



Title	木本類の耐凍性増大過程 : ニセアカシアの幹の耐凍性と物質変動との関係
Author(s)	吉田, 静夫; 酒井, 昭
Citation	低温科学. 生物篇, 25, 29-44
Issue Date	1967-12-25
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/17718
Type	bulletin (article)
File Information	25_p29-44.pdf



[Instructions for use](#)

木本類の耐凍性増大過程 XII*

ニセアカシアの幹の耐凍性と物質変動の関係

吉田 静夫・酒井 昭

(低温科学研究所 植物凍害科学部門)

(昭和42年9月受理)

I. 緒 言

Siminovitch¹⁻⁴⁾等はニセアカシアの皮層組織を用い、長年の間、耐凍性の変動と糖および水溶性蛋白質の含量の変動との間の関係を調べ、耐凍性と水溶性蛋白質との間には平行関係が認められるが、耐凍性と糖含量との間には平行関係すら認められないとのべている。さらに彼は耐凍性と炭水化物との関係については、糖が増加するために耐凍性が増すのではなく、澱粉の減少が結果として耐凍性をたかめているにすぎないとのべている。

耐凍性と糖との間の関係をしらべる従来の研究^{5,6)}は、たんに両者の平行関係を求めるだけで、両者の間の因果関係を求めようとする傾向は少なかった。酒井^{7,8)}はクワの皮層組織を用いて、季節の変動の場合にも、秋や春の人工的低温処理の場合にも、耐凍性と糖の含量とは平行して変動することを明らかにした。さらにクチナシの葉を用いて、人工的に葉柄から糖を増加させたときには、細胞内の浸透濃度がたかまったし、また葉の中の糖が増したことを明らかにした^{8,9)}。なおその場合、糖の増加につれて耐凍性もたかまった。さらに Trunova¹⁰⁾は、小麦の子葉鞘を用い、人工的に糖を増加させたとき、 -9°C から -20°C まで耐凍性がたかまったことを報告している。これらの事実から、少なくとも耐凍性の状態にある植物では、大なり小なり糖が増せばそれに応じて耐凍性がたかまることは明らかである。

クワの皮層組織^{7,8)}では、水溶性蛋白質は、季節的変動の場合ほぼ耐凍性と平行して増大するが、低温処理して耐凍性が増大するときには、糖とちがって全く変動しない。それ故に耐凍性の増大を Siminovitch 等のいうように水溶性蛋白質の量の増大だけでは説明できないものと考えられる。

最近 Siminovitch¹¹⁾等はニセアカシアの皮層組織を用いて、耐凍性と水溶性蛋白質との関係についてさらに詳細な研究を行なった結果、従来の考えと同様に、耐凍性の増大に直接的に関与しているのは水溶性蛋白質であって、糖は耐凍性増大に関与していないと結論している。そして炭水化物の役割として、澱粉の減少が二次的に耐凍性をたかめているにすぎないとのべている。しかしこのていどの実験結果から、ただちに上のような結論をくだすことはでき

* 北海道大学低温科学研究所業績 第847号

ないように思う。たとえば最近の結論の基礎となっている糖の定量値は、1953年³⁾のデータをそのまま使用していて、糖の量については再検討を行っていない。また彼の実験では、7~14日間の短期間の低温処理後における耐凍性と糖の量の変動についてはなにも調べていない。さらに凍結実験においては、彼は -70°C まで冷却後、液体窒素中に入れたので、耐凍性の最低の状態から最高値までについて、糖および水溶性蛋白質含量との関係を調べたとのべているが、 -70°C まで冷却後、液体窒素中に入れて生存していたからといって耐凍性が最高値にまでたかまったとはいえない¹³⁾。

以上のように、彼の実験にはなおいろいろ問題点があるので、耐凍性と糖および水溶性蛋白質との関係、ことに耐凍性と糖との関係をより明らかにするために、Siminovitch等が用いているニセアカシアの皮層組織を用いて、この問題を検討してみた。

本実験は1966年7月から1967年6月までの間に行なったものである。

実験材料を送付して頂いた農林省林業試験場九州支場、高木哲夫技官に謝意を表します。

II. 材料と方法

材料： 札幌および熊本で生育しているニセアカシア (*Robinia pseudo-Acacia* L.) の幹の皮層組織を用いた。幹の太さは胸高でいずれも20~25 cmで樹高は5~6 mであった。

所定時期に、地上50~100 cmの幹の北側から2×5 cmの大きさの皮層組織のブロックを島状に、1本の幹の同じ高さの近接した部位から1~3個ずつ材の表面から剥ぎとった。物質の定量と耐凍性の大きさの測定は、剥ぎとった同一ブロックについて行なった。剥ぎとった皮層組織の一部はただちに含水量測定に供し、他はこれを2等分して一方は対照とし、他方は 0°C で2週間低温処理して、それぞれ耐凍性および浸透濃度の測定に使用した。なお残りは乾燥ないようにポリエチレンの袋に入れて、 -30°C の低温室に直接入れ凍結保存し物質の定量に用いた。材料の採取にさいしては、木を正常な状態に保ち、かつ皮層部を通じての物質の移動を妨げないように留意し、剥ぎとったあとに少量のワセリンをぬって保護した。1967年8月現在、実験に使った木はすべて正常に発育している。実験には同一場所に生育しているニセアカシア3本を使用した。個体番号をそれぞれNo. 1, 2, 3と表わした。

含水量： 含水量の測定は試料採取直後、生重量で約500 mgを秤量し、 105°C で4時間乾燥して求め、生重量あたりの百分率で表わした。

細胞の生死の判定： 融解した組織小片から縦断切片約10個をとり、中性赤で生体染色してから、高張な平衡塩溶液中で原形質分離させた。平衡塩溶液と水との間で原形質分離と復帰を2回繰り返したのち、なお正常に染まり原形質分離している細胞を生きているものとみなした。

耐凍性の測定： 耐凍性の大きさを調べる場合には、約1.5×0.7 cmに切り取った皮層組織を少量の水でぬらしてからポリエチレン袋でつつみ、 -5°C の低温室に入れた。約30分後に凍結していないものは人工的に植氷して、30分ごとに 5°C ずつ低い恒温箱に移し、所定温度まで冷却した。そこに16時間保ってから、 0°C の空中に取り出して融かした。 -70°C まで

の凍結に耐える細胞は、それ以下のどんな温度にも耐えるので、この程度まで耐凍性がたかまった材料では、普通の方法では耐凍性の大きさをはかることができない。したがってこれらの耐凍性のたかい材料では、いろいろな温度で予備凍結してから、液体窒素中に入れたのち、害をうけない最高の予備凍結温度で耐凍性の大きさをあらわした¹²⁻¹⁴⁾。液体窒素中に入れるときは、組織のブロックをポリエチレンシートでつつみ、糸でしばりおもりをつけて、いろいろの温度で予備凍結後¹³⁻¹⁴⁾、液体窒素中に投入した。そこに5分間おいたのち、 -30°C の低温室に取り出し、その温度に2時間おいてから 0°C の空中でゆっくり融解させた。液体窒素で処理してから -30°C に2時間置くのは、細胞内にできた氷晶核の生長速度が -30°C 近くで最も大きいので、もし予備凍結後の急速冷却中に細胞内に氷晶核ができておれば、それらは液体窒素から取り出して -30°C におく間に、細胞に有害となる程度まで生長すると考えられるからである。

浸透濃度： 細胞の浸透濃度は平衡塩溶液を用い、限界原形質分離濃度を測定してきめ、食塩濃度で表わした。

炭水化物および多価アルコールの定量： 外側の死んでいる樹皮を除去したのち、生きている皮層組織を生重量で500 mg 秤量し、蒸留水10 mlと少量の石英砂を加えて十分に磨砕してホモゲネートを作った。これを遠沈して上清をとり、沈澱は再び10 mlの蒸留水に懸濁後、再び遠沈して上清をあつめ、上記の上清と混合した。この上清に、トリクロール酢酸を最終濃度が10%になるように加えて除蛋白した。除蛋白した上清を糖の定量に用いた。

糖のペーパークロマトグラフは、ブタノール：酢酸：水(120:30:4)の展開液を用い上昇法で5回展開し、各成分に相当する部分を切り取って水であらい流し、アンスロン法で比色定量した。アンスロン試薬に対する各糖の発色度は異なるので¹⁵⁾、比色定量後各糖について補正した。

澱粉ははじめの水抽出したあとの残査を 0°C に冷えた52%過塩素酸で抽出し、アンスロン法で比色定量した。澱粉の抽出は全て 0°C の低温室で行なった。

多価アルコールの定量は、皮層組織を生重量で500 mg 秤量し、石英砂と共に十分磨砕して80%エタノールで十分抽出してえられた上清を減圧下で濃縮し、エーテルで脱脂後1 mlの蒸留水に溶かした。その0.2 mlをWhatman No. 1濾紙片に一度吸着させ、ついで、常温で乾燥後、10 mlの水で溶出した。その一定量を過ヨウ素酸で酸化後、クロモトローブ酸で比色定量した¹⁶⁾。

水溶性蛋白質の定量： ホモゲネートからトリクロール酢酸で沈澱した蛋白質は、20 mlの蒸留水に懸濁し、その1 mlをマイクロケルダール法に基づいて分解したのち、カセイソーダで中和し、Fels and Veatch法¹⁷⁾で窒素を定量した。

リン脂質の定量： 生重量で2 gの試料を少量の石英砂と共に 0°C の低温室で磨砕して、Schneider法により分画し、クロロホルム：メタノール(1:1)で常温で3回抽出した。抽出液は減圧下で濃縮し、2 mlのクロロホルム：メタノール(1:1)で再び抽出し、その0.04 mlを5規定硫酸で加熱分解した。リンはFisk and Subbarow法で定量した。上のべた抽出液の

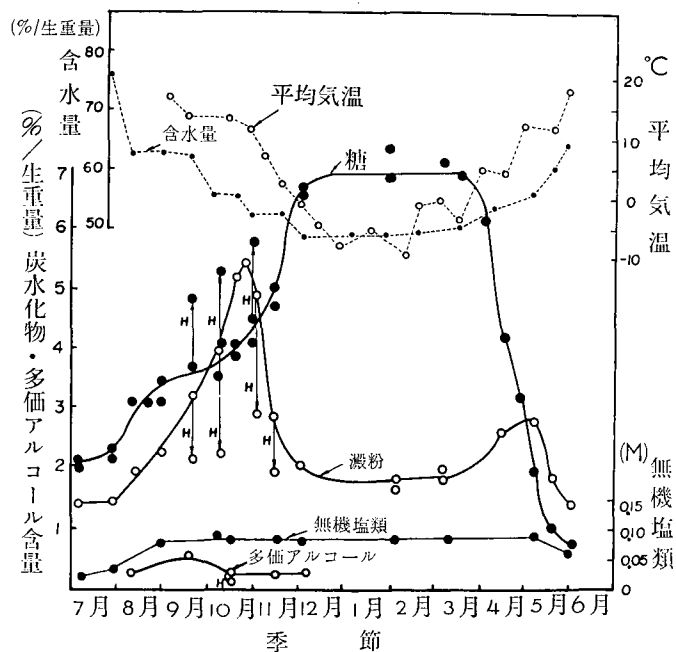
0.05 ml を薄層クロマトグラフィーでクロロホルム：メタノール：水 (65 : 25 : 4) を溶媒として 30 分間展開し、風乾後、モリブデン酸アンモニウム一過塩素酸試薬¹⁸⁾ で発色させた。プレートは、シリカゲル G (Merk 製) と水を 30 : 50 の割合で作ったものを使用した。

無機塩類の定量： 皮膚部小片を室温から直接液体窒素中に入れて凍結し、融解後搾汁をとり、その一定量を灰化した。それを一定量の蒸留水に溶かして氷点降下法によってモル濃度を求めた。

III. 結 果

1. 炭水化物、多価アルコールおよび無機塩類の季節変動

No. 1 の個体を用いて定量した結果を第 1 図に示す。生重量当りの糖の量は、5 月から 6 月に最低値を示す。8 月上旬からかなり増加しはじめ、9 月下旬から 10 月上旬にかけて増加の度合は一時ゆるやかになるが、10 月下旬以降、澱粉の減少と共に急速に増加し、12 月初旬に最大値に達する。冬の間、最大値を維持し、4 月中旬以降、芽がふくらみかけると同時に急速に減少しはじめ、芽が開舒し新梢が伸長する 5 月中旬には最低値を示す。含水量は 9 月下旬から漸次減少し、11 月下旬に最低値に達する。その後 3 月下旬までその値を維持し、のち再び増加する。



第 1 図 ニセアカシアの皮膚組織に含まれている炭水化物の季節変化

材料は No. 1 の個体を用いた。炭水化物、多価アルコールおよび水の量は生重量あたりの百分率で示す。無機塩類の量はモル濃度で示す。H は 0°C で 2 週間低温処理したことを示し、そのときの含有量の変動を矢印で示す

澱粉は8月上旬頃から糖の増加と平行して増加し、落葉が8分通り進んだ10月下旬に最大値に達し、その後、急速に減少し、12月初旬に最低値に達する。春は3月下旬から5月上旬まで再び増加するが、量的には秋の最大値の半分にすぎない。新梢が伸長を開始する5月上旬頃になると減少しはじめ、6月上旬に再び最低値となる。秋に澱粉が減少し始める時の平均気温は約10°Cであり、平均気温が0°Cになるまえにすでに最低値に達している。春は、平均気温が5°C以上になれば澱粉は増加しはじめる。春においてNo. 3の個体で測定した澱粉と糖の量の変動の結果は第2図に示した。

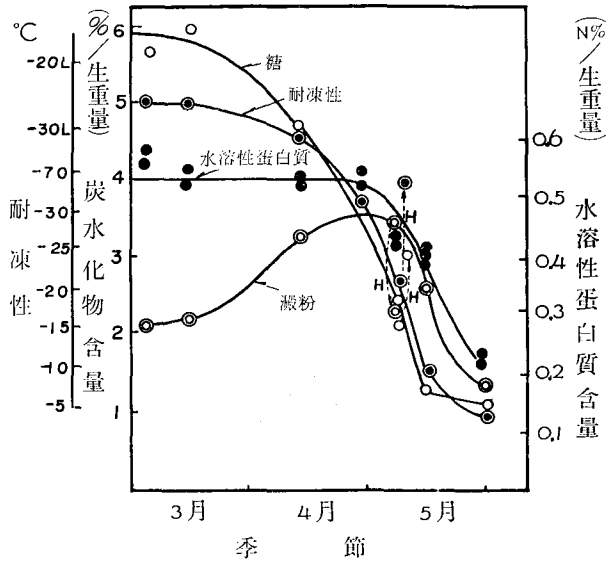
10月15日に0°Cで2週間人工的に低温処理すると、例外なく3~

4割、糖が増加するし(第1図)、5月初旬に低温処理しても糖は増加する(第2図)。低温処理前後における糖と澱粉の変化は互に逆方向に進み、明らかに澱粉から糖への変化がおきていることを示している。

ニセアカシアの皮層組織に含まれている多価アルコールの量は、生重量あたりで0.2~0.5%で、季節的にほとんど変動を示さないし、低温処理の前後でもほとんど変化しない(第1図)。

無機塩類の量は、9月から4月までほとんど変化しない(第1図)。

つぎに、8月から12月までの皮層組織に含まれている糖を、ペーパークロマトグラフィーで調べた結果を第1表に示す。ニセアカシアの皮層組織に含まれている糖の組成は、夏は蔗糖が大部分で、グルコース、フラクトースは微量検出されるにすぎない。蔗糖は、秋から冬にかけていちぢるしく増加する。11月以降はスタキオースとラフィノースの増加が顕著である。10月15日に人工的に低温処理すると、蔗糖も増加するが、増加率はスタキオースとラフィノースがいちぢるしい。しかし、グルコースとフラクトースはほとんど変化なく、12月にやや増加する。8月10日から10月15日までは、含まれている全糖量に対する蔗糖の割合は90%であって、この間の糖の増加の大部分は蔗糖の増加で説明できる。11月以降は、スタキオース、ラフィノースのほか、グルコースとフラクトースも増加するので、全糖量に対する蔗糖の割合は90%から70%に低下する。ラフィノースやスタキオースのアンスロン試薬に対する発



第2図 春におけるニセアカシアの皮層組織の物質変化と耐凍性との関係

材料としてNo. 3の個体を用いた。耐凍性はほとんどすべての細胞が害なく生存し得る最低温度で示した。Hは0°Cで2週間低温処理したことを示し、破線をもった矢印は処理後の変動を示す

第1表 ニセアカシアの皮層組織に含まれている糖の種類の種類
季節的および低温処理前後における変動

期 日	糖 の 種 類					糖の総量 (%/W.W)	糖の全量に 対する蔗糖 の割合 (%)
	蔗糖	ラフィノース	スタキオース	グルコース	フラクトース		
8月10日	2.24*	0.03	0.04	0.09	0.08	2.48	90.3
9月19日	3.43	0.04	0.09	0.07	0.09	3.72	92.2
10月15日	3.72	0.09	0.09	0.07	0.17	4.14	89.8
10月15日(H)**	4.51	0.23	0.63	0.08	0.14	5.59	80.6
11月15日	4.68	0.09	0.22	0.14	0.07	5.20	90.0
12月2日	4.68	0.38	0.76	0.24	0.16	6.22	70.6

糖はペーパークロマトグラフィーで分離後定量した

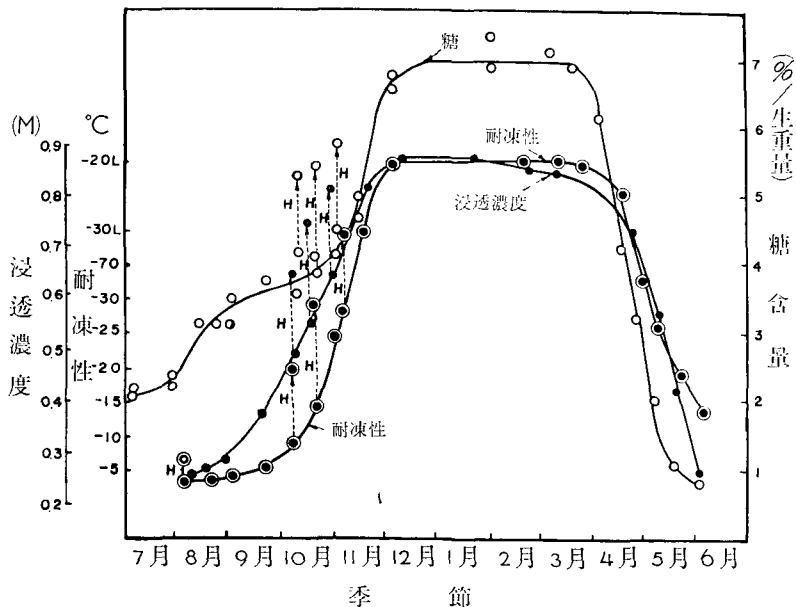
* 糖の量はすべて生重量あたりの百分率であらわした

** (H) は10月15日の材料を0°Cで2週間低温処理したことを示す

色度は、グルコース100に対して57と低い¹⁵⁾。したがって、糖の抽出液について、直接アンズロン法で比色定量した場合の定量値は、実際よりも低めの値を示すことがあっても、過大評価するおそれはない。

2. 糖と耐凍性の関係

糖と耐凍性との関係を同じ材料について測定した。第3図にその結果を総括して示す。9月下旬には、皮層細胞は-5°C、16時間の凍結に耐えるようになるが、それ以前は-5°Cの短



第3図 ニセアカシアの皮層組織における糖の量と耐凍性との関係

材料はNo. 1の個体を使用した。浸透濃度は食塩の濃度で表わした。耐凍性はほとんどすべての細胞が害なく生存している最低温度であらわした。-20L, -30Lは、それぞれ、-20°Cあるいは、-30°Cで予備凍結してから液体窒素中に入れたことを示す。Hは0°Cで2週間低温処理したことを示し、矢印をもった破線は低温処理後の値の変動を示す

時間の凍結にしか耐えられない。10月以降、耐凍性は急速に増大し、12月初旬に最高値に達し、 -20°C で予備凍結してから液体窒素中に入れても生存できるようになる。このような季節的変動の場合は、9月から12月初旬までの糖の増加と耐凍性の増大、および、3月以降の糖の減少と耐凍性の減少との間に平行関係が認められる。しかし、耐凍性がきわめて低い7月から8月にかけて、糖は可成り増加しているが、皮膚細胞の浸透濃度はほとんど増加していない。なお、いずれの場合も、低温処理によって、糖も耐凍性も平行的に変動する。

3. 水溶性蛋白質と耐凍性との関係

Jones and Phillips¹⁹⁾ は、ニセアカシアの皮膚組織中の蛋白質はグロブリンとアルブミンが主体であると報告している。もし、塩可溶性のグロブリンの量がアルブミンよりも相対的に多いか、季節的に両者の間で変換があるならば、水溶性蛋白質の量だけで耐凍性との関連を論ずることはできない。そのために、No. 1の個体について10月5日と11月15日の材料を蒸留水で抽出した場合と、0.5 M 食塩溶液で抽出した場合の可溶性蛋白質の量を比較してみた(第2表)。

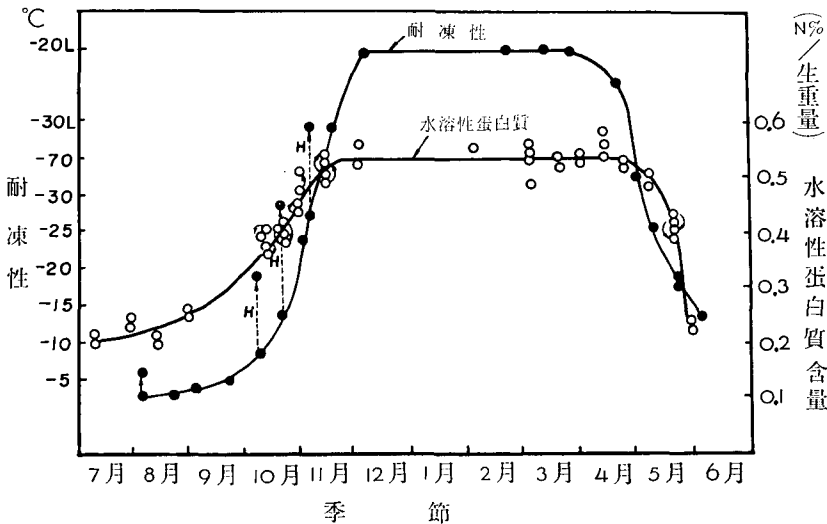
0.5 M 食塩水で抽出した場合は、水で抽出した場合よりも、つねに、生重量あたりの N の量にして約 0.05% 位大きな値を示す。

No. 1の個体について調べた水溶性蛋白質と耐凍性との関係を第4図に示す。水溶性蛋白質は、9月以降いちぢるしく増大し、11月下旬か12月初旬に最大値に達する。その後、4月

第2表 水で抽出した場合と 0.5 M 食塩溶液で抽出した場合の可溶性蛋白質の量

期 日	可溶性蛋白質の量	
	水で抽出	0.5 M 食塩水で抽出
10月5日	0.27*	0.32
11月15日	0.44	0.49

* 蛋白質の量は、生重量あたりの N の百分率で示す



第4図 ニセアカシアの皮膚組織における水溶性蛋白質の量と耐凍性の季節変化

材料は No. 1の個体を使用した。耐凍性はほとんどすべての細胞が害なく生存し得る最低温度で示した。 -20L 、 -30L の略号は第3図に同じである。Hは 0°C での2週間低温処理したことを示し、矢印をもった破線は低温処理後の変動を示す

下旬までこの値を維持し、5月に入って芽が開舒し新梢が伸長しはじめると共に急速に減少する。秋から冬にかけて耐凍性が増大する過程では、耐凍性と平行して水溶性蛋白質がいちぢるしく増大するが、春は耐凍性が -20°L から -30°C まで低下しても、水溶性蛋白質はそのまま冬の最高値を維持し、耐凍性が低下しはじめてから約1ヵ月後に急に減少する。低温処理しても水溶性蛋白質の量はほとんど変わらない。このことは、No. 3の個体についても同様である(第2図)。

第3表 水溶性蛋白質と耐凍性との量的関係

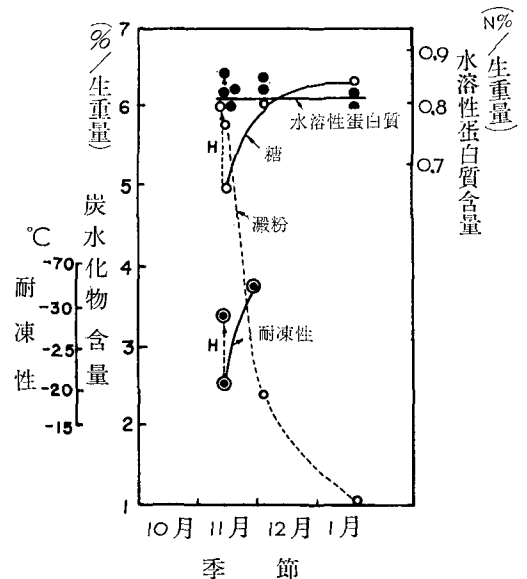
実験期日	耐凍性* ($^{\circ}\text{C}$)				糖の量 (%/W.W)				水溶性蛋白質 (N %/W.W)			
	No. 1	No. 2	No. 3	No. 4	No. 1	No. 2	No. 3	No. 4	No. 1	No. 2	No. 3	No. 4
10月15日	-15	-8	-5	—	4.1	4.3	3.5	—	0.38	0.35	0.33	—
11月15日	-30L	-70	-70	-20	4.9	6.0	4.7	5.2	0.53	0.44	0.49	0.82
12月2日	-20L	-25L	-25L	-50	6.7	6.6	5.8	6.1	0.54	0.41	0.52	0.83
1月21日	—	—	—	—	—	—	—	6.3	—	—	—	0.82
2月2日	-20L	-25L	-25L	—	6.9	6.6	5.9	—	0.54	0.41	0.52	—

* 耐凍性はほとんどすべての細胞が害なく生存し得る最低温度で示し、 -20L 、 -25L 、 -30L は、それぞれ、 -20 、 -25 および -30°C で予備凍結後液体窒素中に入れたことを意味する。No. 1~No. 3は札幌で生育している材料を、No. 4は熊本で生育している材料を航空便で札幌に送付したものを使用

水溶性蛋白質の量は、使用する材料の個体差が大きい(第3表)。同時期において、No. 2とNo. 3の個体の耐凍性はほぼ同じであるが、No. 2の水溶性蛋白質の量はNo. 3よりも約20%小さい。また、九州の材料では、札幌の材料の2倍近くの水溶性蛋白質を含むのに、耐凍性はいちぢるしく小さい。したがって、量的には、水溶性蛋白質と耐凍性との平行関係はみとめがたい。

4. 木の生育地の違いと耐凍性ならびに物質の季節変動

ニセアカシアの生育地の違いが、耐凍性と物質変動にどう影響するのかわかるために、定期的に熊本から航空便で送られてきた材料について、炭水化物、水溶性蛋白質および耐凍性を調べた結果を第5図に総括して示す。材料の都合上、全季節について調べることができなかったが、札幌では、糖が12月初旬に最大値に達するが、熊本では1月中旬



第5図 九州で生育しているニセアカシアの皮層組織における炭水化物および水溶性蛋白質の量と耐凍性との関係

耐凍性はほとんど全ての細胞が害なく生存し得る最低温度で示した。Hは 0°C で2週間低温処理したことを示し、破線をもった矢印は処理後の変動を示す

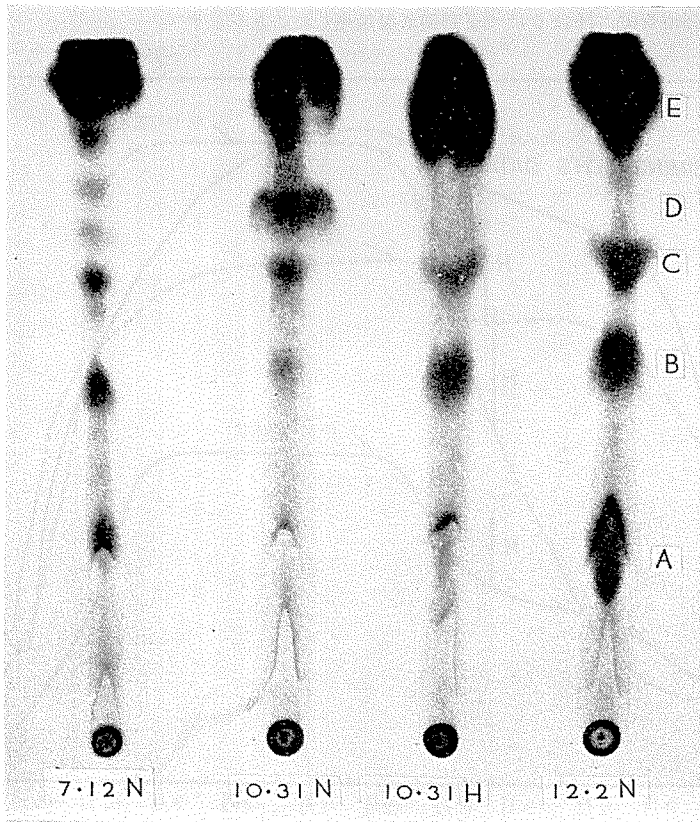
まで増加する。澱粉も、札幌では、12月初旬に最低値になるが、熊本では1月中旬まで減少する。11月15日に低温処理すると、糖が増大しこれに平行して耐凍性も増大する。水溶性蛋白質は、11月15日にすでに最大値を示しており、糖や耐凍性の最高値に達する時期とは明らかにずれている。低温処理すると、水溶性蛋白質は0.02~0.03%増大したが、これは定量誤差の範囲内にあるものとおもわれる。したがって生育地が異なっても、耐凍性や物質変動には本質的な差異はなく、気温や日長の違いに基づく位相のずれとして現われる。

5. リン脂質の季節変動と耐凍性との関係

第4表に、Schneider法で分画したリン脂質の定量値を示す。

なお、図示しなかったが、7月に低温処理しても、定性的には何等変化が認められなかった。なお、各スポットについては、まだ同定していない。

No. 2の個体では、7月には生重量2gあたり89.8 μ gであるが、12月には、181.4 μ gと約2倍近く増加している。しかし、10月31日にはすでに冬の値近くまで増大しており、こ



第6図 ニセアカシアの皮層組織に含まれるリン脂質の薄層クロマトグラム

NおよびHはそれぞれ無処理の対照および0°Cで2週間低温処理したことを示す
プレート：シリカゲルG (Merk 製)

展開溶媒：クロロホルム：メタノール：水 (65:25:4)

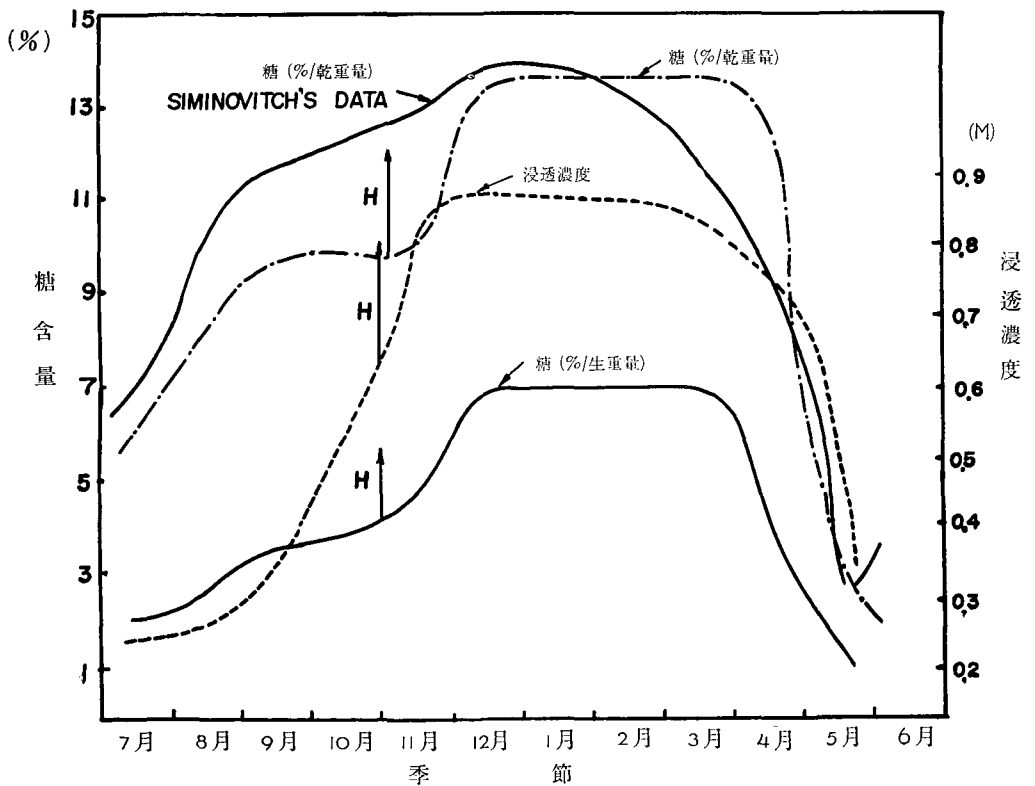
発色試薬：モリブデン酸アンモニウム—過塩素酸を噴霧して100°Cで5分間加熱

第4表 リン脂質, 糖および水溶性蛋白質量と耐凍性との関係

実験試料	期 日	リン脂質 (P μ g/2 gW.W)	糖 (%/W.W)	水溶性蛋白質 (N %/W.W)	耐 凍 性* ($^{\circ}$ C)
No. 2	7月12日 N**	89.8	—	—	-5
	7月12日 H	86.9	—	—	-5
	10月31日 N	178.6	5.3	0.42	-20
	10月31日 H	177.8	6.2	0.42	-70
	12月2日 N	181.4	6.7	0.40	-25 ^L
No. 3	10月5日 N	89.5	3.2	0.30	-5
	10月5日 H	136.8	4.4	0.32	-20
	10月15日 N	116.4	3.5	0.34	-8
	10月15日 H	127.8	4.6	0.33	-23

* 耐凍性は、ほとんどすべての細胞が害なく生存している最低温度で表わした。-25^Lは-25 $^{\circ}$ Cで予備凍結後、液体窒素中に入れたことを示す

** Nは無処理の対照, Hは0 $^{\circ}$ Cで2週間低温処理したことを示す



第7図 生重量あたりの糖の量と乾重量あたりの糖の量の比較

材料は No. 1 の個体を用いた。H は 0 $^{\circ}$ C で 2 週間低温処理したことを示し、そのときの含有量の変動を矢印で示す。なお、比較のため、Siminovitch³⁾ のデータを蔗糖と還元糖の量を加えて表わした

で低温処理しても増加しなかった。また、7月に低温処理しても変わらなかった。一方、No. 3の個体では、10月5日と10月15日に低温処理するとリン脂質はいちぢるしく増加した。

薄層クロマトグラフィーで調べてみると(第6図)、9つのスポットが確認され、これらのうち、Rf値0.35のA、Rf値0.50のB、Rf値0.65のC、および、Rf値0.8~0.97のEが季節的にも増加するし、低温処理後にも増加している。10月31日の無処理の場合、Rf値が0.7の物質Dが一次的に増大し、低温処理後に消失、あるいは減少している。

6. 糖の量の表わし方

乾物重量で表わした場合と、生重量あたりで表わした場合の糖の季節変化を第7図に示す。

乾物重量あたりで糖の量を表わすと、7月から9月にかけて Siminovitch³⁾等の結果と一致するが、本実験では11月以降再び急速に増大する。11月以降の糖の増加は澱粉の減少による。9月から10月にかけての糖の増加率の低下は、生重量あたりで表わしても認められ、澱粉が最大値に達する時期と一致する(第1図参照)。

皮層柔細胞の浸透濃度の変化は、生重量あたりの糖の変化とほぼ平行する。また、低温処理後の糖の量は、どの表わし方でも確実に増加しているし、浸透濃度も増加している。なお、低温処理中に含水率はほとんど変化しなかった。

IV. 考 察

本報では、ニセアカシアの幹の皮層組織について、炭水化物、多価アルコール、リン脂質および水溶性蛋白質の含有量を季節的に調べると共に、0°Cで2週間低温処理して、その処理による物質の変動を調べた結果、耐凍性と糖およびリン脂質の間には、季節的変動の場合にも、人工的低温処理の場合にも、平行的に増大することが明らかになった。

Siminovitch³⁾等は、乾重量で表わした蔗糖の量が、耐凍性がまだ小さい9月に、すでに最大値に達することを、糖が耐凍性に関与していない重要な根拠の一つとしている。しかし、彼は、蔗糖と還元糖を別々に定量して、耐凍性と糖の関係を論ずるのに蔗糖だけを問題にし、還元糖の変化を無視している。第7図に示したように、彼のデータを蔗糖と還元糖の量を加えて表わせば、糖全量として9月に最高値に達することなく12月まで増加している。彼は、ニセアカシアの皮層組織の糖をペーパークロマトグラフィーで調べ³⁾、非還元糖としては蔗糖、還元糖としてはグルコース、フラクトースおよびマルトースが含まれていることをあきらかにしている。しかし、糖抽出液の非還元糖をすべて蔗糖とみなしている。ところが、著者等が調べた結果では、8月から11月初旬までは、Siminovitch等がのべているように、蔗糖が全糖量の90%をしめているが、11月中旬以降12月まで、蔗糖以外に非還元糖であるスタキオースとラフィノースの増加がいちぢるしいため、蔗糖の全糖量に対する割合は70%まで低下している。一方これに対して、還元糖であるグルコースとフラクトースの含量は、12月に多少増加するが、それらの和は全糖量の6%にすぎない。

第7図に示したように、糖の量を乾重量あたりで表わした方が8~9月の糖の増大は大きく、9~10月にはっきりした水平部が現われる。生重量あたりで表わしても、8~9月に一時

的にいちぢるしい糖の増大が認められるが、9~10月にその増加の度合が再び低下する。

一方、糖の量と浸透濃度の値を比較すると、8~9月には、糖の増加と浸透濃度の増加とは一致しない。さらに多価アルコールの量は少なく、糖に比較してほとんど無視できる程度であり、無機塩類も0.1M以内である。したがって、浸透濃度は細胞内の糖の濃度を忠実に反映しているものと考えられる。それ故に、8~9月の一時的な糖の増加は、皮層組織の皮層柔細胞における糖の増加のほかに、葉から転流して来る篩管の中の糖に由来するものもありうることを示しているかも知れない。この時期の糖のほとんどが蔗糖であることも、上の推測の妥当性を裏付けているように思われる。糖の量を乾重量あたりで表わした曲線で、9~10月に現われる水平部は、澱粉の蓄積の旺盛な時期と一致するので、糖から澱粉への変化のため、糖の増加倍率が減少するために現われるものと考えられる。さらにこの時期には含水量が低下するので、糖の量を乾物重量で表わした場合に、これらの二つの要因が作用して水平部ができるものと考えられる。10月以降、12月までは、乾重量あたりでも、生重量あたりでも、いずれの場合にも糖は確実に増加し、耐凍性もこれと平行して増加する。

Siminovitch¹¹⁾等は、10月下旬から11月初旬に -70°C まで凍結状態で冷却後、液体窒素中に入れても生存していることから、その時期に耐凍性は最高値に達したと考えている。しかし液体窒素処理に耐えたといっても、その場合の効果的予備凍結温度¹²⁻¹⁴⁾は -70°C であるので、それは耐凍性の最高値よりかなり低い。本実験の結果のように、効果的予備凍結温度は11月初旬以降、12月初旬~中旬まで増加しつづけ、最高値の -20L に達する。この場合、耐凍性の増加に対応して糖も12月初~中旬まで増加しつづける。このように、Siminovitch等の実験では、耐凍性増加過程の全部を把握していない。

秋以降の浸透濃度は、生重量あたりの糖の量と平行的に移行し、皮層組織の搾汁液について氷点降下法により求めた溶質の濃度とも傾向的に一致する。これらのことから、9月以降の糖の増加は細胞内の糖の増加を意味していることが明らかである。

10月に低温処理すると、耐凍性の増大と平行して糖も増加し、逆に澱粉は減少する。なお浸透濃度も耐凍性と平行して増大する。このことは多くの木本類について酒井^{7,9)}によって行なわれた結果と一致する。

Siminovitch⁹⁾等が行なった環状剥皮 (ringing) の方法は、幹を通じての物質の転流や、貯蔵、蛋白質の生合成など、植物生理学的には多くの興味ある問題を提供しているが、物質と耐凍性との問題を調べる場合には、適当な方法でない。ことに何か月間も飢餓の状態におかれるために、蛋白質とちがって糖は処理中に消費されてしまうので、処理後の物質と耐凍性の関係を論じても、あまり意味がないように思われる。また、彼は、1~2週間の短期間の人工的な低温処理を行なっていないが、もし、彼がこの実験を行なえば、糖と耐凍性との間の正しい関係をつかみ得たものと思う。耐凍性と物質との関係を論ずる場合には、季節変動だけでなく、人工的低温処理による両者の変動を調べるのが不可欠であるように思う。

春には、生重量で表わした糖と浸透濃度は傾向的に一致し、両者とも3月下旬から急速に減少する。なお耐凍性もまったくこれと平行して低下する。春に低温処理すると、秋と同様に

澱粉が減少して糖が増大するし、耐凍性も増加する (第1図, 第2図)。

一方、水溶性蛋白質は秋は耐凍性と平行して増加するが、春は糖よりも約1カ月遅れて減少し (第2図, 第4図)、耐凍性とは平行して変化しない。熊本の材料では、水溶性蛋白質は11月15日にすでに最大値に達していて、糖および耐凍性は12月以降も増加しつづけている (第5図)。このように、季節的にみても、耐凍性と水溶性蛋白質との間の平行関係は認め難く、さらに、低温処理しても水溶性蛋白質はほとんど変化しない。このことは酒井^{7,9)}がすでにクワの枝について述べている。さらに第3表に示したように、熊本の材料は、札幌の材料よりも、水溶性蛋白質の含有量が約2倍多いが、耐凍性は逆に熊本の方が低い。以上の結果から、水溶性蛋白質の量的な変動が直接耐凍性の変動を支配しているとは考え難い。

Siminovitch⁴⁾等は、春に、水溶性蛋白質がまだ減少しないうちに耐凍性が低下するのは、細胞内に澱粉粒が増加するので、機械的なストレスが増すために耐凍性が低下すると説明している。しかし、9月から10月にかけて、澱粉が蓄積される時期に、澱粉の増加と平行して耐凍性も増大することから、Siminovitch等の仮説は認め難い。

樹木はその生育地によって、物質の変動や耐凍性の変動がかなりことなる²⁾。札幌よりも約10°緯度が低い熊本のニセアカシアについて調べた結果では、耐凍性と物質の季節変動は、本質的に、札幌のニセアカシアと同じで、生育条件の差違による全体的な位相のずれが認められるにすぎない。

Siminovitch等が実験を行なった場所は、北アメリカの北緯45°付近であり、北緯43°の札幌と緯度的に大差なく、物質の季節変動も、耐凍性の変動も、ほぼ同一時点で対比できるものとする。事実、糖の季節変動以外はSiminovitch等の結果とほぼ一致している。

最近 Siminovitch¹¹⁾等は、ニセアカシアについて、糖や水溶性蛋白質の量が同じで耐凍性がいちぢるしくことなる材料で、リン脂質の量を定量し、リン脂質の量と耐凍性の大ききとがよく一致しており、リン脂質の耐凍性に対する役割に注目している。

本実験では、リン脂質を定量すると共に薄層クロマトグラフィーで季節変動と低温処理による変動を調べた。その結果リン脂質は真夏の材料に少なく、秋から冬にかけていちぢるしく増加するし、真夏に低温処理してもほとんど変化しないが、10月に低温処理するとリン脂質がいちぢるしく増加することを明らかにした。また低温処理後量的にあまり変化しない場合でも、ある種のリン脂質の間に質的变化が認められる (第7図)。この質的なリン脂質の変化が具体的に何を意味するか分らないが、耐凍性を高める要因として、糖以外のいろいろな物質が関与している可能性もあるので、今後詳しく調べてみる予定である。しかしリン脂質の増大と耐凍性の増加との間に因果関係があるか否かは現在のところ明らかでない。

V. 摘 要

ニセアカシアの幹の皮層組織を用いて、炭水化物、多価アルコール、水溶性蛋白質、リン脂質等を定量して、これらの物質と耐凍性との間の関係、ことに、糖と耐凍性の関係を調べた。

1) 生重量あたりの糖の量および浸透濃度は、秋から春にかけて、耐凍性の大ききと平行

して変動する。耐凍性がきわめて小さい7月から8月にかけても、糖は一時増大するが、これは、浸透濃度の増大を伴わないので、皮層柔細胞内の糖の増加を意味しないものと思われる。

糖の量を乾重量あたりで表わせば、7月から8月の糖の増大はいっそういちぢるしいが、9月に最大値になることはなく、11月以降12月まで増加しつづける。

0°Cで2週間低温処理すると、浸透濃度および糖は増大し、これと平行して耐凍性はいちぢるしく増大する。

多価アルコールは、生重量あたりで0.2~0.5%含まれるが、季節的にも、低温処理後においても、ほとんど変動しない。

2) 水溶性蛋白質の量は、秋から冬にかけて耐凍性の増大と平行して変動するが、春は、糖および耐凍性の低下より約1カ月遅れて減少しはじめる。人工的な低温処理の場合、水溶性蛋白質の量は、糖や耐凍性とちがって、ほとんど変動しない。

3) リン脂質の量は、季節的にも、人工的な低温処理後においても増加するし、ある種のフラクションのパターン変化もみとめられる。

以上の結果から、糖と耐凍性との間には平行関係がみとめられるが、水溶性蛋白質の量的変化と耐凍性との間には平行関係は認められない。

文 献

- 1) Siminovitch, D. and Briggs, D. R. 1949 The chemistry of the living bark of the black locust tree in relation to its frost hardiness. I. Seasonal variations in protein content. *Arch. Biochem.*, **23**, 8-17.
- 2) Siminovitch, D. and Briggs, D. R. 1953 Studies on the chemistry of the living bark of the black locust tree in relation to its frost hardiness. IV. Effects of ringing on translocation, protein synthesis and the development of hardiness. *Plant Physiol.*, **28**, 177-200.
- 3) Siminovitch, D., Wilson, C. M. and Briggs, D. R. 1953 Studies on the chemistry of the living bark of the black locust tree in relation to frost hardiness. V. Seasonal transformation and variation in the carbohydrates: starch-sucrose interconversions. *Plant Physiol.*, **28**, 383-400.
- 4) Siminovitch, D. and Briggs, D. R. 1954 Studies on the chemistry of the living bark of the black locust tree in relation to frost hardiness. VII. A possible direct effect of starch on the susceptibility of plants to freezing injury. *Plant Physiol.*, **29**, 331-332.
- 5) Parker, J. 1958 Change in sugars and nitrogenous compounds of tree barks from summer to winter. *Naturwiss.*, **45**, 135-140.
- 6) Parker, J. 1962 Relationship among cold hardiness, water soluble protein, anthocyanins, and free sugar in *Hedera helix*. *Plant Physiol.*, **37**, 809-813.
- 7) 酒井 昭 1957 木本類の耐凍性増大と糖類及び水溶性蛋白質との関係. 低温科学, 生物篇, **15**, 17-30.
- 8) 酒井 昭 1960 木本類の耐凍性増大の過程 IX. 糖類の凍害に対する保護作用. 低温科学, 生物篇, **18**, 23-34.
- 9) Sakai, A. 1962 Studies on the frost-hardiness of woody plants. I. The causal relation between sugar content and frost-hardiness. *Contr. Inst. Low Temp. Sci.*, **B 11**, 1-40.
- 10) Трунова, Т. И. 1963 Значение разных форм сахаров в повышении морозостойкости колеоптилей озимых злаков. Физиология Растений **10**, 588-594.
- 11) Siminovitch, D., Gfeller, F. and Rheaume, B. 1966 The multiple character of the biochemical

- mechanism of freezing resistance of plant cells. In *Cellular Injury and Resistance in Freezing Organisms* (E. Asahina, ed.), *Inst. Low Temp. Sci.*, Sapporo, 93-117.
- 12) Sakai, A. 1965 Determining the degree of frost hardiness in highly hardy plants. *Nature*, **206**, 1064-1065.
- 13) 酒井 昭 1963 超低温における植物の生存. III. 耐凍性の大きさと効果的予備凍結温度との関係. 低温科学, 生物篇, **21**, 1-16.
- 14) Sakai, A. 1965 Survival of plant tissue at super-low temperatures. III. Relation between effective prefreezing temperatures and degree of frost hardiness. *Plant Physiol.* **40**, 882-887.
- 15) 堀越 毅 1958 糖類 (アンスロン法). 化学の領域, 増刊, **34**, 36-39.
- 16) Burton, R. M. 1957 The determination of glycerol and dehydroxyacetone. In *Method in Enzymology* (S. P. Colowick and N. O. Kaplan eds.), Academic Press, N. Y., **III**, 246-248.
- 17) 波多野博行・鷹野康威 1961 タンパク質総窒素. 化学の領域, 増刊, **47**, 29-40.
- 18) 野田万次郎 1967 脂質のペーパーおよび薄層クロマトグラフィー (別冊. 蛋白質, 核酸, 酵素), 生物化学実験法. VII. 脂質実験法, 共立出版, 東京, 3-29.
- 19) Jones, D. B. and Phillips, S. 1937 Protein content of the bark of black locust, *Robinia pseudo-Acacia*. *Jour. Amer. Chem. Soc.*, **59**, 595-596.
- 20) 酒井 昭 1965 木本類の耐凍性増大過程. XI. 亜熱帯産及び熱帯産ヤナギの耐凍性, 低温科学, 生物篇, **23**, 27-36.

Summary

To clarify the relationship between the frost resistance and the contents in some substances, especially in sugar and water soluble protein in both natural and artificial hardening, some experiments were made using the stem bark of black locust trees. The following facts were confirmed.

1) An intimate correlation between the osmotic concentration and frost resistance was observed in all seasons tested. In the period from November to May, the same relation was also found between the sugar content and the frost resistance. In both autumn and spring, artificial frost hardening at 0°C for 14 days resulted in a remarkable increase in sugar content and in frost resistance.

In the season from July to September at which time a parallel correlation could not be observed between sugar content and frost resistance, a considerable increase in sugar content in bark tissues resulted in only a slight increase in the osmotic concentration in the cortical cells. This fact indicates that in this season the increase of sugar content in bark tissues does not mean an increase of sugar in cortical cells. The content of polyhydric alcohol was very small in bark tissues, and showed only a slight change in both seasonal and artificial hardening.

2) In seasonal variations from autumn to spring, a parallel correlation was observed between the content of water soluble protein and the frost hardiness. However, in late April at which time both sugar content and frost resistance had considerably declined, the content of water soluble protein still remained at a high level. Also, in October and April at which times artificial hardening is remarkably effective, the sugar content is closely proportional to the increase of frost resistance, but not to that of water soluble protein.

3) The total content of phospholipids isolated and fractionated from the bark tissues using Schneider's method showed a considerable increase from autumn to winter and some components of the above varied with seasonal and artificial hardening.

From these results, an intimate parallelism between sugar content and frost hardiness in the bark cortical tissues of black locust trees was confirmed, while the same relation was not found between the content of water soluble protein and the frost hardiness.