

平成 21 年 5 月 25 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2006～2008

課題番号：18780242

研究課題名（和文）植物凍結下における生理・生化学的解析と凍結傷害回避機構の解明

研究課題名（英文）Understanding plant freezing tolerance mechanism through physiological and biochemical analyses at freezing temperatures

研究代表者

河村 幸男（KAWAMURA YUKIO）

岩手大学・農学部・准教授

研究者番号：10400186

研究成果の概要：凍結下でおきる膜のダイナミクスは、植物が高い耐凍性を得るための必須条件と考えられる。本研究では、凍結過程における細胞膜と内膜の変化を、生理・生化学的手法により解析し、凍結、もしくは凍結融解過程における膜のダイナミクスをとらえることに成功した。また、このダイナミクスの一つである細胞膜修復に、植物シナプトタグミン SYT1 が関与することを示し、さらに、SNARE タンパク質も関与する可能性を示す結果を得た。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	2,200,000	0	2,200,000
2007年度	700,000	0	700,000
2008年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	210,000	3,810,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：境界農学・環境農学

キーワード：植物、耐凍性、凍結下、生理生化学的解析

## 1. 研究開始当初の背景

耐凍性は寒冷地域に生育する植物にとって、氷点下の冬を乗り切るために必要不可欠な生理的要素である。温帯以北で暮らす植物は秋から冬にかけての季節変化、特に温度低下を感知し、耐凍性を増し氷点下で生き延びることが出来る。この現象は低温馴化と呼ばれている。これまで多くの研究者が低温馴化による耐凍性上昇の解明に取り組んできたにもかかわらず、未だにその機構について本質的なこと、特に遺伝的要素と耐凍性との関係が明らかになっていない。

耐凍性機構の解明が困難である原因は2つ考えられる。まず、1) 凍結ストレスが3種の異なるストレス、すなわち、凍結脱水による乾燥ストレス、脱水・吸水もしくは氷晶成長による機械ストレス、そして低温ストレスを同時に植物細胞にもたらす複雑なストレスであることが挙げられる。次に、2) 耐凍性という性質が少数の遺伝的要素に支配されるものではなく、複数の要素が揃ってはじめて機能する複合的なものである、ということが挙げられる。このような困難があるにもかかわらず、これまで多くの研究から、1) 細胞膜

はある凍結温度以下では不安定になり、その結果凍結傷害が生じること、2) 耐凍性増大のためには細胞膜が凍結下で安定的になることが必須であること、がほぼ間違いのない仮説として支持されている。

細胞膜は主に膜脂質と膜タンパク質により構成されているが、低温馴化による耐凍性の上昇と平行して、この両者は大きく変動することが報告されてきた。申請者はこれまで、低温馴化中に増加する細胞膜タンパクを同定してきた(Kawamura and Uemura 2002, 2003)。その中の一つ、シナプトタグミン様タンパク質は、膜融合による細胞膜修復機構に深く関与する細胞膜タンパク質であった。動物分野では、機械的ストレスによる細胞膜損傷とその細胞膜修復機構についてさかんに研究が行われてきており、細胞膜修復には必ず細胞外のカルシウムが必要であり、壊れた細胞膜を修復するために内膜小胞が使用されることが示されてきた。シナプトタグミンは内膜小胞が細胞膜に融合するために必要とされるタンパク質であると推定されている(Reddy et al. 2001)。この事は、凍結下という極限の状況においても植物細胞は、凍結ストレスに対して“静かに耐えている”のではなく、“動的な変化でもって積極的に対応している”ことを意味する。他にも、キクイモ塊茎を用いた実験で凍結過程において細胞膜タンパク質が大きく変動することや(Uemura & Yoshida 1986)、凍結により、ER構造がダイナミックに変化することが、非常に耐凍性の高いクワで知られている(Fujikawa & Takabe 1996)。

以上のことを考慮すると、凍結下でおきるダイナミックな変化、特に膜の変化は植物が高い耐凍性を得るためには必須の条件と考えられる。逆に、この凍結下でのダイナミクスに関するタンパク質は凍結傷害回避に直接関与するものと考えられ、これらのタンパク質を同定することは耐凍性機構の解明に大きく寄与すると考えられる。

## 2. 研究の目的

耐凍性は寒冷地域に生育する植物にとって、氷点下の冬を乗り切るために必要不可欠な生理的要素であり、この分子機構の解明は応用上非常に重要である。現在、凍結下においても植物細胞は動的な変化でもって積極的に対応していることが明らかになりつつある。凍結下でおきるダイナミックな膜の変化は、植物が高い耐凍性を得るための必須条件と考え

られる。この凍結下でのダイナミクスに関わる膜タンパク質は凍結傷害回避に直接関与するものと考えられ、これらを同定することは耐凍性機構の解明に大きく寄与すると考えられる。そこで本研究では、凍結過程における細胞膜と内膜の変化を、生理・生化学的手法により解析し、凍結傷害回避機構の概観を明らかにすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

実験は4つの視点から行ったが、それぞれの方法は複数にわたり、また実験内容と密接に結びついている。そのため、方法と成果を分離して記述すると、記述が繁雑かつ重複するため、方法は成果の中で記述する。

## 4. 研究成果

### (1) 細胞レベルでの凍結下における膜のダイナミクスの検証

凍結下において膜のダイナミクスが生じている可能性を検討するために、3つの細胞レベルの実験を行った。1番目の実験では、細胞膜修復に着目した。これまでの実験により、凍結耐性は細胞外カルシウム依存性であり、この凍結耐性は、細胞膜タンパク質であるシナプトタグミンSYT1が関与する細胞膜修復の結果であることが予想されていた。そこでSYT1のカルシウムセンサーであるC<sub>2</sub>Aドメインに対するペプチド抗体anti-SYT1を作製し、この抗体の存在下で、シロイヌナズナ葉切片を用いて、浸透圧調節物質のない状態で-3°Cの凍結耐性試験を行った(図1)。

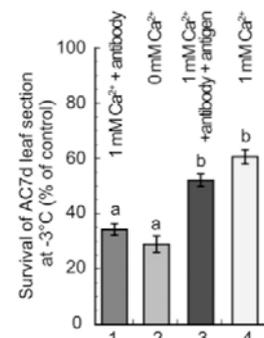


図1 anti-SYT1存在下での凍結耐性試験。低温馴化7日目のシロイヌナズナ葉から75~80 μm組織切片作成後、それぞれ1 mM CaCl<sub>2</sub> + 0.13 μM anti-SYT1(1)、0 mM CaCl<sub>2</sub>(2)、1 mM CaCl<sub>2</sub> + 0.13 μM anti-SYT1 + 1 μM 抗原(3)、1 mM CaCl<sub>2</sub>(4)存在下で凍結耐性試験を行った。

その結果、カルシウム依存性凍結耐性が著

しく阻害された。一方、anti-SYT1とその抗原を同時に加えて凍結耐性試験を行ったところ、再びカルシウム依存性凍結耐性が観察された。すなわちこの抗体による阻害は、抗体の特異性によるものである。抗体が反応するC<sub>2</sub>Aドメインは細胞質側に存在するため、凍結もしくは融解中に必ず膜の完全性が崩壊しなければ抗体は作用できない。この結果は、カルシウム依存性凍結耐性が細胞膜修復に因るものであることを示し、凍結下において膜のダイナミクスが起こっている可能性を示すものである。

2番目の実験では、シロイヌナズナ葉より単離したプロトプラストを用いて、細胞膜特異的蛍光色素であるFMI-43により、-4°Cまでの細胞膜の凍結および融解過程の観察を行った。その結果、凍結直後、細胞膜直下に多数の小胞(FIV: freeze-induced vesicle)が現れることを発見した。詳細な解析により、FIVは凍結もしくは融解過程における細胞膜表面積制御機構の結果であることが明らかとなった。細胞膜表面積制御機構とは機械ストレス耐性機構の一つであり、機械ストレスにより生じる細胞膜の張力変化を一定に保ち、過度の張力による細胞膜の崩壊を防ぐための機構である。一方、FIVの細胞膜への融合は、主に細胞膜張力が増加する融解時に観察されたが、それ以外にも、時折、凍結過程においても観察された(図2)。現在のところ、この結果が、細胞膜修復によるものか表面積制御機構によるものかは分からないが、凍結下において膜のダイナミクスが起こっていることを直接的に示すものである。

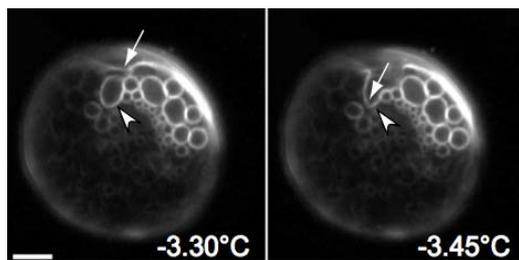


図2 凍結過程における細胞膜とFIVとの融合。低温馴化7日目のシロイヌナズナ葉からプロトプラストを単離後、FMI-43蛍光試薬存在下で凍結過程を観察した。凍結により細胞膜は細胞内にFIVとして取り込まれ、その結果、細胞膜の近傍にFIVが多数観察される。また、一部のFIV(矢頭)が細胞膜(矢印)と融合する様子が凍結下において観察された。

3番目の実験では、ER保留シグナルであるHDEL配列を有するGFPを発現するシロイヌナ

ズナ(Matsushima et al. 2002、京都大学西村いくこ先生のご厚意により分譲していただいた)を使用し、低温馴化後の葉切片を用いることにより、低温顕微鏡下においてERの凍結下におけるダイナミクスを観察した。これまで、凍結によりER構造がダイナミックに変化することが報告されていたが、少なくとも、この実験系で観察されるER構造は、凍結前後において大きな変化を示さなかった。

## (2) 植物体レベルでの凍結下における膜のダイナミクスの検証

膜の分画などの生化学的実験は、植物体を使用して行うため、細胞レベルでの結果を植物体レベルで検証しなければならない。一方、細胞レベルでの結果を植物体レベルでの結果と結びつけるためには、遺伝学的実験が有効であり、細胞膜修復に関しては、その分子機構にSYT1が関与することが明らかとなっている。そこで、細胞膜修復と植物体における凍結耐性の関係を調べるため、RNAi効果によりSYT1をノックダウンするシロイヌナズナ変異体SYT1-RNAi、およびT-DNAによるSYT1欠損株を用いて凍結耐性試験を行った。変異株および野生株をアガロースプレートで生育させ、環境試験器中で-10°Cまで凍結し、融解後の再成長により、植物体の凍結耐性を調べた(図3)。

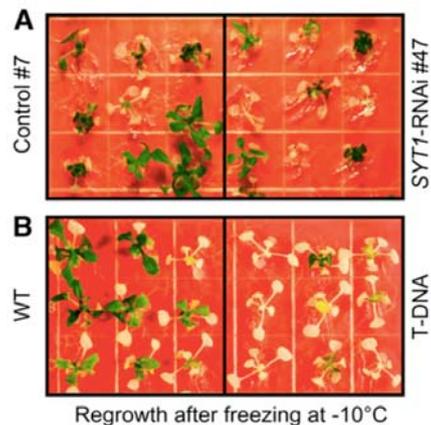


図3 植物体を用いた凍結耐性試験。植物体は寒天プレート上で10日間育てた後、低温馴化7日間行ったものを用いた。凍結処理は-10°Cで12時間行われ、その後2°Cで6時間かけ融解された。図の写真は融解後10日目のものである。

その結果、RNAi変異株およびT-DNA変異株は、コントロール株および野生株よりも、凍結耐性が低いことが明らかとなった。さらに、電解質漏出法により、RNAi変異株とT-DNA変異体株の葉を用いて詳細な凍結耐性試験を行った。その結果、-8°Cから-14°Cの凍結

耐性にSYT1が関与することが明らかとなり、この温度域で、凍結過程もしくは凍結融解過程での膜のダイナミクスが生じている可能性があることが示された。

### (3) SNAREタンパク質に対する抗体を用いた基礎的な生化学実験

以上の結果は、凍結下において膜のダイナミクスを生化学的に解析するには、細胞膜修復に着目し、研究を進めることが最善であることを示す。細胞膜修復において、シナプトタグミンはカルシウムセンサーとして働くことが知られているが、SYT1は細胞膜側にあり、膜のダイナミクスをこのタンパク質だけで解析するには限界がある。一方、膜融合そのものにはSNAREと呼ばれる3種のタンパク質群、すなわち、シンタキシン (SYP)、シナプトブレビン (VAMP)、SNAP25様タンパク質 (SNAP25-like) が関与し、これらは、細胞膜と小胞それぞれに存在することが知られている。しかし、シロイヌナズナには、多数のSNAREアイソフォームがあるため、その中でも凍結下における膜修復機構に関与するものを同定する必要がある。そこでまず、マイクロアレイデータベースより、低温馴化過程で増加するものを選び、それらの共通配列を用いてSYP、VAMP、SNAP25-likeのペプチド抗体を作製した。

まず、低温未馴化のシロイヌナズナより得られた粗膜画分を使用し、得られた抗体の特異性をイムノブロットングにより検証した。抗SYP抗体 (anti-SYP) は予想される分子量サイズの近くである39kDaと37kDaにバンドを検出するだけでなく、50kDaの位置にもバンドを検出した。次に、抗VAMP抗体は、反応性の異なる抗体が2種得られた

(anti-VAMP1、anti-VAMP2)。これらの抗体は、予想される分子量サイズの近くでは、それぞれ同一サイズの27kDaバンドを検出するが、それ以外に、anti-VAMP1は46kDaに、anti-VAMP2は55kDaにバンドを検出した。次に、抗SNAP25-like抗体 (anti-SNAP) は、予想される分子量サイズである約30kDaではバンドを検出せず、53kDaの位置でのみバンドを検出した。SNAREはSDS耐性な強固な複合体を形成することが知られており、それぞれのSNARE抗体が検出した約50kDa付近のバンドはSNARE複合体であることが予想された。さらに、低温未馴化の植物体より二層分配法で得られた細胞膜画分を用いてイムノブロットングを行ったところ、anti-SYPとanti-VAMP1は各々モノマーと考えられるバ

ンドのみを検出し、anti-SNAPはバンドを検出しなかった。

上記の結果をより詳細に検討するために、低温未馴化の植物体より得られた粗膜画分を、ショ糖連続密度勾配超遠心法によりさらに分画し、マーカー抗体であるanti-PIP (細胞膜; Ohshima et al. 2001)、anti-BIP (ER; Hatano et al. 1997)、およびanti-V-PPase (液胞膜; Maeshima & Yoshida 1989) を用いて、SYT1およびSNAREタンパク質との比較を行った (anti-PIPおよびanti-V-PPaseは名古屋大学前島正義先生のご厚意により、anti-BIPは京都大学西村いくこ先生のご厚意により分譲していただいた) (図4)。

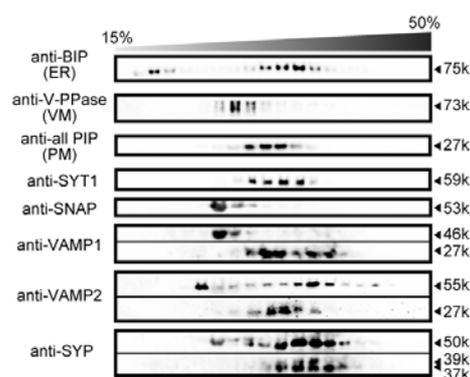


図4 ショ糖密度勾配による粗膜画分の分画。低温未馴化のシロイヌナズナより粗膜画分を分画後、再懸濁された粗膜画分は15~50%の連続ショ糖密度勾配上にロードされ、28000 rpmで20時間の遠心をかけられた。超遠心後、0.5mLずつ分画し、それぞれの画分を20  $\mu$ LずつSDS電気泳動にかけ、その後、イムノブロットングを行った。

その結果、まず、anti-SYT1が検出されるフラクションは、anti-PIPのフラクションとほぼ一致した。次に、anti-SNAPで検出される53kDaバンドは、マーカー抗体が示すどのフラクションとも一致しなかったが、anti-SYPおよびanti-VAMP1で検出される複合体バンド (50kDaおよび46kDa) とは一致した。次に、anti-VAMP1およびanti-VAMP2が反応するモノマーバンドは、anti-PIPのフラクションとほぼ一致したが、anti-SYPが反応するモノマーバンドはanti-PIPフラクションと多くは重なるものの、やや重いフラクションにも検出された。また、anti-SYPおよびanti-VAMP2が反応する複合体バンド (50kDaおよび55kDa) は、2つのフラクションに別れ、anti-VAMP2の軽いフラクションはどのフラクションとも一致しなかったが、anti-SYPおよびanti-VAMP2の重いフラクションは、anti-SYPモノマーフラクションと似た位置

に検出された。

以上の結果より、まず、SYT1、および、SYPと VAMP のモノマーは、二層分配法により得られる細胞膜においても確認されることから、細胞膜面分に局在すると考えられた。次に、SNARE 複合体は、細胞膜、液胞膜、および ER 以外の膜に局在し、また、anti-SNAP、anti-SYP および anti-VAMP1 に反応する複合体は、同じ膜上にある可能性があることが考えられた。

#### (4) 凍結下における膜のダイナミクスに関するSNAREタンパク質の同定の試み

SYT1変異株を用いた実験より、植物体では $-8^{\circ}\text{C}$ から $-14^{\circ}\text{C}$ の凍結耐性に膜修復が関与することが示された。膜修復モデルでは、修復に関与する内膜は細胞膜に移るため、もし内膜系のSNAREタンパク質が膜修復に関与しているならば、凍結融解前後でそれらのタンパク質の量的な変動が観察されると考えられる。また、細胞膜にあるタンパク質の移動は生じないため、それらのタンパク質は凍結融解前後において変動は見られないと予想される。そこで、植物体を $-10^{\circ}\text{C}$ で凍結融解後、粗膜画分を分画し、SNARE抗体、anti-PIPおよびanti-SYT1を用いてイムノブロッティングを行った(図5)。

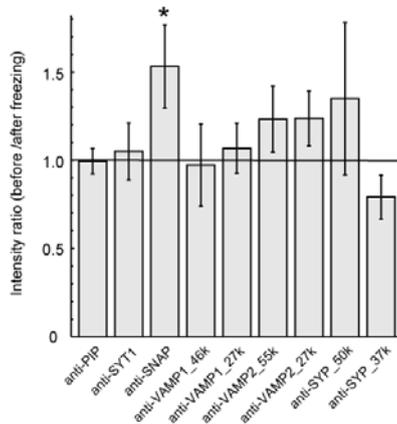


図5 低温順化7日目のシロイヌナズナを環境試験期中で $-2^{\circ}\text{C}$ で10時間置き、十分に凍結させた後、 $-10^{\circ}\text{C}$ まで12時間かけて徐々に温度を下げた。凍結後、常温で直ぐに葉のサンプリングを行ったが、サンプリングの途中で葉は融解した。この様にして、凍結融解前後で集められた葉の粗膜画分を用いて、イムノブロッティングが行われた。イムノブロッティングにより得られたバンド画像をNIH imageにより数値化し、凍結前の値を基準とした相対値を計算しグラフ化した。

まず、細胞膜タンパク質であるPIPおよび

SYT1においては、凍結融解前後での変動は観察されなかった。次に、anti-SNAPでは、統計的に有意な差で、凍結融解後におおよそ1.5倍の増加が確認された。一方、統計的な有意差は無かったものの、anti-VAMP2では、複合体およびモノマーバンドの増加が観察され、また、anti-SYPでは、複合体バンドは増加が、モノマーバンドでは減少が観察された。しかし、anti-VAMP1では、複合体およびモノマーバンドの変化は観察されなかった。

SYT1は細胞膜修復に関与するタンパク質ではあるが細胞膜タンパク質であり、予想通り凍結融解前後では変動は観察されなかった。SNAP25-likeは、内膜だけでなく、細胞質にも存在することが確認されており、膜融合が活性化されたために、細胞質から内膜に移動したのと考えられた。一方、anti-VAMP2およびanti-SYPの結果は、膜修復機構からは予想出来ない結果であり、実験の精度の向上、および、SYT1変異体株を利用した実験を行う必要がある。しかし、これらの変化は、十分に凍結融解における膜ダイナミクスの結果であると考えられる。

次に、統計的な有意差が見られたSNAP25-likeに着目し、さらに生化学的実験を進めた。まず、SNAP25-likeは他のSNAREタンパク質と複合体を作るため、それらのタンパク質は凍結下における膜ダイナミクスに関係するものと考えられる。そこで、粗膜画分を可溶化後、抗体カラムによりSNAP25-likeを精製し、SDS-PAGEにより結合タンパク質の確認を行った(図6)。その結果、SNAP25-likeに7本のタンパク質バンドが確認された。今後、TOF-MSで同定を行う予定である。

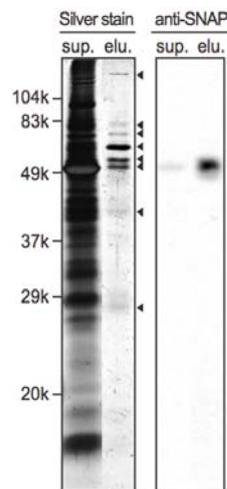


図6 anti-SNAPによる抗体カラムを用いたタンパク質精製。低温未馴化のシロイヌナズナ葉より得られた粗膜画分を2%CHAPSにより $4^{\circ}\text{C}$ で3時間可溶化した後に、超遠心により可溶化過分を分離した(sup画分)。その後、anti-SNAPによる抗体カラムにかけ、抗体に吸着した画分を得た(elu画分)。sup画分とelu画分をSDS電気泳動にかけた後、銀染色およびanti-SNAPによるイムノブロッティングを行った。

一方、実験の精度を高めるために遺伝学的手法も有効であると判断し、本実験で作製したSNAREタンパク質抗体に反応すると予想されるVAMP (VAMP721、VAMP722、VAMP723)、SNAP25-like (SNAP-33)、および、SYP (SYP122) のT-DNA欠損株を取り寄せた。SNAP-33欠損株は致死的であるため、ヘテロで種子を保存したが、それ以外はホモラインの単離まで成功した。今後、これらを用いて、SNAREと凍結膜動態との関係を明らかにしていく予定である。

(5) 得られた成果のインパクトと今後  
凍結中における膜動態を示す、生理・生化学的実験は、ほぼ皆無である。そのため、凍結耐性における膜修復を示した結果は、国際的にも評価され、その結果は植物生理学専門誌の中でもっとも評価の高いPlant Cell誌に掲載された。また、凍結中の膜動態を示した結果も、国際的に評価の高いPlant & Cell Physiology誌に掲載された。凍結動態に関与するタンパク質の同定に関しては、抗体カラムの結果で示したように、あと一步のところまで近づけた。今後、これらのタンパク質の同定した後、変異株を用いた生理実験により裏付けを行っていく予定である。

## 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4件)

- ① Yamazaki, T., Kawamura, Y., Uemura, M., Extracellular freezing-induced mechanical stress and surface area regulation on the plasma membrane in cold-acclimated plant cells, Plant Signaling and Behavior, 2009、査読有、責任著者
- ② Yamazaki, T., Kawamura, Y., Minami, A., Uemura, M., Calcium-dependent freezing tolerance in *Arabidopsis* involves membrane resealing via synaptotagmin SYT1, Plant Cell, 20, 3389-3404, 2008、査読有、責任著者
- ③ Yamazaki, T., Kawamura, Y., Uemura, M., Cryobehavior of the plasma membrane in protoplasts isolated from cold-acclimated *Arabidopsis* leaves is related to surface area regulation,

Plant Cell Physiology, 49, 944-957, 2008、査読有、責任著者

- ④ 河村幸男、山崎誠和、上村松生、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、2006、査読有、責任著者

[学会発表] (計4件)

- ① Yamazaki T., Kawamura Y., v Minami A., Uemura M., A plant synaptotagmin is involved in freezing tolerance, XVI Congress of the Federation of European Societies of Plant Biology (FESPB 2008)、2008. 8. 18-22、Tampere、Finland
- ② 河村幸男、山崎誠和、上村松生、氷晶成長による機械的ストレスとその耐性機構、第48回日本植物生理学会年会、2007. 3. 28~30、松山
- ③ Kawamura Y., Yamazaki T., Uemura M., Enhanced freezing tolerance is dependent on the extracellular calcium during freezing. Plant Biology 2006, 2006. 8. 5~9, Boston, USA
- ④ 河村幸男、山崎誠和、上村松生、凍結における機械的ストレスとその耐性機構、第52回低温生物工学会大会、2006. 5. 26~27、福岡

[その他]

ホームページ等

<http://news7al.atm.iwate-u.ac.jp/~crcdb/bt/index.htm>

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

河村 幸男 (Kawamura Yukio)

岩手大学 農学部・准教授

研究者番号：10400186