



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	アカビートの耐凍性とフォスフォリラーゼ
Author(s)	照本, 勲; TERUMOTO, Isao
Citation	低温科学. 生物篇, 15, 31-38
Issue Date	1957-11-05
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/17595
Type	departmental bulletin paper
File Information	15_p31-38.pdf



アカビートの耐凍性とフォスフォリラーゼ*

照 本 勲

(低温科学研究所 生物学部門)

(昭和 32 年 6 月受理)

I. 緒 言

植物は秋に生長を止め、晩秋の毎夜の低温によつてしだいに hardy な状態になり、やがて到来するきびしい寒さにも耐えるようになる。hardy な状態になつた細胞はたとえ凍つても細胞外凍結をおこしやすく細胞内部は凍りにくい。このように耐凍性の高い状態にあるかないかで凍結様式もまつたく変り、その結果凍結曲線の型も変つてくることが既にわれわれによつて明らかにされている²⁾。

植物が自然に hardy になるにつれて細胞の滲透濃度は高くなるが、人工的に耐凍性を増強する処理をしても同様に高まる。アカビートの葉柄の柔細胞の滲透濃度は耐凍性の状態で約 1M (蔗糖)、耐凍性のない時ではその約半分に減少する。しかし根では両者とも変化がなく大体同じ滲透濃度をもっている²⁾。

植物体が低温によつて滲透濃度を高め、また凍結様式を変えるようになるためには、植物体内においての物質代謝、すなわち種々の酵素の作用が関係してると考えられる。このように考えると細胞の耐凍性の強さ変るにつれて、酵素の活性度或は分布も変つてくる事が予想される。

このような予想でまず耐凍性とフォスフォリラーゼ、酸性フォスファターゼの活性度との関聯を明らかにするため、アカビートを材料として以下報告するような 2, 3 の実験を行つた。

II. 方 法

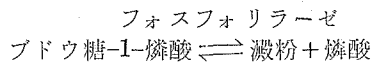
材料としてアカビート (*Beta vulgaris* L. var. *Rapa* Dumort) の葉、葉柄及び根を用いた。実験は前回²⁾の如く 11 月上旬より下旬にわたつて行つた。札幌での 11 月の気温は中旬になると氷点下を前後するようになるため、既に圃場のアカビートは自然にかなり hardy な状態になつている。このアカビートを鉢植えとして一部を 0°C に、一部を 25°C の恒温箱中に 7~14 日間おいて、それぞれ harden 及び deharden した。

* 北海道大学低温科学研究所業績 第 365 号

なお比較の意味でバレイショ塊茎，タマネギ鱗茎，ネギ鱗茎を使用した。

検出した酵素ならびに代謝産物は次の通りである。フォスフォリラーゼ，酸性フォスファターゼ，澱粉，還元糖及び油脂である。

1. フォスフォリラーゼの証明。 反応液 (2% ブドウ糖-1-燐酸 (G-1-P) 1 cc, 0.1 M 錯酸緩衝液 pH 5.9 · 1 cc) に試料切片を入れ，25° で 20 時間培養したのを蒸溜水でよく洗い，ヨードヨードカリ溶液で澱粉の生成を検出する。澱粉の生成があればフォスフォリラーゼの活性があつた証拠である (図版第 1-2 図)。



2. 酸性フォスファターゼの証明。 前回⁷⁾と同じ方法であるが反応液は次の組成である。

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

各試薬を混合した時生ずる沈澱は，濾紙で濾過するかまたは遠心分離で除去する。培養は 37°C で 2 時間行つた。培養後蒸溜水でよく洗滌し十分に基質を洗い去り，次に 2% 錯酸に約 3 分間浸し，蒸溜水で洗い 1% 黄色硫化アンモン溶液に 2~3 分間浸した後再び蒸溜水で洗滌する。酸性フォスファターゼ活性の部分には PbS の黒褐色沈澱が現われる。

3. 澱粉の検出。 Iodine-potassium Iodide テストを用いた。

4. 還元糖の検出。 Fehling's solution テストを用いた。切片は 2~3 細胞層の厚さにつくる。始めスライドに A 液 (Copper sulphate 79.28 g + 蒸溜水 1 l) をとり，この中に切片を入れ数分放置し硫酸銅が充分細胞内に入ったのち，速に水洗し予め 1~2 滴の B 液 (Sodium potassium tartrate 346 g + Sodium hydroxide 100 g + 蒸溜水 1 l) をスライドグラスに取つて沸騰させてある中に移し，カバーグラスをかけて更に数秒沸騰させる。還元糖が存在すれば亜酸化銅の橙色又は赤褐色の沈澱を生ず。

5. 油脂の証明。 Sudan III 又は Sudan black B⁹⁾ の染色性で調べた。

III. 結 果

1. フォスフォリラーゼ 人工的に 4~14 日間 hardening, dehardening を行つたもの，及び -2°~-4°C で同じく 4~14 日間凍結させたものについてフォスフォリラーゼの活性を調べた。その結果は第 1 表にまとめてある。deharden された組織では完全にフォスフォリラーゼの反応は現われない。大体処理 2 日で反応が失われる。葉においては 24 時間処理で活性が失われる。harden されたものではフォスフォリラーゼの反応は葉柄の柔細胞では顆粒状に現われ (図版第 7-8 図)，葉の細胞では細胞全体が強くヨード反応を呈示する。また葉柄に縦走る篩管も孔辺細胞もフォスフォリラーゼの活性を示す。凍結状態 (-2°~-4°C) で保存さ

第1表 フォスフォリラーゼの活性
測定 11月5日—11月19日

日 数	処 理											
	対 照			dehardening			hardening			凍 結		
	葉	葉柄	根	葉	葉柄	根	葉	葉柄	根	葉	葉柄	根
0	+	+	-									
4				-	-		++	++				
7				-	-		##	##		##	##	
9				-	±	-	##	##	-	##	##	-
14				*	-	-	++	##	-	+	##	-

対照は畑より採取直後のものである。第2, 3, 4表における対照も同様である。

* 処理中に葉がかれた。処理中に新しく出てきた色素(アントシアン)をもたない葉での反応は(-)である。

れた後もフォスフォリラーゼの活性の増大が認められる。葉では14日目わずかに活性が低くなつた。また注目されることは、実験された総ての場合根においては全くフォスフォリラーゼの反応が認められなかつた事である。

2. 酸性フォスファターゼ フォスフォリラーゼの場合と同様の条件下で酸性フォスファターゼの活性度の変化を調べたところ、第2表の結果を得た。

第2表 酸性フォスファターゼの活性
測定 11月5日—11月19日

日 数	処 理											
	対 照			dehardening			hardening			凍 結		
	葉	葉柄	根	葉	葉柄	根	葉	葉柄	根	葉	葉柄	根
0	+	+	+									
7				+	+		+	+		+	+	
9					+	±		++	++		++	++
11					±			++			++	
14				*	+	+		++	++		++	++

* 処理中に葉がかれた。

dehardening 処理されたものでは酸性フォスファターゼの活性が他のものにくらべて幾分減少することがわかる。hardening 及び凍結処理のものは共に反応は強くなっている。フォスフォリラーゼと異なり、酸性フォスファターゼの活性は根にも認められるが、葉柄、葉にくらべると、やや弱いように思われる。

3. 還元糖 hardening, 凍結処理のものでは葉柄において還元糖が幾分増加するが、根においては余り差は認められなかつた。dehardening のものでは葉柄で増加はみられなかつた。葉の還元糖は、検出の処理に含まれている葉緑素が小球状に分散し、反応結果の解釈を誤るので調べなかつた。

第3表 還元糖の検出

測定 11月5日—11月19日

日 数	処 理											
	対 照			dehardening			hardening			凍 結		
	葉	葉柄	根	葉	葉柄	根	葉	葉柄	根	葉	葉柄	根
0		+	±									
7					+			++			++	
9					+	±		++	±		++	±
14					+	+		++	++		++	++

4. 澱粉 前述の各処理を行つたもの及び対照のものあらゆる部分において、澱粉は全く検出されなかつた。

5. バレイショ塊茎 アカビートは耐凍性をもつ植物であり、人工的な低温処理によつても容易に滲透濃度は増加し、その凍結様式も変るのである。バレイショ塊茎は寒さにあえば還元糖が著しく増加して、滲透濃度が高まることが知られているが、耐凍性はない。この点でアカビートとは対照的のバレイショについて調べることは興味あることと思われるので、次の実験を行つた。

温度処理の方法は、バレイショ塊茎の一部を25°Cに、一部を0°Cの恒温箱中に7~28日間放置した。実験に使用した切片は酸性フォスファターゼ及び還元糖の検出の場合、皮層部と中心部の柔組織の両方を使用した。その他の場合は柔組織(髓部)の切片のみを用いた。検出の方法は前と同じであつた。

第4表 バレイショにおける検出

測定 1月29日—2月26日

日数	処 理													
	25°C							0°C						
	Pr.	酸 P.		澱粉	還元糖		油脂	Pr.	酸 P.		澱粉	還元糖		油脂
皮層		柔組織	皮層		柔組織	皮層			柔組織	皮層		柔組織		
0	##		++	##		++	++							
7	##		++	##	—	++	++	##		++	##	##	++	++
14	##	—	++	##	—	++	++	##	++	++	##	##	++	##
21	##	—	++	##	—	+	##	##	++	++	##	##	++	##
28	##	—	++	##	—	—	++	##	—	++	##	##	++	##

Pr.=フォスフォリラーゼ, 酸P.=酸性フォスファターゼ

バレイショ皮層部では、如何なる場合もフォスフォリラーゼの反応は紫色の顆粒状となつて細胞内にあらわれる。澱粉粒の存在する柔組織部の細胞では細胞一面にヨード反応を呈するが、澱粉粒とは明瞭に區別出来る。また縦横に走る管束部分には皮層部で見られると同じく顆粒状となつてフォスフォリラーゼの反応が認められる。第4表に示すとおりフォスフォリラー

ゼの活性には、25°C 処理及び 0°C 処理のものの両者間で差は認められなかつた。酸性フォスファターゼは 25°C 処理の皮層部においてのみ活性が認められないが、柔組織では明かに活性を示し、しかもその強さは処理日数に無関係に等しい。0°C 処理の場合は皮層部、柔組織における活性度は全く変化を示さない。

澱粉(澱粉粒)の分布又は量的な変化は認められなかつた。還元糖の反応は、バレイショでは非常に顕著に現われるが高温にしておくと、つまり dehardening されると始め皮層部から糖がなくなり、4 週間目では柔組織の部分にも反応が見られなくなる。それに反して低温処理では特に皮層の部分に糖の蓄積することが認められた。油脂の検出では 0°C 処理の方が幾分増加するように見えるが余り両者の区別は明瞭でない。

6. タマネギ鱗莖 タマネギはある程度低温処理を受けると耐凍性を増すが⁸⁾、その程度はアカビートに比べてかなり低いので比較する意味で調べてみた。その結果を第 5 表にまとめた。材料には鱗片葉の外側表皮、内側表皮及びその間に存在する柔組織を用いた。

第 5 表 タマネギにおける検出

測定 3月4日—3月25日

日数	処 理																																
	25°C										0°C																						
	Pr.			酸 P.			澱 粉			還元糖			油 脂			Pr.			酸 P.			澱 粉			還元糖			油 脂					
	O	P	I	O	P	I	O	P	I	O	P	I	O	P	I	O	P	I	O	P	I	O	P	I	O	P	I	O	P	I			
0	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	±	±	±																		
7	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	±	-	-	-	-	+	+	+	±	±	±	+	+	+
14	-	-	-	±	+	+	-	-	-	+	+	+	±	±	±	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	±	±	±	+	+	+
21	-	-	-	+	+	±	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	±	±	±	+	+	+

Pr.=フォスフォリラーゼ, 酸 P.=酸性フォスファターゼ, O=外側表皮, P=柔組織, I=内側表皮

フォスフォリラーゼの活性は、タマネギの澱粉合成阻害剤によつて阻止されることが Eyster¹⁾によつて報告されたが、この実験においてもフォスフォリラーゼの反応は全く認められない。酸性フォスファターゼは両者の間に顕著な差はなかつた。澱粉は総ての実験で全組織に検出できなかつた。還元糖、油脂共に 25°C、0°C 処理の間に差は認められない。即ち hardening, dehardening 処理はタマネギではこれ等の検出量に殆んど何等の影響をも及ぼさないということになる。

7. ネギ鱗莖 タマネギと同様に dehardening, hardening 処理を受けてもフォスフォリラーゼ、酸性フォスファターゼの反応、及び澱粉、還元糖、油脂の量には変化が認められなかつた。その結果を第 6 表にまとめた。寒さにあつて植物が耐凍性をえる機構に関しては、非常にたくさんの研究がなされてきたが、未だ不明の点が多い。最も一般に認められていることは耐凍性が高い細胞の滲透価は高いということである。また耐凍性のある植物は人工的に低温処理することで必ず滲透価が増す。然し、バレイショの場合のように低温にあつたと滲透価が

第6表 ネギにおける検出

測定 3月6日—3月27日

日数	処 理																																
	25°C									0°C																							
	Pr.			酸 P.			澱 粉			還元糖			油 脂			Pr.			酸 P.			澱 粉			還元糖			油 脂					
O	P	I	O	P	I	O	P	I	O	P	I	O	P	I	O	P	I	O	P	I	O	P	I	O	P	I	O	P	I	O	P	I	
0	-	-	-	+	+	+	-	-	-	##	+	##	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	##	-	##	-	-	+	-	-	-
7	-	-	-	+	+	+	-	-	-	##	-	##	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	##	-	##	-	-	+	-	-	-
14	-	-	-	±	±	±	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	±	±	±	-	-	-	##	+	##	+	+	+	-	-	-
21	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	±	+	+	-	-	-	-

Pr.=フォスホリラーゼ, 酸P.=酸性フォスファターゼ, O=外側表皮, P=柔組織, I=内側表皮

高まるにかかわらず耐凍性をもたないものもある。植物が耐凍性の高い状態では特に還元糖、及び非還元糖の含量は多く従つて浸透価も高い。同一植物であつても糖の含有量は夏期に少なく冬期に多く、また実験的にも寒冷にさらすことによつて糖の増加があり浸透価が高まる⁵⁾。低温によつて還元糖、非還元糖が増す機構について¹⁾2, 3の研究がなされてきたが、まだ不明瞭な点が多い。低温による浸透濃度の増大に関係する酵素として近年特にフォスホリラーゼがあげられてきた。この酵素が関係するとすれば harden されるにつれて澱粉→糖の反応が進んで、今まで浸透的に作用をもたなかつた澱粉から浸透活性の糖類が多量に生ずることは一応了解できる。アカビートを hardening した場合、最も顕著なことはフォスホリラーゼの活性が増加することで、deharden した組織ではこの酵素の活性が全く認められなくなることである。

一方これと平行的に、hardening によつて葉柄の細胞の浸透濃度はまし且耐凍性が增大するが、deharden すると丁度これと反対の結果となる。しかも根においては harden しても浸透濃度も耐凍性も高まり方が遙かに少ない²⁾。従つて低温処理によるアカビートの浸透濃度の増大にはフォスホリラーゼが関係しているものと思われる。

摘 要

アカビートを人工的に harden した場合と deharden した場合について、組織化学的にフォスホリラーゼと酸性フォスファターゼの活性を調べ、同時に還元糖、澱粉の検出を行つた。フォスホリラーゼの活性は harden されたもので大きく、deharden された組織では全く検出できなかつた。酸性フォスファターゼの活性も deharden されると次第に低下するが、harden されてもほとんど増強されない。フォスホリラーゼは両処理とも根においては反応は認められない。この酵素はアカビートの浸透価を高めることに特に関係すると思われる。なお比較の意味でバレイショ、タマネギ及びネギの各組織についても実験を行つた。

最後に、この研究について御指導下さつた青木藤教授、ならびに有益な御助言をいただき

た朝比奈助教授に深く感謝する。

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) 青木 廉・朝比奈英三・照本 勲 1953 生物の凍結過程の分析 IX. 植物の耐凍性と凍結曲線の型. *低温科学*, **10**, 69.
- 3) Ewart, M. H., D. Siminovitch and D. R. Briggs 1953 Studies on the chemistry of the living bark of the black locust tree in relation to frost hardiness. VI. Amylase and phosphorylase systems of the bark tissues. *Plant Physiol.*, **28**, 629.
- 4) Eyster, H. C. 1949 Inhibitor in onion for starch synthesis. *Science*, **109**, 382.
- 5) Levitt, J. 1956 The hardiness of plants. Academic press.
- 6) Scott, M. F. 1955 The distribution and physical appearance of fats in living cells—introductory survey. *Am. J. Bot.*, **42**, 475.
- 7) 照本 勲 1956 植物組織の酸性フォスファターゼの検出について. *低温科学, 生物篇*, **14**, 29.
- 8) ———— 1957 タマネギの耐凍性について. *低温科学, 生物篇*, **15**, 39

Résumé

Using the leaf, petiole and root of table beet, histochemical studies were conducted on how the activity of phosphorylase and acid-phosphatase is influenced by the grade of the frost-hardiness. Further, in parallel, the changes of reduced sugar- and starch-content also were measured.

Phosphorylase activity in leaf and petiole, excepting root, was distinctly increased by the hardening treatment (at 0°C for 7~14 days), by which table beet had sufficiently become frost-hardy. All tissues of table beet having lost their frost-hardiness by the dehardening treatment (at 25°C for 7~14 days), showed no phosphorylase reaction. In contrast with the leaf and petiole, the root never showed phosphorylase activity independently of the grade of the frost-hardiness. Kept in frozen state (at -2°~-4°C for 7~14 days), the phosphorylase activity of the leaf and petiole did not decrease, but rather became stronger. The activity of acid phosphatase found generally in all tissues of table beet was also increased by the artificial hardening, but was not completely lost, when dehardened, as was that of phosphorylase. In the root tissues, however, acid phosphatase activity seems to be somewhat weaker than in the leaf and petiole. According as the cells become frost-resistant, the increase of the osmotic concentration of the cells and that of the activity of phosphorylase distinctly change in parallel. From these facts it seems that phosphorylase plays an important role to increase the osmotic concentration and the frost-resistance in table beet. For comparison with table beet, on potato tuber, scale leaf of onion and welsh onion, the activities of phosphorylase and acid-phosphatase were also studied.

図 版 説 明

- 第 1 図 アカビートの葉の横断切片。
 フォスホリラーゼ反応 (-)。
 (基質・G-I-P の添加なし)。
- 第 2 図 同上。フォスホリラーゼ反応 (≡)。
 8 日間 harden した組織。
- 第 3 図 同上。酸性フォスファターゼ反応 (±)。
 11 日間 deharden した組織。
- 第 4 図 同上。酸性フォスファターゼ反応 (≡)。
 11 日間 harden した組織。
- 第 5 図 同上。酸性フォスファターゼ反応 (-)。
 (基質・β-グリセロリン酸の添加なし)。
- 第 6 図 アカビートの葉柄の柔組織。
 フォスホリラーゼ反応 (-)。
 2 日間 deharden した組織。
- 第 7 図 同上。フォスホリラーゼ反応 (≡)。
 10 日間 harden した組織。(×360)
- 第 8 図 同上。フォスホリラーゼ反応 (≡)。
 圃場の雪の下から掘りだした組織。
 (1 月 8 日)。
- 第 9 図 同上。酸性フォスファターゼ反応 (+)。
 2 週間 deharden した組織。
- 第 10 図 同上。酸性フォスファターゼ反応 (≡)。
 2 週間 harden した組織。
- 第 11 図 同上。酸性フォスファターゼ反応 (-)。
 (基質・β-グリセロリン酸の添加なし)。
 (第 7 図を除き各 ×100)

