



Title	芽胞形成菌におけるシステイン酸の挙動に関する研究
Author(s)	越川, 富比古
Citation	大阪大学, 1979, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/32243
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、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏名・(本籍)	越川富比古
学位の種類	薬学博士
学位記番号	第 4588 号
学位授与の日付	昭和 54 年 3 月 24 日
学位授与の要件	薬学研究科 應用薬学専攻 学位規則第 5 条第 1 項該当
学位論文題目	芽胞形成菌におけるシスティン酸の挙動に関する研究
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 岩田平太郎 教授 三浦 喜温

論文内容の要旨

緒論

芽胞形成菌の栄養型細胞は、対数増殖期の末期になると培地中の栄養源の消失にともない、形態学的にも生理学的にも栄養型細胞とまったく異なった芽胞を形成する(1, 2, 3)。この芽胞形成は(4, 5), 遺伝的コントロールされた一連の生化学的現象の発現ならびに形態学的变化を経て完成されるものであり、種々な面からの芽胞形成機構解明の研究が数多く行なわれている。そのひとつとして芽胞形成時に特異的に認められる物質をは握し、この物質の変化あるいは芽胞形成時におけるその消長について検討することより、物質のレベルで芽胞形成機構を解明しようとする試みがある。これに関してはすでに cortex の構成成分、spore coat のたん白質、ジピコリン酸等に関する研究が行なわれているが、芽胞形成機構との直接的な関連を明らかにするまでには至っていない(6, 7, 8, 9,)。そこで著者は、B. subtilis の芽胞形成期細胞に特異的に現われてくる低分子未知物質の検出を試み、この物質を中心として芽胞形成機解明の糸口を見出すことを試みた。

本研究においては、まず芽胞形成期細胞中のトリクロル酢酸(TCA)可溶性抽出物に注目し、この分画について検討したところ芽胞形成時の細胞中に Cysteic acid が蓄積されることが明らかとなつたので、この物質の芽胞形成期における挙動を追求し芽胞形成との関連性を検討した。

本論

第 1 章 枯草菌芽胞形成期細胞の TCA 可溶性画分の強酸性 Ninhydrin 反応陽性物質の存在および同定

芽胞形成期細胞を冷10% TCA で抽出し、抽出液をアミノ酸アナライザーにより分析した結果を

Fig. 1 に示した。アスパラギン酸に先行して溶出される物質の存在が認められ、本画分を酸加水分解した場合にもアミノ酸アナライザでの溶出位置は酸加水分解前と同じであった。そこで、この画分の化合物の本体を明らかにするため精製を試みた。すなわち、TCA 抽出液を Amberlite CG-120 カラムクロマト、酸加水分解し、再び Amberlite CG-120 カラムクロマトおよび活性炭処理を行なった。つぎに 2,4-dinitrophenyl 化し、ECTEOLA—セルロースカラムクロマト、Sephadex G-10で分画し、再結晶を行ない DNP-Compound I を得た。

この物質を薄層およびペーパークロマト (Table 1)、ロ紙電気泳動 (Fig. 2) および高速液体クロマトにより、既知物質と比較した結果、Cysteic acid と同定された。

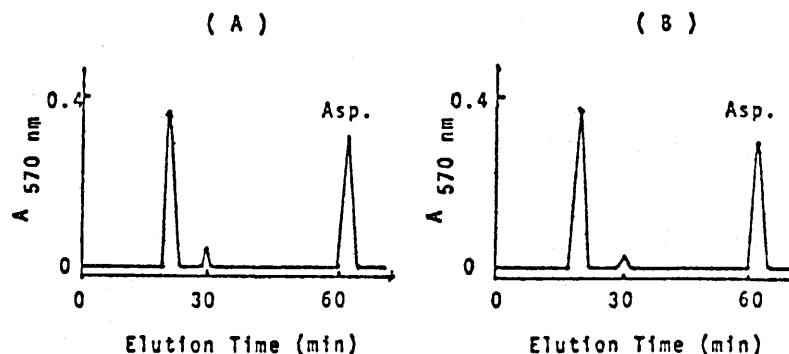


Fig. 1. Elution Pattern of Ninhydrin Positive Materials in TCA Extract from Sporulating Cells by Amino Acid Analyzer

Table 1

Rf Values of DNP-Compound I and Other DNP-Derivatives in Thin Layer and Paper Chromatography

	System A	System B
DNP-Compound I	0.81	0.53
DNP-Cysteic Acid	0.81	0.53
DNP-Taurine	0.60	0.55
DNP-Phosphorylserine	0.72	0.57
DNP-Homocysteic Acid	0.55	0.90

System A: Thin Layer Chromatography

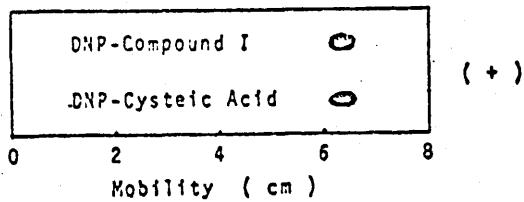
Gel; Silicagel 60 PF₂₅₄

Solvent; 1.5M Levy's Phosphate Buffer

System B: Paper Chromatography

paper; Toyo No. 51

Solvent; n-BuOH-AcOH-H₂O (4 : 1 : 5)



Condition: Voltage; 10V/cm
 Time; 2.5hrs
 Buffer; 0.15M Acetate Buffer
 (pH 5.0)
 Paper; Toyo No. 51

Fig. 2. Identification of DNP-Compound I by Paper Electrophoresis

第二章 Cysteic acid の定量法および枯草菌生活環における菌体内 Cysteic acid 含量

枯草菌の芽胞形成期細胞中に Cysteic acid が存在することが明らかとなつたが、生活環での Cysteic acid 含量を測定するため、高速液体クロマトによる Cysteic acid の定量法について検討した。

高速液体クロマト用試料の調製方法は、種々検討した結果、細胞の TCA 抽出液を Amberlite CG-120 カラムに吸着させ、脱イオン水で溶出した画分を DNP 化することにより満足すべき結果が得られた。また、高速液体クロマトによる Cysteic acid の分離条件について検討したところ、zorbax ODS カラム、溶出液 0.01 M 酢酸ナトリウム溶液、温度50°C、圧力 100 kg/cm² の条件が良好であった。この方法により添加回収実験を行なった結果、回収率は94~98%であり、Cysteic acid の定量法として用いることができるこことを確認した。

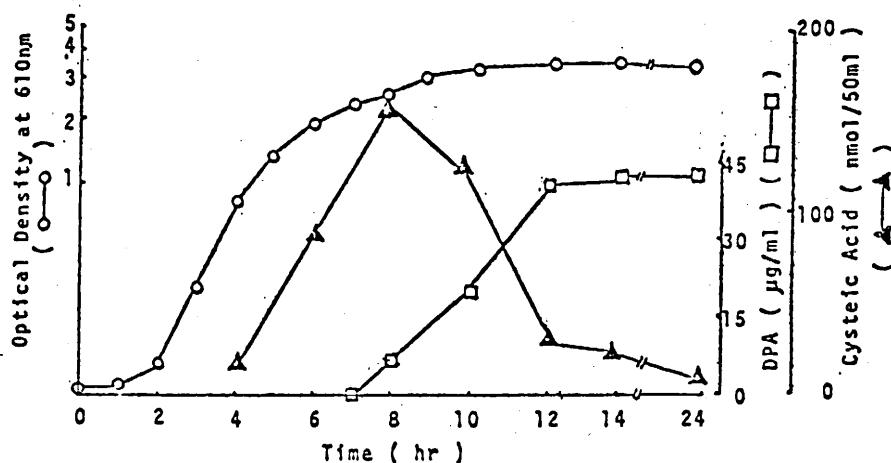
この方法を用いて、枯草菌の生活環における Cysteic acid 含量を測定したところ(Table 2)、乾燥菌体100 mg 当り栄養型細胞では69nmole、芽胞形成期細胞では 350nmole 存在したが、芽胞ではほとんど存在せず、芽胞形成期の細胞に多く存在することが明らかとなつた。

Table 2
 Content of Cysteic Acid in Cells at Various Stages

Cell Phase	TCA Extract (nmol/10mg)	After Hydrolysis (nmol/10mg)
Vegetative Cell	69.0	69.0
Sporulating Cell	350.0	384.0
Spore	0	9.1
Soluble Fraction	7.1	—
Insoluble Fraction	—	2.0

第三章 Cysteic acid の芽胞形成期での挙動および芽胞形成との関連性

芽胞形成期における Cysteic acid の挙動を Fig. 3 に示した。細胞内 Cysteic acid 含量は芽胞形成初期から増加しはじめ、芽胞の特異成分であるジピコリン酸の産生が開始される時期で最高に達し、以後芽胞の成熟につれて減少することが認められた。この時期における培養液上清中に全く Cysteic acid が検出されないことからこの減少は細胞内で代謝されることに起因するものと推察された。

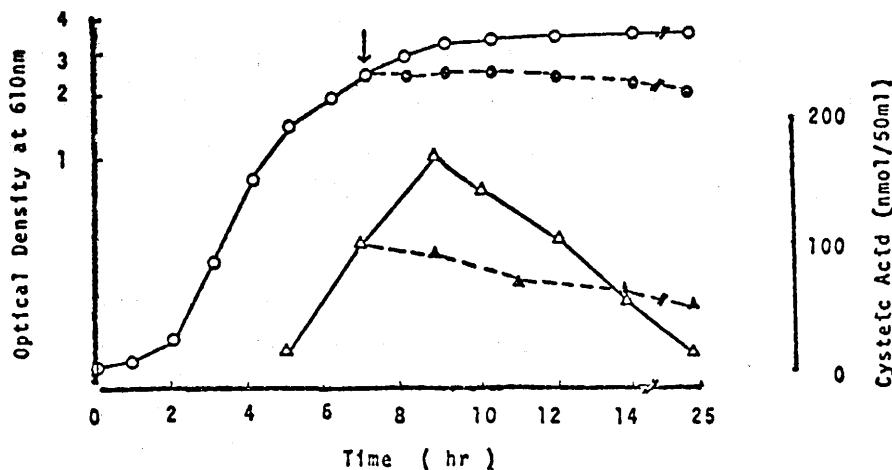


Cells harvested at the indicated intervals were extracted with 10% trichloroacetic acid. Cysteic acid was determined by high pressure liquid chromatography.

Fig. 3. Level of Cysteic Acid during Growth and Sporulation of *Bacillus subtilis* NRRL B558

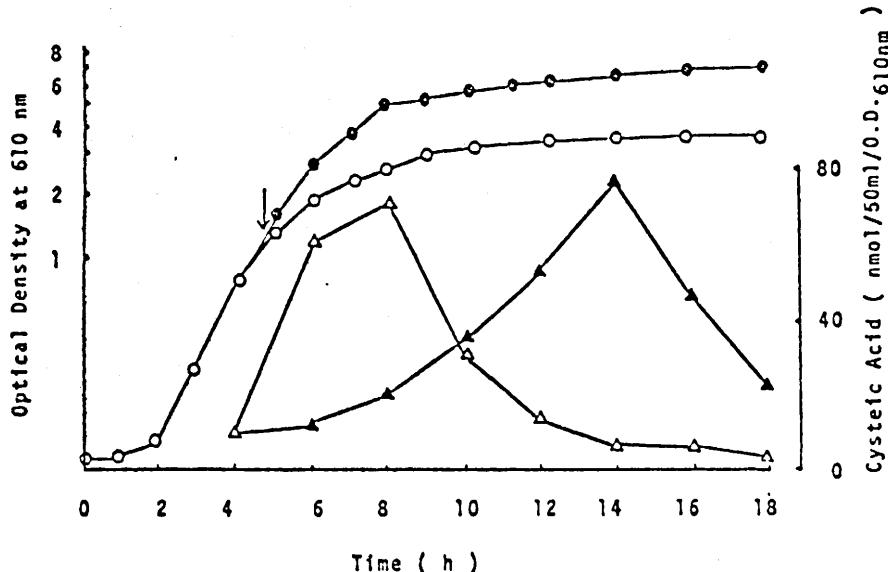
つぎに、芽胞形成期における Cysteic acid の挙動が、芽胞形成と関連性があるかどうかについて検討した、この関連性を見る方法のひとつとして、芽胞形成の阻害あるいは遅延を人为的に行なった場合、これと対応して Cysteic acid の細胞内含有量がどのように変化するかを観察する方法を考えられる。もし芽胞形成が阻害されたとき Cysteic acid の合成がおこらず、また芽胞形成が遅延したとき、Cysteic acid の合成がこれに対応して遅延したとすれば、すくなくとも芽胞形成機構と Cysteic acid 生合成機構が何らかの関連性を有するものと判断できる。そこで、まず、クロラムフェニコールで芽胞形成を阻害(10)したところ、Cysteic acid の蓄積は抑制され、また、過剰量のグルコースを添加して芽胞形成を遅延(11)させた場合には、Cysteic acid の蓄積も遅延する結果が得られた(Fig. 5)

一方、Cysteic acid の蓄積は菌の増殖が停止することによりおこるとも考えられたので、Fig. 6 に示すように Mn^{2+} を添加しないで培養し、菌の増殖を停止させたところ Cysteic acid 量は増加しなかった。さらに、 Mn^{2+} を添加して芽胞形成が可能な条件にすると Cysteic acid の蓄積がみられた。これらの事実から、Cysteic acid の合成が芽胞形成機構と密接な関係にあることが示唆された。



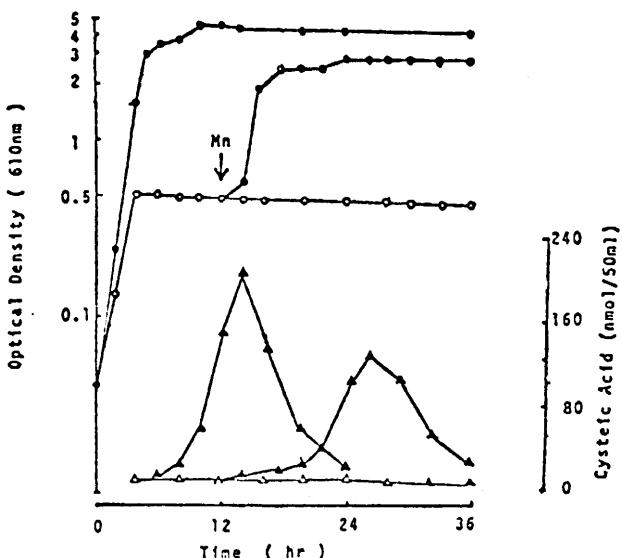
Cells were cultivated in Schaeffer's medium (open symbols). Chloramphenicol ($10 \mu\text{g}/\text{ml}$) was added at 7 hr (closed symbols). Growth: (-○-), Cysteic Acid : (-△-, -△-)

Fig. 4. Effect of Chloramphenicol on Sporulation and Cysteic Acid Accumulation



Cells were grown in Schaeffer's medium (open symbols) and glucose was added after 4.5 hr cultivation (closed symbols). Growth: (-○---●--), Cysteic Acid:(-△---▲--)

Fig. 5 Effect of Glucose on Sporulation and Cysteic Acid Accumulation.



Cells were cultivated in Schaeffer's medium plus 25 mM glucose with (closed symbols) and without 10 μM MnCl_2 (open symbols). Growth: (-○-, -●-), Cysteic Acid: (-△---▲-), Arrow indicates the addition of MnCl_2 (10 μM) into the Mn^{2+} -deficient medium.

Fig. 6. Effect of Mn^{2+} on Growth, Sporulation and Cysteic Acid Accumulation

第4章 芽胞形成期細胞における Cysteic acid の生合成および代謝経路の検討

Cysteic acid の生合成経路について検討した。 $^{35}\text{S}-\text{Methionine}$ あるいは $^{35}\text{S}-\text{Cysteine}$ を培地に添加して培養した芽胞形成期細胞の TCA 抽出液をアミノ酸アナライザーにて分離し、放射活性を測定したところ、 $^{35}\text{S}-\text{Methionine}$ 添加の場合、TCA 抽出液の放射活性の50%以上が Cysteic acid の溶出位置に認められた (Fig. 7) $^{35}\text{S}-\text{Cysteine}$ を添加した場合には、TCA 抽出液の放射活性の90%以上が Cysteic acid の溶出位置に認められた。

さらに、 $^{35}\text{S}-\text{Methionine}$ および $^{35}\text{S}-\text{Cysteine}$ を添加して培養した芽胞形成期細胞の TCA 抽出液の Amberlite CG-120 素通り画分を DNP 化したのち、DNP 画分および DNP 化されない画分に分画し、そのそれぞれについて ^{35}S 標識化合物の検討をした。DNP 画分を高速液体クロマトにより分析した結果、DNP-Cysteic acid の溶出位置に放射活性が認められた (Fig. 8)。また、DNP 化されない画分の ^{35}S 標識化合物を薄層クロマトにより分析した結果、Rf 値 0.35 付近に放射活性が認められ (Fig. 9)，さらに、この物質は芽胞中にも存在することが判明した。このような性質の物質としては枯草菌芽胞に Sulfolactate が存在することが報告されており、検討した結果 Sulfolactate と同定した。Sulfolactate が Cysteic acid の代謝産物であるかについて検討するため、 $^{35}\text{S}-\text{Cysteic acid}$ を培地に添加して培養したところ、芽胞形成期細胞および芽胞中の Sulfolactato に放射活性が認められた。

以上のことから、芽胞形成期初期において、Methionine あるいは Cysteine から Cysteic acid

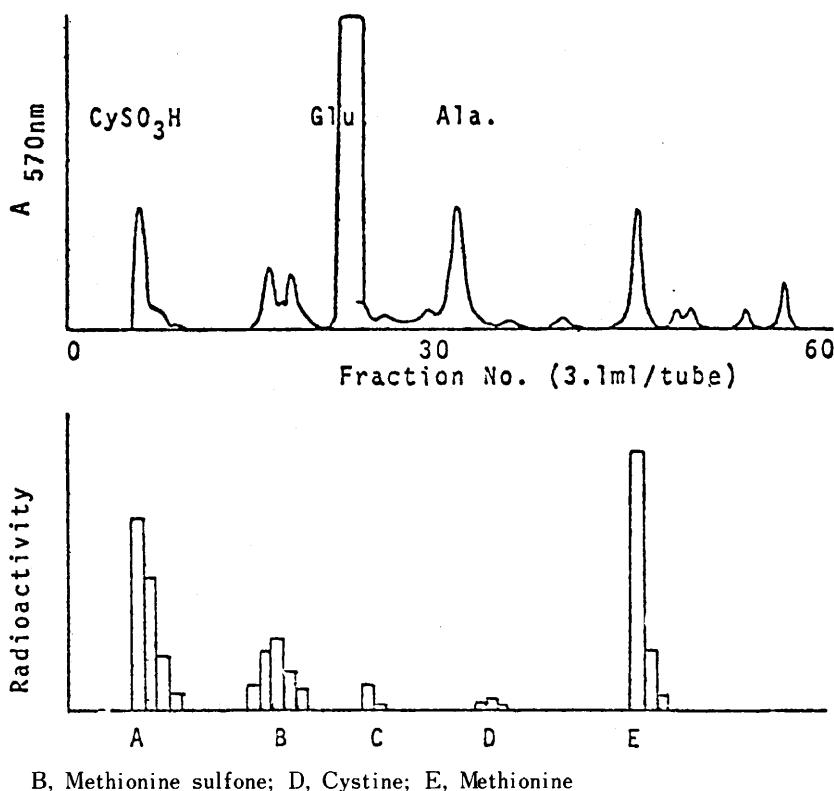


Fig. 7. Amino Acid Analysis of TCA Extract from sporulating Cells Grown in Medium Containing ^{35}S -Methionine

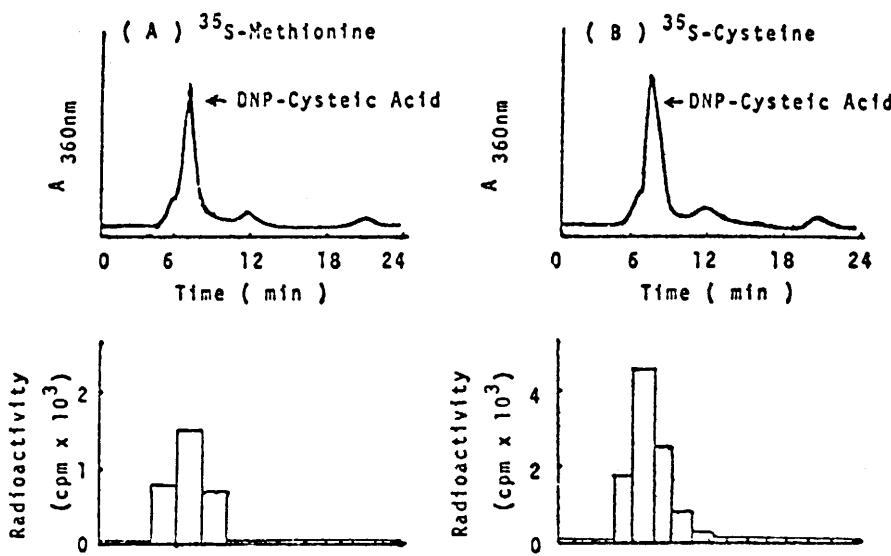
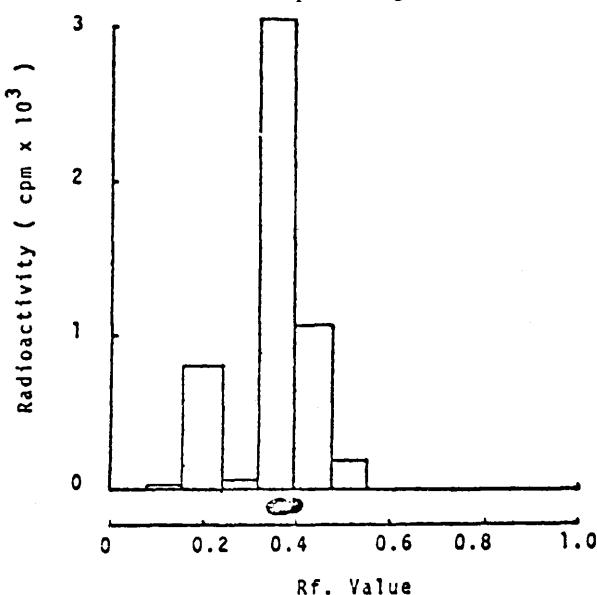


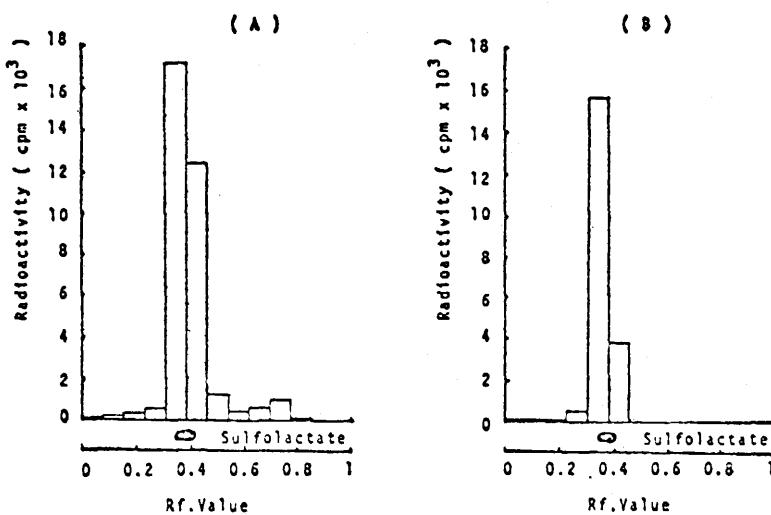
Fig. 8. Analysis of ^{35}S -labeled Compounds in DNP-Fraction R-1 from Sporulating Cells by High Pressure Liquid Chromatography

Fig. 9. Analysis of ^{35}S -labeled Compounds in Non-DNP-Fraction R-1 from Sporulating Cells



Sporulating cells were cultivated in schaeffer medium containing ^{35}S -Methionine.

Fig. 10. Conversion of ^{35}S -Cysteic Acid into ^{35}S -sulfolactate *in vitro*



(A): Non-DNP-Fraction R-1 of Sporulating Cells

(B): Non-DNP-Fraction R-1 of Spore

Cells were cultivated in Schaeffer's medium for 6 hrs and transferred into replaced sporulation medium containing ^{35}S -cysteic ($5 \mu\text{Ci}/100 \text{ ml}$). Sporulating cells and spores were prepared after subsequent 8 hrs and 20 hr, respectively.

が生合成されて菌体内に蓄積され、これはさらに芽胞形成の進行に伴い Sulfolactate に代謝され、芽胞中に取込まれることが明らかとなり、本代謝経路が、芽胞形成期の低分子含硫化合物の主要代謝経路であることが示唆された。

第五章 Cysteic acid および Sulfolactate の in vitro における生合成

前章において、芽胞形成期では、Methionine → Cysteine → Cysteic acid → Sulfolactate の代謝系の存在が示唆されたので、cell-free 系で Cysteine から Cysteic acid、および Cysteid acid から Sulfolactate への生合成について検討した。 ^{35}S - Cysteine を含む 0.2M glycine buffer (pH 9) と菌抽出液をけん気的条件下、37°C 30分間反応させ、次に好気的条件下で37°C、30分間反応したのち、反応物を DNP 化して、高速液体クロマトにより分析した。その結果、Cysteic acid の溶出位置に放射活性が認められ、また、 ^{35}S - Cysteic acid、0.01 M- α -Ketoglutarate と菌抽出液を37°C、30分間反応させたのち、反応物を薄層クロマトにて分離したところ、Sulfolactate の位置に放射活性が認められた (Fig. 11, 12).

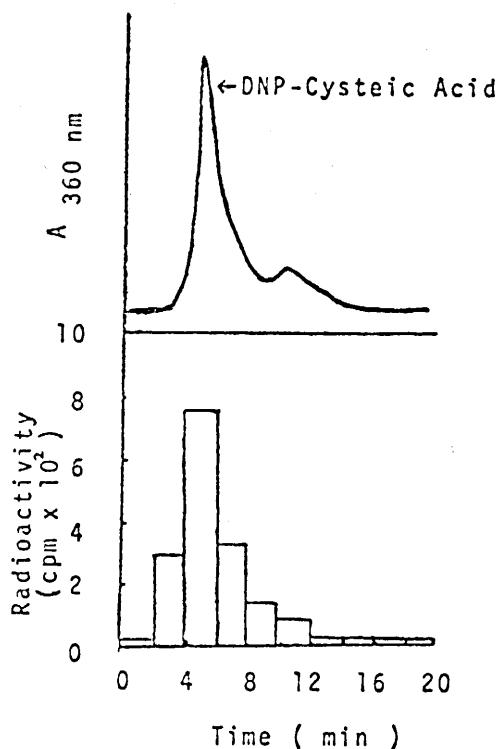


Fig.11. Formation of Cysteic Acid by Cell-Free System

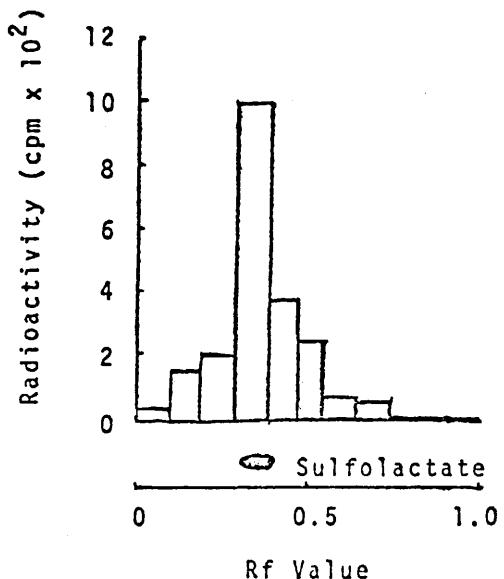


Fig. 12. Formation of Sulfolactate by Cell-Free System

以上のことより、cell-free 系でも、Cysteine から Cysteic acid が、Cysteic acid から Sulfolactate が生合成されることが認められた。

結論

B. subtilis NRRL B 558の芽胞形成期細胞の TCA 溶性画分の Ninhydrin 反応陽性物質について、その同定および定量法、さらに芽胞形成期での挙動について検討した。

1. 芽胞形成期細胞中に Cysteic acid が存在することを明らかにした。
2. Cysteic acid の高速液体クロマトによる定量法を確立し、生活環での Cysteic acid 含量を測定し、芽胞形成期に多く存在することが認められた。
3. 芽胞形成期における Cysteic acid の挙動は、芽胞形成と関連性があることが示唆された。 Cysteic acid は菌体内で生合成され、とくに芽胞形成期細胞内で活発に生合成されるが、芽胞形成後期には代謝されて減少することが推察された。
4. Cysteic acid は Methionine および Cysteine から生合成され、さらに Cysteic acid は Sulfolactate に代謝されることが明らかとなった。
5. cell-free 系で Cysteic acid および Sulfolactate が生合成されることが認められた。

引用文献

1. Kornberg, A., Spudich, J. A., Nelson, D. L., and Deutscher, M. P. (1968); Annu. Rev. Biochem. 37, 51
2. Gould, G. W., and Hurst, A. (1969); The Bacterial Spore, Acad. Press
3. 蜂須賀養悦, 堀越弘毅, 耐久型細胞 岩波書店 (1976)
4. Murrell, W. G. (1967); Advance in Microbial Physiology 1, 133
5. Schaeffer, P. (1969); Bacteriol. Rev., 33, 48

6. 佐野圭二, 市川富夫, 近藤雅臣, (1975) 日本細菌学雑誌, , **30**, 339
7. Sano, K., Ichikawa, T., and Kondo, M. (1975) ; Microbios **12**, 67
8. Powell, J. F., and Strange, R. E. (1959) ; Nature, **184** , 878
9. Bonsen, P. P. M., Spudich, J. A., Nelson, D. L., and Kornberg, A. (1969) ; J. Bacteriol., **98**, 62
10. Spudich, J. A., and Kornberg, A., (1968) ; J. Biol. Chem. **243** , 4600
11. Schaeffer, P., Millet, J., and Aubert, J.P. (1965) Proc. Natl. Acad. Sci., **54**, 704

論文の審査結果の要旨

Bacillus subtilis の芽胞形成期細胞中にシスティン酸が存在することを発見した。このシスティン酸は芽胞形成期の細胞内で生合成され菌体内含有量は増加するが、芽胞形成期後期には代謝され減少することが明らかとなり、また、同時にこの生合成および代謝が芽胞形成機構と密接な関係があることを認めた。システィン酸生合成ならびに代謝機構を検討した結果メチオニン、システィンを経由してシスティン酸が生合成され、芽胞形成期後期にはスルホラクテートに代謝され、この物質となって芽胞内に存在することを明らかにした。これらの成果は薬学博士を授与するに値する研究であることを認めた。