



Title	ニセアカシア韌皮組織のミクロゾーム膜画分のリン脂質含量のデハードニングによる変化
Author(s)	吉田, 静夫
Citation	低温科学. 生物篇, 33, 11-20
Issue Date	1976-03-18
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/17817
Type	bulletin (article)
File Information	33_p11-20.pdf



[Instructions for use](#)

ニセアカシア鞣皮組織のミクロゾーム膜画分の リン脂質含量のデハードニングによる変化*

吉田 静夫

(低温科学研究所)

(昭和50年10月受理)

I. 緒 言

これまでの報告でポプラやニセアカシアの鞣皮組織ではハードニングならびにデハードニングの過程でリン脂質含量が変化することが明らかにされている¹⁻⁴⁾。ポプラやニセアカシアの鞣皮組織から遠心分画されたいろいろな粗細胞画分について、蛋白質あたりのリン脂質含量を比較すると、ハードニングによりこれが増加しデハードニングにより減少することがわかっている^{2,5)}。このように、膜のリン脂質含量が耐凍性と平行して変化する可能性が考えられる。

このことを確かめるため、デハードニングの前後のニセアカシア鞣皮組織からそれぞれミクロゾーム画分を調製し、これをシヨ糖密度勾配遠心によりいくつかの膜画分とし、その各々について蛋白質あたりのリン脂質含量を比較した。その結果、トノプラスト、ゴルジ装置およびERなどの膜蛋白質あたりのリン脂質含量がデハードニングの前後で変化することが認められたので報告する。

II. 材料と方法

材料：3月中旬に野外に生育しているニセアカシア (*Robinia pseudoacacia* L.) の幹 (径4 cm) を採取し、 -3°C で凍結保存した。随時、 -3°C から取出してデハードニングさせた。デハードニングは幹を25 cmの長さに切り水蒸気飽和したポリ袋に入れ室温 ($18\sim 23^{\circ}\text{C}$) に約10日間置いて行った。その結果、鞣皮組織の耐凍度は未処理の対照の -50°C から -10°C に低下した。

遠心分画による細胞画分の調製： -3°C に凍結保存した対照の幹とデハードニングさせた幹よりそれぞれ鞣皮組織をはぎとり細片とした。これを一定量の海砂とつぎに述べる溶液と共に乳鉢中で2分間磨砕した。溶液は0.75 M ソルビトール、150 mM トリス-塩酸緩衝液、pH 7.8、10 mM EDTA、5 mM DTT (ジチオスレイトール) および1% フィコールからなる。なお1 gの組織あたり5 mlの溶液、0.3 gのPolyclar AT、0.6 gの海砂を用いた。また、1回の実験に15 gの組織を用いた。以上の操作はすべて 0°C で行った。磨砕液は4枚のガーゼを通し $200\times g$ 5分間遠心後その上清を $1,000\times g$ 10分、 $17,000\times g$ 20分、ついで $220,000\times g$ 40分の順に遠心して得られる各沈澱画分をそれぞれプラスチックド ($200\sim 1,000\times g$)、ミトコンドリア ($1,000\sim$

* 北海道大学低温科学研究所業績 第1753号

17,000×g) およびマイクロゾーム (17,000~220,000×g) とした。マイクロゾーム画分は 0.75 M ソルビトール, 1 mM EDTA および 2 mM トリス-塩酸緩衝液を含む溶液に懸濁した。

不連続シヨ糖密度勾配遠心による膜画分の調製: 4 ml のマイクロゾーム懸濁液を不連続シヨ糖密度勾配にのせてスピスコ SW 27 ローターで 27,000 rpm, 2 時間遠心した。不連続シヨ糖密度勾配は Leonard らの方法⁶⁾ に準じ 2 mM トリス-塩酸緩衝液, pH 7.6, および 1 mM EDTA を含む 45, 38, 34, 30, 25, 20 および 16% (w/w) の各シヨ糖液をそれぞれ 5, 4, 4, 6, 6, 4, 4 ml ずつ重層して作成した。遠心後, チューブの底の部分から 2 ml ずつ分取し分析に供した。

脂質の抽出と分析および酵素活性の測定: 脂質の抽出精製およびリン脂質の定量は前報⁵⁾ によった。

アンチマイシン A 非感受性 NADH チトクロム C 還元酵素の活性はチトクロム C の還元を 550 nm における吸光度の増加より求めた。反応液は 100 μ mole のリン酸緩衝液, pH 7.2, 0.5 mg の酸化型チトクロム C, 5 μ mole の NaN_3 , 10^{-3} μ mole のアンチマイシン A と 50 μ l の酵素液からなり, 全量 2 ml とした。これに 0.5 μ mole の NADH を加え室温で反応させた。NADPH チトクロム C 還元酵素の活性は上記の反応液からアンチマイシン A を除き, NADH の代わりに 0.5 μ mole の NADPH を加えて室温で反応させ 550 nm における吸光度の増加を測定した。

酸性ホスファターゼ活性は, 200 μ mole の酢酸緩衝液, pH 4.8, 10 μ mole の p-ニトロフェニルホスフェートを含む反応液に 50 μ l の酵素液を加えて全量 1 ml とし, 30°C で 7 分間反応させた。2 ml の 0.1 N NaOH を加え反応を停止させ, 405 nm で測定した。

酸性プロテアーゼ活性の測定は Beever の方法⁷⁾ に準じて行った。反応液は 100 μ mole のリン酸緩衝液, pH 5.5, 基質として 5 mg のカゼインを含み, それに酵素液を加え全量 2.0 ml となし 30°C で 20 分間反応させた。なお, 反応は 0.5 ml の 20% TCA を加え停止させ, 遠心後 280 nm における吸光度を測定した。

チトクロム C 酸化酵素活性は 550 nm における吸光度の変化から求めた。反応液は 100 μ mole のリン酸緩衝液, pH 7.2, 0.42 mg の還元型チトクロム C, 0.03% のジギトニン, 0.001 mM EDTA および, 20 μ l の酵素液からなり, 全量を 2.0 ml とした。なお, 反応は室温で行った。

イノシンジリン酸加水分解酵素の活性は Ray らの方法⁸⁾ により行った。反応液は 1.5 μ mole のイノシンジリン酸, 1.5 μ mole の MgCl_2 , 50 μ mole の KCl, 50 μ mole のトリス-塩酸緩衝液, pH 7.5, そして 0.1 ml の酵素液からなり, 全量を 0.5 ml とし 35°C で 1 時間反応させた。なお, 酵素液は 0°C で 3 日間インキュベートしたものを使った。0.5 ml の 10% TCA を加えて反応を停止させ遠心後その上清の 0.5 ml について Fiske-SubbaRow 法⁹⁾ により無機リン酸を定量した。なお, 反応停止直前に 1 滴の 1% 牛血清アルブミンを加え上清の濁りを除いた。

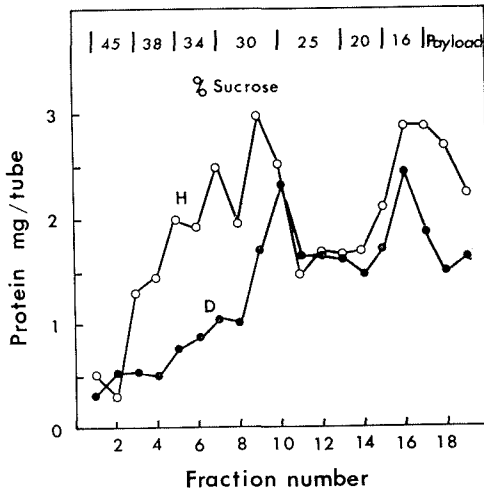
NADPH-キノン還元酵素活性は Wassilait and Nason の方法¹⁰⁾ により, NADPH の酸化を 340 nm の吸光度の減少から求めた。なお, 非酵素的酸化を補正した。

蛋白質の定量は TCA で沈澱したものについて Lowry の方法¹¹⁾ で行い牛血清アルブミンを標準とした。

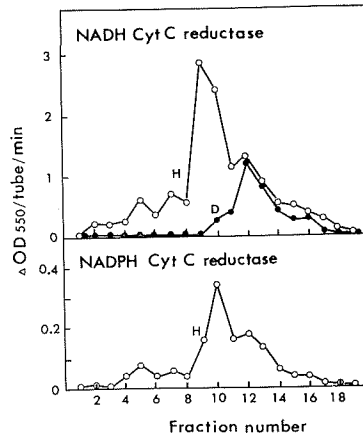
III. 結 果

第1図にミクロゾームの不連続シヨ糖密度勾配遠心における蛋白質含量の分布を示した。デハードニング後比較的密度の大きな画分において著しい蛋白質の減少がみられる。しかし、画分 11~14 附近では蛋白質含量に殆んど変化が認められない。

NADH チトクロム C 還元酵素は動物の ER (小胞体) やミトコンドリアの外膜に結合しているが¹²⁾、高等植物ではトノプラストやミトコンドリアの内膜および外膜に結合していると云われている^{13,14)}。そして、ミトコンドリア内膜由来の酵素はアンチマイシン A に高い感受性を示すと云われている¹⁵⁾。第2図に示すように、アンチマイシン A 非感受性 NADH チトクロム C 還元酵素は画分 9~10 (25% と 30% の界面) と画分 11~13 (25% 層) にふたつの活性ピークがみられる。画分 9~10 の活性ピークはデハードニング後減少したが、画分 11~13 のそれはあまり変化しなかった。



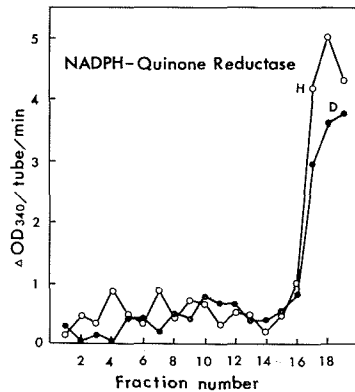
第1図 不連続シヨ糖密度勾配における蛋白質の分布。H: 対照, D: デハードニングしたもの。図上段に用いたシヨ糖濃度 (% w/w) を示した



第2図 不連続シヨ糖密度勾配におけるアンチマイシン A 非感受性 NADH チトクロム C 還元酵素活性と NADPH チトクロム C 還元酵素活性の分布。略号 H, D は第1図に同じ。活性は 550 nm における吸光度変化量で表わした

第2図の下段に NADPH チトクロム C 還元酵素の活性分布を対照の試料について示す。この酵素は動物細胞の ER にみられるが¹⁶⁾、植物ではその存在部位は明らかにされていない。不連続シヨ糖密度勾配遠心においてふたつの活性ピークが認められ、それぞれ上述のアンチマイシン A 非感受性 NADH チトクロム C 還元酵素の活性ピークとほぼ一致するが、より高密度側の活性ピークは必ずしも一致しない。したがって、これらの2種類の酵素は必ずしも同じ膜に由来するとは云い難い。

NADPH-キノン還元酵素の活性分布を第3図に示す。Semadeni¹⁴⁾によれば、この酵素は可溶性酵素と考えられている。ニセアカシアでも殆んど活性が可溶性画分にみられ、膜画分にはわずかな活性が認められるがはっきりしたピークを示さない。デハードニング後の活性変



第3図 不連続シヨ糖密度勾配における酸性ホスファターゼ活性と酸性プロテアーゼ活性の分布。酸性プロテアーゼ活性は280nmでの吸光度の増加分で表わした。略号H, Dは第1図に同じ

化は少ない。

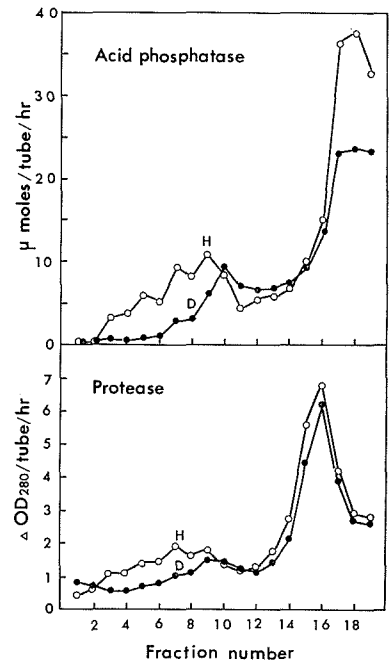
植物細胞のライソゾーム、すなわち液胞の代表的な指標酵素^{13,14)}と考えられている酸性ホスファターゼと酸性プロテアーゼの活性分布を第4図に示した。酸性ホスファターゼ活性の大部分は可溶性酵素として密度勾配の最上層に分布し、沈澱画分にわずかな活性が認められた。この沈澱画分の活性が無傷の液胞に由来

するか、又は他の膜に由来するのか今のところわからない。いずれにせよ、活性の主要部分が可溶性画分にみられることから大型の液胞は磨砕時においてこわれているものと考えられる。

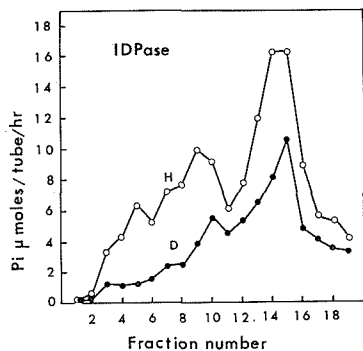
一方、酸性プロテアーゼは上記の酵素とは分布において異った挙動を示した。すなわち、大部分の活性は16%シヨ糖層に現れ、比重の小さい膜断片に結合しているか、あるいは分子量が非常に大きいかのいずれかと考えられる。酸性ホスファターゼの場合と同様に、わずかの活性が沈澱画分にみられた。デハードニング後酸性ホスファターゼ活性は可成り低下していたが、酸性プロテアーゼ活性は殆んど変化しなかった。

イノシンジリン酸加水分解酵素は植物では細胞化学的¹⁷⁾にも生化学的⁸⁾にもゴルジ装置の膜の指標酵素と考えられている。この酵素は0°Cで2ないし3日間インキュベートすると著しく活性化される。密度勾配遠心における活性分布を第5図に示した。ふたつの活性ピークが認められた。最も高い活性ピークは画分14~15にみられ、およそ16%と20%の界面に相当する。他の比較的低い活性ピークは画分9~10にみられ、これはおよそ25%と30%の界面に相当し、前述のアンチマイシンA非感受性NADHチトクロムC還元酵素のピークのひとつと一致している。イノシンジリン酸加水分解酵素の活性はデハードニング後著しく低下した。このことは、デハードニングの過程でゴルジ装置が分解減少したことを示すものと思われる。

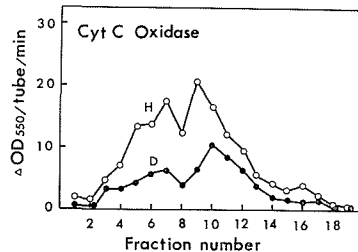
樹木の靱皮組織の細胞は細胞壁が厚く硬いため細胞破碎に大きな力を要する。したがって、ミトコンドリアの可成の部分は磨砕中にこわされミクロゾーム画分に移行することが予想



第4図 不連続シヨ糖密度勾配におけるNADPH-キノ還元酵素活性の分布。活性は340nmでの吸光度の減少量で表わした。略号H, Dは第1図に同じ



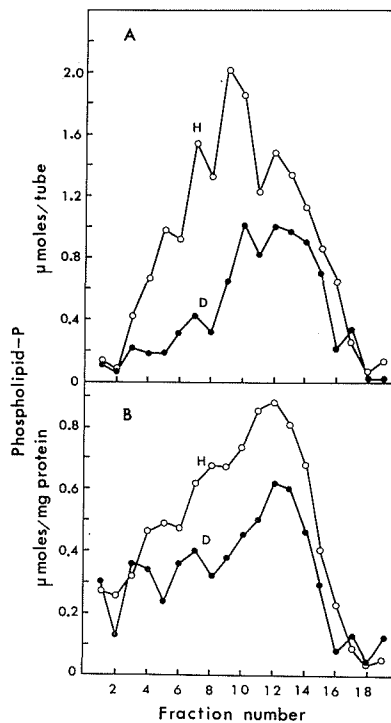
第5図 不連続シヨ糖密度勾配におけるイノシンジリン酸加水分解酵素活性 (IDPase) の分布。活性は遊離した無機リン酸の量で表わした。略号 H, D は第1図に同じ



第6図 不連続シヨ糖密度勾配におけるチトクロム C 酸化酵素活性の分布。活性は 550 nm での吸光度減少量で表わした。略号 H, D は第1図に同じ

される。事実、チトクロム C 酸化酵素の分布からみたミトコンドリア由来の膜のマイクロゾーム画分への混入率は約 30% であった。第 6 図にマイクロゾーム中のチトクロム C 酸化酵素活性の分布を示した。図から明らかなように、ふたつの活性ピークが認められ、ひとつは画分 5~7 にかけて、他は画分 9 に現れた。別の実験では、比較的無傷と考えられるミトコンドリアは 38% と 45% の界面 (画分 3 に相当) にみられ、上記のふたつの活性ピークはいずれも無傷のミトコンドリアよりも比重が小さい。画分 9 における活性ピークは前述のアンチマイシン A 非感受性 NADH チトクロム C 還元酵素の活性ピークのひとつと見掛上一致している。マイクロゾーム中のチトクロム C 酸化酵素の活性はデハードニングにより著しく低下した。

以上の結果から、マイクロゾームの膜画分の分離は十分とは云い難いが、酵素の分布からみて画分 11~13 及び 14~15 はそれぞれトノプラストの断片及びゴルジ装置の膜断片が比較的純粋に分離されたと考えられる。画分 9~10 はアンチマイシン A 非感受性 NADH チトクロム C 還元酵素の活性が高く、動物細胞におけるその活性分布から類推¹⁶⁾して ER が多く集っているものと考えられる。しかし、チトクロム C 酸化酵素やイノシンジリン酸加水分解酵素の活性分布からみて、この画分はミトコンドリア内膜やゴルジ装置由来の膜断片の混入が大きいと考えられる。画分 3~8 の密度



第7図 不連続シヨ糖密度勾配におけるリン脂質の分布。A: 全リン脂質含量, B: 蛋白質量 (mg) あたりのリン脂質含量 (μ mole)。略号 H, D は第1図に同じ

の大きな画分には原形質膜，ミトコンドリアその他の膜が混入しているものと思われるが，今のところ明らかでない。

シ₃糖密度勾配における全リン脂質含量の分布を第7図Aに示した。比較的密度の小さい膜画分に多量のリン脂質が含まれている。すなわち，画分9~10に最も多量に存在し，ついで画分12および7の順となっている。デハードニング後すべの画分において著しいリン脂質の減少が認められた。第1図に示した蛋白質含量の分布とリン脂質の分布との間には必ずしも平行関係は認められない。第7図Bに蛋白質(mg)あたりのリン脂質含量(μmole)の分布を示した。図から明らかなように，画分11~13は最もリン脂質に富む膜画分と考えられる。デハードニング後全画分において蛋白質当りのリン脂質が低下した。このことから，まえに報告したように粗ミクロゾーム画分でみられたデハードニング後の蛋白質あたりのリン脂質含量の減少は，ミクロゾーム画分に含まれる特定の膜における現象ではなく，広範囲の膜系において起っていることが考えられる。

IV. 考 察

ポプラやニセアカシアのように耐凍性の高い樹木について，耐凍性の変動と平行してリン脂質含量が変化することが知られている¹⁻⁵。ポプラではリン脂質の増減は生理的状态ならびに環境温度に依存し，低温下ではトリグリセリドを消費してリン脂質を合成することを示唆するような実験データが得られている²。

季節的な耐凍性の変動につれ，ニセアカシアやクワの皮層柔細胞の微細構造が著しく変化することが知られている^{18,19}。また耐凍性の増大と平行して細胞は大型の液胞の後退と細胞質の増大が進み，小胞状の膜構造の発達，原形質膜のくびれ込みが起り，より小型化した液胞が細胞内に分散する傾向を示す。また耐凍性が低下するときはこの逆の経過をたどる。リン脂質の増減はこのような細胞の膜構造の発達あるいは減退を定性的に反映していると考えられる。しかし，これまでのポプラやニセアカシアに関する実験データ^{2,5}から，細胞の形態変化と平行して膜がリン脂質の少ない状態から多い状態あるいはこの逆方向への変化が耐凍性の変化と平行して起ることが予想された。このことを明らかにするには，分離精製された膜画分について，その膜組成を耐凍性の変化の前後について比較検討する必要がある。

これまでの予備的な実験で，ニセアカシアの韌皮組織からのミクロゾーム画分はKClで促進される Mg^{2+} 依存のATPase，NADHチトクロムC還元酵素およびイノシンジリン酸加水分解酵素に富むことがわかっていた。不連続シ₃糖密度勾配におけるいろいろな酵素の分布からみて，i) トノプラストの断片(画分11~13，アンチマイシンA非感受性NADHチトクロムC還元酵素活性を有する)およびii) ゴルジ装置由来の膜断片(画分14~15，イノシンジリン酸加水分解酵素活性を有する)のふたつの膜画分が比較的純粋な状態で分離されたように思われる。酸性プロテアーゼ活性の高い画分16は，膜であるかどうかについては更に検討の余地がある。

NADHチトクロムC還元酵素は植物ではトノプラスト¹³やミトコンドリアの内膜および外膜¹⁴に存在すると云われている。植物のミトコンドリア内膜由来の酵素はアンチマイシンA

に感受性であるから¹⁴⁾、画分 11~13 および画分 9~10 にみられるアンチマイシン非感受性の酵素はミトコンドリア内膜に由来するものではない。また、植物では膜の起源からみて、ER とトノプラストは相互に密接な関連を持っていると云われ^{20,21)}、両者は形態的にも膜組成的にも可成り似通ったものと考えられる。したがって、アンチマイシン A 非感受性 NADH チトクロム C 還元酵素は ER とトノプラストの両者にまたがって存在する可能性がある。

KCl で促進されるアルカリ性 Mg^{2+} -ATPase が植物のミクロゾーム中のトノプラストと思われる膜画分に存在することが Rungle and Wiskich²²⁾ や Leigh, Wyn Jones and Williamson ら²³⁾ によって報告されている。彼らはこの ATPase が K^+ よりもむしろ Cl^- で促進され、オキザロ酢酸、リンゴ酸、酒石酸など通常液胞内に蓄積される有機アニオンによって著しく促進されることを明らかにした^{22,23)}。このことから、彼らはアニオンの能動的膜輸送に関連していると考えている。また、このトノプラストと思われる膜画分には NADH チトクロム C 還元酵素の活性が認められている²²⁾。これらの ATPase の性質は、Hodges ら²⁴⁾ によって明らかにされた植物の原形質膜の ATPase とは極めて性質を異にする。今回、同時に行った別の実験によれば、アンチマイシン A 非感受性 NADH チトクロム C 還元酵素活性のある画分 11~13 に KCl で促進される Mg^{2+} -ATPase が存在し、至適 pH が 9 近辺で全活性も比活性も他の画分に比べて極めて高いことがわかった²⁵⁾。さらに、この ATPase はリンゴ酸、フマル酸およびオキザロ酢酸により著しく促進されることがわかった。以上のことから、画分 11~13 にはトノプラストの断片が多く存在するものと考えられる。アンチマイシン A 非感受性 NADH チトクロム C 還元酵素活性のみられる画分 9~10 も上述の ATPase の全活性は高いが比活性は低い。したがって、この画分にもトノプラスト断片が含まれていると考えられるが、チトクロム C 酸化酵素、イノシンジリン酸加水分解酵素の分布から考えて ER、ミトコンドリア内膜、およびゴルジ装置由来の膜などの混入が多いものと推定される。

イノシンジリン酸加水分解酵素は植物のゴルジ装置の膜に特異性の高い指標酵素と考えられている⁸⁾。不連続シヨ糖密度勾配におけるこの酵素活性の分布からみて、ゴルジ由来の膜は比重の小さい膜断片 (画分 14~15) と比重の比較的大きな膜断片 (画分 8~10) とに分離しているものと思われる。画分 14~15 は他の酵素の活性が低いので、ゴルジ装置の膜断片の一部が比較的純粋に集っているものと推定される。

今回の実験では、原形質膜の所在を明らかにできなかった。Leonard, Hansen and Hodges⁶⁾ によれば、コムギの根端の原形質膜は不連続シヨ糖密度勾配において 38% と 48% の界面ないしは 34% と 38% の界面に集ると報告している。至適 pH が 6.0~6.5 の K^+ で促進される Mg^{2+} -ATPase は植物の原形質膜の指標酵素のひとつと考えられている。ニセアカシアの韌皮組織では、その細胞の機能から考えて、このような ATPase の活性が高いとは考えられない。今回行った別の実験結果によれば、画分 3~7 にかけて弱いながら K^+ で促進される至適 pH が 6 近くの Mg^{2+} -ATPase の活性が認められた²⁵⁾。しかし、画分 3~7 は同時に他の膜の混入が多いと考えられ、原形質膜がどの程度含まれているか形態的な観察を待たねば何も云えない。

デハーディング後著しいリン脂質の減少がほとんどすべての画分において観察された。デ

ハードニングによるミクロゾーム全体のリン脂質含量の低下は、この細胞画分のある特定の膜の動向によるのではないように思われる。蛋白量あたりのリン脂質含量はトノプラストの断片が多く集っていると考えられる画分 11~13 において最も多い。デハードニング後蛋白量あたりのリン脂質含量は画分 3 を例外としてトノプラストやゴルジ装置の膜断片を含むすべての膜画分において顕著に減少している。このように、これまでに知られている耐凍性の変動に伴ってみられた粗細胞画分の蛋白あたりのリン脂質含量の変化^{3,5)}は、リン脂質を多く含む特定の膜系の動向によるのではなく、可成り広い範囲の膜系におけるリン脂質含量の変化に基くものと推察される。

ポプラやニセアカシアの韌皮組織にはきわめて強い活性を有するホスホリパーゼ D が存在するが^{2,25)}、各膜画分のホスファチジン酸の含量はいずれも 10% 以下であり、操作の全過程(およそ 5 時間)を通じてこの酵素の活性は可成り低く抑えられていたと思われる。また、遊離脂肪酸やジグリセリドは検出されなかったので、膜のリン脂質含量に直接影響を与えるホスホリパーゼ A, B, C およびホスファチジン酸ホスファターゼの働いた形跡は認められない。したがって、デハードニングの前後でみられた膜のリン脂質含量の変化は処理の前後におけるホスホリパーゼ活性の差異による影響とは考えられない。

まえに報告したように、ステロール類の量はリン脂質の場合とちがってデハードニング後あまり変化しないことがわかっている⁵⁾。このように、脂質の種類によってデハードニングの過程でその消長がかなり異っている。デハードニングによる膜のリン脂質含量の低下を補うような別の種類の脂質が変化するかどうかについては今後検討の余地があるように思われる。

すでに報告した結果¹⁻⁵⁾と今回の実験結果から、膜系におけるリン脂質含量と脂質組成は一定不変のものではなく、細胞の生理的な状態や細胞の環境への適応の過程で可成り変化することが考えられる。このような脂質の面からみた膜組成の変化は、膜の物理化学的性質、殊に凍結時の膜の安定性に影響をおよぼしているのではないかと思われる。

V. 摘 要

植物細胞の膜系のリン脂質含量が耐凍性の変化に伴って変るかどうかを明らかにするため、デハードニングの前後のニセアカシア韌皮組織からそれぞれミクロゾーム画分を調製し、これらを不連続シヨ糖密度勾配によりいくつかの膜画分に分け、その各々について蛋白量あたりのリン脂質含量について比較検討した。

不連続シヨ糖密度勾配におけるいろいろな酵素活性の分布から、トノプラスの断片およびゴルジ装置の膜断片と思われる膜画分がそれぞれ比較的純粋に分離された。

デハードニング後いずれの膜画分においても、蛋白量あたりのリン脂質含量が可成り減少した。このことから、細胞の膜系はデハードニングにより、リン脂質の多い状態から少い状態へ変化すると考えられる。

文 献

- 1) Yoshida, S. and Sakai, A. 1973 Phospholipid changes associated with cold hardiness of cortical cells from poplar stem. *Plant and Cell Physiol.*, **14**, 353-359.
- 2) Yoshida, S. 1974 Studies on lipid changes associated with frost hardiness in cortex in woody plants. *Contr. Low Temp. Sci.*, Ser. **B**, **18**, 1-43.
- 3) Siminovitch, D., Rheume, B., Pomeroy, K. and Lepage, M. 1968 Phospholipid, protein and nucleic acid increases in protoplasm and membrane structures associated with development of extreme freezing resistance in black locust tree cells. *Cryobiology*, **5**, 202-225.
- 4) 吉田静夫 1969 植物の耐凍性に関する研究 II. ニセアカシア樹皮組織の磷脂質の季節的変動. 低温科学, 生物篇, **27**, 119-123.
- 5) 吉田静夫 1973 樹木の皮部のリン脂質の細胞内分布とハードニングおよびデハードニングによるその変化. 低温科学, 生物篇, **31**, 21-30.
- 6) Leonard, R. T., Hansen, D. and Hodges, T. K. 1973 Membrane-bound adenosine triphosphatase activities of oat roots. *Plant Physiol.*, **51**, 749-754.
- 7) Beevers, L. 1968 Protein degradation and proteolytic activity in cotyledons of germinating pea seeds (*Pisum sativum*). *Phytochem.*, **7**, 1837-1844.
- 8) Ray, P. M., Shininger, T. L. and Ray, M. M. 1969 Isolation of β -glucan synthetase particles from plant cells and identification with Golgi membranes. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **64**, 605-612.
- 9) Fiske, C. H. and Subbarow, Y. 1952 The colorimetric determination of phosphorus. *J. Biol. Chem.*, **66**, 375-400.
- 10) Wasilait, W. D. and Nason, A. 1955 Pyridine nucleotide-quinon reductase from pea seeds. *In Methods in Enzymology* (S. P. Calowick and N. O. Kaplan eds.), Academic Press, London, **2**, 725-729.
- 11) Lowry, O. H., Roserbough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. 1951 Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275.
- 12) Lardy, H. and Ferguson, S. M. 1969 Oxidative phosphorylation in mitochondria. *Ann. Rev. Biochem.*, **38**, 991-1034.
- 13) Matile, Ph. 1968 Lysosomes of root tip cells in corn seedlings. *Planta*, **79**, 181-196.
- 14) Semadeni, E. G. 1967 Enzymatische Charakterisierung der Lysosomenäquivalente (Sphärosomen) von Maiskeimlingen. *Planta*, **72**, 91-118.
- 15) Douce, R., Christensen, E. L. and Bonner, W. D. Jr. 1972 Preparation of intact plant mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta*, **275**, 148-160.
- 16) Colbeau, A., Nachbaur, J. and Vignas, P. M. 1971 Enzymatic characterization and lipid composition of rat liver subcellular membranes. *Biochim. Biophys. Acta*, **249**, 462-492.
- 17) Douwalder, M., Whaley, W. G. and Kephart, J. 1969 Phosphatases and differentiation of the Golgi apparatus. *J. Cell Sci.*, **4**, 455-497.
- 18) 大塚宏二 1972 クワ皮層細胞の春における耐凍性変動と細胞内微細構造変化. 低温科学, 生物篇, **30**, 33-34.
- 19) Pomeroy, M. K. and Siminovitch, D. 1971 Seasonal cytological changes in secondary phloem parenchyma cells in *Robinia pseudoacasia* in relation to cold hardiness. *Can. J. Bot.*, **49**, 787-795.
- 20) Matile, Ph. and Moor, H. 1968 Vacuolation: Origin and development of the lysosomal apparatus in root-tip cells. *Planta*, **80**, 159-175.
- 21) Spichiger, J. V. 1969 Isolation und Charakterisierung von Sphärosomen und Glyoxisomen aus Tabakendosperm. *Planta*, **89**, 56-75.
- 22) Rungle, J. M. and Wiskich, J. T. 1973 Salt stimulated adenosine triphosphatase from smooth

- microsomes of turnip. *Plant Physiol.*, **51**, 1064-1068.
- 23) Leigh, R. A., Wyn Jones, R. G. and Williamson, F. A. 1974 Ion fluxes and ion-stimulated ATPase activities. *In Membrane Transport in Plants* (U. Zimmerman and J. Dainty eds.), Springer-Verlag, Berlin, Heiderberg, New York, 307-316.
- 24) Hodges, T. K., Leonard, R. T., Bracker, C. E. and Keenan, T. W. 1972 Purification of ion-stimulated adenosine triphosphatase from plant roots: Association with plasma membranes. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **69**, 3307-3311.
- 25) 吉田静夫 1975 未発表.
- 26) Yoshida, S. and Sakai, A. 1974 Phospholipid degradation in frozen plant cells associated with freezing injury. *Plant Physiol.*, **53**, 509-511.

Summary

Upon dehardening of stem bark of black locust, a significant decrease in phospholipid content on milligram protein basis was observed in the microsomal fraction. To ascertain this with a defined membrane, the microsomal preparations were further separated into several membrane fractions on discontinuous sucrose gradient. Based on the distributions of various enzymes on the gradient, Golgi apparatus membranes and tonoplast fragments were successfully separated with less contamination by the other membranes. The subfraction 11~13 on the gradient, apparent density of 1.10 grams cubic centimeter, which was assumed to be enriched with fragmented tonoplast, was observed to be most enriched with phospholipid on milligram protein basis. Dehardening resulted in significant reductions in the contents of protein and phospholipid in the submicrosomal fractions. Significant decreases in phospholipid content on milligram protein basis were observed during dehardening in fragmented tonoplast, Golgi apparatus membranes and the other unidentified membrane fractions.

Thus, it seems apparent that the transition of cell membranes from phospholipid enriched state to phospholipid depleted state be involved in the dehardening process.