HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	酵母細胞の核酸合成過程における凍結障害
Author(s)	僧都, 博; 荒木, 忠
Citation	低温科學. 生物篇, 20, 69-79
Issue Date	1962-12-20
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/17663
Type	departmental bulletin paper
File Information	20_p69-79.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

Hiroshi SOUZU and Tadashi ARAKI 1962 Injury on Nucleic Acids Synthesis due to the Freezing and Thawing of Yeast Cells. *Low Temperature Science, Ser.* ***B, 20.*** (With English résumé p. 79)

酵母細胞の核酸合成過程における凍結障害*

僧都　博　荒木　忠
(低温科学研究所　医学部門)

(昭和37年8月受理)

I. 緒　　言

酵母を凍結融解したとき一般に凍結温度の低下，凍結速度の大きさに従って生残率が減少することは良く知られた事実である。一方生きているものであっても，このような処理を受けた細胞では，通常のものにくらべて培養開始後増殖を始めるまでの時間即ち lag phase がかなり延長することが見出されている。更にこの発育の遅れは，5% グルコース溶液で 29°C, 12 時間前培養をすることによって，無処理対照とほぼ同じ程度までもどすことが可能であるという報告もある[1]。このような事実から，酵母の凍結障害はその増殖能に密接な関連をもつ障害であることが想像される。そうしてその障害の程度によって，恢復不可能なものは死細胞と考えられ，恢復可能なものは，増殖はある程度遅れるが結局は生きた細胞として扱われることになる。

こうした考え方にたつと，凍結融解による細胞障害の本態を知るためには，細胞増殖のもとになる反応の機構と，それに対する凍結融解の影響を調べて行くことが必要になる。酵母の増殖が核酸の合成と重要な関係をもっていることは Ogur 等の研究によっても明らかなことであり[2]，凍結融解による核酸合成能の変化が，細胞の増殖能の変化の重要な因子になっていることは想像にかたくない。著者らは，核酸の主要構成物質である燐の動きに注目して，これから核酸合成能の変化を追求し，細胞の凍結障害の機構を明らかにしようとした。

II. 実験材料並びに方法

1) 使用材料

市販のパン酵母(日甜イースト)を冷蒸溜水で毎分 3000 廻転, 15 分間宛 2 度遠心洗滌する。この沈澱に White の方法[3]に従って，水を加えて 500 mg/ml の酵母浮遊液を作り，これを用いて以下に示すような処理や測定を行なった。

2) 凍結融解

イ. 急速凍結　　上記の酵母浮遊液を約 40 ml とり，直径 5 cm の底の平らなアルミ缶に

* 北海道大学低温科学研究所業績　第 622 号

入れて，液体窒素で急速に凍結した。充分時間をおいて，液体窒素の沸騰のとまったところで缶を取り出し，直ちに＋25℃の温湯 Bath で振盪しながら融解した。実験条件によって同じ操作を2度，3度くり返して行なった。

ロ．緩慢凍結　同じ材料約 40 ml をガラス試験管に取り，0°～－50℃は毎分 0.1℃で凍結，－50℃から下は液体窒素の温度まで急速に冷却した。融解は急速凍結の場合と同じ条件であった。

3) 培地及び培養条件

通常の実験では普通麦汁培地を用いたが，特に燐の動きを調べるためには White の合成培地を作り[4]，燐酸を完全に除いた培地では，燐酸バッファーの代りに酢酸バッファーを使って pH を調整し使用した。

この培地に上記の材料を 10 mg/ml の濃度で浮遊し攪拌しながら 29℃で培養した。一定時間毎に浮遊液を定量的に(通常は 100 ml)採取し，直ちに氷冷して代謝をとめ，冷蒸溜水で二度洗滌した後凍結乾燥したものについて，核酸及び燐の抽出を行なった。特に燐の性質を調べるために一つの試料に対して前培養を行なったり，或いはある条件の培養から次の培養に移しかえるには，その培養液から遠沈によって細胞を集め，氷冷した蒸溜水で二度遠心洗滌して次の培地に同じ濃度で再浮遊した。

4) 核酸及び燐の抽出

上記の材料から Ogur & Rosen の方法[5]に従って，酸可溶性部分，脂質を除き，残渣に 10% 過塩素酸液 2.5 ml を加えて＋4°～5℃に少なくとも一昼夜放置することによってリボヌクレィン酸(以下 RNA と略する)を分解させ，更に同じ溶液で 2.5 ml 宛二度抽出した計三度分の抽出液を合せて RNA 劃分とした。

RNA を抽出した残渣に 5% 過塩素酸液 2.5 ml を加え，70℃の湯浴中で 20 分間熱した後遠沈し，同様操作を更に二度くり返し，三度分の抽出液を合わせてこれをデオキシリボヌクレィン酸(DNA)劃分とした。

5) 核酸及び燐の定量

RNA の量は 260 mμ に持つ極大吸収をベックマン型分光光度計で測定し，これを市販のイースト RNA の既知濃度のものを比較対照にして RNA-P 量を算出した。

DNA は Dische の diphenylamine 法を用いて 600 mμ に生ずる青色をベックマン型分光光度計で測定し，市販の DNA 標品を比較対照にして，DNA-P 量を算出した。

RNA 劃分に含まれる総燐の量は，Fiske and Subbarow の方法に従って，発生する青色を 660 mμ で同じくベックマン型分光光度計で測定し算出した。

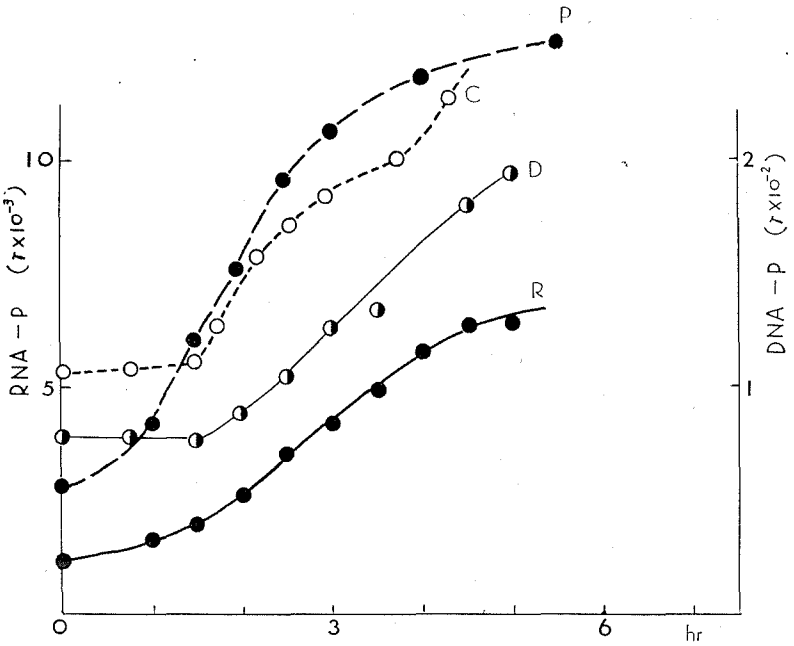
6) 細胞数の測定

培養の各段階で抽出定量用の試料を採取するとき，同時に少量の浮遊液を取り，適当な濃度に稀釈してトーマ血球計算板上で細胞数をかぞえ，細胞増殖の時間的変化をしらべた。

III. 実 験 結 果

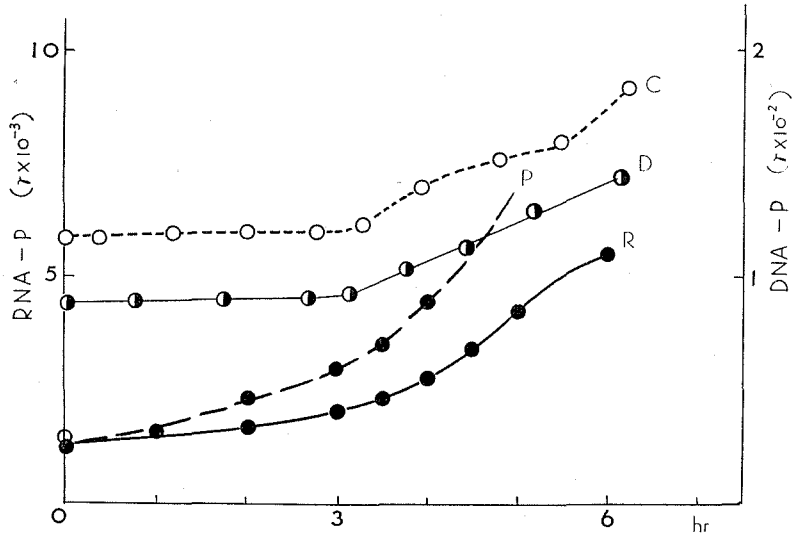
1) 凍結融解処理細胞の核酸及び燐量の消長

第1図に無処理対照に於けるRNA, DNA及びRNA劃分の総燐の時間変化と，同時に測定した細胞数の変化を示す。この図からわかるように，培養開始と共に先ずRNAの増加が始まり，その後約1時間半の誘導期をおいてDNAの増加が始まる。その際DNAの増加の始まる時間と，細胞の増殖の始まる時間とは完全に一致する。第2図は急速凍結一度，第3図は同二度の時の同じ変化の比較である。急速凍結一度のものでは，生残率は無処理対照の約30%，同じく二度のものでは約15%に減少しているために，単位時間における核酸及び細胞の増加の割合いは小さくなるが，RNA, DNA, 細胞数三者の相互関係には，対照とくらべて本質的な違いは見られない。しかし，RNA合成が緩慢になるのと共に，DNAの合成及び細胞の増殖開始までの誘導期の延長が認められ，凍結融解一度のものでは3時間，二度のものでは4時間となっている。

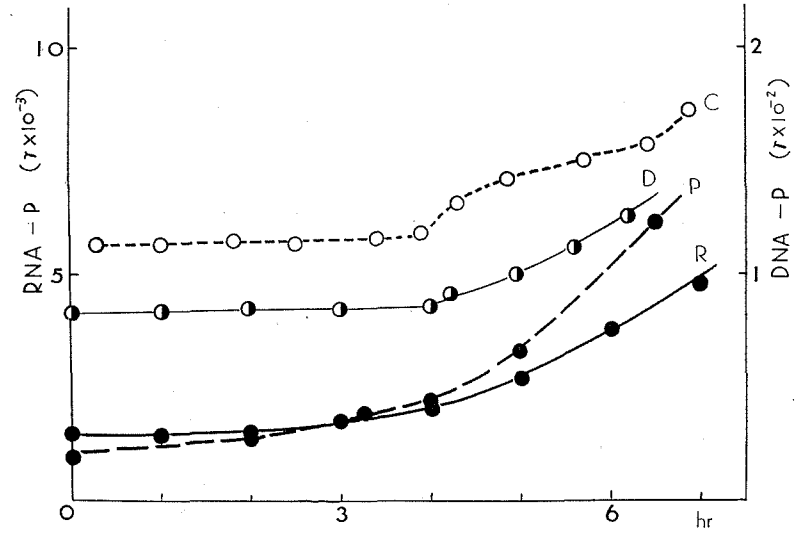


第1図　無処理対照試料100 ml中の核酸及び燐量の時間変化
縦軸，核酸及び燐量　横軸，培養時間
P: RNA劃分の総燐，R: RNA，D: DNA，
C: 細胞数(時間変化の目安として入れたので数値は省略)

一方緩慢凍結で障害の程度の低い場合の結果を第4図に示す。このものでは，最低到達温度は前2例と同じであるが，冷却の速度が小さいために生残率は90%となっており，RNA合成の速さもDNA及び細胞の増加の際の誘導期の長さも対照にくらべて殆んど変っていない。



第2図 急速凍結融解一度の試料 100 ml 中の核酸及び燐量の時間変化

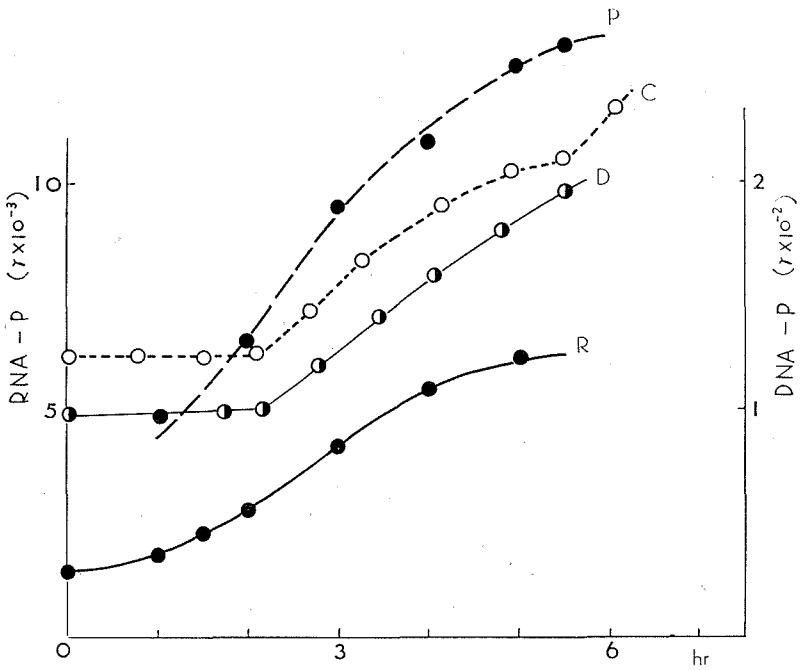


第3図 急速凍結融解二度の試料 100 ml 中の核酸及び燐量の時間変化

縦軸，核酸及び燐量　横軸，培養時間
P：RNA 劃分の総燐，R：RNA，D：DNA，
C：細胞数（数値は 1 図と同じ意味で省略）

以上のことから核酸の合成と細胞の増殖の間の関係が凍結障害の際にもそのままあてはめられることがわかる。

つぎに注目されるのは，急速凍結融解したときに RNA 劃分の総燐量が急激に減少することである。第 1 図に見られるように，この劃分の全燐量は，RNA の吸光係数から算出した燐量とは必ずしも一致せず，細胞の増殖のさかんな時ほどその差は大きくなり，RNA–P 量の数

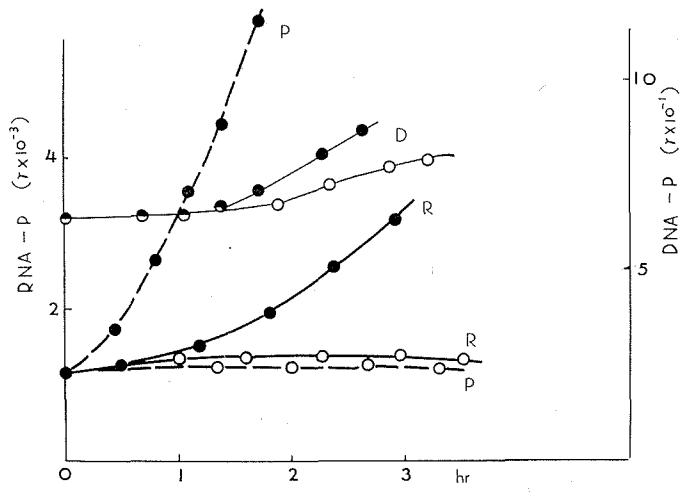


第4図　緩慢凍結融解一度の試料 100 ml 中の核酸及び燐量の時間変化
縦軸，核酸及び燐量　横軸，培養時間
P：RNA 劃分の総燐，R：RNA，D：DNA，
C：細胞数 (数値は 1 図と同じ意味で省略)

倍にも達する。この総燐から RNA–P を引きさったものを便宜上 RNA frac-P と呼ぶことにする。ところで一度これを急速に凍結融解すると，この燐はもはやこの劃分には存在しなくなって，丁度 RNA の吸光度から算出した燐量に等しい燐だけが残る。しかし第 2, 3 図で見られるように，これ等の処理では，培養開始直後の核酸量 (RNA, DNA 共) 及び細胞数は全く変化を受けない。しかも，第 4 図に示すように，細胞の障害の少ない緩漫凍結では総燐量は減少していない。更に第 2, 3 図で始めに RNA–P の高さまで低下した総燐量は RNA の合成が始まるに先立って再び増加して RNA–P の量より次第に高くなってくることが見られる。

2) RNA frac-P の役割

前節の結果から，細胞の増殖と核酸の合成が密接な関係にあるということは，凍結障害にもそのままあらわれ，しかも，この核酸合成能の変化は RNA frac-P の動きと関連しているということが示唆される。このことから凍結融解によって RNA frac-P を失なうことが核酸合成の遅れと関係しているのではないかということが想像されるわけである。しかし，上記の事実だけでは RNA frac-P が核酸合成に役立っているという直接の証拠にはならず，或いは単に核酸合成の際の副産物というように，核酸合成に附随して起る反応の産物にすぎないのではないかという疑問が残る。この点を確かめるために White の合成培地[4] から燐酸を完全に除いた培



第5図 White の合成培地での核酸の合成

縦軸，試料 100 ml 中の核酸量　横軸，培養時間

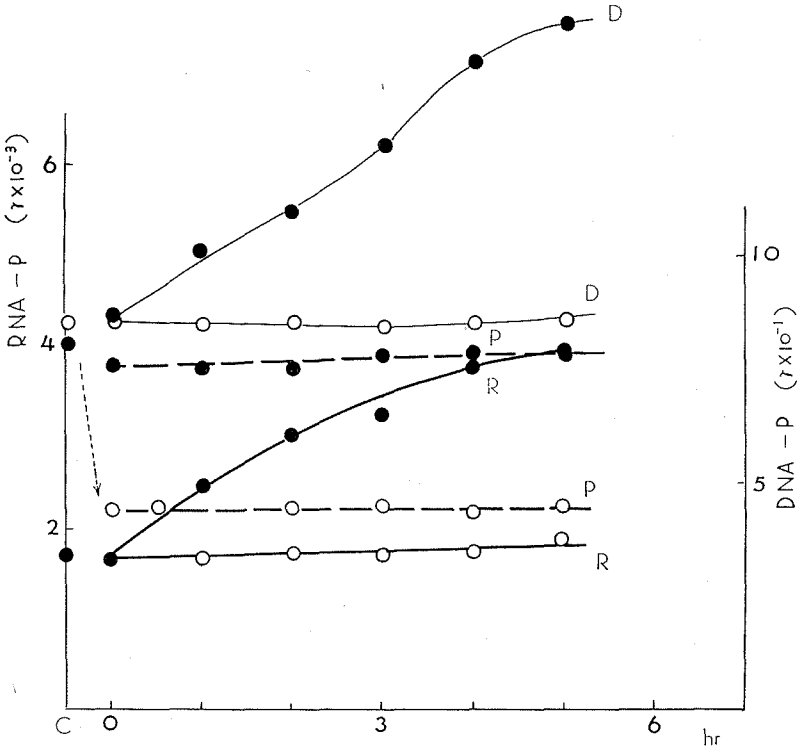
● 完全培地　○ 燐を除いた培地

P: RNA frac-P, R: RNA, D: DNA

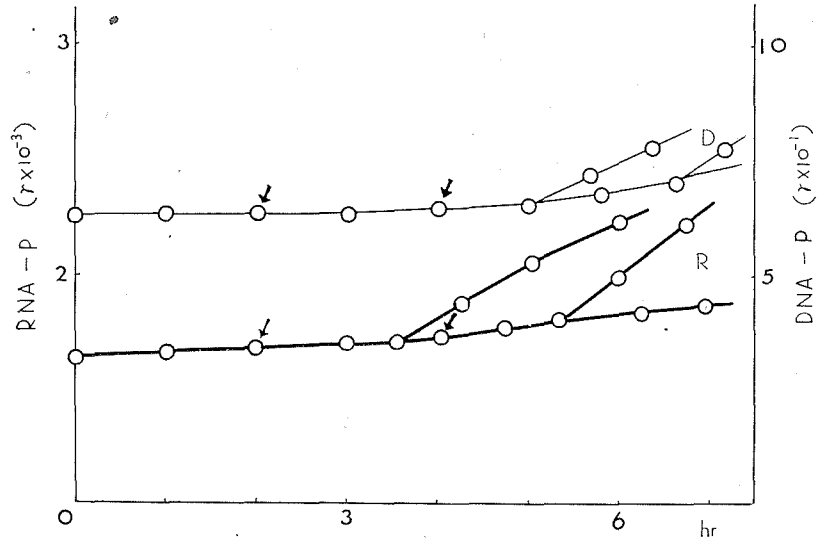
地を作り，それに RNA frac-P をもった細胞ともたない細胞をそれぞれ培養して，燐と核酸の関係を調べてみた。即ち燐飢餓状態にして，RNA frac-P を完全に消費した細胞試料では，この培地で培養したとき核酸の合成，細胞の増殖は全く起らない (第5図)。しかし第6図に示すように前培養によって RNA frac-P を充分に蓄積した試料では，燐を全く含まない培地中でも直ちに核酸の合成がはじまり，RNA frac-P の燐が完全に RNA–P に変ったとき核酸の合成はとまる。一方，同様に前培養をした細胞を一度急速凍結融解することによって，RNA frac-P を消失させた試料では，RNA の合成はもちろん，DNA の合成も，従って細胞の増殖も殆んど起らない。凍結融解に耐えて生き残った細胞であっても燐を失なうと増殖が停止することは，この培養液に一定時間後に無機燐を加えると再び核酸の合成，細胞の増殖が始まることからわかる。第7図に見られるように，燐を除いた White の培地中では全く核酸の増加の見られない凍結融解試料に，2時間後，或いは4時間後に無機燐を加えると (矢印) その一定時間後に核酸の合成がはじまる。このとき，燐を加えてから核酸の合成の始まるまでの時間は，RNA で1時間半，DNA で3時間で，これは急速凍結融解一度のものを最初から完全培地に培養して発育過程をみた時の RNA，DNA の増加曲線とよく一致する (第2図参照)。

3) RNA frac-P の生成と核酸合成の関係

前節の実験で，細胞内での核酸の合成にその細胞のもっている RNA frac-P が利用されることが明らかにされたが，次に凍結融解によってこの燐の蓄積が阻害されることと，核酸合成が遅れることとの間にどのような関係があるかということ，いいかえると RNA frac-P の生成の遅れることが核酸合成の遅れを招いているのか，或いはその逆に核酸合成の遅延する結果として RNA frac-P の生成が遅れるのかを確かめなければならない。この為に核酸の合成とは切



第6図　前培養で RNA frac-P を蓄積した細胞の燐なし培地での核酸合成
縦軸，核酸及び燐量　横軸，培養時間　P：RNA frac-P，
R：RNA，　D：DNA　● 対照，　○ 急速凍結融解試料

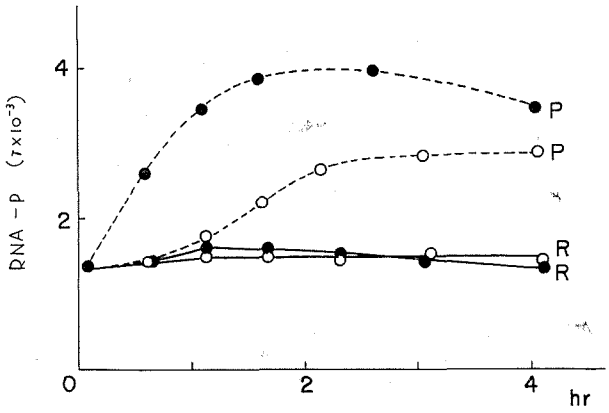


第7図　燐なし培地中での凍結融解試料に燐を加えた時の核酸合成
R：RNA，　D：DNA

り離した RNA frac-P の生成だけが凍結融解によって影響を受けるかどうかを知る必要がある。Schmidt 等によれば，イーストをグルコース，カリイオン及び無機燐と培養することによって核酸の合成なしに，この燐化合物の生成が見られる[6]。

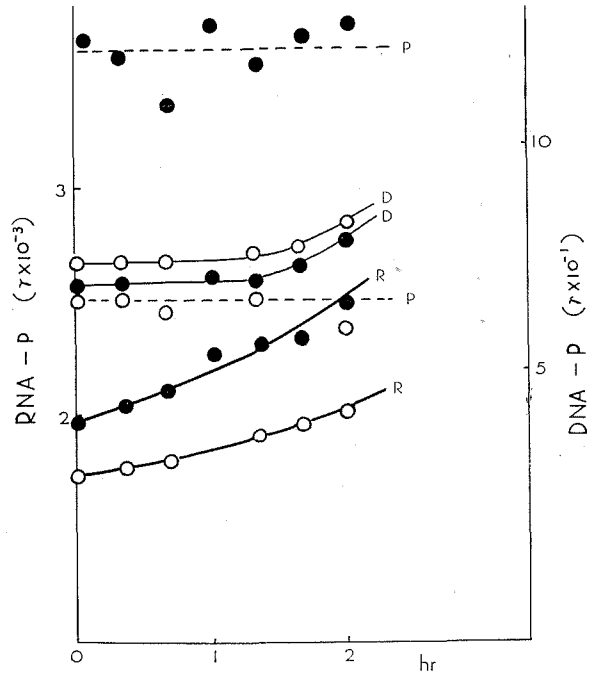
第8図に，急速凍結融解後，この方法で培養した試料の核酸及び RNA frac-P の変化を示す。この図によれば核酸の合成とは無関係に，RNA frac-P の生成が凍結融解によって影響を受けることがはっきり見られ，培養の初期に於ける燐化合物生成曲線の形は，凍結融解した試料を，普通の培養液中で培養した場合の曲線とよく一致する。この事は RNA frac-P の生成の遅れが核酸合成の遅れによって引き起されるのではなく，全く別の原因によるものであることを示している。

次に核酸合成の遅れが燐化合物の生成の遅れによって生ずるものとすれば，凍結障害を受けた細胞であっても培養を始める前にグルコース，カリイオン及び燐で前培養をすることによって RNA frac-P を充分に再生しておけば培養の際の核酸合成の遅れは見られない筈である。対照では1時間，凍結処理試料では2時間半前培養をすることでこの燐を夫々の maximum まで蓄積した試料を，燐を完全に除いた White の培地で培養したときの核酸の合成のようすを第9図に示す。両試料とも培養開



第8図 細胞をグルコース，カリイオン及び無機燐酸のみで培養した時の核酸及び燐の増加

縦軸，核酸及び燐量　横軸，培養時間
P：RNA frac-P，R：RNA
● 対照　○ 凍結融解試料



第9図 前培養によって RNA frac-P だけを再生した凍結融解試料の燐なし培地における核酸合成

縦軸，核酸及び燐量　横軸，培養時間
P：RNA frac-P，R：RNA，D：DNA
● 対照　○ 急速凍結融解試料

始と同時に RNA の合成が始まり，約1時間半後に DNA の合成が始まるが，この時間的関係は，対照と処理試料の間に全く差異が見られずまた単位時間に於ける RNA frac-P から RNA えの燐の移りの比率も良く一致している (第1表)。

第1表　前培養によって RNA frac-P だけを再生した凍結融解試料の単位時間に於ける核酸合成の比率 (⊿RNA-P/RNA rfac-P)

	0 ～ 1 時間	1 ～ 2 時間	0 ～ 2 時間
対照	0.12	0.19	0.31
凍結融解	0.12	0.20	0.33

IV. 考　察

従来微生物は凍結融解によってどんな障害を受けるかについて，形態的，機能的にいろいろの立場から研究されているが，そのうち種々の凍結条件によって，細胞がどの程度死滅するかという実験が割に多い。

細胞の生死ということは，時に非常に判定の難かしい場合があるが，plate count 法で colony を作るか否かという増殖能力の有無を生死判定の規準としているのが殆んどである。しかしこの度の仕事でも気のつくように，ひとくちに凍結障害といっても，細胞の死滅から単なる増殖の遅れに至るまで，一回の試料の中でもさまざまの段階があり，そのような中間段階の障害の機構を追求することによって始めて凍結障害の機構を明らかにすることが出来るものと考える。

障害による細胞増殖の遅れの原因については，RNA frac-P の消失とこれの生成に遅れが生ずるということの二点が今回の実験で明らかになったが，これらのことと凍結融解処理との間の関係は未だ明らかでない。従ってこの点について更に研究を進めることが今後に残された課題であり，この点の究明なくしては凍結障害の機構を論ずるわけにゆかない。また今回の結果からは，細胞死滅の機序については何もいわれない。細胞の死滅と増殖の遅れを全く別の原因に帰するか，或いは同じ原因が作用してはいるがその程度に差があり，ある範囲を越えたものは遂に死に至ると考えるかについては議論のわかれる所であるが，著者らは後者に立って考えを進めている。この考え方によれば，細胞の死滅は増殖系の障害によるものと説明されるわけである。これだけが凍結障害のすべてでないことはいうまでもないが，かなりの要因としてこのことを取り上げてさしつかえないものと思われる。

次に第8図に示した結果についてもう少し詳しく考えて見ると，実験結果の項でも述べたように，燐化合物の生成は対照に於いては培養開始後1時間半，凍結融解細胞では同じく2時間の間は，夫々無処理のもの或いは凍結融解一度のものを通常の培地で培養したときの燐化合物の生成速度に一致若しくは僅かに先行する位の速度をもっている。しかし正常培養のものでは此の状態が数時間持続するのに対して (第1，2図参照)，此のような処理のものでは1～2時間で増加がとまり，最終の燐量は正常培養のものの2～3分の1位の値にしか達しない。これは，この燐の生成が，培養の後半に於いては核酸合成その他の代謝の影響を受けていて，全く独立に起り得るものではないことを示して居り，実験結果の項での説明と矛盾する。われわれ

は，この点についてこれを二つの相にわけて考え，核酸合成その他の影響がまだはっきりあらわれない前半と，明らかにこの支配下におかれる後半とに分れるものと解釈している。このことは，この燐酸化合物があくまでも細胞内に於ける代謝経路の一つの部分を受けもつものであることの証拠であり，この部分に何等かの形で障害の起ることが，細胞全体に大きな影響を及ぼすことは容易に想像される。

V. 摘 要

酵母細胞に於ける凍結障害の機構を調べる一つの手段として，核酸合成能の変化を Ogur & Rosen の方法に従ってしらべた結果次のことが明らかになった。

1) 上記の方法で RNA 劃分に含まれる核酸以外の燐化合物が，細胞を急速凍結融解することによって失なわれ，同時に生き残った細胞であっても核酸の合成に遅れが生ずる。

2) この燐化合物は核酸の合成に必要であり，これを蓄積した細胞は燐を含まない培地中で核酸合成を行なうが，凍結融解等でこの燐を失なった細胞では，培地に燐がないと核酸合成は起らない。

3) 細胞の急速凍結融解によって，核酸の合成とは無関係に，この燐化合物の生成が障害を受ける。

4) 凍結障害を受けた細胞でも，前培養によってこの燐化合物を再生した場合は，正常なものと同じ速さで核酸の合成が起る。

以上のことから，核酸合成過程に於いてその前駆物質である燐化合物の生成を阻害するような障害が凍結融解によって起り，その結果が細胞の増殖に影響するものと考えられる。

おわりに終始御指導を賜わった根井外喜男教授に厚く感謝の意を表します。

文 献

1) 坂上康雄 1959 酵母の発育及び代謝に及ぼす凍結融解の影響. 低温科学, 生物篇, ***17*** 105-124.
2) Ogur, M., Minckler, S. and McClary, D. O. 1953 Desoxyribonucleic acid and the budding cycle in the yeasts. J. Bact., ***66***, 642-645.
3) White, J. 1954 Yeast technology. John Wiley and Sons, New York.
4) White, J. and Munns, D. J. 1950 Yeast growth method for determination of biotin, pantothenic acid and inositol activities in raw materials. J. Inst. Brew., ***56***, 141-149.
5) Ogur, M. and Rosen, G. 1950 The nucleic acids of plant tissues. I. The extraction and estimation of desoxypentose nucleic acid and pentose nucleic acid. Arch. Biochem., ***25***, 262-276.
6) Schmidt, G., Hecht, L. and Thannhauser, S. J. 1949 The effect of potassium ions on the absorption of orthophosphate and the formation of metaphosphate by baker's yeast. J. Biol. Chem., ***178***, 733-742.

Résumé

To find the site of injury in frozen and thawed yeast cells, changes of nucleic acid synthesizing ability in the cells were investigated using the method of Ogur and Rosen.

Control cells kept in malt extract medium accumulated a large amount of unknown phosphorus compound in RNA fraction obtained by the above mentioned analytical method. After the cells were rapidly frozen to −196°C and thawed, the phosphorus compound disappeared. Besides, the nucleic acid synthesis and cell growth, too, were remarkably prolonged.

On the other hand, when the same cells were frozen slowly to −196°C and thawed, neither disappearance of the phosphorus compound nor the lag phase of RNA synthesis was seen and also the rate of cell growth was not affected.

To clarify the fluctuation of the phosphorus compound described above and its relation to nucleic acid synthesis, the cells were incubated in synthetic culture medium free from orthophosphate. Normal cells which had possessed the endogeneous phosphorus compound continued their growth using this phosphorus to synthesize nucleic acid, while the endogeneous phosphorus lacking cells produced by freeze-thawing or even by longer incubation in phosphorus lacking culture showed neither nucleic acid synthesis nor growth.

By incubating the cells in a medium with glucose, phosphorus and potassium only, it was found that above mentioned phosphorus compound increased without nucleic acid synthesis. The phosphorus compound increased very slowly in freeze-thawed cells after they were cultured in a glucose, phosphorus and potassiun medium in contrast with the unfrozen cells. This difference is accord with that of nucleic acid synthesis and cell growth between normal and freeze-thawed cells.

When the freeze-thawed cells were preincubated in a glucose, phosphorus and potassium medium till the accumulation of the phosphorus compound reached its maximum and then transferred to no-phosphorus medium, all phosphorus in the accumulated phosphorus compound seemed to be transferred to that of RNA, and the rate of the reaction was almost equal to that in control.

It is assumed therefore that lag phase at nucleic acid synthesis and cell growth in freeze-thawed cells is largely caused by the slow accumulation of the phosphorus compound.