報 文

好気性アノイリナーゼ菌芽胞に関する研究

第2報 *Bacillus thiaminolyticus* 芽胞の発芽阻害について

(昭和43年2月8日受理)

川崎近太郎* 近藤雅臣* 手島邦和*

Studies on the Spores of Aerobic Thiaminase Bacteria

II. Inhibition of Germination by D-Isomers of Germinative Substances

Chikataro KAWASAKI, Masaomi KONDO and Kunikazu TESHIMA

(Faculty of Pharmaceutical Sciences, Osaka University:
Toneyama, Toyonaka)

Effects of D-isomers of several germinative substances on the spore germination of *B. thiaminolyticus* were investigated. The germination with L-alanine, L- α -amino-*n*-butyric acid, L-norvaline, L-serine, L-methionine and L-threonine was inhibited by the addition of equimolar concentration of each D-isomer, but no inhibition occurred when D-glutamine was added to the germination system using L-glutamine. Among those germination inhibitors, D-alanine was the strongest inhibitor and this substance completely inhibited the germination caused by all germinative substances. The inhibition with D-alanine was easily recovered when the inhibited spores were washed and resuspended in a L-alanine medium, or when the excessive amount of L-alanine was added to the inhibited germination medium. From the results, inhibition mechanisms of germination by D-isomers were discussed.

(Received February 8, 1968)

緒 言

前報¹⁾において好気性アノイリナーゼ菌 *B. thiaminolyticus* の芽胞が、L-alanine およびその構造類似の数種の L-アミノ酸単独により発芽することから、発芽誘導物質の化学構造と発芽機構の関連性について論じた。その際 D-アミノ酸では発芽を誘導せずむしろ阻害することが明らかとなり、誘導物質の立体構造が発芽機構と密接な関係にあることが判明した。

D-アミノ酸による芽胞の発芽阻害に関しては *Bacillus* 属の他の芽胞において多くの報告^{2)~4)}があるが発芽誘導物質の化学構造と発芽の関連性については一般的原則を見出すまでに至っていない。

今回、*B. thiaminolyticus* 芽胞の発芽時の D-アミノ

酸の効果について検討し発芽阻害現象を通じて発芽機構を明らかにするための基礎的知見を得ることを試みた。

実験方法

菌株: *B. thiaminolyticus* Matsukawa et Misawa を用いた。

芽胞形成および発芽の判定: 前報¹⁾の方法を用いた。

実験結果

1) L-および D-アミノ酸の相互関係

前報において明らかにした発芽誘導物質の具備すべき必須構造としてカルボキシル基、 α 位の水素原子およびアミノ基があげられるが、D-alanine は発芽を誘導せずむしろ阻害作用を示した。そこで L-アミノ酸 10^{-3} M に等モル濃度の D-アミノ酸を添加した培地に芽胞浮遊

* 大阪大学薬学部: 大阪府豊中市刀根山 6-5

Table 1. Covrelation of L- and D-Amino Acids on Germination of Spores of *B. thiaminolyticus*

Values indicate O. D. reduction %
 „—” indicate O. D. reduction below 10%

Each medium contained 10^{-3} M of L- and D-amino acids

	None	D-Alanine	D-Glutamine	D- α -Amino- <i>n</i> -butyric acid	D-Norvaline	D-Serine	D-Methionine	D-Threonine
None	—	—	—	—	—	—	—	—
L-Alanine	41	—	40	24	39	37	40	39
L-Glutamine	40	—	38	20	38	22	40	37
L- α -Amino- <i>n</i> -butyric acid	40	—	38	11	39	16	40	33
L-Norvaline	37	—	30	—	15	—	16	—
L-Serine	37	—	34	—	29	—	33	—
L-Methionine	28	—	—	—	—	—	—	—
L-Threonine	21	—	—	—	—	—	—	—

液を加え37°, 60分培養した発芽を検討した。

Table 1 の結果より, D-alanine はいずれの L-体による発芽をも完全に阻害し, 最も強い阻害力を示した。これに対し D-serine, D- α -amino-*n*-butyric acid, D-threonine は L-alanine, L-glutamine, L- α -amino-*n*-butyric acid 以外の L-アミノ酸による発芽を完全に阻害し, D-glutamine, D-norvaline, D-methionine は L-methionine および L-threonine による発芽は完全に阻害したが, その他のアミノ酸に対しては部分的に阻害を示しても完全には阻害しなかった。

また L-alanine は D-alanine 以外の D-アミノ酸では全く阻害されず発芽誘導力が最も強いと考えられ, L-glutamine, L- α -amino-*n*-butyric acid がこれにつき L-methionine, L-threonine は単独では発芽を誘導するが D-体の存在下ではすべて発芽を阻害され発芽誘導力が低いと考えられる。

2) L-alanine 発芽における D-alanine の影響

各種発芽誘導物質中 L-alanine が最も強い発芽誘導力を有し, また D-alanine がいずれの発芽誘導物質による発芽をも完全に阻止することから, 本芽胞の発芽機構において alanine の構造が最も密接な関係を有するものと想像される。そこで発芽における L-alanine と D-alanine の関連をさらに検討した。

M/100 トリス緩衝液 (pH 8.0) に L-alanine 10^{-3} M を添加した発芽培地に種々の濃度の D-alanine を加え, 芽胞浮遊液を加えて 37°, 60 分後における濁度減少率を

Fig. 1. Inhibitory pattern of germination by D-alanine

Each medium contained 10^{-3} M of L-alanine

Reduction of optical density was measured after 60 min incubation

求めたところ Fig. 1 に示す結果が得られた。すなわち L-alanine と等モル濃度以上の D-alanine が培地中に存在すると L-alanine による発芽を完全に阻害し, この現象において発芽誘導物質と阻害物質との間に量的関係の存在が予想された。

3) 阻害の回復

D-alanine による発芽阻害が芽胞表面もしくは内部にあると推察される発芽誘導物質に対する receptor と D-alanine の結合により生じたものかあるいは他の形式による阻害であるのかを明らかにするため, まず D-alanine 10^{-3} M 培地に芽胞浮遊液を加え37°, 30分培養

Fig. 2. Recovery of inhibited germination

I) Effect of removal of D-alanine from inhibited germination medium

Germination-inhibited spores were washed by centrifugation (—) or filtration (---) for removing D-alanine from medium, and were resuspended in germination medium containing 10^{-3} M of L-alanine

Fig. 3. Recovery of inhibited germination
II) Effect of excessive amount of
L-alanine

Each medium contained 10^{-8} M
of D-alanine

Reduction of optical density
was measured after 30 min incu-
bation

したところ、濁度はまったく減少しなかった。この培養液の一部を遠沈し集めた芽胞を脱イオン水を用いて冷却下遠沈洗浄、または Millipore filter (Millipore Filter Corp., Bedford, Massachusetts, U. S. A.) で菌体を集め数倍量の脱イオン水を通して洗浄後 L-alanine 培地に移植したところ Fig. 2 に示すように 37° , 30分以内で完全に発芽し阻害は回復することが認められた。残りの培養液に L-alanine を種々の濃度に加え 37° , 30分培養したところ Fig. 3 に示すように L-alanine が D-alanine と等濃度では発芽しないが 10 倍濃度では完全に発芽することが認められた。

考 察

B. thiaminolyticus 芽胞は数種の L-アミノ酸により発芽するがこの発芽は対応する D-アミノ酸により完全に阻害された。発芽誘導物質の必須構造すなわち L-アミノ酸に対する芽胞の receptor が芽胞表面もしくはその内部に存在すると仮定すれば、本芽胞の発芽誘導物質である alanine, serine, α -amino-*n*-butyric acid など個々のアミノ酸により receptor の存在部位が変わるとは考えられず、すべて同一部位に作用するものと考えられる。したがってこれら L-アミノ酸に対応する D-アミノ酸は単に対応する異性体のみに作用するだけでなく L-アミノ酸および D-アミノ酸が相互に干渉し合うものと考えられる。

用いた数種の D-および L-アミノ酸の相互関係から、とくに alanine の構造が発芽に最も有効であるといえよう。

Table 1 の結果から本芽胞において一般に D-アミノ

酸は L-アミノ酸と等量では発芽を阻害したが glutamine のみは例外であった。glutamine に最も構造類似の glutamic acid および asparagine は発芽には無効であり glutamine のみの特異な存在といえるがこの意義については現在不明である。しかし D-glutamine の阻害作用が弱いことから 1) glutamine がすみやかに代謝され、代謝産物の形で作用する。2) 他のアミノ酸と異なる部位に作用する。3) 同じ部位に作用するが阻害作用のみ弱い、という 3 つの可能性が予想される。

D-alanine の阻害は不可逆的なものではなく、L-alanine を適量添加することにより完全に回復するので単なる競合作用と考えられ、また芽胞を洗浄するのみで容易に阻害がなくなることから D-alanine による発芽阻害は芽胞表面もしくは内部に存在すると思われる L-アミノ酸 receptor との強固な結合によりあらわれるとは考えられず、むしろ L-alanine の receptor への到達を阻害する結果発芽阻止の現象としてあらわれてくるものと推察される。

Woese ら³⁾によれば D-alanine の阻害作用は L-alanine と D-alanine の単なる親和力の相違によるものであろうとされているが、より詳細な阻害様式を追求するにはまず発芽時の L-alanine の挙動に注目する必要がある。現在 L-alanine が芽胞内に取り込まれるか否かについては意見の分かれるところであるが Martin ら⁵⁾が *B. licheniformis* を用いて報告しているように、芽胞の cytoplasm 内にまでアミノ酸のままで取り込まれているとは断定できないとして、芽胞に接触するのみで発芽を開始させるという Hassell ら⁶⁾のいわゆる trigger reaction よりも一たんは芽胞内に取り込まれると考える方が妥当であろうと思われるし、実際、本芽胞においても ninhydrin によるアミノ酸定量など⁷⁾から発芽時の少なくともある時期においては L-alanine のままで芽胞内に取り込まれているという可能性の方が強いと思われる。これに関して現在標識アミノ酸を用いて詳細に検討中である。

要 約

B. thiaminolyticus 芽胞の L-alanine による発芽は等量の D-alanine により阻害された。その阻害は芽胞を洗浄することによりまたは適量の L-alanine を添加することにより完全に回復した。

また発芽を誘導した 7 種の L-アミノ酸に対応する D-アミノ酸を用い各 10^{-8} M 濃度で相互作用をしらべたところ、各アミノ酸により発芽誘導力、阻害力に差があり、その作用は alanine が最も強かった。L-アミノ酸が強い発芽誘導力を示すほどそれに対する D-アミノ酸の阻害力は強かったが D-glutamine は例外的に弱い阻害力しか示さなかった。

文 献

- 1) 川崎近太郎, 近藤雅臣, 手島邦和: 食衛誌, 8,

-
- 207 (1967).
- 2) J. Hermier, M. Rousseau: Ann. Inst. Pasteur **102**, 629 (1962).
- 3) C.R. Woese, H.J. Morowitz, C.A. Hutchison: J. Bacteriol. **76**, 578 (1958).
- 4) J. Wolf, S.A.Z. Mahnoud: J. Appl. Bacteriol. **20**, 373 (1957).
- 5) J. H. Martin, W. J. Harper: J. Dairy Sci. **48**, 282 (1965).
- 6) W. K. Harrell, H. Halvorson: J. Bacteriol. **69**, 275 (1955).
- 7) 川崎近太郎, 近藤雅臣, 手島邦和: 未発表.