

《解 説》

可食性界面活性剤シヨ糖脂肪酸エステルの細菌胞子に対する抗菌作用

森山龍一¹⁾, 杉本和弘²⁾, 加藤志郎²⁾, 昌山敦²⁾

1) 中部大学応用生物学部 2) 名古屋大学大学院生命農学研究科

1. 細菌胞子の発芽

好気性バシラス (*Bacillus*) 属や嫌気性クロストリジウム (*Clostridium*) 属の細菌は栄養源の枯渇などの外部環境の悪化に伴い栄養細胞とは機能的・形態的に全く異なる耐久性細胞である胞子 (スポア (spore), 芽胞とも言う) を形成し, 外部環境が好転するまで休眠状態, すなわち代謝の凍結した状態, で存在する. 米国ユタ州のソルトレイク (塩湖) から採取された二疊紀 (2億5千年~4億年前) 由来の岩塩内に閉じこめられたままで休眠状態を保持していた胞子の存在が報告されており¹⁾, 休眠胞子は生命体の中で最も耐久性 (耐熱・耐薬剤性) に優れた細胞と考えられる. しかし, 一見矛盾するようであるが休眠胞子は栄養素 (例えばL-アラニンのようなアミノ酸) などの発芽誘起剤との接触により数秒から数分で発芽し, 発芽後生育 (outgrowth) 期を経て栄養細胞にもどり栄養増殖する. 発芽 (germination) とは特定の誘起物質によって始動され休眠胞子の持つ特性を不可逆的に喪失する胞子の一連の分解過程と定義される. 発芽の時点では未だ代謝活性は回復せず, 胞子に既存の複数の発芽関連酵素の活性化が逐次的に生じ, 発芽が進行するものと考えられる. この過程で脱水状態に近い状態にあった胞子コア部分は水和 (胞子の含水量は乾燥重量当たり0.3-0.7gであり, 栄養細胞の3-4gと比較して極端に低い) し, 生合成系を含む代謝系が蘇生する発芽後生育期を経て栄養細胞となる. 現代の日常生活における胞子形成細菌の汚染は, それが食品や医薬品に起きた場合には通常の加熱滅菌では容易に殺傷することができないため, 食品の変敗や食中毒, 感染症などの深刻な社会問題を引き起こす. また, 近年生物テロとして世間に深い衝撃を与えた「白い粉の恐怖」の正体は炭疽菌 (*Bacillus anthracis*) の胞子そのものであり, この他にも生

物兵器として利用が想定される胞子形成細菌は数多い. したがって, 細菌胞子の耐熱性や発芽の機構解明とそのコントロールは, 我々人類の「食と健康」にとって極めて重要な課題である.

細菌胞子の発芽は, 胞子内に既に存在する発芽関連酵素の逐次的活性化に基づいて進行する代謝の関与しない過程である. 発芽は短期間で終了し, なおかつ形態学的ランドマーカーも少ないため, その基礎的理解の進展は閉ざされていた. むしろ発芽に伴う耐熱性や胞子光屈折性の消滅など, 発芽に伴う生理的現象の変化に着目した実際の・応用的研究が先行し, これらの分子機構は不明のままに現在に至っている. この実際面での研究が胞子の殺滅やその制菌・静菌に関して多くの重要な情報を提供したことは評価されるべきであり^{2, 3)} これらの現象論的研究から演繹された発芽モデルや発芽の分子機構が提唱され, 有益な仮説を生んだことも事実である. しかしながら, それら仮説

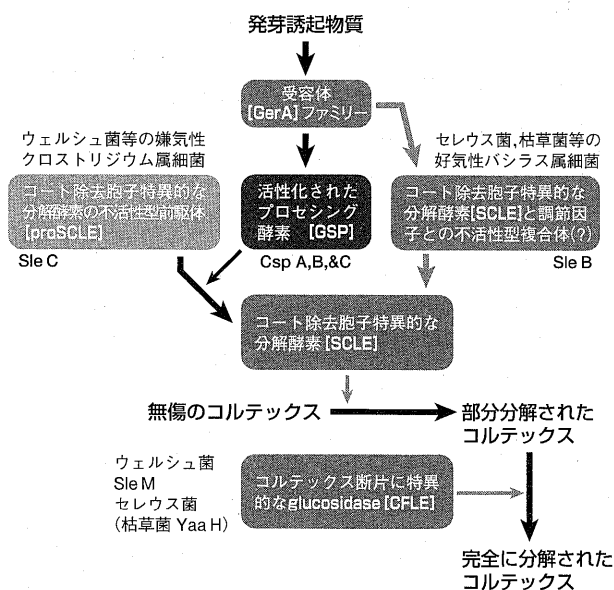


図1. 筆者等が提唱している細菌胞子の発芽機構に関する分子モデル.

表1. 細菌胞子の発芽に主要な役割を果たすコルテックス分解酵素の性質

	セレウス菌		ウェルシュ菌	
	SCLE	CFLE	SCLE	CFLE
遺 伝 子	<i>sleB</i>	<i>sleL</i>	<i>sleC</i>	<i>sleM</i>
生 合 成	胞子形成第Ⅱ～Ⅲ期にフォアスポアにおいて分泌シグナル配列を持つ28-kDaタンパク質として合成される	胞子形成時に母細胞側において48-kDaタンパク質として合成される	胞子形成時に4つのドメインからなる50-kDa前駆体タンパク質として合成される	胞子形成時に38-kDaタンパク質として合成される
休眠胞子における存在様態	24-kDa成熟型タンパク質 不活性型	48-kDa成熟型タンパク質 活性型	35-kDa前駆体タンパク質 不活性型	38-kDa成熟型タンパク質 活性型
局 在 性	コルテックス外縁	コルテックス外縁	コルテックス外縁	コルテックス外縁
基 質	コート除去胞子	コルテックス断片	コート除去胞子	コルテックス断片
ラクタム環の必要性	あり	あり	あり	あり
酵 素 活 性	amidase (?) 又は <i>lytic transglycosidase</i> (?)	glucosaminidase	amidase (?)	muramidase
相同性酵素の存在	枯草菌、炭疽菌などの好気性バシラス属細菌		ボツリヌス菌、破傷風菌、アセトノーブタノール菌などの嫌気性クロストリジウム細菌	

が実証もなく定説の如く一人歩きしているのも現実である。

近年我々の研究グループは、胞子発芽の主要な生化学的事象であるコルテックス（胞子に固有の化学構造を持つペプチドグリカン層）の分解に関与する複数の酵素を食中毒菌であるセレウス菌 (*Bacillus cereus*) 及びウェルシュ菌 (*Clostridium perfringens*) 胞子より活性を保ったままの状態に単離・同定することに他に先駆けて成功し、その性質や構造および遺伝子解析を通して発芽機構の分子論的解明の端緒を開いてきた (表1)⁴⁾。図1に現在我々が提唱している胞子発芽の分子モデルを示す。

2. ショ糖脂肪酸エステル of 細菌胞子に対する抗菌作用

上述したように、発芽時特異的に作用するコルテックス分解酵素の同定によりこれまで主として生理学的観察による胞子発芽の機構解明が分子レベルへと深まってきた。しかしながら、例えば水銀剤などのSHブロック剤が発芽酵素を失活させることにより発芽を完全に阻止できること (表1参照) は明らかになったが、そのような試薬は通常生物が食することが不可能なために食品加工などに直ぐに応用できる訳ではない。他にも細菌胞

子を死滅させることが可能な薬剤が開発されているものの、いずれも食品や医薬品の加工施設の殺菌消毒に使用が限定され、既に食材や製品内に混入してしまった胞子には対処できないのが実情である。

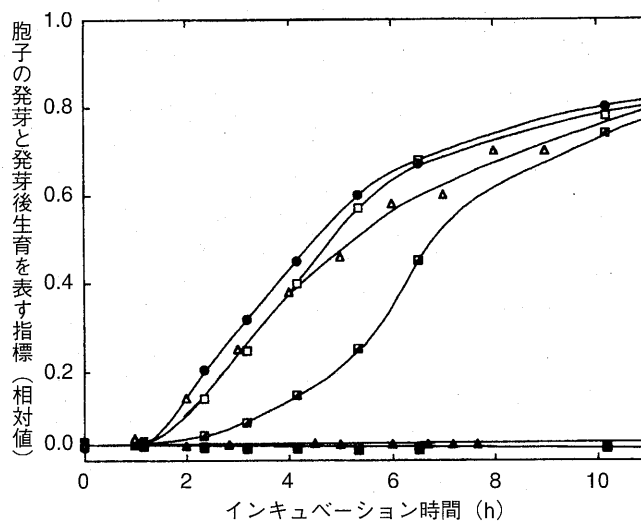


図2. ショ糖モノラウリル酸エステル (SE12) とショ糖モノパルミチン酸エステル (SE16) のセレウス菌 (*Bacillus cereus*) 胞子発芽・生育に対する効果。

(●) コントロール (△) 0.01 mM SE16
(▲) 0.1 mM SE16 (□) 0.1 mM SE12
(○) 0.3 mM SE12 (■) 1.0 mM SE12.

表2. スポアの大きさとスポアへのシヨ糖脂肪酸モノエステル (SE) の結合量

スポア	大きさ			スポア1個当たりのSE分子の結合数 (×10 ⁷)			
	全幅 (μm)	全長 (μm)	全表面積 (μm^2)	測定値		スポア表面を覆うのに 必要とされる最低分子数	
				SE12	SE16	SE12	SE16
セレウス菌	0.7	1.5	3.3	3	2	0.72	0.83
枯草菌	0.6	1.2	2.3	2	1	0.50	0.58
ウェルシュ菌	1.2	2.4	10.0	4	3	2.20	2.50

生体にも存在する物質から構成され、生体内で容易に分解されるため食品添加剤として認可されているモノアシルグリセロールやシヨ糖脂肪酸エステル (sugar ester, 以下SE) などの可食性界面活性剤は、乳化剤として用いられるばかりでなく、主として自動販売機内で高温 (50~70度) 保蔵される缶入り飲料における孢子形成細菌の発芽や生育を抑制することが知られていた⁵⁻⁷⁾ (図2参照)。しかしながら、その抗菌作用のメカニズムについては全く不明であったことと共に、これら薬剤の作用機構の解明が孢子発芽の機構解明に役立つことが期待されたため、下記に示すようなシヨ糖脂肪酸モノエステル (SE) の抗菌作用に関する分子論的研究が試みられた。

2-1. シヨ糖脂肪酸モノエステルの細菌孢子への結合と抗菌作用の関連

シヨ糖脂肪酸モノエステル (SE) はタンパク質、特に生体膜に内在する膜タンパク質に非特異的に結合してそのオリゴマー構造に影響を与えることが知られている⁸⁾。従って、シヨ糖脂肪酸モノエステル (SE) が孢子細胞膜に存在すると推定されている発芽誘起物質のレセプターに作用して、孢子発芽を抑制することが十分に考えられたため、¹⁴Cでラジオアイソトープラベルしたシヨ糖脂肪酸モノエステル (SE) を合成して細菌孢子への結合量について検討したところ、シヨ糖脂肪酸モノエステル (SE) は孢子の特定部位に結合するのではなく、細菌孢子表面全体を覆うような形で非特異的に吸着していることが示唆された (表2)⁹⁾。

2-2. シヨ糖脂肪酸モノエステルの抗菌作用低下の要因解明

シヨ糖脂肪酸モノエステル (SE) の抗菌活性は、時間依存的に喪失することがしばしば観察されて

いる。活性低下の要因を検討するため、セレウス菌 (*Bacillus cereus*) 孢子を用いたシヨ糖脂肪酸モノエステル (SE) 添加培地中での生育と培養に伴う培地シヨ糖脂肪酸モノエステル (SE) の濃度変化は、シヨ糖脂肪酸モノエステル (SE) が孢子発芽には関与せず、発芽後生育および栄養増殖を阻害することを示唆した¹⁰⁾。エステルの抗菌活性の強さは、ラウリン酸エステル>パルミチン酸エステル>ステアリン酸エステルの順であるが、一度生育を阻害された細菌が再び生育能を回復し、その回復は培地のシヨ糖脂肪酸モノエステル (SE) 濃度の減少と相関することが認められた (図3)¹⁰⁾。

また、発芽孢子と栄養細胞の浸出液中にエステラーゼ活性が認められる (図4) と共に、シヨ糖脂肪酸モノエステル (SE) のシヨ糖と脂肪酸への加水分解能も観察され、シヨ糖脂肪酸モノエステル (SE) の抗菌活性の低下は発芽孢子及び栄養細胞から遊離するエステラーゼによるシヨ糖脂肪酸モノ

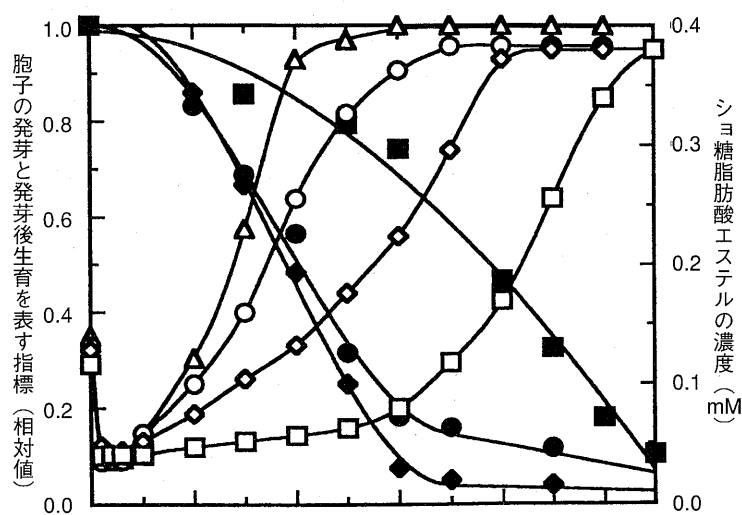


図3. セレウス菌 (*Bacillus cereus*) 孢子発芽・生育に対するシヨ糖脂肪酸モノエステルの効果。
△, コントロール □と■, SE12
◇と◆, SE16 ○と●, SE18.

ノエステル (SE) の分解に起因することが示唆された¹⁰⁾.

3. おわりに

上述したように, ショ糖脂肪酸モノエステル (SE) による細菌胞子に対する静菌作用に関する研究結果は, 当初の目論見に反して本薬剤が細菌胞子の発芽機構の解明のためのツールとしては使用できないことを示す残念なものであった. しかしながら, ショ糖脂肪酸エステルの静菌作用がエステルの加水分解により低下する事が明らかになったことにより, エステラーゼに対する活性抑制剤の併用や分解されにくい構造への改良など, 食品添加剤としての今後の機能向上にとって重要な観点を加えたものと考えられる. また, 細菌胞子の発芽を人為的にコントロール (バイオコントロール) するためには生理的事象を追う現象論的理解のみに留まらず, 胞子発芽機構の物質論的・分子論的レベルでの理解をますます発展させることが極めて重要である⁴⁾ ことを痛感させられる事例の一つとなった.

参考文献

- 1) Vreeland, R.H., and Rosenzweig, W.D., and Powere, D.W. (2000) *Nature*, **407**, 897-900.
- 2) Keynan, A. (1978). In *Spores VII*, (Chambliss, G., and Vary, J.C. eds.), pp. 43-53. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- 3) Smoth, L.A., and Pierson, M. (1982) *J. Food. Protection*, **45**, 84-92.
- 4) Makino, S., and Moriyama, R. (2002) *Med. Sci. Monit.*, **8**, 119-127.
- 5) Shibasaki, I. (1982) *J. Food Safety*, **4**, 35-38.
- 6) Marshall, D. L., and Bullerman, L.B. (1986) *J. Food Prot.*, **49**, 378-382.

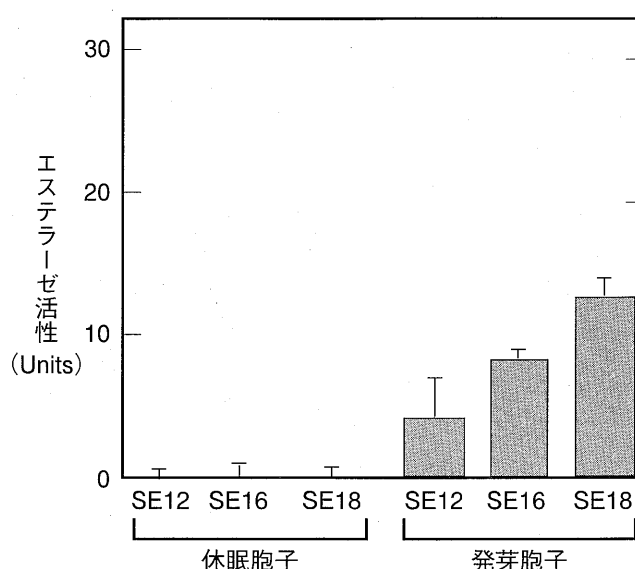


図4. セレウス菌 (*Bacillus cereus*) 胞子から遊離するエステラーゼによるショ糖脂肪酸モノエステル (SE) の加水分解.

- 7) Tsuchido, T., Ahn, Y. H., and Takano, M. (1987) *Appl. Environ. Microbiol.*, **53**, 505-508.
- 8) Makino, S., and Moriyama, R. (1991) in *Microemulsions and Emulsions in Foods* (El-Nokaly, M., and Cornell, D., eds.), pp. 182-192, American Society for Microbiology, Washington, D. C.
- 9) Moriyama, R., Sugimoto, K., Miyata, S., Katsuragi, T., and Makino, S. (1996) 防菌防黴. **24**, 13-38.
- 10) Sugimoto, K., Tanaka, H., Moriyama, R., Nagai, Y., Ogawa, A., Makino, S. (1998) *Biocontrol Science*, **3**, 17-21.