

<平成 20 年度助成>

# 食品汚染微生物制御のための自殺誘発殺菌法の開発

土戸 哲明・松村 吉信・坂元 仁

(関西大学化学生命工学部生命・生物工学科)

## 1. 緒 言

最近の加工食品の殺菌では、品質や栄養価の高さを重視したミニマムプロセッシングが採用される傾向にある。そのため、加熱よりも非熱殺菌に期待がかけられ、さまざまな方法が実用化に向けて検討されている<sup>1)</sup>。本研究でとりあげた自殺殺菌法はその一つで、微生物自身もつ自己組織分解能を活性化して自殺させ、簡便で経済的な方法として利用する新しい試みである<sup>2,3)</sup>。微生物は、自己構成成分である核酸や細胞壁、細胞膜脂質、タンパク質などを合成するとともに分解する能力をもち、それらの分解活性は通常、合成との間で作用のバランスやタイミングが調節されている。しかし、なんらかのきっかけを与えれば、この制御が乱れて分解系が作動し、自己組織の分解が起こる。

著者らの研究室では、枯草菌を用いた研究で、低温ショックや食品乳化剤の添加、高濃度 1 価カチオンへの曝露が自己分解酵素のオートリシン(主に CwIB)の活性を脱制御し、細胞壁分解を引き起こして細胞死をもたらすこと<sup>3,4)</sup>、また高温や低温へのショック処理により、細胞がもつ YokF エンドヌクレアーゼが活性化して自身の染色体 DNA が分解され、細胞死が誘発されることを報告している<sup>5)</sup>。

さらに、これまでの我々の研究<sup>6)</sup>により、好気条件下での温和な条件での殺菌処理では損傷菌が多く発生し、それらにおいても損傷に起因してこれらの分解系が作動すること、とくに、これらの損傷細胞では、細胞膜損傷に由来する呼吸鎖電

子伝達系の機能障害のために発生すると推察される活性酸素の 2 次傷害が認められている。この酸化ストレスによる細胞の致命的な自己損傷も広い意味での自殺誘発に含めることができ、さらに著者らは、これが上述の自己溶菌誘発にも関与する可能性を示唆している(未発表)。

本研究では、食品汚染細菌の制御技術としての自殺誘発殺菌法の基盤確立と応用展開を図るため、①対象を枯草菌以外の好気性孢子形成細菌に拡大して自己溶菌誘発法の普遍性を検討するとともに、有効な処理方法・条件を導出し、食品系への適用性を調査すること、②枯草菌をモデルとして、活性酸素発生による自己損傷誘発の殺菌法の基礎知見を得るため、いくつかの抗酸化系の単独および多重欠損株のストレス耐性の特性とマイクロアレイ解析による遺伝子発現特性を明らかにすること、③それらの欠損株の自己溶菌能を調べ、活性酸素発生と溶菌誘発との関係を調査すること、を目的に研究を行った。

得られた成果は多数に及ぶためデータの掲載を限定し、一部のものは記述に止めたこと、また、当初予定していた好熱性細菌についての検討は、低温ショックによる溶菌誘発は認めたものの、その要因となる自己溶菌酵素遺伝子の取得のための形質転換系の構築が最終的に不成功に終わったため、報告から除外したことを付記する。

## 2. 材料および方法

### 2.1. 使用菌株

主に、枯草菌 *Bacillus subtilis* 168 *trpC2* を

使用した。一部の実験では、*Bacillus cereus* NBRC13494、*Bacillus megaterium* ATCC14581、*Bacillus coagulans* NBRC12583、*Bacillus licheniformis* NBRC12200、*Bacillus pumilus* NBRC14367、*Bacillus sphaericus* NBRC15095、*Bacillus circulans* NBRC3329、*Geobacillus stearothermophilus* NBRC12550 も使用した。また、坂元(未発表)により作製された以下の *B. subtilis* 168 *trpC2* 由来抗酸化系遺伝子多重欠損株として、*katA kat E katX*(以下 KATs) 欠損株、*sodA sodF yojM*(以下 SODs) 欠損株、*ahpCF ohrA ohrR ohrB*(以下 ORGs) 欠損株、および KATs-ORGs、SODs-ORGs、KATs-SODs-ORGs の各多重欠損株を使用した。

## 2.2. 培養と自己溶菌誘発およびストレス処理

培地は L 培地 (pH7.0) を用い、液状食品として、本つゆと本つゆ香り白だし(いずれもキッコーマン株式会社製で5倍希釈したもの)も用いた。自己溶菌誘発の際は、対数増殖期まで培養した細胞を0℃への低温ショック(培地の場合、培養液を精製水に、食品の場合は食品中に、10倍希釈法により冷却)あるいは食品乳化剤添加によって処理した。乳化剤は、ジグリセリンモノミリスチルエステル(DG<sub>14</sub>)、ジグリセリンモノパルミトイルエステル(DG<sub>16</sub>)、スクロースモノパルミトイルエステル(SC<sub>16</sub>)を用いた。ストレス耐性は、加熱(55℃、5min)と低温(0℃、10min)処理による殺菌効果は平板法により、また過酸化水素(0.2~0.35mM)と*t*-ブチルヒドロペルオキシド(*t*-BuOOH; 0.35~0.5mM)処理による発育抑制効果は、自動発育記録培養装置を用いた発育遅延時間評価<sup>7)</sup>によって評価した。

## 2.3. 溶菌、増殖抑制と生存数の測定

溶菌と増殖抑制の程度は細胞懸濁液の濁度(OD<sub>650</sub>)低下によって評価した。生存数は L 培地を用い、寒天平板法あるいは発育遅延解析法<sup>7)</sup>によって測定した。

## 2.4. 電気泳動法によるタンパク質解析とゲノムアレイ解析

SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動法(PAGE)および等電点電気泳動法とこれを組み合わせた二次元電気泳動法を用いた。タンパク質の検出は Flamingo 染色によった。また、アナテック(株)の G 電極法によるタンパク質解析も同社に依頼して行った。DNA チップによるマイクロアレイ解析は、全 RNA を抽出後、タカラバイオ(株)に依頼して行った。

## 2.5. オートリシン活性の測定

枯草菌ペプチドグリカンを調製し、細胞の超音波破碎液を添加してその OD<sub>540</sub> の低下から活性を測定した。活性の 1U は、1分あたりの OD<sub>540</sub> 値を 1/10<sup>4</sup> 低下させる変化量とした。

## 2.6. 薄層クロマトグラフィーによる脂質分析

細胞から Bligh-Dyer 法によって脂質を抽出し、二次元薄層クロマトグラフィーにより、展開プレートの発色スポットから、検出・同定するとともに、ImageJ 画像解析ソフトによって定量した。

## 2.7. 過酸化脂質量の定量

細胞のリゾチーム破碎液について、TBARS Assay Kit(フナコシ)を用い、脂質の過酸化によって生じるマロンジアルデヒド(MDA)などのチオバルビツール酸反応物質を指標に定量した。

## 2.8. 細胞の酸化還元電位の測定

細胞の破碎液を調製後、その酸化還元電位を東亜ディーケーケー株式会社製のポータブル酸化還元電位計 RM-20P を用いて測定した。

## 3. 結 果

### 3.1. 枯草菌および種々の *Bacillus* 属細菌と *G. stearothermophilus* の自己溶菌誘発

枯草菌とその他の種々の *Bacillus* 属細菌の対数増殖期細胞について、自己溶菌誘発の効果を検討した。誘発処理は、0℃への低温ショック、食品乳化剤の DG<sub>14</sub>、DG<sub>16</sub>、SC<sub>16</sub> 添加である。その結

果の代表例として、図1に枯草菌と *B. coagulans* の細胞の低温ショックによる溶菌の経過を示し、

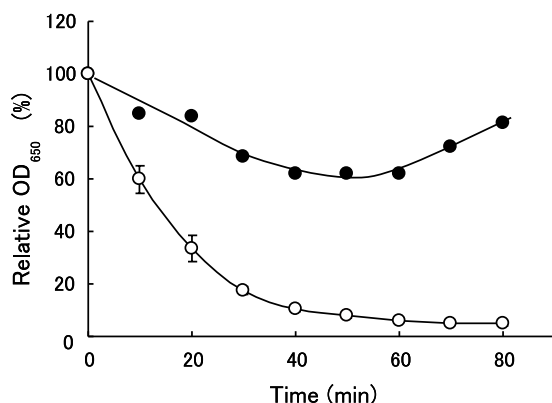


図1 枯草菌 168 と *B. megaterium* の対数増殖期細胞の低温ショックによる溶菌

枯草菌 168 (○) と *B. megaterium* (●) の培養細胞を 37℃ から 0℃ の精製中に 10 倍希釈法で冷却し、30 分保温後、37℃ に戻して濁度を測定した。数値は 3 回の実験の平均値。

他の細菌を含めた結果を表1にまとめた。この結果から、同じ *Bacillus* 属であっても種によって、また誘発方法によって溶菌効果が異なり、低温処理の効果は枯草菌と *B. coagulans* で著しく、*B. megaterium* でもある程度の効果が認められた。乳化剤処理はほぼ広く全般的に効果が見られたが、*B. cereus* では DG<sub>14</sub> や DG<sub>16</sub> よりも SC<sub>16</sub> で顕著であった。好熱性の *G. stearothermophilus* においても低温処理では顕著な溶菌が観察された。

### 3.2. 枯草菌のストレス耐性における抗酸化系の機能評価

次に、枯草菌の活性酸素発生に基づく自己損傷殺菌法の基礎知見を得るため、カタラーゼ系、スーパーオキシドジスムターゼ (SOD) 系、有機系活性酸素防御系に関わる主要各抗酸化系遺伝子群欠損株を用い、加熱 (55℃、5min)、低温 (0℃、10min)、過酸化水素 (0.2 ~ 0.35mM)、有機系の *t*-BuOOH (0.35 ~ 0.5mM) への耐性を調査した。その結果、個々のデータを省略するが、熱耐性については、野生株の 168 と比べて KATs 欠損株ではあまり差がないものの、SODs、KATs-SODs、KATs-ORGs、SODs-ORGs の各欠損株では生存数比で 100 倍あるいはそれ以上に顕著に耐性化した。また、低温ショック耐性でも同様の傾向が見られ、この場合の耐性化は 10 ~ 30 倍程度であった。0.2 ~ 0.35mM の濃度範囲の過酸化水素に対する耐性は、ORGs 欠損株 > 168 株 > SODs 欠損株 > SODs-ORGs 欠損株 > KATs 欠損株 > KATs-SODs 欠損株 > KATs-ORGs 欠損株 > KATs-SODs-ORGs 欠損株の順であり、*t*-BuOOH の 0.35 ~ 0.5mM における耐性では、KATs-SODs-ORGs 欠損株 > KATs 欠損株 > KATs-ORGs 欠損株 > KATs-SODs 欠損株 > SODs-ORGs 欠損株 > 168 株 (野生株) > SODs 欠

表1 自己溶菌誘発法による種々の *Bacillus* 属系細菌に対する溶菌誘発効果

細菌	自己溶菌誘発処理 <sup>1)</sup>			
	低温ショック	SC <sub>16</sub> 処理	DG <sub>14</sub> 処理	DG <sub>16</sub> 処理
<i>B. subtilis</i>	+++	++	+	(+)
<i>B. cereus</i>	-	+++	+	-
<i>B. megaterium</i>	(+)	++	++	++
<i>B. coagulans</i>	+++	++	++	++
<i>B. licheniformis</i>	-	+++	+++	++
<i>B. pumilus</i>	-	++	(+)	(+)
<i>B. sphaericus</i>	-	(+)	(+)	-
<i>B. circulans</i>	-	(+)	+	(+)
<i>G. stearothermophilus</i>	+++	ND <sup>2)</sup>	ND	ND

<sup>1)</sup> 対数増殖期細胞を処理後 60 min の OD (OD<sub>e</sub>) の未処理の OD (OD<sub>i</sub>) に対しての比、R (= OD<sub>e</sub>/OD<sub>i</sub>) の値によって評価 [-: R が 0.9 以上, (+): R が 0.7~0.9, ++: R が 0.5~0.7, +++: R が 0.3~0.5, ++++: R が 0.3 以下]

<sup>2)</sup> 未検討

損株 > ORGs 欠損株の順で、予想外に全欠損株の耐性が最大であった。さらに、この全欠損株は、*t*-BuOOH 濃度域 0.35 ~ 0.5mM でどの菌株よりも発育の開始が早かったが、培養の濁度がピークに達したのち減少する傾向が見られた。野生株と比較した各欠損株の耐性化と感受性化についての傾向を表 2 にまとめた。

これらの結果から、KATs、SODs、ORGs の各主要抗酸化系遺伝子群の間で、各ストレス耐性において欠損による相補的な関係があることが明らかとなった。また、これらの全欠損株においてもなおストレス耐性化が観察されたことから、KATs、SODs、ORGs 以外にも補完的な耐性をもたらす抗酸化系遺伝子群の存在が示唆された。

各欠損株の細胞タンパク質量を SDS-PAGE で調査したところ、上記の温度ストレス耐性となる KATs-ORGs 欠損株と SODs-ORGs 欠損株においていくつかのバンドが高レベルになっていること、しかし全欠損株ではタンパク量の減少がみられた。次に、2次元電気泳動法で解析した結果、同様の傾向で高レベルとなるタンパク質スポットが多く確認され、たとえば、KATs-ORGs 株で SodA (Mn-SOD) が 10 倍以上、SODs-ORGs 欠損株で  $\sigma^B$  レギュロンの構成タンパク質 NadE が 5 倍以上増加した。G 電極法による 2次元電気泳動

では、個々の結果を省略するが、さらに多くの既知の抗酸化タンパク質および未知タンパク質の増加が観察された。

そこで、KATs、ORGs、KATs-ORGs、KATs-SODs-ORGs の各多重欠損株について、マイクロアレイ解析による遺伝子発現挙動を調査した。その結果、全部で 4,000 あまりの数の遺伝子の転写データのうち、KATs 欠損株では、転写量が 2 倍以上又は 1/2 以下となった遺伝子(転写量変動遺伝子)が 35 個確認された。このうち、鉄輸送に関与する *fur* レギュロン遺伝子の転写量が減少し、転写量が 2 倍以上増加した遺伝子は 9 個しか観察されなかった。ORGs 欠損株では、164 個の転写量変動遺伝子が確認され、とくにアミノ酸、糖、エネルギー代謝系に関与する遺伝子群やカタラーゼ *katA* (約 5 倍) などの転写量が増加する一方、*fur* レギュロン遺伝子の転写量が減少していた。耐熱性を示した KATs-ORGs 欠損株では、911 個の転写量変動遺伝子が確認され、PerR レギュロン遺伝子である *mrgA*、一般ストレス応答に関与する *gspA*、*gsiB*、*ydaG*、*yfkM*、*ysnF* や代謝系(アミノ酸(特にシステイン、メチオニン)、糖、脂質、脂肪酸、エネルギー)に関与する遺伝子群、さらに抗酸化系のカタラーゼ(*katA*、*ydhU*、*yjqC*)、SOD ホモログ(*sodF*、*yojM*)、チオレドキシニンに

表 2 枯草菌の抗酸化遺伝子欠損株の対数増殖期細胞の種々のストレスに対する耐性

遺伝子欠損	ストレス処理			
	加熱 <sup>1</sup>	低温ショック <sup>2</sup>	過酸化水素 <sup>3</sup>	<i>t</i> -BuOOH <sup>4</sup>
KATs <sup>5</sup>	0	0	▼	△
SODs <sup>6</sup>	△	△	▼	▼
ORGs <sup>7</sup>	0	0	△	▼
KATs, SODs	△	△	▼	△
KATs, ORGs	△	△	▼	△
SODs, ORGs	△	△	▼	△
KATs, SODs, ORGs	▼	0	▼	△

細胞のストレス耐性は、野生株との比較において、上昇の場合△、下降の場合▼、変化があまりない場合 0 で表示した。

<sup>1</sup> 55°C, 5min. <sup>2</sup> 0°C, 10min. <sup>3</sup> 0.1~1mM. <sup>4</sup> 0.05~0.5mM. <sup>5</sup> *katA kat E katX*.

<sup>6</sup> *sodA sodF yojM*. <sup>7</sup> *ahpCF ohrA ohrR ohrB*.

似たドメインを持つ *yneN*、そして孢子形成期に誘導される *sigE*、*sigF*、*sigG* などの転写量が増加していた。一方、バイオサーファクタントに関与する surfactin synthetase や核酸代謝系(プリン)に関与する遺伝子群における転写量の顕著な減少が観察された。酸化ストレス応答に関与する Spx レギュロン遺伝子の転写量の変動は微弱であった。KATs-SODs-ORGs 欠損株では、371 個の転写量変動遺伝子が確認され、特に *mrgA*、*yjqC*、*yneN* やアミノ酸代謝系(アスパラギン酸、グルタミン酸、アルギニン、プロリン)の転写量が増加する一方、surfactin synthetase や核酸代謝系(プリン、ピリミジン)、運動性(鞭毛、走化性)、オートリシンに関与する遺伝子群の転写量が減少していた。

### 3.3. 活性酸素防御系の自己溶菌誘発との関係

前項に示したように、多くの抗酸化遺伝子多重欠損株が温度ストレスに耐性化したことから、温度ショックによる溶菌誘発における抗酸化遺伝子欠損の影響を調べた。その結果、調べた KATs-ORGs と SODs-ORGs の両欠損株の、37°C → 55°C (5min) → 37°C の加熱処理と 37°C → 0°C (30min) → 37°C の低温ショック処理の双方において、溶菌速度が野生株のそれぞれ、1/1.6 ~ 1/3、1/1.4 ~ 1/2 であることがわかった(図2)。

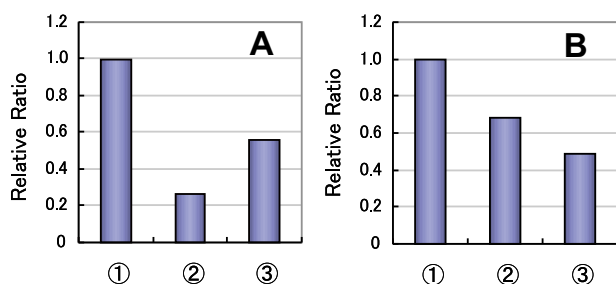


図2 枯草菌 168 の抗酸化遺伝子多重欠損株における加熱(A)および低温ショック処理(B)によって誘発した溶菌の速度の比較

①, 野生株, ②, KATs-ORGs 欠損株, ③, SODs-ORGs 欠損株  
野生株の溶菌速度(加熱では 0.00926 OD<sub>650</sub>/min, 低温ショックでは 0.0284 OD<sub>650</sub>/min)を 1 とした相対比で示した。

そこで、次にこれら抗酸化遺伝子欠損による溶菌能低下の要因を検討した。まず、オートリシン

の活性を調査したところ、これら 3 株間でほぼ同じであったことから、オートリシン活性の制御因子に相異があると推察し、さらに検討した。2次元薄層クロマトグラフィーを用いて脂質組成を分析した結果、カルジオリピンとフォスファチジルエタノールアミンのレベルに差はなかったが、フォスファチジルグリセロールは KATs-ORGs 欠損株で顕著に増加しており、また糖脂質のグルコシルグリセリドが増加する傾向が見られた。

抗酸化遺伝子欠損株では発生する活性酸素が多くなり、脂質の過酸化の程度が大きく、細胞内も酸化されることが推測されたので、過酸化脂質量と細胞破碎液の酸化還元電位を測定した。KATs-ORGs と SODs-ORGs の両欠損株の過酸化脂質量は野生株と差がなかったが、酸化還元電位は図3に示すように、KATs-SODs-ORGs 欠損株 > SODs-ORGs 欠損株 > KATs-ORGs 欠損株 > 168 株の順であり、多重欠損ほど酸化の程度が上昇していることが判明した。

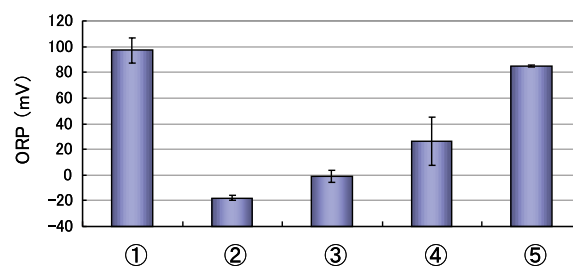


図3 枯草菌 168 とその抗酸化遺伝子多重欠損株の細胞破碎液における酸化還元電位の比較

①, 無細胞ブランク試料, ②, 野生株, ③, KATs-ORGs 欠損株, ④, SODs-ORGs 欠損株, ⑤, KATs-SODs-ORGs 欠損株。  
数値は 2 回の実験の平均値。

以上の結果から、枯草菌の自己溶菌誘発において、抗酸化遺伝子の欠損がおそらくオートリシンの活性制御系に変化を誘起すると推察され、直接的あるいは間接的に溶菌を抑制したものと考えられる。

### 3.4. 食品系における自殺誘発

上記の結果から、枯草菌など一部の *Bacillus* 属細菌の L 培地中で対数増殖期まで発育した細胞は、加熱や低温、食品乳化剤の添加の処理によっ

て自己溶菌を誘発し、ひいては細胞死をもたらすことが明らかになった。そこで、自殺殺菌の実用への可能性を探るため、液体食品に適用してその効果を検討した。本つゆと本つゆ香り白だしを対象に、枯草菌の低温ショックによる溶菌誘発と細胞死の経過を調べた。その結果、ショック後 37℃加温開始時では溶菌はほとんどみられず、加温 30 分後の溶菌率は、本つゆで 38%、白だしでは 71%であった。また、平板法によって求めた死滅率は、加温開始時で本つゆは 23%、白だしでは 4.5%と低く、30 分加温後の値は、それぞれ、54%と 33%であった。

#### 4. 考 察

著者ら<sup>3)</sup>は、すでに枯草菌の種々の処理による自己溶菌誘発が、主に自己溶菌酵素のオートリシンによるものであることを示しているが、種々の *Bacillus* 属細菌の低温ショックと食品乳化剤処理による自己溶菌誘発効果が、同じ属でも誘発処理によって、また種によって異なることがわかった。これは、活性化される細胞壁分解酵素の種類やその制御系に違いがあるものと推察される。さらに、基質細胞壁の構造の相異による可能性も考えられる。この結果は、実用的には溶菌誘発処理を併用するか、標的細菌によって使い分ける必要があることを示唆している。溶菌現象は液状食品の本つゆと本つゆ香り白だしにおいても認められた。生存率は、冷却後の加温開始時でも低かったが、これは平板法による評価のため溶菌トリガリングの不可逆的な進行が平板上でも起こったためと推察される。

著者ら<sup>3,4)</sup>は、加熱や低温ショックによる枯草菌の細胞死についても、少なくともその一部にオートリシンが関与することを報告しているが、これらの自己溶菌処理時の生存数評価においてカタラーゼを寒天培地に添加したとき、生存数が野生株よりも *cwlB* 欠損株において 2 倍前後高いことを示した。このことは、自己溶菌酵素の活性化と

酸化ストレスとの間に何らかの関係がある可能性を示唆するものと言える。

枯草菌の主要な KATs、SODs、ORGs の酸化還元遺伝子群の欠損株を用いた種々のストレス耐性の結果は、無機の過酸化水素、スーパーオキシドアニオンラジカル、有機系活性酸素防御系間で相補的あるいは補完的な相互作用の存在を示唆しており、これらの複数の欠損においてはさらにそれら以外の補欠的な酸化還元遺伝子群や酸化ストレスの修復遺伝子群の発現が起こることが示され、*Bacillus* 属細菌の酸化還元システムは、かなり複雑かつ高度なネットワーク的制御下にあるものと推察される。調べた KATs-ORGs と SODs-ORGs の両欠損株で溶菌速度が低下した事実は、これら補欠的な遺伝子や修復遺伝子が自己溶菌酵素の活性になんらかの相互作用をもつことを示唆している。ここで示した活性とその制御系の調査結果は、オートリシンの活性そのものよりも、活性制御系に影響が現れたことによると推測される。しかし、現象的にはそれらの間の因果関係は示唆できても、その詳細は全く不明であり、さらに今後検討を進める必要がある。

この助成研究は、自己溶菌や活性酸素発生の自己損傷による自殺殺菌法の利用を図ったものであるが、これら自己溶菌と活性酸素の間にも因果関係があることが示唆された。また液体食品における栄養細胞の溶菌と死滅が確認できたものの、実用上の処理の方法やその最適条件の導出については、今後の検討が必要である。本方法は、一般の低酸性食品で問題となる細菌胞子には効果がなく、栄養細胞を対象とする酸性液体食品の低温加熱殺菌に利用が限定されるが、予備処理や胞子発芽後の 2 次処理法として有効とみられる。

#### 5. 要 約

本研究では、食品汚染微生物制御に対する自己溶菌誘発殺菌法の応用のための基礎的知見を得る



ことを目的に検討を行った。具体的には、①対象を枯草菌以外の *Bacillus* 属細菌に拡大し、菌種と自己溶菌誘発方法の適用性を検討するとともに、食品系への適用性を調査すること、②枯草菌をモデルとして、活性酸素発生による自己損傷誘発の殺菌法の基礎概念を構築するため、いくつかの抗酸化遺伝子群多重欠損株のストレス耐性の特性と合成タンパク質および遺伝子の発現の特性を明らかにすること、③それらの抗酸化遺伝子群欠損株の自己溶菌能と特性解析により、活性酸素発生と溶菌誘発との関係を調査すること、である。

得られた成果の概要は以下のとおりである。

- 1) 種々の *Bacillus* 属系細菌の栄養細胞は、低温ショックや食品乳化剤添加処理によって自己溶菌を起こした。枯草菌でみられたように、この溶菌は必然的に細胞死をもたらし、自殺殺菌法としての利用が考えられた。
- 2) これらの *Bacillus* 属系細菌の溶菌誘発は、処理の方法によって、また種によって異なり、とくに低温ショックの溶菌誘発作用は限定的であった。
- 3) 枯草菌 168 の KATs、SODs、ORGs の各抗酸化遺伝子多重欠損株を用い、加熱、低温ショック、食品乳化剤に対する耐性を調査し、これらの遺伝子群の複数の多重欠損ほど加熱と低温に耐性化すること、その要因を発現タンパク質および遺伝子転写量から解析した結果、機能不明のものも含めて種々の遺伝子の発現が上昇または低下することを認めた。
- 4) KATs-ORGs と SODs-ORGs の各欠損株の加熱および低温ショックによって誘発した溶菌が野生株よりも遅いことから、溶菌に活性酸素が関与する可能性が示唆された。オートリシン活性は菌株間で差がないことから、活性

制御系に相異があるものと推察され、中でも脂質組成の変化がその要因の一つとして挙げられた。

- 5) 液状食品のモデルとして本つゆと本つゆ香り白だしを使用し、枯草菌の溶菌誘発と死滅を確認した。

これらの成果は、自己溶菌誘発殺菌法の実用展開のための基礎的知見を提供するもので、今後の一層の検討が期待される。

#### 謝 辞

本研究の遂行にあたり、多大な助成を賜りました財団法人浦上食品・食文化振興財団に厚く御礼申し上げます。また、実験を担当いただいた関西大学大学院工学研究科博士課程前期課程の西願文哉・田中清貴、同化学生命工学部の北郷雄基・寺村憲一郎の学生各氏に感謝いたします。

#### 文 献

- 1) 一色賢司, 松田敏生(編): 食品の非加熱殺菌応用ハンドブック, サイエンスフォーラム (2001).
- 2) Tsuchido, T., Kato, Y., Ono, K., and Matsumura: Y. Killing of *Bacillus subtilis* by cell suicide through autolysis induction. *Biocontrol Sci.*, **1**, 19-24 (1996).
- 3) 土戸哲明, 坂元 仁. 自殺殺菌法の原理と応用, 食品工業, **51**, (14), 20-26 (2008).
- 4) Tsuchido, T., Nishino, T., Kato, Y., and Takano, M.: Involvement of membrane lipids in cold shock-induced autolysis of *Bacillus subtilis* cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **59**, 1636-1640 (1995).
- 5) Sakamoto, J. J., Sasaki, M., and Tsuchido, T.: Purification and characterization of a *Bacillus subtilis* 168 nuclease, YokF, involved in chromosomal DNA degradation and cell death caused by thermal shock treatments. *J. Biol. Chem.*, **276**, 47046-47051 (2001).
- 6) 土戸哲明: 殺菌プロセスにおいて発生する損傷菌の生理学的特性. 日本食品微生物学会雑誌, **20**, 141-149 (2003).
- 7) Takano, M., and Tsuchido, T.: Availability of growth delay analysis for the evaluation of total injury in stressed bacterial population. *J. Ferment. Technol.*, **60**, 189-198 (1982).

## Development of a Method for Killing of Bacteria Contaminating in Food by Suicide Induction

Tetsuaki Tsuchido, Yoshinobu Matsumura and Jin Sakamoto  
*Department of Life Science and Biotechnology, Faculty of Chemistry,  
Materials and Bioengineering, Kansai University*

We carried out this study to obtain fundamental information about the application of a method of inducing cell autolysis for control of food-borne microorganisms. The outline of the results obtained were as follows.

- 1) Cells of different species of bacilli autolyzed after exposure to cold shock and food emulsifiers. The effects of autolysis induction depended upon the species and the method used. *Geobacillus stearothermophilus* cells also markedly autolyzed by cold shock treatment.
- 2) The effect of autolysis induction varied with the lysis-induction method and bacterial species. In particular, that with cold shock is restricted to some species.
- 3) By using *B. subtilis* mutants defective in different multiple gene sets relating to the oxidative stress, such as KATs (*katA*, *katE*, and *katX*), SODs (*sodA*, *sodF*, and *yojM*), and ORGs (*ahpCF*, *ohrA*, *ohrR* and *ohrB*), we examined their resistances to heat, cold shock, and food emulsifiers, and found that many mutants defective in those genes acquired resistances to heat and cold shock. To know the reason for these events, we analyzed the levels of both proteins produced and transcripts from genes in those mutants by two-dimensional gel electrophoresis as well as micro-array methods. As a result, we found that the expression of so many novel genes was up-regulated, while that of a number of genes was down-regulated.
- 4) We suggested that the oxidative stress may be involved in the induction of cell autolysis, since mutants defective in either KATs-ORGs or SODs-ORGs lysed more slowly than the wild type after exposure to heat and cold shock treatments. These two mutants possessed the level of autolysin activity similar to that of the wild type, but different patterns in the cellular lipid composition, suggesting a factor for explaining the above difference.
- 5) We tried the autolysis-induction method to apply to liquid foods, Hontsuyu and Hontsuyu-Kaori-Shirodashi, and confirmed the lysis and death of *B. subtilis* cells.

These results offer fundamental information for practical use of the suicide-induction method and it is expected that further investigation may promise that.