

***Helicobacter pylori* に対する大豆ペプチドの影響**

朴 雅美・井上正康*

大阪市立大学大学院医学研究科

Effect of Soybean Peptide Fractions on the Growth of *Helicobacter pylori*

Ah-Mee PARK and Masayasu INOUE

Osaka City University Medical School, Osaka 545-8585

ABSTRACT

H. pylori, a gram-negative and microaerobic bacterium plays important roles in the pathogenesis of gastritis, peptic ulcer and gastric cancer. To test the possibility that dietary consumption of soybean proteins might be beneficial for the improvement of the related risk factors, we studied their effects on the metabolism and growth of *H. pylori*. The three insoluble fractions of soybean peptide, DL, D1 and S, strongly inhibited the growth of *H. pylori*, but not of *E. coli*. Some of their fractions, R and D3, accelerated the respiration and ATP generation of *H. pylori*, while Fujipro-R had no appreciable effects. The understanding of the mechanism by which some soybean peptide fractions show bacteriostatic action against *H. pylori* might permit establishment of the method for minimizing *H. pylori*-dependent gastric injury and cancer. *Soy Protein Research, Japan* **3**, 63-66, 2000.

Key words : *H. pylori*, soybean peptide, metabolism, antibacterial

Helicobacter pylori (*H. pylori*) は胃の粘膜層に生息し、胃炎や胃潰瘍さらには胃がんの原因ともなりうる細菌として知られている^{1,2)}。本菌の除菌は主に抗生物質2剤とプロトンポンプインヒビターを用いて行われる。また、アスコルビン酸や緑茶のカテキン類などにも抗菌作用があることが知られており³⁾、我々が通常摂取している食物中にも抗菌作用を有するものが存在する可能性がある。本菌の生息場所や障害作用の面から考え、食物由来の抗菌作用成分の検討は非常に重要と考えられる。大豆には動脈硬化や心疾患を予防する働きがあるといわれている。今回、大豆ペプチド画分の *H. pylori* に対する種々の影響を解析し、その胃粘膜病変や

胃がんの発症予防における可能性を検討した。

方 法

菌株は *H. pylori* NCTC-11637 と *E. coli* JM019 を用いた。大豆ペプチド画分6種と分離大豆たん白質のフジプロ-R (FPR) を用いた。増殖測定には30時間UV照射により滅菌したペプチドを用いた。

***H. pylori* の増殖に対する大豆ペプチドの影響**

ブルセラブロス中に各大豆ペプチド画分を終濃度0.1%となるよう添加し、 1×10^6 /mL の *H. pylori* を加えアネロバックキャンピロ (三菱ガス化学株式会社) を用いて微好気条件下とし⁴⁾、37℃で48時間振盪培養を行った。その後、5%馬血清を添加した寒天培地に移

*〒545-8585 大阪市阿倍野区旭町1-4-3

し、さらに48時間培養を行った後コロニー数をカウントした。*E. coli*の増殖能の測定にはLB培地を用い、好気条件下12時間の培養を行った。

*H. pylori*の呼吸に対する大豆ペプチドの影響

クラーク型酸素電極を用いて*H. pylori* (2.5×10^8 /mL), *E. coli* (1×10^8 /mL) およびラットミトコンドリア (1 mg/mL) の呼吸活性を測定した⁵⁾。各ペプチドを終濃度0.1%となるよう添加し、呼吸速度の変化を解析した。また、ATP測定はベーリンガーマンハイム社のATP Bioluminescence Assay kitを用いた。

*H. pylori*の活性酸素産生動態に対する大豆ペプチドの影響

活性酸素の測定には化学発光プローブのL012とMCLAを用い、化学発光値をLuminescence Reader (アロカ社)で測定した⁶⁾。*H. pylori* (5×10^8 /mL)に0.5%のTriton X-100を加え膜を可溶化した後、終濃度0.1%の大豆ペプチドを添加し時間毎の発光値測定を行った。

結果と考察

*H. pylori*の増殖に対する大豆ペプチドの影響

ペプチド画分D1, SおよびDLは*H. pylori*の増殖を完全に抑制した。コントロール群に比べ、RとPM画分は約50%抑制したが、D3とフジプロRは影響しなかった (Fig. 1)。一方、大腸菌ではDLは増殖能を約50%減少させたが、その他のペプチド画分では影響が見られなかった。*H. pylori*の増殖を抑制したペプチドはいずれも不溶性の画分であった。その作用機序は不明であるが、直接的に増殖を抑制するか増殖に必要な栄養分を吸着することで抑制している可能性が考えら

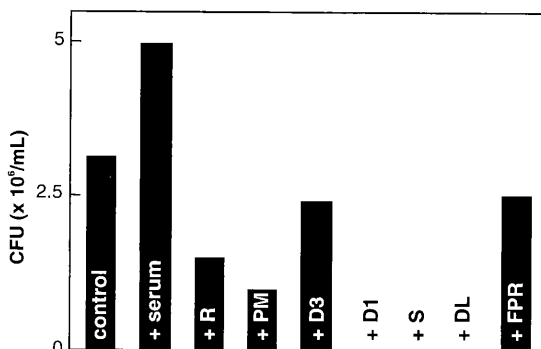


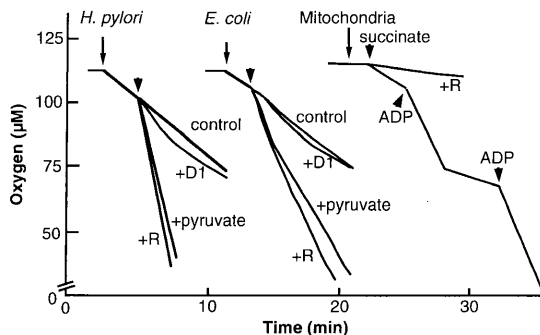
Fig. 1. Effect of soybean peptide fractions on *H. pylori* growth. *H. pylori* was cultured microaerobically with or without 0.5% peptide fraction at 37 °C. After 48 h, viability was determined. CFU: colony-forming units.

れ、さらなる検討が必要である。

*H. pylori*の呼吸に対する大豆ペプチドの影響

*H. pylori*にR, PM画分を添加 (1 mg/mL)すると、ビルビン酸呼吸と同程度の酸素消費が認められた (Fig. 2)。このような作用は*E. coli*でも同様に認められたが、ラット肝のミトコンドリア呼吸には影響しないことが判明した。これら3種のペプチドはいずれも、ペプチド鎖長が短く、遊離アミノ酸を多く含むものである。この*H. pylori*や*E. coli*の酸素消費はアルギニンを基質とした呼吸によるものか、アミノ酸が菌体のアミノ酸オキシダーゼにより酸化される反応を反映するものと考えられる。そこでこれらペプチド添加によるATP産生量を測定したところ、R, D3画分ではATP産生量がビルビン酸添加時よりも増加した (Fig. 3)。このような作用もまた、*E. coli*でも同様に認められた。一方、酸素消費の高かったPM, Sに関してはATPの増

A)



B)

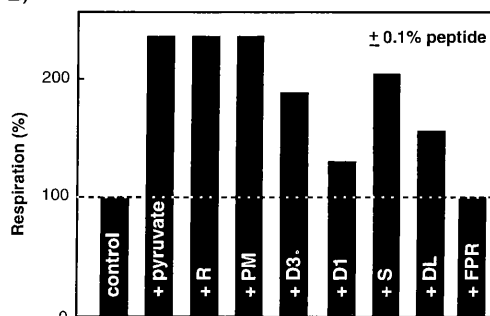


Fig. 2. Effect of soybean peptide fraction on *H. pylori* respiration. Respiration of *E. coli* (1×10^8), *H. pylori* (2.5×10^8) and mitochondria was monitored with Clark-type oxygen electrode at 37 °C in 10 mM HEPES buffer containing 0.9% NaCl. (A) The time indicated by arrowhead, soybean peptide fractions (0.1%) or pyruvate (5 mM) were added to a reaction mixture containing *E. coli*, *H. pylori* or mitochondria. (B) Control was shown as 100% respiration activity.

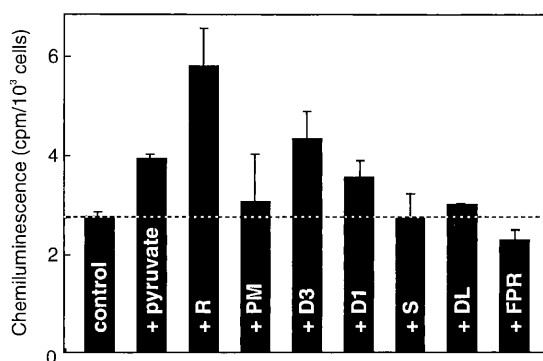


Fig. 3. Effect of soybean peptide fractions on ATP generation by *H. pylori*. With or without 0.1% peptide fraction, *H. pylori* was incubated for 10 min at 37 °C. And the content of ATP was measured using a ATP Bioluminescence Assay kit CLS II (BOEHRINGER MANNHEIM). N=3, mean $\pm$ SD.

加は認められなかった。このことから各ペプチド画分によって酸素消費の増加の機序が異なっており、Rでは呼吸活性が増加していることが明らかとなった。

*H. pylori*の活性酸素産生動態に対する大豆ペプチドの影響

MCLAは O_2^- を、L012は $\cdot OH$ を主に検出する発光プローブである⁶⁾。MCLAを用いた測定ではいずれのペプチドも*H. pylori*の活性酸素産生に影響を与えなかった (Fig. 4a)。一方、L012を用いた測定では図に全ては示さなかったがいずれのペプチド画分、フジプロ-Rも0.1%ではほぼ完全に発光を消失させた (Fig. 4b)。この作用がペプチドのラジカル消去能によるものかL012に結合することで発光を抑制するためか不明である。そこで、これらのペプチドの直接的ラジカル消去能を解析するために、ESRを用いて H_2O_2 -Feラジカル生成系への影響を観察した。解析の結果、S画分が弱い消去能を有するのみであり、他のペプチド画分は全く影響のないことが判明した。このことからL012の発光抑制作用はペプチドによる直接的なラジカル消去能によるものではなく、L012に結合するためか、*H. pylori*による活性酸素の産生そのものを抑制しているためと考えられる。

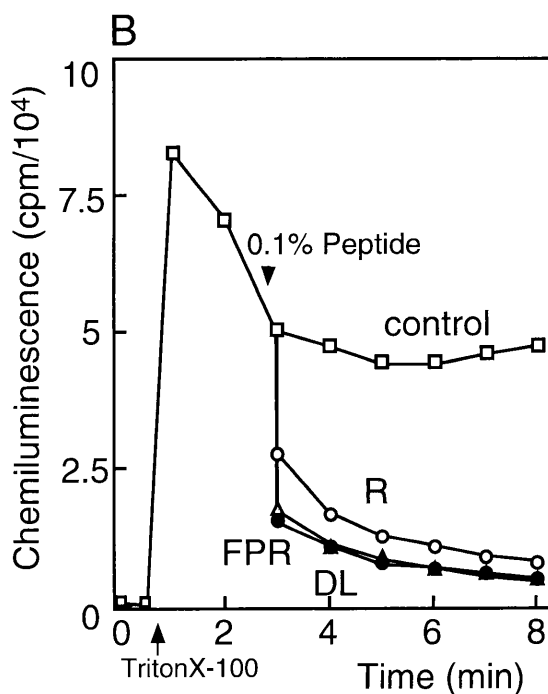
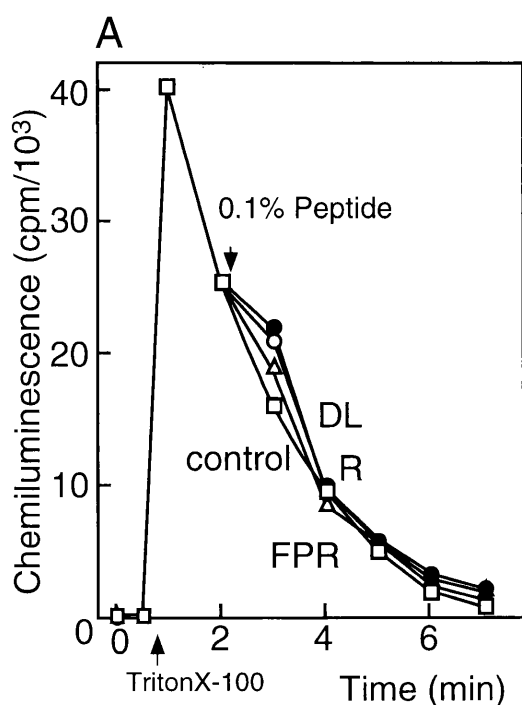


Fig. 4. Effect of soybean peptide fractions on reactive oxygen generation by *H. pylori*. The time course of the generation of reactive oxygen species by *H. pylori* (5×10^8 /mL) was monitored by the chemiluminescence method with either 1 μ M MCLA (A) or 0.4 mM L012 (B) at 37 °C. At the time indicated by arrowhead, soybean peptide fractions (0.1%) were added.

要 約

分離大豆たん白質のフジプロ-R は *H. pylori* の呼吸や増殖などに全く影響を与えなかった。しかし、3 種 (DL, S, D1) の不溶性ペプチド画分は *H. pylori* の増殖を抑制した。また、可溶性の R 画分は *H. pylori* や *E. coli* の呼吸活性を増加させることが判明した。これらのペプチド画分中には様々な生理活性が存在することが研究されてきた。今回、これらのペプチド画分が抗 *H. pylori* 作用を有することが判明したがその成分とメカニズムは不明であり、今後の検討が必要である。

文 献

- 1) Parsonnet J, Hansen S, Rodriguez L, Gelb AB, Warnke RA, Jellum E, Orentlich N, Vogelman JH and Friedman GD (1994): *Helicobacter pylori* infection and gastric lymphoma. *N Engl J Med*, **330**, 1267-1271.
- 2) Hahm KB, Lee KJ, Kim JH, Cho SW and Chung MH (1998): *Helicobacter pylori* infection, oxidative DNA damage, gastric carcinogenesis, and reversibility by rebamipide. *Dig Dis Sci*, **43**, 72S-77S.
- 3) Zhang HM, Wasaka N, Maeda O and Yamamoto T (1997): Vitamin C inhibits the growth of bacterial risk factor for gastric carcinoma: *Helicobacter pylori*. *Cancer*, **80**, 1897-1903.
- 4) Nagata K, Satoh H, Iwahi T, Shimoyama T and Tamura T. (1993): Potent inhibitory action of the gastric proton pump inhibitor lansoprazole against urease activity of *Helicobacter pylori*: unique action selective for *H. pylori* cells. *Antimicrob Agents Chemother*, **37**, 769-774.
- 5) Yu H, Sato EF, Nagata K, Nishikawa M, Kashiba M, Arakawa T, Kobayashi K, Tamura T and Inoue M (1997): Oxygen-dependent regulation of the respiration and growth of *Escherichia coli* by nitric oxide. *FEBS Lett*, **409**, 161-165.
- 6) Imada I, Sato EF, Miyamoto M, Ichimori Y, Minamiyama Y, Konaka T and Inoue M (1999): Analysis of reactive oxygen species generated by neutrophils using a chemiluminescence probe L-012. *Anal Biochem*, **271**, 53-58.