



Title	木の皮層組織中の無液胞細胞について
Author(s)	酒井, 昭; SAKAI, Akira
Citation	低温科学. 生物篇, 21, 17-24
Issue Date	1963-12-10
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/17670
Type	departmental bulletin paper
File Information	21_p17-24.pdf



木の皮層組織中の無液胞細胞について

酒 井 昭

(低温科学研究所 生物学部門)

(昭和38年7月受理)

I. 緒 論

植物の若い細胞では液胞は存在しないか、またはその容積が小さいが、細胞の発育が進むにつれて液胞の容積は増し、成熟した細胞は一般に大きな液胞をもっている。しかし、秋や冬の充分成熟した木の枝の皮層組織中に、液胞をもたない細胞の存在することが Levitt によって報告されている^{1,2)}。彼はキササゲの皮層細胞では、全細胞が中性赤溶液に強く染まる単一の大きな液胞とそれを囲む細胞質からできているが、それに対してミズキでは、半数の皮層細胞はキササゲのように液胞と細胞質からできているが、他の半数の細胞は単一の大きな液胞をもっていないし、またそれらの細胞は中性赤溶液で染まらないで細胞全体が一様にうすい赤褐色を呈していると述べている。そして彼は前者の細胞を *vacuolate cell*、後者の細胞を *avacuolate cell* とよんで区別している。著者もクワ(品種タキノカワ)の枝の皮層細胞を水又は水溶液中に入れて検鏡すると、どの細胞にも液胞が認められないし、中性赤溶液で染色すると細胞全体が一様にうすい赤褐色に染まることを観察した³⁾。しかし、同一品種のクワでも、発芽後の若い枝の皮層細胞ではいずれも液胞と細胞質との2重構造が認められた³⁾。Siminovitch は長年ニセアカシアの皮層細胞を用いて耐凍性と脱水抵抗及び脱水抵抗と水溶性蛋白質との関係を調べているが⁴⁾、彼の論文中にある写真をみるとどの細胞にも液胞が認められない⁵⁾。また朝比奈の論文中のニワトコの皮層細胞の写真にも液胞が認められない⁶⁾。これらの事実から考えて、木の皮層細胞では、草本類の細胞とちがって液胞をもたない細胞がかなり広範囲に存在しているものと考えられる。ここで問題になるのは、上に記した無液胞細胞の多くはいずれも組織切片を中性赤溶液中で生体染色後、いろいろな媒液中に入れて調べた結果認められたものである。したがって、現在のところ無液胞細胞が *intact* の組織中にもそのままの状態が存在しているという証拠はない。むしろ組織切片を切取って媒液中に浸して顕鏡するまでの処理中に、トノプラストが破れて液胞内容物が細胞質とまざりあったために液胞が認められてなくなるという可能性がある。もし液胞のない細胞が、処理中にトノプラストが破れて生じた異常細胞があるならば、こうした材料を実験に使用することは危険である。その反面、従来は細胞の表層を傷つけないでトノプラストを破ることができなかつたが、これができるとすれば、こうした材料を使って原形質表層の透過性を直接調べられるかもしれない。また、もしも無液胞細胞が *intact* の

* 北海道大学低温科学研究所業績 第643号

状態で存在しているならば、こうした材料をいろいろな実験に使用できる。たとえば、糖や無機塩類が細胞内で細胞質と液胞とにどのような割合で分布しているかが、凍害の機構を考える場合に問題となるが、今のところこれを確める方法がない。もし無液胞細胞が実際に存在しているならば、こうした2重構造をもたない細胞を実験に使用することによって上に述べた面倒な問題はさけられる。

いずれにしても、木の皮層細胞を実験に使用する場合には、液胞をもたない細胞が異常であるか否かを確かめておく事が必要であるが、どの研究者も従来この点に対して全く考慮を払わなかった。

本論文は液胞のない細胞が正常であるか否かを明らかにするために行ったもので、これに関連して原形質表層の透過性についてもあわせて考察した。

II. 実 験 材 料

実験材料としてクワ (*Morus bombycis* Koidz. var. *takinokawa*), ポプラ (*Populus nigra* L. var. *italica* Muenchh.), ニセアカシア (*Robina pseudo-acacia* L.), ミズキ (*Cornus controversa* Hemsl.) 及びコリヤナギ (*Salix koriyanagi* Kimura) の1年生の枝の皮層細胞を用いた。なおクワは品種としてタキノカワのほかにゴロウジュ、セイジュウロウの2品種も用いた。いずれの樹種も、冬の枝の先端より約20 cmの部位を実験に用いた。

III. 実 験 結 果

1. 木の皮層組織中の無液胞細胞

冬の木の枝の皮層組織から縦断切片を切取って、水又は高張塩溶液に入れて検鏡すると、バラではどの細胞にも液胞と細胞質からなる2重構造が認められる(図版 I-1)。なおこの図中の細胞はあらかじめ中性赤溶液で生体染色後、高張塩溶液中で原形質分離させたもので、液胞のみが赤紫色に染まっている。しかし、クワ(品種: タキノカワ)(図版 I-2, 3) やニセアカシアではどの細胞にもこの2重構造が認められてないで、細胞全体が一様にうすいレンガ色に染まっている。図版 I-4 は中性赤で染色後水につけて検鏡したニセアカシアの皮層細胞である。ポプラ、ヤナギ、リンゴを始め多くの樹種では、一つの組織切片中に2重構造をもつ細胞と2重構造をもたない細胞とが混在している。図版 II-5 は生体染色後、高張平衡塩溶液中で原形質分離させたヤナギの皮層細胞で左側3つの細胞は中性赤でよく染った液胞をもっているが、右側の4つ細胞には液胞が認められない。なお液胞のない細胞は全体が一様にうすいレンガ色に染まっている。また、いろいろな品種のクワについて調べた結果、水に浸した場合液胞が認められないタキノカワ、ゴロウジュ等の品種と水に浸しても液胞が認められる品種(セイジュウロウ)とがあることが判った。図版 II-6 は水に浸したクワ(品種: セイジュウロウ)の皮層細胞で全細胞に液胞が認められる。

以上の結果から考えて、ある種類の植物では、どうして細胞が細胞質と液胞からなる2重構造をもち、他のものでは2重構造をもたないかが問題となる。Levitt が述べているように¹⁾,

液胞をもたない細胞が本来組織中にあるのか、それとも処理中に人為的にトノプラストが破れて液胞内容物と細胞質とがまざりあった結果、細胞の2重構造が認められなくなったものか判らない。もし処理中にトノプラストが破れることがあるとすれば、それは切片をきりとる時か、きりとった切片を水又は溶液中に浸す時のいずれかである。実験の結果、クワやニセアカシアでは、水や低張及び高張溶液中に浸した細胞はすべて2重構造をもたないが(図版 II-7)、きりとった切片を水又は水溶液中にさらさないで、直接流動パラフィンに浸して検鏡してみると、2重構造をもつ多くの細胞像が認められた(図版 II-8)。なおニセアカシアでも同様な結果がみられた。図版 III-9はポプラの組織切片を高張平衡塩溶液中で原形質分離させたものでどの細胞にも液胞が認められない。なお組織切片を水につけた場合にも同様な結果が得られた。しかし、組織切片を水や水溶液にさらさないで、直接流動パラフィン中で検鏡した場合には、どの細胞にも液胞と細胞質からなる2重構造が認められた(図版 III-10)。以上の結果から、もともと無液胞細胞が組織中に存在しているとは考えがたい。無液胞細胞は水又は水溶液中に浸した場合、トノプラストが破れて、液胞内容物と細胞質とがまざりあって出来た異常細胞と考えられる。

2. 原形質表層の透過性

もしも原形質表層が溶質を自由に透過させるならば、トノプラストが破れた細胞を高張溶液の中に入れた時には原形質分離がおこらないはずである。このことを確かめるために、トノプラストが破れた細胞と破れていない細胞とを含む同一組織切片を高張平衡塩溶液の中に入れて調べた。図版 III-11はミズキの正常細胞と異常細胞とが同程度に原形質分離していることを示す。図版 III-12はポプラの皮層細胞で、ミズキと同様に、異常細胞も正常細胞も殆んど同程度に原形質分離していることを示す。この場合、正常なポプラの細胞の限界浸透濃度は1.40 M、トノプラストの破れた異常細胞のそれは1.34~1.36 Mであった。なお、トノプラストの破れたクワの細胞は2倍の高張平衡塩溶液と水との間で原形質分離と復帰とを少くとも5回繰返すことが出来た。また、異常細胞を0°Cの水の中におけば少くとも2日間はその状態を保っている。なおこのような異常細胞は正常細胞と同様に、NaCl, グルコース, サッカロース等を透過させないが、メタノール, エチレングライコール, ジメチール・サルホ・オキシド等を透過させる。なお、秋や春の細胞はグリセリンを透過させないが、厳寒期では正常細胞も異常細胞もグリセリンを透過させる。

IV. 考 察

1. 無液胞細胞について

キササゲの皮層細胞は、通常の細胞のように液胞と細胞質からなる2重構造をもっているが、ミズキでは、半数の細胞は液胞をもっているが、他の半数の細胞は液胞をもっていないとLevittは報告している¹⁾。なお彼はこの無液胞細胞を正常な細胞とみなし、細胞には無液胞と液胞細胞の2種類があると考えている。そして細胞の表層の状態を調べる実験に両者の細胞を使用している。Siminovitshはニセアカシアの皮層細胞を用いて、耐凍性と脱水抵抗及び脱

水抵抗と水溶性蛋白質との関係を調べている^{4,5)}。しかし、ニセアカシアの細胞はすでに述べたように、水溶液中でトノプラストが破れて全細胞が異常となるし、彼の論文中の写真にもトノプラストが破れた異常な細胞像のみが認められる⁵⁾。こういう異常状態の細胞を用いて脱水抵抗をはかる事にはいろいろな問題がある。ただし、ニセアカシアの場合には全細胞が異常になっているので、これらの細胞を用いても脱水抵抗の相対値はあるていど求められる。この事はクワの皮層細胞を用いて行った著者の脱水抵抗の論文についてもあてはまる⁷⁾。木の皮層細胞を用いた実験では、多くの著者がこのようなトノプラストの破れた異常細胞を正常な細胞とみなして実験に使用して、この点についてどの研究者も従来全く考慮をはらっていない。このように、木の皮層細胞は草本類の細胞とちがって異常になりやすいので、木の皮層細胞を用いて実験を行なう時には、使用する細胞のトノプラストが水溶液中で破れているか否かをあらかじめ確かめることが必要である。また処理中にトノプラストが破れないような材料を実験に使用することも必要である。

2. 原形質表層の透過性について

植物細胞の原形質表層は一般に溶質を透過しにくいと考えられている。しかし、溶質は液胞内には透過できないが、原形質表層を自由に透過できるという意見もある^{8,9,10)}。植物細胞を高張溶液の中に入れた時おこる原形質分離の現象は原形質表層が溶質を自由に透過させないために起こると説明されている。しかし、原形質分離の現象は原形質表層が自由に溶質を透過させると考えても説明できる。すなわち、細胞を高張溶液の中に入れた時、トノプラストは溶質を自由に透過させないので、高張溶液中では液胞の収縮がおこるが、液胞と細胞質との間に構造的連絡があるために、液胞の収縮につれて細胞質も受動的に収縮して原形質分離がおこると考えれば説明できる。もしも溶質はトノプラストを透過できないが、原形質表層を自由に透過できるならばトノプラストの破れた細胞は高張溶液の中に入れても原形質分離をおこさないはずである。しかし、細胞の表層をきずつけないでトノプラストを破ることが技術的に困難であったために、この問題は今迄たしかめられていなかった。本実験のように、ある樹種の皮層細胞は容易にトノプラストを破ることができる。しかし、このような細胞を高張溶液の中に入れても、液胞をもつ正常な細胞と同程度に原形質分離することから、少なくとも実験条件下では原形質表層が溶質を自由に透過するとは考えがたい。

3. 凍害と細胞間隙との関係

植物の細胞間隙の構造や状態はよく判っていない。植物の細胞間隙は一般に水蒸気で飽和された空気のみたされて、細胞間の物質の移動や交換は原形質連絡糸 (Plasmodesmata) によって行なわれていると考えられている。

草本類の葉柄の一部や木の皮層組織を水中に入れて減圧にすると多量の空気がでてくる。この事は葉の場合と同様に、草本類や木の皮層組織の細胞間隙には多量の空気が含まれている事を示している。また照本は凍結しているビートの塊茎の細胞間隙にできている氷を集めて調べた結果¹¹⁾、凍害を受けていない場合には、その中には溶質が殆んど含まれていない事を明らかにした。この事実は細胞間隙に溶液が含まれていない事を示す一つの証拠になる。Hadson

は原形質表層は溶質を自由に透過するので、細胞外凍結にさいして水とともに溶質も析出すると考えている¹²⁾。しかし本論文の結果から明らかなように、原形質表層は溶質を自由に透過させないし、上に述べた照本の結果も細胞が害されていない限り原形質表層は溶質をとほさない事を示している。

生物細胞の凍害に関する理論の多くは、細胞や組織切片を、いろいろな溶質を含む溶液の中に浸して行った実験結果にもとづいている。しかし、こうした場合の凍害は細胞の状態や細胞内に含まれている保護物質のほかに、媒液中の溶質の質と量によって著しく影響される傾向がある。たとえば、キャベツの葉柄の細胞をグルコース溶液中に浸して凍結させると、 -30°C 又は -70°C の凍結に耐えられる¹³⁾。なおこの場合にグルコースは細胞内に透過しない。これに反して、水に浸して凍結させるか、または葉柄をそのまま空中で凍結させる場合には -15°C での凍結にも耐えられない。また水に浸して -10°C まで凍結した細胞や空中で -10°C まで凍結させた葉柄は、空中でゆっくり融解する場合には生存しているが、これらを 10°C の水中に入れて速く融解させると、融解のさいに害を受ける。しかし、キャベツの葉柄の細胞をグルコース溶液に浸して -30°C 又は -70°C まで凍結後、直接 30°C の水中に入れてこれを速く融解させても細胞は殆んど害を受けない¹³⁾。この事実は植物細胞を溶液に浸して凍結、融解させる場合には、植物細胞を速く融解させても害が現われがたい事を示している。植物細胞を凍結後生存させるためには、ゆっくり融解させる事が必要である。そして、動物と植物におけるこの点についての差は両細胞における細胞膜の有無によって説明されてきた¹⁴⁾。しかし、上のキャベツの実験から判るように、この原因は植物細胞膜に求めるだけでなく、植物の細胞間隙の状態にも求めるべきである。すなわち、*intact* の植物細胞は動物細胞とちがって、溶液につからない状態で凍結、融解されている。この事が融解速度に対して植物細胞が動物細胞より敏感である主要な理由と考えられる。なお、この問題に関連して *intact* の植物では、融解速度のほかに融解後おかれる温度が以後の植物の凍害の度合にかなり影響を与える場合がある。したがって、植物の凍害を考える場合には、植物細胞がどういう状態で凍結融解されるかに考慮をばらう事が必要である。また、*intact* の植物の凍害の機構をより明らかにするためには、細胞間隙の状態も解明されなければならない。

摘 要

1. クワ、ニセアカシアの枝の皮層細胞を水又は水溶液中に入れて検鏡すると、どの細胞にも液胞が認められない。しかし、水又は水溶液につけないうで流動パラフィンに浸して調べると、大部分の細胞において液胞が認められる。この事から、従来いわれていたように木の皮層組織中に、本来、無液胞細胞が存在しているのではなく、水又は水溶液中に細胞を入れると、ある樹種の細胞では、トノプラストが破れて液胞内容物と細胞質とがまざりあうために、液胞と細胞質からなる細胞の2重構造が認められなくなるものと考えられる。

2. トノプラストが破れた異常細胞は高張溶液中で原形質分離するし、また原形質分離と復帰とを数回繰返すことができる。なお、そのような細胞の限界浸透濃度は正常な細胞とあま

り変わらない。この事から少なくとも実験条件下では、原形質表層は溶質を自由に透過させないものと思われる。

3. 木の皮層細胞は水や水溶液中でトノプラストが破れて異常な細胞になりやすいので、実験に使用する前に、細胞が正常であるか否かを確かめることが必要である。また木の皮層細胞を使用する実験では、水溶液中に細胞を入れても細胞が異常にならないような材料を実験に使用することも必要である。

文 献

- 1) Levitt, J. and Siminovitch, D. 1940 The relation between frost resistance and the physical state of protoplasm. I. The protoplasm as a whole. *Canad. J. Res C.*, **18**, 550-561.
- 2) Siminovitch, D. and Levitt, J. 1941 The relationship between frost resistance and the physical state of protoplasm. II. The protoplasmic surface. *Canad. J. Res.*, **19**, 9-20.
- 3) 酒井 昭 1959 原形質分離による生死の判定 一木本類の皮層細胞一. *低温科学, 生物篇*, **17**, 21-27.
- 4) Siminovitch, D. and Briggs, D. R. 1953 Studies on the chemistry of living bark of the black locust tree in relation to its frost-hardiness. III. The validity of plasmolysis and desiccation tests for determining the frost hardiness of bark tissue. *Plant Physiol.*, **28**, 15-34.
- 5) Siminovitch, D. and Briggs, D. R. 1954 Studies on the chemistry of the living bark of the black locust tree in relation to its frost hardiness. VII. A possible direct effect of starch on the susceptibility of plants to freezing injury. *Plant Physiol.*, **29**, 331-337.
- 6) Asahina, E. 1956 The freezing process of plant cell. *Contr. Inst. Low Temp. Sci.*, No. **10**, 83-126.
- 7) 酒井 昭 1959 木本類の耐凍性増大過程 IV. 一脱水抵抗と糖濃度との関係一 *低温科学, 生物篇*, **17**, 35-41.
- 8) Hope, A. B. and Stevens, P. G. 1952 Electric potential differences in bean roots and their relation to sap uptake. *Austral. J. Sci. Res.*, B, **5**, 335-343.
- 9) Hylmø, B. 1953 Transpiration and ion absorption. *Physiol. Plant.*, **6**, 333-405.
- 10) Epstein, E. 1956 Mineral nutrition of plants: Mechanism of uptake and transport. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **7**, 1-24.
- 11) 照本 勲 1961 植物細胞間隙にできる氷晶について. *低温科学, 生物篇*, **19**, 23-28.
- 12) Hadson, M. A. and Idle, D. B. 1962 The formation of ice in plant tissues. *Planta*, **57**, 718-730.
- 13) 酒井 昭 1961 植物細胞の凍害の機構 I. 一凍害に対する媒液の影響 1— *低温科学, 生原篇*, **19**, 1-16.
- 14) Iljin, W. S. 1933 Über der kältetod der Pflanzen und seine Ursachen. *Protoplasma*, **20**, 105-124.

Summary

There is a distinct difference in appearance of the cells in sectioned tissue between *catalpa* and *cornus*. In the former plant, the protoplast of every cortical cells consists of a layer of cytoplasm surrounding a single large vacuole which can be stained intensely with neutral red. In the latter plant, only half the cortical cells are of this type and the others have no single large vacuole: neutral red staining either fails to detect vacuoles or at most causes a faint brownish red coloration throughout the whole cell. Levitt has called these unstained cells "avacuolate" ones and the cells with distinct vacuole, "vacuolate" cells. The "avacuolate" cells have been found widely in woody plant, however, no evidence

has been presented to show that these "avacuolate" cells actually exist in the intact plants and that they are not an artifact produced at the time of preparation.

To make clear these points experiment was made with the cortical cells of some woody plants. Cortical tissue sections were made with a sharp blade of hand razer. These slices with or without vital staining were immersed into water or balanced salts solution and then observed under microscope. In mulberry tree, popular, black locust tree etc., when the tissue slices were put into water or balanced salts solution, no vacuole was found in these cells (Fig. 2, 3, 4). On the other hand, if cortical cells in these plants were observed in liquid paraffin without any pretreatment, almost all protoplasts were found to have a distinct large vacuole (Fig. 8, 10). In alpine rose and *catalpa*, "avacuolate" cells were scarcely found in the treated cells with water or hypertonic balanced salts solution (Fig. 1). These facts seem to suggest that "avacuolate" cells do not originally exist in an intact plant, but are merely an abnormal form of cells, in which the cytoplasm was coalesced with vacuolar content as a result of a rupture of tonoplast. In this view point, it seems not adequate to use these abnormal cells as the experimental materials for physiological studies.

As to the osmotic concentration in these cells, there is only a slight difference between normal and abnormal ones (Fig. 11, 12). The osmotic value of normal cells of the cortical tissue of popular in winter is 1.40 M and that of the abnormal ones, 1.35-1.36 M. In mulberry tree, these "avacuolate" cells could withstand plasmolysis and deplasmolysis with 2-fold isotonic balanced salts solution and water. Besides, such plasmolysis could be repeated even 4 times. These facts shows that the ectoplasts of "avacuolate" cells are nearly impermeable to ions in spite of the distinct injury in the tonoplasts.

図 版 の 説 明

- 第 1 図 中性赤溶液で生体染色後，高張平衡塩溶液中で原形質分離したバラの皮層柔細胞。○印は液胞 ×1000
- 第 2 図 原形質分離したクワの皮層柔細胞。どの細胞にも液胞が認められない。×1200
- 第 3 図 原形質分離したクワの皮層柔細胞。どの細胞にも液胞と細胞質との 2 重構造が認められない。×400
- 第 4 図 水につけたニセアカシアの皮層柔細胞。×1000 どの細胞にも液胞が認められない。
- 第 5 図 中性赤溶液で生体染色後，原形質分離したヤナギの皮層柔細胞。左側の 3 つの細胞には液胞が認められるが右側の 4 つには液胞が認められない。×1000
- 第 6 図 水につけても液胞が認められるクワ (品種：セイジュウロウ) の皮層細胞。×1000 ○印：液胞
- 第 7 図 水につけたクワの皮層細胞。どの細胞にも液胞が認められない。×1000
- 第 8 図 水や水溶液につけないクワの皮層柔細胞。流動パラフィン中にて検鏡。○印：液胞をもつ細胞 ×2500
- 第 9 図 高張平衡塩溶液中で原形質分離したポプラの皮層柔細胞。どの細胞にも液胞が認められない。×1000
- 第 10 図 水や水溶液につけないポプラの皮層柔細胞。流動パラフィン中にて検鏡。どの細胞にも液胞と細胞質からなる 2 重構造が認められる。○印：液胞 ×1000
- 第 11 図 生体染色後，原形質分離したミズキの皮層細胞。○印は液胞をもつ細胞 ×2500
- 第 12 図 生体染色後，原形質分離したポプラの皮層柔細胞。○印は液胞をもつ正常な細胞。×1000





