OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Bacillus megaterium芽胞殻外層の形態形成に関する研究 : 芽胞殻外層欠損変異株を用いて
Author(s)	田窪, 芳博
Citation	大阪大学, 1989, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/36647
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

【15】

氏名・(本籍)	田窪芳博(たくぼよしひろ)
学位の種類	薬学博士
学位の番号	第8525号
学位授与の日付	平成元年3月15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	Bacillus megaterium芽胞殻外層の形態形成に関する研究 —芽胞殻外層欠損変異株を用いて—
論文審査委員	(主査) 教授 近藤 雅臣 (副査) 教授 西原 力　教授 三村 務　教授 三浦 喜温

論文内容の要旨

微生物における形態形成については，古くからファージや細菌のべん毛を材料として分子レベル，遺伝子レベルの研究が行われてきた。また，分化過程での形態分化の機構についてはCaulobacterやMyxobacteriaなどにおいて多くの研究者により多方面から研究されているが，その全容解明には到っていない。一方，細菌の芽胞形成も機能・形態の変化を伴った分化過程であり，その生化学的変化については分子レベルでよく研究され，遺伝的解析も行われてきた。現在最もよく研究されている枯草菌芽胞形成過程では，一群の遺伝子の逐次的発現はシグマ因子のカスケードモデルで理解されている。しかし，芽胞形成を形態形成のモデルとして考えると，芽胞に特有な構造物である芽胞殻やエキソスポリウムの形態形成機構に関する分子レベル，遺伝子レベルでの研究は少なく，またこの過程では上記のシグマ因子のカスケードモデルだけでは説明できない様々なレベルでの調節機構が存在しているものと考えられる。

芽胞殻は芽胞の特異成分であり，Bacillus megateriumの芽胞殻についてはその構造，化学成分，生合成について多くの情報の蓄積がすでにある。一方，芽胞の最外被構造を形造っている芽胞殻外層（以下外層と略する。）はガラクトサミン－6－リン酸多糖およびペプチド（または蛋白質）をその主要成分としている。ガラクトサミン多糖の前駆体の生合成についてはその一部が明らかにされているが，前駆芽胞上での多糖形成については一切不明である。また，ペプチド成分についてはその分子種さえも明らかにされていない。

本論文ではまず外層欠損変異株を単離し，この変異株を用いることにより芽胞殻外層のペプチドの分子種，性状，沈着および芽胞殻外層の形態形成の制御機構について検討を加えた。その結果をまとめると次のようになる。

1. エチルメタンスルホン酸処理後，ウログラフィン密度勾配遠心を用いることによりB.megateriumＡＴＣＣ　12872 菌の芽胞殻外層欠損変異株を多数分離した。これら外層欠損変異株では，ガラクトサミン－６－リン酸糖鎖および４８Ｋ，３６Ｋおよび２２Ｋダルトンの芽殻殻蛋白質（Ｐ48，Ｐ36およびＰ22）が欠損している点を除いて，他の構造成分においては野性株と違いが見られなかった。また，外層が芽胞表面の疎水性に大きく寄与しているが，耐熱性，発芽剤に対する特異性には必須因子ではないことが明らかとなった。
2. 芽胞殻外層標品および外層欠損変異株の芽胞殻蛋白質の分析の結果よりＰ48，Ｐ36およびＰ22は，芽胞殻外層に存在する蛋白質と結論された。これらの蛋白質は，ジスルフィド結合により芽胞上に沈着するのではなくＰ48およびＰ36は主にイオン結合により，一方，Ｐ22 は強い疎水結合により芽胞上に沈着していると考えられた。

   また，芽胞表層には主にＰ36が存在すること，一方Ｐ48 は，最もプロテァーゼの作用を受けにくい存在状態をとっていることが示唆された。
3. 外層欠損変異株ＭＡＥ05株では一旦前駆芽胞上には沈着したＰ36，Ｐ22 は，母細胞の溶解に伴って前駆芽胞上より消失し，成熟芽胞上では検出されなかった。これらの蛋白質を消失させる因子は培養上精中のプロテアーゼ様酵素と考えられ，また，外層蛋白質のプロテアーゼ様酵素による分解に対するガラクトサミン－６－リン酸糖鎖の防御機能が示唆された。
4. トランスポゾンTn917　を用いて単離した外層欠損変異株すべてにおいてＵＤＰ－ＧＩｃＮＡｃ－４－epimerase，UDP－GalNAc－deacetylase の活性発現およびＰ48のみの生合成が認められなかった。したがって，Ｐ48遺伝子の発現と両酵素の活性発現は同一の制御を受けており，一方，Ｐ36，Ｐ22 はそれとは別に制御されていると考えられた。

ところで，これらの生化学的事象は芽胞形成過程に起こる他の生化学的事象と共にどのように制御されているのであろうか。芽胞形成過程は，その時間的順序が正しく制御された一連の逐次的過程より構成されていることが知られている。しかし，その逐次的過程も一つだけではなく，同時平行または分岐した過程が存在するものと考えられているが，コルテックス・芽胞殻・エキソスポリウムの構造形成過程については不明な点が多い。これらの外層欠損変異株は外層以外の構造については野性株と違いが見られなかった。従って，Ｐ48がt_3 より生合成されることを考慮すると，外層形成過程は，芽胞形成過の早い時期に，芽胞形成過程の他の過程とは独立した過程を形成していることが考えられた。

外層蛋白質Ｐ48 およびガラクトサミン－６－リン酸糖鎖合成の初期酵素をマーカー蛋白質として，外層形成過程というカスケード系における蛋白質および遺伝子レベルでの調節機構の解明が今後の課題である。

論文の審査結果の要旨

細菌芽胞の外層欠損変異株を分離し，これを用いて外層ペプチドの分子種，性状，沈着および形態形成

の制御機構について検討した。

その結果，芽胞殻に存在する3種の蛋白質，P22，P48，P36が芽胞殻外層に存在すること，P48とP36は主にイオン結合により，また，P22は強い疎水結合により芽胞上に沈着していることが判明した。これらの蛋白質の沈着機序を検討した結果，外層欠損変異株においては，3種の蛋白質とも母細胞原形体内で生合成され前駆芽胞上に沈着されるが，成熟芽胞形成時に細胞内プロテアーゼで分解されるため外層の構築が不能となることを明らかにした。また，トランスポゾンTn 917を用いた実験からP48遺伝子の発現とUDP－GICNAC－4－epimerase，UDP－GalNAc－deacefylaseの活性発現が同一の制御を受けており，P22は別に制御されていることを明らかにした。これらの成果は芽胞殻生合成機構の解明に貢献するものであり，薬学博士の学位を授与するに値するものと判定した。