

Title	Bacillus cereus成熟芽胞における抗酸染色性とPoly- β -hydroxybutyrateとの関係
Author(s)	近藤, 雅臣
Citation	
Issue Date	
Text Version	none
URL	http://hdl.handle.net/11094/28226
DOI	
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

【 41 】

氏名・(本籍)	近藤雅臣 こんどうまさおみ
学位の種類	医学博士
学位記番号	第 1 0 5 号
学位授与の日付	昭和 35 年 3 月 25 日
学位授与の要件	医学研究科病理系 学位規則第 5 条第 1 項該当
学位論文題目	Bacillus cereus 成熟芽胞における抗酸染色性と Poly- β -hydroxybutyrate との関係
	(主査) (副査)
論文審査委員	教授 藤野恒三郎 教授 天野 恒久 教授 須田 正巳

論 文 内 容 の 要 旨

1 目 的

細胞芽胞はその栄養型細胞とは全くことなつた形態構造をもち、また同時にその染色性においても栄養型細胞にみられない特徴ある性状—抗酸染色性—を示すのである。このような特性は、高度の耐熱性、耐酸性、耐アルカリ性とならんで細菌芽胞を特質づける最も大きな生物学的性状であるといえる。しかし、これらの特性がどのような機構でその耐性と直接結びついているのか、またいかなる物質がこの性質の真の不在手であるかについては現在殆ど明らかにされていない。そこで芽胞の代表的特性である抗酸染色性をとりあげ、その基因物質とそれの芽胞構造への結びつきを解明することを試みた。

2 方 法

Bacillus cereus No. 2 をとりあげ、すべての実験を通じてその成熟芽胞乾燥標品を材料とした。

(A) 乾燥成熟芽胞標品—B. cereus No. 2 を寒天平板上 35°C 一時間培養したものを洗滌後更に M/100 磷酸緩衝液 (pH7.0) に再浮遊し、35°C で振盪、栄養型細胞が全くみとめられなくなった洗滌芽胞標品を乾燥した。

(B) Exosporium — 乾燥芽胞標品を石英砂と共に乳鉢にて磨碎後遠沈分画法によつた。

(C) Stripped spore — 乾燥芽胞標品を 1%—Desoxycholate 溶液に浮遊し、Mickl disintegrator にて処理後、遠沈分画法によつた。(B), (C) いずれの場合も電子顕微鏡によつて確められた。

(D) 芽胞不溶性部分—乾燥芽胞標品を M/100 磷酸緩衝液に浮遊し、その標品中に intact spore が検出できなくなるまで Sonic oscillator (10KC) を用いて破壊し、遠沈後その沈澱物を Trypsin 処理し洗滌乾燥した。

(E) Poly- β -hydroxybutyrate の定量—乾燥標品を超音波処理により完全に破壊し、その全内容を乾燥後、acetone, ether—ethanol (1:3) にて沸点で処理後 chloroform で polymer を抽出し methanol で

洗滌後乾燥重量を測定した。

(F) 染色方法— Moeller の方法を用い各種有機溶媒処理による芽胞の染色性の変化及び polymer の染色性を光学顕微鏡的に観察した。

3 結 果

I) *Bacillus cereus* No. 2 の成熟芽胞を acetone, ether-ethanol (1:3), chloroform と各種有機溶媒で順次処理していくと、これまで栄養型細胞にしか含まれないとされていた poly- β -hydroxybutyrate が chloroform 抽出により芽胞中に存在することがわかった。成熟芽胞中乾燥重量で4.1%である。しかもそれは芽胞殻に局在し乾燥芽胞殻の52%をしめる。

II) 増殖の各段階での polymer 総量の定量を行なったところ, logarithmic growth phase では含まれず, declining growth rate の phase に入るところから蓄積されはじめ, その含量は3~4%となるが, その後全過程を通じてその消失は殆どみられない。

III) 前述のごとく芽胞の各種有機溶媒処理と併行してその染色性の変化をしらべると, chloroform で何回も処理することにより polymer が抽出されるとともに抗酸性染色で赤くそまるべき芽胞が次第に methylene blue で青く染まるものが多くなって来る。このことは chloroform により抗酸染色性物質が溶解しきるため起る現象と考えられる。しかも chloroform 抽出物である polymer が抗酸性染色で赤くそまる。従って抗酸性染色の基因物質は poly- β -hydroxybutyrate であると考えられる。

IV) *Bacillus cereus* No. 2 の成熟芽胞は電子顕微鏡的観察によれば, その芽胞殻は exosporium を含めて3層よりなっていることが認められる。機械的破壊法, 遠心分離法などにより成熟芽胞を exosporium とその内部構造(裸芽胞)とに分け, 各々についてその polymer 含量, 染色性, 電顕像などの対比研究を行なった結果 poly- β -hydroxybutyrate は少なくとも裸芽胞の外層部を構成している構造と密接な関係のあることがわかった。

4 総 括

(1) これまで栄養型細胞にしかないといわれていた poly- β -hydroxybutyrate が *Bacillus cereus* No. 2 の成熟芽胞中に含まれていることがわかった。

(2) これまで不明とされていた芽胞抗酸性染色の基因物質が poly- β -hydroxybutyrate であることを明らかにした。

(3) この polymer は少なくとも exosporium を取り除かれた裸芽胞の外層部の構成成分であると思われる。

論文の審査結果の要旨

細菌芽胞はその栄養型細胞とは全くことなつた形態構造をもち, また同時にその染色性においても栄養型細胞にみられない特徴ある性状—抗酸染色性—を示すのである。このような特性は, 高度の耐熱性と並んで細菌芽胞の代表的特性であるといえる。しかしこれらの特性がどのような機構でその耐性と結びついているのか, またいかなる物質がこの性質の真のになつてであるかについては現在何ら明らかにされていない。著者は芽胞の代表的特性の一つである抗酸染色性をとりあげ, その基因物質と, その芽胞構造へ

の結びつきを解明することを試み、次の諸事実を明らかにした。

1) *Bacillus cereus* No. 2 の成熟芽胞アセトン、エーテル・エタノール混合物 (1:3v/v) , クロロホルムと各種有機溶媒で順次処理していくと、これまで栄養型細胞にしか含まれないとされていた Poly- β -hydroxybutyrate がクロロホルム抽出により芽胞中に存在することが明らかになった。成熟芽胞中乾燥重量あたり4.1%であった。

2) この Polymer を芽胞から除去することにより、その芽胞は抗酸染色性を失い、またとりだした Polymer は抗酸染色性を示した。

3) 芽胞の抗酸染色性は芽胞の殻と行動を共にし、同時に Polymer はこの殻に局在することが明らかとなった。更にこの殻から Polymer を除去することによりその抗酸染色性が失われた。

4) 機械的破壊法、遠心分離法等により成熟芽胞を exosporium とその内部構造(裸芽胞)とにわけ、各々についてその Polymer 含量、染色性、電顕像などの対比研究を行なった結果、Polymer は芽胞の最外層を形成している exosporium には存在せず、それより内側にある芽胞構造に局在している。また抗酸染色性はこの内部構造に局在する。

以上の結果からみて芽胞の抗酸染色性の化学的実体が芽胞殻の構成成分として含まれている Poly- β -hydroxybutyrate であることを明らかにした著者の成果は細菌芽胞の生物化学的研究に新しい知見を加えたものと認められる。