

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580453

研究課題名(和文)木質バイオマス生産を支える樹木冬芽の越冬機構の解明

研究課題名(英文) Study on overwintering mechanism of dormant buds of trees for sustainable production of woody biomass

研究代表者

荒川 圭太 (Arakawa, Keita)

北海道大学・(連合)農学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：00241381

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：冬芽の越冬機構である凍結適応機構と休眠について調べた。カラマツ冬芽の凍結挙動を低温走査型電子顕微鏡(cryo-SEM)等で調べると、原基の細胞は部分脱水するものの、細胞内に残存する水は深過冷却していることが示唆された。また、冬芽ではピニトールやスクロースなどが主要な炭水化物として蓄積していたが、それだけでは過冷却能を説明できないものと考えられた。また、カラマツ冬芽の自発休眠が解除されて強制休眠へ移行する過程での可溶性タンパク質組成の変化をLC-MS/MS法で調べると、自発休眠から強制休眠に移行する比較的短期間ではタンパク質組成は大きく変化しないことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, extraorgan-freezing and endodormancy release of larch dormant buds were studied for understanding overwintering mechanism of dormant buds of trees. Cryo-scanning electron microscopic study revealed that primordial cells were partially dehydrated at subzero temperatures and water remaining in primordial cells was kept in the deep supercooling state. In this issue, accumulation of several carbohydrates such as pinitol and sucrose were detected as major components. However, it is difficult to explain that high freezing tolerance by deep supercooling capability of primordial tissue is determined by accumulation of major carbohydrates alone. Possible contribution of minor components such as supercooling-facilitating substances might be studied in larch dormant buds. In addition, proteomic analysis by using LC-MS/MS showed that only minor changes in soluble protein composition occurred in larch dormant buds within three weeks during endodormancy release.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：環境農学

キーワード：冬芽 越冬機構 耐寒性 休眠

1. 研究開始当初の背景

高緯度地域に生育する樹木の凍結抵抗性は非常に高く、それゆえに寒冷地への分布が可能となっている。特に皮層(師部)柔細胞や形成層の細胞は細胞外凍結によって氷点下温度に適応している。この凍結様式は、ある氷点下温度にて最初にアポプラストにて形成された細部外氷晶(結晶状態の水)と細胞内部の一時的な過冷却水(液体の水)との間で生じる蒸気圧差によって細胞内から細胞外へ水が脱水することから始まる。さらに、気温低下にともなって細胞内部の自由水が脱水(凍結脱水)することで、致命的な傷害をもたらす細胞内凍結(細胞内部の水が凍結すること)を回避するものである。これは個々の細胞で対応可能な凍結挙動であり、草本植物などでもみられる一般的な凍結適応様式である。高緯度地域に生育する樹木の細胞では特に凍結抵抗性が高く、高いものでは液体窒素温度でさえも耐える。

一方、木部柔細胞は上記のような細胞外凍結とは異なり、深過冷却によって氷点下温度に適応する。これは発達した細胞壁を有する木部柔細胞に特徴的なシステムであり、数ヶ月に及ぶ野外の厳寒期でも安定して細胞内部の水を過冷却状態に維持できるものである。しかし、この深過冷却能力には限度温度があり、それを越えて冷却されると過冷却が破れ、細胞内凍結を即座に引き起こして致命的傷害を被ることになる。近年、細胞壁による細胞外氷晶の作用に対する物理的な障壁効果と共に、細胞内部の溶質による過冷却促進効果によって深過冷却能がもたらされている事が示唆された。また木部組織の傷害が樹木全体の生育の低下につながることや、木部柔細胞の凍結抵抗性(過冷却能の限度温度)の高低は樹種の緯度的分布とよく対応していることから、樹幹の耐寒性において木部組織の凍結抵抗性は重要な要素である事が強く示唆された。

一方、翌年以降の生長を決定している胚的組織を備えている冬芽では、複数樹種において器官外凍結という特殊な凍結挙動を示す事が知られていた。この仕組みは細胞単位の応答ではなく、冬芽という器官全体での応答機構であることがこれまでの研究によって示唆されていた。特に針葉樹の冬芽でみられるような、凍結脱水した水が冬芽の特定の場所、すなわち鱗片の間やクラウン組織という厚壁細胞群の直下にできる空隙などの細胞外スペースにのみ析出するという特性は、器官全体でもって凍結制御していることを裏付けるものである。

しかし、このような事実はあるものの、この器官を構成する各組織の個々の細胞の応答性はもとより、メカニズムの詳細はほとんど不明のままであった。近年、当研究グループでは、冬芽の凍結挙動を細胞レベルで解析し、そのメカニズムを明らかにしようと試みている。

2. 研究の目的

翌春の成長・生殖器官である樹木の冬芽(葉芽や花芽)では、器官外凍結という冬芽でのみ見出されるような特徴的な方法で氷点下温度に適応すると考えられてきた。特に、冬芽の器官外凍結は、緑葉や皮層でみられる細胞外凍結や木部でみられる深過冷却のように細胞単位で応答するものではなく、組織・器官単位で協同して応答するといわれている。しかしそのメカニズムに関して、細胞レベルや分子レベルでの解析はほとんどおこなわれていない。そこで本研究では、翌年の成長に寄与する非常に重要な冬芽の越冬機構の解明を目指し、器官外凍結などの冬芽の凍結適応について細胞・分子レベルで解析を進め、その理解に努めることを目的とした。本研究期間では、冬芽による体系的な凍結挙動において、個々の細胞が氷点下温度に対してどのように応答するのか等々について解明していくことから開始することにした。

3. 研究の方法

本研究では、冬芽の越冬機構の解明を目指し、器官外凍結をはじめとする冬芽の凍結適応について細胞・分子レベルで解析を進める。

まずは、ニホンカラマツをはじめ複数樹種を選んで、光学顕微鏡や低温走査型電子顕微鏡(cryo-SEM)で冬芽の組織構造や細胞外氷晶の分布を調べる。特に、cryo-SEMでは、細胞外氷晶がどの部位に形成されるのか、さらには細胞内が十分に脱水されているか否かなどについて検証する。同時に、示差熱分析やcryo-SEMによって、組織細胞の内部に残存する水が過冷却しているのか否かを判定する。このような実験結果をふまえ、冬芽が器官外凍結なのかそれ以外の凍結挙動なのかを総合的に判定する。

次に、ニホンカラマツなどにおいて、無傷の冬芽ならびにそこから摘出した原基や芽鱗の細胞の凍結挙動をcryo-SEMで比較するなど、組織・細胞レベルにてメカニズムの解明に努める。

その後、器官外凍結する冬芽や細胞外凍結する冬芽を用い、組織や細胞の凍結抵抗や休眠機構について細胞・分子レベルでの解明にも着手し、冬芽の越冬機構の解析を進める。

4. 研究成果

本研究では、冬芽の凍結抵抗性機構を詳しく分析することで冬芽の越冬機構の理解に努めることを目的とした。その第一段階として、複数樹種の冬芽の凍結様式を精査し、特定の冬芽でのみ見出されるユニークな器官外凍結を中心に、冬芽の凍結挙動のメカニズムを細胞レベルで解析し、凍結適応機構の解明を目指した。

まずは、いくつかの樹種の冬芽を用い、示差熱分析や光学顕微鏡観察、cryo-SEM観察などによって検証し、それらの凍結挙動を分類

した。すると、カラマツのほか、カツラの冬芽でも器官外凍結することが明らかになった。一方、シラカンバの冬芽は細胞外凍結することが明らかになった。

次に、器官外凍結のメカニズムを調べるため、ニホンカラマツ冬芽を構成するいくつかの組織細胞の凍結挙動を cryo-SEM で比較した。すると、無傷の冬芽を氷点下温度にさらした場合、原基の細胞は部分脱水しながらも細胞内に残存する水は過冷却して、細胞内凍結を回避していることが明らかになった。

一方、芽鱗の細胞では細胞外凍結によって脱水することで細胞内凍結を防いでいることが明らかになった。また、厚壁なクラウン組織の細胞群の下側の空隙や芽鱗の間の空間に細胞外氷晶が蓄積するという、器官外凍結の典型的な様子が確認できた。組織毎に細胞は異なる凍結挙動を示したが、冬芽を構成する組織が協同して器官外凍結を維持していることが明確になった (図1)。



図1. 冬芽の器官外凍結の模式図。
器官外凍結するニホンカラマツの冬芽では、芽鱗の間や厚壁のクラウン組織下部の空隙に細胞外氷晶を形成するため、原基組織は細胞外氷晶から隔離されている。

さらに、ニホンカラマツのほか、器官外凍結するカツラの冬芽を構成する各組織の細胞の凍結挙動を cryo-SEM 観察などによって明らかにした。カツラ冬芽では、無傷の冬芽を氷点下温度にさらした場合、原基の細胞は部分脱水しながらも細胞内に残存する水は過冷却して、細胞内凍結を回避していることが明らかになった (遠藤ら, 2012)。一方、それらとは異なり、シラカンバの冬芽では細胞外凍結し、冬芽を構成する各組織の細胞が細胞外凍結することを cryo-SEM 観察で明らかにした。

器官外凍結する冬芽を構成する個々の細胞の氷点下温度に対する応答性 (凍結挙動) を調べると、原基の細胞は部分脱水するため、結果的に深過冷却によって細胞内凍結を回避することが明らかにされた。その深過冷却能について分析を試みることにした。すると、冬芽のメタノール粗抽出液から、水の凍結を阻害する (すなわち水の過冷却を促進する) 活性を検出した。そのため、過冷却活性に関与する成分の単離・同定を試みた。その結果、分画して得られた活性画分 (5.5°C) には、ピニトール、フルクトース、スクロースなど6種類の炭水化物が主要な成分として高濃度で含まれることが判明した。ただし、これ

らの主要な炭水化物のみでは 2.4°C の過冷却活性しか再現できなかったため、この画分に含まれる微量成分についてもさらなる分析が必要と思われた。

また、翌春の成長を担う冬芽の越冬機構に関連し、冬芽の凍結抵抗性 (凍結適応機構) と休眠に関する性質を調べ、冬芽の越冬戦略について理解を深めることにも着手した。

ニホンカラマツの冬芽の休眠機構のうち、自発休眠が解除して強制休眠へ移行する過程の生理変化、なかでも可溶性タンパク質組成の変化について着目した。

そこで、まずはニホンカラマツの冬芽と、開芽のタイミングが他の樹種より早いバッコヤナギの冬芽を用いて自発休眠の解除時期について調べ、タンパク質組成の変化を比較するタイミングを調べることにした。

この結果、それぞれの樹種の冬芽の開芽率が急激に変化する時期が見出された (図2)。

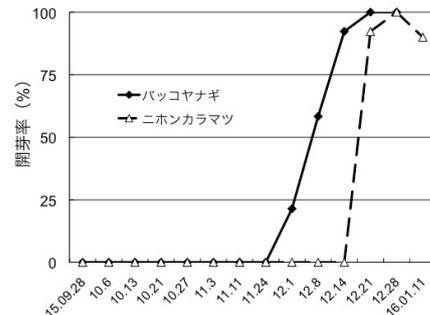


図2. ニホンカラマツとバッコヤナギの冬芽の休眠状態の検証。
各々の時期に採取した枝を水挿しし、23°Cで4週間まで開芽する様子を観察し、開芽率を求めた。

そこで、急激な開芽率が上昇するタイミングを自発休眠の解除時期とみなし、その時期をばさんで前後およそ2週間ずつ期間をばさんで試料を調製し、可溶性タンパク質組成を比較することにした。

そのため、最初に一次元の SDS-PAGE 分析をおこなって、自発休眠解除前後の比較的短期間での可溶性タンパク質組成の変化を調べたが、大きな組成変化は検出できなかった (図3)。

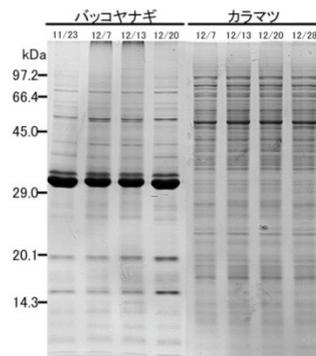


図3. バッコヤナギとニホンカラマツの冬芽の自発休眠解除時期における可溶性タンパク質組成のSDS-PAGE分析。

そこで可溶性タンパク質組成の変化をシ

ヨットガンプロテオーム法によって調べた。ニホンカラマツとバッコヤナギの冬芽を用いて、それぞれ自発休眠の解除前後2週間程度の比較的短期間でのタンパク質の組成変動をLC-MS/MSで調べた。その結果、バッコヤナギでは約880、カラマツでは約690のタンパク質が同定され、そのうち2倍以上の変化が見られたものはそれぞれ41個と14個であった。冬芽の自発休眠解除時期で2倍以上の量的変化が見られたタンパク質が非常に少ないことから、自発休眠が解除して強制休眠に移行する比較的短期間では、タンパク質組成は大きな変化に至らないことが考えられた。そのため、自発休眠期から強制休眠期への移行期間をさらに長くにとってタンパク質の組成を比較することや、休眠に関する転写発現調節もしくは情報伝達系に關与する候補タンパク質に注目して調べるのが今後の課題として考えられた。

以上のように、組織構造学的、生理・生化学的実験を今後も継続することによって、冬芽の越冬機構の詳細をさらに明らかにしていきたい。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 8 件)

- ① 鈴木 伸吾, 高橋 大輔, 桑原 慎子, 上村 松生, 荒川 圭太: 樹木の冬芽の自発休眠の解除期における可溶性タンパク質組成変化の分析. 低温生物工学会誌, 60: 59-63 (2014), 査読有
- ② Kasuga, J., Endoh, K., Yoshiba, M., Taido, I., Arakawa, K., Uemura, M., Fujikawa, S.: Roles of cell walls and intracellular contents in supercooling capability of xylem parenchyma cells of boreal trees, *Physiologia Plantarum*, 148: 25-35 (2013), 査読有, (10.1111/j.1399-3054.2012.01678.x)
- ③ Kuwabara, C., Wang, D., Endoh, K., Fukushi, Y., Arakawa, K., Fujikawa, S.: Analysis of supercooling activity of tannin-related polyphenols. *Cryobiology*, 67: 40-49 (2013), 査読有, (10.1016/j.cryobiol.2013.04.008)
- ④ Wang, D., Kasuga, J., Kuwabara, C., Endoh, K., Fukushi, Y., Fujikawa, S., Arakawa, K.: Presence of supercooling-facilitating (anti-ice nucleation) hydrolyzable tannins in deep supercooling xylem parenchyma cells in *Cercidiphyllum japonicum*. *Planta*, 235: 747-759 (2012), 査読有, (10.1007/s00425-011-1536-3)
- ⑤ Kuwabara, C., Wang, D., Kasuga, J.,

Fukushi, Y., Arakawa, K., Koyama, T., Inada, T., Fujikawa, S.: Freezing activities of flavonoids in solutions containing different ice nucleators. *Cryobiology*, 64: 279-285 (2012), 査読有, (10.1016/j.cryobiol.2012.02.012)

- ⑥ Endoh, K., Fujikawa, S., Arakawa, K.: Freezing behavior of cells in evergreen needle leaves of fir (*Abies sachalinensis*), *Cryobiology and Cryotechnology*, 58: 125-134 (2012), 査読有
- ⑦ 遠藤 圭太, 岡田 香織, 鈴木 伸吾, 藤川 清三, 荒川 圭太, カツラ冬芽の細胞の凍結挙動, 低温生物工学会誌, 58: 179-184 (2012), 査読有

[学会発表] (計 18 件)

- ① 岡田 香織, 遠藤 圭太, 荒川 圭太: 樹木冬芽における有鱗芽と裸芽の凍結適応機構. 日本木材学会北海道支部・平成25年度研究発表会. 平成25年11月28日, 大雪クリスタルホール会議室, 旭川市, 11月28日 (2013)
- ② 鈴木 伸吾, 高橋 大輔, 遠藤 圭太, 岡田 香織, 上村 松生, 荒川 圭太: 樹木冬芽の越冬過程における可溶性タンパク質の組成変化. 日本木材学会北海道支部・平成24年度研究発表会、札幌コンベンションセンター, 11月13日 (2012)
- ③ Wang, D., Kuwabara, C., Endo, K., Fukushi, Y., Fujikawa, S., Arakawa, K.: Supercooling-facilitating hydrolyzable tannins isolated from xylem tissues of *Cercidiphyllum japonicum*. *Plant and Microbe Adaptations to Cold*, Hokkaido University, Sapporo, June 24-28 (2012)
- ④ 桑原 慎子, 寺内 隆二, 高岡 尚生, 栃木 弘, 荒川 圭太, 藤川 清三: 界面活性剤による過冷却促進(氷核形成阻害)効果. 第57回低温生物工学会年会, つくば国際会議場, つくば市, 5月31日~6月1日 (2012)
- ⑤ 遠藤 圭太, 藤川 清三, 荒川 圭太: カツラおよびシラカンバ冬芽の組織細胞の凍結挙動の比較, 第62回日本木材学会大会, 北海道大学, 札幌市, 3月15-17日 (2012)
- ⑥ Wang D., Kuwabara C., Endoh K., Fujikawa S., Arakawa K.: Characterizations of supercooling-facilitating hydrolyzable gallotannins in xylem tissues of *Cercidiphyllum japonicum*, 第62回日本木材学会大会, 北海道大学, 札幌市, 3月15-17日 (2012)

- ⑦ Endoh, K., Fujikawa, S., Arakawa, K. :
Cryo 2011 (The 47th Annual Meeting of
the Society for Cryobiology)
Supercooling-facilitating
activities in larch (*Larix kaempferi*)
dormant buds, Oregon, July 24-27
(2011)
- ⑧ Endoh, K., Arakawa, K., Fujikawa, S. :
Freezing adaptation mechanism of
larch (*Larix kaempferi*) dormant buds
by extraorgan freezing, 9th
International Plant Cold Hardiness
Seminar, Luxembourg, July 17-27
(2011)

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.agr.hokudai.ac.jp/rfoa/env/env3-4.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

荒川 圭太 (ARAKAWA, Keita)
北海道大学・大学院農学研究院・准教授
研究者番号：00241381

(2) 研究分担者

該当なし ()
研究者番号：

(3) 連携研究者

該当なし ()
研究者番号：