特集 —— 高圧力が拓く流体の分子描像 ——

圧力-温度処理による芽胞死滅の
高圧 NMR 直接観測Direct High-Pressure NMR Observation of Molecular Processes of Spore Inactivation
by a Sequential Pressure-Temperature Perturbation前野 寛大^{1,*}Akihiro MAENO^{1,*}金折 賢二²Kenji KANAORI²藤井 茂¹Shigeru FUJII¹山崎 彬³Akira YAMAZAKI³赤坂 一之⁴Kazuyuki AKASAKA⁴

Some bacteria such as the *Bacillus* and *Clostridium* species can form spores, which are the dormant form of vegetative bacteria and are highly resistant to physical and chemical stimuli, the sterilization of which requires heating at $\sim 121^{\circ}\text{C}$ for 30 min. A crucial factor that maintains this high-resistivity is the high concentration ($\sim 10\%$ in dry weight of spore) of dipicolinic acid (DPA), which is spore-specific. We have applied ^1H high-resolution high-pressure NMR spectroscopy, for the first time, to the spore suspension, and observed, directly and in real-time, the specific release of DPA molecules from the spore into the bulk water phase in response to a mild hydrostatic pressure (200 MPa) at 20°C . After the release of DPA, heat-treatment below $\sim 100^{\circ}\text{C}$ has proven to be sufficient to cause the inactivation of the spores. Direct observation of molecular processes in bacterial spores with high-pressure NMR in response to pressure and temperature perturbations shown here opens a new avenue for studying spores and vegetative cells directly at the molecular level.

[*high-pressure NMR, bacterial spore suspension, pressure response, dipicolinic acid, protein thermal denaturation, spore inactivation*]

1. プロローグ

本稿は本特集「高圧力が拓く流体の分子描像」の中で唯一生命体を対象としている。ここで、「流体の分子描像と生命の接点は何なのか？」—との疑問を抱いた読者も多いだろう。しかし考えてみると、

そもそも生命を支配する流体は“水”であり、生命のダイナミズムは最終的に水のダイナミズムによって支えられている。この事実に基づくと、「流体の分子描像」が「生命体」と無関係であるはずがない。ところで、本稿の主要なテーマは“休眠状態”（または“仮死状態”）にある細菌の「芽胞」であり、

¹ 〒573-1010 大阪府枚方市新町 2-5-1 関西医科大学医学部 化学教室
Laboratory of Chemistry, Kansai Medical University, 2-5-1 Shin-machi, Hirakata, Osaka 573-1010

² 〒606-8585 京都市左京区松ヶ崎橋上町 京都工芸繊維大学 生体分子応用化学
Department of Biomolecular Engineering, Kyoto Institute of Technology, Hashikami-cho, Matsugasaki, Sakyo-ku, Kyoto 606-8585

³ 〒940-8622 新潟県長岡市呉服町 1-4-5 越後製菓株式会社
Echigoseika Co. LTD., 1-4-5 Gofuku-machi, Nagaoka, Niigata 940-8622

⁴ 〒602-8566 京都市上京区梶井町 465 京都府立医科大学
Kyoto Prefectural University of Medicine, 465 Kajii-cho, Kamigyo-ku, Kyoto 602-8566

* Electronic address: maenoak@hirakata.kmu.ac.jp

加圧によってそれを“生き返らせよう”という話である。芽胞もその中心部（コア）に少量の水を持ってはいるが、pyridine-2,6-dicarboxylic acid (dipicolinic acid; DPA) の Ca 塩を多量に含んでおり、最近の NMR 研究によると、その「分子描像」はかなりな（局所）運動性をもつゲル状態であるとされる[1]。これに対し我々は、加圧—脱圧によって芽胞内部から芽胞外へ DPA が流出する過程を、直接高圧 NMR の信号としてオンラインで観測することに成功した[2]。このとき逆に、外部から芽胞内にバルクの水が侵入し、芽胞内部が DPA を含むゲル状の水環境から流動性の高い“普通の水”環境へと転移する。すると芽胞は直ちに“休眠状態”から目覚めて再び命が動き始めるのである。すなわちこの流体の変化が、休眠状態の芽胞を増殖可能な栄養細胞へと蘇らせたのである。これを加熱すると 80–100°C の比較的低温で菌は死滅することがわかった。今後、これを高圧力を利用する芽胞の新規「低温殺菌法」として発展させて行く所存である。

2. はじめに

ある種のバクテリアは、熱・圧力・薬剤・乾燥などの環境ストレスに遭遇すると、代謝を著しく抑制した「芽胞(spore)」を形成して“休眠状態”あるいは“仮死状態”となる(Fig. 1a)。芽胞の内部は高度に脱水された堅牢な細胞構造となっており、母

細胞から分離された芽胞は、基本的には湿熱滅菌（オートクレーブ処理；121°C，30 分以上）をしない限り、長期に渡る休眠状態を維持する。そして、周囲が再び増殖に適した環境になると、短時間で栄養細胞へと発芽し増殖を始める。これは加工食品の長期保存を妨げ、しばしば食中毒などの重篤な感染症を引き起こす。従来のオートクレーブ法では食品から多くの有効成分や食品本来の風味が失われており、健康に寄与する美味しい食品が求められる現代の健康志向に適した方法とは言えない。また、食品のみならず、医薬、医療などの分野においても細菌芽胞による汚染・感染は時として重大な健康被害をもたらす。そのため、対象物から芽胞を取り除くことは、今人間社会が直面している重要な課題の一つである。

これに対してこの半世紀に多くの努力がなされ、近年に至り、加熱処理に圧力処理を組み合わせることで加熱単独処理よりも効果的な芽胞死滅がもたらされる可能性が示された[3,4]。しかし、圧力を組み合わせることで、なぜ比較的低温(<100°C)での芽胞殺菌が可能なのか、またどうすればそれが効率よく行えるのかはこれまで全く不明であった。芽胞は厚い殻に守られ、その内部に内在性成分であるジピコリン酸(Dipicolinic acid: DPA)を高濃度（芽胞乾燥重量の 10% 以上）に含んでいる(Fig. 1b)。加圧・加熱処理によるその漏出が芽胞死滅の引き金になると考えられ、それを示す実験的証拠も得られて

Fig. 1. (Color online) Structures of *Bacillus subtilis* spore. (a) Microscopic images with the scanning electron microscopy (SEM) (left panel) and with the phase-contrast microscopy (right panel). (b) Schematic image of the internal structure of the spore with multi-layers consisting of lipids, polysaccharides and proteins. The inset shows the chemical structure of dipicolinic acid (DPA), known as the spore specific substance.

いる[5]。しかし、これまでの芽胞に対する「圧力の効果」と「温度の効果」の多くは渾然一体として観測され、その程度は最終的に細菌が死滅するかどうかの段階で判定されてきた。そのため、加圧および加熱処理におけるどの過程で芽胞からの DPA 流出が起こるのか、あるいは、どの過程で芽胞が死滅するのか、特に前者に関する両処理の役割についてその解釈は混乱している[6]。最近、荻野らによって、加圧と加温の効果を分離観測できる可能性が示された[7]。そこで筆者らは、これまで明確に分離されてこなかった芽胞に対する加圧と加熱の効果を、それぞれ別個の現象として直接分子レベルで検証することを試みた。本稿でその詳細を解説するが、我々は独自に開発した高圧核磁気共鳴分光法(High-Pressure Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy: HP-NMR)〔赤坂 一之, 高圧力によるタンパク質動態研究の展開, 2014 年度高圧力学会賞〕を適用することで、*Bacillus subtilis* natto の芽胞を対象に、加圧下における芽胞からの DPA の流出を直接オンラインかつリアルタイムで追跡することに初めて成功した[2]。さらにそれに続く常圧下での昇温により、比較的低い温度(80~100°C)で芽胞蛋白質等が変性し、芽胞の殺菌が達成されることを細菌培養により確認した[2]。芽胞および細菌の生死を左右する決定的な分子過程を、“直接的に”分子信号の変化として検出することに初めて成功した本研究は、芽胞基礎分野の研究に新しい実験手法を導入すると共に、食品の長期保存のための新規な芽胞殺菌技術開発への貢献が期待される。

3. 細菌芽胞の構造的特徴

芽胞は栄養細胞中で不等分裂した前細胞が芽胞形成過程において変化した「芽胞原形質(Core)」を包含する直径 1 μm 程度の細胞構造である[8]。そして染色体(Chromosome)を含む Core を、ペプチドグリカンと類似の成分からなる「皮層(Cortex)」と主として蛋白質で構成された多層構造である「芽胞殻(Inner coat, Outer coat)」とが覆っている(Fig. 1b)[9]。もう一つの特徴として、芽胞特有の成分である DPA が Core を中心に存在することが挙げられる。DPA は芽胞形成の過程で生合成される化合物であるが[10]、先述した通り、高度に脱水された芽胞内部における濃度は芽胞乾燥重量の約 10% と異常に高く、芽胞 Core 内での含量が多い

Ca^{2+} と結合してキレートを形成し、他の高分子成分とともに半結晶状で存在していると考えられている[11-13]。これまで、芽胞蛋白質のプロテオーム解析、発現・機能解析、芽胞構造とストレス耐性との相関など多くの研究が行われてきたが[14-16]、DPA を始めとする芽胞内在性成分の役割と芽胞殺菌の関連については殆どわかっていない。

4. 実用的な芽胞殺菌技術確立のための課題と可能性

4.1 加圧処理と加熱処理の併用

菌種による違いはあるものの、一般的な芽胞は 121°C, 30 分程度の湿熱処理(オートクレーブ)により死滅することが知られている[17]。しかし、この方法では長期間の保存を実現する代償として、特に食品分野で重要視される食材の物性や熱分解性の栄養成分が大きく失われるというデメリットがある。食材の性状および栄養成分の維持を担保した効率的な殺菌を行いたいという社会のニーズに応えるには、可能な限り加熱による処理を避けながら殺菌効率を上げる方法を見出さなければならない。そこで近年、高温処理に代わる低侵襲性の殺菌方法として期待されているのが、添加物の付加や過度の加熱による酸化反応を伴わない「高圧力」の利用である。

これまでの研究から、高圧処理により耐熱性芽胞の発芽が促進されることが知られている一方[18]、園池が過去 100 年間の研究をまとめたところ、ほとんどの菌種の栄養細胞は 400 MPa, 20 分以上の加圧処理で殺菌されるのに対して、耐熱性芽胞は軒並み高圧単独処理での殺菌が困難であると報告されている[19]。従って、これまでは、まず芽胞を加圧することで栄養細胞への発芽を促し、それら栄養細胞を加熱により死滅させるという方法論が主流とされ、その中で圧力は発芽誘起のツールとして用いられてきた。それと並行して、高圧処理のみで芽胞を殺菌するには至適圧力が存在し、その殺菌力は高温になるほど高まるとの報告から[20]、殺菌効率の向上を目指し高圧処理と加熱処理を併用する試みが盛んに行われるようになった。しかしながら、菌種によっては高温条件下で加圧することで逆に殺菌効果が阻害される場合があること[21]、高圧処理による芽胞の発芽誘導にも一般的な蛋白質と同様に至適温度、至適圧力があり、それらは菌種によって様々でないこと[20,22]など、様々な制約が存在することで汎用性の高い殺菌条件を決めることは困難であるとき

れた。これまでに圧力と温度の組み合わせと殺菌効果に関する研究は実に数千件あまりも報告されているが、現在のところ耐熱性芽胞の殺菌に有効な圧力は 500 MPa 以上、加熱温度は 100°C 以上、処理時間は数十分とされており、これらが圧力を利用した殺菌技術の実用化を阻む高い障壁となっている。さらに処理温度以外にも pH, 糖, 塩濃度, 水分活性などが圧力の効果に影響を与えており[23–26], 細菌芽胞の効率的殺菌に不可欠な因子の探索を一層困難なものにしている。

4.2 加圧効果と加熱効果の分離検証の必要性

最近, 比較的低い圧力 (200 MPa 程度) を前処理として施すことで, 脱圧後 100°C 程度での加熱殺菌における効率が顕著に上がることが報告された[7,27,28]。また, 加圧処理後に観測される現象として, 芽胞外部への DPA 漏出や, 芽胞内部への浸水を示唆する湿潤密度(buoyant density)の低下が認められ[7], 特に前者は芽胞殺菌の引き金になると考えられている[3]。他にも, 加圧前処理に対する応答として, 芽胞内の ATP 量や発芽に関連した蛋白質における発現量の変化などが報告されているが[29], どの処理過程で芽胞から内在性成分の漏出が起こり, どの様にして芽胞が生物学的な死に至るのか, 一連の分子基盤は殆ど明らかになっていない。また, これまでに加圧処理と加熱処理の併用により現象論的に効率的な殺菌が実現することは知られているものの, 二つの異なる物理的処理のいずれが芽胞死滅に重要なプロセスなのかについても明らかにされていない。それらの因果関係を調べるためには二つの異なる物理的処理による効果を明確に分離して検証する必要があるだろう。そこで筆者らは, 細菌芽胞の物理的処理に応じて生じる成分変化を原子

レベルの分解能で観測できる NMR を用いて, 芽胞懸濁液を対象に圧力効果および温度効果を直接追跡することを企画した。特筆すべきは, 加圧-脱圧後ではなく, 加圧下において直接オンラインで信号を観測可能な高圧 NMR 法を, 芽胞に対する圧力効果の検証に初めて適用した点である。同法は, 赤坂らが独自に開発したセラミック製耐圧 NMR セルと市販の NMR システムとを組み合わせた日本発の独創的技術であり[30], 本研究のように加圧環境にある芽胞成分の変化を分子レベルで, かつリアルタイムに観測するには最適な手法である。

5. 高圧 NMR 法による芽胞に対する圧力-温度効果の解析

5.1 実験の狙いと手順

圧力と温度はそれぞれ異なる効果を生体高分子に与えることが知られている[31]。そのため, それらを互いの影響を受けない独立した効果として検出できるよう, 以下の 3 段階で実験を行った(Fig. 2)。

- ステップ 1 (加圧過程): 20°C で 200 MPa まで加圧し, その後 20°C のまま圧力を保持
- ステップ 2 (脱圧過程): 20°C を保ちながら 200 MPa から常圧まで減圧し 20°C で保持
- ステップ 3 (加熱過程): 常圧下で目的の温度 (80°C~100°C) まで加熱

これら芽胞懸濁液における加圧-加熱過程をリアルタイムに ^1H NMR で測定し, 各ステップにおける芽胞成分の質的・量的変化を調べた。

本研究では枯草菌 *Bacillus subtilis* natto (NBRC13169) を用いた。芽胞菌の調製については原著論文[2]を参照されたい。コロニーから培養した栄養細胞を, さらに DSM (Difco Sporulation

Fig. 2. (Color online) Experimental procedure in three steps; Step 1. Pressurization (5→200 MPa); monitored on-line with high-pressure NMR, Step 2. De-pressurization (200 MPa→5 MPa); monitored on-line with high-pressure NMR, Step 3. Heating to a mildly high temperature (80–100°C); monitored with conventional NMR.

Medium) 下で 72 時間培養しながら芽胞形成を誘導し、芽胞の成熟度合いを位相差顕微鏡下で確認したのち精製を行った (成熟した芽胞は Fig. 2a で示したように明るく光って観察される)。精製した芽胞を遠心分離で回収し、残渣画分 (= 成熟芽胞) を重水 (D_2O) に懸濁、それをセラミック製耐圧 NMR セル [30] もしくは市販の NMR チューブ (Wilmaad-LabGlass Co.) に充填し、600 MHz NMR (AVANCE III, Bruker) で 1H NMR 測定を行った。ここでは、芽胞に対する圧力の物理的な効果に限定する目的から、加圧・脱圧処理に伴う芽胞の生物学的応答 (主に発芽過程での酵素反応を含む代謝変化) を可能な限り抑制すべく、圧力処理時の温度を枯草菌の生育温度範囲内の $37^\circ C$ よりも低い $20^\circ C$ に設定した。また、処理時に急激な加圧 (もしくは減圧) 作業を行うと、断熱圧縮 (もしくは断熱膨張) により試料温度が短時間で大きく変化してしまうため、加圧および減圧には十分な時間をかける必要があることに留意したい。

5.2 芽胞内成分と芽胞外漏出成分の分離 (1H NMR 測定)

生体高分子の 1H NMR 測定は、特別な同位体標識を必要としない上に信号の検出感度が良いことから、最も基本的な NMR 実験として古くから行われてきた。この場合、試料水溶液中に含まれる全ての分子における水素核 (1H) が NMR による観測の対象となるため、例えばアミノ酸 100 残基程度の比較的小さな蛋白質でも取得した 1H NMR スペクトルには千本を超える信号が一度に検出される。

では芽胞懸濁液の場合、どのようなスペクトルが得られるのか。細菌芽胞は複雑な分子システムによって構築されており、原理的には芽胞内に存在する全ての分子の水素核が 1H NMR スペクトルに反映される。したがって、芽胞内で特別な事象 (内在性成分の漏出など) が起こったことを見抜くには、少なくとも先述の 3 つの処理ステップで得られた懸濁液の 1H NMR スペクトルから目的とする成分の信号を的確に分離できなければならない。そこで我々は、芽胞内部から外部へ流出した分子の信号を 1H NMR 上で区別できるのかを確かめるために、発芽した直後の芽胞本体とその代謝産物の混合物である発芽芽胞懸濁液を用いた予備的な実験を行った (Fig. 3)。Fig. 3a に芽胞懸濁液の 1H NMR スペクトルを示しているが、ここではシャープな信号と幅

広な信号が入り混じっているのがわかるだろう。続いて、この混合懸濁液を遠心分離 ($8,000 \sim 10,000 \times g$) した後、残渣を D_2O で再び懸濁し 1H NMR で測定したところ、芽胞本体に由来する幅広い信号のみが観測された (Fig. 3b)。他方、上清画分では代謝物中の低分子に由来するシャープな信号群が観測された (Fig. 3c)。この結果は、芽胞内部から外部に漏出した成分はシャープな NMR 信号として、芽胞内部に留まる全ての成分は幅広い NMR 信号として区別できるという事実を明確に示している。つまり、芽胞外に漏れ出てきた成分と、芽胞内部に留まる成分とを NMR スペクトル上で容易に分離することができるのである。この方法を用いて、細菌芽胞の圧力および温度効果に伴う外液への漏出成分の同定と定量分析を 1H NMR 信号の変化を基に行った。

5.3 二段階の DPA 漏出過程を伴う芽胞に対する圧力効果 (ステップ 1-2)

まずステップ 1 として、中程度の圧力条件下 (200 MPa , $20^\circ C$) での芽胞における分子レベルの挙動を高圧 1H NMR で観測した。処理前のスペクトル (Fig. 4a) では、高磁場領域 ($1\text{--}4 \text{ ppm}$) に幅広い信号群が観測されているが、これらは主に芽胞の高分子化合物 (蛋白質、多糖類、脂質) に由来すると考えられる [32]。しかし、 200 MPa まで加圧すると

Fig. 3. An experimental demonstration showing that the 1H NMR signals from the bulk solution and those from the spore of *Bacillus subtilis* natto can be separated by simple centrifugation of the spore suspension. (a) The suspension containing an aqueous mixture of germinating spores and their metabolites. (b) The germinating spores only. (c) The supernatant containing the metabolites only. The sharp signals at $\sim 0 \text{ ppm}$ originate from DSS added for inner reference.

直ちに（およそ 15 分以内：5 分間の加圧時間および温度が一定になるまでの 10 分間の待ち時間）、小さいが比較的シャープな信号が 8.1 ppm 付近に出現した (Fig. 4b)。化学シフトデータベースによれば、この NMR 信号は DPA におけるピリジン環（含窒素六員環）の水素核に帰属されることがわかった (Fig. 4 inset, DPA^{2-} の構造式)。その後、200 MPa において 90 分間静置したが、この DPA 信号の強度が時間依存的に変化することはなかった (Fig. 4c)。この結果は、芽胞内在性成分である DPA が 200 MPa を印加後直ちに（～15 分以内）芽胞外液へ漏れ出る過程を示しており、芽胞に対する圧力効果として、まずは DPA の急速な漏出が生じることの明確な証拠となる。また、Fig. 4b および 4c の 0.7–1.5 ppm 付近で、加圧処理前には存在しなかった幾つかのシャープな信号が新たに観測された。過去の文献から、これらは芽胞構造の一部を構成する、もしくは芽胞内部に埋もれていた低分子の細胞成分に由来すると推察されるが[32]、いずれ

にせよ、DPA 以外の芽胞成分も加圧によって直ちに外部へ漏出してくることは間違いないようである。

続くステップ 2 で、20°C で 200 MPa から 5 MPa へと脱圧し、その後の過程をリアルタイムに ^1H NMR で追跡した（高圧 NMR 実験では、耐圧 NMR セルの試料室に残った細かな気泡がスペクトルの質に影響を及ぼすため、それを除去する目的で通常 5 MPa を常圧と見なしている）。すると、芽胞懸濁液をゆっくりと常圧に戻したところで、先ほど加圧下で検出されていた DPA 信号の強度がさらに増大したのである (Fig. 4d)。この結果は、脱圧に伴い DPA 分子が芽胞から追加で漏れ出てきたことを明示している。このような現象はオンライン型高圧 NMR を用いた実験でこそ観測可能であることを強調したい[33]。

既述の通り、芽胞内部で Ca と結合した DPA (DPA-Ca 複合体) はキレートを形成して存在することが有力とされている。では、外液へ漏出した DPA はどのような状態にあるのだろうか。通常、遊離した DPA の化学シフト値は約 8.0 ppm を示す。一方、DPA-Ca 複合体の化学シフト値は約 8.1 ppm を示し (Fig. 4e)、これは加圧処理後に検出された DPA の NMR 信号と同じ値であった (Fig. 4d)。このことから、少なくとも芽胞外部へ漏出した DPA は Ca^{2+} と結合した DPA-Ca の構造を取っていることが示唆された。

ステップ 2 では、脱圧と共に DPA 信号の強度が増大したが (Fig. 4d)、その後の DPA 信号強度の時間変化を調べると、0.7–2.5 ppm 付近の芽胞本体に由来する幅広い信号群の変化とは対照的に、DPA の NMR 信号が時間経過と共に明らかに増大していた (Fig. 5a, b)。ここで注目すべきは DPA が漏れ出した時間スケールと量的変化である。Fig. 6 に示した実時間に対する DPA 相対漏出量のプロットから、加圧処理直後に芽胞内全量の約 1/3 量の DPA が芽胞から漏出したのち、脱圧処理に伴い残りの DPA が非常にゆっくりと漏出してきていることがわかるだろう。また、脱圧後のプロットにおける漸近的な特徴から、ほぼ 100% の DPA が芽胞外部へ出るには約 20 時間を要していた。これらの結果をまとめると、加圧過程（ステップ 1）と脱圧過程（ステップ 2）における高圧 NMR 実験から、*Bacillus subtilis* の圧力効果として DPA の漏出が二段階の過程を経て生じており、ステップ 1 では 15 分以内に完了する“非常に速い時間スケールの DPA 漏出”が

Fig. 4. Effect of pressure at 200 MPa on the ^1H NMR spectrum of the spore suspension of *Bacillus subtilis* natto in D_2O at 20°C. (a) Before applying pressure (at 5 MPa), (b) Immediately after applying pressure at 200 MPa at 20°C, (c) After applying pressure at 200 MPa for 90 min at 20°C, (d) After de-pressurized to 5 MPa within 5 min at 20°C [6], (e) Chemical shift profile of DPA-Ca complex only.

Fig. 5. Effect of depressurization from 200 MPa to 5 MPa in Step 2 on the ^1H NMR spectrum of the spore suspension of *Bacillus subtilis* natto in D_2O at 20°C . (a) Low-magnetic field part: Change in the DPA signal with time. (b) High-magnetic field part: Change in the cell component signals with time. The measurement started within a total of ~ 15 min for reducing pressure (5 min) and stabilizing the temperature (10 min), and ~ 30 minutes were elapsed for recording each spectrum [6].

Fig. 6. Time-dependent leakage of DPA in the entire process of pressure treatment of the spore suspension of *Bacillus subtilis* natto in Step 1 and Step 2 as monitored by ^1H NMR. Inset shows the ^1H NMR signals of DPA in the entire process of pressure treatment including Step 1 and Step 2 [6].

(過程 1), 続くステップ 2 では一転, 数十時間という“非常に遅い時間スケールでの DPA 漏出”が認められた (過程 2)。

5.4 加圧前処理後の加熱処理に伴う芽胞殺菌効果 (ステップ 3)

ステップ 2 に続くステップ 3 では, 圧力処理された芽胞懸濁液を中程度の温度 ($\leq 121^\circ\text{C}$) で 30 分間処理し, その試料を NMR で測定した。高圧 NMR 実験で用いたセラミック製耐圧セルは熱伝導性が悪く温度実験には不向きなため, ここでは市販の NMR チューブ (Wilmad-LabGlass Co.) に各処理を施した芽胞懸濁液試料を移し替え, オフラインで NMR 測定を行った。今回用いた 80°C 以上の処理温度は, 溶液中の一般的な蛋白質をアンフォールドもしくは熱変性させるのに十分な条件であり [34], 実際に Fig. 7 の ^1H NMR スペクトルにおいて, 溶媒に晒されたアミノ酸側鎖のメチルプロトン ($-\text{CH}_3$) に典型的な 0.9 ppm 付近の強い NMR 信号として蛋白質の変性が確認できた [35]。また, 多糖類や脂質二重膜はこの温度領域ではその構造や相が大きく変わっているものと考えられる [36]。ここで, ステップ 2 の後に加熱処理 (80°C , 30 分間) を行った芽胞懸濁液の ^1H NMR スペクトルを未処理芽胞のそれと比較すると, 高磁場側 ($0\text{--}3$ ppm) で新たに幾つかの強くシャープな信号が出現した (Fig. 7a, b)。興味深いことに, Fig. 7b (もしくは Fig. 7c) におけるこれらの信号群はオートクレーブ処理 (121°C , 30 分間) によって芽胞を湿熱滅菌した際の NMR スペクトル (Fig. 7d) と酷似しており, その両方において同様の蛋白質熱変性が生じていることが示された (Fig. 7, 点線枠内)。因みに, 処理温度を 100°C にしても 80°C の場合と同様の NMR スペクトルが得られた (データ未掲載)。これらの結果は, ステップ 3 に先立ち施した加圧前処理が芽胞蛋白質の熱安定性を下げることに極めて効果的であることを明示している。

では, 蛋白質の熱変性が芽胞生存率にどう影響するのか。ここで未処理, 加熱単独処理, 圧力前処理後の加熱処理, オートクレーブ処理を行った各懸濁液試料をそれぞれ LB 寒天培地に塗布した後のコロニー形成を比較した (Fig. 7e)。すると, 中程度の圧力と加熱を組み合わせた場合 (Fig. 7e-3) に, 加熱単独処理 (Fig. 7e-2) と比較して発芽を伴う芽胞の増殖能が著しく低下し, 定性的にオートクレーブ (Fig. 7e-4) と殆ど遜色のない殺菌効果が得られた。因みに加圧単独処理の場合, 加熱単独処理と同様に殺菌効果は認められなかった (データ未掲載)。

Fig. 7. (Color online) Effect of the pressure pre-treatment and heat-treatments on the spore suspension of *Bacillus subtilis* natto, monitored on the ^1H NMR spectrum (a–d) and the viability of the spore (e). (a) No pressure / no temperature treatment. (b) Treated at 80°C for 30 min in Step 3 (after pre-treatment at 200 MPa for 10 min in Step 1 and then at 5 MPa for 10 min in Step 2). (c) The same as (b), but after standing for 3 h in Step 2. (d) Autoclaved under the standard condition (at 121°C for 30 min with no applied pressure) [6]. Note that the ^1H NMR spectra suggest strongly that a large part of the spore proteins are nearly denatured in (b) and (c) treated at 100°C, in close resemblance to the case in (d) (simple autoclaving) treated at 121°C. (e): The viability of the spore in terms of colony formation treated differently as indicated; note that the pre-treatment with pressure at 200 MPa at 20°C and then heating at 100°C (No.3) shows a nearly complete inactivation of spores with almost no colony formation as in autoclaving (No.4), while the simple heat treatment at 100°C without pressure pre-treatment (No.2) causes immense colony formation. All treated spores were inoculated into LB agar plate, and were incubated at 35°C for approximately 12 hours to form colonies.

6. 加圧-加熱処理に伴う効率的芽胞殺菌の分子機構

6.1 なぜ圧力処理の過程で DPA 漏出が起こったのか？

本研究で最も驚いた結果は、加圧/脱圧という2つの異なる過程で芽胞からの DPA 漏出が多段階的に生じていたことである。従来は圧力処理後にしかその効果を確認することができなかったが、高圧 NMR によるリアルタイムでの観測が実現し、DPA の圧力応答についての挙動を正確に把握することが可能となった。

芽胞構造内での DPA の局在性については、Core 内部に加えてその周辺領域にも DPA が分布しているとの報告が幾つかあるが[37]、その知見に基づくと、過程 1 で芽胞構造内の比較的表層に近い領域（例えば Cortex）に分布していた DPA-Ca 複合体が圧力の印加に反応して即座に流出し、脱圧後に Core 領域に分布する DPA-Ca 複合体がゆっ

くりと流出した（過程 2）ものと考えられる。前者の急速な漏出過程は、基本的には天然状態の蛋白質や多糖類が多く存在する Core 周辺環境への速くそして可逆的な水分子の浸透に反応して生じたものと推察される。他方、後者の遅い漏出過程は、過程 1 よりも複雑な機構を経て、DPA-Ca 複合体に富む Core そのものから生じたと考えられる。確かに 200 MPa という圧力領域は、基本的に可溶性蛋白質の可逆的な構造変化を引き起こすが[38]、芽胞の様な複雑に凝縮されたシステムにおいては必ずしもそうではないのかも知れない。脱圧過程ではむしろ、加圧によって生じた高分子の一時的な構造変化が実時間内では完全には元に戻らないことで、部分的に不完全な芽胞構造が残った、もしくは半透性の芽胞内膜(inner forespore membrane, Fig. 1b)に通ずる“隙間”ができたのではないかと推測している。現段階ではいずれも推測の域を出ないが、圧力に反応して芽胞内膜に存在するとされる DPA チャネルを

通じて DPA 分子が流出するとの報告もある[6]。細胞膜の半透性が一旦機能し始めると、高濃度の DPA を包含する Core と芽胞内へ侵入したバルク水との間に高い浸透圧が生じ、それによって遅い時間スケールで生じる芽胞内部への浸水および外液への DPA 漏出が促進されるのであろう。これらの解釈は、圧力処理後の芽胞において観測された、内部への浸水を示唆する湿潤密度(buoyant density)の減少と矛盾しない[7]。

6.2 中程度の温度における加熱処理で芽胞に何が起こったのか？

Core 領域からの DPA 漏出と外部からの浸水が起こると Core 内における蛋白質などの高分子は通常の水環境に晒され加熱の対象となり、100°C よりも低い温度域で容易に変性してしまうだろう[34]。Fig. 7b (もしくは Fig. 7c) の ^1H NMR スペクトルにおいて観測された信号群に、ランダムコイルもしくは変性した蛋白質に特徴的な側鎖メチル基の化学シフトを示すものが見つかったことで、芽胞構造の一部を構成している蛋白質がステップ 1-3 を通じて高度に熱変性したことが強く示唆される。実際に、加圧前処理後に加熱処理を施した芽胞懸濁液の ^1H NMR スペクトルとオートクレープ処理後のそれとを比較すると、両者の NMR 信号パターンは非常に良く似ていた(Fig. 7b, d)。この結果から、通常、常圧下で芽胞の不活性化に用いられる 121°C (2 気圧) よりずっと温和な 80°C で処理した場合でも芽胞外殻や膜構造を含む Cortex などの芽胞特異的な構造あるいはその構成成分に重大な損傷が生じ、先述の DPA 漏出との複合的な影響によって効率的な芽胞の不活性化が実現したと考えられる。

7. まとめと展望

本研究では、細菌芽胞に対する圧力および温度の効果を、DPA 及び蛋白質等の挙動を指標として NMR で検証することに成功した。具体的には、*Bacillus subtilis* において生じる圧力(200 MPa, 20°C)–温度(0.1 MPa, 80°C)の連続処理に伴う分子事象を観測する方法として、高圧 ^1H NMR 法を初めて採用した。同法により、圧力応答による芽胞からの DPA 漏出が速さの異なる 2 つの過程で生じる事実が、“直接的”，そして“リアルタイム”で明らかになった(Fig. 6)。たとえ 20°C であっても DPA

漏出の第 1 過程は速く、加圧後数分で完了してしまう。それとは対照的に、第 2 過程は脱圧後にゆっくりと 20 時間ほどかけて進行していく。一旦全ての DPA 分子が放出されると芽胞蛋白質の熱安定性は極度に低下し、芽胞蛋白質は耐熱性芽胞の構成成分であるにもかかわらず一般的な球状蛋白質と同様に 80°C で変性してしまった(Fig. 7)。ここで重要な点は、蛋白質が変性状態に至った芽胞では、同時に増殖能もほぼ失われていたという事実である。これは、芽胞の高度な耐熱性は内部の蛋白質に与えられた特殊な性質に基づくものというよりは、芽胞が環境ストレスに晒された際に、代謝の維持や発芽・増殖に最低限必要な蛋白質を変性させないためのシステムを生来備えていることによるものと推測される。

本研究は、標的となる菌種あるいは摂動の選択が限定的ではあるものの、圧力や温度に対する細菌芽胞および細胞の応答を分子レベルで直接検出する新規手法としての高圧 NMR の有効性を示すことができたといえよう。また、芽胞および細菌の生死を左右する重要な分子過程を、圧力・温度摂動による“生の”分子信号の変化として検出することに成功した本研究は、今後の芽胞および細胞研究における新しい可能性を示唆するものとなった。一方、本研究で開発された手法は、食品および医学応用の観点から、菌種の異なる芽胞の殺菌に対してどの様な温度・圧力の組み合わせが最も効率的なのかを検証する上で直接的かつ有効な情報を提供するものと期待され、我々は独自にこれに関する研究を進めている。

謝 辞

櫻井 一正 博士(近畿大学)には高圧 NMR 測定実施に際してご協力頂いた。また、本研究は科学研究費補助金(17K18255)による支援により可能となったものである。この場を借りて深く感謝致します。

参考文献

- [1] S. Kaieda, B. Setlow, P. Setlow, B. Halle: *Biophys. J.*, **105**, 2016 (2013).
- [2] K. Akasaka, A. Maeno, A. Yamazaki: *Biophys. Chem.*, **231**, 10 (2017).
- [3] 重田有仁, 渡邊弥生, 青山康司, 岡崎尚: 広島食工技研報, **27**, 29 (2013).
- [4] J. Ahn, H.Y. Lee, V.M. Balasubramaniam: *J. Sci. Food Agric.*, **95**, 174 (2015).

- [5] E.Y. Wuytack, S. Boven, C.W. Michiels: *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**, 3220 (1998).
- [6] C.A. Lenz, R.F. Vogel: in *High Pressure Bioscience - Basic Concepts, Applications and Frontiers*, eds. K. Akasaka, H. Matsuki (Springer), Chapter 23, pp. 469–537 (2015).
- [7] 荻野美由紀, 西海理之: 高圧力の科学と技術, **25**, 334 (2015).
- [8] P.T. McKenney, A. Driks, P. Eichenberger: *Nat. Rev. Microbiol.*, **11**, 33 (2013).
- [9] A. Driks: *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **63**, 1 (1999).
- [10] L.A. Chasin, J. Szulmajster: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **29**, 648 (1967).
- [11] 西原力: 日本細菌学雑誌, **37**, 829 (1982).
- [12] K. Watabe: *PDA Journal of GMP and Validation in Japan*, **3**, 67 (2001).
- [13] P. Setlow, L. Li: *Photochem. Photobiol.*, **91**, 1263 (2015).
- [14] 渡部一仁: 薬学雑誌, **133**, 783 (2013).
- [15] 関口順一: 生物工学会誌, **91**, 50 (2013).
- [16] P. Setlow: *Microbiol. Spectrum*, **2**, TBS-0003-2012 (2014).
- [17] G. Sykes: in *Methods in Microbiology*, eds. J.R. Norris, D.W. Ribbons (Academic Press), Vol. **1**, pp. 77–121 (1961).
- [18] J.G. Clouston, P.A. Wills: *J. Bacteriol.*, **97**, 684 (1969).
- [19] 園池耕一郎: 日本食品科学工学会誌, **44**, 522 (1997).
- [20] A.J.H. Sale, G.W. Gould, W.A. Hamilton: *J. Gen. Microbiol.*, **60**, 323 (1970).
- [21] F.H. Johnson, C.E. ZoBell: *J. Bacteriol.*, **57**, 353 (1949).
- [22] W.G. Murrell, P.A. Wills: *J. Bacteriol.*, **129**, 1272 (1977).
- [23] 芝崎勲: 新・食品殺菌工学 (光琳, 東京, 1983), p. 390.
- [24] 滝妥恵, 栗生武良, 光浦暢洋, 高垣康雄: 加圧食品, 林力丸 編 (さんえい出版, 京都, 1990), 第 12 章, pp. 143–155.
- [25] 衣笠仁, 竹尾忠一, 福元研治, 秦野徹, 石原正美: 生物と食品の高圧化学, 林力丸 編 (さんえい出版, 京都, 1993), p.237.
- [26] S. Koseki, K. Yamamoto: *Int. J. Food Microbiol.*, **111**, 175 (2006).
- [27] 山崎彬: 高圧力の科学と技術, **16**, 4 (2006).
- [28] S.H. Park, V.M. Balasubramaniam, S.K. Sastry: *Lwt-Food Sci. Technol.*, **57**, 243 (2014).
- [29] K. Reineke, K. Schlumbach, D. Baier, A. Mathys, D. Knorr: *Int. J. of Food Microbiol.*, **162**, 55 (2013).
- [30] K. Akasaka: in *High Pressure Bioscience - Basic Concepts, Applications and Frontiers*, eds. K. Akasaka, H. Matsuki (Springer), Chapter 33, pp. 707–721 (2015).
- [31] L. Smeller: in *High Pressure Bioscience - Basic Concepts, Applications and Frontiers*, eds. K. Akasaka, H. Matsuki (Springer), Chapter 2, pp. 19–39 (2015).
- [32] T. Nakai, R. Ishima, H. Sakahara, K. Endo, J. Konishi, K. Akasaka: *Acad. Radiol.*, **3**, 742 (1996).
- [33] K. Akasaka, H. Yamada: in *Methods in Enzymology*, eds. T.L. James, V. Doetsch, U. Schitz (Academic Press), **338**, pp. 134–158 (2001).
- [34] P.L. Privalov: *Adv. Protein Chem.*, **35**, 1 (1982).
- [35] K. Wuthrich: *NMR of Proteins and Nucleic Acids* (Wiley), (1986).
- [36] R. Winter: in *High Pressure Bioscience - Basic Concepts, Applications and Frontiers*, eds. K. Akasaka, H. Matsuki (Springer), Chapter 17, pp. 345–370 (2015).
- [37] C. Kawasaki, M. Kondo, T. Nishihara: *J. Japanese Society for Bacteriology*, **22**, 463 (1967).
- [38] K. Akasaka: *Chem Rev.*, **106**, 1814 (2006).

[2018 年 3 月 30 日受付, 2018 年 5 月 21 日受理]

© 2018 日本高圧力学会