

Title	細菌芽胞殻の構造と機能に関する基礎的研究
Author(s)	今川, 正良
Citation	
Issue Date	
oaire:version	
URL	https://hdl.handle.net/11094/32554
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 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

【 2 】

氏名・(本籍)	いま 今	がわ 川	まさ 正	よし 良
学位の種類	薬	学	博	士
学位記番号	第	4918	号	
学位授与の日付	昭和55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	細菌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 岩田平太郎 教授 青沼 繁 教授 三浦 喜温			

論 文 内 容 の 要 旨

緒 論

細菌芽胞は、熱、薬品などに対して著しい抵抗性を有しているが、発芽誘起物質と接触するとすみやかに発芽し、抵抗性を一挙に失う。このような芽胞の耐久性の維持と発芽剤の認識選択機構に対して、芽胞の最外層を形成する芽胞殻が重要な役割を果たしていると考えられている(1, 2)。

芽胞殻の機能を検討する際、成熟芽胞をタンパク質変性剤などで処理し、その性質を検討する方法がよく行われてきた(3, 4)。しかしながら、芽胞形成過程に処理を行う方法はほとんど検討されていない。Fig. 1に示したように、芽胞形成は、形態的にもまた化学構造的にも明らかに異なった7つのStageを経て進行する(5)。Stage Vは芽胞殻がassemblyされる時期であり、この時期にある種の処理を行うことは、芽胞殻の構造と機能を検討する一方法としてきわめて有効な手段であると思われる。

芽胞殻中のシステイン残基はS-S結合の形で芽胞の抵抗性に寄与していることが、Vinter(6)により報告されている。またFitz-Jamesら(7)は、芽胞殻中のリン含量が芽胞殻の構造と密接な関連を有することを報告している。そこで、SH基やリン酸基に強い親和性を有する(8)塩化第二水銀を芽胞殻の形成期(Stage V)に添加し、形成した芽胞の諸性質を検討することにより、芽胞殻の機能解明を試みた。

本 論

第1章 水銀添加培地で形成した芽胞の形態構造および諸性質

Bacillus megaterium QM B1551菌をSchaeffer液体培地で同調的に培養した。培養9時間目

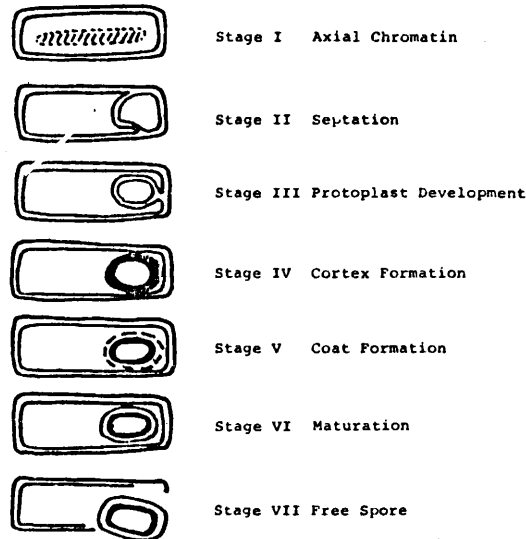


Fig.1. Diagrammatic representation of seven stages in sporulation.

(Stage V, Fig.1) に塩化第二水銀 $50 \mu\text{M}$ を添加した後、引き続き培養を行い、30時間目に集菌し水銀芽胞を調製した。超薄切片を作製し電子顕微鏡により形態構造を観察したところ、未処理芽胞と比較して、とくに芽胞殻に変化がみられた。未処理芽胞の芽胞殻は、電子密度の高い2層(外層および内層)が観察されたのに対して、水銀芽胞殻は両層共に非常に薄かった。さらに、芽胞を低温灰化後観察すると、未処理芽胞では電子密度の高い芽胞殻が観察されたのに対して、水銀芽胞では芽胞殻を認めることができなかった。このことから水銀芽胞は、非常に薄くまたもろい芽胞殻を有していると思われた。

芽胞を破碎後、コア、コルテックス、芽胞殻に分画しその成分比を求めると、水銀芽胞の芽胞殻乾燥重量はTable 1に示したように未処理芽胞の61%であり形態観察の結果を裏付けた。

Table 1. DNA Content in Core Fraction, Hexosamine Content in Cortex Fraction, and Dry Weight of Coat Fraction

	DNA *	Hexosamine **	Dry Wt. of Coat ***
Intact Spore	19.8 (1.00)	30.5 (1.00)	299 (1.00)
Hg-Spore	24.3 (1.23)	46.6 (1.53)	182 (0.61)

*: μg /core fraction from mg spore

** : μg /cortex fraction from mg spore

***: μg /coat fraction from mg spore

このようにとくに芽胞殻に変化をうけた芽胞が調製できたので、次に芽胞特有の諸性質について検討した。

水銀芽胞は、未処理芽胞と同様、光屈折性、メチレンブルーに対する非染色性、リゾチームに対する非感受性を有しており、また、芽胞に特異的な成分であるジピコリン酸(DPA)含量およびDPA

とキレート結合してコア内に存在すると考えられているカルシウム (Ca) 含量も未処理芽胞と比較して大差はみられなかった。

しかし、Table 2 に示したように80℃30分間の熱処理で水銀芽胞はほとんど死滅し、熱に対する抵抗性をもたなかった。

Table 2. Heat Resistance of Hg-Spore

	Colony Counts $\times 10^{-8}$ /mg Spore		Heat Resistance (%)
	Total Cell	Resistant Cell*	
Intact Spore	2.71	1.87	(69.0%)
Hg-Spore	3.19	0.10	(3.1%)

* : Survival spores after heating at 80℃ for 30 minutes.

本菌芽胞は通常ブドウ糖および硝酸カリウムにより発芽するが、60℃30分間熱活性化した後ブドウ糖0.5mM、硝酸カリウム0.5mMを加え610nmにおけるOD減少率を指標として発芽実験を行うと、水銀芽胞は未処理芽胞と同様に完全に発芽し、正常な発芽能を有していた。熱活性化を行わない場合には、Fig. 2 に示したように、未処理芽胞は発芽しないが水銀芽胞は熱活性化した場合と同様に完全に発芽した。さらに、Fig. 3 に示したように、未処理芽胞は硝酸カリウム0.5mMのみでは全く発芽しないのに対して、水銀芽胞は完全に発芽した。ブドウ糖0.5mMのみで発芽実験を行った場合も同様の結果が得られた。

このように水銀芽胞は、未処理芽胞と比較して発芽剤に対してきわめて高い感受性を示すことが明らかとなった。

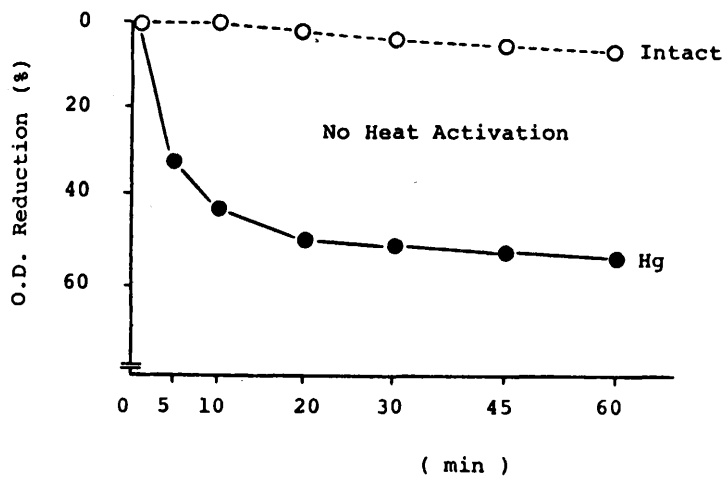


Fig. 2. Germination of spores induced by glucose plus KNO_3 without heat activation.

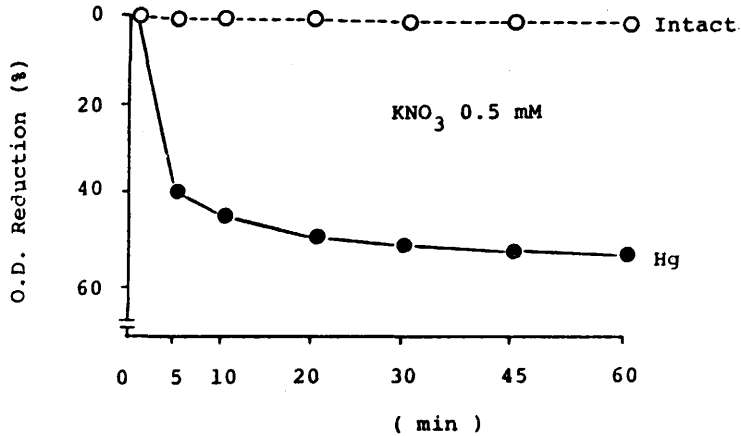


Fig.3. Germination of spores induced by KNO₃.

第2章 水銀芽胞の芽胞殻構成成分

芽胞形成期に水銀を添加したところ芽胞殻が薄く、また、もろい芽胞が形成された。この芽胞は、熱に対する抵抗性を失い、発芽剤に対して非常に高い感受性を示したことから、上記の性質の変化に対して芽胞殻が大きく寄与しているものと推察された。そこで、本章では芽胞殻構成成分について検討した。

Table 3 に示したように芽胞殻の約80%はタンパク質より成っており、水銀芽胞殻でもその含量に変化はなかった。その他、水銀芽胞殻の糖、アミノ糖、カルシウム含量も未処理芽胞と比較して大差はみられなかったが、リン含量が顕著に低下していた。

芽胞殻を、1.0% SDS, 50mM DTT を含む pH10.0 の緩衝液で 37°C 20 分間抽出処理すると、Table 4 に示したように芽胞殻タンパク質の 80~90% が、抽出され、リンは 40~50% 抽出された。この抽出成分 (Sol. A-fraction) について、1.0% SDS を含む 10% ポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動を行うと、数本のタンパク質のバンドが検出され、主バンドの分子量は約 11,000 と算出された。さらに、このゲルをスライスした後 ³²P の放射活性を測定したところ、主バンドの位置にリンの放射活性がみとめられた。水銀芽胞殻の抽出成分も同様のタンパク質の泳動パターンを示したが、分子量 11,000 のバンドのリンの放射活性は未処理芽胞の約半分であった。

Table 3. Chemical Components of Spore Coats

	Protein	Sugar	Hexosamine	Phosphorus	Calcium
Intact	786	3.92	17.4	4.97	3.53
Hg	802	4.85	13.3	0.81	2.41

values are expressed as $\mu\text{g}/\text{mg}$ coat

抽出成分を、0.1% SDS を含む pH10.0 の緩衝液中で Sephadex G-200 にかけたときの溶出パターンを Fig. 4 に示した。Tube No. 30 付近に、280nm のタンパク質の吸収と、リンの放射活性の大きな

Table 4. Solubilization of Spore Coats

Coat	Pprotein $\mu\text{g}/\text{mg coat}$ (%)		^{32}P cpm/mg coat $\times 10^{-3}$ (%)	
	total	solubilized	total	solubilized
Intact	786 (100)	612 (78)	4.00 (100)	1.61 (40)
Hg	802 (100)	764 (94)	1.54 (100)	0.79 (51)

Spore coat was solubilized in 50 mM carbonate buffer (pH 10.0), containing 1% SDS and 50mM DTT for 20 minutes at 37°C.

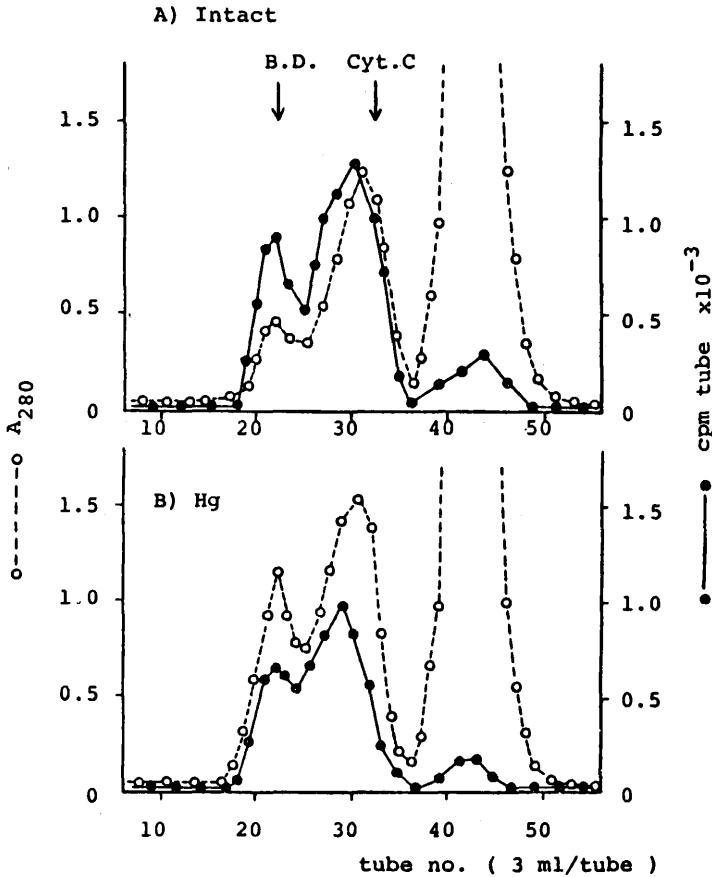


Fig.4. Sephadex G-200 chromatogram of Sol. A-fraction.

ピークがみとめられた。このピークは、チトクロームC (分子量12,000) とほぼ同じ位置であることから、電気泳動における主バンドに相当するものと思われた。そこで、このピークについてアミノ酸組成を検討した (Table 5)。未処理および水銀芽胞ともに、アスパラギン酸、セリン、グルタミン酸、グリシン、アラニンを多く含み、その組成に大差はみられなかった。しかし、未処理芽胞ではタンパク質 1 mgあたり 0.1μ mole のリンを含んでいるのに対し、水銀芽胞ではその値は約半分であった。

分子量11,000の低分子タンパク質は、芽胞殻タンパク質の主成分として *B. subtilis* (9, 10, 11, 12), *B. cereus* (2) など他の芽胞形成菌においても知られているが、その役割については不明であり、リンの存在についても全く検討されていない。このタンパク質はリン結合タンパク質として存在しており、水銀芽胞殻において、そのアミノ酸組成には変化がみられなかったが、リン含量が約半分に低下していたことから、タンパク質中のリンが、芽胞の休眠性の保持に重要な役割を果たしているものと推察された。

Table 5. Amino Acid Composition and Phosphorus Content of LM-proteins in Sol. A-fraction of Spore Coat

Amino Acid*	Intact	Hg
Lys	6.2	4.4
His	1.8	1.8
Arg	5.3	5.3
Asp	12.4	11.4
Thr	7.2	8.0
Ser	9.9	10.2
Glu	9.0	8.0
Pro	0.0	0.0
Gly	15.2	16.3
Ala	9.6	12.7
Cys	7.2	4.6
Val	3.9	3.5
Met	0.0	0.5
Ile	4.0	4.1
Leu	5.6	5.4
Tyr	0.0	0.4
Phe	2.6	3.6
Phosphorus**	1.01	0.49

*: mole percent

** : $\times 10^{-1}$ μ mole/mg protein

第3章 芽胞殻低分子タンパク質の存在部位

芽胞殻タンパク質の主成分である低分子タンパク質は、多くの芽胞形成菌で知られているが (2, 9, 10, 11, 12), その存在部位については検討されていない。第1章で示したように、本菌芽胞は内層、外層の2層よりなるが、Kondoら (13, 14) は、アルカリ抽出、超音波処理を用いて、芽胞殻を、アルカリ可溶性画分 (A-fr), パラクリスタル画分 (P-fr), 抵抗性画分 (R-fr) の3画分に分画し、R-frは芽胞殻外層に、また、A-fr, P-frは内層に相当することを報告している。

この分画法を用いて分画した各画分におけるタンパク質含量を Table 6 に示した。A-frは芽胞殻タンパク質の40%, P-frは55%をしめているのに対して、R-frはわずか4%にすぎず、分子量11,000

の低分子タンパク質が芽胞殻タンパク質の主成分であることを考えあわせると、この低分子タンパク質がR-frに由来しているとは考えられない。また、この低分子タンパク質は、Table 4, Fig. 4および電気泳動の結果から、芽胞殻タンパク質の60%以上をしめることより、A-fr, P-frの両画分より抽出されたものと思われた。A-fr, P-frのゲル電気泳動でも低分子タンパク質と同じ位置にバンドが検出され、上記の結果を裏付けた。このことから、分子量11,000の低分子タンパク質は芽胞殻内層に存在することが明らかとなった。

Table 6. Contents of Protein in Spore Coat Fractions

Fraction	protein $\mu\text{g}/\text{mg}$ spore (%)	
	Intact	Hg
Spore Coat	232.7 (100)	149.0 (100)
A-fr	94.3 (41)	62.8 (42)
P-fr	129.0 (55)	80.7 (54)
R-fr	9.4 (4)	5.4 (4)

第4章 発芽に対する芽胞殻外層の役割

第2章、第3章では、SDS, DTTを用いて芽胞殻を可溶化し、芽胞殻内層のタンパク質に結合したリンが発芽に関与することを明らかにした。しかし、Table 4に示したように、タンパク質は大部分抽出されたものの、リンの約50%は抽出されずに不溶性画分に回収され、これはタンパク質と結合しないリンが多量に存在することを示唆している。タンパク質含量の低い芽胞殻外層(R-fr)は、この不溶性画分に含まれると考えられるが、Kondoら(15)は、A-, P-, R-frについてリン含量を測定し、R-frは著しくリン含量が高く、このリンはガラクトサミンと結合した形で存在していると報告している。さらに、このリンはリン酸基として芽胞表層の荷電状態を支配し、発芽剤の侵入を防いでいると推論している。

Table 7に示したように、未処理芽胞では、R-frは最もリン含量が高く、水銀芽胞のR-frのリン含量は未処理芽胞の約5分の1に低下していた。この結果は、第1章で述べた発芽剤に対する感受性増大の要因として、芽胞殻内層のリンタンパク質と共に外層のリンの関与を強く示唆している。

Table 7. Distribution of ^{32}P in Spore Coats

Coat	cpm/mg fraction $\times 10^{-3}$ (%)		
	A-fr	P-fr	R-fr
Intact	2.33 (100)	4.59 (100)	5.59 (100)
Hg	0.94 (40)	2.28 (50)	1.20 (21)

上記のように、芽胞殻外層が発芽剤の侵入に対して防衛的に働いていると考えた場合、発芽時には、発芽剤自身が外層の荷電状態を打ち消す方向に働いていると考えられる。しかし、従来発芽剤として糖やアミノ酸を用いていたために、発芽剤の認識すなわち発芽の第1段階から、次の第2段階へとすみやかに移行し、第1段階における発芽剤の挙動を検討することが非常に困難であった。

今回、塩化カドミウム (Cd) を用いて本菌芽胞を発芽させると、第1段階である耐熱性の消失、Ca、DPAの流出はすみやかにみられるものの、第2段階でおこるとされているアミノ酸のとり込み、呼吸活性の発現などは全く観察されず、発芽の第1段階で停止することをみいだした。この系は発芽剤の認識 (第1段階) の検討にはきわめて有効と思われる。

そこで、Cdのとり込みを検討したところ、接触直後から急激に芽胞内にとり込まれ、5分で最高に達した (Fig. 5)。このCdの約60%は芽胞殻に存在しており、また、芽胞殻中Cdの大部分はR-frに結合していた (Table 8)。さらに、タカジアスターゼ処理によりこのCdはリンに結合していることも判明した。

このように、Cdによる発芽の系で、発芽時に非常に多量のCdがR-frのリンに結合していたことは、上記の、芽胞殻外層が発芽剤の透過性に関与しているという推定を強く支持する結果であると考えられる。

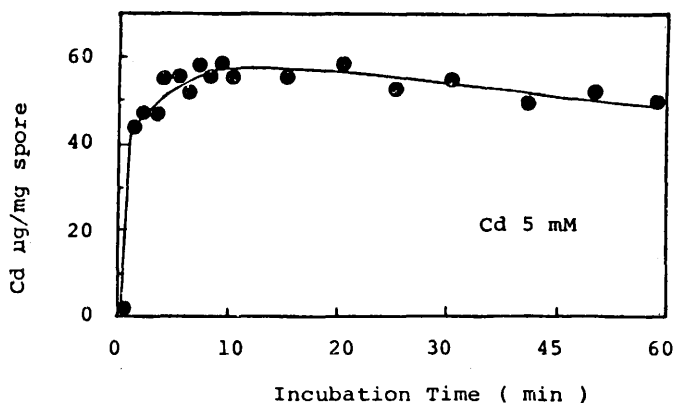


Fig. 5. Uptake of cadmium into spores during germination.

Table 8. Distribution of Cadmium in Spore

fraction	Cd $\mu\text{g}/\text{mg}$ spore	(%)
whole cell	50.72	100.0
core	15.82	31.2
cortex	5.49	10.8
coat	29.41	58.0
alkali-soluble	4.12	8.1
paracrystal	1.91	3.8
resistant	23.38	46.1

第5章 芽胞の透過性

第2章、第3章において芽胞殻内層の低分子タンパク質中のリンが、また、第4章では芽胞殻外層中のリンが芽胞の休眠性に重要な役割を果たしているという結果を得た。

これらのリンはいずれも芽胞の外部から内部への透過性のbarrierとして働いていると考えられ、水銀芽胞では未処理芽胞と比較して透過性が高くなっていると考えられる。

そこで、芽胞内部へは侵入しないと考えられる分子量5,000~5,500の¹⁴C-イヌリンを内部標準として³H-水の透過性を検討した。Table 9 に示したように未処理芽胞では³H-水と¹⁴C-イヌリンの比が1.06であるのに対して、水銀芽胞は1.26 ($p < 0.05$)であり、水銀芽胞は未処理芽胞と比較して水の透過性が著しく増大しているものと考えられた。

Table 9. Permeability of Intact Spore and Hg-Spore

	[³ H-H ₂ O]/ [¹⁴ C-Inulin]			
	Exp 1	Exp 2	Exp 3	mean ± S. E.
Intact Spore	1.18	1.02	0.97	1.06 ± 0.06
Hg-Spore	1.29	1.22	1.27	1.26 ± 0.02 *

*: $p < 0.05$

結 論

- 1) 芽胞殻形成期に塩化第二水銀を添加することにより、芽胞殻が薄く、熱に対する抵抗性の低い、また、発芽剤に対して高い感受性を示す水銀芽胞を調製することができた。
- 2) 芽胞殻タンパク質の主成分である分子量11,000の低分子タンパク質は、芽胞殻内層に存在するリン結合タンパク質であることを明らかにした。水銀芽胞は、このタンパク質含量が減少すると同時に、とくに、そのタンパク質に結合しているリンの割合が減少した。未処理芽胞と水銀芽胞の低分子タンパク質の比較から、芽胞殻内層のリンが、芽胞の休眠性に関連していることを示した。
- 3) 水銀芽胞は、芽胞殻外層に存在するリンも著しく減少していた。塩化カドミウムを用いて、発芽進行の第一段階を検討することにより、芽胞殻外層のリンも発芽剤の透過性に関与していることを示した。
- 4) ³H-水を用いて透過性の実験を行ったところ、上記2、3の結果を支持すべく、水銀芽胞では未処理芽胞と比較して高い水の透過性を示し、芽胞殻、とくに芽胞殻中のリンが、芽胞内部への透過性のbarrierとして働いていることを明らかとした。

引用文献

- 1) Warth, A. D., *Adv. Microbial Physiol.*, **17**, 1 (1978).
- 2) Aronson, A. I., and Fitz-James, P. C., *Bacteriol. Rev.*, **40**, 360 (1976).
- 3) Vary, J. C., *J. Bacteriol.*, **116**, 797 (1973).
- 4) Somerville, H. J., Delafield, F. P., and Rittenberg, S., *J. Bacteriol.*, **101**, 551 (1970).
- 5) Murrell, W. G., *Adv. Microbial Physiol.*, **1**, 133 (1967).

- 6) Vinter, V., *Fol. Microbiol.*, **4**, 216 (1959).
- 7) Fitz-James, P. C., and Young, J. E., *J. Bacteriol.*, **78**, 755 (1959).
- 8) Vallee, B. L., and Ulmer, D. D., *Ann. Rev. Biochem.*, **41**, 91 (1972).
- 9) Pandey, N. K., and Aronson, A. I., *J. Bacteriol.*, **137**, 1208 (1979).
- 10) Mitani, T., and Kadota, H., *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **22**, 51 (1976).
- 11) Munoz, L., Sadaie, Y., and Doi, R. H., *J. Biol. Chem.*, **253**, 6694 (1978).
- 12) Goldman, R. C., and Tipper, D. J., *J. Bacteriol.*, **135**, 1091 (1978).
- 13) Kondo, M., and Foster, J. W., *J. Gen. Microbiol.*, **47**, 257 (1967).
- 14) 川崎, 西原, 近藤, *日細誌*, **25**, 209 (1970).
- 15) 近藤, 西原, *日細誌*, **25**, 215 (1970).

論文の審査結果の要旨

細菌芽胞殻の機能を明らかにするための手段として、従来から行なわれてきた方法とは全く異なった方向から検討を加えた。すなわち、芽胞形成期中芽胞殻の生合成が行なわれる時期に重金属を添加し、特異的に芽胞殻の生合成を阻害することに成功した。この方法により形成させた芽胞は、芽胞殻が薄く、かつもろくなっており、しかも耐熱性が失われ、また、発芽剤に対する感受性が増大していることが判明した。耐熱性の低下は芽胞への水の透過性に大きな変化があることに基因するものとした。これらの結果から芽胞殻は芽胞の耐熱性に関係する構造のひとつであるとともに発芽剤に対する選択性の第1関門であることを証明し、この選択には、芽胞殻表面のリン酸基が関与していることを明らかにした。これらの研究成果は全く新しい手法で検討されたもので芽胞研究に新しい重要な知見を加えたものと考えられ、薬学博士の称号を授与するに値する研究と判定した。