



Title	植物の越冬と凍結抵抗性について
Author(s)	荒川, 圭太; Arakawa, Keita; 鈴木, 伸吾 他
Citation	低温科学, 83, 201-210
Issue Date	2025-03-29
DOI	https://doi.org/10.14943/lowtemsci.83.201
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/94805
Type	departmental bulletin paper
File Information	19_p201-210_LT83.pdf



植物の越冬と凍結抵抗性について

荒川 圭太¹⁾, 鈴木 伸吾²⁾

2024 年 12 月 10 日受付, 2025 年 1 月 8 日受理

植物は夏から秋にかけて成長が停止し、休眠を始める。さらに秋から冬にかけて低温馴化過程を経て凍結抵抗性が高まり、越冬が可能となる。また、冬から春にかけて気温が上昇するにつれて脱馴化過程を経ることで凍結抵抗性が低下すると共に、開芽・開葉など成長が始まる。越冬する植物にとって必要な低温馴化や凍結抵抗性の上昇などの現象は休眠過程と並行して起こるもので、多くの生理反応が関与する。本章では、越冬する植物にとって必要な低温馴化や凍結抵抗性などの生理機構や凍結に対する細胞の応答(凍結挙動)について概説する。

Title: Freezing Resistance of Overwintering Plants

Keita Arakawa¹, Shingo Suzuki²

Plants gradually stop growing in late summer and enter dormancy. From autumn to winter, plants undergo a cold acclimation process, which increases their freezing resistance, enabling them to survive the winter. As the temperature rises from winter to spring, plants undergo a deacclimation process, which reduces their freezing resistance, and they also begin to grow, with buds opening and leaves expanding. Cold acclimation and increase in freezing resistance, which are necessary for overwintering plants, occur in parallel with the dormancy process and involve a number of physiological responses. This chapter outlines the physiological mechanisms including cold acclimation and freezing resistance that are necessary for overwintering plants and the cellular response of plants to freezing.

キーワード：植物, 低温馴化, 凍結挙動, 凍結抵抗性
cold acclimation, freezing behavior, freezing resistance, plants

1. 緒言

成長に適した春や夏の季節と成長に適さない秋や冬の季節を交互に迎えるような地域に生息する植物は、こうした季節の変化に見合った生活環を示す。例えば一年生植物であれば、春に発芽した芽生えが成熟し、冬を迎える前に種子散布を終える。二年生植物であれば、実生が

越冬する際に春化し、翌春に生殖成長することで開花結実する。多年生植物の本木植物であれば、発芽したあとは複数年にわたって成長を続け、成熟してから種子散布を行うことになる。日本のように明確な季節変化がみられる環境では、夏から秋へと季節が移り変わるにつれて日長は次第に短くなり、外気温は徐々に低下するので、このような気候の変化が端緒となり、越冬する植物は成

連絡先

荒川 圭太

北海道大学 大学院農学研究院 樹木生物学研究室

〒060-8589 札幌市北区北9条西9丁目

Tel: 011-706-2516

Email: keita-ar@agr.hokudai.ac.jp

1) 北海道大学 大学院農学研究院

Research Faculty of Agriculture, Hokkaido University

Sapporo, JAPAN

2) 北海道大学 大学院歯学研究院 学術支援部

Faculty of Dental Medicine, Hokkaido University

Sapporo, JAPAN

長を止める一方で、低温馴化過程を経ることで凍結抵抗性を上昇させ、厳寒期を乗り切ることが可能となる。本章では、越冬して翌春に成長を再開するために必要な低温馴化や凍結抵抗性といった植物の生理機能に関して概説する。

2. 植物の越冬

2.1 越冬する環境 (条件) について

越冬と言っても、どのような発達段階で、どのような状態で冬を迎えるかは植物によって様々である。そのため、越冬に関する植物の生理・生態について詳しく知ることが、植物の越冬能力を理解する上でとても重要なことである (酒井 1995)。例えば、越冬する植物の発達段階 (形態) として、種子や芽生え、幼植物体 (実生、幼木)、成熟個体などが挙げられる。また、越冬する状況 (環境条件) としては、水中や土壤中、落葉層に埋もれている場合、積雪層の下に埋もれる場合、寒風にさらされている場合など、様々な状況がある。土壤中や積雪層の深くに埋もれるような場合には、外気温が低下する影響を直接的に受けにくい環境といえる。一方、積雪量が少ない地域や風が強く雪が堆積しにくいような場所、また積雪層上面よりも高い場所に位置する組織・器官などは、気温の影響を直接受けやすい環境といえる。そのため、水中や土壌深くに存在する個体や組織は凍らない程度の低温で、また積雪層下に埋まってしまうような植物個体は比較的高い氷点下温度で、さらに積雪層より高い場所に位置する植物個体や組織は厳しい凍結温度で、それぞれ越冬することになる。しかも、深い積雪層や被陰環境は、同時に日照量にも影響を及ぼしう。そのため、融雪時期の気温上昇の程度や植物が受ける光強度などは、越冬する植物の生育環境や生存率にも影響を及ぼす環境要因とみなすことができる。しかも、秋から冬、冬から春のような季節の移行期には、気温や降雪量の変化は毎年同じではないため、例年より気温低下が遅れたり時として一過的に大きい気温低下が起きたりすることで植物の成長 (停止や再開) や低温馴化・脱馴化の程度に影響が出るため、霜害や凍害を被る可能性にも影響が生じる。一方、厳寒期では、凍結抵抗性が十分に発揮された時期であるため、その凍結抵抗性の最大値に応じて凍霜害の程度が異なる。そのため、低温馴化や脱馴化の進行程度と生育環境の変動の大きさによって傷害の有無、程度が影響される。このような観点から、近年顕在化している気候変動による秋～冬、冬～春の極端な気温変化などが生産性に大きく影響することが予想される。

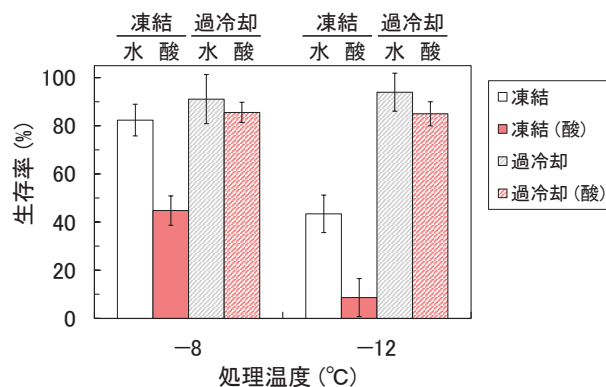


図1: 冬コムギ緑葉の凍結傷害について。

低温馴化した冬コムギの緑葉切片を酸性条件下で凍結処理もしくは過冷却処理した後で生存率を測定して、酸性雪ストレスの影響をシミュレーションした。凍結、植水して凍結処理した試験区; 過冷却、植水せずに過冷却を維持した試験区; 水、超純水を添加した試験区; 酸: 3 mM 硫酸溶液 (pH 2) を添加した試験区。この図は、Inada et al. (2006) *Plant Cell Physiol.* 47: 504–512 のFig. 3を改変して転載した。

2.2 凍結抵抗性の評価と凍結傷害

植物が有する凍結抵抗性の能力を超えるほど低い氷点下温度まで冷却されて凍結すると、凍結傷害を被る (酒井 1995, Sakai and Larcher 1987)。このように過度の凍結ストレスを受けると、例えば、凍結融解後に開芽や開葉、再成長がみられなくなったり、葉が褐変して枯死・落葉したりする。植物の凍結抵抗性を調べる際、多くの研究者が実施する試験では、様々な設定温度まで凍結させた組織を融解させた後、植物の生存率を検定する。個体レベルで生存率を検定する場合、凍結融解後の植物個体の再成長が対照区 (未凍結試料) と比べてどれだけ低下したのかを調べることが一般的である。再成長の割合をどのように判断するかは、試験の目的や試験に使用した植物試料の発達状態などによって異なるが、開芽や開葉の割合を調べたり、個体の背丈や重量などの成長量を調べたり、種子生産量を調べたりするなど、研究目的に応じて選択される。この場合、生存率の検定を終えるまでに相応の時間を要する。そのため、生存率の検定までの時間を節約して、組織や細胞レベルで生存率を検定する事例も多々みられる。凍結融解によって致命的な傷害を被ると、細胞膜を筆頭に生体膜の機能損傷が生じるため、細胞の選択的透過性が解消されてしまう。そのため、凍結融解後の組織を一定量の水に浸して緩やかに振とうするとイオンなどの細胞内容物が漏出してくる。そこで組織外の水の電気伝導率を測定し、対照区 (未凍結試料) と比べてどれだけ電気伝導率が高まったかで傷害率を算出し、その逆数をもって生存率をもとめることが

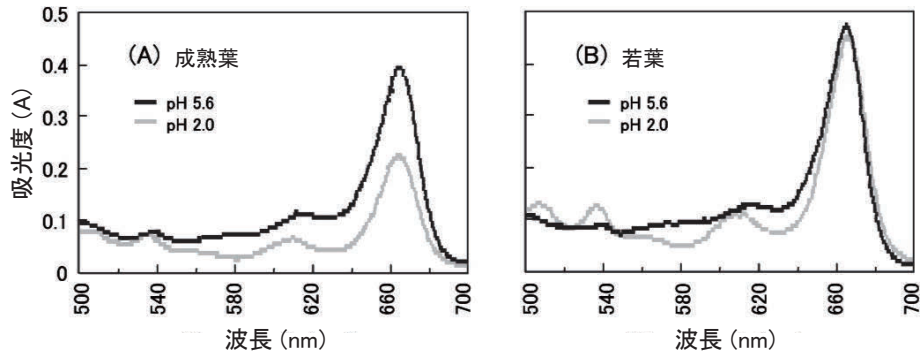


図2：凍結融解後の冬コムギ緑葉に対する光照射の影響について。

低温馴化した冬コムギ実生に3 mM 硫酸水溶液 (pH 2) を添加して酸性条件下で凍結融解することで酸性雪ストレスをシミュレーションした後、成熟葉 (A) と若葉 (B) からそれぞれクロロフィル粗抽出画分を調製し、吸収スペクトルを測定して対照区 (超純水で凍結融解した試料) 由来のものと比較した。黒色のグラフ、試験区 (pH 2.0の硫酸水溶液を使用した試料)；灰色のグラフ、対照区 (二酸化炭素を飽和させてpH 5.6にした超純水を使用した試料)。この図は、Inada et al. (2007) *Environ. Sci.*, 14 (Suppl) : 53-71のFig. 1を改変して転載した。

できる (Uemura and Yoshida 1984)。また、組織や細胞の生存率を評価するため、生命力のひとつの指標として組織や細胞が有する還元力を指標とする方法も利用されており、還元力がどの程度残存しているかを調べることで生存率を算出することが可能である (Steponkus and Lanphear 1967)。このような還元力を利用する方法では、還元力を利用して組織を染色することができるので、どの組織が健全性を保っているかを視覚的に確認することもできる。組織が染色された後、有機溶媒を使用することで還元された化合物を組織から抽出することで定量化もできる。

同様に細胞レベルで生存率を測定する方法として、細胞に基質を投与して酵素活性によって得られる化合物の有無をもって細胞の生死を判断するものもある。例えば、二酢酸フルオレセインを細胞に投与すると、細胞内のエステラーゼ活性によって分解されて蛍光を発するようになる (Murai and Yoshida 1998)。また、細胞が致死的な傷害を被るとエステラーゼ活性を損なうので蛍光を発しなくなる。そのため、蛍光を発する細胞の有無で生死判定が可能となる。草本植物の場合、プロトプラストを調製しやすいため、モデル実験として用いることがある。プロトプラストの場合、細胞壁が無いので膨張して破裂しないよう細胞の浸透圧よりもわずかに高張な溶液に細胞を懸濁しているため、外液に加える溶質 (主に糖アルコールのような適合溶質) が凍害保護効果を示して実際よりも高い凍結抵抗性を示すのではないかと心配される場合がある。そのため、利用する植物材料に応じて組織とプロトプラストの間で凍結抵抗

性に違いがないかを事前に確かめて細胞の性質を知っておく必要がある。実際、プロトプラスト化しても凍結抵抗性が組織のものと同程度であった事例が知られている場合には、プロトプラストも植物組織と同様に扱いやすいものと考えられている (Gordon-Kamm and Steponkus 1984)。一方で、プロトプラスト化することで凍結抵抗性が高まっていた事例も知られている (Murai and Yoshida 1998)。この場合には、細胞壁の除去による影響や懸濁液に利用した浸透圧調整用の溶質による影響などが原因のひとつとして考えられるので、組織切片の細胞間隙にプロトプラスト懸濁用の溶液を満たしたものをを用いて凍結抵抗性を測定するなどして、プロトプラストを懸濁する高張な溶液が凍結抵抗性に及ぼす影響を事前に評価しておく必要がある。特に、溶質による細胞膜の保護効果によって凍結による膜傷害を軽減している可能性が十分に考えられる。

元来、細胞外凍結が進行することで発生し始める凍結傷害は、細胞膜の不可逆的な構造変化の発生頻度と相関性がみられることや、凍結傷害が生じると細胞から電解質漏出が起こることなどから、細胞膜が凍結傷害の初発部位と考えられてきた (Steponkus 1984)。そのため、凍結傷害が発生する細胞膜の健全性を維持することが凍結抵抗性には重要であるという考え方に則って、低温馴化過程における細胞膜の構造的・機能的変化に注目して研究が行われてきた経緯がある。厳しい気温低下にさらされて細胞外凍結が過度に進むと、凍結脱水によって細胞が著しく収縮変形したり (Steponkus and Webb 1992)、細胞外氷晶に挟まれて押し

つぶされたりする (Fujikawa 1995). これによって細胞膜とほかの生体膜とが異常接近した部位が生じると、脂質二重膜同士で相互作用を起こして局所的に膜融合を起こすなど、不可逆的な構造変化が生じてしまう。それによって細胞膜は機能を喪失し、膜傷害が発生すると考えられている。

当研究グループでは、以前、酸性降下物を含む雪（すなわち酸性雪）による影響を、冬コムギを使ったシミュレーション実験で調べたことがある。酸性雪の場合、積雪層の下層では再結晶化によって氷晶表面や間隙に酸性降下物が濃縮され、積雪層に埋まる植物は凍結濃縮された酸性降下物と比較的長期にわたって接触する可能性が高くなるものと考えられた。そこで、低温馴化させた冬コムギ実生を用い、硫酸の希釈水溶液を凍結してから製氷機で削って得られた細氷で実生を覆ったり、少量の硫酸の希釈水溶液と共に実生や緑葉切片を凍結させたりすることで酸性雪ストレスをシミュレーションし、その影響を評価した。例えば、超純水で作った細氷で人為的に低温馴化させた冬コムギ実生を覆ったものを対照区とし、3 mM 硫酸水溶液 (pH 2) で作った細氷で覆ったものを試験区とし、両者を -4°C のフリーザーで3日間処理し、融解後に実生を通常の生育条件で栽培したところ、数日後には試験区の成熟葉で局所的に枯死した部位が観察され始め、3週間後には対照区に比べて成長量が顕著に低下していた。3 mM 硫酸水溶液 (pH 2) という結構な酸性度だと感ずるが、凝固点降下の原理にしたがって考えると、濃度の異なる溶液を同じ温度まで凍結させた場合、残存する未凍結な硫酸水溶液は凝固点に達するまで濃縮されるはずなので、処理前に硫酸水溶液の濃度が異なっている、同じ氷点下温度で処理する限り、凍結濃縮された硫酸溶液の濃度は同じになるはずである。その代わり、凍結濃縮された硫酸水溶液の体積はpH 2の処理区の方がpH 4の処理区の100倍多い計算になる。そのため、雪のpHが低いほど、氷晶と氷晶との間で凍結濃縮された硫酸溶液の量が多くなるので、植物が濃縮された硫酸水溶液と接触する頻度や範囲が多くなることが考えられる。このような凍結濃縮は酸性雪に限ることではなく、塩や重金属などでも同様のことが起こりうるため、氷点下温度で水が凍ることによって凍結濃縮された溶存物質の影響が融解後に顕在化することによる負の影響は低温下特有のストレス因子として位置付けられる。また、緑葉切片にpH 2の硫酸水溶液を添加し、植氷せずに -12°C まで過冷却させても、超純水を添加した対照区と比べ、昇温後の試料の生存率はほとんど低下しなかった。一方、植氷して酸性条件下で凍結させると、対照区と比べて融解後の試料の生存率は顕著に低下した (図1)。このことは、単なる気温低下という環

境刺激に比べ、それによって生じるアポプラストの水の凍結の方が植物細胞の凍結脱水や収縮変形を誘発し、共存する有害な溶質を凍結濃縮しうするため、越冬する植物にとっては負荷が大きいことを示唆している (Inada et al. 2006)。

また、凍結による損傷を受けた後で光照射されると、二次的な酸化傷害が発生して被害が拡大することはよく知られている。これは光合成器官を有する緑色植物にとって unavoidable 問題ともいえる。すなわち、凍結融解によって生存率 (= 生命力) の低下した緑葉が太陽光を浴びることで、消費しきれなかった光エネルギーによって活性酸素種が発生し、それによってさらなる緑葉の傷害へと繋がるのが予想される。筆者らは、冬コムギ実生に対してpH 2の酸性条件下で凍結融解処理を終えてから、光照射の有無の条件設定のもとで 10°C にて実生を栽培して酸性雪ストレス処理による影響を調べたところ、超純水で凍結融解した対照区や酸性条件下で凍結融解した直後から暗処理をおこなった試験区の成熟葉の応答とは異なり、融解直後から光照射をおこなった試験区の成熟葉では12時間以内に光化学系IIの最大量子収率 (Fv/Fm) が低下しており、24時間以内に乾燥重量や相対含水率も低下していた (Inada et al. 2007)。成熟葉から得られたクロロフィル粗抽出画分の吸収スペクトルを調べると、酸性条件下での凍結融解直後からクロロフィル分解が生じた徴候が観察されたため (図2)、その後の光照射によって成熟葉では二次的な酸化傷害が発生して損傷が大きくなった可能性が示唆された (Inada et al. 2007)。

2.3. 低温馴化

毎年冬を迎える多年生植物は、毎年成長と休眠のサイクルを繰り返す。すなわち、気温が高く成長に向いている時期と、気温が低く成長に不向きな時期が交互に訪れる。そのため、温帯や亜寒帯で自生する越冬植物は成長期と休眠期を交互に迎える。このような植物は、秋から冬にかけて日照時間が短くなるにつれ成長速度が低下して休眠期へと移行する。それと並行するように、気温が低下するにつれて低温馴化が進み、植物の凍結抵抗性は向上する。休眠と凍結抵抗性の向上はほぼ同時期に生じるが、休眠と低温馴化は異なる生理学的プロセスである (Welling and Palva 2006)。

低温馴化過程では様々な遺伝子の発現が伴う現象である。近年の網羅解析 (オミクス解析) によって、遺伝子転写産物レベル (トランスクリプトーム) (Fowler and Thomashow 2002)、遺伝子翻訳産物 (タンパク質) レベル (プロテオーム) (Kawamura and Uemura 2003)、代謝産物レベル (メタボローム) (Guy et al. 2008) などでのいろいろな植

物の低温馴化過程が調べられているように、様々なレベルで変化が生じることが明らかにされている。これらの網羅解析結果からも明らかのように、低温馴化過程では様々な変化が生じることで、結果的に凍結抵抗性が向上して植物は越冬が可能となる。

オーソドックスな研究では、越冬する草本植物として秋蒔きのコムギ (*Triticum aestivum*) (Tanino and McKersie 1985) やライムギ (*Secale cereale*) (Uemura and Steponkus 1994), ペレニアルライグラス (*Lolium perenne*) (Abeynayake et al. 2015) などのようなイネ科の単子葉植物のほか、アルファルファ (*Medicago sativa*) (Mohapatra et al. 1987), セイヨウアブラナ (*Brassica napus*) (Kubacka-Zębalska and Kacperska 1999), シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) (Gilmour et al. 1988), バレイショ (*Solanum tuberosum*) (Palta et al. 1993) などの双子葉植物を利用した研究が多くみられた。この他、木本植物ではヤマグワ (*Morus bombycis*) (Yoshida 1984) や *Cornus* (ミズキ属) (Li et al. 1966), モモ (*Prunus persica*) (Buchanan et al. 1976) などを用いた研究が知られている。例えば、季節変化に伴う細胞成分の組成変化を精査して、低温馴化による凍結抵抗性の向上と正の相関性を示す主成分に着目する研究がいくつかみられた。その主たる成分が凍結傷害の初発部位と考えられている細胞膜の膜脂質 (Uemura and Steponkus 1994) や膜タンパク質 (Kawamura and Uemura 2003) を始め、可溶性糖やLEA (Late Embryogenesis Abundant) タンパク質のような熱可溶性タンパク質群などである (Fujikawa et al. 2006)。

可溶性糖については、適合溶質として機能するといわれている。最も典型的な低温誘導性の可溶性糖はスクロースであり、多くの植物種で多量に蓄積するものとして知られている。このほか、多量ではないが、ラフィノースやスタキオースのようなラフィノース族オリゴ糖も低温誘導性の可溶性糖として検出されている。これらの糖は、種類にかかわらず多量に蓄積することで細胞内の溶質濃度が高まり、凝固点降下度が増すという利点がある。このほか、凍結脱水時には細胞内の自由水の量がかなり減少するため、これらの可溶性糖に水和している結合水が細胞内高分子の構造安定化 (凍害保護) に寄与するともいわれている。また、リポソームなどを利用した実験系では、膜脂質表面に結合した糖がガラス化を起こすことで、リポソーム同士の膜融合を阻害することも報告されている。このように、適合溶質としての可溶性糖は、濃度が高ければ浸透圧調節に関与するし、濃度が高くなくても保護物質として安定化に関与するものと考えられている。

また、細胞壁を構成する多糖類の組成の変化を示唆する

結果がいくつかの植物種で示されている。これらの変化は、細胞壁の化学的、物理的性質に影響を及ぼすため、特に細胞外凍結する細胞において、細胞壁の強度が増すことで極度の細胞の変形が防がれ、細胞膜と生体膜との間の相互作用を抑制して細胞膜の凍結傷害の発生頻度を低下させる可能性が考えられる。この他にも、細胞壁内部での氷晶の伝播の程度は細胞間隙や細胞壁内部の微小な空隙の大きさに依存することが考えられる。細胞間隙や細胞壁内部に分布するペクチンは、メチル化修飾されているとカルシウムを介したペクチン間での架橋構造が形成できないので物質の透過性が向上すると共に細胞壁の柔軟性が向上するといわれている。さらに、ペクチンのガラクトン含量を低下させると細胞壁の強度が低下傾向を示すだけでなく、凍結抵抗性も低下することがシロイヌナズナの形質転換体を用いて実証されている (Takahashi et al. 2024)。また、器官外凍結する冬芽では、凍結感受性の高い原基と細胞外氷晶を蓄積する空隙・細胞間隙との間に位置する組織において細胞壁や細胞間隙にペクチンを堆積して、原基組織への細胞外氷晶の伝播を抑制する役割を担っているとも考えられている (Kuprian et al. 2017)。そのような組織では冬を迎える前までにペクチンの蓄積が進む事例も知られており、ペクチンの化学組成や構造特性が凍結挙動に与える影響はとても興味深い。

このほか、低温馴化過程ではLEAタンパク質群の蓄積も知られている (Thomashow 1999, Welling and Palva 2006)。これらは、植物組織から得られるタンパク質の粗抽出液を沸騰水中で10～20分間くらい加熱しても熱変性による不溶化を起こしにくいという性質を表す熱可溶性タンパク質として称されている。この性質を示すものの多くは、親水性の高いものや低分子で単純な構造を有するタンパク質が多いとされている。これらのタンパク質を調べると、LEAタンパク質やHSPs (Heat Shock Proteins) の一部などが検出される。LEAタンパク質であれば、細胞内の高次構造を有する成分 (タンパク質や膜脂質) などを保護・安定化するような作用を示す報告が多い。HSPsであれば、分子シャペロン活性によって構造変化の防止や変性タンパク質の回復に貢献するものと予想される。いずれも植物細胞の凍結脱水時に細胞内成分の機能損傷を防ぐことで細胞内代謝系の酵素群や膜輸送系などの活性を維持するものとして位置付けられる (Fujikawa et al. 2006)。

また、細胞膜の脂質 (特にリン脂質) の組成変化に注目すると、凍結脱水によって細胞膜と他の生体膜とが異常接近する場合において、膜脂質の極性基に結合水が多いことは、膜脂質同士の相互作用を抑制するのに都合が

良い性質といえる。実際、極性基への結合水の多い膜脂質が低温馴化過程で増加する傾向にあった (Uemura and Steponkus 1999)。

さらに、抗酸化に関与する様々な成分も低温誘導性を示すため、酸化ストレス防止に貢献する。特に、凍結傷害を受けた組織では、光照射によって発生する活性酸素種によって凍結傷害が助長される。これは、いわゆる光傷害と同じような症状のため、抗酸化酵素などの誘導は、二次的な酸化傷害の抑制に効果的である。また、前述したような保護や安定化に関わる成分の増加は、結果的に細胞全体の保護・安定化に貢献することが期待される。さらに、光合成組織において光合成活性はストレス感受性が高い因子なので、凍結傷害の指標とみなす実験系も確立されている。光合成組織のクロロフィル励起能を調べることで地上部の凍結によるダメージを評価する研究も知られており、凍結抵抗性の指標としても用いられる事例がある (Ehlert and Hincha 2008)。

2.4. 凍結挙動

気温が低下して周囲の水が凍結するような時、植物細胞の凍結に対する応答の様式は、気温の低下に応じて平衡的に脱水する「細胞外凍結」と、気温が低下しても脱水しないもしくは脱水量が気温の低下に伴っていない「深過冷却」の2つのタイプに大きく分類される (Fujikawa 2006)。多くの草本植物や樹木の樹皮の細胞のように多くの植物細胞で見られるのは細胞外凍結である。氷点下温度に気温が低下した場合、土壌や植物体表面などで水分が凍結することがきっかけとなって植物体内の細胞外(アポプラスト)の水も凍結が始まる。土壌微粒子などの塵芥や氷核細菌などが植物体表面に付着していると、それらが核となって氷晶形成(凍結)が始まり、それがきっかけとなって気孔などを通じて植物体内のアポプラスト水まで凍結が進む。このような氷核の形成を促すような成分を氷核活性物質と呼ぶ。このような環境因子のほかにも、アポプラスト水を凍結させる植物由来の氷核活性物質が存在するという報告がある。例えば、花粉表面の多糖類 (Pummer et al. 2012) やレンギョウの枝髓から検出されたシュウ酸カルシウム一水和物 (石川ら 2016)、カツラの樹皮の細胞壁成分 (古賀ら 2021) などに凍結を促す氷核活性が検出されている。特に、枝髓から検出されたシュウ酸カルシウム一水和物やカツラ樹皮の細胞壁成分は、植物体内からアポプラスト水の凍結を誘導する可能性も考えられる。すなわち、0℃以下に気温が低下したにもかかわらず外環境由来で凍結が生じない場合でも、植物体自身が有する氷核活性によって一過的な過

冷却が解消されて細胞外凍結が始まる可能性があることを意味する。一過的な過冷却が過度に進行してから凍結するよりも少しでも高い温度で凍結が始まった方が脱水速度は緩やかになるため、最終的に脱水量が同じでも細胞にとって負荷が小さくなる。そのため、ある程度まで気温が低下すると細胞外凍結が始まるような仕組みになっていると考ええることもできそうである。

アポプラストの水は細胞内部に比べて溶質濃度が低いことや、氷核活性物質が細胞外に存在することなどの理由によって細胞外の水が凍結を始めると、細胞膜の内側の水との間で生じた蒸気圧差に応じて細胞内から細胞外へと水が移動することで細胞が脱水する(凍結脱水)。それによってさらに細胞外氷晶が大きく成長するので、脱水収縮だけでなく大きくなった細胞外氷晶によっても変形する。このような凍結脱水は、原形質分離とは異なり、細胞壁ごと細胞を潰す(サイトリシス)。能力を超えた気温低下によって過度の凍結脱水が生じると、それが原因となる著しい収縮変形が起き、細胞膜が細胞内の他の生体膜と異常接近することで両者の間で不可逆的な微細構造変化が生じて膜傷害が発生すると考えられている (Steponkus 1984)。札幌近郊のイネ科草本植物だと、LT₅₀ (50%が致死性の傷害を受ける凍結温度) は-30℃よりも高いことが多いが、同じく札幌近郊の木本植物の樹皮の柔細胞では、LT₅₀が-40℃以下のものも多くみられる。ヤマゲワの樹皮の柔細胞もその一例であり、緩速凍結で-60℃以下まで処理した後に液体窒素処理しても50%近く生き残ることが実証されている。このような非常に高い凍結抵抗性を示す理由として、小胞体 (ER) の構造変化が関与するという仮説がある。これによると、季節的な低温馴化過程でER由来の膜小胞が増加した柔細胞が比較的高い氷点下温度で細胞外凍結されると、膜小胞が融合して囊状のERが何層にも細胞膜直下に配置する多重層構造を構築することが明らかになった (Fujikawa and Takabe 1996)。季節的な低温馴化によってこのER多重層構造が構築される頻度が高くなり、季節的な脱馴化が進むほどER多重層構造がみられる頻度が低くなるため、凍結抵抗性の季節変化と正の相関性がみられた。このようなER多重層構造は、凍結抵抗性の低いシロイヌナズナでは観察されなかった。そのため、このような構造変化は樹木のように高い凍結抵抗性を有するものにみられるものであり、凍結脱水によって形成されるERの多重層構造が細胞膜の直下に配置されることで、細胞膜と内膜との直接的な相互作用を妨げるという仮説が立てられている (Fujikawa et al. 2006)。現時点では、このようなER多重層構造がみられる樹種は限られている。

一方、氷点下温度で深過冷却する木部の柔細胞の場合は、細胞外凍結とは異なり、アポプラストの水が凍結し始めても脱水が起きない。そのため、細胞内部で過冷却する水は気温が低下するほど細胞内凍結の発生するリスクが高まるが、現実的には樹幹や枝が強い風や積雪などで物理的な刺激を受けても木部組織の柔細胞が細胞内凍結を起こさないくらい安定的に過冷却が維持されているので深過冷却と呼ばれている。しかも、札幌近郊の樹木では、日常的に体験できるような一過的な過冷却とは異なり、 $-30 \sim -40^{\circ}\text{C}$ 近くまで冷却されても細胞内凍結を起こさないものも多い。

木部組織における柔細胞の占有率や含水率に依存するが、細胞内の水の凍結によって生じる発熱（潜熱の放出）のピークを熱分析や示差熱分析によって検出することができれば、その発熱開始温度が深過冷却の解消された温度として認識できるので、木部柔細胞の深過冷却能は比較的容易に評価できる（Sakai and Larcher 1987）。ただし、この発熱量が検出感度以下であると、細胞外凍結の場合と同様の発熱パターンを示すので両者を区別するのが困難となる。このような場合、低温走査型電子顕微鏡（cryo-SEM）のような装置を使用して細胞内氷晶のサイズを調べることで細胞内凍結の有無を判断する（Fujikawa and Kuroda 2000）。

前述したように、示差熱分析で容易に細胞内凍結の発生を判断できる木部組織を用い、ペクチンを消化するペクチナーゼ処理したり、カルシウムイオンを捕捉するようなEGTA処理してから熱分析や示差熱分析をおこなうと、過冷却が解消して細胞内凍結が生じることで得られる発熱ピークが高い温度側にシフトしたり、ピークそのものが小さくなって検出しづらくなったことが示された。これらの結果などからもわかるように、深過冷却能における細胞壁構造の重要性が示唆されている（Wisniewski 1995, Wisniewski et al. 2014）。このような深過冷却の維持するメカニズムとして、木部柔細胞の内部の水が細胞外氷晶の影響で植水されないように、細胞壁構造によって隔離されている微小な水滴のように存在することが重要だといわれていた（Ashworth and Abeles 1984）。その後、細胞内に蓄積するポリフェノール成分である一部のフラボノイド配糖体や加水分解性タンニンから、氷核活性を抑制して凍結温度を低下させる抗氷核活性が検出されたことから、細胞内成分にも過冷却の維持に貢献する可能性があると考えられている（Fujikawa et al. 2018, Kasuga et al. 2008, Wang et al. 2012）。なお、余談ではあるが、このような抗氷核活性は凍結を遅延・抑制する効果が期待されるため、筆者らの研究グループでは抗氷核活性を利用して凍霜害抑制を試みたこともある。表面に氷核細菌を塗布した緑葉でも凍結抑制効果を

を示すような緑葉粗抽出物をいくつか選抜し（Suzuki et al. 2017）、それらを鉢植えに噴霧すると氷核細菌に起因する凍結を回避することが可能であった。そのうちの1つであるチャの粗抽出物を茶畑の一部に散布する試験を複数年にわたって実施したところ、実施した年度の気象条件などにより影響を受けたと思われるが、チャの凍霜害の抑制効果がみられた年度もあったことから、限定的ではあるものの、抗氷核活性を有する緑葉粗抽出物の野外での有効性も確認できたと考えている（荒川ら 2023）。

また、カラマツやカツラなどの冬芽でみられる器官外凍結という凍結挙動では、凍結抵抗性の低い原基組織が凍結抵抗性の高い組織（芽鱗など）によって細胞外氷晶から隔離されながら越冬するものである（Sakai and Larcher 1987, Ashworth et al. 1989）。この原基組織は、気温の低下に応じて非平衡的に脱水するため、細胞外凍結とは異なり脱水量が限られる。そのため、原基細胞内に残存する水は深過冷却状態にある。一方、脱水された水は、原基組織から離れた領域（芽鱗と芽鱗の間や芽鱗内部の細胞間隙など）に蓄積されるため、器官外凍結する冬芽を採取して垂直方向に剃刀刃で切断すると、芽鱗の基部に細胞外氷晶の集積する様子が観察される（Ishikawa et al. 2015, Neuner et al. 2019）。このような凍結挙動を示す冬芽から原基だけを取り出して緩速凍結を始めると、無傷の冬芽の時とは大きく異なり、原基細胞の凍結傷害が容易に発生することから（Endoh et al. 2009）、冬芽の構造が保持されていて初めて正常な器官外凍結が成立し、相応の凍結抵抗性が発揮されることが理解できる。おそらく、原基から脱水された水が芽鱗のような細胞外氷晶を蓄積する部位まで正しく移動して細胞外氷晶を形成することや、原基が細胞外氷晶の伝播から隔離されることのために、冬芽を構成する組織が協同して器官外凍結を成立させるものと考えられている。

2.5. まとめ

近年のテクノロジーの進歩によって研究の進展は目覚ましいものがあるが、日常的に目にする草本植物や木本植物の越冬だけでもまだ未解明な現象が残されている。また、気候変動の影響なのか、今までの我々の常識の範囲を超える様な降雨（雪）量や気温の変動が生じるため、環境応答に関する研究では、これまでよりも柔軟な発想やきめ細やかな条件設定などが必要となってきたように思われる。なかでも季節の移り変わりの時期に生じる低温馴化や脱馴化という生理変化をもたらす過程は、凍結抵抗性の上昇・下降に直接影響するため、越冬する植物の生存戦略にとって重要である。今回は触れていないが、脱馴化過程では、

凍結抵抗性の低下に加えて休眠解除による成長の再開が始まる時期のため、気温の変化などの環境変化の影響を受けやすい状態といえる。そのため、脱馴化過程の植物生理を明らかにするため、低温馴化と同様に丁寧な解析が進められている。今後もいろいろなアプローチによって植物の越冬機構に関する理解が深まることが期待される。

謝辞

本章で取り上げた筆者らの研究グループによる研究成果の多くは、北海道大学名誉教授の藤川清三先生のご指導のもと、多くの卒業生や共同研究者との連携によって得られたものです。また、これらの研究成果の一部は、JSPS 科研費 (JP24K09012, JP21K05699, JP15H04615, JP16580270, ほか) や北海道大学ロバスト農林水産工学国際連携研究教育拠点などの助成によるものです。ここに謝意を表します。

参考文献

- Abeynayake, S. W., Etzerodt, T. P., Jonavičienė, K., Byrne, S., Asp, T. and Boelt, B. (2015) Fructan metabolism and changes in fructan composition during cold acclimation in perennial ryegrass. *Front. Plant Sci.* 6: 329, doi: 10.3389/fpls.2015.00329.
- Ashworth, E. N. and Abeles, F. B. (1984) Freezing behavior of water in small pores and the possible role in the freezing of plant tissues. *Plant Physiol.* 76: 201–204.
- Ashworth, E. N., Davis, G.A. and Wisniewski, M. E. (1989) The formation and distribution of ice within dormant and deacclimated peach flower buds. *Plant Cell Environ.* 12: 607–612.
- Buchanan, D. W., Biggs, R. H. and Bartholic, J. F. (1976) Cold acclimation of Florida peach and nectarine cultivars. *Hortscience* 11: 398–400.
- Ehlert, B. and Hinch, D. K. (2008) Chlorophyll fluorescence imaging accurately quantifies freezing damage and cold acclimation responses in Arabidopsis leaves. *Plant Meth.* 4:12 doi: 10.1186/1746-4811-4-12.
- Endoh, K., Kasuga, J., Arakawa, K., Ito, T., Fujikawa, S. (2009) Cryo-scanning electron microscopic study on freezing behaviors of tissue cells in dormant buds of larch (*Larix kaempferi*). *Cryobiology* 59:214–222.
- Fowler, S. and Thomashow, M. F. (2002) Arabidopsis transcriptome profiling indicates that multiple regulatory pathways are activated during cold acclimation in addition to the CBF cold response pathway. *Plant Cell* 14: 1675–1690.
- 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. (2016) Plant Responses to Freezing. In: eLS. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, doi: 10.1002/9780470015902.a0023719.
- Fujikawa, S. and Kuroda, K. (2000) Cryo-scanning electron microscopic study on freezing behavior of xylem ray parenchyma cells in hardwood species. *Micron*. 31: 669–686.
- Fujikawa, S., Kuwabara, C., Kasuga, J., Arakawa, K. (2018) Supercooling-Promoting (Anti-ice Nucleation) Substances. In: *Survival Strategies in Extreme Cold and Desiccation -Adaptation Mechanisms and Their Applications-*. pp. 289–320 (Eds Iwaya-Inoue, M., Sakurai, M., Uemura, M.), Springer.
- Fujikawa, S. and Takabe, K. (1996) Formation of multiplex lamellae by equilibrium slow freezing of cortical parenchyma cells of mulberry and its possible relationship to freezing tolerance. *Protoplasma* 190: 189–203.
- Fujikawa, S., Ukaji, N., Nagao, M., Yamane, K., Takezawa, D. and Arakawa, K. (2006) Functional Role of Winter-accumulating Proteins from Mulberry Tree in Adaptation to Winter-induced Stresses. In: *Cold Hardiness in Plants*. pp. 181–202 (Eds Chen, T. H. H., Uemura, M. and Fujikawa, S.), CABI Publishing.
- Gordon-Kamm, W. J. and Steponkus, P. L. (1984) Lamellar-to-hexagonalII phase transitions in the plasma membrane of isolated protoplasts after freeze-induced dehydration. *Proc. Natl. Sci. USA*, 81: 6373–6377.
- Guy, C., Kaplan, F., Kopka, J., Selbig, J. and Hinch, D. K. (2008) Metabolomics of temperature stress. *Physiol. Plant.* 132: 220–235.
- Inada, H., Fujikawa, S. Saito H. and Arakawa, K. (2006) Influence of Simulated Acid Snow Stress on Leaf Tissue of Wintering Herbaceous Plants. *Plant Cell Physiol.* 47: 504–512.
- Inada, H., Nagao, M., Fujikawa, S. and Arakawa, K. (2007) Effects of Light Condition after Simulated Acid Snow Stress on Leaves of Winter Wheat. *Environ. Sci.*, 14 (Suppl): 53–71.
- Ishikawa, M., Ishikawa, M., Toyomasu, T., Aoki, T. and Price, W. S. (2015) Ice nucleation activity in various

- tissues of *Rhododendron* flower buds: their relevance to extraorgan freezing. *Front. Plant Sci.* 6:149, doi: 10.3389/fpls.2015.00149.
- Kasuga, J., Hashidoko, Y., Nishioka, A., Yoshiba, M., Arakawa, K. and Fujikawa, S. (2008) Deep supercooling xylem parenchyma cells of katsura tree (*Cercidiphyllum japonicum*) contain flavonol glycosides exhibiting high anti-ice nucleation activity. *Plant Cell Environ.* 31: 1335–1348.
- Kawamura, Y. and Uemura, M. (2003) Mass spectrometric approach for identifying putative plasma membrane proteins of *Arabidopsis* leaves associated with cold acclimation. *Plant J* 36: 141–154.
- Kuprian, E., Munkler, C., Resnyak, A., Zimmermann, S., Tuong, T. D., Gierlinger, N., Müller, T., Livingston, D. P., Neuner, G. (2017) Complex bud architecture and cell-specific chemical patterns enable supercooling of *Picea abies* bud primordia, *Plant Cell Environ.* 40: 3101–3112.
- Li, P. H., Weiser, C. J. and Van Huyst. R. (1966) The Relation of Cold Resistance to The Status of Phosphorus and Certain Metabolites in Red-Osier Dogwood (*Cornus stolonifera* Michx.) *Plant Cell Physiol.* 7: 475-484.
- Murai, M. and Yoshida, S. (1998) Evidence for the cell wall involvement in temporal changes in freezing tolerance of Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) tubers during cold acclimation. *Plant Cell Physiol.* 39: 97-105.
- Neuner, G., Monitzer, K., Kaplenig, D. and Ingruber, J. (2019) Frost Survival Mechanism of Vegetative Buds in Temperate Trees: Deep Supercooling and Extraorgan Freezing vs. Ice Tolerance. *Front. Plant Sci.* 10: 1-13.
- Pummer, B. G., Bauer, H., Bernardi, J., Bleicher, S., Grothe, H. (2012) Suspendable macromolecules are responsible for ice nucleation activity of birch and conifer pollen. *Atmos. Chem. Phys.* 12: 2541–2550.
- Sakai, A. and Larcher, W. (1987) Frost Survival of Plants; Responses and Adaptation to Freezing Stress. Springer-Verlag, Berlin, pp. 321.
- Steponkus, P. L. (1984) Role of the Plasma Membrane in Freezing Injury and Cold Acclimation. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 35: 543-584.
- Steponkus, P. L. and Lanphear, F. O. (1967) Refinement of the triphenyl tetrazolium chloride method of determining cold injury. *Plant Physiol.* 42: 1423-1426.
- Steponkus, P. L. and Webb, M. S. (1992) Freeze-induced dehydration and membrane destabilization in plants. In: Somero G. N., Osmond, C. B. and Bolis, C. L. (eds) *Water and Life: Comparative Analysis of water Relationships at the Organismic, Cellular and Molecular Level*, pp. 338–362. Springer-Verlag: Berlin.
- Suzuki, S., Fukuda, S., Fukushi, Y., Arakawa, K. (2017) Screening of plant resources with anti-ice nucleation activity for frost damage prevention. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 81: 2090-2097.
- Takahashi, D., Soga, K., Kikuchi, T., Kutsuno, T., Hao, P., Sasaki, K., Nishiyama, Y., Kidokoro, S., Sampathkumar, A., Bacic, A., Johnson, K. L. and Kotake, T. (2024) Structural changes in cell wall pectic polymers contribute to freezing tolerance induced by cold acclimation in plants. *Current Biol.* 34: 958–968.
- Tanino, K. K., and McKersie, B. D. (1985). Injury within the crown of winter wheat seedlings after freezing and icing stress. *Can. J. Bot.* 63: 432–436.
- Thomashow, M. F. (1999) Plant cold acclimation: freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. *Annu. Rev. Plant Biol.* 50:571–599.
- Uemura, M. and Steponkus, P. L. (1994) A Contrast of the Plasma Membrane Lipid Composition of Oat and Rye Leaves in Relation to Freezing Tolerance. *Plant Physiol.* 104: 479-496.
- Uemura, M. and Steponkus, P. L. (1999) Cold acclimation in plants: relationship between the lipid composition and the cryostability of the plasma membrane. *J. Plant Res.* 112: 245–254.
- Uemura, M. and Yoshida, S. (1984) Involvement of Plasma Membrane Alterations in Cold Acclimation of Winter Rye Seedlings (*Secale cereale* L. cv Puma). *Plant Physiol.* 75: 818-826.
- Wang, D., Kasuga, J., Kuwabara, C., Endoh, K., Fukushi, Y., Fujikawa, S. and Arakawa, K. (2012) Presence of supercooling-facilitating (anti-ice nucleation) hydrolyzable tannins in deep supercooling xylem parenchyma cells in *Cercidiphyllum japonicum*. *Planta* 235: 747–759
- Welling, A. and Palva, E. T. (2006) Molecular control of cold acclimation in trees. *Physiol. Plant.* 127: 167-181.
- Wisniewski, M. (1995) Deep supercooling in woody plants and the role of cell wall structure. In: Lee RE, Warren GJ, Gusta LV (eds) *Biological ice nucleation and its applications*. APS Press, Minneapolis, pp. 163–181.
- Wisniewski, M., Gusta, L. and Neuner, G. (2014) Adaptive

- mechanisms of freeze avoidance in plants: a brief update.
Environ. Exp. Bot. 99: 133–140.
- Yoshida, S. (1984) Chemical and biophysical changes in the plasma membrane during cold acclimation of mulberry bark cells (*Morus bombycis* Koidz cv Goroji). *Plant Physiol.* 76: 257–265.
- 荒川圭太, 工藤尚美, 鈴木伸吾, 高橋淳, 後藤高秋, 中澤佑哉, 福士幸治, 藤川清三. (2023) 植物粗抽出液の抗氷核活性（過冷却促進活性）による凍結傷害軽減の試み. 低温生物工学会誌 69: 1–6.
- 石川雅也, 野村孝之, 槌谷明日香. (2016) シュウ酸カルシウムを含む氷核活性剤. 公開特許. 特許第6029058号.
- 古賀泰雅, 鉄穴口晃, 鈴木伸吾, 重富顕吾, 荒川圭太. (2021) カツラ樹皮由来の氷核活性物質に関する研究. 低温生物工学会誌 67: 141–145.
- 酒井昭. (1995) 植物の分布と環境適応. pp. 164 朝倉書店.