超薄切片法に依る醱酵微生物の構造に関する研究 (第 1 報)*

Aspergillus oryzae の conidia, *Streptomyces griseus* の spore及び *Clostridium acetobutylicum* の構造について

板垣史郎, 古川 稔, 木下祝郎 (協和醱酵工業株式会社東京研究所)

昭和 33 年 9 月 25 日 受理

緒 言

超薄切片法は細菌学の領域にも新しい有力な研究方法として採用されて居るが、既に本法を用いて微生物の内部微細構造の観察が可成り試みられ、相当の知見を得て居る。之等の報告を第 1 表に示した。

第 1 表 超薄切片法に依る微生物の研究

報 告 者	菌 株	固 定 法
東 昇 ⁽¹⁾	<i>Staph. aureus</i> , <i>E. coli</i>	0.5% OsO ₄ Ph. Buff. 2~10' 10 h
戸田, 小池, 平木, 武谷 ⁽²⁾	<i>Mycobact. tuberculosis</i>	0.2~1.0% OsO ₄ Ph. Buff. 2~8 h
" ⁽³⁾	"	
" ⁽⁴⁾		
篠 原 他 ⁽⁵⁾	<i>Mycobact. tuberculosis</i>	
津 田 ⁽⁶⁾	<i>Pen. chrysogenum</i>	0.5% OsO ₄ Ph. Buff. 30'
Robinow ⁽⁷⁾	<i>B. cereus</i> (spore), <i>B. megath.</i>	0.5~1.0% OsO ₄ , 8~20'
Chapman & Hillier ⁽⁸⁾	<i>B. megath.</i> R form	2% OsO ₄ , 0.8% NaCl, 16 h
Bradfield ⁽⁹⁾	<i>Staph. aureus</i> , <i>Paracolon Bacillus</i>	
Agar & Douglas ⁽¹⁰⁾	<i>Sacch. cerevisiae</i>	1% OsO ₄ Ph. Buff or Chapman's
" ⁽¹¹⁾	"	16~20 h
Bartholomew ⁽¹²⁾	<i>Sacch. cerev. & carlsberg.</i>	
Birch-Andersen ⁽¹³⁾	<i>Salm. typhimurium</i>	
Tomlin & May ⁽¹⁴⁾	<i>E. coli</i>	1% OsO ₄ , Palade's Buff. Chapman's 2~20 h
Chapman ⁽¹⁵⁾	<i>B. megath.</i> (spore), <i>B. cereus</i>	Chapman's
Piekarski & Giesbrecht ⁽¹⁶⁾	<i>B. megath.</i>	.
Stoker, Smith & Fiset ⁽¹⁷⁾	<i>Rickettsiae burnetii</i>	
Chapman & Kroll ⁽¹⁸⁾	<i>Spiril. serpens</i>	Chapman's

之等の中、著者等の特に関心をいいたく醱酵微生物についてなされたものは、僅かに津田⁽⁶⁾の *Pen. chrysogenum* の菌糸に就てと、Agar & Douglas^(10,11) の *Sacch. cerevisiae* に関するもの、及び Bartholomew⁽¹²⁾ の *Sacch. cerevisiae* 及び *Sacch. carlsbergensis* に就ての報告位のものである。依って著者等は種々の醱酵微生物を採り上げ、超薄切片法を適用してその微細構造を明かにせんとした。

本実験の主眼とする所は各種の醱酵微生物の微細構造を確かめるにある事は勿論であるが、併せて固定法に依りその観察所見が如何に異るかと言う点に就ても若干の検討を加えた。その理由は本技法がほぼ完成されたとは云え、その第一段階たる固定法の、所見に及ぼす影響に就ては充分検討されて居るとは云い難い状況である為である。前述した諸報告の固定法に就てみるに、先ず固定剤としては総て OsO₄ が用いられて居る。超薄切片法を適用する場合の固定剤としては、OsO₄ は他の物質に比して優れて居ると考えられて居る。然し使用された OsO₄ 溶液の濃度及び溶媒組成に就ては可成り区々であり、濃度については 0.5~2.0%，溶媒としては単なる蒸留水、燐酸緩衝液、Palade⁽¹⁹⁾ の緩衝液及び 0.8% NaCl を添加した Chapman & Hillier⁽⁸⁾ の緩衝液等が挙げられ、その固定時間としては短きは東⁽¹⁾の初期の報告に述べられて居る 2~10 分、Robinow⁽⁷⁾ の bacterial spore に対する 8~20 分、津田⁽⁶⁾の *Penicillium* 菌糸に対する 30 分があり、長きは Agar & Douglas^(10,11) の酵母に対する 16~20 時間、Chapman⁽¹⁵⁾ の *B. cereus* に対する 16 時間等がある。固定時間の長短は当然固定液の濃度、温度、材料の種類、大きさ等に左右される所であろう。固定過度は人工産物の出現や、予期せざる構造の

* Studies on the Fine Structures of Fermenting Microorganisms by Ultra Thin Sectioning. Part. I. On the Fine Structures of Conidia of *Aspergillus oryzae*, Spores of *Streptomyces griseus* and *Clostridium acetobutylicum*.

By Shiro ITAGAKI, Minoru FURUKAWA and Shukuo KINOSITA (Tokyo Research Laboratory, The Kyowa Fermentation Industry Co., Ltd.)

変化を来し、あまつさえ所見に対する解釈をあやまたしめるであろう。

斯の如き諸点は所見の解釈に當って常に念頭においておかなければならない。

実験方法及び実験材料

実験方法は主として東⁽²⁰⁾の方法に従った。本報告に於ける固定法の検討は、単なる固定時間の長短についてのみ行った。固定剤の種類、溶媒組成等については次の機会に譲りたい。

使用したマイクロームは日本電子光学製 JUM-3 型、電子顕微鏡は同じく日本電子光学製 JEM-T 4 型である。

1. *Aspergillus oryzae* IAM S 4-15 の conidia Czapek's agar 上にて 28°, 1 週間培養し、充分成熟した conidia を集め、pH 7.2 の磷酸緩衝液にて 3 回洗滌、同上緩衝液にて OsO₄ を最終濃度 3.5% となる如くして固定した。固定は室温約 25° にて行った。固定時間は 0.5, 1.0, 2.0, 5.0, 10.0 及び 20.0 時間とし、その後は常法に従って洗滌、脱水、包埋を行って切片を作製した。包埋の際の monomer の混合比率は *n*-butyl-methacrylate 7 : methylmethacrylate 3 とした。以下材料は総て同一比率の monomer に依り包埋、重合した。

2. *Streptomyces griseus* #1 (Waksman) の spore Bennet's agar 上 28° にて 2 週間培養して、充分成熟した spore を集め、之を材料とした。固定時間は 5.0, 10.0 及び 22.0 時間とした。

3. *Clostridium acetobutylicum* KH 30-2 Active culture 及び seed culture は玉蜀黍膠を使用し、本醱酵培地は可及的に夾雑物の混入を避ける為、半合成培地を用いた。この培地組成は省略する。16 時間培養菌体を遠沈に依り集め、pH 7.2 の磷酸緩衝液にて洗滌し材料にした。固定時間は 5.0, 10.0 及び 22.0 時間である。

結 果

1. *Aspergillus oryzae* IAM S 4-15 の conidia (第 1 図及び第 2 図参照) *Asp. oryzae* の conidia は最外層に棘を有するが、その棘は突起した膜に依り形成され、棘の内部は中空の如く考えられる。その内部に更に膜が存在し、細胞質を包む。内外の二膜共その厚さは 50~100 m μ であり、棘を形成する外膜は比較的破損し易い点より、この二層の膜には本質的な差異があるものと想像される。膜の密度はさして高くなく、部分的に疎な感じを抱かせる所見も得られた。

細胞質部分は不均一であり、特に electron density の低い部分は nuclear site ではないかと考えられる。然し本菌の conidia は核染色所見に依り、2~4 核である事が判って居るので切片にて明かに nuclear site を示す事は困難である。又細胞質膜の如きものは認められなかった。特に興味をひく事は、細胞質中に 1~数ケの electron opaque な小顆粒を認めた事である。この顆粒の径は大は 100 m μ 、小は 30 m μ 位であるが、切片である為 conidia 中に於ける数及び大きさの分布は明かでない。しかもこの顆粒は構造を有し、10~30 m μ 位の多数の小胞に分れて居る。その本態は不明であるが、所謂 volutin 顆粒の如きものではないであろうか。別に著者等⁽²¹⁾は *Micrococcus glutamicus* の切片中に同様構造を有する極性顆粒を認めて居る。

第 1 図

Asp. oryzae IAM. S 4-15 の conidia 中にみられる顆粒の構造。極めて小さい胞様構造を有する細胞内顆粒数ケをみる (矢印)。

第 2 図

Asp. oryzae IAM. S 4-15 の conidia. 棘を形成する外膜は一部分破損して居る。細胞内顆粒を認める。

第 3 図

S. griseus #1 (Waksman) の spore. 胞子の中心部分は density が低く、この部分は nuclear site に一致すると考えられる。

内膜と細胞質との間には空隙が認められるが、之は人工産物である可能性が強い。

固定時間は 5~10 時間位が良い様に思われるが、0.5~2.0 時間でもさして変わった所見ではない。

2. *S. griseus* #1 (Waksman) の spore (第 3 図参照) 最外層は 25~50 mμ の厚さを有する膜に被われる。この膜は稀に 2 層に分れて居る如き所見も得られるが、確実ではない。

胞子膜と細胞質との間には *Asp. oryzae* の conidia に於て認められた如き空隙が存在し、その内部に細胞質が中空ドーナツ形を呈して居る。この density の低い部分は核染色所見と対比し、所謂 nuclear site であると考えられる。

細胞質部分は時に細かい繊維様構造、或は海綿状構造を示す事があるが、一般には無構造に近い。

固定時間は 5 時間で充分と思われる。

3. *Cl. acetobutylicum* KH 30-2 (第 4 図及び第 5 図参照) 菌体には明かな cell wall を認めなかった。菌体中には極めて大きい vacuole が連続的に存在し、その周囲を取りまく細胞質は極めて細い繊維状構造物が網状にからみ合って形成されて居る。この繊維状構造物の太さは 5 mμ 以下と考えられる。

予想された鞭毛基底部 (鞭毛根) の如き構造を認める事は出来なかった。

Vacuole 様構造物中には太さ 20~30 mμ 位の紐状構造物が存在し、著るしい場合は幾つかの vacuole を貫通して 1 本の紐状構造物が走り、菌体のほぼ全長を貫いて居る場合もある。之は所謂 chromonema に一致するものと考えられ、多くの菌に於て既に認められて居る。このものは deoxyribonuclease 処理に依り消失する事より恐らく広く bacteria に共通した核質部分と考えられるものであろう。本菌の固定は 5 時間で充分である。

総 括 及 び 考 察

超薄切片法を適用して醗酵微生物の構造を観察すべく行った実験の一部として、以下に述べる 3 種の微生物を材料としてその内部構造を観察した。

(1) *Asp. oryzae* IAM. S 4-15 の conidia に就て：内外 2 層の膜は夫々 50~100 mμ の厚さを有し外膜はやや破損し易い。細胞質の密度は不均一であり、1~数ヶ所、特に density の低い部分が認められるが、之等は独立、若しくは別の density の低い部分と連絡した形を示す。恐らくは nuclear site に一致するものであろうが確実ではない。*Asp. oryzae* の conidia は核染色に依り明瞭に 2~4 核を認める事が出来るので、之等の

第 4 図

Cl. acetobutylicum KH 30-2. 細胞膜を認めず、細胞質は極めて細い繊維様構造を示す。大きい vacuole 中に所謂 chromonema に一致すると考えられる紐状構造物が存在する (矢印)。

第 5 図

Cl. acetobutylicum KH 30-2. chromonema は時にほとんど細菌体の全長に達する如き所見の時もある (矢印)。

density の低い部分は nuclear site である可能性が高いが、明かではない。

細胞質中には 1~数ヶの極めて密度の高い小顆粒を認める事がある。この顆粒の大きさ及び数的分布は切片の為明瞭ではないが、観察されたものは何れも $100\text{ m}\mu$ 以下である事から、 $100\text{ m}\mu$ 程度の小顆粒と考えて良いであろう。この顆粒は更に多数の小胞に分れて居り、時には数 10 の小胞より構成されて居るのではないかと思わせる所見もある。Bacterial spore については第 1 表記載の Robinow⁽⁷⁾ の *B. cereus* 及び *B. megatherium* についての研究、Chapman⁽¹⁵⁾ の同様の研究があるが、何れもこの様な顆粒を認めては居ない。従つて conidia がこの様な顆粒をもつと云う事は、*Aspergillus* 属に特異的なものか、更に広くカビ類の conidia に一般的に存在するものであるか等の点を確かめ、ひいてはその生理的意義についても検討する必要がある。

(2) *S. griseus* # 1 (Waksman) の spore について： 胞子膜は稀に 2 層より成る如き所見を得る事もあるが、精細は不明である。膜の厚さは一層と考えると $25\sim 50\text{ m}\mu$ である。

細胞質の中心部は density が低く、この部分は nuclear site であると考えられる。核染色所見と一致する。この部分は無構造であるが、細胞質は全般にやや疎であり、時に海綿状とも思われる場合があるが、あまり明かな構造は示さない。

(3) *Cl. acetobutylicum* KH 30-2 について： Cell wall を認めなかった事は大きい特徴と云える。鞭毛根の如き構造も認められなかった。

細胞質の中には極めて大きい vacuole が連続的に存在し、細胞質の大部を占めて居る。細胞質は極めて細い繊維状構造物に依つて網状構造を呈するが、この細繊維の太さは $5\text{ m}\mu$ 以下と考えられる。又 vacuole 中には $20\sim 30\text{ m}\mu$ 位の太さの紐状構造物が存在し、このものははなはだしい場合には数ヶの vacuole を貫通し、菌体の全長にも及ぶ事がある。この紐状構造物は各種の細菌類に於て既に認められて居り、細菌類の共通構造物と考えられる。その本質は所謂 Chromonema であろう。

本菌に於ては特に膜様構造を認めなかったが、この事は興味のある所見である。この様な現象は嫌気性菌の特徴であるのか。即ち好気的な集菌、洗滌等の諸操作に際して脱落、或は破壊されるものであるかについては更に検討したい。之に関連して著者等は本菌を通常の方法で suspension として電子顕微鏡観察を行うと、やはり膜様構造物を認めず、嫌氣的表面培養を行った菌体を観察すれば明かな cell wall を認め、さらに集菌、洗滌後 Webb⁽²²⁾ の方法に依り cell wall 染色を施すと、一般の細菌類に比し遙かに染色性が劣る等の知見を得て居る。

(4) 固定時間について： 固定時間は今回著者等が使用した 3 種類の材料では pH 7.2 の磷酸緩衝液を溶媒として、 OsO_4 最終濃度 0.35% を用い、5 時間でほぼ充分と考えられる。戸田等⁽²⁾ は結核菌を用いて OsO_4 濃度を 1.0, 0.5 及び 0.2% で固定し、2 時間迄は各濃度共固定液は浸透せず、内部構造は明かでないと言われ、1.0 及び 0.5% では 4 時間で可成り良好で、8 時間では 1.0~0.2% の何れも可成り良好な結果を得ると報告されて居る。結核菌は固定について種々議論されて居るが、之は菌体成分の特殊性の為と考えられて居る。

切片の観察所見より、固定法の良否を決定する事は可成り困難、且つ危険な点が多いが、著者等は固定時間の差に依りその切片所見が異ならないならば、短時間を採用すべきであると考えて居る。之は出来る限り over fixation に帰因する人工産物を防ぐ意味に外ならない。又固定時間の差により、その所見に相異がある時は何れが忠実な固定であるかを判定する事は更に困難である。斯る場合は超薄切片法以外の方法で充分その構造を検討した上で論ぜられるべきであり、即ち固定に際しては、その忠実度と人工産物を常に念頭において判断を下さなければならぬと考える。

本研究の概要は昭和 32 年 10 月 4 日、第 4 回電子顕微鏡学会シンポジウムに於て報告した。

(1) 東 昇：科学，22，480 (1952).	(7) C. W. Robinow：J. Bact., 66, 300 (1953).
(2) 戸田忠雄，小池聖淳，平木齊，武谷健二：東京医事新誌，72，447 (1955).	(8) G. B. Chapman, J. Hillier：J. Bact., 66, 362 (1953).
(3) T. Toda, M. Koike, N. Hiraki, K. Takeya：J. Bact., 73, 442 (1957).	(9) J. R. G. Bradfield：Nature, 173, 184 (1954).
(4) 戸田忠雄，小池聖淳，平木齊，武谷健二：東京医事新誌，74，5 (1957).	(10) H. D. Agar, H. C. Douglas：J. Bact., 70, 427 (1955).
(5) 篠原近知，他：第 30 回日本細菌学会総会講演 (1957).	(11) H. D. Agar, H. C. Douglas：J. Bact., 73, 365 (1957).
(6) S. Tsuda：J. Bact., 71, 450 (1956).	(12) J. W. Bertholomew, R. Levin：J. Gen. Microbiol., 12, 473 (1955).

- (13) A. Birch-Andersen : *J. Gen. Microbiol.*, 13, 327 (1955).
 (14) S. G. Tomlin, J. W. May : *Australian J. Exptl. Biol. Med. Sci.*, 33, 249 (1955).
 (15) G. B. Chapman : *J. Bact.*, 71, 348 (1956).
 (16) G. Piekarski, P. Giesbrecht : *Naturwiss.*, 43, 89 (1956).
 (17) M. G. P. Stoker, K. M. Smith, P. Fiset : *J. Gen. Microbiol.*, 15, 632 (1956).
 (18) G. B. Chapman, A. J. Kroll : *J. Bact.*, 73, 63 (1957).
 (19) G. E. Palade : *J. Exptl. Med.*, 95, 285 (1951).
 (20) 東 昇 : *Virus*, 6, 69 (1956).
 (21) 木下祝郎, 板垣史郎, 古川 稔 : 第4回電子顕微鏡学会シンポジウム講演(1957); 植物誌, 72, 114 (1959).
 (22) R. B. Webb : *J. Bact.*, 67, 252 (1954).

蓖麻子毒性蛋白リシンの化学的研究 (第1報)*

リシンの分離法の検討

船 津 勝, 船 津 軍 喜 (九州大学農学部生物化学教室)

昭和 33 年 9 月 17 日 受 理

緒 言

蓖麻子種実中に有毒蛋白であるリシンが存在する事は古くから知られており, 1905 年 Osborne⁽¹⁾ らによって始めて可成純粋な状態に得られた。更に Karrer⁽²⁾ らはこの製品から有毒成分を吸着法や酵素消化により分離しようと試みたが失敗に終り, 蛋白質そのものが有毒である事を確めた。1947 年 Kabat⁽³⁾ らは硫酸ソーダ分別沈澱法によって pH 3.8 塩酸性水抽出液から電気泳動及び超遠心分析に於いて均一なリシン B 1 を得た。一方 Kunitz ら⁽⁴⁾ は硫酸ソーダ飽和で沈澱させて得た精製品の濃溶液を直接或は硫酸による分別沈澱の後, pH 6.8 で長期間 5° に放置する事により始めてリシンを結晶状に分離した。この結晶は超遠心及び電気泳動分析では均一ではあるが, 溶解度試験の結果 2 成分以上から成る固溶体である事が示された。この B 1 及び結晶は何れも毒作用と血球凝集作用を有する。Le Breton 及び Moulé^(5,6) は Osborne らの変法を用いて結晶リシンとほぼ同じ毒力をもつリシン Tb を得た。この Tb は超遠心的には均一であるが, 長時間の電気泳動分析では僅かに易動度の異なる 2 成分 A, B を常に同じ割合に含んでいる事が示された。更に彼女らはこの Tb に一種独特のプロテアーゼ作用のある事を発見し, 毒作用とプロテアーゼ作用に並行関係がある事から毒作用の原因をこのプロテアーゼ作用に帰した。しかし彼女らはそれらの結晶化に失敗したので, 結晶リシンについてはプロテアーゼ作用は検討されていなく, 又 Tb については血球凝集作用は調べられていない。

著者らは結晶リシンとリシン Tb とを調製し, 両者につきプロテアーゼ作用と血球凝集作用を検討した結果, 結晶にもプロテアーゼ作用がある事を認め, その関係を比較した。

実験材料及び方法

1. 材料 蓖麻子の種実には色々の種類があり, 外殻の模様及び大きさを異にする。ここでは日本産の在来小粒種 *Ricinus communis* L. とシャム産の大粒種 *Ricinus sanguineus* L. の 2 種類を使用した。前者は 1 粒約 0.24 g, 後者は約 0.72 g で何れも風乾したものをを用いた。

2. リシンの分離精製

a) 脱脂蓖麻子粉末の調製 : 機械的に殻を除いた蓖麻子の種実に冰冷した石油エーテルを加え, ホモゲナイザーで粉碎し厚い布に包んで圧搾して油脂をしぼり出す。この様にして得られた粉末は尚油脂が残っているので, 更に冷石油エーテルを加え脱脂して後風乾する。この脱脂粉末にはなお少量の油脂が残存するが, リシンの抽出には何ら支障ない故, リシンの調製に供した。脱脂操作は有機溶媒による蛋白質の変性を考慮に入れ, なるべく速に行い, 脱脂後直ちに石油エーテルを除去した。

b) 結晶リシンの分離 : 第 1 表の如く Kunitz ら⁽⁴⁾ の方法により結晶リシンを分離した。

* Chemical Studies on Toxic Protein "Ricin" in Castor Bean. Part I. Research on the Separation of Ricin.

By Masaru FUNATSU and Gunki FUNATSU (Biochemical Laboratory, Faculty of Agriculture, Kyushu University)