

氏 名	格 弓 紘 ひらぎ ゆ づる
学 位 の 種 類	理 学 博 士
学 位 記 番 号	論 理 博 第 423 号
学 位 授 与 の 日 付	昭 和 48 年 3 月 23 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	Physical, Chemical and Morphological Studies of Spore Coat of <i>Bacillus subtilis</i> (枯草菌の胞子膜の物理的・化学的及び形態学的研究)
論文調査委員	(主 査) 教 授 寺 本 英 教 授 大 西 俊 一 教 授 丸 山 工 作

論 文 内 容 の 要 旨

ある種の細菌は、その life cycle の過程で一時休止状態である胞子を形成する。この胞子は増殖期の栄養細胞に比して、放射線や熱などの物理的作用、また化学的・生物学的作用に対して著しい抵抗性を示す。理由は種々考えられるが、一般にその胞子膜の不可蝕性にあるとされている。

従来の定説では、胞子膜はムコ多糖類を含むが、主として蛋白質から構成され、その蛋白質は硫黄含量の多いことから、ケラチン様のものであるとされていた。また生化学的に fractionate すると、化学組成の異なる fraction が得られ、形態学的には inner coat と outer coat と称する二部分から構成されると考えられてきた。つまり、膜の部位によって異なる構造と組成をもつ不均一な組成物と考えられていた。しかし、上述の定説の論法には、甲種の細菌で得たある実験結果と乙種で得た全く別の実験結果を付合させたものが多い。しかるに、形態学的観察によれば、胞子の形態の種間による相違は非常に大きく、これを無視した胞子の共通の形態モデルを論ずるのは大いに疑問がある。また意味の不明な実験も多い。このような混乱を除くため、申請者は単一種の細菌 (*Bacillus subtilis* ATCC 6051) を用いて実験を行ない、従来用いられなかった種々の新手法によって得られた結果を過去の実験結果と比較することによって、これまでの結論が妥当であるか否かを再検討した。

申請者はまず生化学的分画を行ない。各処理段階で、coat fraction がどの程度溶離されるかを測定した。その結果ある特定の処理によって、ある分画が撰択的に多く得られることはないことが判明した。これらの分画をX線回折によって比較してみると、各分画は $2\theta=8.8^\circ$ ($10.1\text{\AA}$)、 94° ($9.4\text{\AA}$) および 20° ($4.4\text{\AA}$) に peak をもつ特徴的なパターンを示し、胞子膜自体と各分画は同一構造の物質であった。以前にケラチン様であると考えられていた分画もさらに2つの分画に分けられ、1つの分画は胞子膜と同じ、他は(分画5と称する)全く異なったパターンを示した。分画5は胞子膜の主要構成要素でないことが明らかになった。

赤外線吸収の測定の結果も、分画5以外は amide I, amide II, amide A, amide B の吸収バンドをも

つ同じ吸収曲線を示した。

アミノ酸組成分析をこれらの分画で行なった結果、これらは非常に類似したアミノ酸組成比を有し、X線回折、赤外線吸収の結果と同じく、各分画が同一蛋白質である可能性が強いことを示唆する。ここで、シスチン含量は最大値で 3.5% であった。また、元素分析の結果も、各分画による元素組成比に殆んど差がないことが明らかになった。硫黄含量は最高 1.08% であり、これをシスチン含量に換算すると 3.6% になる。また、N末端アミノ酸残基の同定を DNP 法で行なったところ、やはり分画の間で、末端基の種類はよく似ていることがわかった。

以上のことから、孢子膜は、局部的に化学組成が異なり、特異的な部位が存在することはなく、全体に組成は均一であり、また、シスチン含量はケラチンに比して著しく少ないことが明らかになった。この均一性については、電子顕微鏡による微細構造の観察によってもそれを支持する知見が得られた。少なくとも *B. subtilis* の孢子膜は、前述の如く、化学的に均一であるばかりでなく、形態学的にも非常に均一性の高いものであることが明らかにされた。

要するに、申請者はX線回折、赤外分光、元素分析、N末端残基の同定などの新しい手段を用いて、従来の孢子膜の構造に関する議論の非論理的な点を排除し、系統的な研究法を開拓した。

参考論文のうち、二編は電子回折による CaCO_3 の新しい構造の決定と、変態機構に関するものである。他の二編は主論文と関連して、孢子膜の構造及び形態に関するものであり、残る一編は、分子の規則集合体に関する理論であり、申請者の巾広い能力と、構造研究における知識を示すものである。

論文審査の結果の要旨

ある種の細菌では、その life cycle の中で一時休止状態である孢子を形成する。この孢子は増殖期の栄養細胞に比して、放射線や熱などの物理的作用、または化学的生物学的作用に対して強い抵抗性を示すが、それは孢子膜の不可蝕性によると考えられている。

従来の定説では、孢子膜はムコ多糖類を含むが、主として蛋白質から構成され、この蛋白質は硫黄含量の多いことから、ケラチン様のものであるとされていた。また生化学的処方分画すると、化学組成の異なる分画にわかれ、形態学的には、inner coat と outer coat の二部分から構成されていると考えられてきた。すなわち膜の部位によって異なる構造と組成をもつ不均一な組織であるとされてきた。

申請者はこれらの定説になる論拠と実験方法の不完全さに疑問をもち、従来用いらなかった手法も加えて、従来の考え方の妥当性を詳しく検討した。先ず従来用いられてきた生化学的分画を行ない。各分画について、X線回折、赤外線吸収、アミノ酸組成の分析、元素分析、N末端残基の同定さらに電子顕微鏡による観察と総合的に詳細な実験を行ない、各分画が化学的組成が同一のものであり、構造的にも似た性質をもつものであることを明らかにした。元素分析による硫黄含量やアミノ酸組成分析の結果から推定されるシスチン含量は高々 3.6% であり、ケラチンに比して著しく少ない。このことから、従来孢子の膜蛋白質がケラチン様のものであるという考えは否定されることになった。また形態学的な観察をも含めて、inner coat の outer coat は、実は同一の層状構造をもつものであることが明白になった。また膜の最外部には、surface layer ともいふべき新しい構造があることが発見された。少なくとも、*Bacillus subtilis*

の胞子膜は、前述の如く化学的に均一であるばかりでなく、形態学的にも均一度の高いものであることが明らかにされた。

これは胞子膜の構造に関する従来の定説を考えなおす必要性があることを明確にしたもので、今後の研究に重要な示唆を与えるものとして、この分野で貢献をしたものといってよい。

よって、本論文は理学博士の学位論文として価値あるものと認める。