

# 抗菌ペプチドを利用した食品機能性評価に用いる培養液の開発

平 敏夫 [株式会社プライマリーセル／CSO]  
山口 昭博 [株式会社プライマリーセル／セルアップセイ部]  
関口 志津子 [株式会社プライマリーセル／マーティング部]  
綾部 時芳 [北海道大学大学院先端生命科学研究院  
細胞生物科学分野／教授]  
相沢 智康 [北海道大学大学院先端生命科学研究院  
先端融合科学研究部門生命分子科学分野／准教授]

## 背景・目的

従来より皮膚、口腔粘膜、鼻粘膜、大腸粘膜等に由来する細胞培養では、微生物感染を防ぐために抗生物質が使用されるが、マイコプラズマやカビ等の除去が不完全であったり、抗生物質が細胞の代謝を妨害して正しい評価を困難にしてしまうケースもある。当社では、「さっぽろバイオクラスター構想“Bio-S”」事業において、北海道大学との共同研究で消化管由来の細胞を利用した食品機能性評価法を開発中であり、リコンビナント抗菌ペプチド作製技術を利用して抗生物質の影響を受けない細胞培養法の開発を進めてきた。本研究では、この技術を応用した食品機能性評価用細胞培養キット開発を行うものである。

## 内容・方法

必要量のリコンビナント抗菌ペプチド Cryptdin-4 (Crp4) を北海道大学相沢研で作成し、綾部研においてそのペプチドの抗菌活性を多種の細菌を用いて活性評価を行い、培養系での有効濃度を検討した。また、マイコプラズマ除去用途での可能性を確認するために(株)プライマリーセルにおいて既にマイコプラズマ等の感染が確認されている細胞系を用いて、そのマイコプラズマが除去できるかどうかの検証を行った。

## ○遺伝子組換え抗菌ペプチドの作製

一般に遺伝子組換え技術による抗菌ペプチドの生産は、抗菌ペプチドが宿主に対して毒性を發揮する、宿主プロテアーゼによる分解の影響を受けやすい、等の問題があるため非常に困難である。そこで本研究では、不溶性顆粒形成能の高いタンパク質をパートナーとした共発現による安定化技術を利用することで、大腸菌を宿主とした遺伝子組換え抗菌ペプチドの安定な生産についての検討を行った。現在までの研究で高い抗菌活性を有することが明らかになっているマウス由来抗菌ペプチド Crp4 をターゲットとして、パートナータンパク質の種類、培養方法、精製方法等の検討を行った。

## ○細菌を用いた有効濃度検討

大腸菌を宿主とした遺伝子組み換え抗菌ペプチド Crp4 のグラム陰性細菌およびグラム陽性細菌株に対する殺菌活性を既報に準じて検討し、有効濃度を解析した。Crp4 最終濃度を  $0.05\mu\text{M}$  ~  $2.7\mu\text{M}$  とし、菌株は好気性菌をターゲットとして、グラム陽性の黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*, ATCC)、グラム陰性の大腸菌 (*E. coli* ML 35, ATCC)、サルモネラ菌 (*S. enterica* serovar Typhimurium, ATCC) を用いて解析した。

## ○マイコプラズマ感染細胞からのマイコプラズマ除去試験

マイコプラズマ感染陽性細胞培養株に対する酸化型抗菌ペプチド Crp4 と固相合成した還元型 Crp4 のマイコプラズマ除去効果を確認した。

## 結果・成果

### ○遺伝子組み替え抗菌ペプチドの作製

#### 1) パートナータンパク質の効果の検証

Crp4 単独で大腸菌菌体内での発現を行った場合には、宿主プロテアーゼによる分解の影響が強く、その生産効率は極めて低かった。そこで、不溶性顆粒形成能の高いタンパク質数種類を選択し、共発現による Crp4 発現に対する効果を検討した。その結果、塩基性の等電点を持つ Crp4 に対しては、酸性の等電点を持つ不溶性顆粒形成能の高いパートナータンパク質が効果的な発現量増強効果を有することが明らかになった。

#### 2) 培養・精製技術の確立

効率的な Crp4 生産技術を確立するために、大腸菌の培養に関して、培地組成、培養温度、発現誘導時期などの検討を行い、Crp4 の発現量が最も多くなる条件を得た。その後、安定な不溶性顆粒として得られた Crp4 分子について、変性剤による可溶化、イオン交換クロマトグラフィー及び逆相 HPLC による精製の条件を検討し、純度の高い Crp4 分子を効率よく得るための条件を決定した。最終的には、培地 1L 当たり、粗ペプチドで 10 mg 以上、最終精製ペプチドで約 1 mg の Crp4 を得ることに成功した。

## ○殺菌活性の測定

作製された大腸菌を宿主とする遺伝子組み換え Crp4 は、今回検討したグラム陽性である黄色ブドウ球菌、グラム陰性である大腸菌、サルモネラ菌のすべてに対して殺菌作用を示した。また、その殺菌活性の強さはそれぞれ Crp4 の濃度依存的であった。Crp4 濃度  $2.7\mu\text{M}$  では、検討したすべての細菌をほぼ死滅させる活性を有していることを確認した。

## ○マイコプラズマ感染細胞からのマイコプラズマ除去試験

### 1) 抗菌ペプチドによる細胞毒性の検討

イヌ メラノーマおよびHeLa 細胞ともに抗菌ペプチド添加による細胞障害性は高濃度においても見られなかった。

### 2) 抗菌ペプチドによるマイコプラズマ除去効果の検討

抗菌ペプチドおよび市販除去剤(MC-210)を加え培養した細胞をPCR法で、また回収した培養液を MycoAlert(r) Mycoplasma Detection Kit によりマイコプラズマ感染確認を行った。MC-210添加群においては、有意な除菌効果が見られたが、抗菌ペプチド添加によるマイコプラズマ除去効果は見られず、MC-210との併用による相乗作用も見られなかった。PCR 法と MycoAlert(r) Mycoplasma Detection Kit の結果には相関が見られ、細胞中においてどちらの方法でもマイコプラズマ感染確認が可能であることが分かった。

レーン1：マーカー 100 bp

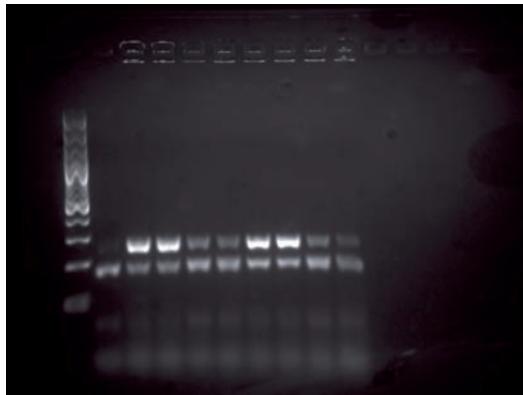
レーン2：Negative Control : PBS

レーン3-4 : Positive control

レーン5-6 : MC-210

レーン7-8 : 抗菌ペプチド

レーン9-10 : 抗菌ペプチド+MC-210



検討を加えたい。

作製した抗菌ペプチドは、マイコプラズマ除去はできなかったものの、感染した細菌の除去に対しては有効性があるので、特に感染のリスクの高い上皮系の細胞を初代培養する場合に予防の意味で添加して行きたい。

## 今後の展望

今回の試験で、抗菌ペプチドを培養液中に添加することによって、細菌感染予防および除去効果は期待できるが、マイコプラズマの除去効果は認められなかった。今後は、抗菌ペプチドの立体構造を酸化型にして添加する、他の薬物(酸化剤)との併用などを検討してゆきたい。

作製した抗菌ペプチドの検討したグラム陽性及びグラム陰性の細菌に対する強力な殺菌活性が明らかになった。今後は、培養液中における有効濃度についてさらに