

令和元年6月19日現在

機関番号：24403

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K05018

研究課題名(和文) Bacillus属細菌胞子の発芽・増殖過程の劣化を指標とした損傷菌生成機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of injured bacteria formation mechanism based on deterioration of germination and proliferation process of Bacillus sporessp.

研究代表者

古田 雅一 (Furuta, Masakazu)

大阪府立大学・工学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：40181458

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：Bacillus subtilis芽胞のガンマ線照射による芽胞DNAの損傷や発芽及び発芽後増殖時の細胞の障害及び修復について知見を得ることを目的としてBacillus subtilis芽胞の発芽過程をマイクロプレートリーダーにより加熱と比較したところ、加熱による発芽速度の減少がみられたのに対し、ガンマ線照射は発芽には影響せず、ジピコリン酸欠損株やGFP融合タンパク質生産株や発芽を阻害するcarvacrol, thymolによる検討から、芽胞の発芽阻害は芽胞の成分タンパク質の変性が関わる一方、ガンマ線照射の場合は芽胞のゲノムDNAの損傷と修復が、細胞死に大きく関わっていることが強く示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Bacillus subtilis芽胞の発芽を抑制する効果には発芽を誘導する化合物と芽胞の内膜に存在する発芽レセプタータンパク質との相互作用が大きく関わっていることが示唆され、加熱によるこれらの活性化と変性との関係が今後の新たな研究目標となったこと、さらにガンマ線照射による芽胞の不活化は発芽システムとは関係が薄く、ゲノムDNAの損傷と修復が細胞の生存に大きく関わっていることが再確認できたことから、このようなメカニズムの差と損傷菌発生との関連性をさらに追求することにより、損傷菌を生じないさらに効率の良い量子ビームをベースとした複合殺菌システムの実現が期待できる。

研究成果の概要(英文)：The germination process of Bacillus subtilis spores was compared with heating using a microplate reader with the aim of obtaining information on damage and repair of the cell viability including genomic DNA repair within the spores during germination and post-germination outgrowth. Germination rate was reduced by the heat treatment at 98°C, while gamma irradiation did not affect the germination. Employing dipicolinic-acid deficient strain, the GFP fusion protein-producing strain reporting the denaturation of cellular proteins, and carvacrol and thymol that inhibit the germination of the spores, it has been strongly suggested that damage and repair of genomic DNA in spores is strongly associated with cell death in the case of gamma irradiation while protein denaturation has been implicated for the deterioration of the spore germination by heating.

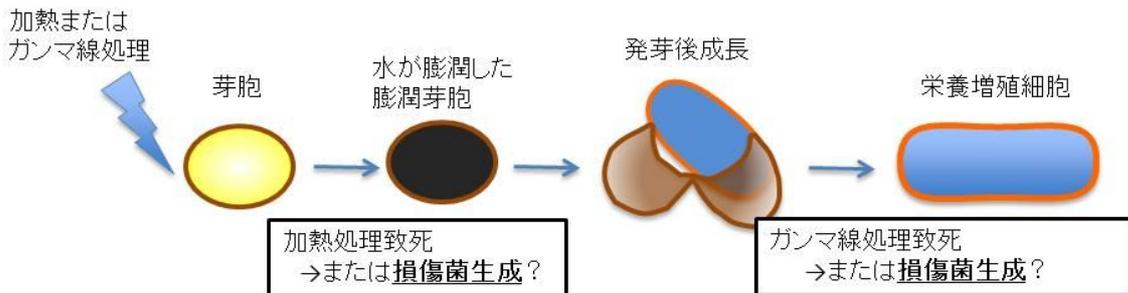
研究分野：殺菌生理学及び工学

キーワード：細菌芽胞 Bacillus subtilis 抗菌 精油 放射線照射 加熱 ストレス応答 殺菌

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

$^{60}\text{Co}$  ガンマ線、電子線など量子ビームを用いた医療用具の放射線滅菌は、わが国においても順調に発展し、平成 17 年の調査では 1,700 億円の経済規模に達している。さらに近年では香料、ハーブ類などを中心に食品の殺菌への放射線照射の利用がアジア、太平洋地域の国々を中心に著しい伸びを見せている (Kume, T., Furuta, M., et al., *RADIOISOTOPES*, 58(1), 25-35, 2009)。



量子ビームの照射を受けた *Bacillus* 属細菌芽胞が食品内で回復し増殖する場合、上図に示すように発芽過程と発芽後成長過程を経て栄養増殖細胞になり、その後誘導期を経て対数増殖期に入る。しかし、実際には、量子ビーム照射により芽胞に生じた損傷は発芽、発芽後成長過程のいずれかの段階の阻害要因となり、回復または成長が阻害された細胞が死に至ると考えられる。その中でも殺菌ストレス処理後に増殖能を失った細胞で条件次第で生存性を回復する細胞集団は損傷菌と呼ばれる。損傷菌が食品加工工程で食品中に残存した際、修復後発育してヒトに害を及ぼす可能性が懸念されているが、実際に検討された報告例は比較的少ない (土戸、日本食品微生物学会雑誌, 20(4), 141 - 149, 2003)。申請者は長年放射線殺滅菌の研究開発に携わってきた経験を生かし、*Bacillus subtilis* の蛍光染色法や遺伝子破壊株と GFP 融合体を駆使し、加熱、薬剤を中心に芽胞の発育過程の影響について研究経験の深い研究分担者、土戸、坂元や研究協力者、高松、桑名らと連携し、本研究を着想した。

## 2. 研究の目的

上記の着想の下、本研究においては最も研究が進んでいる *Bacillus subtilis* を材料として  $^{60}\text{Co}$  ガンマ線や電子線の照射量に応じて芽胞の発芽・増殖過程での細胞の形態や DNA の二重鎖切断変化を以下の手法で解析し、加熱の場合と比較し、DNA 修復や増殖の回復が発芽・発芽後増殖の過程のどの時期に行われ、細胞致死や損傷菌の生成に至る要因について調べた。

1. 芽胞の発芽及び発芽後増殖過程を濁度を指標とした増殖曲線を指標として解析し、細胞の DNA の損傷及び修復をパルスフィールドゲル電気泳動法で調べる。
2. 枯草菌芽胞の発芽過程における  $^{60}\text{Co}$  ガンマ線照射の影響をさらに詳しく調べるために親株とその DPA 合成酵素欠損株に耐熱性蛍光タンパク質を芽胞コア内に発現させ、そのコア内タンパク質の変性挙動とその芽胞の生存性への関与を調べる。

3. 蛍光色素により芽胞や発芽後の DNA, 細胞膜を染色し、<sup>60</sup>Co ガンマ線照射後の細胞損傷や生理活性を評価する。

### 3. 研究の方法

*Bacillus subtilis* 168 株から芽胞を調製し、加熱または種々の線量の <sup>60</sup>Co ガンマ線を照射し、発芽増殖させ、濁度測定、フローサイトメーター等を用いて発芽増殖過程の経時変化を調べた。

枯草菌芽胞の発芽過程における <sup>60</sup>Co ガンマ線照射の影響と加熱の影響とをさらに詳しく比較するために *Bacillus subtilis* 168 株とその *spoIVFAB* (DPA 合成酵素遺伝子) 欠損株に対して、挿入組み換えプラスミドを用いて耐熱性蛍光タンパク質 YFP3.2 を芽胞コア内で発現させた株に対して、芽胞の殺菌抵抗性の要因とされているジピコリン酸(DPA)含量の変化による YFP3.2 の加熱およびガンマ線照射に対する抵抗性変化を調べた。

さらに上記の染色試験と同じ発芽・増殖過程にある細胞から抽出した DNA を通常のアガロースゲル電気泳動法及びパルスフィールドゲル電気泳動法により分離し、ガンマ線照射による DNA 切断と修復の状況を調べ、加熱の場合と比較した。これによりどの時期に DNA 修復が行われるかを特定し、蛍光染色による細胞の状態変化との関係について調べた。本実験は大阪府立大学の設備を用いた。

以上の結果をもとにガンマ線の細菌芽胞発育に与える阻害効果について加熱と対比して論じた。

### 4. 研究成果

本研究においては *Bacillus subtilis* 芽胞の発芽・増殖過程に着目し、<sup>60</sup>Co ガンマ線照射に対して芽胞の発芽・増殖過程のどの段階の損傷が細胞致死の要因となるのかを明らかにすることを目的として研究を行い、以下の成果を得た。

はじめに *Bacillus subtilis* 168 株から芽胞を調製し、種々の線量の <sup>60</sup>Co 線を照射したのち、コロニー計数法により生残曲線を得た。ガンマ線照射後の芽胞は指数関数的に減少し、D<sub>10</sub> は約 2.1 kGy を示した。

次にマイクロプレートリーダーにより LB 培地中での損傷芽胞の発育過程を追跡した。さらに L-アラニンによる発芽処理についても検討した。その結果、ガンマ線及び加熱により芽胞の発育遅延が見られた。芽胞の発芽過程を示す培養初期の濁度低下を指標としてガンマ線照

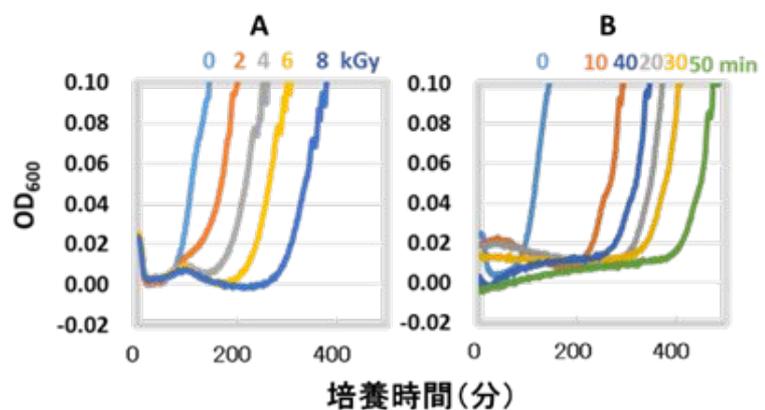


Fig. 1 殺菌ストレス処理後 *B. subtilis* 芽胞の発育過程 A : 線照射、B : 98 加熱処理

射と加熱について比較したところ、*B. subtilis* 芽胞の発芽システムは 線ではほとんど損傷

せず、98 加熱では損傷することが示唆された (Fig. 1)。さらに発芽過程位相差顕微鏡像観察から、L-アラニンによる発芽処理に 線照射芽胞は正常に応答したが、98 加熱処理芽胞の一部では発芽応答が見られなかった。一方ガンマ線照射の場合は芽胞数が  $1/10^4$  に低下する 8 kGy 照射後においても、発芽の抑制はみられなかった。

芽胞のガンマ線による死滅要因の一つとして、水に起因して発生する酸化ストレスによる間接作用があると考えられている。しかし、実際にコア内部の脱水が直接作用および間接作用を制御し耐性化に関与しているか、また、コアに多量に存在する DPA が耐性に関与するかどうかについても検討されていない。そのため、今年度は *Bacillus subtilis* 168 株とその *spoVFAB*

(DPA 合成酵素遺伝子) 欠損株に対して、挿入組み換えプラスミドを用いて耐熱性蛍光タンパク質 YFP3.2 または Redox センサーとして用いられる roYFP1 を芽胞コア内で発現させる組み換え体を作成し、芽胞形成培地に各濃度の DPA を添加した系においてコア内 DPA 濃度が異なる組換え体芽胞を調製し、加熱処理およびガンマ線照射下におけるコア内タンパク質の安定性、生存性に DPA 含量がどのように影響するかについて検討した。

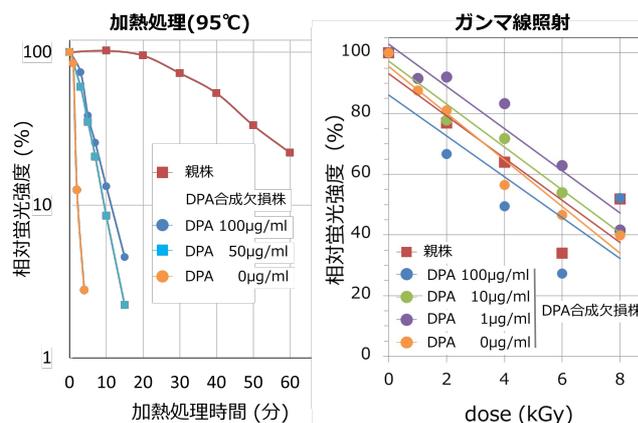


Fig. 2 DPA 蓄積量に依存した YFP3.2 導入 DPA 欠損の *B. subtilis* 芽胞の加熱と  $^{60}\text{Co}$  ガンマ線照射の効果。

加熱処理においては、DPA 合成欠損株に対し DPA の濃度を変化させて添加することにより、コア内発現蛍光タンパク質の消光は抑制され、生存率が上昇した。このことから、DPA 蓄積によるコアの脱水化・自由水の減少によるコア内タンパク質変性の低下により、死滅が抑制されたと推察された。ガンマ線照射では、DPA の蓄積に依存したコア内発現蛍光タンパク質の消光抑制はなく、親株と同様の消光挙動を示した。また、168 株と DPA 合成欠損株の死滅速度に顕著な違いはなかった (Fig.2)。このことから、ガンマ線はコア内発現蛍光タンパク質を失活させること、DPA の蓄積およびそれともなうコアの脱水化はガンマ線照射に対してはコア内タンパク質の保護能力はなく死滅の抑制効果もないことが明らかとなった。

さらに芽胞の発芽増殖過程において経時的に試料をサンプリングし、SDS-ジチオスレイトール処理により芽胞表層のスポアコートを除去し、0.5%低融点アガロースゲルプラグ内で各種酵素処理を施し、芽胞コアに存在するゲノム DNA を抽出し、制限酵素 *NotI* により断片化した DNA に対し、パルスフィールドゲル電気泳動を行なった。その結果から、ガンマ線と 98 加熱処理では *B. subtilis* 芽胞に与える損傷は異なり、ガンマ線では主に DNA に、98 加熱処理芽胞では芽胞表層の発芽システムに損傷を及ぼすことが推察された。

さらに芽胞の発芽過程に及ぼす加熱、ガンマ線の影響についてさらなる知見を得るために発芽過程を阻害する抗菌性を持つ香辛料精油成分、carvacrol, thymol を添加した場合の、*B.*

*subtilis* 芽胞の発芽について検討した。その結果、発芽誘導剤として L-asparagine , D-glucose , D-fructose , K<sup>+</sup> の混合物 (AGFK) を用いた場合は , carvacrol よりも thymol の方が低濃度で発芽誘導の阻害が見られ,互いに異性体の関係にある両者は発芽系に対する親和性が異なる可能性が示唆された。一方,ガンマ線照射芽胞を用いて同様の実験を行った場合は, thymol との複合処理においても芽胞の発芽過程には相乗効果は見られなかった。

以上より, *B. subtilis* 芽胞の発芽を抑制する効果には発芽を誘導する化合物と芽胞の内膜に存在する発芽レセプタータンパク質との相互作用が大きく関わっていることが示唆され、加熱によるこれらの活性化と変性との関係性、及びガンマ線照射によるゲノム DNA の損傷と修復との関連性をさらに追求することにより、さらに効率の良い複合殺菌システムの開発が期待できる。

## 5 . 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計 2 件)

Sakai, T., Tsuchido, T., Furuta, M., Inhibitory effect of spice powders on the development of heated and irradiated *Bacillus subtilis* spores as evaluated by calorimetry, *Biocontrol Sci.* 23(3), 121-128 (2018). [査読あり]

小池佳都子, 坂元 仁, 土戸哲明, 古田雅一, 大藪英一、血液透析システムにおける透析液品質の維持向上に 関するシステム消毒後の細菌の生態制御学的研究 (A) 透析液汚染細菌の加熱および過酸化水素処理による損傷菌の発生の評価 、日本透析医会雑誌、33巻、527-535 (2018) [査読あり]

### 〔学会発表〕(計 11 件)

阪井俊夫, 藤山貴友, 岩田吏世, 原田真美, 坂元 仁, 土戸哲明, 古田雅一, 食品殺菌で発生する損傷菌の動態解析に基づく制御対策 Control of injured microorganisms based on the analysis of their behaviors, FOOMA JAPAN 2018アカデミックプラザ、2018年

富井恵奈美, 塩見真平, 坂元 仁, 土戸哲明, 古田雅一、枯草菌の加熱損傷胞子の発芽とその後の発育に対する食品乳化剤の抑制作用機構、損傷菌セミナー2018、2018年

阪井俊夫, 坂元 仁, 土戸哲明, 古田雅一、細菌胞子の発芽レセプターから見た加熱と精油成分の発芽抑制作用の特性、損傷菌セミナー2018、2018年

阪井俊夫, 傳大輝, 土戸哲明, 古田雅一、熱測定法による香辛料粉末を含む固体系での損傷芽胞の発育過程の解析、損傷菌セミナー2018、2018年

坂元 仁, 土戸哲明, 古田雅一、水および油中での加熱処理における枯草菌胞子のコア内の水の動態と死滅機構、損傷菌セミナー2018、2018年

坂元 仁, 土戸哲明, 古田雅一、枯草菌スポアの発芽レセプターコンポーネントの機能解析 Characterization of components of germination receptors in *Bacillus subtilis* spore, 第70回日本生物工学会大会, 2018年

坂元 仁, 土戸哲明, 古田雅一、発芽・発芽後生長・栄養増殖過程を含めた芽胞損傷評価のための芽胞包括損傷指数の提案、日本防菌防黴学会 第45回年次大会、2018年

阪井俊夫, 坂元 仁, 土戸哲明, 古田雅一、ジピコリン酸放出反応から見た枯草菌芽胞の Carvacrol と Thymol の発芽抑制特性の相違、日本防菌防黴学会 第45回年次大会、2018年

古田雅一、阪井俊夫、普天間章、傳大輝、坂元 仁、土戸哲明、枯草菌胞子の発芽・増殖過程の劣化を指標とした放射線照射による損傷菌生成機構の解析、日本原子力学会2019年春の年会、2018年

坂元 仁、古田雅一、土戸哲明、人為的な発芽不能胞子は正常胞子の助けで発芽できるのか  
Can artificial non-germinating spores germinate with the help of normal spores? 日本農芸化学会2019年度大会、2018年

Effects of heating and gamma-rays on the germination and outgrowth of *Bacillus subtilis* spores, Futenma, A., Sakai T., Sakamoto, J.J., Tuchido, T., Furuta, M., Biomicroworld 2017, October 18-20, 2017 Madrid, Spain 2017年

〔図書〕(計1件)

古田雅一、有害微生物の制御管理、2.3 物理的制御 [8] 紫外線、[9] 電磁波  
「有害微生物の制御と管理 - 現場対応への実践的な取り組み - (監修:高鳥浩介、久米田裕子、土戸哲明、古畑勝則)」(株)テクノシステム 2016年11月13日発行

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

上記の成果は大阪府立大学 21世紀科学研究センターに属する微生物制御研究センターのホームページ([https://www.osakafu-u.ac.jp/academics/orp/21c/research\\_microorganism/](https://www.osakafu-u.ac.jp/academics/orp/21c/research_microorganism/))において適宜発信している。

## 6. 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名: 土戸哲明

ローマ字氏名: Tetsuaki TUCHIDO

所属研究機関名: 大阪府立大学

部局名: 研究推進機構

職名: 客員教授

研究者番号(8桁): 50029295

研究分担者氏名: 坂元仁

ローマ字氏名: Jin SAKAMOTO

所属研究機関名: 大阪府立大学

部局名: 研究推進機構

職名: 客員研究員

研究者番号(8桁): 40570560

### (2)研究協力者

研究協力者氏名: 高松宏治

ローマ字氏名: Hiromu TAKAMATSU

研究協力者氏名: 桑名利津子

ローマ字氏名: Ritsuko KUWANA