

## 解説

## 食品の変敗や食中毒の誘因となる細菌胞子の発芽に関わるリパーゼ

森山龍一<sup>1, 2)</sup>, 昌山敦<sup>3)</sup>, 加藤志郎<sup>3)</sup>, 角田秀典<sup>1)</sup><sup>1)</sup>中部大学応用生物学部, <sup>2)</sup>中部大学生物機能開発研究所, <sup>3)</sup>名古屋大学大学院生命農学研究科

## 1. はじめに

*Bacillus* 属や *Clostridium* 属細菌の形成する胞子は薬剤や熱に対する強い耐性を持つ休眠細胞であり(1, 2), 食品の変敗や食中毒, 感染症など種々の社会問題を引き起こす。また, 炭疽菌 (*Bacillus anthracis*) 胞子等が耐久性のゆえ生物兵器としてバイオテロに利用され得る現代社会においては, 細菌胞子の発芽機構に関する知識は人類の「食と安全」環境の向上にとってますます重要となりつつある。しかしながら, 発芽は内在する蛋白質(酵素)群間の相互作用による表層の自己分解過程であると考えられる(3-5)ため, 発芽機構の解明に基づく発芽の人為的制御(バイオコントロール)を始めとする応用研究への展開にとっては分子論的研究が必須であるとともに, 食品に混入した細菌胞子の殺滅法の改良・向上など応用科学(バイオディフェンス)的側面においても重要な研究課題である。また, 胞子発芽の分子機構の解明は分子間における新規の情報伝達機構の発見につながることも期待され, 基礎的学問における新たな研究領域の創成への可能性が高い。

## 2. 細菌胞子の構造と胞子の発芽

図1に示したように, 細菌の休眠胞子は外側から順に20種類以上のタンパク質から構成されるコート層(図中CT), 母細胞の細胞膜由来の外膜(OM), 胞子固有の化学構造を持つ厚いペプチドグリカンからなるコルテックス層(CX), 胞子細胞壁, 内膜とも呼ばれる胞子細胞膜(IM), 胞子細胞質からなるコア(CR)によって構成される(6, 7)。胞子内部の水分含量は極めて少なく, 外部環境が好転するまで細胞内の代謝が停止した状態, すなわち休眠状態で長い期間(実証的に報告されている最長記録は約2億5

千年以上!(8))サバイバルを試みる。しかしながら,

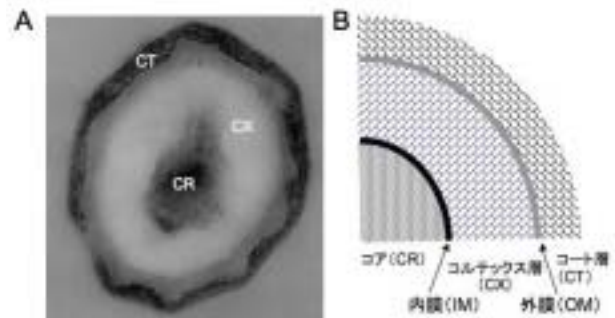


図1. 枯草菌胞子の電子顕微鏡写真(A)と細菌胞子の構造を模式的に表した図(B). 写真Aは中京女子大学 小塚諭教授のご厚意による。

胞子はL-アラニンのような栄養素と出会うと短時間(数分から長くても30分以内)で栄養細胞へと分化し, 再び増殖を開始する。この現象を発芽(germination)と呼ぶが, この際に観察される胞子の耐熱性消失とコルテックス分解が密接に関連すると思われており, コルテックス分解が発芽の最も主要な生化学的事象の一つであると考えられてきた(3-5)。これまでに筆者らは, 食中毒菌としても知られているセレウス菌 (*Bacillus cereus*) やウェルシュ菌 (*Clostridium perfringens*) 胞子から発芽特異的なコルテックス分解酵素を複数他に先駆けて活性を保持した状態で単離・同定することに成功し, それらの酵素学的性質や遺伝子構造を決定すると共に胞子の発芽への関わりについて研究成果の報告をしてきた(3, 9-11)。

細菌胞子のコルテックス層はさらに外膜やコートタンパク質に覆われているため, それら構造・性質が異なる表層成分の分解過程に関する科学的知見が胞子の発芽機構の解明には不可欠であると考えられる。栄養素の枯渇に伴い栄養細胞が胞子へ分化する過

程については特に枯草菌 (*Bacillus subtilis*) を対象として多くの分子生物学的研究がなされ、リン酸リレー

解析から、リパーゼを含む GDSL-エステラーゼファミリーと相同性の高い蛋白質 YcsK の存在が明らかになってい

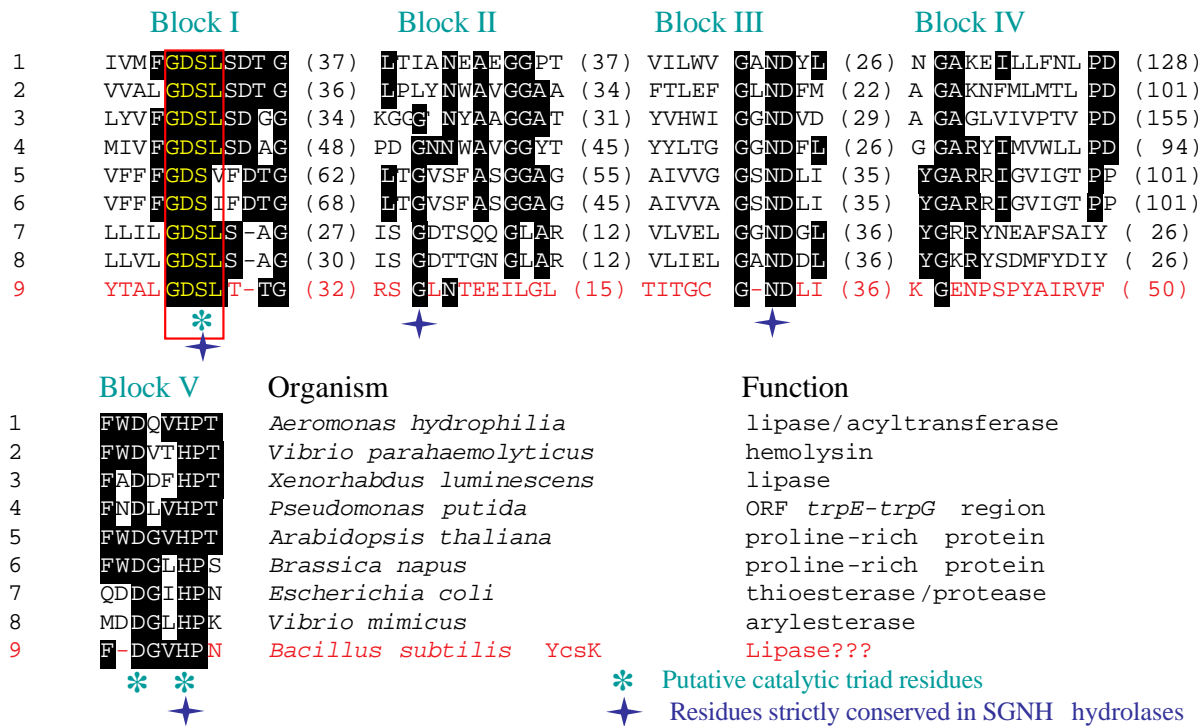


図 2. 枯草菌胞子表面に見出された機能未知タンパク質 YcsK と既知のエステラーゼとの比較。

系やシグマ因子による転写調節カスケードなど他生物における細胞分化のモデルとして先導的な成果を誇ってきた(6, 7). しかしながら、発芽は遺伝子の発現を伴わず既に胞子に存在するタンパク質・酵素の作用によるものであるため、コートタンパク質と外膜の分解機構に関する研究はこれまで皆無に近い状態であった。そこで筆者らの研究グループは、数年前より胞子外膜の脂質代謝に関わる酵素の同定および構造・機能解析を試みてきた。

### 3. 細菌胞子の表面に存在する発芽関連リパーゼ LipC の発見と機能解析

枯草菌は大腸菌に先んじてその全ゲノム配列が明らかにされており(12), 現在では致死以外の全遺伝子欠損株も作製され種々の機能解析プロジェクトが進められている(13, 14). 2002年に報告された摂南大学薬学部渡部一仁教授のグループによる枯草菌胞子のプロテオミクス

た(15)が、その機能は未知のままであった。そこで筆者等は YcsK の機能解析について渡部教授の研究グループと共同研究を進め、その成果として YcsK 欠損株胞子が発芽有機材であるL-アラニンに応答しない・YcsK が胞子形成時に母細胞側で発現されてコート層の外膜近傍に局在化する・大腸菌に発現させた rYcsK がリパーゼ様活性を持つ こと等を明らかにした(16). この報告は細菌胞子の発芽に関わるリパーゼの存在を初めて明らかにしたものであり、筆者等は同時に YcsK を LipC と呼ぶことを提唱し(16), 現在ではこの呼称が定着している。また、この成果は同じ年の Annual Review of Microbiology (2007)中の細菌胞子表面に関する総説(7)にも引用されるとともに、国際会議における発表時にもその新規性や重要性について高い評価を受けた。現在リン脂質に対する基質特異性を含め LipC の酵素学的性質や胞子発芽における生理的役割について解析が行っており、近

い将来における学術雑誌での発表に向けて準備を進めている。

が、表 1 に示したように GDSL ファミリーに属するタンパク質の示す酵素活性は多岐にわたり、多様な基質特

表 1. 機能が既知の GDSL-および SGNH-hydrolase の例.

由来となる生物・組織	報告されている機能	備考
微生物		
大腸菌	チオエステラーゼ/プロテアーゼ, チオエステラーゼ/プロテアーゼ/リゾホスホリパーゼ	
腸炎ビブリオ菌	ヘモリシン, アリルエステラーゼ, アリルエステラーゼ/チオエステラーゼ/キモトリプシン様活性	急性胃腸炎
ネズミチフス菌	エステラーゼ	
モクセラ属菌	ホスホリパーゼ B/リパーゼ	牛伝染性角結膜炎
レジオネラ菌	ホスホリパーゼ A	レジオネラ症
放線菌	リパーゼ, ズベリン エステラーゼ	放線菌
糸状菌	アセチルキシラン エステラーゼ	偏性嫌気性糸状菌
麹 黴	ラムノガラクトツロナン アセチルエステラーゼ	
原 虫	グリコシルホスホイノシトール デアシラーゼ	アフリカ・トリパノソーマ症 (睡眠病)
動物		
ウシ脳	アセチルハイドロラーゼ	血小板活性化因子
植物		
シロイヌナズナ	プロリン高含有タンパク質	
アブラナ	プロリン高含有タンパク質	
ゴムノキ	リパーゼ/エステラーゼ	

上表は参考文献(17)を参考にまとめなおした。表中機能における句点は異なる酵素・タンパク質の区別を表し、/は同一タンパク質が示した複数の酵素活性を示す。

#### 4. 発芽関連酵素 LipC のリパーゼ活性-構造相関に関する今後の研究課題

LipC が属すると思われる GDSL ファミリーは、図 2 中赤線で囲ったように活性アミノ酸残基の前後にグリシン(G)-アスパラギン酸(D)-セリン(S)-ロイシン(L)という特徴ある配列が保存されているセリン酵素であり、そのサブファミリーとして 4 つの機能構造単位(図中 Block と表記)にセリン, グリシン, アスパラギン(N), ヒスチジン(H)の 4 つのアミノ酸が高く保存されている SGNH 酵素群が知られている(17)。LipC も SGNH サブファミリーに属するものと思われる。GDSL 酵素の反応はトリプシンやキモトリプシン, ズブチリシンなどに代表されるセリンプロテアーゼと全く同じであり、アスパラギン酸・ヒスチジン・セリンの 3 つのアミノ酸(触媒の三組, 図 2 中に catalytic triad と表記)による「電荷リレー系」による(18)が、GDSL 酵素の立体構造はファミリーに固有のものでありセリンプロテアーゼとは大きく異なる。これまでに結晶解析のおこなわれた GDSL 酵素の立体構造は、 $\alpha$ -ヘリックスや  $\beta$ -シート構造で構成される基本骨格が極めて類似する。しかしな

異性と作用部位が知られている。これは、基本骨格部分をつなぐループ構造部分のアミノ酸配列における多様性によると考えられる(17)が、LipC のリパーゼ活性にはどのような分子構造との関連性が考えられるだろうか。幸いにも、LipC の論文を見て興味を示したデンマークの構造生物学者が既知の SGNH サブファミリー酵素の立体構造を基に LipC の推定構造モデルを計算して筆者の元に届けてくれた。図 3 がその推定構造をリボンモデルで示したものであるが、図中 Lipase loop と示された 2 つのループ構造部分に疎水性アミノ酸残基が集中するため脂質の脂肪酸などの疎水性部分が結合し、対面に位置する触媒ループにおいて加水分解反応が起きると考えられる。いずれにせよこれは計算上の構造モデルによる推測に過ぎず、今後 LipC の結晶化および X 線解析による構造決定とループ部分のアミノ酸変異による機能解析や基質特異性など酵素学の性質の人為的改変・改良に関する研究の進展が望ましい。リパーゼは日常生活レベルの商品も含めて種々の産業的応用がなされている酵素であり、上述の研究が「食の安全」以外の面で

も社会に役立てることが出来ればとも考えている。

が病原性を持たない枯草菌の LipC とは同一のアミノ酸を 26% 程度しか共有していないことが明らかになっ

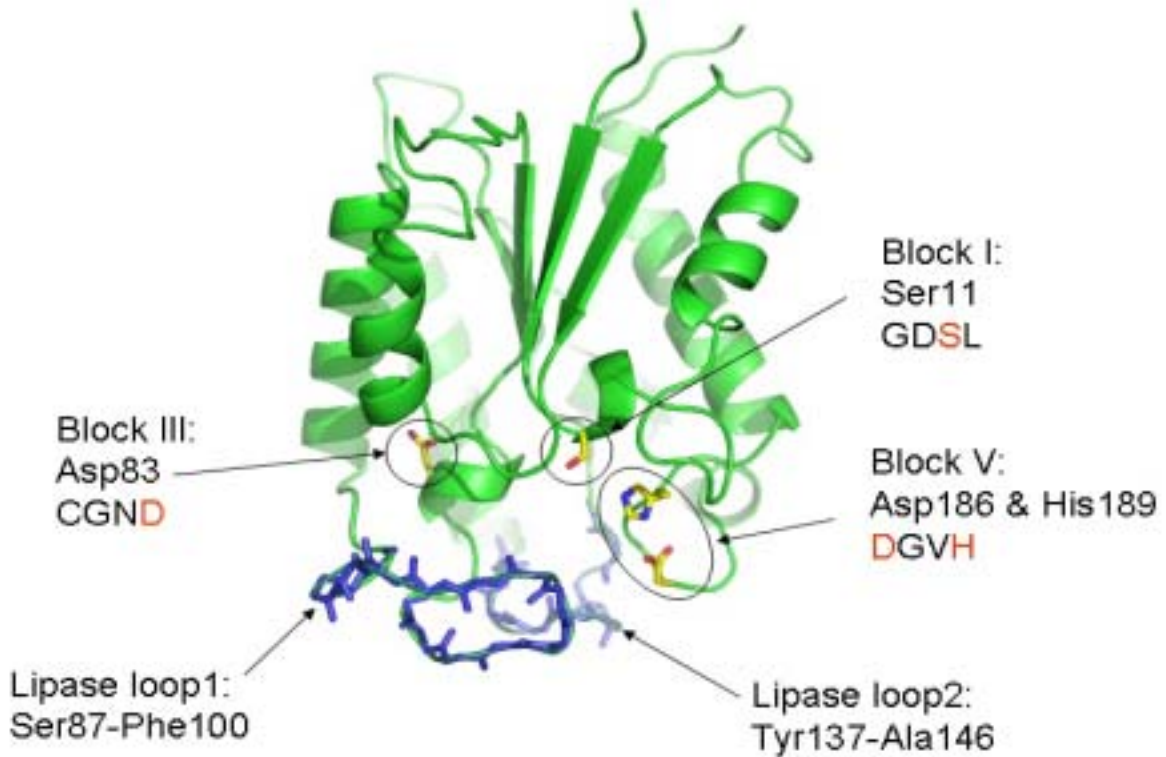


図 3. 枯草菌 LipC の推定構造モデル. 既知の SGNH ファミリー酵素の三次構造に基づいて, コペンハーゲン大学の Anne Mølgaard 博士によって計算された. 図 2 に示した LipC の部分アミノ酸配列も参照されたい.

### 5. 枯草菌と病原性 *Bacillus* 細菌における発芽関連酵素 LipC の多様性

セレウス菌孢子より単離・同定され, 枯草菌孢子の L-アラニンに応答する発芽において「key enzyme」となることが実証されているコルテックス分解酵素 SleB は, 細菌のゲノム解析が進むにつれて多くの *Bacillus* 属細菌に保存されていることが明らかになりつつある. 枯草菌で初めて同定された発芽関連リパーゼである LipC についてホモロジー検索をしてみると, セレウス菌と炭疽菌に少なくともそれぞれ 1 つずつの機能未知遺伝子産物がヒットする. 枯草菌 LipC とセレウス菌および炭疽菌 LipC 相同物のアミノ酸配列を比較する (図 4) と, 興味深いことに共に病原性を示すセレウス菌-炭疽菌間では全アミノ酸配列中約 93% が同一のアミノ酸でタンパク質としてほぼ同じものと考えられるのに対して, 食品の変敗は引き起こす可能性は高い

た. これらの相同遺伝子産物が各々の細菌において

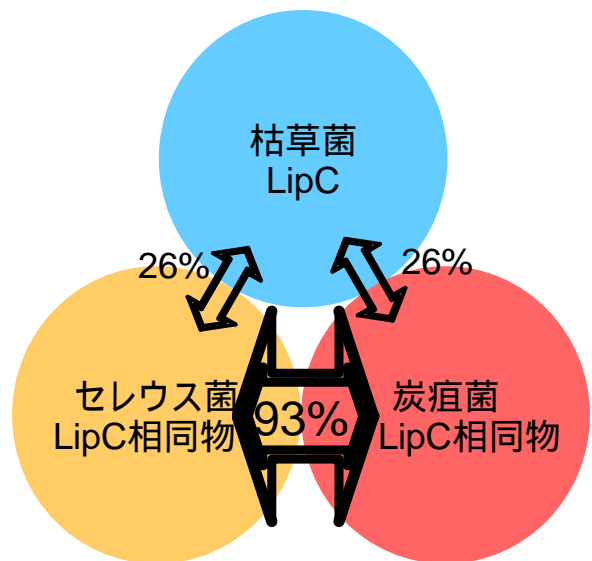


図 4. 枯草菌, セレウス菌と炭疽菌間における LipC の比

較. 数値は各タンパク質の全アミノ酸配列における同一アミノ酸の割合を示す.

胞子の発芽に関与するリパーゼとして機能しているかについては今後の研究の進展を待つ必要があるが、いずれにせよ図 4 に示したアミノ酸配列の相違特に前述したループ構造部分の違いが各タンパク質の生理的機能や酵素学的性質(種による孢子含有脂質組成の違いと酵素の基質特異性との関連など)とどのように結びつくかについては、基礎科学に止まらず応用科学的な側面からも非常に興味深い研究課題だと思われる。また、表 1 に示したように GDSL 酵素は病原細菌において動物細胞・組織に対する毒素として働くものも知られており、病原性の有無に呼応して LipC の酵素学的性質が変化している可能性も否定出来ない。さらに、コーヒーなどのホット缶飲料内における細菌胞子の発芽を抑制する可食性の界面活性剤シヨ糖脂肪酸エステルが、セレウス菌胞子の発芽時に菌体外に放出されるエステラーゼ活性によって激減することが報告されている(19)ので、このエステラーゼ活性が LipC 相同物によるものかどうかなど、「食の安全」といった観点からも今後の重要な課題であると考えている。

## 6. おわりに

以上、食品の変敗や食中毒の誘因となる細菌胞子の発芽に関して、その最新のトピックスとして新規に見出されたリパーゼ LipC について概説した。LipC に関しては現在進行中ゆえに公表できなかった研究成果も多々あって隔靴搔痒たる記述に踏みとどまざるをえなかった部分も多いが、「食の安全を守るためのバイオサイエンス」に関する最新研究動向の一端あるいは息吹を感じ取っていただければ幸いである。

## 引用文献

(1) Nicolson WL, Munakata N, Horneck G, Melosh HJ, Setlow P. 2000. Resistance of *Bacillus* endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments.

Microbiol. & Mol. Biol. Rev. 64: 548-572

- (2) Setlow P. 2006. Spores of *Bacillus subtilis*: their resistance to and killing by radiation, heat and chemicals. J. Appl. Microbiol. 101: 514-525.
- (3) Makino S, Moriyama R. 2002. Hydrolysis of cortex peptidoglycan during bacterial spore germination. Med. Sci. Monit. 8: RA119-127.
- (4) Moir A, Corfe BM, Behravan J. 2002. Spore germination. Cell. & Mol. Life Sci. 59: 403-409.
- (5) Setlow P. 2003. Spore germination. Curr. Op. Microbiol. 6: 550-556.
- (6) Errington J. 2003. Regulation of endospore formation in *Bacillus subtilis*. Nature Rev. 1: 117-126.
- (7) Henriques AO, Moran Jr CP. 2007. Structure, assembly, and function of the spore surface layers. Annu. Rev. Microbiol. 61: 555-588.
- (8) Vreeland RH, Rosenzweig WD, Powere DW. 2000. Isolation of a 250 million-year-old halotolerant bacterium from a primary salt crystal. Nature 407: 897-900.
- (9) Masayama A, Fukuoka H, Kato S, Yoshimura T, Moriyama M, Moriyama R. 2006. Subcellular localization of a germination-specific cortex-lytic enzyme, SleB, of bacilli during sporulation. Genes Genet. Syst. 81: 163-169.
- (10) Masayama A, Hamasakit K, Urakami U, Shimamoto S, Kato S, Makino S, Yoshimura T, Moriyama M, Moriyama R. 2006. Expression of germination-related enzymes, CspA, CspB, CspC, and SleM, of *Clostridium perfringens* S40 in the

- mother cell compartment of sporulating cells. *Genes Genet. Syst.* 81: 227-234.
- (11) Kumazawa T, Masayama A, Fukuoka S, Makino S, Yoshimura T, Moriyama R. 2007. Mode of action of a germination-specific cortex-lytic enzyme, SleC, of a *Clostridium perfringens* S40. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 71: 884-892.
- (12) Kunst F, 他 150 名. 1997. The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature.* 390: 249-256.
- (13) Kobayashi K, 他 98 名. 2003. Essential *Bacillus subtilis* genes. *Proc. Natl. Sci. USA* 100: 4678-4683.
- (14) Kobayashi H, Akitomi J, Fujii N, Kobayashi K, Altaf-Ul-Amin M, Kurokawa K, Ogasawara N, Kanaya S. 2007. The entire organization of transcription units on the *Bacillus subtilis* genome. *BMC Genomics.* 8: 197.
- ( 15 ) Kuwana R, Yasahara Y, Fujibayashi M, Takamatsu H, Ogasawara N, Watabe K. 2002. Proteomics characterization of novel spore proteins of *Bacillus subtilis*. *Microbiology* 148: 3971-3982.
- (16) Masayama A, Kuwana R, Takamatsu H, Hemmi H, Yoshimura T, Watabe K, and Moriyama R. 2007. A novel lipolytic enzyme, YcsK (LipC), located in the spore coat of *Bacillus subtilis*, is involved in spore germination. *J. Bacteriol.* 189: 2369-2375.
- (17) Akoh CA, Lee G-C, Liaw, Y-C, Huang T-H, Shaw J-F. 2004. GDSL family of serine esterases/lipases. *Prog. Lipid Res.* 43: 534-532.
- (18) Dixon M, Webb EC. 1979. *Enzymes* 3rd ed. Longman Group Ltd., London.
- (19) 森山龍一, 杉本和宏, 加藤志郎, 昌山敦. 2006. 可食性界面活性剤シヨ糖脂肪酸エステルの細菌孢子に対する抗菌活性. *中部大学応用生物学部紀要.* 5: 39-42.

**Title:** A novel lipolytic enzyme, LipC, which is involved in bacterial spore germination.

**Authors:** Ryuichi Moriyama<sup>1)2)</sup>, Atsushi Masayama<sup>3)</sup>, Shiro Kato<sup>3)</sup>, Hidenori Tsunoda<sup>1)</sup>

**Addresses:** <sup>1)</sup>Department of Food and Nutritional Sciences, College of Bioscience and Biotechnology, Chubu University

<sup>2)</sup>Chubu University Institute for Biological Function

<sup>3)</sup>Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya University

**Keywords:** *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus anthracis*, bacterial spores, germination, lipase, food degradation, food poisoning