芽胞（細菌孢子）の耐熱性の機構

細菌孢子（芽胞）の耐熱性は、生物自身の生体防御機構への興味とともに、殺菌、滅菌その他を含め食品衛生といった側面などからも注目されてきた。ここでは、今なお不明な点の多いその機構について問題点の整理を試みた。

蜂須賀 養悦 Yoetsu HACHISUKA
名古屋市立大学医学部

細菌孢子（芽胞；細菌孢子は種々の点で真菌孢子と異なり、単に孢子と言えば両者のいずれかまぎらわしいので、医学細菌学で使いならしている芽胞を以後用いる）に耐熱性があるという言葉は、その芽胞を形成する栄養細胞はもちろん、好熱細菌を含めて、無芽胞細菌のいずれよりも高温あるいは長時間の加熱に耐えることを意味している。耐熱性の目安になる加熱温度が具体的に何度であるかについて公認されたものはない。個々の芽胞の

中には耐熱性のかなり低いものもあり、問題は複雑である。表1および表2⁽¹⁾に、有芽胞細菌の何種類かの芽胞の耐熱性を湿熱と乾熱の両者について示したが、湿熱で100℃、5分間の加熱に耐えることは必須条件のように思われる。ただし、この場合も、どのような条件で耐熱性を調べたかが問題であって、*Bacillus subtilis* の芽胞を数回遠心法で洗浄したのち蒸溜水に浮遊して加熱し、普通寒天培地で集落をつくらせた場合、90℃、30分間の加熱で約90%が死滅する。

表 1 湿熱による各種芽胞の死滅時間 (Sykes⁽¹⁾ より)

微 生 物	各温度における死滅時間 (分)							
	100℃	105℃	110℃	115℃	120℃	125℃	130℃	134℃
<i>B. anthracis</i>	2~15	5~10	—	—	—	—	—	—
<i>B. subtilis</i>	長時間	—	—	40	—	—	—	—
腐生性嫌気性菌	780	170	41	15	5.6	—	—	—
<i>Cl. tetani</i>	5~90	5~25	—	—	—	—	—	—
<i>Cl. welchii</i>	5~45	5~27	10~15	4	1	—	—	—
<i>Cl. botulinum</i>	300~530	40~120	32~90	10~40	4~20	—	—	—
土壌細菌	長時間	420	120	15	6~30	4	—	1.5~10
好熱細菌	—	400	100~300	40~110	11~35	3.9~8.0	3.5	1
<i>Cl. sporogenes</i>	150	45	12	—	—	—	—	—

表 2 乾熱による各種芽胞の死滅時間 (Sykes⁽¹⁾ より)

微 生 物	各温度における死滅時間 (分)						
	120℃	130℃	140℃	150℃	160℃	170℃	180℃
<i>B. anthracis</i>	—	—	~180	60~120	9~90	—	3
<i>Cl. botulinum</i>	120	60	15~60	25	20~25	10~15	5~10
<i>Cl. welchii</i>	50	15~30	5	—	—	—	—
<i>Cl. tetani</i>	—	20~40	5~15	30	12	5	1
Soil spores	—	—	—	180	20~25	10~15	15

芽胞の耐熱性と好熱細菌の耐熱性

地球上では、特に温泉などから好熱細菌と称せられる細菌群が発見されている。これらのうち特に有名なのは、アメリカ、Yellowstone の自噴泉から分離された *Thermus aquaticus* である。この細菌は無芽胞のグラム陰性桿菌で、至適発育温度 75℃ 前後、最低生育温度 40℃ である⁽²⁾。同じく Yellowstone の温泉で分離された *B. cardotoux* は芽胞をつくり、最高 85℃ まで生育可能である。また、大島ら⁽²⁾ により伊豆峰温泉から分離された *Flavobacterium thermophilum* HB 8 は無芽胞のグ

図 1 *B. subtilis* 芽胞の超薄切片像 (筆者原図)

バーの長さは $0.5\ \mu\text{m}$ を示す。

ラム陰性桿菌で、生育温度は最高 85°C 、最低 47°C 前後であり、 $60\sim 75^{\circ}\text{C}$ が至適温度である。これらの細菌は高い温度の環境においてのみ生育しうる仕組みを持っており、*F. thermophilum* HB8 の所有する glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase は 90°C 、15 分間の加熱に耐える性質をもっている。

芽胞の耐熱性と好熱細菌の耐熱性とは厳密に区別して考えねばならない。芽胞の場合は、芽胞にとって正常でない高熱という環境におかれても、自らの生命を維持するに必須の酵素その他の高分子物質を熱による傷害から防御しうる仕組みをたまたま備えていることであり、他方好熱細菌は高い温度の環境においてのみ、生命力を維持しうる仕組みになっているわけである。好熱細菌の場合、高熱な環境でのみ酵素その他は活性を示しうるのであって、中温菌の好む環境におかれれば、それらのものの活性は低下し、菌の増殖は停止する。

好熱細菌の生態から判明したことは、菌体外より加えられた温度はそのまま菌体内に伝えられ、高熱に対する防御装置は何もなく、またその必要もないということである。

あった。しからば、芽胞において、外部からの高熱に対しその生命力を維持するために、どのような機構で対応しているのであろうか、それには次の3点が考えられるのである。

- 1) 芽胞の形態の中に熱の侵透を防ぐ機構がある。
- 2) 芽胞の細胞質である core (図 1) が加熱の傷害に耐える物理化学的構造を有する。
- 3) 酵素タンパク質自体が加熱の傷害に耐える性質をもつ。

これらの諸点について、以下順を追って述べてゆこう。

芽胞の各構造と耐熱性との関係

芽胞は、exosporium (外被膜) のあるものと、ないものに大別される。exosporium のあるものとしては *B. cereus* や *B. anthracis* の芽胞が、またないものとしては *B. subtilis* や *B. megaterium* の芽胞が代表的である。exosporium が耐熱性に関係であることは、これら微生物の芽胞が一様に耐熱性のあることから明らかである。

1) Spore coat

図1に *B. subtilis* の芽胞の超薄切片像を示した。spore coat は外層と内層の2層からなり、内層はラメラ構造を示している。exosporium のあるものでは内、外層ともその厚さがうすい。spore coat の化学的組成は主としてタンパク質よりなり、その他、炭水化物や脂質も存在している。芽胞の乾燥重量の30~60%を占め、そのタンパク質量は芽胞のその40~80%を占める。

Spore coat の化学的組成を明らかにするため、芽胞を各種の蛋白分解酵素、表面活性剤、アルカリ、尿素などで処理することが行なわれている。芽胞の菌種のちがにより、得られた結果にも幾多の差異があるが、exosporium のない *B. subtilis* の芽胞の spore coat を sodium dodecylsulphate (SDS) や dithiothreitol によって処理すれば、その85%が可溶化される。抽出されたタンパク質はほとんど均一で、14,000の分子量をもち、N末端はセリンである⁽³⁾。他方、exosporium のある *B. cereus* の芽胞を dithioerythritol (DTE) で処理すれば電顕的に内層部分が消滅し、spore coat のもつタンパク質の82%が可溶化され、さらに SDS で処理すれば残りの coat タンパク質も可溶化され、電顕的に外層部分も消滅する。DTE で可溶化したタンパク質も SDS で可溶化されたものも同一であり、分子量12,000、N末端はグリシンであることが明らかにされた⁽⁴⁾。

これらのタンパク質はグリシンに富み、栄養細胞のタンパク質に比べ数倍のシスチンを含有する点など、多く

の共通性をもっている。しかしながら、これらの化学構造が熱の伝達を防ぐとは到底考えられない。すなわち、Aronson ら⁽⁵⁾は、*B. cereus* T の芽胞を pH 10.5 の DTE で処理しても（前述したように、この方法で内層が消滅し、spore coat のタンパク質の82%が可溶化される）、芽胞は耐熱性を保持し、放射線に対する抵抗性や屈折性を失わず、ジピコリン酸 (dipicolinic acid, DPA) や Ca を保持していることを明らかにしている。Spore coat 自身は酵素や消毒薬を含めた化学薬品には抵抗しえても、耐熱性を保持するには無関係であることは明らかである。さらに、このことを決定的にしたのは、spore coat の形成を阻害したり⁽⁶⁾、mutant で spore coat に欠陥のあるもの⁽⁷⁾などでも耐熱性を保持しうることが示されたからである。

2) Cortex

Coat と core にはさまれた cortex 部分は、電顕像（図1）で示される限りでは、比較的電子線をよく通過させ、特別な構造のないものである。Warth ら⁽⁸⁾によれば、*B. subtilis* の芽胞の cortex の化学組成は図2に示すようなペプチドグリカンであり、これは栄養細胞の cell wall のものときわめて類似している。しかし、多少の相違もみられ、まず第一に橋かけ結合がきわめて少ないことである。ムラミン酸残基の35%が1個のペプチドをもち、5個のペプチド毎に1個が橋かけ結合をしているので、ムラミン酸の約14残基に約1個のペプチドが橋かけ結合をしていることになる。また、cell wall にみと

図2 *B. subtilis* 芽胞より得られたペプチドグリカンの構成単位 (Warth⁽¹⁹⁾より)
%は単位のくり返しの頻度を示す。

められる teichoic acid も芽胞にはみとめられていない。

これらの構造は他の菌種、たとえば *B. cereus*, *B. megaterium*, *B. stearothermophilus*, *Clostridium sporogenes* (Warth ら⁽⁸⁾), や *B. sphaericus*⁽⁹⁾ の芽胞においても同様である。

この cortex の化学物質が芽胞の耐熱性と無関係であることは、一般細菌の cell wall の化学組成がきわめてよく似たペプチドグリカンであるにもかかわらず、まったく熱に対して抵抗性のないことから明らかである。

このほか、cortex に芽胞特有化学物質であるジピコリン酸 (DPA) の存在することが耐熱性に関係していると、一部の学者によって主張されたが、DPA の存在しない芽胞をつくる mutant が得られ^(10,11), この芽胞が耐熱性をもつことが示されたため、DPA が耐熱性と無関係であることが明らかになった。

Cortex そのものの存在しない芽胞が耐熱性をもたないことはすでに報告されている⁽¹²⁾。これは、cortex が熱伝達を防御する本体であるというより、むしろ cortex の形成されない状態では芽胞本来の core が形成されず、また cortex の存在しない状態では本来の core の状態を維持できないことを意味するものである。このことについては後述する。

3) Core

Core は芽胞の発芽後、発芽後成育 (outgrowth) 期を経て、栄養細胞に成長する部分である。この部分に芽胞の生命を左右する重要な各種酵素をはじめとする高分子物質の存在することは明らかであり、芽胞の耐熱性の機構はこの部分のこれら重要物質の加熱による変性を、いかに防ぐかにあると言って過言ではない。したがって、core の物理化学的状态が芽胞の耐熱性と深い関係を有することになる。これは次に項をあらためて述べよう。

Core の物理化学的状态と耐熱性

芽胞が脱水状態にあることが耐熱性の本態であるという考えは古くからあった。ただし、最近の研究⁽¹³⁾には芽胞は必ずしも脱水状態でないことが示されている。しかし、この研究は芽胞全体を対象としての結果であり、core のみ、あるいは芽胞の生命を維持するに必須の高分子物質の存在場所のみが、部分的に脱水状態にあるか

図3 *B. subtilis* 芽胞の無細胞抽出液およびその凍結乾燥物中の glucose dehydrogenase の熱感受性 (小塚、未発表)。

もしれないのである。

いずれにしても、乾燥まではゆかないまでも自由水の少ない状態にあるタンパク質は熱変性にきわめて抵抗性のあることは事実である。図3は、*B. subtilis* の芽胞を音波で破碎して得られた無細胞抽出液を凍結乾燥し、それに少量の水を加えた場合の glucose dehydrogenase (以後 GDH と略す)の加熱に対する抵抗性を示したものである。これによれば、無細胞抽出液中の GDH は 40°C、30 分間の加熱で完全に活性を失うが、それをアンプル中で凍結乾燥したのち、再びアンプルの封を切って空気にさらした状態で、所定の温度で 30 分間加熱し、加熱後磷酸緩衝液で溶解し、活性を測定すれば、90°C、30 分間の加熱で約 75%、80°C、30 分間加熱では 85% の活性を保持しえた。また、封を切ったアンプルに水を 5 μ l 添加したのち加熱したもので、90°C、30 分間加熱で約 18%、80°C、30 分間加熱で約 75% の活性を保持しうることを示し、水を 10 μ l 添加したものでは 70°C、30 分間の加熱で 100% 活性を保持しうるのである。

これらの成績からも想像されるように、脱水状態の酵素タンパク質は加熱による変性には著しい抵抗性を示しうる。もし芽胞の core が脱水状態であれば、芽胞の耐熱性の機構はそれで説明しうることになる。このことは、Murrell ら⁽¹⁴⁾が芽胞の環境の relative humidity を減少させることにより、加熱に対する抵抗性の低い菌種の芽胞の耐熱性を高めうることを示したことでも納得されるのである。

Core を脱水状態にし、またその状態を維持しうる機構については、いくつかの有力な仮説が提唱されてい

る。

① Contractile cortex theory

Lewis ら⁽¹⁵⁾によって提唱された仮説である。彼らはまず芽胞の形態について、将来栄養細胞となる core は芽胞の直径の約 1/2 に圧縮されており、しかも芽胞の直径の約 1/4 の厚さをもった cortex によってとりかまれている事実に着目した。さらに、芽胞自身の core の含水量は減少しており、それが耐熱性の本態をなしていると考えた。core の低含水量は機械的な圧力によって維持されており、それは cortex が形成されるとき、cortex が収縮し、そのため水を含んだ大きな形であった core が含水量の少ない core に変化し、そのままの形で維持されているのであると説明している。

肝腎な cortex の収縮はいかにしておこるのか？ 彼らは、合成されたポリマーにおいて、化学的ポテンシャルが機械的ポテンシャルに可逆的に変換するという Kuhn ら⁽¹⁶⁾の研究からヒントを得て、芽胞形成の末期に未成熟の cortex をとりまく膜を通過して Ca^{2+} や他の 2 価陽イオンが入ってくるため、cortex 内、外のこれら陽イオンの濃度が変化し、そのため化学ポテンシャルが徐々に変化して cortex の収縮がおこると説明した。

Spore coat の表面には溝状のひっこみがあり、それに対し山状の稜線ができていたが（図 1 の芽胞の横断面）、これは cortex が収縮したため生じた空間をうめるためにできた凹凸であるとしている。

Cortex の化学構造はペプチドグリカンが主成分であり、この化学構造はつよく親水性であり、カルボキシル基が反対イオンに対して中和の機会を多く提供している。このことは、この構造が収縮したり、また膨張したりしうることを示唆していることでもある。

Cortex が収縮することにより core に脱水がおこり、core の脱水状態がそのまま維持されることが芽胞に耐熱性をあたえる本態であるというわけである。

② Expanded osmoregulatory cortex theory

Gould ら⁽¹⁷⁾は、①の仮説に対し、反対の内容をもつ仮説を提唱した。cortex は収縮よりむしろ拡張しているという考えを最初に唱えたのは Alderton ら⁽¹⁸⁾であったが、Gould らはこの仮説を多くの事実によって発展させた。彼らによれば、この仮説を支持する事実として、(イ) 芽胞におけるペプチドグリカン量は栄養細胞のそれと比べて多くない；にもかかわらず、(ロ) 芽胞内で

a) Heat resistant form b) Heat sensitive form

図 4 Osmoregulatory expanded cortex の模式図 (Gould ら⁽¹⁷⁾より)

- A: 多価陽イオンに不透透性の coat.
- B: 陰性荷電のペプチドグリカンと移動性 1 価反対イオンよりなる cortex. 高い浸透圧を示す.
- C: 浸透圧的に脱水した core. したがって耐熱性.
- D: 変化した coat, 多価陽イオン通過性.
- E: 中性化した cortex. cortex は瓦解し、1 価反対イオンはなくなる.
- F: 再び含水量の増した core. したがって易熱性.

cortex の占める広さは芽胞の 30~60% の広さであり、cell wall が栄養細胞で占める広さは問題にならないほど狭いこと；などをあげている。すなわち、①の仮説が正しいとすれば、芽胞においては広い cortex 空間にきわめて多量のペプチドグリカンが収縮して存在しなければならないことになる。しかるに、事実は栄養細胞に比量的に少ないペプチドグリカンが広い空間を占める結果になっている。したがって、①の仮説は事実と反するとした。

そこで彼らは、図 4 に示したように、cortex においてはペプチドグリカンがゆるく橋かけ結合し、陰性に荷電したグルーブの相接近したものの斥力により拡張した状態にあるという仮説を出したのである。

陰性に荷電したペプチドグリカンが拡張した状態にあるためには、cortex の中に多量の多価イオンの存在しないことが必須条件である。換言すれば、多量の多価陽イオンをあたえれば cortex の収縮がおこり、耐熱性が失われるはずである。そこで彼らは、spore coat の透過性をたかめる処理をまず芽胞に加えたのち、芽胞に CaCl_2 を作用させたところ、その耐熱性の失われたことを実証したのである。

Cortex にはアミノ基よりも多くのカルボキシル基が存在するペプチドグリカンがあり、陰性に荷電している。その電気的中性を保つには、図 4 で示したようにかなりの移動性の 1 価陽イオンが存在しなくてはならない。ポリマーに移動性の反対イオンが加われば、浸透圧的に活

図 5 *B. subtilis* の芽胞形成順序の模式図

第 I 期：軸状染色体期，第 II 期：forespore 分割期，第 III 期：芽胞 protoplast 形成期，第 IV 期：cortex 形成期，第 V 期：spore coat 形成期，第 VI 期：成熟期，第 VII 期：芽胞遊離期

性となる。たとえば、分子量 20,000 dalton の高分子が 30% 存在するゲル状のもので cortex ができており、その高分子が 1,000 dalton あたり 3 個のカルボキシル基をもっていたとすれば、その浸透圧は 30 atm 以上となり、これだけの浸透圧によれば core から脱水がおり、core の中には低分子の可溶性のものはほとんど存在できなくなると彼らは解説した。

さらに彼らは、もし耐熱性の本態がこのようにして生じた core の脱水状態にあり、この脱水状態はこれととりまく cortex の浸透圧によるのであるとするならば、この浸透圧をかえなければ耐熱性に変化がおこらないはずであると考え、実験を行なった。すなわち、芽胞に対し先述と同様、spore coat の透過性をよくするための処理をしたのち、先の実験で耐熱性を失わせた CaCl_2 に今回は sucrose とを混合したものの中で加熱した。その結果、 CaCl_2 単独の場合とは異なり、芽胞は耐熱性を保持しえたのであった。

③ Anisotropic swollen cortex theory

この仮説は Warth⁽¹⁹⁾ によって提唱された。彼は mutant で spore coat のない芽胞の電顕像⁽⁵⁾において、cortex は外部へ向けて膨化する傾向をみせていないにもかかわらず、core は濃縮された像を示し、その cortex が十分に光屈折性を示した事実は、cortex が拡張するための圧力をうるために強い spore coat の存在を必要とする expanded cortex theory では説明できない現象であると考えた。また、芽胞形成の経過を眺めると、図 5 に示したように、cortex の形成された第 IV 期において、coat は存在しないにもかかわらず、芽胞の細胞質は約 50% も小さくなっている事実にも注目した。

Cortex は、図 5 に示したように栄養細胞の細胞質膜が反転してできた forespore の外側の膜により合成される。その際、cortex のペプチドグリカンの形成は cell wall のそれと同じように、まずペプチド側鎖とそのペプチドの橋かけ結合を十分行なうことから開始される。しかし、cortex のペプチドグリカンでは図 2 に示したような割合の各単位をつくらねばならず、そのためには水解やら transamidation などによってペプチドの橋かけ結合をのぞかなくてはならない。多くの結合がとりのぞかれることは、その構造の膨張をまねくことになる。もし、長いグリカン鎖が表面に平行して位置しておれば、膨張圧は直角に働き、形が球状であれば外部へよりはむしろ内部へ向かって作用する。すなわち、coat の存在には無関係に膨張圧が内部へ向かうことになるわけである。

Cortex が形成されると時を同じくして Ca-DPA が合成され、core にとりこまれ、DPA が水のかなりの量にとって代り、core の含水量を減少させる。この脱水状態によって耐熱性をあたえると説明しているのである。

以上述べた 3 つの仮説は、cortex の形成に伴って未完成の core が影響をうけ、脱水状態の core がいかにして完成し、同時にその状態を維持しうるかについての機構を説明したものであった。では、完成した core はただ脱水した状態のみであるのか？ core 自身の物理化学的構造と、それを基礎にして耐熱性の機構を説明しようとする仮説が提唱されている。

④ core のジビコリン酸 (DPA) キレート物説

従来から、芽胞の core はキレート物で固められた細胞質により構成されているという説があった。すなわち、core 中のリガンドと金属イオンが二重、三重の

キレート物をつくり、これが防衛的膠質物をなしているという考えであり、さらに説明すれば、core 内の分子で荷電した極性グループは膠質物内の反対に荷電した極性グループと結合し、それにより静電的に荷電の低い、化学的に反応性のよい、しかも吸湿性の少ない構造をつくるわけである⁽²⁰⁾。

Core 内に多く存在するものでキレート作用を示す物質は DPA である。栄養細胞にはなく芽胞にのみ存在する DPA は、芽胞の菌種によって異なるものの乾燥重量にして 5~10% を占め、もし core にのみ存在するとすればおそらく 20~30% を占めることになる。

Grecz ら⁽²¹⁾は、1:1 また 1:2 のモル比で Ca^{2+} と DPA を結合させたキレート物をつくり、このものの安定性におよぼす温度と pH の影響を調べた。彼らの実験では、pH 2 とか 10.5 という環境では、Ca-DPA キレート物の解離と芽胞の死滅との間に相関関係があり、これらの pH での芽胞の耐熱性の喪失は Ca と DPA の解離が主原因であることが示された。他方、pH 7 では Ca-DPA キレート物は安定であり、芽胞の死滅温度の加熱でも安定であった。にもかかわらず、現実には死滅温度の加熱で Ca-DPA が芽胞外へ出てくる事実、芽胞内のアミノ酸、ペプチド、DPA が Ca-DPA とかるく結合しており、これが加熱により解離し、出てくるのであると彼らは想像した。

要するに、Ca-DPA キレート物と core 内のアミノ酸、ペプチド、さらに第 2 の DPA などと結合することにより、生命保持に大切な高分子物質を補強し、この結合がこわれると芽胞が耐熱性を失うという仮説を提唱しているわけである。

⑤ 不溶性耐熱性ゲル説

Black ら⁽²²⁾の仮説である。core 内の高分子どうしが橋かけ結合をすることによりゲルが形成され、このようにしてできた high-polymer matrix は不溶性で耐熱性をもち、内部の溶質を不動化し、自由水をとじこめてしまおうと想像した。この仮説の基礎になったものは、SH を結合させたゼラチンの合成二硫化誘導体にみられる不溶性ゲルとその可逆的熱安定性にある。SH を結合させたゼラチンは容易に可溶化したり、また水素結合の関与した熱可逆性のゲルをつくるのである。

この考えによれば、SH グループは芽胞内のタンパク質に結合し、他の SH グループは別の高分子や金属イオ

ンなどと結合しており、このゲルは酸化によって容易に S-S 結合して熱安定性の不溶性ゲルとなりうるというのである。

⑥ 熱安定性酵素説

芽胞が高温の加熱にさらされることは、芽胞にとってはあくまで異常なことである。この異常な高温加熱に耐えて生命を維持できたことは、生命維持に必須な芽胞酵素が core の中で不活化されなかったことを意味している。これまでの仮説は、芽胞の細胞質である core がどのような状態にあれば、その中の酵素が加熱の傷害から防御されうるかを説明したものであった。

高温加熱という異常な条件を前提に考えれば、芽胞内の酵素は次に示す 3 種類に分類されるであろう⁽²³⁾。

(i) ある範囲内の温度の加熱には酵素自身が耐熱性をもつ酵素類

(ii) ある範囲内の温度の加熱には酵素がサブユニットになるとか、あるいは凝集などにより加熱に耐えうる酵素類

(iii) 栄養細胞の酵素と同様、耐熱性のない酵素類

芽胞の中に数多くの酵素類が存在することはよく知られている⁽²⁴⁾。(i)のカテゴリーに属するものとして、かつて Murrell⁽²⁵⁾ や Stewart ら⁽²⁶⁾が、破碎した芽胞の粒子部分と芽胞の酵素を一緒にすれば酵素の耐熱性がより増加することを示したが、これは夾雑物の存在が熱伝達を阻害する現象と思われ、芽胞の酵素の本質にかかわるものではないと思われる。しかし、Tochikubo ら⁽²⁷⁾は *B. subtilis* の芽胞の NADH oxidase の部分精製されたものが 100℃ の加熱に対しその活性をほとんど保持することを示した。これは、明らかに酵素そのものが耐熱性を有する例である。

(ii)のカテゴリーに属する例としては、芽胞が発芽後に重要な役割を果たす GDH であろう。Sadoff ら⁽²⁸⁾は、*B. cereus* の芽胞からえられた GDH は pH 6.5 でもっとも安定性があり、pH を 7.5 から 6.5 に下げることによりダイマーからモノマーにかわり、耐熱性が 260 倍に上昇し、もし NaCl を加えるとさらに耐熱性を上昇させることを明らかにした。また、Hachisuka ら⁽²⁹⁾は、*B. subtilis* の芽胞の無細胞抽出液には GDH の著明な活性がみられるのに対し、この芽胞を 80℃、30 分間加熱したのち同じく無細胞抽出液を調製して調べると、GDH の活性は完全に失われているが、この活性のな

い無細胞抽出液に EDTA とか DPA を作用させると再び活性の回復する事実を明らかにした。しかも、この不活性酵素の分子量は活性型の約 1/2 である。しかし、この現象は同じく芽胞の無細胞抽出液中にある glucose-6-phosphate dehydrogenase にはみられないことも明らかとなった⁽³⁰⁾。

(iii) のカテゴリーに属する酵素類については、Fala-shi ら⁽³¹⁾は *B. subtilis* の deoxyribonucleic acid polymerase について、Gardner ら⁽³²⁾は *B. cereus* var. *terminalis* の purine nucleoside phosphorylase について、また Tono ら⁽³³⁾は *B. subtilis* の inorganic pyrophosphatase について、それぞれ栄養細胞のものと芽胞のものを比較したが、両者の物理・化学的性状がほとんど同一であることを示した。

以上のように、芽胞の酵素の数種類においてすらその性質は多彩であり、芽胞の生命維持に必須と思われる酵素類すべてが加熱に耐えうる機構をそなえているとは限らないことが明らかである。芽胞内に存在する易熱性の酵素タンパク質を加熱による熱変性から防御するためには、何らかの防御機構が必要である。

ま と め

前述した通り、芽胞に耐熱性のあることは芽胞内の主要な酵素そのもの、あるいは酵素の存在する core が、熱による傷害に耐えうる機構をそなえていることにほかならない。酵素そのものの耐熱性は一部のものに認められるにすぎないので、core の耐熱性の機構のみが問題である。

Core が脱水状態にあれば加熱によるタンパク質変性に耐えうる ところから、core の脱水状態が成立するための仮説がいくつか提唱された。しかし、それらには実証されねばならない問題点が多く残っている。contractile cortex theory においては、cortex の収縮のためにそこに多価陽イオンが多量存在しなくてはならない。提唱者の Lewis によれば、 Ca^{2+} を主にした多価陽イオンが未完成の cortex に集中することになっているが、最近の研究⁽³⁴⁾によれば、 Ca^{2+} の存在場所として core を想像している。また、cortex の収縮により core が脱水した際、はたして水は cortex を通過しうるかという疑問が残る。

Expanded osmoregulatory cortex theory においても、

spore coat の存在しない芽胞の耐熱性をどのように説明したらよいのか明らかでない。spore coat の存在なしには cortex は拡張しえても core を圧縮しえないからである。

Anisotropic swollen cortex theory においても、cell wall のペプチドグリカンから cortex のそれにかわるための酵素の実証、また DPA の形成に伴い、それが水にかわることの証明も必要である。

Cortex の形成に伴う core の脱水を論じた以上の仮説のほか、core の構造が Ca-DPA キレート物を中心にした膠質物によって安定性ゲルであるという core の物理化学的性状についての仮説、さらに一部の芽胞酵素そのものが耐熱性であるという事実を含め、いずれの一つをとっても、そのみで完全に芽胞の耐熱性の本態を説明しつくせるものはない。

恐らく、これらの仮説に含まれる種々の機構が複雑にからみあって芽胞の耐熱性を支えていると想像される。

本論文の作成にあたり、本学部第1生化学、田中亮教授に種種御教示をたまわったことを付記し、感謝の意を表する。

文 献

- 1) G. Sykes : in "Methods in Microbiology", Vol.1, ed. by J. R. Norris and D. W. Ribbons, Academic Press, 1961, p. 84.
- 2) 大島泰郎 : 蛋白質 核酸 酵素, 別冊, 164 (1972).
- 3) T. Mitani & H. Kadota : *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 22, 51 (1976).
- 4) A. I. Aronson & D. Horn : in "Spores V" ed. by H. O. Halvorson, R. Hanson and L. L. Campbell, Amer. Soc. Microbiol., 1972, p. 19.
- 5) A. I. Aronson & P. C. Fitz-James : *J. Bacteriol.*, 108, 571 (1971).
- 6) P. C. Fitz-James : in "The Bacterial Spore", ed. by G. W. Gould and A. Hurst, Academic Press, 1969, p. 39.
- 7) A. I. Aronson & P. C. Fitz-James : *J. Bacteriol.*, 123, 354 (1975).
- 8) A. D. Warth & J. L. Strominger : *Biochemistry, New York*, 11, 1389 (1972).
- 9) D. J. Tipper & J. J. Gauthier : in "Spores V", ed. by H. O. Halvorson, R. Hanson and L. L. Campbell, Amer. Soc. Microbiol., 1972, p. 3.
- 10) M. Curry, T. Patt & R. S. Hanson : *Bacteriol. Proc.*, G 240 (1971).
- 11) R. S. Hanson, M. V. Curry, J. V. Garner & H. O. Halvorson : *Can. J. Microbiol.*, 18, 1139 (1972).
- 12) J. C. Lewis : in "The Bacterial Spore", ed. by G. W. Gould and A. Hurst, Academic Press, 1969, p. 345.
- 13) B. J. Marshall & W. Murrell : *J. Appl. Bacteriol.*, 33, 103 (1970).
- 14) W. G. Murrell & W. J. Scott : *J. Gen. Microbiol.*, 43, 411 (1966).

- 15) J. C. Lewis, N. S. Snell & H. K. Burr : *Science*, 132, 544 (1960).
- 16) W. Kuhn, A. Rameiz & D. H. Walters : Proc. 4th Intern. Cong. Biochemistry, Vol 9, ed. by Hoffman-Ostenhoff, Pergamon, 1959.
- 17) G. W. Gould & G. J. Dring : *Nature*, 258, 402 (1975).
- 18) G. Alderton & N. S. Snell : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 10, 139 (1963).
- 19) A. D. Warth : in "Advances in Microbial Physiology", Vol. 17, ed by A. H. Rose and J. G. Norris, Academic Press, 1978, p. 1.
- 20) P. Gerhardt & W. G. Murrell : *Spore News Letter*, Vol 6, 1 (1978).
- 21) N. Grecz, T. Tang & K. S. Rajan : in "Spores V", ed. by H. O. Halvorson, R. Hanson and L. L. Campbell, Amer. Soc. Microbiol., 1972, p. 53.
- 22) S. H. Black & P. Gerhardt : *J. Bacteriol.*, 83, 960 (1962).
- 23) 蜂須賀養悦 : 日本細菌誌, 27, 697 (1972).
- 24) 蜂須賀養悦, 堀越弘毅 (編) : "耐久型細胞", 岩波書店, 1976, p. 198.
- 25) W. G. Murrell : "The Bacterial Endospore", Univ. of Sydney, 1954, p. 1.
- 26) B. T. Stewart & H. O. Halvorson : *J. Bacteriol.*, 65, 160 (1953).
- 27) K. Tochikubo, Y. Yasuda & Y. Hachisuka : in "Spores VII", ed. by G. Chambliss and J. C. Vary, Amer. Soc. Microbiol., 1978, p. 70.
- 28) H. L. Sadoff, J. A. Bach & J. W. Kools : in "Spores III", ed. by L. L. Campbell and H. O. Halvorson, Amer. Soc. Microbiol., 1965, p. 97.
- 29) Y. Hachisuka & K. Tochikubo : *J. Bacteriol.*, 107, 442 (1971).
- 30) T. Tanahashi, K. Tochikubo & Y. Hachisuka : *Japan J. Microbiol.*, 20, 281 (1976).
- 31) A. Falashi & A. Kornberg : *J. Biol. Chem.*, 241, 1478 (1966).
- 32) R. Gardner & A. Kornberg : *J. Biol. Chem.*, 242, 2383 (1967).
- 33) H. Tono & A. Kornberg : *J. Biol. Chem.*, 242, 2375 (1967).
- 34) T. Nishihara, T. Ichikawa & M. Kondo : *Microbiol. Immunol.*, 24(6), 495 (1980).

プロフィール

岩永 勝 (Masaru Iwanaga) 昭和26年8月8日生<略歴>1974年大阪府立大学農学部園芸農学科卒業/1977年京都大学大学院農学研究科修士課程修了/1976~1979年米国ウィスコンシン大学大学院に留学, 遺伝育種学にてPh.D取得後, 国際バレイショセンターに勤務, 現在にいたる<研究テーマと抱負>細胞遺伝学を品種改良に応用すること, 現在は半数体と非還元配偶子を用いたバレイショの育種<趣味>テニス

岩元 睦夫 (Mutsuo Iwamoto) Vol. 18, No. 6, p. 391 参照

上平 恒 (Hisashi Uedaira) 昭和2年8月29日生<略歴>1950年東京工業大学理学系化学コース卒業/同大学大学院修了後, 繊維工業試験所(現繊維高分子材料研究所)勤務, 現在にいたる<研究テーマと抱負>有機電解質溶液の動的構造と生体系の水の構造に興味を持っています<趣味>読書, 音楽鑑賞

梅田 圭司 (Keiji Umeda) Vol. 12, No. 8, p. 531 参照

小笠原長宏 (Nagahiro Ogasawara) 大正13年10月23日生<略歴>昭和22年東京帝国大学農学部農芸化学科卒業/同大学院(旧制)修了後, 昭和30年新潟大学農学部助教授/40年同教授, 現在にいたる<研究テーマと抱負>微生物の生理活性二次代謝産物, 糸状菌の薬剤感受性, 糸状菌のガス状炭化水素の代謝<趣味>運動(身体を動かすこと), 美術鑑賞

佐藤 一精 (Kazuyoshi Sato) 昭和15年9月20日生<略歴>昭和44年京都大

学大学院工学研究科博士課程修了/48年名古屋大学農学部助手, 現在にいたる. この間, 46~48年米国ブランダイス大学留学<研究テーマと抱負>微生物の代謝生理, テトラピロール系化合物の生合成機構とその代謝的役割

木村 修一 (Shuichi Kimura) Vol. 12, No. 8, p. 531 参照

小枝 武美 (Takemi Koeda) 大正11年3月10日生<略歴>昭和20年東北大学理学部生物学科卒業/同年宮城県地方教員, 文部教員/25年東北大学医学部専攻生(薬理学)/31年同大学助手, 同講師/37年同学部退官, 明治製菓(株)中央研究所勤務/55年同社退職, 神戸女子薬科大学教授, 現在にいたる<趣味>東洋医学(鍼灸の薬理学)研究

高桑 進 (Susumu Takakuwa) 昭和23年3月18日生<略歴>1970年富山大学文理学部理学科卒業/同年名古屋大学大学院理学研究科修士課程入学/1975年同大学大学院博士課程満了/1976~1977年日本学術振興会奨励研究員/1980年米国ミズリー・コロンビア大学生化教室留学, 現在にいたる. 理博<研究テーマと抱負>①光合成細菌 *Rhodospirillum rubrum* における水素代謝調節機構の遺伝的解析, ②光合成細菌および化学合成細菌の代謝調節機構の分子生物学的アプローチ, ③化学合成細菌の進化的位置付け<趣味>溪流魚を釣り, 親しき友とワインを飲んで語り合うこと. 山歩きとサイクリング

武田 植人 (Ueto Takeda) 昭和10年3月17日生<略歴>昭和35年東京大学

農学部獣医学科卒業/以後, 明治製菓(株)勤務, 川崎工場薬品開発部, 本社薬品開発部を経て, 現在中央研究所薬理部にて主に医薬品の開発, 毒性薬理検討に従事<研究テーマと抱負>ヒト臨床にシミュレートさせた臨床薬理学, その他医薬, 農業などの安全性評価技術の開発<趣味>ジョギング, サッカー, バレー, 水泳などのスポーツ, 英, 独, 仏, 露, 西, 伊など17カ国語の読書

辻村 克良 (Katsura Tsujimura) 大正3年8月14日生<略歴>昭和13年東京帝国大学農学部農芸化学科卒業/27年同大学助教授/37年東北大学教授/53年同大学退官, 現在にいたる. この間, 53~55年国際協力事業団派遣専門家としてインドネシア国ボゴール農科大学に勤務. 52年日本農芸化学会鈴木賞授与

中山 夏樹 (Natsuki Nakayama) 昭和26年11月21日生<略歴>1975年名古屋大学農学部農芸化学科卒業/同年同大学大学院農学研究科入学/1980年同課程満了/同年日本学術振興会奨励研究員, 現在にいたる. 農博<研究テーマと抱負>高等植物におけるミトコンドリアの形成と分解の生化学的機構. 特に, 種子発芽の系を用いてミトコンドリア内膜酵素の合成・分解機構を研究しています. 現在は, コハク酸脱水素酵素に着目して研究を進めています, ミトコンドリアの他の酵素や, 他のオルガネラの環境変化による形成・分解にも興味をもっています<趣味>野鳥や高山植物の写真撮影(プロ級), 世界のめずらしい笛の収集および演奏, 草野球, 登山など