細菌の脂肪酸構成とその細菌学的意義について

小 島 良 平

協和醸酵東京研究所
東京都町田市旭町 3-6-6 〒 194

〔受付：3月27日，1971年〕

各種細菌の脂肪酸構成を分析した結果，これがそれぞれの細菌の属に特徴的であり，この性質を細菌の分類学に利用しうる可能性を強く示唆する成績を得た。

また用いた細菌の構成している脂肪酸は直接もしくは間接にこれらの細菌の生物学的性質と関係をもつことについて，主として溶血阻止性およびアジュバント効果などの研究結果から考察を加えた。

ストーブラ¹³⁾によつてはじめられたサルモネラのO抗原の化学的研究は，ウエストファールらによつて系統的に発展せしめられ，従来の血清学的分類に対応した化学型の概念が提称された⁹⁾。彼らの仕事の中心は菌体O抗原の単糖構成の解析とその血清型との関係を明らかにすることにある。

リュエデリッツならびにウエストファールにより考案された円形濾紙クロマトグラフィ¹⁰⁾は，展開剤や染色方法ならびに濾紙の種類を変えることにより，脂肪酸の分析にも用いることができる。私はグラム陽性ならびに陰性の各種細菌の構成脂肪酸のパターンについて検討した結果，菌属によつて，その構成脂肪酸が異なることに気づき，しかも，それらの間に一定の規則性があることから，かかる性質が細菌の分類に利用しうるのではないかと考えて，以下の実験と考察を行なった。

脂肪酸の分析法としては円形濾紙クロマトグラフィの他に山川ら¹⁶⁾が開発したガスクロマトグラフィも併用した。

材料と方法

菌株と培養方法：ブドウ球菌（寺島），溶連菌（S8），炭疽菌，ジフテリア菌（PW-8），緑膿菌（B株，P:A，および土島株）腸炎菌，チフス菌（O901），赤痢菌（大原およびEw-1），コレラビブリオ（稲葉），大腸菌（滝2）は伝研（東大医科研）の保存菌株を，ビブリオの11株は予研から分与されたものを用いた。なおサルモネラの5株および大腸菌（O111）のアセトン乾燥

菌体はキックハーフェン博士より分与された。培養方法に関しては文献8および9を参照されたい。

菌体の処理法：固型培地に発育した菌は白金耳でかきとり，液体培地に発育させた菌は遠心して集め（湿菌重量約3g）蒸留水で軽く遠心洗浄したのち再び蒸留水に懸濁させ，100～120°Cで30分加熱殺菌後，図1のごとく分画を行なった。時には生菌を直接に凍結乾燥して用いた。フェノール法による分画はウエストファールの方法に従った¹⁵⁾。

円形濾紙クロマトグラフィ：前述のごとくリュエデリッツら¹⁰⁾の方法に準じて行なった。濾紙は東洋濾紙No.1を用いた。試料20mgを5mlの6N-HCl中で110°C，14時間水解したのち，5mlのエーテルで3回抽出し，エーテルを留去したのちベンゼンに溶かし白金耳で濾紙にのせた。濾紙はあらかじめクロシン（Bp 200～260°C）に浸したのち約3日間空气中で乾かしておいたものを用いた。展開剤には85%酢酸が用いられ，直径9cmのペトリ皿にこれを入れ，濾紙の中心から4本のガス糸を束ねてたらし，糸の下端をペトリ皿内の展開剤中にひたした（図2参照）。展開時間は8～10時間とし，室温は一定（22°C）にしかも容器内は気密に保つようにした。

展開後，空気乾燥したのち0.5%の酢酸銅溶液に30分，水洗30分，ついで0.5% $K_4[Fe(CN)_6]$ 溶液に2～3滴の1N-HClを加えた液中に10分間浸し，最後に十分流水で洗つてから空気乾燥した。以上の処理により脂肪酸は紫褐色に染まり，この色は長く退色しない。

ガスクロマトグラフィ：日立 KGL-2A を用い，試料

Fig. 1. Schema of the Fractionation of the Lipids

Fig. 2. Technique of Round Filter Paper Chromatography

室 270C, 恒温槽 190C, 3~4 m のエチレングリコール・コハク酸ポリエステル 16~20% の日立担体を用い, He を移動相とし (40~50 ml/min), 試料は 1 mcg 程度と

し, 各成分の百分率は面積比から算出した。

ガスクロマト用試料の作製: ガスクロマト用試料の作製には, (1) 凍結乾燥菌体または他の試料をエーテル抽出, (2) クロロホルム・メタノール (2:1) で振とう後, 1 夜放置してから濾紙で濾過, 濾紙はクロロホルム・メタノール・水 (8:4:3) で洗って, 総脂質を下層に転溶せしめ, 溶媒を留去, (3) 脂質数 mg に 3% HCl 加メタノール 5~6 ml を加えて封じ, 100 C で 3 時間加熱後, 石油エーテルで抽出, 水洗によって脱塩酸したのち乾燥した。

溶血反応術式: 溶血反応の術式については文献 8 の方法によった。

成 績

グラム陽性ならびにグラム陰性の菌約 10 株について, 脂質を円形濾紙クロマトグラフィで分析した結果は, 表 1 のごとく, 従来いわれていたように, ジフテリア菌を

除いてはグラム陽性菌の脂質含量は少なかった。溶連菌では, クロロホルム可溶部分の量が比較的多かったが, その外観は他の菌の脂質とはいちじるしく異なっていた。図 3 にグラム陽性菌 3 属 3 株, およびグラム陰性菌 5 属 9 株のタンパク分画の脂肪酸の円形濾紙クロマトグラフィを示す。

グラム陽性菌では脂質の含量が少ないのみならず, 脂肪酸の種類も少なかった。パルミチン酸, ステアリン酸, ミリスチン酸, ラウリン酸ならびにオキシミリスチン酸などはほとんどすべてのグラム陰性菌に共通に認められた。緑膿菌の 2 株においては, カブロン酸も検出された。

表 2 には, サルモネラ 5 株, および大腸菌 O111 の脂肪酸構成を円形濾紙クロマトグラフィでみた成績をかかげた。サルモネラと大腸菌 O111 の脂肪酸パターンは近似しており, いずれも 4 種類の脂肪酸がみとめられた。

ガスクロマトグラフィによる上述の試料の脂肪酸構成の成績を図 4 と表 3 に示した。菌種により明らかに脂肪

Table 1. Lipid Compositions of the E-Fraction in the Heated Extract of Various Bacteria

Bacterial strains		Palmitic acid	Myristic acid	Lauric acid	Capronic acid	Oxymyristic acid
Gram +	<i>Streptococcus hemolyticus</i> (S8)	—	—	—	—	—
	<i>Bacillus anthracis</i>	+	+	—	—	—
	<i>Corynebacterium diphtheriae</i> (PW-8)	±	—	—	—	—
Gram -	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (Tsutijima)	++	+	++	+	+
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (B)	++	++	+	—	+
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (P:A)	++	+	+	+	+
	<i>Salmonella enteritidis</i>	+	+	±	—	+
	<i>Salmonella typhi</i> (O901)	+	±	—	—	—
	<i>Shigella sonnei</i> (Ohara)	+	±	±	—	—
	<i>Shigella dysenteriae</i> (Ew-1)	+	±	±	—	±
	<i>Vibrio cholerae</i> (Inaba)	++	++	+	—	±
	<i>Escherichia coli</i> (Taki 2)	+	±	±	—	±

Round filter paper chromatography.

Table 2. Lipid Composition of Several Species of Enterobacteriaceae

Bacterial strains	Palmitic acid	Myristic acid	Lauric acid	Oxymyristic acid	Lipid contents %
<i>Salmonella abortusequi</i>	++	+	+	+	
<i>Salmonella paratyphi</i> A	++	trace	+	++	
<i>Salmonella paratyphi</i> B	+	+	+	+	3.9
<i>Salmonella kiel</i>	+±	±	+	+±	5.4
<i>Salmonella zewo</i>	+	+	+	+	
<i>Escherichia coli</i> O111	++	+	+	+	4.6

Acetone dried cells, round filter paper chromatography.

Table 3. Fatty Acid Compositions of the Ether-Soluble Bacterial Lipids

Bacterial strains	C ₆	C ₈	C ₁₀	C ₁₂	C ₁₄	C ₁₆₌₀	C ₁₆₌₁	C ₁₈₌₀	C ₁₈₌₁	C _{20<}	Others
<i>Staphylococcus aureus</i> (Terajima)					3	14		12		5	67
<i>Corynebacterium diphtheriae</i> (PW-8)	2	3	3	4	6	45	21	10	6		
<i>Vibrio cholerae</i> (Inaba)					2	39	30	3	25		2
<i>Shigella sonnei</i> (Ohara)				2	26	38	9	1	12	6	5
<i>Shigella dysenteriae</i> (Ew-1)				3	13	56	9	2	12	6	

Gas chromatography.

酸パターンが異なっているのが認められる。赤痢菌の2株は互によく似たパターンを示した。

ガスクロマトグラフィの成績からみると、グラム陽性菌では C₆, C₈, C₁₀ のごとき炭素数の少ない脂肪酸がみられるのが特徴的であり、C₁₆ および C₁₈ などはグラム陽性菌でも陰性菌でも認められた。C₁₆₌₁, C₁₈₌₁ といった不飽和脂肪酸はグラム陰性菌にみられ、なかんずくビブリオにおいてその含量が著しく多かつた。図5と表4

とにビブリオについての成績をかかげる。これからもわかるように、ビブリオの脂肪酸パターンはすべてよく一致しており、新鮮分離株である Woolliams 株と他の保存株との間にも差はみられなかつた。また、菌の血清学的な相違にも左右されることはなかつた。使用した全部のビブリオ株において C₁₂₌₀, C₁₄₌₀, C₁₆₌₀, C₁₆₌₁, C₁₈₌₀, ならびに C₁₈₌₁ が認められ、かつ C₁₆₌₁ と C₁₈₌₁ の和は C₁₆₌₀ と C₁₈₌₀ の和よりも多く、両者の和の比を

Fig. 3. A Paper Chromatogram of the Fatty Acid of E-fractions from Several Bacteria

Table 4. Lipid Compositions of Vibrios

Strains of Vibrio	C ₁₂₌₀	C ₁₄₌₀	C ₁₆₌₀	C ₁₆₌₁	C ₁₈₌₀	C ₁₈₌₁	Others	$\frac{C_{16=1}+C_{18=1}}{C_{16=0}+C_{18=0}}$
<i>Vibrio cholerae</i> (3611)	+	5.2	17.3	16.7	6.6	12.8	41.4	1.2
<i>Vibrio cholerae</i> (Ogawa)	+	7.5	25.1	21.1	4.0	10.1	34.2	1.1
<i>Vibrio cholerae</i> (Woolliams)	+	7.4	30.4	25.5	2.5	10.5	23.7	1.1
<i>Vibrio cholerae</i> (D-80)	+	6.3	22.7	23.3	4.0	14.9	29.8	1.4
<i>Vibrio cholerae</i> (D-4227)	5.2	6.2	25.2	25.2	3.5	23.4	22.3	1.7
<i>Vibrio cholerae</i> (124)	+	7.5	28.0	26.5	2.9	12.7	22.4	1.2
<i>Vibrio cholerae</i> (Inaba)	+	4.5	10.6	18.5	2.0	6.0	58.9	1.9
<i>Vibrio cholerae</i> (5457)	+	4.7	10.7	10.9	1.4	5.7	66.0	1.3
<i>Vibrio cholerae</i> (Tol A) (Denken)	+	8.6	24.9	22.6	1.8	9.4	32.7	1.2
<i>Vibrio cholerae</i> (1715)	+	6.5	26.9	27.4	1.6	15.6	12.0	1.5
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> (5497)	+	5.2	23.3	24.0	2.5	13.4	31.6	1.4

Acetone dried cells, gas chromatography.

Fig. 4. Fatty Acid Patterns of Several Bacteria by Gas Chromatography

とつてみると1.1~1.9であつた。この比もまた菌株それぞれの血清型とは無関係であつた。

考 察

分析機器の進歩と普及につれて細菌の脂質についての知識はかなり進歩してきた。著者と全く別個に多くの研究者によつて研究された知見がケイツ²⁾によつてまとめられている。

しかし、各種細菌の脂肪酸パターンの相異を細菌の分類に役立てようとする積極的な考え方は、小島の発表²⁾以前にはみられなかつた。また、小島の示したビブリオの例以外にも、ナイセリアについての山川ら¹⁰⁾の研究をはじめ、数多くの報告がその後みられるようになった。最近、鈴木らのコリネバクテリウムについての報告もみられる¹⁴⁾。

これらの報告のうち、培養条件の相異その他によつて

脂肪酸パターンに変化がみられるということもあるが、条件を定めた場合には、脂肪酸パターンは菌属によりかなり安定した特徴がみられるので、分類のための参考に十分利用しようと考えられる。

さらに、かかる細菌の脂肪酸パターンと、それぞれの菌の生物学的性状との間に何か関係がないであろうかという点について、実例をあげて考察したいと思う。その具体的な例として、溶血阻止性と脂質の関係、好塩性と脂質の関係、アジュバント効果と脂質の関係をとりあげてみる。

すでに報告したごとく²⁾、菌体加熱抽出物で感作した赤血球にモルモット血清を添加すると、菌の種類によつては強い溶血がみられた。中には全く溶血を示さぬ菌もあつた。しかしこれらの加熱抽出物(粗抽出物とよぶ)からトリクロル酢酸沈澱で分画したタンパク質分画(E分画)には例外なしに強い溶血活性がみられた。したが

Table 5. Hemolytic Activities of the Bacterial Heated Extract and the E-fraction and Hemolysis Inhibiting Factor in the Heated Extract

Bacterial species	Hemolytic titer of heated extract [1]	Hemolytic titer of E-fraction [2]	[1]/[2]	Yield of E-fraction/Yield of heated extract	Influences of the other factors upon the hemolytic activity of E-fraction	Supposed Inhibition factor
<i>Staphylococcus aureus</i>	$n=10^a$	$n=12$	4	0.22	—	
<i>Streptococcus haemolyticus</i>	6	8	4	0.16	—	
<i>Bacillus subtilis</i> ^b	5-7	8	2-8	0.15	—	
<i>Bacillus anthracis</i>	9	9-10	1-2	0.45	—	
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	< 1	8	256<	0.13	inhibition	L
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	8	4-5	0.12-0.06	0.13	acceleration	
<i>Shigella dysenteriae</i>	< 1 or 1	4-7	8-128	0.17	inhibition	L
<i>Shigella sonnei</i>	5-7	9	4-16	0.27	inhibition	L
<i>Salmonella typhi</i>	3	10-12	64-128	0.25	inhibition	L
<i>Salmonella enteritidis</i>	7	4-3	0.12-64	0.37	?	P
<i>Proteus vulgaris</i>	< 1	10	1024<	0.35	inhibition	P
<i>Brucella abortus</i> ^b	< 1	11	2048<	0.27	inhibition	L
<i>Escherichia coli</i>	< 1	2-6	64<	0.04	inhibition	L
<i>Vibrio cholerae</i>	< 1	3-6	64<	0.57	inhibition	P

L : Lipids ; P : Denaturated proteins.

^a Dilution factor in 2^{-n} mg/ml.

^b See literatures 3 and 4.

つてE分画の溶血を抑える物質が粗抽出物中に存在することが考えられる⁹⁾。トリクロル酢酸添加の上清から分離した多糖体と核酸からなる分画には、溶血性も溶血阻止性もみとめられなかつたので、結局脂質が、溶血阻止の主役を担うものと考えられる。このことは、表5に示したように粗抽出物、E分画の溶血活性ならびにそれぞれの収量を比較してみると一層よく理解しうる。

粗抽出物において溶血活性の見られなかつたジフテリア菌、赤痢菌、大腸菌およびコレラ菌では脂質の含量が多く、とくに不飽和脂肪酸の含量が多いことが注目される。本溶血反応は補体を必要とすること³⁾、さらに不飽和脂肪酸の抗補体性についての報告もみられたので、その辺に原因を求めることが出来ると思われる。

E分画の溶血活性はグラム陽性菌においては比較的安

定しているが、グラム陰性菌においては酸化により急激に活性の低下がみられることが観察されたので、グラム陰性菌の脂質における不飽和脂肪酸の多いこととかなり関係しているのではないかと推測される。ちなみにカシュナー¹⁰⁾は好塩菌の好塩性の原因がリン脂質のリン酸基に由来する荷電によると推測している。

その他結核菌がフロイン드의完全アジュバントとして用いられているが、小島は類縁のアルスロバクターにもアジュバント効果をみとめた⁶⁾。両者に共通してみられる脂肪酸のトレハロースエステルとの関与がうかがわれる。あるいは糖をはずした長鎖の脂肪酸部分により密接な関係が求められるのかも知れない。何となれば糖エステルはきわめて強い毒性を有するからである⁹⁾。

以上のように菌体の構成成分としての脂肪酸のパター

Fig. 5. Fatty Acid Compositions of Several *Vibrio* Strains by Gas Chromatography

ンは、細菌の生物学的性質の一部ときわめて密接な関係をもつことは注目に値する。ショイエルブランドとブロッホ¹²⁾の研究を見ても脂肪酸の代謝様式が菌の分類学上の地位と酵素レベルにおいてすでに対応していることを示唆していることから、脂肪酸パターンは細菌の分類に有効に利用できると思う。その際特に脂肪酸パターンと菌属の関係が中心の問題としてとり上げらるべきであろう。

一方微生物の脂肪酸組成が、培養条件や¹⁾、抗生物質耐性となつた場合に変化したり⁸⁾、また脂肪酸に関する変異株についての報告¹¹⁾などもみられるので、一応はこうした事実の存在も考慮した上、菌属 (genus) に特有な脂肪酸パターンの特徴を研究して行くことが、今後の問題ではないかと考えている。

本研究は1962年に着手し、1965年6月(第18回日本細菌学会関東支部例会)において発表した⁵⁾。その後二、三の研究の成績を加えて考察を行なつた。

円形濾紙クロマトグラフィに関しては Max-Planck 免疫生物学研究所 (Freiburg) の O. Westphal 教授ならびに B. Kickhöfen 博士の御教示に、またガスクロマトグラフィについては東大生化学教室の山川教授ならびに植田博士をわずらわしたので感謝する。ピプリオの株を分与していただいた予研の和気朗博士に厚く感謝する。

文 献

- 1) Bunn, C.R., McNeill, J.J. and Elkan, G.H. (1970): *J. Bact.*, **102**, 24-29.
- 2) Kates, M. (1964): *Bacterial Lipids*, In: *Advances in Lipid Research*, Vol. 2, pp. 17-90, N.Y. & London, Academic Press.
- 3) 小島良平 (1960): 日細誌, **15**, 496-502.
- 4) 小島良平 (1960): 日細誌, **15**, 556-563.
- 5) 小島良平 (1966): 日細誌, **21**, 190.
- 6) 小島良平: 未発表.
- 7) Kushner, J. and Onishi, H. (1966): *J. Bact.*, **91**, 653-660.
- 8) Lechevalier, M.P., Horan, A.C. and Lechevalier, H. (1971): *J. Bact.*, **105**, 313-318.
- 9) Lüderitz, O., Staub, A.M. and Westphal, O. (1966): *Bact. Rev.*, **30**, 192-255.
- 10) Lüderitz, O. und Westphal, O. (1952): *Z. Naturforsch.*, **7b**, 136-137.
- 11) Mortimer, R. (1966): *J. Bact.*, **92**, 597-600.
- 12) Scheuerbrandt, G. and Bloch, K. (1962): *J. Biol. Chem.*, **237**, 2064-2068.
- 13) Staub, A.M. and Tinelli, R. (1957): *Bull. Soc. Chim. Biol. (Paris)*, Suppl. **1**, 65-83.
- 14) Suzuki, T., Tanaka, K., Matsubara, I. and Kinoshita S. (1969): *Agr. Biol. Chem.*, **33**, 1619-1627.
- 15) Westphal, O. und Lüderitz, O. (1961): *Pathol. et Microbiol.*, **24**, 870-889.
- 16) Yamakawa, T. and Ueta, N. (1964): *Jap. J. Exp. Med.*, **34**, 361-174.

Fatty Acid Compositions of Bacteria and Their Application to Bacterial Classification

Ryohei KOJIMA

Tokyo Research Laboratory, Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd., Machida, Tokyo

The fatty-acid compositions of various bacterial strains, including vibrios and other groups of organisms, were examined. It was evidenced that some groups of bacteria had a genus-specific fatty acid composition. It was suggested that this characteristic might be available for the bacterial classification.

The relationship between the fatty-acid compositions and biological properties of bacteria was discussed, taking such characteristics as hemolysis-inhibiting capacity and adjuvant activity into consideration.