



|              |                                                                                                                                                 |
|--------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Title        | 芽胞形成菌における強酸性ニンヒドリン陽性物質の挙動                                                                                                                       |
| Author(s)    | 中塩, 哲士                                                                                                                                          |
| Citation     | 大阪大学, 1980, 博士論文                                                                                                                                |
| Version Type |                                                                                                                                                 |
| URL          | <a href="https://hdl.handle.net/11094/32904">https://hdl.handle.net/11094/32904</a>                                                             |
| 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

|             |                                     |         |         |        |
|-------------|-------------------------------------|---------|---------|--------|
| 氏 名・(本籍)    | なか<br>中                             | しお<br>塩 | さと<br>哲 | し<br>士 |
| 学 位 の 種 類   | 薬                                   | 学       | 博       | 士      |
| 学 位 記 番 号   | 第                                   | 5 0 5 0 | 号       |        |
| 学位授与の日付     | 昭和 55 年 8 月 6 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 | 芽胞形成菌における強酸性ニンヒドリン陽性物質の挙動           |         |         |        |
| 論 文 審 査 委 員 | (主査)<br>教 授 近藤 雅臣                   |         |         |        |
|             | (副査)<br>教 授 岩田平太郎 教 授 青沼 繁 教 授 北川 勲 |         |         |        |

## 論 文 内 容 の 要 旨

### 緒 論

Bacillus 属および Clostridium 属の細菌は、その生活環において栄養型増殖期の細胞と、生化学的、形態学的にまったく異なる芽胞を形成する(1, 2, 3, 4)。この芽胞形成機序の解明は、単に特定の菌属の生理現象の領域を越えて、形質発現と生体制御、形態形成と細胞分化の諸領域に連なる重要な問題と考えられる。そのためには、真に芽胞形成と密接に関連した現象を起点に解析されなければならない、芽胞形成により分化した形態、機能ないし特性は、それらを生み出すに至った物質(5, 6)およびその産生調節機構に置き換えることにより因果関係が理解できると考えられる。芽胞形成期の細胞中では、栄養型細胞の構成成分が解体され、芽胞の特異性の発揮に必要な諸成分が合成され、芽胞固有の構造成分、その前駆体、さらにそれらの生合成系に関与した調節因子が多種存在することが予想される(7, 8, 9, 10)。芽胞形成期細胞の原形質可溶性画分には、芽胞固有の cortex および spore coat の前駆体やその構成成分となるアミノ酸、アミノ糖が含まれている。本研究においては、Bacillus subtilis NRRL B 558菌はじめ多くの芽胞形成菌の芽胞形成期細胞の原形質可溶性画分、とくにニンヒドリン反応陽性物質に着目して検索を試み、強酸性含硫アミノ酸タウリンを見い出すとともに、従来微生物ではほとんど知られていないスルホン酸化合物の動態を究明した。

### 本 論

#### 第 1 章 枯草菌栄養型細胞の強酸性 Glucosamine 含有物質の存在および同定

B. subtilis NRRL B 558菌の栄養型細胞および芽胞形成期細胞を冷10%トリクロル酢酸(TCA)

で抽出し、抽出液をアミノ酸アナライザーで比較分析した結果を Fig. 1, Table 1 に示す。栄養型細胞では、酸性アミノ酸 Asparatic acid に先行して溶出される物質の存在が認められ、その画分を酸加水分解した場合、消失し、Glucosamine および Alanine のみが認められた。一方、芽胞形成期細胞においては、同様に強酸性物質の溶出が認められ、本画分を酸加水分解した場合にもアミノ酸アナライザーの溶出位置は同様であり、未同定の物質 (Compound I, II) を含む各種アミノ酸がかなりの量存在し、Glucosamine 量は、栄養型細胞と比較し顕著に減少していた。そこで、まず栄養型細胞の Glucosamine 含有物質を精製した。すなわち、TCA 抽出液を Amberlite CG120 Column Chromatography, Sephadex G-25 Gel Filtration, Paper Electrophoresis により単一に精製した。口紙に展開された Glucosamine 含有物質に各種の検出試薬を噴霧した結果を Fig. 2 に示したが、これらの試薬により発色した Spot は完全に一致したことから、還元糖として Glucosamine リン酸および未知の非還元性糖からなるオリゴサッカライドであることが判明した。Glucosamine を含む画分を 4 N-HCl, 105C, 4 時間加水分解した結果、非還元性糖として Ribitol を含むこと、および非還元糖：リン酸：Glucosamine=1:2:1 のモル比で存在することが判明したことから、Glucosamine, リン酸, Ribitol の結合したポリマーすなわち Teichoic Acid 様物質であることが判明した。

本物質の生活環各時期の含量を検討した結果 (Fig. 3), 栄養型細胞では Glucosamine 量で 1.0  $\mu$ mole/ 1.5g dry weight 存在するが、静止期から芽胞形成期にかけて顕著に減少した。機械的に細胞を破碎後 TCA 抽出を行なった場合も同様の成績を示したことから、TCA 抽出効率の差による

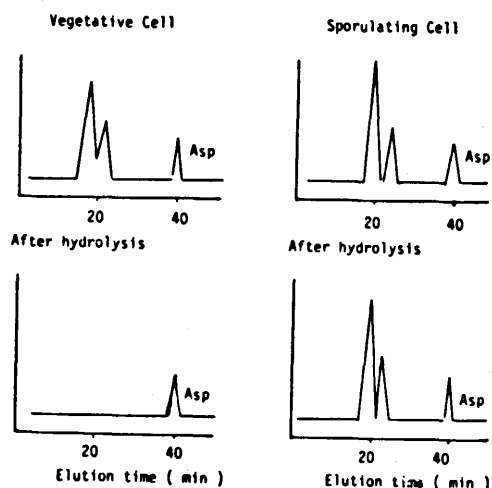


Fig. 1. Comparison of Ninhydrin Positive Materials in TCA Extract of Vegetative and Sporulating Cells by Amino Acid Analyzer.

Table 1 Amino Acid Composition of Fract R-1 Obtained from Vegetative Cells and Sporulating Cells

| Component   | Vegetative Cell | Sporulating cell |
|-------------|-----------------|------------------|
| Compound I  | 0 *             | 3.500****        |
| Compound II | trace           | 0.345            |
| Asp         | trace           | 0.020            |
| Thr         | trace           | 0.030            |
| Ser         | trace           | 0.024            |
| Glu         | trace           | 0.106            |
| Gly         | trace           | 0.036            |
| Ala         | 0.113           | 0.024            |
| Dap*        | 0               | 0.040            |
| Mur**       | 0               | 0.194            |
| GlcN***     | 0.677           | 0.174            |

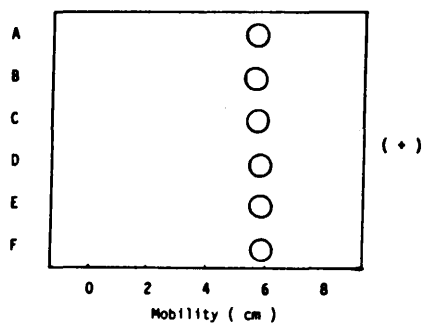
\* Dap; Diaminopimelic acid

\*\* Mur; Muramic acid

\*\*\* GlcN; Glucosamine

\*\*\*\*  $\mu$ mole/ g cells dry weight

現象ではないと思われる。なお、本物質は、栄養型細胞の Cell Wall に局在することが判明した。本物質は、リン酸基、水酸基、アミノ基等の荷電基を多数有することから、細胞壁を通過する荷電した物質の透過、保持、輸送等に関連しているものと推察される。



\* Detecting reagents used were as follows:

- A; Ninhydrin reagent
- B; Diphenylamine aniline reagent
- C;  $\text{AgNO}_3$  reagent
- D; Potassium periodate reagent
- E; Hanes's reagent
- F; Sharon & Seifter's reagent

Experimental condition :

Voltage; 50 V/cm, Time ; 2 hrs,

Buffer; Pyridine-Acetate-Water(1:10:89)

Paper; Toyo No. 51

Fig. 2. Paper Electrophoresis of Glucosamine-Containing Material

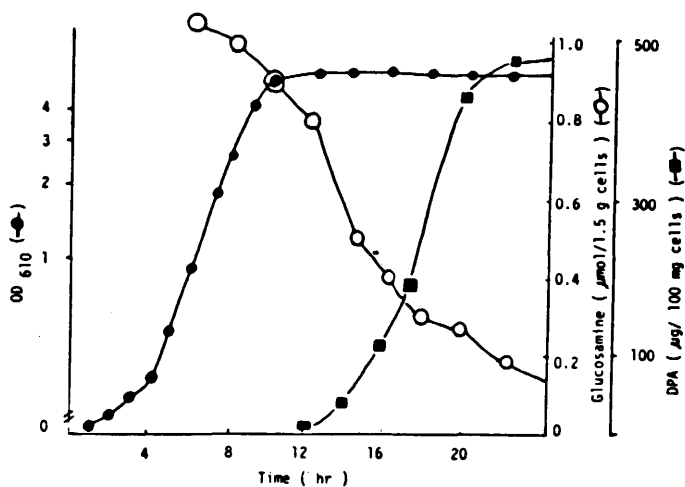


Fig. 3. Level of Glucosamine-Containing Materials during Growth and Sporulation

## 第2章 枯草菌芽胞形成期細胞の TCA 可溶性画分の強酸性ニンヒドリン反応陽性物質の存在と精製について

前章の Fig. 1, Table 1 に示したように, Compound I, II は栄養型細胞には存在せず, 芽胞形成期細胞に存在する物質であり, Compound I については Cysteic Acid であることをすでに明らかにしたので, Compound II について検討を加えた。芽胞形成期の細胞の TCA 抽出液を Amberlite CG120 Column Chromatography, 酸加水分解, Amberlite CG120 Column Chromatography, および活性炭処理をおこない, 2, 4-Dinitrophenyl 誘導体に Ecteola Cellulose Column Chromatography, Sephadex G-10 Gel Filtration で単一に精製し, 融点 209-210 C を示す黄色針状結晶 DNP-Compound II を得た。この物質を, 薄層およびペーパークロマト (Table 2), ロ紙電気泳動 (Fig. 4), 高速液体クロマトグラフィー (Fig. 5) により既知物質と比較した結果, Taurine と推定された。

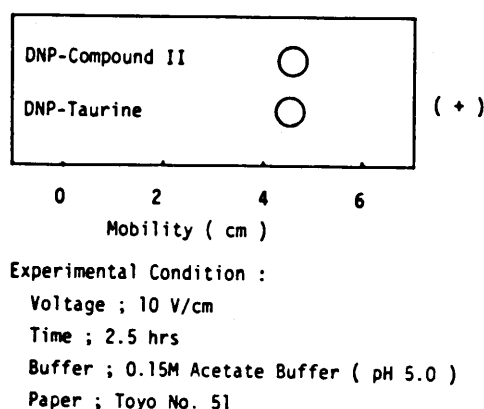


Fig.5. Identification of DNP-Compound II by Paper Electrophoresis

Table 2. Rf Values of DNP-Compound II and other DNP-Derivatives in Thin Layer and Paper Chromatography

|                      | System A | System B |
|----------------------|----------|----------|
| DNP-Compound II      | 0.60     | 0.55     |
| DNP-Taurine          | 0.60     | 0.55     |
| DNP-Compound I       | 0.31     | 0.53     |
| DNP-Cysteic Acid     | 0.81     | 0.53     |
| DNP-Phosphorylserine | 0.72     | 0.57     |
| DNP-Homocysteic Acid | 0.55     | 0.90     |

System A : Thin Layer Chromatography

Gel ; Silicagel 60 PF<sub>254</sub>

Solvent ; 1.5 M Levy's Phosphate Buffer

System B : Paper Chromatography

Paper ; Toyo No.51

Solvent ; n-BuOH-AcOH-H<sub>2</sub>O ( 4 : 1 : 5 )

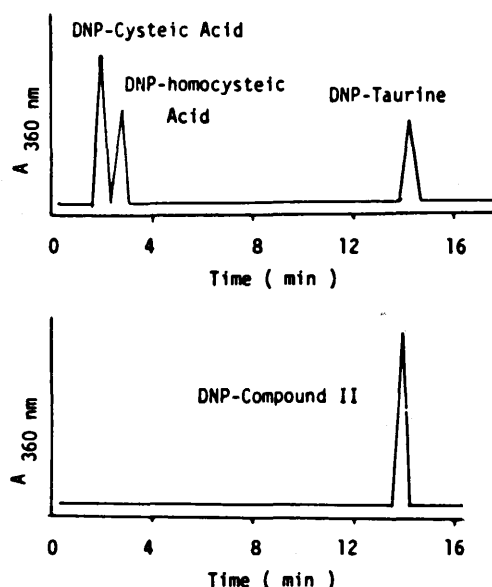


Fig.4. Identification of DNP-Compound II by High Pressure Liquid Chromatography

### 第3章 枯草菌芽胞形成期細胞のTCA可溶性画分の強酸性ニンヒドリン反応陽性物質の機器分析による構造決定

第2章でCompound IIはTaurineと推定されたが微生物においてはアミノスルホン酸の報告は極めてまれであり、かつこれらの数少ない報告における存在の確認は極めて不十分であることから、機器分析による構造決定を試みた。DNP-Compound IIは第2章の成績からDNP-Taurineと類似の化合物であろうと推定される。Table 3に、DNP-Taurineの、Table 4にDNP-Compound IIのPNR (200MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )の成績を示したが、両者は一致しなかった。しかしながら、Table 4およびdecoupling実験から、DNP-Compound IIには、Pyridineが含まれることが推定された。また、DNP-Compound IIの赤外吸収スペクトルから、 $\text{NH-}$ の吸収 ( $3300\text{cm}^{-1}$ )が明らかなことより、上述のPyridineはNH基には結合していないと考えられ、DNP-Compound IIはDNP-TaurineのPyridine塩と推定された。この推定はFD-Mass Spectrumの測定 (Fig. 6)により確証された。すなわち、 $m/e$  371 (5.9%)に $\text{M}^+ + 1$ のionと、 $m/e$  292に100%のfragment ion peakを与える。 $m/e$  292はDNP-Taurine ( $m/e = 291$ ) + 1のイオンで、 $m/e (371 - 292) = 79$ はPyridine分子 ( $\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$ )に相当する。以上のことから、DNP-Compound IIはDNP-Taurine-Pyridine塩と確認された。市販のTaurineから別途DNP-Taurine-Pyridine塩を合成し、DNP-Compound IIと混融 (mixed m. p. 209-210 C), IR (Fig. 7), PMR (Table 5), FD-Mass, UV (Fig. 8)の比較の結果、両者は完全に一致した。Pyridineは、分離精製の過程で使用しており組みこまれる可能性は十分あるが、Taurineの生体内での存在様式は不明で、その構造から、金属

Table 3. Proton Magnetic Resonance Data on DNP-Taurine

| Chemical shift<br>( $\delta$ ) | Proton | Signal | Coupling constant<br>J ( Hz ) |
|--------------------------------|--------|--------|-------------------------------|
| 3.28                           | 2 H    | t *    | 6.4                           |
| 3.90                           | 2 H    | t      | 6.4                           |
| 7.22                           | 1 H    | d **   | 8.0                           |
| 8.28                           | 1 H    | d,d    | 8.0, 2.4                      |
| 8.91                           | 1 H    | d      | 2.4                           |

\*, triplet, \*\*, doublet. ( CD<sub>3</sub>OD, 200 MHz )

Table 4. Proton Magnetic Resonance Data on DNP-Copmound II

| Chemical shift<br>( $\delta$ ) | Proton | Signal | Coupling constant<br>J ( Hz ) |
|--------------------------------|--------|--------|-------------------------------|
| 3.18                           | 2 H    | t *    | 6.4                           |
| 3.90                           | 2 H    | t      | 6.4                           |
| 7.24                           | 1 H    | d **   | 8.0                           |
| 8.16                           | 2 H    | t      | 5.6                           |
| 8.35                           | 1 H    | d,d    | 8.0, 2.4                      |
| 8.71                           | 1 H    | t      | 5.6                           |
| 8.92                           | 2 H    | d      | 5.6                           |
| 9.08                           | 1 H    | d      | 2.4                           |

\*, triplet, \*\*, doublet. ( CD<sub>3</sub>OD, 200 MHz )

Table 5. Proton Magnetic Resonance Data on DNP-Taurine-Pyridine Salt

| Chemical shift<br>( $\delta$ ) | Proton | Signal | Coupling constant<br>J ( Hz ) |
|--------------------------------|--------|--------|-------------------------------|
| 3.17                           | 2 H    | t *    | 6.4                           |
| 3.87                           | 2 H    | t      | 6.4                           |
| 7.24                           | 1 H    | d **   | 8.0                           |
| 8.15                           | 2 H    | t      | 5.6                           |
| 8.34                           | 1 H    | d,d    | 8.0, 2.4                      |
| 8.71                           | 1 H    | t      | 5.6                           |
| 8.92                           | 2 H    | d      | 5.6                           |
| 9.08                           | 1 H    | d      | 2.4                           |

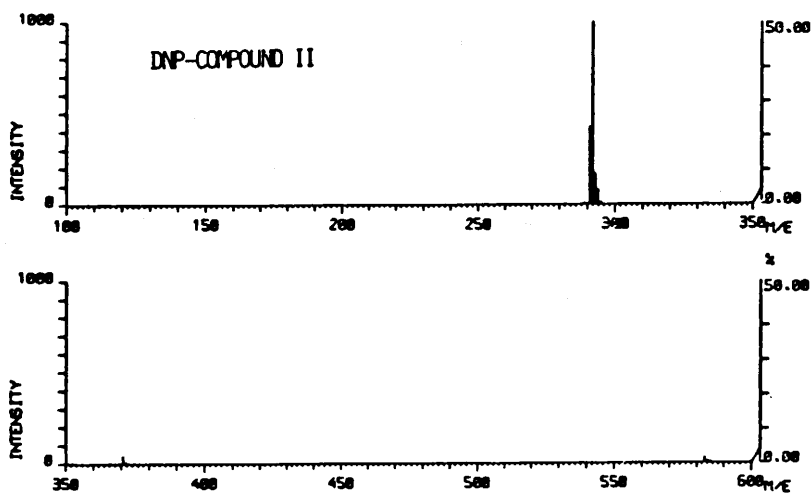
\*, triplet, \*\*, doublet. ( CD<sub>3</sub>OD, 200 MHz )

Fig.6. MASS SPECTRLM (68 TO 39)

SAMPLE. DNP-COMPOUND II (TAURINE LIKE SUBSTANCE)

NOTE. 1980. 2. 8. FD MODE

BASE PEAK. M/E 292.8INT. 57.1

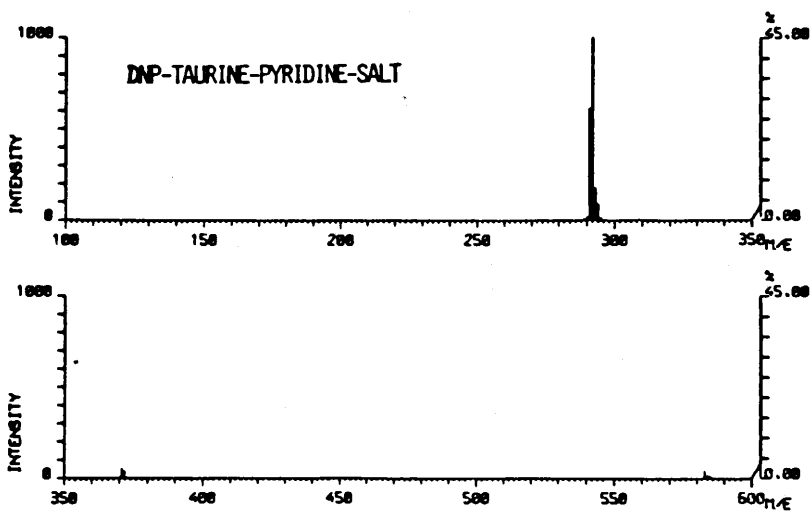


MASS SPECTRUM : (96 TO 118)

SAMPLE. DNP- TAURINE

NOTE. 1980. 2. 8. FD MOOE

BASE PEAK : M/E 292.8 INT. 69.4



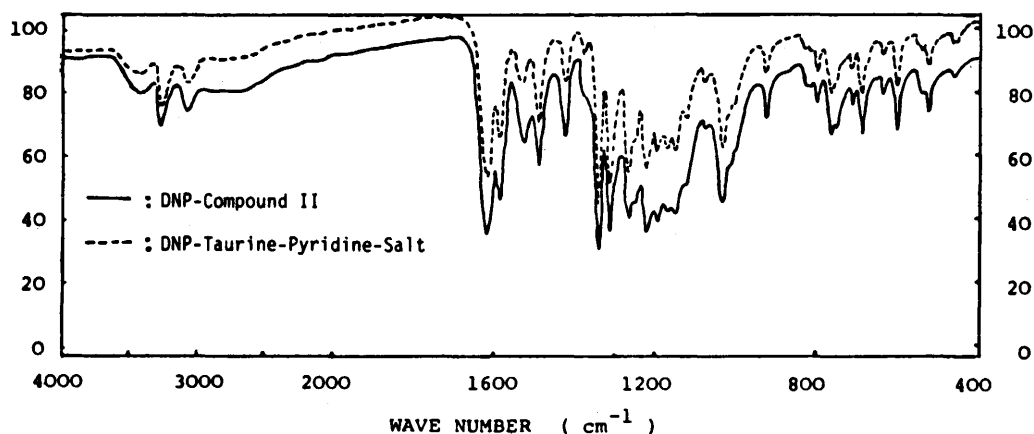


Fig.7. Infrared Spectrum of DNP-Compound II and DNP-Taurine-Pyridine-Salt

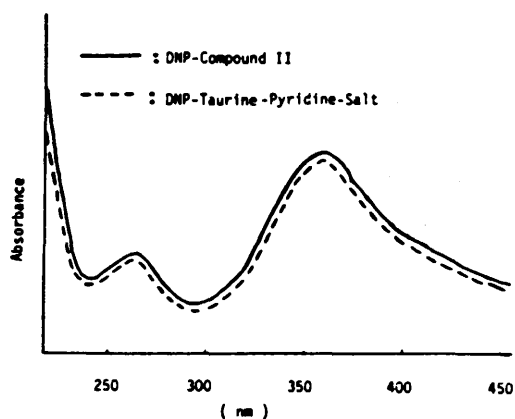


Fig.8. Ultraviolet Spectrum of DNP-Compound II and DNP-Taurine-Pyridine-Salt

イオンそのほかとの錯体を形成することが予想され、芽胞固有の Dipicolinic Acid( 2, 6, -dicarboxylic pyridine) の生合成系になんらかの関与も考えられる。

#### 第4章 Taurine の定量法の検討と菌体内 Taurine 含量

芽胞形成期細胞中に Taurine の存在が明らかとなったので、Taurine の高速液体クロマトグラフィーによる定量法を検討した。種々検討した結果、試料の調製は、細胞の TCA 抽出液を Amberlite CG120 column に吸着させ脱イオン水で溶出した画分を DNP 化すること、および高速液体クロマトグラフィーの分離条件は Zorbax カラム、溶出液 0.01 M 酢酸ナトリウム溶液、温度 50°C、圧力 10 kg/cm<sup>2</sup> が最適であることが判明した。本法により、50 pmole から 1,000 pmole の範囲で直線の検量線 (Fig. 9) が得られ、添加回収実験 (Table 6) により 86—94% の回収率を示したことから Taurine の定量法として用いられることを確認した。生活環各時期の細胞の、乾燥菌体 100 mg あた

りの Taurine 量を測定した結果、栄養型細胞では 7.2nmole、芽胞形成期細胞では34.5nmole 存在し、芽胞中にはまったく存在しないことが明らかとなった。

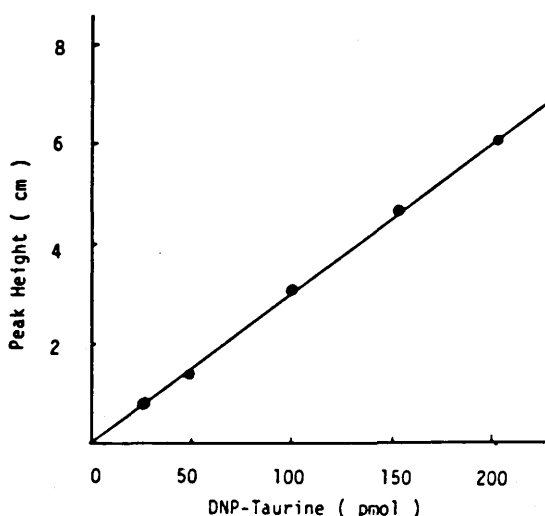


Fig. 9. Calibration Curve of DNP-Taurine

Table 6. Recovery of Taurine in TCA Extract

| Taurine Added<br>( nmol ) | Found<br>( nmol ) | Recovered Taurine<br>( nmol ) | Recovery<br>( % ) |
|---------------------------|-------------------|-------------------------------|-------------------|
| 0                         | 30.4              | -                             | -                 |
| 25                        | 52.0              | 21.6                          | 86.4              |
| 50                        | 75.5              | 45.1                          | 90.2              |
| 100                       | 122.4             | 92.0                          | 92.0              |
| 150                       | 171.9             | 141.5                         | 94.3              |
| 200                       | 218.0             | 187.6                         | 93.8              |

## 第5章 芽胞形成期細胞における Taurine の動態

芽胞形成期における Taurine の挙動をFig. 10に示した。細胞内 Taurine 含量は、前駆芽胞の出現、Dipicolinic Acid 生合成に先行して芽胞形成初期から増加しはじめ、Dipicolinic Acid 生合成の最も活発な時期に最高にたっし、以後芽胞の成熟につれて減少した。なお、TCA 抽出法による成績と、細胞菌体を 6 N-HCl, 106 C, 16時間加水分解後に定量した成績はほとんど一致した。芽胞形成初期の Taurine 含量の急速な増加について、 $^{35}\text{S}$ -Methionine,  $^{35}\text{S}$ -Cysteine,  $^{35}\text{S}$ - $\text{SO}_4^{2-}$ を用いて検討したが新たな生合成の可能性を示す直接的証拠は得られず、むしろ $^{35}\text{S}$ -Taurine を用いた検討により、この時期の著しい Taurine 取り込能の増大によるものと考えられた (Fig. 11)。さらに、芽胞の成熟につれて減少する理由として、取り込まれた Taurine が、一部代謝され、一部そのまま培地中

Table 7. Contents of Taurine in Cells at Various Stages

| Cell Phase           | Content* |
|----------------------|----------|
| I. Vegetative Cell   | 7.2      |
| Sporulating Cell     | 34.5     |
| Spore                | 0        |
| II. Spore            |          |
| Supernatant Fraction | 0        |
| Precipitate Fraction | 0        |

\* : nmol/ 100 mg cells.

I : Cells were extracted with 10% TCA.

II : Spores were disrupted with Cell Mill and were centrifuged at 10,000 rpm for 15 min to separate the "Supernatant" and the "Precipitate Fraction".

Then the "Precipitate Fraction" was hydrolyzed by 6N-HCl at 105 C for 16 hrs.

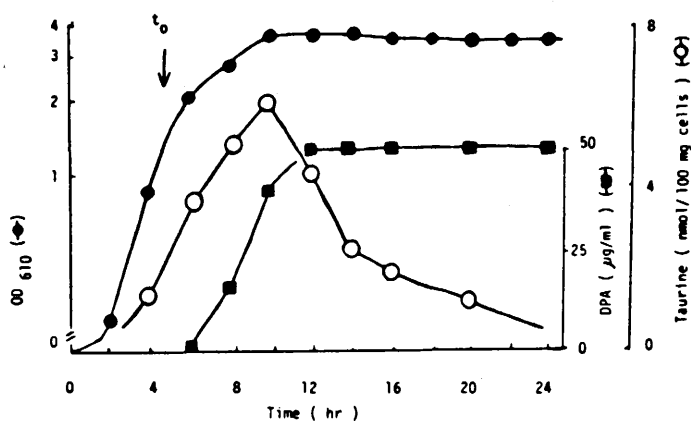


Fig.10. Appearance of Taurine during Growth and Sporulation

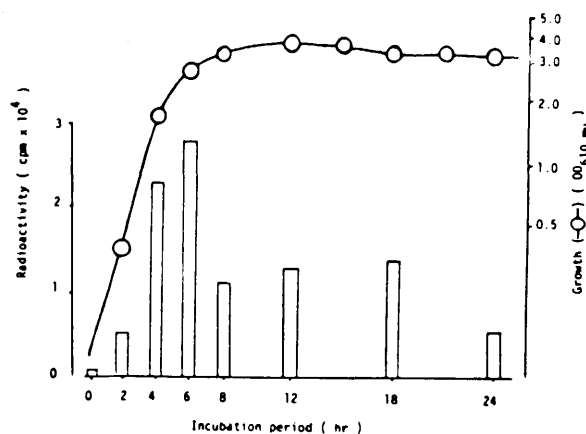


Fig.11. Incorporation of  $^{35}\text{S}$ -Taurine into Cells of *B. subtilis* NRRL B 558 at Various Stages

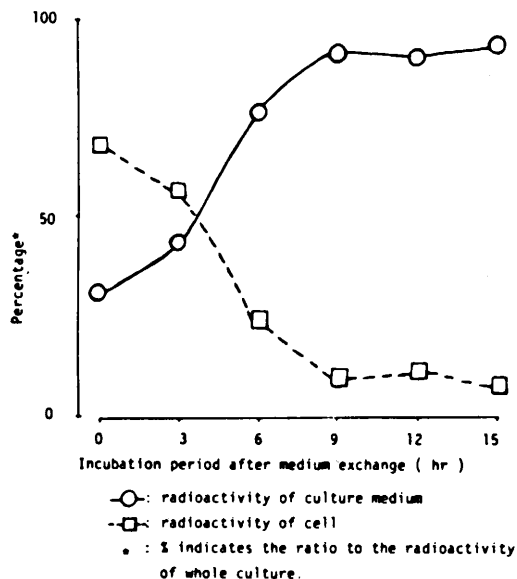


Fig.12. Release of  $^{35}\text{S}$ -labeled Compound into Cultures Medium at Late Sporulation Stages of *B. subtilis* NRRL B 558

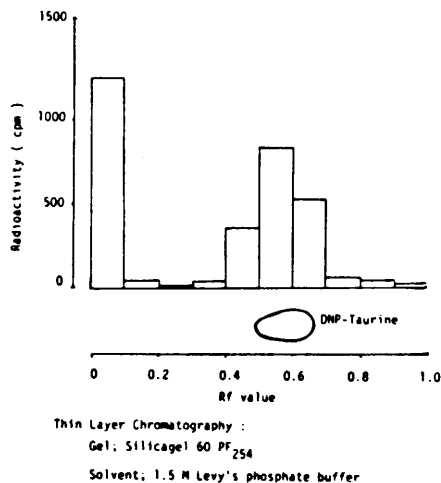


Fig.13. Analysis of  $^{35}\text{S}$ -Compounds in Culture Medium

へ遊離することが判明した。すなわち、 $^{35}\text{S}$ -Taurine 含有培地で芽胞形成初期まで培養した菌体を洗浄後、併行して培養した $^{35}\text{S}$ -Taurine 非含有培地の培養液上清に加え、培地転換後の、培地および菌体内の $^{35}\text{S}$  標識化合物の分布を検討した結果、Fig. 12に示すように、急速に培地中へ遊離することが明らかとなった。しかしながら、培地中の $^{35}\text{S}$  標識化合物を検討した結果、Fig 13に示すように、DNP-Taurine 以外にもかなりの放射活性が認められることから一部代謝されているものと推察された。

## 結 論

*Bacillus subtilis* NRRL B 558菌の栄養型および芽胞形成期細胞の TCA 可溶性画分のニンヒドリン反応陽性物質について、その同定および定量法、さらに生活環における動態について検討した。

1. 栄養型細胞に、Glucosamine, リン酸, Ribitol から構成されるTeichoic Acid 様物質の存在を明らかにした。本物質は芽胞形成期に著しく減少し、芽胞中には認められなかった。
2. 芽胞形成期細胞中に、Taurine が存在することを明らかにした。
3. Taurine の高速液体クロマトグラフィーによる定量法を確立し、生活環での含量を測定し、芽胞形成期に多く存在し、芽胞中には存在しないことを明らかにした。
4. Taurine は、芽胞形成期に取り込まれ、芽胞形成後期には、一部代謝されて、培地中へ遊離することが明らかとなった、

## 引用文献

1. 蜂須賀養悦, 堀越弘毅: (1976): 耐久型細胞, 岩波書店
2. Hanson, S., Peterson, J. A. & Youtten, A. A. (1970): *Ann. Rev. Microbiol*, **24**: 23.
3. Bernlohr, R. W. & Leightzman, C. (1969): *The Bacterial Spore*. Academic Press, New York
4. Murrel, W. G. (1967): *Adv. in Microbial Physiol*, **1**: 133.
5. Powell, J. & Strange, R. E. (1959): *Nature*, **184**: 878.
6. Spudich, J. A. & Kornderg, A (1968): *J. Biol. Chem.* **243**: 4600.
7. Sano, K., Ichikawa, T. & Kondo, M. (1975): *Microbios*, **12**: 67
8. 中塩, 佐野, 市川, 近藤 (1974) *日本細菌学雑誌*, **29**: 105.
9. Kondo, M., Sano, K., Nakashio, S. & Ichikawa, T. (1975): *Spores VI*, p397, Edited by P. Gerhardt, American Society for Microbiology
10. Koshikawa, T., Nakashio, S., Kusuyama, K., Ichikawa, T. & Kondo, M.: (1980): *J. Bacteriol*, in press

## 論文の審査結果の要旨

枯草菌芽胞形成期細胞の TCA 可溶性画分中ニンヒドリン陽性物質について検討し、とくに芽胞形成期においてこれまで見出されてなかったタウリンが細胞内に蓄積されることを発見した。ついで、タウリンの高速液体クロマトグラフィーによる定量法を確立し、生活環におけるタウリンの動態を検討したところ、芽胞形成初期にタウリン量が細胞内に蓄積されはじめ芽胞形成が完了すると細胞内から検出されなくなることを見出し、 $^{35}\text{S}$ -タウリンを用いた実験から芽胞形成末期に細胞外へ放出されることを明らかにした。これらの知見は芽胞形成菌の生活環における強酸性含硫アミノ酸の動態ならびに作用を追求する上で意義ある研究といえ、薬学博士を授与するに値する研究と判定した。