HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	植物の耐凍性に関する研究　II ： ニセアカシア靱皮組織の燐脂質の季節的変動
Author(s)	吉田, 静夫
Citation	低温科學. 生物篇, 27, 119-123
Issue Date	1970-02-20
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/17758
Type	departmental bulletin paper
File Information	27_p119-123.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

Shizuo YOSHIDA 1969 Studies on the Freezing Resistance in Plants. II. Seasonal Changes of Phospholipids in the Bark Tissues of Black Locust Tree. *Low Temperature Science, Ser.* ***B, 27.*** (With English Summary p. 123)

植物の耐凍性に関する研究 II*

ニセアカシア靱皮組織の燐脂質の季節的変動

吉田静夫
(低温科学研究所)

(昭和44年9月受理)

I. 緒　　言

前報[1]において報告したように，ニセアカシア靱皮組織において生体膜に関連の深い糖脂質が，季節的にも人工的な低温処理中にも耐凍度の変化につれて大きく変動することを明らかにした。

本報では生体膜に関連の深い燐脂質をとりあげ，その季節的変動を前報[1]と同じくニセアカシア靱皮組織を使って調べた。その結果個々の燐脂質が季節的に大きく変動するだけでなく，人工的な低温処理中にも興味ある変動が認められた。

II. 材料と方法

前報[1]と同じニセアカシアの靱皮組織を乾燥重量で4.2 g相当を秤量し，20 mlのn-プロパノールと少量の海砂を入れて室温で磨砕した。これを100 mlのクロロホルム：メタノール(2：1 v/v)で3回室温で抽出した。ついでFolch法により非脂質成分を除き，クロロホルム層は無水硫酸ナトリウムで脱水乾燥して溶媒を溜去し3 mlのクロロホルムに溶かした。

燐脂質のケイ酸カラムクロマトグラフ： 上記のクロロホルム溶液を1×6 cmのケイ酸カラムに吸着させ，Haverkate and Deenenの方法[2]を一部改良してクロロホルム中のメタノールの量を2, 4, 8, 20および50%と段階的に増しながら順次溶出した(第1図を参照)。溶出液は5 mlずつ集めその0.2 mlを燐の定量にあてた。ケイ酸(Mallinckrodt製100メッシュ)は使用前に105°Cで2時間活性化した。溶出速度は0.6～0.8 ml/分であった。

燐の定量： 燐はMarrinetii[3]の方法を次のように改良して定量した。すなわち試料中の溶媒を溜去後0.5 mlの60%過塩素酸を加え175～185°Cで45分間加熱分解して放冷後，3.0 mlの水，0.5 mlの2.5%モリブデン酸アンモニウム，ついで0.2 mlのFiske-SubbaRow試薬を加えて混和後100°Cで7分間加熱した。放冷後700 mμで比色定量した。この方法は吸光度の経時変化が極めて小さく再現性が良好であった。無機燐5 μgの吸光度は日立分光光度計139型，光路10 mmで0.420，最適測定濃度は1～15 μgであった。

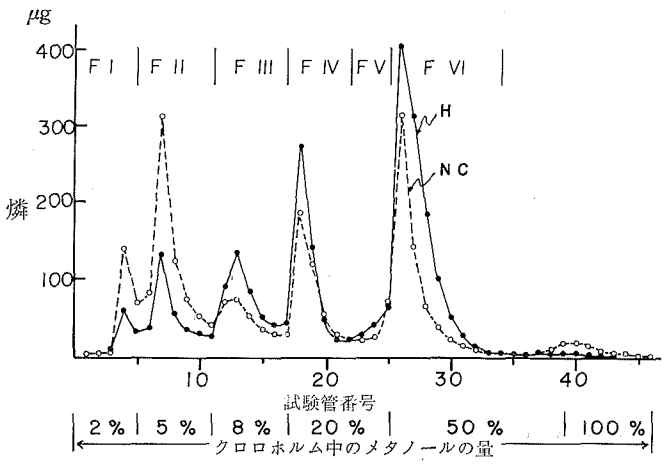
本文では次の略号を用いた。PA, ホスファチジン酸；DPG, ジホスファチジルグリセロー

* 北海道大学低温科学研究所業績　第1010号

ル；PG, ホスファチジルグリセロール；PE, ホスファチジルエタノールアミン；PC, ホスファチジルコリン；PI, ホスファチジルイノシトール。

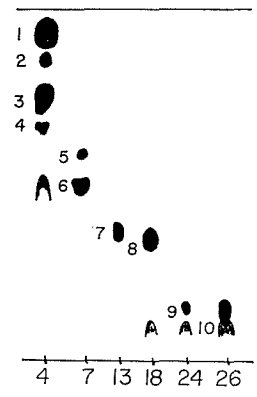
III. 結　果

10月28日の低温処理前後の材料について代表的なケイ酸カラムクロマトグラムを第1図に示した。おのおののピークについて，シリカゲルGのプレートで薄層クロマトグラフィーを行ないいろいろな試薬を用いて定性した。その結果を第2図および第1表に示す。



第1図　燐脂質のケイ酸カラムクロマトグラム

材料：10月28日のニセアカシア靱皮組織．乾燥重量で4.2g使用
破線(NC)は対照，実線(H)は0°Cで2週間低温処理．FI-FVIは分画I～分画VIを表わす．詳細は本文参照



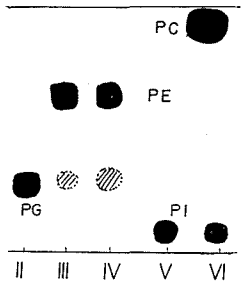
第2図　第1図の各分画の薄層クロマトグラム
プレート：シリカゲルG
展開溶媒：クロロホルム-メタノール-水 (65 : 25 : 4 v/v)
発色試薬：Hanes-Isherwood 試薬
1, 色素および中性脂質；2, DPG；3, PA；4, 5, 未同定；6, PG；7, 未同定；8, PE；9, PC；10, PI

第1表　第2図の各スポットの定性試験

分画*	スポット番号*	定性試験** A	B	C	D	E	推定された物質名
I	1	−	−	−	−	−	色素・中性脂質
	2	+	−	−	−	−	DPG
	3	+	−	−	−	−	PA
	4	+	−	−	−	−	?
II	5	+	−	−	−	−	?
	6	+	∓	−	−	−	PG
III	7	+	∓	+	±	−	?
IV	8	+	∓	+	±	−	PE
V-VI	9	+	+	±	±	−	PC
	10	+	−	−	−	+	PI

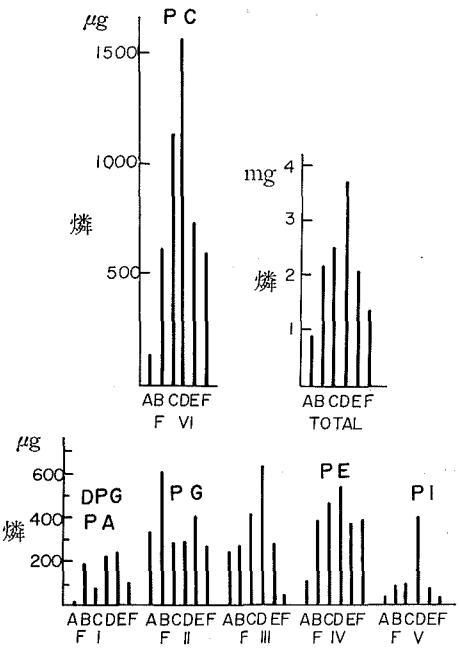
*　第1図および第2図におなじ
**　A, Hanes-Isherwood；B, Dragendorff；C, ニンヒドリン；D, ジフェニルヒドラジン一塩酸；E, アンモニア性硝酸銀．略号は本文参照

分画 III と分画 IV はケイ酸カラムクロマトグラムの溶出位置からそれぞれホスファチジルセリンと PE に相当するのであるが，スポット 7 (分画 III) とスポット 8 (分画 IV) は薄層クロマトグラム上の位置関係が類似し，両者ともニンヒドリンに陽性であった。なお，これらをシリカゲルGのプレートにスポットしてクロロホルム—メタノール—28% アンモニア (65:35:5 v/v) で展開してもほとんど同じ Rf 値を示した。この事実から分画 III はホスファチジルセリンではないと考えられる。第 1 表に示した推定をさらに確かめるために，Dawson 法[4] による各分画の部分水解物を，セルローズプレート (Avisel SF) にスポットして，フェノール—水 (3:1 v/v) で展開した。第 3 図に示したように，分画 II, IV, V および VI は定性試薬に対する反応と相対的位置からそれぞれ PG, PE, PI および PC であることが確められた。しかし，分画 III の水解物は PE のそれと Rf 値が等しくニンヒドリンに陽性であった。この事実から，分画 III は構造上 PE に近いことが推察されるが今のところ不明である。



第 3 図　第 1 図の各分画の部分的水解物の薄層クロマトグラフ
プレート：　Avisel SF (セルローズ粉末)
展開溶媒：　フェノール—水 (3:1 v/v)
発色試薬：　Hanes-Isherwood 試薬を噴霧して紫外線を照射
II～VI は第 1 図の分画番号に相当
図中の略号は本文参照

各分画について定量した結果を第 4 図にまとめて示した。燐脂質の総量は秋から冬にかけて増加し，逆に冬から春にかけて減少した。これを各分画についてみると燐脂質の総量の変動に最も大きく関与しているのは PC であり，未同定の分画 III および PE がこれについで大きい。10 月 28 日頃には PG の増加が著しくこの時期がニセアカシアの落葉期であることと関連して興味が持たれる。この時期に 0°C で 2 週間人工的に低温処理すると PG が減少して PC, PE そして未同定の分画 III が増加した。このことは低温下において PG が PC, PE および分画 III へと移行する可能性が考えられる。つまり低温処理後の燐脂質の変動は燐脂質全体の増加よりも個々の燐脂質の組成上の変化，ことに PC の著しい増加が主役をなしていた。なお PI は真冬には著しく増加するが，それ以外の時期においては量的に少ない。



第 4 図　いろいろな時期における燐脂質の各分画の定量結果
FI～FVI は第 1 図に同じで TOTAL は各分画の合計を表わす
A：10 月 1 日，B：10 月 28 日対照，C：10 月 28 日低温処理後，D：1 月 21 日，E：5 月 9 日，F：6 月 16 日の各材料 (乾重量で 4.2 g)

IV. 考　　察

低温下において燐脂質の合成が活発に行なわれることは微生物についても知られている。奥村[5]は *Escherichia Coli* B. を 37°C から 10°C に移したとき，PE と PG が増加し，しかも構成脂肪酸の不飽和化が同時に起ることを明らかにした。

落葉期をすぎた樹木は気温の低下につれて，低温環境に順応する方向に体制をととのえるものと思われる。燐脂質の変動は，前報[1]において明らかにした糖脂質の変動とならんで低温環境に対する順応現象の一つと云えるかも知れない。これらの脂質は細胞の生体膜との関連が強く，その量的ならびに構成上の変動は究極的には生体膜の機能と物理的性質に反映されるであろう。

ニセアカシア靱皮組織の燐脂質の変動において特筆すべきことは，落葉期の 10 月 28 日頃に PG が一時的に増加することである。この時期に低温処理すると PG が減少して PE，PC および分画 III へ移行することから，PG は一種の先駆物質的な役割が推察される。そしてこの移行に関して Dawson[6] が提唱したホスホリパーゼ D のホスファチジルトランスフェラーゼ活性が考えられる。また Ferrari と Benson[7] らは光合成における燐脂質の合成経路を調べ，初期段階で合成された PG のホスファチジル基が PI へ急速に移行し，ついで PC や PE へと移行することを観察している。

最近，Siminovitch ら[8]はニセアカシア靱皮部の全燐脂質が耐凍性と平行して増加することを明らかにし，このことは生体膜の実質的増加によるとのべている。しかし，まえにのべたように秋に人工的に低温処理 (0°C 2 週間) すると燐脂質全量の増加よりもむしろ PG から PC, PE および分画 III への移行が顕著であった。このことは耐凍性の変動に対して燐脂質総量の変化だけでなく構成上の変化が密接に関連していることを示唆しているものと考えられる。

微生物[5,9]や高等植物[10,11]が低温下におかれると脂肪酸の不飽和度が高まることが知られている。生体膜を構成している脂質の脂肪酸に不飽和結合が導入されると生体膜全体としての性質は相当影響されると考えられる。この点に関しては別の機会に報告したい。

この報告にあたり御指導下さった酒井教授と匂坂助教授に感謝します。

V. 摘　　要

ニセアカシアの靱皮組織をつかって燐脂質の季節的な変動をしらべた。その結果，全燐脂質量は耐凍性と平行して変動しその季節的周期性が明らかになった。一方，個々の燐脂質についてみると秋から冬にかけてホスファチジルコリン，ホスファチジルエタノールアミンおよび未同定の分画 III が著しく増加し，冬から春にかけてその逆の経過をたどった。10 月 28 日頃 (落葉開始時期) に一時的に増加したホスファチジルグリセロールは，人工的な低温処理あるいはそれ以降の季節的経過につれて減少しホスファチジルコリン，ホスファチジルエタノールアミンおよび未同定の分画 III が増加した。

これらの事実は前報[1]の結果と同様に，耐凍性の変動につれて生体膜の脂質構成が変化することを裏付けるものと思われる。

文　　献

1) 吉田静夫 1969 植物の耐凍性に関する研究 I. ニセアカシア靱皮組織の糖脂質の季節的変動. 低温科学, 生物篇, **27**, 109-117.
2) Haverkate, F. and Van Deenen, L. L. M. 1965 Isolation and chemical characterization of phosphatidyl glycerol from spinach leaves. *Biochim. Biophys. Acta.* **106**, 78-92.
3) Marinetii, G. V. 1962 Chromatographic separation, identification and analysis of phosphatides. *J. Lipid Research*, **3**, 1-12.
4) Dawson, R. M. C. 1960 A hydrolytic procedure for the identification and estimation of individual phospholipids in biological samples. *Biochem. J.*, **75**, 45-53.
5) Okumura, H. 1969 Phospholipid metabolism in *Escherichia coli* after a shift in temperature. *Biochim. Biophys. Acta*, **176**, 125-134.
6) Dawson, R. M. C. 1967 The formation of phosphatidyl glycerol and other phospholipids by the transferase activity of phopholipase D. *Biochem. J.*, **102**, 205-210.
7) Ferrari, R. A. and Benson, A. A. 1961 The path of carbon in photosynthesis of the lipids. *Arch. Biochem. Biophys.*, **93**, 185-192.
8) Siminovitch, D., Pheaume, B., Pomeroy, K. and Lepage, M. 1968 Phospholipid, protein and membrane structures associated with development of extreme freezing resistance in black locust tree cells. *Cryobiology*, **5**, 202-225.
9) Fulco, A. J. 1967 The effect of temperature on the formation of Δ^5-unsaturated fatty acids by Bacilli. *Biochim. Biophys. Acta*, **144**, 701-703.
10) Gerloff, E. D., Richardson, T. and Stahman, M. A. 1966 Changes in fatty acids of alfalfa roots during cold hardening. *Plant physiol.*, **41**, 1280-1284.
11) Haris, P. and James, A. T. 1966 The effect of low temperature on Fatty acid biosynthesis in plant. *Biochem. J.*, **112**, 325-330.

Summary

The present paper is concerned with the seasonal changes in phospholipids in bark tissues of black locust tree.

Phospholipids were fractionated into 6 components using column chromatography on silicic acid. They were identified as PA, phosphatidic acid and DPG, diphosphatidylglycerol (fraction I); PG, phosphatidylglycerol (fraction II); PE, phosphatidylethanolamine (fraction IV); PI, phosphatidylinisitol (fraction V); PC, phosphatidylcholine (fraction VI); and an unidentified component (fraction III), respectively. PE, PC, and fraction III increased markedly from autumn to winter and then decreased toward spring with the variation in freezing resistance. However, PG accumulated in late autumn seems to be transformed to PE, PC and an unidentified component (fraction III) under the conditions of artificial and natural hardening processes.

These facts together with the results on glycolipids seem to suggest that some changes in membrane components take place with the variation in freezing resistance.

低温科学生物篇　第27輯　訂正

頁	行		誤	正
11	英文タイトル	1	Freeze Drying	Freeze-Drying
15	下から	2	無糖	庶糖
45	上から	6	4	6
64	下から	10	4	6
78	下から	16	林部	材部
110	下から	16	第3図	第2図
122	上から	2	Escherichia Coli	Escherichia coli
130	第4表		側芽	副芽
131	第6表		側芽	副芽
131	第7表		側芽	副芽
132	第8表		側芽	副芽
159	下から	7	Supercoold	Supercooled
159	下から	9	Supercoold	Supercooled
159	下から	11	低温化学	低温科学