



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	樹木の皮部のリン脂質の細胞内分布とハードニングおよびデハードニングによるその変化
Author(s)	吉田, 静夫; YOSHIDA, Shizuo
Citation	低温科学. 生物篇, 31, 21-30
Issue Date	1974-01-10
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/17804
Type	departmental bulletin paper
File Information	31_p21-30.pdf



樹木の皮部のリン脂質の細胞内分布とハードニング およびデハードニングによるその変化*

吉田 静夫

(低温科学研究所)

(昭和48年8月受理)

I. 緒 言

まえの報告¹⁾でポプラの皮部および材部において、リン脂質とトリグリセリドが季節的にも人工条件下でも特徴的な変化を示すことが明らかにされた。しかし、それは細胞組織全体としての変化であり、それが細胞のどんな部分で起るかについては想像の域を脱し得なかった。この報告では人工的なハードニングやデハードニングの前後で遠心分画により細胞を大まかに4~5の画分に分け、各々の画分について蛋白質量、リン脂質量およびその組成、トリグリセリド、ステロール等について比較検討した。

II. 材料と方法

材料： 材料として圃場に生育しているポプラ *Populus euramericana* C.V. *gelrica* の1~2年生の枝の皮部およびニセアカシア *Robinia pseudoacacia* の幹の皮部を用いた。耐凍度の検定は前報¹⁾の通りである。

細胞の分画法および脂質と蛋白の定量法： 細く切った9gの皮部を同量の海砂、4.5gのPolyclar AT (不溶性ポリビニールピロリドン) と共に1.0Mソルビトール、10mM EDTA、0.2M トリス-塩酸緩衝液 (pH 8.0) を含んだ45mlの溶液中で磨砕した。磨砕は4°Cで行った。3枚のガーゼを通した磨砕液は100×g 10分、1,000×g 10分、12,000×g 15分、ついで78,000×g 60分の順に遠心して得られる各沈澱および最後の上清をそれぞれ細胞画分とした。各沈澱は1mlの0.005M トリス-塩酸緩衝液に懸濁し、その一定量を蛋白の定量に用い、残りは5倍量のイソプロパノールで2回、ついでクロロホルム-メタノール (2:1, v/v) で1回抽出した。78,000×g上清は一部を蛋白の定量に用いた。残りは最終濃度が0.2Nとなるように過塩素酸を加え、0°Cに30分放置して遠心により蛋白部分を集め0.2N醋酸で洗ったあと沈澱画分と同様に脂質を抽出した。脂質抽出液は減圧下で溶媒を除きクロロホルム-メタノール (2:1, v/v) に溶かし Folch の方法²⁾ で非脂質成分を除いて濃縮し、その一部について全リン脂質量を求めた。残りの一定量をシリカゲル H のプレートでクロロホルム-メタノール-氷醋酸 (65:25:8, v/v) で展開して各リン脂質の量を求めた。リンの定量は前報¹⁾の通りである。トリグリ

* 北海道大学低温科学研究所業績 第1258号

セリド、ステロールおよびステロールエステルの分離定量も前報によった。

蛋白の定量³⁾は各沈澱画分の懸濁液あるいは上清の一部を0.2N過塩素酸を加えて沈澱させ、沈澱をイソプロパノールついでエーテルで洗ってから、6N塩酸を加えて封管中105°Cで18時間加水分解しアミノ酸とし、ヒト血清アルブミンの加水分解物を標準にして比色定量した。

III. 結 果

第1～第3表に真冬に圃場から採取したポプラの枝を水蒸気で飽和したポリエチレン袋に入れて室温(18～23°C)で約1カ月間デハードニングさせたときの結果を示した。なお、デハードニング後、芽がふくらみ開芽直前の状態であった。対象の枝は-20°Cから液体窒素中に投入しても害なく耐えたが、デハードニング後耐凍度は-10°Cまで低下した。対照の枝は採取後-5°Cに保存し、デハードニング後の枝と同時に実験に用いた。

第1表に示すように、各画分の蛋白は処理後大幅に減少した。それは78,000×g沈澱およびその上清において最も変化が大きく、処理後各々約1/2となった。一方、各画分のリン脂質の量は78,000×g沈澱およびその上清に最も多く分布し、78,000×g沈澱は単位蛋白量あたりのリン脂質量が最も大きかった。デハードニング後各画分ともリン脂質量は大幅に減少し、それは蛋白量の減少をはるかに上まわっていた。対照とデハードニング後の単位蛋白あたりのリン脂質量を求めると処理後いずれの画分についても可成り大幅に低下していた。それは12,000×g、78,000×gの各沈澱および78,000×g上清において大きく変化した。この事実はデハードニングにより細胞顆粒成分または膜成分が全体として減少するだけでなく、リン脂質に富む状態からリン脂質の少ない状態へと質的に変化することを意味している。

第1表 デハードニング後の各細胞画分の蛋白質、リン脂質および蛋白質あたりのリン脂質の変化

細胞画分	蛋白質 (mg)		リン脂質 (μ mole)		リン脂質/蛋白質		D/C
	C	D	C	D	C	D	
100-p	4.99 (6.3)	5.01 (11.9)	1.48 (9.4)	1.24 (21.1)	0.296	0.247	0.83
1,000-p	2.34 (3.0)	1.51 (3.6)	0.76 (4.8)	0.44 (7.5)	0.328	0.291	0.89
12,000-p	3.69 (4.7)	2.53 (6.0)	1.82 (11.5)	0.87 (14.8)	0.493	0.344	0.70
78,000-p	7.94 (10.0)	3.14 (7.5)	5.71 (36.2)	1.59 (27.1)	0.719	0.506	0.70
Sup	59.82 (75.9)	29.84 (71.0)	6.00 (38.0)	1.73 (29.5)	0.100	0.058	0.58
計	78.78 (99.9)	42.03 (100.0)	15.77 (99.9)	5.87 (100.0)			

材料：1月22日に採取したポプラの皮部；C：対照（使用時まで-5°Cに保存，耐凍度は-20°Cより液体窒素中に投入しても害なく耐える）；D：1カ月間室温でデハードニング（耐凍度は-10°Cまで低下）。蛋白質およびリン脂質の量は9g（生重量）あたりで表わした。100-p～78,000-pは100×g～78,000×g各沈澱画分を，Supは上清画分を表わす。表中の（ ）内の数字は各画分間の百分率組成（%）を示す

第2表に各細胞画分のリン脂質を薄層クロマトグラフィーにより分離定量した結果を示した。各細胞画分のリン脂質組成は対照の枝では100×g、78,000×gの各沈澱および78,000×g上清の各画分でホスファチジルコリンの組成比が他の画分よりも大きな値を示した。また、

第2表 デハードニング前後における各細胞画分のリン脂質組成(百分率)変化

細胞画分	PC		PI		PE		PG		PA*	
	C	D	C	D	C	D	C	D	C	D
100-p	50.3	46.5	7.8	7.7	22.6	24.1	9.8	9.4	9.5	12.4
1,000-p	46.4	35.9	11.3	16.5	22.5	18.0	15.6	18.9	4.1	10.7
12,000-p	43.3	42.8	12.8	12.6	22.4	18.7	12.6	18.6	8.9	7.3
78,000-p	52.6	44.1	6.0	10.6	23.1	22.3	10.8	12.1	7.4	10.8
Sup	50.4	39.0	11.3	17.5	18.6	21.7	14.3	11.2	5.4	10.7

材料: 第1表と同じ, C, D: 第1表と同じ。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; PE: ホスファチジルエタノールアミン; PG: ホスファチジルグリセロール; PA: ホスファチジン酸(微量のジホスファチジルグリセロールを含む)。100-p~78,000-pは100×g~78,000×gの各沈澱画分をSupは上清を表わす

100×gおよび78,000×gの各沈澱でホスファチジルイノトールおよびホスファチジルグリセロールの組成比が他よりも低い値を示した。処理後は12,000×g沈澱を除く他の各画分でホスファチジルコリンの組成比が大きく低下し、特に78,000×g上清においてそれは著しかった。また、1,000×gと12,000×gの各沈澱でホスファチジルエタノールアミンの組成比の低下がみられ、100×g沈澱および78,000×g上清ではホスファチジルエタノールアミンの組成比は逆に大きな値を示した。ホスファチジルイノシトール、ホスファチジルグリセロールおよびホスファチジン酸(少量のカルジオリピンを含む)の各リン脂質の組成比は一部を除いて各画分とも増大していた。以上のように、処理後の各画分のリン脂質の減少はホスファチジルコリンとホスファチジルエタノールアミンの減少に負うところが非常に大きいことが明らかである。

つぎに、第3表にトリグリセリドおよびステロールの処理の前後における組成変化を示した。トリグリセリドの細胞各画分への分布は処理の前後とも78,000×gの上清に最も多く、全画分の40~56%を占めていた。この78,000×g上清の上層に集る白色クリーム状の層を分取し脂質を抽出しその組成をしらべてみるとトリグリセリドの40%以上がこの層にみとめられ、

第3表 デハードニング後の各細胞画分の中性脂質の変化

細胞画分	トリグリセリド(μmole)		ステロール(μmole)		トリグリセリド リン脂質		ステロール リン脂質	
	C	D	C	D	C	D	C	D
100-p	1.03 (13.6)	1.35 (22.8)	0.11 (5.5)	0.17 (14.8)	0.70	1.08	0.07	0.14
1,000-p	0.59 (7.8)	0.69 (11.6)	0.08 (4.0)	0.06 (5.2)	0.78	1.56	0.11	0.14
12,000-p	0.79 (10.4)	0.90 (15.2)	0.20 (10.1)	0.15 (13.0)	0.43	1.04	0.11	0.17
78,000-p	0.87 (11.5)	0.55 (9.3)	1.07 (53.8)	0.35 (30.4)	0.15	0.34	0.19	0.22
Sup	4.30 (56.7)	2.44 (41.1)	0.53 (26.6)	0.42 (36.5)	0.71	1.04	0.09	0.24
計	7.58 (100.0)	5.93 (100.0)	1.99 (100.0)	1.15 (100.0)				

材料および表中の略号は第1表に同じ。トリグリセリドおよびステロールはそれぞれグリセロールおよびコレステロール等量で表わした。100-p~78,000-pは100×g~78,000×gの各沈澱画分をSupは上清画分を表わす。表中()内の数字は各画分間の百分率組成(%)を示す

逆にホスホリピドは非常に少く上清全体の2%以下であった。トリグリセリドは各沈澱画分にも分布しており、デハードニング後ほとんど変わらないか、逆に増加する傾向がみられた。78,000×g上清のトリグリセリドは処理後約1/2に減少していた。各細胞画分について、リン脂質に対するトリグリセリドの比をみると処理後各画分ともその比が大ききな値を示した。

一方、遊離ステロールは対照についてみると78,000×g沈澱に50%以上が分布し、78,000×g上清がこれについて多かった。他の沈澱画分にも分布しているがこれらの画分に比べてわずかであった。デハードニング後100×g沈澱を除いて他の画分とも遊離ステロールの量は減少していたが、78,000×g沈澱の減少が最も顕著であった。リン脂質に対する遊離ステロールの比を求めてみると、各画分ともに処理後その比が可成り増加していた。以上のように、トリグリセリドおよびステロールの変化量はリン脂質のそれに比べて小さいため結果的に処理後各画分ともその脂質組成はトリグリセリドやステロールに富みリン脂質の少い状態になる。この実験は再度追試したがほぼ同様の結果が得られた。

第4表にモノガラクトシルジグリセリドとジガラクトシルジグリセリドの細胞各画分における分布をデハードニングの前後で検討した結果を示した。両者の合計は処理後わずかに減少していた。各画分間の両糖脂質の合計の分布は、対照では78,000×g沈澱とその上清に比較的多く含まれ処理後全画分に分散する傾向がみられた。O・D (665 nm) から求めたクロロフィル量の分布との相関はあまり高くなく、例えば78,000×g上清ではクロロフィの量に比べてこれらの糖脂質の量は極めて多かった。このことは、ポプラの皮部ではこれらの糖脂質が必ずしも葉緑体に局在しているのではなく他のいろいろな膜の成分として存在することを示している。単位蛋白量あたりの両糖脂質の合計量は各画分とも処理後増加していた。これらの糖脂質の変

第4表 デハードニング後の各細胞画分における糖脂質組成の変化

細胞画分	DGD μ mole	MGD μ mole	DGD+MGD (%) μ mole	DGD/MGD	$\frac{\text{DGD+MGD}}{\text{蛋白質 (mg)}}$	$\frac{\text{DGD+MGD}}{\text{葉緑素*}}$	
対照	100-p	0.394	0.229	0.623 (16.6)	1.72	0.124	3.64
	1,000-p	0.271	0.168	0.439 (11.7)	1.61	0.187	6.18
	12,000-p	0.433	0.274	0.707 (19.2)	1.61	0.194	4.65
	78,000-p	0.854	0.371	1.225 (32.7)	2.30	0.154	6.21
	Sup	0.477	0.263	0.740 (19.7)	1.81	0.012	11.93
	計	2.429	1.305	3.734 (99.9)	1.86		
デハードニング後	100-p	0.278	0.465	0.743 (24.4)	0.60	0.148	3.40
	1,000-p	0.185	0.224	0.409 (13.4)	0.83	0.270	4.04
	12,000-p	0.311	0.404	0.715 (23.5)	0.77	0.282	3.20
	78,000-p	0.268	0.326	0.594 (19.5)	0.80	0.189	4.33
	Sup	0.238	0.346	0.584 (19.2)	0.68	0.019	13.58
	計	1.280	1.765	3.045 (100.0)	0.72		

材料：第1表に同じ。DGD：ジガラクトシルジグリセリド；MGD：モノガラクトシルジグリセリド。DGD および MGD の量はガラクトース等量で表わした。

* 葉緑素の量は抽出液の一定量を石油エーテルでうすめ665 nmにおけるO・Dで表わした

化の中で最も特徴的なことは、処理後各画分ともジガラクトシルジグリセリド/モノガラクトシルジグリセリドの比が著しく低下することである。これは78,000×g沈澱画分においてとくに著しい。結局、デハードニングの過程でジガラクトシルジグリセリドからモノガラクトシルジグリセリドへの変化が起ることを示している。

いっぽう、-10°Cの凍結にしか耐えられない4月28日頃の枝を-30°Cで26日間ハードニングし、その前後において前述と同様な実験を行った。ハードニング後皮部は-25°Cの凍結に耐えた。第5表に示すように、各細胞画分の蛋白質量は処理の前後であまり大きな変化はなく蛋白全量はほとんど差がみられなかった。だがリン脂質の量は処理後各画分とも増加した。単位蛋白量あたりのリン脂質の量は処理後12,000×g沈澱を除く他の画分ではいずれも大きな値を示し、それは1,000×gおよび78,000×gの各沈澱において最も著しい傾向を示した。これらの結果はまえに述べたデハードニングの場合と丁度逆の現象である。この実験ではまえの実験と異って78,000×g上清画分のリン脂質量が少い傾向を示した。処理前後の各画分のリン脂質組成は、ホスファチジルコリンにおいては変化が少なくホスファチジルエタノールアミンにおいて全般的に増加する傾向がみられ、12,000×g沈澱を除く他の画分では4~10%の増加を示した。

第5表 ハードニング後の各細胞画分の蛋白質、リン脂質および蛋白質あたりのリン脂質の変化

細胞画分	蛋白質 (mg)		リン脂質 (μ mole)		リン脂質 蛋白質		H/C
	C	H	C	H	C	H	
1,000-p	4.45	2.99	0.52	0.57	0.116	0.190	1.64
12,000-p	4.31	4.53	1.91	2.34	0.443	0.516	1.16
78,000-p	6.18	5.39	3.08	4.00	0.498	0.742	1.49
Sup	24.92	26.91	0.41	0.58	0.017	0.021	1.24
計	39.86	39.82	5.92	7.49			

材料：4月28日に採取したポプラの皮部、耐凍度は-10°C。C：対照，H：-3°Cで26日間ハードニング，耐凍度は-25°Cまで増大。蛋白質およびリン脂質は9g(生重量)あたりで表わした1,000-p~78,000-pは1,000×g~78,000×gの各沈澱画分をSupは上清画分を表わす

ポプラの皮部について得られたこれらの結果が他の樹木にも認められるかどうかを確かめるため、ニセアカシアの幹の皮部を用いてデハードニング処理後の変化をしらべた。材料は4月21日に圃場で採取し処理中の乾燥を防ぐため水蒸気で飽和したポリエチレンの袋に入れて室温で1週間デハードニングさせた。処理後芽が少し開き始めた。処理前の対照は-5°Cに保存した。対照の皮部の耐凍度は-30°Cであったが処理後-15°Cに低下していた。第6表に処理前後の各細胞画分の蛋白質とリン脂質量を示す。蛋白質は各画分とも処理後減少していた。しかし、各画分間の組成比は処理後ほとんど変化していなかった。リン脂質量はポプラの場合と同様に78,000×g沈澱に40%以上が分布して78,000×g上清にも可成りの量が分布していた。処理後各画分ともリン脂質量は顕著に減少した。単位蛋白量あたりのリン脂質の量は処理後いずれの画分でも低下しており、ことに1,000×g沈澱と78,000×g上清でその減少が著し

第6表 ニセアカシアの皮部におけるデハードニング後の各細胞画分の蛋白質およびリン脂質の変化

細胞画分	蛋白質 (mg)		リン脂質 (μ mole)		リン脂質 / 蛋白質		D/C
	C	D	C	D	C	D	
1,000-p	12.05 (3.9)	10.50 (3.8)	2.79 (7.4)	1.89 (6.8)	0.231	0.180	0.78
12,000-p	19.40 (6.2)	16.18 (5.8)	7.79 (20.6)	5.90 (21.1)	0.401	0.364	0.90
78,000-p	22.36 (7.2)	19.46 (7.0)	16.81 (44.4)	12.96 (46.4)	0.751	0.665	0.89
Sup	257.97 (82.7)	232.96 (83.4)	10.44 (27.6)	7.17 (25.7)	0.040	0.030	0.75
計	311.78 (100.0)	279.10 (100.0)	37.83 (100.0)	27.92 (100.0)			

材料：4月21日に採取したニセアカシアの皮部，耐凍度は -30°C 。C：対照，D：室温で1週間デハードニング，耐凍度は -15°C に低下。蛋白質およびリン脂質は9g(生重量)の皮部あたりで表わした。1,000-p~78,000-pは1,000×g~78,000×gの各沈澱画分を，Supは上清画分を表わす。表中の()内の数字は各画分間の百分率組成(%)を示す

かった。このように，デハードニング後単位蛋白量あたりのリン脂質量が減少するのはポプラの場合とまったく同様で，このことは樹木一般について云えることのように思われる。リン脂質の組成の上ではデハードニング後ホスファチジルエタノールアミンの組成比が12,000×g沈澱を除く各画分共に著しく低下していたが，ホスファチジルコリンはほぼ一定の値を示した。

また，ニセアカシアについて各細胞画分間のステロールおよびステロールエステルの分布をしらべると第7表のようであった。ステロールは78,000×g沈澱において最も多く，処理の前後を通じて全画分の44~48%を占めた。また，単位蛋白量あたりのステロールの量も78,000×g沈澱が他の画分よりも多かった。デハードニング後ステロール全量はほとんど変化はみられなかったが，各画分についてみると78,000×g上清で減少し他の画分は多少増加していた。ポプラの場合と同様に，リン脂質量に対するステロール比は処理後78,000×g上清を除くすべ

第7表 ニセアカシアの皮部におけるデハードニング後の各細胞画分のステロールおよびステロールエステルの変化

細胞画分	ステロール (μ mole)		ステロールエステル (μ mole)		ステロール / リン脂質		ステロール / エステル / リン脂質	
	C	D	C	D	C	D	C	D
1,000-p	0.45 (9.3)	0.49 (10.3)	1.69 (22.6)	2.69 (29.6)	0.161	0.259	0.605	1.423
12,000-p	0.98 (20.1)	1.17 (24.4)	3.49 (46.6)	4.55 (50.0)	0.126	0.198	0.591	0.771
78,000-p	2.15 (44.2)	2.30 (48.1)	0.40 (5.3)	0.44 (4.8)	0.128	0.177	0.023	0.034
Sup	1.28 (26.3)	0.82 (17.1)	2.26 (30.2)	1.42 (15.6)	0.123	0.114	0.213	0.198
計	4.86 (99.9)	4.78 (99.9)	7.48 (100.0)	9.10 (100.0)				

材料および処理条件は第6表に同じ。C：対照；D：デハードニング(第6表の条件と同じ)。1,000-p~78,000-pは1,000×g~78,000×gの各沈澱画分を，Supは上清画分を表わす。ステロールおよびステロールエステルはコレステロール等量で表わした。表中の()内の数字は各画分間の百分率組成(%)を示す

ての画分でその比が増大していた。ステロールエステルはステロールとは可成りちがった細胞内分布を示した。すなわち、12,000×g 沈澱にこれが最も多く全画分の46~50%を占めた。一方、78,000×g 沈澱はステロールエステルの含量が最も少なかった。これはステロールの分布の場合と極めて対称的と云える。デハードニング後各沈澱画分でわずかに増加し、78,000×g 上清では逆に約半分に減少していた。ステロールエステルの全量は処理後幾分増加した。リン脂質に対するステロールエステルの比は各沈澱画分でステロールの場合と同様に大きな値を示したが、78,000×g 上清では逆にわずかに低下した。

IV. 考 察

樹木の皮部のような固い組織について細胞を分画する方法はまだ確立されていない。したがって今回のような方法でどの程度の細胞の分画がなされたかわからない。標的酵素の分布および電子顕微鏡による形態的な検討も今後の問題として残っている。78,000×g 上清になお多量のリン脂質が認められたが、過塩素酸で蛋白と共に沈澱することから膜の破片あるいはリポ蛋白の形で含まれることが予想される。以上のように、今回の実験では細胞の分画に多くの問題点があるが、各細胞画分間のリン脂質の組成や、ステロールおよびその脂肪酸エステルなどについてその分布にいくつかの特徴が認められた。ポプラでもニセアカシアでも78,000×g 沈澱にステロールが多く存在し、かつ、ステロールエステルはこの画分には少く、むしろ12,000×g の沈澱に多量に存在していた。最近の報告では、植物の原形質膜は赤血球膜と同様にステロールの含量が他の膜画分に比べて非常に高いことがわかっている⁴⁾。こうしたことから、この実験で得られた78,000×g 沈澱画分には原形質膜が多く含まれている可能性が一応考えられる。

この実験を通じて最も重要と思われることは、ハードニングあるいはデハードニングの過程で各細胞画分の蛋白あたりのリン脂質の量が大きな変化を示すことである。すなわち、耐凍度の高い細胞ほど各細胞画分の蛋白あたりのリン脂質量は多い。このことは耐凍度が高いほど細胞の膜あるいは顆粒はリン脂質に富んでいると云えそうである。Pomeroy と Siminovitch⁵⁾ らや大塚⁶⁾ によって、樹木の皮層柔細胞の季節的な微細構造の変化がしらべられている。彼らは季節的な耐凍度の変動につれて細胞内の膜様構造物の増加あるいは減少をみている。しかしまゝに報告した全リン脂質の季節変動と人工条件下での変動¹⁾ が膜あるいは顆粒の増減を直接反映するのみでなく、膜あたりのリン脂質の増減による膜の質的变化も含まれていると考えられる。

Levitt⁷⁾ らによれば植物の可溶性および不溶性蛋白の疎水性のアミノ酸残基は、耐凍性の植物と非耐凍性の植物において有意な差を見出せなかった。しかし、たとえ蛋白自体の疎水性が変化しないとしても、その周辺に電荷的に中性なホスファチジルコリンやホスファチジルエタノールアミンなどのリン脂質がその疎水性の部分で結合し、その親水性の部分の外側に面して並ぶものとすれば、リポ蛋白全体としてはその親水性が増大するであろう。このような変化は膜の機能とならんかの関連があるものと考えられるし、膜の水に対する透過性の変化あるいは凍結下における膜の安定性にもあるていど寄与するものと考えられる。

また、ステロールおよびその脂肪酸エステルは植物においても膜の成分であることは疑いのないところである⁴⁾。このような中性脂質はハードニングやデハードニングにおいてリン脂質とは異った変動を示すことも重要なことと思われる。すなわち、ハードニングおよびデハードニングの過程でそれぞれあらたな膜の構成あるいは解体-再構成が行われるものと仮定したとき、これらの中性脂質はリン脂質とは別のきよ動を示すものと考えられる。そして、これらの中性脂質はデハードニング後リン脂質に比べて減少の割合は少いから、膜あたりのリン脂質量に対するこれら中性脂質量の比は増加し膜全体としての疎水性の増大をもたらすであろう。

最近、いろいろの生体膜について、蛋白とリン脂質の代謝回転速度がしらべられ、後者は前者よりも速く代謝回転することが明るみに出された^{8,9)}。また、Shaw¹⁰⁾ や Okumura¹¹⁾ によれば *E. coli* を 37°C から 10°C に低下させたとき、細胞増殖に 5 時間ほどの遅延がみられた。このとき、DNA, RNA および蛋白の合成は完全に停止したのにリン脂質は活発に代謝回転した。そして、リン脂質の合成が分解を上回る結果 20% 程度リン脂質の増加がみられた。Mindich^{12,13)} は *B. subtilis* のグリセロール要求株を用いた実験で、培地からグリセロールを除くと脂質の合成は完全に停止したが膜蛋白の合成は活発に行われ、結果的に脂質の少ない膜の生成がみられた。逆に、クロラムフェニコールで蛋白合成を阻害したとき、結果的に脂質の多い膜の形成がみられた。これらの結果は、生体膜の合成と分解において脂質と蛋白が互に独立して行動することを示唆している。このことがすべての膜に一般化できると仮定し、脂質と蛋白の合成ならびに分解速度が外部環境要因に依存するものとすれば、今回の実験で得られたようにハードニングやデハードニングの後、細胞沈澱画分の蛋白量あたりのリン脂質量に差が生ずることがあってもよいと考えられる。

デハードニング後、ポプラの皮部の糖脂質は極めて特徴のある変化を示した。Bervaes¹⁴⁾ はマツの葉をデハードニングしたとき、葉緑体のジガラクトシルジグリセリドが減少しモノガラクトシルジグリセリドが逆に増加することを明らかにした。また、著者¹⁾ はポプラの皮部について秋から冬にこれとは逆の現象、つまり、モノガラクトシルジグリセリドが減少してジガラクトシルジグリセリドが増加する事実を明らかにしている。したがって、これら両糖脂質の相互転換がハードニングとデハードニングの両過程で互に逆方向に進むことが示唆される。また、ポプラの皮部では葉緑素をあまり含まない細胞画分においてこれらの糖脂質が多量に存在し、かつデハードニング処理後大きく変化することから、プラスチド以外の膜に膜成分として含まれていてかような変化をするものと考えられる。当然のことながら、ジガラクトシルジグリセリドはモノガラクトシルジグリセリドよりも著るしく親水性が強いので、このような脂質成分の質的な変化はそれを構成成分とする膜の疎水性に大きなえいきょうを与えることが考えられる。まえに報告したように、ポプラの皮部および材部でトリグリセリドとリン脂質の季節変動が 10 月以降において対称的であることから、これら両脂質間の相互転換が示唆された⁴⁾。今回の実験から明らかのように、細胞内のトリグリセリドの分布はふた通りが考えられる。ひとつは上清の上層に集る白色クリーム状の部分（おそらくこれはリポドボディまたはスフェロプラストと考えられる）に、他は各沈澱画分に存在する。そしてデハードニング後各沈澱画分の蛋白あたりのトリグリセリドの量がいずれも増加していた。このことは、少くともデハード

ニングの過程では、リン脂質からトリグリセリドへの変化が膜画分で起ることを示していると考えられる。また、デハードニング後上清のトリグリセリドの量は約半分減少していたが、開芽期にはグリセロールから糖およびアミノ酸へのとりこみが活発である¹⁵⁾ことから上清のトリグリセリドの一部は分解され消費あるいは他の物質へ代謝されるためと考えられる。

しかし、細胞内におけるトリグリセリドのふたつの存在形態がお互にどう関連し脂質代謝上どのような意義を有するのかは今のところ分らない。

V. 摘 要

ポプラの皮部におけるリン脂質の細胞内分布とハードニングとデハードニングを施した場合の質的な変動について検討した。結果はつぎの通りである。

1. リン脂質は 12,000~78,000×g 沈澱画分に最も多量に存在し、この画分はステロールが比較的少量に存在していた。

2. デハードニング後、各細胞画分の単位蛋白あたりのリン脂質の量は著しく減少していた。逆にハードニングした場合、単位蛋白あたりのリン脂質の量は増加した。

3. ステロールはリン脂質とは異った変動様式を示し、デハードニング後はリン脂質に対する含量の比が増加した。

4. モノガラクトシルジグリセリドとジガラクトシルジグリセリドはともに各細胞画分に広く分布し、葉緑素の少い画分にも多量に含まれていた。デハードニング後、ジガラクトシルジグリセリドは各細胞画分ともに著しく減少し、逆にモノガラクトシルジグリセリドの増加が認められた。

5. トリグリセリドは細胞内においてふた通りの分布が考えられた。ひとつは各細胞沈澱画分に、他は上清に認められた。上清のトリグリセリドの多くの部分はその上層に集るクリーム状の部分に存在していた。デハードニング後、各細胞沈澱画分においてトリグリセリドの増加が認められ、リン脂質からトリグリセリドへの変化が沈澱画分中において起りうる可能性が示唆された。

以上の結果からデハードニングやハードニングにおいて、膜におけるリン脂質をはじめとして糖脂質あるいは中性脂質の質的な変化の起ることが明らかにされた。こうした膜の質的な変化が植物の耐凍度の変動に何らかのえいぎょうを持つことが推察される。

文 献

- 1) 吉田静夫 1973 ポプラの皮部と木質部における脂質および耐凍度の季節的消長. 低温科学, 生物篇, **31**, 9-20.
- 2) Folch, J., Lees, M. and Sloane-Stanley, G. H. 1957 A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.*, **226**, 497-509.
- 3) Spies, J. R. 1957 Colorimetric procedures for amino acids. *In Methods in Enzymology* (S. P. Colowick and N. O. Kaplan eds.), Academic Press, New York, **3**, 467-471.
- 4) Hodges, T. K., Leonard, R. T., Bracker, C. E. and Keenan, T. W. 1972 Purification of an ion-stimulated adenosine triphosphatase from plant roots: Association with plasma membranes. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **69**, 3307-3311.

- 5) Pomeroy, M. K. and Siminovitch, D. 1971 Seasonal cytological changes in secondary phloem parenchyma cells in *Robinia pseudoacacia* in relation to cold hardiness. *Can. J. Bot.*, **49**, 787-795.
- 6) 大塚宏二 1972 クワ皮層細胞の春における耐凍性変動と細胞内微細構造変化. 低温科学, 生物篇, **30**, 33-44.
- 7) Chou, J. C.-L. and Levitt, J. 1972 The hydrophobicity of protein from hardy (freezing resistant) and nonhardy species of grains. *Cryobiology*, **9**, 268-272.
- 8) Omura, T., Siekevitz, P. and Plade, G. E. 1967 Turnover of constituents of the endoplasmic reticulum membranes of rat hepatocytes. *J. Biol. Chem.*, **242**, 2389-2396.
- 9) Kahane, I. and Razin, S. 1968 Synthesis and turnover of membrane protein and lipid in *Mycoplasma laidawii*. *Biochim. Biophys. Acta*, **183**, 79-89.
- 10) Shaw, M. K. and Ingraham, J. L. 1967 Synthesis of macromolecules of *Escherichia coli* near the minimal temperature for growth. *J. Bacteriol.*, **94**, 157-164.
- 11) Okuyama, H. 1969 Phospholipid metabolism in *Escherichia coli* after a shift in temperature. *Biochim. Biophys. Acta*, **176**, 125-134.
- 12) Mindich, L. 1970 Membrane synthesis in *Bacillus subtilis*. I. Isolation and properties of strains bearing mutations in glycerol metabolism. *J. Mol. Biol.*, **49**, 415-432.
- 13) Mindich, L. 1970 Membrane synthesis in *Bacillus subtilis*. II. Integration of membrane proteins in the absence of lipid synthesis. *J. Mol. Biol.*, **49**, 433-439.
- 14) Bervaes, J. C. A. M., Kuiper, P. J. C. and Kylin, A. 1972 Conversion of digalactosyl diglyceride (extra long carbon chain conjugates) into monogalactosyl diglyceride of pine needle chloroplasts upon dehardening. *Physiol. Plant.*, **27**, 231-235.
- 15) 吉田静夫 1970 開葉期のポプラのグリセリン代謝. 低温科学, 生物篇, **28**, 63-71.

Summary

The present report is concerned with the intracellular localization of phospholipid components and their behavior upon hardening and dehardening in the cortex of poplar and black locust trees.

The results are as follows:

1) A large amount of phospholipid and a considerable amount of sterol were found in 12,000-78,000×g pellets from both poplar and black locust cortices.

2) Remarkable decreases in phospholipid/mg protein were observed in every cell fraction in dehardened cortex, especially in 12,000-78,000×g pellets and the supernatants. A reverse change was observed in hardened cortex.

3) The ratio of sterol components against phospholipids increased after dehardening.

4) Galactolipids were found in several cell fractions irrespective of their chlorophyll contents. After dehardening, digalactosyl diglyceride was observed to decrease and monogalactosyl diglyceride to increase inversely in every cell fraction.

5) Triglyceride was located in each particulate cell fraction and in the supernatant. A significant increase in triglyceride was found in each particulate cell fraction after dehardening.

From these results, it may be postulated that some qualitative change in membranes are involved in the hardening process.