

電子顕微鏡に依る酵母の研究

第一報 酵母細胞膜に対する二三の考察

山 本 竜 男

(農学部 水産製造学教室)

緒言 電子顕微鏡を用いた細胞学的研究, 特に単細胞生物のそれに於て, 酵母はその大きより好個の対照であると考えられるに拘らず酵母を用いたこの方面の研究は非常に少い。故に酵母を用いてその細胞構造に対する究明を行うと共に併せて生理学的な研究をも行い, 光学顕微鏡で作られた学説に存在する矛盾, 疑問の解決を試みる目的で行つたのである。

酵母細胞は原形質, 細胞核, 液胞, 微粒体等及び之を包む細胞膜に依り構成されて居り, この細胞膜がゲル状態でゾル状態の内容物を被覆している事は他の細胞と同様である。

電子顕微鏡に依る赤血球膜に關しては多くの研究がある¹⁾²⁾³⁾。が酵母細胞膜に於ても多くの類似性を認める事が出来る。又酵母細胞膜の粘質物に關しては先に貝原氏⁴⁾⁵⁾⁶⁾の研究がある。細菌に就いては色々の観点⁷⁾⁸⁾⁹⁾から考察されつつあるが, Bacteriophage との關係に於ける Anderson, Subtilis に於ける Hillier,¹⁰⁾¹¹⁾ Azotobacter に対する Eisenstark 等の研究が報告されている。

実験並に考察

本報に於て使用菌種は主として *Torula rufia* (C.49). *Torula luteora* (C.45). *Willia anomala* (C.27). new red yeast (T.M). を用いた。菌種番号は京大片桐研究室使用のもので其の儘採用した。以上の菌を採用した理由としては何れも繁殖力が旺盛で取扱いが容易である事, 又 C.49. C.45. は *Shizo saccharomycetes* に属するもので分裂繁殖の特殊性を觀察せんとしたものであり, C.27は皮膜形成酵母としての特徴を取り, T.M. はやまも果実より分離した新赤色酵母で特異の粘質物を分泌する故に採用したものである。

培地は総て Hayduck 氏固体培地として培養日数4~5日目を標準新鮮物としたものである。

実験1. 細胞膜の露出 (Fig. 1)

Fig. 1の内

- C.49原形即ち Hayduck agar の固体培地より蒸溜水中に懸濁せしめ(この場合乳濁し難い)て後観察したもの。
- 同一試料を100°Cで1分間煮沸処理したもの(煮沸に依つては容易に乳濁する)
- 同一試料を10分間超音波処理したもの。

之等の場合固体培地からのC.49の集落は蒸溜水中に乳濁が困難であるが, 煮沸に依つても超音波に依つても容易に乳濁分散する。即ち酵母の凝集性の問題であるが, 之に關しては Hansen 等は酵母周囲¹²⁾に網状組織が出来, 之が酵母を互に密着させるとして酵母粘質物の存在を主張している。又 Kochは凝集形成は一定のPHに依り影響されているとも述べているがこれは細胞膜に対する内的又は外的な蛋白質の影響であると説明されている。(b)は煮沸に依り原形質のみ凝縮し薄い細胞膜を残したものであると考えられる。又この薄い膜は貝原氏に依り粘質物と指摘されているものであるが, ここでは細胞膜であると断定し度い。又(c)に於ける様に超音波の振動に依り細胞膜は破壊せられ内容物は飛び出している。この内容物は振動に依つて粉碎せられる事は無い様に思える。

又一般に酵母細胞膜は外膜と之を裏付ける内膜の二層より出来、その厚さ0.5~1 μ と称せられているが二層の membrane は確認する事が出来ない。

又 (a) (b) に依つて観察すれば試料に及ぼす電子線の熱影響は、湿度100%に於ける100°C のそれより低いものであることを推論する事が許されるだろう。

実験Ⅱ. 超音波処理に依る影響 (Fig. 2)

超音波に依り細胞が大きな影響を受ける事は考えられる所であるが其の形態的变化を観察した。(使用超音波は島津製作所製超音波発振装置を用い、50K. cycle 200m. amp. 10分間処理)

Fig. 2の内

a: C. 27

b: C. 45

c: C. 49

に於ける映像である。之等の作用に依つても細胞膜自身は破壊口を除いて原形を保つている。C. 49の場合膜内に三日月様の残留物を残す事が多かつた。之の生理的意義は不明であるが、Fig. 1 (b) の薄膜が粘質物でなく細胞膜であるとの一つの証明をなす事も出来る。

又酵母の連鎖性(凝集性と関連あるか?)はこの様な外部的力に依つても失われる事は少い。この事は C. 45, C. 49に就いても屢々観察する事が出来る。故に酵母の粘着性は Koch の云う様に、細胞膜に対する外部の影響だけでなく細胞膜そのものに依る。即ち酵母の菌体は非常に離れ難いものである爲だとも推察出来る。

実験Ⅲ. 酵母粘質物に対する所見 (Fig. 3)

a: C. 27

b: C. 45

c: T. M.

先述した様に酵母は固体培地より蒸留水に移す際非常に分散懸濁し難い。之等の原因は酵母粘質物に起因するとされているし、又之に依つて凝集性、酵母輪、酵母皮膜等が説明される事が多いが、(a) の菌体連鎖、(b) の薄膜等も一應粘質物であると考えられる所であるが、之等の特異的粘質物でなく、あくまで細胞膜である。即ち (a) は未だ菌体が分離せずして連鎖して居り、(b) は何かの原因に依り内容物が収縮して膜のみを残したものである事は別の多くの映像に依つて証明する事が出来る。特に (a) は代表的な産膜酵母である事に依つても考えられる。故に酵母の粘着性は別の観点に於て討議しなければならぬ。

然し (c) の T. M は特殊な酵母で固体平板培地に於て Colony 周辺に肉眼的にも観察出来る粘質物を生ず、之は他の酵母に於ては見られない所であるが、この粘質物を検鏡した場合明瞭に網状のものを捕捉出来たのである。即ち Hansen の推論を明に証明した譯である。然し乍ら此の網状物は今迄行つた多種の酵母に発見する事が出来ないし、T. M は特殊酵母であり、一新種である。又皮膜を形成せず、水に対する分散性はこの様な巨大な粘質物にも拘らず特に困難である事は示さなかつた。故に Hansen の指摘する様な酵母粘質物はある特殊酵母には存在するが之に依てのみ酵母の粘着性は説明出来ないと結論する。

実験Ⅳ. 4%塩酸に依る原形質分離 (Fig. 4)

酵母の原形質分離に4%塩酸は良く用いられる所である。即ち固体培地よりの新鮮酵母を4%塩酸に浸漬し、室温に放置(20°C)し12時間後取り出し充分洗滌して観察したものである。

- a: C. 27
b: C. 45
c: C. 49

Plasmolysis を行い一部原形質が飛び出しているが二層に分れた membrane を観察する事が出来ない。

実験Ⅶ. 細胞膜の張力 (Fig. 5)

Fig. 5 に示す様に (a) は C. 49 の超音波処理であるが原形質が殆んど分離しているに拘らず、細胞膜のみは依然原形を保つているし、又破壊口は一部である。(b) は C. 27 の無処理に於ける映像であるが特に膨脹した如き膜を見るし、この場合も内容物は空虚なものである。又 (c) は原形質分離をした C. 45 であるが内容空虚に拘らず完全な原形を示す。之等に示す様に内容物喪失に依る張力は無くなつてに拘らず、かく原形を保つ原因は不明であるが将来の検討を要するものと思考される。上下の張力は無いと映像より推察出来るが弛緩した皺は観察する事が出来ない。之は細菌に於ても同様であるが、血球膜等に於ては皺を観察出来るのである。

実験Ⅵ. 分散性の問題

先述の様に固体培地よりの酵母は非常に分散し難いものであるが、細胞膜の本質を追究する一課程として以下に示す様な試薬に加えてよく振盪して分散を試み、24時間保持した後観察した。

Degree of disperion to several reagents.

Table I dispersion degre immediatly aften time.

yeasts reag.	C. 27	C. 45	C. 49
60% alcohol	十 浮游状に分散するが乳濁しない	井 やや分散	井 十分後やや分散
Benzol	— 器壁に附着して分散しない	同 左	同 左
4% H ₂ SO ₄	井 良く乳濁する	井 比較的容易	井 稍悪い
4% HCl	井 良く分散	井 良く分散	井 稍悪い
4% NaOH	十 浮游状に分散するが乳濁しない	土 分散しない	井 非常に良く乳濁する
4% NaCl	井 割合に良い	井 稍悪い	井 稍悪い

註(十)は分散度を示す

Table II dispersion degree after 24 hours.

yeasts reag.	C. 27	C. 45	C. 49
60% alcohol	井 粉状には良く分散するが乳化悪い	井 良く乳濁	井 乳濁
Benzol	— 器壁に附着して取れない	同 左	同 左
4% H ₂ SO ₄	井 乳濁するが粉状のものが多い	井 乳濁す	井 乳濁す
4% HCl	井 乳濁するが粉状のものが多い	井 乳濁	井 乳濁
4% NaOH	土 寒天様沈殿となる	十 薄膜様沈殿となる	井 小膜様沈殿となる
4% NaCl	井 乳濁良し	井 乳濁良し	井 同 左

以上考察するに

- i) 塩類溶液に対しては一般に蒸留水の場合より乳濁し易い。
- ii) 酸とアルカリに対しては菌に依り相違がある。
- iii) アルカリに対しては菌体そのものが変質する様に考えられる。
- iv) ベンゾール等の溶剤に対しては全く反撥してう。
- v) 何れに対しても菌種に依り相異を示す。

等の事実から分散度の究明より細胞膜又は細胞質の化学成分決定の方途を推論出来ると信じ予報的に以上の項を記載した。

実験Ⅶ. 乾燥酵母の細胞膜 (Fig. 6)

キリン麦酒より分譲せられた乾燥酵母を蒸留水中に分散させて観察したものである。

この場合多くの酵母は原形質の凝縮を示している。膜は平滑さを喪失している様に思えるが猶粘着性は強く保持していた。

乾燥程度に依る細胞膜の変化に就いては更に追試の必要がある。

結 論

- (1) 電子影像に依つて粘質物と考えられ易い薄膜連鎖物は細胞膜そのものである事。
- (2) Hansen 等の推論した粘質物は特殊な酵母にのみ認める事が出来る。而してこの粘質物は凝集力膜生産等に余り影響がない。
- (3) 超音波処理原形質分離等を行つても細胞膜は内容物と行動を別個にし且つ比較的原形を保つている。
- (4) 細胞膜が内外二層より成り平均 0.5μ の厚さを有すると云う事は電子顕微鏡に依つては証明出来ない事である。
- (5) 細胞が各試薬溶液に対して特異性を示す事は勿論同一試薬に対しても菌の種類に依つて相異のある事は指摘出来る。この事は細胞膜の特異性を示すものである。
- (6) 各種実験に示す様に酵母細胞膜は非常に強靱で弾力性の強いものである事が想定される。

(研究室業績第5号)

文 献

- (1) 丹野, 齊藤: 第54回電子顕微鏡総合委員会報告. 54-B-5 (1950)
- (2) 細井, 万井: 第55回電子顕微鏡総合委員会報告. 55-B-14 (1950)
- (3) 丹野, 小林, 齊藤: 電子顕微鏡会誌 1, 2, 26 (1950)
- (4) 貝原友次郎: 日本農化誌 23 481 (1950)
- (5) 貝原友次郎: 日本農化誌 24 160 (1951)
- (6) 貝原友次郎: 日本農化誌 24 255 (1951)
- (7) Anderson, T. F., : J. Bact. 55 637, 651 (1948)
- (8) Hillier & Kurkjian, : J. appl. phys. 16 264 (1944)
- (9) Hillier & Mudd, : J. Bact. 57 319 (1949)
- (10) Eisenstark & McMahon, J. Bact. 59 75 (1950)
- (11) Eisenstark. & mcmahon, : Soil Sci., 68 329 (1949)
- (12) E. Hansen, : Hand buch d. Physiol Bd IV, 46.
- (13) R. Koch : Wochenschv. Brau. (1928)

(昭和27年4月30日受理)

SUMMARY

Electron Microscopy of Yeast.

Part II Studies on the Cell Membrane

by Tatsuo YAMAMOTO

(*Laboratory of manufacturing Fisheries, Agriculture Faculty, Kochi University*)

By many electron micrographs in this paper it could be presumed the fact, —.

(1) The thin membrane and connecting substances around the cells were cell membrane itself, not but mucoid substance.

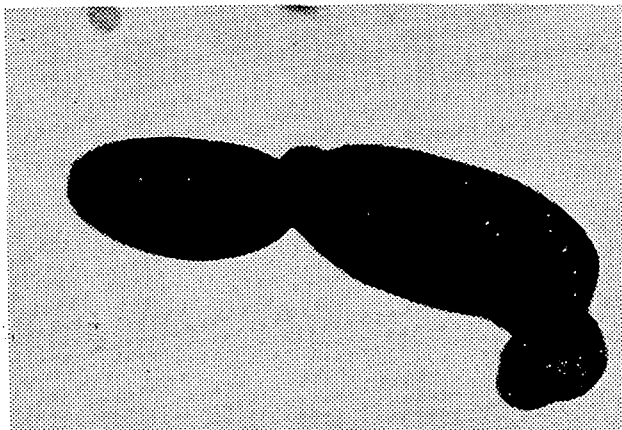
(2) The mucoid substance, presumed by E. Hansen could be recognized only in special yeast, for example, T. M. (Yamamomo yeast), and this substance had no connection with the cohesive power.

(3) The cell membrane have not moved in concert with cytoplasm and kept the actual form in case of super sonic wave treating, or plasmolyse etc.

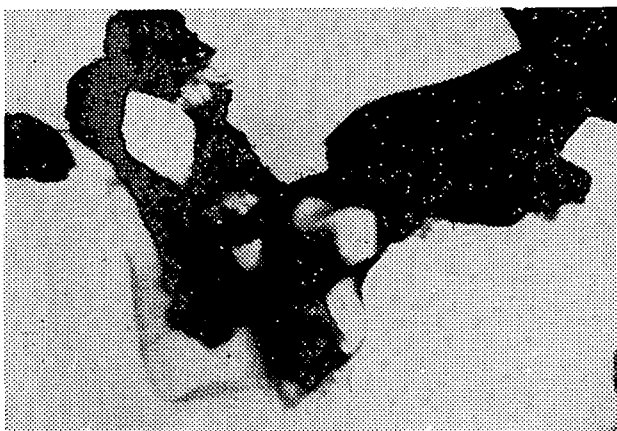
(4) It was not proved that the cell membrane constituted with double rayer, inside and outside.

(Received April 30, 1952)

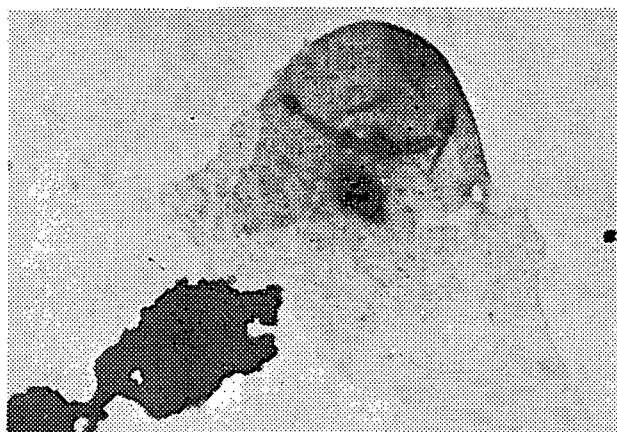
Fig. 1 Exposed cell membrane of yeast. ($\times 6,000$)



(a)



(b)



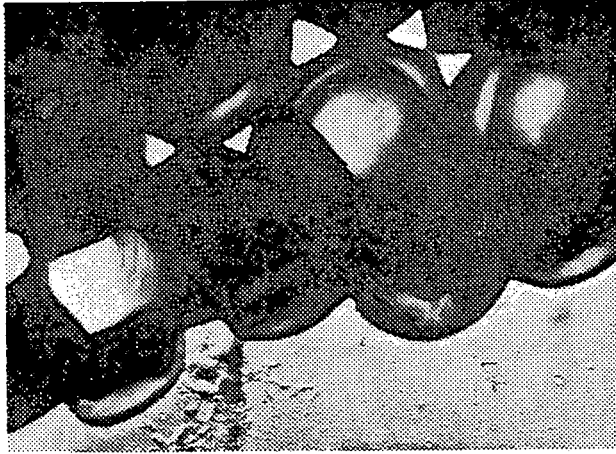
(c)

a: Normal form of *Torula rufla*.

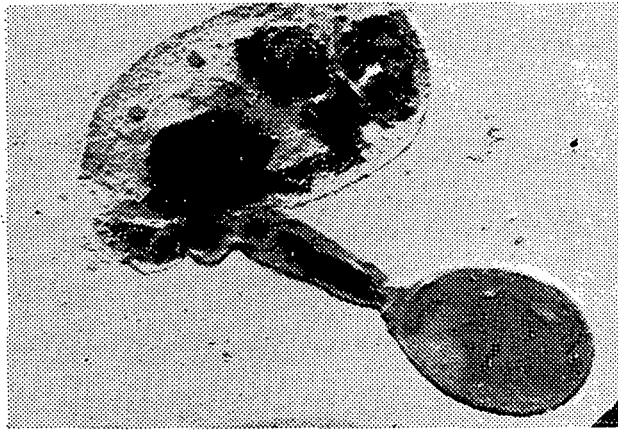
b: Were treated by boiling water for 1 minut. (*Torula rufla*)

c: Was treated by super sonic wave for 10minuts. (*Torula rufla*)

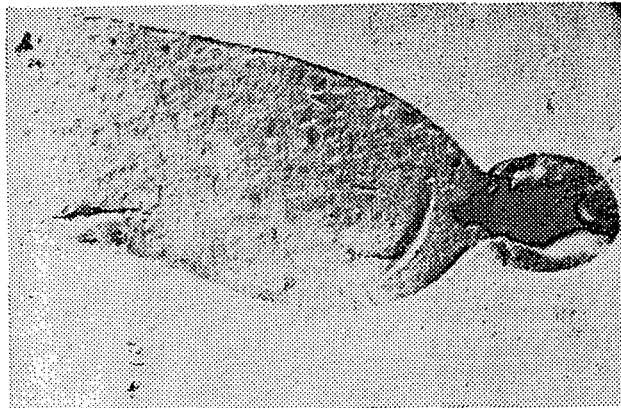
Fig. 2 Effect of Super sonic wave. ($\times 6,00$)



(a)



(b)



(c)

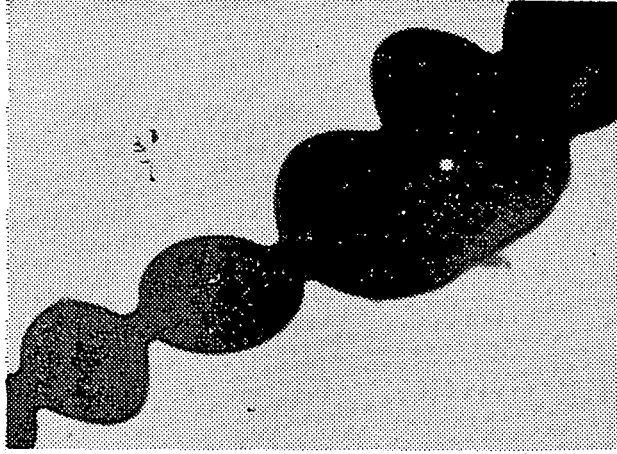
Were treated by super sonic wave for 10 minuts.

a: *Willia anomala*.

b: *Torula luteora*.

c: *Torula rufla*.

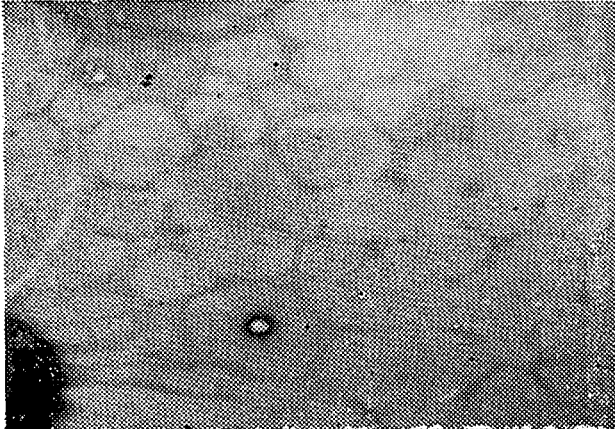
Fig. 3 Mucoïd substance of yeast. ($\times 6,000$)



(a)



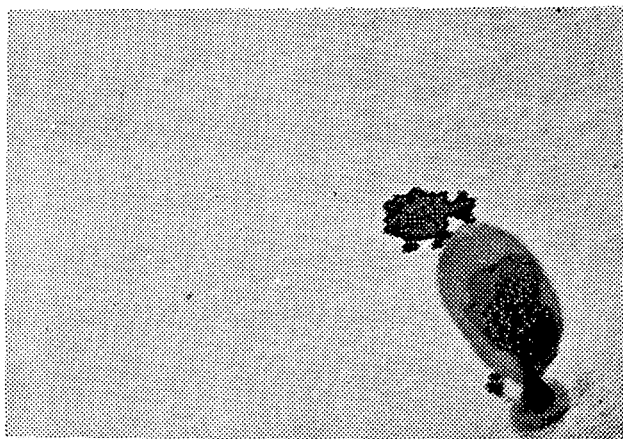
(b)



(c)

a: *Willia anomala*
b: *Torula luteola*.
c: red yeast T.M.

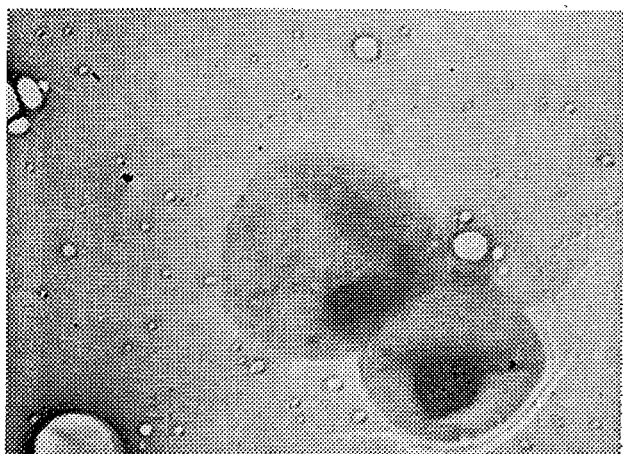
Fig. 4 On the case of plasmolysis by 4% HCl. ($\times 6,000$)



(a)



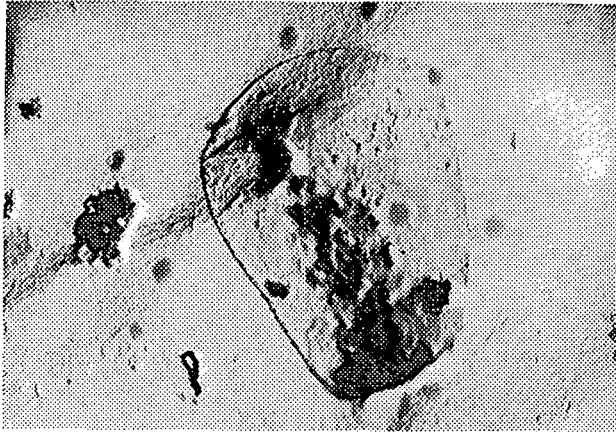
(b)



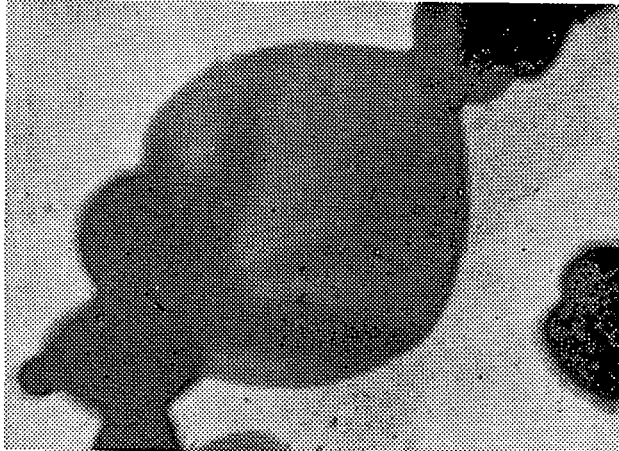
(c)

- a: *Willia anomala*.
- b: *Torula luteola*.
- c: *Torula rufia*.

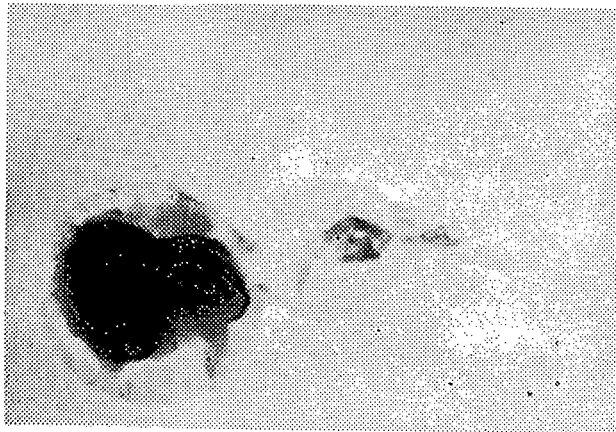
Fig. 5 Tension of cell membran. ($\times 6.000$)



(a)



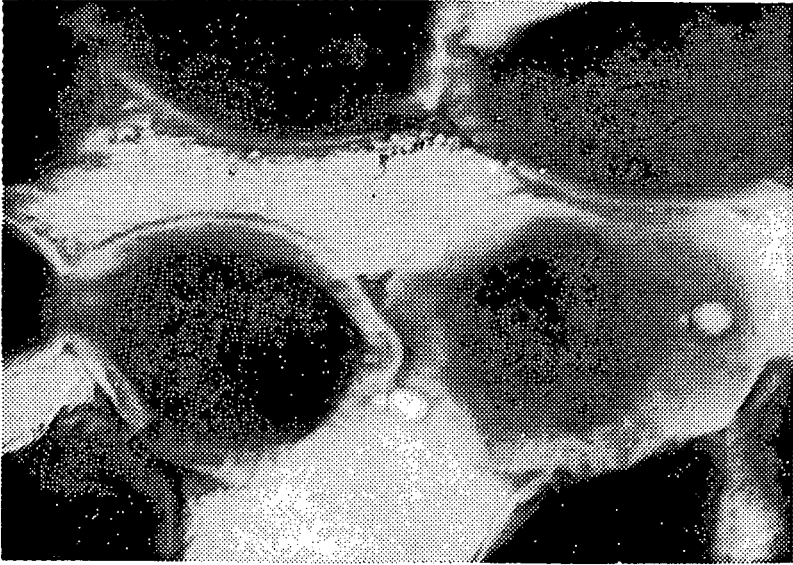
(b)



(c)

- a: *Torula rufia* was treated by super sonic wave
b: *Willia anomala* (treated nothing)
c: *Torula luteola* were treated by 4% Hcl.

Fig. 6 Cell membrane of dried yeast. ($\times 7,500$)



(a)



(b)

a: Natural state.

b: Were 0.5% treated state, by 0.5% NaOHsol.

It is considered that the electron thin parts were cell membranes instead of mucoid substance, and even in those case the cohesive power was not disappeared.

