



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	野菜類遺伝資源凍結保存の基礎としての糖外与による組織・細胞耐凍性の向上に関する研究
Author(s)	実山, 豊
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(農学)
Dissertation Number	甲第4936号
Issue Date	1999-09-30
DOI	https://doi.org/10.11501/3159799
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/32787
Type	doctoral thesis
File Information	4936.pdf



野菜類遺伝資源凍結保存の基礎としての
糖外与による組織・細胞耐凍性の向上に関する研究

農学専攻 博士後期課程

実山 豊

目 次

緒論	1
第1章 数種野菜組織における糖外与処理と生存性および耐凍性の変化	7
第1節 第1章において用いる材料および共通的方法の概要	7
第2節 糖外与処理前の組織の耐凍性検定	14
第3節 糖外与処理後の組織の生存性	21
第4節 糖外与処理後の組織の耐凍性	34
第2章 数種野菜組織における糖外与処理と組織内への糖の取込みおよび耐凍性の変化	40
第1節 第2章において用いる材料および共通的方法の概要	41
第2節 糖外与組織・細胞の fluid-phase endocytosis による糖の取込み	43
第3節 糖外与組織・細胞における耐凍性向上と糖輸送体による取込みとの関連	54
第3章 糖外与野菜組織における糖含量および耐凍性の変動と細胞構造の変化	61
第1節 第3章において用いる材料および共通的方法の概要	62
第2節 野菜組織・細胞への糖外与処理（高濃度糖溶液浸漬法）における糖の種類、濃度および処理時間と耐凍性向上との関連	68
第3節 野菜組織・細胞に対する糖外与処理（高濃度糖溶液浸漬法）の時間と糖取込み量との関連	75
第4節 短時間糖外与処理（高濃度糖溶液浸漬法）後の組織・細胞の凍結過程における構造変化と融解後における生存性向上との関連	78
第5節 野菜組織・細胞の凍結に伴う生存性の変動および構造変化と細胞壁の有無との相互関連に関する組織-プロトプラスト実験系による検証	89

第4章	野菜茎頂の培養による凍結前糖外与処理（糖前培養） と含水率、糖含量および耐凍性の変動ならびに細胞 内小器官および原形質膜超微細構造の変化・・・・・・・・・・	95
第1節	第4章において用いる材料および共通的方法の概要・・・・・・・・・・	96
第2節	培養法による長時間糖外与処理（糖前培養）後の野菜組織に おける含水率、糖含量および耐凍性の変化・・・・・・・・・・	101
第3節	培養法による長時間糖外与処理（糖前培養）後の野菜組織・ 細胞における細胞内小器官の構造変化・・・・・・・・・・	108
第4節	培養法による長時間糖外与処理（糖前培養）後の野菜組織・ 細胞の凍結過程における原形質膜超微細構造の変化と融解後 の生存性向上との関連・・・・・・・・・・	114
第5章	培養細胞に対する糖外与処理または低温処理と耐凍性、 糖含量およびタンパク質の変化・・・・・・・・・・	121
第1節	第5章において用いる材料および共通的方法の概要・・・・・・・・・・	122
第2節	embryogenic callus における耐凍性の変化と糖外与処理 または低温処理との関連・・・・・・・・・・	127
第3節	embryogenic callus における糖含量の変化と糖外与処理 または低温処理との関連・・・・・・・・・・	132
第4節	糖外与処理または低温処理後の embryogenic callus におけ る細胞内微細構造の変化・・・・・・・・・・	137
第5節	糖外与処理または低温処理後の embryogenic callus におけ るタンパク質の変化・・・・・・・・・・	139

第 6 章 総合考察	152
摘要	157
謝辞	167
引用文献	168

略語表

ABA	abscisic acid (アブシジン酸)
ADs	aparticulate domains
AP	alkaline phosphatase
BCIP	5-bromo-4-chloro-3 indoyl phosphate p-toluidine salt
BPB	bromophenol blue
BSA	bovine serum albumin
CLSM	confocal laser scanning microscope (共焦点レーザー顕微鏡)
COR	cold responsive
2,4-D	2,4-dichlorophenoxyacetic acid
DMSO	dimethyl sulfoxide (ジメチルスルホキシド)
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
EF	exoplasmic fracture face
EGTA	ethyleneglycol bis (2-aminoethylether)-tetraacetic acid
FDA	fluorescein diacetate
FJLs	fracture-jump lesions
FW	fresh weight (新鮮重)
ILA	inter lamellar attachment
IMI	inverted micellar intermediate
IMPs	intramembrane particles
H II	hexagonal II phase
HPLC	high performance liquid chromatography (高速液体クロマトグラフィー)
LEA	late-embryogenesis abundant
LT ₅₀	lethal freezing temperature of 50 % survival
LYCH	lucifer yellow carbohydrazide
MAFF	Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries (農林水産省)
MES	3-(n-morpholino) ethansulfonic acid
MOPS	2-(n-monopholino) sulfonic acid
NAA	1-naphthaleneacetic acid
NBT	nitro blue tetrazolium
PBS	phosphate buffered saline
PCMBS	p-chloromercuribenzenesulfonic acid
PEG	polyethylene glycol (ポリエチレングリコール)

PF	protoplasmic fracture face
PMSF	phenylmethanolsulfonyl fluoride
PMT	photo multi pleier
PVPP	polyvinylpolypyrrolidone
SD	standard deviation (標準偏差)
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
SEM	scanning electron microscope (走査型電子顕微鏡)
TCA	trichloroacetic acid
TEM	transmission electron microscope (透過型電子顕微鏡)

緒 論

21世紀を間近に控え、人口増加や地球環境の変化などから予想される食糧不足が懸念されている。これまでのバイオテクノロジーの発展による品種改良技術の進展は、生産性および地域適応性に優れるとともに消費者の嗜好に適合した作物品種を生み出すために、多種多様な植物遺伝資源を利用することを可能にした。将来、新たな品種を作出する必要性はますます高まると予想されるが、植物遺伝資源の亡失を防ぐことは今後の食糧確保と作物の育種にとって極めて重要である。このような現状の中で、消失後に再生不可能な植物資源の確保、ならびに育種に必要な遺伝的多様性の長期安定的確保に役立つ植物遺伝資源保存法の確立が急務となっている。本研究では、このような観点から、植物遺伝資源の凍結保存法に着目し、その技術的基礎となる事象について検討した。

1. 植物遺伝資源保存の現状

現在、国際農業研究機関や各国のMinistry of Agriculture, Forestry and Fisheries (MAFF) のGene Bankで保存されている植物遺伝資源の品目は総数で206,764点におよび、その約8割を占める168,400点は種子形態で保存されている (Miyashita et al., 1998)。大部分の作物種子は乾燥条件下で低温保存 (0 ~ -20℃) することにより、一定期間保存することができるが、安定的に長期間保存することは困難である。特に、乾燥、低温条件に耐えない種子、ならびに種子による保存維持が不可能な栄養繁殖性作物 (イモ類、果樹など) の品種および系統の長期保存は、さらに困難であり、このような作物では、保存対象形態として栄養体 (器官、組織など) が用いられ、現在、約38,000点の栄養体遺伝資源が主として圃場で保存されている (Miyashita et al., 1998)。しかし、圃場に栽植して保存するには、多大な労力、管理費などのほか、広大な土地が必要であり、さらに、屋外で行われることから、常に自然災害による傷害、疫病の蔓延、病害虫による侵食などに起因する絶滅の危険性を考慮しなければならない (八鍬・岡, 1987)。一方、最近では、組織培養法が確立している植物組織については、組織培養法を利用した試験管内での保存が普及してきており、小面積の管理された空間内で、低温、短日、低湿あるいは培地浸透圧を高

くするなどの条件下で生長を抑制しながら、継代培養を繰り返しつつ保存し、必要に応じて個体を復元することが可能になっている。野菜類の遺伝資源保存では、実に1,780点がこの試験管内保存で継代維持されている（Miyashita et al., 1998）。しかし、この方法においても、短期間の培養を繰り返す必要があって、植え継ぎは不可欠であり、また継代培養中に遺伝的・生理的変異の起こる可能性および汚染の危険が常にあり、多種多様な遺伝資源を対象とする確実な長期的保存法とは必ずしも言えない。

2. 長期安定的な遺伝資源保存法としての凍結保存

このような状況下で、液体窒素中における凍結保存が、有力な長期安定的な保存方法として注目を浴びている。動植物の組織・細胞では、超低温下（液体窒素上の気層の -150°C 以下から液体窒素中温度の -196°C まで）での凍結保存法が、医学（阿曾・隅田, 1983）または農学（酒井, 1987）などの分野で広く活用されている。この凍結保存法では、信頼度の高い長期保存が可能であるとともに、労力および費用の大幅な節減と保存面積の縮小が可能である。しかし、凍結は生物体にとってしばしば死の原因となりうるため、凍結保存法では、凍結傷害を防止するための様々な試みが行われてきている。

血液・精子・卵細胞・癌細胞などの動物細胞では、1950年代からグリセリンを凍害防御物質として使用することにより、凍結保存は実用化段階になっていた。一方、植物細胞では、グリセリンは、その浸透性の問題から、凍害防御効果が低く（酒井, 1987）、動物細胞に比べ、凍結保存の研究が遅れた感は否めない。また、動物では、細胞レベルでの保存が目的とされていたのに対して、植物では、多くの場合、応用面において植物体再生を必要とするため、組織レベルでの保存を目指しており、凍結対象となる試料の大きさにおいても植物組織の凍結保存は容易ではなかった。植物では、オノエヤナギ（*Salix sachalinensis*）の休眠枝を液体窒素中で凍結保存したのが初めての報告例であったが（酒井, 1956）、この材料は構造面においても本来的に高い耐凍性（組織のもつ属性としての凍結に対する耐性）をもつものであり、凍結保存は試料の前処理を全く施さずに行われた。その後、1970年代に入り、逆に耐凍性が低い植物組織・細胞を遺伝資源保存の目的で凍結保存する試みが盛んに行われるようになり、試行錯誤の末、様々な凍結前処理が考案され、凍害防御効果（凍

結保存材料の被る凍害を防ぎ軽減する効果) の高いジメチルスルホキシド (DMSO) や糖類の使用により、植物組織・細胞の凍結保存に関する研究は飛躍的に進歩した。

凍結保存対象材料としての植物茎頂は、凍結融解後の組織培養により、植物体再生が可能であり、遺伝的変異の危険性が少なく、また、ウイルスフリーのクローン個体が大量に得られるなどの利点があり、凍結保存対象として広く用いられている。カーネーション (*Dianthus caryophyllus*) の茎頂の凍結保存が、凍害防御物質としてDMSOを用いることによって成功したのち (Seibert et al., 1976)、1970年代から80年代にかけて種々の植物における茎頂の凍結保存に関する研究が盛んになった。トマト (*Lycopersicon esculentum*) の茎頂では、10～15%のDMSO溶液内で試料を緩速予備凍結することにより凍結保存に成功し (Grout et al., 1978)、ジャガイモ (*Solanum tuberosum*) の茎頂では、凍結前に10%のDMSOを添加したMurashige & Skoog (MS) 培地で3日間培養し (前培養)、10%DMSO溶液浸漬処理を行ったのち、その溶液ごと急速凍結することにより凍結保存に成功した (Grout et al., 1978)。また、エンドウ (*Pisum sativum*) の茎頂では、5 %DMSOを添加した培地で2日間前培養後、5 %DMSO溶液浸漬処理を行うことにより凍結保存に成功している (Karthä et al., 1979)。

3. 凍結保存における糖外与処理の役割

しかし、保存対象 (例えばカーネーション茎頂) によっては、前培養培地に、DMSOとグルコース、ソルビトール、スクロースなどの糖類とを組み合わせることで添加することにより、凍結融解後の生存率が、さらに高まることが報告され (Sakai, 1985)、その後、糖を単独で添加した培地による前培養を行った場合においても、DMSO単独添加より高い凍害防御効果が得られることがアスパラガス (*Asparagus officinalis*) (金子ら, 1992) およびバナナ (*Musa spp.*) (Panis et al., 1996) の茎頂で報告されている。

また、茎頂と同様に植物体再生および大量増殖が容易であり、凍結保存に有利な小型の細胞からなるembryogenic callusの凍結保存においても、最初はDMSOを添加した溶液を用いた凍結前培養が行われていたが (Withers, 1979; Karthä et al., 1982)、その後、糖を単独で添加した培地での長期間前培養の

みが行われるようになった (Maddox et al., 1982/83; Blakesley et al., 1996, 1997)。タバコ (*Nicotiana tabacum*) のembryogenic callusでは、6 % ソルビトールまたはマンニトールを含む培地で2日間から5日間前培養し、その状態で緩速冷却し凍結することにより、融解後の生存率が70 % 前後の高い値を示し (Maddox et al., 1982/83)、サツマイモ (*Ipomoea batatas*) のembryogenic callusでは、0.1Mスクロースを添加したMS培地で3日間培養し、次いで0.4Mで6日間、続いて0.7Mで3日間培養し、段階的に糖濃度を高くして、十分に糖を取り込ませたのち、そのまま液体窒素中で急速凍結することにより80%の試料が生存することがわかっている (Blakesley et al., 1996, 1997)。

一方、最近広く用いられているガラス化法による凍結保存法 (Steponkus et al., 1992; Matsumoto and Sakai, 1998) においても糖の果たす役割は大きい。ガラス化法は、グリセリン、エチレングリコール、DMSOおよびスクロースなどの凍害防御作用のある物質を高濃度で含む液 (ガラス化液) 中に試料を浸漬し、これらの物質を浸透的に取り込ませた後、液体窒素に入れ急速冷却する方法であるが、この方法においてもガラス化液への糖の添加が必要であるとともに、試料をガラス化液に浸漬する前に糖 (0.2~0.7M) を含む培地による前培養を行った場合に、凍結融解後の生存率がさらに高くなることが、ナシ (*Pyrus pyrifolia*) の茎頂 (新野ら, 1991)、オウトウ (*Prunus avium*) の茎頂 (Niino et al., 1997)、イネ (*Oryza sativa*) のembryogenic callus (Wang et al., 1998) などで明らかになっている。ガラス化法を緩慢な脱水および試料の取り扱いという点で改良したアルギン酸ビーズ・ガラス化法においても、ガラス化液での処理前に高濃度 (0.5~1.0M) の糖溶液による試料の前培養を行うと、高い生存率をもたらすことが、コーヒー (*Coffea canephora*) の体細胞胚 (Hatanaka et al., 1994)、セイヨウワサビ (*Armoracia rusticana*) の毛状根 (Phunchindawan et al., 1997)、ヤマイモ (*Dioscorea alata*) の茎頂 (Maurie et al., 1998) などで明らかになっている。

このように、糖類は、植物組織の凍結保存において大きな働きを示すとともに、自然界における植物の低温馴化に伴う耐凍性増大過程においても重要な役割を果たしている (Levitt, 1980; Sakai and Larcher, 1987)。植物の種類によって異なるが、多くの植物において、グルコース、ソルビトール、スクロース、ラフィノース、スタキオースなどの可溶性糖類が晩秋の気温低下とともに

に細胞内に多量に蓄積し、耐凍性が増大することはよく知られた事実である(柏田, 1955 ; Jeremias, 1958; Parker, 1959; 酒井, 1960; Trunova, 1963; Sakai and Yoshida, 1968; Levitt, 1980; Fowler et al., 1981)。

4. 糖外与処理による凍害防御機構

このように植物組織の耐凍性には糖が深く関わっているが、糖が示す凍害防御機構の詳細については未だ不明な点が多い。グリセリンやDMSOなどの細胞膜透過型凍害防御物質の効果は、細胞内に浸透し、溶液の氷点降下をもたらすとともに、凍結濃縮による細胞内外の塩濃度の上昇を抑制するというこれらの物質の束一性 (colligative property) に起因すると考えられている (Lovelock, 1953)。糖は、グリセリンやDMSOと同様に束一的な凍害防御効果をもつことが報告されている (Meryman et al., 1977; Lineberger and Steponkus, 1980)。一方、糖の種類の違いによって凍害防御効果が異なることも知られており、糖はまた、非束一的な防御効果をもつと推定されている (Crowe, et al., 1988 ; Leborgne et al., 1995)。糖が示すこのような非束一的な防御効果は、糖が水素結合により膜表面の脂質極性基と結合して水の代替作用を現すことにより (Crowe and Crowe, 1984)、あるいは、膜表面と直接的に結合することはないが、凍結濃縮により糖が膜表面でガラス化し膜を包むように保護することにより (Leslie et al., 1995)、いずれも膜の安定化をもたらし、傷害発生を防止するものと推定されている。さらに、糖が示すこのような直接的な防御効果に加え、凍結前の糖外与処理においては、外与糖が細胞にもたらす浸透圧変化に基づく効果も無視できない。多くの植物細胞において、浸透圧ストレスは細胞の遺伝子発現に影響を与え (Koch, 1996)、耐凍性獲得と関連した様々なタンパク質形成を誘導することが知られている (Guy, 1990; Gusta, 1996; Thomashow, 1998)。

5. 本研究の目的と構成

糖外与処理を行ったのちに高い耐凍性を獲得した植物組織では、その後の液体窒素による凍結保存が容易になることは広く知られ (酒井, 1961)、前述のように、その凍害防御効果について多くの仮説が提唱されている。しかし、凍結保存過

程における糖外与処理の役割については未だ多くの疑問が残されており、①糖外与処理により凍結融解後の生存率が向上する多くの植物組織があり、一方ではその効果がほとんどみられない植物組織があるが、この理由は何か、②糖外与処理により、糖は細胞内にどのような経路で取り込まれるのか、③細胞内に糖が取り込まれない場合においても耐凍性が向上することがあり、また、細胞内に糖が取り込まれると、より高い耐凍性が得られるが、この理由は何か、④浸透圧ストレスは、耐凍性増大に関与するタンパク質などの発現を誘導することが知られているが、糖添加培地を用いた凍結前の培養により、このような変化が起こるか否かなどについては、これまで明らかにされていない。

本研究は、植物遺伝資源凍結保存技術の基礎となる事象を提起し、それらの相互関連を明らかにすることを目的として、タマネギ鱗葉組織、キャベツ葉柄組織、キャベツ葉肉組織、アスパラガス茎頂およびアスパラガス embryogenic callusなどを用い、糖外与処理による耐凍性増大効果の発現機構について検討したもので、次のように構成されている。第1章では、糖外与処理自体が植物組織に及ぼす影響について検討するため、タマネギ鱗葉組織、キャベツ葉柄組織およびアスパラガス茎頂を用い、これらの試料に対する糖外与処理による生存率の変化を調べた。第2章では、糖外与処理による糖の取込み過程を明らかにするため、共焦点レーザー顕微鏡を用い、糖の取込み経路を可視的に追跡し、糖が細胞内に取り込まれることによって試料の耐凍性が増大することを明らかにするとともに、糖が細胞内に取り込まれなくても耐凍性が増大する事例があることを示し、糖の働きについてさらに広い観点から検討した。次に、第3章では、キャベツ葉肉組織を用い、糖が取り込まれない場合の耐凍性増大機構について、Cryo-SEM [Cryo-unit (凍結切断装置) を装着した走査型電子顕微鏡 (scanning electron microscope)] を用い構造的側面から探究した。さらに、第4章では、アスパラガス茎頂を用い、細胞内に糖が取り込まれることにより耐凍性が増大する機構について、フリーズ・フラクチャー・レプリカ法を用い、微細構造の変化について究明した。第5章では、糖外与処理により耐凍性が著しく増大するアスパラガス embryogenic callus を用い、糖外与処理により特定のタンパク質が誘導されることを明らかにした。最後に、第6章においては、以上の研究結果を踏まえ、糖外与処理による耐凍性増大機構について総合的に考察した。

第 1 章 数種野菜組織における糖外与処理と生存性および耐凍性 の変化

緒論において述べたように、植物組織を凍結保存する場合には、高濃度の糖溶液を用いた一定時間の浸漬処理（高濃度糖溶液浸漬）または高濃度の糖を含む培地での培養（糖前培養）などによる糖外与処理を施すことにより、凍結融解後の生存率が著しく向上することが知られている（Withers and Street, 1977; Maddox et al., 1982/83; Blakesley et al., 1996, 1997）。しかし、糖外与処理は、全ての植物組織について、凍結融解後の生存率向上に有効というわけではなく、植物種が異なれば糖外与処理の効果も異なり、ほとんど効果のない試料も存在する。このことが、広範な植物種における遺伝資源凍結保存のための植物組織凍結保存技術を確立する場合の大きな障害の一つとなっている。また、アスパラガス茎頂の凍結保存では、所定時間以上の糖外与処理を行うことにより、耐凍性の低下を招くことが知られている（Kumu et al., 1983）。このように、植物組織によって糖外与処理の凍害防御効果に差異が生ずる理由、あるいは長時間の糖外与処理によって耐凍性が低下する理由は明らかでない。これらの理由を明らかにすることは、多様な植物組織の凍結保存を成功させる上で非常に重要であると考えられる。

本章では、耐凍性増大に対する糖外与処理効果の植物種による違いの理由を明らかにするため、タマネギ (*Allium cepa* L.) 鱗葉組織、キャベツ (*Brassica oleracea* L.) 葉柄組織、およびアスパラガス (*Asparagus officinalis* L.) 若茎頭部小側枝茎頂の 3 種類の野菜組織を用い、これらの未処理試料の耐凍性を明らかにするとともに、糖外与処理による生存率の変化および糖外与処理後の耐凍性の変化について調べた。

第 1 節 第 1 章において用いる材料および共通的方法の概要

本章で用いる材料および共通的方法の詳細については、特に本節において予め述べることにする。

1. 材料の調製

タマネギ (*Allium cepa* L.) 品種・札幌黄の鱗葉組織の調製は次のように行った。室温 (22℃) に置いてあったタマネギ鱗茎の保護葉および肥厚葉を除去し、鱗葉から組織片 [5mm×2mm×0.5mm (厚さ)] (Fig.1) を切り取り、材料として用いた。

キャベツ (*Brassica oleracea* L.) については、品種・アーリーボールを用い、1997年12月中旬から1998年12月下旬に北海道大学低温科学研究所温室内 (室温26℃、湿度70%) で育成した幼植物 (草丈約15cm) の葉を葉柄基部から切り取り、葉柄から表皮を除去したのち、組織片 [5mm×2mm×0.5mm (厚さ)] (Fig.2) に調製し材料として用いた。

アスパラガス (*Asparagus officinalis* L.) については、品種・メリーワシントン500Wを用いた。1995年から1998年までそれぞれの年の晩秋に、定植8年目から12年目に相当する株 (北海道大学農学部附属農場に栽植してある) を掘り上げ、北海道大学低温科学研究所温室内 (室温26℃、湿度70%) のプランターに順次移植し、若茎を萌芽させた。若茎は、12月下旬から翌年の2月上旬までに逐次萌芽させ、長さ約10cmの若茎を採取して、その若茎頭部 (Fig.3-A) の未発育小側枝の茎頂 (約1.5mm) (Fig.3-B) を摘出し材料として用いた。

2. 糖外与処理

糖外与処理は、試料をソルビトール高濃度 (0.8M) 溶液 (pH5.7) に所定時間浸漬することにより行い、対照試料として、全く処理を施さない試料 (未処理試料) を用いた。本章における糖分析試料は、全て、糖外与処理後に高濃度 (0.8M) のポリエチレングリコール400溶液で軽くすすぎ、引き続き試料表面に付着した溶液を濾紙で拭い取ってから用いた。



Fig.1. Segments [5mm × 2mm × 0.5mm (thickness)] excised from scaly leaf of mature onion bulbs (*Allium cepa* L. cv. Sapporo Yellow) used for experiment. Scale = 5 mm.



Fig.2. Petiole segments [$5\text{mm} \times 2\text{mm} \times 0.5\text{mm}$ (thickness)] excised from true leaflet from 30-day-old cabbage plantlets (*Brassica oleracea* L. cv. Early Ball) (about 15cm in height) used for experiment. Scale = 5 mm.

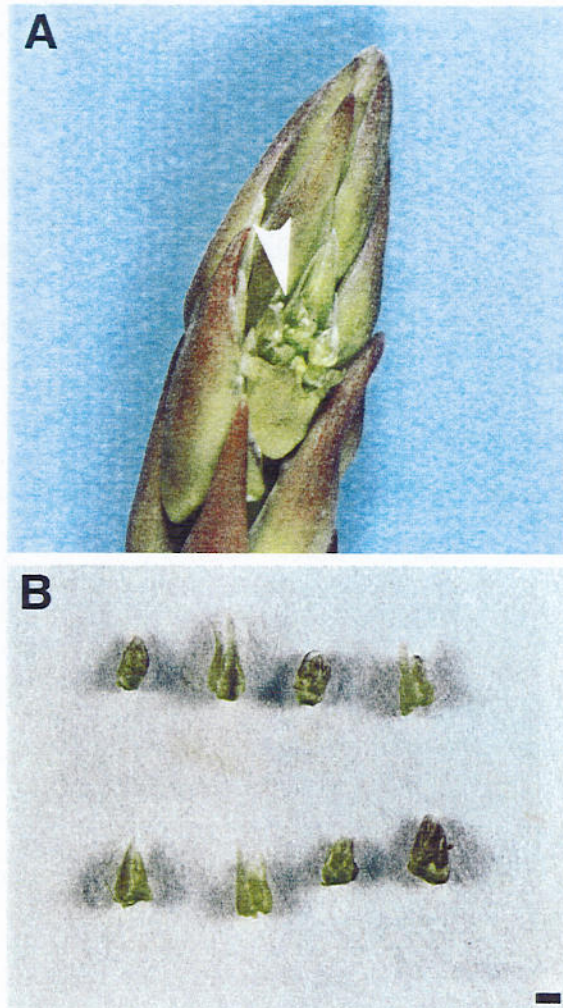


Fig.3. Preparation of asparagus (*Asparagus officinalis* L. cv. Mary Washington 500W) plant materials. (A) Nondeveloped small lateral shoots (arrowhead) covered with true leaves in spear tips; (B) Excised small lateral shoots used for experiment. Scales = 1cm.

一方、溶液浸透価の急激な低下による試料の生存性の変化を調べるため、ソルビトール高濃度（0.8M）溶液処理後、蒸留水を加えることにより、試料ごと、この液を0.4Mまで希釈し、そのまま1時間放置した場合における試料の生存性を調べた。

3. 生存性の評価

（1）電解質漏出法 電解質漏出法による試料の生存性の評価は次のように行った。所定時間の糖外与処理後、または凍結・融解後の組織片（アスパラガスは茎頂のまま）を糖溶液とともに試験管に入れ、パラフィルムで口を封じたのち、振とう器（Taiyo, Rotary Shaker R-II mini）を用いて120rpmで4時間振とうした。振とう後、試料から溶液中に漏出した電解質量を、イオン伝導度計（Horiba, Twin Cond conductivity meter B-173）を用いて測定した。測定後、試験管を100℃で10分間加熱後、放冷し、パラフィルムで口を封じて、再度120rpmで1時間振とう後、2回目の電解質漏出量を測定した。未処理試料および液体窒素に直接浸漬した試料（人為的に組織中の全細胞を死滅させた試料）についても、上述の方法に準じて電解質漏出量を測定した。

また、糖外与処理後または凍結・融解後の試料の生存率については、以下の方法（Pearce and Willison, 1985）に基づき算出した。未処理試料の電解質漏出量／未処理試料の加熱後の電解質漏出量＝X、液体窒素凍結試料の電解質漏出量／液体窒素凍結試料の加熱後の電解質漏出量＝Y、糖外与処理試料または凍結・融解試料の電解質漏出量／糖外与処理試料または凍結・融解試料の加熱後の電解質漏出量＝Zとし、糖外与処理後または凍結・融解後の試料の生存率（％）＝ $[1 - (Z - X) / (Y - X)] \times 100$ によって求めた。

試料の耐凍性は、所定温度における試料の生存率（％）、または所定温度における試料の生存率から求めた生存率曲線に基づいて決定したLT₅₀〔組織中の50％の細胞が死滅する凍結温度（℃）〕で表した。

（2）FDA染色法 FDA染色法（Widholm, 1972）による試料の生存性の評価は次のように行った。糖外与処理後、または凍結・融解後の試料（アスパラ

ガス茎頂については、処理後に厚さ0.2～0.5mmの切片に調製)を10 μ Mの fluorescein diacetate (FDA) 水溶液に10分間浸漬し、その後FDAを含まない液体培地中で3回洗浄(5分間隔)したのち、共焦点レーザー顕微鏡[Bio-Rad, MRC-1024 (computer, Pentium; operating system, OS/2 Warp Connect)]で観察した。観察時の条件は以下のとおりである。組織・細胞内の葉緑体の直蛍光を感受する蛍光検出器[PMT (photo multi pleiyer) (Bio-Rad, S-20E)]1のEmission filterとして680nm filterを用い、FDAの蛍光を感受するPMT2のEmission filterとして540/30nm filterを用いた。共焦点レーザー顕微鏡のシステムモニター上における赤色光(擬似色)は、葉緑体の局在を示し、緑黄色光(擬似色)は、FDAの蛍光、すなわち細胞が生存していることを示す。蛍光の励起には488nmのArgon/Kryptonレーザーを、基本としてレーザー強度10%以下で観察した。観察画像は二次元画像として、または画像処理ソフトウェアにより三次元画像として解析した。FDA染色(Widholm, 1972)による試料の生存性の評価法は、蛍光染色(FDAは、生存している細胞の細胞質内エステラーゼと反応し緑黄色の蛍光を発する)によって個々の細胞の生死を示すもので、細胞レベルでの評価に適している。すなわち、電解質漏出法が組織の平均的な生存率評価に適しているのに対し、FDA染色法は生存率を細胞レベルで微視的に捉えるのに適している。

4.糖分析

糖分析試料は、以下のように調製した。糖外与処理後の試料をポリエチレングリコール400の0.8M溶液で軽くすすぎ、引き続き試料表面に付着したポリエチレングリコール溶液を濾紙で拭ったのち、電子天秤(AND Co., Ltd., HF-200)を用い約200mg(生重)を秤量した。試料に0.2N過塩素酸および標準物質として20mMラクトースを添加し、0℃の乳鉢中で海砂とともに摩砕後、遠心分離機(Sakuma, model M-160-IV)を用いて4℃、14,000 rpmの条件で5分間遠心分離した。上清を5ml容クライオチューブに移し、KHCO₃粉末を用いてpH4に調整したのち凍結乾燥した。この乾燥試料を0.5mlの蒸留水で溶解後、マイクロチューブに移して14,000 rpmの条件で5分間遠心分離し、上清

10 μ lについて糖分析を行った。

調製試料は、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を用いて分析した。HPLCの条件は以下のとおりである。カラムにアミノ・カラム(旭化成, NH₂P-50 4E Shodex)を用い、検出器に示差屈折計(日立, L-3300型RIモニター)を用いた。糖の溶離は、30℃設定のカラムオーブン(日立, L-5020型)で、75%アセトニトリル溶離液(流速0.7ml/min)を用いて行った。分析は2回反復し、その平均値を求めた。

5.凍結および融解

試料の凍結は次のように行った。未処理試料はそのままの状態、糖外与処理試料は試料表面に付着した糖溶液を濾紙で除去したのち、5 ml容試験管に組織片を4～5枚、または茎頂を約10個入れ、プログラミング・フリーザーで冷却した。試料は、-2℃で温度平衡後、同温で植氷し、所定温度まで冷却した。冷却速度は、アスパラガス茎頂およびキャベツ葉柄組織では0.1℃/min、タマネギ鱗葉組織では0.05℃/minとし、熱電対を用いて冷却速度を測定しながら凍結処理を行った。なお、これらの冷却速度は、組織細胞が細胞外凍結を起こす速度であり(タマネギ鱗葉組織では、0.05℃/min以下の冷却速度で細胞外凍結する)、各試料中で細胞外凍結が確実に起こることをCryo-SEMを用いた予備実験で予め確認している。

試料の融解は、所定温度に達した試験管(試料および液が入っている)を34℃温水中に浸漬すると同時に試験管内に糖外与処理溶液を注入する(未処理試料の場合は蒸留水を注入)ことにより行った(10℃/min)。試料の耐凍性は、急速融解した試料について、本章、第1節、3の方法(電解質漏出法およびFDA染色法)に準じて生死を判断し生存率を算出することにより評価した。

第2節 糖外与処理前の組織の耐凍性検定

糖外与処理による耐凍性増大効果の小さい組織としてタマネギ鱗葉組織を、

対照試料としてキャベツ葉柄組織およびアスパラガス茎頂を用い、組織本来の耐凍性に及ぼす糖外与処理の影響について電解質漏出法およびFDA染色法により調べた。

1. 材料および方法

材料は、タマネギ (*Allium cepa* L.) の鱗葉組織片、キャベツ (*Brassica oleracea* L.) の葉柄組織片およびアスパラガスの (*Asparagus officinalis* L.) 茎頂を用いた。また、糖外与処理、生存率の算出、凍結および融解については、本章第1節で述べた方法に準じて行った。

2. 結果

(1) 電解質漏出法による糖外与処理前組織の耐凍性の検定 タマネギ鱗葉組織、キャベツ葉柄組織およびアスパラガス茎頂を用いて、全く処理を施さない未処理試料の耐凍性を電解質漏出法により調べた結果は、Fig.4に示したとおりである。その結果、いずれの試料もほぼ同じ生存曲線を描き、 -10°C までの凍結ではほとんどの細胞が死滅した。タマネギ鱗葉組織、キャベツ葉柄組織およびアスパラガス茎頂の LT_{50} は、それぞれ -2.7°C 、 -3.3°C および -4.0°C であり、アスパラガス茎頂が若干高い耐凍性を示した。

(2) FDA染色法による糖外与処理前組織の耐凍性の検定 FDA染色法により、これら未処理試料の耐凍性を調べた結果は、Figs.5~7に示したとおりである。タマネギ鱗葉の未処理試料では、直径 $50\sim 100\mu\text{m}$ の生存細胞 (FDAによって緑黄色に染色された細胞) が試料全域にわたって観察されたが (Fig.5-A)、 -2°C で植氷・凍結した試料では、生存細胞が著しく減少し (Fig.5-B)、 -5°C (Fig.5-C) および -10°C (Fig.5-D) まで冷却し凍結した試料では生存細胞は全くみられなくなった。

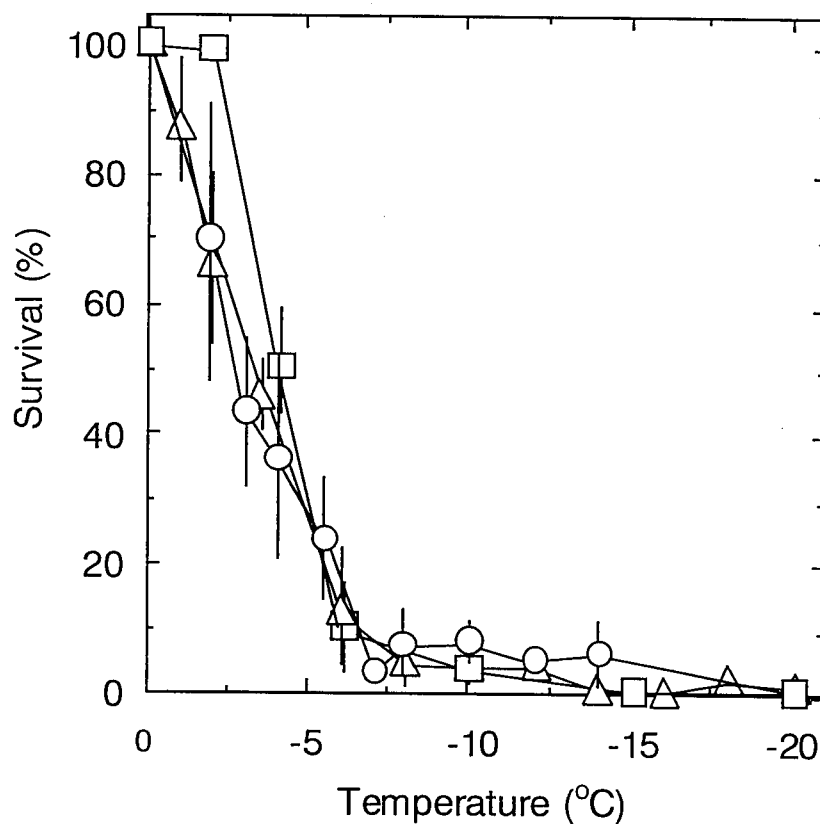


Fig.4. Differences in survivals in nontreated onion bulb scaly leaf tissues (○), nontreated cabbage petiole tissues (△) and nontreated asparagus shoot tips (□) in relation to freeze-thawing. For freezing, cooling rate of 0.05°C/min was used for onion and 0.1°C/min for cabbage and asparagus. All samples were thawed at about 10°C/min to room temperature (22°C). Survival was determined by ion leakage. Bars = SD from three preparations.

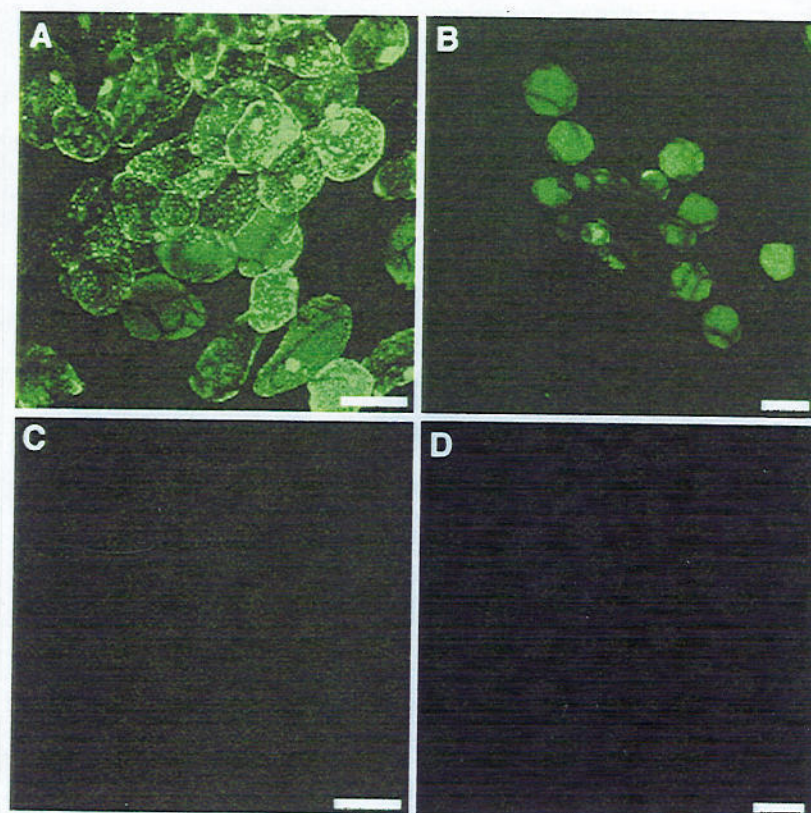


Fig.5. Confocal laser scanning microscope (CLSM) images showing fluorescein diacetate (FDA) vital staining of nontreated onion bulb scaly leaf tissues. (A) Sample before freezing. Samples cooled at 0.05°C/min to -2°C (B), -5°C (C) and -10°C (D). All samples were thawed at about 10°C/min to room temperature (22°C). Greenish-yellow regions correspond to survived cells. Scales = 100 μ m.

キャベツ葉柄組織においても未処理試料では、試料全域に、直径50～100 μ mの生存細胞がみられたが（Fig.6-A）、植氷直後から生存細胞の著しい減少がみられ（Fig.6-B）、-5℃まで冷却し凍結した試料では、直径10～50 μ mの小細胞のみが生存し（Fig.6-C）、-10℃まで冷却し凍結した試料では生存細胞は全くみられなくなった（Fig.6-D）。これらのタマネギ鱗葉組織とキャベツ葉柄組織におけるFDA染色法による耐凍性評価の結果は、電解質漏出法による耐凍性評価の結果と一致した。

アスパラガス茎頂（Fig.7-A）では、植氷後に生存細胞が急激に減少したが、頂端分裂組織などの特定の細胞については-7.5℃まで冷却し凍結しても多くの生存細胞がみられた（Fig.7-B）。しかし、試料を-12.5℃まで冷却し凍結した場合（Fig.7-C）、または、このような緩速冷却を行うことなく、茎頂を液体窒素に直接浸漬し凍結した場合（Fig.7-D）は、特定の細胞も死滅した。

以上の結果から、電解質漏出法では、タマネギ鱗葉組織、キャベツ葉柄組織、アスパラガス茎頂の未処理試料における耐凍性がほぼ同じであることがわかったが、FDA染色法では、アスパラガス茎頂の頂端分裂組織が、用いた組織の中で最も高い耐凍性をもつことが明らかになった。

3. 考察

タマネギの鱗茎は、通常、0℃から室温までの温度で貯蔵されるが、氷点下の低温に遭遇すると凍結傷害を被る。実験的には、-4℃で凍結傷害が生ずることが知られている（Palta et al., 1977）。一方、キャベツの葉は、糖外与処理によって比較的高い耐凍性を獲得することが知られており、糖と耐凍性の関連性についての研究材料として、これまで広く用いられてきた（Sakai and Yoshida, 1968; Sasaki et al., 1996; 佐々木ら, 1997）。また、アスパラガスの茎頂は、凍結保存の対象とされており、糖前培養によって高い耐凍性を獲得することが知られている（金子ら, 1992; 鈴木, 1993）。

電解質漏出法により評価した、タマネギ鱗葉組織、キャベツ葉柄組織およびアスパラガス茎頂の未処理試料の耐凍性は、各試料ともほぼ同じ（LT₅₀で-3℃前後）であった。しかし、個々の細胞の耐凍性をFDA染色法によって調べた

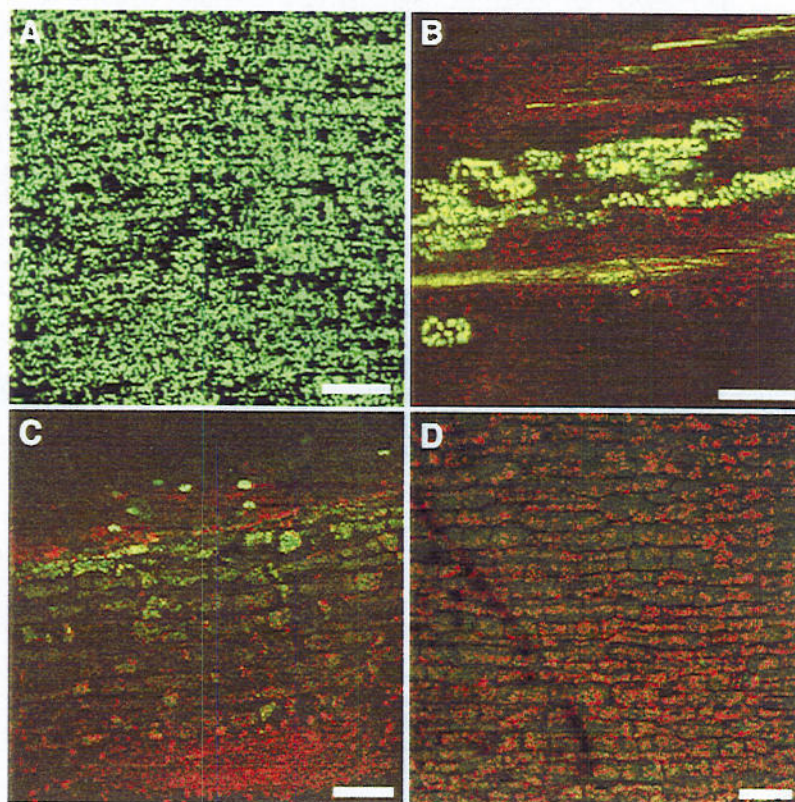


Fig.6. CLSM images showing FDA vital staining of nontreated cabbage petiole tissues. (A) Sample before freezing. Samples cooled at $0.1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ to -2°C (B), -5°C (C) and -10°C (D). All samples were thawed at about $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ to room temperature (22°C). Greenish-yellow and red regions correspond to survived cells and died cells, respectively. Scales = $100\ \mu\text{m}$.

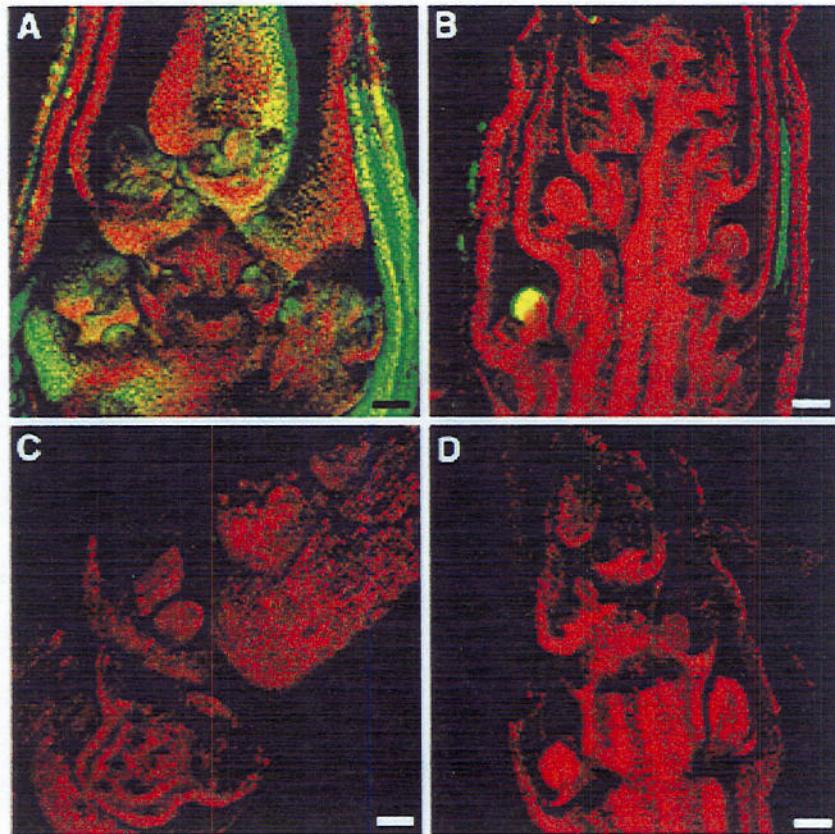


Fig.7. CLSM images showing FDA vital staining of nontreated asparagus shoot tips. (A) Sample before freezing. Samples cooled at 0.1°C/min to -7.5°C (B) and -12.5°C (C). (D) Sample directly immersed into liquid nitrogen. All samples were thawed at about 10°C/min to room temperature (22°C). Greenish-yellow and red regions correspond to survived cells and died cells, respectively. Scales = 100 μ m.

ところ、アスパラガス茎頂では、その頂端分裂組織、葉原基、皮層細胞などの特定の細胞に限り、電解質漏出法による耐凍性評価値 ($LT_{50}=-4^{\circ}\text{C}$) よりはるかに高い耐凍性 ($-5^{\circ}\text{C}>LT_{50}>-7.5^{\circ}\text{C}$) をもつことが明らかになった。これは、電解質漏出法では、高い耐凍性をもつ頂端分裂組織などの特定の細胞と、他の耐凍性の低い細胞とを区別せず、全体として評価したことによると考えられる。FDA染色法により、高い耐凍性をもつことがわかったアスパラガス茎頂の頂端分裂組織は、凍結保存の際、植物体再生の原基となる部位である（鈴木、1993）。このため、アスパラガスについては、状況に応じて、茎頂の頂端分裂組織に着目して実験を進める必要がある。電解質漏出法とFDA染色法による以上の結果から、未処理試料の耐凍性は、組織・細胞の性質が斉一なタマネギおよびキャベツの未処理試料では、 $LT_{50}=-3^{\circ}\text{C}$ 前後であり、未処理のアスパラガス茎頂の頂端分裂組織では、 LT_{50} で -5°C より低く -7.5°C より高いところにあることが明らかになった。

本実験で用いたアスパラガス茎頂は、未発育小側枝の先端部であって複数以上の生長点部をもっており、その中の一つでも生存していれば植物体を再生し得ることから、前述の頂端分裂組織の耐凍性が相対的に高いことと併せて考えると、利点の多い凍結保存材料であると思われる。

第3節 糖外与処理後の組織の生存性

第2節で用いたタマネギ鱗葉組織、キャベツ葉柄組織およびアスパラガス茎頂の糖外与処理自体に対する耐性を電解質漏出法およびFDA染色法により調べた。また、タマネギ鱗葉組織およびキャベツ葉柄組織を用い、糖外与処理による組織内糖含量の変化について調べた。さらに、希釈による浸透圧変化に対する耐性を電解質漏出法およびFDA染色法により調べた。

1. 材料および方法

材料は、タマネギ (*Allium cepa* L.) 鱗葉組織片、キャベツ (*Brassica oleracea* L.) 葉柄組織片およびアスパラガス (*Asparagus officinalis* L.) 茎頂を用いた。また、糖外与処理、耐凍性の評価、凍結および融解、糖分析については、本章第1節で述べた方法に準じて行った。

2. 結果

(1) 糖外与処理時間の経過に伴う生存率の変化 タマネギ鱗葉組織、キャベツ葉柄組織およびアスパラガス茎頂を用いて、ソルビトール高濃度 (0.8M) 溶液による糖外与処理の時間の長短が生存率に及ぼす影響について、電解質漏出法により調べた (Fig.8)。その結果、いずれの試料においても、糖外与処理時間の経過に伴い生存率が低下した。特に、タマネギ鱗葉組織では、糖外与処理直後から2日後までに急激な生存率の低下がみられた。これとは対照的に、キャベツ葉柄組織では、短時間の糖外与処理による急激な生存率低下は認められず、処理開始7日後においても50%以上の高い生存率を示した。一方、アスパラガス茎頂では、タマネギ鱗葉組織とキャベツ葉柄組織との中間的な生存率の低下を示した。

次に、FDA染色法により、ソルビトール高濃度 (0.8M) 溶液による糖外与処理の時間の長短が各試料の生存率に及ぼす影響について調べた (Figs.9~11)。タマネギ鱗葉細胞 (Fig.9-A) では、糖外与処理直後から原形質分離が起こり、処理1時間後にはさらに進行したが、ほとんどの細胞は生存していた (Fig.9-B)。しかし、糖外与処理開始6時間後には多くの細胞が死滅していた (Fig.9-C)。

キャベツ葉柄細胞 (Fig.10-A) においても、糖外与処理によって原形質分離が起きたが (Fig.10-B)、糖外与処理開始24時間後においてもほとんどの細胞は生存していた (Fig.10-C)。

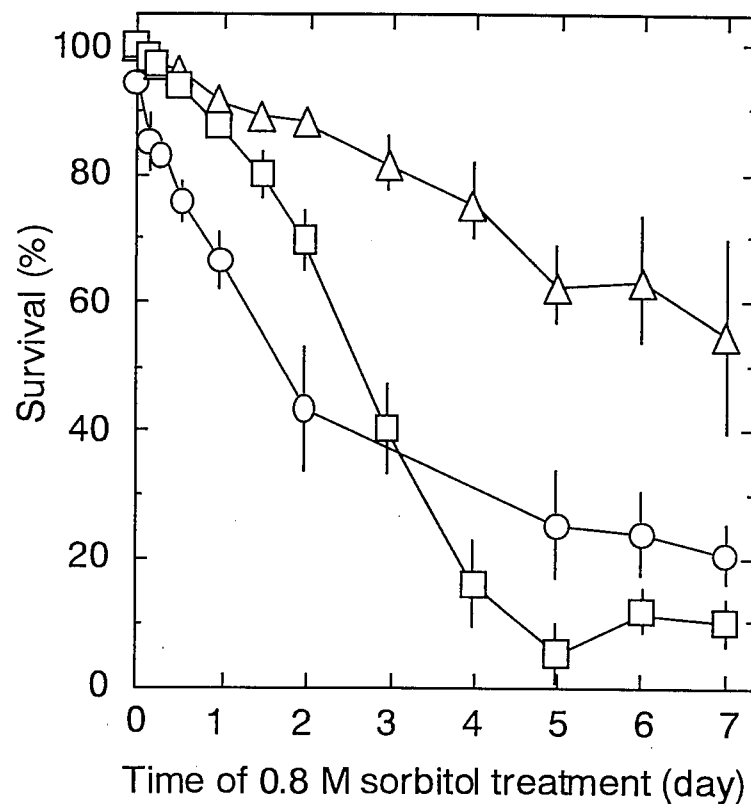


Fig.8. Differences in survivals in onion bulb scaly leaf tissues (○), cabbage petiole tissues (△) and asparagus shoot tips (□) in relation to treatment with 0.8 M sorbitol solution. Survival was determined by ion leakage. Bars = SD from three preparations.

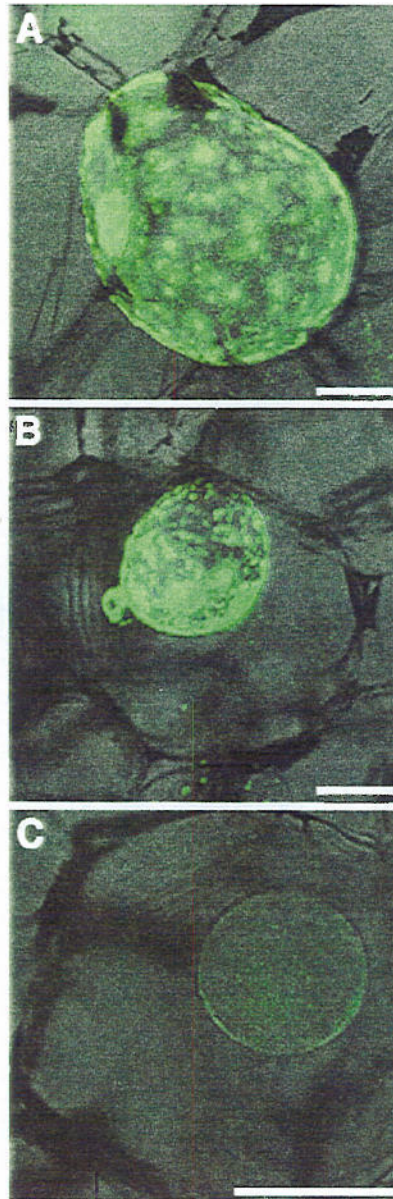


Fig.9. CLSM images showing FDA vital staining of onion bulb scaly leaf cells treated with 0.8 M sorbitol solution for 1hr (**B**) and, for 6 hr (**C**). (**A**) Nontreated sample without exogeneous supplement of sorbitol. Greenish-yellow regions correspond to survived cells. Scales = 50 μ m.

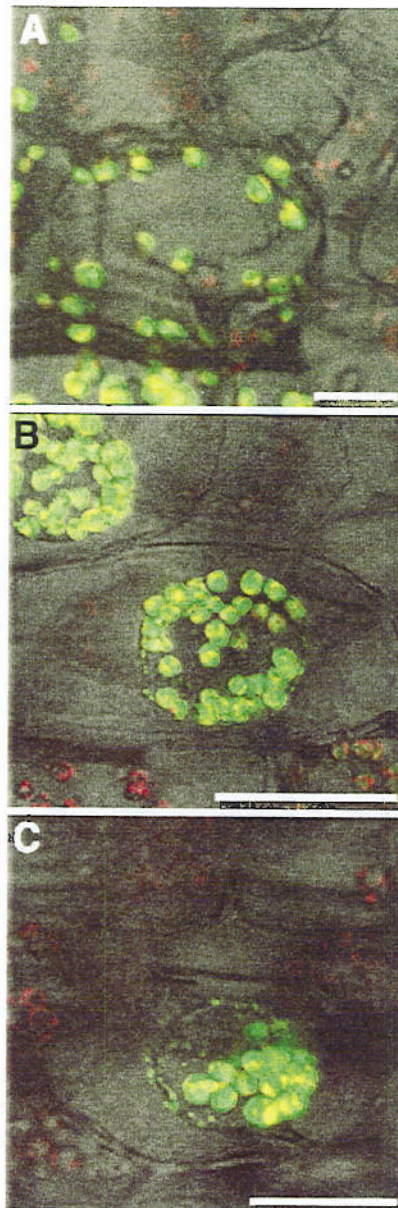


Fig.10. CLSM images showing FDA vital staining of cabbage petiole cells treated with 0.8 M sorbitol solution for 10min (**B**) and, for 24hr (**C**). (**A**) Nontreated sample without exogeneous supplement of sorbitol. Greenish-yellow regions correspond to survived cells. Scales = 50 μ m.

一方、アスパラガス茎頂の細胞では、糖外与処理による原形質分離がわずかに起こり、処理開始24時間後においてもほとんどの細胞は生存していたが (Fig.11-A)、処理開始3日後には半数以上の細胞が死滅していた (Fig.11-B)。しかし、頂端分裂組織などの特定の細胞では、ソルビトール高濃度 (0.8M) 溶液による糖外与処理を4日間行った場合でも (Fig.11-C)、また、さらに高濃度 (2.2M) のソルビトール溶液を用いた糖外与処理3日間行った場合でも (Fig.11-D)、頂端分裂組織のほとんどの細胞は生存していた。

以上の結果から、試料の糖外与処理に対する耐性は、アスパラガス茎頂の頂端分裂組織で最も高く、対照的にタマネギ鱗葉組織では著しく低いこと、ならびにキャベツ葉柄組織ではその中間程度であることが明らかになった。

(2)糖外与処理による細胞内糖組成の変化 糖外与処理に対する耐性の試料間差異を明らかにするため、タマネギ鱗葉組織片およびキャベツ葉柄組織片に糖外与処理を行い、細胞内の可溶性糖類をHPLCにより分析し、その組成の変化を調べた (Fig.12)。なお、アスパラガス茎頂では、糖外与処理に対する耐性が最も高い頂端分裂組織のみを摘出し分析対象とすることが技術的に困難であるため、本実験の対象から外した。タマネギ鱗葉組織では、ソルビトール高濃度 (0.8M) 溶液処理開始直後から組織内のソルビトール含量は漸次増加し続け、本来含有していたフルクトース、グルコースおよびスクロースが著しく減少した (Fig.12-A)。一方、キャベツ葉柄組織では、組織内ソルビトール含量は、ソルビトール高濃度 (0.8M) 溶液処理開始から1時間後まで漸次増加したが、その後はほぼ一定の状態を維持した (Fig.12-B)。また、その他の糖では顕著な減少はみられなかった。

(3)希釈による浸透圧変化に伴う糖外与処理試料の生存率の変化 糖外与処理に対する耐性の試料間差異についてさらに詳しく検討するため、タマネギ鱗葉組織およびキャベツ葉柄組織を用いて、ソルビトール高濃度 (0.8M) 溶液処理後に水を加えて0.4Mまで希釈し、浸透圧を変化させた場合の試料生存性への影響について電解質漏出法により調べた (Fig.13)。キャベツ葉柄組織では、ソルビトール高濃度 (0.8M) 溶液処理後に水を加えて0.4Mまで希釈した場合

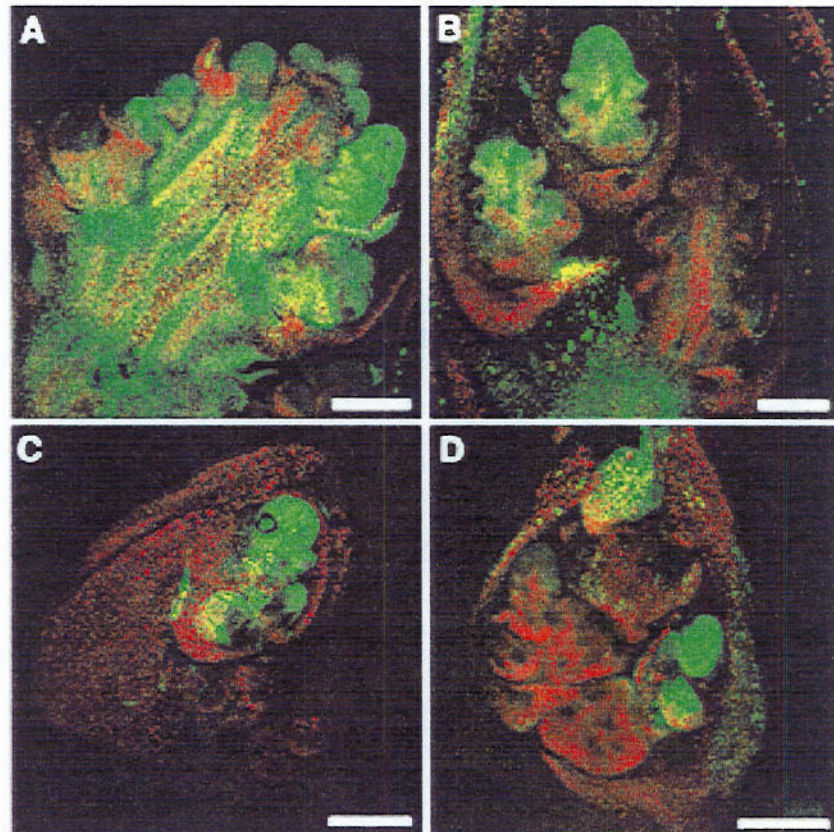


Fig.11. CLSM images showing FDA vital staining of asparagus shoot tips treated with 0.8 M or 2.2 M sorbitol. Samples treated with 0.8 M sorbitol solution for 1 day (**A**), for 3 days (**B**) and, for 4 days (**C**). (**D**) Sample treated with 2.2 M sorbitol solution for 3 days. Greenish-yellow and red regions correspond to survived cells and died cells, respectively. Scales = 100 μ m.

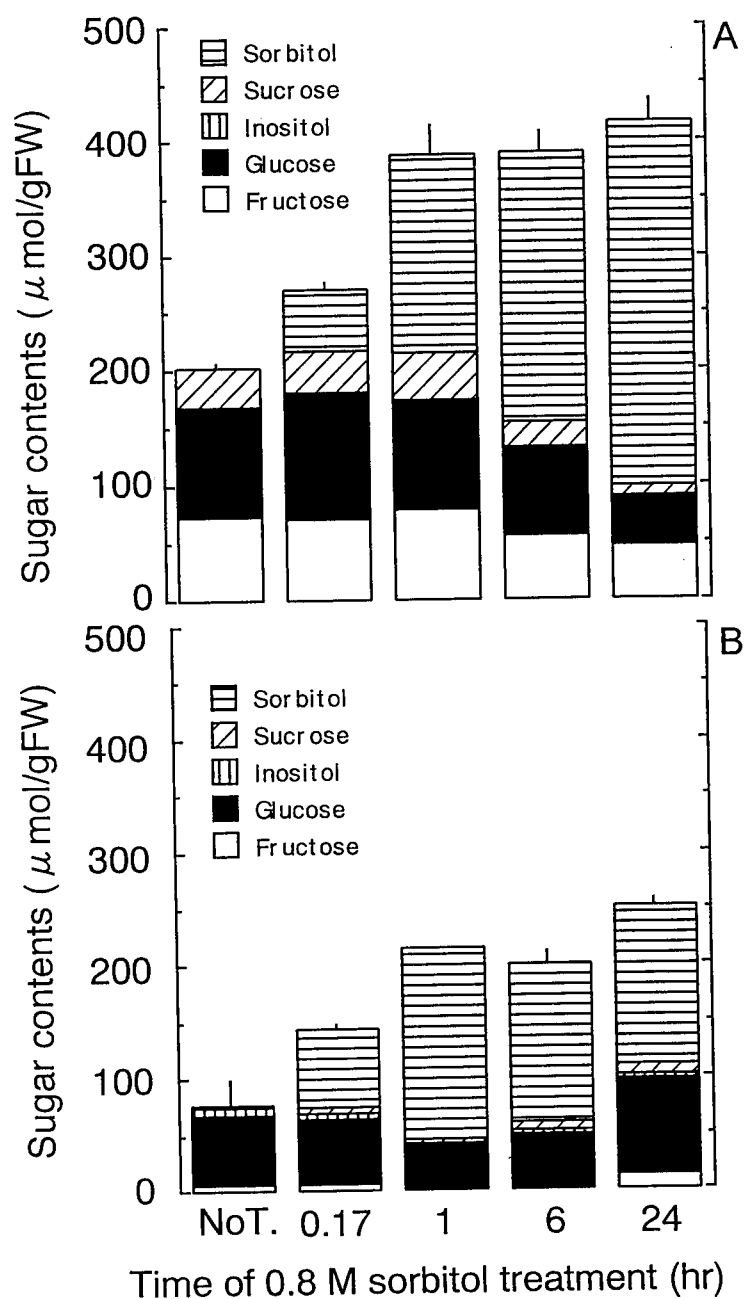


Fig.12. Differences in sugar contents and compositions in onion bulb scaly leaf tissues (A) and cabbage petiole tissues (B) in relation to treatment with 0.8 M sorbitol solution. **NoT.**, no treatment. All samples were washed with distilled water after sorbitol treatment. Bars = SD from three preparations.

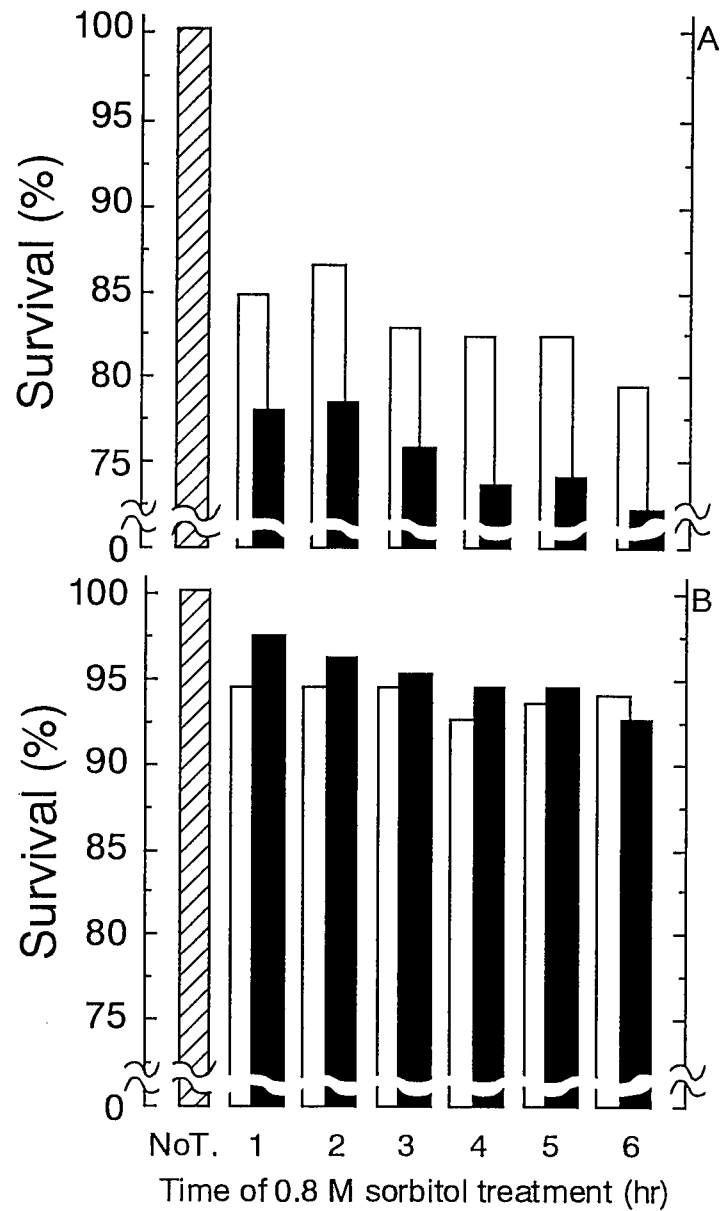


Fig.13. Differences in survivals of onion bulb scaly leaf tissues (**A**) and cabbage petiole tissues (**B**) in relation to treatment with 0.8 M sorbitol solution (□) and osmotic value variations treating with sorbitol solution lowering its concentration from 0.8 M to 0.4 M (■). **NoT.**, no treatment. Survival was determined by ion leakage.

には、試料の生存率に変化はほとんど認められなかったが、タマネギ鱗葉組織では、希釈による浸透圧変化直後に生存率が顕著に低下した。次に、このことをFDA染色法により検証したところ (Fig.14)、ソルビトール高濃度 (0.8M) 溶液処理を1時間行ったキャベツ葉柄細胞 (Fig.14-A) では、0.4Mに希釈することにより原形質復帰が観察されたが (Fig.14-B)、同様に処理したタマネギ鱗葉細胞 (Fig.14-C) では、希釈による原形質復帰がみられず、FDA活性は急激に失われた (Fig.14-D)。これらの結果は、キャベツ葉柄組織に比べて、タマネギ鱗葉組織が高張溶液での脱水に敏感であるとともに、浸透圧変化にもはるかに敏感であることを示している。

(4) 糖外与処理によるタマネギ鱗葉組織・細胞の形態的变化 糖外与処理に対するタマネギ鱗葉組織の耐性が著しく低い理由を詳細に調べるため、糖外与処理中におけるタマネギ鱗葉細胞の形態的变化をFDA染色法により調べた (Fig.15)。ソルビトール高濃度 (0.8M) 溶液で1時間処理したタマネギ鱗葉細胞の細胞質内には、多数の小胞状構造 (直径0.5~2.0 μ m) が観察され (Fig.15-A)、これらの小胞状構造は、液胞に由来することがわかった (Fig.15-B)。この現象は、キャベツ葉柄組織片およびアスパラガス茎頂では観察されなかった (資料未掲載)。

3. 考察

タマネギ鱗葉組織片においては、糖外与処理開始直後から生存率が急激に低下した。糖外与処理中のタマネギ鱗葉組織片では、生存率の著しい低下とともに、細胞内への過剰な糖の取込みおよび本来細胞内に存在していた糖の漏出が認められたが、これらの変化は、キャベツ葉柄組織片ではみられず、アスパラガス茎頂においても認められていないことから (鈴木, 1993)、糖外与処理により、タマネギ鱗葉細胞では脱水による傷害が発生したと考えられる。これを裏付けるように、糖外与処理中のタマネギ鱗葉細胞では、脱水による液胞の小胞化が認められた。また、タマネギ鱗葉組織片では、高張溶液処理後に、組織片を浸漬している高張溶液を等張になるまで希釈すると、浸透圧変化により

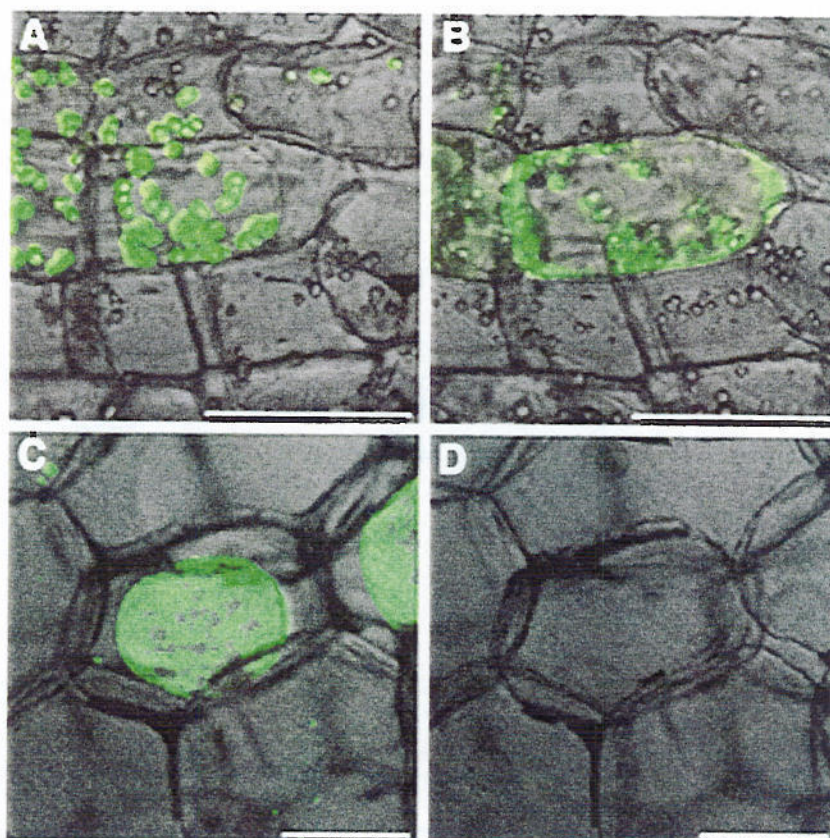


Fig.14. CLSM images showing FDA vital staining in cabbage petiole cells (**A** and **B**) and onion bulb scaly leaf cells (**C** and **D**). Samples immersed in 0.8 M sorbitol solution for 1 hr (**A** and **C**) and in diluted 0.4 M solution for 1 hr (**B** and **D**). Greenish-yellow regions correspond to survived cells. Scales = 100 μ m.

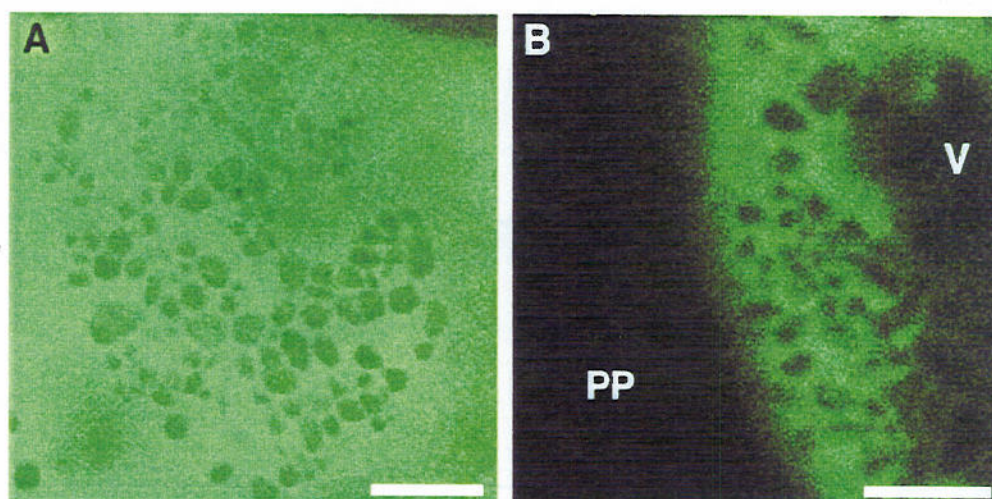


Fig.15. CLSM images showing FDA vital staining of onion bulb scaly leaf tissues treated with 0.8 M sorbitol solution for 1 hr. **(A)** Three-dimensional image. **(B)** Two-dimensional image. These photographs indicate a part of cytoplasm showing vesiculation of vacuole. **PP**, periprotoplasmic space; **V**, vacuole. Scales = 5 μ m.

試料の生存率は著しく低下した。これらのことから、タマネギ鱗葉細胞は、糖外与処理による脱水および浸透的变化に特に敏感であると考えられる。

浸透圧変化に起因する傷害発生の要因として、高張液処理に伴う脱水による膜の不安定化 (Singh, 1979)、高張液で処理した試料をそれより低張な溶液に浸漬した時の浸透圧変化による膜破裂 (Palta and Lee-Stadelmann, 1983, Steponkus and Lynch, 1989)、高張液処理に伴う脱水による液胞の崩壊に起因する細胞質の変質 (Lee-Stadelmann and Stadelmann, 1989; Sopina and Samygin, 1993) などが提唱されている。また、耐凍性の低い細胞 [未馴化ライムギ (*Secale cereale*) 葉由来のプロトプラスト] の凍結脱水傷害が、試料の凍結に伴う脱水によって起こる細胞の浸透圧感受性の喪失 (Steponkus, 1984; Gordon-Kamm and Steponkus, 1984) と、凍結過程における原形質膜の小胞化 (endocytotic vesiculation) に伴う原形質膜表面積の減少 (不可逆的变化) および融解過程の復水によって生ずる内圧に起因する原形質膜の破裂との両方によって生ずることが明らかになっている。一方、これと同様の傷害が、高張糖溶液で細胞を処理した時にも生ずることが報告されている (Steponkus and Lynch, 1989)。本研究では、タマネギ鱗葉細胞を対象として、糖外与処理中の脱水による細胞のFDA活性の低下、および高張糖溶液処理後の希釈に由来する浸透圧変化がもたらす傷害を確認したが、このことは未馴化ライムギ葉由来のプロトプラストの挙動と酷似している。

これに対して、キャベツ葉柄組織およびアスパラガス頂端分裂組織では、糖外与処理自体による生存率の低下は少なく、むしろ糖溶液中で長時間放置した場合、蒸留水に浸漬した状態の試料より生存率の低下が緩やかになる傾向がみられた (資料未掲載)。特に、アスパラガス頂端分裂組織では、キャベツ葉柄組織で用いた糖溶液より高濃度の糖溶液中においても長時間生存したことから、アスパラガス茎頂は、用いた試料の中で、糖外与処理による脱水耐性が最も高い試料であることが明らかになった。以上の結果から、糖外与処理に対する耐性の低いタマネギ鱗葉組織では、糖外与処理自体が傷害をもたらすため、糖外与処理による耐凍性の増大は困難であるが、キャベツ葉柄組織およびアスパラガス頂端分裂組織では、糖外与処理による傷害を受けにくいことが明らかになり、糖外与処理後の耐凍性の増大が期待される。

第4節 糖外与処理後の組織の耐凍性

第3節で用いたタマネギ鱗葉組織、キャベツ葉柄組織およびアスパラガス茎頂を用い、糖外与処理による耐凍性の変化を電解質漏出法およびFDA染色法により調べた。

1. 材料および方法

材料は、タマネギ (*Allium cepa* L.) 鱗葉組織片、キャベツ (*Brassica oleracea* L.) 葉柄組織片およびアスパラガス (*Asparagus officinalis* L.) 茎頂を用いた。また、糖外与処理、耐凍性の評価、凍結および融解については、本章第1節で述べた方法に準じて行った。

2. 結果

(1) 電解質漏出法による耐凍性の評価 タマネギ鱗葉組織、キャベツ葉柄組織およびアスパラガス茎頂を用いて、ソルビトール高濃度 (0.8M) 溶液による糖外与処理後における試料の耐凍性 (LT_{50}) の変化を、電解質漏出法により調べた (Fig.16)。タマネギ鱗葉組織では、糖外与処理時間にかかわらず、試料の耐凍性には変化がみられず、 LT_{50} は終始 -3°C 前後を示した。一方、キャベツ葉柄組織では、糖外与処理開始直後から試料の耐凍性は急激に増大し、糖外与処理開始3時間後には最大の耐凍性 ($LT_{50}=-13^{\circ}\text{C}$) に達した。しかし、その後、糖外与処理時間の経過とともに耐凍性は徐々に低下した。アスパラガス茎頂では、耐凍性は、糖外与処理直後から試料の徐々に増大し、糖外与処理開始12時間後には最大の耐凍性 ($LT_{50}=-10^{\circ}\text{C}$) となり、その後は糖外与処理時間の経過とともに徐々に低下した。

(2) FDA染色法による耐凍性の評価 次に、FDA染色法により、ソルビトール高濃度 (0.8M) 溶液による糖外与処理を3時間行った試料の耐凍性の変化について調べた (Fig.17)。糖外与処理試料を、 -5°C まで冷却し凍結し

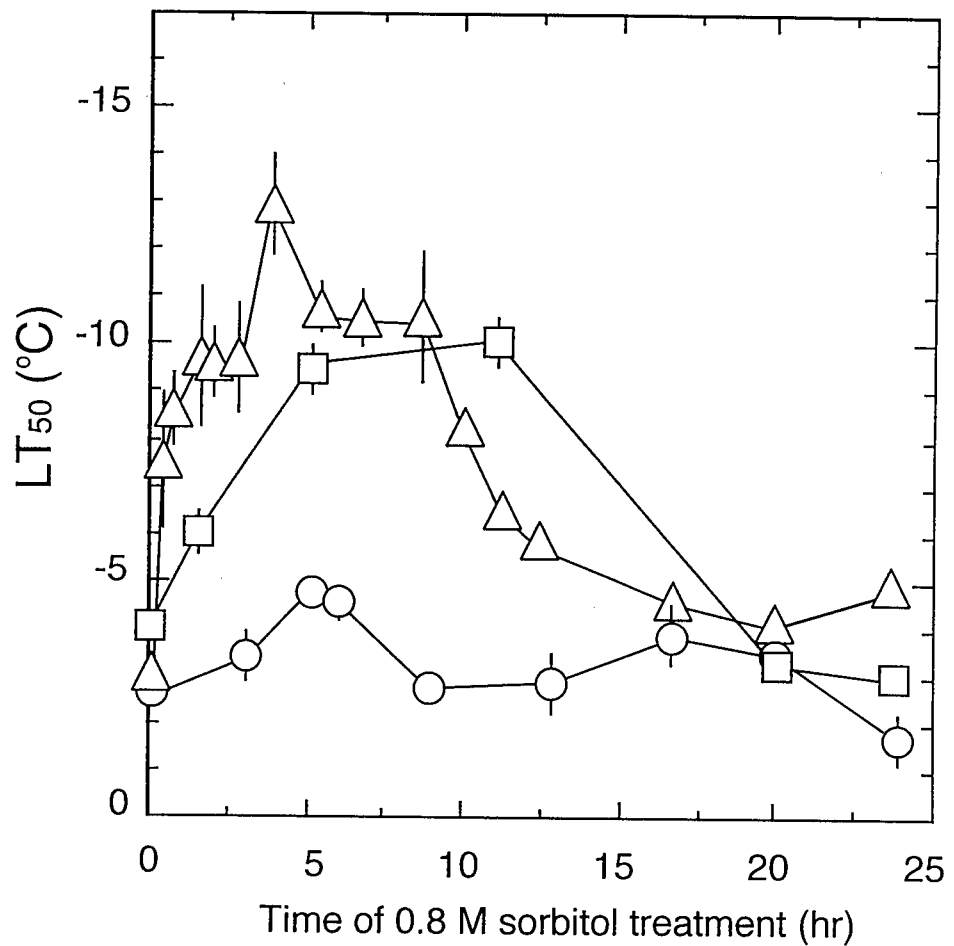


Fig.16. Differences between freezing tolerance (LT₅₀) of onion bulb scaly leaf tissues (○), cabbage petiole tissues (△) and asparagus shoot tips (□) in relation to treatment with 0.8 M sorbitol solution. For freezing, cooling rate of 0.05°C/min was used for onion and 0.1°C/min for cabbage and asparagus. All samples were thawed at about 10°C/min to room temperature (22°C). Survival was determined by ion leakage. Bars = SD from three preparations.

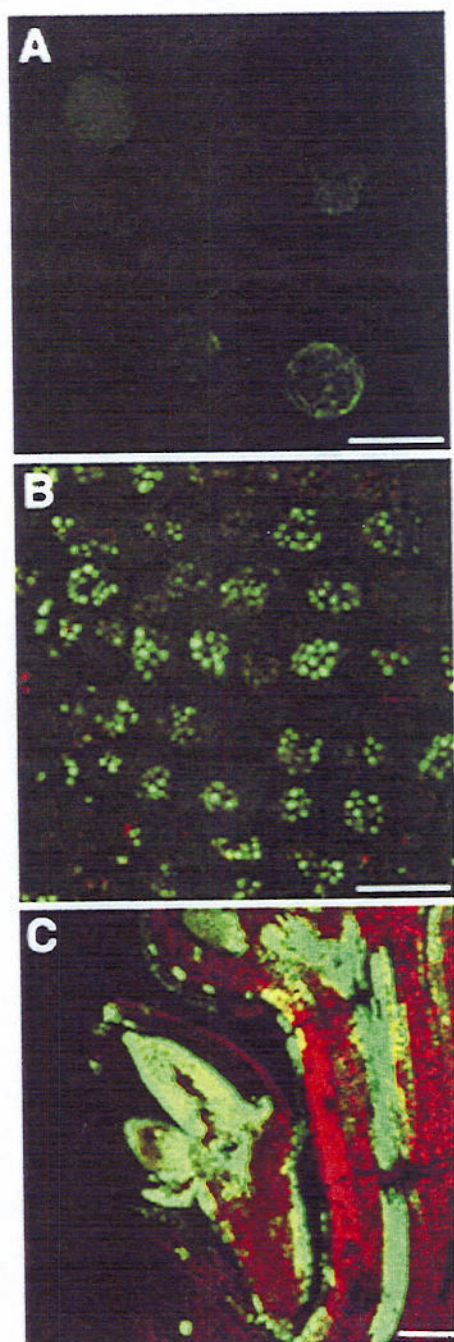


Fig.17. CLSM images showing FDA vital staining of onion bulb scaly leaf tissues (**A**), cabbage petiole tissues (**B**) and asparagus shoot tips (**C**) treated with 0.8 M sorbitol solution for 3 hr and cooled slowly to -5°C . All samples were thawed at about $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ to room temperature (22°C). Greenish-yellow and red regions correspond to survived cells and died cells, respectively. Scales = $100\ \mu\text{m}$.

たところ、タマネギ鱗葉組織では、ほとんどの細胞が死滅したが (Fig.17-A)、キャベツ葉柄組織 (Fig.17-B) およびアスパラガス茎頂 (Fig.17-C) では、多くの細胞が生存していた。また、これらの試料をさらに-30℃まで冷却し凍結したところ、キャベツ葉柄組織では全く生存細胞がみられなかったが (Fig.18-A)、アスパラガス茎頂では頂端分裂組織などの組織・細胞の一部が生存していた (Fig.18-B)。

3. 考察

糖外与処理を行った場合のキャベツ葉柄組織およびアスパラガス頂端分裂組織の凍結後における生存率は、処理時間が長くなるに従って徐々に低下した。一方、耐凍性は、初めは糖外与処理時間の経過とともに増大し、糖外与処理が一定時間を越えると再び減少する傾向がみられた。処理時間の増加とともに耐凍性が徐々に増大するのは、糖が細胞内に浸透して効果を発揮するのに一定時間が必要であるためであり、長時間の糖外与処理により再び耐凍性が減少するのは、糖外与処理自体に対する耐性の低下と関係があるものと考えられる。凍結保存可能なほとんどの植物試料において、糖外与処理には最適時間が存在することから (Withers and Street, 1977; Maddox et al., 1982/83; Kumu et al., 1983; Panis et al., 1996; Blakesley et al., 1996, 1997)、必要以上の長時間の糖外与処理が、試料に傷害をもたらし、その結果として耐凍性を低下させると考えられる。

キャベツ葉柄組織およびアスパラガス頂端分裂組織では、同一の糖外与処理を行っても、最大の耐凍性に到達するまでの時間に差異がみられた。この理由の一つは、キャベツ葉柄組織片では全ての断面から糖が取り込まれるのに対し、アスパラガス頂端分裂組織では小側枝の基部にある切り口のみから糖溶液が取り込まれ、頂端分裂組織に糖溶液が行き渡るまでに時間を要することであると考えられる。アスパラガス茎頂の凍結保存では、糖を添加した固形培地に2日間置床した茎頂を用いることにより良好な成績が得られている (金子ら, 1992)。

一方、同じの糖外与処理を行っても最大の耐凍性は試料によって異なり、キャベツ葉柄組織では、最大の耐凍性は $LT_{50}=-13^{\circ}\text{C}$ であるのに対し、アスパラガス頂端分裂組織では、 -30°C 以下 (FDA染色法) であった。この結果は、

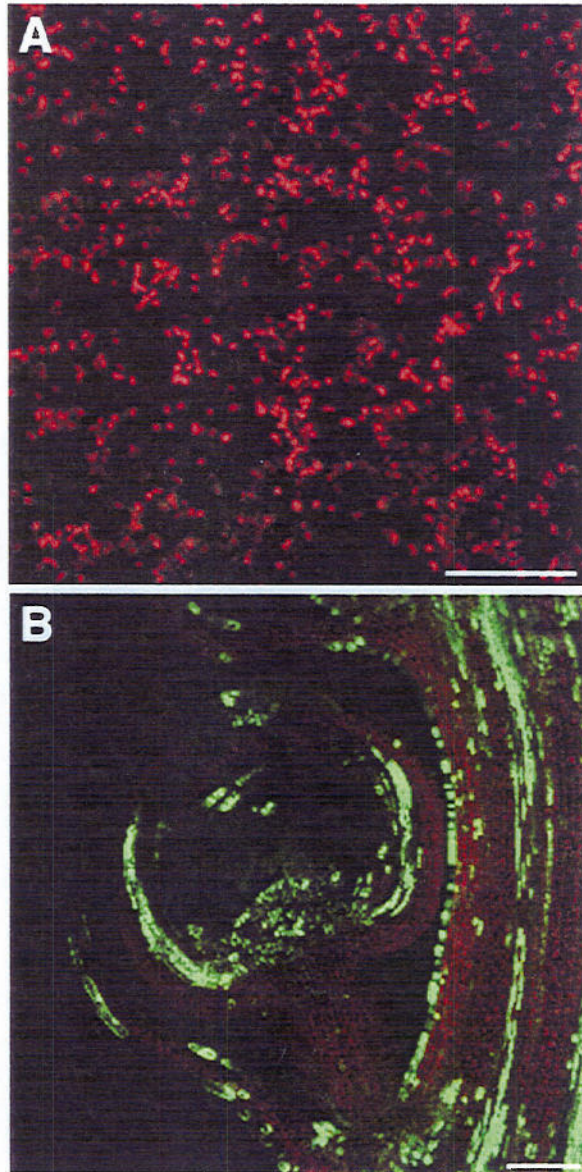


Fig.18. CLSM images showing FDA vital staining of cabbage petiole tissue (**A**) and asparagus shoot tip (**B**) treated with 0.8 M sorbitol solution for 3 hr and cooled slowly to -30°C . All samples were thawed at about $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ to room temperature (22°C). Greenish-yellow and red regions correspond to survived cells and died cells, respectively. Scales = $100\ \mu\text{m}$.

糖の取込み速度のみならず、細胞自体の性質の違いによって糖外与処理の効果が大きく異なることを示している。この理由の一つは、アスパラガス頂端分裂組織の脱水耐性は、キャベツ葉柄組織のそれに比べてはるかに強いことにあると考えられる。

第2章 数種野菜組織における糖外与処理と糖の取込みおよび

耐凍性の変化

第1章で述べたように、糖外与処理自体による脱水および浸透圧変化が害を及ぼすタマネギ鱗葉組織を除き、糖外与処理は、キャベツ葉柄組織およびアスパラガス頂端分裂組織の耐凍性を増大させた。この場合、キャベツ葉柄組織およびアスパラガス頂端分裂組織に対し、同一条件下で糖外与処理を行ったにもかかわらず、最大の耐凍性およびその獲得に要した時間に差異が認められた。

スクロース高濃度（0.7M）溶液処理を24時間行ったリンゴ（*Malus domestica*）およびナシ（*Pyrus pyrifolia*）の茎頂では、凍結保存後のシュート再生率が、種間または品種間で異なり（Niino et al., 1992）、長期間（12日間）のスクロース溶液処理を行ったサツマイモ（*Ipomoea batatas*）の胚様体では、凍結保存後の幼苗形成率が、遺伝子型の違いに左右されることがわかっている（Blakesley et al., 1997）。

種々の糖溶液で処理したキャベツ（*Brassica oleracea capitata*）の葉柄組織では、糖外与処理時間が短時間（10分間）でも、試料は高い耐凍性を獲得するが（Sakai and Yoshida, 1968）、ユーカリ（*Eucalyptus gunnii*）の培養細胞由来プロトプラストでは、長時間（14時間）にわたって細胞内に取り込まれたフルクトースの凍害防御効果により、試料の耐凍性が増大することが報告されている（Leborgne et al., 1995）。

このように、試料または糖外与処理時間の違いによって、糖外与処理の凍害防御効果に差異が生じるが、その機構を明らかにするためには、まず、試料の違いによる糖取込みの有無、さらに、糖が取り込まれた場合における、試料の違いによる糖取込み様式および糖の局在の差異を明らかにする必要がある。

本章では、糖外与処理後に著しく高い耐凍性を獲得するアスパラガス茎頂の頂端分裂組織、中程度の耐凍性を獲得するキャベツ葉柄組織、および糖外与処理によってほとんど耐凍性が変化しないタマネギ鱗葉組織を用い、主に共焦点レーザー顕微鏡により、lucifer yellow carbohydrazide (LYCH) をトレーサーとして用い、糖外与処理時における糖の挙動について調べた。

第 1 節 第 2 章において用いる材料および共通的方法の概要

本章で用いる材料および共通的方法の詳細については、特に本節において予め述べることとする。

1. 材料の調製

材料は、タマネギ (*Allium cepa* L.) 品種・札幌黄の鱗葉組織片、キャベツ (*Brassica oleracea* L.) 品種・アーリーボールの葉柄組織片およびアスパラガス (*Asparagus officinalis* L.) 品種・メリーワシントン500Wの若茎頭部小側枝の茎頂を用いた。材料の調製は、第 1 章、第 1 節、1 の方法に準じて行った。

2. 糖外与処理

糖外与処理は、第 1 章、第 1 節、2 の方法に準じて行った。本章では、処理糖には、主としてソルビトールを用いたが、スクロース輸送阻害剤を用いた試験（第 3 節）ではスクロースを用いた。

3. 糖輸送阻害剤処理

糖輸送阻害剤処理は、1mM の p-chloromercuribenzenesulfonic acid (PCMBs) (Sophie et al., 1990) を添加したスクロース高濃度 (0.8M) 溶液中に試料を 1 時間浸漬することにより行った。糖輸送阻害剤処理後に試料に付着した阻害剤は、PCMBs を除いたスクロース高濃度 (0.8M) 溶液で試料を 5 分間隔で 3 回洗浄して除去した。

4. 凍結および融解

耐凍性検定用の試料の凍結および融解は、第 1 章、第 1 節、5 の方法に準

じて行った。

フリーズ・フラクチャー・レプリカ法によりキャベツ葉柄組織の凍結に伴う細胞内微細構造の変化を観察する場合には、試料の凍結を以下の方法で行った。アルミ製ホルダーの凹部に3～4枚のキャベツ葉柄組織片を入れ、試料の周囲をソルビトール高濃度(0.8M)溶液で満たし、プログラミング・フリーザーを用い、第1章、第1節、5に示した方法に準じて試料をホルダーごと冷却した。植氷は、-3℃の低温槽に試料を入れ、温度平衡後、同温の氷片を試料に接触させることにより行った。次いで、試料を一定の冷却速度で冷却し、所定温度に達した試料を、液体フロン(-150℃)に速やかに浸漬し、急速凍結固定を行った後、液体窒素中で保存した。

共焦点レーザー顕微鏡によりキャベツ葉柄組織の凍結および融解に伴う細胞構造の変化を観察する場合には、試料の凍結は顕微鏡用コールド・ステージ・ユニット(Linkam, LK-120BCS, L-600A, HFS91)を用いて次のように行った。キャベツ葉柄組織片をステージ上に置床後、-3℃で温度平衡させ、同温に冷却した植氷板により植氷し、その後、0.1℃/minで冷却した。所定温度に達した試料は、ユニットに付属したヒーターにより10℃/minで昇温し融解した。

5.耐凍性の評価

第1章、第1節、3(1)の電解質漏出法を用い、所定温度まで緩速冷却し凍結したのち融解した試料の生存率を測定し、その値に基づいて求めた生存率曲線からLT₅₀(℃)を求めた。

6.糖分析

糖分析試料の調製および試料内糖の分析は、第1章、第1節、4の方法に準じて行った。

7.共焦点レーザー顕微鏡による糖の取込みの観察

糖外与処理中における試料への糖取込みの可視化については、Thierryらの方法(Thierry et al., 1997)を参考にして行った。1mg/ml LYCHを添加した0.8Mのソルビトール溶液に試料を所定時間浸漬した。これらの試料をLYCHを除いた0.8Mのソルビトール溶液で5分間隔で3回洗浄後、速やかに共焦点レーザー顕微鏡で観察した(原形質分離の進行を明瞭に示すために、Fig.20-1のA,CおよびFig.20-2のE,Gの試料については、試料中のLYCHを洗浄せずに観察結果を示した)。共焦点レーザー顕微鏡による観察は、第1章、第1節、3(2)に示したFDA染色法と同じ設定条件で行ったが、本章では、PMT2[Emission filter (540/30nm)を用いた]は、LYCHの蛍光(緑黄色の擬似色)を検出している。

8. フリーズ・フラクチャー・レプリカ法

フリーズ・フラクチャー・レプリカ法による凍結過程の細胞内超微細構造変化の観察は、常法(Fujikawa, 1991)に準じて行った。フリーズ・エッチング装置(JEOL, JED-7000)を用い、試料温度 -110°C 、真空度 $0.1 \times 10^{-4} \sim 0.2 \times 10^{-5} \text{Torr}$ の条件下で試料を切断したのち、白金カーボン・ペレットを用い、 30° の傾斜角で切断面に白金を蒸着、次いで、カーボンを回転蒸着した。装置から取り出した試料を、濃硫酸に続き市販の漂白剤に浸漬し、レプリカに付着している試料を溶解したのち、水洗したレプリカを400メッシュの銅製グリッド上に載せ、透過型電子顕微鏡[transmission electron microscope (TEM)](JEOL, JEM-1200EX)を用いて加速電圧100kVで観察した。

第2節 糖外与組織・細胞におけるfluid-phase endocytosis による糖の取込み

タマネギ鱗葉組織、キャベツ葉柄組織およびアスパラガス茎頂の頂端分裂

組織の各細胞へのfluid-phase endocytosisを介した糖の取込みについて調べた。

1. 材料および方法

材料は、タマネギ (*Allium cepa* L.) 鱗葉組織片、キャベツ (*Brassica oleracea* L.) 葉柄組織片およびアスパラガス (*Asparagus officinalis* L.) 茎頂を用いた。また、糖外与処理、凍結および融解、糖分析、共焦点レーザー顕微鏡による糖の取込みの観察、フリーズ・フラクチャー・レプリカ法については、本章第1節で述べた方法に準じて行った。

2. 結果

(1) 糖外与処理に伴うfluid-phase endocytosisの観察 タマネギ鱗葉組織では、糖外与処理により生存率が急激に低下することを、第1章で述べた。本節では、多くの細胞が死滅する以前の、糖外与処理開始直後から1時間後までの間に、レーザー強度を100%に高めて観察を行うことにより(30%以上のレーザー強度は蛍光の退色を早めるので、通常は使用しない)、原形質分離細胞の原形質膜付近に0.1~1 μ mの多数の小胞 (fluid-phase endocytosis小胞) (Fig.19-A) が観察された。また、これらの小胞の数は時間経過とともに増加することがわかった (Fig.19-B)。この結果は、タマネギ鱗葉組織で、fluid-phase endocytosisによる糖の取込みが起きていることを示している。しかし、後述するキャベツ葉柄組織およびアスパラガス茎頂の頂端分裂組織細胞では、3%のレーザー強度で容易にfluid-phase endocytosis小胞が観察できたことから、タマネギ鱗葉組織におけるfluid-phase endocytosisによる糖の取込みはキャベツ葉柄組織およびアスパラガス茎頂の頂端分裂組織細胞に比べてはるかに少量であることが明らかになった。

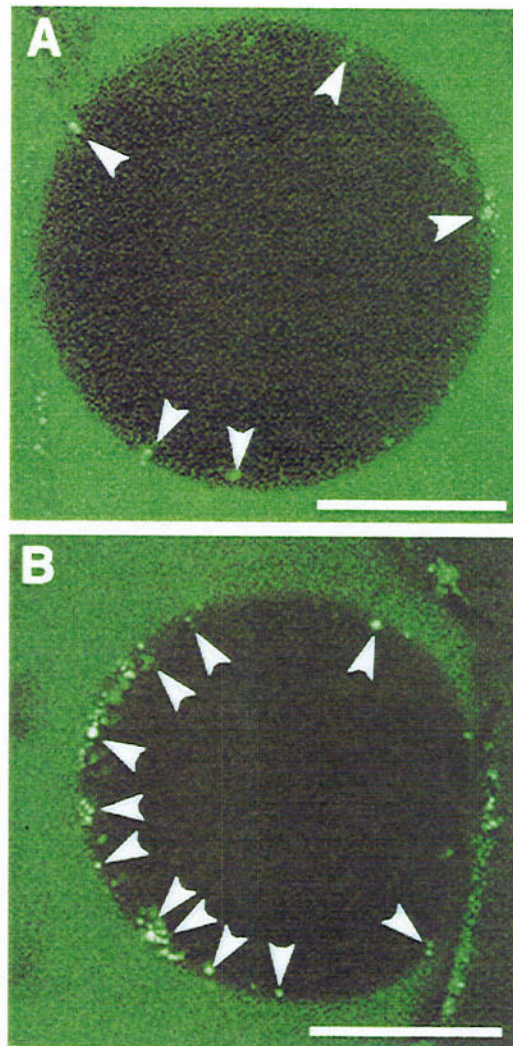


Fig.19. CLSM images showing sugar loading (LYCH as a tracer) into onion bulb scaly leaf cells treated with 0.8 M sorbitol solution containing 1mg/ml LYCH for 10 min (**A**), and for 30 min (**B**). After the treatment, samples were washed solution without LYCH. CLSM image was obtained with 100% laser power. Greenish-yellow regions correspond to fluorescence of LYCH. Arrowheads show intracellular vesicles incorporated by fluid-phase endocytosis. Scales = 50 μ m.

キャベツ葉柄組織においても、糖外与処理時間の経過に伴う原形質分離の進行とfluid-phase endocytosisによる糖の取込みが観察された。糖外与処理開始15秒後の細胞では、原形質分離はほとんど観察されず (Fig.20-1,A)、fluid-phase endocytosis小胞は観察されなかった (Fig.20-1,B)。しかし、糖外与処理開始10分後の細胞では、原形質分離の進行 (Fig.20-1,C) と、直径0.5~3.0 μm の多量のfluid-phase endocytosis小胞 (Fig.20-1,D) が観察された。糖外与処理開始1時間後の細胞では原形質分離はさらに進行し (Fig.20-2,E)、直径3.0 μm 以上のfluid-phase endocytosis小胞が多数存在することが確認された (Fig.20-2,F)。さらに、糖外与処理開始3時間後の細胞では、原形質分離のさらなる進行はみられなかったが (Fig.20-2,G)、小胞が巨大化する傾向 (5~10 μm) が観察された (Fig.20-2,H)。

アスパラガス茎頂の頂端分裂組織においても、fluid-phase endocytosisによる糖の取込みが観察された (Fig.21)。糖外与処理開始10分後には、若干原形質分離を起こした細胞にfluid-phase endocytosisが起こっていることが、試料の随所で観察された (Fig.21-A)。これらの細胞には、直径0.5~2.0 μm のfluid-phase endocytosis小胞が多数存在していた (Fig.21-B)。糖外与処理開始30分後には、小胞内のLYCHとは別に、細胞質中に一様に拡散したLYCHがみられた (Fig.21-C)。さらに、糖外与処理開始3時間後には、LYCHを含むfluid-phase endocytosis小胞の数は増加し、細胞質中に一様に存在するLYCHの蛍光もさらに濃くなっていた (Fig.21-D)。これらの結果は、アスパラガス茎頂の頂端分裂組織が、用いた試料中で最も多量の糖を取り込んでいることを示唆している。

以上の結果は、いずれの試料においても、fluid-phase endocytosis小胞が、糖外与処理時間の経過とともに増加することを示している。また、タマネギ鱗葉組織では少なくとも6時間、キャベツ葉柄組織およびアスパラガス頂端分裂組織では少なくとも2日間は、fluid-phase endocytosis小胞は消滅することなく細胞内に存在した (資料未掲載)。

(2) 凍結および融解時におけるキャベツ葉柄組織・細胞内のfluid-phase endocytosis小胞の挙動 次に、fluid-phase endocytosis小胞が凍

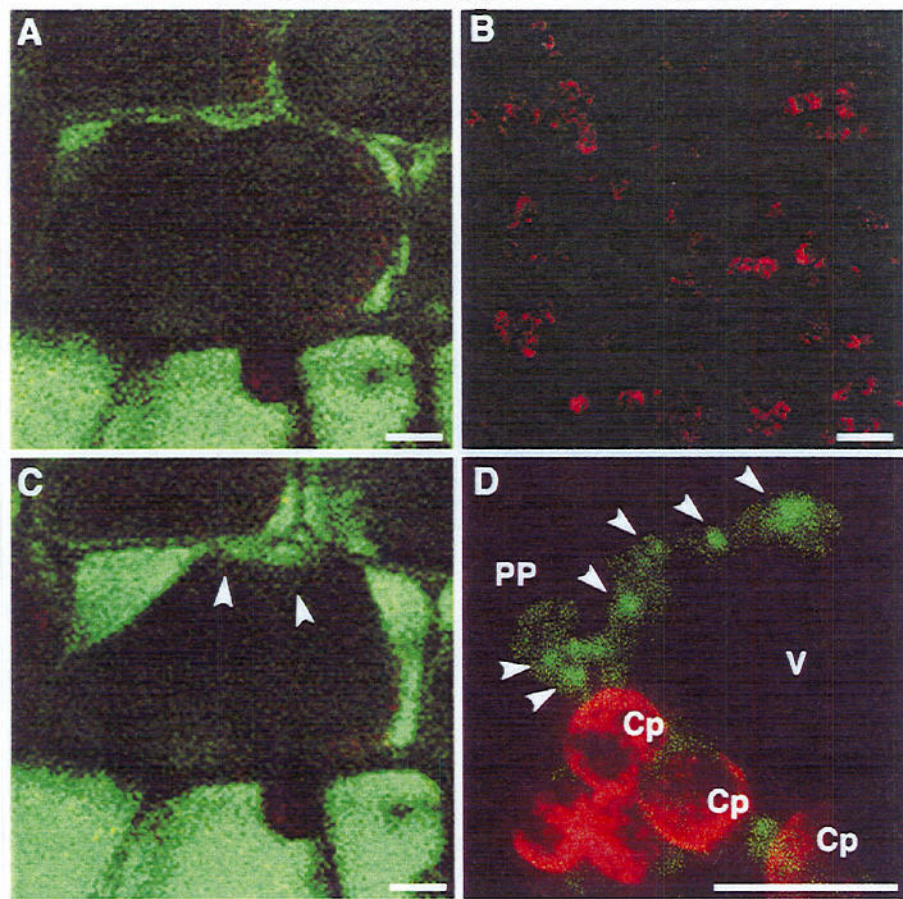


Fig.20-1. CLSM images showing sugar loading into cabbage petiole cells treated with 0.8 M sorbitol solution containing 1mg/ml LYCH for 15 sec (**A** and **B**), and for 10 min (**C** and **D**). (**A** and **C**) Samples before washing. (**B** and **D**) Samples after washing. Greenish-yellow and red regions correspond to fluorescence of LYCH and auto-fluorescence of chloroplasts, respectively. **Cp**, chloroplasts; **PP**, periprotoplasmic space; **V**, vacuole. Arrowheads show intracellular vesicles incorporated by fluid-phase endocytosis. Scales = 10 μ m.

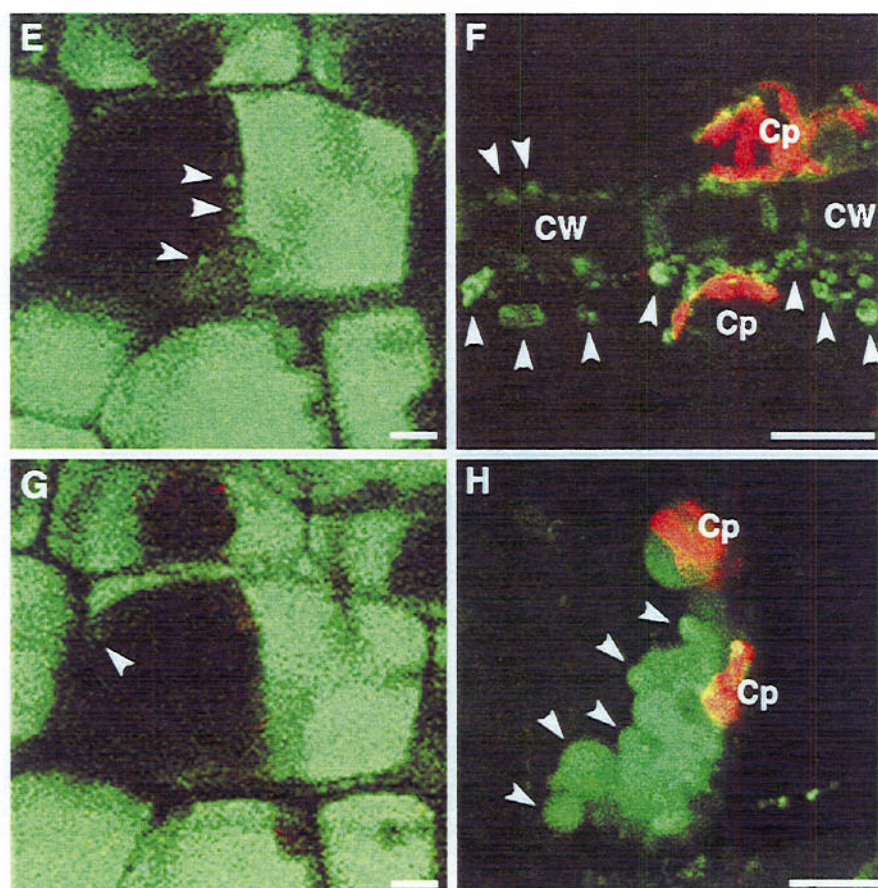


Fig.20-2. CLSM images showing sugar loading into cabbage petiole cells treated with 0.8 M sorbitol solution containing 1mg/ml LYCH for 1 hr (**E** and **F**), and for 3 hr (**G** and **H**). (**E** and **G**) Samples before washing. (**F** and **H**) Samples after washing. Greenish-yellow and red regions correspond to fluorescence of LYCH and auto-fluorescence of chloroplasts, respectively. **Cp**, chloroplasts; **CW**, cell walls. Arrowheads show intracellular vesicles incorporated by fluid-phase endocytosis. Scales = 10 μ m.

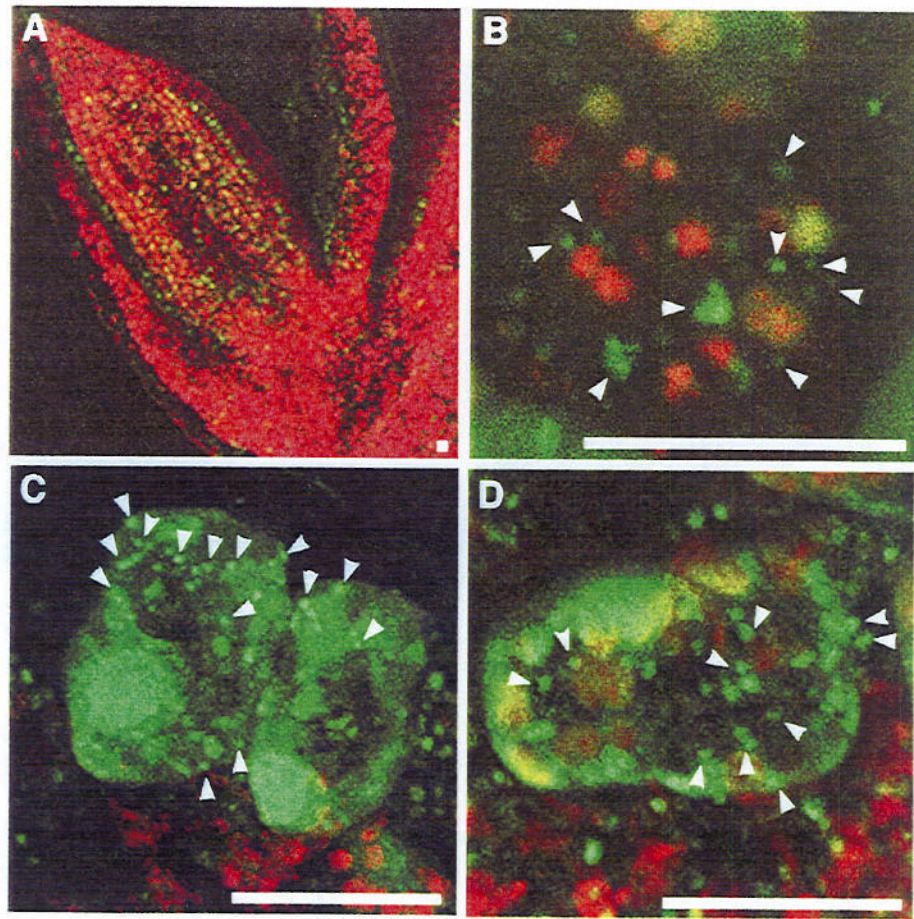


Fig.21. CLSM images showing sugar loading into asparagus shoot tip cells treated with 0.8 M sorbitol solution containing 1mg/ml LYCH for 10 min (**A** and **B**), for 30 min (**C**), and for 3 hr (**D**), and then washed. Greenish-yellow and red regions correspond to fluorescence of LYCH and auto-fluorescence of chloroplasts, respectively. Arrowheads show intracellular vesicles incorporated by fluid-phase endocytosis. Scales = 10 μ m.

結により破壊されることにより、小胞内の糖が細胞質に拡散する可能性について調べた。LYCHを含むソルビトール高濃度（0.8M）溶液中で3時間処理したキャベツ葉柄組織の細胞内には、LYCHを含むfluid-phase endocytosis小胞が多数存在したが（Fig.22-A）、この試料を-10℃まで冷却し凍結しても、細胞内の小胞は、LYCHを含んだまま、細胞の変形に応じて移動した（Fig.22-B）。さらに、試料を-20℃まで冷却し凍結したのち急速融解しても、依然として細胞質内にはLYCHを含む小胞が多数存在していた（Fig.22-C）。同様の現象は、アスパラガス茎頂の頂端分裂組織・細胞においても観察された（資料未掲載）。

次に、fluid-phase endocytosis小胞をフリーズ・フラクチャー・レプリカ法により観察した（Fig.23）。試料を常温から急速凍結固定した場合には、細胞内に大きな氷晶が形成され、細胞内微細構造の観察は困難であるため、試料を緩速冷却し、ある程度凍結脱水した上で急速凍結固定した。この場合、細胞内微細構造を破壊するほどの大きさの氷晶は形成されない。ソルビトール高濃度（0.8M）溶液で10分間処理したのち、-15℃まで冷却し凍結したキャベツ葉柄組織の細胞は著しく変形し（Fig.23-A）、細胞内には、fluid-phase endocytosis小胞（直径0.5～2.0μm）と大きさが一致する多数の小胞が観察された（Fig.23-B）。これらの結果は、キャベツ葉柄組織およびアスパラガス頂端分裂組織において、fluid-phase endocytosisにより取り込まれた糖は、時間経過および凍結・融解に関わらず、そのほとんどが小胞内に隔離された状態にあることを示している。

3. 考察

糖は、その分子の大きさから、原形質膜を自由に透過できず、その透過には、糖輸送体やfluid-phase endocytosisの介在が必要であることが知られている。fluid-phase endocytosisは、高張条件下で原形質膜が陥入することにより細胞外物質を細胞内に取り込むという非特異的膜輸送システムであり、タ

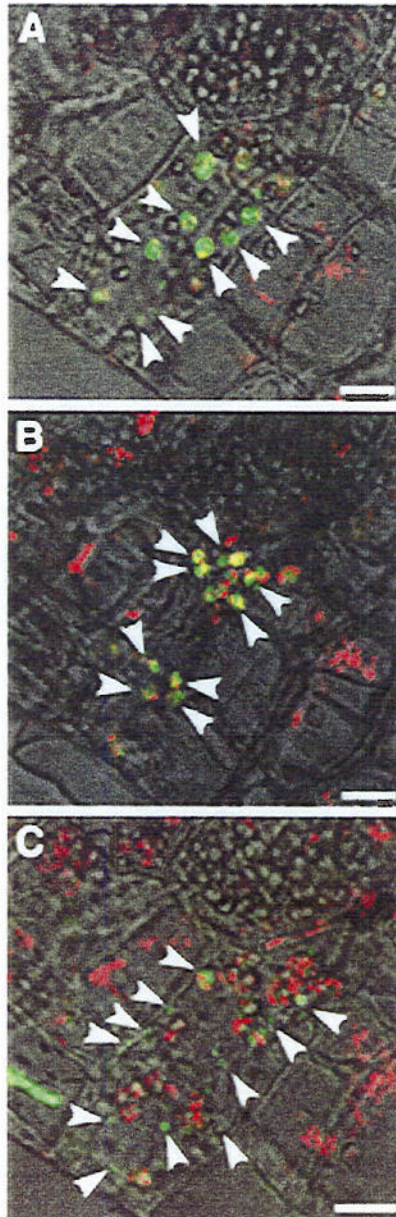


Fig.22. CLSM images showing movement of incorporated endocytotic vesicles (arrowheads) in cabbage petiole cells. (A) Sample treated with 0.8 M sorbitol solution containing 1mg/ml LYCH for 3 hr and washed. (B) Sample of (A) cooled at 0.1°C/min to -10°C. (C) Sample of (B) thawed at about 10°C/min to 10°C. Greenish-yellow and red regions correspond to fluorescence of LYCH and auto-fluorescence of chloroplasts, respectively. Scales = 10 μ m.

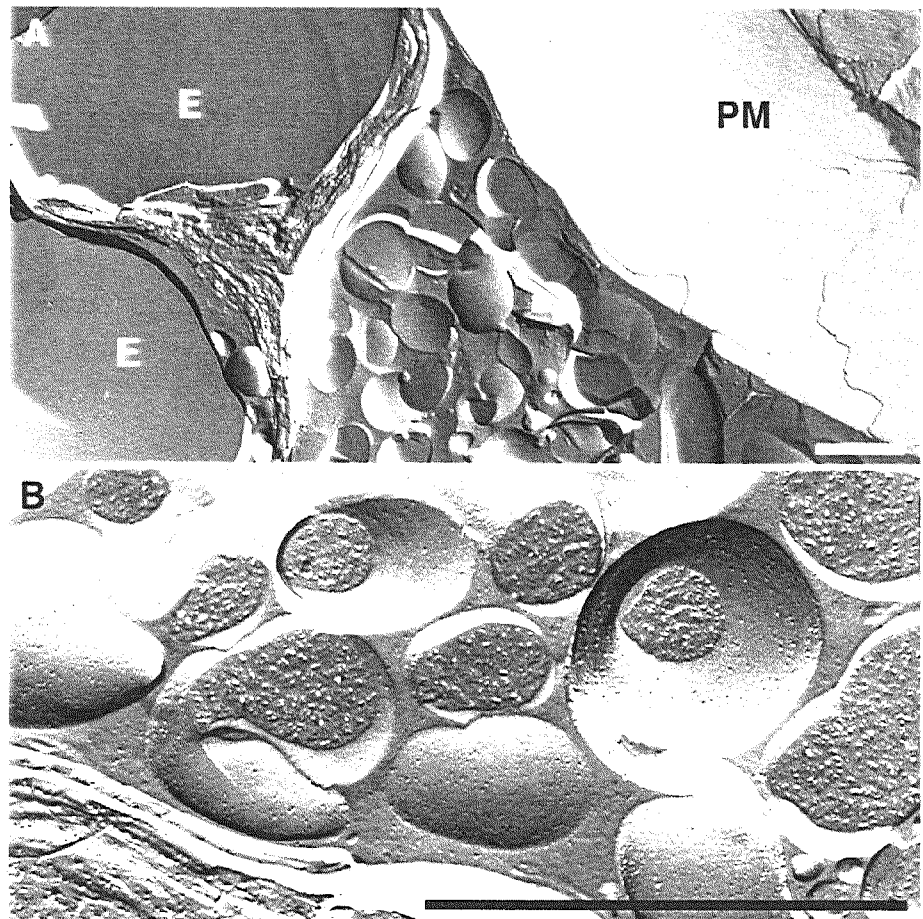


Fig.23. Freeze-replica images showing ultrastructures in cabbage petiole cells treated with 0.8 M sorbitol solution for 10 min and cooled at 0.1°C/min to -15°C. (A) Numerous endocytotic vesicles in frozen cell. (B) High magnification of endocytotic vesicles. **E**, extracellular ice crystals; **PM**, plasma membrane. Scales = 5 μ m.

マネギ (*Allium cepa*) の皮層細胞 (Oparka et al., 1990)、アカザ (*Chenopodium album*) の培養細胞 (Wartenberg et al., 1992)、ツユクサ (*Commelia communis*) の葉 (Hillmer et al., 1990)、ダイズ (*Glycine max*) の葉 (Tanchak et al., 1984; Joachim and Robinson, 1984) など多くの植物細胞でその存在が知られている。このように、高張の糖溶液で植物細胞を処理した場合、細胞は fluid-phase endocytosis によって、さかんに糖溶液を取り込むことがわかっている。

本研究では、試料への糖の取込みを、トレーサーとしてLYCHを用い、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。その結果、用いた全ての試料において、fluid-phase endocytosisによる糖の取込みが観察された。また、fluid-phase endocytosis小胞は、処理時間の経過とともに増加し、その後、少なくとも数時間の間は、LYCHを内包したまま細胞内に存在することが確認された。キャベツ葉柄組織およびアスパラガス茎頂においては、試料を等張条件に戻した場合においても、これらのfluid-phase endocytosis小胞は細胞質内に存在していた(資料未掲載)。タマネギ皮層細胞においても、試料を等張条件に戻したときに、fluid-phase endocytosis小胞が細胞質内に残存し、時間が経過しても消失しないことが報告されている (Oparka et al., 1990)。本研究で用いた全ての試料でみられたfluid-phase endocytosisは、Oparkaらが報告したfluid-phase endocytosisの挙動と一致している。しかし、アカザ培養細胞由来のプロトプラストでは、高張条件下で生じたfluid-phase endocytosis小胞が、等張条件下で消失することから、等張条件で小胞が細胞膜へ再融合し、細胞膜として再利用されている可能性が考えられている (Wartenberg et al., 1992)。

低温馴化したライムギ (*Secale cereale*) の葉由来のプロトプラストでは、凍結または高張条件によりexocytotic extrusion (細胞の収縮に伴う、細胞外側への細胞膜の突出) が可逆的に起きる場合、それらが脱水収縮から細胞を保護する役目を果たすが、未馴化ライムギ葉由来のプロトプラストでの、endocytotic vesiculation (細胞の収縮に伴う、細胞内側への細胞膜の小胞化) は、脱水傷害の表れであることが示唆されている (Gordon-Kamm and Steponkus, 1984)。また、高張条件下における未馴化の*Arabidopsis thaliana*

の葉由来のプロトプラストでみられるexocytotic extrusionもまた、脱水傷害の現れとされており（Uemura et al., 1995）、原形質膜の小胞化が、膜表面積の不可逆的な減少を招き、融解時の復水により破裂を誘起すると考えられている。

本研究でみられたfluid-phase endocytosisは、いわば高張条件下における原形質膜の不可逆的な小胞化であり、fluid-phase endocytosis後のタマネギ鱗葉組織細胞は浸透圧変化により傷害を受けたことから、タマネギ鱗葉細胞で起こるfluid-phase endocytosisは、未馴化ライムギのendocytotic vesiculationと同様に、脱水傷害の表れであると考えられる。これに対し、キャベツ葉柄組織の細胞およびアスパラガス茎頂の頂端分裂組織細胞でみられたfluid-phase endocytosisは、これらの組織が浸透圧変化に対して耐性をもつことから、脱水傷害の現れとは考えにくい。しかし、これらのfluid-phase endocytosis小胞が膜に再融合した形跡がみられないことから、脱水傷害の防御的役割を果たすと断定することはできない。キャベツ葉柄組織の細胞およびアスパラガス茎頂の頂端分裂組織の原形質分離細胞において、原形質復帰時の膜の再拡充がどのように起こるかについては明らかでなく、今後の検討を要する。

キャベツ葉柄組織の細胞およびアスパラガス茎頂の頂端分裂組織細胞で観察されたfluid-phase endocytosis小胞は、 LT_{50} 近傍の温度まで冷却し凍結した場合においても、また引き続き融解した時点においても、消失しなかった。これらの結果は、fluid-phase endocytosisで取り込まれた糖が、凍結・融解後も小胞内から細胞質部分へ放出されていないことを示唆しており、fluid-phase endocytosis小胞内の糖が、耐凍性の増大に関与している可能性は低いと考えられる。

第3節 糖外与組織・細胞における耐凍性向上と糖輸送体による糖の取込みとの関連

本章第2節で述べたように、fluid-phase endocytosis小胞は、凍結・融解後もその形態をほぼ維持し、LYCHの蛍光を保持しており、小胞内の糖が細胞質部分へ放出された形跡はみられず、小胞内に隔離された糖の耐凍性に及ぼす影響については現在のところ不明である。そこで本節では、キャベツ葉柄組織の細胞およびアスパラガス茎頂の頂端分裂組織細胞への、fluid-phase endocytosis以外を介して取り込まれた糖（糖輸送体により取り込まれた糖）の耐凍性に及ぼす影響について、糖輸送阻害剤を用いて調べた。

1. 材料および方法

材料は、キャベツ (*Brassica oleracea* L.) 葉柄組織片およびアスパラガス (*Asparagus officinalis* L.) 茎頂を用いた。また、糖外与処理、糖輸送阻害剤処理、凍結および融解、耐凍性の評価、糖分析、共焦点レーザー顕微鏡による糖の取込みの観察については、本章第1節で述べた方法に準じて行った。

2. 結果

(1) 耐凍性に及ぼす糖輸送阻害剤の影響 電解質漏出法で評価したキャベツ葉柄組織の耐凍性は、未処理試料では $LT_{50} = -3.7^{\circ}\text{C}$ であったが、スクロース高濃度 (0.8M) 溶液処理開始1時間後には $LT_{50} = -9^{\circ}\text{C}$ となり、増大した。しかし、糖溶液にスクロース輸送体の阻害剤であるPCMBSを添加すると、 $LT_{50} = -5.7^{\circ}\text{C}$ となり、耐凍性は減少した (Fig.24)。また、電解質漏出法で評価したアスパラガス茎頂の耐凍性は、未処理試料では $LT_{50} = -2.8^{\circ}\text{C}$ であったが、1時間のスクロース高濃度 (0.8M) 溶液処理により、 $LT_{50} = -6.6^{\circ}\text{C}$ となり、PCMBSの添加により、 $LT_{50} = -5^{\circ}\text{C}$ となった。

(2) 細胞内への糖の取込みに及ぼす糖輸送阻害剤の影響 スクロース高濃度 (0.8M) 溶液で1時間処理したキャベツ葉柄組織から多量のスクロース

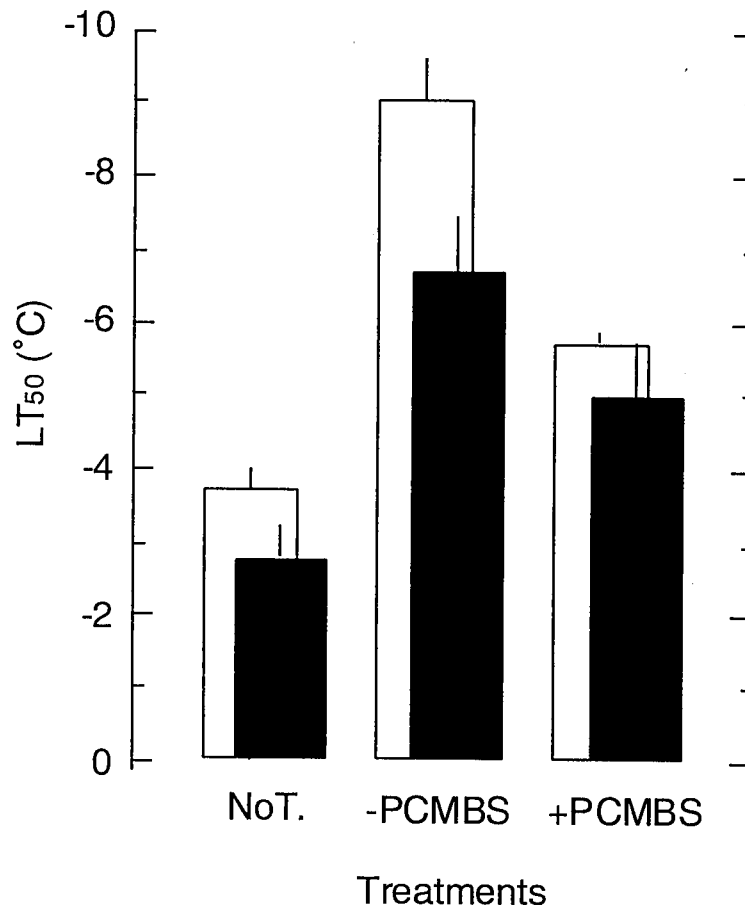


Fig.24. Differences between freezing tolerance (LT_{50}) of cabbage petiole tissues (□) and asparagus shoot tips (■) in relation to treatment with 0.8 M sucrose solution for 1 hr in the presence or absence of 1 mM sucrose transport inhibitor [p-chloromercuribenzenesulfonic acid (PCMBS)]. **NoT.**, no treatment. All samples were cooled at 0.1°C/min and thawed at about 10°C/min to room temperature (22°C). Survival was determined by ion leakage. Bars = SD from three preparations.

が検出されたが、糖溶液に PCMBS を添加することにより細胞内のスクロース含量は減少した (Fig.25) 。さらに、PCMBS が処理溶液内に存在しても、スクロース高濃度 (0.8M) 溶液で1時間処理したキャベツ葉柄組織およびアスパラガス茎頂の fluid-phase endocytosis 小胞の形成が起きることが、共焦点レーザー顕微鏡により確認された (Fig.26) 。(1) の結果と合わせて、これらの結果は、糖輸送阻害剤によって、糖輸送体を介したスクロースの取込みが減少し、耐凍性が低下したことを示しており、糖輸送体を介して取り込まれる糖が、糖外与処理の耐凍性増大機構において重要な役割を果たしていることを示している。

3. 考察

糖輸送体は、原形質膜 (Francisco et al., 1995; Marquat et al., 1997) や液胞膜 (Getz and Klein, 1995; Shiratake et al., 1997) に多数存在し、プロトン勾配 (Shiratake et al., 1997) や K^+ などの無機イオンの濃度差 (Brown et al., 1997) により、ATP (Brown et al., 1997) を共役エネルギーとして糖を輸送していると考えられている。また、輸送体には糖特異性が存在し、例えばスクロース輸送体は主としてスクロースを輸送することが知られている (Marquat et al., 1997) 。

本実験では、スクロース輸送体に対する特異的な輸送阻害剤である PCMBS を糖溶液に添加したのち、キャベツ葉柄組織およびアスパラガス茎頂組織に糖外与処理を行ったところ、PCMBS が fluid-phase endocytosis を抑制しないにもかかわらず、スクロース溶液処理の耐凍性増大効果は著しく抑制されることが示された。これらの結果から、糖外与処理の耐凍性増大効果は、fluid-phase endocytosis を介して取り込まれた糖よりもむしろ、糖輸送体を介して取り込まれた糖に起因していると考えられる。

しかし、PCMBS を添加した糖溶液で処理した試料の耐凍性が未処理試料の耐凍性を上回ることから、fluid-phase endocytosis により細胞内に取り込まれた糖にも凍害防御効果がある可能性も否定できない。また、PCMBS は全て

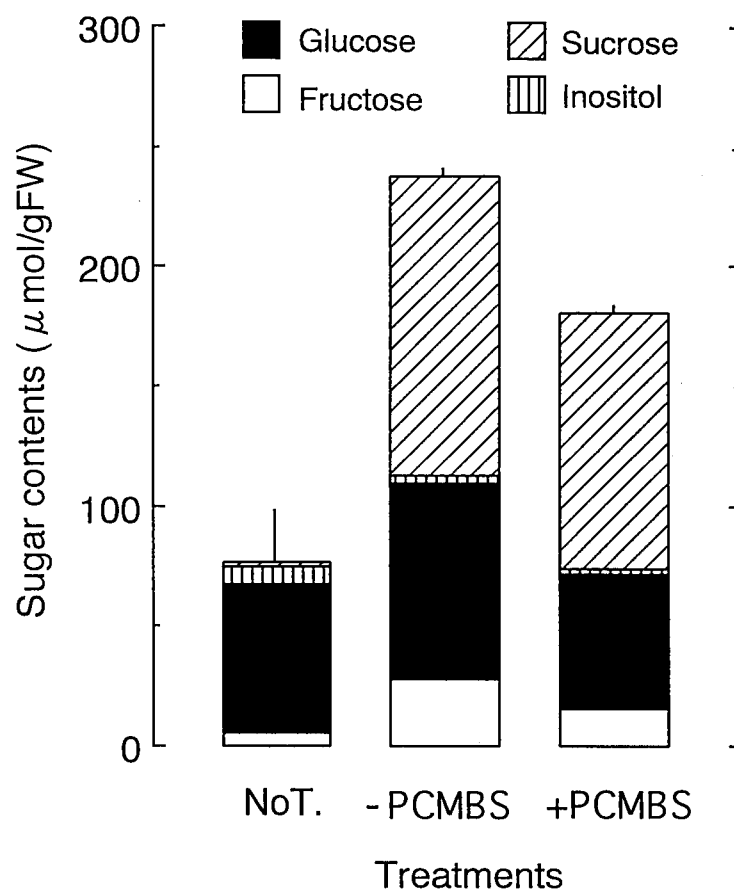


Fig.25. Differences in sugar contents and compositions in cabbage petiole tissues in relation to treatment with 0.8 M sucrose solution for 1 hr in the presence or absence of 1 mM PCMBS. **NoT.**, no treatment. Bars = SD from three preparations.

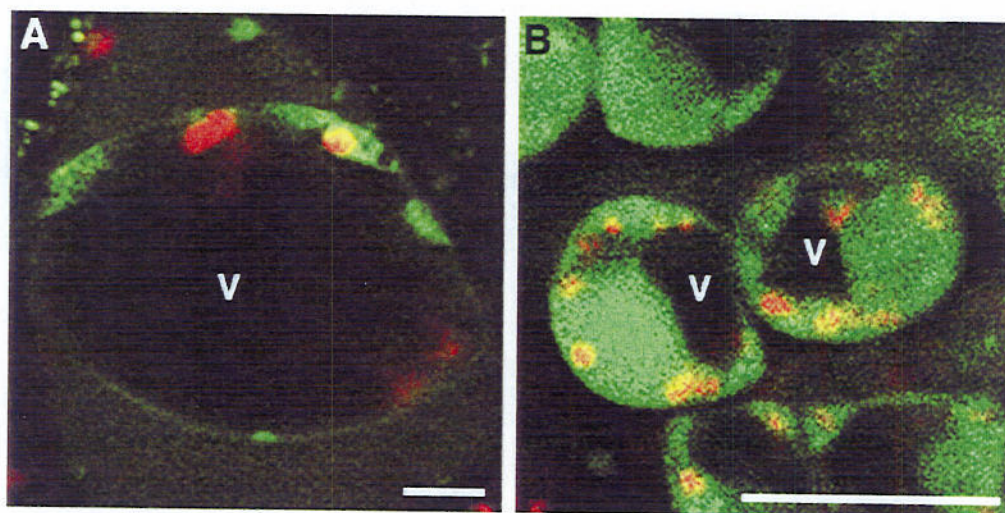


Fig.26. CLSM images showing sugar loading into a cabbage petiole cell (A) and asparagus shoot tip cells (B) treated with 0.8 M sucrose solution in the presence of 1 mM PCMBS. After the treatment, all samples were washed. Greenish-yellow regions correspond to fluorescence of LYCH. V, vacuoles. Scales = 10 μ m.

のスクロース輸送体の働きを阻害するわけではないので、PCMBSで輸送阻害されずに取り込まれた糖の凍害防御効果も無視できない。いずれにしても、細胞内に取り込まれる糖には、fluid-phase endocytosisによって取り込まれほとんど耐凍性増大に関与しない糖と、輸送体により取り込まれ耐凍性増大に関与する糖とが存在すると考えられる。すなわち、細胞内の糖を分析した結果のみではこれらの区別ができないので、細胞内糖と耐凍性との関連性を調べる場合には、細胞内に糖の局在性に注意する必要がある。

ニンジン (*Daucus carota*) の培養細胞では、1 mM PCMBS処理時間が1時間以内であれば、細胞に傷害は発生しない (Thierry et al., 1997)。さらに、種々の植物組織を用いた、PCMBSによるスクロース輸送阻害実験では、PCMBS処理は通常2～4mM PCMBS水溶液で3時間まで行われている (Bourquin et al., 1990; Beruter and Studer-Feusi, 1995; Shiratake et al., 1997)。本研究では、スクロース輸送を阻害するために、キャベツ葉柄組織に対して1mM PCMBS水溶液で試料を1時間処理しているが、PCMBS自体の害作用について予備実験的に検討した結果、溶液に添加した1mM PCMBSのキャベツ葉柄組織に対する害作用は、処理開始3時間後から5時間後に現れることが明らかになった (資料未掲載)。すなわち、本実験で用いた1mM PCMBS水溶液処理は1時間以内であれば、スクロース輸送を阻害する影響を除き、組織に対する影響は、極めて低いと思われる。

第3章 糖外与野菜組織における糖含量および耐凍性の変動と細胞内構造の変化

第2章において、長時間の糖外与処理後のキャベツ葉柄組織およびアスパラガス茎頂の頂端分裂組織では、細胞内への糖の取込みが起こり、これにより耐凍性が高まることを示した。しかし、特にキャベツ葉柄組織では、細胞内に糖が十分に取り込まれないと考えられる短時間の糖外与処理によっても、耐凍性の増大が認められた。

キャベツ葉柄組織では、わずか10分間のグルコース高濃度（1.0M）溶液処理が組織の耐凍性を著しく増大させ、その耐凍性が試料の水洗により減少することが報告されている（Sakai and Yoshida, 1968）。彼らは、この事象を、細胞外に存在する糖の耐凍性増大効果と考えたが、その機構の詳細については明らかにしていない。

一般に、植物細胞は、糖溶液処理などの高張条件にさらされると、短時間で原形質分離を起こすことが知られている（Lee-Stadelmann and Stadelmann, 1989）。コムギ（*Triticum timopheevi*）培養細胞では、スクロース溶液処理時に起きる原形質分離が、凍結脱水時における細胞の変形および生体膜の構造変化を抑制し、凍害を軽減すると考えられており（Sopina and Samygin, 1993）、また、ジャガイモ（*Solanum tuberosum*）培養細胞では、細胞内に浸透しない高分子のポリエチレングリコール1000を含む高張溶液中での処理が耐凍性の増大をもたらすこと、およびジャガイモ培養細胞由来のプロトプラストの耐凍性が培養細胞の耐凍性を上回ることなどから、凍結時に起こる細胞壁の変形による機械的ストレスが、凍結傷害の発生を助長すると考えられている（Tao et al., 1983）。このように、いずれの研究においても、高張溶液処理による原形質分離の発生が、耐凍性増大効果をもつことが示唆されている。

本章では、キャベツ葉肉組織を用いて、短時間の糖外与処理によって現れる耐凍性増大効果の機構を明らかにするために、主としてCryo-SEM法およびフリーズ・フラクチャー・レプリカ法を用い、組織の凍結に伴う細胞構造の変化を観察した。また、これと関連して、凍結傷害への細胞壁の関与を検証するため、キャベツ葉肉組織・細胞の凍結に伴う構造的変化と葉肉組織由来プロトプラストの凍結に伴うそれとをCryo-SEM法により比較した。

第1節 第3章において用いる材料および共通的方法の概要

本章で用いる材料および共通的方法の詳細については、特に本節において予め述べることにする。

1. 材料の調製

(1) 組織の調製 4℃で3～4か月間低温貯蔵してあったキャベツ (*Brassica oleracea* L.) 品種・ゴールドサワーの結球の外側から3ないし4枚目の葉を切り離し、その葉肉組織を剃刀で5mm×2mm×0.5mm (厚さ) の切片に調製したのち材料として用いた (Fig.27)。

(2) プロトプラストの調製 プロトプラストを作製するためのキャベツ葉肉組織 (Fig.28) は、1995年11月中旬から1997年12月上旬に北海道大学低温科学研究所温室 (室温26℃、湿度70%) で育成し、4℃/2℃ (昼/夜, 16時間日長) で30日間低温処理したキャベツ (*Brassica oleracea* L.) 品種・アーリーボールの幼植物 (草丈約15cm) から、第4葉から第7葉までの本葉を採取して用いた。

プロトプラストは以下の手順で単離した。葉の表面をカーボン・パウダーでこすり、洗浄液 [25mM グルコース、0.1% bovine serum albumin (BSA)、2 mM CaCl_2 および 0.45M ソルビトールを添加した溶液 (pH5.7)] で洗浄したのち、剃刀で幅0.5mmに細断した。約2 g (生重) の細断試料を酵素液 [1% Cellulase Onozuka R-10、0.4% Macerozyme R-10、0.5% デキストラン硫酸カリウム、25mM グルコース、0.8% BSA、2mM 3-(n-morpholino) ethansulfonic acid (MES)、5mM CaCl_2 および 0.41M ソルビトール (pH5.7)] 10ml に浸漬し、30℃の恒温振とう器 (80rpm) で4時間振とうした。次いで、60メッシュのナイロンメッシュで酵素液を濾過し、上清を、25mM グルコース、0.8% BSA、2mM MES および 0.53M スクロースを添加した溶液 (pH5.7) 上に載せ、800rpmで2分間遠心分離したのち、密度勾配境界面上に集まったプロトプラストを回収した (スクロース密度勾配遠心法)。このプロトプラストを

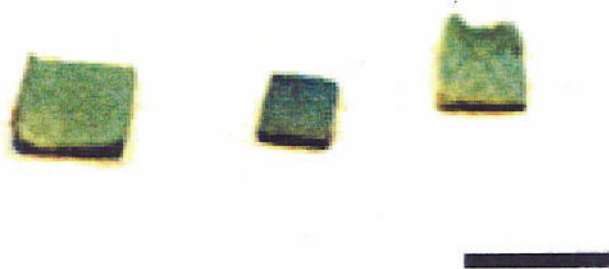


Fig.27. Mesophyll tissue segments [5mm×2mm×0.5mm (thickness)] excised from mature head leaves of cabbage (*Brassica oleracea* L. cv. Gold sour) used for experiment. Scale = 5 mm.



Fig.28. Mesophyll tissue segments [5mm×2mm×0.5mm (thickness)] excised from true leaflet from 30-day-old cabbage plantlets (*Brassica oleracea* L. cv. Early Ball) (about 15cm in height) used for experiment. Scale = 5 mm.

洗浄液中に 5×10^5 個/mlの密度で再懸濁させ、懸濁液を実験に用いた (Figs.29-A,B)。プロトプラストの対照試料として、30日間低温処理したキャベツ実生の葉の葉肉組織片 [5mm×2mm×0.5mm (厚さ)] を用いた。

2. 糖外与処理

糖外与処理は、試料を所定濃度 (実験結果を表す図中に示した) の糖溶液 (pH5.7) 中に所定時間 (図中に示した) 浸漬することにより行った。なお、糖外与処理後の組織表面に付着した糖溶液は濾紙で拭い取った (糖外与処理試料)。対象とした糖は、グルコース、ガラクトース、マルトース、スクロース、ソルビトール、マンニトールであるが、実験によっては特定の糖のみを用いた (図中に示した)。必要に応じて、糖外与処理試料を水洗したものをを用いた (図中に示した)。試料の水洗は、蒸留水により5分間隔で3回すすいだのち、試料表面に付着した水分を濾紙で拭い取るにより行った。糖外与処理試料の対照試料として、処理を全く施さない試料 (未処理試料) を用いた。

3. 凍結および融解ならびに耐凍性の評価

(1) 糖外与処理における糖の種類・濃度および処理時間と耐凍性の変化に関する実験 (第2節)、および短時間糖外与後の組織・細胞における凍結中の構造変化と融解後の生存性の変化に関する実験 (第4節) の場合：試料の凍結および融解は次のように行った。試料を凍結媒液 (未処理試料には蒸留水を用い、糖外与処理試料には同組成の糖溶液を用いた) とともに5ml容試験管 (電子顕微鏡観察用試料の場合にはアルミ製ホルダー) に入れ、 -3°C で温度平衡させ、試験管内液面に氷片を接触させて (電子顕微鏡観察用試料の場合には試料に直接氷片を接触させて) 植氷した。次いで、 -5°C 、 -7.5°C 、 -10°C 、 -12.5°C 、 -15°C 、 -20°C 、 -30°C 、 -40°C の低温槽に試験管 (凍結媒液と試料が入っている) を順次移すこと [各温度には1時間おき温度平衡させた (平衡凍結)] により冷却した (段階的冷却法、平均冷却速度は約 $0.04^{\circ}\text{C}/\text{min}$)。所定温度で平衡させたのち、耐凍性検定用の試料は、速やかに槽外に取り出し、

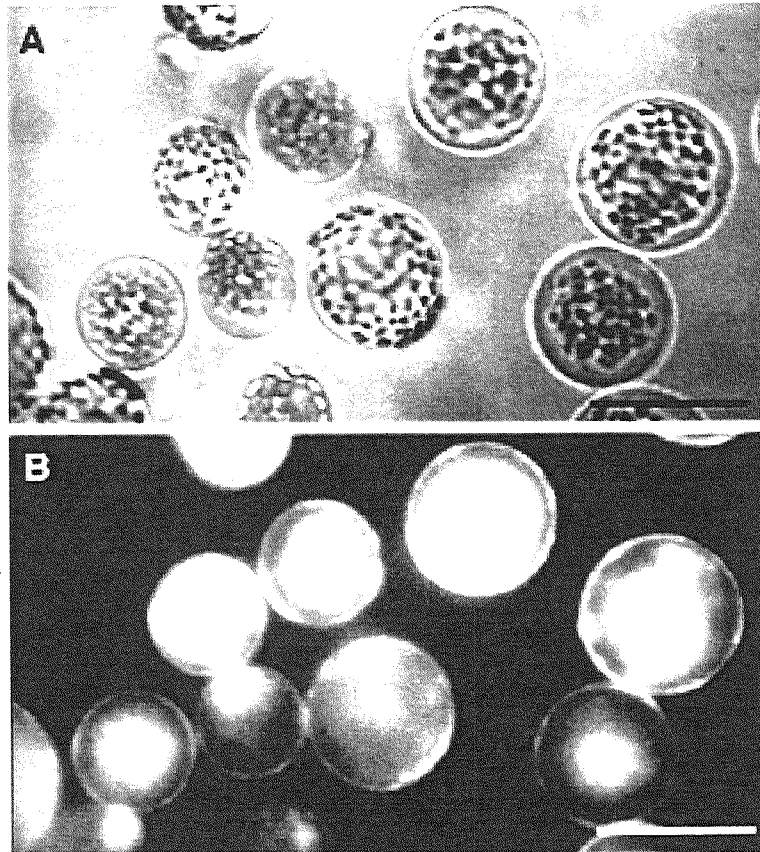


Fig.29. Protoplasts derived from mesophyll tissues of cabbage (*Brassica oleracea* L. cv. Early Ball). (A) Light microscope image. (B) Fluorescence microscope image after FDA staining. Scales = 100 μ m.

4℃で緩速融解（約0.3℃/min）したのち、第1章、第1節、3（1）の電解質漏出法に準じて生存率を算出し、耐凍性を評価した。一方、所定温度に達した電子顕微鏡観察用の試料は、直ちに液体フレオン（-150℃）に浸漬して凍結固定後、液体窒素中に保存した。段階的冷却を行った電子顕微鏡観察用試料の対照試料として、室温から液体フレオンに直接浸漬して急速凍結固定した試料を用いた。

（2）組織・細胞の凍結に伴う生存性の変動および構造変化における差異と細胞壁の有無との相互関連に関する組織-プロトプラスト実験系による検証（第5節）の場合：プロトプラストと組織の耐凍性および凍結に伴う構造変化に関する比較実験では、試料の凍結および融解は次のように行った。組織またはプロトプラストを凍結媒液（プロトプラスト懸濁液と同組成の溶液）とともに5 ml容試験管（電子顕微鏡観察用試料の場合にはアルミ製ホルダー）に入れ、-3℃で温度平衡させ、試験管内液面に氷片を接触させて（電子顕微鏡観察用試料の場合には試料に直接氷片を接触させて）植氷した。次いで、プログラミング・フリーザーを用いて冷却した（0.1℃/min）。一方、所定温度に達した耐凍性検定用の試料は、速やかにフリーザー外に取り出し、4℃で緩速融解したのち、第1章、第1節、3（1）の電解質漏出法に準じて耐凍性の評価を行った。所定温度に達した電子顕微鏡観察用試料は、液体フレオンに速やかに浸漬し急速凍結固定したのち、液体窒素中に保存した。また、緩速冷却を行った電子顕微鏡観察用試料の対照試料として、室温から液体フレオンに直接浸漬して急速凍結固定した試料を用いた。

4.糖分析

糖分析用試料の調製および組織内糖の分析は、第1章、第1節、4の方法に準じて行った。糖分析は、未処理試料、10分間のグルコース溶液処理後の試料、10分間のグルコース溶液処理後に水洗した試料、3時間のグルコース溶液処理後の試料、3時間のグルコース溶液処理後に水洗した試料について行った。分析は2反復とし、その平均値を求めた。

5. Cryo-SEM法

凍結過程における組織・細胞構造の変化に関するCryo-SEM法による観察は、常法（藤川ら, 1988）に準じて行った。Cryo-SEM（JEOL, JSM-840A）内のCryo-unitを用い、試料温度 -105°C 、真空度 10^{-4}Torr の条件下において試料をナイフで切断し、試料温度を約 -95°C まで昇温して10分間エッチングを行ったのち、白金カーボン・ペレットを用い、切断面に回転蒸着した。次いで、試料を -160°C に保持したSEMの試料台に移し、加速電圧5 kVで二次電子像を観察した。

6. フリーズ・フラクチャー・レプリカ法

試料のフリーズ・フラクチャー・レプリカの作製および観察は、第2章、第1節、8の方法に準じて行った。原形質膜構造変化の出現頻度は、電子顕微鏡画像中から任意に選定した30の原形質膜区画（1区画を $1\mu\text{m}^2$ とした）に出現した構造変化の観察数を計測し、区画数で除した値によって表した。

第2節 野菜組織・細胞への糖外与処理（高濃度糖溶液浸漬法） における糖の種類・濃度および処理時間と耐凍性向上 との関連

キャベツ葉肉組織を用い、組織の耐凍性に及ぼす糖外与処理（高濃度糖溶液浸漬法）の影響について、糖の種類・濃度および処理時間に着目し、電解質漏出法により調べた。

1. 材料および方法

材料は、キャベツ (*Brassica oleracea* L.) 品種・ゴールドサワーの結球葉の葉肉組織片を用いた。また、材料の調製、糖外与処理、凍結および融解、耐凍性の評価については、本章第1節で述べた方法に準じて行った。

2. 結果

(1) 糖外与処理における糖の種類と耐凍性向上との関連 キャベツ結球葉の葉肉組織を用いて、種々の糖の高濃度 (1.0M) 溶液による10分間の糖外与処理後の耐凍性の変化について、電解質漏出法により調べた (Fig.30)。未処理試料のLT₅₀は-4.5℃であったが、グルコース、ガラクトース、スクロース、マルトースまたはソルビトールの1.0M溶液による処理後の耐凍性は有意な増大を示した ($-16^{\circ}\text{C} \geq \text{LT}_{50} \geq -17.5^{\circ}\text{C}$)。しかし、1.0Mマンニトール溶液処理後の試料のLT₅₀は-8℃であり、耐凍性を増大させる働きは、上述の糖に比べて、はるかに小さかった。この結果から、マンニトールを除いたほかの糖については、短時間の糖外与処理によって、ほぼ同じ耐凍性増大効果を示すことが明らかになった。

次に、植物組織の凍結保存の際に頻繁に用いられるグルコースの耐凍性増大効果について詳細に検討したところ、以下のような事象が明らかになった。

(2) 糖外与処理における糖濃度と耐凍性向上との関連 処理時間を10分間として、グルコース濃度の変化と耐凍性の変化との関連について調べたところ (Fig.31)、試料の耐凍性は、グルコース濃度が上昇するとともに増大し、用いた濃度の中で最も高い1.0M溶液で処理したときに最大となった (LT₅₀=-17.5℃)。

(3) 糖外与処理における処理時間と耐凍性向上との関連 グルコース高濃度 (1.0M) 溶液を用いて処理時間の変化と耐凍性の変化との関連について調

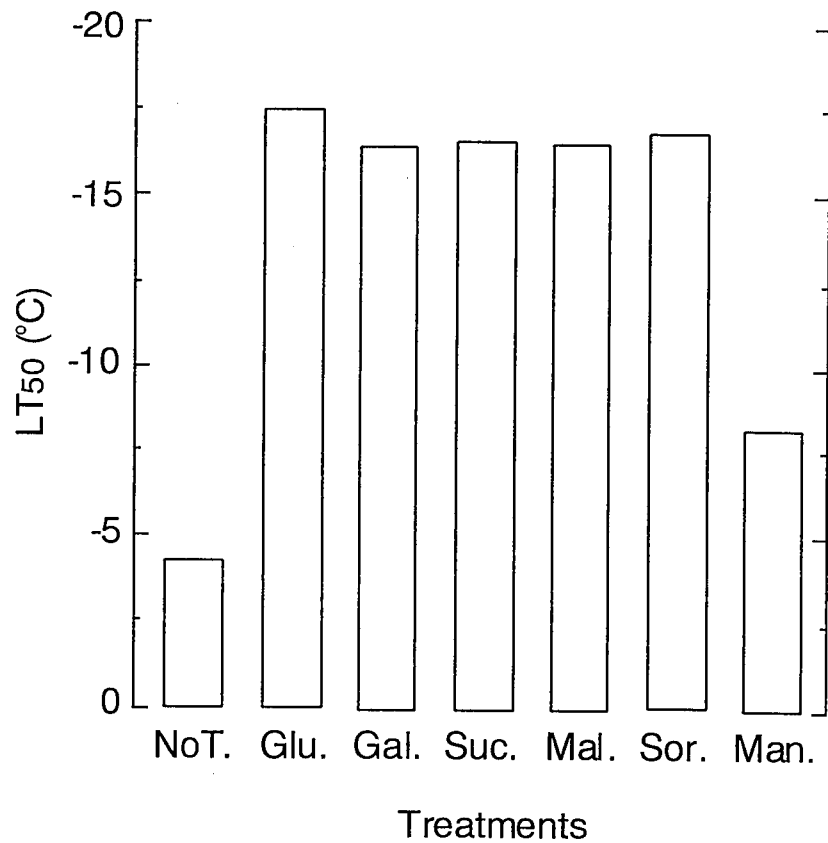


Fig.30. Differences between freezing tolerance (LT_{50}) of cabbage (cv. Gold Sour) mesophyll tissues in relation to treatment with 1.0 M solutions of various sugars for 10 min. **NoT.**, no treatment; **Glu.**, glucose; **Gal.**, galactose; **Suc.**, sucrose; **Mal.**, maltose; **Sor.**, sorbitol; **Man.**, mannitol. All samples were cooled at 0.04°C/min and thawed at about 0.3°C/min to 4°C. Survival was determined by ion leakage.

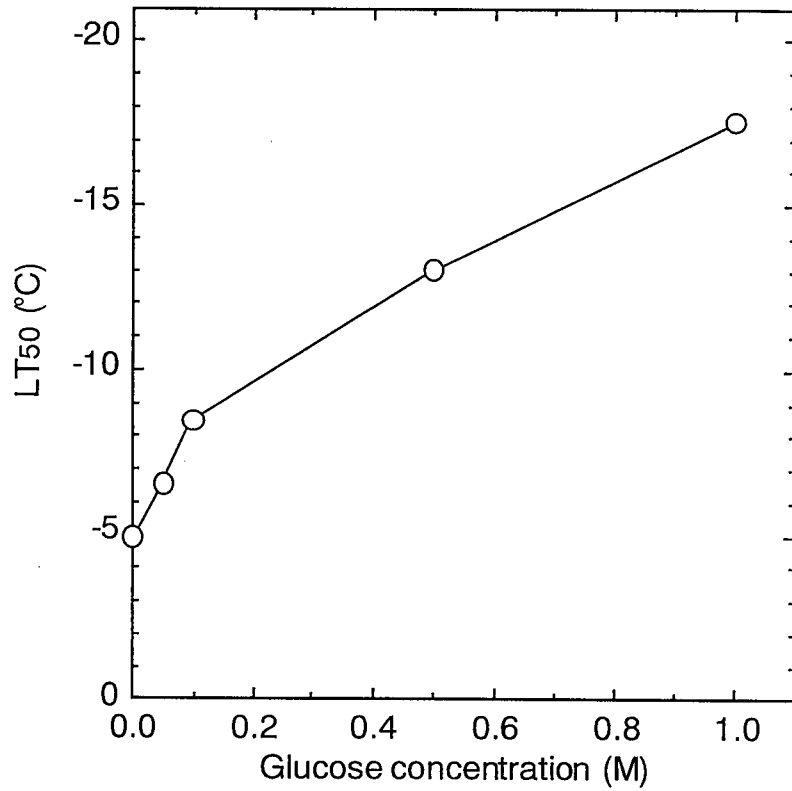


Fig.31. Changes of freezing tolerance (LT_{50}) in cabbage (cv. Gold Sour) mesophyll tissues in relation to treatment with glucose solutions for 10 min at different concentrations. All samples were cooled at $0.04^{\circ}\text{C}/\text{min}$ and thawed at about $0.3^{\circ}\text{C}/\text{min}$ to 4°C . Survival was determined by ion leakage.

べたところ (Fig.32)、試料の耐凍性は、糖外与処理開始直後に著しく増大し、糖外与処理開始3時間後まで高い値を維持した。しかし、3時間を超えると、耐凍性は減少に転じた。この結果から、キャベツ葉肉組織の最大の耐凍性 ($-17.5^{\circ}\text{C} \geq \text{LT}_{50} \geq -18^{\circ}\text{C}$) は、グルコース高濃度 (1.0M) 溶液処理開始10分後から3時間後まで保持されていることがわかった。

(4) 糖外与処理における処理時間および水洗処理と耐凍性向上との関連

グルコース高濃度 (1.0M) 溶液処理開始10分後、3時間後、6時間後の試料を用い、処理直後と水洗後の耐凍性を比較したところ (Fig.33)、未処理試料の耐凍性は水洗によってほとんど変化しなかったが、グルコース溶液処理開始10分後の試料では、糖外与処理によって現れた高い耐凍性が、水洗により著しく低下した。しかし、グルコース溶液処理開始3時間後の試料では、得られた高い耐凍性は水洗後においてもほとんど変化しなかった。また、グルコース溶液処理開始6時間後の試料では、糖溶液処理後の耐凍性が水洗により著しく低下した。

3. 考察

植物組織の凍結保存の際に用いられる糖外与処理は、細胞内に糖を取り込ませるために長時間行う場合が多い (Withers and Street, 1977; Maddox et al., 1982/83; Blakesley et al., 1996, 1997)。しかし、長時間にわたって糖を細胞内に取り込ませた場合には、糖の種類により耐凍性増大効果に差が現れることが知られており (Sakai and Yoshida, 1968)、この差は、個々の糖の特性に起因する非束一的なものと考えられる。これに対し、糖が細胞内に浸透していない場合には、非束一的な糖分子の働きとは関係なく、糖溶液のもつ束一的な浸透圧ストレスのみによる耐凍性増大効果が現れるものと考えられる。すなわち、本実験では、キャベツ葉肉組織を、種々の糖の1.0M溶液で10分間処理したところ、マンニトールを除いた他の糖で、同等の耐凍性増大効果が認められたが、これは、短時間糖外与処理の耐凍性増大効果が、糖溶液のもつ溶液とし

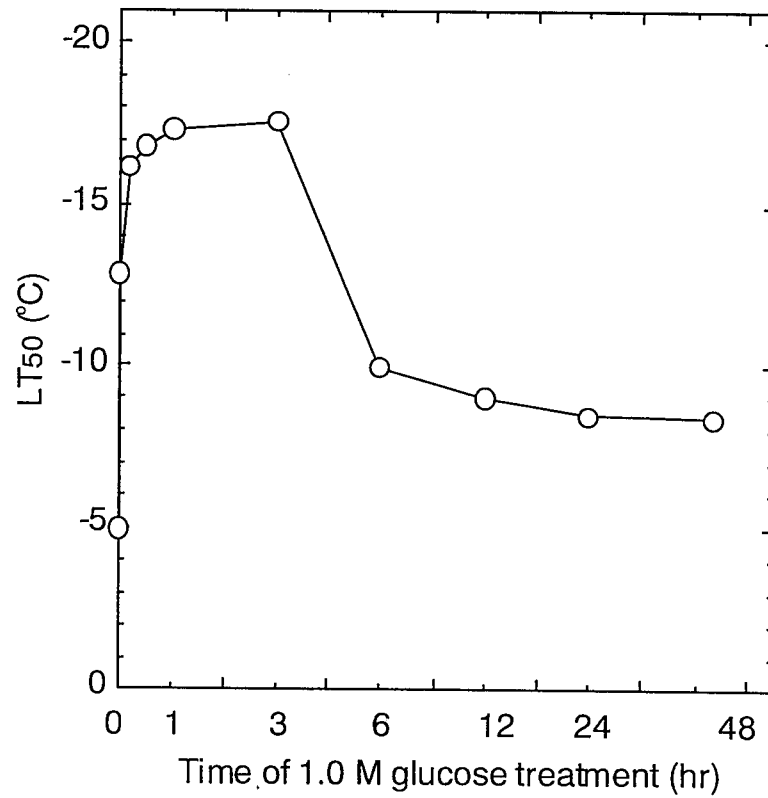


Fig.32. Changes of freezing tolerance (LT_{50}) in cabbage (cv. Gold Sour) mesophyll tissues in relation to treatment with 1.0 M glucose solution at different times. All samples were cooled at $0.04^{\circ}\text{C}/\text{min}$ and thawed at about $0.3^{\circ}\text{C}/\text{min}$ to 4°C . Survival was determined by ion leakage.

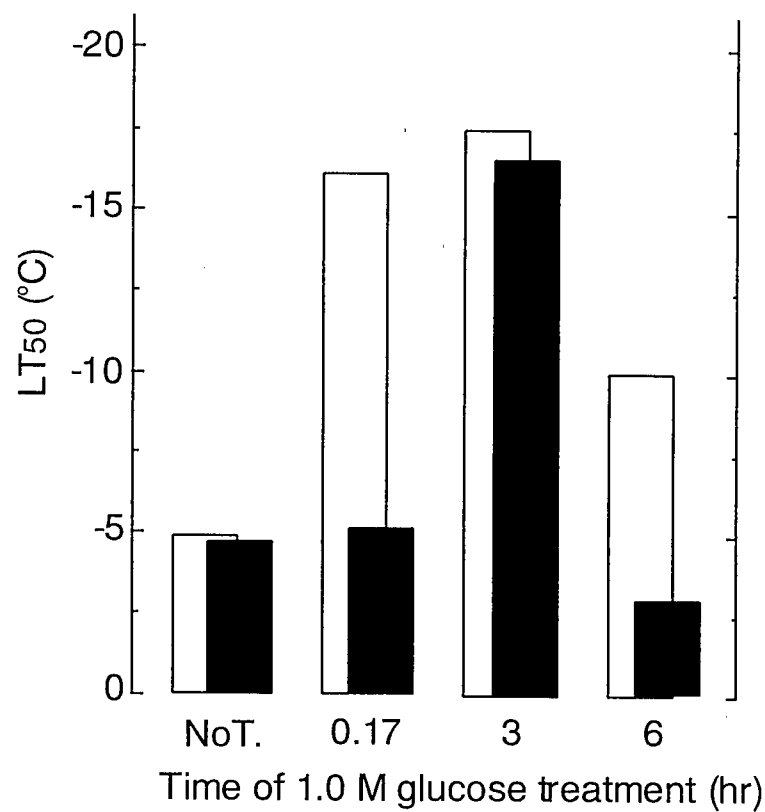


Fig.33. Differences between freezing tolerance (LT_{50}) in cabbage (cv. Gold Sour) mesophyll tissues in relation to treatment with 1.0 M glucose solution before (□) and after (■) washing with distilled water. **NoT.**, no treatment. All samples were cooled at 0.04°C/min and thawed at about 0.3°C/min to 4°C. Survival was determined by ion leakage.

での束一的性質によることを示している。短時間糖外与処理に用いた糖溶液の中で、1.0Mマンニトール溶液の耐凍性増大効果のみが低いことが明らかになったが、この事象は、植氷温度（-3℃）の溶液中で析出するマンニトールの性質（資料未掲載）に関係していると思われる。すなわち、マンニトール溶液では、植氷後に凍結濃縮される過程で結晶が析出し、浸透価が一定値以上に上昇せず、糖溶液のもつ束一的な浸透圧効果が抑制されたためであると考えられる。

10分間のグルコース高濃度（1.0M）溶液処理を行った場合に、グルコース濃度の上昇に伴い耐凍性が増大したことは、短時間糖外与処理の効果が、糖溶液の浸透圧変化に起因することを裏付けている。さらに、10分間のグルコース高濃度（1.0M）溶液処理による耐凍性増大効果が試料の水洗により消失したことは、短時間糖外与処理の効果が、細胞内に取り込まれていないところの、細胞の表面、細胞間中層ならびに細胞膜と細胞壁の間に存在する、いわゆる細胞外の糖に由来する可能性を示している。これらのことから、キャベツ葉肉組織でみられた短時間糖外与処理の耐凍性増大効果は、細胞内に取り込まれていない外在の糖分子の密度によってもたらされる束一的な浸透圧効果によると推察される。

第3節 野菜組織・細胞に対する糖外与処理（高濃度糖溶液浸漬法）の時間と糖取込み量との関連

キャベツ葉肉組織を用い、組織への糖の取込み量に及ぼす糖外与処理（高濃度糖溶液浸漬法）の影響について調べた。

1. 材料および方法

材料は、キャベツ（*Brassica oleracea* L.）品種・ゴールドサワーの葉肉組

織片を用いた。また、材料の調製、糖外与処理、糖分析については、本章第1節で述べた方法に準じて行った。本章の糖分析においては、糖外与処理後に水洗を行わない試料の糖含量を以て、組織内〔細胞内（細胞質、液胞などの細胞内小器官を示す）と細胞外（原形質膜、細胞壁および両者の間隙、ならびに細胞間中層を示す）〕に存在する可溶性の糖の含量とし、また、糖外与処理後に水洗した試料の可溶性糖含量は、細胞内に存在する可溶性糖含量を概ね反映しているものとした。すなわち、水洗後の試料の糖含量は、組織・細胞内の既存の糖と組織・細胞内へ浸透した外与糖とを合わせた含量を表しているものとした。

2. 結果

グルコース高濃度（1.0M）溶液による処理開始10分後または3時間後の試料を用い、水洗前後の可溶性糖含量の変化を調べた（Fig.34）。検出した糖のうち、最も変化の著しい糖はグルコースであった。グルコース含量は、未処理試料では50 μ mol/gFWであったが、糖外与処理開始10分後の試料では200 μ mol/gFWまで増加し、水洗後には80 μ mol/gFWに減少した。また、糖外与処理開始3時間後の試料では、グルコース含量が370 μ mol/gFWまで増加し、水洗後においても160 μ mol/gFWが残留していた。

3. 考察

10分間の糖外与処理後に水洗した試料のグルコース含量が、未処理試料のそれに比べてわずかに多かったのみであることから、10分間の糖外与処理では、グルコースの細胞内への浸透が少ないと考えられる。また、10分間糖外与処理試料を水洗することにより、耐凍性が著しく減少した事実も、細胞内に糖がほとんど取り込まれていないことを裏付けている。これらことは、キャベツ葉肉組織でみられた短時間糖外与処理による耐凍性増大効果が、細胞内に取

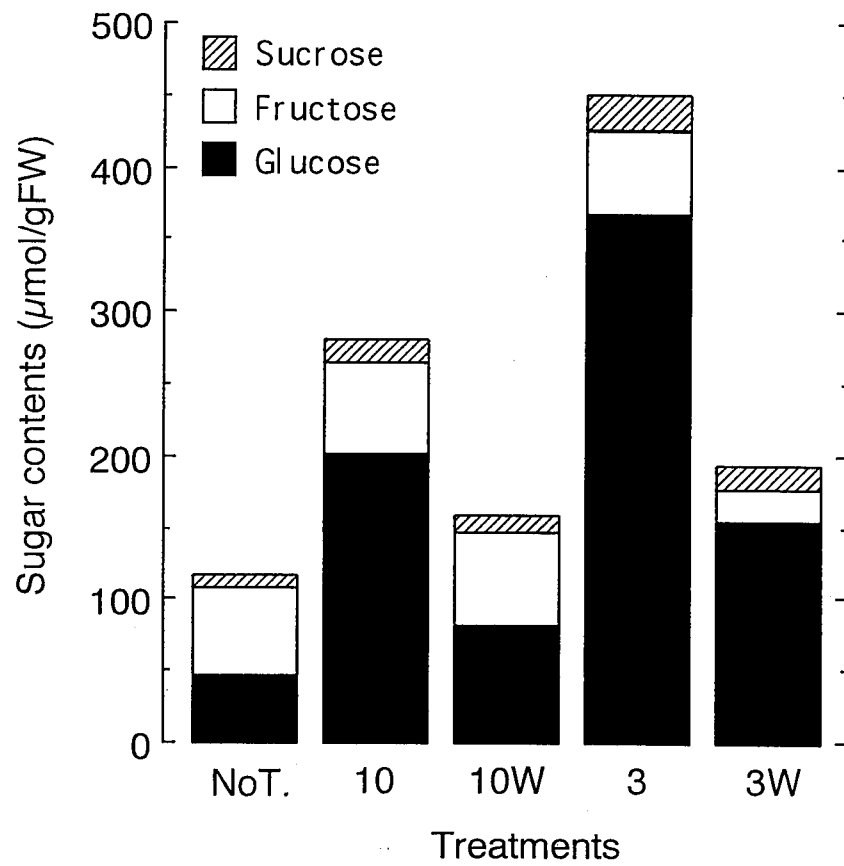


Fig.34. Differences in sugar contents and compositions in cabbage (cv. Gold Sour) mesophyll tissues in relation to treatment with 1.0 M glucose solution for 10 min (**10**), and for 3 hr (**3**). Samples washed after glucose treatment for 10 min (**10W**), and for 3 hr (**3W**). **NoT.**, no treatment. Bars = SD from three preparations.

り込まれていない糖による効果であることを示唆している。

ジャガイモ (*Solanum tuberosum*) の培養細胞では、細胞壁は通過するが細胞内にはほとんど浸透しない高分子のポリエチレングリコール1000を含む高張溶液で処理すると、組織の耐凍性が増大することが報告されている (Tao et al., 1983)。この事象は、ポリエチレングリコール1000の高張溶液 (0.6～0.8 Osm) で処理することによって起こる原形質分離が、凍結時に細胞壁が細胞膜に与える機械的ストレスを排除し、細胞膜の凍結傷害を軽減することに起因すると考えられている。コムギ (*Triticum timopheevi*) の培養細胞では、スクロース高濃度 (1.0M) 溶液処理による原形質分離が、凍結脱水時における細胞の変形および生体膜の構造変化を抑制して、凍結傷害を緩和すると考えられている (Sopina and Samygin, 1993)。また、第2章において述べたように、短時間の糖外与処理により耐凍性が増大したキャベツ葉柄組織は、糖外与処理後、間もなく原形質分離を起こすことが確認されている。これらのことから、キャベツ葉肉組織でみられた短時間糖外与処理の耐凍性増大効果も、この原形質分離の効果によるものと推測される。

第4節 短時間糖外与処理（高濃度糖溶液浸漬法）後の組織・

細胞の凍結過程における構造変化と融解後における 生存性向上との関連

キャベツ葉肉組織に対する短時間の糖外与処理を行った場合の耐凍性増大効果を明らかにするために、10分間のグルコース高濃度 (1.0M) 溶液処理後のキャベツ葉肉組織の凍結に伴う細胞構造の変化および原形質膜超微細構造の変化について、急速凍結した試料および段階的冷却・平衡凍結を行った試料を用いて、Cryo-SEM法およびフリーズ・フラクチャー・レプリカ法により調べた。

1. 材料および方法

材料は、キャベツ (*Brassica oleracea* L.) 品種・ゴールドサワーの葉肉組織片を用いた。また、材料の調製、糖外与処理、凍結および融解、耐凍性の評価（凍結傷害率として表した）、Cryo-SEM法、フリーズ・フラクチャー・レプリカ法については、本章第1節で述べた方法に準じて行った。

また、凍結・融解後の試料の傷害率については、以下の方法 (Pearce and Willison, 1985) に基づき算出した。未処理試料の電解質漏出量／未処理試料の加熱後の電解質漏出量=X、液体窒素凍結試料の電解質漏出量／液体窒素凍結試料の加熱後の電解質漏出量=Y、凍結・融解試料の電解質漏出量／凍結・融解試料の加熱後の電解質漏出量=Zとし、糖溶液処理または凍結融解処理後の試料の凍結傷害率 (%) = $(Z - X / Y - X) \times 100$ によって求めた。

2. 結果

(1) 急速凍結試料の細胞構造および原形質膜超微細構造の観察 糖外与処理を行わない未処理試料の細胞内部の大部分は大きな液胞で占められ (Fig.35-A)、その周囲に細胞質が薄い層となって存在することがCryo-SEM法により確認された (Fig.35-B)。フリーズ・フラクチャー・レプリカ法により未処理試料の細胞の原形質膜破断面を観察したところ、膜タンパク質粒子 (IMPs ; intramembrane particles) が均一に散在する構造が観察された (Fig.35-C)。

これに対し、グルコース高濃度 (1.0M) 溶液で10分間処理した試料では、細胞は原形質分離を起こしており (Fig.36-A)、細胞壁と原形質膜との間 (periprotoplasmic space) には、浸透したグルコース溶液がみられたが (Fig.36-B)、原形質分離細胞の原形質膜破断面には構造的変化はみられなかった。すなわち、IMPsは未処理試料の原形質膜破断面と同じく均一に散在していた (Fig.36-C)。

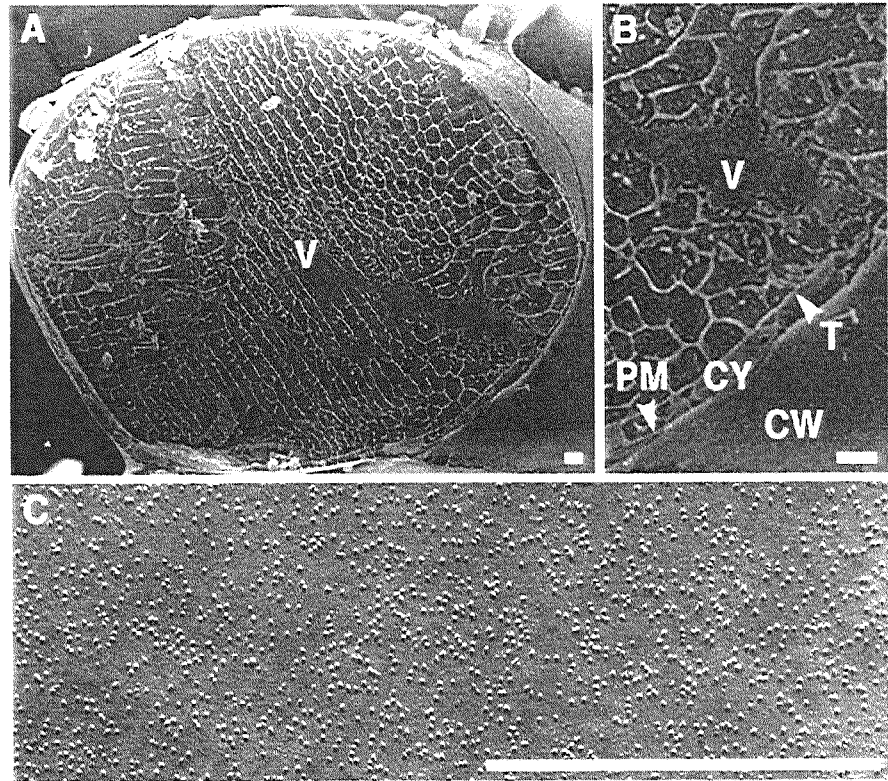


Fig.35. Ultrastructure of mesophyll cells in nontreated cabbage (cv. Gold Sour). Samples were cryofixed rapidly from room temperature. **(A)** Cryo-SEM image showing a cross-fractured view of one cell. **(B)** Highly magnified Cryo-SEM image in a part of **(A)**. **(C)** Freeze-replica image of protoplasmic fracture face (PF) in the plasma membrane. **CY**, cytoplasm; **CW**, cell wall; **PM**, plasma membrane; **T**, tonoplast; **V**, vacuoles. Scales = 1 μm .

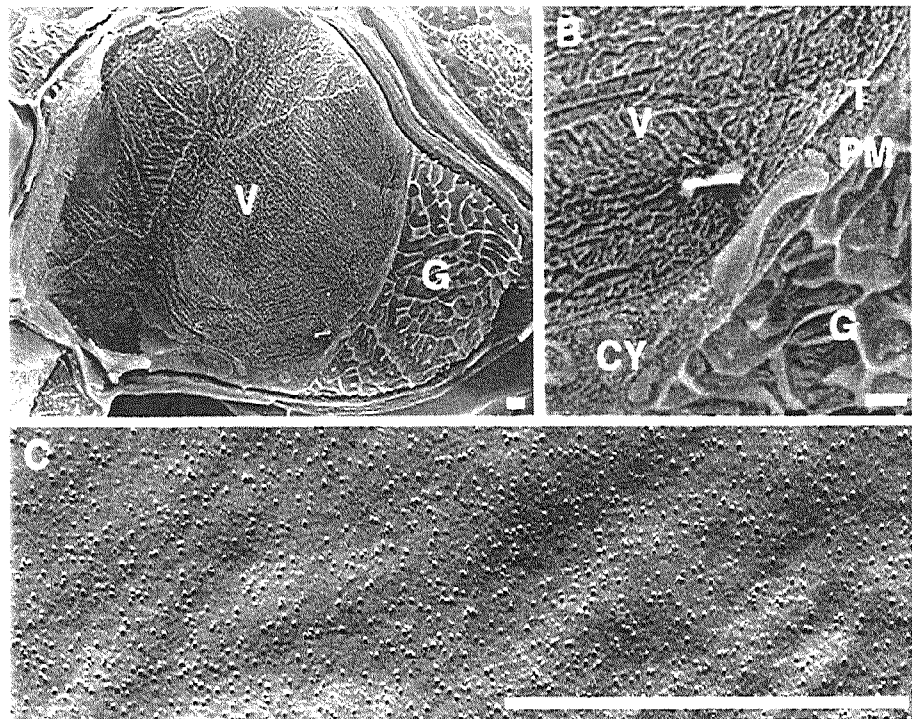


Fig.36. Ultrastructure of cabbage (cv. Gold Sour) mesophyll cells treated with 1.0 M glucose solution for 10 min. Samples were cryofixed rapidly from room temperature. (A) Cryo-SEM image of a cross-fractured view of one cell, showing plasmolysis. (B) Highly magnified Cryo-SEM image in a part of (A), showing glucose solution in periprotoplasmic spaces between plasma membrane and cell wall. (C) Freeze-replica image of PF in the plasma membrane. **CY**, cytoplasm; **G**, glucose solutions; **PM**, plasma membrane; **T**, tonoplast; **V**, vacuoles. Scales = 1 μ m.

(2)段階的冷却および平衡凍結に伴う細胞構造の変化の観察 段階的冷却および平衡凍結に伴うこれらの細胞構造の変化をCryo-SEM法およびフリーズ・フラクチャー・レプリカ法により調べた。糖外与処理を行わない未処理試料を-10℃まで冷却し凍結すると、細胞は著しく変形、収縮し (Fig.37-A)、細胞壁同士が密着している部分がみられた (Fig.37-B)。-10℃は、未処理試料に凍結傷害が生じる温度である。これに対し、グルコース高濃度 (1.0M) 溶液処理試料を-10℃まで冷却し平衡凍結しても、その細胞は、未処理試料でみられたほどの極度の変形はしておらず (資料未掲載)、さらに、-20℃まで冷却し平衡凍結しても、細胞壁同士が密着するほどに著しく変形した細胞はみられなかった (Figs.38-A,B)。これらの細胞のperiprotoplasmic spaceには、部分的に (Fig.38-A) または全体的に (Fig.38-B) 濃縮したグルコース溶液が存在していた。これらの結果は、短時間糖外与処理により原形質分離を起こした細胞では、冷却および凍結時の細胞の変形が緩和されることを示している。

(3)段階的冷却および平衡凍結に伴う細胞の原形質膜超微細構造変化の観察 段階的冷却および平衡凍結によるこれら細胞の原形質膜超微細構造の変化について、フリーズ・フラクチャー・レプリカ法により調べた。未処理試料を-10℃まで冷却し平衡凍結すると、原形質膜には、生体膜同士の異常接近が原因と考えられている構造変化、すなわち、IMPsの欠如部位であるaparticulate domains (ADs)、およびADs中で膜破断面が隣接膜に部分的に移行した部位のfracture-jump lesions (FJLs) の発生が確認された (Fig.39-A)。これに対し、10分間の糖外与処理後の試料を-10℃まで冷却し平衡凍結した場合には、原形質膜破断面には、これらの膜構造の変化はほとんどみられなかった (Fig.39-B)。しかし、10分間の糖外与処理後の試料を水洗し、-10℃まで冷却し平衡凍結した場合には、原形質膜破断面に、再びADsとそれに伴うFJLsが多数発生した (Fig.39-C)。さらに、原形質膜の超微細構造変化に加え、未処理試料の液胞膜破断面には、-10℃までの冷却および平衡凍結により、hexagonal II phase (H II 相) (Fig.40-A) やH II 相に類似したすじ状にうねった状態の構造体 (Fig.40-B) がまれに観察された。

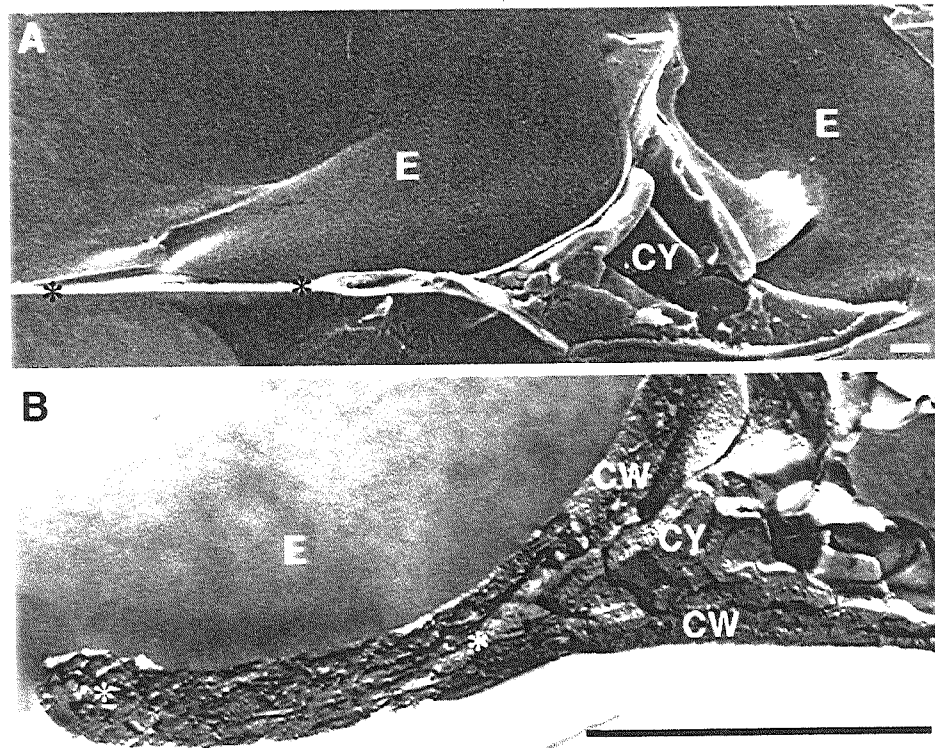


Fig.37. Ultrastructural changes by freezing in nontreated cabbage (cv. Gold Sour) mesophyll cells. Samples were cooled at 0.04°C/min to -10°C. **(A)** Cryo-SEM image. **(B)** Freeze-replica image showing a distinct cellular deformation of cells. **CY**, cytoplasm; **CW**, cell walls; **E**, extracellular ice crystals. Regions between asterisks show extremely closed part of cell wall. Scales = 1 μm.

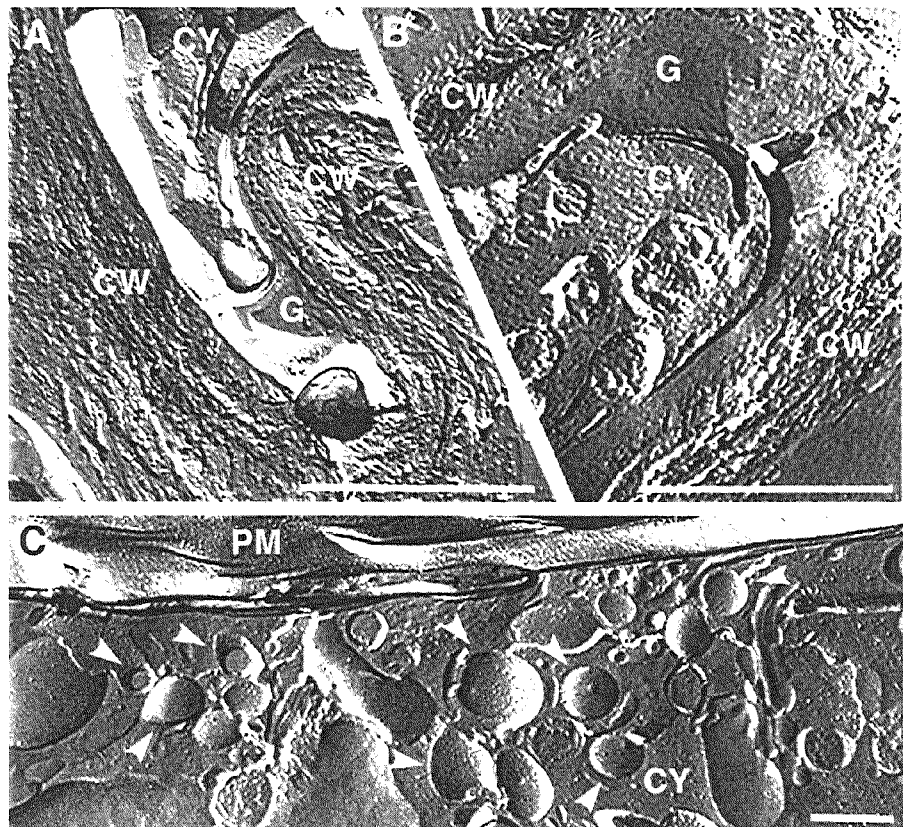


Fig.38. Freeze-replica images showing ultrastructural changes by freezing in cabbage (cv. Gold Sour) mesophyll cells treated with 1.0 M glucose solution for 10 min. Samples were cooled at 0.04°C/min to -20°C. (A and B) A part of deformed cells. (C) A part of cytoplasm showing numerous small vesicles (arrowheads). **CY**, cytoplasm; **CW**, cell walls; **G**, glucose solutions; **PM**, plasma membrane. Scales = 1 μ m.

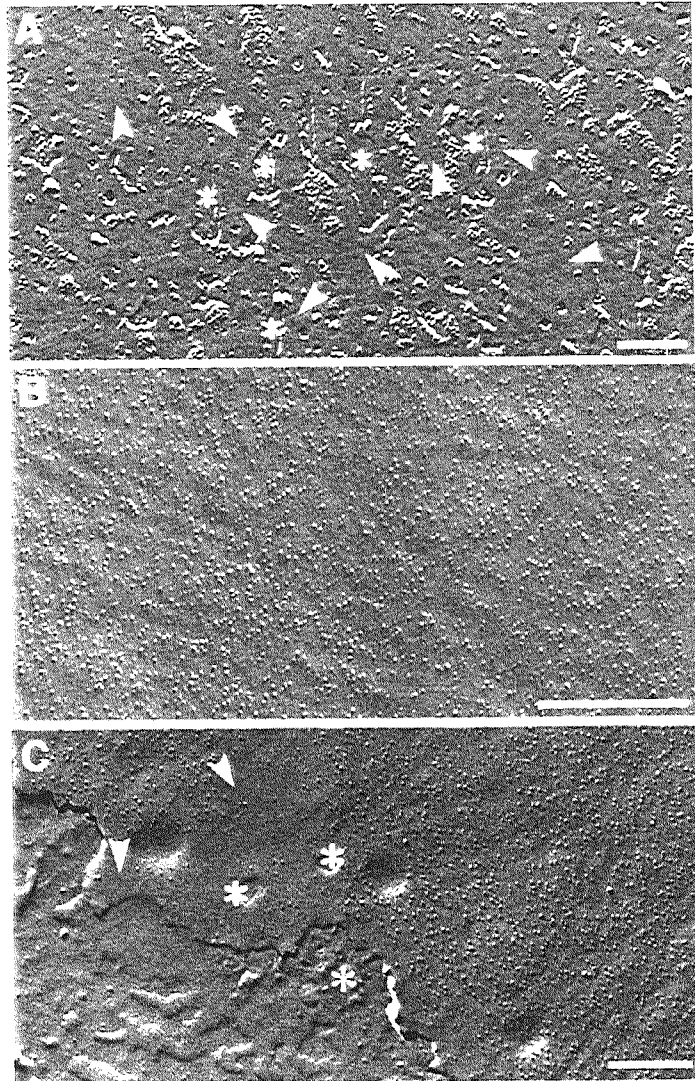


Fig.39. Freeze-replica images of PFs in plasma membrane showing ultrastructural changes by freezing in cabbage (cv. Gold Sour) mesophyll cells. Samples were cooled at 0.04°C/min to -10°C. **(A)** Nontreated samples without exogeneous supplement of glucose. **(B)** Samples treated with 1.0 M glucose solution for 10 min. **(C)** Samples treated with 1.0 M glucose solution for 10 min and then washed. Arrowheads show aparticle domains (ADs). Asterisks show fracture-jump lesions (FJLs). Scales = 200 nm.

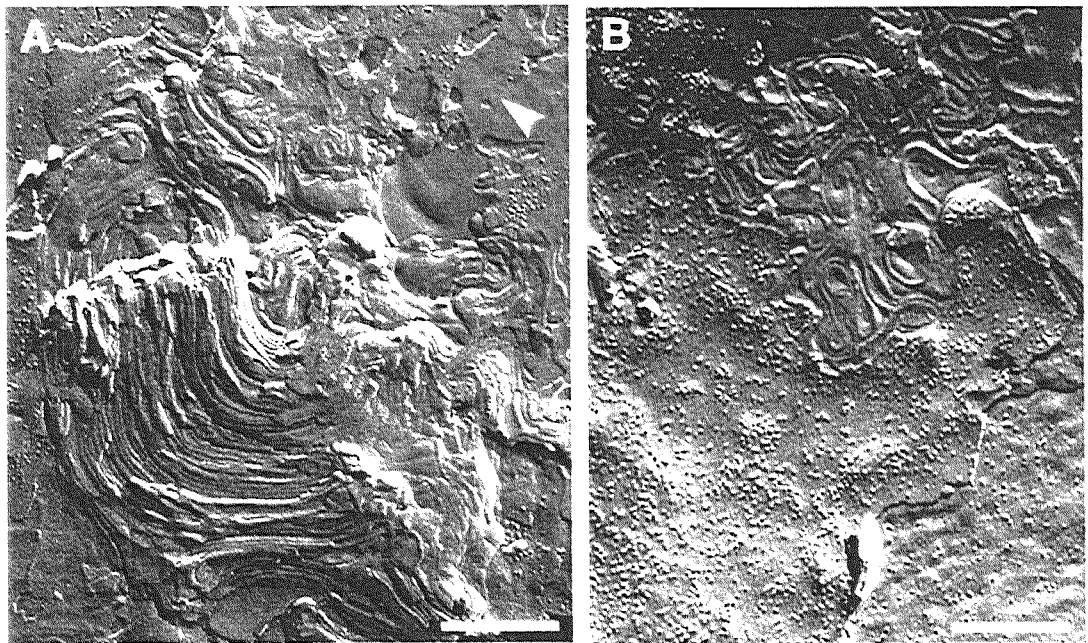


Fig.40. Freeze-replica images showing ultrastructures of tonoplasts in nontreated cabbage (cv. Gold Sour) mesophyll cells cooled at 0.04°C/min to -10°C. Freeze-replicas showing hexagonal II phases (**A**) and structures resembling to hexagonal II phases (**B**). Arrowheads show ADs. Scales = 200 nm.

(4)段階的冷却および平衡凍結に伴う原形質膜超微細構造変化と凍結傷害率との関係 未処理試料、10分間の糖外与処理後の試料および10分間の糖外与処理後に水洗した試料について、段階的冷却および平衡凍結に伴う原形質膜超微細構造の変化の出現率と、電解質漏出法から求めた凍結傷害率との関係をグラフに表した (Fig.41)。全ての試料において、原形質膜超微細構造の変化の出現率と凍結傷害率との間には、ほぼ並行的な関係が認められ、原形質膜超微細構造の変化が、凍結傷害と密接に関係していることがわかった。さらに、未処理試料および水洗試料においては、原形質膜超微細構造変化の出現率と凍結傷害率が、 -5°C から -10°C の比較的高い温度で急激に上昇しているのに対し、糖外与処理試料においては、同じ温度でもこれらの率は低く、さらに、低い温度域においても、原形質膜超微細構造の変化および凍結傷害率が抑制されることが明らかになった。

3. 考察

キャベツ葉肉組織の未処理試料を段階的に冷却し平衡凍結した場合、細胞外氷晶の圧迫により、細胞は著しく変形し扁平になり、細胞壁同士が密着していた。この細胞壁の間では原形質膜などの生体膜が異常に接近していると考えられる。これに対し、短時間の糖外与処理後の試料を段階的に冷却、平衡凍結した場合には、細胞は変形していたが、periprotoplasmic spaceには糖溶液が浸透し、細胞壁同士が密着した箇所はほとんど確認されなかった。

フリーズ・フラクチャー・レプリカ法による一連の研究は、細胞外凍結時における凍結傷害が、凍結脱水に起因する生体膜同士の異常接近と密接に関連していることを示している (Steponkus and Lynch, 1989; Fujikawa and Steponkus, 1990)。この仮説の中で、凍結脱水した細胞では、凍結傷害が次のような過程を経て発生すると推察されている。すなわち、①異常接近した生体膜では、膜タンパク質と膜脂質極性基の水和特性の違いから反発が生じ、膜タンパク質の局所移動が起きると推定され、タンパク質粒子、いわゆる intramembrane particles (IMPs) の凝集であるADsは、その現れとされてい

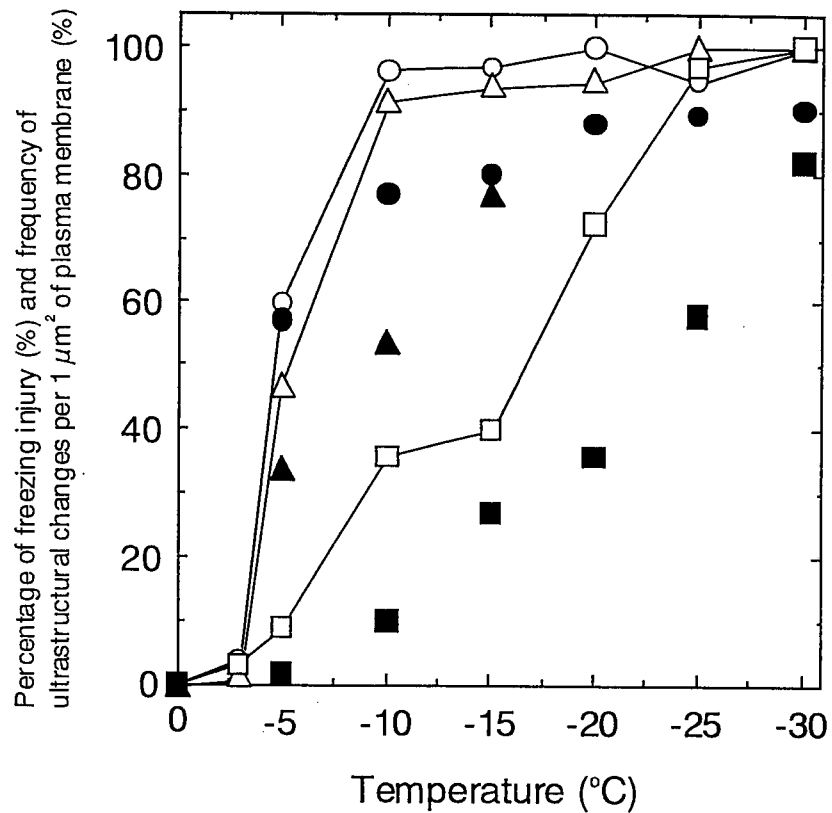


Fig.41. Relationship between freezing injury by freezing (●,■,▲) and frequency of ultrastructural changes in a form of ADs accompanied with FJLs in plasma membranes (○,□,△) of cabbage (cv. Gold Sour) mesophyll cells. Samples were cooled at 0.04°C/min. Frequency of ultrastructural changes was obtained from freeze-replica images. ○,●, nontreated samples without exogeneous supplement of glucose; □,■, samples treated with 1.0 M glucose solution for 10 min; △,▲, samples treated with 1.0 M glucose solution for 10 min and then washed. Freezing injury was determined by ion leakage.

る。②さらに、温度が低下し凍結脱水が進むと、膜接近時には、まずinverted micellar intermediate (IMI) が形成される (Siegel, 1986)。③IMIは、脂質の種類と温度により、HⅡ相あるいはinter lamellar attachment (ILA) を経て膜融合を起こす (Fujikawa, 1995)。このようなHⅡ相形成および膜の融合によって、膜が本来的にもっている半透膜としての機能が失われると考えられる。フリーズ・フラクチャー・レプリカ法により原形質膜破断面を観察すると、膜の融合部分は、脂質膜破断面の欠損部位、FJLsとして観察されることがわかっている。

凍結過程における未処理試料細胞では、原形質膜破断面に、ADsとそれに伴うFJLsが、また液胞膜破断面にはHⅡ相が、比較的高い凍結温度で発生していることが確認された。これに対し、10分間の糖外与処理後に凍結した試料では、それらの生体膜構造変化の発生が、はるかに低い温度域においても抑制されることが明らかになった。

これらのことから、短時間糖外与処理による耐凍性増大効果の発現は、凍結下の生体膜同士の異常接近を緩和することに起因していると推察される。さらに、Cryo-SEMを用いた観察により、凍結下の未処理試料細胞で生体膜の異常接近が認められたことから、10分間の糖外与処理による凍結傷害の軽減は、原形質分離によって、細胞壁と原形質膜との接触がある程度回避されたことに深く関係していると考えられる。

第5節 野菜組織・細胞の凍結に伴う生存性の変動および構造

変化と細胞壁の有無との相互関連に関する組織-

プロトプラスト実験系による検証

本章の第2節から第4節までの実験結果から、短時間糖外与処理に伴う細胞の原形質分離と耐凍性増大効果との関連が示唆された。本節では、この事象を検証するために、キャベツ葉肉組織由来のプロトプラストと葉肉組織の耐凍性の変動および凍結に伴う構造的変化について調べ、凍結傷害への細胞壁の関

与について検討した。

1. 材料および方法

材料は、キャベツ (*Brassica oleracea* L.) 品種・アーリーボールの葉肉組織片およびその葉肉組織由来のプロトプラストを用いた。また、材料の調製、プロトプラストの調製、凍結および融解、耐凍性の評価、Cryo-SEM法については、本章第1節で述べた方法に準じて行った。

2. 結果

(1) 組織およびプロトプラストの耐凍性の比較 キャベツ葉肉組織の生存率は、 -15°C までの冷却および凍結により急激に低下し、 -30°C では数パーセントまで低下した。これに対し、プロトプラストの生存率は、温度の低下に伴い徐々に低くなったものの、 -40°C でも57%の生存率を維持していた (Fig.42)。この結果は、プロトプラストの耐凍性が組織の耐凍性を上回ることを示している。

(2) 凍結に伴う組織およびプロトプラストの構造変化についての比較

次に、組織・細胞とプロトプラストの凍結に伴う構造変化について、Cryo-SEM法により比較したところ、組織 (Fig.43-A) では、 -30°C までの冷却および凍結による細胞外氷晶の成長に伴い極度に変形し (Fig.43-B)、細胞壁の著しい変形とそれに伴う原形質膜同士の異常接近を誘起していたのに対し (Fig.44-A)、プロトプラスト (Fig.43-C) では、 -30°C までの冷却および凍結で著しく変形したが (Fig.43-D)、原形質膜同士が異常接近した箇所は確認されなかった (Fig.44-B)。

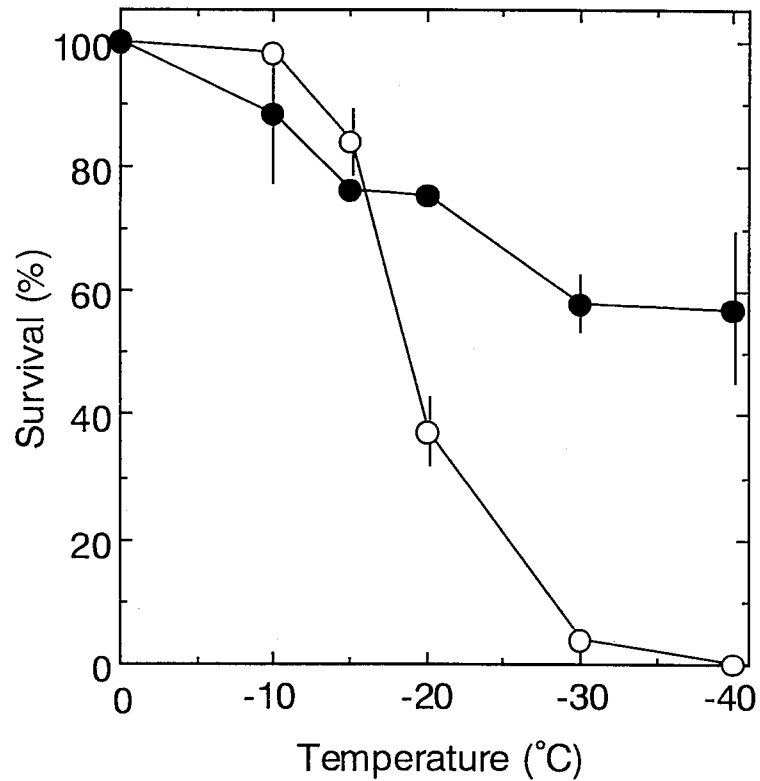


Fig.42. Differences in survivals between intact cells (○) and protoplasts (●) from cabbage (cv. Early Ball) mesophyll tissues in relation to freezing. Both intact cells and protoplasts were obtained from potted plantlets cold-treated at 4°C/2°C (day/night) for 30 days. Samples were cooled at 0.1°C/min and thawed at about 0.3°C/min to 4°C. Survival was determined by ion leakage. Bars = SD from three preparations.

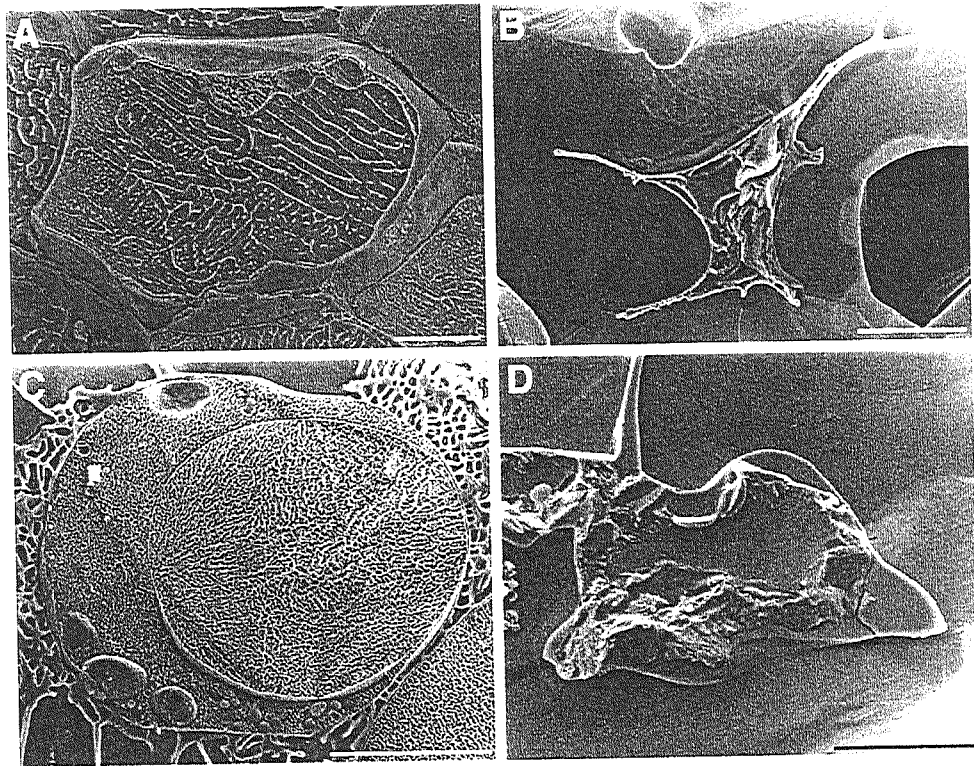


Fig.43. Cryo-SEM images showing ultrastructural changes in the frozen intact cells (**A** and **B**) and protoplasts (**C** and **D**) from cabbage (cv. Early Ball) mesophyll tissues. Both intact cells and protoplasts were obtained from potted plantlets cold-treated at 4°C/2°C (day/night) for 30 days. (**A** and **C**) Samples cryofixed rapidly from room temperature as control. (**B** and **D**) Samples cooled at 0.1°C/min to -30°C. Scales = 10 µm.

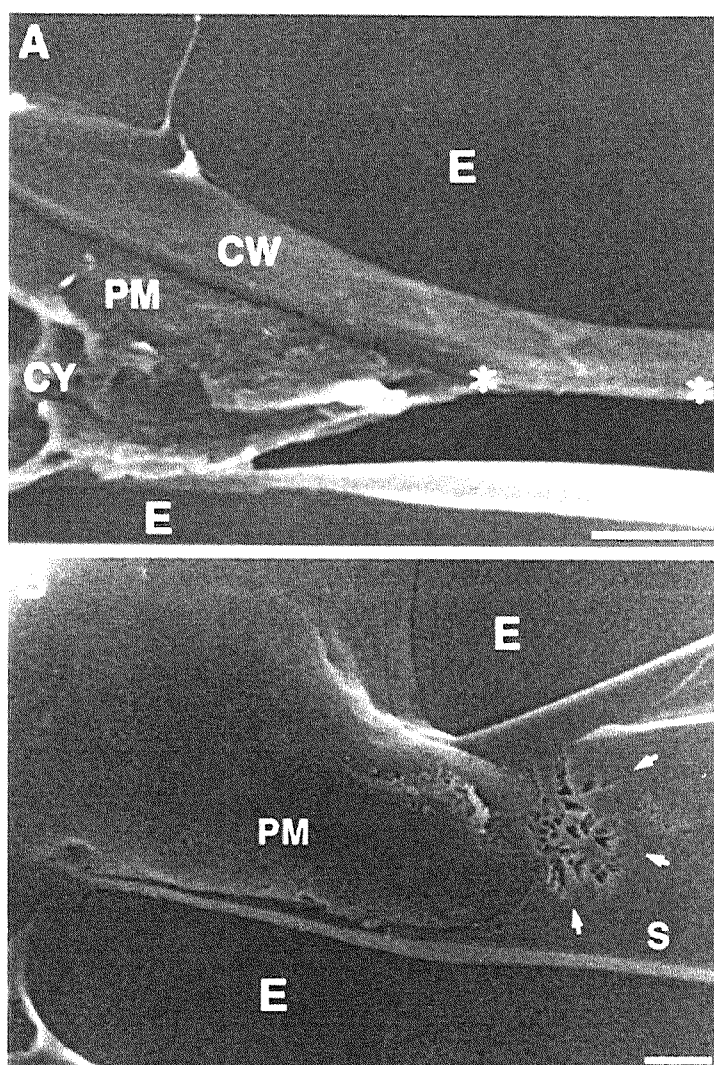


Fig.44. Cryo-SEM images showing ultrastructural changes in the frozen intact cells (**A**) and protoplasts (**B**) from cabbage (cv. Early Ball) mesophyll tissues. Both intact cells and protoplasts were obtained from potted plantlets cold-treated at 4°C/2°C (day/night) for 30 days. Region between asterisks shows extremely closed part of cell wall. Arrows show extracellular sugar solution diluted. Samples cooled at 0.1°C/min to -30°C. **CY**, cytoplasm; **CW**, cell wall; **E**, extracellular ice crystals; **PM**, plasma membranes; **S**, sugar solution. Scales = 10 μm.

3. 考察

セイヨウナシ (*Pyrus communis*)、Seashore saltgrass (*Distichlis spicata*)、Prairie cordgrass (*Spartina pectinata*)の培養細胞由来のプロトプラストは、細胞壁のある培養細胞より凍結傷害を受けやすいことが報告されており (Bartolo et al., 1987)、細胞壁の存在は、むしろ凍結傷害発生に対し防御的に働く可能性が示唆されている。

しかし、ジャガイモ (*Solanum tuberosum*) では、懸濁培養細胞の耐凍性がプロトプラストの耐凍性より低いことから、凍結による細胞壁と原形質膜との接触が、凍結傷害の誘因であると考えられている (Tao et al., 1983)。さらに、キクイモ (*Helianthus tuberosus*) の塊茎組織から単離したプロトプラストの場合には、細胞壁・原形質膜間の機械的ストレスが液胞膜に不可逆的な傷害を発生させ、それに伴い細胞質の酸性化が起きて細胞の活性が低下すると考えられている (Murai and Yoshida, 1998)。

キャベツ葉肉組織を用いた本実験の場合、組織・細胞の耐凍性がプロトプラストの耐凍性より低く、細胞壁の存在が凍結傷害の原因となることが明らかになったが、この場合、凍結により細胞壁は過度に変形し接近しており、原形質膜は、細胞壁に挟まれ異常接近していた。これに対して、プロトプラストでは、凍結しても、脱水収縮による原形質膜同士の異常接近はみられなかった。このような違いの理由の一つとして、細胞壁の可塑性が考えられる。すなわち、プロトプラストでは、原形質膜が柔軟であるため、周囲の氷晶の圧迫に順応して収縮し、外部の氷晶からの衝撃を緩和したのに対し、組織・細胞では、硬い細胞壁が氷晶の圧迫を直接的に受け、過度に変形し復元できなかったと考えられる。キャベツ葉肉組織の細胞では、このように、凍結時の細胞壁の変形が、生体膜を押圧し、凍結傷害を助長するものと考えられる。

以上の結果から、キャベツ葉肉組織の細胞でみられた短時間の糖外与処理の凍害防御効果が、細胞内に浸透していない糖に起因し、糖溶液のもつ浸透圧調節などの束一的な働きによって起こる原形質分離が、凍結時における細胞壁の変形による物理的圧迫から原形質膜などの生体膜を保護する役目を果たしていると考えられる。

第4章 野菜茎頂の培養による凍結前糖外与処理（糖前培養）

と含水率、糖含量および耐凍性の変動ならびに細胞内 小器官および原形質膜超微細構造の変化

アスパラガスをはじめとする多くの植物の茎頂の凍結保存法においては、緩速予備凍結を行う前に、糖添加培地による培養（以下、糖前培養）を行うと、凍害防御効果が顕著であることが報告されている（Karthan et al., 1980; Kumu et al., 1983）。アスパラガス茎頂の凍結保存に成功した例は琴らによって最初に報告され（Kumu et al., 1983）、4% DMSO および 3% グルコースを含む寒天培地を用いた凍結前培養により高い生存率を得ている。しかし、その後、DMSO 単独添加溶液による処理の凍害防御効果は小さく、グルコース高濃度（0.5M）溶液処理が適していることが示され（金子ら, 1992）、現在では、0.5M グルコース単独添加寒天培地による2日間の凍結前培養が、アスパラガス茎頂の凍結保存（緩速予備凍結法による）に最も適する凍結前処理として用いられている。この糖前培養中に、茎頂内に取り込まれたグルコースが代謝されていることから、細胞中に糖が取り込まれていることが示唆されている（鈴木, 1993）。ユーカリ（*Eucalyptus gunnii*）の培養細胞由来のプロトプラストでは、エレクトロ・パルス法によって、人為的に直接、細胞内にフルクトースやラフィノースを取り込ませると、耐凍性が増大することが報告されている（Leborgne et al., 1995）。第2章で述べたように、本研究においても、キャベツ葉柄組織およびアスパラガス茎頂の頂端分裂組織では、細胞内に糖が取り込まれ、高い耐凍性が獲得されることがわかった。これらの結果はいずれも、糖外与処理による凍害防御効果が、細胞内の糖の働きに起因していることを示している。

多くの植物の低温馴化過程においては、耐凍性の獲得とともに糖が内生的に著しく増加することが知られている（Hirsh et al., 1985; Sauter and Kloth, 1987; Koster and Lynch, 1992; Sauter et al., 1996）。しかし、耐凍性の獲得が、このような糖の内生的増加のみに起因するか、または、脂質（Steponkus, 1984）、

タンパク質 (Le Saint, 1969; Guy, 1990)、細胞内微細構造 (Pomeroy and Siminovitch, 1971) などの変化に関連するかは明らかになっていない。

細胞内の糖による凍害防御効果の発現についてみると、糖の束一的な働きとしては、氷晶形成量を減少させる作用および、塩類濃度の上昇を抑制する作用などがあげられており (Lovelock, 1953; Meryman et al., 1977; Lineberger and Steponkus, 1980)、また、非束一的な糖の働きとしては、膜に直接結合することによって現れる水の代替作用 (Crowe and Crowe, 1986) および膜表面でガラス化することによる膜防御作用 (Franks et al. 1991) などが考えられているが、糖が示す凍害防御作用の詳細については未だ不明な点が多い。

本章では、細胞内に取り込まれた糖による凍害防御作用の発現機構を明らかにするため、糖前培養を行うことにより凍結保存が可能となるアスパラガス茎頂を対象として、培養法による糖外与処理 (糖前培養)、低温処理を行い、含水率、可溶性糖含量、デンプン含量を調べるとともに、主として、フリーズ・フラクチャー・レプリカ法を用い、凍結過程における原形質膜超微細構造の変化を調べた。さらに、糖前培養のみを行った試料における糖含量の変化、細胞内微細構造変化、ならびに凍結過程における原形質膜超微細構造の変化と、低温処理のみを行った試料のそれとを比較することにより、低温馴化過程の耐凍性の向上に対する糖の役割について検討した。

第 1 節 第 4 章において用いる材料および共通的方法の概要

本章で用いる材料および共通的方法の詳細については、特に本節において予め述べることにする。

1. 材料の調製

材料は、アスパラガス (*Asparagus officinalis* L.) 品種・メリーワシントン500Wの若茎頭部小側枝の茎頂を用いた。材料の採取および調製は、第 1 章、第 1 節、1 の方法に準じて行った。

2. 糖外与処理および低温処理

(1) 糖外与処理 糖添加培地を用いた培養法による糖外与処理（糖前培養）は、金子ら（1992）の方法（茎頂の凍結保存を目的とする）を参考にして、次のように行った。若茎を70%エタノール中に20秒間浸漬したのち、Tween20（界面活性剤）を2～3滴添加した次亜塩素酸ナトリウム溶液（有効塩素1%）中で15分間ゆっくり攪拌しながら表面殺菌を行い、その後、滅菌水を用いて、材料を5回洗浄した。次に、若茎頭部から長さ1.5mm程度の小側枝茎頂を摘出し、糖添加培地に置床した。培地は、Murashige & Skoogの処方（Murashige and Skoog, 1962）のうちの窒素源を二分の一とした培地（修正MS培地）を基本とし、これに0.5Mのグルコースを添加して、pH5.7に調整したのち、7 g/L寒天を添加したものを用いた。培養は、26℃、16時間日長（60 μ E/m²/s、白色蛍光灯）の条件で2日間行った（糖外与処理）。糖外与処理試料の対照試料として、摘出後に全く処理を施さない試料（未処理試料）と、糖を全く添加しない培地で2日間培養した試料を用いた。

(2) 低温処理 低温処理は、稲葉ら（1984）の方法を参考にして、若茎（5～20cm）が萌出している株（プランターに栽植）を0℃の低温育成室（16時間日長）に移し、16時間日長（60 μ E/m²/s、白色蛍光灯）の条件で20日間置くことにより行った。

3. 凍結および融解

(1) 耐凍性検定用試料（第2節）の場合 凍結媒液（前培養を行った茎頂にはその培地組成から寒天を除いた液体培地を、その他の茎頂には蒸留水を用いた）で満たした1ml容ストロー精液管に茎頂を5個ずつ封入した。次に、-3℃で温度平衡させ、ストローの先端を液体窒素中に数秒間浸漬することにより植氷したのち、-5℃、-7.5℃、-10℃、-12.5℃、-15℃、-20℃の低温槽に、順次移しながら段階的に〔各温度には3時間おき温度平衡させた（平衡凍

結)] 冷却した (段階的冷却法、平均冷却速度は約0.02℃/min) 。各所定温度で平衡させた (平衡凍結) ストロー (茎頂と液が入っている) は速やかにフリーザー外へ取り出し、34℃温水中で急速融解 (10℃/min) した。

(2) 電子顕微鏡観察用試料 (第4節) の場合 組織の凍結に伴う細胞構造の変化をフリーズ・フラクチャー・レプリカ法により観察する場合には、アルミ製ホルダーの凹部に茎頂1つをはめ込み、茎頂の周囲を凍結媒液で満たし、前述の段階的冷却法に従って冷却した。植氷は、試料を-3℃で温度平衡させたのち、氷片を試料に接触させることにより行った。各所定温度で温度平衡させた (平衡凍結) ホルダー (茎頂と液が入っている) は液体フレオン (-150℃) 中に速やかに浸漬し急速凍結固定したのち、液体窒素中に保存した。

4. 再生培養法による耐凍性または凍結傷害率の検定

(1) 耐凍性の検定 (第2節) の場合 試料の耐凍性は、再生培養法 (培養により、個体の生存・再生長を検定する方法) により評価した。凍結・融解後の試料を速やかに再生培地 [窒素源を二分の一に減じた修正MS培地に、30g/Lスクロース、0.1mg/L 1-naphthaleneacetic acid (NAA)、0.1mg/L カイネチンを添加し、pH5.7に調整したのち、7g/L 寒天を添加した培地] に置床し、26℃、16時間日長 (60 μ E/m²/s、白色蛍光灯) の条件で培養した。各処理を行った試料の生存性は、培養1か月後の生存数により評価した。試料の耐凍性は、LT₅₀ [培養後1か月の試料の生存率が50%となった凍結温度 (℃)] で示した。処理区当たりの茎頂数は30~50個とした。

(2) 凍結傷害率の検定 (第4節) の場合 試料の凍結傷害率は、再生培養法によって得た値から算出した。すなわち、凍結傷害率 (%) は、100%から、(1) の耐凍性の検定で求めた生存率 (%) を差し引いた値として表した。

5. 含水量の測定

試料の含水量は以下のようにして測定した。試料表面に付着した過剰な培地を濾紙で拭い、約100mg（生重）に秤量した試料（約150個の茎頂に相当）を70℃の恒温器で3日間乾燥したのち重量を測定し、乾重と生重との比から含水量を算出した。試料の含水率は、この含水量と生重との比から算出した。測定は3反復とし、その平均値を求めた。

6. 可溶性糖含量およびデンプン含量の測定

試料の可溶性糖含量およびデンプン含量は、Anthron法により測定した。約100mg（生重）の試料に10% trichloroacetic acid (TCA) を加え（前培養を行った試料では、秤量前に試料表面に付着した培地を濾紙で拭ったのちにTCAを加えた）、0℃の乳鉢中で摩砕後、遠心分離機（Sakuma, model M-160-IV）を用い3,000rpmで15分間遠心分離した（本章における以下の遠心分離は同条件で行った）。次に、残渣に80%エタノールを加えて遠心分離する操作を2回繰り返したのち、これらのTCA溶液およびエタノールの上清を合わせて全糖抽出液とした。また、糖抽出後の残渣に99%エチルエーテルを加えて遠心分離し、その残渣を風乾したのち52%過塩素酸を添加して遠心分離し、上清をデンプン抽出液とした。これらの全糖抽出液およびデンプン抽出液にAnthron 溶液（0.2% Anthron, 90% H_2SO_4 ）を加え、100℃で10分間加熱したのち、光電分光光度計（Shimadzu, UV-Visible Recording Spectrophotometer UV-160）により、測定波長625nmの条件で比色定量した。本章における糖分析試料については、試料表面に付着した培地を濾紙により払拭したのみで、蒸留水による一定時間の洗浄は行っていない。そのため、検出した糖には、細胞内の糖に加えて細胞外に存在する糖も若干含まれる。

7. 超薄切片の作製および電子顕微鏡観察

試料の細胞内微細構造は、超薄切片法により観察した。材料の調製は以下のとおりである。茎頂を4℃の前固定液[2.5%グルタルアルデヒドおよび3.7%

ホルマリンを含む0.1Mリン酸緩衝溶液 (pH7.2)] に1週間浸漬して前固定したのち、0.1Mリン酸緩衝溶液 (pH7.2) 中で12時間洗浄し、後固定液 [1 % OsO_4 を含む0.1Mリン酸緩衝溶液 (pH7.2)] で後固定を2時間行った。次に、0.1Mリン酸緩衝溶液 (pH7.2) 中で一回洗浄し、エタノール・シリーズ (50%、70%、80%、90%、95%および100%) で1時間ずつ脱水したのち、さらに、プロピレンオキサイドで10分間ずつ3回に分けて脱水した。脱水後の茎頂を50%プロピレンオキサイドを含む50%Spurr樹脂溶液 (Spurr, 1969) に3日間浸漬したのち、100% Spurr樹脂に包埋し、30℃の恒温器中に24時間、さらに、60℃の恒温器中に72時間置いて樹脂を熱重合させた。

樹脂包埋した試料は、ウルトラ・ミクロトーム (Reichert, Ultracut OmU4) を用いて以下の手順に従って切削した。サファイア・ナイフ (Sakura, サファトームSS45) を用いて試料をトリミングしたのち、ダイヤモンド・ナイフ (Diatomo Ltd., Diatome; 刃幅2.1mm) を用いて、厚さ0.1~0.3 μm の切片 (超薄切片) を切削した。超薄切片は、150メッシュの銅製グリッド (Nissin EM Co., Ltd. コロジオン膜張付メッシュ) に載せ、2%酢酸ウラン水溶液で1時間、0.04%クエン酸鉛水溶液で5分間処理し、二重染色を行った。超薄切片の観察は、TEM (JEOL, JEM-1200EX) を用い、加速電圧100kVで行った。

細胞内小器官数を測定する場合の試料の固定は、膜系をより明瞭に観察できるHeplerの固定法 (Hepler, 1981) によって行った。すなわち、茎頂を前固定液 [2%グルタルアルデヒドおよび10mM CaCl_2 を含む0.05M cacodylate buffer (pH7.4)] で2時間前固定したのち、0.05M cacodylate buffer (pH7.4) で洗浄し、後固定液 (2% OsO_4 、0.8% potassium ferricyanide、10mM CaCl_2) で2時間固定した。次に、試料を水洗し、2%酢酸ウラン水溶液に2時間浸漬して前染色を行った。試料の脱水、樹脂包埋、切削および切片の観察は前述の方法に準じて行った。細胞内小器官数は、電子顕微鏡画像中から任意に選定した10個の細胞の細胞内小器官数を計測し、その値を細胞数で除し、細胞あたりの平均値として算出した。

8. フリーズ・フラクチャー・レプリカ法

フリーズ・フラクチャー・レプリカ法は、第2章、第1節、8の方法に準じて行った。原形質膜超微細構造の変化の出現頻度は、電子顕微鏡画像中から任意に選定した15の原形質膜区画（1 μm^2 を1区画とした）に出現した構造変化の数を計測し、その数を全区画数で除した値を原形質膜超微細構造の変化の出現頻度とした。

第2節 培養法による長時間糖外与処理（糖前培養）後の野菜組織における含水率、糖含量および耐凍性の変化

アスパラガス茎頂を用い、長時間（2日間）の糖前培養を行った場合における含水率、糖含量および耐凍性の変化について調べた。

1. 材料および方法

材料は、アスパラガス (*Asparagus officinalis* L.) 品種・メリーワシントン500Wの若茎頭部小側枝の茎頂を用いた。また、材料の調製、糖外与処理（培養法）、低温処理、含水量の測定、糖含量およびデンプン含量の測定、耐凍性検定用試料の凍結および融解、再生培養法による耐凍性の検定については、本章第1節で述べた方法に準じて行った。

2. 結果

（1）含水率の変化 糖前培養前後における試料の含水率の変化を調べたところ（Fig.45）、未処理試料の含水率は89%であった。これに対し、グルコース高濃度（0.5M）添加培地による2日間の前培養後の試料の含水率は77%となり、糖無添加培地で2日間前培養しても、試料の含水率は未処理試料のそ

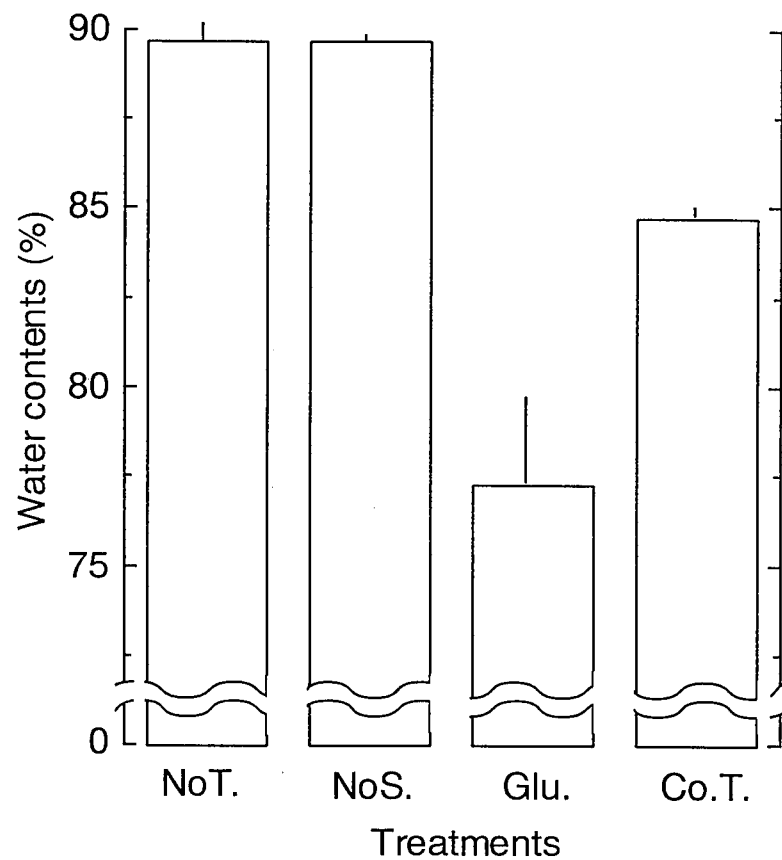


Fig.45. Differences between water contents in asparagus shoot tips in relation to sugar supplement and cold-treatment. **NoT.**, no treatment; **NoS.**, samples incubated in solution without sugar for 2 days; **Glu.**, samples incubated in solid media containing 0.5 M glucose for 2 days; **Co.T.**, samples obtained from cold-treated plantlets. Cold-treatment was made on potted plantlets at 0°C for 20 days. Bars = SD from three preparations.

れと変わらなかった（89％）。また、0℃、20日間の低温処理後の試料では、含水率は若干低下した（85％）。

（２）可溶性糖含量の変化 糖前培養前後における試料の可溶性糖含量およびデンプン含量の変化について調べた（Fig.46）。未処理試料の糖含量は $38\mu\text{mol/gFW}$ であったが、グルコース高濃度（0.5M）添加培地による2日間の前培養後の試料の糖含量がその約6倍の $222\mu\text{mol/gFW}$ に増加したのに対し、糖無添加培地による2日間の前培養後の試料では、糖含量が $14.6\mu\text{mol/gFW}$ に減少した。また、20日間の低温処理のみを行った試料では、糖含量は $156\mu\text{mol/gFW}$ に増加していた。

デンプン含量については、糖含量の変化とほぼ同様の傾向であった。すなわち、糖外与処理を行っていない未処理試料のデンプン含量は、2日間の前培養または20日間の低温処理により増加したが、糖無添加培地による2日間の前培養を行った場合には減少した。

（３）耐凍性の変化 糖前培養前後における試料の耐凍性の変化を、再生培養法により調べた（Fig.47）。未処理試料の LT_{50} は -5.7°C であったが、グルコース高濃度（0.5M）添加培地による2日間の前培養後の試料では、耐凍性の著しい増大が認められた（ $LT_{50}=-21.3^{\circ}\text{C}$ ）。しかし、糖無添加培地で2日間前培養した試料では、耐凍性の増大は僅かであった（ $LT_{50}=-6.6^{\circ}\text{C}$ ）。また、20日間の低温処理のみを行った試料では、糖前培養のみを行った試料とほぼ同じ耐凍性を獲得することが明らかになった（ $LT_{50}=-21.1^{\circ}\text{C}$ ）。一方、低温処理後に2日間の前培養を行った試料は、糖前培養のみ、または低温処理のみを行った試料の耐凍性を上回る耐凍性を示した（ $LT_{50}=-29^{\circ}\text{C}$ ）。しかし、低温処理後の試料を糖無添加培地で2日間の前培養した場合には、試料の LT_{50} は -6°C を示し、耐凍性が減少した。

3. 考察

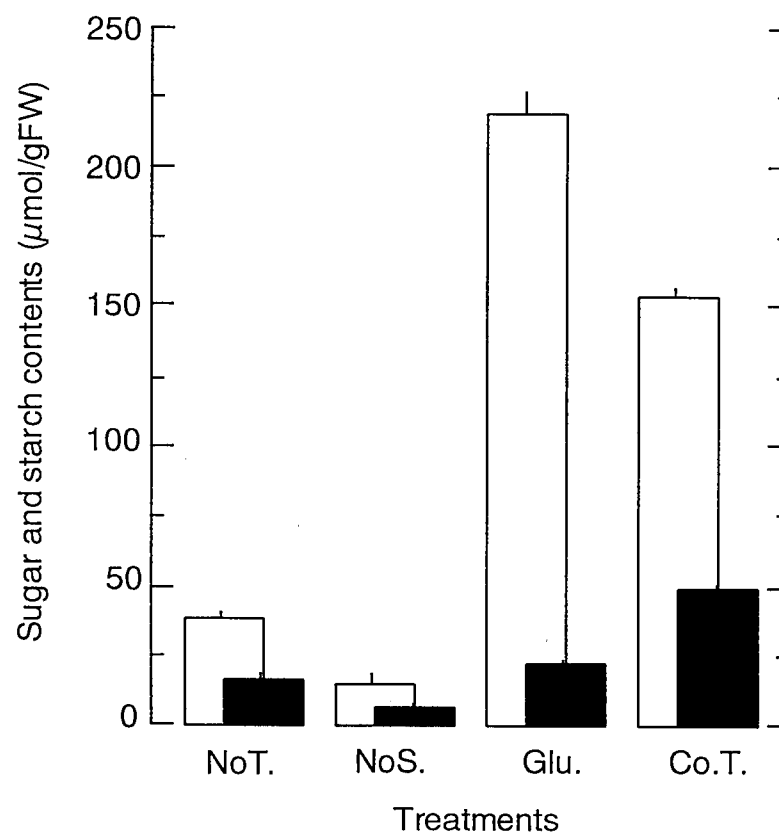


Fig.46. Differences in sugar (□) and starch (■) contents in asparagus shoot tips in relation to sugar supplement and cold-treatment. **NoT.**, no treatment; **NoS.**, samples incubated in solution without sugar for 2 days; **Glu.**, samples incubated in solid media containing 0.5 M glucose for 2 days; **Co.T.**, samples obtained from cold-treated plantlets. Cold-treatment was made on potted plantlets at 0°C for 20 days. Bars = SD from three preparations.

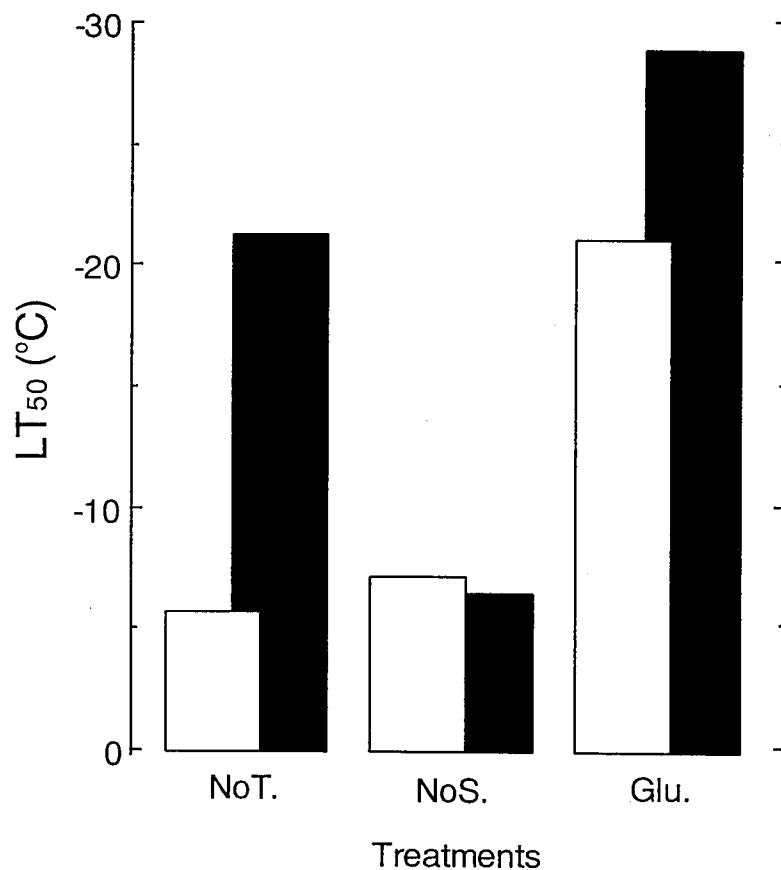


Fig.47. Differences between freezing tolerance (LT_{50}) of asparagus shoot tips in the presence (■) or absence (□) of cold-treatment. Cold-treatment was made on potted plantlets at 0°C for 20 days. **NoT.**, no treatment; **NoS.**, samples incubated in solution without sugar for 2 days; **Glu.**, samples incubated in solid media containing 0.5 M glucose for 2 days. All samples were cooled at 0.02°C/min and thawed at about 10°C/min to room temperature (22°C). Survival of tissues after freeze-thawing were evaluated by observation of regrowth ratio of shoot tips after one month incubation.

糖含量の変化についてみると、本章の糖分析で検出された組織内糖含量は、組織内に存在する糖および試料表面に付着している糖を合わせた値を示している。従って、この値は、細胞外の糖も含み、細胞内の糖含量を正確に表すものではないが、この値の大小は、細胞内の糖含量の変化を少なからず反映しているものと考えられる。すなわち、グルコース高濃度（0.5M）添加培地による2日間の前培養を行ったアスパラガス茎頂における糖含量の著しい増加は、茎頂組織の細胞中へ糖が取り込まれたことによると考えられる。

次に、含水率の変化についてみると、グルコース高濃度（0.5M）添加培地による2日間の前培養後の試料では、著しい含水率の低下が認められた。また、20日間の低温処理のみを行った試料においても、糖前培養試料には及ばないが、若干含水率が低下していた。これらの事実と糖含量の変動とを併せて考えると、糖前培養試料および低温処理試料の細胞内では、糖濃度が著しく上昇していることがわかる。一般に、低温馴化植物では、組織・細胞内における糖類の蓄積に伴い含水率が低下することが知られており（Levitt, 1980）、糖類の蓄積および含水率の低下による細胞内の浸透価の上昇は、低温順化植物の耐凍性獲得の一要因と考えられている（Hirsh et al., 1985）。

本章では、試料の耐凍性は再生培養法で評価したが、再生培養法では、凍結・融解後の組織内の生存細胞が少数であっても、生存細胞が増殖し植物体再生にまで至れば、その組織は、完全に生存しているものとして評価することができる。例えば、本実験で用いたアスパラガスの若茎頭部小側枝茎頂の場合、グルコース高濃度（0.5M）添加培地により2日間前培養した試料の耐凍性は、再生培養法で評価すると -21.3°C （ LT_{50} ）であるが、電解質漏出法で評価すると -8°C にすぎない（資料未掲載）。このような差異は、糖前培養によって著しく耐凍性を高めた頂端分裂組織のみが、凍結・融解後に生き残り、分裂・増殖したことによって生じたものと思われる。再生培養法によって評価したこれらの耐凍性は、凍結・融解後の細胞生存率を直接的に評価するFDA染色法による耐凍性に近いものである。実際の凍結保存では、最終的に植物体の再生率が問題となるため、凍結保存に関する研究報告のほとんどは、この再生培養法による結果を示している（新野ら, 1991; Hatanaka et al., 1994; Niino et al., 1997; Phunchindawan et al., 1997; Wang et al., 1998; Thinh et al., 1998; Malaurie et

al., 1998)。

アスパラガス茎頂は、グルコース高濃度 (0.5M) 添加培地による前培養を 2 日間行った場合には、液体窒素中 (-196°C) で凍結しても生存しており、糖前培養を行わない場合には凍死する (金子ら, 1992) ことと、本実験において、同じ 2 日間の糖前培養により LT_{50} が 15°C 低くなり (未処理試料 $\text{LT}_{50} = -5.7^{\circ}\text{C}$ 、糖前培養試料 $\text{LT}_{50} = -21.3^{\circ}\text{C}$) 耐凍性が向上したことを併せて考えると、この処理によって生じた 15°C の LT_{50} の差が、その後の液体窒素凍結後の生存性に大きな影響を及ぼしているものと思われる。通常の培養に用いられる 0.09M スクロース添加培地で培養したジャガイモ (*Solanum tuberosum*) の培養体シュートの茎頂では、ガラス化法が適用できるほどの耐凍性を獲得することが知られているが (Schnabel-Preikstas et al., 1992)、アスパラガス茎頂については、培地にグルコースを添加せずに前培養すると、耐凍性は増大しない。これらのことは、アスパラガス茎頂の耐凍性の向上には、培地中の糖が重要な役割を果たしていることを示している。

20 日間低温処理した株から萌出ている若茎の頭部小側枝茎頂の耐凍性は、グルコース高濃度 (0.5M) 添加培地により 2 日間前培養した試料で現れたのと同程度に向上したが、その後の糖無添加培地での前培養により減少した。この事象は、低温処理により低温馴化した試料では、室温 (26°C) に 2 日間おくことにより脱馴化され、低温馴化で得られた耐凍性増大効果が消失したことに起因すると考えられる。低温馴化したキャベツの葉肉組織では、脱馴化が数日間という短期間のうちに完了することがわかっており (Sasaki et al., 1996)、一方、本実験で明らかになったように、低温処理後の試料を室温 (26°C) で糖前培養した場合には、脱馴化による耐凍性の低下がみられなかった。このことは、培地中の糖が、低温馴化の耐凍性増大作用の一端を代替している可能性を示唆していると思われる。

第3節 培養法による長時間糖外与処理（糖前培養）後の野菜 組織・細胞における細胞内小器官の構造変化

糖による凍害防御効果と、低温馴化植物における耐凍性獲得機構との関連について、組織・細胞構造の変化の面から比較検討するため、糖前培養前後のアスパラガス茎頂における細胞内小器官の構造変化を超薄切片法により観察し、低温処理試料における変化と比較した。

1. 材料および方法

材料は、アスパラガス (*Asparagus officinalis* L.) 品種・メリーワシントン500Wの若茎頭部小側枝の茎頂を用いた。また、材料の調製、糖外与処理（培養法）、低温処理、超薄切片の作製および電子顕微鏡による観察については、本章第1節で述べた方法に準じて行った。超薄切片法による電子顕微鏡観察を行う場合には、第1章で述べたように、アスパラガスの頂端分裂組織は凍結・融解後の生存性が高く、茎頂の凍結保存において特に重要な部位であることから、頂端分裂組織を観察対象とした。

2. 結果

未処理試料の頂端分裂組織には、液胞が小さく細胞質に富んだ小型の細胞 (Fig.48-A) が多く存在し、その細胞質内には、 OsO_4 により非常に濃く染色される顆粒 [好オスミウム顆粒 (osmiophilic droplet)、脂質と考えられる] を含む葉緑体 ($1.5 \sim 2.0 \mu\text{m}$) が認められた (Fig.48-B)。一方、グルコース高濃度 (0.5M) 添加培地により2日間前培養した試料の頂端分裂組織細胞 (Fig.49-A) では、大型化した葉緑体 ($2.0 \sim 5.0 \mu\text{m}$) 内におけるデンプン顆粒の集積 (Fig.49-B)、粗面小胞体の発達 (Fig.49-C) など、細胞内小器官の著しい構造変化がみられたが、それらの細胞に隣接して多くの死滅細胞（原形質分離の様相を呈し、細胞質が凝集している）も観察された (Fig.49-D)。

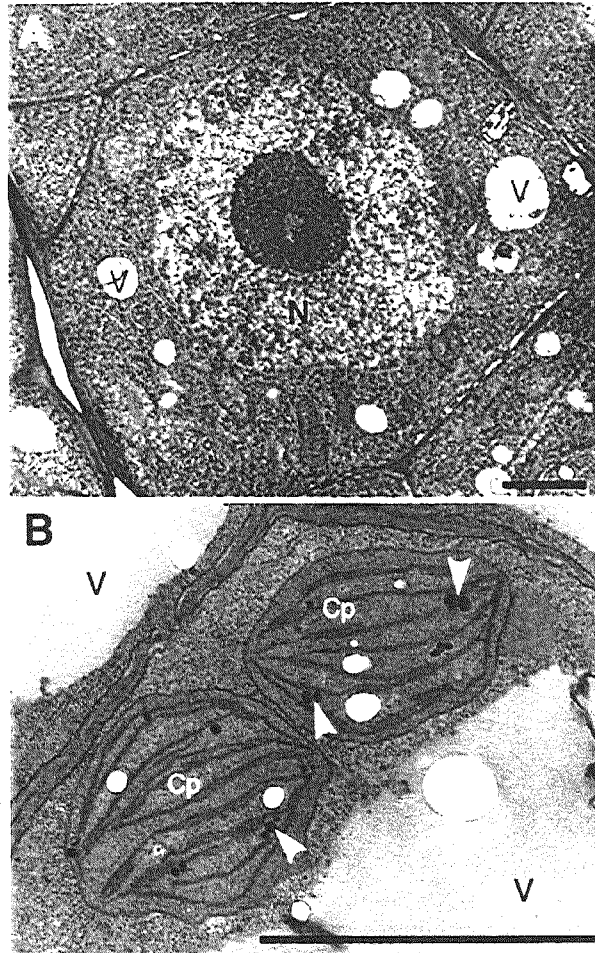


Fig.48. Ultra-thin sections showing ultrastructures of asparagus shoot tip cells without sugar supplement. (A) Whole view of one cell. (B) Osmiophilic droplets (arrowheads) scattered in chloroplasts. **Cp**, chloroplasts; **M**, mitochondrion; **N**, nucleus; **V**, vacuoles. Scales = 2 μm .

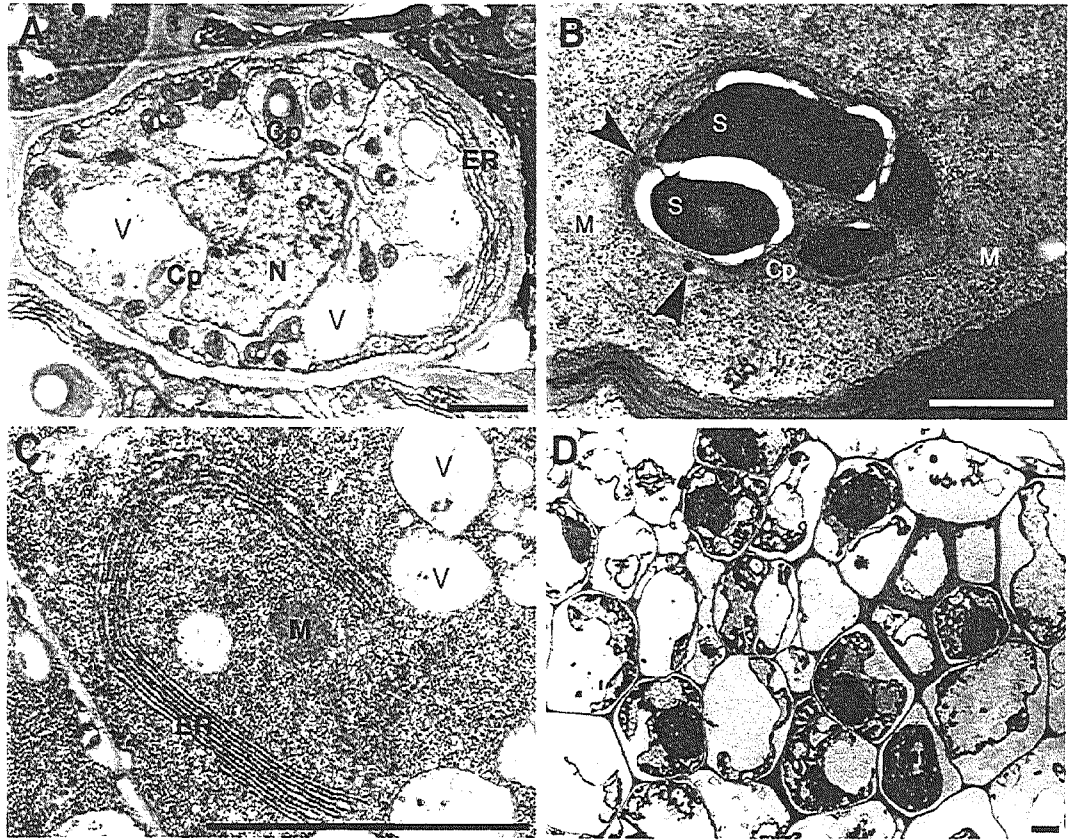


Fig.49. Ultra-thin sections showing ultrastructures of asparagus shoot tip cells incubated in solid media containing 0.5 M glucose for 2 days. **(A)** Whole view of one cell. **(B)** Starch grains and osmiophilic droplets (arrowheads) scattered in a chloroplast. **(C)** A part of one cell showing endoplasmic reticulums. **(D)** Aggregation of died cells adjacent to survived shoot meristem cells. **Cp**, chloroplasts; **ER**, endoplasmic reticulums; **M**, mitochondrion; **N**, nucleus; **S**, starch grains; **V**, vacuoles. Scales = 2 μ m.

また、20日間低温処理試料の頂端分裂組織細胞では、糖前培養試料ほどの著しい構造変化は認められなかったが (Fig.50-A)、大型化した葉緑体 (2.0～3.0 μ m) には好オスミウム顆粒が、未処理試料の場合より若干多く認められた (Fig.50-B)。

電子顕微鏡によるこれらの観察結果をもとに細胞内小器官 (葉緑体、ミトコンドリア、液胞および粗面小胞体) の数を調べたところ (Fig.51)、細胞内小器官の量的変化は、2日間糖前培養試料と20日間低温処理試料とで酷似していた。すなわち、液胞の数については、2日間糖前培養試料および20日間低温処理試料の値は、未処理試料のそれとほとんど変わらなかったが、ミトコンドリアおよび粗面小胞体の数については、2日間糖前培養試料および20日間低温処理試料の場合には、未処理試料の場合と比べて著しく増加する傾向が認められた。さらに、葉緑体の数についても、2日間糖前培養試料および20日間低温処理試料において、若干の増加が認められた。

3. 考察

グルコース高濃度 (0.5M) 添加培地による2日間の前培養に伴う細胞構造の変化として最も顕著であったのは、葉緑体内におけるデンプン顆粒の蓄積であった。これは、糖前培養が行われなかった場合と比較して考えると、グルコースが細胞内へ浸透した結果と考えられる。すなわち、細胞内に取り込まれたグルコースが、2日間の糖前培養期間中にデンプンへと転化され、貯蔵デンプンとして葉緑体内に蓄積されたものと考えられる。さらに、2日間の糖前培養に伴う構造変化の特徴の一つとして、死滅細胞の存在があげられる。これらの死滅細胞は、主として頂端分裂組織以外の部位に観察された。この事実は、頂端分裂組織が、浸透的变化に対する耐性をもつという第1章の結果を裏付けている。

一般に、自然条件下で低温馴化した植物 (Sauter and Kloth, 1987; Pollock and Lloyd, 1987) では、体内のデンプンが可溶性糖に分解されることが知られているが、本実験で用いたアスパラガス茎頂では、Anthron法によってデンプン

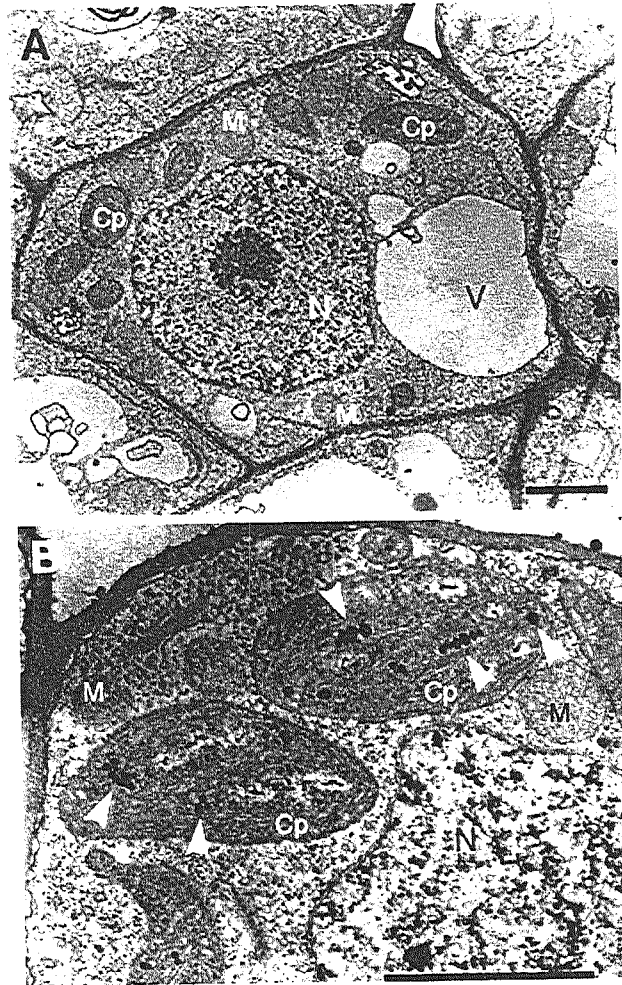


Fig.50. Ultra-thin sections showing ultrastructures of shoot tip cells obtained from potted asparagus plantlets that were cold-treated at 0°C for 20 days. **(A)** Whole view of one cell. **B**, Osmiophilic droplets (arrowheads) scattered in chloroplasts. **Cp**, chloroplasts; **M**, mitochondrion; **N**, nuclei; **V**, vacuole. Scales = 2 μ m.

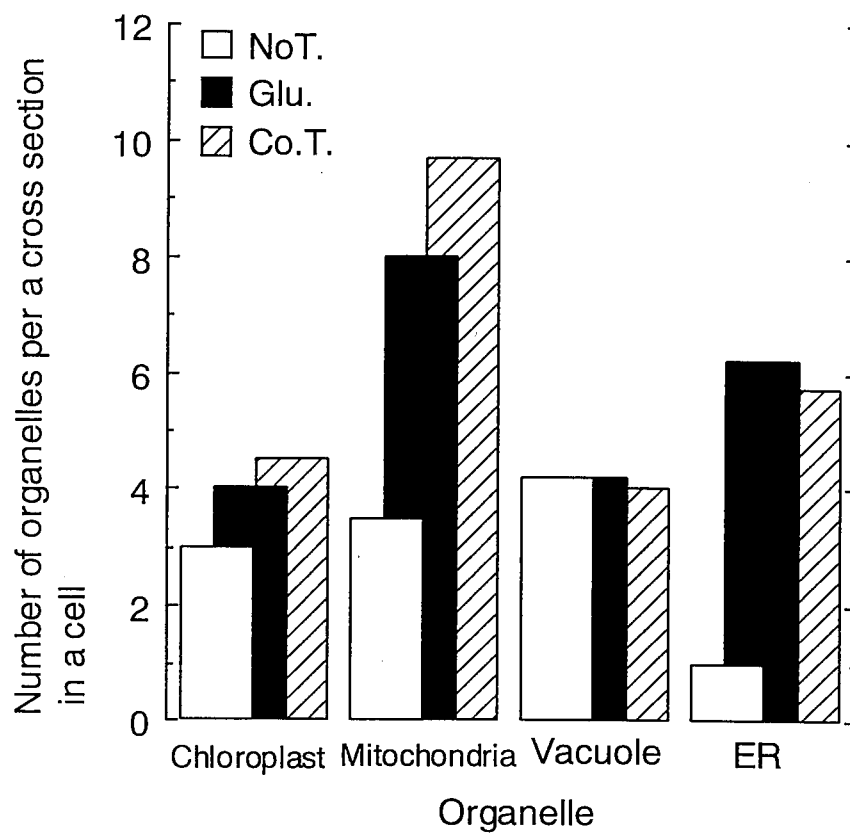


Fig.51. Differences in number of organelles in asparagus shoot tip cells. **NoT.**, no treatment; **Glu.**, samples incubated in solid media containing 0.5 M glucose for 2 days; **Co.T.**, samples obtained from potted plantlets that were cold-treated at 0°C for 20 days. Data were obtained from ultra-thin sections.

ブンを検出すると、低温処理試料内のデンプン含量は高い値を示し、多くの植物の場合と逆の事象が認められた。しかし、アスパラガス茎頂と同じように、*Arabidopsis thaliana*の葉組織柔細胞では、4℃で10日間低温処理することによりデンプンが蓄積するという報告もあり（Ristic and Ashworth, 1993）、低温処理したアスパラガス茎頂では、この*Arabidopsis thaliana*と同一の経路でデンプンの蓄積が進行していると推察される。

本実験では、グルコース高濃度（0.5M）添加培地による2日間の前培養は、アスパラガス茎頂に、糖類の増加とともに耐凍性の向上をもたらし、0℃、20日間の低温処理も糖類の増加と耐凍性の向上をもたらしたが、一般に、低温馴化には、著しい細胞内微細構造変化を伴うことが知られている（Pomeroy and Siminovitch, 1971; Levitt, 1980; Sakai and Larcher, 1987; Sauter and Kloth, 1987; Sauter et al., 1996）。これらの構造変化のいくつかは耐凍性の獲得に直接関与している可能性が示唆されており（Sauter et al., 1996）、低温馴化した植物の細胞構造は、DMSOおよびグルコースなどの凍害防御物質で処理した植物の細胞構造と相似することが指摘されている（Finkle et al., 1985）。本研究で用いたアスパラガス茎頂の頂端分裂組織細胞の構造変化においても、細胞内小器官の増加という点において、低温処理試料と糖前培養試料とは酷似していた。この結果から、低温処理試料の細胞構造の変化と糖の増加との関連が推測されるとともに、構造変化自体と耐凍性との間に密接な関連があるものと考えられる。

第4節 培養法による長時間糖外与処理（糖前培養）後の野菜 組織・細胞の凍結過程における原形質膜超微細構造 の変化と融解後の生存性向上との関連

本章第2節で述べたように、グルコース高濃度（0.5M）添加培地による2日間の前培養は、アスパラガス頂端分裂組織内への糖類の蓄積をもたらした。

この細胞内の糖がもつ凍害防御作用を明らかにするために、2日間糖前培養試料の凍結過程における原形質膜超微細構造の変化をフリーズ・フラクチャー・レプリカ法により調べ、耐凍性の変化と比較検討した。

1. 材料および方法

材料は、アスパラガス (*Asparagus officinalis* L.) 品種・メリーワシントン500Wの若茎頭部小側枝の茎頂を用いた。材料の調製、糖外与処理（培養法）、低温処理、凍結傷害率検定用試料の凍結および融解、再生培養法による凍結傷害率の検定、電子顕微鏡観察用試料の凍結、フリーズ・フラクチャー・レプリカ法については、本章第1節で述べた方法に準じて行った。

2. 結果

段階的冷却および凍結を行った試料の観察に先立って、室温から急速凍結固定した試料を観察したところ、未処理試料の頂端分裂組織細胞の原形質膜破断面には、直径5～10nmのIMPsが均一に散在する構造が観察された (Fig.52-A)。この未処理試料を-5℃まで冷却し凍結すると、原形質膜破断面には、IMPsが欠如した部位であるADsと、それに伴うFJLsの発生が観察された (Fig.52-B)。さらに、未処理試料を-12.5℃まで冷却し凍結すると、ほとんど全ての細胞の原形質膜破断面に、これらの構造変化が認められた (Fig.53-A)。このような原形質膜超微細構造の変化は、糖無添加培地で2日間前培養した試料の原形質膜破断面においても、前述の未処理試料の原形質膜破断面と同様に、高い凍結温度において観察された (Fig.53-B)。しかし、グルコース高濃度 (0.5M) 添加培地により2日間前培養した試料の原形質膜破断面では、-12.5℃まで冷却し凍結した後においても、このような超微細構造の変化はほとんどみられなかった (Fig.53-C)。また、20日間低温処理試料においても、2日間糖前培養試料とほぼ同様に、-12.5℃までの冷却および

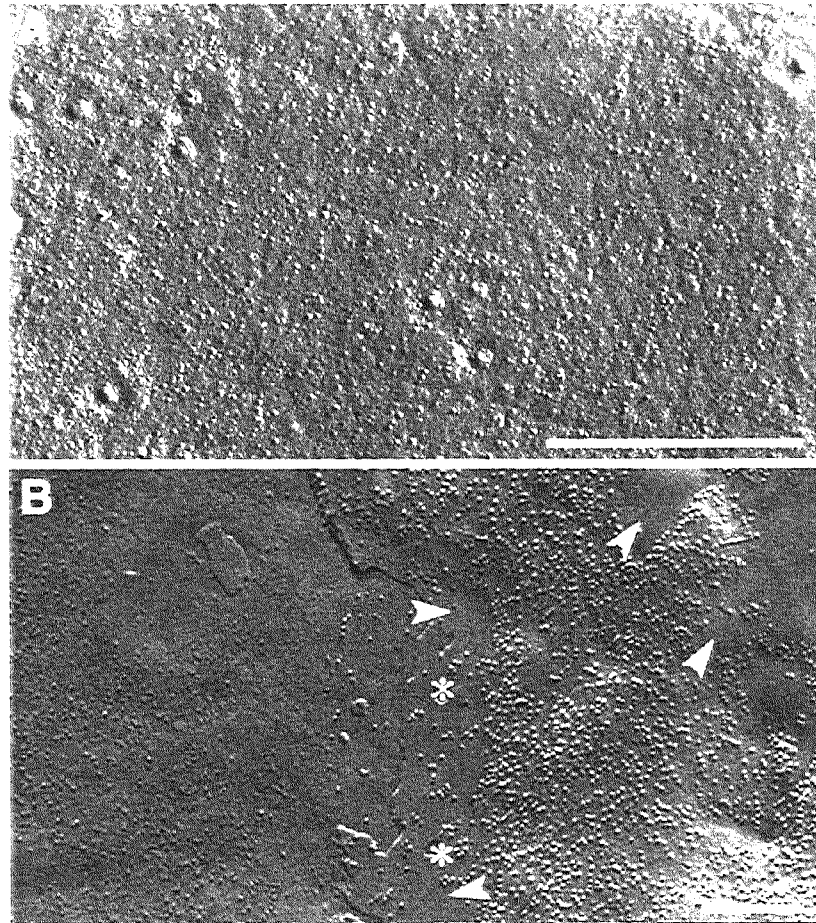


Fig.52. Freeze-replica images of PFs in plasma membranes showing ultrastructural changes by freezing in asparagus shoot tip cells without sugar supplement. **(A)** Samples cryofixed rapidly from room temperature as control. **(B)** Samples cooled at 0.02°C/min to -5°C. Arrowheads show ADs. Asterisks show FJLs. Scales = 200 nm.

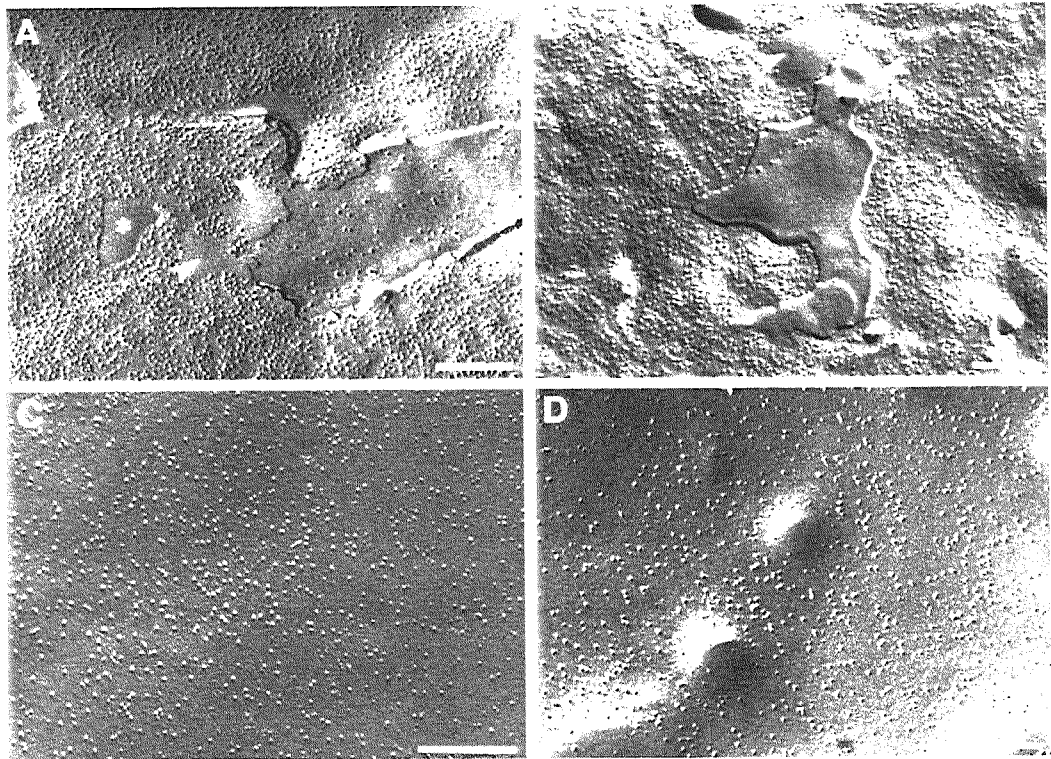


Fig.53. Freeze-replica images of PFs and exoplasmic fracture faces (EFs) in plasma membranes showing ultrastructural changes by freezing in asparagus shoot tip cells. (A) PF of nontreated samples without exogeneous supplement of glucose. (B) EF of samples incubated in solution without sugar for 2 days. (C) PF of samples incubated in solid media containing 0.5 M glucose for 2 days. (D) EF of samples obtained from potted plantlets that were cold-treated at 0°C for 20 days. All samples were cooled at 0.02°C/min to -12.5°C. Arrowheads show ADs. Asterisks show FJLs. Scales = 200 nm.

凍結に遭遇しても、原形質膜破断面における超微細構造変化はほとんどみられなかった (Fig.53-D)。

未処理試料、糖無添加培地で2日間前培養した試料、糖前培養を2日間行った試料および20日間低温処理試料について、原形質膜超微細構造の変化の出現率と、電解質漏出法から求めた凍結傷害率との関係について調べた (Fig.54)。未処理試料および糖無添加培地で前培養した試料については、凍結傷害率と原形質膜超微細構造変化の出現率は、いずれも -5°C で急激に上昇した。これに対して、糖前培養試料においては、凍結傷害と原形質膜超微細構造変化の出現は、はるかに低い温度域まで抑制されることが明らかになった。低温処理試料についても、糖前培養試料と同様に、並行的に変化する凍結傷害率および超微細構造変化の出現率は、低い温度域においても抑制されることが明らかになった。

3. 考察

未処理試料の凍結過程における頂端分裂組織細胞の原形質膜破断面は、生体膜同士の異常接近に起因すると考えられるADsとそれに伴うFJLs (Steponkus and Lynch, 1989; Fujikawa and Steponkus, 1990) の発生が、比較的高い凍結温度で認められた。これに対し、2日間糖前培養試料の凍結過程における頂端分裂組織細胞の原形質膜破断面では、これらの構造変化の発生が、はるかに低い温度域においても抑制されていた。これらのことから、細胞内に浸透した糖が、凍結脱水による生体膜同士の異常接近を抑制していると考えられる。このことは、20日間の低温処理を行った試料においてもみられ、内生的に増加した糖が原形質膜超微細構造の変化を抑制するものと考えられる。

細胞内の糖が、どのようにして生体膜の異常接近を抑制しているかについては、糖溶液が膜表面でガラス化して膜を保護する機能 (Franks et al., 1991)、ならびに糖の水酸基が直接的に膜に結合して水の代替をする機能 (Crowe and Crowe, 1986) などが考えられている。これらの説は、いずれも、糖が膜間のスペーサーとしてはたらき、膜の異常接近を防止する可能性を示唆している。

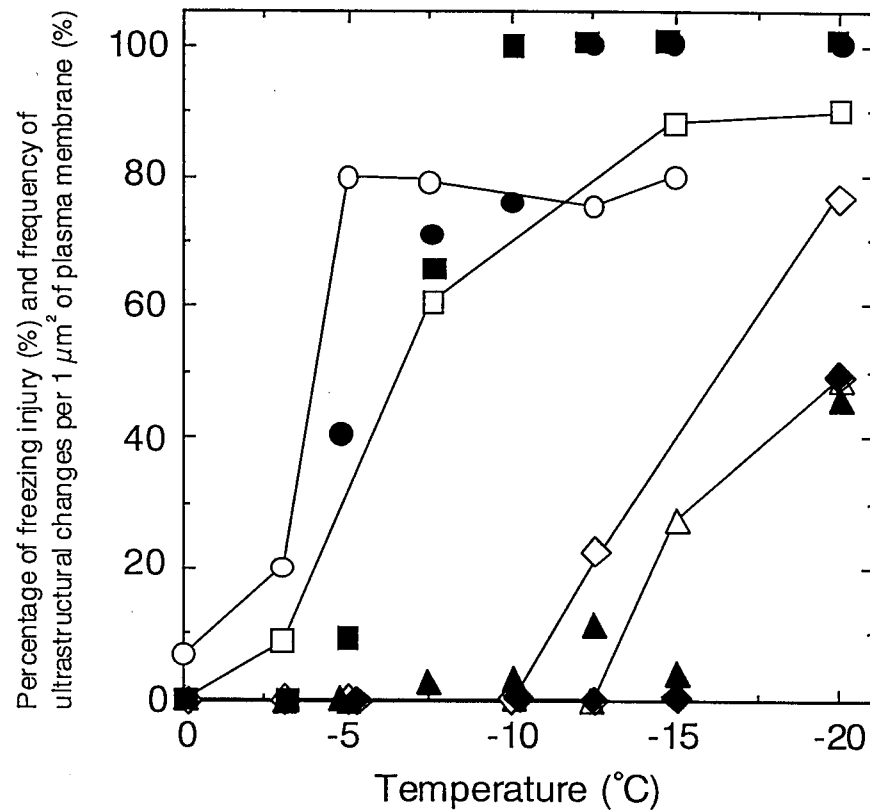


Fig.54. Relationship between freezing injury by freezing (●,■,◆,▲) and frequency of ultrastructural changes in a form of ADs accompanied with FJLs in plasma membranes (○,□,◇,△) of asparagus shoot tip cells. ○, ●, nontreated sample without exogeneous supplement of glucose; □, ■, samples incubated in solution without sugar for 2 days; ◇, ◆, samples incubated in solid media containing 0.5 M glucose for 2 days; △, ▲, samples obtained from potted plantlets that were cold-treated at 0°C for 20 days. All samples were cooled at 0.02°C/min. Freezing injury was evaluated by regrowth. Frequency of ultrastructural changes was obtained from freeze-replica images.

また、細胞内に取り込まれた高濃度の糖が凍結脱水により濃縮された結果、細胞内容物の粘度が高まり、比較的高い温度でガラス化し（村勢, 1994）、細胞の変形を抑制することにより、生体膜の異常接近の機会を少なくしている可能性も考えられる。低温馴化したポプラ（*Populus balsamifera*）では、組織の耐凍性増大の主要因として、細胞内に多量に蓄積した糖類が、高い凍結温度におけるガラス化を誘導していることがあげられている（Hirsh et al., 1985）。しかし、アスパラガス茎頂の場合、低温処理試料では、糖前培養試料と比較して糖含量が少ない傾向にあるにもかかわらず、同等の耐凍性を示したこと、ならびに低温馴化と糖前培養の相加効果がみられたことなどから、糖前培養試料でみられた細胞内の糖の働き以外の要因が、低温馴化過程における耐凍性の向上に関与している可能性があるので、この点については今後検討する必要があると思われる。

第5章 培養細胞に対する糖外与処理または低温処理と耐凍性、

糖含量およびタンパク質組成の変化

前章までに述べてきたように、糖外与処理は、キャベツ葉肉組織および葉柄組織、ならびにアスパラガス茎頂の頂端分裂組織の耐凍性を著しく高めた。しかし、これらの組織では、液体窒素温度で凍結保存するために必要な高い耐凍性は、糖外与処理を行うのみでは得られず、さらに、DMSOなどの凍害防御物質で処理するとともに、冷却および融解速度などの条件を調整する必要がある。

しかし、最近、糖外与処理のみを行った茎頂や植物組織由来のembryogenic callusでは、その後の処理（凍害防御物質処理や緩速冷却など）を行うことなく凍結保存に成功した例が報告されている（Panis et al., 1996; Blakesley et al., 1997）。これらの凍結保存例に共通する点は、糖外与処理がかなりの長期間に及ぶことである。バナナ（*Musa spp.*）の茎頂では、0.4Mスクロースを含むMS培地で3週間前培養を行ったのち、液体窒素で急速凍結することにより、融解後に72%の植物体再生率が得られている（Panis et al., 1996）。また、サツマイモ（*Ipomoea batatas*）のembryogenic callus（遺伝子型：865M）では、0.1Mスクロースを含むMS培地で3日間前培養したのち、0.4Mスクロース添加培地で6日間、引き続き、0.7Mスクロース添加培地で3日間の合計12日間に及ぶ前培養を行ってから液体窒素中に直接浸漬することにより、83%の植物体再生率が得られている（Blakesley et al., 1997）。このような糖外与処理を行ったバナナおよびサツマイモの著しい耐凍性の増大が、全て糖の働きのみ起因するかどうかは不明である。

高濃度の糖を添加した培地を用いた前培養による凍害防御効果の発現については次のように考えることができる。塩類溶液や糖溶液などの高張液への浸漬処理や乾燥処理などの外部からの刺激が引き金となり、植物組織・細胞内には、浸透価を調節する働きの大きい物質（浸透価調節物質, osmolyte）である proline (Van Rensburg et al., 1993; Reinhoud et al., 1996) や glycine betaine (Lilius et al., 1996) などが蓄積することが知られており (Hare et al., 1998)、これとともに、低温や乾燥などの外部刺激により、cold responsive (COR) 遺伝子 (Guy et al., 1985) や late-embryogenesis abundant (LEA) 遺伝子 (Xu et al., 1996) などの耐凍性に関与する特定の遺伝子が誘導され、それらの遺伝子機

能の発現により、組織・細胞内で非常に親水性の高いタンパク質が生成されることが知られている (Thomashow, 1998)。これらの知見から、糖外与処理による耐凍性増大効果には、原形質分離の効果や膜の安定化などの糖自体による直接的な効果に加え、糖外与処理時の浸透圧ストレスにより、間接的にこれらの物質が生成され、耐凍性を向上させる可能性もあると思われる。

本章では、長期間の糖外与処理により高い耐凍性を獲得するアスパラガス (*Asparagus officinalis* L.) 品種・メリーワシントン500Wのembryogenic callusを用い、培養による糖外与処理（糖前培養）に伴うタンパク質組成の変化の有無と耐凍性との関連について検討するとともに、一部のタンパク質についてその性質を調べた。

第 1 節 第 5 章において用いる材料および共通的方法の概要

本章で用いる材料および共通的方法の詳細については、特に本節において予め述べることにする。

1. 材料の調製

材料は、アスパラガス [*Asparagus officinalis* L. 品種・メリーワシントン 500W (MW500W)] の培養中の幼植物体のシュート節部切片を培養することにより誘導したembryogenic callus (Fig.55-A)、アスパラガスembryogenic callus (培養系・Y6 clone) (広島県立農業技術センター生物工学研究所甲村浩之氏から分譲)、およびサツマイモ [*Ipomoea batatas* (L.) Lam. 品種・台農10号] のembryogenic callus (鹿児島県バイオテクノロジー研究所細胞操作研究室下西恵氏から分譲) の3種類を用いた。いずれのembryogenic callusも、26℃、連続照明の条件下（サツマイモについては暗黒条件下）で懸濁培養を行って維持しており、継代培養は1か月ごととし、継代培養開始1週間後から2週間後までのものを実験に用いた。

アスパラガスMW500Wのembryogenic callusは、第1章、第1節、1の方法で採取した若茎頭部小側枝茎頂から形成されたシュートの節部切片を、

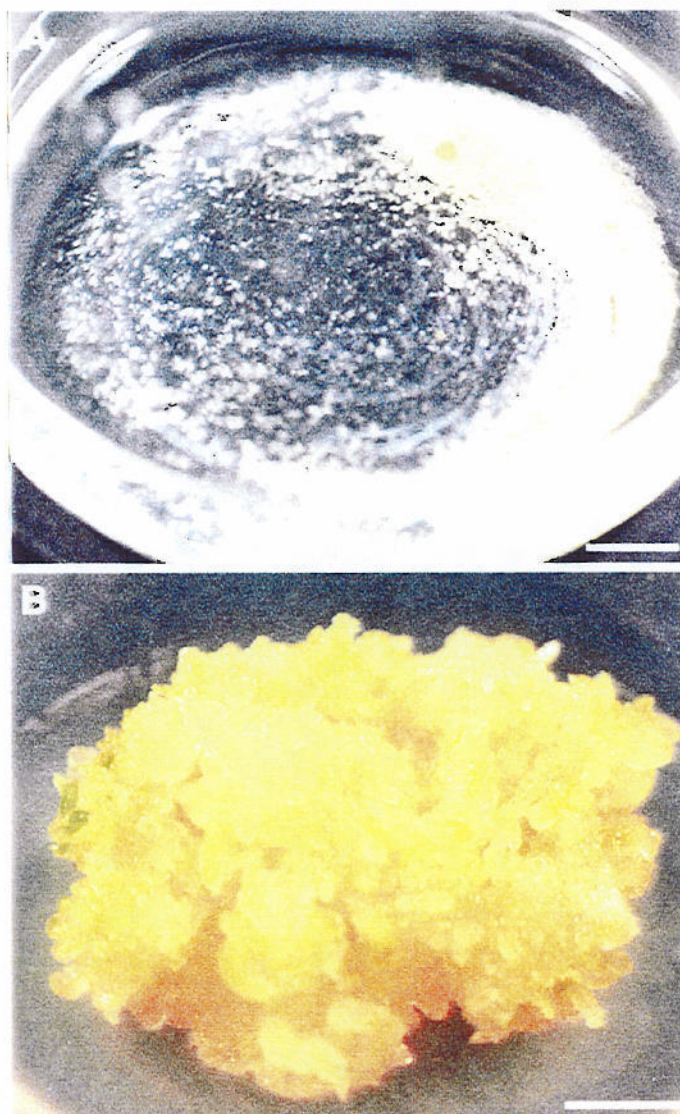


Fig.55. Embryogenic calli of asparagus [*Asparagus officinalis* L. cv. Mary Washington 500W (MW500W)]. (A) Suspension cultures incubated for 1 to 2 weeks and used for experiment. (B) Immature embryos originated from the suspension cultures incubated in growth regulator-free liquid medium for 2 weeks. Scales = 1 cm.

embryogenic callus継代培地（液体培地）[0.09M スクロース、2mg/L 2,4-D、0.5mg/L 葉酸、0.05mg/L ビオチンを添加し、pH5.7に調整した修正MS培地（窒素源を二分の一とした）] で懸濁培養し、培養1か月後に新たに形成されたものを継代培養によって維持しながら、実験に用いた。なお、このembryogenic callusは、生長調節物質無添加の寒天培地（0.09M スクロースを添加した修正MS培地）に置床すると、容易に不定胚集塊を形成するものである（Fig.55-B）。

2.糖外与処理および低温処理

（1）糖外与処理 糖外与処理は、継代培養開始1週間後から2週間後に、embryogenic callusを糖前培養培地[embryogenic callus継代培養培地中のスクロース濃度（0.09M）を、0.8Mもしくは0.4Mに変えた液体培地]へ移し、通常の培養条件で2週間培養することにより行った（糖前培養）。糖前培養試料の対照試料として、前述の継代培養培地（液体培地）で1週間から2週間培養したembryogenic callusを用いた。

（2）低温処理 低温処理はMW500Wのembryogenic callusについてのみ次のように行った。前述のembryogenic callus継代培地（液体培地）で培養しているMW500Wのembryogenic callusを、4℃（12時間）/2℃（12時間）、連続照明の条件下で2週間培養した。

3.凍結および融解ならびに耐凍性の検定

試料の凍結は次のように行った。試料表面に付着している液体培地を濾紙で拭き取ったのち、約100mg（生重）の試料を5ml容試験管に入れ、プログラミング・フリーザーを用い、-3℃で温度平衡させたのち、氷片を接触させることにより植氷し、0.5℃/minで-40℃まで冷却した。所定温度に達した試料を速やかにフリーザー外に取り出したのち、試験管中に1mlの前培養培地を注入し、直ちに34℃温水中で急速融解（10℃/min）した。融解後の試料につい

ては、第1章、第1節、3（1）の電解質漏出法に準じて耐凍性の検定を行った。

4. 糖分析

糖分析試料の調製および組織内糖の分析は、第1章、第1節、4の方法に準じて行った。ただし、糖前培養試料では、試料調製前に、糖を含まない液体培地中で軽くすすぎ、試料表面に付着した培地を濾紙で拭い取ってから用いた。

5. 共焦点レーザー顕微鏡による糖の取込みの観察

embryogenic callusの細胞内への、fluid-phase endocytosisによる糖の取込みの観察は、共焦点レーザー顕微鏡を用いて、第2章、第1節、7の方法に準じて行った。

6. 超薄切片の作製および電子顕微鏡観察

embryogenic callusの超薄切片作製および電子顕微鏡観察は、第4章、第1節、7の方法に準じて行った。

7. タンパク質の抽出

タンパク質の抽出および分画（粗抽出画分、可溶性画分、粗膜画分）は以下の手順に従って、4℃で行った。試料表面に付着している培地を濾紙で十分に拭い取ったのち、約200mg（生重）の試料を、1 mlの抽出バッファー [75mM 2-(n-monopholino) sulfonic acid (MOPS)-KOH (pH7.6)、0.2M スクロース、10mM ethyleneglycol bis(2-aminoethylether)-tetraacetic acid (EGTA)、5 mM ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA)、5% polyvinylpolypyrrolidone (PVPP)]、小型スパーテル3杯ほどの海砂、酸化防止剤（4 mM $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ ）、プロテアーゼ阻害剤 [1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)、1 mg/L

Leupeptin、100 mg/L Pepstatin、1 mM Benzamidine および 5 mM ϵ -caproic acid] とともに乳鉢中で磨砕した。磨砕物を1.5ml容マイクロ・チューブに移し、15,000rpmで10分間遠心分離した。上清を回収したのち、残渣を0.5mlの抽出バッファーで懸濁し、再度同じ条件下で遠心分離して上清を回収した。この上清の中から1mlをとり、それを粗抽出画分 (total extract) とした。粗抽出画分を超遠心分離機 (Hitachi, himac CP70G) を用いて、55,000rpmで30分間遠心分離したのち、得られた上清を可溶性画分 (soluble fraction) とした。遠心分離後の沈殿は、ガラス・ホモジナイザーを用いて、1mlの抽出バッファー中に再懸濁し、これを粗膜画分 (microsome fraction) とした。さらに、可溶性画分の一部を100℃で10分間熱処理し、15,000rpmで10分間遠心分離して得られた上清を熱安定性 (boiling-stable) 可溶性画分とした。

8. タンパク質の定量

各画分のタンパク質の定量は、Bradford色素結合法 (Bradford, 1976) に基づく比色定量法により行った。各画分の抽出液を100倍から300倍に希釈し、その溶液0.8ml中に、発色液 (Bio-Rad, protein assay dye reagent) 0.2mlを注入したのち数秒間振とうし、光電分光光度計を用い、測定波長595nmの条件で比色定量した。

9. SDSアクリルアミドゲル電気泳動法によるタンパク質の同定

SDSアクリルアミドゲル電気泳動法 [sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)] は以下の方法に準じて行った。各画分抽出液に、同量の2×SDSサンプル・バッファー [20mM Tris-HCl (pH 6.8)、4% SDS、10% β -mercaptoethanol、20% グリセロール、0.01% bromophenol blue (BPB)] を添加した液 (サンプル溶液) について、13%の分離ゲルを用い、常法 (Laemmli, 1970) に従ってSDS-PAGEを行った。泳動後、直ちに銀染色法 (Switzer et al., 1979) によりゲル中のタンパク質を

検出した。各ペプチドの分子量は、サンプル溶液と同時に泳動した分子量マーカー（第一化学薬品,「第一」Ⅲ）との比較から決定した。

10. 指標タンパク質の検出

指標タンパク質の検出は、イムノブロット法（ウェスタンブロット法）により行った。SDS-PAGEを行った後のゲルを転写溶液〔48mM Tris base、39mM グリシン、0.037% (w/v) SDS、20% (v/v) メタノール〕に浸漬し、転写ユニットにより、ゲル中のペプチドをメンブラン（Millipore., Immobilon PVDF）に電氣的に転写した。タンパク質が転写されたメンブランは、直ちにブロッキング溶液〔phosphate buffered saline (PBS)、0.2% (w/v) Tween20、3% BSA〕で処理したのち、一次抗体溶液で1時間処理した。反応終了後のメンブランは、ブロッキング溶液で洗浄したのち、二次抗体溶液で1時間処理した。さらに、この反応が終了したメンブランを洗浄液〔PBS、0.2% (w/v) Tween20〕で洗浄し、AP溶液（100mM Tris-HCl、100mM NaCl、5mM MgCl₂）で5分間処理したのち、AP溶液中にAP発色試薬〔50 mg/ml nitro blue tetrazolium (NBT) および50 mg/ml 5-bromo-4-chloro-3 indolyl phosphate p-toluidine salt (BCIP)〕を添加して、特定タンパク質のバンドを発色させた。なお、指標タンパク質としてのLEAタンパク質グループ2（Dehydrinタンパク質）およびグループ3のタンパク質を検出するために、1次抗体として、Dehydrinタンパク質のC末端シーケンス（Biotechnologies co., Stressgen）およびコムギ（*Triticum aestivum* L. cv. Brevor）由来のLEAタンパク質グループ3タンパク質（United States Department of Agriculture, Agriculture Research Service, Washington State University の Dr.Walkar-Simmonsからの分譲）に対するウサギ・ポリクローナル抗体を用いた。

第2節 embryogenic callusにおける耐凍性の変化と

糖外与処理または低温処理との関連

アスパラガスおよびサツマイモのembryogenic callusを用い、糖外与処理（糖前培養）と耐凍性の変化との関連について検討した。

1. 材料および方法

材料は、アスパラガス [*Asparagus officinalis* L.] 品種・メリーワシントン500W (MW500W) の培養幼植物のシュート節部切片を培養することにより誘導したembryogenic callusおよび培養系・Y6 clone (Y6C) 由来のembryogenic callus、ならびにサツマイモ [*Ipomoea batatas* (L.) Lam.] 品種・台農10号 (T10) 由来のembryogenic callusを用いた。また、材料の調製、糖外与処理、低温処理、凍結および融解、耐凍性の評価については、本章第1節で述べた方法に準じて行った。

2. 結果

アスパラガスのMW500W培養体由来およびY6C由来ならびにサツマイモのT10由来の3種類のembryogenic callusを用いて、スクロースを添加した培地による糖前培養後の試料の耐凍性の変化を電解質漏出法により調べた (Fig.56)。

アスパラガスのMW500W培養体由来のembryogenic callusについてみると、0.09M スクロースを添加した液体培地（通常の培地）で培養した場合の耐凍性 ($LT_{50}=-7.5^{\circ}\text{C}$) は、スクロース高濃度 (0.8M) 添加培地での2日間の前培養により著しく増大した ($LT_{50}=-25^{\circ}\text{C}$) (Fig.56-A)。この高い耐凍性は、糖前培養開始8日後まで維持されたが、その後は糖前培養期間の経過とともに急激に減少した。同様の傾向は、スクロース (0.4M) 添加培地で前培養した試料においてもみられた。なお、糖前培養後の試料において得られた最大の耐凍性は、本研究で使用した試料中で最も高かった。

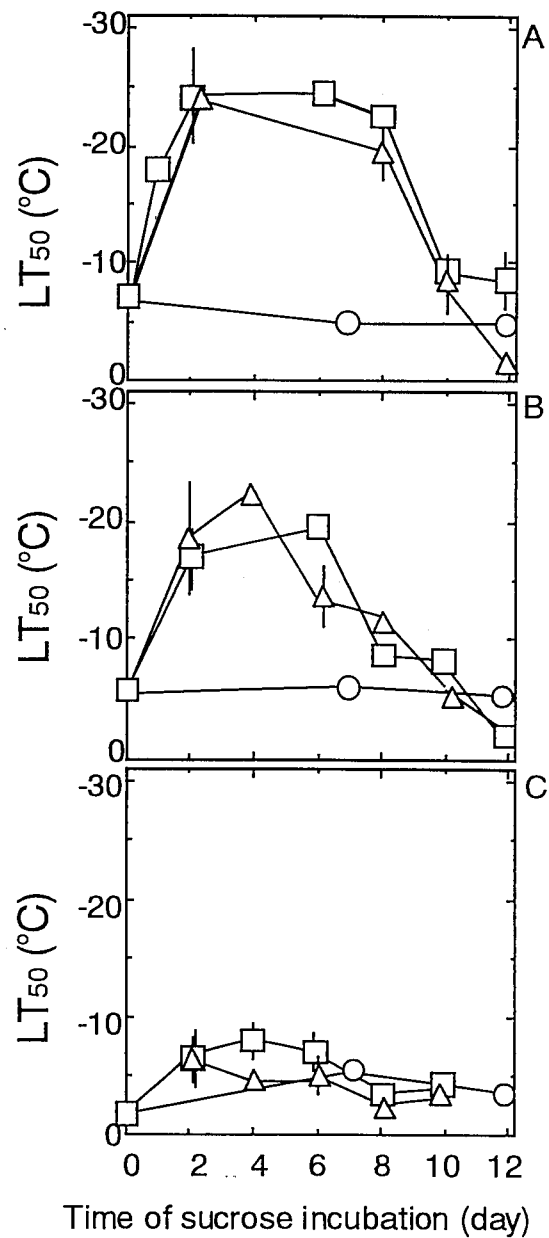


Fig.56. Differences between freezing tolerance (LT_{50}) in various embryogenic calli of asparagus and sweet potato in relation to incubation in liquid media containing 0.4 M ($\square$) or 0.8 M ($\triangle$) sucrose. (A) Asparagus (MW500W). (B) Asparagus (Y6 clone). (C) Sweet potato (Tainung 10). $\circ$, samples incubated with media containing 0.09 M sucrose. All samples were cooled at $0.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ and thawed at about $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ to room temperature (22°C). Survival was determined by ion leakage. Bars = SD from three preparations.

次に、アスパラガスのY6C由来のembryogenic callusについてみると、0.09M スクロース添加培地で培養した場合の耐凍性 ($LT_{50}=-5^{\circ}\text{C}$) は、スクロース高濃度 (0.8M) 添加培地での4日間の前培養により、最大の耐凍性 ($LT_{50}=-22^{\circ}\text{C}$) を示したが、前培養開始6日後以降に徐々に減少した (Fig.56-B)。同様の傾向は、スクロース高濃度 (0.4M) 添加培地により前培養した試料においてもみられた。

一方、サツマイモのT10由来のembryogenic callusでは、0.8Mおよび0.4M スクロースのいずれを培地に添加して前培養しても、耐凍性の増大はほとんど認められなかった (Fig.56-C)。

このように、アスパラガスのembryogenic callus、とりわけMW500Wのembryogenic callusでは、糖前培養による耐凍性の増大が著しいことが明らかになったので、スクロース高濃度 (0.8M) 添加培地で前培養を行ったアスパラガスMW500Wのembryogenic callusを用い、低温処理の効果についてさらに検討したところ、 4°C (12時間) / 2°C (12時間) の低温処理を2週間まで行くと、低温処理期間中に耐凍性はほとんど変化しなかったが ($LT_{50}=-5^{\circ}\text{C}$ 前後)、培地に高濃度 (0.8M) のスクロースを添加して低温処理した場合には、処理開始7日後に最大の耐凍性 ($LT_{50}=-21^{\circ}\text{C}$) を示した (Fig.57)。

3. 考察

スクロース高濃度 (0.8M) 添加培地による前培養を行った場合、アスパラガスのembryogenic callusの耐凍性は著しく増大した。耐凍性は、糖前培養開始直後から急激に増大し、培養開始2日後に最大の耐凍性に達し、この状態を一週間以上維持したのち減少した。このように、糖外与処理中に試料の耐凍性が低下する傾向は、本研究で用いたキャベツ葉柄組織およびアスパラガス若茎頭部小側枝の茎頂 (第1章で述べた)、およびキャベツ葉肉組織 (第3章で述べた) においても認められた。アスパラガスembryogenic callusの糖前培養に伴う耐凍性の変動には、前章までに述べたのと同様に、細胞質中へ取り込まれた糖の働きによる効果と糖外与処理を受けた組織・細胞自体の活性の低下の両方が関与しているものと思われる。

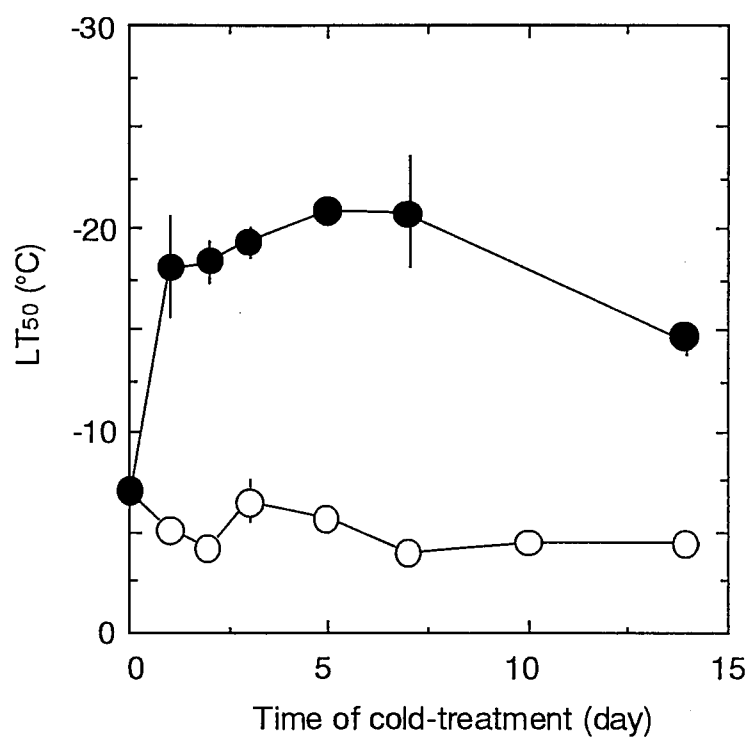


Fig.57. Differences between freezing tolerance (LT_{50}) in cold-treated embryogenic calli of asparagus (MW500W) in relation to incubation in liquid media containing 0.09 M sucrose (○) and 0.8 M sucrose (●). Cold-treatment was made on embryogenic calli at 4°C(12hr) / 2°C(12hr). All samples were cooled at 0.5°C/min and thawed at about 10°C/min to room temperature (22°C). Survival was determined by ion leakage. Bars = SD from three preparations.

しかし、糖前培養後のアスパラガスMW500Wのembryogenic callusが示した最大の耐凍性 ($LT_{50}=-24^{\circ}\text{C}$) は、糖外与処理後のアスパラガス若茎頭部小側枝の茎頂やキャベツ葉柄組織が示した最大の耐凍性を明らかに上回っていた。embryogenic callusは、凍結保存対象として最近頻繁に用いられているが (Blakesley et al., 1996, 1997; Wang et al., 1998)、その理由として、凍結・融解後の植物体再生および大量増殖の容易さに加え、糖外与処理によって著しく高い耐凍性が付与されるというembryogenic callus自体の特性が考えられる。しかし、本節で用いたサツマイモembryogenic callusの場合には、糖前培養の耐凍性増大効果は現れず、さらに、アスパラガスのembryogenic callusについても、MW500W培養体由来とY6C由来のものとは再生する植物体が異なるため、最大耐凍性に差異が生じたものと思われる。これらのことから、embryogenic callusの性質が耐凍性の獲得にとってとりわけ重要であると考えられる。

アスパラガスMW500Wのembryogenic callusでは、糖前培養により耐凍性が著しく高まったが、低温処理開始14日後まで耐凍性の増大は認められなかった。しかし、培養細胞の低温馴化によって耐凍性が高くなった例として、ポプラ (*Populus euramericana* cv. *gelrica*) のカルスを 0°C で20日間低温処理することにより液体窒素での凍結保存が可能になったことなど数多く知られている (Bannier and Steponkus, 1976; Seibert and Wetherbee, 1977)。これらのことから、本章で用いたアスパラガスMW500Wのembryogenic callusでは、低温馴化植物にみられる耐凍性獲得機構が、14日間の低温処理では機能するに至らなかったこと、または、embryogenic callusの性質が培養中に変質し、耐凍性獲得機構が欠損したことが考えられるが、いずれにしても、低温処理開始14日後までの試料と糖前培養開始14日後までの試料を比較することは、糖の凍害防御機構を考える上で重要であると考えられる。

第3節 embryogenic callusにおける糖含量の変化と

糖外与処理または低温処理との関連

アスパラガスのembryogenic callusを用い、糖外与処理（糖前培養）とfluid-phase endocytosisによる糖の取込みとの関係について検討した。

1. 材料および方法

材料は、アスパラガス (*Asparagus officinalis* L.) 品種・MW500Wの培養幼植物のシュート節部切片を培養することにより誘導したembryogenic callusを用いた。また、材料の調製、糖外与処理、低温処理、糖分析、共焦点レーザー顕微鏡による糖の取込みの観察については、本章第1節で述べた方法に準じて行った。

2. 結果

(1) 糖外与処理および低温処理に伴う糖含量の変化 0.09M スクロースを添加した通常の液体培地で培養したアスパラガスMW500Wのembryogenic callusの糖含量は、 $67\mu\text{mol/gFW}$ であった (Fig.58)。しかし、スクロース高濃度 (0.8M) 添加培地による前培養を行うと、培養を開始してから1日後には約 $360\mu\text{mol/gFW}$ の高い値となり、その後もこの状態が維持され (Fig.58-A)、スクロース、ならびにグルコースおよびフルクトースの増加が認められた。

一方、低温処理試料の糖含量は、処理期間中はほとんど変動せず、低温処理開始2週間後の試料においても、 $170\mu\text{mol/gFW}$ 未満であった (Fig.58-B)。

(2) 糖外与処理に伴うfluid-phase endocytosisによる細胞内への糖の取込み 糖前培養によるembryogenic callusの細胞内への糖の取込みを共焦点レーザー顕微鏡で観察した (Fig.59)。0.09M スクロースを添加した通常の液体培地で1日間培養した試料の細胞内には、LYCHの蛍光を発する小胞はほとんど認められなかったのに対し (Fig.59-A)、スクロース高濃度 (0.8M) 添加培地による前培養を1日間行った試料の細胞内には、LYCHの蛍光を発する

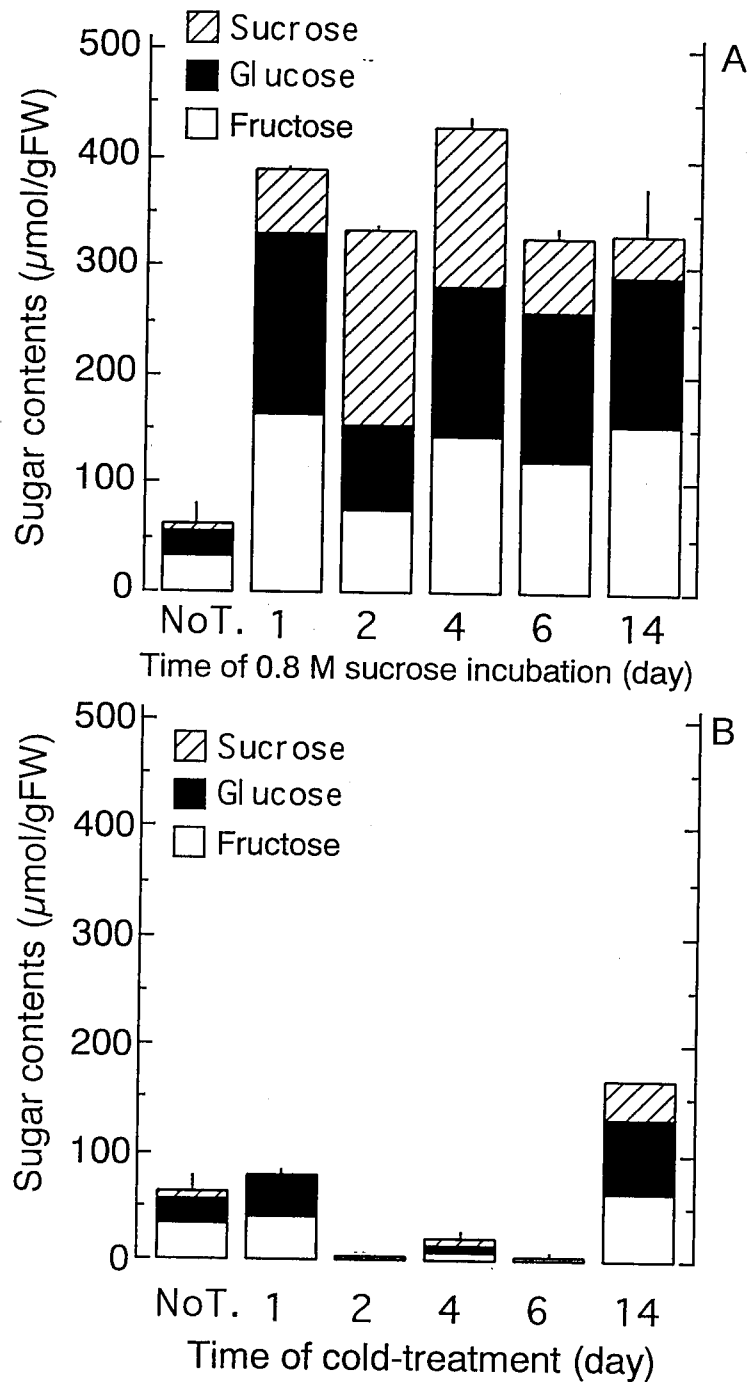


Fig.58. Changes of sugar contents and compositions in asparagus (MW500W) embryogenic calli. (A) Samples were incubated in liquid media containing 0.8 M sucrose at 26°C. (B) Samples were incubated in liquid media containing 0.09 M sucrose at 4°C(12hr) / 2°C(12hr). **NoT.**, no treatment. Bars = SD from two preparations.

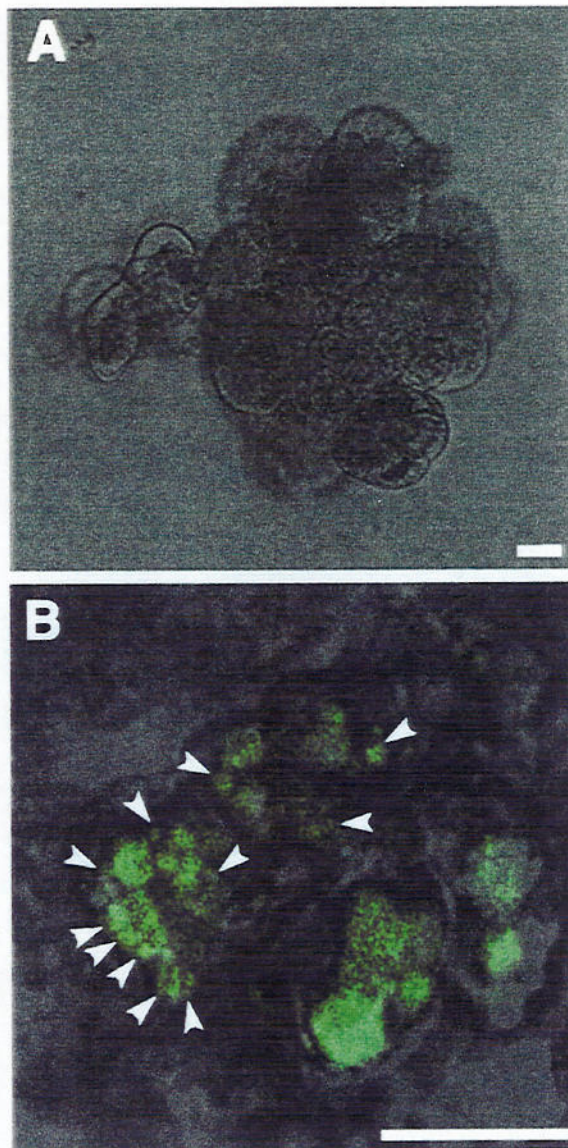


Fig.59. CLSM images showing sugar loading (LYCH as a tracer) into cells of asparagus (MW500W) embryogenic calli incubated in liquid media containing 0.09 M sucrose (**A**) and 0.8 M sucrose (**B**) for one day. Both media contained 1 mg/ml LYCH. After the incubation, all samples were washed with media without LYCH. Greenish-yellow regions correspond to fluorescence of LYCH. Arrowheads show intracellular vesicles incorporated by fluid-phase endocytosis. Scales = 10 μ m.

小胞が多数観察された (Fig.59-B) 。fluid-phase endocytosisによる糖の取込みと耐凍性の増大との関連は薄弱であることは第2章において示したが、本節の結果は、糖前培養中に起こるfluid-phase endocytosisを介して、embryogenic callusの細胞内に、大量の糖が取り込まれることを示している。

3. 考察

スクロース高濃度 (0.8M) 添加培地を用いた前培養によって耐凍性が増大するアスパラガスMW500Wのembryogenic callusでは、糖含量が前培養開始直後に著しく増加し、約1週間後まで高い値を維持していたのに対し、耐凍性の増大がみられなかった低温処理試料では、糖含量の増加は認められなかった。このことは、組織・細胞内の糖含量と耐凍性の増大とが深く関わっていることを示しているが、第2章で述べたように、組織内に取り込まれた糖の全てが、組織の耐凍性増大に関与しているのではないと思われる。スクロース高濃度 (0.8M) 添加培地による前培養により、MW500Wのembryogenic callusの細胞には、fluid-phase endocytosisを介して多量の糖が取り込まれているのと同時に、糖輸送体を介して細胞内に取り込まれると考えられるが、これを検証するには糖輸送阻害剤を用いて検討する必要がある。

一方、MW500Wのembryogenic callusが糖前培養によって獲得した高い耐凍性は、試料内の糖含量のみでは説明ができない。すなわち、3時間の糖外与処理により、 $LT_{50}=-17.5^{\circ}\text{C}$ の耐凍性を獲得したキャベツ葉肉組織の糖含量 ($450\mu\text{mol/gFW}$) (第3章で述べた) は、2日間の糖前培養により $LT_{50}=-24^{\circ}\text{C}$ の耐凍性を獲得したアスパラガスMW500Wのembryogenic callusの糖含量 ($334\mu\text{mol/gFW}$) (本節で述べた) を上回り、組織内糖含量から組織の耐凍性を推定した場合には、キャベツ葉肉組織に一層高い耐凍性が付与されてもよいことになる。これらのことから、アスパラガスMW500Wのembryogenic callusに対する糖前培養の凍害防御効果には、糖による直接的効果のほかに、糖前培養に起因する間接的な効果の存在が予測される。

第4節 糖外与処理後または低温処理後のembryogenic callusにおける細胞内微細構造の変化

アスパラガスのembryogenic callusを用い、糖外与処理（糖前培養）と細胞内微細構造の変化との関連について検討した。

1. 材料および方法

材料は、アスパラガス [*Asparagus officinalis* L.] 品種・MW500Wの培養幼植物のシュート節部切片を培養することにより誘導したembryogenic callusを用いた。また、材料の調製、糖外与処理、低温処理、超薄切片の作製および電子顕微鏡観察については、本章第1節で述べた方法に準じて行った。

2. 結果

0.09M スクロースを添加した通常の液体培地で培養したembryogenic callusは、比較的大きな液胞をもつ細胞（直径10～15 μ m）で構成されていた（Fig.60-A）。この試料は、スクロース高濃度（0.8M）添加培地による2日間の培養により、著しい原形質分離を起こし[原形質分離は、糖前培養7日後および11日後の試料でも観察された（資料未掲載）]、さらに、細胞質内には小胞状構造が現れていた（Fig.60-B）。

一方、10日間低温処理した試料の細胞内微細構造は、通常の培地で培養した試料のそれに比べ、ほとんど変化していなかった（Fig.60-C）。

3. 考察

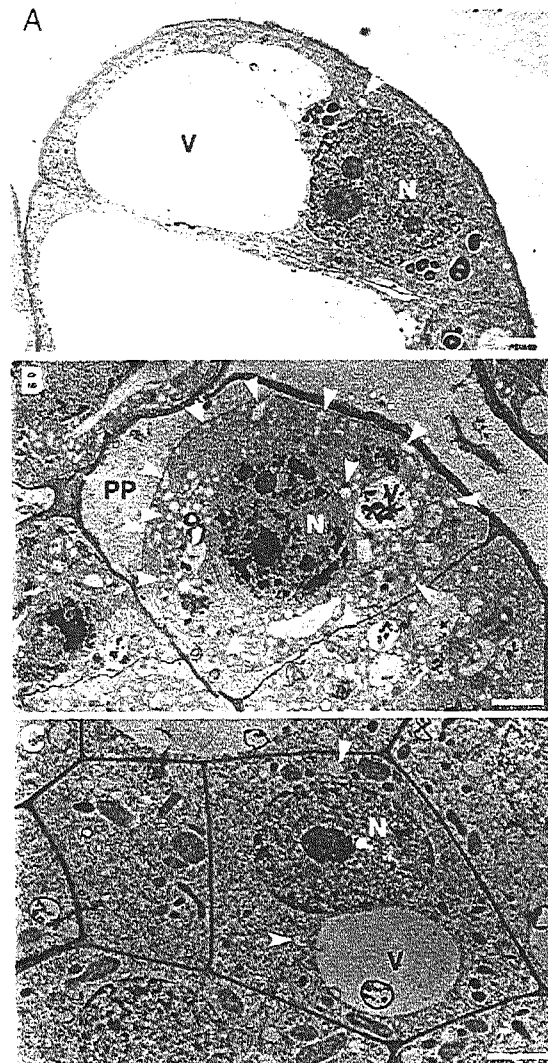


Fig.60. Ultra-thin sections showing ultrastructural changes in cells of asparagus (MW500W) embryogenic calli. (A) Samples incubated in liquid media containing 0.09 M sucrose for one week. (B) Samples incubated with 0.8 M sucrose solution for 2 days showing plasmolysis. (C) Cold-treated samples incubation in liquid media containing 0.09 M sucrose at 4°C(12hr) / 2°C(12hr) for 10 days. N, nuclei; PP, periprotoplastic space; V, vacuoles. Arrowheads show small vesicles. Scales = 1 μ m.

アスパラガスMW500Wのembryogenic callusの細胞では、0.8Mスクロース添加培地による前培養により、著しい原形質分離が起こり、細胞質内には、小胞状の構造が観察された。この小胞状構造の発生源として、液胞および小胞体、もしくはfluid-phase endocytosisの小胞などが考えられるが、詳細については明らかでなく、今後さらに検討する必要があると思われる。

低温処理試料では、細胞微細構造が通常の培地で培養している試料のそれとほとんど変わらず、糖含量の変化も少なかったことから、本章の第2節および第3節の結果と併せて考えると、耐凍性と糖含量との間の関連性が推測されるとともに、耐凍性と細胞構造との間には密接な関係があるものと考えられる。

第5節 糖外与処理後または低温処理後のembryogenic callusにおけるタンパク質の変化

アスパラガスのembryogenic callusを用い、糖外与処理（糖前培養）と組織内タンパク質の変化との関連について検討した。

1. 材料および方法

材料は、アスパラガス (*Asparagus officinalis* L.) 品種・MW500Wの培養幼植物のシュート節部切片の培養により誘導したembryogenic callusを用いた。また、材料の調製、糖外与処理、低温処理、タンパク質の抽出および定量、SDSアクリルアミドゲル電気泳動法、指標タンパク質の検出などについては、本章第1節で述べた方法に準じて行った。

2. 結果

(1) 糖外与処理および低温処理に伴うタンパク質含量の変化 0.09M スクロースを添加した通常の培地で培養したembryogenic callusについてみると、粗抽出画分のタンパク質含量は28 μ g/mgFWであったが、スクロース高濃度(0.8M)添加培地で24時間前培養した場合には、48 μ g/mgFWに急激に増加した。しかし、この粗抽出画分のタンパク質含量は糖前培養期間の経過とともに急激に減少した(Fig.61-A)。また、可溶性画分のタンパク質含量は、粗抽出画分における結果と似た傾向を示し、通常の培地で培養した試料においては20 μ g/mgFWであったが、24時間の糖前培養を行った試料では38 μ g/mgFWに増加し、糖前培養期間の経過とともに急激に減少した(Fig.61-B)。粗膜画分では、糖前培養によるタンパク質含量の変化はほとんどみられなかった(Fig.61-C)。

一方、4 $^{\circ}$ C(12時間)/2 $^{\circ}$ C(12時間)で連続照明の条件下において低温処理を行ったembryogenic callusについてみると、粗抽出画分のタンパク質含量は、低温処理開始4日後まで徐々に減少したのち、約19 μ g/mgFWで平衡状態となり(Fig.61-A)、可溶性画分のタンパク質も、低温処理開始14日後(4 μ g/mgFW)まで徐々に減少する傾向がみられた(Fig.61-B)。また、粗膜画分のタンパク質では、糖前培養試料の粗膜画分のタンパク質と同様に、低温処理による変化はほとんどみられなかった(Fig.61-C)。

(2) 糖外与処理および低温処理に伴うタンパク質組成の変化 スクロース高濃度(0.8M)添加培地での前培養は、embryogenic callusのタンパク質組成に著しい変化をもたらした(Fig.62)。すなわち、粗抽出画分の42、35、30、26.5、24.5、19.5、18.5、16.5、12.5kDの9種のタンパク質が、糖前培養開始直後から培養2ないし3日後まで著しく増加したのち、徐々に減少した。しかし、12kDのタンパク質については、糖前培養開始直後から糖前培養期間の経過とともに徐々に減少する傾向が認められた。

また、スクロース高濃度(0.8M)添加培地での前培養は、可溶性画分のタンパク質組成にも大きな変化をもたらした(Fig.63)。すなわち、可溶性画分の42、35、30、26.5、24.5、18.5、16.5kDの7種のタンパク質が、糖前培養開始直後から3ないし4日後まで増加したのち、徐々に減少した。しかし、12kDのタンパク質については、糖前培養開始直後から減少し続け、一方、15.5kDのタンパク質については、糖前培養開始直後に消失し、培養5日後に再び出現

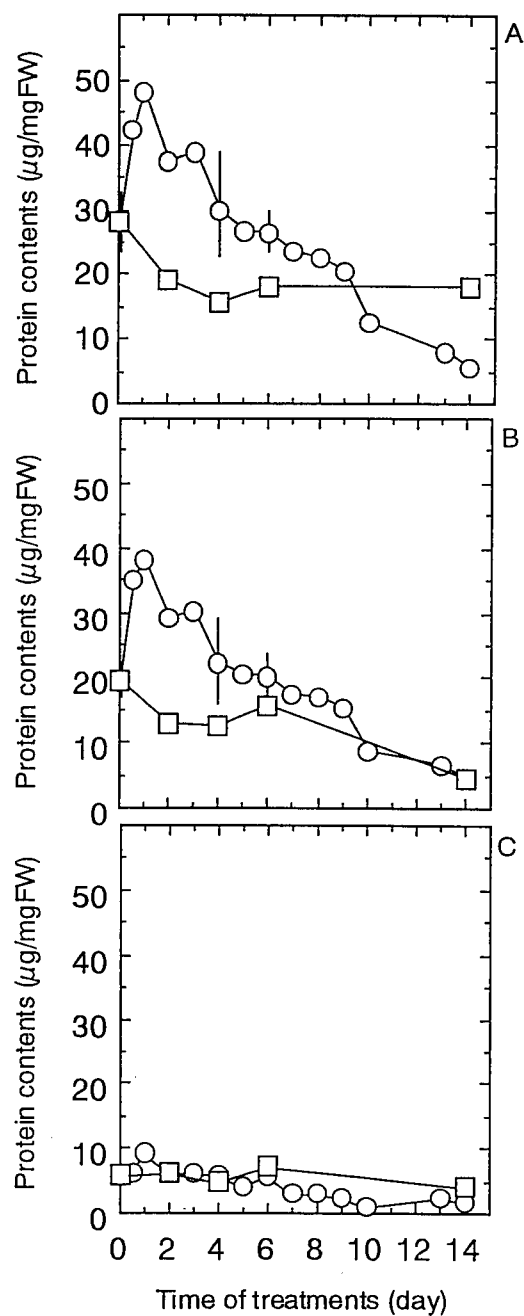


Fig.61. Differences in protein contents of asparagus (MW500W) embryogenic calli in relation to incubation in liquid media containing 0.8 M sucrose at 26°C (○) and 0.09 M sucrose at 4°C(12hr) / 2°C(12hr) (□). **(A)** Total extracts. **(B)** Soluble fractions. **(C)** Microsome fractions. Two hundreds mgFW of calli were used for one preparation. Bars = SD from three preparations.

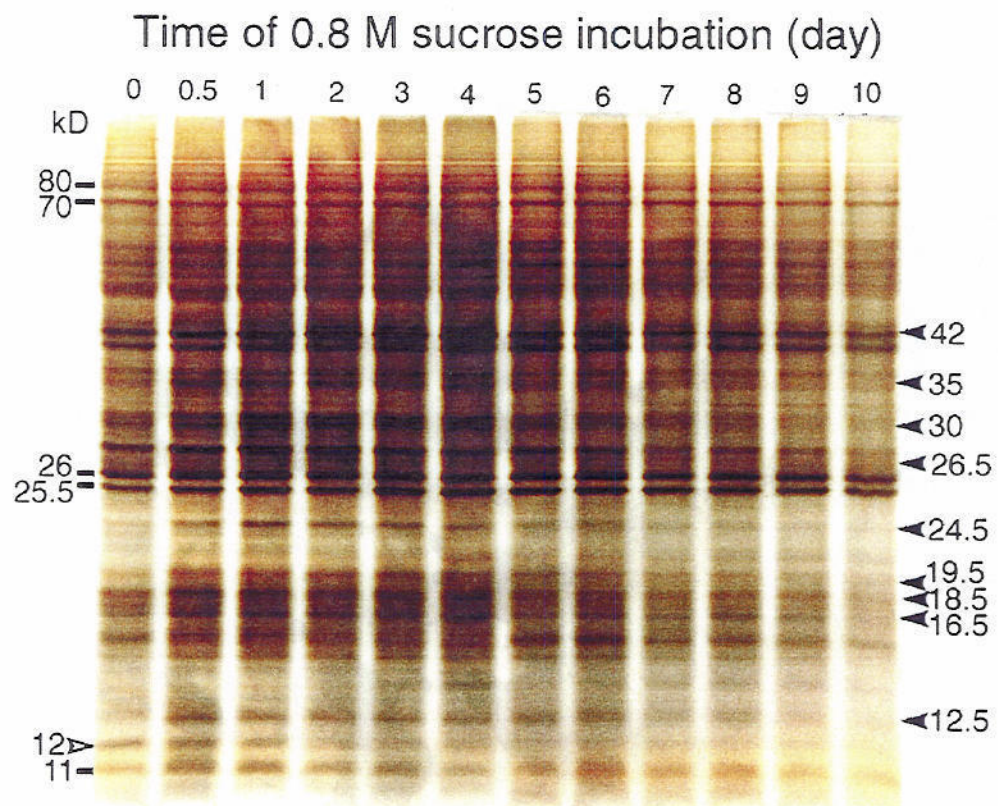


Fig.62. Silver-stained SDS-PAGE profiles of proteins from total extracts of asparagus (MW500W) embryogenic calli incubated in liquid media containing 0.8 M sucrose. Arrowheads show proteins predominantly increased (solid arrowheads) and decreased (open arrowheads) during the incubation. Each lane contains the amount of proteins corresponding to 0.7 mgFW of the calli. Molecular weight marker (DAIICHI.III) was used.

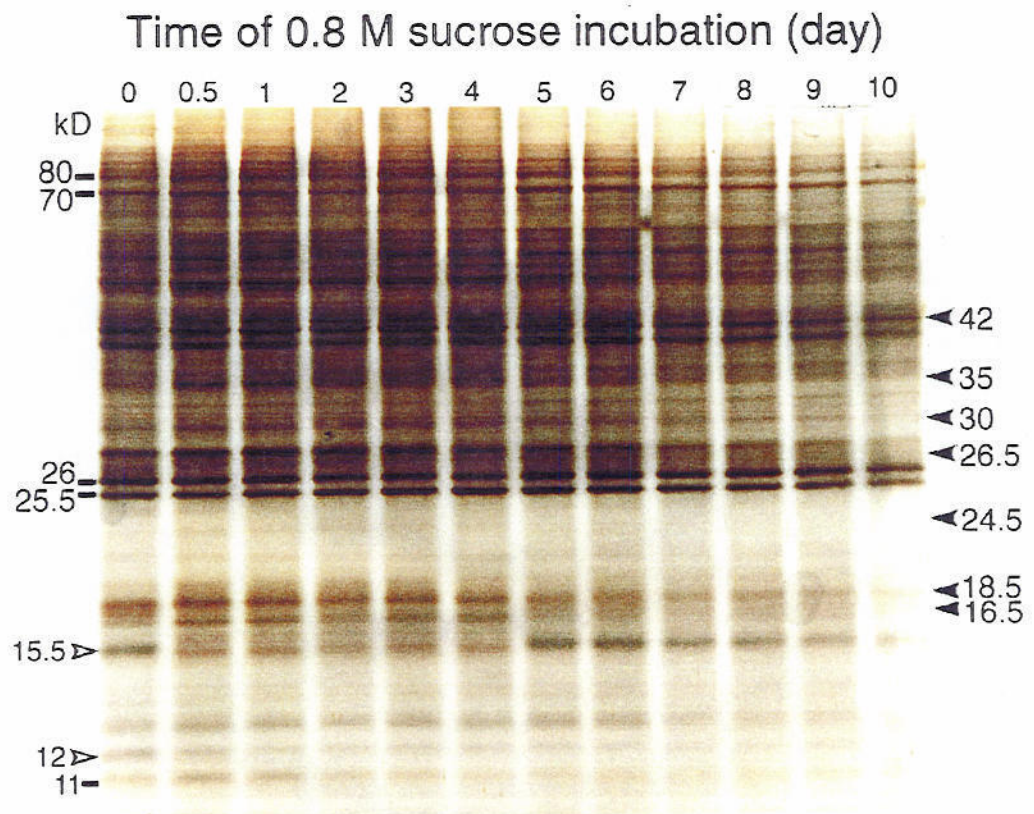


Fig.63. Silver-stained SDS-PAGE profiles of proteins from soluble fractions of asparagus (MW500W) embryogenic calli incubated in liquid media containing 0.8 M sucrose. Arrowheads show proteins predominantly increased (solid arrowheads) and decreased (open arrowheads) during the incubation. Each lane contains the amount of proteins corresponding to 0.7 mgFW of the calli. Molecular weight marker (DAIICHI.III) was used.

する傾向が認められた。以上に述べたほか、多数の微量タンパク質が、糖前培養開始直後から3ないし4日後まで増加し、その後減少する傾向が認められた。

さらに、スクロース高濃度（0.8M）添加培地での前培養は、粗膜画分のタンパク質組成においても大きな変化をもたらした（Fig.64）。すなわち、粗膜画分の30、24.5、19.5、16.5、12.5kDの5種のタンパク質が、糖前培養開始直後から3ないし4日後まで増加したのち、徐々に減少した。また、これらのタンパク質以外の多数の微量タンパク質が、糖前培養開始直後から3ないし4日後にかけて増加し、その後減少する傾向がみられた。

また、スクロース高濃度（0.8M）添加培地での前培養は、可溶性画分のタンパク質のうち熱安定性のタンパク質の組成にも大きな変化をもたらした（Fig.65）。すなわち、熱安定性可溶性画分の42、26.5、24.5、18.5kDの4種のタンパク質が、糖前培養開始直後から3、4日後まで増加したのち、徐々に減少した。さらに、12kDのタンパク質については、糖前培養開始直後から減少し続け、15.5kDのタンパク質については、糖前培養開始直後に消失し、培養5日後に再び出現する傾向が認められた。

一方、4℃（12時間）/2℃（12時間）で連続照明の条件下における低温処理もembryogenic callusのタンパク質組成に変化をもたらしたが、いずれの変化（47.5および33.5kDの2種のタンパク質）も糖前培養試料のそれに比べて微小であった（Fig.66）。可溶性画分の33.5kDのタンパク質については、低温処理開始4日後まで増加したのち、低温処理14日後には減少した。また、粗膜画分の47.5kDのタンパク質については、低温処理開始直後から増加し、低温処理2週間後まで増加した。その他のタンパク質の組成については、低温処理14日後までほとんど変わらなかった。

（3）糖外与処理に伴うLEAタンパク質の発現 embryogenic callusの可溶性画分のタンパク質中の熱安定性タンパク質について、LEAタンパク質に対する抗体を用いて、イムノブロット法（ウェスタンブロット法）による指標タンパク質の検出を行ったところ、抗体と交叉するタンパク質が、スクロース高濃度（0.8M）添加培地での糖前培養を行った場合、変化することが明らかになった（Fig.67）。LEAタンパク質のグループ2に属するタンパク質（dehydrinタンパク質）の抗体と交叉するタンパク質については、糖前培養開始直後から3ないし4日後にかけて増加したのち徐々に減少した42、26.5、24.5、18.5kD

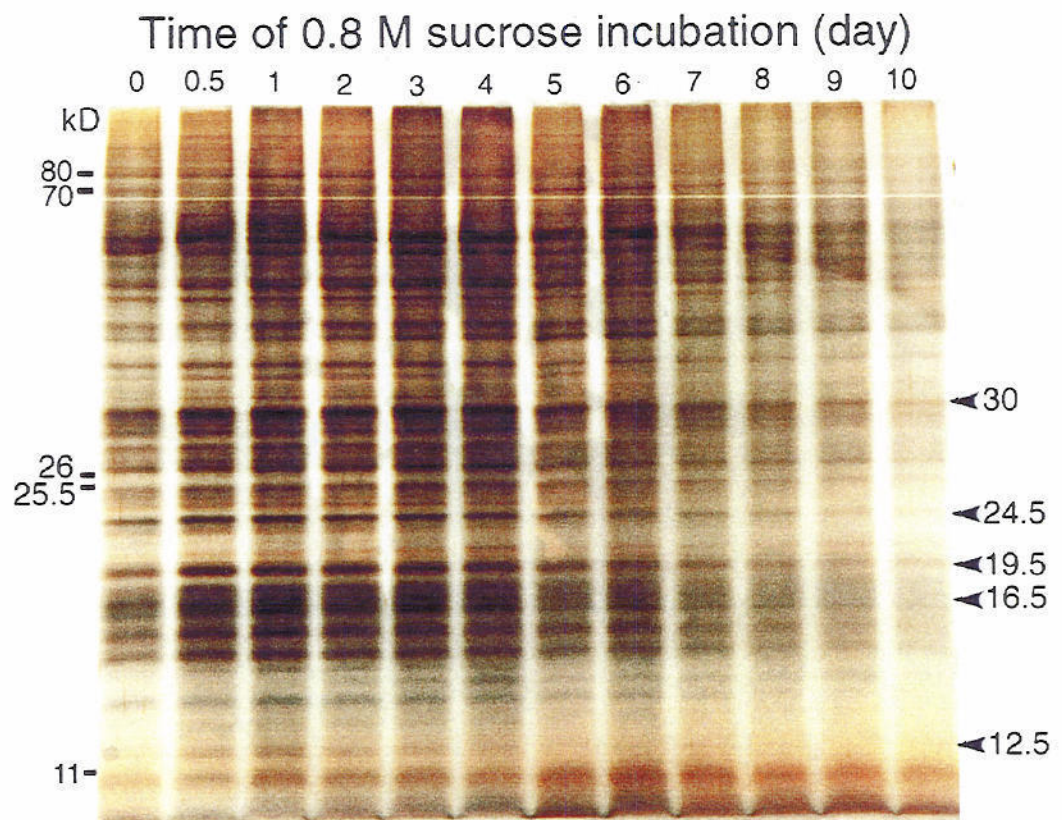


Fig.64. Silver-stained SDS-PAGE profiles of proteins from microsome fractions of asparagus (MW500W) embryogenic calli incubated in liquid media containing 0.8 M sucrose. Arrowheads show proteins predominantly increased during the incubation. Each lane contains the amount of proteins corresponding to 0.7 mgFW of the calli. Molecular weight marker (DAIICHI.III) was used.

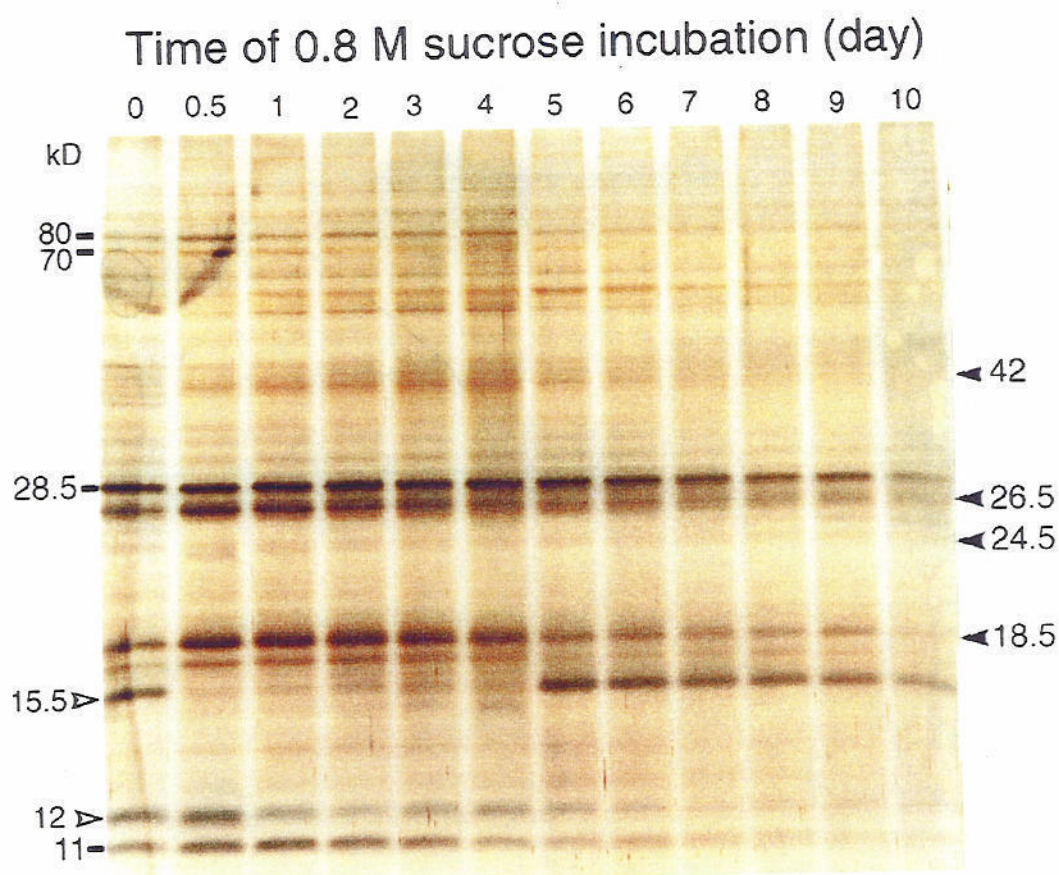


Fig.65. Silver-stained SDS-PAGE profiles of boiling-stable proteins from soluble fractions of asparagus (MW500W) embryogenic calli incubated in liquid media containing 0.8 M sucrose. Arrowheads show proteins predominantly increased (solid arrowheads) and decreased (open arrowheads) during the incubation. Each lane contains the amount of proteins corresponding to 0.7 mgFW of the calli. Molecular weight marker (DAIICHI.III) was used.

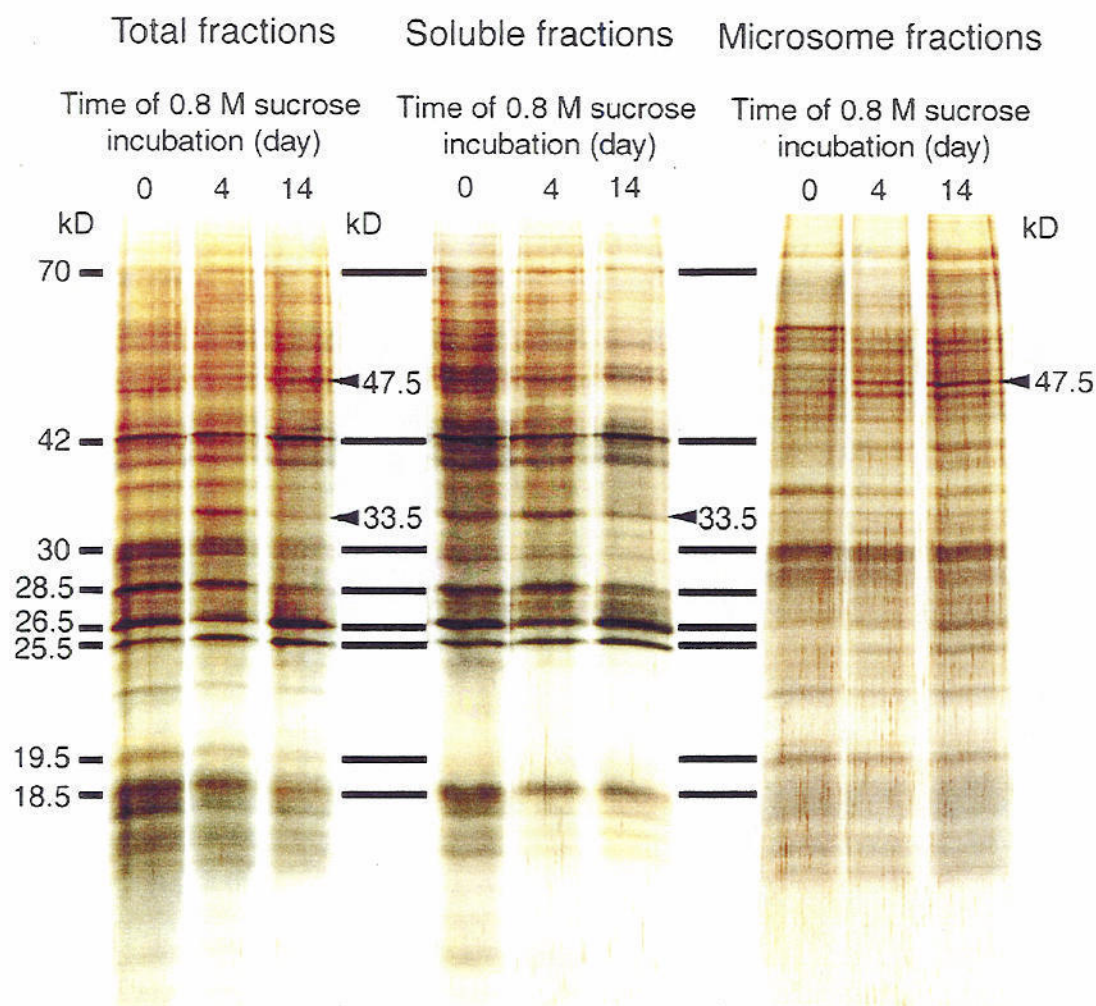


Fig.66. Silver-stained SDS-PAGE profiles of proteins from total extracts, soluble fractions and microsomal fractions of cold-treated asparagus (MW500W) embryogenic calli that were incubated in liquid media containing 0.09 M sucrose at 4°C(12hr) / 2°C(12hr). Arrowheads show proteins predominantly increased during cold-treatment. Each lane contains the amount of proteins corresponding to 0.7 mgFW of the calli. Molecular weight marker (DAIICHI.III) was used.

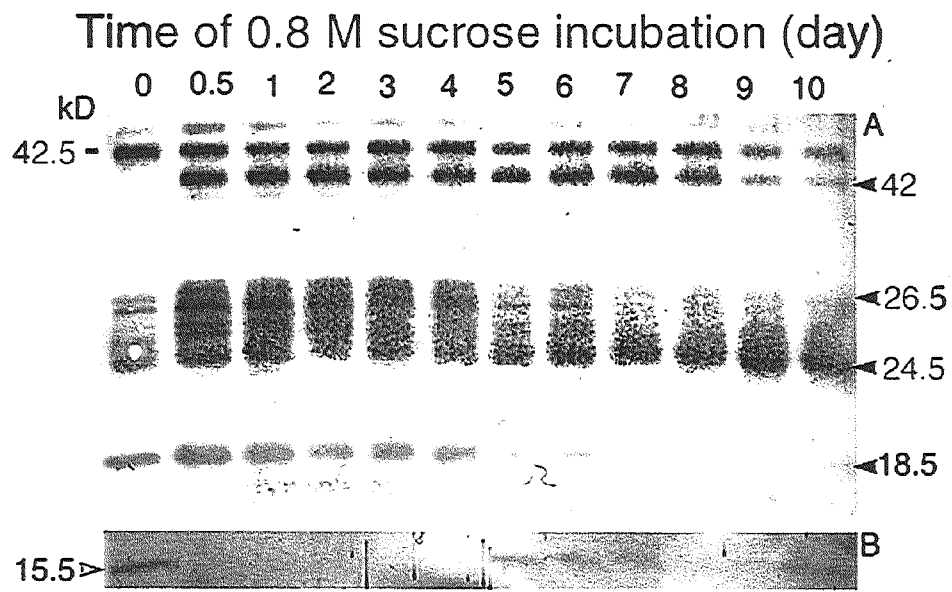


Fig.67. Immunoblot analysis of boiling-stable proteins from soluble fractions of asparagus (MW500W) embryogenic calli incubated in liquid media containing 0.8 M sucrose. Proteins in gels after SDS-PAGE were electrotransferred onto nitrocellulose membranes. Subsequent immunoblot analysis using antiserum against anti-LEA group 2 proteins (dehydrin) (**A**) and antiserum against anti-LEA group 3 proteins (**B**) was performed as described in the text. Arrowheads show proteins predominantly increased (solid arrowheads) and decreased (open arrowheads) during the incubation. Each lane contains the amount of proteins corresponding to 0.7 mgFW of the calli. Molecular weight marker (DAIICHI.III) was used.

のタンパク質と、分子量が一致していた (Fig.67-A) 。また、可溶性画分の熱安定性タンパク質のSDS電気泳動では確認できなかったが、dehydrinタンパク質の抗体に特異的に交叉する30kDから24.5kDの微量タンパク質についても、糖前培養中に増加することが明らかになった。さらに、LEAタンパク質のグループ3に属するタンパク質の抗体と交叉したタンパク質については、糖前培養開始直後に消失し、5日後に再び出現した15.5kDのタンパク質の量的変化と一致していた (Fig.67-B) 。

3. 考察

多くの植物において、低温が引き金となって誘導される低温誘導遺伝子の存在が知られている (Guy, 1990; Monica and Dunn, 1996; Thomashow, 1998) 。これらの遺伝子産物であるCORタンパク質、LEAタンパク質、Cryoprotectin (Hinch et al., 1990) などのタンパク質は、低温馴化中の植物組織内で増加し、脱水からタンパク質を保護するなど、植物の耐凍性増大に直接的に関与している可能性が示唆されている。これらのタンパク質は、組織の乾燥や脱水などによる水分ストレスによっても増加することが知られている (Xu et al., 1996) 。

スクロース高濃度 (0.8M) 添加培地による前培養は、MW500Wのembryogenic callusのタンパク量に著しい変化をもたらした。この変化は、主として糖前培養開始直後に増加する多種類の可溶性タンパク質に由来するものであった。特に、42、35、30、26.5、24.5、18.5、16.5kDの7種の可溶性タンパク質は、耐凍性の増大時期に増加していた。しかし、これらの可溶性タンパク質と、耐凍性の相互関連については現在のところ不明であるので、さらに検討する必要がある。

可溶性タンパク質のうち、特に、熱安定性の可溶性タンパク質については、耐凍性の増大に直接関与していることが多くの植物で知られている (Thomashow, 1998) 。熱安定性の可溶性タンパク質は、疎水性アミノ酸残基をほとんどもたず、水中において球状の立体構造になっていないと考えられている (この構造上の特徴から、これらのタンパク質は100℃で10分間処理しても沈殿せず熱安定性である) 。凍結した細胞内において、熱安定性の可溶性タンパク質は、その親水性から水分子の保持 (Dure, 1993) 、生体膜の安定化 (Hinch et al., 1990) 、

タンパク質構造の安定化 (Krishna et al., 1995)、イオン濃度の上昇緩和 (Roberts et al., 1993) などの働きを担っていると考えられている。本研究において、アスパラガス MW500W の embryogenic callus では、42、26.5、24.5、18.5 kD の 4 種の熱安定性可溶性タンパク質が糖前培養中に著しく増加する傾向が確認されたことから、これらタンパク質が耐凍性の増大に関与している可能性がある。

熱安定性可溶性タンパク質の一つとして、LEAタンパク質が知られている (Dure et al., 1989)。LEAタンパク質は、ワタ (*Gossypium spp.*) 種子の成熟後期に特異的に発現する mRNA に由来する熱安定性の可溶性タンパク質として見出され、現在、一次構造ならびに共通アミノ酸残基をもつブロックの存在から、およそ 5 グループまたは 8 グループの主要グループに分けられている (今井, 1996)。この LEAタンパク質のグループ 2 に属する dehydrin タンパク質は、オオムギ (*Hordeum vulgare*)、トウモロコシ (*Zea mays*)、コムギ (*Triticum aestivum*) およびイネ (*Oryza sativa*) などの穀類作物の乾燥条件下の実生や胚で多く生産される (Mundy and Chua, 1988; Close et al., 1989)。

本実験で用いた dehydrin 抗体は、dehydrin の C 末端付近における、リシンに富んだアミノ酸残基の繰り返し構造に特異的に結合するもので、様々な dehydrin ファミリータンパク質と交叉することが知られている (Mundy and Chua, 1988)。dehydrin タンパク質は、植物の乾燥傷害を抑制する働きをもつと考えられているが (Hare et al., 1998)、冬季のモモ (*Prunus persica*) の樹皮 (Arora and Wisniewski, 1994) や低温処理したブルーベリー (*Vaccinium spp.*) の花芽 (Muthalif and Rowland, 1994) などにおいても増加することが知られ、耐凍性との関与も示唆されている。さらに、dehydrin タンパク質の機能については、核と細胞質に局在することから、ストレス下において、核局在化シグナルを担うある種の核タンパク質に結合し、不活性化させる働きをもっていると考えられているが (Goday et al., 1994)、このタンパク質が耐凍性増大にどのように関与しているかについては、現在のところ明らかになっていない。

本研究では、アスパラガス MW500W の embryogenic callus の熱安定性可溶性タンパク質には、dehydrin 抗体と交叉する 42、26.5、24.5、18.5 kD の 4 種のタンパク質が、スクロース高濃度 (0.8 M) 添加培地による前培養中に増加することがわかったが、耐凍性が増大しない低温処理試料においても、dehydrin と交叉する 26.5 kD のタンパク質が増加した (資料未掲載)。このこ

とから、糖前培養中に増加した26.5kDのタンパク質については、耐凍性の増大との関連性が小さいと考えられる。

LEAタンパク質グループ3のタンパク質は、細胞質内のイオンを捕捉してイオン濃度の上昇を抑制することにより、脱水傷害から細胞を保護すると考えられている (Roberts et al., 1993)。本実験で用いたアスパラガスMW500Wのembryogenic callusでは、LEAタンパク質のグループ3に属するタンパク質に対する抗体 (Reid et al., 1992; Reid and Walker-Simmons, 1993) とわずかに交叉する15.5kDの熱安定性可溶性タンパク質が糖前培養開始直後に消失し、糖前培養開始5日後に再び出現したが、このような植物の乾燥耐性に関与するタンパク質が、糖高濃度溶液による処理過程において、一旦消失したのち再び出現する理由については不明であり、今後検討する必要があると思われる。

タバコ (*Nicotiana tabacum* L. cv. White Burley) の培養細胞では、0.33M マンニトール添加培地で24時間前培養することにより凍結保存が可能になる。このタバコ培養細胞内では、糖前培養開始直後から、LEAタンパク質のグループ5のタンパク質、および亜鉛を捕捉するタンパク質 (Zinc-fingered protein) を産出する遺伝子が特異的に誘導されることがわかっているが (Reinhoud et al., 1996)、これらのタンパク質の耐凍性増大への関与の可能性が示唆されているに過ぎず、どのような機構を通して関与しているかについては明らかにされていない。

以上の結果から、アスパラガスMW500Wのembryogenic callusでみられた糖前培養による著しい耐凍性の増大は、主として細胞内に取り込まれた糖に起因するものと考えられる。しかし、耐凍性が増大しない低温処理embryogenic callusではみられなかったいくつかのタンパク質の変化が、スクロース高濃度 (0.8M) 添加培地による前培養中のembryogenic callusで起きていること、さらに、それらのタンパク質の変化のうちのいくつかは、植物の耐凍性獲得機構に関与していることが示唆されているタンパク質の抗体と特異的に交叉したことから、これらのタンパク質が、糖の凍害防御効果の補助的な役割を果たし、組織・細胞の耐凍性増大に関与している可能性は否定できない。すなわち、糖前培養の凍害防御効果としては、これまでに述べた凍害防御効果のほか、糖溶液の浸透圧ストレスにより増加したタンパク質を経由して現れる間接的な凍害防御効果の存在が考えられるので、これらの点については今後さらに検討する必要がある。

第6章 総合考察

植物遺伝資源が急速に失われつつある中で、有用な遺伝子を保有しており個体再生能力のある植物体の一部（器官、組織および細胞など）を超低温下で凍結保存する方法は、長期安定的な植物遺伝資源の保存手段として最も有効である。しかし、植物組織・細胞の凍結はしばしば凍死の危険を伴うため、これに対する有効な防御法の確立が必要である。緒論で述べたように、糖外与処理は、緩速予備凍結法 (Kantha et al., 1980; Kumu et al., 1983) およびガラス化法 (Niino et al., 1997; Wang et al., 1998) による植物組織の凍結保存において、凍結傷害発生の防止に重要な役割を果たしており、糖外与処理のみで凍結保存が可能になる試料さえ知られている (Panis et al., 1996; Blakesley et al., 1996, 1997)。しかし、凍害防御のための糖外与処理は、主として経験的知見に基づいて行われているため、植物種の違いや用いる糖の種類によって防御効果が異なる理由、ならびに、試料の違いによりその凍害防御機構が異なるか否かなどの基本的な問題点については不明であった。本研究では、植物組織・細胞の凍結融解後の生存率を向上させることを目的として、数種野菜の組織・細胞およびプロトプラストを用い、これらの点について検討した。

まず、糖外与処理による耐凍性の増大がみられない植物組織について、その理由を明らかにすることは、これまで凍結保存が不可能であった植物試料の凍結保存法を改良する上で意義があると思われるので、糖外与処理に起因する耐凍性の増大がほとんどみられないタマネギの鱗葉組織、ならびに糖外与処理により耐凍性が著しく増大するキャベツ葉柄組織およびアスパラガス若茎頭部小側枝の茎頂を用いて、糖外与処理自体による試料の生存率の変化を比較した。その結果、タマネギ鱗葉組織は、高張の糖溶液への浸漬に伴う脱水により著しい傷害を受けること、ならびに外液浸透価の高低に基づく浸透圧変化によっても著しい傷害を受けることが明らかになった。高張液処理によって生じる植物細胞の傷害の原因として、脱水に伴う原形質膜の不安定化 (Singh, 1979; Gordon-Kamm and Steponkus, 1984)、液胞の小胞化 (Lee-Stadelmann and Stadelmann, 1989)、原形質膜の不可逆的な小胞化とそれに伴う復水時の原形質膜の破裂 (Singh and Johnson-Flanagan, 1987) などが考えられている。タマネギ鱗葉組織の細胞では、糖外与処理に用いた糖溶液の濃度 (0.8M) はそれほど高くはないが、脱水により液胞が小胞化し、復水時に原形質膜が破裂するな

ど、典型的な脱水傷害の様相が確認された。これらのことから、タマネギ鱗葉組織では、糖外与処理によって耐凍性がほとんど増大しない理由としては、それほど高くない濃度の糖溶液浸漬によっても脱水傷害が生じるためと考えられる。このような試料の凍結保存には糖は不適であり、むしろ組織に容易に取り込まれ、組織に対して脱水ストレスがかかりにくい凍害防御物質による凍結前処理が必要であると考えられる。

一方、高張糖溶液浸漬による糖外与処理に伴う脱水に対して耐性をもつキャベツ葉柄組織やアスパラガス若茎頭部小側枝茎頂の頂端分裂組織の細胞では、グルコース高濃度（1.0M）溶液による糖外与処理開始から短時間（10分間）のうちに原形質分離が起きた。この短時間の糖外与処理により、組織の耐凍性は増大したが、試料の水洗によりその耐凍性は消失したことから、短時間の糖外与処理による耐凍性の増大は、細胞膜と細胞壁の間、細胞の表面、細胞間中層などの細胞外に存在する糖に起因すると考えられる。短時間糖外与処理後のキャベツ葉肉組織を凍結すると、未処理試料でみられるような、細胞外氷晶から受ける物理的圧迫による細胞の著しい変形・収縮は緩和され、凍結傷害の原因と考えられる原形質膜超微細構造の変化が軽減されていた。この原形質膜超微細構造の変化は、細胞外凍結による細胞の変形・収縮による原形質膜同士の異常接近が原因と考えられており、さらに、この原形質膜の異常接近は、細胞外氷晶の成長に伴う細胞壁の変形により促進されることがわかっている（Fujikawa and Miura, 1986 ; Fujikawa et al., 1999）。これらのことから、短時間の糖外与処理による凍害防御効果は、原形質分離の発生により細胞壁と原形質膜との間の相互の制約関係が緩和されるとともに、細胞の変形・収縮が軽減され、これに伴い、原形質膜の異常接近による傷害が抑制されたことに起因すると考えられる。細胞壁と原形質膜の働きが、細胞の凍結傷害に関与していることは、本研究で用いたアスパラガス若茎頭部小側枝茎頂の頂端分裂組織においてもみられるほか、ジャガイモ（*Solanum tuberosum*）の培養細胞（Tao et al., 1983）やキクイモ（*Helianthus tuberosus*）の塊茎（Murai and Yoshida, 1998）においても知られており、細胞壁の変形・収縮がもたらす原形質膜の異常接近を抑制することが傷害の発生を緩和することにつながるものと推察される。

キャベツ葉肉組織およびアスパラガス若茎頭部小側枝茎頂の頂端分裂組織は、長時間（3時間以上）の糖外与処理を続けた場合には、さらに高い耐凍性を獲得することが本研究により明らかになったが、この耐凍性の増大は試料の水洗後も消失せず、

組織内の糖含量もさらに増加していることから、細胞質中に取り込まれた糖による効果と考えられる。本来、糖は、DMSOやグリセロール類とは異なり、分子量が大きいため細胞質中には取り込まれないと考えられていたが (Shlafer, 1981)、その後の研究により、糖が時間の経過とともに取り込まれることがわかり (Oparka et al., 1990; Marquat et al., 1997)、糖の取込みとともに組織・細胞の耐凍性が増大することが明らかになっている (Leborgne et al., 1995)。糖が細胞質中に取り込まれる経路として、輸送体による輸送 (Marquat et al., 1997) と fluid-phase endocytosis による輸送 (Oparka et al., 1990) が知られているが、長時間の糖外与処理による耐凍性増大過程において糖がどのような経路で細胞内へ取り込まれ、細胞内のどこに分布するかは不明であった。本研究では、共焦点レーザー顕微鏡を用いた観察により、キャベツ葉柄組織およびアスパラガス若茎頭部小側枝茎頂の頂端分裂組織では、糖外与処理を長時間行うことにより、fluid-phase endocytosis により糖が細胞質中に取り込まれることがわかった。しかし、fluid-phase endocytosis によって生じた小胞は、長時間経過して耐凍性が増大した後でも崩壊せず、また、凍結・融解を経ても消失しないことが確認されたことから、fluid-phase endocytosis により取り込まれた糖の凍害防御作用は実証することができなかった。一方、糖輸送体によって取り込まれた糖の耐凍性増大への関与について、糖輸送阻害剤 (PCMBs) を用いて調べたところ、阻害剤処理により細胞質中への糖の取込みが阻害されるとともに、耐凍性増大効果が著しく抑制されることが明らかになった。これらのことから、fluid-phase endocytosis によって取り込まれた糖ではなく、糖輸送体により取り込まれた糖が、主として耐凍性の増大に関与していると考えられる。

糖添加培地での 2 日間の前培養により糖を細胞質中に取り込んだアスパラガス若茎頭部小側枝茎頂を凍結し、頂端分裂組織細胞の原形質膜超微細構造を観察したところ、生体膜同士の異常接近による生体膜超微細構造の変化の発生が、未処理試料に比べ著しく軽減していたことから、糖輸送体により取り込まれた糖の凍害防御効果の一つは、糖が生体膜間のスペーサーとしてはたらき (Franks et al., 1991; Crowe and Crowe, 1986)、膜同士の異常接近の機会を減少させ、原形質膜の傷害を抑制することに起因していると考えられる。

このように、キャベツ葉柄組織およびアスパラガス若茎頭部小側枝茎頂の頂端分裂組織では、糖外与処理は、浸透圧変化に伴う原形質分離の発生、ならびに取り込ま

れた糖のスペーサー的機能などのような直接的効果により耐凍性を高めたと考えられるが、糖外与処理が副次的に、細胞の脂質またはタンパク質組成を変化させ、これらの変化が耐凍性の獲得に関与する可能性も否定できない。多くの植物細胞において、高張溶液による処理が、細胞の遺伝子機能の発現に影響を与え、耐凍性増大に関与する各種のタンパク質を誘導、蓄積することが知られているので（Guy, 1990; Gusta, 1996, Thomashow, 1998）、本研究では、糖外与処理により耐凍性が著しく増大するアスパラガスのembryogenic callusを作出し、糖外与処理によってタンパク質組成に変化が起こるか否かについて検討した。その結果、0.8Mスクロース添加培地を用いて糖外与処理したアスパラガスembryogenic callusでは、耐凍性の増大に伴い、総タンパク質含量が著しく増加し、このタンパク質含量の増加は、主として42、35、30、26.5、24.5、18.5、16.5kDの7種の可溶性タンパク質の著しい増加に由来するものであることが明らかになり、さらに、これらの可溶性タンパク質のうちの非常に親水性の高い4種の熱安定性タンパク質（42、26.5、24.5、18.5kD）については、植物の耐乾性または耐凍性に深く関与すると考えられているLEAタンパク質（Thomashow, 1998）に対する抗体と特異的に反応することが確認できた。また、糖外与処理中に総量的にはほとんど変動しなかった膜画分のタンパク質においても、主として30、24.5、19.5、16.5、12.5kDの5種のタンパク質が、糖外与処理中に増加することが明らかになった。これらの結果から、増加したタンパク質が耐凍性獲得に関与している可能性があると考えられるが、どのような機構によって関与しているかは依然不明であり、今後の重要な検討課題の一つである。

このように、本研究の結果から、糖外与処理による凍害防御効果として、①糖溶液の浸透価に起因する原形質分離により細胞壁と細胞膜の相互間の制約を緩和し、細胞の変形・収縮による傷害を軽減する効果、②細胞内に取り込まれた糖がスペーサー的な役割を果たし、膜の異常接近を回避させて傷害を軽減する効果、さらに、③糖外与処理の結果生じたタンパク質組成の変化による効果など、糖外与処理による各種の凍害防御効果を示唆することができた。

現在、国際的な凍結保存事業において最も急務とされているのは、遺伝資源としての熱帯性栄養繁殖作物および難貯蔵性種子の凍結保存である。これらの研究の主流は、高濃度の凍害防御物質（グリセリンおよびDMSOなど）の混合液を用いるガラ

ス化法を基本とした手法であり、操作の簡便さを追求することに焦点が絞られてきた感がある。しかし、このような物質は、多少を問わず試料に薬害をもたらすことが知られており（Steponkus et al., 1992）、また、遺伝的変異を誘発する可能性が危惧されている。これに対し、糖は、自然界の低温馴化植物中に多く存在することから、このような危険性は少ないと考えられるので、近年、凍害防御物質として糖類のみを用いた凍結保存法が重要視されており、糖の凍害防御効果に再び注目が集まっている。本研究によって明らかになった糖外与処理による凍害防御効果に関する基礎的な知見は、植物遺伝資源凍結保存技術の今後の発展に大きく貢献するものと考えられる。

摘 要

本研究は、植物遺伝資源、特に、野菜遺伝資源の長期保存を目的として、野菜組織・細胞の超低温保存技術の重要な構成要素となっている凍結前糖外与処理の効果について検討したもので、その内容は、1.数種野菜組織における糖外与処理と生存性および耐凍性の変化、2.数種野菜組織における糖外与処理と組織内への糖の取込みおよび耐凍性の変化、3.糖外与野菜組織における糖含量および耐凍性の変動と細胞構造の変化、4.野菜茎頂の凍結前糖外与処理（培養法）と含水率・糖含量および耐凍性の変動ならびに細胞内小器官および原形質膜超微細構造の変化、5.培養細胞に対する糖外与処理または低温処理と耐凍性、糖含量およびタンパク質の変化、に大別され、次のように要約される。

1.数種野菜組織における糖外与処理と生存性および耐凍性の変化

（1）糖外与処理前の組織の耐凍性検定

ソルビトール高濃度（0.8M）溶液への浸漬による糖外与処理を行う前のタマネギ（*Allium cepa* L.）鱗葉組織、キャベツ（*Brassica oleracea* L.）葉柄組織およびアスパラガス（*Asparagus officinalis* L.）若茎頭部小側枝茎頂などの組織・細胞の耐凍性を、電解質漏出法により評価したところ、タマネギ鱗葉組織、キャベツ葉柄組織およびアスパラガス若茎頭部小側枝茎頂の耐凍性がほぼ同等であることがわかった（ $LT_{50}=-3^{\circ}\text{C}$ 前後）。しかし、アスパラガス若茎頭部小側枝茎頂の耐凍性をfluorescein diacetate（FDA）染色法で評価した場合には、凍結保存後の植物体再生に重要な頂端分裂組織は、 $-5^{\circ}\text{C}\geq LT_{50}\geq -7.5^{\circ}\text{C}$ の高い耐凍性を示した。

（2）糖外与処理後の組織の生存性

タマネギ鱗葉組織、キャベツ葉柄組織およびアスパラガス若茎頭部小側枝

茎頂を用い、ソルビトール高濃度（0.8M）溶液への浸漬処理を行った場合の生存率の変化について調べた。タマネギ鱗葉組織についてみると、糖外与処理開始直後から、他の試料より急激に生存率が低下したことから、脱水抵抗性が極めて低く、糖外与処理によって傷害を受ける例の一つであることがわかった。さらに、ソルビトール高濃度（0.8M）溶液浸漬処理の後に、その溶液を0.4Mに希釈し、浸透価を低下させることによっても生存率が低下したことから、タマネギ鱗葉組織・細胞は、溶液浸透価の低下（復水）に起因する浸透圧ストレスにも極度に弱いことが明らかになった。これに対して、キャベツ葉柄組織および、とりわけアスパラガス若茎頭部小側枝茎頂の頂端分裂組織では、糖高濃度溶液浸漬処理による糖外与処理に起因する脱水および復水による生存率の低下は僅かであった。これらのことから、脱水および溶液浸透価の低下による組織・細胞内への復水に起因する浸透圧ストレスに対する耐性は、タマネギ鱗葉組織で最も低く、キャベツ葉柄組織では中程度で、アスパラガス若茎頭部小側枝茎頂の頂端分裂組織では最も高いことが明らかになった。

（3）糖外与処理後の組織の耐凍性

タマネギ鱗葉組織、キャベツ葉柄組織およびアスパラガス若茎頭部小側枝茎頂を用い、ソルビトール高濃度（0.8M）溶液への浸漬処理を行った場合の耐凍性の変化について調べた。タマネギ鱗葉組織の耐凍性は、糖外与処理開始直後から24時間後まで不変であったのに対し、キャベツ葉柄組織の耐凍性は、糖外与処理開始直後から急激に増大し、3時間後には最大（ $LT_{50}=-13^{\circ}\text{C}$ ）となったが、処理時間の経過とともに徐々に低下した。一方、アスパラガス若茎頭部小側枝茎頂の頂端分裂組織の耐凍性は、糖外与処理開始直後から徐々に増大し、12時間後に最大（ $LT_{50}=-30^{\circ}\text{C}$ ）となったが、処理時間の経過とともに徐々に低下した。キャベツ葉柄組織およびアスパラガス若茎頭部小側枝茎頂の頂端分裂組織の耐凍性が、最大となったのち糖外与処理時間の経過とともに低下したのは、処理時間が過剰に長くなり、組織・細胞の活性が低下したことによると考えられる。

2. 数種野菜組織における糖外与処理と組織内への糖の取込み

および耐凍性の変化

(1) 糖外与組織・細胞のfluid-phase endocytosisによる糖の取込み

キャベツ葉柄組織およびアスパラガス若茎頭部小側枝茎頂を用い、ソルビトール高濃度 (0.8M) 溶液への浸漬による糖外与処理を行った場合の細胞質中への糖の取込みについて、lucifer yellow carbohydrazide (LYCH) をトレーサーとして共焦点レーザー顕微鏡により観察したところ、糖外与処理開始数分後の細胞では原形質分離が起き、これによって現れるfluid-phase endocytosisによって細胞質中へ糖が取り込まれることが明らかになった。fluid-phase endocytosisにより生じた小胞は、細胞質内に存在しており、組織を等張条件に戻した後においても細胞質内に残り、原形質膜へ復帰することなく、さらに、組織を凍結・融解した後も消失しなかった。このことから、fluid-phase endocytosisにより取り込まれた糖の凍害防御効果発現への関与は小さいと予想される。

(2) 糖外与組織・細胞における耐凍性向上と糖輸送体による取込み

との関連

糖輸送体を介して細胞質中に取り込まれた糖の凍害防御効果について調べるため、ソルビトール高濃度 (0.8M) 溶液浸漬による糖外与処理を行うと耐凍性が増大するキャベツ葉柄組織およびアスパラガス若茎頭部小側枝茎頂の頂端分裂組織を対象として、耐凍性および糖含量に及ぼす糖輸送阻害剤p-chloromercuribenzenesulfonic acid (PCMBs) 処理の影響について調べた。

未処理のキャベツ葉柄組織およびアスパラガス若茎頭部小側枝茎頂の耐凍性 [$LT_{50} = -3.7^{\circ}\text{C}$ (キャベツ) および -2.8°C (アスパラガス)] は、ソルビトール高濃度 (0.8M) 溶液浸漬による糖外与処理を1時間行うことにより著しく増大したが [$LT_{50} = -9^{\circ}\text{C}$ (キャベツ) および -6.6°C (アスパラガス)]、PCMBsを添加したソルビトール高濃度 (0.8M) 溶液による1時間の糖外与処理を行うと、耐凍性の増大が抑制されること [$LT_{50} = -5.7^{\circ}\text{C}$ (キャベツ) および -5°C

(アスパラガス)」が明らかになった。

さらに、キャベツ葉柄組織の糖含量は、PCMBsを添加したソルビトール高濃度 (0.8M) 溶液による糖外与処理を1時間行った場合 (180 μ mol/gFW) には、ソルビトール高濃度 (0.8M) 溶液浸漬による糖外与処理を1時間行った場合 (240 μ mol/gFW) より減少することが明らかになった。しかし、共焦点レーザー顕微鏡観察によると、fluid-phase endocytosisによる糖の取込みがソルビトール溶液へのPCMBsの添加により抑制されなかったことから、主として組織の耐凍性増大に寄与しているのは、糖輸送体を介して細胞質中に取り込まれる糖であることが明らかになった。

3. 糖外与野菜組織における糖含量および耐凍性の変動と細胞構造の変化

(1) 野菜組織・細胞への糖外与処理 (高濃度糖溶液浸漬法) における糖の種類、濃度および処理時間と耐凍性向上との関連

キャベツ葉肉組織を用い、各種の糖 (グルコース, ガラクトース, スクロース, マルトース, ソルビトール, マンニトール) を1.0Mの濃度で添加した溶液中での糖外与処理を10分間行った場合の耐凍性の変化について、電解質漏出法により調べたところ、マンニトール以外の各糖については、ほぼ同等の耐凍性増大効果が認められ、最大耐凍性は、 $-16^{\circ}\text{C} \geq \text{LT}_{50} \geq -17.5^{\circ}\text{C}$ となった。

耐凍性増大に対して最大の効果を示した1.0Mグルコース溶液を用いてキャベツ葉肉組織に糖外与処理を行うと、処理開始10分後から3時間後に最大の耐凍性 ($-17.5^{\circ}\text{C} \geq \text{LT}_{50} \geq -18^{\circ}\text{C}$) が得られたが、10分後に得られた最大耐凍性は、その後の試料の水洗により消失して $\text{LT}_{50} = -5^{\circ}\text{C}$ となったのに対し、3時間後に得られた最大耐凍性は、水洗後でもほとんど低下しなかった ($\text{LT}_{50} = -16.3^{\circ}\text{C}$) ことから、短時間糖外与処理によって起こる試料耐凍性の増大は、細胞の表面、細胞間中層ならびに細胞膜と細胞壁の間に存在する、いわゆる細胞外の糖の働きによるものと推測される。

(2) 野菜組織・細胞に対する糖外与処理（高濃度糖溶液浸漬法）の 時間と糖取込み量との関連

キャベツ葉肉組織に対して1.0Mグルコース溶液浸漬による糖外与処理を行ったのち水洗を行うことにより、糖含量に及ぼす糖外与処理後の水洗の影響について調べたところ、水洗前後においてグルコース含量が著しく変化することが明らかになった。組織内のグルコース含量は、当初50 μ mol/gFWであったが、糖外与処理10分後には著しく増加し（200 μ mol/gFW）、3時間後にはさらに増加した（370 μ mol/gFW）。しかし、それは、糖外与処理開始10分後の試料を水洗した場合には著しく減少し（80 μ mol/gFW）、糖外与処理3時間後の試料を水洗した場合には、減少したものの大量に残存していた（160 μ mol/gFW）ことから、10分間という短い時間の糖外与処理では、キャベツ葉肉組織の細胞質中にグルコースがほとんど取り込まれていないことが明らかになった。すなわち、キャベツ葉肉組織でみられた短時間糖外与処理による耐凍性増大効果が、細胞質中に取り込まれていない細胞外の糖（細胞間中層ならびに細胞膜と細胞壁の間に存在する糖）による効果であることが明らかになった。

(3) 短時間糖外与処理（高濃度糖溶液浸漬法）後の組織・細胞の

凍結過程における構造変化と融解後における生存性向上との関連

キャベツ葉肉組織を用い、細胞構造に及ぼす凍結の影響についてCryo-SEM [Cryo-unitを装着した走査電子顕微鏡 (scanning electron microscope)] により調べたところ、糖外与処理を行っていない未処理試料を-10℃まで凍結した場合には、著しく変形、収縮した細胞が観察され、細胞中のある箇所では、密着している細胞壁間で原形質膜同士が密着している様子が確認されたのに対し、10分間の1.0Mグルコース溶液処理後に-20℃まで凍結したキャベツ葉肉組織では、細胞壁と原形質膜の間 (periprotoplasmic space) に糖溶液が存在する細胞が多くみられ、凍結による細胞の変形・収縮は軽減されており、原形質膜同士が密着している箇所はみられなかった。フリーズ・フラクチャー・レプリカ法により原形質膜破断面を観察したところ、生体膜同士の異常接近が原

因となるaparticulate domains (ADs)およびそれに伴うfracture-jump lesions (FJLs)などの構造変化が、未処理試料ならびに糖外与処理後に水洗した試料よりも、前述のように糖外与処理を行った試料においてはるかに少なかったことから、短時間糖外与処理の耐凍性増大効果は、細胞の著しい変形・収縮を原形質分離により軽減し、凍結時における生体膜同士の異常接近を回避させて、凍結傷害の発生を緩和するものと考えられる。

(4) 野菜組織・細胞の凍結に伴う生存性の変動および構造変化と 細胞壁の有無との相互関連に関する組織-プロトプラスト 実験系による検証

キャベツ葉肉組織および葉肉組織由来プロトプラストの耐凍性を電解質漏出法により比較したところ、プロトプラストの耐凍性が組織のそれを大きく上回ることが明らかになったことから、細胞壁の存在が凍結傷害の発生を助長しているものと推測される。 -30°C で凍結した組織およびプロトプラストをCryo-SEMにより観察したところ、葉肉組織では、細胞外氷晶の圧迫により細胞壁が著しく変形し、原形質膜同士が異常接近していたが、プロトプラストでは、変形の程度は緩和され、原形質膜同士の密着が起きないことが明らかになり、凍結傷害の原因は、凍結時の細胞外氷晶の成長による細胞壁の変形であるとする前述の結果が実証された。

4. 野菜茎頂の培養による凍結前糖外与処理（糖前培養）と含水率、

糖含量および耐凍性の変動ならびに細胞内小器官および原形質膜
超微細構造の変化

(1) 培養法による長時間糖外与処理（糖前培養）後の野菜組織に おける含水率、糖含量および耐凍性の変化

アスパラガスの若茎頭部小側枝茎頂を用い、含水率、糖含量および耐凍性に及

ばす0.5Mグルコース添加培地での2日間の糖前培養〔凍結保存（緩速予備凍結法）の際の凍結前処理として用いられる〕の影響について調べた。さらに、低温馴化によって起こる糖の増加の意義について探究するために、2日間の糖前培養を行った試料と0℃で20日間の低温処理を行った試料の含水率、糖含量および耐凍性を比較した。

糖外与処理を行わない未処理試料の含水率（89％）は、糖前培養により低下し（77％）、20日間の低温処理（0℃）を行った試料でも含水率の低下が認められた（85％）。

糖前培養または低温処理を行った試料の全糖含量およびデンプン含量の変化について調べたところ、全糖含量は、未処理試料の38 μ mol/gFWから、糖前培養により222 μ mol/gFWまで増加し、一方、低温処理により156 μ mol/gFWまで増加した。デンプン含量についても、糖前培養試料および低温処理試料の両者において、増加する傾向が認められた。

糖前培養および低温処理による試料の耐凍性の変化を再生培養法により調べたところ、未処理試料ではLT₅₀=-5.7℃であったのに対し、糖前培養試料ではLT₅₀=-21.3℃と変化し、耐凍性の著しい増大が認められた。また、低温処理試料の耐凍性も増大した（LT₅₀=-21.1℃）。これらの事実から、含水率の低下および糖含量の増加（浸透価の上昇）と耐凍性とは密接に関連していると推測される。

（2）培養法による長時間糖外与処理（糖前培養）後の野菜組織・

細胞における細胞内小器官の構造変化

アスパラガスの若茎頭部小側枝茎頂の頂端分裂組織を対象として、グルコース高濃度（0.5M）添加培地での2日間の前培養および20日間の低温処理を行った場合における細胞内小器官の構造変化について超薄切片法により調べた。糖前培養試料では、葉緑体の大型化、デンプン顆粒の集積、粗面小胞体の発達など、細胞内小器官の著しい構造変化が認められた。また、低温処理試料においても、葉緑体の大型化など、糖前培養試料と似た構造変化が観察された。特に、小胞体、ミトコンドリアなどの細胞内小器官の数的変動については、低温処理試料と糖前培養試料とは酷似していた。これらのことから、低温処理試料でみられ

る構造変化と内生的に増加した糖の働きとの間に関連があるものと思われる。

(3) 培養法による長時間糖外与処理後の野菜組織・細胞の凍結過程における原形質膜超微細構造の変化と融解後の生存性向上との関連

アスパラガス若茎頭部小側枝茎頂に対してグルコース高濃度 (0.5M) 添加培地での2日間の前培養または20日間の低温処理を行ったのち、頂端分裂組織細胞を対象として、フリーズフラクチャー・レプリカ法により、凍結過程における原形質膜超微細構造の変化について調べたところ、これらの試料では、生体膜同士の異常接近が原因とされるADsとそれに伴うFJLsなどの構造変化が、はるかに低い温度域においても抑制されていた。このことから、糖外与処理中に細胞質中に取り込まれた糖、または低温処理中に内生的に増加した糖が、生体膜間のスペーサーとしてはたらき、凍結時における原形質膜同士の異常接近を回避させ、原形質膜の凍結傷害を抑制するものと考えられる。

5. 培養細胞に対する糖外与処理または低温処理と耐凍性、糖含量およびタンパク質の変化

(1) *embryogenic callus*における耐凍性の変化と糖外与処理または低温処理との関連

アスパラガス [品種・メリーワシントン 500W (MW500W) および培養系・Y6クローン (Y6C)] およびサツマイモ (品種・台農10号) 由来の*embryogenic callus*に対してスクロース高濃度 (0.8M) 添加培地での培養による糖外与処理を行い、耐凍性の変化について調べたところ、アスパラガスMW500W由来の*embryogenic callus*が、糖外与処理開始2日後に最大の耐凍性 ($LT_{50} = -25^{\circ}\text{C}$) を獲得することが明らかになった (アスパラガスY6C培養系由来のものでは $LT_{50} = -22^{\circ}\text{C}$, サツマイモ台農10号由来のものでは $LT_{50} = -8^{\circ}\text{C}$)。これらの耐凍性は、糖外与処理開始8日後まで維持されたのち急激に低下した。アスパラガス

MW500W由来のembryogenic callusの耐凍性は、糖外与処理によって著しく増大したが、低温処理によってはほとんど増大しなかった。

(2) *embryogenic callus*における糖含量の変化と糖外与処理

または低温処理との関連

アスパラガスMW500W由来のembryogenic callusを用い、糖含量に及ぼす糖外与処理および低温処理の影響について調べた。糖外与処理試料では、スクロース高濃度 (0.8M) 添加培地を用いて培養すると、糖外与処理開始1日後から糖含量が増加し (fluid-phase endocytosisによる糖の取込みが観察され、糖輸送体による取込みも起っていると思われる)、2週間後まで高い値を維持したが、低温処理 [4℃ (12時間) / 2℃ (12時間)、2週間] を行った試料の糖含量はほとんど変動しなかった。このことおよび(1)で述べたことから、試料内糖含量が耐凍性に関与していると考えられる。

(3) 糖外与処理または低温処理後の*embryogenic callus*における

細胞内微細構造の変化

アスパラガスMW500W由来のembryogenic callusを用い、スクロース高濃度 (0.8M) 添加培地による培養で糖外与処理および低温処理 [4℃ (12時間) / 2℃ (12時間)、2週間] を行った場合の細胞内超微細構造の変化について超薄切片法により調べた。糖外与処理試料の細胞では原形質分離が起こり、細胞質には小胞状構造が観察されたが、低温処理試料では、このような細胞内における微細な構造的変化は観察されなかったことから、耐凍性と細胞内微細構造変化との間には密接な関連があると考えられる。

(4) 糖外与処理または低温処理後の*embryogenic callus*における

タンパク質の変化

アスパラガスMW500W由来のembryogenic callusを用い、スクロース高濃度 (0.8M) 添加培地での培養による糖外与処理を行った場合、または低温処理 [4℃ (12時間) / 2℃ (12時間)、2週間] を行った場合におけるタンパク

質含量および組成の変化について調べた。量的変化についてみると、糖外与処理試料では、可溶性タンパク質含量が著しく増加したが、低温処理試料では、有意な変化は認められなかった。一方、膜タンパク質については、糖外与処理試料および低温処理試料の両者において、量的変化はほとんど認められなかった。

次に、可溶性タンパク質の組成変化についてみると、糖外与処理試料では、主として42、35、30、26.5、24.5、18.5、16.5kDの7種の可溶性タンパク質が糖外与処理中に増加し、そのうちの42、26.5、24.5、18.5kDの4種の熱安定性タンパク質については、LEAタンパク質（植物の耐凍性および耐乾性の獲得に関与していると考えられている）の一つであるdehydrinの抗体と交叉したことから、アスパラガスMW500W由来のembryogenic callusでみられた糖外与処理の耐凍性増大効果には、細胞質中に取り込まれた糖の効果に加えて、外液からの浸透圧刺激によって誘導されたタンパク質の補助的な効果が加わっていると推測される。

このように、植物組織・細胞に対して高濃度糖溶液による糖外与処理を行うと凍害防御効果が現れ、その効果としては、従来考えられていた細胞質中に取り込まれた糖による直接的な効果のほかに、外液の高浸透圧によって誘起される原形質分離による効果、ならびに浸透圧刺激によって誘導されたタンパク質による補助的効果などがあり、これらが複合的に試料の耐凍性を高めていることが明らかになった。

本研究において明らかになった事象および得られた知見は、野菜遺伝資源をはじめとする植物遺伝資源の凍結保存技術を確立し発展させるための基礎として、重要な役割を果たすものと考えられる。

謝 辞

本論文の作成に当たり終始懇篤なる御教示を賜わるとともに御査閲の労を賜わった北海道大学大学院農学研究科教授原田 隆博士ならびに同研究科教授千葉誠哉博士に対し深甚なる感謝の意を表します。また、本研究の遂行に当たり終始懇切なる御指導を賜わるとともに、本論文の作成に当たり多大なる御教示と御査閲の労を賜わった北海道大学低温科学研究所助教授藤川清三博士に対し、心から厚く御礼申し上げます。

北海道大学名誉教授吉田静夫博士には、研究を行うに当たり多くの御教示ならびに御鞭撻を賜わるとともに、論文作成に当たり数々の御教示を賜わりました。ここに記して厚く御礼申し上げる次第です。

また、本研究を遂行するに際し、実験方法について御指導いただくとともに、有益な御助言を賜わった北海道大学大学院農学研究科助手鈴木 卓博士、北海道大学低温科学研究所助手荒川圭太博士ならびに日本学術振興会特別研究員黒田克史博士に謹んで感謝の意を表します。さらに、これまで多くの有益な御助言を賜わるとともに、種々御協力いただいた北海道大学大学院農学研究科助教授増田 清博士、北海道大学低温科学研究所助手竹澤大輔博士に心から厚く御礼申し上げます。

また、広島県立農業技術センター生物工学研究所甲村浩之技師および鹿児島県バイオテクノロジー研究所下西 恵技師には、貴重な植物材料を快く提供していただきました。ここに謹んで感謝の意を表します。

なお、本研究の遂行に当たり、次の方々から御協力と御激励をいただきました。北海道大学農学部笠井 登技官、同小野朋子事務官、農学部附属農場田村春人技官、ならびに北海道大学低温科学研究所大学院生諸氏および北海道大学大学院農学研究科園芸学分野大学院生諸氏。ここに記して、各位に対し心から厚く御礼申し上げる次第です。

参考文献

- Arora, R. and Wisniewski, M. E. (1994) Cold acclimation in genetically related (sibling) deciduous and evergreen peach (*Prunus persica* (L.) Batsch). II. A 60-kilodalton bark protein in cold acclimated tissues of peach is heat-stable and related to the dehydrin family of proteins. *Plant Physiol.* 105: 95-101.
- 阿曾弘一・隅田幸男 編 (1983) 低温医学. 朝倉書店. 東京.
- Bannier, L. J. and Steponkus, P. L. (1976) Cold acclimation of *Chrysanthemum* callus cultures. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 101: 409-412.
- Bartolo, M. E., Wallner, S. J. and Ketchum, R. E. (1987) Comparison of freezing tolerance in cultured plant cells and their respective protoplasts. *Cryobiology*, 24: 53-57.
- Beruter, J. and Studer-Feusi, M. E. (1995) Comparison of sorbitol transport in excised tissue discs and cortex tissue of intact apple fruit. *J. Plant Physiol.*, 146: 95-102.
- Blakesley, D., Mazrooei, S., Bhatti, M. H. and Henshaw, G. G. (1996) Cryopreservation of non-encapsulated embryogenic tissue of sweet potato (*Ipomoea batatas*). *Plant Cell Reports*, 15: 873-876.
- Blakesley, D., Percival, T., Bhatti, M. H. and Henshaw, G. G. (1997) A simplified protocol for cryopreservation of embryogenic tissue of sweet potato (*Ipomoea batatas* (L) Lam) utilizing sucrose preculture only. *Cryo-letters*, 18: 77-80.
- Bourquin, S., Bonnemain, J. L. and Delrot, S. (1990) Inhibition of loading ^{14}C assimilates by p-chloromercuribenzenesulfonic acid. *Plant Physiol.*, 92: 97-102.
- Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72: 248-254.
- Brown, M. M. Hall, J. L. and Ho, L. C. (1997) Sugar uptake by protoplast isolated from tomato fruit tissues during various stages of fruit growth. *Physiol. Plant.* 101: 533-539.
- Close, T. J., Kortt, A. and Chandler, P. M. (1989) A cDNA-based comparison of dehydration-induced proteins (dehydrins) in barley and corn. *Plant Mol. Biol.*, 13: 95-108.
- Crowe, J. H., Crowe, L. M., Carpenter, J. F., Rudolph, A. S., Wistrom, C. A., Spargo, B. J. and Anchordoguy, T. J. (1988) Interactions of sugars with membranes. *Biochem. Biophys. Acta*, 947: 367-384.
- Crowe, J. H. and Crowe, L. M. (1984) Effects of dehydration on membranes and membrane stabilization at low water activities. In *Biological Membranes*. ed., Chapman, D. Academic Press, New York/London. pp. 57-103.

- Dure, L. III., Crouch, M., Harada, J., Ho, T.-H., Mundy, J., Quatrano, R., Thomas, T. and Sung, Z. R. (1989) Common amino acid sequence domains among the Lea proteins of higher plants. *Plant Mol. Biol.* 12: 475-486.
- Dure, L. III., (1993) In "Plant responses to cellular dehydration during environmental stress", ed. Close, T. J. and Bray, E. A., American Society of Plant Physiologists, pp.91-103.
- Finkle, B. J., Zavala, M. E. and Ulrich, J. M. (1985) Cryoprotective compounds in the viable freezing of plant tissues. In *Cryopreservation of Plant Cells and Organs.* ed. Kartha, K. K., CRC Press, Florida. pp. 75-113.
- Fowler, D. B., Gusta, L. V. and Tyler, N. J. (1981) Selection for winter hardiness in wheat and screening methods. *Crop Sci.*, 21: 896-901.
- Francisco, P. A. and Francois, L. (1995) Sucrose and proline accumulation and sugar efflux in tomato leaf discs affected by NaCl and polyethylene glycol 6000 iso-osmotic stress. *Plant Sci.*, 107: 9-15.
- Fujikawa, S. and Miura, K. (1986) Ultrastructural preservation of plasma membranes by non-lethal slow freezing to liquid nitrogen temperature. *Cell Struc. Func.*, 12: 63-72.
- Fujikawa, S. (1988) Artificial biological membrane ultrastructural changes caused by freezing. *Electron Microsc. Rev.*, 1: 113-140.
- Fujikawa, S. (1991) Freeze-fracture techniques. In *Electron Microscopy in Biology-A Practical Approach.* Harris, J. R. ed., IRL Press, Oxford. pp.173-201.
- Fujikawa, S. (1995) A freeze-fracture study designed to clarify the mechanisms of freezing injury due to the freezing-induced close apposition of membranes in cortical parenchyma cells of mulberry. *Cryobiology*, 32: 444-454.
- Fujikawa, S. and Steponkus, P. L. (1990) Freeze-induced alterations in the ultrastructure of the plasma membrane of rye protoplasts isolated from cold-acclimated leaves. *Cryobiology*, 27: 665-666.
- Fujikawa, S., Jitsuyama, Y. and Kuroda, K. (1999) Determination of the role of cold acclimation-induced diverse intracellular and extracellular changes in plant cells from the viewpoint of avoidance of freezing injury. *JPR Symposium*, in press.
- 藤川清三・鈴木俊明・石川豊治・桜井滋賢・長谷川与一 (1988) Cryo-SEM 像, フリーズレプリカ像を連続撮影するための NEW CRYOUNIT の開発とその応用. 凍結および乾燥研究会会誌, 34: 32-38.
- Getz, H. P. and Klein, M. (1995) Characteristics of sucrose transport and sucrose-induced H^+ transport on the tonoplast of red beet (*Beta vulgaris* L.) storage tissue. *Plant Physiol.*, 107: 459-467.
- Goday, A., Jensen, A. B., Culianez-Macia, F. A., Alba, M. M., Figueras, M., Serratos, J.,

- Torrento, M. and Pages, M. The maize abscisic acid-responsive protein Rab17 is located in the nucleus and interacts with nuclear localization signals. (1994) *Plant Cell*, 6(3): 351-360
- Gordon-Kamm, W. F. and Steponkus, P. L. (1984) The behavior of the plasmamembrane following osmotic concentration of isolated protoplasts : Implications in freezing injury. *Protoplasma*, 133: 83-94.
- Grout, B. W. W., Westcott, R. J. and Henshaw, G. G. (1978) Survival of shoot meristems of tomato seedlings frozen in liquid nitrogen. *Cryobiology*, 15: 478-483.
- Gusta, L. V. (1996) Low-temperature stress tolerance: the role of abscisic acid, sugars, and heat-stable proteins. *Hort. Sci.* 31(1): 39-46.
- Guy, C. L., Niemi, K. J. and Brambl, R. (1985) Altered gene expression during cold acclimation of spinach. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82: 3673-3677.
- Guy, C. L. (1990) Cold acclimation and freezing stress tolerance: role of protein metabolism. *In Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 41: 187-223.
- Hare, P. D., Cress, W. A. and Staden, J. V. (1998) Dissecting the role of osmolyte accumulation during stress. *Plant, Cell and Environment*, 21: 535-553.
- Hirsh, A. G., Williams, R. J. and Meryman, H. T. (1985) A novel method of natural cryoprotection: intracellular grass formation in deeply frozen *Populus*. *Plant Physiol.*, 79: 41-56.
- Hatanaka, T., Tasuda, T., Yamaguchi, T. and Sakai, A. (1994) Direct regrowth of encapsulated somatic embryos of coffee (*Coffea canephora*) after cooling in liquid nitrogen. *Cryo-letters*, 15: 47-52.
- Hepler, P. K. (1981) The structure of the endoplasmic reticulum revealed by osmium tetroxide-potassium ferricyanide staining. *Eur. J. Cell Biol.*, 26: 102-110.
- Hillmer, S., Hedrich, R., Robert-Nicoud, M. and Robinson, D. G. (1990) Uptake of lucifer yellow CH in leaves of *Commelina communis* is mediated by endocytosis. *Protoplasma*, 158: 142-148.
- Hincha, D. K., Heber, U. and Schmitt, J. M. (1990) Proteins from frost-hardy leaves protect thylakoids against mechanical freeze-thaw damage *in vitro*. *Planta*, 180: 416-419.
- 稲葉 彰・原田 隆・八鍬利郎 (1984) アスパラガス若茎小側枝茎頂の凍結保存. 北海道園芸談話会. 18: 68-69.
- 今井亮三 (1996) 植物のストレス耐性と LEA タンパク質. *生物と化学*, 34(5): 294-303.
- Imai, R., Chang, L., Ohta, A., Bray, E. A. and Takagi, M. (1996) A lea-class gene of tomato confers salt and freezing tolerance when expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*, 170: 243-248.

Jeremias, K. (1958) Über den jahresgang einiger zucker in den blättern von *Hedera helix* L.. Planta, 52: 195-205.

Joachim, S. and Robinson, D. G. (1984) Endocytosis of cationic ferritin by bean leaf protoplasts. Eur. J. Cell Biol., 34: 212-216.

金子 学・鈴木 卓・原田 隆・八鍬利郎 (1992) アスパラガス茎頂の凍結生存性ならびに糖および水分含量に及ぼす前培養の影響. 園学雑, 61(1): 236-237.

Kartha, K. K., Leung, N. L. and Gamborg, O. L. (1979) Freeze-preservation of pea meristems in liquid nitrogen and subsequent plant regeneration. Plant Sci. Lett., 15: 7-15.

Kartha, K. K., Leung, N. L. and Pahl, K. (1980) Cryopreservation of strawberry meristems and mass propagation of plantlets. J. Amer. Soc. Hort. Sci., 105: 481-484.

Kartha, K. K., Leung, N., Laprie, P. G. and Constable, F. (1982) Cryopreservation of periwinkle, *Catharanthus roseus* cells cultured in vitro. Plant Cell Rep., 1: 135-138.

柏田 豊 (1955) 桑の炭水化物に関する研究 (Ⅲ). 桑条の遊離糖の時期的変化. 日蚕誌. 24: 76-79.

Koch, K. E. (1996) Carbohydrate-modulated gene expression in plants. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 47: 509-549.

Koster, K. L. and Lynch, D. V. (1992) Solute accumulation and compartmentation during the cold acclimation of puma rye. Plant Physiol., 98: 108-113.

Krishna, P., Sacco, M., Cherutti, J. F. and Hill, S. (1995) Cold-induced accumulation of *hsp 90* transcripts in *Brassica napus*. Plant Physiol. 107: 915-923.

Kumu, Y., Harada, T. and Yakuwa, T. (1983) Development of a whole plant from a shoot tip of *Asparagus officinalis* L. frozen down to -196°C. J. Fac. Agr. Hokkaido univ., 61(3): 285-294.

Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 227: 680-685.

Le Saint, A. M. (1969) Comparison of free protein and soluble carbohydrates levels in relation to the unequal sensitivity to freezing of the *Savoy cabbage* cv. "Pontoise". C. R. Acad. Sci. (Paris), D268: 310-313.

Leslie, S. B., Israeri, E., Lighthart, B., Crowe, J. H. and Crowe, L. M. (1995) Treharose and sucrose protect both membranes and proteins in intact bacteria during drying. Appl. Environ. Microbiol., 61(10): 3592-3597.

Lee-Stadelmann, O. Y. and Stadelmann, E. J. (1989) Plasmolysis and deplasmolysis. Meth. Enzymol. 174: 225-247.

- Leborgne, N., Teulieres, C., Travert, S., Rols, M. P. teissie, J. and Boudet, A. M. (1995) Introduction of specific carbohydrates into *Eucalyptus gunnii* cells increases their freezing tolerance. *Eur. J. Biochem.*, 229: 710-717.
- Levitt, J. (1980) *In Response of plants to environmental stress, chilling, freezing and high temperatures*. 2nd ed. Vol. 1. Academic, New York.
- Lilius, G., Holmberg, N. and Bulow, L. (1996) Enhanced NaCl stress tolerance in transgenic tobacco expressing bacterial choline dehydrogenase. *Bio / Technology*, 14, 177-180.
- Lineberger, R. D. and Steponkus, P. L. (1980) Cryoprotection by glucose, sucrose, and raffinose to chloroplast thylakoids. *Plant Physiol.*, 65: 298-304.
- Lovelock, J. E. (1953) The mechanism of protective action of glycerol against hemolysis by freezing and thawing. *Biochem. Biophys. Acta.*, 11: 28-36.
- Maddox, A. D., Gonsalves, F. and Shields, R. (1982/83) Successful preservation of suspension cultures of three *nicotiana* species at the temperature of liquid nitrogen. *Plant Sci. Lett.*, 28: 157-162.
- Malaurie, B., Trouslot, M.F., Engelmann, F. and Chabrillange, N. (1998) Effect of pretreatment conditions on the cryopreservation of in vitro-cultured yam (*Dioscorea alata* 'Brazo Fuerte' and *D. bulbifera* 'Noumea Imboro') shoot apices by encapsulation-dehydration. *Cryo-Letters*, 19: 15-26.
- Marquat, C., Pétel, G. and Gendraud, M. (1997) Saccharose and sorbitol transporters from plasmalemma membrane vesicles of peach tree leaves. *Biologia Plantarum*, 39 (3): 367-378.
- Matsumoto, T. and Sakai, A. (1998) A novel preculturing for enhancing the survival of in vitro-grown meristems of wasabi (*Wasabia japonica*) cooled to -196°C by vitrification. *Cryo-Letters*, 19: 27-36.
- Meryman, H. T., Williams, R. J. and Douglas, M. S. J. (1977) Freezing injury from "solution effects" and its prevention by natural or artificial cryoprotection. *Cryobiology*, 14: 287-302.
- Miyashita, S., Kunihiro, Y., Ngamine, T. and Shirata, K. (1998) *In vitro* conservation in the Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries Gene bank, Japan. JIRCAS/IPGRI joint international workshop, Cryopreservation of tropical plant Germplasm. on the poster session.
- Monica, A. H. and Dunn, M. A. (1996) The molecular biology of plant acclimation to low temperature. *J. Exp. Bot.* 47(296): 291-305.
- Mundy, J. and Chua, N-H. (1988) Absciscic acid and water-stress induced the expression of a novel rice gene. *EMBO J.* 7: 2279-2286.
- Murai and Yoshida (1998) Evidence for the cell wall involvement in temporal changes in freezing tolerance of jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) tubers during cold

acclimation. *Plant and Cell Physiol.*, 39(1): 97-105.

村勢則郎 (1994) 水の低温物理化学と生物. *日本食品工業学会誌*, 41(9): 646-651.

Murashige, T. and Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, 15: 473-497.

Muthalif, M. M. and Rowland, L. J. (1994) Identification of dehydrin-like proteins responsive to chilling in floral buds of blueberry. *Plant Physiol.* 104: 1439-1447.

Niino, T., Sakai, A., Yakuwa, H. and Nojiri, K. (1992) Cryopreservation of in vitro-grown shoot tips of apple and pear by vitrification. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 28: 261-266.

Niino, T., Tashiro, K., Suzuki, M., Ohuchi, S., Magoshi, J. and Akihami, T. (1997) Cryopreservation of in vitro grown shoot tips of cherry and sweet cherry by one-step vitrification. *Scientia Horticulturae*, 70: 155-163.

新野孝男・酒井 昭・八鍬春美・野尻邦雄 (1991) ナシの培養茎頂のビトリフィケーション法による液体窒素保存. *園芸学会雑誌*, 60(2): 164-165.

Oparka, K. J., Prior, D. A. M. and Harris, N. (1990) Osmotic induction of fluid-phase endocytosis in onion epidermal cells. *Planta*, 180: 555-561.

Palta, J. P., Levitt, J. and Stadelmann, E. J. (1977) Freezing injury in onion bulb cells. *Plant Physiol.*, 60: 393-397.

Palta, J. P. and Stadelmann, E. J. (1983) Vacuolated plant cells as ideal as mometers. Reversibility and limits of plasmolysis and estimation of protoplasm volume in control and water stress tolerant cells. *Plant Cell Environ.*, 6: 601-610.

Panis, B., Totte, N., Nimmen, K. V., Withers, L. A. and Swennen, R. (1996) Cryopreservation of banana (*Musa* spp.) meristem cultures after preculture on sucrose. *Plant Sci.*, 121: 95-106.

Parker, J. (1959) Seasonal variations in sugars of conifers with some observations on cold resistance. *Forest Sci.*, 5: 56-63.

Pearce, R. S. and Willison, J. H. M. (1985) A freeze-etch study of the effects of extracellular freezing on cellular membranes of wheat. *Planta*, 163: 304-316.

Phunchindawan, M., Hirata, K., Sakai, A. and Miyamoto, K. (1997) Cryopreservation of encapsulated shoot primordia induced in horseradish (*Armoracia rusticana*) hairy root cultures. *Plant Cell Rep.* 16: 469-473.

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.

Reid, J. L., Evarard, J. D., Diani, J., Loescher, W. H., Walker-Simmons, M. K. (1992) Production of polyclonal antibodies in rabbits is simplified using perforated plastic golf balls. *Bio. Techniques* 12: 661-666.

Reid, J. L. and Walker-Simmons, M. K. (1993) Group 3 late embryogenesis abundant proteins in desiccation-tolerant seedlings of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Physiol.* 102: 125-131.

Reinhold, P. J., Iren F. V. and Kijne, J. W. (1996) Preculture of tobacco suspension cells with mannitol induces changes related to osmostress and tolerance to cryopreservation by vitrification. *In* Phd 'Cryopreservation of tobacco suspension cells by vitrification.'

Ristic, Z. and Ashworth, E. N. (1993) Changes in leaf ultrastructure and carbohydrates in *Arabidopsis thaliana* L. (Heyn) cv. Columbia during rapid cold acclimation. *Protoplasma*, 172: 111-123.

Sakai, A. (1960) Survival of the twig of woody plants at -196°C. *Nature*, 185: 393-394.

Sakai, A. (1985) Cryopreservation of shoot-tips of fruit trees and herbaceous plants. *In* Cryopreservation of Plant Cells and Organs. ed. Kartha, K. K., CRC Press, Florida. pp. 135-158.

Sakai, A. and Larcher, W. eds. (1987) *In* Frost survival of plants. Response and adaptation to freezing stress. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, London, Tokyo.

Sakai, A. and Sugawara, Y. (1973) Survival of poplar callus at super-low temperature after cold acclimation. *Plant and Cell Physiol.*, 14: 1201-1204.

Sakai, A. and Yoshida, S. (1968) The role of sugar and related compounds in variations of freezing resistance. *Cryobiology*, 5(3): 160-174.

酒井 昭 (1956) 超低温における植物組織の生存. 低温科学. 生物篇. 14:17-23.

酒井 昭 編 (1987) 凍結保存. 凍結保存—動物・植物・微生物—. 朝倉書店. 東京.

酒井 昭 (1960) 木本類の耐凍性増大の過程.VII.糖類の季節変化 (2) 低温科学, 生物篇. 18: 1-13.

酒井 昭 (1961) 植物細胞の凍害の機構 I. 凍害に及ぼす媒液の影響 (1) 低温科学, 生物篇, 19: 1-16.

Sasaki, H., Ichimura, K. and Oda, M. (1996) Changes in sugar content during cold acclimation and deacclimation of cabbage seedlings. *Ann.Bot.*, 78: 365-369.

佐々木英和・市村一雄・岡田邦彦・小田雅行 (1997) キャベツ幼植物の短時間脱馴化がたい統

制と糖含量に及ぼす影響. 園芸学会雑誌, 66(1): 356-357.

Sauter, J. J. and Kloth, S. (1987) Changes in carbohydrates and ultrastructure in xylem ray cells of *Populus* in response to chilling. *Protoplasma*, 137: 45-55.

Sauter, J. J., Wisniewski, M. and Witt, W. (1996) Interrelationship between ultrastructure, sugar levels, and frost hardiness of ray parenchyma cells during frost acclimation and deacclimation in poplar (*Populus x Canadensis Moench* <robusta>) wood. *J. Plant Physiol.*, 149: 451-461.

Schnabel-Preikstas, B., Earle, E. D. and Steponkus P. L. (1992) Cryopreservation of sweet potato shoot tips by vitrification. *Cryobiology*, 29:738-739.

Seibert, M. (1976) Shoot initiation from carnation shoot apices frozen to -196°C. *Science*, 191: 1178-1179.

Seibert, M. and Wetherbee, P. J. (1977) Increased survival and differentiation of frozen herbaceous plant organ cultures through cold treatment. *Plant Physiol.*, 59: 1043-1046.

Shlafer, M. (1981) Pharmacological considerations in cryopreservation. *In* Organ preservation for transplantation. eds., Karow, A. M. Jr. and Pegg, D. E. , Marcell Dekker, New York, 177-212.

Siegel, D. P. (1986) Inverted micellar intermediates and the transitions between lamellar, cubic, and inverted hexagonal amphiphile phases. III. Isotropic and inverted cubic state formation via intermediates in transitions between $L\alpha$ and HII phases. *Chem. Phys. Lipids*, 42: 279-301.

Siminovitch, D. (1979) Protoplasts surviving freezing to -196°C and osmotic dehydration in 5 molar salt solutions prepared from the bark of winter black locust trees. *Plant Physiol.* 63:722-725.

Singh, J. (1979) Freezing of protoplasts isolated from cold-hardened and non-hardened winter rye. *Plant Sci. Letters*, 16: 195-201.

Singh, J.. and Johnson-Flanagan, A. M. (1987) Membrane alterations in winter rye and *Brassica napus* cells during lethal freezing and plasmolysis. *Plant and Cell Environ.*, 10: 163-168.

Sophie, B., Bonnenmain, J. H. and Delrot, S. (1990) Inhibition of loading of ^{14}C assimilates by p-chloromercuribenzenesulfonic acid. *Plant Physiol.*, 92: 97-102.

Sopina, N. F. and Samygin, G. A. (1993) Mechanism of protective action of plasmolysing sucrose solutions during freezing of wheat cell suspension. *Russian Plant Physiol.*, 40(4)2: 560-564.

Spurr, A. R. (1969) A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *J. Ultrastructure Research*, 26: 31-43.

Steponkus, P. L. (1984) Role of the plasma membrane in freezing injury and cold acclimation. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 35: 543-584.

Steponkus, P. L. and Lynch D. V. (1989) The behavior of large unilamellar vesicles of rye plasma membrane lipids during freeze / thaw-induced osmotic excursions. *Cryo-Letters*, 10: 43-50.

Steponkus, P. L., Langis, R. and Fujikawa, S. (1992) Cryopreservation of plant tissues by vitrification. *In Advances in Low-Temperature Biology*, Vol.1 JAI Press Ltd., pp.1-61.

Suzuki, T., Kaneko, M. and Harada, T. (1997) Increase in freezing resistance of excised shoot tips of *Asparagus officinalis* L. by preculture on sugar-rich media. *Cryobiology*, 34: 264-275.

鈴木 卓 (1993) 園芸作物組織の超低温保存に関する基礎的研究. 北海道大学農学部邦文紀要. 第十八巻. 第二号.

Switzer, R. C. III, Merril, C. R. and Shifrin, S. (1979) A highly sensitive silver stain for detecting proteins and peptides in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.*, 98: 231-237.

Roberts, J. K., Desimore, N. A., Lingle, W. L. and Dure, L. III. (1993) Cellular concentrations and uniformity of cell-type accumulation of two Lea proteins in cotton embryos. *Plant Cell*, 5(7): 769-780.

Tanchak, M. A., Griffing, L. R., Mersey, B. G. and Fowke, L. C. (1984) Endocytosis of cationized ferritin by coated vesicles of soybean protoplasts. *Planta*, 162: 481-486.

Tao, D., Li, P. H. and Carter, J. V. (1983) Role of cell wall in freezing tolerance of cultured potato cells and their protoplasts. *Physiol. Plant.*, 58: 527-532.

Thierry, C., Tessereau, H., Florin, B., Meschine, M. C. and Petiard, V. (1997) Role of sucrose for the acquisition of tolerance to cryopreservation of carrot somatic embryos. *Cryo-Letters*, 18: 283-292.

Thomashow, M. F. (1998) Role of cold-responsive genes in plant freezing tolerance. *Plant Physiol.*, 118: 1-7.

Trunova, T. I. (1963) The significance of different forms of sugars in increasing the frost resistance of the coleoptiles of winter. *Fiziol. Rast.*, 15: 103-109.

Uemura, M., Joseph, R. A. and Steponkus, P. L. (1995) Cold acclimation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.*, 109: 15-30.

Van Rensburg, L., Kruger, G. H. J. and Kruger, H. (1993) Proline accumulation as drought-tolerance selection criterion: its relationship to membrane integrity and chloroplast ultrastructure in *Nicotiana tabacum* L. *J. Plant Physiol.* 14: 188-194.

Wang, J. H., Ge, J. G., Liu, F. and Huang, C. N. (1998) Ultrastructural changes during cryopreservation of rice (*Oryza sativa* L.) embryogenic suspension cells by vitrification. *Cryo-letters*, 19: 49-54.

Wartenberg, M., Hamann, J. Pratsch, I. and Donath, E. (1992) Osmotically induced fluid-phase uptake of fluorescent markers by protoplasts of *Chenopodium album*. *Protoplasma*, 166: 61-66.

Widholm, J. M. (1972) The use of fluorescein diacetate and phenosafranine for determining viability of cultured plant cells. *Stain Tech.*, 47(4): 189-194.

Withers, L. A. (1979) Freeze preservation of somatic embryos and clonal plantlets of carrot (*Ducus carota* L.). *Plant Physiol.*, 63: 460-467.

Withers, L. A., and Street, H. E. (1977) Freeze preservation of cultured plant cells. III. The pregrowth phase. *Physiol. Plant*, 39: 171-178.

Xu, D., Duan, X., Wang, B., Hong, B., Ho, T-HD. and Wu, R. (1996) Expression of a late embryogenesis abundant protein gene, HVA1, from barley confers tolerance to water deficit and salt stress in transgenic rice. *Plant Physiol.*, 110: 249-257.

八鍬春美・岡 成美 (1987) 組織・細胞による栄養繁殖植物の遺伝資源保存 (1) . 農業および園芸. 62. 12: 1343-1347