

## 納豆菌 (*Bacillus natto*) 固形培養による血栓溶解酵素の産生

須見 洋行    三宅 佐和\*    矢田貝智恵子\*    松原 主典

**要旨** 納豆菌 (*Bacillus natto*) を接種した11種類の穀類で固形培養を行い、産生される血栓溶解酵素の活性を人工血栓 (フィブリン) の溶解力で比較した。その結果、いずれも40℃、18~66時間の発酵で活性が認められ、特にリョクトウ (*Vigna rasiata* WILCZ)、クロマメ (*Glycine hispida* MAX)、及びダイズ (*Glycine hispida* MAX) ではいずれもヒト血漿プラスミンに換算して1.0CU/g (湿重量) 以上に相当する非常に強い活性の生じることが分かった。

また、血栓溶解能の高かった発酵物中には同時にプロ-ウロキナーゼ活性化酵素 (Pro-UK Act) も、ほぼ血栓溶解活性と相関して検出されることが分かった。

両活性は発酵物を乾燥粉末にして長期間安定であり、新しい機能性食品素材としての応用開発が期待された。

**キーワード:** 穀類、納豆、ナットウキナーゼ、プロ-ウロキナーゼ、血栓溶解

### はじめに

我々はこれまで日本の伝統食品である (糸引き) 納豆中に血栓溶解酵素ナットウキナーゼ (NK) を発見し、その性質及び投与効果について報告してきた。NKは分子量27,700、N末端がAlaの単一ポリペプチド鎖構造のセリン酵素で<sup>1,4)</sup>、何よりも特徴的なのは分子当たりの血栓溶解能がこれまでのいずれの線溶酵素よりも強力であるということである<sup>4)</sup>。また、最近納豆中にはNKとは異なる、より高分子量のプロ-ウロキナーゼ活性化酵素 (Pro-UK Act) も確認されている<sup>5)</sup>。これらの酵素は、in-vitroのみならずラットあるいはヒトに経口投与した場合でも極めて持続的に血中線溶発現に働くことから<sup>5, 6)</sup> 血栓溶解剤としてだけでなく、各種成人病予防目的の新しい機能性食品素材として開発が期待されているが、今まで固形培養については大豆による一般の納豆製造以外これら酵素の検討はほとんどなされていなかった。

今回、我が国で食べられる代表的な穀類発酵での両酵素の産生量を調べたのでその成績を報告する。

### 実験方法及び材料

#### 1) 材料

供試穀類として用いたソバ (*F. esculentum*)、ゲンマイ (*Oryza sativa* L.)、ハトムギ (*Coix lacryma-jobi* L.)、トウモロコシ (*Zea mays* L.)、アズキ (*Vigna angularis* OHWI)、ササゲ (*Vigna sinensis* SAVI)、ソラマメ (*Vicia faba* L.)、クロマメ (*Glycine hispida* MAX)、リョクトウ (*Vigna rasiata* WILCZ)、ダイズ (*Glycine hispida* MAX)、カボチャ種子 (*Cucurubita spp.*) の11種は全て岡山市内で購入したものを使用。牛血漿フィブリノーゲン (Fructon 1) はSigma社(株)、トロンピンは持田製薬(株)、臨床用ウロキナーゼはミドリ十字社(株)、その他の試薬は全て特級品を購入した。ヒト血漿プラスミンは既に報告した方法<sup>7)</sup> で調製したp-nitrophenylguanidinobenzoateによるタイトレーションで81.7% activeのGlu-タイプ酵素である。Pro-UKはヒト腎組織培養液より既に報告した方法<sup>8)</sup> で純化したプラスミン活性化後の比活性86,000IU/mg蛋白の標品を使用した。

#### 2) 納豆菌による発酵

各種穀類を3倍量のイオン交換水で37℃、18時間浸漬したもの (湿重量100g) をPSP容器に入れ、



オートクレーブで120℃、20分間煮沸した。各々にクリーンベンチ内で納豆菌 ( $2.5 \times 10^7$ 細胞/0.5ml) を接種後、40℃、18~66時間のインキュベーションを行った。経時的に5gづつを採取し、各々を蒸留水で10倍容量として1分間ミキサーで処理後、3,000rpm、5分間の遠心分離を行ない、上清に得られる水可溶画分を以後の測定試料とした。

### 3) 人工血栓溶解法

AstrupとMullertzの方法<sup>9)</sup>で人工血栓(標準フィブリン平板)を調製した。フィブリンノーゲン(終濃度0.6%、トロンビンは2.5U/0.5ml)を使用した。活性測定には試料30 $\mu$ lを用い、37℃、1時間インキュベーション後に生じたフィブリン溶解窓の面積(長径 $\times$ 短径、mm<sup>2</sup>)を測定した。

### 4) プロ・ウロキナーゼアクチベーター (Pro-UK Act) 活性

試料を蒸留水でさらに50~500倍に希釈したもの10 $\mu$ lを0.15 $\mu$ g Pro-UK/0.1Mリン酸緩衝液、pH7.4(100 $\mu$ l)と37℃、1時間プレインキュベーション後30 $\mu$ lの $2.5 \times 10^{-4}$ M pyro-Glu-Gly-Arg-pNA(Chromogenik AB, Sweden)を加えて37℃、1時間で生じる405nmの変化で測定した<sup>10)</sup>。活性はPro-UK添加系と非添加系の吸光度の差より、37℃、1分間当たりに遊離されるパラニトロアニリンを標準としてモル数で算出した。

## 実験成績

### 1) 納豆菌による発酵と血栓溶解活性

図1には*Bacillus natto*(BN株)による11種類の穀類を40℃、18時間固形培養した時の写真を示すが、このような短時間の発酵でも全てに血栓溶解活性が確認された。その活性は発酵時間を延ばすとさらに高まり、図2及び表1、左に示すように66時間目には抽出液1滴(30 $\mu$ l)で人工血栓(平板)をいずれも50mm<sup>2</sup>/1hr、37℃以上溶解した。特に強かったリョクトウ、クロマメ、及びダイズの溶解活性(1205、855、840mm<sup>2</sup>/1hr、37℃)はヒト血漿プラスミン

を標準として0.1カゼイン単位(CU)/ml以上に相当する極めて強いものであった。

なお、この同じ1時間という非常に短いインキュベーションの測定条件下で臨床で用いられている血栓溶解剤ウロキナーゼ(1,000IU/ml)を試験してみたが全く活性は認められず、同酵素が標準フィブリン平板法で溶解を示すには37℃、18時間のインキュベーションを要した。

### 2) Pro-UK Act活性

各発酵産物抽出液中のPro-UK Act活性を測定した結果が表1、左である。今回の測定系ではほとんどの試料で100~500倍希釈したもの10 $\mu$ lを使用して強い活性が測定され、やはり特に発酵原料としてリョクトウ、クロマメ、ダイズを使用した場合が強く、またそれらの値もほぼ血栓溶解活性と相関することが分かった。

### 3) 納豆パウダーの試作

酵素活性の特に高かったダイズ、クロマメ及びリョクトウをの発酵物(40℃、18時間の固形培養)を真空乾燥後ブレンダーで粉碎したものは、全てきれいな黄色、紫、及び薄緑色の粉末となり、水に溶かしてもほとんどニオイは生じなかった。これらを密封ガラス容器に入れて各種温度下で保存し、経時的に含まれる両酵素の安定性を調べてみたが、いずれ

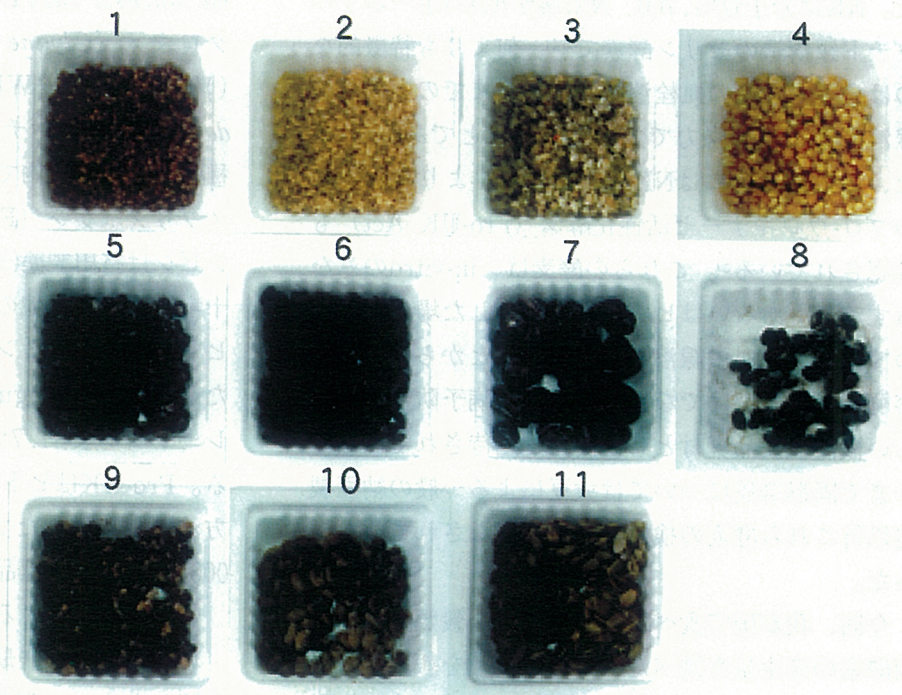


図1 納豆菌による穀類発酵

11種類の穀類(1.ソバ、2.ゲンマイ、3.ハトムギ、4.トウモロコシ、5.アズキ、6.ササゲ、7.ソラマメ、8.クロマメ、9.リョクトウ、10.ダイズ、11.カボチャ種子)を固形培養した発酵産物。この段階でニオイはほとんどない。



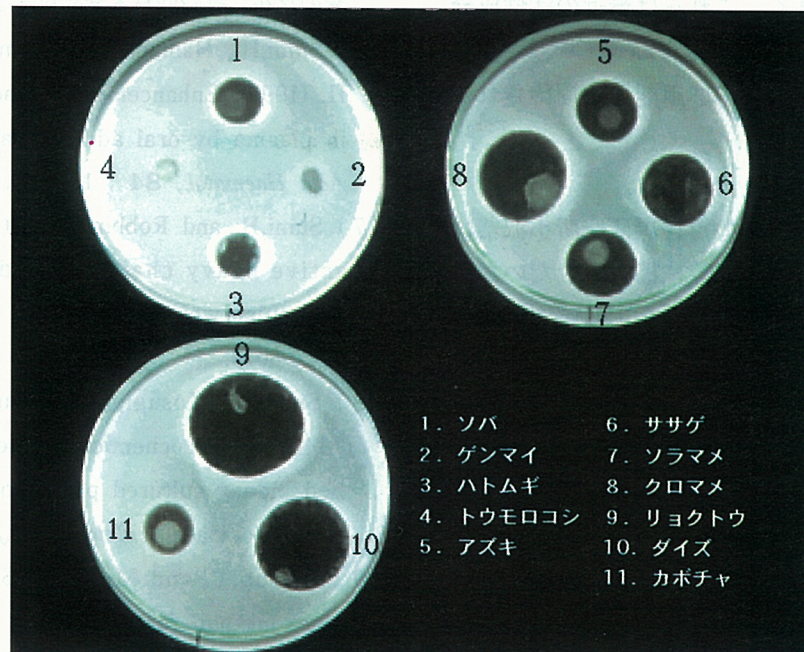


図2 穀類納豆の血栓溶解能

10倍容量の蒸留水で抽出した試料30 $\mu$ lを人工血栓平板にのせた場合、いずれも37℃、1時間という短時間のインキュベーションで強力に溶解されているのが分かる。

も3ヶ月間で20℃以下では100%、そして60℃でも86%以上の活性が保持されていることが分かった。

### 考 察

大豆以外の穀類も納豆菌による発酵で全て血栓溶解活性を産生すること(図2)、水抽出物中の活性は人工血栓平板法で測定してリョクトウ、クロマメ、ダイズの順に強力な活性を持ち、これらは湿重量(g)当たりで現在最も強力な血栓(フィブリン)溶解酵素とされるヒト血漿プラスミンの1.0CU以上に相当する強いものであることが分かった。

穀類の中でも米とかトウモロコシはダイズなどに比べて低蛋白、低脂肪で納豆菌の生育にとっては決して有利な基質ではないと考えられたが、いずれの穀類でも産生されたことは微生物におけるNKの生理的重要性を示唆するもので興味を持たれる。また、特に強い血栓溶解活性を示した3種の穀類については最近の我々のニュートリエ

表1 穀類納豆中のプロ-ウロキナーゼアクチベーター (Pro-UK Act) 活性

穀類 (学名)	血栓溶解活性 (mm <sup>2</sup> ) *	Pro-UK Act活性 (nmol/min) **
ソバ ( <i>F.esculentum</i> )	240	10.7
ゲンマイ ( <i>Oryza sativa</i> L.)	63	3.8
ハトムギ ( <i>Coix lacryma-jobi</i> L.)	210	10.7
トウモロコシ ( <i>Zea mays</i> L.)	50	0.0
アズキ ( <i>Vigna angularis</i> OHWI)	380	11.2
ササゲ ( <i>Vigna sinensis</i> SAVI)	529	23.8
ソラマメ ( <i>Vicia faba</i> L.)	473	24.0
クロマメ ( <i>Glycine hispida</i> MAX)	855	44.5
リョクトウ ( <i>Vigna rasiata</i> WILCZ)	1,205	65.8
ダイズ ( <i>Glycine hispida</i> MAX)	840	35.8
カボチャ ( <i>Cucurubita</i> spp.)	256	11.8

納豆菌による40℃、66時間発酵後の各抽出物の分析値である。

\*37℃、1時間インキュベーション後の30 $\mu$ l抽出液が持つ人工血栓溶解活性を生じた溶解窓の面積で表示。

\*\*37℃、1時間インキュベーション後の10 $\mu$ l抽出液がPro-UK活性化によりpyro-Glu-Gly-Arg-pNAから分解遊離するパラニトロアニリン量で算出。

ントブローによる液体培養での成績で認められているようなNK産生増強に働く豆中の未知物質の関与も推測されるが<sup>11)</sup>、いずれの測定値もほぼPro-UK Act活性と相関することが分かった(表1)。

両酵素活性の高かったダイズ、クロマメ、及びリョクトウの発酵物を乾燥して粉末としたものは高温



条件下での安定性も高く、これらは最近の活性成分の投与実験での有効性とも考え合わせて<sup>12)</sup>、今後の新しい機能性食品素材として応用開発が期待される。

### 謝 辞

納豆菌を提供していただいた目黒研究所小沢恭輔氏、並びに同菌による発酵実験に協力いただいた卒業生・吉川美佐子女史、馬場智子女史に感謝致します。

### 文 献

- 1) Sumi,H., Hamada,H., Tsushima,H., Mihara, H. and Muraki,H. (1987). A novel fibrinolytic enzyme (nattokinase) in the vegetable cheese Natto: a typical and popular soybean food in the Japanese diet. *Experientia*, **43**: 1110-1111.
- 2) CMC編集部 (1988). 機能性食品市場の全容第3章、機能性食品の市場構築構造と市場規模予測、p.39、CMC東京.
- 3) 須見洋行 (1990). 機能性素材マニュアル第6章、ナットウカイネース、p.287、CMC東京.
- 4) Sumi,H., Taya,N., Nakajima,N. and Hiratani, H. (1992). Structure and fibrinolytic properties of nattokinase. *Fibrinolysis*, **6**: 86.
- 5) 須見洋行、矢田貝智恵子、三宅佐和、三村あゆみ、吉川美佐子、馬場健史、岸本憲明 (1996). 納豆中の血栓溶解関連物質の研究：プロ-ウロキナーゼ 活性化酵素の存在、第43回日本食品科学工学会講演集、p.62.
- 6) Sumi,H., Hamada,H., Nakanishi,K. and Hiratani, H. (1990). Enhancement of the fibrinolytic activity in plasma by oral administration of nattokinase. *Acta Haematol.*, **84** : 139-143.
- 7) Sumi,H. and Robbins,K.C. (1983). A functionally active heavy chain derived from human high molecular weight urokinase. *J.Biol. Chem.*, **258** :8014-8019.
- 8) Sumi,H., Kosugi,T., Matsuo,O. and Mihara,H. (1982). Physicochemical properties of highly purified kidney cultured plasminogen activator (single chain urokinase). *Acta Haem.Jpn.*, **45** : 119-128.
- 9) Astrup,T. and Mullertz, S. (1952). The fibrin plate method for estimating fibrinolytic activity. *Arch. Biochem. Biophys.*, **40** :346-351.
- 10) 須見洋行、馬場健史、岸本憲明 (1996). 納豆中のプロウロキナーゼ活性化酵素と血栓溶解能、日本食品科工誌、43:1124-1127.
- 11) 岸本憲明、田野達男、塚田義弘、出河秀幸、須見洋行 (1996). 各種納豆中のナットウキナーゼ活性と酵素生産に関わる因子の検索、第48回日本家政学会大会、東京.
- 12) Sumi,H., Yatagai,C. and Kishimoto, N. (1996). A very strong activity of pro-urokinase activator in "natto", the traditional fermented soybean in Japan. *Fibrinolysis*, **10** (suppl 3): 31.

## Strong Thrombolytic Enzymes Demonstrated in *Bacillus natto*-Fermented Cereals

HIROYUKI SUMI, SAWA MIYAKE\*, CHIEKO YATAGAI\*, KIMINORI MATSUBARA

*Department of Nutritional Science, Faculty of Health and Welfare Science, Okayama Prefectural University, 111 Kuboki, Soja-shi, Okayama 719-11, Japan.*

*\*Science and Standard Committie of Japan Technology Transfer Association (JTTAS), 4-2 Kouji-machi, Chiyoda, Tokyo 102, Japan.*

**Key words:** Cereals, Fermented soybean Natto, Nattokinase, Pro-urokinase, Thrombolysis