



Title	微生物の凍結 IV : 大腸菌細胞に於ける細胞内氷晶形成の機構
Author(s)	根井, 外喜男; NEI, Tokio; 荒木, 忠 他
Citation	低温科学. 生物篇, 25, 113-118
Issue Date	1967-12-25
Doc URL	<a href="https://hdl.handle.net/2115/17725">https://hdl.handle.net/2115/17725</a>
Type	departmental bulletin paper
File Information	25_p113-118.pdf



## 微生物の凍結 IV\*

大腸菌に於ける細胞内氷晶形成の機構

根井外喜男・荒木 忠・松坂理夫

(低温科学研究所 医学部門)

(昭和 42 年 9 月受理)

### I. 緒 言

先に、著者<sup>1)</sup>らは微生物細胞の凍結障害の機構を明らかにするために、大腸菌を用いて、凍結処理による細胞の形態的機能的変化を検討した。その結果、凍結過程に於ける冷却速度が小さければ、速やかに細胞水分が脱水されて細胞は収縮し、殆んど細胞障害を受けないが、冷却速度が大きくなるにつれて、細胞内に氷晶の形成される細胞が多くなり、それに平行して生残率の低下を認めた。しかも、同一冷却速度でも、凍結以外の高張溶液による急速な脱水復水で障害を受け易い嫌気培養菌の方が好気培養菌より細胞内に氷晶が形成され易く、生残率の低下が著しいことがみられた。この実験結果から、凍結の際の細胞水分の移動を規制する細胞膜の水に対する透過性が細胞障害に関与していることが示唆され、細胞内氷晶形成には細胞水分の脱水速度(冷却速度)と細胞膜の水に対する透過性及び細胞水分量等の要因が深く関係していることが想像された。

本実験では、以上の点に注目して、細胞膜の透過性が異なると考えられる嫌気培養菌と好気培養菌を用い、予め細胞水分をいろいろの割合に脱水して冷却速度と細胞膜の水に対する透過性とが細胞内氷晶形成にどのように関与しているかを検討し、凍結過程に於ける細胞内氷晶形成の機構を明らかにしようと試みた。

### II. 材料と方法

**材料:** 当研究室保管の *E. coli* 菌株を用い、細首の肩付フラスコの首まで満したピジョンで緩やかに振盪しながら比較的嫌氣的に、また、三角フラスコのピジョンで十分に通気しながら好氣的に 24 時間培養 (37°C) を行なった。これらの培養菌を集めて、それぞれ 3 回蒸溜水で洗滌し、菌濃度 300 mg/ml の蒸溜水浮遊液として実験に供した。

**凍結融解:** 菌液 0.02 ml を 20×25 mm の大きさのアルミ箔 (厚さ 20  $\mu$ ) 2 枚の間に挟み、なるべく均一な厚さの薄層試料を作り、その試料を予め液体窒素で -150°C に冷却した isopentane 中に投入して凍結し、その温度に約 5 分間おいてから生菌数測定の場合は 20 倍量の蒸

\* 北海道大学低温科学研究所業績 第 851 号

溜水又は等濃度の溶液中に直接浸して急速融解を行なった。また、形態的観察のためには後述のように凍結乾燥を行なった。

**形態的観察：** 上記のように2枚のアルミ箔に挟んだ薄層試料を凍結させた後、その温度で2枚のアルミ箔をはがして、予め液体窒素で冷しておいた乾燥容器に移し、凍結乾燥機に接続して、 $-50^{\circ}\text{C}$ 以下に保ちながら約5時間乾燥を行なった。乾燥後、2%  $\text{OsO}_4$ ・アルコールで固定し、Epon で包埋し熱重合後、マイクローム (Porter-Blum 製) で超薄切片を作り、電子顕微鏡 (日本電子製 6AS) で観察した。

**細胞容積変化の測定：** 上記の菌液に種々の濃度の食塩溶液を等量加え、その一定量を毛細遠心管にとり、ヘマトクリット遠心器 (久保田製) にて 12000 r.p.m. で沈澱細胞量が一定に達するまで遠心した。約 45 分間遠心した後、その NaCl 加菌液の全量に対する沈澱細胞量の比を測定し、NaCl 無添加の対照に対する比率で細胞容積の変化を表わした。

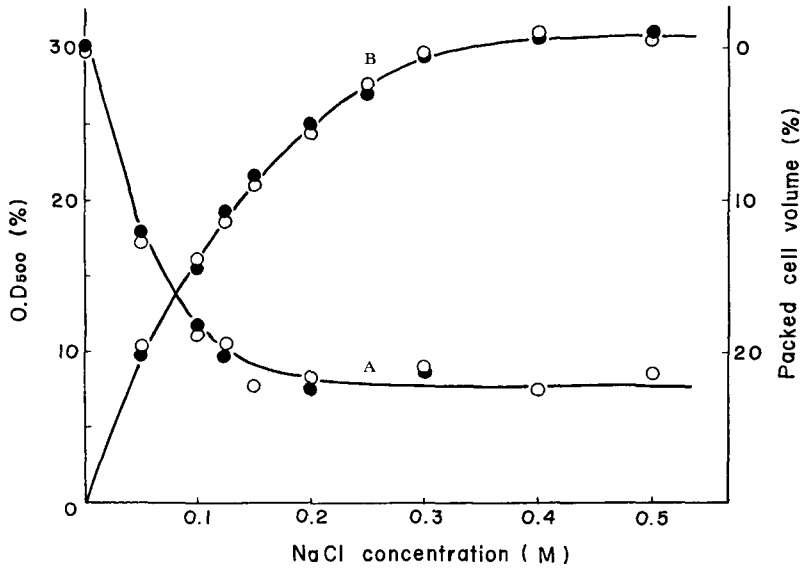
比濁法で細胞容積の変化を表わす場合は 1/400 に希釈した菌液の一定量に種々の濃度の食塩溶液を等量加え、波長 500  $\text{m}\mu$  でその吸光度を測定し、Mager 等<sup>2)</sup> に従い次式によった。

$$\text{吸光度の変化の比率 (O.D}_{500}) = \frac{\text{吸光度 (食塩加菌液)} - \text{吸光度 (蒸溜水菌液)}}{\text{吸光度 (蒸溜水菌液)}} \times 100$$

**生残率の測定：** 凍結融解後の菌液を適當の濃度に希釈して普通寒天培地に注入して平板培養し、発育したコロニー数を数えて、対照の生菌数に対する比率として生残率を算出した。

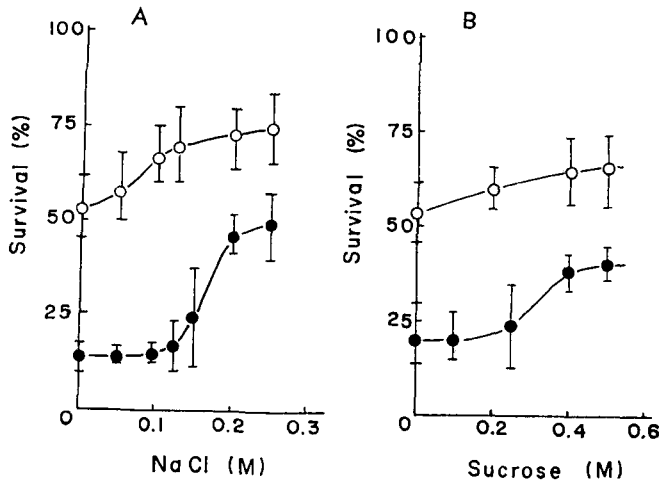
### III. 結 果

前報の実験結果から、予めいろいろの割合に脱水された細胞を一定の冷却速度 (細胞膜の水に対する透過性に比して大きい) で凍結処理を行なう時、細胞膜の透過性の小さい細胞ほど、残存する細胞水分量が少くなければ、細胞障害を受け易いことが予想される。また透過性の同じ細胞を予め脱水してから凍結する場合も、冷却速度が大きければ冷却速度が小さい時に比べてより高度に脱水されていなければ障害を受け易いはずである。この点を検討するためには、先ず、細胞水分を予め脱水する条件及びその条件に対しての細胞水分の脱水の割合を知らなければならない。そこで、短時間内には細胞内に殆んど透過できず、生菌に対して害のない NaCl を用い、その溶液の濃度に対する脱水の割合を遠心法及び比濁法による細胞容積の変化で調べた。その結果は第 1 図に示す通りである。NaCl 加菌液を遠心して、その沈澱細胞量の変化を調べたところ、0.15M NaCl までは濃度の増大するにつれて沈澱細胞量の比率は減少した。一方、細胞容積の変化によると考えられている<sup>3)</sup> 吸光度の変化を調べたところ、0.3M NaCl に至るまでは濃度が増大すると共に吸光度の増加の比率も増大した。このように両測定法によって食塩濃度に対する変化の傾向は一致しなかったが、いずれにせよ、これらの変化は細胞容積の減少によるものと考えられる。このことは、食塩濃度の増大につれて細胞の原形質分離の割合が大きくなり、細胞が益々収縮するという電子顕微鏡による形態的観察 (図版 I) からも支持される。このように食塩濃度に対する細胞容積の変化は好気培養菌でも嫌気培養菌でも同一の変化を示すことが認められたので、予め各種濃度の食塩溶液で脱水された細胞を冷却速度 100,000



第1図 好気及び嫌気培養菌の細胞容積に及ぼす食塩濃度の影響

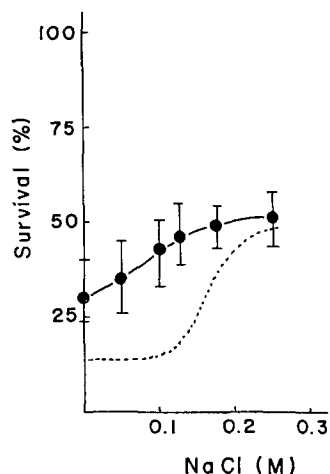
A, 遠心法による沈澱細胞量の変化率; B, 比濁法による吸光度の変化率; ○, 好気培養菌; ●, 嫌気培養菌



第2図 好気及び嫌気培養菌の予備脱水の度合と凍結融解後の生残率の関係

A, 食塩溶液で予備脱水した場合; B, 蔗糖溶液で予備脱水した場合; ○, 好気培養菌; ●, 嫌気培養菌; 冷却速度, 100,000 °C/min; 凍結温度, -150°C

°C/min で凍結処理を行なった。その結果は第 2-A 図に示すように、好気培養菌では脱水のための食塩濃度が増大するにつれて、生残率も漸次高くなり、蒸溜水浮遊液の場合に比べて細胞障害を受け難くなった。一方、嫌気培養菌では 0.15 M NaCl で脱水した場合を境として、それより濃度が大きくなると急激に生残率が高くなった。更に、細胞内に全く透過しない蔗糖を用いて同様の実験を行なった。その結果は第 2-B 図に示すように、食塩溶液の場合と同じ傾向がみられた。この凍結時の細胞形態を 0.10, 0.15, 0.20 M NaCl で脱水した嫌気培養菌で観察すると、凍結処理前の細胞では濃度によって度合は異なるが原形質分離像 (図版 I) がみられ、それらの細胞を凍結すれば、周縁が皺になった収縮像の細胞と細胞全体としては少し小さく細胞内に空洞をもった細胞の 2 種がみられた。しかも、この 2 種の細胞のうち、収縮した細胞の出現の比率は 0.10 M NaCl で予め脱水した場合より、0.20 M NaCl の場合の方が大きいことがみられた (図版 II)。次に、予め各種濃度の食塩溶液で脱水した嫌気培養菌を冷却速度 1000°C/min で凍結処理を行なった。その結果は第 3 図に示すように、脱水のための食塩濃度の増大と共に生残率が高くなり障害を受け難くなった。しかも、この場合には冷却速度 100,000°C/min の場合に比べて、予め脱水することによって障害を受け難くなるために必要な食塩濃度は小さかった。このように、予め細胞水分を脱水してから凍結処理を行なうと、脱水の度合が大きいほど細胞内に氷晶ができ難く、細胞障害を受け難くなるが、好気培養菌では生残率 70~80%, 嫌気培養菌では生残率 40~50% までしか高くないことから、溶液の濃縮による害作用などの他の要因も加わることが考えられる。



第 3 図 嫌気培養菌の予備脱水の度合とその凍結融解後の生残率の関係

—, 冷却速度 1000°C/min;  
 ---, 冷却速度 100,000°C/min;  
 凍結温度, -150°C

#### IV. 考 察

微生物細胞を凍結すると、細胞の種類及び処理条件によって障害の程度に差はあるにしても、凍結過程の冷却速度が大きいほど、細胞障害を受け易いことは良く知られた事実である。大腸菌細胞に於いても、冷却速度が小さければ殆んど細胞障害を受けなく、凍結乾燥による形態観察で細胞は収縮像を示すが、冷却速度が大きくなれば生残率は低下し、それと平行して細胞内に多数の小さな空洞をもった細胞がみられるようになる。この細胞内にみられる空洞が細胞内にできた凍結時の氷晶の抜け殻であることは、冷却速度が小さければ殆んど収縮像を示し、空洞をもった細胞はみられないこと、及び大きい冷却速度で凍結した細胞を低温で長期間放置すると細胞内の空洞が大きくなることから考えてよいであろう。このように凍結によって細胞内に氷晶ができることの機構については既に Mazur<sup>4)</sup> によって示唆されているように、細胞内氷晶形成には冷却速度と細胞膜の水に対する透過性が密接に結びついていることが予想され

る。そこで、一定冷却速度での細胞水分量と細胞膜の透過性の関係、及び冷却速度と細胞水分量の関係を検討するため、透過性の異なる細胞を用い、それらの細胞の水分量をいろいろ加減してから凍結実験を行なった。この細胞水分の脱水の度合を知るために、遠心法及び比濁法で測定したところ、両測定法によって外液の濃度に対する細胞容積の変化の傾向が一致しない結果を得た。これは、外液の浸透圧の増加による細胞の収縮が細胞壁の弾性による細胞全体の容積変化しか反映しない遠心法の場合に対して、比濁法の場合には、その変化の上に更に原形質の収縮による変化が加わって反映するためと考えられる。いずれにしても、外液の濃度の増大につれて原形質分離の度合が大きくなるという形態的観察の結果から、これらの変化は細胞容積の変化によることが明らかにされた。なお、0.10M NaCl で脱水した細胞の形態(図版 I-3)が既に原形質分離を起しているのは、固定に用いられた  $\text{OsO}_4$  の浸透濃度が加わるためと考えられる。このように予め細胞水分を脱水した細胞を凍結し、融解後の生残率を調べると、一定の冷却速度の場合には細胞膜の透過性の小さい細胞ほど、また、細胞膜の透過性が同じ細胞の場合には冷却速度が大きいほど、予め高度に細胞水分を脱水しなければ細胞障害を受け易いことがみられた。この凍結時の細胞形態を観察すると、細胞水分の脱水の度合の大きい場合ほど、細胞内に空洞のある細胞に対する収縮した細胞の出現の比率が大きくなることがみられた。このことから、凍結過程での冷却速度が細胞膜の透過性より小さければ、細胞水分は充分に脱水され、細胞は収縮するため細胞内に氷晶はできないが、冷却速度が大きくなるにつれて、細胞膜のために脱水が遅れ、各温度で氷-水平衡以上の水分が細胞内に残っているために、その結果として細胞内に氷晶ができるようになると考えてよいであろう。このようにしてできる細胞内氷晶形成と細胞障害との間にみられる平行関係から、凍結時の冷却速度が大きい場合の細胞障害の主因として細胞内氷晶形成が予想されるが、これが細胞障害の原因であるか、結果であるかは現在のところ不明であり、更に今後の検討に俟ねばならない。

## V. 摘 要

凍結過程に於ける細胞内氷晶形成の機構を知るために、大腸菌の好気培養細胞と嫌気培養細胞を用い、予め各種濃度の溶液で細胞水分を脱水してから凍結処理をし、その脱水の度合と冷却速度及び細胞膜の水に対する透過性との関係を検討した。その結果、予め細胞水分を脱水してから凍結すると、その脱水の度合が大きいほど生残率の低下が抑制され、脱水処理をしない場合に比べて細胞障害を受け難くなると共に細胞内氷晶の形成が防がれる。一方、一定の冷却速度で凍結すると、細胞膜の透過性の小さい細胞ほど、予め高度に脱水しなければ障害がおこりやすかった。また、細胞膜の透過性が等しい細胞の場合には冷却速度が大きいほど、予め高度に脱水しなければ障害がおこりやすかった。

以上の実験事実から、細胞内氷晶形成は細胞水分の脱水速度と細胞膜の水に対する透過性との兼ね合いで決まることが確認された。

## 文 献

- 1) 根井外喜男・荒木 忠・松坂理夫 1966 微生物の凍結 III. 大腸菌細胞の凍結障害の機構, 低温科学, 生物篇, **24**, 35-48.
- 2) Mager, J., Kuczynski, M., Schatzberg, G. and Avi-Dor, Y. 1956 Turbidity changes in bacterial suspensions in relation to osmotic pressure. *J. Gen. Microbiol.*, **14**, 69-75.
- 3) Bovell, C. R., Packer, L. and Helgerson, R. 1963 Permeability of *Escherichia coli* to organic compounds and inorganic salts as measured by light scattering. *Biochim. Biophys. Acta*, **75**, 257-266.
- 4) Mazur, P. 1963 Kinetics of water loss from cells at subzero temperatures and the likelihood of intracellular freezing. *J. Gen. Physiol.*, **47**, 347-369.

## Summary

In an attempt to elucidate the mechanism of ice crystal formation within cells by freezing, the relationships between preliminary dehydration and rates of cooling and the cell membrane permeability to water were investigated. *Escherichia coli* cells, aerobically and anaerobically cultured, were used as materials.

With the increase in cell dehydration by exposure to hypertonic solution, a decrease in the possibility of intracellular freezing, resulting in an increase in survival rate, was seen. In such freeze-thawed cells, higher permeability and lower rates of cooling resulted in a higher survival rate.

It was therefore ascertained that the possibility of intracellular ice formation depends upon the relationships between the velocity of dehydration due to cooling and the permeability to water of the cell membrane.

## 図 版 説 明

図版 I 食塩溶液で予備脱水した嫌気培養菌。 × 20,000

1. 無処理対照 (蒸溜水浮遊菌)
2. 0.05 M-NaCl 浮遊菌
3. 0.10 M-NaCl 浮遊菌, わずかに原形質分離を起した細胞がみられる
4. 0.20 M-NaCl 浮遊菌, 殆んど細胞が原形質分離をおこしている

図版 II 冷却速度 100,000°C/min で -150°C に凍結した嫌気培養菌。 × 20,000

1. 蒸溜水浮遊菌, 細胞内に大小様々な多数の空洞がみられ, 収縮した細胞は殆んどみられない
2. 0.10 M-NaCl 浮遊菌, 原形質分離を起したまま細胞内に空洞のある細胞と収縮して dense な細胞が混在する
3. 0.15 M-NaCl 浮遊菌, 2 と大体同じであるが, 収縮した細胞が多くなる
4. 0.20 M-NaCl 浮遊菌, 収縮した細胞が殆んどである

