〔農化 第 45 卷, 第 8 号, p. 381~385, 1971〕

Bacillus subtilis PCI 219 の胞子の発芽機構 に関する研究 (第2報)

発芽胞子の darkening にたいする遷移金属イオンの阻害作用について

村 上 八 郎

(宮崎大学農学部農学科)

昭和 45 年 9 月 30 日 受 理

Studies on the Germination Mechanism of *Bacillus subtilis* PCI 219 Spores Part II. Effect of Transition Metal Ions on the Darkening of Germinating Spores [Note]

By Hachiro MURAKAMI

Department of Agronomy, Faculty of Agriculture, University of Miyazaki

On the spore germination, effects of coordination binding of transition metal ions to spores were investigated.

When the spores were incubated in ammonium buffer containing L-alanine or glucose and various amount of Zn^{2+} , rate of dark spores produced by physiological germination decreased, and gray spores or low refractile spores appeared as Zn^{2+} concentration increased. After being treated with EDTA solution, the incubated spores above mentioned further developed in their darkness, presumably by elution of the bound Zn^{2+} from the spores. Cu^{2+} , Ni^{2+} and Co^{2+} which possessed higher ability of coordination, did not induce those changes as in Zn^{2+} , but in the case of Cr^{2+} , Bi^{2+} and Fe^{2+} the same changes as in Zn^{2+} were observed.

It was suggested that darkening of physiologically germinating spores was inhibited by chelation between binding sites of the spore and transition metal cations of low coordination ability.

(Received September 30, 1970)

胞子の発芽にさいしてカチオンが特異な機能を発揮することは、主としてアルカリ金属イオンについて前報⁽¹⁾で述べた。また Rode ら⁽²⁾は Ca^{2+} などアルカリ土類金属は胞子と結合することによって効果的に作用することを報告している。

重金属イオンは発芽を阻害すると報告されている^(3,4)が、それは配位結合性が強く、胞子との結合形態が複雑であるので、アルカリ金属とは異なった作用をするためではないかと考えられる。

本報では主として Zn をもちいて、遷移金属イオンの発芽に及ぼす影響を検討した結果について述べる。

実 験 結 果

I. 胞子への Zn の結合

Rode ら⁽²⁾の方法に従って調製した H-spore の懸濁液 (H-spore 0.5703 g を含む) をあらかじめ秤量した遠沈管にとり、遠沈 (10,000 rpm, 30 分) したのち Black ら⁽⁵⁾の方法にしたがって cell pack 中の水分量を求めた。別に調製した亜鉛アンミン錯体液 [$Zn(NO_3)_2$ 5.45 $\times 10^{-2}$ mole/l を含む NH_4OH-NH_4Cl 緩衝液, pH 9.3, 以下 $Zn-NH_4OH$ 緩衝液と略称する] 5 ml を cell pack に加え、密栓して 60°C, 60 分間攪拌しながら結合処理

Table I. Binding of Zinc or Calcium Ion to *B. subtilis* PCI 219 Spores

Spore (dry weight) (g)	0.5702	0.5702		
Cell pack (g)	1.66	1.66		
Water in cell pack (g)	1.09	1.09		
Treating agent*	Ca(CH ₃ COO) ₂ (5.05 × 10 ⁻² M)	Zn-NH ₄ OH** (5.45 × 10 ⁻² M)		
Cation {	in treating solution {	starting (mg)	10.12	17.88
		final (mg)	8.18	10.66
	bound {	(mg)	1.94	7.22
		meq/g spore	0.17	0.39

* H-spores were treated as described in the text.

** Ammonium buffer (NH₄OH + NH₄Cl, 0.95 M, pH 9.3) containing 5.45 × 10⁻² M Zn(NO₃)₂.

を行なった。ついで遠沈した上澄の一部についてキレート滴定法 (0.01 M EDTA, 指示薬ドータイト XO) により Zn の濃度を測定し、始発濃度 (cell pack 中の水分量補正) との差から結合 Zn 量を算出した。なお比較のため、酢酸カルシウム水溶液中で同様に処理したときの Ca の結合量を別に求めた (Table I)。それによると Zn の結合量は Ca と比較すると、かなり多いことがわかった。これらのカチオンを結合した胞子を Zn-spore および Ca-spore と称することにする。

II. 発芽にたいする Zn の影響

Zn-spore の発芽： Zn を含む弱アルカリ性水溶液中で発芽試験をするために、Zn-NH₄OH 緩衝液および比較のためにアンモニア緩衝液ならびにリン酸緩衝液をえらび、L-アラニンによる発芽を dark spore の生成によって試験した (Table II)。Zn-NH₄OH 緩衝液中では Zn-spore および native spore とともにほとんど発芽し

Table II. Germination of Zn-Spores and Native Spores of *B. subtilis* PCI 219

Incubation mixture	pH	Germination (%) ^(a)	
		Zn-Spore	Native spore
Zn-NH ₄ OH ^(b)	8.5	0	7
Ammonium buffer ^(c)	9.2	85	80
Phosphate buffer	7.2	5(50) ^(d)	95
Water	6.0	21	35

^(a) : Per cent of dark spores after incubation at 37°C for 100 min.^(b) : Ammonium buffer^(c) containing 1.0 × 10⁻² M Zn(NO₃)₂.^(c) : 0.2 M NH₄OH 1 : 0.4 M NH₄Cl 1 v/v, pH 9.3.^(d) : After 4 hr incubation.

Native spores, stored for 3 months, and Zn-spores prepared from the stored native spores.

Spore concentration : 0.1 mg/ml.

なかったが、アンモニア緩衝液中では両胞子ともよく発芽した。これは NH₄⁺ によって促進される発芽⁽¹⁾ が Zn によって阻害されるのであろう。またリン酸緩衝液中では、Zn-spore の発芽速度はきわめて低かった。これらの結果から発芽にたいする Zn の作用は、K あるいは Ca とは異なると思われるのでさらに検討した。

Darkening にたいする阻害作用

用 : Zn-NH₄OH 緩衝液中での L-アラニンあるいはグルコースによる

Zn-spore の発芽を O. D. の低下, dark spore の生成, および DPA の溶出によってしらべた。ついでその胞子を遠心分離して集め、水洗したのち EDTA 水溶液 (NaOH によって pH 8.8 に調整) に懸濁して 60°C, 60 分間処理したときの O. D. の低下, および dark spore の生成をしらべた。結果は Table III に示したとおり, L-アラニン 4.5 × 10⁻³ M にたいして Zn 4.5 × 10⁻³ M およびそれ以上では O. D. の低下率は小で, dark spore はほとんど生成せず, 一部が光屈折性の低下した胞子 (low refractile spore) あるいは gray spore に変化したのみで, 発芽したかどうかの判定は困難であった。そして, さらに 2~24 時間 incubate しても dark spore の増加は認められなかった。つぎにこの懸濁液を遠沈して上澄について DPA の溶出量を 270 mμ における O. D. によって比較したところ, dark spore の生成率ほどの著しい差は認められなかった (Fig. 1)。この場合, L-アラニンが存在しなければ bright spore の状態を維持したので, 上記の諸現象は生理的発芽に伴って起こったものと考えられる。Zn はアラニンとも結合する可能性があるが, ほとんど結合しないと考えられるグルコースによる発芽をも阻害するので, Zn の発芽阻害はそれが胞子に直接作用しておこったと考えられる。

EDTA 水溶液中で incubate されると, 前記 gray spore および low refractile spore の darkening が進化した。

一方 EDTA 水溶液であらかじめ処理された Zn-spore は native spore とほぼ等しい速度で発芽する (Table IV) が, これは結合している Zn が EDTA によって溶離されたためであらう。事実 Table I の Zn-spore は 1.0 × 10⁻² M EDTA (pH 9.3) で 60°C, 60 分間処理され

Table III. Inhibition of Darkening of Germinating Zn-Spores of *B. subtilis* PCI 219 and its Recovery by Treatment with Ethylenediaminetetraacetic Acid

	Incubation mixture ^(a)			Germination ^(b)			EDTA treatment ^(c)	
	Inducer ($\times 10^{-3}$ M)	Zn(NO ₃) ₂ ($\times 10^{-3}$ M)	pH	Decrease in O.D. (%)	Dark spore (%)	Release of DPA	Decrease in O.D. (%)	Dark spore (%)
L-Alanine	4.5	0	9.51	40	95	(+) ^(f)	20	95
	4.5	0.1	9.49	—	85	(+)	—	—
	4.5	1.0	—	—	80	(+)	—	—
	4.5	4.5	9.38	27	20(60) ^(d)	(+)	29	80
	4.5	6.0	9.30	25	($\pm$) ^(g)	(+)	39	50
	4.5	10.0	9.12	17	($\pm$)	(+)	15	5
	4.5	15.0	—	7	($\pm$)	(+)	—	—
Glucose	9.0	10.0	—	—	(20)	(+)	25	20
	33.0	10.0	—	—	(80)	(+)	30	30(70)
None	0	4.0	—	—	2	(-) ^(g)	0	0
	0	10.0	—	—	0	(-)	0	0

(a) : Ammonium buffer (0.2 M) containing L-alanine or glucose and Zn(NO₃)₂. pH values were measured after the addition of Zn(NO₃)₂.

(b) : Incubation at 40°C for 60 min.

(c) : After being washed with water, the spores (b) was incubated in 2.5×10^{-2} M EDTA solution adjusted the pH to 8.8 with NaOH at 60°C for 60 min. Decrease in O.D. means per cent reduction before and after the treatment.

(d) : Gray spores.

(e) : Indicates the presence of low refractile spores.

(f) : Amount of released DPA was almost the same to the control.

(g) : Did not release.

Fig. 1. Ultra-violet Absorption Spectra of DPA Released from Germinated Spores in Ammonium Buffer Containing L-Alanine (4.5×10^{-3} M) and Zn (NO₃)₂.

Zn content : curve I ; none, II ; 4×10^{-3} M, III ; 6×10^{-3} M, IV ; 10×10^{-3} M, V ; DPA $12 \mu\text{g/ml}$ in Zn-NH₃ solution.

ると、結合した Zn の 76% が溶離し発芽速度が増大した。

Zn の結合および溶離と胞子の生理活性との関係： 上記の諸実験において胞子の発芽を光屈折性の低下ならびに DPA の溶出によって判定したが、生理的に苛烈な影響を与える可能性のある Zn の存在下では、上記の諸現象が生理的発芽を示すものかどうか検討する必要があると考えられるので、呼吸量の増加を試験した。Zn-spore およびそれを EDTA で処理した胞子を L-アラニンを含む磷酸緩衝液中で incubate したときの呼吸量をワールブルグ検圧計で測定した結果 (Fig. 2) によると、Zn-spore の初期の呼吸量は少ないが発芽率の増加に伴って増加した。また EDTA によって処理された Zn-spore では、native spore に比較してかなりおくれるが同様な呼吸量の増加が認められ、Zn の溶離によって、発芽能が回復することがわか

Table IV. Germination of Zn-Spores Treated with Ethylenediaminetetraacetic Acid

Treatment*		Germination**	
EDTA ($\times 10^{-1}$ M)	pH	60 min	120 min
1.0	6.2	13	33
1.0	7.6	25	62
1.0	9.4	60	82
1.0	9.8	60	86
1.0***	9.5	65	85

* Zn-Spores were treated with EDTA of various pH values at 60°C for 30 min.

** Incubated in L-alanine (4.5×10^{-3} M)-phosphate buffer (1/30 M, pH 7.2) at 37°C.

*** Native spores.

Spore concentration: 1 mg spore/ml.

Fig. 2. Influence of Zinc on the Germination of *B. subtilis* PCI 219 Spores in View of the Respiration.

After preincubated in phosphate buffer (1/30 M, pH 7.2) containing L-alanine (4.5×10^{-3} M) for 60 min, O_2 consumption of the germinated spores was measured with Warburg respirometer.

Main flasks: 2.5 ml of the preincubated suspension, side arms: 0.5 ml of 1% glucose, curve I; Zn-spores, curve II; Zn-spores pretreated with EDTA same as in Table III but for 30 min, curve III; native spores, curve IV; germination(%) of Zn-spores.

った。

III. その他の遷移金属の影響

遷移金属の硝酸塩 1×10^{-2} M を含むアンモニア緩衝液中での L-アラニンによる発芽を Zn の場合と同様に示した結果を Table V に示した。Cr²⁺, Fe²⁺, および Bi²⁺ は Zn²⁺ と同様に low refractile spore を生じ, EDTA 処理によって一部が dark spore に変化した, DPA を溶出したが, Co²⁺, Ni²⁺, Cu²⁺ および Hg²⁺,

Table V. Darkening and DPA Release during Germination of *B. subtilis* PCI 219 Spores in Ammonium Buffer Containing Transition Metal Ions

Incubation mixture ^(a)		Dark spores (%) ^(b)		DPA released
Metal	pH	Before EDTA treatment	After EDTA treatment	
Cr*	9.0	(±)	95	(+)
Mn*	9.0	80	35	(+)
Fe*	8.9	(±)	90	(+)
Zn	9.0	(±)	30	(+)
Co	—	(—)	0	(—)
Ni	8.9	(—)	10	(±)
Cu	8.8	(—)	0	(?)
Cd	—	(±)	0	(±)
Bi	—	(±)	80	(+)
Hg	—	(—)	0	(—)
Ag**	—	(—)	0	(—)
Control	9.3	90	90	(+)

(a): Composed of 0.2 M ammonium buffer (pH 9.30), 4.5×10^{-3} M L-alanine and 10^{-2} M nitrate of each metal, (*) indicates formation of precipitation, (**) NH_4Cl of the buffer was replaced by NH_4NO_3 .

(b): After incubation, the spores were treated with 2.5×10^{-2} M EDTA (pH 8.8) at 60°C for 30 min, (±) indicates the presence of low refractile spores, (—) almost all the spores remained unchanged.

Ag⁺ では low refractile spore は僅少で DPA の溶出もほとんど認められなかった。ただし Cu²⁺ については 270 mμ の吸収は測定不能であり、菌体に残留する DPA を Janssen⁽⁶⁾ の方法によって定量を試みたが検出されなかった。しかし Cu-DPA が生成しておれば Fe-DPA の生成は困難であるので、残留 DPA が 0 とは断定できない。以上の結果を Irving-Williams 系列に属する金属についてみると、錯体形成能の強い Co²⁺, Ni²⁺ および Cu²⁺ によって発芽は阻害されるが, Cr²⁺, Mn²⁺, Fe²⁺ および Zn²⁺ など錯体形成能の弱い金属によっては阻害されないことがわかった。なお Mn のみが特異な現象を生じたが、その理由は不明である。

考 察

Zn のようにイオン結合とともに配位結合をするカチオンと, COO⁻, NH₃, SH その他種々の配位基をもつ胞子との結合形態は複雑であることが推察される。そして Zn の発芽にたいする作用が, K などのように主としてイオン結合をするカチオンとは異なるのは、胞子との結

合形態の相違に原因するものと考えられる。Zn と胞子との結合がどのようなものか明らかではないが、Zn-システイン錯体は SH および NH_2 との間のキレート結合からなり、 COO^- は関与していない⁽⁷⁾ とされているので、胞子に多量に存在する SH⁽⁸⁾ が Zn との結合にあずかっていることが考えられる。また 2,4-ジニトロフルオロベンゼンで DNP 化処理された胞子の加水分解生成物には常に DNP-リジンが存在する⁽⁹⁾ ので、遊離の NH_2 基が存在することもあきらかである。また本報の実験はアルカリ性液中で行なわれたので COO^- 基も多数あるので、これらの活性基間の立体的関係によって種々な結合が可能となる。

Native spore が Zn- NH_4OH 緩衝液中では dark spore の生成が阻害されるのは Zn と胞子が結合した結果であり、Zn-spore がアンモニア緩衝液、磷酸緩衝液中で dark spore を生成するのは結合した Zn がアンミン錯体あるいは磷酸塩となって胞子からはなれるためと考えられる。発芽すなわち耐熱性維持機構の崩壊は膨潤と darkening を結果として生じる。その機構が contraction⁽¹⁰⁾ によるものであれば、それを緩和することが発芽現象につながるものと考えられる。contraction は COO^- とジアミノピメルン酸の NH_2 とのクロスリンクングによると推定され⁽¹¹⁾、Vinter ら⁽¹²⁾ は発芽胞子の periphery の contraction が塩基性ペプチドなどの添加によって再生されることを示し、その原因として胞子の陰性基同士が塩基性ペプチドによってクロスリンクされることを推定した。配位結合力のきわめて弱い Ca では dark spore の生成率と DPA の溶出率がほぼ一致する⁽⁹⁾ ので、Zn の darkening 阻害作用はその配位結

合力によるものではないかと考えられる。すなわち胞子の NH_2 , NH , SH などの配位基あるいは COO^- と遷移金属との間のキレート結合によって contraction が形成され、そのために darkening が阻害されるものと推定される。

終りに、ご激励いただいた鹿児島大学教授江松雄博士に感謝の意を表します。また農学部教授中津誠一郎博士には有益なご助言をいただき、工学部教授草野一仁博士には錯体の形成についてご教示いただいた。併せて感謝の意を表します。

- (1) 村上八郎：農化，44，539 (1970)。
- (2) L. J. Rode and J. W. Foster : *J. Bacteriol.*, 91, 1582 (1966)。
- (3) K. G. G. Murty and H. O. Halvorson : *ibid.*, 73, 230 (1957)。
- (4) H. S. Levinson and M. G. Sevag : *J. Gen. Physiol.*, 36, 617 (1953)。
- (5) S. H. Black and P. Gerhardt : *J. Bacteriol.*, 82, 743 (1961)。
- (6) F. W. Janssen, A. J. Lund and L. E. Anderson : *Science*, 127, 26 (1958)。
- (7) 村上幸人：金属キレート (I) (坂口，上野編)，南江堂，1967，p. 131。
- (8) H. Kadota and K. Iijima : *Agr. Biol. Chem.*, 29, 80 (1965)。
- (9) 村上八郎：未発表。
- (10) J. C. Lewis, N. S. Snell and H. K. Burr : *Science*, 132, 544 (1960)。
- (11) W. G. Murrell, D. F. Ohye and R. A. Gordon : "Spores," IV, ed. by L. L. Campbell, American Society for Microbiology, 1969, p. 1。
- (12) V. Vinter, J. Stastna and J. Caslavská : *ibid.*, p. 289。