



Title	クワ皮層細胞の春における耐凍性変動と細胞内微細構造変化
Author(s)	大塚, 宏二
Citation	低温科学. 生物篇, 30, 33-44
Issue Date	1972-12-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/17796
Type	departmental bulletin paper
File Information	30_p33-44.pdf



クワ皮層細胞の春における耐凍性変動と 細胞内微細構造変化*

大塚 宏 二

(低温科学研究所)

(昭和47年9月受理)

I. 緒 言

植物の耐凍性の季節的変動と密接に平行して増減する物質について、これまで数多くの報告がある¹⁻³⁾。さらに最近では組織細胞内でのこれらの物質の代謝過程についても研究が進められつつある。しかし耐凍性の変化と関連して細胞内微細構造の変化、すなわち細胞内小器官の形態的变化や細胞内におけるそれらの挙動についての報告は少ない。

最近 Pomeroy and Siminovitch⁴⁾ がニセアカシヤの皮層柔細胞の形態変化を季節的に調べ、耐凍性が著しく増大する秋から耐凍性の低下する4月下旬にかけて、細胞膜に顕著なくびれ込み (infolding) 及び細胞内に数多くの小胞 (vesicles) がみられることを報告した。また、Krasavtsev 等⁵⁾ は秋にシラカバの皮層細胞の耐凍性の増大とともにゴルジ体の数も増加すると述べている。

細胞内での物質の代謝の進行に重要な役割を負っていると考えられる細胞内小器官、特にリボゾーム、小胞体 (ER)、液胞などの挙動と耐凍性の変化との関係を形態的に調べるため、クワの皮層柔細胞を用いて実験を行なった。本報告では冬から春にかけて耐凍性が低下する時期の皮層細胞を電子顕微鏡で観察した結果を述べる。

II. 材料と方法

材料: クワ *Morus bombycis* Koidz., 品種ゴロウジ の1年生枝の皮層細胞を用いた。クワの枝は北大農場の桑園に植栽されていたものを昭和46年12月から昭和47年5月にかけて採集し、同一の実験には同一の枝の同じ側の皮層組織のみを用いた。

耐凍度の測定: 枝の先端から10~20 cmの部位を約3 cmの長さに切りとり、ポリエチレンの小袋に入れて-5°Cの部屋で凍結した。凍結を確認後、1時間ごとに5°Cずつ低い恒温箱に移し、所定の温度に16時間おいた。-70°C以下で凍結に耐えられるようになった細胞ではそれらの耐凍度を通常の方法では比較できない。そのため異なる温度まで予備凍結して液体窒素中に入れる方法を用いた。すなわち、耐凍度の高いものほど高い温度で予備凍結しても液体

* 北海道大学低温科学研究所業績 第1209号

窒素処理後生存していることが知られている⁶⁾。凍結処理した枝は 0°C の部屋に移して融解した。皮層細胞の生死の判定は原形質分離法を用いた。皮層組織切片を中性赤溶液で生体染色後 2 倍の高調平衡塩溶液と水道水で原形質分離と復帰を 2 回繰返してもなお中性赤に染り、しかも正常に原形質分離している細胞を生きているものとみなした。耐凍度はほとんどすべての細胞が生存している最低温度であらわした。

電子顕微鏡観察法：耐凍度の測定に用いたのと同じの枝の一部を供試材料とした。長さ約 3 mm, 幅約 1 mm, 2~3 細胞層の厚さの組織切片を切り取り, それをつぎの組成の固定液に入れて 24 時間固定した。0.1 モルのリン酸緩衝液 (pH 6.7~6.8) に溶解した 5% グルタルアルデヒドと 10% アクロレインを使用直前に等量混合して固定液とした。固定中に固定液を 3 回取換えて室温で固定した。リン酸緩衝液で洗滌後, 2% オスミウム酸水溶液で 24 時間室温で後固定した。固定終了後 1 時間水洗し, ついで 2% 酢酸ウラン水溶液で 16 時間染色した。エタノールで脱水後, エポキシ樹脂に包埋した⁷⁾。Porter MT-I 型ミクロトームで超薄切片をつくり, クエン酸鉛⁸⁾で染色後, JEM6AS 型電子顕微鏡で観察した。

III. 結 果

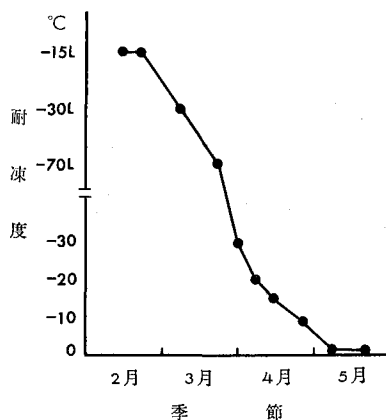
クワ皮層細胞の耐凍度の変化

クワ皮層細胞の耐凍度の変化を第 1 図に示した。クワ皮層細胞は 12 月中旬頃から 2 月中旬頃までもっとも高い耐凍度を維持し, -15°C 予備凍結後, 液体窒素処理にも十分耐えられた。その後, 耐凍度は少しずつ低下しはじめ, 3 月初旬から中旬には -30°C または -70°C で予備凍結しなければ液体窒素温度には耐えられなくなった。ともかく 3 月中旬までは, 皮層細胞は -70°C までの凍結には耐えたが, 平均気温が 0°C 以上に高まる 3 月下旬頃から耐凍性は著しく低下した。4 月初旬は -20°C, 開芽直前の 4 月下旬には -5°C に耐えられるが, 5 月初旬の開芽後には全く凍結には耐えられなくなった。

クワ皮層細胞の電子顕微鏡による観察

上に述べたような耐凍性の低下にともなって, 細胞の微細構造が著しく変化した。耐凍性が最高状態に維持されている 12 月から 2 月中旬の細胞の微細構造を第 2 図及び第 3 図に示す。この時期に特徴的なことは, 小形の液胞がそれぞれ独立した形態で多数存在し, 細胞基質部分は全体として非常に密なことである。また液胞内には電子密度の高い物質の他に柔毛状

あるいは膜状, さらに 0.05~1 μ 程の顆粒状の物質の存在が認められる。そしてこれらの液胞及びその内容物は 12 月から 2 月にかけてかなり変化するように思われる。すなわち, トノプラストの陥入による細胞質の取込が 2 月になると活発になりはじめ (第 3 図の B↑印), 膜状な



第 1 図 冬から春にかけてのクワ皮層細胞の耐凍度の変化

凍結時間: 16 時間

-15L, -30L および -70L は, それぞれ -15°C, -30°C および -70°C で 16 時間凍結してから液体窒素に入れたことを示す

らびに顆粒状の内容物の増加が目立ち始める。12月初旬は葉緑体に澱粉粒がまだかなり認められる(第2図A)。しかし、2月には澱粉粒は著しく小形化し、澱粉粒を含まない葉緑体も観察される(第3図A)。これらの時期の葉緑体のグラナメラの構造はあまり発達していない。小数の小管状の粗面ERが細胞内に観察される(第2図のB)が2月の細胞内は小胞状の滑面ERによって占められる(第3図のB)。遊離のリボゾームは細胞基質中に数個から10数個の集団となって存在している(第2図のB)。

一方、細胞表層に注目すれば、細胞膜はいたるところにくびれ込みが観察され、場所によってはそれは大きなくびれ込みをなし、その内部には顆粒状物質や細胞壁表面物質が認められることが多い(第3図のB↑印、第4図B)。この他に、クリステの発達した球形ミトコンドリア、脂肪粒などが多く観察される。

以上述べたような真冬の細胞の微細構造は第4図から第7図に示すように、耐凍性の低下し始める3月以降において著しく変化した。その変化は耐凍性が -20°C から -10°C まで低下する4月初旬から下旬にかけて特に著しい。3月下旬には葉緑体中に澱粉の蓄積が認められ(第4図のA)、4月中旬から4月下旬においてその傾向が著しかった(第5, 6図)。

液胞は3月下旬においてその大きさが増しはじめ、トノプラストの陥入が顕著になり、全体として非常に入り込んだ形態を示し始める(第4図のB)。4月中旬になると液胞の融合や膨じゅんした小胞との融合が活発に進行し、脂肪粒をとり込んだ像も観察される(第5図)。耐凍性の著しく低下する4月下旬において液胞の大形化が一層顕著になる(第6図)。このような液胞の外部形態変化につれて、その内容物においても変化が認められ、4月下旬になると電子線密度の高い物質がより顕著に認められ、膜状あるいは柔毛状の物質は減少または膨じゅんした状態へと変化する。内容物の無い液胞も認められるようになる。5月には液胞内容物の減少は一層明かである(第7図)。

一方、細胞膜においては、3月中旬にくびれ込みの度合いが極めて著しくなり、くびれこんだ部分が細胞質内に落ちこんで小胞状になった像がみられる(第4図のB)。しかし、この時期以後、細胞膜のくびれ込みの度合いは次第に低下し、4月下旬以降はほとんど平滑な状態へと変化する(第6図のB, 第7図)。

滑面ERの小胞は3月下旬においてやや膨じゅんした状態となり、その小胞内に柔毛状物質の存在が認められる。しかしこの時期では粗面ERの存在は確認できない。4月上旬になると小管状の粗面ERが明かに認められる(第5図のB)。

ゴルジ体は特にその数において変化は認められないが、3月中旬(第4図のB)以降にはゴルジ槽板の付近にゴルジ小胞が多くみられる。ミトコンドリア、脂肪粒は量的にも形態的にも冬から春にかけてあまり大きな変化は認めがたい。

以上のように、クワ皮層細胞の微細構造は耐凍性の変動につれて著しく変化する。その変化は細胞膜、液胞、ERおよびリボゾームの形態、ゴルジ体ならびに葉緑体の諸形態にあらわれることが明かになった。

IV. 考 察

植物の液胞の発達過程でトノプラストの陥入による細胞質の液胞内へのとり込みや、これらの液胞と融合する小胞に各種の加水分解酵素が存在することが知られている⁹⁻¹¹⁾。また液胞内にも加水分解酵素の存在が細胞組織化学的にも見いだされている¹²⁾。これらのことから細胞構成物質の消化や再構成など、動物細胞にみられるような二次ライソゾームとしての機能を液胞がもっているものと推定されている⁹⁾。冬から春にかけてみられるような液胞や内容物の形態変化、液胞と小胞の融合および液胞の著しく増大する4月下旬に小胞状ERが著しく消失することなどを考え合わせると、クワ皮層細胞の液胞にも二次ライソゾームとしての機能がある

第2~7図 説明

細胞内小器管の表示に用いた記号は次の通り：

C, 葉緑体； rER, 粗面ER； sER, 滑面ER； G, ゴルシ体； IB, 液胞内容物； L, 脂肪粒； M, ミトコンドリア； N, 核； Nm, 核膜； Nu, 仁； PL, 細胞膜； R, 遊離のリボゾーム； S, 澱粉粒； V, 液胞； Ve, 小胞； W, 細胞壁

第2図 採集時期 12月10日

- A: 細胞質部分は密で葉緑体、核、脂肪粒、ミトコンドリア、粗面ERなどの細胞内小器管を含む。液胞は小さく内容物も少ない。葉緑体中には形は小さいが澱粉粒がかなりみとめられる
× 60,000
- B: 遊離リボゾームの集合像がみられる × 60,000

第3図 採集時期 2月21日

- A: 液胞内容物が多く、葉緑体中の澱粉は少ない × 10,000
- B: 細胞膜にくびれ込みが多く、くびれ込みの中に顆粒状や細胞壁表層様物質もみられる(↑↑印)。トノプラストの細胞質の取込みを示す(↑印) × 20,000

第4図 採集時期 3月20日

- A: 葉緑体中に澱粉粒の増大がみられる。液胞は複雑な形に入りくみ、ミトコンドリアも多くみられる × 10,000
- 細胞質部分には小胞状ERが多い
- B: 細胞膜のくびれ込みが著しい。細胞内へ落ち込んだ小胞もみられる。トノプラストの陥入と細胞質の取込み↑印 × 20,000

第5図 採集時期 4月10日

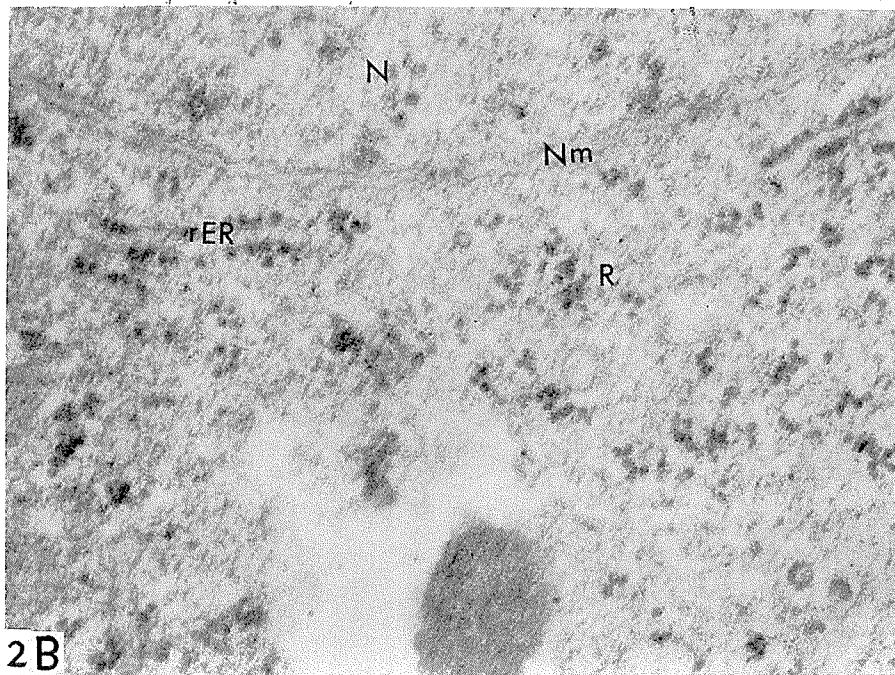
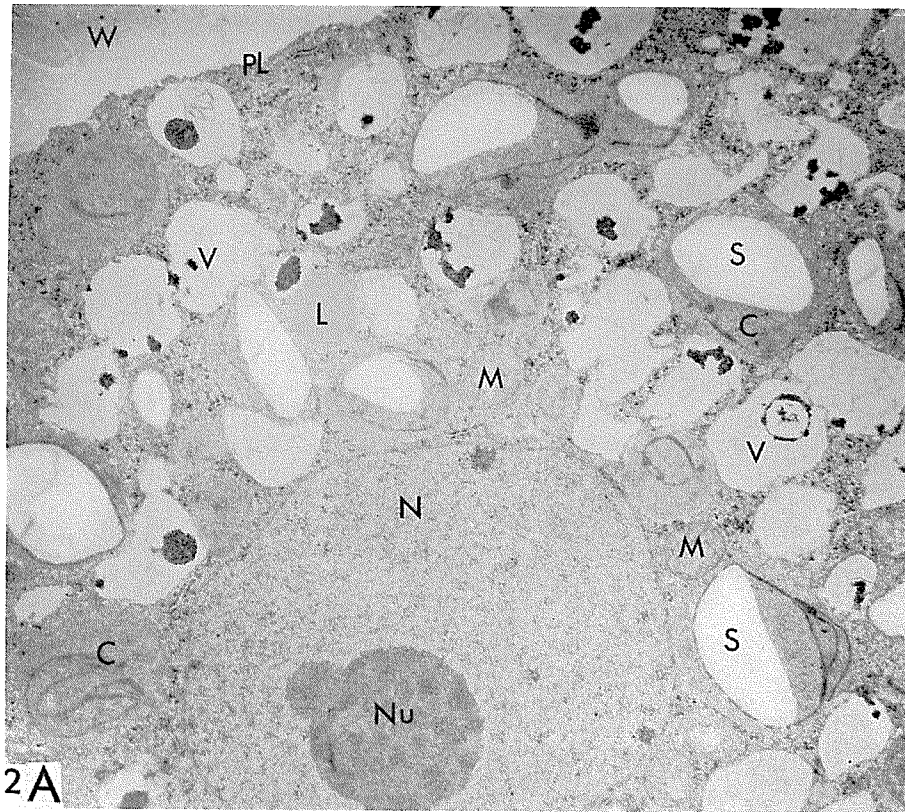
- A: 液胞内に脂肪粒のとり込みがみられる(↑印) × 10,000
- B: 小管状の粗面ERがみられる。細胞内にはなお滑面小胞が多くみられるしトノプラストの陥入がみられる(↑印) × 20,000

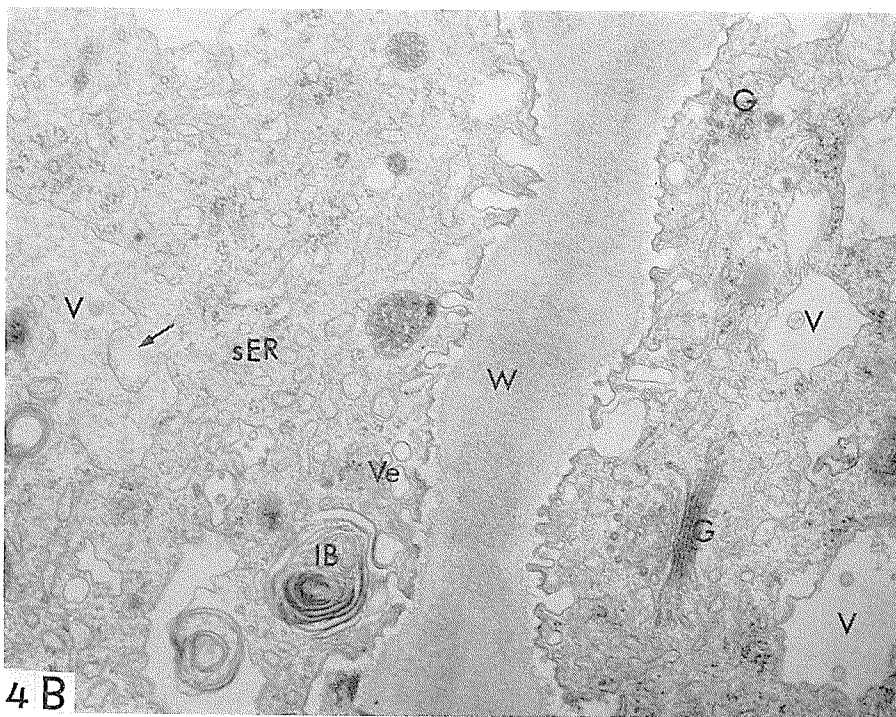
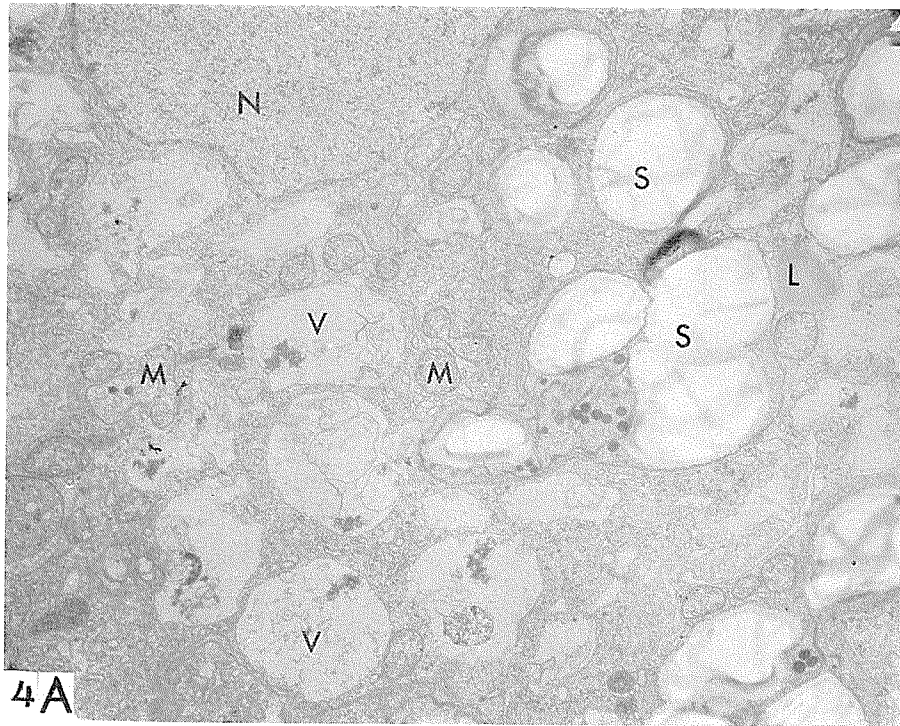
第6図 採集時期 4月25日

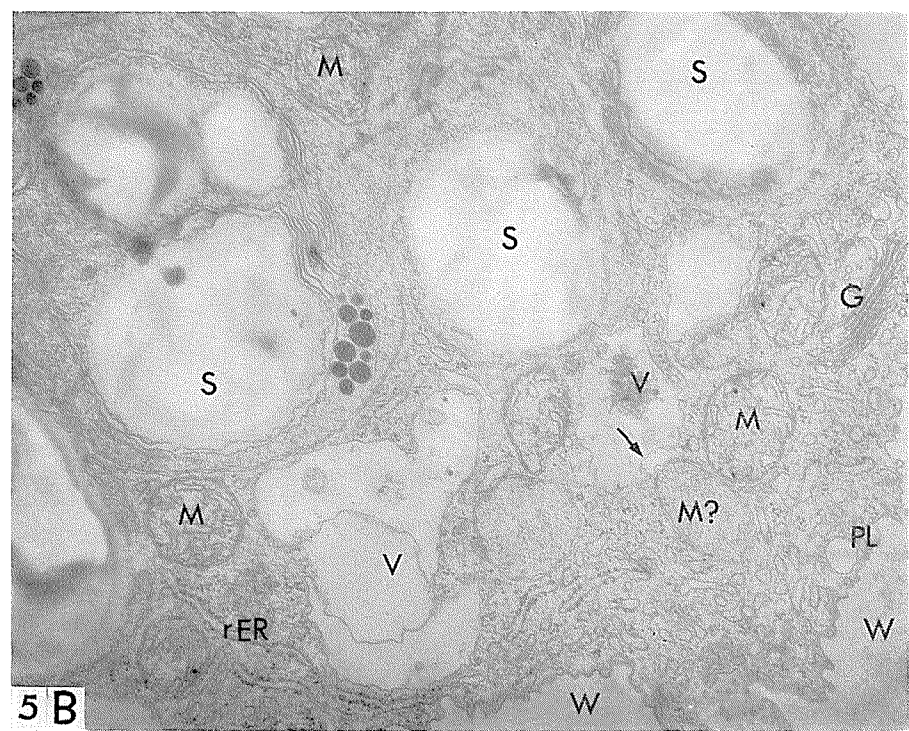
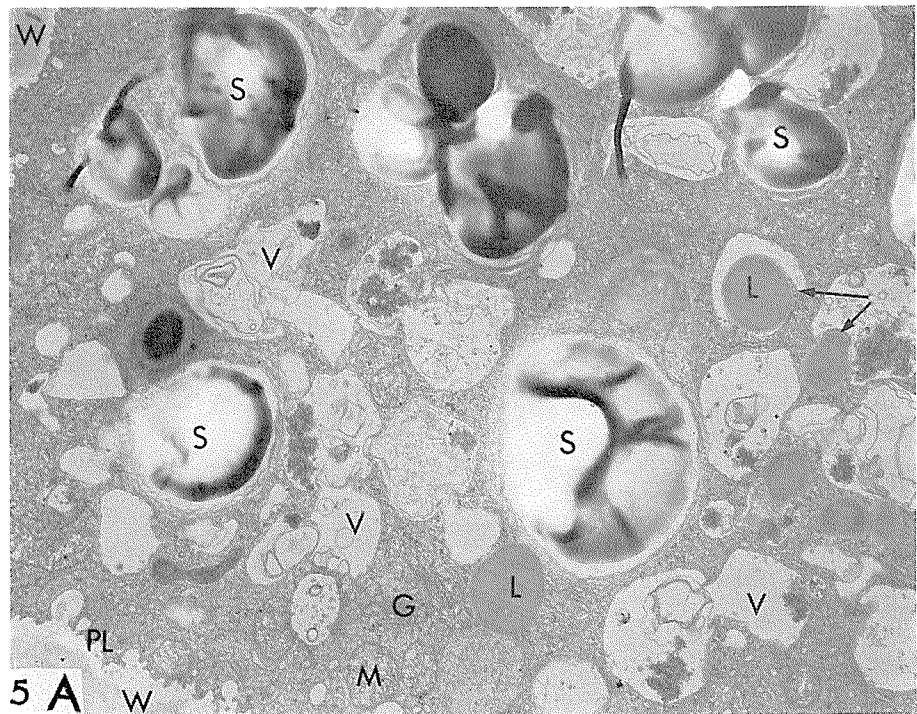
- A: 液胞の融合が進み著しく大きくなる。トノプラストは明瞭に識別できない × 10,000
- B: 細胞膜のくびれ込みは消失して平滑になる。小胞も著しく消失してみられない。リボゾームは遊離で存在する × 20,000

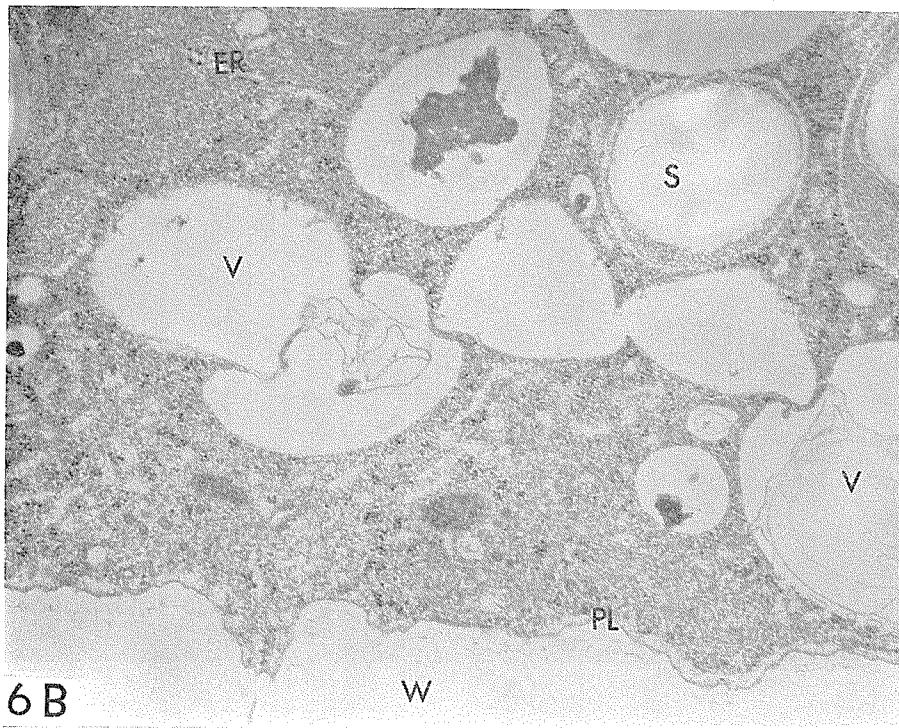
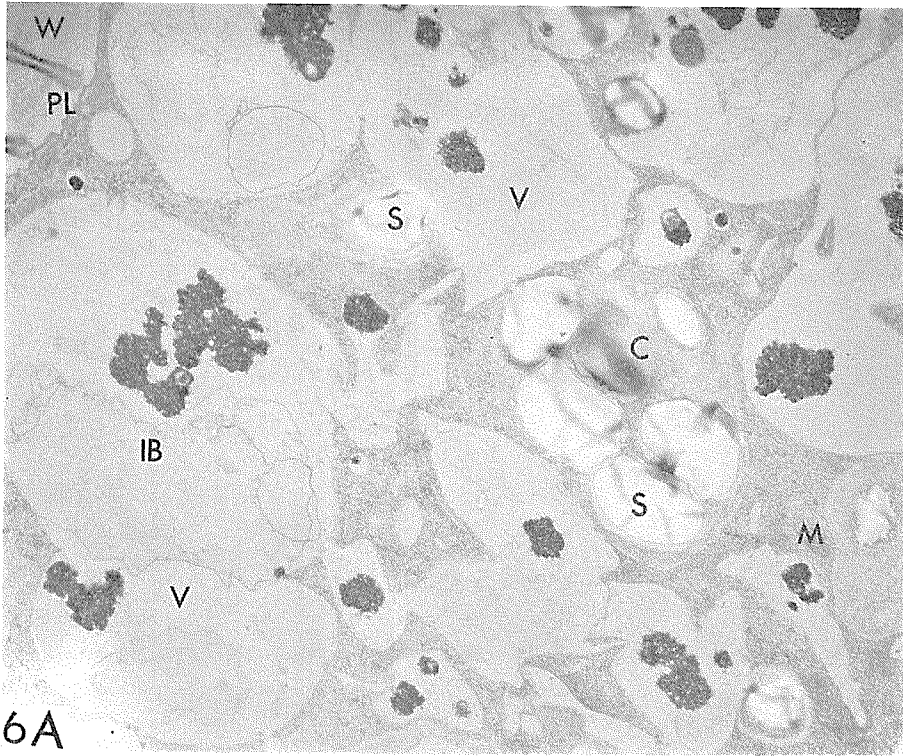
第7図 採集時期 A: 5月10日, B: 5月30日

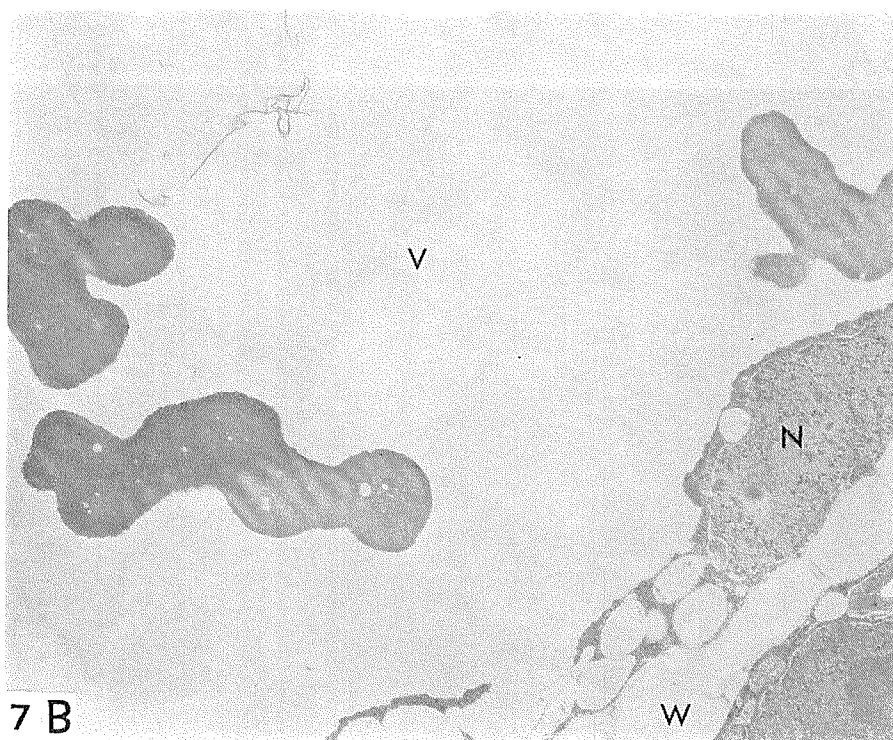
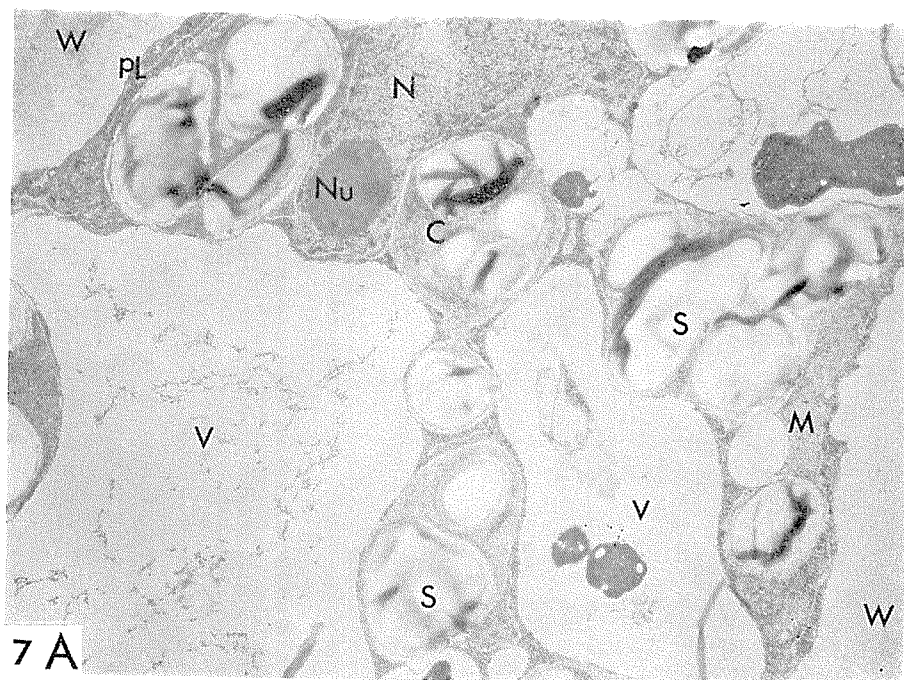
- A: 細胞質部分には核、葉緑体、ミトコンドリアがみられる。液胞の大きさも増し、内容物は少ない × 10,000
- B: 細胞内の少数の大きな液胞によって細胞質は細胞壁に薄く裏打ちされた様になる × 10,000











ように思われる。したがって、今回観察されたような液胞の著しい形態変化は植物の耐凍性と密接な関連のあることが考えられる。

細胞膜についてみれば、冬から3月下旬にかけてそのくびれ込みに明瞭な変化がみられ、この時点を経て、4月中旬以降にかけてくびれ込みが著しく減少する。くびれ込んだ部分に顆粒状物質などの内容物がみられ、さらに小胞として細胞基質中に落ち込みも観察されることから、細胞膜それ自体が季節的に何らかの機能と関連して変化することが考えられる。こうした意味で細胞膜は機能との関連で常に動的な状態にあるものと思われる。

動物細胞では一般に粗面 ER は細胞外への分泌蛋白質の合成に、遊離のリボゾームは細胞自身を構成する蛋白質の合成に関与すると考えられている。クワの皮層細胞では冬にはリボゾームが遊離で存在し、4月下旬頃にリボゾームの付着した粗面 ER が観察されるようになる。この時点でクワ皮層細胞の蛋白合成機構が変化することを示唆している。この時期の粗面 ER は蛋白合成と関連して、細胞の冬型から夏型への転換の上で基本的な役割りを果していることが推定される。

以上述べたように、クワ皮層細胞の微細構造は冬から春にかけて著しく変化することが明らかとなったので、今後は各々の構造成分の時期的な変化と細胞機能との関連および耐凍性との関連を追求する予定である。

摘 要

春におけるクワの皮層細胞の耐凍性の変化と関連して、次のような細胞内微細構造の変化が観察された。

1. 細胞の耐凍性をもっとも高い冬の間の液胞は小形で分散し、内容物も少ないが2月中旬以降にトノプラストのくびれ込み、液胞の融合、内容物の増加がみられ、耐凍性の著しく低下する4月下旬には液胞は著しくその容積を増す。
2. 冬の間にみられる細胞膜のくびれ込みは3月中旬頃まで顕著にみられ、耐凍性の著しく低下した4月下旬にはくびれ込みはみられなくなる。
3. 冬の間にリボゾームは遊離状態で存在し、小胞状の滑面 ER が多く観察される。3月中旬以降滑面と液胞との融合も認められる。4月初旬頃に粗面 ER が現われる。
4. ゴルジ体は4月中旬頃まで活発にゴルジ小胞を放出しているのがみとめられる。
5. 葉緑体中の澱粉粒は冬の間は少なく、3月中旬頃から増加しはじめ、4月中旬頃に著しく多くなる。

文 献

- 1) Sakai, A. and Yoshida, S. 1968 The role of sugar and related compounds in variations of freezing resistance. *Cryobiology* 5, 160-174.
- 2) Siminovitch, D., Rheume, B., Pomeroy, K. and Lepage, M. 1968 Phospholipid, protein, and nucleic acid increases in protoplasm and membrane structures associated with development of extreme freezing resistance in black locust tree cells. *Cryobiology* 5, 202-225.
- 3) Smith, D. 1968 Varietal chemical differences associated with freezing resistance in forage plants. *Cryobiology* 5, 148-159.
- 4) Pomeroy, M. K. and Siminovitch, D. 1971 Seasonal cytological changes in secondary phloem

- parenchyma cells in *Robinia pseudoacacia* in relation to cold hardiness. *Can. J. Bot.* **49**, 787-795.
- 5) Красавцев, О. А. и Туткевич, Г. И. 1971 Ультраструктура клеток коровой Паренхимы Древесных Растений в связи с их морозостойкостью. Физиол. Растений **18**, 601-607.
 - 6) 酒井 昭 1963 超低温における植物組織の生存 III. 耐凍性の大きさと効果的予備凍結温度との関係 低温科学, 生物篇, **21**, 1-16.
 - 7) Luft, J. H. 1961 Improvements in epoxy embedding methods. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **9**, 409-414.
 - 8) Venable, J. and Coggeshall, R. 1965 A simplified lead citrate stain for use in electron microscopy. *J. Cell Biol.* **25**, 407.
 - 9) Matile, P. 1968 Lysosomes of root tip cells in corn seedlings. *Planta* **79**, 181-196.
 - 10) Matile, P. and Moor, H. 1968 Vacuolation: Origin and development of the lysosomal apparatus in root-tip cells. *Planta* **80**, 159-175.
 - 11) Fineran, B. A. 1971 Ultrastructure of vacuolar inclusion in root tips. *Protoplasma* **72**, 1-18.
 - 12) Villers, T. A. 1971 Lysosomal activities of the vacuole in damaged and recovering plant cells. *Nature New Biology* **233**, 57-58.

Summary

The electron microscopic examination of mulberry cortical parenchyma cell was made to clarify the relationship between the ultrastructure and the freezing resistance in the cell. Observation of the cells from early winter to early spring showed that there was a striking change in the organelles such as endoplasmic reticulum (both smooth and granular), vesicles, free ribosomes, Golgi bodies and vacuoles. The difference in structure appeared to be associated with the changes of freezing resistance. These results indicated that morphological study is one of the important practical ways for research to understand a series of changes in frost hardening processes of woody plants.