

# M-1 酵素による *Lactobacillus* 属細菌 プロトプラスト形成課程の形態学的解析

岡山大学医学部細菌学教室（指導：金政泰弘教授）

船 橋 達 天

（昭和59年5月23日受稿）

**Key words :** protoplast, *Lactobacillus*,  
表層構造, endo-N-acetylmuramidase

## 結 言

*Lactobacillus* 属細菌は、卵白リゾチームをはじめ各種壁溶解酵素に対して一般に弱い感受性しか示さず、そのために本属菌についての完全なプロトプラスト形成の報告はほとんど認められない。しかしながら、本属菌は *Streptomyces globisporus* 1829 培養上清より単離精製された end-N-acetylmuramidase（以下 M-1 酵素と略す）に対しては感受性を示す。本酵素は蛋白分解酵素活性の混入も非常に少なく、*Lactobacillus* 属細菌のプロトプラスト形成に有用な酵素と考えられる<sup>1)</sup>。

著者等は、今まで全く不可能であった *Lactobacillus casei* var. *rhamnosus*（以下、*L. rhamnosus* と略す）のプロトプラストを、M-1 酵素処理により短時間にかつ高率に形成し、かつ形成されたプロトプラストが良く生理活性を保持していることを報告した<sup>1)</sup>。この場合、浸透圧調節物質として二糖類または三糖類の存在が不可欠であり、*L. rhamnosus* の M-1 酵素に対する感受性が上記の糖質の存在で著しく増強される現象を認めた。

口分田は<sup>2)</sup>、*Lactobacillus* 属細菌に対する M-1 酵素作用機序を解析して、*L. rhamnosus* においては前述の如く M-1 酵素作用を示すためには酵素処理時に二または三糖類が必要であるが、*L. plantarum* では糖質存在の有無に関係なく M-1 酵素に対して強い感受性を示すことを報告している。

本研究においては、この M-1 酵素感受性の異

なる *L. rhamnosus* および *L. plantarum* の 2 菌種のプロトプラスト形成過程の比較検討を電子顕微鏡観察により行った。その結果、両者の M-1 酵素感受性の差は、M-1 酵素作用部位の違いに起因することが明らかとなり、両菌種の表層構造の相違を示唆する興味ある知見を得た。

## 材 料 と 方 法

### 1) 供試菌および培養

供試菌は、*L. casei* var. *rhamnosus*（以下 *L. rhamnosus* と略す）ATCC 7469、および *L. plantarum* ATCC 8014 である。培地は deVries 培地<sup>3)</sup> を改変したもので、培地 1 l 中の組成は nutrient broth, 12 g; yeast extract, 5 g; Tween 80, 1 ml;  $K_2HPO_4$ , 2 g;  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0.1 g;  $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ , 0.025 g; glucose, 10 g で、この培地の最終 pH は 6.8 である。glucose 液および  $MgSO_4$  と  $MnSO_4$  液は別個に高压滅菌後添加した。なお培養は 37°C 静置条件で行った。

### 2) M-1 酵素処理条件

*L. rhamnosus* および *L. plantarum* は、対数増殖後期あるいは定常期初期の細菌を供試した。培養後の菌は、 $5,000 \times g$ , 10 分の遠心分離により集菌、20 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) で 2 回洗浄後、同一緩衝液に懸濁し菌浮遊液とした。M-1 酵素による細胞壁の消化度は、島津 UV-200S 分光光度計を使用して、37°C 恒温条件における 650 nm の濁度変化を自記記録して測定した。反応液は、最終 3 ml の 20 mM リン酸緩衝液

(pH 7.0)中に0.6~0.8mg乾燥菌体量(3mg湿菌量)を含む条件で、37°C5分間のインキュベート後、M-1酵素を添加して反応を開始した。プロトプラスト形成時には、上記反応液に浸透圧調節物質として0.75M sucroseを添加した。

### 3) 電子顕微鏡試料の作製法

M-1酵素処理前および処理後の試料は、20mMリン酸緩衝液(pH 7.0)に溶解した2.5%グルタルアルデヒドにて0°C1時間固定後前記緩衝液にて2回洗浄し、2%オスミック酸を含む上記緩衝液中にてさらに2時間固定を行った。固定後の試料は、緩衝液で1回洗浄し、エタノール系列にて脱水後、エポキシ樹脂に包埋固化した。固化した試料の超薄切片は、Potter-Blum MT-2B ウルトラマイクロトームにより作成した。超薄切片試料は、2%酢酸ウラニールおよびReynoldsのクエン酸鉛にて二重染色し、検鏡した。

## 結 果

### 1. *L. rhamnosus* および *L. plantarum* のM-1酵素による溶菌に及ぼす sucrose の影響

*L. rhamnosus* および *L. plantarum* を sucrose の存在および非存在下にてM-1酵素処理を行った。Fig. 1に示したごとく sucrose 非存在

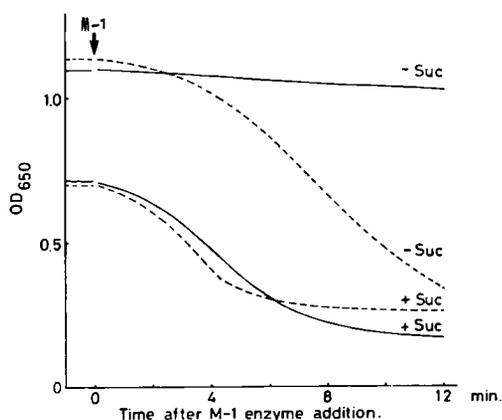


Fig. 1 *L. rhamnosus* および *L. plantarum* のM-1酵素処理に及ぼす sucrose の影響。菌懸濁液は、両菌ともに1mg湿菌量/mlに調整し1.5μg/mlのM-1酵素を添加した。+Sucとは、菌を0.75M sucroseに懸濁したものである。

— : *L. rhamnosus*  
 - - - : *L. plantarum*

下でM-1酵素処理を行った場合、*L. rhamnosus*はほとんど感受性を示さないにもかかわらず、*L. plantarum*は著しい濁度の減少を示した。ところが両菌懸濁液に0.75M sucroseを添加するとODは瞬間的に約1/2に下降し、これにM-1酵素を添加すると両菌種共に添加後に著しい濁度の減少を示した。しかも、*L. plantarum*の方がより強いM-1酵素感受性を示した。このように、両菌種間にはM-1酵素に対する著しい感受性の差異が認められた。以下の実験においては、前述のM-1酵素感受性の差異がいかなる細菌表層構造上の相違に基づくかを明らかにするために、M-1酵素処理過程の経時的変化を電子顕微鏡観察により調べた。

### 2. *L. rhamnosus* および *L. plantarum* の微細構造比較

M-1酵素添加前の両菌種の微細構造を比較するために、両菌種の sucrose 添加前後の形態を調べた。

Fig. 2には*L. rhamnosus*, Fig. 3には*L. plantarum*の sucrose 添加前の菌体の微細構造を示した。*L. rhamnosus*は菌体縦断面での長軸短軸比の大きい長い菌型をしており、細胞壁および細胞膜ともに凹凸の激しい構造をしている。細胞壁は非常に電子密度が低く、細胞壁部分には何らの特徴的な微細構造を認めなかった。*L. plantarum*は卵円形の短桿菌で細胞壁の電子密度も高く、細胞壁中には不鮮明ながら層状構造が観察された。なお細胞壁構造の観察を容易にするため、以下の実験においては、若干厚めの超薄切片試料を鏡検した。

両菌を0.75M sucroseに懸濁すると前述のごとく菌液の濁度は著しく減少するので、この過程での形態学的変化を明らかにするため sucrose 添加時の両菌種の微細構造の変化を調べた。Fig. 4a および 4bには*L. rhamnosus*の微細構造、Fig. 5a および 5bには*L. plantarum*の微細構造を示した。

*L. rhamnosus*は高張条件下に移すと菌体の著しい収縮をきたした。Fig. 4a および Fig. 4bに示されるごとく細胞質の収縮に伴ない細胞壁は細胞膜に結合したまま収縮し、過剰となった細胞壁が突出した像を示した。また、Fig. 4a

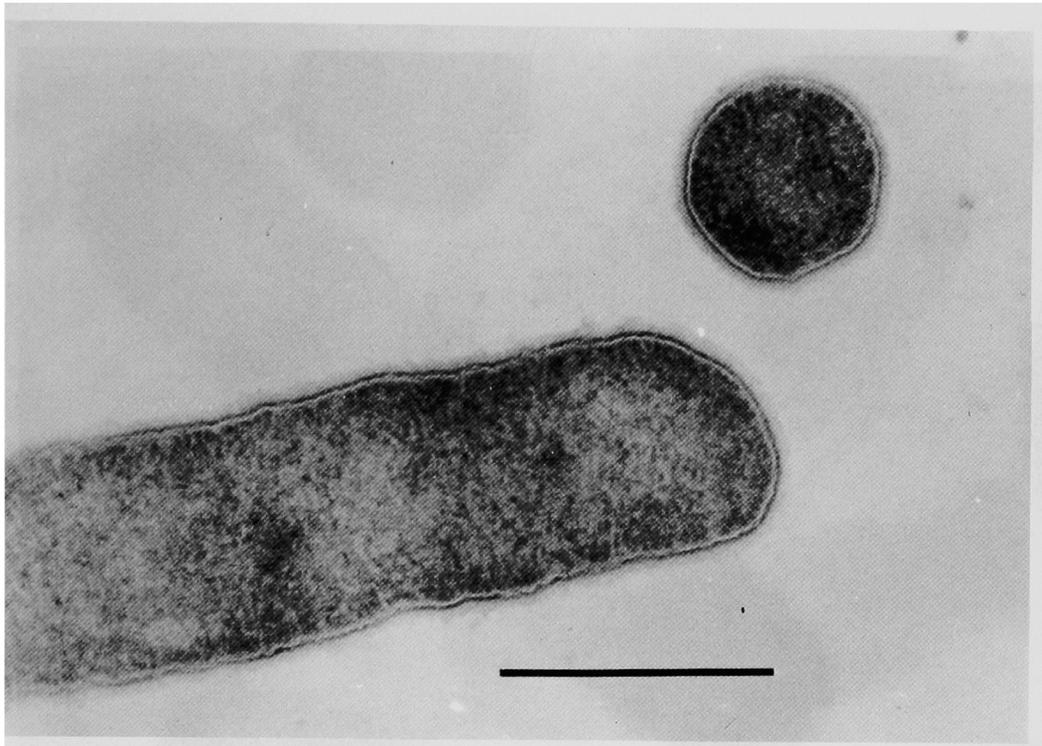


Fig. 2 *L. rhamnosus* の微細構造.

20mMリン酸緩衝液に懸濁した *L. rhamnosus* の微細構造を示している。写真中のスケールは0.5 $\mu$ mを示す。以下の電子顕微鏡写真中のスケールも同様である。

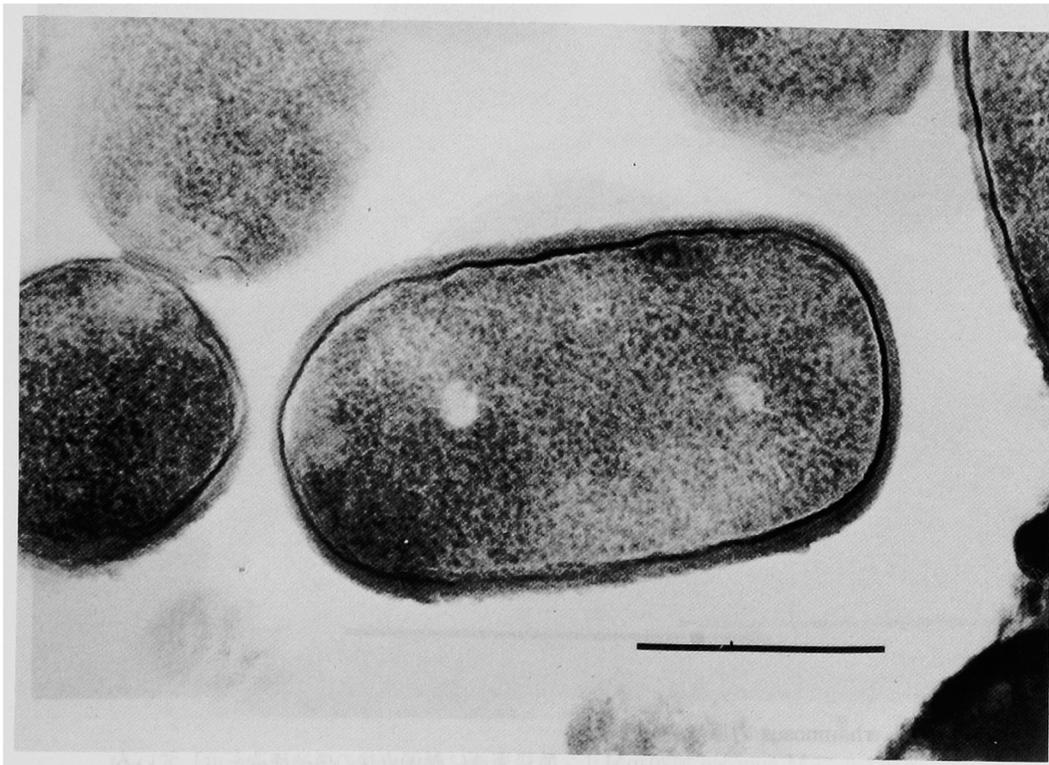


Fig. 3 *L. plantarum* の微細構造.

20mMリン酸緩衝液に懸濁した *L. plantarum* の微細構造を示している。

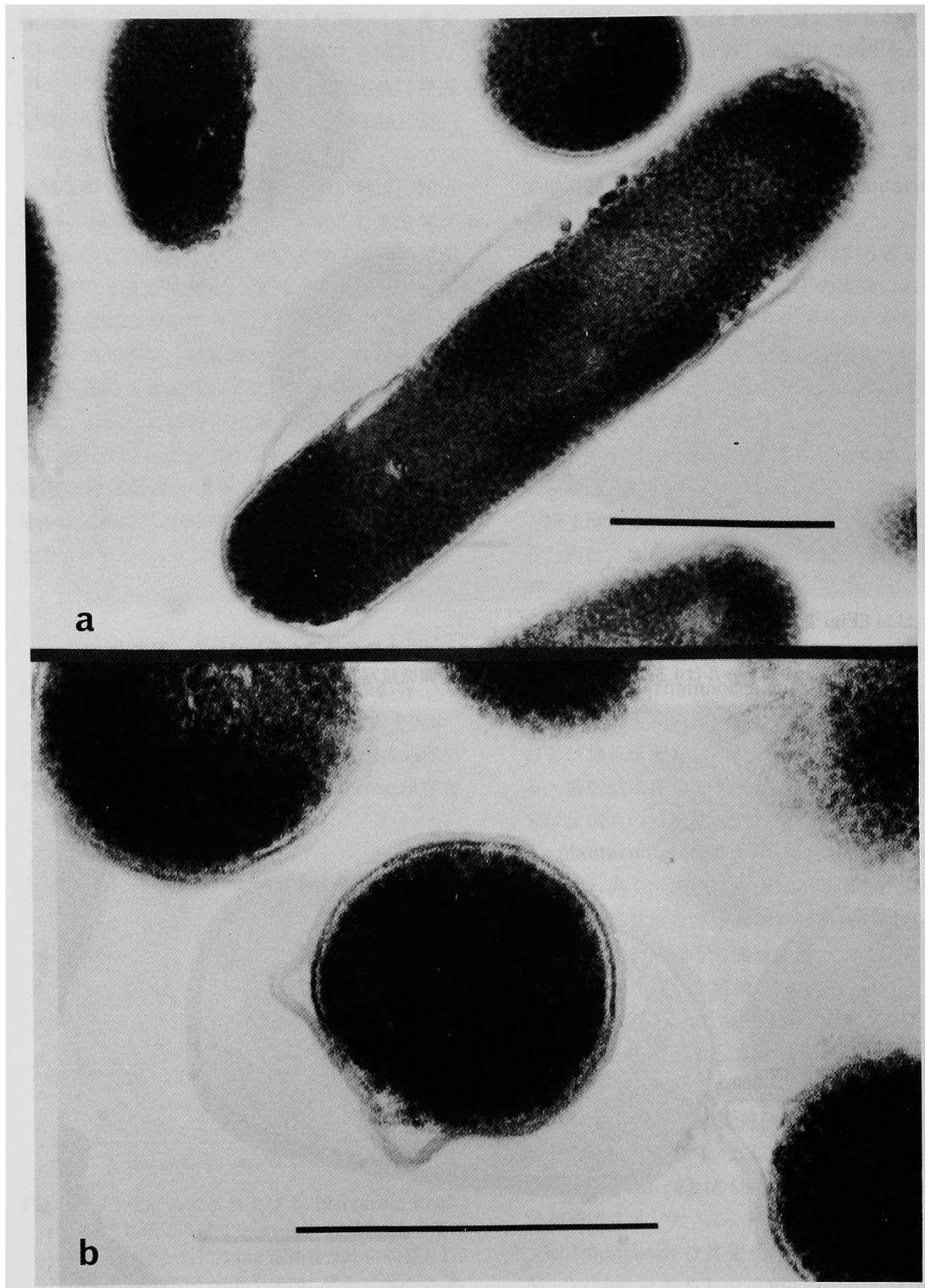


Fig. 4 *L. rhamnosus* の原形質分離像。  
菌体を0.75M sucrose 加20mMリン酸緩衝液に懸濁直後の微細構造を示している。  
aは菌体の縦断像を、bは菌体の横断像を示す。

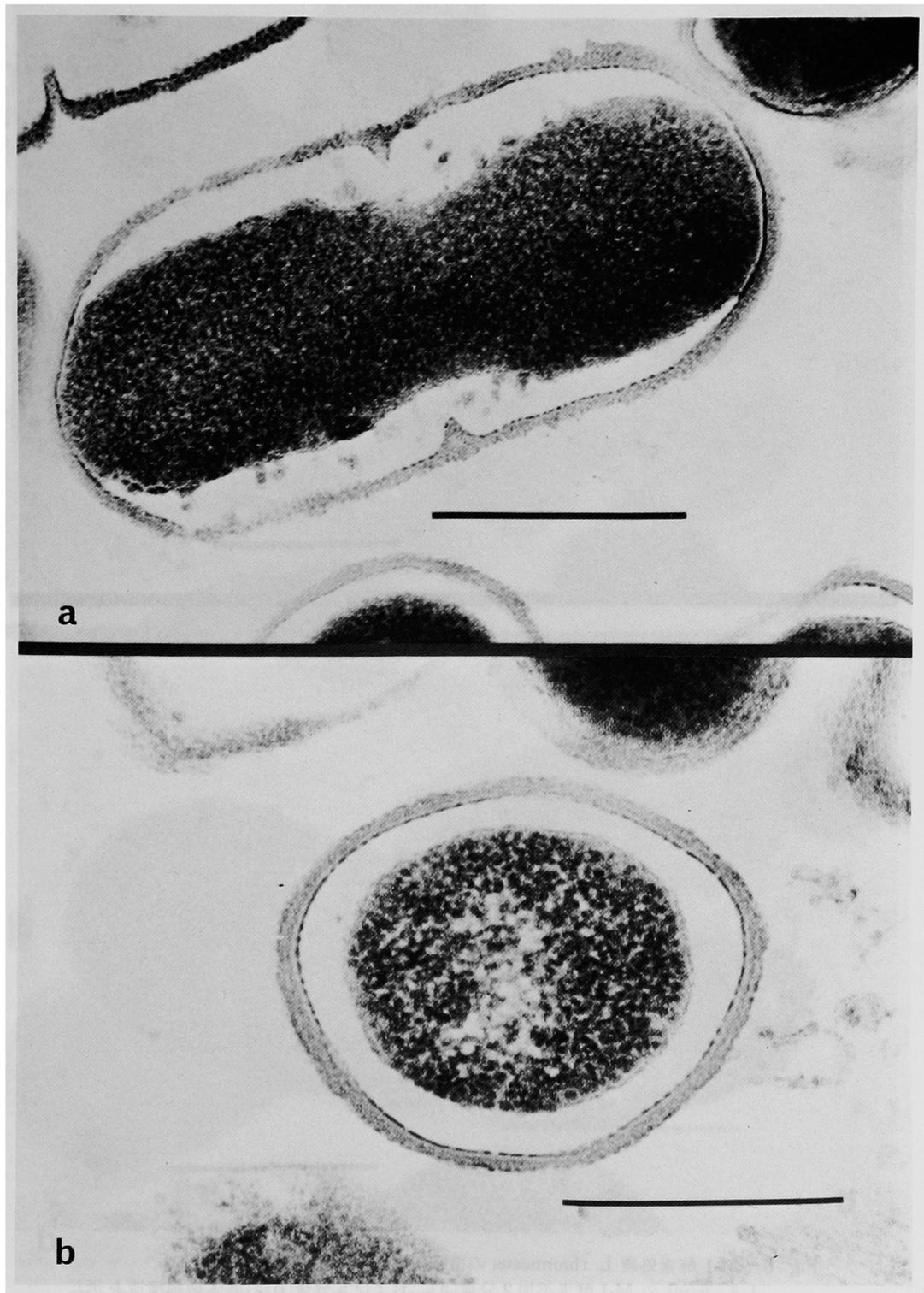


Fig. 5 *L. plantarum* の原形質分離像。  
菌体を0.75 M sucrose 加 20mMリン酸緩衝液に懸濁直後の微細構造を示している。  
aは菌体の縦断像を、bは菌体の横断像を示す。

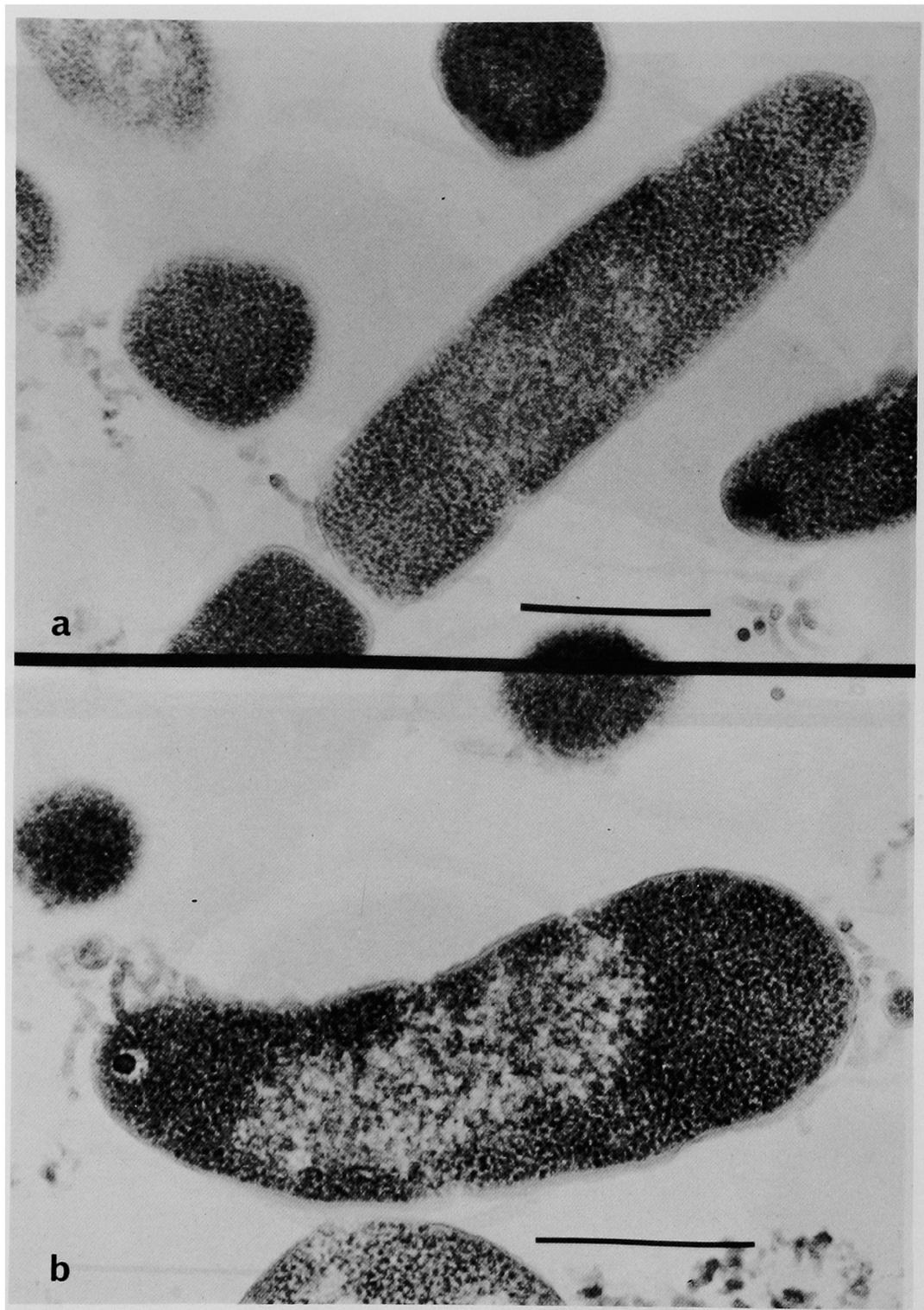


Fig. 6 M-1 酵素処理 *L. rhamnosus* の微細構造.

1.5  $\mu\text{g/ml}$  の M-1 酵素添加 2 分後(a), および 5 分後(b)の菌体微細構造を示している. a では菌体先端部および隔壁部の消化が進行している. b では側壁部の消化が進行しているが消化の度合は両側で異っている. 原形質分離像は観察されない.

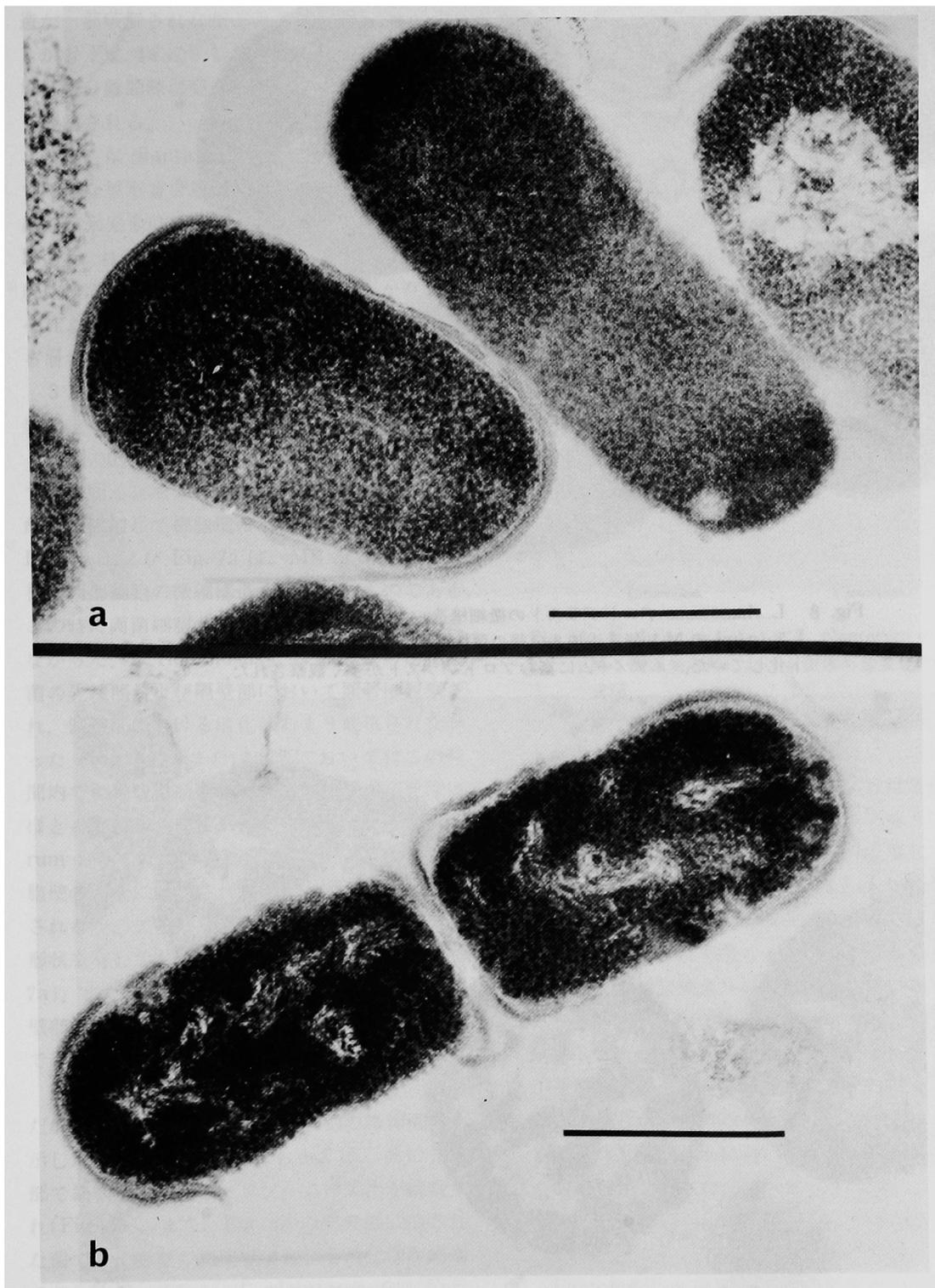


Fig. 7 M-1 酵素処理 *L. plantarum* の微細構造.  
1.5  $\mu\text{g/ml}$  の M-1 酵素添加 2 分後(a)および 5 分後(b)の菌体微細構造を示している。a, b 共に菌体側壁部の消化が進行している。a では杆菌状のプロトプラストが観察される。



Fig. 8 *L. rhamnosus* プロトプラストの微細構造。  
 1.5  $\mu\text{g/ml}$  の M-1 酵素添加 8 分後の菌体を示したが、ほぼ完全にプロトプラスト化していた。メソゾームに富むプロトプラストが多く観察された。

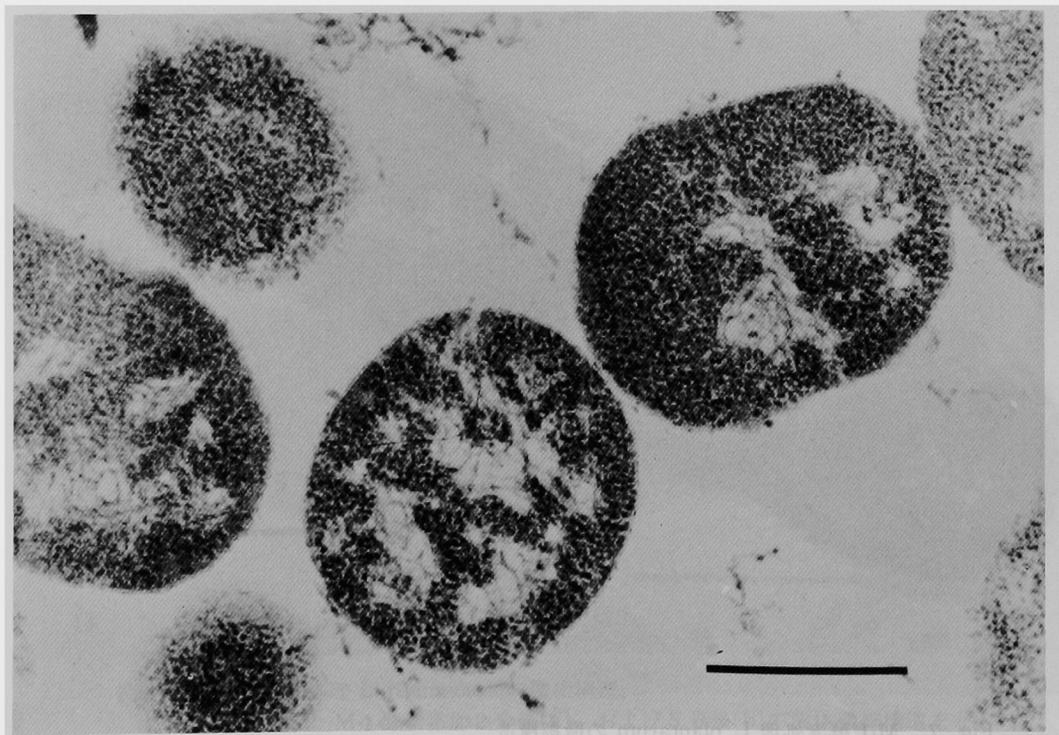


Fig. 9 *L. plantarum* プロトプラストの微細構造。  
 1.5  $\mu\text{g/ml}$  の M-1 酵素添加 8 分後の菌体を示すが、完全にプロトプラスト化していた。原形質膜が破線状に示されている。

および 4b において、前述の細胞壁突出部の構造が一部破壊されたがとき像も観察された。しかも Fig. 4a に示した菌体の縦断面において、原形質分離間隙に突出したメソゾーム構造が多く観察される。

他方、*L. plantarum* では大多数の菌において明確な原形質分離像が観察され、細胞膜は収縮の結果完全に細胞壁から遊離していた。

Fig. 5a および Fig. 5b より明らかなように、細胞壁の最下層には電子密度の高い層が存在し、それより外層側においても若干電子密度の異なる層状構造が観察された。

### 3. M-1 酵素添加後における表層微細構造の変化

前述の 0.75M sucrose に懸濁した細胞を 37°C で 5 分間インキュベート後、1.5 μg/ml の M-1 酵素を添加して細胞壁の消化を行った。

Fig. 6a および Fig. 7a は、M-1 酵素添加 2 分後の両菌細胞の微細構造を比較したものである。この時に両菌細胞共に全く原形質分離像を示さなかった。*L. rhamnosus* では細胞壁の消化が菌の先端部および隔壁部において顕著に観察され、側壁部における消化はあまり観察されなかった (Fig. 6a)。また、本菌においてはこの時間内での細胞横断面における細胞壁の消化像はほとんど観察されなかった。一方、*L. plantarum* においては、酵素処理開始 2 分後ですでに細胞壁の完全に消化されたプロトプラストが観察されたが、この時点でのプロトプラストは菌の形状を有しており、球形化していなかった (Fig. 7a)。また、消化途中の細胞においてはまず側壁部から消化が進行し、菌端部の細胞壁が無傷で存在する像も多く観察された。

Fig. 6b および Fig. 7b は、より消化の進んだ酵素添加 5 分後における両細胞の微細構造を示した。*L. rhamnosus* においては、菌の先端部で細胞壁の離脱とメソゾームの突出が観察され (Fig. 6b)、また、Fig. 6b の中央部に示された菌では、側壁の細胞壁における消化像が両端で著しく異っていた。*L. plantarum* では、Fig. 7b に示したような壁消化の進行の遅い細胞でも両側消化像がますます明らかになっている。

### 4. M-1 酵素処理により形成された両菌プロ

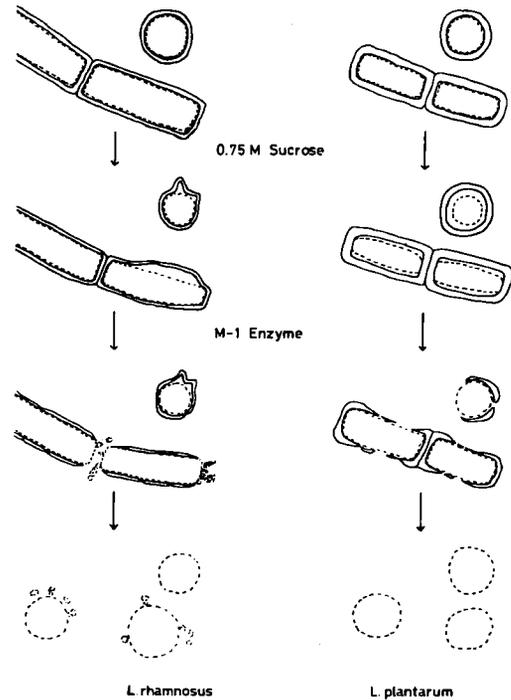


Fig. 10 *L. rhamnosus* および *L. plantarum* の M-1 酵素処理時における菌体形態変化の模式図。

原形質膜は破線で、細胞壁は実線で示した。

### トプラストの微細構造

M-1 酵素処理 8 分後には両菌共にほぼ完全にプロトプラスト化していた。両菌のプロトプラストの微細構造を Fig. 8 および Fig. 9 に示した。*L. rhamnosus* プロトプラストは、非常に明瞭な細胞膜で囲まれており、その厚さは約 70 Å であった。また本菌のメソゾームは良く発達しており、細胞膜よりの突出部も明確に観察される (Fig. 8)。一方、*L. plantarum* プロトプラストでは、細胞膜の境界が非常に不鮮明で、不連続な点の集まりとして観察された (Fig. 9)。膜の厚さも *L. rhamnosus* の約半分であった。本菌プロトプラストにおいてはメソゾームは全く観察されなかった。

### 考 察

*Lactobacillus* 属細菌は卵白リゾチームに対して非常に弱い感受性または全く感受性を示さないため、本酵素を用いてのプロトプラスト形成の試みには非常な困難を伴う。これ以外の酵

素による試みも多く研究者によりなされているが<sup>4)</sup>、いずれの研究においても良好な成績が得られていない。

著者等<sup>1)</sup>は、*Streptomyces globisporus* 1829 株培養上清より精製された endo-N-acetylmuramidase (M-1 酵素) を用いて *L. rhamnosus* のプロトプラストを短時間にかつ高率に形成する条件を見出した。また口分田<sup>2)</sup> は、6 種の *Lactobacillus* 属細菌における M-1 酵素感受性を調べ、その細胞壁分解形態の違いから各菌種間の表層構造の差異に検討を加えた。

著者は、前述の報告に基づき M-1 酵素感受性が著しく異っていた *L. rhamnosus* と *L. plantarum* のプロトプラスト形成過程の電子顕微鏡観察を行ない、M-1 酵素感受性の差を示す形態学上の相違に検討を加えた。Fig. 10 に結果を要約した如く、両菌は高浸透圧条件下での原形質分離および M-1 酵素による細胞壁消化像に著しい違いを示した。

*L. rhamnosus* は M-1 酵素消化に sucrose 存在を必須とする。すなわち sucrose による原形質分離が消化に必要な過程であるとするならば、口分田が推論するように細胞壁表面を外側から陰蔽する物質の存在が考えられる。かかる成分としてはまず規則的配列構造である regular array が考えられるが、著者の得た電頭像では認められるべき構造物は存在せず、増田らの報告でも *L. rhamnosus* には regular array は存在しないとされている<sup>5)</sup>。さらに Wicken らは本菌には rhamnose-containing R-polysaccharide (R 多糖体) が存在する株があり、しばしば莢膜状に外層を覆うと指摘している<sup>6)</sup>、本実験に供試した *L. rhamnosus* ATCC 7469 は、培養条件により R 多糖体の含量が変動し、また本物質が M-1 酵素による細胞壁消化を妨げる程の量である確証は得られなかったが、本物質あるいは全く異なる未知物質が菌表面を覆い M-1 酵素不感受性を与える可能性は考えられる。原形質分離後の M-1 酵素による消化が菌端部から始まり時間経過による消化の進行に部分的不均一が認められるのは、原形質分離が不均一に起こることと関連があると思われるが、今までに得られた結果からは明解な結論が出来ない状態である。

*L. plantarum* は M-1 酵素消化に sucrose の存在を必ずしも必要としない。しかも消化は菌の側壁部から始るという特異な像も著者は明らかにしている。本菌の表層に関する報告はさして多くはないが、細胞壁にタイコ酸 (Ribitol-teichoic acid) が存在することが指摘されている<sup>7)</sup>。しかもこのタイコ酸は一般に細胞壁形成後時間を経過する程に量を増し完成されることが明らかにされている。一般論でいわれる如く菌発育にともなう細胞壁伸長は菌体中央部に起こるとするならば、M-1 酵素抵抗性のあるタイコ酸の比較的少ない菌中央部から消化が始まるのは当然の事と考えられる。

今後は、かかる未知あるいは既知の細胞壁構成物質の存在または局在性を生化学的および免疫化学的解析により明らかにし、*Lactobacillus* 属細菌の M-1 酵素感受性の菌種特異性により詳細な解析を加えたい。

## 要 約

Sucrose 非存在下で M-1 酵素感受性の著しく異なる *L. rhamnosus* と *L. plantarum* の M-1 酵素によるプロトプラスト形成過程の微細構造の電子顕微鏡観察を行った。両菌共に sucrose 存在下で M-1 酵素感受性を示し、プロトプラスト形成が観察された。両菌は、高浸透圧条件下での原形質分離像および M-1 酵素による細胞壁の消化像に著しい差を示した。*L. rhamnosus* では細胞壁消化が菌体先端部および隔壁部で進行するのに対して、*L. plantarum* では菌体側壁部の消化のみが進行していた。しかしながら、sucrose 非存在下における両菌の M-1 酵素感受性を反映すると考えられる表層微細構造は全く観察されなかった。

## 謝 辞

稿を終えるにあたり終始御懇篤なる御指導、御校閲いただきました金政泰弘教授に深甚の謝意を表します。併せて御指導・御援助賜りました友近講師、平井助手、細菌学教室の諸先生に深謝致します。

本研究の遂行にあたり精製 M-1 酵素を御分与頂きました大日本製薬株式会社中央研究所、西村温樹博士、横川哉恵博士、河田茂雄博士に感謝いたします。

## 文 献

1. 友近健一, 船橋達天, 永田哲英, 藤井高志, 金政泰弘: Endo-N-acetylmuramidase による *Lactobacillus casei* プロトプラストの調製, 日本細菌学雑誌, **37**, 777—787, 1982.
2. 口分田晃: *Lactobacillus* 属細菌のプロトプラスト形成に及ぼす糖質の影響, 岡山医学会雑誌, **96**, 掲載予定
3. deVries, W., Kapteijn, W.M.C., Van der Beek, E.G. and Stouthamer, A.H.: Molar Growth Yields and Fermentation Balances of *Lactobacillus casei* L3 in Batch Cultures and in Continuous Cultures. *J. Gen. Microbiol.* **63**, 333—345, 1970.
4. Van Driel, D., Wicken, A.J., Dickson, M.R., and Knox, K.W. Cellular Location of the Lipoteichoic Acids of *Lactobacillus fermenti* NCTC 6991 and *Lactobacillus casei* NCTC 6375. *J. Ultrastructure Res.* **43**, 483—497, 1973.
5. Masuda, K., and Kawata, T. Distribution and Chemical Characterization of Regular Arrays in the Cell walls of Strains of the Genus *Lactobacillus*. *FEMS Microbiol. Lett.* **20**, 145—150, 1983.
6. Wicken, A.J., Ayres, A., Campbell, L.K., and Knox, K.W. Effect of Growth Conditions on Production of Rhamnose-Containing Cell Wall and Capsular Polysaccharides by Strains of *Lactobacillus* subsp. *rhamnosus*. *J. Bacteriol.* **153**, 84—92, 1983.
7. Kandler, O. Amino acid sequence of the murein and taxonomy of the genera *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Leuconostoc* and *Pedinococcus*. *International J. System. Bacteriol.*, **20**, 491—507, 1970.

**Electronmicroscopical Observations of Protoplast Formation Induced  
by M-1 Enzyme Treatment on *Lactobacillus*.**

**Michitaka FUNABASHI**

**Department of Microbiology, Okayama University Medical School, Okayama, Japan**

*Lactobacillus rhamnosus* and *L. plantarum* cells suspended in buffer solution showed the big differences in endo-N-acetylmuramidase (M-1 enzyme) susceptibility. Both strains had high susceptibility to M-1 enzyme in 0.75M sucrose solution and at this conditions the protoplast of these cells were formed. *L. rhamnosus* and *L. plantarum* were totally distinguished by the cell structures of plasmolysis and patterns of cell wall digestion with M-1 enzyme. However other specified fine structures responsible for M-1 enzyme susceptibility in buffer solution were not observed.