

低 温 科 学

北海道大学

低温科学研究所編

生物篇 第35輯

新平社

PDG

目 次

植物細胞の低温傷害に関する研究 I

培養細胞の低温下での微細構造変化	仁木 輝 緒 吉 田 静 夫 酒 井 昭	1-8
------------------------	----------------------------	-----

植物細胞の低温傷害に関する研究 II

低温処理後 26°C に戻した細胞の微細構造変化	仁木 輝 緒 吉 田 静 夫 酒 井 昭	9-14
--------------------------------	----------------------------	------

日本の常緑及び落葉広葉樹の耐凍性	酒 井 昭	15-43
------------------------	-------	-------

日本産シダ植物の分布の類型化と特徴	佐藤 利 幸 酒 井 昭	45-53
-------------------------	-----------------	-------

細胞内凍結の動的な進行過程	島 田 公 夫	55-61
---------------------	---------	-------

クロバネキノコバエ科の一種 *Sciara* sp. の

越冬前蛹の生態と耐凍性	丹 野 皓 三	63-74
-------------------	---------	-------

綜 説

昆 虫 の 越 冬

——生物の多様性と台目的性——	茅 野 春 雄	75-84
-----------------------	---------	-------

「低温科学」以外に発表された所員の研究業績 生物篇関係分 XI (1976-1977)

CONTENTS

Studies on Chilling Injury of Plant Cells I	
Ultrastructural Changes of Cultured Cells Associated with Chilling Injury	<i>Teruo NIKI, Shizuo YOSHIDA and Akira SAKAI</i>
	1- 8
Studies on Chilling Injury of plant Cells II	
Ultrastructural Changes in the Cells Rewarmed at 26°C after Chilling Treatment	<i>Teruo NIKI, Shizuo YOSHIDA and Akira SAKAI</i>
	9-14
Frost Hardiness of Evergreen and Deciduous	
Broad-leaved Trees Native to Japan	<i>Akira SAKAI</i>
	15-43
Distributional Patternization and Characteristics of	
Japanese Pteridophyta	<i>Toshiyuki SATO and Akira SAKAI</i>
	45-53
Dynamic Process of Intracellular Freezing	<i>Kimio SHIMADA</i>
	55-61
Ecological Observation and Frost-resistance in	
Overwintering Prepupae, <i>Sciara</i> sp. (Sciaridae)	
.....	<i>Kouzou TANNO</i>
	63-74

REVIEWS

Biochemical Aspects on Overwintering in Insects	<i>Haruo CHINO</i>
	75-84

List of Contributions on Biological and Medical Sciences from the Institute of Low Temperature Science Appeared in Publications other than *Low Temperature Science*.
XI. (1976-1977)

植物細胞の低温傷害に関する研究 I*

培養細胞の低温下での微細構造変化

仁 木 輝 緒

(北海道大学大学院理学研究科)

吉 田 静 夫・酒 井 昭

(低温科学研究所)

(昭和52年10月受理)

I. 緒 言

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

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

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

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

II. 材料と方法

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

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

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

* 北海道大学低温科学研究所業績 第 1875 号

この研究の一部は昭和52年度科学研究費補助金によって行った

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

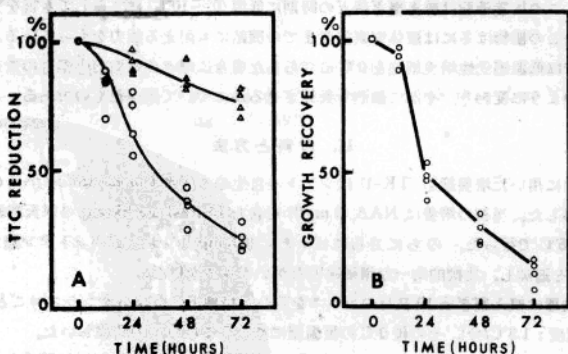
細胞の微細構造を観察するために、所定時間低温にさらした細胞と未処理細胞をリン酸緩衝液 (1/15 M, pH 7.2) で調整した 3% グルタルアルデヒド溶液で 0°C または 26°C で 1.5 時間前固定を行なった。同じリン酸緩衝液で洗った後、リン酸緩衝液で調整した 2% オスミック酸溶液でさらに 2 時間後固定し、アルコール脱水を経て Spurr のエポキシ樹脂¹⁴⁾ に包埋した。超薄切片は酢酸ウラニル溶液、および Rynold の鉛溶液¹⁵⁾ で二重染色を行い、日本電子製電子顕微鏡 (JEM 100 C) で形態観察を行なった。

III. 結 果

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

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

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



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

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

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

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

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

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

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

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

IV. 考 察

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

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

Goldberg colchicine

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

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

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

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

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

V. 摘 要

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

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

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

文 献

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

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

Summary

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

（此处为模糊的正文内容，包含多段文字，因图像质量较差，无法准确转录。依稀可见“子曰”、“子曰”等字样。）

図版説明

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

- 図版 I-1 未処理培養細胞の微細構造。中央に大きな液胞，入り組んだ構造の核が観察できる。
× 5,000
- 図版 I-2 同未処理細胞の微細構造。プロプラスチドの中にしばしば好オスミウム粒がみえる
(矢印 1)。× 10,000
- 図版 II-3 6時間 0°C 処理した培養細胞の微細構造。プロプラスチドの顕著な形態変化が観察できる。× 8,000
左下わく：プロプラスチドの種々の形態。1→2→3 の順に変化する。× 4,000
- 図版 II-4 12時間 0°C 処理した培養細胞の微細構造。粗面 ER の膨化 (矢印 1) が起こり，付着しているリボソームが離れ滑面の微小胞になる (矢印 11)。× 10,000
- 図版 III-5 24時間 0°C 処理した培養細胞の微細構造。細胞質中に大型の粗面 ER 由来の空胞 (Ve) が発達する。× 15,000
- 図版 III-6 同処理の培養細胞の微細構造。液胞膜がところどころで破れ，入り組んだり，空胞膜と融合したりしているのがみられる。× 10,000
- 図版 IV-7 48時間 0°C 処理した培養細胞の微細構造。細胞質の崩壊が起こり，わずかに核，崩壊したミトコンドリアなどが観察できる。× 15,000
- 図版 IV-8 72時間 0°C 処理した培養細胞の微細構造。細胞内小器官が完全に自己消化してしまって，電子密度のたかい膜のみがみられる (矢印 1)。× 20,000

植物細胞の低温傷害に関する研究 II*

低温処理後 26°C に戻した細胞の微細構造変化

仁 木 輝 緒

(北海道大学大学院理学研究科)

吉田 静夫・酒井 昭

(低温科学研究所)

(昭和 52 年 10 月受理)

I. 緒 言

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

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

II. 材料と方法

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

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

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

III. 結 果

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

* 北海道大学低温科学研究所業績 第 1876 号

この研究の一部は昭和 52 年度科学研究費補助金によって行った

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

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

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

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

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

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

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

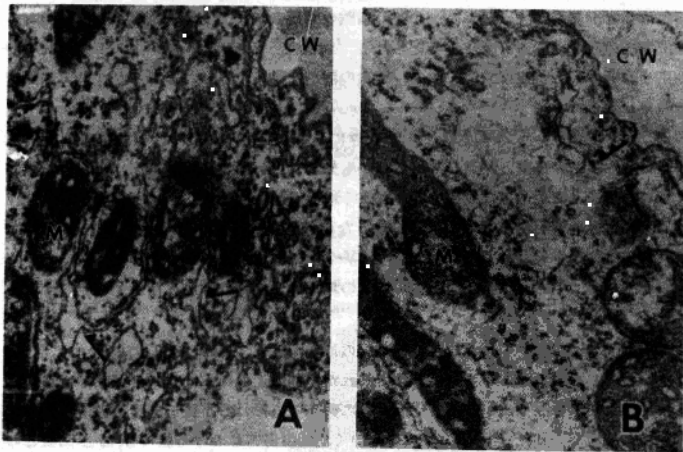
IV. 考 察

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

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

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

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



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

- A ER は膨化した状態から収縮・伸長する形で回復中 (矢印 ↑)。× 20,000
B 空胞内に二重の膜構造が観察でき、その一端は粗面 ER とつらなっている (矢印 ↑)。× 30,000

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

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

24時間低温処理された細胞の中にはその後の26°C処理の間に不可逆的な経過をたどるものがかかなり多く含まれている。すなわち12~24時間経過すると自己消化の過程にある核やミトコンドリアと発達した粗面ERがみられるが、細胞質が崩壊している像もしばしば見受けられる。これは低温処理された細胞の回復にあたりERの正常な形態への回復がまず最初の段階で進められることを示唆している。しかしこの細胞の回復の過程で上記の細胞質の崩壊がおこる事実は液胞膜の崩壊による可能性が考えられる。何故なら、Matile⁴⁾によって植物の液胞の中に細胞内小器官の陥入が観察されており、植物の液胞に動物にみられる二次ライソゾーム様の働きも考えられる。

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

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

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

V. 摘 要

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

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

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

文 献

- 1) Niki, T. Yoshida, S. and Sakai, A. 1978 Studies on chilling injury in plant cells. I. Ultrastructural changes associated with chilling injury in callus tissue of *Cornus stolonifera*. *Plant & Cell Physiol.*, 印刷中.
- 2) 仁木輝緒・吉田静夫・西井 昭 1977 植物細胞の低温傷害に関する研究 I. 培養細胞の低温下での微細構造変化. 低温科学, 生物篇, 35, 1-8.
- 3) Steponkus, P. L. and Lanphear, F. O. 1967 Refinement of the triphenyl tetrazolium chloride method of determining cold injury. *Plant Physiol.*, 42, 1423-1426.
- 4) Matile, Ph. and Moor, H. 1968 Vacuolation; Origin and development of the lysosomal apparatus in root tip cells. *Planta*, 89, 56-75.
- 5) Grove, S. N., Bracher, C. E. and More, D. J. 1968 Cytoplasmic differentiation in the endoplasmic reticulum golgi apparatus vesicle complex. *Science*, 161, 171-173.
- 6) Yamada, M. and Usami, Q. 1975 Long chain fatty acid synthesis in developing castor bean seeds. IV. The synthetic system in proplastids. *Plant & Cell Physiol.*, 16, 329-323.
- 7) Simcox, P. D. Reid, E. E., Calvin, D. T. and Dennis, D. T. 1977 Enzymes of the glycolytic and pentose phosphate pathways in proplastids from the developing endosperm of *Ricinus communis* L., *Plant Physiol.*, 59, 1128-1132.

Summary

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

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

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

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

図版説明

細胞内小器管の表示に用いた記号は次の通り。

CW, 細胞壁; ER, 粗面 ER; G, ゴルジ体; M, ミトコンドリア; N, 核; P, プロプラスチド;
V, 液胞; Ve, 空胞

図版 I-1 無処理の培養細胞の微細構造。プロプラスチドの中に好オスミウム粒がみられる。
× 8,000
右上わく: 同細胞の部分拡大像。粗面 ER および遊離のリボゾームが観察される。
× 20,000

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

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

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

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

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

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

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