

枯草菌形態変化細胞の発現タンパク質解析(その2) —形態変化機構と誘導因子—

しんがきりゅうじ、 かさはらやすひろ、 いのうえてつよし、 こけぐちすすむ、 ふくいかずひろ

○新垣隆資¹⁾、笠原康裕²⁾、井上哲圭¹⁾、苔口進¹⁾、福井一博¹⁾

1) 岡山大・院・医歯・口腔微生物、2) 奈良先端大・情報生命科学

【目的】

細胞形態は細菌分類の大きな指標となるものであるが、一方で種々の細菌において、培養条件や遺伝子変異による形態変化の観察がなされている。中で、細胞壁合成障害や致死的な形態変化に関する知見は新規抗生剤開発に向けて極めて有用なものと思われ、その機構の解明が待たれている。本研究では、第 17 回大会において報告した枯草菌形態変化細胞について発現タンパク質の解析を進め、形態変化機構とその誘導因子について考察を進めたので、その報告を行う。

【方法】

Bacillus subtilis 168 株を最小合成培地に 0.05%酵母エキスを加え、0.02%カザミノ酸を添加した CI 寒天培地に植菌し、カバーガラスを被せて 37℃にて培養した。培養後、菌体を集菌、溶菌処理後、全菌体タンパク質を SDS-PAGE にて分離し、LC/MS/MS により、発現タンパク質を解析、同定した。形態変化細胞を急速凍結-凍結置換法による処理後、超薄切片試料を作成し、透過型電顕観察を行った。

【結果】

前出の ECF シグマ因子、二成分制御系、分岐鎖 α -ケト酸脱水素酵素に加え、形態変化細胞において検出されたものとして、硝酸呼吸系のタンパク質群があった。CI 培地に亜硝酸塩、硝酸塩を添加して培養を行ったところ、特に硝酸塩添加で形態変化が抑制された。電顕観察では形態変化を起こした野生株は、形態変化が抑制されたシグマ Y 遺伝子破壊株に比べて細胞壁が薄かった。また、細胞質中に何らかの物質の蓄積と思われる構造物が発達している細胞や、数層の膜構造が存在するような細胞も観察された。

【考察】

枯草菌の形態変化は、カバーガラス下という環境下、最小培地に微量の栄養素を添加した培地のみにおいて見られ、最小培地やリッチ培地では観察されなかったことから低酸素分圧条件、特異な栄養環境において起こる事象だと考えられた。通気条件や硝酸塩の添加において、形態変化は抑制されることから電子受容体の欠乏が一つの要因であると思われる。また、二成分制御系ならびに ECF シグマ因子遺伝子破壊により形態変化が抑制されることから、何らかの環境認識系とともに、特異な条件下での環境応答を担う遺伝子群の発現制御系が関与しているものと考えられる。分岐鎖アミノ酸代謝、脂肪酸合成に関わる酵素破壊により形態変化が抑制される事、ならびに切片像において観察された細胞質像より、形態変化細胞では何らかの代謝異常が起こっている可能性が示唆された。現在、シグマ Y 遺伝子オペロンならびに分岐鎖 α -ケト酸脱水素酵素遺伝子オペロンについて詳細な解析を進めている。