

黄色ブドウ球菌の耐塩機構における細菌表層の役割

特にフリーズ・エッチング法による形態学的検討

岡山大学医学部微生物学教室（主任：俵 寿太郎教授）

友近健一・篠井加津子・金政泰弘

（昭和49年5月31日受稿）

緒 論

ブドウ球菌属が強い食塩耐性を示すことは周知の事実であり、この特性は臨床的にもブドウ球菌（以下ブ菌と略す）の選択分離に利用されている。通常生理的食塩濃度の培地に発育するブ菌が10%以上の食塩含有培地に増殖した場合には、高塩に対して特殊な防衛機構を有するようにならなければならない、又高滲透圧に対処することも必要であろう。

すでに報告した如く、外界の食塩濃度が145mMから1900mMまで変化しても、菌体内一価カチオン量は極めて恒常性が維持されていることを明らかにした¹⁾この恒常性保持のための環境適応には、ブ菌細胞の変化に色々な可能性が考えられるが、著者等は原形質膜の障壁としての関与に注目し、原形質膜の主要成分である磷脂質中のカルジオリピンが著明に増加し、しかもその構成脂肪酸に枝鎖型が増加することを認めた²⁾

このように障壁概念に立脚し耐塩機構を考える場合、細胞表層の最外側に位置する細胞壁に対する考慮が、対浸透圧的意義も含めて不可欠となってくる。ブ菌細胞壁はペプチドグリカンとリピトールテイコニック酸のおおよそ同量からなり、前者は壁に“固さ”を与えていることが知らされているのに対し、後者の役割は未だ明白にされていないが、一部にはイオン輸送の制御に関与することが報告されている³⁾著者等は本実験において、細胞壁に塩濃度の異なる培養条件下で形態的变化が認められるか否かを、細胞表層の観察に有力な武器であるフリーズ・エッチング法を用いて電顕観察を行なった⁴⁾さらに細胞表層の観察を容易にし、又細胞壁の組成解析にも役立つ目的で、*Flabobacterium* sp. から得たL-11細胞壁溶解酵素⁵⁾による段階的消化を行なった試料に

ついても同法による観察を行なった。

材料及び実験方法

供試菌株及び培養：教室保存の *Staphylococcus aureus* 209Pを使用し、終濃度が0.5%及び10%になるように食塩を添加したブイオン培地で振盪培養を行ない、後期対数増殖期で遠心沈澱により集菌した。各々の培養菌は、それぞれ Normal-ブ菌及び10%一ブ菌と略称する。

細胞壁消化法：集菌菌体を生理的食塩水で2回洗浄、次いで10mM Tris-塩酸緩衝液 (pH7.2) で2回再洗浄後、0.8M蔗糖加同上緩衝液に再浮遊せしめて、1 mg/mlの菌液を作った。ブ菌細胞溶解酵素L-11は、*Flabobacterium* sp. の培養濾液から得た粗酵素（大阪大学歯学部小谷教授より分与を受けた）から加藤等の方法⁶⁾により精製され、上記菌液に湿菌1 mg当り0.2単位の割合で添加した。37℃の水浴中で振盪しながら反応を行ない、細胞壁溶解の程度は島津製作所 Spectromic 20型を用い650nm、における濁度の変化で追跡した。所定時間後水冷により反応を停止し、12,000xg 30分間の遠心沈澱により、処理細胞を回収した。

フリーズ・エッチング法：未処理細胞及び処理細胞は、各々0.8M蔗糖を含む20%グリセリン溶液に浮遊させ、4℃で5時間放置した後、試料台に載せて、液体窒素で冷却したフロン12で凍結した。試料は $4 \sim 10 \times 10^{-6}$ mmHgの条件下に置き、切断を-110℃及びエッチングを-100℃で行なった。シャドウイングはプラチナ・カーボン蒸着で行ない、次いでカーボン蒸着によりレプリカ膜を作製した。レプリカ膜は70%硫酸中で附着試料片を除去した後、蒸留水で洗浄して検鏡に供した。フリーズ・エッチング装置は日本電子K. K. のEE-FED型を使用し、電子顕微鏡は日本電子K. K. のJEM-7型を用いた。

結果と考察

I. Normal-ブ菌及び10%ブ菌の表層構造の比較

Normal-ブ菌のフリーズ・エッチング像を図1. 及び図2. に示す. 図1. はエッチングをやや強く行った場合の像であり, 図2. はエッチングの弱い場合の像である. 細胞壁の厚さは210~260 Åと計算され, その微細構造は粒子性構造をもった約160 Åの外層と, 粒子構造がほとんど認められない約80 Åの内層から成ることが認められた. この外層を形成する粒子群は160~180 Åの直径を有し, 細胞壁の化学分析データや⁹⁾細胞壁におけるリビトールテイコイック酸の最表層局在の可能性から,⁷⁾おそらくテイコイック酸とペプチドグリカンから成る粒子と考えられる. これに対して細胞壁内層はペプチドグリカンのみから成っていると思われる. ブ菌細胞壁の微細構造に関して, Suganuma⁸⁾は超薄切片法による観察から, 電子密度の高い外層と電子密度の低い中間層及び細胞壁と原形質膜が融合した内層の3層から成ることを報告している. 一方, Futai⁹⁾等はL-11酵素処理法による細胞表層の観察から, Suganumaの報告している第3層は観察されないことを示した. フリーズ・エッチング法による微細構造の観察はMorioka等¹⁰⁾により行なわれており, 細胞壁は多層構造を有することが報告されているが, しかしその多層構造はきわめて不明瞭である. 我々の行なった結果はFutai等の報告する2層構造とよく一致し, 又Strominger⁷⁾の化学分析結果から画かれた想定図ともよく一致する.

ひるがえって, カッティングにより現われた細胞膜表面 (PM) を見ると, 約150 Åの直径を有する粒子で均一に覆われており, 又細胞膜裏面 (PM) は, PMに比べて若干粒子性に乏しく, 約200 Åの直径を有する粒子が平滑面に散見された.

10%食塩含有培地で増殖した菌すなわち10%-ブ菌のフリーズ・エッチング像は図3. 及び図4. に示した. 図3. は強くエッチングを行なったものであり, 図4. は弱いエッチングにより得られた像である. 図3. と図4. を比較して最も注目されるのは細胞壁構造である. すなわち, エッチングが充分に行われた場合には280~300 Åの厚さを有する細胞壁が良く観察されたが, エッチングが弱い場合にはその構造が非常に不鮮明であった(図4.). Normal-ブ菌と比較して, 10%-ブ菌では壁の肥厚が著明で約1.5倍であることが判り, 他方菌自体も大きくなっていることが

示された. これらの現象はすでにKanemasa等が超薄切片像観察などで明らかにしており,¹¹⁾耐塩機構上菌形増大及び細胞壁の関与は確実と考えられる.

10%-ブ菌の原形質膜表面については構成する粒子が, 約100~120 Åの直径でかなり不均一であった. Normal-ブ菌と10%-ブ菌で原形質膜の粒子が異なることは, 細菌細胞における多くの酵素活性が原形質膜に局在する膜蛋白に存することと考え合せて, 膜機能の変化も考慮する必要があり, 目下追研究中である.

II. L-11酵素処理細胞における細胞形態の比較.

Normal-ブ菌及び10%-ブ菌のL-11酵素処理による濁度の推移を図5. に示した. Normal-ブ菌においては, L-11酵素処理15分まで急速に減少し, その後35%の比濁度減少を示したところでプラトーに達した. 一方10%-ブ菌では, 最初の10分間比濁度は減少し, その後一時的に比濁度が上昇して, 15分にピークを有するショルダーを示した. なおも反応が続けると, Normal-ブ菌よりやや低い40%の比濁度減少のレベルでプラトーに達した.

図5.

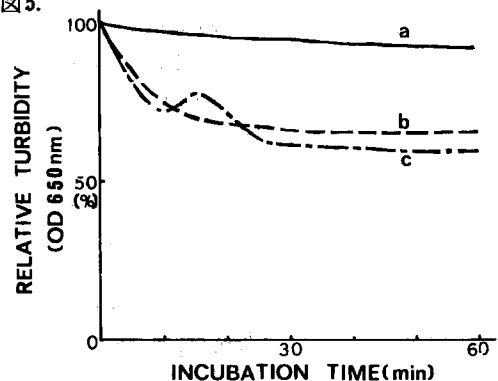


図6. は, Normal-ブ菌をL-11酵素で5分間処理したものである. 矢印で示すごとく, 細胞壁外層を形成していた粒子層が, 酵素処理により, 原形質膜から大きく遊離した像として観察された. しかも, この粒子の大きさが酵素処理により変化しないことや, L-11酵素の有する活性が主としてGlycyl-glysin-endopeptidase, D-alanine-glysin-endopeptidaseおよびNAc-muramyl-L-alanine-amidase活性であることから,¹²⁾この粒子は殆んどリビトールテイコイック酸から成ることが想像される. 次に酵素処理をさらに長く30分間行なうと, これらの粒子層も認められなくなり, 細胞壁は全く溶解もしくは散逸したものと考えられる. したがって原形質膜表

層は完全に裸出するため \overline{PM} は非常に鮮明に認められ全域がほぼ均一な粒子から成ることが示された。

(図7.)

10%-ブ菌における酵素処理像は図8. 及び9. に示した。図8. は10%-ブ菌を10分間 L-11酵素処理行なったものであり、ほとんど細胞壁成分は認められなかった。なお10分間の酵素処理は前述の如く比濁度の一時的上昇する点に対応するが、その原因となるような形態変化はうかがわれなかった。図8. で特筆すべき点は細胞の断面の原形質膜に接した場所に空胞様構造(矢印)が認められたことである。これは Popkin 等¹³⁾ の報告している350-500 Aの直径を有する空胞型メソゾームと非常に良く一致する像で、著者等もこれをメソゾームと断定している。我々の実験範囲内では、このメソゾームが10%食塩存在下で増殖した菌に特異的に認められる結果となったが¹³⁾ その生理的意義に関しては今後の検討を要する。他方酵素処理により現われた原形質膜表面の粒子性が、Normal-ブ菌に比較して不鮮明になっている (\overline{PM}) ことが認められた。次に10%-ブ菌を、30分間酵素処理を行なったものの像を図9. に示した。図8. と同様、細胞壁は全く認められなくて、完全なプロトプラストが形成されていると思われた。このように細胞壁は全く認められないにもかかわらず、分裂途中の細胞(左端の菌)がその形態を良く維持している。小池等¹⁴⁾ はブ菌をリゾスタフィン処理して得たプロトプラストは球状及び半月状の形態を示し、その原形質膜の表面には Silver-methenamine 染色によりムイレンを認めないことから、原形質膜がある程度の rigidity を持ち形状を保持することを報告しているが、著者等の結果もこの事実を示唆するものである。

L-11酵素処理細胞の比較において、10%-ブ菌で比濁度の一時的上昇と云う顕著な差異が認められたが、このことは細胞表面の構造が Normal-ブ菌と10%-ブ菌で質的にも差異があることを示唆しているものと思われる。従って、細胞壁成分における差異

の検討が必要となっており、目下この点に関して研究中である。

結 論

ブドウ球菌耐塩機構における細胞表面の役割の解析をフリーズ・エッチング法により行なった。さらに細胞表面観察をより詳細に行なうために、細胞壁溶解酵素処理を0.5%食塩含有条件下増殖菌(Normal-ブ菌)及び10%食塩含有条件下増殖菌(10%-ブ菌)に行なった試料についても検討を加えた。

I. 酵素処理細胞及び非酵素処理細胞において、10%-ブ菌は Normal-ブ菌に比べて約1.5倍の大きさを有しており、さらに細胞壁も約1.5倍の厚さを示した。しかし、10%-ブ菌細胞壁構造はエッチングの程度によりその明瞭さに差異が認められた。この現象は Normal-ブ菌では認められないことから、両者間において細胞壁が質的に異なる可能性が示唆された。

II. 細胞壁溶解酵素の作用を菌浮遊液の濁度の減少でみると、Normal-ブ菌では処理開始後15分ぐらまでは比濁度は急速に減少し、その後徐々にプラトーに達するのに対して、10%-ブ菌では処理開始後10分までは急速に比濁度の減少が見られるが、その後一時的に比濁度の上昇が認められた。このことも細胞壁が質的に変化していることを意味している。

III. Normal-ブ菌と10%-ブ菌の原形質膜表面の比較において両者間に粒子性の差異が認められた。このことから原形質膜における種々の酵素活性において量的あるいは質的に変化していることが想定される。

稿を終るに当たり、L-11酵素の分与及び御助言を賜ったことを大阪大学歯学部小谷教授及び加藤助教授に深謝すると共に、本研究の推進に技術的援助を賜った共同実験室林信男氏に感謝致します。なお本研究は文部省科学研究費(総合研究A)及び山陽放送学術文化財団研究助成金に負うところ大であることを付記致します。

文 献

- 1) 片山健, 友近健一, 高津智子, 金政泰弘, 俵寿太郎: 岡山医学会雑誌, **85**, 481-486, 1973
- 2) Kanemasa, Y., Yoshioka, T., and Hayashi, H.: Biochim. Biophys. Acta, **280**, 444-450, 1972
- 3) Archibald, A. R., Baddiley, J., and Heckels, J. E.: Nature New Biol., **241**, 29-31, 1973
- 4) Balyuzi, H. H. M., Reaveley, D. A., and Burge, R. E.: Nature New Biol., **235**, 252-253, 1972

- 5) 鷲岳宏, 四本晴夫, 平野正: 医学のあゆみ, **76**, 284-292, 1971
- 6) Kato, K., Kotani, S., Matsubara, T., Kogami, J., Hashimoto, S., Chimori, M., and Kazekawa I.: Biken J., **5**, 155-179, 1962
- 7) Strominger, J. L.: Ann. New York Acad. Sci., **128**, 59-61, 1965
- 8) Sugauma, A.: Ann. New York Acad. Sci., **128**, 26-44, 1965
- 9) Futai, M., Okabayashi, K., and Mizuno, D.: Japan. J. Microbiol., **16**, 341-350, 1972
- 10) Morioka, H., Sugauma, A., Yokota, Y., and Tawara, K.: J. Electron Microscopy, **22**, 255-266, 1973
- 11) Kanemasa, Y., Takai, K., Hayashi, H., Takatsu, T., and Katayama, T.: In press
- 12) Kato, K., Hirata, T., Murayama, Y., Suginaka, H., and Kotani, S.: Biken J., **11**, 1-12, 1968
- 13) Popkin, T.J., Theodore, T. S., and Cole, R. M.: J. Bact., **107**, 907-917, 1971
- 14) 小池聖淳, 中島幸一, 飯田恭子: 日本細菌学雑誌, **28**, 178, 1973

図1. 強いエッチングを行なった Normal-ブ菌のフリーズ・エッチング像

CW: 細胞壁, PM: 原形質膜表面

シャドウイングの方向は左上の矢印で表示してあり, スケールは 1μ を示してある. 以下の図も同様.

図2. 弱いエッチングを行なった Normal-ブ菌のフリーズ・エッチング像

PM: 原形質膜裏面

図3. 強いエッチングを行なった 10%-ブ菌のフリーズ・エッチング像

図4. 弱いエッチングを行なった 10%-ブ菌のフリーズ・エッチング像

図5. L-11酵素処理の効果. 処理は Normal-ブ菌及び 10%-ブ菌を 0.8M 蔗糖添加 10mM Tris-塩酸緩衝液に 1 mg/ml になるように懸濁したものに L-11 酵素を 0.3 単位/ml 添加して行われた. 縦軸は % 比濁度を, 横軸は 37°C における処理時間を示す.

- a. L-11 酵素非添加対称
- b. L-11 酵素添加 Normal-ブ菌
- c. L-11 酵素添加 10%-ブ菌

図6. 5 分間 L-11 酵素処理 Normal-ブ菌のフリーズ・エッチング像

矢印は細胞壁外層を構成する粒子の遊離過程を示す.

図7. 30 分間 L-11 酵素処理 Normal-ブ菌のフリーズ・エッチング像

図8. 10 分間 L-11 酵素処理 10%-ブ菌のフリーズ・エッチング像

矢印はメソゾーム様構造物を示す.

図9. 30 分間 L-11 酵素処理 10%-ブ菌のフリーズ・エッチング像

CONTRIBUTION OF CELL SURFACE TO SALT TOLERANCE
OF STAPHYLOCOCCUS AUREUS
-STUDIES BY FREEZE-ETCHING METHOD-

By

Ken-ichi TOMOCHIKA, Katsuko SASAI and

Yasuhiro KANEMASA

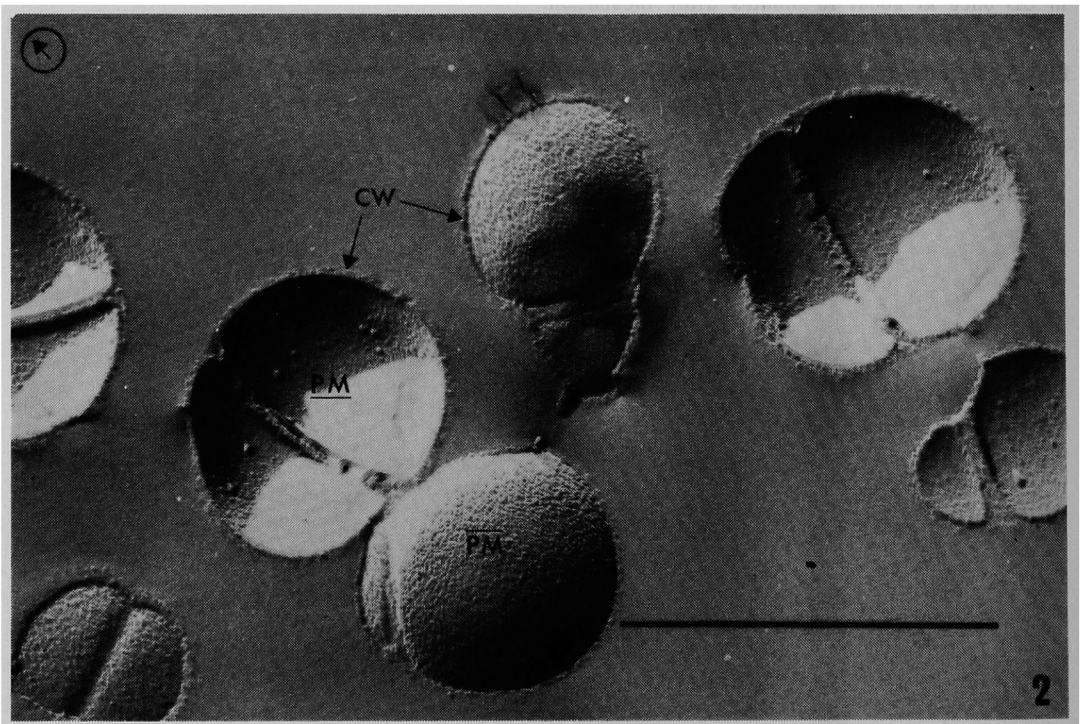
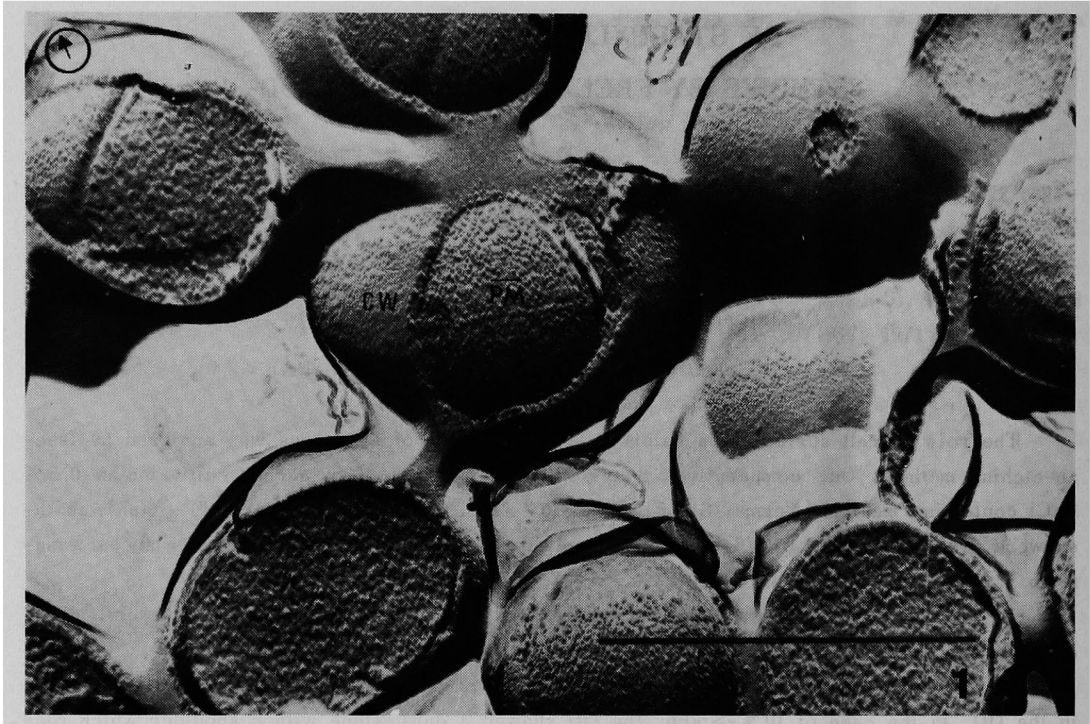
Department of Microbiology, Okayama University

Medical School (Director: Prof. Jutarō TAWARA)

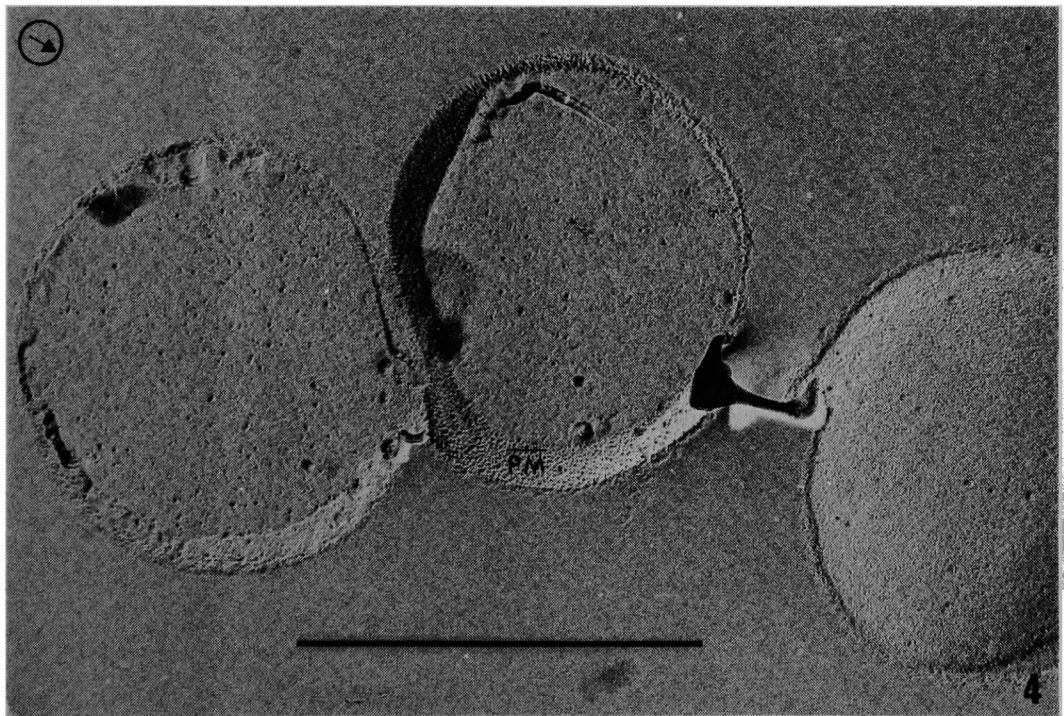
The role of cell surface in a haloresistant mechanism of *S. aureus* was analyzed by freeze-etching method. Our comparative studies were carried out on *S. aureus* cultivated in 0.5% NaCl containing medium (Normal-Staph) and in 10% NaCl containing medium (10%-Staph), as they were or were treated with L-11 enzyme (cell wall lytic enzyme obtained from *Flabobacterium* sp.).

1. As shown in photographs of non-treated and enzyme-treated cells, both the cell size and cell wall thickness of 10%-Staph increased to about 1.5 times Normal-Staph.
2. When Normal-Staph was exposed to L-11 enzyme, there occurred a gradual decrease in the OD. In the case of 10%-Staph, the OD showed a down-slope with a shoulder which rose in OD once at about 10 minutes after incubation.
3. The surface pattern of plasma membrane of Normal-Staph appeared to be made up of closely arranged spherical subunits. But in the case of 10%-Staph, the spherical subunits were indistinct and appeared to be sparsely located.

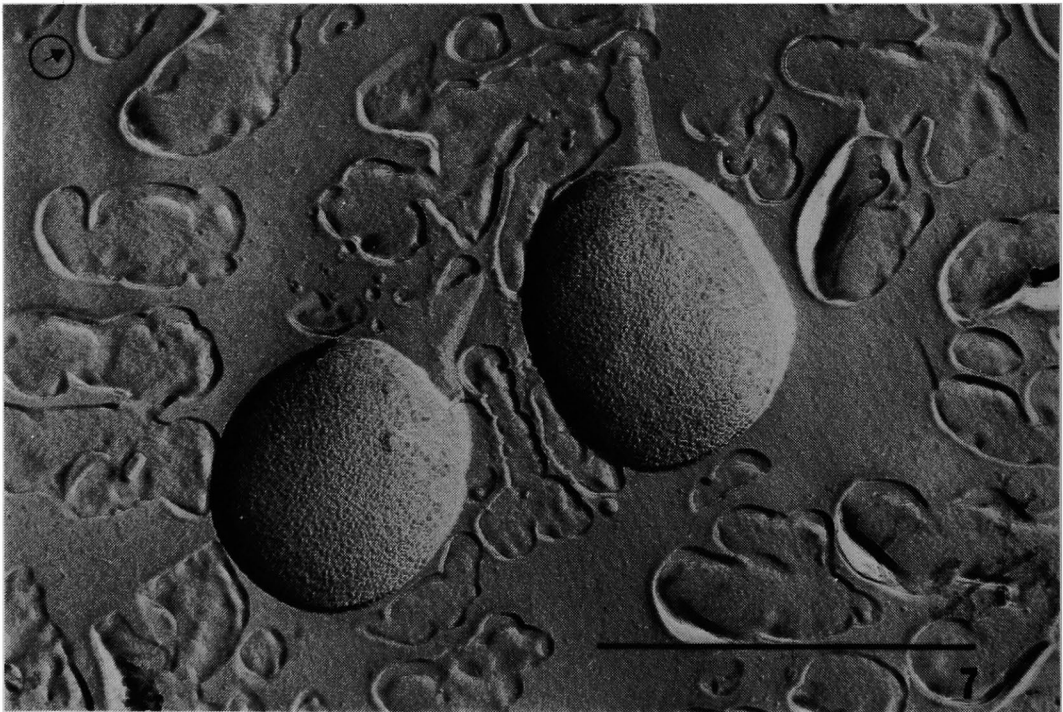
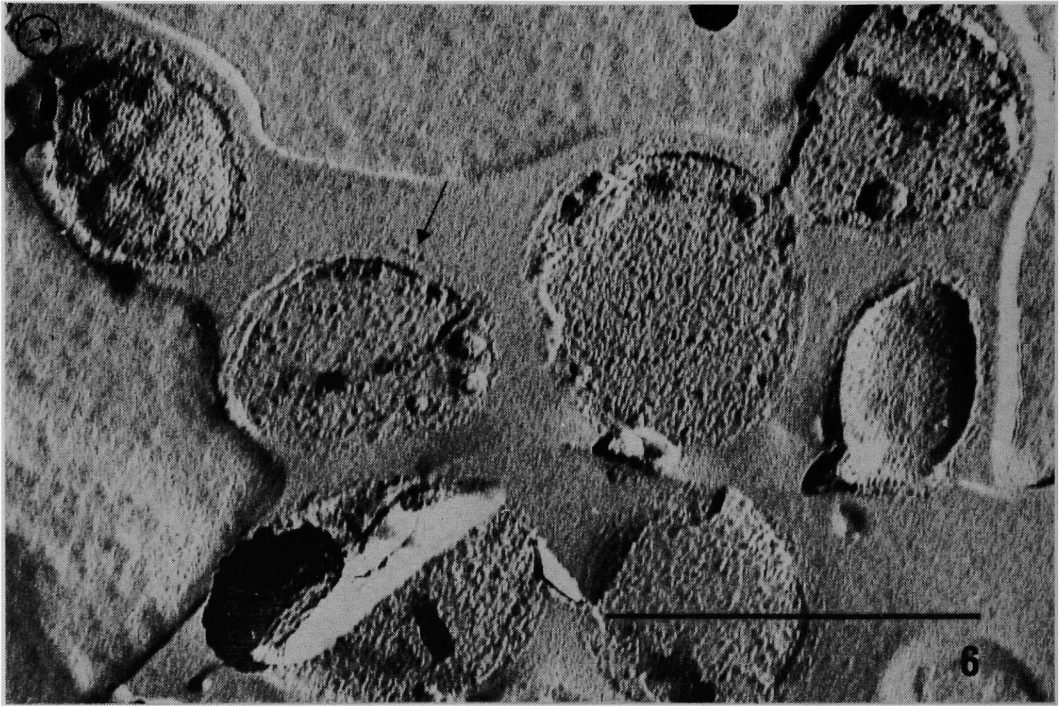
友近他 2 名論文附図



友近他 2 名論文附図



友近他 2 名論文附図



友近他 2 名論文附図

