



Title	Bacillus megaterium発芽変異株とその発芽遺伝子の解析
Author(s)	谷, 佳津治
Citation	大阪大学, 1991, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/37828
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

氏 名	谷 佳 津 治
博士の専攻分野 の 名 称	博 士 (薬 学)
学 位 記 番 号	第 9 8 9 5 号
学位授与年月日	平 成 3 年 9 月 12 日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学 位 論 文 名	<u>Bacillus megaterium</u> 発芽変異株とその発芽遺伝子の解析
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

細菌芽胞の発芽開始機構を解明するため、Bacillus megaterium ATCC12872菌を用い発芽変異株を単離し、その性状を調べるとともに、変異部位の遺伝子のクローニングを行った。また発芽剤の特異性に関与する遺伝子を単離しその一次構造を解析した。

発芽変異株の単離には変異剤としてトランスポゾンTn917を用いた。Tn917の挿入変異株群よりスクリーニングしたところ、4株の異なる発芽変異株が単離された。野性株はグルコース、プロリン、ロイシンおよび硝酸カリウムにより発芽するが、変異株TM-4およびTM-31株の芽胞はこれらの物質では発芽せず、耐熱性を消失しなかったことから発芽開始に必須の遺伝子に変異をうけているものと考えられた。一方、変異株TM-3およびTM-23株の芽胞は先の物質により発芽が誘起され、さらに野性株の芽胞は発芽しないアラニンや脱イオン水によっても発芽した。これまでに発芽能の欠失した変異株は報告されているが、新たな発芽能を獲得した変異株は報告されておらず、TM-3およびTM-23株は新しいタイプの発芽変異株である。これら変異株の芽胞の構造を電子顕微鏡により観察したところTM-3およびTM-23株においてそのコルテックスが野性株に比べ薄いことがわかった。またSDS-DTT処理により芽胞殻蛋白質を抽出しSDSポリアクリルアミド電気泳動により解析したところ、TM-23株において野性株にはみられない高分子量の蛋白質が検出された。SDS-DTT処理されても野性株の発芽能は変化しないが、TM-3およびTM-23株の芽胞の変異により獲得されたアラニンや水に対する発芽能が消失した。SDS-DTT処理された芽胞の形態を電子顕微鏡により観察したところTM-23株の芽胞のコルテックスの厚さが増加しているのが観察された。そこでTM-23株の芽胞が変異により獲得した発芽能と形態について以下のように考察した。コルテックスはペプチドグリカンにより構成されているが細胞壁のそれと比べ架橋度が低く、フリーのカルボ

キシル基が多く存在しその負電荷の斥力により膨張した状態にあり、その圧力がコアの脱水状態を保っていると考えられている。TM-23株の芽胞のコルテックスは薄く、コアへの圧力が低いため、脱イオン水に懸濁しただけでもコア内に水が浸入し発芽状態になるものと考えられる。また SDS-DTT 処理によりコルテックスの膨張が十分になると野性株と同様の発芽能を示すようになったと考えられる。SDS-DTT 処理により抽出されるカチオンなどが変異株のコルテックスの膨張に影響を及ぼしていると考えられる。TM-4 株の芽胞は形態的に野性株と同じであるにもかかわらずいずれの先のいずれの発芽剤によっても発芽しないことから、発芽に必須の遺伝子に変異をうけていると考えられ、Tn917をプローブとし変異部位の DNA をクローニングした。部分的に塩基配列を決定したが即知の遺伝子とはホモロジーがなかった。さらに発芽剤の特異性に関与する遺伝子を得るため以下の実験を行った。ATCC12872 菌の芽胞はグルコース、プロリン、ロイシンおよび硝酸カリウムで発芽するが ATCC19213 菌の芽胞はこれらの化合物では発芽しない。そこで 12872 菌の DNA を 19213 菌に導入しグルコースにより発芽するようになった形質転換株 (T-47 株) を単離した。T-47 株の芽胞はグルコース、プロリン、ロイシンにより発芽したが、硝酸カリウムでは発芽しなかった。このことからグルコースやプロリンなどの糖やアミノ酸による発芽開始機構と硝酸カリウムのようなイオン性の発芽剤による開始機構は異なることが示唆された。また T-47 株に導入された DNA の一部を欠失した株 (T-47-2 株) はプロリンに対する発芽能を欠失した。このことから同じアミノ酸であっても、プロリンとロイシンでは発芽開始には異なる因子が関与していると考えられる。T-47-2 株に導入されていた 2.7 kb の EcoRI-EcoRI 断片の塩基配列を決定したところ予想される。

open reading frame (ORF) がひとつ存在した。この ORF にはアミノ酸残基 260 個からなる蛋白質がコードされており開始コドンの上流には σ A により認識されるコンセンサス配列が存在した。予想される遺伝子産物は極めて親水性の高い蛋白質であり、枯草菌のアラニンによる発芽に関与する遺伝子 gerA とはまったく異なる構造であり、また他の発芽に関与すると考えられている遺伝子ともホモロジーはなかった。

論文審査の結果の要旨

細菌芽胞の発芽機構を解明する為に、トランスポゾンを用いて発芽変異株を単離した。

これらは、いずれの発芽剤によっても発芽しないものと発芽剤に対しての特異性が低下し、水によっても発芽するものとに分けられた。これらの変異株についてその成因を検討した結果後者の変異は構造的なものであり、コルテックスの構造変化に基因するものと判定した。前者の変異株についてはトランスポゾン Tn917 の挿入された領域の DNA をクローニングした。また、発芽剤に対する特異性を支配する遺伝子の解明を試み、導入された DNA を解析し、極めて親水性の高い蛋白質がコードされている部位が関連していることを明らかとした。これらの研究成果は博士(薬学)を授与するに値するものと判定した。