

天然物および卵白ペプチドによる耐性化サルモネラの制御

九州大学大学院農学研究院生命機能科学部門食品衛生化学研究室・教授 宮本 敬久

■ 目 的

サルモネラは環境ストレス耐性が高く、様々な環境ストレス下で損傷するが完全には死滅せず、損傷を回復して人や動物に健康被害を引き起こす。また、細菌細胞集団の中にはトキシン-アンチトキシンシステムを発現して極端に代謝能の低下した集団が存在し、種々のストレスに暴露された後でも耐性化生残菌(一般に Persister と呼ばれる)として生き残ることが示されている。さらに食品中に生残するサルモネラが多剤耐性化やバイオフィーム形成も大きな問題である。本研究では、*Salmonella* Typhimurium において、Persister 集団を死滅に導く Lon や ClpP ならびにアンチトキシンの発現を誘導する物質、バイオフィーム形成阻害物質を卵の成分やその酵素分解物を含む天然由来物質から見いだすことを目的とする。

■ 方 法

Persister 形成を確認するため、3 種の作用点の異なる抗生物質を添加してサルモネラの生菌数を経時的に測定した。Persister 低減効果を調べるため、アンピシリンまたはナリジクス酸と試験物質を併用してサルモネラの生菌数を経時的に測定した。さらに、これらと EDTA の併用効果も同様に調べた。また、D-アミノ酸を中心に試験物質存在下で培養してバイオフィーム形成に対する影響を調べた。バイオフィーム形成抑制効果の認められたプチファインについて HiTrap Octyl FF カラムを用いた疎水性相互作用クロマトグラフに供して溶出画分のバイオフィーム阻害活性を測定した。

■ 結果および考察

Persister 形成を確認するため、3 種の作用点の異なる抗生物質を添加してサルモネラの生菌数を測定した結果、10 および 20 $\mu\text{g/mL}$ のアンピシリンでは 2 log、50 および 500 $\mu\text{g/mL}$ のナリジクス酸では 3 log 程度減少したところで生菌数の減少が止まったことから、培養 4 時間目以降 Persister の生残が示された。リファンピシンに関しては、初発菌数から菌数が変化しなかったため、リファンピシンの作用障壁を除去して再検討が必要である。アンピシリンまたはナリジクス酸との併用では今回試験した物質の添加による Persister の低下は認められなかった。一方で、インドール添加区では使用した二種類の抗生物質の効果を低減させた。サルモネラの外膜に作用するキレート剤を併用物質と同時に添加することにより併用物質の膜透過性の向上を試みた結果、卵白ペプチド EP-1 において、アンピシリンと EDTA との併用により、Persister の低下が認められた。酸性 D-アミノ酸にサルモネラのバイオフィーム形成阻害効果が認められた。ペプチファインについて HiTrap Octyl FF カラムを用いた疎水性相互作用クロマトグラフィーに供してステップワイズ溶出した結果、洗浄画分に高いバイオフィーム阻害活性が認められた。

■ 結 語

継続して卵白ペプチド、天然由来成分を用いて、*S. Typhimurium* の菌体内プロテアーゼに加え、トキシンおよびアンチトキシン遺伝子の転写に対する影響を調べるとともに卵白ペプチドの疎水クロマト分画画分から有効ペプチドの分離・同定を行う。新たにサルモネラ溶菌ファージを分離してファージ耐性化菌体に対する効果も検討し、作用機構の解明を試みる。本研究の成果により、食品の品質には影響を与えず安全性向上に大きく貢献する基盤技術が構築されるものと期待される。