

ノ ー ト

培地中の異なる食塩濃度における *Listeria monocytogenes* の 鞭毛発現量の比較

中 屋 祐 子*

Comparison of Amount of Flagella Proteins Synthesized by *Listeria monocytogenes* Cultured in Media with Different Salt Concentrations

Yuko NAKAYA*

Abstract

Listeria monocytogenes is a bacterium widespread in nature and contaminates food via the environment. The recent spread of cold-chain logistics from ingredient reception to consumers' hands has improved food safety. Although rare in Japan, cases of food contamination by this bacterium are still reported. Ingestion of food contaminated with *L. monocytogenes* by pregnant women can cause serious infections in fetuses and neonates. Ready-to-eat foods that do not require heating before consumption are the main causative food type, and many processed foods with high contamination rates have relatively high salt concentrations.

There are 13 known serotypes of *L. monocytogenes*: 1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab, 4b, 4c, 4d, 4e, and 7. Many of the human isolates are of serotype 4b. The main serotypes detected in food are 1/2a, 1/2b, and 1/2c. *L. monocytogenes* can proliferate in a temperature range of -0.4°C to 45°C (optimum temperature 37°C) and a pH range of 4.4 to 9.4 (optimum pH 7.3) and shows high salt tolerance. The organism has four to five peritrichous flagella. It synthesizes flagella at 25-30°C, but not at 37°C. The flagella are involved in the bacterial attachment to various environments. It is possible that the bacteria, which can survive in low-temperature environments, attach to high salt-concentration foods by their flagella and survive/grow there.

In this study, *L. monocytogenes* serotype 4b was cultured in media with different salt concentrations, followed by extraction of crude proteins containing the flagella from the cells. Then, flagellar proteins were detected by western blot to determine whether a relationship existed between salt concentration of the medium and the amount of flagellar proteins synthesized. However, we found no relationship between the salt concentration of the medium and the amount of flagellar proteins.

In the future, it is necessary to conduct this investigation using the serotype 1/2a, the most frequently detected serotype in contaminated foods, to conduct experiments under conditions similar to those used in food manufacturing processes (e.g., at a temperature below 25°C).

Key words: *Listeria monocytogenes*, 鞭毛, Ready-to-eat, 食塩濃度

緒 言

Listeria monocytogenes は、食品を介して人に感染症を引き起す。本菌は自然界に広く分布しており、家畜のふん便や乳製品、食肉などから分離されている。健康な成人への感染は、 $10^7/g$ 程度に汚染された食品を摂取した場合に胃腸炎症状として発症するが、それ程重篤ではない。一方、妊娠中に本菌で汚染された食品を摂取した場合には、流産あるいは胎児や新生児に髄膜炎などの重篤な感染症を引き起こす¹⁾。いずれの場合も感染経路は汚染された食品であり、喫食前に加熱を必要としない食品

(Ready-to-eat) によるものが多いことが報告されている。国内に流通している食品からの検出はそれほど多くはないが、食肉加工品、魚介類加工品、乳製品、野菜加工品から検出されており、汚染率の高い加工食品は、生ハム、ニシンくん製、明太子、ナチュラルチーズ、野菜の一夜漬けなどである²⁻⁸⁾。これらの食品は比較的食塩濃度の高いものが多く、特に前者3食品の食塩濃度は5.6-9.9%である⁹⁾。

本菌は13の血清型 (1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab, 4b, 4c, 4d, 4e, 7) が知られている。ヒトから検出される血清型は4b型が多く、食品から検出される血清型

* 微生物学・臨床検査学研究室, 女子栄養大学: Laboratory of Microbiology and Medical Technology, Kagawa Nutrition University

は主に 1/2a, 1/2b, 1/2c 型が検出されている¹⁰⁾。

本菌の特徴は、増殖可能温度域が $-0.4 \sim 45^{\circ}\text{C}$ (至適温度 37°C)、pH 域は $4.4 \sim 9.4$ (至適 pH 7.3) と広く、高い耐塩性 (増殖可能な水分活性は0.92, 食塩濃度11.5%相当) という特徴がある¹¹⁾。また、フラジェリンとよばれるタンパク質から成る4~5本の周毛性鞭毛を有し、血清型4bにおける鞭毛の分子量は29-32.5kDaであることが報告されている^{12, 13)}。興味深いことに本菌の鞭毛は 37°C では発現せず、 $25 \sim 30^{\circ}\text{C}$ で発現することが知られている¹²⁾。鞭毛は運動器官であり、様々な環境への付着に関与している。本菌が低温の環境下で生存し、さらに塩分濃度の高い食品に鞭毛を介して付着し、生存、増殖している可能性もあると考えられる。

そこで、本研究では、食塩濃度に伴って鞭毛の発現量が高まるか否かについて実験を行った。

材料と方法

使用菌株

使用菌株は、本研究室に保存されていた髄膜炎患者から検出された *L. monocytogenes* 052101 を用いた。

血清型別

リステリア型別用免疫血清「生研」(デンカ生研)の添付文書に従ってO抗原型別およびH抗原型別を行い血清型を決定した。

NaCl 加 BHI 培地の調製

本菌の培養には Brain Heart Infusion (BHI) 液体培地 (栄研化学) を用いた。BHI 培地には NaCl が0.5% 含有されている (original BHI)。この BHI 培地に NaCl が終濃度2.0%および4.0%になるように調製し、original BHI 培地を含め3種の培地を準備した。

NaCl 加 BHI 培地における増殖曲線の作成

羊血液寒天培地上の一夜培養集落を白金線を用いて original BHI 液体培地2本に接種し1本は 37°C 、もう1本は 25°C で一夜培養した。この2本の菌液を、それぞれ 37°C 一夜培養菌液および 25°C 一夜培養菌液とした。新たな Original BHI 培地31.5mL に 37°C 一夜培養菌液を1/10量接種した後、 37°C で培養し、また新たな Original BHI 培地、2.0% NaCl 加 BHI 培地および4.0% NaCl 加 BHI 培地、それぞれ31.5mL に 25°C 一夜培養菌液を1/10量接種した後、 25°C で培養を開始した。培養には振盪恒温槽を用い、0分から660分までの濁度を測定した (120分までは1時間毎に、120分以降は30分毎に測定)。測定時間毎に Non-treated 48 well Microplate Flat Bottom Polystyrene (Iwaki) に800 μL の培養菌液を入れ、増殖の停止には、菌液の1/10量のホルマリンを使用した。660分後 Microplatereader SH-1000 (Corona) を用いて OD_{600nm} における菌液の濁度を測定し、4つの培養条件における増殖曲線を作成した。

4つの異なる培養条件における細胞の回収

4つの異なる培養条件における細胞の回収量を均一にするため、かつ、多くの細胞を回収するために対数増殖期後期 Log of OD₆₀₀ $\times 10^3 = 2.6$ で増殖を停止させた。増殖停止時間は、各増殖曲線の対数増殖期から任意の2点を用い $y = ax + b$ から求めた。

増殖を停止させた細胞は3,500rpm で20分間遠心し、20mM Tris 0.9% NaCl, pH7.4 (TBS) を用いて2回洗浄した。最後に2mlのTBSに浮遊させた。

細胞からのタンパク質の抽出

細胞からのタンパク質の抽出には Total Protein Extraction (TPE) Kit (Takara) を用い、添付文書に従って鞭毛を含むタンパク質を抽出した (細胞粗タンパク質試料)。

細胞粗タンパク質試料の濃度測定

細胞粗タンパク質試料の濃度は Protein Quantification Assay (Takara) を用いて添付文書に従って測定した。次に行う SDS-PAGE において、gel に apply する4つの異なる培養細胞から抽出された細胞粗タンパク質試料の濃度が均一になるように滅菌水を用いて調製した。なお、濃度は、測定した細胞粗タンパク質試料の中で最も低い濃度 (3.0 $\mu\text{g}/10\mu\text{L}$) に調製した。次いで、3.0 $\mu\text{g}/10\mu\text{L}$ に調製出来たか否かを確認するために、再度濃度を測定した。実際の濃度を Table 1 に示した。

鞭毛タンパク質の検出

鞭毛タンパク質の検出には、Western blot を用いた。Table 1 に示した濃度の細胞粗タンパク質試料10 μL と 2x protein sample buffer 10 μL を混合し、 100°C で10分間加熱した。e-PAGEL 12.5% (Atto) を使用し、1 Lane 毎に10 μL ずつ apply し、250V, 40mA で70分間 SDS-PAGE を行った。分子量マーカーは MagicMark XP Western Protein Standard 20-220 kDa (Novex) を用いた。

Western blot に使用した Immun-Blot PVDF membrane 0.2 μm , 10 $\times$ 7.5cm (Bio-Rad) は Methanol で1分間、次いで transfer buffer (25mM Tris-192mM Glycine 20% methanol) に30分間浸した。また、Filter Paper 10 $\times$ 7.5 cm (Bio-Rad) も transfer buffer に30分間浸漬させた。SDS-PAGE 後の gel は transfer buffer に10分間浸した。これらを用いて Trans-Blot SD (Bio-Rad) で15V, 60分間、細胞粗タンパク質試料を転写した。転写後の PVDF membrane は TBS-Tween 20 で2分間洗浄した。次いで Starting block T20 Blocking Buffer (Thermo Scientific) で1時間 blocking した後、TBS-Tween 20 で10分洗浄した。一次抗体はリステリア型別用免疫血清「生研」H-AB 血清 (抗リステリア H 抗原ウサギ血清) を Starting block T20 Blocking Buffer で1/1,000 希釈し、1時間 incubation した。次いで TBS-Tween 20 で5分3回洗浄を行った。二次抗体は Anti-IgG (H+L), Rabbit, Goat-Polyclonal Antibody, Alkaline

Table 1. Concentrations of crude proteins extracted from *Listeria monocytogenes* 052101 cultured in media with different salt concentration

Salt concentration (%) in BHI	Experiment number	Crude protein concentration ($\mu\text{g}/10\mu\text{L}$)	Crude protein concentration ($\mu\text{g}/10\mu\text{L}$) Mean $\pm$ SD
0.5 ^a	1	1.85	1.85 $\pm$ 0
	2	1.85	
	3	1.85	
2.0	1	1.85	2.12 $\pm$ 0.23
	2	2.25	
	3	2.25	
4.0	1	1.00	1.70 $\pm$ 0.64
	2	1.85	
	3	2.25	

Concentrations of crude proteins extracted from bacterial cells cultured at 25°C are shown.

^aSalt concentration of original BHI (Brain Heart Infusion).

Phosphatase (Funakoshi) を Starting block T20 Blocking Buffer で 1/5,000 希釈し, 1 時間 incubation した。次いで TBS-Tween 20 で 5 分 3 回洗浄し, さらに TBS で 5 分 3 回洗浄した。染色には 1-Step NBT/BCIP (Thermo Scientific) を用いて 15 分染色し, 最後に精製水で 5 分 3 回洗浄し, 乾燥させた。

鞭毛タンパク質の分子量の確認および鞭毛タンパク質量の解析

鞭毛タンパク質の分子量の確認と鞭毛タンパク質量の解析には Western blot で検出されたバンドを Amersham Imager 600 (GE Healthcare Life Science) を用いて画像解析を行った。

本菌の血清型 4b の鞭毛タンパク質の分子量は 29–32.5kDa であることが知られている。今回の実験でも同じサイズの分子量が検出されるか否かの確認と異なる食塩濃度で培養した細胞から抽出した細胞粗タンパク質試料に含まれる鞭毛タンパク質の割合を解析した。鞭毛タンパク質の割合は, Western blot において 1 Lane に検出された鞭毛タンパク質量/1 Lane に検出された総タンパク質量 $\times$ 100により求めた。

結 果

L. monocytogenes 052101 の血清型

L. monocytogenes 052101 の O 抗原型別は VI 型血清に凝集し, H 抗原型別は A, AB, C 型血清に凝集した。添付文書に記載されている被験菌の血清型の決定表に基づいて判定した結果, 血清型は 4b であった。

増殖曲線に基づく増殖停止時間の算出

Fig. 1 に original BHI 培地を用いて 37°C と 25°C で培養した場合, 2.0% NaCl 加 BHI 培地と 4.0% NaCl 加培地を用いて 25°C で培養した場合の増殖曲線を示した。log of OD₆₀₀ $\times$ 10³=2.6 に達する時間は, original BHI 培地を用いて 37°C で培養した場合は 145 分, 25°C で培養した場合は 288 分, 2.0% NaCl 加 BHI 培地を用いて 25°C で培養し

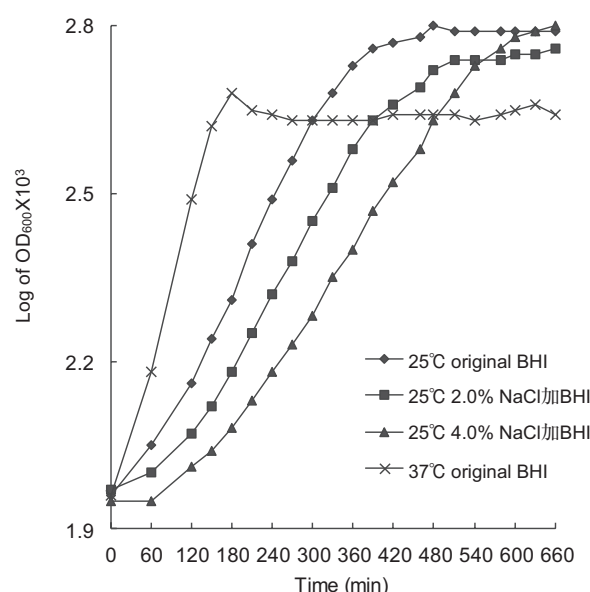


Fig. 1. Growth curves for *Listeria monocytogenes* 052101 cultured in different salt concentrations at 37°C and 25°C. Cell growth was suspended at a Log of OD₆₀₀ $\times$ 10³=2.6. Growth suspension time was obtained using $y=ax+b$, using two points arbitrarily chosen from the logarithmic growth phase of the four growth curves.

た場合は 380 分, 4.0% NaCl 加培地を用いて 25°C で培養した場合は 465 分であった。

前述したように, 本菌は 11.5% の食塩濃度でも発育可能であることが知られている。予備実験において 8.0% NaCl 加 BHI を用い, 25°C 培養での増殖曲線の作成を試みたが, 600 分で log of OD₆₀₀ $\times$ 10³=2.1 であり, 2.6 に達するまでにはかなりの時間を要することから, 今回の実験では, 8 時間以内に 2.6 に達する NaCl 濃度 (4.0% NaCl 以下) について実験を行った。

細胞粗タンパク質試料の濃度

方法に記載したとおり, SDS-PAGE において, gel に apply する 4 つの異なる培養細胞から抽出された細胞粗タンパク質試料の濃度が均一になるように滅菌水を用い

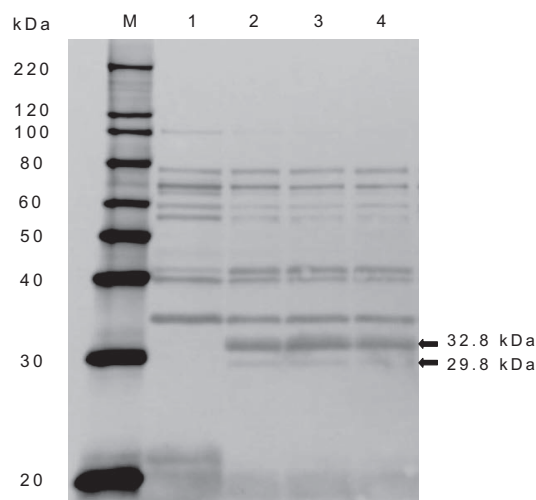


Fig. 2. Immunodetection by western blot of the crude proteins extracted from *Listeria monocytogenes* 052101. Lane M: molecular weight marker; Lane 1: 37°C and original BHI (Brain Heart Infusion); Lane 2: 25°C and original BHI; Lane 3: 25°C and 2.0% NaCl-added BHI; Lane 4: 25°C and 4.0% NaCl-added BHI. The molecular weights shown next to the arrows ($\leftarrow$) are the averages of Lanes 2, 3, and 4.

て3.0 μ g/10 μ Lに調製した。調製後の実際の細胞粗タンパク質試料の濃度をTable 1に示した。25°C, original BHIで培養した場合の細胞粗タンパク質試料の濃度は、3回の実験ともに均一に調製することが出来たが、2.0% NaCl加BHIと4.0% NaCl加BHIで培養した場合の細胞粗タンパク質試料の濃度は均一に調製することが出来なかった。なお、37°C, original BHIで培養した細胞粗タンパク質試料は、鞭毛を発現しないcontrolとして用いたため、濃度は示していない。

鞭毛タンパク質の検出

Fig. 2にWestern blotの結果を示した。25°Cで培養した場合にはoriginal BHI, 2.0% NaCl加BHI, 4.0% NaCl加BHIいずれの条件下でも29.8kDaと32.8kDaにバンドが検出されたが、37°Cでは検出されなかった。従って、既に報告されている血清型4bの鞭毛タンパク質の分子量と同じサイズのバンドが確認できた。

鞭毛タンパク質量の解析

細胞粗タンパク質試料に含まれる鞭毛タンパク質の割合をFig. 3に示した。Table 1に示したとおり、細胞粗タンパク質試料を滅菌水で濃度調製したものの、3回の実験において濃度を均一に調製することが出来なかった。従って、Fig. 3では、3つの異なる培養細胞から得られた鞭毛タンパク質量の割合を比較するために、鞭毛タンパク質のLane%は、Table 1の3つの細胞粗タンパク質試料の濃度を1.0 μ g/10 μ Lに合わせて換算した結果である。培地中の食塩濃度に伴って、鞭毛の発現量が高まることを期待したが、29.8kDaおよび32.8kDaのいずれでも期待した結果は得られなかった。しかし、0.5% NaCl (original) と2.0% NaCl加培地における29.8kDaと32.8kDa

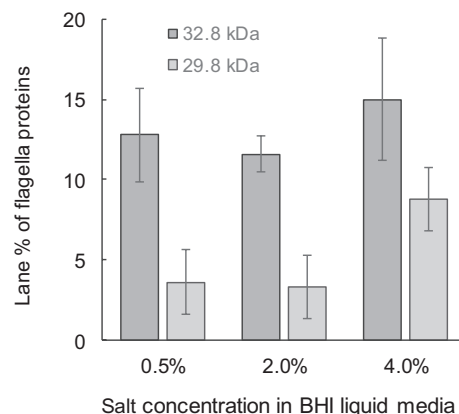


Fig. 3. The proportions of various flagellar proteins in the crude proteins extracted from *Listeria monocytogenes* 052101 cultured in media with different salt concentrations. Lane % of flagellar proteins was calculated as follows: (Amount of flagellar proteins detected by western blot for a lane)/(Total amount of proteins detected in the lane) $\times$ 100.

のLane%の比は同程度 (3.55と3.52) であるが、4.0% NaCl加培地における2つの分子量のLane%の比は前者2つの濃度と比較して小さくなった (1.70)。

考 察

L. monocytogenes は、Ready-to-eatの食品の中でも比較的食品塩濃度の高い食品から検出されている。また、本菌の鞭毛が25~30°Cで発現することから、本研究では、食塩濃度に伴って鞭毛の発現量が高まるか否かについて実験を行った。しかし、食塩濃度依存性の鞭毛発現は認められなかった。

本実験では37°C培養において、29.8kDaと32.8kDaのバンドは検出されず、25°C培養における3種の食塩濃度のみで検出された。一方、2本のバンド以外のバンドは、37°Cと25°Cのいずれでも検出された。また、予備実験において本菌を3種の食塩濃度の半流動培地に接種し、37°Cと25°Cで培養した結果、いずれの食塩濃度でも25°Cのみで運動性が確認できた。これらのことから、25°Cで検出された2本のバンドが本菌の鞭毛タンパク質であると考えた。血清型4bにおける鞭毛タンパク質の分子量について報告されている2つの先行研究は、29kDa¹²⁾ および32.5kDa¹³⁾ と異なる分子量を示している。この2つの研究は、鞭毛タンパク質の抽出方法が異なり、これに伴って鞭毛タンパク質の状態も異なると考えられる。また、前者はaffinity精製された鞭毛抗体を使用し、後者は鞭毛に付加しているN-acetylglucosamineに特異的な抗体を用いて検出している。今回検出された2本の鞭毛タンパク質は、この両者が検出されたと考えられる。

結果で記したように、2本のバンドのLane%の比は4.0% NaClで変化が認められ、また、2本のバンドの鞭毛状態は異なるが、同じ鞭毛タンパク質と考えるならば、2本のバンドのLane%の合計は4.0% NaClで増加している。これらの結果から、食塩濃度依存性の鞭毛発現量は認められなかったものの、食塩濃度と鞭毛発現量に何ら

かの関係性があると考えられる。しかし、今回の実験は3回をみの測定結果であり、必ずしも4.0% NaClで鞭毛の発現量に変化があったとは言いきれない。今後、実験回数を増やし、異なる食塩濃度における鞭毛状態を顕微鏡で観察する事も必要であると考えられる。

方法において、細胞粗タンパク質試料の濃度の測定にProtein Quantification Assayを用いた。濃度は、付属のBSA (Bovine Serum Albumin) を用いて検量線を作成し求めた。細胞粗タンパク質試料の濃度を均一にするために調製を行ったが、3回の実験においてばらつきが見られた。検量線の決定係数は濃度調製前では $r^2=0.9995$ 、濃度調製後では $r^2=0.9939$ であった。正確な濃度決定のためには、より高い直線性が必要であり、濃度測定法を改善する必要がある。

先行研究において、20℃培養における0%、6.0%、11.0% NaCl加培地で増殖させた*L. monocytogenes*が、ステンレスやポリスチレンへの接着にどのように影響を及ぼすかについて報告されている¹⁴⁾。ステンレスへの接着において、実験に用いたほとんどの株で、0% NaCl加培地における接着率より、6.0% NaCl加培地における接着率の方が高く、また11.0% NaCl加培地における接着率は0% NaClおよび6.0% NaCl加培地における接着率と比較して低いことが報告されている。今回の実験では4.0% NaCl加培地における鞭毛タンパク質量までしか観察することが出来なかった。今後、11.0% NaCl加培地での鞭毛タンパク質量についても観察する必要があると考えられる。

最後に、Ready-to-eatの食品において、原料の仕入れから出荷まで、ほとんどの工程は4℃前後で行われており、より製造環境に近い条件下で実験する必要もあると考えている。

要 約

L. monocytogenes は、食品を介してヒトに感染症を引き起こす。主な原因食品は喫食前に加熱を必要としない食品 (Ready-to-eat) であり、汚染率の高い加工食品は比較的食塩濃度の高いものが多い。

本菌の特徴は増殖可能温度域、pH域が広く、また高い耐塩性である。また、25~30℃で鞭毛を発現する。鞭毛は様々な環境への付着に関与している。これらのことから、本研究では、食塩濃度に伴って鞭毛の発現量が高まるか否かについて実験を行ったが、顕著な関係性は認められなかった。

謝 辞

本研究に際し、終始温かく見守っていただきました同研

究室の井越尚子 准教授に心から感謝すると共に、厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) FAO/WHO: Risk assessment of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods: Technical report. Microbiological Risk Assessment Series, 5, (2004)
- 2) 北爪晴恵, 鈴木正弘, 鈴木正樹, 松本裕子, 山田三紀子, 武藤哲典 他: 無加熱摂取食品から検出された *Listeria monocytogenes*. 横浜市衛生研究所年報, **41**, 91-93 (2002)
- 3) 原やす子, 和泉澤真紀, 石井久美子, 阿部晃久, 大橋英治, 丸山務: わが国における Ready-to-Eat 水産食品の *Listeria monocytogenes* 汚染. 日本食品微生物学会雑誌, **20**, 63-67 (2003)
- 4) 小林葉子, 府川克二, 小池長壽, 原口直美, 丸山玄: 加工食品のリステリア菌汚染に関する衛生学的実態調査. 東京都保健医療学会誌, **107**, 124-125 (2003)
- 5) 菅原直子, 佐々木ひとえ, 加藤浩之, 小林妙子, 渡邊節, 山田わか 他: *Listeria monocytogenes* による ready-to-eat 食品の汚染実態. 宮城県保健環境センター年報, **25**, 45-48 (2007)
- 6) 京都市衛生公害研究所 臨床部門: 市販ナチュラルチーズからのリステリア菌の検出. 京都市衛生研究所年報, **55**, 133-134 (2006)
- 7) 佐藤秀美, 小林留美子, 増谷寿彦, 柴田穰, 大塚佳代子, 小野一晃 他: 漬物製造施設における *Listeria monocytogenes* の汚染実態調査について. 埼玉県衛生研究所報, **39**, 151-153 (2005)
- 8) 樋脇弘, 江渕寿美, 馬場愛, 瓜生佳世, 宮本敬久: 辛子明太子における *Listeria monocytogenes* の汚染実態と食品添加物による本菌の制御モデル実験. 日本食品微生物学会雑誌, **24**, 122-129 (2007)
- 9) 文部科学省 七訂食品成分表2018 資料編. 女子栄養大学出版部 (2018)
- 10) 仲真晶子: 11 *Listeria monocytogenes*. 仲西寿男, 丸山務監修. 食品由来感染症と食品微生物, 401-421 (2009)
- 11) ICMSF-International Commission on Microbiological Specifications for Foods. "8 *Listeria monocytogenes*". Micro-organisms in foods 5: Characteristics of microbial pathogens. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, 141-182 (1996)
- 12) Peel, M., Donachie, W., Shaw, A.: Temperature-dependent expression of flagella of *Listeria monocytogenes* studied by electron microscopy, SDS-PAGE and western blotting. J. gen. microbial., **134**, 2171-2178 (1988)
- 13) Schirm, M., Kalmokoff, M., et al.: Flagellin from *Listeria monocytogenes* is glycosylated with beta-O-linked N-acetylglucosamine. J. Bacteriol., **186**, 6721-6727 (2004)
- 14) D. Caly, D. Takilt, V. Lebrete and O. Tresse: Sodium chloride affects *Listeria monocytogenes* adhesion to polystyrene and stainless steel by regulating flagella expression. Lett. Appl. Microbiol., **49**, 751-756 (2009)