



Title	Staphylococcus aureusのL型菌とプロトプラスト間の細胞融合
Author(s)	加藤, 擁一
Citation	大阪大学, 1986, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/35126
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏名・(本籍)	か	とう	よう	いち
	加	藤	擁	一
学位の種類	歯	学	博	士
学位記番号	第	7	1	4
		1		号
学位授与の日付	昭和 61 年 3 月 12 日			
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 2 項該当			
学位論文題目	<i>Staphylococcus aureus</i> の L 型菌とプロトプラスト間の細胞融合			
論文審査委員	(主査)			
	教授	小谷	尚三	
	(副査)			
	教授	猪木	令三	教授 常光 旭 助教授 恵比須繁之
	講師	滝川	正春	

論文内容の要旨

細菌細胞を融合させるには、融合の妨げになる細胞壁をペプチドグリカン加水分解酵素処理などで除去したプロトプラスト、あるいは細胞壁を作ることなく生育し得る安定 L 型菌を用いる必要がある。しかし、プロトプラストは破壊されやすく、また、集落形成能力を一般に欠いているので、融合体を細胞壁を持った元の細胞に復帰させなければならない。一方 L 型菌は、増殖させることは困難ではないが、細胞表層部に関連する特性の一部が細胞壁を持つ親型のそれと異っている可能性が高く、また栄養要求マーカーを利用しにくいなどの制約がある。プロトプラストと L 型菌を組合せて細胞融合させれば、それぞれが持つ欠点を補完させることができるのではないかと考えられる。しかし、この可能性を検討した研究は従来皆無である。本研究では *Staphylococcus aureus* を供試し、プロトプラストと L 型菌とを融合させることを試み、融合体を得ることに成功した。

S. aureus の球菌株として、それぞれクロラムフェニコール (CP) 耐性あるいはテトラサイクリン (TC) 耐性プラスミドを保有する MS353 (pCp) および MS 353 (pTc) 株、ならびに MS 353 (pCp) の CP 耐性プラスミドの脱落株、MS 353 株からストレプトマイシン (SM) 又はエリスロマイシン (EM) のそれぞれに染色体性の耐性を示す突然変異株として分離した MS 353 (Sm^r) と MS 353 (Em^r) 株を用い、これらを Lysostaphin 処理してプロトプラストを得た。

一方 L 型菌株には、EMT-L 株および 209P-L 株からそれぞれ SM あるいは EM に染色体性の耐性を示す EMT (Sm^r) と 209P (Em^r) を分離し、またプラスミド性の CP あるいは TC 耐性を示す L 型菌、FP-L (pCp)、FP-L (Sm^r, pCp)、FP-L (Em^r, pTc) 株を供試した。これらの FP-L 株はプラスミド性の CP あるいは TC 耐性を示すプロトプラストと L 型菌とを融合させることにより分離した。

細胞融合には2通りの方法を用いた。プロトプラスト同士の融合は、薬剤耐性マーカーを異にする2種類のプロトプラストの混合物（遠心沈渣）に50%（w/v）ポリエチレングリコール 6,000（PEG）を加え、暫時室温処理後、そのまま、あるいは復帰寒天培地（R培地）に培養して得た集落を集め、検定用培地〔ブレンハート インフュージョン（BHI）培地、ペニシリン（PCG）加4.5% NaCl-BHI培地、およびR培地のそれぞれにマーカーとした2薬剤を加えた3種類の寒天平板〕表面に接種した。一方L型菌同士の融合では、2種類のL型菌をPEG処理後、そのまま、あるいはPCG加4.5% NaCl-BHIブロスで一晩増菌培養したものを検定用薬剤を添加したPCG加4.5% NaCl-BHI軟寒天培地に混釈培養した。プロトプラストとL型菌とをPEG処理して融合させる実験では、上記2つの方法を併用した。

得られた結果は次のように要約される。

1. プロトプラスト同士の細胞融合では、一方が染色体性、他方がプラスミド性のマーカーを持つ組合せでは、PEG処理後R培地で増殖させて検定に供した場合にはもっぱら球菌型として、一方増菌培養しなかった場合にはR培地上で球菌型、L型および混合型として二重耐性集落が出現した。しかし両マーカーが染色体性の場合には、R培地上で増菌培養した場合にのみ球菌型の二重耐性集落が得られた。
2. L型菌同士の細胞融合では、染色体性あるいはプラスミド性のマーカーを持つ株の種々の組合せによる二重耐性菌の出現状況はプロトプラスト同士の融合実験のそれと同様であった。これらの二重耐性菌はすべてL型であった。
3. プロトプラストとL型菌との細胞融合体の検出をL型菌同士の融合に用いた方法で行った場合、プロトプラストがプラスミド性のマーカーを持つ組合せでのみ、増菌培養の有無にかかわらず、二重耐性のL型集落が得られた。しかしプロトプラストが染色体性のマーカーを持つ組合せでは、L型菌側のマーカーが染色体性、プラスミド性のいずれであっても、増菌の有無にかかわらず、二重耐性集落は出現しなかった。
4. プロトプラストとL型菌の細胞融合をプロトプラスト同士の融合に用いた方法で行った場合、前者が染色体性のマーカーを持ち後者がプラスミド性のマーカーを持つ組合せでは、増菌培養を行うことなく検定用R培地に接種した場合には、球菌型、L型および混合型の二重耐性集落が得られた。一方R培地上で一たん増殖させた際には、二重耐性菌がR培地およびBHI培地では球菌型の集落として出現したが、PCG加4.5% NaCl-BHI培地では二重耐性集落は検出されなかった。さらに、プロトプラストがプラスミド性のマーカーを持ちL型菌が染色体性の耐性を示す組合せでは、増菌培養しなかった場合にのみR培地上にL型の二重耐性集落が出現した。しかし両者の耐性がともに染色体性の場合には、二重耐性を示す集落は検出されなかった。

以上要するに、L型菌とプロトプラストとの細胞融合では、一方が染色体性の薬剤耐性を示し、他方がプラスミド性のマーカーを持つ場合には、染色体性のマーカーを持つ側の細胞の状態を示す融合体のみが検出され、プラスミド性のマーカーを持つ側の細胞の性状を示す融合体は検出されなかった。また、染色体性の薬剤耐性を示すもの同士の組合せでは融合体は得られず、染色体性の組換え体の出現を妨げ

る何らかの機序の存在が推測された。

論文の審査結果の要旨

この研究は、細菌の細胞融合現象がL型細菌とプロトプラストとの間においても起こることを実証した最初のものである。

これ迄にも、プロトプラスト化した細菌細胞同士の融合については多くの研究があり、またL型菌同士の細胞融合については阪大歯学部口腔細菌学教室のグループの先駆的な研究がある。L型菌とプロトプラストとは、細胞融合実験の材料として、それぞれに長所と短所を併せ持っている。

この研究は、L型菌とプロトプラストそれぞれの実験材料としての欠点を補完させ、かつ利点を助長させることを目的として行われた。すなわち、パートナーとしたL型菌およびプロトプラストの薬剤耐性マーカーのいずれかがプラスミド性の組合せでは、細胞融合体を得られることが明らかにされた。両細胞のマーカーが染色体性の場合には両薬剤に耐性を示す融合体を得られないことなど、今後に残された研究課題もあるが、加藤擁一君の業績は細菌の細胞融合現象を、歯科医学のみならず、広く生命科学の種々の分野で利用する研究に新しい局面を開いたものとして、高く評価できる。

したがって、加藤擁一君の論文は歯学博士の学位の請求に十分価するものと判定した。