放線菌胞子の電子顕微鏡による形態について

板垣 史郎*・古川 稔*・木下 祝郎*

Shiro ITAGAKI*, Minoru FURUKAWA* and Shukuo KINOSHITA*: The Morphological Observations with the Electron Microscope on the Spores of *Streptomyces*.

1959年8月9日受付

従来、放線菌 Genus *Streptomyces* の分類は、Bergey's manual¹⁾ に記載されている Waksman-Henrici の方法にしがっている。この分類によると有機培地上に生育させた場合にできる soluble pigment の色、aerial mycelium の色調などを主としており、形態的な特徴は比較的后の方の key として用いられているにすぎない。ところで、抗生物質生産という本菌種の特記すべき性質と、かなり変異をおこしやすい性質のため、新菌株、あるいは新菌種と称せられるものが続々発見報告され、分類上の混乱をきたしている。

Waksman らは前述のように色調を主体とした生理学的性質を重要な key としてあつかっているが、一方 Krassilnikov²⁾ は本菌種の分類にあたって、形態的形質を第1義とし、生理学的性質を第2義的に考え、その上で抗生物質の産生を特徴として分類を進めている。

また、最近 Pridham, Hesseltine および Benedict³⁾ は、Sporophore の形態によって7種に大別し、さらに色を取り入れた考へ方を発表している。

そのほか、分類に関する研究としては、

Waksman,⁴⁾⁵⁾⁶⁾⁷⁾⁸⁾ Lechavalier,⁷⁾⁸⁾ Krassilnikov,⁹⁾¹⁰⁾ Pridham および Gottlieb,¹¹⁾ Burkholder および Sun,¹²⁾ Baldacci,¹³⁾ Hesseltine¹⁴⁾¹⁵⁾ Gauss¹⁶⁾ 岡見, 酒井,¹⁸⁾¹⁹⁾ 黒屋²⁰⁾²¹⁾ 秦^{22,23,24)} 能美および長西,²⁵⁾²⁶⁾²⁷⁾ 能美,²⁸⁾ 早野,²⁹⁾ 山口および佐分利³⁰⁾ 原田³¹⁾³²⁾ 黒沢³³⁾ がある。

そもそも分類学において形態的形質を重視すべきは当然のことで、微生物といえども例外ではない。しかも最近のごとくいちじるしく電子顕微鏡の観察が進んで来つつあるとき、とくにその微細構造すらも当然問

(第1図) Pridham ら³⁾ の Sporophore の分類

1. Straight	} Section
Rectus-flexibilis
2. Flexuous	
3. Fascicled	
4. Open-Loops	} Section
Retinaculum-
apertum
Primitive Spirals, Hooks	
5. Open Spirals	} Section
Spira
6. Closed Spirals	
7. Monoverticillate	Section
Monoverticillus
8. Monoverticillate	Section
with Spirals
Monoverticillus-spira
9. Biverticillate	Section
Biverticillus
10. Biverticillate	Section
with Spirals
Biverticillus-spira

題とすべき時期にきているといえよう。

飯塚³⁴⁾³⁵⁾ は、*Aspergillus* 属の胞子について電子顕微鏡 (以下 EM と略) 観察をおこない、充分分類の基礎となりうることを示した。阿部³⁶⁾ は、*Penicillium* 属の分類にあたって同様な実験をおこない、EM の特徴を認めている。

*協和醗酵工業株式会社東京研究所 〒Tokyo Research Laboratory, the Kyowa Fermentation Industry Co. Ltd., Tokyo, Japan.

放線菌胞子についても EM による観察はある程度おこなわれている。すなわち, Flaig ら³⁷ Enghusen³⁸ の観察などがあるが、いづれも明確な菌株名, あるいは菌株の性質の記載をかくもので、現行の分類と、EM 観察の結果がどの程度の関連性をもっているかほとんど知ることができない。Flaig らは約 500 株を用いて、第 1 表に示すように EM 的胞子形態を分類しており、更に胞子のでき方、培地組成による胞子形態の変化などについてものべている。

(第 1 表) Flaig³⁷ らによる放線菌胞子の電子顕微鏡的形態。

Lang-oval	
rund	
{ glatt	a) stachlig
{ rauch	b) harrig
	c) warzig
rechteckig	

また, Baldacci および Grein³⁹ は, Baldacci の分類に従った種々の Series の *Actinomycetes* 約 50 株の胞子を EM 観察し、胞子の形態、電子線の透過性表面のようすをしらべ、これらの結果、各 series の菌株間には胞子形態のある程度の共通性を認め、series 分類の一つの手掛りとはなるが、species の決定に用いることは無理であるとのべている。

ところで、このように放線菌の分類に関しては問題が多いのであるが、Waksman あるいは Krassilnikov らも、現在では、まだ決定的な分類をおこないうる段階ではなく、研究者のもつすべての知識を分類の key として用いるべきであるといっている状態である。このような有様にかんがみ、著者らは EM 的微細構造が、従来用いられている分類形質とどのような関係があるかを知らうとして観察をおこなった。すなわち、主として aerial mycelium の形態と、胞子の EM 的形態とを組み合わせさせて考察したものであるが、その結果 2, 3 の知見を得た。もちろん本実験は供試菌株の数も少く、形態的形質の遺伝的安定性を充分調べたわけでもないで、予備実験的段階にすぎないが、ここに報告する。

材料および方法

今回観察した 192 株中、64 株は当研究所保存および長尾研究所より分与を受けた type culture であり、

108 株は原田らにより土壌より分離された抗生物質産生株、その他, Baldacci より分与された 25 株中の 21 株 (S. sp. No. 1-No. 25) である。

培地は主として starch Bennet's agar および, Bennet's agar を用いたが、この他 soluble starch, potato ext., glucose soybean agar になどを用いた場合もある。いづれの菌株も 28° にて 2～3 週間培養し、充分胞子を形成させた後、膜を張ったメッシュを直接おしあてて EM 観察をおこなった。

また, sporophore の形態は, agar plate 上で直接検鏡した。sporophore の分類は前述した Pridham らの方法に従い、次の 7 つにわけた。

1. *Rectus-flexibilis* (RF)
2. *Retinaculum-apertum* (RA)
3. *Spira* (S)
4. *Monoverticillus* (MV)
5. *Monoverticillus-spira* (MV-S)
6. *Biverticillus* (BIV)
7. *Biverticillus-spira* (BIV-S)

結 果

観察した 193 株中、大部分は RF (91 株) RA (16 株)、および S (83 株) に属する。

1. 胞子の形および大きさの斉一度について

胞子の形についてはすでにのべた研究者達の観察とはほぼ同じであり、大別すれば次の 3 つになる。

- (1) spherical or oval
- (2) ellipsoidal
- (3) cylindrical

このような形は、胞子の形成方式(たとえば, fragmentation とか segmentation とか)に当然関係することであろう。上記の 3 形の間も、連続的に変化すると考えてよく、同一菌株の胞子の中にも spherical と ellipsoidal が混在していたり、ellipsoidal にしても、その長径と短径の比率はかなり大きく変化することはふつうである。大きさの斉一度合は菌株によってかなり特徴的なものであるかもしれない。たとえば、*S. griseus* は 7 株ともかなり斉一な分布を示していた。*S. sahachiroi* 及び 238 B 1 にみられた柿の種形の胞子は特徴的である。又ツヅミ形 (∞) ともいうべき形の胞子は、*S. lavendulae* をはじめとして、ほとんどの菌株に多かれ少かれ認められたが、之は単に発育不良形とばかりはいえないように思われる。この点は更に検討したい。

2. 胞子の表面のようすについて

胞子の表面の構造もかなりいろいろなものがあり、観察した範囲では次のようである。

- (1) smooth (2) rough (3) granular
- (4) short-spiny (5) spiny (6) hairy

すでに報告された wrinkled は著者らの観察の範囲では認められなかった。

上記のような表面構造の変化も連続的と考えてよく、たとえば、*S. lavendulae* ATCC 8664 は rough であるが、*S. rutgerensis* 2株にみられた short-spiny に極めて近いものといえるし、spiny にしても spine の長さにも長短があり、その太さも異り、74B5株

のごときは spinyであるが hairyに近いものである。また、*S. sp.*No.20においては、成熟に従って spine はやや長くなる。

表面構造中とくに明瞭な granular, short-spiny, spiny および hairy は第2表にみられるように、すべて spiral を形成する *Spira* に属することは注目に価する。他の報告者の写真よりみても、Baldacci および Grein の *Series Diastaticus sp.* *Diastaticus* および *Actinomyces* Cp. 936 はいづれも spineをもち、かつ *Spira* に属すると推定される。

著者らの観察した *Spira* 85株中、このような表面構造を示したものは20株であった。(85株中2株はBIV-S)

(第2表) sporophore の形態 胞子の形、大きさの斉一度、および表面のようすによる分布。

Sporophore	Uniformity	Marking of Surface		Numbers of Strains		
				Type Culture	Newly Isolated	from Baldacci
R F 91	Uniform 77	Smooth 75		30	39	6
		Rough 2		0	2	0
	Irregular 14	Smooth 13		3	9	1
		Rough 1		1	0	0
R A 16	Uniform 11	Smooth 10		1	8	1
		Rough 1		0	1	0
	Irregular 5	Smooth 4		3	1	0
		Rough 1		0	1	0
S 83	Uniform 70	Smooth 51		14	28	9
		Rough 1		0	1	0
		Granular 1		0	0	1
		Short-Spiny 3		2	1	0
	Irregular 13	Spiny 14	4* (3)	7	3	
		Smooth 10		3	7	0
		Rough 2		2	0	0
		Hairy 1		0	1	0
BIV 1	Uniform 1	Smooth 1		1	0	0
BIV-S 2	Uniform 2	Smooth 1		0	1	0
		Spiny 1		0	1	0

**S. sp.* E-150 を含む。

考 察

胞子形態は大別すれば spherical, ellipsoidal および cylindrical になるが、この間は連続的であり、ellipsoidal といっても長径と短径の比率の変化で spherical に近いものから long ellipsoidal までいろいろ変化し、同一菌株中さらに 1 本の spore chain 中にある胞子の形、大きさの斉一度は必ずしも一

(第 3 表) *S. griseus* 群の育成歴史

Strains	Metabolic Products	Cultural History
# 1	SM, V. B ₁₂	Waksman's original
SN - 14	SM-	Okami's red mutant
S - 1	SM, V. B ₁₂	Umezawa-Okami's original
SX ₂ -O-11	SM, V. P ₁₂	S-1 → Xray, 2 times → monospore
H - 12	Grisein	Okami's Grisein Producing strain
TS - 601	SM, V. B ₁₂	Sakai's original
MC - 33	SM, -V. B ₁₂	Z-38 → mono spore

定しない。この斉一度が irregular であることも菌株の一つの特徴である場合がある。*S. lavendulae*, S. CC 8664 はこの最もいちじるしい例といえよう。しかし、*S. griseus* は斉一の方の例であって第 3 表に示すごとく、種々の育成歴史を経、また抗生物質のような産生物質もちがうがかなり斉一な結果を示している。このことは形態的形質がかなり安定なものであることを示す一つの証さともいえよう。

このように、original の相異、X 線照射、産生物質の相異などがあるが、いづれも Bergey's manual に従って *S. griseus* と命名されたものは、その胞子の形態も、斉一度も、表面構造もほとんど等しく、この場合は安定した形態形質と生理学的性質がよく一致したものといえよう。しかし、*S. fradiae* のように、3535株は RF に属し、117 株および岡見氏の原因株は RF に属するような不一致、また、*S. olivaceus* 7 株の中 smooth 6 株 rough 1 株のようにばらつくこともある。*S. olivaceus* では胞子形態、大いさの斉一度も又一定せず、7 株中斉一なもの 5 株、不斉一なもの 2 株となっている。

原田ら³¹⁾の研究によれば、sporophore の形態 aerial mycelium の色調, soluble pigment, carbon source の利用能、抗生物質の産生能などについて

segregants におけるこれらの性質の変動を調べ、その結果、形態的形質は非常に安定したものであり、また、能美²⁸⁾によれば、spiral の形成のような形質は、生理学的性質（たとえば硝酸塩還元性、澱粉分解力、蛋白質分解力など）に比してはるかに安定な形質として遺伝することを示している。

このように、形態的形質は遺伝的にきわめて安定なものであれば、当然分類の key として重視さるべきであ

らう。遺伝的安定性については、さらに検討を要する。

また、著者らの観察のごとく、spine およびその他の表面構造を形成する菌株の sporophore は、いづれも spiral を形成する *spira* に属する (*spira* 85 株中 20 株において表面構造をみとめた) が、このことは無視し得ない結果と考えられる。しかし、spine 形成能の遺伝的安定性のごとき点については十分な検討をおこなっていないのでこの点を指摘するに止める。

また培地組成と胞子形態の関係は、当然菌株の栄養要求の問題として検討されるべきであるが、この点についても次の機会におこないたい。

要 約

193 株の放線菌の胞子につき電子顕微鏡観察をおこない、Pridham らの sporophore の分類に従った sporophore の形態と、胞子の電子顕微鏡の形態の連性をしらべ電子顕微鏡の微細構造を分類上利用しうる可能性を示した。

1. 胞子の形は spherical, ellipsoidal および cylindrical に大別されるが、この間は連続的に変化するもので、同一菌株についてもかならずしもその形態、大いさの斉一度は一定のものではない。

2. 胞子の表面構造については smooth, rough, granular, short-spiny, spiny および hairy にわ

けられる。著者らの観察した範囲では wrinkled は認められなかった。

3. granular, spiny および hairy のとき構造をもつ20株は、いづれも *spira* に属していた。

謝 辞

種々御指導、御助言をいただいた東大教授湯浅明博

士、東大助教授齋藤日向博士、予研岡見吉郎博士、広島大能美良作氏 また御助言とともに菌株を分与された長尾研究所椿啓介博士に深く感謝し、又当所主任研究員阿部重雄博士、富士工場原田雄二郎氏の御指導、また当所研究員岡本福三郎氏の御助力に感謝いたします。

文 献

- 1) Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 7th ed. (1958). 2) Krassilnikov, N. A., 酒井平一訳, 農化誌30 : A. 43(1956) 3) Pridham, T.G., Hesseltine, C.W. and Benedict, R.G., App. Microbiol. 6 : 52 (1958). 4) Waksman, S. A., J. Bact. 1 : 101 (1916). 5) Waksman, S. A., Reilly, C. and Harris, D., ibid. 56 : 259(1948). 6) Waksman, S. A., The Actinomycetes, Chronica Botanica, (1950). 7) Waksman, S. A., Harris, D. and Lechevalier, H., J. Bact. 62 : 149 (1951). 8) Waksman, S. A. and Lechevalier, H., Guide to the Classification and Identification of the Actinomycetes and their Antibiotics, Baltimore (1953). 9) Krassilnikov, N. A., The Guide to the Ray Fungi, Moscow (1941). 10) Krassilnikov, N. A., 放線菌の分類, Moscow (1949). 11) Pridham, T.G. and Gottlieb, D., J. Bact. 56 : 107(1948). 12) Burkholder, P.R. and Sun, S.H., Ann. N. Y. Acad. Sci. 60 : 102(1954). 13) Baldacci, E., Symp. 6th Int. Congress Microbiol.-Actinomycetes, Roma (1953). 14) Hesseltine, C. W., Benedict, R. G. and Pridham, T. G., Ann. N. Y. Acad. Sci. 60 : 134 (1954). 15) Hesseltine, C. W. et al., Antibiotics Annual : 947 (1956-1957). 16) Gause, C. F., Microbiologia, 24 : 103 (1955). 17) 岡見吉郎, *Streptomycetacea* に属する本邦産抗菌性放線状菌の分類 (1955). 18) 酒井平一, 農化会講演4月 (1955). 19) 酒井平一, 農化会講演4月 (1956). 20) 黒屋政彦, 大内信郎, 勝野正則, J. Antibiot. 2 (A) : 74 (1949). 21) 黒屋政彦, 高橋文治, 石田名香雄, 片桐謙, 清水五百子, ibid. 4 : 327 (1950). 22) 秦藤樹, 大木夏男, 横山康彦, 古賀文若, ibid. 6 (B) : 57 (1952). 23) 秦藤樹, 大木夏男, 松前照広, 古賀文若, ibid. 6 (B) : 9 (1952). 24) 秦藤樹, 横山康彦, ibid. 6 (A) : 80 (1953). 25) 能美良作, 長西広輔, 醗酵工学誌, 31 : 476 (1953). 26) 能美良作, 長西広輔, ibid. 32 : 211, 406, 432, 492 (1954). 27) 能美良作, 長西広輔, ibid. 33 : 13, 167, 209, 294, 341(1955). 28) 能美良作, 農化会講演4月 (1959). 29) 早野正己, J. Antibiot. 2 (A) : 79(1949). 30) 山口辰良, 佐分利保雄, ibid. 9 (B) : 62 (1956). 31) 原田雄二郎, 板垣史郎, 久保重夫, 田中史郎, 農化誌 32 : 810 (1958). 32) 原田雄二郎, 久保重夫, 田中史郎, ibid. 32 : 817, 924, 932 (1958). 33) 黒沢英夫, J. Antibiot. 4 : 183 (1951). 34) 飯塚広, 農化誌 29 : 325 (1955). 35) Iizuka, H., J. Gen. Appl. Microbiol. 1 : 10 (1955). 36) Abe, S., ibid. 2 : Nos. 1-3 (1956). 37) Flaig, W., Küster, E. und Beutelspacher, H., Zentr. f. Bakt. II Abt. Bd. 108, 376 (1955). 38) Enghusen, H., Arch. f. Mikrobiol. 21 : 329 (1955). 39) Baldacci, E. and Grein, A., Giornale di Microbiologia 1 : 28 (1955).

Summary

The spores of 193 strains of *Streptomyces* were observed with an electron microscope. There are some relationships between the morphology of sporophores classified by Pridham *et al* and the electron microscopic fine structure of the surface of the spores.

The morphological observation with the electron microscope may be available and feasible for the classification of *Streptomyces*.

1. *S. scabies* CBS (IFO-3111) 齊一な, spherical ないし短い cylindrical を示す。
2. *S. rimosus* NRRL-2234 典型的な原形質連絡がみられる。fragmentation による孢子形成の代表的なものと考えてよいであろう。
3. *S. sachachiroi* 柿の種形をしている。電子線透過性。
4. *S. coelicolor* NI 9023 spore chain を貫いて1本の dense な, おそらく原形質と考えられる紐状構造がはしる。この細い紐状構造の他は電子線をよくとおす。

5. *S. tanashiensis* 289-A-1 *S. coelicolor* に近似であるが、原形質は太い。被膜に注意。一般にこの時期では被膜はほとんど autolysis をおこし、不明瞭だがこの菌株ではきわめて鮮明である。
6. *S. griseus* #1 (Waksman) ellipsoidal ないし cylindrical. *S. griseus* 群は、一般にこのような形と斉一性を示す。
7. *S. flavochromogenes* H-3206 spore の連絡部位に注意。
8. *S. lavendulae* ATCC 8664 spore の斉一度はきわめて悪く、表面は細い凹凸を多数示す。これらの事は本菌株の特徴である。

9. *S. sp.* No. 7 一面に多数の granular 構造がみられる。
10. *S. rutgersensis* H-1159 表面は微細な三角状の突起で被はれる。delicately spinulose とでもいうべきか。
11. *S.sp.*25B1-2 少数のごく細い spine がみられる。
12. *S. viridochromogenus* CBS (IFO-3113) 典型的な spiny 構造。spore の連絡部位に注意。
13. *S. purpurascens* NRRL-B-1454 Spine は太く、先端は鈍である。
14. *S. sp.* No. 19 spine は細く、長い。
15. *S. sp.* 74B5 spiny ではあるが、この spine は先端がきわめて細く、長く、かつ屈曲しており、hairy に近い。
16. *S. sp.* 172B6 典型的な hairy である。

1. Shapes of the spores were classified into three groups, namely, spherical, ellipsoidal and cylindrical. These three shapes change continuously. The shape and uniformity of the spores were not constant even in one spore chain.

2. Markings of surface of the spores were classified into such groups as smooth, rough, granular, short-spiny, spiny and hairy. But the present authors could not observe wrinkled spores.

3. It is a remarkable fact that all of the twenty strains which show clear marking of surface of the spores belong to the *spira*.

雑 録

人工培地上の花粉の置床密度が発芽と 花粉管の伸長におよぼす影響*

有 安 勉**

Tsutomu ARIYASU**: Density Effect of Pollen Put on Artificial Culture Media, upon its Germination and Pollen Tube Growth.

1959年6月1日受付

人工培地上の花粉がその置床密度によって発芽率や花粉管の伸長度を異にすることは、しばしば報告されている¹⁾²⁾。木原³⁾ (1919) は乾燥、低温で貯蔵した花粉を寒天培地にまいた場合、一般に密集した部分から花粉管を出すことが多く、ことに130日間貯蔵した *Digitalis purpurea* の花粉は密集した場合のみ発芽したという。Brink⁴⁾ (1924) は *Cucumis sativus* および *Vinca major* の花粉を用い、寒天培地上では密集花粉の管伸長は、単離花粉のそれより良好であったことを実験的にたしかめた。Schmucker^{5),6)} (1933, 1935) は *Nymphaea tetragona* および *Grevillea robusta* の花粉の液体培養で、あつまきにすると時として発芽が促進されることを見、Schoch-Bodmer⁷⁾ (1936) は徐々に水分を吸収させて発芽させた場合、*Corylus heterophylla* の花粉が密集した部分で多数発芽したと報告している。さらに Kuhn⁸⁾ (1938) は *Matthiola incana* の花粉がゼラチン培地上で、久保⁹⁾ (1954) は *Cosmos bipinnatus* の花粉が寒天培地上で、いずれも密まきの部分でよく発芽したと報じている。以上の

観察のうち、この事実を実験的に数値をあげてたしかめたものとしては、わずかに前記 Brink の報告があるにすぎない。この現象についてはより充分な実験的吟味が必要と考えられるので、筆者は数種の花粉を用いて本現象を検討し、若干の結果を得たのでここに報告する。

材 料 と 方 法

材料として、人工発芽が容易でかつ比較的大型でとり扱いやすい、ツバキ (*Camellia japonica* L.)、チャ (*Camellia sinensis* L.)、キシヨウブ (*Iris pseudacorus* L.)、ジャコウエンドウ (*Lathyrus odoratus* L.) およびオオマツヨイグサ (*Oenothera Lamarkiana* Ser.) の花粉を選んだ。培養は主として寒天培地によった。すなわちシヨ糖10~15%含有の1~1.5% 寒天片 (あつさ2 mm.) (pH6.0—6.5)を用いた。発芽率測定の場合は3mm.×3mm.、花粉管長の測定には10mm.×10mm.の大ききの寒天板をつくった。これらをスライドガラス上に3~10枚づつ並べて置き、各寒天板上に細毛***で1粒宛拾った開葯当日の花粉を1~10粒

* 日本植物学会第19回大会 (1954) において一部を発表した

** Sakado High School Attached to Tokyo University of Education. 東京教育大学附属坂戸高等学校

*** よく洗った1本の豚毛をガラス管の先端にパラフィンで固定したもの。