

ブドウ球菌L型菌の フリーズフラクチャー法による解析

岡山大学医学部細菌学教室

平井義一・中村知明・金谷誠久

志田健太郎・福原明宏・金政泰弘

(昭和59年3月16日受稿)

Key words : L型菌, フリーズフラクチャー,
ブドウ球菌, 膜粒子,
増殖細胞

緒 言

細菌細胞は細胞質膜の外側に細胞壁を有しており, それによって一定の形態を保持している. この細胞壁を有する親株が壁合成阻害剤, リゾチーム等により誘導され, 細胞壁が脱落したままで増殖しうる細胞になったのがL型菌である³⁾. ブドウ球菌のL型菌を例にとっても, 細胞壁を有しないためL型菌細胞は一定の形を呈しない. 大きさの点でも $0.2\mu\text{m}$ 以下のものから $5\mu\text{m}$ 以上に至る幅広い細胞が混在しており, 細胞内電子密度においても様々に異なったものが存在している^{1)~4)}. 大型細胞中には空胞が形成されその空胞の中に小型もしくは中型細胞が存在していることもある. このように非常に多形性に富んだ細胞群であるため分裂機構や増殖単位の解析の点においては不明の点が多い. そこでより詳細に細胞形態を把握し, 増殖単位との関連を明らかにする目的で, ブドウ球菌安定L型菌をフリーズフラクチャー法により電顕観察を行なった.

材料及び実験方法

I. 供試菌と培養方法

供試菌には *Staphylococcus aureus* 209 P 株 (以下親株と略す), 及びそれより誘導確立されている安定L型菌209P-L株⁵⁾ (以下L型菌と略す)を使用した. 親株はブレイン・ハート・イ

ンフュージョン培地 (Difco) にて 37°C で5時間後期対数増殖期まで振盪培養した. L型菌は5%食塩加ブレイン・ハート・インフュージョン培地にて 37°C で24時間, 弱振盪培養を行なった. L型菌集落は上記培地に寒天 (和光) を1%の割合で加え固型培地としたものに48時間培養し形成させた. 集菌は $12,000\times g$, 10分間の遠心を行ない, 親株は 100mM リン酸緩衝液, L型菌は5% NaCl加 50mM リン酸緩衝液で2回洗浄した.

II. 電子顕微鏡観察

超薄切片用試料の菌は緩衝液で洗浄後, 2.5%グルタルアルデヒドで1時間の前固定をした. その後2%四酸化オスミウムで3時間後固定を行ない, ついでエタノール系列で脱水し, 酸化プロピレン置換後エポン812に包埋した. 超薄切片はPotter-Blum MT-2B ウルトラミクロトームにて作製し, 2%酢酸ウラニウム, Reynolds のクエン酸鉛による電子染色を行なった.

フリーズフラクチャー用試料としては, グルタルアルデヒド固定及び未固定のもの, 氷晶防止剤としてグリセリンを添加したものと無添加のものを互いに比較検討した. その結果, いずれの場合もフラクチャー面に差異は認められず, 未固定, グリセリン無添加のものが最も像が鮮明なため主としてこの方法を採用した. つまり, 洗浄後の細胞沈渣をそのままフリーズフラクチャー用試料台にのせ液化窒素 (真空ボ

ンプで吸引し固型化したもの) 中で急速凍結を行なった。その後FD-2(EIKO)を用い -110°C にて割断し、プラチナ、カーボンでレプリカを作成した⁶⁾。電子顕微鏡観察にはH-500(HI-TACHI)を使用した。

結 果

親株の超薄切片像においては細胞膜の外側に厚い細胞壁が存在していた。分裂途中のものは隔壁が形成されており細胞質中央部には核域が観察された(図1)。L型菌は超薄切片像においては $0.2\ \mu\text{m}$ から $10\ \mu\text{m}$ 程度の大きささまざまな細胞が存在していた(図2, 3)。しかしどの細胞においても細胞質膜が直接外界に接しており細胞壁は全く存在していなかった。細胞内電子密度においてもさまざまな細胞が存在しており電子密度の高いものから非常に低いものまで存在し、一般的には中型細胞($0.4\ \mu\text{m}\sim 4\ \mu\text{m}$)は電子密度が比較的高く、大型細胞($4\ \mu\text{m}$ 以上)は低下する傾向にあった。小型細胞($0.2\sim 0.4\ \mu\text{m}$)においては電子密度は非常に高いものとかかなり低いものに分けられる傾向が強かった。なお核域は中型および大型細胞においては明瞭でありクモの巣状の核物質が認められたが、小型細胞においては核域は明瞭ではなかった。大型細胞(図3)においては細胞質内に明らかに二重膜によって形成された空胞が存在し、その空胞中には小型及び中型細胞が存在していた。

次にフリーズフラクチャー法による観察結果を示す。親株ではP面に非常に高い粒子密度を有しており、平滑の面はほとんど存在していなかった(図4)。これに反してE面は粒子が非常に粗であり平滑な面が観察される。

L型菌のフリーズフラクチャー観察においては粒子密度の高いP面における比較検討を行なった。

L型菌のフリーズフラクチャー面においては親株に比しかなりの粒子密度を有するものからほとんど粒子の存在しないものまで色々な細胞が存在した。図5, 6にはL型菌中最も粒子密度の高いものを示した。図7, 8, 9には順次粒子密度が低くなっているフラクチャー面を示した。図8においては粒子密度の低下とともに

残存粒子が凝集している典型的な像が観察される。しかもその残存粒子の分布は一様ではなかった。そして図9のフラクチャー面のようにほとんど膜粒子は観察されなかったものもある。細胞の大きさと粒子密度の相関を見ると、中型細胞は一般に粒子密度が高いものが多く、大型細胞では粒子密度が低いものが多く観察された。小型細胞においては図10に示すように大部分の細胞のP面、E面双方とも膜粒子はほとんど存在しなかった。

一方細胞質内空胞のフリーズフラクチャー面をみると、P面の粒子密度は不均一であるが粒子密度の高いものは稀でありほとんどのものは粒子密度は非常に低かった(図11, 12)。

考 察

L型菌の分裂および増殖細胞の解析についてはいまだ充分ではない^{1),7)-9)}。江田らは超薄切片法による解析により、L型菌の分裂を二分方式、出芽方式、大型細胞内空胞中での娘細胞増殖方式の3つに大別している¹⁾。また最小増殖単位細胞の大きさについては、各種 pore size の filter を培地上におきその上にL型菌を接種し、filter 下に観察される集落形成より解析がされている。これによると $0.2\ \mu\text{m}$ 以下の pore size の filter では filter 下にはほとんど集落が出現してこない。従って $0.2\ \mu\text{m}$ 程度の細胞は増殖能力がないと考えられている。これらの事は超薄切片法による形態観察でも裏付けがなされている⁷⁾⁸⁾。

ところで本研究の目的は、L型菌細胞膜を極力 artifact の少ないフリーズフラクチャー法で観察し、しかもこの膜構造と今まで超薄切片法などに立脚して通説とされている増殖活性との間の相関性を検討することにある。従って細胞構造を維持している大中小のL型菌細胞膜をシリーズ的に比較観察する必要がある。しかしL型菌は液体培養菌でも、固形培地上の集落菌でも多少こわれた細胞および膜片が混入していることが多い。このため単に集菌沈渣のフリーズフラクチャー面だけの観察ではこわれたL型菌の細胞膜像が含まれる可能性が多い。従ってこのような事を避けるためには、図6に示すような

細胞質および膜フラクチャー面が同時に観察される細胞に限定するのがよい。極力このことを念頭におきながら膜フラクチャー面の解析を行なった。ただし観察しやすいため図には膜面のみのフラクチャー面を示した。

超薄切片像において中型細胞は細胞内電子密度が高く、かつ核域が明瞭である事から増殖活性は高いものと考えられてきた。フリーズフラクチャー法による解析で中型細胞の膜はP面膜粒子密度が最も高く均一に分散している。超薄切片像との総合判定から蛋白合成も活発に行なわれ、膜 assembly もスムーズであると考えられる。これに比べ大型細胞は超薄切片像で細胞内電子密度も平均して低く、かつ膜粒子密度も低く不均一であった。従って大型細胞では膜タンパクの合成もしくは取り込みが阻害されており、一方で膜脂質の合成は残存しており、両者の assembly のバランスがくずれていると考えられる。この大型細胞は分裂、増殖能力は低くいずれは退行的に破壊されるものと思われる。一方小型細胞は超薄切片像では細胞内電子密度の高いもののがかなり存在するが核域は明瞭でない。フリーズフラクチャー法では膜粒子はほとんどの細胞で粗であり平滑の面が多く見られる。従って小型細胞もほとんど増殖能力はないと考えられ、小 pore size filter 通過によって増殖がほとんど見られない結果とよく一致している。

結局L型菌は中型細胞が増殖、分裂の中心をなしており、何らかの要因で大型細胞化したも

のや発芽などにより形成された小型細胞は増殖能力はあまりないと考えられる。ただし大型細胞中の空胞内には小型および中型細胞が存在しており、時に大型細胞の死滅後の ghost cell 中に中型細胞が密集して存在するのが超薄切片像で観察される。これらの細胞は増殖能力があるという説があるので、これらの細胞の膜粒子解析がまたれる所である。

本観察においては空胞膜そのもののフラクチャー面は観察され、その膜粒子密度は平均して低いことが判明した。しかし空胞内細胞のフラクチャー面は得られず、今後フラクチャー条件等を検討しこの点を明らかにする予定である。

結 語

Staphylococcus aureus 209 P-L 株を使用し、L型菌のフリーズフラクチャー法による膜粒子の解析を行なった。その結果中型細胞 ($0.4\sim 4\ \mu\text{m}$) が最も高く、均一な粒子密度を有している。超薄切片像の結果と合わせて考えるとこの細胞群が最も活発に分裂、増殖を行なっていると考えられる。大型細胞 ($4\ \mu\text{m}$ 以上) は膜粒子密度も低くかつ不均一であるため分裂、増殖能は低くいずれ死滅するものと考えられるが細胞内空胞中の細胞についてはいまだ不明である。小型細胞 ($0.2\sim 0.4\ \mu\text{m}$) は膜粒子をほとんど有せず増殖能はないものと考えられる。

文 献

1. 江田亨: 細菌 L-form の微細構造, 電子顕微鏡 17, 233—242, 1983.
2. Wyrick, P.B. and Gooder, H.: Reversion of *Streptococcus faecium* cell wall-defective variants to the intact bacterial state. In *Spheroplasts, Protoplasts and L-Forms of Bacteria*. Edited by J. Roux, INSERM, Paris, 59—88, 1976.
3. Dienes, L.: Morphology and reproductive processes of bacteria with defective cell wall. In *Microbial Protoplasts, Spheroplasts and L-Forms*. Edited by L.B. Guze, 74—93, The Williams & Wilkins, Baltimore, 1968.
4. Williams, R.E.O.: L-forms of *Staphylococcus aureus*. *J. Gen. Microbiol.* 33, 325—334, 1963.
5. Eda, T., Kimura, Y., Mori, C. and Kimura, S.: Extracellular membranous structures in a stable L-form of *Staphylococcus aureus*. *J. Gen. Microbiol.* 103, 189—191, 1977.
6. Akahori, H. and Watahiki, T.: Prototype of freeze-drying and vacuum evaporation apparatus. *J.*

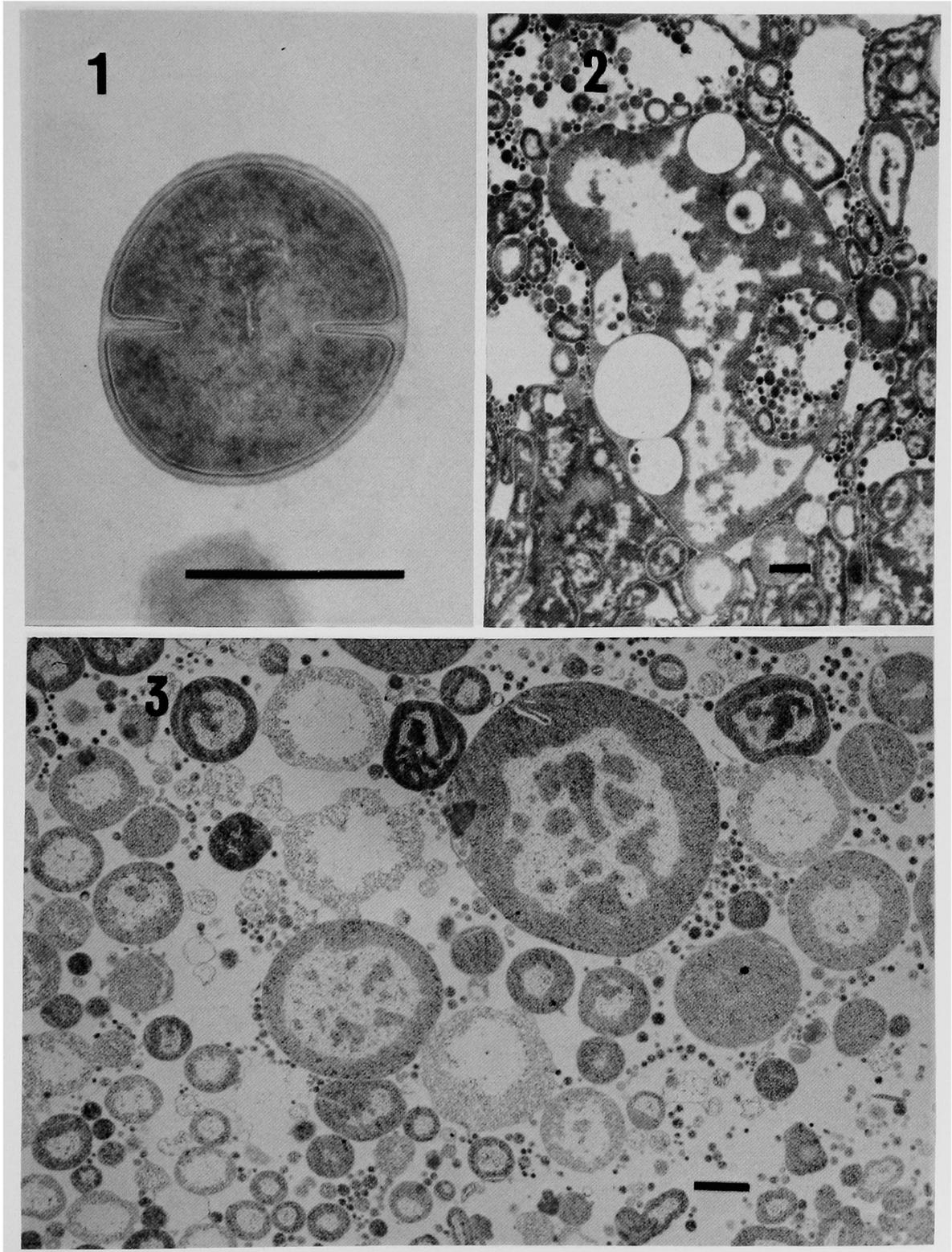
Electron Microsc. 26, 61, 1976.

7. Takahashi, T. and Tadokoro, I.: Staphylococcal L-colonies grown on and through membrane filter with various pore sizes. *Jpn. J. Exp. Med.* 49, 355—360, 1979.
8. Okuda, K., Takahashi, T., Tadokoro, I. and Eda, T.: Studies on the minimum reproductive unit of Staphylococcal L-forms. *Microbiol. Immunol.* 21, 1—10, 1977.
9. Molander, C.W., Weinberger, H.J. and Kagan, B.M.: Growth of Staphylococcal L-forms on and through membrane discs of various pore sizes. *J. Bacteriol.* 89, 907, 1965.

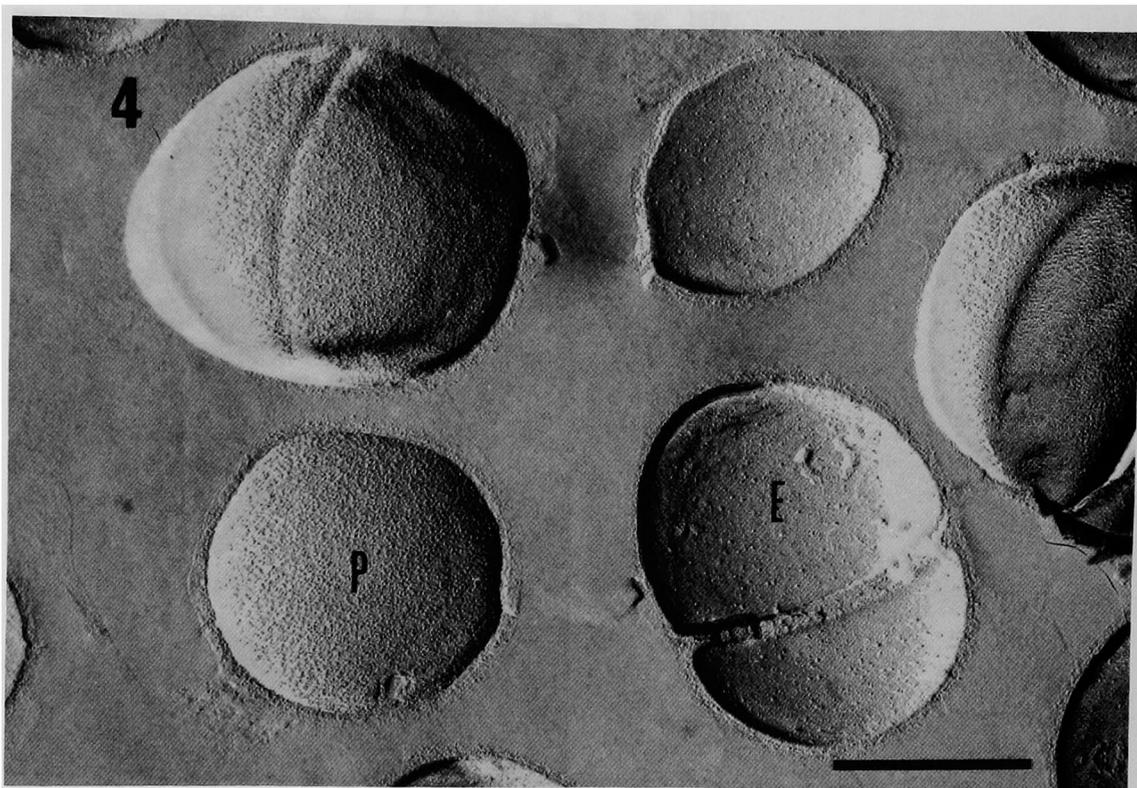
付 図 説 明

- 図1. *Staphylococcus aureus* 209P 株 (親株) の超薄切片像 (スケールは0.5 μm)
- 図2. *Staphylococcus aureus* 209P-L 株 (L型菌) の超薄切片像, 空胞および空胞内細胞を有する大型細胞を示す。 (スケールは1 μm)
- 図3. L型菌の超薄切片像, 大きささまざまな細胞群を示す。 (スケールは1 μm)
- 図4. 親株のフリーズフラクチャー像, P面には膜内粒子が均一に存在しており, E面には粒子は粗に存在している。 (スケールは0.5 μm)
- 図5. L型菌のフリーズフラクチャー像, P面, E面とも親株と同じ膜内粒子の分布および密度を有するフラクチャー面を示す。 (スケールは0.5 μm)
- 図6. L型菌のフリーズフラクチャー像, 同一細胞のフラクチャー面においてP面, E面および細胞質が観察される。 (スケールは0.5 μm)
- 図7. L型菌のフリーズフラクチャー像 (P面), 膜内粒子は比較的均一であるが密度は親株に比べて低下している。 (スケールは0.5 μm)
- 図8. L型菌のフリーズフラクチャー像 (P面), 膜内粒子は密度がかなり低下しており, 不均一に凝集をおこなっている。 (スケールは0.5 μm)
- 図9. L型菌のフリーズフラクチャー像 (P面), 膜内粒子はほとんど存在せず, 一部に凝集している。 (スケールは0.5 μm)
- 図10. L型菌のフリーズフラクチャー像, 小型細胞のフラクチャー面を示す, P面, E面とも膜内粒子は観察されない。 (スケールは0.5 μm)
- 図11. L型菌のフリーズフラクチャー像, 細胞質が割断されて中の空胞膜のフラクチャー面が観察される, P面を見ても粒子密度がかなり高いものとほとんどないものが存在する。 (スケールは0.5 μm)
- 図12. L型菌のフリーズフラクチャー像, 図11と同じく空胞膜のフラクチャー面が観察される, P面の粒子密度はかなり低い。 (スケールは0.5 μm)

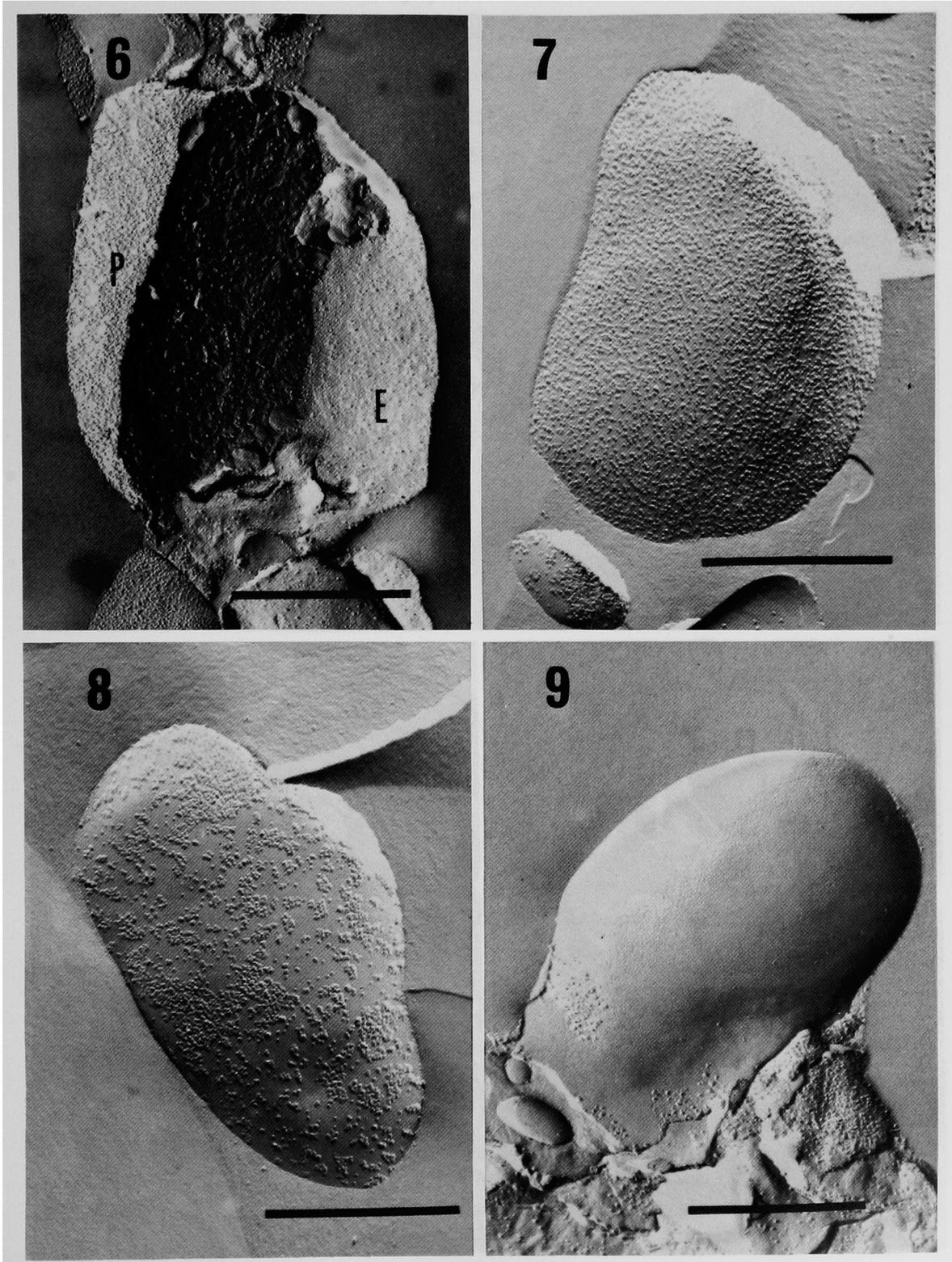
平井義一他5名論文附図



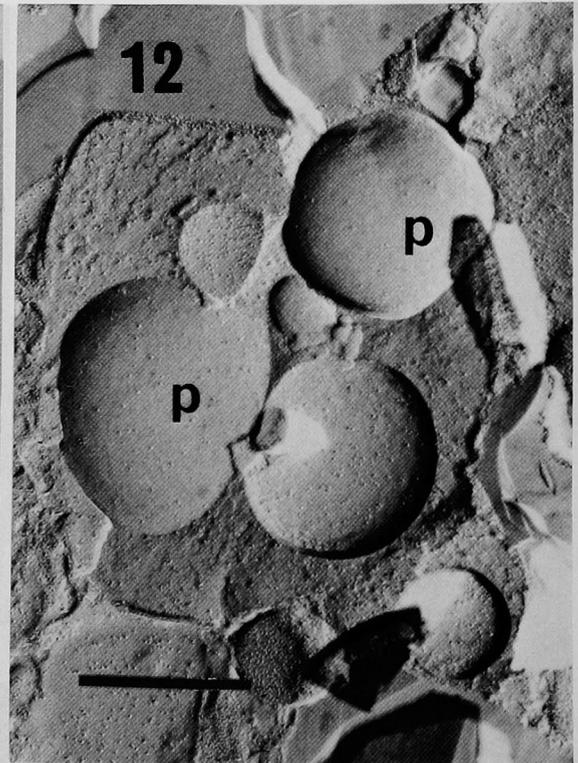
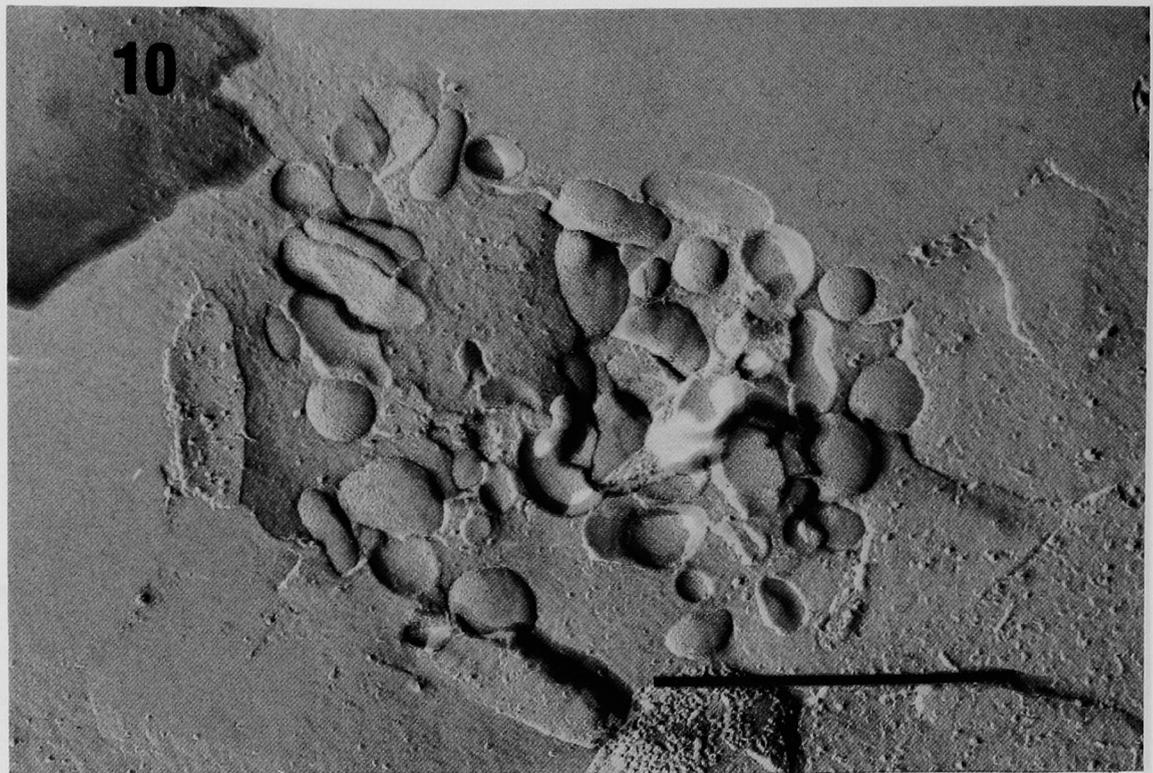
平井義一 他5名論文附圖



平井義一他5名論文附図



平井義一他5名論文附図



**Ultrastructure of Staphylococcal L-form cell membrane
by freeze-fracture replica**

**Yoshikazu HIRAI, Tomoaki NAKAMURA, Tomohisa KANATANI,
Kentaro SHIDA, Akihiro FUKUHARA and Yasuhiro KANEMASA**

Department of Microbiology, Okayama University Medical School

L-form cells are generally pleomorphic and show variety in size ranging from 0.2 μm to more than 10 μm in diameter. We investigated the ultrastructure of the cell membrane of such variable L-form cells derived from *Staphylococcus aureus* 209P in terms of membrane particle distribution by freeze-fracture replica electron microscopy. The specimens were prepared by immediate freezing in liquid nitrogen without any chemical fixatives followed by freeze-fracture with Eiko FD-2. We focused on the structure of the P face only. The particles were densely dispersed on the cell membrane of medium-sized cells (0.4–4 μm). Large (>4 μm) and small (0.2–0.4 μm) cells showed very few particles. In conclusion, the medium-sized cells were growing actively, while large and small cells were not growing.