

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 25 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17H03763

研究課題名(和文) 果樹、園芸植物等の凍結挙動可視化法の深化と凍結制御機構の新展開

研究課題名(英文) New approaches to visualizing freezing behaviors in plant tissues and their mechanisms involved

研究代表者

石川 雅也 (Ishikawa, Masaya)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・特任研究員

研究者番号：90355727

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,900,000円

研究成果の概要(和文)：植物の最大成分は水だ。水は一般的に氷点下で凍結するが、樹木等は冬季頻繁に凍結温度に曝される。これらの越冬器官は、どのように致死的な細胞内の凍結を回避するのだろうか？本研究では、高分解能の温度可変MRIを利用することで、厚い複雑な器官でも、内部組織がどのように凍結を制御しているか、3D可視化してみることが成功した。この方法で、植物種や組織により凍結様式(凍り方の戦略)が非常に多様性に富んでいること、凍結の順位ルールや、凍結バリアの位置等、凍結様式の詳細や機構が判るようになった。また、国内にも同様のMRIを始めて作成して、凍結様式の可視化解析に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

豪州Western Sydney大学と共同で、高分解能温度可変MRIを利用した植物の凍結様式の多様性や動態、メカニズムの可視化解析の開発に成功した。また、国内にも、稼働できる温度可変MRIが完成し、大型試料も含め、植物の凍結様式や凍結過程の解析に利用できるようになった。これにより世界的に皆無であったMRIのマシントイムが大幅に増加し、研究の進展が期待される。今後、撮像方法を工夫して、様々な解析に利用できるようにする計画で、耐寒性機構や凍霜害回避法の開発に寄与することが可能である。

研究成果の概要(英文)：The major component of plant tissues is water. Water freezes at sub-zero temperatures. Wintering woody perennials are exposed to recurrent freezing temperatures. How do these plant organs can avoid lethal intracellular freezing? In this study, noninvasive visualization of freezing behaviors in these thick complicated plant organs was successfully achieved using high resolution temperature-variable MRI. The results show that the method is very powerful in investigating the diversity, dynamics and mechanisms of freezing behaviors. We also successfully constructed a temperature-variable probe for MRI system in Japan and successfully visualized freezing behaviors of plant tissues.

研究分野：植物生理学

キーワード：水 凍結 耐寒性 凍結様式 MRI 氷核活性 可視化 越冬

1. 研究開始当初の背景

温帯以北に生育する樹木等越年生植物は冬季間、頻繁にマイナス温度に曝される。植物の最大成分は水だ。水は一般的に氷点下で凍結する。これらの植物の越冬器官は、翌年の開花・成長に重要だが、どのように致命的な細胞内の凍結を回避するのだろうか？耐寒性植物は、凍結温度下での致命的な細胞内凍結を回避するため、組織の凍結を制御する能力を進化過程で獲得し、種および器官に特異的な凍結様式(凍結挙動・凍結戦略)をもつに到ったと考えられる。大まかには、積極的に特定部位を凍らせる戦略と凍らずに過冷却を維持する戦略があり、種や組織・器官により大きく異なる(図1)。果樹・花卉の花芽等の複雑な越冬器官が組織水の凍結をどのように統御しているかは、重要な耐寒性機構だが、複雑器官の凍結様式の多様性や動態、制御機構は研究が少なく、よく判っていない。研究の最大の障害は、冬芽や枝等、厚く複雑な植物器官の凍結様式、外部から正確に把握することが困難なことだ。従前の解析法は主に示差熱分析だが、位置情報に欠け、どの部位が凍結・未凍結なのか不明だった。

2. 研究の目的

(1) この問題を解決するためには、複雑かつ厚い植物器官の凍結様式を無侵襲に可視化する手法の開発が必須である。凍結様式可視化法としては、筆者らが20年以上前に開発したMRI法が非常に有効であるが、温度可変可能なMRIのマシナタイムが世界でも非常に少ない点が問題である。MRI法は、凍結するとMRI画像が消失する原理を用いた方法だ(図2)。MRIはその後、機器や解析法の進歩が著しい。最新高分解能MRIがどの程度、有効であるか確認するため、まず、豪州 Western Sydney 大学と共同で、最新の高分解能温度可変MRIによる凍結様式の高感度可視化解析を開始する。また、国内にも利用可能な温度可変MRIを作り、可視化解析法を確立する。これらの新手法を果樹や花卉の越冬花芽・枝等に適用し、凍結様式の動態・秩序と多様性、制御機構を明らかにしていく。

(2) 組織の凍結制御に重要な凍結部位と過冷却部位の境界にある凍結バリアなどに着目し、これらの存在部位や役割を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) Price 氏らの協力の下、豪州 Western Sydney 大学にある 600MHz の高分解能 MRI(図3)を用いて、温度可変装置を装着し、どのような撮像が可能か、何℃まで下げられるか、どのくらい撮像時間がかかるかなど、実際に機器を作動、プログラムを組んで、画像をとりながら、試料を変えながら最適利用方法を探った。

(2) 筑波大工学部寺田氏の協力の下、国内にも利用可能な温度可変型MRIを作成した。また、どのような撮像が可能か、冷却能力なども含め、実際の試料をいくつか使って探った。

(3) このような撮像画像の解析手法についても探った。

(4) これらのMRIを利用して、実際の越冬花芽、枝等の凍結様式の解析を行った。特に、凍結様式の多様性、動態、細部の組織の動向、凍結部位と過冷却部位の境界にある凍結バリアの位置や動向などに着目した。また、3D撮像、高速撮像などについて、試行、解析を進めた。

4. 研究成果

(1) 高分解能3D撮像と冷却能力、試料サイズ

豪州の600MHzMRIは、安全を見て-19℃まで冷却可能で、冷却速度もプログラム制御により2℃/h程度で冷却可能であった。また、試料サイズは2cm x 4cm程度まで可能であることが判った。本器を用いて、高分解能3D撮像を行ってみた。試料サイズや解像度にもよるが、おおよそ数時間から半日程度を要する。+1℃から-19℃まで数℃ごとに画像をとることで、凍結過程や凍結様式を解析可能であることが判った。なお、撮像はすべてプログラムにより、自動撮像可能である。

図1. 越冬器官の凍結戦略(凍結挙動)の典型例

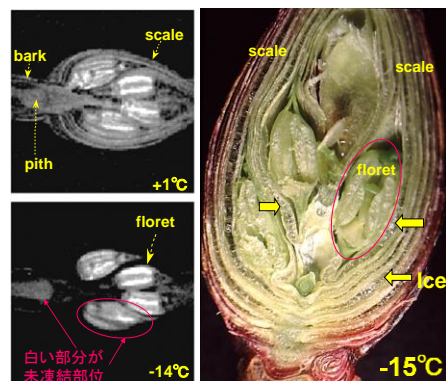
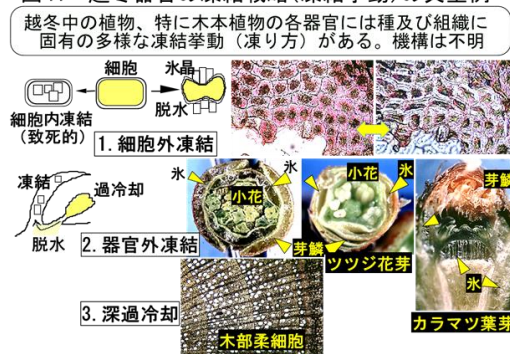


図2 レンゲツツジ花芽の+1℃、-14℃におけるMRI画像(左:白い部分が未凍結水を表すと-15℃での断面(右)。芽鱗片内部に氷結晶が多数ある(Ice

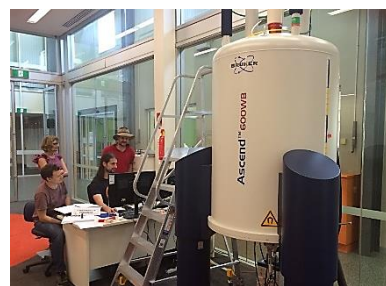


図3. 豪州 Western Sydney 大学の600MHz MRI

(2) 凍結様式の多様性、微細な組織の凍結様式の 3D 可視化解析

豪州 600MHz MRI により、6 種類の材料の冬芽や枝組織の凍結様式の多様性の解析を行った (図 4)。チシマザサやメダケでは、殆どの組織が過冷却をしていた。一方、シラカバやオオバボダイジュでは、ほとんどの組織が細胞外凍結をしていた。このように、種や組織による凍結様式の違いを調査するには、優れた方法といえる。また、この画像は 3D で撮ってあるため、横方向だけではなく、縦方向にも画像を再構成できる。このため、細かい組織も含め、ほぼすべての組織について、凍結様式を調べることが可能である。図 5 はその一例であるが、チシマザサの稈の内外の表皮の画像が消失していることから、稈の表皮だけは細胞外凍結を行っていると考えられた。

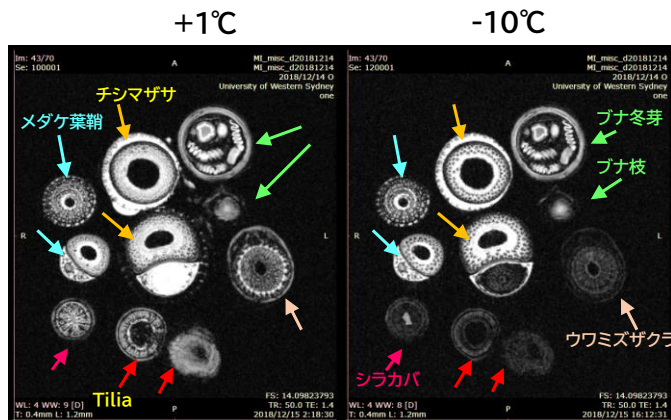


図 4. 600MHz 温度可変 MRI による凍結様式の多様性解析例。植物種により、ほとんどの組織が過冷却するものから、ほとんどが細胞外凍結するものまで、凍結様式の多様性が一目瞭然である。

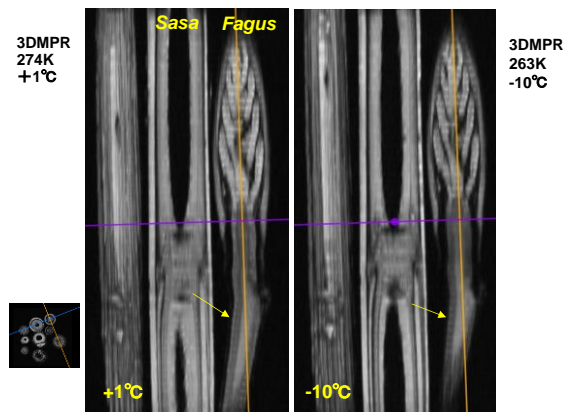
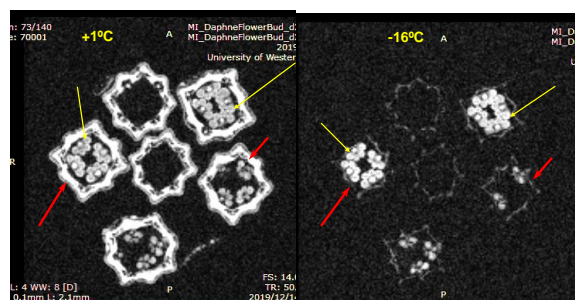


図 5. ヲナ及びチシマザサの 3DMPR 画像。3D 構築により、縦方向の画像も再構成可能である。チシマザサの表皮など細部の組織の凍結様式も可視化可能である。すべての組織の凍結様式を可視化できる優れた方法である。

(3) 凍結部位と未凍結部位の境界に存在する凍結バリアの可視化

同様に 600MHz MRI により、凍結バリアがどこにあるか、可視化することも可能である。エゾナニワズ花芽の一例をあげる。エゾナニワズ花芽では、がく筒、雌蕊の大部分は細胞外凍結する。胚珠も同様であるが、胚珠内の胚嚢だけは、過冷却することが判った。また葯も過冷却する。がく筒と葯は花糸によって連結している。未凍結の葯と凍結するがく筒の間の凍結バリアは花糸の途中にあると考えられた。葯に近い側の花糸は葯と同様に、過冷却していることが判った (図 6)。このように、本法は、凍結バリアの存在部位の解析にも有効であることが判った。



・葯、がく筒の拡大 MRI 像

葯は -16°C でも過冷却状態を維持し未凍結 (yellow arrowed)
がく筒は -5~-6°C で凍結し、細胞外凍結 (red arrowed)
葯の中心にある花糸 (filament) は過冷却で未凍結

図 6. エゾナニワズ花芽の凍結様式の解析。葯は過冷却する一方、がく筒は細胞外凍結をする。葯とがくを結ぶ花糸に凍結バリアがあると考えられるが、葯の付け根の部分の花糸は葯と同様に過冷却していることが判った。

(4) 高速撮像による凍結過程の解析

次に、600MHz MRI で時間分解能をどのくらいまで上げられるか、試行錯誤した結果、画質は落ちるが、最短で約 15 秒ごとの撮像が可能であった (3.5 cm x 1.5 cm の 1 Slice)。これを利用して、レンギョウ枝 3 本を -4°C に放置して 1 晩連続撮像して凍結過程を調べた。その結果、いずれの枝も枝内部の髓から凍結開始し、外側の組織へ広がっていくことが判った。これは、枝を縦に半分に切って、赤外線サーモで撮像した場合の結果とよく似ていた。MRI で高速撮像を行い、凍結過程を観察したのは、世界でも初めてだと思われる。特に組織内部の凍結過程は、赤外線サーモでは観察しにくい、MRI では、無侵襲で凍結過程の観察ができることに意義がある。一方、撮像画像枚数が非常に多くなるため、MRI 撮像を制御する PC のメモリを大量に使うため動作が不安定になる問題も明らかになった。

(5) 国内で利用可能な温度可変 MRI の作成

筑波大工学部寺田氏の協力の下、200MHz の超電導 MRI に挿入できる温度可変 Probe を作成した (図 7)。磁場勾配発生用の x、y、z 方向 Gradient コイルはいずれも平板型のもを自作した。RF コイルも感度の優れたソレノイド型のもを自作した。試料室は横置きで 4 cm x 5 cm までの試料を導入可能で、温度は手動であるが、1-5°C/h で、-20°C まで冷却可能である。冷却温度調節法は、水分を取り除いた乾燥空気を強力な冷風装置 (-40°C 程度) で冷却後、ヒータでコントロールし、Probe 内に導入するシステムとなっている。試料室内の熱電対により温度をモニターし、PID 制御により温調を行う。撮像中に Probe に霜がつく問題は、一切発生しなかった。また、冷却装置は多数のノイズを発生するが、MRI 画像上のノイズは、発生しなかった。

本装置を動かす、ソフトは、寺田研究室の自作のもので、試料により可変でき、最適な撮像条件を選定できる。これを用いて、いくつかの植物の凍結様式の解析を行うことができた。図8にトチノキ花芽の可視化解析事例をあげる。試料室が大型のため、これまで解析できなかった大型試料や複数の小型試料の同時解析が可能である。今後、さらにいろいろな利用法を開発していく予定である。



図7. 筑波大で作成した温度可変MRI装置システム概要と温調可能Probe(自作)とProbe温度の変化

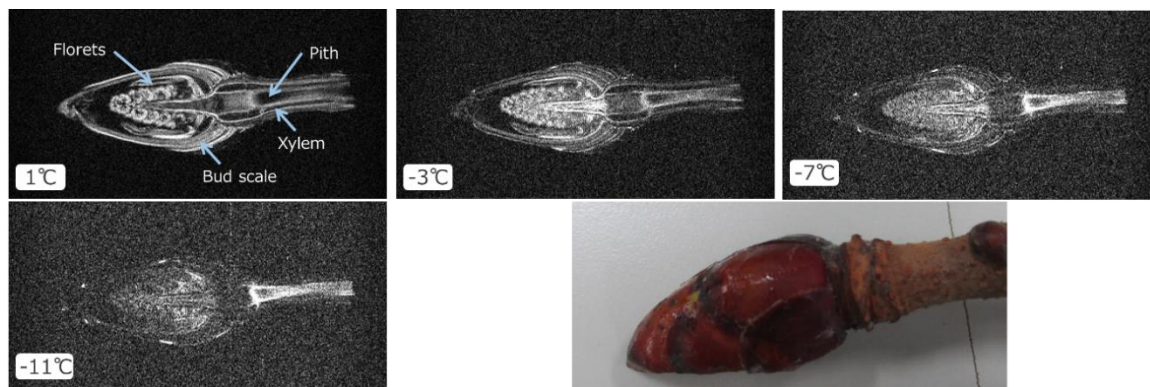


図8. 筑波大の温度可変MRIで撮像した画像例(トチノキの凍結様式)

(6) まとめ

- ①豪州の高分解能 MRI は、非常に強力な可視化能力をもっており、凍結様式の多様性、細部、動態、機構の解析に有効であることが判った。しかし、コロナ禍で大学や施設が事実上閉鎖されたため、期間後半は実験を行うことができなかった。3 DMPR 画像の同時連動解析を行えるようにすることが、今後の課題で、そのためのソフトを世界中で探してようやく見つけることができた。
- ②国内で稼働できる温度可変 MRI が完成し、大型試料も含め、利用できることになった。これにより MRI のマシンタイムが大幅に増加し、研究の進展が期待される。今後、撮像方法を工夫して、様々な解析に利用できるようにする計画である。
- ③今後の本法の普及とため、温度可変 MRI による植物の凍結様式、凍結傷害に関する解析、基礎となる MRI の原理や手法や解釈などについて総説を執筆した (Annual Reports on NMR Spectroscopy Volume 108)。
- ④いずれの温度可変 MRI 可視化解析も共同研究者、研究協力者の理解と協力によるところが多い。深く感謝する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Masaya Ishikawa, Hiroyuki Ide, Tetsuya Tsujii, Timothy Stait-Gardner, Hikaru Kubo, Norihisa Matsushita, Kenji Fukuda, William S. Price, Yoji Arata	4. 巻 45
2. 論文標題 Preferential freezing avoidance localised in anthers and embryo sacs in wintering <i>Daphne kantschatica</i> var. <i>jezoensis</i> flower buds visualised by magnetic resonance imaging	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Plant Cell & Environment	6. 最初と最後の頁 a-b
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/pce.14255	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 久保 光, 石川雅也, 松下範久, 福田健二	4. 巻 66
2. 論文標題 ササ類に含まれる氷核活性物質の探索	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 低温生物工学会誌	6. 最初と最後の頁 105 ~ 109
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.20585/cryobolcryotechnol.66.2_105	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Tim Stait-Gardner, Abhishek Gupta, Allan M. Torres, Scott A. Willis, Zeyu Xiao, Gang Zheng, Masaya Ishikawa, William S. Price	4. 巻 108
2. 論文標題 Magnetic resonance studies of adaptation to freezing and injury in plants	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Annual Reports on NMR spectroscopy	6. 最初と最後の頁 1-63
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/bs.arnmr.2023.06.001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計25件（うち招待講演 3件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 石川 雅也, Stait-Gardner T., 久保 光, 松下 範久, 福田 健二, Price W.S.
2. 発表標題 耐寒性植物の凍結様式詳細の3D非破壊可視化解析
3. 学会等名 第84回日本植物学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Takagawa N, Ishikawa M, Terada Y.
2. 発表標題 Development of variable-temperature MR microimaging system with a large-diameter solenoid coil for a vertical wide bore superconducting magnet.
3. 学会等名 ISMRM 28th Annual Meeting, Sydney (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 石川雅也, T. Stait-Gardner, 久保光, 福田健二, W.S. Price
2. 発表標題 高分解能MRIを用いた複雑な植物器官の凍結様式の非破壊3Dイメージング
3. 学会等名 62回日本植物生理学会 松江
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 石川雅也, T. Stait-Gardner, 久保光, 福田健二, W.S. Price
2. 発表標題 高分解能MRIを用いた凍結バリア部位の3D可視化解析
3. 学会等名 第66回低温生物工学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 宮坂知樹, 高川直也, 石川雅也, 寺田康彦
2. 発表標題 花芽凍結観察用温度可変MRマイクロイメージングシステムの開発
3. 学会等名 第66回低温生物工学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 久保光, 石川雅也, 松下範久, 福田健二
2. 発表標題 亜熱帯性タケ類と温帯性ササ類における氷核活性物質の特性
3. 学会等名 第66回低温生物工学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 宮坂知樹, 高川直也, 石井寛崇, 石川雅也, 寺田康彦
2. 発表標題 温度可変 MRI による植物および食品サンプルの低温撮像
3. 学会等名 第25回NMRマイクロイメージング研究会P5-8
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ishikawa M.
2. 発表標題 Visualization of freezing behaviors in plant organs: diversity and mechanisms involved.
3. 学会等名 12th International Plant Cold Hardiness Seminar (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 石川雅也, Timothy Stait-Gardner, 村川裕基, 山崎秀幸, 朽津和幸, William S. Price
2. 発表標題 MRI によるレンギョウ枝の凍結過程のセミリアルタイム可視化解析
3. 学会等名 第60回日本植物生理学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石川雅也, T. Stait-Gardner, 村川裕基, 山崎秀幸, 朽津和幸, 福田健二, W.S. Price
2. 発表標題 高分解能MRIを用いた植物の凍結過程非破壊可視化法の開発
3. 学会等名 第64回低温生物工学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石川雅也, T. Stait-Gardner, 村川裕基, 山崎秀幸, 朽津和幸, 福田健二, W.S. Price
2. 発表標題 MRIを用いた植物の凍結過程非破壊可視化法の開発
3. 学会等名 第83回植物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 久保光・石川雅也・松下範久・福田健二
2. 発表標題 チンマザサにおける氷核活性物質の探索
3. 学会等名 第131回日本森林学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 久保光、石川雅也、松下範久、福田健二
2. 発表標題 ササ類の氷核活性物質の探索
3. 学会等名 第65回低温生物工学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 石川雅也, T. Stait-Gardner, 久保光, 松下範久, 福田健二, 朽津和幸, W.S. Price
2. 発表標題 高分解能MRIを用いた植物の凍結様式の非破壊3D可視化解析
3. 学会等名 第65回低温生物工学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 石川雅也, Timothy Stait-Gardner, 村川裕基, 山崎秀幸, 朽津和幸, William S. Price
2. 発表標題 MRI によるレンギョウ枝の凍結過程のセミリアルタイム可視化解析
3. 学会等名 日本植物生理学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ishikawa M.
2. 発表標題 Studies on visualization of freezing behaviors and ice nucleation activity of plant tissues.
3. 学会等名 11th International Plant Cold Hardiness Seminar, Wisconsin (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 石川雅也, T. Stait-Gardner, 村川裕基, 山崎秀幸, 朽津和幸, W.S. Price
2. 発表標題 最新MRIを用いた耐寒性木本組織の凍結挙動の可視化解析
3. 学会等名 低温生物工学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 石川雅也, 村川裕基, 山崎秀幸, 朽津和幸, T. Stait-Gardner, W.S. Price
2. 発表標題 レンギョウ枝髓における凍結開始過程の詳細の可視化解析
3. 学会等名 低温生物工学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Ishikawa M, Yamazaki H, Murakawa H, Kuchitsu K, Price WS
2. 発表標題 Visualization of freezing behaviors in cold hardy plant tissues using MRI and infra-red thermography.
3. 学会等名 International Symposium on Imaging Frontier 2017
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Ishikawa M, Murakawa H, Yamazaki H, Kuchitsu K
2. 発表標題 Visualization of freeze initiation in the pith of Forsythia stems using infra-red thermography
3. 学会等名 第58回日本植物生理学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 石川雅也, T. Stait-Gardner, 久保光, 松下範久, 福田健二, W.S. Price
2. 発表標題 耐寒性植物器官の凍結様式の多様性解析手段としての温度可変MRI
3. 学会等名 第63回日本植物生理学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 榎山直人, 高川直也, 石川雅也, 寺田康彦
2. 発表標題 温度可変MRマイクロイメージングシステムを用いた高山植物の凍結過程の評価
3. 学会等名 第67回低温生物工学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 石川雅也, T. Stait-Gardner, 久保光, 松下範久, 福田健二, W.S. Price
2. 発表標題 植物器官の凍結様式の多様性・詳細を高分解能MRIで探索する
3. 学会等名 第67回低温生物工学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 榎山直人, 石川雅也, 寺田康彦
2. 発表標題 温度可変MRマイクロイメージングシステムを用いた高山植物の凍結過程の解析
3. 学会等名 第26回NMRマイクロイメージング研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 石川雅也
2. 発表標題 MRI による凍結様式可視化解析と凍結制御要因
3. 学会等名 日本木材学会組織と材質研究会2022年冬季シンポジウム「樹木の越冬メカニズム」(招待講演)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 Masaya Ishikawa, Hideyuki Yamazaki, Tadashi Kishimoto, Hiroki Murakawa, Timothy Stait-Gardner, Kazuyuki Kuchitsu, William S. Price	4. 発行年 2018年
2. 出版社 Springer, Singapore	5. 総ページ数 409
3. 書名 Ice Nucleation Activity in Plants: The Distribution, Characterization, and Their Roles in Cold Hardiness Mechanisms. In: Iwaya-Inoue M., Sakurai M., Uemura M. (eds) Survival Strategies in Extreme Cold and Desiccation. Advances in Experimental Medicine and Biology, vol 1081.	

1. 著者名 石川雅也	4. 発行年 2018年
2. 出版社 シーエムシー出版	5. 総ページ数 290
3. 書名 植物由来の凍結制御物質の探索と機能評価 in バイオテクノロジーシリーズ 不凍タンパク質の機能と応用 (津田栄編)	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	寺田 康彦 (Terada Yasuhiko) (20400640)	筑波大学・数理物質系・准教授 (12102)	
研究分担者	福田 健二 (Fukuda Kenji) (30208954)	東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・教授 (12601)	
研究分担者	朽津 和幸 (Kuchitsu Kazuyuki) (50211884)	東京理科大学・理工学部応用生物科学科・教授 (32660)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	プライス (Price William S.)	ウェスタンシドニー大学・Organisation and Dynamics・Professor	
研究協力者	ステイトガードナー (Stait-Gardner Timothy)	ウェスタンシドニー大学・National Imaging Facility	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
オーストラリア	Western Sydney大学	Nanoscale Organisation and Dynamics	National Imaging Facility