

## 酵母の高圧環境における振る舞いと酵素化学反応

重松 亨

地球でもっとも深いマリアナ海溝チャレンジャー海淵の深度は10,911 mであり、この地点における水圧は約110 MPaである。したがって、この圧力を超える静水圧環境は自然環境ではありえない特異状態といえることができる。数百MPaの静水圧を人工的に作りだし、微生物を不活性化させる技術は、食品などの非熱的な殺菌への応用の観点から注目されている。本稿では、数百MPaの高圧環境における出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の振る舞いを、不活性化挙動を中心として述べるとともに、酵素化学反応に及ぼす高圧環境の影響についても概説する。

## 高圧環境における微生物の不活性化

1895年にRogerは室温において約290 MPaの圧力処理を *Escherichia coli* および *Staphylococcus aureus* に施し死滅（不活性化）挙動を解析した<sup>1)</sup>。この研究以降、圧力による微生物の不活性化に関する知見が蓄積されてきた。現在までの知見をまとめると、*S. cerevisiae* や *E. coli* をはじめ多くの微生物細胞は、室温において概ね50 MPaの圧力を施すと増殖が抑制され、そして100 MPaを超える圧力では圧力処理時間に応じて不活性化する<sup>2-4)</sup>。そのため、100 MPa以上の致死的な圧力により微生物を不活性化させ食品の保存に応用する可能性が考案されたのである。

ある微生物の細胞集団を高温にさらした加熱殺菌と同様、圧力処理を施した場合も、すべての細胞が一斉に不活性化するわけではない。特に、短い圧力保持時間においては標的理論の1ヒット死モデルに基づく式(1)に

従う形で圧力保持時間に応じて生菌数が減少することが多い。

$$N = N_0 \cdot e^{-kt}$$

$$\text{あるいは } \ln(N/N_0) = -kt \quad (1)$$

ここで、 $N$ は圧力保持時間  $t$ (s)における生菌数 (CFU  $\text{ml}^{-1}$ )、 $N_0$ は初期生菌数、 $k$ ( $\text{s}^{-1}$ )は不活性化速度定数である。この式は化学反応の一次反応を表す式と同じである。このことから、微生物の圧力不活性化を化学反応の速度過程とみなして近似する解析手法をとることができる。

微生物の圧力死滅のメカニズムとして、圧力による細胞膜およびオルガネラ膜系の構造および機能の障害が圧力不活性化の大きな原因の一つであると考えられている。細胞の脂質二重膜が概ね100 MPa以上で相転移することと多くの微生物が100 MPa以上の条件で顕著に不活性化することが、この根拠となっている。また、*S. cerevisiae*の核膜が200 MPaで損傷を受けるという観察結果<sup>5)</sup>、塩濃度・浸透圧などの外的環境により圧力不活性化挙動が鋭敏に変化すること<sup>6)</sup>、*S. cerevisiae*のアミノ酸輸送膜タンパク質の機能が圧力により損なわれること<sup>2,7)</sup>、エルゴステロール合成に関与する遺伝子欠損株が顕著に圧力感受性を示すこと<sup>8)</sup>、細胞内トレハロースによる膜の保護により圧力耐性が増大すること<sup>9)</sup>などの報告がその原因を裏づけている。

さらに、細胞骨格を形成するタンパク質複合体の圧力による損傷<sup>10)</sup>や、異常タンパク質の修復・分解システムも圧力不活性化の原因と考えられている。微生物に熱

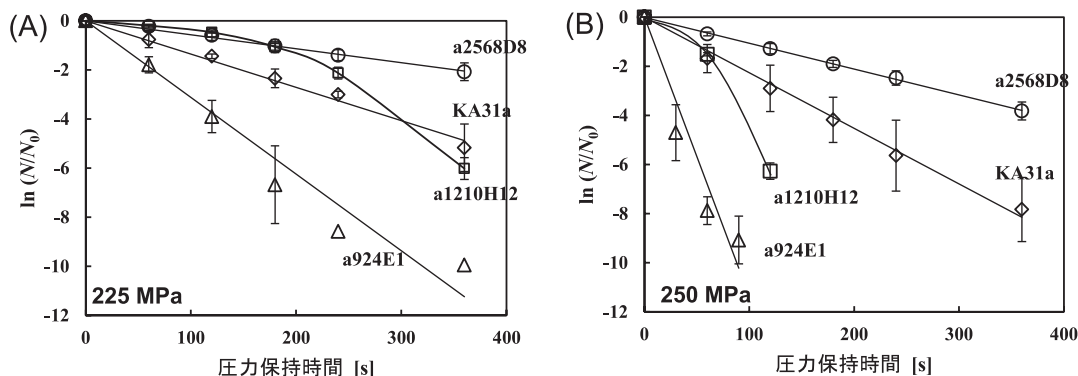


図1. *S. cerevisiae* KA31株およびその変異株の(A) 225 MPaおよび(B) 250 MPaにおける圧力不活性化曲線

ショックを施し、タンパク質の修復を司る熱ショックタンパク質の発現を誘導すると、圧力耐性が増加する<sup>11)</sup>。

**出芽酵母の圧力不活性化挙動と圧力耐性・感受性変異株**

我々は、出芽酵母 *S. cerevisiae* の一倍体株である KA31a 株に紫外線を照射することでランダムな変異を誘発させ、得られた紫外線処理株の中から、親株に比べて圧力耐性（感受性）が変化した変異株を 3 株 (a924E1, a2568D8, a1210H12) 取得した<sup>12,13)</sup>。コロニーカウントで求めた生菌数に基づき解析した親株および a924E1 株, a2568D8 株の圧力不活性化挙動は、圧力保持時間の長さに依存して生存率 ( $N/N_0$ ) の自然対数値が直線的に減少することから、上述の式 (1) に示す一次反応で近似でき (図 1)、これらの株の圧力不活性化は標的理論の 1 ヒット死モデルに従うことが示唆された。

各々の株について各処理圧力における不活性化速度定数を算出し、表 1 に示した。検討したすべての処理圧力条件で、a924E1 株の不活性化速度定数は親株よりも高い値を示した。一方、a2568D8 株の不活性化速度定数は、親株よりも小さな値を示した。以上の結果から、紫外線処理による変異により、a924E1 株は圧力感受性を獲得し、a2568D8 株は圧力耐性を獲得したことが示された。

興味深いことに、a1210H12 株の圧力不活性化挙動は一次反応で近似できなかった (図 1)。この株の不活性化挙動は、標的理論における多重ヒット死モデルに基づく式 (2)<sup>14)</sup> で近似できることが示された。

$$N = N_0 \cdot [1 - (1 - e^{-kt})^m] \quad (2)$$

ここで、 $m$  は細胞当たりの標的（細胞の生死を決定する重要構造体）の数である。処理圧力 225 MPa、240 s 以下の保持時間では a1210H12 株の生存率 ( $N/N_0$ ) は親株よりも高いが、360 s の保持時間になると低くなった。この株の、圧力耐性・感受性が処理条件によって変化する表現形質は、250 MPa の圧力処理においても現れたので、a1210H12 株を圧力耐性変化株とみなした。

圧力処理を施した細胞懸濁液の生菌数をコロニーカウントで求めると同時に、細胞懸濁液を液体培養して増殖曲線を解析する<sup>15)</sup> ことで、誘導期の長さを算出した<sup>13)</sup>。その結果、KA31a, a924E1, a2568D8 株の誘導期は圧力保持時間に依存して長くなることが示された (図 2)。この結果から、圧力保持時間の長さに依存して増殖が遅れた細胞の割合が増加する可能性が示された。誘導期は a924E1 株でもっとも長く、KA31a, a2568D8 株の順で短くなった。この結果から、高圧処理に依存した細胞損傷からの回復が誘導期の延長に関与しており、この機能の優劣が圧力耐性・感受性と相関する可能性が示された。一方、a1210H12 株では圧力保持時間の長さ誘導期の長さの間に顕著な相関性は認められなかったので、この株は高圧処理による損傷により増殖遅延は引き起こさなかった、あるいは増殖遅延を引き起こすレベルの損傷が生じるとその細胞が回復できないことが示唆された。

2,3,5-Triphenyl-2H-tetrazolium chloride (TTC) 染色法により、各株の呼吸能を解析した。その結果、圧力耐性株 a2568D8 は親株 KA31a と同等の呼吸能が示されたが、圧力感受性株 a924E1 および圧力耐性変化株 a1012H12 は顕著な呼吸能の低下が示された。これらの結果から、ミトコンドリアの機能不全による好気呼吸能の欠損が圧力感受性を引き起こす原因の一つである可能性が示された。

以上のことから、遺伝的変異によって出芽酵母の高圧環境下での不活性化挙動が変化することを明らかにした。変異によって、圧力に対する耐性・感受性が変化するとともに、不活性化挙動が従う標的理論におけるモデル (1 ヒット死および多重ヒット死) にも変化を生じさせることを示した。圧力耐性・感受性には圧力処理に依存すると考えられる細胞損傷からの回復能に関与しており、ミトコンドリアの好気呼吸能が関わっている可能性を示した。今後、各変異株における変異が導入された遺伝子の同定ならびに解析を進めることで、致死的な高圧環境下での酵母の圧力耐性・感受性のメカニズムが解

表 1. 親株 KA31a および各変異株の圧力不活性化速度定数

株名	不活性化速度定数 $k[s^{-1}]$				
	150 MPa	175 MPa	200 MPa	225 MPa	250 MPa
KA31a	ND	0.0019 ± 0.0002	0.0035 ± 0.0004	0.0089 ± 0.0004	0.0269 ± 0.0009
a924E1	0.0019	0.0058 ± 0.0006	0.0065 ± 0.0006	0.0286 ± 0.0005	0.0847 ± 0.0055
a2568D8	ND	ND	ND	0.0057 ± 0.0005	0.0107 ± 0.0009
a1210H12	ND	ND	0.0058 ± 0.0008	0.0294 ± 0.0013	0.0828 ± 0.0046

平均値 ± 標準偏差を示した。ND, Not determined

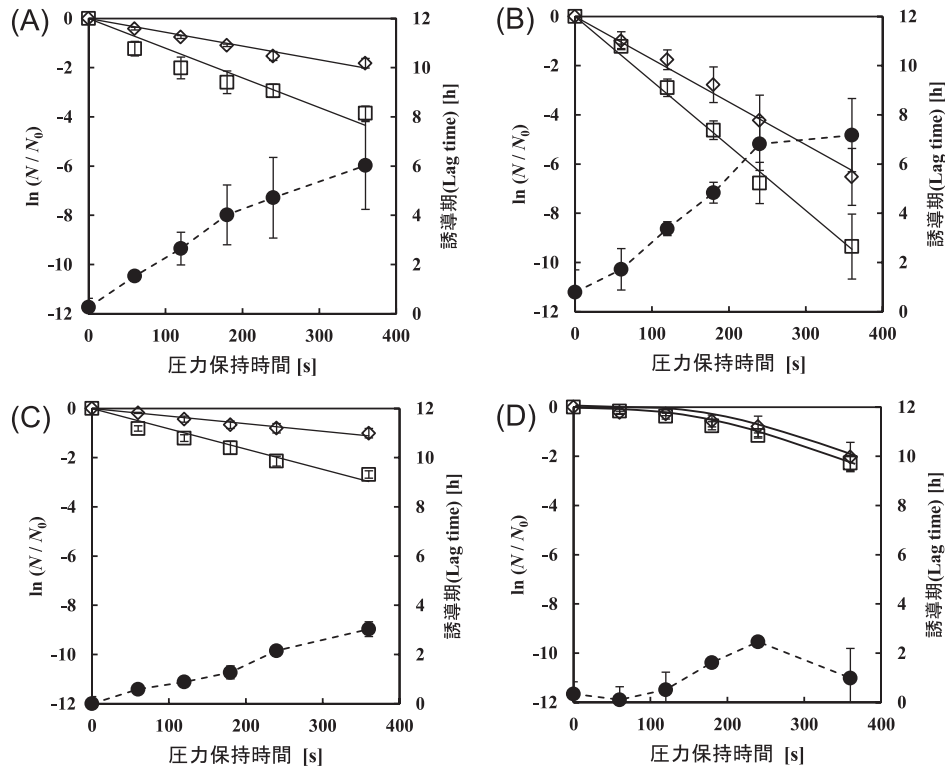


図2. KA31a株 (A), a924E1株 (B), a2568D8株 (C), a1210H12株 (D) の225 MPaにおける圧力不活性化曲線および誘導期 (Lag time), コロニーカウント (◇) および液体培養における増殖曲線解析 (□) に基づく生存率, および算出した誘導期の長さ (●) をそれぞれ示した.

明され, 圧力耐性・感受性を遺伝的に制御する技術の確立につながるものと期待している.

### 酵素反応と高圧環境

これまで, 高圧環境下での微生物細胞の不活性化についてさまざまな知見が蓄積されてきた一方で, タンパク質, 脂質, 糖質など生体物質に及ぼす圧力の影響についても精力的な研究が進められている<sup>16)</sup>. 生体物質に及ぼす圧力の影響を理解する上で, 熱力学的なアプローチが重要となる.

ある系のギブズエネルギー ( $G$ ) は, 式 (3) として定義される.

$$G = H - TS = U + PV - TS \quad (3)$$

ただし,  $H$ はエンタルピー,  $U$ は内部エネルギー,  $V$ は体積,  $S$ はエントロピーであり,  $P$ は圧力,  $T$ は温度である. 圧力および温度を変数としたときのギブズエネルギーの微小変化を示すと次のようになる.

$$\begin{aligned} dG &= dU + (PdV + VdP) - (TdS + SdT) \\ &= (TdS - PdV) + (PdV + VdP) - (TdS + SdT) \\ &= VdP - SdT \end{aligned} \quad (4)$$

ある可逆反応において, ある一定の圧力条件 ( $dP = 0$ ) におけるギブズエネルギー変化 ( $\Delta G$ ) の温度微分は, この反応におけるエントロピー変化を  $\Delta S$  とすると, 式 (5) で表せることになる.

$$(\partial \Delta G / \partial T)_P = -\Delta S \quad (5)$$

したがって, この系は温度の増加に従って, エントロピーが最大となる状態に向かって化学平衡がシフトすることがわかる. エントロピーの微小変化は, 内部エネルギーの微小変化と体積の微小変化により表すことができるので, 温度は系の内部エネルギーと体積を同時に変化させる因子とみなすことができる.

一方, ある可逆反応において, ある一定の温度条件 ( $dT = 0$ ) におけるギブズエネルギー変化 ( $\Delta G$ ) の圧力微分は, この反応における体積変化を  $\Delta V$  とすると, 式 (6) で表せることになる.

$$(\partial \Delta G / \partial P)_T = \Delta V \quad (6)$$

この式から, この系は圧力の増加に従って, 体積が最小となる状態に向かって化学平衡がシフトすることがわかる. このことは, ル・シャトリエの原理に合致する.

このように、温度は系の内部エネルギーと体積を同時に変化させる因子とみなすことができる。これに対して、圧力は、体積変化のみに影響することがわかる。このことが圧力と温度との決定的な違いであり、高圧処理と加熱処理の作用の違いを生み出す理論的な根拠と考えることができる。

タンパク質が高圧環境にさらされると、その非変性状態と変性状態のコンフォメーションの平衡 ( $N \rightleftharpoons D$ ) は、上記の熱力学的な記述に従って最小体積の状態に向かってシフトすると考えられる。圧力によるタンパク質のコンフォメーションの変化は、主に、分子内の隙間の体積減少と水和状態の変化によって生じると考えられている<sup>17)</sup>。個々のコンフォメーション状態をとるタンパク質のポピュレーションの可逆的な変化は、圧力による酵素の見かけ上の活性の変化となって現れる。我々はペクチナーゼ酵素剤 (スミチームPTE; 新日本化学) の活性に及ぼす圧力の影響を解析した(図3)<sup>18)</sup>。0.1 MPa(大気圧)から200 MPaにかけては処理圧力の上昇に伴って反応初速度が増加した。しかし、200 MPaから300 MPaにかけては処理圧力の上昇に伴って反応初速度が減少し、200 MPaにおいて活性が最大となった。この結果は、ペクチナーゼのコンフォメーションの平衡が200 MPaにおいて活性に最適となり、これ以上の圧力条件においては、変性状態にシフトすることを示唆している。

コンフォメーション平衡の変性状態へのシフトに対するタンパク質の圧力耐性はタンパク質の種類によって異なるが、 $\alpha$ -アミラーゼ、 $\beta$ -アミラーゼ、 $\beta$ -グルカナーゼなどの酵素タンパク質は、室温において600 MPa以上の圧力条件でも活性を示すことが報告されている<sup>19)</sup>。100から600 MPaの高圧環境下におけるコンフォメーション平衡のシフトによって、酵素の活性は、抑制され

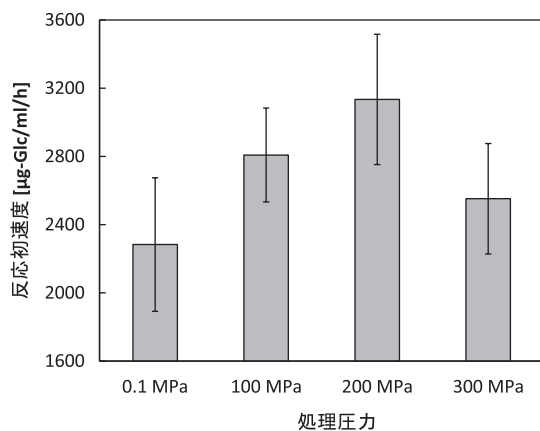


図3. スミチームPTEのペクチナーゼ活性におよぼす圧力の影響。各圧力条件下でペクチンを基質として反応を行い、還元糖濃度の増加初速度を示した。

るだけでなく向上する場合もあることにも注目すべきである。

#### 特異状態微生物学に対する高圧研究のアプローチ

生体物質および微生物に対して圧力処理を施す研究は、殺菌による保存期間の延長、食品素材の物性ならびに生化学的な変化を目的とした非熱的な食品加工技術への応用が大きな原動力の一つとなって進展してきた<sup>20)</sup>。しかし、本特集の主題である特異状態微生物学という切り口で、改めて高圧研究を見直してみると、いくつかの有益な潜在力が見受けられる。たとえば、微生物が環境ストレスによって被る細胞損傷を、増殖の程度ではなく、圧力不活性化挙動という新しい評価軸で解析することを可能とするものである。また、圧力が系の体積にのみ影響する原則から、圧力を用いた実験を行うことで生体分子と溶媒(水に溶解させたタンパク質など)により構成される系の体積変化に関する情報を求めることができる。生体高分子や微生物の示す生命現象を、鍵となる因子の体積変化から解析するアプローチは、圧力を用いることによってのみ可能なユニークなものと考えられる。

#### 文 献

- 1) ZoBell, C. E.: High pressure effects on cellular processes, p. 85, Academic Press (1970).
- 2) Abe, F.: High-pressure microbiology, p. 167, ASM Press (2008).
- 3) Kawarai, T. et al.: *J. Biosci. Bioeng.*, **101**, 515 (2006).
- 4) Aertsen, A and Michiels, C. W.: High-pressure microbiology, p. 87, ASM Press (2008).
- 5) 大隅正子: 加圧食品—研究と開発—, p. 157, さんえい出版 (1990).
- 6) Ueno, S. et al.: *J. Food Sci.*, **76**, M47 (2011).
- 7) Abe, F. and Horikoshi, K.: *Mol. Cell. Biol.*, **20**, 8093 (2000).
- 8) Abe, F. and Minegishi, H.: *Genetics*, **178**, 851 (2008).
- 9) Iwahashi, H. et al.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **66**, 5182 (2000).
- 10) Kobori, H. et al.: *FEMS Microbiol. Lett.*, **132**, 253 (1995).
- 11) Iwahashi, H. et al.: *FEMS Microbiol. Lett.*, **80**, 325 (1991).
- 12) Shigematsu, T. et al.: *J. Food Sci.*, **75**, M509 (2010).
- 13) Nanba, M. et al.: *High Pressure Res.*, **33**, 299 (2013).
- 14) Uden, N. V. et al.: *Arch Microbiol.*, **61**, 381 (1968).
- 15) Hasegawa, T. et al.: *J. Biosci. Bioeng.*, **113**, 788 (2012).
- 16) 重松 亨, 西海理之 監: 進化する食品高圧加工技術, エヌ・ティー・エス (2013).
- 17) Fourme, R. et al.: *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **22**, 636 (2012).
- 18) Kido, M. et al.: *High Pressure Res.*, **33**, 237 (2013).
- 19) Knorr, D. et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, **1764**, 619, (2006).
- 20) 林 力丸: 食品と開発, **22**, 55 (1987).