

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	https://hdl.handle.net/11094/2320
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

論 文 目 録

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 <u>Bacillus</u> cereus T.										
	H. Shibata, M. Uchida, H. Hayashi, and I. Tani.,										
	Microbiol. Immunol., <u>23</u> , 339 (1979)										
2											
۷.	Delayed germination of <u>Bacillus</u> cereus T spores by										
	creatment with trichloroacetic acid and their re-										
	Activation by neating.										
	Microbiol Immunol Accounted										
	meropion. immonor., accepted.										
参考											
1.	<u>Bacillus</u> 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, <u>30</u> ,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., <u>20</u> , 529 (1976)										

- Inhibition by ammonium ion of germination of unactivated spores of <u>Bacillus cereus</u> T induced by L-alanine and inosine.
 H. Shibata, H. Takamatsu, and I. Tani.
 Microbiol. Immunol., <u>22</u>, 123 (1978)
- Inhibition by potassium ion of the pregerminative response to L-alanine of unactivated spores of <u>Bacillus cereus</u> T.

H. Shibata, H. Takamatsu, M. Minami, and I. Tani. Microbiol. Immunol., <u>22</u>, 443 (1978)

20

論文内容の要旨

博士論文題名

5.5

細菌芽胞の発芽始動機構に関する基礎的研究

柴田

洋

学位申請者

緒

論

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、生命活動に適まない 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雑辞を図る。芽胞は呼吸や代謝活性がほとんど認められない体眠状態にあるが 好適な環境下にあっては、体眠状態から脱却し、分裂増 超を繰り返す生命形態に転換する。体眠状態からの脱却 を超点として分裂に至るすでの過程を発芽という。この 過程にあって,芽胞は体眠を維持するメカニズムを破壊 レ、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。すなめち, 休眠を維持するメカニズムを破壊 レ、新生細胞が環境への適応を試み, デ吸, 代謝活性が クメカニズムとは相反する性格をもっものといえる。こ の強能, さらには構成成分の生物活性を複雑に終み合い、 その実体は明らかでない¹²。

発芽、伴、, 芽胞表層の構造, あら、は, 芽胞表面の 商電状態が変化すると、う事実35が明らか、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 の間に窟窿な関係がある、とを末唆している。 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す せいず, 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、アルカリ処理, ある、は違々の抽出方法で処理する といった, 芽胞を不可送的に変性でせる過酷な条件を採 用した研究が従来から行いれている。 しかし、これらの

- / -

方法によっては、 芽胞のみならず, その他の構造にも影響が反ぶことが予想され, 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。 したがって, 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父要が 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、その結果主いに変化を中心に、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 ならないが、トリクロル酢酸(以下、TCAと略)は、こ れらの冬件を満足する化合物といえ、こちに多種多様な 構造類似体が得られる利点がある。

本研究においては、TCAを作用ませた<u>Bacillus</u> cereus] 著胞の性格を明らかいすることにより、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。作用KJる生理学的性質。变化

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(40C,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。低下が認められなが生存率には著しい変化 は認められなかった(Table1)。 TCA 処理等胞の発芽を 经時的以追踪上, こ, 発导率低下, 原因加, 登等遅近現 象が生いたためであることを明らかいした。

Table 1. Properties of <u>B</u>. <u>cereus</u> T spores treated with TCA at various concentrations!

Concn.of TCA	Viability	Refractility	Stainability	Germinability	DPA excreted
O mM	100.0 %	+	-	100.0 %	0 %
15.3	95.0	+	_ ` ·	1000	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	± 2	± 3		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 %.

マらに、生存率を損うことなく発芽遅迎を生いう条件 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、の27N 塩酸)に対する抵抗性の低下や ジャコリン酸保持能力の低下を生いるが、リゾナームや トリフ・シン、フ・ロテアーゼに対する感受性化は認められ ないことを明らかいした (Table Z)。

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

Chemical			Control spores	Spores tr 6.1 mM	eated with 30.6 mM	TCA ² 61.2	at mM
NaOH	1	N	_3	-	+4	+	
	2	N	+	+	. +	+	
HC1	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.

 Insensitive.
 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

第2章 芋胞の発芽機構、対するTCAの作用

本章では、芋肥い対する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の発芽運延活性は、濃度、作用温度、か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 4.01×10⁴ cal/male をネ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, HCI-NaOH; •, TCA; Δ , AcOH.

Table 3.

Effect of treatment of spores of <u>B</u>. <u>cereus</u> T with TCA-Na and HCl on subsequent germination¹

Chemical ²	t-Value ³
Control	22.7 Min
TCA-Na ⁴	18.6
HCl	22.3
A. TCA-Na → HCl	_ ⁵
B. HC1 \rightarrow TCA-Na	18.1

 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.
 Spores were treated with TCA-Na, HC1 (0.27 N), TCA-Na followed by treatment with HC1 (A), or HC1 followed by treatment with TCA-Na (B). Each treatment was carried out at 30 C for 30 min.
 The value was obtained from curves of the optical density at 520 nm as described in the MATERIALS AND METHODS.
 TCA-Na (61.2 mM) was prepared by titration of TCA with N NaOH to pH 7.0.
 Not determined.

種々のTCA構造類似体を用いてその発芽遅近活性を検討した結果、電子吸引性基をもたない構造類以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!

Compound	Formula	Retardation ²
Trichloroacetic acid	CC1 COOH	++++
Trifluoroacetic acid	CF ₃ COOH	+
Tribromoacetic acid	CBr 3 COOH	+++
Dichloroacetic acid	CHC12COOH	+++
Dibromoacetic acid	CHBr 2COOH	++
2,3-Dibromopropionic acid	CH2BrCHBrCOOH	+
2,3-Dibromobutyric acid	CH3CHBrCHBrCOOH	+
Acetic acid	CH 3 COOH	-
Propionic acid	CH3CH2COOH	-
n-Butyric acid	CH3CH2CH2COOH	
Pivalic acid	(CH ₃) aCCOOH	-
Malonic acid	$CH_2(COOH)_2$	-
Glycine	NH2CH2COOH	-
β-Alanine	NH2CH2CH2COOH	-
4-Amino-n-butyric acid	NH2CH2CH2CH2COOH	-

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.

- 5 -

第3章 芽胞a 化学構造 K 対する TCA o 影響

抽出溶膜としての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いる可能性が あることを不唆する。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 TCAtreated and control spores of <u>B</u>. <u>cereus</u> T¹

Spores ²	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

Conteents are shown as percentages of the dry weight of the spores.
 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 大分子の変性を末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CC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マークが了本(1.325、830、あよび 680 cm⁻¹)に認められることを明らかにした(Fig. 2)。



第4章 TCA処理芽胞の発芽能の固復と固復過程に 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 処理萃肥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2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めせるに いうものでもないことから、何らかの機能補償的方法に よる発芽能の囲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、 聞題の解明を試みた。 TCAの作用により低下した発芽能は緩和な条件(40-

50 C)での加熱により容易に囲復した。この田復効果は

- 7 -

加熱温度かよび加熱時間に依存していたことから、TCA の作用による発芽能の低下は、発芽始動機構構成零素の 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 <u>B</u>. <u>cereus</u> T.

加熱により発芽能が田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CC例して、108Cをワーク時温度として脱離す る揮発生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、この物質の存在は既述のる本 の吸収ヤークの有無に対応していることが判明した。こ らに、熱分解が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 は芽肥表面あるいは表面い 近い部位に存在する構成タンパクに作用し, その高次構

_ & -



- 9

造い変化を主い、 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 いあいて, 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3.5。熱や化学薬剤での処理によう萎胞の活性 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。本菌芽胞は加熱やレアラニン(ALA)での 処理により活性化される。が、 両活性化芽胞は異なら発芽 前状態にあることがわかっている。また、本菌芽胞はり ッナーム非感受性であるが、ドヤシル硫酸ナトリウムー ジナオトレイトール(SDS-DTT)で処理すると感受性に変 化する。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の作用人 カニズムやその程度い影響を及ぼすことが予想された。 そこで、本章では、両活性化芽胞あよび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の作用いより発芽遅延を生いた。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 感受性をネレムのい対して、加熱活性化芽胞は、活性化 状態を維持しなから、非活性化芽胞と等価の感受性を示

レた(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。肥よりも強くTCAと反応した。低下レた発芽能は加熱、

- 10 -

あるいはリゾナームの添加により囲復した(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。 リゾナームの作用部位はコルテックスペアチドグリカン である。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ろと推察した。



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^{1} .

Spores	t-Value Without lysozyme	e (Min) With lysozyme
Control ²	26.9	7.7
TCA-treated spores ³	83.9	7.5
After heating ⁴	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 Lalanine and 0.05 mM inosine with or without lysozyme (200 μ g/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.

- 11 -

粧

論

著胞の発芽機構、とくいその炝動機構の追跡、解明への接近を企図して、TCA処理を中心に種々の熱、化学的あよび酵素的処理により芽胞に生びな変化を明らかにし、 発芽機構との関係を検討した。

、 TCAの作用による発芽遅近の程度は、 TCAの濃度、 作用温度、および接触時間に依存してあり、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 島濃度の水素イオンという遂次的作用で、 TCA アニオンの作用はトリクロルメテ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 も高沢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 の結合により生いると推察された。 3. TCA の作用により低下した発芽能は加熱あるいはり ンテームの添加により個復した。
- 4. TCA a 作用に対する加熱活性化等胞a 感受性は未処 理 等胞とほぼ等価であったが、ALA 活性化芽胞なよび SDS-DTT処理 著胞は 著しく強い感受性を示した。
- 5. 以上の成績に基づき, 芋粑の発芋機構に対する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

- 12 -

レ、その結果、スポアコートにおける透過性が増大し、 髙濃度の水奉イオンをはひめ低合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 離して主い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いるい至るりのといえる。 6、 TCA a 作用条件を操作することいより、 発芽始動が 遅迎しにり,極端な場合は停滞するという事実や、こ の現象が、加熱処理いより容易い田復するという事実 い加えて, 活性化状態にある芽胞に対してまでも, 発 芽遅変,すなめち,発芽始動機構の機能低下を主いた ことから、コルテックス溶解酵素系の制御が、芽胞の 休眠と発芋の境界を制御していると推察された。

×Ę

•

- 13 -

.

- 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. <u>60</u>, 335
- Hashimoto, T., Frieben, W. R., and Conti, S. F. (1972); Spores V, 409
- 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
- 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. <u>22</u>, 443
- Warth, A. D., Ohye, D. F., and Murrell, W. G. (1963); J. Cell Biol. <u>16</u>,593

14

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

緒	論 -			1
第1	章	T C A	▲作用:よる芽胞の生理学的性質▲変化	з
	第1	節	芽胞 ◎ 発芽 1= 対する T C A ◎ 影響	3
	第2	箭	専胞の抵抗性に対するTCAの影響	8
	第3	節	芽胞《DPA保持能力に対するTCA《影響	12
	\$\$ 4	節	考察ならびに小뀸	14.
\$\$ z	章	莽枪	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
	第三	箭	TCA 構造類似体。作用	22
	第3	箭	考察ならびに小括	24
	ì	•		
第 3	韋	 年	▲化学構造に対する TCA ▲影響	27
	第1	節	导胞《化学組成 に対する TCA 《影響	27
	第z	箭	TCA処理芽胞のIRスペクトル	28
	第3	節	考察ならびに小菇	31
\$ 4	章 T	ТСА СА ^	処理 存 虍 ∧ 発 存 能 ∧ 回復 と 回復過程 に み け る 挙動	32
	生1	15	张玉钜《间復	37
	ター	野街	七マルー・ニュー 加熱加申」にTCA加根左府&IRIXマトル	3E
	- 中 - 安 2	虾	mmにすした」CACなすでのINAC、1160	JJ 277
	かっ	野	元々 元に) スピーチー いりょしし のうちゃ	זנ תע
	477 X	۳۲	אריוי ער איז אא דער	7.0

	第5	章 発芽	台動性が異なる芽胞に対する	:TCA《影響	43
·		第1節 第2節 第3節	舌住化芽胞に対するTCAの影 DS-DTT処理芽胞に対するTCA 弓察ならびに小活	/響 《影響	43 46 50
	第6	章 総括	よらびに結論		55
		第1節 第2節	総括 吉諭		55 58
٩	謝	辞			60
	参荐	文献			61

<

ABBREVIATIONS

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

ì

緒 論

芽胞形成細菌は自己の体内、耐久型構造を形成し、呼吸、代謝等の生命 活動、適さない外的環境から自己再生、不可欠な遺伝情報やその発現、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²⁰。

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的生命形態であるといえよう。

芽胞は、好適な環境下にあっては、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超点として分裂に至るま での過程を発芽という。この過程にあいて、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^{19,20}、すなめち、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。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(DPA⁴³ 遊離グルタミン酸¹³ など)と複雑に絡みあい、その実体は明らかでない^{19,20}。

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、スポアアロトアウストの水和、コルテックスの溶解など様々な反応が緩密に設計されたアログウムに従って遅滞なく連続、あるいは平行して進行する^{23,30,5%}。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¹⁰。発芽に関する研究は専ら発芽に付随して生い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。芽胞に対すら物理的または化学的因子の作用により発芽機構に生びに変化は各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、34,36,77.87、ほとんど解明されていないのが実情である。

発芽、伴い、芽胞表層の構造^{37.50}、あるいは、芽胞表面の荷電状態が変化 する⁷⁵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 肥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。レ东

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²⁴、アルカリ処理²¹、あるいは種々の抽出方法で処理する²⁷⁷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いれている。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反応ことが予想され、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渡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、芋肥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。

莘胞外層は、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、その結果生びた 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ない。

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^{47,5570}、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。すないち, 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いる。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^{31,44,49}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、かって殺菌剤 として治療に用いられたこともある強酸であり、細菌かよび下等生物に対 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⁴⁹。 また、TCAは含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³⁰。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 ム酸性細菌の 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⁸⁰。

このようなTCAの化学的,生物学的特徴を考慮し、TCAを作用させに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の作用ドよる芽胞の生理学的性質の変化

第1節 芽胞の発芽に対すらTCAの影響

芽胞を適当な条件下で化学物質で処理レた場合, 芽胞の特徴的性状に あらわれる変化は、芽胞に生いた構造上の変化や生化学的変化を反映レた ものと考えられる。

TCAは強酸(pKa,10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っか、Bacillus cereus T 芽胞のTCAに対する抵抗力およびTCAの作用の結果生いろ生理学的変化は明られでない。

ここでは、本菌芽胞のTCAに対する極抗性あよびTCAの作用の結果生いる生理学的性質の変化について検討レス。

I. 実験杯料あよび実験方法

(1) 供試菌ならびに芽胞形成法

本研究は、米国、ロヨラ大学(シカゴ)教授、橋本忠世博士から分与さ ルドB, <u>Cereus</u> Tを供試菌として行った。

芽胞形成は以下に述べる方法⁷² に従って行った。すなめち,本菌を斜面 普通寒天暗地で15時間培養レたのち,その2日金耳を芽胞形成培地200ml にけん濁レ、150 rDMで4.5時間振とう培養レた。この培養液を新鮮な芽胞形 成培地200mlに植え継ぎ、2.5時間振とう培養レたのち,さらに1.5L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1.5L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のジャーファーメンター(マルビシ製、MRJ-30)を使用し、培地1Lに つき滅魔空気を1L/min で通気しなから、撹拌翼囲転数を400 rDMに設定し て行った。培養はすべて30Cで行った。

芽胞形成培地の組成は, (NH4)2SO4 30 mM, Glucose 20 mM, MgSO4 6.3 mM, CuSO4 0.04 mM, ZnSO4 0.08 mM, FeSO4 0.006 mM, CaCl2 0.9 mM, MnCl2 0.7 mM, K2HPO4 5.7 mM + Yeast extract (Difco) 2 g/L である。

普通,約25時間で芋肥形成は完了し、均一な芽胞が得られた。芋胞は速 心分離により集菌し、氷冷しに脱イオン水で5~8囲洗浄したのち、凍結 乾燥して滅圧デシケーター中5Cで保存した。

発芽その他の実験に際レ、50mgの芽胞を脱イオン水10ml にけん濁レ、一夜40 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

芽胞をら1-300mMのTCA水溶液に2mg spores/3mlTCAとなるようにけん 濁し、とくにことわりがないかぎり、40Cで30分開保温したのち、氷冷し 遠心分離により集菌、氷冷したNaPB(0.1M、pH RO)を用いて1個洗浄した。 芽胞の集菌に際し、処理液が10ml以上の場合は久保田冷凍遠心機、model KR 180-Bを使用、10,000×g、5分、10ml以下の場合はEppendorf Microfuge, model 3,200を用いて15,000 rpm、2分達心した。TCA処理芽胞はNaPB にけん 濁し、Coleman Junior II spectrophotometer, model 6/20を用いて 520 nmにあけ ろ0D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を用いて速心し、沈渣を滅菌生理食塩水にけん濁、ODかの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。希釈液を調製し、そのの1mlを普通寒天(BBL)平板に植えた。 30C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示した。

(4) 発芽率 / 测定

発芽はODの低下を測定することにより判定し、耐熱性(65C、15分)の 低下、光展折性の消失、染色性の獲得あよびDPAの排出を測定することに より確認した。

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

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

OD 他下率 = 1 - (OD 2h n/ OD i) (Eq. 1)

のOD、ODtはt分後、OD2hr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は直接革肥を観察、染色性は芽胞をメテレン ブルーで染色したのち光学顕微鏡下は観察レ、芽胞数 100 メマンての割合 で表した。

(6) 耐熱性の測定

滅菌生理食塩水9mlを65C ド予め加熱しておき、これド発芽実験中の培養液から経時的ド分取した試料1mlを添加、すばやく混合し、65Cで15分間保温した。米冷後、生存率測定ドマッマ述べたオ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 K 応びて二つの方法, すなわち, 10川g/ml以上のDPAが 予想される場合は Janssenら3の方法 K 従い比色定量 v た(方法A)。 10川g/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 K おける UV吸收(石英セル, 光路長 / cm)を測 定 v, 標準品を用いて作製 v に 検量線から DPA量を求めた(方法 B)。 TCA 処理 v に芋肥、残存する DPAは、芋肥 / mg K 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,Q45jum)を用いて吸引 口週することにより, 芋肥の分離,米冷レに脱イオン水による洗浄を行い, この操作を5囲繰り返し, 芋肥を吸着レスフィルターちなを合めせて脱イ オン水10mlに浸漬,121 C,20分オートクレーブ処理レたのち,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を放出するか、この現象を測定する場合は次に 述べる方法に従った。すなめち、培養液5ml(芽胞の5mgを含む)を随時 分取し、米冷レたのち、メンブランフィルターを用いて吸引口遇、米冷し た脱イオン水10mlで洗浄後、ニュフィルターを脱イオン水5mlに浸漬し、 ルノ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。

I.実験成績

TCAを作用させた芋胞(TCA処理芋胞)と未処理芋胞について、生存率、 発芽率** 光屈折性、染色性およびDPA量を比較した結果をTable1に記した。 芋胞の特徴である光屈折性や難染色性の消失、DPAの溶出現象は、生存 率が激減すみ150mm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61.2mm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 末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連 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)。

** 培養2時間後,0D他下率 🗅

^{* 0-15} µg DPA (Sigma)/ml

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	±2	± 3	-	85.3
300.0		-	. –	+	-	89.0

Table 1. Properties of <u>B</u>. <u>cereus</u> T spores treated with TCA at various concentrations!

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

+, 55.2 %; -, 44.8 %. +, 52.7 %; -, 47.3 %. 2. 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, 0.1 M sodium phosphate buffer ,pH 8.00 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.

芋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な

---- 6 -----

ければならない。本菌芽胞は61.2mMのTCAの作用を受けたのちも大部分の 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0D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 一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。すなめ ち、61.2mMTCA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は、未処理芽胞や他の低濃度

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き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 遅近によるものであることを確認するにめ、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 <u>B</u>. <u>cereus</u> 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 <u>B</u>. <u>cereus</u> 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、がれも各事象発現は平行レマおり、OD低下のみか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 K 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, 阿熱性, 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^{1.4.18,37,57,57}。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^{1.44,53}。また, B. <u>Cereus</u>など, ある種の芽胞はリゾナームに対する處受 性を示さないが, 還元剤で処理することによりリゾナーム感受性を示すよ うになる^{1.859}。

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あり光屈折性や染色性に顕著な変化を生い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べした。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、あよび6/.2 mM;40C、30分)を用いて、熱、あよび代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。

----- 8 -----

I. 実験材料あよび実験方法

- (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節ヶ同び

(3) 耐熱性。測定

乾燥重量 にして 1 mgの芽胞を脱イオン水 10ml にけん濁し、本文中に示し に温度で15分間または 90C 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、対する抵抗性の測定

乾燥重量にして1mgの芽胞を水酸化ナトリウム(13Eは2N),塩酸 (0.27N)10mlにけん濁,30C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 い対する感受性の測定

芽胞/mgを、リゾナーム、アロテアーゼまたはトリアシン(すべて P-L Biochemicals)を各200µg/ml含むNaPB(ロ/M,pH &0)/0mlにけん濁、30Cで 2時間保温し、この間のODの変化を520nm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。

Ⅰ. 実 験 成 續

(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か、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 ろ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 D90 値をTable2 に 示した。この結果はTCAの作用により阿熱性が低下しにことを示している。

(2) 化学藥品 K村 t a 拖抗性 芋胞 は 化学藥品 K 村 v 強 い 拖抗性 t 示 t 。 定際,本菌芽胞 t 塩酸 (0.27

---- 9 -----



Percentage loss of viability

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

Table 2. Heat resistance of <u>B</u>. <u>cereus</u> T spores treated with TCA at various concentrations!

Concn. of TCA	D ₉₀ (Min)
O 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(/N)各水溶液中,30C,2時間の処理以耐え ることができた。 6/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/N水酸化ナトリウム以, 6/.2 mM TCA処理芽胞では

Chemical		Control spores	Spores tr 6.1 mM	eated with 30.6 mM	TCA ² 61.2	at mM	
NaOH	1	N	_ ³	_	+4	+	
	2	N	+	+	+	+	
HC1	0.27	N	-			+	

Table 3. Effect of chemical agents on TCA-treated and control spores of B. cereus T¹.

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 水村 する抵抗性

本菌芽胞はリゾナーム、トリプシン、プロテアーゼに対し感受性を示さない。レかし、SDS-DTTで処理した本菌芽胞はリゾナーム感受性を示す (Table 4)。リゾナームの基質となる芽胞構成成分がスポアコート内層の コルテックスペプナドグリカンな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 <u>B</u>. <u>cereus</u> T¹.

Spores	Lysozyme	Trypsin	Protease
Control spores	_	_	_
TCA-treated spores ²	-	-	-
SDS-DTT-treated spores ³	+	-	-

1. Treated and control spores (1 mg) were suspended in 10 ml of 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 8.0) containing 200 μ g/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。レたがって、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 ーゼに対しても感受性は認められなかった(Table4)。

第3節 芽胞のDPA保持能力、対するTCAの影響

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^{11,42}。過去において, 耐熱性と関連して議論されてきにが, DPA-deficient あるいはDPA-less mutant 芽胞が耐熱性であった^{41,46,91}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は芽胞の体眠性と深く関係しているとする説がある¹²。

発芽に先だち、芽胞はしばしば活性化を効率とする。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の溶出が生じるれ。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、よらに耐熱性が低下したグリシン芽胞では活性化の最適温度が約5 C低下し、DPAの溶出が促進されるという事実を認めたれ。こうした事実は芽胞の体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近したが、この発芽運動がTCAの作用により芽胞の発芽は着しく遅近したが、この発芽運動がTCAの作用によりすでが生じる可能性がある。例えば、グルタルアルデビドで処理した芽胞が100 C 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れ、すず、活性化状態が異なら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、芽胞の体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. 実験材料あよび実験方法

(1) 夜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

* 髙濃度グリシン含存培地で芽胞形成した芽胞51,61

(3) DPA n 定量

芽胞/mgを脱イオン水10ml にけん濁し、20-100 C 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。なか、本実験で使用した芽胞、710705、721105かよび731110 は、そ れぞれ、1971年7月5日、1972年11月5日かよび1973年11月10日に調製し に芽胞を意味し、凍結乾燥したのち、-15 C 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。

I. 実 験 成 猜

(1) 年齢の異なら芽胞の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の溶出が生いるようになり、DPA保持能力の低下が明らかである。



Fig. 5. Loss of DPA from spores of <u>B</u>. <u>cereus</u> T by heating. Spores were stored in a desiccator at -15 C for 12 (7311 10), 24 (721106), or 40 months (710705). Heating was carried out for 30 min at the indicated temperatures.

(2) TCA処理芽胞。DPA保持能力

Fig. 6は30-100 C 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 C で加熱した場合に顕著であった。100 C 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たかった。

* 既还(穿1章第1節)

** 保存期間は, 73/110, 72/105,かよび710705,それぞれ,12,24,かよび40 ヶ月である。


Fig. 6. Loss of DPA from TCAtreated and control spores of <u>B. cereus</u> T by heating. Heating was carried out for 15 min at the indicated temperatures.

第4節 考察ならびに小括

考察

芋胞に対するTCAの作用(40C,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むよび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。すないち、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、すないち、発芽芽胞数を示している。したかっ 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。

準設死温度や殺菌消毒剤の作用をうけに芽胞が、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びるという報告がある^{10,12,23,28,60,81}。例えば、 <u>Clostridium perfringens</u> type A芽胞は、加熱やアルカリ処理により発芽能を 不可述的に先い、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。

リゾナ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^{10.12}。 また、発芽能を欠損することはないが栄養要求が厳レくなるという例も報告はれている^{60,81}。

TCAの作用による本蘭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固復せず(Fig. 1), 栄養要求の変化は認められなかった。レかレ、TCAが作用した結果,発芽能に変化が生びたことは明白であり, 劣更な環境にむ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, 芽胞構造内にむ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めれる。

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,化学的刺戟いより变化する。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、この変化が発華能や耐熱性の影響するな 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研熱性もまに変化 していることが予想された。実際、TCA処理により研熱性が低下し(Fig. 4, Table2)、これは、H芽胞について述べられに事実と符合する。さら K, 未処理萃胞と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 Kよる発芽に対する反応において、 TCA処理芽胞はH 芽胞と若しく 異なる挙動を示した。すないち,TCA処理芽胞は強軍解質存在下でも発芽 か抑制されに(日芽胞はすみやかは発芽する)。 まに、強電解質不在条件 下でのH芋胞の発芽能の欠除はカルシウム塩の添加いより囲復するが55.57、 TCA処理芋胞の他下した発芋能はカルシウム塩を添加しても囲復しなかっ 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 a 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ナーム非感受性の芽胞を感受性に変え る。本菌芽胞はリゾナーム非感受性であるが、DTEやSDS-DTTで処理するこ といより、リゾナーム感受性に変化する。本来リゾナーム耐性である本菌 芽胞が還元剤の作用によりリゾナ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。リゾナ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アテドグリカンである。コルテックス層はスポアコートの内層構造であり、スポアコートのいめゆる permeability barrier により 保護されている。すなめち、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 厚因である permeability barrier を破壊し、それを為し遂げると考えられて

____ 15 ____

いる。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、本菌等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、リゾナ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たさせたが、リゾナ 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 に示しに結果は、TCAの作用により、芋肥は外因性物質の透過性に変化が生じただけでなく細胞肉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(Table1)から予想された結果であるが、芋肥のDPA保持能力に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。

等胞の加熱活性化の過程でDPAの溶出が生いることは周知の事実である。 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に芽胞ではDPAの溶出の促進が認められに^N。逆 バグルタルアルデヒドで処理した芽胞は100 Cでの加熱い対して未処理芽 胞よりも強いDPA保持能力を示した²⁴。現在DPAはスポアプロトプラスト に存在するとする説^{(540,63}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。すなめち、保持能力、低下はこのような構造の変化を意味 すると推察され、この変化がさらい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不唆する現象が生いてあり、発芽 機構の複雑さを示している。

[I] 小 括

- 1. 本実験条件(40C,30分) いおいて、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、一定の生理的条件い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、リゾナーム、トリプシン、プロ テアーゼに対する抵抗性には変代がなく、依然非感受性であった。
- 3、 TCAの作用はさらい芽胞のDPA保持能力を減弱させることがいかった。

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ろプロセスの各最適叫や, その菌が耐え得る叫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, 熱によって客易に死滅する。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⁶⁸⁸⁵。

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いることが Keynan ら³⁷, ISSaharyis²²によって報告されている。

TCAの水溶液は強酸性であり、そのの1M溶液のDHは約1.2(25C)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い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DH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. 実験材料あよび実験方法

(1) 伐載菌ならびい革胞形成法

第1章第1距に同い

(2) TCA 処理

TCAの作用の対するDHの影響を検討するため、以下の述べるふたつの実験を行った。

- (i) TCA 61.2 mM, 酢酸 60 mM, かよび塩酸 0.27 N をおのおの/N 水酸化 ナトリウムを用いてDH 1.5-ス0r調整した。この溶液を用いてすでい 述べたTCA処理の方法(第1章第1節)に従い, 芽胞を40C で30分 間処理した。
- (ii) TCAEIN水酸化ナトリウムE用いて中和し最終濃度 61.2mMとなるように調整した。この溶液(TCA-Na)3ml に芽胞2mgをけん濁し、

30 C で30 分間保温したのち、蓮心分離により集菌、脱イオン水で1 団洗浄後、塩酸(0.27 N)3 mlに再けん濁し、30 C で30 分間保温し た。別に、TCA-NC と塩酸の作用順序を入い替えて同様に辛肥を処理 した。

TCAの作用に対する温度の影響について、15-60C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 かよび 61.2 mMを 20,30まには40Cで等肥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、氷冷レENOPBでノ田洗浄後、芽胞けん濁液を調製^{*}した。

(3) 発芽定驗

未処理芽胞ならびに各処理芽胞の発芽実験は、ALA,INO 各 a.05 mM を含む NaPB 中、30 C 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にデータの解析

芽胞けん濁液には、発芽始動物質。則載に対して孫尺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^{33,53,78,79}。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反応す可能性が強い。



Fig. 7. Diagrammatic representation of germination curve.

* 既还 (第1章第1 節)

られず、これまな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年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²³。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2者に比較すればよりよい指標といえよう。

実際には、Eq.2 KネレスOD変化率を3点公式KSり数値微分レ、得らいるの最大値を示す時間を最小二乗法KSり求め責値とした。

ODi : 測定開始前の芽胞けん濁液のOD ODt : 培養開始 t 分後の芽胞けん濁液のOD

I.実 験 成 積

発芽遅延現象を生いるTCAの作用に対するDHの影響について、DH1.5-70 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(60mM)、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【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, HC1-NaOH; •, TCA; Δ , AcOH.

酢酸や塩酸を作用すせ 氏芽胞の 【値は試験した 全的城にわたり未処理芽 肥のt值より大きい值を 示さなかった。 一方、TCA を作用させた芽胞ではDH 2 以下では **t** > 240 min を末し、 pH 2からう K か けて t 値は急激 い 他下, 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の作用いよ ろ発芽遅延が生いるため Kは、 一定濃度以上の水 妻イオンが必要であるこ とを末レている。

— 19 —

次に,中和した 61.2mm 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) その送のふたつ 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等胞が示 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

Chemical ²	t-Value ³	
Control	22.7 Min	
TCA-Na ⁴	18.6	
HC1	22.3	
A. TCA-Na \rightarrow HCl	_ 5	
B. HCl → TCA-Na	18.1	

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

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.
 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.
 The value was obtained from curves of the optical density at 520 nm as described in the MATERIALS AND METHODS.
 TCA-Na (61.2 mM) was prepared by titration of TCA with N NaOH to pH 7.0.
 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等能の低下が生い たことを末している。

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 に対してアロットレたものである。 t値は、TCA濃度が増すにつれて、ま に同濃度でも作用温度が高くなるにつれて増大レた。 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、 30.6mM, 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違した。 しか し、高濃度、高温の条件下では t値の progress curve は急激に工昇した。 30.6 mMTCAの作用について、接触時間に対する t値のアロットは t<50min でよい道線性を示した。この道線の傾きは芽胞を TCAの反応における反応 速度を表す。この値(k値とする)を用いたアレーニウスアロットから活 性化エネルギーを求めに結果、 4.01×10⁴ cal/moleであった(Fig. 11)。

----- 20 ------



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 (o-o) or with 61.2 mM TCA at 20 C ($\bullet \bullet$), for the indicated periods.



Fig. 11. Effect of temperature on the interaction of TCA on <u>B</u>. <u>cereus</u> 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。作用

本語では、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のついて検討した。

I. 実験材料あよび実験す法

(1) 試薬

TCA構造特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, アロビオン酸, n-酪酸, ビバリン酸, マロン酸, グリシン, β-アうニン かよび β-アミ)-n-酪酸.

(2) TCA 構造類似体を用いら考胞の処理

各構造類似体 K っ い て , そ れ ぞ れ , 15, 30, 60, 150 , およ び 300 mMの 溶液を作製し, こ a 溶液を用いて, すで K 还 べ F T C A 処理法 (第1章第1 節) K 準 い 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。すなめち、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; 発芽遅近活性があると認めた。300mM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たい場合、その化合物には発芽遅距活性がないと判 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。

I. 実 験 成 續

TCAが芽胞に対し発芽遅延を生じさせるように働くDH域にあいて、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の構造に基づく時性であると考えられる。TCAは酢酸のアルキル基CH3-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もち、そのため、CCl3-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(Table6)。

Effect of various compounds on germination of B. cereus T spores!

Compound	Formula	Retardation ²
Trichloroacetic acid	CC1 aCOOH	
Trifluoroacetic acid	CF ₃ COOH	+++
Tribromoacetic acid	CBr aCOOH	+++
Dichloroacetic acid	CHC1 ₂ COOH	+++
Dibromoacetic acid	CHBr ₂ COOH	++
2,3-Dibromopropionic acid	CH2BrCHBrCOOH	+
2,3-Dibromobutyric acid	CH ₃ CHBrCHBrCOOH	+
Acetic acid	CH 3 COOH	_
Propionic acid	CH3CH2COOH	_
n-Butyric acid	CH ₃ CH ₂ CH ₂ COOH	-
Pivalic acid	(CH ₃) ₃ CCOOH	-
Malonic acid	$CH_2(COOH)_2$	-
Glycine	NH2CH2COOH	-
β-Alanine	NH ₂ CH ₂ CH ₂ COOH	_
4-Amino-n-butyric acid	NH2CH2CH2CH2COOH	-

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.

- 23 ----

Table 6.

強い電子吸引性基をもっ化合物である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 じ活性をもっか、その活性は前記。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)酸はす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 考察ならび以小技

[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。解離度の高い鉱酸 ヤー部の有機酸の抗菌作用は木素イオン濃度に応例し、鉱酸ほど解離しな 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DHが外部環境DH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。 すなめち、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、 生び反水素イオンが細胞内DHを低下させることによるものと考えられてい る^{線85}。

TCAは DKa 10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、発芽遅距を生じるという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DH 域全域にあいて、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 Eugleng gracilis細胞の変性のメカニズムに関するBrinkmann⁴の見解と一致する。

試験した全DH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、非解離型を問めず活性がないことを寛味しており、 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は酢酸のトテル基の水素原子が塩素原子で置換された構造をもっ化合物であり、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、強い電子吸引性を示す。そのため強力な水素イオン使与体でもみる。

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、撞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

た結果、以下の事実が判明した。すなわち、電子吸引性基をもっ構造類似体はすべて活性をテレたが、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 (っまり、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 あよび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 趣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ノールの効果は温度によって変化する^{60,85}。 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た (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レく、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)。後和な条件、例えば、30.6mM(30C)、 61.2 mM (20C)、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)。

芋胞に対するTCAの反応の活性化エネルギーは4.0×10⁴ cal/moleであった (Fig. 11)。この活性化エネルギー(山)は高分子化合物の変性について 得られる 値の範囲内^{68.69}にある。芋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 µ値は2.1~5.6×10⁴ cal/moleであり^{8.44}, 芋胞とTCAの反応から得られたµ 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µ値⁴ともほぼ一致した。形態的に著しく異なる細 胞である芋胞と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 なよれば、 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発している。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。

[1] 小 括

- 1. TCAの発芽遅延活性はDH依存性を示し、一定レベル以上(DH 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いなかったが、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4.0×104 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 強い共役塩基をもっ酸の腹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。

---- 26 -----

.

第3章 芽胞の化学構造に対するTCAの影響

第1節 芽胞の化学組成以対するTCAの影響

芽胞、対すう種々の化学的修飾は芽胞の性状、重大な変化を生じる。 これ、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ありである。発芽能の裏キャリゾテー ムに対し感受性になる変化は萎胞タンパク質の一部を除去することにより 生いるで、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に芽胞成分の 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⁷⁰。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⁴⁹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の作用いより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、本部では、TCA処理考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. 実験材料あるび実験す法

(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いた濃度、 6.1 mM, あょびその間の濃度、 30.6 mMを用いた。TCA処理芽胞は脱イオン水で1 囲汚後、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らな方法に従った。 ヘキソサミンの定量は試料を6N 塩酸で 100 C , 15時間加水分解したの ち Rondle and Morgan⁸⁰の方法に従って行った。

* ヨード酢酸はと線照射の対する芽胞の感受性を亢進するが、TCAのは このような増感作用はないという報告がある4 DPA。定量はJanssenら3の方法に従った。

カルシウムの定量はキレート滴定法、より行った。 芽胞 50mg を脱イオン 水25ml ドけん濁し,121 C,15分オートクレーブ処理後,速心分離,上清中 ド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。

I.実 験 成 積

結果はまとめてTableフェボレな。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 広較すると、処理に零レなTCAの濃度が異なるにもかかめらず、差はほと んど認められなかった。

TCA処理萃胞群と未処理芽胞との差以ついても、タンパク質、カルシウムでそれぞれ 8-9%、 0.4 %の低下が認められに以すぎなかった。

Table 7. Protein, hexosamine, DPA and Calcium contents of TCAtreated and control spores of <u>B</u>. <u>cereus</u> T^{1}

Spores ²	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. Conteonts 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

孝胞の生理学的性状にはTCAの作用による明日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, 孝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とする説が有力であ る¹⁷.

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Brinkmann⁴がネレにE.gra-<u>Cilis</u>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

いた変化は発芽の影響を及ぼす)の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 mMTCA 処理芽胞のIRスペクトルを測定した。

I 実験材料あよび実験方法

(1) 夜試菌ならびい芽胞形成法

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孝胞形成を行った。

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

B. subtilis は普通寒天语地を用いて Kondo and Foster う方法に準いて 芋胞形成を行った。

(2) TCA 処理

第3章節|節に同じ

(3) 発芽芽胞。調製

B. cereus T 芽胞 20mgを普通ブイヨン(BBL) 50ml にけん濁し, 30C で培養 レた。培養は、位相差顕微鏡による観察にあいても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、違心分離により集菌、米冷した般 イオン水を用いて洗浄したのち、凍結乾燥した。なあ、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 ĸ精製した KBr を加え, 常法以従って KBr 錠 剤を作製した。測定は普通Hitachi EPI-62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 赤外吸収分充充度計 を使用した。

I. 実 験 成 績

知菌細胞。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. <u>megaterium</u>の芋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⁵²。この知見を参照して、TCA処理芋胞の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 cm⁴ ドそれぞれアミド I, アミド IIに帰属される特徴的で大き、吸収帯、1,440、1,380 cm⁻¹ ド I、 アミド IIに帰属される特徴的で大き、吸収帯、1,440、1,380 cm⁻¹ ド I、 ビビー 7、1,280 cm⁻¹ ド小さいが鋭、ビーク、そして 1,150-950、800-600 cm⁻¹ には縦細構道を有する吸収帯を示した。1,720 cm⁻¹ の吸収 ビークは本菌芽胞 ド特徴的で、 B. <u>megaterium</u> 芽胞⁵² P. B. <u>Subtilis</u> 芽胞では あらめれず (Fig. 12b), B. <u>megaterium</u> 柴養型細胞では 強く ちらめれ ろ⁵²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、未処理等胞のスペクトルドサられた 1,565、1,280、770、50、50、 640 cm⁻¹ の吸収 ビークが発芽等胞のスペクトルには あらめれなかった。この 吸収 ビーク は Ca-DPA の吸収 ビーク と一致した。 TCA 処理(61.2 mM) 等胞の 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、 あよび 680 cm⁻¹ ド新にな吸収 ビークを認めた。







- 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 考察ならび以小招

[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、それそれ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研熱性にあらめれた変化の主たる原因とは考えられない。しかし、補足的零素である可能性は十分あり得る。

著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館あり、 表在性カルシウムを除去すると、研熱性や発芽能が低下することが知らい ている。表在性カルシウムの存在部位として、スポアコートに局在すると 推察よれていたか²、最近、西原ちな、低温灰化法を電子顕微鏡試料作製技 術として用い、直接これを範囲することに成功している。よらに内在性の カルシウムがスポアプロトプラストに局在していること、DPAとの化学量 論約考察から、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 ることを末唆した。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に結果を示している のかもしれない。

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 いらず、化学組成の変化は明日でなかった。一方、等胞と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不唆した。この事実に基づ き、未処理革肥、TCA処理(6/.2 mM、40C、30分)芽胞のIRスペクトルを 測定した結果、TCA処理等胞のスペクトルには未処理芽胞のスペクトルに はあらめれない吸収マークが1.325、130、ふよび680 cm⁻¹ にあらめれた。新 たにあらめれたこれらの吸収マークa帰属は第4章で検討するが、等胞成 分の高次構造に変化が主じている可能性が非常に強いことを示している。

[1] 小枝

- 1、 TCAの作用により、タンパク質、カルシウムは、未処理等肥と広較すると、TCAの濃度と無関係に8-9%、0.4%、それぞい低下した。 アミリ糖は変化がなく、DPAは61.2mMの作用により 0.5%低下した。
- 2. TCA処理(61.2mM,40C,30分)等胞のIRスペクトルには、未処理 芋胞のスペクトルにあらめれない1.325、830 および 680 cm⁻¹ のう本の 吸収マークの存在が認められた。

第4章 TCA処理萃胞の発芽能の囲復と囲復過程 にあけるTCAの挙動

第1節 発芽能の囲復

莘胞に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、芋胞構成成分の量的変化との相関が認められず、IRスペクトルと測定した結果から、おそらく発芽と窓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2 つの問題を解明する必要がある。発芽機 構が損傷と受けた場合, 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みれば,機能の囲復が可能でみ る。例えば,酸性,環境で表在性の陽イオンが水素イオンと置換しななめ 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囲復すること ができる55.59。また、アルカリ処理や加熱処理により発芽能をたった<u>B</u>, <u>cereus</u> T 芋肥や<u>Cl</u>.<u>perfringens</u> type A 芋肥が発芽するためいはリゾナームや コルテックス溶解酵素の添加が外軍である12.24。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股 水処理による<u>B. megaterium</u>芽胞の不法化を挙げることができる²⁷。不活化芽 肥は水中で加熱することにより再活性化これろ。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腹水され、発芽始動物質に 対する反応性を失うが,水中での加熱は,この部位の再水和を可能にし, その結果、発芽始動物質に対する反応性を囲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先め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 めれる。本節では、その方法について検討した。

I. 実験材料かよび実験方法

(I) TCA 処理

第1章第1節に同じ

(2) 裕莽能旧復実験

第1章第1節で述べた方法に従って調製したTCA処理芋胞けん濁液モギ のまま、あるいは本文中に示いた条件で熱処理したのち、以下に述べる発 芋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 にリゾナーム 200 Jug/ml を 添加したもの、かよび(iii) ALAとINO 各 0.05 mMを含むトリス塩酸緩衝液(50 mM、DH RO)に金属塩(Na2HPO4, K2HPO4, CaCl2, Ca(OAC)2, MgCl2 またはSrCl2)20 mMを添加したものを使用した。

I.実 殿 成 積

(1) リゾナームの添加

本菌芽胞はリゾナ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ナーム(200 μg/ml)を添加しても囲復しなかった。

(2) カルシウム塩の添加

酸性環境下、置かれた芋肥は、発芽の必須条件として、強電解質の存在 を軍求するようになり、強電解質不在条件下では発芽しない⁵⁵⁷。カルシウ ム塩は、強軍解質不在条件下での発芽能を効果的に囲復させる。

Supplemented salts ²	Extent of Control spores	germination ³ TCA-treated spores
Disodium hydrogen phosphate	0.601	0.039
Dipotassium hydrogen phosphate	_ ¹	0.041
Calcium chloride	0.525	0.074
Calcium acetate	0.562	0.055
Magnesium chloride	-	0.056
Strontium chloride	-	0.087

Table 8. Effect of salts in restoring the germinability of TCA-treated spores of <u>B</u>. <u>cereus</u> T^{1} .

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 -} OD₆₀/ODi

Not examined.

しかし、TCA処理芽胞の発芽能の俭下は強電解質(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に芽胞に生いに変化とは 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困復 効果は認められなかった(Table 8)。

(3) 加 熟

Fig. 13は、各濃度のTCAを 作用させな芽胞を発芽培也の けん濁する前い、50C、30分 加温しに場合の発芽率(1時 間後のOD他下率)を末したも のである。また、Fig. 14 ほ 61.2 mMTCA 処理芽胞 いついて 50 [30 分加温後。発芽 医羟 時的に測定したものである。 これら、結果は、TCA処理芽 胞,発芽が50C、30分の加温 いより完全に囲得したことを テレている。加温いよう発芽 能。田復。程度は、加温時間 が増すいつれて大きくなり、 まに加温温度(40-50 C)が 高くなる にっれて 囲復に要す る時間の短縮が認められなこ







Fig. 14. Germination profile of reactivated, TCA-treated spores of <u>B</u>. <u>cereus</u> T. TCAtreated (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.

34 -----

ヒから、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4,06×10⁴ cal/mole 6なり、第3章第1節で求めた」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 <u>B</u>. cereus T.

第2節 加熱処理したTCA処理等肥のIRスペクトル

TCA処理芽胞の低下した発芽能は緩和な条件(50C,30分)での加温 により困復した。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、この変代が発芽や構成の機 能低下と関連したものであるとすいば、機能が困復した芽胞のIRスペクト ルは原状に復すことが予想される。すなわち、発芽能が困復したTCA処理 芋胞の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す いる。

I. 実験材料あよび実験方法

(1) 試料の調製

6/12mMTCAで処理しに芽胞を50C,30分熱処理したのち, 脱イオン水で

---- 35 -----

1 囲汚浄し、凍結乾燥しな。

(2) IRスペクトルの測定
 第3章第2節に同じ

I. 実 験 成 績

50 C で 30 分加温した T C A 処理(6/.2 mM, 40 C, 30 分)芽胞の IR スペクト ルを測定した結果, 期待 じ おり, T C A 処理芽胞 で あらめれた 3 本の吸収 で -7 (/.325, 830 および 680 cm⁻¹)の強度は著しく 低下し, そのため, T C A 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 <u>B</u>. <u>cereus</u> T. Arrows indicate 1,325, 830 and 680 cm⁻¹. 第3節 発芽能田復過程におけるTCAの挙動

TCA処理莘胞の発華能の囲復は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、この変化が質的変化のみであるか、何らかの物 質の移動、すなゆち、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 49-5.1mg を精秤し、日金セル(5mmゆ)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 - アルナルをthermocoupleをして、空気(40ml/min)または窒素(30ml/min) 気流中、昇温速度、5または10 C/min、感度、±1mg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) 熱分解がスクロマトゲウム

乾燥茎腔を加熱分解レ,発生する気体をが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 がスクロマトグラフ を使用し、熱分解温度を 200 C に設定し、 2 m × 3 mm Ø のがうス管、充填 剤 PEG 6.000、10% TPA 、 He (40ml/min·atm) 、カウム温度 /85 C で、検出器 FIDを用いて測定した。

I. 実 験 成 猜

(1) 熱分析35

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。減量はで - 7時温度が56-60 C と 230 C 以上で生いた。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、 ビーク時温度を過ぎて徐々に平衡に連する。 230 C 何近から 生いる第2の減量は菌体の燃烧によるものである。これに対して、 TCA処 理芽胞のTG曲線(Fig.18)は、 ビーク時温度が56-60 C である第1 の減量 の他に燃烧による減量とは異ならもうひとつの減量が、 ビーク時温度108C

* 以後、この減量を第2の減量とする。

付近で生いたことを示した。この滅量は、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濃度にほぼ比例して含まれていることを示している。



(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節で明らかにした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(61.2mM)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84Cまで加熱した試料と、第2の減量が終了する164C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)。

以Cまで加熱レム芽胞のIRスペクトルは、加熱前のIRスペクトルと同い く、ハ325、P30 および 680 cm⁻¹ 以吸収が認められた。一方、 164 C まで加 熱した試料のスペクトルでは、これらの吸収マークは完全に消失した。ニ の事実は、第2の減量が芽胞けん濁液を50 C で加温したとき芽胞に玉びる 変化に対応したものであることを示している。





ì

Fig. 19. IR spectra of TCA-treated spores of <u>B</u>. <u>cereus</u> T.



- Fig. 20. Pyrolytic gaschromatogram of TCAtreated and control spores of <u>B</u>. <u>cereus</u> 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 10² temp. 200 C

Detector: Flame Ionization.

----- 39------

(3) 熱分解がスクロマトグラム

第2の滅量,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 C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処理等肥の未加熱試料の熱分解がスクロマトグラムは約14分の retention timeをもっ単ーヤークを示しなが、未処理等肥および164 Cまで 加熱したTCA処理等肥の熱分解がスクロマトグラムでは、このビークはあ らめれなかった。また、このマークはTCA濃度が増すべつれて、ほぼに例 してたきくなった。TCA標準物質を同一条件で分析した結果, retention time は約14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 考察ならびに小孫

[1] 汚 察

TCA処理芽胞の発芽能へ囲復はカルシウム塩の添加やりゾナーム添加 堵他では認められず、加熱処理によって認められた。リゾナームの効果に 関しては、本菌芽胞ならびにTCA処理した本菌芽胞がリゾナーム非感受性 であることから当然の雑果である。

TCA処理芽胞の発芽能が加熱により田復しなという事実は、TCA処理の結果、発芽機構に生いた変化が、発芽に必須な成分の欠損とか機能衰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田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ると、この田復現象を再活性化ということができる。

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みら知見が ある。すなわち、無水エタ)ールは活性化された<u>B</u>, megaterium</u>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 ろというものである。この現象は発芽始動物質認識部位が悪水アルコール で完全脱水されることにより脱活性化が生いるが、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?。しかし、TCA処理芽胞の加熱 による発芽能囲復のメカニズムに関しては、この考えすを導入することは 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なり、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、発芽能の固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固復現象に平行して生いる反応であることを示唆した。すなれち、付着水は脱離するが、問題の

----- 40 -----

揮発性物質の脱離は認められない 84Cと揮発性物質の脱離が認められる 164C までそれざれ加熱しなTCA 処理芽胞のIR スペクトルを比較しな結果, 前者のスペクトルドは未加熱試料と同様, 1:325, 830 および 4P0 cm⁻¹の吸収 ビ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にTCA濃度に K例すること,ならびい熱分解が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 らめれた3本の吸収ピークョうち,最日強い強度も末した 830 cm⁻¹あょび強 度は小さいが鋭い620 cm-1の各吸収ビークの帰属はCCI 結合に由来すみ吸収 であると推定される⁴⁵。以上の結果は、 芋肥 KTCA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 処理孝胞の発寿能の囲復がTCAの脱 離反応を伴って発現することから,両者の間に付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民に明らかであり、これはTCAアニオンの脱離反応が 発孝能囲復の人力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沢構造に影響することが指摘されている。 Nakajima and Hayashi なTCAと高分子化合物との反なについてDCA/DCE みろい は TCA/ACOH 中でのおりペプチドの coil-helix 転移現象は言及していみ。す なわち、低温ではDCA みるいは TCAはペアテド 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開發し, ペプチ ド残基の分子内木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。 ーオ、酸分子は二量体を形成し脱離するというものである。繊維ボタンパ ク質とTFA についても類似の現象が報告さいている⁸⁹。また, Brambl and Handschin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 す成分以分解されるという現象を報告していろが、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 ロ水素結合 Kより解距している。TCAはその水素結合を開発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される。

〔I】 小 括

1. TCA処理事肥の発芽能は加熱いより固復した。固復効果は、加熱温度、加熱時間に破存していた。

—— 41 ——

2. TCA处理等胞に出現した1.325, 830 および 680 cm¹の吸收 C - 9 は加熱により吸収強度に著しい伧下が認められた。この吸収 C - 9 のち, 1.325 cm⁻¹g V - 9 を険く他の2 本の V - 9 は TCAの CCI 結合に由手すろ

ものでみると推定された。

- 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茎胞以対するTCAの影響

第一節 活性化芽胞、対するTCAの影響

芽胞は熱、酸、アルカリか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え剤の作用により活性化され、発芽始動物質に対するな客が量的、質的に要なってくる¹⁹。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じることが考えられる。

体眠状態にある<u>B. cereus</u> 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 を組み合いせて作用させた場合、濃度要求性が著しく他下する(ALA > /0mm, INO > a5mm, ALA+INO > a02mm)^{46,65} また、本菌等胞は、それ単独では発芽を生びない濃度の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。この現象は、ALAによる等胞の化学的活性化であると考えられる。さらに、ALA活性化等胞の発芽はカリウム場によって妨害されるという特徴がある(Fig.21)^{56,64}



Fig. 21. Two types of activated spores of <u>B</u>. <u>cereus</u> T. ALA-treated spores, prepared by incubation with Lalanine, 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 NH₄ inhibit germination at the indicated stages.

----- 43 -----

莘胞の活性化は、一般に、加熱処理によってなまれることが多い。加熱活性化萃胞は、ALA、INO 個々の作用による発芽において、濃度零彩性の著しい低下や発芽始動物質の化学構造に対する零彩の厳密さが矢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、本菌茎胞の場合は、加熱活性化によりカリウム場による阻害がみらいなくなる。

このように、加熱活性化等胞、ALA活性化等胞はどちらも体験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 広較した。

I. 実験材料かよび方法

(1) 加熟活性化

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

(2) ALA活性化45.

芋肥1mgを a.5mm ALAを含む NaPB 1.5ml にけん濁し、 30C で1時間保温した。 遠心分離により集菌、 NaPB で1囲洗浄後、 NaPB または脱イオン水にけん濁 し、 OD が a.4になるよろに調整した。

(3) TCA 処理

第1章第1節で述べに方法に従って、30C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

I. 実 験 成 猜

(1) 加熱活性化等肥

本菌芽胞の最適活性化温度は75C(30分)である。しかし、70Cでも活性化の程度はほとんど変的らないことから、加熱活性化は70C(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を容易にするため30C(30分)で行った。

TCAを作用させた加熱活性化等胞の発芽の時間変化曲線をFig.220 Kネレた。TCAの作用Kより、加熱活性化芽胞もまた発芽遅延を生いたが、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 へ作用いよる脱活性化は加熱活性化芽胞に対しても生いること、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濃度に対するし値のプロットは、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Q5mM ALAとともに、30C、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、30C(30分)で行った。Fig.22にネレに結果から明らかなように、低濃度のTCAの作用で発 芽連進が生じ、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。



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 ALAtreated 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処理萃肥に対するTCAの影響

前章において、リゾテームはTCA処理芽胞の発芽能の田復効果をもた ないことを末した。しかし、これは、未処理芽胞、TCA処理芽胞はどちら もリゾテ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、発芽機構とリゾナームの関係を議論することはできない。前 記の実験はリゾナ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、リッテーム感受性になる(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 を生いろならば、リッチーム添加による囲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、本菌菜肥のリゾナームに対する感受性が変化することを考慮すると、スポ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か予想される²⁹。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。

本命では、事」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、リゾナーム添加による発芽能の囲復効果の有無を検討した。

I. 実験材料および実験方法

(1) SDS-DT顶理^{29,77}

芽胞/mgを、 a/M NaCl 、 a5%SDS 、 10 mM DTT からなら反応液 15 ml K けん濁し、37 C で 2時間培養した。水冷後、遠心分離、沈渣を水冷した 1 mMトリス 塩酸緩衝液(pH &0) K けん濁したのち、 かたたび遠心分離し、 上清を捨てた。この操作を3 囲繰り返したのち、小量の回緩衝液K けん濁 し、同緩衝液2 L K 対して一夜遠称した。遠心分離K より 筆園、上清を捨 て、沈渣を NaPB 1 ml で泛浄後、NaPB または脱イオン水K けん濁し、 OD がa4 K なるよう K 調整した。一部は、 脱イオン水を用いて洗净し、 凍結乾燥し たのち、 化学分析K 役した。SDS-DTT 処理液上清 K ついても、 遮杵後、 化学 分析K 役した。

(2) TCA処理

第5章事|静に同じ

----- 4.6 -----

(3) 発芽実験

第2章第1節に同じ

(4) 耐熱性の測定

80 C、10分間の加熱に対する研熱性について、第1章第2節に並べにオ法に準じて測定した。

(5) 化学分析

第3章第1節に同じ

(6) リゾナーム、 みよび Lysozyme substrate x 対する TCA処理とその後の熱処理、ならびい活性の測定

(i) リゾナームのTCA処理とその後の熱処理:リゾナーム(15 mg/ml)と TCA(6/1.2 mM)の等量混合液を40C, 30分保温したのち, ただちゃ 5mMト リス塩酸幾衝液(DH 8.0)で5倍に希釈した。これを等分し、一方はそのま す,他守は50C,10分熱処理後,以下い述べる方法に従って活性を測定し た。すなめち、 Lysozyme substrate (<u>Micrococcus luteus</u> cellの乾燥標品, 生 化学工業株式会社)Q.3mgをトリス塩酸機衝液3ml K けん濁したのち、これ い上記の処理液と5,10, または15川添加し、520 nm におけるODの変化も経 時約10反応終了すで測定し、最初の1分間の01度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に変換して末した。 (1) 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 mMTCA各溶液以けん濁(1 mg/ml)レ, 40 C, 30 今保温したのち、ただちゃ Eppendorf Microfugeで2分間畫心分離し、上清も 捨て,沈査をトリス塩酸幾衝液にけん濁, ODを a.35 に調整した。これを等 分し、一方はそのまま、他方は50C、10分熱処理し、以下の実験に使した。 すなわら、各Lysozyme substrate けん濁液にリゾテームを10µg/mlとなるよう K什ん濁し、前記の場合と同集, ODの変化を測定した。

I. 実 験 成 循

(I) SDS-DTT処理²⁹

本菌茎胞のSDS-DTT処理において、20mM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10mMとした。

この条件下では、アミ)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処理し反芽胞のタンパク、アミク糖、およびDPA量を余したものである。この結果は、未処理芽胞の名成分値と比較して、タンパク質では低い値を示しているが、アミク糖および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滅量に伴う芽胞重量の減少により/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COIONyforming 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かいとみて、両者の値をSDS-DTT処理芽胞とへ間で比較したところ、アミノ糖については106、DPA については107というよく似た値を得た。この値(平均値、1065)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、707%/mg Sporesとなった。したがって、実測値との差、155%/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い一致を示した

Table 9. Protein, hexosamine and DPA contents of SDS-DTTtreated spores of B. cereus T!

	Protein	Hexosamine	DPA
Spores	55.2 ²	7.28 ²	11.28 ²
Supernatant	14.4 ²	_ ³ .	-

 Spores were treated with 0.5 % SDS-10 mM DTT in 0.1 M NaCl at 37 C for 2 hr.
 Contents are shown as percentages of the dry weight of the spores.

3. Not detected.

(2) SDS-DTT处理芽胞

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強調され、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、発芽遅延を生いた。 発芽遅近は催濃度で急激に生いた(Fig. 23b)が、50C での加熱により、 体眠芽胞にTCAを作用させた場合と同様、囲復した(Table 11)。

SDS-DTT処理した芽胞はリゾナーム感受性となり、この推算はTCA処理後 も変めらなかった。SDS-DTT処理芽胞はTCAの作用の有無と無関係にリゾナ ームの添加いよりすみやかに発芽した(Table 11)。本菌芽胞では、芽胞 構造中、リゾナームの基質となり得る化学成分はコルテックスと構成する コルテックスペプテドグリカンであり、よらに内層に展開する germ cell

Wallは基質いなり得ないことがめかっている⁸⁸。ここで述べたリゾナームの 作用は, 主理学的条件下での発芽では, 本未, コルテックス溶解酵素かな すべき作用であり, 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 <u>B</u>. <u>cereus</u> T spores treated with SDS-DTT.

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

 Spores were treated with 0.5 % SDS-10 mM DTT in 0.1 M NaCl at 37 C for 2 hr.
 SDS-DTT-treated spores were heated at 80 C for 10 min.

3. Mean ± standard deviation (P=0.05).



Fig. 23. Effect of the concentration of TCA-treatment on germinability of SDS-DTTtreated spores of <u>B</u>. <u>cereus</u> 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) <u>t</u> value.
Table 11.

Effect of TCA-treatment and subsequent heating on germination of SDS-DTT-treated spores of B. cereus T!

Spores	t-Val Without lysozy	ue (Min) me With lysozyme
Control ²	26.9	7.7
TCA-treated spores ³	83.9	7.5
After heating ⁴	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 $\mu g/ml$). 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、リゾキームとLysozyme substrate にTCAを作用させに結果、興味ある事実を見出した(Fig.24)。リゾナーム今子の変性の可逆性については、すでに詳細な研究がある。それによろと、DHやイオン強度、各種タンパク変性剤の作用などで変性し、酸素活性を失うが、変性の原因因子を除支すると復えし、活性の固復がみられる。著者は、リゾナームにTCAを作用させることによる酵素活性の低下、さらに、変性しに酵素を加熱(50C、10分)することによる活性の固復を認めた(Fig.24)。一方、TCAには細菌細胞壁や外膜に作用し、ある種の多機類を分離する作用があり、この作用は、基質であるペプテ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を作用ませるとリゾナームに対する反応量が減少した。この基質を加熱(50C、10分)すると、活性は逆に低下し、熱変性が生じたことを不唆した。この結果から、Lysozyme substrate に対するTCAの作用は、リゾナームに対する場合と異なり、不可逆的変性を生いるものであることが判明した(Table 12)

第3節 考察ならびに小話

(1) 考察

加熱活性化革肥およびALA 活性化革肥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 26 両诺 性化革肥はどちらりTCAの作用により腔活性化よれたが、TCAに対する感 受性において顕著な相違をネッド(Fig.22)。この相違は、TCA濃度に対す ろt値のプロットにおいて明瞭に示されている(Fig.22b)。加熱活性化等



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 <u>Micrococcus luteus</u> cells after the addition of the enzyme at the indicated concentration.

Table 12.

Effect of pretreatment with TCA on lysozyme-digestion against <u>Micrococcus</u> luteus cells!

Concn. of	Before h	neating	After he	ating
TCA (MM)	V ²	Extent	V	Extent
Control	0.543±0.036 ⁴	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 <u>M</u>. <u>luteus</u> 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 μ g/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【値のプロットは休眠芽胞のそれと同じ皹きをもっ直線をネレムのの 対して、ALA活性化芽胞のt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ろと、発 芋帶構に対するTCAの脱活性化作用は,芋胞の外殻構造の変化とそれに伴 う透過性の愛化いより,発芽、必要不可欠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 若果は, 両症往化萃胞の外殻構造の違いを反映している。 休眠孝胞と加熱 活性比芽胞の傾きが等レいということは、両芽胞におけるTCA作用の発現 が等価であり、つまり、TCAが加熱活性化等胞に作用し効果を発現するに めには、休眠季胞と等価の外殺構造の変化が要求されることを未唆してい ろ。対称的に、ALA活性化等肥に対するTCAの作用は、他の二種の等胞よ りも効果的であったが、これは、ALAの作用により、等胞の外被構造はす でに変化しており、 TCAの作用においてその変化に対する軍状が軽減され たことを末暇する。この見解は、SDS-DTT処理等胞のTCAに対する感受性が 施熱活性化芽胞よりもALA活性化芽胞の類似していたことからも支持され よろ。

Fig, 22 ドネレド結果は、 芽胞の発芽活性化のメカニズムドマック、 いく つかの重要な手掛りを与えている。第1以、加熱活性化による芽胞の外殻 構造 a 変化はALA活性化の場合と広較して顕著でなく,むしろ, 休眠孝胞 K近い状態であることが示唆された。第2 K, 加熱活性化等肥とな販等肥 がそいぞい示すも値のプロットは等し、傾きをもっ直線を示したが、も値 は常い加熱活性化芽胞が体眠芽胞よりも小さい値を示した。これは、加熱 注性化Kより生いな発芽能動物質K対する反応性の亢進がTCA作用後も錐 持されており、加魏により活性化される部位がTCAの作用部位と要なるこ とも示唆している。事3K、ALAKよる活性化は芋胞外殻構造K対して TCAアニオンの作用と同様の初果をもつことが示唆された。TCAは強酸性 環境では、芋肥に対し脱活性化作用をネすが、中性~弱酸性の環境では遂 水活性化作用を示した、 TCAの脱活性化作用はTCAアニオン いより活性化 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 アニオンによろ活性化が等価の初果を有すかという考えは、ALA活性化芽 胞に対すみTCAの強い活性を旨く説明する。

コルテックス溶解酵素は広較的表層に局在し、主理的条件によう発芽に は必要不可欠な成分のひとつである^{3/0,1/24}。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 違の酵素は溶解活性はないが、都分的な変 性も引き起こしコルテックス溶解、際して補助的役割を果すと考えられる。 Hashimoto 54は、本菌芽胞を85℃、30分加熱しても充滅しないが、本酵素活性は約50%低下し、発芽の完遂、支障もきたすこと、この支障は、本酵素やリゾナームの添加いより囲復することを明らかいしている。

TCA作用の標的の一つは、わそらくコルテックス溶解酵素であろりと思 りれる。前章では、TCA処理芽胞の発芽能の囲復にリゾテームが効果がな いことを末した。しかし、本菌芽胞は、本表、リゾテ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の作用以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ともつリゾナームの添加により固復したと いう事実から、本酵素がTCAの標的である可能性が強く不安された。

SDS-DTTの作用により、本菌芽胞は発芽能の低下を生びた。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、リゾテームの添加によりすみやかに発芽したことと合わせて考慮 すると、かぞ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⁸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、リゾナームに対するTCAの作用は酵素活性の低下を生びた。TCA処理したリゾナームの活性に加熱により面復した。一方、Lysozyme substrate にTCA を作用ませた結果、低濃度、価温での作用によりリゾナームに対する感受性を失い不可逆的変性を主びた。この結果は、 等肥に生びた変性が可逆的であったという事実を大きく異なる。Lysozyme substrate として使用した M. <u>luteus</u>の細肥壁構造と芽胞におけるリゾナームの基質であるコルテックスペプテドグリカン構造の違いに基づく差^{17.88}であると思われるが、いずれにしても、コルテックスペプチドグリカンはTCA 阿性であるといえる。

コルテックス溶解酵素の活性は2個の金属イオンドより促進されること が報告されている⁸²。 したかって、芋肥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、あるいはまな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かかもしれない。酸性条件下で芋肥を処理 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礎 素活性の他下に基づくという可能性は非常に大まい。 しかしながら、すで に近いに理由から、TCAの作用による発芽能の低下をこのようなメカニズ ムで論じることはできない。

TCAアニオンの作用により芽胞が活性化された状態にあろにもかかわらず、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ませることを示しており、体眠状態にある芽胞の活性化にはい

----- 53 -----

まる発芽反応が、一連の連鎖反応であることを強く末唆する。こへ連鎖反応において、コルテ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。

〔I】 小 枋

- ハ 加熱活性化芽胞、ALA活性化芽胞の対するTCAの作用は体眠芽胞と 同様の発芽遅進を生びた。TCAの対する両活性化芽胞の感受性をCC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、体眠芽胞と 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の作用以より、本菌芽胞はタンパク質の一部を失い、リゾナ ーム感受性以変化した。また、発芽能の低下を生いたが、依然、耐熱 性を末した。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ナームの添加により咽復した。
- 3、リッテームに対するTCAの作用は活性の低下を生いた。これは加熱により回復した。

第6章 総括ならびい結論

第一節 裕 招

著肥にとって発芽は栄養型細胞に変化するにめ、必ず経なければならない過程である。休眠状態にある等胞は、呼吸活性や代謝活性がほとんど 彼出されず、発芽後、活性か上昇してはいめて検出される。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、研究対象となってきた。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が提唱されているものか、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とつうニンからびその構造類似体の構造活性相関的 研究がら、疎水性基、正と貸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、その重零性が証明された別しかし、 参等指動のメカニズムは、ある種の芽胞ではイオンのかによる発芽が可能である。ため、発芽を始動させる方法や、発芽を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たきく次のニマン的けることができる。第1は、前出の発芽始動物質について構造活性相関と調べ、発芽 指動物質認識部位の性格を明らかにする方法^{34,36,97,90} であり、第2は、化学 的または物理的に変性ませに芽胞について発芽の特徴を調べ、その処理に より芽胞に生いた変化と対応ま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らけた部位の機能を明確にする方法 である^{9,1,0,1,2,24,27,27,57, 76, 73, 81}。

発芽は、芋肥麦面状態と蜜母な関係がある。これは、芽肥麦面が、芽肥 と発芽粉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、発芽時に芽肥表面状態や構造が変化するという事実^{37,50,75}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^{44,75,81}から明白で ある。一方、芽肥の表層は、タンパク質に富む構造からなるスポアコート でかいれている¹⁹。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、生存率を損 なめない条件下で異常に低い発芽率を示した。そして、この原因は、発芽 遅延が生い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 よく知られな化合物

である。TCA分子のトリクロルメナレン基は強い電子吸引性をネレ、その ため、TCAの解離性は非常、高く(DKG1.0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 とイオンやアを形成するといった性質がある^{31,49.} そこで著者は、このよ うなTCAの化学的性質を履拠として、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 生した。また、SDS-DTTで処理した芽胞はリゾテーム感受性を示すことが報 告されている⁵⁵、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、リゾテームやトリプシ 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、DH 3.0 以下(TCA、 61.2mM)という強酸性条件を必要とすること、さらに、 4.0 × 10⁴ cal/moleという高分子化合物の変性を示唆する活性化エネルギー値を 末すことが判明した。TCAの作用発現が認められるDH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 や熱分解が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末唆している。低下しに腰能が、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囲復したという事実 がこのことを裏付けている。

TCA処理の効果に対するDHの影響は、弱酸性から中性領域にかけて、TCA が発芽遅変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 和レなTCAと塩酸を用いて、その作用順序の影響を検討した結果、はびめ に中和したTCAを作用させ、次に埴酸を作用させに場合、発芽遅延現象が 発現したが、その送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いよる発芽機構の糖能低下が、次の ような一連の反応を経て生いることを示している。すなめち、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の無視できない)が、 すず、スホッ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に影響を反ぼし、その結果、スポッアコートにあける透過性 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覚性の増たは、これを 如実に反映したりのであろう。 このような状態の芽胞に、TCAが解離して 生び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いるに至る 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、リゾナ -4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、発芽遅進を生びた。この場合もやはり加熱処 理による発芽能の固復が認められたことから、未処理芽胞をSDS-DTT処理芽 胞に対するTCA処理の結果、発現する発芽遅進のメガニズムは、本質的に同 ーであると考えられる。

リゾテーム存在下に、SDS-DTT処理芽胞はTCA処理の有無に関係なく、す みやかい発芽した。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、リゾテームにより補償されたことを意味している。リゾテー ムの作用部位はコルテックスペプチドグリカンであり。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2429.30。したが って、低下した機能がリゾテ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主唆している。 In vitro で、リゾテームに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相復 したという事実はこれを支持する。一方、基質であらM. luteus細胞をTCA 処理すると、リゾテームに対する親和性の低下が生じ、加熱処理にこの傾 句をよらに助長した。

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ネレたが、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酸構造がTCAとの反応に関す るかずり、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、すでに外酸構造に変化が生い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アニオンド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、興味がもたれる現象である。

TCAの作用条件を操作することいより、発芽始動が遅近したり、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)発芽遅近、すなわち、発芽始動機構の機能低下を主 ひたことは、コルテックス溶解酵素活性の制御が芽胞の体眠と発芽の境界 も制御レていると推察され、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、今後さらい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処理を中心い種々の熱、化学的かよび酵素的処理により芽胞に生びた変化を明らかにし、発芽機構との関係を検討した。

- ハ 芽胞にTCAE40C(30分)で作用ませに結果, 61.2mm以上では殺菌 作用が濃度の増加とともに強くなった。 61.2mm以下では殺菌作用はほ とんど認められず,発芽遅距,熱あよび化学薬品に対する抵抗性の低 下, DPA保持能力の低下の度合がTCA濃度の増加とともに増たした。
- 2、 TCAの作用によう発芽遅近の程度はTCAの濃度、作用温度および接触時間に依存しており、またDH 3.0 以下の強酸性環境を零求した。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遂次的作用で、TCAアニオンの作用はCCl3-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 に変化を主いる質的変化が主であり、この変化はTCAの結合により主 いることが判明した。なか、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に発華能は加熱、またはリゾナームの添加

----- 58 -----

いより囲復した。

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。 本研究に当り 常い暖かい御指導と御鞭撻を賜いりましい 恩師徳島大学 谷 勇教授い深謝します。

また、本研究に際し終始御懇篤なる御指導と御鞭撻を賜いっ 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複島大学樋口富彦 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、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文学薬学部 縦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. <u>10</u> ;
	139
2.	安藤矛明 1976. 日卻固訖 31:713
з.	Brambl, R., and Handschin, B. 1976. Arch. Biochem. Biophys. <u>195</u> :606
4.	Brinkmann, K. 1976. Planta(Berl.) <u>129</u> :221
5.	Brown, M. R. W., and Melling, J. 1968. Biochem. J. <u>106</u> :44
6.	Brown, W. C., and Cuhel, R. L. 1975. J. Gen. Micro. <u>91</u> :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. <u>29</u> :345
9.	Carran, H. R., and Evans, F. R. 1945. J. Bacteriol. <u>49</u> :335
10.	Cassier, M., and Sebald, M. 1969. Ann. Inst. Pasteur <u>117</u> :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. <u>111</u> :437
14.	Foerster, H. F., and Foster, J. W. 1966. J. Bacteriol. <u>91</u> :1168
15.	Germain, G. R., and Murrell, W. G. 1974. J. Bacteriol. <u>118</u> :202
16.	Gould, G. W. 1970. J. Gen. Microbiol. <u>64</u> :289
17.	Gould, G. W. 1977. J. Appl. Bacteriol. <u>42</u> :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.	蜂缦留養赀,拯越弘毅,1976. 耐久型钼肥,岩设素店
21.	Hanson, R. S., Curry, M. V., and Garner, J. V. 1972. Can. J. Microbiol.
	<u>18</u> :1139
22.	Harrell, W. K., and Mantini, E. 1957. Can. J. Microbiol. <u>3</u> :735
23.	Hashimoto, T., Frieben, W. R., and Conti, S. F. 1969. J. Bacteriol. <u>98</u> :
	1011
24.	Hashimoto, T., Frieben, W. R., and Conti, S. F. 1972. Spores V:409
25.	林腾哉,并本泰治, 1974, リッテ-ム, 南江堂
26.	Herbert, D., Phipps, P. J., and Strange, R. E. 1971. Methods in Micro-
	biology Vol. 5B:209, Academic Press, London
27.	Holmes, P. K., and Levinson, H. S. 1967. Curr. Mod. Biol. <u>1</u> :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. <u>91</u> :1811
31.	Irwin, G. M., Kostenbauder, H. B., Dittert, L. W., Staples, R., Misher,
	A., and Swintosky, J. V. 1969. J. Pharm. Sci. <u>58</u> :313
32.	Issahary, G., Evenchik, Z., and Keynan, A. 1970. J. Bacteriol. <u>101</u> :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. 神产博太郎, 1975. 熟分析, 蒲蒜红
- 36. 川崎立太郎, 近藤雅臣, 手島邦和, 1967、 食茸誌 2:207
- 37. Keynan, A., Issahary-Brand, G., and Evenchik, Z. 1965. Spores III:180
- 38. Kondo, M., and Foster, J. W. 1967. J. Gen. Microbiol. <u>47</u>:257
- 39. 近藤雅臣,西原力, 1980, 日細菌誌 25:288
- 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 II:47
- 45. 水島三一郎,晨田武彦, 1958,赤外吸收とうて込明, 安立出版
- 46. Mroszczak, 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. <u>46</u>:62
- 48. Newburger, J., and Kostenbauder, H. B. 1977. Life Sci. 20:627
- 49. 日本公定書協会,1976、事九改正日本藥局才註解,広川書店
- 50. 西原力, 1970、日甜菌誌 25:285
- 51. 西原力,森本野子,市川富夫, 红藤雅厚, 1979、日细茵訖、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. <u>87</u>: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. Rondle, 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. 相良元子, 1976、四国医該、 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
- Shibata, H., Takamatsu, H., and Tani, I. 1978. Microbiol. Immunol. <u>22</u>: 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 (桑島:工工,周年,四時,正天,層井,死記,一般,後日初) 朝倉書浩
- 69. Stearn, A. E. 1949. Adv. Enzymol. <u>9</u>:25
- 70. Sutherland, I. W., and Wilkinson, J. F. 1971. Methods in Microbiology 5B:345, Academic Press, London
- 71. 心勇、松村元子,兼任惠彬、柴田洋文,1971、日翻菌誌, 26:392
- 72. 谷勇, 相良元子, 柴田洋文: 1975, 丹朔菌誌 近: 495

- 73. 谷勇, 柴田洋文, 高木洋文, 多田新一, 1774, 日细菌誌, 21:106
- 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
- Warth, A. D., Ohye, D. F., and Murrell, W. G. 1963. J. Cell. Biol. <u>16</u>: 593
- 84. 渡部-仁,細菌芽胞の発芽機構に関わ基礎的研究,大阪大学
- 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. <u>94</u>:2075
 87. Woose, C. R., Morowitz, H. J., and Hutchinson, III, C. A. 1958. J.

Bacteriol. 76:578

- Woose, C. R., Vary, J. C., and Halvorson, H. O. 1968. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. 59:869
- Yamashita, S., and Yamashita, T. 1975. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. <u>72</u>: 941
- 90. Yasuda-Yasaki, Y., Namiki-Kanie, S., and Hachisuka, Y. 1978. J. Bacteriol. 136:484
- 91. Zytkovicz, T. H., and Halvorson, H. O. 1972. Spores V:49

主論文別刷

i

· · · · ·

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 μ 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 pKa 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.

H. SHIBATA ET AL

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 μ 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 $[1-(OD_2/ODi)]$, where ODi is the initial OD and OD₂ 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 μ 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 Splitbeam 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 μ 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 $6 \times hydrochloric acid at 100 C$ for 15 hr; and the DPA content was measured by the method of Janssen et al (11).

EFFECT OF TCA ON BACILLUS CEREUS SPORES

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 $agar^{a}$

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

^{a)} 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.

H. SHIBATA ET AL

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: \bigcirc , 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 8.0) containing 0.05 mM L-alanine and 0.05 mM inosine; $\textcircled{\bullet}$, buffer containing both compounds at 0.5 mM; \triangle , nutrient broth containing 100 μ g/ml of chloramphenicol.

EFFECT OF TCA ON BACILLUS CEREUS SPORES

$pH^{a)}$	Concn. of TCA	Extent of ^{b)} germination
1.6	0 тм 30.6	100.0% 42.9
2.0	15.3 61.2	100.0 29.8
3.0	61.2	100.0

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

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

^{b)} 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.

Chemical	Control	Spores treated with TCA at		
Chemicar	spores	6.1 тм	30.6 тм	61.2 тм
NaOH 1 N	a)		+-b)	
2 n	+	+	· +	+
HCl 0.27 N	•		_	+
Lysozyme 200 µg/ml ^{c)}			_	_

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

a) Insensitive.

^{b)} 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.

^{c)} 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.



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 TCAtreated 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 controlspores of B. cereus T

Spores	Protein	Hexosamine	DPA
Control spores	66.5 ^a)	6.9a)	10.4a)
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	5 7.8	6.7	10.0

a) Contents are shown as percentages of the dry weight of the spores.

344

EFFECT OF TCA ON BACILLUS CEREUS 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).

H. SHIBATA ET AL

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 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 α -helical conformation of a fibrous polypeptide was converted to a β -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

- 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.
- 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 stearo*thermophilus 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.

- 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.
- Karasz, F. E., and O'Reilly, J. M. 1967. Enthalpy changes in the helix-coil transition of poly (γ-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.
- King, W. L., and Gould, G. W. 1969. Lysis of spores with hydrogen peroxide. J. Appl. Bacteriol. 32: 481–490.
- 15) Kulikovsky, 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- γ -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.
- Rode, L. J., and Foster, J. W. 1966. Influence of exchangeable ions on germinability of bacterial spores. J. Bacteriol. 91: 1582–1588.
- Rode, L. J., and Williams, M. G. 1966. Utility of sodium hypochlorite for ultrastructure study of bacterial spore integuments. J. Bacteriol. 92: 1772-1778.
- 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).
- 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.

H. SHIBATA ET AL

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 $(1-OD_t/OD_i)$. 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_t/OD_i is the final value of OD_t/OD_i . When germination was not complete within 4 hr, OD_t was usually takes 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.





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. 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 spore swere 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

Concentration		Extent of germination	on after 1-hr incub	ation
of TCA (mm)	Before	e heating	After	heating ^{b)}
Control	0.713 ^c)	(100.0%)	0.715c)	(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)

Table 1. Reactivation by heating of TCA-treated spores of Bacillus cereus Ta)

a) Spores were treated with TCA at the indicated concentration at 40 C for 30 min.
 b) TCA-treated spores were heated at 50 C for 30 min in sodium phosphate buffer (0.1 M, pH 8.0).

c) $1 - OD_{60} / OD_i$.



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

Compound	Formula	Retardation ^b
Trichloroacetic acid	CCl ₃ COOH	+++
Trifluoroacetic acid	CF3COOH	-{- - {{ -
Tribromoacetic acid	CBr ₃ COOH	+++
Dichloroacetic acid	CHCl ₂ COOH	+++
Dibromoacetic acid	CHBr ₂ COOH	-++-
2,3-Dibromopropionic acid	CH ₂ BrCHBrCOOH	+
2,3-Dibromobutyric acid	CH ₃ CHBrCHBrCOOH	+-
Acetic acid	CH3COOH	
Propionic acid	CH ₃ CH ₂ COOH	—
n-Butyric acid	CH ₃ CH ₂ CH ₂ COOH	_
Pivalic acid	(CH ₃) ₃ CCOOH	_
Malonic acid	$CH_2(COOH)_2$	—
Glycine	$\rm NH_2CH_2COOH$	
β -Alanine	$\rm NH_2CH_2CH_2COOH$	_
4-Amino-n-butyric acid	$\rm NH_2CH_2CH_2COOH$	—

Table 2. Effects of various compounds on germination of Bacillus cereus T spores^a)

 $^{a)}$ Treatment of spores with the indicated compound was carried out at 40 C for 30 min.

^{b)} +, ++, +++, 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 TCAtreated 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/DCE¹ or TCA/AcOH¹: 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).

¹ DCA, dichloroacetic acid; DCE, dichloroethanol; AcOH, acetic acid.

H. SHIBATA ET AL

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 aprés traitment 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.
- 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., Frieben, 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.
- 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.
- Nakajima, A., and Hayashi, T. 1968. Effects of temperature on molecular conformations of poly-γ-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.
- 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.
- 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 mucopeptide in *Bacillus* species. J. Cell Biol. 16: 593-609.

(Received for publication, September 10, 1979)

'lus 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〕

参

考

論

文

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卷 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、変次的ある 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³⁰。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^{1,4,7)}、発芽時培養温度あるいは培地の液性^{6,8)} といつ た環境因子により大きく影響を受ける。Levinson と Hyatt⁵⁾ 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,自然界に広汎に分布し,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³⁰を使用した。培地組成は (NH4)₂SO₄, 0.4 g; Mg SO₄, 0.08 g; MnSO₄, 0.01 g; ZnSO₄, 0.1 mg; FeSO₄, 0.1 mg; CuSO₄·5H₂O, 1.0

495

mg; 酵母エキス (Difco Co.), 0.2g; K₂HPO₄, 0.1g; CaCl₂, 0.01g; glucose, 0.4g; 再蒸留水, 11 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,30C,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,30C,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4Cで行い、精製芽胞は凍結乾燥を行つた後、デ シケーター中(5C)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 85C,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, 70C, 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 クエン酸-Na2 HPO4 (pH 3.0, 5.0), 0.1 M NaH2PO4-Na2HPO4 (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 低下率=1-(OD₆₀/OD₀)

ここで OD₆₀ 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,OD₆ 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^a

Spore	Normal spores	Glycine spores
Viable count	(×10 ⁸ /mg)	(×10 ⁸ /mg)
cells	1.56	1.45
spores ^b	1.55	1.34
after	· .	
heating	1.05	0.02
Heat		
resistance	67.8%	1.5%

^a Data are the averages of triplicate crops and determinations.

^b Spores viable after heating at 70 C for 15 min.

" 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 を行つた両芽胞の発 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) で行つ 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¹⁰⁾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つた。

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^{8,9,11,12)}。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^a

L-;	amino acid (10 mM)	Normal spores	Glycine spores
ala	inine	0.528	0.519
asj	paragine	b	—
asj	partic acid		_
ar	ginine	—	
су	steine	0.521	0.478
glı	utamie	0.395	. 0.331
glı	itamic acid		·
gl	ycine	_	
his	stidine	—	
isc	leucine	0.395	0.211
leı	icine	0.163	0.085
lys	sine	· <u> </u>	
me	ethionine	0.218	0.321
or	nithine		
\mathbf{ph}	enylalanine		
sei	ine	0.322	0.398
th	reonine	0.321	0.074
try	ptophane		—
tyı	rosine	_	
va	line	0.412	0.047

 $^{\rm a}$ Data are summarized by the value of (1-OD_{60}/ OD_0).

^b 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 Lalanine: (○), 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-alanineinduced 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.

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 1×10^2 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-アラニンをはじめ数種のアミノ酸が芽胞の発芽に有 効である^{9,12)}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¹¹⁾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¹¹⁾, 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-ileu,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-ileu、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ことが, Woese β^{11} 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 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

- Aoki, H., and Slepecky, R. A. (1973): J. Bacteriol., 114, 137–143.
- Hashimoto, T., Black, S, H., and Gerhardt, P. (1960): Can. J. Microbiol., 6, 203-212.
- Hashimoto, T., Frieben, W. R., and Conti, S. F. (1969): J. Bacteriol., 98, 1011-1020.
- 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.
- Levinson, H. S., and Hyatt, M. T. (1966): J. Bacteriol., 91, 1811–1818.
- Levinson, H. S., and Hyatt, M. T. (1970): J. Bacteriol., 101, 58-64.
- McCormick, N. G. (1965) : J. Bacteriol., 89, 1180–1185.
- 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.
- Warren, S. C., and Gould, G. W. (1968): Biochim. Biophys. Acta., 170, 341-350.
- Wax, R., Freese, E., and Cashel, M. (1967):
 J. Bacteriol., 94, 522-529.
- Woese, C. R., Morowitz, H. J., and Huchinson, 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-alanineinduced 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-alanineinduced 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, Lmethionine, 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)

IGAKU SHOIN Ltd.

Tokyo

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 ¹⁴C-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 Lalanine 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 (Iwashiya 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 5×10^{-2} mM L-alanine (or inosine) for a certain time. Subsequently, 0.5 or 5×10^{-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 μ 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 whichv 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 (AlaIno-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 1×10^{-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 germinatio	on
	properties of unactivated spores of B. cereus T^{a}	

Germination	Concentrations of L-alanine (µм)	Concentrations of inosine (μM)			
properties ⁰		20	30	40	50
v×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	_ c)	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

^{a)} Germination was performed at 30 C in 0.1 M sodium phosphate (pH 8.0) containing L-alanine and inosine at various concentrations.

b) 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.
 c) 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 5×10^{-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 5×10^{-2} mM. O.D.*i*/ 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.

Preincubation	Preincubated with L-alanine		Preincubated with inosine			
time (min)	$v \times 10^3$	$k \times 10^2$	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	b)		0.973

Table 2. Effects of preincubation time with either L-alanine or inosine on subsequent germination of spores of *B. cereus* T^{a}

^{a)} Unactivated spores were preincubated at 30 C in 0.1 M sodium phosphate (pH 8.0) containing 5×10^{-2} mm L-alanine or 5×10^{-2} mm inosine, and then germinated at 30 C in 0.1 M sodium phosphate (pH 8.0) containing 5×10^{-2} mm L-alanine and 5×10^{-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.

b) 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 $(5 \times 10^{-2} \text{ mM})$ at 30 C for various times, and the courses of Ala-Ino-induced germination $(5 \times 10^{-2} \text{ mM})$, 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 Lalanine 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 5×10^{-2} mM L-alanine at 4–90 C for 30 min. After the addition of 5×10^{-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 5×10^{-2} mm L-alanine, and their germination was observed at 30 C in 0.1 m sodium phosphate (pH 8.0) containing 5×10^{-2} mm L-alanine and 5×10^{-2} mm inosine. The k (\odot) and the O.D.f/O.D.i (\bigcirc) 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.t/O.D.i.

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.



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.

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 5×10^{-2} mm L-alanine or inosine had opposite effects on subsequent germination in the presence of concentrations of 5×10^{-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.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 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 Lalanine 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 heatactivated 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 ¹⁴C-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 Lalanine 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 Lalanine 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

- 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., Frieben, 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 ¹⁴C-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 NH_4^+ on germination of spores of *Bacillus cereus* T induced by L-alanine and inosine. Kinetic analysis showed that NH_4^+ inhibited the germination competitively. Its inhibitory effect was greater when the unactivated spores had been preincubated with Lalanine. 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 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), NH₄⁺ 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 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 NH_4^+ .

MATERIALS AND METHODS

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

H. SHIBAT'A ET AL

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 Lalanine 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 Gi, with G defined as [1-(ODf/ODi)] in the absence of NH_4^+ and Gi 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 Achro 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 (NH₄ 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 heatresistant (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. ODt/ODi 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.

H. SHIBATA ET AL

Germination buffer	Survivors ^b)	Loss of heat resistance
Sodium phosphate	0.6%	99.4%
Ammonium chloride	27.8	72.2

Table 1. Loss of heat resistance of germinated spores of B. cereus T^{a})

^{a)} 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).

b) 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.





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 NH₄ 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 NH₄ 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 $\rm NH_4^+$.

Table 2.	Extents of germination of unactivated spores of B. cereus T induced
	by L-alanine and inosine in ammonium chloride buffer d)

Index of germination	Extent of germination ^{b})
OD decrease	74.7%
DPA release	73.1
Loss of heat resistance	72.6
Phase darkening	75.0
Mean	73.9

^a) 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.

b) 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 NH₄+ in Inhibition of Ala-Ino-Induced Germination

The inhibitory effects of various concentrations of NH_4^+ on Ala-Ino-induced germination of unactivated spores were examined.

Figure 4 shows that a plot of G/Gi against the concentration of NH_4^+ was linear at given concentrations of L-alanine and inosine. Since the slope of each line de-

H. SHIBATA ET AL

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	(-b) (0)	$-\dot{(}0\dot{)}$
60°)		0.485(99.2)
Overnight ^d)		0.490 (100.2)

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

^{a)} 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 NH₄Cl. Ala-Inoinduced germination was carried out at 30 C. Values of $[1 - (OD_{60}/ODi)]$ are shown.

b) OD did not change significantly.

^{c)} Unactivated spores were preincubated in 0.1 M ammonium chloride buffer alone for 60 min at 30 C.

^d) Unactivated spores were preincubated in 0.1 ${\rm M}$ 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. ODI/ODi 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, 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 NH4+

Unactivated spores were preincubated with 0.05 mm L-alanine at 30 C for various periods in 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 NH₄ 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 NH₄ buffer resulted in inhibition of germination by lower concentrations of NH₄⁺ (Fig. 4, broken line).

To examine which part in the germination process was inhibited by NH_4^+ , we preincubated unactivated spores with 0.5 mm L-alanine in Na or 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 NH_4 buffer did not (Fig. 5). These results suggest that 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 NH_4^+ is inhibitory, even in the presence of Na⁺.

Kinetic analysis showed that Ala-Ino-induced germination was inhibited competitively by NH_4^+ (Fig. 4). The inhibitory effect of NH_4^+ was enhanced by preincubating the unactivated spores with L-alanine, but not without even when the spores were preincubated in solution containing NH_4^+ (Table 3). As shown in Fig. 5, however, 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 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 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 NH_4^+ , respectively. When unactivated spores are incubated with L-alanine, inosine and 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 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 NH_4^+ . In the

present work, the Ala-Ino-induced germination of unactivated spores in NH₄ 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 CaCl₂ or high temperature. However, this explanation for the inhibitory action of NH₄⁺ is unlikely because studies on heat resistance of the spores germinated in NH₄ buffer (Table 1) and their phase-contrast photomicrographs (Fig. 3) showed that germination of some of the population was inhibited by NH₄⁺.

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 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.
- Hashimoto, T., Frieben, W. R., and Conti, S. F. 1969. Germination of single bacterial spores. J. Bacteriol. 98: 1011-1020.
- Hashimoto, T., Frieben, W. R., and Conti, S. F. 1969. Microgermination of *Bacillus cereus* spores. J. Bacteriol. 100: 1385-1392.
- 4) Hashimoto, T., Frieben, 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.
- Levinson, H. S., and Feeherry, 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 postgerminative development of *Bacillus megaterium* spores. J. Bacteriol. 83: 1224-1230.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.

- 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.
- 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-[¹⁴C]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.

H. SHIBATA et al

A stimulatory effect of Na⁺ and an inhibitory effect of 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 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 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-[14C]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 μ Ci/ml of L-[14C]alanine (specific activity, 10 mCi/mM).

For examining the incorporation during germination, the spores were suspended in the germination medium containing $0.05 \,\mu$ 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 μ m pore size, Toyo Roshi Co., Ltd.). The filters were washed thoroughly with unlabeled pL-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 ODt/ODi, where ODi is the initial OD and ODt is the value after t min of incubation.

To compare the rate and extent of germination, we used three parameters, v, k and ODt/ODi, as previously described (10). ODf/ODi is the final value of ODt/ODi. For simplicity, ODf 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-14C]alanine was purchased from the Radiochemical Centre Ltd.

RESULTS

Effect of KCl Concentration on Germination

To confirm the inhibitory effect of K^+ on germination of unactivated spores and to test whether this phenomenon results from the absence of Na⁺, 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⁺.

Effect of K⁺ on Preincubation and Subsequent Germination

L-Alanine-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^+ -sensitive, we examined the effects of K^+ during preincubation and subsequent germination of unactivated spores. For this, unactivated

Concentr	ation of	E-t-t-f-f-	
KCl	NaCl	Extent of germination ^o	
0 тм	0 тм	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	

Table 1. Effect of potassium chloride on Ala-Ino-induced germination of spores of *B. cereus* $T^{(a)}$

^{a)} 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.

^{b)} Values of [1 - (ODf/ODi)] are shown.





Table 2. Subsequent germination properties of preincubated spores of B. cereus T^{a}

Spores	$v imes 10^3$	$k \times 10^2$	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

^{a)} 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 kof K-spores was only a third of that of Na-spores (Table 2).

INHIBITION OF GERMINATION BY K+



Fig. 2. Effect of intermediate incubation on germination of *B. cereus* T spores. Na- and Kspores 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-[14C] alanine into Spores during Germination

The kinetics of L-[¹⁴C]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-[14C] alanine into Spores during Preincubation

The kinetics of L-[14C]alanine incorporation into unactivated spores during



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





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

449

H. SHIBATA ET AL

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, 0–0). 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, $\bigcirc-\bigcirc$). The rate and extent of incorporation into spores in the early period of preincubation (Fig. 4, $\bigcirc-\bigcirc$) were parallel to those of the first incorporation during germination (Fig. 3, $\bigcirc-\bigcirc$). In KPB, unactivated spores did not shown 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-



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⁺. 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^+ , 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 Naspores 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⁺, therefore, the native form of the protein may be more stable than the activated form, whereas in the absence of K⁺ 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.

H. SHIBATA ET AL

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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Watabe, K., Ichikawa, T., and Kondo, M. 1974. Biochemical studies on germination of bacterial spores. I. Incorporation of ¹⁴C-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.

