



Title	凍結融解又は凍結乾燥酵母菌体の電子顕微鏡的観察
Author(s)	根井, 外喜男; NEI, Tokio; 坂牛, 栄治 他
Citation	低温科学. 生物篇, 17, 63-69
Issue Date	1959-10-24
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/17623
Type	departmental bulletin paper
File Information	17_p63-69.pdf



凍結融解又は凍結乾燥酵母菌体の電子顕微鏡的観察*

根井外喜男 坂牛栄治

坂上康雄 佐藤正一

(低温科学研究所 医学部門)

(昭和34年7月受理)

I. 緒 言

酵母を低い温度でいろいろ処理した報告は かなり前から多数発表され^{1,2)}, 形態的に観察した報告も少なくはない^{3,4)}。われわれはいろいろな凍結処理を加えたものについて電子顕微鏡を用いて吟味を行った。特に今回は酵母を凍結させてから融解, 乾燥または乾燥後復水したもののについての細胞の形態変化, 就中細胞内構造の変化を知ろうとして実験した。

II. 実験方法

1. 使用材料

Saccharomyces cerevisiae (S. 214) を麦芽汁寒天に 30°C, 72 時間培養してから石膏製の器に菌塊を移し載せ, 更に器の下部を蒸留水で浸して 30°C, 24 時間放置した。こうして得られた菌を蒸留水で 1 回洗滌し実験材料として使用した。

なお, このような gypsum slant に移して発芽する状態にしたものの超薄切片像では, 菌体の微細構造が比較的明瞭であるが, gypsum slant に移さないものでは内部構造が明らかではなかつた。

2. 凍結による変化を知るための実験方法

a. 凍結のさせ方

菌濃度 10 mg/cc の蒸留水浮遊液 1.0 cc をいろいろな冷却速度で凍結させた。即ち,

1) 比較的高い温度で凍結させる場合。-5°C の恒温槽内に材料を 60 分おくと十分な過冷却の状態になるので, 微細な氷片で植氷して凍結させ, ついで -10°C に 60 分, -30°C に 60 分おいた。

2) -30°C の低温室に材料を放置して自然に過冷却を破らせて凍結させる場合。

3) -190°C (液体窒素) に材料を浸して, かなり早い冷却速度で凍結させる場合。

b. 融解

*北海道大学低温科学研究所業績 第 513 号

以上の3通りの方法で凍結させたものを37°Cの温湯槽に浸して融解させた。

c. 凍結乾燥

上記3種の方法で凍結させた材料を直ちに凍結乾燥機にとりつけ、 10^{-2} mm Hgの真空度、 -190°C のコールドトラップを用いて乾燥した。

d. 凍結乾燥後の復水

凍結乾燥した材料を1.0 ccの蒸留水で復水させ10分間放置した。

3. 電子顕微鏡標本作製法

以上の諸種の条件で作った材料を電子顕微鏡で観察するために通常の乾燥標本と超薄切片標本とを作った。

a. 通常の乾燥標本作製法

各種処理を行った菌液をフォルムバルメッシュに載せて室温乾燥し、クロームでシャドウを行った。

b. 超薄切片標本作製法

諸種の凍結の実験による菌の浮遊液を遠心操作して菌体を集め、一般に行われている超薄切片の作製要領⁹⁾即ち、固定→水洗→脱水→包埋→切削を行った。

固定液には、蔗糖を8%の割合に加えた1%オスミウム酸の燐酸緩衝液(pH 7.4)を用い^{6,7)}、 0°C で4時間固定した。

脱水には70→96→100%アルコールと段階的にそれぞれ1時間ずつ菌を浮遊させ、包埋には100%アルコール+プラスチックモノマー→100%プラスチックモノマーと各1時間ずつ菌を置きかえて、最後にカプセルに封入して 45°C で重合させた。

なお、凍結乾燥した菌は、オスミウム酸蒸気で60分密閉固定してから直接プラスチックモノマーで封入し、4時間静置後重合させた。

このようにして得られた諸材料を熱膨脹式マイクロームで切削し、メッシュに載せて観察した。

4. 観察方法

日本電子光学製V-L型を用い、主として80KV、直接4,900倍で観察し撮影した。

III. 実験成績

I 一般乾燥標本による観察結果

(1) 無処理正常菌体

菌液をメッシュに載せてそのまま室温乾燥したのものでは、形態はほぼ整つて楕円形であり、一般に電子密度の大きいものが多いが、透過性のよいものも僅かに認められた。これは培養の古いもので多く現われるのでghostと考えられる⁹⁾。また、これら細胞内には1~数個の大きな、或いは多数の小さな電子不透過性で輪廓のはつきりとした部分がしばしば認められた。この中で大きいものは核に相当し、小さいものは顆粒かミトコンドリアなどに相当するものと思

われる⁹⁾(図版 I-1, 2)。

(2) 凍結融解菌体

この場合は対照のものに較べて ghost とみられる透過性のよい菌がやや多く、細胞の破壊像も僅かであるが現われ、とりわけ破裂口のようなものがよくみえる。また菌体の中央を縦走する不透過性のものでしわ様に変形の形態を示すものがかなり多く認められることが異なつてみられた(図版 I-3)。なお、更に細胞内にみえる大小の多数の電子密度の大きい部分は無処理正常のものと同様であつた(図版 I-4)。

以上の所見は、凍結速度の大小に拘らずほぼ同様で、はつきりした差は認めにくかつた。しかし、比較的高い温度で凍結させたものは、細胞内の大小の電子密度の大きい部分は、まれに対照に近く輪廓はやや明瞭であつた(図版 I-5)。

(3) 凍結乾燥後、復水した場合

凍結融解したものと同様に無処置のものに較べて ghost とみられる電子密度の小さな菌がやや多く、細胞の破壊像もかなり認められた(図版 I-6)。また細胞内の多数の大小の電子密度の大きい部分も同じように輪廓が不明瞭であつた。しかし凍結融解のものでみられた菌体にしわ様に変形したものは認められず、一般に形態のほぼ整つた楕円形のものであつたことがこの条件によるものの特徴であつた(図版 II-7)。

以上のような所見は、凍結時の条件、就中冷却速度に拘らないで共通にみられ、それぞれの条件による特別な差異は認めにくかつた。ただ、比較的高い温度で凍結したものでは、凍結速度の早いものにくらべて電子密度の小さな所謂 ghost と破壊像が少ない点がやや異なるようであつた。

II 超薄片標本による観察結果

(1) 無処理対照

一般に形態のほぼ整つた楕円形を示すが、しばしば不整形のものもみられた。細胞は原形質に相当するものと、その周囲を包んでいる細胞膜とに大きくわけられるが、同一視野でも電子密度が高く構造のあまりはつきりしないものもあれば、菌体がやや大きく微細構造のかなり明瞭なものもあつた。なお、原形質は一般にコンパクトであるが、中には標本作製時の artefact によると思われる皸裂、空隙もしばしば認められた。

微細構造のよくみえるものでは隔膜によつて周囲と明らかに区別することの出来る大小の円形とか楕円形のもので認められたが、そのうち大きいものは細胞に1~数個位しかみられないが、小さいものは多数みられた。前者は核にまた後者は顆粒やミトコンドリアなどに相当するものであらうと想像された¹⁰⁾(図版 II-8, 9)。

(2) 凍結融解した場合

無処理の正常菌体でも超薄切片像では形態の不整形のものがしばしば認められるので、これとはつきり区別ができるほどの凍結融解に特有な形態的の変化を見つけることは困難であつた。しかし細胞原形質の構成で皸裂、空隙などが比較的多く現われ、その程度もやや著しいよ

うにみえた(図版 II-10, 11, 12)。

いろいろと凍結速度を変えても形態的な差はあまり得られなかつたが、液体窒素で凍結したもので、図版 II-12 でみられるような顆粒様物質を包んでいる被膜が破れたのがみられた。

(3) 凍結乾燥した場合

対照或いは凍結融解のものに較べて細胞の著しい萎縮又は破壊像が多かつたが、核や顆粒様物質についてははつきりわからなかつた(図版 III-13)。なお、細胞膜はほぼ形態が整っているが、原形質のかなり萎縮していることもあつた(図版 III-14)。

いろいろな凍結速度のものを観察しても、それぞれの差異は余りはつきりしなかつた。

(4) 凍結乾燥後、復水した場合

菌液を凍結乾燥したままのものでは、前述のように細胞の著しい萎縮とか破壊がみられたが、これを更に復水すると、かなり形態の整つた対照と同じ像を示すものが多かつた。しかし中には、図版 III-15 でみられるような細胞原形質内に地模様にもらのある電子密度の小さな部分の現われることがあること、又、図版 III-16 でみられるような細胞原形質が intact なまま特異な細胞膜剝離をおこなっているものがあることなどで、このような像は、対照は勿論他の条件のものでは認められなかつたので、この場合の特徴かもしれない。また、細胞実質内にある顆粒様物質で、それを覆っている被膜との間に空隙のできているのが屢々みられた(図版 III-17)。

しかしこのようなものは凍結融解の際にも稀にみられることがあつた。

なお、凍結速度の差によつて、余りはつきりした形態上の差はできなかつた。

IV. 総括ならびに考察

われわれは酵母菌液を種々の条件で凍結させた場合におこる菌体の形態的变化(とくに細胞内構造の変化)を知るために、電子顕微鏡を用いて、酵母菌液をいろいろな凍結速度で凍結させてから融解、乾燥または乾燥後復水したものについて観察した。

これには通常行われている細菌の電子顕微鏡的観察の方法、即ち、菌液をそのまま室温乾燥させてみるものと、菌を固定してから超薄切片を作つてみるものとの両者によつて観察を行つた。この場合、前者の方法では殆んどが電子密度の極めて大きい菌としてみられて菌体内構造があまりはつきりせず、後者の方法では菌体内構造は認められるが標本作製時の artefact が大きいので観察に当つては十分な注意が必要と思われた。

しかし、それでも凍結処理を加えない対照のものに較べて、これらの処理をしたものでは明らかに差異があるように思われた。これらの観察結果を一括して第1表に示したが、これでわかるように酵母菌は凍結処理によつて形態的に変化がみられ、とくに細胞内にもいろいろな変化がみられた。しかし細胞内に直接氷晶を証明しない限り、このような変化から直ちに細胞内凍結があつたとは云いきれない。

第 1 表

		無処理の対照	凍 結 融 解	凍 結 乾 燥	凍結乾燥後復水
通 常 標 本	一 般 形 態	ほぼ形態の整つた楕円形。 電子密度の大きいものが大多数を占め、僅かにghostとみられる電子密度の小さなものがみられる。	しわ様に変型のあるものが多い。 破裂口をもつものが僅かみられる。 電子密度の小さなものがやや多い。	—	ほぼ形態の整つた楕円形。 破裂像をもつものがしばしばみられる。 電子密度の小さなものがやや多い。
	細胞内構造	核、或いは顆粒、ミトコンドリアとみられるものは輪廓が明瞭である。	核、或いは顆粒、ミトコンドリアとみられるものは輪廓が不明瞭。	—	核、或いは顆粒、ミトコンドリアとみられるものは輪廓が不明瞭。
超 薄 切 片 標 本	一 般 形 態	ほぼ形態の整つた楕円形のものが多いがしばしば不整形のものもみられる。	不整形のものが多い	萎縮、破壊が著明。	形態がやや整っている。 細胞原形質がintactのまま、細胞膜剝離のあるものがしばしばみられる。
	細胞内構造	核、顆粒、ミトコンドリアなどとみられるものは定型的に配列しているものが多い。 原形質は一般に緻密であるが、中には皸裂像がみられる。	原形質の皸裂像、破壊像のものが多い。	核などの変形。 原形質の萎縮。	顆粒様物質で、それを覆っている被膜との間に空隙のみられることがある。 原形質に地図状にむらになつた電子密度の小さな部分のあることがある。

また凍結速度をいろいろと変えてみても質的に余りはつきりした差異をみとめることは出来なかつた。さきに根井³⁾は光学顕微鏡で直接酵母の凍結状態を観察し、比較的高い温度で緩慢に冷却した場合は細胞外凍結がおこるのに反し、低温での急速凍結では細胞内凍結が多く認められると報告したが、今回の電子顕微鏡的観察ではそのようなはつきりした差異はみとめられなかつた。

酵母は凍結融解又は凍結乾燥によつて機能的に障害されることは従来も知られているところであるが¹⁾、我々の実験で形態的にもかなり障害をうけることが明らかとなつたわけである。しかしこれらの形態的变化を機能的変化と直接結びつけて種々の説明を下すためにはまだまだ所見が不充分である。更に今後の技術的な発展にまたなければならぬ。

V. 結 論

酵母菌体の凍結融解又は凍結乾燥による形態的变化を知るために、菌液を種々の冷却速度で凍結させてから融解、乾燥または乾燥後復水したものについて通常の標本及び超薄切片標本

を作り電子顕微鏡的に観察した。

この結果、いずれの標本においても菌体内構造の変化或いは破壊像などがみられたが、しかし冷却速度による著明な差はみとめ難かつた。

電子顕微鏡撮影に種々の便宜を計つていただいた北大結核研究所高橋昭一郎氏に深く感謝の意を表します。

文 献

- 1) 根井外喜男・小川忠人・兼平信一・秋元博 1954 酵母の機能に及ぼす低温の影響. 日本農芸化学会誌, **28**, 94.
- 2) Wood, T. H. & A. M. Rosenberg 1957 Freezing in yeast cells. *Biochim. Biophys. Acta*, **25**, 78.
- 3) 根井外喜男 1954 酵母の凍結過程 (第1報). 日本農芸化学会誌 **28**, 91.
- 4) Hansen, I. A. & P. M. Nossal 1955 Morphological and biochemical effects of freezing on yeast cells. *Biochim. Biophys. Acta*, **16**, 502.
- 5) 東 昇 1956 電子顕微鏡用超薄切片をつくる最も新しい方法. ウィルス, **6**, 69.
- 6) 小倉光夫・古田幸男 1957 電子顕微鏡的研究に用いられる固定に関する研究 (就中, 滲透圧について). 電子顕微鏡, **5**, 103.
- 7) Bahr, G. F., G. Bloom & U. Friberg 1957 Volume changes of tissues in physiological fluids during fixation in osmium tetroxide or formaldehyde and during subsequent treatment. *Exp. Cell. Res.*, **12**, 342.
- 8) Yamamoto, T. 1954 Electron microscopy of yeast. The characteristics of cell wall. *J. Electronmicroscopy*, **2**, 26.
- 9) Bartholomew, J. W. and R. Lerin, 1955 The structure of *Saccharomyces carlsbergensis* and *S. cerevisiae* as determined by ultrathin sectioning methods and electron microscopy. *J. Gen. Microbiol.*, **12**, 473.
- 10) Agar, H. D. & H. C. Douglas 1957 Studies on the cytological structure of yeast. *Electron microscopy of thin sections. J. Bact.*, **73**, 365.

Résumé

Freeze-thawed or freeze-dried yeast cells were electronmicroscopically examined by the use of ordinary air-dried and ultra-thin-sectioned specimens. Destruction of cellular structures was often observed in most cases, but no significant difference due to rapid or slow rate of cooling was recognized.

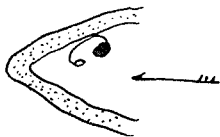
図版説明

普通の標本

- 図版 I-1 対照。
- 図版 I-2 対照。
- 図版 I-3 凍結融解 (-30°C 凍結)。
- 図版 I-4 凍結融解 (-30°C 凍結)。
- 図版 I-5 凍結融解 (-5°C 凍結)。
- 図版 I-6 凍結乾燥後、復水 (-190°C 凍結)。
- 図版 II-7 凍結乾燥後、復水 (-190°C 凍結)。

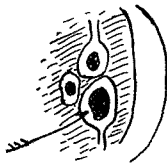
超薄切片標本

- 図版 II-8 対照。
- 図版 II-9 対照。
- 図版 II-10 凍結融解 (-30°C 凍結)。
- 図版 II-11 凍結融解 (-5°C 凍結)。
細胞膜内に電子密度の強い顆粒がみられるが1例の観察だけなので **artefact** かも知れない。
- 図版 II-12 凍結融解 (-190°C 凍結)。



顆粒様物質を覆っている被膜が破裂している像。

- 図版 III-13 凍結乾燥 (-30°C 凍結)。
- 図版 III-14 凍結乾燥 (-190°C 凍結)。
- 図版 III-15 凍結乾燥後、復水 (-5°C 凍結)。
原形質内にみられる、むらのある像は他の条件でみられる原形質の皸裂像と異なる様相を示す。
- 図版 III-16 凍結乾燥後、復水 (-5°C 凍結)。
- 図版 III-17 凍結乾燥後、復水 (-30°C 凍結)。



顆粒様物質で被膜の内側に空隙がある。

