



# HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	植物の凍結障害とリン脂質の分解 I : 凍結中における植物のリン脂質の分解
Author(s)	吉田, 静夫; YOSHIDA, Shizuo; 酒井, 昭 他
Citation	低温科学. 生物篇, 31, 31-39
Issue Date	1974-01-10
Doc URL	<a href="https://hdl.handle.net/2115/17805">https://hdl.handle.net/2115/17805</a>
Type	departmental bulletin paper
File Information	31_p31-39.pdf



## 植物の凍結障害とリン脂質の分解 I.\*

凍結中における植物のリン脂質の分解

吉田 静夫・酒井 昭

(低温科学研究所)

(昭和 48 年 8 月受理)

### I. 緒 言

Greenham<sup>1)</sup> は、凍結下における植物組織の低周波電気抵抗の大きさは細胞の原形質膜が正常か否かによって影響されると云う観点から、アルファルファの冠部組織の低周波電気抵抗を凍結過程でしらべた。その結果、低周波電気抵抗は組織の凍結開始と共に増大するがある時点を界として逆に減少することを見出した。また、Sukumaran と Weiser<sup>2)</sup> もパレイシヨの葉について Greenham と同様の結果を得た。これらの結果は、凍結中に原形質膜が損傷を受けその半過性を失うことを示唆している。Tumanov と Krasavtsev<sup>3)</sup> はケイ光顕微鏡下でマツの葉の細胞の凍結過程を観察し、細胞が害を受ける温度まで冷却したときケイ光の色調が変化することを見出した。このことは、細胞の生死にかかわる重要な変化が凍結中に起こされることを暗示している。凍結中、植物細胞内で起るこうした変化を生化学的にしらべた報告はこれまでに見受けられない。

この報告は、凍結によって膜系に何らかの変化が引起されるとの想定に基き、それを膜の構成成分であるリン脂質の変化の面から明らかにしようとするものである。

### II. 材料と方法

材料：圃場に生育しているポプラ *Populus euramericana* C. V. *gelrica* の枝の皮部と耐凍度の低いアオキ *Aucuba japonica* の葉を用いた。両者とも 5×30 mm 位の小片とし、径 13 mm、高さ 20 cm の試験管に入れて -5°C で植氷後 2 時間その温度に保持し、1 時間ごとに 5°C ずつ低い低温箱に移し所定温度に 20 時間保持した。あるものはこうして -30°C まで冷却後、さらに -50°C までゆっくりと冷却しその温度から液体窒素中に投入した。凍結組織は 0°C の空中でとがした。0°C に一時間おいてから室温に取出しそのまま 3 日間放置した。凍害の程度は肉眼で褐変の程度から判定した。アオキの葉の場合、融解後 1~2 時間以内にその徴候が現れ凍害の判定は容易であった。また、ある場合には、1 g の凍結試料を上記のように融解したあと 5 ml の水を加え 27°C で 4 時間インキュベートし、その水浸出液についてフェノール性物質の遊離を塩化第 2 鉄反応で検出し、620 nm で吸光度を測定した。なお、この結果は肉眼で判定

\* 北海道大学低温科学研究所業績 第 1259 号

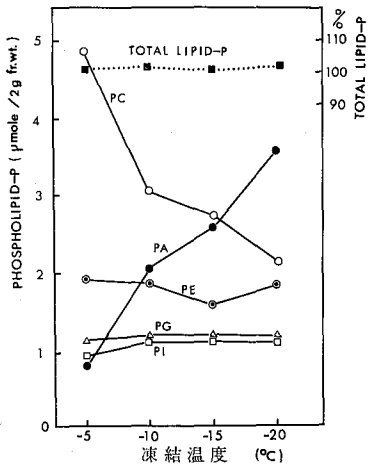
した被害の程度と一致し、比較的短時間に被害を判定できる利点があった。耐凍度は組織が害なく耐える最低凍結温度で表わした。

**脂質の抽出とリン脂質の分析：**脂質の抽出は凍結中あるいは融解後の試料について行なった。凍結中の試料は $-10^{\circ}\text{C}$ に冷えたイソプロパノールとともに乳鉢中に入れ $-10^{\circ}\text{C}$ の低温室内で磨砕した。磨砕後クロロホルム-メタノール(2:1, v/v)で常温にて2回抽出した。融解後の試料は $4^{\circ}\text{C}$ の低温室で上記の方法に準じて行なった。こうして得られた抽出液は減圧下で溶媒を除き、再びクロロホルム-メタノール(2:1, v/v)に溶かし0.9%の塩化ナトリウム1/5容加えて非脂質成分を除いた<sup>4)</sup>。そのあと濃縮してクロロホルム-メタノール(2:1, v/v)で定容とした。その一定量をシリカゲル H の薄層(5×20 cm)に帯状にスポットし、クロロホルム-メタノール-氷醋酸(65:25:8, v/v)を溶媒として $25^{\circ}\text{C}$ で50分展開した。この溶媒でホスファチジルコリン、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、ホスファチジン酸およびジホスファチジルグリセロールは理想的に分離できた。なお、ホスファチジルイノシトールの位置にニンヒドリン陽性な脂質がわずかに検出され、これはホスファチジルセリンと思われたがホスファチジルイノシトールに含めて表わした。また、ジホスファチジルグリセロールは極めて少量でありこれをホスファチジン酸と一緒に表わすことにした。標準リン脂質として、セファデックス LH 20 のカラムを用いて部分的に精製<sup>5)</sup>したホウレンソウの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、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジルイノシトール、ホスファチジン酸およびジホスファチジルグリセロールを用いた。展開後ヨウ素蒸気にさらして各リン脂質の位置を確認し、相当する部分をかきとり直接試験管中で0.5 ml の70%過塩素酸を加えて $180\sim 200^{\circ}\text{C}$ で25分間灰化した。脂質をスポットしなかった薄層部分について、相当するスポットと同じ大きさの部分をかきとり同様に灰化してこれをブランクとした。灰化後2.5%モリブデン酸アンモニウム0.5 ml, Fisk-Sabbarow 試薬0.2 mlを加え $100^{\circ}\text{C}$ で7分間加熱したあと3,000 rpmで遠心してシリカゲル粉末を除き700 nmで吸光度を測定した。この方法は基本的には Marinetti の方法<sup>6)</sup>に準ずるものである。

**醋酸 $-1-^{14}\text{C}$ のとりこみ：**この実験には7月中旬の2年生の小枝を使用した。この枝は $-5^{\circ}\text{C}$ 短時間の凍結にも耐えなかった。2  $\mu\text{Ci}$ の醋酸 $-1-^{14}\text{C}$ を $0.5\times 3\text{ cm}$ の小枝の下側の切口に与え<sup>7)</sup>パラフィルムでつつみ、さらにアルミホイルでつつんで $20^{\circ}\text{C}$ 24時間インキュベートした。これを $-5^{\circ}\text{C}$ で植氷してそこに2時間保持してから $-10^{\circ}\text{C}$ の低温箱に移しそこに6時間おいた。一部は $0^{\circ}\text{C}$ の空中で1時間おいて融解したのち、 $27^{\circ}\text{C}$ で1時間インキュベートした。凍結前の枝を対照として、凍結中のものと融解後のものについて脂質を抽出精製し、その一定量をシリカゲル H の薄層で展開した。展開溶媒は極性脂質についてはクロロホルム-メタノール-氷醋酸(65:25:8, v/v)、中性脂質については石油エーテル-エーテル-氷醋酸(80:35:1, v/v)を用いた。展開後ラジオ薄層クロマトグラフにより各脂質の放射能分布を測定した。

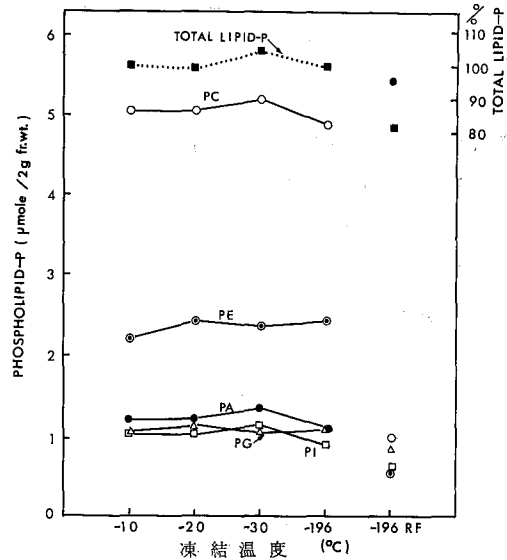
### III. 結 果

10月4日に採取したポプラの枝は $-5^{\circ}\text{C}$ 、20時間の凍結に被害なく耐えたが、 $-10^{\circ}\text{C}$ 、20時間の凍結により著しい害を受けた。第1図に示すように、 $-10^{\circ}\text{C}$ 以下で凍結した場合ホス



第1図 耐凍度の低いポプラの皮部における凍結中のリン脂質組成および全リン脂質量の変化

試料は10月4日に採取したもので耐凍度は $-5^{\circ}\text{C}$ であった。全リン脂質量は未凍結試料を対照としその百分率で示した。PC: ホスファチジルコリン; PE: ホスファチジルエタノールアミン; PI: ホスファチジルイノシトール; 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)



第2図 耐凍度の高いポプラの皮部における凍結融解後のリン脂質組成および全リン脂質量の変化

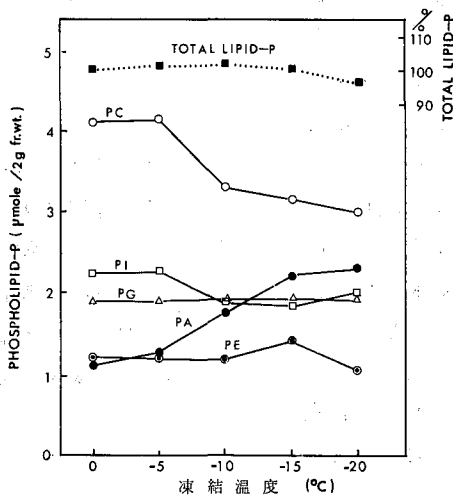
試料は11月6日に採取した。液体窒素温度での緩慢凍結に耐えた。各温度で凍結後 $0^{\circ}\text{C}$ の空中で融解しついで $27^{\circ}\text{C}$ で2時間インキュベートしたのち脂質を室温で抽出した。全リン脂質量は未凍結試料を対照としその百分率で示した。 $-196\text{ RF}$ は室温から直接液体窒素中に投入したことを示す。略号は第1図を参照

ファチジルコリンの著しい減少が観察された。しかし、ホスファチジルイノシトールやホスファチジルグリセロールはまったく変化しなかった。 $-15^{\circ}\text{C}$ ではホスファチジルエタノールアミンがわずかに減少していた。しかも、ホスファチジルコリンの減少はホスファチジン酸の増加を伴った。しかし、全リン脂質量はいかなる凍結温度においても何ら変化が認められなかった。同じ実験を耐凍度の高まった11月6日に採取した枝について行なった。この枝はゆっくり凍結した場合、液体窒素の温度での凍結にも耐えた。そして $-5\sim-30^{\circ}\text{C}$ の温度範囲において、凍結中のリン脂質の変化はまったく認められなかった。しかも、第2図に示したように、これらの組織を融解後 $27^{\circ}\text{C}$ で2時間インキュベートしたあとも何ら変化が認められなかった。ただし、室温から直接液体窒素中に投入して急速凍結融解し、 $27^{\circ}\text{C}$ でインキュベートされたもの(第2図、 $-196\text{ RF}$ )ではリン脂質の著しい変化が観察された。その変化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おいて最も顕著であったが、ホスファチジルグリセロールとホスファチジルイノシトールの減少もみられた。なお、全リン脂質の量も対照の20%ほど減少した。同じ現象が他の植物でも起るか否かを検討するため、 $-5^{\circ}\text{C}$ の凍結にしか耐えないアオキの葉を用いて実験した。第3図に示すように、凍害がおこる $-10^{\circ}\text{C}$ 以下の温度でホスファチジルコリンおよびホスファチジルイノシトールの著しい減少がみられた。しかし、ホスファチジルエタノールアミンとホスファチジルグリセロールは変化

しなかった。また、全リン脂質の量もほとんど変化しなかった。この場合もホスファチジルコリンやホスファチジルイノシトールの減少に伴ってホスファチジン酸の増加がみられた。以上の実験結果から、凍結中におけるリン脂質の分解と凍害が密接に関連していることが明らかにされた。このことは、凍結中膜レベルにおいて何か重要な変化がひきおこされていることを示唆するものと思われる。

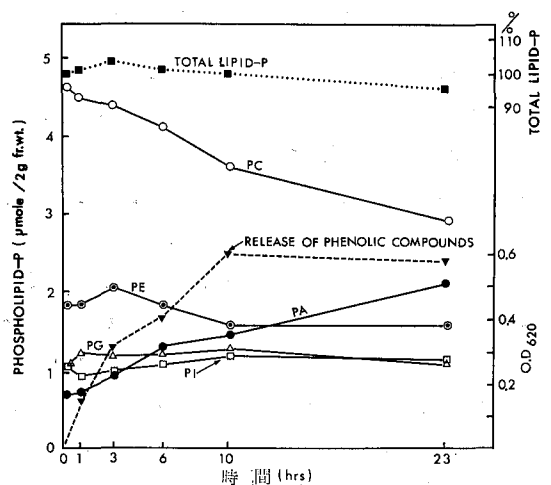
植物が凍害を受ける限界温度において、凍害が時間の函数として増大するものとするれば、リン脂質の分解もまた経時的に進行するものと予想される。この点を検討するため、 $-10^{\circ}\text{C}$ で凍害を受ける9月末の材料を用い、 $-5^{\circ}\text{C}$ から $-10^{\circ}\text{C}$ に移してから害の程度およびリン脂質の分解についてそれらの時間経過をしらべた。第4図にこの結果を示した。フェノール性物質の細胞からの遊離からみた凍害の程度は、10時間までほぼ直線的に増加しそれ以後は一定値を示した。ホスファチジルコリンは時間経過とともにほぼ直線的に減少したがホスファチジルグリセロールとホスファチジルイノシトールはほとんど変化しなかった。ホスファチジルエタノールアミンはわずかに減少する傾向を示した。一方、ホスファチジン酸はホスファチジルコリンの減少と対称的にほぼ直線的に増加した。この結果から、凍結下における凍害の進行とリン脂質の分解はきわめて密接な関係にあることが明らかとなった。

凍結した組織内でリン脂質の分解が進行する凍結温度の範囲を明らかにするため、10月4日に採取した枝を用いて以下の実験を行なった。まず枝の皮部を室温から直接液体窒素に投入して急速に凍結し細胞を殺したのち、液体窒素から取出し、0,  $-5$ ,  $-10$ ,  $-15$ ,  $-20$  および  $-30^{\circ}\text{C}$  に保たれた恒温箱に直接移し、それらの温度に20時間おいた。なお、液体窒素中に



第3図 アオキの葉における凍結中のリン脂質組成ならびに全リン脂質量の変化

試料は $-5^{\circ}\text{C}$ の凍結に耐えた。全リン脂質量の表わし方と略号は第1図と参照



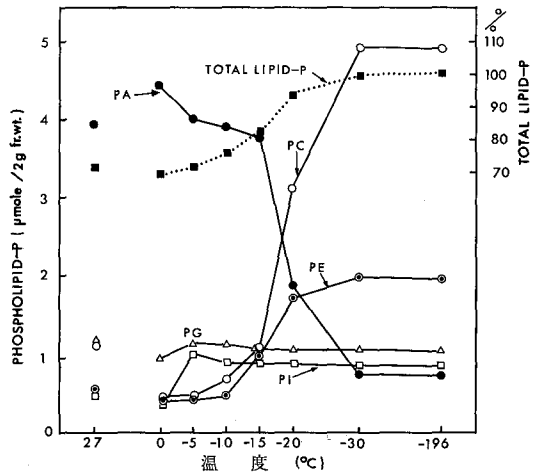
第4図 ポプラの皮部における $-10^{\circ}\text{C}$ で凍結中のリン脂質組成と凍害の経時変化

試料は9月27日に採取したもので耐凍度は $-5^{\circ}\text{C}$ であった。凍害の程度は細胞から遊離して来るフェノール性物質の量を塩化第2鉄反応で検出し620nmにおけるO.D.で表わした。全リン脂質量の表わし方と略号は第1図を参照

20時間保ったものを対照とした。また、融解後の短時間の変化をみるため、液体窒素から取出して0°Cの空中で融解後27°Cで1時間インキュベートしたものについてもしらべた。凍結試料からの脂質の抽出はすでにのべたように-10°Cに冷やしたイソプロパノールとともに-10°Cの低温室で磨碎し、クロロホルムメタノール(2:1, v/v)を加えて室温にもどして抽出した。第5図にその結果を示した。まえて急速冷却で殺された組織では、-30°C以上の温度範囲でホスファチジルコリンおよびホスファチジルエタノールアミンの分解が温度上昇に比例して高まった。そして、-15°C近くでは0°Cとほぼ同程度の分解がみられた。ホスファチジルグリセロールやホス

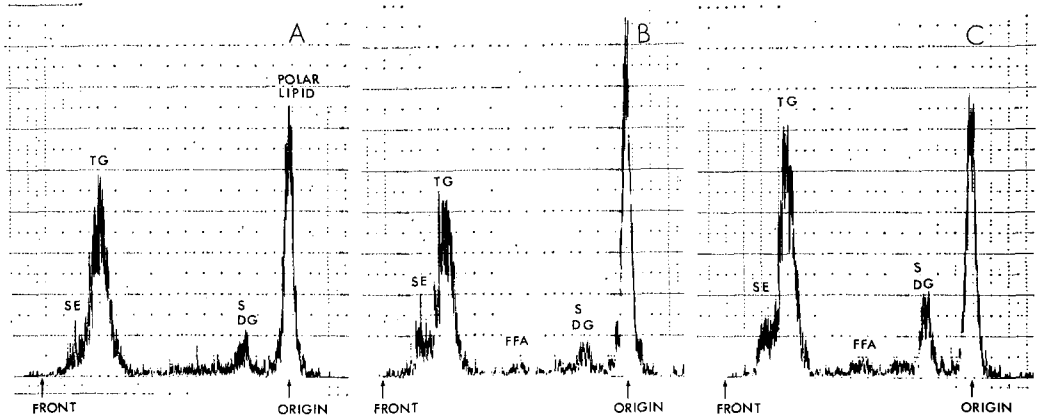
ファチジルイノシトールは-5°C以下の温度範囲でほとんど分解されなかったが、0°Cではホスファチジルイノシトールは著しく分解された。また、全リン脂質量は-20°C以上の温度では、温度が高いほどその減少も大きかった。融解後27°Cでインキュベートすると1時間以内に極めて大きな変化がみられ、0°Cに20時間保持したものとほぼ同程度の変化であった。これまでの実験と同様に、ホスファチジルコリンやホスファチジルエタノールアミンの減少につれてホスファチジン酸の増加が観察された。これらの結果から、大きな被害を受けた組織では-30°Cよりも高い温度で凍結組織中のリン脂質が分解されることが明らかとなった。

以上の実験を通じて、凍結中における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の分解はホスファチジン酸の生成を伴うことから、それがホスホリパーゼDの作用によることがほぼ推定される。しかし、第2図(-196 RF)および第5図に示したように、あらかじめ急速凍結で殺した組織では融解後および凍結中に全リン脂質量の減少がみられる。このことは、場合によってはホスホリパーゼD以外のリン脂質分解酵素も関与していることを示すものと考えられる。この点をたしかめるため、あらかじめ醋酸- $1-^{14}C$ を与えた枝について、凍結中あるいは融解後、複合脂質および中性脂質の放射能分布の変化をしらべた。なお、凍結中あるいは融解後の枝(皮部と材部の両方から脂質を同時に抽出)の脂質中の全放射能量は凍結前の対照と同じであった。アルカリ加水分解後大部分の放射能は脂肪酸に回収され、わずかながらステロール画分にも放射能が検出された。なお、この実験に用いたポプラの枝は7月中旬に採取したもので、-10°C 6時間の凍結にはとうてい耐えられない。-10°Cで6時間後、凍結中の組織から脂質を抽出し、リン脂質の放射能分布をしらべたが、ホスファチジルコリンの放射能量が著しく減少しホスファチジン酸の放射能量が著しく増加した。融解後27°Cで1時間おいた枝の場合、ホスファチジルコリンの放射能量が更に減少するだけでなく、ホスファ



第5図 あらかじめ被害を与えたポプラの皮部におけるリン脂質の組成変化に及ぼす凍結温度の影響

方法の詳細は本文を参照。全リン脂質量の表わし方と略号は第1図を参照



第6図 醋酸 $-1-^{14}\text{C}$ をとりこませたポプラの枝を凍結したときのジグリセリドおよび遊離脂肪酸への放射能の移行

A: 未凍結; B:  $-10^{\circ}\text{C}$ で凍結中; C:  $-10^{\circ}\text{C}$ で6時間凍結後融解して $27^{\circ}\text{C}$ で1時間インキュベート。2 $\mu\text{Ci}$ の醋酸 $-1-^{14}\text{C}$ を2年生の小枝の切口に与え24時間 $20^{\circ}\text{C}$ でインキュベート後 $-5^{\circ}\text{C}$ で2時間ついで $-10^{\circ}\text{C}$ で6時間凍結した。その後一部の枝を $0^{\circ}\text{C}$ 空中で融解させ $27^{\circ}\text{C}$ で1時間インキュベートした。それぞれの枝から脂質を抽出した。プレート: シリカゲルH; 展開溶媒: 石油エーテル-エーテル-氷醋酸(80:35:1, v/v)。TG: トリグリセリド; DG: ジグリセリド; SE: ステロールエステル; S: ステロール; FFA: 遊離脂肪酸

チジルエタノールアミン, ホスファチジグリセロールおよびホスファチジイノシトールの放射能の減少もみられた。したがって, 凍結中および融解後のリン脂質の分解様式はこれまでの結果と一致するものである。

第6図に凍結中あるいは融解後におけるジグリセリドおよび遊離脂肪酸への放射能の移行を表わすラジオ薄層クロマトグラムを示した。第6図AおよびBを比較して明らかなように,  $-10^{\circ}\text{C}$ で凍結中ジグリセリドや遊離脂肪酸への放射能移行はほとんどみられない。しかし, 第6図Cに示すように,  $-10^{\circ}\text{C}$ で6時間凍結後融解して $27^{\circ}\text{C}$ でインキュベートすると, 遊離脂肪酸(FFA)とステロール・ジグリセリド(S・DG)画分に可成りの放射能が移行していた。このステロール・ジグリセリド画分の放射能は, この画分をアルカリ加水分解すると大部分の放射能が遊離脂肪酸画分に回収されることから, ジグリセリドに由来するものである。以上の結果から, 凍結中のリン脂質の分解は主としてホスホリパーゼDの作用によることが考えられ, 融解後はこれ以外の分解酵素も関与しているらしい。

#### IV. 考 察

植物組織をある限界温度以下まで緩慢に凍結してゆくと, 凍結状態においてリン脂質の分解が起り始める。また, その限界温度以下において凍結された植物組織は著しく害される。このように, 植物組織の凍害と凍結状態におけるリン脂質分解の開始は密接な関係にあることが明らかである。リン脂質は膜の構成成分であるから, 植物組織がある温度まで凍結されたとき細胞の膜においてリン脂質の分解を開始させるような何らかの変化が引き起されるものと考えられる。その変化は膜全体として同時に起されるのか, あるいは特定の膜においてそれが先行

して起される結果、2次的に他の膜に影響してそのリン脂質を分解させるのかについては今のところ明らかでない。

Gusta と Weiser<sup>9)</sup> は、凍結融解後あるいは凍結乾燥中に植物組織中の RNA がリボヌクレアーゼによって急速に分解されることを明らかにした。このことから、Weiser<sup>9)</sup> はライゾーム様の細胞内区画構造が凍結あるいは、凍結乾燥によって破壊されるのだらうと想像している。

平山と大井戸<sup>10)</sup> はハウレンソウを  $-10^{\circ}\text{C}$  で1カ月間貯蔵したとき糖脂質やリン脂質が著しく減少することを報告している。しかし、彼らはこのような変化と凍害との関連についてはしらべていない。また、貯蔵期間が非常に長いことや凍結後の脂質の抽出条件の相違などから、この結果を直接われわれの実験結果と対比することは困難である。

急速融解あるいは凍結乾燥後の急速な復水により害を受けたパン酵母は、脂質の抽出性に変化を生じ、かつリン脂質の分解消失が急速に進行することを僧都が報告している<sup>11)</sup>。その理由として僧都は、急速凍結あるいは急速復水によって膜の疎水結合にあずかる水分子の急激な脱着が脂質-蛋白質間の疎水結合を破壊することによると推論している。しかし、より自然に近い条件下では、植物の凍害は緩慢な冷却による細胞外凍結および緩慢な融解のもとで起るもので、細胞内の分子間の水分子の急速な脱着は起り難いと考えられる。しかし、たとえ緩慢な凍結でも、膜における脂質-蛋白質あるいは蛋白質-蛋白質の疎水結合にあずかる水分子の状態は変化するであろうし、また膜を構成している脂質の相転位などが起ることが考えられる。

植物組織を緩慢に凍結したときにみられるリン脂質分解ではホスファチジン酸の蓄積が顕著にみられる。しかし、遊離脂肪酸やジグリセリドの増加はみられない。このことは、凍結中のリン脂質の分解はホスホリパーゼ D の作用によるものと一応考えられる。融解後の組織では遊離脂肪酸やジグリセリドが増加することからさらに他のリン脂質分解酵素、例えばホスファチジン酸ホスファターゼ、ホスホリパーゼ A、B および C など働き出すことが考えられる。急速冷却による細胞内凍結のような場合には全リン脂質量の減少が凍結下においてみられる(第5図)ことから、ホスホリパーゼ D 以外のリン脂質分解酵素が働いている可能性が考えられる。

ホスホリパーゼ D は広く植物界に分布することが知られている。ことに、ハウレンソウ、キャベツおよびニンジンのプラスチドに不溶性の形で分布していることが Kates<sup>12)</sup> によって報告されている。また、キャベツの内側の葉<sup>13)</sup> やピーナッツの種子中<sup>14)</sup> に可溶性のものが含まれていることも報告されている。吉田<sup>15)</sup> はニセアカシアの皮部について、それが細胞の沈澱画分に存在し上清の可溶性画分にはほとんど存在しないことを明らかにしている。ポプラの皮部では、ホスホリパーゼ D はリン脂質の分布と並行していろいろな細胞沈澱画分に分布している(吉田・未発表)。したがって、ポプラの皮部ではホスホリパーゼ D が膜の中に構成蛋白として組込まれて存在する可能性が強い。生きている細胞の中ではホスホリパーゼ D の活性が制御されているものと思われる。その制御機構は膜の脂質の代謝と深いかわりがあるものと思われる。植物の凍害を受けるような凍結温度下では、その制御機構に変化を生じ膜のリン脂質を不可逆的に分解することが想像される。

一方、*in vitro* の実験でポプラやニセアカシアの皮部を磨碎して得られた  $200\sim 78,000\times g$

沈澱画分は、pHの低下(pH 4.0~5.0)あるいはカルシウムの添加により内生的なリン脂質に働くホスホリパーゼDが著しく活性化される(吉田・未発表)。このことから、細胞内におけるpHの低下あるいは膜周辺のカルシウム濃度に変化を与えるような原因が凍結によって引起される可能性も考えられる。

## V. 摘 要

この報告は耐凍度の異なるポプラの皮部およびアオキの葉を用いて凍結障害とリン脂質の変化の関係について検討したものである。その結果、植物組織が凍害を受ける温度まで凍結状態で冷却されたとき、膜を構成するリン脂質が分解されることが明らかになった。ポプラの皮部ではホスファチジルコリンが最も顕著に分解され、ホスファチジン酸の増加がみられる。アオキの葉では上記リン脂質のほかにホスファチジルイノシールも分解される。一方、液体窒素中での凍結にも耐える耐凍度の高まったポプラの皮部では、いかなる凍結温度でも、また融解後においてもリン脂質の分解は観察されない。したがって、凍結中のリン脂質の分解は植物の凍結障害と密接に関連していることが明らかである。凍結中のこうしたリン脂質の分解はホスファチジン酸の増加を伴うことから、ホスホリパーゼDの作用によることが考えられる。

以上の結果から、植物の凍害は凍結中に引き起される細胞の膜系の変化によることが示唆される。その膜系の変化の内容のひとつとしておそらくホスホリパーゼDの活性化が含まれていると考えられる。

## 文 献

- 1) Greenham, C. G. 1966 The stages at which frost injury occurs in alfalfa. *Can. J. Bot.*, **44**, 1471-1483.
- 2) Sukumaran, N. P. and Weiser, C. J. 1972 Freezing injury in potato leaves. *Plant Physiol.*, **50**, 564-567.
- 3) Tumanov, I. I. and Krasavtsev, O. A. 1959 Hardening of northern woody plants by temperatures below zero. *Soviet Plant Physiol.*, **6**, 663-673.
- 4) Folch, J., Lees, M. and Sloane-Stanley, G. J. 1957 A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.*, **226**, 497-509.
- 5) Yoshida, S. and Sakai, A. 1973 Phospholipid changes associated with cold hardiness of cortical cells from poplar stem. *Plant & Cell Physiol.*, **14**, 353-359.
- 6) Marinetti, G. V. 1962 Chromatographic separation, identification and analysis of phosphatides. *J. Lipid. Res.*, **3**, 1-12.
- 7) Sagisaka, S. 1972 Decrease of glucose 6-phosphate and 6-phosphogluconate dehydrogenase activity in the xylem of *Populus gelrica* on budding. *Plant Physiol.*, **50**, 750-755.
- 8) Gusta, L. V. and Weiser, C. J. 1972 Nucleic acid and protein changes in relation to cold acclimation and freezing injury of Korean boxwood leaves. *Plant Physiol.*, **49**, 91-96.
- 9) Weiser, C. J. 1970 Cold resistance and injury in woody plants. *Science*, **169**, 1269-1278.
- 10) 平山 修・大戸井秀年 1969 ホウレンソウ貯蔵時における脂質および色素の成分変化. *農芸化学*, **43**, 423-428.
- 11) 僧部 博 1969 酵母細胞脂質におよぼす凍結融解及び凍結乾燥の影響. *低温科学, 生物篇*, **27**, 23-30.
- 12) Kates, M. 1954 Lecithinase systems in sugarbeet, spinach, cabbage and carrot. *Can. J. Biochem. Physiol.*, **32**, 571-583.
- 13) Davidson, F. M. and Long, C. 1958 The structure of the naturally occurring phosphoglyc-

- erides. 4. Action of cabbage-leaf phospholipase D on ovoidlecithin and related substances. *Biochem. J.*, **69**, 458-466.
- 14) Tzur, R. and Shapiro, B. 1972 Purification of phospholipase D from peanuts. *Biochim. Biophys. Acta*, **280**, 290-296.
- 15) 吉田静夫 1970 ニセアカシアのレシチン分解酵素活性. 低温科学, 生物篇, **28**, 57-62.

### Summary

To obtain some information on the mechanism of freezing injury of plant cells, the degradation of phospholipid components in plant cells during freezing was examined with poplar cortex and leaves of a golden-leaf tree.

Phospholipid degradation during freezing was observed in association with freezing injury. In less hardy poplar cortex, a remarkable decrease in phosphatidylcholine resulted with a concomitant increase in phosphatidic acid at subfreezing temperatures below which tissues sustained injury. The degradation pattern associated with freezing injury differed to some extent according to species. Contrary, in the well hardened poplar cortex, no compositional change in phospholipids was observed during freezing and even after thawing when slowly cooled down to  $-30^{\circ}\text{C}$  or even to the temperature of liquid nitrogen. In the incorporation experiment of acetate- $1-^{14}\text{C}$  into twig pieces, no significant increase was observed in free fatty acids and diglyceride during freezing. It thus appears that phospholipase D is the predominant hydrolysing enzyme of phospholipids associated with freezing injury.

From these results, it seems likely that some deleterious changes in cell membranes, which result in an activation of phospholipase D, occur during freezing below critical temperatures.