

| | |
|--------------|---|
| Title | 細菌芽胞の発芽始動機構に関する基礎的研究 |
| Author(s) | 柴田, 洋文 |
| Citation | 大阪大学, 1980, 博士論文 |
| Version Type | VoR |
| URL | https://hdl.handle.net/11094/2320 |
| rights | |
| Note | |

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

| | |
|---------|---|
| 氏名・(本籍) | 柴 田 洋 文 |
| 学位の種類 | 薬 学 博 士 |
| 学位記番号 | 第 4 8 0 5 号 |
| 学位授与の日付 | 昭 和 55 年 2 月 2 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 | 細菌芽胞の発芽始動機構に関する基礎的研究 |
| 論文審査委員 | (主査) 教 授 近藤 雅臣 (副査) 教 授 青沼 繁 教 授 岩田平太郎 教 授 三浦 喜温 |

論 文 内 容 の 要 旨

緒 論

芽胞形成細菌は自己の体内に細菌芽胞（以下、芽胞と略）と称する耐久型構造を形成し、生命活動に適さない外的環境から自己再生に不可欠な遺伝情報やその発現に必須のメカニズムを保護し生命の維持を図る。芽胞は呼吸や代謝活性がほとんど認められない休眠状態にあるが、好適な環境下にあつては、休眠状態から脱却し、分裂増殖を繰り返す生命形態に転換する。休眠状態からの脱却を起点として分裂に至るまでの過程を発芽という。この過程において、芽胞は休眠を維持するメカニズムを破壊し、新生細胞が環境への適応を試み、呼吸、代謝活性が上昇する。すなわち、休眠を維持するメカニズムと発芽のメカニズムとは相反する性格をもつものといえる。この二つのメカニズムはどちらも芽胞構造やその構成要素の機能、さらには構成成分の生物活性と複雑に絡み合い、その実体は明らかではない。^{1),2)}

発芽に伴い、芽胞表層の構造、あるいは、芽胞表面の荷電状態が変化するという事実³⁾⁻⁵⁾が明らかにされているが、このような事実は、発芽と芽胞表層構造の存在状態の間に密接な関係があることを示唆している。したがって、芽胞表層を化学的に修飾し、その存在状態を変化させれば、発芽に何らかの影響を与えることが予測される。このような観点に立って、芽胞を準致死温度で加熱したり、アルカリ処理、あるいは種々の抽出方法で処理するといった、芽胞を不可逆的に変性させる過酷な条件を採用した研究が従来から行われている⁶⁾⁻⁸⁾しかし、これらの方法によっては、芽胞のみならず、その他の構造にも影響が及ぶことが予想され、その研究結果はかならずしも発芽開始機構と直結したものとは考え難い欠点がある。したがって、芽胞表層部のみ変化を与え、その変化と発芽能の変化との

相関性を求める方法を追求する必要がある。

芽胞外層はタンパク質に富むスポアコートにより構成されており、¹¹⁹⁾この化学的、物理的構造に変化を与える物質を選択すれば、その結果生じた変化を中心に、発芽機構を検討することができる。この目的に合致するためには、作用させる化合物は、その作用が容易に制御できること、化学的性質が明らかであり、しかも、その反応機作が類推可能であるという特徴を備えたものでなければならないが、トリクロル酢酸（以下、TCAと略）は、これらの条件を満足する化合物といえ、さらに多種多様な構造類似体を得られる利点がある。

本研究においては、TCAを作用させた *Bacillus cereus* T 芽胞の性格を明らかにすることにより、発芽始動機構の解明への手掛りを得ることを企図した。

本 論

第1章 TCAの作用による生理学的性質の変化

芽胞に対するTCAの影響について検討した結果、本実験条件（40 C, 30分）において、TCAの作用は高濃度（150 mM以上）では殺菌的であったが、低濃度（61.2 mM）では発芽率の低下が認められたが生存率には著しい変化は認められなかった（Table1）。TCA処理芽胞の発芽を経時的に追跡し、この発芽率低下の原因が、発芽遅延現象が生じたためであることを明らかにした。

Table1 Properties of *B. cereus* T spores treated with TCA at various concentrations¹.

| Concn. of TCA | Viability | Refractility | Stainability | Germinability | DPA excreted |
|---------------|-----------|----------------|----------------|---------------|--------------|
| 0 mM | 100.0% | + | — | 100.0% | 0 % |
| 15.3 | 95.0 | + | — | 100.0 | 0 |
| 30.6 | 92.3 | + | — | 42.9 | 0 |
| 45.9 | 92.6 | + | — | 16.5 | 0 |
| 61.2 | 63.6 | + | — | 10.0 | 4.8 |
| 150.0 | 4.0 | ± ² | ± ³ | — | 85.3 |
| 300.0 | — | — | + | — | 89.0 |

1. Treatment of spores with TCA was performed at 40 C for 30 min.

2. +, 55.2%; —, 44.8 %,

3. +, 52.7%; —, 47.3 %,

さらに、生存率を損うことなく発芽遅延を生じる条件下での芽胞に対するTCAの作用は、熱、化学薬品（N水酸化ナトリウム、0.27 N塩酸）に対する抵抗性の低下やジピコリン酸保持能力の低下を生じるが、リゾチームやトリブシン、プロテアーゼに対する感受性化は認められないことを明らかにした（Table2）。

Table 2 Effect of chemical agents on TCA-treated and control spores of *B. cereus* T¹

| Chemical | Control spores | Spores treated with TCA ² at | | | |
|----------|----------------|---|---------|----------------|---|
| | | 6.1 mM | 30.6 mM | 61.2 mM | |
| NaOH | 1 N | — ³ | — | + ⁴ | + |
| | 2 N | + | + | + | + |
| HCl | 0.27 N | — | — | — | + |

1. Treated and control spores (1 mg) were suspended in 10 ml of aqueous sodium hydroxide or hydrochloric acid. The suspensions were incubated at 30 C for 2 hr, and then centrifuged. The precipitate was resuspended in deionized water and their viability was measured.
2. Treatment of spores with TCA was performed at 40 C for 30 min
3. Insensitive.
4. Sensitive. The colony count after treatment with the chemical was less than one tenth of those of the corresponding TCA-treated and control spores before treatment.

第2章 芽胞の発芽機構に対する TCA の作用

本章では、芽胞に対する TCA の反応キネティクス、および TCA 構造類似体を用いて化学構造と活性との関係を検討した。

TCA の発芽遅延活性は、濃度、作用温度、および接触時間に依存しており、pH 3.0 以下の強酸性条件が必要であること、さらに、芽胞と TCA の反応の活性化エネルギー値は 4.01×10^4 cal/mole を示すことが明らかとなった。しかし、pH 3.0 以下の条件下でも、塩酸や酢酸は効果がなく、TCA アニオンの存在が必要であること、また、その作用は TCA アニオンと高濃度の水素イオンとの協同効果によるものであることが判明した (Fig. 1, Table 3)。

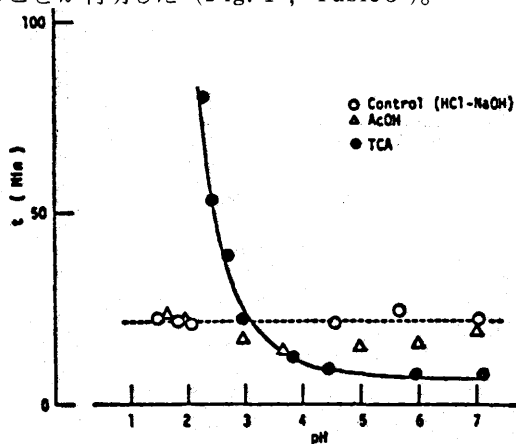


Fig. 1. Effect of the pH of TCA-treatment. Spores were treated with 61.2 mM TCA or 60 mM AcOH at the indicated pH at 40 C for 30 min; o, HCl-NaOH; ●, TCA; Δ, AcOH.

Table 3. Effect of treatment of spores of *B. cereus* T with TCA-Na and HCl on subsequent germination¹.

| Chemical | t-Value ³ |
|---------------------|----------------------|
| Control | 22.7 Min |
| TCA-Na ⁴ | 18.6 |
| HCl | 22.3 |
| A. TCA-Na→HCl | — ⁵ |
| B. HCl→TCA-Na | 18.1 |

1. Germination of spores was induced by 0.05 mM L-alanine and 0.05 mM inosine in 0.1 M sodium phosphate buffer(pH 8.0) at 30 C.
2. Spores were treated with TCA-Na, HCl(0.27 N), TCA-Na followed by treatment with HCl(A), or HCl followed by treatment with TCA-Na (B). Each treatment was carried out at 30 C for 30 min.
3. The value was obtained from curves of the optical density at 520 nm as described in the MATERIALS AND METHODS
4. TCA-Na(61.2 mM) was prepared by titration of TCA with N NaOH to pH 7.0
5. Not determined.

種々の TCA 構造類似体を用いてその発芽遅延活性を検討した結果、電子吸引性基をもたない構造類似体は効果がないことから、TCA アニオンの化学構造に起因する電子吸引性が活性発現に大きく寄与していると考えられた。

Table 4 Effect of various compounds on germination of *B. cereus* T spores.¹

| Compound | Formula | Retardation ² |
|----------------------------|--|--------------------------|
| Trichloroacetic acid | CCl ₃ COOH | +++ |
| Trifluoroacetic acid | CF ₃ COOH | +++ |
| Tribromoacetic acid | CBr ₃ COOH | +++ |
| Dichloroacetic acid | CHCl ₂ COOH | +++ |
| Dibromoacetic acid | CHBr ₂ COOH | ++ |
| 2, 3-Dibromopropionic acid | CH ₂ BrCHBrCOOH | + |
| 2, 3-Dibromobutyric acid | CH ₂ CHBrCHBrCOOH | + |
| Acetic acid | CH ₃ COOH | — |
| Propionic acid | CH ₃ CH ₂ COOH | — |
| n-Butyric acid | CH ₃ CH ₂ CH ₂ COOH | — |
| Pivalic acid | (CH ₃) ₃ CCOOH | — |
| Malonic acid | CH ₂ (COOH) ₂ | — |
| Glycine | NH ₂ CH ₂ COOH | — |
| β-Alanine | NH ₂ CH ₂ CH ₂ COOH | — |
| 4-Amino-n-butyric acid | NH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ COOH | — |

1. Treatment of spores with the indicated compounds was carried out at 40 C for 30 min.
2. +, ++, +++, Effective. Delayed germination occurred when spores were treated with the indicated compound at 30(+++), 60(++), or 150 mM(+); —, Not effective. Delayed germination was not observed when spores were treated with the indicated compound at 300 mM.

第3章 芽胞の化学構造に対する TCA の影響

抽出溶媒としての TCA の性質は、芽胞に TCA を作用させることにより、芽胞構成成分に変化が生じる可能性があることを示唆する。そこで、主要な芽胞構成成分について量的変化の有無を検討した。その結果、基本的な芽胞構成成分の量的変化と発芽能の変化との間には明白な相関々係は見出されず、両者の間には直接の因果関係は存在しないと結論した (Table 5)。

Table 5 Protein, hexosamine, DPA and Calcium contents of TCA-treated and control spores of *B. cereus* T¹.

| Spores ² | Protein | Hexosamine | DPA | Ca |
|---------------------------------|---------|------------|------|------|
| Control spores | 66.5 | 6.9 | 10.4 | 1.95 |
| Spores treated with 6.1 mM TCA | 58.5 | 6.7 | 10.6 | 1.60 |
| Spores treated with 30.6 mM TCA | 57.5 | 6.8 | 10.5 | 1.58 |
| Spores treated with 61.2 mM TCA | 57.8 | 6.7 | 10.0 | 1.57 |

1. Contents are shown as percentages of the dry weight of the spores.
2. TCA-treatment of spores was performed at 40 C for 30 min.

一方、芽胞と TCA との反応の活性化エネルギー値は巨大分子の変性を示唆するものであった。そこで、TCA 処理芽胞の赤外吸収スペクトルを測定し、未処理芽胞、発芽芽胞のそれと比較した結果、基本的なパターンは未処理芽と一致したが、TCA 処理芽胞には未処理芽胞のスペクトルにない吸収ピークが3本 (1,325, 830, および680 cm^{-1}) に認められることを明らかにした (Fig. 2)。

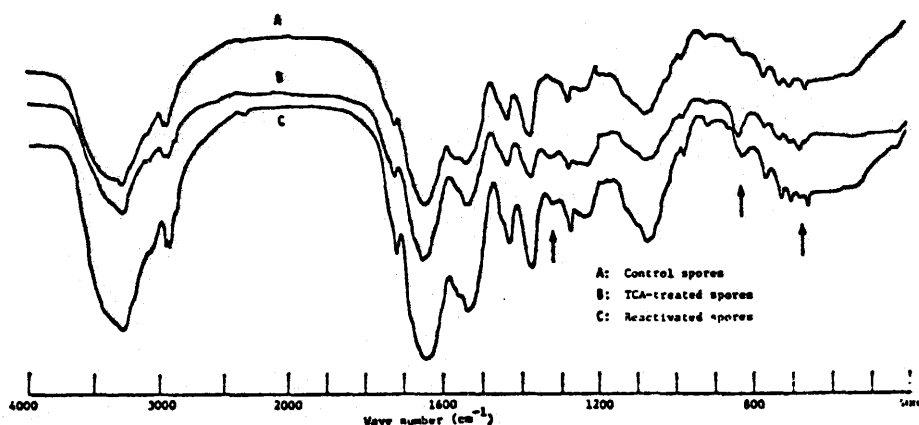


Fig. 2 IR spectra of TCA-treated, reactivated, and control spores of *B. cereus* T. Arrows indicate 1,325, 830 and 680 cm^{-1}

第4章 TCA 処理芽胞の発芽能の回復と回復過程における TCA の挙動

TCA の作用メカニズムを明らかにするためには、TCA 処理芽胞における発芽能の低下が発芽機構そのものの損傷による直接的な機能低下に起因するものか、あるいは、発芽機構を取り巻く環境の変化により機能発現が抑制された状態にあるのかという2つの問題を解明する必要がある。また、本研究で取り扱う TCA の作用は殺菌的ではなく、発芽機構に対してもその機能を完全に失わせるというものでないことから、何らかの機能補償的方法による発芽能の回復が可能であると予想された。そこで、本章ではその方法について検討し、回復過程に生じる変化を明らかにすることから、上記の問題の解明を試みた。

TCA の作用により低下した発芽能は緩和な条件 (40–50 C) での加熱により容易に回復した。この回復効果は加熱温度および加熱時間に依存していたことから、TCA の作用による発芽能の低下は、発芽始動機構構成要素の欠損または修復不能な変性によるものではないと結論した (Fig. 3)。

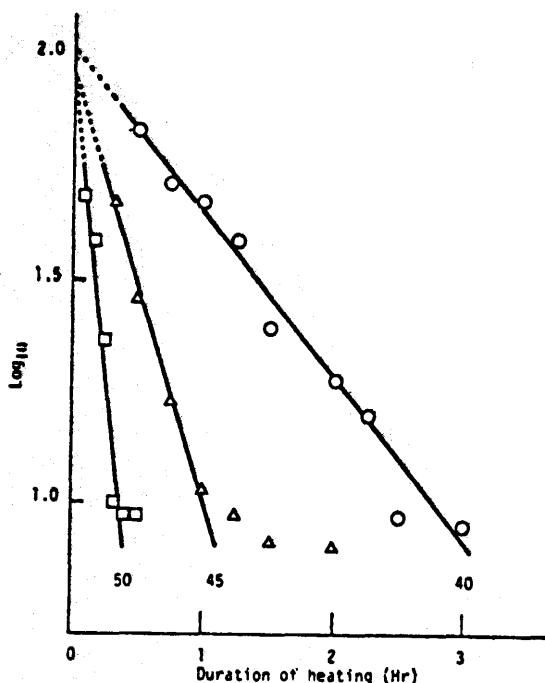


Fig. 3. Effect of the temperature and period of heat-treatment in reactivation of TCA-treated (61.2 mM, 40 C, 30 min) spores of *B. cereus* T.

加熱により発芽能が回復した芽胞の赤外吸収スペクトルは未処理芽胞のそれと一致した。また、TCA 処理芽胞の熱重量分析を行った結果、TCA 処理芽胞には、TCA 濃度にほぼ比例して、108 C をピーク時温度として脱離する揮発性成分の存在が確認された (Fig. 4 b)。赤外吸収スペクトルの解析の結果、この物質の存否は既述の3本の吸収ピークの有無に対応していることが判明した。さらに、熱分解ガスクロマトグラフの結果から、本物質は TCA であると推定した (Fig. 5)。

以上の知見に基づき、TCA は芽胞表面あるいは表面に近い部位に存在する構成タンパクに作用し、

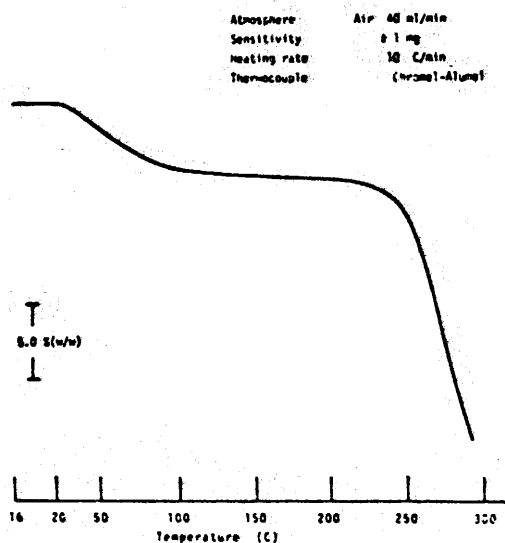


Fig. 4 a. Thermogravimetric curve of spores of *B. cereus* T.

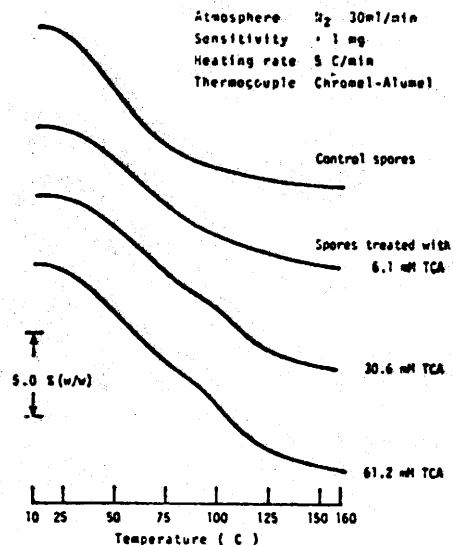


Fig. 4 b. Thermogravimetric curves of TCA-treated and control spores of *B. cereus* T.

その高次構造に変化を生じ、芽胞を高濃度の水素イオンに対して感受性化するものと推察した。

第5章 発芽始動性が異なる芽胞に対する TCA の影響

発芽始動機構において、芽胞の表層構造が重要な役割を演じているという可能性は多くの研究者の指摘するところである。³⁻⁵熱や化学薬剤での処理による芽胞の活性化はスポアコート構成タンパクの conformation の変化と考えられている。^{11,12}本菌芽胞は加熱や L-アラニン(ALA)での処理により活性化される¹⁰が、両活性化芽胞は異なる発芽前状態にあることがわかっている。¹¹また、本菌芽胞はリゾチーム非感受性であるが、ドデシル硫酸ナトリウム-ジチオトレイトール(SDS-DTT)で処理すると感受性に変化する。⁸これらの処理は TCA の作用部位を可溶化したり、あるいは構造的に変化させることにより、TCA の作用メカニズムやその程度に影響を及ぼすことが予想された。

そこで、本章では、両活性化芽胞および SDS-DTT 処理芽胞に対する TCA 処理の影響について検討し、次のような事実を明らかにした。すなわち、両活性化芽胞はいずれも TCA の作用により発芽遅延を生じた。しかし、その程度には著しい差があり、ALA 活性化芽胞が著しく強い感受性を示したのに対して、加熱活性化芽胞は、活性化状態を維持しながら、非活性化芽胞と等価の感受性を示した(Fig. 6)。これは、両活性化芽胞の表層構造の差によるものと推察した。SDS-DTT 処理芽胞もまた未処理芽胞よりも強く TCA と反応した。低下した発芽能は加熱、あるいはリゾチームの添加により回復した(Table 6)。この事実は、TCA の作用により生じた発芽機構の低下した機能がリゾチームにより補償されたことを意味している。リゾチームの作用部位はコルテックスペプチドグリカンである。¹²したがって、TCA の作用により機能が低下した部位はコルテックス溶解酵素であろうと推察した。

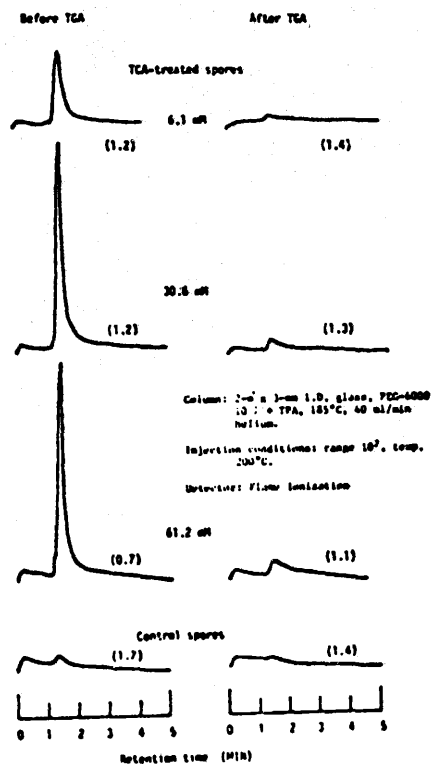


Fig. 5. Pyrolytic gaschromatogram of TCA-treated and control spores of *B. cereus* T. Spores were applied to pyrolytic gaschromatograph before and after thermogravimetric analyses up to 150 C. Figures in parenthesis show the amount of spores(mg) applied.

Column: 2-m x 3-mm I. D. glass, PEG-6000 10%+TPA, 185C, 40ml/min helium
Injectcon condions: range 10² temp. 200C
Detector: Flame Ionization.

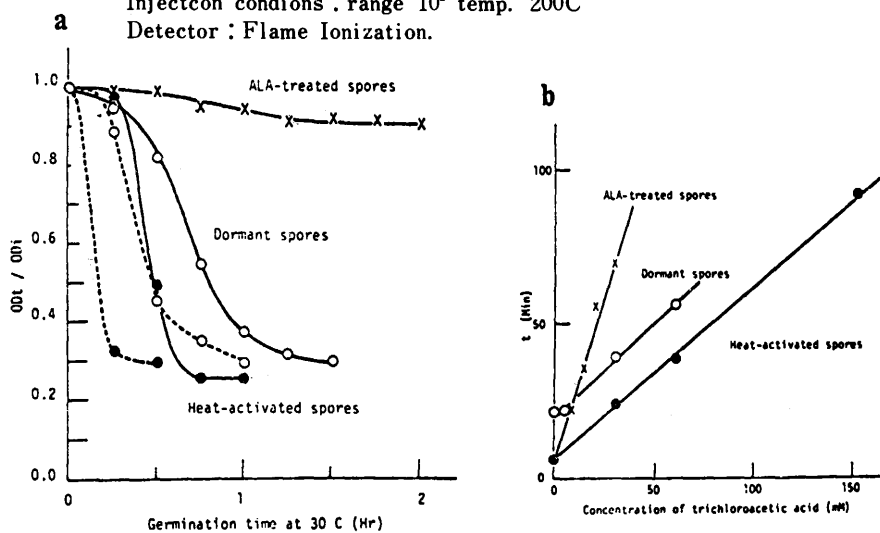


Fig. 6 Effect of the concentration of TCA-treatment. Germination was performed at 30 C in 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 8.0) containing 0.05 mM L-alanine and 0.05 mM inosine. (a) Germination profiles of dormant, heat-activated, and ALA-treated spores, with (solid lines) or without (dotted lines) TCA-treatment (30.6 mM, 30 C, 30 min); (b) Spores were treated at 30 C for 30 min at the indicated concentrations of TCA.

Table 6 Effect of TCA-treatment and subsequent heating on germination of SDS-DTT-treated spores of *B. cereus* T¹.

| Spores | t-Value(Min) | |
|---------------------------------|------------------|---------------|
| | Without lysozyme | With lysozyme |
| Control ² | 26.9 | 7.7 |
| TCA-treated spores ³ | 83.9 | 7.5 |
| After heating ⁴ | 26.0 | |

1. Germination was estimated by measuring a decrease in OD at 520 nm in 0.1 M sodium phosphate buffer containing 0.05 mM L-alanine and 0.05 mM inosine with or without lysozyme(200 ug/ml).
2. Spores were treated with 0.5% SDS-10 mM DTT in 0.1 M NaCl at 37 C for 2 hr.
3. TCA-treatment of spores was carried out with 30.6 mM TCA at 30 C for 30 min.
4. TCA-treated spores were heated at 50 C for 30 min.

結 論

芽胞の発芽機構、とくにその始動機構の追跡、解明への接近を企図して、TCA 処理を中心に種々の熱、化学的および酵素的処理により芽胞に生じた変化を明らかにし、発芽機構との関係を検討した。

1. TCA の作用による発芽遅延の程度は、TCA の濃度、作用温度、および接触時間に依存しており、強酸性(pH 3.0 以下) の環境を必要とした。しかし、酸性条件が満足されるのみでは十分でなく、TCA アニオンの存在が必要であり、その作用は、第1 に TCA アニオン、次いで高濃度の水素イオンという逐次的作用で、TCA アニオンの作用はトリクロルメチレン基の電子吸引性にに基づくものであることが判明した。
2. 芽胞に対する TCA の作用は化学組成の量的変化よりも高次構造の変化によるものと思われ、この変化は、芽胞に対する TCA の結合により生じると推察された。
3. TCA の作用により低下した発芽能は加熱あるいはリゾチームの添加により回復した。
4. TCA の作用に対する加熱活性化芽胞の感受性は未処理芽胞とほぼ等価であったが、ALA 活性化芽胞および SDS-DTT 処理芽胞は著しく強い感受性を示した。
5. 以上の成績に基づき、芽胞の発芽機構に対する TCA の作用を次のように推察した。すなわち、TCA アニオンが、まず、スポアコートタンパク質に作用し、これに結合することによりその conformation に影響を及ぼし、その結果、スポアコートにおける透過性が増大し、高濃度の水素イオンをはじめ低分子化合物に対する抵抗性が低下する。このような状態の芽胞に、TCA が解離して生じた高濃度の水素イオンが作用し、コルテックス溶解酵素を攻撃しその活性を低下させることにより発芽機構の機能低下を生じるに至るものといえる。
6. TCA の作用条件を操作することにより、発芽始動が遅延したり、極端な場合は停滞するという事実や、この現象が、加熱処理により容易に回復するという事実に加えて、活性化状態にある芽胞に

対してまでも、発芽遅延、すなわち、発芽始動機構の機能低下を生じたことから、コルテックス溶解酵素系の制御が、芽胞の休眠と発芽の境界を制御していると推察された。

引用文献

- 1) Gould, G.W., and Hurst, A. (1969); *The Bacterial Spore*, Acad. Press. London
- 2) 蜂須賀養悦, 堀越弘毅・ (1976); 耐久型細胞 岩波書店
- 3) 近藤雅臣, 西原力・ (1970); *日細菌誌*25, 285
- 4) Tochikubo, K., Kojima, K., and Hachisuka, Y. (1975); *Spores IV*, 526
- 5) Gould, G.W., and Sale, A.J.H. (1970); *J. Gen. Microbiol.*60, 335
- 6) Hashimoto, T., Frieben, W.R., and Conti, S.F. (1972); *Spores V*, 409
- 7) Waites, W.M., Wyatt, L.R., and Arthur, B. (1972); *Spores V*, 430
- 8) Vary, J.C. (1973); *J. Bacteriol.* 116, 797
- 9) Kondo, M., and Foster, J.W. (1967); *J. Gen. Microbiol.*47, 257
- 10) Shibata, H., Takamatsu, H., and Tani, I. (1976); *Japan, J. Microbiol.*20, 529
- 11) Shibata, H., Takamatsu, H., Minami, M., and Tani, I. (1978); *Microbiol. Immunol.*22, 443
- 12) Warth, A.D., Ohye, D.F., and Murrell, W.G. (1963); *J. Cell Biol.*16, 593

論文の審査結果の要旨

細菌芽胞にトリクロル酢酸を作用させると、芽胞を死滅させることなく、発芽のみを遅延させる現象を発見した。この現象は、トリクロル酢酸のアニオンが芽胞殻のタンパク質に結合し、その構造に影響を及ぼし、芽胞殻の透過性に変化を与える結果を生じたものとした。この透過性の変化によりトリクロル酢酸が解離して生じた高濃度の水素イオンが芽胞殻外層を通過し、コルテックス溶解酵素に作用することから発芽機能の低下を招来することを明らかにした。このような結果から発芽始動機構においてはコルテックス溶解酵素系の制御が芽胞の休眠と発芽の境界を制御しているものと判定した。これらの研究成果は細菌芽胞の発芽始動機構の解明に新しい手がかりを与えるものであり、その一端を明らかにしたもので、薬学博士の学位を授与するに値する研究業績であると判定した。