



Title	Bacillus megateriumの芽胞殻蛋白質成分に関する免疫化学的研究
Author(s)	El-Belbasi, Hussein Ibraheim
Citation	大阪大学, 1988, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/35888">https://hdl.handle.net/11094/35888</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">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

氏名・(本籍)	<sup>エルベルベシ</sup> EL-BELBASI <sup>フセイン</sup> HUSSEIN <sup>I</sup> IBRAHEIM
学位の種類	薬学博士
学位記番号	第 8152 号
学位授与の日付	昭和 63 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	<i>Bacillus megaterium</i> の芽胞殻蛋白質成分に関する免疫化学的研究
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

### 〔緒 言〕

*Bacillus* 属細菌における芽胞形成過程は形態的变化を伴う分化現象のひとつであり、この過程においては複雑な遺伝的制御の下に芽胞特異成分が生合成される。芽胞殻は芽胞特異成分であり、蛋白質により主として構成されていることから、芽胞形成機構を研究する場合に有力な指標となるため、芽胞殻蛋白質 (SCP) の生合成を中心として多くの研究者によって研究されている。例えば、免疫学的方法により、多種類の菌株の芽胞形成期細胞に SCP の precursor protein が存在すること等が報告されている [1-6]。しかし、その詳細な機構については未だ不明な点が多い。そこで、私は *Bacillus megaterium* の代表な菌株 [7, 8], ATCC 18762 (QMB) 株および ATCC 19213 (Texas) 株、の SCP に対する抗体を用いて免疫化学的手法により、芽胞形成期における SCP の挙動について検討した。

### 〔本 論〕

#### 第一章 *Bacillus* 属芽胞の SCP の抗原性の比較

*B. megaterium* の QMB 株の全 SCP, 精製 22K-SCP と精製 48K-SCP, および Texas 株の精製 17K-SCP に対する抗体を調製し、*Bacillus* 属 4 種 6 株の SCP について抗原性を immuno-blotting 法により、比較検討した。結果を Table 1 にまとめたが、*B. megaterium* の両株の芽胞殻は種々の分子量の SCP を含み、精製した SCP に対する特異抗体であっても、当該株のみならず、他株、さらには *Bacillus* 属の他種株においても交差反応性を示す SCP が検出された。即ち、*Bacillus* 属芽胞の SCP にはかなりの共通した抗原部位が存在することが明らかとなった。

Table 1 Reactivity of antibodies to *B.megaterium* spore coat proteins

strain	reactive spore coat proteins (K dalton)			
	: anti-SCP <sup>a)</sup>	: anti-48K <sup>b)</sup>	: anti-22K <sup>b)</sup>	: anti-17K <sup>c)</sup>
<i>B.megaterium</i>	: *48, 36, *22	: *48	: 44, *22	: 16, 14
ATCC 12872	: *19.5, *17.5	:	: 13	:
	: 16, 13, 12	:	:	:
<i>B.megaterium</i>	: 36, 25, 22	: 17,	: 22, 17	: 22, 19, *17
ATCC 19213	: *19, 18, 17	:	:	:
<i>B.thiaminolyticus</i> M.M.	: *19.5, 16	: No	: No	: 27, *19
<i>B.cereus</i> T	: *13	: *13	: *13	: 13
<i>B.subtilis</i> 60015	: *50, 27	: 50	: No	: No
<i>B.subtilis</i> NRRL B558	: *50, 27	: 50	: No	: No

\* : Major band

a) : IgG against spore coat proteins of *B.megaterium* ATCC 12872

b) : Purified IgG from antibody to coat proteins of *B.megaterium* ATCC 12872

c) : IgG against purified 17K spore coat protein of *B.megaterium* ATCC 12872

## 第二章 *Bacillus megaterium* の SCP の芽胞形成期における挙動

Hashida らの方法 [9] に従って抗 SCP-IgG と peroxidase を用いた enzyme immuno assay による SCP 定量法を確立した。本法における感度は QMB 芽胞の抗 SCP-IgG を用いた場合、0.3ng/assay tube と非常に高かった。

芽胞形成期各時期の菌体から mother cell cytoplasm 画分 (MCC-Fr) と forespore の SCP 画分 (FCP-Fr) を調製し、これらの画分の SCP 量を enzyme immuno-assay 法により測定した。その結果、QMB 株の抗 SCP-IgG を用いた場合には FCP-Fr では  $t_4$  から検出され始め、 $t_9$  でほぼプラトーに達し、MCC-Fr には量的には少ないが  $t_5$  から  $t_9$  において抗原性物質が検出された (Fig. 1)。

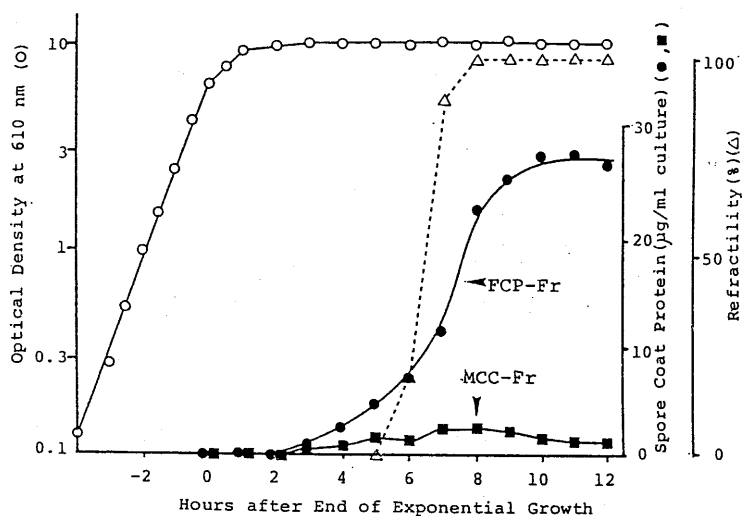


Fig. 1 Levels of spore coat proteins during sporulation, determined by enzyme immuno-assay

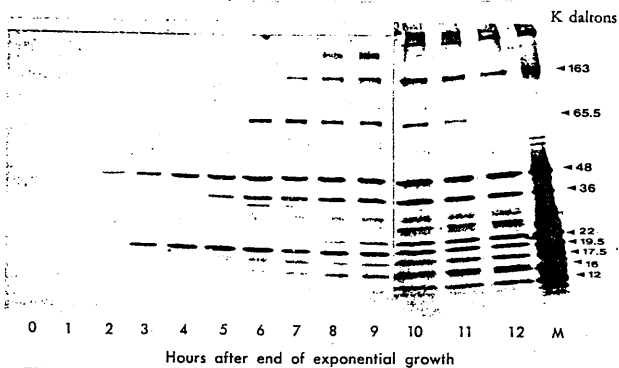


Fig. 2 Immunoblot analysis for spore coat proteins in mother cell cytoplasmic fraction from sporulating cells

Fig. 3 Immunoblot analysis for spore coat proteins in forespore coat protein fraction from sporulating cells

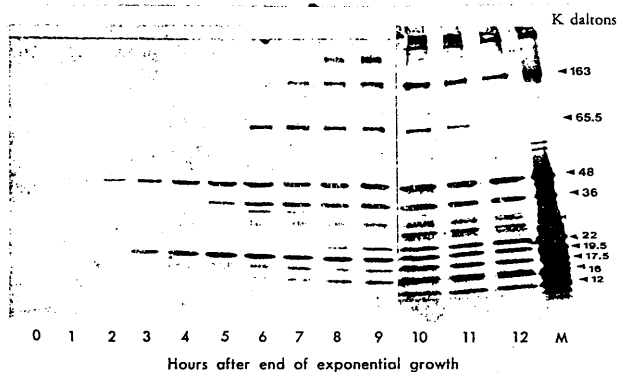


Fig. 4 Immunogold electron microscopy for coat protein antigens in late-sporulating cells

Fig. 5 Immunogold electron microscopy for coat protein antigens in dormant spores



また、抗22K、抗48K-SCP-IgGを用いた場合はそれぞれ  $t_8$ 、 $t_2$  からFCP-Frに抗原性物質が出現した。さらに、Texas株の抗17K-SCP-IgGを用いた場合は  $t_9$  から出現した。これはこれらの時期にSCPがforespore上に沈着してゆくことを示している。

さらにimmuno-blotting法により検討したところ、FCP-FrとMCC-FrでSCPの分子量に差がなく、出現時期も両面分ではほぼ同時であったことから (Fig. 2, 3), 種々の分子量のSCPがそれぞれ異なる時期に生合成され、*B. subtilis*や*B. megaterium*の他の株において報告されているようなprecursor protein [1, 3, 4, 6] は使用した菌株では存在しないか、あるいは存在したとしても非常に急速に修飾をうけ、そして、それらはforespore上に移行することが推察された。

### 第三章 *Bacillus megaterium* の芽胞形成期細胞および成熟芽胞におけるSCP抗原の存在部位

芽胞形成過程は生化学的な変化とともに形態変化が特徴であり、それらの関連性を検討することが必要である。そこで、抗SCP抗体-金コロイドを用いた免疫電顕法により、SCP抗原の存在部位について検討した。その結果、栄養型増殖期や芽胞形成初期の菌体中には金粒子は観察されなかったが、芽胞形成後期に菌体ではFCP-FrとMMC-Frに、また成熟芽胞では芽胞殻部分に金粒子、すなわち、SCP抗原性物質が検出された (Fig. 4, 5)。以上のことはSCPはMMC-Frにおいて生合成され、FCP-Frに移行し、最終的には芽胞殻を構成することを示すものである。

#### [結 論]

*Bacillus megaterium* ATCC 12872およびATCC 19213株の芽胞殻蛋白質 (SCP) に対する抗体を用いて両株の芽胞形成期におけるSCPの挙動について検討し、以下の結果を得た。

- 1) *B. megaterium* の両株の抗SCP抗体と交差反応性を示すSCPは当該株のみならず、他株、さらには*Bacillus*属の他種株にも存在することがimmuno-blotting法により示された。
- 2) 抗SCP-IgGを用いた高感度のenzyme immuno-assay法を確立した。
- 3) *B. megaterium* の芽胞殻は種々の分子量のSCPを含み、それらは芽胞形成期の異なる時期に母細胞原形質中に出現し、foresporeの芽胞殻に移行することがenzyme immuno-assayとimmuno-blotting法により、示された。
- 4) 金コロイド免疫電顕法により、SCP抗原は芽胞形成期後期にforesporeの芽胞殻部分だけではなく、母細胞原形質部分にも検出された。

#### 引用文献

- 1) Munoz, L.E., Sadaie, Y. and Doi, R.H. : J. Biol. Chem., 253, 6694-6701 (1978)
- 2) Pandey, N.K. and Aronson, A. : J. Bacteriol., 137, 1208-1218 (1979)
- 3) Aronson, A.I. : J. Bacteriol., 145, 541-547 (1981)
- 4) Goldman, R.C., and Tipper, D.J. : J. Bacteriol., 147, 1040-1048 (1981)
- 5) Jenkinson, H.F., Sawyer, W.D., and Mandelstam, J. : J. Gen. Microbiol., 123, 1-16 (1981)
- 6) Stewart, G.S.A.B., and Ellar, D.J. : Biochem. J., 210, 411-417 (1983)
- 7) Rode, L.J. : J. Bacteriol., 95, 1979-1986 (1968)
- 8) 西原力 : 日本細菌学雑誌, 37, 829-838 (1982)

- 9) Hashida, S., Imagawa, M., Inoue, S., Ruan, K.H., and Ishikawa, E. : J. Appl. Biochem., 6, 56-63 (1984).

### 論文の審査結果の要旨

B. megaterium 芽胞殻蛋白質の芽胞形成時における生合成機作を Enzyme Immunosay と Immuno-blotting 法により検討し、母細胞原形質中で生合成された種々の芽胞殻蛋白質が forespore 芽胞殻に移行することを明らかにした。また、この現象を金コロイド免疫電顕法により証明することに成功した。これらの研究は芽胞に特有の蛋白質の生合成機構の一端を明らかにしたものだといえ学位授与に値するものと判定した。