

P4:ELISA 法及び合成発色基質法によるナットウ菌産生たんぱく質(BNPP)測定法の開発

朱 霞¹、大村 和伸^{1,2}、橋本 正勝³、前田 浩明¹

¹大和薬品(株)・研究開発部、²獨協医科大学・法医学教室、³(株)シマ研究所

ナットウ菌 *Bacillus subtilis natto* が数種のプロテアーゼを細胞外に分泌することがよく知られている。近年、これらのナットウ菌が産生したプロテアーゼの性質について多くの研究成果が報告されており、抗血栓性などの生理活性の研究に注目が集まっている。数多くの納豆やナットウ菌培養エキス食品も開発されている。一方、これらの食品に含まれている機能性関与成分の分析については、本来食品分析の基本である関連物質の定量方法(重量分析法)がまだない。血栓溶解活性の測定方法があるが、基質フィブリノーゲン及びトロンビンのロット間の差が激しいため、標準酵素と補正係数の導入が必要である。また、測定時の吸光度差が 0.04~0.08 となる極めて狭い範囲が要求され、標準酵素の入手が困難であるなど欠点がある。

本研究は精製ナットウ菌培養物 NKCP から血液の線溶・凝固系に作用する成分を精製し、Bacillopeptidase F のフラグメントであることを確認した。このナットウ菌が分泌する機能性たんぱく質(ナットウ菌産生たんぱく質 BNPP)の含有量とバチロペプチダーゼ活性を測定するために、ELISA 法及び合成発色基質法を開発した。

バチロペプチダーゼ活性の測定には、市販されているプラスミン様活性測定用の合成発色基質 S-2251(H-D-バリル-L-ロイシル-L-リジル-p-ニトロアニリド・ニ塩酸塩)を用いた。酵素反応速度論に基づいて反応条件を検討し、活性測定方法を確立した。37°C、5 分間の反応でバチロペプチダーゼにより遊離された p-ニトロアニリン(pNA)を波長 405nm で測定し、バチロペプチダーゼ活性を求めた。本活性測定法に標準品 p-ニトロアニリンの入手が簡単で、測定時間が短く、405 nm の吸光度が 1.0 までに酵素濃度との直線関係が認められた。

ナットウ菌産生たんぱく質(BNPP)の定量はウサギ抗 BNPP ポリクローナル抗体を用いたサンドイッチ ELISA 法により行なった。マイクロプレートリーダーで波長 490 nm/620 nm の吸光度を測定し、各濃度(0~100 ng/ml)の標準抗原液の吸光度より検量線を作成し、BNPP の含有量を求めた。各試薬がキットになっているので、測定が簡便である。現在、さらにバリデーシオンの検討を行なっている。