

0-2. ハイブリッドアスペンの凍結抵抗性に関する研究

(北大院農) ○板羽貴史、砂留光利、(北大農) 上出奈央
(北大院農) 佐野雄三、藤川清三、荒川圭太

1. 緒言

北方に生育する樹木は、秋から冬にかけての日長の減少や、それに続く気温の低下に応答して凍結抵抗性を上昇させることが知られている。この低温順化の過程の中で、樹木内の構成成分に様々な生理的・構造的変化が生じ、その結果として、冬季の細胞は厳しい氷点下温度やそれにとまなう凍結、脱水などのストレスにも耐えられるようになる¹⁾。

ハイブリッドアスペンは形質転換のモデル樹種として用いられる木本植物のひとつである。ハイブリッドアスペンを用いて形質転換体を作成して低温誘導性遺伝子の機能評価を行うためには、実生そのものを使って凍結適応機構を明らかにする必要がある。そこで本研究は、モデル樹木の凍結適応機構を解明するため、ハイブリッドアスペン実生の低温順化处理による凍結抵抗性の変化とそれにとまなう組織構造変化を明らかにすることにした。

2. 材料と方法

【材料】

供試木には節間培養で増殖させたハイブリッドアスペン (*Populus tremula* × *P. alba*) を用いた。超純水に、1/2 濃度に減じたムラシゲ&スクーグ培地、20 mg/mL スクロース、0.2 mg/mL 2-メルホリノエタンスルホン酸 (MES)、6 mg/mL アガーを添加し、1N 水酸化ナトリウムで pH 5.8 に調節した培地を 200 mL の培養びんに約 40 mL の割合で入れて固化させたものを生育用培地とした。継代は、培養個体を腋芽を含む節間ごとに葉を 1 枚付けたまま切り分けたものを生育用培地に移植するという節間培養にておこなった。移植した個体は 23°C、16 時間日長に設定した人工気象器 (LHP-300-RDCT、NK system) で無菌的に生育させた。びん内の個体が 10 cm 程度に成長したのちバーミキュライトを敷きつめた培養びんに植え替え、約 2 週間後、バーミキュライトを入れたプラスチックポットに移した。その後、23°C、16 時間日長の長日条件下で生育させた。短日処理は 23°C の 8 時間日長で、低温処理は 4°C (昼) / 2°C (夜) の 8 時間日長の条件で行った。

【凍結抵抗性の測定】

茎は縦半分にしたのち、3 mm 程度に分割し、試験管に 3 片ずつ入れた。これに 100 μL の超純水を加えた後、-1°C に設定した液相プログラムフリーザー (F26、Julabo) に試験管をセットしてから約 10 分後に植氷し、さらに -1°C で 1 時間平衡化させた。続いて 2.4°C/h の冷却速度で温度を低下させ、目的の温度に達した時点でサンプリングを行った。なお、液体窒素で急速凍結した試料と凍結せずに 4°C にて処理した新鮮試料を用意し、それぞれ生存率を算出するためのコントロール (生存率 0% と 100%) とし、以後凍結融解する試料と同様に処理した。平衡凍結した試料を 4°C の暗所にて一晩おいて緩速融解した後、超純水を 1 mL ずつ加えてから減圧脱気して組織に水を浸潤させた。試料は遮光して 2 時間振とうした後、導電率計 (Twin Cold B-173、HORIBA) を用いて水溶液の電気伝導度を計測した。計測に使用した溶液を元の試験管に戻してから、試料を沸騰水中で 20 分間加熱処理した。冷却後、さらに 2 時間振とうし、再び溶液の電気伝導度を計測した。計測した 2 つの電気伝導度の値から、以下の要領で各温度での細胞の生存率を算出した。

$$\text{生存率 (\%)} = \left(1 - \frac{S-R}{L-R}\right) \times 100$$

S = 熱処理前の測定試料の電気伝導度 / 熱処理後の測定試料の電気伝導度
L = 熱処理前の液体窒素凍結試料の電気伝導度 / 熱処理後の液体窒素凍結試料の電気伝導度
R = 熱処理前の新鮮試料の電気伝導度 / 熱処理後の新鮮試料の電気伝導度

【光学顕微鏡による観察】

実生苗の茎の培土から上方1~3 cmの切片を切り出した。カミソリを使って5 mm長に切り、茎切片をグルタルアルデヒド5%溶液・リン酸バッファー (pH 7.2) 中に浸漬し、固定液中の試料を真空ポンプに接続したデシケーター内で減圧脱気した後、4°Cで24時間固定した。その後、100 mMリン酸バッファーで4回洗浄し、1%四酸化オスmium中に2時間浸漬して固定した。これを蒸留水で4回洗浄した後、エタノールシリーズ (30%エタノール×1回、50%エタノール×1回、70%エタノール×1回、99.5%エタノール×4回) により脱水を行った。次に、プロピレンオキサイド：エタノール=1：1溶液に30分、プロピレンオキサイドに1時間×3回置換し、プロピレンオキサイド：樹脂 (EPON812：MHA：DMP-30=52.5：46.7：0.8) =1：1溶液で2時間、プロピレンオキサイド：樹脂=1：3溶液で2時間、樹脂のみの溶液で24時間処理して切片に樹脂を浸透させた。包埋板に試料と樹脂を入れ、35°Cで24時間、45°Cで24時間、60°Cで72時間静置して重合させた。この樹脂包埋試料からガラスナイフを取り付けたウルトラミクロトーム (ULTRACUT) を用いて1 μm厚の切片を作成した。得られた切片を1%ゲンチアナバイオレットで5分間染色し、超純水を用いて十分に染色液をすすいだ後、切片をスライドガラス上に移して、バイオリイトで封入し、カバーガラスで覆って永久プレパラートを作成した。その後、光学顕微鏡にセットしたデジタル撮影装置を用いて観察した。

3. 結果と考察

【凍結抵抗性の変化】

本研究では、凍結抵抗性の指標として、試料の生存率が50%となる温度であるLT₅₀を用いた (図1)。長日条件で8週間育成させた、すなわち短日処理直前のハイブリッドアスペン実生では、茎のLT₅₀は-3.2°Cであった。これに8週間の短日処理を行うと-4.8°CまでLT₅₀が低下した。短日処理6週間の後に2週間の短日・低温処理をすると、短日処理を継続するよりもLT₅₀は低下し、-6.6°Cになった。以上の結果より、人為的な長期の短日処理ならびに短日低温処理によってハイブリッドアスペン実生の凍結抵抗性は向上した。

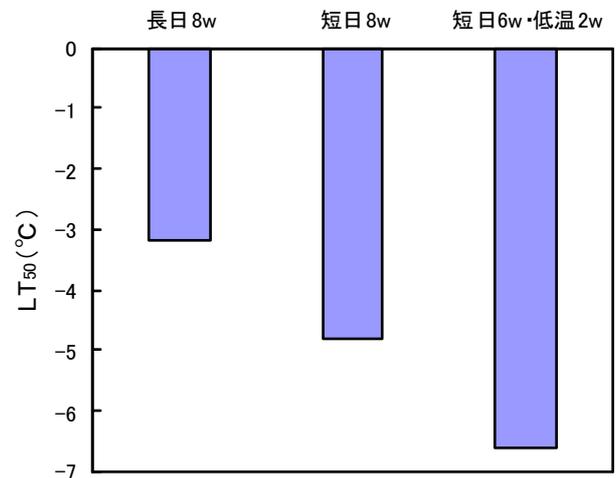


図1 短日・低温処理によるハイブリッドアスペン茎の凍結抵抗性の変化

【組織構造の変化】

バーミキュライトを入れたプラスチックポットに移した後、長日条件で10日間育成させたハイブリッドアスペン実生の茎を光学顕微鏡で観察すると、分化した師部、木部、髄や幅広い形成層帯があり、分化中の細胞も見られた (図2a)。

短日処理を4週間した実生では、まだ形成層帯は成熟中で分化が続いていたが、短日処理が6週間を過ぎたら形成層帯の幅は狭くなり、分裂や分化が止まっていた。短日処理が長くなるにつれて徐々に細胞の成熟が進み、短日処理が6週間のものでは形成層のすぐ隣の細胞まで細胞壁の肥厚が十分に進み、細胞内容物が豊富になっていた。短日処理を8週間したものでは形成層に隣接する細胞まで細胞壁の肥厚が進み、成熟が完了していた (図2b)。成熟が完了していた短日処理8週間のものを2週間低温処理すると、短日処理8週間のものと同様の構造が確認できた (図2c)。

今回、長日処理した実生の茎を光学顕微鏡で観察しても、木部放射柔細胞以外の細胞では細胞内容物はほとんど検出できなかったが、短日処理を行うことによって師部や髄の細胞で細胞内容物が多く見られるようになった。

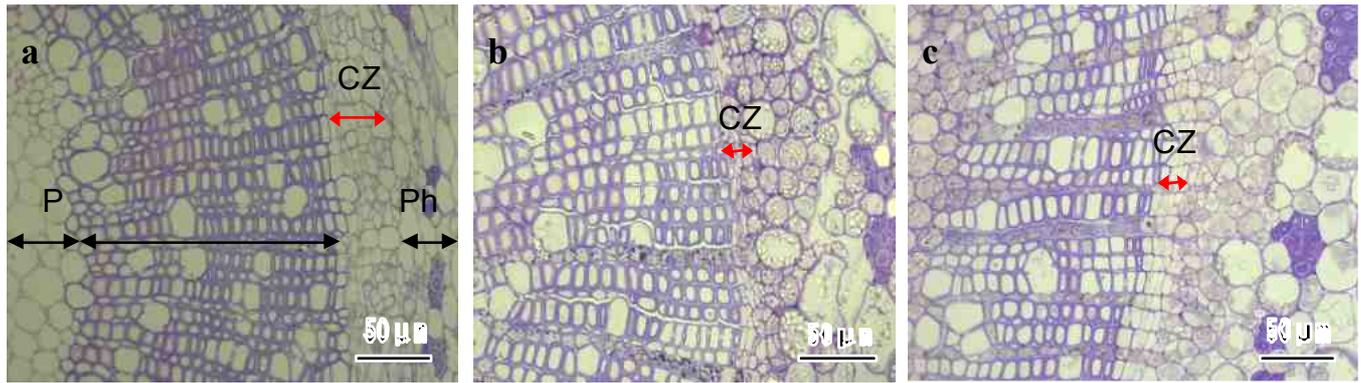


図 2 短日・低温処理による茎（木口面）の組織構造の変化. a: 処理前（長日 10 日間） b: 短日処理 8 週間 c: 短日処理 8 週間後、短日・低温処理 2 週間. P: 髄 Xy: 木部 CZ: 形成層帯 Ph: 師部

ゲンチアナバイオレット溶液 (GV) で染色した切片を光学顕微鏡で観察すると、短日処理 2 週間で髄の細胞内にプラスチドが確認できるようになった (データ示さず)。短日処理期間が長くなるにつれて検出できるプラスチドの数は増加し、短日処理 4 週間ではプラスチドの中心の色が少し抜けて見えるようになった。短日処理 8 週間ではプラスチド内部の大部分の色が白く抜けていた。このようにプラスチドの染色性が変化することは、細胞内にデンプンを蓄積することと関連性があると予想されたため、ヨウ素ヨウ化カリウム溶液で染色した実生茎切片（柾目面）についてその反応性をみると、短日処理 8 週間では髄や木部柔細胞、師部柔細胞がヨウ素デンプン反応によって黒く染まっていた (データ示さず)。このことから、実生では長期の短日処理で細胞内にデンプンが蓄積されたものと考えられた。さらに短日処理 8 週間の後続けて 2 週間の低温処理をおこなうと、GV 液にて再びプラスチドは染色されるようになったことから、短日低温処理によってデンプンが分解されたものと考えられた。これは、寒冷地の成木の季節的低温順化過程におけるデンプンの蓄積量や可溶性糖含量の変化と比較的よく対応したものであった^{2) 3) 4) 5)}。低温順化過程での可溶性糖の蓄積は凍結抵抗性の上昇に密接に関わることが知られているため、このモデル木本植物についても同様に凍結抵抗性（特に深過冷却）との関連は興味深い。

現在、形質転換ハイブリッドアスペンを用いた樹木の凍結適応機構解明の試みのひとつとして、野生の成木において冬季に含有量が増加する可溶性糖のひとつであるラフィノースを人為的に蓄積するハイブリッドアスペンを作出し、可溶性糖の蓄積と凍結抵抗性の関連性を調べているところである。今後もハイブリッドアスペン実生の凍結適応機構についてさらなる研究が必要である。

4. 参考文献

- 1) 酒井昭：植物の耐寒戦略（2003）北海道大学図書刊行会.
- 2) Sauter J.J.: Trees (1988) 2, 242-249.
- 3) Rinne P., Tuominen H., Junttila O.: Tree Physiology (1994) 14, 549-561.
- 4) Sauter J.J., Cleve B.: Trees (1994) 8, 297-304.
- 5) Sauter J.J., Wellenkamp S.: Holzforschung (1998) 52, 255-262.