



# HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	植物組織の酸性フォスファターゼの検出について
Author(s)	照本, 勲; TERUMOTO, Isao
Citation	低温科学. 生物篇, 14, 29-36
Issue Date	1956-11-26
Doc URL	<a href="https://hdl.handle.net/2115/17584">https://hdl.handle.net/2115/17584</a>
Type	departmental bulletin paper
File Information	14_p29-36.pdf



## 植物組織の酸性フوسفターゼの検出について\*

照 本 勳

(低温科学研究所 生物学部門)

(昭和31年7月受理)

### I. 緒 言

30年程まえから急に phosphatase に関する研究がとりあげられてきて、今までに極めて多くの研究論文が出されてきている<sup>8)</sup>。この phosphatase についての研究の大部分は、動物組織を使つてなされたもので、植物を材料として研究されたものはいたつて少ない。又、植物を材料とした組織化学は、動物の組織化学にくらべて未開のところが多く、したがつて基礎的研究も殆んどなされていない有様である。そこで植物の生組織ならびに固定組織について、植物組織化学的に酸性 phosphatase を検出するのに必要な条件を決めるために予備的実験を行つたので報告する。

### II. 方 法

実験の材料にはダイズ (*Glycine Max*) と野生のクワ (*Morus bombycis*) をえらんだ。ダイズは流水中に2時間漬けた後、水道水を充分すすわせた濾紙をしいた発芽シャーレに蒔き、25°C のフラン器中で24時間放置、約15~20mmに発根したものを試料とした。反応に使用した部分は、根端から5mmを切りすて次の5mmの部分を hand section し、細胞二三層の切片をつくるか、またはあとに述べるように固定した切片を作つて用いた。クワは戸外に生育しているものを随時採取して、その枝の尖端から第1、第2節の部分を用いた。

#### 酵素の証明

1. 標準反応液は次の組成であり、阻害剤実験の場合には、蒸溜水の代りに最終濃度が各所定の濃度になるように阻害剤の溶液を加えた。なお基質を入れないで、その他同じ条件で処理したものを対照とした。

0.1 M	Acetate buffer (pH 5.1)	4 cc
0.1 M	Lead nitrate	1 cc
0.1 M	Sodium $\beta$ -glycerophosphate	0.4 cc
	蒸溜水	0.6 cc

\* 北海道大学低温科学研究所業績 第352号

各試薬を混合したとき生ずる沈澱は、濾紙で濾過するか、または円心分離して取去つた。培養温度は 37°C、培養時間は生組織切片で 30 分、固定組織切片で 2 時間である。

2. 培養後蒸留水で 3 回洗滌し十分に基質を洗い去る。次に 2% 醋酸に約 3 分間浸し、のち蒸留水でよく洗う。

3. 1% 黄色硫化アンモン溶液に 2~3 分間浸す。

4. 数回、蒸留水で洗滌する。

5. 必要により、95% alcohol で脱水、abs. alcohol, abs. alcohol 1/2 + xylyl 1/2, 最後に xylyl を通してバルサムで永久標本とする。xylyl の使用で染色は幾分うすくなる。

酸性 phosphatase の活性の場所には、PbS の黒褐色沈澱が現われるので、その濃度で相対的活性度を決めた。

ダイズの細胞では、仁、核、細胞質全部が染色される。クワの組織では、表皮、韌皮繊維、形成層、材部には常に酸性 phosphatase を認められない。のこる柔細胞の部分と篩管部に強い反応が現われる。

### III. 結 果

#### 実験第 1. 固定液の問題

動物組織の場合に最も普通に使用されている Gomori の方法では、植物組織細胞の収縮がはげしく paraffin の透入も不可能であつた。Glick and Fischer の方法のうち A 法も不良であつた。Glick and Fischer の B 法が、細胞への paraffin の透入もよく、細胞の形態もそこなわずに固定切片標本をつくるのに適していた。

固定切片は次の Glick and Fischer の方法<sup>23,24</sup>により、固定、脱水、paraffin 包埋した小片を 15  $\mu$  の厚さに切り、その切片をスライドに Mayer のアルブミンではりつけた。そのスライドを 40°C の温浴上で 5 分間あたためて、しわをのぼし、40°C のフラン器中で 2 時間乾燥したものを固定組織標本とした。随時、xylyl から alcohol にスライドをうつし paraffin を除いて、水に組織をもどしたものを、方法において述べた酵素反応液中で反応させた。

切片の paraffin 除去はつねに次のように行つた。

乾燥した切片 slide glass  $\rightarrow$  xylyl (10 分)  $\rightarrow$  xylyl 1/2  $\cdot$  abs. alc. 1/2 (10 分)  $\rightarrow$  abs. alc. (5 分)  $\rightarrow$  95% alc. (5 分)  $\rightarrow$  85% alc. (5 分)  $\rightarrow$  70% alc. (5 分)  $\rightarrow$  50% alc. (5 分)  $\rightarrow$  30% alc. (5 分)  $\rightarrow$  水洗

#### 固定方法

1. 次の溶液に試料を各 1 時間づつ漬け順次うつして行く。途中、時々吸引ポンプで容器中の空気を除き、組織の中に溶液の透入することを容易にした。

a. 70% alcohol.

b. 80% alcohol.

c. 80% alcohol, 65 cc + *n*-butyl alcohol, 35 cc.

- d. 95% alcohol, 45 cc+n-butyl alcohol, 55 cc.
- e. absolute alcohol, 25 cc+n-butyl alcohol, 75 cc.
- f. n-butyl alcohol.
- g. xylol.

2. 次に常温で paraffin の析出しない程度に、充分 paraffin を xylol に溶かしこんだ xylol-paraffin に試料を移し約 15 時間放置する。

3. 次に溶融している paraffin (53°C) に上記小片をうつし、20 分づつ 3 回溶融 paraffin を順次かへ paraffin を透入させてから、最後に常法<sup>6)</sup>によつて包埋した。

## 実験第 2. 反応時間

- a. 材料 ダイズの幼根の生組織切片

生組織切片で 10 分間反応させたものでは、薄くそまる部分、濃くそまる部分、全く反応しない部分が現われる。30 分たつと全部の細胞が黒色に染つてくる。それ以上は染色度に変りがない。

第 1 表

時 間 (分)	基 質 添 加	基質を添加しない場合 (対 照)
10	+*	—
20	++	—
30	###	—
40	###	—
50	###	—
60	###	—
120	###	—

\* +……わずかに活性,   ###……非常に活性,   —……不活性

- b. 材料 ダイズの幼根の固定組織切片

固定切片では、固定処理中に酵素が幾分失われるためか？ 顕微鏡的な観察ではやや茶褐色かかつてみえる。この実験結果から処理時間を、生組織で 30 分、固定組織で 2 時間を基準とした。

第 2 表

時 間 (分)	基 質 添 加	基質を添加しない場合 (対 照)
60	—	—
120	++*	—
180	++	—
240	++	—

\* 固定組織切片の場合、染色程度は生組織切片にくらべていくらか薄い。

**実験第3. 加熱による不活性**

材料 ダイズの幼根

処理時間 30 分, 対照は同じ時間冷水中に保った。生組織では 59°C で, 固定組織では 57°C 各 30 分で完全に活性を失った。この温度差の原因はわからない。

第 3 表

	55°C	56°C	57°C	58°C	59°C	60°C	対 照 (基質添加)
生 組 織 切 片	##		##	++	—		##
固 定 組 織 切 片	++	++	—	—		—	++

**実験第4. NaF の影響**

材料 ダイズの幼根

NaF は酸性 phosphatase の特異的な阻害剤といわれている。NaF での完全阻害は生組織でも固定組織でも  $10^{-2}$  M であり, 50% の阻害は  $10^{-2}$  M ~  $10^{-3}$  M の間にあるように思われる。

第 4 表

	$10^{-2}$ M	$10^{-3}$ M	$10^{-4}$ M	$10^{-5}$ M	対 照 基質添加 基質添加なし	
生 組 織 切 片	—	+	++	##	##	—
固 定 組 織 切 片	—	+	++	++	++	—

**実験第5. モリブデンの影響**

材料 ダイズの幼根の生組織切片

$10^{-3}$  M 以下の濃度では少しも阻害作用は現われなかつた (Mo としてモリブデン酸アムモニウムを使用した)。

第 5 表

$10^{-3}$ M	$10^{-4}$ M	$10^{-5}$ M	$10^{-6}$ M	対照 (基質添加)
++	++	++	++	++

**実験第6. KCN の影響**

材料 ダイズの幼根の生組織切片

$10^{-4}$  M ~  $10^{-3}$  M では切片の各所に反応を示さない細胞が混在しているが,  $10^{-2}$  M では完全に阻害されている。

第 6 表

$10^{-2}$ M	$10^{-3}$ M	$10^{-4}$ M	$10^{-5}$ M	対 照 基質添加 基質添加なし	
—	+	++	##	##	—

**実験第7.** 流水中に切片を放置した場合の活性変化

材料 ダイズの幼根の固定組織切片

固定組織切片を用い、paraffinを除いてから水に移して、流水中(温度約10°C)に所定時間放置後その活性を調べた。その結果、活性度は対照(蒸留水中に約10分)と等しかった。

第7表

24 時間後	48 時間後
++	++

**実験第8.** 固定組織切片保存温度の影響

a. 材料 ダイズの幼根

普通に考えられているように、低温に保存することは、この実験でも不良の結果をあたえた。かえつて室温附近に固定組織切片を保存することが、酵素活性の維持に好都合のようである。スライドにはりつけたままの切片では、25°Cの保存で122日目までも強い酸性 phosphatase 反応を残していることがわかった。

b. 材料 クワの茎

第8表

保存時間	保存温度 (°C)				
	25	5	0	-5	-10
2 週間目	++	+	±	-	-
3 "	++	-	-	-	-
5 "	++	-	-	-	-

**実験第9.** 生組織切片の保存

材料 ダイズの幼根

カミソリで横断切片をつくり、カバーガラスの中央にはりつけ、シャーレに入れ各温度のフラン器中に保存した。保存した日数は141日までであつたが、基質溶液中で2時間反応(相当に乾燥状態になつているので、反応時間を長めにとつた)させたあとの酸性 phosphatase の検出は、各温度とも保存による酵素反応の減退は見られなかつた。この結果からみると、実験第8の低温度保存による酵素反応の減退は、固定組織材料だけに見られる現象であることがわかる。この場合の固定は Glick and Fischer 法によつたものである。

第9表

保存時間	保存温度 (°C)				
	25	5	0	-5	-10
1 週間目	++	++	++	++	-
2 "	++	+	±	-	-
3 "	++	+	+	-	-

**実験第 10. Paraffin ブロックのまま 0°C に保存した固定組織材料の活性変化**

材料 ダイズの幼根

paraffin ブロックのまま 0°C のフラン器中に 33 日間保存した後、切片を作り、それについて酵素反応を調べた。その結果は、実験第 8 の固定組織切片の場合と同じく、全部酵素の活性を失っていた。

**IV. 考 察**

動物組織でなされた実験は大部分が固定組織標本によつている。しかし植物組織では動物組織と違つて、原形質が細胞膜によつてかこまれているために、paraffin の透入が容易でなく、出来れば生組織切片を用いて、すぐに反応をみるのが望ましい。

上述の結果では生組織切片の方が反応も強く良い結果をあたえている。

固定したものでの反応染色の程度は、生組織切片にくらべて約半分におちている。Gomori<sup>9)</sup> は固定した組織切片の活性は、よい条件でさえ、固定前の全活性の 60~50% が失われることを報告している。Wanner<sup>11)</sup> もトウキビで固定によつて活性の減少することを記載している。

次に酵素を不活性化する温度は、生組織切片と固定組織切片との間に、30 分処理の場合、それぞれ 59°C と 57°C と約 2°C のひらきがあつた。Gomori は paraffin 包埋に際して、paraffin oven の温度が 56°C をこえるか、または 1 時間半以上 paraffin 処理すると、酵素は不活性になると述べているが、本実験の固定組織切片の結果はこれと一致している。

この酵素の特異的な阻害剤として NaF があげられる。Lison<sup>7)</sup> は対照プレパラートとして  $10^{-3}$  M~ $10^{-2}$  M (0.0042~0.042%) 濃度の NaF で処理したものをを用いているが、ダイズの幼根でも  $10^{-2}$  M の濃度で完全に反応を停止する。また、モリブデン塩は酵母の表面 phosphatase を阻害するが<sup>9),10)</sup>、然しダイズにおいては Mo の阻害作用は見られなかつた。

KCN に対しては、NaF と同じく  $10^{-2}$  M で完全に阻害された。

Pearse<sup>7)</sup> は、phosphatase の研究のための保存 paraffin ブロックを 4°C に保つており、その際スライドに切片をはりつけたものと、paraffin ブロックのまま保存したものとの間に差がないという。普通、paraffin ブロックのまま貯蔵すると phosphatase の活性は低下すると Lison は報告しているが、Gomori は 5 年間室温においた paraffin ブロックからつくつた切片で、一つも活性の低下が見られなかつたという。著者の実験では、明らかに常温 (25°C) の方が切片のままでも長く酵素反応を維持し、低温に保存したものは、前者にくらべて短時間に酵素反応が不活性となつている。これに反して生組織切片においては、保存温度による活性の変化は -10°C においてさえ殆んど認められない。Arreguin-Lozano and Bonner<sup>1)</sup> はバレイシヨ塊茎の全しぼり汁と、硫酸アンモンで分離した液の両方を、0°C と 25°C に 3 週間保存し、その後の phosphatase の活性の測定を行い差がないことを示している。

以上の種々の実験から、植物組織について組織化学的に酸性 phosphatase を充分に検出で

きることがわかった。なお、生組織切片の方が、固定組織切片にくらべて強い反応を示すことと、生組織切片では、活性は保存温度に殆んど影響されないが、固定組織標本の保存温度は、低温より常温の方がよいことが確められた。

### 摘 要

発芽ダイズの幼根とクワの1年生枝の切片で、酸性フォスファターゼを組織化学的に検出することを試みた。

植物組織切片は生切片と固定切片の両方を用いた。固定には *n*-ブチールアルコールを使用する Glick and Fischer 法が適当である。生切片で30分、固定切片で2時間処理することによつて、酵素反応が充分に現われる。生切片で59°C、固定切片で57°C各30分処理すると酸性フォスファターゼは不活性になる。また弗化ソーダ、モリブデン酸アンモン、青酸カリの阻害作用も調べた。

固定組織切片の保存温度は低温より常温の方がよいが、生組織切片では酵素の活性は保存温度にほとんど左右されない。

終りに、始終御指導下さった青木藤先生に感謝の意をあらわす。

### 文 献

- 1) Arreguin-Lozano, B. and J. Bonner 1949 Experiments on sucrose formation by potato tubers as influenced by temperature. *Plant Physiol.*, **24**, 720.
- 2) Glick, D. and E. E. Fischer 1945 Studies in histochemistry. XVI. Methods for the histochemical localization of adenosinetriphosphatase, thiaminepyrophosphatase and glycerophosphatase in grains and sprouts. *Arch. Biochem.*, **8**, 91.
- 3) ————— 1949 Techniques of histo- and cytochemistry. Interscience. (New York).
- 4) Lison, L. 1953 Histochimie et cytochimie animales, principes et methodes. Gauthier-Villars. (今泉正訳, 1954).
- 5) Moog, F. 1952 Histochemistry. *Surv. Biol. Prog.* **2**, 197.
- 6) 緒方知三郎 1941 病理組織顕微鏡標本の作り方手ほどき. 南山堂 (東京).
- 7) Pearse, A. C. E. 1953 Histochemistry, theoretical and applied. Chyrchill. (London).
- 8) Roche, J. 1950 Phosphatases. *The Enzymes* **1**, 473.
- 9) Rothstein, A. and R. Meier 1949 The relationship of the cell surface to metabolism. IV. The role of cell surface phosphatases of yeast. *J. Cell. Comp. Physiol.*, **34**, 97.
- 10) ————— 1954 The enzymology of the cell surface. *Protoplasmatologia* **2**, E4.
- 11) Wanner, H. 1952 Phosphataseverteilung und Kohlenhydrattransport in der Pflanze. *Planta*, **41**, 190.

### Résumé

For the purpose of determining suitable conditions for detecting the acid phosphatase in plant tissues by histochemical means, some attempts were made, using the radicle of soybean and young twig of mulberry tree.

Glick and Fischer's method gave the most suitable results for fixation. The apparent enzyme reaction comes out after 30 minutes incubation in the sections prepared from the fresh material, but the sections from the fixed one need 2 hours in incubation for appreciable reaction. The inactivation of the acid phosphatase occurs after 30 minutes treatment at 59°C in unfixed section, but at 57°C in the fixed ones. The enzyme activity in the fixed sections is preserved better in room temperature (ca. 25°C) than in lower ones (below 5°C or 0°C). Contrariwise, in the fresh and unfixed sections such activity is not affected by preservation temperatures.