

第二報 原形質分離下に於ける諸考察

山 本 竜 男

(農学部 水産製造学教室)

緒 言 上述の表題は本報告の総てに適合しないかも知れないが、細胞膜と原形質を分離せしめる事に依り、それ等の相関関係を更に追究し、酵母細胞質の構成研究に一階程を作ると共に多くの原形質分離条件を與えて之の細胞に及ぼす影響を検討したのである。

又此処に於ては廣い範囲に於ける一般的なもの求めたのであり、各項目の詳細に就いては順次検討しつある。酵母を対照としての研究は殆んどなく最近赤血球を用いた形質構造の研究に対しては東、¹⁾ 細見、²⁾ 万井、³⁾ 丹野、⁴⁾ Bessis 等の研究がある。⁵⁾

実験並に考察

使用菌種は京大片桐研究室より分譲せられたもので菌種番号は同一のものを使用した。

- C.27, *Willia anomala*
- C.28, *Willia saturnus*
- C.45, *Torula luteola*
- C.46, *Torula minuta*
- C.49, *Torula rufia*
- C.53, (American yeast)
- C.88, Aging yeast (*Willia anomala* sp.)
- C.99, *Saccharomyces Peka Kumamoto*.

Dried yeast, Dried yeast of Kirin Brew. Co.

猶檢鏡試料作成条件は之等のものを Hayduck 氏寒天培地上に 48~72時間 (25~30°C) に培養し、菌体を各溶液に懸濁せしめて後各溶液の性質に應じて操作し試料を調製した。特に酸、アルカリの場合には鏡体に及ぼす悪影響を考慮して洗滌を十分に行つた爲、映像には変化を認める事は無かつたが試料作成条件として考慮する必要がある。

実験 1. 老朽細胞の細胞膜 (Fig. 1)

之等の試料は移植後 7ヶ月を経過したもので適温に一週間培養して後室温に放置したものである。

酵母細胞膜は一般に幼若細胞のものは薄く次第に老熟するに従つて厚さを増すと考えられ、光学系に於ては明かに認められる所であり、時に於ては 1 μ 以上に達する場合がありますとされているものである。然し乍ら Fig. 1 に示す映像より考察すれば何れを探つても細胞膜の厚化は認められない。即ち透過電子線の量より推測して新鮮細胞と殆んど変化がない様である。従つて老朽細胞に於ける細胞膜の厚化はあり得ないと云う一つの推定を下す事が出来る。例え厚化したとしても極く僅かなものに過ぎない。又明瞭な原形質膜の存在も指摘出来ない。ただ原形質の凝縮は何れの細胞に於ても認められる所であり、C.88 に於て特に顯著である。そして此の事は植物細胞は細胞膜が相互に連絡して相牽引する爲原形質分離を起し易く、單細胞のそれは之無き故に困難であると云う橋谷⁶⁾氏の説に反証するもので酵母の細胞膜は原形質の凝縮に拘らず依然強力な弾性を示し原形を維持するものである。

又之等図中 electron thin part は所謂酵母粘質物と考えられ易いものであり、新鮮物に於ても認められるが、之が細胞膜でなく粘質物とすれば細胞膜と考えられるものは存在しない。故に第一報に指摘

した如く明かに之は細胞膜である。又原形質の凝縮の形態方向等は同一の菌種に於ても不規則であるが一般に他細胞との接觸部に偏在し勝ちである事は指摘出来る。

実験Ⅱ．酵母細胞に及ぼす稀薄硫酸の影響 (Fig. 2)

酸の稀薄溶液中に於ける細胞の影響を観察中特に $\frac{1}{10}$ N. 硫酸に於て各細胞は特異的現象を示し、糸状物を必ず残留させた。即ち試料作成には $\frac{1}{10}$ N. 硫酸溶液10CC中に新鮮培養酵母一白耳を取りて浮遊せしめ充分振盪分散させ、24時間放置後、上澄傾斜、遠心分離を繰返した沈澱を蒸留水に懸濁させて検鏡したものである。

之等糸状物の本質に關しては全く不明であるが、細胞膜の破壊状態より考察して膜構成物質中の特種なものとも考えられるが、細胞質特に核物質との關連性も推察出来る。又此の酸度は酵母の生育を許さないものであるが、硫酸が酵母を死滅せしめる状況を観察出来る。即ち細胞膜は非常に多孔質となり、その一部は破壊される。又一部のもの原形質分離を起し不規則となる。

実験Ⅲ．酵母細胞に及ぼす食塩の影響 (Fig. 3)

塩類の酵母に及ぼす影響として種々の研究があるが、Boas⁷⁾ は中性塩の影響は細胞膜の膠質性を変えて透過性を變化せしめるとしている。又其の毒作用に対しては Richards, Marboe⁸⁾ 等の研究がある。

此処では塩類の細胞に対する作用として食塩を用いて考察した。即ち $\frac{1}{10}$ M. 1M. 2M. の食塩水に新鮮酵母を浮遊分散させ24時間放置後十分水洗したもの、及び水洗しないものを検鏡した。Fig. 3 に示す様に非常に特異的なものとして細胞膜周囲に微粒体を残留せしめる事である。之等微粒体の考察として水洗しない試料 (V. a, b) に於ける様に食塩の結晶は必ず正四面体の結晶を作る事は肉眼的にも光学的にも電子的にも同様に観察出来るが他の図に於ける (水洗した場合) ものは結晶形でない、如何なる物質に依るかは全く不明である。

然し乍ら食塩、非食塩の相違は別としても必ず細胞膜周囲に吸着せられる現象は細胞の荷電状況、細胞の膠質化学的考察に対して一方向を示すものと考えられる。又図のⅢ, VI に示すものは C. 45 C. 49 を 1M. NaCl にて処理後約30日放置して自己消化を試みたものの映像である、膜及び細胞質の破壊状況を將來の参考とし度い。

実験Ⅳ．酵母細胞に及ぼす苛性ソーダの影響 (Fig. 4)

試料は前回と同様に各濃度の NaOH 溶液 10CC に分散せしめ充分水洗又は水洗しないものを試料とした。酵母に対する NaOH の影響は酸よりも遙かに蓄しいものがある、細胞膜は勿論原形質も $\frac{1}{10}$ N. NaOH で強く侵される事は各映像に依り観察する事が出来る。然し乾燥酵母はその作用が新鮮酵母よりも緩かである様に思える。此の事は Buchner, 片桐氏等の乾燥酵母に対する induction period の研究と対照して將來考究の必要がある。何れにしても膜、細胞質共に非常に侵され易い事は之等の化学構成物特に蛋白質に対して一つの指示を與えるものである。乾燥酵母の場合10% NaOH (室温) に於ても猶一部原形を示すものがあり、又一細胞に於ても非常に溶解し難い成分のある事に留意しなければならない。

実験Ⅴ．塩酸及び苛性カリ、塩化カリ、塩化バリウム等の影響 (Fig. 5)

Fig. 5 に示す様に HCl は H₂SO₄ に比較して作用は多少緩慢の様であるし、又特異的な糸状物を残す事も無いが、細胞膜が破壊せられるのは事実である。特にⅢに示す様に Feulgen 反應に於て Ribo-nucleic acid¹²⁾ の選択的抽出物たる N. HCl 60°C 加温の条件に於ては細胞膜の破壊が蓄しく、 $\frac{1}{10}$ N.

H₂SO₄ の場合とやや類似の分解物が観察出来る。この事は又 先述の糸状物の本質に対する一つの指針を示すかも知れない。

又 Ⅲ に示す様に KOH の溶解力は NaOH のそれと大差がない様であるが、細胞質の一部を特に強く残留するのが一つの特徴であるかも知れない。又 KCl・BaCl₂ 等の塩類に依る特異的現象は更に追の究の必要がある。

然し之等は明に中性塩類の一特徴として採用出来る。そしてこの事は陰イオン、陽イオンの酵母に対する刺戟性、殺菌性の問題、又金属イオンの膠質凝固力の問題、細胞荷電問題等の解決への一方向を示すものである。

実験Ⅵ. ソルベントの影響其他 (Fig. 6)

固体培地よりの新鮮酵母は benzol, ether, alcohol 等の有機溶剤に対しては全く分散しない、疎水的なものは勿論純 alcohol の様なものに於ても非常に困難である。故に試料作成には分散しない儘浸漬し24時間放置後、溶剤を傾斜及び蒸発せしめて後、蒸留水中に分散させて観察したものである。

即ち特異的現象としては各細胞の形態的破壊は殆んど見られなかつた所であるが、塵状物質を試料面に残す事が多い、之は溶剤の脱水作用に依つてやはり細胞質が大きく影響されているものと考えざるを得ない。

実験Ⅶ. 乾燥酵母に於ける可溶性窒素の変化

以上酸、塩基、塩類等の酵母細胞に及ぼす影響を観察したが、實際菌体蛋白に與える影響を可溶性窒素の量を以て表わし比較検討した。

即ち試料は乾燥酵母を用い、試料 2.5g を各溶液 25cc に浸漬し、室温 (平均15°C) に24時間放置、及び沸騰浴中に10分間処理後24時間室温放置の二種とし、この間時々攪拌して後遠心分離及び濾過に依つて濾液を分け、溶出する可溶性窒素の量を Kjeldahl 法に依り測定した。

第一表は之等の菌体全窒素量に対する割合及び蒸留水可溶性窒素との差を示したものである。但し乾燥酵母菌体中に於ける全窒素は9.699%であつた。

Table. 1. The proportion of soluble nitrogen to total nitrogen of dried yeast.

Solvents	Soluble total-N / Yeast total-N			
	in room temp. 15°C	difference to distilled water	in 100°C for 10 minuts	difference to distill. water
dist. water	19.88%	—%	23.07%	—%
0.1M. KCl	21.21	+ 1.33	23.57	+ 0.50
0.1M. NaCl	16.20	— 3.68	24.03	+ 0.96
M. KCl	24.46	+ 4.53	27.82	+ 5.75
M. NaCl	22.53	+ 2.65	25.32	+ 2.25
0.1N. NaOH	24.88	+ 5.00	29.63	+ 4.56
0.1N. KOH	24.02	+ 4.14	29.33	+ 6.26
N. NaOH	67.43	+47.55	—	—
N. KOH	67.20	+47.32	—	—
0.1N. HCl	18.39	— 1.49	23.10	+ 0.03
N. HCl	23.42	+ 3.54	33.15	+10.08
0.1N. H ₂ SO ₄	14.20	— 5.68	20.75	— 2.37
0.2N. H ₂ SO ₄	21.01	+ 1.18	—	—

0.3N. H ₂ SO ₄	22.45	+ 2.57	—	—
0.4N. H ₂ SO ₄	23.04	+ 3.16	—	—
0.5N. H ₂ SO ₄	23.96	+ 3.98	—	—
0.6N. H ₂ SO ₄	24.27	+ 4.99	—	—
N. H ₂ SO ₄	25.24	+ 5.96	33.33	+10.26
2N. H ₂ SO ₄	27.17	+ 7.99	—	—
3N. H ₂ SO ₄	27.43	+ 7.95	—	—
4N. H ₂ SO ₄	28.45	+ 8.57	—	—

以上の様に熱時は冷時に比較して作用激しく可溶窒素の増加を來す。又濃度の増加に従つて窒素量も増加したが、特異的現象として、0.1N. H₂SO₄, 0.1N. HCl, 0.1M. NaCl の冷時に於ては蒸溜水の場合より少く、0.1N. H₂SO₄ では熱時に於ても減少している。塩基類に於ては蛋白の溶出が著しい。又0.1N. H₂SO₄の場合、その絲狀物の現出と併せて着目すべき所のものである。

実験Ⅶ. 分散性の問題

第一報に一部記載した様に種々の分散力の比較を行つたが第二、三表に示す如くである。

即ち菌種に依りても多少の相違があるのは勿論各溶液の相違に依つて大きな差がある、この事は又細胞膜乃至細胞質の化学構造に一つの条件を與えるものである。

Table. 2. Dispersion degree of yeast (C.49) to several solutions.

solutions degree	0.1N. H ₂ SO ₄	0.1N. NaOH	0.1N. HCl	0.1N. NaCl	0.1N. KOH	N. NaCl
immediatly after	+ difficult	+	+	+	+	+
by boiling	+	+	+	+	+	+

Table. 3. Difference of dispersion degree by kind of yeasts to 0.1 N H₂SO₄.

yeasts	degree
T.M. (Yamamomo yeast)	—
C. 27	+
C. 28	+
Sacc. Sake.	+
C. 46	+
C. 49	+

結 論

- (i) 酵母に於て老朽細胞の細胞膜は厚化するとの事實は電子顯微鏡に依つては觀察出來ない、今迄のこの説を否定する。
- (ii) 酵母を稀薄硫酸液に浸漬すれば特異の絲狀物を出す事を見出した、このものの本質に關しては不明であるが、酵母核との關連性が考えられる。
- (iii) 中性塩類に依り特異な現象を呈する、且つ各塩類に依り之等は又異なるのである。

- (iv) 塩基類に依つて酵母は強く作用される, 細胞膜も細胞質も同様に溶解されるが, 細胞質には特に抵抗力が強いものの存在が指摘出来る。
- (v) 0.1N H₂SO₄ が溶解する酵母窒素の量は純水に於けるより低位にあり, 糸状物との関連性に於いて興味がある。

本研究は京大片桐先生及び北原先生の御指導に依る事を併記して感謝の意を表す。又研究員藤田君の勞を謝す。猶第一報は第6回電子顕微鏡学会, 第二報は日本農藝化学大会(昭27年4月)に於て講演した。
(研究室業績第6号)

文 献

- (1) 東, 脇坂, 水川: 電子顕微鏡 1 32 (1950)
 (2) 細見, 万井: 電顯委員会試料55-B-14 (1950)
 (3) 万井: 電子顕微鏡 2 32 (1951)
 (4) 丹野, 小林, 齊藤: 電子顕微鏡 1 92 (1950)
 (5) H. Bessis: J. Hemat. 5 1083 (1950)
 (6) 橘谷: 酵母学 246
 (7) E. Boas: Biochem. Zeitschr. 176 349 (1926)
 (8) Richards: J. biol. chem. 405 (1932)
 (9) Marboe: Zentralbl. f. bakteriolog. 81. 67 (1930)
 (10) Buchner: Zymase garung 182 (1905)
 (11) 片桐, 山岸: Biochem. J. 23 645 (1929)
 (12) Ely, J. & Ross, M.: Anat. Rec. 104 103 (1949)

(昭和27年4月30日受理)

SUMMARY

Electron Micrography of Yeast

Part II Studies on the State of Plasmolysis

by Tatsuo YAMAMOTO

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

(1) The thicked membrane of old cells, about 7 months cultures, were not observed by electron micrographs.

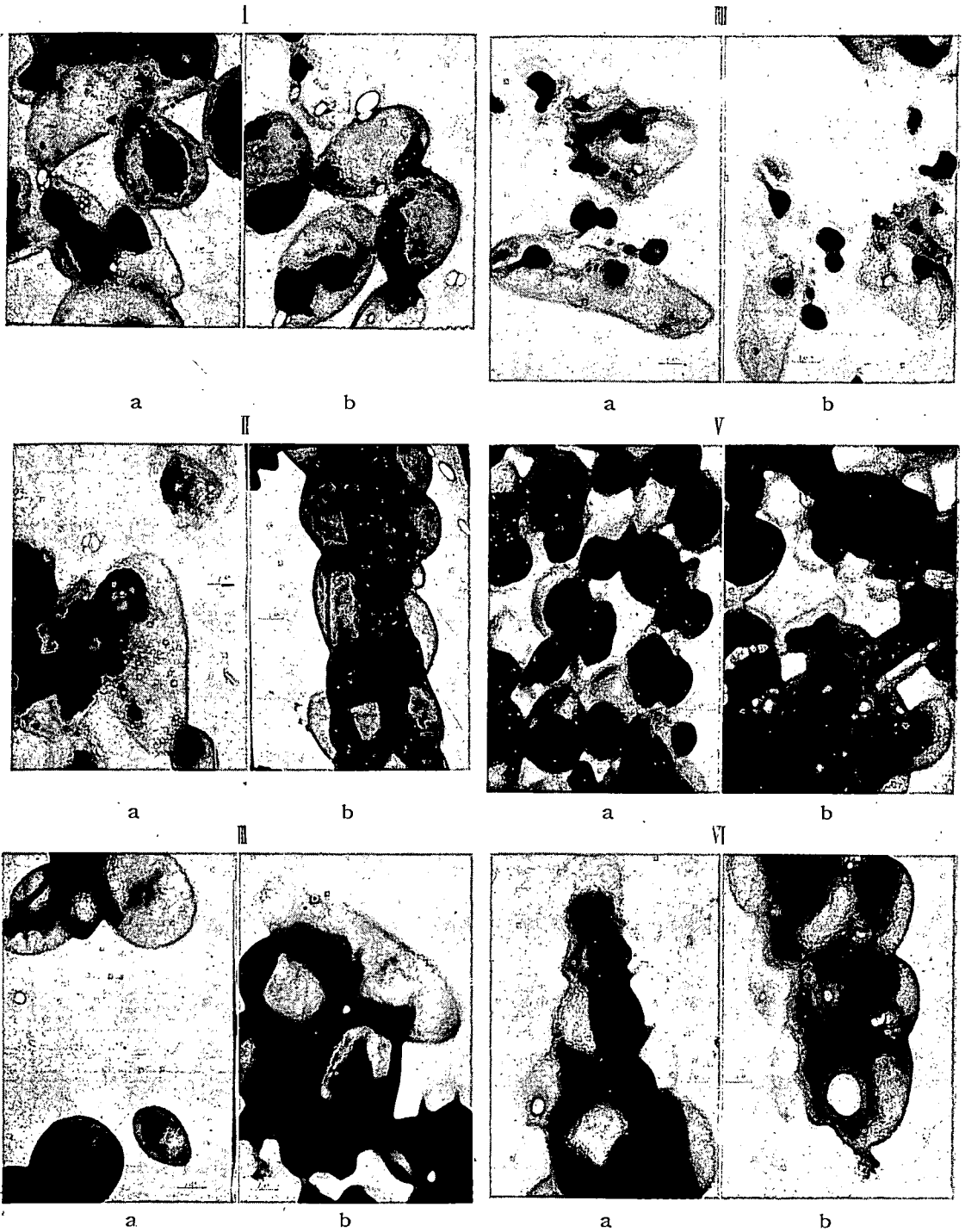
(2) It was found the special thread like substances appeared when the cells were treated in dilute sulphuric acid solution, but the essence of these substances could not be cleared yet.

(3) The characteristic phenomena came out by effect of neutral salt solutions treating. These characterisity were differentiated from the kind of salts.

(4) Alkaline solutions had affected on cells strongly, the cell membrane and cytoplasm were melted away similiarly, but the fact could be indicated that the existence of substance which have strong resistance for alkaline in cytoplasm.

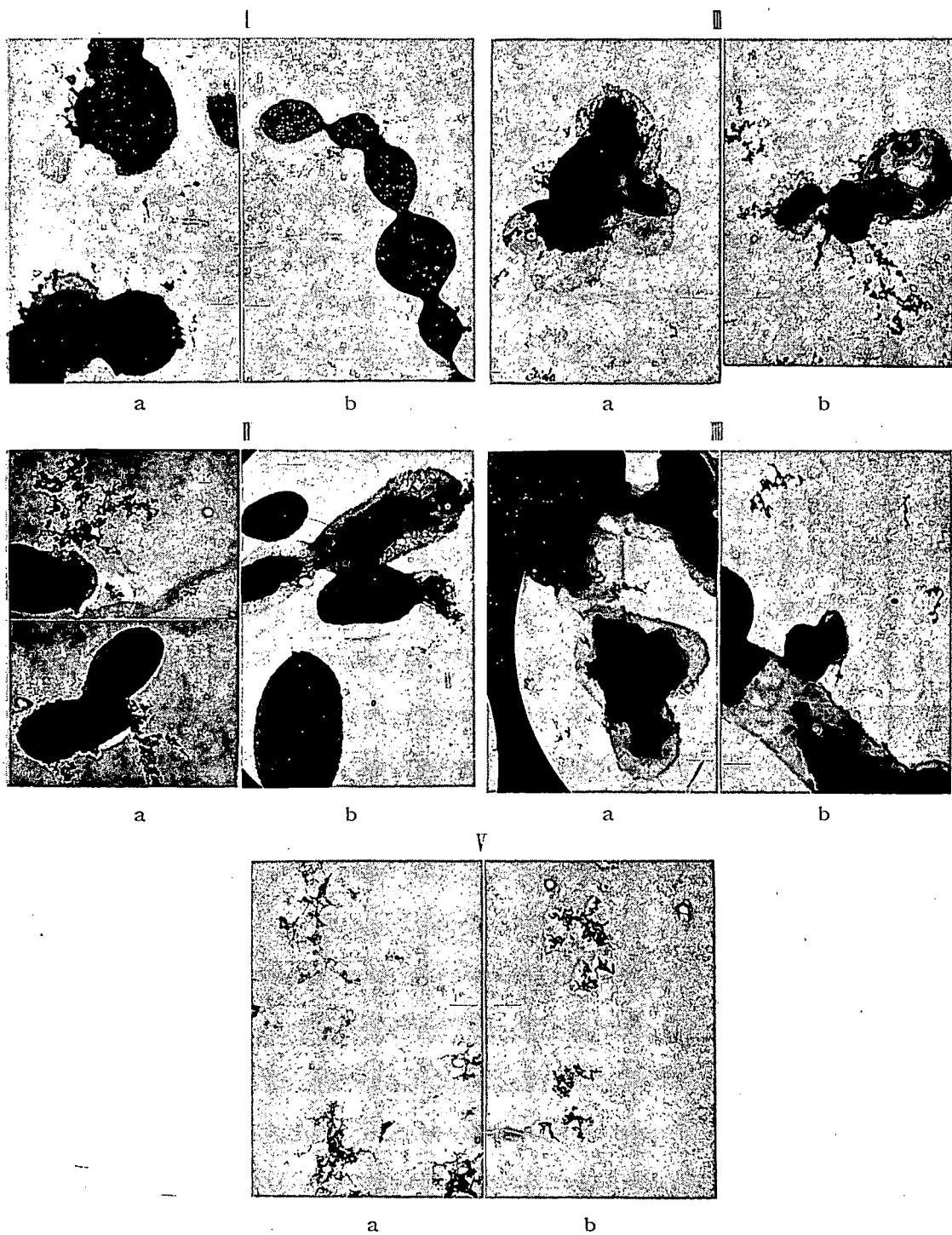
(Received April 30, 1952)

Fig. 1 The cell membrane of old cells. ($\times 4,000$)
 (Micrographs indicate the cells from cultures after 7 months of growth.)



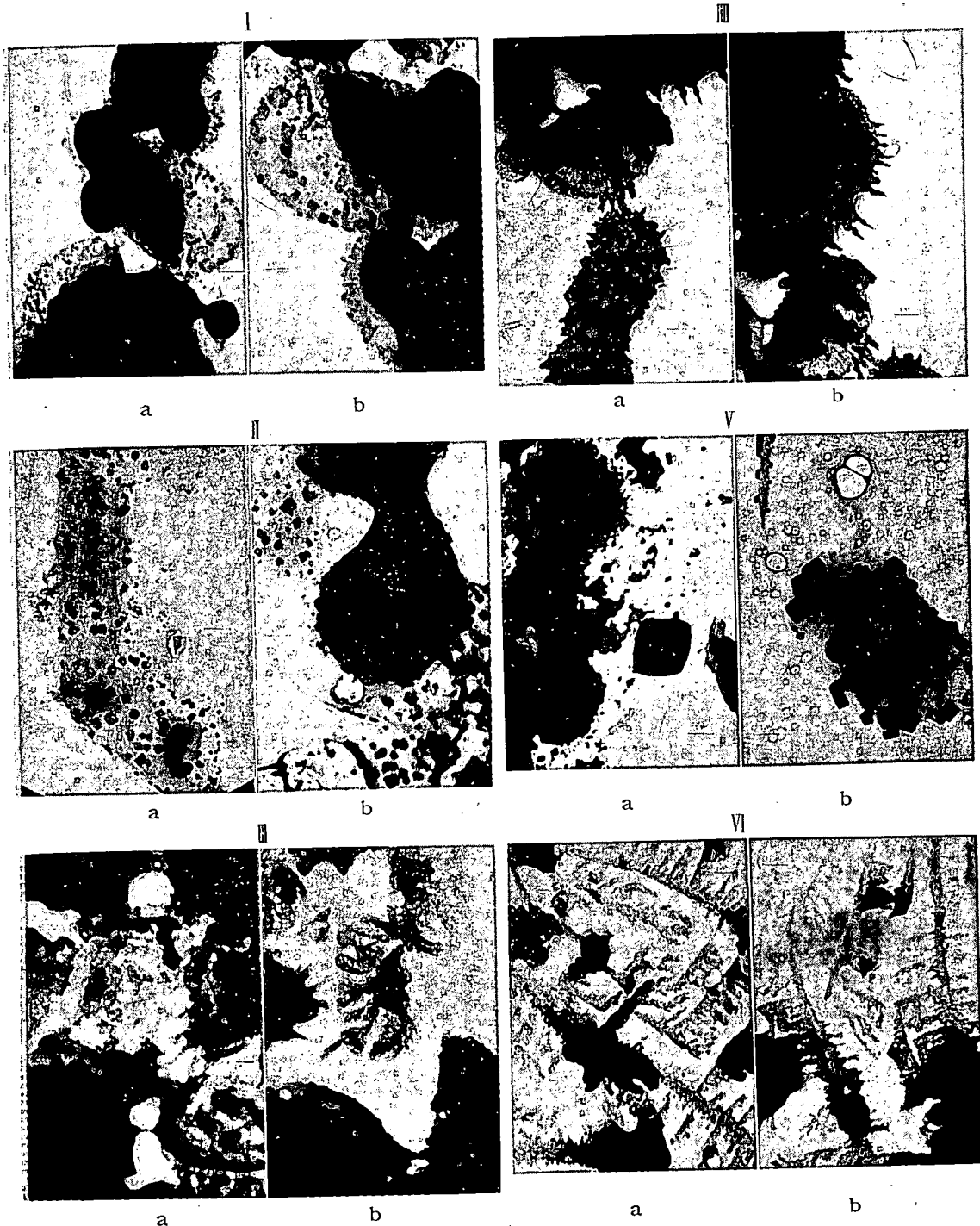
Note. I a...C.45 I b...C.49 II a...C.28 II b...C.27
 III a...C.83 III b...C.88 IIII a...C.88 IIII b...C.88
 V a...C.53 V b...C.99 VI a...C.27 VI b...C.27

Fig. 2 Effect of $\frac{1}{10}$ N. sulphuric acid on yeast cells. ($\times 4,000$)



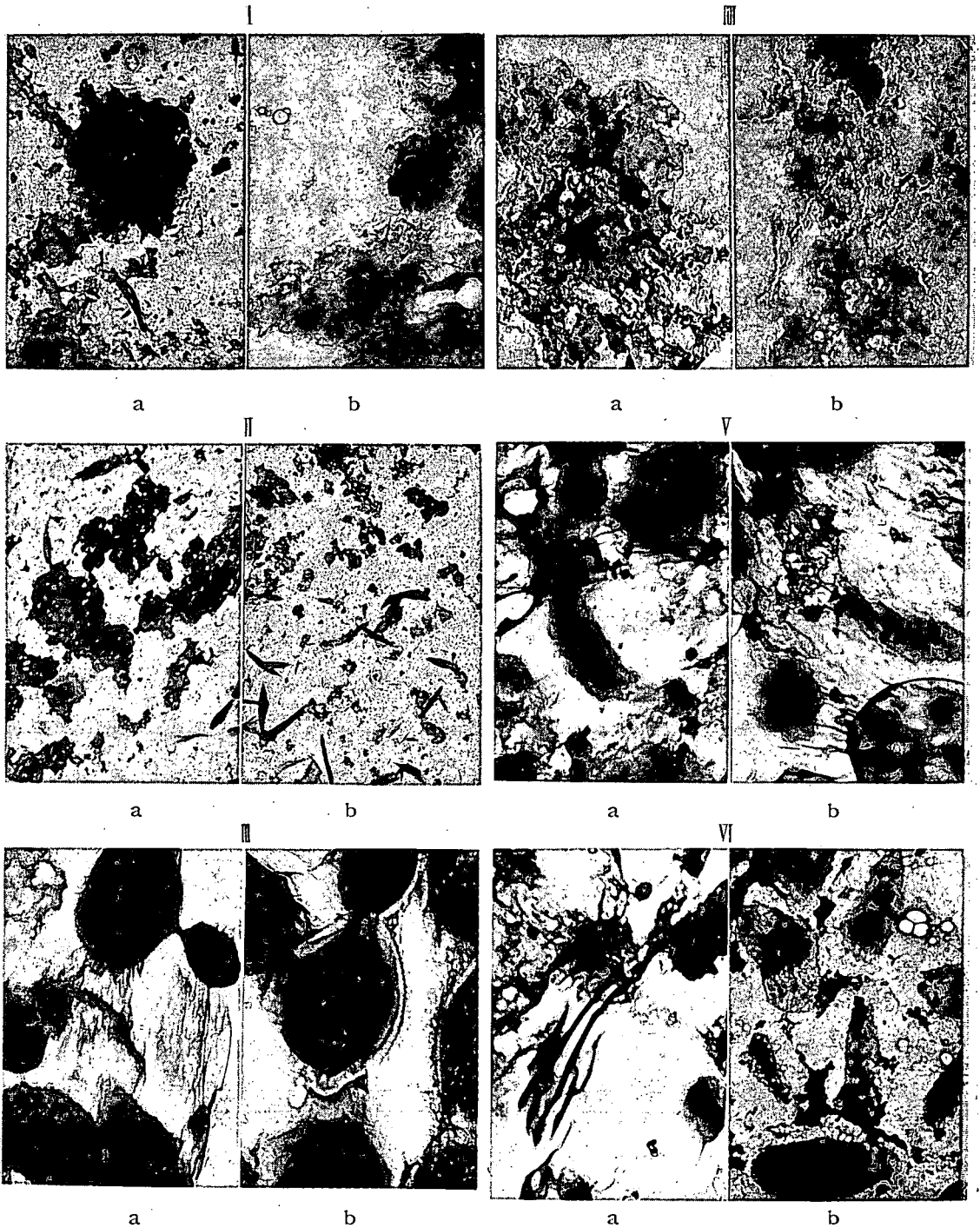
Note. I a...C.28 I b...C.28 II a...C.45 II b...C.45
 III a...C.45 III b...C.45 III a...C.49 III b...C.49
 V a) } ...C.27 (old culture after 7 months)
 V b) }

Fig. 3 Effect of sodium chloride. ($\times 4,000$)



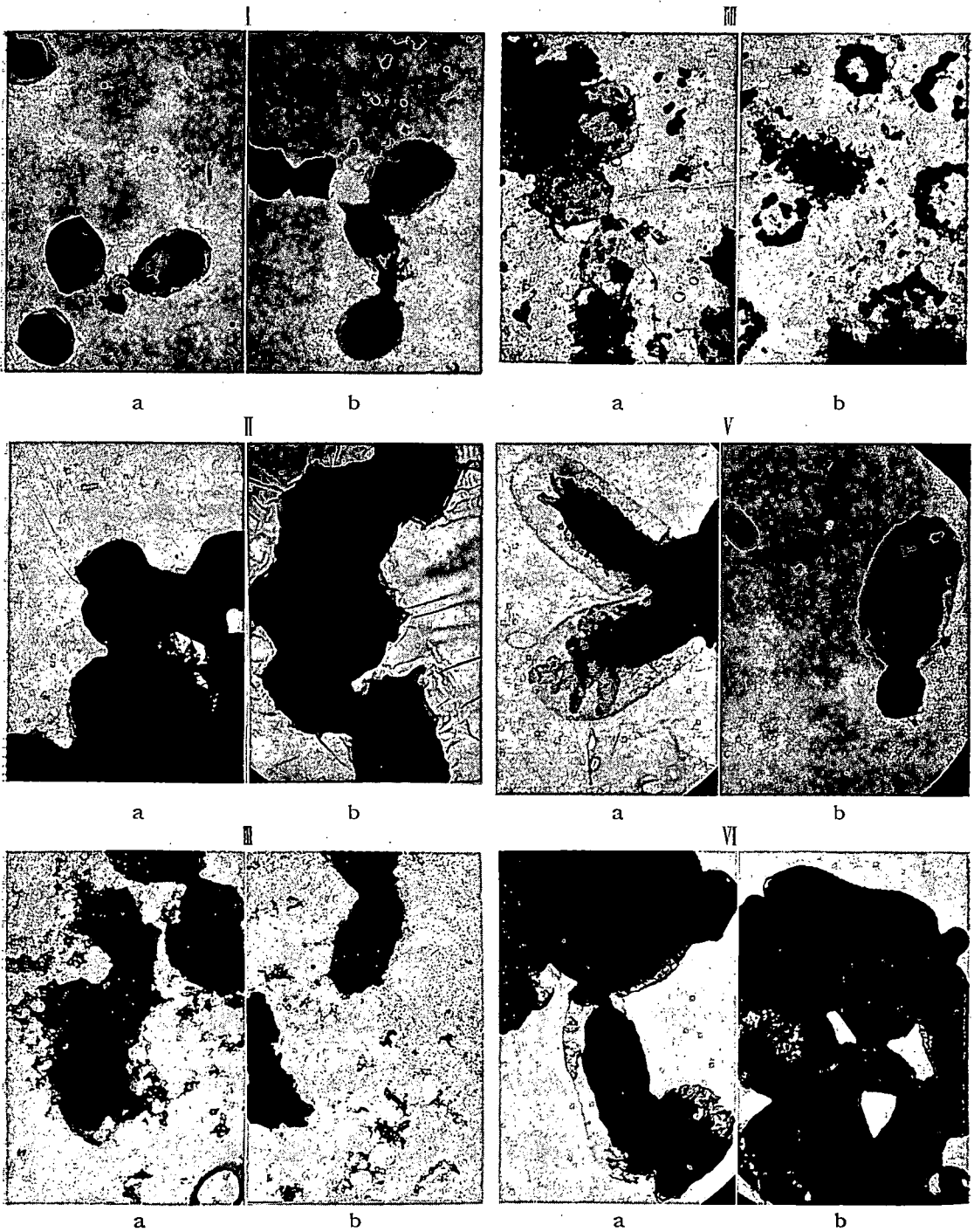
Note. I a, I b...C.49 (1M. NaCl)
 II a, II b...Dried yeast (1M. NaCl)
 III a, III b...C.45 autolysis. (1M. NaCl)
 IIII a...C.49 (2M) IIII b...C.45 (2M)
 V a, V b...C.49 (2M. NaCl) Case of not Washing.
 VI a, VI b C.49 autolysis. (after 2M. NaCl treating)

Fig. 4 Effect of caustic soda. ($\times 4,000$)



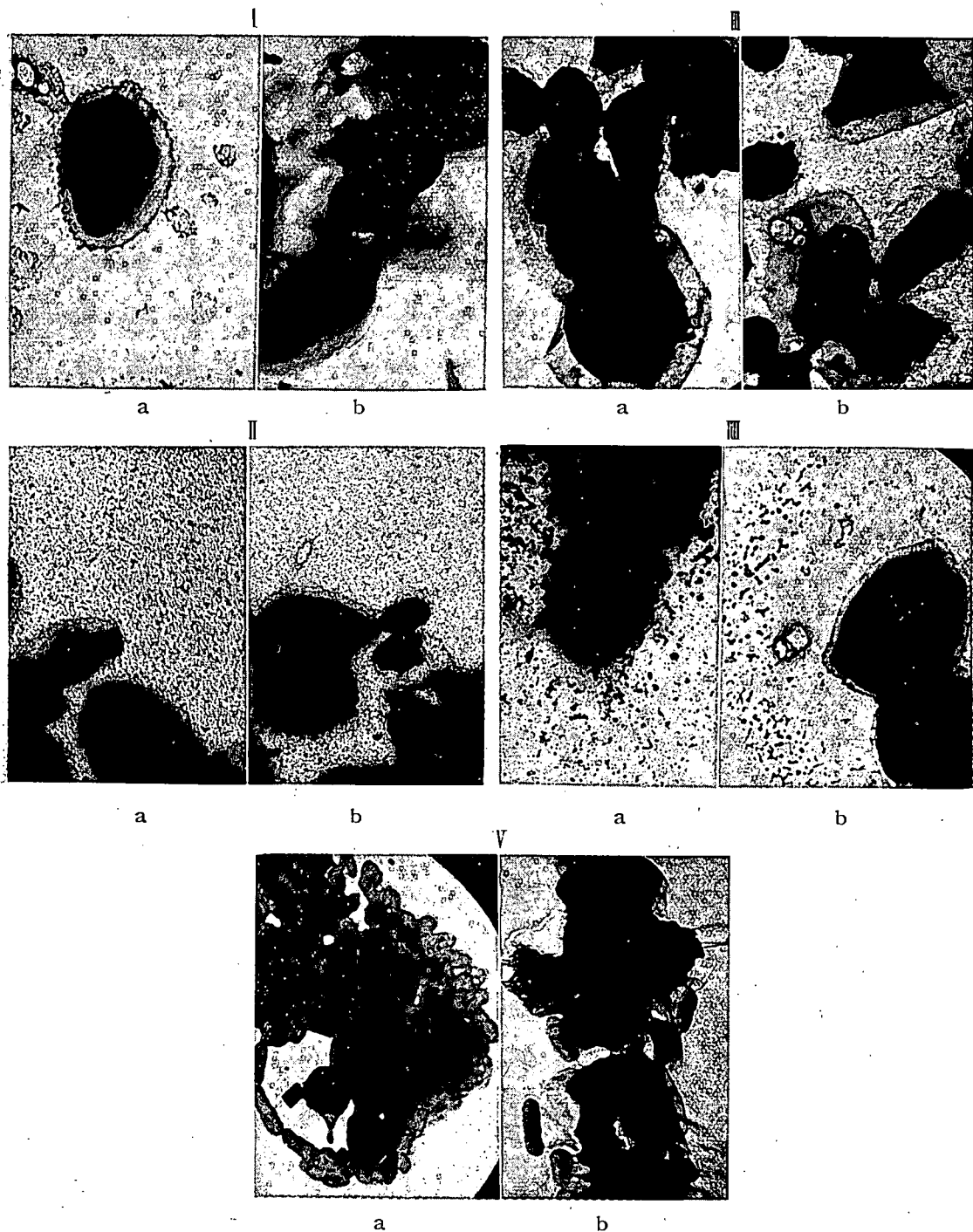
Note. I a, I b...C.49 ($\frac{1}{10}$ N. NaOH)
 II a, II b...C.45 ($\frac{1}{10}$ N. NaOH) Case of not washing
 III a, III b...Dried yeast. (0.5%NaOH)
 IV a, IV b...C.49 ($\frac{1}{10}$ N. NaOH) Case of boiling
 V a, V b...Dried yeast (M. NaOH)
 VI a, VI b...Dried yeast (10% NaOH)

Fig. 5 Effects of hydrochloric acid, caustic potash, potassium chloride, barium chloride. ($\times 4,000$)



Note. I a...C.45 ($\frac{1}{2}$ N. HCl) I b...C.49 ($\frac{1}{2}$ N HCl)
 II a, II b...C.49 (N. HCl)
 III a, III b...C.49 (N. HCl) was treated at 60°C . for 1 minut.
 IV a, IV b...C.49 ($\frac{1}{2}$ N KOH)
 V a, V b...C.49 (M. KCl)
 VI a, VI b...C.49 (M. BaCl₂)

Fig. 6 Effects of benzol, alcohol, etc.



Note. I a, I b...C.49 (Benzol)
 II a, II b...C.45 (Benzol)
 III a, III b...Dried yeast (Benzol)
 IIII a, IIII b...C.49 (alcohol)
 V a, V b...C.49 (was attacked by bacteria)

