

火落菌に関する研究 (第2報)

火落菌超薄切片の電子顕微鏡観察

深谷伊和男・山下 勝*・花市敬正**

1) 前報において、火落菌、特に真性火落菌は高い耐アルコール性と好アルコール性をもつことを示した。
 しかし、火落菌が何故このような性質を備えているのかという点に関しては、^{2), 3), 4)} まだあまり検討が行われていない。

本報では、火落菌の耐アルコール性、好アルコール性の問題との関連付けを目的として、火落菌と一般的な乳酸菌、代表的なグラム陽性菌およびグラム陰性菌の超薄切片を作製し、電子顕微鏡観察による比較を行い、火落菌菌体の構造的特徴を検討したのでその結果を報告する。

実 験 方 法

1. 供試菌株 火落菌は、真性火落菌 6 菌株、火落性乳酸菌 4 菌株を用い、比較対照の意味で一般的な乳酸菌 4 菌株、代表的なグラム陽性菌と陰性菌を 1 菌株づつ用いた。第 1 表には供試菌株リストを

第 1 表 供 試 菌 株

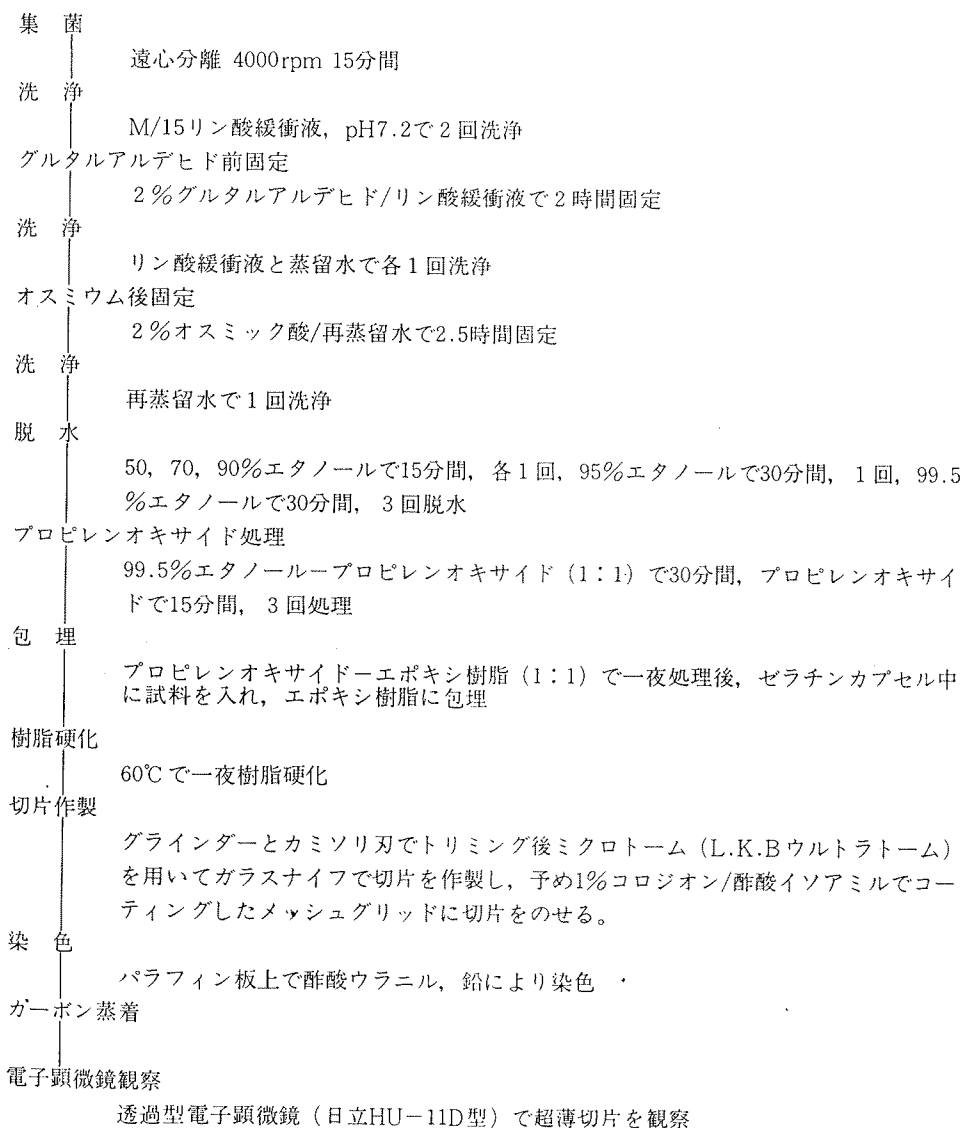
グループ	菌株 No.	学 名	
真性火落菌	ヘテロ発酵型	S-14	<i>Lactobacillus heterohiochii</i>
		S-20	"
		H-1	"
	ホモ発酵型	S-24	<i>Lactobacillus homohiochii</i>
		S-25	"
		S-33	"
火落性乳酸菌	ヘテロ発酵型	S-7	
		H-34	
	ホモ発酵型	S-4	
		H-7	
一般乳酸菌	ATCC 8014	<i>Lactobacillus arabinosus</i>	
	ATCC 7469	<i>Lactobacillus casei</i>	
	ATCC 9338	<i>Lactobacillus fermenti</i>	
	ATCC 8042	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	
一般細菌	グラム陽性	PCI 129	<i>Bacillus subtilis</i>
	グラム陰性	IAM 1006	<i>Pseudomonas fluorescens</i>

* 現在 名城大学農学部 ** 愛知県がんセンター (現在名古屋大学医学部)

示す。

2. 生育培地および培養方法 前報¹⁾に示したそれぞれの培地を用い、真性火落菌および火落性乳酸菌培地のエタノール濃度は5%に調整した。培養は試験管中で行い、真性火落菌乳酸菌は30℃、6日間、乳酸菌は30℃、3日間静置培養を行った。一般細菌は37℃、3日間振とう培養を行った。

3. 電子顕微鏡用観察用超薄切片の作製 培養菌体を遠心分離で集菌後第1図に示す方法で前固定、後固定、脱水、包埋、薄切、染色を行い、電子顕微鏡観察を行った。包埋用エポキシ樹脂の調製方法を第2表に示すが、本報の場合はNo.3の条件を用いた。染色液は2%酢酸ウラニル溶液と鉛溶液で染色⁵⁾を



第1図 電子顕微鏡観察用超薄切片の調製方法

行った。

第2表 エポキシ樹脂の組成

No.	Soft : Hard	成 分 (ml)			
		Epon812	DDSA*	MNA**	DMP-30***
1	3 : 7	9.7	3.7	6.6	0.3
2	4 : 6	9.4	5.0	5.6	0.3
3	5 : 5	9.0	6.5	4.5	0.3
4	6 : 4	8.8	7.4	3.8	0.3

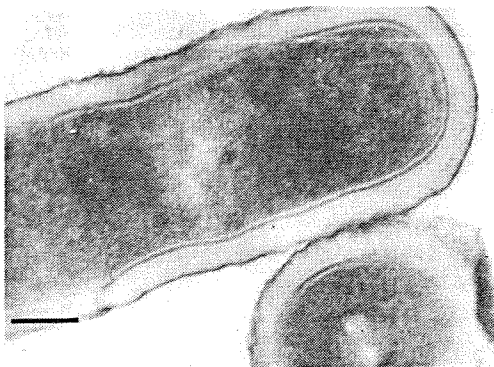
* Dodeceny succinic anhydride

** Methyl nadic anhydride

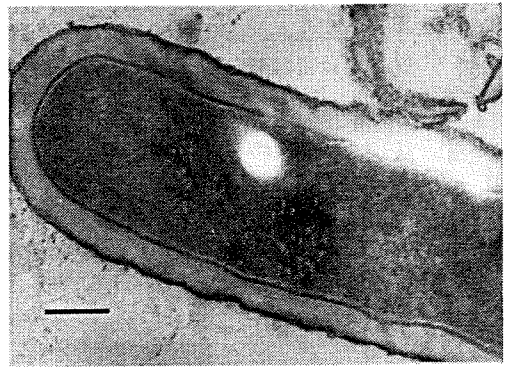
*** 2, 4, 6-Dimethylaminomethyl-phenol

実験結果および考察

電子顕微鏡観察の結果を第2図から第17図に写真で示す。ヘテロ発酵型真性火落菌 *L. heterohiochii* S-14を第2図に、S-20を第3図に、H-1を第4図に示す。ホモ発酵型真性火落菌 *L. homohiochii* S-24を第5図に、S-25を第6図に、S-33を第7図に示す。ヘテロ発酵型火落性乳酸菌 S-7を第8図に、H-34を第9図に、ホモ発酵型火落性乳酸菌 S-4を第10図に、H-7を第11図に示す。一般乳酸菌 *L. arabinosus* ATCC8014を第12図に、*L. casei* ATCC7469を第13図に、*L. fermenti* ATCC9338を第14図に、*Leuconostoc mesenteroides* ATCC8042を第15図に示す。代表的なグラム陽性菌 *B. subtilis* PCI 129を第16図に、グラム陰性菌 *Pseudomonas fluorescens* IAM1006を等17図に示す。

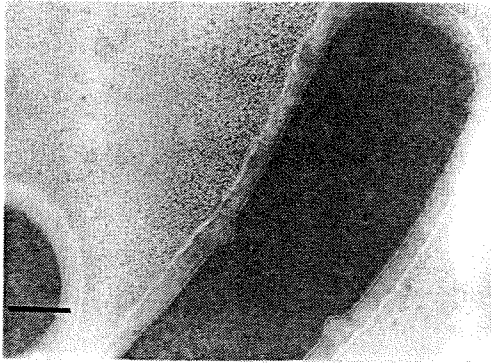


第2図 ヘテロ発酵型真性火落菌 *L. heterohiochii* S-14の電子顕微鏡写真

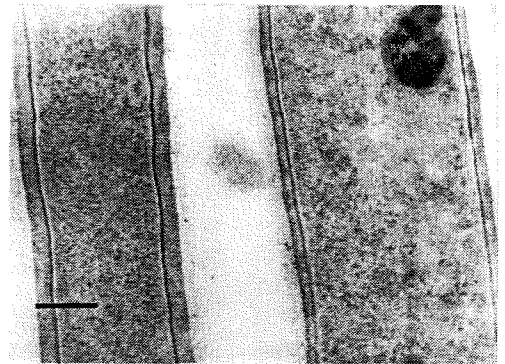


第3図 ヘテロ発酵型真性火落菌 *L. heterohiochii* S-20の電子顕微鏡写真

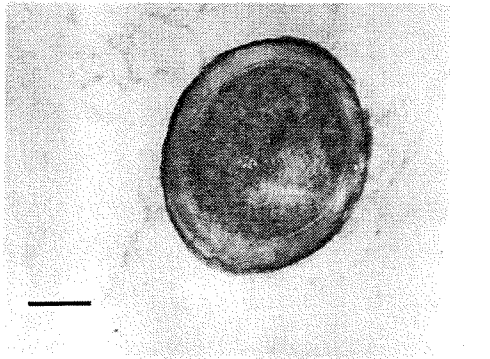
Scale mark : 2,000 Å, 第1図から第17図に共通



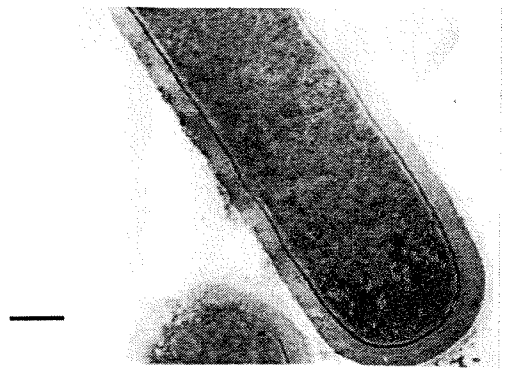
第4図 ヘテロ発酵型真性火落菌 *L. heterohiochii* H-1の電子顕微鏡写真



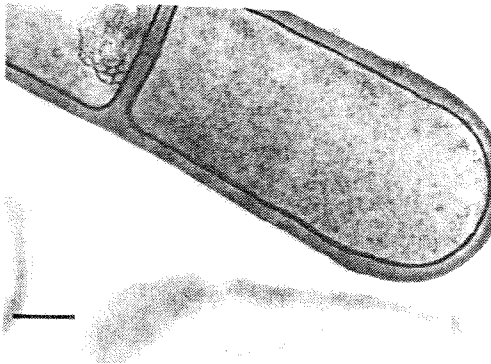
第5図 ホモ発酵型真性火落菌 *L. homohiochii* S-24の電子顕微鏡写真



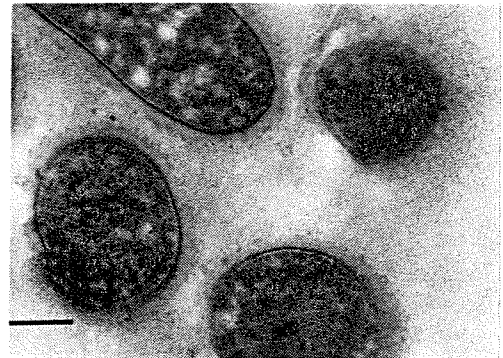
第6図 ホモ発酵型真性火落菌 *L. homohiochii* S-25の電子顕微鏡写真



第7図 ホモ発酵型真性火落菌 *L. homohiochii* S-33の電子顕微鏡写真



第8図 ヘテロ発酵型火落性乳酸菌 S-7の電子顕微鏡写真



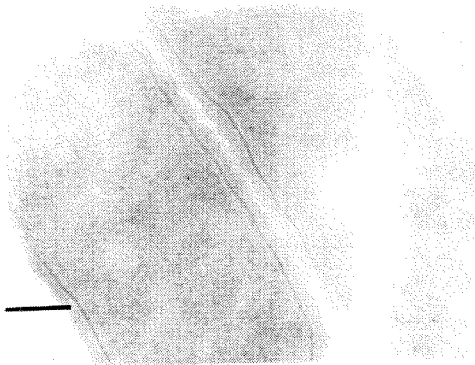
第9図 ヘテロ発酵型火落性乳酸菌 H-34の電子顕微鏡写真



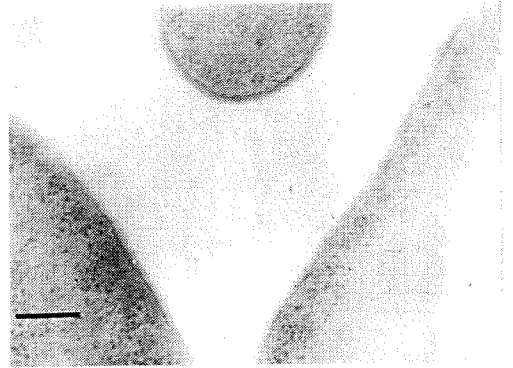
第10図 ホモ発酵型火落性乳酸菌 S-4 の電子顕微鏡写真



第11図 ホモ発酵型火落性乳酸菌 H-7 の電子顕微鏡写真



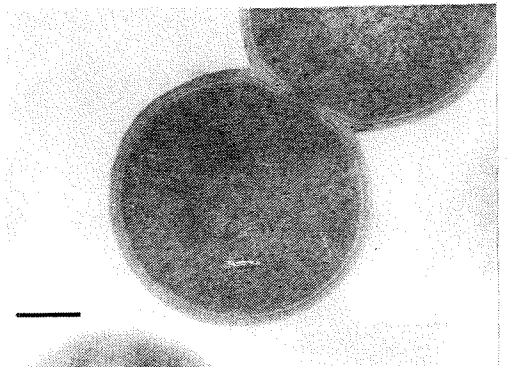
第12図 *L. arabinosus* ATCC 8014 の電子顕微鏡写真



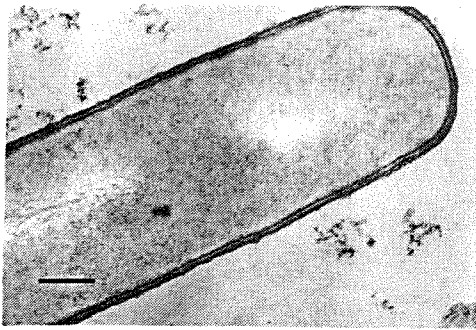
第13図 *L. casei* ATCC 7469 の電子顕微鏡写真



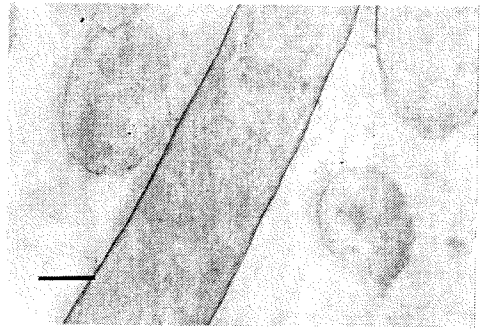
第14図 *L. fermenti* ATCC 9338 の電子顕微鏡写真



第15図 *Leuconostoc mesenteroides* ATCC 8042 の電子顕微鏡写真



第16図 グラム陽性細菌 *B. subtilis*
PCI129の電子顕微鏡写真



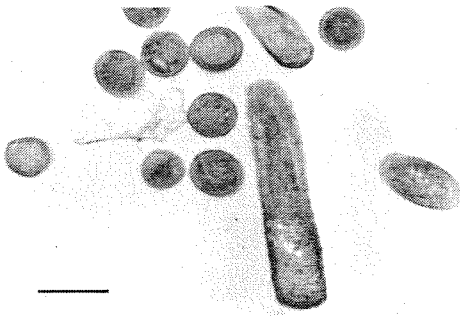
第17図 グラム陰性細菌 *Pseudomonas*
fluorescens IAM 1006の電子顕
微鏡写真

これらの写真を比較すると、菌体表層部分の厚さに差異が認められ、火落菌は一般的な乳酸菌あるいは細菌に比べて電子顕微鏡写真では電子密度の低い透明な部分が厚く、真性火落菌ではこの傾向が顕著であった。写真より、菌体表層部分の厚さをそれぞれの菌について測定すると第3表に示す結果となった。

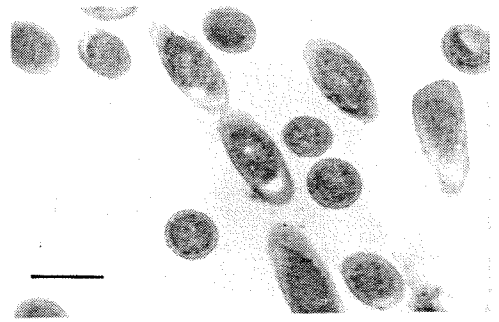
第18図と第19図には *L. heterohiochii* S-14と *L. homohiochii* S-25について、観察視野の広い低倍率の写真を示したが、これらの写真からも真性火落菌の菌体表層の厚いことが確認できた。

第3表 菌体表層部の厚さ

菌	株	菌体表層部の厚さ(Å)
ヘテロ発酵型真性火落菌	S-14	850-1,000
"	S-20	900-1,100
"	H-1	700- 800
ホモ発酵型真性火落菌	S-24	400- 600
"	S-25	600- 700
"	S-33	650- 750
ヘテロ発酵型火落性乳酸菌	S-7	450- 500
"	H-34	400- 450
ホモ発酵型火落性乳酸菌	S-4	400- 500
"	H-7	350- 400
<i>L. arabinosus</i>	ATCC 8014	350- 400
<i>L. casei</i>	ATCC 7469	200- 250
<i>L. fermenti</i>	ATCC 9338	300- 350
<i>Leuc. mesenteroides</i>	ATCC 8042	250- 350
<i>B. subtilis</i>	PCI 129	200- 250
<i>P. fluorescens</i>	IAM 1006	20- 30

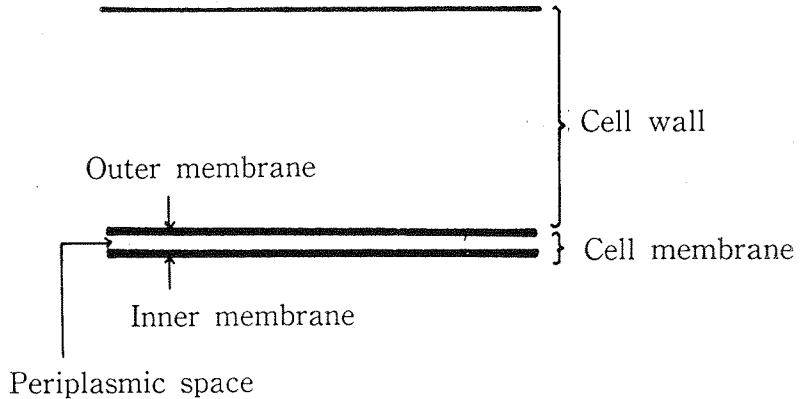


第18図 ヘテロ発酵型真性火落菌 *L. heterohiochii*
S-14の低倍率電子顕微鏡写真
Scale mark: 10,000 Å



第19図 ホモ発酵型真性火落菌 *L. homohiochii*
S-25の低倍率電子顕微鏡写真
Scale mark: 10,000 Å

通常グラム陽性菌は、*B. subtilis* (第16図) と *P. fluorescens* (第17図) の写真からもわかるように、グラム陰性菌に比べて厚い菌体表層部分をもつことが知られているが、電子顕微鏡写真で示されるグラム陽性菌の菌体表層部分のモデルは第20図のようであり、最外層は電子密度の低い透明な細胞壁部分であ



第20図 電子顕微鏡写真でみられるグラム陽性菌の菌体表層モデル

り、その内側に電子密度の異なる三層構造を示す細胞膜部分が存在すると考えられている。火落菌も乳酸菌もグラム陽性菌であるので、写真上で厚くみられる電子密度の低い部分は細胞壁に相当すると考えられる。

細胞壁は、浸透圧など物理的な外力に抗して、菌体細胞に一定の形態と強度を与える役割を果たしているが、van't Hoffの式にしたがってエタノール溶液の浸透圧を計算すると、10%溶液で約45atm、20%溶液で約90atmであり、非常に高い浸透圧となり、火落菌の厚い細胞壁は、このような高い浸透圧に対して菌体を保持するうえで何らかの役割を果たしているものと考えられる。

真性火落菌の細胞壁部分の厚さについては、谷川、梅津らは、*L. heterohiochii* H-1において、対数増殖期までは生育とともに厚さが増すこと、培地中のエタノール濃度が高くなるほど厚さが増すことを

報告している。

また百瀬らは⁷⁾リゾチーム処理で細胞壁を溶解してプロトプラストを作製する際に、真性火落菌は火落性乳酸菌に比べて長時間を要することを報告している。さらに真性火落菌をエタノールあるいは細胞壁構造に破壊的に作用することで知られるEDTAで処理すると、⁸⁾グルコース消費速度、乳酸脱水素酵素の活性が高まることを報告し、²⁾真性火落菌では細胞壁が物理的に栄養物の菌体内への到達を悪くしており、エタノールは細胞壁に作用してこの障害を除去するものと推定し、5-8%エタノール濃度で真性火落菌が示す好アルコール性について説明を与えている。

これらの報告はいずれも真性火落菌の細胞壁が厚いことを支持するものであり、厚い細胞壁は単に物理的な外力に抗して菌体を保持するだけでなく、真性火落菌の耐アルコール性、好アルコール性をはじめとする生理的な特徴とも深く関連しているものと考えられた。

今後は、火落菌、特に真性火落菌の細胞壁組成および構造について検討するとともに、細胞壁の生合成の面からの検討が必要と考える。特に生合成については、グラム陽性菌細胞壁の主成分であるムコペプチド生合成の際にキャリアーリピドとしてイソプレノイドアルコールが働き、このイソプレノイドアルコールはメバロン酸から生成されることがわかっている。^{9), 10), 11), 12)}真性火落菌はメバロン酸要求性を持つことで知られており、このことから真性火落菌の厚い細胞壁形成の問題とメバロン酸要求性との相互の関連づけが可能である。

要 約

火落菌として、真性火落菌 6 菌株、火落性乳酸菌 4 菌株を用い、比較対照として一般的乳酸菌 4 菌株、細菌 2 菌株を用いて、超薄切片を作製し、電子顕微鏡観察を行った。その結果、火落菌は細胞壁部分が厚く、特に真性火落菌では非常に厚いことが確認された。

終りに本研究を遂行するに当り、ご指導を賜りました愛知県がんセンター生物部、田中達也先生、山形貞子先生に深く感謝いたします。

文 献

- 1) 深谷伊和男, 山下 勝: 愛知食品工試年報, 23, 1 (1983)
- 2) 百瀬洋夫, 秋山裕一ら: 醸協, 66, 799 (1971)
- 3) T. Tanigawa and M. Umezu: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 25, 31 (1979)
- 4) 深谷伊和男, 山下 勝: 醸工大会講演要旨, 15 (1972)
- 5) T. Sato: *J. Electron Microsc.*, 17, 158 (1968)
- 6) 榑友彦, 湯浅俊美ら: 化学の基礎, 55 (1966)

- 7) H. Momose, E. Yamanaka et al : *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **20**, 179 (1974)
- 8) R. W. Jakson and J. A. Demoss : *J. Bacteriol.*, **90**, 1420 (1965)
- 9) M. Ishimoto, S. Minakami et al : *Metabolic maps, 3rd edition*, 12 (1968)
- 10) K. J. I. Thorne and E. Kodicek : *Biochem. J.*, **99**, 123 (1966)
- 11) K. J. I. Thorne : *J. Bacteriol.*, **116**, 235 (1973)
- 12) Y. Higashi, J. L. Strominger and C. C. Sweeley : *Proc., N. A. S.* **57**, 1878 (1967)