



Title	Micrococcus lysodeikticusの細胞壁自己融解現象 : その生理的意義について
Author(s)	物種, 利彦
Citation	大阪大学, 1975, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/2685
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

博士学位論文

Micrococcus lysodeikticus の

細胞壁自己融解現象

—その生理的意義について—

物種利彦

Micrococcus lysodeikticus の

細胞壁自己融解現象

—その生理的意義について—

内容	ページ
はじめに	2
まえがき	4
主な材料および方法	10
実験結果	18
図、表、写真	
考察	74
引用文献	87
謝辞	94

はじめに

細菌を液体培地に接種、培養し、経時的に濁度を測定してその変化を片対数のグラフ用紙に記入すると図1のようないわゆる増殖曲線が得られる。この論文で取り扱った自己融解現象は、死滅期における濁度の減少を対象としたものではなく、対数期菌体と静止期菌体の自己融解能、特に対数期の菌体か示す自己融解現象を取り上げたものである。

一方、細菌1個の増殖過程を模式的に示すと図2のようになる。分離直後の1個の細胞が、体積なごびに表面積の増大、くびれ、隔壁伸長、隔壁形成完了、娘細胞への切り離しという過程をたどる。従来、分裂と分離という術語が混交使用されているように思われるが、体積や表面積の増大に始まり隔壁形成完了までの過程を「生長」、くびれができてから2つの娘細胞に切り離される直前までの過程を「分裂」、そして隔壁形成から2つの娘細胞への切り離し完了までの過程を「分離」

と呼ぶことにする。

細胞壁自己融解酵素という言葉は、厳密には、生きた細胞の構築成分としての細胞壁或いは単離した細胞壁標品自身が自己融解を起こした時、この現象を引き起こしている酵素に対して使われるべき言葉である。しかし、細胞壁自己融解酵素は細胞壁自己融解を引き起こすのが本来の役割ではなく、むしろ菌の生理機能に重要な役割を果たしていると考えられる。このため、この論文では、細胞壁自己融解が観察される菌(場合)にも、細胞壁自己融解酵素と同じ生理的役割を荷った酵素の存在を想定している。その酵素に対しては、別の術語、例えば細胞壁切断酵素を使うべきであるが、別な種類の、別な生理的役割を荷った酵素と誤解される恐れがあるため、細胞壁自己融解酵素という術語を統一した。

まえがき

溶菌現象は、細菌が認識されて以来今日に至るまで、細菌を扱う者が常に目にする現象であり、また注意を払わねばならぬ現象である。溶菌という現象—通常は、菌懸濁液（培養菌液や菌苔を含む）の濁度の減少、透明化といった細菌細胞の集団について観察されるか—は、関与する因子の起原からみて二つに分けられる。一つは細菌の自己融解現象と呼ばれるもので、これは外的因子の助けを借りずに菌自身の内的因子によって起こる溶菌現象と定義されてきた(3)。それに対して、機械的、物理的、化学的、生物学的な外的因子によって引き起こされる *heterolysis* がある。しかしながら、自己融解 (*autolysis*) と *heterolysis* を明確に区別するのが困難な場合があるために、その後自己融解の定義として、菌自身が保有する ムレイナーゼ（プロチドグリカン加水分解酵素）の作用によって起こる溶菌という定義が出された(4)。すなわち内的因子、

外的因子によらず、細胞内ペプチドグリカン加水分解酵素の働きが溶菌の直接原因となっている場合には自己融解とする考えであり、この定義が現在では最も一般的なようである。しかし厳密な意味での内的因子によるものだけを区別して自己融解としている場合もある。いずれにせよ菌自身が保有するペプチドグリカン加水分解酵素による細胞壁の解体をもって自己融解とする考えの背景には、単離した細胞壁にも自己融解現象が観察されること、ムシイン（ペプチドグリカン）がすべて細菌細胞壁の構築成分であること、蔗糖水溶液中で自己融解を起させるとプロトプラスト或いはスフエロプラストが生成すること、これまでに作用点が明きうかになっている自己融解酵素がすべてペプチドグリカン加水分解酵素であること、などのような実験事実があった。

図1の細菌の増殖曲線は、静止期の後に死滅期と云うのがあることを示している。何故

死滅期が存在するのか？ 静止期の状態を続けることはできないのだろうか？ 静止期から死滅期への移行の鍵をにぎる要因は何か？、といったやや哲学に似た疑問が死滅期の自己融解現象に対して投げかけられるが、この現象の意義は、因果関係に目をつぶれば合目的的に理解できるように思われる。ところがここでの主な研究対象である対数期菌体の示す自己融解現象に対しては、次のような別の大きな疑問が生いてくる。「対数期の菌体を適当な緩衝液中に懸濁し、適温に保ち、経時的に濁度が減少する」というのが、いくつかの菌種に認められる典型的な対数期自己融解現象であり、細胞壁自己融解酵素(=ペプチドグリカン加水分解酵素)による細胞壁の解体に起因することは知られている。この細胞壁自己融解現象が何故増殖の最も盛んな対数期の菌体に観察されるのか？ 静止期菌体に観察されないのはどうしてなのか？ 自分自身の死につながりがねない危険な酵素を何故

細菌が保有しているのか？ この酵素は一体どのように制御されているのか？ といった様々な疑問が生じてくる。これらの疑問に答えるべく、多年にわたって多くの研究が積み重ねられてきた。これまで従来の研究は全て、今でもそうであるが、最も増殖、分裂の盛んな対数期に細胞壁自己融解酵素の活性が最も高いからには、細胞壁自己融解酵素が、細胞の増殖(5~14)、形質転換における受容能力(competence)の獲得(8, 15~18)、細胞外毒素の分泌(19~21)、細胞外酵素の分泌(22, 23)、などのいずれも細胞壁が関与する細胞の生理機能に重要な役割を果たしているに違いないと、この想定のもとに進められてきた。

これらの研究者達と同じく、私も細胞壁自己融解酵素の存在に疑問と興味を抱き、Micrococcus lysodeikticus (IFO 3333株)を供試菌とし、細胞壁自己融解現象および関与する細胞壁自己融解酵素について、特にその生理的意義を念頭におきつつ実験を行った。

M. lysodeikticus は、リゾチームに最も感受性の高い菌として、Fleming によって土壤中より発見された好気性のグラム陽性の単球菌であり、非病原菌である(24,25)。その細胞壁は、図3に示されたようなペプチドグリカン(26,27)とタイクロン酸(28,29)の2種類の高分子物質より成り立っており、これらの構造もよく研究されているので、細胞壁関係の研究を行なうには実験結果の解析のしやすい材料だといえる。

M. lysodeikticus の自己融解現象に関しては、NCTC 2665 株の菌体および単離した細胞壁が自己融解を起こすという簡単な報告がある(5)。最近、同じく NCTC 2665 株の菌体を蔗糖加緩衝液中でリゾチーム処理して得たプロトプラストを遠心洗浄後、浸透圧ショックで破裂させ、超遠心機で遠心分離したメソゾーム画分に細胞壁自己融解酵素が局在しているとの報告が出された(30)が、対数期菌体が自己融解を起こすのかどうかに関する記載が全く見

5 水 灰 〇。

主な材料および方法

1. 使用菌株

(財) 醗酵研究所より分与された Micrococcus lysodeikticus IFO 3333 (親株) を用いた。

2. 酵素類

トリプシンは持田製薬(株)のトリプシリン(商品名、牛膵臓由来の結晶、透析、凍結乾燥標品)を用いた。トリプシンインヒビター(Type I-S, From Soy bean, Lyophilized, chromatographically prepared)とDNase I (From Beef Pancreas, 1× Crystallized and Lyophilized, substantially free of RNase)はいずれもSigma Chemical Co.のものを使用した。リゾチームは生化学工業(株)の製品(鶏卵白由来の6回結晶、凍結乾燥品)を用いた。

3. 継代用寒天斜面培地に使った製品

ヤマトンと酵母エキスは大五栄養化学(株)のポリヤマトンと粉末酵母エキスを、寒天はPO寒天培地には市販の未精製の系寒天(お供え用)を、他の寒天培地には和光純薬工業(

株)の試薬一級寒天末を、グルコースと食塩は試薬特級を、グリセリンは試薬一級を使用した。

4. 継代培養

表1に示した3種類の寒天斜面培地を用いた。親株を、PO寒天培地で継代した株をPO株(親株は(財)醗酵研究所においてPO寒天培地で継代保存されていたので、PO株は親株に等しい)、NPG寒天培地で継代した株をNPG株、NP寒天培地で継代した株をNP株と呼ぶことにした。またNPG寒天培地に2代継代培養したNPG株をPO寒天培地に継代した株をNPG→PO株とした。いずれの株においても、植之継ぎは約1か月毎に行い、37℃で約24時間培養した菌を培地ごと4℃に保存した(ただし、各株間の性状比較のためほぼ1日おきに継代した時期もある)。この実験では、主として親株であるPO株と変異株であるNPG株とを用いた。

5. 自己融解実験に供試するための培養
いずれの株に対しても NP 液体培地 (表 1 に
示した NP 寒天培地より寒天を除いたもの) を
用い、培養は原則として次の方法によった。
寒天斜面培地上に継代保存した菌を L 字管 (垂
直部 8 cm、水平部 11 cm、内径 1.5 cm) に入
れた 5 ml の NP 液体培地に接種し、約 20 時間前培
養した。約 2 ml の前培養菌液を平底フラスコ
(容量 500 ml) に入れた 200 ml の NP 液体培地に
植之、本培養した。前培養および本培養とも
に培養条件は、温度 37℃、振盪数 100 回/分、振
幅 0.5 cm とした。培養菌液の濁度は、島津一
ボシユロム分光光度計 (スペクトロニツク 20
型) を使用して波長 550 nm で測定し、その経
時変化を追跡した。ただし実験初期の頃は、
本培養に 250 ml の NP 液体培地を入れた坂口コ
ルバン (容量 500 ml) を使用して、温度 32℃
、振盪数 180 回/分、振幅 2.0 cm で培養し、濁度
を島津分光光度計 (ダダール 40 型) で測定した
。

6. 自己融解

自己融解の有無および程度は、培養菌液を3,000gで10分間遠心し、集めた菌体を脱イオン水で2回遠心洗浄した後、0.01Mリン酸・ナトリウム緩衝液 pH 7.5 に懸濁し（波長 550 nm での濁度、 $OD_{550} = 0.45 \sim 0.55$ に調整）、37°C に保温して OD_{550} の変化を追跡した。培養菌液の遠心から菌懸濁液の作製までの操作は、0~4°C を保つように配慮した。保温0時間の OD_{550} を100として、保温後各測定時点における残存濁度を%で表わした。

7. トリプシンまたは DNase I の培地への添加

高圧滅菌した後約50°Cまで冷却して軟かく保った継代用寒天培地に、汙過滅菌したトリプシンの0.001N塩酸溶液または DNase I の水溶液を加え（加えた液量は培地容積の5%以下）、一夜室温に放置して固化させた酵素加寒天斜面培地に、翌日菌を接種した。なおトリプシン加寒天培地は数日間室温に放置した後

にも、凝固水中のトリプシン活性が検出された（DNase I 活性については調べなかった）。NP液体培地へは、菌を植える直前にトリプシン溶液を通過滅菌して加えた（加えた液量は培地容積の2.5%以下）。ちなみにトリプシン加NP液体培地を37℃で約30時間振盪した後にも、菌の接種の有無にかかわらず、トリプシン活性（菌を植えた場合には、厳密にはアルブミン加水分解酵素活性）が培地中に認められた。

8. 光学顕微鏡^用試料の染色

寒天斜面または液体培地培養菌から常法に従って作った塗末標本（固定は核染色の場合にはエタノール・酢酸を用い、他は火焰固定）をサフラニン水溶液で単染色し、また Hucker の変法でグラム染色した。細胞壁染色は Bisset-Hale の法により行った。また核染色は Feulgen 法に従い、対比染色にはサフラニン水溶液を用いた。

9. 電子顕微鏡用試料の調製

遠心洗浄した菌を2.5%グルタルアルデヒド加0.1Mリソ酸・ナトリウム緩衝液 pH 7.0 中または1%オウミウム酸加同緩衝液中で40℃で4時間固定した。両液による二重固定を行った場合もある。固定後充分遠心洗浄した菌を脱イオン水に懸濁し、適量をホルムバル（ポリビニールホルマール）膜を張った銅メッシュ上に載せ、シリカゲル入りのデシケーター中で放置乾燥した。白金（80%）・パラジウム（20%）で影づけ（shadowing）を施し、カーボンで補強した後、日立 HU-12A 透過型電子顕微鏡で観察した。

10. 菌体の破碎、分画 (31) および各画分の
n-ブタノール抽出 (32, 33).

脱イオン水で洗浄した供試菌体（主として PO 株の対数期菌体）の懸濁液（約 0.5g 湿菌量 / ml 脱イオン水）の 25 ml と破碎用のガラスビーズ（直径 0.17 ~ 0.18 mm、Kat. Nr. 54150（2884））の 25 ml とを付属のガラス容器（容量 70 ml）に入れ、液化炭酸ガスを流して冷却し

ながら Braun 社製の細胞破砕機 (Type 2876) にかけ、4,000 回転/分で 8 分間 (1 分間ずつ 8 回) 上記容器を回転させて菌体を破砕した。破砕菌液は、後述の図 9 に示すようにして分画した (全操作を $0 \sim 4^{\circ}\text{C}$ で行うよう配慮した)。培養上澄液以外の  内の 5 つの画分を更に n-ブタノール処理 (図 10、全操作を $0 \sim 4^{\circ}\text{C}$ で行った) して得た水層部について細胞壁自己融解酵素活性を測定した。基質には、PD 株の対数期増殖菌より得た熱処理細胞壁 (細胞壁を脱イオン水中で 100°C 、10 分間熱処理し、3 回遠心洗浄した後凍結乾燥したもの) を用いた。

11. 化学分析

アミノ酸およびアミノ糖の分析は、凍結乾燥した試料を封管中で 6N 塩酸により 100°C で 16 時間加水分解し、日立 KLA-3B 型アミノ酸自動分析計を用いて行った (34)。加水分解の際のアミノ酸、アミノ糖の破壊に対する補正は行なわなかった。遊離のアミノ基をもつア

ミノ酸（なっしはアミノ糖）の分析は、1-フルオル-2,4-ジニトロベンゼン（FDNB）処理した試料を、同じように加水分解し、アミノ酸自動分析計にかけて行った（35）。一方遊離のカルボキシル基をもつアミノ酸の分析は、試料をヒドラジン分解した後ベンズアルデヒド処理を行い、アミノ酸自動分析計により行った。ヒドラジン分解によるアミノ酸の破壊の補正率は、 $L\text{-Ala-L-Ala-L-Ala}$ (tri-L-Ala) を同様に処理することによって求めた。

ヘキソースの定量はグルコースを標準物質として Anthrone 法により（36）、また蛋白質量は、牛血清アルブミン（BSA、Sigma chemical co.）を標準物質として Lowry-Folin 法で測定した（37）。

実験結果

70-シ

I	PO株(親株)について	21
1.	自己融解現象	21
	(1)緩衝液のpHとモル濃度の影響	21
	(2)増殖相と自己融解	22
	(3)蔗糖加緩衝液中での自己融解	22
	(4)凍結乾燥菌の自己融解	25
2.	単離した細胞壁の自己融解ならびに細胞壁自己融解酵素について	26
	(1)単離した細胞壁の自己融解	26
	(2)細胞壁自己融解酵素調製の試み	26
3.	トリプシン加緩衝液中での自己融解	28
	(1)濁度の減少におよぼすトリプシン(DNase I)の影響	28
	(2)PO株の緩衝液中での自己融解に基づく細胞質の漏出に対するトリプシン添加の影響	30
4.	培地へのトリプシンの添加	31
	(1)継代培地に添加したトリプシンまたはDNase IがPO株の性状におよぼ	

す影響

31

(2) トリプシン加 NP 液体培地中での培養が PO 株の増殖、形態、自己融解能におよぼす影響

32

(3) トリプシン加培養による PO 株の自己融解能の可逆性

33

II NPG 株 (変異株) について

35

1. 変異株の分離

35

2. NPG 株の集落ならびに菌の形態 - PO 株との比較

35

[附] PO 株、NPG 株、NP 株および NPG → PO 株の自己融解能の比較

36

3. NPG 株の自己融解能

37

(1) 増殖相と自己融解

37

(2) NPG 株のトリプシン加緩衝液中での保温

37

4. 培地へのトリプシンの添加

37

(1) トリプシン加 NP 液体培地中での培養が NPG 株の増殖、形態、自己融

解能にかよぼす影響

37

(2) トリプシン加培養で引き起こせし

た NPG 株の形態変化の可逆性

38

5. NPG 株の形態に対するリジチーシ
の影響

40

Ⅲ PO 株と NPG 株の細胞壁の化学分析

41

実験結果

I PO株(親株)について

1. 自己融解現象

U) 緩衝液のPHとモル濃度の影響

遠心洗浄したPO株の対数期培養菌を、PH5~9の0.01Mおよび0.05M(最終濃度、以下同じ)リン酸・ナトリウム緩衝液に懸濁して37°Cに保温した時のOD₅₅₀の変化を測定した。保温22時間後の残存濁度(%)をプロットした。図4に示されているようにPH7付近で自己融解が最も強く起こることが判った。なお、酢酸・ナトリウム緩衝液(PH5、7)、クエン酸・ナトリウム緩衝液(PH5、7)、蟻酸・アンモニウム緩衝液(PH7)、酢酸・アンモニウム緩衝液(PH7)、トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン・塩酸緩衝液(PH7、9)、リン酸・カリウム緩衝液(PH5、7、9)を用いて同様な実験を行なったが、リン酸・ナトリウム緩衝液を用いた場合と同様、殆んど例外なく0.05M緩衝液よりも0.01M緩衝液を用い

た時に OD_{550} の減少の度合が強かった。なお自己融解は、脱イオン水に懸濁した菌液を $0^{\circ}C$ に静置した時にも認められた (22時間後の残存濁度 73%)。以上の実験に基づいて以後、自己融解の有無や程度は、 $0.01M$ リン酸・ナトリウム緩衝液 $PH7.5$ 中、 $37^{\circ}C$ で観察することにした。

(2) 増殖相と自己融解

増殖曲線の種々の時期に集菌した PO 株の自己融解能を測定し、増殖相との関係を調べた。図5に見られるように、対数期初期から中期にかけての増殖相の菌がよく自己融解を起こし、静止期に入ると殆んど自己融解を起こさなくなった。この所見は、細菌の増殖相と自己融解との間に何らかの関係のあることを示唆するものである。

(3) 蔗糖加緩衝液中での自己融解

遠心洗浄した PO 株の対数期の菌体を最終濃度が $0.5M$ ないし $2.0M$ とするよう蔗糖を加えた緩衝液 ($0.01M$ リン酸・ナトリウム緩衝

液 pH 7.5) に懸濁し、 37°C に保温した。時間を追って、 100 ml ずつの懸濁液を汲み出し、これを 5 ml の 1.2 M 食塩水で希釈し、一方同様に 100 ml の懸濁液を 5 ml の脱イオン水で希釈し、兩者の濁度を測定比較した。図 6 に蔗糖加緩衝液中で 8 時間保温後に取り出した懸濁液についての結果を示した。 1.0 M 以上に蔗糖を含む緩衝液中で保温した菌体懸濁液を 1.2 M の食塩水で希釈した時にはあまり濁度の減少が認められないうが、脱イオン水で希釈した場合には濁度が著しく減少した。

次に対数期で集めた 10^8 株の菌体を 1.2 M 蔗糖加緩衝液中に懸濁し (凍結乾燥菌量に換算して約 20 mg/ml)、 37°C に保温した時の浸透圧溶菌 (osmotic lysis) に対する感受性ならびに細胞質の漏出の経時的変化を調べた結果を図 7 に示した。すなわち時間を追って汲み出した懸濁液を 1.2 M 食塩水と脱イオン水の二種類の希釈液で希釈して濁度を測り、かつこれらの希釈試料の $12,000\text{ g}$ 、10 分間の遠心上澄液の紫

外吸収を日立 EPS-3T型自記分光光度計により
 波長260nm(遠心上澄液は260nmに^極大吸収
 をもつ)で測定した。図7では、各時点の残
 存濁度は、保温0時間の菌体懸濁液を1.2M食
 塩水で希釈した時の濁度に対する%として、
 また紫外吸収は、上述の実験に用いたのと同
 じ菌懸濁液にリゾチーム(最終濃度1mg/ml)
 を加えて溶菌させた対照実験で得られた遠上
 澄液のOD₂₆₀を100として%で表わした。
 脱イオン水で希釈した時の濁度の減少および
 紫外吸収物質の漏出が著しいのに、1.2M食
 塩水で希釈した時の濁度の減少がわずかであ
 ること、また紫外吸収物質の漏出が非常に少
 ないことが明らかである。以上の所見は、1.2
 Mの蔗糖を含む緩衝液中で M. lysodeikticus にリ
 ゾチームを作用させると安定なプロトプラス
 トが得られるという事実(38)に照らして考え
 ると、対数期のPO株が示す自己融解は細胞壁
 の溶解によるものであることを示すものと考
 えられる。すなわち1.2M食塩水による希釈の

場合と異なり、脱イオン水で希釈した際に著明な濁度の減少が見られるのは、自己融解の結果細胞壁の強剛性が失われた菌体をとりまく細胞質膜が、細胞内部の高い浸透圧に抗しきれず破裂するためと考えられる。なお水で希釈した時に、リゾチームで溶菌した際の対照ほかに濁度が下がらないのは、自己融解酵素がリゾチームに比べて、細胞壁を大まかに切断するためではないかと考えられる。また、保温の時間において2種類の希釈液で希釈した時の濁度ならびに紫外吸収が一致せず、ずれるのは、反応開始前に（保温の時間よりも前の操作中に）既に細胞壁自己融解酵素が働いたことを示している。

(4) 凍結乾燥菌の自己融解

対数期 PO 株の洗浄菌体を凍結乾燥し、シリカゲル入りのデシケーターに入れて室温に放置保存し、自己融解能の変化を追跡した。表 2 から、凍結乾燥操作によって菌体が自己融解を起しにくくなるよう変化すること、お

よび凍結乾燥菌体は保存中、日数の経過とともにさらに自己融解を起こしにくくなって行くことがわかる。

2. 単離した細胞壁の自己融解ならびに細胞壁自己融解酵素について

(1) 単離した細胞壁の自己融解

対数期の PO 株より調製した細胞壁を緩衝液に懸濁して 37°C に保温し、 OD_{550} の減少を経時的に調べた (図 8)。対数期の全菌を用いた場合に比べて程度はかなり弱いが、濁度の減少が認められ、かつこの自己融解は懸濁液にトリプシンを添加した場合には弱められ、また細胞壁を熱処理 (脱イオン水中で 100°C 、10 分間熱処理し、3 回遠心洗浄) した場合には認められなくなった。なお PO 株の静止期や NPG 株の対数期の菌から単離した細胞壁 (非熱処理) についても同様な実験を行なったが、全菌の場合と同様、これらの細胞壁は自己融解を起こさなかった。

(2) 細胞壁自己融解酵素調製の試み

PO株の対数期増殖菌によって図9に記載したような方法に従って菌体を破砕し、菌破砕液を分画遠心して細胞壁、細胞質膜、および細胞質を主とする画分その他を分離した。ついでこれらをルーズバーンで抽出して得た水層部（図10）について細胞壁自己融解酵素活性を次のようにして測定した。テスト溶液1 mlに基質（後述）0.5 ml、0.1 M リン酸・ナトリウム緩衝液 pH 7.5 を 0.15 ml（最終濃度 0.01 M）、防腐剤として1% 窒化ナトリウム水溶液 0.25 ml、脱イオン水を 0.6 ml 加えて全量を 2.5 ml とし、37°C に保温して OD₅₅₀ の減少を測定した。基質としては、対数期 PO 株の熱処理細胞壁の凍結乾燥品を脱イオン水に 5 mg/ml の割合に懸濁したものを用いた。供試各画分の酵素活性（反応23および71時間後の濁度の変化を指標とした）を表3に示した。培養上澄液には、少なくとも濃縮しない状態では酵素活性は認められなかった。供試画分のうちでは、20,000 倍、10 分間遠心上澄画分のルーズ

タノール抽出物に最も強い細胞壁自己融解酵素活性が認められた。すなわち細胞壁自己融解酵素を得るには、細胞質や細胞質膜或いはその断片やメソゾーム、さらには *periplasmic space* (細胞質膜と細胞壁の間隙) に存在する物質が含まれると推定される画分をネグタノール処理するのが適当だと思われる。なお、20,000g、10分間の遠心で沈澱する細胞壁を主とする画分のネグタノール抽出物中にも活性が認められた。しかしこの画分がペプチドグリカン以外の多くのアミノ酸を含むこと、この画分をさらに緩衝液、脱イオン水で充分洗淨して得た細胞壁にはペプチドグリカン成分以外のアミノ酸が殆んど検出されないことを考へ合わせると、この細胞壁画分に認められる活性は細胞壁に付着した細胞質膜に由来するものと考えられる。

3. トリプシン加緩衝液中での自己融解

(1) 濁度の減少におよぼすトリプシン (DNase I) の影響

対数増殖期の PO 株を 0.01M リン酸・ナトリウム緩衝液 $\text{pH} 7.5$ に懸濁した時の OD_{550} の減少を経時的に追った (図 11)。濁度の減少とともにグラム染色性は、陽性から陰性へと変化した。この図では保温 1 時間後に残存濁度が 50% に減少しているが、これは最もよく自己融解が認められた実験例であり、多くの場合残存濁度が 50% に達するのに約 6 時間程度を要し、実験ごとにかなりのばらつきがあった。

さて図 11 に実線で示した実験に用いたのと同じ菌体もトリプシン (最終濃度 0.4mg/ml) を加えた緩衝液に懸濁し、 37°C に保温した時の OD_{550} の変化を時間を追って測定した。図 11 に点線で示したように、トリプシンの添加により自己融解が極度に抑制された。

なお対数期の PO 株の洗浄菌体を炭イオン水中で 100°C 、10 分間処理し、3 回遠心洗浄した熱処理全菌および 1% ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) 水溶液に懸濁し、 0°C で一夜が

くは人した後、3回豚イオシ水で遠心洗浄した SDS 処理全菌は、有意の OD_{550} の減少を示さなかった。これらの所見は自己融解現象に酵素の関与を思わせ、しかもこの自己融解酵素が細胞表層に存在している可能性を示唆している。なお対数期の PO 株をトリプシンのかわりに DNase I (最終濃度 5 または $25 \mu\text{g}/\text{ml}$) を加えた緩衝液に懸濁、保温しても自己融解の抑制は認められなかった。

(2) PO 株の緩衝液中での自己融解に基づく細胞質の漏出に対するトリプシン添加の影響

PO 株の対数期培養菌をトリプシン (最終濃度 $0.2 \mu\text{g}/\text{ml}$) 加緩衝液に懸濁し、 37°C に保温して経時的に濁度の変化と $20,000 \times$ 、10 分の遠心上澄液の紫外吸収物質を波長 260 nm で測定した。紫外吸収の方は、別にリグザーム (最終濃度 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$) を加えて完全溶菌させた対照実験の遠心上澄の OD_{260} を測定し、この値を 100 % として % で表わした。図 12 に示すようにトリプシンを添加することにより濁度の減

少が抑えられ、とともに紫外吸収物質の量も著しく抑えられた。すなわち、トリプシンにより細胞表層に存在する細胞壁自己融解酵素活性が抑制され、その結果菌の透過障壁 (permeability barrier) の完全さが保持され、細胞質の漏出が抑えられることがわかった。

4. 培地へのトリプシンの添加

(1) 継代培地に添加したトリプシンまたは DNase I が PO 株の性状におよぼす影響

酵素を添加しない継代培地上的 PO 株の個々の菌の形態は単球菌であり (写真 1、10)、グラム染色性は陽性であり、集落には粘稠性が認められた。ところが、DNase I (最終濃度 5 または 10 または 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 或いはトリプシン (最終濃度 20 または 50 または 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) を加えた PO 寒天培地に培養した場合には、その集落が粘稠性を示さないのが観察された。なお PO 株をトリプシン或いは DNase I を加えた寒天培地に培養した場合、菌の生育および形態やグラム染色性には変化は見られなかった。こ

れは、トリプシンにより細胞表層に存在する自己融解酵素活性が抑制され、DNAの漏出が止まったものと考えられるが、PO株は継代培地で増殖中にも極一部の菌が自己融解を起こしているものと思われる。

(2) トリプシン加NP液体培地中での培養がPO株の増殖、形態、自己融解能におよぼす影響

PO株をトリプシン(最終濃度 $5 \mu\text{g}/\text{ml}$) 加NP液体培地中で培養し、増殖の様相や菌の形態や自己融解能がどのような影響を受けるかを観察した。増殖曲線や菌の形態(半球菌)(写真2、11)、グラム染色性(陽性)には影響は認められなかった。(ただし最終トリプシン濃度を $20 \mu\text{g}/\text{ml}$ に上げると菌の外形の丸味が乏しくなっていた。) しかしながら、自己融解能については、増殖曲線の種々の時期に集めた菌体の各々を冷脱イオシ水で2回遠心洗浄した後、 0.01 M リン酸・ナトリウム緩衝液 $\text{pH} 7.5$ に懸濁し、 37°C に保温して濁度の変

化を追跡すると、図13に見られるように、対数期の菌体についてもそれほど明確な濁度の減少が認められず、トリプシン加培地に培養することにより自己融解が抑えられることが明らかにになった。培養菌体を遠心洗浄する際の洗浄液（冷脱イオン水）にトリプシンインヒビターを加えて行ったが、何回か行なった実験すべてにおいて、自己融解の抑制が観察された。

(3) トリプシン加培養によるPO株の自己融解能抑制の可逆性

トリプシン（最終濃度 $5\mu\text{g}/\text{ml}$ ）加NP液体培地中で培養し、その結果自己融解能を抑制された対数期の菌を遠心し、供試培養菌液と同容積のトリプシンインヒビター（最終濃度 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ ）加NP液体培地で、ついで同容積のNP液体培地で洗浄した。このように洗浄した菌体を原容積の約 $1/3$ 容のNP液体培地に懸濁し、その一部（約 10ml ）を新しいトリプシンを含まないNP液体培地（ 200ml 、平底フラスコ中）に

植え、振盪培養した。以上の操作はすべて無菌的に行った。振盪6時間半後、対数期に達した菌は自己融解能を回復しており、0.01Mリン酸・ナトリウム緩衝液pH7.5に懸濁して8時間および13時間保温した後、残存濁度は、それぞれ59%および50%だった。なお供試菌体を洗浄する液(NP液体培地)に加えたトリプシン・インヒビターの影響について吟味するため、PO株をトリプシン・インヒビター(最終濃度1μg/ml)加NP液体培地中で培養したが、増殖曲線、菌の形態、グラム染色性、なお自己融解能に何らの影響も認められなかった。ちなみに、トリプシン・インヒビターを洗浄後に加えずに同様の実験をした場合には、後培養して対数期に達した菌に自己融解能の回復が認められなかった場合と認められなかった場合とがあり、一定した実験結果が得られなかった。

II NPG 株 (変異株) について

1. 変異株の分離

(財) 醗酵研究所より分与された親株、すなわち PO 株を NPG 寒天斜面培地に継代培養を^繰り返したところ、数代目以後の菌体が、親株が自己融解を起こす条件で、全く自己融解を示さなくなつた。このように斜面培地培養菌を NPG 平板寒天培地上にまき、単一集落をひき出して変異株 (NPG 株) を分離し、以後 NPG 寒天培地に継代保存した。

2. NPG 株の集落ならびに菌の形態 — PO 株との比較

NPG 株の集落は PO 株と同じく黄色を呈したが、PO 株の集落が粘稠性を示すのに対して、NPG 株の集落には粘稠性は認められなかった。一方、個々の菌体の形態については PO 株が単球菌であるのに対して、NPG 株は *tetrad* であった (写真 3、12、13)。グラム染色性はいずれの株も陽性であった。

付] PO株、NPG株、NP株およびNPG→PO株の自己融解能の比較

これら各株の自己融解能を比較した結果を表⁴に示した。NPG寒天培地からグルコースを省いたNP寒天培地に継代したNP株は、NPG株とは異なり、対数期の菌が自己融解を起こすのが観察された。しかし濁度減少の程度は、PO株に比べると少ないようであった。またNP株はその集落の粘稠性もPO株のそれと比べて少なかったが、個々の菌の形態はPO株と同じく、単球菌であった。すなわちNPG寒天培地上での変異株の選別には、多量に含まれたグルコースがかなり影響しているように思われる。なおNPG→PO株は、NPG株と同じく自己融解を起こさず、集落の粘稠性も認められなかった。菌の形態もNPG株と同じくcuboidであった。すなわちいったん変異株が生じると、この株をPO寒天培地で継代してもそう簡単には親株に復帰しないことが示された。

3. NPG株の自己融解能

(1) 増殖相と自己融解

図14に示すように、NPG株はPD株とは異なり、対数期の菌体をも含めて増殖曲線の全領域にわたって（ただし死滅期を除く）自己融解を起こさないことが確認された。

(2) NPG株のトリプシン加緩衝液中での保温

I-3-(2)と同様な実験をNPG株の対数期培養菌について行なったが、トリプシン添加の有無にかかわらず、自己融解能に変化は認められず、また細胞質の漏出も全く見られなかった（図15）。

4. 培地へのトリプシン添加

(1) トリプシン加NP液培地中での培養がNPG株の増殖、形態、自己融解能におよぼす影響

図15に示したように、対数期の菌体には依然として自己融解が認められないが、増殖曲線には若干の、また菌の形態には著しい変

化がみられた。すなわち濁度でみた最大生育量の低下が観察され、またトリプシン加NP液体培地中でNPG株は、*in situ*としてではなく、二次元に四角のタイルを敷きつめたかのように見える、網目状の隔壁構造をもった大きな細胞‘集塊’として増殖するのが注目を引きつけた(写真4、5、14、15)。この細胞‘集塊’を構成している個々の‘単位球菌’は核を有していることから、生長、分裂は正常に進行しており、ただ分離の^みが添加したトリプシンにより阻害されたようにみえる。グラム染色性には変化は認められなかった。形態の変化は対数期、静止期を問わず認められ、既にL字管での前培養(最終トリプシン濃度は本培養の場合と同じく $5\mu\text{g}/\text{ml}$)の段階で観察された。最終トリプシン濃度を $20\mu\text{g}/\text{ml}$ に上げると、細胞‘集塊’の縁のなめらかさが乏しくなった。

(2) トリプシン加培養で引き起こされたNPG株の形態変化の可逆性

トリプシン（最終濃度 5mg/ml ）加 NP 液体培地（ 5ml 、L 字管中）で培養した大形細胞集塊を静止期で集め、I-4-B) の PO 株の場合と同様、トリプシンインヒビター（最終濃度 1mg/ml ）加 NP 液体培地および NP 液体培地で洗浄した。洗浄した菌体を供試した培養菌液と同容積の NP 液体培地に懸濁し、その一部（約 0.1ml ）を新しいトリプシンを含まない NP 液体培地（ 5ml 、L 字管中）に植え振盪培養した。以上の操作はすべて無菌的に行った。一夜振盪培養すると（静止期）、菌の形態は元の *te Chad* に戻っていた（写真 7）。PO 株についての実験の場合と同じく、洗浄液に加えたトリプシンインヒビターの影響を吟味したが、菌の形態、グラム染色性に影響は認められなかった。なおトリプシンインヒビターを洗浄液に加えずに同様の実験を行なったが、供試菌の形態が元の *te Chad* に戻るのが観察された。しかし洗浄操作をせずに、トリプシン加培養菌液（約 0.1ml ）をそのまま新しい NP 液体

培地(5 ml) に植えて振盪培養した時には細胞‘集塊’と *te Chad* の混在が見られた。増殖曲線や自己融解能に与える影響については吟味しなかった。

5. NPG 株の形態に対する リゾチーム の影響

NP 培地に培養した NPG 株の *te Chad* またはトリプシン加 NP 液体培地中で培養した NPG 株の細胞‘集塊’を 1.2 M 食塩水中で リゾチーム (最終濃度約 1 mg/ml) 処理後 (室温、約 30 分)、グラム染色を施し、光学顕微鏡で観察した。グラム陽性の球菌がつながってできた上記 *te Chad* 或いは細胞‘集塊’がばらけ、サフраниンで赤く染まる、すなわちグラム陰性の微少なプロトプラストが見られた (写真 9)。

すなわち、*te Chad* および細胞‘集塊’のどちらにおいてもこれらを構成している‘単位球菌’は、充分な機能を有する細胞質膜を持っており、かつこの‘単位球菌’は リゾチーム 感受性の細胞壁でつながり合われていることがわか

った。

Ⅲ PO株とNPG株の細胞壁の化学分析

M. lysodeikticus の細胞壁ペプチドグリカン
は、図3に示すような分子構造を基本的な構
築単位としてゐるとされているが、表5にあ
げたPO株およびNPG株から単離した細胞壁の
ペプチドグリカンのアミノ酸やアミノ糖の組
成ならびにN末端およびC末端アミノ酸の種
類やグルタミル酸残基1モル当りのモル数に
はそれほど目立った差は認められなかった。
トリプシン加NP液体培地に培養し、静止期に
集めたNPG株の細胞壁のC末端リジンが他の
3種類の細胞壁のそれに比べて高い値を示し
たが、この差が有意であるかどうか、或いは
どのような意味を持つかについては、今後の
吟味を要すると思える。なおペプチドグリカ
ン構成アミノ酸およびアミノ糖以外のアミノ
酸自動分析計により検出されるニヘドリン
陽性物質の量は無視しうる程度であった。

一方、供試細胞壁ペプチドグリカンのグリカン部の平均鎖長を比較するために、それぞれ細胞壁を NaBH_4 で還元 (39) 後、6N 塩酸中で 100°C 、16 時間加水分解したものをアミノ酸自動分析計にかけて、ムラミシトールおよびグルコサミンニトールの測定を試みた、いずれのアミノ糖アルコールも殆んど無視しうる程度しか検出されず、4 種類の細胞壁のペプチドグリカンのグリカン部平均鎖長は、いずれもかなり長く、供試細胞壁間に差異を認めることはできなかった。

さらにタイクロン酸 (図3) の構成成分であるグルコース量にも有異の差は認められなかった。

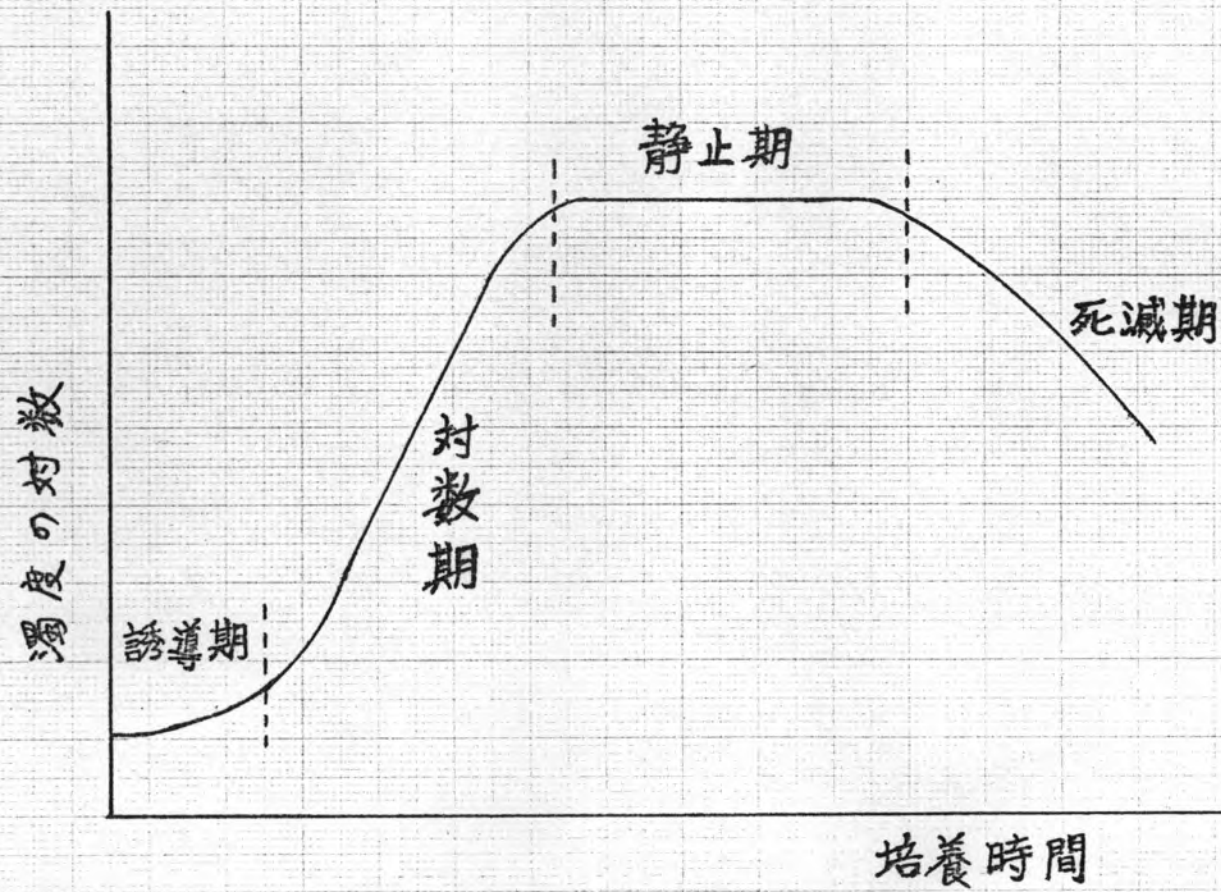


図1. 細菌の増殖曲線

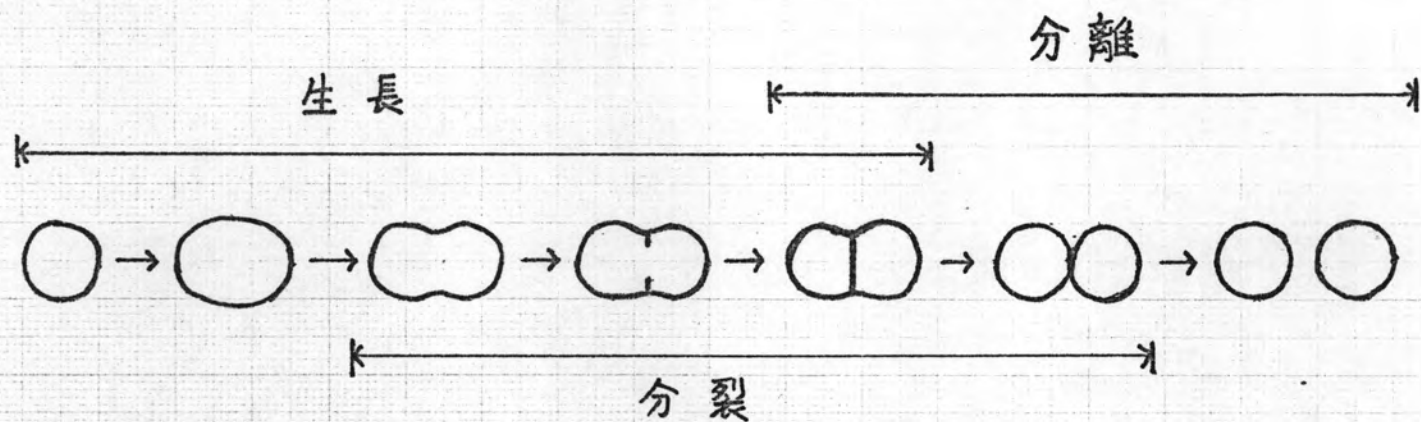


図2. 球菌の増殖(生長、分裂、分離)過程を示す模式図
(文献(1,2)を参考にした)

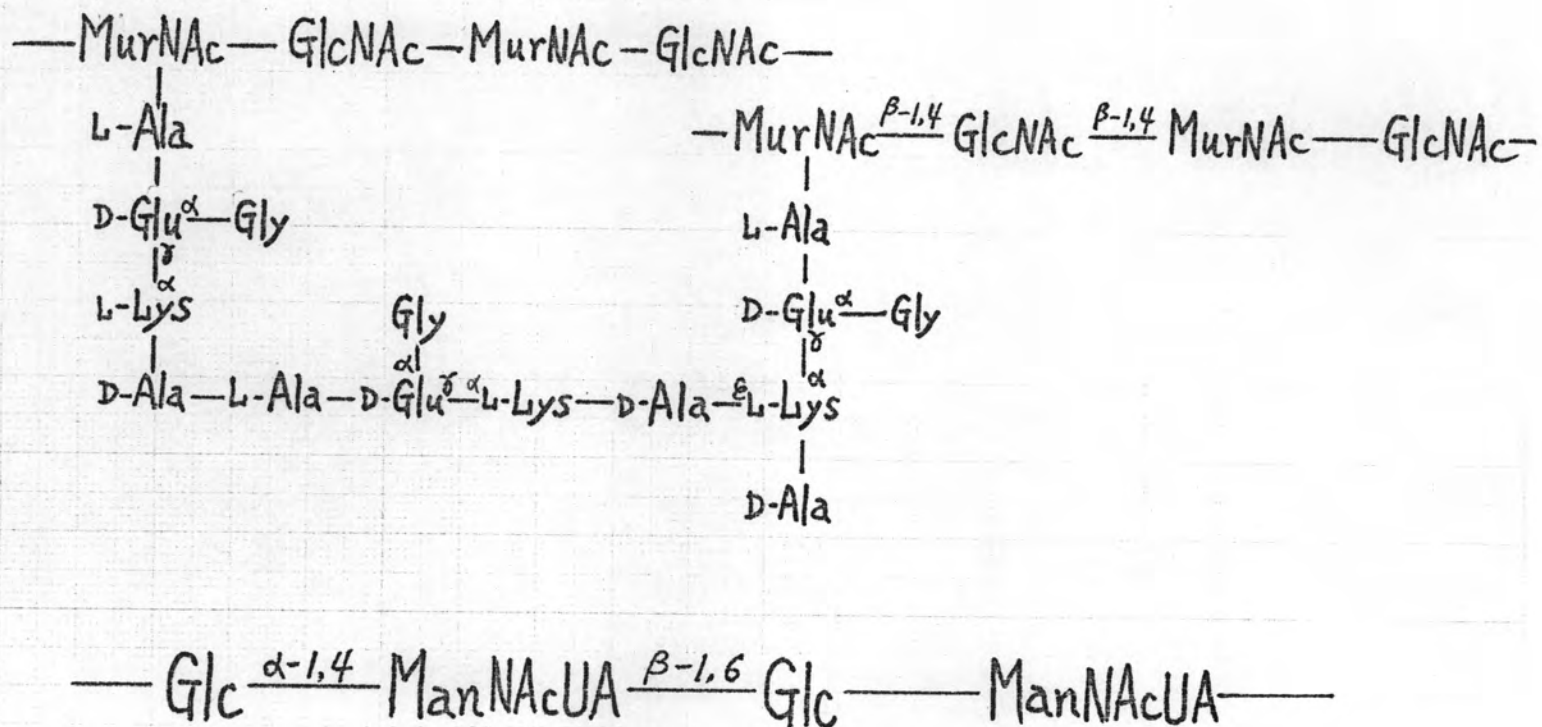


図3. Micrococcus lysodeikticus の細胞壁を構成している二つのポリマー、
 ペプチドグリカン(上)(26, 27) と タイクロン酸(下)(28, 29)

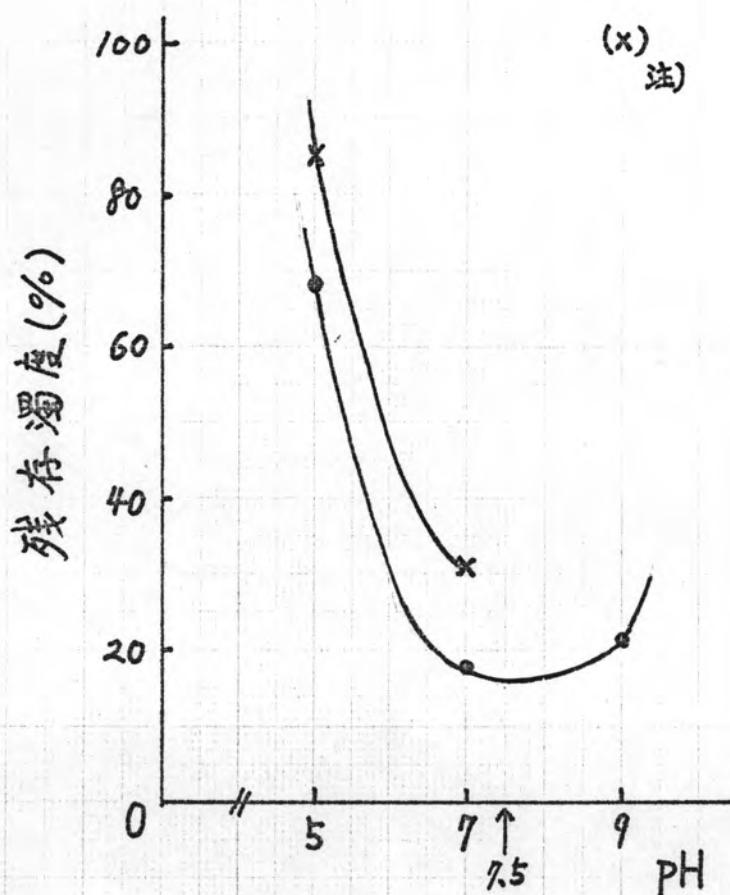


図4. PO株の対数期菌体の自己融解に
およぼすpHの影響。

保温22時間後の残存濁度を示した。

●—0.01 M リン酸・ナトリウム緩衝液

x—0.05 M リン酸・ナトリウム緩衝液

注) 均一な懸濁液にならず、正確な濁度が
測定できなかったが、殆んど自己融解
が起っていると思われる。

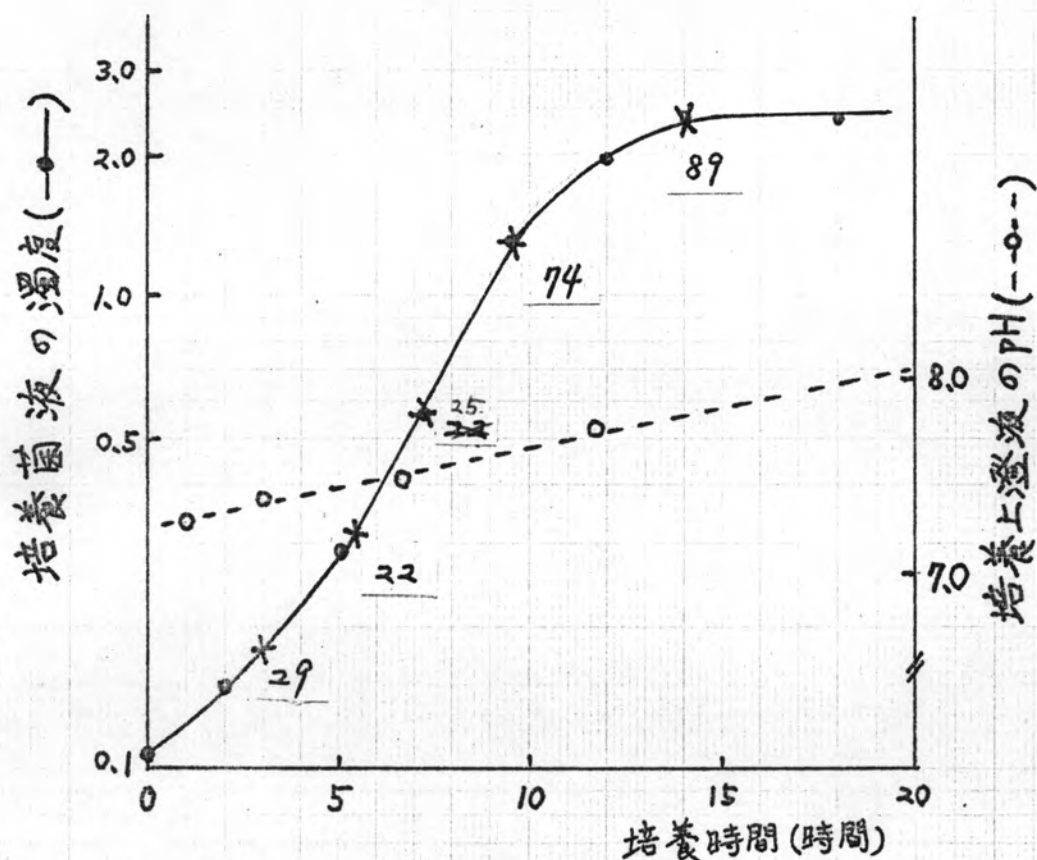


図5. PO株の自己融解能の増殖時期による差.

X印の時点で菌体を集めて、洗浄し、0.01Mリン酸-ナトリウム緩衝液に懸濁した。37°Cに保温して、濁度の変化を測定した。保温16時間後の残存濁度を%で傍に示した。

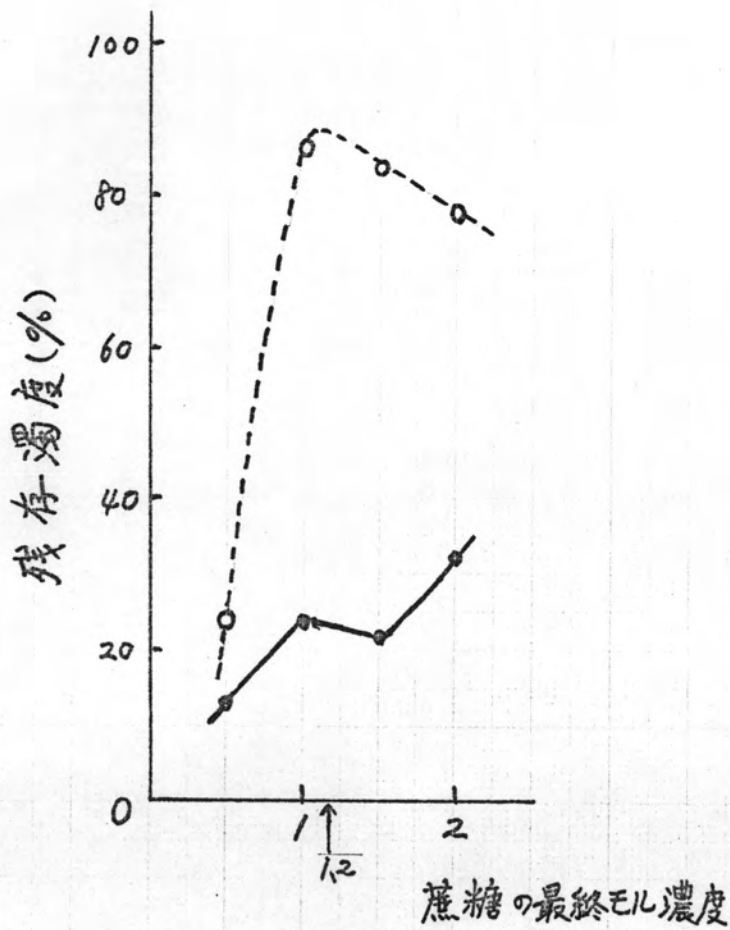


図6. PO株の対数期菌体の蔗糖加緩衝液中での自己融解.

保温8時間後の残存濁度を示した。

—●— 脱イオン水で希釈

--○-- 1.2 M 食塩水で希釈

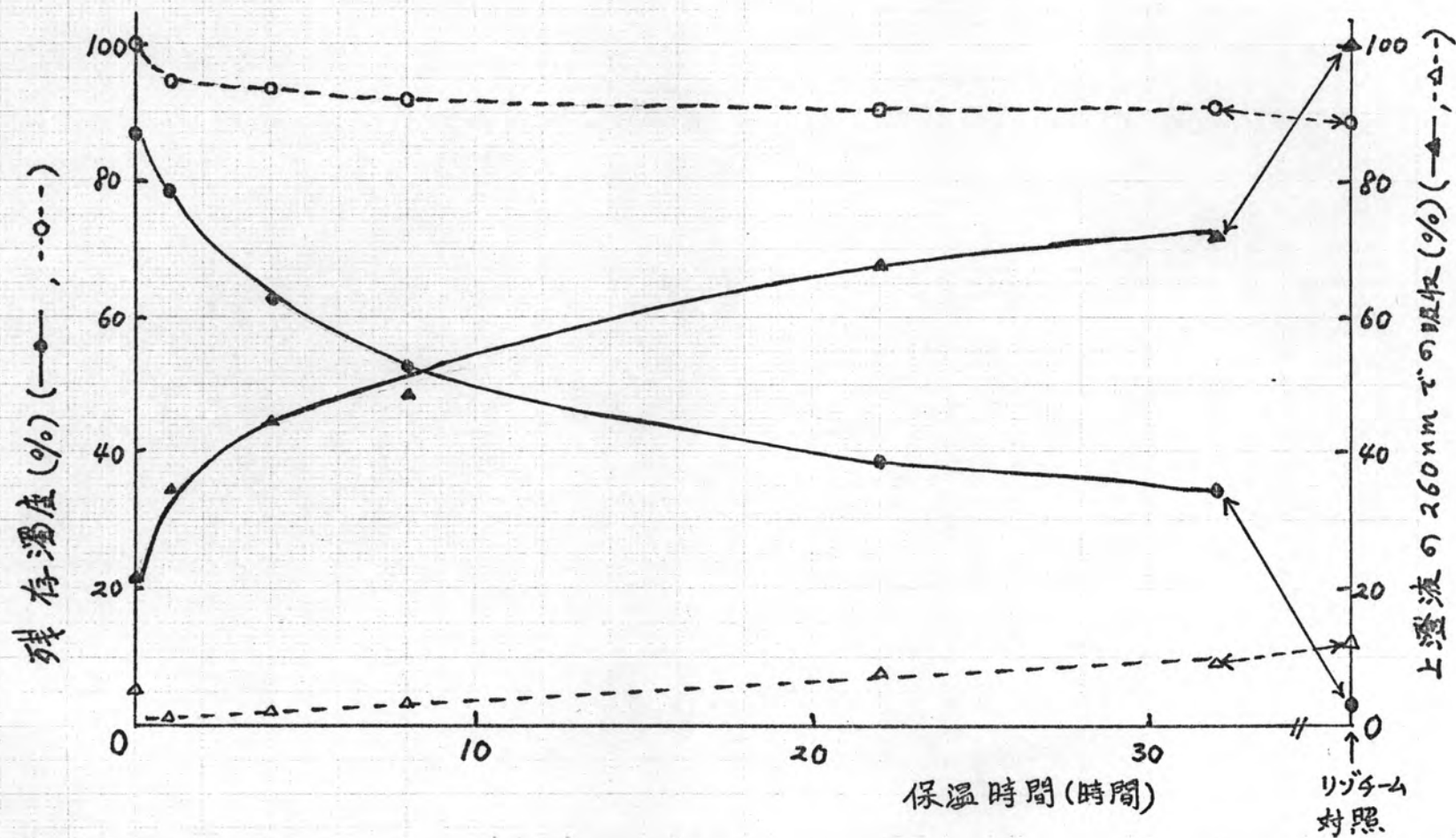


図7. PQ株の対数期菌体の1.2M蔗糖緩衝液中での自己融解と細胞質のそれ。
 —— 脱イオン水で希釈。 - - - - 1.2M食塩水で希釈。

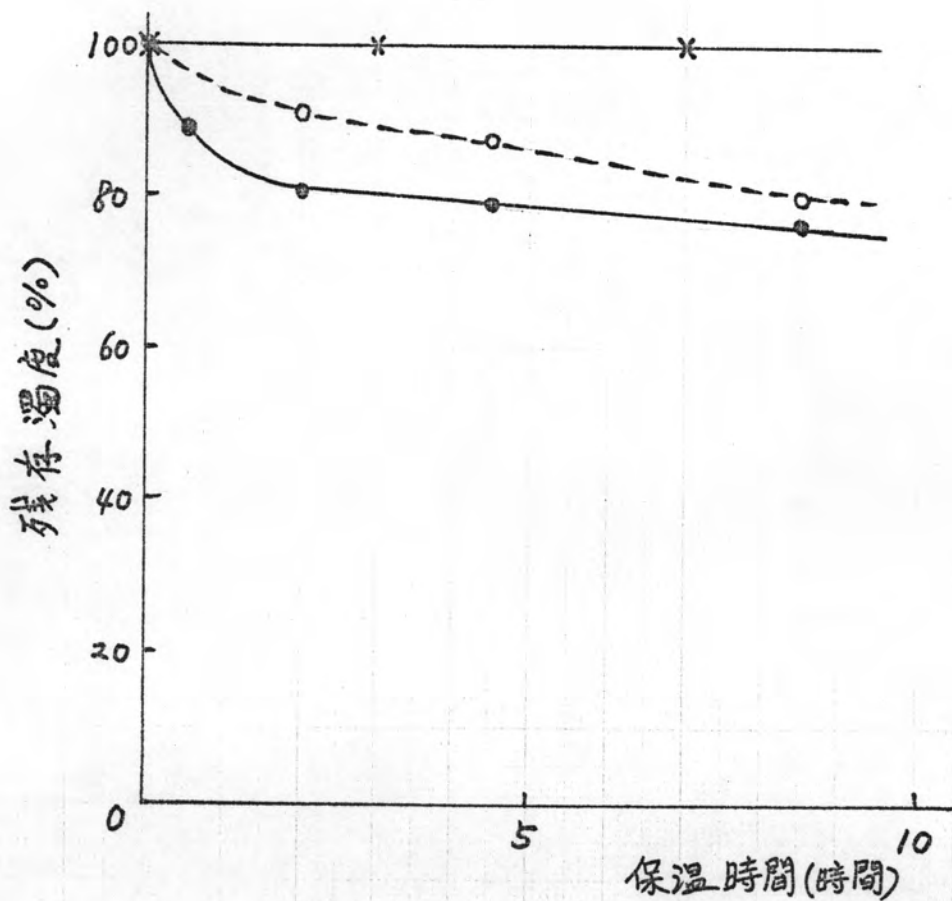


図8. PO株の対数期菌体より単離した細胞壁の自己融解

- トリプシン無添加
- トリプシン添加(最終濃度1.3μg/ml)
- x— 加熱処理した細胞壁

(PO株の静止期菌体 ならびに
NPG株の対数期菌体より単離
した非加熱の細胞壁も同様
な態度を示した。)

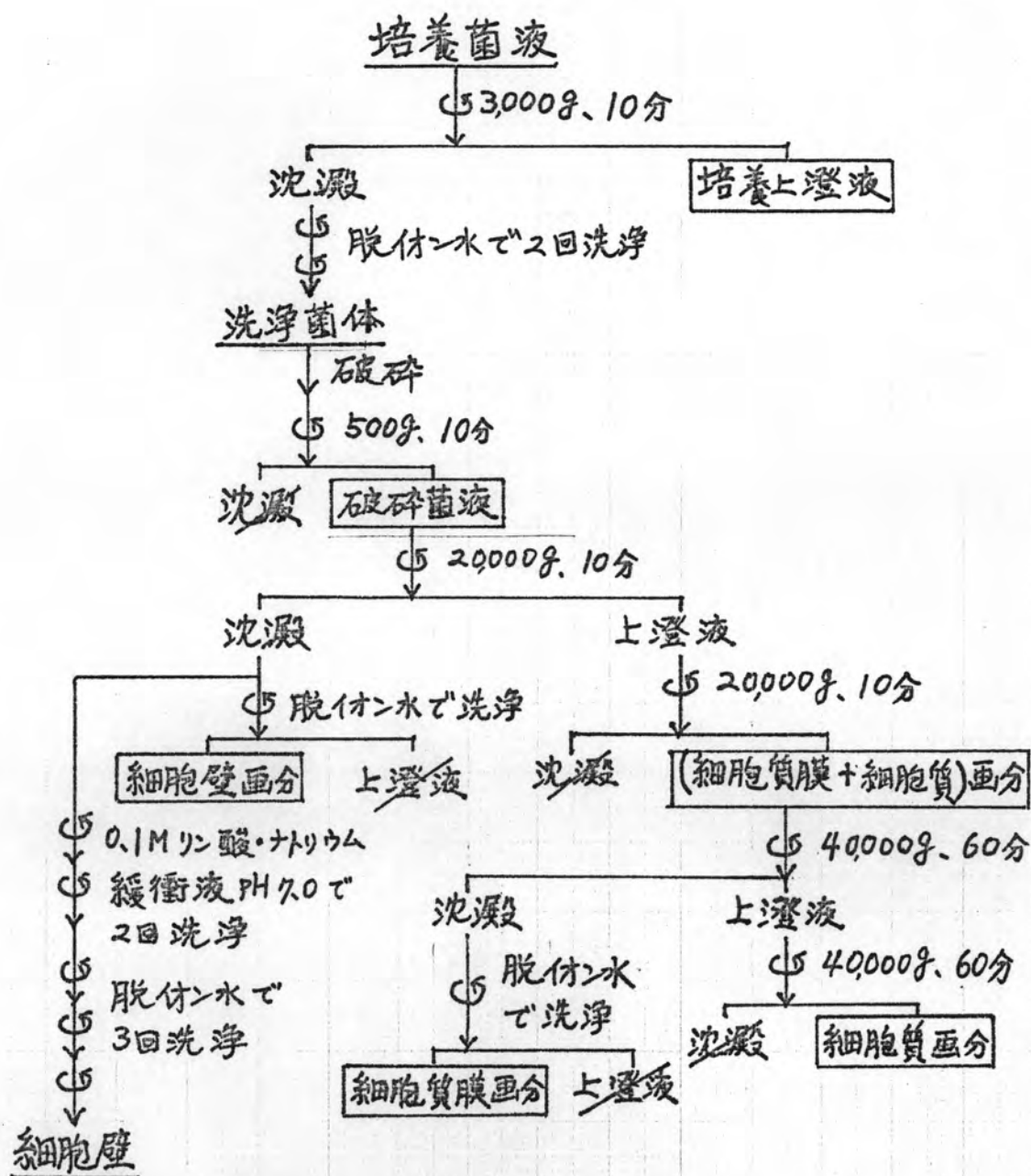


図9. 菌体の破碎および破碎菌液の分画.

(細胞壁自己融解酵素の検出には、
□内の試料を用いた.)

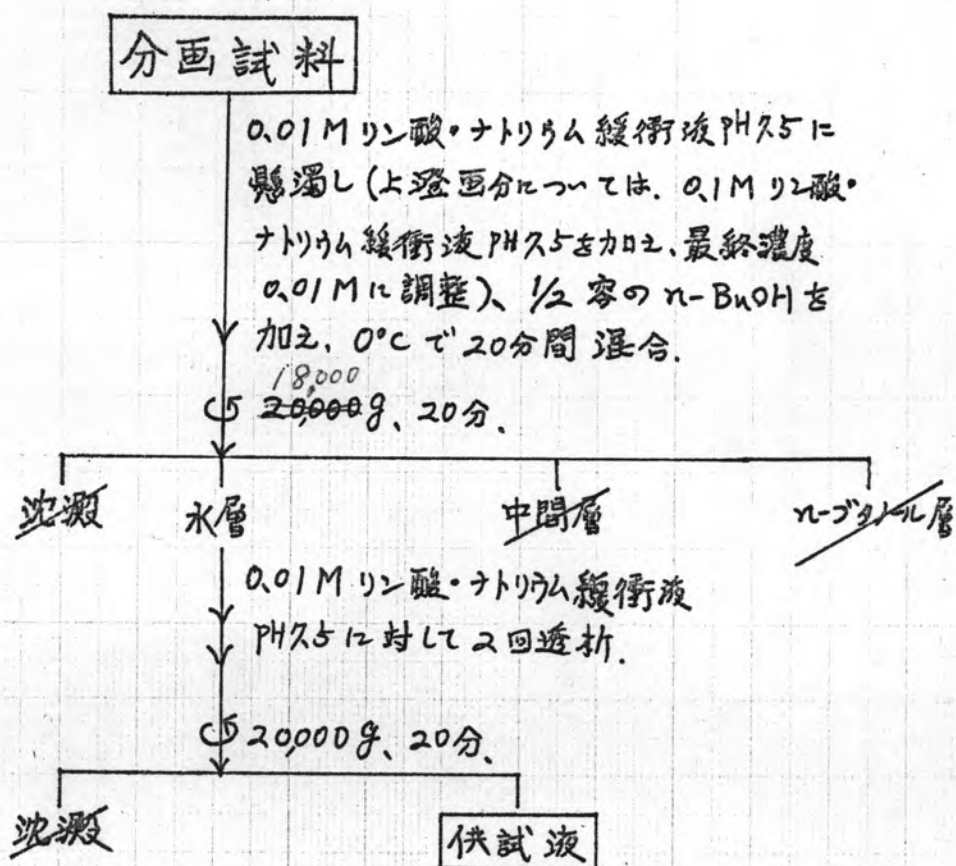


図10. n -ブタノールによる細胞壁自己融解酵素の抽出。

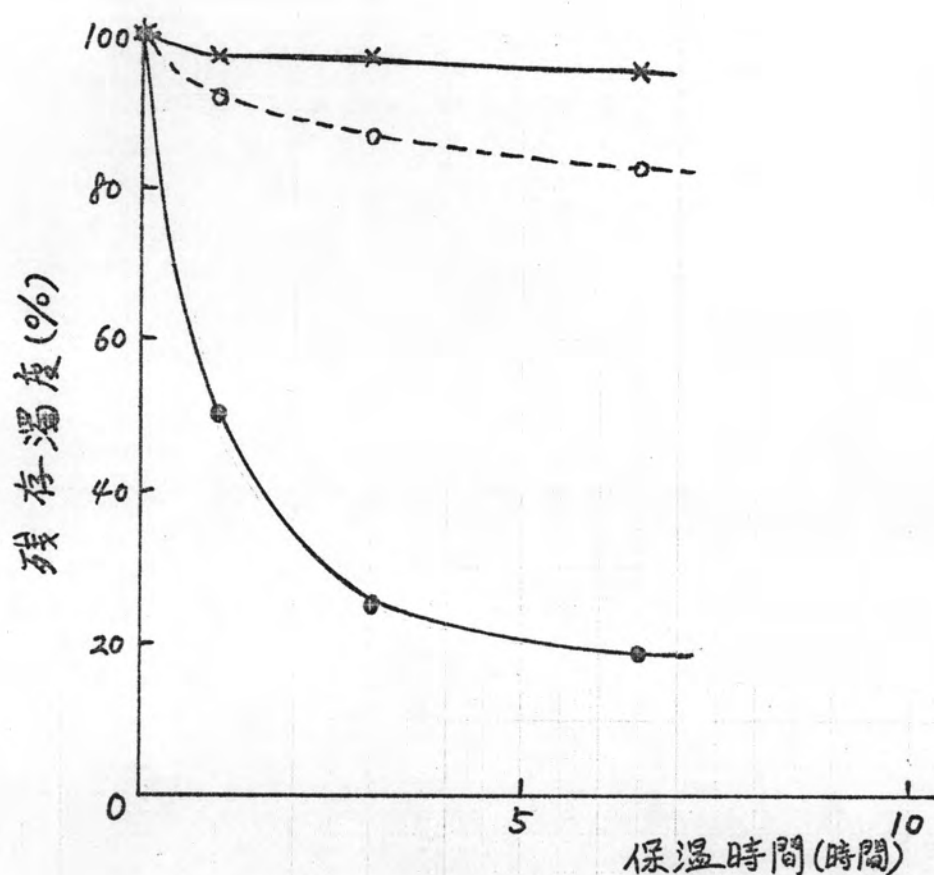


図11. *P. aeruginosa* 株の対数期菌体の自己融解に
およぼすトリプシン添加の影響

- トリプシン無添加
- トリプシン添加 (最終濃度 0.4 $\mu\text{g/ml}$)
- x— 加熱処理 または SDS 処理した全菌
を用いた対照実験

最終トリプシン濃度 0.2 $\mu\text{g/ml}$ または 0.5 $\mu\text{g/ml}$
の場合にも自己融解は抑制された。

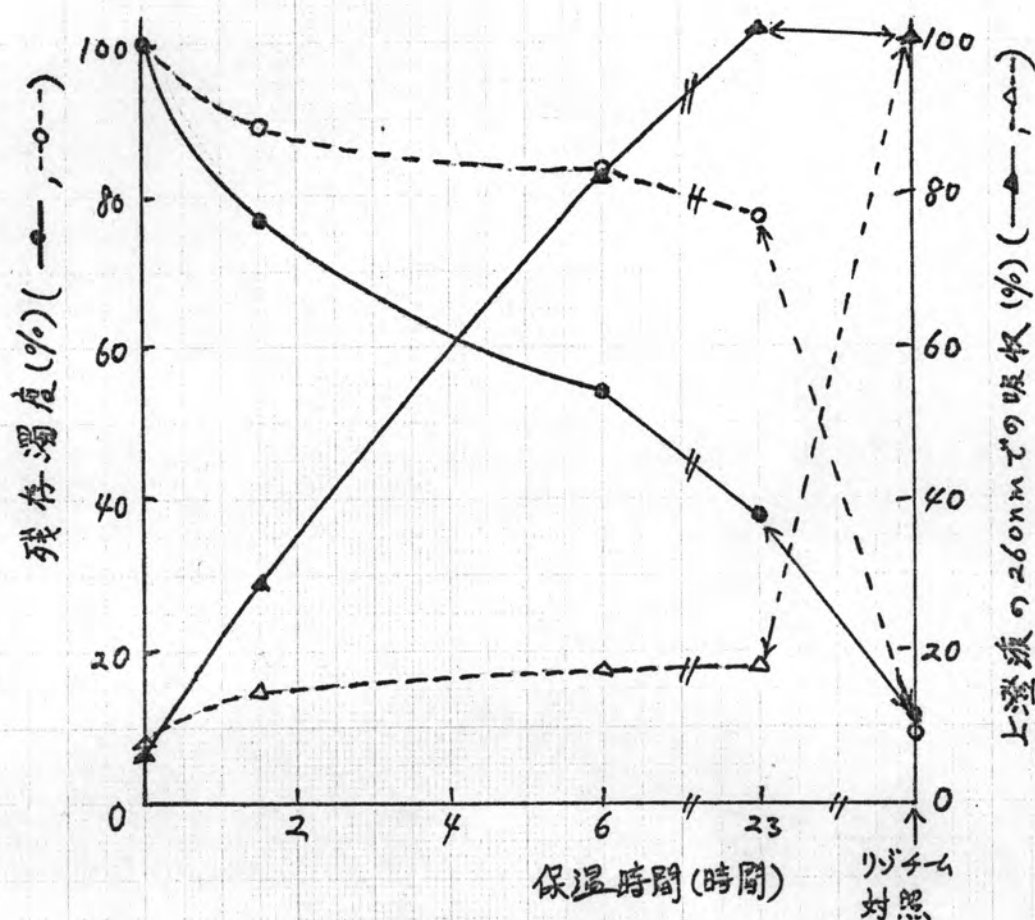


図12. P0株の対数期菌体のトリプシン加後衝液中での自己融解と細胞質のそれ。

——トリプシン無添加

-----トリプシン添加(最終濃度 $0.2 \mu\text{g/ml}$)

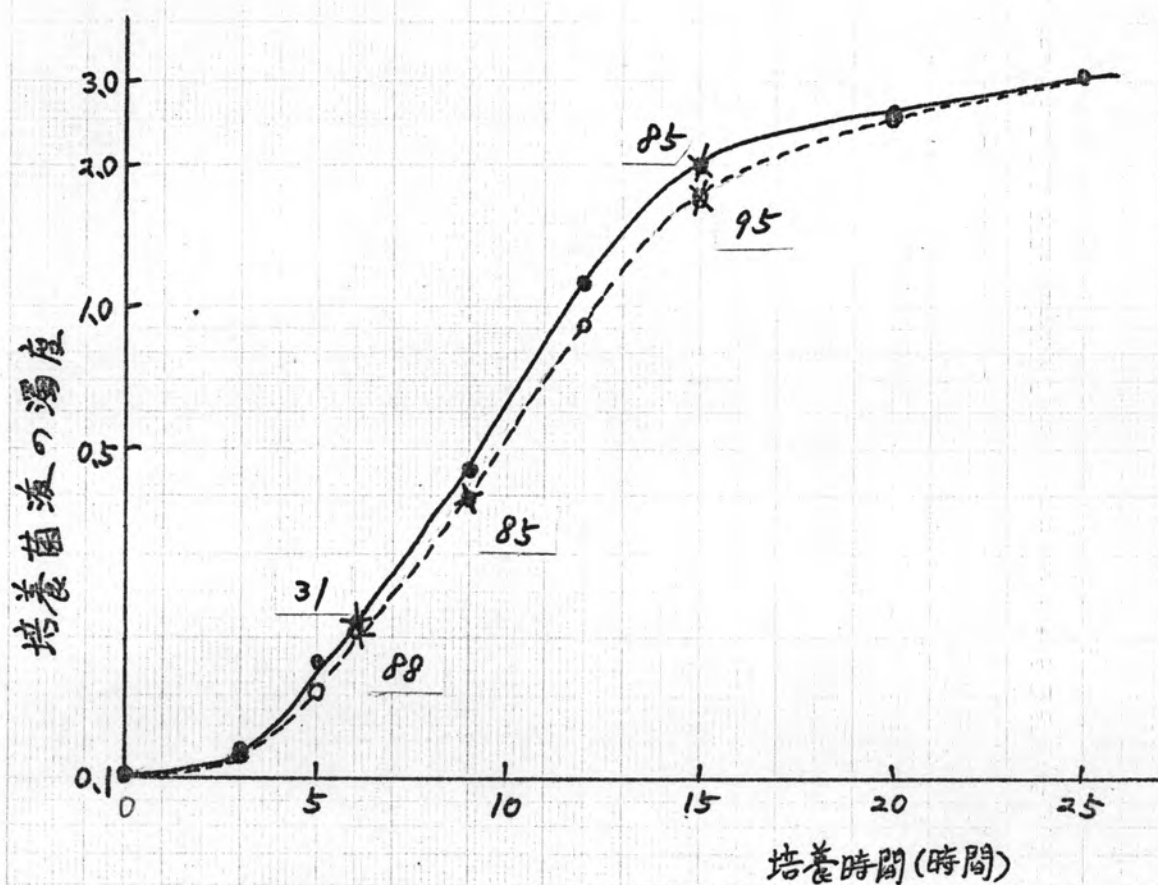


図13. NP液体培地へのトリプシンの添加がPO株の増殖曲線と自己融解能におよぼす影響。

—●—トリプシン無添加(対照実験)

--○--トリプシン添加(最終濃度 $5\mu\text{g/ml}$)

実験操作および説明は図5と同じ。

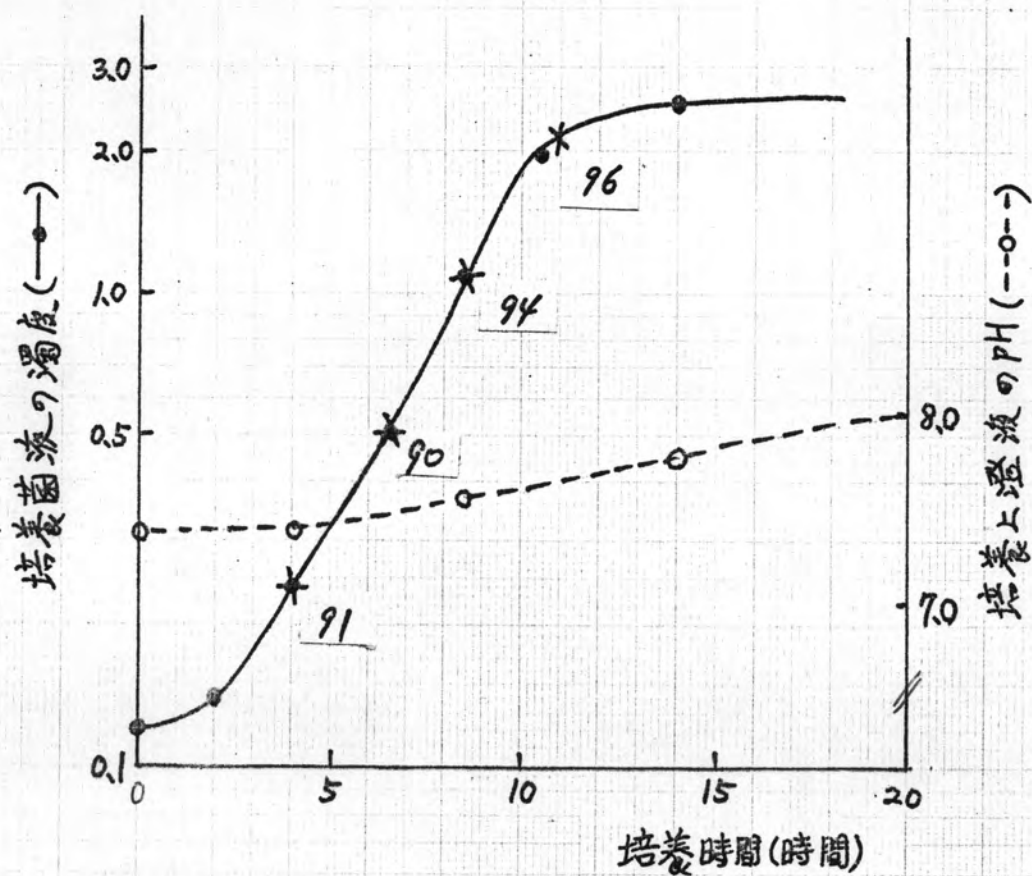


図14. NPG株の増殖時期と自己融解能.

実験操作および説明は図5と同じ.

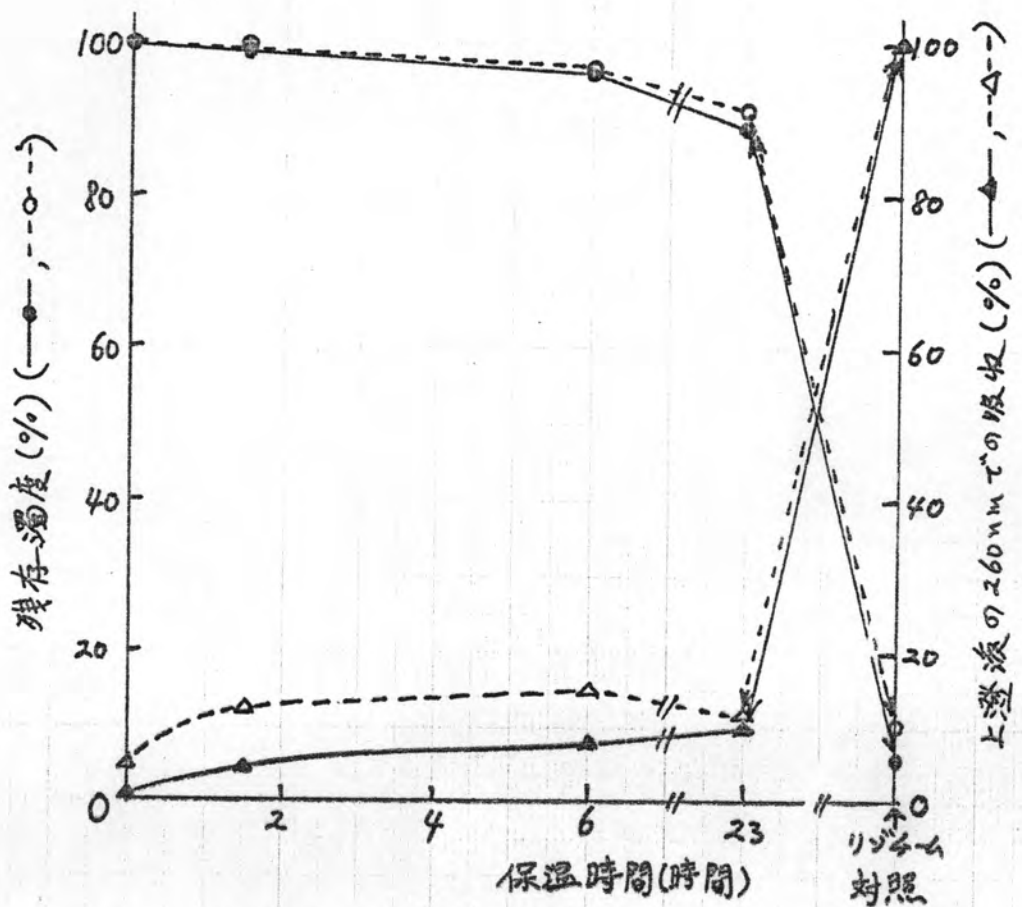


図15. NPG株の対数期菌体のトリプシン加緩衝液中での自己融解と細胞質のもれ。

——トリプシン無添加

-----トリプシン添加(最終濃度 $0.2 \mu\text{g/ml}$)

トリプシン無添加の時に比べ、トリプシンを添加した場合、上澄液の260nmでの吸収が大きくなっているのは、添加したトリプシンの吸収によるものと思われる。

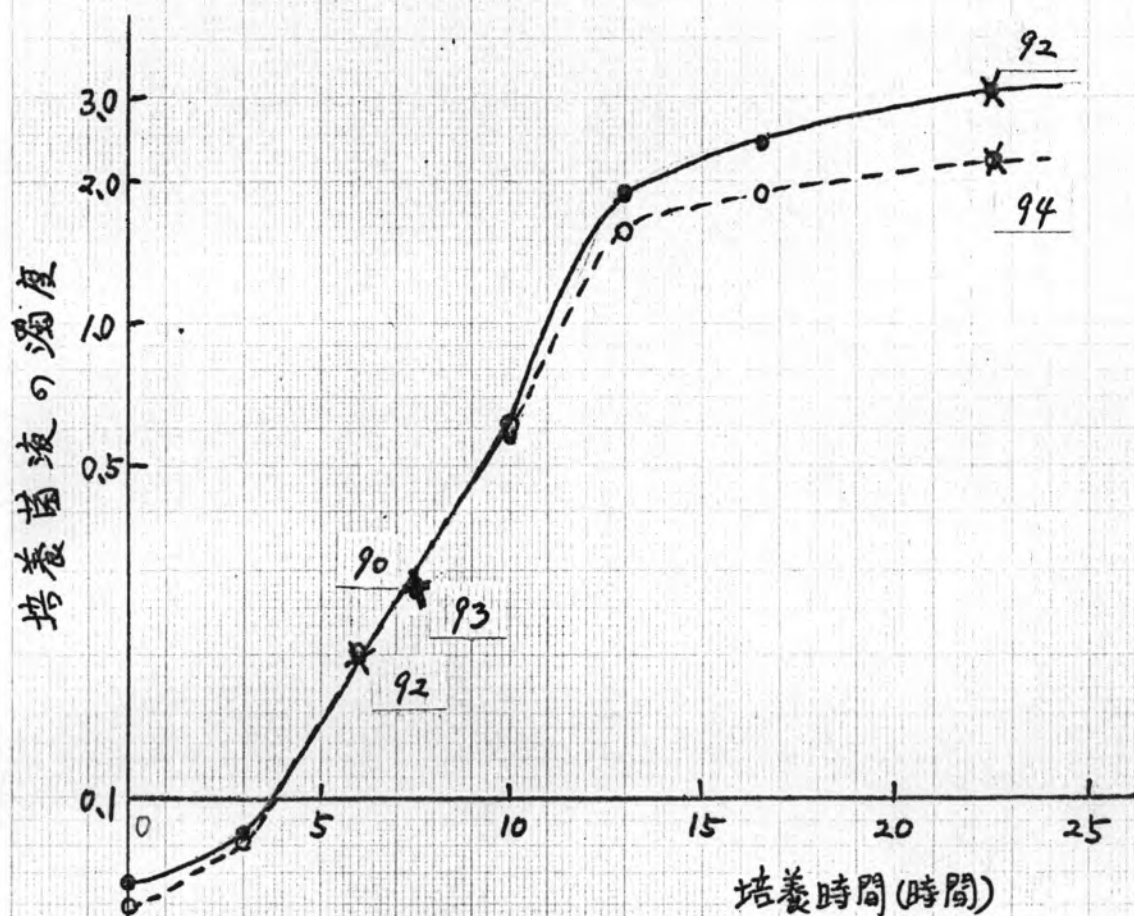


図16. NP液体培地へのトリプトシンの添加がNPG株の増殖曲線と自己融解能におよぼす影響、

—●—トリプトシン無添加(対照実験)

--○--トリプトシン添加(最終濃度5 μ g/ml)

実験操作および説明は図5と同じ

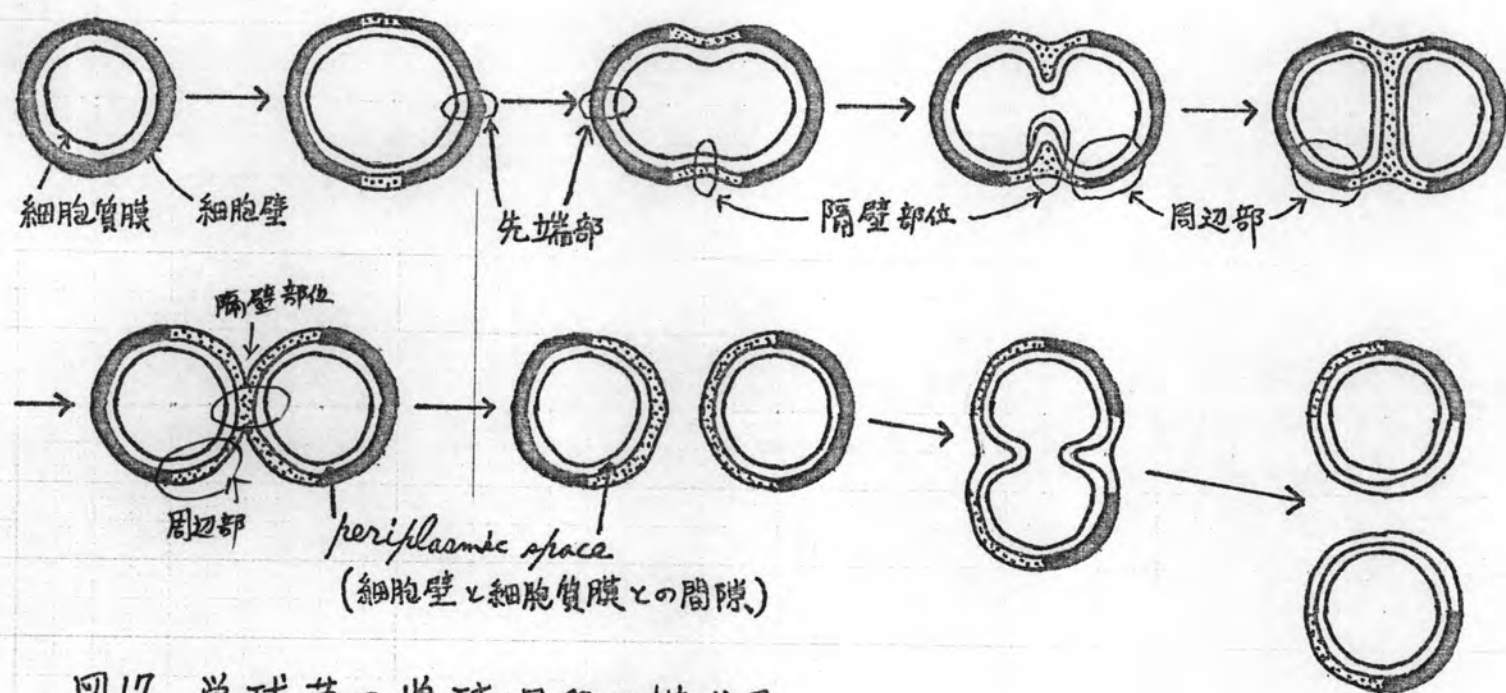


図17. 単球菌の増殖過程の模式図.

(文献(1,2)を参考にした)

- 古い細胞壁、 □ 第1回目の分裂で合成された新しい細胞壁、
- 第2回目の分裂で合成された、より新しい細胞壁。

表1. 継代に用いた3種類の固型培地の組成.

	PO寒天培地	NP _G 寒天培地	NP寒天培地
ジャガイモ200g からの浸出液	+	—	—
ポリペプトン	10	10	10
酵母エキス	5	5	5
グルコース	1	10 ²⁾	—
グリセリン	1	—	—
食塩	—	3	3
寒天	30 ¹⁾	15	15

脱イオン水1ℓ当りの量で示した。

1N NaOHで pH7 に調整した後、高圧滅菌
(約120°C、2Kg/cm²で20分間)した。

1) 未精製の寒天を用いた。

2) 別に高圧滅菌した後、混合した。

表2. 凍結乾燥および保存が、PO株の対数期菌体の自己融解能におよぼす影響。

保温 時間	凍結 乾燥 前	凍結 乾燥 直後	デシケーターに保存した日数				
			5日	12日	20日	38日	59日
8時間	49	59	65	79	84	87	88
24時間	34	49	63	64	75	82	85

数字はすべて、保温0時間の濁度を100とした時の残存濁度を示す%。

表3. PO株の対数期培養菌より得た各種画分の細胞壁自己融解酵素活性

供試液 由来画分	残存濁度(%)		蛋白質量 ³⁾ (mg/ml)	菌量 ⁴⁾ (mg/ml)
	保温時間 23時間, 71時間			
培養上澄液 ¹⁾	93	92	8.0	—
破碎菌液	82	52	3.7	57
細胞壁画分	89	71	0.1	270
(細胞質膜+ 細胞質)画分	52	12	3.8	67
細胞質膜画分	95	80	0.4	210
細胞質画分	87	61	4.2	67
細胞質画分 ¹⁾	84	64	10.0	75
基質対照 ²⁾	95	91	—	—

1) n-ブタール処理をしていない。

2) 供試液の代りに 0.1M リン酸・ナトリウム緩衝液 pH7.5 を 0.1ml, 脱イオン水を 0.9ml 加えた。なお基質の代りに脱イオン水 0.5ml を加えた酵素対照についても、各画分について濁度の変化も測定したが殆んど変化はなかった。

3) 供試液 1ml 中の蛋白質量 (BSA 換算)。

4) 供試液 1ml が由来した出発材料 (凍結乾燥全菌に換算) の mg 数。

表4. PO株, NPG株, NP株およびNPG→PO株
の対数期菌体間の自己融解能の比較.

供試株	集菌時の濁度	残存濁度(保温時間)
PO株(20代目)	0.57	25 (16時間)
PO株(27代目)	0.49	34 (16時間)
NPG株(17代目)	0.51	90 (16時間)
NP株(15代目)	0.49	32 (23時間)
NP株(20代目)	0.51	48 (23時間)
NPG→PO株 (15代目)	0.47	94 (23時間)

表 5. 細胞壁の分析.

	6N塩酸、100°C、16時間 ¹⁾				FDNB処理後、加水分解 ¹⁾				ヒドラジン分解 ¹⁾			
	PO- LCW	PO- SCW	NPG- LCW	NPG-T- SCW	PO- LCW	PO- SCW	NPG- LCW	NPG-T- SCW	PO- LCW	PO- SCW	NPG- LCW	NPG-T- SCW
Mur	0.88	0.82	0.88	0.76	0.68	0.62	0.67	0.68	—	—	—	—
GlcN	0.99	1.02	1.04	0.96	0.84	0.85	0.86	0.95	—	—	—	—
Glu	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	(1.00) ²⁾	(1.00) ²⁾	(1.00) ²⁾	(1.00) ²⁾
Gly	1.05	1.05	0.91	0.98	0.94	0.92	0.85	1.01	0.95	0.98	1.02	0.84
Ala	2.00	1.91	1.84	1.80	1.56	1.64	1.66	1.76	0.18	0.14	0.20	0.13
Lys	0.96	1.13	1.03	0.83	0.28	0.29	0.28	0.32	0.41	0.51	0.42	0.71
Glu量 ³⁾	0.49	0.52	0.46	0.49	略語、PO-: PO株、NPG-: NPG株、NPG-T-: トリフミン 加NP液体培地で培養したNPG株、 LCW: 対数期菌体より調整した細胞壁、 SCW: 静止期菌体より調整した細胞壁							
ヘキソース量 ⁴⁾	0.67	0.63	0.61	0.62								
細胞壁 ⁵⁾ 収量	40	36	41	38								

1) Gluを1.00とした場合のモル比で表わした。加水分解にともなう破壊の補正は行なわなかった。

ヒドラジン分解の場合のみ、*tri-L-Ala*を用いて補正した。 2) 実際の数値は0.00。

3) 細胞壁1mgに含まれるGluの μmole 数。

4) 細胞壁1mgに含まれるグルコース換算ヘキソース量の μmole 数。

5) 湿菌1gより得られる細胞壁(凍結乾燥品)のmg数。

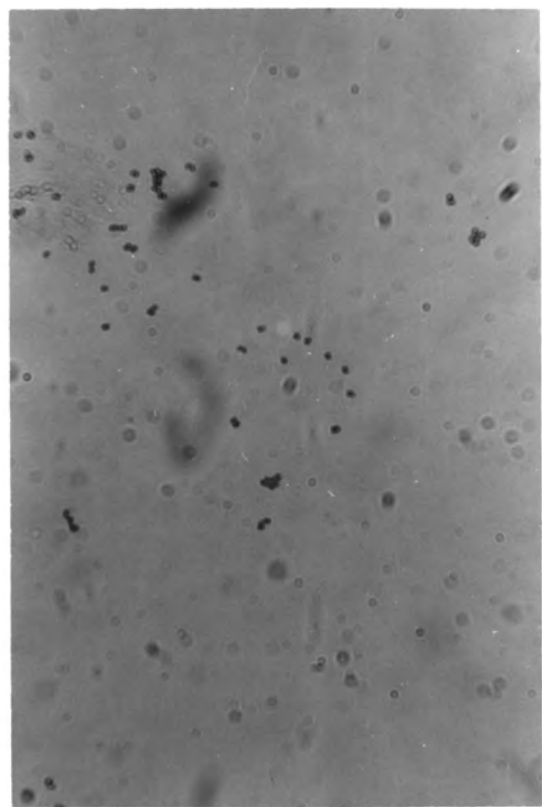


写真3.

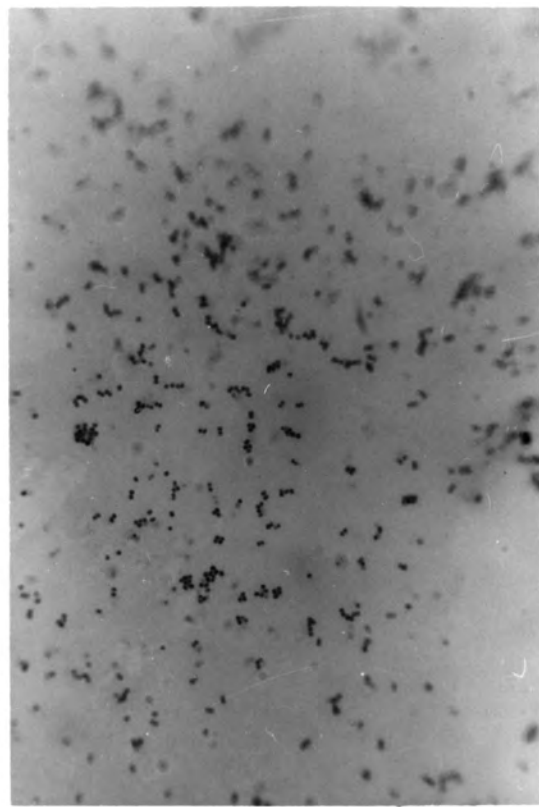


写真2.

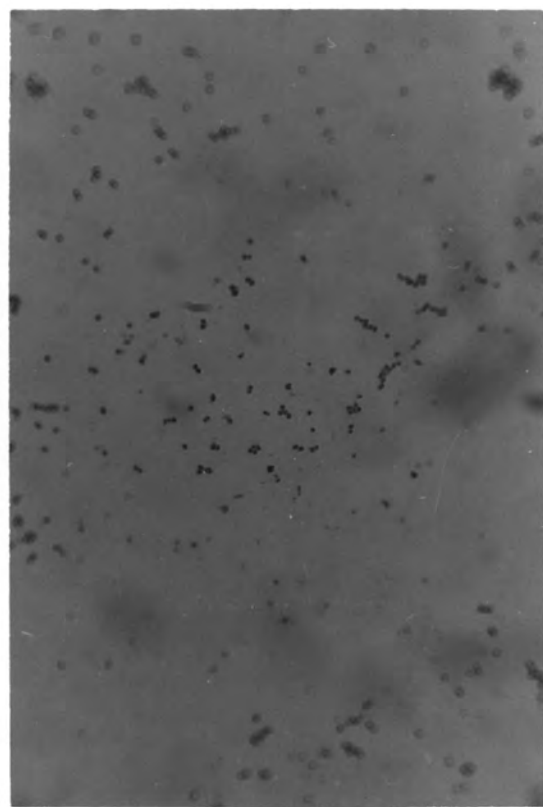


写真1.

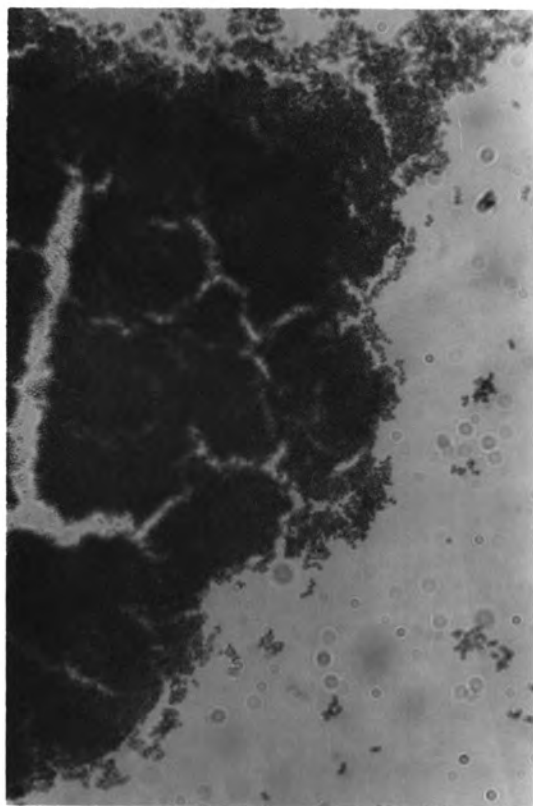


写真 6.

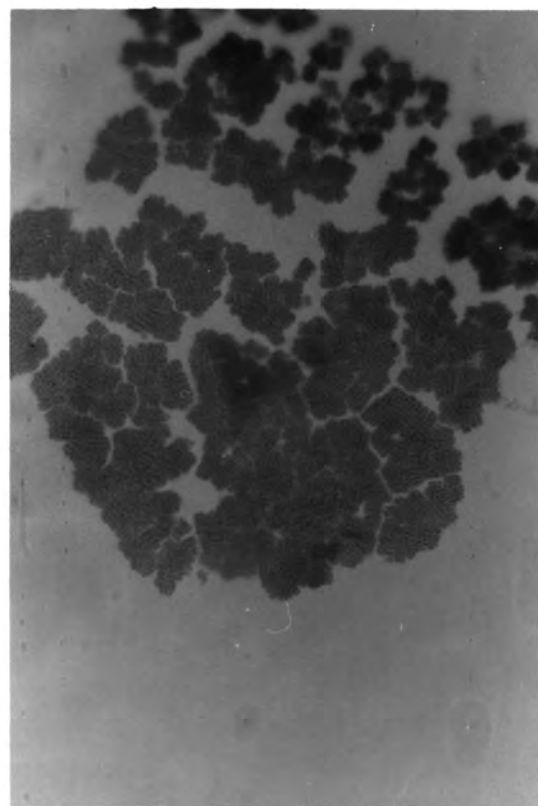


写真 5.

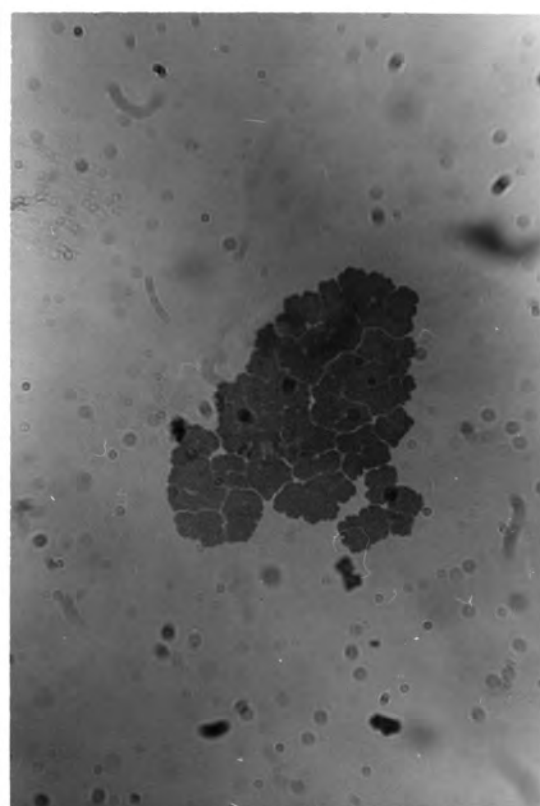


写真 4.

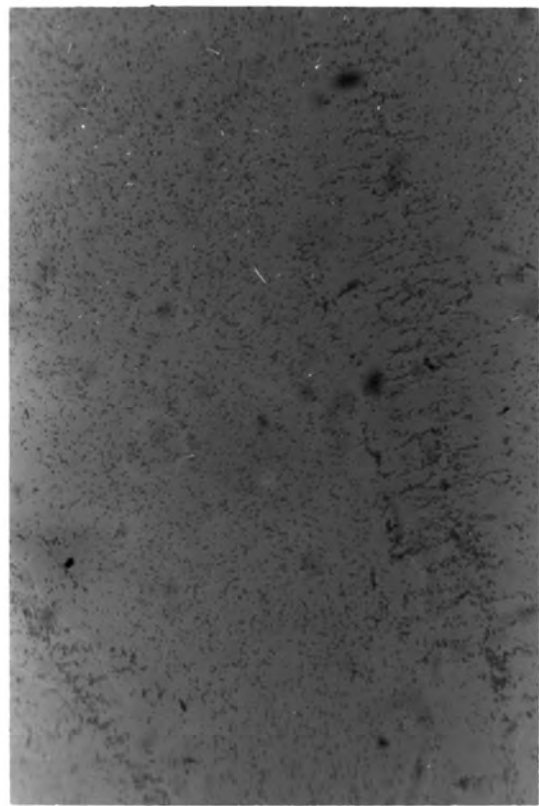


写真 9.

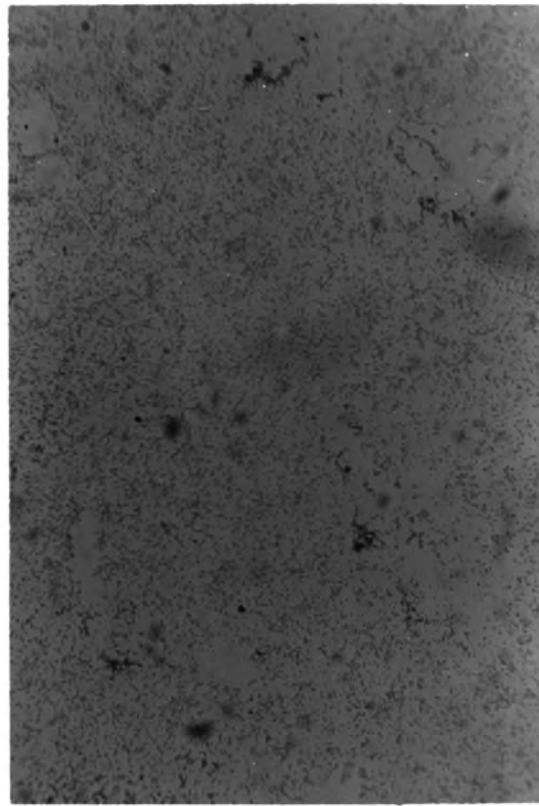


写真 8.

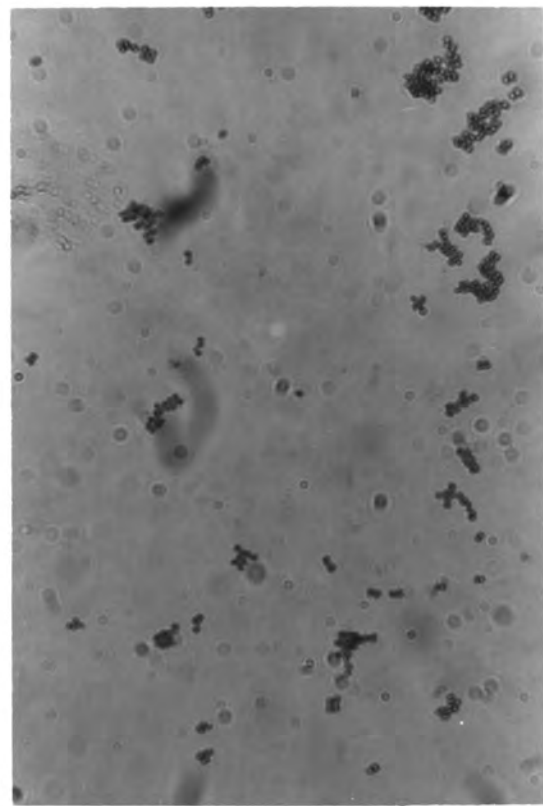


写真 7.

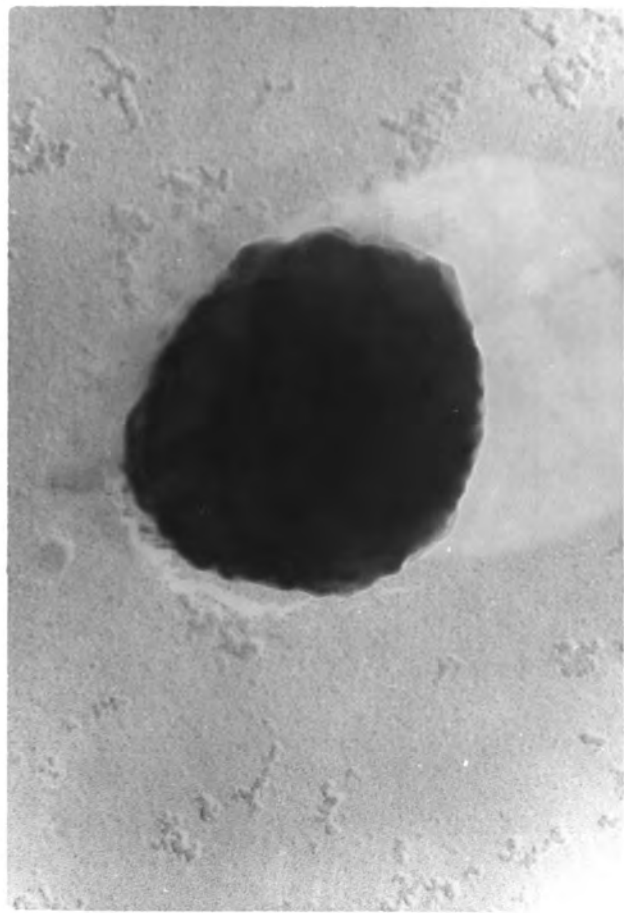


写真 11.

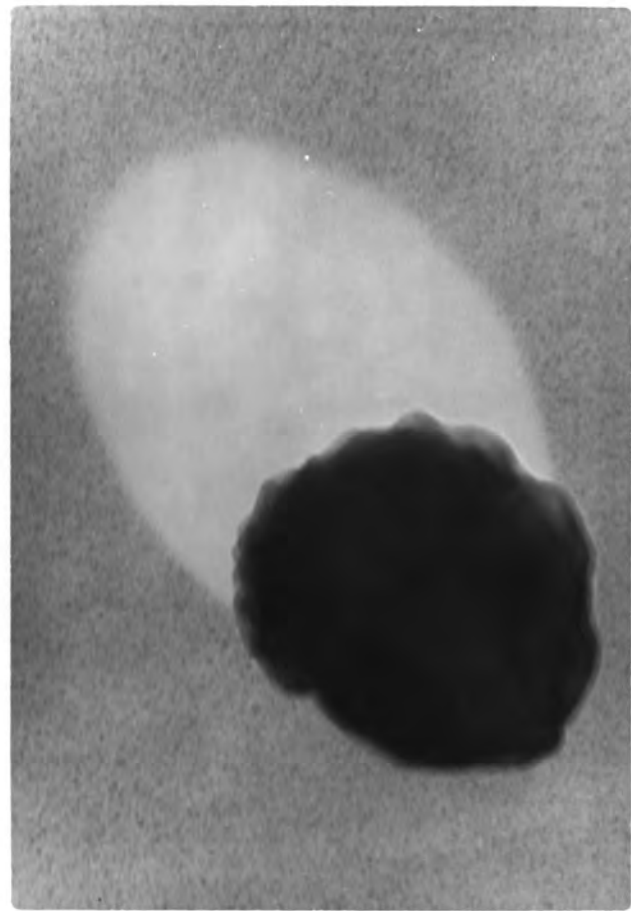


写真 10.

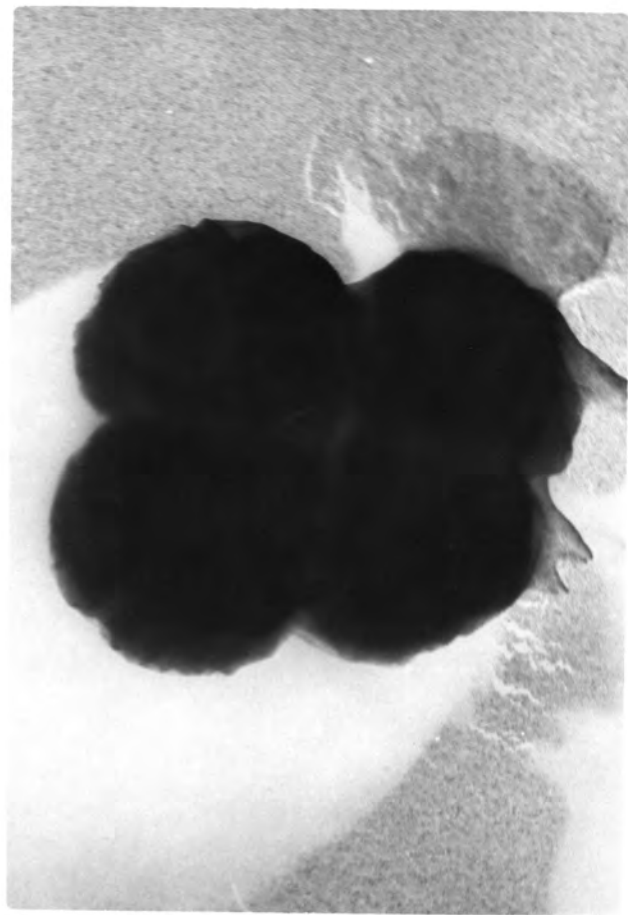


写真13.

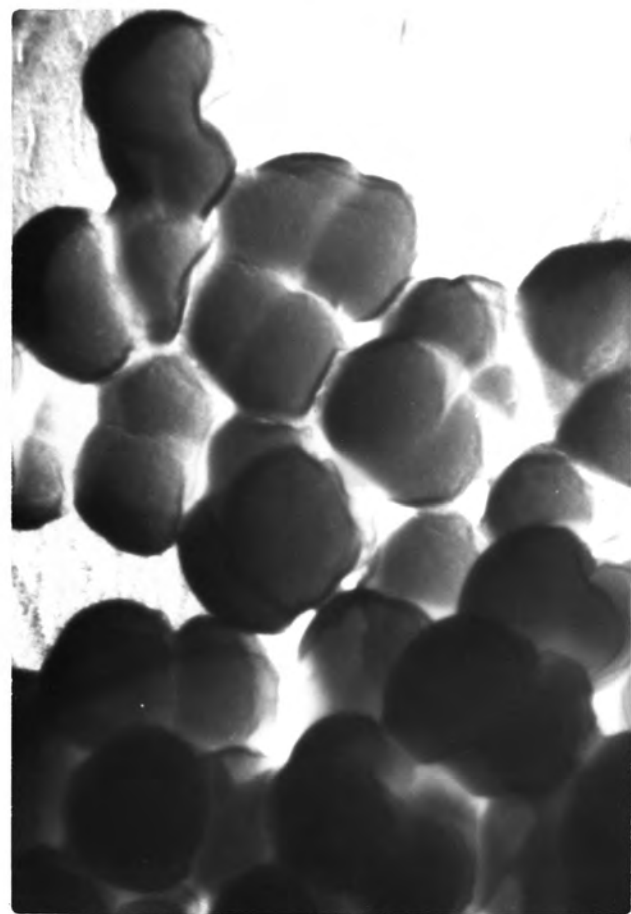


写真12.

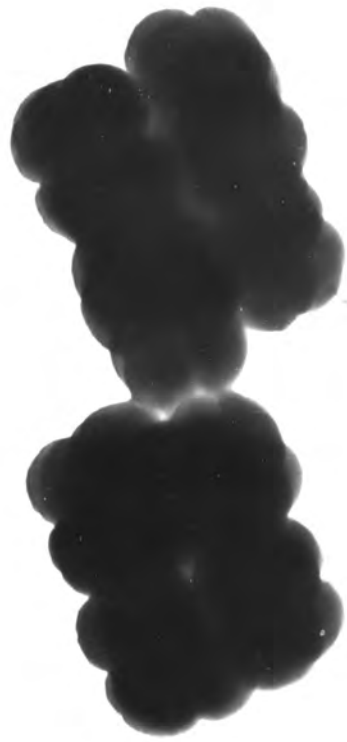


写真 15.



写真 14.

写真 1. PO株の光学顕微鏡写真。グラム染色。
 $\times \overset{1,600}{\cancel{3,200}}$ (直接倍率 $\times 1,000$).

写真 2. トリプシン加 NP 液体培地中で培養した PO 株の光学顕微鏡写真。グラム染色。
 $\times \overset{1,600}{\cancel{3,200}}$ (直接倍率 $\times 1,000$).

写真 3. NPG 株の光学顕微鏡写真。単染色。
 $\times \overset{1,600}{\cancel{3,200}}$ (直接倍率 $\times 1,000$).

写真 4. トリプシン加 NP 液体培地中で培養した NPG 株の光学顕微鏡写真。細胞壁染色。
 $\times \overset{1,600}{\cancel{3,200}}$ (直接倍率 $\times 1,000$).

写真 5. トリプシン加 NP 液体培地中で培養した NPG 株の光学顕微鏡写真。核染色。
 $\times \overset{1,600}{\cancel{3,200}}$ (直接倍率 $\times 1,000$).

写真 6. PO 株の光学顕微鏡写真 (濃い菌懸濁液をスライドガラス上に火焰固定し、細胞壁染色を施したもの。写真 4 との比較のために載せた)。
 $\times \overset{1,600}{\cancel{3,200}}$ (直接倍率 $\times 1,000$).

写真 7. トリプシン加 NP 液体培地中で培養後洗淨し、新たにトリプシンを含まな

い NP 液体培地で培養した NPG 株の光学顕微鏡写真。グラム染色。X ^{1,600}~~3,200~~
(直接倍率 X 1,000)。

写真 8. NPG 株を 1.2M 食塩水中でリゾチーム処理したものの光学顕微鏡写真。グラム染色。X ^{1,600}~~3,200~~ (直接倍率 X 1,000)。

写真 9. トリプシン加 NP 液体培地中で培養した NPG 株を 1.2M 食塩水中でリゾチーム処理したものの光学顕微鏡写真。グラム染色。X ^{1,600}~~3,200~~ (直接倍率 X 1,000)。

写真 10. PO 株の電子顕微鏡写真。オスミウム酸固定。X ^{6,000}~~52,000~~ (直接倍率 X 35,000)。

写真 11. トリプシン加 NP 液体培地中で培養した PO 株の電子顕微鏡写真。グルタルアルデヒド固定。X 69,000 (直接倍率 X 40,000)。

写真 12. NPG 株の電子顕微鏡写真。グルタル

アルデヒド固定。× 26,000 (直接倍率 × 15,000)。

写真 13. 写真 12 に同じ。オスミウム酸固定。
× 43,000 (直接倍率 6,000)。

写真 14. トリプシン加 NP 液体培地中で培養した NP 株の電子顕微鏡写真。グルタルアルデヒドとオスミウム酸による二重固定。× 5,200 (直接倍率 × 3,000)。

写真 15. 写真 14 に同じ。二重固定。× 14,000 (直接倍率 × 8,000)。

考察

細菌細胞の増殖に果す細胞壁自己融解酵素の役割としては、次の5つの可能性が考えられている(1, 9, 10, 40)。(I) ペプチドグリカン前駆体を細胞壁中に組み入れるための細胞壁ペプチドグリカンの切断(41~44) : ペプチドグリカンの生合成に関する研究(26)から前駆体であるウリジンニリン酸(UDP)-N-アセチルペンタペプチドを細胞壁ペプチドグリカン中に組み込むための受容体として、非還元末端にN-アセチルグルコサミンが必要であると考えられ、N-アセチルムラミダーゼがこの役割を荷っていることが示唆されている。(II) 細胞の形態変換のためのペプチドグリカンの切断(45, 46) : Arthrobacter crystallopoietesの球状菌と桿状菌の間でN-アセチルムラミダーゼ活性に変化が認められることからN-アセチルムラミダーゼが、また桿状菌の細胞壁ペプチドグリカンの平均グリカン鎖長が球状菌のそれと比べて長いという所見に基づいてN-アセ

チルムラミダーゼとN-アセチルグルコサミニダーゼの一方または両方が、形態変換で役割を演じていることが推定されている(43、47、48)。一方 Myxococcus xanthus における形態変換では、エンドペプチダーゼが関与することを示唆する実験結果が報告されている(49)。

(i) 分裂に際してのペプチドグリカンの切断：Bacillus subtilis 168 の変異株である tms-12 が隔壁を持たない、多核長桿状を呈することが報告されているが、細胞壁自己融解酵素との関係については述べられていない(50)。ちなみに分裂と前項の形態変換や次項の分離と区別することが容易でない場合があり、また従来、分裂と分離という言葉が混交して使用されていることもあり、分裂と分離と言いつたえ左方が適切だと思われる場合がかなりある。

(ii) 分離のためのペプチドグリカンの切断(16、51～55)：例えば、自己融解能を欠いた Bacillus licheniformis の変異株が長い鎖状に生育することが知られ、親株がN-アセチルムラミル-L-ア

チルムロミダーゼとN-アセチルグルコサミニダーゼの一方または両方が、形態変換で役割を演じていることが推定されている(43, 47, 48)。一方 Myxococcus xanthus における形態変換では、エンドペプチダーゼが関与することを示唆する実験結果が報告されている(49)。

(i) 分裂に際してのペプチドグリカンの切断：Bacillus subtilis 168 の変異株である cms-12 が隔壁を持たない、多核長桿状を呈することが報告されているが、細胞壁自己融解酵素との関係については述べられていない(50)。すなわち、分裂と前項の形態変換や次項の分離と区別することが容易でない場合があり、また従来、分裂と分離という言葉が混交して使用されていることもあり、分裂を分離と言い換えた方が適切だと思われる場合がかなりある。

(ii) 分離のためのペプチドグリカンの切断(16, 51~55)：例えば、自己融解能を欠いた Bacillus licheniformis の変異株が長い鎖状に生育することが知られ、親株がN-アセチルムロミル-L-ア

さてここに今まで触れられていないが、重要な問題が見落とされていることを指摘したい。それは、これから細胞壁自己融解酵素がその生理的役割を果たした後の不活性化の問題である。対数期の菌体が細胞壁自己融解現象を示す菌種ないし菌株も静止期になると一般に自己融解を起さなくなるということが知られている（ただし「はじめに」の項で述べたように死滅期の菌についての問題はここでは考えないことにする）。とすれば、対数期菌体に存在する細胞壁自己融解酵素は静止期への過程でどのような運命をたどるのだろうか？

また対数期の菌体についても自己融解現象の認められない菌種や菌株も数多く存在するが、これらの菌は細胞壁自己融解酵素を持っていなのだろうか？ 細胞壁自己融解酵素が上述のように細胞の増殖に必須のものであるならばこの酵素を全く持たない細菌の存在は考えられない。それならば何故自己融解が観察されないのか？ 現在までこれらの疑問

に言及した報告は見当たらない。

さて、Micrococcus lysodeikticus IFO 3333 の PO 株の対数期菌体に、細胞表層に存在する細胞壁自己融解酵素による自己融解現象が観察された。関与する酵素が細胞表層に存在することは、細胞壁自己融解現象が菌懸濁液にトリプシンを添加することにより抑えられ、細胞質のものを止まったことによって、また 12M 蔗糖加緩衝液中で自己融解を起こせると「プロトプラスト」が形成されることによって示された。またトリプシンを液体培地に加えて培養したところ、増殖曲線、形態、グラム染色性などには全く変化は認められなかったが、対数期菌体の自己融解が抑えられることを見い出した。(トリプシンを加えての培養という実験については、少なくとも自己融解現象に関する研究では、報告は見当たらない。) この所見は、一見、自己融解と増殖とが無縁なことを示すようにも思えるが、次のような解釈も可能ではなかっただろうか？ すなわち対数期の

菌体を適当な条件においた時に観察される自己融解現象は、もうすでにその生理的役割を果たし終えた、菌自身にとって不要な細胞壁自己融解酵素により引き起こされ、従ってこの酵素がトリプシンにより不活性化されても、菌の増殖や形態やグラム染色性には全く影響が見られないのであるとする考えである。

この解釈が正しいとすれば、まだ生理的役割を果たしていない細胞壁自己融解酵素というものも存在するはずであり、もしその酵素を外部から制御することができれば、菌の増殖や形態などに大きな変化をもたらすことが可能になるだろうと予測される。

NPG株は、偶然得られた変異株であるが、単球菌としてばらばらに増殖する親株とは異なり、*intrad* を一つの単位として増殖するのが観察された。この変異株をトリプシンを加えた液体培地で培養したところ、形態に大きな変化がみられた。すなわち分離能力を欠いたために生長、分裂によって生じた多数の細

胞が互いにつながり合い、その結果あたかも
タイルを敷きつめたかのような、二次元的に
大きな核がりをもった細胞「集塊」の出現が観
察された。これは、ましてしくまだ生理的役割
を果たしている細胞壁自己融解酵素活性が
培地に添加したトリプシンにより抑制された
ことを示すものと解釈できよう。そしてその
自己融解酵素の生理的役割が2つの娘細胞へ
の分離に際しての細胞壁の切断にあることは
明らかだと思われる。PO株においては添加す
るトリプシン濃度を上げてても、形態の変化は
観察されなかった。これは、PO株の自己融解
酵素がNPG株のそれと、質、量或いは存在状
態において異なるためではなかったと考えられ
るが、今後の検討を要する問題であろう。

さてトリプシン添加によるPO株の自己融解
能の変化およびNPG株の形態変化（分離能力
の変化）が可逆的であること、培地へのトリ
プシンの添加がいずれの菌にも致死的な影響
を与えないことを考え合わせると、細菌細胞

に、生理的役割を終えた、非常に危険な存在である細胞壁自己融解酵素がトリプシン様の蛋白質分解酵素によって不活性化されるという機構（直接作用による不活性化が、或いはインヒビターの介在などいくつかのステップを介しての間接的な機序によるものかなどの点は不明であるか）が存在すると考えられたいだろうか？

細胞の分離、細胞壁自己融解酵素、そして細胞壁自己融解現象に関して、次のような一つの解釈が可能ではないかと考える。「細胞分裂の進行と共に、隔壁部位で合成された新しい細胞壁は周辺部へと移行する(60)。同時に、隔壁部位での細胞壁の切断という生理的役割を果たした細胞壁自己融解酵素も周辺部へ移行する(a)。この過程で上記酵素は周辺部の *periplasmic space* に存在するトリプシン様の蛋白質分解酵素で不活性化される(b)。細胞壁自己融解現象は、この不活性化機構の不完全な菌においてのみ、たまたま観察される現象

であり、生理的役割を果たし終えた細胞壁自己融解酵素によって引き起こされるのである(図17)。」(a)の可能性について：対数期菌体の細胞壁自己融解が、分離直後(と思われる)の細胞においては一方の先端部より始まり次第に弱まりながらもう一方の先端部へ拡大していくことが、また分裂途中の細胞においては隔壁部位で始まり徐々に周辺部へと進行していくことが、電子顕微鏡による観察で明らかになっている(61~63)。この事実、細胞壁自己融解酵素が周辺部へと移行し、その過程で不活性化されることを示すものと解釈されなうか。(b)の可能性について：細胞表層(細胞外では無い)に蛋白質分解酵素が存在することが、M. lysodeikticusと同じ球菌である3種類の菌種で報告されているが、これらの酵素はいずれも培地から栄養を取り入れるための消化酵素の役割を荷っていると考えられている(64~66)。(c)の可能性を示唆すると思われる実験としては、Bacillus subtilis

168 の芽胞形成変異株 SR22 (細胞外蛋白質分解酵素を欠いている) のもつ細胞壁自己融解酵素 (3 種類のうちの 1 つ) が、親株 (1 種類の細胞壁自己融解酵素を持つ) の細胞外蛋白質分解酵素により不活性化されたという報告がある (67)。原著者自身はこの所見の意義について詳しくは議論してはないうが、細胞外蛋白質分解酵素を欠く変異株に 3 種類の細胞壁自己融解酵素活性が認められるのに、細胞外蛋白質分解酵素を持つ親株には 1 種類の自己融解酵素しか検出されないという事実は、細胞壁自己融解酵素が当該菌の保有するトリプシン様の蛋白質分解酵素によって不活性化されるという前記の説によれば、無理なく説明できると考えられる。現在かなり多くの菌種について細胞壁自己融解現象が報告されているが、菌種により検出される自己融解酵素の種類が 1 つのものから 3 つのものまであり、その特異性 (ペプチドグリカンの切断点) がまちまちであることも、不完全な不活性化

を受け、細胞壁自己融解酵素を保有する菌に、たまたま自己融解が観察されるにすぎないので考えれば納得できるように思われる。

他方、Streptococcus faecalis について、トリプシンを加えた緩衝液に単離した細胞壁を懸濁し、37℃に保温すると、自己融解が促進されるという報告がある(41)。この所見をはじめとする一連の実験から、細胞壁自己融解酵素の前駆体(Pro-enzyme)が存在し、それが細胞質中に存在するトリプシン様の蛋白質分解酵素によって隔壁部位の細胞壁中で活性化されるというモデルが提案されている(68)。細胞壁自己融解酵素のトリプシンによる一方は不活性化、他方は活性化という一見相反する所見を、この酵素の生理的役割、或いは制御機構とどのように結びつけて説明づけるかは今後の研究を待たねばならない。

さてこの実験に用いた株とは別の M. lysodeikticus NCTC 2665 株(大阪大学、歯学部、口腔細菌学教室で普通グイヨン寒天斜面培地に継

代保存されている株)については、対数期菌体、静止期菌体(濁度でみた最大生育量は、IFO 3333 のPO株の約2倍だった)ともに自己融解を起こさなかった(ただし、0.01M リン酸・ナトリウム pH7.5 中、37℃ という条件のもとで)。この NC TC 2665 株が自己融解を起こしたという報告があること(5)、IFO 3333 のPO株も継代を重ねると(PO寒天培地を用いても)次第に自己融解を起こしにくくなる傾向にあること(今回の研究においても、実験途中でPO株の自己融解能の低下が認められた。そこでPO平板寒天上に分離培養を行い、適当に選んだ10個ほどの集落からの純培養菌について対数期菌体の自己融解能を調べ、最も自己融解能の強いと思われる集落を選んで植え継いだ。)を考えると、自己融解能という性質は変化しうるものであり、人為的に或いは自然に何らかの選択にかけられるのでなければ、生理機能を果たし終えた細胞壁自己融解酵素の不活性化が滑らかに進行せず、い

わば'不必要な自己融解酵素が残るために自己融解を起こしやすい菌は選択によって除かれ、用済みの自己融解酵素の制御が巧く行なわれてゐる、不必要な自己融解を起こさない菌が淘汰を免がれて生き残る可能性が大きいと考えられる。

引用文献

1. J.M. Ghuysen and G.D. Shockman. Biosynthesis of Peptidoglycan. "Bacterial Membranes and Walls", ed. by L. Leive, Marcel Dekker, Inc., New York, p.37 (1973).
 2. M.L. Higgins and G.D. Shockman. Model for Cell Wall Growth of Streptococcus faecalis. J. Bacteriol., 101, 643(1970).
 3. M. Welsch. Lysis by Agents of Microbial Origin. J. Gen. Microbiol., 18, 491(1958).
 4. H. Stolp and M.P. Starr. Bacteriolysis. Ann. Rev. Microbiol., 19, 79(1965).
 5. P. Mitchell and J. Moyle. Autolytic Release and Osmotic Properties of 'Protoplasts' from Staphylococcus aureus. J. Gen. Microbiol., 16, 184(1957).
 6. G.D. Shockman, J.J. Kolb and G. Tonnie. Relations between Bacterial Cell Wall Synthesis, Growth Phase, and Autolysis. J. Biol. Chem., 230, 961(1958).
 7. W. Weidel and H. Pelzer. Bagshaped Macromolecules-A New Outlook on Bacterial Cell Walls. Advan. Enzymol., 26, 193(1964).
 8. J.L. Strominger and J.M. Ghuysen. Mechanisms of Enzymatic Bacteriolysis. Science, 156, 213(1967).
 9. H.J. Rogers. Bacterial Growth and the Cell Envelope. Bacterial Rev., 34, 194(1970).
 10. J.S. Thompson. Role of Autolytic Enzymes in the Growth and Morphogenesis of Bacterial Cell Walls. J. Theoret. Biol., 33, 63(1971).
 11. L. Glaser, Bacterial Cell Surface Polysaccharides. Ann. Rev. Biochem., 42, 91(1973).
 12. F. Fiedler and L. Glaser. Assembly of Bacterial Cell Walls. Biochim. Biophys. Acta, 300, 467(1973).
-

13. G.D. Shockman, L. Daneo-Moore and M.L. Higgins.
Problems of Cell Wall and Membrane Growth, Enlargement,
and Division. Ann. New York Acad. Sci., 235, 161(1974).
14. M. Slater and M. Schaechter. Control of Cell Division
in Bacteria. Bacteriol. Rev., 38, 199(1974).
15. F.E. Young and J. Spizizen. Biochemical Aspects of
Competence in the Bacillus subtilis Transformation
System. II. Autolytic Enzyme Activity of Cell Walls.
J. Biol. Chem., 238, 3126(1963).
16. A. Tomasz. Biological Consequences of the Replacement
of Choline by Ethanolamine in the Cell Wall of
Pneumococcus: Chain Formation, Loss of Transformability,
and Loss of Autolysis. Proc. Nat. Acad. Sci., 59, 86
(1968).
17. J.M. Ranhand. C.G. Leonard and R.M. Cole. Autolytic
Activity Associated with Competent Group H Streptococci.
J. Bacteriol., 106, 257(1971).
18. J.M. Ranhand. Autolytic Activity and Its Association
with the Development of Competence in Group H Strepto-
cocci. J. Bacteriol., 115, 607(1973).
19. D.A. Boroff. Study of Toxins of Clostridium botulinum.
III. Relation of Autolysis to Toxin Production.
J. Bacteriol., 70, 363(1955).
20. P.F. Bonventre and L.L. Kempe. Physiology of Toxin
Production by Clostridium botulinum Types A and B.
I. Growth, Autolysis, and Toxin Production. J. Bac-
teriol., 79, 18(1960).
21. T. Kawata and K. Takumi. Initiation Sites of Autolysis
in Clostridium perfringens Type A as Revealed by
Electron Microscopy. J. Gen. Appl. Microbiol., 16,
341(1970).
22. 野村真康, アミラーゼ生産菌 (Bac. subtilis) の溶菌現象に
関する研究(第1報) Anaerobic lysis について. 農化.,
29, 674(1955).

23. M. Nomura, J. Hosoda and H. Yoshikawa. Studies on Amylase Formation by Bacillus subtilis. VI. The Mechanism of Amylase Excretion and Cellular Structure of Bacillus Subtilis. J. Biochem., 45, 737(1958).
24. A. Fleming. On a Remarkable Bacteriolytic Element Found in Tissues and Secretions. Proc. Roy. Soc., B 93, 306 (1922).
25. A. Fleming. Arris and Gale Lecture on Lysozyme. A Bacteriolytic Ferment Found Normally in Tissues and Secretions. Lancet, 216, 217(1929).
26. J.M. Ghuysen, E. Bricas, M. Lache and M. Leyh-Bouille. Structure of the Cell Walls of Micrococcus lyso-deikticus. III. Isolation of a New Peptide Dimer, N^α-[L-Alanyl-γ-(α-D-glutamyl-glycine)]-L-lysyl-D-alanyl-N^α-[L-alanyl-(α-D-glutamyl-glycine)]-L-lysyl-D-alanine. Biochemistry, 7, 1450(1968).
27. K.H. Schleifer and O. Kandler. Micrococcus lysodeikticus: A New Type of Cross-linkage of Murein. Biochem. Biophys. Res. Commun., 28, 965(1967).
28. H.R. Perkins. A Polymer Containing Glucose and Aminohecuronic Acid Isolated from Micrococcus lyso-deikticus. Biochem. J., 86, 475(1963).
29. S. Hase and Y. Matsushima. Structural Studies on a Glucose Containing Polysaccharide Obtained from Micrococcus lysodeikticus Cell Wall. III. Determination of the Structure. J. Biochem., 72, 1117(1972).
30. P.Owen and J.H. Freer. Isolation and Properties of Mesosomal Membrane Fractions from Micrococcus lyso-deikticus. Biochem. J., 129, 907(1972).
31. M.R.J. Salton and R.W. Horne. Studies of the Bacterial Cell Wall. II. Methods of Preparation and Some Properties of Cell Walls. Biochem. Biophys. Acta, 7, 177(1951).
32. A.H. Maddy. The Solubilization of the Protein of the Ox-erythrocyte Ghost. Biochim. Biophys. Acta, 88, 448(1964).

33. A.H. Maddy. The Properties of the Protein of the Plasma Membrane of Ox Erythrocytes. Biochim. Biophys. Acta, 117, 193(1966).
34. D.H. Spackman, W.H. Stein and S. Moore. Automatic Recording Apparatus for Use in the Chromatography of Amino Acids. Anal. Chem., 30, 1190(1958).
35. J.M. Ghuyssen, D.J. Tipper and J.L. Strominger. Enzymes that Degrade Bacterial Cell Walls. "Methods in Enzymology" ed. by E.F. Neufeld and V. Ginsberg, Academic Press, New York, VIII, 685(1966).
36. W.E. Trevelyan and J.S. Harrison. Studies on Yeast Metabolism. I. Fractionation and Microdetermination of Cell Carbohydrates. Biochem. J., 50, 298(1952).
37. O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. J. Biol. Chem., 193, 265(1951).
38. P. Mitchell and J. Moyle. Liberation and Osmotic Properties of the Protoplasts of Micrococcus lysodeikticus and Sarcina lutea. J. Gen. Microbiol., 15, 512(1956).
39. M.L. Wolfrom and A. Thompson. Reduction with Sodium Borohydride. "Methods in Carbohydr. Chem.", ed. by R.L. Whistler, M.L. Wolfrom and J. N. BeMiller, Academic Press, Inc., New York, II, 65(1963).
40. J.M. Gluyssen. Use of Bacteriolytic Enzymes in Determination of Wall Structure and Their Role in Cell Metabolism. Bacteriol. Rev., 32, 425(1968).
41. G.D. Shockman, J.S. Thompson and M.J. Conover, The Autolytic Enzyme System of Streptococcus faecalis. II. Partial Characterization of the Autolysin and Its Substrate. Biochemistry, 6, 1054(1967).
42. S.L. Kingan and J.C. Ensign. Isolation and Characterization of Three Autolytic Enzymes Associated with Sporulation of Bacillus thuringiensis var. thuringiensis. J. Bacteriol., 96, 629(1968).

43. T.A. Krulwich and J.C. Ensign. Activity of an Autolytic N-Acetylmuramidase during Sphere-Rod Morphogenesis in Arthrobacter crystallopoietes. J. Bacteriol., 96, 857(1968).
44. J. Coyette and J.M. Ghuyssen. Wall Autolysin of Lactobacillus acidophilus strain 63AM Gasser. Biochemistry, 9, 2952(1970).
45. D.P. Fan, M.M. Beckman and W.P. Cunningham. Ultrastructural Studies on a Mutant of Bacillus subtilis Whose Growth is Inhibited Due to Insufficient Autolysin Production. J. Bacteriol., 109, 1247(1972).
46. C.W. Forsberg, P.B. Wyrick, J.B. Ward and H.J. Rogers. Effect of Phosphate Limitation on the Morphology and Wall Composition of Bacillus licheniformis and Its Phosphoglucosyltransferase-Deficient Mutants. J. Bacteriol., 113, 969(1973).
47. T.A. Krulwich, J.C. Ensign, D.J. Tipper and J.L. Strominger. Sphere-Rod Morphogenesis in Arthrobacter crystallopoietes. I. Cell Wall Composition and Polysaccharides of the Peptidoglycan. J. Bacteriol., 94, 734(1967).
48. T.A. Krulwich, J.C. Ensign, D.J. Tipper and J.L. Strominger. Sphere-Rod Morphogenesis in Arthrobacter crystallopoietes. II. Peptides of the Cell Wall Peptidoglycan. J. Bacteriol., 94, 741(1967).
49. D. White, M. Dworkin and D.J. Tipper. Peptidoglycan of Myxococcus xanthus: Structure and Relation to Morphogenesis. J. Bacteriol., 95, 2186(1968).
50. X.O. Breakefield and O.E. Landman. Temperature Sensitive Divisionless Mutant of Bacillus subtilis Defective in the Initiation of Septation. J. Bacteriol., 113, 985(1973).
51. D.P. Fan. Autolysin(s) of Bacillus subtilis as Dechaining Enzyme. J. Bacteriol., 103, 494(1970).
52. C. Forsberg and H.J. Rogers. Autolytic Enzymes in Growth of Bacteria. Nature, 229, 272(1971).

53. D.P. Fan and M.M. Beckman. Mutant of Bacillus subtilis Demonstrating the Requirement of Lysis for Growth. J. Bacteriol., 105, 629(1971).
54. H.M. Pooley, G.D. Shockman, M.L. Higgins and J. Porres-Juan. Some Properties of Two Autolytic-Defective Mutants of Streptococcus faecalis ATCC 9790. J. Bacteriol., 109, 423(1972).
55. J.W. Soper and C.G. Winter. Role of Cell Wall Autolysin in Chain Formation by a Mutant Strain of Streptococcus faecalis. Biochim. Biophys. Acta, 297, 333(1973).
56. J.J. Pollock, J.M. Ghuyssen, R. Linder, M.R.J. Salton, H.R. Perkins, M. Nieto, M. Leyh-Bouille, J.M. Frère and K. Johnson. Transpeptidase Activity of Streptomyces D-Alanyl-D Carboxypeptidases. Proc. Nat. Acad. Sci., 69, 662(1972).
57. N. Sharon and S. Seifter. Transglycosylation Reaction Catalyzed by Lysozyme. J. Biol. Chem., 239, PC 2398(1964)
58. D.M. Chipman, J.J. Pollock and N. Sharon. Lysozyme-catalysed Hydrolysis and Transglycosylation Reactions of Bacterial Cell Wall Oligosaccharides. J. Biol. Chem. 243, 487(1968).
59. J.J. Pollock and N. Sharon. Studies on the Acceptor Specificity of the Lysozyme-Catalyzed Transglycosylation Reactions. Biochemistry, 9, 3913(1970).
60. R.M. Cole. Symposium on the Fine Structure and Replication of Bacteria and Their Parts.III. Bacterial Cell-Wall Replication Followed by Immunofluorescence. Bacteriol. Rev., 29, 326(1965).
61. R.R. Mohan, D.P. Kronish, R.S. Pianotti, R.L. Epstein and B.E. Schwartz. Autolytic Mechanism for Spheroplast Formation in Bacillus cereus and Escherichia coli. J. Bacteriol., 90, 1355(1965).
62. M.L. Higgins, H.M. Pooley and G.D. Shockman. Site of Initiation of Cellular Autolysis in Streptococcus faecalis as Seen by Electron Microscopy. J. Bacteriol., 103, 504(1970).

63. M.L. Higgins, J. Coyette and G.D. Shockman. Sites of Cellular Autolysis in Lactobacillus acidophilus. J. Bacteriol., 116, 1375 (1973).
64. I.J. McDonald. Location of Proteinase in Cells of a Species of Micrococcus. Can. J. Microbiol. 8, 785 (1962).
65. N.Z. Sarnar, M.J. Bissell, M. DiGirolamo and L. Gorini. Mechanism of Excretion of a Bacterial Proteinase: Demonstration of Two Proteolytic Enzymes Produced by a Sarcina Strain (Coccus P). J. Bacteriol., 105, 1090 (1971).
66. T.D. Thomas, B.D.W. Jarvis and N.A. Skipper. Localization of Proteinase(s) near the Cell Surface of Streptococcus lactis. J. Bacteriol., 118, 329 (1974).
67. W.C. Brown and F.E. Young. Dynamic Interactions between Cell Wall Polymers, Extracellular Proteases and Autolytic Enzymes. Biochem. Biophys. Res. Commun., 38, 564 (1970).
68. H.M. Pooley and G.D. Shockman. Relationship Between the Latent-Form and the Active Form of the Autolytic Enzyme of Streptococcus faecalis. J. Bacteriol., 100, 617 (1969).

謝辞

本研究に際し、終始御指導いただいた松島祥夫教授に深く感謝致します。

また研究途中より懇切な御指導、御助言をいただいた歯学部口腔細菌学教室、小谷尚三教授に厚くお礼申し上げますとともに、種々の御協力、御援助を賜った同教室、平地慶行助手に謝意を表します。

さらに電子顕微鏡写真を撮影していただいた歯学部電子顕微鏡室、石丸昌司技官をはじめ、数々の実験上の便宜を計って下さった松島研存らに口腔細菌学教室の多くの皆様に心より感謝致します。