HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	酵母細胞に於ける凍結障害 : 凍結融解による酵素活性発現の機構
Author(s)	僧都, 博
Citation	低温科學. 生物篇, 23, 85-96
Issue Date	1965-12-01
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/17699
Type	bulletin (article)
File Information	23_p85-96.pdf

Instructions for use

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

Hiroshi SOUZU 1965 Freezing Injury in Yeast cells. Outbreak of Phosphatase Activity by Freeze-Thawing. *Low Temperature Science, Ser.* ***B, 23.*** (With English Summary p. 96)

酵母細胞に於ける凍結障害*

凍結融解による酵素活性発現の機構

僧都　博
(低温科学研究所　医学部門)

(昭和40年7月受理)

I. 緒　言

酵母細胞の中に存在する多くの燐化合物の中で，古くからその存在が知られておりながらあまり詳細な報告のないものの一つにポリリン酸がある。1949年 Wiame[1] は酵母細胞内に存在するこの種の燐が，代謝に果たす役割の異なる2種類のものからなることを示し，これらをメタ燐酸と呼んだ。今日ではこれはポリリン酸と呼ぶべきものであるといわれている。松橋[2] はこの燐を Dowex 1 のカラムにかけて分離し，オルト燐酸から始まり重合度十幾つのものに至るまで分離した。更に1956年 Kornberg[3] は同じく酵母細胞から抽出され，Dowex 1 のカラムから KCl 濃度 0.1 M で溶出される燐化合物が，トリポリリン酸であることを確認し，同時に細胞からこの燐を分解するトリポリリン酸分解酵素を抽出した。

1963年 Tonino 等[4] は酵母細胞中の3種の燐酸分解酵素について報告し，基質特異性のないアルカリ性リン酸分解酵素は細胞膜内にあり，もう一つの基質特異性のない酸性リン酸分解酵素は細胞壁中に存在することを示した。これは1960年の Suomalainen 等[5] の報告とも一致する。

先報[6] に於いて著者は細胞からポリリン酸及びポリリン酸分解酵素を抽出してその性質を調べ，その結果から酵母細胞を凍結融解したとき分解流出する燐はポリリン酸であり，この分解はポリリン酸分解酵素の作用によるものであることを示した。

今回はこのポリリン酸及びポリリン酸分解酵素の細胞内に占める位置及び凍結融解によっておこる細胞膜の透過性の変化，ひいてはポリリン酸とポリリン酸分解酵素相互間の反応の機序について報告したい。

II. 材料及び方法

1. 材　料

新鮮なパン酵母（日甜イースト）を脱イオン水で3回洗って使用した。snail enzyme は Industrie Biologique Française S.A. 製のもので，アンプル開封後は凍結保存し，使用毎に融解して用いた。もう一つの細胞壁溶解酵素は阪大照井研究室より贈られたものを使用した。

* 北海道大学低温科学研究所業績　第738号

2. 方 法

無機燐の定量は Fiske & Subbarow 法で，metachromasy は Wiame の方法[7] に従い，4×10^{-5} M Toluidine blue を用いて 500 mμ から 650 mμ の間で起る吸光度の変化を測定した。

プロトプラスト： 完全に細胞壁を取り去ったプロトプラストは 15 時間培養の酵母細胞に，照井研究室製の細胞壁溶解酵素を作用させて製した。先ず 400 mg の細胞を 0.2 M Tris buffer (pH 7.30) 4 ml に浮游し，安定剤として 3 M NaCl と 0.6 M $MgSO_4$ の混合溶液 4 ml を加え（最終濃度で 0.5 M NaCl, 0.1 M $MgSO_4$ となる），これに 16 ml の酵素液を加え攪拌しながら 30°C で反応させた。この酵素液は原材料（細菌抽出物の硫安塩析物）を 10 倍量の脱イオン水に溶解し，冷脱イオン水に 20〜40 時間透折して得られる。この条件では 6 時間以内に細胞の 90% 以上が完全にプロトプラストになる。反応終了後 2000×g 7 分の遠心でこれを集め，冷した 0.5 M NaCl–0.1 M $MgSO_4$ の混合液で 3 度洗滌して同じ液に再浮游した。

不完全プロトプラストの製法は次の通りであった。100 ml の合成培地中で 750 mg の酵母細胞を 30°C に 9 時間培養，遠心によりこれを集め，0.1 M phosphate-citrate buffer (pH 5.75) に溶かし，水を加えて全量 13 ml とする。これに安定剤として 1.3 g の mannitol を加え，0.1 ml の snail enzyme と 30°C で反応させる。15 時間の後に細胞を遠心で集め，0.6 M NaCl 溶液で 3 度洗滌し同じ液に再浮游した。

これらプロトプラストについてポリリン酸又は，ポリリン酸分解酵素の試験をするには，抽出した酵素及びポリリン酸での実験と同じ条件で[6] 基質又は酵素の代りにプロトプラストを加えた。この場合完全なプロトプラストでは常に安定剤を加えたが，不完全プロトプラストの場合には必ずしも必要としなかった。

凍結融解： 酵母細胞又はプロトプラストの浮游液 (500 mg/ml 前後) 2〜3 ml を径 3 cm の底の平らなアルミニウムの缶に入れ液体窒素に浸して凍結，窒素の沸騰の止まったところで引き出し 30°C の温湯中で振りながら融解した。凍結融解細胞又は凍結融解プロトプラストからの燐の流出は各 pH の buffer に混じた細胞又はプロトプラスト浮游液を総量 1 ml 宛中試験管に取り，これを液体窒素中で凍結し，30°C に保った恒温水槽中で振りながら融解してそのまま反応を行なった。反応時間は融解時間も含めてのものとした。

細胞膜透過性： 未処理及び凍結融解後の細胞浮游液一定量に濃度既知のイヌリン，ラクトース及びポリリン酸溶液の一定量をそれぞれ加え，室温及び 30°C で混合直後，又は 30 分後における浮游液上清中の溶質濃度を測定し，原液と比較することから各種物質の細胞内浸透度を調べた。細胞間水分の測定には 5% イヌリン水溶液を蒸溜水に 40 時間以上透折して用い，105°C 乾燥後の乾物重量を測定した。ラクトースは同じく 5% 水溶液を作り，乾物重量から測定した。ポリリン酸は 1 N HCl 100°C 7 分間の分解の後，無機燐量を測定した。いずれの場合にも盲検としてこれら溶液のかわりに水を用いた時の乾物量又は無機燐量を測定し，測定結果から差し引いた。

III. 結　　果

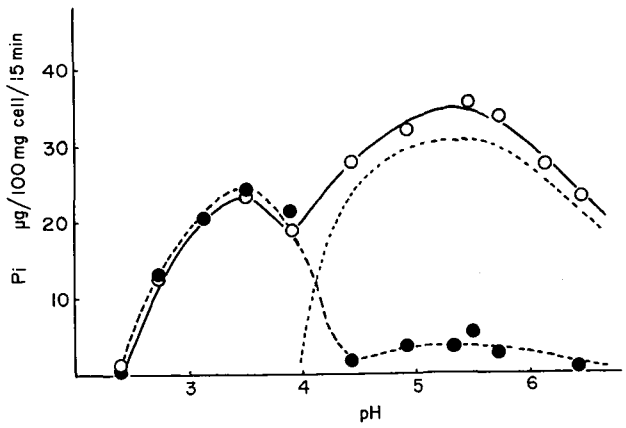
1. 細胞内におけるポリリン酸分解酵素の位置

凍結融解細胞からの燐の流出が酵素作用によるものであろうということは，前報の結果[6]及びこの種の細胞がその膜内に基質特異性のないアルカリ性燐酸分解酵素を持っていること[4]から容易に想像される。更に正常な細胞では外から加えたポリリン酸が分解されることはない(第1図参照)ということから，この酵素は細胞膜内にのみ存在するものと考えられる。このことは酵母細胞をプロトプラストにして，外から基質のポリリン酸 (0.7 M KCl 劃分[6]) を加え，そのプロトプラストの持つ酵素の活性状況を見ることによって確かめられた。結果は第1表に見られるように，正常なプロトプラストではポリリン酸をごくわずかしか分解しないが，これを凍結融解してから基質を加えた場合にはポリリン酸の分解は急激に増加している。このことから正常な状態では細胞膜内に存在する酵素が，凍結融解によって膜外基質と作用するようになったことが知られる。

第1表　正常及び凍結融解プロトプラストの酵素活性

反応混液：プロトプラスト，50 mg；基質 (0.7 M KCl 劃分)，200 μg；0.1 M $MgCl_2$，0.25 ml；安定剤 (3 M NaCl)，0.4 ml；1 M acetate buffer pH 5.50，0.25 ml；総量 3.0 ml 30°C，15 分

プロトプラストの状態	分解 P_i/50 mg·プロトプラスト/15 分
正常プロトプラスト浮遊液上清	0 μg
正常プロトプラスト浮遊液	3 〃
凍結融解プロトプラスト {上清 27, 沈澱 7}	34 〃



第1図　正常及び凍結融解細胞の外部基質分解に於ける pH 活性曲線

100 mg 細胞/0.3 ml H_2O；M/10 Mg Cl_2，0.2 ml；1 M acetate buffer，0.5 ml；400 μg/ml 基質 (0.7 M KCl 劃分)，0.5 ml 30°C，15分。---●--- 正常細胞　—○— 凍結融解細胞　------ 凍結融解によって発現した酵素活性

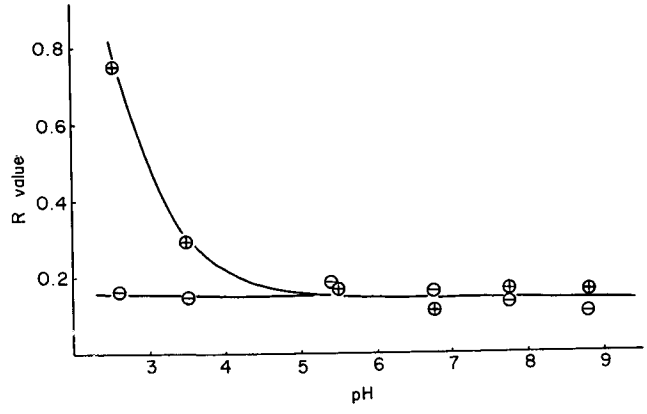
更にこの考えを支持するいま一つの結果を次に示す。先にも述べたように凍結処理をしない正常な細胞では，これに外部から基質を加えても中性附近での燐の分解流出は極めて少量より見られない。しかしこのものを凍結融解すると，この点での燐の分解流出は急激に増大する(第1図)。このとき燐の分解速度と pH との関係は，細胞から抽出精製した酵素のこの基質に対する pH 活性曲線とよく一致する（第8図参照)。

第1図における他の重要な点は，pH 3.5 附近で最大活性を示す酵素の存在である。この酵素は凍結処理を受けない正常な状態でも外からの基質を分解することができるが，凍結処理をしてもその活性は増さない。このことから酸性リン酸分解酵素は，細胞膜の外側に存在するものと考えられる。

2. 基質ポリリン酸の細胞膜透過性について

A. 未凍結細胞での R 値

前節の結果から酸性燐酸分解酵素が細胞壁内にのみ存在することが想像されたが，これは基質が細胞壁中より内部に入らないという仮定にもとづいての推論である。このことを確実に立証する目的で Conway and Downey の方法[8] に従って正常細胞でのポリリン酸及びラクトースの R 値を測定した。この値は物質が細胞内部にどの程度のところまで容易に入り得るかを示す値である。第2図にトリポリリン酸及び 0.7 M KCl 劃分の蒸溜水浮游細胞内への透過度 R と pH の関係を示した。この値は室温から 30°C 附近までは温度による影響はなく，試料と細胞の混合直後から 30 分迄の間では時間にも無関係である。0.7 M KCl 劃分の酸性側における高い値を除いては，他は広い範囲の pH 領域において平均十数パーセントの値が得られ，後述のラクトースでの値ともほぼ一致する。Conway and Downey によれば種々の物質が細胞容積の 10～20% の部分まで容易に浸透し，それ以上は入り得ないかまたは入っても速度は非常に遅い。そしてこの値は細胞壁の部分に相当するといわれる。



第2図 正常細胞における R 値と pH の関係

⊕: 0.7 M KCl 劃分 ⊖: トリポリリン酸

酵母細胞，約 0.4 g；0.7 M KCl 劃分又はトリポリリン酸，200 μg；M/2 buffer, 0.1 ml；総量 1.2 ml 室温 20 分後に細胞を除き上清を 1 N HCl 100°C 7 分間分解，P_i を Fiske & Subbarow 法で測定

このように基質が細胞壁内以上には浸透しないにもかかわらず酵素が作用すること，及び細胞の凍結によってもその活性は殆んど増さないことから酸性リン酸分解酵素は細胞壁にのみ存在するということが強く支持される。

第2表 凍結融解細胞における R 値
約0.4 g 凍結融解酵母細胞/ml H_2O，1 ml；5% ラクトース溶液，1 ml 室温 20 分後に細胞を除き上清 1 ml を 105℃ で 8 時間乾燥し乾物重量を測定。ポリリン酸については第 2 図と同じ

物質		R 値 % 正常細胞	R 値 % 凍結融解細胞
ラクトース		14.1	34.4
ポリリン酸 (0.7 M KCl 劃分)	pH 3.5	34.2	700<
	pH 8.8	10.5	31.5

B. 凍結融解細胞での R 値

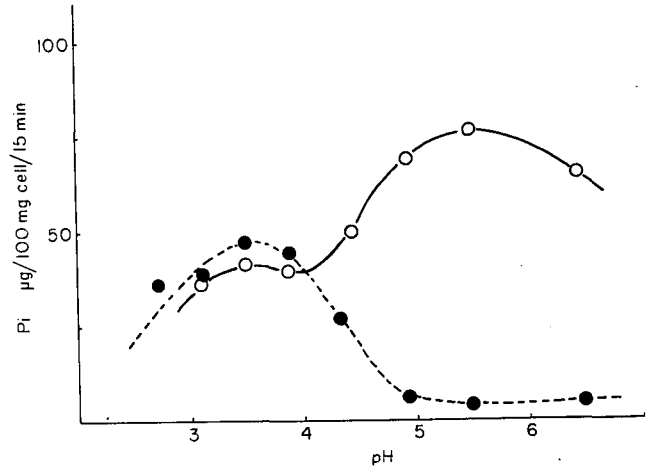
正常な細胞では外からの基質に対して活性を示さないポリリン酸分解酵素が凍結によって活性を示すようになるのは，細胞の凍結融解によって基質が酵素に接近し得るようになった結果と考えられるが，この原因となっているものは細胞膜の透過性の変化であろう。第 2 表は凍結融解細胞と正常細胞について行なった細胞膜透過性（R 値）の比較である。凍結融解試料は正常な細胞の浮游液を液体窒素で急速に凍結したのち温湯中で融解し，蒸溜水で 3 度洗ってから正常細胞浮游液と同じ濃度に蒸溜水に再浮游したものを用いた。正常な細胞の示す R 値が細胞壁の部分の容積に相当するのに対して，凍結融解細胞では溶質がもっと内部にまで浸透していることがこれによって示され，凍結融解の結果，細胞膜の透過性に変化の生じたことが想像される。

C. 細胞内におけるポリリン酸の位置

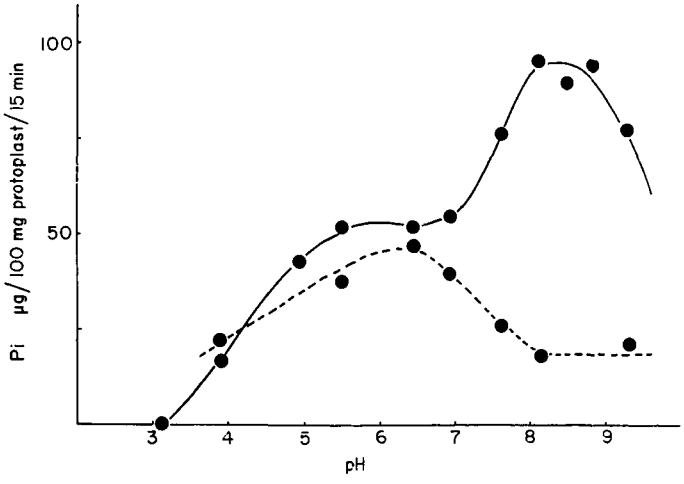
中性附近で活性の強いポリリン酸分解酵素が細胞膜内に存在するのに対して，その基質となるポリリン酸が同じ細胞内に存在しながら正常な状態ではこの酵素と反応せず，細胞を凍結融解することによって始めて反応が起こること，及び外から加えたポリリン酸が正常な細胞では細胞壁部分にしか入らないのに，これを凍結融解することによって細胞膜の透過性が変り，膜内まで浸透するようになることなどから考えて，細胞内に存在するポリリン酸は細胞膜より外に存在するのではないかとの想像がなされる。既に述べたように，この細胞の細胞壁部分には酸性リン酸分解酵素が存在するので，ここにポリリン酸が存在するならば，酵母を pH 3.5 附近に保つことによって，正常な細胞においてもポリリン酸の分解を起こすことができるはずである。酵母を麦汁培地中で培養し，対数期のものを集めるとポリリン酸を貯えた細胞が得られる。このような細胞を使用して得た正常細胞からの燐の分解流出量と pH の関係を第 3 図に示す。また同じ細胞を液体窒素で一度凍結融解した後，同様に処理した時の結果をも同時に併記する。この第 3 図は第 1 図における正常細胞，凍結融解細胞の結果とそれぞれ非常に良く対応しており，これから細胞内部に蓄積したポリリン酸は，外部から加えたポリリン酸と同様に，酸性リン酸分解酵素とは未凍結処理の細胞においても反応するが，ポリリン酸分解酵素とは凍結融解後に始めて反応するようになることがわかる。このことは細胞内に蓄積したポリリン酸が細胞膜外に位置するとの考えを支持するものである。

ポリリン酸が細胞膜外に存在することは全く別の方法でも確かめられた。酵母細胞は強固な細胞壁で包まれているので，そのままの状態では細胞浮游液にポリリン酸分解酵素を加えて

もポリリン酸を分解することはない。そこで細胞にカタツムリの消化酵素を作用させて，細胞壁を部分的に分解溶離した不完全なプロトプラストを作り，このプロトプラストの浮游液に外からポリリン酸分解酵素を作用させて無機燐の流出を調べた。第4図は未凍結プロトプラストに外部から酵素を作用させた時のpHと燐流出量との関係を示したものである。第5図に同じ不完全プロトプラストを凍結融解したときの自己分解による燐流出とpHの関係を同様に示した。これら2図の比較によって細胞の凍結融解の結果，分解されるポリリン酸が，外部から加え



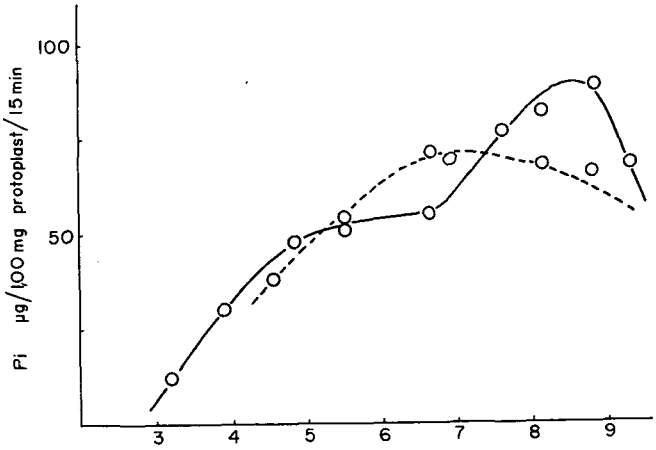
第3図 細胞内に蓄積されたポリリン酸分解に於けるpH活性曲線
100 mg 細胞/0.3 ml H_2O；M/10 $MgCl_2$, 0.2 ml；1 M acetate buffer, 0.5 ml 水を加えて総量2.0 ml 30°C, 15分
…●… 正常細胞 —○— 凍結融解細胞



第4図 不完全プロトプラストに対する外部からの酵素作用とpHの関係
50 mg プロトプラスト/0.3 ml H_2O；M/10 $MgCl_2$, 0.2 ml；酵素液, 0.3 ml；buffer, 0.2 ml 水を加えて総量2.0 ml 30°C, 15分。 実線 Mg^{++} 添加 点線 Mg^{++} 無添加

た酵素によっても同じように分解されることが知られる。外から加えた酵素の場合にも又凍結融解の場合にも，Mg^{++} を加えない場合の燐分解の pH 活性曲線は抽出精製した酵素の同じく抽出精製したポリリン酸に対する pH 活性曲線と良く一致する。しかし細胞壁の溶解が進み，完全なプロトプラストになると酵素の作用によるポリリン酸の分解は見られなくなる（第3表）。

これらの事実からポリリン酸は細胞壁部分に存在するものと考えられる。



第5図 凍結融解による不完全プロトプラストからの燐流出と pH の関係
50 mg プロトプラスト/0.3 ml H_2O；M/10 $MgCl_2$, 0.2 ml；buffer, 0.2 ml 凍結融解後水を加えて総量 2.0 ml 30℃, 15分。 実線 Mg^{++} 添加 点線 Mg^{++} 無添加

第3表 細胞の状態と外からのポリリン酸分解酵素作用状況
反応混液：50 mg 細胞又はプロトプラスト；0.1 M $MgCl_2$, 0.1 ml；ポリリン酸分解酵素液，0.3 ml；安定剤（3 M $NaCl_2$), 0.3 ml；M/2 Tris buffer pH 8.4, 0.1 ml 水を加えて総量 1.5 ml 30℃, 15分

細胞壁溶解酵素作用時間	0	1	2	3	4	5	6	7 時間
細胞の状態	正常細胞	不完全プロトプラスト						完全プロトプラスト
分解 P_i/15分	0 μg	25 〃	35 〃	30 〃	23 〃	13 〃	8 〃	0 〃

IV. 考　　察

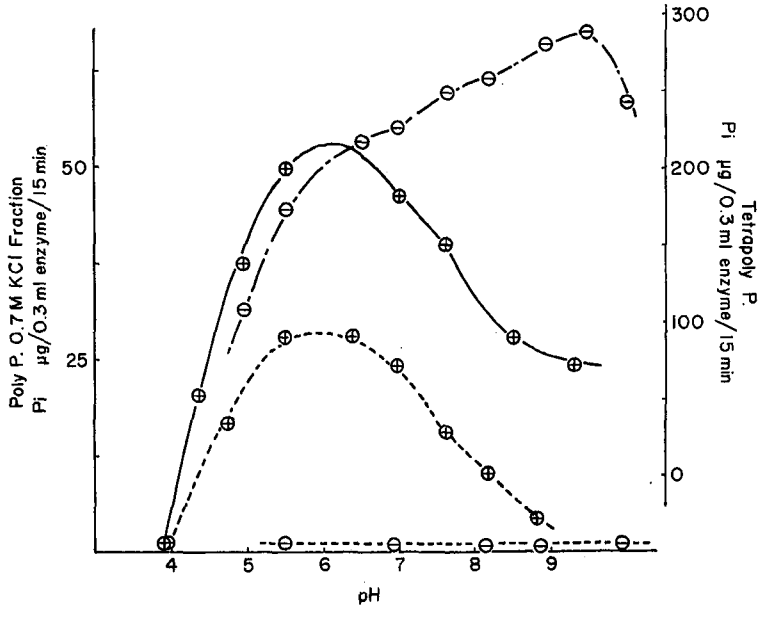
すでに前報に報告したように，細胞の凍結融解に際してポリリン酸を分解する酵素が作用することは明らかで，しかもそれが細胞内に占める位置についても細胞膜内ということが明らかになった。先に Tonino 等は酵母細胞の細胞膜の内側に基質特異性のないアルカリリン酸分解酵素が存在することを発表しており，その至適 pH は基質によって多少異なるが，大体 pH 9～10 附近にあたる[4]。この実験に使用した酵素液でもトリポリリン酸，テトラポリリン酸を基質としたとき，その至適 pH は 9 附近にあり，この点からは Tonino 等の酵素とも一致する。

しかし彼等の場合酵素は1種類と考えているのに対して，今回使用された酵素液では充分に精製した 0.7 M KCl 劃分のような基質ではその至適 pH が異なる (pH 6.0 附近)，また活性の度合いも基質によってかなり違いがある，等の点から2種以上の酵素が混じっている可能性もあり，これらの研究者の報告した酵素とポリリン酸分解酵素が同一のものであるかどうかは今のところ明らかでない。更に，アルカリリン酸分解酵素は正常な細胞及びプロトプラストでは外部からの基質に対して活性を全く示さない[4] のに対して，ポリリン酸分解酵素の場合は正常な細胞及びプロトプラストでも，中性附近で極くわずかながら常に活性が見られるという点からも，別の酵素である可能性が考えられる。しかしいずれにせよ，このリン酸分解酵素が細胞膜内に存在するという点については先の報告と一致する。

正常な細胞内におけるこの酵素の役割を，細胞壁内に貯蔵物質として蓄積されたポリリン酸から適宜リン酸を分解して，内部で使用できるようにするためのものと考えれば今回の実験結果をうまく説明することができる。

酸性で活性を示す酵素の存在については，酵母の増殖の過程において一定の時期にこれが使用されるものと考えられるが，通常の状態での細胞における凍結障害の機構とは関係ないものと思われる。

抽出されたリン酸分解酵素による 0.7 M KCl 劃分分解の pH 活性と，不完全プロトプラストに酵素を作用させた時及び，凍結融解した不完全プロトプラストからの無機燐の遊離の場合

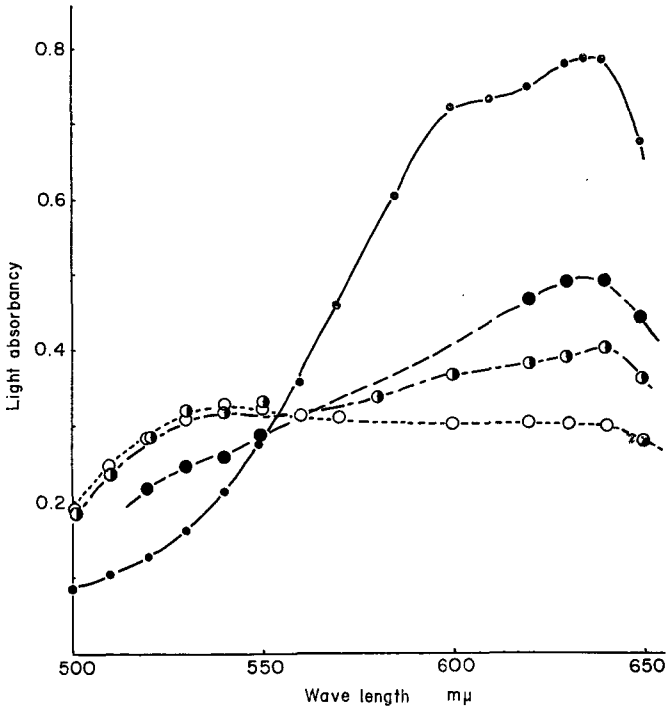


第6図 ポリリン酸分解酵素の pH 活性曲線

酵素液 0.3 ml；ポリリン酸 (0.7 M KCl 劃分)，200 μg；テトラポリリン酸，100 μg；M/2 buffer, 0.2 ml 水を加えて総量 2.0 ml 30°，15 分。 ⊕：0.7 M KCl 劃分 ⊖：テトラポリリン酸
実線及び破線：Mg^{++} 添加 点線：Mg^{++} 無添加

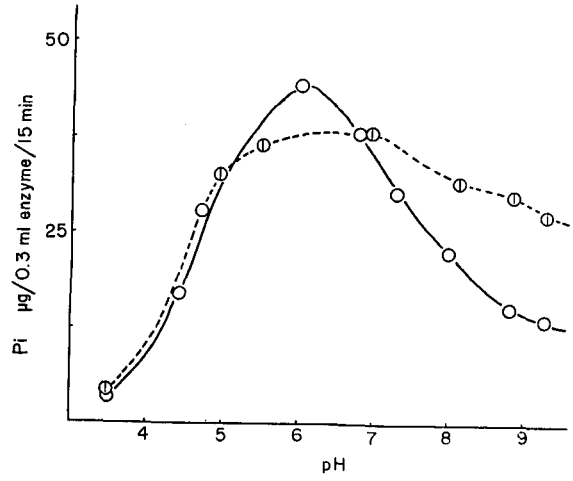
の pH 活性曲線が，アルカリ側で差が出来ることについては（第 4, 5, 6 図参照），この酵素液の諸種の基質に対する至適 pH 及び活性度の違いから説明することができる。第 6 図に示すようにこの酵素はテトラポリリン酸を基質としたとき，Mg^{++} の存在下では 0.7 M KCl 劃分を基質としたときに比して 4 倍程度の活性があり，特にアルカリ側における活性は他の部分に比して極めて高いが，Mg^{++} の存在しない状態では pH 全領域で殆んど活性を示さない。一方 0.7 M KCl 劃分を基質とした場合には Mg^{++} による活性賦活も僅少であり，至適 pH も影響を受けない。そこで正常細胞及びプロトプラストにはテトラポリリン酸程度のものが少量含まれていると考えると Mg^{++} の存在下ではアルカリ側で高い無機燐の流出が見られ，Mg^{++} のない状態では中性附近でのみこれが見られることの説明がつく。細胞内におけるこのような低分子燐酸の存在については，0.7 M KCl 劃分が貯蔵日数につれて metachromasy の程度が小さくなり（第 7 図），同時にポリリン酸分解酵素の pH 活性曲線でもアルカリ側での活性が増してゆくことから想像される（第 8 図）。

細胞の凍結によってこれら基質と酵素が接触して分解が起こるとするとこのためには細胞膜になんらかの形で変化が生じ，酵素又は基質の一方，又は両方が透過し得るようになることが



第 7 図　ポリリン酸 (0.7 M KCl 劃分) の metachromasy と貯蔵中に於けるその変化

4×10^{-5} M Toluidine blue 水溶液
200 μg ポリリン酸 (0.7 M KCl 劃分)
……○…… 抽出直後　－－◐－－ 1 カ月保存後
－－－●－－－ 2 カ月保存後　——●—— 色素のみ



第8図 ポリリン酸分解酵素の pH 活性

酵素液 0.3 ml；ポリリン酸 (0.7 M KCl 劃分), 200 μg；M/10 $MgCl_2$, 0.2 ml；M/2 buffer, 0.2 ml

—○— 基質精製直後 …①… 同 4°C 2 カ月保存後

必要である。酵母細胞の構成比率は乾燥物 24%，水分 76% であるから[9]，もし溶質が単なる拡散だけで細胞内に入るとすると，全細胞容積の 76% が最大値となる筈である。この点凍結融解細胞における浸透度 R がラクトース 34.4，0.7 M KCl 劃分，pH 8.8 の場合 31.5% であることは理論値の約 1/2 であり，このような凍結融解試料での細胞の障害率とも考え合わせると先ずは妥当な値と考えられる。一方 0.7 M KCl 劃分で pH 3.5 の場合には，測定値からだけ見れば理論値の数倍にもなっているが，このことは加えた溶質が拡散だけではなく，吸着或いは代謝のような特殊な状態で細胞に沈着したものと考えなければ説明がつかない。正常細胞の場合に酸性側で浸透度がやや高い結果に出ているのは同じような現象の結果と考えられる。0.7 M KCl 劃分よりも分子量が小さいと考えられるトリポリリン酸が同じ pH 3.5 で，他の部分と変ならいことからもこの点が支持される。

凍結融解によって細胞膜に生じる破損の性質についての詳細な説明は現在のところない。しかしイヌリンのように細胞壁にも浸透することのできない物質では凍結融解による透過性の変化は見られないので[10]，細胞壁そのものの破壊は考えられず，細胞壁に囲まれたままの状態で細胞膜に小さな破壊が起きるものと想像される。細胞膜に起きる破壊の原因となるものとしては，細胞水分の細胞内に於ける凍結，或いは溶媒の凍結から来る細胞水分の急激な移動などが考えられ，これらのことによって膜自体の半透的性質が破壊されるものと考えられる。

摘　要

酵母細胞内に存在するポリリン酸及びそれを分解する酵素の細胞内における位置を調べた結果，ポリリン酸分解酵素は細胞質内に，酸性リン酸分解酵素及びこれら両者の基質となるポリリン酸は，細胞壁中にのみ位置することが知られた。

酵母細胞を凍結融解することによって，細胞膜の透過性に変化が生じ，正常な状態では細胞壁の部分にしか入らないラクトース及びポリリン酸が，細胞膜内部まで浸透し得るようになる。しかしイヌリンは未凍結の場合と同じく細胞には全く浸透し得ない。

以上の結果から，細胞の凍結融解によって細胞膜の透過性に変化が生じ，酵素と基質の接触が起きるためにポリリン酸の分解反応が起きるものと推定された。

終りに，細胞壁溶解酵素を下さった阪大照井研究室のかたがたにお礼申し上げる。御指導御校閲下さった根井教授に感謝する

文　献

1) Wiame, J. M. 1949 The occurence and physiological behavior of two metaphosphate fractions in yeast. J. Biol. Chem., ***178***, 919-929.
2) Matsuhashi, M. 1956 Über die chromatographische Trennung von kondensierten Phosphatenan Anionenaustauscherharzen. J. Biochem., ***44***, 65-67.
3) Kornberg, S. R. 1956 Tripolyphosphate and trimetaphosphate in yeast extract. J. Biol. Chem., ***218***, 23-31.
4) Tonino, G. J. M. and Steyn-Parvé, E. P. 1963 Localization of some phosphatases in yeast. Biochim. Biophys. Acta, ***67***, 453-469.
5) Suomalainen, H., Linko, M. and Oura, E. 1960 Changes in the phosphatase activity of baker's yeast during the growth phase and location of the phosphatases in yeast cell. Biochim. Biophys. Acta, ***37***, 482-490.
6) 僧都　博 1964 酵母細胞に於ける凍結障害. 凍結融解による燐化合物分解の機構. 低温科学, 生物篇, ***22***, 109-118.
7) Wiame, J. M. 1947 The metachromatic reaction of hexametaphosphate. J. Am. Chem. Soc., ***69***, 3146-3147.
8) Conway, E. J. and Downey, M. 1949 An outer metabolic region of the yeast cell. Biochem. J., ***47***, 347-355.
9) 僧都　博・根井外喜男・尾藤方通 1961 微生物の水分とその凍結. 特に酵母並びに大腸菌の菌体水分量と生死との関係について. 低温科学, 生物篇, ***19***, 49-58.
10) 荒木　忠 1965 酵母細胞の醗酵に及ぼす凍結融解の影響. 低温科学, 生物篇, ***23***, 97-109.

Summary

A series of studies of cell iujury by freezing were done from the biochemical point of view. In the present paper, the localization of polyphosphates and phosphatases in yeast cells, and changes in the permeability of cell membrane by freeze-thawing are reported.

It was found that a phosphatase, showing a high activity at neutral pH, existed inside the cell membrane, and that another acid phosphatase and polyphosphates were in the cell wall.

The freeze-thawing treatment resulted in some changes in permeability of cell membrane in yeast cells. Lactose and polyphosphate, which normally can only penetrate the cell wall, became capable of penetrating the cell membrane too, but inulin could not at all.

Conserning the mechanism of degradation of polyphoshates in freeze-thawed cells, it was assumed that such changes in the permeability of the cell membrane caused by freeze-thawing may bring about the contact of phosphate outside the cell membrane with phosphatase inside the membrane and finally effect the decompostion of phosphate. Some possible explanations for injury of cell membrane were also made.