HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	木本類の耐凍性増大の過程　Ⅳ ： 脱水抵抗と糖濃度との関係
Author(s)	酒井, 昭
Citation	低温科學. 生物篇, 17, 35-41
Issue Date	1959-10-24
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/17620
Type	departmental bulletin paper
File Information	17_p35-41.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

Akira SAKAI 1959 The Frost-Hardening Process of Woody Plant IV. Relation of Increase in Sugar Concentration to Dehydration Resistance. *Low Temperature Science, Ser. B, 17.* (With English Résumé p. 41)

木本類の耐凍性増大の過程 IV*

——脱水抵抗と糖濃度との関係——

酒　井　　昭

(低温科学研究所　生物学部門)

(昭和34年7月受理)

I.

細胞外凍結に対する抵抗性の1つの指標として，Siminovitch[6] 等は高張塩溶液中での細胞の脱水抵抗を用いている。著者もこの方法を用いて，季節的な耐凍性の変化と脱水抵抗の間に平行関係がある事を既に報告[1] した。Siminovitch 等はこの脱水抵抗や耐凍性の増大の要因を水溶性蛋白質の増大に帰し，糖類のそれに対する役割を認めていない[5)~9)]。著者[3),4)] の実験では人工的低温処理をした場合，水溶性蛋白質は殆んど増加しないにも拘わらず，脱水抵抗や耐凍性が増大し，それに平行的に糖濃度が増加する事を見出し，したがつて，耐凍性のみならず，脱水抵抗に対しても糖濃度が重要な役割を果している事を既に断片的に報告した。いろいろの条件で測つた脱水抵抗と耐凍性の大きさとの関係，各時期に低温処理した場合の両者の変動の関係及びそれに関連して起こる物質の変動について行つた一連の実験結果を報告する。

II.

桑 *Morus bombysis* Koidz. (品種：タキノカワ) の1年生の枝の直径 0.6~0.7 cm 部位の皮層細胞の縦断切片をとり，それを高張平衡塩溶液中で一定時間脱水させてから，水道水にかえして生存率を測つた。生死の判定は中性赤溶液で染色後，原形質分離法で行つた。高張溶液は等張の NaCl, $CaCl_2$ 溶液を 9:1 の容積比に混合した平衡塩溶液を用いた。NaCl, KCl, $CaCl_2$ の各単塩溶液と等張の上記平衡塩溶液を用いて，同一条件で脱水抵抗を測ると，単塩溶液中では生存率が極めて低い。また NaCl と $CaCl_2$ の混合比をいろいろ変えて脱水抵抗を測ると，この混合比は脱水抵抗に殆んど影響なく，いずれか一方の塩が微量 (1% 以下) 含まれるだけで各単塩溶液の場合よりも著しく脱水抵抗をました。

脱水状態におく温度の影響を調べた結果，温度が低くなるほど生存細胞数がまし，0°C 以下 −10°C までの間では殆んど差が見出されなかつた。その結果を第1表に示す。

* 北海道大学低温科学研究所業績　第508号

第 1 表 脱水抵抗に及ぼす温度の影響
(5 M 平衡塩溶液で脱水)

		脱水されていた期間		
		1 日	3 日	4 日
脱水状態におかれた温度	20°C	25*	0	0
	10°C	80	50	0
	0°C	90	75	40
	− 5°C	90	80	50
	−10°C	90	80	50

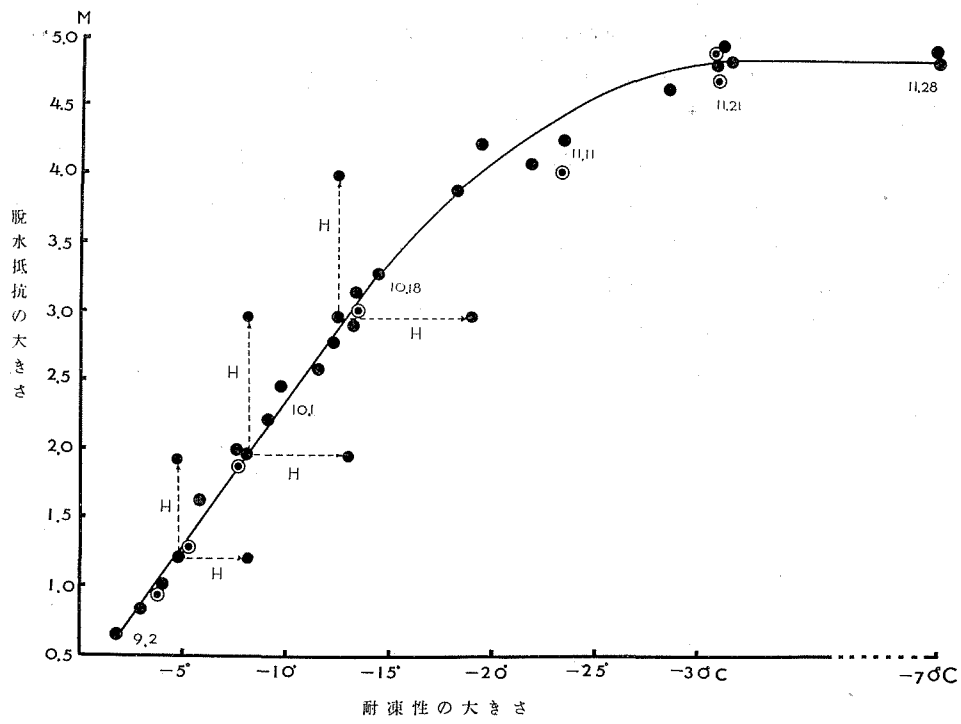
実験期日： 12月 16 日
* 皮層柔細胞の生存率 (%)
脱水条件： 水→2 M→3 M→5 M
吸水条件： 5 M→2 M→1 M→水
脱水，吸水は 10°C で行つた。

脱水する時の速度が早いほど脱水後の生存率が低下するので，同一系列の実験には同一条件で脱水した。Siminovitch が脱水抵抗を測定した方法は各高張塩溶液中に切片を直接入れて 10 分間室温で脱水後，水道水にもどして生死を判定した。上に記した様に，脱水条件によつて脱水抵抗の値が異なる事が判つたので，本実験では Siminovitch と同じ方法で室温で 10 分間測定した値と，最もよい条件で測つた値とを比較してみた。耐凍性と脱水抵抗との関係を知る関係上，耐凍性を測るのと出来る丈近い条件で脱水抵抗を測る事が望ましい。そのため，−5°C の温度で 4 時間脱水状態においた。なお脱水する場合は，0°C に冷却した高張液中で漸次脱水の度を強めて行つた。吸水させる時は，0°C で徐々に低調溶液に移して最後に水道水で吸水させた。室温に移してから，細胞の等張液の 2 倍の高張液中で原形質分離させた。その際，中性赤に染まり，正常に原形質分離している細胞を生きているものとみなした。

1 系列の実験には 10～15 個の切片を用い，各切片は中性赤溶液で染めてから，顕微鏡で全細胞が生きている事を確めた後，脱水させた。耐凍性の大きさをきめるには脱水抵抗に使用した同一枝の隣りあう節から 1～1.5 cm の小片を切りとり，各温度で凍結させ，その温度で平衡後 4 時間おいてから取出して，原形質分離法で皮層柔細胞の生存率を測定した。

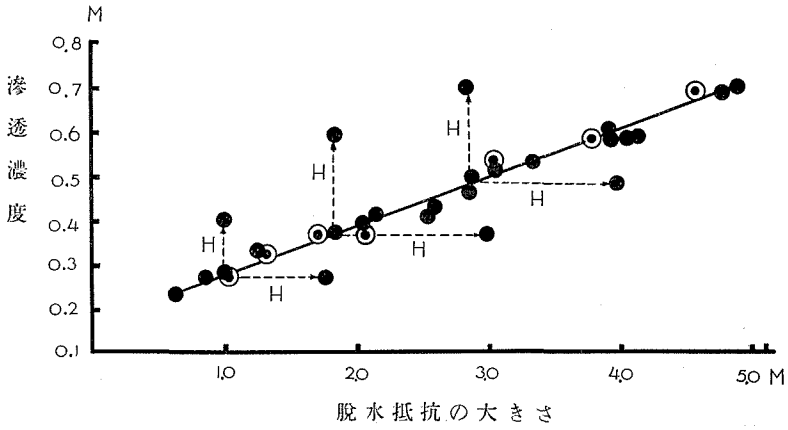
III.

実験 1 耐凍性と脱水抵抗の関係。9 月から 11 月末までの期間に，上に述べた方法で耐凍性と脱水抵抗の値及び各時期に低温処理した時のそれらの値を測定した。その結果を第 1 図に示した。第 1 図の縦軸は脱水抵抗の大きさの値で，上の方法で測定して，その溶液中で全細胞が生存している塩溶液の濃度で脱水抵抗の大きさをあらわしたものである。横軸は耐凍性の大きさで，全細胞がのこらず生存している最低凍結温度で耐凍性の大きさを現わした。耐凍性



第 1 図　脱水抵抗と耐凍性の関係

●印は 15°C で 10 分間脱水した場合 (Siminovitch の方法)
⊙印は −5°C で 4 時間脱水した場合
破線 (H) は低温処理 (0°C で 10 日間) した場合の変化
図中の数字は実験期日を示す。

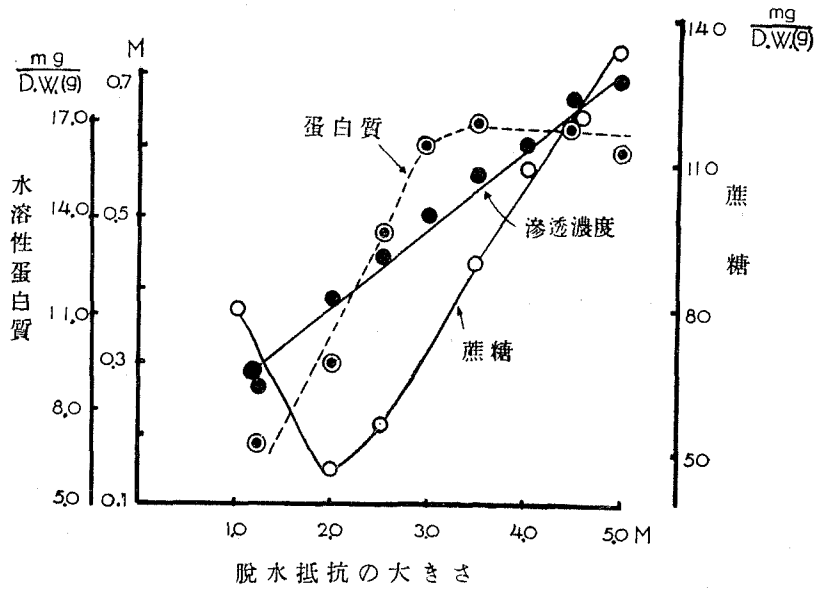


第 2 図　脱水抵抗と滲透濃度の関係

●印は 15°C で 10 分間脱水した場合
⊙印は −5°C で 4 時間脱水した場合
破線 (H) は低温処理 (0°C で 10 日間) した場合の変化を示す。

の大きさが −20°C 近くになるまでは両者の関係は直線関係にある。それ以後は直線関係からずれてゆく。またこのような方法で脱水抵抗や耐凍性の大きさを現わす時には，Siminovitch の方法で測定した値も，本実験で用いた低温で脱水する方法でも略々同一線上にのる。なお 0°C で 10 日間低温処理すると耐凍性の増大に比例して脱水抵抗も増大する事を第 1 図に併せて示した。脱水抵抗の大きさを横軸にとり，脱水抵抗を測定したその細胞の滲透濃度を縦軸にとると，滲透濃度の大きさと脱水抵抗の大きさとの関係が直線的になる。なお低温処理した場合，脱水抵抗の増大と滲透濃度の増大との間に平行関係がある事をも第 2 図に示した。

実験 2　脱水抵抗の増大と物質の変動。脱水抵抗を測定した同一枝の隣りあう節の皮層部について，水溶性蛋白質と蔗糖量を測定した所，第 3 図に示す様に水溶性蛋白質は 10 月下旬頃までは，脱水抵抗と平行的に増大するが，それ以後殆んど増加しない。それにも拘わらず脱水抵抗や耐凍性の大きさは増大する。この際，蔗糖もこれに平行して増大する。



第 3 図　脱水抵抗と物質の変動
横軸の脱水抵抗の大きさは全細胞が生存しておる高張溶液の濃度であらわした。

IV.

脱水抵抗が耐凍性とどの様な関係にあるかを知るために，耐凍性の大きさを測る条件に出来る丈近い条件で，即ち 0°C の温度で徐々に脱水させ，−5°C の温度に 4 時間おいてから徐々に吸水させて脱水抵抗を測つてみた。また従来用いてきた Siminovitch の方法でも測つてみたが，脱水抵抗の大きさを全細胞が生きている時の溶液の濃度で現わすと両方法とも同じ結果を示した。いずれの方法を用いても，脱水抵抗と耐凍性の大きさの間には略々平行関係が認めら

れる。耐凍性の大きさが約 −20°C より大きくなると，耐凍性の増大割合よりも，脱水抵抗の増大割合が小さくなる。凸型に原形質分離させて，各濃度で細胞の容積の変化を顕微鏡で調べてみると，3.5～4.0 M 以上になると，容積は殆んど変らない。一方，細胞外凍結による脱水の場合には，−20°C 以下では脱水される水の量は非常に減少し，−30°C より −70°C まで温度を下げても，この方法では水はより以上脱水されないと考えられる。実際に，細胞外凍結の場合に，少なくとも数日間以内においては，−30°C 以下いくら温度が低下しても，害は現われてこない。脱水抵抗の場合に，媒液の濃度が 4 M 以上においては，脱水される水の量はそれ以上殆んど増加しないが，媒液の濃度のたかまるにつれて，塩（たとえ害の少ない平衡塩溶液でも）の悪い影響が加わつてくるために，脱水抵抗の大きさと，耐凍性の大きさの関係は 4 M 以上では直線からずれてくるものと考えられる。

脱水抵抗の大きさと物質の変動。Siminovitch[5)~9)] 等が脱水抵抗の増大，したがつて耐凍性の大きさの変動も水溶性蛋白質の増加に基づくとのべている。その根拠として，季節を追つて脱水抵抗を測り，それと平行して水溶性蛋白質の量を測つた所，両者が平行して増大する事実をあげているにすぎない。著者の実験[3),4)] では，低温処理した場合，水溶性蛋白質は殆んど増加しないにも拘わらず，脱水抵抗も耐凍性も著しく増大する。しかも糖濃度は脱水抵抗の増大と平行して増加する。この事実は脱水抵抗の増大が水溶性蛋白質よりも糖濃度の増大に基づいている事を示す 1 つの証拠である。季節的に異なつた時期に同一条件で低温処理した場合の脱水抵抗の増大を考える時には，水溶性蛋白質もこれにある関係を有する事は前報[3)] においてのべた。前報[3)] において述べた様に低温処理前後の脱水抵抗を測る時，同一濃度の高張液で測らないで，それぞれの細胞の等張液に対して同一倍数の濃度の高張液で測定する時には，両者の脱水抵抗の差は殆んどなくなる事実も，脱水抵抗に対して糖濃度が関係している 1 つの証拠である。

Siminovitch[9)] 等が脱水抵抗の増大に対して，糖類が関与していないと主張したのは，7 月頃糖の量が増大するにも拘わらず，その時，脱水抵抗が増大しない事を有力な一つの根拠としている。しかし，彼等は乾物量当りであらわした糖の量と脱水抵抗の間の関係を論じている。著者の用いた材料でも，同様の関係が認められるが，乾物量当りの糖量でなく，湿重量又は糖濃度であらわせば両者の関係は矛盾なく説明される。その後，伸長停止に伴ない蓄積されていた可溶性糖類が澱粉に変るために乾物当りの糖量は減少するが，この時，湿重量に対して約 15～20 % の水分が減少するために，乾物当りの糖量は減少するにも拘わらず，糖濃度は増加する。そしてこの時も脱水抵抗は増大する。この場合，Siminovitch 等のように糖量を乾物当りで現わせば，脱水抵抗の増大は糖の量からだけでは説明出来ない。糖の量を乾物当りであらわす事は，同一時期，同一条件の枝についてならよいが，異なつた時期，条件の枝を乾物当りで現わした糖量で説明する事は，殊に木本類の場合，季節によつて乾物量中の不溶部分の量の増大が著しいので危険である。

現在，糖アルコール類の定量を測定中であるが，現在までの所，桑では冬季においてもこ

れは少ししか存在していない。

なお，ここでいう水溶性蛋白質は塩折及び透折の実験から，アルブミンだけでなく，グロブリンも含む事が判つた。さらに同一資料を水及び 0.5 M NaCl 溶液で抽出してから除蛋白して蛋白量を測定した結果，両者の値が全く同じであつた事から，ここでいう水溶性蛋白質は可溶性蛋白質の意味である。

摘 要

季節を追つて，さらに各時期に低温処理して脱水抵抗と耐凍性の間の関係を調べたが，両者の間に略々平行関係が存在している。脱水抵抗の増大に対して水溶性蛋白質よりも，細胞濃度の増大が密接な関係をもつている。

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) 酒井 昭 1956 植物に於ける耐凍性増大と外囲温度. 低温科学, 生物篇, ***14***, 7.
2) ———— 1956 超低温における植物組織の生存. 低温科学, 生物篇, ***14***, 17.
3) ———— 1957 木本類の耐凍性増大過程 I. 耐凍性増大と糖類及び水溶液性蛋白質の関係 (1). 低温科学, 生物篇, ***15***, 17.
4) ———— 1958 木本類の耐凍性増大過程 II. 耐凍性増大と糖類及び水溶液性蛋白質の関係 (2). 低温科学, 生物篇, ***16***, 23.
5) Siminovitch, D. and D. R. Briggs 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.
6) ———— 1953 Studies on the chemistry of the living bark of the black locust tree in relation to its frost hardiness. 3. The validity of plasmolysis and desiccation test for determining the frost hardiness of bark tissues. Plant Physiol., ***28***, 15.
7) Siminovitch, D. 1953 Studies on the chemistry of the living bark of the black locust tree in relation to its frost hardiness. 4. Effects of ringing on translocation, protein synthesis and the development of hardiness. Plant Physiol., ***28***, 177.
8) ———— 1953 Studies on the chemistry of the living bark of the black locust tree in relation to its frost hardiness. 5. Seasonal transformations and variations in the carbohydrates, starch-sucrose interconversions. Plant Physiol., ***28***, 383.
9) Siminovitch, D and D. R. Briggs 1954 Studies on the chemistry of the living bark of the black locust tree in relation to its frost hardiness. 7. A possible direct of starch on the susceptibility of plants to freezing injury. Plant Physiol., ***29***, 331.

Résumé

To clarify the relation between dehydration resistance and frost-hardiness, some experiments were made in the parenchyma cells of the cortical tissue of the mulberry tree. As the temperatures at which parenchyma cells are dehydrated in the hypertonic balanced salts solution is lowered, the proportion of survivors amongst these cells obviously becomes greater, so far as the rate of dehydration as well as subsequent rehydration is the same in every experiment. Accordingly, the percentage of survivors in the parenchyma cells which are immersed in a hypertonic balanced salts solution for 4 hours at −5°C after slow dehydration is larger than in the cells dehydrated in the same solution for 10 minutes at about 20°C after rapid dehydration (Siminovitch method). When the grade of dehydration resistance is represented by the maximum concentration of the hypertonic solution in which almost all of the parenchyma cells are able to survive after immersion for a few hours, there is found no difference in the grade of dehydration resistance between the cells treated respectively in each of the two ways. If the grade of frost-resistance is represented by the lowest temperature at which all of the parenchyma cells are able to survive after 4 hours of freezing, a parallel correlation is found between the grade of frost-resistance and that of dehydration resistance which is represented by the lowest temperature stated above, when twigs are chilling naturally as well as artificially.

In these experiments, the increase in dehydration resistance of the parenchyma cells is closely proportional to that in their sucrose concentration, but it is not accompained by any increase of their soluble protein, especially, when they are artificially chilled.