真菌の細胞核に関する研究

(I) 諸種細胞内部構造の被染性について

Studies on the Cell Nucleus of Yeasts.

(I) Stainability of the Intracellular Structures.

丸 山 平 次*
Heiji MARUYAMA

緒 言

真菌細胞の細胞核について、現在その存在は疑いのないものとされているが、細胞核の微細構造、核分裂の経過などについては見解の一致をみない。これらの問題に関する代表的見解として、Lindegren¹⁾、や DeLamater²⁾ は、真菌においても、一般細菌と同様に、染色体が明瞭に認められ、その数も ploidy に平行し、染色体の存在が単に形態学的に立証されるだけでなく、遺伝学的にも裏付けられたものとしている。殊に Lindegren³⁾ 一門 (1959) は、近年真菌の遺伝学の一環として、Micromanipulator を用いて分離した多数の Ascospore を用い、adenine anthranilic acid, choline, histidine, isoleucine, lysine, proline, thiamine に対する要求性、Caffeine, cobalt, 銅, cadmium, nicotine に対する抵抗性、及び dextrine, galactose, melibiose, maltose, melezitose, lactose の分解能の相互の linkage を研究し、*Saccharomyces* の染色体はその haploid 数が少くとも 7 個存在しなければならないと述べている。

この種の研究は、Winge and Roberts⁴⁾ 1950, Guillard⁵⁾ 1949, Hawthorne 1956, Douglas and Condie⁶⁾ 1954, なども行っており、遺伝学的研究特に linkage からの推定では、真菌における染色体の存在は、確定的なものにさえ思われる。併し、一方、電子顕微鏡による超薄切片の観察や、染色標本での観察では、依然として、染色体の存在はもとより、核分裂自身の経過についても、不明な点が残されている。即ち Lindegren and Rafalko (1950)⁷⁾ は、*Saccharomyces bayanus* で、楕円形の nuclear vacuole の中に対をなして染色体がみられ、これに接して nucleolus や centrosome が存在し更に chromosomal chromatin と centrosomal chromatin とは、Feulgen 反応における時期的な差異がみられると言う。Ogur et al. (1952)⁸⁾ は DNA 量は ploidy に平行するが、乾燥量、RNA 量及び、meto-

phosphate 量は必ずしも平行しないとし、染色体の主成分である DNA が ploidy と共に増加することを以て、染色体の存在を裏付けしている。Mundkur (1954)⁹⁾ は *Saccharomyces* の細胞核は液胞外に存在し、optical empty な袋状を呈し、染色体と思われる構造はみられない。また核分裂と budding とは平行せず核膜の消失もみられない。核分裂は、核の延長に続いて中央部の constriction によつて完了する。更に Feulgen 陽性顆粒は、ploidy に関係なく 2 個存在し、ploidy の増加と核の大きさは或程度平行するが、統計的に一定した比率は認められないという。Spindle element の存在も認められず、従来の染色体説は、遺伝学的考察の不備と染色過程における固定剤による人工産物の除外をおろそかにした結果であろうと述べている。

Hashimoto et al.¹⁰⁾ (1959), Conti and Naylor¹¹⁾ (1960) は、超薄切片の電子顕微鏡写真と Lindegren の方法を改良した染色法による染色標本とを比較して、次のように述べている。即ち Mundkur (1954) と同様に核膜の消失は認められず、核の分裂は細胞分裂とは無関係に独立した分裂経過を辿るが、核の形態は、葉状で均一な内容を有し、染色体と見做すべき構造は見られず、chromatin は核内に均一に分散しているものであろうという。また Vacuole については Lindegren らの解釈とは反対に、特に有意義な形態ではないとしている。このように DeLamater や Lindegren らの染色体存在説に対する反論も多く、これらの原因は Mundkur も指摘している通り、固定剤の影響や染色法自体の検討に不十分な点がある為であると思われる。その傾向は単に細胞核のみでなく、Mitochondria をはじめ、種々の細胞内微細構造にもみられ、Yotsuyanagi¹²⁾ (1955) は Sudan III, Tetrazolium 及び Janus green B を用いて生体染色を行い、Tetrazolium も Janus green B も Mitochondria を選択的に染色するという定説に反論を加え、Janus green B は Mitochondria を染めるが

* 順天堂大学医学部菌学教室
1960年11月20日受付

Tetrazulium は Cytochrome C-Cytochrome Oxidase 系呼吸酵素によつて赤色の Formazan を形成し、これが lipid inclusion に移行して、顆粒状の外観を呈するとしている。更に Yotsuyanagi (1955), Ephrussi et al¹¹⁾, (1956) は、Yeast の Mitochondria には、紐状のものと球状のものとがあると述べている。これに対し William et al¹²⁾ (1956) は、紐状の Mitochondria は Tetrazulium 染色の際の人工産物であつて、実際には存在しないと反論し、更に Müller¹³⁾ (1958) は位相差顕微鏡を用いて無染色標本に紐状の mitochondria を証明しているが、この形態は特に固定や生体染色の操作によつて破壊され易いと述べている。これら諸報告における所見のくいちがいは、各人各様の観察法の差異によるものと言わねばならない。このことは、Ganesan¹⁴⁾ (1957) も指摘しており、RNA の除去には NaCl と 8-hydroxy-quinoline を用いている。一般に標本作製の初めから、染色、包埋に至るまで、人工産物の出現する機会を出来るだけ除去するために、種々の考案が為され、或いは凍結乾燥したまゝ低温で染めるとか、出来るだけおだやかな方法で RNA 除去を行うとか、各人各様の工夫がみられる。教室の高橋¹⁵⁾ はさきに、核染色における固定剤の影響を検討し、更に遺伝学的な実験成績から液胞と核との関連性を追究しているが、著者は、核染色所見と生体染色、mitochondria 染色などを比較検討し、興味ある知見を得たので報告する。

実験材料並びに実験法

被検菌株は、高橋の用いたものと同様で、*Saccharomyces cerevisiae* 6—001 (IFO 0209), *Saccharomyces cerevisiae* 6—010 (IFO 0635), *Saccharomyces cerevisiae* 6—016 (IFO 0637), *Candida robusta* 1—134 (IFO 0718) 及び *Candida robusta* 1—149 (IFO 0735) の5株である。

培地は Wickerham の Vegetation 培地に寒天を加えたものを用い、30°C 24—48 時間培養して、更に同一培地に subculture したものを標本作製の材料とした。

Wickerham 培地

Aq. dest.	100cc
Peptone	0.5g
Yeast extract	0.3g
Malt extract	0.3g
Glucose	1.0g
Agar	1.5g

PH 修正不要 115°C 滅菌

標本作製法は、高橋の方法¹⁵⁾ に準じ、塗抹法または浮遊法とし、染色は次の方法で行つた。

1) 色素液

Janus green: 0.5 % 酢酸水に Janus green を 1 % になるように溶かして作る。

Acid fuchsin: 0.04N HCl に 0.5 % になるように fuchsin を溶かして作る。

Acid thionine: 0.5 % 酢酸水に 0.5 % に thionine を溶かして作る。

Toluidin blue: 0.5 % 酢酸水に 0.5 % に toluidin blue を溶かす。

Neutral red: 蒸留水を用いて 0.1 % 溶液とする。

Methyl green: 蒸留水を用いて 0.5 % 溶液とする。

Ribonuclease: 蒸留水を用いて 0.1 % 溶液とし NaOH で pH 6.0 に修正する。

2) 染色法

生体染色: Neutral red, Methyl green, Toluidin blue, Thionine を用い、(生体染色の場合には Toluidin blue, Thionine は 0.1 % 蒸留水溶液とした)。それぞれの色素液を Wickerham ブイヨンで 10 培に稀釈し、この中に被検菌を浮遊せしめ、30°C の温浴中に 30 分—24 時間入れてから、適宜スライドにとり、カバーガラスをかけて観察した。または温浴処理後遠沈管にとり、遠心器を用いて、蒸留水で洗滌してから観察した。

HCl-fuchsin 染色, HCl-thionin 染色: 高橋の方法¹⁵⁾ に準じて行つた。

HCl-Janus green 染色: 1N HCl で 4—6 分間加水分解し、次いで Janus green 液で染める。

スライドに塗抹標本作製してからこの操作で染める通常法と共に、全操作を遠沈管を用いて濡れた状態のままで行つて比較した。固定には Bouin 液または Carnoy 液を用いた。

Neutral red-Janus green 染色

Neutral で生体染色を行い、遠心して沈渣に Bouin 液を加え、更に遠心し、70 % アルコールで洗い、Janus green 染色を行つた。また固定液を Carnoy 液に換えアルコール処理を行わない場合もあった。

Neutral red-HCl 法

Neutral red 生体染色の後、固定、1N HCl 加水分解を行い塩酸加水分解の影響をみた。

Janus green-Neutral red 法

Janus green 生体染色に続いて、遠心し、沈渣に Neutral red 液を加えて生体染色を施した。

HCl-Neutral red 法, HCl-Janus green 法、通常の核染色法に準じて塩酸加水分解を行い、これを Neutral red 液または Janus green 液で染色した。(表1参照)

表 1 Neutral red-Bouin-Janus green 染色

試料
↓
Neutral red (0.01%) 30°C 30分
↓
3000r/m 5~10分 2回 蒸溜水で洗滌
↓
Bouin 液 10分
↓
70%アルコール 10分
↓
Janus green 1% (0.5%酢酸溶液)

Ribonuclease 消化法: 高橋¹⁵⁾の記載に従い, 0.1% 酸素水溶液を用い, 37°C 2時間作用させ, Toluidin blue 液で染色した. なお全操作を遠沈管内で行い, 染色完了後スライドにとり, カパーガラスをかけて観察した.

成 績

HCl-fuchsin, HCl-thionin 染色では, 従来の報告にみられる通り, 球状, 杆状, 垂鈴状など種々の形態の核物質がみられ, 中には, いわゆる染色体様の外観を呈するものも多かったが Centrosome, Spindle と思われる構造はみられなかった.

また液胞も多くの場合収縮または破壊されて, 一定の形態を示さないことが多かった. (写真1).

Neutral red 生体染色では, 液胞への色素の侵入が著明で Wickerham 培地で10倍に希釈した色素液に菌を浮遊すると, その直後から色素の侵入がみられ以後24時間後に至るまで, 撰択的に液胞部に着染がみられ, これ以外には液胞外部に2~3個の顆粒にも着染が見られることがある. (写真8) 次に Neutral red で染めた標本を乾燥することなく, 直ちに Bouin 固定または Carnoy 固定を行うと, 細胞は収縮し, 液胞も多少変形するが, Neutral red は散逸することなくそのまま液胞内に留る (写真9). またこれに更に Janus green 染色を施す (表1) と赤く染つた液胞外に Janus green

着染部がいわゆる染色体様の外観を呈するのがみられる (写真10) (図1). この際中間に用いる固定液の種類によつて Janus green 着染部分の外観に差異があり, Carnoy 固定の場合 (表2) には, Bouin 固定の時の様な染色体様構造はみられず, 一般に液胞以外は細胞全体が Janus green で一様に染まり, 赤い液胞部分の収縮は著しく, 棍棒状に変わる傾向が強い.

Neutral red 生体染色に続いて NHCl 処理を加えると, 染色された部分は塩酸処理により, 脱色されて了う. この現象は染色後, 一旦固定操作を行つてから塩酸処理を加えても同様である.

表 2 Neutral red-carnoy-Janus green 染色

試料
↓
Neutral red (0.1%水溶液を Wickerham broth で 10倍に希釈) 30°C 30分
↓
水洗 (蒸溜水) 3000r/m 10分
↓
Carnoy 液 10分
↓
3000r/m 10分
↓
蒸溜水 3000r/m 10分
↓
1% Janus green 0.5%酢酸溶液)
↓
30°C 15分
↓
水洗 (蒸溜水) 3000r/m 10分
↓
Sediment
↓
mounting

表 3 NHCl-Neutral red 又は Janus green 染色

試料
↓
NHCl 60°C 5分 (遠心管を用いる)
↓
3000r/m 10分
↓
水洗 (蒸溜水 3000r/m 10分)
↓
0.1% Neutral red 又は 1% 1% Janus green.

又この操作を逆にして NHCl 処理を先ず遠沈管内で行い, 次いで 300r/m 10分間遠心して沈渣を得, 一度蒸溜水で洗滌してから Neutral red または Janus green で染色すると (表3), 前者では多少の変形はみられるが液胞部分のみが Neutral red に染り, 後者では, 染色体様構造がみられる場合と, 一様に細胞全体が染る場合とがある (写真2,3) (図2,3). Janus green 染色では, 生体染色の場合液胞以外の細胞質が一様に着染し, 通常の塗抹標本をアルコール, Carnoy 液などで固定して染色すると, 多数の

図 1

図 2

図 3

顆粒がみられ、且その数は diploid 株では haploid 株よりも多く、一見 ploidy に平行して増減するようにみえる (写真4,5)。

しかしながら、この関係は NHCl 処理標本ではみられず、塗抹標本では、NHCl 処理後同一条件で acid fuchsin 染色、及び Janus green 染色を施せば、acid fuchsin 染色標本では通常の染色体様構造がみられるのに反し、Janus green 染色標本では細胞全体が一様に染まる傾向が強く、時には顆粒状構造もみられるが、ploidy との平行関係はみられない。その数は普通 2~3 個である。

Toluidin blue 生体染色では、色素の侵入は数分内にみられるが、液胞内には侵入せず細胞質が平等に着染し、時には dancing body が染まる場合もある。細胞内には特殊な構造は認められなかつた。

Methyl green 染色標本 (表4) でも塗抹標本では、Toluidin blue の場合と同様で、特に染色体様の構造は出現しない。一般に青く染まつた細胞質の内部に不染性の不規則な形態がみられ、液胞の収縮したものと思われる (写真6)。この所見は生体染色標本では更に明瞭であり、明らかに液胞は不染性で細胞質 (時には dancing body も) のみが良く染る (写真7)。

表4 Methyl green 染色

Janus green 生体染色に続いて Neutral red 生体染色を施した場合には、Janus green のみに着染し、または Janus green による一様な着染に被われて、Neutral red による着染は認められなかつた。この関係は、両種の染色順序を逆にしても同一の結果が得られた。

Neutral red-Carnoy-Toluidin blue 染色 (表5) では、液胞は赤染し、且つ Carnoy 固定によつて収縮して核様の外観を呈し、それを囲んで青紫色の細胞質がみられ、これ以外には特別な構造はみられなかつた。なお、Neutral red 着染部は、液胞全体であることもあり、また液胞内部の顆粒 dancing body のみ

表5 Neutral red-Toluidin blue 染色

のこともある。一般に色素液との接触時間が短いと dancing body のみが染まる場合が多い。また Neutral red 染色部 (液胞) は1細胞に1個のことが多いが時には 2~3 個みられることもある (写真8)。

Ribonuclease 消化標本では、高橋¹⁵⁾の報告と同様に液胞周囲における色素の着染が特異的であつた。

考 案

この実験では、性状の異なる数種の色素液を用い、単独或いは種々の組合せて染色し、またその染色順序をかえて、Yeast 細胞の形態学的要素の本質を知ろうとしたのであるが、これらの中、HCl-fuchsin, HCl-thionin 染色は一般に微生物細胞核の染色法として Feulgen 反応に準ずるものと考えられており¹⁵⁾¹⁶⁾、Janus green は mitochondria を特異的に着染すると言われるが、時には核染色にも用いられる¹⁷⁾。Toluidin blue は DNA には metachromatic に、RNA には orthochromatic に着染するといわれ¹⁸⁾、Methyl green は DNA に選択的に着染する色素である。また Neutral red は生体染色によく用いられ、一般には核が染まるものとされている¹⁷⁾。

著者の実験では、Saccharomyces における細胞内部構造の中、液胞及びいわゆる染色体と呼ばれるもの並びに Mitochondria がこれらの色素に対しどの様に反応するかをみたのであるが、液胞は Neutral red に対して特に被染性が著しく、且一旦染まると塩酸処理のように激しい操作を加えない限り安定であり、通常の固定操作や洗滌では脱色されない。また Janus green, Methyl green, Toluidine blue などでは染まらない。即ち Neutral red 自体は核染色にも用い得る色素ではあるが、他の色素に対する態度からみて、液胞内容と細胞核とは別のものであると考えなければならない。

次に Janus green で染る顆粒については、他の色素特に種々の核染色法における所見と比較し、前者は NHCl 処理によつて消失する傾向が強く、またいわゆる染色体、または細胞核が棍棒状乃至星状であるのに対し、球状でその数も著しく多いことなどから考えて、明らかに核物質ではない。Yotsuyanagi 等¹⁰⁾¹¹⁾ が言うように mitochondria と考えるのが妥当であろう。

細胞核については、DeLamater 一門の染色体説が現在の微生物細胞等の主流をなしているが、高橋¹⁵⁾ Hashimoto⁸⁾ など染色体の存在に疑問をもつ報告も多く、この実験成績でも、Toluidin blue 染色や Methyl green 染色では液胞を囲んで細胞質内に色素の着染がみられる点から、核物質は液胞外の細胞質内に比較的 diffuse な状態で存在すると考えるべきであり、Neutral red と Toluidin blue との組合せでは固定剤の影響を受け、Neutral red 着染部が球状または星状に変わり、丁度核染色における細胞核と同一の外観を呈し、しかも、Toluidin blue の着染が Neutral red 着染部の近くに濃く、他の部分に淡いことからみて、既に高橋が指摘している液胞周辺における核物質の存在するという考え方に一つの裏付けを為し得たものと思う。

この考え方は、更に NHCl 処理を通常の核染色と全く同一条件で行い、染色だけを Neutral red で行うと液胞の部分に一致して核様の着染がみられ、同様に Janus green で染めても同じ所見が得られる。即ち塩酸処理後 Giemsa, Fuchsin, Thionine などでも染める通常の核染色は液胞の収縮像を染めていることになる。且つ実験成績からも明らかな通り、Methyl green, Toluidin blue などでも染まる核物質は、液胞外に存在し、特別な構造をもっていない。従つていわゆる *Saccharomyces* における染色体は、細胞質内に存在する核物質が染色操作に際して、液胞周囲に集積し、液胞の収縮によつて星芒状に染めだされたものと考えられる。更に Janus green 染色顆粒は別として液胞は勿論、他の色素で染る形態には、ploidy に平行した数の増減がみられないことも染色体存在説を疑わしめるものである。尙 Neutral red に染まる物質が、核物質に関連があるか否かについては未だ結論を得ない。

結 論

Janus green, Toluidin blue, Neutral red, Methyl green による生細胞並びに塗抹乾燥標本の染色所見を検討し、次の結論を得た。

1) *Saccharomyces* いわゆるの細胞核と Mitochondria とは別のものである。

2) 細胞核は ploidy に平行した数の増減を示さない。
3) 通常の核染色によつて染め出される像は液胞の収縮とその周囲への核物質の集積によつてもたらされるものである。

終りに臨み恩師土屋毅教授及び上条助教授の御指導、御校閲を深謝し、また川北講師他教室員の御援助を感謝致します。

(本論文の要旨は第 33 回日本細菌学会総会に報告した)。

文 献

- 1) Lindegren, C.C. and Rafalko, M.M.: Exp. Cell Research, 1, 169, 1950.
- 2) Delamater, E.D.: Bacterial Anatomy, Camb. Univ. Press. 215, 1956.
- 3) Zindgren, C.C., Lindegren, G., Shult, E.E. and Desborough, S.: Nature, 183, 800, 1959.
- 4) Cook, A.H.: The Chemistry and Biology of Yeast, Acad. Press., N.Y., 1958.
- 5) Douglas, H.C. and Conde, F.: J. Bact., 68, 662, 1954.
- 6) Ogur, M. Minkler, S., Lindegren, G. and Lindegren, C.C.: Arch. Bioch. Biophys. 40, 175, 1952.
- 7) Mundkur, B.D.: J. Bact., 68, 514, 1954.
- 8) Hashimoto, T. Conti, S.F. and Naylor, H.B.: J. Bact. 77, 344, 1959.
- 9) Conti, S.F. and Naylor, H.B.: J. Bact., 79, 417, 1960.
- 10) Yotsuyanagi, Y.: Nature, 176, 1208, 1955.
- 11) Ephrussi, B., Slonimski, P.P. and Yotsuyanagi, Y.: Nature, 177, 1041.
- 12) Williams, M.A., Lindegren, C.C. and Yuasa, A.: Nature, 177, 1041, 1956.
- 13) Müller, R.: Nature, 181, 1809, 1958.
- 14) Ganesan, A.T. and Swaminathan, M.S.: Stain Tech., 33, 115, 1958.
- 15) 高橋満: 順天堂医学雑誌, 4, 3, 141, 1955, ibid, 5, 3, 185, 1959.
- 16) 上条清明: 医学の歩み, 34, 1, 25, 1960.
- 17) Lillie, R.D., Histochemical Technique and Practical Histochemistry, Blakiston Co. Inc., N.Y., 1953.
- 18) 柴谷篤弘: 核酸及び核蛋白質, 下巻, 江上不二夫編, 共立出版社, 昭和 26 年.

Summary

Intracellular structures of *Saccharomyces cerevisiae* (diploid and haploid strains) and *Candida robusta* (proved to be triploid strain of *Saccharomyces* by Takahashi, 1959) were investigated with several nuclear and mitochondrial staining dye solutions.

Staining procedure used were, HCl-fuchsin, HCl-thionin, HCl-toluidine blue, ribonuclease digestion method, supravital staining with methyl green, neutral red, janus green and toluidne blue, and many combinations with these procedures.

Results obtained were summarized as follows: 1) So called cell nucleus of the yeasts were obviously different from mitochondria. 2) Number of the structure stained by nuclear staining dyes did not increase parallelly to the ploidy. 3) Nuclear substance exist in the area surroundig the vacuole, or diffusely dispersed nuclear substance accumulate in the perivacuolar area in the process of the staining procedure. And consequently shrinkage of the vacuole occured resusting in formation of chromosome-like nuclear configurations.

Department of Bacteriology, Junteudo University, Schocl of Medicine.

丸山論文附図(1)

写真 1. HCl-ftchsin *S. cerevisiae*
6-001

写真 2. HCl-neutral red *S. cerevisiae*
6-001

写真 3. HCl-Janui green *S. cerevisiae*
6-001

写真 4. Janus green *S. cerevisiae*
6-001

写真 5. Janus green *S. cerevisiae*
6-016

写真 6. Carnoy-Methyl green
S. cerevisiae 6-001

丸山論文附图(Ⅱ)

写真 7. Methyl green (生) 24時間
S. cerevisiae 6-001

写真 8. Neutral red 30分
S. cerevisiae 6-001

写真 9. Neutral red-Bouin アルコール
S. cerevisiae 6-001

写真 10. Neutral red-Bouin アルコール
Janus green *S. cerevisiae* 6-001

写真 11. Neutral red-Bouin アルコール
Toluidin blue *S. cerevisiae* 6-001

写真 12. Neutral red-Bouin アルコール
Toluidin blue *S. cerevisiae* 6-001