The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Bacillus megaterium芽胞殻外層の化学構造に関する研究
Author(s)	尾垣, 淳治
Citation	大阪大学, 1983, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/33365
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。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

【3】

氏名・(本籍)	尾垣淳治（おがきじゅんじ）
学位の種類	薬学博士
学位記番号	第 6021 号
学位授与の日付	昭和58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	***Bacillus megaterium* 芽胞殻外層の化学構造に関する研究**
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

細菌芽胞は，熱，紫外線などの物理的処理や薬剤，酸，溶菌酵素などの化学的処理に対して強い抵抗性を示す休眠耐久型細胞である(1)。芽胞が発現する種々の抵抗性は劣悪な生育環境下において，その生命を維持するためのものである。これらの特性を獲得することにより芽胞は強い生命力で生存し続けることができる。芽胞の形態構造は栄養型細胞とは全く異なっており生命活動の本体である原形質を覆うようにコルテックス層と芽胞殻が層状の耐久構造を形成している（2,3,4,5)。とくに芽胞殻は最外被構造であり常時，外部環境と接触している部位であることから芽胞が抵抗性を発現する場の一つと考えられる。これまで芽胞殻の機能として，その強固な構造が防御壁として作用することや発芽剤の選別など種々の報告がある（6,7)。しかし，それらの報告は現象面からの考察であり，芽胞殻の詳細な化学構造が解明されていない現状では芽胞殻の本質的な機能は明らかではない。したがって，芽胞殻の構造とその機能を考察するためには詳細な化学構造の解明が必須条件であり，これまでに報告されている芽胞殻たんぱく質のように容易に可溶化できる成分（6,8,9）だけでなく，糖質やその他の未検討成分についても解析を進める必要がある。本研究において実験材料として用いた*Bacillus megaterium* QM B1551菌の芽胞殻は主として，たんぱく質から構成されている内層と，糖，リン，たんぱく質から構成されている外層とに区分することができる。とくに外層には一般的な可溶化処理では可溶化することができず，ヘキソサミンとリンに富む画分が存在していることから，この画分について化学組成および化学構造の解明を試みた。また，この画分と外層における抵

抗性との関連について，明らかにした化学構造に基づき考察を加えた。

本　論

第1章　外層抵抗性画分の単離およびその化学組成

B. megaterium QM B1551菌は，グルタミン酸寒天平板培地で培養し休眠芽胞を形成させた。芽胞をKondo-Fosterの方法(10)に従って分画し，外層の抵抗性画分を調製した。100gの休眠芽胞から28gの芽胞殻が得られさらにこの芽胞殻から9gの抵抗性画分が単離された。この結果から本菌において外層の抵抗性画分は芽胞殻重量の約32%を占めることが明らかになった。単離した抵抗性画分は，4N塩酸，110℃，6時間，封管中での加水分解により重量の約70%が可溶化された。この可溶性画分について化学組成を検討し，その結果をTable 1に示した。

Table 1. Chemical Composition of Hydrolysate of Resistant Fraction

Components	Content (μmole*)	(%**)
Hexosamines	938	22.1
Amino Acids	3280	43.0
Organic Phosphorus	1180	3.4
(as Phosphate esters		11.6)

* Values are expressed as μmole/g of Resistant Fraction.
** Values are expressed as %(W/W) of Resistant Fraction.

外層の抵抗性画分はAspartic acidなど架橋部に位置するアミノ酸，ガラクトサミン，リン酸およびカルシウムなどの灰分から構成されていることが明らかとなった。

第2章　外層抵抗性画分におけるガラクトサミンとリン酸の存在形態

前章において抵抗性画分重量の43%をアミノ酸が占めていることを示した。しかし，これらのアミノ酸はプロナーゼ処理により切断されたペプタイドに由来するものであり，抵抗性画分での機能発現には直接的な関与はしないと考え，ガラクトサミンとリン酸の存在形態について検討した。4N塩酸，110℃，6時間，封管中で抵抗性画分を加水分解し可溶性画分を調製した。この可溶性画分を陽イオン交換樹脂Dowex 50W×4 (H^+型)カラムに添加し0.05N塩酸，0.3N塩酸により順に溶出した。未吸着画分と0.05N塩酸溶出画分にヘキソサミンとリンが検出され，0.3N塩酸溶出画分にはヘキソサミンのみが検出された(Fig. 1)。

第3章　外層抵抗性画分からのオリゴ糖の単離と化学構造

抵抗性画分におけるガラクトサミン-6-リン酸の糖鎖構造を明らかにするため，ガラクトサミン-6-リン酸を含むオリゴ糖の精製を試みた。Dowex 50W×4カラムの未吸着画分をBio-Gel P-2カラム（200～400 mesh，1.5×100cm）を用いて精製した結果，ガラクトサミンとリンを含む3つのピーク（Fragment-1, -2，および-3）が検出された（Fig. 2)。これら3種のオリゴ糖の推定分子量は，それぞれ1300，700，500であった。各オリゴ糖をろ紙クロマトグラフおよび薄層クロマトグラフ上で単一スポットを与えるまでに精製し，平均糖鎖長をPark-Johnson法(15)により測定した結果，Fragment-1はPentasaccharide，Fragment-2はTrisaccharide，そしてFragment-3はDisaccharideと決定された（Table 2)。

次に各オリゴ糖の1モル相当量を加水分解し構成糖およびリン含量を測定した（Table 3)。

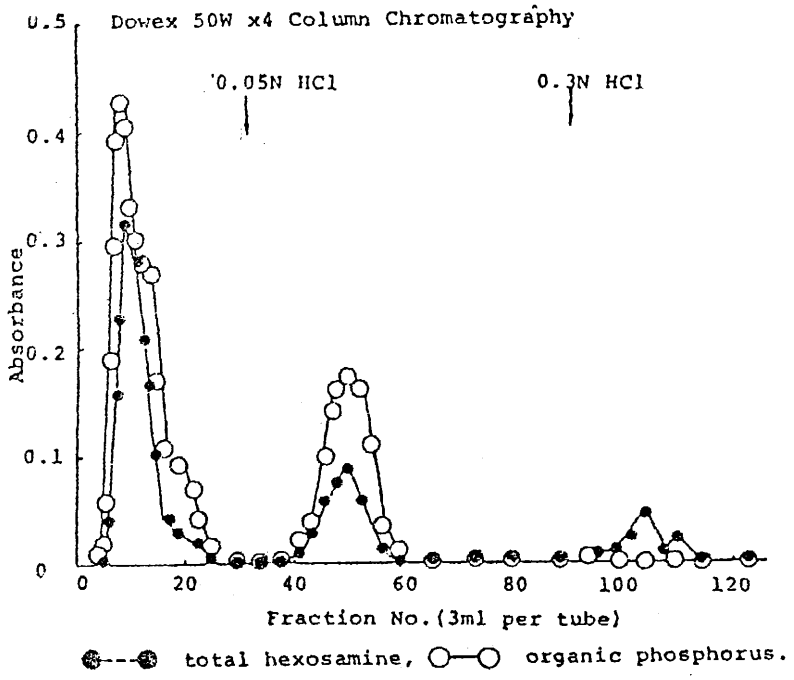


Fig.1.

Table 2. Average Chain Length of Purified Oligosaccharide Fragments

	Reducing groups (μmole) Intact	Hydrolysate	Chain length (units*)
Fragment-1	2.0	9.5	4.8
Fragment-2	2.1	7.0	3.3
Fragment-3	1.9	3.7	1.9

* Average Chain length was calculated as galactosamine unit.

Table 3. Chemical Composition of Purified Oligosaccharide Fragments.

	Galactosamine (μmole)	Org. Phosphorus (μmole)	Mannose (μmole)
Fragment-1	4.9	5.1	N. D.
Fragment-2	2.1	2.3	0.9
Fragment-3	2.1	2.2	N. D.

N. D.; Not detectable

単離した3種のオリゴ糖の構造をFig.3に示した。未吸着画分での各オリゴ糖の存在比が52：15：33であったことから，オリゴ糖においてもガラクトサミン-6-リン酸が主要構成糖であった。また，ガラクトサミン-6-リン酸モノマーの量を考え合わせると抵抗性画分を構成する糖の97%がガラクトサミン-6-リン酸であることになり，したがって，抵抗性画分にガラクトサミン-6-リン酸の骨格構造の存在することが明らかとなった。

第4章　糖鎖構造の生合成経路からの検討

芽胞形成時の形態構造や芽胞殻生合成機構に関する知見⑯から，ガラクトサミン-6-リン酸の糖鎖は芽胞形成後期に母細胞原形質で生合成され，前駆芽胞表層へ沈着移行するものと推察された。そこでSchaeffer（×2）液体培地で本菌を培養し，培養各時期の母細胞原形質を用いてグルコサミンからガラクトサミンへのエピマー化反応を触媒する酵素，4-Epimeraseの

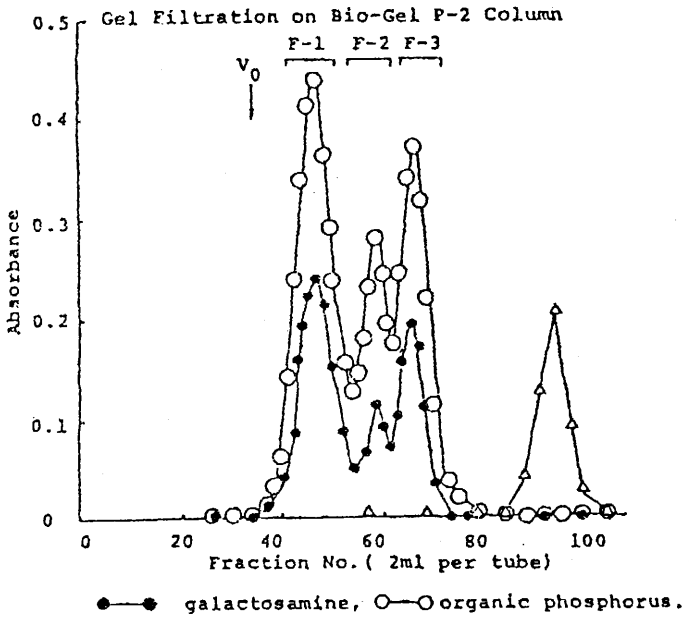


Fig. 2

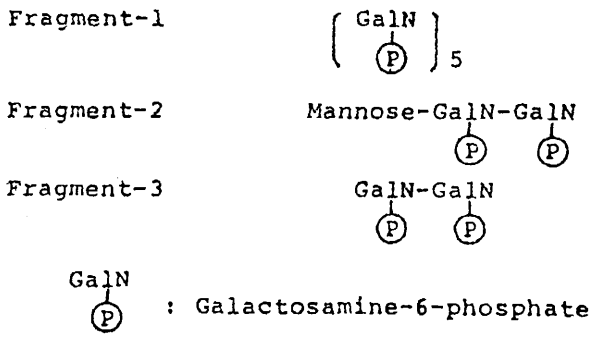
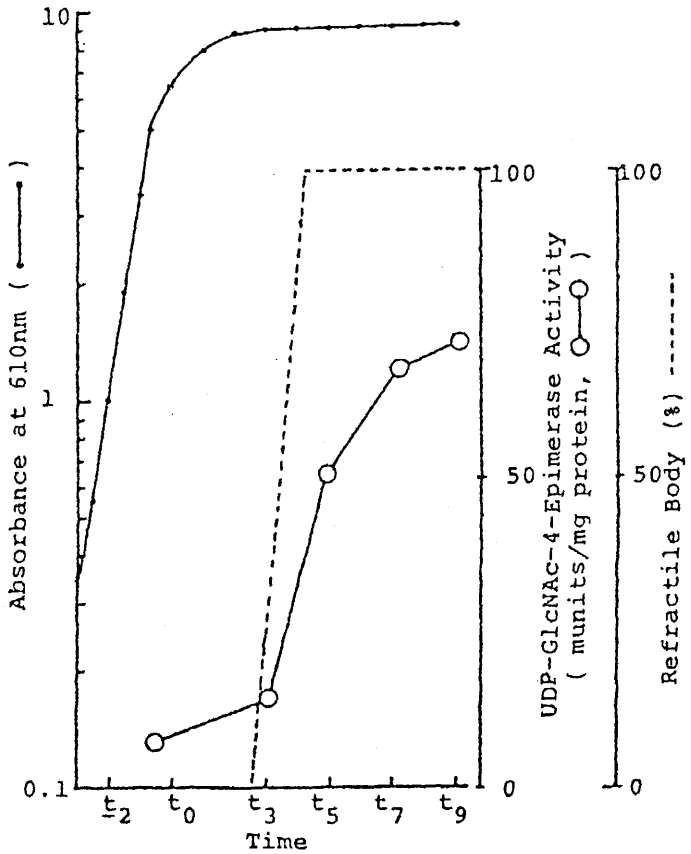


Fig. 3 Structure of Oligosaccharides isolated from Resistant Fraction.

活性を測定した。本酵素についてはGlaserの報告(17)にもあるように，グルコサミンの各体謝中間体について個々に存在する可能性が考えられたので，グルコサミンとその誘導体を基質として基質特異性を検討した。その結果，UDP-GlcNAcだけが基質活性を示しガラクトサミンの生成が認められた。UDP-GlcNAcを基質として芽胞形成に伴う4-Epimeraseの活性変動を測定したところ，Fig. 4に示したように芽胞殻の形成時期に4-Epimerase活性の上昇が認められ，本菌の芽胞殻外層の形成にUDP-GlcNAc-4-Epimerase（E. C. ,1, 3, 7）の関与することが証明された。

本菌においてもUDP-GlcNAcから4-Epimeraseにより生成される。UDP-GalNAcがChitinと同様な直鎖糖鎖を形成している可能性が高いと考えられた。



t_0 means the time at which exponential growth ceases.

Fig.4 Behaviour of UDP-GlcNAc-4-Epimerase Activity during Growth and Sporulation.

第5章　外層における糖鎖構造と抵抗性の発現

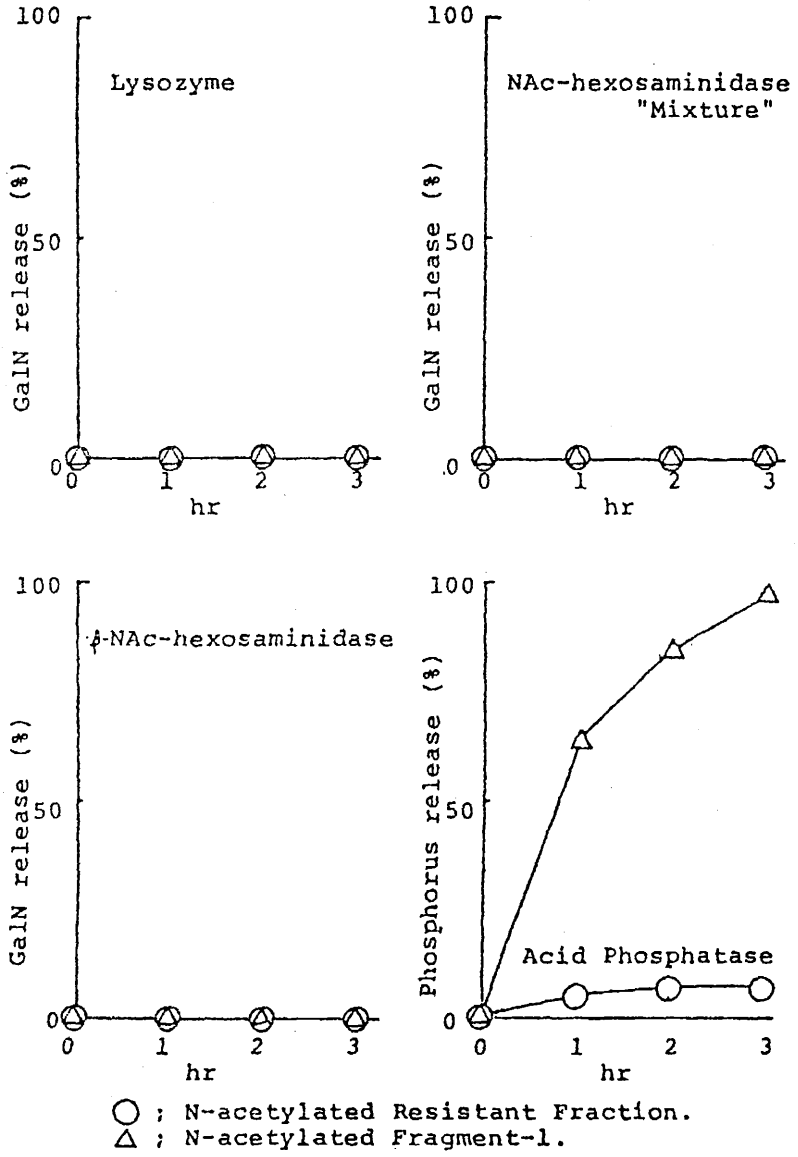
外層の抵抗性画分と単離したオリゴ糖について，いくつかの抵抗性を比較し骨格構造と抵抗性の発現との関係について検討した。オリゴ糖としてガラクトサミン-6-リン酸のPentamerであるFragment-1を用いた。Fig.5の結果から，本菌芽胞殻外層での抵抗性の発現は糖鎖による高次構造に基づく分子ふるい効果に起因しているものと考えられる。すなわち，酸性Phosphataseの場合には分子量が10万と高分子であり，糖鎖構造の内部まで侵入できないものと推察される。分子量1万のLysozymeの場合，侵入できないか，あるいは侵入できたとしても糖鎖がガラクトサミンであるため水解は起こらない。

また，さらにガラクトサミン骨格に作用できるNAc-hexosaminidase類の場合は，糖鎖による高次構造に加えてリン酸基の存在が抵抗性の発現に関与していると考えられた。

結　論

B. megaterium QM B1551菌芽胞殻外層の化学構造および外層における抵抗性について検

Fig.5 Effect of Lytic Enzymes and Phosphatase on Resistant Fraction and Its Fragment



討した。

1．*B. megaterium* QM B1551菌芽胞殻外層の主要構成糖がガラクトサミン-6-リン酸であることを明らかにした。

2．外層より単離した3種のオリゴ糖の化学構造を決定し，ガラクトサミン-6-リン酸の糖鎖が外層中で骨格構造を形成しておりその一部にマンノースが付加していることを示した。

3．芽胞殻形成期の母細胞原形質中にガラクトサミンの生合成に関与するUDP-GlcNAc-4-Epimeraseが存在することを証明した。

4．本酵素活性の芽胞形成時期に伴う変化および基質特異性から，本酵素が外層形成に関与していること，生成されるガラクトサミンの糖鎖が直鎖であること，およびガラクトサミン-6-リン酸がN-アセチル体として外層中に存在する可能性の高いことを示した。

5．外層において発現される抵抗性の本体がガラクトサミン-6-リン酸による骨格構造と，それによる分子ふるい効果である可能性を示し，リン酸基の存在が溶菌酵素に対する抵抗性に関与し外層における抵抗性を増強していることを明らかにした。

引用文献

1．Roberts, T. A., and Hitchins, A. D., the Bacterial Spore, 611 (1969)

2．Pandy, N. K., and Aronson, A. I., J. Bacteriol., **137** 1208 (1979)

3．Munoz, L., Sadaie, Y., and Doi, R. H., J. Biol. Chem., **253** 6694 (1978)

4．Goldman, R. C., and Tipper, D. J., J. Bacteriol., **135** 1091 (1978)

5．Mitani, T., and Kadota, H., J. Gen. Appl. Microbiol., **22** 51 (1976)

6．Warth, A. D., Adv. Microbiol. Physiol., **17** 1 (1978)

7．Aronson, A. I., and Fitz-James, P. C., Bacteriol. Rev., **40** 360 (1976)

8．Watabe, K., Kakiuchi, Y., and Kondo, M., Microbios, **12** 221 (1975)

9．Uchida, A., and Kadota, H., Agr. Biol. Chem., **40** 1349 (1976)

10．Kondo, M., and Foster, J. W., J. Gen. Microbiol., **47** 257 (1967)

11．Gottschalk, A., Ann. N. Y. Acad. Sci., **106** 168 (1963)

12．Makino, M., and Yamashina, I., J. Biochem., **60** 262 (1966)

13．Anderson, B., Hoffman, P., and Meyer, K., J. Biol. Chem., **240** 156 (1965)

14．Kondo, M., and Nishihara, T., Japan J. Microbiol., **25** 157 (1970)

15．Park, J. T., and Johnson, M. G., J. Biol. Chem., **181** 149 (1949)

16．Murrell, W. G., Adv. Microbiol. Physiol., **1** 133 (1967)

17．Glaser, L., J. Biol. Chem., **239** 3178 (1964)

論文の審査結果の要旨

細菌芽胞は2ないし3層の外被構造をもち，これが芽胞の抵抗性あるいは発芽機構と密接な関係があることが示唆されている。これらの関係を明らかにするため外被構造の検討が進められているが，その化学構造についてはほとんど明らかにされていない。本研究はこの点について追求したものであり，とくに最外層の構造がガラクトサミン-6-リン酸の糖鎖を骨格構造とすることを明らかにした。このガラクトサミン-6-リン酸は，芽胞形成にともなって出現する

UDP-アセチルグルコサミン-4-エピメラーゼによってN-アセチルグルコサミンから生合成されることを明らかにした。これらの研究成果は芽胞殻の骨格構造を明らかにすると同時に最外層の生合成機構にも重要な示唆を与えるものであり，薬学博士を授与するに値するものと判定した。