HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	植物細胞の低温傷害に関する研究　II ： 低温処理後２６℃に戻した細胞の微細構造変化
Author(s)	仁木, 輝緒; 吉田, 静夫; 酒井, 昭
Citation	低温科學. 生物篇, 35, 9-14
Issue Date	1978-03-30
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/17830
Type	departmental bulletin paper
File Information	35_p9-14.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

Teruo NIKI, Shizuo YOSHIDA and Akira SAKAI 1977 Studies on Chilling Injury of Plant Cells. II. Ultrastructural Changes in the Cells Rewarmed at 26°C after a Chilling Treatment. *Low Temperature Science, Ser.* ***B, 35.*** (with English Summary p. 13)

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

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

前報[1,2]において低温感受性の培養細胞 *Cornus stolonifera*, TK-1 を低温 (0°C) にさらしたとき，比較的短時間に害を受け，その進行につれて細胞の微細構造に一連の変化が起こることを報告した。培養細胞を0°Cにさらしたとき，最初にプロプラスチドの特異的な構造変化が起こり，それに続いて粗面小胞体 (ER) の膨化ならびに空胞化が認められた。これらの形態的変化は液胞膜の崩壊に先行していた。また核・ミトコンドリアその他の細胞内小器管の急速な崩壊は液胞膜の崩壊後にみられた。これらのことから，液胞膜の変化が細胞の低温傷害において重要な役割を果しているものと考えられる。

本報告は，0°Cに12および24時間さらした細胞を26°Cに戻したときの微細構造の回復経過を明らかにするために行った。

II. 材料と方法

実験に供した材料は前報[2]と同じく *Cornus stolonifera* の培養細胞 (TK-1) で，誘導および培養については前報[2]と同じである。なお培養は26°Cでおこなった。

低温処理は前報[2]と同じく植え継ぎ後10日目の培養細胞を，0°Cに12および24時間さらしたのち，26°Cに戻した。細胞の生存率は前報[2]と同じくTTC還元量[3]で表わした。

微細構造を観察するための試料は0°C処理直後，または26°Cに戻してからそれぞれ6, 12および24時間経過したものから採取し，前報[2]にしたがって固定，包埋ならびに染色をし，観察した。

III. 結 果

第1表に0°C処理した細胞およびその後26°Cに移し，そこに12時間おいた細胞のTTC還元量を示した。0°Cに12時間処理してから26°CにもどしたときのTTC還元量は0°C処理

* 北海道大学低温科学研究所業績 第1876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

第1表 0°C 処理後およびその後 26°C に移し 12 時間経過したときの TTC 還元量

実験番号	0°C 処理時間（時 間）	TTC 還元量		B/A×100
		0°C 処理後 (A)	26°C 移行後 (B)	
1	12	0.29±0.04	0.29±0.03	100
	24	0.25±0.05	0.14±0.03	56
2	12	0.35±0.03	0.36±0.06	103
	24	0.30±0.03	0.20±0.01	67

後と同じ値を示したが，0°C に 24 時間処理してから 26°C に戻した場合に低温処理後の値の 60～70% に低下し，これは低温処理前の値の半数である。このことは 0°C に 24 時間さらした細胞ではこの処理中にある有害な変化がおこり，26°C にもどした時 12 時間以内に変化が進むことを意味している。

図版 I-1 に無処理の細胞，図版 I-2 に 12 時間低温処理した細胞の微細構造を示した。無処理の細胞のプロプラスチドにみとめられる好オスミウム粒は 12 時間処理後には認め難く，プロプラスチド基質の電子密度が増加しプロプラスチド自身の変形がはじまる（矢印 ↑↑）。（図版 I-2, 矢印 ↑），大部分はリボゾームを離し滑面 ER の状態になっている。これを 26°C に戻した時 6 時間後には図版 II-3 に示すように粗面 ER の活発な形成（図版 II-3, 矢印 ↑）がみられ微小胞化した滑面 ER は回復しつつある。粗面 ER は非常に長く伸長していて，ある場合には液胞にそって位置している（図版 II-3, 矢印 ↑↑）。この段階ではプロプラスチドはかなり大きく変化したままである。核やミトコンドリアにはほとんど変化は認められない。図版 II-3 中央下部に示されている細胞は ER が原形に近く回復しているが（矢印 ↑），細胞質の部分的な崩壊がみられる場合で，このような例はごくまれにしか観察されない。26°C に 12 時間おいた時，図版 II-4 に示すようにプロプラスチドをはじめその他の細胞内小器管もすべて低温処理前の形態に回復している。

以上のように，0°C 12 時間処理された細胞で認められた微細構造の変化は 26°C に戻し 12 時間おくとほぼ完全に処理前の状態に回復した。

次に，24 時間 0°C で処理された細胞では，図版 III-5 に示すように，細胞質に粗面 ER に由来する大型の空胞が多く見られる。また遊離リボゾームが細胞質中に冷却前より増加している（図版 III-5, 右上わく）。ミトコンドリアの一部には内膜構造が失われ膨潤しているものも見受けられる（図版 III-5, 矢印 ↑）。しかし 26°C に戻し 6 時間経過した細胞では，図版 III-6 に示すように，粗面 ER に由来の大型化した空胞は縮小して二重膜構造をとる（図版 III-6, 矢印 ↑）。しかし，無処理の細胞でみられた粗面 ER はまだほとんど見られない。この時期の細胞では細胞質にポリゾームが極めて顕著に認められる（図版 III-6, 右上わく）。0°C に 24 時間さらしてから 26°C に 12 時間おかれた細胞では，約半数の細胞が処理前の形態にほぼ回復している（図版 IV-7）。図版 IV-7 左側に示すように，粗面 ER の形成がみられるが，細胞質の崩壊による細胞内小器管の自己消化を示すものがほぼ半数の細胞で見られた。また 26°C に 24 時間おいた細胞では粗面 ER はほぼ無処理の細胞に近い形態を示し，その他の細胞内小器管もほぼ回復し

ている。しかし，ほぼ半数ほどの細胞では，図版 IV-8 左下にみられるように，細胞内小器管が完全に自己消化してしまっているものがあった。

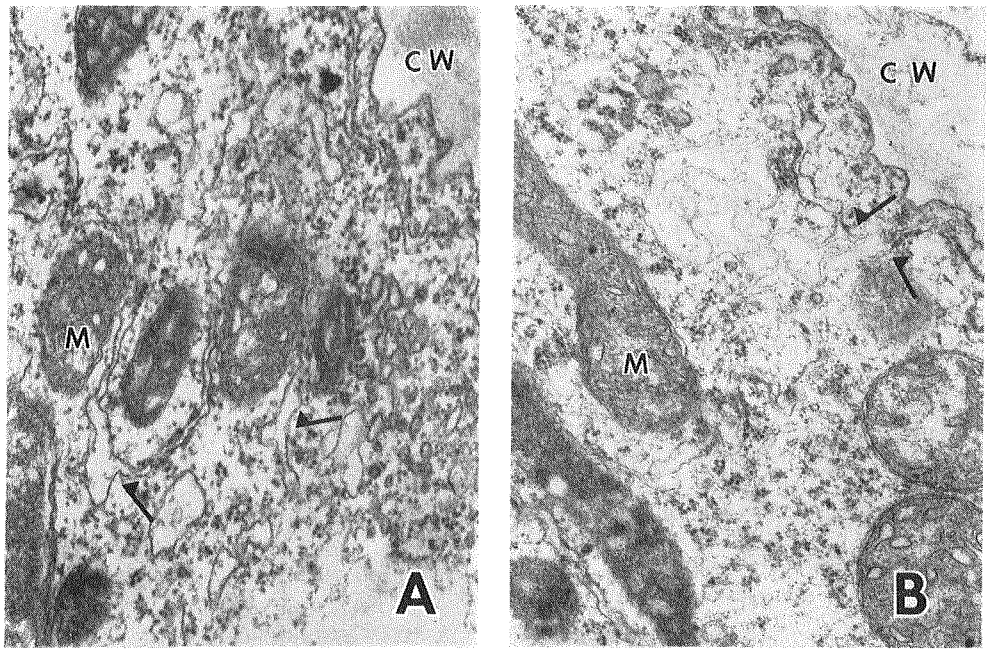
IV. 考　　察

26°C で培養している低温感受性の培養細胞を 0°C にさらした時におこる微細構造の変化は，0°C にさらす時間が 12 時間の場合にはその後 26°C に戻すとほぼ回復するが，24 時間の場合には約半数は回復できなかった。

培養細胞を 0°C にさらした時にみられる一連の細胞内微細構造の変化，すなわちプロプラスチドの基質の電子密度変化，およびプロプラスチド形態変化，粗面 ER の膨化と空胞化，およびそれに伴うリボゾームの遊離などと液胞膜の崩壊は傷害過程における一連の変化とみることができる。核・ミトコンドリア，その他の細胞内小器管は低温処理初期において形態的にほとんど変化が認められず，液胞膜の崩壊後はじめてこれらの細胞内小器管の自己消化像が観察される。つまり液胞膜の機能が，その修復能力も含めて，正常に保たれている場合には細胞を 26°C にもどしたときそれまでに変化している微細構造を回復できるものと考えられる。

細胞を 26°C に戻したときの微細構造の回復の速さは低温にさらされた時間に依存し，長時間低温にさらされた細胞はその回復により長い時間を要する。このことは単に低温処理中の微細構造の変化量だけでは説明できない別の要素が含まれている可能性が考えられる。

低温処理から 26°C に戻したときにみられる最も顕著な変化は滑面 ER から粗面 ER への



第1図　0°C に 12 時間 (A)，および 24 時間 (B) さらしたのち 26°C に戻し 6 時間経過後の細胞の微細構造。

A　ER は膨化した状態から収縮・伸長する形で回復中 (矢印 ↑)。× 20,000

B　空胞内に二重の膜構造が観察でき，その一端は粗面 ER とつらなっている (矢印 ↑)。× 30,000

変化である。その様式は12時間の低温処理から26°Cに戻した場合，第1図Aに示すように膨化した滑面ERの収縮とER膜面へのリボゾームの付着によって再び元の粗面ERへと回復する。一方24時間低温にさらしてから26°Cに戻したときは第1図Bに示すように大型化したER由来の空胞は収縮して二重膜構造をとり細胞質中にとじこめられたような複雑な構造をとっている。第1図B矢印(↑)で示すように，その一部は粗面ERへと連なり，粗面ERへの回復を示唆させる。26°Cにもどして12～24時間経過すると，長く伸びた粗面ERが数多く観察される。この粗面ERは加温によってしだいに冷却以前の形態を回復する。したがって加温後にみられる粗面ERの構造は，低温処理12時間の細胞の回復の場合と同様に，一旦ひどく変化したERの構造をもとにして再生されると考えられる。

図版I-1，図版III-5および図版III-6の右上わくに細胞質の拡大像を示したが，24時間低温にさらしてから26°Cにもどしたときポリゾームが多数観察される。このことはこの時期に蛋白合成が活発であることを示唆し，微細構造の回復に蛋白合成が不可欠であることを示している。つまり，細胞の生死の限界近くまで低温処理による変化のすすんだ細胞はその回復により多くのエネルギーと物質，特に蛋白質の合成を必要とするのではないかと考えられる。

24時間低温処理された細胞の中にはその後の26°C処理の間に不可逆的な経過をたどるものがかなり多く含まれている。すなわち12～24時間経過すると自己消化の過程にある核やミトコンドリアと発達した粗面ERがみられるが，細胞質が崩壊している像もしばしば見受けられる。これは低温処理された細胞の回復にあたりERの正常な形態への回復がまず最初の段階で進められることを示唆している。しかしこの細胞の回復の過程で上記の細胞質の崩壊がおこる事実は液胞膜の崩壊による可能性が考えられる。何故なら，Matile[4]によって植物の液胞の中に細胞内小器管の陥入が観察されており，植物の液胞に動物にみられる二次ライソゾーム様の働きも考えられる。

このような低温処理から26°Cにもどしたときにみられる粗面ERの回復と発達は低温により傷害を受けた膜系の修復と関連しているのかも知れない。事実，図版II-3にみられるように，長く伸びた粗面ERが小さな液胞を囲んだように発達している像がしばしば観察される。このことはERと液胞膜が膜の起源において密接な関連があることから注目される[5]。またその時ゴルジ体の増加がみられる(図版II-3，図版IV-7)。ゴルジ体は膜の転化の場であるという考え方[6]からすれば，粗面ERの発達とゴルジ体の増加は膜代謝の面から注目すべきことと考えられる。

プロプラスチドは冷却中の最も早い時期にその形態が変化するが，26°Cに戻したときERの回復よりも可成り遅れて回復する。前報[2]で触れたが加温過程におけるプロプラスチドのこのような可逆的変化は低温下における変化とともに興味のもたれる事実である。最近この細胞内小器管に対して新しい知見[6,7]が出されているので，低温傷害における膜の損傷と回復とのかかわりを考えるうえで重要と考えられる。

結論として，低温下で進行する形態の変化はそれが一定限界を越えない範囲では可逆的なものと考えられる。低温処理中及び26°Cに戻す過程における形態的な観察から液胞膜の機能の不可逆的変化が細胞の生死に対して決定的な役割を果すものと推論される。

V. 摘　　要

26°C で培養している低温感受性培養細胞を 0°C に異なる時間さらした時におこる細胞内微細構造の変化が 26°C に戻した時にどのように回復するか調べた。

12 時間 0°C にさらされた細胞はその微細構造がかなり変化するが，その後 26°C に戻すと元の形態を回復した。しかし，24 時間 0°C にさらされた細胞では，その半数位が 26°C に戻した時その微細構造を回復したが，残りの細胞は 26°C に移した後細胞が崩壊した。なお，これらの崩壊する細胞では ER 構造の回復があるていど見受けられた。

以上のことから粗面 ER の回復が傷害細胞の形態および機能の回復に重要な働きをしているものと考えられる。

文　　献

1) Niki, T. Yoshida, S. and Sakai, A. 1978 Studies on chilling injury in plant cells. I. Ultrastructural changes associated with chilling injury in callus tissue of *Cornus stolonifera*. *Plant & Cell Physiol.*, 印刷中.
2) 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 I. 培養細胞の低温下での微細構造変化. 低温科学, 生物篇, **35**, 1-8.
3) Steponkus, P. L. and Lanphear, F. O. 1967 Refinement of the triphenyl tetrazolium chloride method of determing cold injury. *Plant Physiol.*, **42**, 1423-1426.
4) Matile, Ph. and Moor, H. 1968 Vacuolation; Origin and development of the lysosomal apparatus in root tip cells. *Planta*, **89**, 56-75.
5) Grove, S. N., Bracher, C. E. and More, D. J. 1968 Cytomembrane differenciation in the endoplasmic reticulum golgi apparatus vesicle complex. *Science.* **161**, 171-173.
6) 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**, 320-323.
7) Simcox, P. D. Reid, E. E., Canvin, D. T. and Dennis, D. T. 1977 Enzymes of the glycolytic and pentose phosphate pathways in proplastids from the developing endosperm of *Ricinus xommunis* L., *Plant Physiol.*, **59**, 1128-1132.

Summary

The restoration and the deterioration of ultrastructures during rewarming process were observed in cultured cells of *Cornus stolonifera* in which an apparent change in the morphology of organelles has taken place by a previous chilling at 0°C.

Complete restoration of the moderately altered ultrastructures in 12-hr chilled cells took place in almost all of the cells within 12 hr of warming at 26°C. Even in the case of chilled cells for 24 hr, the ultrastructures once severely altered were partially or completery recovered in more than fifty percent of the treated cells. The longer the period of warming, the better the restoration of the structures.

Many cells, however, displayed deteriorative ultrastructures during warming. Restoration of the form of rough endoplasmic reticulum and the development of polysomes in recovering cells were characteristic in the early stage of warming. In addition, a rupture of tonoplast was sometimes observed in chilled cells for 24 hr during warming.

A possible role of rough endoplasmic reticulum and of integrity of tonoplast on cell recovery during a chill-warm sequence is discussed.

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 無処理の培養細胞の微細構造。プロプラスチドの中に好オスミウム粒がみられる。× 8,000
右上わく：同細胞の部分拡大像。粗面 ER および遊離のリボゾームが観察される。× 20,000

図版 I-2 12 時間 0°C にさらした細胞の微細構造。粗面 ER が微小胞化する (↑)。プロプラスチドの形態変化が観察される (↑↑)。× 10,000

図版 II-3 12 時間 0°C にさらした後, 26°C に戻し 6 時間経過した細胞の微細構造。ER の回復が起こり (↑), 粗面 ER が見られ, その一部は小さな液胞を囲んでいる (↑↑)。中央下部の細胞では細胞質の崩壊がはじまっている。× 5,000

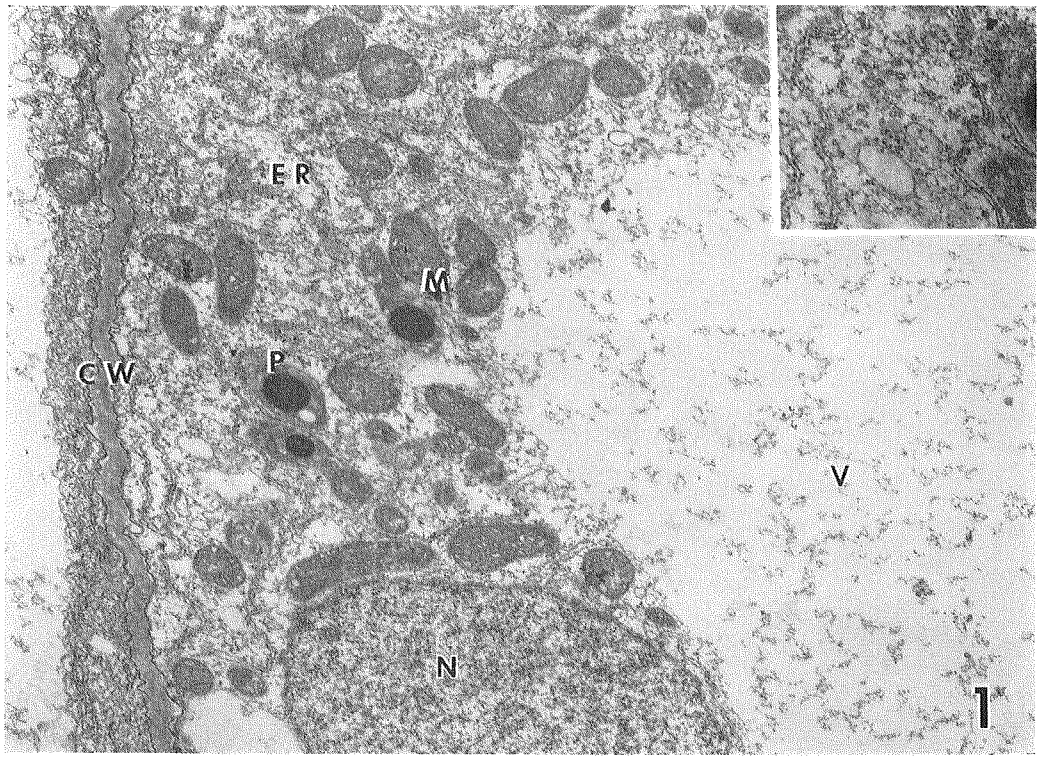
図版 II-4 0°C に 12 時間さらしてから 26°C に戻し, 12 時間経過した細胞の微細構造。粗面 ER, プロプラスチドの形態が低温処理前の形態に回復している。× 8,000

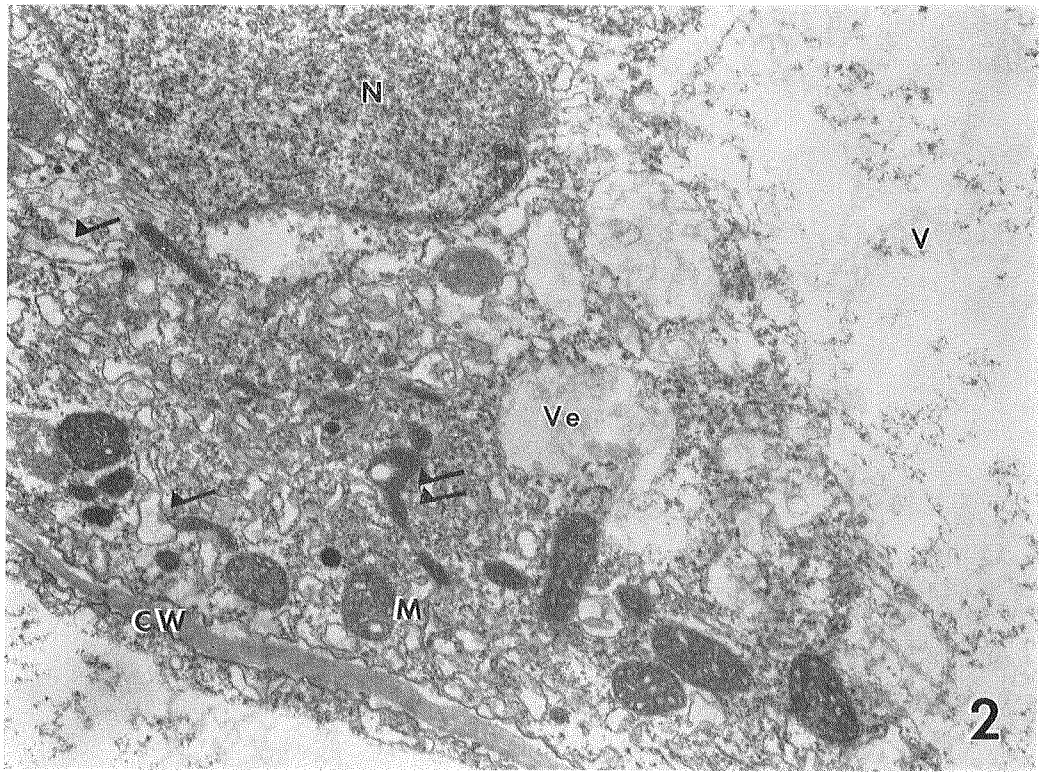
図版 III-5 0°C に 24 時間さらした細胞の微細構造。粗面 ER に由来する大型の空胞が観察される。内膜が消失し膨潤したミトコンドリアも若干観察された (↑)。× 10,000
右上わく；同処理細胞の部分拡大像。遊離リボゾームが観察される。× 20,000

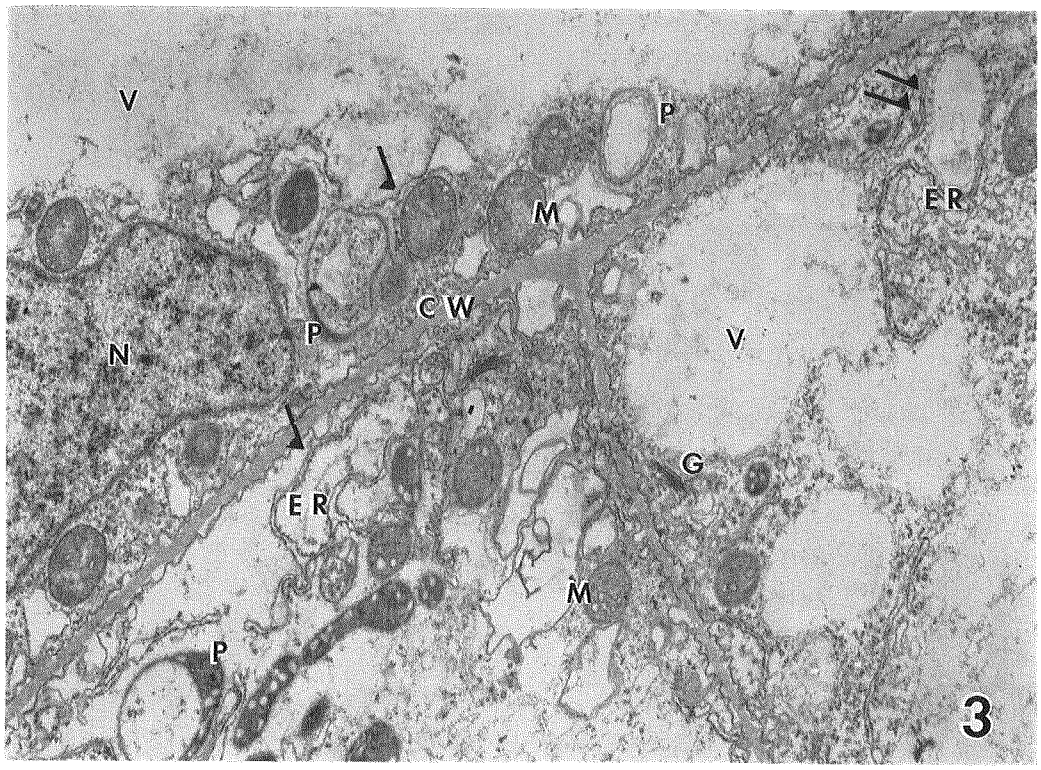
図版 III-6 0°C に 24 時間さらしてから 26°C に戻し, 6 時間経過した細胞の微細構造。空胞内に二重構造の膜が観察される (↑)。ポリゾームの増加がみられる。× 8,000
右上わく；同処理の細胞の部分拡大像。ポリゾームの形態を示している。× 15,000

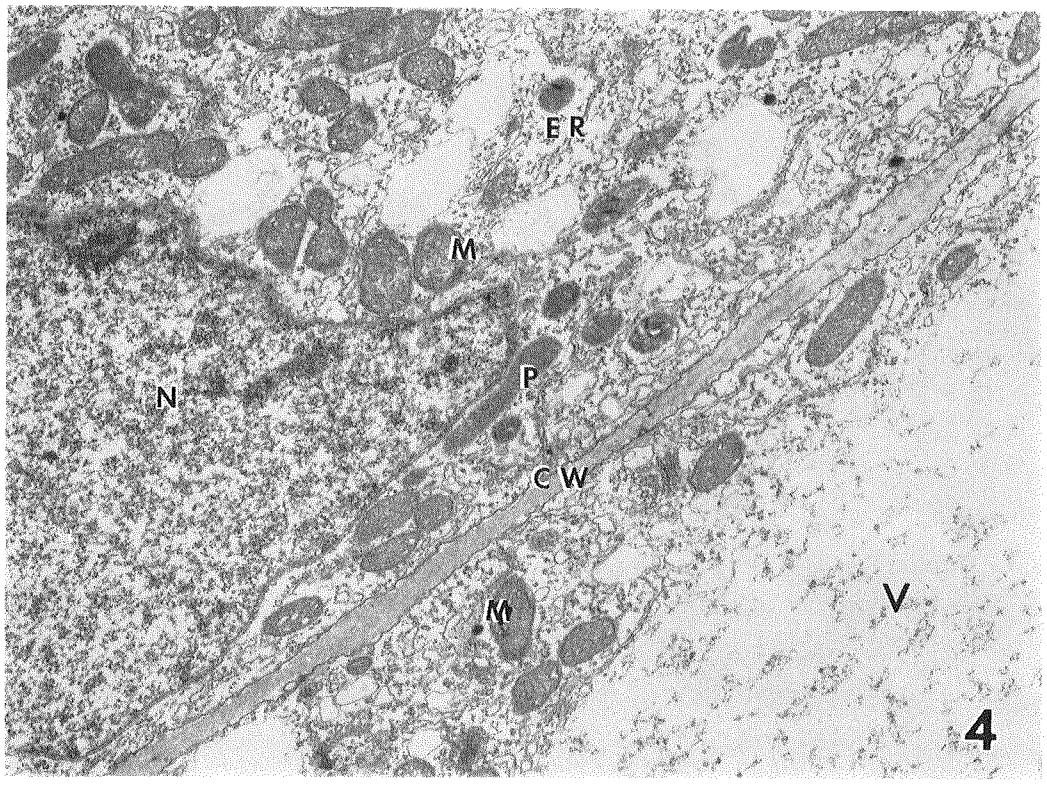
図版 IV-7 0°C に 24 時間さらしてから 26°C に戻し, 12 時間経過した細胞の微細構造。粗面 ER の回復が起きている。左側細胞では細胞質と液胞との境界が不鮮明である。崩壊し始めたミトコンドリアがみられる (↑)。× 5,000

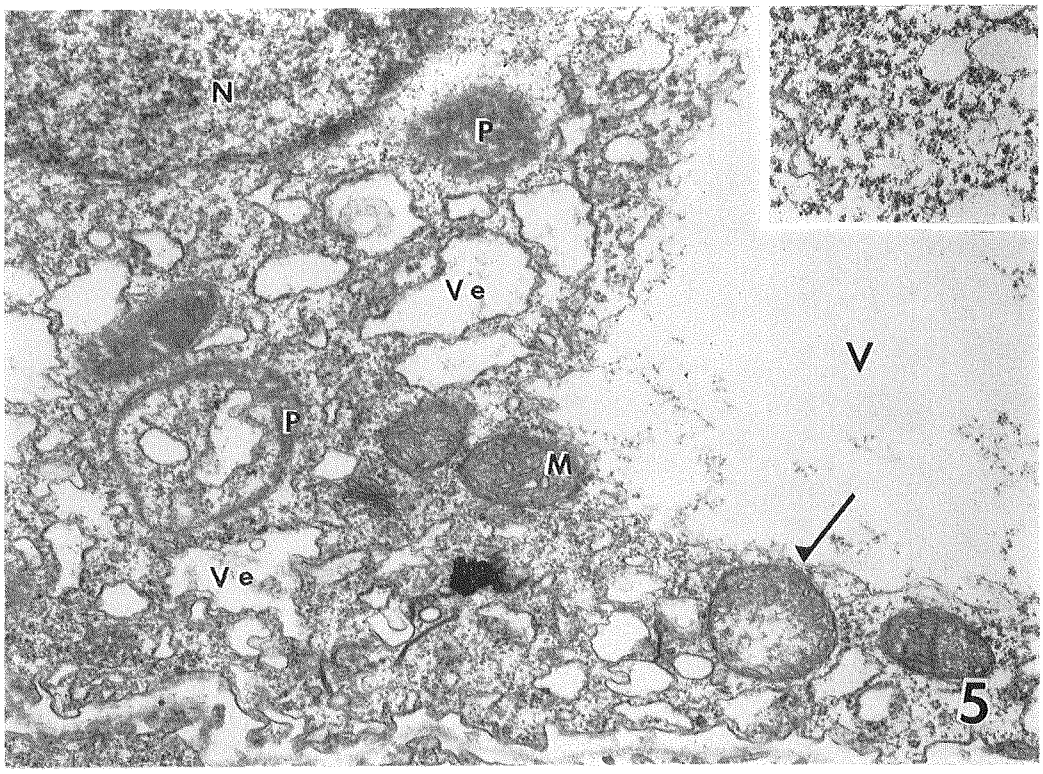
図版 IV-8 0°C に 24 時間さらしたのち 26°C に戻し, 24 時間経過した細胞の微細構造。細胞内小器管はすべて処理前の形態に回復している。左下の細胞は崩壊がすんで細胞内小器管はすべて自己消化されている。× 10,000

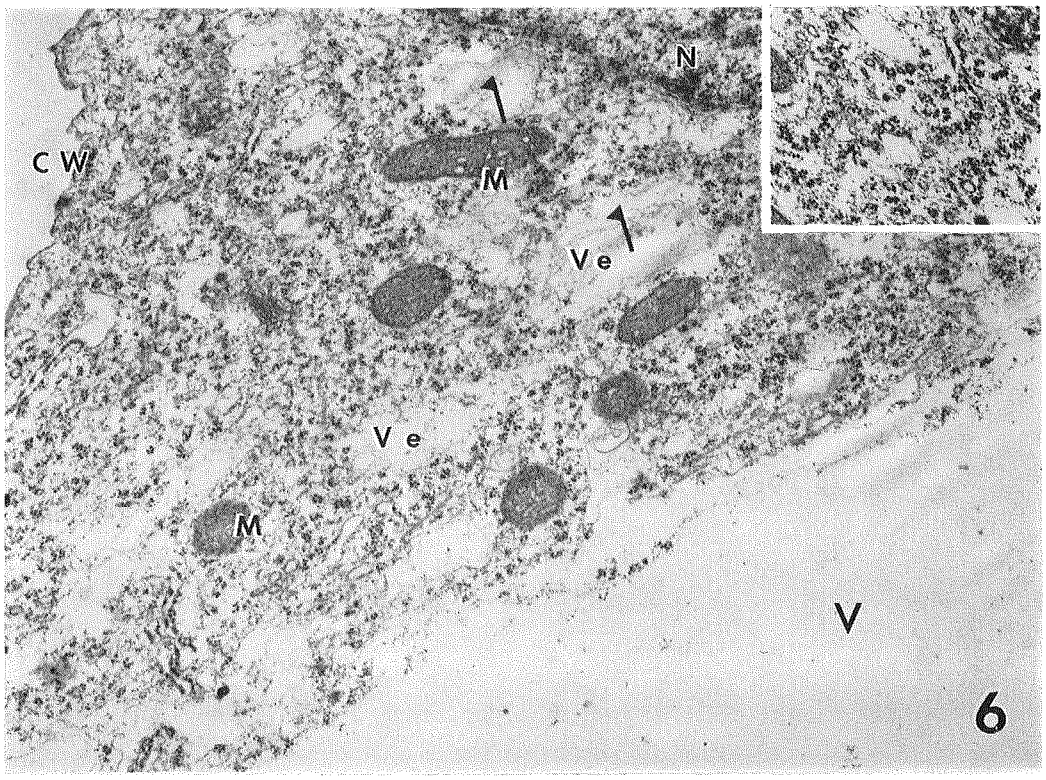

ER
M
CW
P
V
N
1

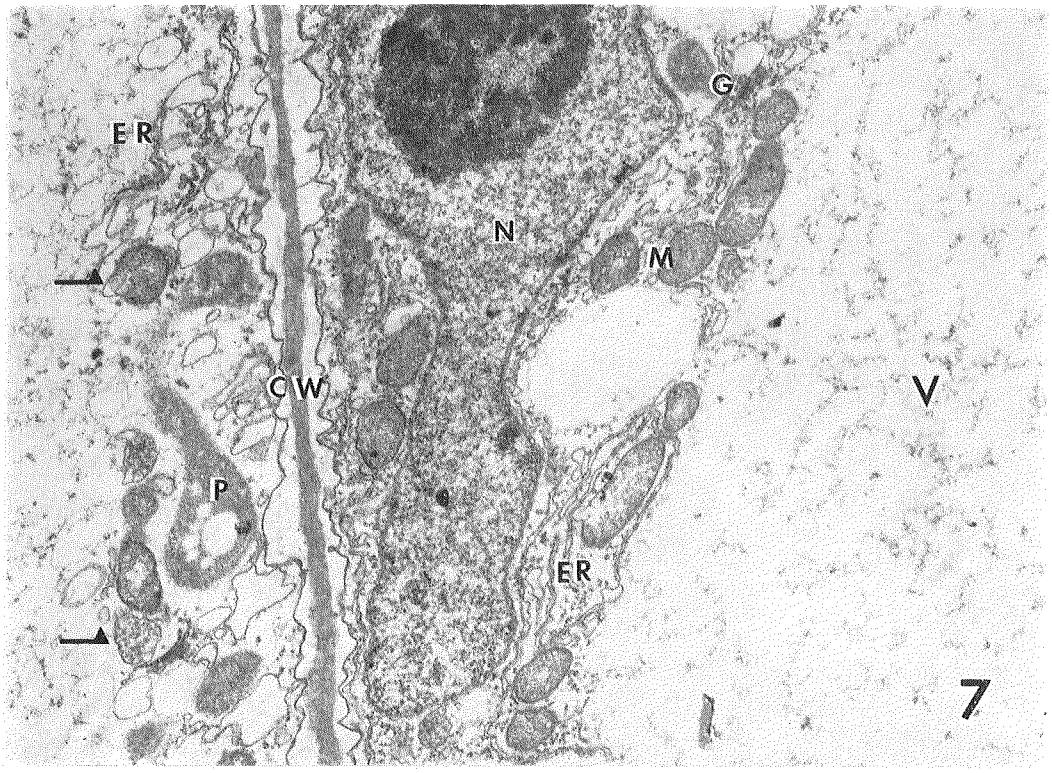

N
V
Ve
CW
M
2

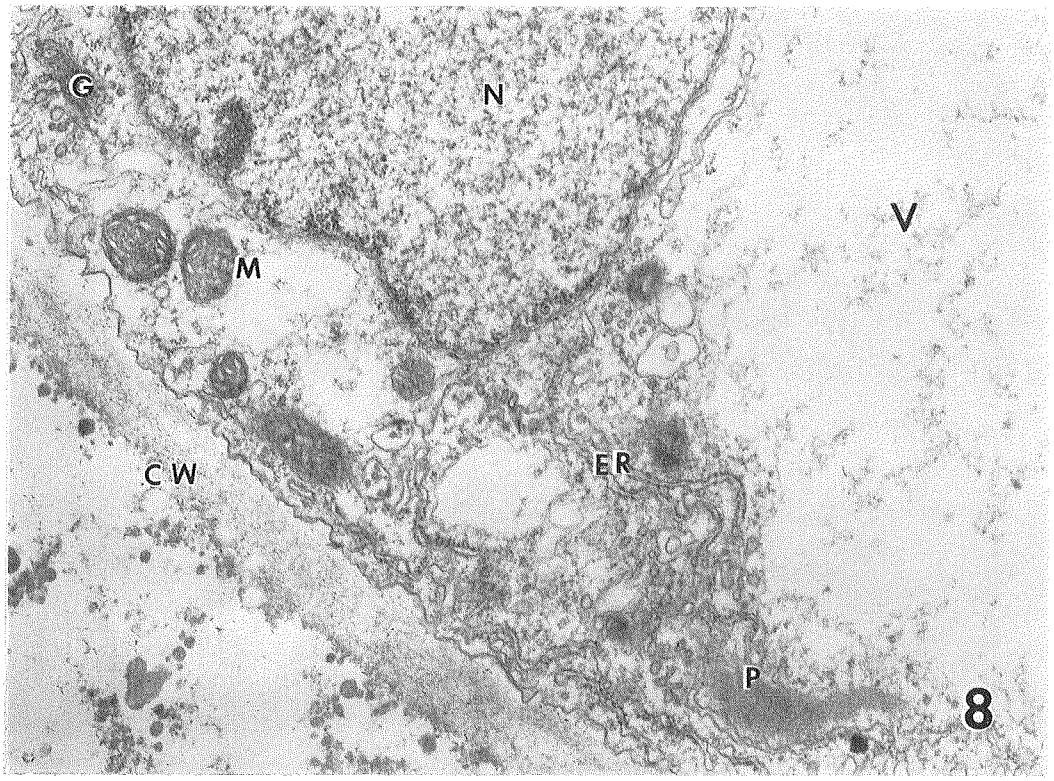

V
P
M
ER
CW
P
N
V
G
ER
M
P
3


ER
M
P
N
CW
M
V
4


N
P
Ve
V
P
M
Ve
5


N
C W
M
Ve
Ve
M
V
6


ER
G
N
M
CW
V
P
ER
7


G
N
V
M
CW
ER
P
8