



Title	枯草菌前駆芽胞の生化学的性状に関する基礎的研究
Author(s)	飯田, 誠一
Citation	大阪大学, 1982, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/33540">https://hdl.handle.net/11094/33540</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">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> 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)	飯田誠一
学位の種類	薬学博士
学位記番号	第 5776 号
学位授与の日付	昭和 57 年 7 月 29 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	枯草菌前駆芽胞の生化学的性状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 鎌田 皎 教授 岩田平太郎 教授 青沼 繁

### 論文内容の要旨

#### 緒論

栄養成分の枯渢など生活環境の悪化により誘導される細菌の芽胞形成過程は、一連の生化学的・形態学的变化を伴い進行し、細胞分化のモデル系として広く研究されている(1~4)。

芽胞形成は形態的な特徴から 0~7 期に分けて理解されている(5)。静止期細胞の原形質膜が内部に陥没し、母細胞(mother cell)原形質が非対称的に二分され、小画分は母細胞に由来する原形質膜に包含され、これが前駆芽胞(forespore)となる。原形質二重膜の間に cortex が形成され、ついでその表面に spore coat 蛋白質が積層される過程を経て前駆芽胞が成長して成熟芽胞となる。

芽胞形成に関する従来の研究は、母細胞画分と前駆芽胞を含む細胞全体を対象として行われていた(6, 7)ため、芽胞形成中期以降の細胞内変化に関する問題は未解決のまま残されている(8, 9)。

著者は細菌の芽胞形成機構を解明する基礎的研究として前駆芽胞の重要性に注目し、枯草菌(*Bacillus subtilis* 60015)の芽胞形成過程における生化学的変化および蛋白質合成について検討を行った。

#### 第 1 章 枯草菌前駆芽胞の生化学的性質

枯草菌の芽胞形成期細胞を 25% sucrose 存在下 lysozyme 処理、音波処理を行ない前駆芽胞を単離し、その性質について成熟芽胞と比較した。 $t_5$  (対数増殖期終了 5 時間目) の前駆芽胞は、分画処理前の細胞の 1/1000 以下の生菌数を示していたものの、耐熱性、耐オクタノール性、L-alanine 発芽能をすでに獲得しており、また細胞内DPA 80% 以上は前駆芽胞内に蓄積されていた。

芽胞形成過程で特異的な挙動を示す酵素(10, 11)に着目し、芽胞形成期における活性の変動を検討した。phosphoglycerate mutase, enolase, alkaline phosphatase は  $t_5$  以降の母細胞画分でほぼ一定

の活性を示していたが、前駆芽胞内では特徴的な変化を示していた。すなわち、alkaline phosphataseは $t_5$ で最大活性を示し、phosphoglycerate mutaseは $t_{11}$ 、enolaseは $t_{13}$ で最大活性を示していた。

SDS-Disc 電気泳動により芽胞形成各時期の原形質蛋白質成分について検討した結果、母細胞画分と前駆芽胞画分の蛋白質泳動パターンに相違が認められた。また、前駆芽胞内でも芽胞形成の進行に伴い蛋白質パターンに変化が観察された。

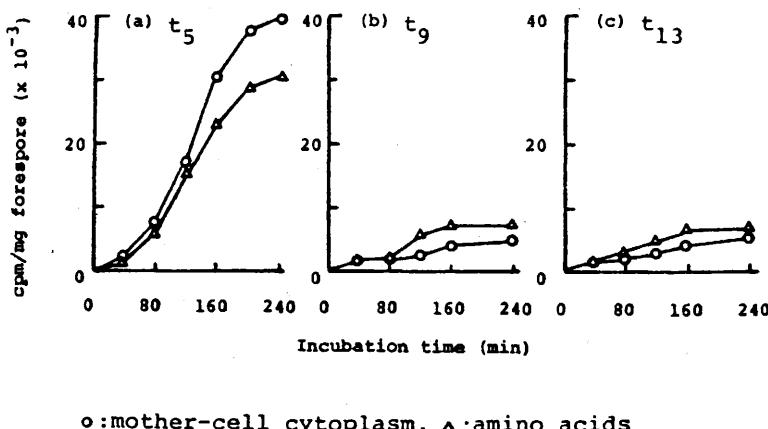
## 第2章 枯草菌前駆芽胞の蛋白質合成

芽胞形成期細胞の蛋白質合成能を検討する目的で、<sup>14</sup>C-phenylalanineの取り込み実験を行った。その結果、芽胞形成の開始とともに取り込み能は減少したものの、 $t_5$ 期細胞においても対数増殖期細胞の40%の取り込み能が観察された。また、芽胞形成期細胞を前駆芽胞と母細胞画分とに分離し、放射活性の分布をしらべたところ $t_5$ では55%の放射活性は前駆芽胞中に存在していた。 $t_9$ 以降の細胞においても低いながら<sup>14</sup>C-phenylalanineの取り込みが観察され、放射活性の80%以上は前駆芽胞中に検出された。

芽胞形成期細胞の蛋白質合成能をさらに検討するため、前駆芽胞を単離して<sup>14</sup>C-phenylalanine含有アミノ酸混液または対応する母細胞画分と保温して蛋白質合成実験を行った。Fig. 1に示すように、 $t_5$ 前駆芽胞が最も高い取り込み活性を示し、これはTCA不溶性であり、クロラムフェニコールにより完全に阻害された。

Fig. 1

### Incorporation of [<sup>14</sup>C]Phenylalanine into Isolated Forespores



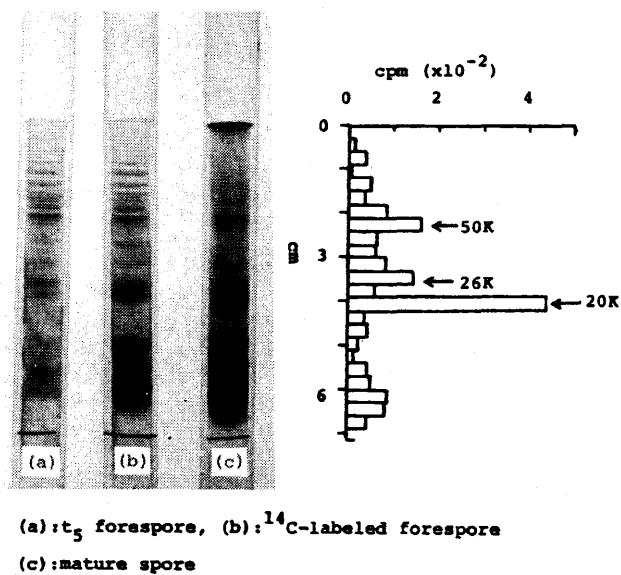
○:mother-cell cytoplasm, ▲:amino acids

$t_5$ 前駆芽胞内の放射活性の分布を検討したところ、73%は原形質画分に、26%は膜画分に存在していた。また、後者を尿素+DTT+SDS処理したところ約70%の膜蛋白質が可溶化され、この画分中に90%の放射活性が存在していた。

## 第3章 $t_5$ 前駆芽胞原形質蛋白質の検討

SDS-Disc 電気泳動により $t_5$ 前駆芽胞内でラベルされた原形質蛋白質の分析を行ない、芽胞形成に

Fig. 2  
SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoretic Pattern  
of  $^{14}\text{C}$ -Labeled Cytoplasmic Protein



おける挙動を検討した(Fig. 2)。放射活性は分子量約20,000の蛋白質に鋭いピークとして集中しておりその他26,000, 50,000の蛋白質にも検出された。経時的変化を検討したところ、約20,000の蛋白質はラベルする前の $t_5$ 前駆芽胞ではわずかに存在し、成熟芽胞では濃厚な蛋白質バンドとして存在していた。したがって、本蛋白質は $t_5$ 付近で前駆芽胞内で生合成が開始されていることが推定された。

放射活性を指標にしてゲルロ過操作を順次行い、本蛋白質を精製した。精製蛋白質の分子量は、電気泳動により24,200と推定した。

#### 第4章 $t_5$ 前駆芽胞膜可溶性蛋白質の検討

$t_5$ 前駆芽胞のラベルされた膜可溶性蛋白質について同様に芽胞形成における挙動を検討した。電気泳動による分析の結果、分子量約74,000, 33,000, 20,000, 12,000の蛋白質に放射活性が分布していた(Fig. 3)。Spore coat蛋白質の主成分と類似の分子サイズを示す低分子量蛋白質領域に放射活性が検出され、このことはspore coat蛋白質の一成分が前駆芽胞内で生合成されている可能性を示唆するものであった。この点を明確にするためspore coat蛋白質に対する抗体を調製し、二抗体法による免疫沈降反応を行った(Table 1)。 $t_5$ 前駆芽胞のラベルされた膜可溶性蛋白質の74%は沈降画分に回収された。したがって、上記可能性が免疫化学的にも強く示唆された。

#### 結論

(1) 枯草菌の芽胞形成期細胞をlysozyme・音波処理法により前駆芽胞を単離した。 $t_5$ 前駆芽胞は成熟芽胞の有する特性をすでに獲得していた。各種酵素活性および原形質蛋白質成分を比較した結果、 $t_5$ 以降の前駆芽胞内で特異的な変動パターンが観察された。

(2)  $^{14}\text{C}$ -phenylalanineによるパルスラベル実験の結果、 $t_5$ 前駆芽胞が蛋白質合成能を有しているこ

Fig. 3

SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoretic Pattern  
of  $^{14}\text{C}$ -Labeled Membranous-soluble Protein

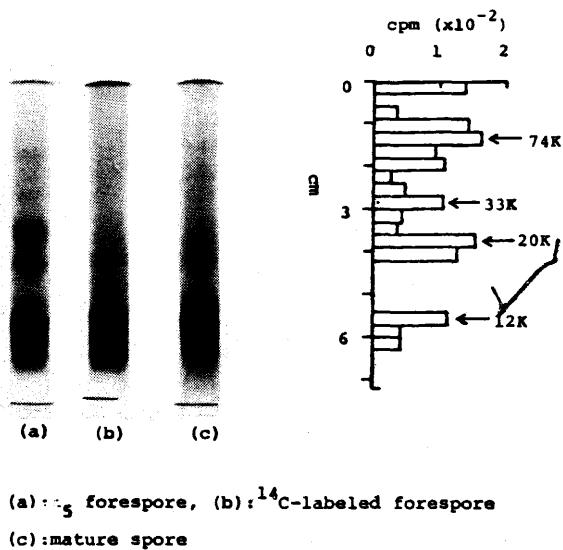


Table 1 Immunoprecipitation of  $^{14}\text{C}$ -labeled Membranoussoluble Protein with Mature Spore Coat Protein

Total reaction mixture	2,610 cpm	(100%)
Immunoprecipitated	1,920	(73.6)

Immunoprecipitation was carried out using two antibodies: first, anti-mature spore coat protein; second, anti-rabbit IgG.

とが明らかとなった。

(3)  $t_5$ 前駆芽胞内で生合成される蛋白質のうち、原形質画分の主成分を精製し、分子量24,200の蛋白質を得た。

(4) 膜可溶性画分は種々の分子サイズの放射化蛋白質を含み、免疫化学的検討からspore coat蛋白質の一部が前駆芽胞内で生合成されていることが推察された。

## 引用文献

- 1 . A. Kornberg, et al, 1968. Ann. Rev. Biochem., **37**, 51.
- 2 . P. Scheaffer, 1969. Bacterial. Rev., **33**, 48.
- 3 . R. S. Hanson, et al, 1970. Ann. Rev. Microbiol., **24**, 53.
- 4 . A. Aronson, et al, 1977. Proc. N. A. S., **74**, 1254.
- 5 . P. Fitz-Ja&es & E. Young, 1969. p. 39. In Bacterial Spores, Academic Press.
- 6 . G. Chambliss & J. C. Vary, 1978. Spores VII, American Society for Microbiology.
- 7 . H. S. Levinson, et al, 1981. Sporulation and Germination, American Society for Microbiology.
- 8 . A. J. Andreali et al, 1973. J. Bacteriol., **115**, 1159.
- 9 . M. W. Eaton & D. J. Ellar, 1974. Biochem. J., **144**, 327.
10. R. H. Doi, et al, 1976. p. 145. In Microbiology 1976, American Society for Microbiology.
11. E. Freese & Y. Fujita, 1976. p. 164. In Microbiology 1976, American Society for Microbiology.

## 論文の審査結果の要旨

枯草菌の芽胞形成期細胞をリゾチームならびに音波処理し、前駆芽胞を単離することに成功し、単離した前駆芽胞の酵素活性、原形質蛋白質成分などを検討した結果、 $t_5$ 以降の前駆芽胞内で特異的な変動パターンがみられた。これについて詳細を検討するため<sup>14</sup>C-phenylalanineによるパルスラベル実験を行い、 $t_5$ 前駆芽胞が蛋白質生合成能を有していることを明らかにした。また、ここで生合成される蛋白質は原形質部に存在するものと膜画分に存在するものとがあり、いずれも前駆芽胞内で生合成され成熟芽胞として必要な構成成分としてつくりあげられていくものと考えられた。この知見は芽胞形成機構の解明に貢献する新しい成果であり、薬学博士の学位を授与するに値する研究業績であると判定した。