



Title	細菌芽胞の発芽始動機構に関する基礎的研究
Author(s)	柴田, 洋文
Citation	大阪大学, 1980, 博士論文
Version Type	VoR
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/2320">https://hdl.handle.net/11094/2320</a>
rights	
Note	

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏

名

柴田洋文

博士論文題名

細菌芽胞の発芽始動機構に関する基礎的研究

1. Effect of trichloroacetic acid treatment on certain properties of spores of Bacillus cereus T.  
H. Shibata, M. Uchida, H. Hayashi, and I. Tani.,  
Microbiol. Immunol., 23, 339 (1979)
2. Delayed germination of Bacillus cereus T spores by treatment with trichloroacetic acid and their re-activation by heating.  
H. Shibata, H. Murakami, and I. Tani.,  
Microbiol. Immunol., accepted.

参考論文

1. Bacillus cereus T 芽胞の発芽機構に対するグリシンの作用.  
谷 勇、相良知子、柴田洋文.  
日細菌誌, 30, 495 (1975)
2. Germination of unactivated spores of Bacillus cereus T. Effect of preincubation with L-alanine or inosine on the subsequent germination.  
H. Shibata, H. Takamatsu, and I. Tani.  
Japan. J. Microbiol., 20, 529 (1976)

3. Inhibition by ammonium ion of germination of unactivated spores of Bacillus cereus T induced by L-alanine and inosine.

H. Shibata, H. Takamatsu, and I. Tani.

Microbiol. Immunol., 22, 123 (1978)

4. Inhibition by potassium ion of the pregerminative response to L-alanine of unactivated spores of Bacillus cereus T.

H. Shibata, H. Takamatsu, M. Minami, and I. Tani.

Microbiol. Immunol., 22, 443 (1978)

# 論文内容の要旨

博士論文題名

細菌芽胞の発芽始動機構に関する基礎的研究

学位申請者

柴田 洋文

芽胞形成細菌は自己の体内に細菌芽胞（以下、芽胞と略）と称する耐久型構造を形成し、生命活動に適さない外的環境から自己再生に不可欠な遺伝情報やその発現に必須のメカニズムを保護し生命の維持を図る。芽胞は呼吸や代謝活性がほとんど認められない休眠状態にあるが、好適な環境下にあつては、休眠状態から脱却し、分裂増殖を繰り返す生命形態に転換する。休眠状態からの脱却を起点として分裂に至るまでの過程を発芽という。この過程において、芽胞は休眠を維持するメカニズムを破壊し、新生細胞が環境への適応を試み、呼吸、代謝活性が上昇する。すなわち、休眠を維持するメカニズムと発芽のメカニズムとは相反する性格をもつものといえる。この二つのメカニズムはどちらも芽胞構造やその構成要素の機能、さらには構成成分の生物活性と複雑に絡み合い、その実体は明らかでない<sup>1,2</sup>。

発芽に伴い、芽胞表層の構造、あるいは、芽胞表面の荷電状態が変化するという事実<sup>3-5</sup>が明らかにされているが、このような事実は、発芽と芽胞表層構造の存在状態の間に密接な関係があることを示唆している。したがって、芽胞表層を化学的に修飾し、その存在状態を変化させれば、発芽に何らかの影響を与えることが予測される。このような観点に立って、芽胞を導致死温度で加熱したり、アルカリ処理、あるいは種々の抽出方法で処理するといった、芽胞を不可逆的に変性させる過酷な条件を採用した研究が従来から行われている<sup>6-8</sup>。しかし、これらの

方法によつては、芽胞のみならず、その他の構造にも影響が及ぶことが予想され、その研究結果はかならずしも発芽開始機構と直結したものとは考え難い欠点がある。したがつて、芽胞表層部にのみ変化を与え、その変化と発芽能の変化との相関性を求める方法を追求する必要がある。

芽胞外層はタンパク質に富むスポアコートにより構成されており、この化学的、物理的構造に変化を与える物質を選択すれば、その結果主に変化を中べに、発芽機構を検討することができる。この目的に合致するためには、作用させる化合物は、その作用が容易に制御できること、化学的性質が明らかであり、しかも、その反応機構が類推可能であるという特徴を備えたものでなければならぬが、トリクロル酢酸（以下、TCAと略）は、これらの条件を満足する化合物といえ、さらに多種多様な構造類似体を得られる利点がある。

本研究においては、TCAを作用させた Bacillus cereus T 芽胞の性格を明らかにすることにより、発芽始動機構の解明への手掛りを得ることを企図した。

## 本 論

### 第1章 TCA の作用による生理学的性質の変化

芽胞に対する TCA の影響について検討した結果、本実験条件（40℃，30分）において、TCA の作用は高濃度（150mM 以上）では殺菌的であったが、低濃度（61.2mM）

では発芽率の低下が認められ、生存率には著しい変化は認められなかった (Table 1)。TCA 処理芽胞の発芽を経時的に追跡し、この発芽率低下の原因が、発芽遅延現象が生じたためであることを明らかにした。

Table 1. Properties of *B. cereus* T spores treated with TCA at various concentrations!

Concn. of TCA	Viability	Refractility	Stainability	Germinability	DPA excreted
0 mM	100.0 %	+	-	100.0 %	0 %
15.3	95.0	+	-	100.0	0
30.6	92.3	+	-	42.9	0
45.9	92.6	+	-	16.5	0
61.2	63.6	+	-	10.0	4.8
150.0	4.0	± <sup>2</sup>	± <sup>3</sup>	-	85.3
300.0	-	-	+	-	89.0

1. Treatment of spores with TCA was performed at 40 C for 30 min.

2. +, 55.2 %; -, 44.8 %.

3. +, 52.7 %; -, 47.3 %.

さらに、生存率を損うことなく発芽遅延を生じる条件下での芽胞に対する TCA の作用は、熱、化学薬品 (N 水酸化ナトリウム, 0.27N 塩酸) に対する抵抗性の低下やジピコリン酸保持能力の低下を生じるが、リゾチームやトリプシン, プロテアーゼに対する感受性化は認められないことを明らかにした (Table 2)。

Table 2. Effect of chemical agents on TCA-treated and control spores of *B. cereus* T!

Chemical	Control spores	Spores treated with TCA <sup>2</sup> at 6.1 mM	30.6 mM	61.2 mM
NaOH 1 N	- <sup>3</sup>	-	+ <sup>4</sup>	+
2 N	+	+	+	+
HCl 0.27 N	-	-	-	+

1. Treated and control spores (1 mg) were suspended in 10 ml of aqueous sodium hydroxide or hydrochloric acid. The suspensions were incubated at 30 C for 2 hr, and then centrifuged. The precipitate was resuspended in deionized water and their viability was measured.

2. Treatment of spores with TCA was performed at 40 C for 30 min.

3. Insensitive.

4. Sensitive. The colony count after treatment with the chemical was less than one tenth of those of the corresponding TCA-treated and control spores before treatment.

## 第2章 芽胞の発芽機構に対するTCAの作用

本章では、芽胞に対するTCAの反応キネティクス、およびTCA構造類似体を用いて化学構造と活性との関係を検討した。

TCAの発芽遅延活性は、濃度、作用温度、および接触時間に依存しており、pH 3.0以下の強酸性条件が必要であること、さらに、芽胞とTCAの反応の活性化エネルギー値は  $4.01 \times 10^4 \text{ cal/mole}$  を示すことが明らかとなった。しかし、pH 3.0以下の条件下でも、塩酸や酢酸は効果がなく、TCAアニオンの存在が必要であること、また、その作用はTCAアニオンと高濃度の水素イオンとの協同効果によるものであることが判明した (Fig. 1, Table 3)。

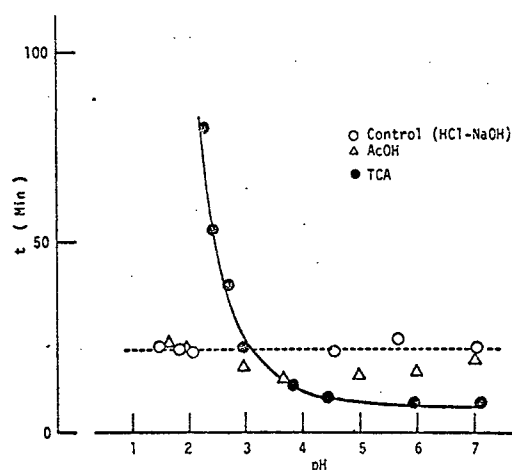


Fig. 1. Effect of the pH of TCA-treatment.

Spores were treated with 61.2 mM TCA or 60 mM AcOH at the indicated pH at 40 C for 30 min: o, HCl-NaOH; ●, TCA; Δ, AcOH.



Table 3. Effect of treatment of spores of *B. cereus* T with TCA-Na and HCl on subsequent germination<sup>1</sup>

Chemical <sup>2</sup>	t-Value <sup>3</sup>
Control	22.7 Min
TCA-Na <sup>4</sup>	18.6
HCl	22.3
A. TCA-Na → HCl	- <sup>5</sup>
B. HCl → TCA-Na	18.1

1. Germination of spores was induced by 0.05 mM L-alanine and 0.05 mM inosine in 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 8.0) at 30 C.
2. Spores were treated with TCA-Na, HCl (0.27 N), TCA-Na followed by treatment with HCl (A), or HCl followed by treatment with TCA-Na (B). Each treatment was carried out at 30 C for 30 min.
3. The value was obtained from curves of the optical density at 520 nm as described in the MATERIALS AND METHODS.
4. TCA-Na (61.2 mM) was prepared by titration of TCA with N NaOH to pH 7.0.
5. Not determined.

種々の TCA 構造類似体を用いてその発芽遅延活性を検討した結果、電子吸引性基をもたない構造類似体は効果がないことから、TCA アニオンの化学構造に起因する電子吸引性が活性発現に大きく寄与していると考えられた。

Table 4.

Effect of various compounds on germination of *B. cereus* T spores<sup>1</sup>

Compound	Formula	Retardation <sup>2</sup>
Trichloroacetic acid	CCl <sub>3</sub> COOH	+++
Trifluoroacetic acid	CF <sub>3</sub> COOH	+++
Tribromoacetic acid	CBr <sub>3</sub> COOH	+++
Dichloroacetic acid	CHCl <sub>2</sub> COOH	+++
Dibromoacetic acid	CHBr <sub>2</sub> COOH	++
2,3-Dibromopropionic acid	CH <sub>2</sub> BrCHBrCOOH	+
2,3-Dibromobutyric acid	CH <sub>3</sub> CHBrCHBrCOOH	+
Acetic acid	CH <sub>3</sub> COOH	-
Propionic acid	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> COOH	-
n-Butyric acid	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> COOH	-
Pivalic acid	(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> CCOOH	-
Malonic acid	CH <sub>2</sub> (COOH) <sub>2</sub>	-
Glycine	NH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> COOH	-
β-Alanine	NH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> COOH	-
4-Amino-n-butyric acid	NH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> COOH	-

1. Treatment of spores with the indicated compounds was carried out at 40 C for 30 min.
2. +, ++, +++, Effective. Delayed germination occurred when spores were treated with the indicated compound at 30 (+++), 60 (++) , or 150 mM (+); -, Not effective. Delayed germination was not observed when spores were treated with the indicated compound at 300 mM.

### 第3章 芽胞の化学構造に対するTCAの影響

抽出溶媒としてのTCAの性質は、芽胞にTCAを作用させることにより、芽胞構成成分に変化が生じる可能性があることを示唆する。そこで、主要な芽胞構成成分について量的変化の有無を検討した。その結果、基本的な芽胞構成成分の量的変化と発芽能の変化との間には明白な相関々係は見出されず、両者の間には直接の因果関係は存在しないと結論した (Table 5)。

Table 5. Protein, hexosamine, DPA and Calcium contents of TCA-treated and control spores of *B. cereus* T<sup>1</sup>

Spores <sup>2</sup>	Protein	Hexosamine	DPA	Ca
Control spores	66.5	6.9	10.4	1.95
Spores treated with 6.1 mM TCA	58.5	6.7	10.6	1.60
Spores treated with 30.6 mM TCA	57.5	6.8	10.5	1.58
Spores treated with 61.2 mM TCA	57.8	6.7	10.0	1.57

1. Contents are shown as percentages of the dry weight of the spores.
2. TCA-treatment of spores was performed at 40 C for 30 min.

一方、芽胞とTCAとの反応の活性化エネルギー値は巨大分子の変性を示唆するものであった。そこで、TCA処理芽胞の赤外吸収スペクトルを測定し、未処理芽胞、発芽芽胞のそれと比較した結果、基本的なパターンは未処理芽胞と一致したが、TCA処理芽胞には未処理芽胞のスペクトルにはない吸収ピークが3本 (1,325, 830, および 680 cm<sup>-1</sup>) に認められることを明らかにした (Fig. 2)。

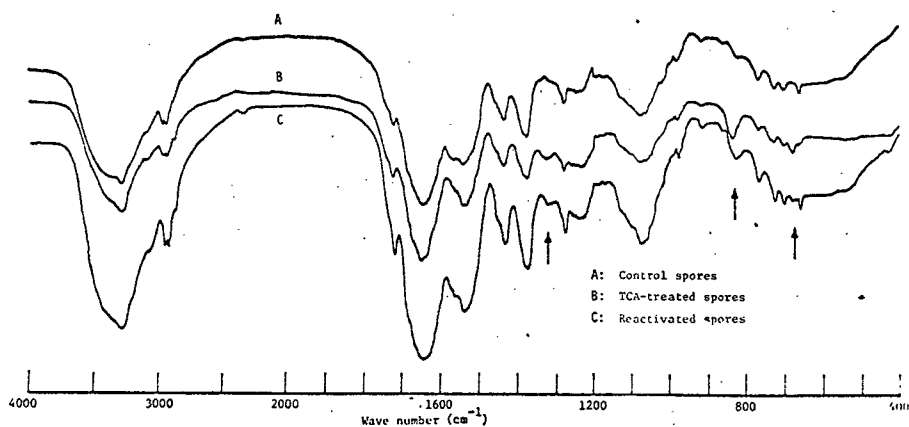


Fig. 2. IR spectra of TCA-treated, reactivated, and control spores of *B. cereus* T. Arrows indicate 1,325, 830 and 680  $\text{cm}^{-1}$ .

#### 第4章 TCA処理芽胞の発芽能の回復と回復過程におけるTCAの挙動

TCAの作用メカニズムを明らかにするためには、TCA処理芽胞における発芽能の低下が発芽機構そのものの損傷による直接的な機能低下に起因するものか、あるいは、発芽機構を取り巻く環境の変化により機能発現が抑制された状態にあるのかという二つの問題を解明する必要がある。また、本研究で取り扱うTCAの作用は殺菌的ではなく、発芽機構に対してもその機能を完全に失わせるというものでもないことから、何らかの機能補償的方法による発芽能の回復が可能であると予想された。そこで、本章ではその方法について検討し、回復過程に生じる変化を明らかにすることから、上記の問題の解明を試みた。

TCAの作用により低下した発芽能は緩和な条件(40-50℃)での加熱により容易に回復した。この回復効果は

加熱温度および加熱時間に依存していることから、TCAの作用による発芽能の低下は、発芽始動機構構成要素の欠損または修復不能な変性によるものではないと結論した (Fig. 3)。

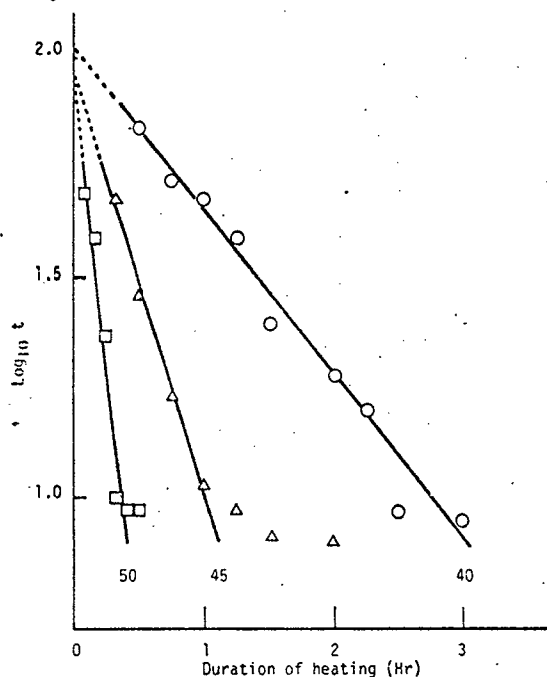


Fig. 3 . Effect of the temperature and period of heat-treatment in reactivation of TCA-treated (61.2 mM, 40 C, 30 min) spores of *B. cereus* T.

加熱により発芽能が回復した芽胞の赤外吸収スペクトルは未処理芽胞のそれと一致した。また、TCA処理芽胞の熱重量分析を行った結果、TCA処理芽胞には、TCA濃度にほぼ比例して、108°Cをピーク時温度として脱離する揮発性成分の存在が確認された (Fig. 4b)。赤外吸収スペクトルの解析の結果、この物質の存否は既述の3本の吸収ピークの有無に対比していることが判明した。さらに、熱分解ガスクロマトグラフの結果から、本物質はTCAであると推定した (Fig. 5)。

以上の知見に基づき、TCAは芽胞表面あるいは表面に近い部位に存在する構成タンパクに作用し、その高次構

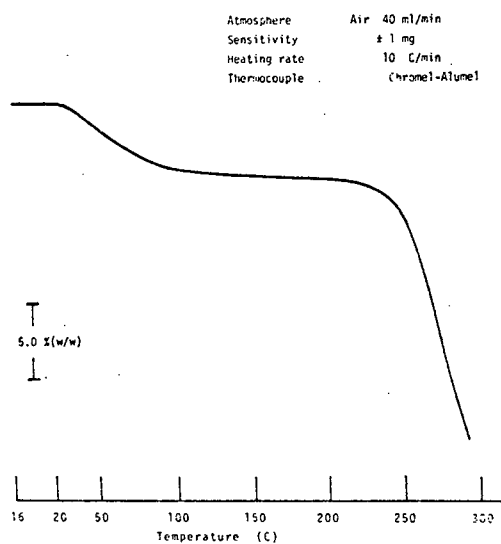


Fig. 4a. Thermogravimetric curve of spores of *B. cereus* T.

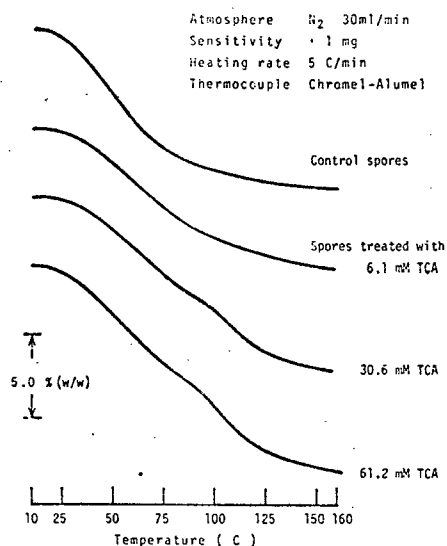


Fig. 4b. Thermogravimetric curves of TCA-treated and control spores of *B. cereus* T.

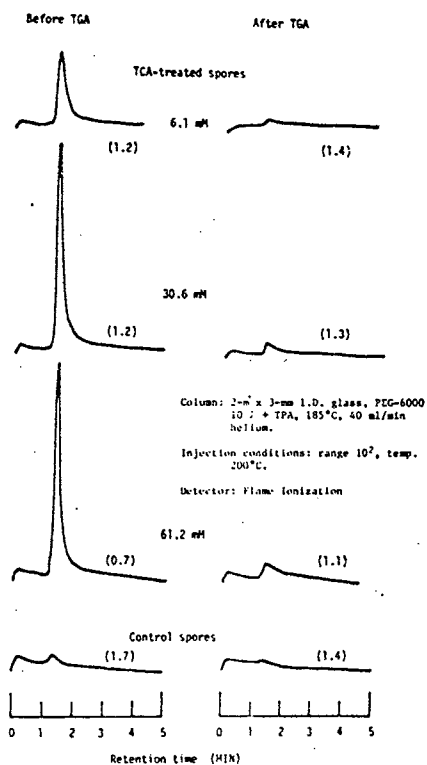


Fig. 5. Pyrolytic gaschromatogram of TCA-treated and control spores of *B. cereus* T. Spores were applied to pyrolytic gaschromatograph before and after thermogravimetric analyses up to 150 C. Figures in parenthesis show the amount of spores (mg) applied.

Column: 2-m x 3-mm I.D. glass, PEG-6000  
10 % + TPA, 185 C, 40 ml/min  
helium.

Injection conditions: range  $10^2$   
temp. 200 C

Detector: Flame Ionization.

造に変化を主い、芽胞を高濃度の水素イオンに対して感受性化するものと推察した。

## 第5章 発芽始動性が異なる芽胞に対するTCAの影響

発芽始動機構において、芽胞の表層構造が重要な役割を演じているという可能性は多くの研究者の指摘するところである<sup>3-5</sup>。熱や化学薬剤での処理による芽胞の活性化はスポアコート構成タンパクの conformation の変化と考えられている<sup>12</sup>。本菌芽胞は加熱やヒアウニン (ALA) での処理により活性化される<sup>10</sup>が、両活性化芽胞は異なる発芽前状態にあることがわかって<sup>11</sup>いる。また、本菌芽胞はリゾチーム非感受性であるが、ドデシル硫酸ナトリウム-ジナオトレート (SDS-DTT) で処理すると感受性に変化する<sup>8</sup>。これらの処理はTCAの作用部位を可溶化したり、あるいは構造的に変化させることにより、TCAの作用メカニズムやその程度に影響を及ぼすことが予想された。

そこで、本章では、両活性化芽胞およびSDS-DTT処理芽胞に対するTCA処理の影響について検討し、次のような事実を明らかにした。すなわち、両活性化芽胞はいずれもTCAの作用により発芽遅延を生じた。しかし、その程度には著しい差があり、ALA活性化芽胞が著しく強い感受性を示したのに対して、加熱活性化芽胞は、活性化状態を維持しながら、非活性化芽胞と等価の感受性を示した (Fig. 6)。これは、両活性化芽胞の表層構造の差によるものと推察した。SDS-DTT処理芽胞もまた未処理芽胞よりも強くTCAと反応した。低下した発芽能は加熱、

あるいはリゾチームの添加により回復した (Table 6)。この事実は、TCA の作用により生いた発芽機構の低下した機能がリゾチームにより補償されたことを意味している。リゾチームの作用部位はコルテックスペプチドグリカンである。<sup>12</sup> したがって、TCA の作用により機能が低下した部位はコルテックス溶解酵素であろうと推察した。

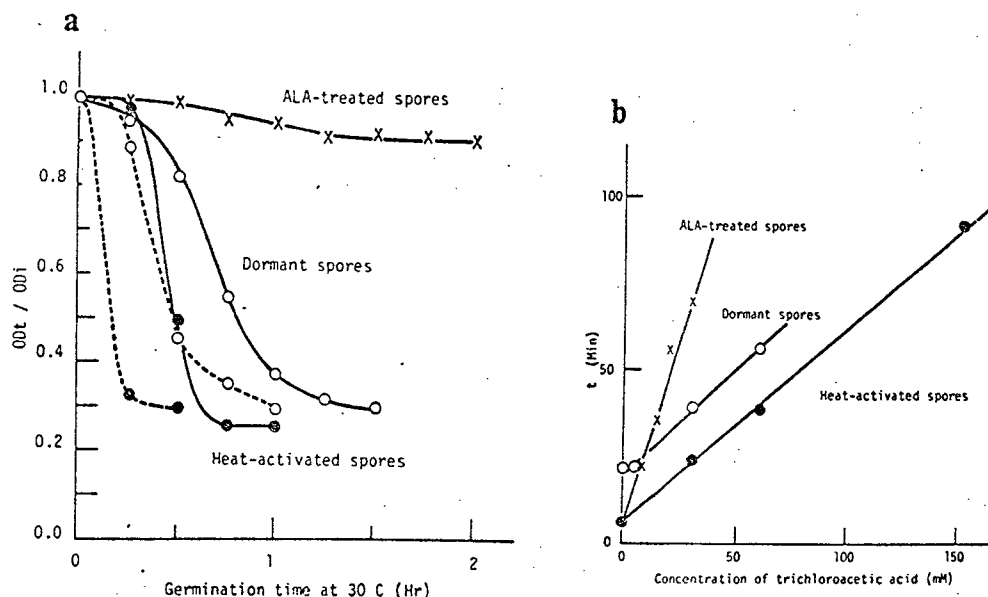


Fig. 6. Effect of the concentration of TCA-treatment. Germination was performed at 30 C in 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 8.0) containing 0.05 mM L-alanine and 0.05 mM inosine. (a) Germination profiles of dormant, heat-activated, and ALA-treated spores, with (solid lines) or without (dotted lines) TCA-treatment (30.6 mM, 30 C, 30 min); (b) Spores were treated at 30 C for 30 min at the indicated concentrations of TCA.

Table 6.

Effect of TCA-treatment and subsequent heating on germination of SDS-DTT-treated spores of *B. cereus* T<sup>1</sup>

Spores	t-Value (Min)	
	Without lysozyme	With lysozyme
Control <sup>2</sup>	26.9	7.7
TCA-treated spores <sup>3</sup>	83.9	7.5
After heating <sup>4</sup>	26.0	

1. Germination was estimated by measuring a decrease in OD at 520 nm in 0.1 M sodium phosphate buffer containing 0.05 mM L-alanine and 0.05 mM inosine with or without lysozyme (200 µg/ml).

2. Spores were treated with 0.5 % SDS-10 mM DTT in 0.1 M NaCl at 37 C for 2 hr.

3. TCA-treatment of spores was carried out with 30.6 mM TCA at 30 C for 30 min.

4. TCA-treated spores were heated at 50 C for 30 min.

芽胞の発芽機構，とくにその始動機構の追跡，解明への接近を企図して，TCA処理を中心に種々の熱，化学的および酵素的処理により芽胞に生じた変化を明らかにし，発芽機構との関係を検討した。

1. TCAの作用による発芽遅延の程度は，TCAの濃度，作用温度，および接触時間に依存しており，強酸性（pH 3.0以下）の環境を必要とした。しかし，酸性条件が満足されるのみでは十分でなく，TCAアニオンの存在が必要であり，その作用は，第1にTCAアニオン，次いで高濃度の水素イオンという逐次的作用で，TCAアニオンの作用はトリクロルメチレン基の電子吸引性に基づくものであることが判明した。
2. 芽胞に対するTCAの作用は化学組成の量的変化よりも高次構造の変化によるものと思われ，この変化は，芽胞に対するTCAの結合により生じると推察された。
3. TCAの作用により低下した発芽能は加熱あるいはリゾチームの添加により回復した。
4. TCAの作用に対する加熱活性化芽胞の感受性は未処理芽胞とほぼ等価であったが，ALA活性化芽胞およびSDS-DTT処理芽胞は著しく強い感受性を示した。
5. 以上の成績に基づき，芽胞の発芽機構に対するTCAの作用を次のように推察した。すなわち，TCAアニオンが，まず，スポアコートのタンパク質に作用し，これに結合することによりその *conformation* に影響を及ぼ



れ、その結果、スボアコートにおける透過性が増大し、高濃度の水素イオンをはじめ低分子化合物に対する抵抗性が低下する。このような状態の芽胞に、TCAが解離して生じた高濃度の水素イオンが作用し、コルテックス溶解酵素を攻撃しその活性を低下させることにより発芽機構の機能低下を生じるに至るものといえる。

6. TCAの作用条件を操作することにより、発芽始動が遅延したり、極端な場合は停滞するという事実や、この現象が、加熱処理により容易に回復するという事実に加えて、活性化状態にある芽胞に対してまでも、発芽遅延、すなわち、発芽始動機構の機能低下を生じたことから、コルテックス溶解酵素系の制御が、芽胞の休眠と発芽の境界を制御していると推察された。

## 引用文献

1. Gould, G. W., and Hurst, A. (1969); The Bacterial Spore, Acad. Press. London
2. 蜂須賀養悦, 堀越弘毅. (1976); 耐久型細胞 岩波書店
3. 近藤雅臣, 西原 力. (1970); 日細菌誌 25, 285
4. Tochikubo, K., Kojima, K., and Hachisuka, Y. (1975); Spores VI, 526
5. Gould, G. W., and Sale, A. J. H. (1970); J. Gen. Microbiol. 60, 335
6. Hashimoto, T., Friebe, W. R., and Conti, S. F. (1972); Spores V, 409
7. Waites, W. M., Wyatt, L. R., and Arthur, B. (1972); Spores V, 430
8. Vary, J. C. (1973); J. Bacteriol. 116, 797
9. Kondo, M., and Foster, J. W. (1967); J. Gen. Microbiol. 47, 257
10. Shibata, H., Takamatsu, H., and Tani, I. (1976); Japan, J. Microbiol. 20, 529
11. Shibata, H., Takamatsu, H., Minami, M., and Tani, I. (1978); Microbiol. Immunol. 22, 443
12. Warth, A. D., Ohye, D. F., and Murrell, W. G. (1963); J. Cell Biol. 16, 593

# 細菌芽胞の発芽始動機構に 関する基礎的研究

柴 田 洋 文

# 細菌芽胞の発芽始動機構に 関する基礎的研究

# 目 次

緒 論	1
第1章 TCAの作用による芽胞の生理学的性質の変化	3
第1節 芽胞の発芽に対するTCAの影響	3
第2節 芽胞の抵抗性に対するTCAの影響	8
第3節 芽胞のDPA保持能力に対するTCAの影響	12
第4節 考察ならびに小结	14
第2章 芽胞発芽機構に対するTCAの作用	17
第1節 pH, 温度, および接触時間の影響	17
第2節 TCA構造類似体の作用	22
第3節 考察ならびに小结	24
第3章 芽胞の化学構造に対するTCAの影響	27
第1節 芽胞の化学組成に対するTCAの影響	27
第2節 TCA処理芽胞のIRスペクトル	28
第3節 考察ならびに小结	31
第4章 TCA処理芽胞の発芽能の回復と回復過程における TCAの挙動	32
第1節 発芽能の回復	32
第2節 加熱処理したTCA処理芽胞のIRスペクトル	35
第3節 発芽能回復過程におけるTCAの挙動	37
第4節 考察ならびに小结	40

第5章	発芽始動性が異なる芽胞に対するTCAの影響	43
第1節	活性化芽胞に対するTCAの影響	43
第2節	SDS-DTT処理芽胞に対するTCAの影響	46
第3節	考察ならびに小结	50
第6章	総括ならびに結論	55
第1節	総括	55
第2節	結論	58
謝 辞		60
参考文献		61

## ABBREVIATIONS

AcOH	acetic acid
ALA	L-alanine
DBrA	dibromoacetic acid
DBrBuA	dibromobutyric acid
DBrPrA	dibromopropionic acid
DCA	dichloroacetic acid
DCE	dichloroethanol
DPA	dipicolinic acid (pyridine-2,6-dicarboxylic acid)
DTE	dithioerythritol
DTT	dithiothreitol
INO	inosine
IR	infrared absorption
NaPB	sodium phosphate buffer
OD	optical density
PHB	poly- $\beta$ -hydroxybutyrate
SDS	sodium dodecyl sulfate
TBrA	tribromoacetic acid
TCA	trichloroacetic acid
TFA	trifluoroacetic acid
TG	thermogravimetric analysis
UV	ultraviolet

## 緒 論

芽胞形成細菌は自己の体内に耐久型構造を形成し、呼吸、代謝等の生命活動に適さない外的環境から自己再生に不可欠な遺伝情報やその発現に必須のメカニズムを保護し、生命の維持を図る。この耐久型構造を細菌芽胞（以下、芽胞という）という<sup>20</sup>。

生物は不断にエネルギーを消費し物質代謝を行うことにより生命を維持しているが、芽胞は呼吸や代謝活性がほとんど認められない休眠状態にあり、この点において、特異な生命形態である。しかし、“種の維持”という生物学的至上命題に沿って、劣悪な環境下で生命を維持していくためには合目的生命形態であるといえよう。

芽胞は、好適な環境下においては、休眠状態から脱却し分裂増殖を繰り返す生命形態に転換する。休眠状態からの脱却を起点として分裂に至るまでの過程を発芽という。この過程において、芽胞は休眠を維持するメカニズムを破壊する。そして、新生細胞が環境への適応を試み、呼吸、代謝活性が上昇する<sup>19,20</sup>、すなわち、休眠を維持するメカニズムと発芽のメカニズム（発芽機構）とは相反する性格をもつものといえる。この二つのメカニズムはどちらも芽胞構造やその構成要素の機能、さらには構成成分（DPA<sup>43</sup>、遊離グルタミン酸<sup>13</sup>など）と複雑に絡みあい、その実体は明らかでない<sup>19,20</sup>。

発芽現象は、発芽開始から新生細胞の出現に至るまで、スポアコートの構造変化、スポアプロトプラストの水和、コルテックスの溶解など様々な反応が緻密に設計されたプログラムに従って遅滞なく連続、あるいは平行して進行する<sup>23,30,54</sup>。そして、この間に、熱や化学薬品に対する抵抗性の低下、DPAの放出や芽胞けん濁液のODの低下といった現象を生じる<sup>19</sup>。発芽に関する研究は専ら発芽に付随して生じる様々な事象を観察、測定することによりなされるが、上記の各事象はよくその対象にされている。芽胞に対する物理的または化学的因子の作用により発芽機構に生じた変化は各事象発現のキネティクスに影響を及ぼす<sup>29,73,78,89</sup>、すなわち、発芽機構の性格はこれらの事象発現のキネティクスに反映されると考えられる。

発芽は芽胞に対する発芽始動物質の作用により惹起されるが、発芽開始のメカニズムについては、一部の発芽始動物質の化学構造とその活性の関係に関する研究等の例外を除き<sup>34,36,77,87</sup>、ほとんど解明されていないのが実情である。

発芽に伴い、芽胞表層の構造<sup>39,50</sup>、あるいは、芽胞表面の荷電状態が変化する<sup>75</sup>という事実が明らかにされているが、このような事実は、発芽と芽胞表層構造の存在状態の間に密接な関係があることを示唆している。また



がって、芽胞表層を化学的に修飾し、その存在状態を変化させれば、発芽に何らかの影響を与えることが予測される。

このような観点に立って、芽胞を準致死温度で加熱したり<sup>24</sup>、アルカリ処理<sup>21</sup>、あるいは種々の抽出方法で処理する<sup>27</sup>といった、芽胞を不可逆的に変性させる過酷な条件を採用した研究が従来から行われている。しかし、これらの方法によっては芽胞表層構造のみならず、その他の構造にも影響が及ぶことが予想され、その研究結果はかならずしも発芽開始機構と直結したものとは考え難い欠点がある。すなわち、発芽能にあらわれる変化が、発芽機構の変化によるものか、その他の部位が変化したことによる波及効果によるものであるかを区別することは困難である。したがって、芽胞表層部のみ変化を与え、その変化と発芽能の変化との相関性を求める方法を追求する必要がある。

芽胞外層は、タンパク質に富むスボアコートにより構成されており、この化学的、物理的構造に変化を与える物質を選択すれば、その結果生じた変化を中心に、発芽機構を検討することができる。

この目的に合致するためには、作用させる化合物は、その作用が容易に制御できること、化学的性質が明らかであり、しかも、その反応機作が類推可能であるという特徴を備えたものでなければならぬ。

トリクロル酢酸（以下TCAと略す）は、これらの条件を満足する化合物といえ<sup>47, 55, 70</sup>、さらに、多種多様な構造類似体が得られる利点がある。

TCAはその化学構造に起因する特異な化学的性質を有する。すなわち、大きい解離度をもち、解離して酸アニオンとプロトンを生じる。さらに酸アニオンは親油性であり、第4級アンモニウム塩とイオンペアを形成する性質<sup>31, 46, 48</sup>がある。

生物学的観点からみると、TCAは強力な殺菌効果を有し、かつて殺菌剤として治療に用いられたこともある強酸であり、細菌および下等生物に対して細胞質毒として作用し、濃厚溶液ではこれを破壊するとされている<sup>49</sup>。また、TCAは尙れた生体成分抽出試薬として知られ、その濃度や作用温度を適当に設定することにより、種々の生体成分の抽出が可能である<sup>70</sup>。例えば、アミノ酸、代謝中間体やコエンザイムなど低分子物質、無機ポリリン酸、核酸、グラム陽性細菌細胞壁のタイコ酸、タイクロン酸、およびグラム陰性細菌の somatic antigen など多糖類の抽出に使用される。芽胞破砕物からヘキソサミンが抽出されたという報告もある<sup>83</sup>。

このようなTCAの化学的、生物学的特徴を考慮し、TCAを作用させた芽胞の性格を明らかにすることにより、発芽始動機構の解明への手掛りを得ることを企図した。

## 第1章 TCAの作用による芽胞の生理学的性質の変化

### 第1節 芽胞の発芽に対するTCAの影響

芽胞を適当な条件下で化学物質で処理した場合、芽胞の特徴的性状にあらわれる変化は、芽胞に生じた構造上の変化や生化学的变化を反映したものと考えられる。

TCAは強酸(pKa, 1.0以下)であり、一般に、芽胞は酸、アルカリに対して栄養細胞よりも強い抵抗力をもつが、*Bacillus cereus* T 芽胞のTCAに対する抵抗力およびTCAの作用の結果生じる生理学的変化は明らかでない。

ここでは、本菌芽胞のTCAに対する抵抗力およびTCAの作用の結果生じる生理学的性質の変化について検討した。

### I. 実験材料および実験方法

#### (1) 供試菌ならびに芽胞形成法

本研究は、米国、ロヨウ大学(シカゴ)教授、橋本忠世博士から分与された *B. cereus* T を供試菌として行った。

芽胞形成は以下に述べる方法<sup>72</sup>に従って行った。すなわち、本菌を斜面普通寒天培地で15時間培養したのち、その2白金耳を芽胞形成培地 200 ml にけん濁し、150 rpm で4.5時間振とう培養した。この培養液を新鮮な芽胞形成培地 200 ml に植え継ぎ、2.5時間振とう培養したのち、さらに1.5 L の新鮮な芽胞形成培地に植え継ぎ、同様に培養した。最後に、全量を15 L の新鮮な芽胞形成培地に注ぎ込み、芽胞形成が完了するまで培養した。培養は30 L のジャーファーマンター(マルビシ製, MRJ-30)を使用し、培地1 L につき滅菌空気を1 L/min で通気しながら、攪拌翼回転数を400 rpm に設定して行った。培養はすべて30°Cで行った。

芽胞形成培地の組成は、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  30 mM, Glucose 20 mM,  $\text{MgSO}_4$  6.3 mM,  $\text{CuSO}_4$  0.04 mM,  $\text{ZnSO}_4$  0.08 mM,  $\text{FeSO}_4$  0.006 mM,  $\text{CaCl}_2$  0.9 mM,  $\text{MnCl}_2$  0.7 mM,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  5.7 mM に Yeast extract (Difco) 2 g/L である。

普通、約25時間で芽胞形成は完了し、均一な芽胞が得られた。芽胞は遠心分離により集菌し、氷冷した脱イオン水で5~8回洗浄したのち、凍結乾燥して減圧デシケーター中5°Cで保存した。

発芽その他の実験に際し、50mgの芽胞を脱イオン水10mlにけん濁し、一夜4°Cにて放置したのち適当量に分配、凍結した。凍結した芽胞けん濁液は一週間以内に使用した。

## (2) TCA 処理

芽胞を  $6.1-300\text{ mM}$  の TCA 水溶液に  $2\text{ mg spores}/3\text{ ml TCA}$  となるようにけん濁し、とくにことわりがないかぎり、 $40^\circ\text{C}$  で 30 分間保温したのち、氷冷し遠心分離により集菌、氷冷した NaPB ( $0.1\text{ M}$ ,  $\text{pH } 8.0$ ) を用いて 1 回洗淨した。芽胞の集菌に際し、処理液が  $10\text{ ml}$  以上の場合は久保田冷凍遠心機、model KR 180-B を使用、 $10,000 \times g$ , 5 分、 $10\text{ ml}$  以下の場合は Eppendorf Microfuge, model 3,200 を用いて  $15,000\text{ rpm}$ , 2 分遠心した。TCA 処理芽胞は NaPB にけん濁し、Coleman Junior II spectrophotometer, model 6/20 を用いて  $520\text{ nm}$  における OD が  $0.4$  になるように調整し、以下の実験に供した。

## (3) 生存率の測定

芽胞けん濁液を Eppendorf Microfuge を用いて遠心し、沈渣を滅菌生理食塩水にけん濁、OD が  $0.25$  になるように調整したのち、10 倍希釈法により、適当な濃度の希釈液を調製し、その  $0.1\text{ ml}$  を普通寒天 (BBL) 平板に植えた。 $30^\circ\text{C}$  で 24 時間培養して形成されたコロニーを計測した。TCA 処理芽胞の生存率は未処理芽胞が示す値を  $100\%$  としてその相対値で表した。

## (4) 発芽率の測定

発芽は OD の低下を測定することにより判定し、耐熱性 ( $65^\circ\text{C}$ , 15 分) の低下、光屈折性の消失、染色性の獲得および DPA の排出と測定することにより確認した。

OD  $0.4$  に調整した芽胞けん濁液  $2.5\text{ ml}$  に発芽培地を等量加えてよく混合したのち、 $30^\circ\text{C}$  で培養した。使用した発芽培地は、ALA と INO (各  $0.05$  または  $0.5\text{ mM}$ ) を含む NaPB ( $0.1\text{ M}$ ,  $\text{pH } 8.0$ )、および Chloramphenicol (P-L Biochemicals)  $100\text{ }\mu\text{g/ml}$  を含む普通ブイヨン (BBL) である。

OD の低下は  $520\text{ nm}$  において経時的に測定し、結果は  $\text{OD}_t/\text{OD}_i$  または 2 時間後の OD 低下率 (Eq. 1) で表した。ここで、 $\text{OD}_i$  は測定開始前の芽胞けん濁液

$$\text{OD 低下率} = 1 - (\text{OD}_{2\text{hr}}/\text{OD}_i) \quad (\text{Eq. 1})$$

の OD,  $\text{OD}_t$  は  $t$  分後、 $\text{OD}_{2\text{hr}}$  は 2 時間培養後の OD を示す。

## (5) 光屈折性および染色性の観察

光屈折性は位相差顕微鏡下に直接芽胞を観察、染色性は芽胞をメチレンブルーで染色したのち光学顕微鏡下に観察し、芽胞数 100 についての割合で表した。

## (6) 耐熱性の測定

滅菌生理食塩水 9 ml を 65°C に予め加熱しておき、これに発芽実験中の培養液から経時的に分取した試料 1 ml を添加、すばやく混合し、65°C で 15 分間保温した。氷冷後、生存率測定について述べた方法に従い生残菌数を求めた。結果は非加熱試料が示す値を 100% としてその相対値で表した。

## (7) DPA の定量

予想される DPA 量に応じて二つの方法、すなわち、10 µg/ml 以上の DPA が予想される場合は Janssen らの方法<sup>33</sup>に従い比色定量した（方法 A）。10 µg/ml 以下と予想される場合は Union High Sensitivity Split-beam spectrophotometer, model SM-401 を使用、270 nm における UV 吸収（石英セル、光路長 1 cm）を測定し、標準品を用いて作製した検量線から DPA 量を求めた（方法 B）。

TCA 処理した芽胞に残存する DPA は、芽胞 1 mg に TCA を作用させたのちメンブランフィルター（東洋濾紙株式会社、TM-2、0.45 µm）を用いて吸引口過することにより、芽胞の分離、氷冷した脱イオン水による洗浄を行い、この操作を 5 回繰り返して、芽胞を吸着したフィルター 5 枚を合わせて脱イオン水 10 ml に浸漬、121°C、20 分オートクレーブ処理したのち、上清中に含まれる DPA を主として方法 A により定量することにより検討した。

発芽に伴い、芽胞は DPA を放出するが、この現象を測定する場合は次に述べる方法に従った。すなわち、培養液 5 ml（芽胞 0.5 mg を含む）を随時分取し、氷冷したのち、メンブランフィルターを用いて吸引口過、氷冷した脱イオン水 10 ml で洗浄後、このフィルターを脱イオン水 5 ml に浸漬し、121°C、20 分間オートクレーブ処理を行い、上清中に含まれる DPA を方法 B により定量した。

## II. 実 験 成 績

TCA を作用させた芽胞（TCA 処理芽胞）と未処理芽胞について、生存率、発芽率<sup>\*\*</sup>、光屈折性、梁色性および DPA 量を比較した結果を Table 1 に記した。

芽胞の特徴である光屈折性や難梁色性の消失、DPA の溶出現象は、生存率が激減する 150 mM 以上の濃度の TCA を芽胞に作用させた場合に現れた。生存率の低下は 61.2 mM の作用で認められた。しかし、低下の程度は約 36% で、依然、大部分（64%）の芽胞は生存（コロニー形成能を保持）していた。これに対して、発芽に対する影響は顕著であり、発芽率は僅か 10% を示したにすぎなかった。発芽能に対する TCA の作用の影響は発芽培地の種類や発芽始動物質の濃度に拘らず同じ傾向を示した（Fig. 1）。

\* 0-15 µg DPA (Sigma)/ml

\*\* 培養 2 時間後の OD 低下率

Table 1. Properties of *B. cereus* T spores treated with TCA at various concentrations!

Concn.of TCA	Viability	Refractility	Stainability	Germinability	DPA excreted
0 mM	100.0 %	+	-	100.0 %	0 %
15.3	95.0	+	-	100.0	0
30.6	92.3	+	-	42.9	0
45.9	92.6	+	-	16.5	0
61.2	63.6	+	-	10.0	4.8
150.0	4.0	± <sup>2</sup>	± <sup>3</sup>	-	85.3
300.0	-	-	+	-	89.0

1. Treatment of spores with TCA was performed at 40 C for 30 min.
2. +, 55.2 %; -, 44.8 %.
3. +, 52.7 %; -, 47.3 %.

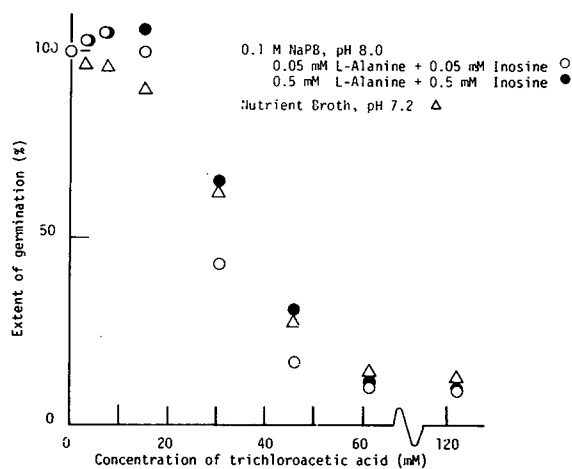


Fig. 1. Effect of treatment of *B. cereus* T spores with TCA on germination. Spores were treated with TCA at the indicated concentrations at 40 C for 30 min. Then, germination of treated and control spores was estimated by incubation at 30 C for 2 hr in the following germination media: ○, 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 8.0, containing 0.05 mM L-alanine and 0.05 mM inosine; ●, buffer containing both compounds at 0.5 mM; Δ, nutrient broth containing 100 μg/ml of chloramphenicol.

芽胞がコロニーを形成するためには、発芽、増殖という過程を必ず経る

ければならない。本菌芽胞は61.2 mMのTCAの作用を受けたのにもかかわらず大部分の芽胞がコロニーを形成する能力を維持していた。この事実は大部分の芽胞が発芽したことを意味する。生存率と発芽率に関する実験結果は一見矛盾しているように思えるが、それについては次のように考えられる。本実験の発芽率測定は発芽始動後2時間の発芽に伴うODの低下を測定することにより求められたものであり、一方、生存率の測定は24時間培養後のコロニー形成値で測定されたものである。すなわち、両測定値の間には培養時間で大きな開きが存在する。生存率の結果に関連して、未処理芽胞とTCA処理芽胞の平板培養(24時間後, Fig. 2)は興味ある事実を示した。すなわち、61.2 mM TCA処理芽胞が形成したコロニーは、未処理芽胞や他の低濃度のTCA処理芽胞が形成したコロニーと比較すると、やや小さく、大きさも不揃いであった。この事実は発芽率の低下が発芽遅延によるものであることを示唆している。

さらに、発芽現象とOD低下現象が同時進行しない場合にも両測定値間に差がでると考えられるので、芽胞のTCA処理による発芽率の低下が発芽遅延によるものであることを確認するため、発芽に伴って生じる事象のうち代表的な事象であるODの低下、耐熱性の消失、ならびにDPAの排出につ

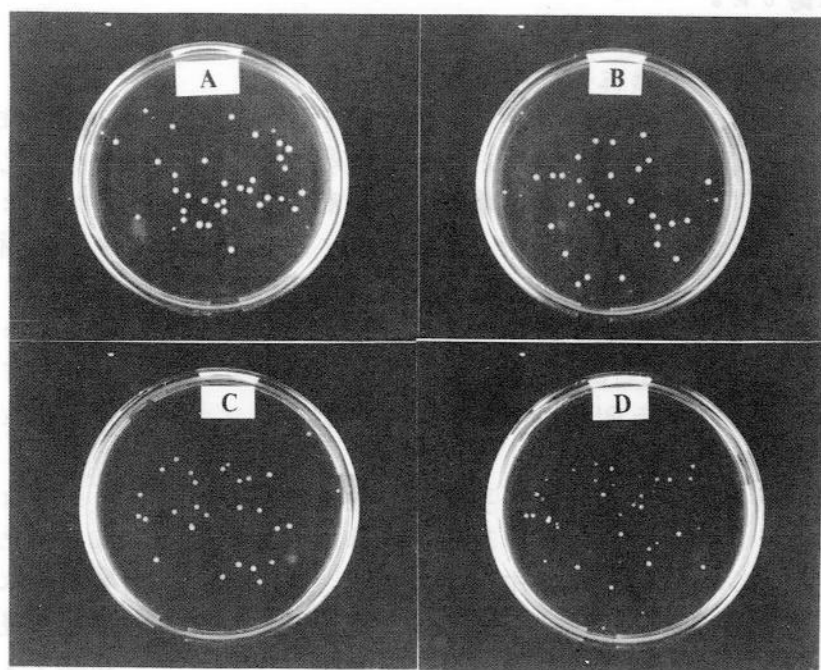


Fig. 2. Effect of treatment of *B. cereus* T spores with TCA on colony development on nutrient agar. Control spores (A) and spores treated with TCA at 6.1 (B), 30.6 (C), and 61.2 mM (D) at 40 C for 30 min were incubated on nutrient agar at 30 C for 24 hr.

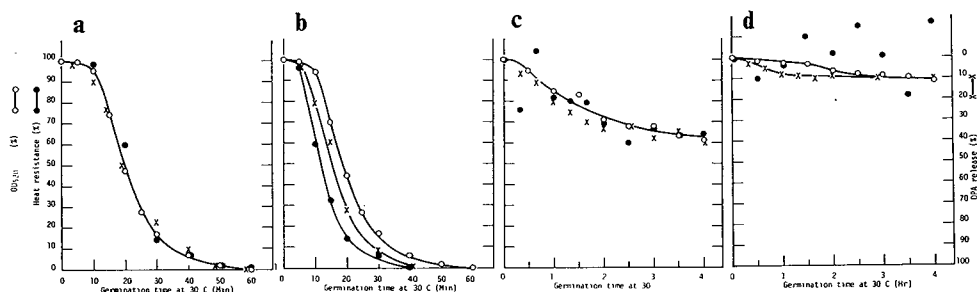


Fig. 3. Germination profiles of TCA-treated and control spores of *B. cereus* T.  
(a) Control spores; (b) Spores treated with TCA at 6.1 mM; (c) 30.6 mM; (d) 61.2 mM.

いて、その時間変化を検討した (Fig. 3)。結果は、未処理芽胞、TCA処理芽胞いずれも各事象発現は平行しており、OD低下のみが阻害されるという事実は見出されなかった。また、各事象の発現はTCA濃度が増すにつれて抑制される傾向が認められ、発芽率の低下が発芽遅延によるものであることを確認した。

## 第2節 芽胞の抵抗性に対するTCAの影響

芽胞に酸やアルカリ、あるいは還元剤を作用させると、耐熱性、発芽始動物質に対する反応性や酵素に対する感受性において顕著な変化が見出される<sup>1,5,18,37,57,59</sup>。例えば、酸性環境下で芽胞表在性の陽イオン（とくにカルシウムイオン）は水素イオンと置換する（以下、水素イオン負荷芽胞をH芽胞と称し、これに対してもとの芽胞をCa芽胞と仮称する）。H芽胞はCa芽胞に比して、発芽能や耐熱性の点で劣っていることが明らかにされている<sup>1,44,57</sup>。また、*B. cereus*など、ある種の芽胞はリゾチームに対する感受性を示さないが、還元剤で処理することによりリゾチーム感受性を示すようになる<sup>18,59</sup>。

TCAの作用による*B. cereus* T芽胞の一般的性状の変化についてはすでに検討した。その結果、大部分の芽胞が生存しており光屈折性や染色性に顕著な変化を生じない低濃度の作用条件下で、発芽能には顕著な変化が認められることを明らかにした。本節では、発芽能に対する影響の程度が異なる三種のTCA処理芽胞（6.1, 30.6, および61.2 mM; 40°C, 30分）を用いて、熱、および化学薬品や細胞壁溶解酵素やタンパク分解酵素に対する抵抗性を比較した。

## I. 実験材料および実験方法

### (1) 供試菌ならびに芽胞形成法

第1章第1節に同じ

### (2) TCA処理

第1章第1節に同じ

### (3) 耐熱性の測定

乾燥重量にして1 mgの芽胞を脱イオン水10 mlにけん濁し、本文中に示した温度で15分間または90°Cで5-60分加熱したのち、生存率測定について述べた方法に従い生残菌数を求めた。

### (4) 化学薬品に対する抵抗性の測定

乾燥重量にして1 mgの芽胞を水酸化ナトリウム(1または2 N)、塩酸(0.27 N)10 mlにけん濁し、30°Cで2時間保温した。Eppendorf Microfugeを用いて遠心分離し上清を捨て沈渣を滅菌生理食塩水にけん濁し生残菌数を求めた。

### (5) 酵素に対する感受性の測定

芽胞1 mgを、リゾチーム、アロテアーゼまたはトリプシン(すべてP-L Biochemicals)を各200 µg/ml含むNaPB(0.1 M, pH 8.0)10 mlにけん濁し、30°Cで2時間保温し、この間のODの変化を520 nmにおいて測定した。結果は生残菌数を測定することにより確認した。

## II. 実験成績

### (1) 熱抵抗性

Fig. 4は80-100°C, 15分加熱後の生菌数減少の割合を示したものである。本菌芽胞は90°C, 15分の加熱に抵抗性であったが、TCA処理芽胞はより低い温度で生菌数の減少を生じ、TCAの作用によって80°C以上の高温に対する抵抗性機構に影響を受けていることが判明した。90°Cでの加熱による生菌数減少の程度はTCAの濃度に依存していた。各芽胞のD<sub>90</sub>値をTable 2に示した。この結果はTCAの作用により耐熱性が低下したことを示している。

### (2) 化学薬品に対する抵抗性

芽胞は化学薬品に対し強い抵抗性を示す。実際、本菌芽胞は塩酸(0.27



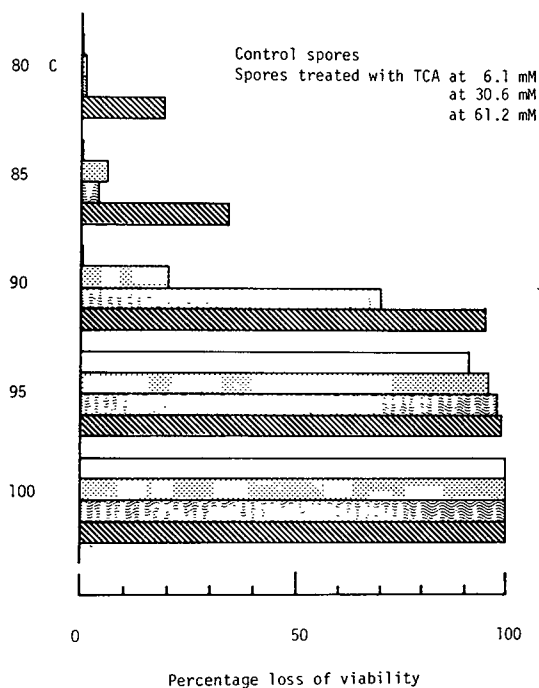


Fig. 4. Effect of treatment of spores of *B. cereus* T with TCA on their heat-sensitivity. Heating was carried out for 15 min at the indicated temperatures.

Table 2. Heat resistance of *B. cereus* T spores treated with TCA at various concentrations<sup>1</sup>

Concn. of TCA		D <sub>90</sub> (Min)
0	mM	540
6.1		150
30.6		28.3
61.2		11.5

1. Treatment of spores with TCA was performed at 40 C for 30 min.

N) や水酸化ナトリウム (1 N) 各水溶液中, 30 C, 2 時間の処理に耐えることができた。6.1 mM TCA 処理芽胞は未処理芽胞と同じ抵抗性を示した。30.6 mM TCA 処理芽胞は 1 N 水酸化ナトリウムに, 61.2 mM TCA 処理芽胞では

さらに 0.27 N 塩酸に対する抵抗性を失った (Table 3)。

Table 3. Effect of chemical agents on TCA-treated and control spores of *B. cereus* T<sup>1</sup>

Chemical		Control spores	Spores treated with TCA <sup>2</sup> at		
			6.1 mM	30.6 mM	61.2 mM
NaOH	1 N	- <sup>3</sup>	-	+ <sup>4</sup>	+
	2 N	+	+	+	+
HCl	0.27 N	-	-	-	+

1. Treated and control spores (1 mg) were suspended in 10 ml of aqueous sodium hydroxide or hydrochloric acid. The suspensions were incubated at 30 C for 2 hr, and then centrifuged. The precipitate was resuspended in deionized water and their viability was measured.

2. Treatment of spores with TCA was performed at 40 C for 30 min.

3. Insensitive.

4. Sensitive. The colony count after treatment with the chemical was less than one tenth of those of the corresponding TCA-treated and control spores before treatment.

### (3) 酵素に対する抵抗性

本菌芽胞はリゾチーム、トリプシン、プロテアーゼに対し感受性を示さない。しかし、SDS-DTTで処理した本菌芽胞はリゾチーム感受性を示す (Table 4)。リゾチームの基質となる芽胞構成成分がスポアコート内層のコルテックスペプチドグリカン<sup>23</sup>であることを考慮すると、この変化はスポ

Table 4. Effect of lysozyme, trypsin, and protease on TCA-treated, SDS-DTT-treated and control spores of *B. cereus* T<sup>1</sup>

Spores	Lysozyme	Trypsin	Protease
Control spores	-	-	-
TCA-treated spores <sup>2</sup>	-	-	-
SDS-DTT-treated spores <sup>3</sup>	+	-	-

1. Treated and control spores (1 mg) were suspended in 10 ml of 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 8.0) containing 200 µg/ml of the indicated enzyme, and incubated at 30 C for 2 hr.

Enzyme sensitivity was tested by measuring the decrease in OD of the suspension at 520 nm and the loss of viability after heating at 65 C for 15 min. +, Sensitive; -, Insensitive.

2. Treatment of spores with TCA was performed at 61.2 mM at 40 C for 30 min.

3. Spores were treated with 0.5 % SDS-10 mM DTT in 0.1 M NaCl at 37 C for 2 hr.

\* 後述 (第5章第2節)

アコートの透過性の変化を示唆していると思われる。したがって、未処理芽胞と同様、TCA処理芽胞がいずれもこの消化酵素に対して感受性を示さなかったという結果は、少なくともこの酵素の透過を許すほどにはスポアコートが変化しなかったことを意味している。また、トリアシンやプロテアーゼに対しては感受性は認められなかった (Table 4)。

### 第3節 芽胞のDPA保持能力に対するTCAの影響<sup>P</sup>

芽胞の乾燥重量にして5-15%も存在するDPAの生物学的存在意義は未だ明らかでない<sup>11,42</sup>。過去において、耐熱性と関連して議論されてきたが、DPA-deficientあるいはDPA-less mutant 芽胞が耐熱性であった<sup>21,46,91</sup>ことから、今日、DPAは耐熱性とは直接の関係がないというのが定説のようである。むしろDPAは芽胞の休眠性と深く関係しているとする説がある<sup>17</sup>。

発芽に先立ち、芽胞はしばしば活性化を必要とする。活性化には加熱活性化がよく用いられるが、加熱活性化の過程でDPAの溶出が生じる<sup>22</sup>。溶出の程度は加熱時間に比例しており、活性化の程度と相関している。著者はこの事実を確認するとともに、さらに耐熱性が低下したグリシン芽胞<sup>\*</sup>では活性化の最適温度が約5℃低下し、DPAの溶出が促進されるという事実を認めた<sup>71</sup>。こうした事実は芽胞の休眠を維持する機構とDPAを保持する能力との間に何らかの関係が存在することを示唆している。TCAの作用により芽胞の発芽は著しく遅延したが、この発芽遅延がTCAの作用により芽胞を超休眠状態にすることにより生じるものであれば、DPAを保持する能力にも変化が生じる可能性がある。例えば、グルタルアルデヒドで処理した芽胞が100℃での加熱によるDPAの溶出において未処理芽胞よりも強く抵抗するという例<sup>74</sup>がある。そこで、本節では、まず、活性化状態が異なると考えられる年齢の異なる芽胞のDPA保持能力について検討し、芽胞の休眠を維持する機構とDPA保持能力との相関が、この場合にも認められるか否かを明らかにしたのち、TCA処理芽胞のDPA保持能力を比較検討した。

## I. 実験材料および実験方法

### (1) 供試菌ならびに芽胞形成法

第1章第1節に同じ

### (2) TCA処理

第1章第1節に同じ

---

\* 高濃度グリシン含有培地で芽胞形成した芽胞<sup>51,61</sup>

### (3) DPAの定量

芽胞1mgを脱イオン水10mlにけん濁し、80-100℃で15分間熱処理したのち遠心して上清を分離し、上清中に抽出されたDPAを方法B\*に従って定量した。なお、本実験で使用した芽胞、710705、721105および731110は、それぞれ、1971年7月5日、1972年11月5日および1973年11月10日に調製した芽胞を意味し、凍結乾燥したのち、-15℃でデシケーター中に保存していたものである\*\*。熱処理は30分間行った。

## II. 実 験 成 績

### (1) 年齢の異なる芽胞のDPA保持能力の比較

芽胞の老化は芽胞を活性化することが知られている。Fig. 5は年齢の異なる芽胞についてDPA保持能力を比較したものである。老化が進むにつれて、より低温でDPAの溶出が生じるようになり、DPA保持能力の低下が明らかである。

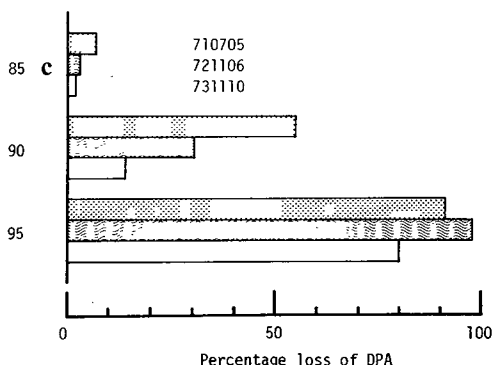


Fig. 5. Loss of DPA from spores of *B. cereus* T by heating. Spores were stored in a desiccator at -15°C for 12 (731110), 24 (721106), or 40 months (710705). Heating was carried out for 30 min at the indicated temperatures.

### (2) TCA処理芽胞のDPA保持能力

Fig. 6は80-100℃で15分加熱によるDPA溶出を示したものである。芽胞の処理に用いたTCA濃度の増加に伴いDPA溶出量の増加が認められた。この傾向は90ないし95℃で加熱した場合に顕著であった。100℃で加熱した場合、すべての芽胞から65~75%のDPAが溶出し、TCA濃度と溶出量とは相関しなかった。

\* 既述（第1章第1節）

\*\* 保存期間は、731110、721105、および710705、それぞれ、12、24、および40ヶ月である。

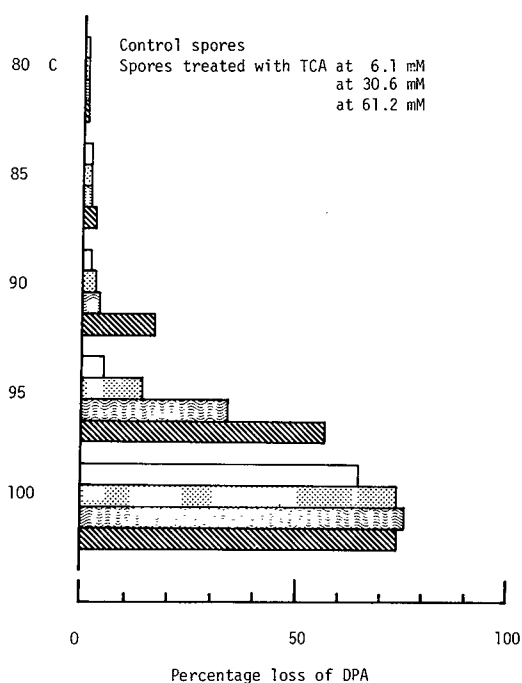


Fig. 6. Loss of DPA from TCA-treated and control spores of *B. cereus* T by heating. Heating was carried out for 15 min at the indicated temperatures.

#### 第4節 考察ならびに小结

##### [I] 考 察

芽胞に対するTCAの作用(40°C, 30分)は、高濃度では殺菌的であり、光屈折性の消失、難染色性から易染色性への変化およびDPAの溶出を生じ生存率が低下した。低濃度では発芽能に強い影響が現れた。すなわち、生存率には影響が認められない30.6mM TCAの作用で発芽率は46%に低下した。生存率ははじめの生菌数に対する処理後の生菌数の割合を示したものであり、コロニー形成芽胞数、すなわち、発芽芽胞数を示している。したがって、上記の結果は矛盾した印象を与えるが、ここで示した発芽率は途中経過にすぎないことを考慮するとこの結果はよく理解できる。事実、平板寒天上に形成されたコロニーの状態(Fig. 2)や、発芽現象の時間変化曲線(Fig. 3)は、TCAの作用の結果、発芽が遅延することを示している。

準致死温度や殺菌消毒剤の作用をうける芽胞が、生命は維持しているが発芽能を欠損したり機能低下を生じるという報告がある<sup>10, 12, 27, 28, 60, 81</sup>。例えば、*Clostridium perfringens* type A芽胞は、加熱やアルカリ処理により発芽能を不可逆的に失い、普通寒天平板上にコロニーを形成することができないが、

\* 発芽率測定のための培養時間は2時間、これに対して生存率測定のためのそれは24時間である。

リゾチームや培養上清を添加した普通寒天培地ではコロニーを形成する<sup>10,12</sup>。また、発芽能を欠損することはないが栄養要求が厳しくなるという例も報告されている<sup>60,61</sup>。

TCAの作用による本菌芽胞の発芽率の低下は発芽培地の種類や発芽始動物質の濃度を変えても回復せず (Fig. 1), 栄養要求の変化は認められなかった。しかし, TCAが作用した結果, 発芽能に変化が生じたことは明白であり, 劣悪な環境におかれた芽胞は生命を失うよりもさきに発芽能に影響をうけるということは, 芽胞構造内における発芽機構の存在部位について重要な示唆を与えているように思われる。

発芽能に限らず, 熱や化学薬品に対する抵抗性もまた芽胞に対する物理的, 化学的刺激により変化する。酸性の環境では芽胞表在性の陽イオンが水素イオンと置換し, この変化が発芽能や耐熱性に影響する<sup>1,59</sup>。TCA水溶液は強酸性であり, 芽胞をTCA水溶液にけん濁することは芽胞を酸性の環境におくことになり, TCA処理芽胞は発芽能だけでなく耐熱性もまた変化していることが予想された。実際, TCA処理により耐熱性が低下し (Fig. 4, Table 2), これは, H芽胞について述べられた事実と符合する。さらに, 未処理芽胞とTCA処理芽胞のカルシウム含量を比較した結果, TCA処理によるカルシウム含量の減少が明らかになった (第3章)。しかし, ALAとINOによる発芽に対する反応において, TCA処理芽胞はH芽胞と著しく異なる挙動を示した。すなわち, TCA処理芽胞は強電解質存在下でも発芽が抑制された (H芽胞はすみやかに発芽する)。また, 強電解質不在条件下でのH芽胞の発芽能の欠除はカルシウム塩の添加により回復するが<sup>57,59</sup>, TCA処理芽胞の低下した発芽能はカルシウム塩を添加しても回復しなかった (第4章第1節)。したがって, カルシウムレベルの低下が耐熱性低下の一因である可能性は否定できないが, TCA処理芽胞はH芽胞とは異なると考えられる。

芽胞に対する還元剤の作用はリゾチーム非感受性の芽胞を感受性に変える。本菌芽胞はリゾチーム非感受性であるが, DTEやSDS-DTTで処理することにより, リゾチーム感受性に変化する<sup>18</sup>。本来リゾチーム耐性である本菌芽胞が還元剤の作用によりリゾチーム感受性に変化する機構は次のように説明されている。リゾチームの基質となるのはコルテックスの構成成分であるコルテックスペプチドグリカンである<sup>83</sup>。コルテックス層はスポアコートの内層構造であり, スポアコートのいわゆる permeability barrier により保護されている。すなわち, スポアコートの不透過性が原因して酵素分子は基質存在部位に達することができない。還元剤はスポアコート構成タンパク質のジスルフィド結合を開裂し, 変性させることにより, 不透過性の原因である permeability barrier を破壊し, それを為し遂げると考えられて

いる<sup>37</sup>。その結果、酵素分子はコルテックス層へ侵入することが可能になり、基質との反応が可能となる。

TCA の作用により、本菌芽胞は化学薬品に対する抵抗性が低下したが (Table 3)、この結果は permeability barrier の変化を示唆している。しかし、リゾチームに対しては依然非感受性を示し (Table 4)、TCA の作用による barrier の変化は低分子化合物に対する透過性を増大させたが、リゾチームのような巨大分子の透過性に影響を及ぼすまでには至っていない。

Fig. 6 に示した結果は、TCA の作用により、芽胞は外因性物質の透過性に変化が生じただけでなく細胞内成分の易漏性もまた亢進したという事実を示している。これは、高濃度の TCA の作用により DPA の溶出が生じたこと (Table 1) から予想された結果であるが、芽胞の DPA 保持能力と活性化との関係という面から検討すると極めて興味深い。

芽胞の加熱活性化の過程で DPA の溶出が生じることは周知の事実である<sup>22, 71</sup>。溶出の程度は加熱時間に比例しており、活性化の程度と相関する。事実、活性化の最適温度が低下した芽胞では DPA の溶出の促進が認められた<sup>71</sup>。逆にグルタルアルデヒドで処理した芽胞は 100°C での加熱に対して未処理芽胞よりも強い DPA 保持能力を示した<sup>74</sup>。現在 DPA はスボアプロトプラストに存在するとする説<sup>15, 40, 63</sup>が有力であり、この説に従えば、DPA を保持する能力はプロトプラストやそれを取り巻く外殻構造の状態と密接に関係するものといえる。すなわち、保持能力の低下はこのような構造の変化を意味すると推察され、この変化がさらに活性化につながるのであろう。

TCA の作用により DPA の保持能力が低下したという事実は、TCA の作用により芽胞が活性化されたことを意味するものかもしれない。しかし、活性化とは逆に、発芽遅延という脱活性化を示唆する現象が生じており、発芽機構の複雑さを示している。

## (II) 小 括

1. 本実験条件 (40°C, 30 分) において、TCA の作用は高濃度 (150 mM 以上) では殺菌的であったが、低濃度 (61.2 mM 以下) では致命的でなく、発芽機構に対する影響が顕著であり、一定の生理的条件による発芽を遅延させた。
2. 芽胞に対する低濃度の TCA の作用は発芽機構に対してだけでなく抵抗性機構に対してもその影響が現れた。TCA 処理芽胞は熱、化学薬品に対する抵抗性が低下した。しかし、リゾチーム、トリアシン、フロテアーゼに対する抵抗性には変化がなく、依然非感受性であった。
3. TCA の作用はさらに芽胞の DPA 保持能力を減弱させることがわかった。

## 第2章 芽胞の発芽機構に対するTCAの作用

### 第1節 pH, 温度, および接触時間の影響

細菌の増殖, 生存, またその菌が保有する代謝系のあるプロセスの各最適pHや, その菌が耐え得るpH域はそれぞれ異なることがある。また, 細菌に対する熱の効果は, 中性やアルカリ性培地中よりも酸性培地中で効果的であり, 熱によって容易に死滅する。このように細菌に対する水素イオンの作用は非常に複雑である。一方, 弱酸である酢酸や安息香酸と強酸である塩酸の毒性を弱酸性の環境で比較すると, 前者は毒性があるが後者は比較的毒性が低い。これは細菌の膜構造における酸の非解離分子とそれに対応するイオンの透過性の差によるものと考えられている<sup>68,85</sup>。

芽胞に対する水素イオンの作用についてみると, 極端な酸性の環境で芽胞を加熱することにより, 芽胞の不活性化を生じることがKeynanら<sup>37</sup>, Issaharyら<sup>32</sup>によって報告されている。

TCAの水溶液は強酸性であり, その0.1 M溶液のpHは約1.2 (25°C)である。芽胞をTCA溶液にけん濁するということは, 芽胞を高濃度の水素イオンが存在する環境に置くことであり, 前章で明らかにした発芽遅延現象は, この水素イオンの作用により芽胞に生じた変化によるものであるかもしれない。そこで, 本節では, 発芽遅延現象に対するTCA作用時のpHの影響を明らかにし, 温度および接触時間の影響についても検討した。

### I. 実験材料および実験方法

#### (1) 供試菌ならびに芽胞形成法

第1章第1節に同じ

#### (2) TCA処理

TCAの作用に対するpHの影響を検討するため, 以下に述べるふたつの実験を行った。

- (i) TCA 61.2 mM, 酢酸 60 mM, および塩酸 0.27 N をおのおの1 N 水酸化ナトリウムを用いてpH 1.5-7.0に調整した。この溶液を用いてすでに述べたTCA処理の方法(第1章第1節)に従い, 芽胞を40°Cで30分間処理した。
- (ii) TCAを1 N 水酸化ナトリウムを用いて中和し最終濃度 61.2 mMとなるように調整した。この溶液(TCA-Na) 3 mlに芽胞 2 mgをけん濁し,



30℃で30分間保温したのち、遠心分離により集菌、脱イオン水で1回洗浄後、塩酸(0.27 N) 3 mlに再けん濁し、30℃で30分間保温した。別に、TCA-Naと塩酸の作用順序を入れ替えて同様に芽胞を処理した。

TCAの作用に対する温度の影響について、15-40℃でTCA処理を行うことにより検討した。接触時間の影響については、TCA 30.6および61.2 mMに20, 30または40℃で芽胞に作用させて検討した。

各処理芽胞は、遠心分離により集菌、氷冷したNaPBで1回洗浄後、芽胞けん濁液を調製<sup>\*</sup>した。

### (3) 発芽実験

未処理芽胞ならびに各処理芽胞の発芽実験は、ALA, INO 各0.05 mMを含むNaPB中、30℃で行い、520 nmにおけるODの低下を経時的に測定した。

### (4) 発芽実験により得られたデータの解析

芽胞けん濁液には、発芽始動物質の刺激に対して様々な感受性を示す芽胞が混在しており、これら芽胞の発芽の進行が非同調的であることは多くの研究者により指摘されている<sup>23, 53, 78, 79</sup>。これは、培養時間に対して発芽芽胞の個体数の変化、すなわち、発芽芽胞個体数の時系列変動を意味する。一個の芽胞の発芽ではなく、集団の発芽(とくに速度や程度)に関するデータを取り扱う場合、この事実を無視することは結果の解釈に重大な影響を及ぼす可能性が強い。

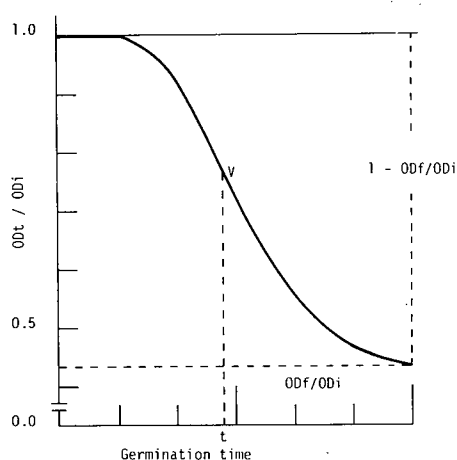


Fig. 7. Diagrammatic representation of germination curve.

本研究において、発芽を観測する目的は発芽の遅延の程度、すなわち、発芽に要する時間を知ることである。発芽の程度を示す指標として「一定時間培養後の発芽率」が用いられるが、これは、前記の要求を十分満足するものではない。また、ひとつの実験系に含まれるすべての芽胞の発芽が終了するために要する時間を計測することは極めて困難であり、計測が可能な場合でも、発芽始動反応に対する感受性が著しく低い一部の芽胞の影響を強く受けることは避け

\* 既述(第1章第1節)

られず、これより前記の要求を満足するものとはいえない。そこで著者は、培養時間に対する発芽芽胞の分布におけるモードを求めて発芽に要する時間の指標、 $t$ 、とした (Fig. 7)。モードはその集団内で最も多くの芽胞が発芽する時間を意味しており、近似的には、発芽芽胞の約50%がこの時間までに発芽する<sup>23</sup>。したがって、前記の要求を完全に満足するものではないが、前二者に比較すればよりよい指標といえよう。

実際には、Eq. 2 に示した OD 変化率を3点公式により数値微分し、得られる値の最大値を示す時間と最小二乗法により求め  $t$  値とした。

$$\text{OD 変化率} = 1 - (\text{OD}_t / \text{OD}_i) \quad (\text{Eq. 2})$$

OD<sub>i</sub> : 測定開始前の芽胞けん濁度の OD

OD<sub>t</sub> : 培養開始  $t$  分後の芽胞けん濁度の OD

## II. 実 験 成 績

発芽遅延現象を生じる TCA の作用に対する pH の影響について、pH 1.5-7.0 に調整した TCA (61.2 mM) を芽胞に作用させて、発芽に対する影響を観察した。対照として、同様に調整した酢酸 (60 mM)、塩酸 (0.27 N) を芽胞に作用させた。結果は、発芽遅延の程度を明確に表現するため、発芽率ではなく、発芽の速さを示す  $t$  値で表した (Fig. 8)。

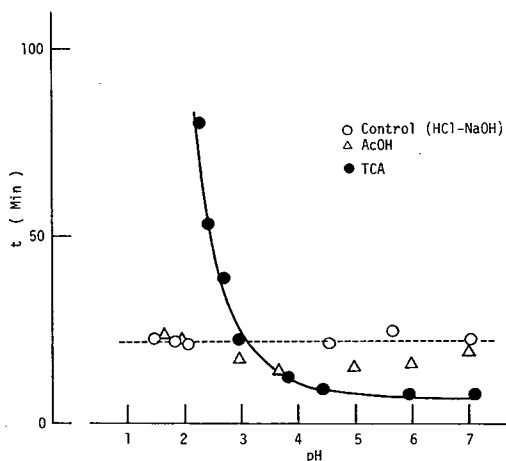


Fig. 8. Effect of the pH of TCA-treatment. Spores were treated with 61.2 mM TCA or 60 mM AcOH at the indicated pH at 40 C for 30 min: o, HCl-NaOH; ●, TCA; Δ, AcOH.

酢酸や塩酸を作用させた芽胞の  $t$  値は試験した全 pH 域にわたり未処理芽胞の  $t$  値より大きい値を示さなかった。一方、TCA を作用させた芽胞では pH 2 以下では  $t > 240$  min を示し、pH 2 から 3 にかけて  $t$  値は急激に低下、pH 3.5 以上では、逆に、未処理芽胞が示す値よりも低い値を示した。この結果は、TCA の作用による発芽遅延が生じるためには、一定濃度以上の水素イオンが必要であることを示している。

次に、中和した 61.2 mM TCA (TCA-Na) と 0.27 N 塩酸を用いて、(A) 芽胞にまず TCA-Na を作用させたのち、塩酸を作用させる、(B) その逆のふたつの場合について、 $t$  値に及ぼす影響を検討した。その結果、実験系 A で処理した芽胞の発芽は極めて緩慢であり  $t$  値を求めることができなかったのに対して、実験系 B では、同時に測定した未処理芽胞や塩酸処理芽胞が示した  $t$  値よりも小さい値を示した (Table 5)。この結果は、TCA の作用が

Table 5. Effect of treatment of spores of *B. cereus* T with TCA-Na and HCl on subsequent germination<sup>1</sup>

Chemical <sup>2</sup>	t-Value <sup>3</sup>
Control	22.7 Min
TCA-Na <sup>4</sup>	18.6
HCl	22.3
A. TCA-Na → HCl	- <sup>5</sup>
B. HCl → TCA-Na	18.1

1. Germination of spores was induced by 0.05 mM L-alanine and 0.05 mM inosine in 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 8.0) at 30 C.
2. Spores were treated with TCA-Na, HCl (0.27 N), TCA-Na followed by treatment with HCl (A), or HCl followed by treatment with TCA-Na (B). Each treatment was carried out at 30 C for 30 min.
3. The value was obtained from curves of the optical density at 520 nm as described in the MATERIALS AND METHODS.
4. TCA-Na (61.2 mM) was prepared by titration of TCA with N NaOH to pH 7.0.
5. Not determined.

TCA アニオンと水素イオンの協同効果によるものであり、最初に TCA アニオンが作用したのち高濃度の水素イオンの作用により発芽能の低下が生じたことを示している。

Fig. 9 は 15-40 C で 30 分間 TCA を作用させた芽胞が示す  $t$  値を TCA 濃度に対してプロットしたものである。 $t$  値は、TCA 濃度が増すにつれて、また同濃度でも作用温度が高くなるにつれて増大した。Fig. 10 は  $t$  値と接触時間との関係を示したものである。適当な条件下では、例えば、30.6 mM, 30 C,あるいは 61.2 mM, 20 C では、 $t$  値の progress curve は接触時間の経過とともに次第に緩慢な上昇曲線を描き、ついには一定の値に達した。しかし、高濃度、高温の条件下では  $t$  値の progress curve は急激に上昇した。30.6 mM TCA の作用について、接触時間に対する  $t$  値のプロットは  $t < 50$  min でよい直線性を示した。この直線の傾きは芽胞と TCA の反応における反応速度を表す。この値 ( $k$  値とする) を用いたアレニウスプロットから活性化エネルギーを求めた結果、 $4.01 \times 10^4$  cal/mole であった (Fig. 11)。

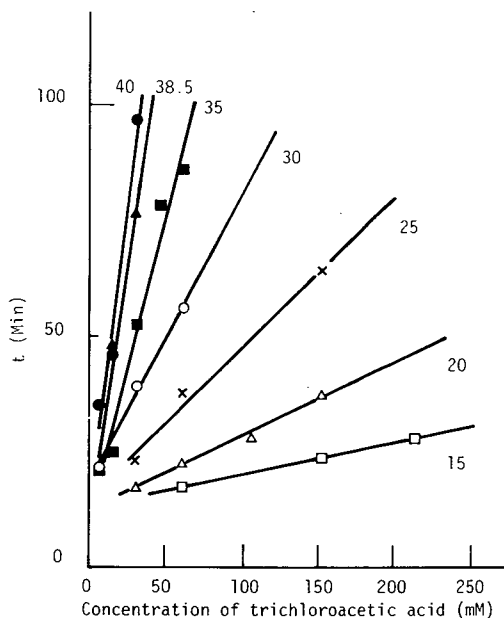


Fig. 9. Effect of the concentration and temperature of TCA-treatment. Spores were treated for 30 min with the indicated concentrations of TCA. Figures indicate the temperature of TCA-treatment.

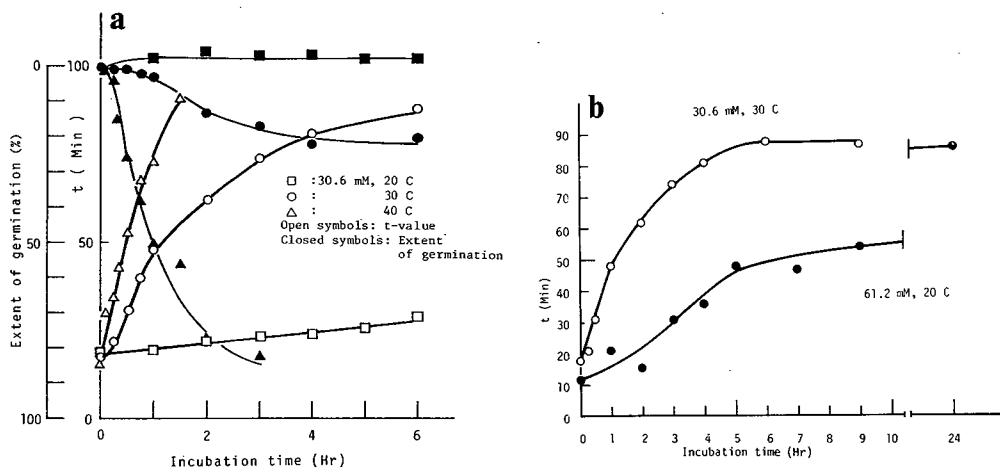


Fig.10. Effect of the period of TCA-treatment.  
 (a) Spores were treated with 30.6 mM TCA at 20, 30, or 40 C for the indicated periods.  
 (b) Spores were treated with 30.6 mM TCA at 30 C (○-○) or with 61.2 mM TCA at 20 C (●-●), for the indicated periods.

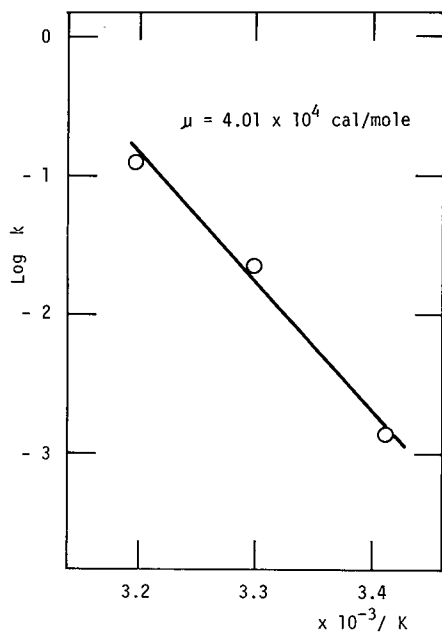


Fig. 11. Effect of temperature on the interaction of TCA on *B. cereus* T spores (Arrhenius plot). The  $k$  values, estimated from Fig. 10a, were used as the rate functions.

## 第2節 TCA構造類似体の作用

本節では、TCA構造類似体を用いて、TCAの作用発現とTCA分子の化学構造上の特徴との関係について検討した。

### I. 実験材料および実験方法

#### (1) 試薬

TCA構造類似体として下記の試薬を用いた。

TFA, TBrA, DCA, DBrA, 2,3-DBrPrA, 2,3-DBrBuA, 酢酸, アロピオン酸,  $n$ -酪酸, ピバリン酸, マロン酸, グリシン,  $\beta$ -アラニンおよび $\gamma$ -アミノ- $n$ -酪酸。

#### (2) TCA構造類似体を用いた芽胞の処理

各構造類似体について、それぞれ、15, 30, 60, 150, および300 mMの溶液を作製し、この溶液を用いて、すでに述べたTCA処理法(第1章第1節)に準じて、40°Cで30分間芽胞を処理した。

#### (3) 発芽実験

第3章第1節に同じ。

#### (4) データの解析

第3章第1節に同じであるが、各TCA構造類似体が芽胞の発芽機構に及ぼす影響の評価は、30mMTCAで処理した芽胞が示す $t$ 値を基準として行った。すなわち、各構造類似体で処理された芽胞が示す $t$ 値が、このTCA処理芽胞が示す $t$ 値とほぼ等しいか、あるいはより大きい値を示した場合、発芽遅延活性があると認めた。300 mMの濃度を作用させた場合においても $t$ 値の増大が認められない場合、その化合物には発芽遅延活性がないと判定した。活性の強さは効果が認められた最小濃度により、30mMおよびそれ以下の場合、+++、60mM、++、150mM、+として表した。

## II. 実 験 成 績

TCAが芽胞に対し発芽遅延を生じさせるように働くpH域において、酢酸や塩酸はそのような活性を示さなかった。したがって、この活性はTCAの構造に基づく特性であると考えられる。TCAは酢酸のアルキル基 $\text{CH}_3$ -の水素原子がすべて塩素原子で置換された化合物である。塩素原子は高い電気陰性度を持ち、そのため、 $\text{CCl}_3$ -基は強い電子吸引性を示す。そこで、電子吸引性の異なる種々のTCA構造類似体の活性を比較した (Table 6)。

Table 6.

Effect of various compounds on germination of  
*B. cereus* T spores<sup>1</sup>

Compound	Formula	Retardation <sup>2</sup>
Trichloroacetic acid	$\text{CCl}_3\text{COOH}$	+++
Trifluoroacetic acid	$\text{CF}_3\text{COOH}$	+++
Tribromoacetic acid	$\text{CBr}_3\text{COOH}$	+++
Dichloroacetic acid	$\text{CHCl}_2\text{COOH}$	+++
Dibromoacetic acid	$\text{CHBr}_2\text{COOH}$	++
2,3-Dibromopropionic acid	$\text{CH}_2\text{BrCHBrCOOH}$	+
2,3-Dibromobutyric acid	$\text{CH}_3\text{CHBrCHBrCOOH}$	+
Acetic acid	$\text{CH}_3\text{COOH}$	-
Propionic acid	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COOH}$	-
n-Butyric acid	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$	-
Pivalic acid	$(\text{CH}_3)_3\text{CCOOH}$	-
Malonic acid	$\text{CH}_2(\text{COOH})_2$	-
Glycine	$\text{NH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$	-
$\beta$ -Alanine	$\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$	-
4-Amino-n-butyric acid	$\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$	-

1. Treatment of spores with the indicated compounds was carried out at 40 C for 30 min.

2. +, ++, +++, Effective. Delayed germination occurred when spores were treated with the indicated compound at 30 (+++), 60 (++) , or 150 mM (+); -, Not effective. Delayed germination was not observed when spores were treated with the indicated compound at 300 mM.

強い電子吸引性基をもつ化合物であるTFA, TBrA, DCA, DBrAはいずれも、TCAと同様、芽胞の発芽を遅延させた。2,3-DBrPrAや2,3-DBrBuAもまた同じ活性をもつか、その活性は前記の化合物より弱く、同程度の活性発現のためには5倍の濃度が必要であった。これに対して、電子吸引性基をもたない化合物である脂肪酸やアミノ酸はまったく活性を示さなかった。

TCAアニオンは親油性でもあるが、上記の結果は、親油性因子のみでは活性発現に何ら寄与しないこともまた示している。

### 第3節 考察ならびに小括

#### (I) 考察

酸の抗菌作用は一般に次のように説明されている。解離度の高い鉍酸や一部の有機酸の抗菌作用は水素イオン濃度に比例し、鉍酸ほど解離しない有機酸の抗菌作用は非解離分子や共役塩基の性質に基づく。また、弱酸性環境下では、強酸である塩酸よりも弱酸である酢酸の毒性が強い。細菌細胞は細胞内pHが外部環境pHの変化に対応することなくほぼ中性を維持する。一方、細胞膜は対応するイオンよりも非解離分子をよく透過させる。すなわち、酢酸の毒性発現は非解離分子が細胞内に侵入し、そこで解離し、生じた水素イオンが細胞内pHを低下させることによるものと考えられている<sup>6,8,9</sup>。

TCAは $pK_a$  1.0以下の、塩酸に匹敵する強酸である。TCAの抗菌作用はTCAから産生される高濃度の水素イオンの作用に帰せられるかもしれない。しかし、芽胞の発芽機構に作用し、発芽遅延を生じるというTCAの生物活性は水素イオンのみの作用では起こり得ず、また、TCAの分子種についても試験したpH域全域において、ほぼ完全に解離していると考えられることから、TCAの生物活性はTCAアニオンと水素イオンとの協同効果によるものであると推察される (Fig. 8)。これは、TCAの作用による *Euglena gracilis* 細胞の変性のメカニズムに関する Brinkmann<sup>4</sup> の見解と一致する。

試験した全pH域において、酢酸 (60mM) はTCA様の生物活性を示さなかった。この事実は、酢酸は解離型、非解離型を問わず活性がないことを意味しており、TCAの作用がTCA分子の化学的特徴に基づくものであることを示している。

TCAは酢酸のメチル基の水素原子が塩素原子で置換された構造をもつ化合物であり、それゆえ、共役塩基の化学的性質は親油性を示すとともに塩素原子の高い電気陰性度のために強い電子吸引性を示す。そのため強力な水素イオン供与体でもある。

このようなTCAアニオンの化学的特徴と活性との関係をより明確にするため、種々の構造類似体を用いて芽胞を処理し発芽に及ぼす影響を検討し

の結果、以下の事実が判明した。すなわち、電子吸引性基をもつ構造類似体はすべて活性を示したが、そうでない構造類似体は不活性であった。活性な構造類似体についてその活性の強さを比較すると、酸性度の大きさ（つまり、電子吸引性の強さ）に対応した序列、TFA, TCA, TBrA, および DCA > DBrA > 2,3-DBrPrA および 2,3-DBrBUA, が認められた (Table 6)。以上の事実は、TCAの活性発現には、電子吸引性基に起因する化学的性質の寄与が極めて大であることを示している。

細胞に対する水素イオンやフェニールの効果は温度によって変化する<sup>60,85</sup>。TCAの活性の強さもまたTCAの濃度や作用温度、接触時間に依存している (Fig. 9, 10)。接触時間に対する依存は高濃度、高温の条件下では明らかでなく、これは反応条件が厳しく、そのため反応が急激に進行するためであると考えられる（このような条件下での反応は発芽能に対する影響のみに留まらないであろう）。緩やかな条件、例えば、30.6 mM (30°C), 61.2 mM (20°C), を選択することにより、接触時間に対する依存が顕著であった (Fig. 10b)。

芽胞に対するTCAの反応の活性化エネルギーは  $4.0 \times 10^4$  cal/moleであった (Fig. 11)。この活性化エネルギー ( $\mu$ ) は高分子化合物の変性について得られる値の範囲内<sup>67,69</sup>にある。芽胞内の高分子物質の変性を意味すると考えられている現象に加熱活性化がある。加熱活性化について報告された  $\mu$  値は  $2.1 \sim 5.6 \times 10^4$  cal/mole であり<sup>8,41</sup>、芽胞とTCAの反応から得られた  $\mu$  値はこの範囲内にある。さらに、TCAの作用による *E. gracilis* の細胞膜の変性について報告された  $\mu$  値<sup>4</sup>ともほぼ一致した。形態的に著しく異なる細胞である芽胞と *E. gracilis* が、TCAとの反応において、同レベルの活性化エネルギーを示したことは興味深い。TCAの作用部位の類似性を示しているのかもしれない。

Brinkmann<sup>4</sup>によれば、*E. gracilis* 細胞におけるTCAの可能な作用部位は細胞膜タンパクと脂質層であり、作用メカニズムとしては、TCAアニオンが細胞膜外層に作用し水素イオンの透過性を高めるのであろうと推察している。これは、芽胞に対するTCAの作用メカニズムについての著者の見解とよく一致している。

## [II] 小 括

1. TCAの発芽遅延活性はpH依存性を示し、一定レベル以上 (pH 3.0以下) の水素イオン濃度を必要とした。しかし、水素イオン濃度が十分である場合でも、塩酸や酢酸には活性がなく、TCAに特異的な活性であることが判明した。
2. TCAの作用は濃度および温度依存性であった。



3. TCAの作用は高濃度、高温の条件では接触時間依存性が認められなかったが、適当な条件下では接触時間依存性を示した。
4. TCAと芽胞の反応の活性化エネルギーは  $4.0 \times 10^4$  cal/mole であった。
5. TCA構造類似体の発芽遅延活性を検討した結果、電子吸引性効果の強い共役塩基をもつ酸の順に序列が認められた。電子吸引性基をもたない酸は活性を示さなかった。

### 第3章 芽胞の化学構造に対するTCAの影響

#### 第1節 芽胞の化学組成に対するTCAの影響

芽胞に対する種々の化学的修飾は芽胞の性状に重大な変化を生じる。これには、多くの場合、芽胞構成成分や芽胞の化学組成の変化を伴う。例えば、芽胞は酸性条件下で陽イオンと水素イオンを交換する一種の cation exchanger<sup>1</sup>であることが知られている。このイオン交換が発芽能力や耐熱性に影響を及ぼすことは既に述べたとおりである。発芽能力の喪失やリゾチームに対し感受性になる変化は芽胞タンパク質の一部を除去することにより生じる<sup>22</sup>。このように、芽胞成分の変化と性状の変化には直接の関係がみられることから、TCAの作用による芽胞性状の既述の変化もまた芽胞成分の変化に起因することは十分考えられる。

TCAはタンパク沈殿剤としてよく知られた生化学試薬である。また、種々の生体成分を抽出する溶媒としてもよく用いられている<sup>20</sup>。細菌など微生物細胞に対しては細胞質毒として作用するとされている<sup>49</sup>が、芽胞細胞に直接作用させた例はあまりない\*。高濃度のTCAの作用によりDPAの溶出が生じることについてはすでに明らかにしたところであるが、本節では、TCA処理芽胞の種々の性状に見出された変化との関係を検討することを目的に、その化学組成の変化を明らかにした。

#### I. 実験材料および実験方法

##### (1) TCA処理

第1章第1節に同じ。TCAの濃度は、発芽に対する影響がまったく認められなかった濃度、6.1 mM、極めて強い発芽抑制が生じた濃度、61.2 mM、およびその間の濃度、30.6 mMを用いた。TCA処理芽胞は脱イオン水で1回洗浄後、凍結乾燥して試料とした。

##### (2) 化学分析

タンパク質の定量はHerbertら<sup>26</sup>の方法に従った。

ヘキソサミンの定量は試料を6 N塩酸で100°C、15時間加水分解した後Rondle and Morgan<sup>58</sup>の方法に従って行った。

---

\* ヨード酢酸はγ線照射に対する芽胞の感受性を亢進するが、TCAにはこのような増感作用はないという報告がある<sup>14</sup>。

DPAの定量はJanssenら<sup>33</sup>の方法に従った。

カルシウムの定量はキレート滴定法により行った。芽胞50mgを脱イオン水25mlにけん濁し、121°C、15分オートクレーブ処理後、遠心分離、上清中に含まれるカルシウムをシクロヘキサンジアミン四酢酸を用いて定量した。

## II. 実 験 成 績

結果はまとめてTable 7に示した。表から明らかなように各成分は未処理芽胞とTCA処理芽胞群との間には差が認められるが、TCA処理芽胞群内で比較すると、処理に要したTCAの濃度が異なるにもかかわらず、差はほとんど認められなかった。

TCA処理芽胞群と未処理芽胞との差についても、タンパク質、カルシウムでそれぞれ8-9%、0.4%の低下が認められたにすぎなかった。

Table 7. Protein, hexosamine, DPA and Calcium contents of TCA-treated and control spores of *B. cereus* T<sup>1</sup>

Spores <sup>2</sup>	Protein	Hexosamine	DPA	Ca
Control spores	66.5	6.9	10.4	1.95
Spores treated with 6.1 mM TCA	58.5	6.7	10.6	1.60
Spores treated with 30.6 mM TCA	57.5	6.8	10.5	1.58
Spores treated with 61.2 mM TCA	57.8	6.7	10.0	1.57

1. Contents are shown as percentages of the dry weight of the spores.
2. TCA-treatment of spores was performed at 40°C for 30 min.

### 第2節 TCA処理芽胞のIRスペクトル

芽胞の生理学的性状にはTCAの作用による明白な変化が認められるにもかかわらず、化学組成における変化は顕著でなかった。このような、化学的、形態学的に著しい変化は認められないが、生理学的に顕著な差が認められるという例に、芽胞の活性化が挙げられる。この場合は、発芽始動物質認識部位構成タンパク質における構造変化によるものとする説が有力である<sup>19</sup>。

TCAは巨大分子に結合してその立体構造を変化させる。本研究における芽胞とTCAとの反応の活性化エネルギー、およびBrinkmann<sup>4</sup>が示した *E. gracilis* とTCAとの反応の活性化エネルギー値は、巨大分子の変性エネルギーの範囲に属している。

以上の事実は、TCAの作用により芽胞のある特定の部位（この部位に生

いた変化は発芽に影響を及ぼす)に conformation の変化が生いていることを強く示唆する。これを立証するため、未処理芽胞を対照として、変化が最も大きいと予想される 61.2 mM TCA 処理芽胞の IR スペクトルを測定した。

## I 実験材料および実験方法

### (1) 供試菌ならびに芽胞形成法

B. cereus T, B. megaterium QM B1551, B. subtilis PCI 219 を用いた。

B. cereus T は第 1 章第 1 節で述べた方法に従って芽胞形成を行った。

B. megaterium は Kondo and Foster<sup>38</sup>の方法に従って芽胞形成を行った。

B. subtilis は普通寒天培地を用いて Kondo and Foster<sup>38</sup>の方法に準じて芽胞形成を行った。

### (2) TCA 処理

第 3 章第 1 節に同じ

### (3) 発芽芽胞の調製

B. cereus T 芽胞 20mg を普通グイオン (BBL) 50ml にけん濁し、30°C で培養した。培養は、位相差顕微鏡による観察において光屈折性を示す芽胞が認められなくなるまで行い、培養終了後、遠心分離により集菌、氷冷した脱イオン水を用いて洗浄したのち、凍結乾燥した。なお、発芽後増殖防止のため、chloramphenicol (P-L Biochemicals), 100 µg/ml を添加した。

### (4) IR スペクトルの測定

凍結乾燥した試料、約 20mg に精製した KBr を加え、常法に従って KBr 錠剤を作製した。測定は普通 Hitachi EPI-G2 赤外吸収分光光度計を用いて行い、とくに拡大スペクトルを測定する場合は JASCO DS-701G 赤外吸収分光光度計を使用した。

## II. 実 験 成 績

細菌細胞の IR スペクトルは複雑であり、その解析は極めて困難である。しかし、Norris and Greenstreet は、B. megaterium の芽胞形成の各段階の全菌を試料としてスペクトルの測定を試み、栄養型細胞に特徴的な PHB や芽胞に特徴的な Ca-DPA といった含有成分の消長を明らかにすることに成功している<sup>52</sup>。この知見を参照して、TCA 処理芽胞の IR スペクトルを測定し検討した。

本菌未処理芽胞のIRスペクトルは、 $1,650$ ,  $1,540\text{ cm}^{-1}$  にそれぞれアミド I, アミド II に帰属される特徴的で大きい吸収帯、 $1,440$ ,  $1,380\text{ cm}^{-1}$  に比較的鋭いピーク、 $1,280\text{ cm}^{-1}$  に小さいが鋭いピーク、そして  $1,150-950$ ,  $800-600\text{ cm}^{-1}$  には微細構造を有する吸収帯を示した。 $1,720\text{ cm}^{-1}$  の吸収ピークは本菌芽胞に特徴的で、B. megaterium 芽胞<sup>52</sup>や B. subtilis 芽胞ではあらわれない (Fig. 12b), B. megaterium 栄養型細胞では強くあらわれる<sup>52</sup>ことから、PHBに由来するものと考えられる (Fig. 12a)。発芽芽胞の吸収スペクトル (Fig. 12a) と比較すると、未処理芽胞のスペクトルにみられ  $1,565$ ,  $1,280$ ,  $770$ ,  $730$ ,  $700$ , および  $660\text{ cm}^{-1}$  の吸収ピークが発芽芽胞のスペクトルにはあらわれなかった。この吸収ピークは Ca-DPA の吸収ピークと一致した。TCA処理 ( $61.2\text{ mM}$ ) 芽胞のIRスペクトルは未処理芽胞のIRスペクトルとよく一致したが、 $1,325$ ,  $830$ , および  $680\text{ cm}^{-1}$  に新たな吸収ピークを認められた。

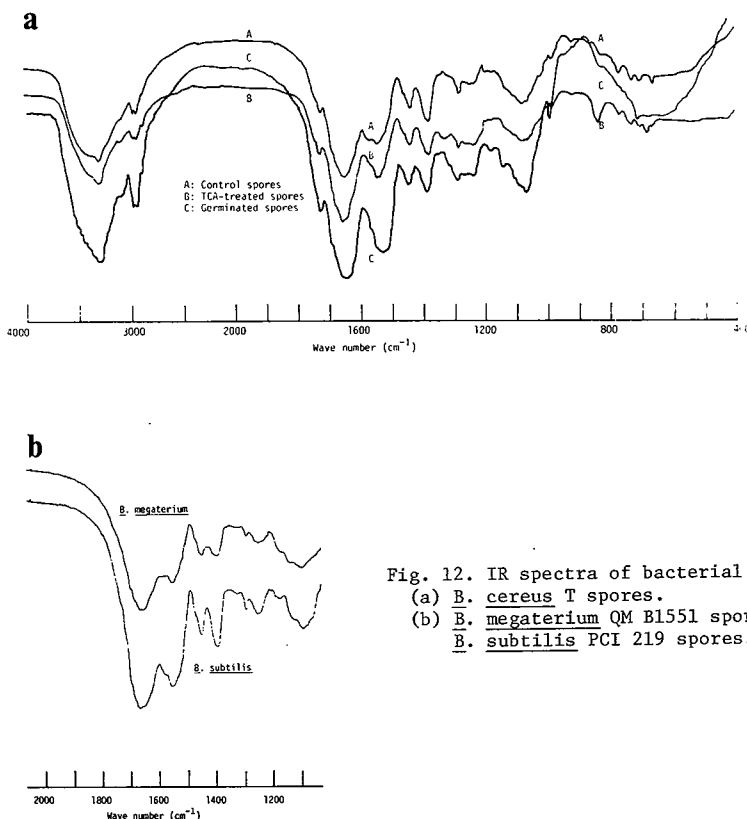


Fig. 12. IR spectra of bacterial spores.  
(a) B. cereus T spores.  
(b) B. megaterium QM B1551 spores and  
B. subtilis PCI 219 spores.

### 第3節 考察ならびに小括

#### [I] 考 察

TCAの作用により芽胞の化学組成はタンパク質とカルシウムで量的変化が認められ、それぞれ8-9%、0.4%低下した。アミノ糖、DPAには顕著な変化は認められなかった（DPAは61.2mMTCA処理芽胞では0.5%低下した）。タンパク質、カルシウムレベルの低下は、TCA濃度とは無関係に、TCA処理芽胞すべてが8-9%、0.4%それぞれ低下した。したがって、化学組成に生じた変化は発芽能や耐熱性にあらわれた変化の主たる原因とは考えられない。しかし、補足的要素である可能性は十分あり得る。

芽胞に存在するカルシウムは、表在性のものと内在性のものが2態あり、表在性カルシウムを除去すると、耐熱性や発芽能が低下することが知られている。表在性カルシウムの存在部位として、スボアコートに局在すると推察されているが<sup>2</sup>、最近、西原ら<sup>51</sup>は、低温灰化法を電子顕微鏡試料作製技術として用い、直接これを証明することに成功している。さらに内在性のカルシウムがスボアプロトプラストに局在していること、DPAとの化学量論的考察から、この内在性カルシウムはDPAと1:1のキレート結合していることを示唆した。表在性カルシウムは、酸性環境では、水素イオンと置換するので、上述のカルシウムレベルの低下は、TCA水溶液が強酸性であることから、表在性カルシウムが水素イオンと置換した結果を示しているのかも知れない。

TCA処理芽胞は生理学的性質において顕著な変化が認められたにもかかわらず、化学組成の変化は明白でなかった。一方、芽胞とTCAの反応の活性化エネルギーは芽胞成分の高次構造の変化を示唆した。この事実に基づき、未処理芽胞、TCA処理（61.2mM、40℃、30分）芽胞のIRスペクトルを測定した結果、TCA処理芽胞のスペクトルには未処理芽胞のスペクトルにはあらわれない吸収ピークが1325、830、および680  $\text{cm}^{-1}$ にあらわれた。新たにあらわれたこれらの吸収ピークの帰属は第4章で検討するが、芽胞成分の高次構造に変化が生じている可能性が非常に強いことを示している。

#### [II] 小 括

1. TCAの作用により、タンパク質、カルシウムは、未処理芽胞と比較すると、TCAの濃度と無関係に8-9%、0.4%、それぞれ低下した。アミノ糖は変化がなく、DPAは61.2mMの作用により0.5%低下した。
2. TCA処理（61.2mM、40℃、30分）芽胞のIRスペクトルには、未処理芽胞のスペクトルにあらわれない1325、830および680  $\text{cm}^{-1}$ の3本の吸収ピークの存在が認められた。

## 第4章 TCA処理芽胞の発芽能の回復と回復過程 におけるTCAの挙動

### 第1節 発芽能の回復

芽胞にTCAを作用させることにより、芽胞はその発芽能の低下を示した。この現象には、芽胞構成成分の量的変化との相関が認められず、IRスペクトルを測定した結果から、おそらく発芽と密接な関連がある芽胞構成成分の高次構造の変化に対応したものであることが推察された。

TCAの作用メカニズムを明らかにするためには、TCA処理芽胞における発芽能の低下が、発芽機構そのものの損傷による直接的な機能低下に起因するものか、あるいは発芽機構と取り巻く環境の変化により機能発現が抑制された状態にあるのかという2つの問題を解明する必要がある。発芽機構が損傷を受けた場合、損傷を受けた部位が修復可能であるか、あるいは修復が困難な場合であっても代償的方法があれば、機能の回復が可能である。例えば、酸性の環境で表在性の陽イオンが水素イオンと置換したため発芽能を失った芽胞は当該陽イオンの再負荷により発芽能を回復することができる<sup>57,59</sup>。また、アルカリ処理や加熱処理により発芽能を失った *B. cereus* T 芽胞や *Cl. perfringens* type A 芽胞が発芽するためにはリゾチームやコルテックス溶解酵素の添加が必要である<sup>12,24</sup>。一方、芽胞(発芽機構)の周囲の環境の変化により発芽能を失った例として、無水アルコールでの脱水処理による *B. megaterium* 芽胞の不活化を挙げる<sup>27</sup>ことができる。不活化芽胞は水中で加熱することにより再活性化される。この現象は、発芽始動物質認識部位の周囲の付着水は、凍結乾燥などの処理では脱水されず、無水アルコールなどの液体乾燥剤による乾燥により脱水され、発芽始動物質に対する反応性を失うが、水中での加熱は、この部位の再水合を可能にし、その結果、発芽始動物質に対する反応性を回復すると説明されている。

本研究で取り扱うTCAの作用は殺菌的ではなく、また、発芽機構に対してもその機能を完全に失わせるというものでもない。したがって、上記の方法に類似した何らかの機能補償的方法による再活性化が可能であると思われる。本節では、その方法について検討した。

### I. 実験材料および実験方法

#### (1) TCA処理

第1章第1節に同じ

## (2) 発芽能回復実験

第1章第1節で述べた方法に従って調製したTCA処理芽胞けん濁液をそのまゝ、あるいは本文中に示した条件で熱処理したのち、以下に述べる発芽培地を用いて発芽実験\*を行った。発芽培地として、(i) 第1章第1節で述べた培地、(ii) ALAとINO 各 0.05 mMを含むNaPBにリゾチーム 200 µg/ml を添加したもの、および(iii) ALAとINO 各 0.05 mMを含むトリス塩酸緩衝液 (50 mM, pH 8.0) に金属塩 ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{Ca}(\text{OAc})_2$ ,  $\text{MgCl}_2$  または  $\text{SrCl}_2$ ) 20 mMを添加したものを使用した。

## II. 実 験 成 績

### (1) リゾチームの添加

本菌芽胞はリゾチーム非感受性であり、この性質はTCA作用後も変化しなかった。したがって、TCA処理芽胞の発芽能はリゾチーム (200 µg/ml) を添加しても回復しなかった。

### (2) カルシウム塩の添加

酸性環境下に置かれた芽胞は、発芽の必須条件として、強電解質の存在を要求するようになり、強電解質不在条件下では発芽しない<sup>52,59</sup>。カルシウム塩は、強電解質不在条件下での発芽能を効果的に回復させる。

Table 8. Effect of salts in restoring the germinability of TCA-treated spores of *B. cereus* T<sup>1</sup>

Supplemented salts <sup>2</sup>	Extent of germination <sup>3</sup>	
	Control spores	TCA-treated spores
Disodium hydrogen phosphate	0.601	0.039
Dipotassium hydrogen phosphate	— <sup>4</sup>	0.041
Calcium chloride	0.525	0.074
Calcium acetate	0.562	0.055
Magnesium chloride	—	0.056
Strontium chloride	—	0.087

1. Spores were treated with 61.2 mM TCA at 40 C for 30 min. Treated spores were thoroughly washed with deionized water and added to 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) containing 0.05 mM L-alanine and 0.05 mM inosine. Germination was performed at 30 C for 60 min.

2. Germination medium was supplemented with the indicated salts at the concentration of 20 mM.

3. 1 - OD<sub>600</sub>/OD<sub>i</sub>

4. Not examined.

\* 既述 (第1章第2節)



しかし、TCA処理芽胞の発芽能の低下は強電解質（リン酸塩）存在下でも認められることから、上述の酸性環境に置かれた芽胞に生じた変化とは異なる。実際、カルシウム塩やその他の金属塩を添加しても発芽能の回復効果は認められなかった（Table 8）。

### (3) 加熱

Fig. 13は、各濃度のTCAを作用させた芽胞を発芽培地にけん濁する前に、50℃、30分加熱した場合の発芽率（1時間後のOD低下率）を示したものである。また、Fig. 14は61.2 mM TCA処理芽胞について50℃、30分加熱後の発芽を経時的に測定したものである。これらの結果は、TCA処理芽胞の発芽が50℃、30分の加熱により完全に回復したことを示している。加熱による発芽能の回復の程度は、加熱時間が増すにつれて大きくなり、また加熱温度（40-50℃）が高くなるにつれて回復に要する時間の短縮が認められたこ

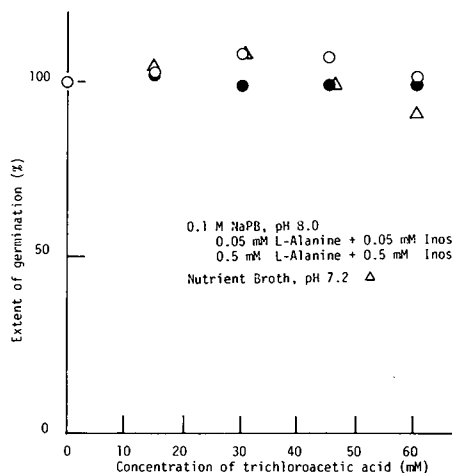


Fig. 13. Reactivation by heating of TCA-treated spores of *B. cereus* T. Spores were treated with TCA at the indicated concentration at 40 C for 30 min. Following separation and resuspension in sodium phosphate buffer (0.1 M, pH 8.0) or deionized water, the spores were heated at 50 C for 30 min. Then, germination of spores was estimated by incubation at 30 C for 1 hr in the germination media.

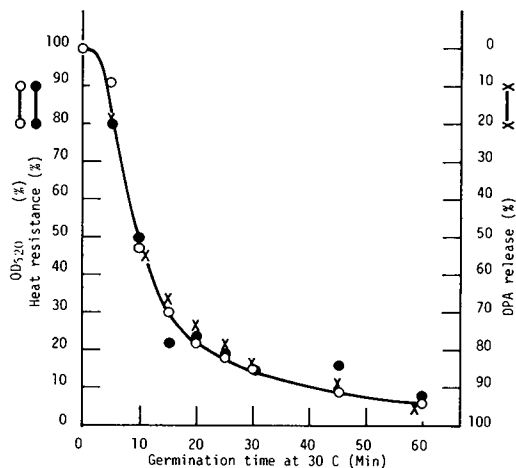


Fig. 14. Germination profile of reactivated, TCA-treated spores of *B. cereus* T. TCA-treated (61.2 mM, 40 C, 30 min) spores were heated at 50 C for 30 min. Germination was carried out in 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 8.0) containing 0.05 mM L-alanine and 0.05 mM inosine.

とから、発芽能の回復は加温時間や加温温度に依存していることが判明した (Fig. 15)。また、この結果から求めた活性化エネルギーは  $4.06 \times 10^4$  cal/mole となり、第3章第1節で求めた  $\mu$  値とよい一致を示した。

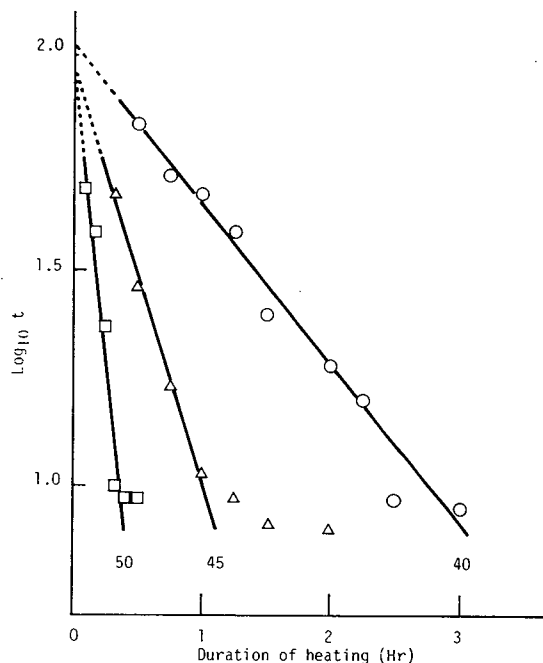


Fig. 15. Effect of the temperature and period of heat-treatment in reactivation of TCA-treated (61.2 mM, 40 C, 30 min) spores of *B. cereus* T.

## 第2節 加熱処理したTCA処理芽胞のIRスペクトル

TCA処理芽胞の低下した発芽能は穏和な条件 (50 C, 30分) での加温により回復した。前章において、TCA処理芽胞のIRスペクトルが未処理芽胞のものと異なっていることを明らかにしたが、この変化が発芽機構の機能低下と関連したものであるとするならば、機能が回復した芽胞のIRスペクトルは原状に復することが予想される。すなわち、発芽能が回復したTCA処理芽胞のIRスペクトルは未処理芽胞のIRスペクトルと一致することが期待される。

### I. 実験材料および実験方法

#### (1) 試料の調製

61.2 mM TCA で処理した芽胞を 50 C, 30分熱処理したのち、脱イオン水で

1 回洗淨し、凍結乾燥した。

## (2) IR スペクトルの測定

第3章第2節に同じ

## II. 実 験 成 績

50 C で 30 分加温した TCA 処理 (61.2 mM, 40 C, 30 分) 芽胞の IR スペクトルを測定した結果、期待どおり、TCA 処理芽胞であらわれたい本の吸収ピーク (1,325, 830 および 680  $\text{cm}^{-1}$ ) の強度は著しく低下し、そのため、TCA 処理芽胞の IR スペクトルは未処理芽胞の IR スペクトルと極めてよく似たスペクトルパターンを示した (Fig. 16)。

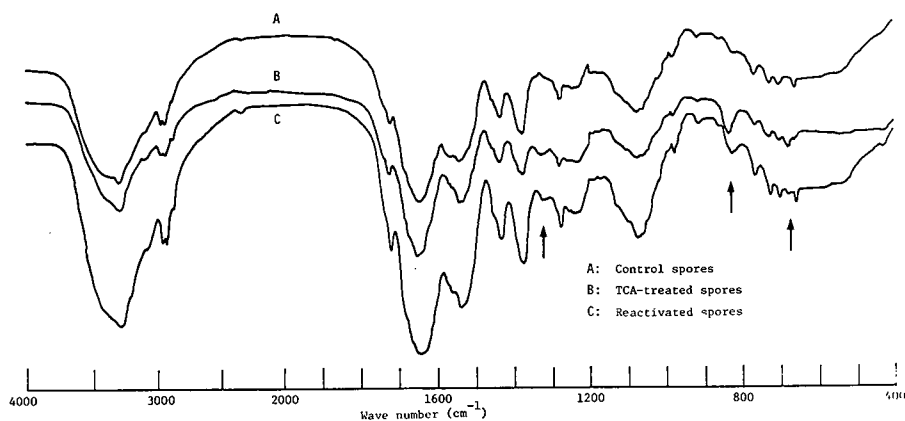


Fig. 16. IR spectra of TCA-treated, reactivated, and control spores of B. cereus T. Arrows indicate 1,325, 830 and 680  $\text{cm}^{-1}$ .

### 第3節 発芽能回復過程におけるTCAの挙動

TCA処理芽胞の発芽能の回復はIRスペクトルの変化と一致することが判明した。そこで、次に、この変化が質的变化のみであるか、何らかの物質の移動、すなわち、量的変化を伴ったものであるかを検討した。

## I. 実験材料および実験方法

### (1) 熱重量分析

凍結乾燥した芽胞 49-5.1 mg を精秤し、白金セル (5 mm  $\phi$ ) に均一に詰め込み、Shimadzu TGA-30Mを用いて熱重量分析を行った。測定条件は、クロメル-アルメルをthermocoupleとして、空気 (40 ml/min) または窒素 (30 ml/min) 気流中、昇温速度、5 または 10  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 、感度、 $\pm 1$  mg で測定した。

### (2) IRスペクトルの測定

第3章第2節に同じ

### (3) 熱分解ガスクロマトグラム

乾燥芽胞を加熱分解し、発生する気体をガスクロマトグラフを用いて測定した。

Shimadzu PYR-2A熱分解装置を装着したShimadzu GC-6APTF ガスクロマトグラフを使用し、熱分解温度を 200  $^{\circ}\text{C}$  に設定し、2 m  $\times$  3 mm  $\phi$  のガウス管、充填剤 PEG 6000, 10% TPA, He (40 ml/min $\cdot$ atm), カラム温度 185  $^{\circ}\text{C}$  で、検出器 FIDを用いて測定した。

## II. 実験成績

### (1) 熱分析<sup>35)</sup>

Fig.17 は未処理芽胞の熱重量分析曲線 (TG 曲線と略す) である。室温からの昇温につれて芽胞重量の減量していく様子が示されている。減量はピーク時温度が 56-60  $^{\circ}\text{C}$  と 230  $^{\circ}\text{C}$  以上で生じた。最初の減量は芽胞の乾燥の程度により変化することから、付着水の蒸発を示していると思われる。第1の減量は、ピーク時温度を過ぎて徐々に平衡に達する。230  $^{\circ}\text{C}$  付近から生じる第2の減量は菌体の燃焼によるものである。これに対して、TCA処理芽胞のTG曲線 (Fig.18) は、ピーク時温度が 56-60  $^{\circ}\text{C}$  である第1の減量の他に燃焼による減量とは異なるもうひとつの減量<sup>\*</sup>が、ピーク時温度 108  $^{\circ}\text{C}$

\* 以後、この減量を第2の減量とする。

付近で生じたことを示した。この減量は、高濃度のTCAを作用させた芽胞ほど大きく、TCA処理芽胞には、未処理芽胞にはない揮発性成分がTCA濃度にはほぼ比例して含まれていることを示している。

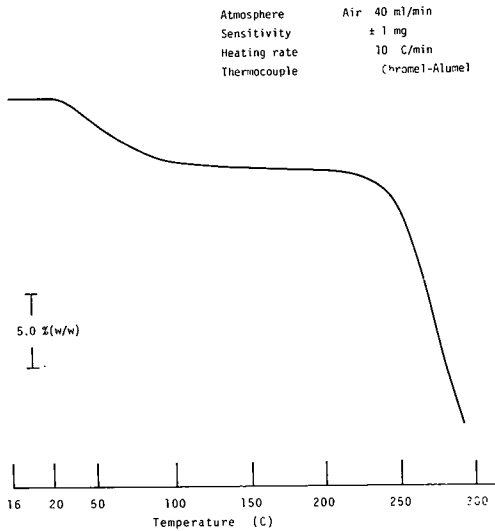


Fig. 17. Thermogravimetric curve of spores of *B. cereus* T.

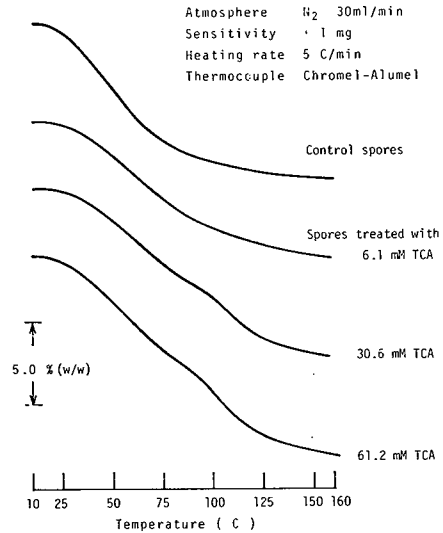


Fig. 18. Thermogravimetric curves of TCA-treated and control spores of *B. cereus* T.

## (2) IRスペクトル

TCA処理芽胞には未処理芽胞にはない揮発性成分が含まれていることがわかったが、この物質の熱による離脱反応が、第2節で明らべたIRスペクトルに反映された変化であるか否かを明らかにするため、TCA処理芽胞(61.2 mM)について、第1の減量がほぼ終了し、第2の減量がまだ認められない84°Cまで加熱した試料と、第2の減量が終了する164°Cまで加熱した試料(どちらも乾燥菌体)のIRスペクトルを測定した(Fig. 19)。

84°Cまで加熱した芽胞のIRスペクトルは、加熱前のIRスペクトルと同じく、1325, 830 および 680  $\text{cm}^{-1}$  に吸収が認められた。一方、164°Cまで加熱した試料のスペクトルでは、これらの吸収ピークは完全に消失した。この事実は、第2の減量が芽胞けん濁液を50°Cで加熱したとき芽胞に生じる変化に対応したものであることを示している。

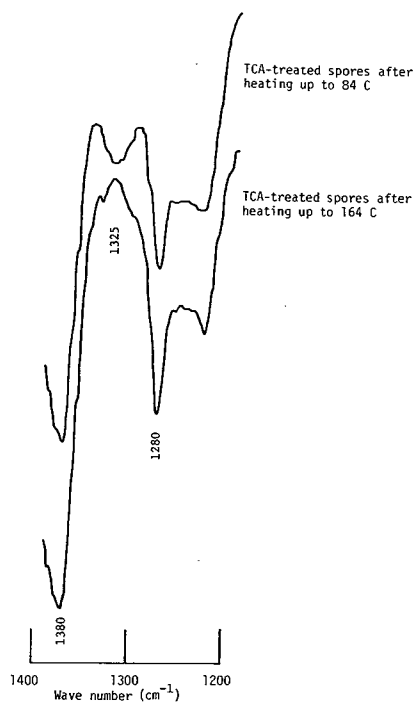


Fig. 19. IR spectra of TCA-treated spores of *B. cereus* T.

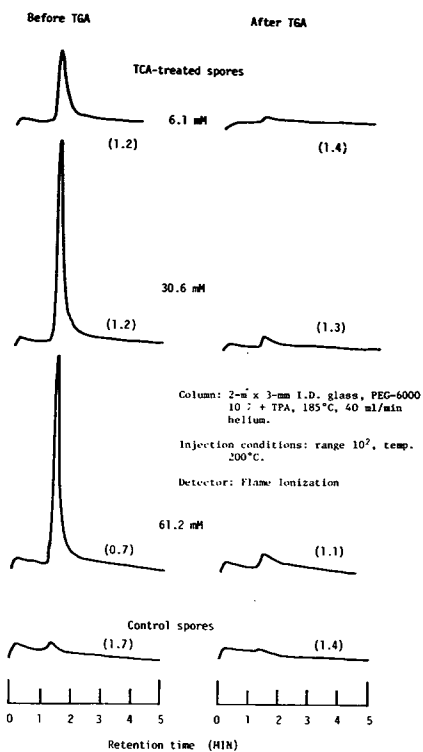
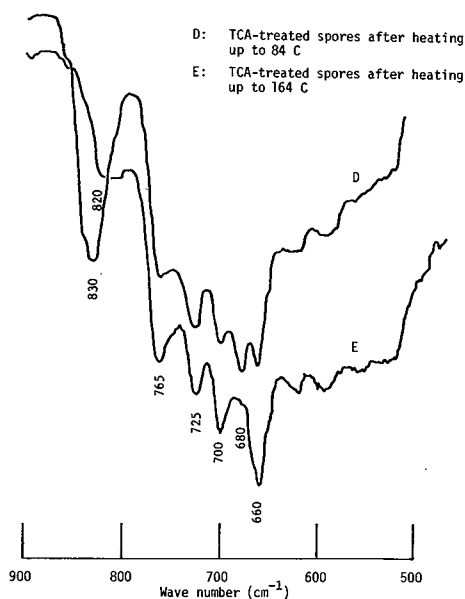


Fig. 20. Pyrolytic gaschromatogram of TCA-treated and control spores of *B. cereus* T. Spores were applied to pyrolytic gaschromatograph before and after thermogravimetric analyses up to 150 C. Figures in parenthesis show the amount of spores (mg) applied.

Column: 2-m x 3-mm I.D. glass, PEG-6000 10 % + TPA, 185 C, 40 ml/min helium.

Injection conditions: range  $10^2$  temp. 200 C

Detector: Flame Ionization.

### (3) 熱分解がスクロマトグラム

第2の減量の原因となる揮発性成分を追跡するために、未加熱試料と164℃まで加熱した試料を熱分解がスクロマトグラムにより分析した(Fig. 20)。

TCA処理芽胞の未加熱試料の熱分解がスクロマトグラムは約1.4分のretention timeをもつ単一ピークを示したが、未処理芽胞および164℃まで加熱したTCA処理芽胞の熱分解がスクロマトグラムでは、このピークはあらわれなかった。また、このピークはTCA濃度が増すにつれて、ほぼ比例して大きくなった。TCA標準物質を同一条件で分析した結果、retention timeは約1.4分であり、上記の結果と一致したことから、未知の揮発性成分はTCAであると考えられる。

## 第4節 考察ならびに小括

### [I] 考 察

TCA処理芽胞の発芽能の回復はカルシウム塩の添加やリゾチーム添加培地では認められず、加熱処理によって認められた。リゾチームの効果に関しては、本菌芽胞ならびにTCA処理した本菌芽胞がリゾチーム非感受性であることから当然の結果である。

TCA処理芽胞の発芽能が加熱により回復したという事実は、TCA処理の結果、発芽機構に生じた変化が、発芽に必要な成分の欠損とか機能喪失といった不可逆的変性ではなく、加熱により容易に機能が回復する可逆的な変性であることを示しており、TCA処理芽胞が脱活性化された状態にあると考え、この回復現象を再活性化とすることができるとする。

脱活性化された芽胞の再活性化のメカニズムについては興味ある知見がある。すなわち、無水エタノールは活性化されたB. megaterium芽胞を脱活性化し、脱活性化された芽胞は、水中で加熱することにより再活性化されるというものである。この現象は発芽始動物質認識部位が無水アルコールで完全脱水されることにより脱活性化が生じるが、水中での加熱により再水和され再活性化されると説明されている<sup>27</sup>。しかし、TCA処理芽胞の加熱による発芽能回復のメカニズムに関しては、この考え方を導入することはできない。

TCA処理芽胞の熱分析結果から、TCA処理芽胞に未知の揮発性物質が含まれており、この物質は加熱により芽胞から脱離することが明らかとなった(Fig. 18)。これは、発芽能の回復効果が温度依存性であるという事実(Fig. 15)と符合する。また、熱分析試料のIRスペクトルを測定した結果は、揮発性物質の脱離反応が発芽機構における機能回復現象に平行して生じる反応であることを示唆した。すなわち、付着水は脱離するが、問題の

揮発性物質の脱離は認められない84°Cと揮発性物質の脱離が認められる164°Cまでそれぞれ加熱したTCA処理芽胞のIRスペクトルを比較した結果、前者のスペクトルには未加熱試料と同様、1325, 830および680 $\text{cm}^{-1}$ の吸収ピークが明瞭に認められたが、後者のスペクトルでは完全に消失した。この揮発性物質は、TCA処理芽胞から脱離する量が処理に用いたTCA濃度に比例すること、ならびに熱分解ガスクロマトグラムを用いた分析により、本物質がTCA標準物質と同じretention timeを示したことから、TCAであると同定した。また、この結果に基づき、TCA処理芽胞のIRスペクトルにあらわれた3本の吸収ピークのうち、最も強い強度を示した830 $\text{cm}^{-1}$ および強度は小さいが鋭い680 $\text{cm}^{-1}$ の各吸収ピークの帰属はCCI結合に由来する吸収であると推定される<sup>45</sup>。以上の結果は、芽胞にTCAを作用させることによりTCAアニオンが芽胞に結合すること、およびこの結合は加熱により解離することを示している。加熱によるTCA処理芽胞の発芽能の回復がTCAの脱離反応を伴って発現することから、両者の間に何らかの関連があるかにみえるが、芽胞に対するTCAアニオンの作用は、芽胞の発芽能の低下の直接の原因でないことが既に明らかであり、これはTCAアニオンの脱離反応が発芽能回復のメカニズムと直接の関係がないことを意味している。

TCAはタンパクに結合して高次構造に影響することが指摘されている<sup>55</sup>。Nakajima and Hayashi<sup>47</sup>はTCAと高分子化合物との反応についてDCA/DCEあるいはTCA/ACOH中でのポリペプチドのcoil-helix転移現象に言及している。すなわち、低温ではDCAあるいはTCAはペプチド残基と水素結合し、ポリペプチドはコイル状構造を形成するが、高温では水素結合が断裂し、ペプチド残基の分子内水素結合によりポリペプチドはヘリックス構造を形成する。一方、酸分子は二量体を形成し脱離するというものである。繊維状タンパク質とTFAについても類似の現象が報告されている<sup>49</sup>。また、Brambl and Handschin<sup>3</sup>はミトコンドリアに含まれる高分子成分がTCAの作用により低分子成分に分解されるという現象を報告しているが、これは、低分子成分がsubcomponentとして高分子成分を構成しており、各subcomponentsは水素結合により解離している。TCAはその水素結合を断裂すると解釈されている。

以上の知見に基づき、芽胞とTCAの反応を考察すると、TCAは芽胞表面あるいは表面に近い部位に存在する構成タンパクに作用し、上記のような反応を経て高次構造に変化を主とし、芽胞を高濃度の水素イオンに対して感受性化するものと推察される。

## (II) 小 括

1. TCA処理芽胞の発芽能は加熱により回復した。回復効果は、加熱温度、加熱時間に依存していた。



2. TCA処理芽胞に出現した  $1325$ ,  $830$  および  $680\text{ cm}^{-1}$  の吸収ピークは加熱により吸収強度に著しい低下が認められた。この吸収ピークのうち、 $1325\text{ cm}^{-1}$  のピークを除く他の2本のピークはTCAの  $\text{CCl}$  結合に由来するものであると推定された。
3. 熱分析の結果、TCA処理芽胞には未知の揮発性物質の存在が確認された。
4. この揮発性物質はTCAであると同定された。

## 第5章 発芽始動性が異なる芽胞に対するTCAの影響

### 第1節 活性化芽胞に対するTCAの影響

芽胞は熱、酸、アルカリおよびメルカプトエタノールやチオグリコール酸などの還元剤の作用により活性化され、発芽始動物質に対する応答が量的、質的に異なってくる<sup>19</sup>。活性化のメカニズムは明らかでないが、前記の物理的処理や化学薬剤の作用により、スポアコート構成タンパク質の高次構造が変化し、透過性の変化や発芽に関与する酵素の活性に変化が生い起こることが考えられる。

休眠状態にある *B. cereus* T 芽胞は、ALAとINO 個々の作用による発芽の場合よりも、ALAとINO を組み合わせて作用させた場合、濃度要求性が著しく低下する (ALA > 10mM, INO > 0.5mM, ALA+INO > 0.02mM)<sup>14,65</sup>。また、本菌芽胞は、それ単独では発芽を生じない濃度のALAとともに一定時間培養することにより、ALA+INOによる発芽が促進され、INO単独での発芽における濃度要求性も低下する<sup>65</sup>。この現象は、ALAによる芽胞の化学的活性化であると考えられる。さらに、ALA活性化芽胞の発芽はカリウム塩によって妨害されるという特徴がある (Fig. 21)<sup>56,61</sup>。

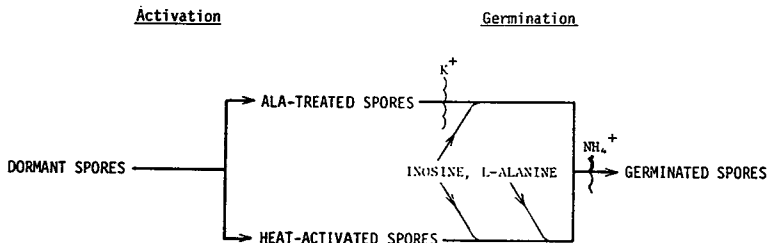


Fig. 21. Two types of activated spores of *B. cereus* T. ALA-treated spores, prepared by incubation with L-alanine, are sensitive to inosine. Heat-activated spores, prepared by heating at 70 C for 30 min, are sensitive to L-alanine and inosine. K and NH<sub>4</sub> inhibit germination at the indicated stages.

芽胞の活性化は、一般に、加熱処理によってなされることが多い。加熱活性化芽胞は、ALA, INO 個々の作用による発芽において、濃度要求性の著しい低下や発芽始動物質の化学構造に対する要求の厳密さが失われ発芽始動物質の質的拡大がみられることが多い。さらに、本菌芽胞の場合は、加熱活性化によりカリウム塩による阻害がみられなくなる。

このように、加熱活性化芽胞、ALA活性化芽胞はどちらも休眠状態にある芽胞とは明らかに異なる発芽前状態 (state of readiness が異なる) にある。そこで、この2つのタイプの活性化芽胞のTCAの作用に対する反応を比較した。

## I. 実験材料および方法

### (1) 加熱活性化

芽胞50mgを脱イオン水10mlにけん濁し、70℃、30分熱処理後、遠心分離により集菌、脱イオン水で1回洗浄したのち、脱イオン水10mlに再けん濁して試料とした。

### (2) ALA活性化<sup>65</sup>

芽胞1mgを0.5mM ALAを含むNaPB 1.5mlにけん濁し、30℃で1時間保温した。遠心分離により集菌、NaPBで1回洗浄後、NaPBまたは脱イオン水にけん濁し、ODが0.4になるように調整した。

### (3) TCA処理

第1章第1節で述べた方法に従って、30℃で30分間、TCA処理を行った。

### (4) 発芽実験

第2章第1節に同じ

## II. 実験成績

### (1) 加熱活性化芽胞

本菌芽胞の最適活性化温度は75℃(30分)である。しかし、70℃でも活性化の程度はほとんど変わらないことから、加熱活性化は70℃(30分)で行った。TCAの作用は休眠状態にある芽胞に対する作用との比較と容易にするため30℃(30分)で行った。

TCAを作用させた加熱活性化芽胞の発芽の時間変化曲線をFig. 22aに示した。TCAの作用により、加熱活性化芽胞もまた発芽遅延を生じたが、休

眠芽胞と加熱活性化芽胞の発芽曲線を比較すると、各TCA濃度において、加熱活性化芽胞は休眠芽胞よりもすみやかに発芽した。この結果は、TCAの作用による脱活性化は加熱活性化芽胞に対しても生じること、および加熱による活性化状態はTCA処理後も維持されていることを示している。TCA濃度に対する $\log$ 値のプロットは、この結果を一層明確に示している (Fig. 22b)。

## (2) ALA活性化芽胞

ALA活性化は休眠芽胞を0.5 mM ALAとともに、30°C、1時間培養することにより行った。TCAの作用は、加熱活性化芽胞と同様、30°C (30分) で行った。Fig. 22に示した結果から明らかなように、低濃度のTCAの作用で発芽遅延が生じ、TCAはALA活性化芽胞に対して極めて強く作用することが判明した。この現象はALA+INOによる発芽に対するアンモニウムイオンによる阻害作用と類似している<sup>66</sup>。

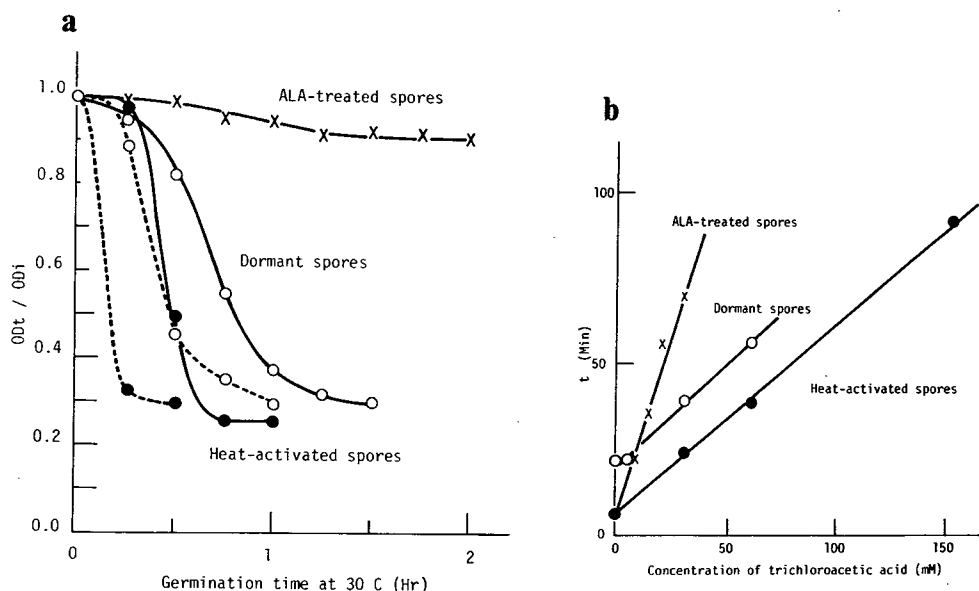


Fig. 22. Effect of the concentration of TCA-treatment. Germination was performed at 30°C in 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 8.0) containing 0.05 mM L-alanine and 0.05 mM inosine. (a) Germination profiles of dormant, heat-activated, and ALA-treated spores, with (solid lines) or without (dotted lines) TCA-treatment (30.6 mM, 30°C, 30 min); (b) Spores were treated at 30°C for 30 min at the indicated concentrations of TCA.

## 第2節 SDS-DTT処理芽胞に対するTCAの影響

前章において、リゾチームはTCA処理芽胞の発芽能の回復効果をもたらさないことを示した。しかし、これは、未処理芽胞、TCA処理芽胞はどちらもリゾチーム非感受性であることから当然の結果である。したがって、この結果から、発芽機構とリゾチームの関係を議論することはできない。前記の実験はリゾチーム感受性の芽胞に対してなされるべき性質のものである。

本菌芽胞はSDS-DTTの作用により、リゾチーム感受性になる(Table 4)。SDS-DTTを作用させた芽胞に対してTCAを作用させ、発芽機構の機能の変化を生じるならば、リゾチーム添加による回復効果の有無を確認することができよう。

SDS-DTTは、その作用により、本菌芽胞のリゾチームに対する感受性が変化することと考慮すると、スボアコートのタンパク質に作用すると考えられ、また、SDS-DTTはタンパク質を可溶化する性質があることから、芽胞に対するSDS-DTTの作用はTCAの作用部位を可溶化したり、あるいは構造的に変化させることが予想される<sup>29</sup>。この変化は、TCAの作用メカニズムやその程度に影響を及ぼすであろう。

本節では、第1に、SDS-DTT処理した芽胞に対するTCAの効果について検討し、TCAがSDS-DTT処理芽胞の発芽機構に影響し、その機能が低下することを確認した。第2に、SDS-DTT処理後、TCA処理した芽胞について、リゾチーム添加による発芽能の回復効果の有無を検討した。

## I. 実験材料及び実験方法

### (1) SDS-DTT処理<sup>28,77</sup>

芽胞1mgを、0.1M NaCl, 0.5% SDS, 10mM DTTからなる反応液1.5mlにけん濁し、37°Cで2時間培養した。氷冷後、遠心分離、沈渣を氷冷した1mMトリス塩酸緩衝液(pH 8.0)にけん濁したのち、ふたたび遠心分離し、上清を捨てた。この操作を3回繰り返したのち、少量の同緩衝液にけん濁し、同緩衝液2Lに対して一夜透析した。遠心分離により集菌、上清を捨て、沈渣をNaPB 1mlで洗浄後、NaPBまたは脱イオン水にけん濁し、ODが0.4になるように調整した。一部は、脱イオン水を用いて洗浄し、凍結乾燥したのち、化学分析に供した。SDS-DTT処理液上清についても、透析後、化学分析に供した。

### (2) TCA処理

第5章第1節に同じ

(3) 発芽実験

第2章第1節に同じ

(4) 耐熱性の測定

80℃, 10分間の加熱に対する耐熱性について, 第1章第2節に述べた方法に準じて測定した。

(5) 化学分析

第3章第1節に同じ

(6) リゾチーム, および Lysozyme substrate に対する TCA 処理とその後の熱処理, ならびに活性の測定

(i) リゾチームの TCA 処理とその後の熱処理: リゾチーム (15 mg/ml) と TCA (61.2 mM) の等量混合液を 40℃, 30分保温したのち, 各 5 ml に 5 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 8.0) で 5 倍に希釈した。これを等分し, 一方はそのまま, 他方は 50℃, 10分熱処理後, 以下に述べる方法に従って活性を測定した。すなわち, Lysozyme substrate (*Micrococcus luteus* cell の乾燥標品, 生化学工業株式会社) 0.3 mg を トリス塩酸緩衝液 3 ml にけん濁したのち, これに上記の処理液を 5, 10, または 15  $\mu$ l 添加し, 520 nm における OD の変化を経時的に反応終了まで測定し, 最初の 1 分間の OD 変化量および最終反応量により表した。結果は, 比較を容易にするため, ODt/ODi に変換して示した。

(ii) Lysozyme substrate の TCA 処理とその後の熱処理: Lysozyme substrate を 3.06, 6.12, および 61.2 mM TCA 各溶液にけん濁 (1 mg/ml) し, 40℃, 30分保温したのち, 各 5 ml に Eppendorf Microfuge で 2 分間遠心分離し, 上清を捨て, 沈渣を トリス塩酸緩衝液にけん濁, OD を 0.35 に調整した。これを等分し, 一方はそのまま, 他方は 50℃, 10分熱処理し, 以下の実験に供した。すなわち, 各 Lysozyme substrate けん濁液に リゾチーム を 10  $\mu$ g/ml となるようにけん濁し, 前記の場合と同様, OD の変化を測定した。

## II. 実 験 成 績

(1) SDS-DTT 処理<sup>29</sup>

本菌芽胞の SDS-DTT 処理において, 20 mM 以上の高濃度の DTT を用いると, 芽胞の凝集が著しく, 満足すべきけん濁液を調製することができなかった。そのため, 以後の SDS-DTT 処理に用いた DTT の濃度は 10 mM とした。

この条件下では, アミノ糖, DPA は, 処理液上清中に検出することはできなかったが, タンパク質は 14.4%/mg spores が上清中に検出された。

Table 9は、SDS-DTT処理した芽胞のタンパク、アミノ糖、およびDPA量を示したものである。この結果は、未処理芽胞の各成分値と比較して、タンパク質では低い値を示しているが、アミノ糖およびDPAはやや高い値を示している。これは、処理液上清中に検出されたタンパク質の減量に伴う芽胞重量の減少により1 mgあたりに含まれる芽胞個体数の増加が原因であると推察された。しかし、SDS-DTT処理芽胞と未処理芽胞のcolonyforming unitを計測しても、ほとんど差が認められなかった。そこで、アミノ糖とDPAはSDS-DTTの作用による量的変化が無視できるほど少ないとみて、両者の値をSDS-DTT処理芽胞と未処理芽胞との間で比較したところ、アミノ糖については1.06、DPAについては1.07というよく似た値を得た。この値(平均値、1.065)をもとに、未処理芽胞のタンパク質量からSDS-DTT処理芽胞のタンパク質量に相当する値を逆算して求めると、70.7%/mg sporesとなった。したがって、実測値との差、15.5%/mg sporesが可溶化されたタンパク質量であると考えられる。この値を未処理芽胞の重量に換算すると14.6%/mg sporesとなり、上清中に可溶化されたタンパク質の実測値とよく一致を示した。

Table 9. Protein, hexosamine and DPA contents of SDS-DTT-treated spores of *B. cereus* T<sup>1</sup>

	Protein	Hexosamine	DPA
Spores	55.2 <sup>2</sup>	7.28 <sup>2</sup>	11.28 <sup>2</sup>
Supernatant	14.4 <sup>2</sup>	- <sup>3</sup>	-

1. Spores were treated with 0.5 % SDS-10 mM DTT in 0.1 M NaCl at 37 °C for 2 hr.

2. Contents are shown as percentages of the dry weight of the spores.

3. Not detected.

## (2) SDS-DTT処理芽胞

SDS-DTT処理した芽胞は依然、耐熱性であった (Table 10)。SDS-DTT処理した芽胞の発芽は非同調性が増強され、発芽芽胞の時間分布は広範囲にわたった (Fig. 23a)。この芽胞にTCAを作用させると、発芽遅延を生じた。発芽遅延は低濃度で急激に生じた (Fig. 23b) が、50°Cでの加熱により、休眠芽胞にTCAを作用させた場合と同様、回復した (Table 11)。

SDS-DTT処理した芽胞はリゾチーム感受性となり、この性質はTCA処理後も変わらなかった。SDS-DTT処理芽胞はTCAの作用の有無と無関係にリゾチームの添加によりすみやかに発芽した (Table 11)。本菌芽胞では、芽胞構造中、リゾチームの基質となり得る化学成分はコルテックスを構成するコルテックスペプチドグリカンであり、さらに内層に展開する germ cell

Wallは基質になり得ないことがわかっている。<sup>83</sup> ここで述べたリゾチームの作用は、生理学的条件下での発芽では、本来、コルテックス溶解酵素がなすべき作用<sup>24</sup>であり、この結果は、コルテックス溶解酵素の活性低下を示している。

Table 10.

Heat resistance of *B. cereus* T spores treated with SDS-DTT.

	Colony-forming units <sup>3</sup>
Control <sup>1</sup>	$2.27 \pm 1.23 \times 10^8/\text{mg}$
After heating <sup>2</sup>	$1.68 \pm 0.97$

1. Spores were treated with 0.5 % SDS-10 mM DTT in 0.1 M NaCl at 37 C for 2 hr.

2. SDS-DTT-treated spores were heated at 80 C for 10 min.

3. Mean  $\pm$  standard deviation ( $P=0.05$ ).

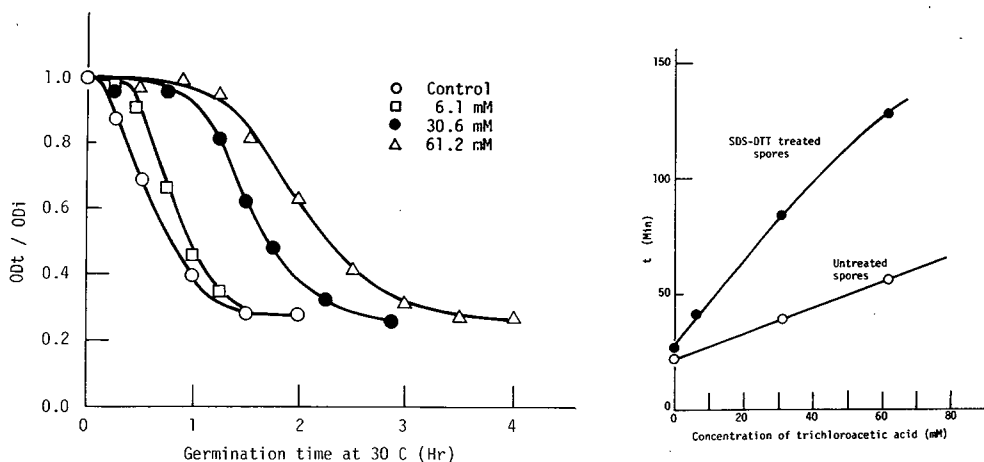


Fig. 23. Effect of the concentration of TCA-treatment on germinability of SDS-DTT-treated spores of *B. cereus* T. Germination was performed at 30 C in 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 8.0) containing 0.05 mM L-alanine and 0.05 mM inosine. SDS-DTT-treated spores were treated with TCA at the indicated concentrations at 30 C for 30 min. (a) Germination profiles; (b)  $t$  value.



Table 11.

Effect of TCA-treatment and subsequent heating on germination of SDS-DTT-treated spores of *B. cereus* T<sup>1</sup>

Spores	t-Value (Min)	
	Without lysozyme	With lysozyme
Control <sup>2</sup>	26.9	7.7
TCA-treated spores <sup>3</sup>	83.9	7.5
After heating <sup>4</sup>	26.0	

1. Germination was estimated by measuring a decrease in OD at 520 nm in 0.1 M sodium phosphate buffer containing 0.05 mM L-alanine and 0.05 mM inosine with or without lysozyme (200 µg/ml).

2. Spores were treated with 0.5 % SDS-10 mM DTT in 0.1 M NaCl at 37 °C for 2 hr.

3. TCA-treatment of spores was carried out with 30.6 mM TCA at 30 °C for 30 min.

4. TCA-treated spores were heated at 50 °C for 30 min.

これに関連して、リゾチームと Lysozyme substrate に TCA を作用させた結果、興味ある事実を見出した (Fig. 24)。リゾチーム分子の変性の可逆性については、すでに詳細な研究がある。それによると、pH やイオン強度、各種タンパク変性剤の作用などで変性し、酵素活性を失うが、変性の原因因子を除去すると復元し、活性の回復がみられる。著者は、リゾチームに TCA を作用させることによる酵素活性の低下、さらに、変性した酵素を加熱 (50 °C, 10 分) することによる活性の回復を認めた (Fig. 24)。一方、TCA には細菌細胞壁や外膜に作用し、ある種の多糖類を分離する作用があり、この作用は、基質であるペプチドグリカンの構造に影響を及ぼし、酵素に対する親和性を低下させることが考えられる。実際、基質に TCA を作用させるとリゾチームに対する反応量が減少した。この基質を加熱 (50 °C, 10 分) すると、活性は逆に低下し、熱変性が生じたことを示唆した。この結果から、Lysozyme substrate に対する TCA の作用は、リゾチームに対する場合と異なり、不可逆的変性を生じるものであることが判明した (Table 12)。

### 第3節 考察ならびに小结

#### (I) 考察

加熱活性化芽胞および ALA 活性化芽胞は休眠状態にある芽胞とは発芽始動物質に対する反応性 (state of readiness) が異なる (Fig. 21)。<sup>6)</sup> 両活性化芽胞はどちらも TCA の作用により脱活性化されたが、TCA に対する感受性において顕著な相違を示した (Fig. 22)。この相違は、TCA 濃度に対する値のプロットにおいて明瞭に示されている (Fig. 22b)。加熱活性化芽

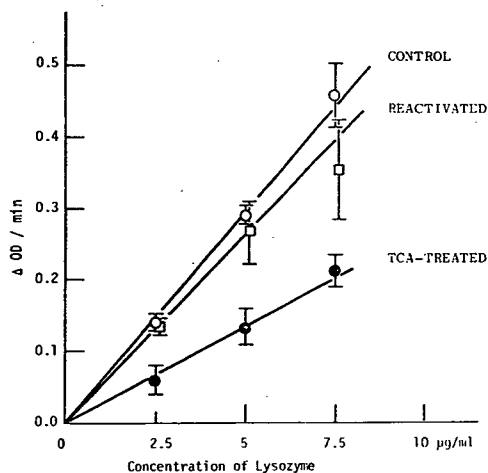


Fig. 24. Effect of TCA-treatment of egg white lysozyme on the activity. The enzyme was treated with 30.6 mM TCA at 40 C for 30 min. Lytic activity was determined by measuring decrease in OD at 520 nm of a suspension of *Micrococcus luteus* cells after the addition of the enzyme at the indicated concentration.

Table 12.

Effect of pretreatment with TCA on lysozyme-digestion against *Micrococcus luteus* cells<sup>1</sup>

Concn. of TCA (mM)	Before heating		After heating	
	V <sup>2</sup>	Extent <sup>3</sup>	V	Extent
Control	0.543±0.036 <sup>4</sup>	100.0 %	0.417±0.076	91.6±3.0 %
3.06	0.251±0.033	80.9±2.4	0.161±0.023	62.8±3.6
6.12	0.222±0.040	77.1±3.4	0.197±0.022	62.3±2.1
61.2	0.238±0.042	79.7±4.8	0.193±0.033	61.2±2.8

1. Lyophilized cells of *M. luteus* were treated with TCA at the indicated concentrations at 40 C for 30 min with or without subsequent heat-treatment at 50 C for 10 min. TCA-treated cells were suspended in 5 mM Tris-HCl (pH 8.0) to adjust an OD at 520 nm of 0.35. Lysozyme was added to the suspension (final concentration, 10 μg/ml), and the suspension was incubated at room temperature for 10 min. The rate and extent of lysozyme-digestion were estimated by measuring decrease in OD at 520 nm.

2. Initial velocity.

3. Extent of digestion after 10 min.

4. Mean ± standard deviation (P=0.05)

胞の $\theta$ 値のプロットは休眠芽胞のそれと同じ傾きをもつ直線を示したのに対して、ALA活性化芽胞の $\theta$ 値のプロットが示す直線の傾きは休眠芽胞のそれよりも大きい勾配を示した。これまで明らかにした事実によると、発芽機構に対するTCAの脱活性化作用は、芽胞の外殻構造の変化とそれに伴う透過性の変化により、発芽に必要な成分がプロトンの作用を受け変性することにより発現すると推論される。この見解に基づけば、上記の結果は、両活性化芽胞の外殻構造の違いを反映している。休眠芽胞と加熱活性化芽胞の傾きが等しいということは、両芽胞におけるTCA作用の発現が等価であり、つまり、TCAが加熱活性化芽胞に作用し効果を発現するためには、休眠芽胞と等価の外殻構造の変化が要求されることを示唆している。対称的に、ALA活性化芽胞に対するTCAの作用は、他の二種の芽胞よりも効果的であったが、これは、ALAの作用により、芽胞の外殻構造はすでに変化しており、TCAの作用においてその変化に対する要求が軽減されたことを示唆する。この見解は、SDS-DTT処理芽胞のTCAに対する感受性が加熱活性化芽胞よりもALA活性化芽胞に類似していたことから支持される。

Fig. 22 に示した結果は、芽胞の発芽活性化のメカニズムについて、いくつかの重要な手掛りを与えている。第1に、加熱活性化による芽胞の外殻構造の変化はALA活性化の場合と比較して顕著でなく、むしろ、休眠芽胞に近い状態であることが示唆された。第2に、加熱活性化芽胞と休眠芽胞がそれぞれ示す $\theta$ 値のプロットは等しい傾きをもつ直線を示したが、 $\theta$ 値は常に加熱活性化芽胞が休眠芽胞よりも小さい値を示した。これは、加熱活性化により生じた発芽始動物質に対する反応性の亢進がTCA作用後も維持されており、加熱により活性化される部位がTCAの作用部位と異なることを示唆している。第3に、ALAによる活性化は芽胞外殻構造に対してTCAアニオンの作用と同様の効果をもつことが示唆された。TCAは強酸性環境では、芽胞に対し脱活性化作用を示すが、中性～弱酸性の環境では逆に活性化作用を示した。TCAの脱活性化作用はTCAアニオンにより活性化された芽胞に対して高濃度の水素イオンが作用することにより発現すると推論される。したがって、芽胞外殻構造に対してALAによる活性化とTCAアニオンによる活性化が等価の効果を有するという考えは、ALA活性化芽胞に対するTCAの強い活性を旨く説明する。

コルテックス溶解酵素は比較的表層に局在<sup>6</sup>、生理的条件下で発芽には必要不可欠な成分のひとつである<sup>7,10,12,24</sup>。本酵素は単一の酵素ではなく、endo-N-acetylglucosaminidase と muramyl-L-alanine amidase という溶解活性をもつ酵素に加えて、D-alanine carboxypeptidase や N-acetylglucosamine deacetylase から成っている。あとの2種の酵素は溶解活性はないが、部分的な変

性を引き起こし、コルテックス溶解に際して補助的役割を果たすと考えられる。Hashimoto<sup>24</sup>は、本菌芽胞を85°C、30分加熱しても死滅しないが、本酵素活性は約50%低下し、発芽の完遂に支障をきたすこと、この支障は、本酵素やリゾチームの添加により回復することと明らかにしている。

TCA作用の標的の一つは、おそらくコルテックス溶解酵素であろうと思われる。前章では、TCA処理芽胞の発芽能の回復にリゾチームが効果がないことを示した。しかし、本菌芽胞は、本来、リゾチーム非感受性であり、この性質はTCA作用後も保持されていたことを考慮すると、この結果は、TCAの標的が本酵素であるとする可能性を排除する理由とはなり得ない。逆に、TCAの作用により発芽能の低下が一層助長されたSDS-DTT処理芽胞の発芽が、本酵素と類似した機能をもつリゾチームの添加により回復したという事実から、本酵素がTCAの標的である可能性が強く示唆された。

SDS-DTTの作用により、本菌芽胞は発芽能の低下を生じた。これは、この処理で芽胞全タンパク質の約20%が可溶化されたこととは無関係には考えられず、リゾチームの添加によりすみやかに発芽したと合わせて考慮すると、おそらくコルテックス溶解酵素が部分的に可溶化され酵素量が減少したためであろう<sup>7</sup>と推察される。

In vivoでのTCAの作用を裏付けるように、in vitroにおいて、リゾチームに対するTCAの作用は酵素活性の低下を生じた。TCA処理したリゾチームの活性は加熱により回復した。一方、Lysozyme substrateにTCAを作用させた結果、低濃度、低温での作用によりリゾチームに対する感受性を失い不可逆的変性を生じた。この結果は、芽胞に生じた変性が可逆的であったという事実と大きく異なる。Lysozyme substrateとして使用した *M. luteus* の細胞壁構造と芽胞におけるリゾチームの基質であるコルテックスペプチドグリカン構造の違いに基づく差<sup>17,83</sup>があると思われるが、いずれにしても、コルテックスペプチドグリカンはTCA耐性であるといえる。

コルテックス溶解酵素の活性は2価の金属イオンにより促進されることが報告されている<sup>82</sup>。したがって、芽胞表層に分布するカルシウムは、本酵素の活性発現に関与しているか、あるいはまた積極的に活性発現の調節機構の一員として機能しているのかもしれない。酸性条件下で芽胞を処理した場合に生じる発芽能の低下は表在性カルシウムの除去に起因した本酵素活性の低下に基づくという可能性は非常に大きい。しかしながら、すでに述べた理由から、TCAの作用による発芽能の低下をこのようなメカニズムで論じることができない。

TCAアニオンの作用により芽胞が活性化された状態にあるにもかかわらず、発芽が抑制されるということは、コルテックス溶解酵素活性の抑制が発芽を遅滞させることを示しており、休眠状態にある芽胞の活性化にはい

する発芽反応が、一連の連鎖反応であることを強く示唆する。この連鎖反応において、コレリックス溶解反応はごく初期の反応であるように思われる。

## (II) 小 括

1. 加熱活性化芽胞、ALA活性化芽胞に対するTCAの作用は休眠芽胞と同様に発芽遅延を生じた。TCAに対する両活性化芽胞の感受性を比較した結果、加熱活性化芽胞は活性化状態を維持しながら、休眠芽胞と等価の感受性を示した。一方、ALA活性化芽胞はより強い感受性を示した。
2. SDS-DTTの作用により、本菌芽胞はタンパク質の一部を失い、リゾチーム感受性に変化した。また、発芽能の低下を生じたが、依然、耐熱性を示した。SDS-DTT処理芽胞に対するTCAの作用は発芽能の低下を助長した。発芽能の低下はリゾチームの添加により回復した。
3. リゾチームに対するTCAの作用は活性の低下を生じた。これは加熱により回復した。

## 第6章 総括ならびに結論

### 第1節 総括

芽胞にとって発芽は栄養型細胞に変化するため、必ず経なければならぬ過程である。休眠状態にある芽胞は、呼吸活性や代謝活性がほとんど検出されず、発芽後、活性が上昇してはじめて検出される。そのため芽胞が新生細胞を形成する過程は、極めて単純化された細胞分化のモデルとして分子生物学分野における好個の研究対象となってきた<sup>20</sup>。一方、芽胞が休眠状態から脱却し発芽を始動するメカニズムは酵素反応説、アロステリック効果説<sup>17</sup>が提唱されているものの、その実体は依然として不明のままである。発芽始動物質認識部位の構造については、発芽始動活性を有する化合物としてよく知られたL-アラニンおよびその構造類似体の構造活性相関的研究<sup>87</sup>から、疎水性基、正と負に荷電した基に対応する構造であることが指摘され、疎水性部分については、最近、その重要性が証明された<sup>91</sup>。しかし、発芽始動のメカニズムは、ある種の芽胞ではイオンのみによる発芽が可能である<sup>19</sup>など、発芽を始動させる方法や、発芽始動活性を有する化合物の多種多様性がその解析を困難にしている。

発芽始動のメカニズムに関する研究方法は大きく次の二つに分けることができる。第1は、前出の発芽始動物質について構造活性相関を調べ、発芽始動物質認識部位の性格を明らかにする方法<sup>34, 36, 87, 90</sup>であり、第2は、化学的または物理的に変性させた芽胞について発芽の特徴を調べ、その処理により芽胞に生じた変化と対応させて検討することにより発芽機構の存在部位や発芽機構の活性化あるいは障害をうけた部位の機能を明確にする方法である<sup>9, 10, 12, 24, 27, 29, 59, 76, 77, 81</sup>。

発芽は、芽胞表面状態と密接な関係がある。これは、芽胞表面が、芽胞と発芽始動物質が最初に接触する部位であるというトポロジー的事実に加えて、発芽時に芽胞表面状態や構造が変化するという事実<sup>29, 50, 75</sup>と、この変化が発芽と深い関係があることを示唆するいくつかの証拠<sup>24, 77, 81</sup>から明白である。一方、芽胞の表層は、タンパク質に富む構造からなるスポアコートでおおわれている<sup>19</sup>。したがって、タンパク質変性剤を作用させることは、この部位を変性させ、発芽に影響を及ぼすものと考えられる。実際、TCAで処理した芽胞について、発芽に対する影響を検討した結果、生存率と相なぬ条件で異常に低い発芽率を示した。そして、この原因は、発芽遅延が生じたためであることが判明した。

TCAは強酸であり、タンパク質の変性剤としてよく知られた化合物

である。TCA分子のトリクロルメチレン基は強い電子吸引性を示し、そのため、TCAの解離性は非常に高く(pKa 1.0以下)、強力な水素イオン供与体である。また、水素結合に対する攻撃性に富み、第四級アンモニウム塩とイオンペアを形成するといった性質がある<sup>31,42</sup>。そこで著者は、このようなTCAの化学的性質を根拠として、TCAの作用により芽胞に生じた変化を明らかにし、発芽機構との関係を検討することにより、発芽始動メカニズムに関する考察を試みた。

生存率を損なうことなく発芽遅延を生じる条件下での芽胞に対するTCAの作用は、熱、化学薬品に対する抵抗性の劣弱化やDPA保持能力の低下を生じた。また、SDS-DTTで処理した芽胞はリゾチーム感受性を示すことが報告されている<sup>32</sup>が、TCAで処理した芽胞では塩酸や水酸化ナトリウムといった低分子化合物に対する抵抗性は低下したものの、リゾチームやトリプシン、プロテアーゼに対する感受性は認められなかった。これによって、TCA処理による芽胞外殻構造の透過性の変化、すなわち、permeability barrierの崩壊の程度が察知できよう。

発芽機構に対するTCAの作用のキネティクスに関する研究から、TCAの作用は濃度、作用温度、および接触時間依存性であり、そのうえ、pH 3.0以下(TCA, 61.2 mM)という強酸性条件を必要とすること、さらに、 $4.0 \times 10^4$  cal/moleという高分子化合物の変性<sup>33,34</sup>を示唆する活性化エネルギー値を示すことが判明した。TCAの作用発現が認められるpH域において、塩酸や酢酸は効果がなく、TCAアニオンの存在が必要であり、しかも、TCA構造類似体の構造と活性との相関から、TCA分子の構造のなかで、電子吸引性基が重要な役割を演じていることが示された。

熱重量分析および分析中の各昇温段階における試料のIRスペクトル解析や熱分解ガスクロマトグラムの結果から、TCAが芽胞に結合することが判明した。一方、TCAの作用により芽胞に生じた性状の変化はいずれも芽胞に作用させたTCAの濃度に対応して発現したが、TCA処理芽胞の化学組成には、TCA濃度に対するそのような関係を見出すことができなかった。

以上の結果は、TCAの作用による発芽機構の機能低下が、発芽機構構成要素の欠除により生じたのではなく、機能部位における立体構造の変化により生じたものであることを示唆している。低下した機能が、外因性物質の添加を必要とせず、単に加熱処理のみにより容易に回復したという事実がこのことを裏付けている。

TCA処理の効果に対するpHの影響は、弱酸性から中性領域にかけて、TCAが発芽遅延現象を惹起する能力がないことを示した。逆に、強酸性領域であっても、TCA不在条件下では、芽胞の発芽能は正常であった。また、中和したTCAと塩酸を用いて、その作用順序の影響を検討した結果、はじめ

に中和したTCAを作用させ、次に塩酸を作用させた場合、発芽遲延現象が発現したが、その逆の場合では発現しなかった。この結果は、TCAアニオンと高濃度の水素イオンとの協同効果による発芽機構の機能低下が、次のような一連の反応を経て生じることを示している。すなわち、TCAアニオン（部分的には高い水素イオン濃度の効果による寄与も無視できない）が、まず、スボアコートのタンパク質に作用し、これに結合することにより、そのconformationに影響を及ぼし、その結果、スボアコートにおける透過性が増大し、高濃度の水素イオンをはじめとする低分子化合物に対する抵抗性が低下する。塩酸や水酸化ナトリウムに対する感受性の増大は、これを如実に反映したものであろう。このような状態の芽胞に、TCAが解離して生じた高濃度の水素イオンが作用し、発芽機構の機能低下を生じるに至るものといえる。

芽胞をSDS-DTTで処理すると、芽胞は約14%のタンパク質を失い、リゾチーム感受性に変化した。SDS-DTTで処理した芽胞にTCAを作用させると、未処理芽胞よりも強く反応し、発芽遲延を生じた。この場合もやはり加熱処理による発芽能の回復が認められたことから、未処理芽胞とSDS-DTT処理芽胞に対するTCA処理の結果、発現する発芽遲延のメカニズムは、本質的に同一であると考えられる。

リゾチーム存在下に、SDS-DTT処理芽胞はTCA処理の有無に関係なく、すみやかに発芽した。この事実は、TCAの作用により生じた発芽機構の低下した機能が、リゾチームにより補償されたことを意味している。リゾチームの作用部位はコルテックスペアチドグリカンであり<sup>23</sup>、芽胞の発芽に伴い、コルテックス溶解酵素により、この高分子構造は分解される<sup>24,27,30</sup>。したがって、低下した機能がリゾチームの添加により補償されたということは、TCA（実際は高濃度の水素イオン）の作用がコルテックス溶解酵素に対するものであることを示唆している。In vitroで、リゾチームにTCAを作用させた結果、酵素の反応速度が低下し、この活性の低下が加熱により回復したという事実はこれを支持する。一方、基質であるM. luteus細胞をTCA処理すると、リゾチームに対する親和性の低下が生じ、加熱処理はこの傾向をさらに助長した。

TCAの作用に関する以上の成績および見解に基づき、活性化状態の異なる芽胞にTCAを作用させることにより、活性化のメカニズムに関して、興味ある知見を得た。すなわち、加熱活性化芽胞はTCAの作用に対して未処理芽胞と同様な感受性を示したが、ALA活性化芽胞は強く反応し、急激に発芽能を失った。これは、加熱活性化芽胞の外殻構造がTCAとの反応に関与するかわり、未処理芽胞のそれに近い状態にあり、ALA活性化芽胞では、ALAの作用により、すでに外殻構造に変化が生じていることを示唆している。



ALA活性化芽胞の高い感受性は、TCAアニオンによる外殻構造への作用の必要度の低下に伴い、TCAの作用は主として高濃度の水素イオンの作用に帰せられることによるものと推察される。これは、活性化と外殻構造との関係を示した点で活性化のメカニズム解明への重要な手掛りを与えていると思われ、興味をもたれる現象である。

TCAの作用条件を操作することにより、発芽始動が遅延したり、極端な場合は停滞するという事実、加熱処理により容易に正常に復するという事実に加えて、活性化状態にある芽胞に対してまで（加熱活性化芽胞は活性化状態を維持しつつ）発芽遅延、すなわち、発芽始動機構の機能低下と生じたことは、コルテックス溶解酵素活性の制御が芽胞の休眠と発芽の境界を制御していると推察され、不活性型から活性型への転換が trigger

reaction である可能性が極めて強く、今後さらに検討すべき問題と考えられる。

## 第2節 結 論

芽胞の発芽機構、とくに、その始動機構の追跡、解明への接近を企図して、TCAの化学的性質をよりどころにし、TCA処理を中心とした種々の熱、化学的および酵素的処理により芽胞に生じた変化を明らかにし、発芽機構との関係を検討した。

1. 芽胞にTCAを40℃（30分）で作用させた結果、6.2mM以上では殺菌作用が濃度の増加とともに強くなった。6.2mM以下では殺菌作用はほとんど認められず、発芽遅延、熱および化学薬品に対する抵抗性の低下、DPA保持能力の低下の割合がTCA濃度の増加とともに増大した。
2. TCAの作用による発芽遅延の程度はTCAの濃度、作用温度および接触時間に依存しており、またpH 3.0以下の強酸性環境を要求した。しかし、酸性条件のみが満足されても十分でなく、TCAアニオンの存在が必要であり、その作用は、第1にTCAアニオン、次いで高濃度の水素イオンという逐次的作用でTCAアニオンの作用は $\text{CCl}_3$ -基の電子吸引性に基づくものであることが判明した。
3. 芽胞に対するTCAの作用は、化学組成の量的変化よりもconformationに変化を生じる質的变化が主であり、この変化はTCAの結合により生じることが判明した。なお、この結合は加熱により解離することが判明した。
4. TCAの作用により低下した発芽能は加熱、またはリゾチームの添加

により回復した。

5. TCA の作用に対する加熱活性化芽胞の感受性は、未処理芽胞とほぼ等価であったが、ALA 活性化芽胞は著しく強い感受性を示した。

## 謝 辞

本研究に当り 常に暖かい御指導と御鞭撻を賜りました  
恩師 徳島大学 谷 勇教授に深謝します。

また、本研究に際し終始御懇篤なる御指導と御鞭撻を賜わつ  
た大阪大学近藤雅臣教授に衷心より感謝の意を表します。

研究途上有益な御助言をいただきました徳島大学樋口富彦  
助教授、山下伸典助教授、西田幹夫助教授、大阪大学市川富  
夫助教授、西原力助手、渡部一仁助手に深く感謝致します。

また、本研究の実験に協力していただいた徳島大学薬学部  
微生物薬品化学教室の諸氏に深く感謝します。

## 参考文献

1. Alderton, G., and Snell, N. S. 1963. Biochem. Biophys. Res. commun. 10:139
2. 宇藤芳明 1976. 日細菌誌 31:713
3. Brambl, R., and Handschin, B. 1976. Arch. Biochem. Biophys. 195:606
4. Brinkmann, K. 1976. Planta(Berl.) 129:221
5. Brown, M. R. W., and Melling, J. 1968. Biochem. J. 106:44
6. Brown, W. C., and Cuhel, R. L. 1975. J. Gen. Micro. 91:429
7. Brown, W. C., Cuhel, R. L., and Greer, C. 1977. Spore Research 1976, Vol. I.:335
8. Busta, F. F., and Ordal, Z. J. 1964. J. Food Sci. 29:345
9. Carran, H. R., and Evans, F. R. 1945. J. Bacteriol. 49:335
10. Cassier, M., and Sebald, M. 1969. Ann. Inst. Pasteur 117:312
11. Church, B. D., and Halvorson, H. 1959. Nature 183:124
12. Duncan, C. L., Labbe, R. G., and Reich, R. R. 1972. J. Bacteriol. 109:550
13. Foerster, H. F. 1972. J. Bacteriol. 111:437
14. Foerster, H. F., and Foster, J. W. 1966. J. Bacteriol. 91:1168
15. Germain, G. R., and Murrell, W. G. 1974. J. Bacteriol. 118:202
16. Gould, G. W. 1970. J. Gen. Microbiol. 64:289
17. Gould, G. W. 1977. J. Appl. Bacteriol. 42:297
18. Gould, G. W., and Hitchins, A. D. 1963. J. Gen. Microbiol. 33:413
19. Gould, G. W., and Hurst, A. 1969. The Bacterial Spore, Academic Press, London
20. 蜂須賀養悅, 堀越弘毅, 1976. 耐久型細胞. 岩波書店
21. Hanson, R. S., Curry, M. V., and Garner, J. V. 1972. Can. J. Microbiol. 18:1139
22. Harrell, W. K., and Mantini, E. 1957. Can. J. Microbiol. 3:735
23. Hashimoto, T., Frieben, W. R., and Conti, S. F. 1969. J. Bacteriol. 98:1011
24. Hashimoto, T., Frieben, W. R., and Conti, S. F. 1972. Spores V:409
25. 林勝哉, 井本泰治, 1974, リソソーム, 南江堂
26. Herbert, D., Phipps, P. J., and Strange, R. E. 1971. Methods in Microbiology Vol. 5B:209, Academic Press, London
27. Holmes, P. K., and Levinson, H. S. 1967. Curr. Mod. Biol. 1:256
28. Holmes, P. K., Nags, E. H., and Levinson, H. S. 1965. J. Bacteriol. 90:827
29. Hsieh, L. K., and Vary, J. C. 1975. Spores VI:465
30. Hyatt, M. T., and Levinson, H. S. 1966. J. Bacteriol. 91:1811
31. Irwin, G. M., Kostenbauder, H. B., Dittert, L. W., Staples, R., Misher, A., and Swintosky, J. V. 1969. J. Pharm. Sci. 58:313
32. Issahary, G., Evenchik, Z., and Keynan, A. 1970. J. Bacteriol. 101:418
33. Janssen, F. W., Lund, A. J., and Anderson, L. E. 1958. Science 127:26

34. Jones, A., and Gould, G. W. 1968. J. Gen. Microbiol. 53:383
35. 神戸博太郎, 1975. 熱分析, 講談社
36. 川崎近太郎, 近藤雅臣, 平島邦和, 1967. 食衛誌 8:207
37. Keynan, A., Issahary-Brand, G., and Evenchik, Z. 1965. Spores III:180
38. Kondo, M., and Foster, J. W. 1967. J. Gen. Microbiol. 47:257
39. 近藤雅臣, 西原力, 1970. 日細菌誌 25:278
40. Leanz, G. and Gillerg, C. 1973. J. Bacteriol. 114:455
41. Levinson, H. S., and Hyatt, M. T. 1969. Biochem. Biophys. Res. Commun. 37:909
42. Levinson, H. S., Hyatt, M. T., and Moore, F. E. 1961. Biochem. Biophys. Res. Commun. 5:417
43. Lewis, J. C. 1972. J. Biol. Chem. 247:1861
44. Lewis, J. C., Snell, N. S., and Alderton, G. 1965. Spores III:47
45. 水島三一郎, 島田武彦, 1958. 赤外吸収とラマン効果, 玄立出版
46. Mrosczczak, E. J., Vallner, J., and Perrin, J. H. 1969. J. Pharm. Sci. 58:1567
47. Nakajima, A., and Hayashi, T. 1968. Bull. Chem. Res. Kyoto Univ. 46:62
48. Newburger, J., and Kostenbauder, H. B. 1977. Life Sci. 20:627
49. 日本公定書協会, 1976. 第九改正日本薬局方註解, 広川書店
50. 西原力, 1970. 日細菌誌 25:285
51. 西原力, 森本節子, 市川富夫, 近藤雅臣, 1979. 日細菌誌 34:278
52. Norris, K. P., and Greenstreet, J. E. S. 1958. J. Gen. Microbiol. 19:566
53. Powell, J. F. 1950. J. Gen. Microbiol. 4:330
54. Powell, J. F. 1957. J. Appl. Bacteriol. 20:349
55. Robinson, O. R., and Jencks, W. P. 1965. J. Am. Chem. Soc. 87:2470
56. Rode, L. J., and Foster, J. W. 1962. Nature 194:1300
57. Rode, L. J., and Foster, J. W. 1966. J. Bacteriol. 91:1582
58. Randle, C. J. M., and Morgan, W. T. J. 1955. Biochem. J. 61:586
59. Rowley, D. B., and Levinson, H. S. 1967. J. Bacteriol. 93:1017
60. Russell, A. D., and Loosemore, M. 1964. Appl. Microbiol. 12:403
61. Sacks, L. E. 1972. Spores V:437
62. 相良和子, 1976. 四国医誌 32:9
63. Scherrer, R., and Gerhardt, P. 1972. J. Bacteriol. 112:559
64. Shibata, H., Minami, M., Takamatsu, H., and Tani, I. 1978. Microbiol. Immunol. 22:443
65. Shibata, H., Takamatsu, H., and Tani, I. 1976. Jap. J. Microbiol. 20:529
66. Shibata, H., Takamatsu, H., and Tani, I. 1978. Microbiol. Immunol. 22:123
67. Sizer, I. W. 1943. Adv. Enzymol. 3:35
68. Stanier, R. Y., Doudoroff, M., and Adelberg, E. A. 1957. The Microbial World, Prentice-Hall Inc., New York ( 奈良江工, 岡本, 川崎, 正木, 増井, 共訳, 一般微生物学 朝倉書店 )
69. Stearn, A. E. 1949. Adv. Enzymol. 9:25
70. Sutherland, I. W., and Wilkinson, J. F. 1971. Methods in Microbiology 5B:345, Academic Press, London
71. 心算, 松村和子, 兼任恵彬, 柴田洋文, 1971. 日細菌誌 26:392
72. 谷勇, 相良和子, 柴田洋文, 1975. 日細菌誌 30:495

73. 谷 勇, 柴田洋文, 高木洋文, 多田新一. 1974. 日細菌誌, 29:106
74. Thomas, S., and Russell, A. D. 1974. J. Appl. Bacteriol. 37:83
75. Tochikubo, K., Kojima, K., and Hachisuka, Y. 1975. Spores VI:526
76. Ueno, A., Kametaka, S., Nishihara, T., Ichikawa, T., and Kondo, M. 1978. Spores VII:109
77. Vary, J. C. 1973. J. Bacteriol. 116:797
78. Vary, J. C., and Halvorson, H. O. J. Bacteriol. 95:1327
79. Vary, J. C., and McCormick, N. G. 1965. Spores IV:188
80. Verma, M. R., Bhuchar, V. M., and Theratill, K. J. 1957. Nature 179:1244
81. Waites, W. M., Wyatt, L. R., and Arthur, B. 1972. Spores V:430
82. Warth, A. D. 1972. Spores V:29
83. Warth, A. D., Ohye, D. F., and Murrell, W. G. 1963. J. Cell. Biol. 16:593
84. 渡部一仁, 細菌芽胞の発芽機構に関する基礎的研究, 大阪大学
85. Wilson, G. S., and Miles, A. 1975. Principles of Bacteriology, Virology, and Immunity, 6th Ed., Vol. I, Edward Arnold Ltd., London
86. Wise, J., Swanson, A., and Halvorson, H. O. 1967. J. Bacteriol. 94:2075
87. Woese, C. R., Morowitz, H. J., and Hutchinson, III, C. A. 1958. J. Bacteriol. 76:578
88. Woese, C. R., Vary, J. C., and Halvorson, H. O. 1968. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. 59:869
89. Yamashita, S., and Yamashita, T. 1975. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. 72:941
90. Yasuda-Yasaki, Y., Namiki-Kanie, S., and Hachisuka, Y. 1978. J. Bacteriol. 136:484
91. Zytkevich, T. H., and Halvorson, H. O. 1972. Spores V:49

主論文別刷

## Effect of Trichloroacetic Acid Treatment on Certain Properties of Spores of *Bacillus cereus* T

Hirofumi SHIBATA,\* Michiko UCHIDA, Hiroko HAYASHI,  
and Isamu TANI

\*Department of Microbial Chemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences,  
University of Tokushima, Tokushima

(Received for publication, September 11, 1978)

**Abstract** Spores of *Bacillus cereus* T treated with trichloroacetic acid (6.1-61.2 mM) were compared with untreated spores, and as the concentration of the chemical increased, the following alterations in spore properties were found: (1) the extent of germination decreased irrespective of the germination medium used; (2) the spores became sensitive to sodium hydroxide (1 N) and hydrochloric acid (0.27 N), but not to lysozyme (200  $\mu$ g/ml); (3) loss of dipicolinate increased on subsequent heating; and (4) the spores became more sensitive to heat. However, trichloroacetic acid-treated spores were still viable and there was no significant change in spore components. The mechanism of action of trichloroacetic acid is discussed.

Certain properties of bacterial spores are modified without loss of viability by alteration of the spore structure on treatment with various chemical agents. Waites et al (27) found that alkali treatment of spores altered their quantitative and qualitative requirements for induction of germination, and decreased the electron density of the spore coats but had no effect on protoplasts. Gould and Hitchins (6) found that spores became sensitive to lysozyme when pretreated with thioglycolate at pH 3, and suggested that resistance of spores to the lytic enzyme was due to the impermeability of the coat to this protein. Keynan et al (13) found that exposure of spores to extreme pH values activated dormant spores, and Brown and Melling (5) demonstrated that similar treatment released dipicolinic acid (DPA) from spores and affected the dormancy of the spores. There are several reports that exposure of spores to an acid environment with (22) or without (1, 16, 19) a reducing agent resulted in loss of ions essential for dormancy (16), for resistance to heat (1, 22), and for germinability (19, 22).

Trichloroacetic acid (TCA) is a strong acid with a  $pK_a$  value of less than 1, and aqueous TCA at various concentrations is used for extracting various cellular components from cells and cell debris (23). Warth et al (28) found that hot TCA released hexosamine from spore integuments. However, little is known about the effect of TCA on intact bacterial spores. The present paper reports that exposure of *Bacillus cereus* T spores to TCA changed their viability, germinability, and resistance to heat and to chemicals.



## MATERIALS AND METHODS

*Spore preparation.* Spores of *B. cereus* T harvested from G medium (8, 24) were washed repeatedly with centrifugation at 4 C, lyophilized, and stored in a desiccator.

*Treatment of spores with TCA.* Aqueous solutions of TCA were prepared just before use. Lyophilized spores (20 mg) were treated with 30 ml of various concentrations of TCA for 30 min at 40 C, washed once with 30 ml of chilled deionized water with centrifugation, resuspended in 5 ml of deionized water, and lyophilized.

*Viable counting procedure.* The viability of treated and control spores was determined by measuring colony-forming ability. For this, appropriately diluted samples (0.1 ml) were plated on nutrient agar (Difco), and after 24 hr incubation at 30 C, colonies were counted.

*Germination.* Treated and control spores (0.5 mg) were suspended in 5 ml of germination medium and incubated at 30 C for 2 hr. The germination media used were nutrient broth (Difco) containing 100  $\mu$ g/ml of chloramphenicol (P-L Biochemicals), 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 8.0) containing 0.05 mM L-alanine and 0.05 mM inosine (Kohjin), and the same buffer containing 0.5 mM concentrations of the two compounds. Germination was measured as a decrease in optical density (OD) of the spore suspension at 520 nm in a Coleman Junior II spectrophotometer, model 6/20. The extent of germination was calculated as  $[1 - (OD_2/OD_i)]$ , where  $OD_i$  is the initial OD and  $OD_2$  is the value after 2 hr incubation, and the value for treated spores was expressed as a percentage of that for control spores.

*Resistance to chemicals.* Treated and control spores (1 mg) were suspended in 10 ml of aqueous sodium hydroxide (1 or 2 N) or hydrochloric acid (0.27 N), or in 10 ml of the phosphate buffer containing 200  $\mu$ g/ml of lysozyme (Seikagaku Kogyo). The suspensions were incubated at 30 C for 2 hr, and then centrifuged (15,000 rpm for 2 min). The precipitate was resuspended in deionized water and adjusted to an OD of about 0.25, and their viability was measured as described above. Enzyme sensitivity was also tested by measuring the decrease in OD of the suspension at 520 nm.

*DPA release.* DPA release on heating was estimated as follows. Treated and control spores (1 mg) were suspended in 10 ml of deionized water and heated at 80, 85, 90, 95, or 100 C for 15 min. The spores were removed by centrifugation (10,000 rpm for 15 min) and the amount of DPA in the supernatant fluid was estimated by measuring the absorption at 270 nm in a Union High Sensitivity Split-beam spectrophotometer, model SM-401, using cuvettes of a 1-cm light path. The value was then deduced from a standard curve prepared using 0–15  $\mu$ g DPA (Sigma) /ml. The precipitated spores were resuspended in deionized water and their viability was measured.

*Chemical analyses.* The protein content of spores was estimated by the method of Herbert et al (9); the hexosamine content was measured by the method of Rondle and Morgan (21) after acid hydrolysis with 6 N hydrochloric acid at 100 C for 15 hr; and the DPA content was measured by the method of Janssen et al (11).

*Chemicals.* Unless otherwise indicated, TCA and other chemicals were purchased from Wako Pure Chemical Industries Ltd. Yeast extract was from Difco Laboratories.

## RESULTS

### *Colony Formation of Spores Treated with TCA*

Results concerning colony formation of spores on nutrient agar, after treatment with various concentrations of TCA, are given in Table 1. Treatment with 6.1–45.9 mM TCA had no effect on the colony forming ability of spores. However,

Table 1. Effect of treatment of *B. cereus* T spores with TCA on colony formation on nutrient agar<sup>a)</sup>

Concn. of TCA	No. of survivors
Control	$2.58 \times 10^8$ /mg spores
15.3 mM	2.45
30.6	2.38
45.9	2.39
61.2	1.64

<sup>a)</sup> Spores were treated with TCA at the indicated concentrations at 40 C for 30 min.

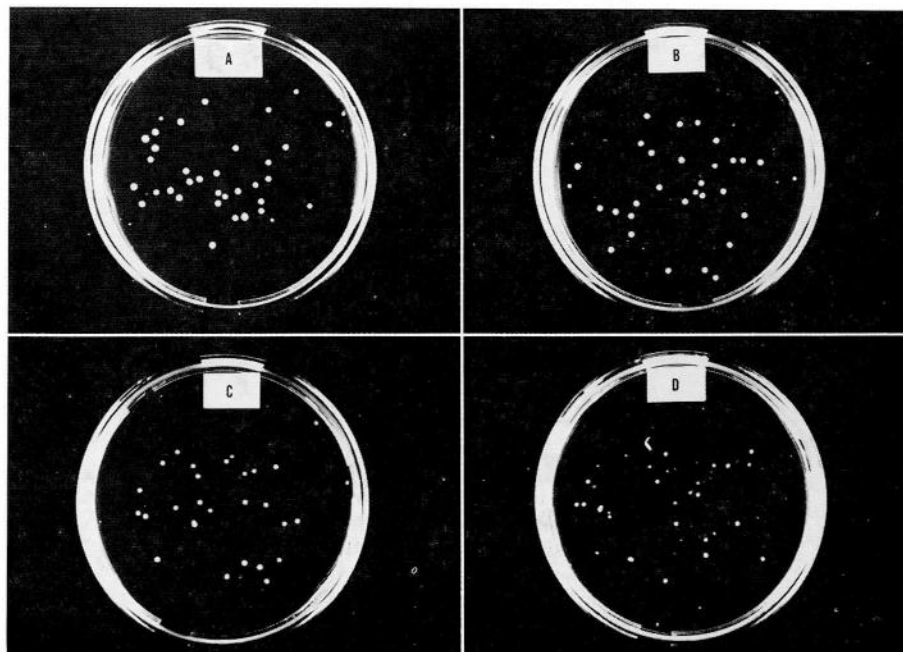


Fig. 1. Effect of treatment of *B. cereus* T spores with TCA on colony development on nutrient agar. Control spores (A) and spores treated with TCA at 6.1 (B), 30.6 (C), and 61.2 mM (D) at 40 C for 30 min were incubated on nutrient agar at 30 C for 24 hr.

treatment with 61.2 mM TCA slowed down the development to normal colonies and partially inhibited colony formation. During the following 24 hr incubation, no colonies were newly formed. Typical profiles of colony development of TCA-treated and control spores after 24 hr incubation are shown in Fig. 1. Spores treated with 6.1 or 30.6 mM TCA formed normal colonies, but spores treated with 61.2 mM TCA formed small colonies of various sizes.

#### *Germination of TCA-Treated Spores*

Figure 2 shows the relation between the extent of germination of TCA-treated spores and the concentration of TCA. The extent of germination decreased with increase in TCA concentration of more than 15.3 mM. Spores treated with 61.2 mM TCA did not germinate within 2 hr. The decrease in the extent of germination was not affected by the type of germination medium used.

Since the pH range of the TCA solution used was from 1.3 to 2.3, the observed effect might be due simply to the pH, i.e. the proton concentration but not to the overall acid concentration, during TCA-treatment.

Table 2 shows the extent of germination of spores treated with TCA at different pH values. The pH values indicated were adjusted by titration with sodium

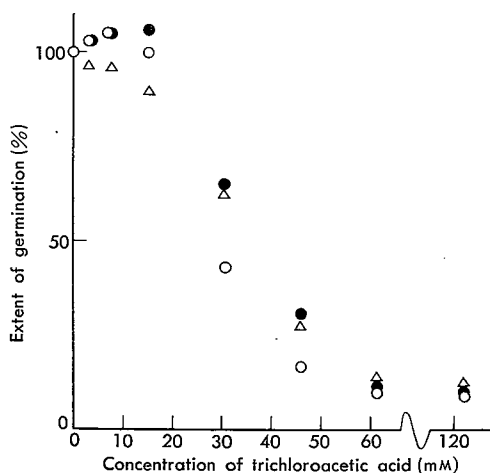


Fig. 2. Effect of treatment of *B. cereus* T spores with TCA on germination. Spores were treated with TCA at the indicated concentrations at 40 C for 30 min. Then, germination of treated and control spores was estimated by incubation at 30 C for 2 hr in the following germination media: O, 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 8.0) containing 0.05 mM L-alanine and 0.05 mM inosine; ●, buffer containing both compounds at 0.5 mM; Δ, nutrient broth containing 100 μg/ml of chloramphenicol.

Table 2. Effect of pH during treatment of *B. cereus* T spores with TCA on germination

pH <sup>a)</sup>	Concn. of TCA	Extent of <sup>b)</sup> germination
1.6	0 mM	100.0%
	30.6	42.9
2.0	15.3	100.0
	61.2	29.8
3.0	61.2	100.0

<sup>a)</sup> The pH values indicated were adjusted by titration with sodium hydroxide or hydrochloric acid.

<sup>b)</sup> Germination of treated spores was estimated by incubation at 30 C for 2 hr in 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 8.0) containing 0.05 mM L-alanine and 0.05 mM inosine.

hydroxide or hydrochloric acid. Low pH-treatment tested without TCA had no effect on germinability of spores, whereas treatment with TCA (30.6 mM, pH 1.6) caused reduction in the extent of their germination. At pH 2.0, treatment of spores with 15.3 mM TCA did not affect their germination, whereas treatment with 61.2 mM TCA caused marked reduction in the extent of germination. At pH 3.0, 61.2 mM TCA also had no effect on germinability of spores.

#### Resistance to Chemicals

Results concerning the resistance of TCA-treated and control spores to various chemicals are summarized in Table 3. Spores treated with 6.1 mM TCA, as well as control spores, were resistant to both 1 N sodium hydroxide and 0.27 N hydrochloric acid, whereas spores treated with 30.6 mM TCA were not resistant to 1 N sodium hydroxide and spores treated with 61.2 mM TCA lost their resistance to both chemicals. TCA-treated and control spores were not resistant to 2 N sodium hydroxide.

Table 3. Effect of chemical agents on TCA-treated and control spores of *B. cereus* T

Chemical	Control spores	Spores treated with TCA at		
		6.1 mM	30.6 mM	61.2 mM
NaOH 1 N	— <sup>a)</sup>	—	+ <sup>b)</sup>	+
2 N	+	+	+	+
HCl 0.27 N	—	—	—	+
Lysozyme 200 µg/ml <sup>c)</sup>	—	—	—	—

<sup>a)</sup> Insensitive.

<sup>b)</sup> Sensitive. The colony count after treatment with the chemical was less than one tenth of those of the corresponding TCA-treated and control spores before treatment.

<sup>c)</sup> Enzyme sensitivity was tested by the decrease in OD of the suspension at 520 nm during treatment of TCA-treated and control spores with the enzyme.

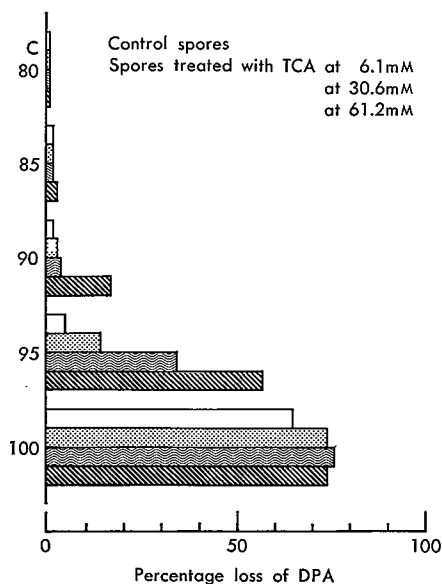


Fig. 3. Loss of DPA from TCA-treated and control spores of *B. cereus* T by heating. Heating was carried out for 15 min at the indicated temperatures.

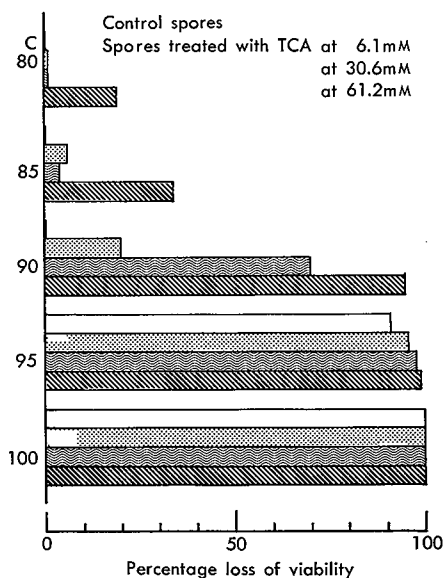


Fig. 4. Effect of treatment of spores of *B. cereus* T with TCA on their heat-sensitivity. Spores were heated as described for Fig. 3.

The effect of lysozyme on spores treated with TCA was also studied. Treatment with TCA had no effect on the sensitivity of spores to the enzyme.

#### *Release of DPA and Loss of Viability by Heating*

Figure 3 shows the effect of temperature on the release of DPA from TCA-treated and control spores. At 90°C, spores treated with 61.2 mM TCA lost some DPA, but spores treated with lower concentrations of TCA did not lose DPA. At 95°C, the degree of loss of DPA increased with increases in the concentration of TCA used in treatment of the spores. At 100°C, all spores lost a lot of DPA, irrespective of whether or not they had been treated with TCA.

The heat-sensitivity of TCA-treated spores was also examined. As shown in Fig. 4, TCA-treatment increased the heat-sensitivity of the spores.

Table 4. Protein, hexosamine, and DPA contents of TCA-treated and control spores of *B. cereus* T

Spores	Protein	Hexosamine	DPA
Control spores	66.5 <sup>a)</sup>	6.9 <sup>a)</sup>	10.4 <sup>a)</sup>
Spores treated with 6.1 mM TCA	58.5	6.7	10.6
Spores treated with 30.6 mM TCA	57.5	6.8	10.5
Spores treated with 61.2 mM TCA	57.8	6.7	10.0

<sup>a)</sup> Contents are shown as percentages of the dry weight of the spores.

*Contents of Protein, Hexosamine, and DPA*

The contents of various components in control spores and spores treated with 6.1, 30.6, and 61.2 mM TCA were determined. The protein in spores treated with 6.1–61.2 mM TCA was 8–9 per cent less than that of control spores. TCA-treatment did not affect the hexosamine content, but treatment with 61.2 mM TCA caused slight loss of DPA. The results are summarized in Table 4. Although there were slight differences in the values for control and TCA-treated spores, the results show that TCA had little effect on the contents of these components.

## DISCUSSION

In this work, TCA-treatment was found to cause marked alterations in spore germinability (Fig. 2) and resistance to chemicals (Table 3) and to heat (Fig. 4). However, despite these alterations in the properties of spores, TCA-treatment caused no significant change in spore components (Table 4).

A progressive decrease in the extent of germination was observed in spores treated with TCA at increasing concentrations of 15.3 to 61.2 mM, irrespective of the germination medium used (Fig. 2). This effect of TCA depended on its anion concentration rather than on the proton concentration (Table 2). Spores treated with 61.2 mM TCA did not germinate within 2 hr. However, after this treatment a considerable proportion of the spores was still viable (Table 1), indicating that they retained the ability to germinate and to develop further. Therefore, this result indicates that a decrease in the extent of germination of TCA-treated spores resulted from retardation of germination but not from loss of germinability. This possibility is supported by the finding that colony development was delayed by treatment of spores with 61.2 mM TCA.

It has been reported that an acid environment results in activation of spores, with (5) or without (13) loss of DPA. On the other hand, treatment with glutaraldehyde inhibited germination of *Bacillus pumilus* spores and reduced the degree of DPA loss on subsequent heating at 100 C for 10 min (25). In contrast, treatment of *B. cereus* T spores with TCA (in this work) deactivated them for germination but increased the degree of DPA loss on subsequent heating at 95 C for 15 min.

Treatment with TCA also increased the sensitivity of spores to chemical agents (Table 3) and heat (Fig. 4). It is thought that the spore coats protect spores against lysis and killing by chemical agents or lytic enzymes (2, 6, 7, 14, 27, 29). Studies on the ultrastructure of spores treated with various chemicals demonstrated modification of the coats leading to disruption of normal permeability barriers (15, 20, 26); moreover, disintegration of the coats resulted in inactivation of the spores (18). It is likely, therefore, that some denaturation of the coats by TCA resulted in increased sensitivity to chemical agents, but after this denaturation of the coats, the spores were still resistant to lysozyme (Table 3), indicating that they were still impermeable to the macromolecule. This assumption is supported by the finding that TCA denatured an outer cell membrane of *Euglena gracilis*, thus increasing the penetration of the acid into the cells (4).

Exposure of spores to an acid environment resulted in a loss of ions essential for dormancy (16), for resistance to heat (1, 22), and for germinability (19, 22). In this regard, although it has not been investigated it is likely that removal of certain ions by treatment of spores with TCA increases their heat-sensitivity. With the reduction in the germinability of spores treated with TCA, however, this assumption is not applicable because spores exposed to an acid environment retained their ability to germinate in a phosphate buffer (pH 8.0) containing L-alanine and inosine (19).

TCA and related compounds are known to denature proteins and to dissociate many proteins into monomers. For example, a helix-coil transition of polypeptides was attributed to the action of TCA (17) or dichloroacetic acid (12, 17), and the  $\alpha$ -helical conformation of a fibrous polypeptide was converted to a  $\beta$ -conformation by treatment with trifluoroacetic acid (30). Brambl and Handschin (3) demonstrated that treatment of intact mitochondria with TCA before extraction with detergent caused conversion of higher molecular weight components to lower molecular forms.

Low pH values are known to alter the tertiary structure of proteins, and Keynan et al (13) have shown that *B. cereus* spores, heated at pH 1 for increasing periods of time in excess of 20 min, rapidly lost their ability to germinate with L-alanine plus adenosine, but were not killed. Holmes et al (10) have pointed out the possibility that a spore component, essential to L-alanine plus adenosine-induced germination of *B. cereus* spores, was heat-sensitive at low pH values.

TCA itself has two different properties: it is a strong proton donor and it is a lipophilic acid anion. Brinkmann (4) suggested that the anion of TCA interacts with an outer cell membrane and then the proton diffuses through the denatured membrane to kill the cell. Hence, it is proposed that the alterations in the properties of *B. cereus* T spores by treatment with TCA are due to changes in structural conformations of the coat protein, probably caused primarily by the acid anion of TCA and secondarily by its proton.

#### REFERENCES

- 1) Alderton, G., and Snell, N. S. 1963. Base exchange and heat resistance in bacterial spores. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **10**: 139-143.
- 2) Bayliss, C. E., and Waites, W. M. 1976. The effect of hydrogen peroxide on spores of *Clostridium bifermentans*. *J. Gen. Microbiol.* **96**: 401-407.
- 3) Brambl, R., and Handschin, B. 1976. Mitochondrial biogenesis during fungal spore germination: products of mitochondrial protein synthesis *in vivo*. *Arch. Biochem. Biophys.* **175**: 606-617.
- 4) Brinkmann, K. 1976. Circadian rhythm in the kinetics of the acid denaturation of cell membranes of *Euglena gracilis*. *Planta (Berl.)* **129**: 221-227.
- 5) Brown, M. R. W., and Melling, J. 1968. Dipicolinic acid release and dormancy of *Bacillus stearothermophilus* spores as a function of pH and temperature. *Biochem. J.* **106**: p 44.
- 6) Gould, G. W., and Hitchins, A. D. 1963. Sensitization of bacterial spores to lysozyme and to hydrogen peroxide with agents which rupture disulfide bonds. *J. Gen. Microbiol.* **33**: 413-423.
- 7) Gould, G. W., Stubbs, J. M., and King, W. L. 1970. Structure and composition of resistant layers in bacterial spore coats. *J. Gen. Microbiol.* **60**: 347-355.
- 8) Hashimoto, T., Black, S. H., and Gerhardt, P. 1960. Development of fine structure, thermostability, and dipicolinate during sporogenesis in a bacillus. *Can. J. Microbiol.* **6**: 203-212.
- 9) Herbert, D., Phipps, P. J., and Strange, R. E. 1971. Chemical analysis of microbial cells, p. 209-

344. In Norris, J. R., and Ribbons, D. W. (eds), *Methods in microbiology* 5B, Academic Press Inc., London.
- 10) Holmes, P. K., Nags, E. H., and Levinson, H. S. 1965. Concurrent heat activation and suppression of *Bacillus megaterium* spore germination. *J. Bacteriol.* **90**: 827-828.
- 11) Janssen, F. W., Lund, A. J., and Anderson, L. E. 1958. Colorimetric assay for dipicolinic acid in bacterial spores. *Science* **127**: 26-27.
- 12) Karasz, F. E., and O'Reilly, J. M. 1967. Enthalpy changes in the helix-coil transition of poly ( $\gamma$ -benzyl-L-glutamate). *Biopolymers* **5**: 27-35.
- 13) Keynan, A., Issahary-Brand, G., and Evenchik, Z. 1965. Activation of bacterial spores, p. 180-187. In Campbell, L. L., and Halvorson, H. O. (eds.), *Spores III*, American Society for Microbiology, Ann Arbor, Mich.
- 14) King, W. L., and Gould, G. W. 1969. Lysis of spores with hydrogen peroxide. *J. Appl. Bacteriol.* **32**: 481-490.
- 15) Kulikovskiy, A., Pankratz, H. S., and Sadoff, H. 1975. Ultrastructural and chemical changes in spores of *Bacillus cereus* after action of disinfectants. *J. Appl. Bacteriol.* **38**: 39-46.
- 16) Lewis, J. C., Snell, N. S., and Alderton, G. 1965. Dormancy and activation of bacterial spores, p. 47-54. In Campbell, L. L., and Halvorson, H. O. (eds.), *Spores III*, American Society for Microbiology, Ann Arbor, Mich.
- 17) Nakajima, A., and Hayashi, T. 1968. Effects of temperature on molecular conformation of poly- $\gamma$ -methyl-L-glutamate in solvents. *Bull. Inst. Chem. Res., Kyoto Univ.* **46**: 62-76.
- 18) Polyakov, A. A., Kulikovskii, A. V., and Pilipenko, V. N. 1976. Submicroscopic structure of *Bacillus anthracis* spores subjected to methyl bromide treatment. *Dokl. Vses. Akad. S-kh. Nauk* 23-24.
- 19) Rode, L. J., and Foster, J. W. 1966. Influence of exchangeable ions on germinability of bacterial spores. *J. Bacteriol.* **91**: 1582-1588.
- 20) Rode, L. J., and Williams, M. G. 1966. Utility of sodium hypochlorite for ultrastructure study of bacterial spore integuments. *J. Bacteriol.* **92**: 1772-1778.
- 21) Rondle, C. J. M., and Morgan, W. T. J. 1955. The determination of glucosamine and galactosamine. *Biochem. J.* **61**: 586-589.
- 22) Rowley, D. B., and Levinson, H. S. 1967. Changes in spores of *Bacillus megaterium* treated with thioglycolate at a low pH and restoration of germinability and heat resistance by cations. *J. Bacteriol.* **93**: 1017-1022.
- 23) Sutherland, I. W., and Wilkinson, J. F. 1971. Chemical extraction methods of microbial cells, p. 345-383. In Norris, J. R., and Ribbons, D. W. (eds.), *Methods in microbiology* 5B, Academic Press Inc., London.
- 24) Tani, I., Sagara, T., and Shibata, H. 1975. Germination of glycine spores of *B. cereus* T. Japan. *J. Bacteriol.* **30**: 495-499 (in Japanese).
- 25) Thomas, S., and Russell, A. D. 1974. Studies on the mechanism of the sporicidal action of glutaraldehyde. *J. Appl. Bacteriol.* **37**: 83-92.
- 26) Waites, W. M., King, N. R., and Bayliss, C. E. 1977. The effect of chlorine and heat on spores of *Clostridium bifermentans*. *J. Gen. Microbiol.* **102**: 211-213.
- 27) Waites, W. M., Wyatt, L. R., and Arthur, B. 1972. Effect of alkali treatment on the germination and morphology of spores of *Clostridium bifermentans*, p. 430-436. In Halvorson, H. O., Hanson, R., and Campbell, L. L. (eds.), *Spores V*, American Society for Microbiology, Washington, D. C.
- 28) Warth, A. D., Ohye, D. F., and Murrell, W. G. 1963. Location and composition of spore mucopeptide in *Bacillus* species. *J. Cell Biol.* **16**: 593-609.
- 29) Wyatt, L. R., and Waites, W. M. 1975. The effect of chlorine on spores of *Clostridium bifermentans*, *Bacillus subtilis* and *Bacillus cereus*. *J. Gen. Microbiol.* **89**: 337-344.
- 30) Yamashita, S., and Yamashita, T. 1975. Conformation of high-molecular-weight poly (L-valine) in solid state. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **72**: 941-942.



## Delayed Germination of *Bacillus cereus* T Spores after Treatment with Trichloroacetic Acid and Their Reactivation by Heating

Hirofumi SHIBATA,\* Hiromi MURAKAMI, and Isamu TANI

Department of Microbial Chemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences,\*  
University of Tokushima, Tokushima 770

(Accepted for publication, November 18, 1979)

**Abstract** Treatment of *Bacillus cereus* T spores with trichloroacetic acid delayed their germination. The extent of retardation depended on the concentration of trichloroacetic acid, and the temperature, pH and duration of treatment. The effect was completely reversed by subsequent heating, and this restoration of germination also depended on the temperature and duration of heat treatment. Fourteen compounds were examined for their ability to suppress germination of spores. The halogenated fatty acids tested, such as trifluoro-, tribromo-, and dichloroacetic acid, caused suppression of germination, whereas other compounds, *i.e.*, free fatty acids and amino acids, did not. It is concluded that the charge distribution of fatty acid molecules is important for their effect in suppressing germination of spores.

Curran and Evans (3) found that dormant spores could be activated by heat treatment. Since then various treatments, such as exposure to water vapor (8), aqueous ethanol (6), and extreme pH values (9, 15), have been found to activate spores. These treatments, however, are also known to cause suppression of germination of spores without loss of viability. For example, spores of *Clostridium perfringens* were inactivated by heat (2, 4) or by alkali (4). *Bacillus cereus* spores, when heated at low pH, rapidly lost their germinating ability (9). In addition, Holmes and Levinson (6) demonstrated that ethanol-activated spores of *Bacillus megaterium* were deactivated by absolute alcohol.

We are interested in the influence of organic acids, such as trichloroacetic acid (TCA), on germination. It is known that hexosamine can be extracted from spore integuments by TCA at high temperature (16), but little is known about the actual effects of TCA on intact bacterial spores. We found that treatment of *B. cereus* spores with TCA prevented initiation of their germination (13). The present paper describes studies on the effect of various conditions of TCA treatment on germination of *B. cereus* spores and reversal of the effect by heat. Studies on the effects of TCA analogues on germination are also described and the relation of the structure of chemicals to their ability to lower the rate of germination of spores is discussed.

## MATERIALS AND METHODS

*Spore preparation.* *B. cereus* T spores were prepared as described previously (14), lyophilized and stored in a desiccator before use.

*Treatment of spores with chemicals.* Aqueous solutions of TCA or other chemicals were prepared just before use. Spores (2 mg, dry weight) were treated with 3.0 ml of solutions of the test chemicals at various concentrations as indicated in the text. Then the spores were washed once with 3.0 ml of chilled, deionized water by centrifugation in an Eppendorf Microfuge, model 3,200, for 2 min (15,000 rpm) and the resultant pellet was resuspended in 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 8.0). For examination of the reactivation of TCA-treated spores by heat, the spore suspension was heated at 40, 45 or 50 C for various periods.

*Germination.* Suspensions of treated and control spores were mixed with phosphate buffer containing L-alanine and inosine, adjusted to an optical density (OD) of 0.25 at 520 nm in a Coleman Junior II spectrophotometer, model 6/20, and incubated with occasionally shaking at 30 C. The final concentrations of L-alanine and inosine were 0.05 mM. Germination was estimated by measuring the decrease in OD at 520 nm as described previously (12).

Germination was usually expressed as  $OD_t/OD_i$ , where  $OD_i$  is the initial OD and  $OD_t$  is the value after incubation for  $t$  min. To compare the rate and extent of germination, we used values of  $t$  and  $(1 - OD_f/OD_i)$ . The value  $t$  is the time of incubation, at which the value obtained by numerical differentiation of  $(1 - OD_t/OD_i)$  with respect to a unit time (1 min) is maximal, required before germination at the maximum rate.  $OD_f/OD_i$  is the final value of  $OD_t/OD_i$ . When germination was not complete within 4 hr,  $OD_f$  was usually taken as the OD after 4 hr.

*Chemicals.* Inosine was purchased from Kohjin Co., Ltd; yeast extract was from Difco Laboratories; dibromoacetic acid, tribromoacetic acid, 2,3-dibromopropionic acid and 2,3-dibromobutyric acid were from Nakarai Chemicals Ltd., TCA and other chemicals were purchased from Wako Pure Chemical Industries, Ltd.

## RESULTS

*Effect of Temperature during Treatment with TCA on Spore Germinability*

Typical time courses of germination of control spores and spores treated with TCA for 30 min at 30 and 40 C are shown in Fig. 1a and b, respectively. The time required for initiating germination was longer at higher concentrations of TCA and at the higher temperature. When spores had been treated under severe conditions, such as with 30.6 mM or 61.2 mM TCA at 40 C for 30 min, the distribution of their germination times in germination medium became widely scattered. These results suggest that the effect of TCA on spores is dependent not only on the concentration of TCA but also on the temperature of treatment.

This observation was confirmed by treating spores with various concentrations of TCA at different temperatures (15–40 C) for 30 min, and then examining their

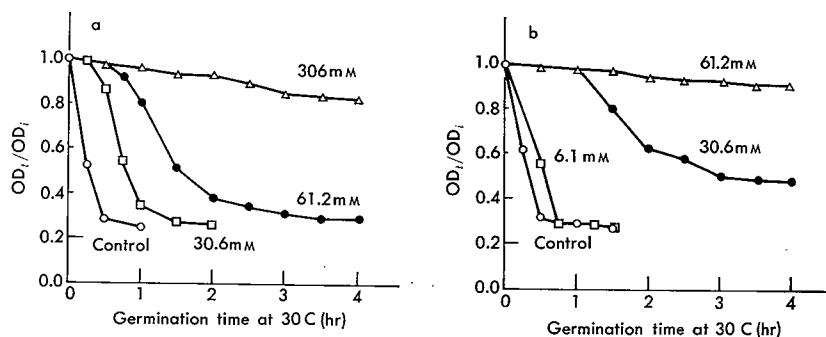


Fig. 1. Germination of control and TCA-treated spores of *Bacillus cereus* T. Spores were treated at 30 (a) or 40 C (b) for 30 min with the indicated concentration of TCA.

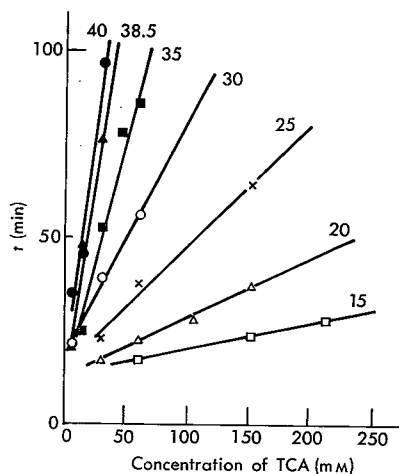


Fig. 2. Effects of the concentration and temperature of TCA treatment. Spores were treated for 30 min with the indicated concentration of TCA. Figures indicate the temperature of TCA treatment.

germination (Fig. 2). Values of  $t$ , representing the rate of germination, were calculated from data on the time courses of germination. The  $t$  values increased linearly with increase in the concentration of TCA, and as shown in Fig. 2 the slopes of the lines increased with increase in the temperature of TCA treatment. Thus these results confirm that the effect of TCA on the spores is dependent on the concentration of TCA and the temperature of treatment.

#### Effect of pH during Treatment with TCA on Spore Germinability

The effect of pH during TCA treatment of spores had not been known, although treatment at a low pH without TCA has been found to have no effect on the germination of spores (13).

For examination of this problem, spores were treated at 40 C for 30 min with 61.2 mM TCA adjusted to pH values of 1.5–7.0 with 1.0 N sodium hydroxide, and their germination was then determined by monitoring the decrease in OD during

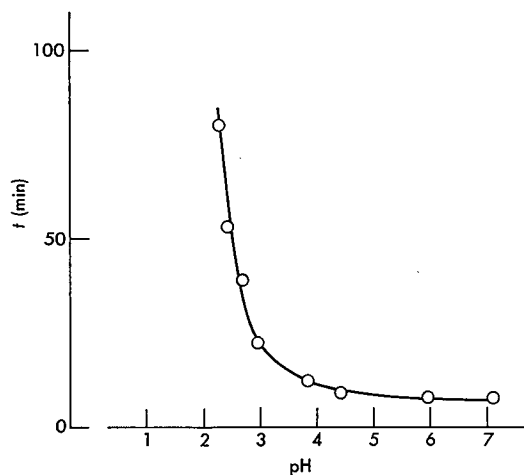


Fig. 3. Effect of the pH of TCA treatment. Spores were treated with 61.2 mM TCA at the indicated pH at 40 C for 30 min.

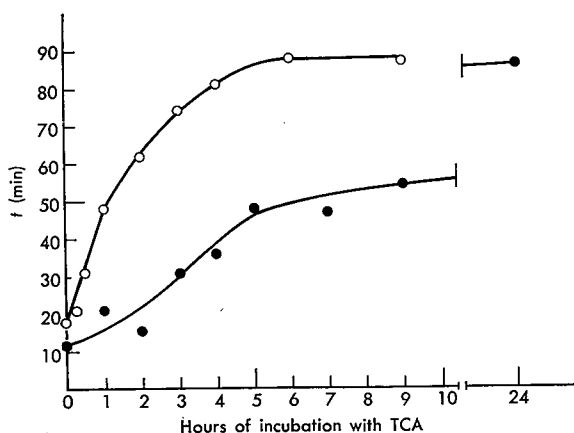


Fig. 4. Effect of the length of TCA treatment. Spores were treated with 30.6 mM TCA at 30 C (○) or with 61.2 mM TCA at 20 C (●), for the indicated periods.

incubation at 30 C for 4 hr. As shown in Fig. 3, the  $t$  values increased markedly when the spores were treated at below pH 3.0, but decreased, rather than increasing, on treatment with TCA at pH 4.0–7.0. These results suggest that the effect of TCA is due not only to the TCA anion, but also to a high concentration of proton.

#### *Effect of the Length of the Treatment with TCA on Spore Germinability*

Next we examined the effect of the length of the incubation period on TCA treatment of spores. Figure 4 shows that the  $t$  value initially increased with increase in the period of incubation with TCA. After treatment with 61.2 mM TCA at 20 C, increase in the  $t$  value became slower after 5 hr, when the  $t$  value was about half the maximum  $t$  observed after 24-hr incubation. After treatment with 30.6 mM TCA at 30 C, the maximum  $t$  value was observed after 6-hr incubation. After

Table 1. Reactivation by heating of TCA-treated spores of *Bacillus cereus* T<sup>a</sup>

Concentration of TCA (mM)	Extent of germination after 1-hr incubation			
	Before heating		After heating <sup>b</sup>	
Control	0.713 <sup>c</sup>	(100.0%)	0.715 <sup>c</sup>	(100.0%)
15.3	0.659	(92.4)	0.717	(100.3)
30.6	0.065	(9.1)	0.713	(99.7)
45.9	0.060	(8.4)	0.720	(100.7)
61.2	0.049	(6.9)	0.714	(99.9)

<sup>a</sup> Spores were treated with TCA at the indicated concentration at 40 C for 30 min.

<sup>b</sup> TCA-treated spores were heated at 50 C for 30 min in sodium phosphate buffer (0.1 M, pH 8.0).

<sup>c</sup>  $1 - OD_{600}/OD_{420}$ .

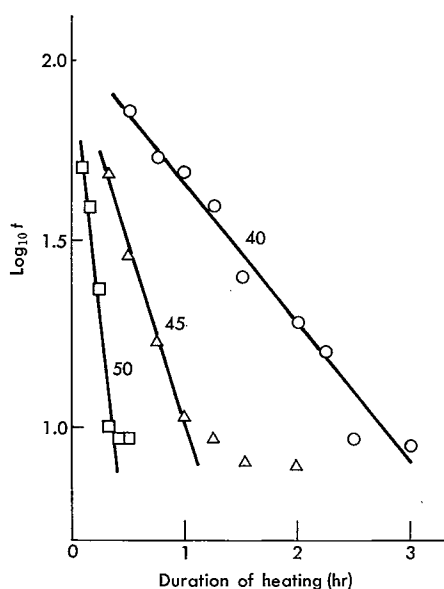


Fig. 5. Effect of the temperature and length of heat treatment in reactivation of TCA treated (61.2 mM, 40 C, 30 min) spores of *Bacillus cereus* T.

treatment with 61.2 mM TCA at 30 or 40 C, the  $t$  value increased more rapidly (data not shown).

#### Reactivation of TCA-treated Spores by Heating

When spores that had been treated (40 C, 30 min) with various concentrations of TCA were heated (50 C, 30 min) in phosphate buffer (pH 8.0) and then incubated in germination medium, they all germinated completely within 1 hr (Table 1). This result indicates that the germinability of TCA-treated spores is restored by heating.

The effects of the temperature and length of heat treatment on reactivation of TCA-treated spores (61.2 mM, 40 C, 30 min) are shown in Fig. 5. The  $t$  values decreased as a function of the length of heat treatment. Moreover the heating

Table 2. Effects of various compounds on germination of *Bacillus cereus* T spores<sup>a)</sup>

Compound	Formula	Retardation <sup>b)</sup>
Trichloroacetic acid	$\text{CCl}_3\text{COOH}$	+++
Trifluoroacetic acid	$\text{CF}_3\text{COOH}$	+++
Tribromoacetic acid	$\text{CBr}_3\text{COOH}$	+++
Dichloroacetic acid	$\text{CHCl}_2\text{COOH}$	+++
Dibromoacetic acid	$\text{CHBr}_2\text{COOH}$	++
2,3-Dibromopropionic acid	$\text{CH}_2\text{BrCHBrCOOH}$	+
2,3-Dibromobutyric acid	$\text{CH}_3\text{CHBrCHBrCOOH}$	+
Acetic acid	$\text{CH}_3\text{COOH}$	—
Propionic acid	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COOH}$	—
<i>n</i> -Butyric acid	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$	—
Pivalic acid	$(\text{CH}_3)_3\text{CCOOH}$	—
Malonic acid	$\text{CH}_2(\text{COOH})_2$	—
Glycine	$\text{NH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$	—
$\beta$ -Alanine	$\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$	—
4-Amino- <i>n</i> -butyric acid	$\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$	—

<sup>a)</sup> Treatment of spores with the indicated compound was carried out at 40 C for 30 min.

<sup>b)</sup> +, ++, +++, Effective. Delayed germination occurred when spores were treated with the indicated compound at 30 (+++), 60 (++) or 150 mm (+); —, Not effective. Delayed germination was not observed when spores were treated with the indicated compound at 300 mm.

period required for reactivation of TCA-treated spores decreased with increase in temperature; for instance, the period required at 45 C was about one-third of that needed at 40 C.

#### *Effect of Treatment with TCA Analogues on Spore Germinability*

The ability of 14 compounds to lower the rate of germination of spores was examined. As shown in Table 2, all halogen-substituted fatty acids tested were effective, trifluoro-, tribromo-, and dichloroacetic acid being as effective as TCA. Dibromoacetic acid was more effective than 2,3-dibromopropionic acid or 2,3-dibromobutyric acid. The other compounds tested, which were fatty acids and amino acids, were not effective, even at a concentration of 300 mm.

#### DISCUSSION

The germination properties of bacterial spores can be modified without loss of viability by treatment with various agents (2–9, 15). We found previously (13) that treatment of spores with TCA caused marked reduction in germinability and in resistance to chemicals or heat. Reduction in the extent of germination was observed irrespective of the germination medium used.

In the present work, we demonstrated the following characteristics of the effect of TCA treatment on *B. cereus* T spores with regard to their germinability: (i) Exposure of spores to TCA results in delayed germination (Fig. 1). (ii) The effect

of TCA depends on its concentration and the temperature (Fig. 2), pH (Fig. 3) and length of treatment (Fig. 4). We also found that the effect of TCA on germination of spores is completely reversed by subsequent heating (Table 1 and Fig. 5).

It has been reported that the normal lytic system responsible for cortical degradation during germination is inactivated by heat (2, 4, 5) or alkali (4) and that the damaged spores require the addition of either lysozyme or a cortex lytic enzyme for restoration of their germination (2, 4, 5). The present results, however, indicate that the suppression of germination caused by TCA is reversible and that the TCA-treated spores retain the normal system for utilization of metabolizable germinants.

Finally, we obtained evidence that the charge distribution in fatty acids is important for their effect in suppressing germination of spores. Our evidence for this is that (i) of the fatty acids tested, all the halogenated fatty acids suppressed germination, but other compounds, *i.e.*, free fatty acids and amino acids, did not; (ii) dichloro- and tribromoacetic acid were more effective than dibromoacetic acid; (iii) all halogenated acetic acids were much more effective than 2,3-dibromopropionic acid or 2,3-dibromobutyric acid. Thus, substitutions which tended to withdraw electrons from the carboxyl group increased the effectiveness. In the case of halogenated acetic, propionic and butyric acids, however, the differences in effectiveness could be due to the steric effect of the hydrophobic moieties of the molecules.

When *B. cereus* spores were heated at pH 1 for more than 20 min, they rapidly lost their ability to germinate with L-alanine plus adenosine but were still able to grow on a rich medium (9). Holmes et al (7) suggested that this might be because some spore component that is essential for germination induced by these two compounds is heat sensitive at extremely low pH values.

Nakajima and Hayashi (10) demonstrated a coil-helix transition of certain polypeptides in DCA/DCE<sup>1</sup> or TCA/AcOH<sup>1</sup>: at lower temperature, hydrogen bonds between DCA or TCA and peptide residues are in a coiled conformation, whereas at higher temperature, these hydrogen bonds are broken and the peptide residues form intramolecular hydrogen bonds giving a helical structure such that the molecules can form dimers. This possibility cannot directly explain the interaction of TCA with spores, but it seems likely that similar conformational changes in spore components result in inactivation of the normal functional system for germination.

TCA itself has two different properties: it is a strong acid with a *pKa* of less than 1 and it is a lipophilic acid anion. Brinkmann (1) demonstrated that the anion of TCA interacts with the outer cell membrane of *Euglena gracilis*. This interaction of the acid anion with the membrane presumably involves binding of TCA molecules to some protein in the membrane (11). It seems likely, therefore, that suppression of germination of *B. cereus* spores by TCA results from modification of certain spore components that are essential for germination at extremely low pH after change in permeability of the spore coat(s) induced by the action of the acid anion (13).

<sup>1</sup> DCA, dichloroacetic acid; DCE, dichloroethanol; AcOH, acetic acid.

## REFERENCES

- 1) Brinkmann, K. 1976. Circadian rhythm in the kinetics of acid denaturation of cell membrane of *Euglena gracilis*. *Planta (Berl.)* **129**: 221-227.
- 2) Cassier, M., and Sebald, M. 1969. Germination lysozyme-dépendante des spores de *Clostridium perfringens* ATCC 3624 après traitement thermique. *Ann. Inst. Pasteur* **117**: 312-324.
- 3) Curran, H.R., and Evans, F.R. 1945. Heat activation inducing germination in the spores of thermotolerant and thermophilic aerobic bacteria. *J. Bacteriol.* **49**: 335-346.
- 4) Duncan, C.L., Labbe, R.G., and Reich, R.R., 1972. Germination of heat- and alkali-altered spores of *Clostridium perfringens* type A by lysozyme and an initiation protein. *J. Bacteriol.* **109**: 550-559.
- 5) Hashimoto, T., Friebe, W.R., and Conti, S.F. 1972. Kinetics of germination of heat-injured *Bacillus cereus* spores, p. 409-415. In Halvorson, H.O., Hanson, R., and Campbell, L. L. (eds), *Spores V*, American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- 6) Holmes, P.K., and Levinson, H.S. 1967. Activation of *Bacillus megaterium* spores with aqueous ethyl alcohol: their deactivation and reactivation. *Curr. Mod. Biol.* **1**: 256-258.
- 7) Holmes, P.K., Nags, E.H., and Levinson, H.S. 1965. Concurrent heat activation and suppression of *Bacillus megaterium* spore germination. *J. Bacteriol.* **90**: 827-828.
- 8) Hyatt, M.T., Holmes, P.K., and Levinson, H.S. 1966. Activation of *Bacillus megaterium* spore germination by water in the vapor phase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **24**: 701-704.
- 9) Keynan, A., Issahary-Brand, G., and Evenchik, Z. 1965. Activation of bacterial spores, p. 180-187. In Campbell, L.L., and Halvorson, H.O. (eds), *Spores III*, American Society for Microbiology, Ann Arbor, Mich.
- 10) Nakajima, A., and Hayashi, T. 1968. Effects of temperature on molecular conformations of poly- $\gamma$ -methyl-L-glutamate in solvents. *Bull. Inst. Chem. Res., Kyoto Univ.* **46**: 62-76.
- 11) Robinson, D.R., and Jencks, W.P. 1965. The effect of concentrated salt solutions on the activity coefficient of acetyltetraglycine ethyl ester. *J. Am. Chem. Soc.* **87**: 2470-2479.
- 12) Shibata, H., Takamatsu, H., and Tani, I. 1976. Germination of unactivated spores of *Bacillus cereus* T. Effect of preincubation with L-alanine or inosine on the subsequent germination. *Japan. J. Microbiol.* **20**: 529-535.
- 13) Shibata, H., Uchida, M., Hayashi, H., and Tani, I. 1979. Effect of trichloroacetic acid treatment on certain properties of spores of *Bacillus cereus* T. *Microbiol. Immunol.* **23**: 339-347.
- 14) Tani, I., Sagara, T., and Shibata, H. 1975. Germination of glycine spores of *B. cereus* T. *Japan. J. Bacteriol.* **30**: 495-499 (in Japanese).
- 15) Waites, W.M., Wyatt, L.R., and Arthur, B. 1972. Effect of alkali treatment on the germination, and morphology of spores of *Clostridium bifermentans*, p. 430-436. In Halvorson, H.O., Hanson, R., and Campbell, L.L. (eds), *Spores V*. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- 16) Warth, A.D., Ohye, D.F., and Murrell, W.G. 1963. Location and composition of spore mucopolypeptide in *Bacillus* species. *J. Cell Biol.* **16**: 593-609.

(Received for publication, September 10, 1979)



参  
考  
論  
文

*Bacillus cereus* T 芽胞の発芽機構に  
対するグリシンの作用

谷 勇 相良 知子 柴田 洋文

徳島大学薬学部微生物薬品化学教室

徳島市庄町1丁目 〒770

〔受付：11月21日，1974年〕

日本細菌学雑誌 第30巻 第3号 昭和50年5月（別刷）

Reprinted from Japanese Journal of Bacteriology

Vol. 30, No. 3, 495-499 (May, 1975)

*Bacillus cereus* T 芽胞の発芽機構に  
対するグリシンの作用

谷 勇 相良 知子 柴田 洋文

徳島大学薬学部微生物薬品化学教室

徳島市庄町1丁目 〒770

〔受付：11月21日，1974年〕

日本細菌学雑誌 第30巻 第3号 昭和50年5月（別刷）

Reprinted from Japanese Journal of Bacteriology

Vol. 30, No. 3, 495-499 (May, 1975)

## *Bacillus cereus* T 芽胞の発芽機構に 対するグリシンの作用

谷 勇 相良 知子 柴田 洋文

徳島大学薬学部微生物薬品化学教室

徳島市庄町1丁目 〒770

〔受付：11月21日，1974年〕

*Bacillus cereus* T の芽胞形成において，芽胞形成培地にグリシンを高濃度に添加した場合，形成された芽胞（グリシン芽胞）は，グリシンを添加しない芽胞形成培地で形成された芽胞（正常芽胞）より低い熱抵抗性を示した。

これら両芽胞は，heat activation (70°C, 30分) を行つた後，発芽始動物として L-アラニンを用いた場合の，発芽時培養温度，発芽培地の液性の影響，および，D-アラニンによる発芽阻害，また，両芽胞の発芽始動物としての L-アミノ酸に対する要求について，検討した。その結果，発芽時培養温度，発芽培地の液性が発芽におよぼす影響は，両芽胞は，ほぼ同様の成績を示した。しかし，次の二点において両芽胞のあいだに相違が認められた。

1) 正常芽胞において発芽始動活性が認められた L-アミノ酸（アラニン，システイン，メチオニン，セリン，トレオニン，バリン，イソロイシン，ロイシン，グルタミン）のうち，トレオニン，バリン，イソロイシン，ロイシンの4種は，グリシン芽胞では発芽始動活性が著しく低下していた。

2) L-アラニンによる発芽の D-アラニンによる阻害が，正常芽胞よりもグリシン芽胞に強く発現した。

これらの事実は，*B. cereus* T において，芽胞形成過程に高濃度グリシンを作用させることにより，芽胞発芽機構に本質的な変化は生じないが，発芽始動物認識部位に立体構造上の変化を生じるということを示唆している。

休眠状態の芽胞は種々の環境条件に対し強固な抵抗性を示すが，適当な条件下では，発芽という過程を経て，芽胞は休眠状態から強い代謝活性を示す状態へと変化する。この発芽は芽胞独特の生長様式であり，逐次的あるいは平行して生じるいくつかの反応から構成された芽胞構造の破壊過程である<sup>3)</sup>。発芽時に生じる反応の結果発現する様々の現象の kinetics は休眠芽胞の活性化の程度<sup>1,4,7)</sup>，発芽時培養温度あるいは培地の液性<sup>8,9)</sup> といった環境因子により大きく影響を受ける。Levinson と Hyatt<sup>5)</sup> によれば，このような kinetics の差は芽胞形成培地の相違によつても生じると報告されている。

著者らは，自然界に広く分布し，かつ最も簡単な構造のアミノ酸であるグリシンを高濃度に添加した芽胞形成培地において芽胞形成を行い，得られた芽胞を，グリ

シンを含まない芽胞形成培地から得られた芽胞と比較，検討した。その結果，両者の間に熱抵抗性および発芽現象の kinetics において差異のあることが認められた。そこで，発芽に対する環境因子の影響を比較し，発芽機構に対するグリシンの作用を検討したので報告する。

### 材料と方法

使用菌種および芽胞形成培地：本実験に使用した菌種は *Bacillus cereus* T である。

継代培養，熱抵抗性測定のための plating 用培地として普通寒天培地を使用した。増殖および芽胞形成培地として modified G 培地<sup>2)</sup>を使用した。培地組成は (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.4 g; Mg SO<sub>4</sub>, 0.08 g; MnSO<sub>4</sub>, 0.01 g; ZnSO<sub>4</sub>, 0.1 mg; FeSO<sub>4</sub>, 0.1 mg; CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, 1.0

mg; 酵母エキス (Difco Co.), 0.2 g;  $K_2HPO_4$ , 0.1 g;  $CaCl_2$ , 0.01 g; glucose, 0.4 g; 再蒸留水, 1 l である。

**芽胞形成:** *B. cereus* T の保存菌種を斜面普通寒天培地に接種し, 15時間培養した後, 2白金耳を芽胞形成培地 (坂口式フラスコ, 容量 500 ml に培地 200 ml を含む) に懸濁し, 30°C, 4.5時間振盪培養を行った。次に, この培養液 20 ml を新鮮な芽胞形成培地 200 ml に植え継ぎ, 30°C, 2.5時間振盪培養を行った。同様の条件で再び植え継ぎを行い最終培養を行った。振盪培養器は, いわしや製往復式振盪器を用い, 150 rpm で行った。

芽胞形成は約30時間で終了し, 芽胞は遠心分離により集菌した後, 滅菌精製水で5~8回洗浄した。すべての操作は4°Cで行い, 精製芽胞は凍結乾燥を行った後, デシケーター中 (5°C) に保存した。

**熱抵抗性測定:** 芽胞 50 mg を精製水 10 ml に懸濁, この懸濁液における 85°C, 30分加熱前後の適当な倍数希釈液について plating method による生菌数計測を行い, その比を求めて比較検討した。

**Heat Activation:** 芽胞 50 mg を精製水 10 ml に懸濁, 70°C, 30分加熱した後, 直ちに氷冷し, 遠心分離により集菌, 滅菌精製水で1回洗浄した後, 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 6.4) に懸濁した。

**発芽:** 発芽の測定は 520 nm における芽胞懸濁液の OD (optical density) の変化を測定することにより行った。上述のように調製した芽胞懸濁液を, 発芽始動物を含む 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 8.0) に滴下 (このとき OD が約0.8を示すように調整する) し, すみやかに攪拌した後, 520 nm, slit 1.0 にて測定した (Hitachi 124 spectrophotometer)。発芽に対する培地の液性を検討するため, 上述のリン酸緩衝液 (pH 8.0) の代わりに, 0.1 M KCl-HCl (pH 1.0), 0.1 M ケン酸- $Na_2HPO_4$  (pH 3.0, 5.0), 0.1 M  $NaH_2PO_4$ - $Na_2HPO_4$  (pH 7.0, 8.0), 0.1 M トリス緩衝液 (pH 9.0) を使用した。発芽始動物としては L-アラニン (10 mM) を使用したが, 他に L-アミノ酸 19 種についても検討した: アラニン (ala), アルギニン (arg), アスパラギン (asn), アスパラギン酸 (asp), システイン (cys-SH), グルタミン (gln), グルタミン酸 (glu), グリシン (gly), ヒスチジン (his), イソロイシン (ileu), ロイシン (leu), リジン (lys), メチオニン (met), オルニチン (orn), フェニルアラニン (phe), セリン (ser), トレオニン (thr), トリプトファン (trp), チロシン (tyr), およびバリン (val) (和光)。

結果は次のような OD 低下率を用いて表わした。

$$OD \text{ 低下率} = 1 - (OD_{60}/OD_0)$$

ここで  $OD_{60}$  は発芽培地 (発芽始動物を含む緩衝液) に芽胞懸濁液を滴下した後, 60分経過後,  $OD_0$  は最初の 520 nm における OD を表わす。

Table 1. Heat resistance of normal spores and glycine spores of *B. cereus* T<sup>a</sup>

Spore	Normal spores	Glycine spores
Viable count	( $\times 10^8$ /mg)	( $\times 10^8$ /mg)
cells	1.56	1.45
spores <sup>b</sup>	1.55	1.34
after heating <sup>c</sup>	1.05	0.02
Heat resistance	67.8%	1.5%

<sup>a</sup> Data are the averages of triplicate crops and determinations.

<sup>b</sup> Spores viable after heating at 70°C for 15 min.

<sup>c</sup> Heating was done at 85°C for 30 min.

## 成 績

グリシンを添加した培地から得られた芽胞の熱抵抗性: Modified G 培地から得られた芽胞 (正常芽胞) と, グリシン (6 mg/ml) を加えた培地から得られた芽胞 (グリシン芽胞) の 85°C, 30分の加熱に対する熱抵抗性を Table 1 に示した。正常芽胞が 67.8% を示したのに対し, グリシン芽胞では 1.5% と顕著な差が認められた。

正常芽胞, グリシン芽胞の発芽に対する温度 pH の影響: 既述の方法で heat activation を行った両芽胞の発芽に対する温度の影響を Fig. 1 に示した。発芽は L-アラニン 10 mM, 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 8.0) で行った。正常芽胞, グリシン芽胞ともに 25~35°C において最もよく発芽したが, グリシン芽胞は 40~45°C において正常芽胞よりも高い値を示し, 高温による阻害<sup>10)</sup>の発現が正常芽胞より遅延することが認められた。L-アラニン 10 mM による発芽において, 発芽培地の液性に対する両芽胞の反応を 30°C において検討した (Fig. 2)。グリシン芽胞は正常芽胞と同様に pH 8.0 に最大値を示し, 両芽胞の間に, 差はほとんど認められなかった。

L-アミノ酸の発芽始動活性: 芽胞の発芽にある種の L-アミノ酸, 特に L-アラニンが有効なことはよく知られている<sup>8,9,11,12)</sup>。そこで R-側鎖の異なる数種の L-アミノ酸について発芽始動活性を検討した (Table 2)。その

Table 2. Effect of L-amino acids on germination of normal spores and glycine spores of *B. cereus* T. Both spores were heat-activated at 70 C for 30 min, and then germinated at 30 C in 0.1 M phosphate buffer (pH 8.0) containing one of a number of L-amino acids as indicated, each at a concentration of 10 mM<sup>a</sup>

L-amino acid (10 mM)	Normal spores	Glycine spores
alanine	0.528	0.519
asparagine	— <sup>b</sup>	—
aspartic acid	—	—
arginine	—	—
cysteine	0.521	0.478
glutamic	0.395	0.331
glutamic acid	—	—
glycine	—	—
histidine	—	—
isoleucine	0.395	0.211
leucine	0.163	0.085
lysine	—	—
methionine	0.218	0.321
ornithine	—	—
phenylalanine	—	—
serine	0.322	0.398
threonine	0.321	0.074
tryptophane	—	—
tyrosine	—	—
valine	0.412	0.047

<sup>a</sup> Data are summarized by the value of  $(1-OD_{60}/OD_0)$ .

<sup>b</sup> Very low effect.

結果、正常芽胞では L-ala, L-cys-SH, L-met, L-ser, L-thr, L-val, L-leu, L-ileu, および L-gln の 9 種に発芽始動活性が認められた。グリシン芽胞においても同様の成績が得られたが、L-val の発芽始動活性が著しく低下した。上述の 9 種の L-アミノ酸のそれぞれの芽胞にたいする発芽始動活性を、L-ala を 1.0 として検討した結果、グリシン芽胞では正常芽胞に比して L-thr, L-leu, L-ileu の 3 種が 1/2~1/4 に低下し、L-val は 1/8 以下の値を示した。

D-アラニンによる発芽阻害: L-アラニンによる発芽が D-アラニンにより競合的に阻害されることはよく知られ

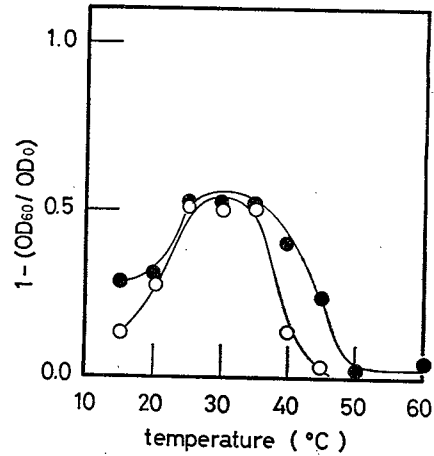


Fig. 1. Effect of temperature on germination of normal spores and glycine spores of *B. cereus* T. Both spores were heat-activated at 70 C for 30 min, and then germinated at different temperatures (15–60 C at 5 C intervals) in 0.1 M phosphate buffer (pH 8.0) containing 10 mM L-alanine: (○), normal spores; (●), glycine spores.

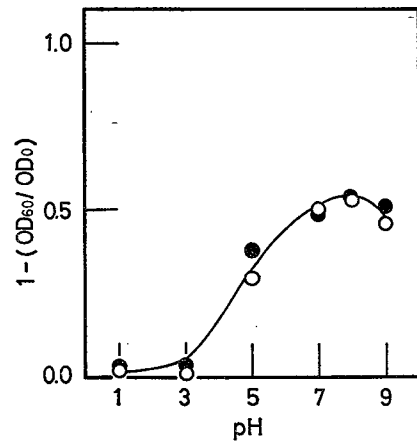


Fig. 2. Effect of pH on germination of normal spores and glycine spores of *B. cereus* T. Both spores were heat-activated at 70 C for 30 min, and then germinated at 30 C in 0.1 M buffer solutions (pH 1.0–9.0) containing 10 mM L-alanine: (○), normal spores; (●), glycine spores.

ている。そこで、両芽胞の L-アラニンによる発芽に対する D-アラニンの影響を検討した結果、Fig. 3 にみられるように、正常芽胞では D-, L-アラニン等モル濃度に

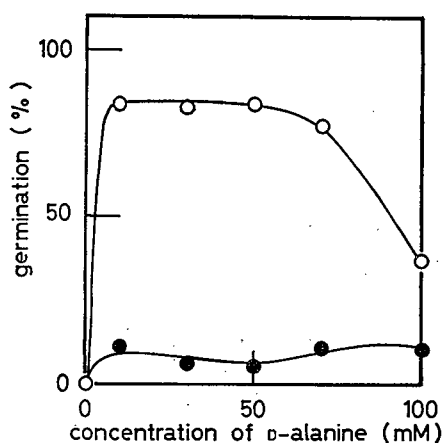


Fig. 3. Inhibition by D-alanine of L-alanine-induced germination of normal spores and glycine spores of *B. cereus* T. Both spores were heat-activated at 70°C for 30 min, and then germinated at 30°C in 0.1 M phosphate buffer (pH 8.0) containing L-alanine (10–100 mM) in the presence of equimolar concentrations of D-alanine: (○), normal spores; (●), glycine spores.

において D-アラニン 10~70 mM では約 20% の阻害が認められた。さらに  $1 \times 10^2$  mM を加えた場合には、L-アラニンが等モル濃度存在しても発芽阻害は 63% に達した。一方、グリシン芽胞では等モル濃度の D-アラニンの添加により 90% の阻害が認められた。

### 考 察

L-アラニンははじめ数種のアミノ酸が芽胞の発芽に有効である<sup>9,12)</sup>ことはよく知られている。さらにその構造と発芽始動活性の相関が Woese ら<sup>11)</sup>により詳細に検討されている。L-アミノ酸による発芽では、L-アラニンの発芽始動活性が最も高く<sup>11)</sup>、今回著者らが得た成績も同様であり、*B. cereus* T の正常芽胞、グリシン芽胞ともに L-cys-SH のみであり、L-val, L-leu, L-gln (以上正常芽胞)、L-ser (グリシン芽胞) において 75~78% の発芽始動活性を認めたにすぎない (Table 2)。

正常芽胞、グリシン芽胞は、発芽時培養温度や発芽培地の pH に対する反応、および発芽始動動物に対する要求において、ほぼ同様の成績を示した。しかし、1) 正常芽胞に発芽始動活性が認められた 9 種の L-アミノ酸のうち、グリシン芽胞は L-thr, L-val, L-leu, L-leu の 4 種の発芽始動活性に顕著な低下が認められた (Table 2)。

2) L-アラニンを発芽始動動物に用いた場合の D-アラニンによる阻害作用はグリシン芽胞に特に強く発現した。*B. subtilis* (Marburg) 芽胞は、L-アラニンよりも D-アラニンに強い親和性を示すが、Woese ら<sup>11)</sup>により報告されているが、同様の現象が *B. cereus* T のグリシン芽胞に強く発現したものと思われる。

これらの事実は、*B. cereus* T の正常芽胞、グリシン芽胞において、両芽胞の L-アミノ酸に対する発芽始動動物認識部位に立体構造上の相違が生じていることを強く示唆しており、*B. cereus* T の芽胞形成過程において、高濃度グリシンの存在は、芽胞の熱抵抗性に影響を与えると同時に、芽胞の発芽機構の発芽始動動物認識部位においてもその形成に影響をおよぼすことが明らかになった。

本論文の要旨は第25回日本細菌学会中国四国支部総会および第46回日本細菌学会総会において発表した。

### 文 献

- 1) Aoki, H., and Slepecky, R. A. (1973): *J. Bacteriol.*, **114**, 137–143.
- 2) Hashimoto, T., Black, S. H., and Gerhardt, P. (1960): *Can. J. Microbiol.*, **6**, 203–212.
- 3) Hashimoto, T., Friebe, W. R., and Conti, S. F. (1969): *J. Bacteriol.*, **98**, 1011–1020.
- 4) Keynan, A., Issahary-Brand, G., and Evenchik, Z. (1965): *In* Spores III, Edited by Campbell, L. L., and Halvorson, H. O., pp. 180–187, American Society for Microbiology, Ann Arbor, Mich.
- 5) Levinson, H. S., and Hyatt, M. T. (1966): *J. Bacteriol.*, **91**, 1811–1818.
- 6) Levinson, H. S., and Hyatt, M. T. (1970): *J. Bacteriol.*, **101**, 58–64.
- 7) McCormick, N. G. (1965): *J. Bacteriol.*, **89**, 1180–1185.
- 8) Uehara, M., and Frank, H. A. (1965): *In* Spores III, Edited by Campbell, L. L., and Halvorson, H. O., pp. 38–46, American Society for Microbiology, Ann Arbor, Mich.
- 9) Warren, S. C., and Gould, G. W. (1968): *Biochim. Biophys. Acta.*, **170**, 341–350.
- 10) Wax, R., Freese, E., and Cashel, M. (1967): *J. Bacteriol.*, **94**, 522–529.
- 11) Woese, C. R., Morowitz, H. J., and Hutchinson, C. A. (1958): *J. Bacteriol.*, **76**, 578–588.
- 12) Woese, C. R. (1959): *J. Bacteriol.*, **77**, 690–694.

## Germination of Glycine Spores of *B. cereus* T

Isamu TANI, Tomoko SAGARA and Hirofumi SHIBATA

Department of Microbial Chemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences  
University of Tokushima, Tokushima 770, Japan

When formed in modified G medium, spores of *Bacillus cereus* T were heat-resistant. They were heat-sensitive, however, as compared with normal spores, when formed in modified G medium supplemented with 6 mg/ml of glycine (glycine spores).

Some properties in germination were studied in normal and glycine spores which were different from each other in heat-resistance. When effects of temperature and pH on L-alanine-induced germination were tested, both spores showed similar results: an optimal temperature and an optimal pH were 30°C and 8.0, respectively. When these spores were examined for requirement of any L-amino acid as a germinant and for inhibition by D-alanine of L-alanine-induced germination, the same results were also obtained from them, except the following two points.

(1) Nine L-amino acids, L-alanine, L-cysteine, L-glutamine, L-isoleucine, L-leucine, L-methionine, L-serine, L-threonine and L-valine, were effective as germinants for normal spores. Four of them, L-isoleucine, L-leucine, L-threonine and L-valine, were not so effective as the other five for glycine spores.

(2) Inhibition by D-alanine of L-alanine-induced germination was much stronger to glycine spores than normal spores.

These results suggest that sporulation in the presence of a high concentration of glycine may have resulted in the conformational changes of the recognition sites on germinants, as well as in the decreased heat resistance of spores of *B. cereus* T.

Reprinted from  
Japan. J. Microbiol.  
Vol. 20 (6), 529-535, 1976

# Germination of Unactivated Spores of *Bacillus cereus* T

Effect of Preincubation with L-Alanine or Inosine  
on the Subsequent Germination

Hirofumi Shibata, Hiroaki Takamatsu, and Isamu Tani

*Department of Microbial Chemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences,  
University of Tokushima, Tokushima*

(Received for publication, June 17, 1976)



# Germination of Unactivated Spores of *Bacillus cereus* T

## Effect of Preincubation with L-Alanine or Inosine on the Subsequent Germination

Hirofumi SHIBATA, Hiroaki TAKAMATSU, and Isamu TANI

Department of Microbial Chemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences,  
University of Tokushima, Tokushima

(Received for publication, June 17, 1976)

### ABSTRACT

Heat-activated spores of *Bacillus cereus* T germinate rapidly in the presence of L-alanine alone or inosine alone. In contrast, unactivated spores can not germinate in the presence of either germinant alone but rapidly in the presence of both germinants. The highest level of cooperative action of L-alanine and inosine on the germination was observed when they were present in a ratio 1:1. Preincubations of unactivated spores with L-alanine or inosine had opposite effects on the subsequent germination in the presence of both germinants: preincubation with L-alanine stimulated the initiation of subsequent germination, while preincubation with inosine inhibited it. These results suggest that germination of unactivated spores initiated by L-alanine and inosine includes two steps, the first initiated by L-alanine and the second prompted by inosine. The effect of preincubation of unactivated spores with L-alanine was not diminished by washings. The pH dependence of the preincubation of unactivated spores was not so marked as that of the subsequent germination in the presence of inosine.

Germination is initiated by a number of compounds known as germinants [2]. L-Alanine is one of the most effective germinants and its role in germination has been studied by many workers [7, 14, 19]. Vary and Halvorson [12] suggested that L-alanine might act as a cofactor of germination enzymes, and Woese et al [20] predicted from a study on kinetic models for germination that L-alanine was not an allosteric effector but a substrate for germination enzymes. On the other hand, it was proposed that L-alanine had two separate functional roles in germination of spores of *Bacillus subtilis* by Wax et al [17, 18] and in *Bacillus cereus* by Warren and Gould [14]. Recently, Watabe et al [15, 16] observed that two distinct modes of <sup>14</sup>C-L-alanine

uptake were shown during germination of spores of *Bacillus thiaminolyticus*.

Purine ribosides are also effective germinants for various species of spores [2, 5, 6, 9]. In particular, it was pointed out that inosine greatly stimulated germination in the presence of L-alanine [1, 5, 14, 22]. Among *B. cereus* spores, even dormant spores (in the sense of unactivated spores) germinated in the presence of L-alanine and inosine at very low concentrations, even though they could not germinate in the presence of either germinant alone, except for aged or activated spores [22].

In this paper, we discuss the roles of L-alanine and inosine in the early stage of germination of *B. cereus* T spores initiated by both germinants.

### MATERIALS AND METHODS

*Preparation of spores.* *B. cereus* T (obtained from Dr. T. Hashimoto, Loyola University of Chicago, Strich School of Medicine) was

Requests for reprints should be addressed to Dr. Isamu Tani, Department of Microbial Chemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of Tokushima, Shomachi 1-chome, Tokushima, 770 Japan.

used throughout this work. Spores were formed in modified G medium [3] as follows [10].

Cells from a stock culture of *B. cereus* T were cultivated on nutrient agar at 30 C for 15 hr. Two loopfuls of this culture were inoculated into 200 ml of G medium and incubated on a reciprocal shaker (Iwashiyama Co., 150 rpm) at 30 C for 4.5 hr. Then, 20 ml of this culture were transferred to a flask containing 200 ml of fresh G medium, and the flask was shaken for 2.5 hr in the same way. After this procedure was repeated, the final culture was incubated under the same conditions to complete the sporulation process.

Free spores were collected and washed five to eight times with chilled, redistilled water by centrifugation at 4 C. Then they were lyophilized and stored in a desiccator at 5 C. Fresh spore suspensions were prepared as required and used within a week.

**Heat activation.** Fifty milligrams of spores were suspended in 10 ml of deionized water and this suspension was heated at 70 C for 30 min. The spores were collected and washed once with chilled, deionized water by centrifugation at 4 C. Then they were resuspended in 10 ml of deionized water.

**Preincubation.** Preincubation of unactivated spores with either L-alanine or inosine prior to germination was performed as required.

Unactivated spores (0.5 mg) were incubated in 3.0 ml of the medium containing 0.5 or  $5 \times 10^{-2}$  mM L-alanine (or inosine) for a certain time. Subsequently, 0.5 or  $5 \times 10^{-2}$  mM inosine (or L-alanine) was added and germination was observed. The filtration technique was used as required. After preincubation was performed in the same way, the spores were separated and washed twice with 10 ml of chilled, deionized water by filtration using a membrane filter (Toyo Roshi Co., Ltd., TM-2, 0.45  $\mu$ m) at 4 C. Then the spores were resuspended in chilled, deionized water.

Unless otherwise indicated, preincubation was performed at 30 C for 60 min in 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 8.0).

**Germination.** Germination was followed by measuring decreases in the optical density (O.D.) of a spore suspension at 520 nm as follows.

A spore suspension (5 mg/ml) was dropped into 3 ml of medium and adjusted to a final O.D. of approximately 0.8. The mixture was quickly shaken, and the decrease in O.D. was measured in a Hitachi 124 spectrophotometer equipped with an automatic recording apparatus. Unless otherwise indicated, all experiments were performed at 30 C in 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 8.0) containing various concentrations of germinants. Germination was expressed as  $O.D.t/O.D.i$ , where O.D.i is the initial O.D. and O.D.t is that after incubation for  $t$  min.

**Analysis of germination.** It has been pointed out by many workers that the occurrence of germination in a spore suspension is asynchronous and its kinetics reflect the summation of events occurring in the individual members of the populations [4, 8, 11, 13]. Therefore, to compare the germination process under various experimental conditions, we used three parameters,  $v$ ,  $k$  and  $O.D.f/O.D.i$ ; where  $v$  is the maximum value obtained by numerically differentiating  $[1 - (O.D.t/O.D.i)]$  with respect to a unit time (1 min),  $k$  is a reciprocal of the time at which  $v$  is obtained, and  $O.D.f/O.D.i$  is a final value of  $O.D.t/O.D.i$ . For simplicity, O.D.f was usually taken as an O.D. after incubation for 60 min. Under a given condition,  $v$  is the maximal germination rate per min and  $k$  is proportional to the reciprocal of the time required for half of the spore population to complete its germination.

**Chemicals.** Chemicals were purchased from Wako Pure Chemical Industries, Ltd. with the following exceptions: inosine was from Kohjin Co., Ltd. and yeast extract was from Difco Laboratories.

## RESULTS

### *Effects of Concentrations of L-Alanine and Inosine*

It is well known that heat-activated spores of *B. cereus* T can germinate in the presence of either L-alanine alone or inosine alone [1, 6, 14, 22]. In contrast, unactivated spores do not germinate in the presence of either germinant alone but germinate rapidly without heat activation in the presence of L-alanine and inosine [22]. We also obtained similar results.

The germination of unactivated spores in the presence of L-alanine and inosine (Ala-

Ino-induced germination) was observed at various concentrations of both germinants. As shown in Table 1, the values of  $v$  and  $k$  increased with higher concentrations of either germinant, while  $O.D.f/O.D.i$  de-

creased. A marked decrease in  $O.D.$  was not observed at concentrations of either germinant of less than  $1 \times 10^{-2}$  mM ( $O.D.f/O.D.i > 0.9$ , data are not shown). When comparing  $v$  or  $k$  obtained at the same levels

Table 1. Effects of concentrations of L-alanine and inosine on germination properties of unactivated spores of *B. cereus* T<sup>a)</sup>

Germination properties <sup>b)</sup>	Concentrations of L-alanine ( $\mu M$ )	Concentrations of inosine ( $\mu M$ )			
		20	30	40	50
$v \times 10^3$	20	3.0	8.6	9.4	20.6
	30	5.5	16.0	24.4	25.6
	40	5.0	21.5	24.8	26.9
	50	18.1	24.3	31.1	37.3
$k \times 10^2$	20	— <sup>c)</sup>	3.4	4.0	4.3
	30	3.5	4.1	4.8	5.3
	40	4.2	5.0	5.5	5.9
	50	4.8	5.5	6.2	6.4
$O.D. f/O.D.i$	20	0.918	0.765	0.730	0.532
	30	0.850	0.595	0.487	0.485
	40	0.867	0.520	0.492	0.469
	50	0.590	0.526	0.473	0.447

<sup>a)</sup> Germination was performed at 30 C in 0.1 M sodium phosphate (pH 8.0) containing L-alanine and inosine at various concentrations.

<sup>b)</sup> The values of  $v$ ,  $k$  and  $O.D.f/O.D.i$  were obtained from curves of the optical density at 520 nm as described in the Materials and Methods.

<sup>c)</sup> Not determined.

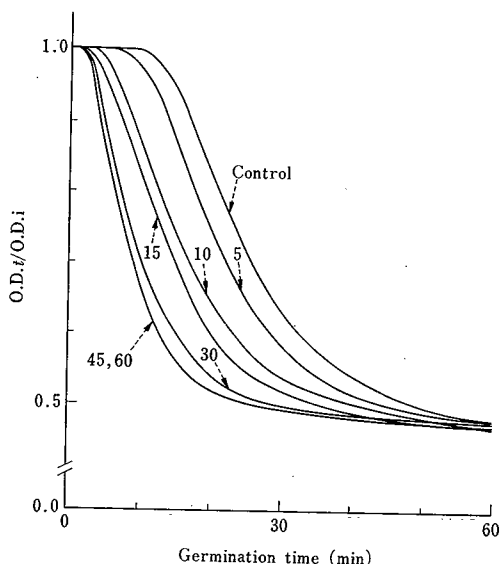


Fig. 1. Effect of preincubation time with L-alanine on the subsequent germination in the presence of L-alanine and inosine. Preincubation and germination were performed at 30 C in 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 8.0). Concentrations of L-alanine and inosine were  $5 \times 10^{-2}$  mM.  $O.D.t/O.D.i$  is the ratio of the optical density at a given time to the initial optical density at 520 nm. Numbers indicated represent time of preincubation in min.

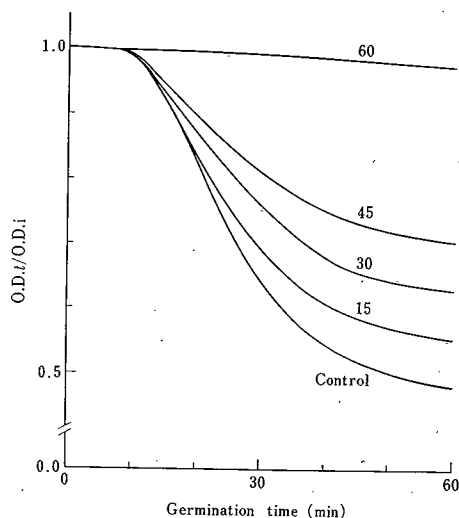


Fig. 2. Effect of preincubation time with inosine on the subsequent germination in the presence of L-alanine and inosine. Preincubation and germination were performed at 30 C in 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 8.0). Concentrations of L-alanine and inosine were  $5 \times 10^{-2}$  mM.  $O.D.t/O.D.i$  is the ratio of the optical density at a given time to the initial optical density at 520 nm. Numbers indicated represent time of preincubation in min.

Table 2. Effects of preincubation time with either L-alanine or inosine on subsequent germination of spores of *B. cereus* T<sup>a</sup>)

Preincubation time (min)	Preincubated with L-alanine			Preincubated with inosine		
	$v \times 10^3$	$k \times 10^2$	O.D.f/O.D.i	$v \times 10^3$	$k \times 10^2$	O.D.f/O.D.i
0	25.0	5.6	0.490	25.0	5.6	0.490
1	27.3	5.9	0.478	25.8	5.4	0.493
10	27.4	10.0	0.488	21.4	5.6	0.531
15	31.8	11.1	0.476	19.0	5.9	0.554
30	45.6	25.0	0.472	14.0	5.7	0.637
45	57.4	25.0	0.478	12.6	5.9	0.705
60	57.8	25.0	0.486	— <sup>b</sup> )	—	0.973

<sup>a</sup>) Unactivated spores were preincubated at 30 C in 0.1 M sodium phosphate (pH 8.0) containing  $5 \times 10^{-2}$  mM L-alanine or  $5 \times 10^{-2}$  mM inosine, and then germinated at 30 C in 0.1 M sodium phosphate (pH 8.0) containing  $5 \times 10^{-2}$  mM L-alanine and  $5 \times 10^{-2}$  mM inosine. The values of  $v$ ,  $k$  and O.D.f/O.D.i were obtained from curves of the optical density at 520 nm as described in the Materials and Methods.

<sup>b</sup>) Not determined.

(molar concentration) of total germinants (L-alanine plus inosine), the highest value was obtained at the same concentration of both germinants.

#### Effects of Preincubation with L-Alanine or Inosine

To determine which germinant was initially effective in the Ala-Ino-induced germination, unactivated spores were preincubated in the presence of either germinant alone ( $5 \times 10^{-2}$  mM) at 30 C for various times, and the courses of Ala-Ino-induced germination ( $5 \times 10^{-2}$  mM, respectively) were observed. The results obtained are shown in Figures 1 and 2, and summarized in Table 2. During preincubation for 60 min, no O.D. decrease was observed.

When the time of preincubation with L-alanine was increased (Fig. 1),  $v$  did not change significantly for the first 15 min, and then increased rapidly, reaching almost the maximum value after preincubation for 45 min. The value of  $k$  reached a maximum after incubation for 30 min. The O.D.f/O.D.i ( $0.481 \pm 0.009$ ) did not change appreciably with the preincubation time.

The increase in the time of preincubation with inosine (Fig. 2) caused marked changes in both  $v$  and O.D.f/O.D.i but not in  $k$ . When spores were preincubated with inosine for 60 min, they did not germinate at all.

These results indicate that preincubation of unactivated spores with either L-alanine or inosine alone had opposite effects on their subsequent germination in the presence of both germinants: preincubation with L-

alanine stimulated the initiation of the germination (Fig. 1), while that with inosine inhibited it (Fig. 2).

#### Effects of Temperature on Preincubation

Unactivated spores were preincubated with  $5 \times 10^{-2}$  mM L-alanine at 4–90 C for 30 min. After the addition of  $5 \times 10^{-2}$  mM inosine, their subsequent germination was observed at 30 C. The results are shown in Figure 3 by plotting  $k$  and O.D.f/O.D.i against temperature during preincubation.

The plot of  $k$  gave a rapid rise at 20–30 C, a rapid fall at 70–90 C and a plateau between 30 C and 70 C. The highest value of  $k$  was shown at 65 C. On the other hand, the plot of O.D.f/O.D.i showed a rapid fall at 20–30 C, a rapid rise at 85–90 C and a plateau between 30 C and 80 C. These results indicate that the optimum temperature range for preincubation was about 30–70 C.

#### Effects of pH of the Medium on Preincubation and Subsequent Germination

Spores were preincubated for 60 min at pH 8.0 with 0.5 mM L-alanine and washed twice with deionized water by filtration, and the subsequent germination was observed at pH 5.0, 8.0 and 9.4 in the presence of 0.5 mM inosine alone (Fig. 4).

The spores germinated at pH 8.0 which shows that the effect of L-alanine during preincubation appeared in the subsequent germination even after the spores were washed. They could also germinate at pH 9.4 but not at pH 5.0. These results suggest

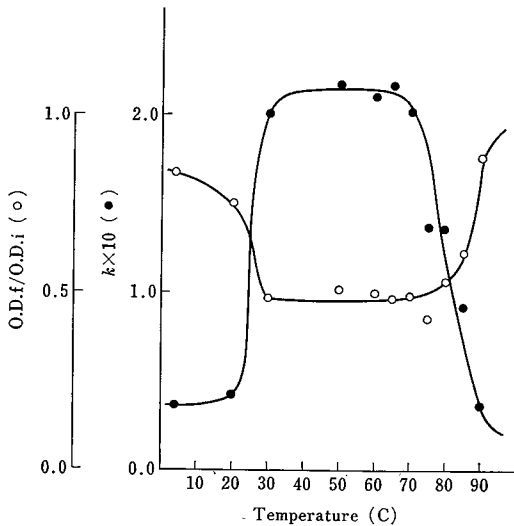


Fig. 3. Effect of preincubation temperature on subsequent germination. Unactivated spores of *B. cereus* T were preincubated at various temperatures for 30 min in 0.1 M sodium phosphate (pH 8.0) containing  $5 \times 10^{-2}$  mM L-alanine, and their germination was observed at 30 C in 0.1 M sodium phosphate (pH 8.0) containing  $5 \times 10^{-2}$  mM L-alanine and  $5 \times 10^{-2}$  mM inosine. The  $k$  (●) and the O.D.f/O.D.i (○) are plotted against preincubation temperature. The  $k$  was obtained from curves of the optical density at 520 nm as described in the Materials and Methods. The O.D.f/O.D.i is the final value of O.D./O.D.i.

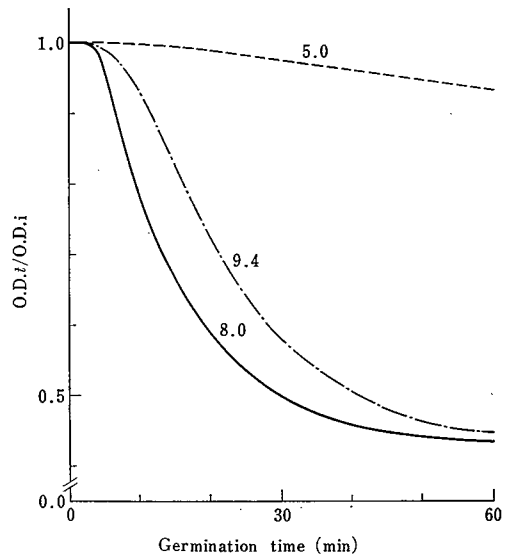


Fig. 4. Effect of pH of the medium on subsequent germination. Unactivated spores of *B. cereus* T were preincubated at 30 C for 60 min in 0.1 M sodium phosphate (pH 8.0) containing 0.5 mM L-alanine, and subsequent germination was observed at 30 C in 0.1 M sodium phosphate (pH 5.0, 8.0 and 9.4) containing 0.5 mM inosine. O.D.t/O.D.i is the ratio of the optical density at a given time to the initial optical density at 520 nm. Numbers indicated represent pH of subsequent germination media.

that the subsequent germination in the presence of inosine alone may be identical to the germination in the presence of both germinants [14].

In contrast, when unactivated spores were preincubated at pH 5.0 and 9.4, they germinated at pH 8.0 to the same degree as the spores preincubated at pH 8.0 (Fig. 5). However, in the subsequent germination of the spores preincubated at pH 5.0, slight retardation of the germination was observed.

#### DISCUSSION

The most effective germination of *B. cereus* T spores is initiated by L-alanine in the presence of purine ribosides [1, 2]. Warren and Gould [14] suggested that the presence of an amino acid was essential for germination of spores of *B. cereus* T in the presence of purine ribosides. Furthermore, Yousten [22] pointed out that inosine alone did not bring about a pregerminative structural change in spores such as that caused by L-alanine for more rapid germination.

In comparisons of data on germination of unactivated spores at the same levels of total germinants (L-alanine plus inosine), the highest values of  $v$  were found at the same concentrations of both germinants (Table 1). This suggests that the cooperative action of both germinants is a maximum when they are present in a ratio 1:1.

Preincubations of unactivated spores of *B. cereus* T with either  $5 \times 10^{-2}$  mM L-alanine or inosine had opposite effects on subsequent germination in the presence of concentrations of  $5 \times 10^{-2}$  mM of both germinants. Ala-Ino-induced germination was stimulated by preincubation with L-alanine (Fig. 1) but inhibited by that with inosine (Fig. 2).

Jones and Gould [5] and Yousten [22] reported that inosine might enhance the activity of alanine racemase. From this point of view, it is possible that the inhibition of subsequent germination of the spores preincubated with inosine may be due to the effect of D-alanine which was converted from L-alanine by active alanine racemase.

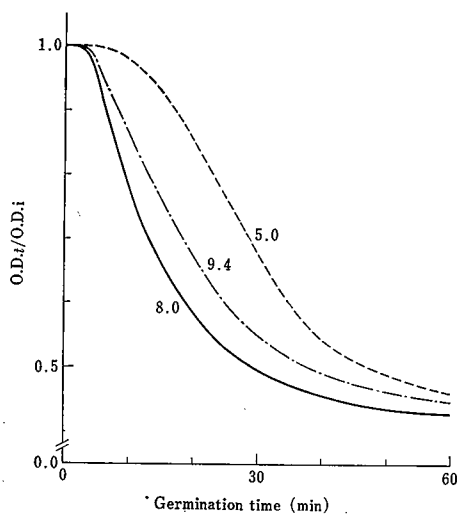


Fig. 5. Effect of pH of preincubation medium on subsequent germination. Unactivated spores of *B. cereus* T were preincubated at 30 C for 60 min in 0.1 M sodium phosphate (pH 5.0, 8.0 and 9.4) containing 0.5 mM L-alanine, and subsequent germination was observed at 30 C in 0.1 M sodium phosphate (pH 8.0) containing 0.5 mM inosine. O.D./O.D.i is the ratio of the optical density at a given time to the initial optical density at 520 nm. Numbers indicated represent pH of preincubation media.

However, this seems to be unlikely since the same results as above were obtained in the presence of D-cycloserine (unpublished data).

These results suggest that L-alanine and inosine sequentially act to promote germination at the same site(s) in the spores of *B. cereus* T. The unactivated spores may initially be brought into some pregerminative state by the action of L-alanine which seems to act as an allosteric effector or a cofactor of germination enzymes [7, 12, 21]. Subsequently, the germination process is carried out under the action of inosine. It was found that the effect of initial action of L-alanine on unactivated spores remained after washing and that the pH dependence of the preincubation with L-alanine was not so marked as that of the subsequent germination in the presence of inosine (Figs. 4 and 5). These results suggest that the role(s) of L-alanine in preincubation are remarkably different from those in germination of heat-activated spores. However, it is likely that the former are included the latter.

With respect to the subsequent germina-

tion reaction with inosine, it appears possible that the roles of inosine can be replaced by those of L-alanine under certain conditions, since heat-activated spores can germinate in the presence of L-alanine alone. This possibility has been supported by the observation of Watabe et al [15]. They reported that during germination the spores of *B. thiaminolyticus* incorporated  $^{14}\text{C}$ -L-alanine through two distinct steps: the first, a minor uptake before the initiation of decrease in O.D. and the second, a continuous active uptake accompanied by a decrease in O.D.

Heat activation required slightly higher temperatures than preincubation with L-alanine since the optimum temperature range for heat activation was 70–80 C [14]. During preincubation with L-alanine, unactivated spores did not initiate germination. These results seem to indicate that the first reaction of unactivated spores with L-alanine is different from the heat-induced activation. However, it is more likely that the heat-induced activation is a kind of initial reaction of unactivated spores induced by L-alanine, i.e., heat treatment of unactivated spores in the absence of L-alanine may require higher temperatures to produce L-alanine or its active analogues in the spores.

These results strongly suggest that L-alanine plays two functional roles in the germination of spores of *B. cereus* T, and the reaction induced by the initial role of L-alanine may be an intrinsic character in the mechanism of their germination.

#### ACKNOWLEDGMENT

The authors wish to thank Dr. S. Yamashita for his invaluable advice and Mr. E. Yoshikawa for his technical assistance throughout this work.

#### REFERENCES

- [1] Foerster, H.F., and Foster, J.W. 1966. Response of *Bacillus* spores to combinations of germinative compounds. *J. Bacteriol.* **91**: 1168–1177.
- [2] Gould, G.W. 1971. Methods for studying bacterial spores, p. 327–382. In Norris, J.R., and Ribbons, D.W. (eds), *Methods in microbiology*, vol. 6A, Academic Press Inc., London.
- [3] Hashimoto, T., Black, S.H., and Gerhardt, P. 1960. Development of fine structure, thermostability, and dipicolinate during sporogenesis in a bacillus. *Canad. J. Microbiol.* **6**: 203–212.
- [4] Hashimoto, T., Friebe, W.R., and Conti, S.F. 1969. Germination of single bacterial spores. *J. Bacteriol.* **98**: 1011–1020.

- [5] Jones, A., and Gould, G.W. 1968. Stimulation of germination of bacterial spores by analogues of D-alanine. *J. Gen. Microbiol.* **53**: 383-394.
- [6] Lawrence, N.L. 1955. The cleavage of adenosine by spores of *Bacillus cereus*. *J. Bacteriol.* **70**: 577-582.
- [7] O'Connor, R.J., and Halvorson, H.O. 1961. L-Alanine dehydrogenase: Mechanism controlling the specificity of amino acid-induced germination of *Bacillus cereus* spores. *J. Bacteriol.* **82**: 706-713.
- [8] Powell, J.F. 1950. Factors affecting the germination of thick suspensions of *B. subtilis* spores in L-alanine solution. *J. Gen. Microbiol.* **4**: 330-338.
- [9] Powell, J.F., and Hunter, J.R. 1955. Spore germination in the genus *Bacillus*: the modification of germination requirements as a result of preheating. *J. Gen. Microbiol.* **13**: 59-67.
- [10] Tani, I., Sagara, T., and Shibata, H. 1975. Germination of glycine spores of *B. cereus* T. Japan. *J. Bacteriol.* **30**: 495-499. (in Japanese)
- [11] Vary, J.C., and Halvorson, H.O. 1965. Kinetics of germination of *Bacillus* spores. *J. Bacteriol.* **89**: 1340-1347.
- [12] Vary, J.C., and Halvorson, H.O. 1968. Initiation of bacterial spore germination. *J. Bacteriol.* **95**: 1327-1334.
- [13] Vary, J.C., and McCormick, N.G. 1965. Kinetics of germination of aerobic *Bacillus* spores, p. 188-198. In Campbell, L.L., and Halvorson, H.O. (eds), *Spores III*, American Society for Microbiology, Ann Arbor, Mich.
- [14] Warren, S.C., and Gould, G.W. 1968. *Bacillus cereus* spore germination: Absolute requirements for an amino acid. *Biochim. Biophys. Acta* **170**: 341-350.
- [15] Watabe, K., Ichikawa, T., and Kondo, M. 1974. Biochemical studies on germination of bacterial spores. I. Incorporation of  $^{14}\text{C}$ -L-alanine into spores of *Bacillus thiaminolyticus* during germination. *Japan. J. Microbiol.* **18**: 173-180.
- [16] Watabe, K., Nishihara, T., and Kondo, M. 1974. Biochemical studies on germination of bacterial spores. II. The inhibitory mechanism of D-alanine on L-alanine-induced germination of *Bacillus thiaminolyticus*. *Japan. J. Microbiol.* **18**: 181-184.
- [17] Wax, R., and Freese, E. 1968. Initiation of the germination of *Bacillus subtilis* spores by a combination of compounds in place of L-alanine. *J. Bacteriol.* **95**: 433-438.
- [18] Wax, R., Freese, E., and Cashel, M. 1967. Separation of two functional roles of L-alanine in the initiation of *Bacillus subtilis* spore germination. *J. Bacteriol.* **94**: 522-529.
- [19] Woese, C.R., Morowitz, H.J., and Hutchinson III, C.A. 1958. Analysis of action of L-alanine analogues in spore germination. *J. Bacteriol.* **76**: 578-588.
- [20] Woese, C.R., Vary, J.C., and Halvorson, H.O. 1968. A kinetic model for bacterial spore germination. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **59**: 869-875.
- [21] Wolgamott, G.D., and Durham, N.N. 1971. Initiation of spore germination in *Bacillus cereus*: a proposed allosteric receptor. *Canad. J. Microbiol.* **17**: 1043-1048.
- [22] Yousten, A.A. 1975. Germination of *Bacillus cereus* endospores: A proposed role for heat shock and nucleosides. *Canad. J. Microbiol.* **22**: 1192-1197.

## Inhibition by Ammonium Ion of Germination of Unactivated Spores of *Bacillus cereus* T Induced by L-Alanine and Inosine

Hirofumi SHIBATA, Hiroaki TAKAMATSU, and Isamu TANI

Department of Microbial Chemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences,  
University of Tokushima, Tokushima

(Received for publication, January 6, 1977)

**Abstract** Studies were carried out on the inhibitory effect of  $\text{NH}_4^+$  on germination of spores of *Bacillus cereus* T induced by L-alanine and inosine. Kinetic analysis showed that  $\text{NH}_4^+$  inhibited the germination competitively. Its inhibitory effect was greater when the unactivated spores had been preincubated with L-alanine.  $\text{NH}_4^+$  did not inhibit the response of unactivated spores to L-alanine during preincubation. These results suggest that L-alanine sensitizes the spores to the inhibitory effect of  $\text{NH}_4^+$ .

Germination proceeds well in the presence of both L-alanine and inosine. Previously we suggested that germination of unactivated spores of *Bacillus cereus* T induced by L-alanine and inosine may proceed by at least two steps, the first step induced by L-alanine and the second by inosine (14).

Inorganic ions are also required for complete germination: Levinson and Sevag (8) reported that manganese ions stimulate germination, and Rode and Foster (9-11) reported that germination was poor in the absence of ions or at low ionic strength. Generally, an ionic strength of about 0.1 M is optimal for germination (1, 13).

Of the various cations studied previously (6, 7, 11, 17, 18),  $\text{NH}_4^+$  has the most interesting effects: it stimulated germination of heat-activated spores of some strains of *Bacillus subtilis* and it induced germination of the spores of *Bacillus megaterium* QM B1551 in the presence of nitrate, but it did not facilitate germination of *B. cereus* T. These findings suggest that the spores of different strains and species require different ions for germination.

The present study was conducted to confirm that  $\text{NH}_4^+$  plays a role in regulating the initiation of germination of *B. cereus* T in the presence of L-alanine and inosine, and also to obtain information on the action of  $\text{NH}_4^+$ .

### MATERIALS AND METHODS

**Organism.** *B. cereus* T (obtained from Dr. T. Hashimoto, Loyola University, Chicago) was used.



*Sporulation, harvesting and preincubation procedures.* The procedures used to obtain sporulation, and for harvesting and preincubation were as described previously (14).

*Germination procedure.* Spores were allowed to germinate in the presence of L-alanine and inosine (Ala-Ino-induced germination) in buffer solution containing ammonium chloride, ammonium phosphate or sodium phosphate (0.1 M, pH 8.0). Germination was measured as the decrease in optical density (OD) of the spore suspension at 520 nm in a Hitachi double beam spectrophotometer, model 124, equipped with a Hitachi automatic recording apparatus, model QPD 54. The decrease in OD was measured continuously during incubation at 30 C.

Germination was usually expressed as  $ODt/ODi$ , where  $ODi$  is the initial OD and  $ODt$  is that after  $t$  min of incubation. The extent of germination was expressed in terms of  $G$  or  $G_i$ , with  $G$  defined as  $[1 - (ODf/ODi)]$  in the absence of  $NH_4^+$  and  $G_i$  as  $G$  in the presence of  $NH_4^+$ .  $ODf/ODi$  was defined as the final value of  $ODt/ODi$ ;  $ODf$  was usually taken as the OD after 60 min of incubation.

*Release of dipicolinic acid.* The dipicolinic acid (DPA) content of spores was determined colorimetrically by the method of Janssen et al. (5) in extracts prepared by autoclaving spores at 121 C for 15 min. DPA release was expressed as a percentage of the total DPA. The total DPA of *B. cereus* T spores was 9.4% of their dry weight under the present conditions.

*Loss of heat resistance.* Spores were incubated in germination medium for 60 min at 30 C and then transferred to deionized water (1:10 dilution) at 65 C. Samples were heated for 30 min at 65 C, and cooled in an ice bath, and then 0.1 ml of appropriately diluted samples was plated on nutrient agar. After 24 hr of incubation at 30 C, colonies were counted. Viable spore counts were expressed as percentages of the initial count.

*Phase-contrast microscopy.* A Nikon microscope, model Biophoto VBS, equipped with a 100 $\times$  objective lens (CF Plan Achrom DM 100/1.25, Nikon) was used for dark phase-contrast microscopy. Photomicrographs were taken on panchromatic film (Neopan F, Fuji Photo Film Co., Ltd.).

*Chemicals.* Chemicals were purchased from Wako Pure Chemical Industries, Ltd. with the following exceptions: inosine was from Kohjin Co., Ltd. and yeast extract from Difco Laboratories.

## RESULTS

### *Properties of Ala-Ino-Induced Germination of Unactivated Spores in Ammonium Chloride Buffer*

Ala-Ino-induced germination of unactivated spores was estimated in 0.1 M ammonium chloride buffer ( $NH_4$  buffer) and in 0.1 M sodium phosphate buffer (Na buffer).

In the early stage of germination, the decrease in OD and release of DPA were quicker in  $NH_4$  buffer than in Na buffer (Figs. 1 and 2). However, the final levels of OD decrease and DPA release were less in  $NH_4$  buffer than in Na buffer.

After 60 min in  $NH_4$  buffer, about one quarter of the spores were still heat-resistant (Table 1) and appeared bright under a phase-contrast microscope (Fig.

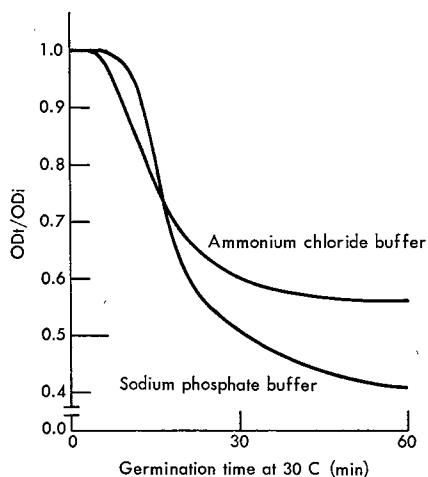


Fig. 1. Ala-Ino-induced germination of unactivated spores of *B. cereus* T. Germination was observed at 30°C in the presence of L-alanine and inosine (0.05 mM, each) in ammonium chloride or sodium phosphate buffer (0.1 M, pH 8.0). Germination in ammonium chloride was similar to that in ammonium phosphate. OD<sub>t</sub>/OD<sub>i</sub> is the ratio of the optical density at a given time to the initial optical density at 520 nm.

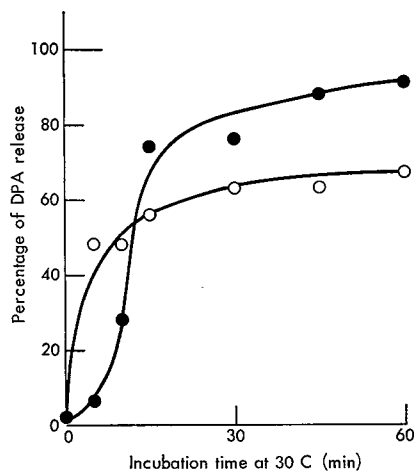


Fig. 2. DPA release during Ala-Ino-induced germination of unactivated spores of *B. cereus* T. Conditions for germination were as described in Fig. 1. DPA release is shown as a percentage of the total DPA: (○), ammonium chloride buffer; (●), sodium phosphate buffer.

Table 1. Loss of heat resistance of germinated spores of *B. cereus* T<sup>a)</sup>

Germination buffer	Survivors <sup>b)</sup>	Loss of heat resistance
Sodium phosphate	0.6%	99.4%
Ammonium chloride	27.8	72.2

<sup>a)</sup> Unactivated spores of *B. cereus* T were incubated for 60 min at 30 C in the presence of L-alanine and inosine (0.05 mM, each) in the indicated buffer (0.1 M, pH 8.0).

<sup>b)</sup> Survivors were measured after heating the spores for 30 min at 65 C. Viable spore counts are given as percentages of the initial count. Results in ammonium phosphate buffer were not significantly different from those in ammonium chloride buffer.

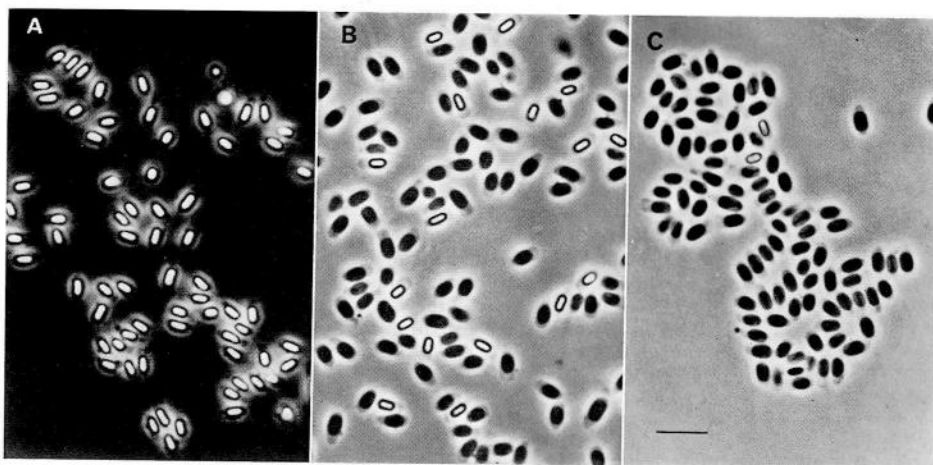


Fig. 3. Phase-contrast photomicrographs of *B. cereus* T spores. Ungerminated spores (A) and spores after incubation in ammonium chloride (B) or sodium phosphate (C) for 60 min at 30 C. Conditions for germination were as described in Fig. 1. The bar in the micrograph represents 5  $\mu$ m: CF Plan Achro DM  $\times 100$ , CF Photo  $\times 5$ .

3B), whereas most of the spores (99.4%) in Na buffer were heat-sensitive (Table 1) and appeared dark under the phase-contrast microscope (Fig. 3C). Thus, a quarter of the spores in  $\text{NH}_4$  buffer containing L-alanine and inosine (0.05 mM, each) did not germinate.

The levels of germination in buffer containing L-alanine and inosine (0.05 mM, each) estimated by various parameters are summarized in Table 2. The results show that in  $\text{NH}_4$  buffer under the conditions employed the spores showed about 74 % of the germination achieved in Na buffer. The extent of germination was also reduced using ammonium phosphate in place of ammonium chloride, or using 0.1 M Na buffer supplemented with 0.05 M ammonium chloride. Therefore, the reduction seems to be due to the presence of  $\text{NH}_4^+$ .

Table 2. Extents of germination of unactivated spores of *B. cereus* T induced by L-alanine and inosine in ammonium chloride buffer<sup>a)</sup>

Index of germination	Extent of germination <sup>b)</sup>
OD decrease	74.7%
DPA release	73.1
Loss of heat resistance	72.6
Phase darkening	75.0
Mean	73.9

<sup>a)</sup> The results are summarized from Figs. 1 and 2 and Table 1. Phase darkening of a total of 100 spores was examined under a phase-contrast microscope.

<sup>b)</sup> Results are values after incubation for 60 min at 30 C. To facilitate comparison, the results are expressed as percentages of the values obtained in sodium phosphate buffer.

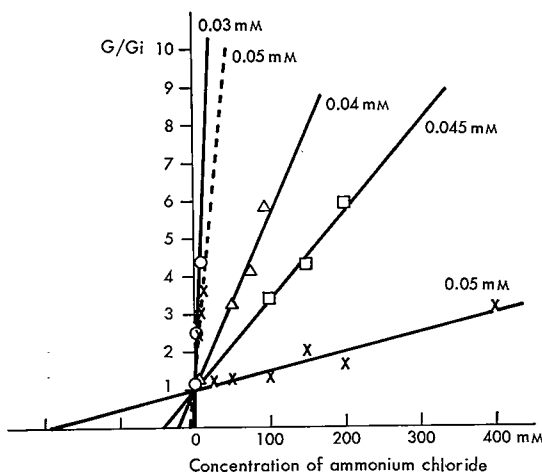


Fig. 4. Effect of the concentration of ammonium chloride in inhibition of Ala-Ino-induced germination. The extents of Ala-Ino-induced germination of unactivated spores (continuous lines) and preincubated spores (broken line) were measured in the presence of various concentrations of ammonium chloride in sodium phosphate buffer (0.1 M, pH 8.0) containing L-alanine and inosine at the indicated concentrations. Preincubation was carried out in sodium phosphate or ammonium chloride buffer (0.1 M, pH 8.0) containing L-alanine (0.05 mM) at 30 C for 60 min.

#### *Effect of the Concentration of $\text{NH}_4^+$ in Inhibition of Ala-Ino-Induced Germination*

The inhibitory effects of various concentrations of  $\text{NH}_4^+$  on Ala-Ino-induced germination of unactivated spores were examined.

Figure 4 shows that a plot of  $G/G_i$  against the concentration of  $\text{NH}_4^+$  was linear at given concentrations of L-alanine and inosine. Since the slope of each line de-

Table 3. Influence of the preincubation period with L-alanine on the extent of Ala-Ino-induced germination<sup>a)</sup>

Preincubation period	Preincubated in sodium phosphate	Preincubated in ammonium chloride
0 min	0.483 (100%)	0.489 (100%)
5	0.372 ( 77.1)	0.353 ( 72.2)
10	0.279 ( 57.8)	0.241 ( 49.3)
20	0.226 ( 46.9)	0.111 ( 22.7)
30	0.176 ( 36.5)	0.053 ( 10.8)
60	— <sup>b)</sup> ( 0 )	— ( 0 )
60 <sup>c)</sup>		0.485 ( 99.2)
Overnight <sup>d)</sup>		0.490 (100.2)

<sup>a)</sup> Unactivated spores of *B. cereus* T were preincubated with 0.05 mM L-alanine in sodium phosphate buffer or ammonium chloride buffer (0.1 M, pH 8.0) for the indicated times at 30 C, and then resuspended in 0.05 M sodium phosphate buffer (pH 8.0) containing 0.05 mM L-alanine, 0.05 mM inosine and 0.05 M NH<sub>4</sub>Cl. Ala-Ino-induced germination was carried out at 30 C. Values of  $[1 - (OD_{60}/OD_i)]$  are shown.

<sup>b)</sup> OD did not change significantly.

<sup>c)</sup> Unactivated spores were preincubated in 0.1 M ammonium chloride buffer alone for 60 min at 30 C.

<sup>d)</sup> Unactivated spores were preincubated in 0.1 M ammonium chloride buffer alone overnight at 4 C.

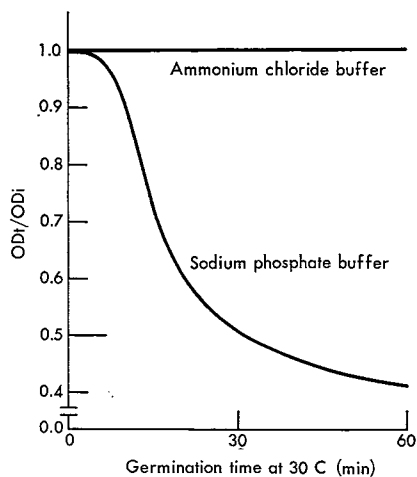


Fig. 5. Germination of *B. cereus* T spores induced by inosine alone. Unactivated spores were preincubated with 0.5 mM L-alanine in 0.1 M ammonium chloride buffer (pH 8.0) or 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 8.0) for 60 min at 30 C. Then the spores were washed once with chilled, deionized water and incubated at 30 C in the indicated buffer (0.1 M, pH 8.0) containing 0.5 mM inosine alone. OD<sub>t</sub>/OD<sub>i</sub> is the ratio of the optical density at a given time to the initial optical density at 520 nm.

pended on the concentrations of the latter,  $\text{NH}_4^+$  seems to cause competitive inhibition of the action of L-alanine and/or inosine.

*Influence of Preincubation of Unactivated Spores with L-Alanine on the Inhibition by  $\text{NH}_4^+$*

Unactivated spores were preincubated with 0.05 mM L-alanine at 30 °C for various periods in  $\text{NH}_4$  buffer or Na buffer, and then the levels of Ala-Ino-induced germination were measured.

As shown in Table 3, the values of  $G_i$  decreased greatly with increases in the preincubation period. However, when unactivated spores were suspended in  $\text{NH}_4$  buffer without L-alanine and inosine for 60 min at 30 °C or overnight at 4 °C, their subsequent germination induced by L-alanine plus inosine was not affected. In contrast, preincubation of unactivated spores with L-alanine in Na or  $\text{NH}_4$  buffer resulted in inhibition of germination by lower concentrations of  $\text{NH}_4^+$  (Fig. 4, broken line).

To examine which part in the germination process was inhibited by  $\text{NH}_4^+$ , we preincubated unactivated spores with 0.5 mM L-alanine in Na or  $\text{NH}_4$  buffer for 60 min at 30 °C and then washed them with chilled deionized water and measured their germination in the presence of 0.5 mM inosine in the same buffers.

Results showed that spores in Na buffer germinated but those in  $\text{NH}_4$  buffer did not (Fig. 5). These results suggest that  $\text{NH}_4^+$  inhibited the response of spores to inosine, but not to L-alanine.

## DISCUSSION

Rode and Foster (11) reported that spores of *B. cereus* T germinated well in solutions of sodium salts but very poorly in solutions of ammonium salts. We confirmed this result (Table 2) and demonstrated that  $\text{NH}_4^+$  is inhibitory, even in the presence of  $\text{Na}^+$ .

Kinetic analysis showed that Ala-Ino-induced germination was inhibited competitively by  $\text{NH}_4^+$  (Fig. 4). The inhibitory effect of  $\text{NH}_4^+$  was enhanced by preincubating the unactivated spores with L-alanine, but not without even when the spores were preincubated in solution containing  $\text{NH}_4^+$  (Table 3). As shown in Fig. 5, however,  $\text{NH}_4^+$  did not inhibit the response of unactivated spores to L-alanine during the preincubation. These results suggest that L-alanine sensitizes the spores to the inhibitory action of  $\text{NH}_4^+$ .

Previously we found that L-alanine activated the spores to respond to inosine (14). To explain the effects of L-alanine, inosine and/or  $\text{NH}_4^+$  on the spores, we tentatively postulated that there are two types of activation of spores by L-alanine by which the spores become sensitive to inosine and  $\text{NH}_4^+$ , respectively. When unactivated spores are incubated with L-alanine, inosine and  $\text{NH}_4^+$ , one of the two reactions which predominates will determine whether the spores germinate or remain in the resting state. Thus populations that require relatively long times for initiating germination (16) will be more likely to be affected by  $\text{NH}_4^+$ .

An alternative explanation is as follows: different phases of the germination process of an individual spore may be stimulated and/or inhibited by  $\text{NH}_4^+$ . In the

present work, the Ala-Ino-induced germination of unactivated spores in  $\text{NH}_4$  buffer was not only inhibited but also partially stimulated by the cation (Figs. 1 and 2). Moreover, the germinations of single spores of some species showed bimodal kinetics (2, 15), and Hashimoto et al (3, 4) reported that the second phase of germination of *B. cereus* T spores was inhibited by high concentrations of  $\text{CaCl}_2$  or high temperature. However, this explanation for the inhibitory action of  $\text{NH}_4^+$  is unlikely because studies on heat resistance of the spores germinated in  $\text{NH}_4$  buffer (Table 1) and their phase-contrast photomicrographs (Fig. 3) showed that germination of some of the population was inhibited by  $\text{NH}_4^+$ .

Some previous reports (12, 13) support the first possible mechanism, in which alterations, including conformational changes, of spore coat proteins or protein receptor sites for germinants by ions might influence germination. Thus it seems likely that  $\text{NH}_4^+$  inhibits germination by arresting alterations of these proteins.

We are indebted to Kohgaku Co., Ltd. for facilitating use of the phase-contrast microscope, Nikon Biophoto VBS. We also wish to express our gratitude to Miss T. Yamamoto for technical assistance.

#### REFERENCES

- 1) Fleming, H. P., and Ordal, Z. J. 1964. Responses of *Bacillus subtilis* spores to ionic environments during sporulation and germination. *J. Bacteriol.* **88**: 1529–1537.
- 2) Hashimoto, T., Friebe, W. R., and Conti, S. F. 1969. Germination of single bacterial spores. *J. Bacteriol.* **98**: 1011–1020.
- 3) Hashimoto, T., Friebe, W. R., and Conti, S. F. 1969. Microgermination of *Bacillus cereus* spores. *J. Bacteriol.* **100**: 1385–1392.
- 4) Hashimoto, T., Friebe, W. R., and Conti, S. F. 1972. Kinetics of germination of heat-injured *Bacillus cereus* spores, p. 409–415. In Halvorson, H. O., Hanson, R., and Campbell, L. L. (eds), *Spores V*, American Society for Microbiology, Washington, D. C.
- 5) Janssen, F. W., Lund, A. J., and Anderson, L. E. 1958. Colorimetric assay for dipicolinic acid in bacterial spores. *Science* **127**: 26–27.
- 6) Levinson, H. S., and Feecherry, F. E. 1975. Influence of cations on nitrate-induced germination of *Bacillus megaterium* QM B1551 spores, p. 495–505. In Gerhardt, P., Costilow, R. N., and Sadoff, H. L. (eds), *Spores VI*, American Society for Microbiology, Washington, D. C.
- 7) Levinson, H. S., and Hyatt, M. T. 1962. Nitrogenous compounds in germination and post-germinative development of *Bacillus megaterium* spores. *J. Bacteriol.* **83**: 1224–1230.
- 8) Levinson, H. S., and Sevag, M. G. 1953. Stimulation of germination and respiration of the spores of *Bacillus megaterium* by manganese and monovalent anions. *J. Gen. Physiol.* **36**: 617–629.
- 9) Rode, L. J., and Foster, J. W. 1962. Ionic germination of spores of *Bacillus megaterium* QM B1551. *Arch. Mikrobiol.* **43**: 183–200.
- 10) Rode, L. J., and Foster, J. W. 1962. Ionic and nonionic compounds in the germination of spores of *Bacillus megaterium* Texas. *Arch. Mikrobiol.* **43**: 201–212.
- 11) Rode, L. J., and Foster, J. W. 1962. Ions and the germination of spores of *Bacillus cereus* T. *Nature* **194**: 1300–1301.
- 12) Rode, L. J., and Foster, J. W. 1966. Influence of exchangeable ions on germinability of bacterial spores. *J. Bacteriol.* **91**: 1582–1588.
- 13) Sacks, L. E. 1972. Influence of intra- and extracellular cations on the germination of bacterial spores, p. 437–442. In Halvorson, H. O., Hanson, R., and Campbell, L. L. (eds), *Spores V*, American Society for Microbiology, Washington, D. C.
- 14) Shibata, H., Takamatsu, H., and Tani, I. 1976. Germination of unactivated spores of *Bacillus cereus* T: Effect of preincubation with L-alanine or inosine on the subsequent germination. *Japan. J. Microbiol.* **20**: 529–535.
- 15) Uehara, M., and Frank, H. A. 1967. Sequence of events during germination of putrefactive anaerobe 3679 spores. *J. Bacteriol.* **94**: 506–511.

- 16) Vary, J. C., and Halvorson, H. O. 1965. Kinetics of germination of *Bacillus* spores. J. Bacteriol. **89**: 1340-1347.
- 17) Wax, R., Freese, E., and Cashel, M. 1967. Separation of two functional roles of L-alanine in the initiation of *Bacillus subtilis* spore germination. J. Bacteriol. **94**: 522-529.
- 18) Wolf, J., and Thorley, C. M. 1957. The effects of various germination agents on the spores of some strains of *B. subtilis*. J. Appl. Bacteriol. **20**: 384-389.

---

Requests for reprints should be addressed to Dr. Isamu Tani, Department of Microbial Chemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of Tokushima, Shomachi 1-78, Tokushima 770, Japan.



## Inhibition by Potassium Ion of the Pregerminative Response to L-Alanine of Unactivated Spores of *Bacillus cereus* T

Hirofumi SHIBATA, Hiroaki TAKAMATSU, Masako MINAMI, and Isamu TANI

*Department of Microbial Chemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences,  
University of Tokushima, Tokushima*

(Received for publication, September 16, 1977)

**Abstract** The effect of potassium ion on L-alanine-inosine-induced germination of unactivated spores of *Bacillus cereus* T was studied. Unactivated spores germinated in 0.1 M sodium phosphate buffer (NaPB), but not 0.1 M potassium phosphate buffer (KPB), at pH 8.0 and at 30 C. Inhibition of germination was also observed on incubation of unactivated spores in NaPB containing potassium chloride. Previously it was demonstrated that germination of unactivated spores involves at least two steps, one induced by L-alanine, and the other by inosine. Potassium ion seems to inhibit the response of the spores to inosine, because: (1) Spores that had been preincubated with L-alanine in NaPB or KPB, germinated in NaPB but not KPB in the presence of inosine. (2) During germination in NaPB, incorporation of L-[<sup>14</sup>C]alanine showed bimodal kinetics with a rapid first phase and a second continuous phase, but in KPB the second phase of incorporation did not occur.

The events occurring before germination of unactivated spores are discussed with reference to the initiation of germination.

Dormant bacterial spores change to a metabolically active form during germination. This change is accompanied by certain characteristic events, which have been used as criteria of germination; these events include loss of heat resistance, reduction of the dipicolinate content, acquisition of stainability, and decrease in optical density (2). From the metabolic point of view, however, it can be considered that some factors leading to the initiation of germination have already occurred before these events become apparent.

L-Alanine is one of the best known of the substances that initiate germination of spores of some bacterial species. L-Alanine is thought to play two distinct roles in germination (11, 13), and this idea is strongly supported by the finding of two distinct profiles of incorporation of L-alanine during germination of *Bacillus thiaminolyticus* spores (12). We reported previously (10) that unactivated spores of *Bacillus cereus* T can germinate in the presence of inosine alone if they have been preincubated with L-alanine. This function of L-alanine seems to be quite different from that of the amino acid during L-alanine-inosine-induced germination of heat-activated spores.

A stimulatory effect of  $\text{Na}^+$  and an inhibitory effect of  $\text{K}^+$  on germination of unactivated spores of *B. cereus* T were shown by Rode and Foster (7), but further studies have not been made on the  $\text{K}^+$  effect. Ionic environments are extremely important in germination, and it has been pointed out that the cardinal event in germination is ion-dependent (3).

Being interested in the roles of ions in germination, in this work we studied the effect of  $\text{K}^+$  on germination of unactivated spores of *B. cereus* T.

#### MATERIALS AND METHODS

*Organism and culture method.* *B. cereus* T (obtained from Dr. T. Hashimoto, Loyola University of Chicago, Strich School of Medicine) was used.

Spores, produced as described previously (10), were harvested and washed with chilled, deionized water by repeated centrifugation (8,000 rpm) at 4 C.

*Germination.* Germination was estimated by measuring decrease in the optical density (OD) of the spore suspension at 520 nm in a Hitachi double beam spectrophotometer, model 124, equipped with a Hitachi automatic recording apparatus, model QPD 54. Cuvettes of 1-cm light path were used.

Unless otherwise indicated, unactivated spores (0.3 mg, dry weight) were suspended in 3 ml of buffer solution (pH 8.0) containing 0.05 mM L-alanine, 0.05 mM inosine and either 0.1 M sodium phosphate or 0.1 M potassium phosphate. The spore suspension was then quickly shaken and the decrease in OD was measured continuously during incubation at 30 C.

*Preincubation and subsequent germination.* Unactivated spores (1.0 mg, dry weight) were suspended in 1.5 ml of buffer solution (pH 8.0) containing 0.5 mM L-alanine and either 0.1 M sodium phosphate or 0.1 M potassium phosphate. The spore suspension was incubated for 60 min at 30 C, cooled in an ice-bath, and centrifuged in an Eppendorf Microfuge, model 3,200, for 2 min (15,000 rpm). The precipitate was resuspended in sodium phosphate buffer or potassium phosphate buffer (0.1 M, pH 8.0) and adjusted to an OD of about 1.6. Then the suspension (1.5 ml) was mixed with an equal volume of the same buffer containing 0.2 or 1.0 mM inosine (final concentration, 0.1 or 0.5 mM) and germination was monitored.

*Incorporation of radioactive amino acid during preincubation and germination.* To examine incorporation of L-[ $^{14}\text{C}$ ]alanine into unactivated spores during preincubation, unactivated spores (0.5 mg, dry weight) were suspended in 5 ml of sodium or potassium phosphate buffer (0.1 M, pH 8.0) containing 0.5  $\mu\text{Ci/ml}$  of L-[ $^{14}\text{C}$ ]alanine (specific activity, 10 mCi/mM).

For examining the incorporation during germination, the spores were suspended in the germination medium containing 0.05  $\mu\text{Ci/ml}$  of the radioactive amino acid and incubated at 30 C. Samples (1 ml) taken at various times were filtered through membrane filters (0.45  $\mu\text{m}$  pore size, Toyo Roshi Co., Ltd.). The filters were washed thoroughly with unlabeled DL-alanine (0.05 mM) solution and the radioactivity on the films was measured in an Aloka liquid scintillation spectrometer, model LSC-602.

*Analysis of germination.* Germination was usually expressed as OD<sub>t</sub>/OD<sub>i</sub>, where OD<sub>i</sub> is the initial OD and OD<sub>t</sub> is the value after *t* min of incubation.

To compare the rate and extent of germination, we used three parameters, *v*, *k* and OD<sub>t</sub>/OD<sub>i</sub>, as previously described (10). OD<sub>f</sub>/OD<sub>i</sub> is the final value of OD<sub>t</sub>/OD<sub>i</sub>. For simplicity, OD<sub>f</sub> was usually taken as the OD after 60 min of incubation.

*Reagents.* Chemicals were purchased from Wako Pure Chemical Industries, Ltd. with the following exceptions: inosine was from Kohjin Co., Ltd. and yeast extract was from Difco Laboratories.

L-[U-<sup>14</sup>C]alanine was purchased from the Radiochemical Centre Ltd.

## RESULTS

### *Effect of KCl Concentration on Germination*

To confirm the inhibitory effect of K<sup>+</sup> on germination of unactivated spores and to test whether this phenomenon results from the absence of Na<sup>+</sup>, we incubated unactivated spores in 5 mM sodium phosphate buffer (pH 8.0) containing 0.05 mM L-alanine, 0.05 mM inosine and various concentrations of KCl with NaCl to give a constant ionic strength.

The extent of germination decreased with increase in the concentration of KCl and at concentrations of over 40 mM no appreciable germination occurred (Table 1). Thus, germination was inhibited by KCl, even in the presence of Na<sup>+</sup>.

### *Effect of K<sup>+</sup> on Preincubation and Subsequent Germination*

L-Alanine-inosine-induced germination (Ala-Ino-induced germination) of unactivated spores of *B. cereus* T may involve at least two steps, first a response to L-alanine and then one to inosine (10).

To see which step is K<sup>+</sup>-sensitive, we examined the effects of K<sup>+</sup> during preincubation and subsequent germination of unactivated spores. For this, unactivated

Table 1. Effect of potassium chloride on Ala-Ino-induced germination of spores of *B. cereus* T<sup>a</sup>)

Concentration of		Extent of germination <sup>b</sup> )
KCl	NaCl	
0 mM	0 mM	0.567
0	50	0.565
10	40	0.344
20	30	0.221
30	20	0.123
40	10	0.079
50	0	0.048

<sup>a</sup>) Unactivated spores were incubated for 60 min at 30 C in 5 mM sodium phosphate buffer (pH 8.0) containing 0.05 mM L-alanine, 0.05 mM inosine and the indicated concentrations of KCl and NaCl.

<sup>b</sup>) Values of [1 - (OD<sub>f</sub>/OD<sub>i</sub>)] are shown.

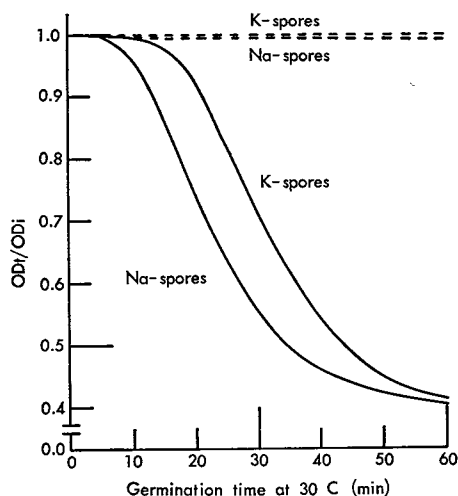


Fig. 1. Effects of sodium and potassium ions on preincubation and subsequent germination of *B. cereus* T spores. Spores, preincubated with 0.5 mM L-alanine buffered with 0.1 M sodium phosphate (Na-spores) or potassium phosphate (K-spores) for 60 min, were incubated in either sodium phosphate buffer (continuous lines) or potassium phosphate buffer (broken lines) containing 0.1 mM inosine. All experiments were carried out at 30 C and at pH 8.0.

Table 2. Subsequent germination properties of preincubated spores of *B. cereus* T<sup>a)</sup>

Spores	$v \times 10^3$	$k \times 10^2$	ODf/ODi
Na-spores	29.9	10.0	0.411
Na-K-spores	30.4	5.6	0.417
K-spores	30.7	3.3	0.417
K-Na-spores	28.4	5.4	0.415

<sup>a)</sup> Germination was estimated in 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 8.0) containing 0.1 mM inosine. Data were calculated from the curves shown in Figs. 1 and 2.

spores were incubated with 0.5 mM L-alanine in sodium phosphate buffer (NaPB) or potassium phosphate buffer (KPB) for 60 min and then transferred to either NaPB or KPB containing 0.1 mM inosine.

Both spores preincubated in NaPB (designated as Na-spores) and those preincubated in KPB (K-spores) germinated on subsequent incubation in NaPB medium, but not on incubation in KPB medium (Fig. 1). In NaPB medium, the values of  $v$  and ODf/ODi of K-spores and Na-spores were comparable, but the value of  $k$  of K-spores was only a third of that of Na-spores (Table 2).

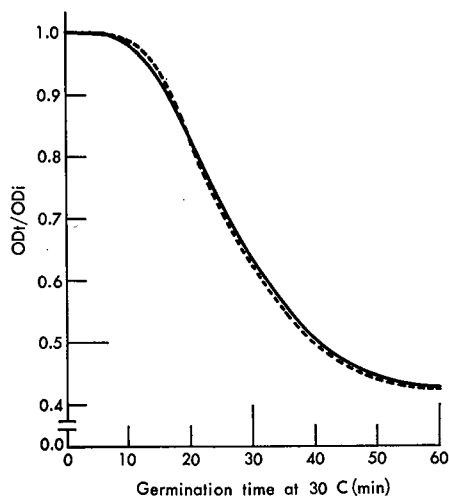


Fig. 2. Effect of intermediate incubation on germination of *B. cereus* T spores. Na- and K-spores were incubated for 60 min in 0.1 M potassium phosphate buffer (continuous line) or 0.1 M sodium phosphate buffer (broken line), and then the spores were transferred to 0.1 M sodium phosphate buffer containing 0.1 mM inosine. All procedures were carried out at 30 C and at pH 8.0.

This result suggests that potassium ion may influence the state of readiness of spores preincubated with L-alanine for the response to inosine. This possibility was confirmed as follows. Before estimating germination induced by 0.1 mM inosine in NaPB, Na-spores were incubated for 60 min at 30 C in KPB without L-alanine (designated as Na-K-spores) and K-spores were incubated in NaPB in the same way (K-Na-spores).

It was found that the germinations of Na-K-spores and K-Na-spores were similar (Fig. 2); but as shown in Table 2, the value of  $k$  of Na-K-spores was less than that of Na-spores, and the  $k$ -value of K-Na-spores was more than that of K-spores.

#### *Incorporation of L-[ $^{14}C$ ]alanine into Spores during Germination*

The kinetics of L-[ $^{14}C$ ]alanine incorporation during Ala-Ino-induced germination was studied (Fig. 3). In NaPB, the profile of L-alanine-incorporation was bimodal with a rapid and then a slower phase. In contrast, in KPB, the incorporation rate was very low and the value after 60 min was approximately 50% of that in NaPB.

#### *Incorporation of L-[ $^{14}C$ ]alanine into Spores during Preincubation*

The kinetics of L-[ $^{14}C$ ]alanine incorporation into unactivated spores during

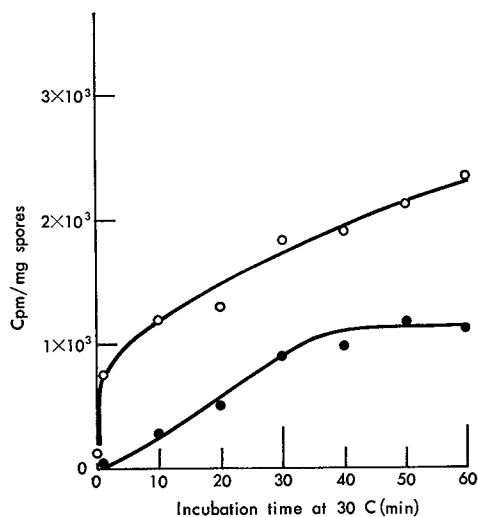


Fig. 3. Incorporation of L-[ $^{14}\text{C}$ ]alanine into unactivated spores of *B. cereus* T during Ala-Ino-induced germination. Unactivated spores were incubated at 30 C in the germination medium containing 0.05  $\mu\text{Ci/ml}$  of L-[ $^{14}\text{C}$ ]alanine, buffered with 0.1 M sodium phosphate (O) or potassium phosphate (●) at pH 8.0.

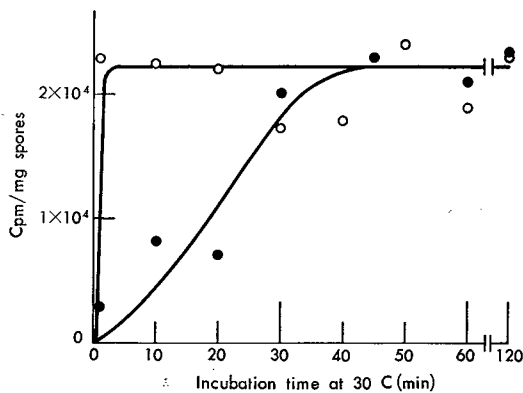


Fig. 4. Incorporation of L-[ $^{14}\text{C}$ ]alanine into unactivated spores of *B. cereus* T during preincubation. Unactivated spores were incubated at 30 C in 0.1 M phosphate buffers (pH 8.0) containing L-[ $^{14}\text{C}$ ]alanine (0.5  $\mu\text{Ci/ml}$ ): O, sodium phosphate buffer; ●, potassium phosphate buffer.

preincubation was studied (Fig. 4), using either NaPB or KPB containing L-[ $^{14}C$ ]-alanine.

In NaPB, the maximum incorporation was seen immediately after contact with L-alanine, and the level remained high throughout the 2-hr incubation period. In KPB, the extent of incorporation increased gradually, reaching the same level as that in NaPB at 30 min after addition of L-alanine. The profile of incorporation by unactivated spores in KPB was similar to that of unactivated spores in KPB containing both L-alanine and inosine (see Fig. 3).

It seems likely that the difference in the kinetics of incorporation of L-alanine during preincubation might reflect the extent of subsequent germination. Thus, unactivated spores were preincubated with 0.5 mM L-alanine in either NaPB or KPB for various periods and then the subsequent germination induced by 0.1 mM inosine was estimated in NaPB.

When the extent of germination of the preincubated spores was plotted as a function of the preincubation times, it was found that the extent of germination increased with increase in the preincubation time in both cases (Fig. 5). The lengths of preincubation required for the maximum extent of germination were about 15 min and 45 min in NaPB and in KPB, respectively.

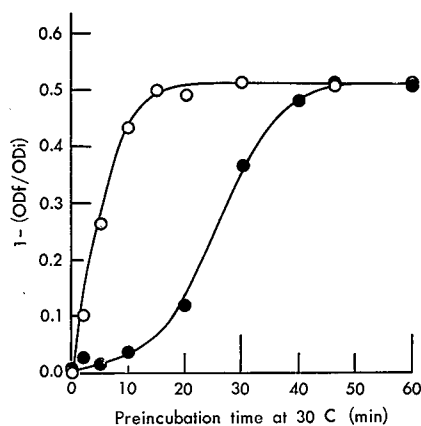


Fig. 5. Effect of preincubation time with L-alanine on subsequent germination of spores of *B. cereus* T. Unactivated spores were incubated at 30 C for the indicated times in 0.1 M phosphate buffers (pH 8.0) containing 0.5 mM L-alanine (O, sodium phosphate buffer; ●, potassium phosphate buffer), and then the spores were transferred to 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 8.0) containing 0.1 mM inosine. Subsequent germination was monitored for 60 min at 30 C.

## DISCUSSION

Germination of unactivated spores of *B. cereus* T is known to be influenced by inorganic ions (7-9). Previously Ala-Ino-induced germination of the spores was found to be stimulated in NaPB but not KPB (7). However, the effect of  $K^+$  was not studied further.

In the present work, we first confirmed these results and demonstrated a significant inhibition of germination by  $K^+$ , even in the presence of  $Na^+$  (Table 1). Since heat-activated spores germinated in the presence of both L-alanine and inosine either in NaPB or KPB (1), these results indicate that  $K^+$  specifically inhibits the germination of unactivated spores.

Second we examined the kinetics of L-[ $^{14}C$ ]alanine incorporation into unactivated spores. We observed bimodal kinetics during germination in NaPB with a rapid phase followed by a slower phase (Fig. 3,  $\circ-\circ$ ). Similar kinetics of incorporation of the amino acid during germination of *B. thiaminolyticus* spores has been reported (12), although the profile of incorporation was quite different.

During preincubation with labeled L-alanine in NaPB, the radioactivity incorporated into unactivated spores increased rapidly to a maximum, which was then maintained throughout the incubation period (Fig. 4,  $\circ-\circ$ ). The rate and extent of incorporation into spores in the early period of preincubation (Fig. 4,  $\circ-\circ$ ) were parallel to those of the first incorporation during germination (Fig. 3,  $\circ-\circ$ ). In KPB, unactivated spores did not show bimodal kinetics of incorporation in the presence of both L-alanine and inosine: the second phase did not occur (Fig. 3,  $\bullet-\bullet$ ). These findings indicate that the second phase of incorporation of L-alanine is characteristic of Ala-Ino-induced germination of *B. cereus* T spores, and support the idea that L-alanine has multiple functions during germination. The exact roles of L-alanine are unknown, but probably after its incorporation in the second phase L-alanine serves as a substrate for enzymatic reactions (4, 5) leading to outgrowth of germinated spores.

We have suggested that Ala-Ino-induced germination of unactivated spores of *B. cereus* T involves at least two distinct steps; the first due to L-alanine and the second to inosine (10). These responses may result in reactions leading to spore germination with consequent increased uptake of L-alanine.

Third, in this work we found that spores preincubated with  $Na^+$  or  $K^+$  (Na- or K-spores) germinated in the presence of inosine in NaPB but not in KPB (Fig. 1). Thus, the response of unactivated spores to L-alanine during preincubation was not inhibited by  $K^+$ . Moreover, it also seems unlikely that the reactions induced by inosine leading to germination are inhibited by  $K^+$ , since heat-activated spores can germinate in KPB containing both L-alanine and inosine (1).

Examination of the subsequent germination of Na- and K-spores showed that the lag before germination of K-spores was longer than that of Na-spores (Fig. 1 and Table 2). It is likely that a difference in the states of K- and Na-spores in the pregermination stage may be reflected by the length of the lag periods before sub-



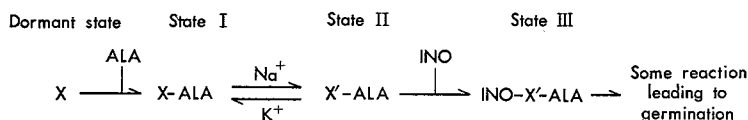


Fig. 6. Hypothetical scheme for alteration of the receptor site of spores of *B. cereus* T during the pregerminative stage: X, native form of protein receptor site; X', altered form of the protein; ALA, L-alanine; INO, inosine.

sequent germination. Actually, the initiation of subsequent germination, which was induced by inosine in NaPB, was retarded when Na-spores had been incubated in KPB without L-alanine, and accelerated when K-spores had been incubated in NaPB (Fig. 3 and Table 2). These results suggest that the cations may influence the state of readiness of unactivated spores for germination.

It seems likely that the reactions of spores with inosine are mediated by some alteration of receptor sites for germinant produced after association of the spores with L-alanine in the presence of Na<sup>+</sup>. Alteration of the receptor sites may activate or stimulate them to associate with inosine, and this alteration may be reversible (Fig. 3). Furthermore, this alteration may be prevented by K<sup>+</sup>, and so inosine does not associate with its receptor sites in the spores in KPB, thus explaining why germination does not occur in KPB.

Changes in the physical state of proteins may accompany changes in the exposure of parts of these proteins to the ionic environment (6). Evidence that various factors alter the receptor sites was provided by the finding that germination of Na-spores preincubated at pH 5.0 was slower than that of Na-spores preincubated at pH 8.0 (10). Thus alteration of the receptor sites may be attributed to conformational changes of the protein in the receptor sites. In the presence of K<sup>+</sup>, therefore, the native form of the protein may be more stable than the activated form, whereas in the absence of K<sup>+</sup> the activated form may be the more stable.

A hypothetical scheme for alteration of the receptor site in unactivated spores during the early pregerminative stage is given in Fig. 6. There is little evidence that the receptor sites for L-alanine and inosine are the same, but these compounds clearly cooperate in initiation of germination (10).

The germination of heat-activated spores was not inhibited by KPB. Thus the change produced by heating may lead directly to further steps where the spores can germinate without the alteration process of state II.

Rode and Foster (8) and Sacks (9) independently suggested that a conformational change of protein in the spore coat, or in other receptor sites for germinants, may explain some ionic effects. It has been suggested that ions act, not as the prime germinative influence (1), but by augmenting the effect of an endogenous organic germinant (3) on ionic germination, which is supported by ions alone. These views are compatible with our proposal as to the early pregerminative steps in unactivated spores of *B. cereus* T.

## REFERENCES

- 1) Foerster, H.F., and Foster, J.W. 1966. Response of *Bacillus* spores to combinations of germination compounds. *J. Bacteriol.* **91**: 1168–1177.
- 2) Gould, G.W. 1969. Germination, p. 397–444. *In* Gould, G.W., and Hurst, A. (eds), *The bacterial spore*, Academic Press Inc., New York.
- 3) Levinson, H.S., and Feeherrey, F.E. 1975. Influence of cations on nitrate-induced germination of *Bacillus megaterium* QM B1551 spores, p. 495–505. *In* Gerhardt, P., Costilow, R.N., and Sadoff, H.L. (eds), *Spores VI*, American Society for Microbiology, Washington, D.C. 20006, USA.
- 4) O'Conner, R.J., and Halvorson, H.O. 1959. Intermediate metabolism of aerobic spores. IV. Alaine deamination during the germination of spores of *Bacillus cereus*. *J. Bacteriol.* **78**: 844–851.
- 5) Prasad, C., Diesterhaft, M., and Freese, E. 1972. Initiation of spore germination in glycolytic mutants of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **110**: 321–328.
- 6) Robinson, D.R., and Jencks, W.P. 1965. The effect of concentrated salt solutions on the activity coefficient of acetyltetraglycine ethyl ester. *J. Am. Chem. Soc.* **87**: 2470–2479.
- 7) Rode, L.J., and Foster, J.W. 1962. Ions and the germination of spores of *Bacillus cereus* T. *Nature* **194**: 1300–1301.
- 8) Rode, L.J., and Foster, J.W. 1966. Influence of exchangeable ions on germinability of bacterial spores. *J. Bacteriol.* **91**: 1582–1588.
- 9) Sacks, L.E. 1972. Influence of intra- and extracellular cations on the germination of bacterial spores, p. 437–442. *In* Halvorson, H.O., Hanson, R., and Campbell, L.L. (eds), *Spores V*, American Society for Microbiology, Washington, D.C. 20006, USA.
- 10) Shibata, H., Takamatsu, H., and Tani, I. 1976. Germination of unactivated spores of *Bacillus cereus* T. Effect of preincubation with L-alanine or inosine on the subsequent germination. *Japan. J. Microbiol.* **20**: 529–535.
- 11) Warren, S.C., and Gould, G.W. 1968. *Bacillus cereus* spore germination: absolute requirements for an amino acid. *Biochim. Biophys. Acta* **170**: 341–350.
- 12) Watabe, K., Ichikawa, T., and Kondo, M. 1974. Biochemical studies on germination of bacterial spores. I. Incorporation of <sup>14</sup>C-L-alanine into spores of *Bacillus thiaminolyticus* during germination. *Japan. J. Microbiol.* **18**: 173–180.
- 13) Wax, R., Freese, E., and Cashel, M. 1967. Separation of two functional roles of L-alanine in the initiation of *Bacillus subtilis* spore germination. *J. Bacteriol.* **94**: 522–529.

---

Requests for reprints should be addressed to Dr. Isamu Tani, Department of Microbial Chemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences University of Tokushima, Shomachi 1-78, Tokushima 770, Japan.

