

# 細菌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

鹿児島大学歯学部 口腔細菌学講座

## Cell Wall Autolysis in Gram-Positive Bacteria —with special reference to the physiological role—

Toshihiko Monodane

Department of Microbiology, Kagoshima University  
Dental School, Kagoshima 890, Japan

### Abstract

It is well-known that cellular autolysis is caused by enzymatic degradation of cell walls, and the enzyme(s) responsible for the autolysis is indispensable for the growth of bacterial cells. In fact, however, there are many autolytic-defective bacteria for which we can hardly observe cellular autolysis.

How can bacteria lacking the indispensable autolytic mechanisms survive and maintain their existence? Another question is why susceptibilities to autolysis can change during the growth phase, i.e., from the autolysable log phase cells to the non-autolysable stationary phase cells. It is strongly suggested that there must be inactivation mechanism(s) of the autolytic enzymes which have lost their physiological roles and become rather harmful to the bacteria themselves.

In accordance with this reasoning, the existence of two kinds or phases of autolytic enzymes, "a physiological autolytic enzyme" and "a useless autolytic enzyme," was assumed. The former is the indispensable enzyme for bacterial growth, and the latter is the harmful one which has completed its physiological role and should be inactivated. Autolytic bacteria are those which can not inactivate the "useless autolytic enzyme" effectively, and autolytic-defective bacteria are those which have an effective inactivating mechanism for the "useless autolytic enzyme."

### Key words

autolysis, physiological role, cell wall, gram-positive bacteria, *M. luteus*

## I. はじめに

グラム陽性菌とグラム陰性菌は細胞壁の構造が異なりペプチドグリカン含量も大きく異なるので、同じに論じ難い点がある。ここではグラム陽性菌の自己融解現象に限った。

さて細菌を一定容量の液体培地に接種し、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、Fig. 1 のようないわゆる増殖曲線が

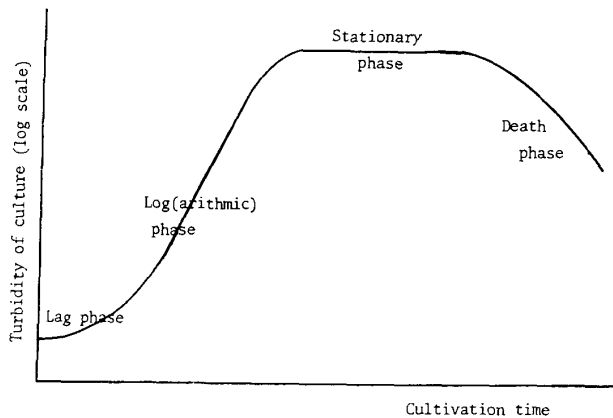


Fig. 1. Growth curve of bacteria.

得られる。ここ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、特に対数期の菌体が示す自己融解現象を取り上げたものである。

## II. 細菌の自己融解現象<sup>1)-9)</sup>

溶菌現象 (bacteriolysis) 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ない現象である。溶菌という現象—通常は菌懸濁液 (培養や集落を含む) 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—は関与する因子の起源からみて2つに分けられる。1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<sup>10)</sup>。それに対して物理的・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 (ペプ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<sup>11)</sup>。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、この定義が現在でも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、i) 単離した細胞壁にも自己融解現象が観察されること、ii) ムレイン (ペプチドグリカン) がすべての細菌細胞壁の構築成分であること、iii) 蔗糖溶液中で自己融解を起こさせるとプロトプラスト或いはスフェロプラストが生成すること、iv) それまでに作用点が明ら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実験事実があった。

静止期の後の死滅期の自己融解現象に対して、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、といった細菌に限らず全生物に共通のやや哲学的な疑問が投げかけられるが、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ないものでもない。ところがここに取り上げた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じてくる。『対数期の菌体を適当な緩衝液中に懸濁し適温に保つと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が知られている。この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難いのはどうしてなのか、自分自身の死につながりか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。これら従来の研究は全て、今でもそうであるが、最も増殖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、形質転換における受容能力 (competence) の獲得、細胞外毒素の分泌、細胞外酵素の分泌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いう想定のもとに進められてきた。

細胞壁自己融解酵素という用語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

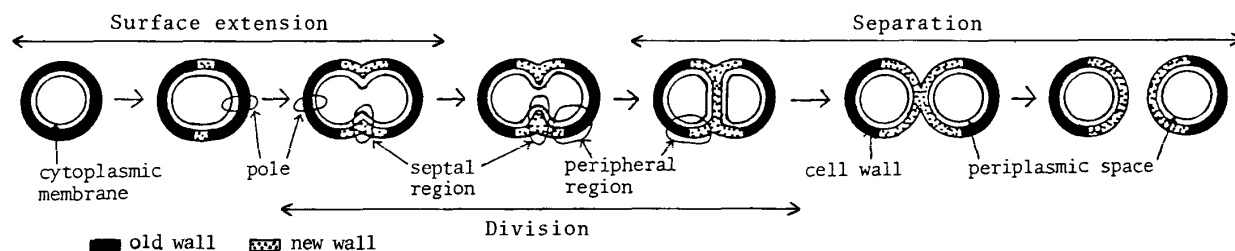


Fig. 2. Growth cycle of gram-positive monococci.

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用語である。しかし細胞壁自己融解酵素は、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（あるいは果たしていた、または果たすはずであった）と考えられる。ここでは細胞壁自己融解が観察され難い菌（され難い場合）にも細胞壁自己融解酵素という用語を用いたが、本来の生理機能が不明のうに別の用語を用いると混乱や誤解が生じるので、細胞壁自己融解酵素という用語で統一した。

細菌細胞の増殖 (Fig. 2) に果た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る。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：ペプチドグリカンの生合成に関する研究からペプチドグリカンの単位モノマー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担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：*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に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。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。iii) 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。ついでながら分裂を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。iv) 分離のためのペプチドグリカンの切断：例えば自己融解能を欠いた*Bacillus licheniformis* の変異株が長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-アラニンアミダーゼを持っていることから、この酵素が分離の役割を担っていることが示唆されている。v) 加水分解酵素が合成反応を行う可能性：*Streptomyces* 属の数種類の菌株より単離されたD-アラニル-Dカルボキシペプチダーゼがトランスペプチレーションを行うことが報告されている。又鶏卵白リゾチーム (N-アセチルムラミダーゼ) がトランスグリコシダーゼ作用を持っていることもよく知られている。したがって細胞壁自己融解酵素であるペプチドグリカン加水分解酵素がペプチドグリカンの生合成に何らかの役割を果たしている可能性が考えられている。以上5つの可能性が細胞壁自己融解酵素の増殖に果たす生理的役割として考えられる。ただし一つの酵素がいくつもの役割を兼ねているのか、一つの役割に何種類の酵素が関与しているのか、などの疑問については今までになされた研究からは適確な解答を得難い。

さてここに今まで触れられていないが重要な問題が残されている。それはこれら細胞壁自己融解酵素がその生理的役割を果たし終え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こしにくくなることが知られている。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か、また対数期の菌体についても自己融解現象の認め難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いのか。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

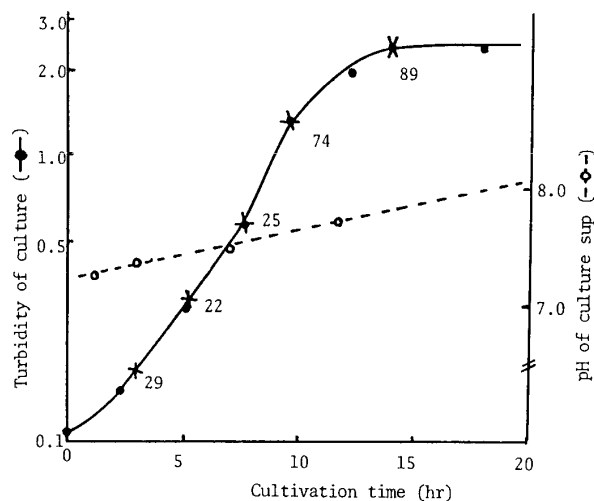


Fig. 3. Dependence of cellular autolysis on growth phase. The cells harvested at the growth phase marked with X were incubated in the autolyzing buffer at 37°C. Figures near the mark "X" show % residual turbidity after a 16 hr incubation.

細菌の存在は考えられない。ならば何故自己融解が観察され難いのか。私がこの実験を開始した十数年前までこれらの疑問に言及した報告は見られなかった。私が行った実験からこれらの疑問に一つの答えが見い出された。その実験について簡単に述べる。

### Ⅲ. *Micrococcus luteus* の自己融解

当時 *Micrococcus luteus* 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<sup>12)</sup>があったに過ぎない。その後同じく NCTC 2665 株の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<sup>13)</sup>が出たが、対数期菌体の自己融解について全く触れていなかった。micrococci は非病原性とされているが日和見感染の可能性も無視できないとされている。type species である *M. luteus* は鶏卵白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球菌であり、よく知られよく利用されている菌の一つである。その細胞壁はペプチドグリカンとそれに共有結合したタイクロン酸の二種類の高分子物質より成り立っており、それらの構造・生合成もよく研究されている。複雑な形態や組成の細胞壁をもつ他の菌の基礎的実験モデルとして適している。

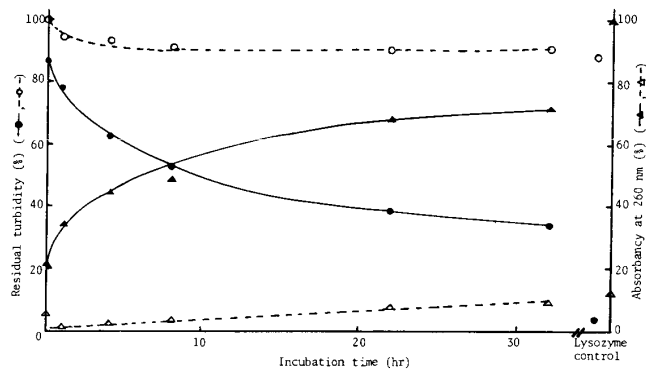


Fig. 4. Time course of the development of osmotic fragility of log phase cells. Log phase cells were incubated in 1.2 M buffered sucrose at 37°C. Two aliquots of the suspensions were taken out at various time intervals. One of them was diluted with 1.2 M sodium chloride solution (----) and the other was with deionized water (—). Turbidity of both diluted samples was measured, and the samples were centrifuged. The absorbancy of supernatant fluids was measured at 260 nm.

以下 A ~ G の実験は type strain である *M. lysodeikticus* (*luteus*) IFO 3333 についてのものである<sup>14), 15)</sup>。

#### A. 増殖相と自己融解能

Fig. 3 に見られるように、対数期の菌はよく自己融解を起こしたが静止期に入ると殆ど自己融解を起こさなくなった。これは細菌の増殖と自己融解との間に何らかの関係があることを示している。Fig. 3 以下 autolyzing buffer とは 0.01 M pH 7.5 のリン酸ナトリウム緩衝液である。

#### B. 蔗糖加緩衝液中での自己融解

Fig. 4 は対数期菌体の示す自己融解が細胞壁の溶解によることを示している。すなわち 1.2 M 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細胞壁の自己融解の結果、露出した細胞質膜が細胞内部の高浸透圧に抗しきれず破裂したと考えられる。

なお保温 0 時間で濁度ならびに上清の紫外吸収が一致しないのは保温 0 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。この点は先にも述べたが特に細胞壁を研究材料とする者は注意

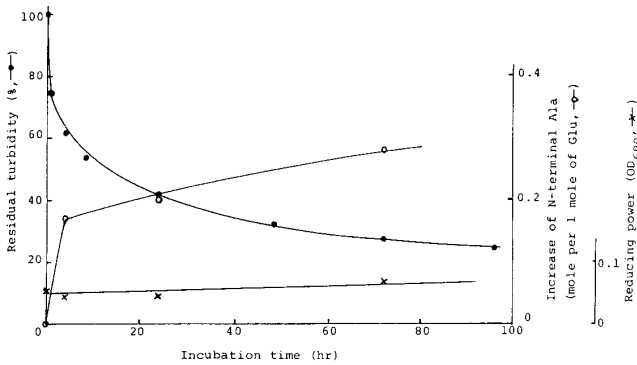


Fig. 5. Analyses of the terminal groups liberated by autolysis of the cell walls isolated from the log phase cells. The cell walls were incubated in the autolyzing buffer at 37°C. At time intervals aliquots were withdrawn to measure OD<sub>550</sub>, to determine the reducing power and to determine N- or C-terminal amino acids. There was no significant increase in either N-terminal Glu, Gly and Lys or C-terminal Ala, Glu, Gly and Lys during the incubation.

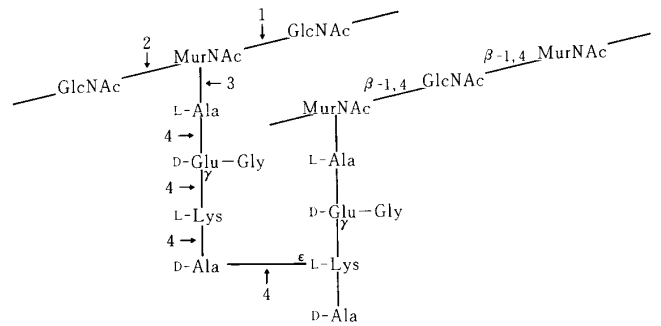


Fig. 6. Primary structure of peptidoglycan in *M. luteus* and possible bond(s) hydrolyzed by the autolytic enzyme(s). Arrows 1, 2, 3 and 4 indicate the sites of action of endo-N-acetylmuramidase, endo-N-acetylglucosaminidase, N-acetylmuramyl-L-alanine amidase and of endopeptidases, respectively.

を払わねばならない。得た菌や細胞壁が既に自己融解酵素の作用を受けていて元の細胞壁の構造を保持していないかもしれない。

C. 単離した細胞壁の自己融解

対数期菌体より調製した細胞壁の自己融解の程度は対数期の全菌のそれに比し弱い。Fig. 5はこの自己融解に関与しているのはN-アセチルムラミル-L-アラニンアミダーゼであることを示している (Fig. 6 参照)。

D. 全菌の自己融解に及ぼすトリプシンの影響

Fig. 7は細胞表面に存在する細胞壁自己融解酵素活性がトリプシンにより抑制され、その結果細胞壁の剛性が保持され細胞質の漏出が抑えられたことを示している。

E. トリプシン加培地での培養と自己融解

Fig. 8は培地に加えたトリプシンが増殖曲線には影響を与えず対数期菌体の自己融解能を抑えたことを示している。グラム染色性や形態 (Fig. 9, 当学部中研の走査型電子顕微鏡で一昨年撮り直したものである) にも変化は見られなかった。

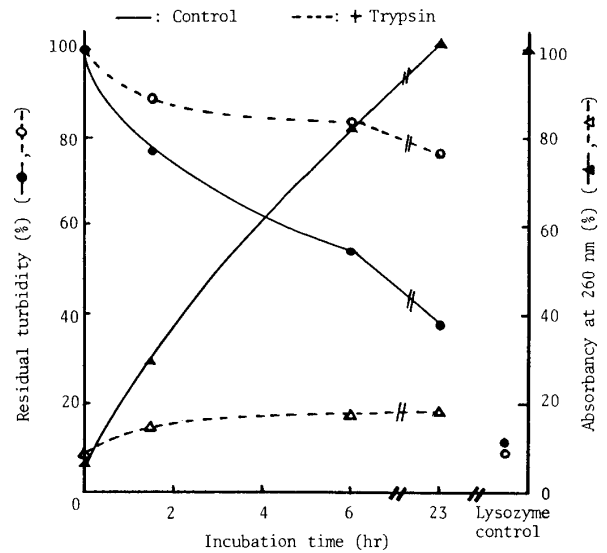


Fig. 7. Effect of trypsin on the cellular autolysis and leakage of cytoplasmic materials of log phase cells. Log phase cells were incubated in the autolyzing buffer with trypsin at 37°C. At time intervals, the turbidity and ultraviolet absorbancy of the supernatant fluid were measured.

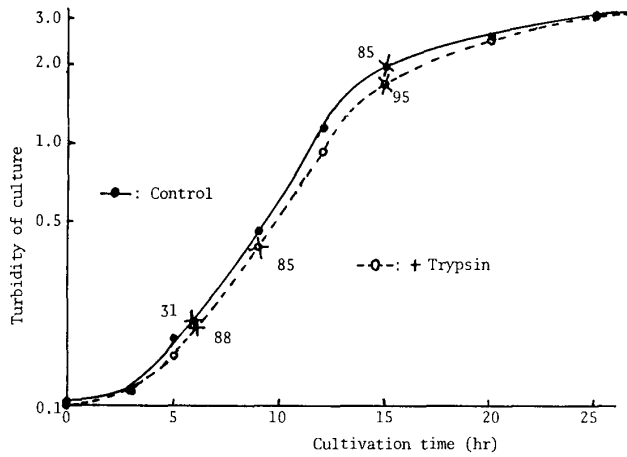


Fig. 8. Effect of addition of trypsin to the culture medium on growth curve and autolytic ability. The experimental procedures were the same as those in Fig. 3.

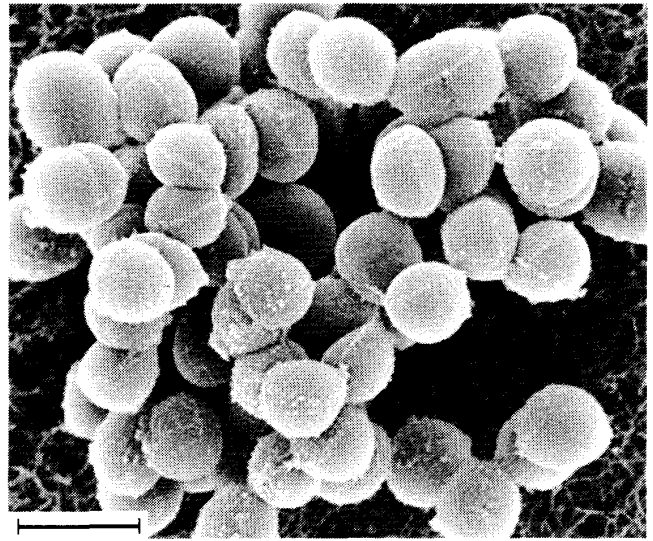


Fig. 9. *M. luteus* IFO 3333 seen under a scanning electron microscope. The cells occur singly, in pairs and in irregular clusters. The newly exposed surfaces of the cells were smoother than the old surfaces. No discernible morphological changes were observed on the cells in the culture medium either in the presence or absence of externally added trypsin. The bar represents 1  $\mu$ m.

Table 1. Chemical compositions and terminal group analyses of cell walls<sup>a)</sup>

Components <sup>b)</sup>	Hydrolysis		Hydrolysis after FDNB-treatment		Hydrazinolysis	
	LCW <sup>c)</sup>	SCW <sup>d)</sup>	LCW	SCW	LCW	SCW
Mur	0.88	0.82	0.68	0.62	—	—
GlcN	0.99	1.02	0.84	0.85	—	—
Glu	1.00	1.00	1.00	1.00	[1.00]	[1.00]
Gly	1.05	1.05	0.94	0.92	0.95	0.98
Ala	2.00	1.91	1.56	1.64	0.18	0.14
Lys	0.96	1.13	0.28	0.29	0.41	0.51
Hexose [Glucose]	1.36	1.21				
Phosphorus [Organic]	0.42	0.38				
Glu contents <sup>e)</sup>	0.49	0.52				
Yield <sup>f)</sup>	40	36				

<sup>a)</sup> Values are expressed in molar ratios to the total glutamic acid residue.

<sup>b)</sup> Other ninhydrin positive materials detected were negligibly small.

<sup>c)</sup> Cell walls prepared from the log phase cells.

<sup>d)</sup> Cell walls prepared from the stationary phase cells.

<sup>e)</sup>  $\mu$  mole of glutamic acid per mg of lyophilized cell walls.

<sup>f)</sup> Yield (mg) of lyophilized cell walls prepared from 1 g of wet cell.

#### F. トリプシン加培養により抑制された自己融解能の回復

トリプシン加培養により自己融解能の抑制された対数期菌体をトリプシンを含まない新しい培地で洗浄し、一部をトリプシンを含まない培地に植え再び培養した。こうして対数期に達した菌体は自己融解能を回復しており、autolyzing bufferに保温13時間後の残存濁度は50%だった。

#### G. 細胞壁の化学分析

Table. 1 は対数期菌体及び静止期菌体より調製した細胞壁の間でペプチドグリカン構成成分、タイクロン酸のグルコースを反映していると思われるヘキソース、ペプチドグリカンとタイクロン酸の結合部に存在するとされる有機リン含量に有意差のないことを示している。さらに両者のグリカン鎖の長さ、 $700\text{ cm}^{-1}$ から $4,000\text{ cm}^{-1}$ の赤外吸収スペクトルにも差はみられなかった。加うるに両者の鶏卵白リゾチームに対する感受性にも差はなかった。これらは対数期菌体と静止期菌体でペプチドグリカンの構造に差のないことを示していると考えられ、静止期菌体が自己融解を起こし難いのはペプチドグリカンの構造が変化したことによるものではなく、自己融解酵素活性が変化したことによるものと考えられる。

#### H. 考察

Eに述べたようにトリプシンを加えて培養することにより増殖曲線・形態・グラム染色性には全く変化を与えず、対数期菌体の自己融解が抑えられた。このことは一見自己融解と増殖とが無縁なことを示すようだが、次の解釈も可能である。すなわち対数期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、既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用済みの細胞壁自己融解酵素により引き起こされ、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全く影響が見られないのであると解釈できないだろうか。すべての細菌細胞は細胞壁自己融解酵素を持っており、その生理的役割を終えた放置すれば非常に危険な存在である自己融解酵素を何らかの機序により不活性化する機構が存在するのではないだろうか。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不要な細胞壁自己融解酵素によって引き起こされるものと考えられる。この解釈と関連あると思われる報告がいく

つかある。micrococci<sup>16),17)</sup>や*Streptococcus*<sup>18)</sup>において細胞表層に蛋白質分解酵素が存在することが報告されているが、原著者らはこれらの酵素は培地から栄養を取り入れるための消化酵素だと考えている。さらに*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)の持つ三種類の細胞壁自己融解酵素のうちの一つが、親株(一種類の細胞壁自己融解酵素をもつ)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<sup>19)</sup>。原著者はこの実験事実の意義を詳しく議論していないが細胞外蛋白質分解酵素を欠く変異株に3種類の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、前述の説によれば無理なく説明できよう。また*Bacillus subtilis* 168WTの変異株*Cbl-1*はゆっくりと自己融解を起こすが、その対数期菌体より調製した細胞壁は蛋白質分解酵素活性を持っているという<sup>20)</sup>。現在かなり多くの菌種で細胞壁自己融解現象が報告されているが、菌種・菌株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、加うるにその特異性(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る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のだと考えれば納得できるように思われる。

さてこの実験に用いたIFO 3333株とは別のNCTC 2665株については対数期菌体・静止期菌体ともに自己融解は認め難かった。このNCTC 2665株が自己融解を起こしたという報告があること、IFO 3333株も継代を重ねると次第に自己融解を起こしにくくなる傾向にあることを考えると、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うまく行われて不必要な自己融解を起こさない菌が淘汰を免れて生き残る可能性が大きいと考えられる。

#### IV. おわりに

*M. luteus*の自己融解に関する報告はその後見られないが、対数期菌体より調製した細胞質膜と細胞壁がペプチドグリカン生合成に関与しているN-アセチルムラミル-L-アラニンアミダーゼ活性を含んでいる

という報告がある<sup>21)</sup>。

自己融解酵素の制御(活性化)に関する注目すべき報告としては、永年にわたって *Streptococcus faecalis* と *Streptococcus pneumoniae* を供試菌として実験している2つのグループによる報告がある<sup>22)-24)</sup>。全菌や細胞壁の自己融解がその菌から抽出したりポタイコ酸や他の脂質により阻害され、脱アシル化されたりポタイコ酸によっては阻害されない。静止期では脱アシル化されたりポタイコ酸が培養上清に多量に検出されるという。これらはリポタイコ酸の脂質部分が自己融解酵素活性に関与していることを示している。リポタイコ酸が自己融解酵素の活性を阻止しており、自己融解酵素がその生理機能を発揮すべき時にはリポタイコ酸が脱アシル化され、その結果自己融解酵素が活性化され、そして脱アシル化されたりポタイコ酸は細胞外へ放出されると考えられている。しかしながらリポタイコ酸の脂質部分は細胞質膜内にあり、タイコ酸部分が細胞壁内にあるとされている。自己融解酵素の働く場所は細胞壁内である。細胞質膜内にあるリポタイコ酸の脂質部分が、どのように細胞壁内の自己融解酵素を制御するのかまた機能を発揮した後の自己融解酵素はどうなるのか今後説明を要する点である。

*S. faecalis* を実験材料としているグループは自己融解酵素が前駆体として存在し、機能を発揮すべき時には細胞質内に存在するトリプシン様の蛋白質分解酵素により活性化されるという考えも捨てていない<sup>25)</sup>。

すべての細菌がいろいろな機能を担った数種類の特異性の異なった細胞壁自己融解酵素を持っていると考えられる。それらが異なった機構で制御されていることは充分考えられる。細胞壁自己融解酵素の制御機構に関する研究はかなり進展したがまだ説明されるべく残されている部分が多い<sup>9), 26), 27)</sup>。

ついでながらペニシリン等の $\beta$ -ラクタム系抗生物質(細胞壁合成阻害剤)やファージによる溶菌にも自己融解酵素が関与しているようである<sup>9), 27)-32)</sup>。ペニシリンによる溶菌はペニシリンが細胞壁ペプチドグリカンの生合成を阻害することによるのみでなく、ペニシリンがリポタイコ酸と自己融解酵素の結合を解き自己融解酵素を活性化することにもよるのだという。対数期菌体に自己融解の観察される菌の対数期培養にペニシリンを添加すると濁度が減少するが、自己融解の観察され難い菌では濁度が減少しない。すなわちペニシリンによる細胞壁生合成阻害は静菌的であり、自己融解酵素が殺菌的に働くのだと考えられている。

自己融解の観察され難い菌であろうと静止期菌体

(静止期培養にペニシリンを添加しても濁度は減少しない)であろうと、すべての細菌は何らかの細胞壁自己融解酵素をもっていると考えられる。これらの潜在的自己融解酵素を働かせうる薬剤の開発は基礎的研究(例えばプロトプラストの調製)にも応用的研究(例えば病気の治療)にも新たな道を開くことが期待される。

引用文献は特に関係あるもの、近年の重要なものと総説に限った。

### 引 用 文 献

- 1) Weidel, W. & Pelzer, H.: Bagshaped macromolecules-A new outlook on bacterial cell walls. *Advan. Enzymol.* 26, 193-232, 1964
- 2) Ghuysen, J. M.: Use of bacteriolytic enzymes in determination of wall structure and their role in cell metabolism. *Bacteriol. Rev.* 32, 425-464, 1968
- 3) Rogers, H. J.: Bacterial growth and the cell envelope. *Bacteriol. Rev.* 34, 194-214, 1970
- 4) Ghuysen, J. M. & Shockman, G. D.: Chap. 2, Biosynthesis of peptidoglycan., In: *Bacterial Membranes and Walls*, L. Leive, Ed. 37-130, Marcel Dekker, Inc., New York, 1973
- 5) Glaser, L.: Bacterial cell surface polysaccharides. *Ann. Rev. Biochem.* 42, 91-112, 1973
- 6) Tipper, D. J.: Chap. 3, Bacterial cell walls., In: *Subunits in Biological Systems, Part B (Biological Macromolecules Vol. 8)*, G. D. Fasman & S. N. Timasheff, Ed. 121-346, Marcel Dekker, Inc., New York, 1973
- 7) Shockman, G. D., Daneo-Moore, L. & Higgins, M. L.: Problems of cell wall and membrane growth, enlargement, and division. *Ann. New York Acad. Sci.* 235, 161-197, 1974
- 8) Slater, M. & Schaechter, M.: Control of cell division in bacteria. *Bacteriol. Rev.* 38, 199-221, 1974
- 9) Rogers, H. J., Perkins, H. R. & Ward, J. B.: The bacterial autolysins., In: *Microbial Cell Walls and Membranes*, 437-460, Chapman and Hall Ltd., London, 1980
- 10) Welsch, M.: Lysis by agents of microbial origin. *J. Gen. Microbiol.* 18, 491-497, 1958
- 11) Stolp, H. & Starr, M. P.: Bacteriolysis. *Ann. Rev. Microbiol.* 19, 79-104, 1965
- 12) Mitchell, P. & Moyle, J.: Autolytic release and osmotic properties of 'protoplasts' from *Staphylococcus aureus*.



- J. Gen. Microbiol. 16, 184-194, 1957
- 13) Owen, P. & Freer, J. H.: Isolation and properties of mesosomal membrane fractions from *Micrococcus lysodeikticus*. Biochem. J. 129, 907-917, 1972
  - 14) Monodane, T., Matsushima, Y., Hirachi, Y. & Kotani, S.: Cell wall autolysis in log phase cells of *Micrococcus lysodeikticus* (*luteus*). Microbiol. Immunol. 22, 57-66, 1978
  - 15) Monodane, T., Matsushima, Y. & Kotani, S.: Demonstration of the physiological role of autolysis by a comparative study with a wild-type and its non-autolytic mutant of *Micrococcus lysodeikticus* (*luteus*) cultivated with externally added proteolytic enzymes. Microbiol. Immunol. 22, 67-80, 1978
  - 16) McDonald, I. J.: Location of proteinase in cells of a species of *Micrococcus*. Can. J. Microbiol. 8, 785-794, 1962
  - 17) Sarner, N. Z., Bissell, M. J., DiGirolamo, M. & Gorini, L.: Mechanism of excretion of a bacterial proteinase: Demonstration of two proteolytic enzymes produced by a *Sarcina* strain (coccus P). J. Bacteriol. 105, 1090-1098, 1971
  - 18) Thomas, T. D., Jarvis, B. D. W. & Skipper, N. A.: Localization of proteinase(s) near the cell surface of *Streptococcus lactis*. J. Bacteriol. 118, 329-333, 1974
  - 19) Brown, W. C. & Young, F. E.: Dynamic interactions between cell wall polymers, extracellular proteases and autolytic enzymes. Biochem. Biophys. Res. Commun. 38, 564-568, 1970
  - 20) Heijenoort, J. van, Menjon, D., Flouret, B., Szulmajster, J., Laporte, J. & Baltelier, G.: Cell wall of a teichoic acid deficient mutant of *Bacillus subtilis*. Eur. J. Biochem. 20, 442-450, 1971
  - 21) Jensen, S. E. & Campbell, J. N.: Amidase activity involved in peptidoglycan biosynthesis in membranes of *Micrococcus luteus* (*sodonensis*). J. Bacteriol. 127, 319-326, 1976
  - 22) Höltje, J. -V. & Tomasz, A.: Lipoteichoic acid: A specific inhibitor of autolysin activity in pneumococcus. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 72, 1690-1694, 1975
  - 23) Cleveland, R. F., Höltje, J. -V., Wicken, A. J., Tomasz, A., Daneo-Moore, L. & Shockman, G. D.: Inhibition of bacterial wall lysins by lipoteichoic acids and related compounds. Biochem. Biophys. Res. Commun. 67, 1128-1135, 1975
  - 24) Cleveland, R. F., Daneo-Moore, L., Wicken, A. J. & Shockman, G. D.: Effect of lipoteichoic acid and lipids on lysis of intact cells of *Streptococcus faecalis*. J. Bacteriol. 127, 1582-1584, 1976
  - 25) Pooley, H. M. & Shockman, G. D.: Relationship between the latent form and the active form of the autolytic enzyme of *Streptococcus faecalis*. J. Bacteriol. 100, 617-624, 1969
  - 26) Shockman, G. D. & Barrett, J. F.: Structure, function, and assembly of cell walls of gram-positive bacteria. Ann. Rev. Microbiol. 37, 501-527, 1983
  - 27) Microbial Cell Wall Synthesis and Autolysis (Proceedings of a Symposium by FEMS, 1984), C. Nombela, Ed. Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam, 1984
  - 28) Rogers, H. J. & Forsberg, C. W.: Role of autolysins in the killing of bacteria by some bactericidal antibiotics. J. Bacteriol. 108, 1235-1243, 1971
  - 29) Tomasz, A.: The mechanism of the irreversible antimicrobial effects of penicillins: How the beta-lactam antibiotics kill and lyse bacteria. Ann. Rev. Microbiol. 33, 113-137, 1979
  - 30) Shockman, G. D., Daneo-Moore, L., Cornett, J. B. & Mychajlonka, M.: Does penicillin kill bacteria? Rev. Infec. Dis. 1, 787-796, 1979
  - 31) Rogers, H. J., Perkins, H. R. & Ward, J. B.:  $\beta$ -Lactam antibiotics: the penicillins and cephalosporins., In: Microbial Cell Walls and Membranes, 326-369, Chapman and Hall Ltd., London, 1980
  - 32) Garcia, E., Rojo, J. M., Garcia, P., Ronda, C., Lopez, R. & Tomasz, A.: Preparation of antiserum against the pneumococcal autolysin; inhibition of autolytic activity and some autolytic process by the antibody. FEMS Microbiol. Lett. 14, 133-136, 1982