凍結に植物細胞はどのように適応するか

藤川清三*

植物体内の水の凍結は稀な現象ではない。地球上の陸地の半分以上の地域は冬季には氷点下の気温になり、植物体内の水は凍結するが、植物は凍結に適応する機構を発達させ、このような地域に広く分布し生育を続けている。これとともに、我々は自然界では氷点下の温度に適応できない植物組織を、人工的に液体窒素温度までも凍結し保存する技術をもつ。凍結という極限環境への植物の適応機構の解明は、植物の寒冷環境への適応進化の道筋を明らかにするという生物学的関心とともに、高緯度地域での植物生産性の向上のための技術革新、および凍結保存技術の向上などを含む、広く農学、医学、食品科学などの応用科学領域をカバーする重要な課題である。

ヒトをはじめとする哺乳動物などは一定の体温を維持する機構を備えているが、自己温度調節能力をもたない植物体の温度は、外気環境の影響を受け大きく変動する。植物の場合、低温、特に氷点下の温度への適応能力（凍結抵抗性）が重要であり、生育地の温度環境の違いに基づいて多様な性質を示す。この凍結抵抗性は、広義での低温順化の結果であり、熱帯起源の植物が徐々に凍結抵

抗性を獲得しながら寒冷地へと適応進化してきた過程で獲得されて来たであろう長時間スケールでの順化⁽¹⁾、温帯、寒帯などの中・高緯度地域に生育する多年生植物で年間を通してみられる季節的な順化、および数日から数週間という短期間の低温による順化を含む。

低温順化による凍結抵抗性の獲得は、遺伝子発現の変化⁽²⁾、RNAの増加⁽³⁾、糖の増加⁽⁴⁾、可溶性蛋白質の増加と変化⁽⁵⁾、細胞内浸透圧の変化、ホルモン・バランスの変化、膜特性の変化など、さまざまな細胞内変化を伴う。寒冷地の多年生植物は夏季にはほとんど耐凍性をもたないが、季節的順化の結果、冬季には液体窒素温度までの凍結にさえ耐え得るものが知られている⁽⁶⁾。低温順化の結果もたらされる細胞の変化がどのように、凍結による物理・化学的環境に耐え得る機構を作るのであろうか。一方、本来耐凍性をもたない、たとえば上述の夏季の多年生植物の組織細胞を我々はさまざまな人工的コントロールを施すことにより、液体窒素温度で凍結し保存する技術をもっている。この解説では、植物細胞が自然環境および人工的環境下の氷点下の温度で示す挙動の多様性を概説するとともに、一見異なって見える、自然環境と人工的環境での凍結に対する適応機構の共通性を述べる。

Mechanisms of Adaptation of Plant Cells to Freezing Environment

* Seizo FUJIKAWA, 北海道大学低温科学研究所

冷却速度の違いによって細胞はどのように凍結するか

凍結下での細胞の挙動

凍結下での細胞の挙動は、冷却速度および凍結温度により大きく変化する。図1は液体窒素温度まで凍結した細胞の冷却速度に依存した凍結様式を示す。この定性的な関係は動物、植物を問わずすべての細胞に共通する特徴である⁽⁷⁾。冷却により、まず細胞外の水分が氷点下数度で凍結を開始する。外液が凍結しても細胞の原形質膜は氷晶の侵入（植氷）を防止する障壁として機能するため、細胞内の水は凍結せず一時的に過冷却する。同じ温度では過冷却水は水に比べ蒸気圧が高いため、細胞内外に化学ポテンシャル差ができる。冷却速度が十分に遅い場合、細胞内の水分はこの化学ポテンシャル差を埋めるように細胞外へ脱水され、凍結する（図1-a）。冷却速度が緩慢に（平衡的に）温度低下が続くことにより脱水は続き、最終的に細胞内のほとんどの水分が脱水される。これを細胞外凍結という。冷却速度がやや速い非平衡的細胞外凍結（図1-b）では、冷却速度が遅い場合に比べ、細胞のサイズは若干大きい。これは、おそらく一部の水

が脱水されきらずに細胞内に留まるためと考えられ、凍結による細胞の生死を考えるうえで重要である。

冷却速度がさらに速くなると、細胞内の凍り得る水分が十分に脱水される前に温度が低下し、細胞内水分の過冷却度が増加する。そして、過度の過冷却が起こると、細胞は瞬時に細胞内凍結を起こす（図1-c）。冷却速度が増し温度が低くなるほど（過冷却度が増すほど）氷晶核の数が増え、逆に氷晶の成長速度は減少する。このため、氷晶のサイズは冷却速度の増加とともに徐々に小形化する（図1-d, e）。冷却速度が速く、過冷却度が水のガラス転移温度（ T_g ）を越えた場合、水は氷晶を形成せずに粘度を増しガラス化する（図1-f）。

凍結による障害

本来凍結耐性をまったくもたない動物細胞などでは、平衡的な凍結は著しい障害をもたらす。このような細胞でも冷却速度が速くなると、生存率は徐々に増加する。しかし、細胞内凍結の発生とともに生存率は急激に減少する。細胞内の水がガラス化するような冷却速度では、再び生存率は上昇する（図1）。これらの結果は、凍結障害をもたらす要因には冷却速度に依存した2つの要素があることを示している⁽⁸⁾。1つは冷却速度が遅く細胞外凍結が起こる場合に発生する害であり、もう1つは冷却速度が速く細胞内凍結が起こるときに発生する害である。細胞外凍結による害の主因は脱水であるが、脱水に付随する、有害な細胞内外の塩濃度の増加、pH変化、溶質の結晶化などの発生は、しばしば害の主因を見極めることを困難にする。これに対して、細胞内凍結による害は、細胞内氷晶形成による細胞構造の物理的損傷によると考えられる。細胞内凍結はすべての生物細胞に致死障害を与える。

図1で示した関係は、冷却速度に依存した細胞の、主に水分透過性の違いによりもたらされる現象である。このため、原形質膜の水分透過性、細胞のサイズの違いなどにより、細胞外凍結から細胞内凍結へ移行する臨界冷却速度は大きく異なる。たとえば、ヒト赤血球では細胞内凍結を起こす臨界冷却速度は1000°C/分以上であるのに、植物細胞の多くは1°C/分以下である⁽⁹⁾。植物細胞では低温順化の有無によってもこの値は異なり、一般に低温順化後は順化前に比べ、速い冷却速度でも細胞内凍結を起こし難い⁽¹⁰⁾。しかし、植物プロトプラストを用いた実験では、順化前後でこの臨界冷却速度の変化はなく、順化後には過冷却が破れ細胞内凍結が起こる温度が低下するだけであるという報告もある⁽¹¹⁾。これらの結果は、植物細胞の低温順化の前後の凍結挙動の違いに細胞壁が関与している可能性を示唆しており、今後、低温順化が

図1 ■ 冷却速度に依存した細胞の凍結挙動

室温から液体窒素まで冷却した場合、 T_m 、 T_h 、 T_r 、 T_g はそれぞれ水の融解温度、均質核形成温度、脱ガラス化温度、ガラス化温度を示す。細胞内凍結は、植氷、不均質核形成、均質核形成のいずれかにより起こる。

細胞壁に及ぼす役割の検討が必要である。

細胞の凍結保存

多くの生物細胞では、細胞外凍結による害を免れるのに十分な冷却速度は、細胞内凍結を免れるためには速すぎる。このオーバーラップのため、多くの細胞は冷却速度の調節だけでは凍結保存はできない。図 1-b で示す生存に最適な冷却速度を用いる緩速凍結保存法では、予め細胞および組織を細胞内に浸透する低濃度のグリセリン、DMSO (ジメチルスルホキシド)、エチレングリコールなどの凍害防止剤で処理する。凍害防止剤として用いられる化学試薬は、共通した特徴として水酸基を多くもち、凍結下で水の代役をつとめることにより脱水の影響を軽減し、最適生存領域を広げる効果をもつ。植物組織細胞の緩速凍結保存に広く用いられる凍結条件は、20 % 前後の DMSO などを含め細胞内に浸透させ、これを 0.1°C/分前後の冷却速度で -30°C 以下まで凍結後、液体窒素に投入するというものである。この場合も、冷却速度が遅すぎると過度の脱水により害が起こり、速すぎると細胞内凍結により害が起こる。

緩速凍結保存法に加え、最近、高濃度のガラス化しやすい凍害防止剤で細胞内水分を置換し、これを凍結することにより、細胞内外に氷晶をまったく作らず保存するガラス化法が広く用いられている^(12,13)。純水をガラス化するためには、直径 1 μm の水滴を -145°C まで過冷却する必要がある、実用的に困難である。しかし、高濃度の凍害防止剤で置換した試料は、 T_g の上昇により液体窒素に投入することによりガラス化が可能であり、高い生存率が得られる。

植物細胞は自然環境下でどのように凍結するか

自然界での温度低下 (冷却速度) は十分遅く、これにより多くの植物細胞は細胞外凍結を起こすことにより氷点下の温度に適応する。しかし、多様な植物細胞の中にはその構造特性により、自然環境下での温度低下によっても、過冷却またはガラス化により氷点下の温度に適応するものがみられる。

耐凍性

細胞外凍結により氷点下の温度に適応する植物の凍結抵抗性を耐凍性と呼ぶ。耐凍性は、平衡的凍結により何度の凍結温度まで耐えるかにより表わされる。しばしば 50 % の細胞が障害を受ける温度 (LT_{50}) がこれに用いられる。細胞外凍結での適応には、氷点下数度の凍結にしか耐えられない植物細胞がある一方、高い脱水耐性を獲得し液体窒素温度の凍結にさえ耐え得るものまで幅広く

存在する⁽⁶⁾。植物細胞が凍結下で被る脱水量は、

$$\frac{273 - T}{1.86}$$

により近似的に求められる浸透圧値に等しい。この値は同一凍結温度では一定であり、もともと含水率の低い細胞ほど同一凍結温度での脱水量が少ないことを意味する。細胞外凍結により氷点下の温度に適応する植物細胞は、低温順化に伴い含水率を低下させるとともに凍結下での水分透過性をも高め、積極的に脱水を起こす機構を発達させ、致死的な細胞内凍結を回避しているようである。耐凍性は同一植物種でも生育地の温度により大きく変化するが、低温順化により種固有の耐凍度が回復される遺伝的に固定された形質である⁽⁶⁾。

植物細胞には、細胞外氷晶ができてこれに影響されずに、凍結の影響を回避し、氷点下の温度に適応するものがある。耐凍性をもたない植物の最も簡単な氷点下の温度への適応は、氷点降下による凍結回避である。氷点降下はまた過冷却度を増進させる効果をもつ。不凍蛋白質の存在も、生体内の水の氷点をわずかに数度下げることにより、氷点下の環境での生物の適応を可能にする機構である⁽¹⁴⁾。

過冷却

過冷却は最も重要な凍結回避機構である。過冷却による冬越しは、寒冷地に分布する木本植物の冬芽⁽⁶⁾、一部の木本植物の葉⁽¹⁵⁾、ササの細胞などでみられる⁽¹⁵⁾。過冷却による適応の最も顕著な例は、樹木の木部放射柔細胞でみられる。温帯以北に生育する樹木の木部放射柔細胞には水の均質核形成温度 (T_h) である -40°C 付近まで深過冷却するものがある⁽¹⁶⁾。これらの細胞内水分の融点はせいぜい -2 ~ -3°C であり、過冷却は氷点降下の結果ではない。溶質の種類により若干の違いはあるが、水溶液の過冷却度は融点降下温度の 2 倍程度である。初期の研究では、過冷却をする放射柔細胞をもつ樹木は、寒冷地に生育する数少ない特殊な樹木に限られると考えられていた。しかし、現在では深過冷却はほとんどの樹木の木部放射柔細胞でみられる一般的な低温適応機構であることが明らかになっている。細胞間隙に氷晶が成長できる十分なスペースをもたず、しかも堅牢な細胞壁をもつ樹木の木部放射柔細胞が独特に発達させてきた氷点下の温度に対する適応機構と考えられる。

この過冷却能は、熱帯産の樹木の木部放射柔細胞にさえみられ、温暖地では季節を通してその過冷却限度は変わらず -20°C 前後であるが、寒冷地では季節的に変化し、夏には -20°C 付近、冬には -40°C 付近まで増加する。細胞外氷晶による植水と脱水の影響を防止することで得ら

図 2 ■細胞内凍結がひき起こす原形質膜の構造変化⁽²⁶⁾

ハクウンボク木部放射柔細胞。a:凍結下(−50°C)での構造。深過冷却の破れにより形成された細胞内氷晶(I)による原形質膜(PM)の損傷を示す。b:aの凍結細胞を−3°C付近まで融解したときの構造。c:凍結細胞をさらに室温まで融解後、0°Cまで再冷却したときの構造。温度依存の膜内粒子の欠如部位(矢印)が作られる。棒線はいずれも200 nm。

れる過冷却特性は、原形質膜ではなく細胞壁の性質による⁽¹⁷⁾。樹木の木部放射柔細胞は、長時間スケールでの低温順化の結果、細胞外氷晶の影響を極力回避する細胞壁を発達させることにより氷点下の温度に適応してきたといえる。このような細胞は、過冷却の限度以下の低温($< T_h$)にさらすと細胞内凍結により障害を起こす(図2参照)。このため、過冷却により冬越しをする木部放射柔細胞をもつ樹木の分布は、年間の最低気温が−40°C(水の T_h)を記録したことのない地域に限られている⁽¹⁶⁾。

年間の最低気温が−40°C以下になる高緯度地帯には、木部構造が過冷却をする樹木のそれと変わらないにもかかわらず、細胞外凍結により氷点下の温度に適応する木部放射柔細胞をもつ樹種が分布するようになる⁽¹⁶⁾。興味あることは、このように冬季に細胞外凍結により氷点下の温度に適応する柔細胞も、気温の高い夏季には細胞

外凍結を起こす能力を失い過冷却する点である⁽¹⁸⁾。これは、長時間スケールでの低温への適応進化の名残と考えられる。さらに、寒冷地に生育する樹木の木部放射柔細胞には、過冷却から細胞外凍結へと移行する過程を示すと考えられるさまざまな低温挙動をとるものがみられる⁽¹⁹⁾。筆者らは、熱帯から寒帯まで分布する広葉樹について、温度に依存した木部放射柔細胞の低温挙動の変遷について、植物細胞の寒冷環境への適応進化の興味深い一つのモデルとして調査を開始している。

ガラス化

乾燥に耐える植物の種子では、細胞内の水は温度が下がっても氷晶を作らずガラス化する⁽²⁰⁾。このような種子の水分は細胞質内で束縛された状態にあり、プラス温度でも水はガラス化している可能性が報告されている⁽²¹⁾。

凍結による細胞障害はどのように発生するか

細胞外凍結および細胞内凍結ともに、凍結障害の最初の兆候は、細胞内に存在する溶質、低・高分子の生体物質が融解直後に細胞外に流出する現象である。このため、凍結障害の原初部位は細胞を外界から仕切る原形質膜であることは疑いない⁽¹¹⁾。細胞内凍結による害は、一部の考えを除き⁽¹¹⁾、氷晶が物理的に原形質膜を壊すことにより発生すると考えられている。これに対して、細胞外凍結による害の原因については多くの仮説が出されている。塩害説は凍結濃縮した塩の毒性により⁽²²⁾、ミニマム・ボリューム説は脱水によりある極限を越えて細胞が収縮することによる機械的ストレスにより⁽²³⁾、機械的破壊説は細胞外氷晶の機械的ストレスで細胞が変形することにより⁽²⁴⁾、SH 仮説は蛋白質の変性により⁽¹⁰⁾、いずれも原形質膜が壊されて障害が発生すると考えている。しかしこれらの仮説は、いずれも膜がどのように壊されるかの説明には至っていない。

凍結適応のメカニズムを明らかにする一つのアプローチとして、原形質膜に起こる凍結障害の実体を電子顕微鏡で可視的に把握することにより、低温順化に伴って起こる変化、および凍結保存処理がどのようにこの障害を防止するかを見極める方法がある。特に、フリーズ・レ

プリカ電子顕微鏡法は、凍結下の細胞構造をアーティファクトのない、あるがままの姿で表わし、しかも他の電子顕微鏡法では表わし得ない、膜の内部の分子構造を示す点で有力な方法である⁽²⁵⁾。

細胞内凍結による障害

深過冷却の破れにより細胞内凍結を起こした樹木の木部放射柔細胞のフリーズ・レプリカによる観察は、予測されたように凍結下では細胞内氷晶により膜の物理的損傷が起こることを示した(図 2-a)。さらに、細胞内凍結した細胞では、融解中に氷晶により壊された細胞器官の膜と原形質膜の融合が見られ(図 2-b)、融解後に原形質膜は小胞化し細胞は完全に破壊された。さらに、融解後の原形質膜断片には、凍結前には見られなかった、温度依存の脂質の相分離現象が起こる(図 2-c)。これらの結果は、細胞内凍結は原形質膜に物理的損傷を与えるのみならず、連鎖的にさまざまな構造変化をもたらし、致死的な細胞障害に導くことを示している⁽²⁶⁾。同様の結果は、細胞内凍結した動物細胞についても得られている⁽²⁷⁾。

細胞外凍結による障害

フリーズ・レプリカによるヒト赤血球の研究により、細胞外凍結による障害発生と原形質膜の微細構造変化との間に重要な関係があることが示された⁽²⁸⁾。植物細胞に

図 3 ■ 細胞外凍結が引き起こす原形質膜の構造変化⁽³⁸⁾

クワノキ皮層柔細胞。a：原形質膜 (PM) と細胞器官の膜の異常接近により作られたフラクチャー・ジャンプ (矢印)。両膜ともに異常接近部位には膜内粒子の欠如が見られる。b：同じく異常接近による H_{II} 相の形成を示す。棒線はいずれも 200 nm。

についてもライ麦の葉から作られたプロトプラストについてフリーズ・レプリカ法で、細胞外凍結による障害が原形質膜の構造変化と関連して発生することが、1984年にSteponkusのグループにより最初に示された⁽²⁹⁾。耐凍性の低い低温順化前のプロトプラストは -10°C 前後の平衡凍結により、原形質膜破断面に膜内蛋白質粒子の欠如部位、脂質二重層がシリンダー状の逆ミセル構造となるヘキサゴナル H_{II} 相(H_{II})への転移、およびこれらの構造の直下にラメラ構造を形成することが認められた(図3-

b参照)。引き続き1985年にPearceら⁽³⁰⁾は、冬小麦の葉を用い、細胞外凍結による膜内粒子の欠如部位の形成と障害発生が関連することを示した(図3-a参照)。これらの結果はいずれも、凍結脱水による脂質二重層の液晶-ゲル相の転移温度の上昇、および液晶- H_{II} 相の転移温度の低下を反映する現象として捕らえられた。凍結脱水により、本来高温部で発生する H_{II} 相への転移が凍結下で発生し、逆に液晶-ゲル相への転移温度が上昇した結果として膜内粒子の凝集が起こったと当初考えられていた。

図4 ■フラクチャー・ジャンプ部位において融解過程で見られる構造⁽³⁷⁾

クワノキ皮層柔細胞。a:凍結下(-20°C)で見られるフラクチャー・ジャンプ(矢印)。b:aの状態から、 -3°C 付近まで融解したときのフラクチャー・ジャンプ部位の構造、脂質粒子状構造(1)、線上構造(2)、内容物をもった線上構造(3)が見られる。c:bの状態が原形質膜(PM)と細胞器官膜(EM)の融合状態であることを示す。d: 0°C まで融解したときの構造変化。棒線はいずれも200 nm。

膜相互作用による障害

1986⁽³¹⁾, 1987 年⁽³²⁾ に筆者らは、種々の食用キノコについて、フリーズ・レプリカ法により、細胞外凍結による障害の発生と原形質膜微細構造変化との関係を広範に調べ、凍結による原形質膜構造変化の発生と、原形質膜の破壊の結果、細胞外に流出するイオン量で表わした障害発生率との間に密接な関係があることを示した。障害と関連した原形質膜の構造変化は、膜内粒子の欠如部位の形成であった。H_{II} 相への転移はこの材料の原形質膜では発生しなかったが、液泡、ER (小胞体) などの膜には顕著に発生した。この研究で筆者らは、膜内粒子の欠如部位の形成は単なる温度低下による脂質の相転移の結果ではないこと、さらに脱水と温度低下の相互作用の結果でもないことを、高浸透圧溶液での脱水処理と過冷却の組み合わせにより証明した。この研究で、膜内粒子の欠如部位は、凍結脱水による細胞の変形収縮により、2 つ以上の膜が異常接近した部位に限られて作られることが初めて明らかになった。その後 1989 年の総説で⁽³³⁾ Steponkus らも、ライ麦で見られた H_{II} 相を含む構造変化が膜どうしの異常接近した部分にのみ形成される膜相互作用の結果であることを確認した。

異常接近により起こる膜相互作用による構造変化がどのように障害をもたらすのであろうか。H_{II} 相の形成は脂質二重層のもつ半透膜としての機能の喪失という観点から容易に障害の原因と考えられる⁽³⁴⁾。これに対して、膜内粒子の欠如がどのように障害に結びつくかの理由は定かでなかった。ライ麦をはじめ多くの高等植物の原形質膜脂質の液晶-ゲル相の転移温度 (T_m) は凍結障害が発生する温度よりはるかに低い。この問題を解明するため、筆者と Steponkus のグループは⁽³⁵⁾ 膜内粒子の欠如部位で原形質膜の凍結破断面が、これと異常接近した細胞内膜へと局所的に逸脱する現象、いわゆる“フラクチャー・ジャンプ”が頻繁に起こる点に着目した。この現象が一般的な凍結破断面の偶発的な逸脱と異なるのは、逸脱した破断面が乗り移る細胞内膜もまた膜内粒子を欠いている点である (図 3-a, 図 4-a 参照)。

フラクチャー・ジャンプ自体は障害ではない、原形質膜の何らかの障害の発生がフラクチャー・ジャンプをもたらすと考えられる。当初筆者らは、これを異常接近による膜脂質が他方の脂質層に炭化水素鎖を侵入させたインター・ディグレーションを反映するという可能性としてとらえた⁽³⁶⁾。しかし、先に述べたように凍結障害 (フラクチャー・ジャンプ) の起こる温度で脂質は液晶相であり、ゲル相の脂質でしか起こらないインター・ディグレーションの可能性はない。フラクチャー・ジャンプ発生

部位の原形質膜の構造変化を調べるために、凍結によりフラクチャー・ジャンプを形成した細胞を部分的に融解して、その構造を調べた⁽³⁷⁾。これは、凍結下で脱水により全体的に収縮してしまっている細胞を部分的に融解・覆水し、ジャンプが起こる領域を少なくすることにより、その部位で起こっている決定的な構造変化を捕らえようという試みである (図 4)。部分的融解の結果、フラクチャー・ジャンプ (図 4-a) に一致する膜内粒子の欠如部位には、脂質粒子状構造、これらが数個繋がった線状構造体、および破断面に内容物をもつ線状構造が現われた (図 4-b)。破断面に内容物をもった線状構造は明らかに、原形質膜と細胞内膜の融合部位である (図 4-c)。さらに融解することにより、これらの部位から発生した変化は膜全体に広がり、膜の小胞化により細胞破壊が起こる (図 4-d)。この結果は、凍結がもたらす膜の異常接近が非生理的な膜融合を起こし、膜全体が不安定化した結果、障害をもたらすと解釈された⁽³⁷⁾。

膜構造変化の分子機構

異常接近により起こる膜の構造変化の分子機構は、モデル膜を用いて行なわれた実験と照らし合わせることでより以下のように考えられている⁽³⁴⁾。脂質および蛋白質からなる膜どうしは、膜表面の水和斥力のため、一定距離以上の接近を起こさない。凍結脱水により膜どうしが異常接近をすると、水和依存の斥力が分子間に働く。これにより、膜表面で最も水和度の高い蛋白質がまず脂質と相分離を起こす。これがフリーズ・レプリカで見られる膜内粒子の凝集として観察される。さらに脱水が進むことにより、膜内粒子の欠如部位の脂質もまた、その極性基の水和度の違いに基づき相分離を起こす。

脂質二重層どうしの接近は、接近した脂質単層に横方向の圧縮力をもたらし膜を不安定化させる (図 5-a)。これにより、接近した脂質膜間に逆ミセル中間構造体が作られる (図 5-b)。これがフリーズ・レプリカで見られる脂質粒子状構造 (図 4-b) と考えられる。脱水量、温度、脂質の種類などに応じて、逆ミセル中間体は H_{II} 相を形成するか (図 5-c)、ラメラ相互結合を通して膜融合を起こす (図 5-d)。ラメラ相互結合は逆ミセル中間体が線上に並び最終的に融合をもたらす過程であり、融解中のフラクチャー・ジャンプ領域で見られた、線状構造および線上の融合部 (図 4-b) がこれに一致すると考えられる。

その後のフリーズ・レプリカによる植物細胞の凍結下での微細構造に関する研究により、クワノキ⁽³⁸⁾、ニセアカシア、ハルニレ、ポプラ、ヤマナラシ、ライラックなどの樹木の皮層柔細胞、キクイモ根茎、キバナノアマナ葉、オーチャードグラス葉、オート麦葉⁽³⁹⁾、アラビドプ

シス葉⁽⁴⁰⁾の組織細胞およびプロトプラストなど、調べられたすべての植物細胞で、膜の異常接近による、 H_{II} 相またはフラクチャー・ジャンプの形成という、原形質膜の微細構造変化の発生と凍結障害の発生が密接に関連することが明らかになっている。クワノキの皮層柔細胞で見られるように、低温順化の過程はまさに、原形質膜が異

常接近による微細構造変化を免れる過程と一致する (図 6-a)。

低温順化のみならず、浸透性の凍害防止剤であるエチレングリコール⁽⁴¹⁾、または DMSO 処理したライ麦のプロトプラスト、および長時間の培養により細胞内にグルコースを取り込ませたアスパラガス茎頂細胞⁽⁴²⁾においても、耐凍性の増加は、凍結による膜の異常接近の軽減と関連する (図 6-b)。さらに、短時間の処理により、細胞外にのみグルコースが存在する場合、キャベツ葉の耐凍性は増大するが、この場合も耐凍性の増大は異常接近によりもたらされる原形質膜の微細構造変化の防止効果と一致する⁽⁴³⁾ (図 6-c)。

図 5 ■ 膜の異常接近による H_{II} 相および膜融合の形成を示す模式図⁽³⁴⁾

Z : ラメラ相/ H_{II} 相の脂質極性基の表面積の割合, T_{bh} : ラメラ相から H_{II} 相への転移温度

凍結障害を防御する機構

凍結障害の主因を膜の異常接近によりもたらされる原形質膜の微細構造変化の発生として捕らえたとき、障害の防御は異常接近を防止する機構の構築によると考えられる。低温順化の結果発生するさまざまな変化の幾つか、および凍害防止剤処理はいずれも膜の異常接近を防止する働きにより凍害を防御すると解釈できる。低温順化により原形質膜自体の構造変化が起こることにより直接的に、あるいは細胞質内外の変化が起こることにより間接的に、原形質膜の異常接近が防御される可能性がある。

低温順化

Steponkus ら⁽⁴⁴⁾ は、低温順化の結果、ライ麦、オート麦、アラビドプシス葉の組織細胞、あるいはこれらのブ

図 6 ■ 凍結障害の発生と膜の異常接近による原形質膜の構造変化の発生との関係

a: クワノキ皮層柔細胞。○, □, ◇: それぞれ夏, 秋, 冬の凍結障害の発生率, ●, ■, ◆: それぞれ夏, 秋, 冬の原形質膜の構造変化の発生率⁽³⁸⁾。
b: アスパラガス茎頂。○: 未処理, □: 0.5 M グルコースを細胞内に取り込ませた試料の凍結障害の発生率, ●: 未処理, ■: 0.5 M グルコースを細胞内に取り込ませた試料の原形質膜の構造変化の発生率⁽⁴²⁾。
c: キャベツ葉。○: 未処理, □: 1 M グルコースが細胞外にのみある試料の凍結障害の発生率, ●: 未処理, ■: 1 M グルコースが細胞外にのみある試料の原形質膜の構造変化の発生率⁽⁴³⁾。

ロトプラストで見られる数度から10数度の耐凍性の増加の主因は、低温順化に伴い原形質膜に水和度の高いホスファチジルコリン(PC)などのリン脂質が増加し、逆に水和度の低いステロール、セレブロシドなどの脂質が減少することによって考えている。浸透圧-10 MPaでは、PC、ホスファチジルエタノールアミン(PE)、ステロール、ステリルグルコシド、セレブロシドが担う水の量(重量%)はそれぞれ約19, 14, 6, 5, 1と見積もられている。これは、水/脂質のモル比ではそれぞれ10.6, 6.5, 1.5, 1.7, 1になる。リン脂質では、水和度の違いは極性基と結合する水分子のモル数(水モル/脂質モル)に反映し、PCでは10~12モルであるのに対して、PEでは7モルであると計算されている。膜表面の水和度の増加は、一定の凍結温度では膜どうしの接近の度合いを軽減し、ひいては異常接近をもたらす温度を低下させる可能性をもつと考えられる。

低温順化の結果、原形質膜には膜の流動性の上昇、原形質膜の脂質クラスおよび分子種の変化、脂質の蛋白質に対する量比の増加、膜構成蛋白質の新生および消失など、さまざまな変化が現われる。異常接近を防止するために最も効果を示すと考えられる水和度の高いリン脂質が低温順化後にキクイモ根茎⁽⁴⁵⁾、クワ皮層柔細胞⁽⁴⁶⁾などの原形質膜で増加する。低温順化による耐凍性の増加とともに、アラビドプシス葉の細胞⁽⁴⁰⁾では原形質膜リン脂質の全脂質に対するモル比が47%から57%に、春撒きオート麦⁽⁴⁷⁾では29%から37%に、冬撒きオート麦⁽⁴⁷⁾では29%から40%に、ライ麦⁽⁴⁷⁾では37%から43%にそれぞれ増加する。これに伴い、水和度の低いステロール、セレブロシドなどは減少する。ジャガイモの小葉の細胞において、原形質膜リン脂質は低温順化により耐凍性が増す種では増加する一方、耐凍性の向上がみられない種では変化しない⁽⁴⁸⁾。しかし、これらのいずれの結果も、低温順化に伴い微量ではあるが、リン脂質のうち、より水和度の高いPCの量比が減少しPEが増加する傾向のあることを示している。脂質分子種の変化は、異常接近が起こった場合にH_{II}相ができるかフラクチャー・ジャンプが起こるかという、微細構造変化に影響を与える可能性が指摘されている。

原形質膜脂質の蛋白質に対する量比の増加は、低温順化の結果起こる一般的变化として、麦の葉、クワノキ皮層柔細胞などで知られている。フリーズ・レプリカで原形質膜を観察した結果では、低温順化後の原形質膜では膜内粒子が減少する⁽⁴⁹⁾。この結果は、低温順化による脂質の量比の増加は、蛋白質量の減少を反映することを示す。低温順化による膜構成成分のうち最も水和度の高い

蛋白質の減少は、異常接近の防止にはマイナスの効果をもつことになる。

可溶性糖質の役割

低温順化による原形質膜脂質の変化は、理論的に異常接近を防止する可能性をもつ。しかし、これだけで高い耐凍性を示す植物細胞が異常接近を防止する機構をすべて説明できるわけではない。液体窒素温度までの耐凍性を示すクワノキ皮層柔細胞から単離した原形質膜小胞は、少なくとも-20°Cまで凍結することにより異常接近を起こす⁽³⁶⁾。低温順化による細胞内環境変化、特に糖の蓄積は原形質膜の異常接近を防止するための重要な機構になると考えられる。ちなみに、前述の単離した原形質膜小胞の異常接近は糖の添加で防止された⁽³⁶⁾。

低温により植物の成長は停止するが、光合成は低温下でも続く。その結果、光合成産物であるスクロースなどの糖の細胞内蓄積がもたらされる。これは単なるシンクとソースの関係ではなく、低温によるスクロース代謝酵素の活性増加、および順化の停止とともに酵素活性が減少することが知られている⁽⁵⁰⁾。木本植物では貯蔵澱粉が秋に最大に達し、耐凍性の獲得過程とともに分解され、さまざまな可溶性糖が細胞内に蓄積される。低温順化の結果高い耐凍性が得られる植物では、糖の蓄積と耐凍性の増加には明瞭な比例関係がみられる。さらに、ユーカリノキの培養細胞にエレクトロ・パルス法によりさまざまな糖を取り込ませたところ、これらの糖が耐凍性の向上効果を示すことが明らかにされている⁽⁵¹⁾。

他の凍害防止剤と同様に、糖の水酸基は水の代用機能を果たすことにより凍害防止剤として機能すると考えられている。これとともに、糖水溶液はガラス形成能が高い。細胞内に高濃度で蓄積した糖は凍結中に濃縮され、比較的高温でガラス化することにより、膜どうしの異常接近を防止するバルクのスペーサーとしての役割を果たすと考えられる。低温順化したポプラ皮層細胞は高濃度のラフィノースとスタキオースを含み、0.5°C/分の冷却速度では-30°Cでガラス化を起こす。この機構が冬季の樹木細胞が示す高い耐凍性の主因と考えられている⁽⁵²⁾。DMSOなどの凍害防止剤で処理後緩速凍結保存した細胞、およびガラス化法により凍結保存した細胞の膜どうしが異常接近することを防止する機構は、ガラス化したバルクの凍害防止剤の存在によって考えられる。

糖は乾燥状態でリン脂質の極性基と直接結合することが、赤外分光光度計を用いた極性基のP-O非対称伸縮振動の測定、および走査熱分析による脂質小胞のゲル-液晶転移温度測定⁽⁵³⁾から推測されている。脂質モデル膜および生体膜が示す透過性の障壁としての機能は、脂質の

ゲル-液晶転移温度 (T_m) 付近で損なわれる。これは T_m 近辺のゲル相と液晶相の境界には物理的な隙間ができるためと考えられている。糖が示す凍害防止剤としての機能は、脂質の T_m を下げることにより透過性の障壁としての膜の機能を保持することによると考えられている⁽⁵³⁾。しかし、先に述べたライ麦、およびユリ花粉細胞⁽⁵⁴⁾、大腸菌⁽⁵⁵⁾ を使った細胞レベルでの実験では、脂質の T_m と障害発生とはまったく関係がないことが証明されている。糖の添加は、一方において脂質二重層の液晶相を不安定化し、 H_{II} 相への転移温度を低下させるという効果をもつことにも注意しなければならない。リポソーム表面に直接結合した糖はリポソーム間の接触を妨げるスペーサーの役割をし、脱水によるリポソームの融合を防止する⁽⁵⁶⁾。この事実が、膜どうしの異常接近を防止する糖の保護効果の本質を示すと考えられる。

糖をはじめとする凍害防止剤の保護効果の一つは、塩濃度の増加を抑える束一的性質によると考えられている。事実、モデル実験で、凍害防止剤の添加により、毒性のあるイオンなどの凍結濃縮効果が減少し、蛋白質の解離、変性が防止されることが示されている⁽⁵⁷⁾。しかし、細胞レベルの障害が蛋白質の変性と結びつくことを示す証拠は得られていない。ハウレンソウから単離したチラコイド膜への糖の添加は、凍結による ATP 合成酵素の共役因子 (F1) の遊離を防止する。しかし、細胞レベルでの凍結では F1 の遊離は起こらず、障害発生はチラコイド膜の破損により起こる⁽⁵⁷⁾。

糖による凍害防止効果は必ずしも濃度のみに依存するのではなく、特定の糖の種類によって変わる。一般に二糖は単糖、多糖より保護効果が強い。またその二糖も、同一含水量では種類が違えばガラス転移温度 (T_g) が異なる。たとえば、スクロース<マルトース<トレハロースの順で高くなる⁽⁵⁸⁾。リポソームの凍害に対する保護効果も一般にこの順に高まる⁽⁵⁹⁾。糖がもつこのような性質から、糖と結合した水が膜表面でガラス化することにより保護作用を示すというガラス状態仮説が提唱されている⁽⁶⁰⁾。水がガラス状態で膜表面を覆うことにより膜どうしの異常接近は防止される。

膜表面の糖鎖の役割

糖鎖を取り込ませた脂質小胞では、凍結障害の発生が軽減される⁽⁶¹⁾。これは、糖鎖の存在が、凍害防止剤として添加された糖と同様に、膜表面を保護するためと推定されている。この場合にも膜表面で二糖として機能する糖が高い保護機能を示す。冬季に高い耐凍性を示すクワノキ、ニセアカシア、ポプラなどの皮層柔細胞およびこれらの樹木の（凍結により細胞外凍結を起こす）木部放

射柔細胞では、凍結の開始に伴い小胞状の ER が短時間で融合し、多重層構造化し原形質膜直下を完全に覆う現象が見られる⁽⁶²⁾。この現象は、耐凍性の低い夏季にはまったく見られない。ER の膜表面は他の膜に比べ多量の糖鎖をもつと考えられ、原形質膜と他の膜との異常接近を防止する機構となっている。厳しい寒さにさらされる寒冷地に生育する樹木の細胞が高い耐凍性を獲得するための重要な適応機構と考えられる。

糖の示すその他の役割

細胞外へ添加した糖も、膜どうしの異常接近を防止する効果があることは先に示した。細胞外の糖の添加によるもう一つの保護効果は、融解による浸透圧変化のバッファーとしての働きにある。糖を添加しないで凍結細胞を融解すると、明らかに浸透圧変化による害の見られる細胞もある。しかし、細胞外の糖の保護効果は凍結中に発揮され融解中には効果がないという報告もある。キャベツの葉の細胞の場合、細胞外に添加された糖により細胞は浸透圧的原形質分離を起こす。凍結障害の発生は、プロトプラスト<原形質分離した細胞<本来の細胞の順で増加する⁽⁶³⁾。これらの結果は細胞壁と細胞質の相互作用が異常接近に重要な影響を与えることを示唆する。予め高張の糖溶液で処理し原形質分離を起こした細胞に比べ、無処理の組織細胞の変形度は著しく、細胞外氷晶の成長により細胞壁の局所的な接近部位ができ、この部分で膜の異常接近が起こりやすい⁽³¹⁾。糖の添加は、細胞外氷晶の成長を抑制するとともに、原形質分離により細胞壁と細胞質の相互作用を軽減することにより、変形収縮の度合いを減らし、異常接近を軽減する効果を果たしているようである⁽⁴³⁾。

不凍蛋白質

低温順化の結果、ある種の植物はアボプラストに不凍蛋白質を増加させる⁽¹⁴⁾。不凍蛋白質は細胞外氷晶の形を変える。この事実はまた、不凍蛋白質の一つの役割として、細胞外氷晶による細胞の変形を軽減することにより異常接近を防止する可能性を推定させる。

*

植物のもつ凍結という極限環境に適応する能力を明らかにする研究の一端として、この解説では細胞外凍結による障害の発生が、凍結による膜の異常接近という共通した現象で発生する可能性があることを示した。この仮説の下で、低温順化による細胞の構造変化、および人工的凍結保存の過程が凍結障害を防御する機構を概念的に説明することができる。しかし、もとよりこの仮説は、複雑な生理機能を示す生物細胞と凍結によりもたらされ

る物理・化学的ストレスの相互作用を説明するには不十分であり、個々の詳細についてはさらに解明が続けられている。低温順化の結果、植物細胞に新生される蛋白質は優に100を越える。しかし、これらの蛋白質が耐凍性の獲得に果たす役割については現在のところまったく不明である。バイオテクノロジーにより、近い将来、生産性の高い耐凍性植物を創出するためにも、耐凍性という現象の基本原理を見極めることがまず必要である。生物学をはじめ、物理学、化学など広範な研究者の協力により、さらに総合的に、植物のもつ凍結という極限環境への適応能力が詳細に解明されることが期待される。

文献

- 1) 酒井 昭：“植物の分布と環境適応”，朝倉書店，1995.
- 2) M.F. Thomashow：*Adv. Low Temp. Biol.*, **2**, 183 (1993).
- 3) S.S. Mohapatra, R.J. Poole & R.S. Dhindsa：*J. Exp. Bot.*, **38**, 1697 (1987).
- 4) A. Sakai & S. Yoshida：*Cryobiology*, **5**, 160 (1968).
- 5) M. Perras & F. Sarhan：*Plant Physiol.*, **89**, 577 (1989).
- 6) 酒井 昭：“植物の耐凍性と寒冷適応”，学会出版センター，1982.
- 7) P. Mazer：*in* “Cryobiology”，ed. by H.T. Meryman, Academic Press, 1966, p. 213.
- 8) G.E.W. Wolstenholme (ed.)：“The Frozen Cell”，J. & A. Churchill, 1970.
- 9) S. Fujikawa：*Elect. Microsc. Rev.*, **1**, 113 (1988).
- 10) J. Levitt (ed.)：“Responses of Plants to Environmental Stresses”，Academic Press, 1980.
- 11) P.L. Steponkus：*Ann. Rev. Plant Physiol.*, **35**, 543 (1984).
- 12) G.M. Fahy, D.R. MacFarlane, C.A. Angel & H.T. Meryman：*Cryobiology*, **21**, 407 (1984).
- 13) P.L. Steponkus, R. Langis & S. Fujikawa：*Adv. Low Temp. Biol.*, **1**, 1 (1992).
- 14) M. Antikainen, M. Griffith, J. Zang, W.-C. Hon, D.S.C. Yang & K. Pihakaski-Maunsbach：*Plant Physiol.*, **110**, 845 (1996).
- 15) A. Sakai & W. Larcher (ed.)：“Frost Survival of Plants”，Springer-Verlag, 1987.
- 16) M.F. George, M.R. Becwar & M.J. Burke：*Cryobiology*, **19**, 628 (1982).
- 17) S. Fujikawa, K. Kuroda & K. Fukazawa：*Micron*, **25**, 241 (1994).
- 18) S. Fujikawa, K. Kuroda & J. Ohtani：*Micron*, in press (1996).
- 19) 黒田克司，藤川清三，大谷 諄：低温生物工学会誌，**41**，118 (1995).
- 20) R.J. Williams & A.C. Lepold：*Plant Physiol.*, **89**, 977 (1989).
- 21) K.L. Koster：*Plant Physiol.*, **96**, 302 (1991).
- 22) J. Lovelock：*Biochim. Biophys. Acta*, **10**, 414 (1957).
- 23) H.T. Meryman：*Nature*, **218**, 333 (1968).
- 24) W.S. Iljin：*Protoplasma*, **20**, 105 (1933).
- 25) S. Fujikawa：*in* “Electron Microscopy in Biology”，ed. by J.R. Harris, IRL Press, 1991, p.173.
- 26) S. Fujikawa：*Cryo-Letters*, **15**, 223 (1994).
- 27) S. Fujikawa：*in* “Effects of Low Temperatures on Biological Membranes”，ed. by G.J. Morris and A. Clarke, Academic Press, 1981, p.323.
- 28) S. Fujikawa：*J. Cell Sci.*, **49**, 369 (1981).
- 29) W.J. Gordon-Kamm & P.L. Steponkus：*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 6373 (1984).
- 30) R.S. Pearce & J.H.M. Willison：*Planta*, **163**, 304 (1985).
- 31) S. Fujikawa & K. Miura：*Cryobiology*, **23**, 371 (1986).
- 32) S. Fujikawa：*Cryo-Letters*, **8**, 156 (1987).
- 33) P.L. Steponkus & D.V. Lynch：*J. Bioenerg.*, **21**, 21 (1989).
- 34) P.L. Steponkus, M. Uemura & M.S. Webb：*Adv. Low Temp. Biol.*, **2**, 211 (1993).
- 35) S. Fujikawa & P.L. Steponkus：*Cryobiology*, **27**, 665 (1990).
- 36) 藤川清三：植物細胞工学，**4**，319 (1992).
- 37) S. Fujikawa：*Cryobiology*, **32**, 444 (1995).
- 38) S. Fujikawa：*Trees*, **8**, 288 (1994).
- 39) M.S. Webb, M. Uemura & P.L. Steponkus：*Plant Physiol.*, **104**, 467 (1994).
- 40) M. Uemura, R.A. Joseph & P.L. Steponkus：*Plant Physiol.*, **109**, 15 (1995).
- 41) 藤川清三，P.L. Steponkus：低温生物工学会誌，**37**，25 (1991).
- 42) 夷山 豊，鈴木 卓，原田 隆，藤川清三：低温生物工学会誌，**41**，50 (1995).
- 43) Y. Jitsuyama, T. Harada & S. Fujikawa：in preparation.
- 44) P.L. Steponkus & M.S. Webb：*in* “Water and Life”，ed. by G.N. Somero, C.B. Osmond and C.L. Bolis, Springer-Verlag, 1992, p. 338.
- 45) M. Ishikawa & S. Yoshida：*Plant Cell Physiol.*, **26**, 1131 (1985).
- 46) S. Yoshida：*Plant Physiol.*, **76**, 257 (1984).
- 47) M. Uemura & P.L. Steponkus：*Plant Physiol.*, **104**, 479 (1994).
- 48) J.P. Palta, B.D. Whitaker & L.S. Weiss：*Plant Physiol.*, **103**, 793 (1993).
- 49) B.L. Zhou, K. Arakawa, S. Fujikawa & S. Yoshida：*Plant Cell Physiol.*, **35**, 175 (1994).
- 50) C.L. Guy *et al*：*Plant Physiol.*, **100**, 502 (1992).
- 51) N. Leborgne, C. Teulieres, S. Travert, M.-P. Rols, J. Teissie & A.M. Boudet：*Eur. J. Biochem.*, **229**, 710 (1995).
- 52) A.G. Hirsh, R.J. Williams & H.T. Meryman：*Plant Physiol.*, **79**, 41 (1985).
- 53) L.M. Crowe & J.H. Crowe：*Biochim. Biophys. Acta*, **946**, 193 (1988).
- 54) F.A. Hoekstra, J.H. Crowe & L.M. Crowe：*Plant Physiol.*, **97**, 1073 (1991).
- 55) C.H. J.P. Fabrie, J.M.W. Smeets, B. de Kruijff & J. de Gier：*Chem. Phys. Lipids*, **70**, 133 (1994).
- 56) P.R. Harrigan, T.D. Madden & P.R. Cullis：*Chem. Phys. Lipids*, **52**, 139 (1990).
- 57) D.K. Hincha & J.M. Schmitt：*Biochim. Biophys. Acta*, **812**, 173 (1985).
- 58) J.L. Green & C.A. Angell：*J. Phys. Chem.*, **93**, 2880 (1989).
- 59) J.H. Crowe, J.F. Carpenter, L.M. Crowe & T.J. Anchordoguy：*Cryobiology*, **27**, 219 (1990).
- 60) K. Koster, M.S. Webb, G. Bryant & D.V. Lynch：*Biochim. Biophys. Acta*, **1193**, 143 (1994).
- 61) Y.S. Park & L. Haung：*Biochim. Biophys. Acta*, **1124**, 241 (1992).
- 62) S. Fujikawa & K. Takabe：*Protoplasma*, **190**, 189 (1996).
- 63) D.L. Tao, P.H. Li & J.V. Carter：*Physiol. Plant*, **58**, 527 (1983).