原 著

細菌芽胞殻に関する研究

1) *Bacillus megaterium* の芽胞殻の形態構造

川崎近太郎 西原 力 近藤雅臣

大阪大学薬学部衛生化学教室

(受付: 1月7日, 1970年)

芽胞乾燥重量の30~50%を占める芽胞殻は、発芽誘導物質と最初に接触する場であり、発芽による変化の多くがこの外被構造の透過性の変化に基づくと考えられることから、発芽開始機構において芽胞殻が重要な役割を演じているものと推察される。したがって、この芽胞殻の物理的、化学的構造およびその発芽時変化を明らかにすることができるならば発芽開始機構の解明に重要な手がかりが得られるものと考えられる。芽胞殻は通常2~3層からなる複雑な構造を有している (Robinow⁷⁾, Ohye & Murrell⁸⁾) が、前述の目的で研究を行なう場合、従来のように芽胞殻全体について分析を行なう (Murrell⁵⁾) のではなく、各層の物理的、化学的構造あるいはこれら各層のうち、どの層が発芽のさい、変化をうけるかなどを追求する必要がある。

Bacillus 属の芽胞とくに *B. megaterium* に属する芽胞はすべて Glucose と KNO₃ により発芽する群と、L-Alanine と Inosine により発芽する群に大別され (Hyatt & Levinson¹⁾)、両群の芽胞は発芽誘導物質以外に、表面構造、発芽時の表面構造の変化、リン、DPA (Dipicolinic acid)、Hexosamine 含量および耐熱性などにおいても対照的な性質を示すことが知られており (Rode & Williams⁹⁾, Rode⁸⁾)、*B. megaterium* QM B1551 (以下1551菌と略す) および *B. megaterium* ATCC 19213 (以下19213菌と略す) がそれぞれの代表株としてあげられる。

したがって、1551菌と19213菌について得られた共通な結果は少なくとも *B. megaterium* においては一般性のあるものと考えられる。そこでまず両菌株の芽胞殻を Kondo & Foster³⁾ の方法により、物理的、化学的に特徴ある3つの分画すなわち、Alkali-soluble Fraction, Paracrystal Fraction および Resistant Fraction (以下それぞれ A-Fr, P-Fr および R-Fr と略す) に分離し、その分画処理前後の沈渣の超薄切片像の比較から、各分画が芽胞殻のどの層に由来するか、またどのような形態

で存在するかを検討し、芽胞殻の物理的、化学的構造を明らかにするための基礎的知見を得ることを試みた。

実験材料ならびに方法

(1) 使用菌株および保存法

B. megaterium QM B1551 および ATCC 19213 を普通寒天斜面培地に4週間毎に植え継ぎ、37°C で24時間増殖させ、冷蔵庫内に保存した。

(2) 静止芽胞収集法

保存菌株より普通寒天斜面培地で37°C、24時間前培養し、この前培養菌を滅菌蒸留水に懸濁し、滅菌綿棒にて芽胞形成用培地 (表1) に塗布したのち、37°C にて3日間培養して芽胞を形成させた。形成した芽胞はコンラージ棒にて集菌し、99% 以上が静止芽胞となるまで脱塩水で冷却下遠沈洗浄を繰返したのち、凍結乾燥して保存した。

(3) 芽胞殻分画法

概略を図1に示したが Kondo & Foster³⁾ の方法に従って A-Fr, P-Fr, R-Fr に分画した。すなわち、芽胞を Braun 細胞破碎機にて完全に破碎し (2,000 rpm, 60分)、破碎物 (Debris) を Lysozyme (SIGMA) で37°C、20時間処理し、洗浄後脱塩水で冷却下一夜透析して精製した芽胞殻 (Spore Coats) を得た。この Spore Coats を出発物質として 1/16 N-NaOH 中に O.D. (Optical Density at 610 mμ, 10 mm Cell) 0.9 以下に懸濁し、50°C、30分アルカリ処理を行ない、遠沈 (10,000 rpm, 30分) により上清と沈渣 (Residue I) に分け、上清は Millipore Filter (0.45 μ) を通過させて混入沈渣を除き、ろ液を N-HCl で中和後 40°C 以下で減圧濃縮し、これを透析したものを A-Fr とした。Residue I は洗浄後、冷却下音波処理 (20 KC, 30分) を行ない、遠沈 (10,000 rpm, 20分) により上清と沈渣 (Residue II) に分け、上清は透析して P-Fr とし、Residue II はさらに 50°C で20

Table 1 Medium for Sporulation of *B. megaterium*

(A)	Glucose	1000 mg,	MgSO ₄ ·7H ₂ O	200 mg,
	NaCl	100 mg,	L-Glutamate	1000 mg,
	Trace Elements*	10 ml,	Yeast Extracts	500 mg,
	Agar	20 g,		
Dissolve in 800 ml of distilled water and adjust pH to 6.9.				
(B)	(NH ₄) ₂ HPO ₄	200 mg,	KH ₂ PO ₄	1000 mg,
Dissolve in 200 ml of distilled water and adjust pH to 6.9.				
Mix (A) and (B) after autoclaving and pour to plates.				

* CaCl₂; 500 mg, MnSO₄; 700 mg, ZnSO₄; 1000 mg,
FeSO₄; 100 mg in 1000 ml.

時間 Pronase (科研：プロナーゼ P) 処理を行ない、洗浄後透析して R-Fr とした。なお各分画は凍結乾燥したのち、デシケーター中に保存した。

Fig. 1 Scheme for Fractionation of Spore Coats

(4) 電子顕微鏡操作

試料を Kellenberger ら²⁾の方法に準じて 1% OsO₄ で固定し、酢酸ウランウムで染色し、脱水後 Epon 812 (A:B=3:7) に包埋した。ミクロトーム (日本電子：JUM-5 型) にて超薄切片を作製し、電子顕微鏡 (日本電子：JEM-120 型) を用いて観察した。

実験成績

(1) *B. megaterium* QM B1551 の芽胞殻構造と各分画の関連

芽胞殻から分離した特徴的な 3 分画の存在部位、ならびに存在形態を検討するために 1551 菌の芽胞殻分画操

作各段階において、各分画除去前後の沈渣の形態的变化を切片像の比較により観察した。

1551 菌の芽胞殻は厚い electron-dense な外層と不明瞭ではあるが electron-lucent な内層とから構成されていた (写真 1)。芽胞を破碎して得た Debris ではこの内層に内接して Cortex の一部と思われる付着物が認められた (写真 2)。この Debris を Lysozyme で処理するとその付着物は消失し、内層と外層の二層のみとなり、内層に繊維構造がわずかに観察されるものもあった (写真 3)。

さらにアルカリ処理して A-Fr を除去した芽胞殻 (Residue I) では内層部にはっきりとした繊維構造があらわれ (写真 4)、この繊維構造の間隙を充填していた成分が A-Fr に相当することが明らかとなった。Residue I をさらに音波処理をして P-Fr を除去した Residue II では、electron-dense な外層のみが残り、繊維構造部分がまったく消失した (写真 5)。このことは P-Fr が内層の繊維構造を形成していることを示すものである。残った外層部は Pronase 処理により、やや粗構造となったが、大きな変化はなく、この部分が R-Fr に相当することがわかった (写真 6)。

(2) *B. megaterium* ATCC 19213 の芽胞殻構造と各分画の関連

1551 菌と同様の操作により、19213 菌の芽胞殻の各分画の存在部位および存在形態を検討した。

19213 菌の芽胞は 1551 菌の芽胞に比してやや小型で、その芽胞殻は薄く、とくに外層は薄かった (写真 7)。Debris およびそれを Lysozyme 処理して得た芽胞殻は 1551 菌の場合とは異なり、芽胞形態が維持されず、芽胞殻構造、とくに外層が物理的障害にたいして軟弱な構造であると推察されたが、1551 菌と同様 electron-dense

な外層と electron-lucent な内層の2層からなることが認められた(写真8, 9)。

さらに A-Fr を除いた Residue I では 1551 菌の場合と同様に、繊維構造が electron-dense な層に近接した部分に観察された(写真10)。このことからアルカリ処理により抽出された A-Fr が内層の繊維構成成分の間隙を充填していたものと考えられ、そのためにアルカリ処理以前では繊維構造が観察されなかったといえる。さらに Residue II では写真11のように内層部の繊維構造の大部分が消失し、この内層部の繊維構成成分が音波処理により溶出される P-Fr に相当することが明らかとなった。

写真11の場合は音波処理が不完全であったためか、部分的に付着した内層がみられるが、音波処理を十分に行ない、Pronase 処理を行なうと外層のみとなり(写真12)、外層が R-Fr からなることがわかった。以上から 19213 菌の芽胞殻外層は R-Fr からなり、内層は A-Fr と P-Fr の立体的な組み合わせからなり、1551 菌の場合と同様であることが明らかになったが、1551 菌と比較して 19213 菌の外層が薄く、また軟弱な構造であることが特徴的であった。

考 察

本報の結果は Kondo & Foster³⁾ により、1551 菌および 19213 菌の芽胞殻から単離された化学的、物理的に特徴ある分画の各々が芽胞殻のどの構造に由来するのかを明らかにしたものといえる。すなわち図2に模式化したように R-Fr が芽胞殻外層に相当し、P-Fr が内層の繊維構造を形成し、その間隙を A-Fr が充填しているものと考えられる。1551 菌と 19213 菌を比較した場合、形態的に差が認められたのは外層であり、内層の A-Fr および P-Fr には差が検出できなかった。

Rode & Williams⁹⁾ は 1551 菌と 19213 菌の外被構造に関する形態学的観察を行ない、芽胞を次亜塩素酸で処理したとき、Outermost Integument, Fibrillar Integument および Membranous Integument の3層が分離してくることを報告している。その際 Outermost Integument が最外層であり、1551 菌と 19213 菌においてその厚さや次亜塩素酸にたいする抵抗性が異なることなどから、R-Fr に Outermost Integument が相当し、また Fibrillar Integument はその存在部位および形態から P-Fr からなる繊維構造に相当するといえる。

しかし Membranous Integument は超薄切片像では観察されず、このことは芽胞殻の処理方法の違いに起因

するかもしれないが、この膜構造がアルカリ性における次亜塩素酸処理によって分離すること、また A-Fr は層状構造をとらないことなどから、A-Fr とは関係のないものであり、むしろ Outer Cortex Layer などに相当するものと推察される。A-Fr の形態に関しては Kondo & Foster⁴⁾ は Alkali-soluble Layer として Paracrystal Layer に重層しているか、あるいは Resistant Layer と Paracrystal Layer の間にはさまれて存在するものと予想しているが、本報告における超薄切片の電顕像から、この A-Fr は層状構造をとらず、P-Fr から構成される繊維構造の間隙を充填していることが明らかとなった。

したがって芽胞殻内層はこの両者の立体的な組み合わせより構成されているものと考えられ、1551 菌と 19213 菌において差がみられないところから、少なくとも *B. megaterium* の芽胞殻内層は共通の構造を有するものと推察される。また無処理の *B. cereus*, *B. coagulans*, *B. stearothermophilus*, *B. subtilis* の芽胞において芽胞殻内層に繊維構造が存在することが、Warth¹⁰⁾ によって報告されているが、これはこれらの芽胞においても芽胞殻内層部に P-Fr に相当する構成成分が存在することを証明するものといえる。

また *B. subtilis* の繊維構造が、煮沸した芽胞においてより鮮明に認められることや、電顕操作の細部における違いなどから、これらの観察結果は A-Fr 相当成分の存在をまったく否定するものではなく、これらの芽胞においても内層部において P-Fr 相当成分以外に A-Fr 相当成分も存在することが予想される。したがって *B. megaterium* の芽胞殻構造の検討から明らかとなった内層構造は、他の菌種の芽胞殻にも存在し、芽胞殻内層の基本的な構造であることが示唆される。

Fig. 2 Diagrammatic Interpretation of Spore Coat Structure of *B. megaterium*

総 括

B. megaterium の1551 菌と19213菌について芽胞殻を物理的, 化学的処理により, A-Fr, P-Fr および R-Fr に分画し, その分画処理各段階の沈渣の超薄切片の電顕観察を行ない, 各分画が芽胞殻のどの構造に由来するかを明らかにした。

1) 1551 菌の芽胞殻は electron-dense な外層と electron-lucent な内層をもち, 外層は主として R-Fr からなり, 内層は繊維構造を示す P-Fr と層状構造をとらず, P-Fr の構造の間隙を充填する形で存在する A-Fr の立体的な組み合わせからなっていることが明らかとなった。

2) 19213 菌においても1551 菌の場合と同じく, 芽胞殻は内外2層からなり, 外層は R-Fr から, また内層は繊維構造を示す P-Fr とそれを充填する A-Fr の組み合わせから構成されていた。

3) 以上を模式化すると図2のようになり, 両菌を比較すると内層は共通な構造からできていたが, 外層は異なり, 1551 菌の外層は19213 菌のそれよりも厚かった。

なお本研究の一部は日本薬学会第88年会総会(1968年)

および第41回日本細菌学会総会(1968年)にて報告した。

本研究における電子顕微鏡操作に関してご援助をいただいた日本電子株式会社に感謝します。

文 献

- 1) Hyatt, M. and Levinson, H. S. (1961): J. Bacteriol., **85**, 204-211.
- 2) Kellenberger, E. *et al.* (1958): J. Biophys. Biochem. Cytol. **4**, 671-678.
- 3) Kondo, M. and Foster, J. W. (1967): J. Gen. Microbiol., **47**, 257-271.
- 4) Kondo, M. and Foster, J. W. (1967): Biken J. **10**, 243-251.
- 5) Murrell, W. G. (1967): Advance in Microbial Physiol., **1**, 133-251.
- 6) Ohye, D. F. and Murrell, W. G. (1962): J. Cell Biol., **14**, 111-123.
- 7) Robinow, C. F. (1960): The Bacteria (Edited by Gunsales, I. C. and Steinier, R. Y., New York, Academic Press), **1**, pp. 207-248.
- 8) Rode, L. J. (1968): J. Bacteriol., **95**, 1979-1986.
- 9) Rode, L. J. and Williams, M. G. (1966): J. Bacteriol., **92**, 1772-1778.
- 10) Warth, A. D. *et al.* (1963): J. Cell Biol. **16**, 579-592.

Studies on the Bacterial Spore Coat

1) Morphological Structure of the Spore Coat of *Bacillus megaterium*

Chikataro KAWASAKI, Tsutomu NISHIHARA and Masaomi KONDO

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Osaka University, Toyonaka, Osaka

The spore coat structures of two strains of *Bacillus megaterium* were studied. The coat residues isolated from the dormant spores of both strains were fractionated successively by alkali-treatment, sonication, and enzymatic digestion. Then morphological changes of the residues were observed electron-microscopically at each step of the treatment. From the observation, it was suggested that the spore coats of both strains might consist of two layers, and that the inner layer might be composed of a fibrillar skeleton structure containing alkali-soluble material as a structural component between the two layers.

Photo 1-6 Dormant Spore and Spore Coats of *B. megaterium* QM B1551

- Photo 1 Dormant Spore
- Photo 2 Debris
- Photo 3 Spore Coats (Lysozyme-treated)
- Photo 4 Residue I (Alkali-extracted)
- Photo 5 Residue II (Sonically disintegrated)
- Photo 6 Resistant Fraction (Pronase-treated)

Photo 7-12 Dormant Spore and Spore Coats of *B. megaterium* ATCC 19213

- Photo 7 Dormant Spore
- Photo 8 Debris
- Photo 9 Spore Coats (Lysozyme-treated)
- Photo 10 Residue I (Alkali-extracted)
- Photo 11 Residue II (Sonically disintegrated)
- Photo 12 Resistant Fraction (Pronase-treated)