

学 位 論 文 題 名

北方落葉広葉樹木部柔細胞の深過冷却機構における
細胞内成分の役割

学位論文内容の要旨

冬季に気温が氷点下になる寒冷な地域に生育する植物は、その生活環の中で凍結ストレスを受ける。多くの植物細胞は、この凍結ストレスに対し、細胞内の水分が脱水を受ける細胞外凍結により適応する。一方、木化した厚い二次壁からなる細胞壁を持つ樹木の木部柔細胞は、ほとんど脱水を受けず、深過冷却と呼ばれる凍結回避機構により、細胞内水分を液体状態に保ったまま氷点下温度に適応している。

準安定状態である水の過冷却には物理的な限度温度が存在し、多くの北方樹木の木部柔細胞は、水の均質核形成温度である -40°C 程度までしか過冷却を続けることができない。一方、細胞外凍結による適応機構には、このような物理的限界は存在しない。そのため、木部柔細胞の凍結抵抗性は他の組織細胞に比べて低く、木部柔細胞の過冷却限度温度が樹木の凍結抵抗性を決め、寒冷地への樹木の分布を規制する鍵要因となっている。従って、木部柔細胞の深過冷却機構を明らかにすることは、樹木の低温環境への適応機構を解明する上で極めて意義深い。

これまで、木部柔細胞の深過冷却機構は、特殊な構造特性を持つ細胞壁が植氷や脱水といった細胞外の氷晶からの影響を防ぐバリアとして機能することで、プロトプラストが隔離された小さな液滴として存在するために均質核形成温度まで過冷却を続ける、という物理的な現象としてのみ説明されてきた。しかし、北方樹木の木部柔細胞は冬季に数週間以上も過冷却を続けることや、季節的に木部柔細胞の過冷却能力が大きく変化することなどから、深過冷却機構は細胞壁の構造特性のみでは説明できない。このため、本研究は、北方落葉広葉樹の木部柔細胞の深過冷却機構における細胞内成分の役割の解明を目的として行われた。

1) 細胞内成分が深過冷却機構に与える影響

木部柔細胞の細胞内成分が過冷却能力に影響を与えるか否かを調べるため、凍結融解処理や煮沸処理によって木部柔細胞の細胞膜を破壊し、細胞内成分を漏出させた際の過冷却能力の変化を示差熱分析 (DTA) により調べた。

本研究で用いた冬季に採取したブナ (*Fagus crenata*) の未処理の木部柔細胞の過冷却能力は -40°C 程度であったが、凍結融解処理や煮沸処理により、それぞれ、 -30°C 及び -20°C 程度まで低下した。また、低温走査型電子顕微鏡 (Cryo-SEM) による観察により、これらの処理は細胞壁の構造に大きな変化を与えないことを明らかにした。以上の結果から、凍結融解処理や煮沸処理による過冷却能力の低下は、細胞膜が破壊されたことで細胞内成分が細胞外へと漏出したことによると推測され、木部柔細胞内には深過冷却機構に関与する何らかの細胞内成分が存在すると考えられる。

2) 細胞内可溶性糖の深過冷却機構における役割

重要な細胞内成分の一つとして細胞内に蓄積する可溶性糖に着目し、木部柔細胞の深過冷却機構に果たす役割の解明を試みた。本研究では、シラカンバ (*Betula platyphylla* var. *japonica*) を材料として用い、季節的な低温馴化、脱馴化過程における木部柔細胞の過冷却能力の変化と、それに伴う細胞内可溶性糖の組成変化を調べた。また同時に、細胞外凍結をする同樹種の皮層柔細胞に蓄積する可溶性糖と比較することで、深過冷却機構における可溶性糖の役割を検討した。

シラカンバの木部柔細胞内の可溶性糖含量は、冬季の過冷却能力の上昇に伴って増加し、冬季には夏季の4倍以上の可溶性糖が蓄積した。特に、スクロース、ラフィノース、スタキオースの含量が冬季特異的に増加した。しかし、同様の変化は細胞外凍結をする皮層柔細胞でも見られた。一方、組織に占める柔細胞の割合から、木部柔細胞には皮層柔細胞に比べて、数倍におよぶ高濃度の可溶性糖が蓄積することが明らかになった。この事実は、DTAやCryo-SEMにより測定した木部柔細胞と皮層柔細胞の細胞内融点の違いとも一致した。以上の結果から、冬季の木部柔細胞には高濃度で可溶性糖が蓄積し、これによる凝固点降下とそれに伴う氷核形成（凍結）温度低下が木部柔細胞の過冷却を促進することが示唆された。

3) 木部由来の粗抽出画分が深過冷却に与える影響

北方落葉広葉樹の木部柔細胞からの抽出成分が深過冷却に与える影響を検討するため、いずれもその木部柔細胞が深過冷却をする、オニグルミ (*Juglans mandshurica* var. *sachalinensis*)、カツラ (*Cercidiphyllum japonicum*)、クリ (*Castanea crenata*)、シラカンバ (*B. platyphylla* var. *japonica*)、ナナカマド (*Sorbus commixta*)、ブナ (*F. crenata*)、ヤマグワ (*Morus bombycis*) の、冬季に採取した木部組織から80%エタノールにより抽出した成分について、これらが水溶液の氷核形成温度に与える影響を、ドロップレット・フリージング・アッセイにより評価した。この結果、本研究で用いたすべての樹種から得た粗抽出画分は、氷核形成細菌を含む緩衝液の氷核形成温度を低下（過冷却度を増進）させる活性を示した。このうち、最も高い氷核形成阻害活性を示したカツラ木部由来の粗抽出画分は、氷核形成細菌を含む緩衝液に加え、ヨウ化銀を含む緩衝液や、氷核形成物質を加えない緩衝液の氷核形成温度も低下させた。このことは、北方落葉広葉樹の木部組織には、様々な物質による氷核形成活性を阻害する物質が存在することを示す。

4) 過冷却促進物質の同定

氷核形成阻害物質の同定を行うため、カツラの木部組織から抽出した粗抽出画分を、水と酢酸エチルを用いた液々分配と、引き続き、シリカゲル・カラム・クロマトグラフィーにより分画した。最も高い氷核形成阻害活性を示した画分に含まれる成分を、分取HPLCにより単離したところ、4つの化合物が氷核形成阻害活性を示した。UV、MS、NMRスペクトル分析の結果、これらの化合物は、いずれもフラボノイド配糖体であり、それぞれ、ケルセチン-3-*O*- β -グルコシド、ケンフェロール-7-*O*- β -グルコシド、8-メトキシケンフェロール-3-*O*- β -グルコシド、ケンフェロール-3-*O*- β -グルコシドであることが明らかになった。これらの化合物は、氷核形成細菌を含む緩衝液の氷核形成温度を、それぞれ、2.8℃、9.0℃、3.4℃、4.0℃低下させた。フラボノイド配糖体が過冷却促進効果を持つという事実は新規の知見であるとともに、これらの氷核形成阻害活性は、既知の氷核形成阻害物質に比べて非常に高い値を示した。以上の結果から、北方落葉広葉樹の木部組織（柔細胞）に氷核形成阻害物質（過冷却促進物質）が蓄積するという新知見が得られた。

本研究は、北方落葉広葉樹の木部柔細胞の深過冷却機構には細胞内成分が関与すること、冬季の木部柔細胞には高濃度の糖と、高い氷核形成阻害活性を示す化合物の蓄積がみられ、いずれも過冷却能

力を促進する効果があることを明らかにした。本研究で得られた結果は、樹木の氷点下温度に対する適応機構を解明する上で重要な知見である。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 藤 川 清 三

副 査 教 授 寺 澤 実

副 査 助教授 荒 川 圭 太

副 査 教 授 山 田 敏 彦 (北方生物圏フィールド
科学センター)

副 査 助教授 橋 床 泰 之 (応用生命科学専攻)

学 位 論 文 題 名

北方落葉広葉樹木部柔細胞の深過冷却機構における 細胞内成分の役割

本論文は6章からなり、図31、表6、参考文献144を含む93ページの和文論文である。他に参考論文6編が添えられている。

樹木の木部組織に存在する柔細胞は、樹木の他の組織細胞に比べ低い凍結抵抗性をもつ。このため木部柔細胞の凍結抵抗性が寒冷地への樹木の分布限界を決める要因となっている。樹木の木部柔細胞は深過冷却という、細胞内の水分を液体状態で保ったまま氷点下温度に適応する、他の組織細胞とは全く異なる、ユニークな凍結適応機構を示す。木部柔細胞は過冷却の限度温度を、季節的に、及び成育地の温度変化に対応して、大きく変動させることにより環境温度変化に適応している。北方樹木では数週間に及ぶ長期間、 -40°C 以下の低温でも木部柔細胞は過冷却状態を維持する。しかしながら、これまでは樹木の木部柔細胞の深過冷却のメカニズムについてはほとんど研究されてこなかった。このため、本研究は、北方落葉広葉樹の木部柔細胞の深過冷却機構を解明することを目的として行われた。

研究は、まず、ブナを用いて行われ、木部柔細胞の細胞内成分が過冷却能力に与える影響を調べた。細胞内成分を漏出させた際の過冷却能力の変化を、示差熱分析 (DTA) 及び、低温走査型電子顕微鏡 (Cryo-SEM) により観察することにより、木部柔細胞内には深過冷却機構に関与する何らかの細胞内成分が存在することを明らかにした。

次いで、シラカンバを材料として、木部柔細胞内に蓄積する可溶性糖に着目し、深過冷却機構に果たす糖の役割の解明を試みた。細胞外凍結する同樹種の

皮層柔細胞との比較における糖分析の結果、木部柔細胞のみに特異的に蓄積する可溶性糖は存在しないことを明らかにした。しかし、糖濃度は皮層柔細胞に比べて数倍高いことを明らかにした。この事実は、DTAやCryo-SEMにより測定した木部柔細胞と皮層柔細胞の細胞内融点の測定結果とも一致した。以上の結果から、冬季の木部柔細胞内には高濃度で可溶性糖が蓄積し、これによる束一的性質による凝固点降下と、それに伴う氷核形成（凍結）温度低下が木部柔細胞の深過冷却を促進する一要因であることを明らかにした。

また、北方落葉広葉樹の木部柔細胞からエタノールで抽出した粗抽出画分が深過冷却に与える影響を、ブナ、シラカンバ、カツラ等、7種の北方落葉広葉樹について調べた。ドロップレット・フリージング・アッセイにより評価した結果、用いたすべての樹種の粗抽出画分は非常に低濃度で、非束一的性質により、氷核形成細菌を含む緩衝液の氷核形成温度を低下（過冷却度を増進）させる活性を示すことを明らかにした。

さらに、これらの樹種中、最も高い氷核形成阻害活性を示したカツラを用い、粗抽出画分中の氷核形成阻害物質の同定を行った。粗抽出画分を、水と酢酸エチルを用いた液々分配、シリカゲル・カラム・クロマトグラフィーにより分画した。最も高い氷核形成阻害活性を示した画分に含まれる成分を、分取HPLCにより単離して、氷核形成阻害活性を示す4つの化合物を同定した。UV、MS、NMRスペクトル分析により、これらの化合物は、いずれもフラボノイド配糖体であり、それぞれ低濃度で過冷却促進効果をもつ、ケルセチン-3-O- β -グルコシド（過冷却促進効果、2.8℃）、ケンフェロール-7-O- β -グルコシド（9.0℃）、8-メトキシケンフェロール-3-O- β -グルコシド（3.4℃）、ケンフェロール-3-O- β -グルコシド（4.0℃）であることを明らかにした。フラボノイド配糖体が過冷却促進効果を持つという事実は新規の知見であるとともに、これらの氷核形成阻害活性は、既知の氷核形成阻害物質に比べて遙かに高い値を示した。

本研究は、北方落葉広葉樹の木部柔細胞の深過冷却機構には細胞内成分が関与することを明らかにし、木部柔細胞内に高濃度で蓄積する可溶性糖が、束一的性質による凝固点降下とこれに伴う氷核形成温度低下をもたらすことが過冷却の一因であることを明らかにした。さらに、非常に低濃度で、非束一的性質により過冷却能力を促進する数種のフラボノール配糖体の存在を明らかにし、これらによる複合的効果が木部柔細胞の深過冷却をもたらすメカニズムの一端であると考察した。これらの結果は、木部柔細胞の深過冷却のメカニズムを解明する新規の知見である。よって、審査員一同は、春日純が博士（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。