Osaka University Knowledge Archive

Title	芽胞形成菌の脂質成分に関する研究
Author(s)	石原, 廣男
Citation	大阪大学, 1978, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/32024
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

【5】

氏名・(本籍)	石原廣男（いしはらひろお）
学位の種類	薬学博士
学位記番号	第 4122 号
学位授与の日付	昭和53年1月7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	**芽胞形成菌の脂質成分に関する研究**
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 教授 三浦 喜温

論文内容の要旨

緒　論

細菌の中で，Bacillus 属，Clostridium 属は，その生活環の一部として芽胞を形成することが知られている。その静止芽胞は，熱や薬剤に対し強い抵抗性を示し，栄養型とは生理的にも形態的にもまったく異なる耐久型細胞である。この芽胞形成菌の生活環における生理機構の変動に関しては，これまで形態学的に，あるいは，化学成分などを中心とした生理学的研究が多く行なわれてきたが，まだ不明の点が多い。とくに，これらの過程において，細胞の重要な構成成分である脂質がどのような役割を演じているか，あるいは，生理的変動にともないどのように変化していくかについては，わずかな知見しか得られていない。Bacillus 属の細菌は[1-7]とくにその脂肪酸組成が特徴的であることなどが認められているが，芽胞形成菌における脂質研究は，単に成分としての検討にすぎず，芽胞形成菌の生理機構との関連性を明らかにする意図で行なわれたものはない。そこで，芽胞形成菌の生理機構との関連性を明らかにするための基礎的知見を得ることを目的として，各期の細胞における脂質の組成とその変化について検討を行なった。

本　論

1）枯草菌の静止および発芽芽胞の脂肪酸組成とその分布について

Bacillus 属の細菌では，その脂肪酸組成として，炭素数15，17の奇数枝鎖脂肪酸が存在していることが知られており[1-7]枝鎖脂肪酸の物理化学的性質から，脂肪酸組成と芽胞の特性との間に関連性があるかどうか，あるいは，発芽時にどのような変化がおこるかについて検討した。

静止芽胞には，7.8%の総脂質，2.1%の脂肪酸が含まれ，総脂質はCortex 画分にはほとんど含有

されず，Coat画分とCore画分にほゞ同量ずつ分布し，脂肪酸については，その約$\frac{2}{3}$がCore画分，約$\frac{1}{3}$がCoat画分に検出された。

静止芽胞の脂肪酸組成について，GLCにより検討したところ，約16ケのピークが確認され，炭素数13～18，とくに15，16，17に集中していた。それら脂肪酸の百分率(Table 1)では，iso $C_{14:0}$，iso $C_{15:0}$，anteiso $C_{15:0}$，iso $C_{16:0}$，n $C_{16:0}$，iso $C_{17:0}$，anteiso $C_{17:0}$ の7種で約98.5%を占めた。また，不飽和脂肪酸はほとんど検出されず，枝鎖脂肪酸が95%以上を占めた。

これら脂肪酸の分布は，Coat画分では，anteiso $C_{15:0}$が最も多く，以下iso $C_{15:0}$，iso $C_{17:0}$の順となり，anteiso型41.8%，iso型55.3%，直鎖型3%以下となった。Core画分においても，Coat画分とほゞ同様の組成であったが，iso $C_{15:0}$が最も多く，iso型62.6%，anteiso型32.8%，直鎖型4%となり，Coat画分と比較して，iso型が多く，直鎖型もわずかに多く検出された。Cortex画分も同様の脂肪酸が検出されたが量が非常に少なかった。また，偶数鎖，奇数類の分類では，Coat画分，Core画分ともに15：85の存在比となり，奇数鎖脂肪酸が優勢であった。

Table 1. Distribution of fatty acids in dormant spore

	Fatty acid	Spore	Fraction Coat	Cortex	Core
1	iso $C_{13:0}$	0.07	0.02	…	0.05
2	anteiso $C_{13:0}$	…	…	…	…
3	iso $C_{14:0}$	2.88	0.79	0.01	2.08
4	n $C_{14:0}$	0.13	0.03	…	0.10
5	iso $C_{15:0}$	28.96	7.57	0.06	21.33
6	anteiso $C_{15:0}$	29.83	10.78	0.06	19.00
7	n $C_{15:0}$	0.18	0.18	…	0.16
8	iso $C_{16:0}$	8.32	3.07	0.02	5.22
9	n $C_{16:0}$	2.86	0.72	0.01	2.13
10	$C_{16:0}$	0.08	…	…	0.07
11	iso $C_{17:0}$	19.80	6.12	0.04	13.64
12	anteiso $C_{17:0}$	5.85	2.54	0.01	3.30
13	n $C_{17:0}$	0.04	…	…	…
14	iso $C_{18:0}$	0.23	0.04	…	0.19
15	n $C_{18:0}$	0.37	0.06	…	0.31
16	$C_{18:0}$	0.39	0.08	…	0.31
	Total	100.0	31.84	0.21	67.89

一般に脂肪酸は，不飽和より飽和の方が，直鎖型より枝鎖型が，さらに枝鎖脂肪酸の中でもiso型よりanteiso型の方が，その物理化学的性状が高温においてもより安定な性状を示す[8]。芽胞に存在する脂肪酸として，枝鎖飽和脂肪酸が圧倒的に多いことは，静止芽胞のもつ種々の抵抗性などの特性と無関係ではなく，また，anteiso型の分布割合がCoat画分に高いことは，芽胞の特性の発現にCoatの果

たす役割が大きいことを示唆するものである。

芽胞は発芽により，耐熱性その他の特性を一挙に失うが，その際，流出成分もあり，乾燥重量が約70%となり，総脂質含量も減少した。その減量は，いずれの画分においても認められた。

発芽芽胞の脂肪酸組成は(Table 2) 静止芽胞と比較して，質的にはほとんど変化はなかったが，各

Table 2. Distribution of fatty acids in germinated spore

	Fatty acid	Spore	Coat	Fraction Cortex	Core
1	iso $C_{13:0}$	0.05	0.01	+	0.04
2	anteiso $C_{13:0}$	…	…	…	…
3	iso $C_{14:0}$	2.63	0.64	+	1.99
4	n $C_{14:0}$	0.12	0.04	…	0.08
5	iso $C_{15:0}$	27.71	7.21	++	21.50
6	anteiso $C_{15:0}$	30.14	8.03	++	22.11
7	n $C_{15:0}$	0.10	0.03	…	0.07
8	iso $C_{16:0}$	8.69	2.11	+	6.58
9	n $C_{16:0}$	2.41	0.75	++++	1.66
10	$C_{16:1}$	…	…	…	…
11	iso $C_{17:0}$	19.03	4.14	++	14.89
12	anteiso $C_{17:0}$	7.69	1.98	+	5.71
13	n $C_{17:0}$	…	…	…	…
14	iso $C_{18:0}$	0.09	0.04	+	0.05
15	n $C_{18:0}$	0.15	0.05	+	0.10
16	$C_{18:1}$	0.19	0.08	+	0.11
	Total	100.0	25.11		74.89

… = trace or not detectable

+, ++ =detectable, but a little amount

画分の分布割合など，量的に変動が認められた。すなわち，Coat画分に対してCore画分は相対的に増加し，とくにanteiso型が増加していた。

個々の脂肪酸の量的変動は，発芽時にすでに代謝や生合成が進行しているか，あるいは，Coat画分からCore画分への脂肪酸の移行に起因すると考えられる。また，Core画分において，発芽によりanteiso型が増加したことは，栄養型細胞で，anteiso型が相対的に多いことから考えて，脂肪酸組成の上からも芽胞から栄養型への変換が，栄養型細胞の母体となる芽胞のCore画分において，発芽時におこっていることを示すものである。

2）枯草菌の増殖および芽胞形成過程における菌体内脂肪酸組成の変化

栄養型細胞には総脂質，脂肪酸ともに多く，その脂肪酸組成を静止芽胞と比較すると，相対量の相

違が認められた。すなわち，栄養型細胞には，直鎖型脂肪酸が比較的多く，枝鎖脂肪酸のうちではiso型が少なかった。奇数鎖，偶数鎖の比較では，奇数鎖が約88%を占めていた。これは，静止芽胞の場合とほゞ同様であるが，他の菌種[4-7,9-11]と比較すると，より高い値であり，本菌株に特徴的であるといえる。

対数増殖期から芽胞形成に至る細胞の主な脂肪酸組成についての経時変化を検討した。anteiso $C_{15:0}$ は対数増殖期に高く，芽胞形成期に一時的に減少し，成熟期に再び急増した。iso $C_{15:0}$ はanteiso $C_{15:0}$ と逆の変動を示した。また，iso $C_{16:0}$ は漸次増加傾向を示し，n$C_{16:0}$ は芽胞形成にともなって減少した。

Table 3. Fatty acid composition of cells during growth and sporulation

	Vegetative				
1 iso $C_{13:0}$	0.28	0.22	0.19	0.10	0.10
2 anteiso $C_{13:0}$	…	…	…	…	…
3 iso $C_{14:0}$	1.44	1.79	2.32	2.86	2.86
4 n $C_{14:0}$	0.20	0.16	0.10	…	…
5 iso $C_{15:0}$	25.12	29.56	33.59	33.93	30.60
6 anteiso $C_{15:0}$	30.48	28.49	24.89	23.07	29.03
7 n $C_{15:0}$	0.15	0.10	0.10	…	0.10
8 iso $C_{16:0}$	3.85	4.17	5.33	6.91	7.74
9 n $C_{16:0}$	5.69	4.19	3.28	3.03	2.33
10 $C_{16:1}$	…	…	…	…	…
11 iso $C_{17:0}$	22.17	22.89	22.26	23.05	21.27
12 anteiso $C_{17:0}$	9.46	8.10	7.79	6.95	5.93
13 n $C_{17:0}$	…	…	…	…	…
14 iso $C_{18:0}$	0.05	…	…	…	0.23
15 n $C_{18:0}$	0.77	0.23	0.15	0.10	0.10
16 $C_{18:1}$	0.29	0.10	…	…	…
Total	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0

… = trace or not detectable

他の脂肪酸に関してもいくらか変動が認められた。これらの変動は，芽胞形成期において脂肪酸の生合系，あるいは，代謝系の変換，変動を示すものである。

脂肪酸生合成系には，奇数枝鎖脂肪酸系と直鎖脂肪酸系の酵素系が存在し，高温菌の場合，増殖温度の変化により，その均衡が変動する[12]ことが報告されているが，本菌の芽胞形成期における脂肪酸合成系の変動は，何らかの環境因子，あるいは，菌体内成分の量的変化により調節されている可能性が考えられる。しかし，B, megaterium の芽胞形成期に取り込まれたグリセリンや酢酸が，静止芽胞中にはほとんど検出されない[13]ことを考慮すると，芽胞形成中の母細胞部分と，前駆芽胞部分における脂肪酸生合成系の相違，あるいは，母細胞部分から前駆芽胞部分への選択的な移行，蓄積が脂肪酸組成の変動として検出されたとも推察される。そこで，芽胞形成期の細胞を母細胞部分（リゾチーム

可溶性画分）と前駆芽胞部分（リゾチーム非感受性画分）とに分画し，脂肪酸組成を検討した。その結果，iso $C_{15:0}$の変動は，母細胞部分の変動の結果であり，芽胞形成後期におけるanteiso $C_{15:0}$ の増加は，前駆芽胞部分における増加の結果と判明した。

3）静止芽胞，栄養型細胞の脂質成分，および芽胞形成期におけるリン脂質成分について

静止芽胞，栄養型細胞の脂質成分を抽出し，中性脂質，糖脂質，リン脂質を分離同定するとともに，それらと芽胞の特性との関連について検討した。また，各期の細胞におけるリン脂質含量をしらべ，芽胞形成期におけるリン脂質の変化について検討した。

枯草菌の栄養型細胞と静止芽胞の脂質組成は，前者はリン脂質：中性脂質：糖脂質の比が70：25：5であるのに対し，後者は56：43：1と大きな相違が認められた。B. megaterium[14),15)] において，リン脂質含量が芽胞形成初期に最大となり，静止芽胞ではその$\frac{1}{2}$に減少し，中性脂質が増加するということからも，脂質成分に関する酵素系が芽胞形成にともない大きな変動があることを示す。

リン脂質組成のうち，CLは，S. aureus[16,17)] において耐塩機構の関連が論じられているが，本菌においても静止芽胞では，リン脂質中CLが73%と非常に高く，CLと芽胞のもつ抵抗性機構との間に何らかの関連があることを示唆するものといえる。

Table 4. Lipid composition of vegetative cells and spores

	Phospholipid					Neutral lipid %	Glyco lipid %
	Total	CL	PdE	PdG	Nh+A		
Vegetative cells	69.6 (100.0)	26.0 (37.3)	21.3 (30.6)	6.2 (8.9)	16.1 (23.2)	24.9	5.5
spores	55.6 (100.0)	41.0 (73.7)	7.1 (12.8)	6.0 (10.8)	1.5 (2.7)	43.2	1.2

CL＝Cardiolipin,　PdE＝Phosphatidylethanolamine,
PdG＝Phosphatidylglycerol,　Nh＋A＝Unidentified ninhydrin positive lipid

中性脂質に関しては，Poly β-hydroxy batyrateがエネルギー貯蔵型[18)] として，あるいは，抗酸性性染色の原因物質[19,20)] として芽胞形成菌において知られているが，本菌においてはWax様物質のうち，β-ヒドロキシ脂肪酸エステルが，これに近い成分と考えられる。

糖脂質として，DGDGおよびMGDGが検出されたが，これらの本菌における存在意義は不明であるが，一般に，高温菌，好塩菌，芽胞形成菌など，苛酷な環境条件下で生育しうる菌種に糖脂質が多い傾向があり，[21,22,23)] 環境に対する抵抗性機構の一因子としての意義も推察される。

リン脂質含量について，生活環全体にわたり，その変化をしらべたところ，まず，発芽時にわずかに減少が認められたが量的には大差なく，発芽によるリン脂質の消費または流出はあまりないものと推定された。発芽による変化は，Coat画分ではほとんどなく，Core画分では，逆に増加が認められ，発芽とともに脂質生合成の開始が示唆され，脂肪酸組成の変化とも一致した。対数増殖期に入るとリン脂質は増加し，stationary phaseで最大となり，芽胞形成期に減少する傾向を示し，芽胞形成過程

にリン脂質が大きく関与している可能性が示唆された。

芽胞形成期細胞のリン脂質組成の変動をしらべた結果，栄養型細胞と比較して，PdE, Nh＋A が少なく，相対的にCL，PdGの増加が認められた。そこで，芽胞形成期細胞の母細胞と前駆芽胞におけるこれら脂質の分布をしらべたところ，母細胞画分中，PdEは，栄養型細胞のときの約半分に減少し，Nh＋Aは非常に少なかった。一方，かなり多量のニンヒドリン陽性物質が検出され，この大部分はEAであり，PdE, Nh＋Aがこの時期に分解されていることが明らかとなった。そして，これらは，前駆芽胞中にも少ないことから，芽胞形成のためのエネルギー源として消費されるか，または，これらのリン脂質が中間体となって芽胞構成成分に変換することにより，見かけ上減少した可能性も推定された。

CL，PdGが前駆芽胞中に多くとりこまれていたことは，前駆芽胞の種々の抵抗性などの特性の獲得との関連が示唆された。また，前駆芽胞のリン脂質組成が，全体として静止芽胞と類似の組成を示し，この時期にすでに成熟芽胞と同様の脂質含有構造が形成されてきていることが推定された。

結　論

1）枯草菌は，各期の細胞を通じて特徴的な脂肪酸を含有し，その組成は炭素数13～18に集中し，とくに奇数枝鎖飽和脂肪酸が高比率で存在し，不飽和脂肪酸はほとんど存在しなかった。

2）芽胞のCoat画分は，anteiso $C_{15:0}$の比率が高いことなど，芽胞の特性と，含有する脂肪酸の物理化学的な性質の間に関連性のあることが示唆された。

3）芽胞の発芽により，Core画分においてanteiso $C_{15:0}$が増加することから，静から動への大きな変化に脂肪酸生合成も関与することが示唆された。

4）対数増殖時には，直鎖型脂肪酸生合成系の作用も認められたが，一般には，奇数枝鎖型生合成系が活発であった。また，芽胞形成期には，脂肪酸組成の変動があり，その母細胞部分と前駆芽胞部分との代謝の相違，あるいは，後者への移行，蓄積によるものと判明した。

5）栄養型細胞と静止芽胞の脂質組成は，前者はリン脂質が多く，後者は中性脂質が増加し，リン脂質はやや減少した。しかし，リン脂質組成のうち，ＣＬは静止芽胞中に高比率で存在し，芽胞の特性との関連が示唆された。

6）芽胞の発芽により，Core画分のリン脂質の増加は，リン脂質生合成の開始を示唆した。

7）芽胞形成期において，リン脂質含量の減少が認められ，これは，PdE, Nh＋Aの減少によるものであり，また，相対的にＣＬ，PdGが増加した。このことは，母細胞部分での代謝と前駆芽胞部分へのとりこみの結果おこったものと考えられた。

REFERENCES

1）Akashi, S. and Saito, K. (1960); J. Biochem., **47** 222-229

2）Saito, K. (1960); J. Biochem., **47** 699-709

3）Saito, K. (1960); J. Biochem., **47** 710-719

4）Bulla, L. A., Bennett, G. A., and Schotwell, O. L. (1970); J. Bacteriol., **104** 1246-1253

5) Kaneda, T. (1967) ; J. Bacteriol., **93** 894-903
6) Kaneda, T. (1968) ; J. Bacteriol., **95** 2210-2216
7) Kaneda, T. (1969) ; J. Bacteriol., **98** 143-146
8) 植田伸夫, (1971) ; 油化学**30** 663-669
9) Yao, M., Walker, H. W. and Lillard, D. A. (1970) ; J. Bacteriol., **102** 877-878
10) Shen, P. Y., Coles, E., Foote, J. L. and Stenesh, J. (1970) ; J. Bacteriol., **103** 479-481
11) Urakami, c. and Umetani, K. (1968) ; Biochim. Biophys. Acta, **164** 64-71
13) 大島, 吉田, 曽根, 平田, 市川, 若山, 大島, (1975) ; 蛋白質・核酸・酵素**20** 168-175
13) Bacon, K. and White, D. (1974) ; J. Bacteriol., **118** 225-230
14) Bertsch, L. R. L., Bonson, P. P. M. and Kornderg, A. (1969) ; J. Bacteriol., **98** 75-81
15) Scandella, C. J. and Kornberg, A. (1969) ; J. Bacteriol., **98** 82-86
16) Kanemasa, Y., Yoshioka, T. and Hayashi, H. (1972) ; Biochim. Biophys. Acta, **280** 444-450
17) 遠水, 岡部, 狩山, 林, 金政, (1976) ; 第18回日本脂質生化学研究会要旨p155-158
18) Nakata, H. M. (1966) ; J. Bacteriol., **91** 784-788
19) Kondo, M. and Yoneda, M. (1959) ; Biken's J., **2** 247-258
20) Kondo, M., Yoneda, M., Nishi, Y., and Fukai, K. (1961); Biken's J., **4** 41-49
21) Derosa, M., Gambacorta, A. and Bulock, J. D. (1975) ; J. Gen. Microbiol., **86** 156-164
22) Langworthy, T. A., Mayberry, W. R. and Smith, P. F. (1974) ; J. Bacteriol., **119** 106-109
23) Lang, D. R. and Lundgren, D. G. (1970) ; J. Bacteriol., **101** 483-489

なお, 文中には以下の略語を使用した。

$C_{13:0}$: tridecanoic acid
$C_{14:0}$: myristic acid
$C_{15:0}$: pentadecanoic acid
$C_{16:0}$: palmitic acid
$C_{16:1}$: palmitoleic acid
$C_{17:0}$: margaric acid
$C_{18:0}$: stearic acid
$C_{18:1}$: oleic acid
n : normal
CL: cardiolipin
PdE: phosphatidyl ethanolamine
PdG: phosphatidyl glycerol
DG: diglyceride
TG: triglyceride
FA: fatty acid

DGDG: diglucosyl diglyceride
MGDG: monoglucosyl diglyceride
EA: ethanolaminaime

論文の審査結果の要旨

枯草菌芽胞およびその生活環における各時期の脂質成分を検討し，細胞分化にともなう脂質成分の変動を明らかにした。すなわち，本菌は生活環各時期を通じて特徴的な脂肪酸を含有し，炭素数15～17の奇数枝鎖飽和脂肪酸が高比率で存在すること，芽胞発芽時Anteiso C15：0の増加がみられ，芽胞形成期には栄養型細胞でみられた脂肪酸組成に変動がおこり，その組成が芽胞型に移行することを明らかにした。また，リン脂肪組成の検討から，栄養型細胞ではリン脂質が高比率に存在するか，芽胞では中性脂肪が多く，またカルジオリピンが高比率に存在することなどを明らかにした。これらの研究は細胞分化と脂質成分の関連性を追求するための基礎的知見を得たもので，薬学博士の学位論文に値するものと認めた。