2°C) for 0, 0.25 (6 hr), 1, or 2 d. ABA content was measured using an ELISA method. Data were the mean and SD of three or more biological replicates. Student's t-test indicated no significant difference between samples before and after cold treatment ($P < 0.05$).

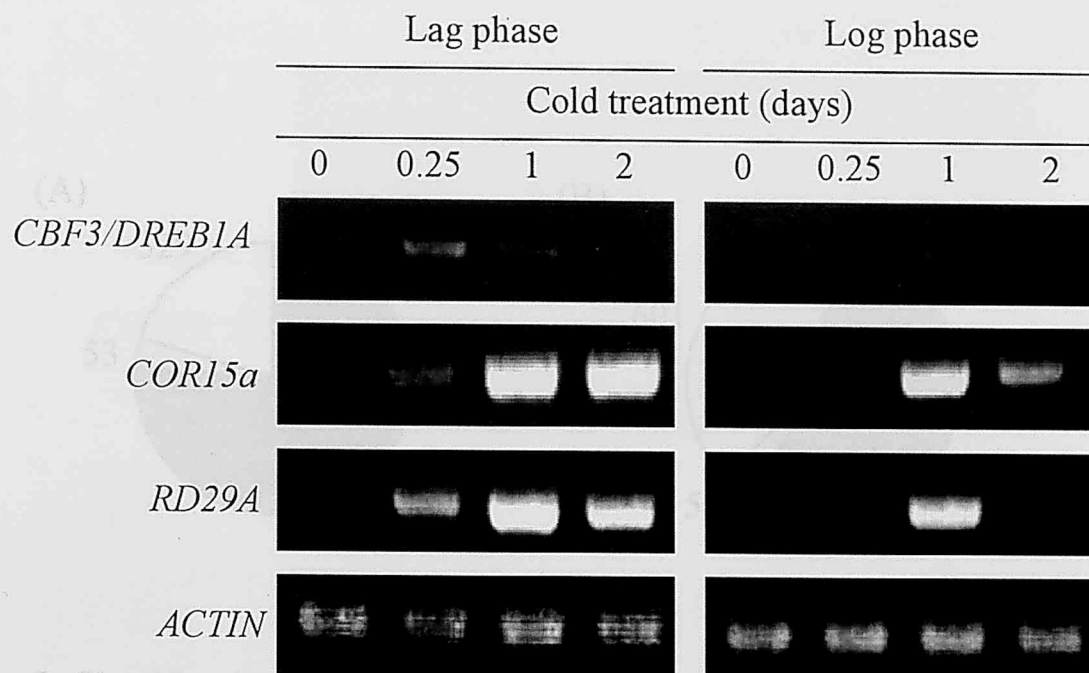


Figure 8. Classification of cold upregulated and downregulated genes identified in *Arabidopsis* T87 suspension cultured cells using microarray analysis. (A) Cold upregulated (≥ 2) and (B) cold downregulated (≤ 0.5) genes. Genes were classified into three groups: genes that were up- or down-regulated throughout cold treatment

Figure 7. Cold-responsive-gene expression in *Arabidopsis* T87 suspension cultured cells during cold treatment. RNA was isolated from cultured cells at the lag or log phase before or after cold treatment (2°C) for 0, 0.25 (6 hr), 1 or 2 d. Semi-quantitative RT-PCR was performed for *DREB1A/CBF3*, *COR15a*, *RD29A* using equal amount of RNA. *ACTIN* was used as loading control.

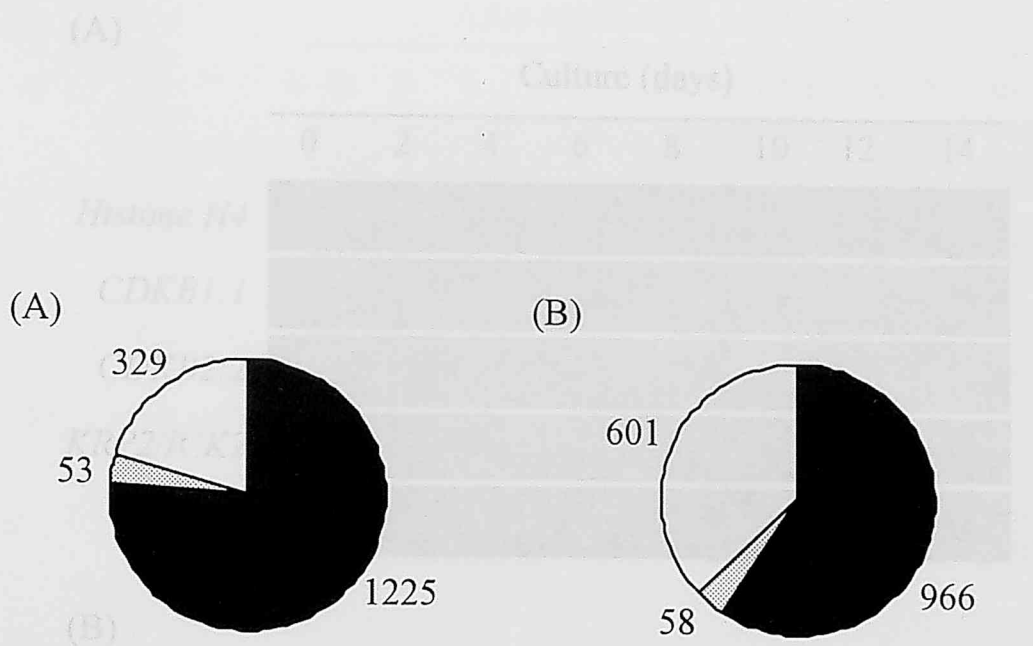


Figure 8. Classification of cold upregulated and downregulated genes identified in *Arabidopsis* T87 suspension cultured cells using microarray analysis. (A) Cold upregulated (≥ 2) and (B) cold downregulated (≤ 0.5) genes. Genes were classified into three groups: genes that were up- or downregulated throughout cold treatment for 2 days (dark grey) and transiently after 1 day (grey) or later after 2 days (white) of cold treatment.

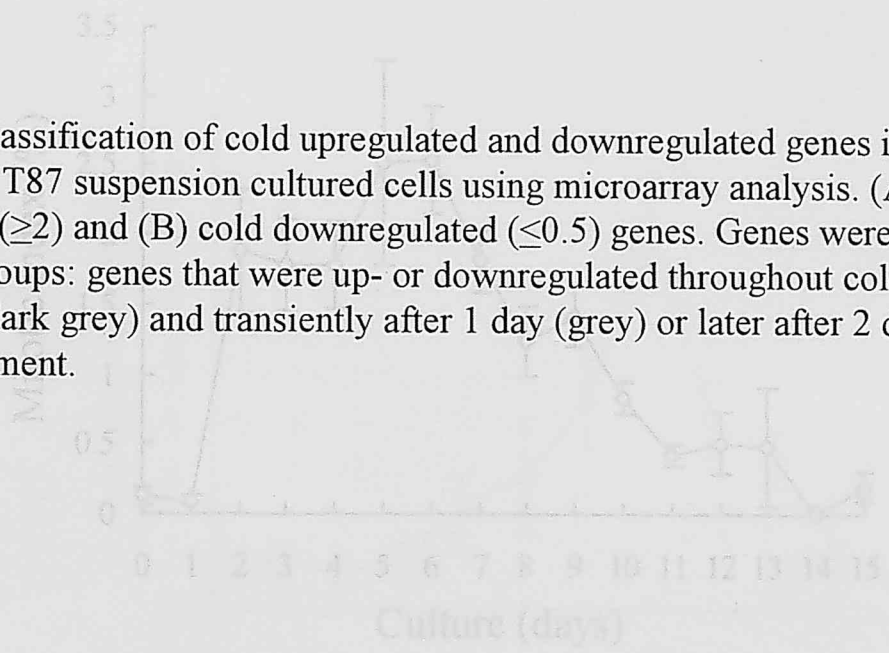


Figure 9. Changes of cell cycle during culture period in *Arabidopsis* T87 suspension cultured cells. (A) Expression analysis of cell cycle specific genes using semi-quantitative RT-PCR and (B) Mitotic index during culture period.

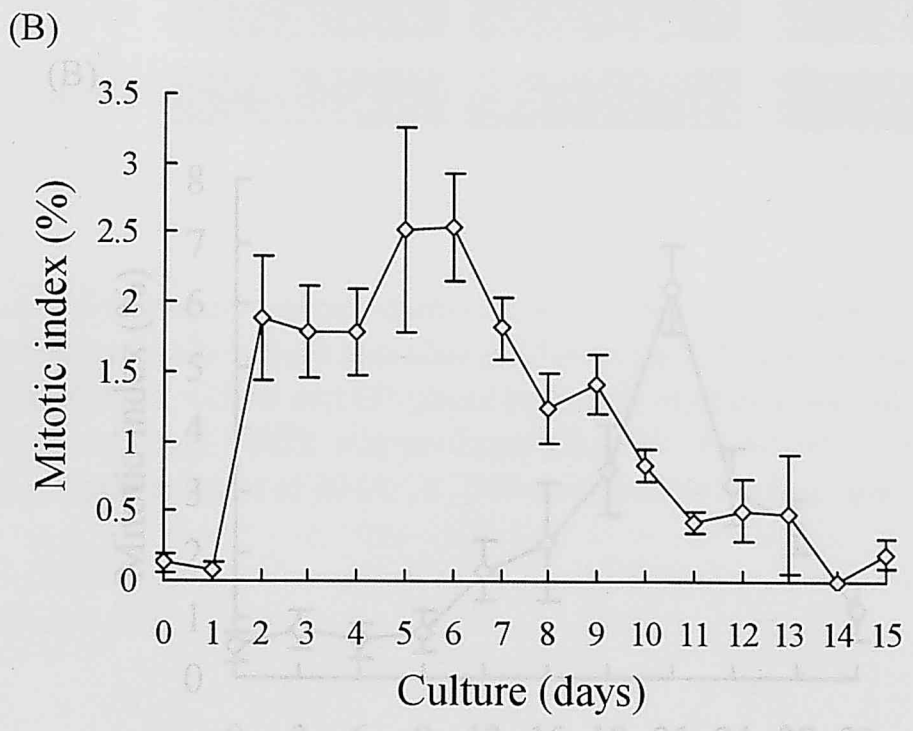
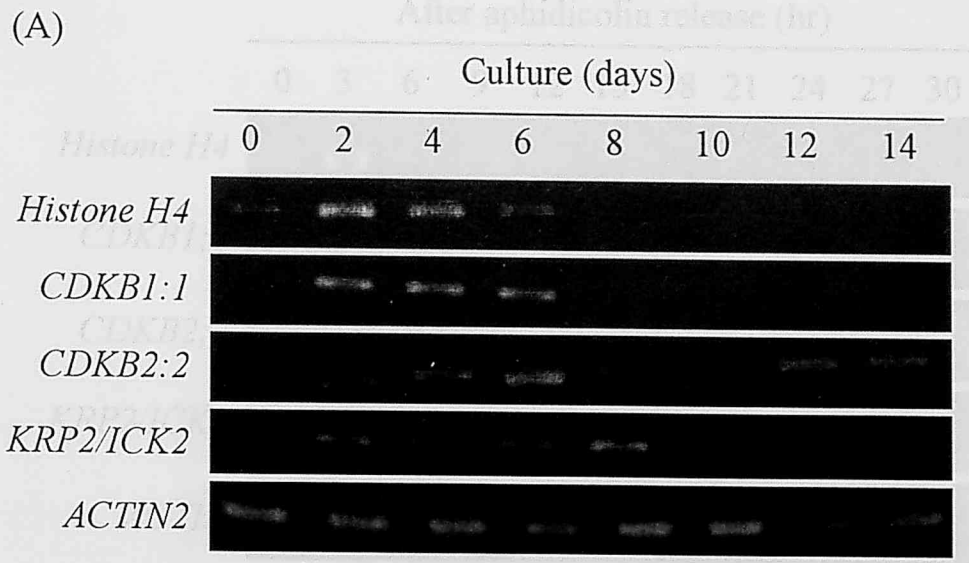
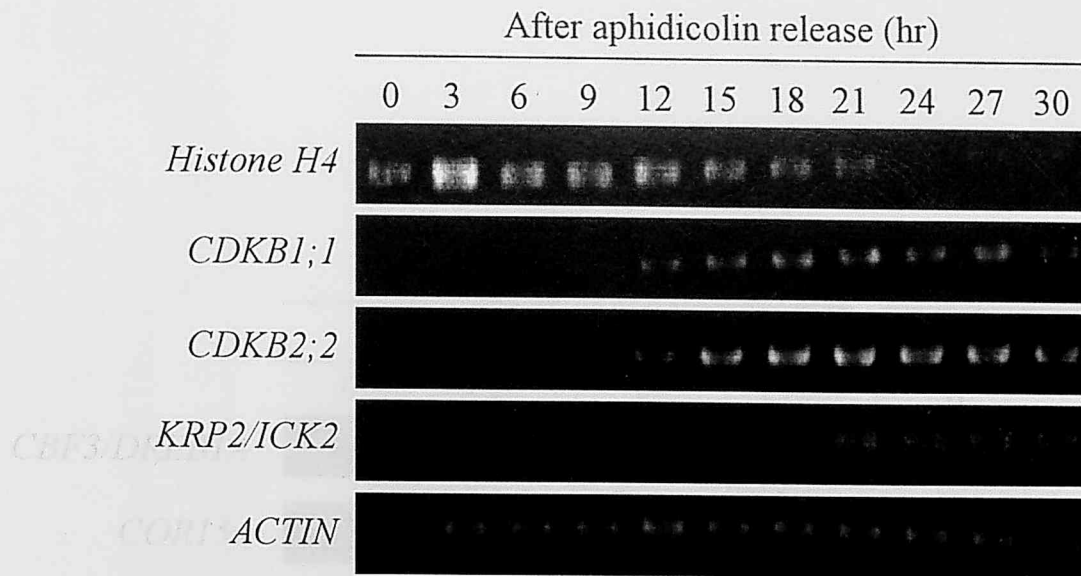


Figure 9. Changes of cell cycle during culture period in *Arabidopsis* T87 suspension cultured cells. (A) Expression analysis of cell cycle specific genes using semi-quantitative RT-PCR and (B) Mitotic index during culture period.

(A)



(B)

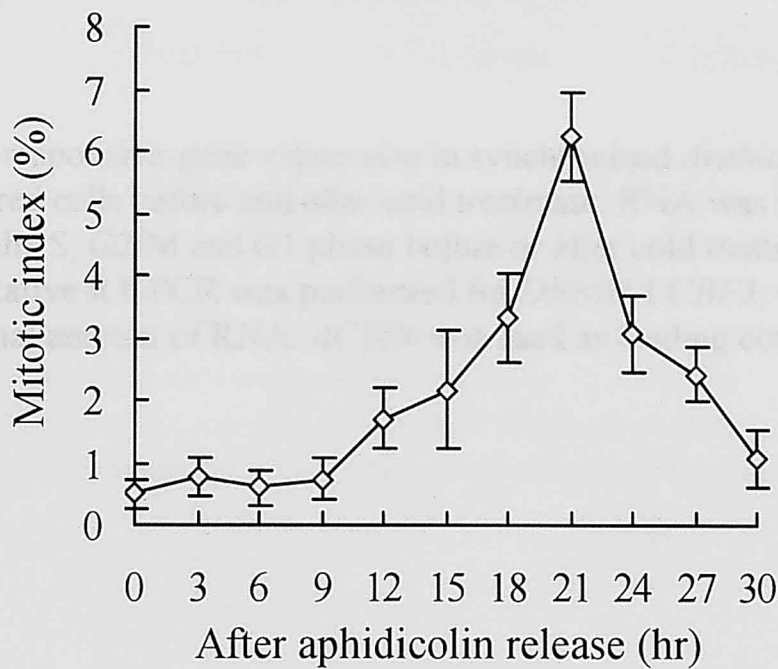


Figure 10. Synchronization of *Arabidopsis* T87 suspension cultured cells after aphidicolin treatment. (A) Expression analysis of cell cycle specific genes using semi-quantitative RT-PCR and (B) Mitotic index after aphidicolin release.

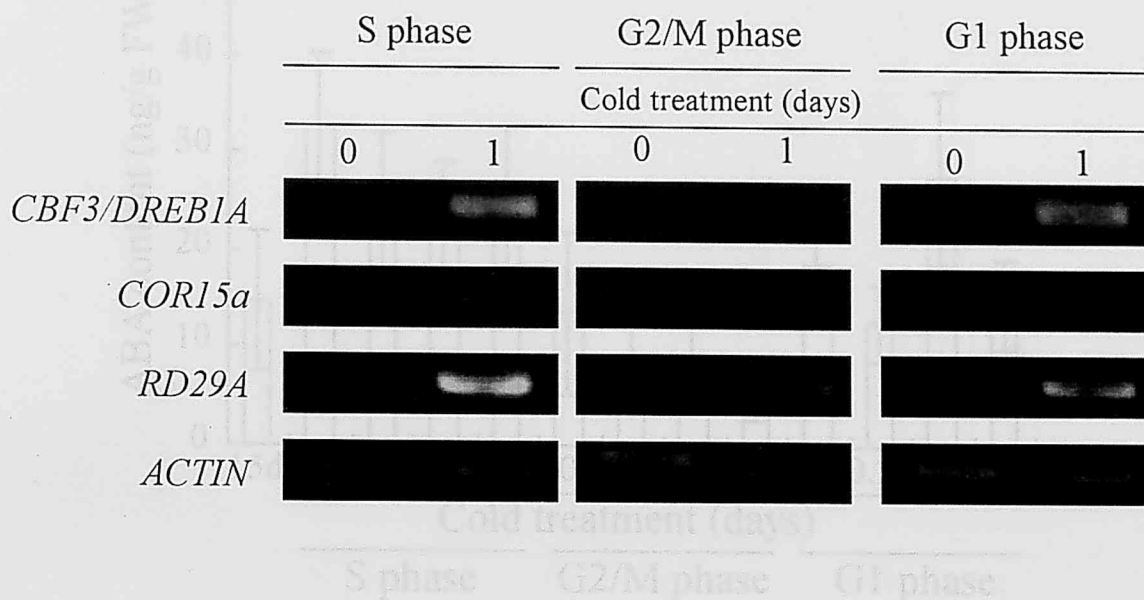


Figure 11. Cold-responsive-gene expression in synchronized *Arabidopsis* T87 suspension cultured cells before and after cold treatment. RNA was isolated from cultured cells at the S, G2/M and G1 phase before or after cold treatment (2°C) for 1 d. Semi-quantitative RT-PCR was performed for *DREB1A/CBF3*, *COR15a* and *RD29A* using equal amount of RNA. *ACTIN* was used as loading control.

1, or 2 d. ABA content was measured using an ELISA method. Data were the mean and SD three or more biological replicates. Student's t-test indicate no significant difference between samples before and after cold treatment ($P < 0.05$).

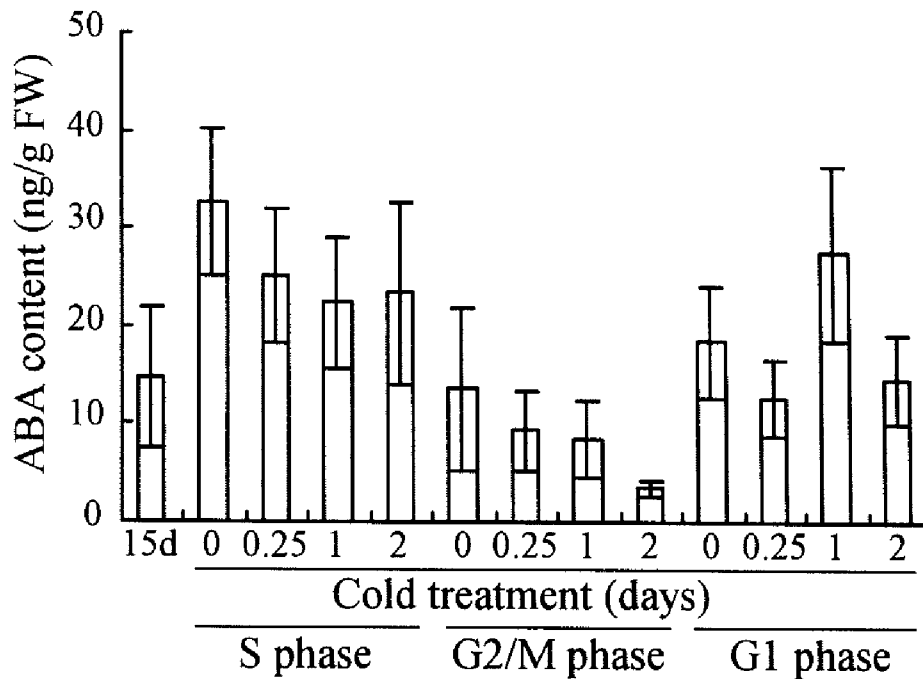


Figure 12. Endogenous ABA content in synchronized *Arabidopsis* T87 suspension cultured cells during cold treatment. Synchronization of cells was performed using 15-day-old cultured cells. ABA was extracted from cells at the S, G2/M and G1 phase after subjecting them to cold treatment (2°C) for 0, 0.25 (6 hr), 1, or 2 d. ABA content was measured using an ELISA method. Data were the mean and SD three or more biological replicates. Student's t-test indicate no significant difference between samples before and after cold treatment ($P < 0.05$).

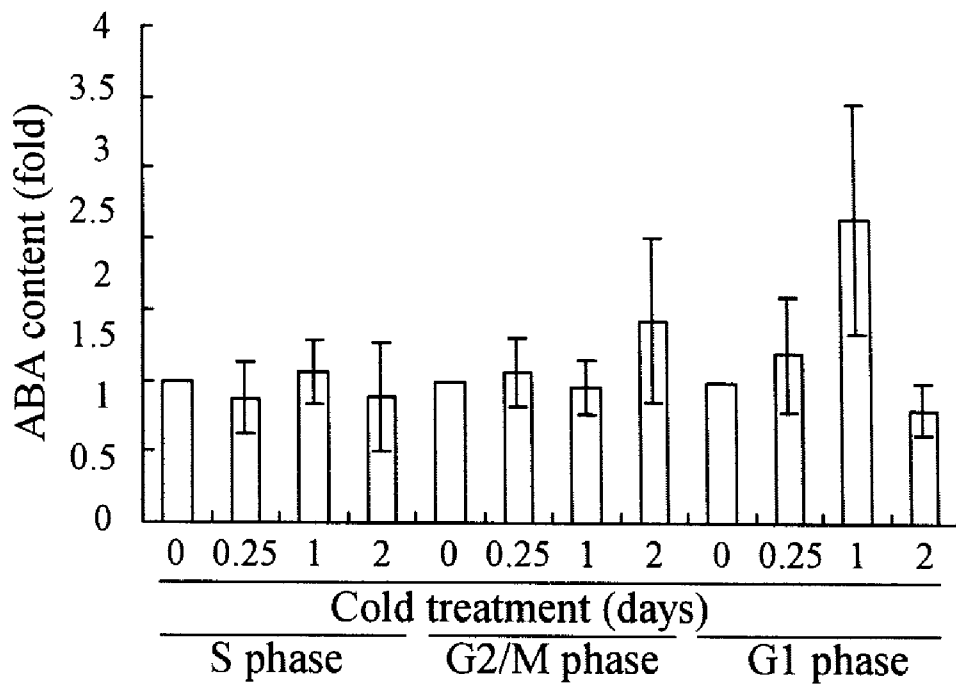


Figure 13. Relative content of endogenous ABA in synchronized *Arabidopsis* T87 suspension cultured cells during cold treatment. Data indicate in fold changes of endogenous ABA content compared to that before cold treatment (0 d) at each cell cycle phase cells. Student's t-test indicate no significant difference between samples before and after cold treatment ($P < 0.05$).

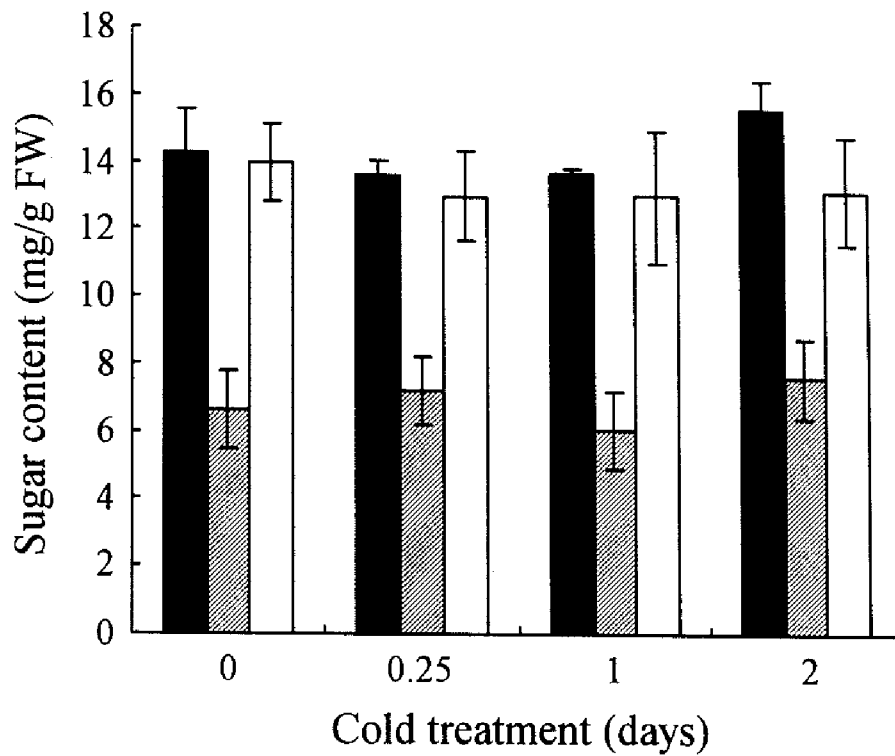


Figure 14. Changes of total soluble sugar content in synchronized *Arabidopsis* T87 suspension cultured cells during cold treatment. Cultured cells at the S (black bar), G2/M (hatched bar) and G1 (white bar) phase were subjected to cold treatment (2°C) for 0, 0.25 (6 hr), 1, or 2 d. Data were the mean and SD of three or more biological replicates. Student's t-test indicate no significant difference in samples before and after cold treatment in each cell cycle phase cells ($P < 0.05$).

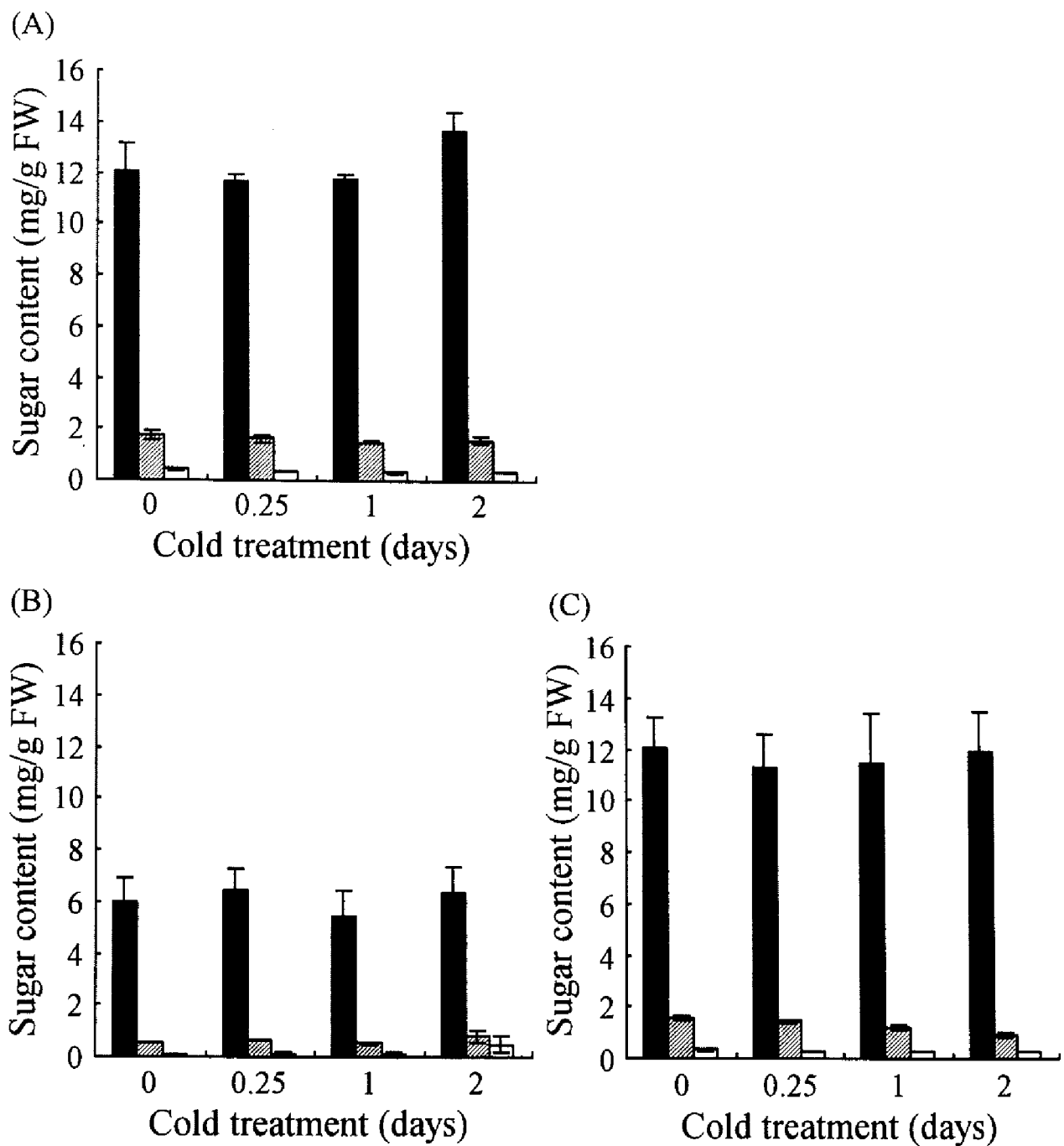


Figure 15. Changes of sucrose (black bar), glucose (hatched bar) and fructose (white bar) content in synchronized *Arabidopsis* T87 suspension cultured cells during cold treatment. Cultured cells at the S (A), G2/M (B) and G1 (C) phase were subjected to cold treatment (2°C) for 0, 0.25 (6 hr), 1, or 2 d. Data were the mean and SD of three or more biological replicates. Student's t-test indicate no significant difference in samples before and after cold treatment in each cell cycle phase cells ($P < 0.05$).

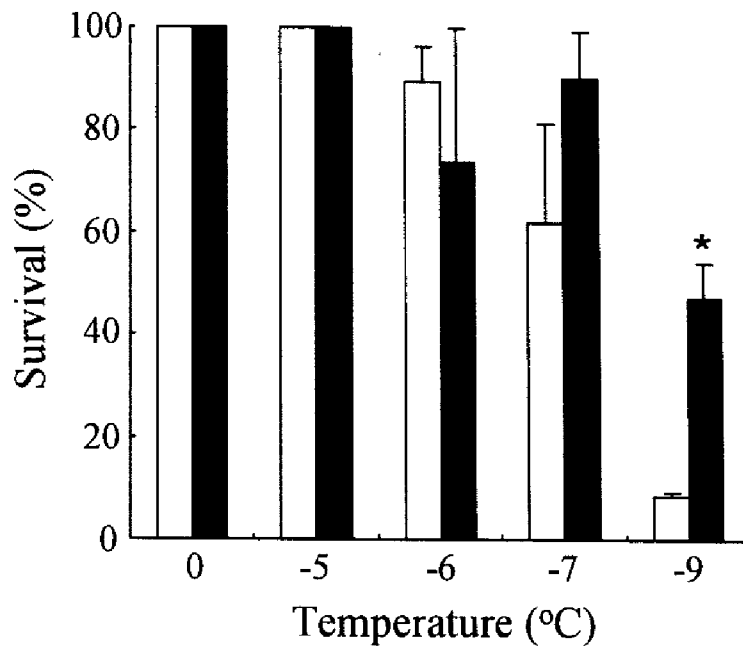


Figure 16. Freezing tolerance of *Arabidopsis* T87 suspension cultured cells at S phase. Cultured cells were collected at the S phase and subjected to freezing before (white bar) or after (black bar) 2 days of cold treatment. Freezing tolerance of cells was evaluated by regrowth assay after a freeze/thaw cycle. Survival was expressed as a ratio of fresh weight of frozen cells to unfrozen cells (see text). Data were the mean and SD of three or more biological replicates. Survival significantly different from that of the sample before cold treatment is marked with an asterisk ($P < 0.05$).

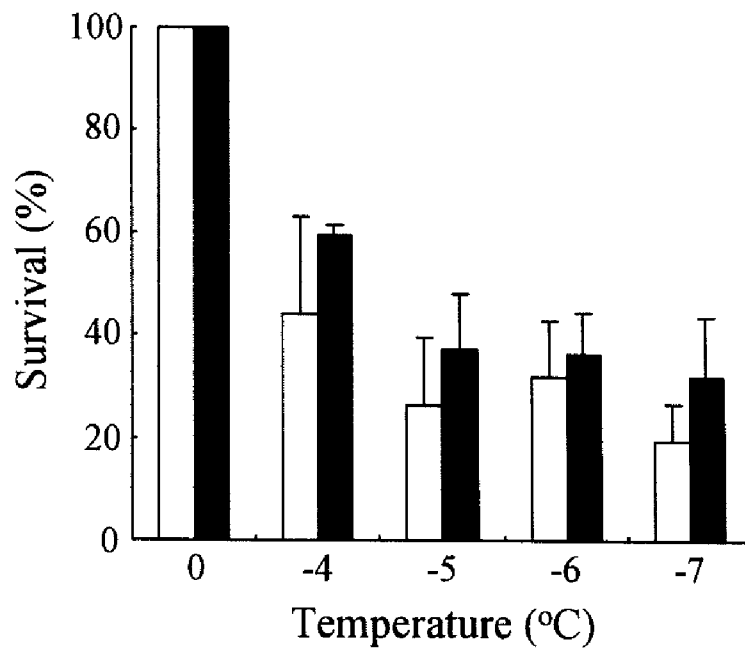


Figure 17. Freezing tolerance of *Arabidopsis* T87 suspension cultured cells at G2/M phase. Cultured cells were collected at the G2/M phase and subjected to freezing before (white bar) or after (black bar) 2 days of cold treatment. Freezing tolerance of cells was evaluated by regrowth assay after a freeze/thaw cycle. Survival was expressed as a ratio of fresh weight of frozen cells to unfrozen cells (see text). Data were the mean and SD of three or more biological replicates. Student's t-test indicate no significant difference between samples before and after cold treatment at any temperatures tested ($P < 0.05$).

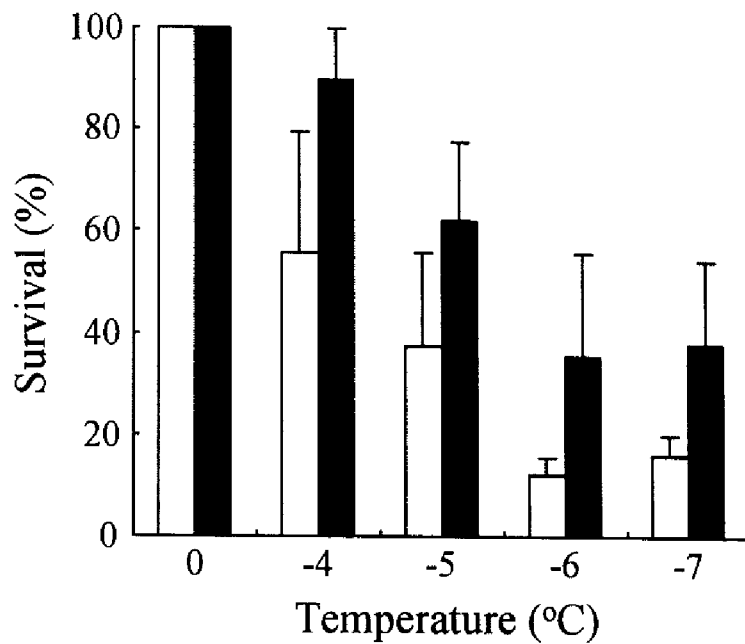


Figure 18. Freezing tolerance of *Arabidopsis* T87 suspension cultured cells at G1 phase. Cultured cells were collected at the G1 phase and subjected to freezing before (white bar) or after (black bar) 2 days of cold treatment. Freezing tolerance of cells was evaluated by regrowth assay after a freeze/thaw cycle. Survival was expressed as a ratio of fresh weight of frozen cells to unfrozen cells (see text). Data were the mean and SD of three or more biological replicates. Student's t-test indicate no significant difference between samples before and after cold treatment at any temperatures tested ($P < 0.05$).

Table. 1 Categorization of predicted functions of genes upregulated (≥ 2 with $P < 0.05$) throughout 2 days of cold treatment only found in lag phase cells

Functional category	Number	AGI No.	Annotation
Signal transduction	6	At2g05940.1	Protein kinase, putative similar to auxin-regulated dual specificity cytosolic kinase
		At2g39360.1	Protein kinase family protein contains protein kinase domain
		At2g46600.1	Calcium-binding protein, putative similar to EF-hand Ca^{2+} -binding protein CCD1
		At3g55450.1	Protein kinase, putative similar to protein kinase APK1B
		At4g17530.1	Ras-related GTP-binding protein, putative very strong similarity to RAB1C
		At5g12940.1	Leucine-rich repeat family protein contains leucine rich-repeat domains
Metabolism	4	At1g56670.1	GDSL-motif lipase/hydrolase family protein
		At1g73010.1	Phosphoric monoester hydrolase
		At3g02040.1	Glycerophosphodiester phosphodiesterase (SRG3)
		At3g58490.1	Phosphatidic acid phosphatase family protein
Transcription factor	4	At2g40140.1	Zinc finger (CCCH-type) family protein contains Pfam domain
		At3g15030.1	TCP family transcription factor, putative similar to TCP3
		At5g51190.1	AP2 domain-containing transcription factor, putative contains similarity to ethylene responsive element binding factor
		At5g61600.1	Ethylene-responsive element-binding family protein (AtERF5)
Transporter	4	At1g76430.1	Phosphate transporter family protein
		At3g22600.1	Lipid transfer protein (LTP) family protein
		At5g03555.1	Allantoin transporter
		At5g17860.1	Cation exchanger, putative

Table. 1 (continued)

Functional category	Number	AGI No.	Annotation
Protein fate	4	At2g24540.1	Kelch repeat-containing F-box family protein similar to SKP1
		At3g13820.1	F-box family protein
		At5g09800.1	U-box domain-containing protein
		At5g64660.1	U-box domain-containing protein similar to immediate-early fungal elicitor protein CMPG1
Cell rescue & defense	2	At5g04720.1	Disease resistance protein (CC-NBS-LRR class)
		At5g47280.1	Disease resistance protein (NBS-LRR class)
Other	11	At1g05160.1	Ent-kaurenoic acid hydroxylase (KAO1)
		At1g31440.1	SH3 domain-containing protein 1 (SH3P1)
		At1g53340.1	DC1 domain-containing protein
		At1g64330.1	Myosin heavy chain
		At1g67800.1	Copine-related low similarity to Copine I
		At2g31865.1	Poly (ADP-ribose) glycohydrolase (PARG) family protein
		At3g01560.1	Proline-rich family protein contains praline rich extension domains
		At3g04640.1	Glycine-rich protein predicted proteins
		At4g13110.1	BSD domain-containing protein
		At4g29950.1	Microtubule-associated protein
		At5g39720.1	Avirulence-responsive protein-related/ avirulence induced gene (AIG) protein-related similar to AIG2 protein
Unknown	8	At1g10740.1	
		At1g17090.1	
		At3g53270.1	
		At4g15470.1	
		At4g23530.1	
		At5g16030.1	
		CHR3:003963674	
		-003963733	
CHR5:022851672			
-022851731			

Table. 2 Categorization of predicted functions of genes upregulated (≥ 2 with $P < 0.05$) transiently after 1 day of cold treatment only found in lag phase cells

Functional category	Number	AGI No.	Annotation
Transporter	3	At1g19450.1	Sugar transporter family protein
		At1g22550.1	Proton-dependent oligopeptide transport (POT) family protein
		At4g39390.1	Transporter-related low similarity to glucose-6-phosphate
Metabolism	1	At4g13350.1	Human Rev interacting-like protein-related/hRIP protein-related similar to Nucleoporin-like protein RIP (HIV-1 Rev-binding protein)
Cell rescue & defense	1	At1g32090.1	Early-responsive to dehydration protein-related/ ERD protein-related similar to ERD4 protein (early-responsive to dehydration stress)
Cell wall	1	At3g56000.1	Glycosyl transferase family 2 protein similar to beta-(1-3)-glucosyl transferase
Cell-Cell signaling	1	At4g15800.1	Rapid alkalization factor (RALF) family protein similar to RALF precursor
Unknown	4	At1g23110.1 At1g68910.1 At5g49000.1 At5g66675.1	

Table. 3 Categorization of predicted functions of genes downregulated (≤ 0.5 with $P < 0.05$) throughout 2 days of cold treatment only found in lag phase cells

Functional category	Number	AGI No.	Annotation
Transcription factor	6	At1g08320.1	bZIP family transcription factor
		At1g30210.1	TCP family transcription factor, putative similar to TFPD (GI:6681577) [<i>Arabidopsis thaliana</i>]
		At1g62370.1	Zinc finger family protein
		At5g06710.1	Homeobox-leucine zipper protein 14 (HAT14)
		At5g59000.1	Zinc finger family protein
		At5g59460.1	Scarecrow-like transcription factor 11 (SCL11)
Metabolism	3	At3g24590.1	Signal peptidase I family protein
		At5g19290.1	Esterase/lipase/thioesterase family protein low similarity to monoglyceride lipase [<i>Homo sapiens</i>]
		At5g62740.1	Band 7 family protein strong similarity to hypersensitive-induced response protein [<i>Zea mays</i>]
Translation	2	At1g77840.1	Eukaryotic translation initiation factor 5, putative
		At5g12110.1	Elongation factor 1B alpha-subunit 1 (eEF1Balpha1) identical to elongation factor 1B alpha-subunit
Signal transduction	1	At5g45780.1	Leucine-rich repeat transmembrane protein kinase, putative
Protein fate	1	At2g02360.1	F-box family protein/SKP1 interacting partner 3-related contains similarity to SKP1 interacting partner 3

Table 3 (continued)

Functional category	Number	AGI No.	Annotation
Other	7	At2g45280.1	DNA repair family protein contains similarity to Swiss-Prot
		At3g04260.1	SAP domain-containing protein
		At3g09210.1	KOW domain-containing transcription factor family protein
		At3g48150.1	Cell division cycle family protein
		At4g18470.1	Negative regulator of systemic acquired resistance (SNI1)
		At5g13050.1	5-formyltetrahydrofolate cyclo-ligase (5-FCL)
		At5g40850.1	Urophorphyrin III methylase (UPM1) identical to urophorphyrin III methylase
Unknown	6	At1g09520.1	
		At1g15980.1	
		At4g26190.1	
		At5g08400.1	
		At5g21140.1	
		At5g24350.1	

Table. 4 Categorization of predicted functions of genes downregulated (≤ 0.5 with $P < 0.05$) transiently after 1 day of cold treatment only found in lag phase cells

Functional category	Number	AGI No.	Annotation
Signal transduction	1	At4g17890.1	Signal peptidase I family protein
		At5g46180.1	Ornithine aminotransferase, putative
Transporter	1	At1g63440.1	Copper-transporting ATPase, putative similar to ATP dependent copper transporter
		At4g36630.2	EMB2754 (EMBRYO DEFECTIVE 2754)
Other	2	At1g66840.1	Similar to PMI15 (plastid movement impaired 15) [<i>Arabidopsis thaliana</i>]
		At3g59040.1	Pentatricopeptide (PPR) repeat-containing protein
Unknown	2	At1g13245.1	
		At3g44280.1	

Table. 5 Categorization of predicted functions of genes upregulated (≥ 2 with $P < 0.05$) through cold treatment found both in *Arabidopsis* plants and lag phase cells.

Functional category	Number	AGI No.	Annotation
Transporter	6	At1g76430.1	Phosphate transporter family protein
		At3g22600.1	Lipid transfer protein (LTP) family protein
		At5g03555.1	Allantoin transporter
		At5g17860.1	Cation exchanger, putative
		At1g19450.1	Sugar transporter family protein
		At4g39390.1	Transporter-related low similarity to glucose-6-phosphate
Signal transduction	4	At2g05940.1	Protein kinase, putative similar to auxin-regulated dual specificity cytosolic kinase
		At3g55450.1	Protein kinase, putative similar to protein kinase APK1B
		At5g12940.1	Leucine-rich repeat family protein contains leucine rich-repeat domains
		At2g46600.1	Calcium-binding protein, putative similar to EF-hand Ca^{2+} -binding protein CCD1
Transcription factor	4	At2g40140.1	Zinc finger (CCCH-type) family protein contains Pfam domain
		At3g15030.1	TCP family transcription factor, putative similar to TCP3
		At5g51190.1	AP2 domain-containing transcription factor, putative contains similarity to ethylene responsive element binding factor
		At5g61600.1	Ethylene-responsive element-binding family protein contains similarity to ethylene responsive element binding factor 5 (AtERF5)
Protein fate	4	At2g24540.1	Kelch repeat-containing F-box family protein similar to SKP1
		At3g13820.1	F-box family protein
		At5g09800.1	U-box domain-containing protein
		At5g64660.1	U-box domain-containing protein similar to immediate-early fungal elicitor protein

Table. 5 (continued)

Functional category	Number	AGI No.	Annotation
Metabolism	3	At1g73010.1	Phosphoric monoester hydrolase
		At3g02040.1	Glycerophosphodiester phosphodiesterase (SRG3)
		At4g13350.1	Human Rev interacting-like protein-related/hRIP protein-related similar to Nucleoporin-like protein RIP (HIV-1 Rev-binding protein)
Cell rescue & defense	2	At5g04720.1	Disease resistance protein (CC-NBS-LRR class)
		At5g47280.1	Disease resistance protein (NBS-LRR class)
Other	8	At4g29950.1	Microtubule-associated protein
		At1g31440.1	SH3 domain-containing protein 1 (SH3P1)
		At1g64330.1	Myosin heavy chain
		At1g67800.1	Copine-related low similarity to Copine I
		At3g01560.1	Proline-rich family protein contains praline rich extension domains
		At3g04640.1	Glycine-rich protein predicted proteins
		At5g39720.1	Avirulence-responsive protein-related/ avirulence induced gene (AIG) protein-related similar to AIG2 protein
		At1g53340.1	DC1 domain-containing protein
Unknown	3	At1g17090.1	
		At3g53270.1	
		At5g16030.1	

Table. 6 Categorization of predicted functions of genes downregulated (≤ 0.5 with $P < 0.05$) through cold treatment found both in *Arabidopsis* plants and lag phase cells.

Functional category	Number	AGI No.	Annotation
Metabolism	2	At5g19290.1	Esterase/lipase/thioesterase family protein low similarity to monoglyceride lipase [Homo sapiens]
		At5g46180.1	Ornithine aminotransferase, putative
Translation	2	At1g77840.1	Eukaryotic translation initiation factor 5, putative
		At5g12110.1	Elongation factor 1B alpha-subunit 1 (eEF1Balpha1) identical to elongation factor 1B alpha-subunit
Signal transduction	1	At4g17890.1	Signal peptidase I family protein
		At1g08320.1	bZIP family transcription factor
Transcription factor	1	At1g63440.1	Copper-transporting ATPase, putative similar to ATP dependent copper transporter
		At2g02360.1	F-box family protein / SKP1 interacting partner 3-related contains similarity to SKP1 interacting partner 3
Other	4	At2g45280.1	DNA repair family protein contains similarity to Swiss-Prot
		At3g09210.1	KOW domain-containing transcription factor family protein
		At5g40850.1	Uroporphyrin III methylase (UPM1) identical to uroporphyrin III methylase
		At1g66840.1	Similar to PMI15 (plastid movement impaired 15) [<i>Arabidopsis thaliana</i>]
Unknown	3	At1g09520.1	
		At1g15980.1	
		At5g08400.1	