

パケット形成突然変異株を用いての 黄色ブドウ球菌分裂様式の研究

岡山大学医学部細菌学教室（主任：金政泰弘）

友 近 健 一 ・ 平 井 義 一

岡 部 昭 延 ・ 口 分 田 晃

金 政 泰 弘

（昭和54年3月23日受稿）

Key words : 黄色ブドウ球菌・菌分裂・クランプ形成

パケット形成・夾膜様構造物

緒 言

黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*, 以下ブ菌と略称する) は, その属名の由来からも明確なごとく, 菌の増殖に伴って不規則なクランプ (菌塊) を形成する (Bergy's Manual, 第8版)¹⁾. しかし, そのクランプ形成機構に関して, 決定的な解明は未だなされていない. 一般には, ブ菌が *Streptococcus* 属細菌とは異なり, 細胞分裂時における隔壁形成方向に一定の法則性がなく, 種々の方向へ生ずる結果, 菌塊がクランプ状 (又は, ブドウ房状) となると考えられていた.

近年, 本研究分野における走査電顕技術の進歩とその応用範囲の拡大により, 多くの情報が蓄積されつつある. Koyama et al. は, ブドウ房状配列に成る原因を次のように説明している. すなわち, 分裂面は必ず直交する三平面に生ずるが, 隔壁の開裂後, 細胞相互の位置移動 (分離過程) が自由になるためであるとしている. 又, Amako et al. は, 高分解能走査電顕による形態観察の結果, 隔壁形成は前分裂面に直角の方向に起こるけれども, 隔壁形成後の娘細胞開裂が偏心的に一方から行われ, 対側が最後まで連絡を保つためにクランプを作るに至ると述べている.

何れにしても, ブドウ房状クランプ形成には, 隔壁形成以後の事象が重要な因子となることが示唆されている. このたび, 著者らは細胞分裂の様相が親

株と極端に異なり, 細胞塊がパケット状で, コロニーも極めて粗礎である変異株を単離した. この変異株の隔壁形成と細胞開裂の進行との関連, 又その時に働くであろう生化学的機序の異同等を精査すれば, 細菌分裂における新たな知見が得られるものと期待している. 本報はこの変異株の形態に対する電顕観察の結果を報告する次第である.

材料及び実験方法

供試標準株及び突然変異株単離法: 教室保存の *Staphylococcus aureus* 209P を標準親株とし, ことわりのない限り平板培養は普通寒天培地, 液体培養はブイヨン培地で培養した. パケット形成突然変異株は次の手順に従って単離した. 37℃で液体培養した親株を後期対数期で集菌, 50mM 酢酸緩衝液 (pH 5.0) で2回洗浄し, 同一緩衝液に再懸濁する. この菌懸濁液に200 μ g/ml の N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine を添加し, 暗所, 37℃条件下で50分間作用せしめる. その後3回ブイヨン培地で洗浄し, 同培地に再懸濁し28℃に10時間置き, 続いて1単位/ml のペニシリンGを添加し42℃に移す. 12時間のインキュベーション後に菌液0.1 mlを平板培地に塗布し, 30℃で培養後生じたコロニーを用いて温度感受性テストを行なって高温感受性突然変異株を単離した.

走査型電子顕微鏡観察: 細胞は2回生理的食塩水で洗浄後, 2.5%グルタルアルデヒド含有150

mMリン酸緩衝液(pH7.2)に懸濁し、0℃で2時間固定を行なった。固定後、アルコール系列で脱水、酢酸イソアミルで置換して、臨界点乾燥を行なった。白金-パラジウム蒸着後日本電子 JSM U-3 走査型電子顕微鏡で検鏡した。

超薄切片観察：上記方法で洗浄した細胞を2.5 % グルタルアルデハイド・1 % オスミック酸の二重

固定後、アルコール系列で脱水し、エポキシ樹脂に包埋した。超薄切片試料は、電子染色を施し、日立 H-500 透過型電子顕微鏡で観察した。

結 果

変異株 (ts 250) の生物学的性状：単離したパッケージ形成変異株の生物学的性状を表1に示した。ts

表1 親株及びパッケージ形成変異株 (ts 250) における生物学的性状の比較

	各培養温度における増殖性			10%食塩存在下での増殖性	マンニット分解能	コアグラゼ産生能
	30°	37°	42°			
親 株	++	+++	+++	+	+	+
ts 250	++	+	±	+	+	±

250は、42℃でほとんど増殖しなかったが37℃では、かなり良く増殖した。生物学的性状では、耐塩性、マンニット分解で親株と同一結果を示した。しかし、コアグラゼ活性はほとんど認められなかった。図1は、親株及び ts 250 の振盪培養された菌液を静置した時の沈降状態を経時的に示したものである。親株では観察した時間内で沈降は全く認められなかった。しかし、ts 250 では静置後15秒で培養液上部に透明域が現われ、3分後にはほとんど全ての細胞塊が沈降した。光学顕微鏡による観察でも、親株では一個のクランプを構成する細胞数は20~30であったが、ts 250 では個々のパッケージを構成する細胞数が数百を越えていることが認められた。

図2は平板上におけるコロニーの形状を示した。親株のコロニーは、その辺縁が円形で、ドーム状隆起を示し表面は極めて平滑であった。しかし、ts 250 は同程度の大きさのコロニー形成するものの、辺縁は不整で不規則な隆起を示し、表面は粗大顆粒状であった。この ts 250 のコロニー形態は、培養温度と関係なく30℃でも37℃でも観察された。このことは、パッケージ形成変異自体は高温感受性とは直接関係ないと思われる。また図2B及び2Cの矢印で示されるごとく低頻度ながら露滴状コロニーへの復帰も観察され、本変異が突然変異の結果生じた事を強く示唆している。

走査電子顕微鏡観察：普通寒天培地に30℃の条件で生育した親株及び ts 250 のコロニー形態を観察

した。図3に示すごとく、親株のコロニーは、円形で中央部が高く盛り上がっている。コロニーを構成する細胞は、均一性が保たれ個々に分離した球菌で占められている。強拡大像(図3D)で細胞間に繊維状の構造物が認められたが、これは多分、粘液物質に由来した物と思われる。個々の菌体表層は全く無構造平滑であった。図4は ts 250 のコロニーを示したものであるが、不整粗大構造をしていた。倍率を上げて観察すると細胞分離が強く抑制され、細胞間境界が不明瞭な4~8個の細胞パッケージの重積された像が観察された。細胞表層は密なしわ状、強拡大では不規則突起状を呈していた。

超薄切片観察：パッケージ形成は細胞表層の異常に起因している可能性が示唆されたので、超薄切片試料を用いて表層の微細構造の観察を行なった。細胞は液体培地中で振盪培養により増殖したものを使用した。図5及び図6に示したごとく、親株と ts 250 の両者の表層構造には非常に明確な差異があった。親株は走査電顕像で観察された滑らかな細胞外観に良く対応して、一様に分離独立した細胞であり、細胞表層も均一な壁層構造を有していた。また分裂中の細胞を除けば細胞間相互に連絡はなく、細胞全体の形状もほとんどが正円状であった。一方、ts 250 の表層構造は走査電顕像からも予想された様に著明な変化が存在する。図6に示されたごとく、4~8個の細胞が一群で存在しており、また個々の細胞の構造も親株とは明確に異なっていた。最も顕著な変

化は、細胞壁とその外側に存在するネットワーク状あるいは突起状の構造物にある。細胞壁の染色性は低下し、厚さは親株の1.5倍程度増していた。さらに細胞壁とその外側の夾膜状構造物との境界は明瞭でない。この夾膜状構造物はネットワーク状のもの(図6A)と突起状のもの(図6B)の2種に分けられた。隔壁の形成によって原形質は完全に分離しているが、その後の細胞の分離が進行せず、2~4個の細胞集団が肥厚した細胞壁に閉じ込められた像が見られた。しかもこの細胞集団間には遊離せず、従って増殖経過が追跡され得る。ts 250の細胞では、高頻度で異常な細胞分裂像や隔壁像が観察された。一方、ts 250の細胞形状が若干正円形とは異なる点を除いて、親株とts 250の両者ともに細胞膜以内の構造には特別な変化が認められなかった。

考 察

細菌における細胞分裂様式は、菌種により多くの特徴があり、結果として各菌種は特徴的な細胞配列を有するようになる。近年電子顕微鏡技術の進歩によって、細菌細胞の微細構造に関する知見は飛躍的に増加して来た。

Amako et al.^{2,3)}, Tzagoloff et al.⁴⁾による研究によって、ブ菌の隔壁の出現様式とクランプ形成過程の関係が若干明らかとなった。彼らによれば、細胞分裂後における細胞の分離過程に起因してクランプが形成されることになる。一方、我々の単離したパケット形成変異株は、細胞分裂後における細胞の分離が細胞壁外側の夾膜様構造物によって障害されており、そのために正常なコロニー形成が困難であることが示唆された。従って本変異株における夾膜様構造物の存在と親株における菌の分離様式との因

果関係を考えることは、ブ菌におけるクラスター形成過程解明の重要な手掛りを与えるものと思われる。

ブ菌におけるパケット形成変異株は、Koyama et al.⁵⁾によっても報告されている。彼らの単離した変異株のパケットは、8~64個の細胞から構成されており、我々の単離した変異株のパケットとはその構成細胞数において明確に異なっていた。彼らは、SDS や Tritonx-100 処理によりパケット形成が誘導されることや、これら界面活性剤で誘導したパケットが彼らの単離した変異株のパケットに類似する点で、この変異が“packet separation enzyme(s)”の活性消失により現われると推論している。このように自己融解酵素が細胞分裂とそれに続く細胞の分離に重要な役割を荷なうことは明白である^{6,7,8)}。本報で述べたts 250のパケットは、Koyama et al.⁵⁾の報告にあるパケットとは細胞壁外側の夾膜様構造物が存在する点で異なっている。

かつて細胞表層の変化に起因して不規則配列のパケット形成を誘発する変異株がChatterjee et al.⁹⁾によって単離されている。その変異株は、ほとんど全てのバクテリオファージ感染に対して耐性を有していて、ファージに対するレセプターの消失から細胞表層の変化が示唆されているものである。しかも、この変異株の自己融解酵素活性は親株に比べて、数倍も高く、パケット形成に融解酵素失活が寄与することは否定されている。我々の単離した変異株も細胞表層に変化を起している点で、上記変異株に類似したものと思われる。

今後パケット形成変異株を用いての細胞壁合成あるいはその融解過程を研究することによって、細胞分裂機構の細胞学的、生化学的解明が期待できるものと確信している。

文 献

1. In "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8Ed." Ed. of Buchanan, R.E., and Gibbons, N.E. pp. 483-489, 1974. The Williams and Wilkins Co., Baltimore.
2. Amako, K., and Umeda, A.; An improved method for observation of bacterial growth using the scanning electron microscope. J. Electron Microsc., 26, 155-159, 1977.
3. 天児和暢：高分解能走査型電子顕微鏡の微生物学への応用。電子顕微鏡, 12, 29-35, 1977.
4. Tzagoloff, H., and Novick, R.: Geometry of cell division in *Staphylococcus aureus*. J. Bacteriol., 129, 343-350, 1977.
5. Koyama, T., Yamada, M., and Matsushashi, M.: Formation of regular packets of *Staphylococcus aureus* cells. J. Bacteriol., 129, 1518-1523, 1977.

- 6 . Forsberg, C., and Rogers, H.J.: Autolytic enzymes in growth of bacteria. *Nature*, **229**, 272-273, 1971.
- 7 . Huff, E., Silvermann, C.S., Adams, N.J., and Awkard, W.S.: Extracellular cell wall lytic enzyme from *Staphylococcus aureus*: Purification and partial characterization. *J. Bacteriol.*, **103**, 761-769, 1970.
- 8 . Chatterjee, A.N., Wong, W., Young, F.E., and Gilpin, R.W.: Isolation and characterization of a mutant of *Staphylococcus aureus* deficient in autolytic activity. *J. Bacteriol.*, **125**, 961-967, 1976.
- 9 . Chatterjee, A.N., Mirelaman, D., Singer, H.J., and Park, J.T.: Properties of a novel pleiotropic bacteriophage-resistant mutant of *Staphylococcus aureus* H. *J. Bacteriol.*, **100**, 846-853, 1967.

図1. 親株及び ts 250 の液体培養細胞の沈降性の比較。

細胞は37℃で振盪培養された。培養液を垂直に静置した後の細胞塊の沈降を経時的に追った。

A: 親株

B: ts 250

図2. 親株及び ts 250 の平板培地上におけるコロニー形態。

写真は培地上のコロニーを接写撮影したものである。正常なコロニーで観察される白点は撮影に使用したライトの反射である。

A. 30℃で増殖した親株の露滴状コロニー。

B. 30℃で増殖した ts 250 の粗糙コロニー。

C. 37℃で増殖した ts 250 の粗糙コロニー。

図B及びCにおける矢印は復帰突然変異を起したコロニーを示す。

図3. 平板培地上に30℃条件で増殖した親株コロニーの走査電顕像。

A: × 220

B: × 2,200

C: × 7,300

D: × 22,000

図4. 平板培地上に30℃条件で増殖した ts 250 コロニーの走査電顕像。

A: × 220

B: × 2,200

C: × 7,300

D: × 22,000

図5. 液体培養した親株の超薄切片像。

A: ×20,000

B: ×40,000

図6. ts 250 で観察される2種の夾膜様構造物の比較。

A: ネットワーク様構造物,
×40,000

B: 突起様構造物,
×40,000

友近健一他論文附図

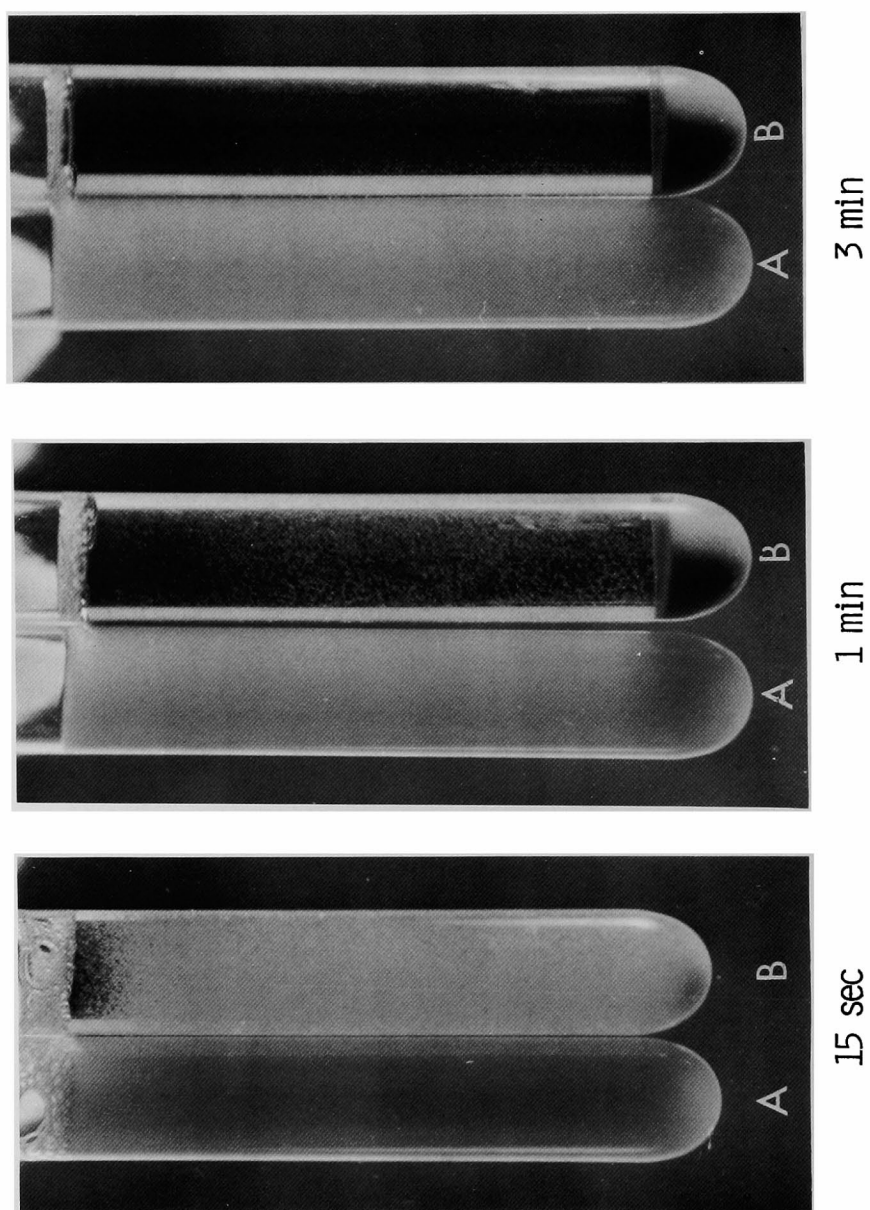


図 1

友 近 健 一 他 論 文 附 図

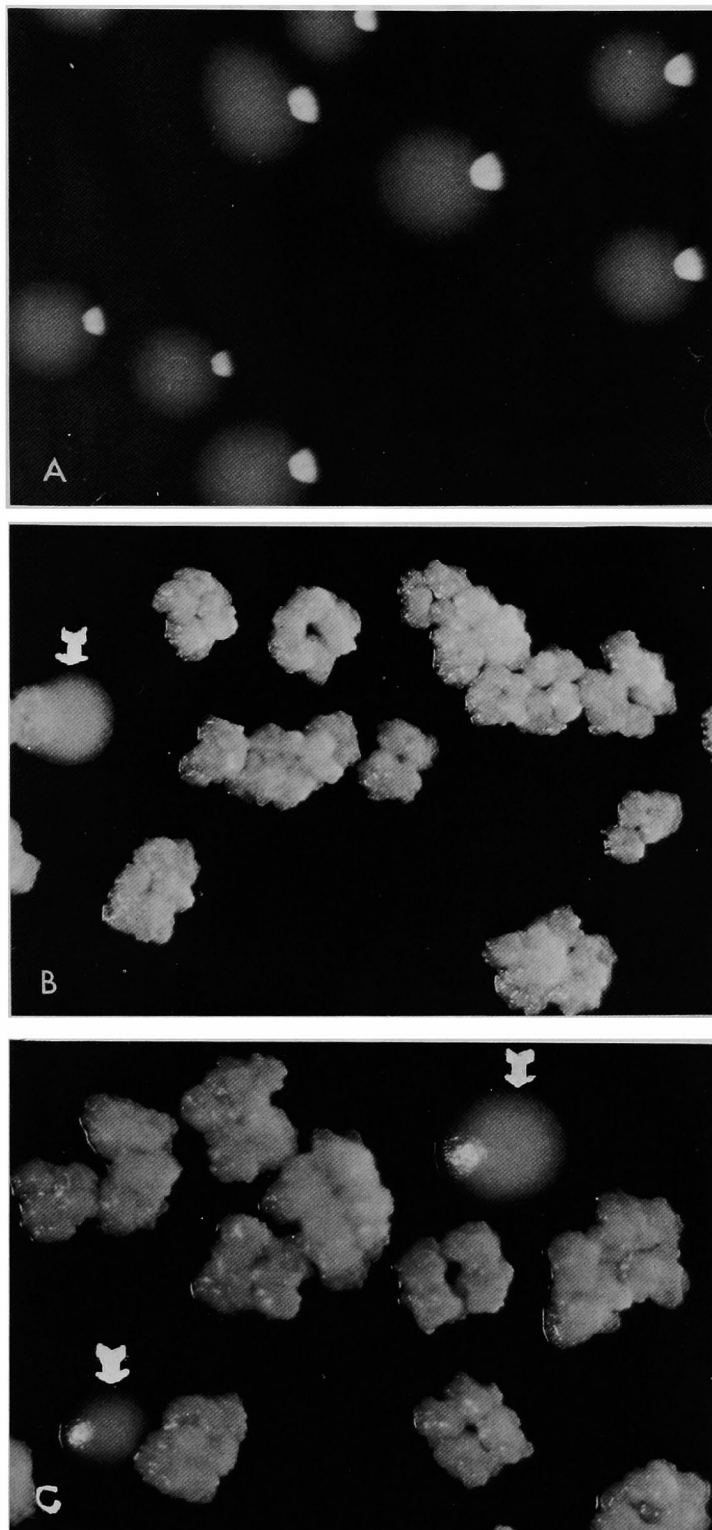


図 2

友 近 健 一 他 論 文 附 図

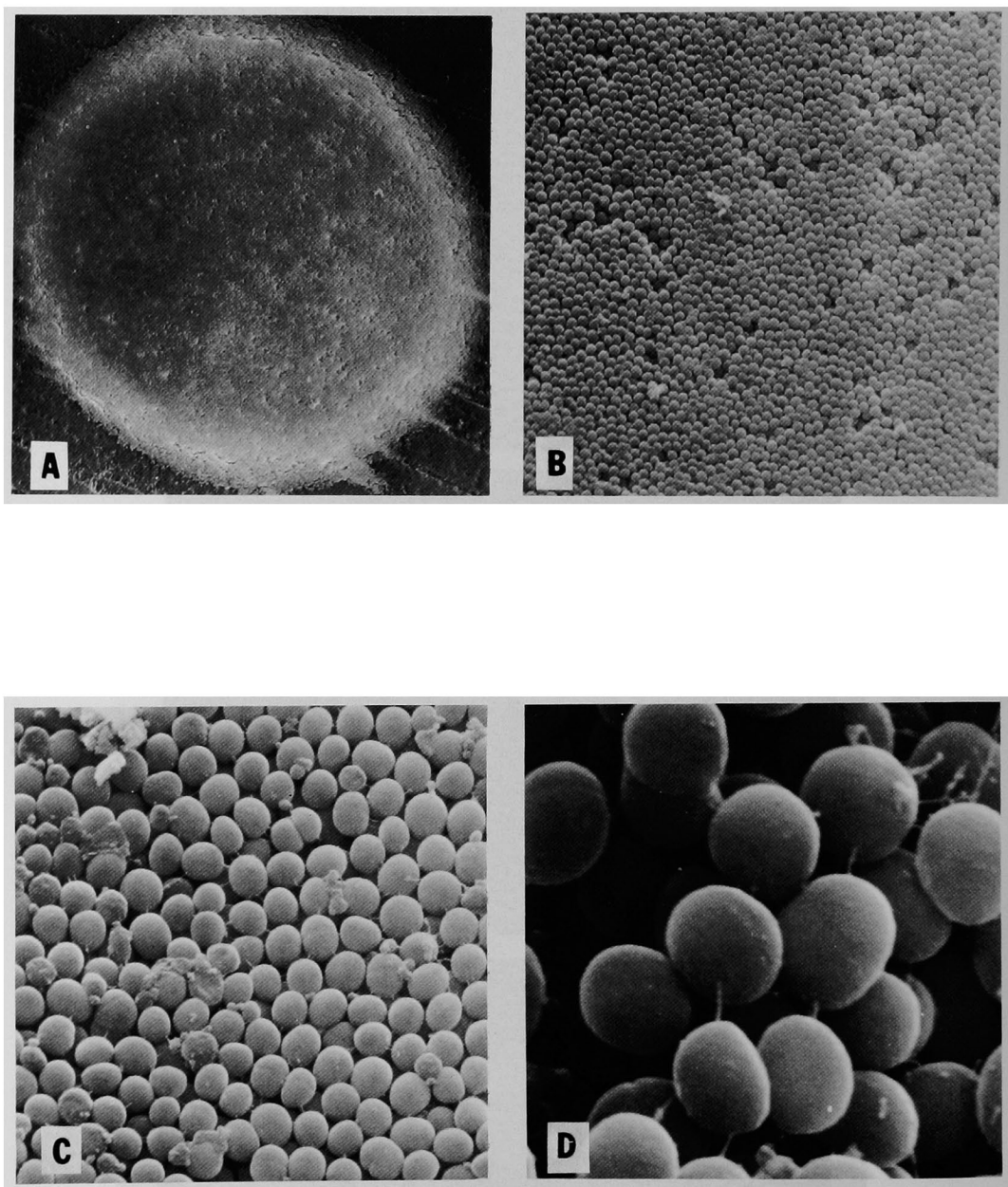


図 3

友 近 健 一 他 論 文 附 図

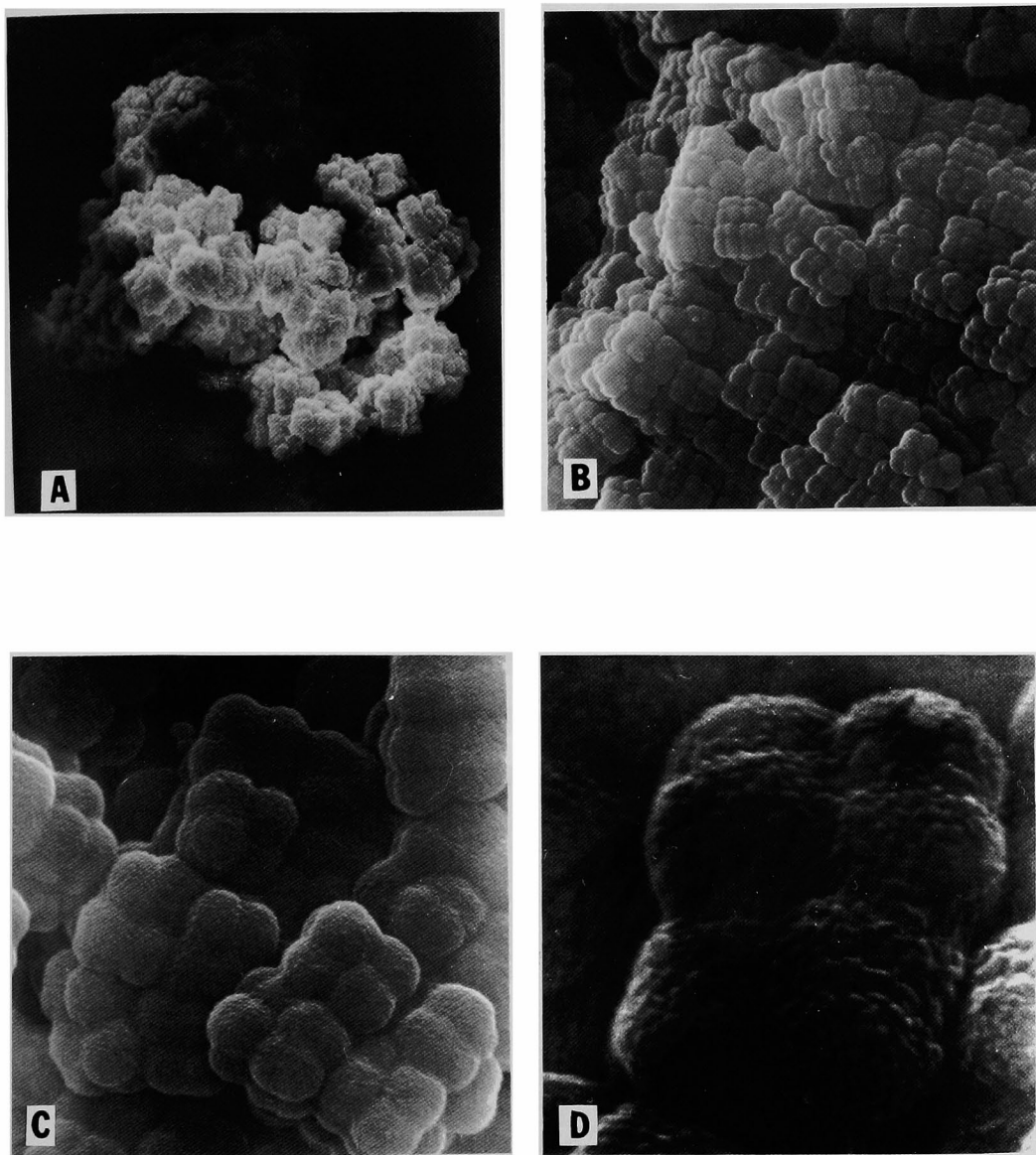
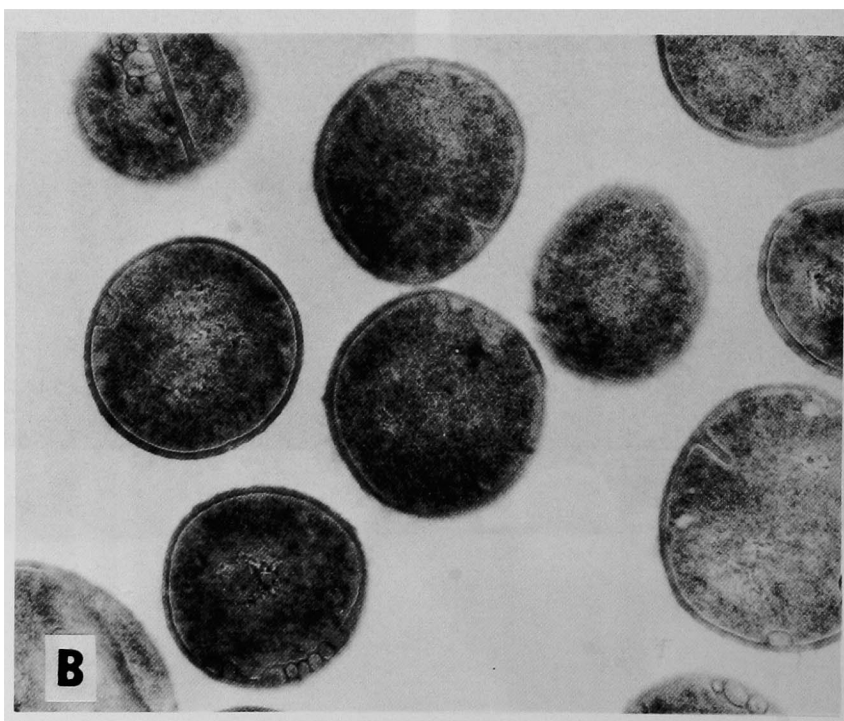
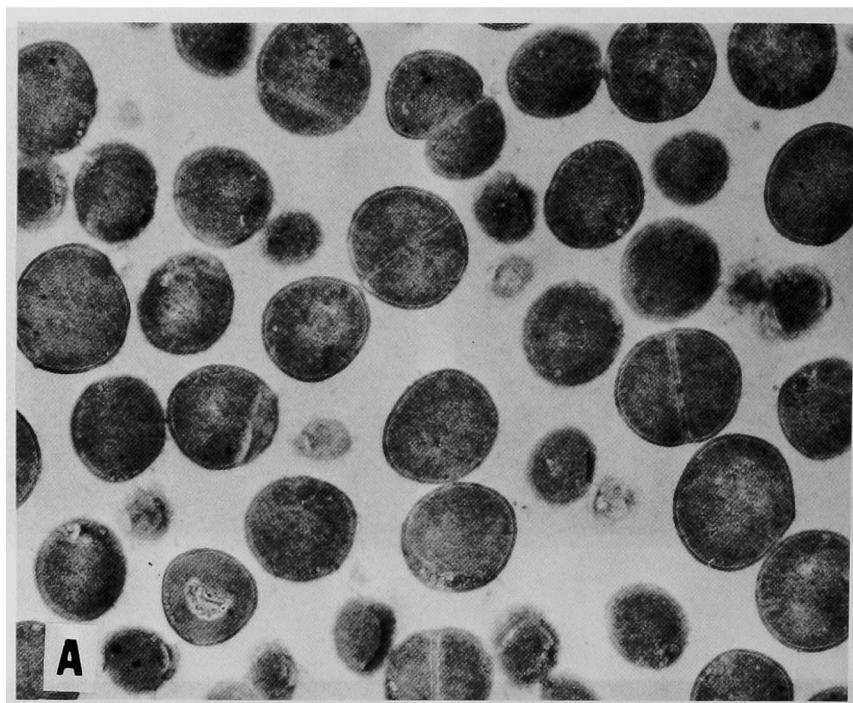


図 4

友近健一他論文附図



友 近 健 一 他 論 文 附 図

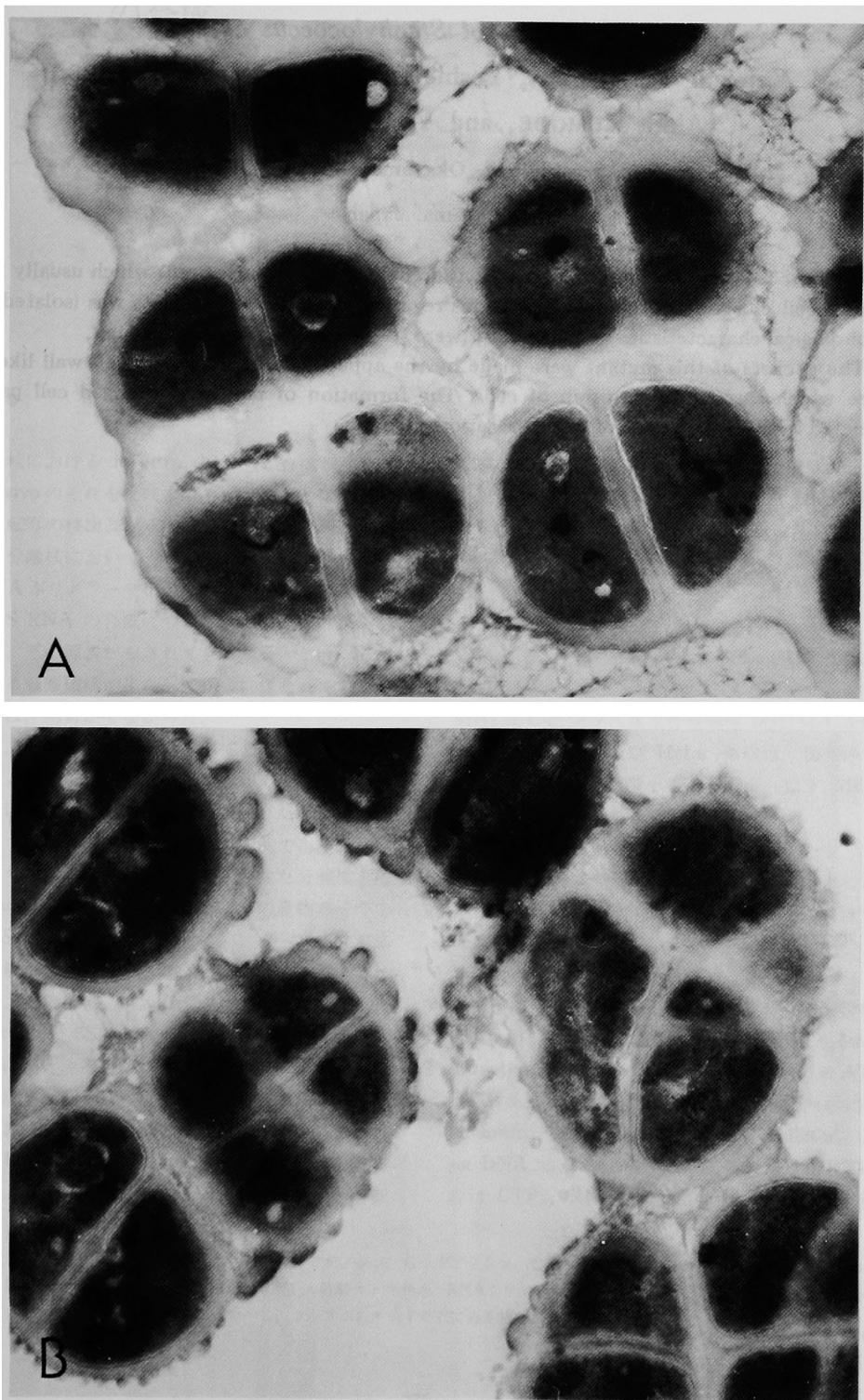


図 6

**A morphological observation on the regular packet
forming mutant of *Staphylococcus aureus***
Ken-ichi TOMOCHIKA, Yoshikazu HIRAI, Akinobu OKABE,
Akira KUMODE, and Yasuhiro KANEMASA
Department of Microbiology, Okayama University Medical School,
Okayama, Japan

In order to study the process of cell division in *Staphylococcus aureus* which usually forms irregular cell clusters, a mutant which forms regularly arranged cell packets was isolated. The morphological characteristics of this mutant were studied by electron microscopy.

The packets of this mutant were made by the appearance of thickened cell wall like substance which surrounded a group of cells. The formation of regularly arranged cell packets originated in the disturbance of cell segregation.