

令和元年6月11日現在

機関番号：34417

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K18255

研究課題名(和文)細菌芽胞の圧力殺菌機構解明に向けた高圧NMRによる分子論的アプローチ

研究課題名(英文) A molecular approach by high pressure NMR for elucidation of the pressure sterilization mechanism of a bacterial spore

研究代表者

前野 寛大 (MAENO, Akihiro)

関西医科大学・医学部・助教

研究者番号：70570951

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、近年、現象論的に高い殺菌効率が認められた圧力前処理と熱処理を組み合わせた細菌芽胞不活性化法において、その分子機構の一端を明らかにすることである。*Bacillus subtilis natto*由来の芽胞を標的に、高圧NMR法による分子論的アプローチ、位相差顕微鏡または走査型電子顕微鏡を用いた形態学的アプローチを行い、芽胞に対する加圧効果と加熱効果を完全に分離した上で、不活性化に至る過程を分子レベル、且つリアルタイムに観測できる新規方法論を確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、これまでは単なる現象として捉えられてきた芽胞殺菌に対する物理処理の効果が初めて分子論的に検証され、その殺菌過程における分子機構の一端が明らかとなった。極めて複雑な分子集合体である芽胞の殺菌機序の理解は、生命科学、食品科学、医学など多岐の分野において学術的に有益な知見を生み出すだろう。同時にそれらが今後、食品加工分野における多様な性状の食材に対応した非加熱あるいは低温・低圧殺菌法の開発や、近年の医療分野で問題視されている集団感染を誘起する感染症原因菌芽胞の特異的なストレス耐性に対するオーダーメイド殺菌技術開発などに幅広く応用されていくことが見込まれ、その社会的意義は大きいだろう。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this research is to partially elucidate the molecular mechanism of the inactivation method of bacterial spores on the combination of pre-pressurization and heating, whose high efficiency of sterilization was phenomenologically recognized in recent years.

Against the spores originated from *Bacillus subtilis natto*, a molecular approach using high pressure NMR and a morphological approach using phase contrast microscopy or scanning electron microscopy (SEM) were mainly carried on. As the result, we succeeded to establish a novel methodology which enables the real-time observation under molecular level of an inactivation process of spores with keeping a pressure effect and a heat effect completely separated.

研究分野：高圧生物科学，応用微生物学，生物物理化学

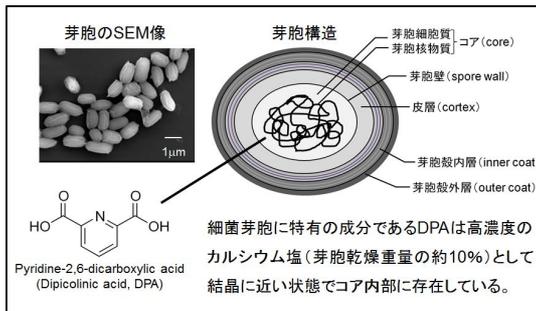
キーワード：細菌芽胞 圧力殺菌 芽胞損傷 高圧NMR

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

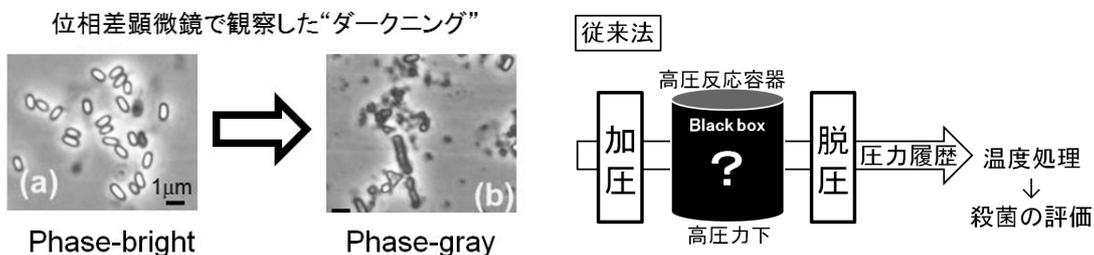
1. 研究開始当初の背景

(1) 一部の細菌は生育環境が悪化すると、極限まで代謝を抑えると同時に強固な外殻構造を有する芽胞(孢子、スポア)を形成して休眠し、圧力、熱、放射線などの物理的処理あるいは薬剤などの化学的処理に対して極めて強い抵抗性を示すことが知られている。これらはしばしば加工食品の製造過程、医薬品の原材料および製剤過程における重篤な細菌汚染および感染症を生じる原因となる。芽胞を形成する細菌(芽胞形成細菌)の代表例としてバチラス属(*Bacillus*)やクロストリジウム属(*Clostridium*)が知られており、いずれも極めて抵抗性の高い芽胞を形成するが、中でもボツリヌス菌(*C. botulinum*)、ウエルシュ菌(*C. perfringens*)、セレウス菌(*B. cereus*)などは芽胞から再度発芽した栄養細胞が毒素を生産することで食中毒の原因となる。そのため、これらの芽胞を微生物学的に制御することは、食品業界のみならず、医薬、医療など幅広い分野における重要な課題として対応策が練られているが、汎用性と効率を兼ね備えた殺菌法は未だ確立されていない。細菌芽胞は栄養細胞から芽胞を形成する過程で、栄養細胞から不等分裂したコア領域(core)を包含する多層構造を構築する(下図)。

細菌芽胞のモデルとして用いられる *B. subtilis* の芽胞構造は主に、コア領域を覆うように形成されたペプチドグリカンおよび脂質に富む皮層(cortex)と、多様なタンパク質複合体が複雑に凝集化した最外部の芽胞殻(inner coat, outer coat)とで構成されているが、もう一つの特徴はコア領域に存在する芽胞特有の成分ジピコリン酸(DPA)にある[Driks A., Microbiol. And Mol. Biol. Rev., 63(1):1-20 (1999)]。DPAは芽胞形成過程において生合成されるが、その濃度は芽胞乾燥重量の約10%と異常に高く、実際はカルシウム塩の半結晶状態として芽胞芯部に含まれている。これまでに芽胞表層タンパク質の同定や構造とストレス抵抗性の相関について多くの研究が為されているものの、DPAを始めとする芽胞関連分子の役割と芽胞殺菌の関係性については良く分かっていない[関口, 生物工学会誌, 91(2):50-72 (2013)]。



(2) 芽胞殺菌に関して、湿熱滅菌(オートクレーブ)により 121℃, 30分 で一般的な芽胞は死滅することが知られているが、この方法では、例えば食品分野で重要視される“食材の性状を損なわずに”効率的な殺菌を行いたいというニーズに応えることはできない。そこで、熱処理に代わる新しい芽胞殺菌法として近年注目されているのが、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。特に、前処理として比較的低い圧力(2,000気圧程度)を印加しておく、脱圧後の中温域(<100℃)での加熱処理によって効率的な芽胞殺菌が行えるという報告がなされた[Park SH et al., Lwt-Food Sci Technol., 57:243-252 (2014), 荻野ら, 高圧力の科学と技術, 25(4):334-342 (2015)]。さらに、加圧処理後に観測される現象として、ジピコリン酸(DPA)の芽胞外部への漏出、芽胞内部への浸水を示唆する湿潤密度(buoyant density)の低下[荻野ら, 高圧力の科学と技術, 25(4):334-342 (2015)]、そして“ダークニング”と呼ばれる位相差顕微鏡上で特異的に観察される芽胞の形態学的変化(下図左参照)が報告されている。これらはいずれも、前処理として印加した圧力の「履歴」として芽胞に与えられた物理的あるいは物理化学的な損傷によって生じる現象として捉えられているが[Reineke K et al., Int. J. of Food Microbiol. (2013)]、現段階では“圧力履歴”における分子機構は殆どわかっていない(下図右参照)。



2. 研究の目的

既述の通り、芽胞形成菌と呼ばれる一部の細菌は、増殖に不適当な環境下で強い抵抗性を示す芽胞を形成する。これらはしばしば加工食品の製造過程、医薬品の原材料および製剤過程における細菌汚染および重篤な食中毒や感染症などを生じる原因となるが、芽胞を微生物学的に制御するための方法は長い間確立されていなかった。これに対し、近年、中程度の圧力と温度を組み合わせた方法に高い殺菌効果が認められ、同時に、圧力殺菌後の芽胞から内在性成分であるDPAの外部への漏出、芽胞内部への浸水が現象論的に示された。

そこで代表者は“圧力履歴”として扱われているこれら諸現象について、高圧NMRを用いた

分子論的アプローチ、位相差または走査型電子顕微鏡を用いた形態学的アプローチからの詳細な解析を行い、芽胞殺菌過程における分子機構の一端を探ることを本研究の目的とした。

3. 研究の方法

前処理として圧力を印加することで、脱圧後の加熱処理により高い芽胞殺菌効果が得られるが、その殺菌プロセスにおける分子機構は殆ど明らかになっていない。そこで、芽胞殺菌における分子機構の一端を解明すべく、芽胞における圧力と温度の効果について、主に高分解能 NMR を利用した以下の 3 点に注力して研究を遂行した。

- (1) 芽胞に対する圧力（高圧 NMR）と温度（常圧 NMR）の効果を NMR スペクトル上で分離したうえでそれぞれ解析を行う
- (2) (1) の処理に伴い芽胞外部へ漏出する内在性成分を NMR スペクトル/NMR データベースから同定する
- (3) 圧力、温度などの物理的処理に伴う芽胞構造の詳細な損傷度（ダークニングの進行度を含む）を位相差および走査型電子顕微鏡により形態学的に分析する

上記(1)～(3)に係る方法の詳細を以下に記した。

【 ^{13}C 安定同位体標識した *B. subtilis* 芽胞の大量培養および精製法の確立】: 代表者はこれまでに *B. subtilis natto* (納豆菌) の芽胞をモデル系として、1L あたり $1.5 - 2.0 \times 10^{10}$ cfu/mL (cfu: colony forming unit) の収量が見込める大量培養及び精製法のプロトコルを確立している。本研究では、予備実験で用いた芽胞形成に特化した DSM 培地 (Difco Sporulation Medium [Nicholson W. & Setlow P., Molecular Biological Methods for Bacillus, 391-450 (1990)]) を ^{13}C -グルコースを炭素源とする M9 培地へと変更し、 ^{13}C 安定同位体標識された納豆菌芽胞の大量培養を試みる。仮に ^{13}C 標識芽胞の収量が不十分であったり、現行の精製プロトコルに問題が生じた場合には、予備実験で調製した安定同位体非標識の芽胞懸濁液を用いた ^1H NMR 測定を中心に計画を前倒しで進め、並行して ^{13}C 標識芽胞の大量培養・精製条件の検討および最適化を図る。

【高圧 NMR を用いた細菌芽胞に対する圧力効果の解析】: 耐圧 NMR セルの加圧限界である 2,000 気圧までの範囲で、 ^1H , ^{13}C 一次元および $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ 二次元 NMR スペクトル (HSQC 等) の取得を試みる。細菌芽胞の NMR 信号を加圧下で直接観測することにより、これまでブラックボックスとされていた“圧力履歴”の実体を世界で初めて分析する。具体的には、どのような種類の低分子化合物 (DPA, アミノ酸など) や生体高分子 (糖、脂質、タンパク質など) が、どの圧力段階で漏出するのかを一次元あるいは二次元 NMR を用いて分子レベルで解析する。

【常圧 NMR を用いた細菌芽胞に対する熱効果の解析】: ^{13}C 標識した芽胞懸濁液を分注し、オートブロックで数分～数十分間加熱処理 (80～100) する。芽胞殺菌の指標として、オートクレーブで完全に湿熱滅菌した際の NMR スペクトルを用いる。処理後の各懸濁液を遠心分離で上清と残渣に分離し、常圧下での NMR 測定を行う (^1H , ^{13}C 一次元および $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ 二次元 NMR 測定)。その後、加熱処理に伴い上清に漏出した成分を分析し、それらを加圧処理の場合に漏出した成分と比較する。

【殺菌処理に伴う芽胞損傷の形態学的解析】: 芽胞に対する物理的処理 (加圧、加熱およびそれらの組み合わせ) により芽胞内部から DPA を始めとする多様な成分の漏出が期待されるが、それらは芽胞外殻構造の損傷に起因するものと考えられる。そこで、位相差顕微鏡や走査型電子顕微鏡 (SEM) を用いて各処理後の芽胞におけるダークニングの程度 (浸水と共に進行)、外殻構造または表層構造の損傷度合いを形態学的に評価し、芽胞構造の部分的な崩壊とバルク水の芽胞内への浸入、あるいは内在性成分の漏出との因果関係について検証する。

4. 研究成果

[平成 29 年度]

(1) 大量培養および精製した安定同位体非標識 *B. subtilis natto* 由来の芽胞に対する圧力効果と温度効果を ^1H NMR スペクトル上で分離しそれぞれ検証した結果、以下が明らかになった。

細菌芽胞に対する圧力効果として、加圧時と除圧時で時間スケールが全く異なる二段階での内在性成分 DPA の漏出が生じる

温度効果として、タンパク質成分の熱変性が認められる

圧力または熱の単独処理では芽胞の殺菌効率は上がらない

(2) 加熱処理に先立ち、前処理として芽胞へ 2,000 気圧の加圧をしておく、脱圧後の 100 処理との組み合わせにおいて、芽胞を湿熱滅菌した際と同様の NMR スペクトルが得られ、ほぼ

完全に芽胞が殺菌されることがわかった。

(3) 様々な物理条件下で処理した芽胞における DPA およびタンパク質漏出量の定量、走査型電子顕微鏡による形態学的変化の観察、コロニー形成能の比較を行った。その結果、殺菌効率の大幅な上昇には、加圧前処理によって生じる芽胞内部への浸水と、それに伴う外部への DPA の漏出が重要なプロセスであることが分子レベルで明らかになった。

(4) 平成 29 年度には、当初、安定同位体標識した *B. subtilis* 芽胞の大量培養および精製法の確立を計画していたため、芽胞形成に用いる培地を従来の DSM 培地から ^{13}C グルコースを炭素源とする M9 培地へと変更し、大量培養の条件をスモールスケールで検討した。計画では、DSM 培地と同様の 1L 当たり $1.5\text{--}2.0 \times 10^{10}$ cfu/mL の収量を見込んでいたが、実際はその半分以下の収量 (1.0×10^4 cfu/mL) であった。

(5) 高圧 NMR を用いた芽胞に対する圧力効果および常圧 NMR を用いた熱効果の解析では、一次元 ^1H NMR 測定において、それぞれで異なる成分変化または成分漏出の過程が観測された。

[平成 30 年度]

(6) 【加圧前処理後の加熱処理に伴う漏出成分の NMR 解析】: 芽胞懸濁液を加圧前処理 (2,000 気圧, 10min) の後に加熱処理 (100 °C, 30min) し、処理液上清と沈殿懸濁液それぞれにおける含有成分を NMR で分析した。主な化学シフト値をデータベースで照合した結果、上清に既知の内存在成分 DPA に加えて、アミノ酸、核酸、糖質、有機酸が漏出した可能性が示された。他方、芽胞懸濁液では脂質あるいは細胞由来と考えられるブロードな信号群が認められた。

(7) 【殺菌処理に伴う芽胞損傷の形態学的解析】: 各物理処理を施した芽胞の表面構造変化を走査型電子顕微鏡で調べた結果、加圧処理では最外殻が内側に大きく窪んでいた一方、加熱処理では表面が凸凹に波打つように変形していた。これらの形態変化が意味することはまだ不明瞭だが、少なくとも圧力と温度とは全く異なる形態変化が生じる事が示された。

(8) 【圧力と温度処理条件のスクリーニング】: 低圧 (1-2,000 気圧) および低温領域 (60-100 °C) で条件の組み合わせを検討した。条件ごとの NMR スペクトルの比較から、DPA が温和な条件下でも漏出していることが示唆され、蛍光色素を用いた顕微鏡観察と併せて、現時点では低圧・低温の条件は殺菌には不十分だが明らかに物理的な損傷を負っていることがわかった。

以上の通り、本研究では *Bacillus subtilis natto* 由来の芽胞を標的に、高圧 NMR 法による分子論的アプローチ、位相差顕微鏡または走査型電子顕微鏡を用いた形態学的アプローチを主に行い、芽胞に対する加圧効果と加熱効果を完全に分離した上で、不活性化に至る過程を分子レベルで、且つリアルタイムに観測できる新規方法論を確立した。同時に、温和な条件でも殺菌が実現できる可能性が示され、今後はこれらの知見に基づき、より汎用性の高い殺菌技術の開発を進めていきたい。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

(1) 前野 寛大, 金折 賢二, 藤井 茂, 山崎 彬, 赤坂 一之 (2018) 圧力-温度処理による芽胞死滅の高圧 NMR 直接観測, 高圧力の科学と技術, 28, 113-122. 査読あり

[DOI] <https://doi.org/10.4131/jshpreview.28.113>

(2) Kazuyuki Akasaka, Akihiro Maeno, Akira Yamazaki (2017) Direct high-pressure NMR observation of dipicolinic acid leaking from bacterial spore: A crucial step for thermal inactivation, Biophysical Chemistry, 231, 10-14. 査読あり

[DOI] <https://doi.org/10.1016/j.bpc.2017.04.008>

[学会発表] (計 6 件) (○: 発表者)

(1) ○前野 寛大, 金折 賢二, 赤坂 一之, 圧力殺菌過程で生じる細菌芽胞の不可逆的構造変化, 第 59 回高圧討論会 (2018)

(2) ○Kazuyuki Akasaka, Akihiro Maeno, Shigeru Fujii, Kenji Kanaori, On-line high-pressure NMR technique applied to bacterial spores, 59th Experimental Nuclear Magnetic Resonance Conference (国際学会) (2018)

(3) ○Akihiro Maeno, Kenji Kanaori, Kazuyuki Akasaka, Evidence that pressure causes irreversible changes in the structure of bacterial spore: A combined NMR, SEM and fluorescence microscopic approach, 10th International Conference on High Pressure

Bioscience and Biotechnology (国際学会) (2018)

(4) ○前野 寛大, 金折 賢二, 藤井 茂, 山崎 彬, 赤坂 一之, 加圧 - 温度処理による芽胞死滅の NMR 直接観測, 第 58 回高圧討論会 (2017)

(5) ○Akihiro Maeno, Kenji Kanaori, Akira Yamazaki, Kazuyuki Akasaka, Direct observation of pressure-assisted thermal sterilization on bacterial spores, 9th International Meeting on Biomolecule under Pressure (国際学会) (2017)

(6) ○赤坂 一之, 前野 寛大, 山崎 彬, 芽胞死滅過程の直接 NMR 観測: 加圧による DPA の流出, 第 64 回生化学会近畿支部会 (2017)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 0 件)

〔その他〕
ホームページ等:
<http://research.kmu.ac.jp/kmuhp/Koza?kyoinId=ybkkeo> (関西医科大学 HP, 教員業績)

6. 研究組織

(1) 研究分担者
無し

(2) 研究協力者
研究協力者氏名: 赤坂 一之
ローマ字氏名: (AKASAKA, kazuyuki)

研究協力者氏名: 金折 賢二
ローマ字氏名: (KANAORI, kenji)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。