シリーズ特集「損傷菌」

解説

サルモネラの加熱損傷・修復の特性とメカニズム

宮本 敬久

九州大学大学院農学研究院生命機能科学部門食料化学工学講座食品衛生化学研究室

Heat Injury and Recovery in *Salmonella*

Takahisa Miyamoto

Laboratory of Food Hygienic Chemistry, Division of Food Science and Biotechnology, Department of
Bioscience and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Kyushu University,
6-10-1, Hakozaki, Higashi-ku, Fukuoka, Fukuoka 812-8581

Heat treatment is commonly used for sterilizing food. The higher the treatment temperature, the greater the sterilization efficiency; however, protein denaturation of food can result. Mild heat treatment may only sublethally injure bacterial cells. Moreover, sublethally heat-injured *Salmonella* in food can recover under favorable conditions, leading to foodborne illness. To elucidate the molecular mechanism of recovery from heat injury, global changes in gene transcription of *Salmonella* Typhimurium were investigated. Recovery of the heat-injured *S. Typhimurium* cells in Tryptic Soy Broth (TSB) resulted in full recovery after 3 h of incubation at 37°C. DNA microarray analysis of 60-min recovering cells revealed an increase in the transcription of 141 genes. Among them, genes of known function involved to various degrees in the recovery were: genes involved in branched-chain amino acid (BCAA) transport (*livJ*, *livH*), cell envelope integrity (*ddg*), heat-shock response (*cpxP*, *rrmJ*), phage shock protein (*pspA*), ribosome modulation factor (*rmf*), and virulence (*sseB*) transcriptional regulation (*rpoE*, *rpoH*, *rseA*, *rseB*, *rseC*). It was found that supplementation of TSB with BCAA resulted in enhanced recovery of injured cells compared to those recovered without BCAA. (Accepted Nov. 16, 2017)

Keywords : heat injury, recovery, *Salmonella*, transcription

キーワード : 加熱損傷, 回復, サルモネラ, 遺伝子転写

1. はじめに

食品の加熱は、調理、加工、変性防止および殺菌のため頻繁に行われている。殺菌を目的とする場合、加熱温度の上昇および処理時間の増大により殺菌効果は大きくなるが、テクスチャー、風味、色、栄養成分など食品の品質低下を引き起こすこともある。一般に、加熱により微生物細胞では細胞壁や細胞質膜の損傷による菌体内成分の漏洩、タンパク質の変性による酵素の失活・エネルギー代謝障害、核酸関連物質の分解などが起こるため生理活性が低下し死滅する¹⁾。細菌に対する加熱処理の効果は、加熱温度や時間だけでなく、細菌の種類、菌株の種類、菌濃度、菌の生育の履歴および加熱時の環境（浮遊液の組成や pH）など様々な要因に左右される。加熱が不十分な場合、一部の細菌栄養細胞は死滅し、一部は回復不可能な損傷を受けて次第に死滅に向かうが、無傷もしくは回復可能な損傷菌として存在している細菌集団も存在する。一般に生物は、熱

ストレスを受けると熱ショック蛋白質（HSP, Heat Shock Protein）と呼ばれる蛋白質を合成する。HSP は熱変性した蛋白質のリフォールディングや会合を助けたり、分解除去したり様々な役割を果たすことが報告されている¹⁾。食品中で生じた損傷菌は回復に適した条件におかれると損傷を回復して増殖するため、異臭、ガス発生、変色、腐敗などの原因となるばかりでなく食中毒の原因ともなり得る。このような損傷菌では、細胞膜の損傷や代謝活性の低下等のため、NaCl、選択阻害剤、抗生物質、微量の重金属イオン、RNase 等の一部の酵素に対して感受性となっていることがある²⁾。損傷菌をいきなり栄養豊富な培地に移すと急激な代謝活性化が起こるため菌体内にフリーラジカルが生成し、回復初期にはこれらを処理できずに死に至ることもある。また、海や河川などの低栄養状態で存在する細菌では、生きていても人工的に培養困難な状態、しかし何らかの刺激や還元物質の共存下ではコロニー形成できるようになることも知られている³⁾。食品や環境中に存在する細

Fig. 1 Effects of pH and heating temperature on viability of *Salmonella* Enteritidis at 10^6 CFU/mL

Viable counts were determined by plating on TSA (○) and DHL (●) agar.

菌の多くは様々なストレスを受けた直後には増殖しにくくなっている。このため、殺菌の評価や食品中の細菌検査は、細菌の生理状態を理解して行う必要がある。

サルモネラは一般的に乾燥に強い食中毒細菌であり⁴⁾、畜肉製品や卵製品だけでなく低水分活性食品を原因食品とする食中毒事件の原因物質としても重要である。欧米ではピーナッツバター、粉ミルク、チョコレートおよびシリアルなどを原因として患者数 200~700 名の大規模な食中毒事件が発生している^{5)~10)}。このようなストレス環境中のサルモネラは熱や抗菌剤などの物理的、化学的ストレスに対する耐性が高くなることが知られているが、そのメカニズムの詳細は明らかではない¹¹⁾¹²⁾。

2. サルモネラの加熱損傷

細菌に対する加熱の効果は細菌の置かれた環境、すなわち溶媒の種類、溶液中の塩濃度・イオンの種類・栄養分・pH などにより大きく異なる。栄養豊富な Tryptic Soy Broth (TSB, 0.5% NaCl 含有, $A_w=0.99$) 培地で培養した *Salmonella* Enteritidis の菌体を種々の pH の 50 mM リン酸-クエン酸緩衝液に懸濁 (10^6 CFU/mL) して加熱処理した際のコロニー形成能の変化を Fig. 1 に示す。ここで、生菌数の測定に使用した Tryptic Soy Agar (TSA) 培地は選択性の無い栄養豊富な培地で、時間はかかると思われるが、回復可能な損傷菌は損傷を回復して分裂増殖してコロニー形成できる。しかし、損傷回復に時間がかかる場合には、24 時間の培養後にはコロニーが微小で確認できない可能性もあるため、48 時間後にもコロニー形成を確認する必要がある。従って TSA によるコロニー数から算出される生菌数は、非損傷菌数と回復可能な損傷菌の和である。また、Deoxycholate-Hydrogen Sulfide-Lactose (DHL) Agar 培地は腸内細菌の選択分離用培地で、0.01% デスオキシコール酸ナトリウムを含有しているため、細胞表面、特に外膜を損傷したグラム陰性細菌ではデスオキシコール酸ナトリウムに対する抵抗性が低下するため、その界面活性作用によ

り膜損傷が進行し、さらには溶菌するため生育が阻害される。このため DHL 培地上のコロニー数から算出される生菌数は、非損傷菌と 0.01% デスオキシコール酸存在下でも回復可能な損傷菌数の和となるが、ほとんどが非損傷菌であると考えられる。従って本稿では TSA 培地による生菌数と DHL 培地による生菌数の差を回復可能な損傷菌数として取り扱う。

酸性側の pH 3, 4 では加熱処理を行わなくても、コロニー形成能は低下するが、50°C 処理においては、pH 5, 6, 7 だけでコロニー形成が認められ、pH 6 では 90% 以上の菌体が損傷を受けていたことになる。さらに 55°C 処理では、TSA 培地でコロニー形成できたのは pH 6 の場合のみで、99% 以上が損傷菌であった。 10^6 CFU/mL の菌懸濁液を同様に加熱処理すると、Fig. 2 に示すように 60°C ではすべての pH でコロニー形成は認められなかったが、その死滅、損傷の程度は 10^6 CFU/mL の場合に比べて低く、55°C 加熱後には pH 4 以上では DHL 培地上でも高いコロニー形成能を保持していた。このように菌濃度が高い場合には細菌は加熱による影響を受けにくく、加熱が不十分あるいは熱伝達が十分ではない場合には回復可能な程度に損傷しただけの菌体が多数存在し、後に回復する。

さらに加熱の影響は、生育培地の成分や水分活性にも左右される。TSB 培地で培養した *S. Typhimurium* 菌体を PBS に懸濁して加熱すると Fig. 3 に示すように 55°C での加熱により多くの回復可能な損傷菌が生成する¹³⁾。TSB 培地にそれぞれ終濃度 8% NaCl ($A_w=0.94$)、35% Sucrose ($A_w=0.95$)、20% Glycerol ($A_w=0.94$) となるように添加した培地を調製し、各培地で 1 夜培養した菌体を同培地中、60°C で 5 分間加熱処理して TSA 培地および DHL 培地を用いて生菌数を測定して加熱の影響を調べた。その結果を Fig. 4 に示す。生育培地が同じでも加熱を TSB 中で行っているため、Fig. 3 とは異なり野生株でも 55°C での損傷菌の生成は少なかった。60°C で加熱処理後には、TSB 培地中ではこれまでの結果同様に TSA および DHL による生菌

Fig. 2 Effects of pH and heating temperature on viability of *Salmonella* Enteritidis at 10^8 CFU/mL

Viable counts were determined by plating on TSA (○) and DHL (●) agar.

Fig. 3 Effects of heating temperature on viability after heat treatment on *S. Typhimurium*¹³⁾

Bacterial cells were suspended in phosphate buffered saline (pH 7.4) at 10^8 CFU/mL and heated at 45, 50, 55 or 60°C for 15 min. Viable counts were determined by plating on TSA (□) and DHL agar (■). Mean $\pm$ standard deviation was calculated from the data for three separate experiments.

数は大きく低下し、その差も無いことから回復可能な損傷菌は発生していないことが分かる。しかし、35% Sucrose および 8% NaCl 存在下で培養した菌を同培地で加熱した場合、TSA による生菌数はほとんど低下しておらず、ほとんどが回復可能な損傷菌の状態で生残していると考えられる。また、Glycerol は高濃度では細胞毒性も認められるので水分活性は 8% NaCl と同じでも生残率が低かったと思われる。さらに *S. Typhimurium* の野生株、*rpoE* 欠損株、*rpoS* 欠損株についても同様に耐熱性を調べた。その結果、Fig. 5 に示すように野生株と比較して、*rpoE* 欠損株は TSA および DHL 上のコロニー数がともに減少し、*rpoS* 遺伝子欠損株では DHL 上のコロニー数の低下は顕著であった。 σ^E および σ^S はサルモネラのストレス応答において重要な役割を果たすストレス応答性転写制御因子である。*rpoE* の発現はヒートショック、エタノールおよび浸

Fig. 4 Effects of heat treatments on viability of *S. Typhimurium* in TSB containing Sucrose, NaCl and glycerol

Bacterial cells were suspended in phosphate buffered saline (pH 7.4) at 10^6 CFU/mL and treated at 25 or 60°C for 15 min. Viable counts were determined by plating on TSA (□) and DHL agar (■).

Fig. 5 Effects of heat treatment on viability of *S. Typhimurium* wild type, $\Delta rpoE$ and $\Delta rpoS$ mutants

透圧ストレスによるペリプラズムタンパク質や外膜タンパク質のミスフォールディングによって誘導される細胞表皮ストレス応答性転写調節因子であり、ペリプラズムプロテアーゼ、フォールディング因子、リン脂質およびリポ多糖合成タンパク質、調節因子、主な代謝関連タンパク質および膜タンパク質などの発現を調節している¹⁴⁾。一方、*rpoS*は、低温、高浸透圧、炭素源飢餓、高温および低pHなどの一般的なストレス応答性の定常期特異的な転写調節遺伝子で、ストレス耐性、細胞形態、代謝、バイオフィーム形成および病原性に影響を与える多くの遺伝子を調節しており、大腸菌においては全遺伝子の約11%もの遺伝子を調節している¹⁵⁾。これらは浸透圧および加熱ストレス応答にも関わることが報告されている¹⁶⁾。一般的に加熱損傷菌は、加熱による細胞表面の疎水性の増加により、非損傷菌では阻害作用の小さい疎水性の抗菌剤に対して感受性が高くなることが知られており¹⁷⁾、*rpoS*の欠損により細菌は損傷しやすい状態になっているため DHL に含まれる選択剤に対して感受性が高くなっていったと考えられる。また、加熱処理により野生株と比較してより多くの *rpoS* 欠損株が死滅した。*RpoS* は浸透圧ストレスによって加熱ストレスからタンパク質を保護するトレハロース合成に関する遺伝子の発現を誘導する。さらに *rpoS* 欠損によりシャペロンである DnaK、GroEL および HtpG の発現量も減少するなど *rpoS* は多くの浸透圧ストレスおよび加熱ストレスに応答するタンパク質の発現を調節しており、*rpoS* の欠損によりこれらのストレス応答システムが働かないために、野生株と比較して多くの *rpoS* 欠損株が損傷から回復できなかったと考えられる^{18)~20)}。

3. 加熱損傷からの回復

このような回復可能な損傷菌を形成させないような加熱条件の設定が食品の殺菌で必要なことは言うまでもないが、加熱損傷から細菌を回復させないような成分が食品中

Fig. 6 Changes in viability of *S. Typhimurium* after heat-injury and during recovery¹³⁾

Bacterial cells were suspended in phosphate buffered saline (pH 7.4) at 10^8 CFU/mL and heated at 55°C for 15 min. An equal volume of 2X TSB was added to the heat-treated suspension and incubated for 6 h. Viable counts were determined by plating on TSA (○) and DHL agar (●).

に含まれている場合には殺菌のための加熱処理条件を緩和できることにもなる。また、回復可能な加熱損傷菌を確実に検出することも加熱処理の効果を正しく評価するためには重要である。

加熱処理により生じた回復可能な損傷菌は Fig. 6 に示すように TSB のような栄養豊富な液体培地中で数時間保温することにより損傷を回復して分裂増殖可能になる¹³⁾²¹⁾。加熱損傷からの回復において菌体内ではどのような変化が起きているのかを調べるため、*S. Enteritidis* について加熱損傷回復時に発現量の増える蛋白質を二次元電気泳動により検出して同定した結果、加熱直後および回復時の菌体では、FusA (タンパク伸長因子) ならびに PykF (ピルビン酸キナーゼ) の発現量が増加していることを見出した²¹⁾。FusA は蛋白質合成における伸長因子 G (EF-G) であり、新規の蛋白質合成に必須である²²⁾。また、PykF はホスホトラ

Table 1 DNA microarray analysis of *S. Typhimurium* gene transcription after 60-min recovery

Genes with increased transcription during recovery from heat-injury		
Putative proteins (67 Total)	Cytoplasmic proteins (18 Total)	
	Cell envelope protein (20 Total)	
	Other (29 Total)	<i>mntH</i> (Divalent metal cation transporter)
Stress induced (17 Total)	Cytoplasmic heat shock protein (6 Total)	<i>rrmJ</i> (Ribosomal RNA large subunit methyltransferase) <i>dnaJ</i> (Chaperone protein) <i>groE,S</i> (10 kDa chaperonin) <i>dnaK</i> (HSP70 Chaperone protein) <i>clpX</i> (ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit)
		<i>cpxP</i> (Repressor)
		<i>fkpA</i> (Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase)
		<i>htrA</i> (Periplasmic serine endoprotease DegP-like)
		<i>spy</i> (Periplasmic protein related to spheroplast formation)
	Cell envelope heat shock protein (4 Total)	<i>pspABC</i> (Phage shock protein), <i>pspG</i> (Phage shock protein)
Energy generation and metabolism (14 Total)	Phage shock response (4 Total)	<i>pspABC</i> (Phage shock protein), <i>pspG</i> (Phage shock protein)
	Other (3 Total)	
	Fatty acid metabolism (2 Total)	<i>fadBE</i> (Fatty acid oxidation complex)
	Pyruvate metabolism (1 Total)	<i>dcoB</i> (Oxalacetate decarboxylase)
	Glyoxylate bypass (1 Total)	<i>aceA</i> (Isocitrate lyase)
	Amino acid metabolism and transport (7 Total)	<i>livF,H,I,K,M</i> (leucine, isoleucine, valine, threonine transport system) <i>pphB</i> (Serine/threonine-protein phosphatase)
		<i>gluT</i> (glutamate and aspartate uptake)
Miscellaneous (43 Total)	Vitamin metabolism (2 Total)	
	Oxidative phosphorylation (1 Total)	
	Transcriptional regulation (8 Total)	<i>rpoE</i> (RNA polymerase sigma-E factor) <i>rseA,B,C</i> (Anti-sigma-E factor) <i>rpoH</i> (RNA polymerase sigma-H factor) <i>greA</i> (Transcription elongation factor)
		<i>sseB,C,E</i> (Secreted effector protein)
		<i>hilC</i> (AraC family transcriptional regulator)
		<i>ssaG,H,I,K,L,M,O,P</i> (Secretion system apparatus), <i>spaS</i> (surface presentation of determinants needed for the entry of <i>Salmonella</i> species into mammalian cells)
	Metal homeostasis (4 Total)	<i>cutC</i> (Copper homeostasis protein) <i>znuC</i> (Zinc import ATP-binding protein) <i>iscA</i> (Iron-binding protein)
	Membrane integrity (1 Total)	<i>ddg</i> (Lipid A biosynthesis palmitoleyltransferase)
	Ribosomal protein (2 Total)	<i>rpmE2,J2</i> (ribosomal protein)
	DNA replication (1 Total)	<i>dnaG</i> (DNA primase)
	Other (9 Total)	

ンスフェラーゼシステムにおいてホスホエノールピルビン酸からピルビン酸の合成を触媒し²³⁾、PykF の欠損は生育速度の低下を引き起こす²⁴⁾ことが知られている。実際に加熱損傷したサルモネラはピルビン酸ナトリウムまたはカタラーゼを添加した TSB 中において 37℃ で培養した場合には誘導期が短縮されることもあり、加熱に伴う酸化ストレスからの回復促進効果を有すると考えられている。

さらに詳細に回復中の変化について検討するために *S. Typhimurium* 野生株について回復中の遺伝子発現変化を DNA マイクロアレイにより網羅的に解析した。その結果、Table 1 に示すように回復培養 1 時間目には対数増殖期後期と比較して 141 個の遺伝子の転写量が有意に増加した。この中で細胞外皮ストレスに応答する σ^E をコードしている *rpoE* 遺伝子、細胞質熱ストレスに応答する σ^H を

Fig. 7 Intact cell count increase, relative to time zero, of *S. Typhimurium* after 1 h recovery in TSB supplemented with BCAA¹³⁾

コードしている *rpoH* 遺伝子, また既知の HSP に加えてファージショックタンパク質 (Psp) 反応関連遺伝子群, 分岐鎖アミノ酸 (BCAA) 輸送関連遺伝子群, および各種金属イオンの恒常性に関わる遺伝子などの転写量が顕著に増加した¹³⁾。回復に対する BCAA の効果を検討するため, 加熱損傷からの回復培養中にバリン, ロイシン, イソロイシンを添加した。回復培養 0 時間目と 1 時間目の DHL による生菌数を比較した結果, Fig. 7 に示すように回復培養 1 時間後にはコントロールでは 12.8 倍, 0.01% BCAA では 16.9 倍, 0.1% BCAA では 57.3 倍に生菌数が増加したことから回復培養中に 0.1% BCAA を添加すると損傷菌の回復に有効であることが示された。人体では合成できない必須アミノ酸であるバリン, ロイシン, イソロイシンは筋肉でグリコーゲンなどのエネルギー源が不足したときに利用され, 筋肉の疲労を防ぐことから, スポーツ前に摂取するとよいといわれている²⁵⁾。また, 細菌ではロイシン反応性調節タンパク質 (Lrp) がロイシンと反応してアミノ酸合成を促進し, アミノ酸分解を抑制することでアミノ酸代謝に関与しており, さらにアミノ酸輸送に関わる *liv* オペロンの発現を抑制すると考えられている²⁶⁾。損傷回復に対する Lrp の関与についても検討する必要があるが, BCAA は加熱損傷からの回復に重要であると考えられる。

4. 最後 に

細菌の加熱損傷と回復の機構についてはこれまで数多くの研究が行われてきたが, 様々な環境要因の影響を受け, 菌種, 菌株, 生育履歴によっても感受性が異なるため, その機構は複雑で不明な点も多い。さらに, 細菌集団内には分裂していない一部の「Persister (持続生残菌)」と呼ばれる細菌集団が存在し, これらは抗菌薬存在下でも生残することが示されているが, 他の環境ストレスに対しても耐性が高いと思われる。このような細胞集団の存在も視野に入れて損傷菌の問題を考える必要がある。

今後さらに食品のロングライフ化が進むと思われるが,

高品質で風味の良い食品を作るためには損傷菌の発生を抑え, あるいは損傷菌を回復させないための工夫をしながら微生物制御を行うことが重要である。

本研究の一部は農林水産省委託「食品の安全性と動物衛生の向上のためのプロジェクト」(2013~2017 年) 損傷菌の発生機序の解明と検出・制御技術の開発事業「食品中の加熱損傷サルモネラによるリスクの低減技術開発」研究として実施したものであり関係機関に深謝いたします。

文 献

- 1) 澤井 淳, 五十嵐英夫, 清水 賢 (1995). 加熱による細菌の損傷. 日本食品微生物学会雑誌, **12**, 79-85.
- 2) 宮本敬久 (2010). 加熱による細菌の損傷と制御. 食品と開発, **45**, 7-9.
- 3) 伊藤 武, 森地敏樹編 (2008). 「食品のストレス環境と微生物—その挙動・制御と検出—」, サイエンスフォーラム, 東京.
- 4) Sarah, F., Kristian, H., Orla, C., Aolife, C., Shane, C., Peter, M., Alejandro, A., Jay, C., and Seamus, F. (2013). ProP is required for the survival of desiccated *Salmonella enterica* serovar Typhimurium cells on a stainless steel surface. *Appl. Environ. Microbiol.*, **79**, 4376-4384.
- 5) Breuer, T. (1999). CDC investigations: the May 1998 outbreak of *Salmonella* Agona linked to cereal. *Cereal Foods World*, **44**, 185-186.
- 6) Rowe, B., Hutchinson, D.N., Gilbert, R.J., Hales, B.H., Begg, N. T., Dawkins, H.C., Jacob, M., Rae, F.A., and Jepson, M. (1987). *Salmonella* Ealing infections associated with consumption of infant dried milk. *Lancet*, **ii**, 900-903.
- 7) Kapperud, G., Gustavsen, S., Hellesnes, I., Hansen, A.H., Lassen, J., Hirn, J., Jähkola, M., Montenegro, M.A., and Helmuth, R. (1990). Outbreak of *Salmonella typhimurium* infection traced to contaminated chocolate and caused by a strain lacking the 60-megadalton virulence plasmid. *J. Clin. Microbiol.* **28**, 2597-2601.
- 8) Rushdy, A.A., Stuart, J.M., Ward, L.R., Bruce, J., Threlfall, E. J., Punia, P., and Bailey, J.R. (1998). National outbreak of *Salmonella* Senftenberg associated with infant food. *Epidemiol. Infect.*, **120**, 125-128.
- 9) Werber, D., Dreesman, J., Feil, F., van Treeck, U., Fell, G.,

- Ethelberg, S., Hauri, A.M., Roggentin, P., Prager, R., Fisher, I. S., Behnke, S.C., Bartelt, E., Weise, E., Ellis, A., Siitonen, A., Andersson, Y., Tschäpe, H., Kramer, M.H., and Ammon, A. (2005). International outbreak of *Salmonella* Oranienburg due to German chocolate. *BMC Infect. Dis.*, **5**, 7. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-5-7>
- 10) CDC. (2007). Multistate outbreak of *Salmonella* Tennessee infections associated with peanut butter — United States, 2006–2007. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.*, **56**, 521–524.
- 11) Gruzdev, N., Pinto, R., and Sela, S. (2011). Effect of desiccation on tolerance of *Salmonella enterica* to multiple stresses. *Appl. Environ. Microbiol.*, **77**, 1667–1673.
- 12) Spector, M.P. and Kenyon, W.J. (2012). Resistance and survival strategies of *Salmonella enterica* to environmental stresses. *Food Res. Int.*, **45**, 455–481.
- 13) Wen, H.M., Naito, K., Kinoshita, Y., Kobayashi, H., Honjoh, K. I., Tashiro, K., and Miyamoto, T. (2012). Changes in transcription during recovery from heat injury in *Salmonella* typhimurium and effects of BCAA on recovery. *Amino Acids*, **42**, 2059–2066.
- 14) Skovierova, H., Rowley, G., Rezuchova, B., Homerova, D., Lewis, C., Roberts, M., and Kormanec, J. (2006). Identification of the σ^E regulon of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Microbiology*, **152**, 1347–1359.
- 15) Weber, H., Polen, T., Heuveling, J.V., Wendisch, F., and Hengge, R. (2005). Genome-wide analysis of the general stress response network in *Escherichia coli*: σ^S -dependent genes, promoters, and sigma factor selectivity. *J. Bacteriol.*, **187**, 1591–1603.
- 16) 土戸哲明 (2006). 食品殺菌における細菌の損傷回復, ストレス抵抗性化と Cross protection の問題, 低温生物工学会誌, **52**, 35–42.
- 17) 土戸哲明 (2001). バクテリアの細胞表面と熱ストレス傷害, 熱耐性, 表面科学, **22**, 645–651.
- 18) Hengge-Aronis, R., Klein, W., Lange, R., Rimmele, M., and Boos, W. (1991). Trehalose synthesis genes are controlled by the putative sigma factor encoded by *rpoS* and are involved in stationary-phase thermotolerance in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, **173**, 7918–7924.
- 19) Back, J.F., Oakenfull, D., and Smith, M.B. (1979). Increased thermal stability of proteins in the presence of sugars and polyols. *Biochemistry*, **18**, 5191–5196.
- 20) Kabir, M.S., Sagara, T., Oshima, T., Kawagoe, Y., Mori, H., Tsunedomi, R., and Yamada, M. (2004). Effects of mutations in the *rpoS* gene on cell viability and global gene expression under nitrogen starvation in *Escherichia coli*. *Microbiology*, **150**, 2543–2553.
- 21) Kobayashi, H., Miyamoto, T., Hashimoto, Y., Kiriki, M., Motomatsu, A., Honjoh, K., and Iio, M. (2004). Identification of Factors Involved in Recovery of Heat-Injured *Salmonella* Enteritidis. *J Food Prot.*, **68**, 932–941.
- 22) Liljas, A. (1990). Some structural aspects of elongation, In “The ribosome: structure, function and evolution.” ed. by W. E. Hill, A. Dahlberg, R. A. Garrett, P. B. Moore, D. Schlessinger and J. R. Warner, American Society of Microbiology, Washington, D.C., pp. 309–317.
- 23) Waywood, E.B. and Sanwal, B.D. (1974). The control of pyruvate kinases of *Escherichia coli*. Physicochemical and regulatory properties of the enzyme activated by fructose 1, 6-diphosphate. *J. Biol. Chem.*, **249**, 265–274.
- 24) Elizabeth, P. (1999). Effect of growth reduction of genetic modifications on acetate accumulation and biomass yields in *Escherichia coli*. *J. Biosci. Bioeng.*, **87**, 775–780.
- 25) Gleeson, M. (2005). Interrelationship between physical activity and branches-chain amino acids. *American Society for Nutritional Sciences*, 1591 S-1595 S.
- 26) Calvo, J. M. and Matthews, R. G. (1994). The leucine-responsive regulatory protein, a global regulator of metabolism in *Escherichia coli*. *Microbiological Reviews*, **58**, 466–490.

(平成29年11月16日受理)