The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Bacillus megaterium芽胞殻外層成分の多糖生合成に関する研究
Author(s)	西川, 淳一
Citation	大阪大学, 1987, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/35352
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)	西川淳一（にしかわじゅんいち）
学位の種類	薬学博士
学位記番号	第 7703 号
学位授与の日付	昭和62年3月26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*芽胞殻外層成分の多糖生合成に関する研究
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 三浦 喜温　教授 内田 驍

論文内容の要旨

Bacillus 属の細菌は，栄養源の涸渇に対応して増殖を停止し，複雑な生化学的，形態学的変化を伴う芽胞形成期を経て，芽胞を形成する。この過程は，細胞の分化現象としては最も単純な系であり，古くからその制御機構に関する研究が数多く行われているが，未だ不明な点が多い。

一方，*Bacillus megaterium* ATCC 12872は，電子顕微鏡下で電子密度の濃い部分として観察され，乾燥重量の約10%を占める芽胞殻外層を有している。その主要構成成分はガラクトサミン－6－リン酸（GalN－6－P）糖鎖であり，その生合成は芽胞形成過程の後期において特異的に行われる。

以上のような観点から，GalN－6－P糖鎖生合成系は，芽胞成形過程における形態形成の制御メカニズムを理解する上で，有力なモデル系になり得ると考え，その生合成について検討を行った。

構成糖としてのガラクトサミンは本菌の生活環を通して，芽胞に特異的な成分であり，また一般に多糖生合成中間体としてUDP化糖が存在する。これらのことから芽胞形成過程後期に出現するUDPと結合したガラクトサミン誘導体は，GalN－6－P糖鎖生合成中間体である可能性が高いと考え，α－D－ガラクトシドに特異的なレクチン，*Bandeiraea simplicifolia* レクチンを用いてガラクトサミン誘導体を単離し，その分析を行った。

芽胞形成過程後期の菌体より調製した原形質低分子画分には，このレクチンに親和性を示す物質が高速液体クロマトグラフィー（HPLC）上で2種類存在することが確認された。そこで，これらの物質を精製し，その成分を調べたところ，いずれも基本組成としてガラクトサミンとUDPが1：1に結合した糖ヌクレオチドであった。このうちの一つは，HPLC上での挙動からUDP－N－acetylgalactosamine（UDP－GalNAc）と推定され，もう一方は^{13}C－NMRスペクトル，FAB質量スペクトル

等により，ＵＤＰ－galactosamine（ＵＤＰ－GalN）と推定された。

次に，ＵＤＰ－GalNAcおよびＵＤＰ－GalNがGalN－６－Ｐ糖鎖生合成中間体であることを確かめるため，芽胞形成期におけるこれらの物質の変動と，芽胞殻外層上へのGalN－６－Ｐ沈着時期の関係を調べた。

ＵＤＰ－GalNAcおよびＵＤＰ－GalNは対数増殖期においては全く検出されず，対数増殖終了後３時間目（T_3）よりＵＤＰ－GalNAcが細胞中に出現し，T_6に最大値を示したのち減少した。一方，ＵＤＰ－GalNはＵＤＰ－GalNAcが減少を開始するT_6以降急激に増加し，T_8からT_{10}にかけて一定値を示したのち，芽胞殻外層上へのGalN－６－Ｐ沈着量の増加に伴って減少した。以上の結果は，GalN－６－Ｐ糖鎖の生合成中間体としてＵＤＰ－GalNAcがまず出現し，それが脱アセチル化をうけたのち芽胞殻外層上に沈着することを示唆した。

先にも述べたように，GalN－６－Ｐ生合成は芽胞形成過程後期に特異的な現象であり，本菌の生活環の中で制御されている。従って，それに関与する酵素群の活性も発現調節されている可能性が考えられ，次にＵＤＰ－GlcNAcをＵＤＰ－GalNAcに変換する酵素GlcNAc－４－epimeraseおよびＵＤＰ－GalNAcからＵＤＰ－GalNを生成する酵素ＵＤＰ－GlcNAc deacetylaseについて，芽胞形成期におけるそれぞれの酵素活性の挙動を調べた。

その結果，GlcNAc－４－epimerase活性はT_6より上昇し，T_8以降一定値を示した。一方ＵＤＰ－GalNAc deacetylase活性はT_8より上昇し，T_{10}以降一定値を示した。これらの酵素活性は，対数増殖期および芽胞形成過程初期には検出限界以下であり，GalN－６－Ｐ糖鎖生合成に関与する酵素群の活性発現は，本菌の生活環の中で制御されていることが明らかになった。

また，ＵＤＰ－GlcNAc－４－epimeraseの基質であるＵＤＰ－GlcNAcは細胞壁およびコルテックスペプチドグリカン生合成系においても重要な中間体である。従って，ＵＤＰ－GlcNAcを経るこれら３つの代謝経路は，細胞のステージに応じて調節されていると考えられた。そこで，^{14}Ｃ－GlcNを用い，これら生合成系の切り換えがどの時期に行われているかを調べた。

^{14}Ｃ－GlcNを各ステージの培養液に添加し，パルスラベルしたのち，細胞壁画分，コルテックス画分，芽胞殻外層画分に取り込まれた放射活性を測定した。その結果，対数増殖期においては細胞壁に，芽胞形成過程中期においてはコルテックスに，芽胞形成過程後期においては芽胞殻外層に，主に放射活性が検出され，GlcNからの代謝経路は本菌の生活環の中で巧妙に制御されていることが明らかになった。

この代謝経路の切り換えには，ＵＤＰ－GlcNAc－４－epimeraseの活性発現が重要な意味を持つものと考えられるが，その制御が分子レベルでどのようなメカニズムによって行われているのかを知るためには，本酵素の活性発現機構を理解する必要があり，そこで，ここでは本酵素の活性発現が酵素蛋白の修飾等によりおこるのか，遺伝子レベルでの制御なのかを知る目的で，酵素の精製を行い，それに対する抗体を用いて芽胞形成期における酵素蛋白の量的変化を調べた。

その結果，蛋白としてのＵＤＰ－GlcNAc－４－epimeraseは，活性の発現時期と同じ時期に出現し，その後の挙動も同様であった。このことは，本酵素活性の発現は，蛋白への翻訳以前の段階で制御されていることを示している。

芽胞形成に関与する遺伝子発現の制御機構として現在最も有力であるのは，Losickらが提唱したシグマ因子（ＲＮＡポリメラーゼのプロモーター認識能を担うサブユニット）のカスケードモデルである。この説に従うならば，本菌における芽胞殻外層の生合成制御も，それに関与する酵素群の合成が，芽胞形成期におけるシグマ因子の質的変化によって遺伝子発現の段階で調節されることにより行われると考えられた。

論文の審査結果の要旨

芽胞殻外層の骨格成分であるガラクトサミン－６－リン酸の生合成過程を研究し，ＵＤＰ－Ｎ－アセチルグルコサミンからＵＤＰ－Ｎ－アセチルガラクトサミンを経由して，ＵＤＰ－ガラクトサミンが生産され，これが芽胞殻外層に沈着することを明らかにした。この経路に関与するＵＤＰ—Ｎアセチルグルコサミン－４－エピメラーゼおよびＵＤＰ－Ｎ－アセチルガラクトサミンデアセチラーゼの存在を確認し，これらの酵素が前記の反応が進行する直前に細胞内に順次出現することを明らかにした。

これらの事実は細菌芽胞形成過程を明らかにする上で重要な知見であり，薬学博士を授与するに値するものと判定した。