

学 位 論 文 題 名

広葉樹木部放射柔細胞の氷点下温度への適応に関する研究

学位論文内容の要旨

樹木が冬期間の凍結ストレスに対して適応機構をもつことは、寒冷地で生存していくうえで不可欠な条件である。寒冷地に生育する樹木では、形成層細胞や皮層細胞に比べて木部放射柔細胞の耐凍性が低いことから、木部放射柔細胞の氷点下温度での挙動が生育地の限界を決める重要な要素となっている。したがって、木部放射柔細胞の氷点下温度での挙動を明らかにすることは、樹木の多様な生理的機能を解明するうえで極めて意義深いことである。

樹木の木部放射柔細胞の氷点下温度での挙動の研究は、示差熱分析（DTA）法を中心手段におもに温帯以北の樹木について行われてきた。これらの研究で、DTAプロファイルにおける低温での発熱（LTE）の有無により木部放射柔細胞が氷点下の温度に適応するメカニズムには深過冷却による凍結回避と細胞外凍結による耐凍性の獲得という2つの全く異なる方法があることが示されている。しかし、LTEのピークが明瞭ではない、あるいは一定の冷却速度でしか発熱を検知できないなどの理由からDTA法ではこれらの区別が難しい場合が多々あり、DTA法による推定が実際の木部放射柔細胞の氷点下温度での挙動を正確に表しているのかは明らかになっていない。

深過冷却をする木部放射柔細胞は、水の均質核形成温度である -40°C 付近で致死的な細胞内凍結を起こす。一方、細胞外凍結をする木部放射柔細胞にはこのような物理的限界はない。そのため、深過冷却をする木部放射柔細胞をもつ樹種は最低気温が -40°C を記録したことのない地域のみで生育し、細胞外凍結をする木部放射柔細胞をもつ樹種はさらに寒冷地にまで分布を広げていると考えられている。しかし、暖温帯に生育する広葉樹の中にも、木部放射柔細胞が細胞外凍結をする樹種があることが報告されており、これまでの報告では、樹木の木部放射柔細胞の氷点下温度での挙動が単なる樹種的特性か、あるいは生育地の温度に依存している特性なのかは不明である。

本論文では、広葉樹の木部放射柔細胞の氷点下温度への適応を明らかにするために、低温電子顕微鏡法（Cryo-SEM法、フリーズ・フラクチャー・レプリカ法）を用いて、異なる温度環境に生育する樹種について木部放射柔細胞の実際の氷点下温度での挙動を調べるとともに、これらの凍結抵抗性および脱水耐性を調べ、木部放射柔細胞の氷点下温度での挙動と生育地の温度環境との関係を明らかにした。実験には、熱帯・亜熱帯、暖温帯、冷温帯に一般的に生育する広葉樹のおもに3年生の枝を用いた。

まず、DTA法が木部放射柔細胞の実際の氷点下温度での挙動を正確に示すのかどうかを検討した。予備実験の結果、DTA法で明瞭なLTEが発生した樹種（ハクウンボク）と全くLTEが発生しなかった樹種（レッド・オジャー・ドッグウッド）について、それらの木部放射柔細胞の氷点下温度での挙動を低温電子顕微鏡法を用いて直接観察した。その結果、ハクウンボクでは、DTA法による推定どおり木部放射柔細胞は深過冷却をした。一方、レッド・オジャー・ドッグウッドでは、冬期にはDTA法による推定どおり木部放射柔細胞は細胞外凍結を起こした。しかし、夏期にはDTA法による推定と異なり、木部放射柔細胞が -25°C 付近までの深過冷却をすることを明らかにした。以上の結果から、木部放射柔細胞の正確な氷点下温度での挙動を把握するためには低温電子顕微鏡法による直接的な観察が必要であることを示した。

以上の知見に基づいて、これまでに研究が行われていない熱帯・亜熱帯樹種をはじめ、暖温帯樹種および冷温帯樹種を選定し、低温電子顕微鏡法を用いそれらの木部放射柔細胞の氷点下温度での挙動を調べ、これらの氷点下温度での挙動と樹木の生育分布との関係について明らかにした。熱帯・亜熱帯樹種では、植氷によって直ちに細胞内凍結を起こす一部の樹種（マンゴー）の少数の細胞を除き、ほとんどの樹種（マルバゴムノキ、ガジュマルなど）の木部放射柔細胞は若干の脱水を伴う -10°C 付近までの深過冷却をすることを明らかにした。暖温帯樹種（センダン、クスノキなど）では、夏期には -10°C 付近までの深過冷却、冬期には -20°C 付近までの深過冷却をすることを明らかにした。冷温帯樹種の氷点下温度での挙動には3通りの異なった挙動がみられた。これらは、1) 夏期には -25°C 付近まで、冬期には -40°C 付近までの深過冷却をする木部放射柔細胞をもつ樹種（ハクウンボク、エゾヤマザクラなど）、2) 夏期には -25°C 付近までの深過冷却、冬期には -40°C 付近までの深過冷却と細胞外凍結をする木部放射柔細胞が混在する樹種（ヤマグワ、ハルニレなど）、3) 夏期には -25°C 付近までの深過冷却、冬期には細胞外凍結をする木部放射柔細胞をもつ樹

種（レッド・オジャー・ドッグウッド，シラカンバなど）である。生育地および季節による温度変化に伴い木部放射柔細胞の氷点下温度での挙動が大きく変化する事実は、木部放射柔細胞の氷点下温度での挙動が温度変化に強く依存されることを示す。

つぎに、木部放射柔細胞の氷点下温度での挙動と生存の関係を調べた。その結果、木部放射柔細胞の深過冷却能の増加に伴って凍結抵抗性が増加することを明らかにした。しかし、熱帯・亜熱帯樹種と暖温帯樹種では、深過冷却中に起こる部分的な脱水により、木部放射柔細胞の生存率が深過冷却の破れる温度よりも若干高い温度で低下した。さらに、冷温帯樹種のうち深過冷却をする木部放射柔細胞のみをもつ樹種では -40°C 、深過冷却と細胞外凍結をする木部放射柔細胞が混在する樹種ではさらに低い温度、細胞外凍結をする木部放射柔細胞のみをもつ樹種では最も低い温度（ -70°C 以下）まで生存できることを明らかにした。

また、熱帯から冷温帯までの地域にそれぞれ分布する樹種について、木部放射柔細胞の脱水耐性の変化を浸透圧脱水実験により調べた。その結果、木部放射柔細胞の氷点下温度での挙動が深過冷却かあるいは細胞外凍結かという違いに拘わらず、生育地および季節により温度が低下するにつれ、木部放射柔細胞の脱水耐性は徐々に高まる傾向を示した。これらの結果は深過冷却と細胞外凍結が生育地の温度に依存した連続した氷点下温度への適応機構であることを示唆する。

木部放射柔細胞の氷点下温度での挙動の違いは、細胞壁あるいは原形質膜の構造特性の影響によると考えられる。本論文では木部放射柔細胞の氷点下温度での挙動のメカニズムを解明するための予備的な実験として、深過冷却をする木部放射柔細胞の細胞壁の役割について調べた。その結果、細胞内凍結を起こし、原形質膜が明らかに破壊された木部放射柔細胞においても、融解後、再冷却した場合に再び深過冷却をすることが明らかになった。この結果は木部放射柔細胞の氷点下温度での挙動の違いに細胞壁の特性が強く関与することを示す。

本研究で得られた知見は、樹木の氷点下温度への適応を明らかにしていくうえで重要であるとともに、低温生物学および樹木生理学の研究の進展に寄与するところが大きいと考えられる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 大 谷 諄

副 査 教 授 高 橋 邦 秀

副 査 助教授 藤 川 清 三 (低温科学研究所)

学 位 論 文 題 名

広葉樹木部放射柔細胞の氷点下温度への適応に関する研究

本論文は6章で構成され、図55、表23、引用文献98、総頁数165の和文論文である。別に参考論文6編が添えられている。

植物の生細胞が氷点下温度に適応するメカニズムには、過冷却による凍結回避と細胞外凍結による耐凍性の獲得という2つの方法があることが知られている。樹木では、木部の放射柔細胞の氷点下温度での適応性は、樹木内の他の生細胞に比べて低いことから、樹木の寒冷地への生育分布を規制する重要な要素になっている。

木部放射柔細胞の氷点下温度への適応メカニズムは、これまで示差熱分析法によって主に冷温帯樹種について調べられており、気温が -40°C 以下になる寒冷地にまで生育する樹木は細胞外凍結をする木部放射柔細胞をもつが、このような低温にならない地域に生育する樹木は深過冷却をする木部放射柔細胞をもつことが明らかにされている。

本研究では、木部放射柔細胞の氷点下温度での挙動について、低温電子顕微鏡法（低温走査電子顕微鏡法および凍結切断レプリカ法）を用いて細胞レベルでの直接観察をすることにより、まずこれまで用いられてきた示差熱分析法による結果を検討した。その結果、示差熱分析法は必ずしも木部放射柔細胞の氷点下温度での正確な挙動を示さないことを明らかにした。すなわち、示差熱分析法によって深過冷却をすると判断される場合は正確な挙動を示すが、細胞外凍結をすると判断される場合には誤った結果をもたらす可能性があることを明らかにした。これらの結果に基づき、本研究では低温電子顕微鏡法を用いて、生育地温度の異なる広葉樹39種（熱帯・亜熱帯樹種5種、暖温帯樹種12種および冷温帯樹種22種）について、採取試料を実験室内で目的の氷点下温度まで種々の条件下で冷却し、それらの木部放射柔細胞の挙動を調べた。

熱帯・亜熱帯樹種では -10°C 前後まで深過冷却をするが、暖温帯樹種の冬期で

は -20°C 、夏期では -10°C 前後まで深過冷却をする。また、冷温帯樹種の冬期では、 -40°C 付近まで深過冷却をする木部放射柔細胞のみをもつ樹種、深過冷却と細胞外凍結をする木部放射柔細胞が混在する樹種および細胞外凍結をする木部放射柔細胞のみをもつ樹種が存在するが、これらすべての樹種の夏期では -20°C 前後まで深過冷却をする。以上の結果は、氷点下温度での木部放射柔細胞の挙動は樹木の生育地温度の低下にともない深過冷却から細胞外凍結に変わること、同一樹種内でも深過冷却と細胞外凍結をする木部放射柔細胞が存在する樹種があることを示す。

つぎに、氷点下温度での木部放射柔細胞のこれらの挙動と生存率の関係について調べた。熱帯・亜熱帯と暖温帯の樹種および深過冷却型の冷温帯樹種では、深過冷却能が高くなるにしたがい木部放射柔細胞が生存できる温度は低くなる傾向があること、また、冷温帯樹種の冬期では、深過冷却型の樹種、深過冷却・細胞外凍結型の木部放射柔細胞が混在する樹種、細胞外凍結型の樹種の順に、木部放射柔細胞が生存できる温度は低くなることを明らかにした。

さらに、浸透圧脱水法により木部放射柔細胞の脱水耐性について調べた。深過冷却をする木部放射柔細胞には脱水耐性はないと考えられていたが、深過冷却をする木部放射柔細胞の冬期での脱水耐性は、暖温帯樹種では -20°C 付近までであるが、冷温帯樹種ではさらに高くなること、暖温帯・冷温帯樹種の夏期での脱水耐性は低くなることを明らかにした。細胞外凍結をする木部放射柔細胞は、当然極端に高い脱水耐性を示した。これらの結果は、木部放射柔細胞の脱水耐性はそれらの深過冷却・細胞外凍結型とは無関係に生育地や季節の温度低下にともない高くなることを示す。

本研究で得られた上述の結果は、木部放射柔細胞の氷点下温度への適応性が樹木の生育温度に依存して連続的に深過冷却型から細胞外凍結型へと徐々に変遷したことを強く示唆するものである。

以上のように、本論文は低温電子顕微鏡法による広範かつ詳細な観察結果をもとにして、生育地温度の異なる広葉樹の木部放射柔細胞の氷点下温度での適応性について検討したものであり、その成果は学術上高く評価される。よって審査員一同は、黒田克史が博士（農学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認めた。