

加熱処理による細菌芽胞の発芽に關与するタンパク質の機能解析

摂南大学 薬学部
桑名 利津子

1. 研究の目的と背景

生物が外的な環境要因に対応して遺伝子発現を変化させ表現型を変えることは、生物が生きていく上で本来持っている生存戦略である。枯草菌をはじめとする芽胞形成細菌は、栄養源の枯渇などの栄養増殖に適さない環境になると、芽胞を形成することにより細胞形態を変える。芽胞はDNAを含むコア、ペプチドグリカン層からなるコルテックス、タンパク質からなるコートの三層構造からなっている。このような複雑な構造のため芽胞は長期休眠能を持ち、栄養源の欠乏だけでなく、熱・放射線・化学薬品・分解酵素などに対し強い抵抗性を持っている。また栄養増殖に適した環境になると、そのシグナルを受け取り、発芽し、栄養増殖を行う。

芽胞は耐久性が高いため、食品や医薬品などに混入した芽胞を殺菌するには高温による加熱処理が必要となるが、熱により変質しやすい製品には適用できない。発芽反応を開始した芽胞は、芽胞の持つ特性を消失し、細胞形態を大きく変化させる。そのため発芽誘導を利用した殺菌が試みられている。食品や医薬品を管理する上で、細菌芽胞および発芽を制御することは重要である。

枯草菌芽胞は発芽を誘発するために熱ショックを与えることにより、発芽反応が進行することが以前から知られていた。しかしながら、脱水状態で、熱に対して強い抵抗性を持っている芽胞が、なぜ熱ショックを与えられたことによって発芽が容易になるのかについては全く不明である。本研究では、熱ショックによる芽胞の発芽誘導のメカニズムを明らかにするため、加熱処理の有無により発芽に影響するタンパク質を同定することを目的とした。

2. 研究方法

枯草菌芽胞の発芽に關与するタンパク質は、芽胞形成期に発現すると考えられる。本申請者は現在までに枯草菌芽胞に含まれるタンパク質および芽胞形成期に発現すると報告された遺伝子群について解析を行ってきた。そのうち芽胞形成期特異的に発現する遺伝子を新たに174種類同定した。本研究では174種類の遺伝子破壊株より芽胞を調製し、加熱処理の有無および発芽剤としてL-Ala (L-alanine), AGFK (Asparagine, Glucose, Fructose, KCl), DPA-Ca (Dipicolinic acid Calcium)を用いて各遺伝子破壊株における発芽能について解析を行った。発芽の指標として、酸化還元発色薬 triphenyl tetrazolium chrolide (TPTZ) を

利用した。芽胞は休眠状態のため、全ての酸化還元酵素が不活性状態である。発芽が始まると酸化還元酵素が活性化することにより、酸化還元発色薬が無色から赤色に呈色することを利用した。

3. 研究内容

本研究は、熱ショックによる芽胞の発芽誘導のメカニズムを明らかにするため、加熱処理の有無により発芽に影響するタンパク質を同定することを目的とし、枯草菌芽胞形成期に発現する遺伝子群において、加熱処理による細菌芽胞の発芽に關与するタンパク質のスクリーニング解析である。

4. 研究の実施経過

対象とした芽胞形成期に発現する遺伝子群の遺伝子破壊株が174種類と多いため、発芽解析としては遺伝子発現の時期から2つのグループに分けて解析を行った。(1)芽胞形成期初期および中期に発現する遺伝子群の発芽解析。(2)芽胞形成期後期に発現する遺伝子群の発芽解析。発芽に關与するタンパク質のスクリーニング解析は終了した。現在は、発芽に關与すると明らかになった遺伝子群について、より詳細な解析を行っている。

5. 研究から得た結論・考察

芽胞形成期に発現する遺伝子群174種類について加熱処理の有無により発芽解析を行った。加熱処理の有無に関わらず、発芽に關与する遺伝子は14種類あった。そのうちの2種類は芽胞形成に關与する遺伝子であることが報告されていた。次に加熱処理により発芽に關与する遺伝子は72種類あった。

枯草菌芽胞形成期に特異的な遺伝子発現は、枯草菌芽胞形成期特異的なシグマ因子 (SigF, SigE, SigG, SigK) に依存している。枯草菌芽胞タンパク質はアミノ酸配列組成および遺伝子発現が依存するシグマ因子によりその局在部位を推定することが可能である。本研究で明らかにした加熱処理により発芽に關与する遺伝子86種類について、それぞれのシグマ因子を解析したところ、SigE 依存の遺伝子が49種類、SigEK 依存の遺伝子が2種類、SigF 依存の遺伝子が1種類、SigFG 依存の遺伝子が1種類、SigG 依存の遺伝子が27種類、SigK 依存の遺伝子が6種類であった。

SigE および SigK 依存遺伝子は枯草菌芽胞形成期に母細胞側で遺伝子発現が行われ、コートまたはコルテックスに局在し、一方で SigF および SigG 依存遺伝子は枯草菌芽胞形成期にファオスポア側で遺伝子発現が行われ、コアまたはコルテックスに局在すると推定される。SigE および SigK 依存により遺伝子発現が行われ、かつ発芽に関与するタンパク質の多くは発芽剤のコアまたは発芽受容体までの浸透性に関与していると考えられる。一方で、SigF および SigG 依存により遺伝子発現が行われ、かつ発芽に関与するタンパク質の多くは、発芽剤が発芽受容体に感作した後、発芽反応の過程に関与していると考えられる。

本研究で得られた結果は加熱処理により発芽に関与するタンパク質のうち、コートおよびコルテックスに局在すると推定されるものが多かった。芽胞は耐熱性を持つ細胞であるため、芽胞の内部構造であるコアに含まれるタンパク質は、加熱処理を行っても、コート構造により加熱の影響がタンパク質構造まで影響するとは考えにくい。しかしながら、コート及びコルテックスタンパク質の一部は加熱処理によりタンパク質修飾が行われ、発芽に影響することがあると示唆された。今後はこれらの発芽に関与するタンパク質が、発芽過程においてどのように機能しているかを解析する必要がある。

6. 残された問題、今後の課題

発芽に関与するタンパク質の機能解析を行う上で、芽胞の発芽期のステージ分類はとても重要である。位相差顕微鏡で発芽過程を観察すると、成熟芽胞は光屈折性のある細胞であるが、発芽過程が進行すると次第に暗くなっていく。このため、発芽過程は位相差顕微鏡観察像によりステージ分類されている。しかしながら、今までの位相差顕微鏡観察による発芽のステージ分類では、いずれの発芽過程に関与しているかを説明できない因子を本研究中において発見した。そのため、現在の発芽ステージの分類と発芽を評価する方法に問題があると考えられる。

現在までの研究において、発芽過程が客観的に分類できていない大きな問題点として次の二点が考えられる：(1) 位相差顕微鏡観察による形態観察だけでは、主観的な観察となる上に、細胞内で生じている現象がわからない。(2) 発芽時の細胞内イベントを評価する方法は、芽胞のコア内に蓄えられているジピコリン酸の放出量測定のみである。しかし、ジピコリン酸放出量は相対的な細胞数に対して測定するため、個々の細胞においてジピコリン酸の放出量と細胞形態を同時に観察することができない。今後の研究課題としては、発芽時に生じる細胞内イベントと細胞形態をリンクさせることにより芽胞の発芽過程を評価するシステムの確立である。

食品などに栄養細胞が混入していた場合、加熱処理を行うことによって多くの細菌種を殺菌することが可能になる。しかしながら芽胞が混入していた場合、加熱による殺菌と発芽誘導は表裏一体となる。そのため熱ショックによ

る芽胞から発芽機構を解析することは、芽胞の発芽を人為的に制御することが可能になる。また芽胞形成細菌は枯草菌だけでなく、セレウス菌、ボツリヌス菌、ウエルシュ菌、炭疽病菌なども含まれる。これらの細菌は枯草菌と同様の発芽機構を持つと考えられ、食中毒だけでなく、私たちの生活に多大な危害を与えることがある。芽胞および発芽を制御することは、食品や医薬品などの衛生管理においても大変重要な課題である。