

0-3. 異なる凍結挙動を示すカツラおよびシラカンバ冬芽の組織細胞

(北大院農) ○遠藤圭太、荒川圭太、藤川清三

【緒言】

冬季に厳しい凍結ストレスに曝される寒冷地に生育する樹木の冬芽は、樹種によって異なる凍結適応機構を有する¹⁾。多くの樹種の冬芽では、器官外凍結という冬芽のみで見られる特殊な機構によって氷点下温度に適応することが知られており、器官外凍結する冬芽が氷点下温度に曝されると冬芽内の特定の場所のみ氷が析出する。一方、いくつかの樹種の冬芽では、師部や形成層と同様に草本植物を含む植物の一般的な凍結適応機構である細胞外凍結によって氷点下温度に適応していることも知られている¹⁾。

これまで冬芽の凍結適応機構のほとんどは、示差熱分析という組織の凍結に起因する発熱を検出する手法を用いて調べられてきた²⁾。この手法では実験システム上、冷却速度は自然界で起こりえないような速さの設定であり、しかも組織全体での凍結挙動によって適応様式が判断されるため、必ずしも個々の細胞レベルでの凍結挙動の違いを反映するものではない。そのため、示差熱分析の結果からでは、多様な組織からなる冬芽の組織細胞が氷点下温度に対してどのように適応しているかは必ずしも明らかにできたとはいえない。また、器官外凍結する冬芽と細胞外凍結する冬芽において、組織の構造や凍結挙動について細胞レベルで観察し比較した例はなく、なぜ異なる凍結挙動を示すのかは明らかにされていない。

そこで本研究では、自然界で起こるような温度低下を再現して十分に緩やかに冷却した試料を観察することのできる低温走査型電子顕微鏡 (Cryo-SEM) を用いて、器官外凍結するカツラ冬芽と細胞外凍結するシラカンバ冬芽の凍結挙動を細胞レベルで観察し、それらの構造の違いや凍結挙動を比較した。

【材料と方法】

供試木

2010年2月、北海道大学北方生物圏フィールド科学センター札幌研究林に生育するカツラ (*Cercidiphyllum japonicum*) および、シラカンバ (*Betula platyphylla* var. *japonica*) 成木から1-3年生の枝を採取した。採取した枝は、乾燥を防ぐために雪と共にビニール袋に入れて-10°Cの冷凍庫で保存し、保存期間が6ヶ月以内の枝を実験に用いた。冷凍庫で保存した枝は、4°Cの冷蔵庫に移して1夜静置して融解してから実験に用いた。なお、実験には、枝の側方に形成される側芽を用いた。

緩速凍結処理

冬芽全体の凍結挙動を調べるため、カツラとシラカンバの枝を-30°Cまで緩速凍結 (冷却速度=5°C/day) によって凍結させて実体顕微鏡 (SMZ-2T, Nikon) にて観察した。冬芽のついた枝を-3°Cのフリーザー (MDF-192AT, SANYO) に移して1夜静置した後、-5°Cから-30°Cまで5°C/dayの冷却速度で緩速凍結した。-30°Cまで凍結した枝は、-30°Cのまま瞬時に液体窒素中に投入して急速凍結固定した。

冬芽の各組織の細胞の凍結挙動は、試料を-30°Cまで緩速凍結にて凍結させてからCryo-SEMで観察した。試料は、5mm程度の枝が付いた状態で切り出した冬芽 (冬芽の構成組織がすべて揃ったもの) と、実体顕微鏡の下で冬芽から摘出した花原基、リン片を用意した。冬芽全体の試料は、Cryo-SEM観察用の試料ホルダーに入れ、試料固定のために水でマウントした。また、冬芽から摘出した花原基やリン片は、試料と氷が直接接触した状態で凍結するように試料を水で覆った。ホルダーに入れた試料は-3°Cのフリーザーに移して温度平衡させた後、触氷して凍結させた。その後、-3°Cで1夜静置して-5°Cまで冷却した後、各温度まで5°C/dayにて緩速凍結した。各温度まで凍結した試料は、各温度から液体フロン (-164°C) にて急速凍結固定し、液体窒素中で保存した。緩速凍結処理を行

わかない室温のコントロール試料は、ホルダーに入った試料を室温から液体フロンで急速凍結固定することで調製し、使用するまで液体窒素中で保存した。

再結晶化処理による細胞内水分の有無の検証

-30℃まで凍結した冬芽の中の細胞内に凍りうる水が存在するか否かを確認するため、氷晶の再結晶化処理を行った後、Cryo-SEMにて細胞内の氷晶の状態を観察した。緩速凍結によって-30℃まで冷却した冬芽を液体窒素(-196℃)に浸漬させることで未凍結水を凍結させた後、-20℃のフリーザーに試料を移して1夜静置することで昇温して再結晶化を促した。その後、再度液体窒素に浸漬して急速凍結固定し保存した。

実体顕微鏡観察

緩速凍結処理にて-30℃まで凍結した試料は、氷点下温度を保つために-10℃の低温室で液体窒素中から取り出し、ナイフにて冬芽の断面を作成して実体顕微鏡で観察を行った。緩速凍結処理を行わないコントロール試料は、冷蔵庫で静置後、室温で断面を作成し観察を行った。

Cryo-SEM 観察

液体窒素中で保存した試料を-95℃のCryo-SEM (JSM-840A, JEOL) 試料作成室内のコールドステージに移した。およそ15分の温度平衡後、試料をコールドナイフで割断し直ちに白金-炭素にて試料割断面を蒸着した。蒸着した試料は、-164℃の観察用ステージに移し、加速電圧5kVで2次電子像を観察、写真撮影を行った。

【結果】

カツラ及び、シラカンバの冬芽の凍結挙動

緩速凍結 (冷却速度=5℃/day) によって-30℃まで凍結したカツラとシラカンバの冬芽の凍結挙動を、実体顕微鏡を用いて観察した。カツラの冬芽は、最外層に数層から成るリン片と、その内部の花原基と葉原基から構成されており、数層から成るリン片の間や、リン片と原基の間には空隙が観察された (データ示さず)。この冬芽を-30℃まで緩速凍結すると、細胞外の水が局所的に析出する典型的な器官外凍結の様相を呈した。カツラ冬芽の器官外凍結では、花原基を取り囲む数層からなるリン片の間のみ氷が析出し、リン片と原基の間やその他の場所では氷の析出は観察されなかった (Fig. 1)。

一方、シラカンバの冬芽は、最外層に数層から成るリン片とその内部の花原基と葉原基から構成されており、リン片間や花原基とリン片の間など、組織の間が粘性の高い物質で満たされている様子が観察された。この冬芽を-30℃まで緩速凍結すると、器官外凍結の典型となる局所的な氷の析出ではなく、冬芽の内部全体で細胞外氷晶が観察され、リン片の間や花原基に隣接して氷が存在していた。

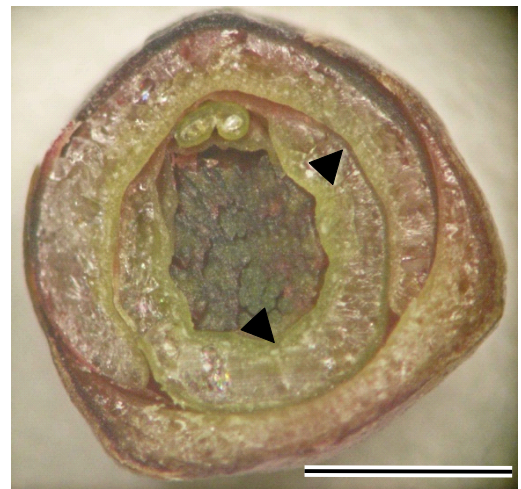


Fig. 1. カツラ冬芽の器官外凍結. -30℃までの凍結でリン片の間のみ氷が析出した. 矢頭: 氷. Bar=1 mm.

冬芽の組織細胞の凍結挙動

カツラ及びシラカンバ冬芽を緩速凍結処理によって-30℃まで凍結し、Cryo-SEMを用いて各組織の細胞の凍結挙動の観察を行った。凍結前のカツラ冬芽の花原基では、薄い細胞壁から成る細胞が組織内を密に占める様子が観察され (Fig. 2a)、リン片では、厚い細胞壁から成る細胞によって構成されている様子が観察された。また、カツラ冬芽の花原基及びリン片では組織内に細胞間隙は観察されず、細胞外で水は観察されなかった。コントロール試料のカツラ冬芽の花原基 (Fig. 2a) 及びリン片の細胞では、円形や楕円形の形をした細胞の割断面を観察すると、細胞

内には急速凍結固定によってできた微小な氷が見られたため、細胞内に水が多く含まれていたことが示された。

-30°Cまで緩速凍結したカツラ冬芽では、実体顕微鏡での観察同様にリン片の間のみで細胞外の氷の析出が観察され、花原基及びリン片の組織の中に氷は析出していなかった (Fig. 2b)。この器官外凍結したカツラ冬芽の組織細胞を細胞レベルで観察したところ、花原基の細胞は薄い細胞壁とともに収縮変形し、細胞内に氷晶が観察されないことから、凍結脱水していることが示唆された (Fig. 2b)。リン片の細胞でも、細胞内に氷晶は観察されず、凍結脱水して扁平上に収縮変形した様子が観察された。

シラカンバ冬芽は、花原基ではカツラ冬芽の花原基よりも若干厚い細胞壁が観察され (Fig. 3)、リン片では花原基よりも若干厚い細胞壁が観察された。また花原基の組織内では細胞間隙が見られ、円形の断面の細胞を観察すると、細胞内に水を多く含む様子が観察された (Fig. 3a)。またリン片でも、花原基同様に組織内では細胞間隙と円形の細胞の断面が観察され、細胞内に水を多く含む様子が観察された。

緩速凍結によって-30°Cまで凍結したシラカンバ冬芽では、花原基 (Fig. 3b) とリン片ともに組織の中で細胞外氷晶が析出していた。細胞外に氷が析出した花原基 (Fig. 3b) とリン片の細胞は、著しく収縮変形し細胞内氷晶は観察されないことから凍結脱水していることが示唆された。

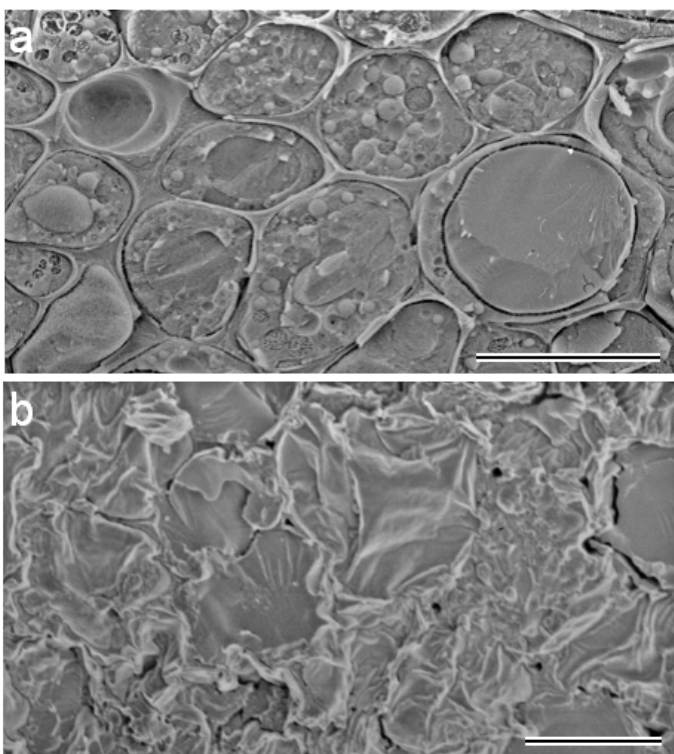


Fig. 2. カツラ冬芽の花原基の細胞の凍結挙動.
(a) コントロール試料の花原基の細胞.
(b) -30°Cまで凍結したカツラ冬芽の花原基の細胞. 凍結脱水により収縮変形した様子が観察された. Bars=10 μ m.

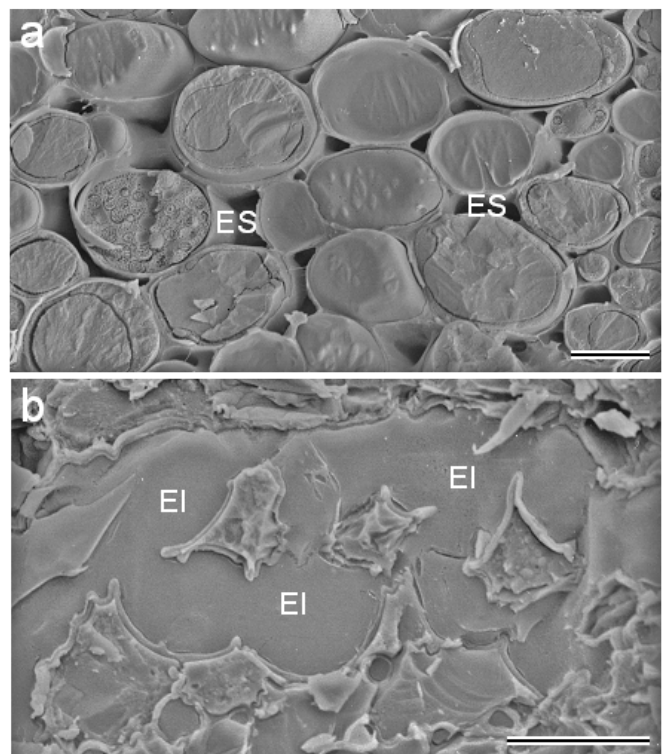


Fig. 3. シラカンバ冬芽の花原基の細胞の凍結挙動.
(a) コントロール試料の花原基の細胞. ES: 細胞間隙. (b) -30°Cまで凍結したシラカンバ冬芽の花原基の細胞. 凍結脱水により著しく収縮変形した細胞と細胞外に氷が観察された. EI: 細胞外氷晶. Bars=10 μ m.

細胞内水分の有無の検証による凍結挙動の予測

緩速凍結によって-30°Cまで凍結したカツラ及びシラカンバの冬芽では、細胞内に水が存在して過冷却しているのか、細胞は完全に脱水して細胞外凍結しているのかを調べるために、凍結後に再結晶化処理を行った試料をCryo-SEMにて観察した。再結晶化実験では、液体窒素への浸漬で試料を完全に凍結させた。この時、細胞内に凍りうる水が存在する場合には、急速凍結固定によって微小な氷となる。この液体窒素で凍結させた試料を-20°Cまで昇温すると、細胞内の氷は再結晶化して大きな氷晶となる。一方、細胞内の水が凍結脱水によって完全に脱水して凍りうる水が存在しない場合には、液体窒素に浸漬後に昇温しても細胞内に氷ができていないため、再結晶化処理の前後で細胞内の構造に大きな変化はないはずである。

そこで、再結晶化処理を行ったカツラ冬芽を調べると、花原基の細胞は再結晶化処理によって細胞内に大きな氷晶が形成された様子が見られた。一方、リン片の細胞では再結晶化処理後も細胞内に氷は形成されず、再結晶化処

理前と変わらない様子であった。これらの結果により、器官外凍結したカツラ冬芽において、花原基の組織細胞では-30℃まで凍結しても細胞内に凍りうる水を保持していたことから過冷却していることが示唆された。一方、リン片の細胞は凍結脱水によって細胞内の水が完全に脱水され細胞外凍結したことが示唆された。

また、-30℃までの凍結で器官外凍結を示さなかったシラカンバ冬芽では、花原基、リン片ともに再結晶化処理後も細胞内に氷は観察されないことから、全ての細胞が細胞外凍結していることが示唆された。

冬芽から抽出した各組織の細胞の凍結挙動

カツラ及び、シラカンバの冬芽から花原基、リン片を抽出して氷と直接接触した状態で凍結させた際の抽出組織の細胞の凍結挙動を Cryo-SEM を用いて観察した。器官外凍結するカツラ冬芽では、冬芽全体を凍結させた場合、リン片間にのみ氷が析出するため花原基は直接氷と触れることがない。このカツラ冬芽から花原基を抽出して氷と直接接触させて凍結したところ、-10℃までの凍結処理で細胞内凍結を起こしていた (Fig. 4)。一方、リン片では-30℃までの凍結でも細胞内凍結は起こらず、細胞外凍結している様子が観察された。

シラカンバの冬芽では、各組織を抽出して直接氷と触れた状態で凍結させても、花原基、リン片ともに細胞内凍結は起こらず、-30℃までの緩速凍結によって全ての細胞が細胞外凍結している様子が観察された (Fig. 5)。

【考察】

本実験では、器官外凍結するカツラ冬芽と細胞外凍結するシラカンバ冬芽を用い、氷点下温度における各組織細胞の凍結挙動を観察した。

器官外凍結するカツラ冬芽の組織では、同じく器官外凍結するカラマツ冬芽³⁾と同様に組織内に細胞間隙を持たないが、細胞外凍結するシラカンバ冬芽の組織では、細胞外凍結する師部や形成層と同様に組織内に細胞間隙を持っていた。この細胞間隙の存在は、細胞外凍結で氷を析出させる場所が細胞に隣接していることを示す。また、抽出した花原基を細胞外氷晶に隣接させて凍結すると、カツラ冬芽では細胞内凍結し、シラカンバ冬芽では細胞外凍結したことから、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、これらの組織細胞の細胞外氷晶に対する感受性、凍結脱水速度の違い、さらには細胞外氷晶を析出させるような細胞間隙の有無などが起因する可能性が考えられた。

【参考文献】

- (1) A. Sakai, W. Larcher; Frost Survival of Plants: Responses and Adaptation to Freezing Stress, Springer-Verlag, Berlin, 1987, pp. 1-304.
- (2) H.A. Quamme; Deep supercooling in buds of woody plants, in: R.E. Lee, G.J. Warren, L.V. Gusta (Eds.), Biological Ice Nucleation and Its Applications, APS Press, St. Paul, MN, 1995, pp. 183-199.
- (3) K. Endoh, J. Kasuga, K. Arakawa, T. Ito, S. Fujikawa, Cryo-scanning electron microscopic study on freezing behaviors of tissue cells in dormant buds of larch (*Larix kaempferi*), Cryobiology, 59, (2009), 214-222.

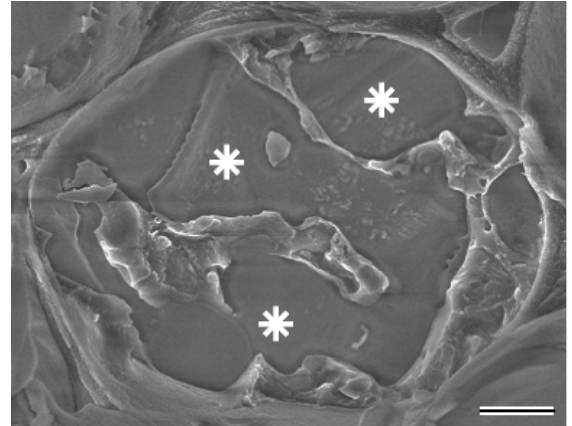


Fig. 4. カツラ冬芽から抽出して-10℃まで凍結した花原基の細胞。細胞内凍結した様子が観察された。*: 細胞内氷晶。Bar=1 μm.

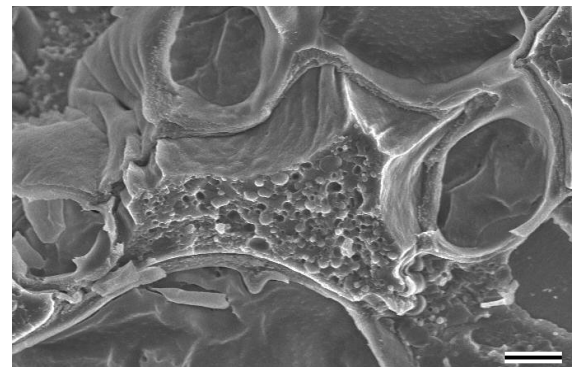


Fig. 5. シラカンバ冬芽から抽出して-30℃まで凍結した花原基の細胞。細胞外凍結した様子が観察された。Bar=1 μm.