

コメ由来システインプロテアーゼ阻害因子を活用した
機能性食品の開発
- 歯周病・骨関連疾患予防因子 -

新潟県農業総合研究所食品研究センター
大坪貞視

システインプロテアーゼ阻害剤の生理機能（1）

感染防御

ウイルス/細菌の感染・病原性に関わるプロテアーゼの阻害

> ウイルス

- ポリオウイルス
- コロナウイルス：SARSウイルス
- 単純ヘルペスウイルス

> 細菌

- 歯周病菌 (*Porphyromonas gingivalis*)
- 黄色ブドウ球菌

> 真菌

- 植物病原性菌類 (*Botrytis, Fusarium*)

システインプロテアーゼ阻害剤の生理機能（2）

体内におけるタンパク質分解の調節

タンパク質分解の亢進に関連する病的状態の抑制

- ＞ 進行性筋ジストロフィー
- ＞ 癌の浸潤と転移
- ＞ リュウマチ
- ＞ 骨粗鬆症

植物由来のシステインプロテアーゼ阻害因子
を機能性食品素材として実用化する

歯周病予防

骨関連疾患の予防

歯周病とは

成人の約80%が罹患する二大口腔疾患の1つ

> 口腔ケア

- 高齢者が歯を失う最大の原因 → 高齢者の生活の質（QOL）が悪化
- 口臭の原因
- インフルエンザウイルスの感染

> 全身疾患の予防



歯周病の病理発生

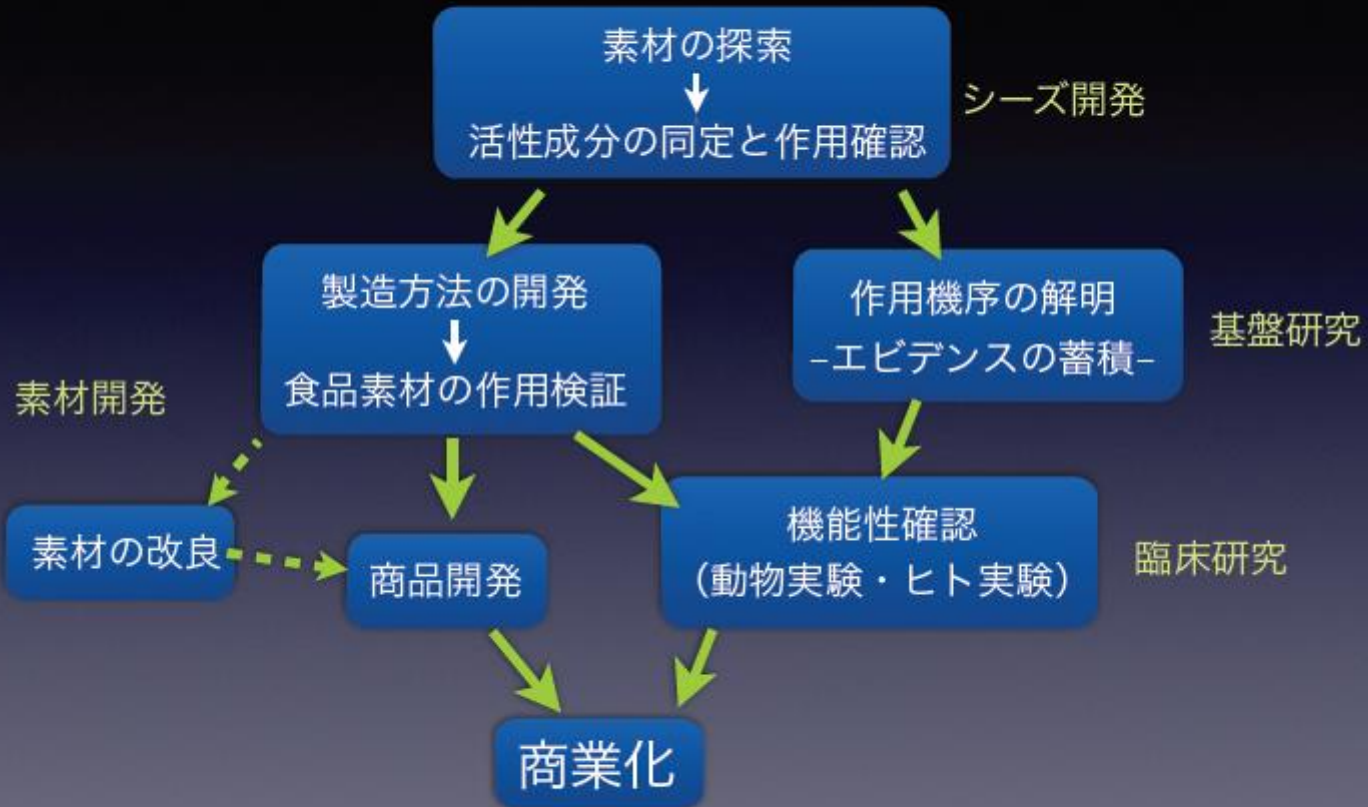
歯周病原菌の感染による炎症性疾患

Porphyromonas gingivalis

疾患関連プロテアーゼ：Arg-ジンジパイン (Rgp)

植物由来のRgp阻害因子を歯周病予防食品素材
として実用化する

研究開発の流れ



精白米中の歯周病菌プロテアーゼ(Rgp)阻害剤の同定

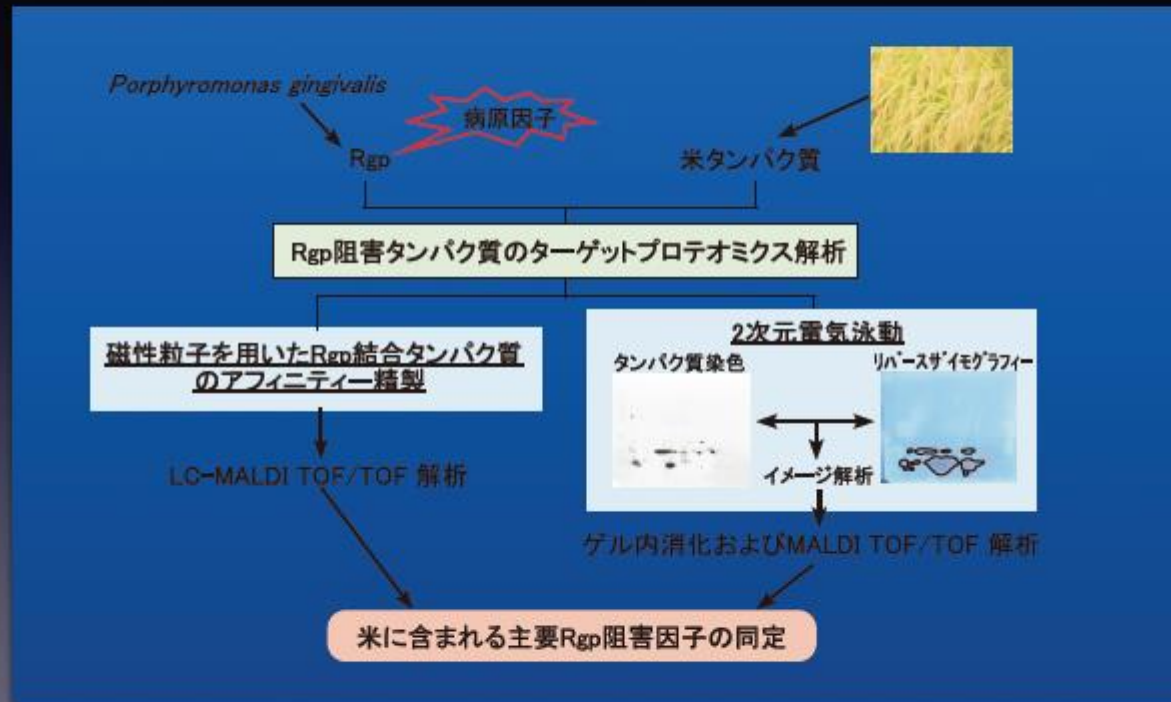
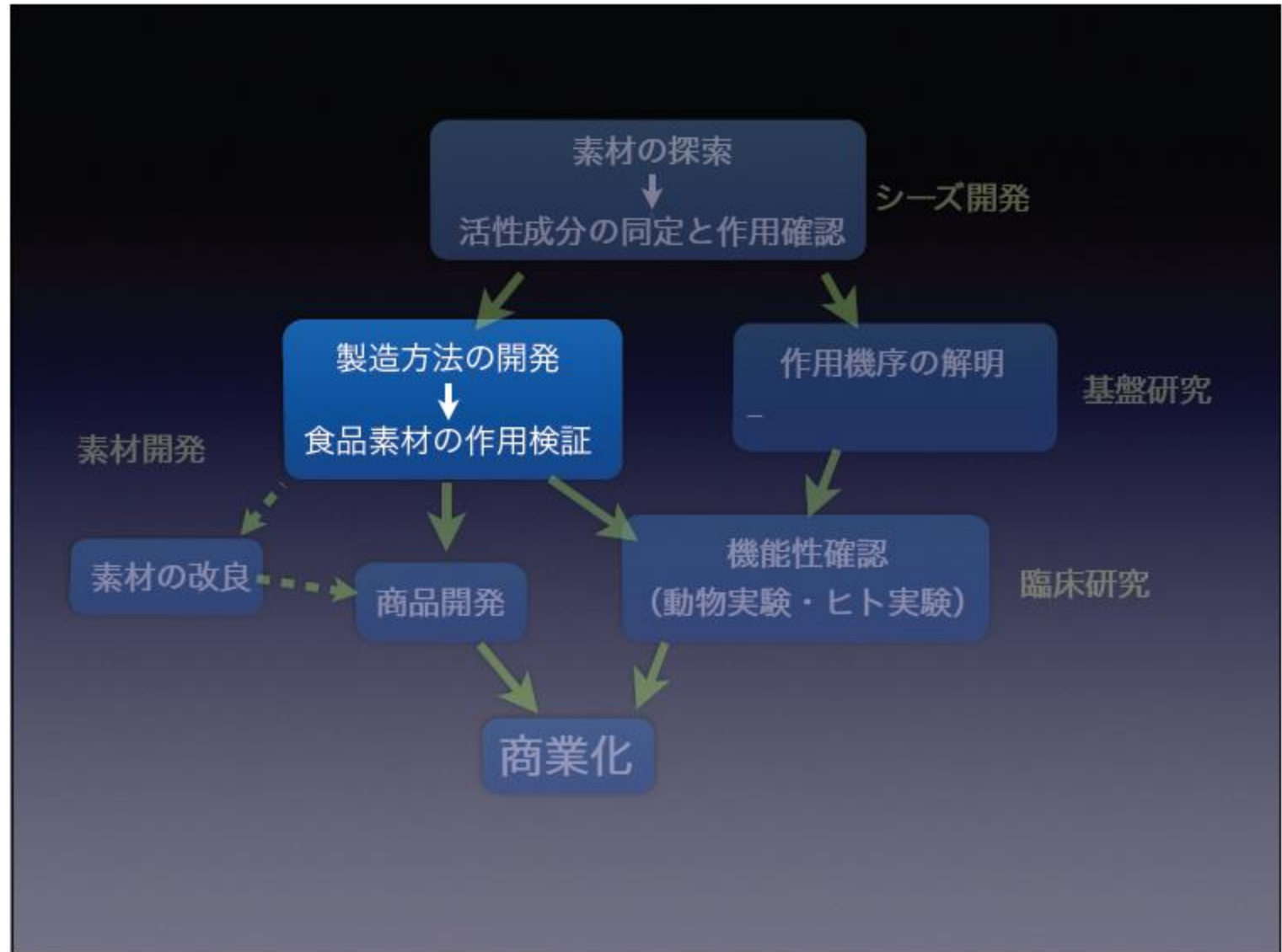


Table 1. Arg-gingipain binding proteins identified by LC-MALDI TOF/TOF

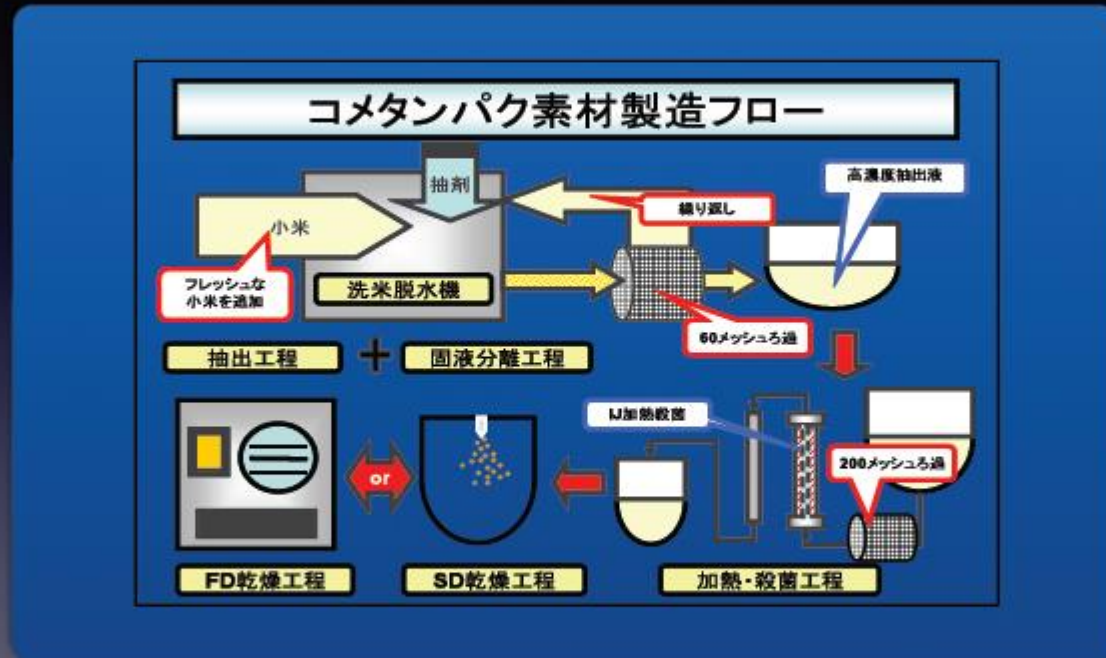
No.	Score ^a	MP ^b	Accession No. ^c	Predicted structure and/or function	MW (Da) ^d	pI ^e
1	946	15	115471167	Plant lipid transfer/seed storage / trypsin-alpha amylase inhibitor domain containing protein	13,000	5.30
2	729	11	41469581	Putative globulin (with alternative splicing)	61,109	6.10
3	462	11	115464709	26 kDa Globulin (alpha-globulin)	18,903	6.47
4	349	4	115471171	Seed allergenic protein RA17 precursor	15,129	6.54
5	322	8	114152827	Bowman-Birk type bran trypsin inhibitor precursor	25,385	5.11
6	236	4	115455865	Globulin 2 (fragment)	48,871	6.29
7	212	5	115461925	Nitrogen regulator protein P-II	20,211	10.30
8	198	3	115463191	Manganese-superoxide dismutase precursor	22,393	5.80
9	193	5	115471173	Seed allergenic protein RAG2 precursor	15,237	7.43
10	98	2	115471187	Cereal seed allergen, trypsin / alpha-amylase inhibitor family protein	14,069	7.38
11	97	2	115470671	E1 protein and Def2/Der2 allergen family protein	13,994	4.94
12	94	3	115482468	Cyanate hydratase	18,596	5.54
13	75	2	115471201	Alpha-amylase/trypsin inhibitor (RBI) (RATI)	13,163	6.80
14	56	1	115457104	Lectin precursor (Agglutinin)	20,156	5.65
15	55	1	115483198	EC protein LII (Zinc-metallothionein class II)	8,487	7.15
16	53	1	115452975	40S ribosomal protein S21	9,248	7.29
			115454509	40S ribosomal protein S21	13,172	5.75
17	52	1	62733815	Hypothetical protein, LOC_Os11g26400	19,950	11.79



農水省『新たな農林水産政策を推進する実用技術開発事業』

- 課題『コメタンパク質を活用した歯周病予防向け機能性食品の開発』
- 研究期間：2008 - 2010年度
- 研究内容と参画機関
 - ✻ 大量製造方法の開発
 - 新潟大学：基本プロセスの開発
 - 築野食品工業株式会社：製造プラントの開発
 - ✻ オーラルケア食品の開発
 - 株式会社ブルボン
 - ✻ 食品素材の機能性検証
 - 新潟県農業総合研究所食品研究センター

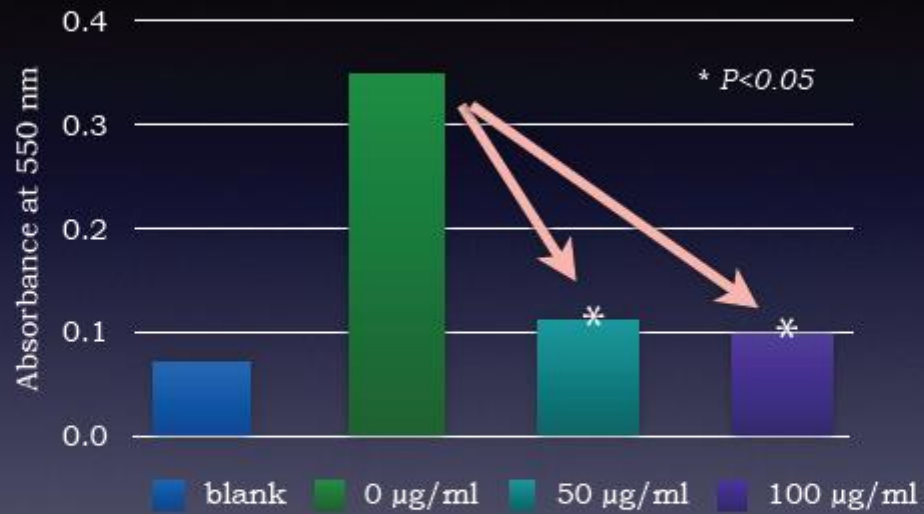
コメからの歯周病菌プロテアーゼ阻害剤の製造方法



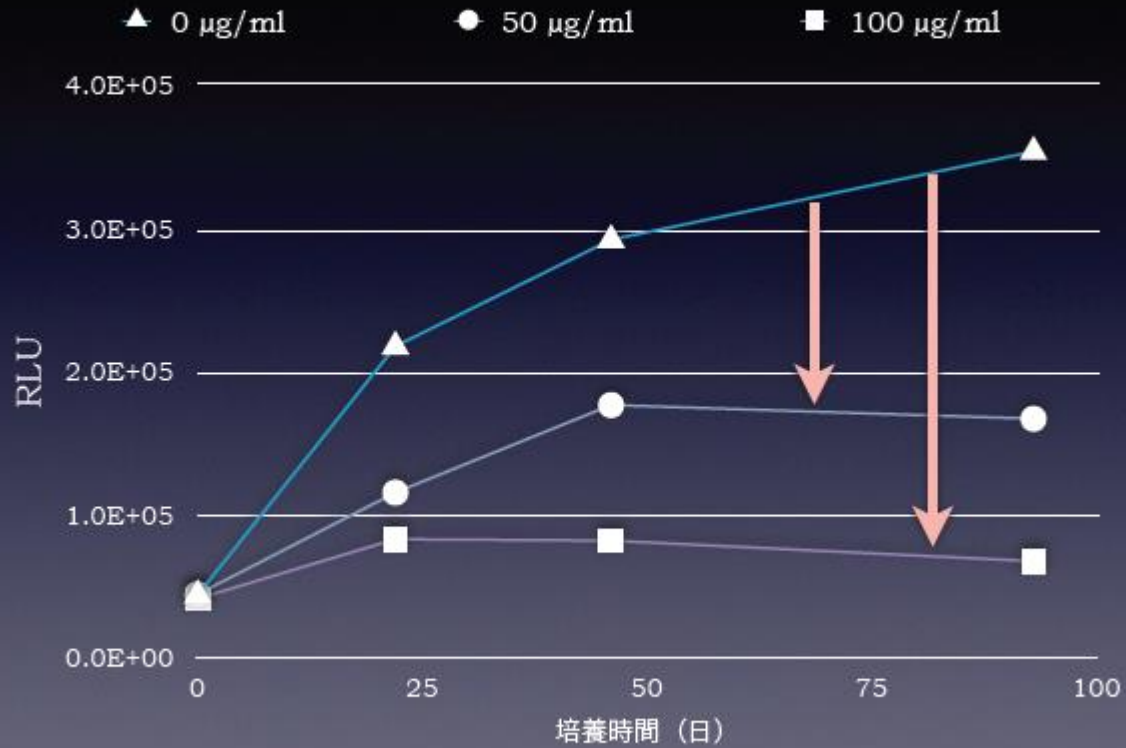
コメタンパク質素材の歯周病予防作用

- 歯周病菌プロテアーゼによるヒトタンパク質の分解を阻害する
- 歯周病菌によるバイオフィルムの形成を阻害する
- 歯周病菌の増殖を阻害する
- 歯周病菌プロテアーゼによる口腔細胞の接着阻害を抑制する

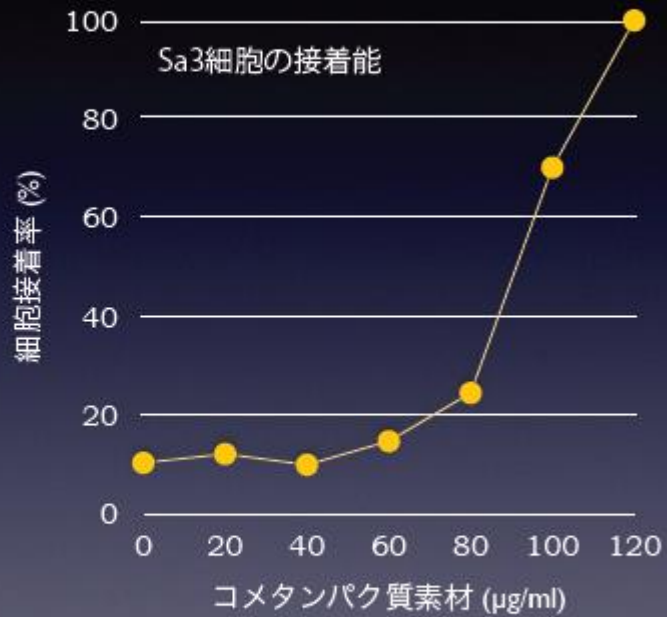
歯周病菌によるバイオフィルム形成の阻害



歯周病菌増殖の阻害



歯周病菌プロテアーゼから細胞接着を保護



対照



歯周病菌プロテアーゼ処理



歯周病菌プロテアーゼ処理
100 μg/mlコメタンパク質素材

コメタンパク質抽出物は中性pHでの溶解性が低い



- 利用効率の低下
- 食品利用の制限

主要阻害因子である α -グロブリンの溶解度が原因

α -グロブリンの歯周病菌プロテアーゼ阻害作用

- 阻害活性は立体構造によらない
- 歯周病菌プロテアーゼを拮抗的に阻害する

阻害活性を保持したまま α -グロブリンを低分子化

JST研究成果最適展開支援プログラム (A-STEP)

研究の流れ

プロテアーゼとの相互作用
領域の同定



必要最小配列の同定



市販の酵素製剤スクリーニング

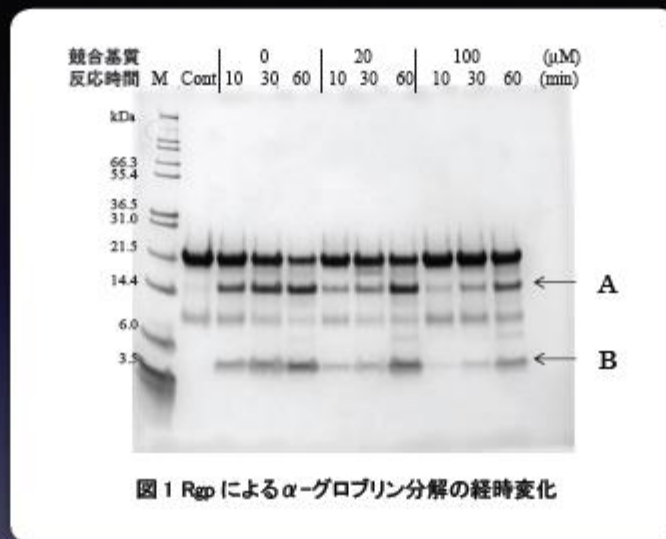


酵素処理条件の検討



酵素処理によるコメタンパク質素材のペプチド化方法

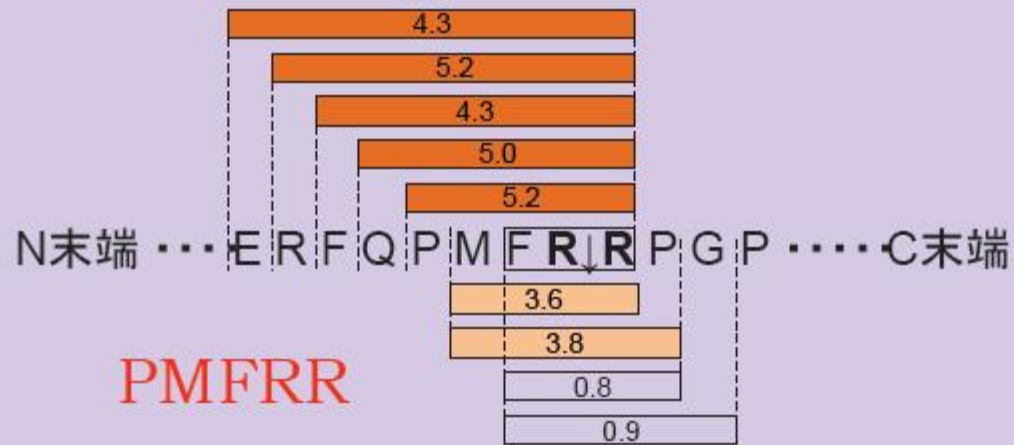
α -グロブリンにおける歯周病菌プロテアーゼ相互作用部位



```

1 qlsesemrfr drqcqrevqd spldacrqvl drqltgrerf qpmfrrpgal glrmqccqql
61 qdvsrecreca airrmvrsye esmpmpleqg wssssseyyg gegssseqgy ygegsseegy
    
```

最小配列の同定



歯周病菌プロテアーゼに対する相対阻害活性
(FRRの阻害活性を1.0とする)

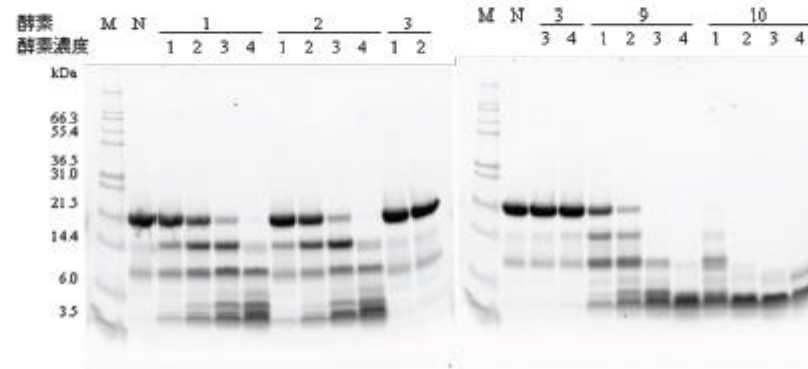
市販酵素製剤のスクリーニング

酵素メーカーへのヒアリング/技術資料から11種類を選定

市販酵素製剤の基質特異性

酵素製剤	酵素活性 (RFU)							
	P	M	F	R	A	L	K	E
1	108	393	66	60	0	0	1	0
2	78	0	50	86	0	12	0	0
3	68	0	0	0	0	0	2	0
4	6,905	8,283	18,214	6,761	252	127,554	1,510	241
5	25,191	15,271	13,782	17,463	1,279	70,196	12,251	165
6	17,093	7,297	9,733	7,765	223	66,232	1,826	74
7	59	317	167	856	1	219	35	60,318
8	1,360	10,087	20,596	9,192	401	170,982	2,386	64
9	481	943	688	547	428	579	478	678
10	112	2,430	1,271	144	90	1,696	116	218
11	227	6,951	6,972	15,810	807	21,459	12,068	7

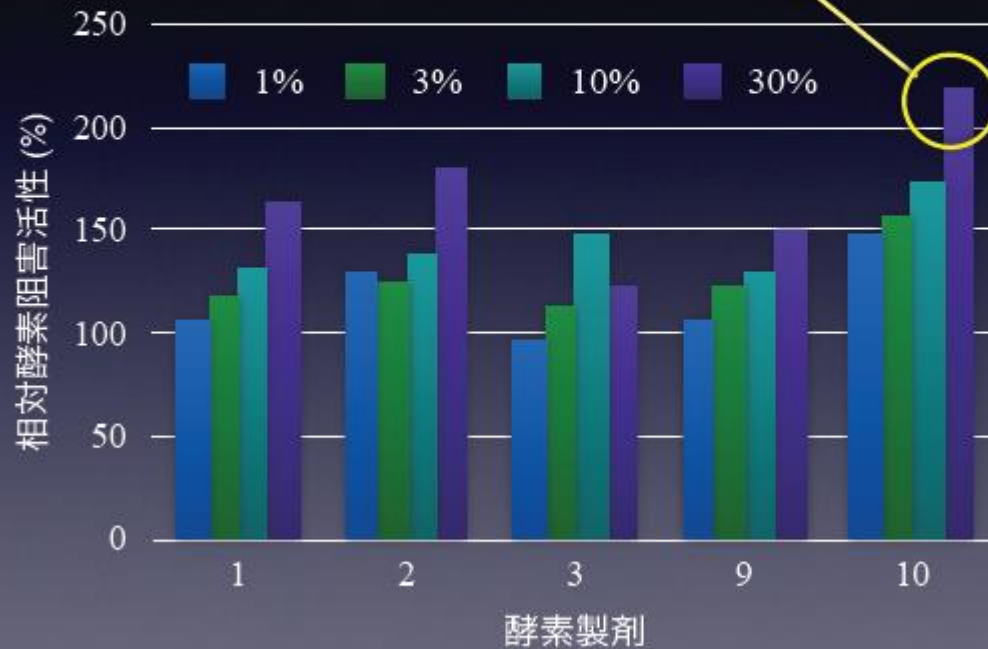
市販酵素製剤による α -グロブリンの分解



M: 分子量マーカー; N: 酵素未処理, 酵素濃度, 1: 1%; 2: 3%; 3: 10%; 4: 30%

歯周病菌プロテアーゼ阻害活性に対する酵素処理の影響

中性pHでの溶解度→約7倍



骨関連疾患の予防

細胞による骨分解が過剰

→骨の量が減少

→骨強度が低下

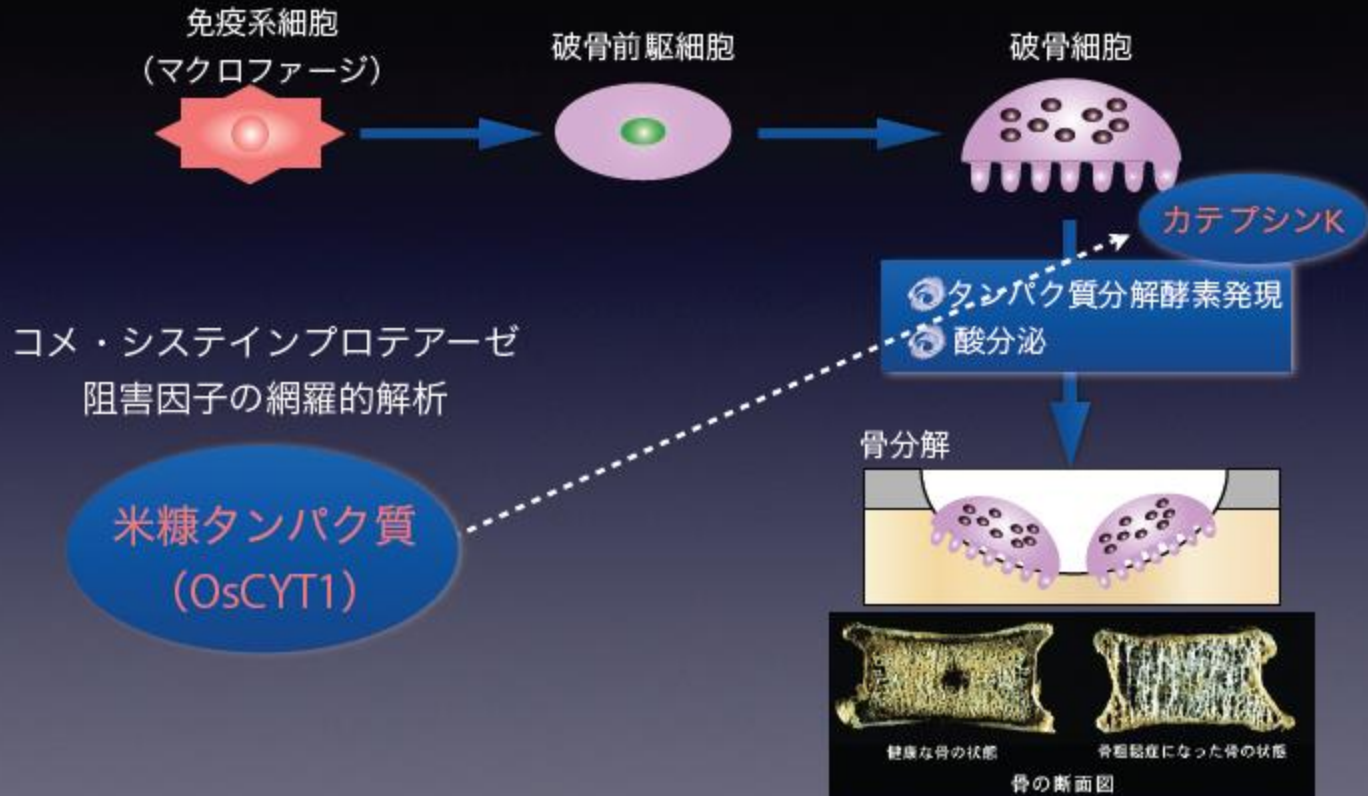
- ＞ 重度歯周炎による歯の消失
- ＞ 骨粗鬆症
- ＞ リウマチ

骨関連疾患の状況

- ＞ 歯周病：成人の約80%が罹患（潜在リスク）
- ＞ 骨粗鬆症：約750万人～1,100万人
- ＞ 関節リウマチ：約340万人

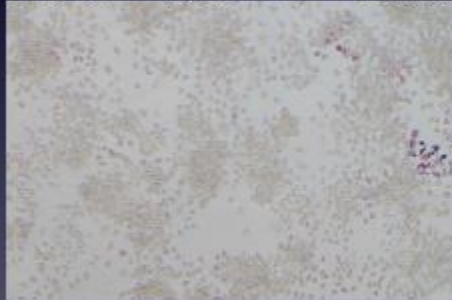
機能的食品としての大きな市場

骨分解のメカニズム



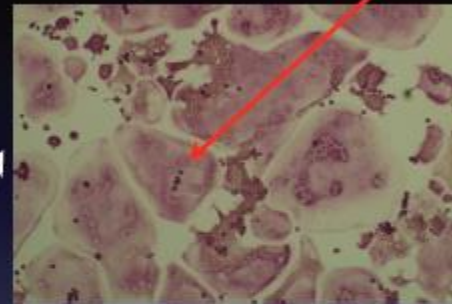
OsCYT1による破骨細胞形成の抑制

マウス・マクロファージ細胞



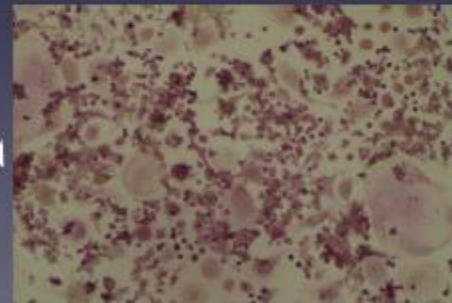
分化誘導

OsCYT1なし

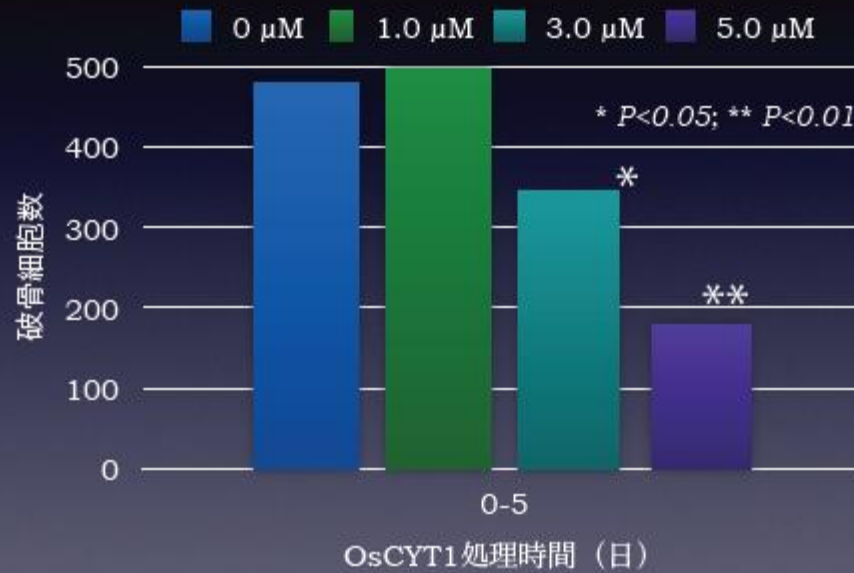


破骨細胞

OsCYT1あり



OsCYT1による破骨細胞分化の阻害



OsCYT1による破骨細胞の骨吸収活性の抑制 -人工骨での評価-



免疫系細胞
(マクロファージ)



破骨前駆細胞



破骨細胞

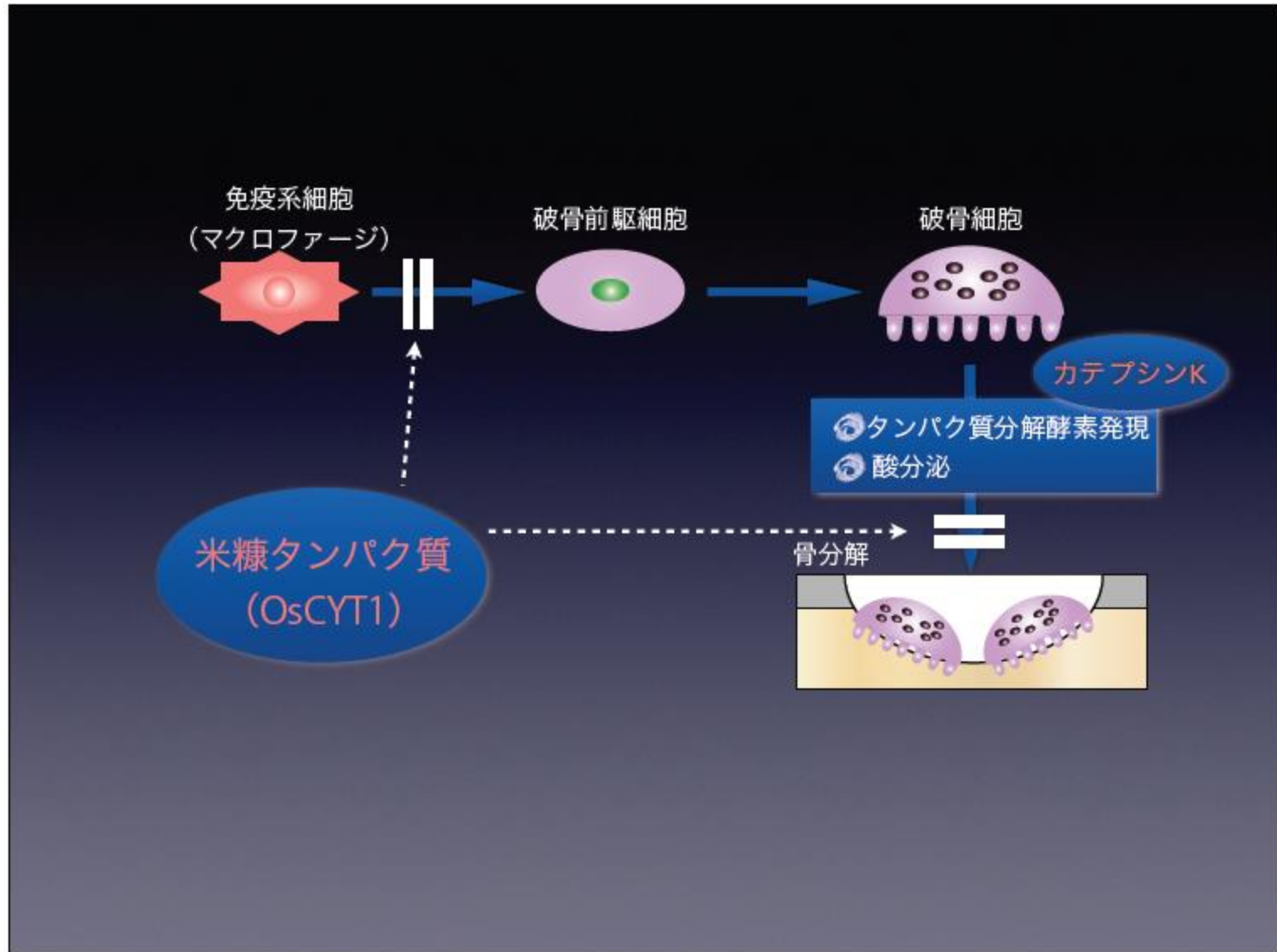


カテプシンK

- タンパク質分解酵素発現
- 酸分泌

米糠タンパク質
(OsCYT1)

骨分解



システインプロテアーゼ阻害因子の食品素材化

歯周病予防因子

骨関連疾患予防因子



プロテアーゼ阻害因子以外の機能性植物タンパク質/ペプチド