(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第4982908号
(P4982908)
(45)発行日　平成24年7月25日(2012.7.25)　(24)登録日　平成24年5月11日(2012.5.11)

(51)Int.Cl.　　F I
A61K 38/55 (2006.01)　　A61K 37/64 ZNA
A61P 1/02 (2006.01)　　A61P 1/02
A61P 31/04 (2006.01)　　A61P 31/04

請求項の数 4　(全 12 頁)

(21)出願番号　特願2007-251996 (P2007-251996)
(22)出願日　平成19年9月27日 (2007.9.27)
(65)公開番号　特開2009-84161 (P2009-84161A)
(43)公開日　平成21年4月23日 (2009.4.23)
審査請求日　平成21年8月25日 (2009.8.25)

(73)特許権者　592102940
新潟県
新潟県新潟市中央区新光町４番地１
(73)特許権者　304027279
国立大学法人　新潟大学
新潟県新潟市西区五十嵐２の町８０５０番地
(74)代理人　100080089
弁理士　牛木　護
(74)代理人　100137800
弁理士　吉田　正義
(74)代理人　100119312
弁理士　清水　栄松

最終頁に続く

(54)【発明の名称】歯周病菌プロテアーゼ阻害剤ならびに抗歯周病菌剤

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
配列番号１に示されるアミノ酸配列を有する蛋白質の、５４番目から６０番目までのアミノ酸残基に相当するペプチド配列（Arg－Thr－Leu－Val－Arg－Arg－Gln）、又は、配列番号４に示されるアミノ酸配列を有する蛋白質の、１４番目から２５番目までのアミノ酸残基に相当するペプチド配列（Arg－Arg－Leu－Met－Ala－Ala－Lys－Ala－Glu－Ser－Arg－Lys）を有効成分として含有することを特徴とする歯周病菌プロテアーゼ阻害剤。
【請求項２】
歯周病菌ポルフィロモナス・ジンジバリス（Porphyromonas gingivalis）プロテアーゼに対する阻害活性を有することを特徴とする請求項１に記載の歯周病菌プロテアーゼ阻害剤。
【請求項３】
配列番号４に示されるアミノ酸配列を有する蛋白質の、１４番目から２５番目までのアミノ酸残基に相当するペプチド配列（Arg－Arg－Leu－Met－Ala－Ala－Lys－Ala－Glu－Ser－Arg－Lys）を有効成分として含有することを特徴とする抗歯周病菌剤。
【請求項４】
歯周病菌ポルフィロモナス・ジンジバリス（Porphyromonas gingivalis）に対する抗菌作用を有することを特徴とする請求項３に記載の抗歯周病菌剤。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】

【０００１】
本発明は、可食性に優れたイネ種子に由来し、歯周病の治療や予防に有効な、タンパク質性ならびにペプチド性のプロテアーゼ阻害剤ならびに抗菌剤に関する。
【背景技術】
【０００２】
歯周病は成人の８０％以上が罹患している感染症であり、う蝕と並んで二大口腔疾患に数えられている。歯周病の発症には様々な嫌気性細菌が関わっているが、その中で最も重要な病原菌とされているのがポルフィロモナス・ジンジバリス（Porphyromonas gingivalis）である。ポルフィロモナス・ジンジバリスは嫌気性のグラム陰性桿菌であり、糖発酵性を持たない。従って、その増殖には蛋白質の分解が必要不可欠であり、その役割を担っているのが、ポルフィロモナス・ジンジバリスが産生するプロテアーゼ群である。特に、トリプシン様システインプロテアーゼであるアルギニン－ジンジパイン（Ｒｇｐ）とリジン－ジンジパイン（Ｋｇｐ）は本菌種が産生する主要プロテアーゼとして、その増殖と病原性に必須な役割を担っていることが明らかとなっている（非特許文献１、２）。また、歯周病のみならず、ポルフィロモナス・ジンジバリスが動脈硬化の危険因子であること（非特許文献３）、アルギニン－ジンジパインがそこでも重要な役割を果たしていることが知られている（非特許文献４）。
【０００３】
このように、口腔疾患や動脈硬化の予防におけるポルフィロモナス・ジンジバリスの管理の重要性が認知され、本菌種の感染生理におけるアルギニン－ジンジパインやリジン－ジンジパインの役割が明らかになるに従い、歯周病の治療や予防を目的としたプロテアーゼ阻害剤の開発に注目が集まるようになってきた。そのための合成薬剤や抗生物質としては、１－（３－フェニルプロピオニル）ピペラジン－３（Ｒ，Ｓ）－カルボン酸－［４－アミノ－１（Ｓ）－（ベンゾチアゾール－２－カルボニル）ブチル］アミド（非特許文献５）、ベンザミジン誘導体（非特許文献６）、テトラサイクリンとその誘導体（非特許文献７）が報告されており、アルギニン－ジンジパインやリジン－ジンジパインによるヒト唾液ヒスタチンの切断部位に基づいて設計されたペプチド系化合物、ＫＹＴ－１とＫＹＴ－３６がそれぞれアルギニン－ジンジパインとリジン－ジンジパインを特異的に阻害することが示されている（非特許文献８）。更には、ストレプトマイセス属（Streptomyces sp.）ＦＡ－７０株が産生するアンチパインアナログ、ＦＡ－７０Ｃ１がアルギニン－ジンジパインを強く阻害するとの結果も見いだされている（非特許文献９）。ＫＹＴ－１、ＫＹＴ－３６やＦＡ－７０Ｃ１がポルフィロモナス・ジンジバリスの増殖や病原性を抑えるという知見も同時に得られており、このことからもジンジパイン阻害剤が歯周病の予防に有効であるのは確実である。
【０００４】
同時に、安全性の観点から、植物に由来するジンジパイン阻害剤を見いだそうとする試みが行われている。例えば、特許文献１や非特許文献１０は、カテキン又はカテキン混合物がアルギニン－ジンジパインやリジン－ジンジパインの活性を阻害することを報告している。特許文献２では赤霊芝と黒霊芝が、特許文献３では黄杞葉、緑茶、ヨモギ、カリン、刺梨、ギムネマ、ルイボス茶、サンザシ、ウコン、ラカンカ、シリマリン、枸杞子、紫玄米、エレウテロコック、月桃葉、ドクダミ、大棗、霊芝がジンジパイン阻害剤として記載されている。また、特許文献４では、ニンニク、チンピ、カンゾウ、カミツレ、シャゼンソウ、キキョウ、ケイヒ、ウイキョウ、ホップ、カノコソウ、オウゴン、シコン、セージ、イチョウ、竹およびソウハクヒが歯周病の予防あるいは治療に有用なプロテアーゼ阻害剤として挙げられている。発明者らも、米タンパク質ならびに米に含まれるオリザシスタチン類がジンジパイン阻害剤として有効であることを見いだしている（特許文献５）。
【特許文献１】特開２００４－１４３１２７号公報
【特許文献２】特開２００５－３５９０９号公報
【特許文献３】特開２００３－３３５６４８号公報
【特許文献４】特開平６－２５０００号公報

【特許文献５】特開２００７－１６００２号公報
【非特許文献１】Infect. Immun. 69, 2972－2979, 2001
【非特許文献２】J. Biol. Chem. 274, 17955－17960, 1999
【非特許文献３】J. Periodontol. 78, 677－682, 2007
【非特許文献４】J. Biochem. (Tokyo) 140, 713－723, 2006
【非特許文献５】Infect. Immun. 70, 6968－6975, 2002
【非特許文献６】Biol. Chem. 383, 1193－1198, 2002
【非特許文献７】Antimicrob. Agents Chemother. 45, 2871－2876, 2001
【非特許文献８】Mol. Pharmacol. 66, 1599－1606, 2004
【非特許文献９】Biol. Chem. 384, 911－920, 2003
【非特許文献１０】Oral. Microbiol. Immunol. 19, 118－120, 2004
【発明の開示】
【発明が解決しようとする課題】
【０００５】
しかしながら、合成薬物や抗生物質は医薬品としての利用には適しているものの、食品を介した歯周病の予防目的には適切ではない。また、特許文献２～４に挙げられたプロテアーゼ阻害剤は、植物組織抽出物としての利用に留まっており、プロテアーゼ阻害剤としての分子実体が明らかになっていない。そのため、健康に及ぼす影響が解明されているとは言い難く、安全性の点で不安が残るものも少なくない。従って、食品から医薬品までの幅広い利用が可能なジンジパイン阻害剤は限られており、歯周病予防に適した様々な機能性食品を具現化するためには、分子実体が明らかであり、安全性に優れた天然物由来の新たな阻害剤が求められている。
【課題を解決するための手段】
【０００６】
本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意検討を重ねた結果、イネに含まれ、ジンジパイン阻害活性を有する成分を同定することに成功した。そして、それがポルフィロモナス・ジンジバリスのプロテアーゼ活性のみならず、その増殖をも抑制できることを確認し、本発明を完成するに至った。
【０００７】
なお、本発明において明らかとなったジンジパイン阻害活性を有する成分とは、配列番号１～３３に示されるいずれかのアミノ酸配列からなる蛋白質であり、これらの蛋白質が歯周病菌ポルフィロモナス・ジンジバリスのプロテアーゼ活性や増殖に対する阻害作用を有することはこれまで全く知られていなかった。
【０００８】
本発明の歯周病菌プロテアーゼ阻害剤は、配列番号１に示されるアミノ酸配列を有する蛋白質の、５４番目から６０番目までのアミノ酸残基に相当するペプチド配列（Arg－Thr－Leu－Val－Arg－Arg－Gln）、又は、配列番号４に示されるアミノ酸配列を有する蛋白質の、１４番目から２５番目までのアミノ酸残基に相当するペプチド配列（Arg－Arg－Leu－Met－Ala－Ala－Lys－Ala－Glu－Ser－Arg－Lys）を有効成分として含有する。
【０００９】
また、歯周病菌ポルフィロモナス・ジンジバリス（Porphyromonas gingivalis）プロテアーゼに対する阻害活性を有する。
【００１０】
本発明の抗歯周病菌剤は、配列番号４に示されるアミノ酸配列を有する蛋白質の、１４番目から２５番目までのアミノ酸残基に相当するペプチド配列（Arg－Arg－Leu－Met－Ala－Ala－Lys－Ala－Glu－Ser－Arg－Lys）を有効成分として含有する。
【００１１】
また、歯周病菌ポルフィロモナス・ジンジバリス（Porphyromonas gingivalis）に対する抗菌作用を有する。
【発明の効果】

【００１２】
本発明による歯周病菌プロテアーゼ阻害剤ならびに抗歯周病菌剤は、古くから食用穀類として摂食しているイネに由来する蛋白質やその部分配列であるペプチドを有効成分とするため、機能面での有効性のみならず安全性にも大変優れたものである。従って、薬剤や医薬部外品における利用だけでなく、食品成分としての利用が可能である。従って、歯周病の治療や予防に幅広く使用することができ、オーラルケアを中心とした健康管理に大きく貢献することができる。
【発明を実施するための最良の形態】
【００１３】
以下、本発明のプロテアーゼ阻害剤ならびに抗菌剤の一実施形態について詳細に説明する。
【００１４】
本発明のプロテアーゼ阻害剤ならびに抗菌剤は、イネ（Oryza sativa）に含まれる等電点５．０～６．５の蛋白質又はその部分ペプチドを有効成分として含有する。
【００１５】
そして、本発明のプロテアーゼ阻害剤に含有される有効成分として好適に用いることのできる蛋白質又はその部分ペプチドとしては、（ａ）配列表の配列番号１～３３のいずれか１つに記載のアミノ酸配列を有する蛋白質、（ｂ）配列表の配列番号１～３３のいずれか１つに記載のアミノ酸配列を有する蛋白質であって、１又は複数のアミノ酸の置換、欠失、挿入、又は付加を含み、かつプロテアーゼ阻害活性を有する蛋白質、（ｃ）配列表の配列番号１～３３のいずれか１つに記載のアミノ酸配列の部分配列を有するペプチドであって、プロテアーゼ阻害活性を有するペプチド、（ｄ）配列表の配列番号１～３３のいずれか１つに記載のアミノ酸配列の部分配列を有するペプチドであって、１又は複数のアミノ酸の置換、欠失、挿入、又は付加を含み、かつプロテアーゼ阻害活性を有するペプチド、が例示される。そして、これらの１種又は複数種の混合物を本発明のプロテアーゼ阻害剤とすることができる。
【００１６】
また、本発明の抗菌剤に含有される有効成分として好適に用いることのできる蛋白質又はその部分ペプチドとしては、（ａ）配列表の配列番号１～３３のいずれか１つに記載のアミノ酸配列を有する蛋白質、（ｂ）配列表の配列番号１～３３のいずれか１つに記載のアミノ酸配列を有する蛋白質であって、１又は複数のアミノ酸の置換、欠失、挿入、又は付加を含み、かつ抗菌作用を有する蛋白質、（ｃ）配列表の配列番号１～３３のいずれか１つに記載のアミノ酸配列の部分配列を有するペプチドであって、抗菌作用を有するペプチド、（ｄ）配列表の配列番号１～３３のいずれか１つに記載のアミノ酸配列の部分配列を有するペプチドであって、１又は複数のアミノ酸の置換、欠失、挿入、又は付加を含み、かつ抗菌作用を有するペプチド、が例示される。そして、これらの１種又は複数種の混合物を本発明の抗菌剤とすることができる。
【００１７】
また、本発明のプロテアーゼ阻害剤ならびに抗菌剤は、特に、歯周病菌ポルフィロモナス・ジンジバリス（Porphyromonas gingivalis）プロテアーゼに対する阻害活性と、抗菌作用、すなわち、ポルフィロモナス・ジンジバリス増殖阻害活性を有する。
【００１８】
なお、アミノ酸配列の「部分配列」とは全アミノ酸配列の一部分のことをいい、「部分ペプチド」とは、アミノ酸配列の「部分配列」を有するペプチドのことをいう。そして、本発明のプロテアーゼ阻害剤ならびに抗菌剤として用いることのできる部分ペプチドは、本発明の有効成分である蛋白質の全アミノ酸配列のうち、プロテアーゼ阻害活性や抗菌作用を示しうる活性部位の領域を含んでなるものである。
【００１９】
本発明においては、蛋白質やペプチドのプロテアーゼ阻害活性や抗菌作用を利用することが目的であるから、これらのプロテアーゼ阻害活性や抗菌作用を保持している限り、蛋

白質やペプチドの誘導体も本発明のプロテアーゼ阻害剤ならびに抗菌剤に用いることができる。ここで、蛋白質やペプチドの誘導体とは、歯周病菌ポルフィロモナス・ジンジバリスのプロテアーゼ活性や増殖阻害活性を有するものであって、かつ、該当する蛋白質やペプチドのアミノ酸配列のアミノ末端のアミノ基または各アミノ酸の側鎖のアミノ基の一部または全部、および／または該当する蛋白質やペプチドのアミノ酸配列のカルボキシル末端のカルボキシル基または各アミノ酸の側鎖のカルボキシル基の一部または全部、および／または、該当する蛋白質やペプチドの各アミノ酸の側鎖のアミノ基およびカルボキシル基以外の官能基（水酸基やチオール基など）の一部若しくは全部が、適当な他の置換基（リン酸基やアセチル基など）によって修飾を受けた場合をいう。さらには、ポルフィロモナス・ジンジバリスのプロテアーゼ阻害活性や増殖阻害活性を保持できる範囲で、該当する蛋白質やペプチドのアミノ酸配列において、１又は複数個のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入、又は付加を行うこともできる。これらの修飾やアミノ酸配列の改変は、例えば、蛋白質中に存在する官能基の保護、安全性および組織移行性の向上、または活性の増強等を目的として行われる。

【００２０】

上述の蛋白質やペプチドの誘導体には、本発明のプロテアーゼ阻害剤ならびに抗菌剤に用いることのできる蛋白質やペプチドの薬学上許容されうる塩も包含されうる。このような塩の好ましい例としては、ナトリウム塩またはカルシウム塩のようなアルカリ金属またはアルカリ土類金属塩、フッ化水素酸塩、塩酸塩のようなハロゲン化水素酸塩、硝酸塩、硫酸塩、リン酸塩などの無機酸塩、エタンスルホン酸塩のような低級アルキルスルホン酸塩、フマル酸塩、コハク酸塩、酢酸塩などの有機酸塩などが挙げられる。さらには、蛋白質やペプチドを溶媒和物としてもよい。このような溶媒和物としては、水和物、エタノール和物などのアルコール和物、およびエーテル和物などが挙げられる。

【００２１】

本発明によるプロテアーゼ阻害剤ならびに抗菌剤は、古くから食用穀類として摂食しているイネに由来する蛋白質やその部分ペプチドを有効成分とするため、機能面での有効性のみならず安全性にも大変優れたものである。そして、本発明の口腔用組成物又は食品は、本発明のプロテアーゼ阻害剤又は抗菌剤を添加してなり、有効成分である蛋白質やペプチドを有効量含むものであるから、歯周病の治療や予防に幅広く使用することができ、オーラルケアを中心とした健康管理に大きく貢献することができる。

【００２２】

本発明の口腔用組成物の種類は特に限定されず、例えば歯磨きやマウスウォッシュのように口腔内で用いられるものを含み、具体的には、練り状、液体状、粉末状の歯磨剤、マウススプレーなどの口中清涼剤、トローチ剤、うがい剤、シロップ剤等の医薬品または医薬部外品が挙げられる。また、本発明の食品の種類は特に限定されず、例えば、飴、チューインガム、トローチ、ジャムや飲料等が挙げられる。

【００２３】

なお、本発明の口腔用組成物又は食品において、有効成分である蛋白質やペプチドの配合割合は、口腔用組成物、食品の種類および該当する口腔用組成物や食品に配合される他の成分の種類や量に応じて適宜選択することができる。

【００２４】

本発明において、有効成分である蛋白質はイネの葉、茎、皮、根、種子などの抽出物から、慣用の方法に従って、蛋白質画分を分離して得ることができるが、特に可食部である種子からの分離が望ましい。ここで、抽出物の製造方法は、蛋白質の抽出に適用できるものである限り、特に限定されないが、例えば、葉、茎、皮、根、種子などの組織部分を水またはリン酸緩衝液のような溶媒中で磨砕した後、ろ過または遠心分離により上清を集め、必要に応じて希釈や濃縮することにより得ることができる。

【００２５】

そして、等電点電気泳動によって等電点５．０～６．５の範囲の蛋白質を取得することにより、有効成分である蛋白質を分離精製することができる。なお、抽出物から有効成分

である蛋白質を分離精製する方法は等電点電気泳動に限定されず、例えば、イオンクロマトグラフィーなどのクロマトグラフィー法など、蛋白質の分離精製に一般に用いられる方法を使用してもよい。

【００２６】

また、有効成分である蛋白質の製造において加熱処理を行うこともできる。この加熱処理はイネ組織中に含まれるプロテアーゼの失活に有効である。加熱方法や加熱条件は特に限定されないが、好ましくは６０～１２０℃の温度範囲で加熱を行う。

【００２７】

本発明において、有効成分である部分ペプチドは、有効成分である蛋白質の製造過程において得られるか、または、得られた蛋白質を慣用のアミノ酸配列切断手段によって切断し、活性測定によって活性の有無を確認することによって得ることができる。慣用のアミノ酸配列切断手段としては、特に蛋白質分解酵素を用いた酵素的切断方法が有効である。この場合に使用する酵素は、蛋白質のプロテアーゼ阻害活性や抗菌作用を消失させない酵素であれば、特に限定されないが、アルギニン残基やリジン残基に対して特異性を持たない蛋白質分解酵素を用いるのが望ましい。このような酵素としてはエンドプロテイナーゼＡｓｐ－Ｎなどが挙げられる。

【００２８】

なお、有効成分である蛋白質やペプチドは、分離精製して用いてもよいが、有効成分である蛋白質やペプチドを有効量含むものであれば、植物体組織またはその乾燥品、粉砕品、抽出物そのままを使用してもよい。乾燥品や粉砕品の調製方法も本発明による有効成分を含んで得ることができる限り、特に限定されない。

【００２９】

また、有効成分である蛋白質やペプチドは、慣用の化学的合成法により製造されたものであってもよい。有効成分である蛋白質は配列番号１～３３に示されるいずれかのアミノ酸配列からなるもので、有効成分であるペプチドはその部分配列であることから、これら蛋白質やペプチドの修飾物や配列改変物を含めて、これらの有効成分は化学的に合成して得ることができる。

【００３０】

また、有効成分である蛋白質やペプチドは、遺伝子工学的手法によっても製造できる。すなわち、有効成分である蛋白質ならびにその部分配列であるペプチドは、配列番号３４～６６に示されるいずれかの塩基配列によってコードされるものであるから、そのＤＮＡによって形質転換することで得られた形質転換細胞において製造することができる。すなわち、有効成分である蛋白質やペプチドは、それを示すアミノ酸配列をコードするＤＮＡ断片を、宿主細胞内で複製可能でかつ発現可能な状態で含むＤＮＡ、特に組換えベクターの形態とし、それを用いて宿主細胞の形質転換を行い、得られた形質転換体を培養することによって製造することができる。有効成分である蛋白質やペプチドをコードするＤＮＡ断片を取得する方法は特に限定されず、ＰＣＲや化学合成など、慣用の方法を使用することができる。該当する蛋白質やペプチドの製造に際しては、所謂宿主－ベクター系を利用してもよい。なお、このような宿主－ベクター系を使用するに当たっては、慣用される各種の発現ベクターの作成法および形質転換法を用いることができる。

【００３１】

このような遺伝子工学的手法に用いることのできる核酸は、（１）配列表の配列番号３４に記載の塩基配列のうち、２４～５１５番目、（２）配列表の配列番号３５に記載の塩基配列のうち、１２８～６１０番目、（３）配列表の配列番号３６に記載の塩基配列のうち、９８～１９９０番目、（４）配列表の配列番号３７に記載の塩基配列のうち、１１１～２９６７番目、（５）配列表の配列番号３８に記載の塩基配列のうち、９３～９６６番目、（６）配列表の配列番号３９に記載の塩基配列のうち、８７～５８７番目、（７）配列表の配列番号４０に記載の塩基配列のうち、８９～６８２番目、（８）配列表の配列番号４１に記載の塩基配列のうち、３１～５０７番目、（９）配列表の配列番号４２に記載の塩基配列のうち、５３～５３２番目、（10）配列表の配列番号４３に記載の塩基配列の

うち、９７～５７９番目、（11）配列表の配列番号４４に記載の塩基配列のうち、５１～５３９番目、（12）配列表の配列番号４５に記載の塩基配列のうち、４３５～８９９番目、（13）配列表の配列番号４６に記載の塩基配列のうち、１１６～５８５番目、（14）配列表の配列番号４７に記載の塩基配列のうち、６～７７０番目、（15）配列表の配列番号４８に記載の塩基配列のうち、３５～２５６２番目、（16）配列表の配列番号４９に記載の塩基配列のうち、４８～２７５２番目、（17）配列表の配列番号５０に記載の塩基配列のうち、３１～２７２１番目、（18）配列表の配列番号５１に記載の塩基配列のうち、４３～５０７番目、（19）配列表の配列番号５２に記載の塩基配列のうち、２４～４９７番目、（20）配列表の配列番号５３に記載の塩基配列のうち、９６～３９３３番目、（21）配列表の配列番号５４に記載の塩基配列のうち、１９～５７９番目、（22）配列表の配列番号５５に記載の塩基配列のうち、５０～５５０番目、（23）配列表の配列番号５６に記載の塩基配列のうち、１１８～５７０番目、（24）配列表の配列番号５７に記載の塩基配列のうち、１１８～５７０番目、（25）配列表の配列番号５８に記載の塩基配列のうち、４６～９０２番目、（26）配列表の配列番号５９に記載の塩基配列のうち、５３～４９９番目、（27）配列表の配列番号６０に記載の塩基配列のうち、７１～７５４番目、（28）配列表の配列番号６１に記載の塩基配列のうち、５４～４０３番目、（29）配列表の配列番号６２に記載の塩基配列のうち、５９８～１５３２番目、（30）配列表の配列番号６３に記載の塩基配列のうち、６２～４４７９番目、（31）配列表の配列番号６４に記載の塩基配列のうち、１～１１０４番目、（32）配列表の配列番号６５に記載の塩基配列のうち、１～２１５９番目、（33）配列表の配列番号６６に記載の塩基配列のうち、１１１～７８２番目のいずれかの塩基配列を有する。これら（１）～（33）の塩基配列は、それぞれ配列表の配列番号１～３３に記載のアミノ酸配列に対応しており、これら（１）～（33）の塩基配列により、それぞれ配列表の配列番号１～３３に記載のアミノ酸配列を有する蛋白質をコードすることができる。したがって、これらの塩基配列を有する核酸を用いることにより、本発明のプロテアーゼ阻害剤ならびに抗菌剤に使用することのできる、プロテアーゼ阻害活性又は抗菌作用を有する蛋白質をコードすることができる。

【００３２】

以下に本発明の実施例を具体的に説明するが、本発明の有効性を述べるために例示するものであって、本発明はこれらの実施例に限定されない。

【実施例１】

【００３３】

（精白米からの蛋白質抽出）

コシヒカリ精白米をサンプルミルで粉砕し、これに１０倍量の５０ｍＭ トリス－ＨＣｌ（ｐＨ８．０）／５００ｍＭ ＮａＣｌ緩衝液を加えて４℃で３０分撹拌した。撹拌後、１０，０００ｒｐｍ×１５分間の遠心分離によって固形分を除去し、上清に対して８０℃で１０分間の加熱処理を行った。更に、１０，０００ｒｐｍ×１５分間の遠心分離で沈殿物を除去し、その上清を蛋白質抽出液とした。

【００３４】

（歯周病菌プロテアーゼ阻害活性の測定）

酵素標品には歯周病菌ポルフィロモナス・ジンジバリス（Porphyromonas gingivalis ATCC33277）から精製したアルギニン－ジンジパインを用いた。阻害活性測定用の緩衝液は、１００ｍＭ ＨＥＰＥＳ（ｐＨ７．５）／１５０ｍＭ ＮａＣｌ／５ｍＭ $CaCl_2$／０．０５％ Ｂｒｉｊ３５／４ｍＭ ジチオスレイトール（DTT）とし、反応は２ｍｌ容積で行った。所定濃度のサンプルとアルギニン－ジンジパイン４０ｐＭを４０℃で５分間プレインキュベーションした後、酵素基質としてＺ－Ｐｈｅ－Ａｒｇ－ＭＣＡを５０μＭの濃度になるように加えて、酵素反応を開始した。反応の進行は蛍光分光光度計（励起波長３８０ｎｍ；蛍光波長４４０ｎｍ）を用いて、蛍光強度の増加としてモニタリングし、酵素反応の強さは基質から遊離するアミノメチルクマリン（ＡＭＣ）量で評価した。酵素阻害活性１ユニット（Ｕ）は、酵素基質から１分間に１μｍｏｌのＡＭＣ遊離を阻害する量と定義した。

【００３５】
（等電点電気泳動による精白米蛋白質の分画）
上記蛋白質抽出液を限外ろ過膜（分画分子量５，０００Ｄａ）を用いて濃縮すると共に、緩衝液を７Ｍ 尿素／２Ｍ チオ尿素に置換した。このサンプルを７Ｍ 尿素／２Ｍ チオ尿素／４％ ＣＨＡＰＳ／２０ｍＭ ＤＴＴ／１％ ＺＯＯＭキャリアアンフォライト（ｐＨ３～１０；インビトロジェン製）溶液とした後、１０，０００ｒｐｍ×１５分間の遠心分離によって沈殿物を除去し、等電点電気泳動（ＩＥＦ）を行った。電気泳動にはｐＨ３．０、ｐＨ５．４、ｐＨ６．２とｐＨ１０．０のディスクを装着したＩＥＦフラクショネーター（インビトロジェン製）を用いた。ＩＥＦで得られた各ｐＨ画分の試料について、歯周病菌プロテアーゼに対する阻害活性を上述の方法により測定した（表１）。歯周病菌プロテアーゼ阻害活性は、その約８０％がｐＨ５．４～６．２の等電点範囲で回収することができた。歯周病菌プロテアーゼに対して阻害活性を有する蛋白質は、その多くが等電点５．０～６．５の範囲の蛋白質であることは明らかである。

【００３６】
【表１】

		プロテアーゼ阻害活性 (mU/ml)	容積 (ml)	プロテアーゼ阻害総活性 (mU)	阻害活性分画率 (%)
IEF 前		16.11	3.25	52.36	-
IEF 画分	pH3.0-5.4	0.00	1.25	0.00	0.0
	pH5.4-6.2	36.58	1.00	36.58	78.9
	pH6.2-10.0	7.82	1.25	9.78	21.1

【００３７】
（歯周病菌プロテアーゼ阻害蛋白質の分離）
上述の等電点電気泳動におけるｐＨ５．４～６．２の画分から、歯周病菌プロテアーゼ阻害蛋白質を、歯周病菌プロテアーゼを固定化したアフィニティービーズを用いて分離した。

【００３８】
ポルフィロモナス・ジンジバリスの培養上清より精製したアルギニンージンジパインを２０ｍＭ ＨＥＰＥＳ緩衝液（ｐＨ７．０）中で、磁性ビーズ（MagnaBind Amine Derivatized Beads；Pierce製）と混合し、更に１ｍＭ リンカー（BS^3；NHS ester；Pierce製）を添加した後、緩やかに攪拌しながら４℃で２時間インキュベートした。次いで、トリスーＨＣｌ（ｐＨ７．５）を５０ｍＭになるよう加え、３０分間のインキュベーションにより未反応の官能基をブロックすることで、アルギニンージンジパイン固定化ビーズを作製した。

【００３９】
上述のｐＨ５．４～６．２のＩＥＦ画分を、ゲルろ過カラム（HiTrap Desalting；ＧＥヘルスケア製）を用いて脱塩した後、５０ｍＭ ＨＥＰＥＳ（ｐＨ７．５）／１５０ｍＭ ＮａＣｌ／５ｍＭ $CaCl_2$／４ｍＭ ＤＴＴ／０．０５％ ＣＨＡＰＳ溶液において、５０℃で１５分の還元処理を行った。還元した試料をアルギニンージンジパイン固定化ビーズと４℃で２０分間反応させ、磁気分離でビーズを回収後、５０ｍＭ ＨＥＰＥＳ（ｐＨ７．５）／５００ｍＭ ＮａＣｌ／５ｍＭ $CaCl_2$／４ｍＭ ＤＴＴ／０．０５％ ＣＨＡＰＳにて洗浄した。次いで、１００ｍＭ グリシンーＨＣｌ（ｐＨ２．７）／４ｍＭ ＤＴＴを用い、アルギニンージンジパイン固定化ビーズに結合した歯周病菌プロテアーゼ阻害蛋白質を溶出させた。

【００４０】
（歯周病菌プロテアーゼ阻害蛋白質の同定）
分離した歯周病菌プロテアーゼ阻害蛋白質にトリフルオロ酢酸（ＴＦＡ）を０．１％に

なるよう加え、ＺｉｐＴｉｐ Ｃ１８（Millipore製）に結合・洗浄し、５０％ アセトニトリル／０．１％ ＴＦＡ溶液で溶出した。溶出液は８０℃で乾固させた後、５０ｍＭ NH_4HCO_3 にて溶解し、０．２ｍＭ ＤＴＴ存在下で５０℃、１５分間の還元処理、次いで０．２７ｍＭ ヨードアセトアミド存在下でのアルキル化処理を行った。その後、トリプシン（Promega製）を０．５ｎｇ／μｌになるよう加えて、３７℃で１５時間のインキュベーションによる酵素消化を行った。

【００４１】

酵素消化サンプルは、ＯＤＳカラム（Inertsil Peptides C18 0.2×150mm；ＧＬサイエンス製）を分離カラムとし、液体クロマトグラフィーシステム（nanoLC 1200；Agilent製）を用いて、流速２μｌ／分で３０分のリニアグラジェント（４～４０％アセトニトリル／０．１％ ＴＦＡ）により分離した。グラジェントの間に、分離サンプルを、３０秒間隔でターゲットプレート（Prespotted AnchorChip；Bruker Daltonics製）にスポットした。スポッティングには、サンプルスポッター（PROTEINEER fc；Bruker Daltonics製）を用いた。

【００４２】

ターゲットプレート上のサンプルスポットは１０ｍＭリン酸アンモニウム／０．１％ ＴＦＡで洗浄し、マトリックス支援レーザーイオン化（ＭＡＬＤＩ）－飛行時間型（ＴＯＦ）質量分析計（autoflex III；Bruker Daltonics製）を用いてＭＳ／ＭＳ分析した。得られたＭＳ／ＭＳデーターから、ＭＡＳＣＯＴ（Matrix Science製）データベースにより蛋白質を同定した。これらの検討により、配列番号１～３３のそれぞれに示されるアミノ酸配列からなる蛋白質が、イネ由来の歯周病菌プロテアーゼ阻害蛋白質であることがわかった。配列番号１～３３のそれぞれに示され、歯周病菌プロテアーゼ阻害蛋白質をコードする塩基配列は、データベース（Rice Annotation Project DataBase（http://rapdb.dna.affrc.go.jp/index.html））における配列検索により明らかにした。

【００４３】

（歯周病菌プロテアーゼ阻害蛋白質に由来するペプチドの歯周病菌プロテアーゼ阻害活性）

配列番号１に示されるアミノ酸配列を有する蛋白質の、５４番目から６０番目までのアミノ酸残基に相当するペプチド配列（Arg－Thr－Leu－Val－Arg－Arg－Gln）をＲＡ１７（２７－３３）、配列番号４に示されるアミノ酸配列を有する蛋白質の、１４番目から２５番目までのアミノ酸残基に相当するペプチド配列（Arg－Arg－Leu－Met－Ala－Ala－Lys－Ala－Glu－Ser－Arg－Lys）をＣＨ（１４－２５）として、それぞれ化学合成し（シグマアルドリッチジャパン）、上述の方法に従って歯周病菌プロテアーゼ阻害活性を測定した（図１）。この結果から、歯周病菌プロテアーゼ阻害蛋白質の部分ペプチドが、歯周病菌プロテアーゼに対して阻害活性を有することがわかった。従って、歯周病予防を目的とした機能因子として有用であることは明らかである。

【００４４】

（歯周病菌プロテアーゼ阻害蛋白質に由来するペプチドの歯周病菌増殖阻害活性）

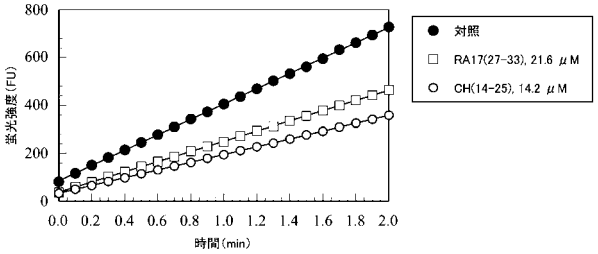
上述のペプチドＣＨ（１４－２５）について、歯周病菌ポルフィロモナス・ジンジバリスに対する増殖阻害活性を測定した。

【００４５】

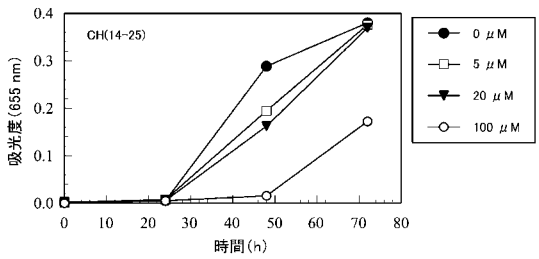
ポルフィロモナス・ジンジバリス（JCM8525株）を波長６５５ｎｍでの初発吸光度が０．００５になるように変法ＧＡＭブイヨン（日水製薬製）に接種し、これを９６ウェルマイクロプレートに、１ウェル当たり１００μＬ分注した。同時に、ＣＨ（１４－２５）を最終濃度が０，５，２０あるいは１００μＭになるように添加し、３７℃で嫌気培養した。嫌気培養にはアネロパック（三菱ガス化学製）を用い、培養開始から０，２４，４８ならびに７２時間後に６５５ｎｍでの吸光度をマイクロプレートリーダーで測定して、ポルフィロモナス・ジンジバリスの増殖をモニタリングした（図２）。図２から明らかなように、ペプチドＣＨ（１４－２５）は、歯周病菌プロテアーゼ阻害活性に加えて、その濃度に依存する歯周病菌増殖阻害活性を示した。

【００４６】
以上の試験例からも、イネ由来の歯周病菌プロテアーゼ阻害蛋白質とその部分ペプチドが、天然物由来の歯周病予防因子として有用であることは明確である。
【図面の簡単な説明】
【００４７】
【図１】ペプチドＲＡ１７（２７－３３）とペプチドＣＨ（１４－２５）について、歯周病菌プロテアーゼ阻害活性を測定した結果を示すグラフである。
【図２】ペプチドＣＨ（１４－２５）について、歯周病菌ポルフィロモナス・ジンジバリスに対する増殖阻害活性を測定した結果を示すグラフである。

【図１】



【図２】



【配列表】
0004982908000001.app

フロントページの続き

(72)発明者　太養寺　真弓
新潟県加茂市新栄町２番２５号　新潟県農業総合研究所食品研究センター内
(72)発明者　大坪　貞視
新潟県加茂市新栄町２番２５号　新潟県農業総合研究所食品研究センター内
(72)発明者　谷口　正之
新潟県新潟市西区五十嵐二の町８０５０番地　新潟大学工学部内

審査官　春田　由香

(56)参考文献　特開２００７－０１６００２（ＪＰ，Ａ）
特開２００６－１５１８４３（ＪＰ，Ａ）

(58)調査した分野(Int.Cl.，ＤＢ名)
Ａ６１Ｋ　３８／００－５８
Ａ６１Ｋ　８／００－９９
Ａ６１Ｑ　１１／００－０２
Ａ６１Ｋ　６／００－１０
Ａ２３Ｌ　１／００－４８
ＪＳＴＰｌｕｓ／ＪＭＥＤＰｌｕｓ（ＪＤｒｅａｍＩＩ）