

## 1. はじめに

これまでに、我々は必須アミノ酸の一つであるトリプトファンのD体(D-Trp)が食塩存在下において細菌の増殖を顕著に抑制する効果を有することを報告してきた。この技術は食品の新たな微生物制御法としての利用が期待されている。しかし、D-Trpが細菌の増殖を抑制するメカニズムについては未だに解明できていない。新たな微生物制御手法として、より効果的な利用を可能にするためにはD-Trpの作用機序を明らかにすることが重要である。本研究ではD-Trpによって細菌の増殖が抑制されるメカニズムを解明することを目的として、D-Trpが細菌体内部に取り込まれて作用する可能性と、細菌体外部で作用する可能性の2つの仮説を検証した。

## 2. 方法

- (1) 供試細菌 定常期の *Escherichia coli* (ATCC 25922) を用いた。
- (2) 培養条件 食塩(NaCl)濃度(%)とD-Trp濃度(mM)との組合せで、①NaCl 0%-D-Trp 0 mM, ②NaCl 0%-D-Trp 40 mM, ③NaCl 1%-D-Trp 0 mM, ④NaCl 1%-D-Trp 40 mM, ⑤NaCl 3%-D-Trp 0 mM, ⑥NaCl 3%-D-Trp 40 mMの6条件から各実験ごとに設定し *E. coli* を37°Cで培養した。このうち条件①～⑤は *E. coli* が増殖可能な条件であるのに対して、条件⑥は増殖が抑制される。
- (3) D-Trpの作用検証 1) 菌体内部での検証 D-Trpを添加する条件②, ④, ⑥で培養した *E. coli* の菌体内容物を抽出し、アミノ酸分析により菌体内部の遊離アミノ酸濃度を測定した。条件①, ②, ⑤, ⑥で培養した *E. coli* の菌体内容物を抽出し、メタボローム解析により菌体内部の代謝物量を測定した。 2) 菌体外部での検証 *E. coli* を条件⑥の増殖抑制環境にて、37°Cで一定時間培養した後、遠心分離とペプトン水により菌体を2回洗浄した。その後再び条件③～⑥培地環境中に接種して増殖挙動を検証した。

## 3. 結果と考察

- (1) 菌体内部での検証 培養時の食塩濃度に関わらず *E. coli* 内部から Trp が検出され、条件② NaCl 0%-D-Trp 40 mM, ④NaCl 1%-D-Trp 40 mM (増殖可能条件)において多量の Trp が検出された。増殖可能条件においても *E. coli* は D-Trp を取り込むことが示され、D-Trp そのものに *E. coli* の増殖を阻害する働きはないものと考えられる。代謝物は食塩の影響を強く受け、増殖可能条件⑤NaCl 3%-D-Trp 0 mM, および増殖抑制条件⑥NaCl 3%-D-Trp 40 mM で培養した *E. coli* 細胞内の代謝物の検出量はほとんど同様であった。検出量の異なるいくつかの物質にグアノシン4'リン酸(ppGpp)があり、この物質の合成が増殖抑制の一因であると考えられる。これらの結果から菌体内部で作用して代謝阻害を誘導している可能性は低いことが示唆された。

- (2) 菌体外部での検証 増殖不能な条件⑥で培養した *E. coli* を増殖可能な条件③～⑤の培地に移植すると、すべての条件で増殖し、増殖抑制条件⑥の培地に移した場合は増殖が抑制された。すなわち、D-Trp 環境下で増殖抑制されていた *E. coli* の外部環境から D-Trp を取り除くと再増殖することが明らかとなつたため、D-Trp は菌体外部で作用し *E. coli* の増殖に何らかの影響を及ぼしていることが示された。

## 4. まとめ

本研究結果から D-Trp は細菌体外部で作用して増殖を抑制していることが示されたことから、食品に応用する際には D-Trp が環境中に存在し続けることが必要である。