A 型ボツリヌス菌の自己融解に関する研究

第1報 全菌の自己融解

(昭和43年7月4日受理)

川田十三夫* 佐藤成美* 山下彦王*
宅見賢二* 采見憲男* 渡辺健二*

Studies on Autolysis of *Clostridium botulinum* Type A

I. Autolysis of Whole Cells

Tomio KAWATA, Shigemi SATO, Hikoo YAMASHITA, Kenji TAKUMI,
Norio UNEMI and Kenji WATANABE

(Department of Food Microbiology, Tokushima University School
of Medicine, Tokushima: 3-chome, Kuramoto-cho, Tokushima)

Cells of *Clostridium botulinum* type A strain 190 grown in thioglycolate medium (GYPT medium) autolysed after having reached a maximum growth. This strain was dissociated into large and small colony-forming types in semisolid media. The cells obtained from the large colony type autolysed more rapidly than those from small one. Washed cells harvested at logarithmic growth phase lysed in phosphate buffer at 37°C within 2~3 hours. Autolysis rose above pH 6.0 and was optimal near pH 7.0. The potential for autolysis reached a maximum toward the end of the logarithmic growth phase and thereafter the cells became resistant to autolysis. The autolytic activity was destroyed by heating the cells at 60°C for 10 minutes and was slightly affected by cysteine (10^{-2} M), N-ethylmaleimide (10^{-2} M) and mercaptoethanol (10^{-1} M).

During autolysis nitrogen, protein, nucleic acids, reducing sugars, amino sugars and botulinum toxin were released from the cells as the reduction of the turbidity in cell suspension occurred. Electron microscopic observations on the process of autolysis revealed that the partial lysis of walls occurred first at the end of the organism and the cytoplasmic contents were lost through such lesions. The lysis of the wall centripetally spread and finally the morphological entity of the wall was completely lost. From these findings it is suggested that the autolysis may be preceded by auto-digestion of the cell wall at the end of the organism.

(Received July 4, 1968)

ボツリヌス菌の自己融解については毒素産生機構との関連において多くは培養液における現象として報告されているが^{1)~5)}、その本態の究明はほとんど行なわれていない。われわれは自己融解をおこしやすいA型菌190株について自己融解に及ぼす諸因子を検討し、その際遊離される物質を定量し、またその過程を電子顕微鏡で観察し、細胞壁の部分的自己融解がこの現象に先行することを示す知見を得たので報告する。

* 徳島大学医学部栄養学科栄養衛生学教室：徳島市蔵本町3丁目

実験材料および方法

供試菌株 北海道衛生研究所飯田広夫博士のご好意により分与された *Clostridium botulinum* type A, 190株を用いた。この菌株は半流動寒天高層培地中で大小2種類の集落に解離し、大集落形成型を190L型、小集落形成型を190S型とした。Eller⁶⁾もボツリヌス菌で大小集落の解離を観察している。この両型は形態学的・生化学的性状、産生毒素には著しい差はみられず、継代しても安定しているが、190L型が190S型よりすみやかに自己融解するので実験には主として190L型を用い

た。

培養 ブドウ糖・酵母エキス・ペプトン・チオグリコレート培地 (GYPT 培地) を用いた。この培地組成はブドウ糖, 5 g; 酵母エキス, 5 g; ポリペプトン 20 g; チオグリコール酸ナトリウム 0.5 g; 精製水 1 L (pH 7.2 に調整) よりなる。通常 37° に培養し、対数発育期の 6 時間培養菌の冷却遠沈ののち集菌し、冷 0.05 M リン酸塩緩衝液 (pH 7.0) で遠沈洗浄し、同じ緩衝液に浮遊し菌液とした。

菌液の濁度と溶菌率 菌液の濁度は光電比色計で波長 660 mμ にて測定した。溶菌率は濁度減少率 (%) として次式のようにして算出した。

$$t \text{ 時間後の溶菌率}(\%) = \frac{OD_i - OD_t}{OD_i} \times 100$$

ただし, OD_i : 最初の菌液の OD (optical density)

OD_t : t 時間後の菌液の OD

通常最初の菌液の OD は 0.6~0.8 に調整した。

化学分析 窒素は Lang⁷⁾ による Folin-Nessler 法, タンパク質はウシ血清アルブミンを標準として Lowry らの法⁸⁾, 還元糖は Nelson-Somogyi 法⁹⁾, アミノ糖は Rondle-Morgan 法¹⁰⁾ によりそれぞれ定量した。還元糖, アミノ糖の定量はあらかじめ試料を 4N 塩酸で 121° 4 時間加水分解後, 真空乾燥して塩酸を除去したものについて行なった。核酸は波長 260 mμ における吸収物質として遊離量をあらわした。

毒性試験 体重約 20 g の dd 系マウスの腹腔内に試料の希釈液 0.5 ml 宛注射し、ボツリヌス毒素の LD₅₀/mgN を算出した。希釈液には 0.2%ゼラチン加リン酸塩緩衝液 (pH 6.2) を用いた。

電子顕微鏡による観察 菌液を一定時間後に 10% の割にホルマリンを加えて固定後、精製水で遠沈洗浄し、精製水に再浮遊し、これをコロジオン膜上にのせて乾燥した後、白金パラジウムで shadow した。日立 HS-7D 型電子顕微鏡 (加速電圧 50 KV) で観察、撮影した。

実験結果

1. GYPT 培地における発育曲線

190株の大集落型 (190 L 型) と小集落型 (190 S 型) を

Fig. 1. Growth curve of *C. botulinum* type A 190 in GYPT medium

それぞれ試験管内で GYPT 培地に接種し、30°, 37° 水浴中における発育状態を濁度の変化で経時的に観察した。Fig. 1 に示すように 190 L 型は 37° で 11 時間で最大発育に達し、定常期は短かく急速に濁度を減じ溶菌がおこる。190 S 型は発育がやや遅れ、自己融解も遅れる。30° においては両型とも発育速度がおそいが、190 L 型が発育も自己融解もすみやかであった。

2. リン酸緩衝液における自己融解

190 L 型と 190 S 型を GYPT 培地に 37° 6 時間培養した対数期の菌を 0.05 M リン酸塩緩衝液 (pH 7.0) に浮遊し 37° において溶菌率をしらべた。Fig. 2 に示すように 190 L 型はすみやかに溶菌し、1 時間で 72%, 2 時間では 93% の溶菌率を示した。他方、190 S 型は 1 時間で 23%, 2 時間で 51% の溶菌率を示し、4 時間後によりやく 91% に達し、自己融解が 190 L 型にくらべ遅れることを示した。以後の実験では主として 190 L 型について行なった。

3. pH の影響

GYPT 培地 6 時間培養の菌を精製水で洗浄後 0.05 M リン酸塩緩衝液または 0.05 M Tris 緩衝液に浮遊し、

Fig. 2. Autolysis of *C. botulinum* type A 190 in 0.05 M phosphate buffer (pH 7.0) at 37°C

Fig. 3. Effect of pH on autolysis

37° 1時間後における自己融解に及ぼす pH の影響を検討した。Fig. 3 に示すように自己融解は pH 6.0 以上ではすみやかにおこり、その至適 pH は7.0付近にあった。pH 5.3 以下では阻害が著しいが、pH 9.1 までのアルカリ側ではわずかに阻害が示されたにすぎない。

4. 培養発育時期の影響

GYPT 培地に 37° で一定時間培養した菌を遠沈集菌し、0.05 M リン酸塩緩衝液 (pH 7.0) に浮遊し、37° 1時間おき溶菌率を比較した。この実験の場合培養15時間まで最大発育に達したが、Fig. 4 に示すようにこの時期までの溶菌率は70~74%であった。最大発育以後は前述のように培養中に自己融解がおこるため、残存菌の自己融解率は次第に低下し、40時間培養以後の菌では6~10%の溶菌率にすぎなくなる。この結果は発育旺盛な対数期の菌がすみやかに自己融解しやすいが、それ以後の培養菌は自己融解し難くなることを示す。

Fig. 4. Effect of age of culture on autolysis
Cells grown in GYPT medium for various intervals were suspended in 0.05 M phosphate buffer (pH 7.0) and incubated at 37°C for 1 hour

Fig. 5. Effect of temperature on autolysis
Cell suspensions in phosphate buffer were heated at desired temperatures for 10 min and then incubated at 37°C for 1 hour

5. 加熱の影響

6時間培養菌を 0.05 M リン酸塩緩衝液 (pH 7.0) に浮遊し、5 ml 宛試験管に分注し、50~100°の水浴中で10分間加熱し、ただちに氷水中で急冷後、37°に1時間おき溶菌率をしらべた。Fig. 5 に示すように溶菌率は50°加熱で38%、60°以上の加熱では10%以下となり、加熱により自己融解は著しく阻害された。

6. 阻害剤の影響

Table 1. Effect of Inhibitors on Autolysis

Inhibitor	Molarity	% Lysis
l-Cysteine	10 ⁻²	55
	10 ⁻³	82
N-Ethylmaleimide	10 ⁻²	58
	10 ⁻³	74
Mercaptoethanol	10 ⁻¹	51
	10 ⁻²	70
NaF	10 ⁻¹	79
	10 ⁻²	75
Monoiodoacetic acid	10 ⁻³	80
EDTA	10 ⁻³	80
Control (no inhibitor)	—	85

Fig. 6. Release of substances during autolysis of *C. botulinum* type A 190 L in 0.05 M phosphate buffer (pH 7.0) at 37°C

Table 2. Release of Toxin during Autolysis of *C. botulinum* Type A 190 L

Sample	Toxin potency (LD ₅₀ /mg N)
Whole cell	1.1 × 10 ⁴
Supernatant after autolysis	
15 min	9.0 × 10 ⁴
30 min	2.1 × 10 ⁵
60 min	1.8 × 10 ⁴
120 min	7.2 × 10 ³

リン酸塩緩衝液 (pH 7.0) に阻害剤を所定濃度に加え、これに6時間培養菌を浮遊し 37° に1時間において阻害効果を溶菌率より判定した。Table 1 に示すように SH 酵素の阻害剤である cysteine(10^{-2} M), N-ethylmaleimide

(10^{-2} M), mercaptethanol (10^{-1} M) で自己融解は幾分阻害されたが、モノヨウ素酢酸 (10^{-3} M), フッ化ナトリウム (10^{-1} M), キレート剤である EDTA (10^{-3} M) では阻害がみられなかった。

Fig. 7 to 10. Electron micrographs of autolytic process of *C. botulinum* type A 190 L incubated in phosphate buffer (pH 7.0) at 37°C. Shadowed with platinum-palladium. The scale mark represents 1 μ .

Fig. 7. Incubation for 15 min Cell walls are partially dissolved at an end of the organism

Fig. 8. Incubation for 30 min Cell walls are dissolved at both ends of the cell and the cytoplasmic contents are released through such lesions

Fig. 9. Incubation for 30 min Remnants of the cell wall are still observable to be associated with the cytoplasmic residues

Fig. 10. Incubation for 60 min Walls can not be detectable and only cytoplasmic residues are shown as amorphous substances

7. 自己融解による遊離物質と遊離毒素

6時間培養の190 L型菌をリン酸塩緩衝液(pH 7.0)に浮遊し、37°に一定時間おいた後、18,000×g 30分冷却遠沈して得た上清について自己融解中に菌より遊離された窒素、タンパク質、還元糖、アミノ糖、波長260 mμ吸収物質として核酸を定量し、遊離率を算出した。Fig. 6に示すように窒素、タンパク質、核酸は菌液の濃度の減少に平行して遊離され、3時間後にはすべて90%前後に達した。細胞壁の主要成分¹¹⁾である還元糖、アミノ糖も時間の経過と共に遊離され、3時間後には共に約78%に達した。

自己融解に伴うボツリヌス毒素の遊離ないし活性化を遠沈上清のマウスに対するLD₅₀/mgNをもとめて検討した。Table 2に示すように15時間の自己融解中にもかなりの毒素が遊離し、30分後には窒素量当たりの毒素量は最高に達し、以後はかえって減少した。これは遊離された毒素がこの条件下では次第に不活性化されるためと考えられる。

8. 自己融解過程の電子顕微鏡的観察

細菌の自己融解過程を電子顕微鏡的に詳細に観察した報告はほとんどない。6時間培養菌をリン酸塩緩衝液(pH 7.0)に浮遊し、37°に一定時間おいた後ホルマリン固定し、電子顕微鏡で観察した。自己融解の最も初期段階においてFig. 7に示すように細胞末端部の細胞壁が部分的に溶解することが観察され、この段階では細胞質には変化が及んでいないようである。Fig. 8は自己融解がすすんだ30分のもので両端の細胞壁部分がすでに溶解し、この部分から細胞質内容が流出していることを示し、Fig. 9ではこの状態がさらに進行して細胞壁がわずかに残存するにすぎなくなる。1時間後ではFig. 10に示すように強固な形態としての細胞壁は認められなくなり、多くは細胞質性の不溶物または細胞質膜などが無定形物質として観察されるにすぎない。

考 察

一般に細菌は培養条件が悪化すると自己融解をおこすことは古くから観察されているが、その機作についての究明は比較的近年になってからである¹²⁾。ボツリヌス菌が自己融解することはかなり以前から知られていたが、Boroff¹⁾、Kindler および Mager²⁾はボツリヌス毒素産生が自己融解に密接に関係することを始めて報告し、ついで Bonventre および Kempe³⁾、飯田⁵⁾は培養液での自己融解の生理的条件と毒素産生過程を詳しく検討した。しかし、ボツリヌス菌の自己融解の本態に関する研究は全く行なわれていない現状である。

190株が大小集落型に解離し、運動性が大でまた発育もすみやかな大集落型が自己融解がすみやかなことは一般に自己融解が発育旺盛な菌において急速におこる事実と考えて興味深い。対数発育期の菌を単に緩衝液に浮遊して37°におくだけですみやかに自己融解するが、これ

は栄養条件の悪化と偏性嫌気性菌にとって不都合な媒液の酸化還元電位の上昇により細胞の死を招来し、ついで細胞崩壊がおこるのであろう。

細菌の自己融解の際、細胞壁溶解が先行することは Nomura および Hosoda¹³⁾らにより *Bacillus subtilis* において報告され、その autolysin が抽出された。Mitchell および Moyle¹⁴⁾は *Staphylococcus aureus* が自己融解により高張溶液中で細胞壁が溶解され“protoplast”を形成することを観察した。最近いくつかの菌について細胞壁自己融解酵素が抽出され、そのあるものでは細胞壁の主成分である peptidoglycan に対する作用部位の究明されたものがあるが¹⁵⁾、*Clostridium* 属についてのこの方面の知見はきわめて乏しい。Galli および Hughes¹⁶⁾が *Clostridium sporogenes* の自己融解は細胞壁の構造または組成の変化に由来すると示唆しているにすぎない。

今回の実験において全菌の自己融解により細胞壁の主要構成成分である還元糖、アミノ糖が遊離されることは細胞壁の溶解がおこっていることを示している。この過程の電子顕微鏡的観察において最初に細胞末端部の細胞壁が溶解されることが明らかにされた。Shockmanら¹⁷⁾は¹⁴C-lysineを用いた実験から *Streptococcus faecalis* において autolysin が最初に細胞壁の新合成部位に作用すると結論している。ボツリヌス菌の細胞壁合成は恐らく細胞分裂直後において細胞末端部で旺盛で自己融解の開始の際最初にこの部分がおかれ、ついで細胞質内容が細胞壁欠損部より流失し、次第に全細胞壁が溶解され細胞の崩壊が完了すると考えられる。

結 論

A型ボツリヌス菌190株はGYPT培地で最大発育に達した後は急速に自己融解する。この菌株は大小の2集落型に解離し、大集落型の細胞は小集落のものよりすみやかに自己融解する。対数発育期の洗浄菌をリン酸塩緩衝液中におくと37°、2~3時間で溶菌し、その至適pHは7.0付近であった。最大発育までの幼若な菌は自己融解しやすいが、それ以後の古い培養では自己融解し難くなる。自己融解は60°、10分加熱で著しく阻害され、またcysteine (10⁻² M)、N-ethylmaleimide (10⁻² M)、mercaptoethanol (10⁻¹ M)で幾分阻害された。

自己融解に伴って窒素、タンパク質、核酸、還元糖、アミノ糖、ボツリヌス毒素が細胞から遊離する。電子顕微鏡でこの過程を観察すると最初に細胞末端部の細胞壁の部分的溶解がおこり、細胞質内容がこの損傷部から流出し、細胞壁は次第に求心的に溶解していき、ついにはその形態学的特性を完全に失った。これらの所見はボツリヌス菌の自己融解が菌末端部の細胞壁の自己融解によって先行されることを示唆した。

本研究の要旨は第41回日本細菌学会総会(1968年4月2日、東京)において発表した。

文 献

- 1) D. A. Boroff: J. Bacteriol. **70**, 363 (1955).
- 2) S. H. Kindler, J. Mager: Science **122**, 926 (1955).
- 3) P. F. Bonventre, L. L. Kempe: Appl. Microbiol. **7**, 374 (1959).
- 4) P. F. Bonventre, L. L. Kempe: J. Bacteriol. **79**, 18 (1960).
- 5) 飯田広夫: 日細菌. **19**, 463 (1964).
- 6) C. Eller, L. Rogers, E. S. Wynne: Appl. Microbiol. **15**, 55 (1967).
- 7) C. A. Lang: Anal. Chem. **30**, 1692 (1958).
- 8) O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, et al.: J. Biol. Chem. **193**, 265 (1951).
- 9) M. Somogyi: J. Biol. Chem. **195**, 19 (1952);
阿武喜美子, 瀬野信子: 蛋白質核酸酵素 **12**,
1102 (1967).
- 10) C. J. M. Randle and W. T. J. Morgan: Biochem. J. **61**, 586 (1955).
- 11) M. R. J. Salton: "The Bacterial Cell Wall" p. 97 (1964) Elsevier Publishing Co. Amsterdam.
- 12) 野村真康: "微生物生理学" 植村定治郎, 福見秀雄, 柳田友道編 p. 854 (1960), 朝倉書店.
- 13) M. Nomura, J. Hosoda: J. Bacteriol. **72**, 573 (1956).
- 14) P. Mitchell, J. Moyle: J. gen. Microbiol. **16**, 184 (1957).
- 15) J. L. Strominger, J.-M. Ghuyssen: Science **156**, 213 (1967).
- 16) E. Galli, D. E. Hughes: J. gen. Microbiol. **39**, 345 (1965).
- 17) G. D. Shockman, H. M. Pooley, J. S. Thompson: J. Bacteriol. **94**, 1525 (1967).