

図 5

Poly (C+Na⁺), Poly (G+C) ΔH_5 Poly (G+C), Poly G ΔH_6
 Poly G, Poly C ΔH_7 Poly C. いま, 観測熱を ϕ とし, ΔH_5 , ΔH_6 , ΔH_7 の希釈熱は非常に希薄領域を取扱っているの
 で, 希釈熱は小さいとして無視すると, Poly (G+C)

complex の ΔH_1 は,

$$\Delta H_1 = \phi - (\Delta H_2 + \Delta H_3 + \Delta H_4)$$

上式を使って, 解析すると, Poly (G+C) complex の形成に要するエネルギーは約 -12.3 kJ/BPM となる。

以上, 生体高分子の高次構造の研究手段として, 熱分析, 熱量測定を紹介した。特に熱分析, DSC による研究手段について, 大阪府大の高橋氏が炉とセルの間の熱交換が起ることによって, 熱測定の効率が悪いと指摘しているが, 何ら定量的なことについては言及していない。この問題に関して, 実際, 炉に比較してセルは非常に小さく, また反応熱も非常に小さいため, その熱交換がどの程度熱量測定に影響を及ぼすか疑問である。しかし, この問題についてさらに検討すべきであろう。

なお紙面の都合上, 分光学的な知見についての詳細, その他, Poly A と Poly U の混合熱, その環境変化による構造変化, DNA の環境変化による Conformational な挙動, コラーゲン分子の抽出方法による熱変性の相異など紹介できないのが残念である。今後, これらの基礎データをもとに, 構造と生物機能との関連を追求し, 具体化していきたい。

研究ノート

細菌胞子「活性化」過程の示差熱分析

1. はじめに

前田好美*, 古賀正三*

Bacillus 属や *Clostridium* 属などの細菌は適当な培地で培養すると, 培養の後期に耐久器官としての胞子(芽胞)を形成する。胞子は熱・薬剤・放射線などに対して著しく高い抵抗性を示す。たとえば栄養細胞は 333K の加熱によって死滅する菌が多いが, 細菌胞子は 373K の加熱によっても死滅しない場合が多い。むしろ細菌胞子は 333K 前後の温度で加熱すると発芽しやすくなる。この現象を「熱活性化」という。「熱活性化」によって起る効果としては, 発芽率ならびに発芽速度が高くなること以外に発芽誘導物質に対する要求性が変化することや Glucose oxidation のような代謝活性が出現することが知られている。このように加熱処理によって現象的には顕著な差異がみられるにもかかわらず, その機構についてはほとんど分

っていない。加熱処理によって胞子細胞中のある種の高分子(おそらくは蛋白質)の高次構造が変化して活性化されるのであろう。そしてこの過程では代謝反応は行われていないという考えが漠然とあるけれども, またほかの考え方もあって, その点を確める実験方法が困難なため, いまのところははっきりしていない。

もしも胞子成分の高次構造に変化が起るなり, 胞子中の何処かに相転移が起るなりするのであれば, 微少な熱の出入りを伴うだろうから, 胞子の生細胞を試料として示差熱分析を行えば, 問題の手掛りが得られるだろうという希望をもって始めた著者らの仕事の一部をつぎに述べる。

* 東京大学応用微生物研究所: 東京都文京区弥生 1-1-1

Yoshimi Maeda, Shozo Koga: The Institute of Applied Microbiology, University of Tokyo

2. 実験方法

定量示差熱分析用に関与された第二精工舎製熱リーク走査型熱量計 SSC-540 を使用した。本装置は昇降温をゆっくり行なうことができるので、温度軸に関する分解能がよく、基線が安定し、再現性にすぐれている。

使った菌株は *Bacillus cereus* IFO 3131 で、303K, 48 時間の培養で孢子を得た。培地組成などについては著者らの論文を参照されたい。^{1), 2)} 微生物試料のような水を含む系の場合に最も問題になる点は、水の蒸発による巨大なピークによる妨害を防ぐことであるが、本装置附属の試料密封装置を使って容器を密封することで目的を達することができた。しかしそれでも試料容器の内壁と蓋の間にはさみこまれた水分が蒸発することによりピークを生じ、信号と混同される場合があるが、これもあらかじめ、密封した試料容器を真空デジケータに入れて減圧することによりほぼ防ぐことができた。次に問題になる点は感度であるが、なるべく感度を試料量でもかせぐために、遠心分離によって得られたペースト状の孢子の附着水を更に素焼板で吸い取って、水分含量 60% 程度にしたものを 70mg 前後容器に入れて測定した。

3. 実験結果

3.1 細菌孢子の示差熱曲線と「熱活性化」の相関

昇温速度 0.6K/min で測定した細菌孢子の熱曲線は図 1 のようになった。すなわち 329K, 368K, 376K に 3 つの吸熱ピーク、378K にするどい発熱ピークが認められた (ピークの位置はすべてその頂点の温度位置で示した)。図には示さなかったが、栄養細胞の場合には 339K に吸熱ピークが認められた。¹⁾ 孢子の 329K ピークは栄養細胞よりも低いところにあり、熱抵抗性の強い孢子が低い温度のところで吸熱反応を起しているのは興味深い。多分これが孢子に特有の「熱活性化」に関係しているピークであろう。そこでこの点を確かめるために孢子の懸濁液をいろいろの温度で 30分または 60分加熱してから、303K で 1% L-Alanine, 0.07mol Tris buffer (pH7.0) にあらためて懸濁し 30分後の発芽率を測定した。その結果を同じく図 1 に示した。329K ピーク付近で発芽率が急激に上昇し、活性化が起っていることが分った。また熱量計の中で 329K ピークの高温側まで加熱した孢子とその手前で加熱走査をとめたものについて同じように発芽率を比較したところ、前者の方が発芽率が高く、活性化されていることが分った。¹⁾ 「熱活性化」が起るには水が必要であるといわれているが、孢子を凍結乾燥して水分含量を少くしたもの (8.6%) は 329K のピークは認められなかった。¹⁾ これらのことから孢子にみられる低温側

の 329K ピークは「熱活性化」に関係していると思ってよいであろう。

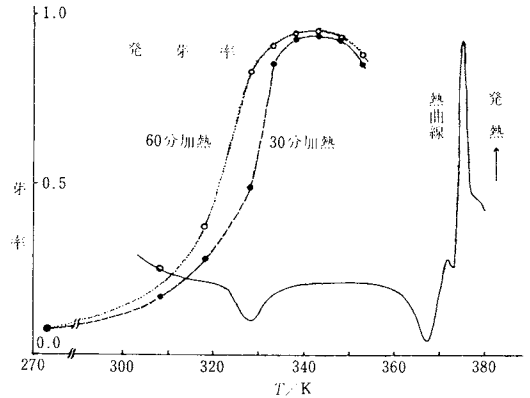


図 1

3.2 「熱活性化」の可逆性

細菌孢子の「熱活性化」は可逆的な現象であるといわれている。たとえば 338K, 45分間加熱して活性化した孢子を 301K で 72時間おくと活性 (発芽率) が 80% 減少し、休眠状態にもどると報告されている。³⁾ また著者らの結果でも、333K, 1時間の「熱活性化」を行なった孢子について、急激に冷却したものを基準にして、0.11K/min のゆっくりした速度で 303K まで冷却、その温度で 0, 7, 14 日間おいたものの発芽活性を測定したところ、それぞれ 36.5%, 66.3%, 77.6% だけ活性が減少し、活性化を行なった後で低温側におくことによって活性化効果が大部分消滅することが分った。前述の 329K ピークについてその可逆性を確かめるために、孢子を 0.6K/min で 333K まで昇温して 329K ピークが出たものを、ただちに 0.6K/min の速度で降温したところ、329K 吸熱ピークの逆反応と思われる発熱ピークが 315K に現われた。つまり問題のピークを示す反応は多少のヒステレシスを伴いながら可逆的に起るのであって、「活性化」現象との相関性はますます強まったものと考えてよいだろう。

3.3 「熱活性化」と水の構造

著者らは前に *Bacillus megaterium* の孢子について、これを部分的に乾燥した試料の水分の状態を、同様に処理した栄養細胞と比較して、誘電率・NMR などの測定から孢子中の水分子は運動の自由性を束縛された状態にあることを示した。⁴⁾ このことは *Bacillus stearothermophilus* の孢子についても認められた。

Bernal と Fowler (1933年) は水の「構造温度」という言葉を使っているが、その後 Worley と Klotz はいろいろの無機塩類や高分子の水溶液について近赤外線吸収を測定し、NaBr, NaSCN などは「構造温度」を上げる働きがあり、CH₃COONa はほとんど影響なく、Polyvinylpyr-

rolidone (PVP) は下げると報告している。⁵⁾ ここで見ているのは水分子間に出来る水素結合数の増減であるから、別の言い方をすればNaBr, NaSCNは水素結合による水の構造性を破壊し、PVPはその構造性を増加させるということになる。上述の近赤外線吸収を目安にした方法によると、たとえば2.48mol NaBrの278K水溶液中の水と299Kの純水とは同じ「構造温度」をもつことになる。(「構造温度」は目安とする物理量の種類によって異なるから、ここにあげた溶質の分類は、普通にいわれているStructure breakerなりStructure makerとは必ずしも一致しない。)

前記したように孢子の活性化には水分の存在が必要であるから、水の「構造温度」を変えるような物質を添加することによって活性化温度を移動させ、したがって示差熱曲線上のピークを動かすことができはしないだろうかと考えて、上記の塩類や高分子について、その添加の329Kピークに対する影響を調べてみた。その結果は図2に示すように、329KピークはNaSCN, NaBrにより低温側に移動し、CH₃COONaやPVPによっては3~4Kだけ高温側に移動した。また孢子の発芽率に対するNaSCNやNaBr添加の影響を調べたところ2.5mol~5molの濃度では室温でも活性化することが認められた。

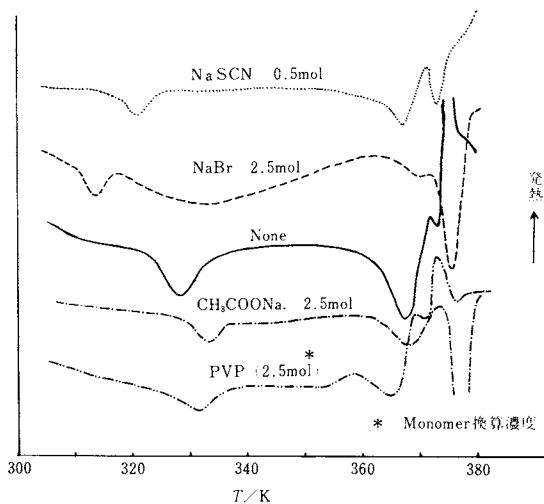


図2

4. おわりに

われわれはここで孢子の「活性化」が水の構造破壊に

よって引金を引かれると結論するほど楽観的ではない。しかしながら示差熱曲線にあらわれた329Kピークがこの現象とかかわりあいがある、その反応が起るためには、共存する水分の「量」と「質」とが問題であることは確かのように思われる。ところで水の構造変化と同時に(あるいは相前後して)起る孢子「活性化」の本番は何であろうか—今のところ皆目わからない。もしもこれが高分子、たとえば蛋白分子の高次構造変化だとすれば、可逆的であるところからみると溶液相の出来事ではなく、孢子の構造部分で起る反応であろう。そして添加物質の影響をまともに受けることからすると、その場所は細胞の外層部ではないだろうか。休眠中の孢子では、自由水にくらべて構造性に富んだ水が、外層マトリックスを構成しているこの高分子に接して局在しているのかも知れない。つぎに前述した筆者らの誘電率その他のデータ⁴⁾が同一部分の水の行動を示している(その保証はいまのところないから別の考え方もできる。)ものだとすれば、この局在の水は疎水性の水和水ではなくて親水基によるものであろう。さらに解離基のまわりの水和水が水素結合による高い構造性を示すとは考えにくいから、非解離性の極性基の近傍にある水ではなかろうか。それも孤立した極性基ではなくて、マトリックス上にそれも周期的に分布した極性基の影響下に構造性に富む局在水を作っているのであろう。

いずれにしても、こうした物理化学的過程につきまして酸素消費を伴う代謝反応が起るわけであって、このあたりに「物理学」と「生理学」の境界線をさぐる途はまだまだ遠く険しい。

いろいろと御教示・御討論いただいた私たちの研究室の藤田暉通助教授と河合良夫氏に深謝いたします。

文 献

- 1) Y. Maeda, Y. Teramoto, S. Koga, J. Gen. Appl. Microbiol. **21**, 119 (1975).
- 2) Y. Maeda, S. Noguchi, S. Koga, J. Gen. Appl. Microbiol. **20**, 11 (1974).
- 3) A. Keynan, Z. Evenchik, H. O. Halvorson, J. W. Hastings, J. Bacteriol. **88**, 313 (1964).
- 4) Y. Maeda, T. Fujita, Y. Sugiura, S. Koga, J. Gen. Appl. Microbiol. **14**, 217 (1968).
- 5) J. D. Worley, I. M. Klotz, J. Chem. Phys. **45**, 2868 (1966).