

平成 30 年 6 月 4 日現在

機関番号：32665

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K18704

研究課題名(和文) 納豆中に含まれる抗う蝕性物質の同定と応用化

研究課題名(英文) Biofilm inhibition of cariogenic *Streptococcus mutans* by Japanese fermented food natto

研究代表者

成澤 直規 (NARISAWA, Naoki)

日本大学・生物資源科学部・講師

研究者番号：90632034

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：これまでに市販納豆の可溶性抽出液にう蝕原性 *Streptococcus mutans* のバイオフィルム形成抑制効果を明らかにしている。36種市販納豆を対象として評価した結果、バイオフィルム抑制効果はプロテアーゼ活性と相関性が認められた。抑制因子を精製した結果、セリン型プロテアーゼであるナットウキナーゼの特徴と良く類似した。これは *S. mutans* のバイオフィルム形成に必須である非水溶性グルカン合成阻害が原因であることが明らかとなった。ナットウキナーゼは歯の脱灰の臨界pHである5.0付近においても比較的活性を維持しており、応用的にも利用可能であるものと期待された。

研究成果の概要(英文)：Natto made from soybeans cultured with *Bacillus subtilis* natto contains an abundance of proteolytic enzymes. In this study, we investigated the correlation between the protease activity of extracts from 36 commercially available natto products and the inhibition of biofilm formation. The biofilm inhibitory effect was found to correlate with the level of protease activity in the natto extracts, without reducing the viable cell numbers. The natto extract markedly inhibited the production of a water-insoluble glucan by *Streptococcus mutans*, which is the main agent involved in the formation of biofilm by cariogenic streptococci. The characteristics of the protease present in the extract were similar to those of nattokinase. Our results indicate that the protease activity exhibited by extracts of the Japanese fermented food natto reduces the risk of caries by inhibiting biofilm formation.

研究分野：応用微生物

キーワード：納豆 う蝕 バイオフィルム *Streptococcus mutans* ナットウキナーゼ

1. 研究開始当初の背景

う蝕とは口腔内細菌の代謝産物である酸により歯のエナメル質が脱灰することで生じる口腔疾患の1つであり、世界で最も罹患率が高い細菌感染症の1つである。乳酸菌に分類される *Streptococcus mutans* は酸生産性・酸耐性に優れ、付着能とバイオフィーム(界面上に形成される微生物塊)の形成能が高いため主要なう蝕原因菌である。従来より抗う蝕剤として種々の殺菌剤が使用されてきたが、日和見菌に対して免疫能を有する常在菌への影響や耐性菌の出現など必ずしも望ましいものではなく、バイオフィーム形成を制御することが重要であるとの認識が一般的である。*S. mutans* のバイオフィーム形成には、スクロースを基質とした非水溶性グルカンの合成が必須であり、これを標的としたう蝕予防研究が古くより行われてきた。特に茶葉由来のポリフェノール類、カテキン類等はグルカン合成に必須であるグルコシルトランスフェラーゼを阻害し(引用文献)、抗う蝕剤として実用化されている。

2. 研究の目的

申請者はこれまでに納豆破砕液、および納豆菌培養液にう蝕原性 *S. mutans* のバイオフィーム形成阻害効果を有することを明らかにしている。う蝕の誘発と本菌によるバイオフィーム形成とは密接に関連することから、本活性物質はう蝕予防剤として応用利用可能になるものと期待される。国内外を問わずこれまでに納豆中に含まれる抗う蝕剤に関する報告例はない。そこで本研究では、納豆に含まれるバイオフィーム抑制物質の同定と作用機序の解明を行う。さらに口腔内環境を模したモデル系での抑制効果について評価し、応用化へ向けた基礎的知見の集積を行う。

3. 研究の方法

(1) 納豆抽出液の作成と成分分析

市販納豆 36 種類を対象とした。蒸留水に納豆を 10% となるよう添加し、ストマッキングの後に、吸引ろ過フィルターにより除菌を行った。糖量の測定には F-kit を使用した。タンパク質濃度は BCA protein assay kit を使用した。

(2) プロテアーゼ活性測定

アゾカゼインを基質として 37 条件下にて評価した。ここでは 1U は 1 分当りに A₄₄₀ を 0.01 変化させる量と定義した。

(3) バイオフィーム形成評価

供試菌株は *S. mutans* ゲノム株 UA159 株、およびヒト口腔分離株を使用した。

スクロースを含む TSB 培地を使用し、マイクロタイタープレートにて 37、20 時間、5%CO₂ 条件下にて培養後、底部に付着した細胞をサフラニンにて染色を行った。エタノールにて色素抽出後の被色量にてバイオフィーム形成量を評価した。各種納豆抽出液は、10~50% になるよう添加した。必要に応じて、ヒドロキシアパタイトディスクや人工唾液を加えて評価した。

(4) 殺菌効果の検討

被験菌として、*S. mutans* を含む一般口腔常在 Streptococci 8 種類を対象とした。BHI 寒天培地上に被験菌を塗布し、そこに納豆抽出液を 5 μl 塗布した。バイオフィーム形成量の評価と同様の条件下にて培養し、スポット周囲のハローの有無により殺菌効果を評価した。

(5) ザイモグラフィー

納豆抽出液を 80% 硫酸アンモニウムで精製後の画分について、カゼインを含むアクリルアミドゲルにて電気泳動を行い、活性バンドの確認を行った。

(6) 非水溶性グルカンの測定

付着細胞を洗浄し、残存した細胞を NaOH にて処理したものを試料とした。グルカン量はフェノール硫酸法を用い、グルコース相当量として評価した。

4. 研究成果

(1) 市販納豆抽出液のバイオフィーム抑制効果

市販納豆 36 種類を対象として、可溶性画分中のバイオフィーム形成抑制効果を評価した。試料間で抑制効果は異なるものの、多くの試料で抑制効果が確認された。一方、いずれの納豆抽出液についても加熱処理 (90、15 min) することで抑制効果が消失した。ヒト口腔内を想定した唾液およびヒドロキシアパタイトディスク存在下でも同様の効果が認められた。納豆にはジピコリン酸やペプチドなど抗菌性を有する報告がある。本研究で用いた濃度域では *S. mutans* 並びに近縁する Streptococci に対する抗菌性は認められなかった。このことから、納豆抽出液は、*S. mutans* のバイオフィーム形成を特異的に阻害することが示唆された。

(2) 納豆抽出液の特徴

各納豆抽出液の pH は 6.0 程度であり、バイオフィーム抑制効果との関連は認められなかった。フルクトース量は試料間で差異が認められたが、バイオフィーム形成抑制効果との関連は見られなかった。グルコース、スクロースについてはいず

れの試料においてもごくわずかししか検出されなかった。

プロテアーゼ活性は 36 種の抽出液間で大きな差異が認められ、0.4 U から 2.0 U の範囲内であった。納豆抽出液中のプロテアーゼ活性と抑制効果に相関が認められた ($R^2=0.81$)。

(3) 抑制因子の同定

納豆抽出液中のバイオフィーム抑制効果は、プロテアーゼインヒビター-PMSF 1.0 μ M 濃度で完全に阻害されたが、TPCK と Leupeptin では抑制効果に影響が見られなかった。

納豆抽出液よりバイオフィーム抑制画分を抽出・精製し、ザイモグラフィーにて確認した結果、30 KDa 付近に活性が認められた。納豆中にはセリン型プロテアーゼであるナットウキナーゼが含まれるが、本研究で明らかとなった抑制因子はナットウキナーゼの特徴と良く類似した。市販のナットウキナーゼにも同様のバイオフィーム抑制効果が認められており(引用文献)、納豆中においても同様の効果があるものと考えられた。

(4) 抑制メカニズム解析

S. mutans のバイオフィーム形成にはスクロースを基質として不溶性グルカン合成に密接に関連する(引用文献)。そこで納豆抽出液存在下での不溶性グルカンの定量を行った。その結果、納豆抽出液の濃度依存的にグルカン量の低下が認められた。また、グルカンを蛍光染色により可視化した結果からもこれを支持する結果が得られた。以上のことから、納豆抽出液はグルカン合成能を阻害することでバイオフィーム形成を抑制するものと考えられた。

(5) う蝕予防剤としての可能性について

う蝕予防剤として応用利用に際して、口腔環境においてバイオフィーム抑制効果を有するのことが重要な課題である。そこで本研究では、口腔内環境を再現するため、pH の変化、また液の存在下でのナットウキナーゼのプロテアーゼ活性を評価した。その結果、ナットウキナーゼは他の 15 種類のプロテアーゼに比べ酸性条件下においても比較的活性を維持することが明らかとなった。また、唾液存在下においても活性に影響しないことが確認された。このことから、ナットウキナーゼはう蝕予防剤として利用可能性が示された。

(6) 考察・まとめ

本研究では、市販納豆よりう蝕原性細菌のバイオフィーム抑制効果の確認と抑制因子の同定を行った結果、プロテアーゼ

が抑制に関わることを明らかにした。一方で、納豆発酵過程では様々な成分の消長があるものと予想され、発酵段階によっては新たな抑制因子の存在も考えられる。

我々は納豆製造のスターターである納豆菌、およびその近縁種である枯草菌の培養液を対象として抑制因子の探索を行った結果、ヌクレアーゼが当該因子であることが示唆された。バイオフィームは一般に菌体に加え、菌体外多糖、菌体外タンパク質、菌体外 DNA などをマトリックス構成成分としており、*S. mutans* においても同様である。よってヌクレアーゼは菌体外マトリックス分解によりバイオフィーム形成を抑制するものと推測される。

納豆抽出液にはバイオフィーム形成抑制効果が認められたが、一方で原料大豆の抽出液にはバイオフィーム形成促進効果が認められた。この事実は、抗う蝕剤としての利用に際し、大きな問題となる。促進因子は加熱処理後も活性を維持することが明らかとなった。今後は促進因子の同定、および発酵過程での消長を明らかにする必要がある。

S. mutans の非水溶性グルカン合成には糖転移酵素であるグルコシルトランスフェラーゼの活性が重要である。本研究結果より、納豆抽出液およびナットウキナーゼの存在により非水溶性グルカン合成量が著しく低下することが明らかになったことから、グルコシルトランスフェラーゼ活性が抑制されたものと考えられた。今後は *S. mutans* よりグルコシルトランスフェラーゼを精製し、ナットウキナーゼ存在下での活性測定に加え、転写レベルでの評価も行う予定である。

納豆抽出液は形成されたバイオフィーム分解効果はわずかであった。このことから、バイオフィーム形成抑制剤としての利用が考えられる。一方、応用利用に際し、口腔内で一定期間効果を持続させる方法など、いくつか課題も残されている。今後は更に応用利用性について解析が必要であると考えられる。

引用文献

Nakahara et al., 『Inhibitory effect of oolong tea polyphenols on glycosyltransferases of mutans Streptococci』 Appl. Environ. Microbiol., vol. 59, 1993, p968-973.

Narisawa et al., 『Interference effects of proteolytic nattokinase on biofilm formation of cariogenic streptococci』 Food preser. Sci., vol. 40, 2014, p273-278.

Narisawa et al.,

『Competence-dependent endogenous

DNA rearrangement and uptake of extracellular DNA gives a natural variant of *Streptococcus mutans* without biofilm formation』 J. Bacteriol., vol. 193, 2011, p5147-5154.

5. 主な発表論文等 〔雑誌論文〕(計1件)

A. Iwamoto, T. Nakamura, N. Narisawa, Y. Kawasaki, S. Abe, Y. Torii, H. Senpuku, and F. Takenaga.

『The Japanese fermented food natto inhibits sucrose-dependent biofilm formation by cariogenic streptococci』 Food Sci. Technol. Res., vol.24, 2018, p129-137, 査読有
doi.org/10.3136/fstr.24.129

〔学会発表〕(計8件)

日本食品科学工学 64 回大会, 日本大学 (2017年8月28日~8月30日)

『市販納豆分離株によるう蝕原性細菌バイオフィルム抑制効果の検討』
中村 知世, 成澤 直規, 鳥居 恭好, 竹永 章生

日本食品科学工学 64 回大会, 日本大学 (2017年8月28日~8月30日)

『市販納豆によるう蝕原性細菌バイオフィルム抑制効果の検討』
岩本 理, 中村 知世, 成澤 直規, 鳥居 恭好, 竹永 章生

第66回日本食品保蔵科学会, 高知県立大学 (2017年6月24日~6月26日)

『市販納豆によるう蝕原性バイオフィルム形成抑制効果に関する検討』
成澤 直規, 鳥居 恭好, 竹永 章生

第90回 日本細菌学会総会, 仙台国際センター (2017年3月19日~3月21日)

『食品由来プロテアーゼによるう蝕原性バイオフィルム形成抑制機構の解析』
入江 友啓, 成澤 直規, 竹永 章生

日本食品科学工学会平成29年度関東支部会, 山梨学院大学 (2017年3月4日)

『市販納豆を用いたう蝕原性細菌バイオフィルム形成抑制物質の探索』
岩本 理, 中村 知世, 成澤 直規, 竹永 章生

日本食品科学工学会 63 回大会, 名城大学 (2016年8月25日~8月27日)

『納豆抽出液によるう蝕原性バイオフィルム抑制効果の検討』
中村 知世, 成澤 直規, 鳥居 恭好, 竹永 章生

日本食品科学工学会 H28 年度関東支部会, 日本大学 (2016年3月5日)

『納豆菌によるう蝕誘発性バイオフィル

ム形成抑制機構に関する検討』

川崎 幸正, 成澤 直規, 鳥居 恭好, 竹永 章生

日本食品科学工学会第62回大会, 京都大学 (2015年8月27日~8月29日)

『納豆菌によるう蝕原性 *Streptococcus mutans* バイオフィルム形成抑制因子の探索』

川崎 幸正, 成澤 直規, 鳥居 恭好, 竹永 章生

6. 研究組織

(1) 研究代表者

成澤 直規 (NARISAWA, Naoki)

日本大学・生物資源科学部・講師

研究者番号: 90632034

(2) 研究協力者

竹永 章生 (TAKENAGA, Fumio)

鳥居 恭好 (TORII, Yasuyoshi)

阿部 申 (ABE, Shin)

中村 知世 (NAKAMURA, Tomoyo)

岩本 理 (IWAMOTO, Rika)

川崎 幸正 (KAWASAKI, Yukimasa)