

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K05887

研究課題名(和文)分子クラウディングの視点で解明する大腸菌の高圧不活性化

研究課題名(英文) High hydrostatic pressure inactivation of Escherichia coli under molecular crowding conditions

研究代表者

山本 和貴 (YAMAMOTO, Kazutaka)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・食品研究部門・グループ長補佐

研究者番号：00353954

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)：分子クラウディング状態(溶質濃度、300～400 mg/ml)では、高分子高次構造の高圧耐性が向上することから、溶質含量30-40%の食肉等での高圧殺菌耐性向上を類推した。分子クラウディング剤としてエチレングリコール、ポリエチレングリコール、Ficollを10～40 %w/w添加したリン酸生理緩衝液に、大腸菌を懸濁し、400-600 MPa、25℃で10分間処理後、選択培地で健常菌、非選択培地で健常菌・損傷菌を検出した。その結果、分子クラウディング添加系では、無添加系と比べて、大腸菌の耐圧性を向上させる傾向があり、損傷菌または健常菌が顕著に検出される条件も見出された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

非熱的殺菌技術としてジュース、肉加工品への利用が進む食品高圧加工ではあるが、高圧損傷菌の知見は限定的であり、各種高圧加工食品における損傷菌発生への影響因子解明が不可欠である。本研究では、分子クラウディング環境が、大腸菌を高圧ストレスから保護し、損傷を抑制し、健常菌を生残させ得ることをモデル系にて示した。これにより、分子クラウディングが新影響因子であることを見出して学術に貢献した。更に、ジュース等の希薄系よりも肉加工品等の濃厚系では高圧殺菌効果が低下し、損傷菌または健常菌が増加する可能性を示したことで、高圧殺菌において実用的にも有用な知見が得られた。

研究成果の概要(英文)：High pressure tolerance of high order structure in biopolymers has been reported under molecular crowding conditions (solute conc., 300-400 mg/ml). Therefore, it was assumed that high pressure inactivation of bacteria might be less effective in foods such as meat than in dilute food systems due to their enhanced tolerance possibly caused by high solute concentrations at 30-40%. Ethylene glycol, polyethylene glycol, and Ficoll as molecular crowding agents (MCAs) were added at a max. concentration of 40 %w/w to phosphate-buffered saline where Escherichia coli cells were suspended. The suspension was treated with high hydrostatic pressures (HHPs) of 400-600 MPa at 25 °C for 10 min and then spread on selective and nonselective media to detect healthy cells and healthy/injured cells, respectively. There was a trend where HHP-induced injury of the cells was suppressed by the addition of MCAs, and healthy population was highly detected under some conditions.

研究分野：食品高圧科学

キーワード：分子クラウディング 大腸菌 高圧 不活性化 Ficoll エチレングリコール ポリエチレングリコール 損傷

1. 研究開始当初の背景

大腸菌 ATCC25922 を用いて、高圧不活性化の操作条件を解明し、回復を最適化する温度帯が健常菌の至適増殖温度より低いこと[1,2]、蛍光フローサイトメトリー解析により損傷菌が健常菌と死菌とは異なる蛍光パターンを示し、コロニー径が損傷菌では不均一になること[3]等を明らかにしてきた。しかしながら、これら研究は、希薄系の液状食品を模した実験系であり、濃厚系の固形食品に細菌がバイオフィームを形成して付着する等の粘稠な状況を作出していなかった。

食品高圧加工では、高圧力、高温、長時間処理である程、殺菌効果が高まる。一方、対象食品群は、希薄系の液状食品または動物・植物細胞から構成される濃厚系の固形食品であるが、更に塩類、糖質、脂質、蛋白質等の共存物質が濃厚に共存する系では、高圧殺菌効果の低下が、多くの場合において経験的に知られているのみであり、粘稠な状態を作出している研究例は乏しい。そこで本研究では、濃厚系での高圧殺菌挙動を解明するために、分子クラウディングの視点を導入する。細胞質中の蛋白質、DNA 等の高分子濃度は 300 - 400 mg/ml (30 - 40%) と濃厚であり、分子クラウディング状態にある。これは、生化学実験系での希薄な濃度 (1 mg/ml 以下) よりも遥かに高く、試験管内の希薄溶液で酵素活性等を測定すると、細胞内での真値と比べて、桁違いのデータとなる場合がある。分子クラウディング状態の作出には、細胞質中の物質を必ずしも用いる必要はなく、試薬添加による分子クラウディング状態作出により調べることができる。

損傷菌制御が益々注目されている中、各種損傷菌の知見は蓄積してはいるが、高圧損傷菌の挙動には、未解明な部分が多い。応募者らは、大腸菌、リステリア属菌等について、高圧損傷菌の挙動解明に取り組んできた。対流等が影響する不均一熱伝達での熱損傷菌とは異なり、均一な圧力伝達による高圧損傷菌の調製は、再現性が高い。熱、圧力、化学物質等、ストレスの種類により損傷機構が異なることが示唆されてはいるが、高圧損傷菌の特性解明による損傷微生物学の更なる発展が期待される。また、損傷菌には、軽度損傷菌、重度損傷菌等、異なる状態にある損傷菌が存在することが指摘されており、その詳細を解明するための実験材料として、再現性高く調製可能な高圧損傷菌は有望である。

2. 研究の目的

細菌懸濁マトリックスの分子クラウディング状態が大腸菌の高圧不活性化に及ぼす影響の解明を目的とする。具体的には、致死的不活性化(死滅)、亜致死的不活性化(損傷)への影響を、分子クラウディング剤の濃度・種類から解明する。

3. 研究の方法

分子クラウディング剤を添加して分子クラウディング状態の大腸菌懸濁液を調製し、その高圧処理による不活性化効果を調べるといいう新手法を導入する。これは、濃厚系食品での細菌の高圧不活性化を、系統的に理解する端緒となると期待される。具体的には、高圧不活性化研究で研究蓄積のある大腸菌 ATCC25922 を用い、これを増菌培養後に洗浄し、EG、PEG200、Ficoll® (ショ糖-エピクロロヒドリン共重合高分子) を 0、10、20、30、40 %w/w の濃度で含むリン酸生理緩衝液 (pH7.4) に懸濁し、25、400、500、600 MPa で 10 分間処理した。処理後の大腸菌懸濁液は、適宜段階希釈し、選択培地 (デソキシコレート培地) 及び非選択培地 (標準寒天培地) に平板塗布後、それぞれ 37 °C 及び 25 °C /37 °C で培養し、健常菌及び健常菌 + 損傷菌を検出した。なお、少なくとも、本研究で用いた大腸菌 ATCC25922 については、非選択培地において 25 °C で培養すると、37 °C で培養するよりも多くの損傷菌が検出可能である[1]。

4. 研究成果

(1) エチレングリコール (EG) 添加系 (図 1)

MCA 無添加の対照区と比較すると、大腸菌が資化しない EG 添加系においては、600 MPa 処理では耐圧性向上はなかったが、500 MPa 処理では 40% 添加区において、健常菌及び 37 °C で検出される損傷菌が 2 桁多く検出され、明確な耐圧性向上が認められた。400 MPa 処理では、EG10% 添加系において弱いものの特異的な保護効果があり、この傾向は 500 MPa 処理及び 600 MPa 処理においてもみられたが、その原因については不明である。

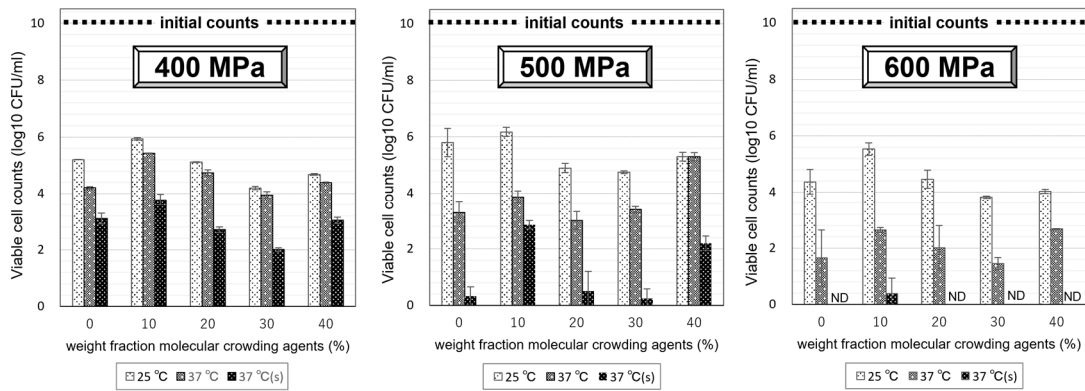


図1 エチレングリコール (EG) 高濃度添加による大腸菌の高圧不活性化への影響
 25 °C, 健常菌 + 熱にやや弱い損傷菌 (非選択培地で 25 °C 培養後に検出); 37 °C, 健常菌 + 熱にやや強い損傷菌 (非選択培地で 37 °C 培養後に検出); 37 °C(s), 健常菌 (選択培地で 37 °C 培養後に検出)

(2) ポリエチレングリコール (PEG200) 添加系 (図2)

MCA 無添加の対照区と比較すると、大腸菌が資化しない PEG200 添加系においては、600 MPa 処理では耐圧性向上はなく、むしろ耐圧性が若干低下する傾向が見られた。500 MPa 処理では 40 % 添加区において、37 °C で検出される損傷菌及び健常菌が顕著に増え、明確な耐圧性向上が認められた。また、400 MPa 処理においては、PEG200 の添加濃度依存的に損傷菌及び健常菌の検出数が増えた。

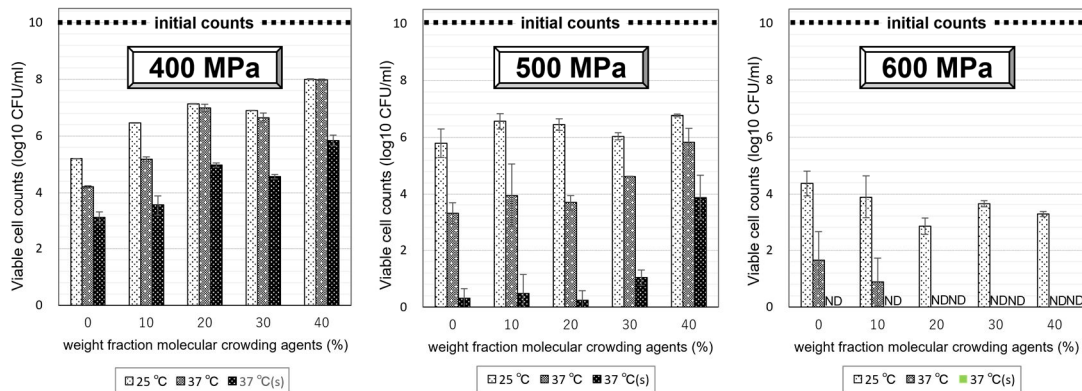


図2 ポリエチレングリコール (PEG200) 高濃度添加による大腸菌の高圧不活性化への影響
 25 °C, 健常菌 + 熱にやや弱い損傷菌 (非選択培地で 25 °C 培養後に検出); 37 °C, 健常菌 + 熱にやや強い損傷菌 (非選択培地で 37 °C 培養後に検出); 37 °C(s), 健常菌 (選択培地で 37 °C 培養後に検出)

(3) Ficoll®添加系 (図3)

大腸菌がシヨ糖に近い程度に資化する Ficoll®を添加した系では、600 MPa 処理では 30 %・40 % 添加区で明らかに耐圧性向上があり、25 °C / 37 °C で検出されるいずれの損傷菌も、1~2桁多く検出され、更に 40 % 添加系では 2桁多い健常菌が検出され、明確な耐圧性向上があった。500 MPa 処理では、40 % 添加区のみで健常菌及び損傷菌の顕著な増加があった。400 MPa 処理では、10 % 及び 20 % 添加系において健常菌が少なく検出される傾向がある一方で、Ficoll®添加濃度依存的に損傷菌検出数が増す傾向がみられたことから、致命的な重い損傷への保護効果がありつつも、10 % 及び 20 % 添加系では、亜致命的な軽い損傷が促進された可能性がある。

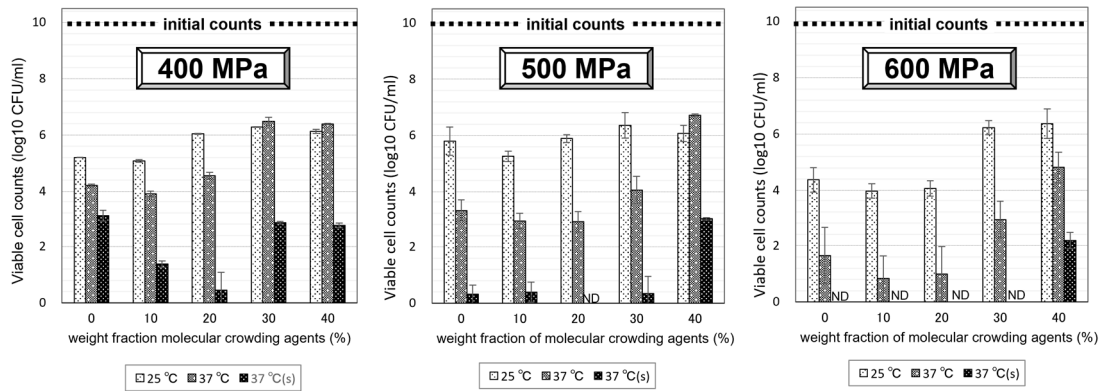


図3 Ficoll®高濃度添加による大腸菌の高圧不活性化への影響

25 °C, 健常菌 + 熱にやや弱い損傷菌 (非選択培地で 25 °C 培養後に検出); 37 °C, 健常菌 + 熱にやや強い損傷菌 (非選択培地で 37 °C 培養後に検出); 37 °C(s), 健常菌 (選択培地で 37 °C 培養後に検出)

以上、30 / 40% MCA の添加系で作出した分子クラウディング状態では、大腸菌の高圧損傷に保護効果があり、特に 40 % 添加系では健常菌の検出に繋がる保護効果が見出された。

食品高圧加工による細菌不活性化においては、本研究で焦点を当てた分子クラウディング効果以外にも、糖質、脂質、蛋白質、ビタミン類、ミネラル等の共存成分があり、これらの影響を加味した上で不活性化効果を調べる必要がある。また、従来は、様々な検出培地で細菌の生死判定をすることが主流であったが、今後は、検出時の培養温度にも留意しつつ、損傷菌の視点からも殺菌効果を判断し、より安全な食品加工・流通の条件を解明して提示する必要がある。

引用文献

- [1] Kimura K et al., Injury and recovery of *Escherichia coli* ATCC25922 cells treated by high hydrostatic pressure at 400-600 MPa, *J. Biosci. Bioeng.*, 123 (6), 698-706 (2017).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Kazutaka YAMAMOTO, Junzhang ZHU, Xue ZHANG, Yoshiko NAKAURA, Zhenya ZHANG
2. 発表標題 Injury of Escherichia coli induced by high hydrostatic pressure under molecular crowding conditions
3. 学会等名 Virtual International Conference on High Pressure Bioscience and Biotechnology (HPBB2021) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kazutaka YAMAMOTO, Mika HIROSE, Junzhang ZHU, Xue ZHANG, Yoshiko NAKAURA, Susumu KAWASAKI, Takashi INAOKA, Zhenya ZHANG
2. 発表標題 Injury of Escherichia coli induced by high hydrostatic pressure under molecular crowding conditions of Ficoll
3. 学会等名 11th International Conference on High Pressure Bioscience and Biotechnology (HPBB2022) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山本和貴, 廣瀬美佳, 稲岡隆史, 川崎晋, 中浦嘉子
2. 発表標題 Ficoll (ショ糖-エピクロロヒドリン共重合体) を単一炭素源とした大腸菌の増殖
3. 学会等名 日本応用糖質科学会2022年度大会 (第71回)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------