

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 22 日現在

機関番号：11201

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25292205

研究課題名(和文)凍結下における植物細胞の生体膜ダイナミクスと凍結耐性機構

研究課題名(英文) Dynamics and cryo-observation of organelles and actin filaments in plant cells living under freezing

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：我々が開発した新規の低温顕微鏡技術により、これまでより高解像度での凍結観察が可能となった。この技術により、木本性植物4種および草本性植物7種において、低温・凍結下における小胞体の動態観察を行った。まず、全ての植物において、細胞外の凍結により小胞体の流動性が停止した。シロイヌナズナではさらに、液胞膜、ゴルジ体、葉緑体およびアクチンフィラメントも全て凍結によりその流動性が停止し、また、凍結中の細胞内カルシウム濃度は高いまま維持されていた。以上より、植物細胞は凍結下で生き延びるために、カルシウムをシグナルとして、その活動を強制的に低下させている可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：Our novel cryo-microscopy technique enabled cryo-observation at higher resolutions than ever. We used this technique to observe the dynamics of the endoplasmic reticulum (ER) under freezing in 4 species of woody plants and 7 species of herbaceous plants. In all plants, it was observed that the extracellular freezing induced the cessation of the streaming of ER. In *Arabidopsis thaliana*, furthermore, we observed the cryo-dynamics of the vacuolar membrane, the Golgi apparatus, the chloroplast and the actin filament, and all of their streamings were stopped by freezing. It was also observed that the intracellular calcium concentration was maintained high during freezing. Taken together, it is possible that plant cells which survive under freezing forcibly reduce their activity using calcium as a signal of extracellular freezing.

研究分野：低温および凍結下における植物生理学

キーワード：植物 凍結耐性 低温顕微鏡技術 凍結観察 ライブイメージング オルガネラ動態 アクチンフィラメント動態 細胞内カルシウム

1. 研究開始当初の背景

凍結耐性機構の解明は安定的な農産物供給のためには必須であり、そのため、この研究は 100 年以上もの長い歴史がある。しかし未だに、凍結中でどのような生命活動が営まれているかはほとんど解明されておらず、その結果、凍結耐性機構も不透明なままである。

凍結耐性機構には様々な機能性分子が関与し、例えば、寒冷な地域で暮らす植物は気温低下に伴いこれらの分子を発現させる(低温馴化)。近年、我々は、凍結耐性の高い植物細胞で細胞膜や小胞体(ER: endoplasmic reticulum)の膜構造が凍結下でダイナミックに変動することを明らかにしてきた(Yamazaki et al. 2008, Tanino et al. 2013)。これらの凍結動態は凍結耐性機構に深く関与すると推定されている。また、最近の我々の観察では、これら細胞膜および ER の膜動態は独立したのではなく、相互作用しあう凍結動態であることを示唆するデータが得られている。しかし、その相互作用に関するや詳細な機構や役割に関してはほとんど未知なままである。この原因は、凍結下で“観る”技術が不十分であり、空間・時間分解能が一般の顕微鏡観察と比べると著しく低いことにある。

上記のような背景を考えると、凍結下で生きた現象を“観る”技術が発展すれば、低温生理学の分野に大きなブレークスルーがもたらされる。これまで我々は、このような観点から凍結下での観察可能な光学顕微鏡技術を開発し、現在も、別の研究費(JST: A-STEP)でより高解像度での観察可能な系を開発中であり、平成 25 年度半ばまでに新たな系が完成する予定である。

2. 研究の目的

我々は、凍結下で生きた植物細胞を共焦点顕微鏡で観る、という世界でもユニークな技術を開発し、細胞膜や ER の膜構造が凍結下で動的に変化する様子を、世界で初めて見いだしてきた。一方、それぞれの膜系はカルシウムを介して相互作用し、凍結耐性向上に関与している可能性があるものの、依然、詳細は不透明であり、その結果、この生理的意味はほとんどが未知なままである。

本研究課題では、シロイヌナズナを中心に複数の植物を用いて、膜系および特定のタンパク質の凍結動態(細胞膜、細胞膜タンパク質、ER などの細胞内膜、アクチンフィラメント)および細胞内カルシウム変動のリアルタイム解析を行い、凍結下での一般的な細胞生理学的現象を明らかにする。これらの解析は直接凍結耐性の解明に結びつき、高凍結耐性植物の作成の基礎となる。

3. 研究の方法

(1) 蛍光マーカートンパク質を発現する形質転換植物の作成

様々な蛍光タンパク質を融合させたオルガネラマーカートンパク質を発現させるバイナリーベクターを入手し、形質転換植物を作成した。また、アクチン結合性タンパク質 ABD2-GFP 過剰発現する形質転換植物は他研究室より入手した。

(2) 様々な植物での細胞膜および ER の凍結動態の一般性について

細胞膜の凍結動態はシロイヌナズナのみ、ER の凍結動態はネギおよびシロイヌナズナでしか観察されていない。そこで、植物一般的な現象であるかをいくつかの植物を用いて検討を行った。

細胞膜の凍結動態に関しては、プロトプラストを用いる実験系において観察されてきたため、Yamazaki ら(2008)の方法に従い観察を行った。ER の凍結動態は凍結による試料の移動および氷晶による不鮮明さを最小限に抑えるため、新たな方法を構築した。観察手順は下記の通りである。まず、厚さ 100~200 μm 程度の切片を手作業にて作成後、5 μM ER-Tracker (ThermoFisher)を含む溶液により小胞体の蛍光染色を室温で行った。18×24 mm のカバーガラスに 1%寒天溶液(1% Agar, 1 mM Mes/KOH (pH 5.6), 1 mM CaCl_2)を厚さ 100~200 μm 程度になるように敷き詰め、寒天が固化した後、カバーガラスの周辺に乾燥防止用のシリコングリスを塗り、染色した植物試料を上部のみ寒天から露出する様に埋め込み、最後に、18×24 mm のカバーガラスを上のにのせることにより試料を封入した。次に、熱伝導効率を上げるためにペースト状熱伝導ゲル GEL (タイカ)を 20 に設定された低温ステージ上に薄く塗布した後、封入された試料を載せた。また、試料を凍結させる場合はカバーガラスの一部をステージ上の植氷部位に触れさせた。目的の温度に達した後もしくは凍結後 10 分以上経ってからレーザー共焦点顕微鏡にて観察を行った。

(3) 凍結による細胞内カルシウム濃度変動とその影響

複数の蛍光試薬およびカルシウムセンサータンパク質 Yellow Cameleon 3.6 を使用し、細胞内カルシウム濃度変化を凍結前後および凍結中において解析を試みた。また、Yellow Cameleon 3.6 により細胞内カルシウムの変動を観察するため、このタンパク質を発現する形質転換植物を他研究室より入手した。低温および凍結下での観察は、ER 動態の観察系と同様の系を用いた。Yellow Cameleon 3.6 の場合、さらに、植物を非破壊で低温・凍結観察できる顕微鏡観察系を構築したので、この系でも観察を行った。

(4) 液胞膜、ゴルジ体および葉緑体の凍結動態観察

新規の凍結顕微鏡観察系を用いて、高解像度による液胞膜、ゴルジ体および葉緑体の凍結動態の観察を葉切片や表皮、根などを用いて行い、ER 以外のオルガネラの凍結動態観察を試みた。

4. 研究成果

(1) 細胞膜の凍結観察

低温馴化したシロイヌナズナプロトプラストの細胞膜を蛍光染色し、凍結下で観察を行うと、凍結により細胞膜が陥入して生じる小胞 (FIV: freeze-induced vesicle) が観察される。一方、過去の文献では、低温馴化したライムギプロトプラストの細胞膜を凍結下で観察を行うと、細胞の外側に襞状の構造物が観察されることが報告されている。平成 25 年度に完成した新規の凍結顕微鏡観察系では、これまでより高解像度での凍結観察が可能となった (図 1)。そこで、我々もライムギプロトプラストを用いて、凍結下の細胞膜観察を試みた。その結果、細胞の外側に襞状の構造物が細胞膜から延びている様子と同時に、FIVs 様の構造物も観察された。次に、FIV と内膜との相互作用の確認のため、低温馴化したシロイヌナズナプロトプラストを用いて FIV と ER の凍結挙動の同時観察を試みた。-4℃および-7℃で観察を行った結果、両者は凍結下では僅かに染色が重なった箇所は見られたが、ほとんどは独立していた。そのため、凍結中の細胞内では、FIV は ER とは結合せずに独立して存在している可能性が示唆された。

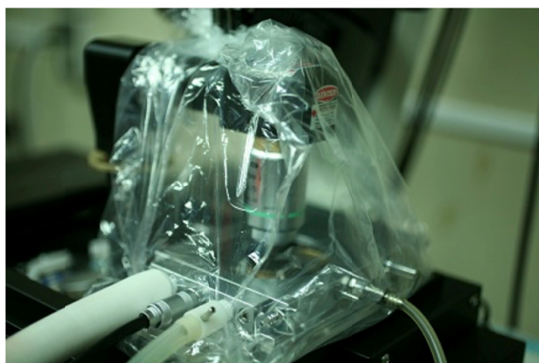


図 1 共焦点低温顕微鏡

(2) ER の凍結動態の一般性について

近年、我々の研究室では、凍結下で生きるメカニズムを細胞レベルで理解するため、レーザー共焦点低温顕微鏡を用いた凍結下におけるライブイメージングの系を開発し、その結果、小胞体の興味深い凍結動態を見だしてきた。例えば、低温馴化したネギ (*Allium fistulosum*) の表皮細胞では、凍結前では活発に流動する小胞体ネットワークが凍結と共にその流動を停止し、さらに小胞化する。一方で、融解後 1 時間以

内にほぼネットワーク構造およびその流動性は回復するため、この現象は凍結前後で可逆である。以上を踏まえると、この小胞体の凍結動態は、細胞が凍結下で生きることに関連した現象である可能性が想像される。一方、この現象に関してはネギおよびシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) のみで観察されているだけであり、植物で一般的な現象かは以前明らかでない。本研究項目では、様々な植物種から試料を採取し、小胞体の凍結動態の一般性を明らかにすることを目的とした。

まず、野外で生息する複数の植物種を観察対象とし、盛岡市内にある岩手大学構内およびその近辺で試料採取を行った。木本性植物では、落葉樹であるイロハモミジ (*Acer palmatum*) およびセイヨウハコヤナギ (*Populus nigra* L. var. *italica*)、常緑樹であるマサキ (*Euonymus japonicus*) およびツバキ (*Camellia japonica*) を観察した。草本性植物ではヒメオドリコソウ (*Lamium purpureum*)、エゾヘビイチゴ (*Fragaria vesca*)、キクイモ (*Helianthus tuberosus*) およびアズマネザサ (*Pleioblastus chino*) を観察した。組織としては、木本性植物の場合、一年生の枝、葉および葉柄、草本性植物の場合は葉、葉柄および塊茎の組織を観察した。また、人工気象器で育てた植物試料としては、シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*)、ライムギ (*Secale cereale*) およびカラスムギ (*Avena sativa*) を用いた。

2015 年の冬期より観察を開始した。まず、野外で低温馴化した常緑樹や落葉樹の 1 年生の枝および葉を 20℃で観察したところ、どの試料およびどの組織においても、ER はシート状もしくは小胞状で細胞内に広がっているものの、草本植物で確認されてきたようなフィラメント状のネットワーク構造はあまり発達していなかった。また、10 分から 20 分程度の連続観察では、20℃においても ER の形態変化は僅かであり、流動性がかなり低いものと推定された。

次に、低温馴化した冬季の草本類においても、20℃での小胞体の動態観察を行った。その結果、観察したほとんどの植物において、これまでの報告と同様に、小胞体は発達したフィラメント状のネットワーク構造を有し、かつ、高い流動性で細胞内を循環する様子が観察された。今回観察した中では唯一アズマネザサだけが異なり、木本類で観察されたような形態および流動性の低さが見られた。以上より、常温における小胞体動態が木本類と草本類とで大きく異なる傾向があることが示唆された。

次に、-2℃での過冷却および凍結での比較を中心に、ER の低温下における動態観察を行った。草本性植物については双子葉類 4 種 (キクイモ、ヒメオドリコソウ、エゾヘビイチゴおよびシロイヌナズナ) および単子葉類 2 種 (ライムギおよびカラスムギ) を用いて、

木本植物については、セイヨウハコヤナギ、ツバキおよびマサキを用いて観察を試みた。また、ライムギおよびカラスムギに関しては、人工気象器内で育てた後、2-12 時間中期の人工的な低温馴化を4週間行った試料を用いて、それ以外の植物は、冬季、野外より採取した試料を用いた。

まず、草本性植物の場合、過冷却における観察を行ったところ、温度低下に伴う流動性の低下が観察され、また、-2 の過冷却の状態でもその流動性は 20 の時と比べかなり低下していたものの、十分な流動性は認めら

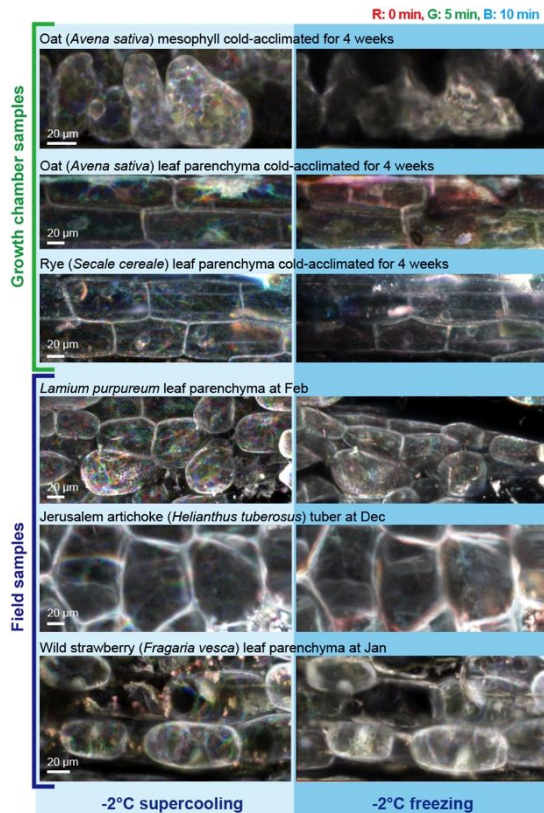


図2 -2 過冷却もしくは凍結下での草本性植物におけるER動態

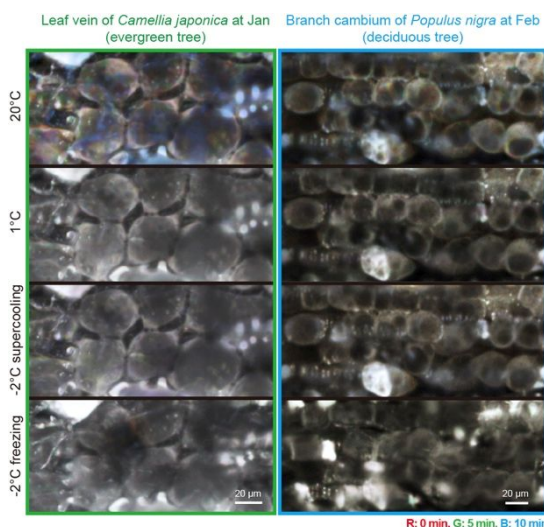


図3 木本性植物におけるERの低温および凍結動態

れた(図2)。次に、-2 で凍結した場合、観察した全ての草本性植物において流動性の停止が見られた。一方、ネギおよびシロイヌナズナで見られた凍結に伴うERの小胞化現象は、ライムギおよびカラスムギでは観察されたが、他の植物では見られず、凍結下においてもERのフィラメント構造は維持されていた。

次に、木本性植物の場合、常緑樹に関しては葉の葉脈における細胞を、落葉樹に関しては1年生の枝の細胞を中心に観察を行った(図3)。20において比較的流動性が見られた細胞において観察を行ったところ、まず、温度低下に伴う流動性の低下が観察された。次に、-2において凍結前後の動態比較を行ったところ、構造的な変化は見られなかったが、凍結に伴う流動性の停止が、僅かにではあるが観察された。

本研究項目をまとめると、様々な植物における凍結前後での小胞体動態が明らかとなり、まず、1) 常温における小胞体動態が木本類と草本類とで大きく異なる傾向があること、2) 常温で小胞体の流動性が確認された場合、凍結に伴いその流動性が停止すること、が確認された。次に、3) ネギおよびシロイヌナズナで観察された凍結に伴うERの小胞化は、全ての植物において観察はされなかった。一方で、ERの凍結誘導性小胞化が観察された植物は全て人工環境で育成し低温馴化を行ったものであった。今後、この事が一般的なことか否かを、同一植物を使い、野外と人工環境での差異を検証する事は、人工環境での植物管理を考える上で重要なことであると考えられる。

(3) 様々なオルガネラ凍結動態

ゴルジ体、液胞膜およびアクチンフィラメントの動態を、蛍光タンパク質を発現させたシロイヌナズナを用いて試みた。また、葉緑体も葉肉細胞で大きさが発達したものの以外は、細胞内を活発に移動するため、これらに関してクロロフィルの自家蛍光を利用し

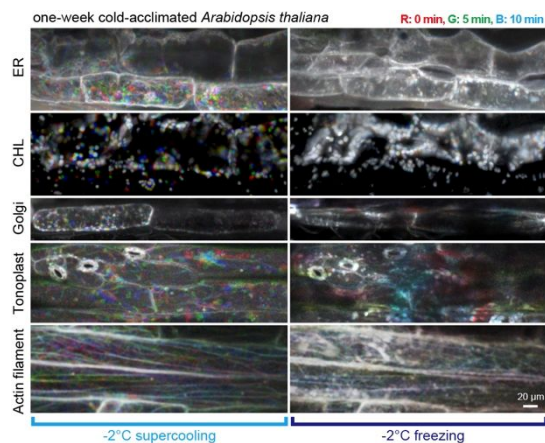


図4 低温馴化した植物におけるオルガネラおよびアクチンフィラメントの凍結動態

観察を行った。また、観察は1週間2で低温馴化した植物体を中心に行った。

まず、低温動態について観察を行ったところ、観察したオルガネラおよびアクチンフィラメントはすべて、温度低下に伴う流動性の低下が観察された(図4)。興味深いことに、液胞膜の一部は、20ではフィラメント構造であったが、温度低下に伴い液胞内に小胞状に陥入した構造物が観察された。次に、-2における凍結前後の様子を観察したところ、観察したオルガネラおよびアクチンフィラメントはすべて、凍結に伴い流動性が停止した(図4)。-2まで観察された液胞のフィラメント構造は凍結下ではほぼ失われた。一方、アクチンフィラメントに関しては凍結下においてもそのフィラメント構造は維持されていた。アクチンフィラメントに関しては低温馴化前での試料でも観察を行ったが、興味深いことに、その場合は、凍結に伴いフィラメント構造は消失した。

(4) 非破壊で低温・凍結観察を行うための顕微鏡観察系の開発

平成25年度に完成した新規の凍結顕微鏡観察系では、これまでより高解像度での凍結観察が可能となった。サンプルを安定的に冷やすには、作動距離1mm程度の20倍レンズ(0.75NA)が限界である事が明らかとなった。そこで新規の凍結顕微鏡観察系をさらに発展させるためいくつかの試作を行った。その結果、サンプルからレンズまでを温度制御できるジャケット付きビーカー内に入れる観察系が、最も温度を安定的に制御できることが分かった。少なくとも現時点で植物個体丸ごと凍結しながら共焦点顕微鏡観察が出来ることを確認した(図5)。

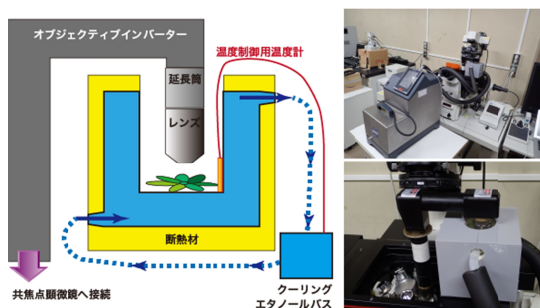


図5 低温・凍結下における非破壊での共焦点顕微鏡観察システム

(5) 低温・凍結下における細胞内カルシウム観察系の開発

細胞内カルシウムの低温および凍結動態を行うため、カルシウムセンサー蛍光タンパク質であるYC3.6を発現するシロイヌナズナ植物、および、カルシウム蛍光試薬であるFluo-4 AMなどを使用し検討した。その結果、蛍光試薬では安定した結果を得ることが難しい事が明らかとなった。

次に、カルシウムセンサー蛍光タンパク質であるYC3.6を発現するシロイヌナズナ植物

を用いて、低温および凍結下における細胞内カルシウム動態を観察できる系を開発した。また、個体観察が可能な新規の凍結顕微鏡の験系と組み合わせ、植物体を傷つけずにカルシウムの凍結動態を観察したところ、凍結と同時に細胞内カルシウムが上昇し、また、20分程度の観察内ではあるが、その状態が維持され続けることが確認された(図6)。他の植物でもカルシウム動態が観察できるように、今後も引き続き、カルシウム蛍光試薬の検討中である。

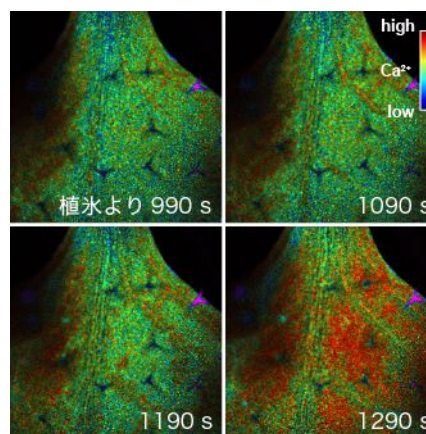


図6 -4における凍結過程と細胞内カルシウムの上昇

<引用文献>

Yamazaki T, Kawamura Y and Uemura M. (2008) 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.
 Tanino KK, Kobayashi S, Hyett C, Hamilton K, Liu J, Li B, Borondics F, Pedersen T, Tse J, Ellis T, Kawamura Y, Uemura M. (2013) *Allium fistulosum* as a novel system to investigate mechanisms of freezing resistance. *Physiologia Plantarum* 147:101-111.

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12件)

河村幸男, 上村松生 (2017) 様々な植物における小胞体動態とその凍結観察の試み. *低温生物工学会誌* 63:41-44. 査読有.
http://square.umin.ac.jp/jscc/jp/publication/journal/vol63_no1.html
 開勇人, 上村松生, 河村幸男 (2016) 短時間の温度変化による植物のカルシウムイオンシグナル変化. *低温生物工学会誌* 62:67-70. 査読有.
 DOI:10.20585/cryobolcryotechnol.62.

1_65_13

Takahashi D, Kawamura Y and Uemura M. (2016) Cold acclimation is accompanied by complex responses of glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored proteins in Arabidopsis. Journal of Experimental Botany 67 : 5203-5215. 査読有 . DOI:10.1093/jxb/erw279

Minami A, Furuto A, Kondo M, Kawamura Y, Uemura M. (2015) Arabidopsis plasma membrane microdomain protein, dynamin-related protein 1E, controls plasma membrane protein accumulation and is associated with freezing tolerance. Plant J 83:501-514. 査読有 . DOI:10.1111/tbj.12907

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. 査読有 . DOI:10.1016/j.envexpbot.2014.02.002

開勇人, 上村松生, 河村幸男 (2014) 植物の温度変化に対する細胞内カルシウム動態について . 低温生物工学会 . 60:139-142. 査読有 . http://square.umin.ac.jp/jscc/jp/publication/journal/vol60_no2.html

[学会発表](計20件)

開勇人, 富永陽子, 上村松生, 河村幸男 . 植物の低温馴化過程におけるカルシウムシグナルと温度変化の影響:野外での低温馴化の理解に向けて, 第58回日本植物生理学会年会, 2017.3.16, 鹿児島大学(鹿児島)

Hiraki H, Uemura M, Kawamura Y. Plants change cold perception system depending on the environment. Society for Experimental Biology 2016, 2016.7.4, Brighton, UK

Hiraki H, Tominaga Y, Uemura M, Kawamura Y. Low-temperature sensing and cold acclimation in plant cells: what is the role of calcium signals? 20th FESPB/EPSO Congress, 2016.6.29, Prague, Czech

河村幸男, 上村松生 . 様々な植物における小胞体動態とその凍結観察の試み, 第61回低温生物工学会, 2016.6.25, 東京電機大学理工学部(埼玉)

開勇人, 富永陽子, 上村松生, 河村幸男 . 植物の低温感知におけるCa²⁺の動態とその役割, 第60回低温生物工学会大会, 2015.5.30, 東京

河村幸男, 開勇人, 上村松生 . 植物の低温馴化と小胞体動態, 日本植物学会第

79回大会, 2015.9.8, 朱鷺メッセ(新潟)

Hiraki Y, Uemura M, Kawamura Y. Low-temperature sensing of plant cells and the dynamics of cytoplasmic calcium. 10th International Plant Cold Hardiness Seminar, 2014.8.17, Poznan, Poland

上村松生, 高橋大輔, 南杏鶴, 河村幸男 . 温度刺激に対する細胞膜マイクロドメインの組成および機能の応答. 日本植物学会第78回大会, 2014.9.12, 明治大学(東京)

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

[その他]

ホームページ等

<http://news7a1.atm.iwate-u.ac.jp/%7Ecrcdbbt/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

(2)研究分担者

上村 松生 (UEMURA, Matsuo)

岩手大学・農学部・教授

研究者番号: 00213398