

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 5 月 25 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2014

課題番号：23780150

研究課題名(和文)細菌の適応能力を逆にとる：適合溶質の取込み機構を活用した安全・高品質な食品製造

研究課題名(英文) Let's take advantage of bacterial adaptability to environmental stress: High quality and safe food production by using uptake incompatible solute into bacterial cell

研究代表者

小関 成樹 (Koseki, Shigenobu)

北海道大学・(連合)農学研究科(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) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：細菌のストレス応答時の適合溶質の細胞質内への取り込みに注目して、細菌が誤って適合溶質として機能しない非適合溶質を取り込むことによって、代謝阻害を誘導し、結果として増殖を抑制する、との仮説のもとに種々のアミノ酸をはじめとする食品素材の細菌増殖抑制効果を明らかにした。アミノ酸のなかでも、D-トリプトファンが顕著な効果を示すことを明らかにするとともに、最適な作用条件を解明した。新たな非熱的な微生物制御手法として利用が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Under osmotic stress, bacterial cells uptake compatible solutes such as glycine-betaine to maintain homeostasis. It is unknown whether there are incompatible solutes that are similar in structure to compatible solutes but have adverse physiological effects on bacterial physiology. The objective of this study was to evaluate solute incompatibility of various amino acids against bacterial growth. Twenty-three amino acids with L and/or D isomers were examined for the effect of bacterial growth inhibition. Among the various amino acids examined, D-tryptophan (~40 mM) in PYG broth supplemented with 0 to 4% (w/v) salt inhibited the growth of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica*, and *Escherichia coli* O157:H7 at 25 °C. These results demonstrate that the uptake of D-tryptophan as an incompatible solute during osmotic stress may inhibit bacterial growth. The antibacterial effect of D-tryptophan demonstrated in this study suggests that D-tryptophan could be used as a novel preservative.

研究分野：非熱的微生物制御

キーワード：適合溶質 アミノ酸 ストレス応答 浸透圧ストレス

### 1. 研究開始当初の背景

近年、世界的にも消費者は安全性だけでなく、食品素材の持つ機能性・食感・香り等を保持した高品質な美味しい加工食品を望んでいる。しかしながら、このような食品は従来製法の加工食品に比べ、微生物学的な安全性を安定的に確保することが難しいことから、必然的に消費期限を短く設定せざるを得ない。消費期限の短い食品は、短期間での消費が求められるが、必ずしも適切に流通・消費されないために、結果として大量の廃棄を生み出す食品ロスの一要因として世界中で大きな社会問題になっている。これらの問題を解決するためには、加工プロセスの高度化・最適化だけでなく、加工処理後の微生物学的な安全性を安定化させ、短期間の期限設定による不必要な廃棄を減少させるための加工食品の設計上の工夫が求められている。設計上の工夫として、少量の添加で食品品質に悪影響を与えず、細菌増殖を抑制する物質、とりわけ食品素材に注目して活用方法を検討する必要がある。

### 2. 研究の目的

本研究では細菌のストレス応答時の適合溶質の細胞質内への取り込みに注目した。浸透圧ストレスなどを受けた際にカリウムイオン等のイオン性物質の取込みなどに加えて、グリシンベタインやプロリンなどの非イオン性の適合溶質を取り込むことで細胞内の浸透圧や pH などの恒常性維持に重要な役割を果たしていることが知られている。一方で、正常に適合溶質として動作する物質以外（非適合溶質）の取込みが誤って起きた場合には、代謝阻害を誘導することが報告されている。

細菌細胞がストレスに応答して、誤って適合溶質として機能しない非適合溶質を取り込むことによって、代謝阻害を誘導し、結果として増殖を抑制する、との仮説のもとに種々のアミノ酸をはじめとする食品素材の細菌増殖抑制効果を明らかにして、新たな微生物制御の技術を開発することを目的とした。

### 3. 研究の方法

対象とする細菌にはグラム陰性菌として *Escherichia coli* を、グラム陽性菌として *Listeria monocytogenes* を用いる。候補物質として食品素材として安全性の確認されているタンパク質の構成アミノ酸 20 種類、さらにタンパク質には含まれないアミノ酸、例えばオルニチン、クレアチンなどを含めた合計 25 種類程度のアミノ酸を対象として、それぞれの光学異性体も含めて細菌の増殖活性に与える影響を検討した。

具体的には、Peptone Yeast Glucose 培地を基礎培地として、種々の食塩濃度、アミノ酸濃度の条件を作成して、対象細菌を接種して増殖挙動を検討した。

96 穴マイクロプレートの各ウェルに、各条件の試料培地を 180  $\mu$ L ずつ分注した後、細菌液を 20  $\mu$ L ずつ接種した。調製したマイクロプレートを 25°C に設定したマイクロプレートリーダー (BIO-RAD Laboratories 製 iMark) で、595 nm の吸光度 (Optical Density, OD) 変化として観察した。吸光度測定は 10 分間隔で自動的に連続測定した。

得られた増殖曲線を解析することで、各種アミノ酸添加による増殖抑制効果を定量的に評価した。

### 4. 研究成果

#### (1) 細菌増殖抑制物質の探索

グリシンベタインやプロリンなどが適合溶質として取り込まれることから、各種のアミノ酸を対象として、3 種類の食中毒細菌 (*Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica*, *E. coli* O157:H7) に対する増殖抑制効果を網羅的に検討した。食塩の添加による浸透圧ストレスを負荷することで、適合溶質あるいは非適合溶質の取込みを促進させることで、細菌の増殖抑制効果を明らかにした。その結果、全ての菌種に対して、D 体のトリプトファンが顕著な増殖抑制効果を示すことを明らかにした。

#### (2) D-トリプトファン添加による細菌増殖抑制効果

D-トリプトファン (40 mM) は食塩添加による浸透圧ストレスの負荷によって、いずれの細菌に対しても増殖抑制効果を示した。特に、グラム陰性菌である *E. coli* O157:H7 (図 1) と *Salmonella* (図 2) に対しては、食塩濃度の上昇に伴い、増殖の遅れが認められるようになり、食塩濃度 3% 以上の条件下では、完全に増殖を抑制することが明らかとなった。

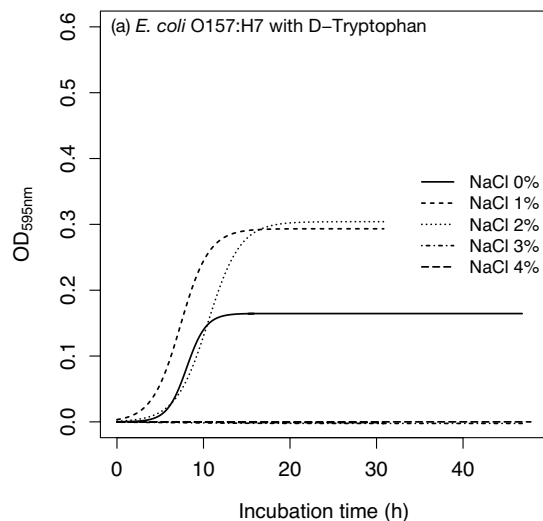


図 1. 異なる食塩濃度 (0-4%) 環境下における吸光度 (595 nm, 25°C) の変化を指標とした D-トリプトファン添加の有無による細菌の増殖抑制効果の比較 *E. coli* O157:H7

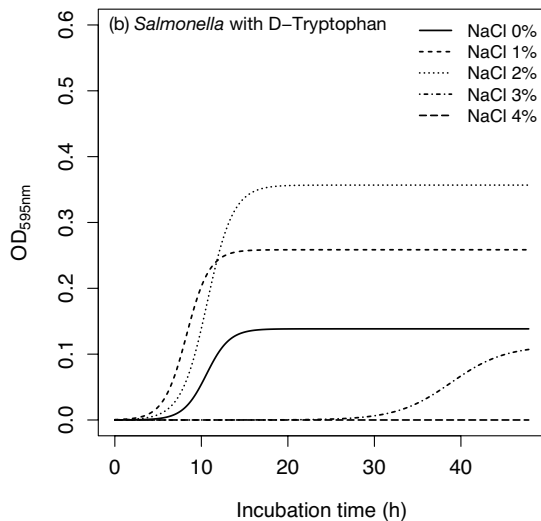


図 2. 異なる食塩濃度 (0–4%) 環境下における吸光度 (595 nm, 25°C) の変化を指標とした D-トリプトファン添加の有無による細菌の増殖抑制効果の比較 *Salmonella*

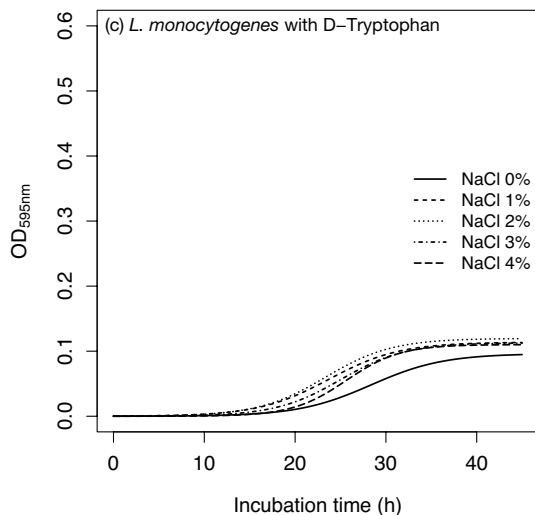


図 3. 異なる食塩濃度 (0–4%) 環境下における吸光度 (595 nm, 25°C) の変化を指標とした D-トリプトファン添加の有無による細菌の増殖抑制効果の比較 *L. monocytogenes*

た。一方、グラム陽性菌である *L. monocytogenes* では食塩濃度の増加に伴う、明らかな増殖の遅れは認められなかった。逆に食塩無添加 (NaCl 0%) 環境下で最も増殖が遅れることが示された (図 3)。

このように菌種によって、増殖抑制効果に違いが認められた原因は、グラム陽性/陰性の違い、すなわち細胞の膜構造の違いによって、適合溶質あるいは非適合溶質の取込み機構が異なることが原因であると考えられる。したがって、本研究結果から、D-トリプトファン添加による細菌増殖抑制は、主にグラム陰性菌に対して高い効果を発揮するものと考えられる。

### (3) D-トリプトファン添加濃度の影響

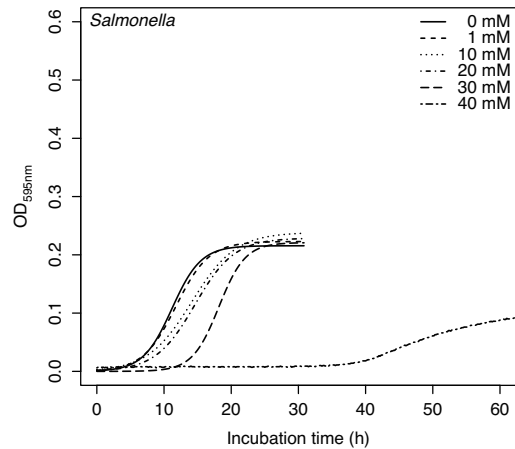
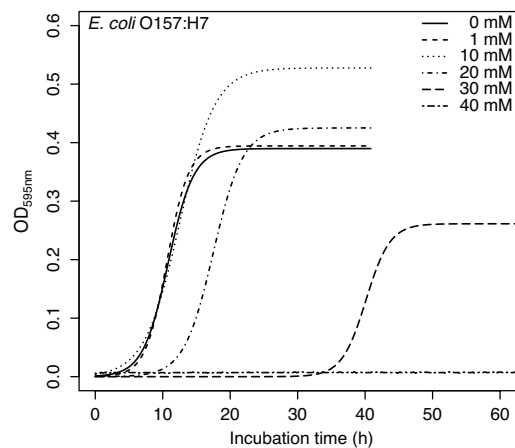
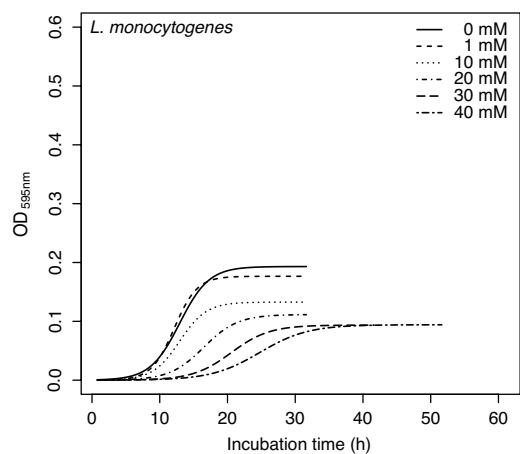


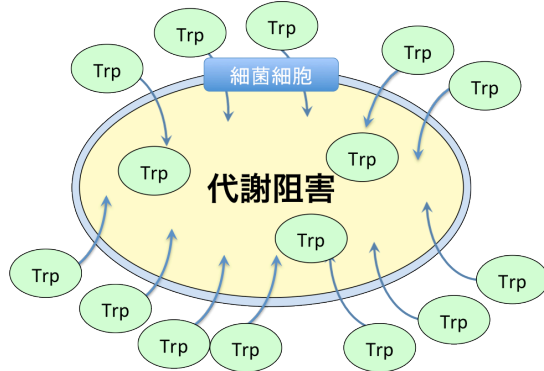
図 4. 添加トリプトファン濃度が *L. monocytogenes*, *E. coli* O157:H7, *Salmonella* の増殖に及ぼす影響

細菌増殖を抑制するために有効な D-トリプトファン濃度を明らかにするために、種々の濃度における細菌の増殖挙動を検討した。

その結果、確実な細菌増殖抑制効果を発現させるためには、菌種によらず、30 mM 以上の添加が必要であることが示された。*E. coli* O157:H7 では 40 mM の添加で完全に増殖を抑制することができた。一方で、*L. monocytogenes* は 40 mM 添加した場合にも、増殖を抑制できず、増殖開始までの時間を遅らせる効果にとどまった。

(4) 研究成果の活用場面

アミノ酸が細菌細胞内に取り込まれることで、代謝阻害を誘導し、増殖抑制効果を発現していると仮定した場合 (図 5), 以下のよ  
うな活用方法が考えられる。



仮説1：トリプトファン取込み

図 5. トリプトファンの取込み仮説イメージ

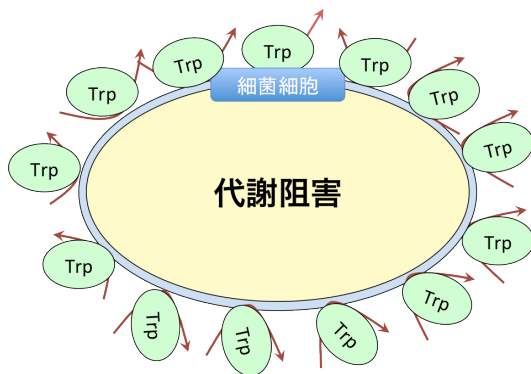
①殺菌洗浄剤のように一定以上の濃度に設定したアミノ酸溶液中に、対象とする食材を一定時間以上浸漬、あるいはスプレー噴霧

この活用方法は特に、非熱的な操作が要求される生の食材、例えばカット野菜、畜肉、魚介類などに適用可能である。

②食材の下処理段階における高塩分調味液への漬け込み工程での利用

例えば野菜の浅漬けやハム等の肉製品の製造工程などを想定される。

一方、細菌細胞は直接的にアミノ酸を菌体内に取り込んではいないが、生育環境すなわち菌体外に多量にアミノ酸が存在することによって、何らかの代謝阻害が誘導されると仮定した場合 (図 6) には以下のような活用が想定される。



仮説2：トリプトファン環境影響説

図 6. トリプトファンの環境影響仮説イメージ

③加工食品材料として添加

具体的には、各種のソース類への添加や、魚肉・畜肉の練り製品をはじめとする加工食品への添加などが考えられる。

(5) まとめ

アミノ酸、特に D-トリプトファンの細菌細胞に対する作用メカニズムは現時点では未解明である。したがって、第一に実行すべき課題は作用メカニズムを明らかにすることである。作用メカニズムを明らかにできれば、効果的、効率的な活用方法を見出すことにつながり、食品素材を用いた新たな微生物制御技術としての発展が期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

Koseki, S., Nakamura, N. and Shiina, T. Growth Inhibition of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica*, and *Escherichia coli* O157:H7 by D-Tryptophan as an Incompatible Solute. *Journal of Food Protection*, 査読有, 78, 819-824 (2015).

doi:10.4315/0362-028X.JFP-14-374

[学会発表] (計 1 件)

Koseki, S. Tryptophan Acts as an Incompatible Solute: Growth inhibition of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica*, and *Escherichia coli* O157:H7, International Association for Food Protection (IAFP) 2104 Annual meeting, August 6, 2014, Indianapolis (USA).

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]  
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小関 成樹 (KOSEKI, Shigenobu)  
北海道大学大学院 農学研究院・准教授  
研究者番号：70414498

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：