

学 位 論 文 題 名

植物の凍結傷害機構に関する細胞生理学的研究

学位論文内容の要旨

本研究では、低温顕微鏡を用いた一連の実験結果をもとに、植物の凍結傷害機構に関して得られた新しい知見について報告する。本研究で材料に用いたキクイモ (*Helianthus tuberosus* L.)は、北米原産の地中植物(geophyte)で、北海道全域に広く分布している。地中に形成される塊茎は10月から12月にかけて、組織レベルでの耐凍性を -3°C から -8°C (LT₅₀)まで高める。これに対して組織から分離したプロトプラストの耐凍性は、塊茎形成の初期(9月下旬)においてすでに -29°C を示し、出芽直前の4月まで -25°C 程度の耐凍性を維持した。一方、組織片を等張の平衡塩溶液またはソルビトール溶液に浸して凍結融解すると生存率は未処理(脱イオン水に浸して凍結)の組織に比べて著しく上昇した(平衡塩溶液中で -18°C 、ソルビトール溶液中で -22°C [LT₅₀]に耐える)。このように、酵素処理により細胞壁を除去する(プロトプラスト)か、あるいは組織片を等張溶液に浸して凍結中に原形質分離を起こさせることによって、凍結傷害が著しく緩和されることから、キクイモ細胞の凍結傷害には細胞壁が強く関与していることが示唆された。

無傷組織の凍結融解過程において、どの段階で傷害が発生するかを明らかにするため、凍結融解過程における細胞質 pH の変化を蛍光レシオ法により測定した。キクイモ塊茎の組織切片を蒸留水中で細胞外凍結させると、細胞壁と細胞膜とが密着した状態で細胞は脱水収縮する。このような条件下では、細胞質 pH が凍結過程において、温度の低下とともに急激に低下する様子が観察された。細胞質 pH がある臨界値(pH 6.3-6.4)以下に低下すると、融解過程での pH 回復は全くみられなかった。このことは、致命的な傷害をもたらす不可逆的な変化が、凍結過程ですでに発生していることを示唆している。しかし、このような凍結による細胞質 pH の低下は、組織を等張溶液に浸して凍結し、凍結中に原形質分離を起こさせることによって著しく緩和された。これらの結果は、凍結中に細胞膜と細胞壁との間で発生する何らかの物理・化学的な相互作用が、組織細胞の凍結傷害と密接に関係していることを示唆している。

等張なソルビトール溶液中で -14°C 以下の温度まで凍結させた組織細胞では、融解後に低張溶液中に移すと、二次的な傷害が発生する。その原因として、原形質分離をとまなう凍結融解過程で、細胞膜の一部が失われるためと推定された。原形質分離したキクイモ細胞では、細胞膜と細胞壁とを連ねる“Hectian strands”と呼ばれる多数の繊維状の構造物が見られる。組織切片を等張溶液中で -14°C 以下で凍結融解させた場合、あるいは、それに匹敵する高張脱水処理をした場合には、Hectian strands が断片化して、細胞膜から離脱する様子が観察された。断片化した Hectian strands

は、復水過程で細胞膜に再回収されなかった。このような過度の細胞脱水による Hechtian strands の不可逆的な構造変化が細胞膜物質の減少をもたらし、融解後の膜表面積の再拡張を制限するため細胞膜が損傷を受けるものと考えられる。このことが融解後における二次的な細胞傷害の発生に関与していることが強く示唆された。

低温馴化後、および低温脱馴化後のキクイモ塊茎からそれぞれ単離されたプロトプラストでは、2つの異なる凍結傷害様式が観察された。すなわち、低温馴化後のプロトプラストでは、細胞膜の損傷による傷害型(plasma membrane lysis type)が優先し、低温脱馴化後のプロトプラストでは、液胞膜の損傷による傷害型(vacuolar membrane lysis type)が優先した。後者では、融解にともなう細胞復水の過程で細胞膜は正常な形態を維持しているにもかかわらず、液胞は融解直前までの体積拡大の過程で突如として内容物が吐出することと容積が急激に縮小することが観察された。それにともなって、細胞質 pH は急激に低下することが同時に観察された。これは、液胞膜損傷による半透過性ならびに細胞質と液胞との間の内のプロトン濃度勾配が失われたことを示している。この実験結果からキクイモ塊茎のプロトプラストでは、低温馴化過程と低温脱馴化過程では凍結傷害の機構が大きく異なっていることが示された。

以上の結果より、植物の凍結傷害は、「凍結脱水ストレスが直接細胞膜に働いて細胞膜を不安定化させる」ことだけが唯一の機構要因ではなく、植物の耐凍性の大きさ、種類あるいは組織器官の違いによっては、細胞壁と細胞膜との物理的、あるいは化学的な相互作用による細胞膜の損傷、ならびに凍結脱水ストレスによる液胞膜の損傷が重要な役割を果たしていると結論される。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 吉 田 静 夫
副 査 教 授 山 本 興太朗
副 査 助 教 授 奥 山 英登志
副 査 助 教 授 藤 川 清 三

学 位 論 文 題 名

植物の凍結傷害機構に関する細胞生理学的研究

寒冷地域に生育する越年性植物は長期にわたる氷点下の冬を生き抜く為の特別な適応能力、すなわち耐凍性を持っている。耐凍性は植物の分布北限を規定する生理的要因の一つであり、寒冷地域に於ける植物生産にとっても重要である。本研究は、低温顕微鏡ならびに画像解析法による一連の細胞生理学的な実験により、凍結傷害の発生機構を解明しようとするものである。申請者は、北海道に広く分布する北米原産のキクイモ (*Helianthus tuberosus* L.) の塊茎組織を実験材料として、凍結傷害における細胞壁の役割について新しい知見を得た。キクイモの塊茎形成は、9月下旬に始まり10月下旬に完成する。塊茎組織の耐凍性は9月下旬から1月初旬にかけて地温の低下とともに -3°C から -8°C へと増加する。一方、酵素処理により細胞壁を除去したプロトプラストは、塊茎形成の直後(9月下旬)から出芽直前の4月までの全期間を通して構成的に -25°C での凍結に耐える。この結果は、塊茎組織の耐凍性の季節変化は主として細胞壁によって支配されることを示唆している。塊茎の組織片を等張の平衡塩溶液やソルビトール溶液に浸して凍結融解すると凍結傷害は著しく軽減され、 -20°C 程度の凍結に耐えた。これらの等張溶液に浸した塊茎組織切片の凍結過程を低温顕微鏡下で観察すると、外液の凍結濃縮に伴って細胞は原形質分離を起こすのが確認された。このことから、細胞膜が細胞壁と密着した状態で組織細胞が凍結脱水されるとき、両者間に発生するある種の有害な相互作用が細胞膜に損傷を与えるものと推定された。有害な温度まで凍結させた塊茎組織から直接細胞膜を分離し膜蛋白質の組成を分析したところ、2, 3の特別な膜蛋白質が特異的に消失することが確認された。このことから、組織細胞を凍結するとき細胞膜の表層蛋白質分子とこれに内接する細胞壁高分子との間にある種の分子間相互作用が発生し、その結果、細胞膜が不可逆的な損傷を受けると推論した。

塊茎組織の凍結融解過程に於て、どの段階で傷害が発生するかを明らかにする為、凍結融解過程に於ける細胞質pHの変化を蛍光レシオ法により低温顕微鏡下で測定した。

組織切片を蒸留水に浸して凍結させると温度の低下とともに細胞質 pH は急激に低下した。細胞質 pH がある臨界値 (pH 6.3-6.4) 以下まで低下すると、その後の融解過程では pH の回復はみられなかった。このことは、細胞膜に致命的な損傷を与える「細胞膜－細胞壁」間の分子的相互作用が凍結中に発生することを示唆している。組織切片を等張溶液に浸して凍結させると細胞は原形質分離を起こし細胞膜と細胞壁の接触が回避されるが、この場合には細胞質 pH の低下は大幅に緩和された。

組織切片を等張なソルビトール溶液中に浸し -14°C 以下まで凍結させ、融解後に低張条件に移すと二次的な傷害が発生する。原形質分離した組織細胞では、細胞膜と細胞壁を連ねる Hechtian strand と呼ばれる多数の繊維状構造物がみられる。組織切片を等張溶液中で -14°C 以下まで凍結するか、あるいはそれに匹敵する高張脱水処理を施すと、その後の融解にともなう復水、および原形質復帰過程で Hechtian strand が断片化し細胞膜から離脱するのが観察された。断片化した Hechtian strand は復水過程で細胞膜には回収されない。このような過度の細胞脱水による Hechtian strand の不可逆的な構造変化が細胞膜物質の減少をもたらし、融解後の膜表面積の再拡張を制限する為に細胞膜が物理的に破壊されると推定した。

5月初旬にはキクイモ塊茎は出芽を開始し、それに伴って組織レベルの耐凍性は低下する（低温脱馴化）。この時期の塊茎組織から分離されたプロトプラストの凍結傷害の様式は、秋から真冬の塊茎組織から分離されたプロトプラストのそれとは非常に異なるものであった。後者のプロトプラストでは細胞膜の損傷による傷害 (-25°C 以下で発生) が優先し、前者のプロトプラストでは液胞の選択的な損傷による傷害 (-5°C 以下で発生) が優先した。この場合、融解に伴う細胞の復水過程で細胞膜は正常な形態に復帰したが、液胞は容積拡大の過程で内容物の吐出をとめないながら急激に容積が縮小するのが観察された。それに伴って細胞質 pH は急激に低下することから、液胞膜の損傷が細胞にとって致命的であることを示している。この実験結果は、凍結傷害が凍結脱水による細胞膜の構造的な損傷だけでなく、液胞膜の損傷によっても発生することを始めて示したもので非常に意義深い。

以上の研究結果から、植物の凍結傷害は「凍結脱水ストレスの直接的な作用による細胞膜構造の損傷」だけで発生するのではなく、植物の耐凍性の大きさ、植物の種類、あるいは組織器官によっては「細胞壁と細胞膜に発生する分子的相互作用による細胞膜構造の損傷」、さらには凍結脱水ストレスによる液胞膜構造の損傷も重要な役割を果たすことが明かとなった。凍結傷害の発生機構に関するこれらの新しい知見は、耐凍性機構の解明にむけた今後の研究に大きく貢献するものである。

審査委員一同は、これらの研究成果を高く評価し、大学院課程における研さんや単位取得なども併せ申請者が博士（地球環境科学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。