樹木冬芽における有鱗芽と裸芽の凍結適応機構

（北大院農）○岡田香織、遠藤圭太、荒川圭太

1.　緒言

北方の樹木の冬芽は、冬季の間、厳しい寒さや凍結にさらされる。冬芽は枝葉や花の元となる原基組織を備えた、春以降の生長や生殖に関わる重要な器官である。細胞内の水分が凍結する（細胞内凍結）と、氷晶により細胞膜が損傷し、細胞は致死的な傷害を被るため、多くの樹種において原基組織を含む冬芽は器官外凍結という凍結適応機構を発達させている。これまで、冬芽の凍結適応機構に関する研究では主に実体顕微鏡や示差熱分析（DTA）といった手法が用いられてきた。器官外凍結する冬芽では、凍結が起こると鱗片や原基組織が脱水し、鱗片の間などの原基組織から離れた場所に氷が蓄積する様子が実体顕微鏡による観察で明らかになっている。また、DTA により凍結下の原基組織の細胞は過冷却していることが示唆されていた。しかし、これらの手法は冬芽を構成する各組織の細胞がどのような凍結挙動を示すかを明らかにするものではないため、冬芽の凍結適応機構の詳細は未だ明らかになっていない。そのため、当研究グループでは近年、低温走査型顕微鏡（Cryo-SEM）を用いて冬芽の凍結挙動を細胞レベルで明らかにすることを試みている。そこで本研究では、サラサドウダン（*Enkianthus campanulatus*）とエゴノキ（*Styrax japonica*）の広葉樹 2 種について Cryo-SEM を用いて冬芽の凍結適応機構を解析した。

2.　実験方法

2.1.　供試材料

北海道大学北方生物圏フィールド科学センター森林圏ステーション札幌研究林の実験苗畑に生育するエゴノキ（*Styrax japonicum*）、サラサドウダン（*Enkianthus campanulatus*）の成木から当年生枝を採取した。採取は 2012 年 12 月下旬から 2013 年 1 月上旬にかけて行い、採取した枝はポリ袋に入れて 4℃の冷蔵庫で一晩かけて融解後、実験に用いた。

2.2.　凍結抵抗性の測定

凍結抵抗性は電解質漏出法により求めた。ねじ口試験管に冬芽 1 つを蒸留水(500 µl)と共に入れ、-3℃に冷却しておいたフリーザーに移して 1 時間温度平衡させた。その後、植氷して凍結させ、一晩静置した。翌日-5℃に設定し、その後は 5℃/day の速度で冷却した。試料は-5、-10、-20、-30℃の各設定温度まで冷却した後、直ちに 4℃の冷蔵庫に入れ、遮光条件下で一晩かけて融解した。引き続き遮光条件下にて振とう機で 4 時間振とうした後、試験管内の水を分取して、溶液中に漏出した電解質量を導電率計で測定した。測定後、熱湯中で 10 分間加熱して冬芽を死滅させた後、1 時間振とうしてから再度電解質量を測定した。また、未凍結の試料と液体窒素による凍結融解した試料も同様の方法で電解質量を測定し、それぞれ生存率 100%と生存率 0%の指標とした。

なお、生存率は次式によって求めた。

生存率(%) ={1-(Z-X)/(Y-X)}×100

X=未凍結試料の電解質漏出量／未凍結試料の加熱後の電解質漏出量

Y=液体窒素による凍結融解試料の電解質漏出量／液体窒素による凍結融解試料の加熱後の電解質漏出量

Z=凍結試料の電解質漏出量／凍結試料の加熱後の電解質漏出量

2.3.　実体顕微鏡による凍結挙動の観察

室温観察時は、野外より採取した冬芽を 4℃の冷蔵庫に入れ一晩融解後、剃刀で割断し、実体顕微鏡下にて横断面と縦断面を観察した。凍結試料観察時は、野外より採取した冬芽を-3℃のフリーザーにいれ 1 時間静置した後、-5℃に設定して一晩静置した。その後 5℃/day の冷却速度で-30℃まで凍結した。-30℃まで凍結した枝は、フリーザーから取り出した後、直ちに液体窒素に浸けて急速凍結固定した。枝を-10℃の冷温室に持ち込み冬芽を剃刀で割断し、横断面を実体顕微鏡で観察した。

2.4.　低温走査型電子顕微鏡（Cryo-SEM）による凍結挙動の観察

2.4.1.　凍結試料の作成

野外より採取した冬芽を 4℃の冷蔵庫に入れ一晩融解後、室温にて Cryo-SEM 観察用の試料ホルダーに入れ、水でマウントした。ホルダーを-3℃のフリーザーに移し 1 時間温度平衡させた後、植氷して凍結させ、一晩静置した。翌日-5℃に設定し、その後は 5℃/day の速度で各設定温度まで凍結した。フリーザーから取り出した試料は直ちに液化フロン(-164℃)に浸漬し、急速凍結固定した。作成した試料は実験に使用するまで液体窒素中で保管した。

2.4.2.　再結晶化試料の作成（サラサドウダン冬芽）

サラサドウダン冬芽を上記(2. 4. 1.)の要領で調製し、-20℃まで 5℃/day の速度で凍結した試料をフリーザーから取り出し、直ちに液体窒素を用いて急速凍結固定した。この試料を再び-20℃のフリーザーに戻して一晩静置し、未凍結水の再結晶化を促した。その後、試料をフリーザーから取り出し、直ちに液化フロンを用いて急速凍結固定した。作成した試料は実験に使用するまで液体窒素中で保管した。

2.4.3.　Cryo-SEM による観察

液体窒素中で保管していた試料は、-100℃に設定した Cryo-SEM の凍結処理室内の冷却ステージに移し、試料をステージ上で 10 分間温度平衡させた後、凍結処理室内のコールドナイフを用いて試料を割断した。割断面を 70 秒間エッチングした後、白金 - パラジウムにより蒸着した。蒸着は 120 秒を連続 2 回行った。蒸着後、試料を-140℃の観察用ステージに移し、加速電圧 5.0 kv で二次電子像を観察した。

3.　結果と考察

3.1.　サラサドウダン冬芽の凍結適応機構

図 1 に電解質漏出法により測定したサラサドウダン冬芽の凍結抵抗性を示した。鱗片に包まれた完全な状態の冬芽では、-30℃まで凍結したときの生存率は約 60%であった。一方、原基のみを取り出すと -10℃までの凍結で生存率は約 35%まで低下した。このことから、サラサドウダン冬芽の葉原基は鱗片に内包された状態にあることで初めて十分な凍結抵抗性を得られることが示唆された。

-30℃まで緩速冷却した冬芽の横断面を実体顕微鏡で観察した結果を図 2 に示した。サラサドウダン冬芽の内部には中央に葉原基があり、それが 8~10 枚ほどの鱗片に包まれていた（図 2a）。-30℃まで凍結した冬芽では、鱗片の間に一様に氷の蓄積が見られた（図 2b）。

Cryo-SEM を用い、細胞の凍結挙動を観察したところ、鱗片組織に細胞外氷晶が認められたが、葉原基組織には細胞内外ともに氷晶は存在しなかった。鱗片、葉原基の細胞はどちらとも凍結による脱水に起因すると考えられる収縮変形を生じていたが、細胞内の水分が完全に脱水されているのか、過冷却しているのかはわからなかった。細胞内水分の状態を明らかにするために再結晶化処理を行ったところ、葉原基の細胞では再結晶化によって成長した氷晶が細胞内に認められたのに対し、鱗片細胞の内部には氷晶は認められなかった（データ未掲載）。したがって葉原基細胞は部分的な脱水を伴った過冷却によって、また鱗片細胞は細胞外凍結によって、それぞれ凍結に適応していたことが明らかになった。

器官外凍結による凍結適応機構を持つカラマツの冬芽において、同様の凍結挙動が明らかにされていることから、サラサドウダンの冬芽は器官外凍結によって凍結に対して適応していることが示唆された。

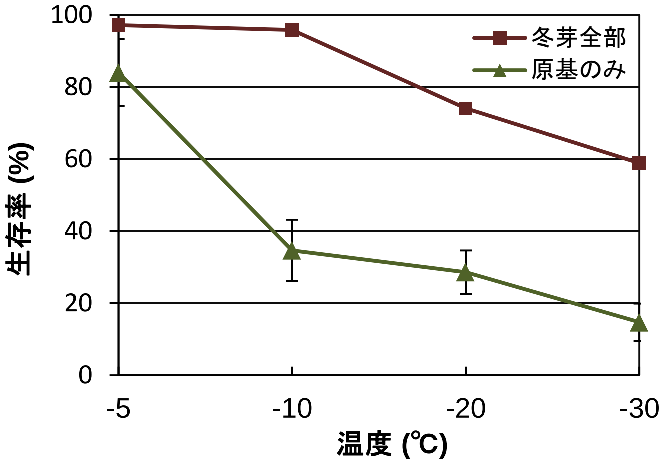

図 1. サラサドウダン冬芽の凍結抵抗性.

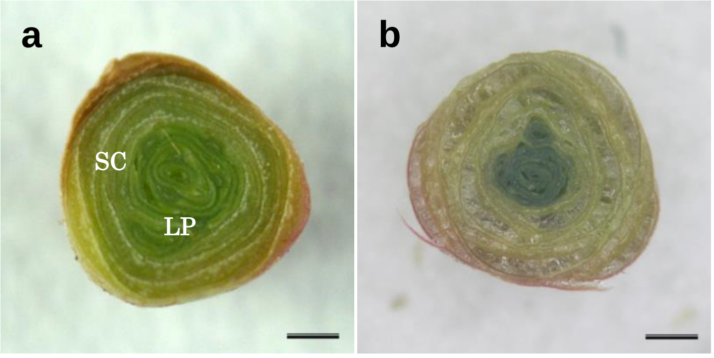

図 2. サラサドウダン冬芽の横断面を示す実体顕微鏡写真. a: 室温, b: -30℃まで凍結. SC: 鱗片, LP: 葉原基, Bars: 1 mm.

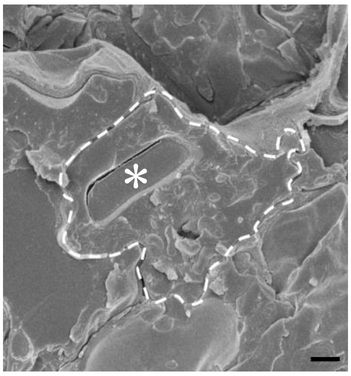

図 3. 再結晶化処理後のサラサドウダン冬芽の葉原基細胞の凍結挙動を示す Cryo-SEM 画像. *: 細胞内氷晶, 破線: 細胞の輪郭, Bar: 100 µm.

3.2.　エゴノキ冬芽の凍結適応機構

図 4 に電解質漏出法により測定したエゴノキ冬芽の凍結抵抗性を示した。-5℃まで凍結したところ、生存率は約 90%であったが、-10℃までの凍結で急激に低下し、約 50%となった。-30℃まで凍結すると生存率は約 20%であった。

-30℃まで緩速冷却した冬芽の横断面を実体顕微鏡で観察した結果を図 5 に示した。エゴノキの冬芽は鱗片を持たない裸芽であり、冬芽内部には表面に褐色の毛を持つ 3～4 枚の緑色の葉原基が認められた（図 5a）。葉原基には表面と裏面に褐色の毛が生えているため、結果として冬芽全体を褐色の毛が覆うような形になっている。-30℃まで凍結した冬芽では、葉原基中に氷の蓄積を確認することはできなかった(図 5b)。

Cryo-SEM を用いて細胞の凍結挙動を観察したところ、-5℃まで緩速凍結した冬芽内の組織にはどこにも氷の蓄積が認められなかった（データ未掲載）。-20℃まで凍結すると葉原基の内部に細胞外氷晶が析出しており(図 6)、氷晶の周囲の細胞は著しく扁平に収縮した様子が観察された。また、このとき細胞内凍結した細胞は認められなかった。したがって、エゴノキ冬芽の葉原基細胞は、凍結に対し過冷却ではなく、細胞外凍結による凍結適応機構を持つものと考えられた。一般に細胞外凍結を示す組織や細胞は高い凍結抵抗性を示すことが知られているが、エゴノキ冬芽では、-10℃までの凍結で生存率が約 50%まで低下し、かなり低い凍結抵抗性を示した。このような結果は、設定した冷却速度による人為的な要因によるものか、あるいは本来の冬芽の性質によるものかは不明である。そのためエゴノキ冬芽の凍結適応機構に関しては、今後さらに詳細な研究が必要と考えられる。

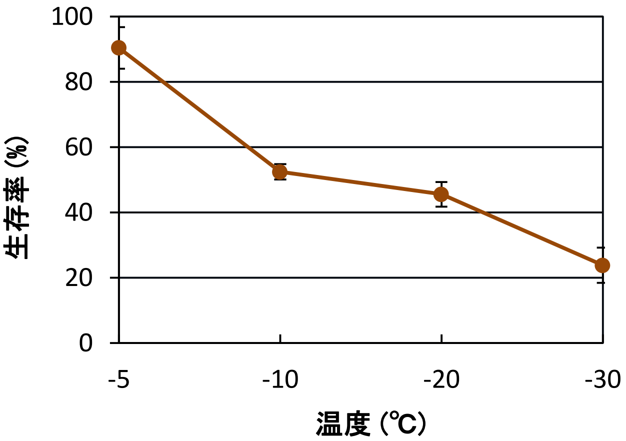

図 4. エゴノキ冬芽の凍結抵抗性.

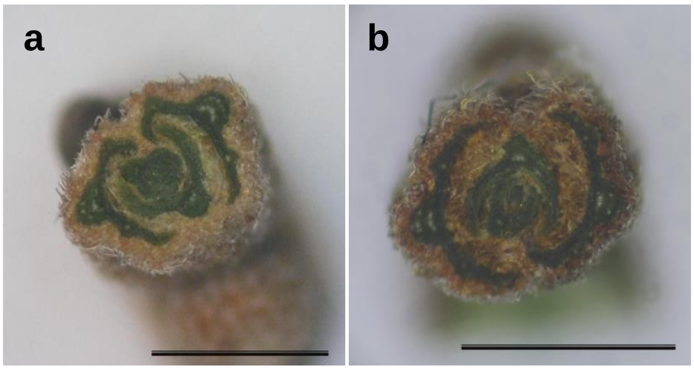

図 5. エゴノキ冬芽の横断面を示す実体顕微鏡写真.
a: 室温, b: -20℃まで凍結, Bars: 1 mm.

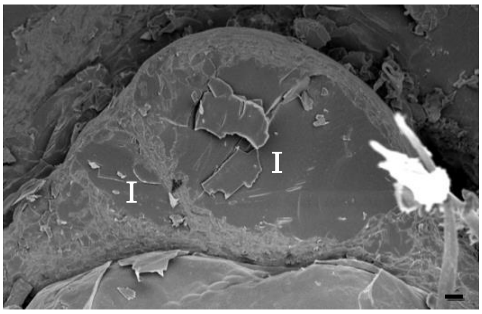

図 6. -20℃まで凍結したエゴノキ冬芽の葉原基組織の凍結挙動を示す Cryo-SEM 画像, I: 細胞外氷晶, Bar: 10 μm.