



Title	マリモ節間細胞の耐凍性 II
Author(s)	照本, 勲; TERUMOTO, Isao
Citation	低温科学. 生物篇, 22, 1-17
Issue Date	1964-10-20
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/17677
Type	departmental bulletin paper
File Information	22_p1-17.pdf



マリモ節間細胞の耐凍性 II*

照 本 勲

(低温科学研究所 生物学部門)

(昭和 39 年 7 月受理)

I. 緒 言

マリモは淡水産藻類としてきわめて高い耐凍性を持ち、この性質には他の大部分の耐凍性植物でしられているような環境温度による変化がみとめられない¹⁾。前報において報告したように、この性質は越冬中の樹木の細胞にみられる糖のような凍害防止物質の蓄積によるものでなく、マリモ細胞の原形質本来の性質に由来するものと考えられる。

このような点からみて、本種の細胞についてえられる種々の結果は、植物細胞の耐凍性の機構を明らかにするうえに、ひとつの大きな手がかりを与えるものと思われる。前報²⁾では、その原形質の性質に影響をあたえると思われた無機塩類、糖類、多価アルコール類を作用させ、これら諸物質についてえられた細胞の耐凍性の変化から、その細胞外凍結による凍害の機構を考察したが、本報では脂肪溶剤、表面活性剤及びカルシウム沈澱剤がマリモ節間細胞の耐凍性に如何に影響するかを検討し、この結果から凍害の機構を考察した。

この研究で御懇篤な御指導を仰いだ青木廉教授、また有益な助言を賜った朝比奈英三教授、並びに実験材料を御恵与下さった理学部山田幸男教授、阪井与志雄博士に深く感謝する。

II. 材料及び方法

淡水産藻類のマリモ *Aegagropila Sauteri* (Nees) Kütz. の糸状体を実験材料として用いた。

マリモの構造は割合に簡単であり、その節間細胞は直径 40~80 μ 、長さは直径の 10 数倍という長い円筒形をしている。この細胞は約 3 μ の厚さをもつ細胞膜におおわれ、その細胞は網目状に密に配列したクロロプラストをもっており、また多数の核とピレノイドを含んでいる³⁾。

マリモ細胞の凍結過程の観察には、低温室内にまたは -30°C まで冷却できる特殊低温箱内に設置した顕微鏡を使用した。これらの場合マリモ細胞は少量の媒液と一緒にシリコンでおおって懸滴として観察した⁴⁾。

細胞の生死の判定は、すべて 1 M 平衡塩溶液を用いて、原形質分離の有無できめた。

固定には低温固定法を用いた。すなわちマリモの糸状体をカバーガラスにのせたまま種々の媒液と共にあらかじめ凍結しておき、この凍結温度と同じ温度に冷却した純エタノール・氷

* 北海道大学低温科学研究所業績 第 677 号

酢酸混合液 (容積 19:1) 中に、そのカバーグラスごと投入し、更に4時間同じ温度に保って固定した⁵⁾。その後、室温の純エタノールにうつし、一晚放置脱水し、適宜染色し、顕微鏡観察を行なった。

III. 脂肪溶剤の影響

生物細胞の原形質膜には、細胞の他の部分にくらべて特にフォスファチドが多いと考えられ、実際に脂肪溶剤を媒液として作用させると細胞に大きな影響のあることが知られている。細胞表層部とくに原形質膜の状態変化が細胞の耐凍性に大きな影響をあたえるものと考えられるので、始めに14種の脂肪溶剤を使ってこれがマリモの耐凍性にあたえる影響をしらべた。

1. 脂肪溶剤の耐凍性への影響

まづ媒液としての各脂肪溶剤のマリモに対する有害濃度をしらべた。予め段階的に濃度の異なる各溶液中に、数拾本のマリモ糸状体細胞をつけ、20°C (暗黒)、24時間放置後の細胞の生死の状態から、限界濃度をきめた。マリモの凍結実験はこの濃度の媒液中で行なった。ただしメタノール、エタノール、tert-ブタノール、Ethyl "Cellosolve" は限界最高濃度が他物質にくらべて非常に高いので限界濃度より低濃度で実験を行なった。

マリモ糸状体の数拾本を、各媒液とともにスライドグラス上にのせ、カバーグラスをかけた顕微鏡下でできるだけ早く (30分以内)、細胞に異状のないことを確かめた後に、-15°C と -30°C で各2時間凍結させた。凍結方法は、マリモをのせたスライドグラスをそのまま各温度の恒温箱中におき、自発凍結がおこるのを待ったが、約10分たってもまだ凍っていない場合、試料の一端に氷をふれて人為的に植氷して凍らせた。マリモ細胞を凍結させる際、各溶剤の直接の作用、予め行なった溶剤処理の影響、この双方が加わった場合のそれぞれについてしらべるため次の三つの方法をとった。

A) 24時間、室温の各溶液につけておいたマリモ細胞を同じ溶液を媒液として凍結させる。

B) 24時間、室温の各溶液につけておいたマリモ細胞を脱イオン水でよく洗滌し、脱イオン水を媒液として凍結させる。

C) 凍結前に A), B) の如く各溶液に予めつけることなしに、各溶液につけ直ちに媒液とともに凍結させる。

これらの3種の実験の結果は第1表に示した。

A) の実験からマリモ細胞は、メタノール、エタノール、アセトンを除いて他の溶液中では全部凍死をおこすことがわかった。メタノールだけはこれを使用した場合に対照以上の生存率つまり、-30°C、12時間の凍結でメタノールでは100%、対照では10~20%の生存率を示し、凍結防止剤となった。メタノールは予め24時間処理しなくても、媒液として存在すれば凍害を防ぐことが可能である (C)。

実験 (B) によれば、n-, iso-プロパノール、n-, iso-, sec-, tert-ブタノール、Ethyl "Cellosolve" で処理されたマリモ細胞は、凍結の際純水でよく洗滌し、媒液を脱イオン水としても、

第1表 各種脂肪溶剤の影響

種 類	分子量	使用濃度 (20°C, 24時間) (以内で無害)	A: 24時間前処理後同液を 媒液とした場合の2時間 凍結後の生存率(%)		B: 24時間前処理後脱イオ ン水を媒液とした場合の 2時間凍結後の生存率(%)		C: 前処理せずに各溶剤を 媒液とした場合の2時間 凍結後の生存率(%)	
			-15°C	-30°C	-15°C	-30°C	-15°C	-30°C
Methanol	32	2 M	100	100	100	0	100	100
Ethanol	46	2 M	100	0	50	0	90~100	0
Aceton	58	2 M	10~20	0	100	0	10~0	0
n-Propanol	60	0.5 M	0	0	10~20	0	0	0
iso-Propanol	60	1 M	0	0	40~50	0	0	0
Ether	74	0.9 M	0	0	70~80	0	20~30	0
n-Butanol	74	0.1 M	0	0	50	0	0	0
iso-Butanol	74	0.2 M	0	0	10~20	0	0	0
sec-Butanol	74	0.1 M	0	0	10~20	0	10~20	0
tert-Butanol	74	1 M	0	0	20~30	0	0	0
Ethyl "Cellosolve"*	90	1 M	0	0	10~20	0	0	0
Chloroform	119	0.04 M	0	0	80~90	0	0	0
対 照 (脱イオン水)							100	10~20

* Ethylene Glycol Monoethyl Ether

(1月~2月の材料)

ほとんどが 50% 以上の凍結をうけた。すなわち室温で 24 時間処理中にこれらの溶剤は細胞の原形質に不可逆的な変化をあたえたことが明らかである。この 7 種の溶剤中では直ちに凍結させても致命的な凍害をうけている (C)。

また (B) からアセトン、エーテル、クロロホルムの 3 種の脂肪溶剤は、24 時間室温処理中にたとえ細胞原形質に何らかの変化をあたえたとしても、水で洗えばその影響は消失する程度であるか、または少なくともその後の凍結実験にほとんど影響をあたえない程度であることがわかる。このほか脂肪溶剤としてトルエン、キシレンを使用した。両者は水に不溶なので、マリモ細胞を直接分液漏斗内でこれらの溶剤と 1 分間接触させ、そのあと脱イオン水で数回よく洗滌して溶剤をとり除き、脱イオン水を媒液として凍結 (-15°C , 2 時間) させるとトルエンで処理したマリモ細胞は、完全に 100% 凍死し、キシレンで処理したものは約 50% 凍死した。

第 1 表より、各種の脂肪溶剤を次の三つに分類できる。

- 1) メタノール, エタノール
- 2) アセトン, エーテル, クロロホルム
- 3) n-, iso-プロパノール, n-, iso-, sec-, tert-ブタノール

メタノール, エタノールは凍害を増大させず、特に前者では凍害防止の効力が高い。アセトン, エーテル, クロロホルムは洗滌することで前処理の影響がほとんど残らない。第 3 群の脂肪溶剤は、原形質にあたえる傷害が大きく水洗してもその後の凍結の際必ず致命的となる。

2. マリモ細胞の脂肪溶剤に対する透過性

メタノール, エタノール及びアセトンの細胞内への透過性をくらべ、それらを媒液とした場合の細胞の耐凍性との相関をしらべた。方法は予め等張 (非電解質約 1.2~1.4 M) の 2 倍濃度の平衡塩溶液に細胞を入れて、原形質分離した細胞を 15 分後、これらの脂肪溶剤 (4 M) につけて溶剤自身の細胞内への透過の結果、原形質復帰するまでの時間の読みの平均をとった。* 第 2 表にメタノール, エタノール及びアセトンの透過度を示したが、前二者のマリモ細胞への透過速度は相等しく、アセトンは更にこれら二者よりも速く透過した。このばあいアセトンが長時間この濃度で作用しても全く無害の溶質であるならば、あるいはメタノール以上に有効な凍害防止剤であるかもしれないが、アセトンは 3 M 以上の濃度になると細胞に害をあたえる (24 時間, 20°C 暗黒状態処理で、3 M 以上の濃度で有害) ので凍害をまた大きくなるのであ

第 2 表 溶 剤 の 透 過

室温 22°C

種 類	濃 度	原形質復帰までに要する時間 (秒)
Methanol	4 M	33
Ethanol	4 M	32
Aceton	4 M	21

(7 月の材料)

* この方法で原形質復帰させたものは、メタノール, エタノールは勿論アセトンのばあいでも細胞は正常で、数分のうちに純水中にもどすと、再び高張平衡塩溶液に入れたばあい原形質分離を正常に行なう。

ろう。

細胞の耐凍性を著しく高めるメタノールが、良く細胞内に透過することは期待されていたがメタノールより効力の少ないエタノールもその細胞への透過性には差がなかった。エタノールの常温での毒性をしらべたところ、3 M 以上の濃度では、24 時間以内に細胞は全滅することがわかった。

3. 脂肪溶剤を媒液としたばあいの凍結像

種々の溶剤中にマリモ細胞をつけ、 -15°C で 2 時間凍結したあとの細胞の生死と、凍結時の低温固定像を第 3 表に示した。

第 3 表 各種溶剤を媒液として凍結したばあいの低温固定像 -15°C , 2 時間凍結

種 類	濃 度	生 存 率 (%)	低 温 固 定 像
Methanol	1 M	100	正常型, 縮小の程度小
Ethanol	1 M	100	正常型, 縮小の程度小
Aceton	1 M	50	甚しい脱水型
iso-Propanol	1 M	0	甚しい脱水型, 原形質崩壊
tert-Butanol	1 M	0	甚しい脱水型, 原形質崩壊
Ethyl "Cellosolve"	1 M	0	正常型
脱イオン水		100	正常型

(3月の材料)

また細胞の凍結過程の観察は、メタノール、アセトン及び n-ブタノールで行なった。2 M メタノールを媒液としてマリモ細胞を凍らせると、細胞は -20°C までの冷却でやや脱水されるが、その程度は対照 (水中での凍結) に比べて明らかに少なく、勿論原形質分離はおこらない。細胞内部の形状もややプラスチックが密集するだけで常態とほとんど変わらない (図版 I-1)。この状態のものを融解すれば凍死する細胞は全くない。

2 M アセトン中で細胞を凍らせると、やはり原形質分離することなく細胞は縮小するが、脱水収縮の程度は対照 (水中での凍結) よりむしろ大きく、またしばしば 1 個の塩溶液中での凍結²⁾ でみられたように一部が扁平になった (図版 II-4)。 -15°C , 30 分の凍結で大部分の細胞は凍死してしまった。

0.1 M n-ブタノール中で細胞を凍らせると、細胞はそのままの形で非常に強く脱水され節部を除いては甚だ細くなる。このばあい、細胞をとりまく二次的な氷晶はほとんどみられないので、細胞内の水はまわりの媒液の凍結と連続的に外にでて凍るものと思われる。つまり細胞外凍結にともなう脱水に対して細胞は、はじめから全く抵抗性を失っていたものであろう。このように甚しく収縮した細胞は、すでに完全に凍死していて、融解させるにつれ細胞内の原形質ははっきりと崩壊してゆく (図 III-8, 9)。

これらの結果からわかるように、メタノール、エタノール及び Ethyl "Cellosolve" 中では、凍結時の細胞は何れも細胞外凍結による脱水を示すが、対照と同じく原形質の状態は正常であった (図版 III-10)。特に凍害の少ないメタノールとエタノールでは縮小の程度が対照よりも更

に少なかった (図版 I-2, 3)。iso-プロパノールと tert-ブタノールでは凍結中にすでに原形質の崩壊像があらわれていた (図版 II-6, 7)。アセトンではやはり甚しい脱水縮小を示すが原形質崩壊は前二者程明らかにはおこらない (図版 II-5)。

4. 高濃度メタノールの耐凍性への影響

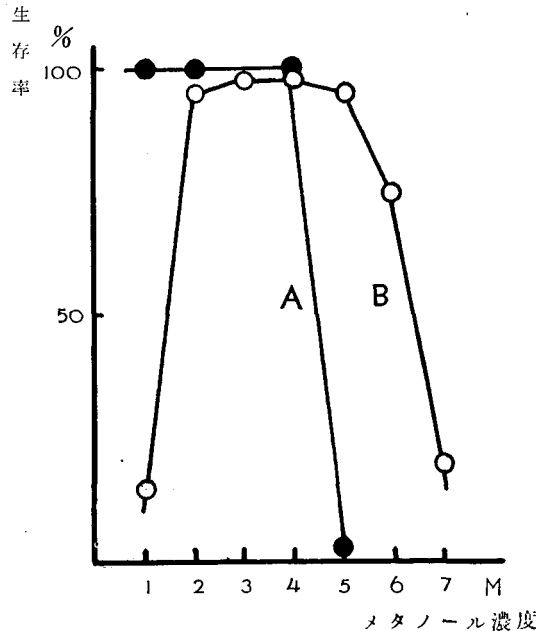
使用した 14 種の脂肪溶剤のうち、メタノールは凍結時の媒液として、マリモ細胞の耐凍性を増加した唯一のものであったので、更に高濃度のメタノールを使用して耐凍性への影響をしらべた。まづ常温でマリモ細胞に対するメタノール有害濃度をしらべた (第 4 表)。これによると 7 M 以上のメタノール媒液は、マリモ細胞に致命的であることがわかる。

第 4 表 メタノールの有害濃度 20°C, 暗黒状態, 24 時間処理後の生存率

濃 度 (M)	1	2	3	4	5	6	7	8
生存率 (%)	100	100	100	100	100	90	0	0

(12 月の材料)

そこでこの限界濃度内で、予め 24 時間メタノールにつけておいた細胞と、凍結の直前にメタノールに入れた細胞の耐凍性をくらべてみた (第 1 図)。予めメタノールにつけてあった細胞では 1 M から 4 M まででは 100% 生存し、5 M 以上では全滅した。これに比べると凍結のときだけメタノールを媒液としたばあいは 1 M では効果がないが、高濃度では逆に効果が大きく 5 M でも約 100%、6 M でも 75% という生存率をしめした。これらの結果から細胞の凍害にあたる媒液の作用は、単に凍結の時に作用するものばかりでなく、凍結以前に細胞がうけている何等かの変化が細胞外凍結による脱水濃縮の過程において原形質の保全に強く影響することが明らかである。すなわちメタノールは 1 M の濃度においても、原形質に作用する十分な時間があれば、2 M 以上の濃度の媒液中で凍結させればあいに匹敵する効果をあらわし、一方高濃度では常温で 6 M まで無害のようにみえるが、5 M 以上の溶液中に 24 時間おかれた細胞はすでに有害な変化をうけており、これが凍結に際して致命的になるのであろう。



第 1 図 媒液のメタノールの濃度と凍害 (-33°C, 2 時間凍結)
 A: 24 時間前処理, 凍結の際も媒液としたとき
 B: 前処理せず, 凍結の際のみ媒液としたとき (1 月の材料)

IV. 表面活性剤の影響

前報²⁾ならびにこの報告でのべてきた実験の結果は何れも原形質膜の状態変化が耐凍性に大きく影響することを思わせる。そこで細胞内には滲透しないで特に表面に作用すると考えられる表面活性剤を媒液として細胞の凍結実験を試みた。

表面活性物質は、電荷によって三種に分類される。

- a) アニオン性表面活性物質
- b) カチオン性表面活性物質
- c) 非イオン性表面活性物質

カチオン性の表面活性物質は、一般にアムモニウム化合物を含み、生物細胞に対して著しく毒性が強い。アニオン性に属するものは、カチオン、非イオン性との中間の毒性をもつ。非イオン性は比較的無毒であるが、透過性に影響するといわれている。

使用した表面活性物質は次の通りである。

{	アニオン性	{	Monogen LH (第1)
			Emal O (花王)
			Aerosol OT (A.C.C.)
{	カチオン性	{	Amer Dex (Fleed wood Prod.)
			Levenol A (花王)
			Osvan (和光)
{	非イオン性	{	Span 20 (和光)
			Tween 20 (東京化成)
			Tween 80 (和光)

これらの表面活性剤が、耐凍性にあたえる結果を第5表に示した。方法は前記脂肪溶剤のばあいと同様な3種類の処理により -15°C 、 -30°C 2時間凍結後の結果を調べた。なお凍結させる前に予め常温で24時間媒液として作用させ、害の現われない最高濃度を各表面活性剤についてしらべ、これを第5表に限界濃度として示した。凍結の実験には、表示した限界濃度のものを媒液として使用した。常温ではカチオン性が最も毒性が強く、 $10^{-4}\%$ 以上の濃度では24時間で害があらわれる。アニオン性は $10^{-2}\%$ 、24時間が限界濃度で、非イオン性のものは最も害作用がすくなかった。

第5表によれば、常温で24時間表面活性剤で前処理されると細胞は例外なく影響をうけ、これは水洗してもその直後の凍結の際必ず凍害の増大となってあらわれる(B欄)。このばあい水洗せずにそのまま引きつづき表面活性剤を媒液として凍らせても(A欄)、凍害はほとんど増大しない。また前処理せず媒液として直ちに凍結させたばあいは(C欄)、前処理だけで凍結させたばあいと害の程度に大差なく、二、三のものではむしろ害が少ない。これらの何れのばあいても、アニオン性のものが最も凍害が大きく、カチオン性がこれに次ぎ、非イオン性のものが最も凍害が少ない。ただ例外としてEmal Oはアニオン性であるが、媒液として直ちに凍結させたばあいのみは非常に害が少なかった。

第5表 各種表面活性剤の影響

種 類	限界濃度 (%)*	A: 24時間の前処理後同液を媒液とした場合の2時間凍結後の生存率(%)		B: 24時間の前処理後脱イオン水を媒液とした場合の2時間凍結後の生存率(%)		C: 前処理せずに各溶剤を媒液とした場合の凍結後の生存率(%)	
		-15°C	-30°C	-15°C	-30°C	-15°C	-30°C
アニオン性 Monogen LH	10 ⁻²	10	0	10	0	0	0
Aerosol OT	10 ⁻²	30	0	40	0	20	0
Emal O	10 ⁻²	0	0	0	0	90~100	0
カチオン性 Amer Dex	10 ⁻⁴	50~60	0	80~90	0	50	0
Levenol A	10 ⁻⁴	20~30	0	10~20	0	10~20	0
Osvan	10 ⁻⁴	50~60	0	30~40	0	80	0
非イオン性 Span 20	3	80~90	10	80~90	0	80~90	20~30
Tween 20	5	80~90	10	40~50	20~30	40~50	0
Tween 80	5	80~90	10	80	0	50	0
対 照 (脱イオン水)						100	10~20

* 常温で24時間媒液として細胞に作用させたときの無害な最高濃度、凍結実験はこの濃度で使用した。

(1月~2月の材料)

V. Ca 沈澱剤の影響

前報でのべた塩溶液中でのマリモの凍結の結果²⁾からみると、媒液中に Ca があることはその凍害を防ぐために有効である。また、原形質表層部における Ca イオンの状態変化が細胞に大きな影響をあたえることはすでによく知られている^{6,7,8)}。そこで、マリモ細胞の耐凍性機構に関する手がかりをうるため、Ca 沈澱剤の溶液で処理したマリモ細胞を使って、更にこの実験を試みた。

まづ初めに予備実験として、Ca 沈澱剤として Na-oxalate 及び Na-citrate を用い 10^{-3} ~ 10^{-1} M のいろいろな濃度でマリモ細胞を 15 分以上前処理してから、脱イオン水でよく洗い -15°C で 2 時間凍結させてみたところ、何れの場合も明瞭な凍害があらわれた。このばあいの細胞の凍結過程を観察すると、純水の中で凍らせたばあいの違いはほとんど発見できないが、同一温度での脱水縮小の程度は対照(純水)の細胞よりも甚しいことがしばしばあり、また細胞からの脱水に由来する二次的の氷晶が細胞の外面に発達するばあいが少ない(図版 III-11)。しかし Ca 沈澱剤による前処理だけならば、沈澱剤の濃度を 0.1 M、前処理時間を 15 分とする限り凍結以前の形態は全く常態のままであって、1 M 平衡塩溶液による原形質分離とその後の復帰を全く正常に行うことができる。また、このように前処理された細胞も凍結温度を高めれば凍害は少なくなり -5°C 、2 時間の凍結ではほとんど凍死しない(第 6 表)。

そこで次にこのような前処理によって耐凍性の低下したマリモ細胞が、前報²⁾ならびに前

第 6 表 Ca 沈澱剤による前処理が細胞の耐凍性に与える影響 (0.1 M Na-oxalate で 15 分処理し、更に 15 分間水洗してから水を媒液として 2 時間凍結)

凍結温度	-5°C	-10°C	-15°C
生存率 (%)	90~100	60	10

(8月の材料)

第 7 表 Ca 沈澱剤処理後にメタノールまたはエチレングリコールを作用させたばあいの耐凍性

前処理液	媒液の種類	2 時間凍結後の生存率 (%)	
		-15°C	-31°C
0.1 M Na-oxalate	脱イオン水	10	0
	2 M メタノール	100	80
	2 M エチレングリコール	50	30
無処理	脱イオン水	100	10
	2 M メタノール	100	100
	2 M エチレングリコール	100	100

(12~1月の材料)

章において有効なことがわかった二種の凍結防止剤を媒液としたばあい、どの程度耐凍性が高まるかをしらべてみた。すなわち 0.1 M Na-oxalate でマリモ糸状体を 15 分前処理し、よく水洗してから媒液として脱イオン水を使用したばあいと、2 M メタノール、または 2 M エチレングリコール溶液を使用したばあいの耐凍性を比較した。

第 7 表からわかるように、マリモ細胞は Ca 沈澱剤で処理後、メタノール、エチレングリコール溶液を媒液として凍らせると、細胞の凍死率が明らかに減少する。特に前者では無処理のものをメタノール中で凍らせたばあいと、ほとんど同様な結果であった。

なお、Ca 沈澱剤でない単塩で前処理してもこのような結果は表われない。すなわち同じ濃度の NaCl, CaCl₂ 溶液で 15 分間前処理し水洗後、脱イオン水、2 M メタノールを媒液として凍結させてみたが、前処理溶液の影響はみられなかった (第 8 表)。

第 8 表 前処理としての単塩処理後の耐凍性の変化

前 処 理 溶 液	媒 液 の 種 類	2 時間凍結後の生存率 (%)	
		-15°C	-32°C
0.1 M NaCl	脱 イ オ ン 水	100	10
	2 M メ タ ノ ー ル	100	100
0.1 M CaCl ₂	脱 イ オ ン 水	100	10
	2 M メ タ ノ ー ル	100	100
無 処 理	脱 イ オ ン 水	100	10
	2 M メ タ ノ ー ル	100	100

(3 月の材料)

これらの結果からマリモ細胞は、Ca 沈澱剤によってごく短時間のうちにある変化をおこし、それが凍結にともなう脱水収縮の際に致命的な傷害をおこす原因となることがわかる。そうだとすれば、凍結以外の方法によって、このような脱水縮小を Ca 沈澱剤で前処理したマリモの細胞におこさせてみたときも、同じような傷害が期待できるはずである。この目的で次のような実験を行なった。

前記実験のばあいと同様に Ca 沈澱剤でマリモ細胞を前処理してから純水で十分に洗い、次にこれをできるだけ高滲透濃度の液中で原形質分離させてその後の生死をしらべた。原形質分離液としては、塩類以外に糖やグリセリンが考えられるが、すでに前報²⁾で述べたように糖は 2 M 以上ではマリモ細胞に猛毒であり、またグリセリンは 1.6 M 以上では毒性があるので共に使うことができない。塩溶液のうちで最も毒性の低いのは CaCl₂ または NaCl:CaCl₂ :: 9:1 の平衡塩溶液である。そこでこの実験に多量の Ca イオンをふくむ分離液を使用するのは、あまり望ましいことではなかったが、やむをえず平衡塩溶液を採用し、できるだけ急速に原形質分離を完了させるために 2 M 溶液 (NaCl 等張) を常温で 3 分間作用させた。勿論この程度の分離液の濃度は、マリモ細胞がこれらの塩溶液を媒液として -15°C の凍結中にその周囲に生じるであろう塩の濃度よりはるかに低いものであるが、これ以上高濃度になるとたとえ平衡塩

溶液であっても細胞に大害を与えるので使用することができない。マリモ細胞を濾紙上で水をよくのぞいてから多量の2 M 平衡塩溶液中に投入すると急激に脱水されて著しい凹形原形質分離をおこす。これを急激に低張液に戻すと原形質復帰の際、原形質破裂をおこす細胞がきわめて多いので、非常に徐々に分離液をうすめてゆく必要がある。この実験では、2 M の平衡塩溶液に次第に水を加えて原形質復帰を完了させた。このようにして行なった実験の結果は次の通りである。なお生死の判定は、いちど原形質復帰した細胞を再度1 M 平衡塩溶液中で原形質分離させてきめた。

第9表 Ca 沈澱剤処理後の原形質分離による害

前 処 理 (15分)	原形質分離 (各3分)	生 存 率 (%)
1 M Na-oxalate	2 M 平 衡 塩 溶 液	85
無 処 理	2 M 平 衡 塩 溶 液	100

(7月の材料)

この結果は、生存率の上でそれ程の大差は生じなかったが、Ca 沈澱剤で処理されない対照の細胞では原形質分離が完全に無害であるのに、前処理された細胞は、このような程度の脱水縮小によってもあるていどの害を受けることがわかった。

次に前と同じ方法でいちど Ca 沈澱剤で処理した細胞を更に0.1 M CaCl₂ 溶液中で種々の時間処理してどのくらい耐凍性が回復するかをしらべた(第10表)。その結果では耐凍性の回復は20°C で1日程度 Ca 塩溶液中におかれた位ではまだ不完全で、細胞は正常の状態にもどっていない。

第10表 Ca 沈澱剤処理後に CaCl₂ 溶液中で処理し、脱イオン水中で凍結させた細胞の耐凍性
-15°C, 2時間凍結後の生存率 (%)

Ca 沈澱剤 (15分)	脱イオン水洗滌	CaCl ₂ 濃 度	CaCl ₂ 処理時間 (20°C)			
			15分	1時間	4時間	24時間
0.1 M Na-oxalate	15分	0	10			
		0.1 M	60	60	50	50~60
0.1 M Na-citrate	15分	0	0			
		0.1 M	30	20	30~40	50~60

(7月の材料)

VI. 考 察 及 び 結 論

1. 脂肪溶剤

植物細胞に対し脂肪溶剤は、直接間接に大きな影響をあたえ、低濃度で作用させても原形質の興奮性を甚だしく消失させることが知られている。また各種のアルコールのような溶剤を媒液としたときには、種々の物質に対する細胞の透過性が大きく影響されることがいろいろな

植物細胞でしらべられている⁹⁾。このような作用は、当然細胞の耐凍性に大きな影響をあたえるものと想像される。実際に大麦ではその細胞のフォスファチドの含量が植物体の耐凍性と平行関係があり、これを溶解できる脂肪溶剤を媒液として凍結させると、紫キャベツのような耐凍性の高い草本でも凍害が大きくあらわれる¹⁰⁾。

今回使用した脂肪溶剤をそのマリモ細胞の耐凍性に対する作用によって分類すると次の三種に大別される。

1) メタノール, エタノール: 細胞本来の耐凍性を低下させない。

2) アセトン, エーテル, クロロホルム: 24時間この溶液につけておいても水洗すれば凍結のときにその影響がのこらない。しかし媒液として凍結させれば凍害を高める。

3) *n*-, *iso*-プロパノール, *n*-, *iso*-, *sec*-, *tert*-ブタノール, Ethyl "Cellosolve": 媒液として凍結させると致命的な凍害をあたえ、24時間この溶液で前処理後、水洗して水と共に細胞を凍らせても相当の凍害がある。

第1表の結果から比較的低濃度でもこれらの物質の大部分は、いずれも明らかな凍害をマリモ細胞にあたえ、しかもそのほとんどが24時間の前処理だけで水洗ではのぞくことのできない変化を細胞にあたえた。その溶液に24時間つけておき引き続きこれを媒液として凍結させたばあい細胞が生存できたのは、細胞内によく透過するメタノール, エタノール, アセトンの3種類にすぎなかった。これらの結果からみると、脂肪溶剤が24時間の前処理中におそらく細胞の表面にあたえると思われる原形質構造上の傷害が、細胞外凍結にともなう細胞の収縮のさいに致命的な凝固や崩壊に発展するのであろう。細胞内に十分多量に透過しても害の少ないメタノール, エタノールでは細胞の透過係を高めるので凍結のさい細胞の甚だしい収縮がおこらない(図版 I-1, 2, 3)。前処理だけでは細胞を害せず、かつ細胞内によく透過するアセトンによる凍害は、その高濃度溶液の害* (第1表) によって説明される。

2. メタノール

メタノールは多価アルコールの何れよりも毒性が少なくかつ細胞内によく透過する。2 M メタノール溶液中で細胞を凍らせるとき、原形質分離はみられず細胞の収縮もほとんどおこらない。従ってメタノールの凍害に対する著しい保護作用は多価アルコールのばあいと同様に凍結時の細胞の収縮を阻止することで説明してよいであろう。しかしメタノールでさえ甚だしい高濃度では、次第に有害な作用をあらわす。第1図に明らかな5 M以上のメタノール媒液による前処理が凍害を急増させる理由は、24時間の前処理の間に高濃度メタノールによる細胞の傷害が、まさに発現する限界近くまで達しており、これが凍結にともなう溶質の濃縮によって急速に致命的となったのであろう。また1 Mメタノール媒液中で24時間の前処理が細胞の耐凍性を高めるのにきわめて有効である事実は(第1図)、このような物質が細胞内へ透過した後、更に速度のおそい何等かの変化が原形質におこることを想像させる。

* その原因は恐らくフォスファチドのような原形質膜構成成分の溶解によるものであろう。

3. 表面活性剤

表面活性剤の溶液で細胞を処理すると、これらの物質は、原形質表面の親水性の蛋白に吸着されて、集積すると考えられる。したがってイオン性の活性剤を使用したばあいには、その後の媒液の pH にしたがって原形質の電荷をかえる作用があり、このことは毒物や色素等の細胞表面への吸着に非常に影響することが知られている¹¹⁾。他の物質と併用せず表面活性剤を単独で生物に作用させたばあいには、カチオン性のものが最も毒性が大きく、非イオン性のものはほとんど無害であり、アニオン性のものはこの両者の中間の性質がある¹¹⁾。これらの表面活性剤は、例外なく 24 時間の前処理中に、その後の凍結のさいにあらわれる何等かの傷害をマリモ細胞にあたえ、特にアニオン性剤による害は甚だしい。24 時間の前処理に引き続き、同じ媒液中で細胞を凍らせたばあいでは、イオン性の異なる三群の表面活性剤の間に明らかな凍害の差がみられ、アニオン性の表面活性剤の害は最大で、前処理のみの結果とほとんど等しくカチオン性のものでは、アニオン性のばあいに次ぐ凍害をあらわし、前処理だけのばあいよりいくぶん凍害が大きく、一番害の少なかった非イオン性剤では、前処理のみのばあいとほとんど等しいという結果になった。このような凍害の差は、非イオン性の表面活性剤のばあいは、その毒性が最も少ない事実と平行関係があることによって、あるていど説明できるがアニオン性のものは、その毒性がカチオン性のものより 100 倍も低いにもかかわらず凍害は最も大きくあらわれている。

これらの結果が、無機塩類や糖類を作用させたばあいの凍害と異なるところは、表面活性剤を媒液として直接凍結させると、凍害はむしろ少ないにもかかわらず、これらの活性剤による前処理だけでも、その後の純水中での凍結に際して細胞に害作用をあたえることである。恐らくはマリモ細胞表面へ、これら活性剤が次第に集積しある時間の後には、原形質内に水を保持する機構に対して不利な何等かの変化をおこさせるため、これは水洗等によって急速には恢復されない傷害と考えられる。

4. Ca 沈澱剤の作用

今まで述べてきたように、マリモ細胞の原形質膜表面に何等かの有害な変化がおこっているばあいには、それを水で十分洗い、かつ水と共に凍らせたばあいでも明らかな凍害がおこってくる。一方原形質表層部の構造を保つための Ca イオンの重大な役割はよく知られている⁹⁾。またマリモ細胞にとって媒液中の Ca 塩は、細胞の耐凍性を保持するために最も有効な塩類であることはすでに述べた⁹⁾。したがってマリモ細胞に Ca 沈澱剤を作用させたばあい、その後の細胞の凍結に際して、恐らく著しい影響をあたえるであろうことは十分予測される。すなわち Na-oxalate または Na-citrate のわずか 0.1 M 溶液の 15 分間の前処理によって、ほとんどの細胞が -15°C 、2 時間の凍結のさい凍死するのである。このばあい、マリモ細胞が細胞外凍結をすることは観察の結果明らかであるので、凍害は外部にできる氷によって原形質体が脱水されて収縮する結果であると考えられる。しかも、凍結温度が -10°C ならば凍害ははるかに軽減され、 -5°C ではほとんど凍死する細胞がない(第 6 表)、いっぽう媒液としてメタノールやエチレングリコールを使えば、Ca 沈澱剤の前処理の影響は現われない(第 7 表)。前

項でのべたようにこの二物質は細胞内によく透過して凍結のときの細胞の脱水収縮の程度を低める作用がある。これらの事実から、Ca 沈澱剤によってマリモ細胞の表面からの Ca イオンの離脱があったばあい、これによっておこる原形質表面の傷害は、その細胞が凍結のさい脱水収縮しても、その収縮の程度が小さければ決して致命的とならないと考えられる。また Ca 沈澱剤で前処理した細胞にとってはメタノールの方が明らかにエチレングリコールよりも保護作用が大きいが、対照の細胞ではこの二つの保護剤の効力に差は見られない(第7表)。これは前述のようにメタノールの方が凍結のときに細胞内部に透過する速度が大きく、したがって細胞の収縮の程度を少なくさせることができる事実から容易に説明される。さらに前記の想定をたしかめるために Ca 沈澱剤の前処理後に原形質分離剤によって、常温でマリモ細胞を収縮させてみたところ、期待どおり前処理された細胞には、原形質分離時の収縮によって死ぬものが見られなかった(第9表)。このばあいの死亡率が15%程度であって、 -15°C での凍死のばあいよりかなり少ないことは、原形質分離剤の濃度が、葉害をさけるために2 M (NaCl 等張)に過ぎないため、その脱水の程度が上記の凍結の場合よりはるかに少ないことによるのであろう。

マリモ細胞が Ca 沈澱剤によって受けたこのような傷害は、恐らく完全に恢復するためには比較的長い時間を要するものらしく、24 時間 CaCl_2 溶液に細胞をつけておいても、その恢復はきわめて不十分であった(第10表)。

5. マリモ細胞の凍害と耐凍性

各種の媒液中で凍結させた細胞でその凍害のおこり方をしらべた結果は、マリモ細胞の凍害の主因が細胞外凍結による原形質からの脱水とその収縮であることをしめしている。

凍結に耐えて生存できるような条件では、凍結中の細胞の収縮の程度は、凍死するような条件のばあいに比べて常に小さい。また細胞内にすみやかに透過する親水性の小分子物質でしかも細胞に無害のものは凍害を非常によく防止し、さらに細胞の耐凍性を高める作用がある。実際にこれらの物質の溶液中で凍結させた細胞は収縮の程度が小さい。細胞内に透過しにくいものはたとえ無害の物質であっても、細胞の耐凍性を対照以上に高める作用はほとんどない。したがってマリモ細胞の凍害は、凍結にもとづく原形質の失水と収縮がある限界に達したときにはじめておこると考えられる。これは Levitt の「凍結による細胞の失水収縮のため生じた歪力が原形質構造を機械的に破壊する¹³⁾」という凍害に対する説明に近い考え方であるが、彼の説が原形質と細胞膜との間に働く力を植物細胞では特に重要視しているのに対し、マリモのばあいは原形質体そのものの収縮の程度が凍害を生ずる最大の条件となる。

マリモの細胞の原形質は、細胞外凍結によるこのような脱水と収縮に対して或る程度まで耐えられる特殊な構造を、本来から持っており、これは耐凍性の高い植物細胞でしばしばみられる糖のような貯蔵物質の蓄積にもとづく性質ではない。このような原形質構造を保持するためには、原形質と結びついた Ca^{++} が重要な役割を果たしており、これを除去するような処理によって細胞の耐凍性は非常に低下する。

原形質膜に有害な影響をあたえる要因は、それが Ca 沈澱剤による短時間処理のばあいのように表層部のみに働いたときでも、細胞の凍結に際しておこる原形質の失水収縮が致命的と

なる温度を高める作用がある。すなわち細胞外凍結にもとづく細胞の収縮が比較的わずかでもすでに細胞は凍死する結果となる。このことは、このさいの細胞の凍害が原形質の失水や収縮にもとづく原形質膜表面構造の破壊であることを思わせる。

摘 要

この研究は、藻類の耐凍性機構を明らかにするために行なったものである。材料として、阿寒湖に生育するシオグサ科の淡水産緑藻マリモ *Aegaglopila Sauteri* (Nees) Kütz. の糸状体細胞を用いた。

マリモは淡水産藻類としてはその耐凍性がきわめて高く、淡水と共に凍らせると、1日以内ならば -20°C に達する低温での細胞外凍結にも耐えられる。

まずマリモ細胞を凍結する際、各種の脂肪溶剤をそれぞれ常温では無害の濃度の媒液として使用した。その結果は、メタノールはよく凍害を防ぎ、エタノールはほとんど対照の耐凍性をかえない。アセトン、エーテル、クロロホルムは凍害が大きい、24時間常温で前処理しても、洗えばその影響はほとんど残らない。使用した *n*-, *iso*-プロパノール、*n*-, *iso*-, *sec*-, *tert*-ブタノール、Ethyl "Cellosolve" などの溶剤は、媒液として細胞を凍らせればもちろん大害をあたえるが、前処理だけでも細胞に少なからぬ作用があり、これをよく水洗して凍らせても相当な凍害があらわれる。

細胞に最も速く透過して、しかも高濃度でも害の少ないメタノールは、マリモ細胞の耐凍性を著しく高めるが、この溶液中の細胞の凍結像は、細胞外凍結による細胞からの脱水が少ないことを示している。

各種の表面活性剤の溶液を媒液として凍らせたばあいは、使用したいずれの物質も多少なりとも細胞に凍害をあたえたが、一価の塩や糖にくらべるとその程度は低い。24時間常温で前処理してから洗滌して、水と共に細胞を凍らせると、アニオン性のものが大害があり、カチオン性や非イオン性のものは害が少ない。しかしこのような前処理だけでもその後の凍結の際例外なく凍害があらわれることは表面活性剤の特色である。

Ca 沈澱剤として Na-oxalate および Na-citrate を低濃度 (共に 0.1 M) で短時間 (15 分) 作用させると、よく水洗してから水を媒液としてマリモ細胞を凍らせたばあいは、著しく耐凍性が低下する。またこのとき細胞を凍らせずに原形質分離させただけでも、明らかな害がみとめられる。同じ前処理をした細胞をエチレングリコールまたはメタノールを媒液として凍結させると全く凍害がおこらない。また前処理後の細胞は CaCl_2 溶液 (0.1~1.0 M) 中におかれると、その耐凍性を徐々に恢復する。

これらの結果から、マリモ細胞のもつ耐凍性と凍害の機構に関して一連の解釈を試みた。

文 献

- 1) 照本 勲 1959 マリモの凍害と乾燥害. 低温科学, 生物篇, **17**, 1-7.
- 2) 照本 勲 1962 マリモ節間細胞の耐凍性 I. 低温科学, 生物篇, **20**, 1-24.

- 3) Fritsch, F. E. 1948 The Structure and Reproduction of the Algae, Volume I. University Press, Cambridge, 791pp.
- 4) Asahina, E. 1956 The freezing process of plant cell. *Cont. Inst. Low Temp. Sci.*, **10**, 83-126.
- 5) 照本 勲 1958 植物細胞の低温固定像について. 低温科学, 生物篇, **16**, 1-5.
- 6) Heilbrunn, L. V. 1952 An Outline of General Physiology, W. B. Saunders Co. Philadelphia and London, 818pp.
- 7) 照本 勲 1959 植物細胞の耐凍性に影響する媒液中の無機塩類の効果について. 低温科学, 生物篇, **17**, 9-19.
- 8) 照本 勲 1959 植物の耐凍性と Ca イオン. 科学, **29**, 256.
- 9) Paech, K., Wartiovaara, V., und R. Collander. 1956 Narkose und Narkotica. *Ency. Plant Physiol.*, **2**, 779-791.
- 10) Wiehelm, A. F. 1935. Studien über die Bedeutung der Lipoide, insbesondere der Posphatide, für die Frostresistenz der Pflanzen. *Phytopath. Zeit.*, **8**, 225-236.
- 11) Currier, H. B. 1956 Effects of toxic Compounds: stimulation, inhibition, injury, and death. *Ency. Plant Physiol.*, **2**, 792-825.
- 12) Levitt, J. 1958 Frost, Drought, and Heat Resistance, *Protoplasmatologia*, **VIII-6**. Springer-Verlag, Wien, 87pp.

Summary

The present paper deals with a series of experiments on the mechanism of frost-resistance in algae cells. Fresh water Cladophoraceae, *Aegagropila Sauteri* (Nees) Kütz., the well-known marimo (lake balls) of Lake Akan in Hokkaido, were used as experimental materials.

These marimo show an extraordinarily high frost-resistance for a fresh water alga. They can tolerate extracellular freezing at -20°C for at least 24 hours.

Cells of this alga were subjected to extracellular freezing in various media. With the exception of methanol and ethanol, the use of fat solvents fatally injured the cells. When the cells were previously treated for 24 hours in solutions of these fat solvents, even though they were thoroughly washed in pure water, subsequent freezing produced marked cellular injury. However, in the case of acetone, ether and chloroform washing was highly effective in reducing frost-injury caused by such pre-treatment. Methanol was the most effective as a protective agent. It is a hygroscopic neutral compound which easily penetrates these algae cells and it is also less toxic, even in highly concentrated solutions.

The various surfactants (cationic, anionic and nonionic) used produced fewer cellular injuries with freezing than did monovalent inorganic salts or sugars. However, when these cells were pretreated for 24 hours in solutions of these surfactants, they were very apt to suffer frost-injury even after having been washed in pure water.

Pre-treatment for a very short time in a dilute solution of Ca-precipitant, was also found to result in a remarkable reduction of frost-resistance in the cells. In addition, following pretreatment, some of the cells were fatally injured by plasmolysis alone in balanced salt solution. In cells previously treated with Ca-precipitant, methanol or ethylene glycol in solution was highly effective in preventing injury with freezing.

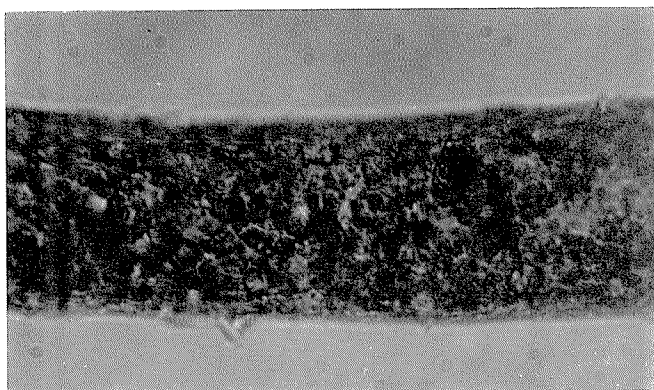
From the results briefly described above, frost-injury in cells of this alga seems to be mechanical which becomes fatal when contraction in the freezing cell has reached a certain

degree. Any agent which has a deleterious effect upon the cell surface, with or without apparent injury, lessens the critical degree of cell contraction. The affected cells are easily destroyed with freezing at temperatures at which there are no injuries to normal cells. On the other hand, a harmless compound such as methanol can protect cells against frost-injury, because by permeating the cell they lessen the degree of contraction at a given temperature.

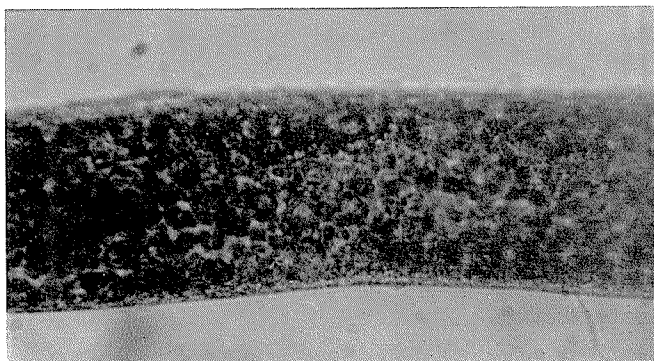
第 1 図 2 Mメタノール中での凍結。-18°C。ほとんど収縮せず，細胞内部も正常とかわらない。生存。 ×350

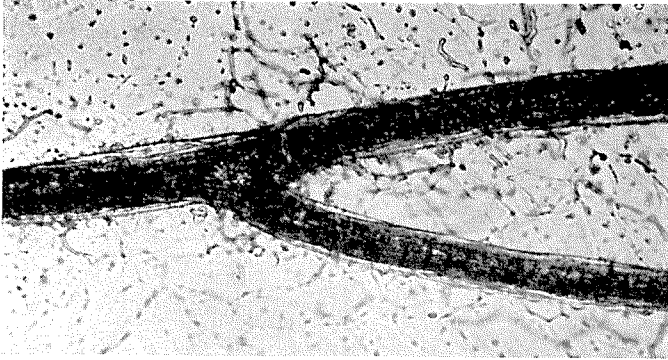


第 2 図 1 Mメタノール中で-15°Cで2時間凍結後低温固定。生存。 ×500

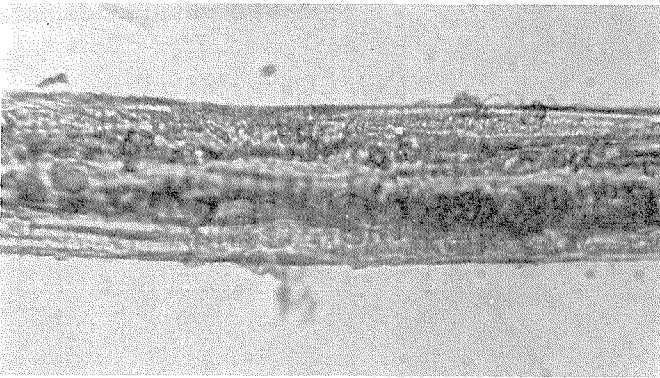


第 3 図 1 Mエタノール中で-15°Cで2時間凍結後低温固定。ほとんど脱水されていない。生存。 ×500

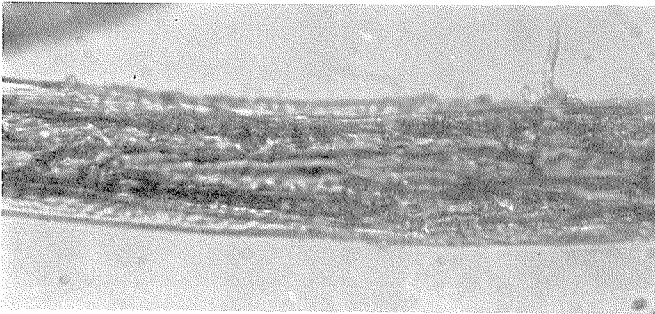




第4図 2 Mアセトン中での凍結。-17°C。凍死。×175



第5図 1 Mアセトン中、-15°Cで2時間凍結後低温固定。約50%の細胞は凍死する。×500

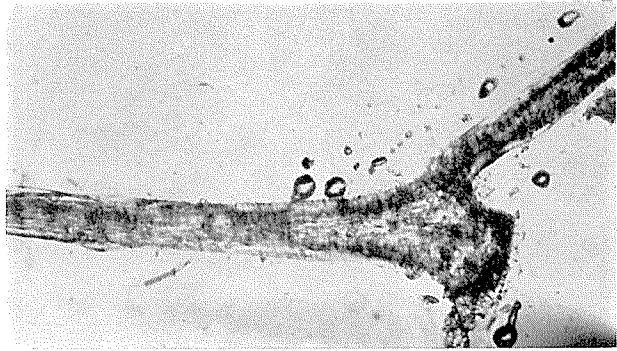


第6図 1 M iso-プロパノール中で-15°Cで2時間凍結後、低温固定。細胞は全部凍死する。×500

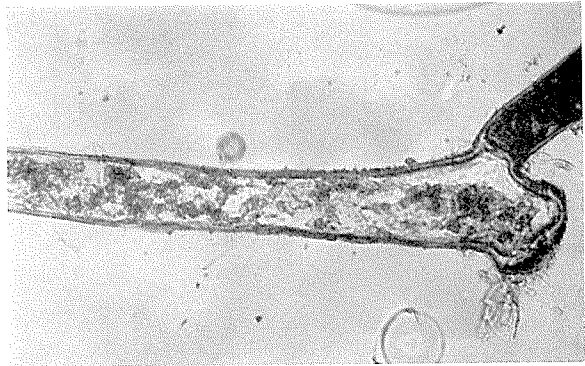


第7図 1 M tert-ブタノール中で-15°Cで2時間凍結後、低温固定。細胞は全部凍死する。×500

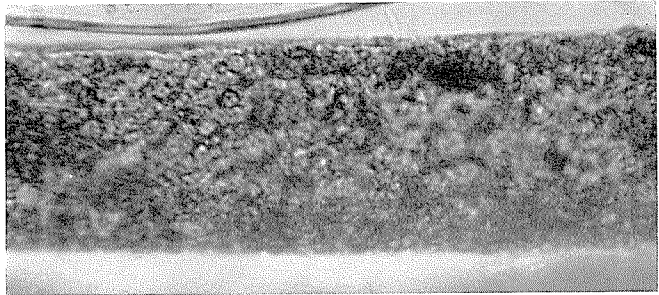
第8図 0.1 M n-ブタノール中の凍結。-16°C。はげしい収縮がおこる。 ×175



第9図 同上細胞。30分間の凍結後融解した直後の細胞，はげしい原形質崩壊をしめす。0°C。 ×175



第10図 1 M Ethyl "Cellosolve" 中で -15°C で2時間凍結後，低温固定。30%内外の細胞は生存できる。 ×500



第11図 0.1 M Na-oxalate で15分前処理後，水洗して凍結。-15°C。細胞のまわりに二次的な氷の発達が見られる。 ×350

