

令和 元年 9 月 5 日現在

機関番号：10101
研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化）
研究期間：2016～2018
課題番号：15KK0267
研究課題名（和文）必須アミノ酸による食品有害細菌の増殖抑制効果：作用機構の解明と予測モデルの開発（国際共同研究強化）
研究課題名（英文）Mechanism of antibacterial effect of essential amino acid(Fostering Joint International Research)
研究代表者
小関 成樹 (Shigenobu, Koseki)
北海道大学・農学研究院・准教授
研究者番号：70414498
交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 10,800,000円
渡航期間： 2ヶ月

研究成果の概要（和文）：本研究ではD-Trpにより細菌の増殖が抑制されるメカニズムを解明するためD-Trpが細菌細胞内で作用している可能性、細菌細胞外で作用している可能性の2つの仮説を立て検証を行った。得られた結果を総合的に判断すると、D-Trpによる細菌の増殖抑制はD-Trpが細菌に取り込まれて起こるのではなく、細胞膜や細胞外部で作用している可能性が高いという結論が得られた。またD-Trpにより増殖抑制されたE. coliは増殖可能な環境に移ると再増殖したことから、D-Trpを微生物制御に利用する際は常に環境中にD-Trpが存在する必要があると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

D-トリプトファンの利用が新規の微生物制御手法として世界的な認知度が向上し、世界中の人々がより安全で高品質な食品を届けることに貢献する。また、基礎研究面においても、細菌のストレス応答に関する新たな評価法、知見が蓄積され、今後の微生物制御ならびにストレス応答メカニズムの解明に寄与することが期待される。実用面においても実際の生牡蠣の保存流通中における腸炎ビブリオの増殖を顕著に抑制できることを見出したことから、生牡蠣のみならず多様な生鮮海産物品の微生物学的な安全性を確保した流通体系の確立に大いに貢献することが期待できる。

研究成果の概要（英文）：The aim of the present study was to elucidate the mode of action of D-Trp as an antibacterial agent. We investigated two different hypotheses: D-Trp is incorporated into bacteria and acts intracellularly, or D-Trp acts outside the bacterial cell and inhibits membrane function. E. coli incorporated D-Trp added to the culture medium regardless of the subsequent growth effect. Similar amounts of E. coli metabolites were detected when incubated under the growth-promoting condition of 3% NaCl and the growth-suppression condition of 3% NaCl with 40 mM D-Trp. By contrast, guanosine 3',5'-bis(diphosphate) was only detected under the growth-suppression condition. However, once E. coli cells with D-Trp-induced growth suppression were transferred to a proliferative environment, proliferation was only suppressed in the environment with specific extracellular concentrations of NaCl and D-Trp. We conclude that D-Trp influences membrane function to exert its antimicrobial effects.

研究分野：予測微生物学

キーワード：適合溶質 トリプトファン 増殖抑制

様式 F-19-2

1. 研究開始当初の背景

D-トリプトファンをはじめとする数種類のアミノ酸が、食中毒細菌の増殖を顕著に抑制することを明らかにしてきた (Koseki et.al., 2015)。例えば、腸管出血性大腸菌 O157:H7 や各種のサルモネラ属菌は、室温 (25°C) 条件において、完全に増殖を抑制するだけでなく、死滅させることを確認してきた。しかしながら、「なぜ、D-トリプトファンが細菌の増殖を抑えることができるのか?」「どのような作用機序で、細菌の増殖が抑制されるのか?」といったメカニズムについては、未解明なままであり、細菌細胞内への D-トリプトファン等のアミノ酸の取込みを仮説として、細菌細胞内のアミノ酸濃度の変化の側面から検討していた。

2. 研究の目的

新規な微生物制御物質としての D-トリプトファンの作用機序を細菌細胞に対するストレス応答を、細胞膜の細胞膜のイオン輸送能の面から明らかにするとともに、各種代謝活性の変化の側面から明らかとし、実際の食品へ適用する際の効果的な活用方法が示され、実用化への道が促進する。

D-Trp の作用メカニズムの解明を進めるために 2 つの仮説を立て検証を行った。第 1 の仮説は D-Trp が細菌細胞内に取り込まれて代謝阻害などを引き起こし、細菌の増殖が抑制されている可能性である。D-Trp による細菌の増殖抑制効果は高食塩濃度、すなわち高浸透圧条件下で顕著であるが、このような高浸透圧条件下において細菌は適合溶質と呼ばれる細胞内に高濃度に蓄積しても毒性を示さない物質を合成、もしくは取り込むことが知られている。そのため細菌がその適合溶質と誤って D-Trp を取り込み、細胞内部で作用して増殖抑制が引き起こされている可能性が考えられることから、高浸透圧環境である増殖抑制環境下にて細菌が D-Trp を取り込むか細菌細胞内のアミノ酸濃度を分析することにより検証を行った。また D-Trp の取り込みにかかわらず細胞内の代謝に異常を起こし、正常に増殖ができなくなる可能性も考えられ、細胞内の代謝状態を確認するため細胞内代謝物の分析を行った。第 2 の仮説は D-Trp が細胞膜や細菌細胞外で作用し細菌の増殖が抑制されている可能性である。この可能性を検証するために細菌を D-Trp 存在下の増殖抑制環境で培養し、環境中から D-Trp や食塩を取り除いた際に再増殖可能か、生菌数の変化を検討した。

3. 研究の方法

(1) 供試細菌 *Escherichia coli* (ATCC25922) を用いた。-80°C にて凍結保存されていた *E. coli* を Tryptic soy agar (TSA) および Tryptic soy broth を用いて 2 回前培養を行い、各実験に用いた。

(2) 培地条件 基礎となる培地に Peptone Yeast Glucose (PYG) 液体培地を用いた。実験ごとに食塩濃度 0, 1, 3%, D-Trp 濃度 0, 40 mM の組み合わせで条件を設定した。これらの組み合わせのうち、食塩濃度 3%, D-Trp 濃度 40 mM 条件のみ *E. coli* の増殖が抑制される条件であり、それ以外の 5 つの組み合わせはすべて *E. coli* の増殖が確認される条件である。

(3) 分析方法

a) 細胞内容物の Trp 濃度の測定 *E. coli* を食塩濃度 0, 1, 3%, D-Trp 濃度 40 mM の計 3 条件に調製した PYG 液体培地中にて 37°C で培養した。培養開始から 1, 4, 8, 12 時間後に培養物を採取し、含まれる *E. coli* 細胞を純水で 2 回洗浄した。細胞内容物は改良ブライ・ダイアー法にて抽出した。この方法は細胞にメタノールを加えることで細胞膜を破壊して細胞内容物を抽出し、そこに水とクロロホルムを加えて遠心分離を行うことにより、細胞内容物に含まれる物質を水とクロロホルムへの溶解度の違いによって水層・油 (クロロホルム) 層へ層分離させる方法である。上層から水層、タンパク質等の不溶解物、油層に分かれる。アミノ酸は水溶性の物質であることから水層に含まれるため、本実験では最上層である水層をサンプルとして採取した。サンプル中に不純物が見られる場合は 0.2 μm のフィルターにてろ過処理を行い、アミノ酸分析に用いた。アミノ酸分析には日立高速アミノ酸分析計 L-8900 を用いた。この機器の測定原理はニンヒドリン誘導体化高速液体クロマトグラフィーである。

b) 細胞内代謝物の分析 *E. coli* を食塩濃度 0, 3%, D-Trp 濃度 0, 40 mM の組み合わせで 4 条件に調製した PYG 液体培地中にて 37°C で 24 時間培養した。*E. coli* 細胞数が $10^8 - 10^9$ 個となるように培養物を採取し、含まれる *E. coli* 細胞を Milli-Q 水で 2 回洗浄した。その後、細胞にメタノールを加えて超音波処理を行うことにより細胞膜を破壊して細胞内容物を抽出した。タンパク質などの不純物を取り除くため限外ろ過フィルターと遠心分離により限外ろ過を行ったものをサンプルとした。得られたサンプルを用いてメタボローム解析を行った。メタボローム解析とは細胞内のほぼ全ての代謝物を検出し定量するもので、その物質と量を既知の代謝経路に当てはめることにより細胞内の代謝状態を検討する解析手法である。また代謝物とは生体内における低分子代謝物質の総体を指し、DNA、RNA、タンパク質は除外される。このメタボローム解析にはキャピラリー電気泳動-飛行時間型質量分析計を用いた。

c) 増殖抑制状態からの回復の可否 初めに *E. coli* を約 10^5 Colony Forming Unit (CFU)/mL となるように希釈し、食塩濃度 3%, D-Trp 濃度 40 mM の増殖抑制条件に調製した PYG 液体培地中にて 37°C で培養した。培養開始から 1, 4, 8, 12 時間後に培養物を採取し、含まれる *E. coli* 細胞を純水で 2 回洗浄した。その *E. coli* を食塩濃度 1, 3%, D-Trp 濃度 0, 40 mM の組み合わせで 4 条件に調製した新たな PYG 液体培地に移し、37°C で 24 時間培養した。実験開始時、初期の増

殖抑制条件にて培養後、新たな PYG 液体培地で培養後の計 3 回培養物を採取した。その培養物をペプトン水を用いて適宜希釈し、TSA に塗抹して 37°C で 24 時間培養後、現れたコロニー数をカウントし *E. coli* の生菌数の変化を測定した。

4. 研究成果

(1) 細胞内容物の Trp 濃度の測定

図 1 にアミノ酸分析による *E. coli* 細胞内容物から得られたサンプル中の Trp 濃度変化の結果を示した。無調整の PYG 液体培地で培養した *E. coli* 細胞内容物からは Trp が検出されなかったため、Trp の検出濃度を D-Trp の取り込み量として評価した。すべての食塩濃度条件において Trp 濃度の上昇が見られたため、*E. coli* は食塩濃度に関わらず D-Trp を取り込むという結果が得られた。食塩濃度 0%, D-Trp 濃度 40 mM 条件では 12 時間の培養時間の範囲において Trp 濃度は上昇し続け、食塩濃度 1, 3%, D-Trp 濃度 40 mM の 2 条件では Trp 濃度は上昇したのちに低下した。Trp 濃度の最大値は食塩濃度が低いほど大きくなった。増殖可能条件 (食塩濃度 0, 1%, D-Trp 濃度 40 mM) および増殖抑制条件 (食塩濃度 3%, D-Trp 濃度 40 mM) の両方で D-Trp の取り込みが確認されたことから、D-Trp そのものには増殖を阻害する働きはないものと考えられる。また高浸透圧環境下で増殖抑制が見られることから、細菌は適合溶質と誤って D-Trp を取り込んでいると予想したが、D-Trp の取り込み量は高浸透圧条件ほど小さくなったため適合溶質と誤って D-Trp が取り込まれた可能性は低い結果となった。

(2) 細胞内代謝物の分析

メタボローム解析により得られた代謝物の検出量を網羅的に比較した。食塩の有無により代謝物の検出量は大きく異なり、食塩を添加した食塩濃度 3%, D-Trp 濃度 0 mM の増殖可能条件と食塩濃度 3%, D-Trp 濃度 40 mM の増殖抑制条件において代謝物の検出量は同様の傾向であった。検出量の異なる物質もいくつか見られたが、その中にグアノシン 4 リン酸 (ppGpp) があった。この物質は栄養飢餓状態において細菌が合成する物質であり、アミノ酸合成酵素以外の遺伝子の安定的な転写が阻害される「緊縮応答」と呼ばれる反応の制御を行う。この反応により細菌は自ら増殖を抑制することで栄養飢餓状態に適応する。図 2 は各条件における ppGpp の検出量を示しており、縦軸の Relative Area とは分析機器から出力されたピークの面積値について実験操作や分析感度等によるずれや差を補正した値である。本実験では増殖抑制条件でのみ ppGpp が検出されていたことから、*E. coli* の増殖抑制が引き起こされた一因と考えられる。またすべての条件で同様の基礎培地を用いており栄養状態は同様であると考えられるが、増殖抑制条件で培養した場合のみ *E. coli* の栄養飢餓に対する反応が見られたことから、D-Trp の作用により *E. coli* は栄養飢餓環境下にあると誤認する、もしくは栄養の取り込みを行う細胞膜などに D-Trp が作用して *E. coli* の栄養の取り込みを阻害することで実際に *E. coli* の栄養飢餓が引き起こされる可能性が考えられた。

(3) 増殖抑制状態からの回復の可否

増殖抑制条件で 12 時間培養した *E. coli* を増殖可能条件 3 条件、増殖抑制条件 1 条件の計 4 条件の新たな培地に移し培養した際の生菌数変化を図 3 に示した。生菌数の変化は初めに *E. coli* を増殖抑制条件で培養した時間に関わらず、同様の傾向が認められた。培養時間 12 時間の点が増殖抑制条件で培養

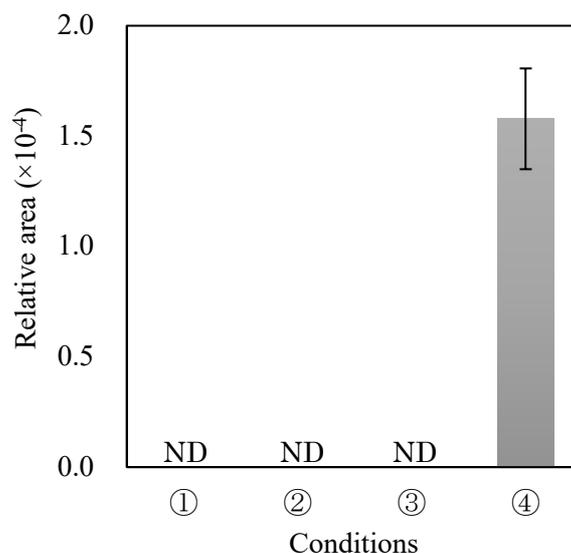


図2 各条件にて24時間培養後の*E. coli*細胞内のppGppの検出量 (食塩濃度 0% D-Trp濃度 0 mM : ①, 食塩濃度 0% D-Trp濃度 40 mM : ②, 食塩濃度 3% D-Trp濃度 0 mM : ③, 食塩濃度 3% D-Trp濃度 40 mM : ④) ND, Not detected

した後の生菌数であるが、実験開始時の生菌数よりも減少する傾向が見られ、増殖が抑制されていることが確認された。培養時間 36 時間の点は増殖抑制された *E. coli* を 4 条件の新たな培地に移して培養した後の生菌数であり、増殖可能な 3 条件に調製された培地に移すと *E. coli* は再増殖し、同様の増殖抑制条件に調製された培地に移すと *E. coli* の増殖は抑制され続けた。図 1 の結果から初めに増殖抑制条件で培養した際にも *E. coli* 細胞内部に D-Trp が取り込まれていると考えられるが、*E. coli* 細胞外部に食塩のみが存在する条件（食塩濃度 3%、D-Trp 濃度 0 mM）の培地に移した場合、すなわち細胞内部に D-Trp が存在し、細胞外部に食塩が存在する環境下でも *E. coli* が増殖したことから、*E. coli* の増殖抑制には細菌細胞外に D-Trp と食塩の双方が存在する必要がある可能性が考えられる。よって D-Trp が細菌細胞外部で作用し増殖を抑制している可能性が高いことが示唆されたが。また、増殖抑制された *E. coli* を増殖可能条件の培地に移した場合 *E. coli* は再び増殖したことから、*E. coli* は D-Trp によって増殖抑制された状態から回復できる可能性が示唆された。そのため実際に食品に用いるには、一時的に D-Trp による処理を行うのではなく、常に D-Trp と食塩の存在する細菌の増殖抑制環境を保つ必要があると考えられる。

(4) まとめ

本研究では D-Trp により細菌の増殖が抑制されるメカニズムを解明するため D-Trp が細菌細胞内で作用している可能性、細菌細胞外で作用している可能性の 2 つの仮説を立て検証を行った。得られた結果を総合的に判断すると、D-Trp による細菌の増殖抑制は D-Trp が細菌に取り込まれて起こるのでなく、細胞膜や細胞外部で作用している可能性が高いという結論が得られた。また D-Trp により増殖抑制された *E. coli* は増殖可能な環境下に移ると再増殖したことから、D-Trp を微生物制御に利用する際は常に環境中に D-Trp が存在する必要があると考えられる。

<引用文献>

- ① Koseki, S., Nakamura, N., Shiina, T., 2015. Growth Inhibition of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica*, and *Escherichia coli* O157:H7 by D-Tryptophan as an Incompatible Solute. *J. Food Prot* 78, 819–824. doi:10.4315/0362-028X.JFP-14-374

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① Kan, K., Chen, J., Kawamura, S., **Koseki, S.**, 2018. Characteristics of D-Tryptophan as an Antibacterial Agent: Effect of Sodium Chloride Concentration and Temperature on *Escherichia coli* Growth Inhibition. *J. Food Prot.* 81, 25–30. doi:10.4315/0362-028X.JFP-17-229
- ② Chen, J., Kudo, H., Kan, K., Kawamura, S., **Koseki, S.**, 2018. Growth Inhibitory Effect of D-tryptophan on *Vibrio* spp. in Shucked and Live Oysters. *Appl. Environ. Microbiol.* AEM.01543–18. doi:10.1128/AEM.01543-18

[学会発表] (計 3 件)

- ① 工藤裕子, 陳劍, 川村周三, **小関成樹**. D-Tryptophan による細菌の増殖抑制メカニズムの解明, 日本食品科学工学会北海道支部大会, 札幌, 2018 年 12 月 2 日.
- ② Chen, J., and **Koseki, S.** Growth Inhibitory Effect of D-tryptophan on *Vibrio* spp. in Broth culture, Seawater and live Oysters International Association for Food Protection 2018 annual meeting, Saltlake city, USA, July 8 – July 11, 2018.
- ③ Chen, J., and **Koseki, S.** Antibacterial activity of D-tryptophan against *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* O157:H7 under osmotic stress and its application to oysters, International Association for Food Protection 2017 annual meeting, Tampa, USA, July 9 – July 12, 2017.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

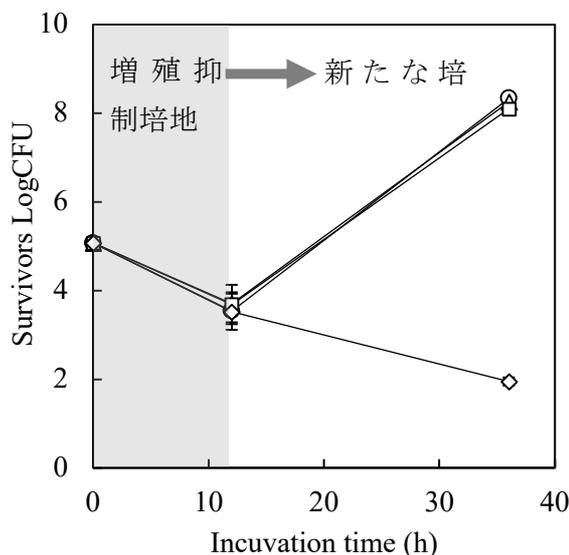


図3 *E. coli*を増殖抑制条件（食塩濃度3% D-Trp濃度40 mM）で12時間培養した後、増殖可能条件（食塩濃度1% D-Trp濃度0 mM：○，食塩濃度1% D-Trp濃度40 mM：△，食塩濃度3% D-Trp濃度0 mM：□）および増殖抑制条件（食塩濃度3% D-Trp濃度40 mM：◇）の新たな培地に移して培養した際の生菌数の変化

○出願状況（計0件）

○取得状況（計0件）

〔その他〕

なし

6. 研究組織

研究協力者

〔主たる渡航先の主たる海外共同研究者〕

研究協力者氏名：Tom Ross

ローマ字氏名：Tom Ross

所属研究機関名：University of Tasmania

部局名：Agricultural Science

職名：Professor

研究協力者氏名：Kostas Koutsoumanis

ローマ字氏名：Kostas Koutsoumanis

所属研究機関名：Aristotle University of Thessaloniki

部局名：Department of Food Science and Technology

職名：Professor

〔その他の研究協力者〕

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。