細菌細胞膜に関する研究

第11報 細菌細胞膜の分離法とその装置

吉田 長之 田中 三郎 高石 憲治
 和泉 義文 西野 健二 福家 勇
 角谷 公 福井 公明 橋本 忠世

徳島大学医学部細菌学教室

〔受付：12月28日1955年〕

緒言

細菌細胞膜を研究の対照にする実験においては、細胞膜（以下CWと略）そのものを純粋に分離する方法を見出す事が先決問題である。そのためには先ずどのような方法で細胞を破壊するのが最も適切であるかという事から研究する必要がある。従来用いられてきた細胞の破壊方法は多種多様にわたっているが、その中で一番簡単な方法は buffer, toluene, ether, thymol, chloroform 等に細胞を長時間浸して自家融解¹⁾をおこさしたり、凍結融解を繰り返して細胞を破壊したりする方式である。また音波及び超音波²⁾の振動を利用して細胞を破壊する方法も古くから用いられている。その装置としては、Magnetostriction oscillator, Mullard quartz crystal Ultrasonic oscillator, 並びに Rathen 10 kc sonic oscillator 等が有名である。次によく使われる方法に hand grinding method³⁾がある。これは鋼鉄又は瑪瑙製の乳鉢の中で細胞と硬質粒子たとえば金剛砂、石英砂、銀砂、硝子球、鋼鉄球等を混合し両者を激しく摩擦して細胞を破壊する方法である。Muys, G. T. 及び Kalnitsky, G. 等の glass mill⁴⁾や Booth-Green mill⁵⁾等はこれを自動的にしたものである。硬質粒子を混入する代りに鋼鉄製容器内に同じく鉄製の廻転棒を挿入して両者の摩擦面を利用した装置に Hughes press⁶⁾がある。また暫新的な方法として、Milner, H. W.⁷⁾が葉緑体の研究に用いたピストン式高圧装置がある。それとよく似た方法で Gas 圧を利用したものに Fraser D. の装置⁸⁾がある。また外圧の代りに溶液の滲透圧を急激に変化させて細胞を破壊するものに著者等の方法⁹⁾がある。しかし以上の方法は細胞内の酵素学的研究には利用し得るがいずれも細胞の不自然な崩壊を伴い且つ原形質を充分に除き得ないという理由で C. W. 自体を研究目的とする

分離法としては不適當である。現在 C. W. を最も自然な形で分離することが出来る装置としては Mickle H¹⁰⁾ の tissue disintegrator が唯一のものであらうと考えているが入手困難である。著者等は独自の立場から C. W. 分離法やその装置の研究を行いやゝ満足すべき成果を得たのでこゝに詳細を報告したいと思う。

I. 細胞膜分離操作を行うまでの準備

1) 細菌の培養と集菌：C. W. 分離に供する細菌は対数発育期に相当するものが望ましいが、多くの場合多量の細胞を必要とする関係上20時間培養以内のものを使用すればそれで充分である。但し百日咳菌のように発育の遅い菌では培養時間を適当に考慮する必要がある。培養基は原則として固形培地を使用するのがよいが、やむを得ず液体培地を用う場合は、あらかじめ塩類その他に基因する沈澱物を充分に除去しておくことが大切である。培養基の乾燥は表面がやゝ湿潤している程度にとどめ、過度に乾燥しないように注意しなければならない。その際 Smithies, W. R.¹¹⁾等は培地中に0.15%の塩化カルシウムを添加すると、或種の細菌ではC. W. が分離し易くなると述べているが著者等の方法では特にこのような前処置を行う必要を認めない。さて培地上に菌が発育してから、その上に生理的食塩水を加え、全集落が見えなくなるような状態にして約10分間放置する。その後

YOSHIDA Nagayuki, TANAKA Saburo, TAKAISHI Kenji, IZUMI Yoshifumi, NISHINO Kenji, FUKUYA Isamu, KAKUTANI Isao, FUKUI Komei and HASHIMOTO Tadayo: Studies on the Bacterial Cell Wall. Introduction of a method and an apparatus for preparation of bacterial cell wall. Department of Bacteriology, Tokushima University, School of Medicine, Tokushima —Jap. J. of Bact., 11(5), 439-442, 1956.

培養基を数回ゆつくり左右に傾けると菌は自然に液中に移行するから、その菌液を集めて定法通り3回洗滌するわけである。

2) 菌液濃度の調整： 振盪する菌液濃度は菌種によつてそれぞれ異なっているが、C.W.の収率の点では可及的に高濃度のものを使用した場合の方が良好である。しかし菌液濃度を高くするのにも自から一定の限界があつて、むやみに濃度を濃くしても多くの場合えつて有害な結果を招く事は屢々経験するところである。一般に細胞が破壊されるとコロイド状の原形質を溶液中に

放出し、その表面張力を低下さすと同時に粘度をも著しく高めるものである。その程度は菌液濃度が高くなればなるほど顕著である。著しい場合はそのために振盪している菌液が全く移動しなくなることさえある。このような状態では多量のC.W.を分離することは望み得ない。しかしその至適菌液濃度は菌種によつてそれぞれ異なっているので経験的に認知する以外に全く方法はないが、大体のめやすとして溶液を軽く振盪しながら少量ずつ菌を浮遊さしていって菌液がよく流動する範囲内の最高濃度になつたならば、先づそれが至適濃度の附近で

第 1 図

第 2 図

あると思つて間違いないようである。

3) 硝子粉末の調製： 良質の硬質硝子を鉄製乳鉢で細かく砕いてから丁寧に水洗し、新しいクローム硫酸に数日間浸す。その後で再び純白雪状になるまで水洗し十分に乾燥する。乾燥できたら篩にかけて直径約 0.2~1 mm ぐらいのものを選別し乾熱滅菌して保存する。

II. 細菌細胞の破壊方法

1) 手振り法： 硬質試験管内に上記の硝子粉末約 5 g を入れ、それと同じ容量だけ生理的食塩水に浮遊した菌液を加え末端から 10 cm ぐらいの所で試験管を熔封し、布で充分に被包した後手で力一杯上下に振盪する。球菌では約 1 時間半、腸内細菌では約 1 時間、長桿菌では 30~40 分間振盪すると大体 50% 以上の細菌が破壊される。

2) 簡単に自作出来る振盪器： 手振り法はガスバーナーさえあれば何時でも簡単に実施することが出来るが、C.W. の収量が少ないために、多量の C.W. を必要とするような実験たとえば免疫反応や化学的検索等を行う場合には甚しく手数を要するのでこれを機械的に行うようにしたのが第 1 図及び第 2 図である。この装置は図のように極めて簡単なものであるが、少量の試料で実験を行う場合にはこれで充分間に合っている。本装置における振盪菌液の最大容量は 4 ml で 1 回の C.W. 収量は E. coli で乾燥量約 5 mg である。

3) T I 型菌液破壊器の試作

第 3 図の装置は大量の C.W. を分離する目的で著者等が設計した試作品である。Mickle の装置と異なっている点は平行棒を有していないことである。この装置では

第 3 図

試料筒の重量が直接回転軸に作用し垂直運動を行うようになっているのである程度まで試料の容量並びに振盪速度を増すことが出来るようになっている。使用の要領は全長 13 cm, 外径 3.5 cm, 容量 50 ml の硬質硝子管内に 30 ml の菌液とその 1/3 容の硝子粉末を混入し、すり同せの硝

第 4 図

子蓋で密封する。(第 4 図)これを上下に弾性ゴムを挿入した外径 4 cm, 長さ 15 cm の金属性保護容器に入れる。試料筒の内面にはこの容器を納めるために直径 4.2 cm, 深さ 4.5 cm の孔が 4 個あけてあるから、その中に保護容器をはめてみ、上から固定円板でしっかりと固定する。モーターの出力は 1/2 馬力で振盪速度は 100~2000 回/分の間を自由に選択することができる。振幅は固定式で 6.5 cm である。試料容器 4 本を着装した場合の振盪菌液総量は 120 ml である。振盪速度は菌種並びに研究目的によつてそれぞれ異なっているが、大体において形態学を主とする場合は C.W. の過度な破壊や変形等をさけるために低速で処理し、免疫化学的試料を得るためには高速振盪を行つて充分に細胞を破壊するのが原則である。これらの条件は経験的に定める以外に方法はないが本装置では毎分 500~1,200 回転の間を選択すれば充分その目的を達成することができる。

III. 振盪菌液を処理して細胞膜を分離するまでの順序

硝子粉末と共に振盪した細菌浮遊液は下記の順序に従つて処理し、最後に C.W. と原形質分割液に分けることができる。この操作のうちで C.W. の純度検定は手数を要するが必ず行わなければならないのである。その際未破壊菌が多数混入していることがわかれれば、目的の純度が得られるまで低速遠心で不純物を除去する必要がある。これを忠実に実行すればどの菌でも 100% に近い純度の C.W. を分離することができるはずである。

細菌細胞膜分離法

生理的食塩水菌浮游液+硝子粉末

TI型細菌破壊器で 500~1200回/分10~60分間振盪

1,000 r. p. m. 10分間遠心 (硝子粉末除去)

上清

1,500 ~ 3,500 r.p.m. 10~20分間遠心 2回

上清

細胞膜純度の検定

10,000 r. p. m. 10~20分間遠心

上

↓

液 (pH 1.0)

VI. 細胞膜分離度を検定するための染色法

細胞膜の純度を検討するには電子顕微鏡の検査によるものが普通であるが、分離のたびにこの検定法を行うのは容易なことではない。しかし分離したC.W.を染色して光学顕微鏡的に検査する方法はまだ見出されていない。もともとC.W.はあらゆる色素に対して著しく難染性であるが、多数の色素を用いて種々実験した結果次のような方法で染色することに成功した。1) C.W.を塗抹乾燥。2) メタノール固定3分。3) 0.5% Victoria blue水溶液で10~20分間染色。4) 水洗乾燥、この染色法によるとC.W.は淡青色に染まり、少しでも原形質が残留していればその部分だけ青藍色に濃染する。たゞこの方法も抗酸性菌やコレラ菌に対しては無効であるが、後者の場合はAerosol AY 飽和水溶液を10分間作用させたから上記の染色を行えば他の菌と同程度に染色することができる。現在著者等は多くこの方法を用いてC.W.の分離度を検定しているがその他場合によつては位相差顕微鏡を用いたり、生菌数を測定したりすることもある。また Petropf Hauser Counting Chamber 等各種計算板を使用する方法もある。

V. TI 型細菌破壊器を使用した種々の基礎的実験

これから述べる実験は条件を簡略するため振盪速度は 800 回/分、菌液濃度は Mc Farland No. 3、容量は 20ml、硝子粉末 20gr に一定し C. W. 破壊率の算定には上記の染色法を採用した。

1. 各種細菌浮游液の振盪時間と細胞破壊状況

各種細菌の生理的食塩水浮游液を振盪し、時間的経過に従つて破壊率を算定したものが第5図である。これによると *B. subtilis* は20分間、*E. coli* B は40分間、*S.*

typh. H 901は60分間の振盪で 100%破壊されているが H. pertussis や St. aureus 209-P は60分間振盪しても尚それぞれ 9 %, 19%の未破壊菌が残っている。

第5図 各種細菌浮遊液の振盪時間と細胞膜破壊率

2. E. coli B 菌を各種 Medium に浮遊させて振盪したときの破壊状況

E. coli B 菌を蒸留水、食塩燐酸緩衝液、0.9%食塩水にそれぞれ浮遊させ振盪時間の経過を追って細胞の破壊率を算出したものが第6図である。蒸留水を用いたものは他の2者に比べてやゝ成績が良いようであるが、Victoria blue に対する染色性が低下しているのがみられた。これは恐らく溶液中のイオン強度が足りないために Lipoprotein が過剰に破壊脱落した結果であろうと推察される。

第6図 E. coli B 菌を各種溶液に浮遊した場合の振盪時間と細胞膜の分離状況

3. E. coli B 菌を各種 Medium に浮遊させて振盪したときの Medium 内 pH の変動

E. coli B 菌をそれぞれ pH 7.0 に修正した 0.9% 食塩水、蒸留水、磷酸緩衝液に浮游させて定法通り振盪した。対照としては菌を浮游させていない蒸留水を用いた。第 7 図は振盪経過につれて変動する溶液中の pH を示したものである。これによると菌浮游液に食塩磷酸緩衝液を使用した場合は 40 分間振盪しても pH は僅かに 0.3 上昇す

るだけであるが、他の溶液を使用した場合10分間の振盪でどの場合も 8.8 になり、40分間では遂に 9.3 にまで上昇する。このように溶液中の pH が急激に上昇する原因は混入した多量の硝子粉末が振盪するたびに互に衝突あるいは摩擦し合つて、さらに細かく砕け内部にもついていたアルカリ性物質を溶液中に遊離するためである。

第7図 E. coli B 菌を各種溶液に浮遊した場合の振盪時間による溶液中の pH の変動

総括並びに結論

従来細菌細胞膜を純粋に分離することは極めて困難と考えられていたが、分離装置自体を研究改良することによつてかなり大量の C.W. を容易に採取することができるようになった。今回著者等が報告した T I 型細菌破壊器もまだ改良の余地はあるが、現存している此の種の装置のうちでは最も効率のよいものであると考えている。この装置で細胞が破壊される原理は Mickle のそれと全く同じもので大体次のように解釈してよいと思う。即ち菌浮遊液と硝子粉末を密封した硝子容器内で激しく振盪すると溶液中に浮遊している細菌は鋭い断端をもつている硝子の小粒子に衝突して C.W. の一部が破壊される。この時の状態を E.M. で観察してみると C.W. だけでなくその破壊部分に相当して原形質膜も一部破れているのが多く見られる。C.W. の一部にこのような欠損ができると細胞内に存在しているコロイド状の原形質は C.W. 自身のもつている弾力性と振盪によつて生ずる周囲からの液圧であたかもしぼり出されるような状態で狭い破壊孔を通して激しく振盪している溶液中に放出され C.W. だけが分離されてくるのである。この分離度を左右する因子には振盪速度、振幅、硝子粉末量、菌液濃度並びに容量等が考えられるが、これらの条件は目的によつてそれぞれ適当に選択しなければならない。分離された C.W. には多かれ少なかれ原形質の薄片が附着しているのでそれを除去するために数回洗滌しなければならないが、その

際生理的食塩水でいくら洗滌しても無駄である。しかし磷酸緩衝液 (pH 7.0~7.2) を使用すれば有効にそれを除去する事が出来る。かくして得られた C.W. を EM によつて検討してみると多くの場合膜の破壊されている範囲は意外に小さく、しかもその殆んどが破壊される以前に細胞がもつていた固有の形を保有しているのがみられる。一般に球菌は桿菌よりも著しく破壊され難い。また同じ形状のものであれば大きい菌は小さい菌よりも破壊が容易である。C.W. の厚薄は破壊の難易に直接影響しない。この装置によつて酵素学的試料を得るには菌液並びに試料保護容器をあらかじめ充分冷却しておく必要がある。また pH の急激な上昇を考慮して菌浮遊液に使用する溶液は磷酸緩衝液を用いなければならない。現在著者等はこの装置を応用して芽胞菌細胞内に存在する芽胞を純粋に分離し芽胞膜を得ることに成功した。これらの研究は別報で詳しく報告するつもりである。

結 論

T I 型細菌破壊器を試作して細菌細胞膜の分離法を詳述し C.W. の新しい染色法として Victoria blue 法を案出した。

(本論文の要旨は昭和 30 年 11 月 3 日第 8 回日本細菌学会中四国支部総会で吉田が特別講演の一部として発表した)

参 考 文 献

- 1) Avery, O. T., and Cullen, G. E.: J. Exptl. Med., 32, 571-582, 1920.
- 2) Hugo, W. B.: Bact. Reviews., 18, 87-105, 1954.
- 3) Stevens, F. A., and West, R.: J. Exptl. Med., 35, 823-846, 1922.
- 4) Kalnitsky, G., Utter, M. F., and Werkman, C. H.: J. Bact., 49, 595-605, 1945.
- 5) Booth, V. H., and Green, D. E.: Biochem. J., 32, 855-861, 1938.
- 6) Hughes, D. E.: Brit. J. Exptl. Path., 32, 97-109, 1951.
- 7) Milner, H. W., Lawrence, N. S., and French, C. S.: Science, III, 633-634, 1950.
- 8) Fraser, D.: Nature, 167, 33-34, 1951.
- 9) 吉田長之, 田中三郎, 福家勇, 高石憲治, 西野健二, 角谷公: 日本細菌学雑誌, 10 (6), 561-567, 1955.
- 10) Mickle, H.: J. Roy. Microscop. Soc. 68, 10-12, 1948.
- 11) Smithies, M. R., Gibbons, N. E., and Bayley, S. T.: Canadian J Microbiology., 8, 605-613, 1955.