HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	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
Author(s)	僧都, 博
Citation	低温科學. 生物篇, 22, 109-118
Issue Date	1964-10-20
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/17686
Type	departmental bulletin paper
File Information	22_p109-118.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

Hiroshi SOUZU 1964 Freezing Injury in Yeast Cells. The Mechanism of Degradation of Some Phosphorus Compounds of Yeast Cells Resulting from Freezing and Thawing. *Low Temperature Science, Ser.* ***B, 22.*** (With English Summary p. 117)

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

僧都　博
(低温科学研究所　医学部門)

(昭和39年7月受理)

I. 緒　　言

生物細胞の多くは凍結によって，何等かの障害を受け，その障害の程度は細胞の種類，凍結融解の条件によって大きく支配される。酵母細胞についてもこの点に関しては，現在までにいろいろの報告がなされている[1,2]。

これらの実験の多くは，処理後の細胞の生残を Viable Count によって調べたものであって，これは細胞の受ける障害を増殖能ということに重点を置いて見るからであろう。著者ら[3]も同じ様な点に注目して，先に酵母の増殖に直接の関係を持つ核酸合成系についての研究結果を報告した。

これによれば，10 N 過塩素酸によって酵母細胞の RNA 劃分に同時抽出され，核酸合成に役立っている或る種の無機燐が，凍結融解によって細胞から消失すること，及びその燐の再合成に要する時間が細胞分裂の開始の遅れに一致することが知られており，燐の消失と細胞の障害の間に密接な関係があることが示唆されている。従ってこの燐の消失機構を明らかにすることによって，凍結融解によって起る細胞の構造的機能的な障害の一端がうかがわれるものと思われる。

なおこの種の燐については従来多くの報告があり，Wiame[4] はこれをメタ燐酸と名づけ，抽出の方法によってこのものが二つのグループに分れ，その細胞内に於ける役割もそれぞれ異なるものと考えた。また Schmidt 等[5] はこの燐の生成にはカリウムイオンが必要であり，燐の欠乏状態の後には特にその生成が活潑になることを報告している。更にこの二人共にこの燐が核酸合成に役立っているとの考えを持っている。

本実験に於いては，凍結融解によって起る細胞内の物質の動きに注目し，これから細胞内部の構造変化を類推しようとのねらいをもって，燐の消失の機構を明らかにしようとしたものである。

* 北海道大学低温科学研究所業績　第686号

II. 材料並びに方法

1. 材料

市販のパン酵母（日甜イースト）を冷蒸溜水で二度洗滌し，500 mg/mℓ の浮遊液を作り，これを以下の実験に供した。

2. 方法

1) 燐化合物の抽出精製：麦汁培地で 30°C に 3～4 時間培養して，充分に燐を貯えた細胞を蒸溜水で二度洗滌して凍結乾燥し，この乾物を良く磨砕したものから次の処理で燐を抽出した。すなわち，Ogur and Rosen の方法[6] に従って，酸可溶性部分，脂質を除いた残渣に 10% トリクロル酢酸を加えて，0°C で 1 時間放置後遠心し，更に残渣を同じ液で洗い，抽出液，洗液を合して粗抽出液とした。このものを二度等量のエチルエーテルと振ってトリクロル酢酸を除き，KOH で pH を中性にしてから一夜放置し，エーテルをとばしたものを Dowex I のカラムにかけて燐を分劃した。カラムは径 2 cm，高さ 10 cm のものを用い，溶出速度は毎分約 2 mℓ であった。溶出は 0.02 N 塩酸に 0.1 M から始まり 0.3 M, 0.5 M, 0.7M と順次高濃度の KCl を加えた液で行ない，Fraction collector を用いて各々 15 mℓ 宛の劃分に分けた。分劃した試料を Cellophane bag で水道水，冷脱イオン水に一夜透析して塩を除いたものを精製試料とした。酵素の基質としては主に 0.5 M 劃分のものを用い，時には 0.7 M 劃分のものも用いた。

2) 酵素の抽出精製：上記細胞浮遊液を，約 30 mℓ 宛 French presser cell に入れ 6,000kg/cm² の圧力を加え乍ら，毎分数 mℓ の速度で噴出した。破砕した細胞浮遊液を Tris buffer で pH 8.0 に調整し，そのまま 0°C で 1 時間抽出後 15,000 g, 30 分の遠心で未破砕の細胞，破砕した細胞壁等を除き，更に 100,000 g, 40 分の遠心で微細な破片及び細胞内容物を分離し，沈渣は捨てた。この上清に硫安を 0.5 飽和になるように加え，生じた沈澱を遠心して除き，上清に更に 0.6 飽和になるまで硫安を加え，生じた沈澱を遠心によって集め，0.1 M Tris buffer pH 8.0 に溶解し，水道水，蒸溜水に十数時間透析した。この操作を 2 度くり返し，精製酵素液として用いた。

3) 急速凍結融解：1 mℓ の試料を径 1.5 cm の試験管に入れ，手で振り乍ら液体窒素に浸して凍結，30°C の温湯中で振り乍ら融解した。

4) 酵素反応：反応混液の組成は次の通りであった。

5 mℓ 中，100 μM の Buffer，10 μM の $MgCl_2$，500 μg の基質，酵素液通常 0.3 mℓ。反応は特別の場合以外，総て 30°C で行ない，15 分後に 5% トリクロル酢酸 2 mℓ を加えて反応をとめ，生じた沈澱を除いてから，Fiske and Subbarow の方法で発色し燐量を算定した。

5) 細胞からの燐の分劃及び定量：未処理細胞，急速凍結融解細胞を，夫々浮遊液上清，アルコール溶解劃分，熱アルコール・エーテル劃分，酸可溶性劃分，10 N 過塩素酸（又は 10% トリクロル酢酸）抽出劃分，5 N 熱過塩素酸抽出劃分，熱 2% NaOH 劃分に分離し，夫々の部分について適当量の試料に 10 N 硫酸 0.4 mℓ を加え時々過酸化水素数滴を加え乍ら 160°C で分解し，生じたオルト燐酸を Fiske and Subbarow の方法で測定した。必要な点については，同

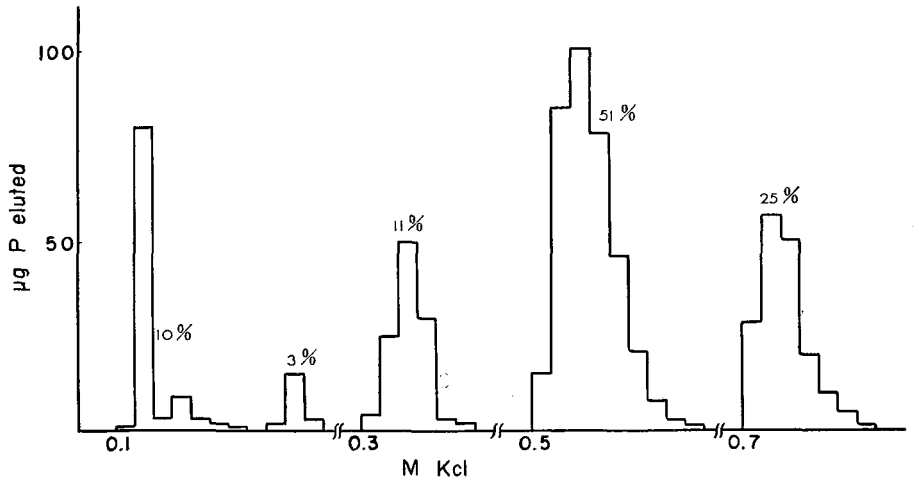
時にオルト燐酸の直接の測定も行なった。

6) 凍結融解細胞からの燐流出量の測定：0.5 M Acetate Buffer 1 mℓ に 20 mg の細胞を浮遊して液体窒素で凍結，30°C 湯浴中で融解時間をも含めて 15 分間反応させた。これに 5 % トリクロル酢酸 0.5 mℓ を加えることによって反応をとめ，遠心後適当量の上清をとってオルト燐酸量を測定，凍結融解直後の試料上清中の燐量を blank として酵素の活性を算出した。

III. 結　　果

1. 燐化合物の性質

上述の方法に従って抽出した燐化合物を Dowex I のカラムにかけて分離した結果を第 1 図に示す。この図から見られるように，この燐は単一のものではなく，KCl 濃度によって順次 5 つの部分に分けられる。新鮮なものでは試料による相互の量比にはあまり変動はない。0.1 M KCl で初めに溶出される約 10% の劃分は，大部分がオルト燐酸で少量のピロ燐酸を含んでいる。又同じ劃分の残りの 3 % のものは市販のトリポリリン酸と全く同じ位置にあたり Kornberg[7] のトリポリリン酸の研究結果とよく一致する。更に KCl 濃度を高めることによって，0.3 M KCl 劃分 11%，同じく 0.5 M 劃分 51%，0.7 M 劃分 25% となって，吸着した燐は全部 0.7 M KCl 濃度までに溶出される。



第 1 図　Dowex I による燐の分劃　　溶出液，0.02 N HCl + 各 M KCl

このようにして分劃された燐化合物中，0.3 M KCl 濃度以上で溶出される劃分には，紫外線吸収も殆んど認められず，また窒素含量もないことからヌクレオタイドの混在は否定される。抽出の際に混じって来た少量のヌクレオタイドは 0.1 M KCl 劃分に全部溶出されることがわかる（第 1 表）。0.5 M 及び 0.7 M KCl で溶出する劃分の燐は；(0.3 M 劃分は少量なので実験しなかったが，0.5 M 以上の劃分に準ずるものと考えられた。) 1 N HCl, 100°C 7 分で完全にオルト燐酸に変るが，分解しない状態ではオルト燐酸の測定には反応せず，Cellophane bag に

第 1 表 Dowex I によるポリリン酸分劃劃分の組成

	総 燐	紫 外 吸 収*		窒 素**
	μg/mℓ	260 mμ	280 mμ	μg/mℓ
0.1 M KCl 溶出劃分	82	9.00	2.30	38
0.5 M 〃	116	0.20	0.10	0
0.7 M 〃	110	0.60	0.30	0

* 島津製，ベックマン型分光光度計
** ミクロキエルダール法

第 2 表 Dowex I による燐酸分劃劃分の透析膜透過性
水道水 (10°C) 3 時間，蒸留水 (3°C) 2 時間透析

	透 析 前			透 析 後			収 率
	P μg/mℓ*	Vol mℓ	Total P μg	P μg/mℓ*	Vol mℓ	Total P μg	(%)
0.1 M KCl 劃分	46	33	1,518	19	33	627	41
	82	27	2,210	42	26	1,090	49
0.3 M 〃	22	100	2,200	18	103	1,854	84
0.5 M 〃	60	72	4,320	57	76	4,332	100
	116	72	8,350	106	74	7,800	94
0.7 M 〃	42	71-	2,982	41	75	3,075	103
	110	28	3,020	101	29	2,920	97

* 1 N HCl 100°C 7 分 分解後 Fiske and Subbarow 法で測定

よって水に数時間以上透析しても殆んど透析膜を通らない (第 2 表)。この燐は又，後述の方法によって抽出したポリリン酸分解酵素によって完全に分解され，その pH 活性曲線 (第 2 図参照) も，トリポリリン酸，テトラポリリン酸を基質としたときと同様である。これらの実験結果から，この燐化合物はそれぞれ重合度の異なるポリリン酸の混合体であると考えられる。またこの抽出した燐をあらかじめ液体窒素で二度急速凍結融解してから分劃しても，その溶出劃分相互の量比には変化は見られない。燐化合物自体は凍結融解の影響を受けないことがこの結果から知られる (第 3 表)。

第 3 表 抽出ポリリン酸の凍結融解による Dowex I 分劃劃分えの影響

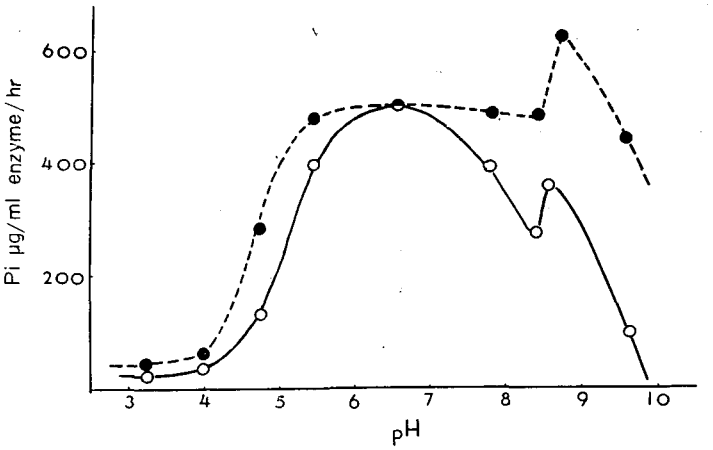
	M KCl 劃 分							
	0.1		0.3		0.5		0.7	
対 照	13	(%)	11	(%)	51	(%)	25	(%)
凍 結 融 解	12		6		51		31	

対照は抽出後直ちに Dowex I カラム吸着，分劃
凍結融解は抽出した試料を液体窒素で凍結融解してから Dowex I カラムに吸着，分劃

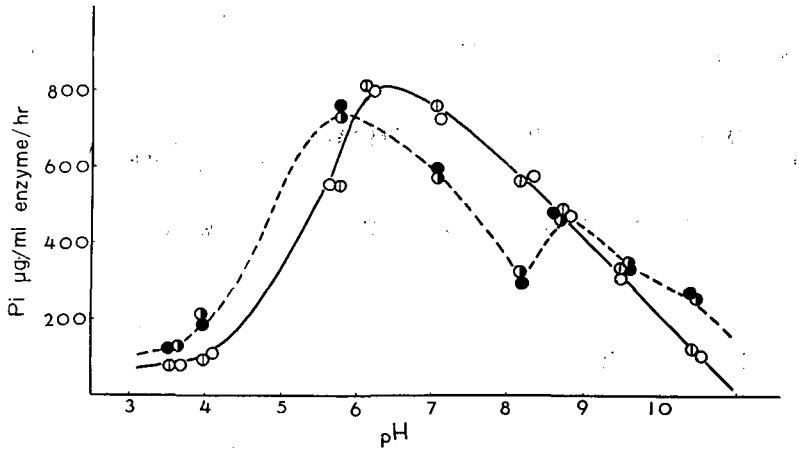
2. ポリリン酸分解酵素の精製とその性質

前節の結果から，燐化合物はポリリン酸であることが推定された。一方酵母は一般にポリリン酸の分解酵素を持っていることが知られており，凍結融解の際の燐の消失にもこの酵素が

作用していることが想像される。そこでこの可能性を検討するために，Kornberg 等[7] の方法を参考にし乍らポリリン酸分解酵素を抽出精製して，その性質を調べた。実験方法の項で述べた方式に従って抽出精製した酵素を，前節で述べた燐化合物の 0.5 M KCl 劃分を基質として反応させた時の pH 活性曲線を第 2 図に示す。この酵素は pH 5 附近から 9 附近まで広い範囲にわたって活性を示し，10^{-5} M $MgCl_2$ によって，アルカリ側で活性化が著るしい。しかしこの酵



第 2 図　ポリリン酸分解酵素の pH 活性曲線　I
反応混液組成は本文参照
pH 3.3 Acetate buffer, 4.0～5.4 Succinate buffer,
6.6 Tris-Maleate buffer, 7.8～9.6 Tris buffer.
·····●·····　$Mg Cl_2$ 添加　　——○——　$Mg Cl_2$ なし



第 3 図　ポリリン酸分解酵素の pH 活性曲線　II
反応混液組成は本文参照
pH 3.5～3.6 Acetate buffer, 4.0～6.2 Succinate buffer,
7.0～9.6 Tris buffer, 10.5 Glycine-HCl buffer.
·····　$MgCl_2$ 添加　——　$MgCl_2$ なし
○ ●　対照　　◑ ◑　凍結融解後

素の活性曲線は，今回の実験で得られたものについても2通りあって，第3図に示すようにpH 6附近にピークを示し，マグネシウムによって弱い阻害を受ける場合もある。このようなことから，現在の酵素はpH活性の異なる2種類以上の酵素が共存しているものと考えられる。

この酵素は液体窒素で急速に二度凍結融解しても活性には何等の変化も起こらないことが第3図から知られる。また麦汁培地で十数時間培養した酵母試料では，前記方法による抽出液中に酵素活性が全く見られなくなるが，そのような試料では凍結融解によるポリリン酸の消失は見られない。これらの事実は凍結による燐化合物の消失が，細胞内にあるポリリン酸分解酵素の作用によるものとの考えを支持するものである。

3. 凍結融解細胞中での燐化合物の挙動

第1，2節の結果から，問題の燐化合物はポリリン酸であり，このものの消失がポリリン酸分解酵素の作用によるらしいことが示唆されたので，実際に細胞についてその確認を行なった。第4表，第5表に対照酵母と急速凍結融解酵母の夫々について，幾つかの劃分に分別抽出された燐の量を示す。この結果，急速凍結融解によって，細胞のRNA劃分から消失した燐は，全

第4表 凍結融解による細胞内の燐組成変化

		対照	凍結融解
乾燥重量*		218 mg	196 mg
** 総燐量	浮遊液上清	10 μg	1,015 μg
	70%アルコール洗液	760 〃	1,300 〃
	熱アルコール・エーテル抽出液	170 〃	270 〃
	冷10%過塩素酸抽出液 (RNA劃分)	3,100 〃	1,700 〃
	熱5%過塩素酸抽出液 (DNA劃分)	400 〃	380 〃
	熱2%苛性ソーダ抽出液	170 〃	180 〃
	合計	4,700 〃	4,845 〃

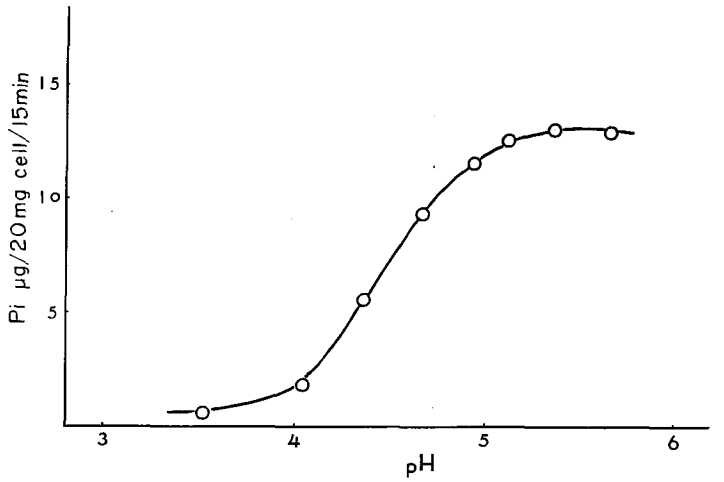
* 乾燥重量の差は凍結融解による内容物流出の結果生じたもので初めの量は同じである
** 10 N H_2SO_4 0.4 mℓ, 160°C で分解後 Fiske and Subbarow 法で測定

第5表 凍結融解による RNA 劃分燐量の変化 (乾物量 50 mg)

		対照 (μg)	凍結融解 (μg)
浮遊液上清	P_i[1]	22	400
	$P_{nucleotide}$[2]	11	65
	P_{total}[3]	30	520
RNA劃分	P_i[1]	40	20
	P_{RNA}[2]	350	310
	P_{total}[3]	710	325

1) Fiske and Subbarow 法で直接測定
2) 260 mμ の吸収から計算
3) 硫酸，160°C 分解後 Fiske and Subbarow 法で測定

部オルト燐酸に分解され，浮遊液の上清中に流れ出ていることが知られる（第5表)。この燐化合物は抽出した後では凍結融解によるオルト燐酸えの変化は見られないので，この分解反応は細胞の凍結によって，酵素の作用が働いた結果おきたものと考えられる。更にpHを変えたbufferの中で細胞を凍結融解して燐の挙動を調べた結果，この燐の分解作用はpHによって変化し，pH 4より酸性では反応はおこらず，これよりアルカリ側で急に作用するようになることが確認された（第4図)。このpH活性曲線は前節のポリリン酸分解酵素の曲線とよい一致を示しており，この点からも細胞の凍結融解に際しての燐化合物の分解流出が，この酵素の作用によるものであるとの考えが支持される。



第4図 凍結融解細胞からの燐流出とpHの関係

IV. 考　　察

さきに酵母細胞を凍結融解すると，細胞内から燐化合物が消失することを報告したが，今回の実験によってその燐化合物の大部分を占めるものはポリリン酸系統のものであることが明らかになった。前回の実験では，この燐は酵母のRNA劃分に含まれて得られたのであるが，今回は抽出液を10 N過塩素酸から10%トリクロル酢酸に変え，抽出時間も極く短かくしたことから，RNAの分解を最小限におさえて，ヌクレオタイドの混在を最も少なくすることが出来た。このためにその後の処理が非常に容易になったものである。

抽出された燐化合物が，重合度の異なる5つ以上の劃分の混合物であることについては，それが，本来の姿であるのか，また抽出その他の操作によるものであるのか明らかでない。Kornberg[7]はこの方法による0.1 M KCl溶出の劃分にトリポリリン酸の後に更にトリメタリン酸が溶出することを示しており，この両者で抽出された燐の数パーセントに当ることを述べている。このように分劃のしかたをていねいにすることによって，より微細なグループに分たれる可能性は充分にある。この度の実験は相当多量の燐の動きを説明する目的であるために，微細な点迄の追求はさけ，且つその中でも最も大きいグループと考えられる0.5 M KCl溶出劃

分に主として注目したものである。しかし新鮮な酵母では，抽出燐化合物間の量比が常に一定値を示すのに，凍結融解後にはこの量比が変化して，重合度の大きいものに対して，重合度の小さいものの比が大きくなっていること(未発表のデータ)から考えて，燐酸全体としては可成り自然に近い状態で抽出されているものと考えられる。ただしこの燐が全部，いわゆる7分燐であり，10 N 過塩素酸中では徐々にではあるが，0°C 近辺でもオルト燐酸に分解されることなどから考えて，抽出は慎重であることが望ましい。特に高濃度の酸に長時間接しておくことはさけなければならない。しかし精製したものについては，冷蔵庫内でかなり長期の保存によっても，分解は殆んど起こらないと考えてよい。この燐の細胞代謝における役割については，Wiame[4], Schmidt[5] 等も示唆し，且つ前報[3] でも示したように，核酸の構成成分になるものと考えられるが，その詳細な過程は不明である。

このポリリン酸の分解が酵素作用によるものであることは，凍結融解酵母からの燐の流出速度(オルト燐酸化の速度)と pH の関係が，酵素の pH 活性曲線に一致すること，(第2, 3図，第4図参照) 及び，前培養によって酵素を消耗した細胞では凍結融解による燐の分解が見られないことから明らかである。またこの酵素が抽出された状態では液体窒素による凍結によって失活しないことは，同様に凍結融解したのちの細胞内でも活性をもつ可能性のあることを示している。

正常な細胞中では不活性なこの酵素が，凍結融解によってはじめて活性をあらわすようになる機構はどのようなものであろうか。この説明の一つとして，正常な細胞中では，酵素は基質と隔離された状態にあり，凍結融解によって始めて基質と接触するようになる，ということが考えられる。この説明を実証するためには，正常な細胞中における酵素及び，基質の位置の決定が先づなされねばならない。Tonino 等[8] は酵母細胞に，基質特異性を持った α-グリセロリン酸分解酵素及び，基質特異性のない酸性リン酸分解酵素，アルカリリン酸分解酵素が存在することを示し，これ等酵素の細胞内に於ける位置の決定をも行なっている。これによれば α-グリセロ燐酸分解酵素及びアルカリリン酸分解酵素は，共に細胞膜内にのみ存在し，ただ一つ酸性リン酸分解酵素だけが細胞膜の外側に存在する。

今回の実験試料が酸性リン酸分解酵素を持たないことは，その pH 活性曲線から明らかなので (第2図参照)，ポリリン酸を分解する可能性のあるのは，アルカリリン酸分解酵素ということになり，Tonino 等の説に従えば，酵素は細胞膜内だけに存在するといえよう。

ポリリン酸の位置については，現在まで何も知られていない。しかし培養の際のこの燐の生成の速さ[3,5] 及び，その抽出の比較的容易なことなどから，この燐がかなり表層に近い所に存在することが考えられるので，細胞膜の外側に位置する可能性も充分にある。若しこの仮定が許されるならば，正常な細胞では細胞膜によって分たれていた基質と酵素が，急速凍結融解の結果生じた細胞膜附近の変化によって接触し，反応を起したということが想像される。この点についてはなお引続き実験中である。

結　　論

1. 酵母細胞の RNA 抽出劃分に含まれる燐化合物を分離精製して，このものが重合度の異なる数種のポリリン酸のグループであることを確かめた。

2. 酵母細胞中にこの燐酸化合物を分解する酵素が存在することを確かめ，更にこの酵素を分離製精して，凍結融解後の細胞中でもこのものが活性を保持し得ることを確認した。

3. 酵母の急速凍結融解によってこのポリリン酸がオルト燐酸に分解されて細胞から浮遊液上清に流出することが明らかになり，更にこの分解は細胞浮遊液の pH に依存することが知られた。

4. この燐分解の pH 活性と分離したポリリン酸分解酵素の pH 活性曲線が一致すること及び，酵素活性を示さない時期の細胞では凍結による燐の分解が見られないことから，この燐の分解流出が酵素の作用によるものであることが確認された。

おわりに終始御指導を賜わった根井教授に感謝する。

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) 荒木　忠・根井外喜男 1962 微生物の凍結の機構 I. 低温処理酵母の生存について. 低温科学, 生物篇, ***20***, 57–68.
3) 僧都　博・荒木　忠 1962 酵母細胞の核酸合成過程に於ける凍結障害. 低温科学, 生物篇, ***20***, 69–79.
4) Wiame, J. M. 1949 The occurence and physiological behavior of two metaphosphate fractions in yeast. *J. Biol. Chem.*, ***178***, 919–929.
5) Schmidt, G. Hecht, L. and Thannhauser, S. J. 1949 The effect of potassium ions on the absorption of metaphosphate by bakers yeast. *J. Biol.* Chem., ***178***, 733–742.
6) 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.
7) Kornberg, S. R. 1956 Tripolyphosphate and trimetaphosphate in yeast extract. *J. Biol. Chem.*, ***218***, 23–31.
8) Tonino, G. J. M. and Steyn-Parvé, E. P. 1963 Localization of some phosphatases in yeast. *Biochim. Biophys. Acta*, ***67***, 453–469.

Summary

A previous paper reported the escape of some phosphorus compounds of yeast cells which resulted from freezing and thawing. In the present experiment, further detailed investigations of the origin and nature of these substances have been made.

1) Some phosphorus compounds were obtained from yeast cells by extraction and purification and these compounds were discovered to be composed of several kinds of inorganic polyphosphates having different molecular weights.

2) Extraction and partial purification also yielded a phosphatase capable of decomposing

these phosphorus compounds. This capability was unaffected by freezing and thawing.

3) It was determined that the polyphosphates degraded to orthophosphates during the freezing and thawing process and were released from the cells into surrounding media. The degree of this degradation depended upon the pH of the cell suspension.

4) Since the pH-dependency of the polyphosphate degradation coincided with that of the phosphatase activity, and since the cells which showed no phosphatase activity, did not release any phosphorus compounds, it was concluded that the effect of phosphatase in freezing and thawing resulted in the release of the phsophorus compounds.