



Title	原形質分離法による生死の判定 : 木本類の皮層細胞
Author(s)	酒井, 昭; SAKAI, Akira
Citation	低温科学. 生物篇, 17, 21-27
Issue Date	1959-10-24
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/17618
Type	departmental bulletin paper
File Information	17_p21-27.pdf



原形質分離法による生死の判定*

— 木本類の皮層細胞 —

酒 井 昭

(低温科学研究所 生物学部門)

(昭和34年7月受理)

I.

植物細胞の生死を判定するために、古くから原形質分離法が用いられてきた。この方法は短時間に極めて少量の材料で、比較的簡単に細胞の状態を判定出来る利点があるが、これに対する批判も少なくない。特に細胞膜と原形質膜との凝着力が大きく、細胞質の凝集力が弱い、或いはこれを弱くする時には細胞質の内部は裂かれ、これが甚だしくなると、分離剤は殆んど自由に細胞内に透潤し、半透過性は只トノプラストのみに限られ、細胞質の外層は細胞膜に附着したままか、或いはその近くに留まり、トノプラストが収縮してトノプラスト分離を起こす事はよく知られている³⁾。Jensen¹⁾は Luyet がタマネギの表皮細胞を用いて、急速冷却—急速加温の方法で液体空気に処理してから、それらの細胞の生死を原形質分離法で調べた結果を追試している。ネギの表皮細胞を用いた彼の実験で、トノプラストの周辺に破壊した細胞質層が認められたにも拘わらず、液胞は中性赤、メチレン青でよく染まり、しかも原形質分離している事実を指摘している。彼は細胞が生体染色し、原形質分離する性質は液胞の性質に属するもので、細胞全部の生死とは関係がない。したがって原形質分離しているからその細胞が生存しているとはみなしがたいと述べ、細胞の生死の判定には細胞質や核の状態に注意を払う必要がある事を指摘している。

草本類とちがつて木本類の皮層細胞は非常に小さいので、草本類よりも細胞質層がうすく、しかも澱粉や顆粒にとんでいるので、原形質流動や核の状態は判りにくい。なお、形成層の様な分裂組織とちがつて皮層組織を組織培養する事は出来ない。そのために、数年来、著者は各種木本類の皮層細胞の生死の判定を原形質分離法で行ってきたが、その実施についての色の問題点については今迄詳しく言及してこなかった。本報告では Jensen の指摘する様な事実が木本類の皮層細胞においても認められるかどうか、また原形質分離法で生死を判定する際の色々な問題点についてもものべてみた。

* 北海道大学低温科学研究所業績 第510号

II.

実験材料として主に桑(品種名: タキノカワ) *Morus bombycis* Koidz. ハマナシ *Rosa rugosa* Thunb. 及びポプラ *Populus sieboedi* Mig. の1年生枝を使用した。

皮層細胞の縦断切片を切取つて高張溶液中で原形質分離させた。高張溶液は等調の NaCl と CaCl_2 を 9:1 の容積比に含む平衡塩溶液を用いた。

III.

1. 切片を切取る際の障害 木の枝の皮層細胞の色々な生理的性質を調べるためには薄層の縦断切片を切取る事が必要である。木の細胞は小さく顆粒にとみ、草本類の細胞とちがつて非常に見にくいので、1細胞層の薄い切片を切取る事が望ましい。殊に切片や枝の小片を用いて、それを色々処理してから、皮層細胞の生存率を調べる必要がある実験においては、その切片を切り取る際に、切片中の全細胞が生存している事が望ましい。かように枝から細胞層の切片を切取る際に、切片中の半数以上の細胞が死んでしまう場合が多い。一般的に、皮層部に硬角組織を多く含む材料では正常な 1~2 細胞層の切片を切取る事が不可能である。例えば、ブドウ、ツバキ、サザンカ、フジ等がこの例である。それに対して硬角組織の少ないクワ、アケビ、ツタ、バラ、カラマツ、ヤナギ、ロウバイ等は無害の 1 細胞層を切とる事が比較的容易である。

2. トノプラストの破れた細胞 1~2 細胞層の薄い切片を切取る時、木の種類によっては、トノプラストが破れて液胞の内容物と細胞質とが混り合う。しかしプロトプラストは半透過性を保っているので、高張溶液中でそのような細胞は原形質分離する。ポプラは第 1, 2* 図に示すように、切片をとる時の刺戟でトノプラストが破れ易い。図のように一視野中、大部分の細胞のトノプラストが破れている場合もある。予め中性赤で生体染色してあるので、正常な細胞は第 1, 2 図の○印の細胞の様に、液胞の部分は赤く染つていて、それを取まく中性赤に染らない原形質層をもっている。然しトノプラストの破れている細胞は正常の場合の液胞内容液の pH よりアルカリ側にかたよつていて薄いレンガ色を呈している。この色の差から両者の細胞は明らかに区別出来る。このように、トノプラストの破れた細胞は室温で少なくとも 6 時間はこの半透過性を保っているし、細胞の等張液 (0.6 M) の 2 倍の高張溶液で原形質分離させ、これを水道水中で原形質復帰させる。かような分離—復帰を 8 回繰返したが、それらの細胞はやはりこの半透過性を失わなかつた。また第 1, 2 図から判る様にトノプラストの破れた細胞も正常な細胞も同一高張溶液中で同程度に分離している。ポプラの場合に較べてバラの場合には、かような異常細胞は非常に少い。第 3, 4 図はハマナシの皮層切片であるが一視野中全細胞が正常である。切片によつてはトノプラストの破れた異常細胞も認められる。第 4 図にはトノプラストの破れている細胞(○印)が 1 つ認められる。今迄使用した材料中、シラカバではかよ

* 第 1, 2 図中○印の細胞のみが正常で他の細胞はトノプラストが破れている。

うな異常細胞が全く認められなかつた。とにかく、切片を切取る際に、かような異常細胞が多量に出来るような材料は皮層細胞の切片を使用する実験には不適當である。

3. 原形質層の薄い細胞 桑の皮層細胞は原形質層がうすいために、顆粒が多く、凸型に分離している場合には、第1図のポプラのトノプラストの破れた細胞の様な外観を呈している(第8, 9図)。しかし、5年間に少なくとも1万個以上の切片を調べてきたが、クワの皮層細胞では1細胞層の切片でも、3細胞層の厚い切片でも、ポプラやバラの正常な細胞に見られる様なあつい原形質層は一度も見られなかつた。また桑の細胞は核が常に表層近くに認められるし、顆粒の少ない成育初期の細胞を調べてみると(第14図)、顆粒は液胞の外側の薄い細胞質層にのみ存在している。さらに焦点を色々変えて調べてみると、細胞の中央部には顆粒は全く認められない。それに対してポプラのトノプラストの破れた細胞は顆粒が1カ所に集っている。これらの事から桑の皮層細胞は外観はトノプラストの破れた細胞に似ているが、これは原形質が薄いためにその様に見えるにすぎない。桑の外に、ニセアカシア、イチヂク、ロウバイ等でも桑の様に原形質層がうすい。この様な細胞はある程度高張(等張液の1.5~2倍)な平衡塩溶液中で分離させると凹型の分離型を示す(第5, 6図)。これに対して、原形質層の厚いポプラ、バラ等では凸型の分離型を示す(第1, 3図)。季節によつて分離型はあまり変らない。耐凍性と分離型の関係については今後調べる予定である。少なくとも桑では、細胞が正常であり、分離液が等張液の1.5~2倍である限り常に凹型で、細胞が異常になると凸型に変わる。この分離型は使用する分離液によつても異なる。桑の場合、硝酸カリを使用すれば常に凸型に分離する。前に述べた様な厚い原形質層をもつた細胞は、桑とちがつて、正常の時も平衡塩溶液中で凸型の分離型をとり易い。

4. 細胞の異常性と分離型の変化 同一種類の皮層細胞を用いて、細胞の害の度合を原形質分離法で知る場合には、ある条件のもとでその細胞の正常な分離型を知つてから、その細胞が漸次異常になるにつれて、分離型がどの様になるかを調べれば、分離型の変化からその細胞の異常性の度合が判るはずである。

最初に桑の正常な皮層細胞*を等張溶液の2倍の高張平衡塩溶液中で原形質分離させると第5図に示す様な分離形を示す。細胞が正常であり、耐凍性の大きい時には、必ずかような分離形を示す。このように分離した細胞を、室温で高張溶液中に入れておいてその細胞がどういう過程をへて死んで行くかを調べてみた。室温で20分後には凹型(第6図)になり、時間の経過と共に凸型に移行してゆく(第7図)。室温で3~4時間後に全部の細胞が凸型に移行した(第8, 9図)。細胞内は今まで一様に見えていたが、その後、中性赤で濃く染まつた顆粒が現われ、それが漸次大きくなって行く(第10図)。その頃になると、細胞の半透過性も失われて、一見原形質復帰した状態になつて細胞は崩壊し細胞の色調もなくなる(第11図)。第12図は冬の枝を-30°Cで1日間凍結させてから、皮層細胞を調べたもので全細胞が正常である。しかし細

* 材料は4月末に採集した。

胞が耐えられる限度以上の低温度で枝の小片を凍結させてから、切片を切取つて細胞の状態を高張溶液中で調べると、上に述べた様な、異常な細胞や死んだ細胞が認められる。5月20日、枝の小片を -20°C で24時間凍結融解後、皮層細胞の切片を調べてみた(第13図)。染色もしないし、分離もしない崩壊した細胞数が約17%、凸型に分離した細胞数が約30%、凹型に分離した細胞が45%存在している。かように、異常条件におかれて細胞が害された場合、正常な細胞から死んだ細胞まで、色々な異常性をもつた細胞が混在している。その際、どの状態にある細胞が死んでおり、或いは生きてるかという判定が問題となる。判定の規準や測定の場合によつて値は異なってくる。例えば、凍結融解後、直に測定した場合と、1~2日経過してから測定した場合とでは値は異なる。しかし、同一系列の実験に対して、同一判定規準を使用すれば、細胞、組織の抵抗性の大きさが相対的に現わされる。したがつて、かような抵抗性の相対的な大きさを知るために生存率を調べる場合には、任意の一定規準によつて生死を判定すればよい。著者は染色して分離(凹型でも凸型*でも)している細胞を全て生存しているものとみなして判定した。なお、染色していても全く分離していない細胞や、異常に少ししか分離していない細胞、逆に染色していないで凹型に分離している細胞も可成りの数見出されるが、これらの細胞は生きているものとみなさなかつた。

5. 原形質分離法による生死の判定 原形質分離の状態からその細胞が正常かどうかを判定する事はむずかしい。染色しており、凹型に分離していても、その細胞が正常の状態に近いという事は判るが、それが正常であるとは断定出来ない。枝の小片を凍結—融解後、染色して凹型に分離している細胞の数を、時間と共に切片を切取つて調べてみると、そのような細胞の数は漸次減少し、通常は1日経過*後は殆んど減少しなくなる。その期間中に、異常な細胞は死んでしまうので、あとに残つている細胞は大体正常なものとみなされる。この方法は異常細胞の混在の割合が少ない場合にはいいが、異常細胞が過半数をしめる場合には、正常な細胞は異常な細胞によつて悪い影響を受けて、二次的に害される事もありうる。

原形質分離法で細胞が正常であるかどうかを判定する今1つの方法は、一定の濃度差で分離と復帰を繰返す事である。原形質分離—復帰に対する抵抗性は季節によつて異なるが、脱水抵抗の季節的変動と大体平行して変る。耐凍性の小さい9月頃の細胞でも、等張液の4倍の高張液と水の間で2回分離と復帰を繰返しても正常な分離形を保っている。3回以上繰返すと異常分離形が現われたり、分離するが染まらない細胞が出てくる。しかし2倍の高張液と水で分離と復帰を繰返せば、少なくとも5回までの間においては異常分離形を生じない。冬期の細胞では、4倍の高張液で分離—復帰を10回繰返しても、正常な染色性と分離形を保っている。木の皮層細胞、殊にクワの様な原形質層の薄い種類では、原形質分離—復帰の繰返しに対して非常に安定である。問題とする細胞が正常であるかどうかを検討する場合に、一定の条件のもとで、分離と復帰を何回まで繰返しても、その細胞がなお正常な染色性と分離形を保つておら

* 凸型に分離して、しかも顆粒化していない細胞。

** 無処理の対照の正常な細胞の数はその期間中減少しない。

れるかを予め知つてから、同一条件で問題とする細胞についてその回数を調べれば、ある程度までその細胞の正常性が判る。この方法で調べてみると、染色して凹型分離をしている細胞は正常な細胞の状態に近い。

前に述べたように細胞の抵抗性の相対値を知るのではなく、ある処理後、その細胞が正常であるかどうかを目的で原形質分離させる場合には、通常、2倍の高張液と水との間で少なくとも5回分離—復帰を繰返してなお染まつており、正常な凹型分離を保っている細胞を正常な細胞とみなしてきた。

IV.

Jensen がタマネギで指摘した様な、細胞質が破壊されているにも拘わらず、液胞が染まり原形質分離している細胞を著者は木の皮層細胞において見出せなかつた。木の皮層細胞ではタマネギの表皮細胞とちがつて、むしろ、トノプラストが破れ易くプロトプラストの方がより安定している。Jensen が述べている様に、原形質分離がトノプラストの性質にのみ基づくという事は、少なくとも木の皮層細胞ではみとめがたい。トノプラストが破れ、細胞質と液胞の内容物が混合していても、プロトプラストは半透過性を保っている。分離の度合も正常な細胞と同様であるし、原形質分離と復帰を繰返しても、また室温に数時間おいてもプロトプラストのこの半透過性は保たれている。またこの事より、プロトプラストは透過性で、トノプラストのみ半透過性であつて、高張溶液中で細胞が原形質分離する時には、細胞質は液胞の収縮に応じてただ受動的に収縮するという事は考えられない。少なくとも、実験の範囲内においては、正常な細胞のプロトプラストは半透過性をたもっている。

異常環境にさらされた細胞の害の度合を知る目的から原形質分離法を使用する場合には、同一系列の実験に対して、同一判定規準で染色性と分離型から害の度合をきめる事は妥当である。その場合、薄い細胞層を切取つた時、切片中の全細胞が正常である様な材料を使用する事が必要である。しかし相対的な害の度合を調べるのではなく、ある処理後、その細胞が実際に正常であるかどうかを判定する事は面倒である。

皮層細胞の生存率から直ちに枝全体の害の度合を判定する事は出来ない。枝全体の生死の判定と皮層細胞の原形質分離法で判定した値との関係については前報²⁾で既に報告しておいた。皮層細胞のように組織培養も出来ないし、細胞が小さく、顆粒が多くて原形質流動が判りにくい材料では、現在の所、原形質分離法は少しの材料で、短時間に細胞の状態をある程度知る事が出来る便利な方法であるが、この方法の使用に際しては色々な注意が必要である。

摘 要

Jensen がタマネギの表皮細胞で観察したような細胞質が破壊しておりながら、なお液胞内容物が染まり原形質分離しているような細胞は木の皮層細胞では認められなかつた。むしろトノプラストが破れて細胞質が液胞内容物と混つていながら、なおプロトプラストが半透過性

を保っている細胞が多く認められた。原形質分離している木の皮層細胞では、少なくともプロトプラストは半透過性を保っている。

同一系列の実験に対して、同一判定規準によつて細胞の染色性と分離型とから、原形質分離法によつて、細胞の異常性を相対的に決める事は妥当である。

御校閲して頂いた朝比奈教授に謝意を表わします。

文 献

- 1) Jensen, A. B. 1942 Studien über die Kälteresistenz von Pflanzenzellen. *Protoplasma*, **36**, 195.
- 2) 酒井 昭 1955 木本類の枝条の生死の判定. 低温科学, 生物篇, **13**, 43.
- 3) 坂村 徹 1958 植物生理学 上 (八版) 1015 pp. 東京, 裳華房.

Résumé

When the epidermal cells of an onion treated with liquid nitrogen were plasmolysed by a hypertonic solution, Jensen observed some abnormal cells in which the vacuoles were normally stained by neutral red solution and tonoplasts still retained their semi-permeability, having the cytoplasmic layers torn outside the tonoplasts. From this fact, Jensen claimed that the ability of vital staining and of plasmolysis in plant cell is not a reliable index to its viability, because these abilities are based on the function of the vacuole alone, but not of the entire protoplast.

However, such abnormal cells have not yet been observed in the parenchyma cells of the cortex of woody plants, but there are found some parenchyma cells in which the ectoplasts still retain their semi-permeability though their tonoplasts are torn and their cytoplasmic layers are mixed with vacuole content. If precaution is taken to choose those materials in which such abnormal cell conditions are scarcely brought out in treatment, it may be allowed to determine the relative degree of viability in parenchyma cells by their "stainability" by neutral red solution and also by the appearance of plasmolysed cells, at least in one series of experiments.

図 版 説 明

- 第 1 図 原形質分離したポプラの皮層柔細胞。トノプラストの破れた異常細胞が多く認められる。
○印は正常細胞。×1000
- 第 2 図 同上。 ×400
- 第 3 図 原形質分離したハマナシの皮層柔細胞。全細胞が正常である。×1000
- 第 4 図 同上。トノプラストの破れた細胞 (○印) が 1 個認められる。×1000
- 第 5 図 原形質分離したクワの皮層柔細胞。×1000
- 第 6 図 同上。凹型に移行中。×1000
- 第 7 図 同上。凹型から凸型に移行中。×400
- 第 8 図 同上。凸型分離。×1000
- 第 9 図 同上。凸型分離。×400
- 第 10 図 同上。凸型分離。細胞内に濃く染まつた大きい顆粒が認められる。細胞崩壊前。×1000
- 第 11 図 同上。半透過性も失われて細胞崩壊中。×1000
- 第 12 図 冬期に -30°C で 1 日間凍結したクワの枝の皮層柔細胞。全細胞が正常である。×400
- 第 13 図 4 月末に -20°C で 1 日間凍結したクワの枝の皮層柔細胞。色々な状態の細胞が混在している。×400
- 第 14 図 成育初期のクワの皮層細胞の原形質分離。細胞質と液胞の境が明らかである。×600





