



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	植物細胞の低温傷害に関する研究 I : 培養細胞の低温下での微細構造変化
Author(s)	仁木, 輝緒; NIKI, Teruo; 吉田, 静夫 他
Citation	低温科学. 生物篇, 35, 1-8
Issue Date	1978-03-30
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/17829
Type	departmental bulletin paper
File Information	35_p1-8.pdf



植物細胞の低温傷害に関する研究 I*

培養細胞の低温下での微細構造変化

仁木輝緒

(北海道大学大学院理学研究科)

吉田静夫・酒井昭

(低温科学研究所)

(昭和52年10月受理)

I. 緒言

植物の低温そのものによる傷害に関する研究はこれまで主として生化学的観点から行なわれてきたものが多く、たとえば低温下でのミトコンドリアの酸化活性の消失や低下に関するものであった¹⁻⁶⁾。しかしながら、低温傷害と関連した細胞内の微細構造の形態学的変化に関する研究は極めて少なかった⁷⁻¹⁰⁾。

最近 Ilker らは低温 (5°C) にさらされたトマト発芽鞘細胞で細胞質の液胞化、プラスチドやミトコンドリアなどの崩壊を観察している。しかし、これらの報告においては、観察された個々の細胞内小器管の構造変化の相互関連や細胞の低温傷害への直接的役割については十分な説明がなされていない。

著者らは北アメリカに自生するミズキ *Cornus stolonifera* の枝から低温感受性のカルスを分離した。この培養細胞は植え継ぎ後どの時期に低温 (0°~10°C) にさらしても害を受ける。しかし、本来この植物は冬には液体窒素温度までの凍結にも耐える能力をもっている。

本報告は低温感受性培養細胞を 0°C にさらした場合に個々の細胞内小器管の微細構造が経時的にどのように変わり、やがて細胞を致死させるかについて調べたものである。

II. 材料と方法

本実験に用いた培養細胞 (TK-1) はシアトル自生のミズキ *Cornus stolonifera* の枝の形成層から誘導した。当初の培養は NAA (3 mg/l) を含む Murashige-Skoog の寒天培地¹²⁾ を用いて暗黒、26°C で行った。のちにさらにビオチン (0.5 mg/l)、およびパントテン酸カルシウム (0.5 mg/l) を追加し、比較的均一な増殖率のたかいカルスを得た。

低温処理は植え継ぎ後 10 日目のカルスを用い、培地上のカルスをフラスコごと氷水に浸し (冷却速度: 1.3°C/分)、その後 0°C の恒温箱に移しそこに所定の時間おいた。

所定時間 0°C にさらしたカルスの生存率は、TTC 還元率と増殖率を勘案して決めた。

* 北海道大学低温科学研究所業績 第 1875 号

この研究の一部は昭和 52 年度科学研究費補助金によって行った

TTC 還元率は Steponkus and Lanphear¹³⁾ の方法によった。増殖率は所定の時間 0°C にさらしたものを、および未処理 (26°C) のものをそれぞれ新しい培地に移し、26°C 暗黒中で 15 日間培養し、それらの生重量の増加を比較してもとめた。

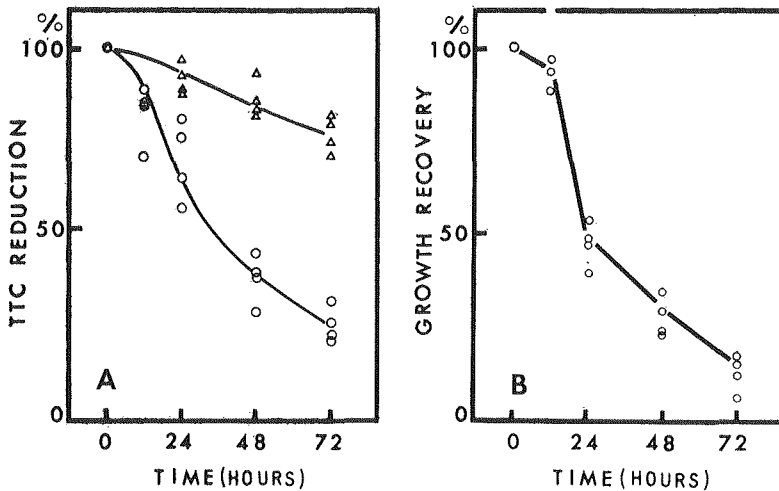
細胞の微細構造を観察するために、所定時間低温にさらした細胞と未処理細胞をリン酸緩衝液 (1/15 M, pH 7.2) で調整した 3% グルタルアルデヒド溶液で 0°C または 26°C で 1.5 時間前固定を行なった。同じリン酸緩衝液で洗った後、リン酸緩衝液で調整した 2% オスマック酸溶液でさらに 2 時間後固定し、アルコール脱水を経て Spurr のエポキシ樹脂¹⁴⁾ に包埋した。超薄切片は酢酸ウラニル溶液、および Rynold の鉛溶液¹⁶⁾ で二重染色を行い、日本電子(株)製電子顕微鏡 (JEM 100 C) で形態観察を行なった。

III. 結 果

第 1 図 A に示すように 0°C に 24 時間さらしたカルの TTC 還元量は、未処理のその約 60% に減少し、72 時間では約 25% に低下した。しかし、12 時間以内では、その還元量の変化は大きくなかった。第 1 図 B はいろいろな時間 0°C に処理した細胞を 26°C で 15 日間培養した場合の増殖率で、この増殖率と TTC 還元量はほぼ平行して変化することがわかった。このことは TTC 還元法がこの培養細胞の生存率の指標として有効であることを示している。

この細胞の低温処理前の微細構造は図版 I-1, 2 に示すように、中央に大きな液胞、粗面 ER および入り組んだ構造の核 (図版 I-1) が観察できる。また多くのミトコンドリアが観察でき、プロプラスチドはしばしば好オスミウム粒を含み (図版 I-2)、基質の電子密度は低く、だ円状を呈している。また遊離のリボゾームが細胞質に認められる。

これらの細胞を 6 時間 0°C にさらすと図版 II-3 に示すような微細構造変化がみとめられ



第 1 図 A 0°C で異なる時間処理した細胞の TTC 還元量の変化。TTC 還元率は未処理の細胞に対する百分率で示し、横軸は処理時間を示す (○: 0°C 処理, △: 26°C 処理)

第 1 図 B 0°C で異なる時間処理した細胞を 26°C, 15 日間新しい培地で培養した後の増殖率。なお増殖率は無処理の対照の生重量増加分に対する割合で示した

た。すなわち、プロプラスチドの電子密度が増加し、伸長して内側に向って陥入しその内部に大量の細胞質をとりこんだ構造や棒状構造などが観察される(図版 II-3)。左下わくにプロプラスチドの種々の形態変化を示した。プロプラスチドの1→2→3の形態変化が考えられる。同時に好オスミウム粒の消失がみとめられる。その他細胞内小器管(粗面 ER, ミトコンドリア, ゴルジ体, 細胞質膜など)には大きな変化は認められなかった。

0°Cに12時間さらした細胞では図版 II-4に示すように、粗面 ER が膨化し始め(図版 II-4, 矢印↑)、さらに微小胞化すると共にリボゾームが離れ滑面の空胞へと変化した(図版 II-4, 矢印↑)。しかし、このとき核, ミトコンドリアおよび細胞質膜には大きな形態的变化はみられなかった。細胞質には遊離リボゾームが観察でき、プロプラスチドは0°Cに6時間さらしたものとほぼ同じ構造を示していた。

0°Cに24時間さらした細胞では形態変化が進み図版 III-5, 図版 III-6に示すように細胞質は粗面 ER に由来する大きな空胞で占められていた。その空胞膜は液胞膜よりも電子密度が高く、電子密度をもつ内容物を含む液胞とは対称的である。またこの時液胞膜に顕著な形態変化が認められた。液胞膜はしばしば不規則にくびれこんだ形状を呈し、液胞膜と空胞の融合も観察された(図版 III-6)。また液胞膜が部分的に破壊されているものがかなりの細胞で観察された。ミトコンドリアは大多数のものが正常な形態を保持していたが、若干膨潤したのもわずかながら観察された。プロプラスチドは電子密度が低下し、構造がやや不鮮明になった。しかし、核と細胞質膜はなお正常な形態を保っていた。

0°Cに48時間さらされたものでは図版 IV-7に示すように、細胞質の自己消化像が観察されミトコンドリア, ゴルジ体, プロプラスチドなどの細胞内小器管はもはやその原形をとどめていない。細胞質膜は依然として細胞壁周辺に認められるが、分断され崩壊が起きている。

72時間0°Cにさらされた細胞は、図版 IV-8に示すように細胞内小器管は全く認められず電子密度の高い空胞が目立つ。

このように細胞が0°Cにある時間さらされると、低温傷害の進行に呼応して細胞内に一連の顕著な微細構造変化が起きることが明らかになった。

IV. 考 察

ポプラ, リンゴ, キクなど耐凍性の高い植物から誘導した培養細胞は低温処理することによって耐凍性が高まることが報告されている^{16~18)}。この実験に用いたミズキ(*Cornus stolonifera*)の枝も真冬には液体窒素温度での凍結に耐えられ、したがって用いたミズキのカルスは低温への適応に必要な代謝系が継代培養の過程で失われたか、あるいは抑制されているものと考えられる。0°Cにさらしたときの傷害の度合は冷却速度に依存しないで、0°Cにさらされる時間に依存する。

低温感受性の植物が低温にさらされたとき、プラスチドが顕著な構造変化を起こすことが知られている¹⁰⁾。このカルスもまた低温処理の初期6時間後にプロプラスチドの顕著な形態変化が観察された。しかし、このようなプロプラスチドの形態変化はコルヒチン, サイトカラシン B 処理によっては起らないが、窒化ナトリウム処理によって類似の変化が観察された(未発表

データ)。このことから、このプロプラスチドの形態変化が低温下における原形質流動の停止と直接的には結びつかないものと考えられる。現在のところなぜその形態変化がおこるかについては不明であるが、低温下における機能変化と密接に関連しているものと考えられる。培養細胞におけるプロプラスチドの生理的役割はまだ明らかになっていないが最近、Yamada らは¹⁹⁾ 発芽中のヒマ種子胚乳からプロプラスチドを分離し、それが長鎖脂肪酸の合成系をもつことを明らかにした。このカルスのプロプラスチドも同じような機能をもつと仮定するならば、低温にさらすことによってこのような脂肪酸代謝が何らかの影響を受ける可能性も考えられる。

Kimball らは⁸⁾ 低温に対して異なる感受性をもつ草本植物を 4°C にさらしたとき、粗面 ER が増加しゴルジ体は減少することを観察した。しかし、本実験では低温に 12 時間さらすことによって粗面 ER は膨化し微小胞化し始め、リボゾームを遊離して滑面 ER の小胞になった。さらに長い時間低温にさらすと小胞は大型の空胞へと発達し、細胞質のかなりの部分を占めるようになった。Ilker ら⁷⁾ も低温処理されたトマト発芽子葉鞘で、本実験と同じような粗面 ER の形態変化を報告している。

本実験で観察された粗面 ER の一連の形態変化は究極的には低温下における細胞微細構造の崩壊過程と深く関連しているものと考えられる。また粗面 ER からリボゾームが離れ、空胞になることから ER としての機能が低温処理の過程で変化していることが示唆される。ER が植物細胞において膜および膜構成物の生合成に重要な役割をすることから^{19~22)}、ER の正常な機能が変化すれば細胞の膜代謝の上に重大な結果をもたらすものと考えられる。

0°C に 48 時間さらされた細胞において細胞内小器管 (核, ミトコンドリア, プロプラスチド, リボゾーム) の崩壊が突如として起こる。これは 24 時間 0°C の細胞でみられた液胞膜の複雑に込こんだ構造が、その後の低温処理で液胞膜の崩壊へと進み細胞質を自己消化させたものと考えられる。次報²³⁾ でべるように 24 時間以内の低温処理で液胞膜がその修復能も含めて健全に機能しうる状態にあれば、その後 26°C に戻したとき微細構造を回復できる。このことから、細胞が低温にさらされたとき液胞膜が崩壊すれば致命的であると考えられる。植物の液胞は RNase, 非特異的な酸性ホフターゼ, プロテアーゼなど自己消化酵素をもっていることが報告されている²⁴⁾。したがってこの細胞が正常に機能するにはこれら自己消化酵素の局在性が厳密に保持されている必要がある。

一方、細胞質膜は 24 時間以内の低温では形態的にはほとんど変化はみられなかった。このことは低温に於いて著しい形態変化を起こす液胞膜に比べて特筆すべき事実である。従来、植物の低温傷害は細胞質膜の半透性を失うことによって起こると考えられ、実際現象として低温処理中に無機イオンやアミノ酸などの物質が細胞から流出することが観察された¹⁾。しかし、著者らがこれまで本材料で調べたところでは、少なくとも 24 時間以内で無機イオンやニンヒドリン陽性物質が流出する事実は認められなかった。このことから、低温下で細胞質膜の損傷が他のすべての変化に先行して進むとは考え難い。従来報告されている現象は低温傷害の進んだ状態の細胞をみているものと考えられる。

V. 摘 要

低温感受性培養細胞を用いて低温傷害と関連した微細構造の変化を調べた。0°C 処理 6 時間でプロプラスチドの形態変化が起こり、12 時間で粗面 ER は膨化し、24 時間では大型の空胞に発達した。この過程で粗面 ER からリボゾームが離れた。また液胞膜は 24 時間において空胞との融合がおこり、その後液胞膜の分断がみられた。0°C 処理 24 時間以内ではミトコンドリア、核、細胞質膜には形態変化はほとんど認められなかった。

低温処理 48 時間から細胞質の急激な崩壊がみられた。またこの時液胞膜は完全に崩壊していた。低温処理 48 時間以降に起こるこのような大きな変化は、24 時間でみられた液胞膜の構造変化が更に進んで崩壊に至るためと考えられる。

これらの観察から低温下での初期の粗面 ER の形態変化と液胞膜の崩壊との関連について考察した。

文 献

- 1) Lyons, J. M. 1973 Chilling injury in plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **24**, 445-466.
- 2) Yamaki, S. and Uritani, I. 1972 The mechanism of chilling injury in sweet potato. VI. Change of lipid components in the mitochondrial membrane during chilling storage. *Plant & Cell Physiol.*, **13**, 67-69.
- 3) Yamaki, S. and Uritani, I. 1973 The mechanism of chilling injury in sweet potato. X. Change in lipid-protein interaction in mitochondria from cold-stored tissue. *Plant & Cell Physiol.*, **51**, 883-888.
- 4) Yamaki, S. and Uritani, I. 1974 Mechanism of chilling injury in sweet potato. XII. Temperature dependence of succinoxidase activity and lipid-protein interaction in mitochondria from healthy or chilling-stored tissue. *Plant & Cell Physiol.*, **15**, 669-680.
- 5) Lyons, J. M. and Rasion, J. K. 1970 Oxidase activity of mitochondria isolated from plant tissues sensitive and resistant to chilling injury. *Plant Physiol.*, **45**, 386-389.
- 6) Wade, N. L., Breidenbach, R. W., Lyons, J. M. and Keith, A. D. 1974 Temperature-induced phase change in the membranes of glyoxisomes, mitochondria, and proplastids from germinating castor bean endosperm. *Plant Physiol.*, **54**, 320-323.
- 7) Ilker, R., Waring, J., Lyons, J. M. and Breidenbach, R. W. 1976 The cytological response of tomato-seedling cotyledons to chilling and the influence of membrane modifications upon these responses. *Protoplasma*, **90**, 229-252.
- 8) Kimball, S. L. and Salisbury, F. B. 1973 Ultrastructural changes of plants exposed to low temperature. *Amer. J. Bot.*, **60**, 1028-1033.
- 9) Platt-Alvia, K. A. and Thomson, W. W. 1976 An ultrastructural study of two forms of chilling-induced injury to the rind of grape fruit (*Citrus paradisi*, Macfied). *Cryobiology*, **13**, 95-106.
- 10) Taylor, A. D. and Craig, A. S. 1971 Plants under climatic stress. II. Low temperature, high light effects on chloroplast ultrastructure. *Plant Physiol.*, **47**, 719-725.
- 11) Yamaki, S. and Uritani, I. 1973 Mechanism of chilling injury in sweet potato. VII. Morphological change in chilling injured sweet potato root. *Agr. Biol. Chem.*, **37**, 183-186.
- 12) Murashige, T. and F. Skoog 1962 A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.*, **15**, 473-497.
- 13) Steponkus, P. L. and Lanphear, F. O. 1967 Refinement of triphenyltetrazolium chloride method of determining cold injury. *Plant Physiol.*, **42**, 1423-1426.

- 14) Spurr, A. R. 1969 A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *J. Ultrastruct. Res.*, **26**, 31-43.
- 15) Rynolds, E. S. 1963 The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain electron microscopy. *J. Cell Biol.*, **17**, 207-212.
- 16) Sakai, A. and Sugawara, Y. 1973 Survival of poplar callus at super-low temperatures after cold acclimation. *Plant & Cell Physiol.*, **14**, 1201-1204.
- 17) Bannier, L. J. and Steponkus, P. L. 1976 Cold acclimation of Chrysanthemum callus cultures. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, **101**, 409-412.
- 18) Tumanov, I. I., Butenko, R. G. and Ogolevts. 1968 Use of isolated tissue method for studying hardening of plant cells. *Fiziol. Rast.*, **15**, 749-756.
- 19) Yamada, M. and Usami, Q. 1975 Long-chain fatty acid synthesis in developing castor bean seeds. IV. The synthetic system in proplastids. *Plant & Cell Physiol.*, **16**, 879-884.
- 20) Gonzalez, E. and Beever, H. 1976 Role of the endoplasmic reticulum in glyoxisome formation in castor bean endosperm. *Plant Physiol.*, **57**, 406-409.
- 21) Matile, Ph. and Moor, H. 1968 Vacuolation: Origin and development of the lysosomal apparatus in root-tip cells. *Planta*. **80**, 195-175.
- 22) Moore, T. S., Kagawa, T. and Beevers, H. 1973 Enzymes of phospholipid metabolism in the endoplasmic reticulum of castor bean endosperm. *Plant Physiol.*, **52**, 50-53.
- 23) 仁木輝緒・吉田静夫・酒井 昭 1977 植物細胞の低温傷害に関する研究 II. 低温処理後 26°C に戻した細胞の微細構造変化. *低温科学, 生物篇*, **35**, 9-14.
- 24) Matile, Ph. 1975 The lytic compartment of plant cells. In *Cell Biology Monographs* (M. Alfert, W. Beermann, G. Rudkin, W. Sandritter and P. Sitte, eds.) Springer-Verag, Wien & New York, 18-38.

Summary

The present study was designed to observe the primary changes in ultrastructure associated with chilling injury in cultured cells. Cultured cells of *Cornus stolonifera* (TK-1) subjected to 0°C for a period longer than 24 hr suffered serious injury, while no injury was observed within 12 hr by the same treatment. Ultrastructural changes were first observed in proplastids and endoplasmic reticula in the cultured cells subjected to 0°C for 6 and 12 hr, respectively. A partial dilation followed by microvesiculation of the rough endoplasmic reticulum was detected in the cells subjected to 0°C for 12 hr. The microvesicles formed develop into large smooth vesicles after a 24-hr exposure to 0°C. During these processes, a release of ribosomes from rough endoplasmic reticula was observed. A remarkable structural change in tonoplast became apparent in the chilled cells for 24 hr. The microvesicles originated from endoplasmic reticula fused into tonoplast which was gradually destructed. No visible change was, however, observed in mitochondria, nucleus, plasmamembrane and other cell organelles within 24 hr. Upon further prolonged exposure to 0°C up to 48 hr, a remarkable degradation proceeded in cytoplasm. The sequential ultrastructural changes observed in cell organelles, especially in rough endoplasmic reticulum and tonoplast, appears to closely relate to a degradative process of cells caused by chilling treatment.

図版説明

細胞内小器管の表示に用いた記号は次の通り。CW, 細胞壁; ER, 粗面ER; G, ゴルジ体; M, ミトコンドリア; N, 核; P, プロプラスチド; V, 液胞; Ve, 空胞

- 図版 I-1 未処理培養細胞の微細構造。中央に大きな液胞, 入り組んだ構造の核が観察できる。
× 5,000
- 図版 I-2 同未処理細胞の微細構造。プロプラスチドの中にしばしば好オスミウム粒がみえる
(矢印↑)。× 10,000
- 図版 II-3 6時間0°C処理した培養細胞の微細構造。プロプラスチドの顕著な形態変化が観察できる。
× 8,000
左下わく: プロプラスチドの種々の形態。1→2→3の順に変化する。× 4,000
- 図版 II-4 12時間0°C処理した培養細胞の微細構造。粗面ERの膨化(矢印↑)が起こり, 付着しているリボゾームが離れ滑面の微小胞になる(矢印↑)。× 10,000
- 図版 III-5 24時間0°C処理した培養細胞の微細構造。細胞質中に大型の粗面ER由来の空胞(Ve)が発達する。
× 15,000
- 図版 III-6 同処理の培養細胞の微細構造。液胞膜がところどころで破れ, 入り組んだり, 空胞膜と融合したりしているのがみられる。× 10,000
- 図版 IV-7 48時間0°C処理した培養細胞の微細構造。細胞質の崩壊が起こり, わずかに核, 崩壊したミトコンドリアなどが観察できる。× 15,000
- 図版 IV-8 72時間0°C処理した培養細胞の微細構造。細胞内小器管が完全に自己消化してしまつて, 電子密度のたかい膜のみがみられる(矢印↑)。× 20,000

