



Title	Bacillus subtilisのSporangium特異成分に関する研究
Author(s)	櫻井, 純
Citation	大阪大学, 1972, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/30577
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

【4】

氏名・(本籍)	櫻 井 純
学位の種類	薬 学 博 士
学位記番号	第 2516 号
学位授与の日付	昭和47年3月25日
学位授与の要件	薬学研究科応用薬学専攻 学位規則第5条第1項該当
学位論文題目	Bacillus subtilisのSporangium特異成分に関する研究
論文審査委員	(主査) 教 授 近藤 雅臣 (副査) 教 授 上原 喜八郎 教 授 青沼 繁 授 授 三浦 喜温

論 文 内 容 の 要 旨

芽胞形成菌は、生活環において、栄養型細胞の原形質中に、形態的にも、生化学的にも、全く性質の異なった芽胞を形成する。この芽胞形成機構の解明は、細菌生理の領域のみにとどまるべき問題ではなく、ひろく、生体制御機構をあつかう研究領域における重大な課題にもつながるものといえる。

栄養型細胞の増殖には、芽胞形成に関する遺伝情報は発現せず、ひとたび芽胞形成が誘発されると、その過程に特徴的な遺伝情報が連鎖的に発現し、栄養型細胞中に芽胞が形成されると考えられている。¹⁻³⁾ この芽胞形成機構を明らかにするための試みとして、これまで、生化学的、形態学および遺伝学的な立場^{8,9)} から、種々検討されている。まず、生化学的検討としては、芽胞形成初期に出現するProtease³⁾あるいは、抗生物質⁴⁾の産生と芽胞形成過程との関係、また、芽胞形成期に出現するKrebs Cycle系の酵素の役割^{5,12)}さらに、芽胞形成期に特徴的に変化する酵素⁶⁾の究明などがある。しかし、これらの事実が、培地条件、菌種、変異株など実験条件によって、必ずしも、芽胞形成過程に、特徴的現象としては認められず、これらの現象と芽胞形成過程との間に直接的関係を認めることができない。このように、生化学的究明によって、適確な情報が得られないことから、形態学的¹⁰⁾ 遺伝学的¹¹⁾ 検討による解明も、おのずから限界があり、このような従来の方法のみに依存することによっては、もはや解決の手がかりがないといっても過言ではない。したがって、問題解決のためには、このような方法から脱却して、芽胞の特異的な成分もしくは、その成分中に存在する特異的物質を見出し、それらの物質を起点として、解明の手がかりを得ることが必要である。そこで、ジピコリン酸(DPA)⁷⁾のように芽胞のみに存在する物質、また、芽胞に特徴的な機成分¹¹⁾ すなわち、Cortex、芽胞殻の前駆体や、それら構成成分中に存在する物質を対象として、それらの芽胞形成時の挙動を究明すれば、これから得られた知見は、培地条件、菌種、変異株など実験条件の変化により左右されないので、芽胞形成時におこる生化学的変化と、芽胞形成過程との間に、直接的証拠を得

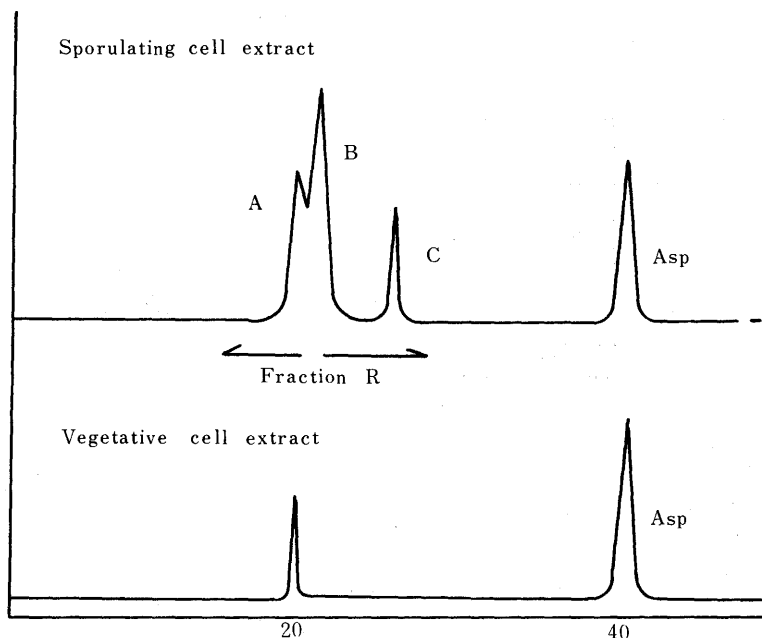
ることができる。

芽胞形成期には、栄養型細胞のタンパク質など、構成成分が分解されて、その生成物を利用して、芽胞形成がおこり⁶⁾とくに、DPA、Cortex、芽胞殻は、芽胞形成中期から後期にわたって形成されることが判明している。

そこで、上述の目的で、芽胞の特徴的構成成分の前駆体を見出すため、*Bacillus subtilis* NRR B 558の芽胞形成中期以後の細胞を用いて、芽胞形成期に生ずる特異的物質の検討、さらに、その特異物質と芽胞の特異的構成成分との関連性について究明を行なった。

1) 芽胞形成期の細胞のTCA抽出物から単離される芽胞殻成分

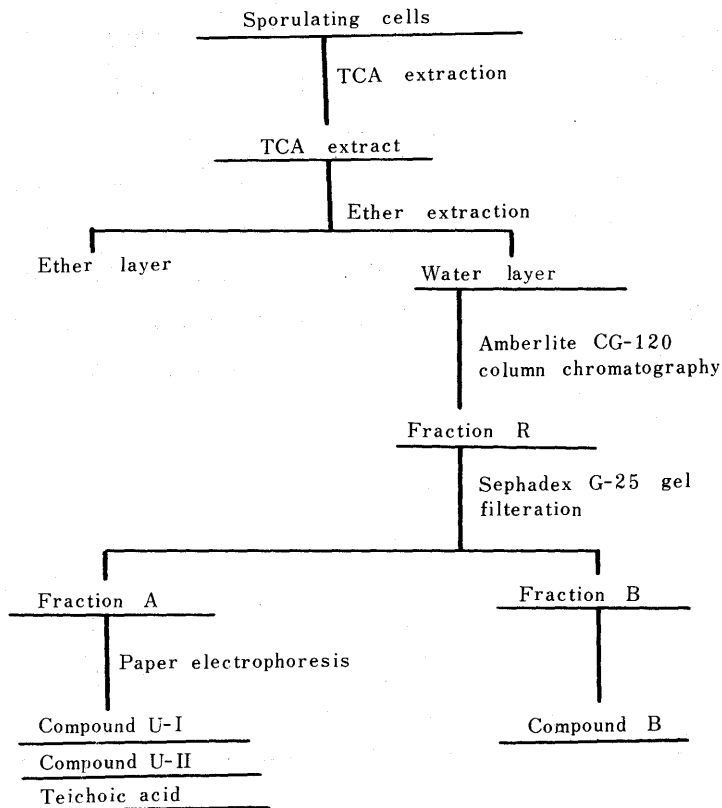
栄養型細胞ならびに芽胞形成期の細胞から、冷10%TCA溶液による抽出物を得、その抽出物をアミノ酸自動分析装置により、検討を行なったところ、図1に示すように、酸性領域に芽胞形成期の特徴的なpeakを認めた。このpeakに存在する物質を得るため、図2に示す方法に従って、部分精製し、塩酸加水分解を行ない検討を行なった結果、芽胞形成期の細胞に特徴的で、酸加水分解を受けない物質(Compound B)を見出した。この物質は、電気泳動的には、比較的Cysteic acidと同じような挙動を示すこと、さらに、陽イオン交換樹脂 Column chromatographyにおける Elution patternとを考えあわせると、強い酸性物質であることは明らかである。Compound Bが示す酸性が、いかなる官能基の関与によるのかを検討するため、³⁵S-Methionine を使用してスルホニル基の検出を試み、また、Paper chromatography, Paper Electrophoresis を行なった後、ハムス法によるリン酸の検出を行なった結果、いずれも Compound B に認めることができなかった。これらの事実は、この化合物が、生体成分であることから、Compound B が示す酸性は、カルボキシル基の関与によるものであることが推察された。



さらに、この物質が、非還元性であることか紫外部に特徴的吸収が認められないことから、未知のアミノ酸であることが推察された。

Compound B が、芽胞といかなる関係を持つかを明らかにするため、この化合物の生合成 Pattern ならびに、芽胞における局在性について検討を行なった。その結果 Compound B は DPA 生合成中期もしくは後期に、Sporangia の原形質に最も多量に蓄積されること、さらに、前駆芽胞の Maturation とともに、その原形質から減少することが明らかとなった。この減少は、Compound B が芽胞成分への利用による可能性を示したので、芽胞を分画し検討したところ、Compound B は、芽胞殻分画にのみ存在することが明らかとなり、芽胞殻の成分であることが判明した¹³⁾

Purification Procedure of Ninhydrin-Positive
Materials from Sporulating Cells



2) 芽胞形成期の細胞のTCA 抽出物から単離される Cortex 前駆体

芽胞形成期の細胞のTCA 抽出物から、Compound Bを精製する過程で得られるFraction Rを塩酸加水分解し、アミノ酸自動分析装置で、分析すると、Peptidoglycan由来のアミノ酸、アミノ糖が検出されるが、栄養型細胞の場合は、そのようなアミノ酸、アミノ糖は検出されなかった。この事実から、芽胞形成期の細胞からのみ、特異的に抽出されるPeptidoglycanの存在が確認された。

すでに報告されているように^{14,15)}冷TCAによって、細胞壁からPeptidoglycanは抽出されないこと、芽胞形成期に細胞壁のPeptidoglycanは、Germ cell wall, Cortexの前駆体以外に存在しないことから、抽出されたPeptidoglycanは、芽胞の成分の前駆体であることは明らかである。そこで、芽胞形成期の細胞のTCA抽出物から、Peptidoglycanを単離するため、Sephadex gel filtration後、Paper Electrophoresisによって、単一spotになるまで精製をくりかえしたところ、3種類の物質を得た。これら単離された物質のうち、2種類は、Peptidoglycanであり、1種類はTeichoic acidであった。単離されたPeptidoglycanは、酸加水分解後の分析によって、ともにAlanine (Ala)、Glutamic acid (Glu)、Diaminopimelic acid (Dap)、Serine (Ser)、Glycine (Gly)、(3 : 2 : 1 : 1 : 1)を持ち、両者は、アミノ糖の数だけが異なるPeptidoglycanであることが明らかとなった。このPeptidoglycanのPeptide鎖を決定するため、DNP化によってN末端を、ヒドラジン分解によって、C末端を検討したところ、Dapのアミノ基とGly, Alaのカルボキシル基が遊離であることが判明し、すでに報告されている、Peptidoglycanの構造に関する知見^{14,15)}と考えあわせ、Peptide鎖のアミノ酸順序は、L·Ala-D·Glu-meso·Dap-D·Ala, L·Ala-D·Glu-L·Ser-Glyであることが推察された。これらのPeptidoglycanは、酸加水分解後、アミノ酸自動分析装置で分析すると、Glucosamineの分子数が、Muramic acidの分子数よりかなり多いので、すでに報告されているPeptidoglycanのglycan部分を説明することができない。そこで、Liuらの報告ならびに、アミノ酸自動分析装置における分析のElution patternの結果から、Muramic acid phosphate¹⁶⁾が、これらPeptidoglycanに存在する可能性を考え、Liuら¹⁶⁾の方法に従いStreptococcus faecalisの細胞壁から、Muramic acid phosphateを得、この標準のMuramic acid phosphateと単離されたPeptidoglycanの酸加水分解物との、Column chromatographyにおけるElution patternの比較ならびに、Acid phosphatase処理後のMuramic acidの出現について検討した結果、これらのPeptidoglycan中に存在するMuramic acidの一部がリン酸化されていることが明らかとなった。一方、栄養型細胞の細胞壁のPeptidoglycanは、Ala, Glu, Dapの3種類のアミノ酸とリン酸化されていないMuramic acid, Glucosamineよりなっているので、これら単離されたPeptidoglycanは、栄養型細胞の細胞壁のPeptidoglycanとは異種のものであることが判明した。この事実は、Germ cell wallが栄養型細胞の細胞壁と同じである事実と考えあわせ、単離されたPeptidoglycanがCortexの前駆体もしくは、その由来のPeptidoglycanであることを示すものである。そこでPeptidoglycanの特異アミノ酸であるDapに着目し、³H-Dapを使用し、Cortexの生合成に関して検討を行なった結果、増殖停止3時間後にDapが急激に取り込まれ、つぎにFraction R中のRadioactivityの急激な増加がおり、増殖停止5時間後に、急激に減少し、それと同時に、TCA不溶性画分に、Radioactivity

の増加が認められた。これらの事実は、芽胞形成期の細胞の抽出物から、単離された Peptidoglycan は Cortex の前駆体であることを示している。

3) 総括および結論

Bacillus subtilis NRRL B 558 の芽胞形成期の細胞から、芽胞形成期に特異的に出現する物質、ならびに、生物活性を有する物質を見出し、下記に示すように、これらの物質と芽胞の特異成分との関係を明らかにし、さらに、芽胞形成過程に若干の示唆を得た。

I) Compound B は、アミノ基の存在する酸性物質で、おそらくカルボキシル基も存在すると推察されることから、未知の酸性アミノ酸と考えられた。この物質は、芽胞形成期に DPA の生合成と同時に、Sporangia の原形質で生合成され、DPA の生合成の中期以後に、Sporangia の原形質から減少し、芽胞殻の一成分として組み込まれることが判明した。この事実より、芽胞殻の生合成は、DPA 生合成中期より始まることが示唆された。

II) 芽胞形成期の細胞から抽出、単離された Peptidoglycan は、L-Al-D-Glu-meso-Dap-D-Ala, L-Al-D-Glu-L-Ser-Gly の 2 種類の Peptide 鎖を有し、Glycan 部分には、Glucosamine Muramic acid, Muramic acid phosphate が存在することが判明した。このような Peptidoglycan は、栄養型細胞の細胞壁には、全く認められず、DPA 生合成の開始前時、すなわち、Cortex の生合成時に、最も多量に抽出され、Cortex の生合成が進むと、ほとんど抽出されなくなることから、Cortex の前駆体であることが明らかとなった。

これらの事実より、Cortex の Peptidoglycan の生合成は Sporangia の原形質で、Peptidoglycan のある断片まで、生合成され、さらに、Cortical spore に運ばれ、その場所で、その断片が polymerization される一連の過程が推察された。

III) Dihydro-DPA から DPA 生成に促進的に作用する活性物質は、Peptidoglycan 関連物質であることがわかった。^{17, 18)} この事実は、活性物質が、DPA 生合成直前に、最大活性を示すこの時期に、Cortex の前駆体が最も蓄積されることと考えあわせると、DPA 生合成の最終段階は Cortex の生合成と関係していると推察される。

IV) Cortex の前駆体は、DPA の生合成初期において消失することから、Cortex の生合成が、DPA の生合成よりも先行し、また、芽胞殻の一成分である Compound B の消失は、DPA 生合成中期以後であることから、芽胞殻の生合成は、DPA の生合成よりも、かなり遅れて始まると推察されるので、Cortex, DPA, 芽胞殻の順序で生合成されると考えられる。一方、DPA の生合成の最終段階は、Peptidoglycan 関連物質で促進されること、また、Penicillin で Cortex の生合成を抑えると DPA が、芽胞から流出するという Vinter ら^{19, 21)} の報告、さらに Cortexless-Mutant は、DPA を芽胞内に保持できないという Fitz-James ら²²⁾ の報告など、これらの事実から、DPA は、Cortex 内もしくは、その周辺に存在し、その外側を芽胞殻がおおっていると推察された。

論文の審査結果の要旨

本研究は細菌芽胞の形成機構の解明のため従来より行なわれて来た方法とは異なり、芽胞にのみ存在する成分の挙動に基づいて行なわれ、芽胞形成期に特異的に存在する物質を見出し、芽胞形成との関連性の一端を明らかにした。すなわち Sporangium に特異的に存在する Peptidoglycan を単離し、構造決定し、このものが芽胞 Cortex の前駆体であることを明らかにした。これは芽胞形成機構解明への新しい方法を見出したものと云えるので薬学博士の学位を授与するに値する論文である。