

Pseudomonas aeruginosa 脂質組成の 細胞壁欠落にともなう対応変化

岡山大学医学部細菌学教室（主任：金政泰弘教授）

内 藤 伸 明

（昭和58年2月22日受稿）

Key words: *P. aeruginosa*, Spheroplast,
L-form, lipid composition,
Cardiolipin

緒 言

細菌が最外層の細胞壁を欠落して生育しているためには、その内層の細胞膜に何らかの対応変化が生じているのであろうことは容易に推測される。黄色ブドウ球菌の場合には、壁欠落にともない、細胞膜の脂質組成が変化し、同時に元来発現していないコレステロール合成系が発現していることが示されている¹⁻³⁾。これらの変化は、ブドウ球菌が硬い細胞壁を欠落すると、その表層構造の補強を細胞膜で代償していると考えられる。グラム陰性桿菌の場合は、細胞壁の外層に外膜を有しており、また細胞膜脂質組成はグラム陽性菌とは異っているため、ブドウ球菌の場合と同等には考え難い。

Pseudomonas aeruginosa は土中、污水、人の皮膚等に広く常在するグラム陰性桿菌である。かつ環境適応力が強く、しかも元来弱病原性菌であるにもかかわらず、近時化学療法剤の普及と共に菌交代症の主役として現今のグラム陰性菌感染症の主要原因菌の一つになってきている⁴⁾。その理由として *P. aeruginosa* は多くの壁合成阻害剤に対し自然耐性であることと、効果のある高濃度の壁合成阻害剤などで壁合成を阻害ないし欠落しても生育することにあると考えられる。しかしその反面 *Pseudomonas* の壁欠落菌、すなわち L 型菌はあまり分離されておらず、またその性状も不明な点が多い⁵⁻⁹⁾。そこで本研究では、*Pseudomonas* が細胞壁を欠落する過程に

おいて、細胞膜構成の脂質成分が如何に変化するかを調べた。その目的のためスフェロプラスト、不安定 L 型菌の分離を試み、その脂質組成変化を検討し、*Pseudomonas* の環境適応性の一面を解明しようと試みた。

材料および方法

I. 供試菌と培養方法

菌は *Pseudomonas aeruginosa* IFO-3455 株（以下親株と略す）を供試した。培養は普通ブイヨン（日水製薬）（以下 N 培地と略す）と 4 % NaCl と 0.5 % イースト・エキストラクト（Difco Laboratories）を含むブレイン・ハート・インフュージョン（Difco Laboratories）（以下 L 培地と略す）の 2 種類を用いた。大量培養には、 $\frac{1}{100}$ 接種で、強振盪しながら 37°C で 5 時間（N 培地中）または 7 時間（L 培地中）培養した。集菌は 12,000 × g 10 分間の遠沈でおこない、冷生理食塩水または 4 % NaCl 添加 0.05 M リン酸緩衝液で 2 回洗滌した。

II. スフェロプラストの作成

N 培地で培養した親株菌を、後期対数増殖期（O.D. 650nm = 1.2）で集菌し、Osborn の方法¹⁰⁾でスフェロプラスト化した。スフェロプラスト形成は位相差顕微鏡で確認し、90 % 以上スフェロプラスト化した菌液を 12,000 × g 20 分間の遠沈で集菌した。

III. L 型菌の誘導

上記の方法で分離したスフェロプラストの 0.1 ml を 10 % 馬血清、0.5 M 蔗糖および 0.5 % イース

ト・エキストラクトを添加したブレイン・ハート・インフュージョン (BHI) 培地に1%の寒天 (和光純薬) を加えた平板培地 (以下 LSC 培地と略す) に接種し, 30 μ g carbenicillin (CBPC) 含有 disk を置き, 37°Cでガス・バック法 (BBL) により嫌氣的に培養した。培養10日目に disk 周辺のコロニーを選び, LSC 培地で上記と同様の方法で継代し, 更に7日間培養した。再び disk 周辺に生育したコロニーを選択し, CBPC 500 μ g/ml (Gripenin: 藤沢薬品) を添加した LSC 培地で好氣的に継代培養を重ねた。8代目継代時に典型的L型菌コロニーを認めるようになり, 9代目より CBPC 2mg/ml を含む LSC 培地で継代し, これを不安定L型菌とした。このL型菌は, LSC 培地から継代的に馬血清を漸減除去すると4代目から無血清培地で充分育成し, 前記L培地にも馴化増殖した。膜脂質分析のための供試菌はこの血清無添加L培地で培養したものを用いた。また培養は微弱振盪し, 好氣的におこなった。なおこのL型菌はCBPC を含まない培地で培養すると, 10~14日後には全て親株に復し, 生化学的特性は全て親株と一致した。

IV. 脂質の抽出および分析

集菌した湿菌量の20倍量の chloroform/methanol (2/1, V/V) 混液で3回 (1回目, 2時間, 2回目, overnight, 3回目, 3~4時間) 抽出して粗脂質を得, これを Folch 静置法にて精製した¹¹⁾。中性脂質およびリン脂質は Unisil (100~200 mesh, clarkson 社) のカラムクロマトグラフィー (1 $\times$ 15cm) により, 分別抽出した。リン脂質の分析は二次元薄層クロマトグラフィー (Silicagel. G, Merck 社) (以下 TLC と略す) によった。一次元展開は chloroform/methanol/H₂O (65/25/4, V/V/V), 二次元展開は chloroform/methanol/7N-NH₄OH (60/35/4.5, V/V/V) で行った¹²⁾。リン脂質の定量は Kates 法¹³⁾でおこない, 相対含量はP比で表わした。中性脂質画分は TLC 上で petroleum ether/diethyl ether/ acetic acid (82/18/3, V/V/V) 系により展開し, 標準物質との R_f 値により同定した²⁾。L型菌においては全菌の脂質分析以外に膜分画の脂質分析を行った。

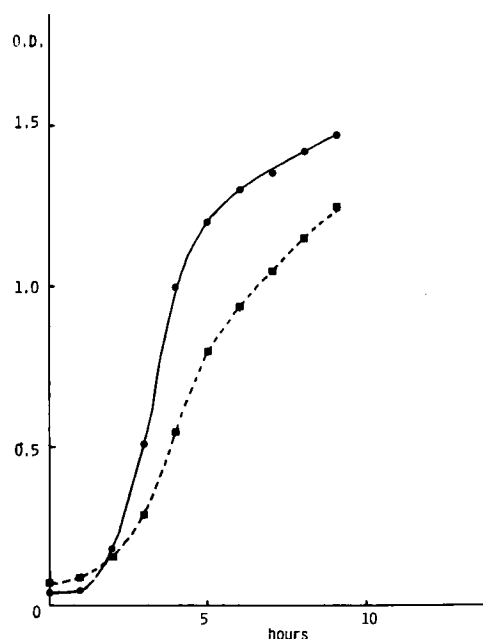


図1) *Pseudomonas aeruginosa* IFO-3455 の増殖曲線 N培地, L培地に1%接種, 37°Cで振盪培養

●—● N-broth
■—■ L-broth

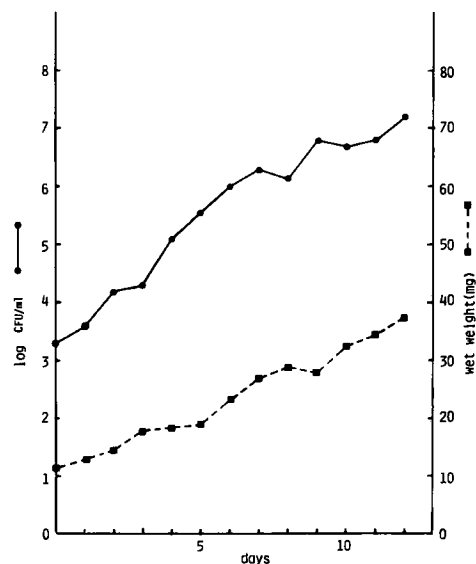


図2) *Pseudomonas aeruginosa* IFO-3455 より分離したL型菌の増殖曲線 2mg/ml CBPC 加L培地で37°C, 弱振盪培養

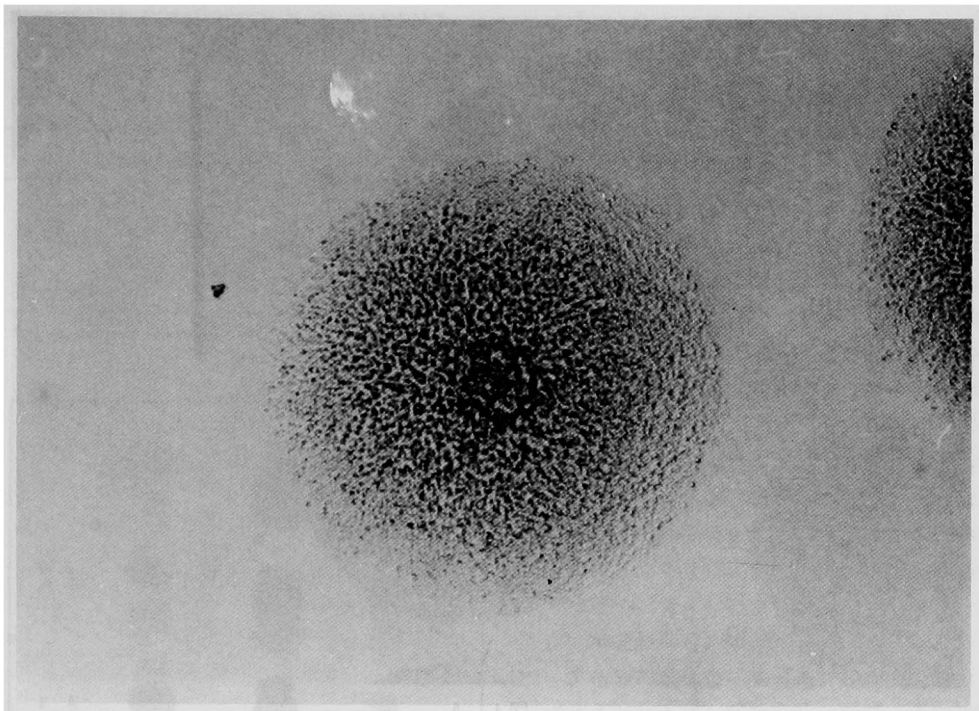


図3) *Pseudomonas aeruginosa* IFO-3455 より分離したL型菌のコロニー形態
倒立位相差顕微鏡×40で撮影

L型菌膜分画は前処置として全菌を10mMリン酸緩衝液 (PH 7.4) で低張処理の後, 10分間超音波処理 (海上電機, 19.5 KHz) を行った。DNase, RNase 処理後 $15,000 \times g$ 10分間で残存菌体を除去し, $170,000 \times g$ 30分間で得た沈渣を膜分画とした。膜分画からの脂質の抽出および分析は全菌の場合と同様に上記の方法に従った。

V. 脂肪酸の分析

Unisil カラムクロマトグラフィーにより分別抽出したリン脂質画分を TLC で分画精製し, 各リン脂質を塩酸メタノール法でエステル化した脂肪酸メチルエステルを, ガスクロマトグラフ (Hitachi K53 GLC, FID) を用いて同定, 相対量を定量した。脂肪酸の同定はガスクロマトグラフにおいて標準物質との保持時間 (retention time) の比較とマススペクトロメトリー (Shimadzu GCMS-9020 OF, CI-EI) によった。

VI. 電顕観察

菌体を0.1M リン酸緩衝液 (PH 7.4) で調製

した2.5%グルタルアルデハイドと2%四酸化オスミウムで固定し, エタノール系脱水後, 酸化プロピレン置換し, エポン812に包埋した。超薄切片はPoter-Blum MT-2B ウルトラミクロトームにて作製し, 2%酢酸ウラニウム, Reynold のクエン酸鉛による電子染色を行った。電子顕微鏡は日立 H-500型 (加圧電圧75KV) により観察した。なおL型菌の場合は, 固定操作までは浸透圧調整のため4% NaCl を添加した。

結 果

1. 増殖曲線と形態変化

図1に親株の増殖曲線を示した。親株は4% NaCl を添加した高塩培地にもよく増殖し, N培地, L培地共に O.D. が1.2の対数増殖期のものを実験に供した。一方L型菌の増殖は親株に比較し非常に緩慢であるが, 血清無添加培地でも十分に増殖した。しかし浸透圧調整剤のNaCl を含まない培地では増殖は見られなかった。

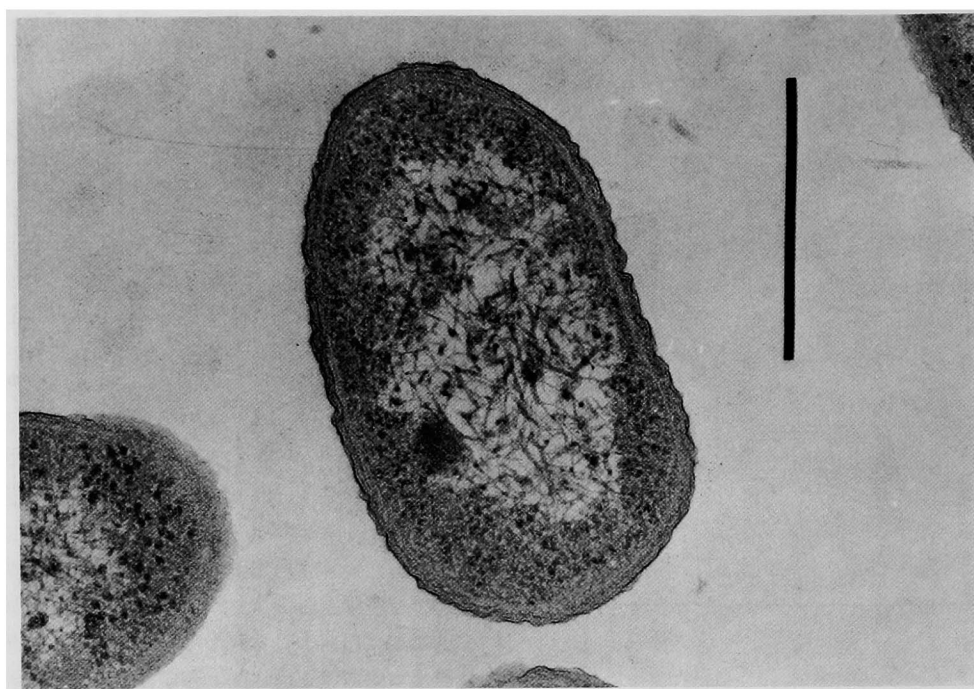


図 4, A

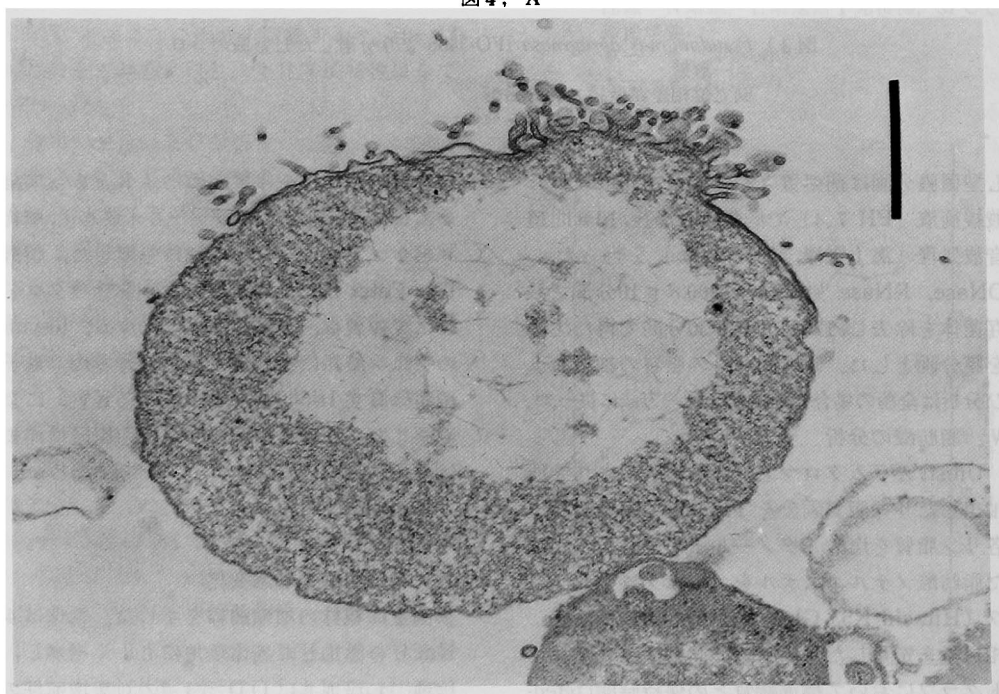


図 4, B

図 4) 培養後の超薄切片電子顕微鏡像 ($\times 40,000$ で撮影, 押入スケール $0.5\mu\text{m}$)
2.5%グルタルアルデヒド, 2%オスミック固定, エポン包埋, 酢酸ウ
ラニウム, クエン酸鉛による後染色
A: 親株菌液体培地で5時間培養
B: L型菌液体培地で6日間培養

表1 LIPID COMPOSITION OF PARENT, SPHEROPLAST AND L-FORM OF *P. aeruginosa*

	Parent (N-broth)	Parent (L-broth)	Spheroplast	L-form
Phospholipids	92.9	89.4	86.5	71.5
Neutral lipids	3.2	8.6	10.8	23.2
Glycolipids	3.9	2.0	2.7	5.3

Data were expressed as percentage of total extracted lipid fraction

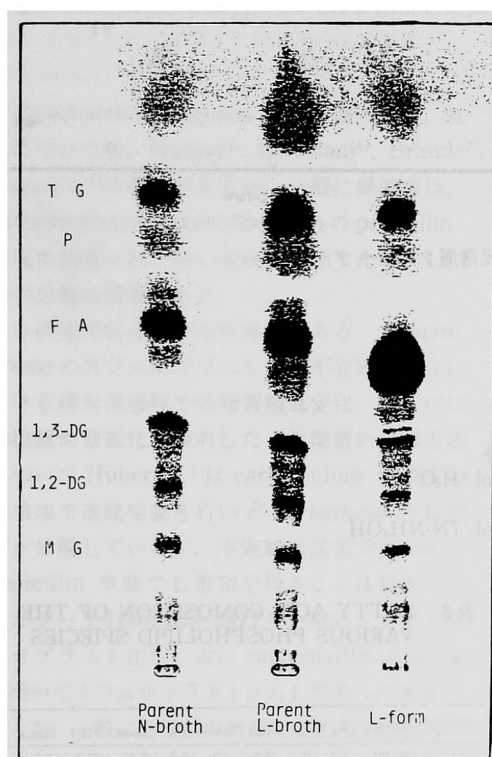


図5) 親株菌とL型菌の中性脂質の一次元薄層クロマトグラフィー

TG : triglycerides

P : Pigment

FA : fatty acids

DG : diglycerides

MG : monoglycerides

Silica Gel G 薄層クロマトプレート

展開 : 一次元 petroleum ether / diethyl ether / acetic acid (82 :

18 : 3, V/V/V)

図2にL型菌のCBPCを含むL培地での増殖曲線を示した。コロニー形成単位 (C.F.U.), 湿重量

ともに1%接種量で12日間測定を行った。C.F.U.では接種時 $2 \times 10^3/\text{ml}$ が12日目に $1.6 \times 10^7/\text{ml}$ まで増殖した。また湿重量でも12日目まで漸次増加傾向をとっていた。なお分析用供試菌にはL型菌としてもっとも安定に生育している6日目のものも供試した。

図3にL型菌のL培地上でのコロニー形態を示した。特有な freid egg 状のコロニーを呈していることがわかる。親株とこのL型菌の電子顕微鏡像を図4に示した。親株は $0.5 \sim 0.6 \times 1.5 \mu\text{m}$ の桿状を呈し、外膜、細胞壁、内膜の構造が確認され、細胞内構造も一定性を示している。L型菌は球状多形性を呈し、細胞壁は完全に欠落しており、一部外膜が残存しているがほとんどの部分は細胞膜が露出していた。菌体内構造は親株と比較しリボゾーム、核酸の密度が粗で核域の拡大を認めた。

II. 構成総脂質の変化

N培地の親株菌、L培地の親株菌、スフェロプラストおよびL型菌のリン脂質、中性脂質、糖脂質の含有比を表1に示した。

親株菌は総脂質の92.9%がリン脂質であるが、L型菌ではリン脂質は71.5%で中性脂質が23.2%に相対的に増加していた。糖脂質は含量も少ないが4者の間に著明な差は認められなかった。またL型菌の膜分画においてはリン脂質70.8%、中性脂質21.0%、糖脂質8.2%であり、L型菌全菌との差異は認められなかった。

III. 中性脂質の分析

図5に親株菌とL型菌の中性脂質のTLCパターンを示した。図からも明らかな如くL型菌ではFatty acidの増加がみられ、その他のTriglyceride等には著明な変化は認められなかった。

IV. リン脂質組成

親株菌とL型菌のリン脂質の二次元TLCパターンを図6に示し、各成分比を表2に示した。N培地での親株菌ではPhosphatidyl-ethanolamine (PE)が72%で主体を占め、以下Phosphatidylglycerol (PG)が15%、Cardiolipin (CL)が8%、Phosphatidylcholine (PC)が4%である。4% NaClを含むL培地ではCLが18%に増加し、PEは相対的に61%に減少して

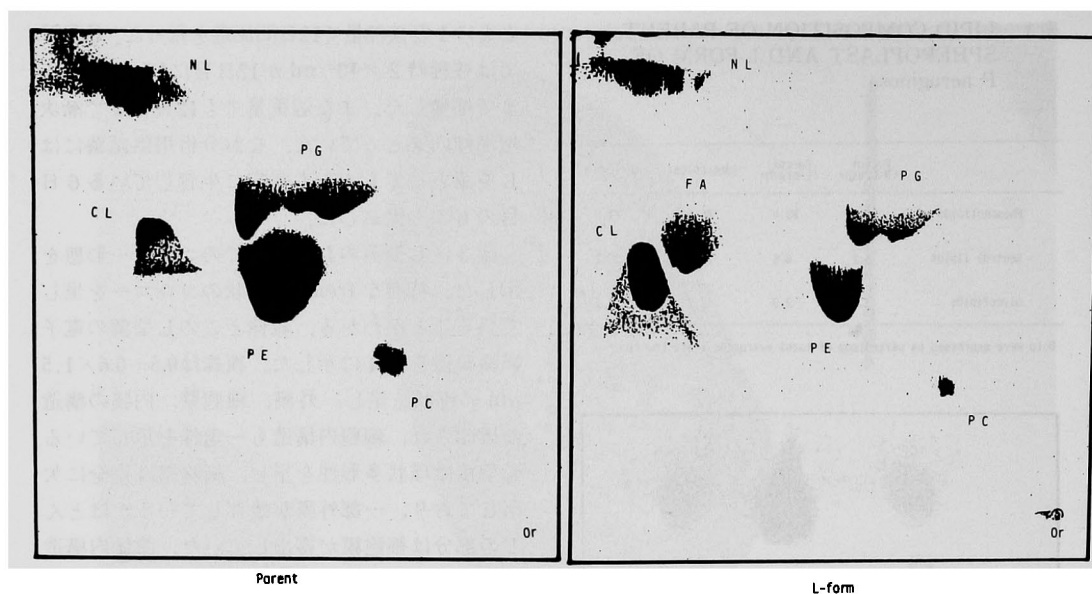


図6) 親株菌とL型菌のリン脂質の二次元薄層クロマトグラフィー

Or : 原点

PE : Phosphatidylethanolamine

PG : Phosphatidylglycerol

CL : Cardiolipin

PC : Phosphatidylcholine

FA : fatty acid

NL Neutral lipid

Silica Gel G 薄層クロマトプレート

展開 : 一次元 chloroform/methanol/H₂O

(65 : 25 : 4, V/V/V)

二次元 chloroform/methanol/7N-NH₄OH

(60 : 35 : 4.5, V/V/V)

表2 PHOSPHOLIPID COMPOSITION OF Parent, spheroplast and L-FORM OF *P. aeruginosa*

Phospholipids	Parent (H-broth)	Parent (L-broth)	Spheroplast	L-form
Cardiolipin	8	18	13	27
Phosphatidylethanolamine	72	61	72	53
Phosphatidylglycerol	15	16	12	12
Phosphatidylcholine	4	3.7	2	5
Origin	1	1.3	1	3

Data were expressed as percentage of phosphorus in total phospholipids.

表3 FATTY ACID COMPOSITION OF THE VARIOUS PHOSPHOLIPID SPECIES

Phospholipids	Strains	C ₁₄	C ₁₆	C _{16:1}	C _{17:0}	C ₁₈	C _{18:1}	C _{18:2}	C _{19:0}
PE	Parent	1.6	36.1	22.2	0.4	0.3	N.D.	39.3	N.D.
	L-form	2.2	44.7	8.1	3.2	1.6	5.6	29.7	4.2
CL	Parent	1.2	33.9	18.8	N.D.	1.7	N.D.	44.2	N.D.
	L-form	2.5	34.2	5.0	2.8	3.4	9.8	32.2	9.4
PG	Parent	1.1	38.8	20.1	N.D.	N.D.	N.D.	39.9	N.D.
	L-form	2.9	60.4	8.3	2.1	0.6	0.6	25.1	N.D.
PC	Parent	1.2	43.2	16.1	N.D.	N.D.	N.D.	39.4	N.D.
	L-form	1.5	49.5	13.3	1.0	2.3	1.0	27.5	2.1

Values were expressed as %

いる。スフェロプラストはPEが72%でCLは13%であるが、L型菌ではCLが27%に増加し、PEは逆に53%に減少している。CL含量はまたL型菌の継代によっても異なり、表に示した結果は継代32代目の菌であるが、25代目ではCL

は16%、45代目のものでは34%までCLが増加しており、不安定L型菌の継代代数によりCLが増加する傾向を示した。

又CLの増加はリン脂質内相対的増加のみではなく絶対量においても増加している。

なおデータには示していないが、L型菌の膜分画より得られたリン脂質組成は全菌から得られたものとまったくかわらなかったことを強調しておく。

V. 脂肪酸分析

親株とL型菌の各リン脂質の主たる構成脂肪酸の分析結果を表3に示した。L型化にともない主たるリン脂質であるPE, CL, PGにおいてC_{16:1}およびC_{18:1}の不飽和脂肪酸が減少する傾向があり、前者において特にその傾向は顕著であった。また特異な現象として親株にはほとんど認められなかったC_{17:cyc}, C_{19:cyc}, C_{18-OH}が出現した。

考 察

Pseudomonas aeruginosa のL型菌の分離、性状については、Hubert⁵⁾, Bertolani⁶⁾, Braude⁷⁾, Kagan ら⁸⁾の報告があるが、一般に緑膿菌は、carbenicillin, sulbenicillin, 以外の penicillin 系抗生物質に対し強い抵抗性を示すため、L型菌の分離は困難である。

本研究ではグラム陰性桿菌である *P. aeruginosa* のスフェロプラスト化、不安定L型化における膜欠落過程での脂質組成変化、ならびに細胞膜形態変化を検討した。L型菌の分離方法について Hubert ら⁵⁾は carbenicillin 加濃度勾配培地で連続培養を行い *P. aeruginosa* のL型菌を分離しているが、本実験供試菌では carbenicillin 単独でL型菌を得ることは難かしく、したがって lysozyme-EDTA を用いてまずスフェロプラスト化し、次に carbenicillin 添加培地を用いてスフェロプラストからL型菌への誘導を行った。一般にL型菌の誘導には浸透圧調整剤、血清、壁合成阻害剤等が必要とされるが、本実験では10%馬血清加BHI培地に浸透圧調整として0.5M蔗糖、ならびに carbenicillin を添加し嫌氣的に培養を行いL型菌の分離を行った。また細胞壁欠落にともないL型菌はこわれ易く、特に機械的刺激に弱い¹⁴⁾。しかしL培地に適応した後の液体培養においては、静置培養では増殖が悪いため、微弱振盪し好氣的に培養を行わざるを得なかった。

本研究での脂質分析には *P. aeruginosa* の親株、スフェロプラストおよびL型菌の全菌を用いた。この三者の脂質分画においてL型菌の中

性脂質が増加していた。細菌の脂質はほとんど膜中にのみ存在していると考えられるが、このL型菌で増加している中性脂質がすべて膜中に存在するものか否かを、L型菌の膜を分離し分析を行った。その結果、膜分画と全菌からの脂質分画に差は認められなかった。したがって親株、スフェロプラストおよびL型菌の全菌から抽出して得た脂質の分析結果はすなわち膜の脂質組成を反映していると考えられる。

P. aeruginosa は元来弱い耐塩性を有しているが、本実験に用いたL培地は4% NaCl を含んでいる。L培地で生育した菌はNaCl を含まないN培地で生育したものに比べて、表2に示した如くCLが相対的に増量している。これは黄色ブドウ球菌に認められた耐塩性変化と類似しており、その意義は黄色ブドウ球菌で示されたものと同じであろう¹⁵⁾。

P. aeruginosa がスフェロプラスト化またはL型化するにともない膜リン脂質組成変化はCLの増加であり、特にL型化での増加は著しい。しかもL型菌を継代するほど著明になり、またそれと併行してL型菌の親復帰率は低下する。その相関性やメカニズムの解明にはさらに詳細な研究が必要である。グラム陽性のブドウ球菌では、PGとCLが膜脂質の主体を占め、それがL型化すると、PGがCLに転換し、CLが50%以上占めるようになることが報告されている³⁾。*P. aeruginosa* の場合は、グラム陰性菌の共通の性質としてPEが主体を占め、CL, PGは少量しか認められない。しかもCLが増加してもPEが相対的に減少していた。この代謝経路については更に検討を加える必要があろう。しかし現実にはCLが増量していることは、示差熱測定法による相転移点の高温シフトに示された如く、CLがL型菌の膜の硬さの補強をしているとみられる¹⁶⁾。一方リン脂質構成脂肪酸のL型化における変化をみると、C_{16:1}が減少し、C_{16:0}がある程度増加するとともにシクロプロパン脂肪酸も増加が認められた。C_{16:0}等の飽和脂肪酸の増加においても相転移点の高温シフトがおこるが、このシクロプロパン脂肪酸に関しては相転移点の高温シフトをおこす¹⁷⁾、もしくは関与しない¹⁸⁾という報告もあり、相転移に対する影

響は明らかでないが、シクロプロパン脂肪酸では相転移点を低下させることはないと思われる。したがって膜リン脂質構成脂肪酸の変化においてもある程度膜の硬さの補強を行っているものと考えられる。またL型菌でも同様に *Proteus mirabilis* で C₁₇cyc, C₁₉cyc が増えるという報告もあるが¹⁹⁾、*P. aeruginosa* の親株菌でも長期培養により同様の現象がみられる²⁰⁾ことから、このシクロプロパン脂肪酸の増加がL型化にいかなる生理的意義をもつかは今後の問題として追求が必要と思われる。

結 語

親株より不安定L型菌の分離、誘導には、carbenicillin, 10%馬血清, 浸透圧調整剤として0.5M蔗糖の三者を用い嫌気的条件下にて施行した。親株のリン脂質は膜脂質組成中92.9%を占めているのに対し、L型菌では71.5%でリン脂

質中 CL は親株に対し約20%まで増加していた。また CL の相対量は継代にともない増加し、逆にL型菌の親復帰率は減少をきたした。またL型菌の脂肪酸組成では C_{16:1}が減少し、C_{16:0}の増加と、特異的に C₁₇cyc, C₁₉cyc, C₁₈-OH を認めた。このような CL の増加や、脂肪酸組成の変化はL型菌が細胞壁の補償手段として膜の硬さを補強し、自ら生物学的な環境適応反応を起こしているものと考えられた。

謝 辞

本研究の遂行にあたり御指導を賜りました金政泰弘教授、香川医科大学林英生教授、岡部昭延助教授に深く謝意を表します。また本実験の直接指導をいただいた細菌学教室の友近健一講師、平井義一助手、狩山玲子助手に厚く御礼申し上げます。

(本研究の一部は第35回中四国細菌学会で報告した。)

文 献

1. Okabe, A., Hirai, Y., Hayashi, H. and Kanemasa, Y.: Alteration in phospholipid composition of *Staphylococcus aureus* during formation of autoplast. *Biochem. Biophys. Acta* **617**, 28—35, 1980.
2. Hayami, M., Okabe, A., Sasai, K., Hayashi, H. and Kanemasa, Y.: Presence and synthesis of cholesterol in stable *Staphylococcal* L-forms. *J. Bacteriol.* **140**, 859—863, 1979.
3. Hayami, M., Okabe, A., Kariyama, R., Abe, M. and Kanemasa, Y.: Lipid composition of *Staphylococcus aureus* and its derived L-forms. *Microbiol. Immunol.* **23**, 435—442, 1979.
4. Buchanan, R.E. and Gibbons, N.E.: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8th Ed., The Williams and Wilkins Company, Baltimore, pp. 221—222, 1974.
5. Hubert, E.G., Potter, C.S., Hensly, T.J., Cohen, M., Kalmanson, G.M. and Guze, L.B.: L-form of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect. Immun.* **4**, 60—72, 1971.
6. Bertolani, R., Elberg, S.S. and Ralstone, D.: Variations in properties of L-form of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect. Immun.* **11**, 180—192, 1974.
7. Braude, A.I., Siemienski, J. and Lee, K.: Spheroplasts in human urine. In *Microbial Protoplasts, Spheroplasts and L-form*, ed. L.B. Guze, The Williams and Wilkins Co., Baltimore, pp. 372—378, 1968.
8. Kagan, B.M.: Role of L-forms in *Staphylococcal* infection. In *Microbial Protoplasts, Spheroplasts and L-form*, ed. L.B. Guze, The Williams and Wilkins Co., Baltimore, pp. 372—378, 1968.
9. Yamamoto, A. and Homma, J.Y.: L-form of *Pseudomonas aeruginosa*. An effective method for the production of stable L-forms. *Jpn. J. Exp. Med.* **48**, 219—226, 1978.
10. Osborn, M.J., Gander, J.E., Parisi, E. and Carson, J.: Mechanism of assembly of *Salmonella typhimurium*. Isolation and characterization of cytoplasmic and outer membrane. *J. Biol. Chem.* **247**, 3962—3972, 1972.
11. Folch, J., Lee, M. and Stanley, G.H.S.: A simple method for the isolation and purification of total

- lipids from animal tissues *J. Biol. Chem.* **226**, 497—509, 1957.
12. Rouser, G., Kritchevsky, G. and Yamamoto, G.: *Lipid Chromatographic Analysis*. Dekker Inc., New York, pp. 99—162, 1967.
 13. Kates, M., Allison, A.C. and James, A.T.: Phosphatides of human blood cells and their roles in spherocytosis. *Biochim. Biophys. Acta* **48**, 571—582, 1961.
 14. Mcquillen, K.: Bacterial protoplasts growth and division of *Bacillus megaterium*. *Biochim. Biophys. Acta* **18**, 458—461, 1955.
 15. Kanemasa, Y., Katayama, T., Hayashi, H., Takatsu, T., Tomochika, K. and Okabe, A.: The barrier role of cytoplasmic membrane in salt tolerance mechanism in *Staphylococcus aureus*. *Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt., Suppl.* **5**, 189—201, 1976.
 16. 狩山玲子, 平井義一, 友近健一, 林 英生, 金政泰弘: 壁欠落にともなう細胞膜リン脂質変動の物性論的検討. *Proc. J.C.B.L.* **23**, 66—69, 1981.
 17. McGarrity, J.T. and Armstrong, J.B.: The effect of salt on phospholipid fatty acid composition in *Escherichia coli* K-12. *Biochim. Biophys. Acta* **398**, 258—264, 1975.
 18. Cronan, J.E.Jr., Reed, R., Taylor, F.R. and Jackson, M.B.: Properties and biosynthesis of cyclopropane fatty acids in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **138**, 118—121, 1979.
 19. Gmeiner, J., Kroll, H.P. and Martin, H.H.: Membrane composition of the cell-wall-less protoplast L-form of *Proteus mirabilis*. In *Spheroplasts Protoplasts and L-forms of Bacteria*. ed. J. Roux, INSERM, Paris, **65**, pp. 175—184, 1976.
 20. Hancock, I.C. and Meadow, P.M.: The extractable lipids of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochim. Biophys. Acta* **187**, 366—379, 1969.

**Lipid composition of the unstable L-form
derived from *Pseudomonas aeruginosa* IFO 3455.**

Nobuaki NAITO

Department of Microbiology

Okayama University Medical School.

(Director: Prof. Y. Kanemasa)

The effects of removing the cell wall on the lipid composition of the plasma membrane of Gram-negative *Ps. aeruginosa* were examined, and compared with the effects observed with Gram-positive bacteria like *S. aureus* (Hayami et. al. Microbiol. Immunol. 23(6), 1979). The L-form, which was derived from *Ps. aeruginosa* IFO 3455 by treatment with EDTA-lysozyme, was comprised of 71.5% phospholipids(PL), 5.3% glycolipids(GL) and 23.2% neutral lipids(NL). The phospholipids included phosphatidylethanolamine (PE), cardiolipin(CL), phosphatidylglycerol(PG), and phosphatidylcholine(PC) at the relative concentrations of 53, 27, 12, and 5%, respectively.

In comparison with the bacterial form, neutral lipids and CL content was higher in the L-form, but PE was lower. Fatty acid analysis showed that the L-form contained more C16 saturated fatty acid than the bacterial form. The L-form also contained the C17_{cyc}, C19_{cyc}, and C18-OH types of fatty acids which were not detected in the bacterial form.

These findings are similar to those obtained with *S. aureus*, indicating that the phospholipids and fatty acids in the plasma membrane play an important role in adaptational changes or compensation for the loss of the cell wall.