

低温顕微鏡と高速ビデオカメラを組み合わせた細胞内凍結過程の解析

¹岩手大学農学部附属寒冷バイオシステム研究センター,
²生研機構, ³近畿大学理工学部土木工学科,
⁴メリーランド大学細胞生物学・分子遺伝学科 (アメリカ合衆国)

上村 松生¹, 中川原千早¹, 河村 幸男^{1,2,4}, 吉田 静夫¹, 江藤 剛治³, 竹原 幸生³

**Analysis of Intracellular Freezing Process of Plant Cells with
Cryomicroscope and High-Speed Video Camera**

Matsuo UEMURA¹, Chihaya NAKAGAWARA¹, Yukio KAWAMURA^{1,2,4},
Shizuo YOSHIDA¹, Takeharu ETOH³ and Kosei TAKEHARA³

¹*Cryobiosystem Research Center, Faculty of Agriculture, Iwate University, Morioka 020-8550*

²*Bio-oriented Technology Research Advancement Institution, Tokyo 105-0001*

³*Department of Civil Engineering, Kinki University, Higashi-Osaka 577-8502*

⁴*Department of Cell Department of Biology & Molecular Genetics, University of Maryland,
College Park, MD 20742-5815, USA*

Normal-speed (32 frames/sec) and high-speed (up to 4,000 frames/sec) video cameras attached with a cryomicroscope were utilized to analyze the freezing process of protoplasts isolated from Arabidopsis leaves and Jerusalem artichoke tubers. With protoplasts isolated from leaves of non-acclimated Arabidopsis seedlings, intracellular freezing was observed even when protoplasts were frozen to -10°C at rates of 0.5 to $1.0^{\circ}\text{C}/\text{min}$, and the frequency increased significantly at 2.5 to $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$. After cold acclimation for 1 day at 2°C , the intracellular freezing did not occur at cooling rates of 1.0°C or slower. Cold acclimation for 2 to 7 days further resulted in a shift of the temperature range over which intracellular freezing occurred to lower temperatures. High-speed video microscopy revealed that intracellular freezing was initiated, with no exceptions, at places near the plasma membrane. However, it was not possible with techniques used in the present study to determine whether ice formation initially occurs inside or outside the cell. Nevertheless, these studies demonstrate that videomicroscopy combined with cryostage provides an insight to understand the effect of cold acclimation on the freezing process of plant protoplasts.

はじめに

第48回低温生物工学会研究報告13.

[Key words : Cryomicroscopy, Intracellular freezing, High-speed video camera, Protoplast, Plasma membrane ; 低温顕微鏡, 細胞内凍結, 高速ビデオカメラ, プロトプラスト, 細胞膜]

細胞を凍結すると, 氷晶形成は細胞外と細胞内のいずれかに起こる. 氷晶が細胞外に形成される細胞外凍結は, 比較的冷却速度が遅い場合に発生することが知られている^{5, 11)}. 緩慢冷却された場合, 細胞内の温度や水の化学ポテンシャルは, 細胞間隙のそ

れらとほぼ並行を保っている。しかし、細胞間隙における浸透濃度が細胞内のそれより低い場合、あるいは、細胞間隙には氷核を形成しうる物質が多く存在するために、細胞間隙に最初に氷晶が形成される。いったん氷晶形成が起こると、細胞間隙に存在する氷の表面水の化学ポテンシャルは急激に低下する。氷の表面における水ポテンシャルは、同温度で過冷却している水の化学ポテンシャルより低い場合、さらに、水分子は細胞膜の存在する水チャンネルを通して細胞間隙に移動することが可能なため、細胞内で過冷却している水は細胞間隙に引き出され、氷晶の表面に達して凍結し、氷晶は生長する。その結果、細胞は脱水されて収縮することになる。

一方、冷却速度が速い場合は、細胞外凍結が全く起こらないか、あるいは、たとえ細胞外凍結が起こっても、細胞内の水の脱水が進行しないうちに細胞が急激に冷却されることになる。その結果、細胞内は過度に過冷却され、細胞内に氷晶形成が起こる(細胞内凍結)。細胞内凍結発生と細胞膜安定性の損失との関連を報告した例は数多く存在するが^{1, 2, 3, 6, 8)}、細胞膜傷害が細胞内凍結の原因なのか結果なのか、言葉を換えると、細胞内に自発的に凍結が起こった結果細胞膜が傷害を受けるのか、あるいは、細胞膜の損傷が原因で細胞外に形成された氷晶が細胞内に侵入するのか、については未だに明確な決着を見ていない。細胞内凍結がどのような機構で起こるにしても、ある特殊な場合を除いて、細胞内凍結は致死的である。

植物細胞の場合、低温馴化過程で細胞内凍結の発生頻度が変化することが知られている³⁾。秋まきライムギの葉から単離されたプロトプラストにおける細胞内凍結発生頻度は、低温馴化が進行するにつれて小さくなる。同時に測定された細胞内凍結が発生する限界温度における細胞内過冷却度や細胞膜水透過性に関しては、低温馴化前後で差が見られないことから、凍結過程における細胞膜安定性の違いが細胞内凍結発生を左右しているものと結論付けられた。しかし、このような現象が、低温馴化後に比較的高い凍結耐性が得られる草本類である秋まきライムギ(低温馴化後には -25°C 付近まで耐えることが出来る)に見られるものの、低温馴化後の凍結耐性が

それほど高くない(すなわち、細胞内凍結が起こりやすい)草本類に観察されるかどうかは不明である。

そこで、本研究は、近年モデル植物として広く用いられているシロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana* L. (Heyn.) Columbia)を選び、葉から単離されたプロトプラストの凍結耐性、及び、凍結挙動に対する低温馴化の影響を調べることを目的として行われた。シロイヌナズナは、低温未馴化の葉で -4°C 付近の凍結に、また、低温馴化を完全にすると -10°C 付近まで耐えることが知られている^{4, 10)}。従って、秋まきライムギに比較すると、最大耐凍性は低い。さらに、一般ビデオカメラ(32フレーム/秒)と高速ビデオカメラ(最大4,000フレーム/秒)と低温ステージを備えた生物顕微鏡を組み合わせ、シロイヌナズナ、あるいは、キクイモ塊茎(*Helianthus tuberosum*)プロトプラストを用いて細胞内凍結が開始する場所(細胞内?、細胞外?)を観察した。なお、キクイモ塊茎は、未馴化組織で -5°C 付近、低温馴化後には -10°C 程度まで耐える。また、プロトプラストにすると低温馴化前後に関わらず -25°C 付近まで耐えることが知られている¹⁰⁾。

凍結過程に対する低温馴化の影響

低温馴化過程において、シロイヌナズナ葉から単離されたプロトプラストの凍結融解後の生存率は、大きく分けて3段階の凍結耐性変動を見せた。第一に、低温馴化1日では、 -4°C 以下の凍結温度範囲で大きな生存率上昇が見られた。しかし、 $-2\sim-3^{\circ}\text{C}$ の範囲では、それほど大きな低温馴化の効果は見られなかった。ついで、低温馴化3日では、 $-2\sim-3^{\circ}\text{C}$ の範囲で生存率は上昇し、完全に低温馴化した試料とほぼ同程度の生存率を示した。その後、低温馴化7日目まで -5°C 以下における生存率は上昇を続け、完全に低温馴化した最大耐凍性を獲得する。28日間低温馴化しても凍結耐性の上昇は見られなかった。以上の結果は、シロイヌナズナの低温馴化過程が、いくつかの異なった段階から構成されていることを示している。他の植物においても、複数の凍結傷害発生機構が存在し、低温馴化の時間に応じて特定の凍結傷害機構発生が減少し、限られた温度領域

でのみ生存率が上昇することが報告されている¹³⁾。シロイヌナズナは、非常に短い時間（3時間程度）で低温に曝すことだけで凍結耐性が上昇することが観察されており（未発表）、どのような機構で各々の凍結傷害発生が減少するのかを調べるには優れた材料であると考えられる。

次いで、低温馴化過程における細胞内凍結発生頻度の変化をビデオカメラと低温顕微鏡を用いて調べた。細胞内に形成（あるいは侵入）した氷晶核は、細胞内液の過冷却が進んでいるため、急速に細胞内全域に向かって氷晶を生長させる。この時、顕微鏡下では細胞内部が急速に暗くなる（Fig. 1）。この現象（Flashing と呼ばれる）を利用して、細胞内凍結が起こる頻度を測定した。凍結は、冷却速度を0.25～5℃/minで変化させ、-10℃まで温度を低下させた。なお、全ての実験において、植氷は-1～-2℃付近で自発的に起こった。その後5℃付近まで温度を上昇させて試料を融解した。この過程を記録したビデオテープによって、細胞内凍結発生頻度、発生温度、および、冷却速度の関係を解析した。

細胞内凍結発生頻度は低温馴化に伴って減少することが判明したが、低温馴化ステージによって異なった質的変動が起こっていることがわかった。低温馴化前のプロトプラストにおいては、0.25℃/minで冷却した場合にほとんど細胞内凍結しなかったもの

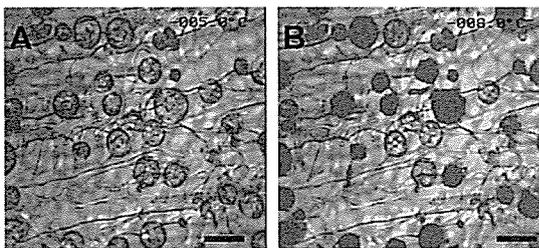


Fig. 1. Representative photomicrographs of *Arabidopsis* protoplasts showing different freezing patterns. Extracellular freezing (A) and intracellular freezing (B). A suspension of *Arabidopsis* protoplasts was cooled at 5℃/min. Under these conditions, intracellular freezing did not occur at -5℃ (all ice crystals were present only outside the protoplasts); however, after cooling to -8℃, the majority of protoplasts turned into black, meaning that ice crystals were formed and spread out inside the protoplasts (referred to as flashing). Bars indicate 50 μm.

の、0.5℃/minより早い冷却速度で細胞内凍結が観察された。その頻度は、冷却速度が高いほど大きく、5℃/minでは約80%のプロトプラストが細胞内凍結した。低温馴化を1日行くと、1℃/minより遅い冷却速度では細胞内凍結が起こらなくなった。しかし、2.5あるいは5℃/minにおける細胞内凍結発生頻度は、低温馴化前と変化がなかった。さらに低温馴化を続けると、比較的速い冷却速度における細胞内凍結発生頻度が減少した。5℃/minの場合、約50%のプロトプラストでのみ細胞内凍結が発生した。以上の結果は、おおよそ以前に報告された冬ライムギ葉から単離されたプロトプラストの結果²⁾と同様であるが、それに加えて、シロイヌナズナにおいては、細胞内凍結発生に関する低温馴化の効果が少なくとも2段階に分けられることを示唆している。

さらに、細胞内凍結発生頻度の温度分布を調べたところ、興味深い事実が見出された。低温馴化前のプロトプラストにおいては、冷却速度が速くなるにつれて細胞内凍結が発生する温度領域が低くなる。例えば、0.5℃/minでは-5℃付近で最も高い頻度で細胞内凍結が発生するのに対し、5℃/minでは-8℃付近が最大発生温度となった。基本的にこの結果は、低温馴化後のプロトプラストでも変わらなかった。これらの結果は、氷晶核形成のための時間が変わらないと仮定すると、冷却速度が速いほど氷晶核形成が起こるまでに試料温度が低下しているためかもしれない。しかし、細胞内の過冷却度が細胞内凍結発生頻度に関連している⁷⁾ならば、遅い冷却速度での細胞内凍結が高い温度（すなわち、過冷却度は小さい）で起こることは説明できない。この点を明らかにするためには、今後のさらなる研究が必要である。

また、細胞内凍結発生温度に対する低温馴化の効果を同じ冷却速度で調べてみたところ、低温馴化が進むにつれて発生温度が低温側へシフトすることがわかった。例えば、5℃/minにおける最大発生温度は、低温馴化前には-8℃付近だったのに対し、低温馴化1日目で-9℃、2日以降では-10℃となっていた。-10℃が最低凍結温度であったため、それ以下の温度にシフトしているかどうかは今回の実験では明らかにできなかった。これらの結果は、低温

馴化によって細胞の過冷却能力が大きくなっていることを示しているのかもしれない。低温馴化後には細胞膜の水透過性が増大し、その結果、細胞がより低温まで凍結しない状態を保ったまま存在できるようになるという報告もある³⁾。一方、低温馴化前後で細胞膜水透過性が変化しないという報告もある³⁾。今後、シロイヌナズナプロトプラストを用いて、細胞膜水チャンネル活性や水透過性に対する低温馴化の影響を詳細に調べる必要がある。

高速ビデオカメラを用いた 細胞内凍結過程の観察

細胞内凍結と細胞膜安定性の関連についての解析を行うため、高速ビデオカメラを低温顕微鏡に接続して観察を行った。材料として、シロイヌナズナ未馴化葉から単離されたプロトプラスト、あるいは、葉緑体無くサイズが大きくて観察が容易なキクイモ塊茎から単離されたプロトプラストを用いた。予備的実験で、シロイヌナズナ葉やキクイモ塊茎から得た組織切片を用いた観察を試みたが、はっきりした観察画像が得られなかったため、今回はプロトプラストを用いた結果のみを報告する。冷却速度は $0.25\sim 10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ で行った。高速ビデオカメラは、予備的実験から最適撮影速度と判定された1,125あるいは2,250フレーム/秒で撮影した。

シロイヌナズナ、および、キクイモプロトプラストの両者で、細胞内凍結が細胞膜近傍から起こることが明確に観察された。多くの場合、細胞膜付近の1カ所から細胞全体に氷晶が広がっていく様子が見られた (Fig. 2)。また、頻度は少ないが、細胞膜近傍の数カ所から氷晶の生長が観察されることもあった (Fig. 3)。シロイヌナズナとキクイモではほとんど同様の画像が得られた。これらの結果は、細胞内凍結が細胞膜近傍から発生することを明確に示している。今回の実験条件では細胞外に氷晶が存在することから、細胞膜が何らかの原因で不安定化し、そこから氷晶が細胞内へ侵入したものと考えられる。事実、細胞膜が細胞内氷晶形成に先立って損傷を受けることが報告されており^{9, 12)}、今回観察された現象もこれらの報告と一致するのかもしれない。しかし、偶然に、細胞膜損傷を伴わないで細胞膜近傍に

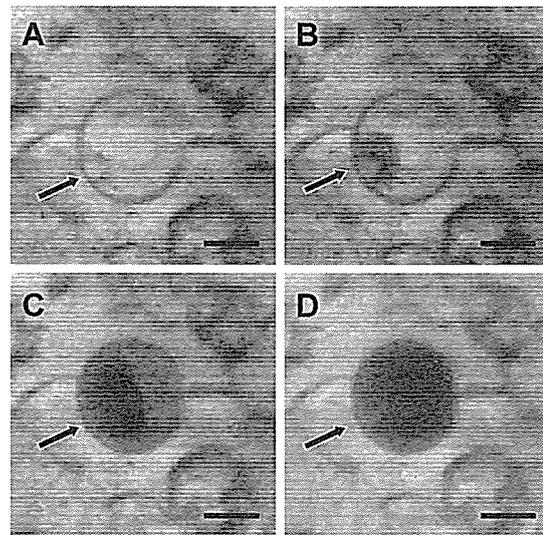


Fig. 2. Intracellular freezing initiating from a single point at the vicinity of the plasma membrane. A sequence of freezing was shown in panel A to D. A suspension of protoplast isolated from Jerusalem artichoke tubers was cooled at $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$. With no exceptions, intracellular freezing was initiated at the vicinity of the plasma membrane. In many cases, freezing appeared to be initiated at a single point (arrow) just inside of the plasma membrane and ice crystals were then spread out in the protoplast. Bars indicate $50\ \mu\text{m}$.

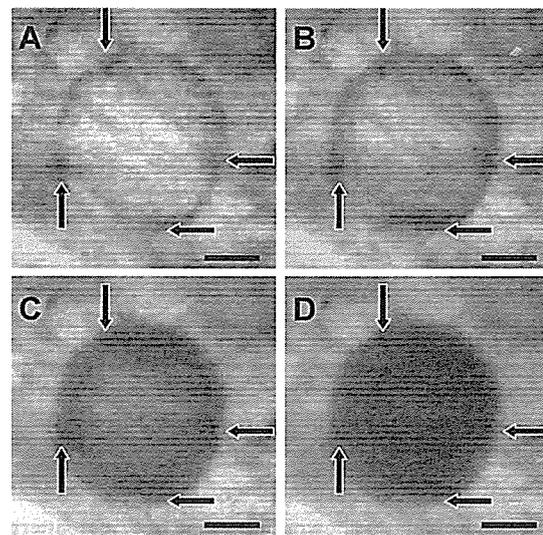


Fig. 3. Intracellular freezing initiating from multiple points at the vicinity of the plasma membrane. A sequence of freezing was shown in panel A to D. A suspension of protoplast isolated from Jerusalem artichoke tubers was cooled at $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$. With no exceptions, intracellular freezing was initiated at the vicinity of the plasma membrane. In a few cases, freezing appeared to be initiated at multiple points (arrows) just inside of the plasma membrane and ice crystals were then spread out in the protoplast. Bars indicate $50\ \mu\text{m}$.

において細胞内で自発的凍結が起こった可能性⁶⁾も否定できない。最近、動物培養細胞を用いて凍結過程を顕微鏡下で観察した報告においても、細胞膜損傷が細胞内凍結の原因なのか結果なのかについての明確な結論を得るには至っていない¹¹⁾。今後、細胞外に氷晶が存在しない場合にどのような画像が観察されるのかなどの検討を行い、この点について解析を進めていく必要がある。

おわりに

細胞内凍結発生機構については、1930年代から報告が出されているが、その発生機構や低温馴化過程における変動を裏付けるための明確な説明はなされていない。細胞膜の性質は細胞内凍結発生を左右する鍵となっていることは、多くの研究者が一致して認めるところではあるが、今後、様々な技術を駆使して、その詳細を明らかにする必要がある。今回材料として用いたシロイヌナズナは、様々な凍結耐性変異体や凍結耐性や低温馴化能の異なる形質転換体が報告されており、これらを用いて細胞内凍結プロセスを解析できる可能性がある。また、高速ビデオカメラによる細胞凍結過程の観察は、そのプロセスを非常に短い時間単位で観察することが可能であり、解像度を改善することができれば有力な解析手段となりうると思われる。

謝 辞

本研究の一部は、生研機構（新技術・新分野創出

のための基礎研究推進事業）研究費、岩手大学学長裁量活性化経費、及び、北海道大学低温科学研究所一般共同研究研究費、の補助によって行われた。

参 考 文 献

- 1) Acker, J. and L.E. McGann : *CryoLetters*, **22**, 241 (2001).
- 2) Asahina, E. : *Nature*, **196**, 445 (1962).
- 3) Dowgert, M.F. and P.L. Steponkus : *Plant Physiol.*, **72**, 978 (1983).
- 4) Gilmour, S.J., R.K. Hajela and M.F. Thomashow : *Plant Physiol.*, **87**, 745 (1988).
- 5) Levitt, J. : "Responses of Plants to Environmental Stresses", 2nd Ed., Vol. 1, Academic Press, New York, p.497 (1980).
- 6) Mazur, P : *Biophys. J.*, **3**, 323 (1963).
- 7) Mazur, P : *Cryobiology*, **14**, 251 (1977).
- 8) McGrath, J.J. and E.G. Calvaho : *Cryobiology*, **12**, 540 (1975).
- 9) Muldrew, K. and L.E. McGann : *Biophys. J.*, **66**, 532 (1994).
- 10) Murai, M. and S. Yoshida : *Plant Cell Physiol.*, **39**, 97 (1998).
- 11) 酒井 昭 : 「植物の耐凍性と寒冷適応」, 学会出版センター, 東京, p.469 (1982).
- 12) Steponkus, P.L., M.F. Dowgert and W.J. Gordon-Kamm : *Cryobiology*, **20**, 448 (1983).
- 13) Uemura, M. and P.L. Steponkus : *Plant Physiol.*, **91**, 1131 (1989).
- 14) Uemura, M., R.A. Joseph and P.L. Steponkus : *Plant Physiol.*, **109**, 15 (1995).