Osaka University Knowledge Archive

Title	Bacillus thiaminolyticus芽胞殻の構造と機能に関する基礎的研究
Author(s)	南, 純三朗
Citation	大阪大学, 1977, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/31804
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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

【14】

氏名・(本籍)	南(みなみ)　純三朗(じゅんざぶろう)
学位の種類	薬学博士
学位記番号	第 3787 号
学位授与の日付	昭和52年1月19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	**Bacillus thiaminolyticus 芽胞殻の構造と機能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 上原喜八郎　教授 青沼 繁　教授 岩田平太郎

論文内容の要旨

*Bacillus*属および*Clostridium*属の細菌はその生活環において芽胞を形成する。芽胞は栄養型細胞とは形態的にも生理的にも全く異なり，DNA合成，RNA合成，たん白質合成などの活性を示さない休眠状態にあり，熱処理，紫外線照射，薬剤などに対して強い抵抗性を有している。芽胞の細胞質（core部）は多重層で取り囲まれており，内側よりcytoplasmic membrane, germ cell wall, cortex, spore coat より成る。このような芽胞の特異な形態構造は，芽胞の休眠性，抵抗性の獲得およびその維持に必須な役割を果たしていると考えられる。したがって，この構造の物理的，化学的性質を明らかにし，これらと芽胞生理との関係について検討することにより，芽胞の特異性を支持する機構を明らかにできるものと考えられる。しかし，現在まで芽胞構成成分についての検討は主に芽胞破砕物についておこなわれており，[1)2)]また水分，金属イオン，ジピコリン酸など特定成分の含量およびその分布と耐熱性など芽胞の特性との関連性は論じられているものの，[3-10)]芽胞のもつ特異な形態構造の本質的役割は明らかにされていない。そこで，本研究においては，*Bacillus thiaminolyticus* 芽胞を用い，芽胞のもつ抵抗性と芽胞殻との関係，芽胞殻と発芽との関係を明らかにすることを目的として実験をおこなった。これらの点を明らかにするには，従来おこなわれてきた芽胞破砕物についての成分分析では困難であり，芽胞を死滅させることなく，その外層部である芽胞殻より各層を除去していくことが最も確実な方法といえる。芽胞殻はたん白質を主成分とし，その他脂質，灰分，炭水化物，リン酸塩を含有している。芽胞殻の可溶化は特定成分については試みられている[11-18)]が，芽胞殻各層の完全な可溶化はなされていない。したがって，芽胞より芽胞殻を除去するには，従来とは異なった可溶化の方法が必要であるので，まず，芽胞殻の新しい分画方法を確立し，この方法により，

上記の実験目的の解明を試みた。

本　論

(1)芽胞殻外層の単離

芽胞より芽胞殻外層の単離を試みた。Kondoらは，*B megaterium*芽胞殻をアルカリ処理，音波処理，pronase処理により，3つの画分に分画しているが，その結果，*B. megaterium*芽胞殻の最外層はいずれの処理によっても可溶化されないresistant fractionに相当することを報告している。また，Aronsonらもスルフヒドリル還元剤を用いて*B. cereus*芽胞殻たん白質の分別抽出を試みているが，外層部はその内層部に比し，抽出されにくいことを報告している。そこで芽胞からのたん白質抽出に先だって，芽胞破砕物から得た芽胞殻につきその可溶化を検討した。50mM－dithiothrei－tol＋1％－SLS（pH 10.5，37℃，3 hr），1/16 N－NaOH(50℃,30min),NaCl(37℃,3 hr,)により乾燥重量当たり，それぞれ13.5％，11.3％，8.5％，のたん白質が抽出された。しかし，芽胞自体からは，これらいずれの処理によっても外層部の可溶化はできなかった。そこで，0.5mm径glass beads 併用下に10mM－SLS溶液中で0～4℃下に音波処理をおこなうことにより外層部の単離を試みた。その結果，3時間の音波処理によって芽胞殻外層を特異的に単離することが可能となった。すなわち，音波処理芽胞の電顕観察では，芽胞殻の最外層が除去されている点をのぞき，形態的にも休眠芽胞と同一であり，また屈折性，メチレンブルー非染色性など休眠芽胞の特性を示した。また，芽胞表面抗体を調製し，音波処理芽胞と反応させた結果，処理芽胞に比べ，明らかに凝集が抑えられており，音波処理により表面構造の変化していることが免疫化学的にも確認された。

(2)音波処理芽胞の性質

音波処理芽胞はその外層部を除き，形態構造の変化は認められなかったが，休眠芽胞の特性である耐熱性，発芽性に変化が認められるか否かを検討した。3時間の音波処理後にも，生菌数，耐熱菌数の減少は認められなかった。また，芽胞に特異な物質であるジピコリン酸も保持されていた。次に音波処理芽胞についてアミノ酸を発芽剤とし，発芽時に生じる濁度の減少率を指標として発芽能を測定した。その結果，L－alanine, L－valine, L－serine, L－α－amino－n－butyric acid, L－glutamineなどの未処理芽胞で発芽を誘導するアミノ酸では良好な発芽を示し，D－alanine，D－glutamine などのD型アミノ酸およびβ－alanineでは未処理芽胞と同じく発芽は誘導されなかった。この結果は，発芽剤との最初の接触部位である芽胞殻外層が発芽機構に関与する可能性を否定しており，芽胞殻最外層は本質的には芽胞の発芽開始に意味を持つ部位でないことが判明した。したがって，このように最外層の除去によっても発芽能に変化のないことが明らかになったが，同時に耐熱性，屈折性，メチレンブルー非染色性など休眠芽胞の特性とされている性質も保持されていることが認められたので，芽胞の休眠性の維持に対して最外層はそれほど重要な意義をもつ構造ではないと考えられる。

(3)芽胞殻中間層の可溶化

芽胞殻中間層を可溶化する目的で音波処理芽胞のアルカリ抽出をおこなった。音波処理芽胞を1/16 N－NaOH でけん濁し，50℃で30分間保温した結果，芽胞乾燥重量の 3.1％のたん白質が抽出された。この抽出たん白質が芽胞殻由来のものであること，また，芽胞破砕物から得た芽胞殻からも同様のア

ルカリ処理により抽出されうるたん白質であるか否かを免疫化学的に検討した。その結果，芽胞殻のアルカリ抽出たん白質に対する抗体は音波処理芽胞のアルカリ抽出液と2本の沈降線を形成し，それぞれ芽胞殻から得たアルカリ抽出たん白質のつくる沈降線と完全に隔合した。このことは音波処理芽胞から得られるたん白質が芽胞殻由来のものであることを示しており，2種のたん白質が存在することが明らかとなった。また，アルカリ処理芽胞を電顕観察した結果，芽胞殻中間層が消失し，内層部にも一部亀裂の生じていることが明らかとなった。

(4)アルカリ処理芽胞の性質

アルカリ処理芽胞は芽胞殻中間層が除去され，さらに内層も形態的変化を受けていることがわかった。そこで，アルカリ処理菌の発芽能および抵抗性をしらべ芽胞殻の機能について検討した。その結果，アルカリ抽出後も耐熱性，屈折性を示し，ジピコリン酸も芽胞内に保持されていた。また，アミノ酸による発芽も未処理芽胞と同様，L－alanine，L－α－amino－n－butyric acid，L－valine などのL型アミノ酸により発芽が誘導され，D－alanine，D－glutamine などD型のアミノ酸およびβ－alanine では発芽が誘導されなかった。また，発芽誘導に必要なL－alanine 濃度も10^{-4}M以上でであり，中間層除去によっても発芽剤の必要濃度は変化しなかった。したがって，芽胞殻中間層も芽胞の耐熱性，発芽能には無関係な部位であることが判明した。しかし，アルカリ処理菌をcell mill を用いて冷却下に 4,600rpm，1時間振とうし，物理的刺激に対する抵抗性をしらべた結果，音波処理菌では芽胞の形態を維持しているのに対し，アルカリ処理菌では完全に形態構造が崩れており，物理的刺激に対する抵抗性が著しく低下していることが明らかとなった。このことは，物理的刺激に対して芽胞を保護するには芽胞殻中間層が必要であり，芽胞殻内層は物理的刺激に対しては，もはや抵抗性を保持し得ないことが明らかとなった。次に還元剤による内層の抵抗性をアルカリ処理芽胞を用いて検討した。アルカリ処理芽胞を50mM－dithiothreitol＋ 0.5%－SLS（pH10.5）溶液中で37℃，11時間攪拌した後，処理菌体をリゾチーム500 μg/ mlと共に37℃で保温し，濁度の変化を観察した。芽胞殻の内側にはcortex が存在しており，cortexはリゾチーム感受性のペプチドグリカンより成ることが知られている。そこで，内層が還元剤処理により可溶化，または透過性に変化が与えられるならば，リゾチームによりcortexが可溶化され，発芽時に認められるのと同様の減少がおこるはずである。しかし，30分間保温後の濁度減少は 6.3%であり，この結果，芽胞殻内層は還元剤処理に対して抵抗性を有することが判明した。

結　論

B. thiaminolyticus 芽胞殻の構造とその機能を明らかにするため形態観察および音波処理，アルカリ処理によって芽胞殻外層，中間層の除去をおこない，その性質を検討した。

(1) 芽胞殻外層は芽胞を 0.5mm径glass beads 併用下に10mM－SLS溶液中で3時間音波処理をおこなうことにより，特異的に単離された。

(2) 音波処理芽胞は耐熱性，屈折性，メチレンブルー非染色性など休眠芽胞の特性を有しており，L－alanineなどL型アミノ酸により，発芽が誘導された。

(3) 芽胞殻中間層は音波処理芽胞を1/16 N－NaOH中50℃，30分間保温することにより抽出され，

免疫化学的に2種のたん白質を含むことが明らかとなった。

(4) アルカリ処理芽胞は耐熱性，屈折性，メチレンブルー非染色性を示し，発芽能も休眠芽胞と比較し，変化は認められなかった。

(5) 芽胞殻内層は物理的刺激に対して弱く，4,600rpm，1時間振とうすることにより，アルカリ処理芽胞は完全に形態構造が崩壊した。しかし，還元剤処理に対しては抵抗性を有しており，還元剤処理後もリゾチームを透過させなかった。

(6) 芽胞に特異な物質であるジピコリン酸は芽胞殻外層，中間層には存在せず，芽胞殻内層以内に存在することが明らかとなった。

文献

(1) Murrell,W.G.:Advances in microbial physiology, vol. 1. Academic Press Inc., New York, P. 144 —189 , (1967) .

(2) Murrell,W.G.:The bacterial spore. Academic Press Inc. New York, P. 215 —273 , (1969) .

(3) Ross,K.F.A. and Billing, E.: J.Gen.Microbiol., **16**, 418 , (1957)

(4) Murrell,W.G. and Scott, W.J.:J.Gen.Microbiol., **43**, 411 , (1966)

(5) Marshall,B.J. and Murrell,W.G.:J.Appl.Bacteriol., **33**, 103 , (1970)

(6) Church,B.D. and Halvolson,H.:Nature,**183** , 124 , (1959)

(7) Levinson,H.S., Hayatt,M.T. and Moore,F.E., Biochem. Biophys. Res. Commun., **5** , 417 , (1961)

(8) Aronson,A.E. and Tincher,A.:Biophys. Res. Commun., **26**, 454 , (1967)

(9) Blach,S.H., Hashimoto, T. and Gerhardt, P.:Can.J. Microbiol., **6**, 213 , (1960)

(10) Murrell,W.G. and Warth,A.D.:In Spores **3**, P. 1. (1965)

(11) Someville,H.J., Delafield,F.P. and Rittenberg,S.C.:J. Bacteriol., **101** , 551 , (1970)

(12) Aronson,A.I. and Fitz—James,P.C.:J.Mol.Biol., **33**, 199 , (1968)

(13) Aronson,A.I. and Horn,D.:In Spores **5**, P.19, (1972)

(14) Fitz—James,P.C.: J.Bacteriol.,**105** , 1119, (1971)

(15) Aronson,A.I. and Fitz—James,P.C.: J.Bacteriol., **108**, 571, (1971)

(16) Kondo,M. and Foster,J.W.:J.Gen.Microbiol., **47**, 257 , (1967)

(17) Kondo,M. and Foster,J.W.:Biken J.,**10**, 243 , (1967)

(18) Gouled,G.W.,Stubbs,J.M. and King,W.L.,J.Gen. Microbiol.,**60**, 347 , (1970)

論文の審査結果の要旨

Bacilus thiaminolyticus 芽胞殻の構造とその機能を明らかにするため，音波処理，アルカリ処理

など物理的，化学的処理により芽胞を死滅させることなく芽胞殻外層，中間層を除去することに成功し，それぞれの芽胞特異性に果す役割あるいは芽胞休眠性に対する芽胞殻の存在意義などについての新らしい知見を得たものであり学位論文に値するものと認めた。