

学 位 論 文 題 名

樹木冬芽の越冬機構に関する研究

学位論文内容の要旨

寒冷地に生育する多くの樹木の冬芽は氷点下温度に対して器官外凍結を示す。この凍結挙動は冬芽という器官全体で応答し、冬芽内部の特異的な場所に氷晶を析出させるものである。しかし、冬芽を構成する様々な組織において、それぞれの細胞の凍結挙動を明らかにした例はなく、冬芽に特有な器官外凍結機構の詳細は不明であった。そこで本研究では、器官外凍結するカラマツ (*Larix kaempferi*) 冬芽の凍結適応機構を明らかにするため、冬芽ならびに冬芽から摘出した各組織を用い、それらの細胞の凍結挙動を電子顕微鏡法にて精査すると共に、細胞内の水の凍結制御に関わる物質について解析した。また、ストロブマツ (*Pinus strobus*)、カツラ (*Cercidiphyllum japonicum*)、シラカンバ (*Betula platyphylla*) の冬芽についても、構成細胞の凍結挙動を電子顕微鏡法によって解析した。

カラマツ冬芽は、翌春の成長を担う枝条原基と葉原基を中心に、原基の基部に位置するクラウンや原基を覆う芽鱗などから構成されている。強制休眠期の厳冬期（2月）に採取したカラマツ冬芽を緩やかな冷却速度（5℃/day）で-30℃まで凍結し、低温走査型電子顕微鏡によって凍結挙動を観察したところ、冬芽の組織内では細胞外氷晶は形成されず、クラウン下にある空隙と芽鱗の間の細胞外領域に氷晶が析出し、典型的な器官外凍結を示した。冬芽を構成する細胞の凍結挙動をさらに分析したところ、器官外凍結中では、細胞外氷晶に隣接する比較的厚い細胞壁を持つ芽鱗やクラウンの細胞は細胞外凍結によって脱水収縮していたが、細胞外氷晶から隔離される薄い細胞壁を持つ枝条原基と葉原基の細胞は細胞内水分の一部が脱水したものの、残存する水は細胞内で過冷却していることが明らかになった。

次に、冬芽から原基を摘出して直に氷に触れるようにして-5℃まで凍結すると、原基の内部に細胞外氷晶が析出した。これと同様に原基を-10℃まで凍結すると一部の細胞が細胞内凍結し、さらに-30℃まで凍結すると細胞内凍結する細胞と細胞外凍結する細胞とが混在した。それに対して原基下部にあるクラウン組織では全ての細胞が細胞外凍結した。そのため、器官外凍結するカラマツ冬芽では、原基はクラウン組織や芽鱗に比べて細胞の脱水量が少なく細胞内に過冷却水が残存し、原基細胞は凍結傷害を受けやすいため、器官外凍結によって原基から細胞外氷晶を隔離するものと考えられた。

また、自発休眠期（11月上旬）のカラマツ冬芽から摘出した原基の凍結挙動も調べたところ、強制休眠期の凍結挙動とは異なり、-15℃の凍結でほとんどの細胞が凍結脱水していた。さらに、強制休眠期の冬芽を-15℃まで凍結すると、細胞膜脂質が特徴的な相分離を起こしていた。しかし、自発休眠期の原基細胞では細胞膜脂質の相分離は起きていなかった。このことから、自発休眠期から強制休眠期へ移行した過程で原基細胞の細胞膜で脂質組成が変化して原基細胞の凍結挙動に影響を与えたことが示唆された。

次に、他の樹種の冬芽の凍結挙動を調べると、-30℃まで凍結した厳冬期のカツラ冬芽では芽鱗の間にのみ氷晶が析出し、器官外凍結を示した。この時、組織内に細胞外氷晶の析出は

なく、薄い細胞壁を持つ花原基や葉原基の細胞は部分的に脱水するとともに過冷却し、厚い細胞壁を持つ芽鱗の細胞は細胞外凍結した。また、冬芽から摘出した花原基を氷と接した状態で凍結させると組織内に細胞外氷晶が形成され、 -10°C 以下までの凍結によっておよそ50%の細胞が細胞内凍結した。一方、摘出した芽鱗の細胞は全て細胞外凍結した。それに対して、シラカンバの冬芽は -30°C まで凍結しても器官外凍結を示さず、花原基や葉原基、芽鱗の組織内にある細胞間隙に細胞外氷晶が析出し、全ての細胞が細胞外凍結していた。冬芽から摘出した花原基、葉原基および芽鱗を -30°C まで凍結しても全ての組織の細胞は細胞外凍結した。ストロブマツの冬芽は、これまでの冬芽とは構造的に異なり芽鱗は死細胞によって構成されていた。この冬芽を -30°C まで凍結しても器官外凍結を示さず、原基内に細胞外氷晶が形成され、原基細胞は細胞外凍結を示した。また、原基を摘出して同様に凍結しても細胞は細胞外凍結した。以上の結果から、樹種ごとに冬芽の凍結挙動に特徴があり、器官外凍結もしくは細胞外凍結という凍結適応機構の違いは、冬芽の原基細胞の細胞外氷晶に対する感受性の違いを反映することが考えられた。

さらに、器官外凍結するカラマツ冬芽において、原基細胞が部分脱水しながらも -30°C 以下まで過冷却するメカニズムを調べるため、過冷却に関与する物質の検出ならびに抽出を試みた。まず、カラマツ冬芽から得たメタノール粗抽出物を含む水溶液の凍結温度を測定し、市販の蒸留水（対照区）の凍結温度と比較することで過冷却活性を調べた。冬芽 5 g 新鮮重量から得られる抽出物の含量を 1 ml の蒸留水に溶解した濃度に調製した水溶液 2 μl を $0.2^{\circ}\text{C}/\text{min}$ にて 4°C から -60°C まで冷却すると、蒸留水 (-28.1°C) とメタノール粗抽出物を含む水溶液 (-32.7°C) の凍結温度の差の 4.6°C が過冷却活性として検出された。そこで、過冷却活性の原因物質を調べるため、有機溶媒に対する溶解性の違いによってメタノール粗抽出物を順次分画し、酢酸エチル画分、メタノール画分および残渣画分を得た後、これらの画分について過冷却活性を評価した。メタノール粗抽出画分と同じ濃度に調製して活性を測定したところ、メタノール画分でのみ 6.4°C の過冷却活性が検出された。さらに、この画分を、セファデックス LH-20 カラムにて分子量の違いによって3つの画分に分画したところ、画分 2 と 3 でそれぞれ 5.5°C 、 3.2°C の過冷却活性が検出された。最も高い活性が得られた画分 2 の成分を HPLC 等で調べたところ、主成分としてピニトール、フルクトース、グルコース、スクロース、メリビオース、ラフィノースが含まれていることが明らかになった。この6種類の化合物について、セファデックス画分 2 に含まれている濃度と等しくなるよう市販の試薬を調合して混合溶液を調製したところ、過冷却活性は 2.4°C であった。この値とセファデックス画分 2 の過冷却活性 (5.5°C) との間に差があるため、6種類の主成分以外の物質が過冷却活性に寄与する可能性が考えられた。

本研究により、器官外凍結しているカラマツ冬芽では、クラウン組織や芽鱗の細胞では細胞外凍結し、原基細胞は部分的に脱水しながらも過冷却することが初めて明らかになった。また、原基から脱水された水は、凍結感受性の高い原基内にとどまらないように細胞外氷晶に対する障壁となるクラウン組織や芽鱗の外へ氷晶として析出させているものと示唆された。さらに、糖などの炭水化物や未同定の成分が細胞内に蓄積し、さらに部分脱水によって溶質濃度が高まることによって原基細胞内の水が過冷却を維持することに貢献するものと考えられた。冬芽の器官外凍結は、凍結感受性の高い原基細胞の凍結傷害を防ぐため、冬芽全体で水の凍結を制御する非常に特徴的な凍結適応機構と結論づけられた。

学位論文審査の要旨

主査	准教授	荒川圭太
副査	教授	佐野雄三
副査	客員教授	今井亮三
副査	講師	福士幸治

学位論文題名

樹木冬芽の越冬機構に関する研究

本論文は、4章からなり、図54、表4、引用文献113編からなる総頁113頁の和文論文である。この他に参考論文5編が添えられている。

寒冷地に生育する多くの樹木の冬芽は氷点下温度に対して器官外凍結を示す。器官外凍結は、冬芽を構成する各組織が協調して冬芽内部の特異的な空隙に氷晶を析出させるものであるが、その詳細な仕組みは不明であった。そこで本研究では、器官外凍結するカラマツ (*Larix kaempferi*) 冬芽を主たる材料に用い、冬芽を構成する組織や細胞の凍結挙動を電子顕微鏡法にて精査すると共に、細胞内の水の凍結制御に関わる物質の存在の有無を検証し、冬芽の凍結適応機構について解析した。

カラマツ冬芽は、枝条原基や葉原基を中心に、原基の基部に位置するクラウン組織や原基を覆う芽鱗などから構成されている。強制休眠期の厳冬期（2月）に採取したカラマツ冬芽は緩やかな冷却速度（5℃/day）で-30℃まで凍結しても生存率は低下しなかった。この時の冬芽の凍結挙動を低温走査型電子顕微鏡（cryo-SEM）で観察すると、芽鱗の間やクラウン組織下の空隙のみに氷晶がみられ、原基などの組織内部では細胞外氷晶は検出されなかった。氷晶に隣接する芽鱗やクラウン組織の細胞では細胞外凍結によって脱水収縮し、原基細胞では細胞内の水が一部脱水したが残存する水は過冷却していた。冬芽から摘出した原基を直に氷に触れさせて-30℃まで凍結すると、細胞内凍結や細胞外凍結によって生存率は20%まで低下した。カラマツ冬芽では、部分脱水すると共に深過冷却する原基は凍結傷害を受けやすいため、細胞外凍結する芽鱗間やクラウン組織下の空隙にて脱水された水を細胞外氷晶として析出することで原基を氷から隔離するものと考えられた。

また、この冬芽（強制休眠期）を-15℃まで凍結すると、原基細胞の細胞膜脂質は特徴的な相分離を起こしたが、自発休眠期（11月上旬）の原基細胞では細胞膜脂質の相分離は起きなかった。したがって、自発休眠期から強制休眠期へ移行すると、厳しい寒さの中でもすでに原基細胞に生理的変化が生じていたことが判明した。

次に、他の樹種で冬芽の凍結挙動を調べると、厳冬期のカツラ (*Cercidiphyllum*

japonicum) 冬芽はカラマツと同様に器官外凍結し、原基細胞は部分脱水すると共に深過冷却し、芽鱗の細胞は細胞外凍結していた。一方、シラカンバ (*Betula platyphylla*) やストロブマツ (*Pinus strobus*) の冬芽は組織内の細胞間に細胞外氷晶が析出し、原基を含む全ての細胞は細胞外凍結を示した。

さらに、器官外凍結するカラマツ冬芽において、原基細胞が部分脱水しながらも -30°C 以下まで深過冷却する分子機構を調べるため、過冷却に関与する物質の検出及び抽出を試みた。カラマツ冬芽 5 g 新鮮重量から得られる抽出物を 1 ml の蒸留水に溶解した濃度に相当するよう調製した試料 2 μl を $0.2^{\circ}\text{C}/\text{min}$ にて 4°C から -60°C まで冷却すると、蒸留水よりも試料の凍結温度が 4.6°C 低下したことで過冷却活性が検出された。そこで、この過冷却活性の原因物質を見出すため、有機溶媒に対する溶解度の違いによってメタノール粗抽出物を順次分画したところ、メタノール画分に過冷却活性を検出した。これをセファデックス LH-20 カラムで 3 つに分画したところ、画分 2 と 3 でそれぞれ 5.5°C 、 3.2°C の過冷却活性が検出された。この画分 2 の主成分を分析した結果、ピニトール、フルクトース、グルコース、スクロース、メリビオース、ラフィノースが含まれていることが判明した。この 6 種類の化合物をセファデックス画分 2 の濃度と等しくなるよう市販の試薬を用いて混合溶液を調製すると 2.4°C の過冷却活性を示したが、分画前の過冷却活性 (5.5°C) より低下したため、6 種類の主成分以外の物質が過冷却活性に寄与する可能性が考えられた。

本研究では、冬芽の凍結適応機構が樹種によって異なることが明らかになり、器官外凍結もしくは細胞外凍結という冬芽の凍結挙動の違いは原基細胞の凍結感受性を反映する可能性が考えられた。また、カラマツ冬芽の器官外凍結は、凍結挙動や凍結抵抗性の異なる組織が協調して水の凍結を制御することで凍結感受性の高い原基細胞の凍結傷害を防ぐという凍結適応機構であると結論づけられた。これらの研究成果は独創性があり、樹木冬芽の越冬機構に関する基礎的知見を提供するものとして学術上高く評価される。

よって、審査員一同は、遠藤圭太が博士 (農学) の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた。