

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5488949号
(P5488949)

(45) 発行日 平成26年5月14日(2014.5.14)

(24) 登録日 平成26年3月7日(2014.3.7)

(51) Int. Cl.	F 1	
A 6 1 K 35/74 (2006.01)	A 6 1 K 35/74	A
A 6 1 P 7/02 (2006.01)	A 6 1 P 7/02	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 1 1
A 2 3 L 1/30 (2006.01)	A 2 3 L 1/30	Z
A 2 3 K 1/18 (2006.01)	A 2 3 K 1/18	A
請求項の数 4 (全 12 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2008-88366 (P2008-88366)	(73) 特許権者	501203344
(22) 出願日	平成20年3月28日 (2008.3.28)		独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構
(65) 公開番号	特開2009-242255 (P2009-242255A)		茨城県つくば市観音台3-1-1
(43) 公開日	平成21年10月22日 (2009.10.22)	(74) 代理人	100119002
審査請求日	平成22年12月9日 (2010.12.9)		弁理士 鈴木 敦
前置審査		(72) 発明者	野村 将
			茨城県つくば市池の台2 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構 畜産草地研究所内
		審査官	川崎 洋祐
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 プラスミノーゲン活性化剤

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ラクトコッカス・ラクチス・サブスピーシーズ・ラクチス (Lactococcus lactis ssp. lactis)、ラクトコッカス・ラクチス・サブスピーシーズ・ラクチス・バイオバー・ジアセチラクチス (Lactococcus lactis ssp. lactis bv. diacetylactis)、及びラクトパチルス・ブルガリカス (Lactobacillus bulgaricus) のいずれか一種以上の乳酸菌の菌体から、pH 1.0 ~ pH 1.2 の緩衝液により抽出されたプラスミノーゲン活性化剤。

【請求項 2】

前記菌体が 80 ~ 150 の温度で 5 分 ~ 40 分加熱処理して用いられる請求項 1 に記載のプラスミノーゲン活性化剤。

【請求項 3】

前記請求項 1 又は請求項 2 に記載のプラスミノーゲン活性化剤を用いた食品。

【請求項 4】

前記請求項 1 又は請求項 2 に記載の記載のプラスミノーゲン活性化剤を用いた飼料又はペットフード。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、乳酸菌の生産する線溶酵素活性化因子を有効成分とし、フィブリノーゲンを限定分解して、血栓形成もしくは血栓再閉塞を阻害するプラスミノーゲン活性化剤に関する

る。

【背景技術】

【0002】

血栓症により引き起こされる疾病は、心筋梗塞、脳梗塞、肺閉塞症などの重篤なものが多く、常に死因の上位を占めている。

【0003】

血栓の形成にはフィブリンが重要な役割を演じるが、繊維素溶解系（織溶系）の正常な活性化は、これらの循環器系疾患の予防となる。即ち、繊維素溶解酵素の不活性前駆体プラスミノーゲンは、活性化因子の作用によって活性型のプラスミンに変換され、血栓を形成するフィブリン及びフィブリノーゲンを小断片化し溶解する。プラスミノーゲン活性化因子としては、プラスミノーゲンアクチベーター（以下tPAと略記することがある。）

10

【0004】

、ウロキナーゼ（以下UKと略記することがある。）

しかし前記tPA、UK等のプラスミノーゲン活性化因子は、高いプラスミノーゲン活性化能力をもつが、その一方で副作用も強い。そこで医薬品のような急性、且つ高い効果を求めるのではなく、食品から低レベルの有効成分を長期間にわたって摂取することによる保健効果が期待されている。中でも納豆はフィブリン分解活性を有し、食事による摂取によって血流改善効果を示すことが知られており、その有効成分も特定されている（例えば特許文献1を参照。）。

20

【0005】

一方、乳酸菌は、炭水化物を分解して乳酸を生成することによってエネルギーを獲得する微生物のうち細菌に属するものの総称であり、代表的な属としてグラム陽性球菌であるLactococcus属、Streptococcus属、Pediococcus属、Leuconostoc属、及びグラム陽性桿菌であるLactobacillus属がある。この乳酸菌については、近年生体調節機能が大きく注目され、整腸作用、免疫調節作用、抗ストレス作用、抗酸化作用など、様々な機能が明らかにされてきており、食品の差別化、需要の創出に貢献している（例えば特許文献2を参照。）。

しかし従来乳酸菌において、プラスミノーゲンの活性化能や血流改善効果に関する知見は報告されていない。

30

【0006】

【特許文献1】特開平3-168082号公報

【特許文献2】特開平8-268899号公報

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

フィブリノーゲンを限定分解して、血栓形成もしくは血栓再開塞を阻害する、新たなプラスミノーゲン活性化剤を提供する。

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明者は、乳酸菌がプラスミノーゲンを活性化させる作用を見出して、本発明をするに至った。即ち本発明は以下の通りである。

40

< 1 > 本発明は、ラクトコッカス・ラクチス・サブスピーシーズ・ラクチス (Lactococcus lactis ssp. lactis)、ラクトコッカス・ラクチス・サブスピーシーズ・ラクチス・バイオバー・ジアセチラクチス (Lactococcus lactis ssp. lactis bv. diacetylactis)、及びラクトバチルス・ブルガリカス (Lactobacillus bulgaricus)のいずれか一種以上の乳酸菌の菌体から、pH 10 ~ pH 12の緩衝液により抽出されたプラスミノーゲン活性化剤である。

< 2 > 更に本発明は、前記菌体が80 ~ 150 の温度で5分~40分加熱処理して用いられるプラスミノーゲン活性化剤である。

< 3 > 更に本発明は、前記プラスミノーゲン活性化剤を用いた食品、及び飼料又はペット

50

フードである。

【発明の効果】

【0009】

本発明は、乳酸菌の菌体を有効成分とする新たなプラスミノゲン活性化剤を提供する。本発明のプラスミノゲン活性化剤である乳酸菌は、幅広い範囲の熱及びpHに安定であり、また乳酸菌は食品であることから、食事から日常的に摂取することにより、血流改善等の保健効果を期待することができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0010】

本発明のプラスミノゲン活性化剤に用いられる乳酸菌としては、ラクトコッカス・ラクチス・サブスピーシーズ・ラクチス (Lactococcus lactis ssp. lactis、なお以下において菌種名の記載はラテン表記のみとし、他の菌種も同様とする。)、ラクトコッカス・ラクチス・サブスピーシーズ・ラクチス・バイオバー・ジアセチラクチス (Lactococcus lactis ssp. lactis bv. diacetylactis)、ラクトコッカス・ラクチス・サブスピーシーズ・クレモリス (Lactococcus lactis ssp. cremoris)、ラクトバチルス・ブルガリカス (Lactobacillus bulgaricus)、ラクトバチルス・コリニフォルミス (Lactobacillus coryniformis)、ラクトバチルス・パラプランタラム (Lactobacillus paraplantarum)、ラクトバチルス・プランタラム (Lactobacillus plantarum)、ロイコノストック・メセンテロイデス (Leuconostoc mesenteroides)、ペディオコッカス・アシディラクティシ (Pediococcus acidilactici)、ストレプトコッカス・サーモフィルス (Streptococcus thermophilus) のいずれか一種以上を用いることができる。

10

20

【0011】

前記の乳酸菌の中でも、Lactococcus lactis ssp. lactis、Lactococcus lactis ssp. lactis bv. diacetylactis、及びLactobacillus bulgaricusがより好ましく、特にLactococcus lactis ssp. lactisとLactococcus lactis ssp. lactis bv. diacetylactisが好ましい。

【0012】

前記Lactococcus lactis ssp. lactisにおいては特にATCC 19435株が、またLactococcus lactis ssp. lactis bv. diacetylactisにおいては特にC 59株が好ましい。なお前記C 59株は、独立行政法人製品評価技術基盤機構 特許微生物寄託センターに、受領番号N I T E A P - 5 3 6として寄託されている。

30

【0013】

本発明のプラスミノゲン活性化剤は、培養後12時間後から用いることが好ましく、培養後20時間後から用いることが更に好ましい。

【0014】

本発明のプラスミノゲン活性化剤は、-30の温度に反復凍結処理した後も、高温で一定時間加熱処理をした後も活性を失わず、広範囲の温度に対し安定である。したがって本発明のプラスミノゲン活性化剤は、加熱食品としても好適に用いることができる。

【0015】

また本発明のプラスミノゲン活性化剤は、室温において用いるよりも、80～150の温度で、5分～40分、より好ましくは100～130の温度で、10分～20分、加熱処理することが、活性が高まり好ましい。

40

【0016】

また本発明のプラスミノゲン活性化剤は、pH3～pH9という広い範囲で安定である。したがって本発明のプラスミノゲン活性化剤は、前記加温調理のみならず、酸を用いる調理等にも用いることができ、日常の広範囲の調理によって本発明のプラスミノゲン活性化剤を摂取することができる。

【0017】

本発明のプラスミノゲン活性化剤は、前記菌体から、pH7～pH14、より好ましくはpH10～pH12の抽出液を用いることにより、プラスミノゲン活性化成分を含

50

む抽出液として使用することもできる。

【 0 0 1 8 】

さらに本発明のプラスミノゲン活性化剤は、ヒト型だけでなく他の動物種のプラスミノゲンにも効果を発揮するため、飼料、ペットフードとしても有効に用いることができる。

【実施例】

【 0 0 1 9 】

<実施例 1 スクリーニング>

(供試株及び培養)

実施例 1 に供試した菌株は、*Lactococcus lactis* ssp. *lactis* に属する菌株 3 種、*Lactococcus lactis* ssp. *lactis* bv. *diacetylactis* に属する菌株 3 種、*Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* に属する菌株 1 種、*Lactobacillus bulgaricus* に属する菌株 2 種、*Lactobacillus coryniformis* に属する菌株 1 種、*Lactobacillus paraplantarum* に属する菌株 1 種、*Lactobacillus plantarum* に属する菌株 1 種、*Leuconostoc mesenteroides* に属する菌株 1 種、*Pediococcus acidilactici* に属する菌株 1 種、及び *Streptococcus thermophilus* に属する菌株 1 種の合計 15 株を用いた。試験に供試した乳酸菌株、及びその入手先を表 1 に示したが、表 1 の寄託機関欄の、1) は American Type Culture Collection. (ATCC) を、2) は 独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター (FERM) を、3) は 農業生物資源ジーンバンク (MAFF) を、4) は 独立行政法人製品評価技術基盤機構 特許微生物寄託センター (NITE) をそれぞれ示す。

【 0 0 2 0 】

供試菌株のうち、C25 株、C59 株、C75 株、D55 株、H80 株は、いずれも独立行政法人製品評価技術基盤機構 特許微生物寄託センターに、C25 株：受領番号 NITE AP-539、C59 株：受領番号 NITE AP-536、C75 株：受領番号 NITE AP-538、D55 株：受領番号 NITE AP-540、H80 株：受領番号 NITE AP-537 として、それぞれ寄託されている。

【 0 0 2 1 】

【表 1】

菌株番号	菌種	寄託機関	寄託番号(受領番号)
ATCC 19435	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i>	1)	ATCC19435
G50	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i>	2)	FERM P-18415
NIAI 527	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i>	3)	MAFF400103
ATCC 13675	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> bv. <i>diacetylactis</i>	1)	ATCC13675
C59	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> bv. <i>diacetylactis</i>	4)	(NITE AP-536)
CVT8W	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> bv. <i>diacetylactis</i>	2)	FERM P-14165
ATCC 19257	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>cremoris</i>	1)	ATCC19257
B-5b	<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	3)	MAFF401001
B-6	<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	3)	MAFF401003
H80	<i>Lactobacillus coryniformis</i>	4)	(NITE AP-537)
C75	<i>Lactobacillus paraplantarum</i>	4)	(NITE AP-538)
L-34	<i>Lactobacillus plantarum</i>	3)	MAFF401501
C25	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	4)	(NITE AP-539)
D55	<i>Pediococcus acidilactici</i>	4)	(NITE AP-540)
510	<i>Streptococcus thermophilus</i>	3)	MAFF400301

【 0 0 2 2 】

Lactococcus 属菌の培養には、M17 培地 (トリプトン 0.5%、ソイトン 0.5%、肉消化物 0.5%、酵母消化物 0.25%、アスコルビン酸 0.05%、硫酸マグネシウム 0.025%、グリセロリン酸二ナトリウム 1.9%、乳糖 0.5% (Difco 社製)) の乳糖を、ブドウ糖 0.5% に置換した培地 (以下 GM17 培地と表記する) を用い、それ以外の菌種の培養には *Lactobacilli* MRS 培地 (プロテオースペプトン 1%、牛肉エキス 1%、酵母エキス 0.5%、ブドウ糖 2%、Tween 80 0.1%、クエン酸アンモニウム 0.5%、硫酸マグネシウム 0.01%、硫酸マンガン 0.005%、リン酸二カリウム 0.2% (Difco 社製、以下 MRS 培地と表記する)) を用いた。

【 0 0 2 3 】

培養にあたっては、本培養の前に、各供試菌株について前培養を1回行い、菌を活性化した。該前培養は、オートクレーブ滅菌した新鮮な前記各培地 5 m l に、保存菌を植金耳で接種し、30 で一晩培養して行った。

【 0 0 2 4 】

(プラスミノーゲン活性化能の測定)

前記により前培養を行った各供試菌株について、培養液 5 0 u l を滅菌した新鮮な前記各培地 5 m l に接種し、30 で14時間静置培養した。該培養液を日立CR20型高速冷却遠心機(ローター形式 R P R S 3 - 3) を用いて遠心分離(3 0 0 0 r p m、20分、4) した。遠心上清(培養上清) を吸引して取り除き、沈殿している菌体を0.85%塩化ナトリウム溶液1m l に懸濁後、同様に遠心分離(3 0 0 0 r p m、20分、4) した。遠心上清(菌体洗浄液) を吸引して取り除き、沈殿している各供試菌株の菌体を回収した。

10

【 0 0 2 5 】

前記により得られた各菌体を、600nmの吸光度が0.25($OD_{600} = 0.25$) になるように、緩衝液0.1M Tris-Cl pH7.4中に懸濁し、菌体懸濁液を得た。該菌体懸濁液50u l に、酵素基質液(0.1M Tris-ClpH7.4、75ug/ml ヒトプラスミノーゲン(Sigma社製、plasminogen from human plasma)、0.15mMプラスミン基質(Sigma社製、N-Tosylglycyl-L-prolyl-L-lysine 4-nitroanilide acetate salt)) 100u l を加え、30 で18時間静置した後、トミーMRX-152型微量冷却遠心機(ローター形式 T M S - 4) を用いて遠心分離(1 2 0 0 0 r p m、10分、4) し、上清の405nmの吸光度を、ベックマンDU640型分光光度計を用いて測定した。

20

【 0 0 2 6 】

前記各菌体懸濁液50u l に、盲検としてプラスミノーゲンを含まない酵素基質液(0.1M Tris-Cl pH7.4、0.15mM プラスミン基質(Sigma社製、N-Tosylglycyl-L-prolyl-L-lysine 4-nitroanilide acetate salt)) 100u l を加え、前記と同様に静置した後、トミーMRX-152型微量冷却遠心機(ローター形式 T M S - 4) を用いて遠心分離(1 2 0 0 0 r p m、10分、4) し、上清の405nmの吸光度を測定した。

【 0 0 2 7 】

前記菌体懸濁液にプラスミノーゲンを含む酵素基質液を加えた上清の405nmの吸光度の測定値(以下反応液測定値ということがある。) から、前記菌体懸濁液にプラスミノーゲンを含まない酵素基質液を加えた上清の405nmの吸光度の測定値(以下盲検測定値ということがある。) を差し引くことにより、両値の差dA405を算出した。

30

【 0 0 2 8 】

プラスミノーゲン活性の測定は、菌体懸濁液の代わりに組織プラスミノーゲンアクチベーター(生化学工業) の含量を、10000IU/ml、20000IU/ml、50000IU/ml、100000IU/mlと替えた0.1M Tris-ClpH7.4の各50ulに、前記プラスミノーゲンを含む酵素基質液、及び前記プラスミノーゲンを含まない酵素基質液をそれぞれ100u l 加え、前記と同様に反応液測定値から盲検測定値を差し引くことによりdA405を算出した。前記組織プラスミノーゲンアクチベーターの含量(以下プラスミノーゲン活性化能ということがある。) とdA405の測定結果を表2に、また該測定結果より得られたプラスミノーゲン活性化能とdA405値の検量線の一例を図1に示す。

40

【 0 0 2 9 】

【表 2】

活性量 (IU/ml)	dA405
0	0.000
10000	0.097
20000	0.113
50000	0.155
100000	0.626

【0030】

10

前記図 1 により作成した活性量の検量線は、Y 軸を (dA405)、X 軸を (プラスミノゲン活性化能) とすると、下記数 1 に示された回帰式となる ($R^2 = 0.9122$)。したがって下記数 2 により、各菌体懸濁液 ($OD_{600} = 0.25$) のプラスミノゲン活性化能 (IU/ml) を求めた。

【0031】

【数 1】

$$Y = 0.000006X - 0.0108$$

【0032】

20

【数 2】

$$[\text{プラスミノゲン活性化能}] = ([\text{dA405}] - (-0.0108)) / 0.000006$$

【0033】

(結果)

前記により求めた各供試菌株の菌体懸濁液 ($OD_{600} = 0.25$) 1 ml 当たりのプラスミノゲン活性化能を表 3 に示す。

【0034】

【表 3】

30

菌株番号	プラスミノゲン 活性化能 (IU/ml)
ATCC19435	46020
G50	21891
NIAI527	12619
ATCC13675	16889
C59	64290
CVT8W	26752
ATCC19257	32082
B-5b	21734
B-6	20393
H80	30581
C75	29053
L-34	4153
C25	2272
D55	5271
510	8493

40

【0035】

表 3 から、供試した 15 株すべてで、プラスミノゲン活性化能を検出した。中でも *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* に属する ATCC19435 株、*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* に属する C59 株及び CVT8W 株、*Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* に属する ATCC 19257 株、*Lactobacillus* *corniformis* に属する H80 株及び C75 株が高い活性を示し、特に ATCC 19435 株及び C59 株が極めて高い活性を示した。

50

【 0 0 3 6 】

<実施例 2 ウシ型プラスミノーゲンに対する作用>

(方法)

実施例 1 においてプラスミノーゲン活性化能が強かった ATCC 19435 株及び C 59 株について、ウシ型プラスミノーゲンに対する活性化能を観察した。菌体懸濁液の調製と活性化能測定は、実施例 1 に記載の方法と同様とし、ウシプラスミノーゲンに対する活性化能測定は、実施例 1 の酵素基質液のヒトプラスミノーゲンを、ウシプラスミノーゲン (Sigma 社製、plasminogen from bovine plasma) に代えることによって行った。

【 0 0 3 7 】

(結果)

前記各菌体の dA_{405} 値と数 2 に示す算式から、ウシ型プラスミノーゲン活性化能を算出した。該各菌株の菌体懸濁液 ($OD_{600}=0.25$) 1 ml 当たりのヒト型及びウシ型プラスミノーゲンに対するプラスミノーゲン活性化能を表 4 に示す。

【 0 0 3 8 】

【表 4】

Strain No.	プラスミノーゲン活性化能	
	Human (IU/ml)	Bovine (IU/ml)
ATCC19435	6749	1686
C59	20201	9792

【 0 0 3 9 】

表 4 から、供試株はヒトプラスミノーゲンだけでなく、ウシプラスミノーゲンにも活性を有することが明らかになった。

【 0 0 4 0 】

<実施例 3 熱安定性>

(方法)

C 59 株について、実施例 1 の方法と同様にして得た菌体懸濁液 ($pH7.4$ 、 $OD_{600} = 0.25$) を、次の 5 条件で処理した。(1) 4℃ で 4 時間静置、(2) 室温で 4 時間静置、(3) -30℃ 凍結後、室温融解を 3 回繰り返し、(4) 沸騰水浴上で 10 分間加熱、(5) オートクレーブ (121℃、1 気圧加圧) で 15 分間加熱。

【 0 0 4 1 】

(結果)

前記各処理した菌体懸濁液について、前記実施例 1 の方法と同様にして、プラスミノーゲン活性化能を測定、算出した。各処理について、菌体懸濁液 ($OD_{600}=0.25$) 1 ml 当たりの残存するプラスミノーゲン活性化能、及び (1) の活性量を 100 とした相対値を残存活性として表 5 に示す。

【 0 0 4 2 】

【表 5】

処理条件	プラスミノーゲン	
	活性化能 (IU/ml)	残存活性 (%)
4℃, 4h	44656	100
RT, 4h	36501	82
freeze-thaw	30385	68
100℃, 10min	77056	173
121℃, 15min	80733	181

10

20

30

40

50

【 0 0 4 3 】

表5の結果から、(4)の100・10分の加熱処理、及び(5)の121・15分の加熱処理では、(1)の4・4時間静置に対して、それぞれ173%、181%と活性量は増加した。(2)の室温・4時間静置では活性低下はほとんど見られなかった。(3)の-30凍結・融解処理によって、活性は約70%に低下したが、活性は維持された。本活性は加温することにより、むしろ向上することが明らかになった。

【 0 0 4 4 】

<実施例4 pH安定性>

(方法)

C59菌体について、前記実施例1と同様の方法により得た菌体について、緩衝液0.1M Tris-Cl pH7.4に替えて、pH3.0, pH 4.0, pH 5.0, pH 6.0, pH 7.0, pH8.0, pH 9.0の各緩衝液を用いて、600nmの吸光度が5.0 ($OD_{600} = 5.0$)になるように、各緩衝液中に懸濁した。前記緩衝液は、pH3.0ないしpH7.0については、McIlvaine緩衝液(リン酸-クエン酸緩衝液)を、pH7.0ないしpH 9.0については、0.1M Tris-Cl緩衝液を、それぞれ用いた。前記菌体懸濁液を、30で3時間加熱処理後、0.1MTris-Cl pH7.4で20倍に希釈し、その50ulを用いて残存するプラスミノーゲン活性化能を測定した。

10

【 0 0 4 5 】

(結果)

各pHで処理後菌体懸濁液($OD_{600}=0.25$)1ml当たりの残存するプラスミノーゲン活性化能、及びプラスミノーゲン活性化能が最も高い値を示したpH4.0の値を100とした相対値を括弧書きとして表6に示す。

20

【 0 0 4 6 】

【表6】

Buffer	pH						
	3.0	4.0	5.0	6.0	7.0	8.0	9.0
MacIlvaine (IU/ml)	87389	94393	94105	93452	87747	-	-
(相対値)	(93)	(100)	(100)	(99)	(93)	-	-
Tris-Cl (IU/ml)	-	-	-	-	83859	84729	87108
(相対値)	-	-	-	-	(89)	(90)	(92)

30

【 0 0 4 7 】

表6の結果から、pH3.0 - pH 9.0の間でプラスミノーゲン活性化能の低下は認められず、広範囲のpHで安定であることが明らかになった。

【 0 0 4 8 】

<実施例5 培養時間>

(方法)

C59菌株について、前記実施例1と同様の方法により前培養をした前培養液50ulを、滅菌した新鮮なGM17培地5mlに接種し、30で培養した。接種後3時間から27時間後まで3時間ごとに培養液を採取し、該採取した培養液について、実施例1の方法で菌体懸濁液($OD_{600} = 0.25$)を作製し、菌体のプラスミノーゲン活性化能を測定した。また、培養上清、及び菌体洗浄液のプラスミノーゲン活性化能についても測定した。培養上清、及び菌体洗浄液は0.1M Tris-Cl pH7.4にて30倍に希釈し、その希釈液50ulに前記酵素基質液100ulを加え、菌体懸濁液と同様の方法でプラスミノーゲン活性化能を測定した。

40

【 0 0 4 9 】

前記処理後菌体懸濁液($OD_{600}=0.25$)1ml当たりの残存するプラスミノーゲン活性化能、及び培養上清と菌体洗浄液の1mlあたりのプラスミノーゲン活性化能(IU/ml)を、表7及び図2に示した。

【 0 0 5 0 】

50

【表 7】

Time (h)	培養液の 濁度 OD ₆₀₀	プラスミノーゲン活性化能		
		菌体 IU/ml	培養上清 IU/ml	洗浄液 IU/ml
3	0.440	10853	18529	2527
6	1.513	5480	20848	3759
9	1.574	8651	18143	4583
12	1.543	9110	21438	4423
15	1.520	22218	20038	6661
18	1.550	62059	20891	5378
21	1.594	85104	20563	4846
24	1.621	96950	21394	5793
27	1.666	97832	19302	4007

10

【 0 0 5 1 】

(結果)

表 7 及び図 2 から、菌の生育は、接種後 6 時間でプラトーに達した。菌体量あたりのプラスミノーゲン活性化能は、15 時間後から増加し、21 時間後にプラトーに達した。培養上清及び菌体洗浄液には活性はほとんど認められず、本活性は菌体に結合している成分によると示唆された。

20

【 0 0 5 2 】

< 実施例 6 無細胞抽出液の調製 抽出液の pH >

(方法)

前記実施例 5 の C 5 9 菌体について、21 時間培養液から実施例 1 に記載の方法で菌体を調製した。前記菌体について、抽出液として McIlvaine 緩衝液 (リン酸 - クエン酸緩衝液) pH3.0, pH 4.0, pH 5.0, pH 6.0、及び 0.1M Tris-Cl 緩衝液 pH7.0, pH 8.0、並びに 0.1 M 重炭酸ナトリウム緩衝液 pH9.0, pH 10.0, pH 11.0 を、OD₆₀₀ = 5.0 となるようにそれぞれ加え、菌体懸濁液を調製した。

30

【 0 0 5 3 】

該菌体懸濁液は、4 で 1 時間静置した後、トミー MRX - 152 型微量冷却遠心機 (ローター形式 TMS - 4) を用いて遠心分離 (12000 rpm、10 分、4) して沈殿を除き、遠心上清 (抽出液) を得た。

【 0 0 5 4 】

前記各 pH の菌体懸濁液、及び抽出液各 10 ul を、0.1M Tris-Cl pH7.4 190ul にそれぞれ加えよく混和した後、菌体懸濁液 (OD₆₀₀=0.25) 及び抽出液の各 1 ml 当たりのプラスミノーゲン活性化能を測定した。該各プラスミノーゲン活性化能の測定値より、各 pH の菌体懸濁液から抽出液への抽出率を、下記数 3 により求めた。結果を表 8 に示す。

【 0 0 5 5 】

【数 3】

40

$$[\text{抽出率}] = [\text{抽出液の活性量}] / [\text{菌体懸濁液の活性量}] \times 100$$

【 0 0 5 6 】

【表 8】

緩衝液	pH	菌体懸濁液 (IU/ml)	抽出液 (IU/ml)	抽出率 (%)
McIlvaine	3.0	51290	1278	2.5
	4.0	71709	4404	6.1
	5.0	80703	4654	5.8
	6.0	78643	6367	8.1
Tris-Cl	7.0	62963	10136	16.1
	8.0	63311	14111	22.3
NaHCO ₃	9.0	71523	24028	33.6
	10.0	61745	47175	76.4
	11.0	65305	61664	94.4

10

【0057】

(結果)

表 8 の結果から、pH 3 - pH 8 の緩衝液で抽出した際にはプラスミノゲン活性化能の緩衝液への移行は見られなかったのに対して、pH 10 以上の緩衝液を用いた際には緩衝液へ活性が移行した。pH 10 以上の緩衝液を用いることにより、無細胞抽出液のプラスミノゲン活性化剤を作成することができる。

20

【産業上の利用可能性】

【0058】

本発明により、乳酸菌の菌体を有効成分とする新たなプラスミノゲン活性化剤が提供される。本発明のプラスミノゲン活性化剤である乳酸菌は、幅広い範囲の熱及び pH に安定であり、また乳酸菌は食品であることから、新たな機能を有する食品を提供することができ、血流改善等の保健効果が期待される。さらに本発明のプラスミノゲン活性化剤は、ヒトプラスミノゲンのみならず、動物のプラスミノゲンも活性化するために、飼料、ペットフード等としても利用することができる。

30

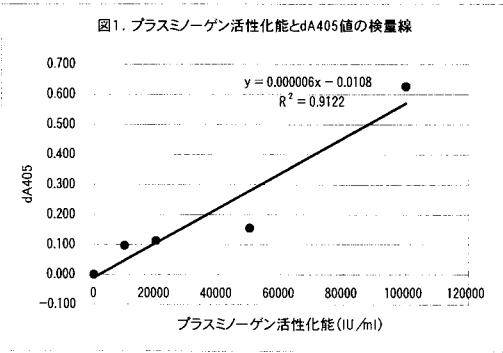
【図面の簡単な説明】

【0059】

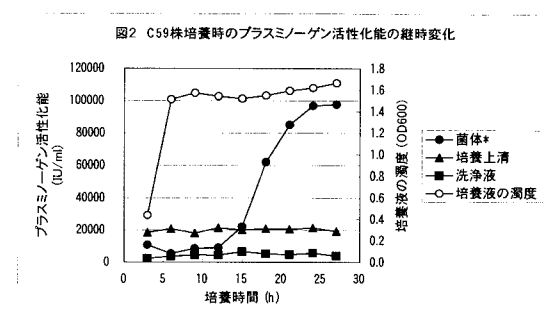
【図 1】プラスミノゲン活性化能と dA 405 値の検量線

【図 2】C59 株培養時のプラスミノゲン活性化能の経時変化

【 図 1 】



【 図 2 】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
 A 2 3 K 1/16 (2006.01) A 2 3 K 1/16 3 0 4 B

(56)参考文献 特開2006-191881(JP,A)
 特開2004-269358(JP,A)
 Hurmalainen V et al., Extracellular proteins of Lactobacillus crispatus enhance activation of human plasminogen., Microbiology., 2007年 4月, Vol.153 No.4, pp.1112-1122
 Antikainen J et al., pH-Dependent Association of Enolase and Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase of Lactobacillus crispatus with the Cell Wall and Lipoteichoic Acids, J Bacteriol., 2007年 6月, Vol.189 No.12, pp.4539-4543

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A 6 1 K 3 1 / 0 0 - 3 1 / 3 2 7
 A 6 1 K 3 1 / 3 3 - 3 1 / 8 0
 A 6 1 K 3 3 / 0 0 - 3 3 / 4 4
 A 2 3 L 1 / 2 7 - 1 / 3 0 8
 A 6 1 K 3 8 / 0 0 - 3 8 / 5 8
 A 6 1 K 4 1 / 0 0 - 4 5 / 0 8
 A 6 1 K 3 5 / 0 0 - 3 5 / 7 6
 A 6 1 P 1 / 0 0 - 4 3 / 0 0
 A 2 3 K 1 / 1 6
 A 2 3 K 1 / 1 8
 CA/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)
 JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)