

低温で増殖可能な食中毒原因菌制御への低温活性リゾチームの応用

相 沢 智 康 [北海道大学大学院先端生命科学研究院／准教授]

藤 村 達 也 [日本ハム株式会社中央研究所札幌サテライト／研究員]

坂本 裕美子 [札幌市衛生研究所保健科学課／技術職員]

出 村 誠 [北海道大学大学院先端生命科学研究院／教授]

背景・目的

大多数の食中毒菌は中温菌であり、その増殖は4℃以下の冷蔵で阻止できる。しかしながら、*Listeria monocytogenes* 等の一部の食中毒菌は、氷点下でさえ増殖できることが問題となっている。日持ち向上剤として広く用いられているニワトリ卵白リゾチームは、*Listeria* 属菌に対して効果が期待できるものの、低温保存条件下では溶菌活性が急激に低下する。

そこで本研究開発では、低温保存条件下でも効果的な微生物増殖制御を可能にする新規技術の開発を目標として、代表者が研究を進めてきた低温活性リゾチームをモデルとし、食中毒原因微生物の制御に対する効果を検証する。さらにタンパク質科学的な解析を元に、食中毒原因菌制御のための新規技術の検討と開発を進める。

内容・方法

1) 低温活性リゾチームの低温増殖微生物制御活性の詳細な解析

現在まで研究で、低温活性リゾチームは食品添加物に用いられるニワトリ卵白リゾチームと比較していくつかの点で優れた性質を有することが明らかになり初めている。そこで低温増殖が問題となる *Listeria* 属菌をはじめとし、大腸菌やサルモネラ属菌等の微生物に対する抗菌活性測定を進め、低温活性リゾチームの効果に関する検討を進めた。メタノール資化性酵母を用いた遺伝子組換え技術により、活性型での大量調整に成功している昆虫(カイコ)由来リゾチーム及びその変異体を用いることで、幅広い実験条件での活性測定を効率的に行った。

2) 低温活性リゾチームの活性発現の分子機構の解明と高活性化へ向けた検討

研究代表者は無脊椎動物由来のリゾチームの低温活性を世界で初めて報告し、X線結晶構造解析等によりその立体構造を明らかにすることに成功している。そこで、低温活性発現機構についての分子レベルでの詳細な解析をさらに進めるために、NMR法を用いた分子内部の立体構造や運動性に関する解析を進めた。

結果・成果

1) 低温活性リゾチームの低温増殖微生物制御活性の

詳細な解析

昆虫由来の低温活性リゾチームを用いた活性測定の結果、グラム陽性細菌である *Listeria* 属菌だけではなく、グラム陰性細菌である大腸菌に対しても高い殺菌活性測定、増殖抑制活性をもつことが明らかになった。一般にリゾチームの抗菌活性は細胞壁の糖鎖を分解する酵素活性による溶菌活性がその中心的な役割を担うと考えられているが、活性部位を欠損した変異型リゾチームを用いた実験から、酵素的なメカニズムに依らない殺菌活性や増殖抑制活性も、その抗菌活性の発現に重要な役割を担っていることが明らかになった。

また、低温活性リゾチームと他の抗菌ペプチドを併用した際の効果について検討したところ、通常では抗菌活性が見られない程度の低濃度の抗菌ペプチドによって、リゾチームの殺菌活性が100倍以上高くなることが確認された。この活性の増強は低温域でも確認されたことに加えて、活性部位を欠損した変異型リゾチームでもこの効果が確認されたことから、種々のリゾチームと他の食品添加物の相乗的な効果の食品添加への応用利用を検討する上で重要な知見を得られたと言える。

2) 低温活性リゾチームの活性発現の分子機構の解明と高活性化へ向けた検討

低温活性リゾチームの低温での活性発現には分子内部の低温での運動性が重要な働きを担っていると予想されるが、その解析にはNMR法を用いた解析が有効と考えられる。そこで、無細胞系を用いたタンパク質合成系を活用することで安定同位体標識した低温活性リゾチームを作成し、NMR法による解析を進めた。その結果全アミノ酸残基の信号帰属に成功し、その結果を利用して立体構造決定及び常温及び低温での運動性の解析を進めることができた。今後これらの解析結果を活用することで、低温での活性発現メカニズムの詳細な解明が期待できる他、他の酵素に対して人工的に低温活性を付与する技術へとつながる重要な知見を得ることが期待できる。

今後の展望

低温活性型リゾチームの低温増殖性食中毒原因菌の制御や種々の食中毒原因微生物に対する有効性が確認されたので、今後は実際の食品に添加した際の効果の検証などを進めたい。例えば、長期間の低温での食品貯蔵における *Listeria* 属菌の抑制効果については今後の興味深い研究課題と言える。また、低温活性型リゾチームの食品保存技術への応用の有用性が明らかになったことから、北海道という低温環境で生育する様々な動植物由来の抗菌タンパク質等にも同様の有用性が認められる可能性が高く、その探索も今後の興味深いテーマと言える。