



Title	木本類の耐凍性増大の過程 II : 耐凍性増大と糖類及び水溶性蛋白質との関係 (2)
Author(s)	酒井, 昭; SAKAI, Akira
Citation	低温科学. 生物篇, 16, 23-34
Issue Date	1958-12-05
Doc URL	<a href="https://hdl.handle.net/2115/17605">https://hdl.handle.net/2115/17605</a>
Type	departmental bulletin paper
File Information	16_p23-34.pdf



## 木本類の耐凍性増大の過程 II\*

耐凍性増大と糖類及び水溶性蛋白質との関係 (2)

酒 井 昭

(低温科学研究所 生物学部門)

(昭和 33 年 7 月受理)

### I

前報<sup>14)</sup>において明らかにした様に、耐凍性増大と蔗糖濃度の増大とは季節的にも、人工的低温処理した場合にも完全に平行の関係があるが、水溶性蛋白質は季節的には略々耐凍性増大と平行して増大するが、低温処理して耐凍性が増大する時には蔗糖とちがつて全く変化しない。それ故、耐凍性の増大を Siminovitch<sup>15)</sup>等のいうように水溶性蛋白質の量の増大からだけでは説明出来ない。また前報では 0°C で 10 日間、低温処理しても、水溶性蛋白質が増大しなかつたが、もつと処理期間を長くした場合、耐凍性増大と関連してそれが増大するかどうかを更にたしかめてみる必要がある。季節的な耐凍性増大の過程において、糖類、及び水溶性蛋白質が果している役割についても検討してみた。季節的に耐凍性増大の過程を考える時、細胞内凍結の起こり易さが季節的にどのように変化するか、又それが細胞の耐凍性の大きさの限界要因をなしておるかどうか、又人工的に低温処理をした場合にそれがどのように変化するかを調べる必要があるが、木の細胞について季節的に、耐凍性増大過程の観点からこの事についてまだ調べられていない。

今まで調べた物質の外に凍結による害に対して、何等かの保護作用\*\*の役割をすくと考えられる物質、例えばグリセリン等が冬期の耐凍性の大きい細胞内に増大するかどうか。昆虫でも耐凍性の高いものにグリセリンが多いという報告<sup>16)</sup>があるが、植物では今の所判らない。今回はこれについて測定する事が出来なかつた。グリセリンとちがつて、耐凍性の小さい細胞にも透過し易いエチレングライコールで処理した場合、耐凍性がどのように増大するか、季節によつて処理効果がどのように異なるかについて 2, 3 実験してみた。以上前報の実験を補足しながら断片的に行つた結果を報告する。

\* 北海道大学低温科学研究所業績 第 450 号  
低温科学, 生物篇, 第 15 輯に発表した「木本類の耐凍性増大と糖類及び水溶性蛋白質との関係」の論文を木本類の耐凍性増大の過程 (I) とする。

\*\* 植物細胞の凍害に対するグリセリン, エチレングライコールの保護作用についての報告<sup>4), 6), 10), 21)</sup> はかなり多い。

御校閲していただいた朝比奈教授に謝意を表わします。

## II

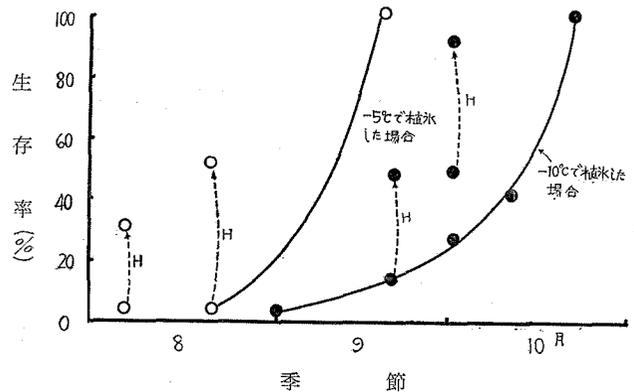
材料として桑 (*Morus Bombycis* Koidz.) のタキノカワ及びケンモチ (品種名) の春刈1年生枝条の先端から20~30 cmの部位を使用した。

人工的低温処理の方法及び皮層細胞の生死の判定法は前報<sup>14)</sup>に従った。糖類はHane's<sup>5)</sup>の方法で、N<sub>2</sub>の定量はLevy and Palmer<sup>8)</sup>の方法を用いた。前報と同様皮層部だけを取り出して、石英砂と水を入れ乳鉢で充分に磨砕して作ったホモゲネートの遠心上清(3,000回/分5分間)を定量に用いた。細胞内凍結の起こり易さは皮層組織の切片を流動パラフィンでカバーグラス上に封じて冷却し、一定温度(-3~-20°C)に達した時、切片を同温度に冷却した細い氷で植氷して過冷却を破り、その温度に5分間おいてから室温に取出して細胞の生存率を調べた。1系列の実験には10~15個の切片を用いた。植氷後5分間で取出すために、かような短時間内には細胞外凍結による害が起きにくい、細胞内凍結の害はこの時間に充分起きるので<sup>1)</sup>、この方法では、細胞内凍結が起き易いかどうか丈が判定出来るとみなしてもいい。

## III

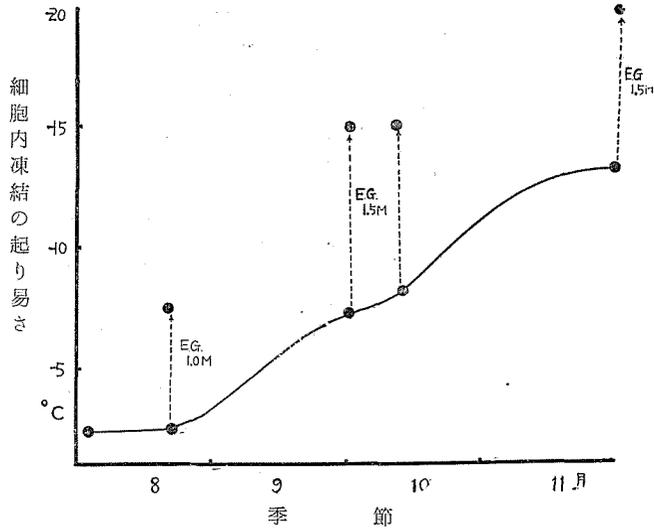
### 実験1. 細胞内凍結の起こり易さの季節的变化

第1図には季節を追って-5°Cと-10°Cで植氷した場合の生存率の値の変化を示している。8月下旬までは-5°Cで植氷しても殆んど全ての細胞が細胞内凍結を起こしてしまうが、8月末~9月中旬にかけて、-5°Cで植氷した時には細胞内凍結が起こりにくくなる。しかしその時期に-10°Cで植氷した時には殆んど全ての細胞が死んでしまうが、10月中旬以降、その抵抗性は漸次増大して、殊に10月下旬には-10°Cで植氷しても、細胞内凍結を起こす細胞はなくなる。この場合、流動パラフィンで切片を封じてあるので、切片の周囲には水溶液がない状態で過冷却しているが、それにも拘わらず、突然植氷しても細胞内凍結を起こしがたい。第2図にも同じ結果を示したが、この場合縦軸には各温度で植氷した場合、殆んど全ての細胞が生きている最低温度で細胞内凍結の難易をあらわした。比較のため第3図に示した曲線は枝の小



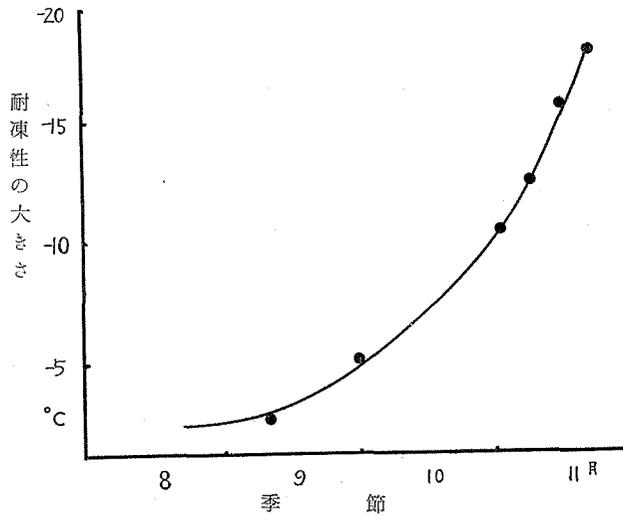
第1図 細胞内凍結に対する抵抗性の季節的变化及び人工的低温処理前後の変化

矢印の方向は低温処理後の値の変化を示す、低温処理の条件：0°Cで10日間、対照と低温処理の実験には同一枝の隣りあう節間の部分を用いた。



第2図 細胞内凍結に対する抵抗性の季節的变化及びエチレングライコール処理前後の変化

図中の曲線は細胞内凍結の起り易さの季節的变化を示す。各温度で組織切片を植氷した時殆んど全ての細胞が生きている最低温度でその大きさを相対的にあらわした。矢印の方向はエチレングライコールで切片を室温で10分間処理した後の値の変化を示す。対照と低温処理の実験には同一の枝の隣りあう節間の部分を用いた。



第3図 耐凍性の大きさの季節変化

片を  $-5^{\circ}\text{C}$  で植氷してから各温度で 24 時間凍結した場合の害なしに耐えうる最低温度で現わした耐凍性の大きさの相対値で両者の曲線が略々平行して変化している。細胞内凍結が起こり易い 10 月初旬以前においては、耐凍性の大きさは細胞内凍結の起こり易さによつて支配されるようである。第 2 図のエチレングライコールで処理した場合の結果は後で説明する。

### 実験 2. 低温処理前後における耐凍性の大きさと糖類及び水溶性蛋白質の変化

前報において  $0^{\circ}\text{C}$  で 10 日間低温処理して耐凍性が増大した時、蔗糖の量は増大したが、水溶性蛋白質は全く変化しなかつたが、低温処理期間を更に長くした場合もそれが変化しないかどうかを確かめるために、前報と同じ方法で  $0^{\circ}\text{C}$  で 21 日まで低温処理した場合に、耐凍性の大きさ、滲透濃度、蔗糖及び水溶性蛋白質の量がどの様に変化するかを調べてみた。

第 3 表にその結果を示した、耐凍性の大きさは最初の 7 日間に著しく増大し、14 日まで漸次増大しているがそれ以降変化しない。滲透濃度、蔗糖の量はこの耐凍性の大きさの変化と全く平行的に変化している。それに対して水溶性蛋白質は殆んど変化していない。従つて  $0^{\circ}\text{C}$  で 21 日間、低温処理した場合でも前報と同様な結果を生じた。

第 1 表 低温処理と耐凍性及び物質の変動

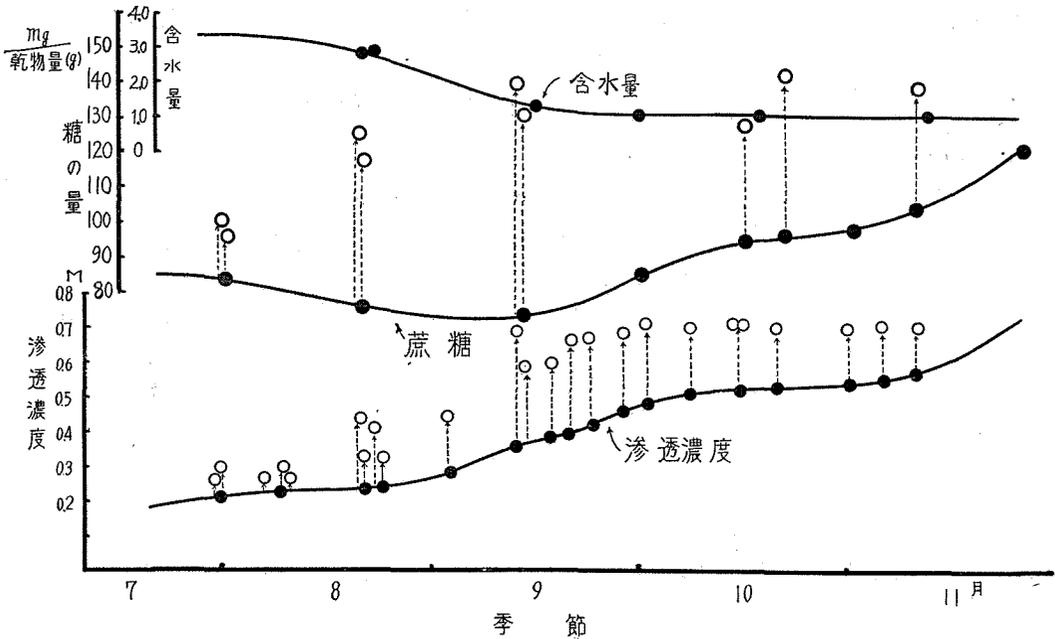
	低温処理の期間(日)			
	0	7	14	21
$-10^{\circ}\text{C}$ で 24 時間凍結	20*	60	80	80
$-20^{\circ}\text{C}$ で 4 時間凍結	5*	50	70	70
滲透濃度 (M)	0.47	0.63	0.68	0.68
蔗糖 (mg/D.W.(g))	95	130	142	145
水溶性蛋白質 (Nmg/D.W.(g))	24.8	21.1	22.7	22.1

実験期日： 10 月 29 日 品種： ケンモチ

\* 数字は凍結融解後の皮層細胞の生存率。

### 実験 3. 異なつた時期に低温処理した場合の耐凍性の大きさと滲透濃度の関係

異なつた時期に同一条件で低温処理した時でも、耐凍性の大きさと滲透濃度の大きさの間に上のような密接な関係がある時には蔗糖の増大が耐凍性増大の一つの大きい要因とみなされる。それに反して低温処理前後の両者の滲透濃度が同一であるのに、耐凍性の大きさに大きい差があれば、この場合には蔗糖以外の要因も大きく作用していると考えざるを得ない。これを確かめるために、各季節に同一条件で低温処理してこれらの間の関係を確かめてみた。その結果、蔗糖は 8 月下旬以降どの時期に低温処理しても、生成する蔗糖の量は大体同じである。従つて低温の作用で蔗糖が生成される反応系はすでに 8 月下旬には形成されていると考えられる(第 3 図)。しかし滲透濃度の方は 9 月中旬になつて、乾物当りの含水量が 1~1.5 近くにならないと、たとえ蔗糖が増大しても、滲透濃度の値が 0.7 M 近くにならない。次いで低温処理して同一滲透濃度を有する細胞の間の耐凍性の大きさを比較してみた。低温処理後の滲透濃度は



第4図 各季節における蔗糖量と渗透濃度の低温処理後の変化  
 矢印は低温処理後の値の変化を示す。低温処理の条件：0°Cで10日間。  
 含水量は乾物当りの値で示した。

第2表 9月30日と10月30日に低温処理した場合の  
 渗透濃度と耐凍性の大きさの関係

低温処理期日		渗透濃度		低温処理後の耐凍性の大きさ (-20°Cで24時間凍結)
		N	H	
9月30日	No. 1	0.45 M	0.7 M	20*
	No. 2	0.47	0.73	30
10月30日	No. 1	0.50 M	0.7 M	70
	No. 2	0.53	0.72	80

\* 皮層細胞の生存率 低温処理条件：0°Cで10日間。

9月30日でも、10月30日でも同様に約0.7 Mであるにも拘わらず、低温処理後の耐凍性の大きさは-20°Cで24時間凍結した場合、9月30日は20~30%の生存率を示すに過ぎないが、10月30日の場合には70~80%の生存率を示した。この事から季節的に耐凍性が增大する時には、その耐凍性の大きさは渗透濃度の大きさからだけでは説明出来ない事が判る。この1カ月間に渗透濃度の増加は小さいが、水溶性蛋白質の増加は著しい(10月30日は9月30日の値より約50%増加している)。両期間において、低温処理して同じ渗透濃度を有していても、両者の間に耐凍性の大きさに可成りの差があるのはこの事に原因があるかもしれない。

#### 実験4. 9月30日と10月30日に低温処理した場合の滲透濃度と脱水抵抗の大きさの変化

9月30日と10月30日に同一条件で低温処理前後において、高張塩溶液による脱水抵抗<sup>14), 15)</sup>の大きさを比較してみた。この場合、いずれの場合もその細胞の等張溶液の6倍の高張溶液中で4時間、脱水状態においてから、生存率を比較して脱水抵抗の大きさをきめた。細胞の等張溶液の6倍の高張溶液で脱水抵抗を調べると、どの時期にも低温処理前後の値は殆んど同じになる。しかし9月30日と10月30日の低温処理後の値を比較すると、細胞の滲透濃度が同一であつても、脱水抵抗の大きさは著しく異なり、前者は15%、後者は75%の生存率を示している。両期間の低温処理前の材料について、蔗糖の量の変化を調べてみると、10月30日は9月30日よりも20%蔗糖が増加しているのに、水溶性蛋白質は55%増加していた。従つて前と同様、両方の時期の細胞内の水溶性蛋白質の著しい差が低温処理後の脱水抵抗の差の原因をなしている様に考えられる。次に組織中の水溶性蛋白質の増加率が小さい9月10日と9月30日について、同様に細胞液の等張溶液の6倍の高張溶液で低温処理後の脱水抵抗の値を調べたが、前実験の場合とちがつて両者の間に殆んど差が認められなかつた。

第3表 9月30日と10月30日における低温処理前後の滲透濃度と脱水抵抗の値の比較

低温処理期日	滲透濃度		使用した高張溶液 (等張液の6倍)		脱水抵抗の大きさ	
	N*	H**	N	H	N	H
9月30日	0.42 M	0.73 M	2.5 M	4.3 M	15****	15
10月30日	0.52	0.72	3.1	4.3	80	75

低温処理条件: 0°Cで10日間。

\* Nは低温処理前の値を示す。 \*\* Hは低温処理後の値を示す。 \*\*\*\* 各高張溶液中で20°Cで6時間、処理後の生存率を示す。

#### 実験5. エチレングライコールで処理した場合の耐凍性の変化

最初に細胞内凍結を防ぐ作用について調べるために、各時期の細胞を1.0—1.5Mのエチレングライコール溶液中に室温で10分間処理してから、表面の液を濾紙でよく拭つて、カバーガラスの間に流動パラフィンで封じて前と同様な方法で細胞内凍結の起り易さを調べてみた。第2図にその結果を示した。エチレングライコールで処理すると低温処理した場合とちがつて短期間に著しく細胞内凍結が起りにくくなる。11月にその1.5 M溶液で処理して、-20°Cまで過冷却してから植水したが全細胞が生きていた。それに対して無処理の対照は全細胞が死んでいた。

次にエチレングライコールで処理した細胞の細胞外凍結に対する影響を調べるために、細胞内凍結が起こる危険のない温度で切片を植水して過冷却を破つてから、漸次冷却して-10°~-30°Cの外圍温度に達してから、1日間、細胞外凍結状態においた後、生存率を無処理と比較した。第6表に示す様に1.5 Mのエチレングライコールで同様に処理した時、季節によつてエチレングライコール処理の影響は異なるが、いずれの場合でも対照よりエチレングライコール

第4表 エチレングライコールの細胞外凍結に及ぼす影響

実験期日	9月26日		11月6日	
	無処理	エチレングライコール (1.5 M)	無処理	エチレングライコール (1.5 M)
-10°Cで24時間凍結	0*	30	60	100
-20°Cで24時間凍結	0	10	0	100
-30°Cで24時間凍結	0	0	0	80

\* 皮膚細胞の生存率。

無処理の対照は-5°Cで植氷，エチレングライコールで処理した場合は-10°Cで植氷した。

で処理した方が生存率がよい。最後に切片を前の様に流動パラフィンで封じて約10°C/分の冷却速度で-10°C，-20°Cまで冷却し，その温度に達してから5時間後に凍結している切片の数を調べた結果，無処理の対照は既に-10°Cで2/10個の切片が凍結しており，-20°Cの場合には10/10個の切片が凍結していたが，これに対してエチレングライコールで処理した時には-20°Cにおいても1個の切片も凍結していなかった。

#### IV

1. 細胞内凍結に対する抵抗性と耐凍性の大きさの関係。耐凍性増大の経過を調べてみると細胞内凍結に対する抵抗性が増大し，それにともなつて，或いはそれよりおくれて細胞外凍結に対する抵抗性が増大する。10月中旬以降は急激に冷却しない限り細胞内凍結は起こりにくいので，耐凍性の大きさは細胞外凍結に耐える大きさによつて支配される。それに反して細胞内凍結が起こり易い10月以前，殊に9月中旬以前においては耐凍性の大きさは細胞内凍結が起こり易いかどうかによつて支配される傾向が大きいようである。たとえ細胞外凍結に対する抵抗性が大きくても細胞内凍結が起りやすければ，細胞の耐凍性の大きさは結局は小さい事となる。この点からも高張塩溶液中での脱水抵抗を測定して，それをそのまま耐凍性の大きさに対する指標として使用する事には問題がある。

2. 耐凍性増大と糖類増大の関係，及び糖類増大の意義。季節的变化の場合においても，人工的低温処理の場合においても耐凍性の増大と蔗糖濃度の増大との間には密接な関係がある。今まで耐凍性増大に対して蔗糖の増大が大きい役割を果しているような多くの事実をあげたが，蔗糖が耐凍性増大に作用しているという直接的な証拠はまだ得られていない。蔗糖は細胞内に透過しがたいので，ある程度の耐凍性を有する細胞内に蔗糖を入れた場合，耐凍性が増大するかどうかを調べる事は今の所出来ない。低温処理した場合，蔗糖が増大するし，又耐凍性も増大する。しかしこの場合，耐凍性が増大したのは低温の作用それ自身によつて増大したのか，或いは低温の作用で増大した蔗糖の作用によるものか判らない。何等かの方法で低温処理しても蔗糖が増加しない方法が見出されればこの両者の要因を分離する事が出来る。或いは逆に低温処理以外の方法で蔗糖を増加させる方法が見出されれば，この問題は更に一步前進出

来るであろう。

低温の作用で澱粉が蔗糖に変化する作用はかなり一般的な現象で球根の休眠をやぶる場合の低温処理<sup>22)</sup>、馬鈴薯の低温貯蔵、穀類の低温ヤロピヅツイア<sup>20)</sup>等の場合にも見られる。木の場合、低温処理による蔗糖の著しい増大が0°Cで5日間の処理ですでおきている。耐凍性の大きい時には0°Cよりも-5°Cでの温度処理の方がより有効である。かような低温度で比較的短い期間に多量の蔗糖が形成される。最近高等植物において uridine diphosphate glucose<sup>23)</sup>を助酵素とする蔗糖合成酵素が見出されたが、その酵素によつて蔗糖が合成されるためには uridine triphosphate glucose の供給を必要とし、従つて ATP と呼吸のエネルギーの供給が必要条件であるので、低温下でこの系によつて短期間に蔗糖が合成されているかどうかは今の所判らない。

耐凍性増大に対する糖類の意義については、従来糖類が増大すると浸透濃度が増大する結果、ある温度で凍る水の量が減少する、糖類は原形質蛋白の変性に対する保護作用が大きい、糖は水和作用が大きいので、細胞内を凍りにくい状態にしたり、脱水される水の量を少なくする等の理由があげられている。植物においては細胞外凍結による害は脱水によつて細胞内が濃縮されたために起る塩害と説明する学者<sup>7),9),18)</sup>が多いが、塩害であるという証拠はまだ得られていない。Lovelock<sup>11),12)</sup> (1954) は赤血球、精子等をグリセリン、メタノール、アセチルアマイド、糖類等の中性溶液中に入れてから凍結させてこれらの物質が凍結に及ぼす影響を調べた所、細胞内に透過しやすく、しかも細胞に害作用を与えない中性溶質は凍結に対して保護作用を与えるが糖類殊に蔗糖は細胞に透過しないので保護作用が殆んどないとのべている。これらの物質の凍結に対する保護作用は細胞内におけるこれらの物質の濃度がたかまる結果、細胞内の塩濃度のモル分率が小さくなるために塩害を起しにくくなるためと説明している。

植物を低温処理した場合に細胞内に著しく蔗糖が増大する。しかも含水量が小さいから、細胞内の蔗糖濃度の増加は著しい、したがつて細胞内の塩濃度のモル分率は蔗糖の増加する前と比較してより小さくなるので、細胞外凍結によつて細胞内が濃縮されても塩害の度合は少なくなると考えられる。

ある一定の時期において、低温処理する前後の耐凍性の変化を考える場合は蔗糖濃度の増大が耐凍性の変化に対して大きい役割を果していると考えられる。次の事実も之を裏書している。低温処理前後において、同一高張溶液で脱水抵抗を比較した時、処理後には脱水抵抗が著しく大きい、しかし細胞の浸透濃度に対して等しい倍率の高張溶液で脱水抵抗を比較してみると両者の差は殆んどなくなる。どの時期についてもこれと同様な結果をえている。しかし季節的に耐凍性が増大する場合の原因を考える時には蔗糖の増大だけでは説明出来ない。たとえ同一浸透濃度であつても、異なつた季節の材料では耐凍性の大きさ、及び脱水抵抗の大きさには大きい差がある。だから原形質の構成主成分である蛋白質の質的、量的変化を考慮する必要があると思われる。Siminovitch<sup>18)</sup>等は細胞外凍結に対する抵抗性は水溶性蛋白質の量の増大に基づくと主張し、これに対して Ullich<sup>7)</sup>一派は糖と蛋白質が結合しているグリコプロタイドの

増大を主張している。彼等はいずれも水溶性蛋白質やグリコプロタイドの強い水和性のために細胞外凍結によつて細胞が極度に脱水される事を防ぐその性質を重視している。なお Siminovich<sup>17)</sup> はニセアカシアの皮層部の水溶性蛋白質を季節的に電気泳動法で分析して、含まれている成分比が季節的にどの様になるかを調べた結果、9月以降、耐凍性が増大するにもかかわらずそれらの成分の数も成分の比も変らない事を報告している。

Siminovich 等は塩可溶性蛋白質についてはふれていない。蛋白質を水で抽出する時、沈澱するとみられる塩可溶性蛋白質や水に可溶性でない蛋白質を不溶性蛋白質として一括して季節的变化を調べた結果、水溶性蛋白質とちがつて、季節の全く変化しなかつたので、これを問題にとりあげなかつたが、所謂、不溶性蛋白質と塩可溶性蛋白質を更に分けて調べる必要がある。現在の所、耐凍性の変化と蛋白質の間の関係についてよく判っていない。水溶性蛋白質が耐凍性増大に対してある種の関係をもっている様であるが、それがどの様に作用しているかの具体的な事は何も判っていない。

3. 低温処理効果について。9月中旬までに枝条の細胞内の炭水化物の蓄積は一応終了したと考えられる。それ以降、水溶性蛋白質の蓄積が増大し、9月下旬から10月下旬にかけてそれは最大の増加率を示す。10月初旬以降、外圍気温の低下につれて、漸次増大し始めた蔗糖は10月下旬から12月初旬まで著しく増大する。そして耐凍性の大きさもこの時に最大の増加を示す。低温処理が初めて有効になる時は年によつて、又枝によつて若干異なるが大體9月上旬である。有効になるための細胞の条件としては細胞内の含水量の低下(乾物量に対して1~1.5)を今の所、必要条件と考えたい。低温処理した時、澱粉の蓄積は8月下旬に相当量に達しているし、蔗糖はすでに少なくとも8月下旬には低温処理によつて増大する条件が出来ている。この澱粉の蓄積と、水の著しい減少を伴う8月下旬から9月中旬の間にそれ以前とことなつて細胞内凍結もある程度起りがたくなり、脱水抵抗も増大する。この時期が低温処理が効果的になる最初の段階である。この時の耐凍性の大きさは $-5^{\circ}\text{C}$ での凍結に数時間耐えられる程度である。それ以降は炭水化物に変つて蛋白質の増大する時期で10月下旬頃最大値近くに達する。この頃細胞内凍結は非常におこりにくくなり、脱水抵抗も著しく増大する。この時の耐凍性の大きさは $-10^{\circ}\text{C}$ での凍結に数時間耐えられる程度である。この頃になつて低温処理を効果的ならしめる必要な準備条件は一応完成したものとみなされる。この二つの段階を経た後において始めて人工的にも、自然の場合にも低温処理効果は最も有効になる。

水溶性蛋白質が何からどのような条件で生成するかはよく判っていない。著者は9月中旬澱粉量が最大に達した時、春刈の1年生の枝で全部摘葉したものと、同じ株の摘葉しなかつた枝との水溶性蛋白質の量を10月下旬に比較した所、両者の間に差は認められなかつた。また Siminovich<sup>19)</sup> 等はニセアカシヤで幹の上部と下部を環状剥皮して上部からと、また下部への物質の流動を各時期に断つて、茎の内の水溶性蛋白質の量を比較した実験においても、水溶性蛋白質の増大は茎の中に蓄えられた物質が秋の条件のもとに変化して増大する事が判っている。多分蓄積されている炭水化物の一部が有機酸を経てアミノ酸に変化し、それが蛋白質に

incorporate して形成されるだろう。この期間、葉で形成された炭水化物は茎におけるその減少と呼吸による消費を補うものと想像される。短期間に水溶性蛋白質を増大させる条件が見出されれば、その条件と蔗糖の増大の条件とを加味すれば、それが人工的に耐凍性を増大させる最も有効な方法となるであろう。現在行われている  $0^{\circ}\text{C}$  前後での低温処理の方法は糖類をはやく増大させるには一番よい方法であるが、この方法では蛋白質は増大しない。

### 摘 要

1) 9月上旬に皮層細胞中の含水量が乾物当り 1.5 近くになつて始めて低温処理効果が有効になる。9月下旬以降、低温処理すると皮層細胞の滲透濃度は冬期の最大値近くまで増大するようになるが、その際、水溶性蛋白質はたとえ  $0^{\circ}\text{C}$  で 21 日間、低温処理しても変化しない。9月中旬、皮層細胞中の炭水化物の蓄積量が最大に達した後、蛋白質の蓄積が増大して 10月下旬にそれは大凡最大値に達する。この時になつて、低温処理によつて耐凍性が著しく増大するに必要且つ充分な条件が細胞内に形成されたものと考えられる。そして自然条件においてもこの後、外圍気温の低下に伴なつて著しい耐凍性の増大と蔗糖の増大とが平行して起る。

2) 耐凍性増大の経過は最初に細胞内凍結が起りにくくなり、それに伴つて、またはそれよりおくれて、細胞外凍結に対する抵抗性が増大する。10月中旬以降は急激に冷却しない限り、細胞内凍結は起りがたい。9月中旬以前には耐凍性の大きさは細胞内凍結の起り易さによつて支配される傾向がある。

### 文 献

- 1) Asahina, E. 1956 The freezing process of plant cell. Cont. Inst. Low Temp. Sci., No., 10
- 2) Burma, D. P. and D. C. Mortimer 1956 The Biosynthesis of uridine diphosphate glucose and sucrose in sugar beet leaf. Arch. Biochem. Biophys., 62, 16.
- 3) Cardini, C. E., Luis F. Leloir and J. Chiriboga 1955 The biosynthesis of sucrose. J. Biol. Chem. 214 149.
- 4) Chandler, W. H. 1913 The killing of plant tissue by low temperature. Missouri Agri. Exp. Sta. Research Bull., 8, 1.
- 5) Hanes, C. S. 1929 An application of the method of Hagedron and Jensen to the determination of larger quantities of reducing sugars. Biochem. J., 23 99.
- 6) Iljin, W. S. 1935 The relation of cell sap concentration to cold resistance in plants. Bull. assoc. russe. recherches sci. Prague, Sect. Sci. nat. math. 3, No. 13, 33.
- 7) Jeremias, K. 1956 Zur physiologie der Frosthärtung, Planta, 47, 81.
- 8) Levy, M. and A. H. Palmer 1928 Jodometric estimation of small quantities of Nitrogen without distillation. J. Biol. Chem., 136, 57.
- 9) Levitt, J. 1941 Frost Killing and Hardiness of Plants. A Critical Review. Minneapolis.
- 10) ———— 1957 The role of cell sap concentration in frost hardiness. Plant Physiol., 32, 237.
- 11) Lovelock, J. E. 1954 The protective action of neutral solutes against haemolysis by freezing and thawing. Biochem. J., 56, 265.
- 12) ———— 1954 The immobilization of spermatozoa by freezing and thawing and the protective action of glycerol. Biochem. J., 58, 618.

- 13) Luyet, B. J. and J. F. Keane, JR. 1952 Comparative efficiency of ethylene glycol, glucose and sodium chloride in protecting tissue against freezing injury. *Biodynamica*, **7**, 119.
- 14) 酒井 昭 1957 木本類の耐凍性増大と糖類及び水溶性蛋白質の關係. 低温科学, 生物篇, **15**, 17.
- 15) ———— 1956 植物における耐凍性増大と外圍温度. 低温科学, 生物篇, **14**, 7.
- 16) Salt, R. W. 1957 Natural occurrence of glycerol in insects and its relation to their ability to survive freezing. *Canadian Entomologist*, **89**, 491.
- 17) Siminovitch, D. and D. R. Briggs 1948 The chemistry of the living bark of the black locust tree in relation to frost hardiness. II. Seasonal variations in the electrophoresis patterns of the water soluble proteins of the bark. *Arch. Biochem.*, **23**, 18.
- 18) ———— 1949 Studies on the chemistry of the living bark of the black locust tree in relation to its frost hardiness. 1. Seasonal variations in protein content. *Arch. Biochem.*, **23**, 17.
- 19) Siminovitch, D. 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 the translocation, protein synthesis and the development of hardiness. *Plant Physiol.*, **28**, 177.
- 20) Teraoka, H. 1958 Biochemical and physiological studies on wheat embryo. 未発表.
- 21) 照本 勳 1957 タマネギの耐凍性について. 低温科学, 生物篇, **15**, 39.
- 22) 塚本洋太郎・上野善和 1957 グラジオラスの球茎の休眠(3). 炭水化物含量の変化と休眠との關係. 園芸学会雑誌, **26**, 137.

### Résumé

1) Whenever the artificial hardening of the cortical tissues of mulberry twig is effective, the increase in their sucrose concentration is closely proportional to that in their frost-resistance. However, the latter is not accompanied with increase in the content of their water soluble protein, even if they are hardened for 21 days at 0°C (Table 3).

2) After the late part of September, the osmotic concentration in the parenchyma cells of the cortex, resulting from the artificial hardening for 10 days at 0°C, reaches nearly to its maximum value usually found in winter (Fig. 4). On the other hand, after the hardening at 0°C for 10 days, these cells at late October become much more hardy than those hardened in the same way at late September, even when the osmotic concentration of both cases increases to the same value (about 0.7 M of balanced salts solution) (Table 4). In the parenchyma cells, when they were dehydrated for 6 hours in balanced salts solution having a concentration of six times isotonicity of the cell sap, the value of the dehydration resistance at late October was considerably greater than at late September. Therefore the degree of frost hardiness cannot be determined only by the values of the osmotic concentration of the parenchyma cells.

3) In early September, when the decrease in water content of the cortical tissues and the increase in their sucrose content per dry weight by hardening result in a considerable increase in the osmotic concentration of the parenchyma cells, the artificial hardening becomes effective in the cell tissues for the first time. Afterward, the effect of the artificial hardening increases with the accumulation of the water soluble protein in the cells.

4) Thin tangential tissue sections were made from the cortical layer of the twig, and then placed on a cover glass in hanging drop of paraffin oil. When cooled slowly to a desired temperature ( $-5^{\circ}\sim-20^{\circ}\text{C}$ ), they were subjected to freezing by means of ice seeding. After they were kept in frozen state for 5 minutes, they were thawed at  $5^{\circ}\text{C}$ . The survival percentage of the cells in these sections was determined by usual plasmolysis method. The degree of the capacity to prevent intracellular freezing of the parenchyma cells was represented by the minimum temperature at which most of them were able to survive after thawing. Before the late August, all the cells in the section frozen at  $-5^{\circ}\text{C}$  were completely damaged, but after early September, the degree of the capacity to prevent intracellular freezing of the parenchyma cells was gradually increased and, at late October, all of the cells even when seeded with ice at  $-10^{\circ}\text{C}$  were capable of normal plasmolysis and deplasmolysis after treatment. The degree of their frost hardiness is mainly controlled by their capacity to prevent intracellular freezing, especially, before the middle September when the degree of their hardiness is very low (Fig. 1, 2, 3).

5) Either by artificial hardening or by treatment with ethylene glycol solutions (1.0~1.5 M), the parenchyma cells become very resistant against the penetration of ice into the supercooled cell interior. The effect of the ethylene glycol is so remarkable that all the cells treated with this agent (1.5 M) at late October can withstand even the inoculation with ice at  $-20^{\circ}\text{C}$  (Fig. 2).