

小麦ペプチド α -チオニンの腸内細菌および口腔細菌に対する阻害効果

老田 茂

(東北農業研究センター)

Inhibitory Effect of Wheat α -Thionin to Intestinal and Oral Bacteria

Shigeru OITA

(National Agriculture Research Center for Tohoku Region)

1 はじめに

小麦胚乳にはアミノ酸45個で構成される抗菌ペプチドの α -チオニンが含まれることは知られていたが、それを有効利用した例がほとんどないことから、 α -チオニンの歯周病細菌やう蝕性細菌に対する効果を明らかにするとともに、腸内細菌への影響も調べたので報告する。

2 試験方法

(1) 小麦 α -チオニンの精製方法

市販薄力小麦粉100 gに0.15 N塩酸300 mLを加えて攪拌後、37°Cで30分間静置し、再び攪拌した後に遠心分離し、得られた上清に10 N水酸化ナトリウム水溶液を滴下して中和した。これを再度遠心分離して得た上清を硫酸(50~90%飽和)塩析し、回収した沈殿物を高速液体クロマトグラフィーに供した。カラムはWakosil 5C4-200, 4.6 mm ϕ $\times$ 250 mm (和光純薬)を用い、0.1%トリフルオロ酢酸と0→40% (0→40分) アセトニトリルを含む水(pH 2.1)による濃度勾配で α -チオニンを溶出させた。 α -チオニンの確認は、MALDI-TOFマスマスペクトル分析および酸加水分解後のアミノ酸分析により行った。薄力小麦粉1 Kgあたりに換算して、40 mgの α -チオニンが得られた。

(2) 抗菌試験方法

菌株はJCMは理化学研究所から、NBRCは(独)製品評価技術基盤機構から購入した。う蝕性細菌 (*Streptococcus mutans*) はブレインハートインフュージョン培地 (Difco) を用いて、37°Cで1日間培養した。歯周病細菌 (*Prevotella nigrescens*, *Fusobacterium nucleatum*) は5 μ g/mLのヘミンと1 μ g/mLのメナジオンを添加した GAMブイオン培地 (日水製薬) に接種し、アネロメイト (日水製薬) に封入して37°Cで嫌氣的に2日間培養した。各培地に小麦 α -チオニンやEDTAを添加してから、菌濃度が約 1×10^6 /mLになるよう接種し、培養後の希釈平板培養で生菌数が100分の1以下に低下した場合に最少殺菌濃度 (MBC), 生菌数が増加しなかった場合に最少阻害濃度 (MIC) とした。

(3) *S. mutans* の酸生成およびグルカン生成試験方法

Ooshimaらの方法¹⁾に準じた。*S. mutans*をブレインハ

ートインフュージョン(BMI)培地 (Difco) で37°Cで一晩培養したものを、BMI培地に接種し、37°Cで4時間培養した。7,000 $\times$ g, 1分間の遠心で集菌し、10 mMリン酸緩衝液(pH 7.2)を含む生理食塩水(PBS)に懸濁後、0.5% ショ糖を含むペプトン水 (ポリペプトン1%, NaCl 1%, pH 7.0) に菌濃度が 2×10^6 /mLになるよう接種し、37°Cで経時的にpHを測定した。

BMI培地で37°Cで一晩培養した *S. mutans*の前培養を、300 mLのBMI培地に接種し、37°Cで18時間静置培養した。遠心上清を50%硫酸塩析(4°C, 4時間)し、沈殿を10 mMリン酸緩衝液(pH 7.4)で懸濁してから、1 Lの同緩衝液で一晩透析し、グルコシルトランスフェラーゼ (GTS)を含む粗酵素液とした。粗酵素 (10~50 μ L), 50 mMリン酸緩衝液(pH 7.4)と1%糖類を含む0.5 mL反応液を37°Cで3時間反応させた後、OD₅₅₀を測定した。

3 試験結果及び考察

(1) 小麦 α -チオニンのう蝕性細菌や歯周病細菌の増殖に及ぼす効果

う蝕性細菌の *S. mutans*に対して、小麦 α -チオニン単独では50 μ g/mLで増殖を阻害し、さらにキレート剤のエチレンジアミン四酢酸二ナトリウム塩 (EDTA-2Na) との組合せにより相乗的な殺菌作用が認められたが、歯周病細菌 *P. nigrescens*や *F. nucleatum* に対しては、EDTA-2Naは単独で殺菌したが、小麦 α -チオニンとの相乗的な殺菌効果は認められなかった (表1)。

(2) う蝕性細菌の酸生成とグルカン生成に及ぼす効果

S. mutans の酸生成において、5 μ g/mLの小麦 α -チオニンは阻害したが、3 μ g/mLの小麦 α -チオニンは阻害しなかった (図1)。なお、ヒトの唾液には通常1~4 mMのカルシウムが含まれており¹⁾、またチオニンの酵母に対する抗菌性がカルシウムによって減殺されることが報告されている²⁾ことから、*S. mutans* の酸生成に及ぼす CaCl_2 の影響を調べた結果、2 mM以上の CaCl_2 添加で、小麦 α -チオニンの阻害効果は認められなくなった。しかし、 CaCl_2 と同濃度のEDTA-2Naをさらに添加することにより、小麦 α -チオニンの阻害効果は維持された (図2)。

一方、*S. mutans* のGTSは糖類から歯垢を形成する不溶性グルカンを生成するため、GTS活性に及ぼす小麦 α -チオニンの影響を調べたが、50 μ g/mLの小麦 α -チオニ

ンはGTS活性を阻害しなかった(データ示さず)。しかし、小麦 α -チオニンとEDTA-2Naの組合せは、*S. mutans* の増殖や酸生成を抑制することから、抗う蝕効果が期待できる。

ヒトは日常的に小麦製品に含まれる α -チオニンを摂取しており、また試験管レベルでは α -チオニンは消化酵素により速やかに分解されることが確認されているため²⁾、もし小麦から抽出した α -チオニンを他の食品に添加したり、口腔内へ塗部しても、腸内細菌への影響は少ないと考えられるが、各種安全性試験は行う必要がある。

4 ま と め

う蝕性細菌の*S. mutans*に対して、小麦 α -チオニン単独で酸生成を阻害し、小麦 α -チオニンとEDTA-2Naと組合せた場合に殺菌効果が認められた。歯周病菌に対してはEDTA-2Na単独で殺菌効果があるが、小麦 α -チオニンとの相乗殺菌効果は認められなかった。

引 用 文 献

- 1) Lrasen, M.J. ; Jensen, A.F. ; Madsen, D.M. ; Pearce, E.I.F. 1999. Individual variations of pH, buffer capacity, and concentrations of calcium and phosphate in unstimulated whole saliva. Arch. Oral Biol. 44: 111-117.
- 2) 老田 茂. 2000. オオムギ, コムギに含まれる α , β -チオニン抗菌ペプチドの抽出と酵素分解. 食工47: 423-430.
- 3) Okada, T. ; Yoshizumi, H. 1973. The mode of action of toxic protein in wheat and barley on brewing yeast. Agric. Biol. Chem. 37: 2289-2294.
- 4) Ooshima, T. ; Izumitani, A. ; Sobue, S. ; Okahashi, N. ; Hamada, S. 1983. Non-cariogenicity of the disaccharide palatinose in experimental dental caries of rats. Infect. Immun. 39: 43-49.

表1 小麦 α -チオニンの口腔細菌に対する阻害効果

菌株		MIC		MBC	
		α -PT* (μ g/mL)		EDTA-2Na (mM)	α -PT+ EDTA-2Na**
<i>Prevotella nigrescens</i>	JCM 6322	100		1	1
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	JCM 8532	100<		0.5	0.5
<i>Streptococcus mutans</i>	JCM 5705	50		50<	0.5

*: 小麦 α -チオニン, **: 小麦 α -チオニン (10 μ g/mL) 共存下でのEDTA-2NaのMBC (mM)

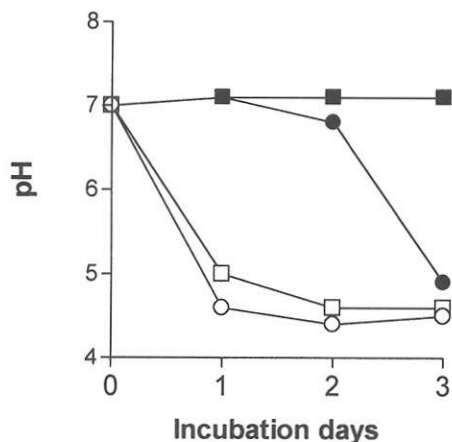


図1 *S. mutans* の酸生成に及ぼす小麦 α -チオニン濃度の影響

○ : 無添加, □ : 3 μ g/mL,
● : 4 μ g/mL, ■ : 5 μ g/mL

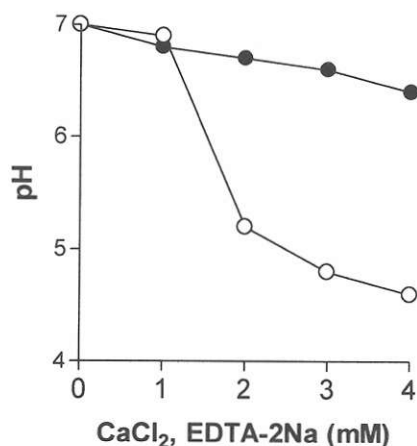


図2 *S. mutans* の酸生成に及ぼすCaCl₂とEDTA-2Naの影響

○ : CaCl₂ のみ添加
● : CaCl₂とEDTA-2Na両方添加