

7. 納豆由来ペプチドの特異な殺菌効果とその作用機序

白石 宗¹⁾, 北川 学^{1,2)}, 山本 聡¹⁾, 久富 亮佑¹⁾, 佐藤 豊孝¹⁾
涌井 秀樹³⁾, 伊藤 英晃⁴⁾, 宮本 篤²⁾, 横田 伸一¹⁾

¹⁾札幌医科大学医学部微生物学講座, ²⁾同 医療薬学

³⁾秋田大学大学院理工学研究科疾患生物学研究室, ⁴⁾同 生化学・分子生物学研究室

はじめに

納豆は、蒸煮した大豆に納豆菌 [*Bacillus subtilis* (*natto*)] を植菌して発酵させた日本の代表的な発酵食品である。また、東アジアを中心に大豆を原料とした無塩発酵食品は少なからず存在するが、「糸引き」は日本の納豆にみられる代表的な特徴であり、日本独自の発酵食品であると考えられている¹⁾。

これまでの研究により、納豆は栄養価が高いだけでなく、さまざまな機能性を備えていることが明らかになっている。例えば、納豆に含まれる酵素の Nattokinase は、線溶酵素を活性化させることで血栓を溶解する作用が知られている²⁾。さらに、納豆由来の複数のペプチドには、血圧の上昇を抑制する効果が報告されている³⁾。その他にも、食後血糖値の上昇抑制⁴⁾や、血清総コレステロールの上昇抑制⁵⁾など、多くの生理作用をもつことが知られている。

近年、われわれの共同研究グループの伊藤らは、納豆由来のペプチド (納豆ペプチド) にかん細胞株を死滅させる活性があることを報告した^{6,7)}。ヒトを含む多くの生物は生体防御ペプチドを有しており、その多くは抗菌作用とがん細胞株への細胞毒性を併せもっていることから、納豆ペプチドも抗菌活性をもつことが予測された。本稿では、われわれの研究で明らかになった納豆ペプチドの殺菌効果とその作用機序⁸⁾について解説する。

1. 納豆ペプチドの特徴

がん細胞株への細胞毒性をもつ納豆ペプチドは、53 残基のペプチド (LNGTSMASPH VAGAAALILS KHPNLSASQV RNRLSSTATY GSSFYYGKGL INV) であり、 α -ヘリックス構造が予測される配列で、正電荷をもつアルギニンおよびリジン残基が点在している。これらは Cathelicidine ファミリーをはじめとする多くの抗菌ペプチドに認められる構造である^{6,7)}。納豆ペプチドは、さまざまながん細胞株を死滅させる活性があり、正常細胞株に対しては毒性を示さないことが明らかになっている。この作用機序は、細胞の膜破壊であることが示唆されている。がん細胞株への細胞毒性は、蒸煮大豆単体および納豆菌単体には認められず、発酵産

物の納豆であることが重要であると考えられている^{6,7)}。納豆 1 パック (約 50 g) から凍結乾燥重量で約 100 mg の納豆ペプチド標品が取得可能である。

2. 納豆ペプチドの特異な殺菌効果

種々の細菌および真菌に対する納豆ペプチドの最小生育阻止濃度 (MIC) を表 1 に示した。納豆ペプチドの十分な殺菌活性の発揮には、培地中にウマ溶血液を添加するの必要があり、*Bacillus* 属細菌のなかの *B. subtilis* グループ (*Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus licheniformis*) と *Streptococcus pneumoniae* (肺炎球菌) に対して特異的な殺菌効果が認められた。さらに、納豆ペプチドの殺菌効果の発揮に必要な溶血液中の成分を検討したところ、ヘミン (鉄を含むポルフィリン) が重要であることが示唆された。これまでに、納豆の抗菌成分としては、細菌の芽胞形成に関与するジピコリン酸が知られている。ジピコリン酸は、グラム陽性および陰性細菌、真菌など幅広い抗菌スペクトルをもつことが報告されている⁹⁾。一方、納豆ペプチドは *B. subtilis* グループの細菌と肺炎球菌にのみ殺菌効果を示すという特異な狭域の抗菌スペクトルを持つことが示された。

3. 納豆ペプチドの殺菌効果の作用機序

納豆ペプチド存在下での殺菌曲線と菌体の形態変化から、*B. subtilis* と肺炎球菌では、作用機序に違いがあることが示唆された。*B. subtilis* では、ペプチド添加直後から速やかな生菌数の減少が認められ (図 1A)、形態観察からその殺菌機序は膜傷害であることが示唆された (図 2A, B)。納豆ペプチドのがん細胞株への細胞毒性も、膜傷害が示唆されていることから^{6,7)}、*B. subtilis* に対しても同様の作用が働いている可能性がある。一方、肺炎球菌では、ペプチドへの曝露初期 (数時間以内) は通常の増殖を示し、その後急速な殺菌が観察された (図 1B)。この殺菌機序は、死滅した菌体の形態観察から溶菌であることが示唆された。さらに、本来双球菌である肺炎球菌 (図 2C) が、納豆ペプチド曝露初期にはレンサ状になっており (図 2D)、菌体の分裂時に分離異常が起きていることが示唆された。肺炎球菌の主要

表 1 微量液体希釈法によるウマ溶血液存在下でのグラム陽性細菌, グラム陰性細菌, 真菌に対する納豆ペプチドの MIC

グラム陽性細菌					
細菌種		菌株	MIC ($\mu\text{g}/\text{mL}$)		
<i>Bacillus</i>	<i>cereus</i>	JCM 2152 ^T	>128		
		AHU 1358	>128		
<i>Bacillus</i>	<i>licheniformis</i>	AHU 1371	8		
<i>Bacillus</i>	<i>megaterium</i>	AHU 1373	>128		
<i>Bacillus</i>	<i>pumilus</i>	AHU 1386	8		
<i>Bacillus</i>	<i>subtilis</i>	AHU 1708 ^T	8		
		AHU 1035	16		
		AHU 1037	8		
		AHU 1604	8		
		AHU 1615	16		
		Enterococcus	<i>faecalis</i>	HU1 (VRE)	>128
				M2486	>128
Enterococcus	<i>faecium</i>	M2483	>128		
<i>Lactobacillus</i>	<i>fermentum</i>	ATCC 9338	64		
<i>Lactobacillus</i>	<i>plantarum</i>	NRIC 1067 ^T	>128		
<i>Lactobacillus</i>	<i>rhamnosus</i>	ATCC 7469 ^T	>128		
<i>Staphylococcus</i>	<i>aureus</i>	ATCC 25923	>128		
		SUNAI (HA-MRSA)	>128		
		SR-581 (CA-MRSA)	>128		
		JCM 5671 ^T	64		
<i>Streptococcus</i>	<i>agalactiae</i>	JCM 12971 ^T	64		
<i>Streptococcus</i>	<i>mitis</i>	JCM 5705 ^T	64		
<i>Streptococcus</i>	<i>mutans</i>	JCM 5705 ^T	64		
<i>Streptococcus</i>	<i>pneumoniae</i>	ATCC 49619	8		
		R6	8		
		SR11	16		
		MH101 (PRSP)	16		
		237 (PRSP)	8		
		442 (Mucoid)	8		
		<i>Streptococcus</i>	<i>pyogenes</i>	JCM 5674 ^T	128
		<i>Streptococcus</i>	<i>salivarius</i>	JCM 5707 ^T	128
		<i>Streptococcus</i>	<i>sanguinis</i>	JCM 5708 ^T	64
		グラム陰性細菌			
細菌種		菌株	MIC ($\mu\text{g}/\text{mL}$)		
<i>Acinetobacter</i>	<i>baumannii</i>	ATCC 19606 ^T	>128		
		SRAC2	>128		
<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	ATCC 25922	>128		
		ATCC 35218	>128		
		7249 (ST131)	>128		
<i>Haemophilus</i>	<i>influenzae</i>	ATCC 51907	>128		
<i>Pseudomonas</i>	<i>aeruginosa</i>	ATCC 27853	>128		
		PA103	>128		
		9728 (Mucoid)	>128		
<i>Serratia</i>	<i>marcescens</i>	SRSM2	>128		
真菌					
真菌種		菌株	MIC ($\mu\text{g}/\text{mL}$)		
<i>Candida</i>	<i>albicans</i>	SRCA1	>128		
		SRCA4	>128		

VRE:バンコマイシン耐性腸球菌, HA-MRSA:院内感染型メチシリン耐性黄色ブドウ球菌, CA-MRSA:市中感染型メチシリン耐性黄色ブドウ球菌, PRSP:ペニシリン耐性肺炎球菌

な自己溶菌酵素である LytA の遺伝子欠損株では, 殺菌時間が遅延することから, ペプチドの肺炎球菌への殺菌機序は, 細胞分裂時の分離異常に伴って生じる溶菌であると考えられる。

おわりに

納豆ペプチドは, 非常に特異な狭域の抗菌スペクトルを有している。肺炎球菌は, 高齢者の市中肺炎, 小児ではしばしば急性中耳炎などを引き起こし, さらに細

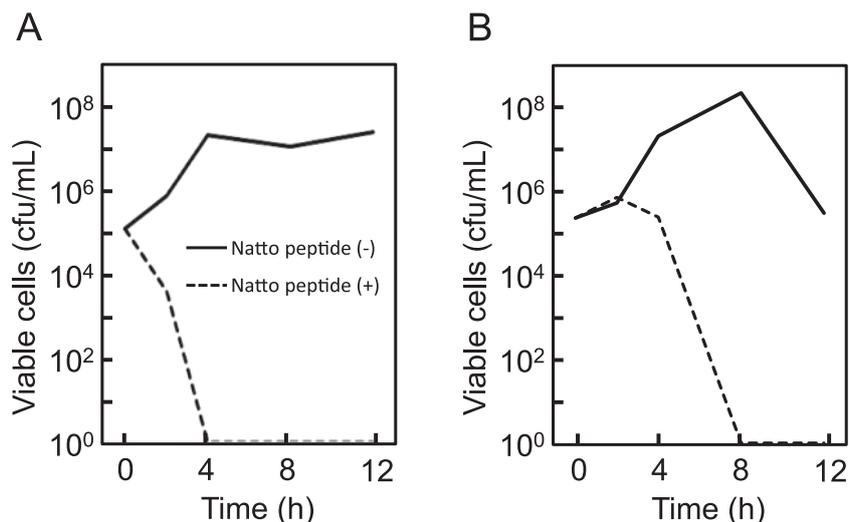


図1 納豆ペプチドの殺菌効果
納豆ペプチド非存在下 (—) および存在下 (64 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (---) での *B. subtilis* AHU 1708^T (A) および *S. pneumoniae* R6 (B) の生菌数の推移。

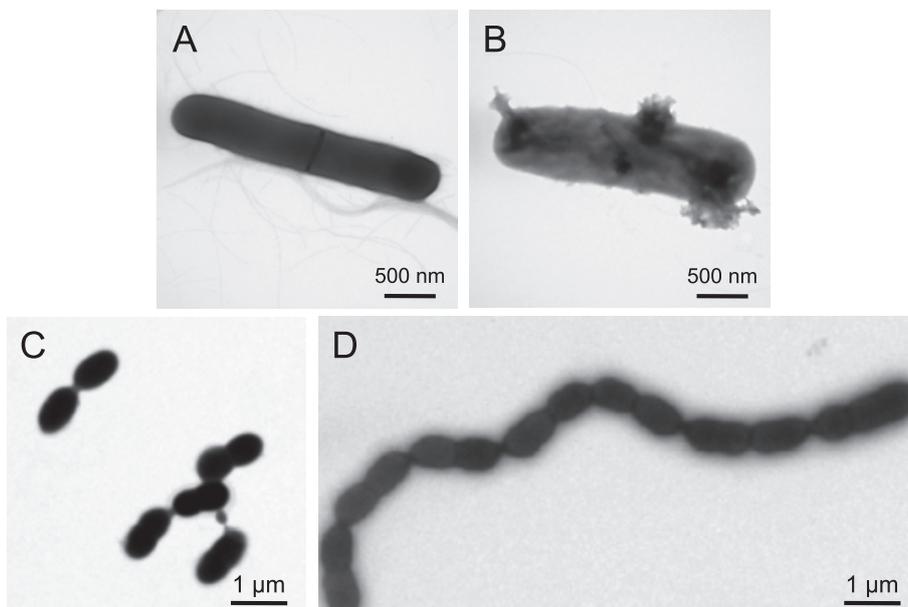


図2 納豆ペプチドによる細胞形態の変化
B. subtilis AHU 1708^T の納豆ペプチド非存在下 (A) と存在下 (64 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (B) での培養 4h 後の透過電子顕微鏡写真。 *S. pneumoniae* R6 の納豆ペプチド非存在下 (C) と存在下 (64 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (D) での培養 4h 後の透過電子顕微鏡写真。

菌性髄膜炎に代表される侵襲性感染症を起こす。また、ペニシリン耐性肺炎球菌 (PRSP) の頻度が高く、その他の抗菌薬に対する交叉耐性も問題となっている¹⁰⁾。納豆ペプチドは、マクロライド系やキノロン系抗菌薬に交叉耐性を示す PRSP に対しても感受性株と同等の殺菌効果を示し、感染予防や治療への有用性が期待される。さらに肺炎球菌に対する作用機序、標的分子を明らかにすることで、常在細菌叢に影響を与えない肺炎球菌特異的な狭域スペクトルの抗菌薬の創薬にもつ

ながると考えている。一方で、納豆ペプチドの抗菌活性とヘミンの関連など、まだまだ不明な点も多く、さらなる研究の進展が必要である。

納豆のような日本古来の伝統的な発酵食品の機能性解明は、われわれの健康維持に役立つだけでなく、卓越した日本の食文化を明らかにする上でも重要と考える。

文献

- 1) 原敏夫：納豆のルーツを求めて。化と生 28：676-681,

1990

- 2) Sumi H, Hamada H, Nakanishi K, et al. : Enhancement of the fibrinolytic activity in plasma by oral administration of nattokinase. *Acta Haematol* 84 : 139-143, 1990
- 3) 嶋影逸, 新保守, 山田清繁, 他 : プロテアーゼ処理挽き割り納豆からの ACE 阻害物質の精製・同定と高血圧自然発症ラットにおける納豆の血圧上昇抑制作用. *食品臨床栄養* 6 : 1-8, 2011
- 4) 石川篤志, 岸幹也, 山上圭吾 : 納豆, 大豆が健常成人の食後血糖値に与える影響. *生活衛生* 53 : 257-260, 2009
- 5) 辻啓介, 辻悦子 : 納豆がラットのコレステロールレベルに及ぼす影響. *栄養誌* 44 : 41-44, 1986
- 6) 畠山詩織, 加福万愉, 岡本知也, 他 : 納豆抽出成分による抗がん作用機構の解析. *素材物性学雑誌* 27 : 15-19,

2016

- 7) 伊藤英晃 : 納豆抽出抗菌ペプチドの抗がん剤への応用. “抗菌ペプチドの機能解明と技術利用” 長岡功編. シーエムシー出版, 2017, p163-175
- 8) Kitagawa M, Shiraishi T, Yamamoto S, et al. : Novel antimicrobial activities of a peptide derived from a Japanese soybean fermented food, Natto, against *Streptococcus pneumoniae* and *Bacillus subtilis* group strains. *AMB Express* 7 : 127, 2017
- 9) 須見洋行, 大杉忠則 : 納豆および納豆菌中の抗菌成分ジピコリン酸. *日農化会誌* 73 : 1289-1291, 1999
- 10) 横田伸一, 佐藤清, 吉田繁, 他 : フルオロキノロン耐性 *Streptococcus pneumoniae* の検出状況と分子疫学的検討. *感染症誌* 78 : 428-434, 2004