

<平成 28 年度助成>

納豆製造モデルを用いたう蝕原性バイオフィーム抑制物質の探索 ～納豆によるう蝕リスク低減化をめざして～

成澤 直規

(日本大学 生物資源科学部食品生命学科)

背景と目的

う蝕とは、歯の硬組織が口腔内細菌の産生する酸により脱灰される口腔疾患の一つである。口腔常在細菌である *Streptococcus mutans* は酸耐性・酸生産性に優れ、かつ歯面上へ強固なバイオフィームを形成することから、主要なう蝕原因菌である。う蝕リスクを低減するには、*S. mutans* のバイオフィームをコントロールすることが最重要である。一般にバイオフィームとは担体表面上に付着した微生物のフィルム状構造体のことを指し、細胞は菌体外多糖等に囲まれており、物理的処理や抗生物質等の化学的処理に対して高い耐性を示し、主に医療分野において問題とされている。よって、*S. mutans* のバイオフィーム形成を制御するためには、耐性菌を作らず安全で安価な食品素材を用いることが有効である。

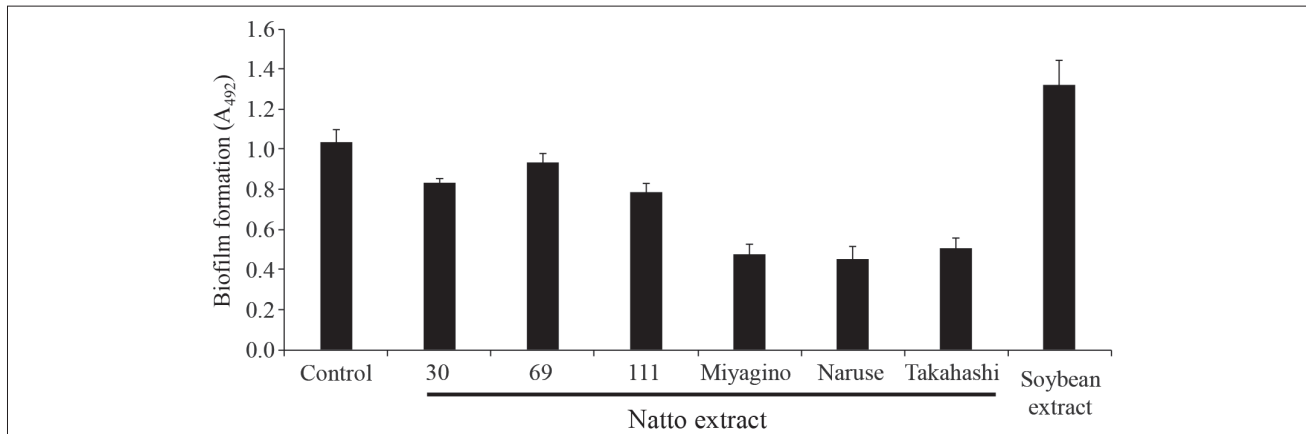
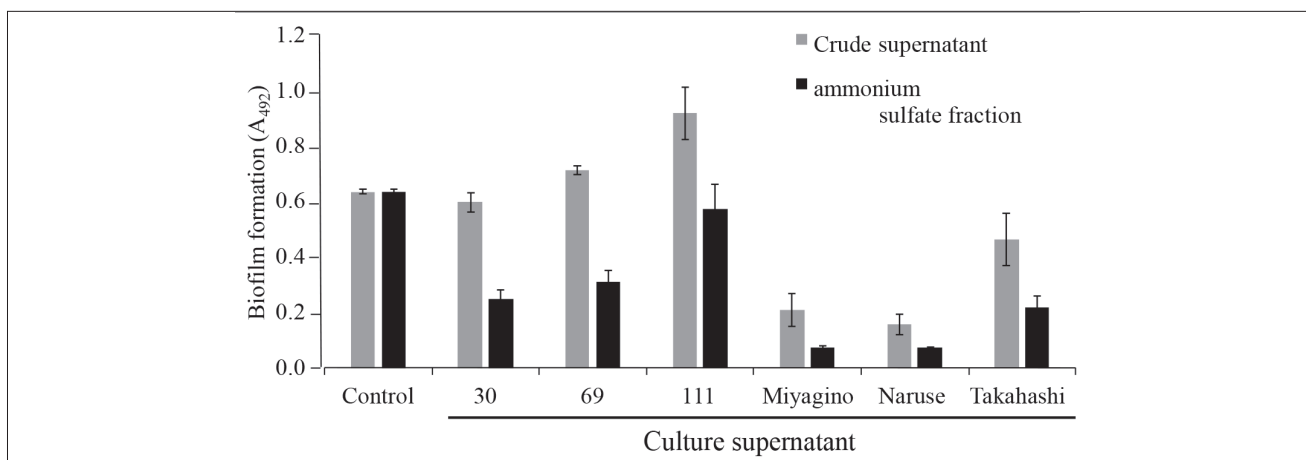
我々は納豆中の可溶性画分が、*S. mutans* のバイオフィーム形成を強く阻害する効果を有することを明らかにし、さらに本現象は生菌には影響しないことも確認している。抑制因子は納豆中で主要なセリン型プロテアーゼであるナットウキナーゼと類似していることを報告した^{1, 2)}。一方で、納豆抽出液中のバイオフィーム形成抑制物質は複数種存在するものと予想され、その全容は明らかとなっていない。そこで本研究では、各種納豆菌を用いてバイオフィーム形成抑制効果の高い納豆を作出し、抑制因子の探索を行った。

方法

S. mutans はヒト臨床分離株 FSM11 株を使用した。納豆菌は高橋株、宮城野株、成瀬株および市販納豆分離株 3 株 (No. 30, No. 69, No. 111) を用いた。納豆製造は大豆としてユキシズカを用い、蒸煮後、各種納豆菌を植菌し、37℃で一晩発酵させた。発酵後、製造された納豆に滅菌水を加え、ストマッキングを行うことで可溶性画分の抽出を行い、0.22μm フィルター除菌後に各種実験に供した。プロテアーゼ活性評価は、アゾカゼインを基質とし、1 分間あたりに A₄₄₀ を 0.001 上昇させる活性を 1unit とした。スクラーゼ活性はスクロースを基質とし、1 分間にグルコースを 10μg 増加させる量を 1unit とした。バイオフィームの形成は 0.25% スクロース添加 Tryptic soy broth without dextrose (TSB) 液体培地を使用し、96 well titer plate に *S. mutans* を 1% 量植菌し、37℃、5%CO₂ 条件で 20 h 培養した。必要に応じて納豆抽出液を 50% 量添加した。培養後、well 底部に付着した細胞をサフラニン溶液で染色し、70% エタノールで色素抽出後、492nm の吸光度を測定しバイオフィーム形成量とした。

結果

納豆中のバイオフィーム形成抑制物質の探索にあたり、大豆品種ユキシズカを用いて納豆製造を行った。納豆菌として市販納豆分離株 3 株、高橋株、宮城野株、成瀬株の計 6 菌株を用いた。納豆作成後の抽出液のバイオフィーム形成抑制効果を Figure 1 に示す。宮城野株、成瀬株、高橋株で製造された納豆

Figure 1. Effect of natto extract and soybean extract on *S. mutans* biofilm formation.Figure 2. Effect of culture supernatant of *B. subtilis* natto on *S. mutans* biofilm formation.

由来の抽出液中に強いバイオフィーム形成抑制効果が認められた。一方で、分離株3株の場合では抑制効果はわずかであった。

原料大豆には抑制効果は確認されなかったことから (Figure 1)、抑制効果の違いは納豆菌の特性の違いに関連するものと考え、各種納豆菌の培養液成分に注目して分析を行った。各納豆菌の培養ろ液は、TSB 培地 +0.25% スクロースにて培養を行い、フィルター除菌により取得した。培養ろ液のバイオフィーム抑制効果は菌株間で大きく異なり、宮城野株、成瀬株、高橋株で強い阻害効果が確認された (Figure 2, Gray bars)。この結果は先の納豆抽出液の抑制効果とよく類似している。これら培養ろ液を硫酸沈殿および透析により濃縮・精製を行った結果、いずれの試料においてもバイオフィーム形成抑制効果が増加した (Figure 2, Black bars)。このことから、各種培養ろ液にはバイオフィーム形成促進因子も存在す

るものと考えられる。培養液、および培養ろ液の中の各種成分を調べた結果、各菌株間で生菌数と pH に大きな違いは認められなかった (data not shown)。一方で、バイオフィーム形成の促進因子の一つであるスクロース量には各試料間で違いが認められ、納豆菌 No.69 と No.111 において残存量が多いことが確認された (Figure 3A)。濃縮・精製後の抽出液を対象としてバイオフィーム形成抑制因子であるプロテアーゼ、およびスクラーゼ活性を測定した結果、菌株間で違いが認められ、プロテアーゼは高橋株で、スクラーゼに関しては宮城野株と成瀬株で高い活性が認められた (Figure 3B and 3C)。

納豆菌のスクラーゼ生産条件を明らかにするため、培養液中のスクロース量を変化させた際の活性を評価した。高橋株を対象として、スクロース濃度を 0 から 10% 量の範囲内で解析を行った結果、0% ではスクラーゼ活性が認められなかったのに対し、

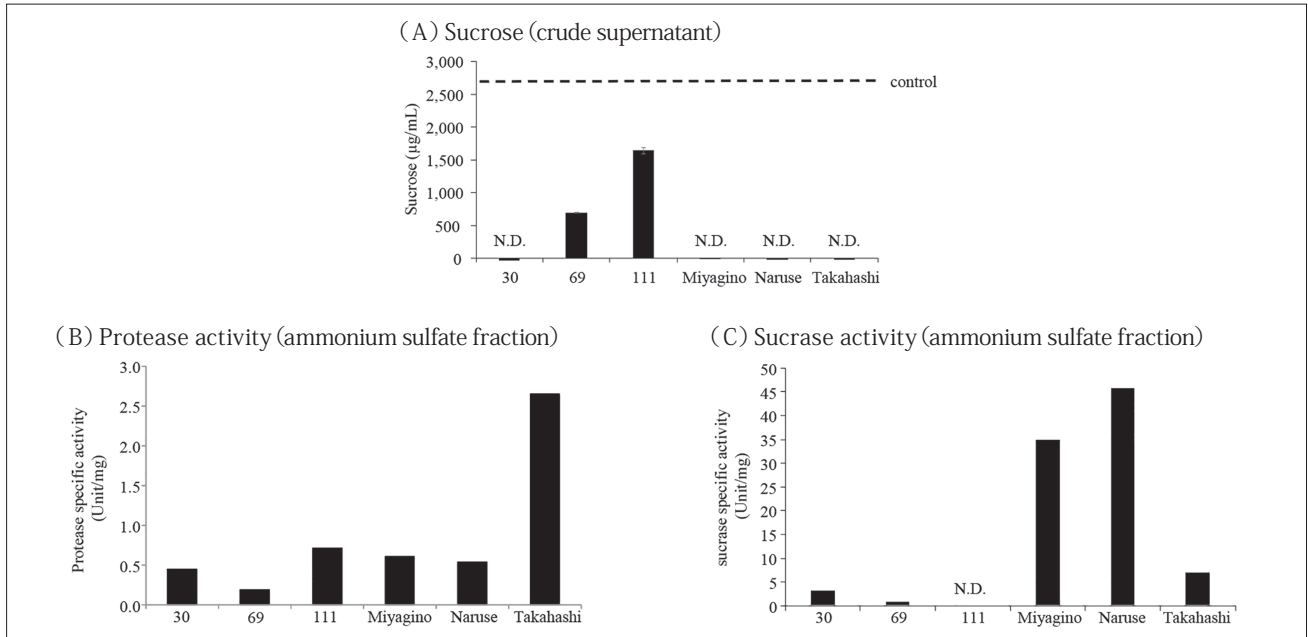


Figure 3. Characterizations of culture supernatant.

スクロースの添加量を増加させることで活性の増加が確認され、10%量存在下では600unit程度であった。一方、納豆菌の近縁種である枯草菌においては、スクロース10%量ではほとんどスクラーゼが誘導されなかった。このことから、納豆菌は低濃度のスクロース存在下によりスクラーゼが誘導可能であることが明らかとなった。我々は10%スクロース存在下で誘導される遺伝子について、マイクロアレイ解析、および定量PCRにより評価した。その結果、既知のスクロース代謝に関わる遺伝子発現に加え、いくつかのアミノ酸代謝に関わる遺伝子発現量の差異が確認された。

考察

S. mutans のバイオフィーム形成は、スクロースの代謝により形成される粘着性不溶性グルカン合成に依存する。本研究の納豆製造モデルを用いた解析結果から、納豆中のバイオフィーム形成抑制因子の一つはスクラーゼであることを提示する。我々は、スクラーゼが *S. mutans* に代謝される前にスクロースを分解し、不溶性グルカン合成阻害によりバイオ

フィルム形成を阻害するものと考えている。

また、納豆中のバイオフィーム抑制効果は、スクロースの残存量にも強く影響するものと考えられる。バイオフィーム形成に影響するプロテアーゼやスクラーゼ、そしてスクロースの存在は、使用する大豆品種の違いに加え、納豆菌の特性に強く影響するものと考えられる。現在、納豆製造に用いられている納豆菌は大きく高橋株、成瀬株、宮城野株のいずれかに由来するものであるが、近年ではメーカーごとに独自の納豆菌を開発し、それぞれ特徴ある商品を創出している。今回使用した納豆分離株は、いずれもスクラーゼ生産性が乏しいことが明らかとなった。また過去の報告から、市販納豆の製造過程においてスクラーゼは発酵初期に誘導されるが、その存在量はごくわずかであるとの報告もある。スクラーゼの誘導にはスクロースの存在が必要であるが、一方でスクロースはバイオフィーム形成促進効果を有することから、必ずしも有効な手段とはならないと推測される。今後、他のスクラーゼ誘導条件を明らかにすることで、バイオフィーム形成抑制効果の高い納豆の創出が可能になるものと期待される。

謝 辞

研究助成のご支援をいただきました公益財団法人浦上食品・食文化振興財団に深く御礼申し上げます。また、本研究遂行にご協力いただいた、日本大学大学院生 中村知世さん、岩本理さん、学部4年生 秋田谷聖希さん、石原麻衣さん、大野深紅さん、食品資源利用学研究室の皆様にご礼申し上げます。

参考文献

- 1) Iwamoto, A., Nakamura, T., Narisawa, N., Kawasaki Y., Abe S., Torii Y, Senpuku H., and Takenaga F. The Japanese fermented food natto inhibits sucrose-dependent biofilm formation by cariogenic streptococci. Food Sci. Tech. Res., 2018, In press.
- 2) Narisawa, N., Kawasaki, Y., Nakashima, K., Abe, S., Torii, Y., and Takenaga, F. Interference effects of proteolytic nattokinase on biofilm formation of cariogenic streptococci. Food presser. Sci., 2014, 40, 273-278.

Cariogenic biofilm inhibition by Japanese fermented natto

Naoki Narisawa

*Department of Food Bioscience and Biotechnology,
College of Bioresource Sciences, Nihon University*

Natto, a traditional Japanese non-salt-fermented food product made from soybeans, has been popular for more than 1,000 years and is currently one of the most widely consumed fermented foods in Japan. Our previous study indicated that natto extracts inhibited sucrose-dependent biofilm formation by cariogenic *S. mutans* without affecting the growth rate of the bacterium. The effects of natto extracts on *S. mutans* were correlated with protease activity. However, there have been no reports on the effect of the other factors present in natto against biofilm formation by cariogenic streptococci. The objective of this study was to investigate the putative factors in natto that inhibit biofilm formation by cariogenic streptococci. Six natto starters (*Bacillus subtilis* natto with strains Miyagino, Takahashi, and Naruse, and isolate strains No. 30, No. 69, and No. 111) were used for the production of natto. Treatments with cell-free extracts derived from natto with strains Miyagino, Takahashi, and Naruse significantly reduced the biofilm formation of *S. mutans* FSM11. We investigated the sucrose, protease, and sucrase content of each culture supernatant. The effects of culture supernatant on *S. mutans* were correlated with both sucrase and protease activity. The natto extracts made from natto with the isolate strains, but not with strains Miyagino, Takahashi, and Naruse, included sucrose, which is the main agent involved in biofilm formation. The purification of the sucrase from natto may be useful for developing oral care products such as toothpaste. Further investigation is required to elucidate the mechanisms by which this enzyme exerts its anti-biofilm effects.