

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460122

研究課題名(和文) 歯周病菌の病原性を不活化する麹菌由来物質の構造と機能

研究課題名(英文) *Aspergillus oryzae* S-03 produces inhibitors to gingipain as a virulence factor of *Porphyromonas gingivalis*

研究代表者

杉山 政則 (SUGIYAMA, MASANORI)

広島大学・医歯薬保健学研究院・教授

研究者番号：30106801

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：歯周病の主な原因菌は *Porphyromonas gingivalis* であり、本菌は毒素ジンジパインをくることで歯周組織を破壊する。予備的実験の結果、*Aspergillus oryzae* S-03株を脱脂大豆を用いて個体培養すると、「毒素ジンジパイン」に対する阻害物質を産生することを発見した。この度の本研究を通じて、脱脂大豆を用いて *A. oryzae* S-03を培養し得られた麹由来のジンジパイン阻害剤の分子量は、3,000～10,000であり、クロロホルムや酢酸エチルには溶解しないが、水には可溶であった。また、100℃、10 minの熱処理でも全く阻害活性は失われなかった。

研究成果の概要(英文)：Periodontitis is a bacterial infection disease, which is caused orally. The pathogen is mainly *Porphyromonas (P.) gingivalis* and leads to the destruction of gingival connective tissues and, occasionally, to the loss of teeth. Although a few kinds of antibiotics are widely accepted for its treatment, its use has led to the appearance of drug-resistant bacteria as well as to side effects in the human body. We have demonstrated that inhibitory substance against gingipain as a virulence factor of *P. gingivalis* were contained in the fac-removed koji of *A. oryzae* S-03. The gingipain inhibitor was largely present at the fermentation of the S-03 strain at 26 h through 42 h. The inhibitory activity was not lost even with heat treatment at 100°C for 10 min. The molecular size of the inhibitor has been suggested to be 3,000-10,000. It should be also noted that the gingipain inhibitor quenches considerably the absorption of hemoglobin to the cell of *P. gingivalis*.

研究分野：薬品資源学

キーワード：麹菌 歯周病 *Porphyromonas gingivalis* 毒素阻害剤

## 1. 研究開始当初の背景

日本国民の8割が罹患している「歯周病」は、歯肉、セメント質、歯根膜、歯槽骨から成る「歯周組織」に細菌が感染して起きる慢性疾患である。歯周病を引き起こす主な細菌は、増殖するのに酸素を嫌う「偏性嫌気性細菌」として知られる *Porphyromonas* (*Pg*) である。

*Pg* は歯と歯茎の間の奥深くに侵入し、「ジンジパイン(gingipain)」と呼ばれる毒素を分泌しながら、歯周組織を破壊しつつ、血管内に侵入する。侵入した *Pg* は、動脈硬化を引き起こすとともに、ジンジパイン毒素が TNF- $\alpha$  の過剰生産を促すことで、インスリンの働きを阻害する結果、糖尿病を発症または増悪化させる。更に、*Pg* は、強烈な口臭、誤嚥性肺炎、関節リウマチ、早産等の原因ともなることがわかってきた。

ジンジパインは、タンパク質分解酵素(プロテアーゼ)の一種であり、ペプチド切断部位が異なる2種類のジンジパインの存在が知られている。1つは Arg-X を、他のひとつは Lys-X を切断する酵素であり、*Pg* 菌体表面の他、細胞外に存在する。両ジンジパインは、協力しながらタンパク質を分解し、歯周組織を破壊していく。

他方、ジンジパインは、*Pg* における病原性の大部分を担うので、ジンジパインに対する阻害薬を開発すれば、*Pg* の病原性を消失できる。一方、ジンジパインは、*Pg* 菌自身が生きるために必要な酵素でもあることから、GP-Inhibitor が存在すると、*Pg* は増殖できない。したがって、抗生物質としての機能も果たすことになる。

現在、歯周病の臨床治療に、テトラサイクリンやミノサイクリンが使われている。ただし、これらの「抗生物質」は、他の口腔内細菌の増殖も同時に阻害するので、口腔内細菌叢を乱すと共に、薬剤耐性菌を出現させるリスクを負う。しかも、ミノサイクリンは、腹痛、下痢、めまい、頭痛、嘔吐のほか、眼と皮膚の黄変、咽頭炎、視覚症状、精神症状等も引き起こすので、これら抗生物質に代わる、安心安全な歯周病治療薬の開発が急務となっている。

研究代表者は、平成20年4月から平成23年3月までの3年間、文部科学省・都市エリア産学官連携促進事業(発展型)・杉山プロジェクトを推進し、以下の成果を得た。

すなわち、脱脂大豆を用いて麹菌を固体培養すると、その醗酵産物中にジンジパイン活性を強力に阻害する物質(GP-Inhibitor と呼ぶ)が生ずることを発見した。そこで、「歯周病の予防及び治療」を目的とした発明として、特許を出願した(名称:「抗菌組成物およびその利用」:特願2010-248633)。その後、JST による国際特許出願の支援が決定した。このことは、GP-Inhibitor の化学構造や諸性質が明らかになれば、特許性も強くなり、かつ、薬剤耐性菌を出現させないための「歯周感染症治療薬」を開発する際の「リード化合物」となり得る。

## 2. 研究の目的

上述のごとく、研究代表者は、醸造用麹菌株を固体培養すると、歯周病の起因菌として知られる *Pg* のつくる「毒素ジンジパイン」に対する阻害物質を産生することを発見した。この阻害物質(GP-Inhibitor)は、細菌の病原性を強く抑えるが、抗生物質とは異なり、菌の増殖を阻害しないので、耐性菌を生じさせないというメリットを持っている。

そこで、本研究では、本毒素の活性を阻害する「歯周感染症予防治療薬」の実用化を最終的な目標として掲げ、麹菌が産生する GP-Inhibitor の性質を明らかにし、かつ、その作用機序の解明を行うとともに、実用化に当たっての、本物質の安全性を検証することを目指した。

## 3. 研究の方法

予備実験として、麹菌の最適培地を検討した。その結果、大豆、しかも、ヘキサソ処理して脂肪分を除いた「脱脂大豆」を培地として、麹菌の分生子を接種し、一定時間培養し、得られた麹醗酵産物中に、強力なジンジパイン阻害活性が見出された。通常、清酒製造用の麹菌 *Aspergillus* (*A.*) *oryzae* はアミラーゼ活性の強い麹菌が使用される。

ところが、アミラーゼ活性よりもプロテアーゼ活性の強い *A. oryzae* S-03 株を用いると、ジンジパインインヒビターが多く産生されることが示唆された。そこで、本研究では、以下のことを実験項目として掲げた。

- (1) 麹菌の仲間である S-03 株以外の *A. oryzae*, *A. sojae*, *A. luchuensis*, *A. luchuensis mut. kawachii* の 4 種類を用い、各種麹原料(穀類・豆類)の組み合わせにより調製した麹抽出液中の GP-Inhibitor 量を調べ、*A. oryzae* S-03 株と比較する。
- (2) 生産性の高い麹菌を選別し、脱脂大豆で固体培養した麹菌の醗酵産物から、GP-Inhibitor を効率よく精製する方法を確立する。
- (3) GP-Inhibitor の物理化学的、生化学的諸性質と作用機序を解明する。特に、GP inhibitor が、*Pg* へのヘモグロビンの結合能に影響を及ぼすか否かを調査する。
- (4) 実験動物を用いた急性毒性試験と、変異原性試験により、GP-Inhibitor の安全性を検証する。
- (5) 上記の各種醗酵抽出物中に含まれる *Pg* に対する抗菌活性(抗菌物質)の存在を検証する。

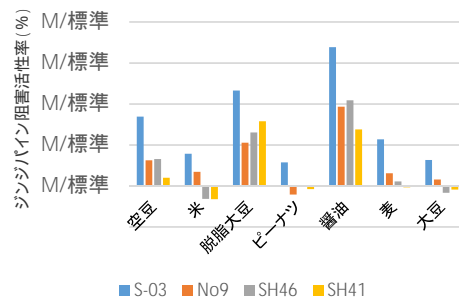
#### 4. 研究成果

歯周病の主な原因菌 *Porphyromonas gingivalis* (*Pg*) は偏性嫌気性細菌であるため、歯と歯茎の間である歯周ポケットに侵入し、歯周組織を破壊する。その結果として歯周ポケットは炎症を起こす。その際、ジンジバリス菌は放出されたヘモグロビンの鉄イオンを摂取し、それを栄養素の 1 つとして増殖に利用していると考えられている。

確認のための再実験でも、脱脂大豆を培地として麹菌を固体培養すると、麹菌が *Pg* のつくる毒素ジンジパイン(GP)に対する阻害物質(GP inhibitor)をつくること明らかになった。

そこで、脱脂大豆以外に、空豆、米、ピーナツ、醤油原料(大豆と小麦の混合物)、麦、

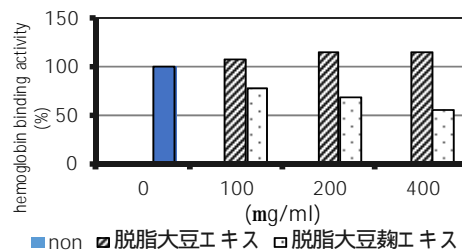
丸大豆を培地とし、4種類の麹菌(*A. oryzae*, *A. sojae*, *A. luchuensis*, *A. luchuensis mut. kawachii*)で調整した各種麹抽出液のジンジパイン阻害活性を調べた。その結果、*A. oryzae* S-03 株を使った麹抽出液中には他の3菌種と比べ、より高いジンジパイン阻害活性が認められた。また、S-03 株においては、脱脂大豆より、醤油原料(大豆と小麦の混合物)を培地として用いた方が、



麹抽出液中のジンジパイン阻害活性が高かった。ただし、後者を培地として用いた場合に生成するジンジパイン阻害物質は、高分子性と推定され、しかも熱に不安定であった。以後、麹の原料は脱脂大豆を用いた。

粗精製した脱脂大豆を原料とした *A. oryzae* S-03 麹由来 GP-inhibitor の分子量は、3,000~10,000 であり、クロロホルムや酢酸エチルには溶解せず、水に可溶であった。また、100℃、10 min の熱処理でも活性が失われなかった。

次に、GP inhibitor が、*Pg* へのヘモグロビ



ンの結合能に影響を及ぼすか否か調査した。その結果、*Pg* 菌とヘモグロビンとの結合阻害率は、醗酵させない(麹菌を接種しない)脱脂大豆エキスに比べ、脱脂大豆を麹菌で醗酵させて得た抽出物の方が有意に高かった。

この結果から、脱脂大豆麹に含有される GP inhibitor が, *Pg* へのヘモグロビンの結合を阻害すると示唆される。

一方, GP inhibitor は, 熱安定性が高いことから, 食品素材(一例として:パン生地)に対し, 醤油原料(脱脂大豆+小麦)に麹菌を摂取し得られたエキス(醤油麹エキスと呼ぶ), もしくは脱脂大豆に麹菌を摂取し得られた脱脂大豆麹エキスのいずれかを添加してパンを製造し, 製パン中に含まれる GP 阻害活性を調べた。その結果, 未醗酵の脱脂大豆エキスと比べ, 麹菌を接種して製造した脱脂大豆麹エキスの方が, GP inhibitor 活性は高いことが実証された。即ち, 脱脂大豆麹エキスに含まれる GP inhibitor は, 機能性食品の製造に利用できると言える。

次に, GP inhibitor の変異原性を評価した。具体的には, 「ウムラック AT」を用いて脱脂大豆麹エキス及び醤油麹エキスの変異原性の有無を調べた。その結果, 両エキスに変異原性は認められなかった。さらに, *Pg* を被検菌として, 抗菌活性を評価した結果, S-03 株を用いて各種麹原料を醗酵させると, その原料のすべてに抗菌活性が認められた(表 1)。

**表 1. 各麹の *Pg* 抗菌活性(阻止円 mm)**

|      | S-03 | No9 | SH-46 | SH-41 |
|------|------|-----|-------|-------|
| 空豆   | 21   | 22  | <8    | <8    |
| 米    | 20   | <8  | 12    | 13    |
| 脱脂大豆 | 18   | 19  | 15    | 13    |
| ピーナツ | 13   | 12  | <8    | 10    |
| 醤油   | 22   | 24  | 11    | 13    |
| 大麦   | 15   | 15  | 11    | 15    |
| 丸大豆  | 18   | 17  | 10    | 13    |

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 9 件)

Higashikawa, F., Noda, M., Awaya, T., Danshiitsoodol, N., Matoba, Y., Kumagai, T., Sugiyama, M.: Anti-Obesity effect of *Pediococcus pentosaceus* LP28 on overweight subjects: a randomized,

double-blind, placebo-controlled clinical trial. Eur. J. Clin. Nutr. in press 2016 (査読有り)

Yasutake, T., Kumagai, T., Inoue, A., Kobayashi, K., Noda, M., Orikawa, A., Matoba, Y., Sugiyama, M.: Characterization of the LP28 strain-specific exopolysaccharide biosynthetic gene cluster found in the whole circular genome of *Pediococcus pentosaceus*. Biochem. Biophys. Report. in press. 2016 (査読有り)

Ikeda, K., Hosoi, T., Yoshii, M., Sugiyama, M., Ozawa, K.: Implementation and Evaluation of Genetic Testing Seminars on Lifestyle-Related Disease Prevention for Pharmacy Students. Yakugaku-Zasshi, 136(2) 2016, in press. (査読有り)

Kumagai, T., Ozawa, T., Tanimoto, M., Noda, M., Matoba, Y., Sugiyama, M.: High level heterologous production of D-cycloserine by *Escherichia coli*. Appl. Environ. Microbiol. 81(22): 7881-7887, 2015 (査読有り)

Uda, N., Matoba, Y., Oda, K., Kumagai, T., Sugiyama, M.: The Structural and mutational analysis of O-ureido-l-serine synthase necessary for d-cycloserine biosynthesis. FEBS J. 282(20) 3929-3944, 2015 (査読有り)

Sugiyama, M.: Structural biological study of self-resistance determinants in antibiotic-producing *actinomycetes*. J. Antibiotics 68(9): 543-550, 2015 (査読有り)

Oda, K., Matoba, Y., Irie, T., Kawabata, R., Fukushi, M., Sugiyama, M., Sakaguchi, T. Structural basis of the inhibition of STAT1 activity by Sendai virus C protein. J. Virol. 89, 11487-11499, 2015 (査読有り)

Shimada A, Noda M, Matoba Y, Kumagai T, Kozai K, and Sugiyama M. Oral lactic acid bacteria that are concerned with the occurrence and/or progression of dental caries in Japanese preschool children. Biosci. Microbiota Food Health. **34**: 29-36, 2015 (査読有り)

Noda M, Miyauchi R, Danshiitsoodol N,

Higashikawa F, Kumagai T, Matoba Y, and Sugiyama M. Characterization and mutational analysis of a novel two-polypeptide bacteriocin produced by a Citrus iyo-derived *Lactobacillus brevis* 174A. Biol. Pharm. Bull. **38**: 1902–1909, 2015 (査読有り)

**[学会発表]** (計 7 件)

野田正文, Narandalai Danshiitsoodol, 的場康幸, 熊谷孝則, 東川史子, 杉山政則: 植物乳酸菌 *Lactobacillus brevis* 174A の産生する二成分バクテリオシンの特性ならびに産生制御機構の解析. 第 54 回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会 中国四国支部学術大会, 高知, 2015 年 10 月 31 日～11 月 1 日

野田正文, 宮内瑠美, Narandalai Danshiitsoodol, 的場康幸, 熊谷孝則, 東川史子, 杉山政則: *Lactobacillus brevis* 174A の産生する二成分バクテリオシンの特徴とその発現制御機構. 日本乳酸菌学会 2015 年度大会, 市川, 2015 年 7 月 11 日～12 日

岡慶人, 熊谷孝則, 井手日奈子, 野田正文, 的場康幸, 杉山政則: 乳酸菌と大腸菌間で複製する温度感受性シャトルベクターの構築. 日本乳酸菌学会 2015 年度大会, 市川, 2015 年 7 月 11 日～12 日

野田正文, 的場康幸, 熊谷孝則, 東川史子, 杉山政則: 変異体を用いた伊予柑由来乳酸菌 174A 株が産生する二成分バクテリオシンの特性解析. 日本乳酸菌学会 2014 年度大会, 広島, 2014 年 7 月 17 日～18 日

野田正文, 町田千帆, 島田歩, 的場康幸, 熊谷孝則, 杉山政則: 齶蝕原性細菌によるバイオフィーム形成を阻害する植物乳酸菌. 第 52 回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会 中国四国支部学術大会, 松山, 2013 年 10 月 26～27 日

野田正文, 的場康幸, 熊谷孝則, 杉山政則: 植物由来乳酸菌 *Lactobacillus brevis*

174A が産生する二成分バクテリオシンの特性. 第 16 回 日本臨床腸内微生物学会総会・学術集会, 広島, 2013 年 8 月 31 日

野田正文, 島田歩, 大黒彩加, 的場康幸, 熊谷孝則, 香西克之, 杉山政則: 乳幼児口腔内より分離された *Lactobacillus* 属乳酸菌の耐酸性と齶蝕との相関性. 日本乳酸菌学会 2013 年度大会, 札幌, 2013 年 7 月 9 日～10 日

**[図書]** (計 1 件)

杉山政則 「現代乳酸菌科学」(2015 年 12 月), 132 頁, 単著, 共立出版

**[産業財産権]**

○出願状況 (計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

○取得状況 (計 2 件)

名称: *Helicobacter pylori* の生育阻害剤およびその製造法  
発明者: 杉山政則  
権利者: 国立大学法人広島大学  
種類: 特許  
番号: 特許 5505298 号  
取得年月日: 平成 26 年 3 月 28 日  
国内外の別: 国内

名称: IL-8 抑制剤およびその製造法  
発明者: 杉山政則  
権利者: 国立大学法人広島大学  
種類: 特許  
番号: 中華民国 発明第 I 410494 号  
取得年月日: 平成 25 年 10 月 1 日  
国内外の別: 国外 (中華民国: 台湾)

**[その他]**

[受賞講演] (計2件)

杉山政則 北里研究所 学会賞受賞者特別講演会, 「抗生物質を産生する放線菌の自己耐性機構」, 2015年1月29日, 北里研究所(東京)

杉山政則, 中国文化賞記念講演会「40年間の微生物研究を振り返って」, 2015年11月29日, 広島感染症研究会(広島)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

杉山 政則 (SUGIYAMA Masanori)  
広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・  
教授  
研究者番号: 30106801

(4) 研究協力者

野田 正文 (NODA Masafumi)  
広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・  
特任講師  
研究者番号: 40457289