シリーズ特集「損傷菌」

解説

嫌気性細菌芽胞の生物学的特性と損傷回復について

三宅真実*, 幸田知子, 安木真世, 坂野上英世, 平田祥太郎

大阪府立大学大学院生命環境科学研究科

Spores of Anaerobic Bacteria: Characteristics and Behaviors during Restoration from Damaged Status

Masami Miyake*, Tomoko Kohda, Mayo Yasugi, Hideyo Sakanoue and Shotaro Hirata

Graduate School of Life and Environmental Sciences, Osaka Prefecture University,
1-58 Rinku Ourai Kita, Izumisano, Osaka 598-8531

Spores are a highly resistant form of bacteria and are capable of surviving various environmental stresses. When food is contaminated with spores, it can result in food spoilage and food-borne illness. Although it is important to develop procedures to control the germination and outgrowth of food-contaminating spores, there is limited biological information about the spores of anaerobic *Clostridium* spp. In this mini-review, recent advances in the biological behaviors of *Clostridium* spp. spores are summarized, and the possible burden in food hygiene induced by putative “damaged-but-viable” spores is discussed. Concerted efforts to elucidate the biological specificity of spores are needed to develop new control measures applicable to a variety of hygienic processes.

(Accepted Nov. 10, 2017)

Keywords : *Clostridium perfringens*, *Clostridium botulinum*, germination, DNA repair, heat inactivation

キーワード : ウェルシュ菌, ボツリヌス菌, 発芽, DNA 修復, 熱変性

1. はじめに

細菌の中には、周囲の環境変化に応答し、熱、乾燥、化学物質等に強い耐性を示す形態に分化するものがある。これは「芽胞」あるいは「孢子」と呼ばれ、主に *Bacillus* 属、*Clostridium* 属の細菌がこのような形質を示す。芽胞は増殖細胞と同じ遺伝情報を持つが、内部の水分含量が低く、乾燥、熱、化学物質など様々な環境変化に耐性を示す。このため芽胞が食品中に混入した場合、通常の加熱調理過程で完全殺菌することは困難で、結果として様々な食品衛生上・品質上の問題を引き起こす。これまで加熱、高圧、電子ビーム、化学物質等、様々な物理化学的処理により食品中芽胞の不活化が試みられてきた。しかし食品の形状や性質により処理の適応可能性には限界があることから、近年では強度の低い処理で十分な効果を示すオーダーメイドの不活化処理法が求められている。このように様々なニーズに応じた芽胞制御法の開発を目指すには、芽胞の構造・生理を十分理解し、その特性を利用することが必要である。これまで、好気性菌である *Bacillus* 属をモデルとして菌が

芽胞を形成する過程、芽胞の構造、生理、熱耐性機構などの解明が進められてきた。一方で、嫌気性細菌 (*Clostridium* 属) では研究が全般的に遅れており、現在利用できる情報は限られている。本ミニレビューでは、*Clostridium* 属細菌芽胞の特性についてこれまで明らかにされた点を、*Bacillus* 属で得られた結果と比較して解説する。さらに、芽胞制御の観点から損傷芽胞という問題にも着目し、主に *Bacillus* 属細菌で得られた情報を基にこの問題について考察を加える。最後に、嫌気性菌が芽胞を形成したり、また芽胞が発芽する際に、ヒト体内因子を利用している研究成果も併せて紹介する。

2. 芽胞の基本構造

好気性菌の *Bacillus* 属と嫌気性菌の *Clostridium* 属で芽胞の基本構造は大きくは変わらず、両者とも4つの層構造から成っている (Fig. 1)。詳細については総説¹⁾を参考にしたい。芽胞の最内部には core と呼ばれる領域が存在し、ここに染色体が収納されている。Core にはまた大量のジピコリン酸 (DPA) が Ca^{2+} と結合して存在

〒598-8531 大阪府泉佐野市りんくう往来北 1-58

*連絡先 (Corresponding author), mami@vet.osakafu-u.ac.jp

する。Ca²⁺-DPA 複合体 (CaDPA) は芽胞形成の後期に core 内部に蓄積され、結果として core 内部の水分含量の低下を招く。これが芽胞の熱耐性に大きく寄与すると言われている。CaDPA はまた発芽時の情報伝達物質としても機能する (後述)。Core の外側には cortex という主にペプチドグリカン構造から成る厚い層が存在し、core 内部を物理的に保護している。Cortex と core の間には inner membrane があり、芽胞特異的な幾つかのタンパク質が局在していて、これが発芽過程で重要な働きをする (後述)。Inner membrane は通常の脂質 2 重膜に比べ 1/100 倍程度透過性が低下していて、core 内部への化学物質の侵入や、CaDPA の cortex への流出を抑えている²⁾。さらにその外側には coat と呼ばれるタンパク質層がある。Coat は数十種類のタンパク質から成り、複数のタンパク質が架橋構造をとることで構造的安定性を保っている。多くの細菌芽胞では coat が最外層となるが、一部の細菌ではさらにその外側に exosporium が存在する。Exosporium は宿主細胞との接着や、その後の病原性発現に何らかの役割を演じていることが報告されている³⁾。Exosporium の存在は菌種・菌株に

よって異なり、*Clostridium* 属では *C. difficile* (デフィシル菌)、*C. sporogenes* で見られる他、*C. botulinum* (ボツリヌス菌) にもその存在が示唆されている⁴⁾。*C. perfringens* (ウェルシュ菌) では exosporium の存在は 1968 年に 1 株で報告されているが⁵⁾、それ以外の報告がないため存在は確定していない。

3. 発芽 (Germination と outgrowth)

Fig. 2 に *Bacillus* 属細菌の芽胞が発芽する主なプロセスを要約した：① 発芽を誘導する低分子化合物 (germinant) が germinant receptor (GR) に作用する、② GR が活性化してイオンチャネルが開く、core 内の CaDPA が core 外へ流出する、③ これによって cortex のペプチドグリカン構造を分解する酵素が活性化し、cortex 構造が緩む、④ 外部の水分が core 内部へ流入し core の水和が引き起こされる、⑤ その後 core 内部で RNA 合成、タンパク質合成などの代謝が開始される⁶⁾。日本語で言う発芽という表現は、芽胞から栄養型細菌が出芽・増殖するまでのすべての過程を表すことが多いが、英語表現ではこの過程は、core が水和するまでの「germination 過程」と、その後栄養型菌体が芽胞から出芽・増殖するまでの「outgrowth 過程」に分けられる。上記 ① から ④ までは germination 過程、⑤ 以降が outgrowth 過程となる。Germination 過程の終了は形態学的には位相差顕微鏡下で白く光る芽胞 (phase-bright 芽胞) が core の水和によって暗く変化する (phase-dark 芽胞) ことで認知できる (Fig. 2)。このような germinant 誘導性の germination の基本メカニズムは、*Bacillus* 属細菌と *Clostridium* 属細菌で概ね共通であることがわかっている¹⁾。

しかし一方で、*Bacillus* 属細菌で見られる分子のいくつかは *Clostridium* 属細菌では認められないか、まったく別のシステムを利用しているらしいことがわかってきた

Fig. 1 General structure of bacterial spore

Fig. 2 A model for germination and outgrowth of spore (*Bacillus* spp.)

Table 1 Comparison of major components necessary for spore germination in *Bacillus* and *Clostridium* spp.^{a)}

Bacteria	GR ^{b)}	Location of GR	GSP ^{e)}	Cortex lytic enzyme	CaDPA release
<i>Bacillus</i> spp.	Ger type	IM ^{c)}	—	SleB, CwlJ	Before ^{f)}
<i>Clostridium</i> spp.					
<i>C. sporogenes</i>	Ger type	?	—	SleB, (CwlJ)	Before
<i>C. botulinum</i>	Ger type	IM	—	SleB, (CwlJ)	Both? ^{g)}
<i>C. perfringens</i>	Ger type	IM	CspB	SleC	After ^{h)}
<i>C. difficile</i>	CspC	OM ^{d)}	CspB	SleC	After

a) Adapted from references 1), 7) and 9); b) GR, germinant receptor; c) IM, inner membrane; d) OM, outer membrane; e) GSP, Germination-specific protease; f) CaDPA release takes place before activation of cortex lytic enzymes; g) CaDPA release takes place both before and after activation of cortex lytic enzymes; h) CaDPA release takes place after activation of cortex lytic enzymes.

(Table 1)¹⁾⁷⁾. *Bacillus* 属では inner membrane 上に存在する GerABC という Ger 型の 3 つの蛋白複合体が GR として働くが、デIFIシル菌ではまったく異なるレセプター (CspC) が germinant を認識し、下流へシグナルを伝える。同じ *Clostridium* 属細菌でもウェルシュ菌、ボツリヌス菌などは Ger 型 GR を持っているから、CspC を GR とすることはデIFIシル菌に特異な性状である。現在、デIFIシル菌はその 16S リボゾーム RNA 配列の相同性や生化学的性状から *Clostridium* 属ではなく *Clostridioides* 属として再分類されることが提唱されていて⁸⁾、生物学的なバックグラウンドの違いによりこの菌種だけが特殊な GR システムを持つのかかもしれない。

Bacillus 属では GR の活性化は CaDPA 放出を引き起こし、その後 cortex 分解酵素 CwlJ, SleB が活性化する (Fig. 2)。ウェルシュ菌は SleB を持たないが、機能的に同等である SleC が cortex 分解を担当している (Table 1)。*Bacillus* 属で CaDPA 放出がどのような経路を介して cortex 分解酵素を活性化するかはまだわかっていないが、ウェルシュ菌、デIFIシル菌の SleC 活性化機序には germination-specific protease (GSP) が関与することがわかっている。SleC は pro 酵素として産生され、末端が CspB という GSP によって切断されることにより活性化する。つまり、GR 活性化が次に CspB を活性化することで最終的な cortex 分解が開始される。重要なのはウェルシュ菌、デIFIシル菌では cortex 分解酵素の活性化には CaDPA 放出は関与しないということである。これらの菌では cortex 分解酵素の活性化後に CaDPA が放出されるし、CspB を欠損させると CaDPA 放出が起こらない。これら細菌では *Bacillus* 属とはまったく異なる経路で DPA 放出が引き起こされるようである。同じ *Clostridium* 属でも、ボツリヌス菌は総じて *Bacillus* 属型の germination システムを使っている (Table 1)。筆者らも、ボツリヌス菌 ATCC 3502 株には CwlJ, SleL, SleB 相同遺伝子が存在すること、SleB 相同遺伝子を破壊すると germination が強く阻害されることを見出している⁹⁾¹⁰⁾。ボツリヌス菌の芽胞は食品中で発芽

して増殖し、致死性の高い食中毒を引き起こすため、本菌の発芽に関与する因子の同定や機能解析は食中毒制御に重要である。今後さらにボツリヌス菌芽胞の発芽機序を明らかにすることが期待される。

Bacillus 属と同じ Ger 型の GR を持つウェルシュ菌、ボツリヌス菌も、Ger 複合体の構造と機能には多様性がある。従って、芽胞の発芽を引き起こす germinant の種類と組み合わせは、菌種や、菌株によって大きく異なる。さらにウェルシュ菌では、食中毒由来株と非食中毒由来株でも発芽を誘導する germinant に差があることが報告されている¹¹⁾。ウェルシュ菌やボツリヌス菌は食品中で発芽することが食中毒の発生に重要である。菌株により発芽誘導する germinant が異なることは、食中毒の原因食品との関係を考えて興味深い。GR と germinant の関係に見る多様性は、食の多様化と並行して変化しており、現在もその変化は多様化しつつあるのかかもしれない。

4. 損傷芽胞について

一般的に芽胞には代謝活性が存在せず、損傷を受けると修復機構が働かないと考えられてきた。実際、芽胞内に存在する ATP 量は、エネルギー代謝を司るには不十分である¹²⁾。しかし近年、芽胞が様々な酵素を coat 層や core 内部に保持し、ある程度の代謝ポテンシャルを有することが証明されている^{13)~15)}。実際芽胞は germinant が作用すると速やかに (10 分以内に) 遺伝子発現を開始する¹⁶⁾。芽胞 core 内部には DNA 修復酵素が内蔵されていて、これが欠損すると発芽率が低下したり、発芽過程が大幅に遅延する¹⁷⁾。そもそも芽胞は環境中で紫外線に暴露され、大なり小なり DNA など遺伝物質が傷害を受ける運命にある。従って芽胞は、本質的に傷害を修復しなければ発芽増殖できないと言っても過言ではない¹⁸⁾。

芽胞に不十分な不活化処理が加わると、遺伝子や構成タンパク質などの生体分子の変性 (損傷) が生じる¹⁹⁾。その損傷が芽胞にとって不可逆的・致命的であれば芽胞は不活化されるが、軽度の損傷であれば細菌の持つ修復機能が働き、

芽胞は再び発芽・増殖する(損傷回復)²⁰⁾。一般に、食品に対して不十分な不活化処理が行われ、食品中で損傷を受けた芽胞が残存した場合、その損傷芽胞の運命には様々な環境条件が影響すると考えられる。例えば食品中に上記損傷の修復に必要な条件が整っていれば、芽胞は損傷回復し、食品変敗の原因となりかねない。しかし復帰に必要な条件を人為的に操作できれば、この回復を妨げて、変敗を防げるかもしれない。このように、最小限の不活化処理で芽胞を損傷させた後に、人為的な条件操作を加えることで芽胞の発芽を制御することが理論上可能となる。

一方、芽胞が受けた損傷を食品中で回復できない場合でも、これが人の体内に入り体内環境で損傷修復できたとしたら、場合によっては大きな問題に発展する²¹⁾。例えばボツリヌス菌のような病原細菌の芽胞が食品に混入していて、これが損傷を受けていた場合、培養検査法では食品から検出することは困難になる。しかしもしこの損傷芽胞が乳児に摂取され、その体内で損傷から回復して消化管内に定着、発芽したとしたら、乳児ボツリヌス症を引き起こす可能性がある²²⁾。これを考えると芽胞の損傷メカニズムや損傷回復メカニズムを研究すること、損傷芽胞の検出法を開発することは、食品衛生上非常に重要である。残念ながら、特に嫌気性菌(*Clostridium* 属細菌)の芽胞に限って言えば、損傷回復に焦点を当てた研究はほとんど行われておらず、そもそも回復可能な損傷状態が存在するかどうかさえ今のところはっきりしない。過去に、熱処理あるいは強アルカリ処理したウェルシュ菌芽胞を、lysozymeを含む培地で培養すると発芽が回復することが報告されている²³⁾²⁴⁾。これは、嫌気性菌の損傷芽胞がある条件下では損傷回復するという状況証拠と言える。嫌気性細菌芽胞が本来備える修復機能が損傷回復過程においてどのように機能し、食品衛生学上どのような意義を持つのか、さらにそれらが食品成分あるいは体内環境因子にどのように応答して進行し、またそのシグナル応答過程を人為的に操作することが可能なのか、今後これらの点を解明し新しい概念での芽胞制御につなげることが望まれる。

5. 嫌気性菌の芽胞—栄養型変換の宿主由来誘導因子

ディフィシル菌はヒト偽膜性腸炎の原因菌である。本菌はヒトからヒトへ芽胞の経口感染により伝搬する。口から体内に入った芽胞は、消化管内で発芽・増殖し、腸内細菌の一部として定着する。従ってヒト消化管内で芽胞の発芽が誘導されることが本菌の感染成立には必須である。既に述べたように本菌は特殊な GR (CspC) を持つが、これに作用する germinant として、胆汁酸 (taurocholic acid) と glycine の組み合わせが重要であることがわかっている。つまりディフィシル菌の芽胞は、胆汁酸を感知してヒト体内に入ったことを知り、効率良く発芽・増殖を開始するらしい²⁵⁾。同様の胆汁酸感知システムはウェルシュ菌にもあ

ることが知られており、*in vitro* で胆汁酸がウェルシュ菌芽胞形成を顕著に促進することが報告されてきた²⁶⁾。筆者らはこれに着目し、ウェルシュ菌の胆汁酸感知システムの研究を進めている。これまで腸内環境を模した培養条件を確立し、胆汁酸のうち deoxycholic acid が 10 μ M という低濃度で芽胞形成を数百倍上昇させること、これは芽胞形成のマスター・レギュレーターである Spo0A のリン酸化を介する、芽胞形成カスケードの促進効果によるものであることを示してきた²⁷⁾²⁸⁾。また、この芽胞形成促進作用を有する胆汁酸類似構造体(ステロイド化合物)の構造活性相関を検討すると、親水性の高い側鎖を持つステロイド化合物ほど芽胞形成促進作用が高く、さらにこの作用を打ち消すステロール化合物のあることも見出している²⁹⁾。このように、嫌気性芽胞形成細菌には、生体物質(宿主因子)と相互作用しつつ芽胞を形成したり発芽および増殖することで、病原性の発現を制御するもののあることがわかってきた。得られた情報を因に、既にディフィシル菌では疾病予防薬の開発が進められており³⁰⁾、ウェルシュ菌でも同様の展開を目指して研究を進めることが望まれる。

6. おわりに

芽胞の研究は主にフォワード・ジェネティックスの手法により大きく進み、その結果、芽胞形成や発芽に関わる因子の同定が急速に進んだ。しかし好気性菌である *Bacillus* 属と異なり、特に嫌気性菌の芽胞研究は大きく遅れを取っていて、ほとんどの部分が未だ謎に包まれている。今後は新しい研究技術・手法を導入することで、これまで手がつけられなかった芽胞の性状を明らかにすることが切に望まれる⁶⁾²⁰⁾。筆者らもウェルシュ菌芽胞の発芽過程をライブ・セル・イメージング・システムを利用して1細胞解析を行っており、芽胞の温和な加熱処理が outgrowth 過程における生物プロセスを加速させるという、これまでの手法では捕らえられなかった新しい現象を見出している³¹⁾。このような1細胞解析に、代謝性蛍光プローブを組み合わせるなどによって³²⁾、今後芽胞の生理機能が次第に明らかにされることを期待する。

食品製造、食品加工の現場では芽胞の不活化は大きな課題である。近年、食品中の芽胞を不活化する際、共存する因子の有無によりその効果が高まることがわかってきた²⁰⁾。また、芽胞そのものを不活化するのではなく、高圧処理により発芽(germination)を促して環境耐性を失わせた後に、比較的温和な処理で殺菌処理を行う手法も実用化が進められている³³⁾。このように芽胞の不活化処理には多様な選択肢が生まれつつあるが、一方で完全な不活化を達成することは簡単なことではない。損傷芽胞という複雑な問題も懸念される。芽胞は数十億年もの時を超え、人類が出会ったこともないような極限環境を生き延びて、現在まで進化してきた。彼らを完全に制御するには、今後も様々な視点か

らその生物学的特性を解明し続けることが求められるだろう。

文 献

- Setlow, P., Wang, S., and Li, Y.-Q. (2017). Germination of spores of the orders *Bacillales* and *Clostridiales*. *Annu. Rev. Microbiol.*, **71**, 459–477.
- Sunde, E.P., Setlow, P., Hederstedt, L., and Halle, B. (2009). The physical state of water in bacterial spores. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **106**, 19334–19339.
- Stewart, G.C. (2015). The exosporium layer of bacterial spores: a connection to the environment and the infected host. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **79**, 437–457.
- Janganan, T.K., Mullin, N., Tzokov, S.B., Stringer, S., Fagan, R.P., Hobbs, J.K., Moir, A., and Bullough, P.A. (2016). Characterization of the spore surface and exosporium proteins of *Clostridium sporogenes*; implications for *Clostridium botulinum* group I strains. *Food Microbiol.*, **59**, 205–212.
- Hoener, J.F., Stuart, P.F., and Holt, S.C. (1968). Cytology of spore formation in *Clostridium perfringens*. *J. Bacteriol.*, **96**, 1818–34.
- Setlow, P. (2013). When the sleepers wake: the germination of spores of *Bacillus* species. *J. Appl. Microbiol.*, **115**, 1251–1268.
- Xiao, Y., Francke, C., Abee, T., and Wells-Bennik, M.H. (2011). Clostridial spore germination versus bacilli: genome mining and current insights. *Food Microbiol.*, **28**, 266–274.
- Lawson, P.A., Citron, D.M., Tyrrell, K.L., and Finegold, S.M. (2016). Reclassification of *Clostridium difficile* as *Clostridioides difficile* (Hall and O'Toole 1935) Prévot 1938. *Anaerobe*, **40**, 95–99.
- Brunt, J., van Vliet, A.H., van den Bos, F., Carter, A.T., and Peck, M.W. (2016). Diversity of the germination apparatus in *Clostridium botulinum* groups I, II, III, and IV. *Front Microbiol.*, **7**, 1702.
- 幸田知子, 細見晃司, 安木真世, 小崎俊司, 向本雅郁. (2016). B型ボツリヌス菌が保有するCBB_2914遺伝子の芽胞形成への関与. 大阪. 第89回日本細菌学会, 講演要旨集, p. 81.
- Bhattacharjee, D., McAllister, K.N., and Sorg, J.A. (2016). Germinants and their receptors in Clostridia. *J. Bacteriol.*, **198**, 2767–2775.
- Setlow, P. and Johnson, E.A. (2012). Spores and their significance. In “Food Microbiology, Fundamentals and Frontiers,” 4th edn, ed by Doyle, M.P. and Buchanan, R., ASM Press, Washington, DC, pp. 45–79.
- Segev, E., Smith, Y., and Ben-Yehuda, S. (2012). RNA dynamics in aging bacterial spores. *Cell*, **148**, 139–149.
- Butterfield, C.N., Lee, S.W., and Tebo, B.M. (2016). The role of bacterial spores in metal cycling and their potential application in metal contaminant bioremediation. *Microbiol Spectr.*, **4**, doi: 10.1128/microbiolspec.TBS-0018-2013.
- Kuwana, R. (2009). Protein modification system in dormant cells. *Journal of Pharmaceutical Society of Japan (Yakugaku Zasshi)*, **129**, 1221–1225 (桑名利津子. 休眠細胞におけるタンパク質修飾機構の解析. 日本薬学雑誌).
- Keijser, B.J., Ter Beek, A., Rauwerda, H., Schuren, F., Montijn, R., van der Spek, H., and Brul, S. (2007). Analysis of temporal gene expression during *Bacillus subtilis* spore germination and outgrowth. *J. Bacteriol.*, **189**, 3624–3634.
- Campos, S.S., Ibarra-Rodriguez, J.R., Barajas-Ornelas, R.C., Ramírez-Guadiana, F.H., Obregón-Herrera, A., Setlow, P., and Pedraza-Reyes, M. (2014). Interaction of apurinic/apyrimidinic endonucleases Nfo and ExoA with the DNA integrity scanning protein DisA in the processing of oxidative DNA damage during *Bacillus subtilis* spore outgrowth. *J. Bacteriol.*, **196**, 568–578.
- Yang, L., Jian, Y., Setlow, P., and Li, L. (2017). Spore photoproduct within DNA is a surprisingly poor substrate for its designated repair enzyme-The spore photoproduct lyase. *DNA Repair (Amst.)*, **53**, 31–42.
- Chęcinska, A., Paszczynski, A., and Burbank, M. (2015). *Bacillus* and other spore-forming genera: variations in responses and mechanisms for survival. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.*, **6**, 351–369.
- Wells-Bennik, M.H., Eijlander, R.T., den Besten, H.M., Berendsen, E.M., Warda, A.K., Krawczyk, A.O., Nierop Groot, M.N., Xiao, Y., Zwietering, M.H., Kuipers, O.P., and Abee, T. (2016). Bacterial spores in food: survival, emergence, and outgrowth. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.*, **7**, 457–482.
- Zhao, X., Zhong, J., Wei, C., Lin, C.W., and Ding, T. (2017). Current perspectives on viable but non-culturable state in foodborne pathogens. *Front. Microbiol.*, **8**, 580.
- Rosow, L.K. and Strober, J.B. (2015). Infant botulism: review and clinical update. *Pediatr. Neurol.*, **52**, 487–492.
- 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.
- Barach, J.T., Flowers, R.S., and Adams, D.M. (1975). Repair of heat-injured *Clostridium perfringens* spores during outgrowth. *Appl. Microbiol.*, **30**, 873–875.
- Paredes-Sabja, D., Shen, A., and Sorg, J.A. (2014). *Clostridium difficile* spore biology: sporulation, germination, and spore structural proteins. *Trends Microbiol.*, **22**, 406–416.
- Heredia, N.L., Labbe, R.G., Rodriguez, M.A., and Garcia-Alvarado, J.S. (1991). Growth, sporulation and enterotoxin production by *Clostridium perfringens* type A in the presence of human bile salts. *FEMS Microbiol. Lett.*, **84**, 15–22.
- Yasugi, M., Sugahara, Y., Hoshi, H., Kondo, K., Talukdar, P.K., Sarker, M.R., Yamamoto, S., Kamata, Y., and Miyake, M. (2015). *In vitro* cytotoxicity induced by *Clostridium perfringens* isolate carrying a chromosomal *cpe* gene is exclusively dependent on sporulation and enterotoxin production. *Microb. Pathog.*, **85**, 1–10.
- Yasugi, M., Okuzaki, D., Kuwana, R., Takamatsu, H., Fujita, M., Sarker, M.R., and Miyake, M. (2016). Transcriptional profile during deoxycholate-induced sporulation in a *Clostridium perfringens* isolate causing foodborne illness. *Appl. Environ. Microbiol.*, **82**, 2929–42.
- 平田祥太郎, 安木真世, 三宅眞実 (2016). 胆汁酸構造類似体がウェルシュ菌食中毒分離株の芽胞形成に与える影響. 東京. 第159回日本獣医学会, 講演要旨集, p. 405.
- Stoltz, K.L., Erickson, R., Staley, C., Weingarden, A.R., Romens, E., Steer, C.J., Khoruts, A., Sadowsky, M.J., and Dosa, P.I. (2017). Synthesis and biological evaluation of bile acid analogues inhibitory to *Clostridium difficile* spore germination. *J. Med. Chem.*, **60**, 3451–3471.
- 坂野上英世, 安木真世, 三宅眞実. (2017). ライブセルイメージングによるウェルシュ菌芽胞の発芽動態解析. 徳島. 第38回日本食品微生物学会学術総会, 講演要旨集, p. 50.
- Loison, P., Gervais, P., Perrier-Cornet, J.M., and Kuimova, M.K. (2016). Effect of ethanol perturbation on viscosity and

-
- permeability of an inner membrane in *Bacillus subtilis* spores. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1858**, 2060-2069.
- 33) Doona, C.J., Feecherry, F.E., Setlow, B., Wang, S., Li, W., Nichols, F.C., Talukdar, P.K., Sarker, M.R., Li, Y.Q., Shen, A., and Setlow, P. (2016). Effects of high-pressure treatment on spores of *Clostridium* species. *Appl. Environ. Microbiol.*, **82**, 5287-97.
- (平成 29 年 11 月 10 日受理)
-