

# 殺菌タンパク質 HE2β1 を用いた薬剤耐性菌の 殺菌技術の開発

## *Development of Disinfection Method against Drug-Resistant Bacteria Using the Antimicrobial Protein; HE2β1*

井川 聡\* 深田 尚\*\*  
Satoshi Ikawa Takashi Fukada

(2009年6月19日 受理)

*Pseudomonas aeruginosa*, a Gram-negative bacterium, is known to be resistant to widely various bactericidal agents. Recently, antimicrobial protein HE2β1 from human epididymis, with a plasma membrane disrupting effect, was reported as an effective bactericide against *Escherichia coli*. In this study, the HE2β1 gene was cloned from human genome DNA and recombinant HE2β1 protein was expressed by *E. coli*. Purified HE2β1 showed strong antibacterial activity, especially against *P. aeruginosa*. Bactericidal activity of HE2β1 was unaffected by NaCl addition (up to 300 mM) and the buffer pH (6.5–9.0). Activity of HE2β1 was maintained completely after boiling treatment, suggesting high thermal stability of HE2β1. Although HE2β1 also showed high stability against detergent (SDS) and a reductant (2-mercaptoethanol), Proteinase K addition completely inactivated HE2β1. These results suggest that HE2β1 is an effective bactericide against *P. aeruginosa* in various environments.

**Key words:** bactericide, antimicrobial protein, HE2β1, *Pseudomonas aeruginosa*, multi-drug resistance

### 1. はじめに

昨今の清潔志向の高まりを受けて身の回りには数多くの抗菌製品があふれ、住環境での微生物汚染のリスクは低減している。しかしその一方で、食品加工、工業生産、医療などの現場では微生物汚染の問題は依然として存在している。特に薬剤耐性菌は医療現場において院内感染などの重大な結果を引き起こすこともあり、薬剤耐性菌の殺菌は重要な課題である。

緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) は細胞壁に薬剤排出ポンプと呼ばれるタンパク質を持ち、有害な殺菌剤などを積極的に細胞外に排出することで薬剤に対して耐性を示すことが知られている<sup>1)</sup>。この排出ポンプの働きが特に強く、ほとんどの殺菌剤が効かない状態に

なったものを多剤耐性緑膿菌と呼び、院内感染による死亡事故の原因となることがある。

多剤耐性菌を殺菌するには、従来の殺菌剤とは異なる作用機構を持つ新たな殺菌剤の開発が必要である。本研究ではこのような新規殺菌剤として、ヒト由来の殺菌タンパク質 HE2(Human Epididymis specific protein 2) の一種である HE2β1 に注目した。HE2β1 は大腸菌 (*Escherichia coli*) に対して強い殺菌力を示す一方で、哺乳動物細胞に対しては毒性を示さないことが報告されている<sup>2,3)</sup>。また、HE2β1 は Fig. 1 に示すように、従来の殺菌剤や抗生物質のように細胞内部で作用するのではなく、細胞壁や細胞膜を破壊することで殺菌すると考えられている<sup>2-4)</sup>。そのため、排出ポンプの影響を受けることなく多剤耐性菌に対しても殺菌力を示すことが期待される。しかしながら、HE2β1 はヒト由来であり、大量の HE2β1 を準備することは難しい。

\* 化学環境部 環境・エネルギー・バイオ系

\*\* 大阪府立大学大学院 生命環境科学研究科

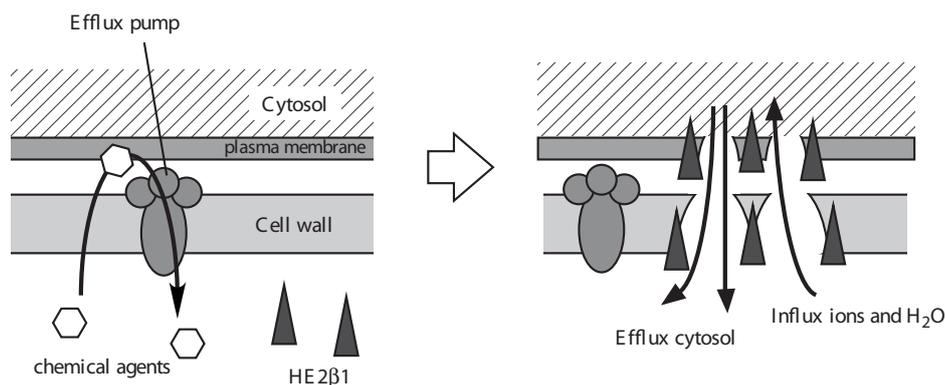


Fig. 1 Scheme for the mode of action of HE2β1.

そこで、本研究ではまず、HE2β1の遺伝子をクローニングして組み換えタンパク質発現系を構築し、HE2β1を大量に生産する技術の開発を行った。ついで、得られたHE2β1の殺菌活性や安定性などを詳細に調べることで、HE2β1の諸性質を解明し、実用化の検討を行った。

## 2. 実験方法

### 2.1 HE2β1遺伝子のクローニングと発現系の作製

ヒト培養細胞(MDA細胞)からゲノムDNAを抽出し、HE2β1の遺伝子断片をPCRによって増幅した。得られたDNA断片をクローニングベクター(pT7Blue-T)にそれぞれ組み込むことでHE2β1遺伝子全長をクローニングし、さらに大腸菌用の発現ベクター(pRSET-B)に組み込んで組換えHE2β1発現プラスミドを構築した。この組み替えHE2β1タンパク質は、精製の際に利用するためにN末端側に6xHisのアフィニティタグを持った状態で発現される。構築した発現プラスミドを大腸菌BL21(DE3)に導入して組換えタンパク質を生産させた。

### 2.2 組み替え大腸菌によるHE2β1の発現と精製

作製した組み替えHE2β1発現大腸菌を100 μg/mlのアンピシリンを含む100 mlの2xYT培地に植菌して30°Cで16時間振盪培養することで、HE2β1を不溶性のタンパク質封入体(inclusion body)として大量に発現させた。培養液を遠心分離(3,500 x g, 5 min, 4°C)にかけて培養上清を取り除き、得られた菌体を適量量(~10 ml)の滅菌水に懸濁した後、超音波破砕機によって菌体を破壊することで内容を抽出した。これを再度遠心分離(15,000 x g, 10 min, 4°C)して、inclusion bodyを含む沈殿物を回収した。

不溶性のinclusion bodyは6 M グアニジン塩酸塩で可溶化させ、6 x His タグを持つHE2β1だけをNi-NTA

agarose カラムに吸着させることで精製した。カラムは8 M 尿素を含むリン酸バッファー(pH 6.3)で洗浄したのち、吸着しているHE2β1を8 M 尿素を含むリン酸バッファー(pH 3.5)でカラムから溶出させた。

溶出されたHE2β1は、段階的に変性剤の濃度を低下させていく多段階透析法<sup>5)</sup>によって、最終的に20 mM リン酸バッファー(pH 7.4)に対して透析したものを精製HE2β1溶液とした。HE2β1は4°Cで保存した。

### 2.3 精製HE2β1の殺菌活性測定

精製されたHE2β1の殺菌活性を*E. coli*、*P. aeruginosa*、*Pseudomonas putida*の3種類の細菌を用いて調べた。それぞれの菌を $7 \times 10^6$  CFU(Colony Forming Unit)/mlの濃度で含むリン酸バッファー(pH 7.4)に様々な濃度のHE2β1を加えて、37°Cで1時間処理した。菌液を100倍、1000倍および10000倍に希釈し、それぞれの希釈液100 μlをLB寒天培地に塗布して30°Cで培養した。18時間の培養後、生育したコロニー数をカウントし、生菌数を求めた。本研究における検出限界は $10^3$  CFU/mlである。

さらに、様々な塩濃度やpHにおけるHE2β1の*P. aeruginosa*に対する殺菌活性を測定した。塩濃度は50 ~ 300 mMとなるようにNaClを反応液に加えて、100 ng/mlのHE2β1存在下で同様の殺菌実験を処理時間30分に変更して行った。また、使用するリン酸バッファーのpHを6.5 ~ 9.0に調製して、殺菌実験を行った。処理時間は30分とした。

### 2.4 HE2β1の安定性の解析

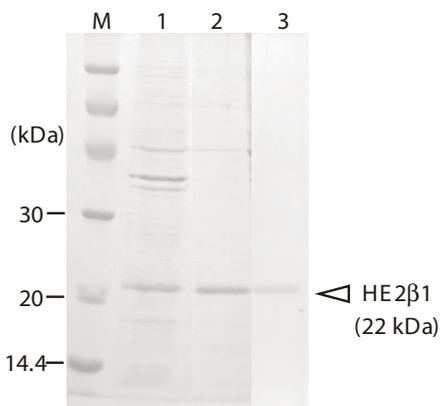
HE2β1の熱安定性を調べるために、精製HE2β1を100°Cで10分間処理したサンプルと、-30°Cで急速に凍結させた後、室温で解凍する操作を2回繰り返したサンプルを調製した。これらを160 ng/mlとなるように菌液に加えて殺菌試験を行った。

HE2β1の界面活性剤に対する安定性を評価するためにドデシル硫酸ナトリウム(SDS)を含む、タンパ

ク質変性用試薬 (SDS サンプルバッファー：4% SDS, 2-mercaptoethanol, 40 mM Tris-HCl (pH 6.8)) を用いた。20 µg/ml の HE2β1 と SDS サンプルバッファーを 2:1 で混合し、5 分間煮沸処理 (SDS 化) を行った後、HE2β1 が 100 ng/ml となるように *P. aeruginosa* の懸濁液 (pH 7.4) に加えて殺菌活性を測定した。また、タンパク質分解酵素 (プロテアーゼ) に対する安定性を調べるために、HE2β1 と 10 mg/ml の Proteinase K(ProK) を 2:1 で混合し、37°C で 4 時間処理した。これを SDS 化処理した後に殺菌活性を測定した。これらの実験のコントロールとして、HE2β1 を含まないバッファーと SDS サンプルバッファーを同様の割合で混合したものをを用いた。

### 3. 結果と考察

本研究で作製した組換え大腸菌を培養した結果、Fig. 2 の Lane 1 に示すように、HE2β1 の大量発現に成功していることが確認された。これにより、これまで大量に調製することはきわめて困難であった HE2β1 を容易に生産することが可能となった。作製した組換え大腸菌では、HE2β1 は不溶性の凝集体として得られるため (Fig. 2 Lane 2)、変性剤で可溶化してから再度活性化処理を行う必要がある。しかしながら、Ni-NTA カラムから溶出された HE2β1 を通常の透析にかけた場合、変性剤が除去されると共に HE2β1 の 95% 以上が再び不溶化してしまった。また、残りの可溶性 HE2β1 も殺菌力を示さなかった。これは立体構造の復元 (refolding) が正しく行われていないためと考えられた。そこで、段階的に変性剤の濃度を低下させていく多段階透析法によって、緩やかに refolding を行っ

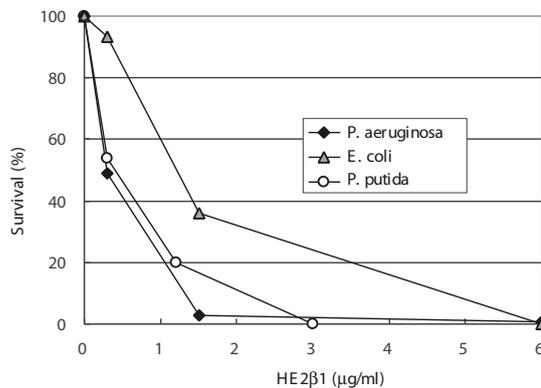


**Fig. 2** SDS-PAGE analysis of HE2β1.  
Lane 1 : Total protein from recombinant *E. coli*,  
Lane 2 : Eluate from Ni-NTA column,  
Lane 3 : Purified HE2β1.

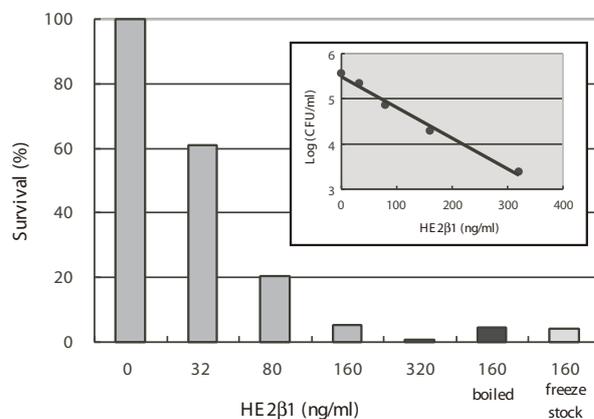
た結果、90% 以上の収率で可溶性の精製 HE2β1 を調製することに成功し、高い殺菌活性も確認された。最終的に得られた精製 HE2β1 は SDS-PAGE で単一のバンドにまで精製されていることを確認した (Fig. 2 Lane 3)。

このようにして得られた HE2β1 を用いて殺菌活性を測定したところ、用いたすべての細菌に対して高い殺菌力を示し、特に *Pseudomonas* 属に対する効果が高いことが明らかとなった (Fig. 3)。比較的薬剤耐性が高いとされる *P. aeruginosa* に対する殺菌活性をより詳細に調べた結果、320 ng/ml の HE2β1 で 99.3% が殺菌されることが分かった (Fig. 4)。これは報告されている *E. coli* に対する殺菌活性 (およそ 20 µg/ml で 99.5% が殺菌<sup>2)</sup>) よりも 60 倍以上高いことになる。これらのことから、HE2β1 は *P. aeruginosa* の殺菌にきわめて有効であると言える。

HE2β1 は塩濃度が高くなると (> 50 mM NaCl) 大腸菌に対する殺菌力が著しく低下することが知られている<sup>2)</sup>。そこで、50 ~ 300 mM NaCl の条件で *P. aeruginosa* に対する殺菌活性を測定したところ、300



**Fig. 3** Bactericidal activity of HE2β1 against *P. aeruginosa*, *E. coli* and *P. putida*.



**Fig. 4** Bactericidal activity of HE2β1 against *P. aeruginosa*.

mM の NaCl でも低下することはなく、むしろ上昇する傾向にあった (Fig. 5)。また、一般的な酵素などはその活性が pH によって大きく変化する場合が多いため、pH の異なるリン酸バッファーを用いて殺菌活性を測定した。その結果、HE2β1 は緑膿菌が増殖可能な条件である pH 6.5 ~ 9.0 の範囲で、ほぼ同等の殺菌活性を保持していた (Fig. 6)。

実際に HE2β1 を殺菌剤として使用する際には、さまざまな環境での安定性が求められる。そこで、HE2β1 の物理的および化学的な安定性について検討を行った。

多くのタンパク質は加熱や凍結によってその活性を失う (失活する) 性質がある。しかしながら、HE2β1 は 100°C、10 分間の加熱処理や繰り返しの凍結融解によっても殺菌活性がほとんど変化しなかった (Fig. 4 boiled, freeze stock)。このことは、HE2β1 が極めて高い熱安定性を持つことを意味している。

次いで、HE2β1 の界面活性剤に対する安定性評価を行った。実験にはタンパク質の変性に用いる SDS サンプルバッファーを用い、5 分間の煮沸による SDS 処理を行った。通常のタンパク質であれば、立体構造が壊れて完全に失活する条件であるにもかかわらず、HE2β1 の *P. aeruginosa* に対する殺菌活性は処理前と比較して 1000 倍以上に高くなっていった (Fig. 7)。SDS サンプルバッファーだけを加えたコントロール実験では *P. aeruginosa* の生菌数はブランクとほとんど差が無いことから、SDS-HE2β1 の強い殺菌力は SDS や 2-ME と HE2β1 の相乗作用によるものであることが予想される。このことから、HE2β1 は極めて高い SDS 耐性を持つことが明らかとなった。

最後に、HE2β1 のプロテアーゼに対する安定性を、Proteinase K を用いて調べた。ProK を作用させた後に SDS 処理を行った場合、*P. aeruginosa* に対する殺菌活性がほぼ完全に失われることがわかった (Fig. 7)。このことは、ProK によって HE2β1 が分解されていることを示しており、プロテアーゼに対しては耐性を持たないことが明らかとなった。このように、プロテアーゼによって分解を受けるということは、環境中で容易に分解されて無害化されることを示唆しており、残留による環境への影響はきわめて少ないと考えられる。

#### 4. まとめ

HE2β1 は様々な細菌に対して殺菌力を有しており、特に *P. aeruginosa* に対して強い殺菌力を示した。また、

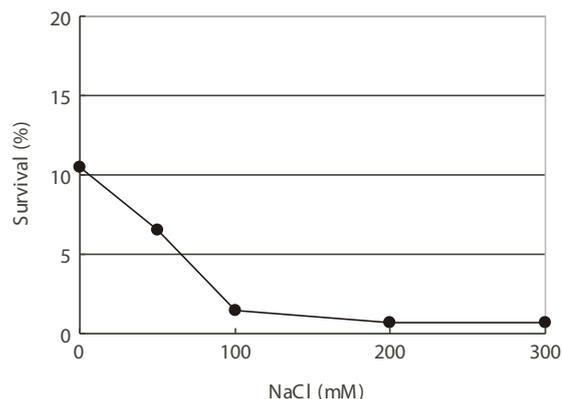


Fig. 5 Effect of NaCl on HE2β1 bactericidal activity against *P. aeruginosa*.

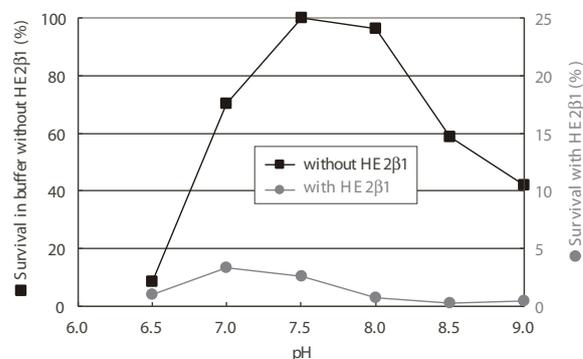


Fig. 6 Effect of pH on HE2β1 bactericidal activity against *P. aeruginosa*.

"Survival with HE2β1" indicates the ratio of survival cells with HE2β1/without HE2β1 at each pH.

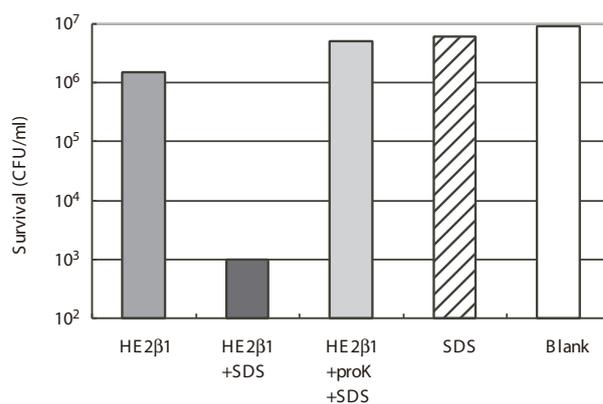


Fig. 7 Bactericidal activity of HE2β1 treated with SDS-sample buffer or Proteinase K.

塩濃度や pH の影響もほとんど受けないことが分かった。HE2β1 は加熱や凍結、界面活性剤の添加等でも殺菌活性が低下することなく、きわめて高い安定性を示した。一方で、タンパク質分解酵素によって容易に

分解されることから、環境中での残留などの心配が無いこともわかった。

このような強い殺菌力と高い安定性、さらに人体や環境への安全性を併せ持つ殺菌タンパク質は他に例が無く、今後、医療現場だけでなく、様々な分野での応用が期待される。

### 謝辞

本研究の一部は科学技術振興機構 (JST) の平成 18 年度シーズ育成試験に採択され、その補助金を受けて行った。この場をお借りして感謝の意を表します。

### 参考文献

- 1) X. Z. LI, H. Nikaido and K. Poole: *Antimicrob. Agents Chemother.*, **39** (1995) 1948.
- 2) S. Yenugu, K. G. Hamil, C. E. Birse, S. M. Ruben, F. S. French and S. H. Hall: *Biochem. J.*, **372** (2003) 473.
- 3) K. G. Hamil, P. Sivashanmugam, R. T. Richardson, G. Grossman, S. M. Ruben, J. L. Mohler, P. Petrusz, M. G. O'Rand, F. S. French and S. H. Hall: *Endocrinology*, **141** (2000) 1245.
- 4) S. Yenugu, K. G. Hamil, F. S. French and S. H. Hall: *Biol. Reprod.*, **71** (2004) 1484.
- 5) K. Tsumoto, M. Umetsu, I. Kumagai, D. Ejima and T. Arakawa: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **312** (2003) 1383.