

2023年度日本食品微生物学会賞受賞総説

植物ポリフェノールの抗菌・抗毒素作用機構に関する研究

Studies on Mechanisms for Antibacterial and Antitoxin Actions
of Plant Polyphenols宮本 敬久[†]

(九州大学大学院農学研究院)

Takahisa MIYAMOTO

Faculty of Agriculture, Kyushu University

はじめに

緑茶に多く含まれるポリフェノールのカテキン類は抗菌作用¹⁻⁷⁾に加え、抗酸化作用⁸⁾、抗がん作用⁹⁾、体脂肪の減少作用¹⁰⁾など多くの機能を有する興味深い天然物質である。カテキン類にはエピ体および非エピ体を含めて8種の主要な成分があり、市販緑茶抽出物 (Green Tea Extracts, GTE) 中に占める各成分の割合 (表1) から分かるように緑茶中に占める割合が最も多いのはエピガロカテキンガレート (EGCG) である。

本研究の開始までにカテキン類の微生物に対する作用については、食中毒細菌に対する静菌および殺菌作用、抗ウイルス作用¹¹⁻¹³⁾ および細菌毒素阻害作用^{14,15)} が報告されていた。抗菌活性はカテキン類の中でエピカテキンガレート (ECG) およびEGCGが高いこと¹⁶⁾、グラム陰性細菌よりもグラム陽性細菌に対して効果が高い傾向にあることが報告されていた¹⁷⁾。また、作用機作としては細菌細胞の細胞膜リン脂質へ結合して膜に損傷を与えること¹⁸⁾ およびカテキン類から発生する過酸化水素の酸化力に基づく殺菌作用^{19, 20)} が推定されていた。しかし、実際に食品に利用可能な条件で行われた抗菌作用についての報告は無く、その作用機構についても不明な点が多く残されていた。

また、我が国における腸管出血性大腸菌 (*Enterohaemorrhagic Escheria coli*, EHEC) 感染者数は、年間約3000~4000人で推移しており、減少傾向はみられない²¹⁾。EHEC感染は消化管障害を引き起こすだけでなく、感染者の3~10%に溶血性尿毒症症候群 (hemolytic uremic syndrome, HUS) や脳症などを併発させ、死に至らしめる可能性がある²²⁾。これら種々の症状を引き起こす主要な病原因子はEHECが感染者の腸管内で産

生する志賀毒素 (Shiga toxin, Stx) である。志賀毒素は1型 (Stx1) と、アミノ酸配列がStx1と55%同一の志賀毒素2型 (Stx2) に大きく分類される²³⁾。また、図1²⁴⁾ に示すようにStxはAB₅型の毒素で28S rRNA N-グリコシダーゼ活性を有するAサブユニットおよび細胞表面のGal α -[1-4]-Gal β [1-4]-Glc-ceramide (Gb3) に結合するBサブユニット5量体から構成されている。図2に示すようにStxのBサブユニット5量体部分が標的細胞表面のGb3に結合し、これによりStxがエンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれる。細胞内でゴルジ体から小胞体へと移行した後、AサブユニットがリボソームにおいてN-グリコシダーゼ活性により28SrRNAの特定部位を脱プリン化してタンパク質合成を阻害する²⁵⁾。EHECが腸管内で産生したStxが血中へと侵入してGb3発現量の多い脳や腎臓に達するとこれらに重篤な障害を起こす。

感染後のEHEC対策としては、EHECの増殖抑制、EHECによるStxの産生抑制または分泌抑制、および産生されたVTの不活化が挙げられる。本感染症の初期治

表1. 緑茶抽出物中に占めるカテキン類の割合

緑茶抽出物中の成分	(%)	
総カテキン類	100	79.2
エピガロカテキンガレート (EGCG)	69.1	
エピカテキンガレート (ECG)	18.9	
ガロカテキンガレート (GCG)	5.0	
エピガロカテキン (EGC)	2.6	
エピカテキン (EC)	2.3	
カテキンガレート (CG)	1.1	
ガロカテキン (GC)	0.6	
カテキン (C)	0.0	
水分		8.0
灰分		2.0
カフェイン		0.2

緑茶抽出物: ポリフェノン70A (三井農林株式会社)

[†]連絡先

☎819-0395 福岡市西区元岡744

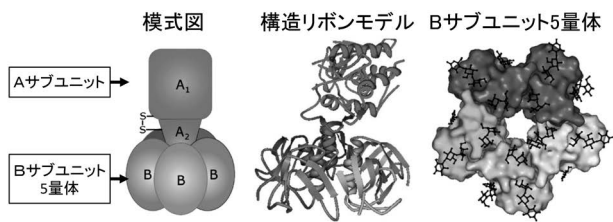


図1. 志賀毒素の構造
参考文献 24) より引用

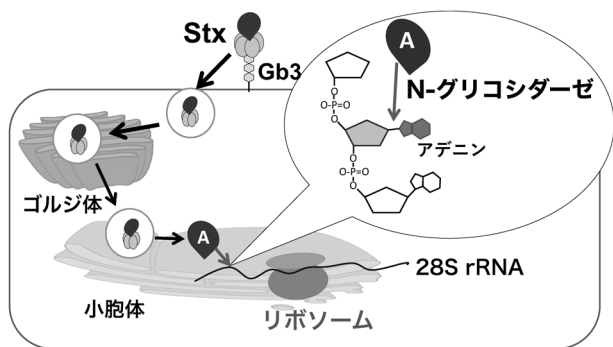


図2. 志賀毒素のタンパク質合成阻害作用機構の概要

療では、抗生物質が使用されているが、EHEC感染中期以降に投与すると抗生物質のストレスによりEHECの溶原化ファージが誘発され、Stx産生および分泌が促進されるため、感染中期以降の抗生物質の投与は好ましくない^{26, 27)}との報告もある。本研究の開始までに、緑茶に含まれるEGCGがStxの活性を阻害する¹⁵⁾こと、ブドウの種子や果皮の抽出物およびリンゴの果汁がStx2の活性を阻害することなどが報告されていた^{28, 29)}。しかしながら、その阻害機構は十分に明らかにされていなかった。

本稿では、これまでに我々の研究で得られたカテキン類の抗菌作用とその機構およびStxの細胞毒性に対するカテキン類の抑制作用と機構についてまとめる。

植物ポリフェノールの抗菌作用機構

カテキン類の抗菌活性

カテキン類は市販の液体培地中では培地成分と沈殿を形成してしまうことから従来のカテキン類の抗菌活性は寒天平板培地を用いて測定されていた。しかし、実際の食品等への応用や抗菌作用の機構解明には、細菌の増殖可能な液体培地中で抗菌作用を調べる必要がある。そこでまず、カテキン類共存下でも沈殿を形成しないように50%濃度となるように調製したLB培地を用いて種々のpHにおいて細菌に対する抗菌スペクトルを調べた³⁰⁾。

緑茶抽出物(Green Tea Extract, GTE)を用いて調べたpH6.5における最小生育阻止濃度(MIC)測定結果を表2に示す³⁰⁾。GTEの抗菌活性はこれまでの報告と同様にグラム陽性菌に対しては高く、グラム陰性菌に対しては全体的に低かった。しかし、グラム陽性菌でもリステリ

表2. 緑茶抽出物のpH6.5における抗菌活性

菌株	MIC (mg/L)
グラム陰性菌	
<i>Burkholderia cepacia</i>	500
<i>Enterobacter cloacae</i>	2000
<i>Escherichia coli</i> O157:H7 (VT1, VT2)	500
<i>Escherichia coli</i> O157:H7 (VT1)	1000
<i>Escherichia coli</i> K12	500
<i>Escherichia coli</i> O157:H- (VT1, VT2)	2000
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	250
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1000
<i>Salmonella</i> Enteritidis	2000
<i>Salmonella</i> Enteritidis $\Delta rpoS$	2000
<i>Salmonella</i> Infantis	2000
<i>Salmonella</i> Typhimurium	2000
<i>Salmonella</i> Typhimurium $\Delta ahpC$	2000
<i>Salmonella</i> Typhimurium $\Delta ahpF$	2000
<i>Salmonella</i> Typhimurium $\Delta katG$	500
<i>Serratia marcescens</i>	>2000
<i>Vibrio alginolyticus</i>	<62.5
<i>Vibrio cholerae</i> non-O1	125
<i>Vibrio cholerae</i>	62.5
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	62.5
<i>Vibrio vulnificus</i>	250
グラム陽性菌	
<i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i>	1000
<i>Bacillus coagulans</i>	250
<i>Bacillus cereus</i>	125
<i>Bacillus subtilis</i>	250
<i>Breviacillus parabrevis</i>	62.5
<i>Enterococcus faecalis</i>	1000
<i>Enterococcus faesium</i>	2000
<i>Levilactobacillus brevis</i>	2000
<i>Lentilactobacillus buchneri</i>	>2000
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	125
<i>Fructilactobacillus fructivorans</i>	>125
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	2000
<i>Lactococcus lactis</i>	500
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	>2000
<i>Listeria monocytogenes</i>	500
<i>Pediococcus acidilactici</i>	2000
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	>2000
<i>Staphylococcus aureus</i>	62.5

アや乳酸菌の一部の菌種は感受性が低く、逆にグラム陰性菌ではビブリオ属細菌の感受性が高かった。抗菌活性がグラム陰性細菌では低い傾向にあった理由の一つとして、中性pHにおいて負に帯電した外膜リポ多糖と同様に負電荷を有するカテキン類が電氣的に反発するなどの理由によりカテキン類が外膜を通過しにくいことが考えられた。グラム陽性菌の中では乳酸菌に対するGTEの抗菌活性は低かったが、これは乳酸菌の有機酸産生能によるpHの低下、菌体表層部の物理化学的性状によりカテキン類が細胞内に侵入しにくいため、あるいはカテキン類から発生する過酸化水素などの活性酸素種を除去する機構が発現していることなどによるものと考えられる。さらに野生株*S. Typhimurium*に対するGTEのMICは2000 mg/Lであったが、菌体表層付近の過酸化

表3 緑茶抽出物の抗菌活性に及ぼすpHの影響

菌株	MIC (mg/L)						
	pH 3	pH 4	pH 5	pH 6	pH 7	pH 8	pH 9
グラム陰性菌							
<i>Burkholderia cepacia</i>	—	>500	>500	>500	500	125	<62.5
<i>Escherichia coli</i> O157:H7 (Stx1 & Stx2)	—	—	2000	2000	500	125	<62.5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	—	—	>1000	>1000	250	250	250
<i>Salmonella</i> Enteritidis	—	—	>2000	2000	500	250	<125
<i>Vibrio cholerae</i> non-O1	—	—	—	250	250	—	125
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	—	—	<7.8	125	63	—	<62.5
グラム陽性菌							
<i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i>	250	1000	500	—	—	—	—
<i>Bacillus cereus</i>	—	—	62.5	125	500	250	125
<i>Bacillus coagulans</i>	—	—	500	250	62.5	62.5	62.5
<i>Bacillus subtilis</i>	—	—	250	500	250	250	125
<i>Lactobacillus brevis</i>	—	2000	2000	2000	>2000	2000	—
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	250	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	—
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	2000	>2000	2000	2000	>2000	>2000	—
<i>Listeria monocytogenes</i>	—	—	62.5	500	500	500	500
<i>Staphylococcus aureus</i>	—	—	500	500	250	125	62.5

物消去に参与するカタラーゼ遺伝子欠損株 $\Delta katG$ では 500 mg/L と有意に低かったことから、細菌の有するカタラーゼ活性の強さもカテキン耐性に関係すると考えられる。カテキン類の抗菌作用にはアルカリ性において産生される過酸化水素の酸化力ならびにカテキン類の細胞質膜リン脂質への結合が関与することが報告されている³¹⁾。種々の pH で培養して GTE の抗菌スペクトルを調べると表3に示すように *S. aureus*, *B. cepacia*, *E. coli* O157:H7 (Stx1, Stx2), *P. aeruginosa* および *S. Enteritidis* に対する GTE の抗菌活性はアルカリ側で高いが、*L. monocytogenes* に対しては酸性側で高く、*L. brevis*, *L. plantarum* および *L. mesenteroides* では pH の影響はほとんど認められなかった³⁰⁾。これは菌種によって増殖最適 pH が異なり、リン脂質の組成、菌体表層成分、および菌体外高分子物質などの種類も異なるためであると思われる。さらに酸性ではガロイル基部分で膜リン脂質への結合による膜損傷¹⁸⁾、アルカリ性ではガリル基が関与して発生する過酸化水素による酸化作用^{19,20)}が関与していると推定される。

また、種々の pH で測定した主要カテキン8成分の MIC を表4に示す³⁰⁾。グラム陰性菌に対しては、どのカテキンも pH5.0, 6.5 では殆ど抗菌効果を示さなかったが、pH8.0 では EGCG および ガロカテキンガレート (GCG), エピガロカテキン (EGC) に抗菌効果が認められた。これは、前述のとおりアルカリ性ではガリル基が関与する過酸化水素産生²⁰⁾が抗菌作用に重要であることを示すものである。また、グラム陽性菌のうち *Bacillus* 属細菌に対しては、酸性ではガロイル基を有する ECG, EGCG, CG, および GCG に抗菌活性が強く、アルカリ性では、ガリル基を有する EGC, EGCG, GC, および GCG の抗菌活性が強い結果となっている。これらの結果も酸性では菌体へのカテキンの吸着³¹⁾が、アルカリ性では過酸化

水素産生²⁰⁾がカテキン類の抗菌活性において重要な役割を果たしていることを示すものである。

細菌菌体に作用したカテキン類の可視化

カテキン類の抗菌作用機構を解明するためにはカテキン類の細菌菌体における局在部位を明らかにする必要がある。カテキン類のうちガリル基を有する EGCG などはアルカリ性で過酸化水素を産生する。セリウムは、過酸化水素と反応 ($3\text{H}_2\text{O}_2 + 2\text{Ce}^{3+} + 6\text{OH}^- \rightarrow 2\text{Ce}(\text{OH})_3\text{OOH} \downarrow + 2\text{H}_2\text{O}$) して凝集物を形成することから植物における過酸化水素の発生部位の可視化に利用されている³²⁾。従って細菌においても過酸化水素を産生するカテキン類の局在部位の観察も可能である。更に、この凝集物はカテキンと反応してより大きな凝集物を生成することを利用し、比濁法により簡便に短時間でカテキンを定量することもできる³³⁾。この原理を応用すると、細菌をカテキン類で処理後、アルカリ条件下でセリウムと反応させて生じる凝集物はセリウムを含むので電子顕微鏡で視覚化することができる³⁴⁾。これによりカテキン類の細菌菌体における局在部位を明らかにできる。

種々の濃度と pH で EGCG 処理 (室温, 1時間) した *S. aureus* 菌体と塩化セリウムを反応後、樹脂包埋して作製した超薄切片試料を透過型電子顕微鏡観察した結果、菌体表層に電子線不透過性の凝集物 ($\text{Ce}(\text{OH})_3\text{OOH}$ の沈殿) が確認され、EGCG が表層に吸着していることが間接的ではあるが示された³⁴⁾ (図3)。EGCG の吸着形態については、酸性では低密度ではあるが細胞壁の奥まで入り込みペリプラズムから細胞膜表層にまで達して厚い層をなしていたのに対し、アルカリ性では細胞壁と考えられる細胞表層最外層にびっしりと一面に吸着しているもののペリプラズム間隙には殆ど入っていないようであった³⁴⁾ (図3)。これに対して大腸菌では 500 mg/L EGCG 処理 (室温, pH6, 1時間) 後でも、ほとんど菌体

表4 カテキン類の抗菌活性に及ぼすpHの影響

カテキン類	MIC(mg/L)														
	<i>Escherichia coli</i> O157:H7			<i>Escherichia coli</i> K12			<i>Staphylococcus aureus</i>			<i>Listeria monocytogenes</i>			<i>Bacillus cereus</i>		
	pH 5	pH 6.5	pH 8	pH 5	pH 6.5	pH 8	pH 5	pH 6.5	pH 8	pH 5	pH 6.5	pH 8	pH 5	pH 6.5	pH 8
エピカテキン (EC)	≧1000	≧1000	≧1000	≧1000	≧1000	≧1000	≧500	≧500	≧500	≧1000	≧1000	≧1000	≧500	≧500	≧500
エピガロカテキン (EGC)	≧1000	≧1000	500	≧1000	≧1000	≧1000	≧500	≧500	125	≧1000	≧1000	250	≧500	≧500	500
エピガロカテキンガラレート (ECG)	≧1000	≧1000	≧1000	500	≧1000	≧1000	250	≧500	≧500	500	500	500	125	250	500
エピガロカテキンガラレート (EGCG)	≧1000	≧1000	250	≧1000	500	250	125	250	62.5	≧500	250	500	125	250	250
カテキン (C)	≧1000	≧1000	≧1000	≧1000	≧1000	≧1000	≧500	≧500	≧500	≧1000	≧1000	≧1000	≧500	≧500	≧500
ガロカテキン (GC)	≧1000	≧1000	≧1000	≧1000	≧1000	≧1000	≧500	≧500	250	≧1000	≧1000	500	≧500	≧500	500
カテキンガラレート (CG)	≧1000	≧1000	≧1000	≧1000	≧1000	≧1000	≧500	≧500	≧500	≧1000	≧1000	≧1000	62.5	≧500	≧500
ガロカテキンガラレート (GCG)	≧1000	≧1000	125	≧1000	≧1000	500	125	250	31.3	250	250	250	62.5	250	250

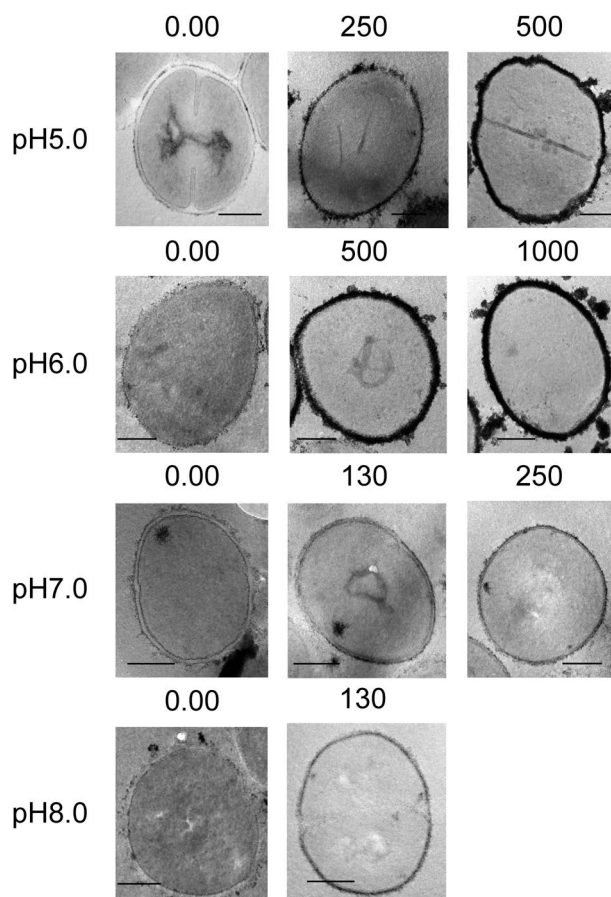


図3. 種々のpHにおいてEGCG処理した*S. aureus*を塩化セリウム染色後の電子顕微鏡観察像
*S. aureus*を1時間室温で種々のpHのHEPES緩衝液においてEGCG処理した。集菌洗浄後、0.1%塩化セリウム溶液(pH 8)中で処理して透過型電子顕微鏡観察した。図中の数値は処理したEGCG濃度(mg/L)を示す。バーの長さ: 200 nm
 参考文献 34) より引用, 一部訂正

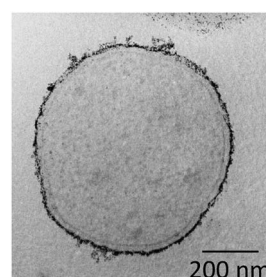


図4. EGCG処理した*E. coli*を塩化セリウム染色後の電子顕微鏡観察像
 EGCG処理濃度: 1000 mg/L, 参考文献 34) より引用

表層部には電子線を透過しない凝集物 (Ce(OH)₃OOH の沈殿) は認められなかった³⁴⁾(図4) ことから, 菌体表層部へのEGCGの親和性は低いことが示された。外膜がカテキン類の作用障壁となっていることがこの結果からも示された。また, *B. cereus*および*B. subtilis*の栄養細胞および芽胞についても同様に観察した結果, *B. cereus*および*B. subtilis*のいずれにおいてもEGCGが栄養

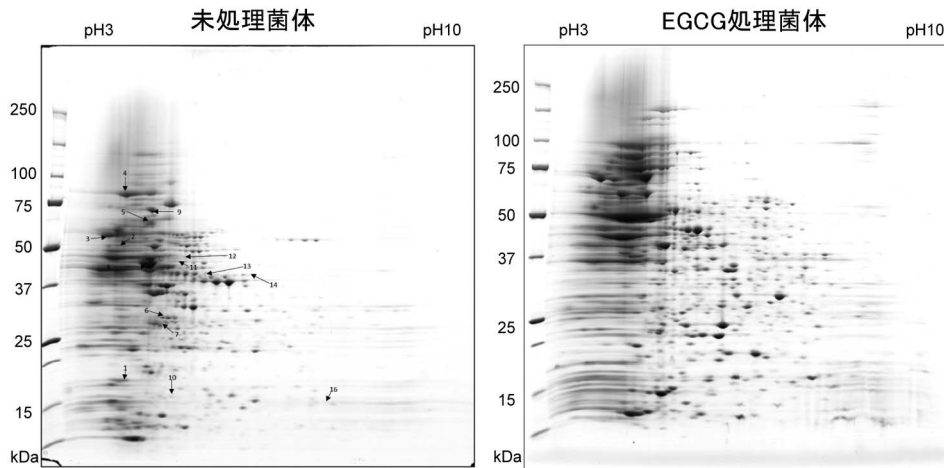


図5. EGCG処理した*B. subtilis*菌体タンパク質の二次元電気泳動パターン
参考文献 36) より引用

細胞表層およびその近傍に存在したが、EGCGの芽胞に対する吸着量は極めて少なかった³⁵⁾。

グラム陽性菌に対する作用機構

グラム陽性菌に対するEGCGの抗菌作用機構を調べるために*B. subtilis*栄養細胞を1000 mg/LのEGCGで37°C、1時間処理後、菌体タンパク質の二次元電気泳動を行った結果³⁶⁾(図5)、EGCGとの結合により凝集して泳動ゲル内に侵入できなかった菌体タンパク質がスポット強度の低下したスポットとして73個検出された³⁶⁾。これらのうち、スポット強度低下の大きかった20個のタンパク質をMS/MSイオンサーチにより同定した結果、菌体表層部のタンパク質として、オリゴペプチドABCトランスポーター結合リポタンパク質、グルコース・ホストトランスフェラーゼシステムトランスポーター、リン酸ABCトランスポーター基質結合タンパク質、ペニシリン結合タンパク質5 (PBP5)が同定された。また、EGCG処理した菌体ではグルコースの取り込みが阻害されたことからEGCGは膜輸送タンパク質と結合してその機能を阻害していることが考えられた。さらにEGCG処理によりPBP5も可溶性タンパク量が低下したが、*B. subtilis*では、*pbp5*遺伝子欠損株の芽胞は耐熱性が低下することが報告されている³⁷⁾。実際にMIC以下の濃度の125 mg/LのEGCG存在下で培養すると芽胞形成率が90%程度から0.6%に低下し、形成された*B. subtilis*芽胞の耐熱性はEGCG非存在下で形成された芽胞の25%程度まで低下した³⁶⁾(図6)。

グラム陰性菌に対する作用機構

*E. coli*栄養細胞を1000 mg/LのEGCGで37°C1時間処理後、菌体タンパク質の二次元電気泳動を行い、EGCG処理により強度が減少したスポットおよび消失したスポットについてタンパク質の同定を行った。その結果、検出されたタンパク質のうち外膜タンパク質はポーリンタンパク質のみであった³⁸⁾。

大腸菌ポーリンタンパク質分子中の塩基性アミノ酸は

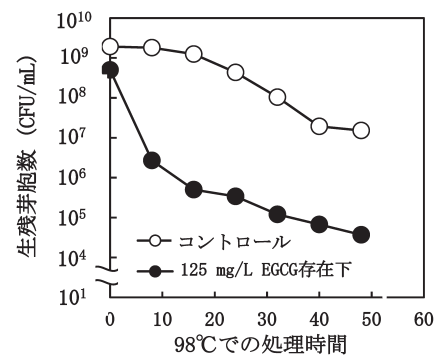


図6. EGCG存在下で形成された芽胞の耐熱性
参考文献 36) より引用

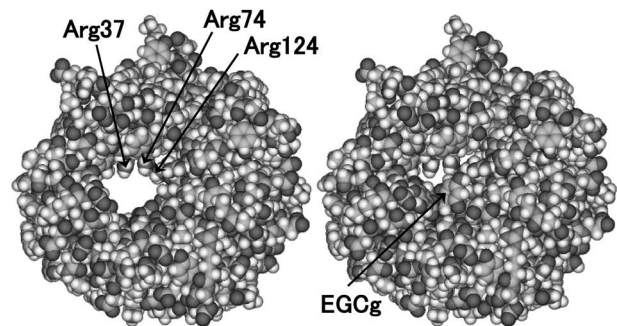


図7. ポーリンタンパク質におけるアルギニン分子の配置とEGCG結合部位の推定
参考文献 38) より引用

ポーリンタンパク質の孔内に側鎖を伸ばした形で存在している³⁸⁾(図7)。特に、孔中央部のArgが3分子存在する部分は狭い。このポーリンとEGCGについてドッキングシミュレーションを行った結果、EGCGは孔内に侵入し孔内で最も狭くなっている孔中央部にあるArgと水素結合により安定的に結合すると推定された³⁸⁾。実際にEGCG処理区ではコントロールに比べグルコースの取り込み能が低下していた。また、これら以外にペリプラズムタンパク質としてMreBタンパク質も同定されている。*S. Typhimurium*や*B. cereus*をEGCGやEGCGで処

理すると、長桿状から短桿状や球状への形態変化が観察され、EGCGやECGは細菌の細胞分裂に対して影響を与える可能性が示唆されている³⁹⁾ことから、MreBタンパク質もEGCGの重要な作用点の一つと考えられた。

さらに*Bacillus coagulans*は独特のリン脂質組成を有するためEGCGが吸着しにくくEGCG感受性が低いこと⁴⁰⁾、黄色ブドウ球菌⁴¹⁾およびウエルシュ菌⁴²⁾についても菌体表層部のタンパク質に結合して機能阻害することがEGCGの抗菌作用機構の一つとして重要であることを明らかにした。カテキン類の抗菌力発現には、対象細菌の種類ごとにpHや塩分濃度、有効な併用物質の組み合わせと濃度の最適化が重要で、実際に、カテキン類を含む緑茶抽出物、食塩および酢酸の併用により野菜の浅漬の保存性が向上することを示した⁴³⁾。

植物ポリフェノールの志賀毒素活性阻害機構

ペロ細胞を用いた細胞毒性試験により食品添加物および天然由来の成分の中からStxの細胞毒性阻害物質のスクリーニングを行った結果、EGCGおよびGCGがStx1の作用を阻害した⁴⁴⁾。そこで、これらのカテキン類について、詳細に検討した。使用したStx試料は、研究室で保有している種々の*E. coli* O157:H7株から選択したStx1のみを産生する菌株、Stx2のみを産生する菌株、およびStx非産生株の培養上清であった。各菌株をLB培地で37°Cで培養し、対数増殖期後期にマイトマイシンCを添加して一晩振とう培養後、ポリミキシンB処理後に得た上清を濾過滅菌して毒素試料を調製した。Stxの力価はVTEC-PRLA [デンカ生研]を用いて測定した。種々の濃度のStx試料とポリフェノール溶液を等量混合し、37°Cで1時間インキュベートした混合液200 μ Lをペロ細胞に添加し、37°Cで2日間培養後の生残率をMTT法により測定した。図8のグラフの縦軸はMTT法による吸光度（細胞生残率）、横軸はカテキン類と混合した時点におけるStxの力価である。この結果、EGCG処理Stxではコントロール（未処理のStx添加）に比べて細胞生残率が高かったことによりStx1の細胞毒性がEGCG処理により抑制されたことが示された。しかし、Stx2に対してはEGCGおよびGCGは活性阻害効果を示さなかった。本試験における毒素濃度およびカテキン濃度においてはEGCGおよびGCGによる毒素活性低減効果はStx1に対してのみ観察されたことから、EGCGおよびGCGはペロ細胞ではなく、Stx1に対して作用し、その細胞毒性を低減させていると考えられた。

カテキン類のStx1細胞毒性阻害機構を推定するために、ドッキングシミュレーションを行った。結晶構造から予測されるStx1およびStx2のBサブユニット5量体のポケットサイズはそれぞれ778 \AA^3 (PDB:2XSC)および475 \AA^3 (PDB:3MXG)である。図9にStx1またはStx2サブユニット5量体に結合したEGCGのドッキングモデル

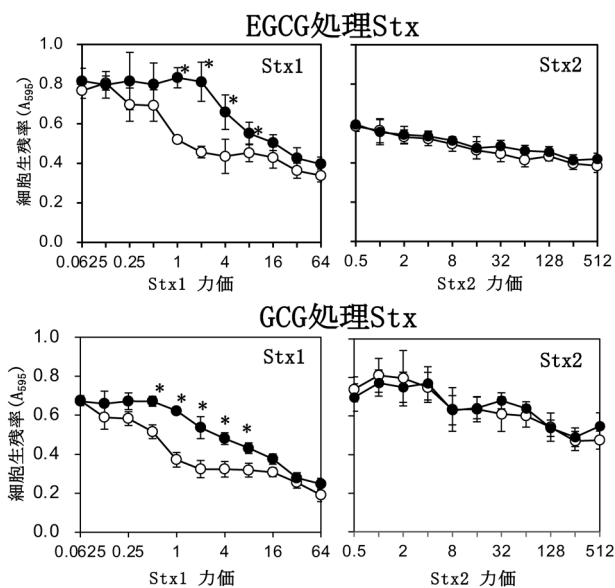


図8. EGCGおよびGCG処理がStxの細胞毒性に与える影響
○：Control（未処理Stx），●：15.6 mg/L EGCG処理したStx
mean \pm SD, n=6, * p <0.01, 参考文献44)より引用

Stx1Bサブユニット5量体 Stx2Bサブユニット5量体

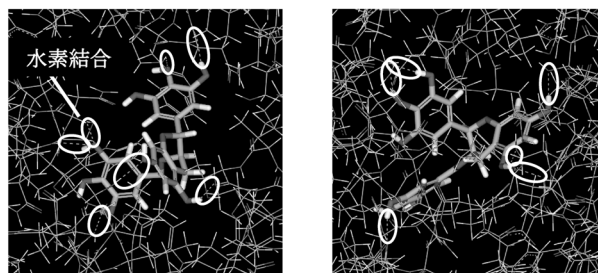


図9. StxBサブユニット5量体のポケットに結合したEGCGのドッキングモデル
参考文献44)より引用

を示す⁴⁴⁾。ドッキングモデルでは、EGCGはStx1Bサブユニット5量体のポケットの内側に面しているアミノ酸の側鎖と7ヶ所で水素結合を形成している。その際の最小分子内エネルギー（歪みエネルギー+電気エネルギー）は-0.1 kcal/molであった。また、EGCGが結合するアミノ酸は、モノマーEの①Ser38および②Ser38、モノマーAの③Ser38および④Asn35、モノマーCの⑤Ser42、モノマーDの⑥Ser42および⑦Asn35であった。一方で、Stx2Bサブユニット5量体の場合は、EGCGは最小分子内エネルギー5.2 kcal/molで6つの水素結合を形成した。EGCGが結合するアミノ酸は、モノマーHの①Ser41および②Ser41、モノマーJの③Ser41、モノマーAの④Ser41および⑤Pro37、モノマーGの⑥Asn34であった。これらの結果から、EGCGはStx2BよりもStx1Bサブユニット5量体との結合で安定な構造をとることが示唆された⁴⁴⁾。また、Stxを阻害しないEGCとStx1BおよびStx2Bの各サブユニット5量体との

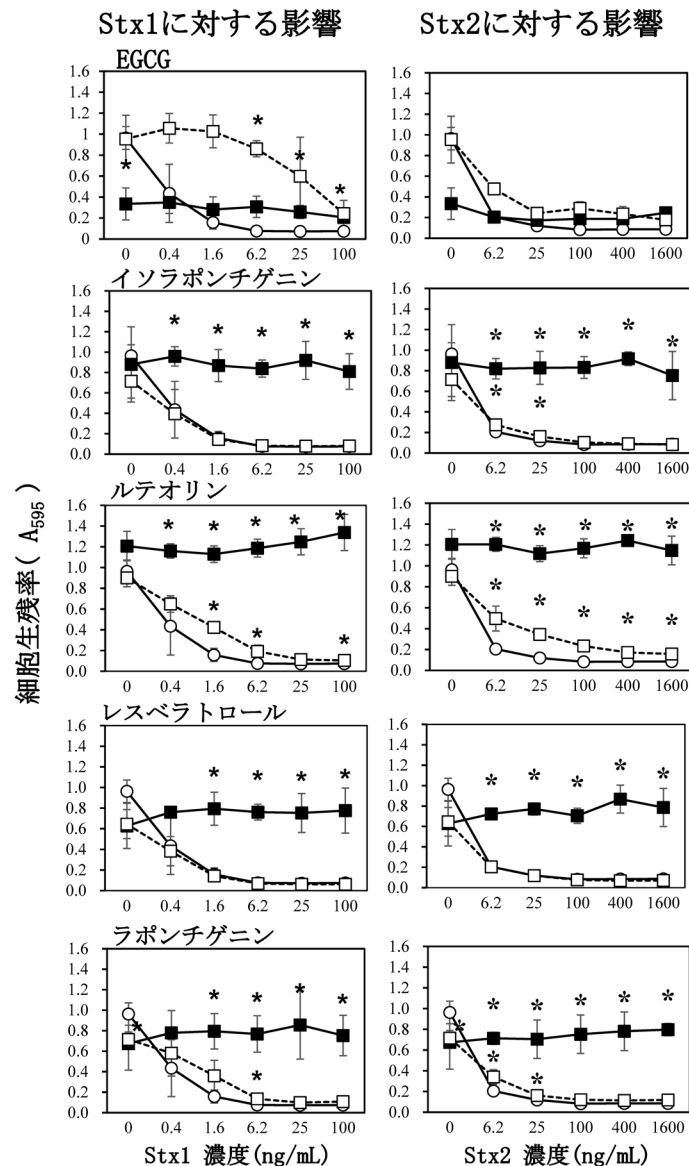


図10. Stxのペロ細胞毒性に対するポリフェノールの影響

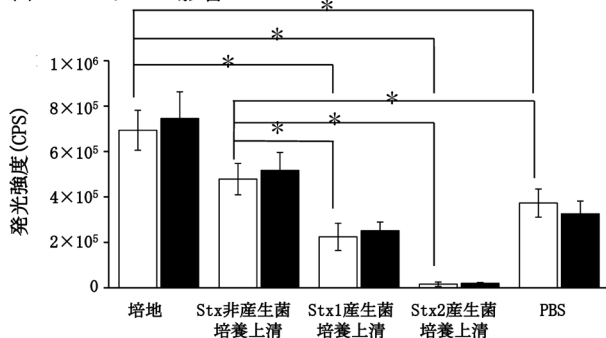
異なる濃度のStxをペロ細胞に添加する前に、0 mmol/L (○), 0.08 mmol/L (□), および0.4 mmol/L (■)のポリフェノールとともに37°Cで1時間インキュベートした。37°Cで48時間培養後、MTT法により細胞生存率を測定した。n=3, *, $p < 0.05$

水素結合数はそれぞれ5および6であったが、その際の最小分子内エネルギーはそれぞれ3.9 kcal/molおよび9.2 kcal/molと計算され、Stx1Bサブユニット5量体との結合において、EGCGはEGCよりも安定的な構造をとることが考えられた⁴⁴⁾。

以上の結果より、EGCGおよびGCGは、Stx1Bサブユニット5量体に安定的に結合し、Bサブユニットと細胞表面のGb3との結合を阻害すると推測された。また、EGCGおよびEGCの阻害活性の違いは、これらの化合物としての構造的な柔軟性とStx1Bサブユニット5量体中心部のポケットにおいて結合する水酸基の位置の違いに起因すると推測された。さらに、Stx2に対して阻害活性を示さないのは、Stx1Bと比べStx2Bサブユニット5量体のポケットサイズが小さく、EGCGおよびGCGが

安定的に結合しにくいためと考えられた。この結果から得られた情報を基にBサブユニット5量体との結合に適した化合物の構造、分子量等の条件を用いて行った*in silico*スクリーニングにより、新たにバイカレイン(生薬・オウゴン)の成分がStx1だけで無くStx2に対しても細胞毒性阻害作用を示すことを見出した⁴⁵⁾。さらに、種々のポリフェノール類についても調べた結果、図10に示すようにルテオリンやスチルベン類のレスベラトロール、ラボンチゲニン、イソラボンチゲニンにもStxの細胞毒性に対する阻害作用を認めている⁴⁶⁾。特に作用の顕著であったEGCGとルテオリンについて、ウサギ網状赤血球ライセートを用いる無細胞系でルシフェラーゼmRNAを用いてルシフェラーゼの発現を指標としてStxによるタンパク質合成阻害に対するポリフェノール

(A) ルテオリンの影響



(B) EGCGの影響

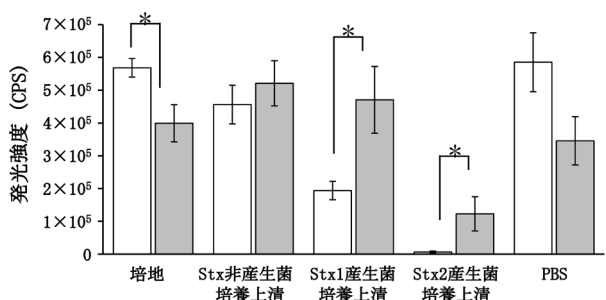
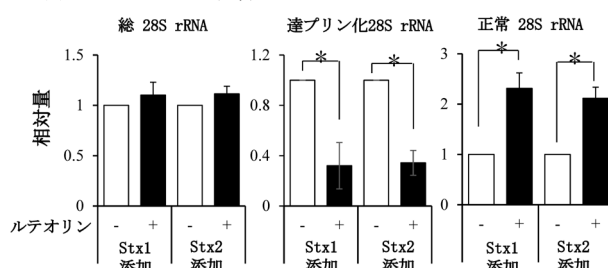


図11. Stx1およびStx2によるタンパク質合成の阻害に対する(A)ルテオリンおよび(B)EGCGの影響
Stx1産生菌, Stx2産生菌, およびStx非産菌の培養上清をそれぞれルテオリン(■), EGCG(□)およびPBS(□)と混合し, 37℃で1時間インキュベート後, 無細胞タンパク質合成系におけるルシフェラーゼの発現に対する影響を調べた. ルシフェラーゼ量は発光法により測定した. n=3, **p*<0.05

の影響を調べた. 図11に示すように無細胞系においてルテオリンはStxのタンパク質合成阻害に影響を与えなかったが, EGCGで処理したStxを添加した場合, 未処理のStx添加に比べてStx1およびStx2ともにタンパク質合成量が増加した. これより, EGCGはStx1およびStx2のタンパク質合成阻害を抑制する, あるいはタンパク質合成系をStxから保護する可能性が示された⁴⁶⁾.

前述したとおり, 菌体内に取り込まれたStxはゴルジ体から小胞体へと移行し, Aサブユニットのみがリボソームに到達して28SrRNAの4324番目のアデノシン残基のN-グリコシド結合を切断する. このような部位特異的rRNA脱プリン反応によりリボソームを不活性化し, タンパク質合成を阻害する²⁵⁾. また, 逆転写酵素が, RNAの非塩基部位の反対側にアデニンを優先的に挿入する事を利用して特定の位置が脱プリン化されたRNAを特異的に検出定量可能なqPCRを用いてWilliamら⁴⁷⁾によりリシンやSSStxの定量が可能であること示されている. これをもとに, Stxで脱プリン化される部位の配列を含む2種類のプライマー(正常な配列検出用および脱プリン化配列検出用)を作製した. 未処理Stxおよびポリフェノールで前処理したStxをベロ細胞に添加して16時間培養後, RNAを抽出し, 逆転写して得たcDNAを用いてqPCRを行って4324番目のアデノシン

(A) ルテオリンの影響



(B) EGCGの影響

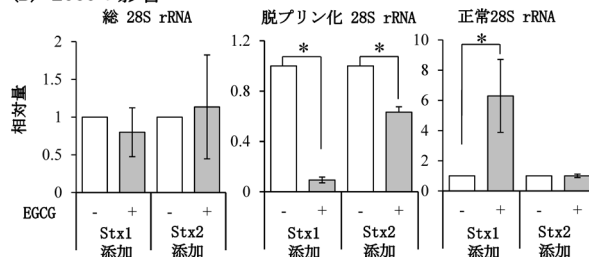


図12. Stx1およびStx2による28S rRNA脱プリンに対する(A)ルテオリンおよび(B)EGCGの影響
Stx1およびStx2産生菌の培養上清を試料としてそれぞれルテオリン(■), EGCG(■), PBS(□)と混合し, 37℃で1時間インキュベート後, ベロ細胞に添加した. 37℃で一晩培養後, RNAを抽出し, 各28SrRNA量をqPCRで測定した. n=3, **p*<0.05

残基が脱プリン化された28SrRNAおよび正常な28SrRNAの定量を行った. 図12に示すようにルテオリン処理Stxを作用させたベロ細胞では, 未処理のStxを作用させた場合と比較して脱プリン化された28SrRNAの割合が減り, 正常な28SrRNAの割合が増えた. 無細胞タンパク質合成系における結果も考慮すると, ルテオリンはStxに結合することでStxの細胞内への取り込みを阻害し, その結果, Stxの細胞毒性が発現されなかったものと思われる⁴⁶⁾.

おわりに

本研究は, 植物ポリフェノール類の抗菌作用機構ならびに抗毒素作用機構をオミックス解析, 情報科学的解析等により解明を試みたものである. さらに詳細な検証が必要な部分も多いと思われるが, 本研究の成果は, 人が長い食経験を有する植物ポリフェノール類の食品保存料としての利用における科学的根拠を示し, また, 抗菌性および抗毒素作用を有する新規化合物の開発に重要な知見を与えると期待される. 食経験のある化合物, 安全性の高い食品添加物それぞれ単独での抗菌作用機構がより明確になると, 標的細菌毎にこれらの効果的な組み合わせと適切な濃度で, pH, 水分活性および保存温度条件毎に細菌の増殖を効果的に阻害すること, または, 物理的処理との組み合わせによる効果的な殺菌が可能になると期待される. これらを体系的に調査・検証し, 結果を情報科学的に処理することにより増殖阻害予測モデルや死滅予測モデルの構築も可能と思われる. これを達成する

ためには、種々の食品微生物におけるの化学的、物理的、および生物学的制御の基礎データの蓄積が重要であることは言うまでもないが、これを読まれている研究者の皆さんの間における情報の共有および共同研究推進に向けた、所属の垣根を越えた産学官の取り組みに期待する。これにより、食品の安全性が確保され、常温および低温下における食品の消費期限及び賞味期限が延長されるとフードロスの削減だけでなく、緊急時に利用可能な防災食の高品質化やバリエーションの拡大、世界における飢餓、栄養不足人口の削減にも大きく貢献することから、SDGsの達成に果たす役割も大きいと期待される。

謝 辞

本研究は、九州大学大学院農学研究院生命機能科学部門食料化学工学講座（旧食糧化学工学科）食品衛生化学研究室で実施されたものです。研究を行うにあたり、ご指導ご鞭撻を賜りました九州大学名誉教授 波多野昌二先生、同 飯尾雅嘉先生、学生時代にご指導頂きました九州大学名誉教授 故 渡辺忠雄先生、茨城大学名誉教授 堤将和先生、および元農研機構九州沖縄農業研究センター吉元 誠先生に深く感謝申し上げます。また、共同研究としてご協力いただきました花王株式会社研究開発部門 安全性科学研究所 徳田様、中山様（現九州産業大学）、重宗様、島谷様、継国様（現ウエルシーライフラボ）、園田様、佐藤様、小澤様、三谷様、および富山様に厚くお礼申し上げます。また、本城賢一准教授、益田時光助教をはじめ研究室のスタッフ、研究推進にご協力頂いた研究室の修了生、卒業生、および在校生の皆様にご心より感謝します。

最後に、本賞受賞にあたり、ご推薦いただいた工藤由起子先生（国立医薬品食品衛生研究所）に深くお礼申し上げます。

参考文献

- 1) 原 征彦, 石上正茶: ポリフェノール類の食中毒細菌に対する抗菌活性. 日本食品工業学会誌, **36**, 996-999 (1989).
- 2) 原 征彦, 渡辺真由美: 茶ポリフェノール類のボツリヌス菌に対する抗菌活性. 日本食品工業学会誌, **36**, 951-955 (1989).
- 3) Mendel, F., Philip, R. H., Carol, E. L., Robert, E. M. and Kozukue, N.: Antimicrobial activities of tea catechins and theaflavins and tea extracts against *Bacillus cereus*. J. Food Prot., **69**, 354-361 (2006).
- 4) 西川武志, 小林菜津美, 岡安多香子, 山田玲子, 磯貝恵美子, 磯貝 浩, 山下利春: 茶およびカテキン含有飲料の病原性大腸菌に対する増殖抑制効果の検討. 腸内細菌学雑誌, **20**, 321-327 (2006).
- 5) 戸田真佐子, 大久保幸枝, 大西玲子, 島村忠勝: 日本茶の抗菌作用および殺菌作用について. 日本細菌学会誌, **44**, 669-672 (1989).
- 6) Taguri, T., Tanaka, T. and Kouno, I.: Antimicrobial activity of 10 different plant polyphenols against bacteria causing food-borne disease. Biol. Pharm. Bull., **27**, 1965-1969 (2004).
- 7) Bandyopadhyay, D., Chatterjee, T. K., Dasgupta, A., Lourduraja, J. and Dastidar, S. G.: In Vitro and in Vivo Antimicrobial Action of Tea: The Commonest Beverage of Asia. Biol. Pharm. Bull., **28**, 2125-2127 (2005).
- 8) Sakihama, Y., Cohen, M. F., Grace, S. C. and Yamasaki, H.: Plant phenolic antioxidant and prooxidant activities: Phenolics-induced oxidative damage mediated by metals in plants. Toxicol., **177**, 67-80 (2002).
- 9) Tachibana, H., Koga, K., Fujimura, Y. and Yamada, K.: A receptor for green tea polyphenol EGCG. Nature Struct. Mol. Biol., **11**, 380-381 (2004).
- 10) Nagao, T., Komine, Y., Soga, S., Meguro, S., Hase, T., Tanaka, Y. and Tokimitsu, I.: Ingestion of a tea rich in catechins leads to a reduction in body fat and malondialdehyde-modified LDL in men. Am. J. Clin. Nutrition, **81**, 122-129 (2005).
- 11) Chang, L. K., Wei, T. T., Chiu, Y. F., Tung, C. P., Chuang, J. Y., Hung, S. K., Li, C. and Liu, S. T.: Inhibition of Epstein-Barr virus lytic cycle by (-)-epigallocatechin gallate. Biochem. Biophys. Res. Commun., **301**, 1062-1068 (2003).
- 12) Song, L. M., Lee, K. H. and Seong, B. L.: Antiviral effect of catechins in green tea on influenza virus. Antiviral Res., **68**, 66-74 (2005).
- 13) 和田邦生, 谷口隆秀, 白井淳資, 本多英一: 緑茶成分に含まれるカテキンの抗ウイルス効果. 日本獣医学会学術集会講演要旨集, p. 188 (2002).
- 14) 戸田真佐子, 大久保幸枝, 生貝 初, 島村忠勝: 茶カテキン類およびその構造類似物質の抗菌作用並びに抗毒素作用. 日本細菌学雑誌, **45**, 561-566 (1990).
- 15) 大久保幸枝, 佐々木武二, 原 征彦, 森 扶美代, 島村忠勝: 腸管出血性大腸菌O157:H7に対するCatechinの殺菌作用および抗毒素作用. 感染症学雑誌, **72**, 211-217 (1998).
- 16) 西山隆造, 小崎道雄: 乳酸菌の生育に及ぼす緑茶抽出液の阻害活性について (その2). 日本農芸化学会誌, **49**, 629-633 (1975).
- 17) Yoda, Y., Hu, Z., Zhao, W. and Shimamura, T.: Different susceptibilities of *Staphylococcus* and Gram-negative rods to epigallocatechin gallate. J. Infect. Chemother., **10**, 55-58 (2004).
- 18) Ikigai, H., Nakae, T., Hara, Y. and Shimamura, T.: Bactericidal catechins damage the lipid bilayer. Biochim. Biophys. Acta, **1147**, 132-136 (1993).
- 19) Arakawa, H., Kanemitsu, M., Tajima, N. and Maeda, M.: Chemiluminescence assay for catechin based on generation of hydrogen peroxide in basic solution. Anal. Chim. Acta, **472**, 75-82 (2002).
- 20) Arakawa, H., Maeda, M., Okubo, S. and Shimamura, T.: Role of hydrogen peroxide in bactericidal action of catechin. Biol. Pharm. Bull., **27**, 277-281 (2004).
- 21) 感染症発生動向調査, <https://www.niid.go.jp/niid/ja/hec-m/hec-iasrtpc/7264-447t.html>
- 22) Paton, J. C. and Paton, A. W.: Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections.

- Clin. Microbiol. Rev., **11**, 450-479 (1998).
- 23) Scheutz, F., Teel, L. D., Beutin, L., Piérard, D., Buvens, G., et al.: Multicenter evaluation of a sequence-based protocol for subtyping Shiga toxins and standardizing Stx nomenclature. J. Clin. Microbiol., **50**, 2951-2963 (2012).
 - 24) Kavaliauskiene, S., Dyve Lingelem, A. B., Skotland, T., and Sandvig, K.: Protection against Shiga toxins. Toxins, **9**(2), 44 (2017).
 - 25) Endo, Y., Tsurugi, K., Yutsudo, T., Takeda, Y., Ogasawara, T. and Igarashi, K.: Site of action of a Vero toxin (VT2) from *Escherichia coli* O157:H7 and of Shiga toxin on eukaryotic ribosomes. Euro. J. Biochem., **171**, 45-50 (1988).
 - 26) Walterspiel, J. N., Ashkenazi, S., Morrow, A. L. and Cleary, T. G.: Effect of subinhibitory concentrations of antibiotics on extracellular Shiga-like toxin I. Infection, **20**, 25-29 (1992).
 - 27) Matsushiro, A., Sato, K., Miyamoto, H., Yamamura, T. and Honda, T.: Induction of prophages of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 with norfloxacin. J. Bacteriol., **181**, 2257-2260 (1999).
 - 28) Quinones, B., Massey, S., Friedman, M., Swimley, M. S. and Teter, K.: Novel cell-based method to detect shiga toxin 2 from *Escherichia coli* O157:H7 and inhibitors of toxin activity, Appl. Environ. Microbiol., **75**, 1410-1416 (2009).
 - 29) Rasooly, R., Do, P. M., Levin, C. E. and Friedman, M.: Inhibition of Shiga toxin 2 (Stx2) in apple juices and its resistance to pasteurization. J. Food Sci., **75**, M296-M301 (2010).
 - 30) 中山素一, 重宗尚文, 徳田 一, 古田可葉子, 松下知世, 吉澤千尋, 宮本敬久: 緑茶抽出物の抗菌活性とpHの影響. 防菌防黴, **36**, 439-448 (2008).
 - 31) Kajiya, K., Kumazawa, S. and Nakayama, T.: Steric effects on interaction of tea catechins with lipid bilayers. Biosci. Biotech. Biochem., **65**, 2638-2643 (2001).
 - 32) Briggs, R. T., Drath, D. B., Karnovsky, M. L. and Karnovsky, M. J.: Localization of NADH oxidase on the surface of human polymorphonuclear leukocytes by a new cytochemical method. J. Cell Biol., **67**, 566-586 (1975).
 - 33) Nakayama, M., Shigemune, N., Tsugukuni, T., Tokuda, H. and Miyamoto, T.: A simple and rapid turbidimetric method for determining catechins in beverages. Int. J. Food Sci. Technol., **45**, 2071-2079 (2010).
 - 34) Nakayama, M., Shigemune, N., Tsugukuni, T., Tokuda, H. and Miyamoto, T.: Difference of EGCG adhesion on cell surface between *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* visualized by electron microscopy after novel indirect staining with cerium chloride. J. Microbiol. Methods, **86**, 97-103 (2011).
 - 35) Shigemune, N., Nakayama, M., Tsugukuni, T., Hitomi, J., Yoshizawa, C., Mekada, Y., Kurahachi, M. and Miyamoto, T.: The mechanisms and effect of epigallocatechin gallate (EGCG) on the germination and proliferation of bacterial spores. Food Control, **27**, 269-274 (2012).
 - 36) Nakayama, M., Shimatani, K., Ozawa, T., Shigemune, N., Tomiyama, D., et al.: Mechanism for the antibacterial action of epigallocatechin gallate (EGCG) on *Bacillus subtilis*. Biosci. Biotech. Biochem., **79**, 845-854 (2015).
 - 37) John, A. T., Anne, N. R., Keith, J., Patrick P. G., Greg, W. and David, J. E.: Reduced heat resistance of mutant spores after cloning and mutagenesis of the *Bacillus subtilis* gene encoding penicillin-binding protein 5. J. Bacteriol., **1**, 257-264 (1986).
 - 38) Nakayama, M., Shimatani, K., Ozawa, T., Higemune, N., Tsugukuni, T., Tomiyama, D., Kurahachi, M., Nonaka, A. and Miyamoto, T.: A study of the antibacterial mechanism of catechins: Isolation and identification of *Escherichia coli* cell surface proteins that interact with epigallocatechin gallate, Food Control, **33**(2), 433-439 (2013).
 - 39) Si, W., Gong, J., Tsao, R., Kalab, M., Yang, R. and Yin, Y.: Bioassay-guided purification and identification of antimicrobial components in Chinese green tea extract. J. Chromatogr., **1125**, 204-210 (2006).
 - 40) Sato, J., Nakayama, M., Tomita, A., Sonoda, T. and Miyamoto, T.: Difference in the antibacterial action of epigallocatechin gallate and theaflavin 3,3'-di-O-gallate on *Bacillus coagulans*. J. Appl. Microbiol., **129**, 601-611 (2020).
 - 41) Kitichalermkiat, A., Katsuki, M., Sato, J., Sonoda, T., Masuda, Y., Honjoh, K.-I. and Miyamoto, T.: Effect of epigallocatechin gallate on gene expression of *Staphylococcus aureus*. J. Glob. Antimicrob. Resist., **22**, 854-859 (2020).
 - 42) Noor Mohammadi, T., Maung, A.T., Sato, J., Sonoda, T., Masuda, Y., Honjoh K. and Miyamoto, T.: Mechanism for antibacterial action of epigallocatechin gallate and theaflavin-3,3'-digallate on *Clostridium perfringens*. J. Appl. Microbiol., **126**, 633-640 (2019).
 - 43) 宮本敬久, 中山素一, 重宗尚文, 徳田 一, 松下知世, 古田可葉子, 目加田瑠子, 本城賢一: 緑茶抽出物の抗菌剤としてのキュウリ浅漬けへの応用. 日食工誌, **56**, 660-664 (2009).
 - 44) Miyamoto, T., Toyofuku, S., Tachiki, N., Kimura, E., Zhou, T., et al.: Specific inhibition of cytotoxicity of Shiga-like toxin 1 of enterohemorrhagic *Escherichia coli* by gallic acid gallate and epigallocatechin gallate. Food Control, **42**, 263-269 (2014).
 - 45) Vinh, P. T., Shinohara, Y., Yamada, A., Duc, H. M., Nakayama, M., et al.: Baicalein inhibits Stx1 and 2 of EHEC: Effects of baicalein on the cytotoxicity, production, and secretion of shiga toxins of enterohemorrhagic *Escherichia coli*. Toxins, **11**, 505-519 (2019).
 - 46) Yuan, L., Nakamichi, R., Hirata, Y., Matsuda, A., Shinohara, Y., Yamada, A., Masuda, Y., Honjoh, K.-I. and Miyamoto, T.: Mechanism for inhibition of cytotoxicity of Shiga toxin by luteolin. Toxicol. in Vitro, **87**, 105537-105547, (2023).
 - 47) William, B. M. and William, H. T.: A functional quantitative polymerase chain reaction assay for ricin, Shiga toxin, and related ribosome-inactivating proteins. Anal. Biochem., **396**, 204-211 (2010).