



Title	酵母細胞に於けるパスツール効果に及ぼす凍結融解の影響
Author(s)	荒木, 忠; ARAKI, Tadashi
Citation	低温科学. 生物篇, 27, 31-40
Issue Date	1970-02-20
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/17748
Type	departmental bulletin paper
File Information	27_p31-40.pdf



酵母細胞に於けるパストール効果 に及ぼす凍結融解の影響*

荒 木 忠
(低温科学研究所)
(昭和44年9月受理)

I. 緒 言

酵母細胞が、障害の度合は処理条件で多少違っても、凍結融解によって何んらかの細胞障害を受けることは良く知られた事実である。この凍結処理による細胞障害の機序を明らかにするため、エネルギーを産出する代謝系に及ぼす凍結融解の影響について、著者は細胞の構造と機能という観点から一連の実験を試みてきた。

前報¹⁾に於いては、酵母細胞の醗酵系の凍結障害を調べ、醗酵能が凍結処理によって低下することを報告した。この醗酵能の低下は醗酵系の酵素群が直接凍結障害を受けるのではなく、細胞膜の半透性が失われた結果として、細胞内の醗酵系に関与する因子が細胞外液で薄められることによるものと推論された。しかし、生細胞は細胞膜と細胞内部での諸機能との兼ね合いで生命が維持されるものであるから、障害を受けた細胞膜も細胞内部機能の相補的働きで修復されることも考えられる。従って、凍結による細胞障害については、細胞膜の障害と細胞内部構造に由来する機能の障害との関連に於いて検討されねばならない。そこで、細胞の内部構造が凍結処理によって、どのような影響を受けるかを先ず最初に調べる必要がある。

細胞内では種々の代謝系が調節制御されており、その一つにパストール効果というエネルギーの産出に欠くことのできない代謝系の調節現象がある。これは好氣的条件のもとで、醗酵(嫌氣的解糖)が呼吸によって阻害される現象であり、最近では、細胞内構造物であるミトコンドリアに内在する呼吸系と細胞膜の内側に存在する醗酵系との間に起る補酵素 (AMP, ADP, ATP) やクエン酸によるアロステリックな反応制御であるとされている²⁻⁵⁾。このパストール効果が酵母細胞では -78°C の凍結処理で消失すると報告⁶⁾されていることから、細胞内のミトコンドリアの呼吸系(酸化的磷酸化反応)が凍結障害を受けるためであろうと著者は想像した。

そこで、本実験では、細胞に内在するミトコンドリアに注目して、酵母細胞及び再構成した無細胞系に於けるパストール効果の凍結障害の機構を調べた。

II. 材料及び方法

細胞浮遊液：市販のパン酵母(日甜イースト)を0.01 M 磷酸緩衝液 (pH 5.8) に浮遊させ、 28°C で24時間通気培養した。この飢餓細胞を0.01 M 磷酸緩衝液で3回遠心洗浄してから0.5 M の

* 北海道大学低温科学研究所業績 第1000号

ルビットを含む 0.01 M 燐酸緩衝液又は燐酸緩衝液のみにて湿重量で濃度 50% の細胞浮遊液を作り、この細胞浮遊液を適宜に希釈して実験に供した。

無細胞抽出液の調製： 5 mM ニコチン酸アミドを含んだ 0.01 M 燐酸緩衝液 (pH 5.8) に浮遊させた細胞 (湿重量, 50%) を前報¹⁾の方法で破碎し、その遠心上清 (100,000×g, 30 分) を 0°C の 1,000 倍量の蒸留水中で 90 分間透析したものを無細胞抽出液として用いた。

ミトコンドリアの調製： 上記の飢餓細胞を 0.14 M 2-メルカプトエチルアミンと 0.04 M エチレンジアミン四酢酸 (EDTA) を含む溶液に浮遊し、28°C で 30 分間静置して細胞壁を脆弱化した後、遠心して集めた予備処理細胞を湿細胞量で濃度 100 mg/ml になるように 1 M ソルビットを含む 0.01 M 燐酸緩衝液 (pH 5.8) 中に浮遊させた。これに細胞壁溶解酵素 (L'Industrie Biologique Francaise, Sein, France の Suc digestif d'Helix pomatia stabilisé) を最終濃度 0.5% になるように加えて、28°C で 3 時間攪拌しながら反応させ、細胞壁を溶解させてプロトプラストを形成させた。このプロトプラストを Stekhoven の方法⁷⁾に従って処理し、酵母ミトコンドリアを調製した。

肝臓ミトコンドリアはネズミの肝臓を 0.44 M ソルビット, 1 mM EDTA, 0.05% 血清アルブミンを含む 0.01 M トリス塩酸緩衝液 (pH 7.4) 中で細片に切りきざみ、ホモゲナイザーで破壊することを除いて Whittaker の方法⁸⁾によって調製した。

浮遊液中のミトコンドリア濃度を表わすために、ミトコンドリアの蛋白質含量をビウレット法で測定し、血清アルブミンを標準溶液としてその蛋白質濃度を求めた。

凍結融解処理： 緩慢凍結の場合は中試験管に入れた試料 1 ml を予め -3°C に冷却しておいたアルコール槽中で植氷して凍結させた後、冷却速度 0.5°C/分で -40°C まで徐々に温度を下げた。凍結温度を一定にするため、この凍結試料を液体窒素に浸してその温度まで冷却させた。急速凍結の場合は内径 3 cm の平底アルミニウム缶に試料 1 ml を入れ、それを液体窒素中に直接浸して急速に凍結させた。凍結処理後、いずれの試料も 30°C の温水にて振盪しながら急速に融した。また、反覆する場合は上記操作を繰り返して行なった。

醗酵能及び呼吸能測定： ワールブルグ検圧計を用いて、28°C で好気又は嫌気条件下に於いて発生する炭酸ガス量及び酸素の吸収量を測定した。好気条件の場合は大気中で、嫌気条件の場合は窒素ガスでガス交換を行なってから、恒温槽中で 10 分間温度平衡を行ない反応を開始させた。また、別にミトコンドリアの呼吸を調べるためには、萩原の方法⁹⁾に従い半密閉型の自記呼吸酸素測定装置 (柳本製) を用いて、25°C での酸素の吸収量を測定した。呼吸調節率及び ADP/O 比は Chance and Williams の方法¹⁰⁾に従って、ポーログラムから計算して求めた。呼吸調節率 (RCR) は ADP が存在しないときの呼吸速度 (定常状態 IV の呼吸) に対する ADP が存在するときの呼吸速度 (定常状態 III の呼吸) の比で表わした。また、P/O 比に等価の ADP/O 比は添加された一定量の ADP が消費つくされるまでの酸素吸収量に対する添加 ADP 量の比で表わした。

生残率測定： 無処理又は処理した細胞浮遊液をそれぞれ適当な濃度まで希釈し、その一定量に麦汁寒天培地を注加して平板培養し、30°C で 48 時間後に認められる集落数を数え、無処理対照に対する百分率で生残率を表わした。

III. 結 果

凍結融解酵母細胞の呼吸能及び醱酵能

磷酸緩衝液に浮遊した細胞の無処理又は凍結融解後の呼吸能及び醱酵能をそれぞれの酸素吸収及び炭酸ガス発生で測定した結果を第1表に示す。無処理細胞の場合、無酸素条件下での醱酵能 ($Q_{CO_2}^N$) は216.4であるが、好気条件下では、その醱酵能が抑制されて112.5 ($Q_{CO_2}^A$) に減少すると共に41.3の呼吸能 (Q_{O_2}) を示した。この細胞の呼吸に影響しない範囲の濃度のパラニトロフェノールが存在するとき、好氣的醱酵能 ($Q_{CO_2}^A$) は112.5から203.3に増大し嫌氣的醱酵能 ($Q_{CO_2}^N$) に殆んど等しくなった。従って、醱酵が呼吸によって阻害又は抑制されるというパスツール効果がみられた。

第1表 酵母細胞の嫌氣的又は好氣的醱酵及び呼吸に及ぼす凍結融解の影響 (磷酸緩衝液に浮遊した場合)

凍 結 条 件	生 残 率 (%)	添加した硝酸 ウラニウム の 濃 度*	嫌氣的醱酵 ($Q_{CO_2}^N$)	好氣的醱酵 ($Q_{CO_2}^A$)		呼 吸 (Q_{O_2})
				無添加	パラニトロフ ェノール添加	
無 処 理 対 照	100	—	216.4	112.5	203.3	41.3
		$1.25 \times 10^{-3} M$	3.6	2.1	—	0.2
緩 慢 凍 結	90	—	192.1	101.4	172.1	34.8
急 速 凍 結	55	—	119.3	61.2	114.4	24.0
		$5 \times 10^{-3} M$	4.9	5.1	—	0.6
急速凍結 5回	<2	—	13.6	13.5	13.7	3.7
		$5 \times 10^{-3} M$	15.8	16.1	—	1.8
		$10^{-2} M$	9.7	9.5	—	1.2

それぞれの値は糖存在下での醱酵及び呼吸から自己醱酵及び呼吸を差し引いて Q (炭酸ガス発生量又は酸素吸収量 $\mu\text{l/hr/mg}$ 乾燥重量) として算出した

* 凍結融解処理後上記濃度の硝酸ウラニウムを添加させてから醱酵及び呼吸を測定した

このような酵母細胞を緩慢又は急速に凍結し、融解後の生残率を増殖能で調べると各々90%又は55%に減少した。緩慢凍結の場合では、嫌氣的醱酵能、好氣的醱酵能及び呼吸能はそれぞれ192.1, 101.4, 34.8に減少し、無処理対照の活性に対して約90%の活性を示した。しかも、パラニトロフェノールが存在すれば好氣的醱酵能も172.1に増加し、丁度90%の生存細胞が正常細胞と同じようなパスツール効果を示すようにみえた。また、急速凍結の場合でも、嫌氣的醱酵能が119.3に減少すると共に好氣的醱酵能及び呼吸能も61.2, 24.0に減少し、対照に対して約55%の活性を示した。この好氣的醱酵能もパラニトロフェノールが存在すれば、醱酵能が114.4に増大し、嫌氣的醱酵能にほぼ等しくなり、一見して、55%の増殖できる細胞のみが正常細胞と同じようにパスツール効果を示し、残り45%の増殖できない細胞は醱酵能及び呼吸能を殆んど示さないようにみえた。しかし、正常細胞の嫌氣的又は好氣的醱酵能を3.6, 2.1と殆んど阻害する硝酸ウラニウムを急速凍結処理後に添加した場合、嫌氣的又は好氣的醱酵能は非常に小さいが、それぞれ4.9, 5.1と等しい値を示し、パスツール効果がみられ

なかった。この硝酸ウラニウムは殆どどの細胞が障害を受けているような急速凍結5回処理試料の醱酵能を全く阻害しないことから、醱酵系そのものを阻害しないが、基質の細胞膜透過を阻害すると考えられる。従って、硝酸ウラニウム存在下での醱酵及び呼吸は細胞膜の半透性を失うような障害を受けた細胞に由来すると考えられ、そのような障害細胞ではパスツール効果も消失すると思われる。このように、障害細胞ではパスツール効果を示さないことは急速凍結を5回繰り返した試料で明瞭に認められた。急速凍結5回処理細胞では、硝酸ウラニウムが存在しなくても、好氣的醱酵能と嫌氣的醱酵能とが殆ど等しい値を示し、各々13.6, 13.5であった。また、パラニトロフェノールを添加しても醱酵能の増加は認められず、13.7であった。従って醱酵の呼吸による阻害現象が凍結融解によって消失することが明らかであり、細胞内のミトコンドリアが凍結によって障害を受け、パラニトロフェノールの添加の場合と同様にミトコンドリアの酸化的磷酸化反応がアンカップリング (uncoupling) されることが想像された。

次に、細胞内のミトコンドリアの障害が凍結による直接的な障害であるかどうかが問題となる。凍結融解によって細胞膜の半透性が失なわれると、細胞内の滲透濃度が細胞外液と等しい低調な滲透濃度になり、ミトコンドリアが低調な滲透濃度の溶液に曝らされるため、障害を受けることが考えられる。この点を検討するため、凍結による細胞障害に対して保護効果のないソルビットを用い、0.5 M ソルビット磷酸緩衝液に細胞を懸濁してから凍結処理を行なった。第2表に示すように、0.5 M ソルビット磷酸緩衝液に懸濁しただけの無処理細胞の醱酵能及び呼吸能は56.0, 23.9で、磷酸緩衝液に浮遊した無処理細胞の場合(第1表参照)に比較して活性は小さかった。この好氣的醱酵能はパラニトロフェノールの添加によって95.7まで増大することから、パスツール効果のあることが明瞭に認められた。しかし、急速凍結を5回繰り返した処理細胞では、醱酵能はパラニトロフェノールを添加しても増加せず、11.2, 12.0とほぼ等しい値を示すので、凍結によるパスツール効果の消失が認められた。

第2表 酵母細胞の醱酵及び呼吸に及ぼす凍結融解の影響
(0.5 M ソルビット磷酸緩衝液に浮遊した場合)

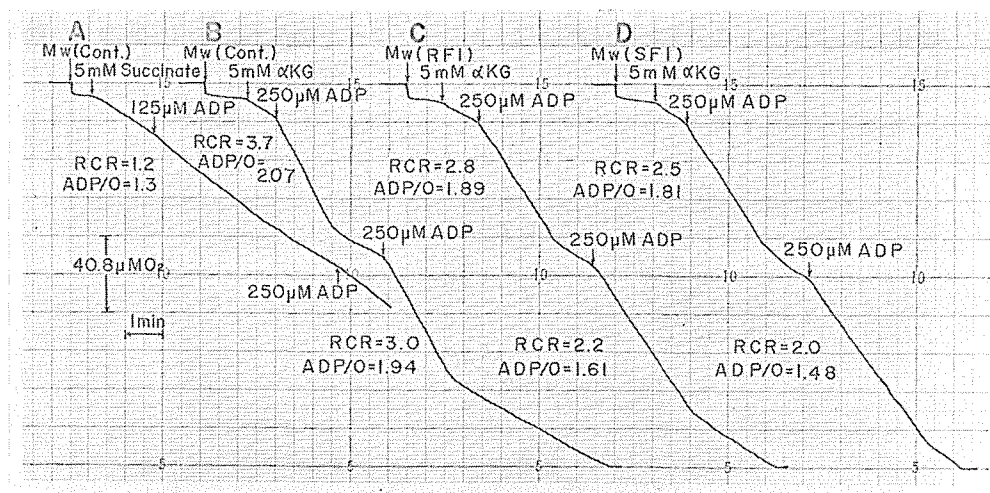
凍 結 条 件	生 残 率 (%)	好 氣 的 醱 酵 ($Q_{O_2}^{好}$)		呼 吸 (Q_{O_2})
		無 添 加	パ ラ ニ ト ロ フ ェ ノ ール 添 加	
無 処 理 対 照	100	56.0	95.7	23.9
急 速 凍 結 5 回	<2	11.2	12.0	2.5

醱酵及び呼吸はソルビットが存在する以外は第1表と同一条件下で測定した

ミトコンドリアの凍結障害

酵母細胞に於けるミトコンドリアが凍結融解によってどのような障害を受けるかを調べるため、細胞内よりミトコンドリアを分離し、そのミトコンドリアの構造と密接に関連した機能として、酸化的磷酸化反応及び呼吸調節機能をポーラグラフ法で測定した。第1図にその一例を示すと、酵母ミトコンドリアに基質としてコハク酸を加えた場合、呼吸速度が著しく増大するが、更にADPを添加しても呼吸の促進は殆どみられず、呼吸調節率は1.2と非常に低か

った。酸化的磷酸化能 (ADP/O 比) も低く 1.3 であった (曲線 A)。基質が α -ケトグルタル酸の場合は ADP の添加によって呼吸の加速がみられ、ADP が消費されると呼吸は減速し、呼吸調節率は基質がコハク酸の場合より高く 3.7 であった。ADP/O 比は 2.07 であった (曲線 B)。このような酵母ミトコンドリアを急速凍結処理すると、呼吸調節率及び ADP/O 比は各々 2.8, 1.89 に低下したが、定常状態 III (基質と ADP の存在) の呼吸速度は無処理対照のものと同程度変らなかった (曲線 C)。一方、酵母ミトコンドリアを緩慢凍結処理すると、呼吸調節率及び ADP/O 比はそれぞれ 2.5, 1.8 に低下した (曲線 D)。いろいろな実験例をまとめて第 3 表に示すと酵母ミトコンドリアは凍結処理によって呼吸調節能の低下及び酸化的磷酸化反応のアンカップリングが引き起こされ、その凍結障害の度合は急速凍結の場合より緩慢凍結の場合の方が



第 1 図 酵母ミトコンドリアの呼吸調節能及び酸化的磷酸化反応に及ぼす凍結融解の影響

無処理又は凍結処理ミトコンドリア (Mw; 0.65 mg 蛋白質) を反応混液に矢印のところで加えた後、基質及び ADP をそれぞれの矢印のところで加えた反応混液 (pH 6.5) は 0.65 M ソルビット、10 mM 磷酸緩衝液、10 mM トリス-マレイン酸緩衝液、0.1 mM EDTA、10 mM KCl から成る
A, B: 無処理対照, C: 急速凍結, D: 緩慢凍結

第 3 表 無処理又は凍結処理酵母ミトコンドリアの呼吸能と呼吸調節率及び P/O 比

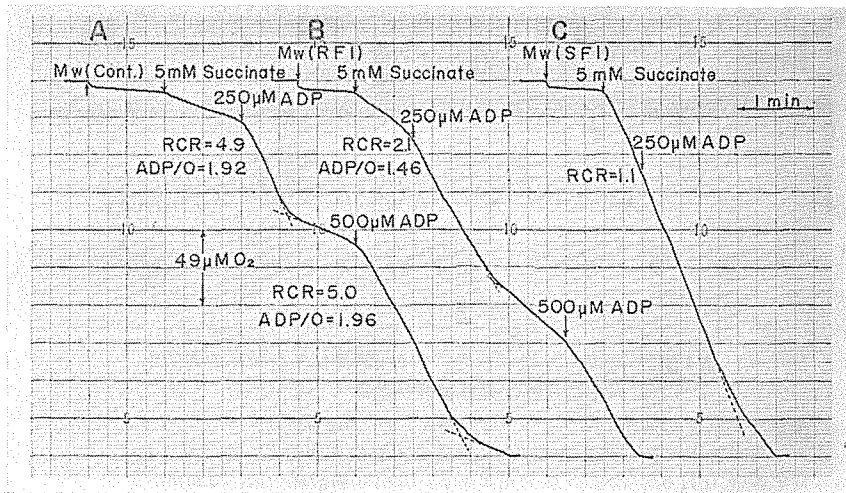
凍結条件	基質	Q _o (定常状態 III)*	呼吸調節率**	P/O 比***
無処理対照	コハク酸	0.20~0.27	0.9~1.4	1.1~1.5
	α -ケトグルタル酸	0.36~0.43	3.0~3.7	1.9~2.2
急速凍結	α -ケトグルタル酸	0.33~0.46	2.2~2.8	1.6~1.9
緩慢凍結	α -ケトグルタル酸	0.35~0.45	1.8~2.5	1.4~1.8

* Q_o (定常状態 III) は基質及び ADP 存在下での呼吸速度で μ atoms O₂ とりこみ/分/mg 蛋白質で表わした

** 呼吸調節率 (RCR) = 定常状態 III の呼吸速度 \div 次の定常状態 IV の呼吸速度

*** P/O 比は ADP/O 比で表わした

僅かであるが大きい傾向がみられた。この傾向は第2図に示すように、ネズミの肝臓から調製したミトコンドリアの場合で明瞭に観察された。肝臓ミトコンドリアでは、基質がコハク酸の場合でも ADP の添加によって顕著な呼吸の促進がみられ、ADP の消費と共に呼吸が減速され、高い呼吸調節率 (RCR=4.9) を示し、ADP/O 比も 1.92 と高かった (曲線 A)。この高度の呼吸調節能を示す肝臓ミトコンドリアを急速凍結処理すると、定常状態 III の呼吸速度は無処理対照の場合と変わらないが、定常状態 IV の呼吸速度が無処理の場合より大きいので低い呼吸調節率 (RCR=2.1) に変化した。また、一定量の ADP 添加による定常状態 III の呼吸の持続時間 (O₂ 消費量に相当) が長くなり、ADP/O 比は 1.46 に低下し、酸化的磷酸化反応のアンカップリングが明らかであった (曲線 B)。緩慢凍結処理した肝臓ミトコンドリアでは呼吸調節が著しく悪くなり、ADP/O 比も算定できないほど低く、急速凍結の場合より障害の度合いが大きかった (曲線 C)。このように細胞から遊離したミトコンドリアでも、その構造に関連した機能が凍結融解によって障害を受けることが明らかになったので、細胞内のミトコンドリアでも凍結によって直接的な障害を受けることが想像された。



第2図 肝臓ミトコンドリアの呼吸調節能及び酸化的磷酸化反応に及ぼす凍結融解の影響

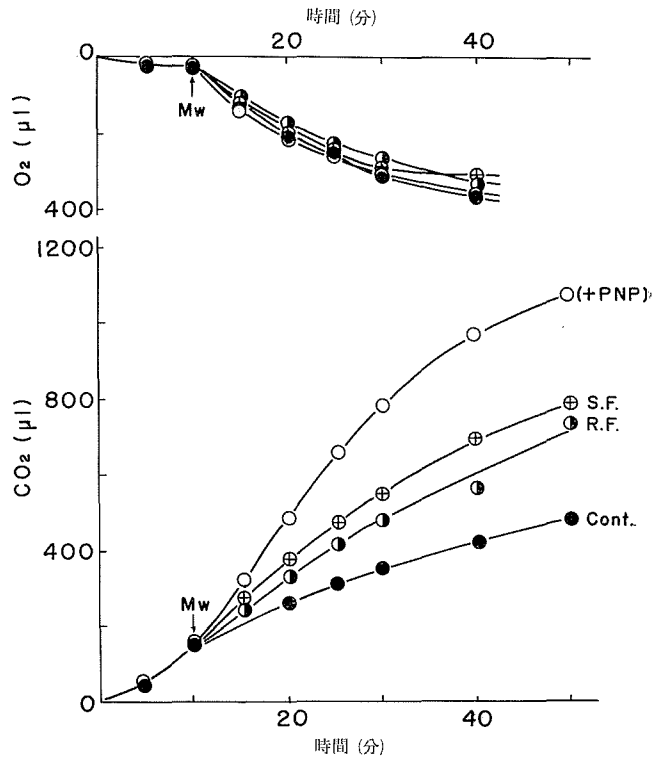
無処理又は凍結処理ミトコンドリア (Mw, 2.64 mg 蛋白質) を反応混液に矢印のところで加えた後、基質及び ADP をそれぞれの矢印のところで添加した
 反応混液 (pH 7.4) は 0.25 M ソルビット, 10 mM 磷酸緩衝液, 10 mM トリス-塩酸緩衝液, 10 mM KCl, 0.2 mM EDTA から成る

A: 無処理対照, B: 急速凍結, C: 緩慢凍結

無細胞系のパスツール効果に対する凍結融解の影響

ミトコンドリアの凍結障害に起因して細胞に於けるパスツール効果が消失することを確認するため、細胞から分離したミトコンドリアと醗酵系の酵素群を含む抽出液から成る無細胞系を用いて、その検討を行なった。酵母細胞から調製した醗酵系の酵素群を含む無細胞抽出液に基質を加えて醗酵を行なわせ、それに肝臓から分離した活性の高いミトコンドリアを添加すると、その醗酵が抑制された。即ち、Gatt and Racker¹¹⁾ も報告しているように、この再構成し

た無細胞系で明らかなパスツール効果が認められた (第3図)。これに反して, 無細胞抽出液にパラニトロフェノールを予め加えておけば, 無処理ミトコンドリアを添加しても, 抽出液の醗酵系による炭酸ガスの発生速度は何んらの影響も受けなかった。一方, 急速又は緩慢凍結処理したミトコンドリアを添加した場合, パラニトロフェノールが存在すれば, 無処理対照のときと同様に抽出液の炭酸ガスの発生速度には何んの影響も受けないが, パラニトロフェノールが存在しなければ, いずれの凍結処理ミトコンドリアでも炭酸ガスの発生速度が無処理対照のときより大きくなり, 処理ミトコンドリアによる醗酵の抑制度が小さくなった。このように, 凍結融解したミトコンドリアではパスツール効果の低下することがみられた。



第3図 再構成した無細胞系でのパスツール効果に及ぼす凍結融解の影響

透析した無細胞抽出液 (22.4 mg 蛋白質) を含む反応混液 (pH 7.4) に肝臓ミトコンドリア (Mw, 13.2 mg 蛋白質) を矢印のところで添加した

パラニトロフェノール (PNP) 存在: ○; 無処理対照, 急速凍結及び緩慢凍結 (同一曲線)

パラニトロフェノール不在: ●, 無処理対照; ◐, 急速凍結; ◑, 緩慢凍結

IV. 考 察

凍結による酵母細胞に於けるパスツール効果の消失が細胞内のミトコンドリアの凍結障害に起因することは, 再構成した無細胞系に於ける添加ミトコンドリアの呼吸による醗酵の阻害

が, 無処理のミトコンドリアよりも凍結処理ミトコンドリアの方が弱いという事実 (第3図) から認められよう。本実験では, この再構成した無細胞系に, 呼吸調節率及び ADP/O 比が低く且つ収量の悪い酵母ミトコンドリアの代りに, 活性の高い肝臓ミトコンドリアを使用した。しかし, 両ミトコンドリアとも凍結融解によって障害の度合は異なっても同一傾向を示すこと (第1, 2図) から, 酵母ミトコンドリアを用いても凍結処理ミトコンドリアによる醗酵の阻害度が減少することは容易に想像されるところである。このようなパスツール効果の消失が凍結融解による細胞内のミトコンドリアの酸化的磷酸化反応のアンカップリングによることは明らかであるが, 凍結処理によってどのような機序でアンカップリングがおこるかは今後検討すべき重要な問題である。

障害細胞ではパスツール効果が殆んど完全に消失するのに反して、凍結処理ミトコンドリアを用いて再構成した無細胞系では、パスツール効果の消失はパラニトロフェノールを加えた場合ほど完全ではなかった。このことは、ミトコンドリアの酸化的磷酸化反応がホスホリパーゼ A によって数分以内に完全にアンカップルされるという報告¹²⁾のように、細胞内では凍結障害に伴ってホスホリパーゼ A のような分解酵素が活性化又は反応できるようになり、その結果、完全なアンカップリングがおこるためかもしれない。また、細胞内に在するミトコンドリアと遊離したミトコンドリアとでは、その置かれる環境条件が違うため、凍結障害の受け方が違うのかもしれない。これらの点に関しては更に今後の検討に俟ねばならないが、パン酵母ではホスホリパーゼ A の活性が小さいという報告¹³⁾と、凍結融解直後及び 15°C で 30 分間放置後の処理細胞ではパスツール効果に差が認められない事実とを考え合せれば、凍結障害に伴うホスホリパーゼ A の活性化又は反応化によって極めて早い速度でミトコンドリアのアンカップリングが引き起されるとは考え難い。

酵母細胞では凍結過程での冷却速度が大きい程障害を受け易いのに対して、遊離したミトコンドリアでは急速凍結より緩慢凍結による障害の方が大きかった。Lusena¹⁴⁾も遊離したミトコンドリアでは緩慢凍結による障害が大きいことを報告している。この凍結速度による障害の傾向の違いを説明するためには、細胞内のミトコンドリアと細胞から分離したものとが同じ態度をとるものかどうかの問題は残るが、両者の間にはミトコンドリアの周りの溶液の質的相異及びそれを取り囲む細胞膜の有無という環境条件の違いを考慮しなければならない。根井^{15,16)}や Mazur^{17,18)}は酵母細胞に於ける凍結障害の形態的機能的観察から、急速凍結の場合には、冷却速度に対応する細胞水分の脱水速度が細胞膜の水に対する透過性より大きいために細胞内部に氷晶が形成されるようになることを示唆している。また、Trump¹⁹⁾らは凍結融解した組織細胞の電子顕微鏡的観察で、緩慢凍結より急速凍結の方が細胞内のミトコンドリアの破壊又は膨潤化が起り易いことを報告している。凍結の際には、遊離したミトコンドリアでは周りが直接氷晶に接するのに対して、細胞内のミトコンドリアでは細胞膜の存在によって氷晶に曝らされ難くなるという違いが考えられるし、また、ミトコンドリアの周りの溶液の濃縮による害は、両者で多少違うことも考えられる。

このような細胞内のミトコンドリアの凍結障害によるパスツール効果の消失を細胞の生死と直接関連づけることはできないが、少なくとも、パスツール効果のような代謝調節機能が凍結融解によって障害を受ければ、異常になった代謝は回復することができず、やがて死に至ることが想像されるであろう。

V. 摘 要

酵母細胞の凍結障害の機序を明らかにするため、細胞内に在するミトコンドリアに注目して細胞に於ける代謝調節機能の 1 つであるパスツール効果に及ぼす凍結融解の影響を調べた。

酵母細胞は凍結融解によって障害を受け、その障害細胞では嫌氣的醗酵能と好氣的醗酵能が殆んど等しい値を示し、パラニトロフェノールの存在下でも醗酵能の増加、即ち、呼吸による醗酵の阻害が認められないことから、パスツール効果の低下することを知った。

細胞から分離したミトコンドリアも凍結融解によって障害を受け、呼吸調節能の低下と酸化的磷酸化反応のアンカップリングが認められた。

遊離ミトコンドリアと醗酵能を有する無細胞抽出液とから成る再構成系でも、凍結融解によってミトコンドリアの呼吸による醗酵の阻害度が減少すること、即ち、パスツール効果の低下がみられた。

以上の実験結果から、凍結融解によるパスツール効果の消失は、恐らく細胞内部の氷晶形成によりミトコンドリアが障害を受けるためであろうと推定された。

文 献

- 1) 荒木 忠 1965 酵母細胞の醗酵に及ぼす凍結融解の影響. 低温科学, 生物篇, **23**, 97-109.
- 2) Aisenberg, A. C., and Potter, V. R. 1957 Studies on the Pasteur effect II. Specific mechanisms. *J. Biol. Chem.*, **224**, 1115-1127.
- 3) Lynen, F., Hartmann, G., Netter, K. F. and Schuegraf, A. 1959 Phosphate turnover and Pasteur effect. In Regulation of Cell Metabolism (G. E. W. Wolstenholme and C. M. O'Connor, eds.), J. & A. Churchill Ltd., London, pp. 256-276.
- 4) Vinuela, E., Salas, M. L., Salas, M. and Sols, A. 1964 Two interconvertible forms of yeast phosphofructokinase with different sensitivity to endproduct inhibition. *Biochem. Biophys. Research Commun.*, **15**, 243-249.
- 5) Wu, R. 1964 Control of glycolysis by phosphofructokinase in slices of rat liver, novikoff hepatoma, and adenocarcinomas. *Biochem. Biophys. Research Commun.*, **14**, 79-85.
- 6) Lund, A. J. and Halvorson, H. O. 1951 Effect of low temperature on enzymes and microorganisms. In Proc. 3rd Conf. on Research, Council on Research, Am. Meat Inst., Chicago, 59-62 (*Chem. Abst.*, **45**, 8569. から引用).
- 7) Stekhoven, F. M. A. H. S. 1966 Studies on yeast mitochondria I. Existence of three phosphorylation sites along the respiratory chain of isolated yeast mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys.*, **115**, 555-568.
- 8) Whittaker, V. P. 1966 The ultrastructure of mitochondria. In Regulation of Metabolic Processes in Mitochondria (J. M. Tager, S. Papa, E. Quagliariello and E. C. Slater, eds.), Elsevier Publ., Amsterdam, pp. 1-27.
- 9) Hagihara, B. 1961 Techniques for the application of polarography to mitochondrial respiration. *Biochim. Biophys. Acta*, **46**, 134-142.
- 10) Chance, B. and Williams, G. R. 1956 The respiratory chain and oxidative phosphorylation. *Advanc. Enzymol.*, **17**, 65-134.
- 11) Gatt, S. and Racker, E. 1959 Regulatory mechanism in carbohydrate metabolism II. Pasteur effect in reconstructed systems. *J. Biol. Chem.*, **234**, 1024-1028.
- 12) Weinbach, E. C. and Garbus, J. 1968 Structural changes in mitochondria induced by uncoupling reagents. The response to snake-venom phospholipase A. *Biochim. Biophys. Acta*, **162**, 500-505.
- 13) Harrison, J. S. and Trevelyan, W. E. 1963 Phospholipid breakdown in baker's yeast during drying. *Nature*, **200**, 1189-1190.
- 14) Lusena, C. V. 1965 Release of enzymes from rat liver mitochondria by freezing. *Canad. J. Biochem.*, **43**, 1787-1798.
- 15) 根井外喜男 1954 酵母の凍結過程 (第1報). 農化, **28**, 91-94,
- 16) 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.
- 17) Mazur, P. 1961 Manifestations of injury in yeast cells exposed to subzero temperatures I.

- Morphological changes in freeze-substituted and frozen-thawed cells. *J. Bacteriol.*, **82**, 662-672.
- 18) Mazur, P. 1963 Kinetics of water loss from cells at subzero temperature and the likelihood of intracellular freezing. *J. Gen. Physiol.*, **47**, 347-369.
- 19) Trump, B. F., Young, D. E., Arnold, E. A. and Stowell, R. E. 1965 Effects of freezing and thawing on the structure, chemical constitution, and function of cytoplasmic structures. *Fed. Proc.*, **24**, Suppl. 15, 114-168.

Summary

The Pasteur effect, which represents the respiratory functions which control the cell fermentation, was examined to elucidate the mechanism of injury to yeast cells resulting freeze-thawing.

By freeze-thawing, the rate of exogeneous fermentation and respiration of the cells suspended in phosphate buffer with or without 0.5 M sorbitol was reduced in accordance with the decrease in the rate of cell survival. However, the rate of aerobic fermentation in the cells injured by freeze-thawing was not increased by an addition of p-nitrophenol and a loss of the Pasteur effect was observed in those injured cells. In isolated mitochondria, oxidative phosphorylation and the respiratory regulating function were damaged by freeze-thawing. The Pasteur effect in a reconstructed system consisting of isolated mitochondrion and cell-free extract was also released by freeze-thawing.

From these results obtained above, it can be said that the release of the respiratory inhibition in the fermentation may have resulted from some injuries sustained by mitochondria, probably caused by the formation of ice crystals within the cells.