

|             |                             |
|-------------|-----------------------------|
| 氏 名         | 村 上 八 郎<br>むら かみ はち ろう      |
| 学 位 の 種 類   | 農 学 博 士                     |
| 学 位 記 番 号   | 論 農 博 第 506 号               |
| 学位授与の日付     | 昭 和 49 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 | 枯草菌孢子の発芽におけるカチオンの作用機構に関する研究 |

(主 査)  
論文調査委員 教 授 緒 方 浩 一 教 授 門 田 元 教 授 柄 倉 辰 六 郎

### 論 文 内 容 の 要 旨

本論文は枯草菌孢子の発芽機構を明らかにするため、*Bacillus subtilis* PCI 219 の孢子の発芽能の耐熱性を指標として発芽におけるカチオンの作用機構についての詳細な研究を行なった結果をとりまとめたものである。

著者は孢子の発芽能と増殖能の耐熱性が異なることを見いだした。すなわち傷害作用の緩徐な乾燥加熱処理によって、増殖能は失っているが発芽能を有する孢子（活性化した孢子）を調製することができたので、この孢子を用いて発芽およびその耐熱性の研究を行なった。

発芽には L-alanine または glucose の存在が必要であり、それぞれ alanine 発芽, glucose 発芽とよぶ。自然の孢子は alanine によって直ちに発芽するが, glucose では長期の貯蔵または加熱が必要である。活性化した孢子は耐熱性が低下しているので発芽の過程がある程度進行した状態にあると考えられる。しかし活性化した孢子をカチオンと発芽誘起剤の存在下で培養することによってはじめて dipicolinic acid の溶出, darkening あるいは glucose の酸化能の出現などの発芽に伴う現象が生じた。すなわち  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Ca^{2+}$  などのアルカリ金属の存在が発芽に必須であり, また トリスアミノメタンその他の有機カチオンも有効である。さらにカチオンは methylene blue (MB) と競合的に孢子と結合することを認めたので、孢子と結合するカチオンの量を MB によって調節し、発芽との関係を調べると両者には明確な相関性が認められた。

また孢子の発芽に対する重金属の作用についても検討を加えた。発芽液中に  $Zn^{2+}$  イオンが高濃度に存在すると孢子は darkening を伴わないで発芽した。Zn 化孢子を EDTA で処理すると自然の孢子と同様な発芽過程をとることがわかった。

さらに孢子を 1-fluoro-2, 4-dinitrobenzene で処理すると孢子表面のアミン酸残基と結合して dinitrophenyl amino acid を生成する (DNP 化孢子)。この DNP 化によって孢子の発芽率は低下しないが、増殖能は50%低下した。自然の孢子と 100°C に加熱した孢子を DNP 化して加水分解し、アミノ酸を調

べると、自然の孢子からは DNP-lysine のみが認められたが、加熱して発芽率の低下した孢子からは DNP-lysine のほかに DNP-glutamic acid, DNP-alanine などの多くの DNP-アミノ酸が得られた。

### 論文審査の結果の要旨

細菌の孢子は一般に耐熱性がすぐれ、100°C 加熱でも完全には殺菌できない。かんけつ殺菌を行なうのはこのためであり、罐詰その他食品の保蔵上重要な問題である。

著者は最も広く分布する枯草菌孢子を用いて耐熱性の観点から発芽とカチオンの作用機構について詳細な研究を行なった。

*Bacillus subtilis* PCI 219 の孢子の発芽能の耐熱性は増殖能の耐熱性よりも強く、glucose 発芽能の活性化に必要な加熱処理は増殖能を不活性化した。

自然の孢子も glucose 発芽能の活性化した孢子も、発芽するためには  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Ca^{2+}$  などのカチオンの存在が必須であるが、有機カチオンも有効である。発芽に対するカチオンの作用を調べるため、カチオンと methylene blue が競合的に孢子と結合することを利用して、カチオンの結合量を変え発芽との関係を見た結果、両者の間には明らかな相関関係があることを見いだした。またカチオンと孢子の結合点は孢子のたん白質のカルボキシル基であることを確かめた。

さらに  $Zn^{2+}$  などの重金属は孢子の発芽の際の darkening を阻害し、また自然の孢子を 1-fluoro-2,4-dinitrobenzene (FDNB) で処理すると孢子表面のアミノ酸残基と結合して dinitrophenyl amino acid を生成して DNP 化孢子となるが、DNP 化によって発芽率は低下せず増殖能は低下することを認めた。

自然の孢子と 100°C に加熱して発芽率の低下した孢子を DNP 化したのち加水分解してアミノ酸を調べると、自然の孢子からは DNP-lysine のみが認められるが加熱した孢子では DNP-lysine のほかに DNP-glutamic acid, DNP-serine, DNP-alanine などの多くの DNP 化アミノ酸が認められる。これは加熱によって孢子の透過性が増大し FDNB が孢子の内部まで滲透したことを示しており発芽率の低下とよく一致する。

以上のように本論文は枯草菌の孢子の発芽に対するカチオンの作用および加熱についての基礎的事実を明らかにしたもので微生物生理学および食品微生物学に寄与するところが大きい。

よって、本論文は農学博士の学位論文として価値あるものと認める。