

ペニシリンによって誘発される黄色ブドウ球菌の自己溶解

—変異株を用いた解析—

石 田 栄 作

Penicillin G — induced autolysis of *Staphylococcus aureus*

— Analysis using mutants —

Eisaku Ishida

(平成9年1月10日受付)

緒 言

細菌の表層には細胞壁と呼ばれる構造が有り、この構造物は細菌に固有の形態を与え、細胞質を保護し、細菌の生態と深く関わっている。細胞壁はペプチドグリカンと呼ばれる構造を中心として成り立っている。ペプチドグリカンの基本骨格は菌種を問わず類似しており、グリカン鎖とペプチド鎖から成っている。黄色ブドウ球菌のペプチドグリカンの、グリカン鎖は *N*-アセチルグルコサミンと *N*-アセチルムラミン酸の繰り返し重合した型を取り、ペプチド鎖は *L*-アラニン、*D*-グルタミン酸、*L*-リジン、*D*-アラニンから成り、隣り合ったペプチド鎖の *D*-アラニンと *L*-リジンの間は5分子のグリシンで架橋されている¹⁾。このグリシンによる架橋構造は、黄色ブドウ球菌に特異的である¹⁾。このように複雑な構造物が細菌表層に、グラム陽性菌の場合は数層に渡り、グラム陰性菌の場合は1~2層存在すると考えられている¹⁾。ペプチドグリカンは細菌の細胞内圧に耐えるために必要な強度を菌に付与している。しかしながら、ペプチドグリカンは静的なものではなく、菌の増殖とともに常に代謝回転を受けている。また、細菌は細胞分裂をして増殖するために、このペプチドグリカンを切断する酵素を必要とする。このようにペプチドグリカンの切断に関与する酵素として、黄色ブドウ球菌では *N*-acetylmuramyl-*L*-alanine amidase、*N*-acetylglucosaminidase および endopeptidase の3種類の酵素活性が知られてい

る¹⁻³⁾。これらの酵素は細胞壁加水分解酵素と総称されているが、酵素の活性化に伴い、しばしば、細菌の溶解、すなわち溶菌を生じるため溶菌酵素あるいは自己溶解酵素と総称されている¹⁻³⁾。これらの酵素群は生理的に細胞分裂、細胞分離、細胞壁の代謝回転、芽胞形成などの諸相で働くと考えられている¹⁻³⁾。

一方、黄色ブドウ球菌は β -ラクタム系薬剤の添加によって溶菌することが知られている^{1,4)}。従来、 β -ラクタム剤の作用機序は、 β -ラクタム剤がペプチドグリカンの生合成を阻害するため細胞壁が脆弱化し、そのために菌の有する溶菌酵素が活性化されて自己溶解を起こすため殺菌的に働くというものであった¹⁾。しかし、 β -ラクタム剤によって黄色ブドウ球菌の自己溶解がどのような機序で起こるのか、また自己溶解と β -ラクタム剤の殺菌作用との関係は、これまで明らかにされていない。

そこで本研究では β -ラクタム剤感受性の黄色ブドウ球菌から溶菌酵素産生変異株を含む種々の変異株を作製し、これら変異株の性状について、特に溶菌との関連を検討した。

材料および方法

1. 材 料

ペニシリン G (PCG) は明治製菓株式会社 (東京) より入手した。cephazolin (CEZ)、methicillin (DMPPC)、ofloxacin (OFLX) はそれぞれ藤沢薬品株式会社 (大阪)、Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo)、第一製薬株式会社 (東京) より入手した。リゾスタフィン、卵白リゾチーム、chloramphenicol (CP) は、それぞれ Sigma Chemical Co.、生化学工業株式会社 (東京)、ペー

リンガーマンハイムジャパン株式会社（東京）より得た。

2. 菌株および培養法

Staphylococcus aureus FDA209P ストレプトマイシン耐性株（以下 Sm^r）および *S. aureus* FDA209P Sm^r より *N*-メチル-*N'*-ニトロ-*N*-ニトロソグアニジン (NMNG) 添加によって得られた変異株を用いた⁵⁾。菌株の培養には、特に断らない限りトリプチケースソイ液体培地 (Trypticase Soy Broth, TSB) を用い、37°C で振とう培養を行った。

3. 変異株

NMNG 変異によって得た溶菌酵素産生性の変化した変異株15株および培地上でのコロニー形態の変化した変異株3株を使用した⁵⁾。溶菌酵素産生性の変化した変異株としては、親株より大きな溶菌ハローを示す株 (HL1, HL13, HL14), 2重の溶菌ハローを示す株 DL34, 48時間培養で小さな溶菌ハローを形成する株 (LL4, LL11, LL22, LL65, LL67), 1週間培養した後でも全く溶菌ハローを形成しない株 (NL16, NL20, NL21, NL24, NL31, NL66) を用いた。コロニー形状の変化した株として、Lyt32, Lyt33, Lyt34 株を用いた。変異株の作製は以下の方法に従った。*S. aureus* FDA209 Sm^r を TSB 10 ml に接種し、37°C で一夜静置培養し、集菌後、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS, pH 7.0) により2回洗浄したものを NMNG 1 mg を含む 0.1 MPBS 10 ml に懸濁し、37°C で30分振とうした。次いで、集菌して PBS により2回洗浄後、変異株の選択を行った。変異株の選択には、Chatterjee らの方法を一部改変して行った^{6,7)}。即ち、*Micrococcus luteus* 加熱死菌 1 mg/ml を含むブレインハートインフュージョン寒天培地プレートに変異株が1プレートあたり100から200コロニー形成するように播き、37°C で48時間培養した。培養後、コロニーから産生される溶菌酵素によりコロニーの周辺に *M. luteus* が溶菌してできる溶菌環 (ハロー) が生ずるが、この溶菌環の形成のされかたによって変異株を選択した。また一部の變異株は寒天培地上での形態によって選択した。

4. 化学療法剤感受性の測定

薬剤としては PCG, CEZ, DMPPC および OFLX を使用した。菌株の薬剤感受性は微量液体希釈法によって行った。各薬剤の2倍系列希釈を含む TSB 100 μ l に最終菌濃度約 10^7 cells/ml の菌を接種し、37°C で18時間静置培養し、肉眼的に菌の発育を見ない最小の薬剤濃度を MIC とした。

5. PCG による自己溶解

対数増殖期で増殖している菌を、あらかじめ37°C に暖めた新しい TSB に吸光度 660 nm (OD660 nm) で0.05になるように調整して接種した。培養を続け、特に断らない限り菌液の濁度が OD660 nm で0.1の時点で1~3 MIC の PCG を添加した後、経時的に吸光度を測定した。

6. 緩衝液中での自己溶解

対数増殖期で増殖している菌を、あらかじめ37°C に暖めた新しい TSB に OD660 nm で0.05になるように調整して接種した。その後、菌液の濁度が OD660 nm で0.1の時点で PCG (1 MIC) 存在、非存在下で培養を続け、2時間後にメンブランフィルター (日本ミリポア, 東京, 0.22 μ m) を用いて集菌した。集菌した菌は 0.05M リン酸緩衝液で2回洗浄後、同緩衝液に OD660 nm が0.7となるように懸濁したのち、37°C で振とうし、菌液の濁度を経時的に測定した。

7. 自己溶解酵素活性の測定

対数増殖期中期まで培養した培養液 100 ml から、以下の方法で溶菌酵素画分を調整した。

培養上清画分：培養濾液を80%飽和硫酸によって濃縮し、500 μ l 0.1M リン酸緩衝液 (pH 6.8) で透析したものを用いた。

LiCl 菌体抽出画分：培養液より集菌した菌体を PBS (pH 7.0) にて2回洗浄し、500 μ l の 3M LiCl (1 ml/湿菌体 1 g) を加え、懸濁し、氷温中で30分間放置後、遠心後に得られた上清を LiCl 菌体抽出画分とした。

Triton 菌体抽出画分：上記と同様の方法で2% Triton X-100 500 μ l を用いて抽出した画分を Triton 菌体抽出画分とした。*M. luteus* 加熱死菌を 0.05M リン酸緩衝液 2 ml に OD660 nm が0.7となるように懸濁したのち、これらの画分を各 40 μ l 添加し、37°C で振とうし、菌液の濁度を経時的に測定した。ブランクとしてそれぞれ 40 μ l の 0.1M リン酸緩衝液 (pH 6.8), 3M LiCl, 2% Triton X-100 を用いた。

溶菌酵素活性のプロファイルの検討は菌体封入ゲルを用いたザイモグラフィによって測定した^{8,9)}。加熱処理菌として *M. luteus* あるいは *S. aureus* を用い、菌体を封入したゲル (10%ポリアクリルアミドゲル, 0.5 mg 乾燥菌体/ml) により LiCl 画分を SDS 電気泳動した後、ゲルを取り出し、30分間水洗した。その後、37°C で 0.1M リン酸緩衝液 (pH 6.8) に浸漬した後、間接光を用いて観察し、封入菌体の溶解による溶菌バンドを観察した。

8. 溶菌酵素感受性試験

加熱処理菌の各種溶菌酵素に対する感受性は、菌体封入ゲルを用いたザイモグラフィーによって測定した^{8,9)}。加熱処理菌を封入したゲル（10% ポリアクリルアミドゲル、0.5 mg 乾燥菌体/ml）で種々の濃度のリゾスタフィン、リゾチムを SDS 電気泳動した後、ゲルを取り出し、30分間水洗した。その後、37°C で 0.1M リン酸緩衝液 (pH 6.8) に12時間浸漬した後、間接光を用いて観察し、封入菌体の溶解による溶菌バンドを示す最少酵素濃度を測定した¹⁰⁾。

9. 脂質組成分析

菌株を 30 ml の TSB に接種し、対数増殖期で [³H] glycerol (37 GBq/nmol) を 9.25 MBq/ml になるように加え、37°C で40分間振とう培養した。遠心して集菌した菌体を PBS で洗浄後、5 ml の chloroform-methanol (2:1 vol/vol) に懸濁し、水中で4分間超音波により破碎した。これに 500 μ l の精製水を加え一夜振とうした後、methanol 相を分取し、ロータリーエバポレーターにより濃縮した。一部は Silicagel G plate にスポットし、二次元に展開した。展開溶媒は一次元用には chloroform-methanol-H₂O (70:25:4

vol/vol) を、二次元用には chloroform-methanol-7M ammonia solution (60:35:3.5 vol/vol) を用いた。各脂質の定性は 50% H₂SO₄ を噴霧したのち 200°C で加熱して生ずるスポットを標準サンプルと比較して行い、定量は発色スポットのシリカゲルをプレートからかきとり、液体シンチレーションカウンターで計測した。

10. その他

蛋白質の定量は、牛血清アルブミンを標準として Bradford らの方法によって行った¹¹⁾。SDS 電気泳動は Laemmli の方法に従って行った¹²⁾。

結 果

1. 液体培地中での変異株の増殖

NMNG 変異によって得られた変異株のトリプチケースイ液体培地中での増殖を検討した。得られたほとんどの変異株で、増殖速度の低下が認められた(図1)。

2. 各種化学療法剤に対する変異株の感受性

各種化学療法剤に対する変異株の感受性について検討した。薬剤としては β -ラクタム剤の PCG, CEZ,

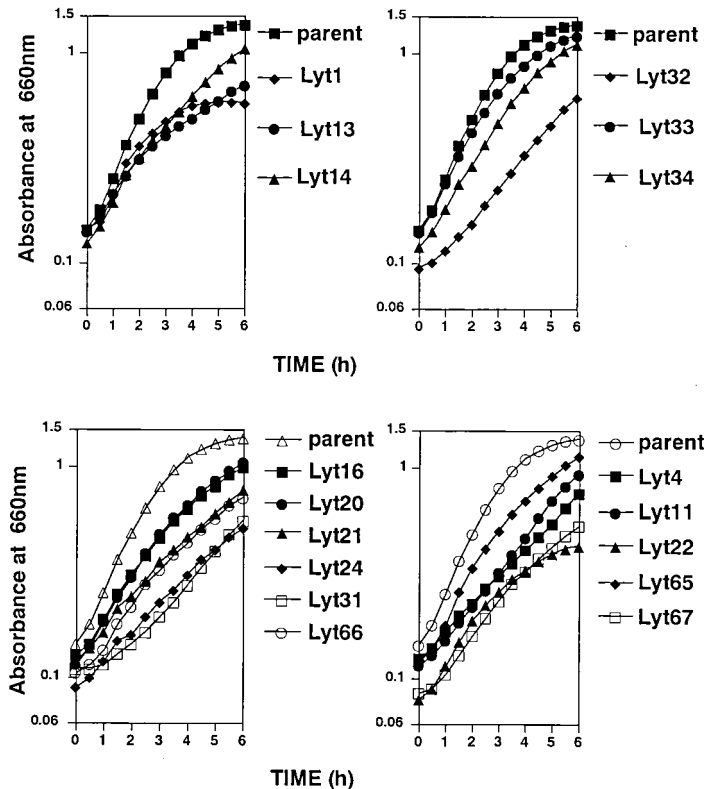


図1 各種 *S. aureus* 変異株の液体培地中での増殖曲線

DMPPC およびニューキノロン剤の OFLX を用いた。いずれの変異株においても PCG, CEZ, DMPPC および OFLX の MIC は24時間値, 48時間値ともに親株と変わらないか, または変化してもせいぜい1ないし2管程度で有意な変化は認められなかった (表1)。同様に MBC にも親株と変異体との間に有意差は認められなかった (表2)。

3. 変異株の増殖に及ぼす PCG の影響

液体培地での変異株の増殖に及ぼす PCG の影響について検討した。各変異株は TSB にて培養後, OD660 nm で0.1の時点で 1 MIC, 2 MIC および 4 MIC

の PCG を添加し, 経時的に吸光度を測定した (図2)。親株では PCG のいずれの濃度でも約1時間後, 吸光度の減少が認められ, 菌体の溶菌が認められた。NL 株ではいずれも吸光度の増加は止まり, 顕著な溶菌は認められなかった。LL 株でも同様の傾向が認められた。一方, HL 株, DL 株は溶菌のやや悪いもの (Lyt14), 溶菌が阻害されたもの (Lyt13), 親株と変わらないもの (Lyt1, Lyt34) など一定の形質変化は認められなかった。一方, コロニー形状の変化した株の中では, Lyt33 は溶菌がやや悪くなり, 一方 Lyt32 株はきわめて早い溶菌を示した。

表1 変異株における種々の化学療法剤の最小発育濃度

		Minimum Inhibitory Concentration (MIC, $\mu\text{g/ml}$)				upper 24h lower 48h						
		PCG	CEZ	DMPPC	OFLX		PCG	CEZ	DMPPC	OFLX		
NL	Parent	0.025	0.1	0.78	0.39	LL	22	0.025	0.1	0.39	0.2	
		0.05	0.1	1.56	0.39			0.05	0.1	1.56	0.39	
	16	0.012	0.1	0.78	0.2		65	0.025	0.2	0.78	0.39	
		0.025	0.2	1.56	0.39			0.1	0.39	3.13	0.78	
	20	0.012	0.05	0.39	0.39		67	0.025	0.1	0.78	0.78	
		0.012	0.1	1.56	0.39			0.025	0.2	1.56	0.78	
	21	0.025	0.2	0.78	0.2		1	0.025	0.2	0.78	0.2	
		0.025	0.2	1.56	0.39			0.05	0.39	1.56	0.2	
	24	0.006	0.05	0.39	0.2		13	0.025	0.2	1.56	0.2	
		0.012	0.05	0.78	0.39			0.05	0.39	1.56	0.78	
	31	0.006	0.05	0.39	0.2		14	0.006	0.1	0.2	0.39	
		0.012	0.05	1.56	0.39			0.012	0.1	0.39	0.78	
	66	0.012	0.1	0.39	0.39		DL	34	0.012	0.05	0.78	0.39
		0.025	0.1	0.78	0.39			0.012	0.1	0.78	0.39	
LL	4	0.025	0.2	0.78	0.39	colony	32	0.025	0.025	0.2	0.2	
		0.025	0.2	1.56	0.39			0.025	0.05	0.78	0.39	
	11	0.025	0.2	0.78	0.39		33	0.012	0.05	0.39	0.2	
		0.025	0.39	3.13	0.78			0.05	0.2	1.56	0.39	

表2 変異株における種々の化学療法剤の最小殺菌濃度

		Minimum Bactericidal Concentration (MBC, $\mu\text{g/ml}$)									
		PCG	CEZ	DMPPC	OFLX		PCG	CEZ	DMPPC	OFLX	
NL	parent	0.025	0.1	0.78	0.39	LL	22	0.025	0.1	0.39	0.2
	16	0.012	0.1	0.78	0.39		65	0.05	0.2	1.56	0.78
		0.012	0.05	0.78	0.39			67	0.025	0.1	0.78
	21	0.025	0.2	1.56	0.2		1	0.05	0.2	1.56	0.2
		0.006	0.05	0.39	0.2			13	0.05	0.2	1.56
	31	0.006	0.05	0.78	0.39		14	0.012	0.1	0.39	0.78
		0.012	0.1	0.39	0.69			DL	34	0.012	0.05
	4	0.025	0.2	0.78	0.39		32	0.025	0.025	0.39	0.39
		0.025	0.2	0.78	0.39			colony	33	0.025	0.05

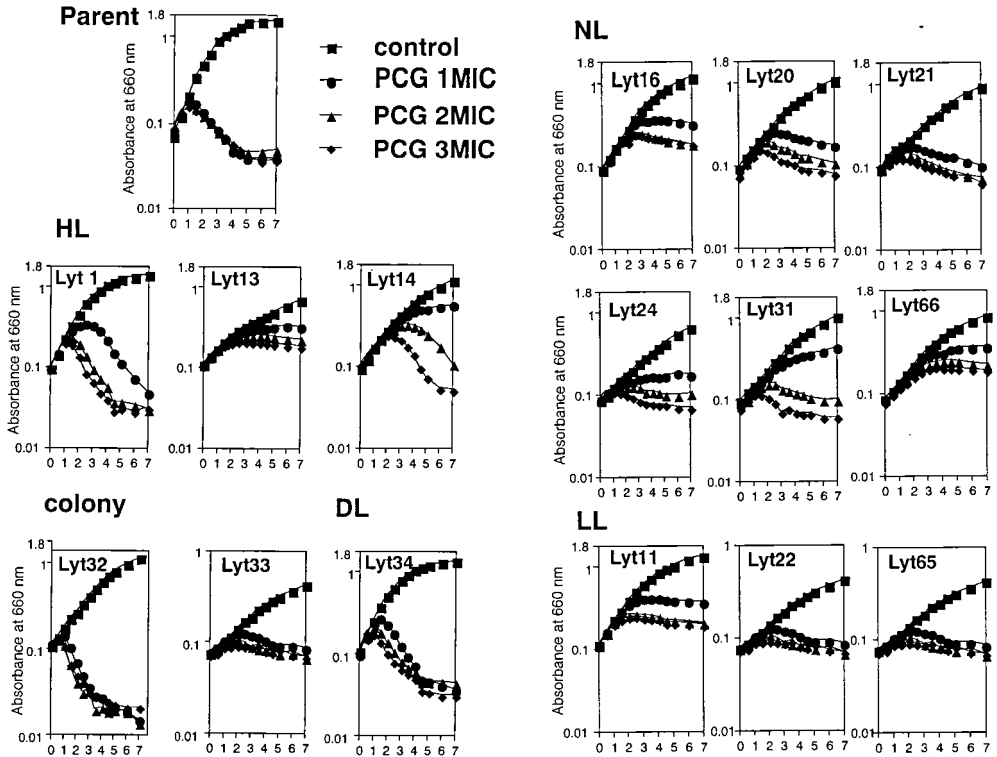


図2 各種 *S. aureus* 変異株の増殖に及ぼす PCG の影響。対数増殖期の菌を希釈し、OD660 nm で0.05となるように調整し、A660 nm が0.1の時点で PCG を添加し、その後、経時的に濁度を測定した。

4. 変異株菌体の自己溶解

次に変異株菌体のリン酸緩衝液中での溶菌を検討した(図3)。*S. aureus* はリン酸緩衝液などの緩衝液中に懸濁することによって溶菌することが知られている。親株では5時間で濁度が約30%減少し、PCG処理菌では約45%減少した。これに対し、NL株やLL株では、いずれの株もPCG非存在下で親株と同様に、約30%の濁度の減少が認められた。しかしながら、この減少率はPCG処理菌でもほとんど変化しなかった。即ち、これらの株ではPCG処理による溶菌の促進は認められなかった。また、HL株、DL株、Lyt33株やLyt34株では親株と大きな差は認められなかった。一方、Lyt32株はPCG非存在下では、5時間で約40%の濁度の減少が認められ、PCG処理菌では約60%の減少が認められた。このことから、Lyt32株は緩衝液中での自己溶菌がPCG処理によって促進することが明らかとなった。

5. 変異株由来の溶菌酵素活性

次に変異株の種々の画分の溶菌活性について検討した(図4)。NL株やLL株はいずれの画分においても親株と比較して、著明に低い溶菌酵素活性を示し

た。HL株のLyt1、Lyt14両菌株とLyt33株は、培養上清画分や3M LiCl抽出画分中の溶菌酵素活性において親株のそれぞれより増加していた。DL株のLyt34株は培養上清画分、3M LiCl抽出画分および2% Triton X-100による抽出画分中のいずれにおいても著しく強い溶菌酵素活性を示した。PCGに易溶菌性を示し、かつ緩衝液中で自己溶菌の亢進していたLyt32株は、溶菌酵素活性の点で親株と同様な活性を示した。

6. Lyt32株の増殖に及ぼすPCGの影響

得られた変異株の中で、コロニー性状の違いによって分離されたLyt32株は、PCGによる易溶菌性というユニークな特徴を有している。そこで、この株に注目し、さらにこの株の性状を検討した。Lyt32株の異なる増殖時期でのPCG投与による影響について検討した(図5)。親株は、対数増殖期にあるときはPCG感受性を示したが、PCGの投与時点が遅れるに従い、溶菌を起すまでの間隔が長くなり、PCGを投与する時点がOD660 nmで0.8を過ぎると、溶菌は全く起こらなくなった。一方、Lyt32株は、OD660 nmが約0.8までは濁度に関係なく溶菌が起き、OD660 nmが

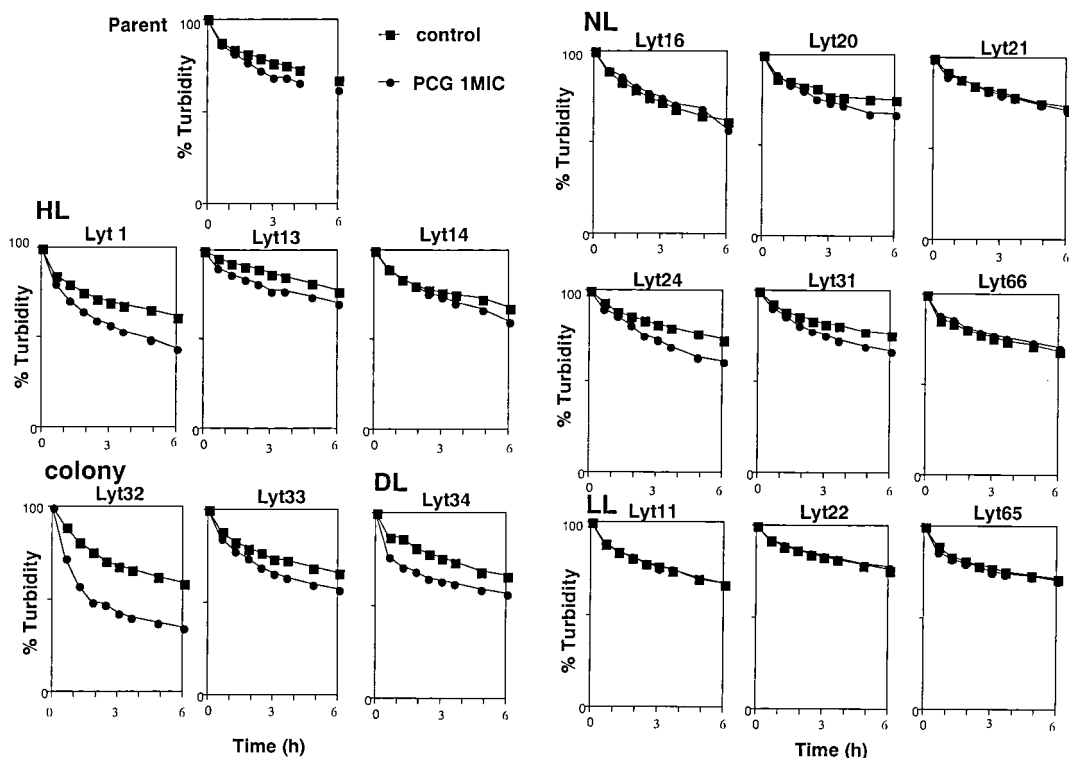


図3 緩衝液中での各種 *S. aureus* 変異株の自己溶解。対数増殖期の菌を接種し、菌液の濁度が OD660 nm で0.1の時点で PCG (1 MIC) 存在、非存在下で培養を続け、2時間後にメンブランフィルターで集菌した。集菌した菌は 0.1M リン酸緩衝液で OD660 nm が0.7となるように懸濁したのち、37°C で振とうし、菌液の濁度を経時的に測定した。

1 を超えてもさらに溶菌が起こることが明らかとなった。

黄色ブドウ球菌の PCG による溶菌は、蛋白合成阻害剤によって阻害されることが知られている¹³⁾。PCG による Lyt32 株の溶菌に及ぼす CP の影響を、親株と比較検討した (図6)。PCG による Lyt32 株の溶菌は親株と同様に CP の添加によって抑制された。

7. Lyt32 株の自己溶解におよぼす PCG の影響

一般に PCG は増殖期の菌に作用し溶菌を誘導する。しかし、Lyt32 株は静止期に入った菌も PCG による溶菌を引き起こした。また、PCG 存在下で培養した Lyt32 株は、緩衝液中での溶菌が著しく亢進していた。そこで、緩衝液中での自己溶解に及ぼす PCG の影響について検討した (図7)。図7に示すように、1 MIC および 2 MIC の PCG を添加した場合でも、Lyt32 株の自己溶解の促進は認められなかった。

8. Lyt32 株の溶菌酵素プロファイル

Lyt32 株の菌体由来溶菌酵素活性は、*M. luteus* を

基質とした場合、親株と差がないことを明らかにしている。そこで、さらに溶菌酵素の質的な変化がないかを、*M. luteus* および *S. aureus* 菌体を封入したポリアクリルアミドゲルを用いたザイモグラフィーによって検討した (図8)。図に示すように親株と Lyt32 株の溶菌酵素活性のプロファイルには差が認められなかった。

9. Lyt32 生菌の溶菌酵素感受性

次に Lyt32 株と親株の外來性溶菌酵素に対する感受性を検討した。外來性溶菌酵素としては、glycylglycine endopeptidase であるリゾスタフィンと *N*-acetyl muramidase であるリゾチームを用いた。図9aに示すように、リゾスタフィンは濃度依存性に菌体を溶解し、親株と Lyt32 株には感受性の違いは認められなかった。一方、リゾチームは親株でほとんど溶菌を引き起こさなかったが、Lyt32 株では濃度依存性に菌体を溶解した (図9a)。

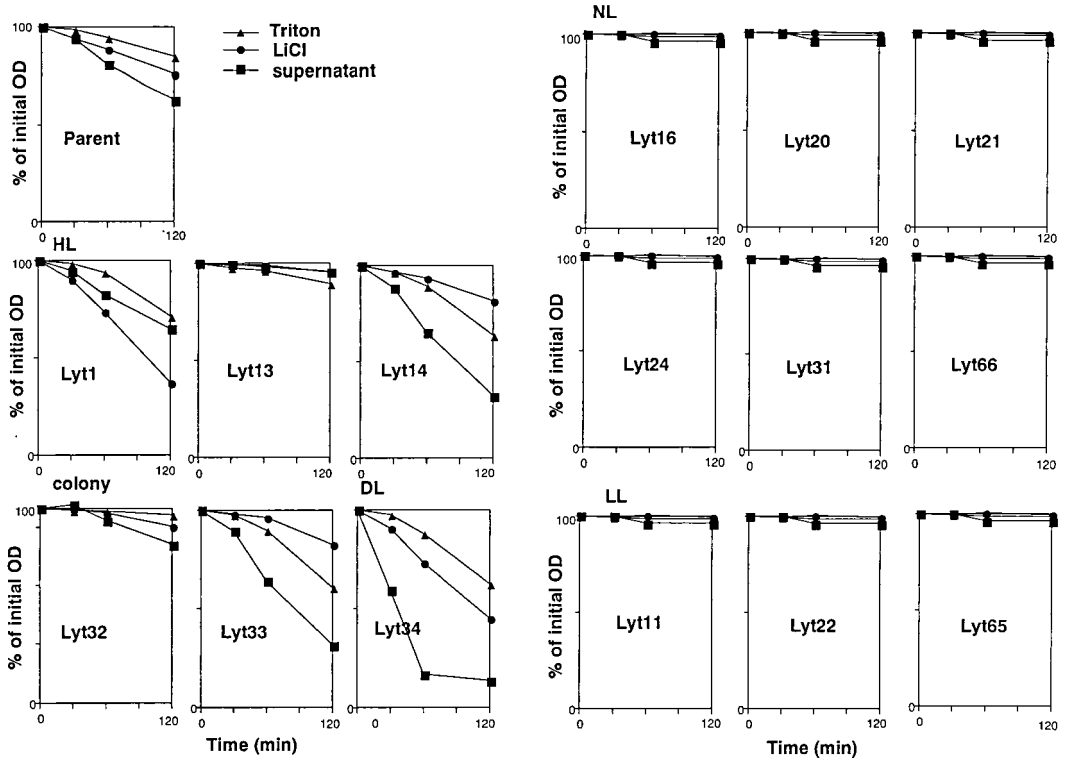


図4 各種 *S. aureus* 変異株より調整した溶菌酵素画分の溶菌活性。上清画分 (supernatant), LiCl 画分 (LiCl), および Triton 画分 (Triton) は「材料および方法」に従って調整した。溶菌活性は *M. luteus* 加熱死菌を 0.05M リン酸緩衝液 2 ml に OD660 nm が 0.7 となるように懸濁し, これらの画分を各 40 μ l 添加し, 37°C で振とうし, 菌液の濁度を経時的に測定することによって調べた。

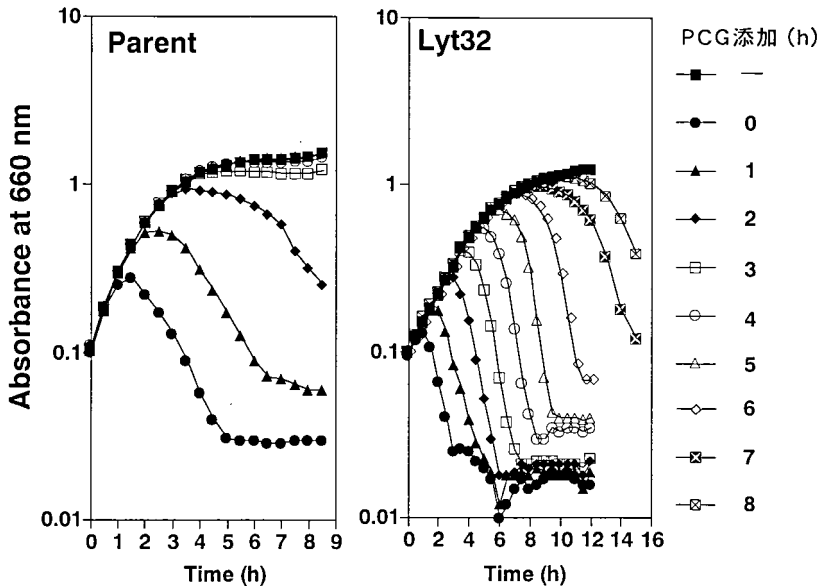


図5 *S. aureus* 親株, 変異株 Lyt32 の増殖に及ぼす PCG の影響。対数増殖期の菌を希釈し, OD660 nm で 0.05 となるように調整し, 図右に示す種々の時点で 1 MIC の PCG を添加し, 経時的に濁度を測定した。

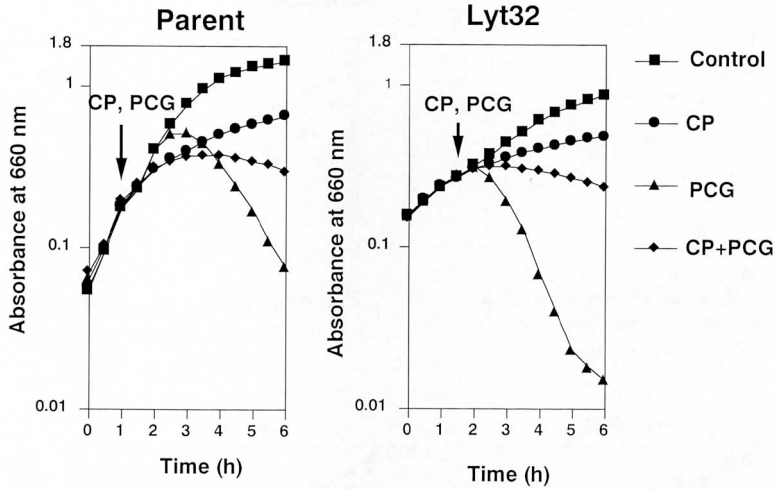


図6 *S. aureus* 親株および変異株 Lyt32 の PCG による溶菌に及ぼす CP の影響。対数増殖期の菌を希釈し、OD_{660 nm} で 0.05 となるように調整し、OD_{660 nm} が 0.3 の時点で 1 MIC PCG, 2 MIC CP を図右の示すように添加し、その後、経時的に濁度を測定した。

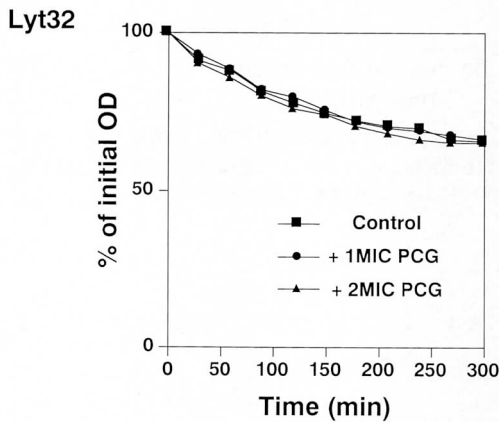


図7 緩衝液中での *S. aureus* 変異株 Lyt32 の自己溶解に及ぼす PCG の影響。緩衝液中で自己溶解は図3の方法に従った。Lyt32 株を懸濁した緩衝液に PCG を図に示す濃度添加し、濁度の変化を測定した。

10. 加熱処理 Lyt32 死菌の溶菌酵素に対する感受性

外来性溶菌酵素の感受性変化の原因として、細菌細胞壁の構造の変化が考えられる。そこで親株および Lyt32 株菌体を封入したポリアクリルアミドゲルを用いたザイモグラフィーによって、外来性溶菌酵素に対する親株および Lyt32 株菌体細胞壁の感受性を検討した。基質である加熱処理菌を溶解して溶菌バンドを形成する最小酵素量はリゾスタフィンでは親株と Lyt32 株がそれぞれ 0.07 および 0.15 ng、リゾチーム

Zymogram

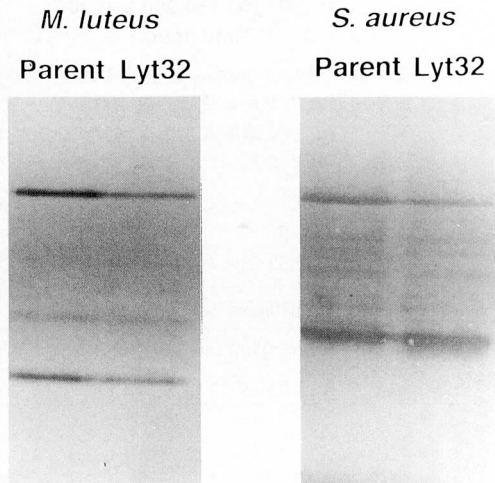


図8 *S. aureus* 親株、変異株 Lyt32 由来の溶菌酵素プロファイル

溶菌酵素のプロファイルは菌体封入ゲルを用いたザイモグラフィーによって測定した。加熱処理菌として *M. luteus* および *S. aureus* を用い、菌体を封入したゲル (10% ポリアクリルアミドゲル, 0.5 mg 乾燥菌体/ml) にて各 LiCl 画分を泳動用緩衝液に透析したものを SDS 電気泳動したのち、ゲルを取り出し、30分水洗した。その後、37°C で 0.1M リン酸緩衝液 (pH 6.8) に浸せきした後、間接光を用いて封入菌体の溶解による溶菌バンドを観察した。

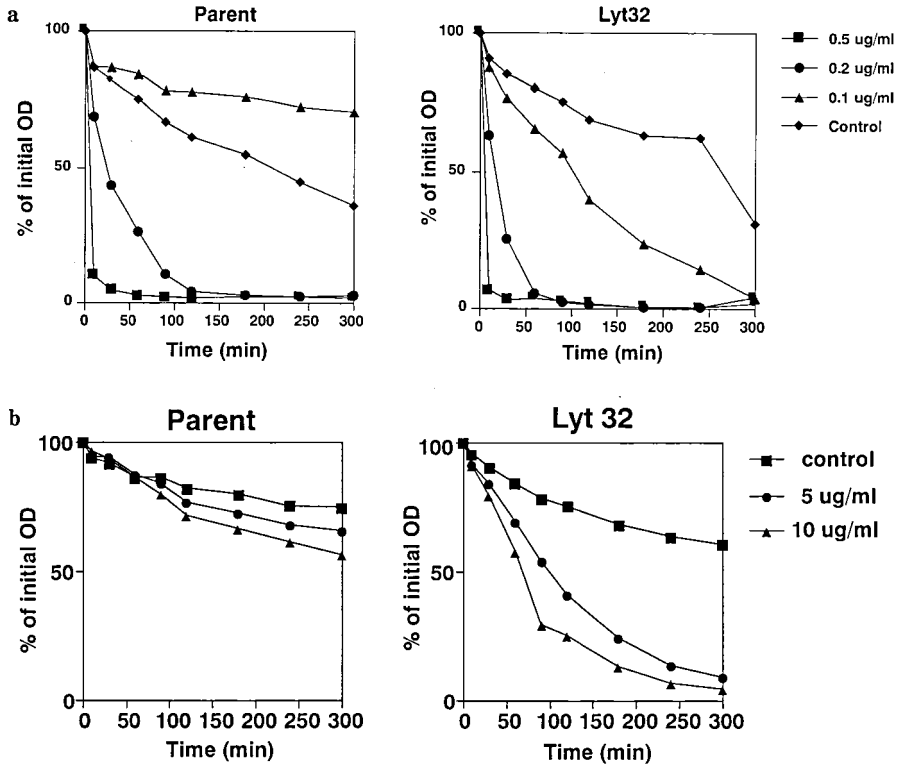


図9 緩衝液中での *S. aureus* 変異株 Lyt32 の自己溶解に及ぼす外来性溶菌酵素の影響。緩衝液中での自己溶解は図3の方法に従った。親株あるいは Lyt32 株を懸濁した 0.1M リン酸緩衝液に外来性溶菌酵素を右図に示す濃度添加し、濁度の変化を測定した。外来性溶菌酵素としては a, リゾスタフィン, b, リゾチームを用いた。

表3 変異株 Lyt32 および親株の MBD 値

	lysostaphin (ng)	lysozyme (ng)
parent	0.07	12.5
Lyt32	0.15	12.5

ではともに 12.5 ng だった (表3)。以上の結果、親株と Lyt32 株の細胞壁に対する外来性溶菌酵素の感受性は同じであると結論づけられた。

11. Lyt32 株の脂質分析

Lyt32 株の易溶性は生菌のみで認められ、蛋白質合成阻害剤の影響を受けること、また Lyt32 株の細胞壁には溶菌酵素の感受性に変化を生じるような変化は認められないことが示唆された。ブドウ球菌の溶菌酵素の活性制御は、リポタイコ酸 (LTA) のような両親媒性物質によってなされていると報告されている¹⁴⁻¹⁷。Lyt32 株の PCG 易溶性が、このような活性制御因子の量的、質的变化による可能性を検討する

表4 変異株 Lyt32 および親株の菌体由来脂質構成

	control (cpm)	Lyt32 (cpm)
chloroform/methanol	56,662	55,627
water	20,000	15,955 (80%)
ppc	133,482	97,311 (73%)
Lipid		
origin	79	96
lysyl-GP	1,462	902
GL	4,356	6,890
CL	160	285
PG	44,668	42,619

ために、菌体脂質を分析した (表4)。親株と Lyt32 株は総脂質量に変化はなかったが、Lyt32 株は LTA が親株の80%、タイコ酸 (TA) は親株の73%に減少していた。脂質では、Lyt32 株は glycolipid や cardiolipin の増加が認められ、phosphatidylglycerol や lysyl phosphatidylglycerol は減少していた。

考 察

PCG 感受性の黄色ブドウ球菌から、NMNG 変異により溶菌酵素産生変異株を含む種々の変異株を分離し、PCG 処理の影響を検討した。その結果、溶菌酵素産生、分泌の低下している株では、PCG による溶菌は著しく悪くなる傾向があった。しかし、溶菌酵素産生、分泌の亢進している株では、PCG による溶菌には共通した傾向は認められなかった。コロニー性状の違いによって分離された Lyt32 株は PCG によって、著明な易溶菌性を示した。このように多くの変異株において PCG による溶菌の程度は変化していたが、MIC や MBC でみた場合に PCG をはじめとする β -ラクタム系、またニューキノロン剤である OFLX に対する感受性は変化していなかった。 β ラクタム剤やニューキノロン剤によって黄色ブドウ球菌は溶菌することが知られている^{1,18)}。しかし、これらの化学療法剤の殺菌作用は、PCG による黄色ブドウ球菌の溶菌とは直接関係しないことが強く示唆された。押田らは、メチシリンによる自己溶解を起こさない黄色ブドウ球菌株を分離し、その株はメチシリンに対する感受性においては親株と変わらないことを報告している¹⁹⁾。また、PCG による黄色ブドウ球菌の溶解は多価電解質である polyanethole sulfonate²⁰⁾、suramin²¹⁾ や青色色素である evans blue²¹⁾、cibacron blue F-3GA²²⁾ によって阻害されることが報告されている。また polyanethole sulfonate や cibacron blue F-3GA は、ともに *in vitro* で黄色ブドウ球菌の自己溶解酵素活性を阻害することが報告されている^{9,20)}。しかし、これらの化合物は、PCG に対する菌体の感受性には変化を与えない^{20,22)}。また Giesbrecht ら²³⁻²⁶⁾ は電子顕微鏡を用いた観察結果から、黄色ブドウ球菌の PCG による溶菌は菌が生化学的に死んだ後の postmortem effect であると述べている。PCG による殺菌作用は古くから次のように捉えられていた。即ち、PCG はペニシリン結合蛋白質に結合し、細胞壁ペプチドグリカンの架橋が脆弱化する。このため細胞壁にはころびが生じ、そこから溶菌が始まるが、この過程に活性化された自己溶解酵素が関わりとされてきた¹⁾。即ち、細菌細胞の死は自己溶解による結果であるというものである。今回の研究結果は、先に述べた報告と併せて、この解釈が誤っていることを明確にしたと考えられる。

PCG により易溶菌性を示す Lyt32 株の性状をさらに検討した。PCG による Lyt32 株の溶菌は対数増殖期のみならず、静止期にも認められた。しかしながら、その溶菌は親株同様、蛋白質合成阻害剤 CP によ

り阻害された。Lyt32 株の産生する溶菌酵素量、ならびにその活性プロファイルには大きな変化は認められなかった。また、Lyt32 株や親株を基質として外来性溶菌酵素に対する感受性を調べた結果、両者の間に差は認められなかった。以上のことから、PCG による Lyt32 株の易溶菌性は、菌株の有する溶菌酵素の産生量や性状の変化、菌株の細胞壁ペプチドグリカンが変化する可能性は否定的であると考えられた。生菌の Lyt32 株は PCG で前処理した場合には、緩衝液中で親株に比して著しい自己溶解を引き起こした。また、生菌の Lyt32 株が緩衝液中で示す自己溶解は、外来性溶菌酵素 lysozyme によって促進された。このように Lyt32 株と親株との差は生菌においてのみ認められた。このことから Lyt32 株の易溶菌性は、溶菌酵素の制御機構に変異が生じたためと推測された。そこで溶菌酵素の活性制御に関わっていると考えられている菌体内 LTA、TA および脂質組成について検討した結果、LTA、TA 含量の低下が認められた。LTA は *S. aureus* 細胞質膜構成成分の一つであり、糖脂質部分を細胞質膜に埋め込み、これにグリセロリン酸が28個重合した高分子構造を有する²⁷⁾。LTA は通常、脱アシル化された脱アシル化 LTA として培地中に放出されている²⁷⁾。 β -ラクタム剤の作用で脱アシル化されていない LTA の培地中への遊離が起こり、菌体からの LTA の遊離が増加することが報告されている²⁸⁾。Triton X-100 は緩衝液中での生菌の自己溶解を促進することが報告されているが¹⁰⁾、 β -ラクタム剤によってもこのようなアシル化 LTA の遊離が増加することが知られている²⁸⁾。また Triton X-100 は細胞膜脂質成分の中で cardiolipin の増加を誘導することが報告されている²⁹⁾。Lyt32 株では細胞膜脂質中のアシル化 LTA が減少し、cardiolipin が増加していた。このように溶菌現象と細胞膜脂質中のアシル化 LTA、cardiolipin の量の間には関連性があると考えられる。LTA はグラム陽性菌において溶菌酵素の活性制御因子として示唆されているが¹⁴⁻¹⁷⁾、分子レベルでその制御メカニズムは明らかにされていない。今後、Lyt32 株は黄色ブドウ球菌の自己溶解酵素の制御メカニズムを研究するための手段として役立つものと考えられる。

総 括

β ラクタム剤感受性の黄色ブドウ球菌から溶菌酵素産生変異株を含む種々の変異株を作製し、これら変異株の性状について、特に溶菌との関連を検討し、以下の結果を得た。

1. 溶菌酵素産生、分泌の低下している株では PCG により溶菌が著しく低下する傾向があった。し

かし、溶菌酵素産生、分泌の亢進している株では、PCGによる溶菌には共通した傾向は認められなかった。コロニー性状の違いによって分離された Lyt32株は、PCGによって著明な易溶菌性を示した。

2. 変異株の β -ラクタム系薬剤 (PCG, CEZ, DMPPC) およびニューキノロン剤 (OFLX) に対する感受性は親株とほぼ同様であった。

3. PCGによる Lyt32株の溶菌は、対数増殖期のみならず、静止期にも認められた。その溶菌は親株同様、蛋白質合成阻害剤 CPにより阻害された。Lyt32株の産生する溶菌酵素量、ならびにその活性プロファイルには、親株と比較して大きな変化はなかった。Lyt32株、親株を基質として外来性溶菌酵素に対する感受性を調べた結果、両者の間に差はなかった。

4. Lyt32株生菌はPCGで前処理した場合、親株に比して緩衝液中では著しい自己溶解を引き起こした。また、Lyt32株生菌の緩衝液中での自己溶解は外来性溶菌酵素リゾチームによって促進された。

5. Lyt32株は細胞膜脂質中のアシル化 LTA が減少し、cardiolipinが増加していた。

謝 辞

稿を終えるにあたり、本研究の指導と論文の御校閲を賜った広島大学歯学部口腔細菌学講座杉中秀壽教授に心から感謝の意を表します。また、本論文作成上、御助言、御校閲を賜りました同口腔外科学第二講座石川武憲教授、並びに同歯科薬理学講座土肥敏博教授に深謝いたします。

また、研究遂行上惜しみない御協力をいただいた口腔細菌学教室員各位に、深く感謝します。

文 献

- H.J. Rogers, H.R. Perkins, and J.B. Ward. (1980): The bacterial autolysins, Microbial cell walls and membranes, Chapman and Hall, London.
- Ward, J.B. and R. Williamson (1984): Bacterial autolysins: specificity and function, p. 159-166. In C. Nombela (Eds.), Microbial cell wall synthesis and autolysis, Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam.
- Ghuysen, J., D.J. Tipper and J.L. Strominger (1966): Enzymes that degrade bacterial cell walls. *Methods in Enzymology* 8: 685-689.
- Labischinski, H., H. Maidhof, M. Franz, D. Krofer, T. Sidow and P. Giesbrecht (1988): Biochemical and biophysical investigations into the cause of penicillin-induced lytic death of staphylococci: checking predictions of the murosome model, p. 181-257. In P. Actor, L. Daneo-Moore, M.L. Higgins, M.R.J. Salton, & G.D. Shockman (Eds.), Antibiotic inhibition of bacterial surface assembly and function, American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Sugai, M., H. Komatsuzawa, K. Ooku-Inomata, Y. Miyake, E. Ishida and H. Suginaka (1994): Isolation and characterization of Staphylococcus aureus which form altered cell clusters. *Microbiol. Immunol.* 38: 995-999.
- Chatterjee, A.N., D. Mirelman, H.J. Singer and J.T. Park (1969): Properties of a novel pleiotropic bacteriophage-resistant mutant of Staphylococcus aureus. *J. Bacteriol.* 100: 846-853.
- Chatterjee, A.N., W. Wong, F.E. Young and R.W. Gilpin (1976): Isolation and characterization of a mutant of Staphylococcus aureus deficient in autolytic activity. *J. Bacteriol.* 125: 961-967.
- LeClerc, D. and A. Asselin (1989): Detection of bacterial cell wall hydrolases after denaturing polyacrylamide gel electrophoresis. *Can. J. Microbiol.* 35: 749-753.
- Sugai, M., T. Akiyama, H. Komatsuzawa, Y. Miyake and H. Suginaka (1990): Characterization of sodium dodecyl sulfate-stable Staphylococcus aureus bacteriolytic enzymes by polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Bacteriol.* 172: 6494-6498.
- Komatsuzawa, H., M. Sugai, C. Shirai, J. Suzuki, K. Hiramatsu and H. Suginaka (1995): Triton X-100 alters the resistance level of methicillin-resistant Staphylococcus aureus to oxacillin. *FEMS Microbiol. Lett.* 134: 209-212.
- Bradford, M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Laemmli, U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- 野上龍造 (1983): ペニシリンによって誘発される黄色ブドウ球菌の溶菌機序. 広大歯誌 15, 259-271.
- Höltje, J.V. and A. Tomasz (1975): Lipoteichoic acid: a specific inhibitor of autolysin activity in Pneumococcus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72: 1690-1694.
- Suginaka, H., M. Shimatani, M. Ogawa and S. Kotani (1979): Prevention of penicillin-induced lysis of Staphylococcus aureus by cellular lipoteichoic acid. *J. Antibiotics* 32: 73-77.
- Shockman, J.D. and J.V. Höltje (1994): Microbial peptidoglycan (murein) hydrolases, p. 131-166. In J.M. Ghuysen & R. Hakenbeck (Eds.), Bacterial cell wall, Elsevier Science B.V., Amsterdam.

- 17) Cleveland, R.F., A.J. Wicken, L. Daneo-Moore and G.D. Shockman (1976): Inhibition of wall autolysis in *Steptococcus faecalis* by lipoteichoic acid and lipids. *J. Bacteriol.* **126**: 192-197.
- 18) Miyake, Y., I. Fujii, M. Sugai, A. Takamori and H. Suginaka (1987): Norfloxacin-induced lysis of *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol. Lett.* **40**: 301-303.
- 19) Oshida, T. and A. Tomasz (1992): Isolation and characterization of a Tn551-autolysis mutant of *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **174**: 4952-4959.
- 20) Wecke, J., Lahav, M., Ginsburg, I., Kwa, E., and P. Giesbrecht (1986): Inhibition of wall autolysis of staphylococci by sodium polyanethole sulfonate "liquiod". *Arch. Microbiol.* **144**: 110-115.
- 21) Wecke, J., M. Franz and P. Giesbrecht (1990): Inhibition of the bacteriolytic effect of beta-lactam-antibiotics of *Staphylococcus aureus* by the polyanionic drugs suramin and Evans Blue. *APMIS* **98**: 71-81.
- 22) Sugai, M., K. Ooku, T. Akiyama, S. Inoue, S. Iseda, Y. Miyake and H. Suginaka (1991): Suppression of penicillin-induced lysis of *Staphylococcus aureus* by cibacron blue 3G-A. *FEMS Microbiol. Lett.* **80**: 151-154.
- 23) Giesbrecht, P., H. Labischinski and J. Wecke (1985): A special morphogenetic defect and the subsequent activity of "murosomes" as the very reason for penicillin-induced bacteriolysis. *Archives of Microbiology* **141**: 315-324.
- 24) Giesbrecht, P., T. Kersten and J. Wecke (1992): Fan-shaped ejections of regularly arranged murosomes involved in penicillin-induced death of staphylococci. *J. Bacteriol.* **174**: 2241-2252.
- 25) Giesbrecht, P., T., Kersten, K. Madela, H. Grob, P. Blomel and J. Wecke (1993): Penicillin-induced bacteriolysis of staphylococci as a post-mortem consequence of murosome-mediated killing via wall perforation and attempts to imitate this perforation process. without applying antibiotics. New York: Plenum Press.
- 26) Giesbrecht, P., T. Kersten, H. Maidhof, D. Kroer, P. Blomel, H. Grob and J. Wecke (1994): A novel, "hidden" penicillin-induced death of staphylococci at high drug concentration, occurring earlier than murosome-mediated killing processes. *Arch. Microbiol.* **161**: 370-383.
- 27) Fischer, W. (1994): Lipoteichoic acids and lipopolysaccharides, p. 199-215. In J.M. Ghuyssen & R. Hakenbeck (Eds.), *Bacterial cell wall*, Elsevier Science B.V., Amsterdam.
- 28) Raychaudhuri, D. and A.N. Chattrjee (1985): Use of resistant mutants to study the interaction of Triton X-100 with *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **164**: 1337-1349.
- 29) 鈴木淳司 (1994) : メチシリン耐性黄色ブドウ球菌の薬剤耐性機序, Thesis 47-51.