



Title	酵母細胞脂質におよぼす凍結融解及び凍結乾燥の影響
Author(s)	僧都, 博; SOUZU, Hiroshi
Citation	低温科学. 生物篇, 27, 23-30
Issue Date	1970-02-20
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/17747
Type	departmental bulletin paper
File Information	27_p23-30.pdf



酵母細胞脂質におよぼす凍結融解 及び凍結乾燥の影響*

僧 都 博

(低温科学研究所)

(昭和44年9月受理)

I. 緒 言

細胞の凍結融解に際して、細胞膜部分に傷害を受ける可能性のあることが多くの研究者によって示唆されている。坂上¹⁾、Armstrong²⁾、Mazur³⁾らは凍結融解処理によって死滅した酵母細胞から多量の細胞内容物が流出することを示した。また、凍結融解によってその細胞の代謝機能や細胞内成分等に変化をきたすとの報告も見られる⁴⁻⁷⁾。細胞膜は単に細胞内容物の外壁を形作っているばかりではなく、それ自身能動輸送や栄養物の積極的な取り込み等の機能を有する。したがって細胞膜における傷害は、その細胞の内容物の流出をもたらすだけではなく、細胞膜自身の機能に対する障害ともなる可能性があり、これらの結果から細胞が死へみちびかれることも十分に考えられる。このように凍結融解によって二次的におこされる細胞障害の例として、著者らは先に凍結融解した酵母細胞においてポリ燐酸の分解がおこることを見出し、この燐酸の分解は凍結融解によってもたらされた細胞膜の透過性の異常に起因する燐酸分解酵素の活性化によるものであることを示した⁸⁻¹¹⁾。細胞膜に対して凍結融解がどのようなかたちの傷害をあたえるかはまだ明らかでない。しかし、一般に試料の凍結乾燥が脂質の抽出を容易にすることはよく知られた事であり、また酵母細胞を凍結乾燥することによって燐脂質の分解がおこるといふ報告もある¹²⁾。実際に著者らの先の実験においても細胞の脂質に由来する燐酸の抽出量が凍結融解後には未処理のものに比べて僅かながら多くなるという事実も認められている^{8,10)}。今回は凍結融解及び凍結乾燥が細胞の膜に対してあたえる傷害の機構を知る目的で、これらの処理とそれによっておこる細胞内での燐脂質の状態変化とについての関係を調べたので報告したい。

II. 材料と方法

材料：市販のパン酵母（日甜イースト）を麦汁培地で通気下に30°Cで15乃至20時間培養したのち遠沈して集め、蒸留水で3度洗って実験に使用した。

凍結融解：急速凍結融解には上記細胞の蒸留水浮遊液（約500 mg/ml）1.5 mlを径3 cmの底の平らなアルミニウム缶に入れ、液体窒素に浸して凍結し窒素の沸騰のとまったところで30°Cの温湯中に移し試料の氷がとけ切った瞬間に再び液体窒素中に移すという操作を5度くり返し

* 北海道大学低温科学研究所業績 第999号

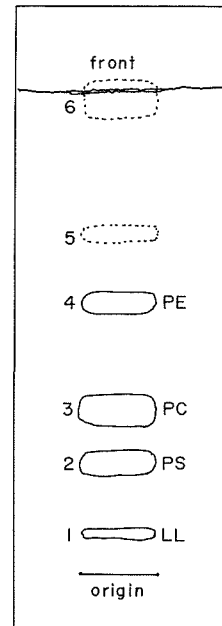
た。緩徐な凍結融解は同じ試料を径 3 cm のガラスのシャーレにとり植氷し乍ら -10°C の氷室で凍結し徐々に -25°C まで温度を下げてから液体窒素中で急速に冷却した。融解は凍結過程とは逆に -25°C , -10°C の順で各氷室に数時間宛宛放置し、最後には $+5^{\circ}\text{C}$ の冷蔵庫内で氷が完全に消えるまで置いた。

凍結乾燥及び復水： 上記と同様の試料 1.5 ml を径 3 cm のガラスシャーレにとり、緩徐な凍結方法で -25°C まで凍結し、通常の凍結乾燥機で乾燥した。急速復水の場合は、この乾燥試料に 0°C に冷却した乾溜水を 1.5 ml 直接ピペットで加えた。緩徐な復水には上記乾燥試料を容器のまま氷の上に置き、これに沸騰水浴から導いた水蒸気 (試料直上で約 30°C) を 1 乃至 2 時間あてた。試料が充分吸湿して糊状になってから更に 1.5 ml の冷蒸溜水を加えた。

インキュベーション： 未処理対照及び融解または復水後の試料を直ちに遠沈管中で 30°C 蒸溜水と混和し総量 3.5 ml の蒸溜水浮遊液にして 30°C 恒温水槽でインキュベートした。所定の時間ののち冷凍遠心して細胞を集め、これを更に 5 ml の冷蒸溜水で一度洗って脂質抽出に供した。インキュベーションの時間は融解または復水の直後から冷凍遠心機に設置するまでの時間で表示し、融解または復水ののち直ちに 2 ml の冷蒸溜水を加え 0°C に保ったまま遠心操作したものをインキュベーション時間ゼロとした。

脂質の抽出及び定量： 脂質の抽出は Deierkauf 等¹³⁾ の方法にしたがって、それぞれ試料湿重量 1 g 当り 20 乃至 30 ml のメタノール、クロロホルム・メタノール (1:1) 及びクロロホルムで 90 分宛 3 度抽出し、これらの抽出液を合わせたものを Folch 等¹⁴⁾ の方法にしたがって 0.1 M KCl で洗い脂質層を蒸発乾固してから 2:1 クロロホルム・メタノール溶液に再溶解した。総脂質含量はこの溶液 0.5 乃至 1.0 ml を減圧下に蒸発乾固した後その重量から求めた。また同じ溶液 20~50 μl を取ってその中の有機燐を測定し¹⁵⁾、燐量を 25 倍したものを燐脂質量とした。

薄層クロマトグラフによる燐脂質の分離と定量： メルク製キーゼルゲル H をもちいて厚さ 0.4 mm の薄層を作り、クロロホルム・メタノール・水 (70:30:5) の系で展開した。展開後硫酸で発色させた結果を第 1 図に示す。これらのうちスポット 6 及び 5 は Hanes 試薬に対し夫々弱く反応するかまたは全く反応しなかった。他の 4 つのスポットは総てこの試薬に強く反応した。このうちスポット 4 は標準試料と同時展開した R_f 値及びニンヒドリン陽性の点からホスファチデルエタノールアミンと同定された。スポット 3 についても標準試料との R_f 値の比較及び Dragendorff 試薬に陽性なことからホスファチデルコリンと同定された。残るスポット 2 はニンヒドリンに、スポット 1 は Dragendorff 試薬に夫々陽性であって、これ



第 1 図 薄層クロマトグラフによる酵母脂質成分の分離

溶媒：クロロホルム・メタノール・水 (70:30:5)。

硫酸による発色。PE, ホスファチデルエタノールアミン; PC, ホスファチデルコリン; PS, ホスファチデルセリン; LL, リゾレシチン

らについては他の文献値を参考にして夫々ホスファチジルセリン及びリゾレンチンであろうと推定された。これら脂質成分の燐酸の定量は、展開後の薄層をヨウ素蒸気にさらして目印をつけたスポットを Skipski ら¹⁶⁾の方法で溶出し、分解後有機燐を測定するやり方で行なった。

III. 結 果

1. 凍結融解または凍結乾燥—復水による細胞脂質の遊離及び抽出量の変化

急速凍結融解または凍結乾燥—急速復水等の処理をした細胞からの脂質の抽出量は、未処理試料から同じ方法で抽出したものに比べて、総脂質、燐脂質ともにいちじるしい増加を示した。しかし、緩徐な凍結融解または凍結乾燥ののちに緩徐な復水処理をした試料では、燐脂質の抽出量は未処理対照細胞にくらべて僅少量の増加しかみとめられなかった。一方、細胞浮遊液上清への脂質の遊離は、急速凍結融解、急速復水等の処理ののちにおいてもほとんどみとめられなかった(第1表)。また凍結融解、凍結乾燥処理による変化の値は等しかった。これらのことは、急速な凍結融解または凍結乾燥後の急速復水等の処理がともに細胞内での脂質の状態になんらかの変化を生じさせたことを示すものであり、とくに燐脂質の変化は、このような処理が細胞膜の構造に対して影響をもたらしたことを示唆するものと思われる。しかし、脂質の上清への遊離が見られないことは、この構造変化がすくなくとも破碎された膜片が細胞外に遊離するというようなものではないことを示していると思われる。

第1表 凍結融解及び凍結乾燥による細胞脂質の遊離および抽出量の変化 (mg 脂質/g 湿細胞)

		対 照	凍 結 融 解		凍 結 乾 燥	
			緩 徐	急 速	緩徐復水	急速復水
総 脂 質	上 清	0.79	—	1.02	—	0.91
	細 胞	5.31	—	10.56	—	9.62
燐 脂 質	上 清	痕 跡	—	0.10	—	痕 跡
	細 胞	1.81	2.03	5.51	2.38	5.67

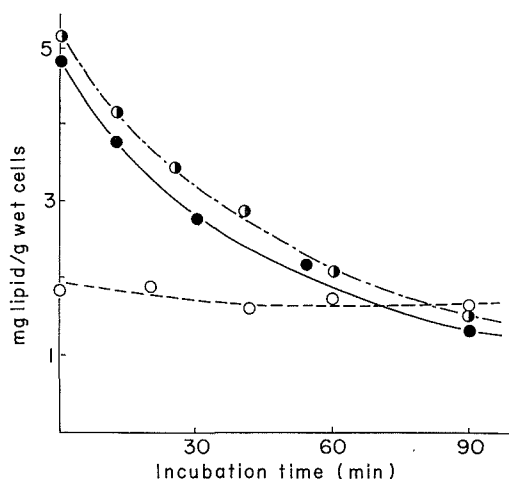
次に、細胞から抽出した総脂質を、薄層クロマトグラフによって各構成成分に分離し、それらの燐酸含量を測定して燐脂質量をもとめた。スポット6はほとんどが中性脂質と考えられ、スポットの大きさに比して燐酸含量は低く、凍結融解、凍結乾燥による影響も少なかった。スポット5の成分はのちに示すように他の燐脂質の分解の結果生じたグリセリドの混合物と考えられ、凍結や乾燥等の処理ののち時間の経過とともにスポットは大きくなって行くのが見られたが燐の含量には全く変化がなくまた極めて低い含量しか見られなかった。残る4つの燐脂質の抽出量は急速な凍結融解または凍結乾燥後の急速な復水によって未処理対照に比べて2乃至4倍に増加するのが見られ、特にホスファチジルセリンの増加がいちじるしかった。しかし凍結融解処理及び凍結乾燥処理によるものの間には目立った差異はなく、また緩徐な凍結融解や凍結乾燥後に緩徐な復水処理をほどこしたものでは、どの成分についても対照との間に目立った差は認められなかった(第2表)。

第2表 酵母細胞磷脂質の抽出量変化 (凍結融解及び凍結乾燥直後) (mg 脂質/g 湿細胞)

磷 脂 質	対 照	凍 結 融 解		凍 結 乾 燥	
		緩 徐	急 速	緩徐復水	急速復水
未同定 (主として中性脂質)	0.20	—	0.25	0.18	0.21
未同定 (主としてグリセリド)	0.10	0.10	0.13	0.09	0.11
ホスファチジルエタノールアミン	0.31	0.36	0.82	0.37	1.05
ホスファチジルコリン	0.73	0.92	2.00	1.10	2.11
ホスファチジルセリン	0.46	0.44	2.00	0.62	1.67
リゾレシチン	0.18	0.21	0.43	0.23	0.53

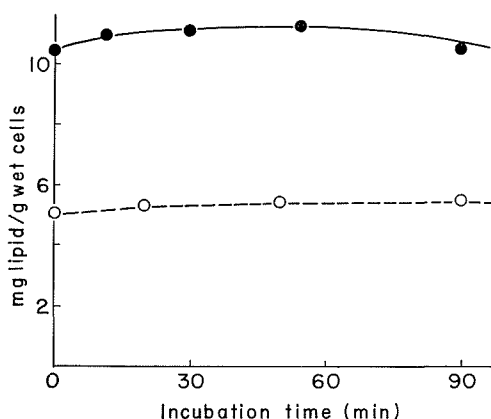
2. 凍結融解及び凍結乾燥試料における磷脂質の分解

前節では急速凍結融解または凍結乾燥—急速復水した試料から処理直後に抽出した場合の脂質量についての変化を示した。一方、このような処理をした試料では、処理後脂質抽出までの間に時間をおくと、その時間の経過するにつれて磷脂質量が減少するのが見られた。未処理試料ではこのような現象は見られないのでこの現象もまたこれらの処理の結果によるものと考えられる (第2図)。抽出される総脂質の量は未処理の細胞に比べると同様にインキュベーションとは無関係に常に一定量を示していること (第3図)、及び薄層クロマトグラフの結果、前述の磷脂質の各スポットがインキュベーション時間につれて小さくなるのに反して磷酸を含まないスポット5だけが逆に大きくなっていくことから、急速凍結融解または急速復水等の処理を受けた細胞内では磷脂質の分解反応がみちびかれるものと考えられた。第4図及び第5図にそれぞれ急速凍結融解及び凍結乾燥—急速復水した細胞内での磷脂質分解の時間経過を成分ごとに示した。併記した未処理細胞における結果からも見られるように、磷脂質の分解は処理後の



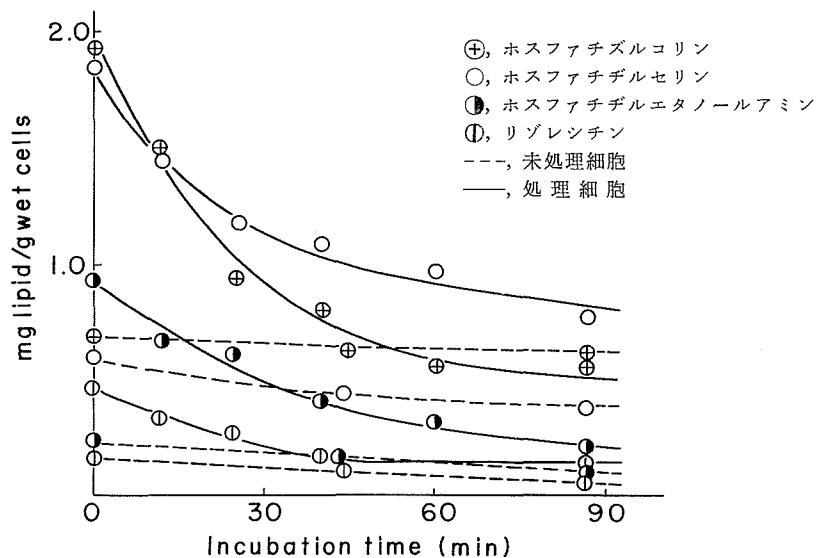
第2図 凍結融解及び凍結乾燥酵母における全磷脂質の減少速度 (30°C 蒸溜水中)

---○---, 未処理細胞; ---●---, 急速凍結融解細胞; —●—, 凍結乾燥急速復水細胞

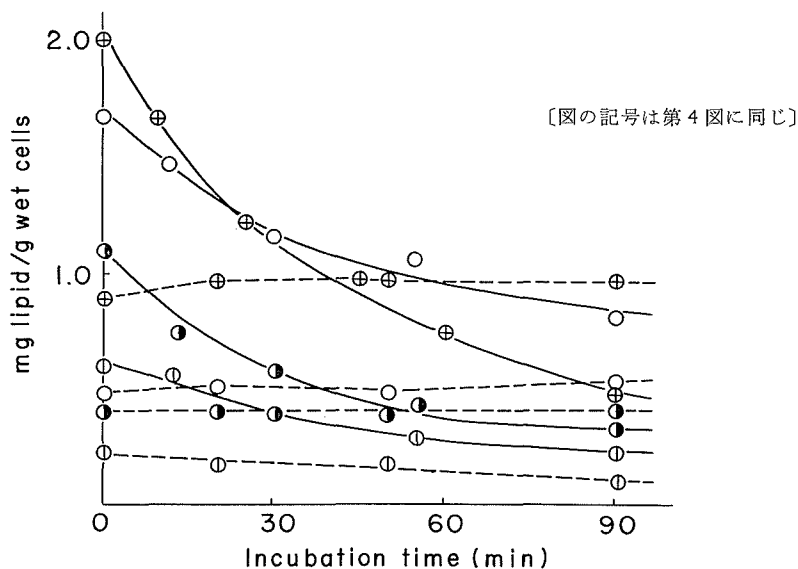


第3図 酵母の総脂質抽出量とインキュベーション時間との関係 (30°C 蒸溜水中)

---○---, 未処理細胞; —●—, 凍結乾燥急速復水細胞



第4図 凍結融解酵母における磷脂質各成分の分解速度 (30°C 蒸溜水中)



第5図 凍結乾燥酵母における磷脂質各成分の分解速度 (30°C 蒸溜水中)

第3表 急速凍結融解及び凍結乾燥急速復水による酵母細胞磷脂質の分解速度

	凍 結 融 解		凍 結 乾 燥	
	60分間の分解率 (%)	各成分の相対分解速度	60分間の分解率 (%)	各成分の相対分解速度
ホスファチジルコリン	64.3	1.00	65.6	1.00
ホスファチジルセリン	48.8	0.72	44.2	0.53
ホスファチジルエタノールアミン	61.7	0.47	61.7	0.40
リゾレシチン	45.2	0.16	43.7	0.18

細胞においてのみ見られるものであり、また未処理試料からの抽出量は試料によって差が見られるのに対して処理後の試料では、試料間の差も二つの処理による差もあまり見られなかった。これら処理試料における燐脂質分解速度の比を第3表にまとめた。両処理試料とも分解の最も速いホスファチデルコリンでは60分間に始めの量の約65%が分解され、最もおそいリゾレンチンでは約45%であって処理の別による値の違いはなかった。一方燐脂質各成分について60分間における分解の量をホスファチデルコリンの値を1としてあらわすと、他の3つでは0.7乃至0.2の間であって、凍結乾燥試料のホスファチデルセリンの分解量が凍結融解試料におけるよりもやや低い値であるのを除いては両処理の間に差は見られなかった。

IV. 考 察

生体膜の構造については多くの説があるが、その主要な構成成分が蛋白質及び脂質であって、特に燐脂質が大きな比率をしめているということはよく知られている。またこれら相互の結合に当っては疎水結合が重要な役をしていることも指摘されているところである。試料の急速な凍結融解、乾燥または急速な復水等は、このような疎水結合に関与している水分子の急激な着脱や状態変化等をおこすものと考えられるので、この結果疎水結合の破壊がおり、組織内に有機溶媒の侵入を容易にすることが脂質の抽出を容易にする要因の一つと考えられる。しかし、膜周辺におこる変化が単にこのような結合の破壊のみにとどまるなら、いったんこわされた結合が融解または復水の後に再び組み直される可能性もあるであろう。緩徐な凍結融解または緩徐な復水処理が細胞の脂質の性状に影響を与えないことはこの可能性を支持するものと思われる。

しかし、急速な凍結融解または乾燥後の急速な復水によって同時にみちびかれる燐脂質の分解反応が、膜に生じた傷害を決定的なものとするのが考えられる。すでに良く知られているように、単位膜モデル¹⁷⁾ではその構成燐脂質分子が極性基 ($-\text{PO}_4^-$, $-\text{NR}_3^+$, $-\text{OH}$) を蛋白質と接する面に向けて並んで居り、また Benson¹⁸⁾ のモデルでも極性基を外側に向けた燐脂質が蛋白質の間に入りこんだ形をとっている。このようなかたちが膜の基本構造と考えるならば、燐酸を含む極性基を失ったグリセリドでは膜を再構成し、その機能を維持するのが困難であろうことは容易に想像されるであろう。燐脂質分解反応はこのような意味において細胞障害の重要な一面をなすものと考えられる。

この燐脂質の分解はホスホリパーゼCの作用によると考えられるが¹⁹⁾、凍結や乾燥等の処理の結果酵素自身またはその存在状態に変化が生じて活性が現われたものか、あるいは脂質がわの構造変化によって酵素作用を容易にうけるようになったのかは明らかでない。またこれらの処理によってリゾレンチンの抽出量も増加することが知られたが、これも始めから存在したものの抽出度が増したのか、または処理によってホスホリパーゼA活性があらわれてリゾレンチンが実質的に増加した結果なのか明らかでない。これらの点の追究は今後に残された問題であろう。

凍結融解及び凍結乾燥—復水の処理が細胞の膜に対して同じような傷害を与えることが明らかになった。このことは、このような傷害がこれら二つの処理に共通な因子によってもたら

されることを示唆するものである。従来凍結融解処理が細胞に与える障害の重要な因子としてよく取り上げられたのは細胞内凍結であるが、これは凍結乾燥—復水処理の際には考えられないので（予備凍結は緩徐なので緩徐な凍結融解処理の場合と同様に細胞水分は細胞外凍結をすると考えられる）、共通の因子とするには無理がある。また仮に細胞内に氷晶ができてそのことが疎水結合の破壊のような害を起すとは考えにくい。この種の害をおこす可能性をもった共通因子としては細胞水分の脱着若しくは状態変化が考えられよう。細胞は凍結によってその水分を失ったと同じ状態におかれ、融解の結果再び水を与えられた状態にもどると考えられるが、これは凍結乾燥—復水処理と同様な過程を通ることとなる。細胞水分の脱失は細胞内での疎水結合の破壊をもたらすであろうし、急速な融解や復水処理による水分子の再添加は疎水結合の正常な再構成を妨げるであろう。そしてこのような膜構造の変化がなんらかのかたちで脂質分解酵素の活性化をもたらし、その結果として膜のより急激な破壊とそれにとまらぬ機能の喪失を招くであろうことは十分に考えられる。

V. 摘 要

凍結融解が細胞に与える障害の一つとして細胞膜の損傷があげられる。膜構造の変化は脂質の変化につながると考えられるので、凍結融解または凍結乾燥—復水処理後の酵母細胞について脂質の抽出量変化及び磷脂質分解を調べた。

急速凍結融解または凍結乾燥—急速復水をした細胞では処理直後に抽出された総脂質及び磷脂質量は未処理試料に比べて2倍以上に増加した。しかし、同様な処理を緩徐な方法でおこなうとこのような変化は生じなかった。

上記の処理で抽出量の増加した脂質のうち、磷脂質では処理後に細胞内で分解反応がすすみ、30°Cのインキュベーションでは、1時間のうちにホスファチデルコリンは65%、ホスファチデルエタノールアミンでは62%、ホスファチデルセリン及びリゾレンチンでは45%が分解された。

細胞脂質に与えるこのような影響は、凍結融解、凍結乾燥—復水の両処理について全く同様であって、これらの処理が細胞膜に傷害を与える共通の要因は、それらの処理によってもたらされる細胞内分子間水分の着脱若しくは状態変化による脂質分子間結合の破壊であることを推定させた。

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) Armstrong, W. McD. 1961 Distribution of potassium in baker's yeast. *Nature*, **192**, 65-66.
- 3) Mazur, P. 1963 Studies on rapidly frozen suspensions of yeast cells by differential thermal analysis and conductometry. *Biophys. J.*, **3**, 323-353.
- 4) Krebs, H. A., Gurin, S. and Eggleston, L. V. 1952 The pathway of oxidation of acetate in baker's yeast. *Biochem. J.*, **51**, 614-628.
- 5) Hansen, I. A. and Nossal, P. M. 1955 Morphological and biochemical effects of freezing on yeast cells. *Biochim. Biophys. Acta*, **16**, 502-512.
- 6) Privitera, C. A., Greiff, D., Strength, D. R., Anglin, M. and Pinkerton, H. 1958 Oxidative phosphorylation by mitochondrial suspensions after freezing and storage at low temperatures. *J. Biol. Chem.*, **233**, 524-527.

- 7) Greiff, D., Myers, M. and Privitera, C. A. 1961 The effects of glycerol, freezing and storage at low temperatures, and drying by vacuum sublimation on oxidative phosphorylation by mitochondrial suspensions. *Biochim. Biophys. Acta*, **50**, 233-242.
- 8) 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.
- 9) 僧都 博 1965 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. 低温科学, 生物篇, **23**, 85-96.
- 10) Souzu, H. 1967 Decomposition of polyphosphate in yeast cell by freeze-thawing. *Arch. Biochem. Biophys.*, **120**, 338-343.
- 11) Souzu, H. 1967 Location of polyphosphate and polyphosphatase in yeast cells and damage to the protoplasmic membrane of the cell by freeze-thawing. *Arch. Biochem. Biophys.*, **120**, 344-351.
- 12) Harrison, J. S. and Trevelyan, W. E. 1963 Phospholipid breakdown in baker's yeast during drying. *Nature*, **200**, 1189-1190.
- 13) Deierkauf, F. A. and Boonj, H. L. 1968 Changes in the phosphatide pattern of yeast cells in relation to active carbohydrate transport. *Biochim. Biophys. Acta*, **150**, 214-225.
- 14) Folch, J., Lees, M. and Sloane Stanley, G. H. 1957 A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J. Biol. Chem.*, **226**, 497-509.
- 15) 渋谷 勲・本田弘子・丸尾文治 1966 複合脂質分析法の改良—大腸菌ホスファチドへの応用. 脂質生化学研究, 117-121 pp.
- 16) Skipski, V. P., Peterson, R. F. and Barclay, M. 1964 Quantitative analysis of phospholipids by thin-layer chromatography. *Biochem. J.*, **90**, 374-378.
- 17) Robertson, J. D. 1959 The ultrastructure of cell membranes and their derivatives. *Biochem. Soc. Symposia, Cambridge, England*, **16**, 1-43.
- 18) Benson, A. A. 1966 On the orientation of lipids in chloroplast and cell membranes. *J. Amer. Oil. Chem. Soc.*, **43**, 265-270.
- 19) Ansell, G. B. and Hawthorne, J. N. 1964 *In Phospholipids-Chemistry, Metabolism and Function*, Elsevier Publishing Company, Amsterdam-London-New York, 152-174 pp.

Summary

It is known that, by freezing and thawing, yeast cells release a considerable amount of cellular components, obviously resulting from membrane damage.

In the present experiment, the extractability of lipids and phospholipid constituents of frozen-thawed or freeze-dried cells was examined to demonstrate such membrane damage.

In cells, rapidly frozen-thawed or rapidly rehydrated after freeze-drying, the amount of total lipid and phospholipids extracted was increased. But, degradation of phospholipids proceeded with the lapse of time after treatment: about 65% of phosphatidyl choline, 62% of phosphatidyl ethanolamine and 45% of phosphatidyl serine and lysolecithine were degraded in 60 minutes at 30°C.

There was no difference in the amount of lipids to be extracted in the control cells and the cells slowly frozen-thawed or slowly rehydrated after freeze-drying.

The extractability and degradation of phospholipids showed similar results in the rapid freeze-thawing and rehydration after freeze-drying. This suggests that the rapid removal or rapid rehydration of water molecules, which take part in the hydrophobic bonding in membrane systems, may be a dominant factor in freezing damage of the cell membrane.