OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Bacillus megaterium芽胞の発芽機構に関する研究
Author(s)	中谷, 喜洋
Citation	大阪大学, 1985, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/34711
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

【5】

氏名・（本籍）	中谷喜洋（なかたによしひろ）
学位の種類	薬学博士
学位記番号	第6848号
学位授与の日付	昭和60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* 芽胞の発芽機構に関する研究
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

*Bacillus*属の細菌は，環境条件の悪化に対応し不利な環境下で生存すべく芽胞を形成する。芽胞は，熱，紫外線，化学物質，物理的刺激などに対し抵抗性を有する耐久型細胞であり，物質代謝をほとんど必要とせず長期にわたって生存可能な生命体である。これらの芽胞の特徴は発芽剤とよばれる低分子化合物と接触することにより数分以内に消失し，適当な環境下では栄養型細胞に分化する。本論文では，この発芽の機構について検討を加えた。発芽とは，芽胞が耐熱性を消失する過程を意味する。一方，コルテックスのコアに対する圧力が，芽胞が耐熱性を有する原因であると考えられている。

そこで，このコルテックスの圧力を崩壊することが，発芽において重要な因子であるものと考え，特に，発芽におけるコルテックスの変化に着目し実験をおこなった。

非イオン性発芽剤であるブドウ糖による，発芽時の形態変化について電子顕微鏡を用い検討した。芽胞の形態変化は，発芽の非常に早い時期に認められた。発芽初期には，コルテックスの体積が減少した芽胞が多く存在し，その存在比は，ブドウ糖添加3分で最高となり，以後減少した。一方，発芽後期には，エキソスポリウムにき裂が認められ、球形に近いかなり発芽が進んだと考えられる芽胞が多く存在した。このことより，芽胞は，発芽剤と接触することにより，まずコルテックス体積において減少がおこり，次いで発芽が，さらに進行するものと考えられた。またこれより，50%の芽胞のコルテックス体積が変化するのに要する時間は2.5分と計算された。なお，この値は，70℃，10分における耐熱性が50%消失するのに要する時間である2.3分とよく一致した。

そこで，コルテックスの体積を減少させる因子が，耐熱性の消失，すなわち，発芽と密接に関係しているものと考え，この因子を究明すべく実験をおこなった。

まず，この因子として，コルテックス分解について検討したが，コルテックスの形態変化速度に比べ遅かった。コア内に存在するジピコリン酸（ＤＰＡ），カルシウム，マグネシウムは，発芽のかなり早い時期に流出され，50%流出に要する時間はそれぞれ，3.4分，4.0分，2.4分であり，コルテックスの形態変化速度と近似していた。

また，これらのカチオンおよびＤＰＡとのキレート体は，単離したコルテックスの体積を減少させる能力を有していた。一方，発芽剤であるブドウ糖は，コルテックスの体積に対し影響を与えないことより，コア内に存在するＤＰＡ，カチオンが，芽胞内膜を通過する過程が，ブドウ糖発芽の第一過程であると考えた。この機構として，ブドウ糖と結合することにより，ＤＰＡ，カチオンに対するチャンネルを開く物質が存在することを推察している。そして，第二過程として，コア内に存在していた，ＤＰＡ，カチオンが芽胞内膜を通過し，コルテックスと相互に作用するものと考えられる。この結果，コルテックス体積の減少，および，コア体積の増加がおこり，コア内水分活性が上昇するものと推察される。

次に，カドミウムによる発芽の機構について検討を加えた。芽胞を塩化カドミウムと保温することにより，すみやかな耐熱性の消失，ＤＰＡの流出が認められた。そこで，発芽にともなうペプチドグリカン断片の流出を，グルコサミンをマーカーとして測定した。

ブドウ糖，硝酸カリウムの混合系による発芽では，すみやかなグルコサミン量の増加が認められたのに対し，塩化カドミウムによる発芽では，その10%程度であった。これに加え，発芽時の，コルテックスのグリカン鎖における還元末端の上昇も認められなかったことより，塩化カドミウムによる発芽では，コルテックスの分解はおこっていないものと判断した。

塩化カドミウムによる発芽芽胞を電子顕微鏡で観察したところ，コルテックスの分解がおこっていないにもかかわらずコルテックス体積において減少が認められた。また，カドミウムは単離したコルテックスの体積を減少させる能力を有することより，カドミウムが，コルテックスと相互作用し，その体積を減少させることがイオン発芽の重要な因子であるものと考えられた。

B.megaterium ATCC 12872 芽胞は，酸処理により発芽能を消失し，カルシウム処理により再び回復する。この現象は，カルシウムがある部位に結合することが発芽に必須であることを示唆させるものであり，この部位を究明することにより発芽機構の一端が明らかになるものと考えた。

カルシウムはかなり非特異的に結合する物質であるため，単純な構造をもつ芽胞を用いることが望ましい。そこで，エキソスポリウム欠損変異株芽胞であるMAE－05芽胞を，ドデシル硫酸ナトリウム－ジチオスレイトール（SDS-DTT），pH 10.0で処理することによりSDS-DTT-MAE－05芽胞を調製した。この芽胞は，電子顕微鏡観察により，エキソスポリウムおよび芽胞殻を欠損していることが明らかになった。そこで，この芽胞より，酸処理芽胞（H-spore）およびカルシウム処理芽胞（Ca- spore）を調製し，その発芽能を調べたところ，野生型芽胞と同様，その発芽能に変化が認められた。したがって，カルシウムが結合することにより発芽能を左右しうる物質の存在部位は，エキソスポリウムおよび芽胞殻ではないことが明らかになった。さらに，^{45}Caを用いたトレーサー実験により，この物質は芽胞内膜に存在する可能性が高いという結果を得た。

論文の審査結果の要旨

細菌芽胞の発芽開始機構の一端を明らかにすべく，グルコースおよび塩化カドミウムを用いた単純な発芽実験を行ない，グルコース発芽においてコルテックスのプロトプラスト＋コルテックスに対する体積比において減少が認められ，これが耐熱性の消失と密接に関係があることを明らかにした。また，塩化カドミウムによる発芽ではコルテックスが分解されていないにもかかわらず前記の比が減少することを認め，これがカドミウムおよびコア内カチオンとコルテックスの相互作用によるものと判定した。これらの事実を含め，芽胞内膜中にカチオンの有無により発芽能を左右する物質が存在する可能性を示唆した。これらの研究成果は，発芽開始機構におけるコルテックスの変化がイオンによる作用であり，これが発芽開始機構のひきがね的役割を果すことを示すものであり，芽胞研究に新しい重要な知見を加えたものと高く評価でき，薬学博士を授与するに値するものと判定した。