抗歯周病活性を有する食品成分の探索研究

篠原　力・安藤　智美・藤村　尚子・辻　智子*
(財団法人相模中央化学研究所第15研究班，同班班長*)

1. 緒　言

歯周病は，歯肉上皮ならびに歯周結合組織の破壊とそれに引き続いて起こる歯槽骨の吸収を主病変とする感染症である。その発症と進行には，歯肉縁下プラーク中に存在するグラム陰性嫌気性細菌群が深く関与している。中でも *Porphyromonas gingivalis* は，深い歯周ポケットから高頻度に検出され，成人性歯周炎や急性進行性歯周炎において最も重要な細菌であると考えられている[1]。*Porphyromonas gingivalis* は，血液凝集素や多くのプロテアーゼを生産しそれらが歯周病の進行や増悪に深く関与している。また，本菌は線毛を有しており線毛を介して歯肉組織への接着や，菌体相互の接着を行う。*Porphyromonas gingivalis* のこの様な病原性発現にとって最も重要な役割を果たす酵素として近年注目されているのが Arg-gingipain である。Arg-gingipain は，*Porphyromonas gingivalis* により特異的に生産されるシステインプロテアーゼであり，アルギニンのC末端を特異的に切断する。本酵素は，歯肉組織を直接分解するのみならず，1)強力な血球凝集活性を有する，2)補体成分の部分加水分解により好中球走化因子を生じさせる，3)多形核白血球の殺菌作用を抑制する，4)免疫グロブリンの分解などの作用を示す，等により宿主の免疫機能を阻害し感染を慢性化し，炎症を増悪する[2,3]。米国では，歯周病が心臓発作のリスクファクター第1位として注目されており，その原因に本酵素が関与している可能性も検討されている。また，Arg-gingipain の欠損株では細胞表層の線毛構造が失われており，外膜の主要な蛋白質の前駆体が蓄積している事から，Arg-gingipain は，*Porphyromonas gingivalis* の細胞表層蛋白のプロセッシング酵素として機能している事が予想されている[4]。本欠損株の培養上清には，血球凝集活性や，多形核白血球の殺菌抑制活性は見られない事からも，本酵素が *P. gingivalis* の主たる病原酵素である事が支持される[5]。

この様な背景から本研究は，Arg-gingipain を阻害する事により *P. gingivalis* の感染力と病原性を抑制し，歯周病の予防治療効果を示すような物質を見出す事を目的として行った。さらに，慢性口腔内疾患に対する使用である事を念頭に置き，安全性の高いソース，即ち食品成分中にその活性を求めた。

2. 方　法

2.1 粗 Arg-gingipain の調製

粗 Arg-gingipain は，*P. gingivalis* ATCC-33277 を3%トリプチケースソイブロス，0.5%イーストエキストラクト，0.05%システイン，0.5%ヘミンおよび0.1%メナジオンを含む培地中で37℃，嫌気的に（アネロパック<三菱ガス化学>）培養して得た培養上清から精製した。*P. gingivalis* ATCC33277 の培養液は，九州大学歯学部山本研究室より供給を受けた。本培養上清につき，4℃で75%飽和硫安沈澱を行い，10,000×g で20分遠心して沈殿を集め，0.05%の Brij 35 を含む10mM リン酸ナトリウム緩衝液（pH7.0）

に溶解後，同緩衝液で4℃で一晩透析した。透析後，不溶物を25,000×g で30分遠心して除き，上清を粗アルギンギパインとした。

本粗酵素の比活性は1,100 U/mg protein，蛋白質としての純度は7％であった。(酵素活性の1Uとは，基質Z-Phe-Arg-MCAから37℃で1分間に1nmolの7-アミノ-4-メチルクマリンを遊離させる活性をもって定義される。) 上記の粗精製酵素液中には，Arg-gingipain以外に基質Z-Phe-Arg-MCAを切断する酵素は，含まれていない事は門脇らによって確認されている。(私信)

2.2　Arg-gingipain アッセイ法

アッセイのプロトコールを以下に示す。

1)　96穴プレートにアッセイサンプル (1-10％ジメチルスルフォキサイド/DMSOに溶解)，0.01 U の粗 Arg-gingipain および5mM システインを含む20mM リン酸緩衝液 (pH7.5) を入れ，37℃で5分間プレインキュベートする。

2)　10μM の Z-Phe-Arg-MCA (4-メチル2-クマリルアミド) を添加して反応を開始し37℃10分間反応する。(反応開始時の総体積100μl)

3)　50mM の酢酸ナトリウム緩衝液 (pH5.0) に溶解した5mM ヨード酢酸を100μl 添加し反応を停止する。

4)　反応により遊離したアミノメチルクマリンの量を450nm の蛍光強度によって測定する。(励起波長365nm)

2.3　スクリーニングサンプルの調製

野菜，ハーブ類71種類をミキサーにより粉砕した後，フォルチ液 (クロロフォルム：メタノール＝2：1) で抽出し，濃縮乾固した後，1-10％DMSOに溶解してアッセイに用いた。アッセイへの添加量は，5-10％ (v/v) とした。

2.4　カテプシンL阻害活性の測定

カテプシンLの阻害活性はBarrettらの方法[3]に従って測定した。ヒト肝カテプシンL (Calbiochem) 0.01U (Uの定義はArg-gingipain同様) とジチオトレイトール (2mM) およびジメチルスルホキシドに溶解した阻害剤を0.01％Brij と1mM *EDTA-2Na* を含有した0.1M酢酸ナトリウム緩衝液 (pH5.5) 中で混合し，37℃で5分間プレインキュベートした後，10μM z-Phe-Arg-MCA を加えて反応を開始した。

37℃で10分間反応させた後，100mM モノクロロ酢酸ナトリウムを含む100mM 酢酸緩衝液 (pH4.3) を加えて反応を停止し，反応液の蛍光強度 (励起波長：365nm，蛍光波長：450nm) を測定した。

2.5　パパイン，フィシン，ブロメライン，キモトリプシンおよびトリプシン阻害活性の測定

パパイン，フィシンおよびブロメラインの阻害活性はSudaらの方法[7]を一部改変して測定した。各酵素溶液 (30分間の反応で280nm の吸光度が0.4-0.5になるように調製)，システイン (0.2 mg/ml) およびDMSOに溶解した阻害剤を17.5 mM ホウ酸緩衝液 (pH7.4) 中にて混合させ，37℃で5分間プレインキュベートした。ここにカゼイン (0.5％) を添加し，37℃で30分間反応させた。1.7M過塩素酸溶液を添加して反応を停止し，室温で1時間放置したのち，遠心上清の吸光度を280nm で測定した。

キモトリプシンおよびトリプシンの阻害活性はUmezawaらの方法[8]を一部改変して測定した。システインを2.5mM 塩化カルシウムに変えた他はパパインと同様の方法で行った。

2.6　抗菌作用の測定

抗菌作用の測定法として歯周病菌を含む各種微生物に対する最小発育阻止濃度 (MIC) を，液体培地希釈法により求めた。すなわち，下記の微

生物を培養し，菌数 2×10^8個/ml に調製し，菌液とした。濃度を段階的に変えた被検抗菌剤を含む培地50μl を入れたU底96穴プレートに，上記菌液を50μl を添加した。下記培養条件で2日間培養後，菌の発育の有無を肉眼で観察した。発育が認められない最小濃度（μg/ml）をMICとした。使用菌株，液体培地 組成および培養条件は以下の通りである。

ポルフィロモナス・ジンジバリス（*Porphyromonas gingivalis*）ATCC33277およびポルフィロモナス・ジンジバリス381は30g/l トリプチックソイブロス，5 g/l 酵母エキス，0.5 g/l システイン，5 mg/l ヘミンおよび1mg/l メナジオン中で，37℃，嫌気的に（アネロパック，<三菱ガス化学>）培養した。フゾバクテリウム・ヌクリエータム（*Fusobacterium nucleatum*）ATCC25586は0.05% システインを含むブレインハートインフュージョンブロス中で，37℃，嫌気的に（アネロパック，<三菱ガス化学>）培養した。ストレプトコッカス・ミュータンス（*Streptococcus mutans*）IFO13955およびアクチノミセス・ビスコーサス（*Actinomyces viscosus*）ATCC15987はブレインハートインフュージョンブロス中で，37℃，好気的に培養した。ヘリコバクター・ピロリ（*Helicobacter pylori*）ATCC43526，43579および43629は10% ウシ胎児血清を含むミュラーヒントンブロス中で，37℃，微好気的に（カンピロパック，<三菱ガス化学>）培養した。エシェリヒア・コリ（*Escherichia coli*）ATCC25922およびスタフィロコッカス・アウレウス（*Staphylococcus aureus*）ATCC25923はミュラーヒントンブロス中で，37℃，好気的に培養した。アスペルギルス・テレウス（Aspergillus terreus）はサブロー培地中で，25℃，好気的に培養した。

3. 結　果

3.1　スクリーニング結果

71種のサンプルのうちナツメグ抽出物に強い活性が見られた。ナツメグの各種抽出物の活性を**表1**に示す。

以上の結果よりナツメグの活性成分はクロロフォルム：メタノール（2：1）の混合溶媒により効率良く抽出される事が推定された。

3.2　活性成分の単離精製

精製法は，**図1**に示した。

ナツメグ粉末（*Myristica fragrans Houtt*）50gをクロロホルム：メタノール（2：1）250mlで，30分間室温で抽出した。この抽出操作を2回繰り返し，得られた抽出液を減圧濃縮した。

この抽出物に水500ml を加え，酢酸エチル500ml で3回抽出した。酢酸エチル層を減圧乾固することにより19.7gの油状物質を得た。この油状物質をクロロホルム：メタノール（2：1）に溶解後，ヘキサンで充填したシリカゲルカラム（5×10cm）にチャージした。ヘキサン：アセトン（100：0），（90：10）各3l で溶出される画分を

表1　ナツメグ抽出物の酵素阻害活性

抽出溶媒	Arg-gingipain 50%阻害濃度 反応系への添加濃度（%v/v）
メタノール	0.080
50%含水メタノール	0.23
アセトン	0.042
50%含水アセトン	0.065
クロロフォルム：メタノール（2：1）	<0.012

ナツメグ（50 g）
↓
クロロフォルム/メタノール（2:1）抽出　(23.8g)
↓
酢酸エチル抽出(20. 2g)
↓
シリカゲルクロマトグラフィー：　ヘキサン：アセトン(90：10)で洗浄
ヘキサン：アセトン(80：20)で溶出
活性物質重量(272mg)
↓
逆相 HPLC：　アセトニトリル：水（50:50）
↓
活性物質 S15A　(104 mg)

図1　S15Aの精製フロー

除去後，ヘキサン：アセトン（80：20）の混合溶媒で溶出し272mgの油状活性物質を得た。この油状物質をメタノール27.2m*l* に懸濁後，濾液を高速液体クロマトグラフィーで精製した。（カラムサイズ；30×250mm，担体；CAPCELL PAK C18 UG120（資生堂社製），溶媒組成；50%アセトニトリル，50% 水，流速；40m*l*/min，温度 23℃，検出波長；210nm，装置；東ソー HLC-8070）。保持時間18-21分の画分を分取し，減圧下溶媒を留去した後，酢酸エチルで抽出し，104mgの精製物 S15A を得た。

以下に S15A の物性データを示す。（**表 2**）。Mass，NMR（COSY，HMBC）スペクトルの解析の結果，S15A をマラバリコンC **図 2** と同定した。

表 2　S15A の物性及びスペクトルデータ

色，性状	淡黄色油状	
溶解性	DMSO，アセトン，メタノールに易溶 クロロフォルムに難溶 水に不溶	
マススペクトル		
EI-MS	m/z 358(M)	
CI-MS	m/z 359(M+H)	
SIMS（グリセロール）	m/z 359(M+H)	
SIMS（グリセロール+NaCl）	m/z 381(M+Na)	
NMR スペクトル		
^{13}C-NMR(125MHz)，^{1}H-NMR(500MHz)データ(DMSO-d_6)		
No.	δc	δH(J=Hz) assign.
1，5	160.8	− =C×2
2，4	107.1	635d(8.2) 2H =CH×2
3	135.2	7.2 t(8.2) 1H =CH
6	111.0	− =C
7	207.4	− C=O
8	44.0	3.01t(7.3) 2H $>CH_2$
9	23.9	1.58m 2H $>CH_2$
10*	28.6	1.26m $>CH_2$
11*	28.76	1.26m $>CH_2$
12*	28.82	1.26m $>CH_2$
13*	28.9	1.26m $>CH_2$
14	31.2	1.47m 2H $>CH_2$
15	34.5	2.37t(7.6) 2H $>CH_2$
16	133.1	− =C
17	115.6	6.54d(2.0)1H =CH
18	144.9	− =C
19	143.0	− =C
20	115.4	6.60d(8.0) 1H =CH
21	118.8	6.39dd(8.0,2.0) 1H =CH
	−	11.55brs 2H OH
	−	8.56brs 2H OH

*は，交換可能

3.3　マラバリコンCの Arg-gingipain 阻害活性

（1）　マラバリコンCの Arg-gingipain 阻害活性を**表 3** に示した。50%阻害濃度（IC50 値）は，2.0μM であった。

（2）　マラバリコンCの酵素阻害特異性を調べた結果を**表 4** に示した。これらの結果からマラバリコンCは，システインプロテアーゼ特異的阻害剤である事が示唆された。

（3）　マラバリコンCの阻害可逆性の検討：マラバリコンCと Arg-gingipain の混合液を透析し，透析によって Arg-gingipain の酵素活性が回復するかどうかを指標に，阻害の可逆性について検討した。同一条件下で，可逆阻害剤として知られるロイペプチンと不可逆阻害剤として知られるヨード酢酸についても検討した。4℃で12時間毎に透析外液のバッファー（50mM リン酸ナトリウム

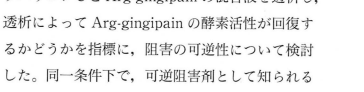

図 2　S15A/マラバリコンCの構造

表 3　アルギンギパイン阻害活性

試料	濃度	アルギンギパイン活性（相対値）
コントロール		100
マラバリコンC	3.8×10^{-7}M	82
	1.1×10^{-6}M	70
	3.4×10^{-6}M	41
	1.0×10^{-5}M	0

表 4　各種プロテアーゼに対するマラバリコンCの阻害活性

酵素	IC_{50}値（μM）
（システインプロテアーゼ）	
Arg-gingipain	2.0
カテプシンL	4.5
（その他のプロテアーゼ）	
パパイン	134.0
フィシン	>279.3
プロメライン	>279.3
キモトリプシン	184.4
トリプシン	134.0

バッファー，pH7.5）交換を行い，交換時に内液の酵素活性を調べた。結果を**表5**に示した。

これらの結果よりマラバリコンCのArg-gingipain阻害は，不可逆阻害である事が示唆される。

（4）　マラバリコンCの抗菌活性

各種嫌気性及び好気性微生物に対するマラバリコンCの抗菌性を**表6**に示した。

マラバリコンCは，*P. gingivalis* に対して選択的な抗菌活性を有する事が明らかとなった。

4. 考　察

マラバリコンCは，1977年にPurushothamanらによって *Myristica malabarica Lam*（ニクズク科）の果皮から単離された他，*Myristica fragrans*（ニクズク）種衣(Mace)からも単離されている[9,10]。本研究では，香辛料として市販されているナツメグを実験材料として用いているが，ナツメグは *Myristica fragrans* の種子の仁である。マラバリコンCには，殺線虫作用[10]，抗腫瘍活性[11]，殺菌[12]，抗酸化作用[13]，コラーゲン合成促進作用[13]などが知られているが，プロテアーゼ阻害活性についての報告はない。本研究により，マラバリコンCが，システインプロテアーゼに選択性の高い阻害活性を示す事，特に歯周病の病原酵素であるArg-gingipainに対し不可逆的に結合して強力な阻害活性を示す事が明らかとなった。マラバリコンCは，病原酵素を阻害するのみならず，病原菌である *P. gingivalis* に対し選択的な抗菌活性を示すことから歯周病の予防，治療に有用な物質として実用化が期待される。

しかしながら，この選択的抗菌活性のメカニズムは不明である。Arg-gingipainは，*P. gingivalis* の細胞膜表層蛋白のプロセッシング酵素であり，Arg-gingipain欠損 *P. gingivalis* は，線毛を欠く事が知られているが，増殖能は正常である。従って，Arg-gingipainの活性が阻害を受ける事により，菌の増殖が抑制される可能性は低い。また，我々は本報告に示した以外にも強力なArg-gingipain阻害剤の合成に成功しているがこれらの阻害剤は全く *P. gingivalis* に対して抗菌活性を示さない。以上の事から，マラバリコンC の *P. gingivalis* 選択的抗菌活性のターゲット分子はアルギンギパイン以外の未知の分子である可能性がある。このターゲット分子を明らかにする事により新たな *P. gingivalis* 特異的抗菌剤開発のtoolを得る事が出来る。また，マラバリコンC の *P. gingivalis* 阻害メカニズムに関するもう一つの可能性として，Arg-gingipainとマラバリコンCの不可逆的結合体が，菌体内外において，*P. gingivalis* の増殖を阻害する可能性も考えられる。マラバリコンCの *P. gingivalis* 阻害メカニズムについては今後の検討課題である。

マラバリコンCは，無味無臭であり経口投与における LD_{50} が2g/kgと，極めて安全性の高い物質である事から，今後は，口腔内に用いる組成物としての応用研究を進める。

表5　マラバリコンCのArg-gingipain阻害可逆性試験

	Arg-gingipainの残存活性 (nmol/mim/mg/protein) (% of control)			
透析回数	阻害剤無し	マラバリコンC	ヨード酢酸	ロイペプチン
0	411 (100)	0 (0)	21 (5)	0 (0)
1	418 (100)	0 (0)	105 (25)	28 (7)
2	216 (100)	52 (20)	61 (23)	249 (95)
3	314 (100)	82 (26)	53 (17)	242 (77)

表6　抗菌活性の測定結果

微生物	最小発育阻止濃度 マラバリコンC	MIC (μg/ml) エリスロマイシン
P. gingivalis 33277	0.39	0.078
P. gingivalis 381	0.098	0.020
F. nucleatum	3.1	10
S. mutans	50	0.039
A. viscosus	13	0.0098
H. pylori 43526	25	0.16
H. pylori 43579	13	0.078
H. pylori 43629	25	0.31
E. coli	>50	>10
S. aureus	13	0.31
A. terreus	>50	>10

5. まとめ

71種類の野菜，ハーブ類の抽出物を対象に，歯周病の病原酵素 Arg-gingipain 阻害活性を有する物質を探索した。その結果，ナツメグの抽出物に含まれるマラバリコンCを見出した。マラバリコンCは，Arg-gingipain，カテプシンLなどのシステインプロテアーゼに対し選択的に阻害活性を示し，*P. gingivalis* に対して選択性の高い抗菌活性を示した。

本研究を遂行するにあたり，多大な研究助成金を賜りました浦上食品・食文化振興財団に深謝すると共に，貴財団の今後益々のご発展を祈念いたします。

P. gingivalis 培養液を供与いただいた他，Arg-gingipain の精製や，アッセイ等をご指導いただきました九州大学歯学部山本健二教授に深謝いたします。

文　献

1) Holt, S. C. et al., Crit. Rev. Oral Biol. Med.,2,177, (1991)
2) Chen, Z. et al., J. Biol. Chem. 267, 18896 (1992)
3) Kadawaki, T. et al., J. Biol. Chem. 269, 21371, (1994)
4) Nakayama, K. et al., J. Bacteriol. 178, 2818, (1996)
5) Nakayama, K. et al., J. Biol. Chem. 270, 23619, (1995)
6) Barrett, A. J. et al., Methods Enzymol. 80, 535, (1981)
7) Suda, H. et al., J. Antibiotics, 25, 263, (1972)
8) Umezawa, H. et al., J. Antibiotics, 23, 425, (1970)
9) Purushothaman, K. K. et al., J. Chem. Soc.,Perkin Trans1, 287, (1977)
10) Nakamura, N. et al., Chem. Pharm.Bull. 36, 2685, (1988)
11) 特開平1－42440
12) Orabi, K. Y. et al., J. Nat. Prod. 54, 586, (1991)
13) 特開平7－33651

Malabaricon C isolated from nutmeg is a potent inhibitor of Arg-gingipain, a major virulence factor of periodontal disease produced by *Porphyromonas gingivalis*

Chikara Shinohara, Tomomi Ando, Naoko Fujimura and Tomoko Tsuji
(Sagami Chemical Research Center)

Porphyromonas gingivalis, a gram-negative, black-pigmented anaerobe, has been strongly implicated in the etiology of periodontal disease. Many proteolytic enzymes produced in large quantities by this pathogen are recognized as important virulence factors in *P. gingivalis* infection. Arginine-specific cystein protease, Arg-gingipain (gingipain R, EC3.4.22.37) is one of such proteases produced by *P. gingivalis*. Periodontal tissue components are directly destroyed and normal host defense mechanisms are disrupted by this enzyme via hydrolysis of many physiologically significant proteins. Therefore, potent inhibitors of Arg-gingipain could be applied to the prevention and the therapy for the periodontal disease caused by *P. gingivalis*.

During our screening for Arg-gingipain inhibitors, a crude extract of nutmeg showed a potent inhibitory activity and its major active component was isolated. The active compound was isolated and identified to be malabaricine C by analysis of NMR and Mass spectra. Malabaricone C irreversibly inhibited Arg-gingipain by 50% at a concentration of 2.0μM and the inhibitory activity was selective for cystein ptoteases.

Furthermore, malabaricone C selectively suppressed the growth of *P. gingivalis*. Arg-gingipain is a processing enzyme of the outer membrane protein and its deletion mutant strain of *P. gingivalis* lacks the fimbria, however, its growth is known to be normal. Therefore, the growth suppression of *P. gingivalis* by malabaricone C can not be explained by its Arg-gingipain inhibition. Further study will be needed to clarify the mechanisms of the selective anti-bacterial activity for *P. gingivalis* by malabaricone C.

Malabaricone C is tasteless and odorless, and very safe compound of which LD_{50} for rat by oral administration is over 2g/kg. These characters are favorable for its use in the daily prevention or chemotherapy of periodontal diseases caused by *P. gingivalis*.