

納豆抽出物が血液凝固・線溶系におよぼす影響について

獨協医大法医学 ○大村和伸, 一杉正仁, 長井敏明, 徳留省悟

獨協医大医学総合研究所 池田雅志

大和薬品(株) 朱 霞

千葉商大政策情報学部 丹羽宗弘

Effects of the extract from *Bacillus subtilis* (natto) on blood coagulation and fibrinolysis.Kazunobu Omura¹, Masahito Hitosugi¹, Munehiro Niwa⁴, Masasi Ikeda²,
Xia Zhu³, Toshiaki Nagai¹, Shogo Tokudome¹¹Department of Legal Medicine, Dokkyo University School of Medicine²Institute of Medical Science, Dokkyo University School of Medicine³Daiwa pharmaceutical Co., Ltd.⁴Faculty of Policy Informatics, Chiba University of Commerce

880 Kita-Kobayashi, Mibu, Tochigi 321-0293, Japan

Phone: +81-282-86-1111 Fax: +81-282-86-7678

E-mail: omura@dokkyomed.ac.jp

ABSTRACT

Fermented soybeans "natto" are traditional functional food that contains bioactive products like Vitamin K, proteases of casein and fibrinolysis. NKCP is refined protein fraction from cultured *Bacillus subtilis* (natto) isolated from common fermented soybeans. We examined the main protein of NKCP and the effects of the coagulation and fibrinolysis.

Our results suggested NKCP is the fragment of Bacillopeptidase F and it would be expected to use for the prevention of thrombosis.

1. はじめに

納豆は、カゼインやフィブリン塊を分解する酵素や、骨の代謝や血液凝固に関与するビタミン K を豊富に含有している伝統的な機能食品である。われわれは、これら納豆の機

能性に着目し、納豆を発酵させる納豆菌が分泌するタンパク質を分取精製(以下 NKCP と称す)した。

NKCP の科学的な分析を進め、主要なタンパク質の同定と、血液の凝固・線溶系におよぼす影響を検討したので報告する。

2. 方法

2.1. NKCP の精製

NKCP は大和薬品株式会社が製造した。NKCP を生産する菌株は、DNA 塩基配列の解析で一般的な *Bacillus subtilis* に帰属された、納豆から分離した納豆菌である。NKCP は、この納豆菌を大豆成分の培地で培養し、菌体、臭気、粘性およびビタミン K を除去するべく精製した粉末状のタンパク分画である。

2.2. 物性解析

分子量の測定は、Sodium dodecyl sulfate-

polyacrylamide gel electrophoresis(以下 SDS-PAGE と略す)法および Time of flight - mass spectrometry (以下 TOF-MS と略す)法を用い、アミノ酸の一次配列は Automated sequential Edman degradation 法を用いて解析した。

酵素活性は、 2×10^{-3} M のプラスミンの発色合成基質 S2251(H-D-Val-Leu-Lys-pNA : 第一化学薬品株式会社)の 0.04M トリス塩酸緩衝液(pH 9.0)溶液における加水分解能で検討した。酵素活性の熱安定性は、トリス塩酸緩衝液(pH 9.0) の NKCP 溶液を 50°C, 60°C, 70°C で 30 分の前処理をして、酸性度安定性は、pH 2.0 - pH 10.0 に設定した NKCP のトリス塩酸緩衝液で 37°C で 1 時間前処理して、この活性測定系で評価した。

2.3. 血液凝固・線溶系におよぼす影響

血栓形成モデルを用いて in situ loop 法で NKCP の効果を検討した。ラット血栓形成モデルは、1.2g/kg ウレタン麻酔下に腹部正中切開し、腹部下行大動脈の血管内皮細胞損傷で血小板の粘着・凝集を惹起させて作成した。誘発と同時に NKCP の生理食塩水溶液を腸注し、血栓形成誘発 6 時間後に活性化部分トロンボプラスチン時間(以下 APTT と略す)とプロトロンビン時間(以下 PT と略す)の測定を行った。

3. 結果

NKCP の分子量は、SDS-PAGE 法では 45KDa, TOF-MS 法では 34,134 Da であった。アミノ酸の一次配列の解析は、Bacillus subtilis が放出するプロテアーゼの一つである Bacillopeptidase F の一部断片であった。

プラスミン合成基質の加水分解能は、NKCP の 100mg/mL 試料溶液で 1.80×10^{-4} mol/min/L を示した。NKCP 粉末は、室温で 2 年間保存しても酵素活性の変動は 5%以内であった。NKCP 溶液における酵素活性の熱

安定性は、50°C までは安定で、60°C で若干低下し、70°C では 5 分で 1/3 減少して 30 分で失活した。酸性度安定性は、pH 7.0 - pH 10.0 で安定だが pH 6.0 から徐々に半減し、pH 4.0 で失活した。

血栓形成モデルを用いた in situ loop 法での検討では、APTT は Control 群に比し NKCP 群では用量依存的に有意な凝固遅延を示した。PT も変化強度は弱いもののほぼ同様の傾向が観察された(table 1)。

Table 1. Mean values of APTT and PT in rats

NKCP (mg/kg)	Groups (n=6)					
	Cont.	5	10	15	100	250
APTT(s)	33	37	36	46	52	63
PT(s)	16	17	18	19	21	21

4. 考察

Bacillus subtilis は、指数増殖の終了期に細胞外へ 5 種類のプロテアーゼ (遺伝子; *apr*, *npr*, *epr*, *mpr*, *bpr*) を放出することが知られている。NKCP は、主要な放出酵素 Subtilisin protease(*apr*) と同じセリンプロテアーゼ Bacillopeptidase F(*bpr*) の 34Kda の断片であると考えられた。

今回用いた NKCP は、プラスミン合成基質の加水分解能で高い活性を示し、pH 6.0 以上かつ 60°C 以下で安定であり、保存性にも優れていた。また、ラット血栓形成モデルの腸管への投与で凝固遅延を認めた。

これらの NKCP の特性を考慮すると、血栓症予防薬としてヒトに対する臨床応用が期待できると思われ、今後さらなる検討が必要である。