

Moorella thermoacetica 芽胞の発芽誘起剤と発芽阻害

青山 好男

Germinants and Inhibition of Germination of *Moorella thermoacetica* Spores

Yoshio Aoyama

Moorella thermoacetica is a putrefactive microorganism in canned low-acidic beverages sold in hot-vending machine. Since their spores are very heat-resistant, they are target microorganism for heat sterilization of low-acidic beverages. There are few information about germination of their spores. In order to develop a new control method of *M. thermoacetica*, information on the germination mechanism of *M. thermoacetica* spores was investigated. Because dormant spores germinate in culture medium such as modified thioglycollate medium, the medium must contain germinants for these bacterial spores. The medium contains eight constituents. Omission test of each constituent taught us that four constituents, Trypticase peptone, Phytone(Soy peptone), L-Cystine, sodium thioglycollate are indispensable for the germination of *M. thermoacetica* spores. L-serine and L-alanine were found as germinants in Trypticase peptone. The germination inhibition test with structural analog and derivatives of the amino acid was performed. As a result, dipeptide or tripeptide of L-serine was found to inhibit the germination.

Key words: spore, germination, germinants, *Moorella thermoacetica*

加温販売されている低酸性飲料では、高温性芽胞菌を死滅させるために、高温で長時間の加熱殺菌処理が施されている。高温性芽胞菌の中で、*Moorella thermoacetica* は芽胞の耐熱性が非常に高く、加熱処理のみで制御することは困難で、さらに抗菌性乳化剤を添加して、その増殖を防止している。低酸性飲料の製造において、この菌の制御は多大な負担となっている。一方、芽胞菌には、芽胞形成や発芽という特徴的なライフサイクルがある。発芽を阻害する、発芽させてから殺滅するなど、発芽情報を新たな制御技術開発に応用することによって、加熱殺菌条件の緩和や抗菌性乳化剤添加量低減の可能性がある¹⁾。しかしながら *M. thermoacetica* の発芽に関しては、ほとんど研究がなされておらず、発芽誘起剤などの情報は無い。そこで、本研究では *M. thermoacetica* の発芽誘起剤を調べ、その結果を利用して発芽阻害を検討することとした。

実験方法

1. 菌株および芽胞調製

菌株はミルクコーヒー缶詰変敗品から分離された *M. thermoacetica* 24-1 株²⁾ を用いた。試験に供した芽胞液の調製は以下のとおりである。冷蔵保存されていた本菌株芽胞液を加熱活性化 (100℃, 5 分) した後、寒天を加えた mTGC 培地に接種し、混釈培養法で培養した。アネロパック嫌気システムを用いて、55℃で 10～12 日間、嫌気培養し芽胞を形成させた。生じたコロニーを掻き取り滅菌希釈

水に懸濁し芽胞-栄養細胞懸濁液を調製した。この懸濁液を加熱処理—リゾチーム処理—ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) 処理により純度 95% 以上の精製芽胞液を調製した。これらを使用直前まで冷蔵保存した。

2. 培地や試薬

mTGC 培地は日水製薬で製造・販売されている粉末状の混合物である。培養および発芽試験の両方に用いた。mTGC 培地はカゼイン製ペプトン、大豆製ペプトン、グルコース、塩化ナトリウム、寒天、L-シスチン、チオグリコール酸ナトリウム、亜硫酸ナトリウムの 8 つの素材からなっている。発芽に必須なものを調べるために、オミット試験を行った。カゼイン製ペプトン、大豆製ペプトンは天然素材で化学組成が不明である³⁾。カゼイン製ペプトンと大豆製ペプトンとして、それぞれ BBL の Trypticase peptone, Phytone peptone を用いた。また Phytone peptone の代わりに Difco の Yeast extract に用いることができるかの試験も行った。L-シスチン、チオグリコール酸ナトリウムなどは試薬特級を用いた。発芽阻害試験に用いた光学異性体の D-セリン、D-アラニン、L-アラニンは試薬特級を用いた。また L-セリンとグリシンからなるジペプチド (L-セリン-グリシン, グリシン-L-セリン), トリペプチド (L-セリン-グリシン-グリシン, グリシン-グリシン-L-セリン) および L-アラニンとグリシンからなるジペプチド (L-アラニン-グリシン, グリシン-L-アラニン), トリペプチド (L-アラニン-グリシン-グリシン, グリシ

ン-グリシン-L-アラニン)は、アミノ酸配列を指定し、GenScript社で固相合成法により合成されたものを購入した。純度は98%以上である。

3. 薄層クロマトグラフィーによる分画および発芽試験液の調製

Trypticase peptone 1.7% 水溶液, Yeast extract 1.0% 水溶液を試料として用いた。プレートはMERCシリカゲル60 (20 cm × 20 cm) を使用し、展開溶媒としてはn-ブタノール:酢酸:水=4:1:1を用いた。展開時間は約2時間で、スポット検出にはニンヒドリンスプレー (東京化成工業製 0.5% in 1-Butanol) を用いた。分析の際には二次元薄層クロマトグラフィーを行ったが、その場合は二次元目の展開溶媒としてエタノール:水=7:3を用いた。

発芽誘起剤探索に用いる発芽試験液は以下のように調製した。薄層クロマトグラムの一部をニンヒドリン発色し、その発色部分を参照して、残りの発色していない部分を分割した画分を小スパチュラで掻きとり、乳鉢ですりつぶし、少量の熱水を加えてよく練り湯浴で3~5分間加熱した。その後マイクロチューブに採取し、超音波処理 (発振周波数 42 kHz-200 W, 15 分間) した。この沸騰水浴中での加熱と超音波処理を繰り返し5回行った。最後に、その液を遠心処理 (日立 hiMac CR15D で 10,000 rpm 10 分) し、上清を発芽試験液として用いた。上清の可溶性成分濃度をBrix計で測定した。Bxは0.3~0.4であった。

4. 発芽評価

発芽評価は経時的に濁度を測定する方法で調べた^{4,5)}。恒温セルホルダー付属の日立分光光度計U-2000を用い、55℃設定で発芽試験液 540 μl を微量分光セルにとり、5分間予熱した後、加熱活性化処理された精製芽胞液を 60 μl 加えて、650 nm での光学密度を濁度として、その低下を経時的に調べた。初発の濁度は0.5前後で、この濁度は芽胞数として約 10⁷ CFU/ml に相当している。加熱活性化処理は100℃、5分である。芽胞は、その調製ロットによって発芽率が変動するため、発芽試験においては調製ロットが変わるたびにmTGC培地での発芽試験を行い、そのmTGC培地での濁度低下を100とした相対百分率で発芽度を評価した。発芽度は最大発芽速度 (1分あたりの濁度低下) もしくは発芽試験2時間後の濁度低下を用いた。

実験結果と考察

1. 発芽に必要な培地素材

mTGC 培地の組成は表1のとおりである。培地の8つの素材で発芽に必要なものを知るために、オミット試験 (素

材を1つずつ除いた7素材構成液での発芽試験)を行った。その結果を図1に示す。Trypticase peptone, Phytone peptone, チオグリコール酸ナトリウム, L-シスチンの4素材を除去した場合には、発芽速度はmTGC培地の場合の20~30%に低下した。その4成分以外のものを抜いた場合は80%以上であった。この結果から、発芽に必要な素材はTrypticase peptone, Phytone peptone, チオグリコール酸ナトリウム, L-シスチンの4つと判断された。

これら4素材の混合液を用いて発芽試験を行ったところ、mTGCと同様な発芽速度を示した。またPhytone peptoneの代わりにYeast extractを用いてもmTGCと同等な発芽曲線を示した (図2)。その組成は、表2の通りで、これを発芽液として発芽誘起剤探索に用いることとした。

表1 mTGC 培地の組成

成分	重量%
Trypticase peptone	1.7
Phytone	0.3
グルコース	0.6
塩化ナトリウム	0.25
寒天	0.07
チオグリコール酸ナトリウム	0.05
L-シスチン	0.025
亜硫酸ナトリウム	0.01

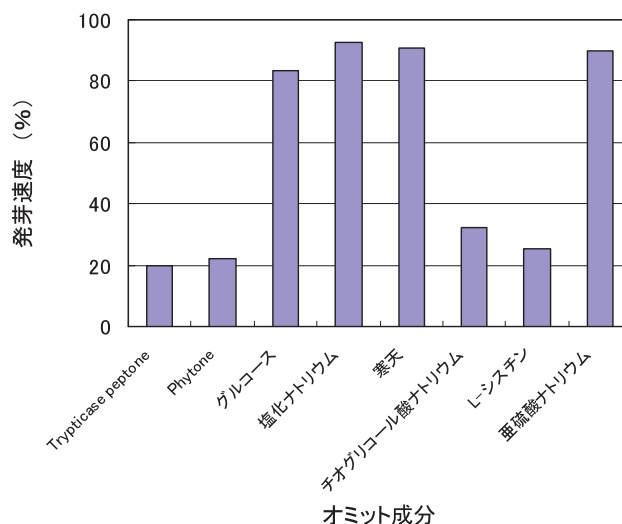


図1 mTGC 培地各成分の除去による発芽速度への影響
mTGC 培地での発芽速度を100とした相対値

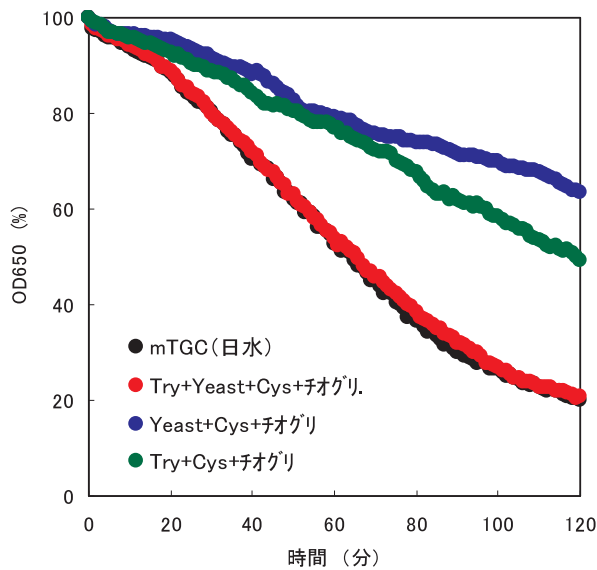
図2 4成分発芽液による *M. thermoacetica* 芽胞の発芽

表2 4成分発芽液の組成

成分	濃度
Trypticase peptone [®]	1.7%
Yeast Extract [®]	1.0%
L-シスチン	0.025%
チオグリコール酸ナトリウム	0.05%

2. 発芽誘起剤の探索

Trypticase peptone と Yeast extract は培地素材でアミノ酸やペプトンなどの窒素給源であり、種々の化合物の混合物である。発芽誘起剤検索の最終目的は、化合物レベルでの発芽液の調製である。そこで Trypticase peptone と Yeast extract 中に存在する発芽誘起剤を化合物レベルで検索した。発芽誘起剤の検索には、Trypticase peptone と Yeast extract の水溶液を薄層クロマトグラフィー (TLC) により数画分に分けて、その画分の発芽能を調べるという方法を用いた。Trypticase peptone 画分の発芽能試験は、画分の抽出液を Yeast extract, L-シスチン, チオグリコール酸ナトリウム混合液に加えたものを発芽液として発芽試験した。Yeast extract 画分の発芽能確認には、画分抽出液を Trypticase peptone, L-シスチン, チオグリコール酸ナトリウム混合液に加えたものを発芽液として発芽試験した。発芽能のある画分が見つければ、その画分をさらに分画し、発芽誘起剤の存在する画分を絞り込むという戦略である。

1) Trypticase peptone および Yeast extract の薄層クロマトグラム

Trypticase peptone と Yeast extract の TLC を図3に示す。これら2つはタンパク分解物でアミノ酸組成など類似しており、図3のクロマトグラムも類似していた。

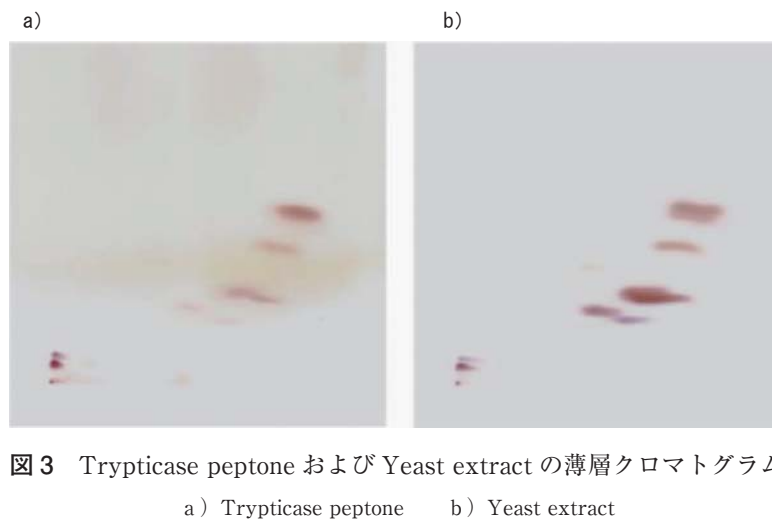


図3 Trypticase peptone および Yeast extract の薄層クロマトグラム

a) Trypticase peptone b) Yeast extract

2) Trypticase peptone 中の発芽誘起剤

Trypticase peptone 溶液を TLC 分画して、得られた3分画のそれぞれの画分からの熱水抽出液を用いた発芽試験の結果を図4に示す。画分B (Rf 0.08-0.30) が他のA,C画分に比べて高い発芽率であった。そこでB画分をさらに3分画して発芽試験した結果、Bのサブ画分③ (Rf 0.21-0.30) に高い発芽能があった。

Bのサブ画分③に存在する化合物を Rf 値や標品アミノ

酸の TLC で調べた結果、アミノ酸として L-アラニン, L-セリン, L-アスパラギン酸, L-プロリン, グリシン, L-スレオニンであった。これらの6アミノ酸すべてを Yeast extract-L-シスチン-チオグリコール酸ナトリウム混合液にそれぞれ 0.05% 加えて発芽試験したところ、80%の濁度低下を示し、これらのアミノ酸が発芽に関与していると推測された (図5 6AA)。

次に6種のアミノ酸についてオミッショントテスト (アミ

ノ酸1つずつ除去して残り5アミノ酸を Yeast extract-L-シスチン-チオグリコール酸ナトリウム混合液に加えた液)を行った。その結果を図5に示す(−アミノ酸名で表現: そのアミノ酸を除く5アミノ酸での発芽試験)。発芽への影響を調べたところ, L-セリン, L-アラニンをオミットすると濁度が低下せず, 発芽しないことを示した。

この2つのアミノ酸が発芽に大きく関与していることを示唆している。L-プロリンをオミットしても, まったく濁度低下しないため発芽に関与していないことが分かった。L-スレオニン, グリシンの発芽への関与は弱く, L-アスパラギン酸の関与はさらに弱かった。

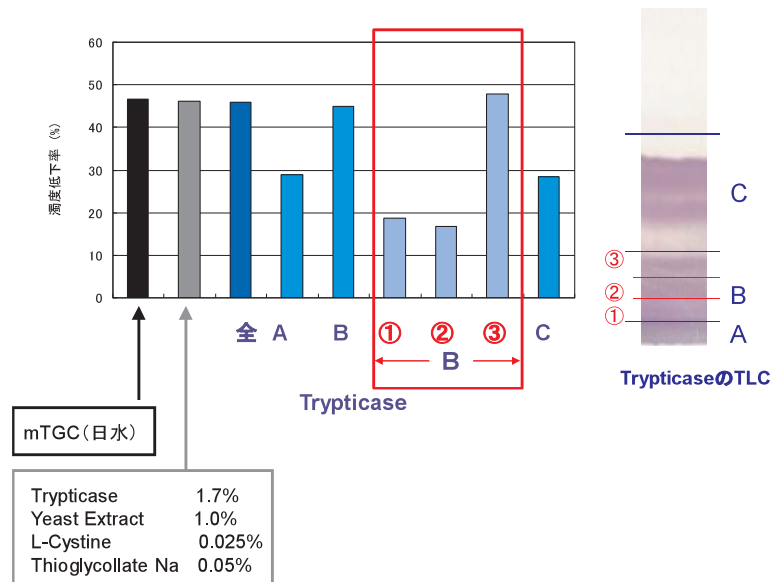


図4 Trypticase peptone の TLC 画分の発芽試験

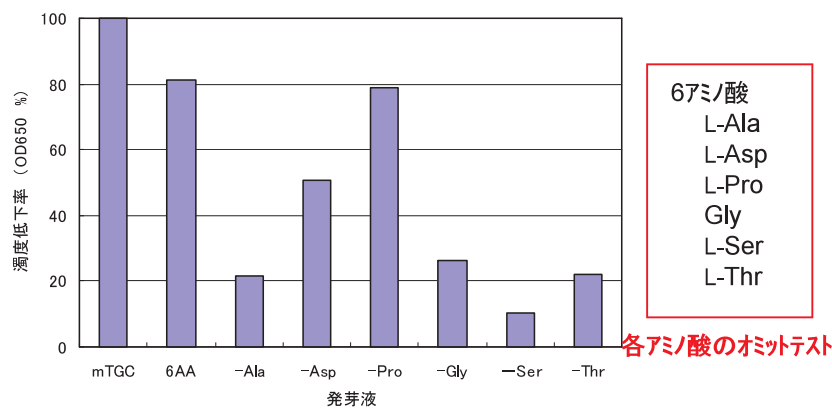


図5 発芽誘起剤検索試験 (アミノ酸オミットテスト)

mTGC 培地での発芽程度を 100 とした相対値, 6AA: 6アミノ酸すべて, 各アミノ酸を除去した5アミノ酸での発芽程度

3) Yeast extract 中の発芽誘起剤

Yeast extract についても TLC 分画を行った。3 画分の発芽試験の結果, 発芽誘起剤は原点近くの画分 A (Rf 0.00-0.12) に存在し, 親水性がきわめて高いものと考えられる。画分 A を 4 分割し, それぞれを小スパチュラで掻き取り, 熱水で抽出した液を用いて発芽試験を行った。A のサブ画分の Rf は ① 0.00-0.03 ② 0.03-0.05 ③ 0.05-0.07 ④ 0.07-0.12 であった。

単独画分を用いた発芽試験 (各画分の熱水抽出液を Trypticase peptone- L-シスチン-チオグリコール酸ナトリウム混合液に加えた液) では, 他の3つ (②, ③, ④) と異なり, ①がわずかに濁度低下したが, その程度はきわめて小さかった。①, ②, ③を混合したところ, mTGC に匹敵する濁度低下を示した (図6の赤色曲線)。他の3つの画分組合せも試験したが, 発芽しなかった。この結果は, Yeast extract の TLC 画分 A 中の発芽誘起剤が複数

存在し、それらが画分 A のサブ画分に分かれたため、これらサブ画分単独では発芽せず、組み合わせてはじめて発芽能を示したものと推定された。次に 2 画分組合せで試験したところ、画分①と③の組合せのみ濁度低下がみられ、発芽誘起剤は①と③に含まれていると考えられた (図 7 の

紫色曲線)。①と③に含まれる発芽誘起剤を化合物レベルで確定するために、この画分に存在すると考えられるアミノ酸や糖、ヌクレオシドを検討したが、確定には至らなかった。

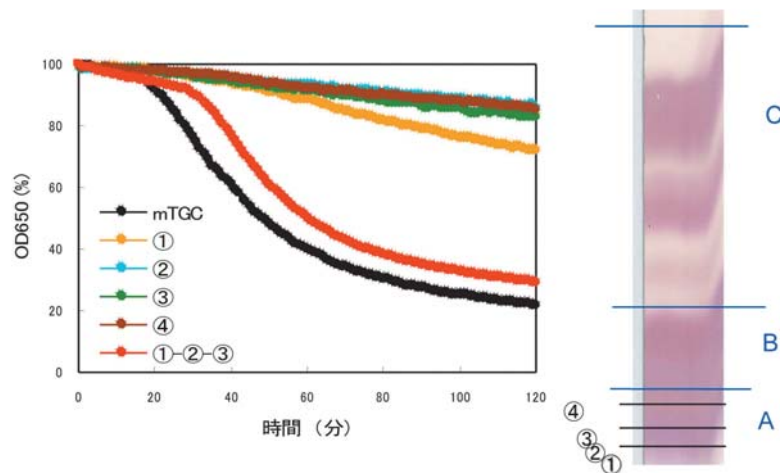


図 6 Yeast extract TLC 画分の発芽 (1)

Yeast extract の TLC 画分 A のサブ画分①～④による発芽能試験

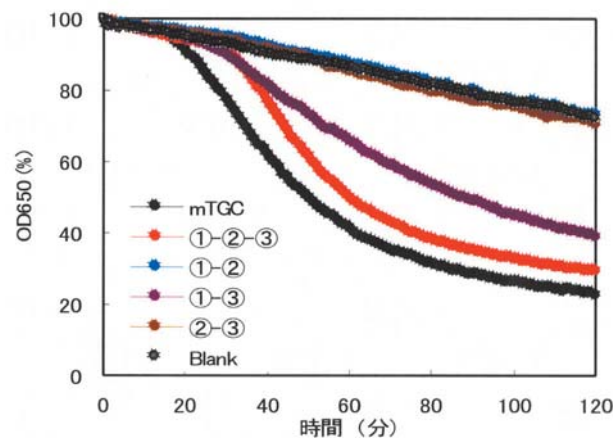


図 7 Yeast extract TLC 画分の発芽 (2)

Yeast extract の TLC 画分 A のサブ画分①～③の組合せによる発芽能試験

3. 発芽誘起剤の構造アナログや誘導体を利用した *M. thermoacetica* 増殖阻止

M. thermoacetica の発芽誘起剤がすべて判明したわけではない。現時点では *Trypticase peptone* 中の 5 種類のアミノ酸が発芽誘起に関連していること、その中で L-セリン、L-アラニンが発芽誘起剤である可能性が高いことが分かっているにすぎない。しかし、*Clostridium* 系の芽胞菌は複数の発芽誘起剤が共存してはじめて発芽が起こる。本実験結果でも 4 成分が共存しないと発芽できない。現時点で判明している発芽誘起関与成分に関する知見を *M. thermoacetica* 芽胞の増殖の抑制、変敗防止に応用できな

いか検討した。*Bacillus* 属芽胞では、発芽誘起剤のアミノ酸の構造アナログが発芽を競合阻害する例が知られている。たとえば *B. subtilis* では L-アラニンが発芽誘起剤であるが、D-アラニンが発芽阻害する。*Clostridium* 系である *M. thermoacetica* 芽胞でもアミノ酸の構造アナログが発芽阻害する可能性がある。発芽阻害試験には、D-アミノ酸および L-セリン、L-アラニンを構成成分とするジペプチド、トリペプチド、テトラペプチドを用いた。

mTGC 培地に阻害候補物質を 0.05% 添加して発芽試験し、濁度低下がどれくらい妨害されるか (mTGC での濁度低下を 100% とした) を調べた。D-アミノ酸は発芽阻害

しなかった。これは *Bacillus subtilis* と異なる結果であった。D- アミノ酸の阻害は L- アミノ酸と構造が類似しているため、発芽受容体に競合的に結合することによるものと考えられる。*Clostridium* 属芽胞では D- 体が阻害しないという報告があり、これに合致した結果であった。その報告に D- 体が阻害しない理由についての言及は無いが、発芽誘起剤が結合する受容体部位の厳密性が強く、構造類似程度がかなり高くないと阻害しない可能性があると推測している。*M. thermoacetica* は発芽受容体構造の面で D- 体が発芽阻害しにくいかもしれない。すなわち発芽受容体の立体構造が結合に対して厳密性を要求しているため、構造異性体が結合しにくい可能性がある。

L- アラニンや L- セリンの誘導体についての発芽試験を行った結果、L- アラニンとグリシンから成るジペプチド、トリペプチド、テトラペプチドはいずれも発芽阻害程度は 10% 以下と低かった。一方、L- セリンとグリシンか

ら成るジペプチド、トリペプチドでカルボキシ末端が L- セリンの場合は 25 ~ 38% と高い発芽阻害を示した (図 8)。現時点で得られている 38% の発芽阻害程度では *M. thermoacetica* の増殖防止に応用するには難しい。ただし単独物質での発芽阻害は難しいが、数種の阻害物質の複合的な使用や他の増殖防止手段との併用などでの増殖防止の可能性が考えられる。すなわちハードルテクノロジーの手段の一つとしての利用が考えられる。

発芽誘起剤の情報を利用し、発芽防止により芽胞菌の増殖を防止する研究は、我が国ではほとんど見られないが、海外では疾病に関与する数種の芽胞菌について行われている⁶⁻¹⁰⁾。その多くは発芽誘起剤のアナログによる発芽阻害である。*B. anthracis* 芽胞の発芽誘起剤としてイノシンと L- アラニンがあるが、イノシンの構造アナログである化合物数種が阻害効果を示した。これらの構造アナログの予防薬としての可能性が論じられている。

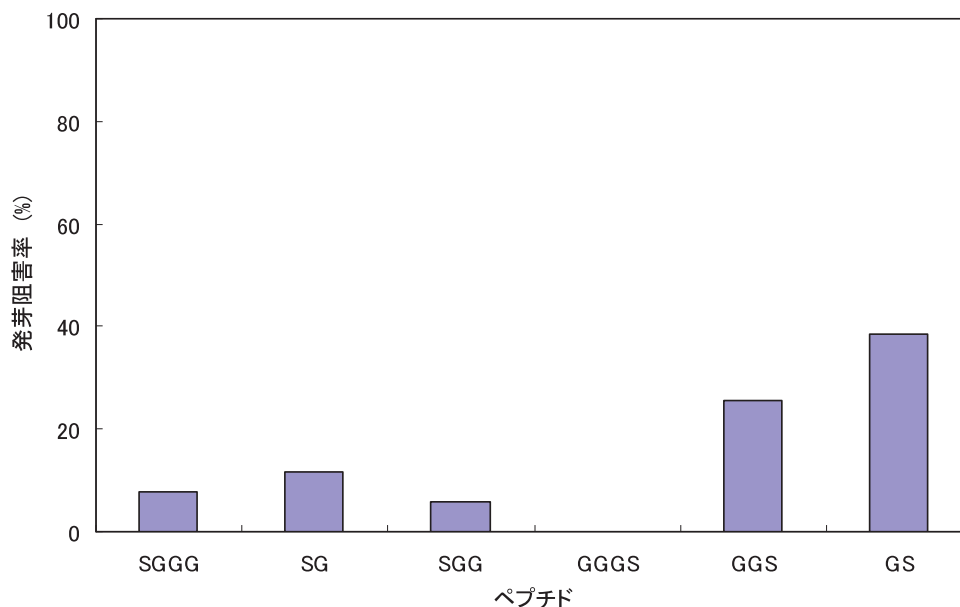


図 8 L- セリンのペプチドによる発芽阻害

SG: L- セリン-グリシン, SGG: L- セリン-グリシン-グリシン, SGGG: L- セリン-グリシン-グリシン-グリシン
GS: グリシン-L- セリン, GGS: グリシン-グリシン-L- セリン, GGGG: グリシン-グリシン-グリシン-L- セリン

まとめ

M. thermoacetica 芽胞の発芽誘起剤を調べた。*M. thermoacetica* の培養に用いられる変法チオグリコレート培地の 8 素材のオミット試験結果から、Trypticase peptone, Yeast extract, チオグリコール酸ナトリウム, L- シスチンの 4 つの組合せで変法チオグリコレート培地と同等に発芽することが分かった。

Trypticase peptone, Yeast extract 中に存在する発芽誘起剤を検索した。それぞれの溶液を薄層クロマトグラフィーで分画し、各画分の熱水抽出液の発芽試験により発

芽能のある画分を調べた。その結果、Trypticase peptone 中の発芽関与成分として L- セリン, L- アラニン, L- スレオニン, グリシン, L- アスパラギン酸が見出された。特に L- セリン, L- アラニンの発芽関与が大きく、この 2 つは発芽誘起剤と考えられた。Yeast extract 中の発芽誘起剤についても、薄層クロマトグラフィーの特定画分に、少なくとも 2 つの発芽誘起剤の存在を示唆する結果が得られた。しかし、その化合物を確定するには至らなかった。

発芽誘起剤と推定される L- セリン, L- アラニンの構造アナログや誘導体が発芽阻害するかどうか調べた結果、D- 体は発芽阻害しなかったが、L- セリンのジペプ

チドやトリペプチドが発芽阻害した。しかし、その発芽阻害は最大 38% であり、単独物質での発芽阻害による *M. thermoacetica* 増殖防止は難しい。増殖防止には、数種の発芽阻害物質を組み合わせる使用、他の増殖防止手段と併用することなどの工夫が必要かもしれない。発芽阻害剤をハードルテクノロジー手段の一つとして利用することが考えられる。

参考文献

- 1) 青山好男： *Moorella thermoacetica* 芽胞の発芽誘起剤と発芽阻害, 日本農芸化学会年次大会講演要旨集, 2014.
- 2) 中山昭彦：ホットベンダーで問題となる腐敗性高温細菌；伊藤武、森地敏樹編「食品のストレス環境と微生物—その挙動・制御と検出」, p.120, サイエンスフォーラム, 2004.
- 3) 駒大輔、山中勇人、森芳邦彦、大本貴士：培地の成分知っていますか？ 生物学基礎講座, 生物学, **89**, 195-199, 2011.
- 4) 安田陽子、朽久保邦夫：スポアの発芽と発芽後成育—細菌スポアにかかわる最近の話題 3—, 防菌防黴, **25**, 333-348, 1997.
- 5) 近藤雅臣、渡部一仁：スポア実験マニュアル, p.19-41, 報堂出版, 1995.
- 6) J.A.Sorg, A.L.Sonenshein : Inhibiting the initiation of *Clostridium difficile* Spore Germination using Analogs of Chenodeoxycholic Acid, a Bile Acid, *J.Bacteriol.*, **192**, 4983-4990, 2010.
- 7) M.Akoachere, R.C.Squires, A.M.Nour, L.Anglov, J.Brojatsch, E.A-Santos Identification of an *in Vivo* Inhibitor of *Bacillus anthracis* : Spore Germination *J.B.C.*, **282**, 12112-12118, 2007.
- 8) Z. Alvarado, K.LeeE.Abel-Santos : Testing Nucleoside Analogues as Inhibitors of *Bacillus anthracis* Spore Germination *In Vitro* and in Macrophage Cell Culture, *Antimicrob. Agents Chemother.* **54**, 5329-5336 (2010).
- 9) N.Ramirez,E.Abel-Santos : Requirements for Germination of *Clostridium sordellii* Spores *In Vitro*. *J.Bacteriol.*, **192**, 418-425. 2010.
- 10) Y.Xiao, C.Francke, T.Abee, M.H.Wells-Bennik: Clostridial spore germination versus bacilli genome mining and current insights. *Food Microbiol.*, **28**, 266-274, (2011).