The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

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	https://hdl.handle.net/11094/35888
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

【9】

氏名・(本籍)	EL-BELBASI HUSSEIN IBRAHEIM（エルベルベシ フセイン イブラヒム）
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	**Bacillus megaterium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変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（ＳＰＣ）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－bloting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[a)]	: anti－48K[b)]	: anti－22K[b)]	: anti－17K[c)]
B.megaterium ＡＴＣＣ 12872	: *48, 36, *22 : *19.5, *17.5 : 16, 13, 12	: *48 : :	: 44, *22 : 13 :	: 16, 14 : :
B.megaterium ＡＴＣＣ 19213	: 36, 25, 22 : *19, 18, 17	: 17, :	: 22, 17 :	: 22, 19, *17 :
B.thiaminolyticus M.M.	: *19.5, 16	: No	: No	: 27, *19
B.cereus T	: *13	: *13	: *13	: 13
B.subtillis 60015	: *50, 27	: 50	: No	: No
B.subtillis ＮＲＲＬ Ｂ558	: *50, 27	: 50	: No	: No

* : Major band
a) : IgG aginst spore coat proteins of B.megaterium ＡＴＣＣ 12872
b) : Purified IgG from antibody to coat proteins of B.megaterium ＡＴＣＣ 12872
c) : IgG aginst 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，ＭＣＰ－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）。

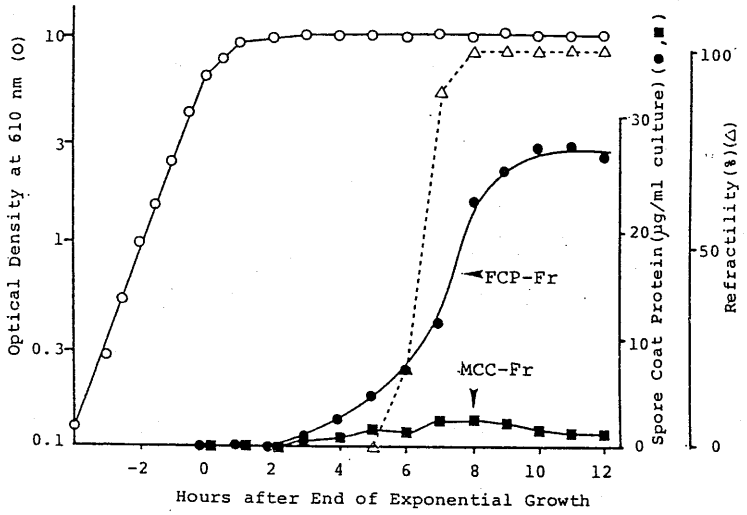

Fig. 1 Levels of spore coat proteins during sporulation, determined by enzyme immuno-assay

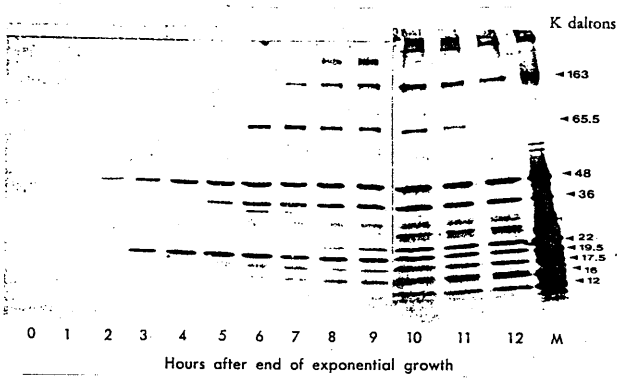

Fig. 2 Immunoblot analysis for spore coat proteins in mother cell cytoplasmic fraction from sporulating cells

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

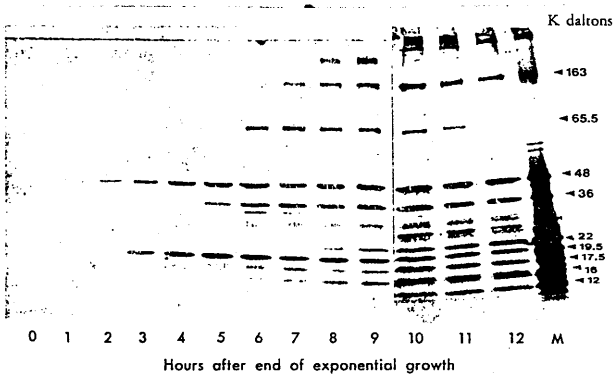

Fig. 4 I mmunogold electron microscopy for coat protein antigens in late—sporulating cells

Fig. 5 Immunogold electron microscopy for coat protein antigens in dorm ant 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ＭＣＣ－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）Pandy,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 Immunosaay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といえ学位授与に値するものと判定した。