



# HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	マリモの呼吸と凍害
Author(s)	照本, 勲; TERUMOTO, Isao
Citation	低温科学. 生物篇, 23, 1-9
Issue Date	1965-12-01
Doc URL	<a href="https://hdl.handle.net/2115/17689">https://hdl.handle.net/2115/17689</a>
Type	departmental bulletin paper
File Information	23_p1-9.pdf



## マリモの呼吸と凍害\*

照 本 勲

(北大低温科学研究所 生物学部門)

(昭和40年7月受理)

### I. 緒 言

淡水産藻類のマリモの生理については、現在まで主に寒冷に対する抵抗性について研究されてきた<sup>1-4)</sup>。今回はマリモの呼吸の強度と、種々の糖を呼吸基質として加えた場合の呼吸量の増加、呼吸に及ぼす阻害剤の影響、凍死細胞に見られる呼吸量の著しい増加について報告する。

### II. 材料と方法

実験材料として淡水産藻類の一種であるマリモ *Aegagropila Sauteri* (Nees) Kütz. の糸状体を用いた。マリモは構造が簡単で、細胞が大きく、その上組織がこわれにくく、培養を続けることが比較的容易で、常時使用することができる。今回の実験に使用したマリモは、新しい水道水の中に室温(約20°C)並びに自然日光中で保存した。マリモは直径40~80 $\mu$ 、長さ直径の拾数倍の大きな節間細胞がー列にならび、いわゆる糸状体をなして、その糸状体が分枝し、それが更に発達して束状に発達する。今回はこの束状になったマリモを使用した。

呼吸量の測定にはワールブルグ検圧計を用いた。測定の際は、材料約1g(秤量にあたっては濾紙で速かに細胞表面の水分を取去る。乾燥量:約150mg)を5ccのM/30 燐酸塩緩衝溶液(pH 7.0)中に浮遊させた。呼吸実験中は、呼吸容器をアルミ箔で覆い光を遮断した。各実験の継続時間は60分乃至180分。温度は常に25°Cであった。呼吸係数は $Q_{O_2}$ (消費 $O_2$   $\mu$ l/mg/hr)であらわした。

なお実験材料としてマリモの他に次の植物を使用した。

アナアオサ	<i>Ulva pertusa</i> Kjellman
ウスバアオノリ	<i>Enteromorpha linza</i> (L.) J. Ag.
アオミドロ	<i>Spirogyra</i> sp.
オオカナダモ	<i>Elodea densa</i> Caspary
アカビート	<i>Beta vulgaris</i> L. var. <i>Rapa</i> Dumort

\* 北海道大学低温科学研究所業績 第728号

### III. 結 果

#### 1. 呼吸の強度

マリモに呼吸基質を外から与えない場合の呼吸の強度は、培養状態で多少変ってくる。呼吸の強度を  $Q_{O_2}$  で示すと 0.15~0.26 (実験時間: 180 分, 乾燥量: 117~178 mg) である。マリモを数日間暗室中に放置した後に呼吸を測定すると、細胞内の呼吸基質の欠乏のために  $Q_{O_2}$  の減少が見られる (対照  $Q_{O_2}$ : 0.24, 2 週間暗室処理  $Q_{O_2}$ : 0.08)。実験液の pH 値が 6.1~8.3 の範囲内では呼吸の強度は殆んど変化を示さなかった。

#### 2. 呼吸基質を与えた場合の呼吸

この実験は、糖類を外から与えた場合、マリモの呼吸が如何なる影響を受けるかをしらべる目的で行なった。一般に糖類は呼吸基質として最もすぐれ、呼吸作用の出発点では、最も広く呼吸の基質になりうる。その結果を第 1 表にあげた。

呼吸基質として通常最も有効であるブドウ糖を加えた場合、82.5% の呼吸促進がみられた。M/20 ブドウ糖を加えた場合の  $Q_{O_2}$  は 0.3 (対照実験, すなわちブドウ糖を与えない場合の  $Q_{O_2}$  は 0.165) である。ガラクトース, 蔗糖, 果糖等いずれも呼吸量の増加がみられた。次にマリモを予め 2 週間暗室処理して、本来もっている呼吸基質を欠乏せしめた材料について、M/20 ブドウ糖を外から与えてその影響をみたが、対照より 100% の呼吸促進がみられたが (ブドウ糖を加えた場合の  $Q_{O_2}$ : 0.16, 対照: 0.08), 対照の呼吸量は甚だ少ないことがわかる。

第 1 表 種々の糖類を媒液に加えた場合のマリモの呼吸

呼吸基質 (各 M/20)	呼吸促進度 (%)
対 照	—
ブ ド ウ 糖	82.5
果 糖	29
ガラクトース	73.5
蔗 糖	51.5

実験継続時間, 60 分; 乾燥量, 122-162 mg

#### 3. 呼吸に対する種々の阻害剤の影響

青酸: 緑色植物の呼吸に対する KCN の影響については現在まで種々なる結果が報告されている<sup>9)</sup>。マリモの呼吸に対する KCN の影響は第 2 表に明らかである。M/1,000 KCN によりマリモの呼吸は 68.7% 阻害され、暗室処理の材料では同濃度で 100% 阻害され、呼吸は完全に停止した。然し、この場合によく材料を洗滌し KCN をとりのぞいてやると徐々にマリモの呼吸は回復し正常に戻った。又、呼吸はブドウ糖の添加にかかわらず KCN を加えることで同程度阻害された。

第 2 表 マリモの呼吸に対する KCN の影響

培 養 条 件	$Q_{O_2}$		呼吸阻害度 (%)
	対 照	M/1,000 KCN	
明	0.27	0.09	68.7
暗 (1 週間)	0.10	0	100

実験継続時間, 180 分; 乾燥量, 133-190 mg

エチルウレタン：この阻害剤は主として脱水素酵素系に対し麻酔的に働くことにより呼吸に影響を与えるものである。マリモの呼吸は、1/100, 1/10, 1 M の各濃度のエチルウレタンを外から与えても呼吸に対する阻害作用は見られなかった。

ヒドロキシルアミン：NH<sub>2</sub>OH·HCl は濃度 M/1,000~M/10,000 の範囲に於いては、マリモの呼吸に対し何等影響を及ぼさなかった。しかし、M/100 NH<sub>2</sub>OH·HCl の場合 Q<sub>O<sub>2</sub></sub> : 0.09 (対照 : 0.21) と呼吸量が小さく、57.1% の呼吸阻害が見られた。

第3表 マリモの呼吸に対するメチレン青の影響

メチレン青の濃度	Q <sub>O<sub>2</sub></sub>
0	0.15
M/2,000	0.22
M/10,000	0.18

実験継続時間, 180 分; 乾燥量, 161-187 mg

#### 4. メチレン青の影響

*Chlorella*, *Ulva* 及び *Enteromorpha* 等の藻類の呼吸は、濃度 M/2,000~M/5,000 のメチレン青を与えると著しく促進される<sup>6)</sup>。実験結果は第3表にあらわした。表から明らかかなようにマリモの呼吸は、メチレン青の添加によって呼吸が促進されることが明らかとなった。

#### 5. 凍結融解後の呼吸量の変化

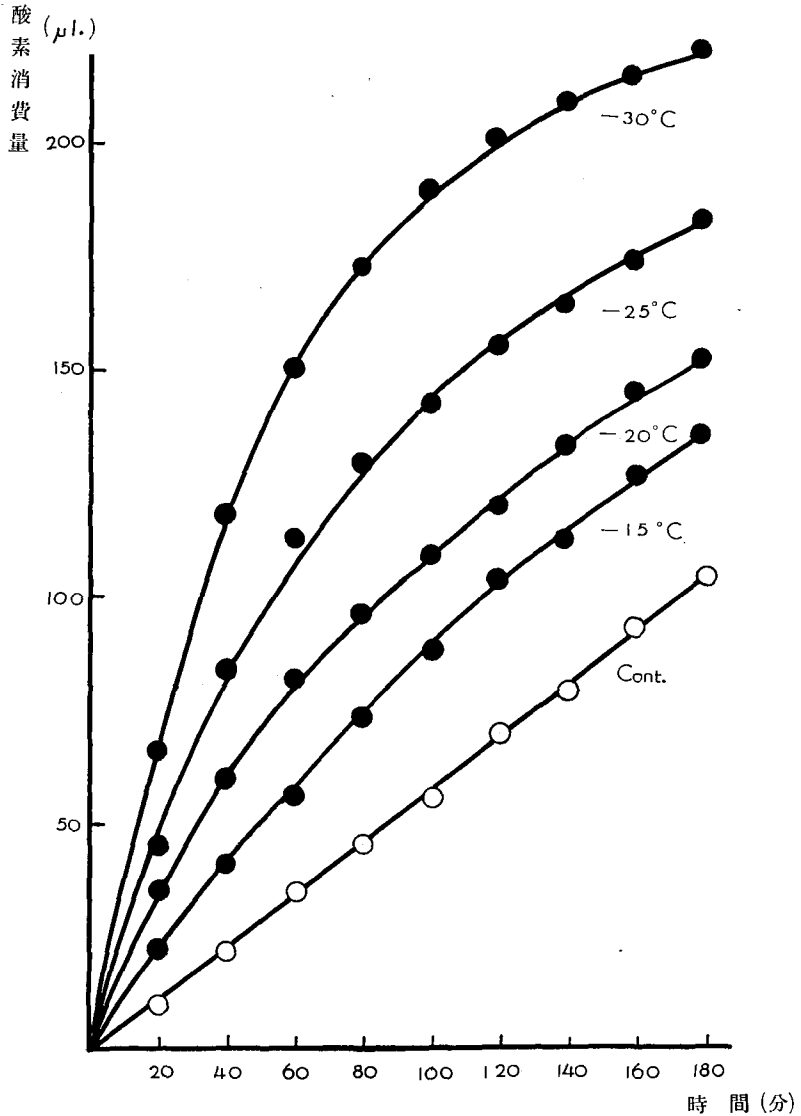
マリモは淡水産藻類としてはその耐凍性がきわめて高く、淡水とともに凍らせると、1日以内ならば -20°C に達する低温での細胞外凍結にも耐えることができる<sup>1-4)</sup>。氷点下の温度に24時間凍結し、融解後直ちにマリモの呼吸をはかると温度が低い程、呼吸量が大きく、それは凍死率に平行関係があることがわかる。その結果は第4表に明らかである。その時間的な関

第4表 マリモの凍結後の生存率と呼吸量

凍結温度	生存率 (%)	Q <sub>O<sub>2</sub></sub>		
		1時間目	2時間目	3時間目
対照	100	0.24	0.21	0.23
-15	80	0.40	0.27	0.21
-20	70	0.54	0.29	0.18
-25	35	0.74	0.28	0.17
-30	0	0.97	0.33	0.12

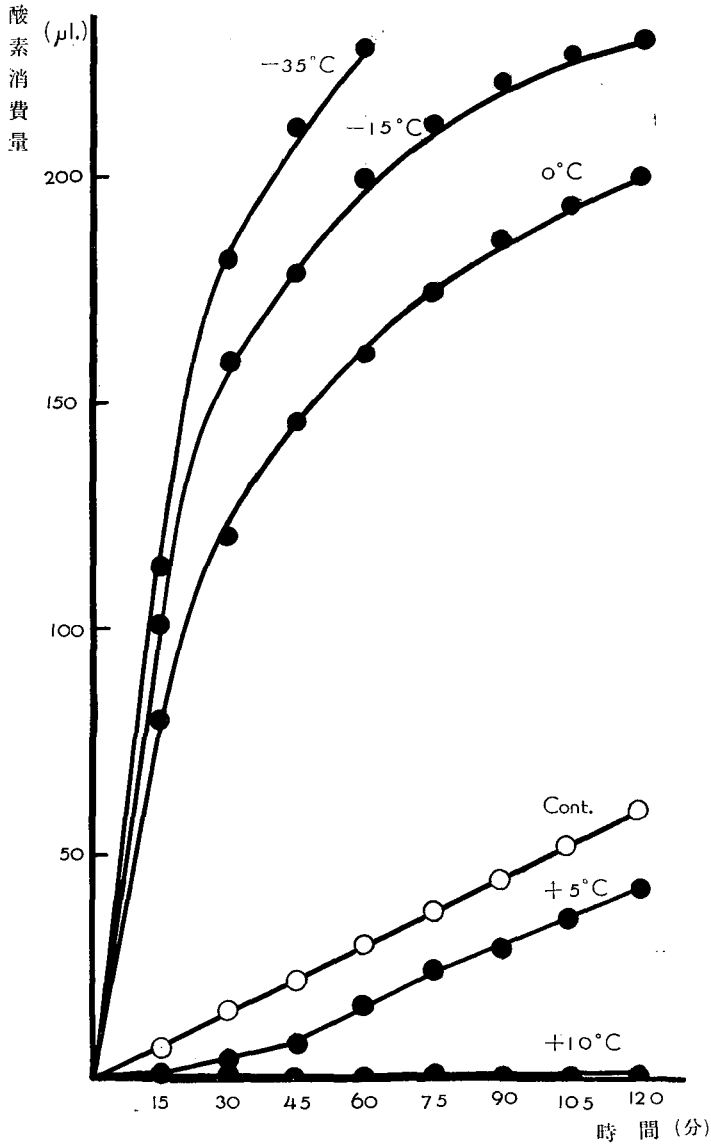
各24時間凍結; 乾燥量, 155 mg

係は第1図にあらわした。-30°C 凍結処理ではマリモ細胞は100%凍死しており、最初対照にくらべ4倍も大きい呼吸量を示したが、時間とともに徐々に低下して、3時間たつと呼吸量は対照の約1/2になる。-15°C で凍結したマリモは、約20%の凍死細胞を含み(図版I-1, 2, 3), 最初呼吸は増大するが、やがて呼吸速度は対照に近づいてくる。この呼吸の融解後の著しい増大は、凍結による細胞の破壊によっておこるが、この呼吸の活性も時間の経過とともに衰退していくことがわかる。次に-35°C で24時間凍結し、完全にマリモ細胞を凍死させた材料を、-35°C, -15°C, 0°C, +5°C, +10°C の各温度に24時間放置してから直ちに室温で呼吸をはかった結果を第2図にあげた。



第1図 マリモの呼吸に及ぼす凍結の影響 (各24時間凍結)  
(乾燥量, 155 mg)

凍死によって細胞の原形質膜の半透性を失なったマリモの呼吸活性は、完全なマリモにくらべて非常に増大するが、凍死後の保存温度によってその呼吸量はいちぢるしく影響されることがわかる。0°C以下で保存された場合、温度が高い程その呼吸量は減少するが、0°C以上の温度に保存された場合特にその影響が大きい。+10°Cの保存温度の場合には24時間後殆んど全く呼吸量を失なった。次に室温でマリモ細胞を乳鉢で磨砕してホモジェネートをつくり、直ちにその呼吸をはかると、完全な細胞の呼吸量の約6倍もの呼吸量の増大があり、時間とともに



第2図 -35°C, 24時間凍結した材料の, 呼吸に及ぼす保存温度 (各24時間放置) の影響 測定は加温後25°C度で行なう (乾燥量, 141 mg)

に徐々に小さくなった。

### 6. 種々の植物の凍結融解後の呼吸

凍結による細胞破壊により, 極めて著しい呼吸量の増大がマリモ細胞でみられたが, 他の藻類や高等植物で, 凍結融解後の呼吸量はどうかを明らかにする目的でこの実験を行なった。この結果は第5表にあらわした。この場合の凍結温度と時間は, これらの植物が完全

凍死をおこす条件であるが<sup>7-10)</sup>、藻類では凍死によって共に呼吸量は小さくなり、高等植物で呼吸量は対照にくらべて増加しているが、マリモの場合程大きな呼吸量の増大を示したものはなかった。

第5表 種々の植物の凍結融解後の呼吸量

種 類	凍 結 条 件	Q <sub>O<sub>2</sub></sub>	
		対照 (未凍結)	凍 結
ア ナ ア オ サ	-20°C, 24時間	1.98	0.44
ウスバアオノリ	-70°C, 24時間	2.08	1.23
ア オ ミ ド ロ	-15°C, 24時間	1.32	0.70
オオカナダモ (葉)	-15°C, 3時間	1.00	2.55
" (茎)	"	0.90	0.63
アカビート (葉)	-15°C, 3時間	1.74	2.30
" (葉柄)	"	1.34	2.16

実験継続時間, 1時間; 生重量, 各1g

#### IV. 考 察

呼吸の強度は、その植物の生育中の色々な培養条件の差異によって多少の変動がある。又一個体でも同一個体の一部でも生長が盛んであり、種々の生理機能の盛んな部分では呼吸が著しい<sup>11,12)</sup>。この点、本実験材料のマリモの呼吸量は非常に小さい。何等呼吸基質を外から与えない場合のマリモの呼吸は、他の藻類にくらべて約10分の1<sup>5,6)</sup>、沈水性藓苔類にくらべ約5分の1<sup>13)</sup>で呼吸の強度としては他のものにくらべて小さい。一般に緑色植物の呼吸の際消費される物質として知られているものは多いが、呼吸基質として適当なものは多くは炭素源として良好である<sup>14)</sup>。中でも糖類は呼吸基質として最も優れている。呼吸作用の出発点では、糖或いはこれに関係ある物質が、最も広く呼吸の基質になりうる。呼吸基質として通常最も有効であるブドウ糖を加えると呼吸量は82.5%の増加が見られた。次いでガラクトース、蔗糖、果糖の順で呼吸促進が見られた。水生藓苔類の呼吸に対する糖類等の影響を見た報告にも、ガラクトースがブドウ糖とほぼ等しい呼吸促進作用のあることをみているが<sup>13)</sup>、第1表で明らかなようにマリモの呼吸の際にも、ブドウ糖について良き呼吸基質となっている。マリモを暗室に放置すると、呼吸は著しく減少するが、植物体中の呼吸物質を予め欠乏せしめた材料について、呼吸基質を外から与えてその影響をみたが、ほとんど同じ利用率であった。然し、種々の海藻では炭水化物、高級アルコールを呼吸基質として利用しえない<sup>15)</sup>。

マリモの呼吸に及ぼす阻害剤の作用として青酸、エチルウレタン、ヒドロキシルアミンの影響をみた。青酸及びエチルウレタンはチトクローム系並に脱水素酵素系に対する阻害剤である。*Chlorella* など藻類の呼吸は、低濃度の青酸によって却って促進されることが報告されている。*Chlorella* では、ブドウ糖を与えることにより、促進された呼吸のみが青酸によって阻害をうけるのであって、外から何も呼吸基質を与えない場合の呼吸は青酸で阻害されないとい

う<sup>6)</sup>。マリモの呼吸は第2表に明らかなように、M/1,000 KCNにより68.7%の阻害をうける。暗室処理したマリモの呼吸は、この濃度で完全に阻害された。青酸はチトクロームCオキシダーゼに対して最も良く阻害があらわれるが、この阻害もよく洗滌して青酸を除くと徐々に呼吸は回復した。ブドウ糖の添加にかかわらずマリモの呼吸は青酸を加えることで阻害された。次に脱水素酵素系に対し麻酔的に働くことで、細胞の酸素吸収に影響を及ぼすエチルウレタンを与えても、マリモの呼吸は阻害されなかった。カタラーゼの阻害剤としての、ヒドロキシルアミンによるマリモの呼吸は、M/100の場合57.1%の阻害が見られた。*Chlorella*, *Ulva* 及び *Enteromorpha* 等の藻類の呼吸はメチレン青を与えることで促進されるが<sup>9)</sup>、マリモの呼吸でもM/2,000~M/10,000の範囲で与えた場合、20~43.3%の呼吸促進がみられた。

マリモを凍結し融解して直ちに呼吸を測定すると極めて著しい呼吸の増大がみられ、その呼吸量の促進は徐々に減少し、数時間後に呼吸は停止する。この呼吸の増大は凍死率と平行関係にある。細胞が凍死することにより原形質及び原形質膜は破壊し、細胞内の全呼吸酵素がなんの障碍もなしに酸化される状態になるからであろう。すなわち基質と酵素との接触がきわめて容易になったといえる。呼吸の増大は、乳鉢で磨碎して機械的に細胞膜を破壊したホモジェネートでも凍結の場合と同程度におこることが認められた。

+10°Cで24時間凍死細胞を保存した時に、殆んど全く呼吸量は失われるが、これは自己分解や熱による酵素の不活性化のためであろう。これと同じ現象は大腸菌の凍結融解でも認められ、生菌数が減少するにもかかわらず、かえって酸素消費量が増大するということが報告されている<sup>16)</sup>。又、ムラサキウマゴヤシ、コムギ、ニセアカシヤでも凍死率の増加と自営呼吸(endogenous respiration)の低下とが相関することを報告しているが、この場合も凍結融解後3°Cで1~2日以上も材料を放置した後に呼吸を測定しているので<sup>17,18)</sup>、マリモでの結果のように凍結融解後の呼吸の変化は見られなかったのであろう。マリモの他、色々の植物が凍結によって凍死した細胞の融解後の呼吸の変化をしらべたが、マリモ程対照にくらべて大きな呼吸の増加を示したものはなかった(第5表)。

マリモ細胞の原形質は、凍結の場合のように細胞外凍結による脱水と収縮に対し或る程度まで耐えられる特殊な構造を本来から持っている<sup>3,4)</sup>。このような原形質の性質のためか、マリモでは常態の細胞としての呼吸の強度は割合に小さい。しかし一たん原形質破壊がおこると前記の理由によって細胞内呼吸酵素の活性は急に高まり、対照にくらべて著しい呼吸量の増大がおこったものと思う。

## 摘 要

阿寒湖に生育する淡水産緑藻のマリモ *Aegagropila Sauteri* (Nees) Kütz. の糸状体を用いて、ワールブルグ検圧計により呼吸を測定した。呼吸の強さは、M/30 磷酸塩緩衝溶液(pH=7.0)中で  $Q_{O_2}$  0.15~0.26の範囲であり、中性付近のpHの多少の変化は呼吸に影響がなかった。然し予め暗室中で飢餓の状態にしたものの呼吸の強さは、対照にくらべて約1/3に減少した。呼吸基質として糖類を与えた場合の影響は、ブドウ糖、ガラクトース、蔗糖、果糖の順に呼吸

促進を示した。青酸は常に阻害的に働き、暗室処理のマリモは M/1,000 の青酸で完全に呼吸が阻害された。エチルウレタンによりマリモの呼吸は阻害されなかったが、M/100 ヒドロキシルアミンにより呼吸阻害が見られた。又、メチレン青を与えるとマリモの呼吸は著しく促進された。

マリモは淡水産藻類としてはその耐凍性がきわめて高いが、 $-30^{\circ}\text{C}$  で 24 時間凍結して完全に凍死したマリモの呼吸量は、対照にくらべ非常に増大した。そして数時間後その呼吸は徐々に停止した。この呼吸の強さは凍死率に比例した。然しこのように凍結融解したマリモも  $+10^{\circ}\text{C}$  で 24 時間放置することによってその呼吸量は殆んど全く失われた。同時に他の種々の植物の凍結融解後の呼吸の強さを比較したが、マリモの場合ほど対照にくらべて大きな呼吸量の増加を示したものはなかった。この理由のひとつは、マリモの細胞は常態で非常に低い呼吸量を示すからである。このような細胞の凍死による呼吸量の急増は、原形質構造の崩壊により細胞内呼吸酵素と基質とが接触しやすくなり、従つてその活性が急に高まったためと思われる。

終りに、御校閲をいただいた朝比奈英三教授、並びに実験材料を御恵与下さった理学部山田幸男名誉教授に深く感謝する。

#### 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 1960 マリモの凍害に対する凍害防止剤の効果について. 低温科学, 生物篇, **18**, 43-50.
- 3) 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.
- 4) 照本 勲 1964 マリモ節間細胞の耐凍性 II. 低温科学, 生物篇, **22**, 1-17.
- 5) Gibbs, M. 1962 Respiration. *In* Physiology and Biochemistry of Algae, (R. A. Lewin ed.) Academic Press, New York and London, 493-528.
- 6) Watanabe, A. 1933 Über die Beeinflussung der Atmung von einigen grünen Algen durch Kaliumcyanid und Methylenblau. Beiträge zur Stoffwechselfysiologie der Algen I., *Acta Phytochim.*, **6**, 315-335.
- 7) 照本 勲 1960 アナアオサの耐凍性. 低温科学, 生物篇, **18**, 35-38.
- 8) 照本 勲 1964 冬の潮間帯に生育する海藻の耐凍性. 低温科学, 生物篇, **22**, 19-28.
- 9) 照本 勲 1958 藻類の凍死. 藻類, **6**, 99-106.
- 10) 照本 勲 1958 植物の耐凍性と滲透濃度. 低温科学, 生物篇, **16**, 7-21.
- 11) Blinks, L. R. 1951 Physiology and biochemistry of algae. *In* Manual of Phycology, (G. M. Smith, ed.) Chronica Botanica Co., Waltham, 263-291.
- 12) Krauss, R. W. 1958 Physiology of the fresh-water algae. *Ann. Rev. Plant physiol.*, **9**, 207-244.
- 13) 宇佐美正一郎 1937 水生蘇苔類の呼吸及び炭酸同化作用に就いて. 植物学雑誌, **51**, 372-379.
- 14) 坂村 徹 1958 植物生理学, 上巻, 裳華房, 東京, 1015 pp.
- 15) Watanabe, A. 1937 Untersuchungen über die Substrate für Sauerstoffatmung von Süßwasser- und Meeres-algen. Beiträge zur Stoffwechselfysiologie der Algen II., *Acta phytochim.*, **9**, 235-254.
- 16) 大原吉輝 1954 凍結融解の細菌呼吸に及ぼす影響の機序について. 低温科学, 生物篇, **12**, 1-37.
- 17) Siminovitch, D., Therrien, H., Wilner, J. and Gfeller, F. 1962 The release of amino acids and other ninhydrin-reacting substances from plant cells after injury by freezing; a sensitive criterion for the estimation of frost injury in plant tissues. *Can. J. Botany*, **40**, 1267-1269.

- 18) Siminovitch, D., Therrien, D. H., Gfeller, F. and Rheaume, B. 1964 The quantitative estimation of frost injury and resistance in black locust, alfalfa, and wheat tissues by determination of amino acids and other ninhydrin-reacting substances released after thawing. *Can. J. Botany*, **42**, 637-649.

### Summary

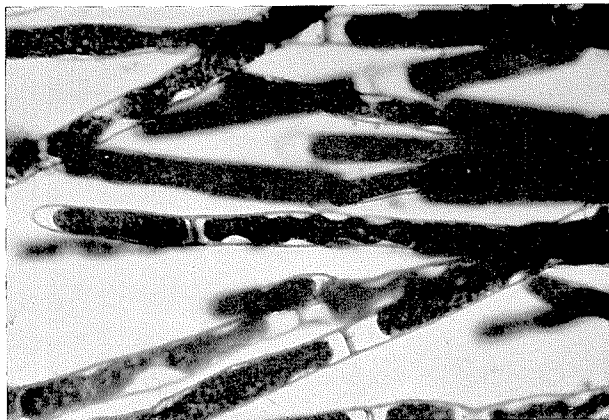
Oxygen uptake of a fresh water Cladophoraceae, *Aegagropila Sauteri* (Nees) Kütz., the well-known marimo (lake balls), was measured manometrically with Warburg apparatus at 25°C. The rate of endogenous metabolism of the cell of this alga is extremely low and  $Q_{O_2}$  was about 0.15-0.26. The respiratory activity was not affected by the change of pH in the range near neutrality. The rate of endogenous metabolism was accelerated by  $M/20$  sugar solution as substrate. The respiratory activity of this alga was inhibited by  $M/1000$  cyanide and  $M/100$  hydroxylamine, while 1 M ethylurethane had no effect. Methylene blue increased respiratory activity of this alga.

Lake balls show an extraordinarily high frost-resistance for a fresh water alga. However, freezing of this alga at temperatures below  $-30^{\circ}\text{C}$  results in fatal injury to the cells. It was noted that respiratory activity of the freeze-thawed cells apparently increased in spite of the increase in frost-injury. Maximum increase of respiratory activity was found in perfectly killed material. After a few hours, respiratory activity which was accelerated by freeze-thawing, gradually decreased. Typical results are shown in Fig. 1. A parallelism was found between the increase of respiratory activity and the proportion of killed cells in the freeze-thawed material. The respiratory activity of the killed cells was almost completely lost after 24 hours at  $10^{\circ}\text{C}$ . Fig. 2 shows such decrease in respiratory activity. Various plants were examined by the same method. The increase of respiratory activity by frost killing in these plants was less than that in the lake ball.

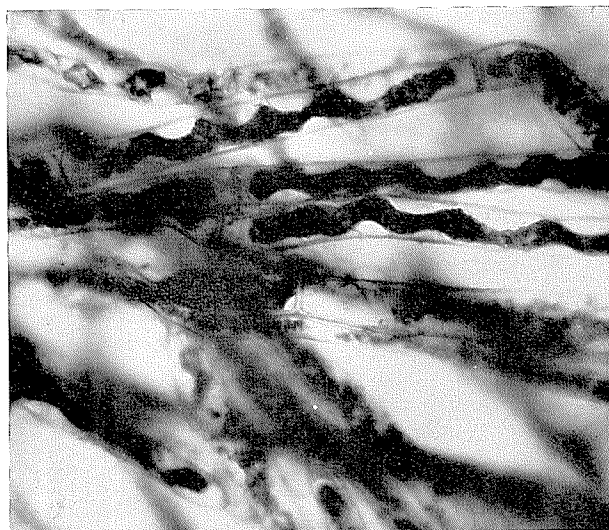
It seems that the increase of oxygen uptake of the frozen-dead cells is the result of the destruction of protoplasmic structure which cause an abrupt rise of intracellular respiratory activity.



1. 対照。1 M 平衡塩溶液で原形質分離させた状態。 ×110



2.  $-15^{\circ}$ , 24 時間凍結融解細胞。  
1 M 平衡塩溶液で約80%の細胞  
が原形質分離している。 ×110



3.  $-30^{\circ}$ , 24 時間凍結融解細胞。  
1 M 平衡塩溶液で原形質分離する  
細胞は殆どない。 ×110

