

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：11201

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究期間：2010～2014

課題番号：22120003

研究課題名（和文）植物の低温耐性獲得および喪失における温度刺激・応答機構の高空間分解解析

研究課題名（英文）Temporal and Spatial Analyses of Sensing and Responses to Temperature during Cold Acclimation and Deacclimation in Plants

研究代表者

上村 松生（UEMURA, MATSUO）

岩手大学・農学部・教授

研究者番号：00213398

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 63,900,000 円

研究成果の概要（和文）：低温応答経路における刺激感知から細胞応答までの分子機構を明らかにすることを目的とした。本研究で、低温馴化・脱馴化プロセスの解析から低温馴化に対する温度領域や光質の影響を明らかにした、発光タンパク質を用いたプロモーター活性高時間・高空間分解解析システムを開発し凍結耐性因子の発現制御を解析した、蛍光標識した植物と共焦点レーザー顕微鏡と温度可変ステージを用いて植物の低温および凍結情報受容メカニズムを細胞内Caや小胞体の挙動から解析した、低温応答に関する細胞膜プロテオームを解析し低温馴化過程で凍結耐性増大に関わるタンパク質を同定した。これらの結果から、植物の温度情報受容・処理機構を考察した。

研究成果の概要（英文）：In this project, we aimed to elucidate molecular mechanisms of cold response in plants to develop cold tolerance, from cold perception to cellular responses. The results revealed that 1) cold acclimation was affected by not only temperature but also light quality, 2) a newly developed in planta monitoring system of gene expression (using a transgenic plant containing a construct of the promoter of the interested gene combined with luciferase gene) was powerful to analyze temporal and special expression patterns of cold-regulated gene during cold acclimation, 3) behavior of ER and Ca in response to cold or freezing could be monitored using unique system of laser scanning confocal microscope and temperature-controlled sample stage, and 4) a cold-induced GPI-anchored protein associated with the plasma membrane was functionally associated with the increase of freezing tolerance. With these results, we discussed the mechanism of temperature perception and signal transduction in plants.

研究分野：植物分子生理学

キーワード：低温馴化 凍結耐性 環境刺激応答 細胞膜 プロテオーム 遺伝子発現 凍結ストレス

1. 研究開始当初の背景

温度、特に低温は、地球上で植物の分布を決定する最も重要な要因の一つである。多くの温帯性植物は、秋から初冬にかけての気温低下と日長短縮に反応し、特異的な遺伝子群発現を介して凍結ストレス耐性を上昇させる。このような機構は「低温馴化」と呼ばれ、その能力の大きさにより、植物の地理的分布や作物の生産性が限定される。

植物の凍結耐性は、凍結傷害の初発部位である細胞膜の機能と構造に強く依存していることが明らかにされてきた。凍結下で細胞が生存するためには、凍結過程における温度低下、凍結脱水に伴う脱水(乾燥)や塩濃縮などによるストレス、および、氷晶成長による機械的ストレスに対して抵抗性を持つ必要がある。そのため、低温馴化過程において植物は特異的な遺伝子群発現を介する細胞膜機能・組成の変動を積極的に行っている。これまで、低温馴化過程で細胞膜に蓄積するタンパク質 (Synaptotagmin、COR15am、Temperature-induced lipocalin など) が細胞レベルでの凍結耐性獲得に貢献する「凍結耐性因子」として詳細に解析されてきた。同時に、その研究過程で各々の凍結耐性因子は凍結耐性機構において異なる役割を持つことが明らかになってきた。例えば、COR15am や Temperature-induced lipocalin は凍結脱水ストレス耐性因子、Synaptotagmin は凍結機械ストレス耐性因子として働く。さらに、SYT1 (Synaptotagmin 遺伝子) の発現組織のパターンは COR15a (COR15am 遺伝子) とは異なることが示唆されている。また、同じ脱水ストレス耐性因子であっても COR15am は葉緑体、Dehydrin は細胞質や細胞膜で働くことから、これらの遺伝子発現の制御は器官によって異なっていると予想される。

植物の凍結は、細胞外溶液に溶質が存在すると一般の溶液と同様の現象が生じ、組織中に凍結箇所と脱水箇所が形成される。上に述べた研究により凍結耐性機構は複数の因子を必要とする複雑なものと推定されてきたが、その複雑さは凍結機械ストレスと凍結脱水ストレスが全ての細胞に均一に負荷されないことによる可能性が高い。この様に、植物体全体の低温受容・処理機構の理解には、低温馴化過程・脱馴化過程における組織レベルで異なる凍結ストレス耐性因子の発現制御機構を解明しなければならぬと考えられた。

2. 研究の目的

本領域の「植物の環境感覚の分子基盤を植物細胞という特定の「場」における反応と位置づけ、刺激の受容から応答に至る過程を新しい植物細胞生物学の立場から総合的に明らかにする」という全体目的に対し、本研究課題では「低温」刺激応答について、刺激の感知から細胞応答までの分子機構を明らかにすることを目的とする。具体的には、①植物の低温馴化における生理条件の検討、②低温誘導性遺伝

子の高時間分解能発現解析、③低温および凍結情報受容メカニズムの解析、そして④細胞膜の低温応答に関するプロテオーム解析、を行い、植物が持つ温度情報受容・処理機構を解析することを本課題の研究目的として設定した。

3. 研究の方法

植物の低温馴化における生理条件の検討：シロイヌナズナ(コロンビア系統)を様々な温度で一定期間低温馴化し、その後、既報 (Uemura et al. 1994) に基づき凍結融解し、再成長及び電解出漏出法によって生存率を計算した。また、光の影響は特定は町を有する LED ランプを用いて調べた。低温で誘導される遺伝子発現の解析は、RT-PCR および qRT-PCR などの手法を用いて実施した。

低温誘導性遺伝子の高時間分解能発現解析：凍結脱水ストレス耐性関連因子 (COR15am、Temperature-induced lipocalin、PLD δ) および凍結機械ストレス耐性関連因子 (SYT1) のタンパク質をコードする遺伝子のプロモータ領域にルシフェラーゼをつないだコンストラクトを用いてシロイヌナズナ形質転換体を作成し、低温条件下での発光検出系を構築した。次いで、ルシフェラーゼ発光量のモニターにより低温処理下における *in vivo* での遺伝子発現パターンを観察し、対象遺伝子プロモータ活性を高時間・高空間分解能で解析した。

低温および凍結情報受容メカニズムの解析：凍結融解過程における小胞体挙動の観察は、ネギ細胞を用い、小胞体を ER-Tracker で染色して用いた。また、低温に応答した細胞内カルシウム動態は Ca²⁺センサータンパク質である Yellow Cameleon 3.6 を発現させたシロイヌナズナ植物体を用いた。これらの試料を倒立型の共焦点レーザー顕微鏡と温度可変ステージを組み合わせた装置に置き、様々な温度変化条件や温度帯で観察し、得られた画像(動画)を PC に保存し、画像解析ソフトを用いて多様な解析を試みた。

細胞膜の低温応答に関するプロテオーム解析：低温関知に重要な役割を果たしている細胞膜および細胞膜マイクロドメインタンパク質の同定や馴化・脱馴化過程における細胞膜タンパク質変動キネティクスをショットガンプロテオーム解析によって明らかにした。さらに、モデル植物から有用植物への展開を念頭に、他の植物(ライムギ等)の細胞膜プロテオームとの比較も行い、馴化・馴化過程の一般性と多様性を考察した。次いで、重要な生理作用に関与していると考えられる脂質修飾型細胞膜タンパク質の一種・GPI アンカー型タンパク質に注目し、その網羅的同定や低温応答性の解析を行った。低温応答性を示す GPI アンカー型タンパク質を同定した後、その他の悪質をコードする遺伝子発現を低下させた変異

体を手し、凍結耐性や低温馴化に関する生理的解析を実施、低温応答性 GPI アンカー型タンパク質の機能解析を行った。

4. 研究成果

低温馴化における生理条件の検討

低温馴化に関する温度と光の相互作用について調べた。馴化温度の検討では、11°C より低い温度で処理した際に凍結耐性が上昇すること、および、最大凍結耐性は馴化温度が低い方が大きくなることを明らかにした。

さらに、これまで低温馴化には光が必須であると報告されてきたが、暗所でも十分に低温馴化することが明らかとなった。また、暗所での低温馴化では、凍結脱水ストレス耐性に関与する浸透圧上昇が見られないことや機械ストレス耐性に関与する SYT1 の欠損株と野生株との間で凍結耐性に差が見られないことも示された。

また、青色光が低温馴化過程に影響を与えるという新規の知見が得られた(図1)。特に、青色光がクリプトクロム経路で凍結耐性変動に関与することが示された。2°C、1日間の低温馴化では、青色光がクリプトクロム経路で、特に、凍結融解後の光合成活性の維持に関与することが示された。一方、この経路は、CBF 経路を介した細胞膜の凍結安定性に関しては、むしろ負に働くことが示された。CBF 経路はフィトクロム制御も受けるため、そのことを考慮すると、本結果は、野外における植物が青色光と他の光質や日長など他の光要因を総合的に判断し低温馴化を進めているということを示唆している。

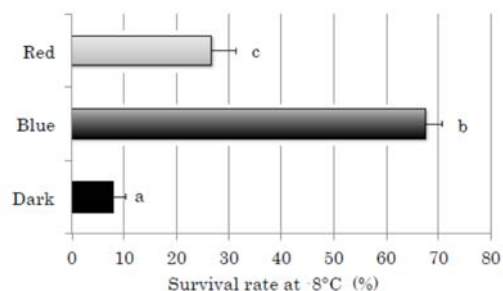


図1 低温馴化における青色光の重要性 (Red, 赤色光; Bleu, 青色光; Dark, 暗黒)

低温誘導性遺伝子の高時間分解能発現解析

凍結脱水ストレス耐性関連因子(COR15am、Temperature-induced lipocalin、PLD δ)および凍結機械ストレス耐性関連因子(SYT1)のタンパク質をコードする遺伝子のプロモータ領域にルシフェラーゼをつないだコンストラクトを用いて形質転換体を作成し、低温条件下での発光検出系を構築し、高時間分解能発現解析を試みた(図2)。その中でも、COR15a 遺伝子発現について詳細に解析した。

COR15a 遺伝子および Temperature-induced lipocalin 遺伝子の発現は地上部で高く、地下部では著しく低かった。一方、PLD δ 遺伝子は

全身で発現が確認でき、SYT1 遺伝子は地上部と地下部両方で発現が見られるものの、地上部での発現の方が高かった。COR15a 遺伝子において、①発現パターンは11°C以下の温度で光周期の影響を受けたが、5°C以上と2°Cでは大きく異なること、②発現変動は転写因子CBFsの発現変動だけで説明が付かないこと、③個様で見た発現量と凍結耐性に強い正の相関が見られること、そして、④発現量と馴化温度の違いによる凍結耐性の差と強い相関があること、などが明らかになった。

また、COR15a 遺伝子の発現は DCMU 処理により大きく低下し、さらに、光周期による特徴的な発現パターンも消失した。このことは、少なくとも、COR15a 遺伝子の発現は、葉緑体から何らかの制御を受けている可能性を示唆するものである。

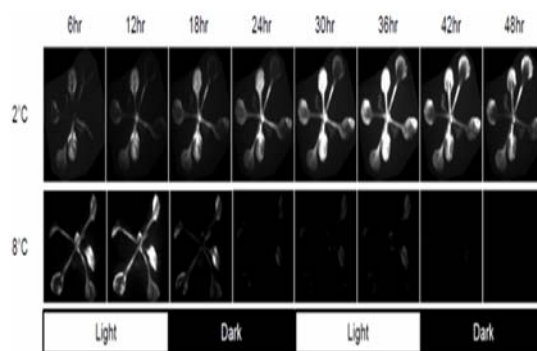


図2 COR15a::ルシフェラーゼを導入した形質転換体の発光

低温および凍結情報受容メカニズムの解析

凍結耐性の高いネギを用いて蛍光染色による ER 凍結動態の観察を試みた。すると、細胞周辺が凍結したと同時に ER は流動を止め、フィラメント状の構造が小胞へと変化した。この ER の凍結挙動はシロイヌナズナの根においても観察された。ついで、このような特徴的な ER の凍結挙動はアクチンフィラメントが関与する可能性を示唆する結果が得られた(図3)。

次に、カルシウムセンサー蛍光タンパク質 YC3.6 を発現するシロイヌナズナおよび低温顕微鏡を用いて、低温受容におけるカルシウムシグナルの役割の検討を行った。まず、根において観察を行ったところ、低温にตอบสนองしたカルシウムシグナルがとらえられ、また、このシグナルは冷却速度の影響を受けることが明らかとなった。

カルシウムセンサー蛍光タンパク質 YC3.6 を発現するシロイヌナズナおよび低温顕微鏡を用い、低温受容におけるカルシウムシグナル、および、それを手掛かりとした植物の低温受容について検討を行った。その結果、まず、根において観察を行ったところ、低温にตอบสนองしたカルシウムシグナルがとらえられた。また、このシグナルは冷却速度の影響を受けることが明らかとなった。さらに、ある一定以上の温度変化を超えた場合にのみ特有のシグナルが観察された。つまり、自然条件においては植物

は絶え間ない温度変化に曝されるが、温度変化に加えて絶対温度も感知しながら、“特定の低温および温度変化”をシグナルとして用い、低温馴化を行っている可能性が示唆された。

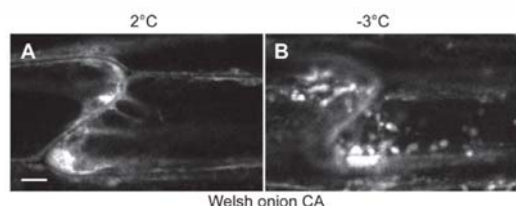


図3 ネギERの凍結挙動。

ネギ小胞体をER-Trackerで染色し、観察した。

細胞膜の低温応答に関するプロテオーム解析

シロイヌナズナ、ライムギ、カラスムギおよび *Brachypodium* を用いて、低温馴化過程で凍結傷害の初発部位である細胞膜（および細胞膜マイクロドメイン）のプロテオームに大きな変動が起こることを見いだした。その変動には植物を問わず共通に見られるものと各植物に特徴的なものが存在し、一部は凍結耐性の程度と関連していると考えられた。さらに、シロイヌナズナ培養細胞の細胞膜プロテオーム解析では低温馴化依存的変動にはアブシジン酸（ABA）依存的変動と共通するものが多く見られ、ABAが細胞膜タンパク質の低温応答にも関わっていることを明らかにした。

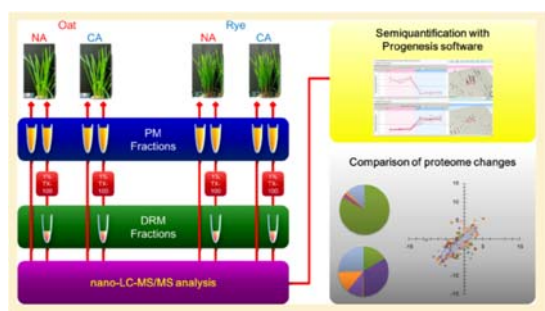


図4 細胞膜マイクロドメインプロテオームの低温応答

次いで、シロイヌナズナ、ライムギ、カラスムギを用いて、細胞膜に存在する特定の構成物からなるマイクロドメインのプロテオーム解析を行った。その結果、マイクロドメインでも低温馴化過程で大きなプロテオーム変動が起こることを見だし、一部は凍結耐性の程度と関連していると考えられた。

特に、GPIアンカー型タンパク質と呼ばれるタンパク質群が、低温馴化前後において特徴的に変動していた。そこで、さらにシロイヌナズナより細胞膜GPIアンカー型タンパク質画分およびアポプラスト画分を回収しプロテオーム解析を行ったところ、低温馴化過程で変動する多数のGPIアンカー型タンパク質を同定することに成功した。さらに、同定されたものの中でいくつかのT-DNA変異体を取り寄せ、凍結耐性試験を行ったところ、凍結耐性が低下するものが見つかった。

さらに、低温馴化および脱馴化過程におけ

る細胞膜リン酸化プロテオーム解析を行ったところ、大規模なリン酸化状態の変化が検出された。例えば、低温下で細胞膜H⁺-ATPaseや糖輸送体の活性制御に関わるリン酸化応答が示され、また、これらのリン酸化応答を制御する可能性のあるProtein kinase/phosphataseの変動も低温下で非常に多く検出された。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計34件）

- ① Minami A, Tominaga Y, Furuto A, Kondo M, Kawamura Y, Uemura M. (2015) Arabidopsis dynamin-related protein 1E in sphingolipid-enriched plasma membrane domains is associated with the development of freezing tolerance. *Plant Journal* (accepted) (査読あり)
- ② Kobayashi S, Kutsuna N, Tanino KK, Uemura M, Kawamura Y. 2014. Confocal cryomicroscopic analysis and cryodynamics of endoplasmic reticulum in herbaceous plant cells. *Environmental and Experimental Botany* 106: 44-51. (doi: 10.1016/j.envexpbot.2014.02.002) (査読あり)
- ③ Ahamed A, Murai-Hatano M, Sakurai-Ishikawa J, Hayashi H, Kawamura Y, Uemura M. 2012. Cold-stress-induced acclimation in rice is mediated by root-specific aquaporins. *Plant and Cell Physiology* 53:1445-1456. (doi: 10.1093/pcp/pcs089) (査読あり)
- ④ Takahashi D, Kawamura Y, Uemura M. 2013. Changes of detergent-resistant plasma membrane proteins in oat and rye during cold acclimation. *Journal of Proteome Research* 12: 4998-5011. (doi: 10.1021/pr400750g) (査読あり)
- ⑤ Yamazaki T, Takata N, Uemura M, Kawamura Y. 2010. Arabidopsis synaptotagmin SYT1, a type I signal-anchor protein, requires tandem C2 domains for delivery to the plasma membrane. *Journal of Biological Chemistry* 285: 23165-23176. (doi: 10.1074/jbc.M109.084046) (査読あり)

〔学会発表〕（計108件）

- ① Tominaga Y, Kawamura Y, Uemura M. 2014. *In planta* monitoring of the regulation of cold-responsive genes under various temperatures and photoperiods. 10th International Plant Cold Hardiness Seminar (Poznan, Poland, Aug 18-21). (Invited talk)
- ② Nakayama T, Takahashi D, Kawamura Y, Uemura M. 2013. Cold-acclimation-induced changes of plasma membrane proteome in

Brachypodium distachyon. 12th International Wheat Genetics Symposium (Yokohama, Japan, September 8-14) (Invited talk)

- ③ Yamazaki T, Kawamura Y, Uemura M. 2012. Extracellular freezing-induced mechanical stress and surface area regulation on the plasma membrane in cold-acclimated plant cells. Plant Abiotic Stress Tolerance Conference II (Vienna, Austria, Feb 22-25) (Invited talk)
- ④ Tanino K, Liu J, Kobayashi S, Kawamura Y, Hamilton K, Borondics F, Uemura M. 2012. Obtaining direct evidence for freezing avoidance and tolerance mechanisms using a single cell layer of *Allium fistulosum* L. Plant and Microbe Adaptations to Cold 2012 (Sapporo, Japan, June 24-28). (Invited talk)
- ⑤ Uemura M, Takahashi D, Li B, Kondo M, Nakayama T, Minami A, Kawamura Y. 2011. What can we learn about cold acclimation process from plasma membrane proteomics with various plant species? 9th International Plant Cold Hardiness Seminar (Luxembourg, Luxembourg, July 17-22) (Invited talk)

〔図書〕 (計 5 件)

- ① Takahashi D, Nakayama T, Miki Y, Kawamura Y, Uemura M. 2014. Proteomic approaches to identify cold regulated plasma membrane proteins. Methods in Molecular Biology (Plant Cold Acclimation: Methods and Protocols, Hincha DK, Zuther E, eds), Springer Science+Business Media, LLC, New York, NY, vol 1166, pp 159-170. (ISBN-13: 978-1-4939-0844-8)
- ② Takahashi D, Li B, Nakayama T, Kawamura Y, Uemura M. 2014. Shotgun proteomics of plant plasma membrane and microdomain proteins using nano-LC-MS/MS. Methods in Molecular Biology (Plant Proteomics: Methods and Protocols, 2nd Ed, Novo JVJ, Komatsu S, Weckwerth W, Wienkoopeds S, eds), Springer Science+Business Media, LLC, New York, NY, vol 1072, pp 481-498 (ISBN-13: 978-1-62703-630-6)
- ③ Kawamura Y, Uemura M. 2013. Plant low temperature tolerance and its cellular mechanisms. In: Plant Abiotic Stress, 2nd Ed (Jenks MA and Hasegawa PM, eds), John Wiley & Sons, Hoboken NJ, pp 109-132 (ISBN-13: 978-1-118-41217-6).
- ④ Tanino K, Liu J, Kawamura Y, Kobayashi S, Borondics F, Uemura M. 2013. Using synchrotron FTIR and confocal cryomicroscopy to explore mechanisms of cold acclimation and freezing resistance using a single cell layer of *Allium fistulosum* L. In:

Proceedings of Plan-Microbe Interactions to the Cold 2012 (Imai R, Matsumoto H, Yoshida M, eds), Springer, Berlin, Germany, pp 165-178 (ISBN-13: 978-1-4614-8253-6).

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 2 件)

① 名称: The method for producing plant body granted freezing tolerance, and utilization thereof.

発明者: Takagi Y, Mitsuta N, Tanaka Y, Uemura M.

権利者: 同上

種類: 特許権

番号: PCT/JP2011/060973

出願年月日: 2010 年 11 月 17 日

国内外の別: 国外

② 名称: 凍結耐性が付与された植物体の生産方法およびその利用

発明者: 高木優, 光田展望, 田中祐二, 上村松生

権利者: 同上

種類: 特許権

番号: 特願 2010-111200

出願年月日: 2010 年 5 月 13 日

国内外の別: 国内

〔その他〕

○ホームページ等

<http://news7a1.atm.iwate-u.ac.jp/~crcdbbt/index.htm> (日本語版)

http://news7a1.atm.iwate-u.ac.jp/~crcdbbt/English_pages/Index/index.htm (英語版)

○受賞

上村松生 平成 24 年度低温生物工学会賞
「植物の低温馴化および凍結耐性メカニズムに関する基礎研究」

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上村松生 (UEMURA, MATSUO)

岩手大学・農学部・教授

研究者番号: 00213398

(2) 研究分担者

河村幸男 (KAWAMURA, YUKIO)

岩手大学・農学部・准教授

研究者番号: 10400186

(3) 研究協力者

富永陽子 (TOMINAGA, YOKO)

アハメド・アリーファ (AHAMED, ARIFA)

高橋大輔 (TAKAHASHI, DAISUKE)

今井裕之 (IMAI, HIROYUKI)

三木雄史 (MIKI, YUSHI)

開勇人 (HIRAKI, HAYATO)