総 説

皮膚糸状菌細胞壁形成における微細構造の解析

大 隅 正 子

日本女子大学理学部物質生物科学科 大学院理学研究科

要 旨

真菌の細胞壁は細胞の遺伝的形態を規定・保持し、物質の細胞内への取り込みや輸送に重要な役割を有している。細胞壁の形成機序については、筆者らによりプロトプラストからの再生系のモデルとして分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* を用いて解析されているが、皮膚糸状菌によるこの種の研究はこれまでに行われていない。そこで、*Trichophyton mentagrophytes* のインタクトなプロトプラストの単離法を確立し、その細胞壁の再生過程を電子顕微鏡を用いて解明した。プロトプラストの表面は、不定形（約 60 nm ϕ ）の粒状を呈していた。SG 寒天培地による再生 3 時間後に、プロトプラストの全面に網目状の繊維構造が現れ、6 時間でプロトプラストは少し膨潤（酵母における “shomoo” の形態）し、やがて菌糸に伸長し始め、15–18 時間では数珠状に伸長した菌糸が観察され、その表面は網目で覆われていた。やがて網目の間に間質物質が現れ、次第に網目を覆い、21 時間を過ぎると、数珠状の菌糸から突如正常な菌糸が出現した。その表面は、通常に培養して発育した菌糸と同様な、微小粒子で覆われていた。この再生過程において観察された網目繊維はグルカンとキチンから構成されていると推定されるが、その構造は真菌の細胞壁形成過程でみられるリボン状のグルカンの網目とは異なり、鞘状（10–20 $\times$ 100–200 nm）とロープ状（20–30 nm ϕ ）を呈していた。この糸状菌のプロトプラストの再生は、2 ng/ml のラノコナゾールにより完全に阻止された。この結果とラノコナゾールの発育菌糸に及ぼす効果の研究から考察して、*Trichophyton* 菌糸の細胞壁の構造モデルを提案した。

Key words: プロトプラストの再生 (protoplast regeneration), 細胞壁の形成 (cell wall formation), 皮膚糸状菌 (dermatophytes), 電子顕微鏡学的研究 (electron microscopy), *Trichophyton mentagrophytes*

はじめに

細胞壁は細胞の遺伝的形態を規定し、保持するだけでなく、細胞機能に関して重要な責務を負っている。細胞壁はまた細胞の外界と接する最表層部位であり、物質の細胞内への取り込みや、反対に生体物質の分泌に、重要な役割を果たす。一方、細胞壁はヒトの細胞と唯一異なる構造であり、病原性の真菌がヒトの細胞に進入する時、細胞壁はその生体細胞と最初に応答する場であり、抗真菌剤と接触する最初の間でもある。従って、真菌の細胞壁の構造とその形成機構の解明は、細胞壁物質の合成、細胞内の物質の輸送と細胞外への分泌、細胞壁の高次構造を構築する機構などを知る手掛かりを与え、それにより医薬品の開発にも貢献する。

ところで、真菌のなかでも、*Saccharomyces cerevisiae* や *Candida albicans* の細胞壁については、古くから膨大な生化学的分子生物学的研究や (Klis¹⁻³) や Suzuki⁴) の総説) 電子顕微鏡学的研究 (Osumi の総説⁵) がなされてきたのに対して、皮膚糸状菌 *Trichophyton* については、研究例

が比較的になく、それらは 1970 年代に発表された北島ら⁶)、Poulain ら⁷) の総説に代表され、近年では鈴木らのグループ⁸) によって NMR による細胞壁多糖の研究があるのみで、電子顕微鏡学的研究はほとんどない。そこで、筆者らは、*T. mentagrophytes* の単離したプロトプラストの細胞壁の再生過程を電子顕微鏡を用いて解析したので、ここに紹介する。

1. *T. mentagrophytes* プロトプラストの単離と再生および電子顕微鏡観察用試料の調整

Sabouraud's glucose (SG) 寒天培地で 1–2 週間、27 °C で培養した *T. mentagrophytes* TIMM 2789 の菌糸の分生子を、 2×10^5 conidia/ml に調整し、同 SG 寒天培地で 24 時間培養後に、Novozym 234, chitinase, lysozyme をそれぞれ 1 mg/ml 含む、0.05 M リン酸緩衝液 (0.7 M KCl, pH 6.0) 中で 30 分間、30 °C で細胞壁を消化して、プロトプラストを単離した^{9, 10)}。

単離したプロトプラストは 0.6 M KCl を含む YPG 寒天培地で 3–42 時間培養した。採取した試料は、通常の固定・脱水・乾燥後にコーティングし、走査電子顕微鏡 (SEM) で、またはエポキシ樹脂に包埋して、透過電子顕微鏡 (TEM) で、観察した^{11, 12)}。

別刷請求先: 大隅 正子

〒112-8681 文京区目白台 2-8-1

日本女子大学理学部物質生物科学科

Fig. 1. SEM image of growing mycelia of *Trichophyton mentagrophytes* showing a straight form (a) and minute fine, amorphous and granular surface (b). a, $\times 7,500$; b, $\times 50,000$.

Fig. 2. SEM image of isolated protoplast showing rough granular surface. a, $\times 20,000$; b, $\times 50,000$.

2. *T. mentagrophytes* プロトプラストの再生過程における微細構造の変化^{9,10)}

1) 正常な菌糸の出現

24時間培養した *T. mentagrophytes* 細胞は、しなやかに菌糸を伸ばし (Fig. 1a), 細胞壁の表面は微細な粒状物質で覆われていた (Fig. 1b).

この細胞からのプロトプラストは球状で (Fig. 2a), その表面は約 30~50nm の粒子で覆われていた (Fig. 2b). このプロトプラストは、再生3時間後までの菌体形状および微細構造に変化が認められなかったが、6時間でプロトプラストは膨潤し、洋梨型 (*Saccharomyces cerevisiae* でいわれている “shomoo”) となり、細かい繊

維構造が表面を覆った (Fig. 3a). この繊維はグルカンとキチンの複合物質であると推定される³⁾.

再生時間の経過とともに、プロトプラストの一端が発芽管様に伸びて、未発達な菌糸状となった (Fig. 3b). この菌糸は数珠状を呈しながら伸長し (Fig. 3c-d), 15時間経過すると、さらにとぐろを巻くように発達した (Fig. 3e). 21時間を経過すると、この菌糸から突如正常な菌糸が枝別れし、以後は菌糸が正常に発達した (Fig. 3f, ←).

SEMによるこの観察は、TEM観察によって確認された。すなわち、Fig. 4aに示されるように、数珠状の菌糸は蛇のようにうねり、その細胞壁は薄い内層とルーズな繊維状の外層 (Fig. 4b, ←) とから構成されている。ま

Fig. 3. SEM image of regeneration of protoplast. a, c, $\times 7,000$; b, $\times 5,000$; d, $\times 1,500$; e, f, $\times 1,000$.

Fig. 4. TEM image of bead-shaped abortive mycelium. $\times 10,000$.

た、21時間後にはこの数珠状の菌糸の側面から、正常な菌糸が出現し (Fig. 5 a), 發育して隔壁が形成された (Figs. 4 a, $\rightleftharpoons$, 5 b, $\leftarrow$).

3. 再生過程における菌糸表層の微細構造

再生過程の菌糸表層を観察すると, Fig. 6 に示すように, プロトプラスト表面 (a) には微細な繊維がロープ状になりながら網目構造を形成している (Fig. 6b). これはグルカンとキチンの繊維が互いに捩れ合って構成していると考えられる. したがって, 分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* で観察された, リボン状のグルカン繊維のみの網目構造¹³⁻¹⁷⁾とは異なっていた. 先端にはこの網目構造はなく, プロトプラストの表面とはほぼ同様であるが (Fig. 3 b-d, $\leftarrow$), うねった状態を呈していた. 再生時間のさらなる経過に伴って, この網目構造は鞘状構造 (Fig. 6c) を呈し, その構造間に粒状の間質物質が出現した (Fig. 6d). この物質はさらに網目の間を埋め尽くし, やがて網目構造は下に隠れ (Fig. 6e), 正常な菌糸の表面の形状へと発達した (Fig. 6f).

4. *Trichophyton* 属菌糸細胞壁の微細構造

われわれはすでに *T. rubrum* の發育菌糸に及ぼす抗真菌剤ラノコナゾールの影響を調べた. *T. rubrum* の發育においてこの抗菌剤は, 菌糸の屈曲, 過剰分岐, 菌糸幅の不均一などをもたらすことに加えて, 菌糸細胞壁の剥

離や穿孔を起こすことを, 超高分解能低加速電圧走査電子顕微鏡 (UHR-LVSEM) 法¹⁸⁾を用いて観察した. しかも, 興味深いことに, この物質はアゾール系薬剤¹⁹⁾であるにもかかわらず, 極めて低い濃度で細胞壁に段階的な破壊を引き起こすことを, われわれは見出している¹²⁾.

その結果と今回の *T. mentagrophytes* のプロトプラストの再生における細胞壁形成過程とを合わせて, *Trichophyton* 属菌糸の細胞壁の構成モデルを提案することが可能となった.

1) 抗真菌剤ラノコナゾールの皮膚糸状菌の表層に及ぼす影響の観察¹²⁾

この糸状菌は菌糸を液体培地で培養することができるため, 低加速電圧領域 (1~3 kV) の分解能を向上させた UHR-LVSEM を用いて, 試料をコーティングしないで, 細胞の最表面を観察できる. 生物試料は導電性がないため, 走査電顕による観察には通常コーティングを必要とするが, ルテニウム酸で細胞壁の多糖を充分に固定すると, コーティングをしないで試料の観察が可能となる¹⁸⁾.

Fig. 7 a に見られるように, 正常な菌糸の表面はザラザラしているが, 強拡大像ではそれが微細な粒子 (10~20nm) で覆われている (右は拡大図) ことがわかる. 薬剤濃度を高めるにつれて, 一皮ずつ表面が剥離していく様子が観察された. すなわち, 濃度 1/1024 MIC (0.02 ng/ml) ではわずかに剥離が観察されたが, その部位で

Fig. 5. TEM image of a new lateral branch from abortive mycelium (a) and a growing mycelium showing septum. $\times 2,000$.

Fig. 6. SEM image of the surface ultrastructure during regeneration showing a protoplast (a), rope-shaped (b), sheath-shaped (c), granular and amorphous (d-f) structure. $\times 50,000$.

Fig. 7. SEM images of mycelia of *T. rubrum* grown without (a) and with (b-d) itraconazole. They show granular feature of the surface of cell wall (a), with sheath-shaped (b), rope-shaped (c) and smooth cell membrane exposing the ultra-minute particles and fibrils mixed with amorphous particles. 0, 0.02, 0.78, 0.31 ng/ml. left, $\times 10,000$; right $\times 50,000$.

Fig. 8. A model of cell wall of *Trichophyton* (大隅・許斐原図).

は、その下に鞘状構造（幅 10～20nm、長さ 100～200nm）が露出していた（Fig. 7 b）。1/256 MIC（0.078 ng/ml）ではさらに剥離が著しくなり、粗いロープ状（約 50nm ϕ ）の構造が観察され（Fig. 7 c, $\leftarrow$ ），1/64 MIC（0.31 ng/ml）では均一でない菌糸の表面が細い繊維（ $\leftarrow$ ，約 10～20nm ϕ ），または不定形の構造物（ $\blacktriangleleft$ ）と超微粒子（ $\rightleftharpoons$ ）で覆われていた（Fig. 7 d）。さらに高濃度，1/8 MIC（2.5ng/ml）の薬剤を添加すると，穿孔が見られ，MIC（20ng/ml）以上では極端な剥離が見られた。

この細胞壁の様子を透過電子顕微鏡で観察すると，剥離の様子が詳細に観察された。透過電子顕微鏡でも走査電子顕微鏡観察と同様に，菌糸壁の剥離は低濃度の薬剤添加で観察された。MIC 濃度では菌糸の細胞壁外層の剥離が観察された¹²⁾。

2) 推定される皮膚糸状菌（*Trichophyton* 属）菌糸細胞壁の構造

今回の *T. mentagrophytes* のプロトプラスト再生時の細胞壁の形成過程（Fig. 6）における微細構造の変化とこの結果とは，互いに正反対の過程を示している。

上記の2つの異なる手段による研究により，糸状菌の細胞壁の構造を Fig. 8 のように推定することができる。この仮説を裏付けるためには，免疫電子顕微鏡法，フリーズ・レプリカ法，ネガティブ染色法など他の電顕法や生化学的手法による細胞壁構成成分の解析と合わせて，さらに多角的に解析することが必要である。

おわりに

T. mentagrophytes のプロトプラストを単離することにより，菌糸への再生系が確立したとはいえ，その再生は寒天培地でのみなされ，液体培地ではまだ再生に成功していない。寒天培養された菌糸は電子顕微鏡観察のための試料作製において制約を受ける。従って，*T. rubrum* では無コーティングによる観察が可能であるが，この種ではチャージングがひどくて観察不可能である。今後は *T. mentagrophytes* の液体培養技術および本種の再生系を確立し，更に研究を進めてゆきたい。

謝 辞

本稿は，庭野吉己，後藤有里（日本農薬（株）総合研究所），溜池あかね，佐藤真美子，石島早苗（日本女子大学理学部，電子顕微鏡施設），許斐麻美（日本女子大学大学院理学研究科）の各氏との共同研究の成果を基礎として纏めたものであり，ここに氏名を記して深甚なる謝意を表す。

文 献

- 1) Klis FM: Review: Cell wall assembly in yeast. *Yeast* **10**: 851-869, 1994.
- 2) Schreuder MP, Mooren ATA, Toschka HY, Verrips AT, Klis FM: Immobilizing proteins on the surface of yeast cells. *TIBTECH* **115**-120, 1994.
- 3) Kollar R, Reinhold BB, Petrakova E, Yeh HJC, Drgonava J, Kapteyn JC, Klis FM, Cabib E: Architecture of the yeast cell wall. *J Biochem Chem* **272**: 17762-17775, 1997.
- 4) Suzuki S, Shibata N, Kobayashi HJ: Immunochemistry of *Candida* mannans, *In* Fungal Cell Wall and Immune Response (Latge JP, Boucias D eds.), Springer-Verlag, Heidelberg, Germany, p.111-121, 1991.
- 5) Osumi M: The ultrastructure of yeast: Cell wall structure and formation. *Micron* **28**: in press, 1997.
- 6) 北島康雄，野沢義則：病原性皮膚糸状菌の細胞壁構造—電顕的および生化学的解析。真菌誌 **18**: 3-15, 1977.
- 7) Poulain D, Briguet J, Deblock S, Vernes A: Paroi nycelienne de *Trichophyton mentagrophytes*: Etude ultrastructurale de ses couches constitutive, apres application d'une methode de mise en evidence des polysaccharides: *Sabouraudia* **13**: 244-254, 1975.
- 8) Ikuta K, Shibata N, Blake JS, Dahl MV, Nelson RD, Hisamichi K, Kobayashi H, Suzuki S, Okawa Y: NMR study of the galactomannans of *Trichophyton mentagrophytes* and *Trichophyton rubrum*. *Biochem J* **323**: 297-305, 1997.
- 9) Osumi M: Cell wall formation of fungal cells revealed by electron microscopy. *In* Fungal Cells in Biodefence Mechanism (Suzuki S, Suzuki M eds), Saikon Pub. Co., Ltd. Tokyo p.35-39, 1996.
- 10) Osumi M, Tameike A, Konomi M, Niwano Y, Goto Y: Isolation of protoplast from *Trichophyton mentagrophytes*

- and its cell wall regeneration. Abst, 13th Congr. Int. Soci. Human and Animal Microl. 127, 1997.
- 11) Osumi M, Naito N, Yamada N, Iwata K: Effect of new antidermatophytic agent liranafat on the ultrastructure of *Trichophyton mentagrophytes*. Chemotherapy **41**: 555-567, 1993.
 - 12) 溜池あかね, 許斐麻美, 佐藤真美子, 石島早苗, 庭野吉己, 大隅正子: 抗真菌剤ラノコナゾールの *Trichophyton rubrum* 発育菌糸細胞壁に及ぼす影響の電子顕微鏡学的研究. 真菌誌 **37**: 251-261, 1996.
 - 13) Osumi M, Yamada N, Nagatani T: High-resolution low-voltage SEM of cell wall regeneration of yeast *Schizosaccharomyces pombe* protoplast. Proc. 46th Ann. Meet. Electron Microsc. Soc. Amer. San Francisco Press. 208-211, 1998.
 - 14) Osumi M, Yamada N, Kobori H, Naito N, Baba M, Nagatani T: Cell wall formation in regeneration protoplast of *Schizosaccharomyces pombe*. J Electron Microsc **38**: 457-468, 1989.
 - 15) Osumi M, Yamada N, Kobori H, Yaguchi H: Observation of colloidal gold particles on the surface of yeast protoplasts with UHRLVSEM. J Electron Microsc **41**: 392-396, 1992.
 - 16) Osumi M, Yamada N, Yaguchi H, Kobori H, Nagatani T, Saito M: Ultrahigh-resolution low-voltage SEM reveals ultrastructure of the glucan network formation from fission yeast protoplast. J Electron Microsc **44**: 198-206, 1995.
 - 17) 大隅正子, 小堀洋美, 山田直子, 矢口寛子, 吉濱 勲, 馬場則男: 酵母細胞壁形成のダイナミクス. 酵母研究のフロンティア—生命科学・医学・産業へのインパクト. (大隅正子, 山口英世編), 瑞穂印刷. 東京. p.123-152, 1994.
 - 18) 大隅正子: 低加速電圧走査電子顕微鏡法—生物編—. 電子顕微鏡 **31**: 45-50, 1996.
 - 19) 近江哲人, 作本貞良, 庭野吉己, 金井和夫, 田中哲二, 鈴木 孝, 内田又左衛門, 山口英世: NND-318 の抗真菌活性—電子顕微鏡学的観察—. 真菌誌 **33**: 339-348, 1992.

Dynamics of Cell Wall Formation from *Trichophyton mentagrophytes* Protoplast

Masako Osumi

Division of Material and Biological Function Science, Graduate School of Science, and
Department of Chemical and Biological Sciences, Faculty of Science, Japan Women's University,
2-8-1, Mejirodai, Bunkyo-ku, Tokyo, 112-8681 Japan

There is no reference to the cell wall formation during the regeneration process in dermatophyte. Having succeeded in identifying the cell wall formation system of protoplast from *Trichophyton mentagrophytes* I introduce here the dynamics of the regeneration of this protoplast and the formation of cell wall using ultrahigh resolution low-voltage scanning electron microscopy and transmission electron microscopy (TEM), compare to the formation of yeast cell wall. Protoplasts were formed from mycelia of *T. mentagrophytes*; they regenerated the cell wall substances and were followed by a network of fibrils after 4-6 hr, which developed into mature mycelia after 21 hr. A network of twisted microfibrils and rope-shaped thick fiber was seen; it was covered with a sheath-shaped structure and was created on the surface of the developing mycelium. Intrafibrillar space and the surface of thick fibers were gradually filled with amorphous particles and a mature cell wall surface was formed. This protoplast regeneration was completely inhibited by the antifungal agent, itraconazole (2 ng/ml). The sectioned TEM image revealed that normal mycelium having a thin cell wall developed from the abortive bead-shaped mycelium which was visible in the loose fibrous structure. Based on this result and our previous work on the ultrastructure of the mycelial surface of *T. rubrum* with itraconazole, a model of the cell wall composition of *Trichophyton* is proposed.

この論文は、第41回日本医真菌学会総会の“シンポジウムⅡ：真菌とその周辺微生物の超微細構造解明の進歩”において発表されたものです。