



| | |
|--------------|---|
| Title | 細菌芽胞の発芽剤特異性に関する研究 |
| Author(s) | 打田, 良樹 |
| Citation | 大阪大学, 1982, 博士論文 |
| Version Type | |
| URL | https://hdl.handle.net/11094/33187 |
| 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

【 2 】

| | | | | |
|---------|----------------------------------|--------|---------|------------|
| 氏名・(本籍) | うち 打 | だ 田 | よし 良 | き 樹 |
| 学位の種類 | 薬 | 学 | 博 | 士 |
| 学位記番号 | 第 | 5 | 6 | 3 |
| 学位授与の日付 | 昭和 57 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 | 細菌芽胞の発芽剤特異性に関する研究 | | | |
| 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

細胞芽胞は、L-AlanineやD-Glucoseなどのその芽胞に特異的な発芽剤により発芽し (1, 2), 休眠性ならびに抵抗性(耐熱性等)を消失する。つづいて形態的にも生理的にも芽胞とは全く異った栄養型細胞へと変化していく(3)。

従来より芽胞の発芽機構に関する研究は、発芽誘導物質の構造と発芽能との関係、また芽胞の発芽時における生化学的な変化等の解明についてなされてきたが、いまだ未解決の部分が多く残されている(4, 5)。

Bacillus megaterium ATCC 19213芽胞は、L-Alanineにより発芽するが、D-Glucoseでは発芽しない。しかし本芽胞は、1.45mM p-Chloromercuribenzoate (PCMB) 溶液 (pH 8.0) 中で60℃・30分間処理することにより、D-Glucoseで発芽する(6)。*Clostridium bifermentans* 芽胞は0.1N-NaOHで4℃、30分間処理されると、L-Serineで発芽誘導がみられるようになる(7)。*B. licheniformis* 芽胞は、過酸化水素処理によりヨウ化カリウムで発芽される(8)。このように、芽胞に何らかの処理を加えて芽胞の性質を変化させ、その変化の原因を究明することにより、芽胞の発芽機構を解明しようとする試みがなされている(9)。著者は、*B. megaterium* ATCC 19213芽胞がPCMB処理によりD-Glucoseで発芽することから、PCMBが芽胞発芽に直接関連する芽胞構成々分を修飾しているものと考えた。そこで、PCMBを結合している芽胞成分の検索を行い、それを介して芽胞発芽機構の解明を試みた。

本 論

第1章 PCMB処理芽胞の発芽性におよぼすUrea処理の影響

B. megaterium ATCC 19213芽胞は、L-Alanine, Inosineで発芽するが、D-Glucoseでは発芽しない。しかしPCMB処理すると、本芽胞はPCMBと結合するとともにD-Glucoseで発芽するようになる (Fig. 1)。このことは、芽胞成分がPCMBと結合し、芽胞の性質に変化が起こり、これが芽胞の発芽剤に対する特異性の変化につながったことを示唆している。

Waitesら(7)は、芽胞の発芽剤特異性発現に芽胞殻が関与していることを示唆している。Nishiharaら(10)は、タンパク質可溶化剤で芽胞を処理した場合主として芽胞殻タンパク質が抽出されることを報告している。そこでPCMB処理芽胞について種々のタンパク質可溶化剤処理を行い、この芽胞の発芽性の変化について検討した。その結果、Ureaで処理した芽胞 (PCMB-Urea処理芽胞) ではD-Glucoseによる発芽能が消失していることを認めた (Fig. 1)。このUrea処理時の上清中には、PCMB処理芽胞に結合していたPCMBの56.6%に相当する水銀量が含まれていた。また、タンパク質もPCMB処理芽胞1 mgあたり13.5 μ gが流出したことを認めた。

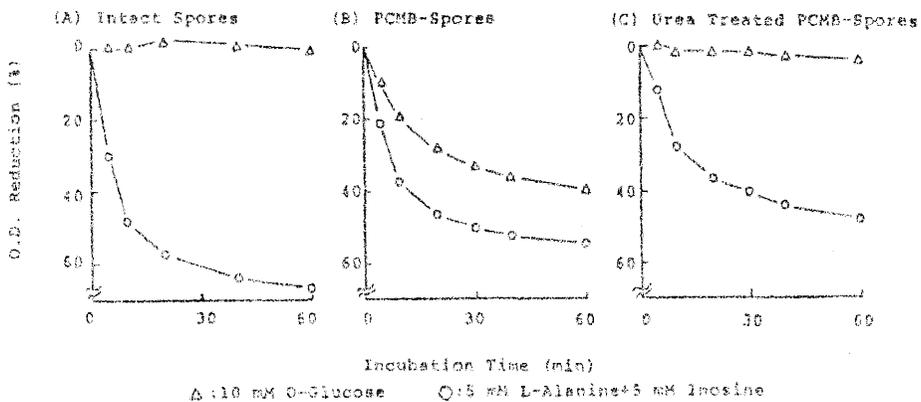


Fig. 1. Germination of (A) Intact, (B) PCMB- and (C) Urea Treated PCMB-Spores

第2章 Urea抽出液中の水銀結合物質の検索とこの物質の芽胞への再構成

PCMB処理芽胞をUrea処理した結果、PCMB処理効果が消失したことから、Urea抽出液中にPCMB結合芽胞成分が存在するものと考え、水銀量を指標としてこの物質の検索を行った。Urea抽出液をSephadex G-25で分画した結果、Fig. 2に示すように、水銀は高分子物質画分 (HM Fra) と低分子物質画分 (LM Fra) に分離し、とくにLM Fraは、Urea処理時PCMB処理芽胞から流出した水銀量の90%以上を含有していた。

両画分のPCMB処理効果への関与を検討するために、Fig. 3に示す方法に従って再構成実験を行った。その結果、HM FraあるいはLM Fra単独溶液を用いて調製した再構成芽胞はD-Glucoseで発芽しなかったが、両画分混合溶液で調製した再構成芽胞は、D-Glucoseで発芽することを認めた (Fig. 4)。

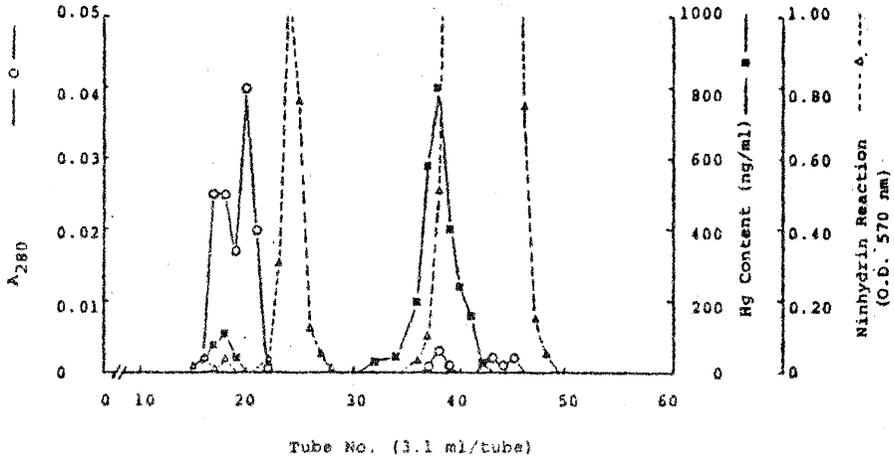


Fig.2. Sephadex G-25 Column Chromatography of Urea Extract.

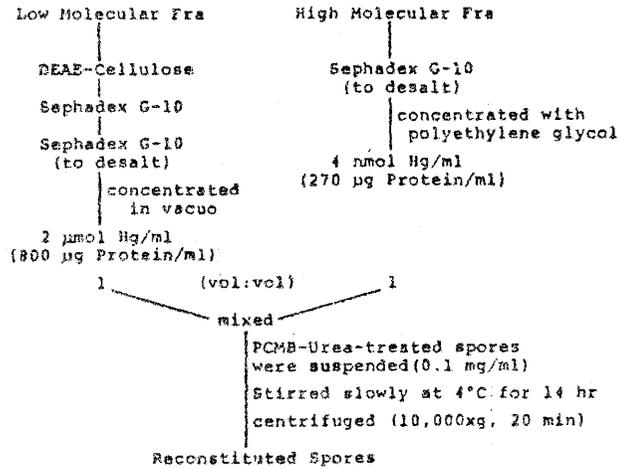


Fig.3. Scheme for Preparation of Reconstituted Spores.

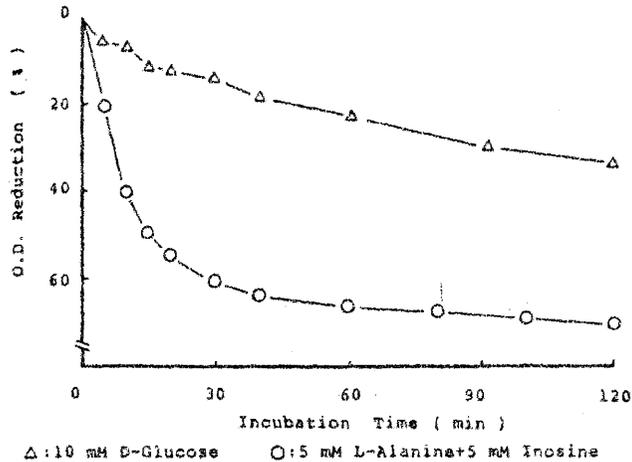


Fig.4. Germination of PCMB-Urea-treated Spores after Incubation with HM and LM Fractions.

第3章 水銀含有低分子物質の精製とその化学組成

Urea処理で流出する量の90%以上の水銀が, LM Fraに含まれていることから, Fig.5に示した方法でこの画分を精製した。その結果, 高速液体クロマトグラフィーおよび薄層クロマトグラフィーにおいて単一とみなすことのできる物質を得ることができた。この物質は, ニンヒドリン反応陽性およびDNP化(2,4-Dinitrophenylation)されることから, ペプチドであることが考えられた。そこでこの物質のアミノ酸組成を検討した。結果は, Table 1に示した。このペプチドのN-およびC-末端アミノ酸をDNP化法およびヒドラジン分解法により検討し, それぞれGlycineおよびGlutamic acidであることを認めた。これらの結果に加えて, Sephadex G-25, G-10によるゲルろ過実験結果から, 水銀含有低分子物質は分子量約1,000のペプチドであることが明らかとなった。

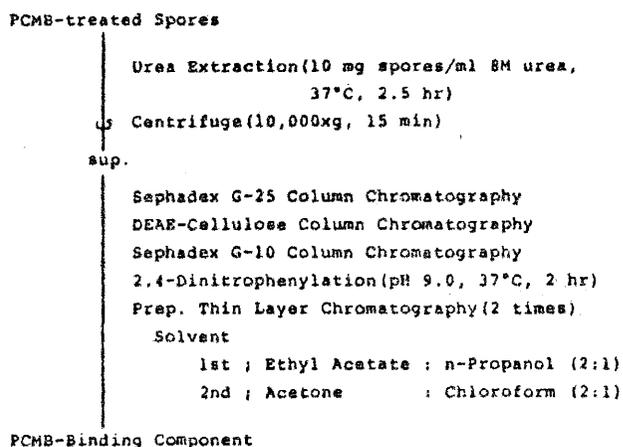


Fig.5. Purification Procedure for PCMB-Binding Component obtained from Urea Extract

Table 1. Amino Acid Composition and Hg Content of PCMB-Binding Component

| Amino Acid | Content (nmol) | Molar Ratio |
|------------|----------------|-------------|
| Gly | 56.6 | 4.35 |
| Ser | 55.6 | 4.28 |
| Asp | 40.7 | 3.13 |
| Ala | 32.2 | 2.48 |
| Glu | 32.1 | 2.47 |
| Thr | 13.0 | 1.00 |
| Hg | 56.6 | 4.35 |

第4章 水銀含有ペプチドの一次構造

水銀含有低分子物質は, ペプチドであることが明らかとなったが, その化学構造を明らかにするためにアミノ酸配列分析を行った (Table 2)。すなわち, 最初に本ペプチドをKoideら(11)の方法に従ってトリプシン処理し, 分解物を二次元ペーパークロマトグラフィーにて精製した。これにより得られた5つのフラグメントに対し, アミノ酸組成分析, DNP化法によるN-末端アミノ酸分析およびカルボキシペプチターゼ法によるC-末端側からの逐次分析を行った。また, ペプシンを用いて水銀含有低

分子画分ペプチドをフラグメント化し、分解物を二次元ペーパークロマトグラフィーにて精製し、6つのフラグメントを得た。このフラグメントのアミノ酸組成、N-末端アミノ酸分析を行った。

トリプシン-フラグメントをカルボキシペプチターゼ処理した時、Serineと親和性を有するカルボキシペプチターゼYを用いたにもかかわらず、各フラグメント (T-1, 2, 4, 5) ともSerineの位置で酵素反応が停止した。その結果、T-1ではAsp・Serの配列決定ができなかった。そこでT-1をさらに高濃度のペプシンで処理し、分解物を二次元ペーパークロマトグラフィーにて精製し、P-1-1, P-1-2を得た。以上の検討により得た結果を総合して、本ペプチドの一次構造をGly-Asp-Ser-Ala-Asp-Ser-Gly-Glu-Gly-Asp-Ser-Ala-Thr-Ser-Gly-Gluと決定した。

Table 2. Summary of Sequence Studies on PCMB-Binding Component

| *Gly-Asp-Ser-Ala-Asp-Ser-Gly-Glu-Gly-Asp-Ser-Ala-Thr-Ser-Gly-Glu* | |
|---|------------------------------------|
| T-1 | *Gly(Asp,Ser)Ala |
| T-2 | *Asp-Ser-Gly |
| T-3 | *Glu-Gly |
| T-4 | *Asp-Ser-Ala |
| T-5 | *Thr-Ser-Gly-Glu |
| P-1 | (*Gly,Asp,Ser,Ala) |
| P-2 | (*Gly,Asp,Ser,Ala,Asp,Ser,Gly,Glu) |
| P-3 | (*Asp,Ser,Gly,Glu) |
| P-4 | (*Asp,Ser,Gly,Glu,Gly,Asp,Ser,Ala) |
| P-5 | (*Gly,Asp,Ser,Ala) |
| P-6 | (*Thr,Ser,Gly,Glu) |
| P-1-1 | *Gly |
| P-1-2 | (*Asp,Ser,Ala) |

The symbols used are as follows: T- and P- fragments obtained by digestion with trypsin and pepsin, respectively. *, 2, 4-Dinitrophenylation method. **, Hydrazinolysis method. —, Carboxypeptidase Y digestion.

第5章 水銀含有ペプチド中の水銀結合アミノ酸

水銀含有ペプチドは、Cysteine残基を含まず、また1分子中に4分子のPCMBに相当する水銀を持っている。(Table 1) またPCMBは、CysteineのSH基と反応すると考えられている。これらのことから、PCMB結合アミノ酸について検討した。

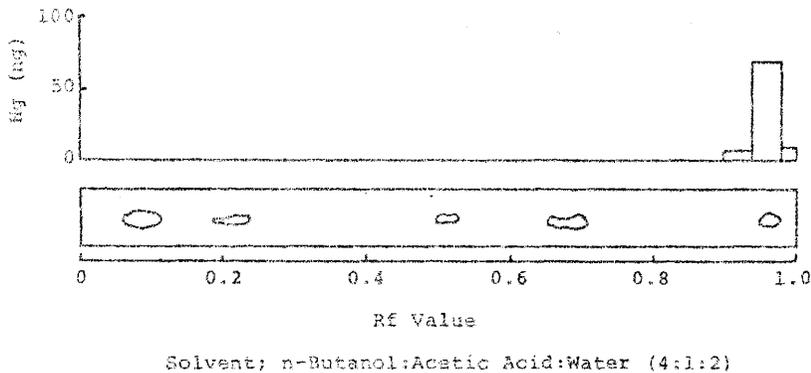


Fig. 6. Analysis of Hg-Binding Amino Acid on Paper Chromatography

再構成実験に用いたLM Fraについて順次ペプシン処理, カルボキシペプチダーゼ処理, アミノペプチダーゼ処理を行い, ペプシドをアミノ酸にまで分解した。分解物をペーパークロマトグラフィーにより分析した結果, Fig. 6に示すように, Rf値0.96の位置に水銀を含むニンヒドリン反応陽性物質の存在を認めた。そこでこの画分のアミノ酸組成および水銀量を検討した。その結果Table 3に示したように, この画分からアミノ酸としてはSerineのみが検出され, Serine:水銀のモル比は1:0.83であった。Fig. 6と同じ条件で, 本ペプチドの構成アミノ酸6種についてペーパークロマトグラフィーを行った場合, それらはすべてRf値0.2付近に検出された。これらの結果から, 水銀はペプチド中のSerine残基と結合していることが明らかとなった。

Table 3. Amino Acid Composition and Hg Content of Ninhydrin-Positive Material

| Amino Acid (nmol) | Hg Content (nmol) | Molar Ratio |
|-------------------|-------------------|-------------|
| Ser 50.2 | 41.8 | 1 : 0.83 |

結 論

B. megaterium ATCC 19213芽胞の, PCMB処理により発芽剤特異性の変化に関与する, 芽胞成分について検討した。

1. PCMB処理*B. megaterium* ATCC 19213芽胞の発芽剤特異性は, PCMB処理芽胞をUrea処理したPCMB-Urea処理芽胞では変化し, 未処理芽胞のそれと同じになった。
2. PCMB処理芽胞のUrea処理時に, 芽胞から流出する水銀結合物質をPCMB-Urea処理芽胞に再構成した芽胞は, 再び発芽剤特異性が変化した。
3. PCMB処理芽胞のUrea処理時に流出する水銀含有低分子物質を精製し, 分子量約1,600のペプチドであることを明らかにした。
4. 水銀含有ペプチドの一次構造は, Gly-Asp-Ser-Ala-Asp-Ser-Gly-Glu-Gly-Asp-Ser-Ala-Thr-Ser-Gly-Gluであることを明らかにした。
5. 水銀含有ペプチド中の水銀結合アミノ酸は, Serineであることが明らかとなった。

引用文献

- 1) Rode, L. J., and Foster, J. W. (1962) : Arch. Mikrobiol., **43**, 183.
- 2) Rode, L. J., and Foster, J. W. (1962) : Arch. Mikrobiol., **43**, 201.
- 3) Sudo, S. Z. and Dworkin, M. (1973) : Adv. Microb. Physiol., **9**, 153.
- 4) Jones, A., and Gould, G. W. (1968) : J. Gen. Microbiol., **53**, 383.
- 5) Woose, C. R., Morowitz, H. J., and Hutchinson, III, C. A. (1958) : J. Bacteriol., **76**, 578.
- 6) Ueno, A., Kametaka, S., Nishihara, T., Ichikawa, T., and Kondo, M. (1978) : Spores VII, 109.

- 7) Waites, W. M., Wyatt, L. R., and Arthur, B. (1975) : Spores V, 430.
- 8) Cerf, O. (1976) : Spore Research 1976, 683.
- 9) Vary, J. C. (1973) : J. Bacteriol., 116, 797.
- 10) Nishihara, T., Yutsudo, T., Ichikawa, T., and Kondo, M. (1981) : Microbiol. Immunol., 25, 327.
- 11) Koide, T., and Ikenaka, T. (1973) : Eur. J. Biochem., 32, 417.

論文の審査結果の要旨

B. megaterium ATCC 19213芽胞はL-アラニンによって発芽するが、D-グルコースでは発芽しないことが知られている。しかし、この特異性は芽胞をPCMBで処理すると変化し、D-グルコースでも発芽するようになる。しかし、PCMB処理芽胞を尿素処理するとD-グルコースでは発芽しなくなりもとの発芽性に戻ることが明らかにされた。このことはPCMBと結合して発芽特異性に変化を生じさせた物質が尿素処理により菌体外に流出したことを示唆するものであり、この考え方にもとずいて可溶化された物質を精製した結果PCMBと結合している主要ペプチドを単離することに成功した。この物質の一次構造を明らかにし、しかもPCMBの水銀部分がこの構造内のセリンと結合していることを明らかにした。この分画と少量ではあるが、分子量の大きいやはり水銀を含む分画を混合しPCMB—尿素処理芽胞に添加し、再構成させると再びD-グルコースでも発芽することが確認された。以上のような研究業績は発芽機構の解明に貢献する独創的な研究として薬学博士の学位を授与するに値するものと判定した。