

細菌の線膨張率の特性は、 栄養細胞ではプラスチックに、芽胞では金属に似ている

中西 弘一^{1*}・小暮 亮雅²・桑名利津子³・高松 宏治³

自然を支配する根本法則は数式で表せる 整数やユークリッド幾何学や微分・積分は目で見える自然をそのまま抽象的な数字や図形として写し取ったものであり、一見して秩序がないように見える自然界の現象は解析方法を工夫することによって数式に従っていることがわかる。特に解析力学で自然界の生物現象などまったく異なった現象が単純な式として表現される。素材分野で見ると、固形材料は、加熱すると膨張し、一般的に熱クリープ曲線を示す。3次元のZ軸方向から一定の応力をかけて加熱すると、熱応力により、膨張量は一定の熱膨張率で上昇する¹⁾。材料の物性が変化する転移温度に近づくにつれ膨張率は低下し、膨張量は最大になる。その結果、転移温度を頂点とした曲線を描く。この転移温度は固形材料の場合、その融点として求めることができる¹⁾。たとえば、金属とプラスチックのように材料が異なれば、融点や熱膨張の状態も異なり、曲線のパターンは異なる。これを生物に当てはめて考えてみるとどうであろうか。微生物細胞は単一の固形材料ではなく、さまざまな成分から成り立っており、その種や、細胞の生活環境の状態によって成分も異なる。そのため、たとえば芽胞形成細菌のように栄養細胞と耐久性のある芽胞の比較のように、膨張量から求められる膨張率や転移温度も種や細胞の状態により異なり、細胞の構造の研究に対する新しいアプローチになると考えた。しかし、これまで細胞1個当たりの膨張量から膨張率、転移温度を計測する有効な手段や報告はない。我々は、薄い膜状素材の熱膨張率や転移温度を計測するナノサーマルアナリシス(nanoTA)という分析装置とプローブの接触により形状や表面観察に限らず物理用の計測が可能な走査型プローブ顕微鏡(scanning probe microscopy: SPM)²⁾を応用し、試料補足性能の高いナノサーチ顕微鏡(島津製作所)でこれら装置を組み上げて、これらを計測する方法を開発した。

SPMによる細胞の物理的計測方法と原理 線膨張率と転移温度計測は、SPMにnanoTAを取り付けた装置を用いた²⁻⁵⁾。細胞にSPMのカンチレバーを接触させ、一定応力をかけた状態で加熱し、膨張量をモニターし、転移温度を求められる^{2,3)}。この細胞の線膨張率 α を求め

る原理(図1)と、この加熱によるクリープ曲線を描くひずみ量の変化のモデル(図2)を示す。昇温に伴う試料の膨張、軟化、あるいはひずみは、試料に接触するSPMのプローブの上下の位置変化(Z軸方向の高さの変化)によって計測した。Stage Aでは、加熱により定率で細胞が膨張するため、Z値の変化から細胞の線膨張率を求めることができる。Stage Aにおいて、細胞の線膨張率 $\alpha = \Delta L/L_0\Delta T$ を、Z値の単位温度あたりの増加率($\times 10^{-6}/^{\circ}\text{C}$)として求めた¹⁾。L₀は加熱前の微生物細胞のZ軸方向の高さ(m)、 ΔL はプローブの温度を t_a から t_b まで上昇した時の細胞の膨張量(カンチレバーのひずみ量)(m)、 ΔT は t_a から t_b までの温度変化($^{\circ}\text{C}$)を示す。Z値が最大(Z_{max})となるプローブの温度をT_gとした。プローブの温度が t_b からT_gまでの、細胞の線膨張率が減少し0になるまでの状態をStage Bとし、線膨張率が0になるT_gの状態をStage Cとした。T_gを超えて加温を続けると、Stage Dになり、細胞のヤング率が小さくなっていきZ

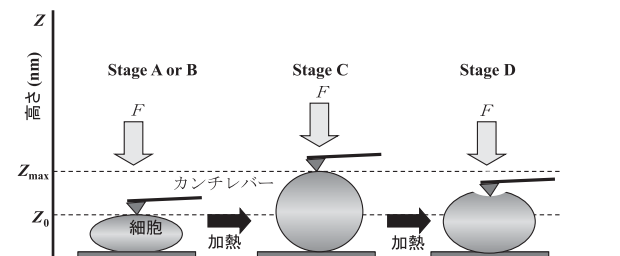


図1. 計測システムの原理。加熱による細胞や芽胞のZ軸方向の熱膨張とカンチレバーの位置。

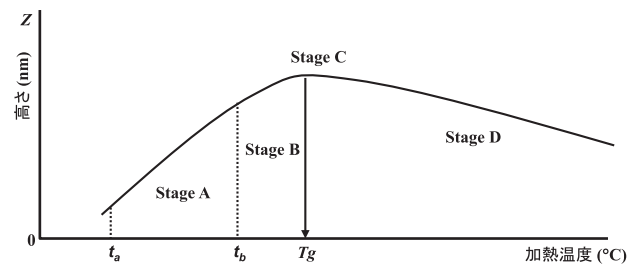


図2. ひずみ量(Z軸方向の高さ)の変化のモデル

* 著者紹介 ¹⁾ ナノ・マイクロバイオ研究所-中西技術士事務所 E-mail: chita-mbrc@u07.itscom.net, ²⁾ (株) 島津テクノロジー, ³⁾ 摂南大学薬学部

表1. 各菌株の加熱による線膨張率と転移温度

菌株	線膨張率 ($\times 10^{-6}/^{\circ}\text{C}$)	転移温度 ($^{\circ}\text{C}$)
栄養細胞		
<i>E. coli</i>	360 \pm 13.5	48 \pm 0.5
<i>Saccharomyces pastorianus</i> (酵母)	280 \pm 12.5	54 \pm 1.2
<i>P. aeruginosa</i>	230 \pm 16.5	56 \pm 0.9
<i>S. aureus</i>	190 \pm 10.5	58 \pm 0.7
<i>B. subtilis</i>	105 \pm 7.5	71 \pm 1.8
<i>G. stearothermophilus</i>	65 \pm 8.9	83 \pm 3.2
芽胞		
<i>B. licheniformis</i>	19 \pm 0.5	107 \pm 1.1
<i>B. megaterium</i>	18 \pm 0.5	113 \pm 0.9
<i>B. subtilis</i>	14 \pm 0.6	125 \pm 2.5
<i>B. coagulans</i>	11 \pm 0.2	131 \pm 2.0
<i>G. stearothermophilus</i>	8 \pm 0.3	172 \pm 1.2
<i>T. mathranii</i>	5 \pm 0.2	239 \pm 6.1
<i>M. thermoacetica</i>	4 \pm 0.3	289 \pm 6.7

表2. 主な固形素材の加熱による線膨張率と融点

素材	線膨張率 ($\times 10^{-6}/^{\circ}\text{C}$)	融点 ($^{\circ}\text{C}$)
プラスチック		
ポリカプロラクトン	122 \pm 3.5	55
ポリエチレン	102 \pm 7.5	116
ポリエチレンテレフタレート	70 \pm 5.5	235
ナイロン	65 \pm 4.5	256
金属など		
金	14.2	1063
アルミニウム	23	660
鉄	11.7	1539
シリカガラス	0.65	1600

値が減少する⁴⁾。

細胞の線膨張率と転移温度について 微生物細胞の加熱による線膨張率と転移温度の変化を表1に示す。比較のため、金属やガラスなどの線膨張率と転移温度(融点)を引用して⁵⁾、表2に示す。グラム陰性菌の *Escherichia coli* や *Pseudomonas aeruginosa* の栄養細胞は、グラム陽性菌の *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Geobacillus stearothermophilus* の栄養細胞より線膨張率が大きい転移温度が比較的良かった。真菌である *Saccharomyces pastorianus* (酵母) の栄養細胞はグラム陰性菌に近い線膨張率を示した。含水濃度が低い芽胞⁶⁾ は栄養細胞全般より、線膨張率は小さいが転移温度が比較的高かった。これらの結果から、芽胞は栄養細胞と比較して、局所的な加熱による変形度合いが小さいことが明らかになった。

転移温度は、たとえば素材の融点のように、加熱による微生物細胞の、ヤング率に代表される物性が変化する

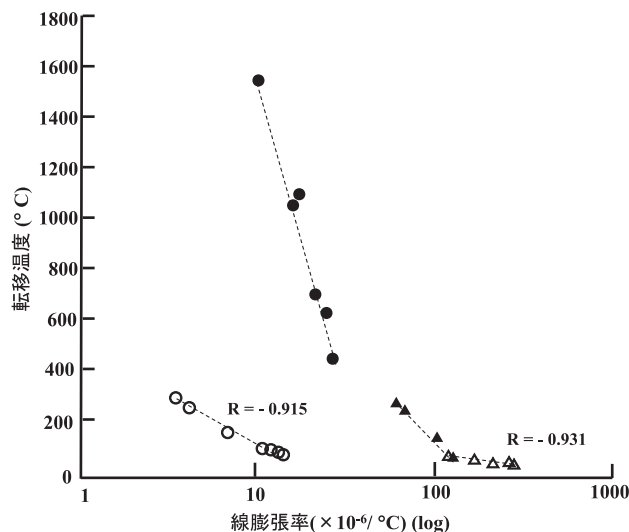


図3. 計測システムの原理. 加熱による細胞や栄養細胞と芽胞, プラスチックと金属との線膨張率と転移温度の比較. ○: 栄養細胞, △: 芽胞, ●: 金属, ▲: プラスチック.

温度とも考えられ、微生物の構造が加熱により物理的に不可逆的に破壊される加熱死滅温度と考えられる。表1ならびに表2の結果を図3にプロットすると、線膨張率と転移温度の間には、栄養細胞 ($r = -0.931$) および芽胞 ($r = -0.915$) とともに負の高い相関が認められた。微生物以外の材料と比較すると、線膨張率が高く転移温度(融点)の低い栄養細胞はプラスチックに似ており、線膨張率が低く転移温度(融点)が高い芽胞は金属に似ていた。

このように、細胞を物理的指標として線膨張率で特徴づけると、線膨張率は体積変化、表面積変化、細胞に含まれる水分の膨張度合いと、浸透圧に対する細胞膜の強度に関係し、細胞を構造的に特徴づけることができると考えられる。そして他の多くの手法に対し、細胞の特徴の理解を深めるための新たな指標となるだろう。今後、さらに加熱による膨張率の変化に合わせてヤング率の変化を追跡することも、また細胞の物理的性質を理解するのに有効な解析ツールと考えられる。

文 献

- 1) Timoshenko, S. P. and Young, D. H.: *Elements of Strength of Materials 5th edition*, D. Van Nostrand Co., Inc., Princeton, New Jersey, U.S.A. (1968).
- 2) 秦 信宏ら: 走査型プローブ顕微鏡入門, オーム社 (2014).
- 3) Shimadzu Corp: <http://www.shimadzu.com/an/surface/nano-ta.html> (2012).
- 4) Nakanishi, K. et al.: *J. Nanobiotechnol.*, **11**, 33 (2013).
- 5) Buschow, K. H. J. ed.: *Encyclopedia of Materials: Science and Technology*, Elsevier, Amsterdam Netherland (2001).
- 6) Parcedes-Sabja, D. et al.: *J. Bacteriol.*, **190**, 4648 (2008).
- 7) Nakanishi, K. et al.: *J. Nanobiotechnol.*, **10**, 22 (2012).