

9857 部分変性リゾチームの抗菌作用に及ぼす食塩の影響

助成研究者：ヒシヤム R. イブ'ラヒム(鹿児島大学 農学部)

共同研究者：井上 祐一(鹿児島大学 農学部)

食品の安全性の見地から天然物に由来する抗菌システムに消費者の関心が集まっており、天然物由来の抗菌剤の開発が望まれている。卵白リゾチームは、有望な抗菌性タンパク質であるが、グラム陽性菌に対しては抗菌性を示すがグラム陰性菌に対して抗菌性を示さないことから、その食品保存剤としての用途が限られている。われわれはタンパク質修飾や遺伝子工学的手法を用いて、グラム陰性菌に対しても抗菌性を示すようリゾチームの改変を行ってきた。これまでの研究でリゾチームを部分変性させると、グラム陰性菌に対しても抗菌性を示すことを見いだした。pH6.0、80℃で20分間加熱した部分変性リゾチーム(HLz80/6)はその酵素活性は54%となるが、グラム陽性菌だけでなく、グラム陰性菌に対しても強い抗菌性を示すことが明らかになった。そこで、このHLz80/6の抗菌作用に及ぼすNaClの影響を調べた。また、抗菌剤のシネルギストとして知られているグリシン併用の効果についても調べた。

HLz80/6は、0.1%までのNaCl, CaCl₂, MgCl₂存在下で、グラム陽性菌*S. aureus*およびグラム陰性菌*E. coli*の両方に対して未変性リゾチームよりも強い殺菌活性を示した。このような殺菌作用は、*Salmonella enteritidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*に対しても認められた。HLz80/6が低イオン強度で強い殺菌作用を示したことは適度な塩濃度が要求される食品や薬に利用できる可能性を示唆していた。0.5および0.1%のNaClの添加は、*S. aureus*および*E. coli*の殺菌作用に及ぼすHLz80/6の効果を低下させたが、これに0.4%のグリシンを添加するとNaCl濃度依存性をそれぞれ1Mおよび0.5Mにシフトさせた。グリシン濃度を1.6%まで増加させた場合にもこの共力作用が認められたが、未変性リゾチームにはこのような共力作用はなかった。このことはグリシンとHLz80/6との併用が食品系において有効であることを示唆していた。このように、リゾチームの部分変性によって、リゾチームがグラム陰性菌に対しても殺菌作用を有するようになり、グリシンを併用することにより、食品の保存剤として利用できる可能性が示唆された。食品にグリシンのような添加物を使用するとフレーバーや味を損なう場合があるが、部分変性リゾチームはグリシンの添加量を減少させ、一方グリシンは、NaClによる部分変性リゾチームの殺菌作用阻害を阻止するものと思われた。

9857 部分変性リゾチームの抗菌作用に及ぼす食塩の影響

助成研究者：ヒツヤマ R, イワノム (鹿児島大学 農学部)

共同研究者：井上 祐一 (鹿児島大学 農学部)

1. 研究目的

食品の安全性の見地から天然物に由来する抗菌システムに消費者の関心が集まっており、天然物由来の抗菌性物質の開発が望まれている。卵白リゾチームは卵白タンパク質の約4%を占め、細菌細胞壁のN-アセチルムラミン酸とN-アセチルグルコサミンの β 1-4結合を加水分解する溶菌酵素である。卵白からリゾチームを分離する方法も確立していることから、すでに食品保存剤として利用されている¹⁻⁴⁾。しかし、リゾチームはグラム陽性菌に対しては抗菌性を示すが、グラム陰性菌は細胞壁がリポ多糖で覆われているため、グラム陰性菌に対しては抗菌性を示さないため、その食品保存剤としての用途が制限されている。

著者らはこれまでに化学的方法でリゾチームに脂肪酸やアルデヒドを結合するとグラム陰性菌に対しても抗菌性を示すことを見出した⁵⁾。また、遺伝子工学的手法でC-端側に5残基の疎水性アミノ酸を挿入するとグラム陰性菌に対しても抗菌性を示すことを報告した^{6, 7)}。さらに最近、リゾチームを加熱により酵素活性を失活させても、抗菌性は残り、グラム陽性菌だけでなくグラム陰性菌に対しても殺菌作用を示すことを見出した^{8, 9)}。このことは、部分変性リゾチームは細菌細胞膜と相互作用しやすくなり、その結果抗菌作用が強くなることを示唆していた。しかし、この部分変性リゾチームを実際の食品へ利用する場合、食品系では食塩が存在している場合が多いので、食塩共存下でその抗菌作用を調べることが必須である。

本研究では、この部分変性リゾチームの抗菌活性に及ぼすNaClの影響および抗菌剤のシネルギストとして知られているグリシン併用の効果について調べた。

2. 研究方法

2.1 実験材料

リゾチームは卵白から5回再結晶化した太陽化学株式会社製のものを使用した。リゾチームの基質としてシグマ社の*Micrococcus lysodeikticus*を用いた。ブレインハートインヒュージョン (BHI)、標準寒天およびペプトン培地はDifco社製のものを用いた。抗菌活性の測定に使用した*Escherichia coli* IFO 3301 (*E. coli* K12)、*Staphylococcus aureus* IFO 14462 (*S. aureus*)、*Bacillus cereus*、*Bacillus subtilis*、*Salmonella enteritidis* および *Pseudomonas aeruginosa* は大阪大学微生物研究所のものを用いた。

2.2 リゾチームの熱変性

リゾチームを10 mM リン酸緩衝液 (pH 6.0) 中に0.1%濃度で溶解し、これをスクリュ

ーキャップ付チューブに入れ、ウォーターバス中で加熱した。

2.3 タンパク質の溶解度の測定

タンパク質の溶解度は、試料溶液をメンブレン (0.45 μm) でろ過し、ろ液中のタンパク質含量をMiller¹⁰⁾の方法で測定することにより求めた。

2.4 酵素活性の測定

*Micrococcus lysodeikticus*の乾燥菌体の懸濁液 (170 $\mu\text{g}/\text{ml}$, pH 6.2 50 mM リン酸緩衝液) 1.9 ml に100 μl のリゾチーム溶液を加えて、溶菌した後、反応液の濁度を660 nm で測定した。

2.5 抗菌性の測定

供試菌をBHI 培地に接種し、37°Cで一晩振とう培養したものを、BHI 培地で1 : 100 に希釈し、さらにA675 の値が1.0になるまで約2時間振とう培養した。これを1 ml とり、4,000 rpm で10分間遠心分離し、上澄を除去した。細菌のペレットを0.65% ペプトン 培地 (pH 7.4) 中にA675 の値が0.002になるように懸濁した。1 mlの細菌懸濁液とペプトン培地に溶解した1 ml のリゾチーム溶液とを混合した。なお、最終リゾチーム濃度は200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ となるようにし、NaCl およびグリシンもリゾチーム溶液中に所定の濃度になるように溶解した。この混合液を30°Cで24時間培養し、その30 μl あるいは0.85%で希釈したものを寒天 プレート培地に添加した。コロニー形成単位 (CFU) は37°Cで14時間培養した寒天プレートのコロニー数から算出した。実験はトリプレットで行い、結果は1 ml当たりのCFU \pm SE (標準誤差) で表示した。

3. 結果および考察

3.1 リゾチームの抗菌作用に及ぼす加熱の影響

リゾチームの抗菌性、酵素活性および溶解度に及ぼす加熱の影響をFig. 1に示した。リゾチームの抗菌性に及ぼす加熱pHの影響を調べたところ、pH6および7で加熱した時に *E. coli* に対して高い殺菌作用を示した (Fig. 1A)。未加熱リゾチームはグラム陰性菌である *E. coli* に対して殺菌作用を示さないので、加熱によって *E. coli* に対する殺菌性が発現したものと考えられた。リゾチーム溶液 (0.1%, pH 6.0)を95°Cまで温度を変えて加熱すると、酵素活性 (溶菌活性) は80°Cでおよそ50%に低下したが、この温度では溶解度の低下は認められなかった (Fig. 1B)。リゾチームは加熱温度にかかわらずグラム陽性菌 *S. aureus* に対して殺菌作用を示した。 *E. coli* に対しては50°Cまでは殺菌性がないが、リゾチームを80°Cで加熱すると高い殺菌作用を示した (Fig. 1C矢印)。このように、リゾチームを加熱により部分変性させると、グラム陰性菌に対しても殺菌性を示すようになることが明らかになった。また、この抗菌活性は酵素活性にかかわらず発現するものと考え、これをHLz/80 呼び、以後の実験に供した。

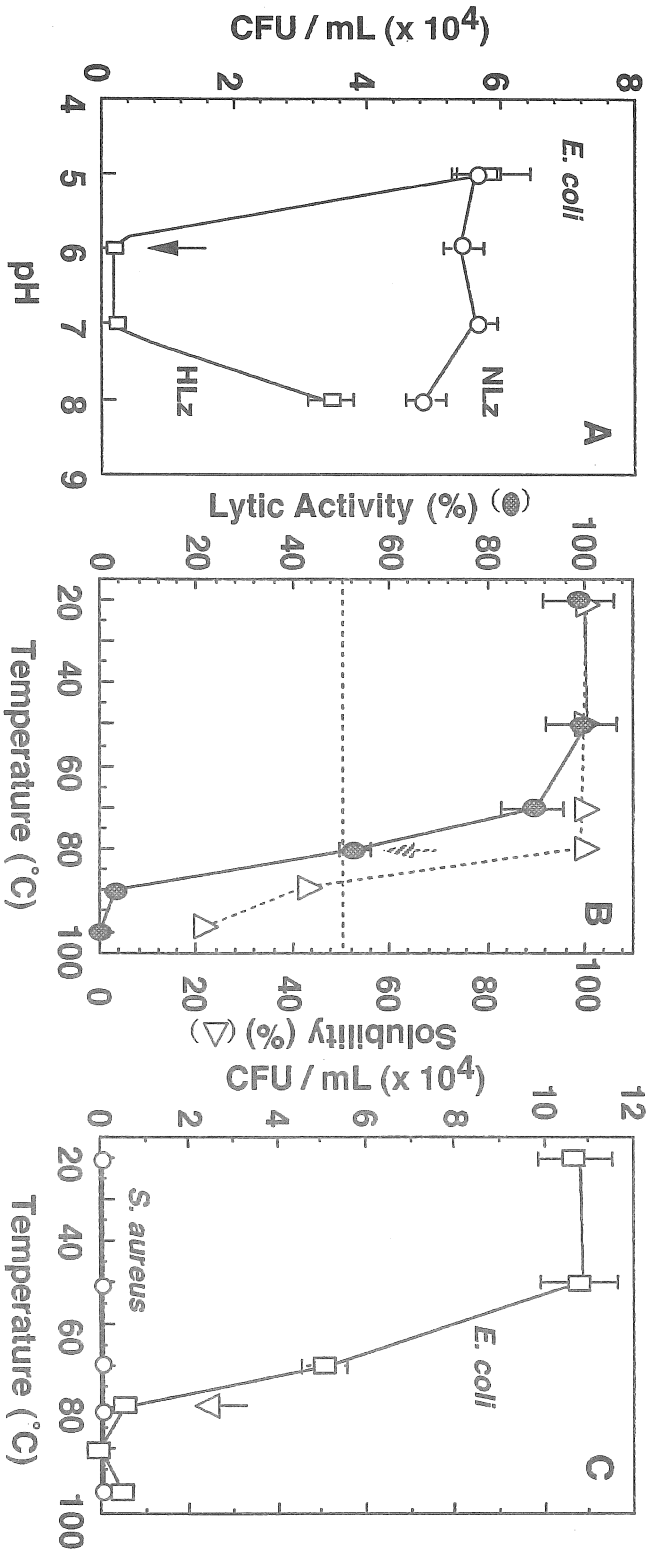


Fig. 1. Heating pH effect on anti-*E. coli* activity (A), and heating temperature dependence of enzymatic activity, protein solubility (B) and anti *Staphylococcal* and anti *E. coli* activity (C) of Lysozyme. (A) Lysozyme was heated at 80°C for 20 min at different pH before testing the antimicrobial activity against *E. coli* K12 for 1 h at 37°C. NLZ and HLZ represent native and heated Lysozyme, respectively. (B) Loss of enzyme activity against *E. coli* (dark circle) and protein solubility (open triangle) retaining high solubility and appreciable enzymatic activity (stippled arrow). (C) Antimicrobial activity against *S. aureus* and *E. coli* K12 of Lysozyme as a function of heating temperature at pH 6.0 for 20 min. Arrows indicate the optimal heating pH (black arrow) and heating temperature in terms of producing the most potent dual bactericidal lysozyme (open arrow) retaining high solubility and appreciable enzymatic activity (stippled arrow). CFU, colony forming units determined on nutrient agar plates. Lysozyme obtained under heating conditions indicated by arrows (80°C / pH 6.0 for 20 min) was selected as the most promising antimicrobial derivatives and thus referred to as HLz80/6 in the following experiments.

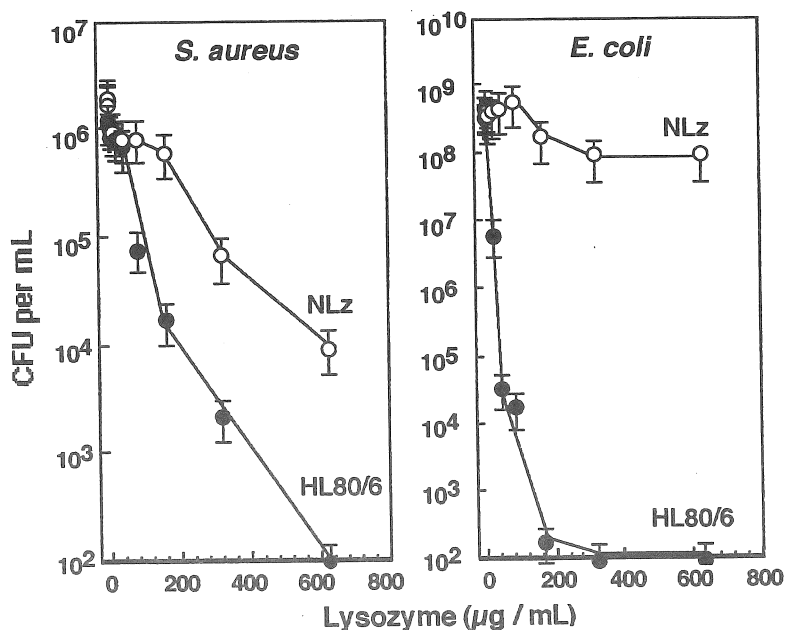


Fig. 2. Effect of HLz80/6 concentration on viability of Gram-positive *S. aureus* (left panel) and Gram-negative *E. coli* k12 (right panel). Bacteria were incubated with the indicated concentration of native (NLz) or the partially unfolded (HLz80/6) lysozyme for 1 h at 35°C in buffered peptone broth (pH 7.4). CFU values were obtained on nutrient agar plates after incubation of the plates for 24 h at 37°C.

S. aureus および *E. coli* に対する抗菌性に及ぼすHLz/80 濃度の影響の結果を Fig. 2に示した。グラム陰性菌 *S. aureus* に対する殺菌作用もHLz/80 の方が未変性リゾチーム (NLz) より強いことを示し、600 μg/mlのHLz/80 で *S. aureus* を殺菌した。グラム陰性菌 *E. coli* に対しては200 μg/mlのHLz/80 で殺菌した。

Table I. Antimicrobial Activity of Native and HL80/6 Lysozymes against Different Bacterial Strains.

Bacteria	NLz (%)			HL80/6 (%)		
	0.125	0.25	0.5	0.125	0.25	0.5
Gram-Positive (CFU / mL)						
<i>Staphylococcus aureus</i>	300	200	< 20	< 20	< 20	< 20
<i>Bacillus cereus</i>	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20
<i>Bacillus subtilis</i>	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20
Gram-Negative (CFU / mL)						
<i>Escherichia coli</i>	>10 ⁷	>10 ⁷	>10 ⁷	10 ³	10 ²	< 20
<i>Salmonella enteritidis</i>	>10 ⁷	>10 ⁷	>10 ⁷	10 ⁴	500	< 20
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10 ⁵	10 ⁴	10 ⁴	10 ⁴	10 ³	10 ²

Initial CFU : 10⁷ CFU / mL

Incubation: 35°C, 2 h

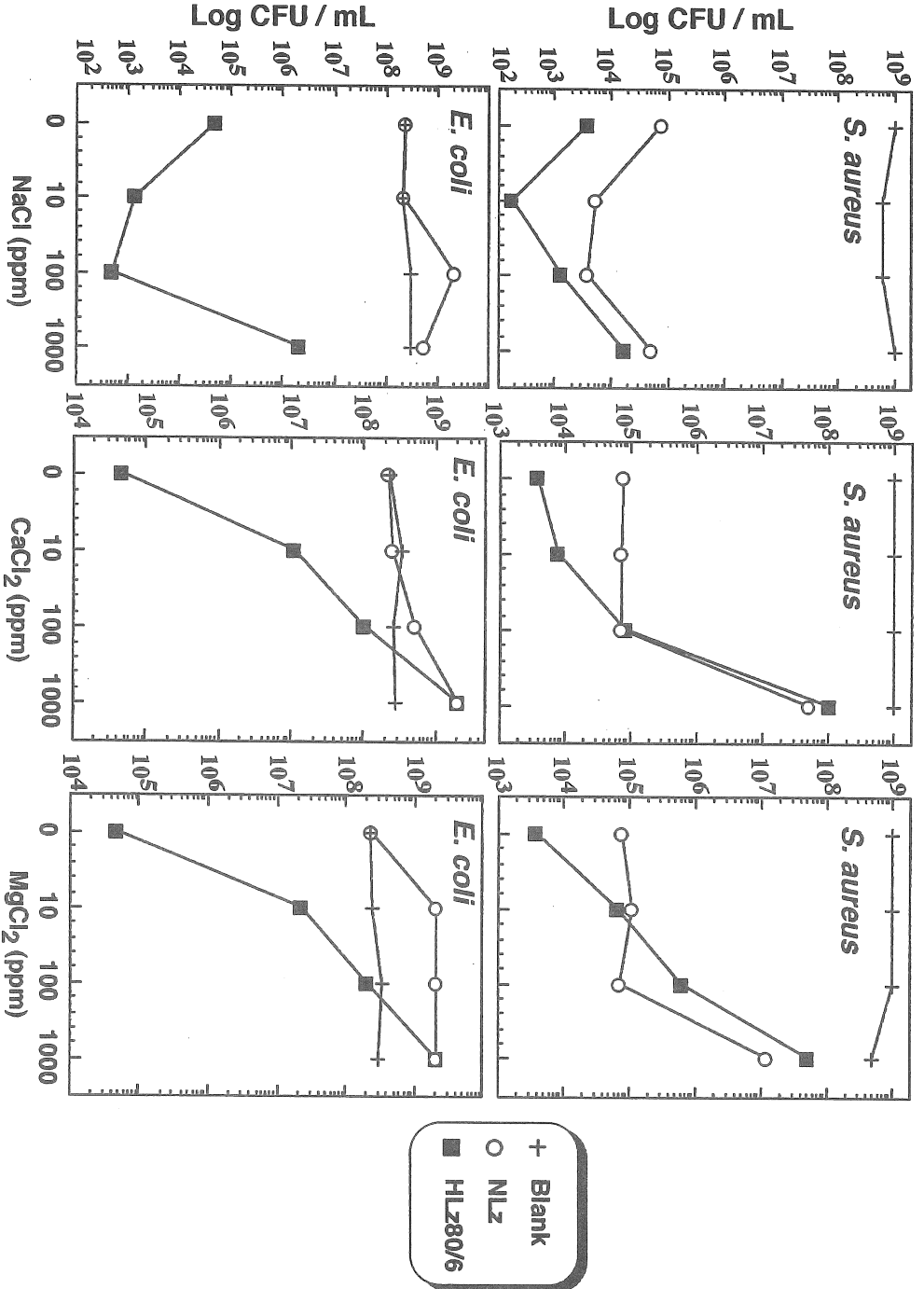


Fig. 3. Effect of different salts on the antimicrobial activity of HL-280/6. Antimicrobial activity of HL-280/6 and NLZ was assayed with NaCl (left panels), CaCl₂ (middle panels), and MgCl₂ (right panels) against *S. aureus* (upper panels) and *E. coli* (bottom panels). Bacteria was incubated in buffered peptone broth (pH7.4) containing various concentrations of the respective salt, with 200 µg / mL NLZ or HL-280/6 at 35°C for 24 h.

3.2 部分変性リゾチームの抗菌性に及ぼすNaClおよびグリシンの影響

この部分変性リゾチームの抗菌性を他のグラム陽性および陰性菌を使って調べ、その結果をTable 1 に示した。グラム陽性菌 *S. aureus*、*Bacillus cereus* および *Bacillus subtilis* に対してはNLz およびHLz/80ともに強い殺菌作用を示したが、NLz はグラム陰性菌 *E. coli* および *Salmonella enteritidis* に対しては殺菌作用を示さなかった。しかし、NLzも *Pseudomonas aeruginosa* に対しては弱い殺菌性を示した。HLz80/6 はこれら3種のグラム陰性菌に対して殺菌作用を示したが、その能力は *Pseudomonas aeruginosa* でやや劣り、菌種による若干の差異が見られた。

S. aureus および *E. coli* に対するHLz80/6 の抗菌作用に及ぼす塩の影響を3種の塩NaCl、CaCl₂ およびMgCl₂を用いて調べた。NaClは *S. aureus* に対しては10 ppmまでの添加で、*E. coli* に対しては100 ppmまでの添加で殺菌作用をやや高めたが、1000 ppm (0.1%) の添加では殺菌作用を阻害した (Fig. 3)。CaCl₂ およびMgCl₂ 添加の影響は、NaCl添加の影響より顕著であった。*B. subtilis* および *Pseudomonas aeruginosa* に対するNLz およびHLz80/6 の抗菌性に及ぼす影響は1%までのNaCl 添加ではなかったが、*B. cereus* に対しては1%のNaCl 添加で明らかに阻害効果があった (Fig. 4)。また、*Salmonella enteritidis* に対しては0.1%のNaCl添加でHLz80/6 の殺菌作用が阻害された。

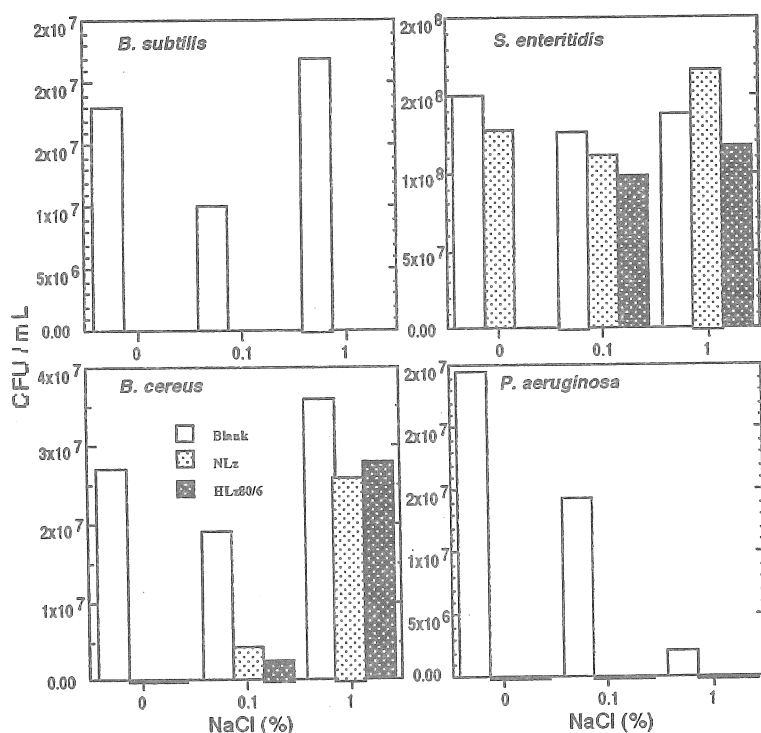


Fig. 4. Effect of increasing NaCl concentration on the antimicrobial activity of HLz80/6 and NLz against two different strains, *Bacillus subtilis* and *Bacillus cereus* of Gram-positive (left panels) and two different strains, *Salmonella enteritidis* and *Pseudomonas aeruginosa* of Gram-negative (right panels) bacteria. Bacteria were incubated with 200 µg / mL protein at 35°C for 24 h in buffered peptone broth (pH 7.4) containing the indicated NaCl concentration.

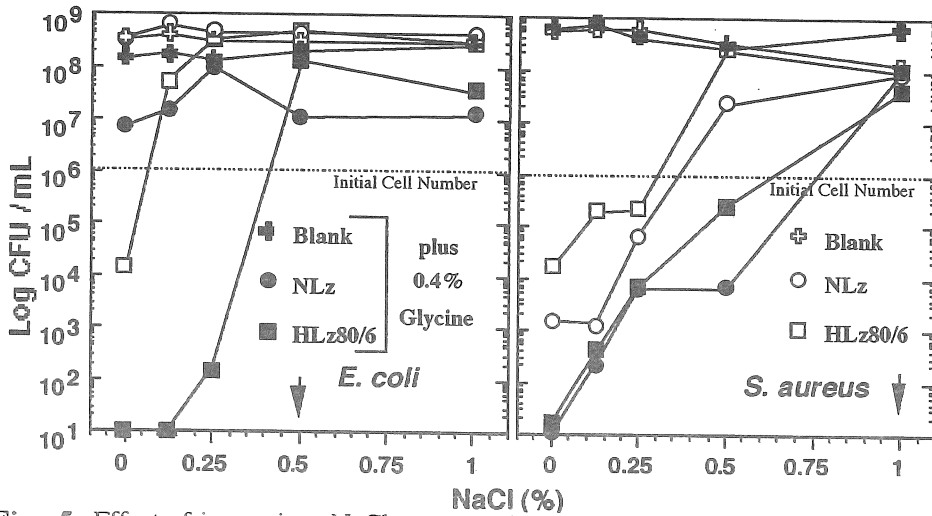


Fig. 5. Effect of increasing NaCl concentration on the antimicrobial activity of HLz80/6 and NLz and synergy with glycine against *S. aureus* (right) and *E. coli* (left). Bacteria were incubated with 200 μ g/mL protein at 35°C for 24 h in buffered peptone broth (pH 7.4) containing different NaCl concentrations alone (open symbols) or with fixed concentration (0.4 %) of glycine (closed symbols). Arrows indicate NaCl concentration at which bactericidal effect of HLz80/6 was abolished.

HLz80/6 の抗菌作用に対してNaClの阻害効果が見られたので、グリシン併用の影響を調べた。0.4% グリシン共存下で*S. aureus* および*E. coli* に対するNLz およびHLz80/6 の抗菌性に及ぼすNaClの影響を調べると、*S. aureus* に対しては1% NaCl で、*E. coli* に対しては0.5% NaCl でも殺菌効果が認められた (Fig. 5 矢印)。さらに、NaCl 未添加および1% 添加区を用いて、グリシン濃度の影響を調べた。Fig. 6に示すように、1%NaClが存在すると、*S. aureus* に対してNLz、HLz80/6ともに抗菌性を示さないが、1.6%のグリシン添加でHLz80/6の殺菌作用が認められた。また、*E. coli* に対しては、0.5% NaCl が存在すると、HLz80/6も抗菌性を示さないが、0.1%以上のグリシン添加で殺菌作用が認められるようになった (Fig. 7)。このように、グリシンが共存すると、より高いNaCl 濃度でもリゾチームが抗菌効果を示すことが明らかになった。

3.3 部分変性リゾチームの抗菌性に対するNaClの作用機構

本研究により得られた結果を基に、部分変性リゾチームの抗菌性に対するNaClの作用機構をFig. 8 に模式化した。部分変性したリゾチームは分子のフレキシビリティとプラスチャージが増大しており、さらに表面疎水性も未変性のその約10倍高くなっている。その結果、部分変性リゾチームと細菌細胞膜との間の疎水性相互作用が大きくなり、NaCl の阻害効果に打ち勝つものと考えられる。この耐塩効果は未変性リゾチームでは起きないであろう。

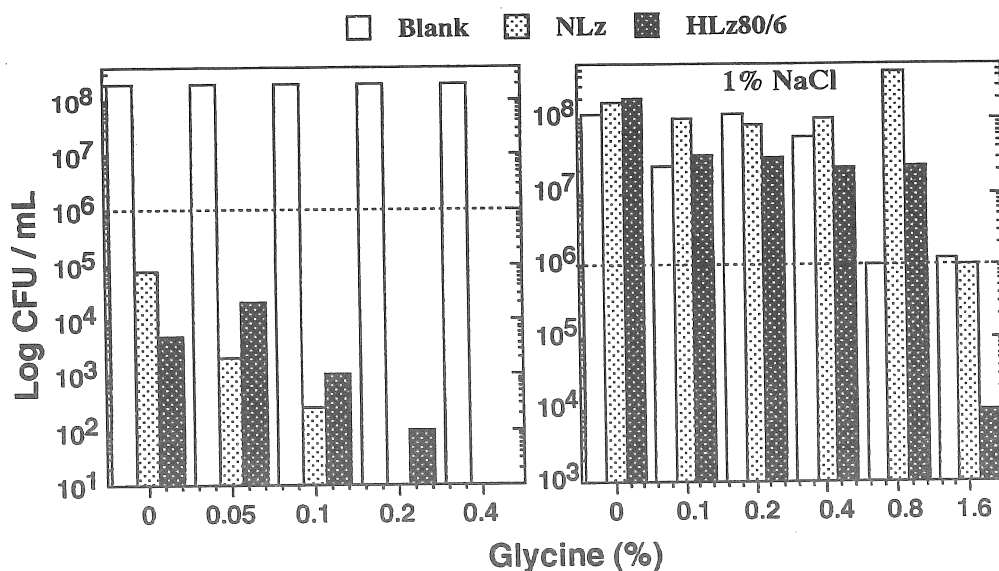


Fig. 6. Antimicrobial synergism of glycine with HLz80/6 against *S. aureus* in overcoming the inhibitory effect of salt. Bacteria were incubated with 200 μg / mL protein at 35°C for 24 h in buffered peptone broth (pH 7.4) containing the indicated glycine concentration in the absence (left) or presence (right) of 1 % NaCl. Horizontal dashed line indicate the initial viability.

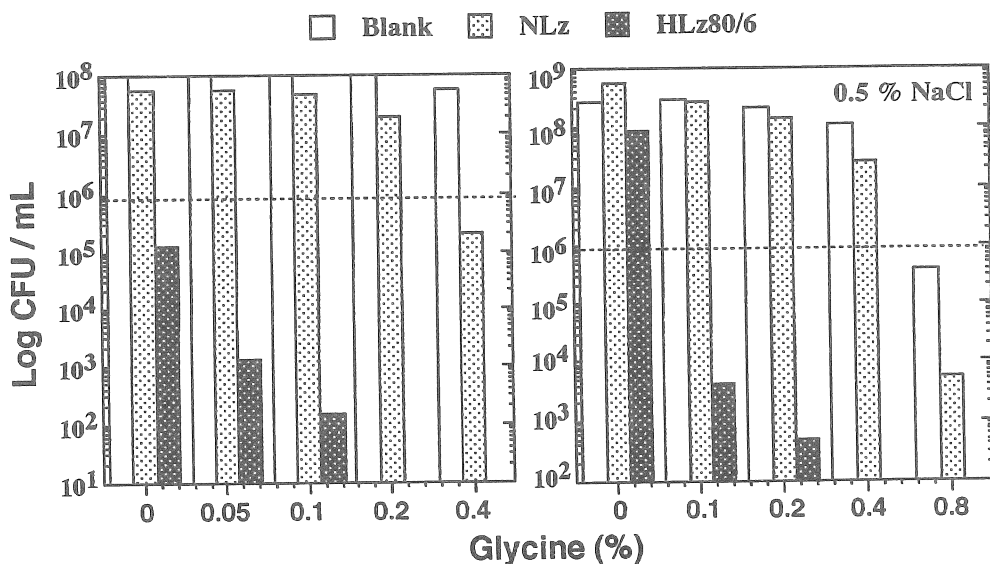


Fig. 7. Antimicrobial synergism of glycine with HLz80/6 against *E. coli* in overcoming the inhibitory effect of salt. Bacteria were incubated with 200 μg / mL protein at 35°C for 24 h in buffered peptone broth (pH 7.4) containing the indicated glycine concentration in the absence (left) or presence (right) of 0.5 % NaCl. Horizontal dashed line indicate the initial viability.

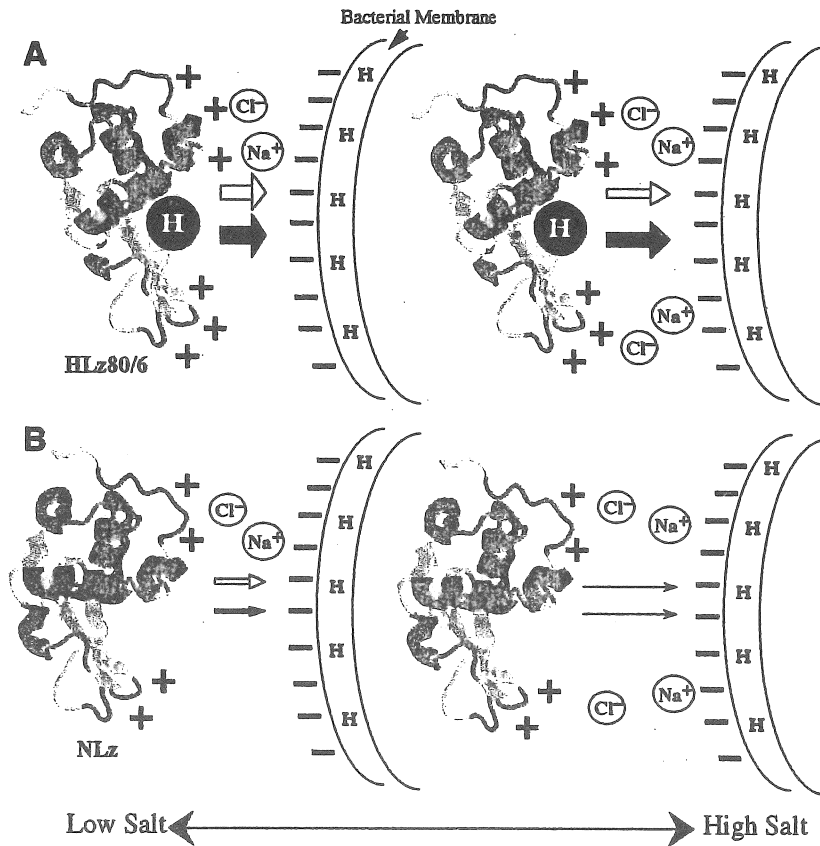


Fig. 8. Schematic representation of how the partial unfolding circumvent the inhibitory effect of salt on the antimicrobial action of lysozyme. The symbols + and - denote the positive and negative charge, respectively. H indicate the hydrophobic region of either unfolded lysozyme, HLz80/6 (dotted dark ball) or the lipid bilayer membranes. Cl⁻ and Na⁺ represents salt ions. Black and white arrows denote the hydrophobic and electrostatic interactions, respectively. The strength of interactions between lysozyme and bacterial surface are indicated by the thickness of the arrow. The partially unfolded lysozyme (HLz80/6) has high molecular flexibility with increased net positive charges and showed 10-fold increase in surface hydrophobicity (Ibrahim et al., 1996 a & b). The increased hydrophobicity and positive charges of HLz80/6 overcome the repression effect of salt ions by indirectly enhancing hydrophobic interaction between the molecule and lipid bilayer. This salt tolerance will not occur with the native lysozyme (NLz).

4. 今後の課題

部分変性リゾチームが食塩存在下でもグラム陽性菌だけでなく、グラム陰性菌に対しても抗菌性を示すことが明らかになった。しかし、実際の食品、特に高塩濃度の食品に適用する場合には注意が必要であろう。また、部分変性リゾチームの抗菌性に対する食塩の阻害効果を少なくするために、食塩添加前にリゾチームを添加する食品加工法を用いるのが有効となるかも知れないが、これらに点については実際に試験してみる必要がある。

5. 文献

- 1) Akashi, A. (1969). Preservative effect of egg white lysozyme added to cooked sausage. *J. Zootech. Sci.*, 40, 243-248.
- 2) Carini, S., Mucchetti, G. and Neviani, E. (1985). Lysozyme: activity against clostridia and use in cheese production- a review. *Microbiol. Alimen. Nutr.*, 3, 299-320.
- 3) Hughey, V. L. and Johnson, E. A. (1987). Antimicrobial activity of lysozyme against bacteria involved in food spoilage and food-borne disease. *Appl. Environ. Microbiol.*, 53, 2165-2170.
- 4) Proctor, V. A. and Cunningham, F. E. (1988). The chemistry of lysozyme and its use as a food preservative and pharmaceutical. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 26, 359-395. .
- 5) Ibrahim, H. R., Hatta, H., Fujiki, M., Kim, M. and Yamamoto, T. (1994a). Enhanced antimicrobial action of lysozyme against Gram-negative and Gram-positive bacteria due to modification with perillaldehyde. *J. Agric. Food Chem.*, 42, 1813-1817.
- 6) Ibrahim, H. R., Yamada, M., Kobayashi, K. and Kato, A. (1992). Bactericidal action of lysozyme against Gram-negative bacteria due to insertion of a hydrophobic pentapeptide into its C-terminus. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 56, 1361-1363.
- 7) Ibrahim, H. R., Yamada, M., Matsushita, K., Kobayashi, K. and Kato, A. (1994b). Enhanced bactericidal action of lysozyme to *Escherichia coli* by inserting a hydrophobic pentapeptide into its C terminus. *J. Biol. Chem.*, 269, 5059-5063.
- 8) Ibrahim, H. R., Higashiguchi, S., Juneja, L. R., Kim, M. and Yamamoto, T. (1996a). A structural phase of heat-denatured lysozyme with novel antimicrobial action. *J. Agric. Food Chem.*, 44, 1416-1423.
- 9) Ibrahim, H. R., Higashiguchi, S., Koketsu, M., Juneja, L. R., Kim, M., Yamamoto, T., Sugimoto, Y. and Aoki, T. (1996b). Partially unfolded lysozyme at neutral pH agglutinates and kills Gram-negative and Gram-positive bacteria through membrane damage mechanism. *J. Agric. Food Chem.*, 44 (12), 3799-3806.
- 10) Miller, G. L. (1959). Protein determination for large numbers of samples. *Anal. Chem.*, 31, 964.

Effect of Sodium Chloride on The Antimicrobial Activity of The Partially Unfolded Lysozyme

Supported Researcher: Hisham R. Ibrahim
Co-researcher: Inoue Yoichi
(Kagoshima University, Faculty of Agriculture)

Summary

There is a great interest among consumers in using natural antimicrobial systems for assuring food safety against undesirable microorganisms. These demands encourages exploitation of naturally occurring antimicrobials. Hen egg-white lysozyme is a good candidate to control pathogenic bacteria. However, the limited antimicrobial activity of lysozyme to certain Gram-positive bacteria restricts its implication in formulated food and drug systems. We have attempted several protein modification and genetic engineering approaches to render lysozyme active in killing Gram-negative bacteria. Recently, we found that the controlled thermal denaturation converts lysozyme into a potent bactericidal molecule against Gram-negative and -positive bacteria, regardless of its residual enzymatic activity. The most potent bactericidal lysozyme was produced by heating at 80°C for 20 min at pH 6.0 (HLz80/6) retaining 54 % of the enzyme activity. The antimicrobial mechanism of HLz80/6 was found to operate through enhanced interaction to the bacterial membranes and subsequent permeabilization.

The present study was undertaken to determine the effect of NaCl, a frequent food ingredient regarded as antimicrobial inhibitor to lysozyme action, on the novel bactericidal activity of HLz80/6 and to verify possible antimicrobial synergism with glycine. HLz80/6 showed remarkably stronger bactericidal activity than the native (NLz) lysozyme against both Gram-positive *S. aureus* and Gram-negative *E. coli* at any salt (NaCl, CaCl₂, and MgCl₂) concentration up to 0.1 %, suggesting its potential use in food and drug systems which requires moderate ionic balance. A similar promising trend was observed by testing the bactericidal effect of HLz80/6 against other bacterial strains such as *Salmonella enteritidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, and *Bacillus cereus*. Addition of 0.5 % and 0.1 % NaCl concentration suppressed the bactericidal activity of HLz80/6 against *S. aureus* and *E. coli*, respectively. However, glycine at 0.4 % concentration exhibited good antimicrobial synergy with HLz80/6 and thus shifted the suppressive dose of NaCl to 1 % and 0.5 % against *S. aureus* and *E. coli*, respectively. Further increase in glycine concentration up to 1.6 % favorably synergized with HLz80/6, but not NLz, against both strains even in the presence of the inhibitory high doses of NaCl, suggesting a greater opportunity for application of HL80/6 with glycine in formulated food systems. Thus, the results introduce an interesting finding that partial denaturation of lysozyme can induce its antimicrobial specificity to include the food-borne Gram-negative pathogens and heralded fascinating opportunities for application of HL80/6 with glycine in formulated food systems. Considering the defects in flavor and taste caused by the addition of potentiator like glycine, HL80/6 greatly reduced the minimal bacteriostatic concentration of glycine, while glycine potentiated the bactericidal action of HL80/6 to circumvent the inhibitory effects of salt.