

バクテリアの細胞表面と熱ストレス傷害，熱耐性

土 戸 哲 明

関西大学工学部生物工学科 ☎ 564 8680 大阪府吹田市山手町 3 3 35

(2001年5月14日受理)

Bacterial Cell Surface and Its Damage by Heat in Relation to Cellular Heat Resistance

Tetsuaki TSUCHIDO

Faculty of Engineering, Kansai University
3 3 35 Yamate-cho, Suita, Osaka 564 8680

(Received May 14, 2001)

The cell surface changes sensitively with environmental stimuli because it locates at the interface between the cell and the environment. Bacteria have their elaborate systems against a variety of stresses as well as other organisms and possess abilities to adapt to, recover from, or obtain tolerance for stressful situations. In some cases, damages to the cell surface are likely to cause directly cell death. Here, an outline of our studies on the effect of heat stress on the structure and functions of cell surface and on the role of cell surface with regard to the heat resistance of bacteria is described.

1. はじめに

微生物には、人間の生活に有用なものもあれば有害なものも数多い。それらは人体に入って病気を引き起こし、ときにはそれがもとで死に至らしめることもあれば、衣食住において腐敗や不快な環境を生じることもある。これら有害微生物を抑制するため、人類は昔から熱や薬剤を殺菌や静菌の主な手段として用いてきた。

このような殺菌・静菌処理は、微生物をそれぞれ致死のおよび非致死のストレスにさらすことと言える。最近、分子生物学や生理学の分野で、微生物の各種物理的あるいは化学的ストレスに対する応答の研究が活発化してきており、とくに細胞膜を中心とする細胞表面の構造、機能がそれら細胞のストレス耐性に影響を及ぼし、ひいてはそれら処理の殺菌、静菌効果を左右することがわかってきている。

本稿では、微生物の代表としてバクテリア（細菌）をとりあげ、その表面構造を概観した後、著者らがこれまで検討してきた、半致死のあるいは致死の加熱ストレ

スにさらした大腸菌細胞表面の損傷と修復、また細胞の熱耐性におけるその表面の係わりについて紹介する。なお、この内容の多くは他の拙著¹⁻⁴にも述べているので、参照されたい。

2. バクテリア表面の構造と機能

バクテリアの表面はどのような構造をしていて、どのような機能をもっているのか、まずこれらのアウトラインを述べよう^{2,5}。

細胞の最も外側には細胞壁があるが、この構造の違いによってバクテリアは大きく2種類に分けられる。この違いはグラム染色法によって見分けられる。この方法によって染色されるグループはグラム陽性バクテリア（枯草菌や黄色ブドウ球菌などが含まれる）、染まらない方はグラム陰性バクテリア（大腸菌や緑膿菌などが含まれる）とよばれる（Fig. 1）。

細胞の形状を保つ役割をしているのがペプチド架橋をもつ多糖類であるムレインとよばれるペプチドグリカンのメッシュ状のかたい層である。これによって細胞内部の高い浸透圧による破裂から身を守っている。グラム陽性バクテリアはこのムレインが厚く頑丈であり、概し

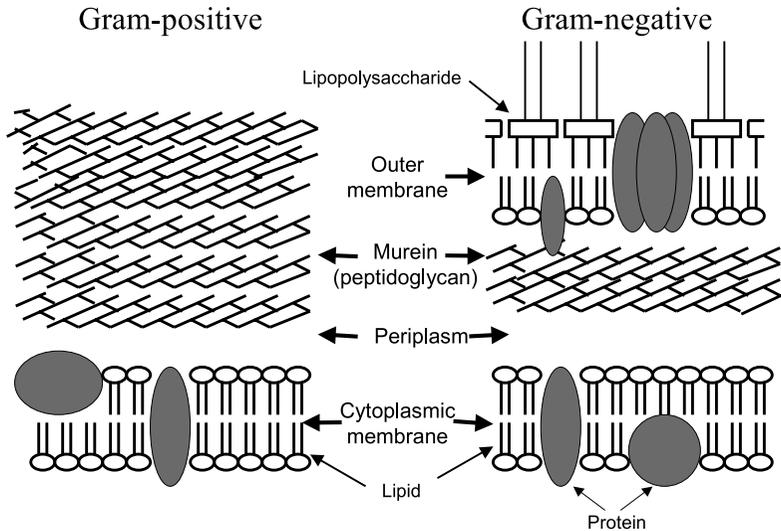


Fig. 1 Schematic representations of cell surface structures of gram-positive and gram-negative bacteria.

て熱や放射線などの物理的ストレスに強い。一方、グラム陰性バクテリアは、ムレイン層が比較的薄く、そのかわりに外側にリポ多糖体を含む外膜構造をもつことが特徴で、外界からの疎水性の抗生物質や食品防腐剤などに対する透過障壁として機能している。このため、グラム陰性バクテリアはおおざっぱに言って化学的ストレスに強い。

細胞壁の内側には外界との仕切りとして、脂質（ほとんどがグリセロリン脂質）の2重層構造の中に膜タンパク質が内在あるいは結合している細胞質膜がある。これら膜タンパク質には、栄養基質の輸送タンパク質、酸素呼吸のための電子伝達系、それに共役したエネルギー変換を担うプロトン-ATPアーゼなど多くの細胞膜酵素がある (Fig. 2)。このほか、バクテリアの種類によっては、莢膜や運動器官である鞭毛、付着や接合に係る線毛をもつものがある。

バクテリア細胞の表面の構成成分（糖や脂質、局在イオンなど）によってその表面物性に特色が現れる。その重要なものは、表面電荷、表面疎水性である。これらは静電的相互作用や疎水性相互作用を通して種々の化合物の透過・排出や生物・担体表面との接触・付着に関わってくる。また、細胞壁の内側にある細胞質膜には上述のようにさまざまな膜酵素があるが、それらの機能は膜脂質の流動性の影響を強く受ける。

Fig. 3は凍結断面法によって作成された大腸菌細胞表面の電子顕微鏡像である⁶⁾。表面の粒々（膜内粒子）が細胞膜を貫通している膜タンパク質と考えられ、これら

のタンパク質の機能や安定性は周囲の脂質の相、すなわち液晶状態かゲル状態かによって変化する。この図に示されているように、37℃で生育した大腸菌を37℃に置いたときには、これら膜内粒子は均一分散しており、これは、このときの膜が液晶相であるためである。しかし、この細胞を0℃に置くと、この分布は不均一になるが、これは低温にさらされたことによって一部の脂質がゲル相に変化し、液晶相と混在する相分離が起こり、タンパク質がゲル相から排除され、液晶相へ移行したためと考えられる。

このように、バクテリアの細胞表面は外界との接点にあるため、周囲の環境に敏感に影響を受けて変化する。そしてそのことが、バクテリア自身の環境ストレスによる損傷や耐性を左右することにもなる。

3. ストレスを受けたバクテリアの細胞表面の損傷と修復

殺菌や静菌処理によってバクテリアはストレスにさらされるが、彼らは、本質的に他の生物にも備わる巧妙な応答機構によって、ストレスによる損傷や抑制から回復や適応、耐性化を起こすことがわかってきている (Fig. 4)。それでは、大腸菌を加熱処理するとどんなことが起こるのかについて述べよう。

大腸菌を50～55℃で加熱して位相差顕微鏡で見ると、外側に風船状に膨らんだブレップ構造が現れた⁷⁾。これは、超薄切片の電子顕微鏡写真では、多重層の膜で覆われたもので、細胞分裂面や細胞の端（極）の部分に

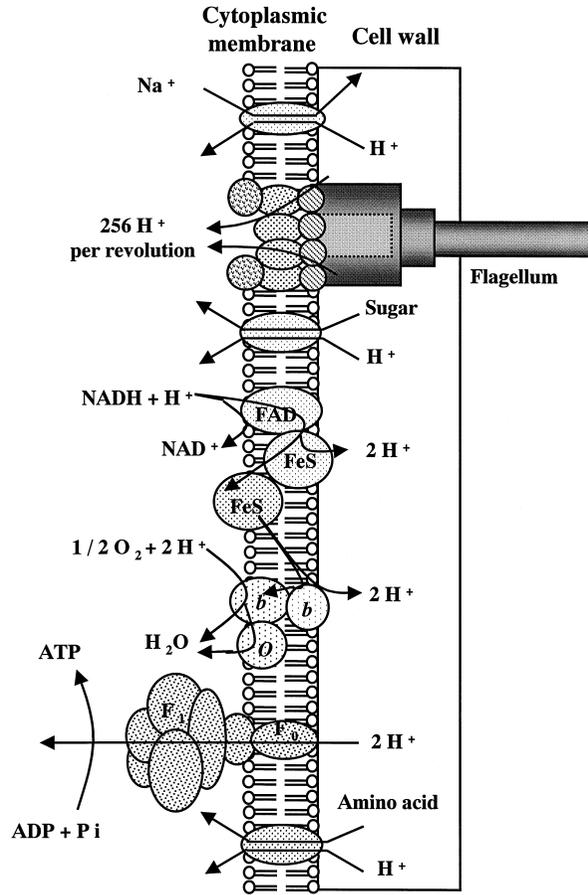


Fig. 2 Structure and functions of the cell membrane of *E. coli*.

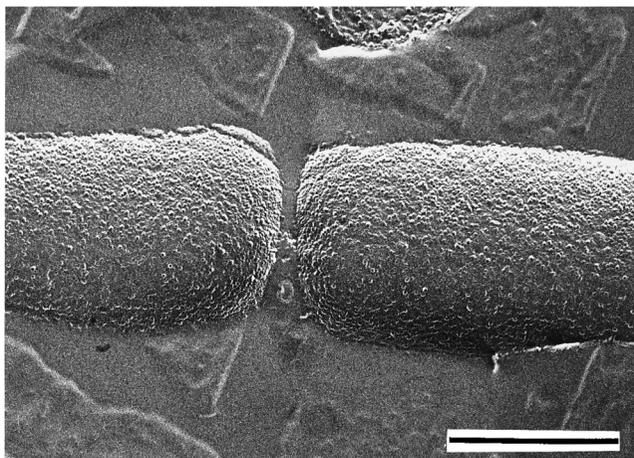
多く見られた (Fig. 5)。著者らはこのブレップが遊離した膜胞を超遠心分離によって集め、その性質を調べた結果、密度は外膜と細胞質膜との間の値 (1.21 g/cm^3) をとり、外膜特有のリ多糖体が存在するものの脂質の割合が多く、膜タンパク質が少ないことがわかった。ドデシル硫酸ナトリウム存在下でのポリアクリルアミド電気泳動法によって膜タンパク質の分離パターンを見たところ、膜胞に含まれるタンパク質は外膜由来であると推察された。また、酵素分析の結果から、細胞内部に局在する酵素は漏洩しておらず、外膜と細胞質膜との間のペリプラズム空間に局在する酵素が遊離したことから、この膜胞、つまりブレップは、外膜が断片化しおそらく内側のムレインと相互作用しているタンパク質などを残した状態で形成され、その後さらに膜胞となって遊離するものと推察された^{7,8}。この過程を表す模式図を Fig. 6 に示す。

このような表面の変化は細胞にどんな変化をもたらす

だろうか？まず、n-ヘキサデカンとの混合によって水相から消失する細胞数を測定する Rosenberg らの方法⁹により、大腸菌の細胞表面の疎水性を調べたところ、表面がより疎水性となることがわかった⁸。また、不透過性の疎水性色素であるクリスタルバイオレット⁸や N-フェニルナフチルアミン¹¹が細胞へ透過できるようになった。さらに、大腸菌には阻害作用が小さい疎水性の比較的高い抗生物質や抗菌化合物に対する感受性が増大した¹³。

これらの事象に連動して、リン脂質分解酵素であるフォスホリパーゼ C を細胞外から加えて処理すると、未加熱細胞にはほとんど作用しないが、加熱細胞の細胞膜中のリン脂質を顕著に分解することがわかった⁸。上の細胞表面疎水性の上昇は、本来外膜の表面にはないはずのリン脂質が、先のブレップ形成とその後の膜胞化遊離によって出現したためであろうと推察される (Fig. 6)。そしてさらに、このことが、大腸菌の外膜を透過しにく

37°C



0°C

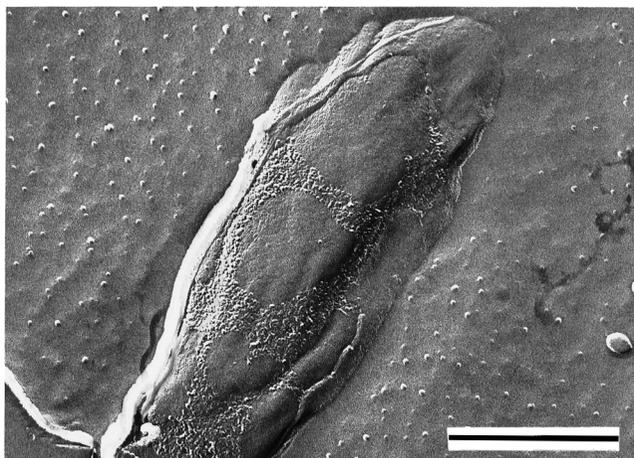


Fig. 3 Electron micrographs of freeze-fractured cell surface of *E. coli* cells grown at 37 °C and then kept at 37 or 0 °C. Bar, 0.5 μm.

い疎水性の化合物や色素の透過を可能とし、それらの阻害作用に対して細胞を感受性にするものと推察される。

以上の結果を総合的に考察すれば、Nikaido¹⁰⁾がサルモネラ菌の外膜欠損株および金属キレート剤のEDTA処理細胞について考察したように、加熱処理細胞についてもFig. 6のような類似のモデルで説明できると考えられる。

このような大腸菌の外膜損傷は加熱後の適当な液体培地での保温により、修復される。リボ多糖体は再合成され¹²⁾、疎水性色素に対する透過性障壁機能が再増殖開始

までに次第に元に戻る¹¹⁾。

一方、細胞質膜の熱損傷については、外膜のような劇的な構造変化は認められないが、機能的には多くの傷害が発生しているものと推察される。たとえば、電子伝達系の障害、基質輸送能の低下、ATPなど細胞質低分子成分の漏洩などがあげられ、とくに酸素存在下での加熱処理による呼吸系障害は正常時よりも活性酸素発生量の増加をもたらし、二次的な細胞損傷を引き起こしていると考えられる¹⁾。

最近、著者の研究室では、グラム陽性バクテリアの枯

草菌を熱ショックや低温ショックにさらすと、DNAの切断が起こることを確認し、これが細胞表面に存在するデオキシリボヌクレアーゼである YokF が細胞膜から脱離し、細胞質に移行して DNA を攻撃することを明らかにした¹⁴⁾。また、枯草菌は低温ショックによって自己溶菌を起こすが、これは自己の細胞が持つ細胞壁分解酵素であるオートリシンが脱制御されて活性化するためであり、この活性化にやはり細胞膜が関与していることを示唆している¹⁵⁾。

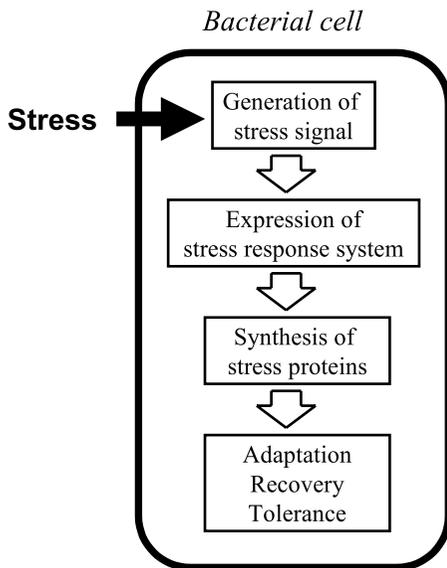


Fig. 4 Outline of stress response in bacterial cell.

4. バクテリアの熱耐性における細胞表面の関与と熱ストレス応答

以上のような細胞表面の損傷は、細胞自身の生存性に直接影響する可能性も考えられるが、加熱の場合は細胞内のさまざまな部位が損傷を受けており、どの傷害が決定的に細胞死をもたらすのかよくわかっていない。しかし、著者ら¹⁶⁾は、細胞の熱耐性に細胞表面が深く関わっていることを示す 1 つの例を報告している。

大腸菌細胞を 37 °C で生育させ、集菌洗浄後、適当な緩衝液中にしばらく予備保温してから 50 °C 以上の温度に加熱処理した場合、その後の死滅は予備保温温度に依存した。0 °C から加熱すると、37 °C からのときに比べて加熱中の死滅速度が大であった (Fig. 7)⁶⁾。0 °C と 37 °C の間の温度についても検討した結果、この耐熱性の様相は細胞膜のゲル-液晶相転移、相分離の挙動に一致することがわかった¹⁶⁾。先 (Fig. 3) に示したように、37 °C に置いた細胞の脂質は液晶相にあり、比較的熱耐性である。相分離を起こし始める温度 (T_c 、ここでは約 20 °C) 以下では次第にゲル相の割合が増え、熱処理に弱くなると推測される。この作業仮説は低温の 15 °C で生育させておいた細胞および不飽和脂肪酸要求変異株を用いて細胞膜の流動性を変化させ、 T_c を変化させた実験からも支持された¹⁶⁾。この仮説の基本的な概要を Fig. 8 に示す。

熱に対するバクテリアの応答として、上述の損傷修復を紹介したが、近年、高温での特有の遺伝子発現機構が関与するいわゆる熱ショック応答システムが明らかになってきている。DNA 上の遺伝子はその遺伝暗号が RNA

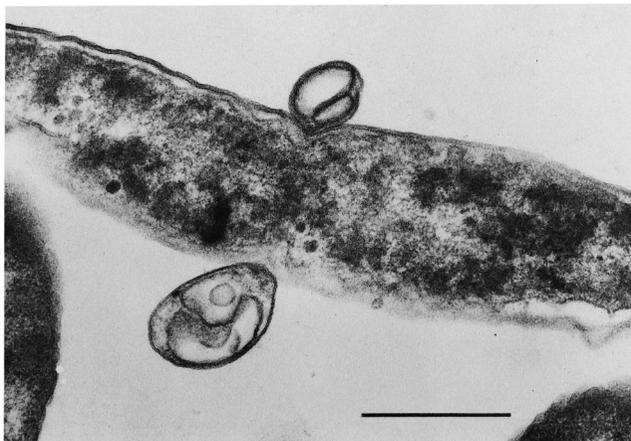


Fig. 5 An electron micrograph of an ultra-thin section of blebs produced on a heated cell of *E. coli*⁷⁾. Bar, 0.5 μ m.

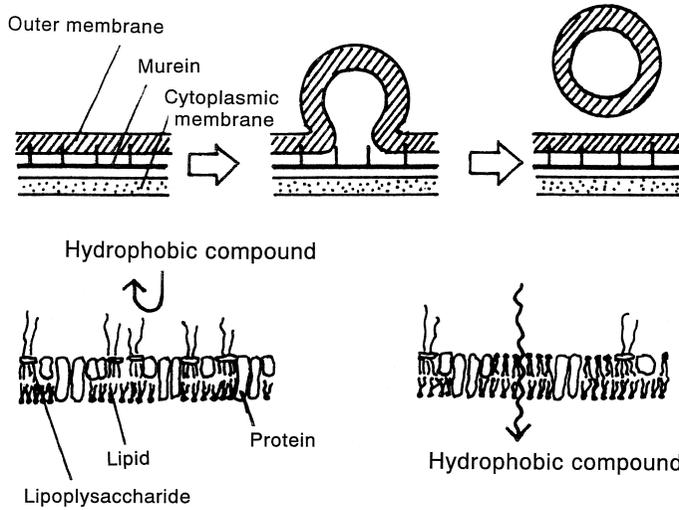


Fig. 6 A model for blebbing and vesiculation of the outer membrane of a heated cell of *E. coli*¹⁾.

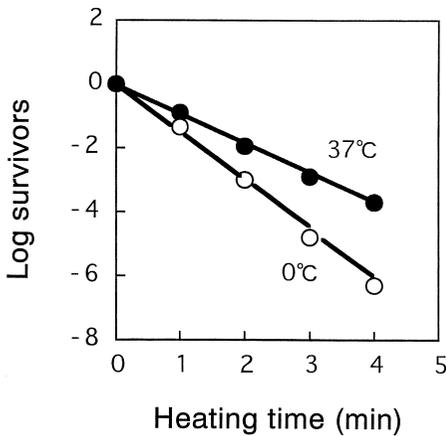


Fig. 7 Effect of preincubation temperature on the thermal death of *E. coli* heated at 50 °C¹⁶⁾.

合成酵素 (RNA ポリメラーゼ) によって伝令 RNA (mRNA) に転写され、さらにリボソームというタンパク質製造工場で翻訳されてさまざまな機能をもつタンパク質が合成される。高温ではタンパク質の変性が起こるので、それを防止・再生あるいは分解する機能をもつものが多くを占める熱ショックタンパク質 (HSP) 群が、それぞれの遺伝子から作られる。大腸菌では、これらの遺伝子の発現を RNA 合成酵素の 1 ユニットであるシグマ因子の σ^{32} という調節タンパク質が一括して制御しており¹⁷⁾、これら発現してくる HSP は細胞質内で機能する (Fig. 9)。

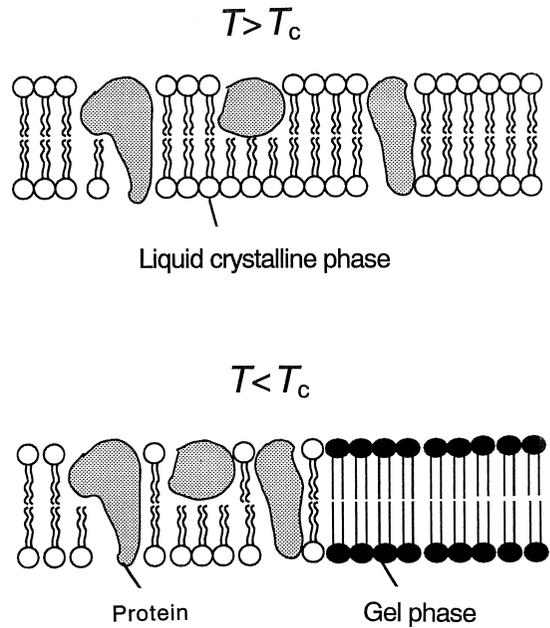


Fig. 8 A proposed model for the preincubation effect on the heat resistance of *E. coli*.

さらにその後、細胞膜を含む細胞表面で働く第 2 の HSP 群が存在することが明らかにされた¹⁸⁾。この応答では別のシグマ因子である σ^{24} (σ^E) がこの一群のタンパク質の遺伝子発現を調節し、主に細胞表面でのタンパク質の構造形成の誤りを処理するタンパク質群が誘導合成

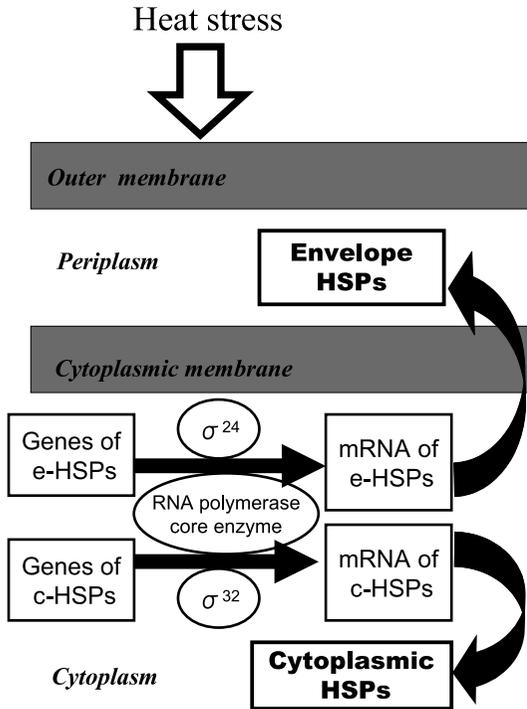


Fig. 9 Heat shock responses in *E. coli*.

される。

5. お わ り に

細胞表面は、バクテリア細胞の種々のストレスに対する耐性や損傷に重大な影響を及ぼす。ここで示した熱ストレス以外にも、薬剤ストレスでは薬剤の透過や排出に関係し、超高压や放射線ストレスにおいても細胞表面が顕著に関わっていることが知られている。これらストレスに対して、バクテリアはそれぞれ特有のストレス遺伝子を発現に発現させ、その産物であるストレスタンパク質を合成し、その働きによって細胞のストレス防御機能を発揮する。このようなシステムは、人間をはじめ、さまざまな生物に本来共通のものである。細胞表面は外界

情報との交信の場であることから、複雑な生理機能が集積しており、その傷害は細胞の生命に甚大な影響を及ぼすだろう。有害バクテリアの有効な制御のためには、彼らのストレス防御戦略システムを知る必要があるが、とくに細胞表面のストレス防御機構の解明は、将来の新しいバクテリア制御法の開発をもたらす可能性が期待できる。

文 献

- 1) 土戸哲明：日本防菌防黴学会誌 **18**, 75 (1990).
- 2) 土戸哲明：“熱殺菌のテクノロジー”，高野光男，土戸哲朗編（サイエンスフォーラム，1997）p. 42.
- 3) 土戸哲明：凍結及び乾燥研究会誌 **39**, 61 (1993).
- 4) 土戸哲明：日本食品科学工学会誌 **46**, 1 (1999).
- 5) F.C. Neidhardt, J.L. Ingraham and M. Schaechter: "Physiology of the Bacterial Cell" (Sinauer, Sunderland, 1990).
- 6) 土戸哲明，藤川清三：未発表.
- 7) N. Katsui, T. Tsuchido, R. Hiramatsu, S. Fujikawa, M. Takano and I. Shibasaki: *J. Bacteriol.* **151**, 1523 (1982).
- 8) T. Tsuchido, N. Katsui, A. Takeuchi, M. Takano and I. Shibasaki: *Appl. Environ. Microbiol.* **50**, 298 (1985).
- 9) M. Rosenberg, D. Gitmool and E. Rosenberg: *FEMS Microbiol. Lett.* **9**, 29 (1980).
- 10) H. Nikaido and M. Vaara: *Microbiol. Rev.* **49**, 1 (1985).
- 11) T. Tsuchido, I. Aoki and M. Takano: *J. Gen. Microbiol.* **135**, 1941 (1989).
- 12) T. Tsuchido, A. Takeuchi and M. Takano: *J. Appl. Bacteriol.* **73**, 531 (1992).
- 13) T. Tsuchido and M. Takano: *Antimicrob. Ag. Chemother.* **32**, 1680 (1988).
- 14) J. J. Sakamoto, K. Minami and T. Tsuchido: submitted.
- 15) T. Tsuchido, T. Nishino, Y. Kato and M. Takano: *Biosci. Biotech. Biochem.* **59**, 1636 (1995).
- 16) N. Katsui, T. Tsuchido, M. Takano and I. Shibasaki: *J. Gen. Microbiol.* **122**, 357 (1981).
- 17) T. Yura, M. Kanemori and M.T. Morita: "Bacterial Stress Responses", ed. by G. Storz and R. Hengge-Aronis (ASM Press, Washington, D.C., 2000) p.3.
- 18) T.L. Raivio and T.J. Silhavy: "Bacterial Stress Responses", ed. by G. Storz and R. Hengge-Aronis (ASM Press, Washington, D.C., 2000) p. 19.