OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

| | |
|---|---|
| Title | 枯草菌芽胞の構造成分に関する研究 |
| Author(s) | 佐野, 圭二 |
| Citation | 大阪大学, 1975, 博士論文 |
| Version Type | |
| URL | https://hdl.handle.net/11094/31206 |
| 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

【5】

| | |
|---|---|
| 氏名・(本籍) | 佐野圭二 |
| 学位の種類 | 薬学博士 |
| 学位記番号 | 第3324号 |
| 学位授与の日付 | 昭和50年3月25日 |
| 学位授与の要件 | 薬学研究科応用薬学専攻<br>学位規則第5条第1項該当 |
| 学位論文題目 | **枯草菌芽胞の構造成分に関する研究** |
| 論文審査委員 | (主査) 教授 近藤 雅臣<br>(副査) 教授 上原喜八郎 教授 青沼 繁 教授 三浦 喜温 |

## 論文内容の要旨

緒　言

ある種の細菌は環境条件の変化に応じて，栄養型増殖期の細胞とはまったく異なった形態構造や機能を有する芽胞を形成する。この過程を芽胞形成過程と称するがその際には，成熟な芽胞を形成するために必要とされる多くの特異物質の産生が認められている。芽胞形成の進行機序を理解するためには，これら特異物質の産生機構の解明が必要であるが，さらにその研究を押し進めてそれらの物質の生理的役割も合わせて理解できれば，この特異物質の存在は，休眠性や耐熱性などのような，芽胞自身が有する特性の発現機構解明のための手がかりにもなり得るものである。

この観点から，数多くの研究者により，芽胞形成期に産生される物質の存在が報告されてきたが，現在まで存在の判明している物質のほとんどは栄養型細胞によっても産生可能であることが示されており，また芽胞形成との必然的な因果関係も立証されていないことから，厳密な意味において芽胞形成期に特異的に産生される物質とはいえないものである。[Hanson et al.; Ann. Rev. Microbiol, *24*, 53, (1970)] このような混乱をさけるため，ここでは従来の方法論から目を転じて，あらかじめ芽胞形成との因果関係の立証が可能と考えられる物質の検索を試みる方法論を展開した。すなわち，cortex や芽胞殻に含まれる特異物質を検索する方法である。これら両成分は芽胞に必須の構造体であるがゆえに，そこに含まれる特異物質の存在が証明できるなら，その物質の産生こそは芽胞形成過程に必然的な現象となるわけである。また，このような特異物質の存在は，cortex や芽胞殻機能の解明にもつながる結果ともなり得るものである。

上記の観点に基づき，本研究では *B. subtilis* NRRL B 558 菌を用い，まず，芽胞 cortex に特異的

なペプチドグリカンについて検討を加え，栄養型細胞との相異を明確にすることを試みた。次に，古くから存在が認められながら，実体の不明であった芽胞殻リン酸化合物に着目し，その実体の解明を試み，さらに，その物質と芽胞形成との関連性についても検討を加えた。

第1章　芽胞 cortex ペプチドグリカンの特異構造

栄養型細胞の細胞壁をリゾチームで可溶化後，その組成を調べた結果，Glu：L-Ala：D-Ala：Dap：Mur：GlcN＝1.00：1.02：0.44：0.97：0.91：0.92 なる組成比を示すペプチドグリカンが得られ，そのうち38％の Dap が DNP 化を受け，また，39％の Dap が COOH 末端アミノ酸として回収されることが判明した。各種細菌細胞壁のペプチドグリカンにおける広範な研究により確立されたペプチド部分の配列順序の厳密な規則性から推察して[Ghuysen; Bacteriol Rev., *32*, 425, (1968)]，本菌栄養型細胞の場合，そのペプチド部分は，L-Ala-D-Glu-Dap なるペプチド中の Dap の ε-$NH_2$ 基と隣接した L-Ala-D-Glu-Dap-D-Ala なるペプチド中の D-Ala の COOH 基とが架橋形成をした構造を有することが示唆された。一方，芽胞ペプチドグリカンの場合は，Glu：L-Ala：D-Ala：Dap：Mur：GlcN ＝1.00：1.19：0.74：0.96：1.52：1.57 なる組成比を示し，そのうち，89％の Dap が $NH_2$ 末端アミノ酸，46％の Ala が COOH 末端アミノ酸として存在することから，栄養型細胞のペプチドグリカンとは異なり，数種類の成分が混在するものと予想された。そこで，芽胞 cortex に特異的なペプチドグリカンの構造を解明する目的のため，これらの成分を分離同定することを試みた。

まず，芽胞ペプチドグリカンの Dowex 50 w×4 カラムクロマトグラフィーを行なった結果，Ala：Mur：GlcN＝1.00：1.40：1.51 なる組成比を示す物質が得られたことより，-GlcN-Mur(-L-Ala)- なる成分の存在が確認された。次に，芽胞ペプチドグリカンの L-11 酵素消化物をゲルろ過（図1）および Ecteola セルロースカラムで分離精製した結果，Glu：Ala：Dap＝1.00：1.86：1.10 なる組成を示すペプチド(Fr. C) と Glu：Ala：Dap＝1.00：1.56：0.95 なる組成比を示すペプチド(Fr. B-2) が得られた。この Fr. C を DNP 化した結果，Ala の50％，Dap の100％が $NH_2$ 末端アミノ酸として存在することより，Fr. C は $NH_2$-L-Ala-D-Glu-Dap(-$NH_2$)-D-Ala-COOH なるテトラペプチドであることが判明した。また，Fr. B-2 においては Ala の⅔，Dap の½が $NH_2$ 末端アミノ酸として存在することより，栄養型細胞と同様に架橋構造を形成したペプチドであることが判明したが，このものは，芽胞が将来発芽した際には栄養型細胞の細胞壁となる germ cell wall に由来することが予想された。

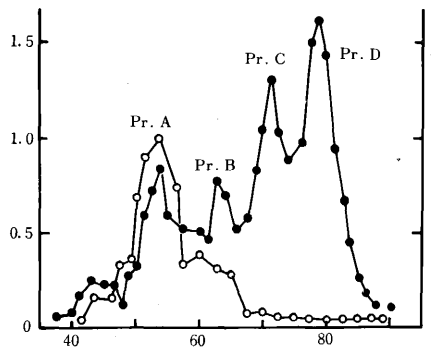


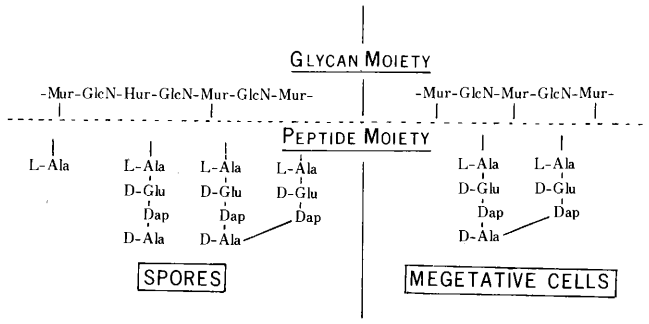

図1

GEL FILTRATION OF L-11 ENZYME DIGEST FROM SPORE INTEGULENTS ON SEPHADEX G-50 AND G-25 COLUMNS CONNECTED IN SERIES

Amino groups and reducing power were determined after hydrolysis by 4N HCl for 3 hours in boiling water.
Column size：G-50＝2.2×90cm, G-25＝2.5×100cm
○——○：Total amino groups (as alanine)
●——●：Total reducing power (as glucosamine)

これらの結果をまとめて図2に示したが，L-Ala やテトラペプチドを結合したペプチドグリカンは芽

図2　PROPOSED STRUCTURES OF PEPTIDOGLYCANS AND VEGETATIVE CELLS

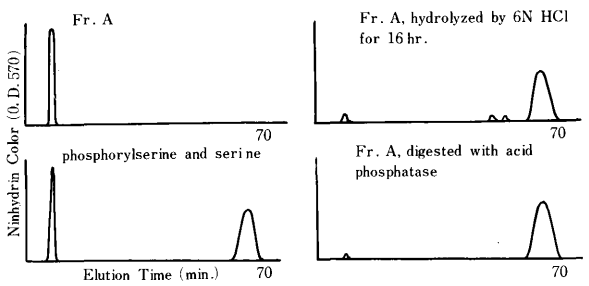



胞独特のものであり，cortex に含まれるものと考えられた。また，グリカン部分に関しても，芽胞の場合ペプチドを結合しない Mur 残基が多量認められたが，このように $NH_2$ 基や COOH 基が多量に遊離した状態で存在することは，cortex に存在することが予想されまた，芽胞の耐熱性の維持に関与することも示されている DPA や Ca の保持に有利と解される〔Lewis; Sclence *132*, 554, (1960)〕，

第2章　芽胞殻におけるリン蛋白質の存在とその挙動

芽胞殻は発芽剤との最初の接触点であり，また，外界からの各種刺激にたいして芽胞を保護する重要な役割を演じている。この芽胞殻に多量のリン酸化合物が含まれることは Fitz-James〔Canad. J. Microbiol, *1*, (1955)〕以来数多く報告されてきたがその実体はまったく不明のままであった。著者はこの芽胞殻を 2NHCl, 106℃, 18 hr. 加水分解を行ない，強酸性のニンヒドリン陽性物質の存在を見出した。この物質は phosphatase 消化により定量的に Ser を生じ，(図3) Ser/P の比が1.00 となることから P-Ser であると同定した。この結果は4種の溶媒系における PPC からも確かめられた。

図3




Fr. A was isolated from partial acid hydrolysates of spore integuments by Dowex 50w×4 column chromatography.

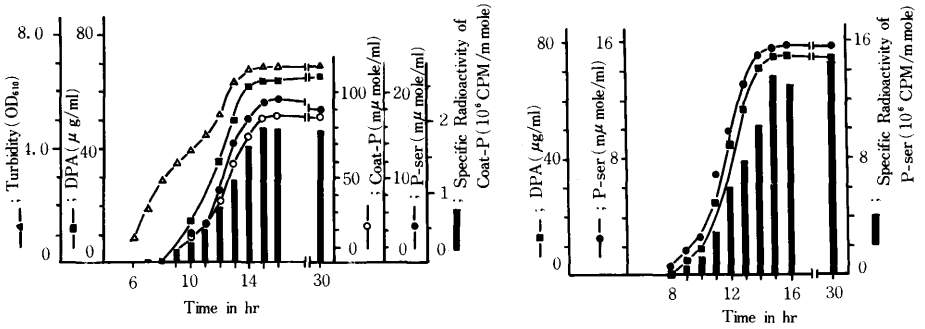
このP-Ser は芽胞殻に局在し，core や cortex 画分にはほとんど存在が認められず(表1)，栄養型細胞にもまったく検出されなかったことから，芽胞殻に特異的に含まれる物質であると判断した。また，NHCl や NKOH にたいする挙動を調べた結果でも，芽胞殻リン酸化合物は典型的なリン蛋白質の性質を示した。さらに，プロナーゼ消化を行なった結果，芽胞殻蛋白質の60% 以上が可溶化されるのにたいし，P-Ser は大部分不溶性画分に残存することも判明したが，Kondo ら〔J. gen. Microbiol, *47*, 257, (1967)〕による *B. megaterium* 菌芽胞殻分画結果と考え合わせ，本菌芽胞の場合，リン蛋白質は

表1
DISTRIBUTION OF PHOSPHORYLSERINE IN THE SPORES

| Fraction | Phosphorylserine | |
|---|---|---|
| | μmoles/mg spores | recovery (%) |
| Whole spores | .033 | 100 |
| Core Fr. | .001 | 3 |
| Cortex Fr. | .003 | 9 |
| Coat Fr. | .031 | 94 |

芽胞殻最外層を形成するものと予想された。Sacks〔Spores V, 437(1971)〕は芽胞を各種陽イオンで処理することにより，芽胞の発芽能に著明な変化を生じることを報告しているが，本菌芽胞において，芽胞殻最外層にリン蛋白質が存在する可能性の示されたことは芽胞殻機能を考察する上において重要な意義を持つものとなる。

次に，芽胞形成期におけるリン蛋白質の挙動を調べる目的のため，32P 含有培地で本菌を培養し，芽胞形成完成までの間の P-Ser，Coat-P の RI 比活性の追跡実験を行なった。その結果，図4 に示す




ように，Coat-P，P-Ser の形成時期と DPA 含量，耐熱性菌数の増加時期とが完全に一致することにより，リン蛋白質の形成は芽胞形成期に特異的な現象であることが示された。また，Coat-P，P-Ser の形成時期とそれらの RI 比活性の上昇時期が良く合致することから，芽胞殻蛋白質は一担形成された後は成熟な芽胞の形成が完了するまで turnover されないことも判明した。

結　論

栄養型細胞と芽胞のペプチドグリカンの構造を比較検討した結果，以下の事実があきらかとなった。

栄養型細胞においては

L-Ala-D-Glu-Dap-D-Ala

L-Ala-D-Glu-Dap

なる架橋構造を形成したペプチドがすべての Mur 残基に結合しており，比較的均一でち密な構造を有していたが，芽胞 cortex では L-Ala-D-Glu-Dap-D-Ala なるテトラペプチドおよび少量の L-Ala が，Mur 残基に結合していたが，これらペプチド成分をまったく結合しない Mur も多量存在し，$NH_2$ 基や COOH 基が多く遊離した状態であることが判明したが，このことは Ca，DPA を保持して芽胞の耐熱性を維持するのに有利であることが示された。

次に芽胞殻リン酸化合物の実体を検討し，以下の事実をあきらかにした。

本菌芽胞のばあい，芽胞殻リン酸化合物は P-Ser の型でリン蛋白質に存在しており，このものは芽胞殻最外層を形成して，芽胞の発芽現象に関与している可能性が示唆された。また，リン蛋白質の形成は芽胞形成期に特異的に認められ，turnover されないことも判明した。なお，細菌の構造蛋白質における P-Ser の存在はきわめてまれであり，芽胞においてはこれが最初の証明となった。このようなリン蛋白質のリン酸化の調節機構が解明されることにより複雑な芽胞形成機構の解明に手がかりを与

えることも予想された。

以上の知見から，芽胞特有の構造体である cortex および芽胞殻に含まれる特異成分の存在を証明し，それらが芽胞特有の機能と関連している可能性が示唆された。

※　文中には以下の略語を用いた

Ala　；アラニン
Glu　；グルタミン酸
Da p　；ジアミノピメリン酸
Mur　；ムラミン酸
GlcN　；グルコサミン
DNP　；2,4-ジニトロフェノール又は2,4-ジニトロフェニル
P-Ser；ホスホリルセリン
Ser　；セリン
Coat-P；芽胞殻リン酸化合物
DPA　；ジピコリン酸

## 論文の審査結果の要旨

細菌芽胞の形成ならびに発芽機構の解明へのいとぐちとして芽胞特異成分の検出を試み，B. subtilis NRRL 558 の芽胞 Cortex が栄養型細胞壁を構成する Peptidglycan と異なった化学構造を有する Peptidglycan から構成されていることを明らかにすると同時に，芽胞最外層に Phosphorylserine が燐酸化合物の主成分として存在することを明らかにした。これらの物質は芽胞形成期にのみ出現し，芽胞特有の成分であること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論文である。