

令和元年6月19日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08012

研究課題名(和文)カロテノイド生産乳酸菌が持つ新規酸化ストレス応答因子と抗酸化物質の探索

研究課題名(英文) Search for novel oxidative stress response factors and antioxidants from carotenoid-producing lactic acid bacteria

研究代表者

萩 達朗 (HAGI, Tatsuro)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・畜産研究部門 畜産物研究領域・主任研究員

研究者番号：00510257

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、黄色カロテノイドを生産する乳酸菌から新たな抗酸化物質を見つけることを目的としている。そこで、酸化ストレスに応答すると予想される遺伝子の解析および、抗酸化物質候補が細胞に与える抗酸化作用について検討した。その結果、黄色カロテノイド(ジアポニューロスポレン)を合成する遺伝子とは別の遺伝子群を発見し、実際、これら遺伝子が黄色カロテノイドを別カロテノイド(派生物質)に変換することを明らかにした。また、派生物質の細胞に対する抗酸化作用を調べた結果、弱い抗酸化作用が観察された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

乳酸菌はプロバイオティクスとして、ヒトを含む動物に有益な効果をもたらす微生物として知られている。本研究では、乳酸菌の新たな有用物質としてカロテノイドに着目し、新規抗酸化物質の探索を行った。乳酸菌が主に生産する黄色カロテノイドをさらに修飾し、数種のカロテノイド派生物が生産されることが確認され、新たな学術的知見が得られた。また、これら派生物には弱いながらも抗酸化作用が確認できたことから、新たな機能性成分として健康維持に貢献できる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The objective of this study is to find novel antioxidants from carotenoid-producing lactic acid bacteria (LAB). Analysis of genes associated with oxidative stress response in LAB was performed. In addition, the effect of predicted antioxidants produced by LAB on human cell was investigated.

As a result, other carotenoid biosynthesis genes, which is different from the existing yellow pigmented carotenoid (diaponeurosporene) biosynthesis genes, were isolated. These genes could convert diaponeurosporene to other carotenoid derivatives. A weak antioxidative activity of carotenoid derivatives was observed in vitro test using human cell line.

研究分野：応用微生物

キーワード：乳酸菌 カロテノイド 抗酸化物質

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

活性酸素種による酸化ストレスは、私達の細胞にダメージを与え、その蓄積は老化促進や様々な疾病発症に関与すると考えられている。そのため、植物や微生物が生産する抗酸化物質を摂取して、過剰な酸化ストレスを抑制する試みがなされている。乳酸菌が作り出す抗酸化物質は、乳酸菌自身の酸化ストレス耐性向上や、動物では酸化ストレスで生じる大腸炎予防に繋がるということが報告されており、乳酸菌の新たな抗酸化物質の発見が重要視されている。抗酸化物質は乳酸菌の酸化ストレス応答により産生される酸化ストレス応答因子である。スーパーオキシドジスムターゼや NADH オキシダーゼ等の抗酸化物質が広く知られているが、乳酸菌の中には、diaponeurosporene(ジアポニューロスポレン、炭素数 30)と呼ばれるカロテノイドを中心とした新規酸化ストレス応答機構を有していることが明らかとなり(図 1)、新たな酸化ストレス応答因子の存在が示唆された。

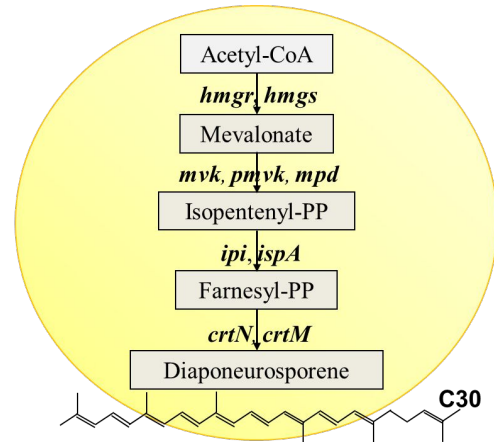


図 1. 乳酸菌のカロテノイド合成経路

2. 研究の目的

本研究では、カロテノイド生産乳酸菌が持つ酸化ストレス応答遺伝子を網羅的に調べ、機能未知遺伝子について、他種乳酸菌で異種発現させて酸化ストレス耐性への影響を調べる。さらに酸化ストレス耐性が向上した発現株については、その抽出物のヒト細胞に対する抗酸化作用を検討する。

3. 研究の方法

(1)新規抗酸化物質合成遺伝子の探索

カロテノイド生産乳酸菌である、*Enterococcus* 属、*Lactobacillus* 属について、ホールトランスクリプトーム解析によって、酸化ストレスに応答する遺伝子群を調べ、新たな抗酸化物質として予想される遺伝子を探索する。具体的には、好気と嫌気培養条件で培養した菌株間の遺伝子発現を比較し、両条件で差があった遺伝子(変動遺伝子)を特定する、また、ゲノム情報から、カロテノイド生産に関する新規抗酸化物質の探索を行う。

(2)新規抗酸化物質候補遺伝子の発現および、ヒト細胞への抗酸化作用

機能未知遺伝子を乳酸菌発現ベクターに連結し、*Lactococcus lactis* MG1363 株(カロテノイド非生産菌)に導入する。この時、プロモーターは、各乳酸菌由来のオリジナルプロモーターを用いる。

作製した発現株について、過酸化水素を含む培地での生育度あるいは、過酸化水素処理して生残性を調べることで、酸化ストレス耐性を評価する。さらに、ヒト細胞への抗酸化作用を検討するため、発現株から粗抽出物を調製する。コントロールとして、候補遺伝子を挿入していないベクターを導入した株の抽出物を用いた。細胞に対する抗酸化作用は OxiSelect Cellular Antioxidant Assay Kit (Green Fluorescence)を使用し、細胞はヒト結腸腺癌由来 HT-29 およびヒト肝癌由来 HepG2 細胞を用いた。

4. 研究成果

(1)新規抗酸化物質の探索

Lactobacillus plantarum を用いて、トランスクリプトーム解析で網羅的な遺伝子発現解析を行った。その結果、嫌気培養に比べて 3 倍以上発現量が増加した機能未知遺伝子が 4 個確認できた。この時、カロテノイド生合成遺伝子は 2 倍程度であった。

一方、過去の成果で得られたトランスクリプトーム解析結果をもとに、*Enterococcus gilvus* から好気培養で発現量が増加する機能未知遺伝子を選択した(Table 1)。*L. plantarum* と比較し、*E. gilvus* の方がカロテノイド遺伝子発現変化および、カロテノイド生産が大きかったため、*E. gilvus* の遺伝子について、シャトルベクターに連結して乳酸菌に導入し、発現株を 7 株作製した。次に、7 株を過酸化水素を含む培地に接種して生育を調べた結果、1 株について、過酸化水素に対する耐性が向上する傾向にあり、乳酸菌の新規抗酸化物質の存在が示唆された。しかしながら、発現株 7 株を菌体破砕機で破砕し、菌体粗抽出液を Total Antioxidant Capacity(TAC) Assay Kit で測定したところ、抗酸化が強い株が確認できなかった。

Table 1. 発現候補遺伝子

	ID	log2(fold_change) 好気/嫌気	product	accession
1	gene2659	5.38595	hypothetical protein	WP_010779726.1
2	gene2658	4.37069	hypothetical protein	WP_010779727.1
3	gene1160	4.03793	hypothetical protein	WP_010781174.1
4	gene3691	4.03127	hypothetical protein	WP_010779118.1
5	gene3873	3.9562	hypothetical protein	WP_010778936.1
6	gene395	3.90905	hypothetical protein	WP_010781910.1
7	gene341	3.80225	hypothetical protein	WP_010781964.1

そこで、*Enterococcus* 属の別の種についてゲノム情報を検索したところ、これまでのカロテノイド生合成遺伝子とは異なる推定カロテノイド生合成遺伝子の存在が確認できた。また、推定カロテノイド遺伝子について RT-PCR で発現を確認したところ、既知のカロテノイド遺伝子と同様に発現し、ストレス応答していることが確認できた。そこで、既知のカロテノイド生合成遺伝子と、ゲノム情報を基に推定した遺伝子をクローニングしシャトルベクターに導入後、*L. lactis* MG1363 に導入したところ、菌体が薄いオレンジ色に変化した。既知のカロテノイド遺伝子のみ導入した場合の菌体は黄色で、推定カロテノイド生合成遺伝子を導入することでオレンジ色になったことから、今回クローニングした遺伝子は、既知のカロテノイドを修飾する遺伝子であることが明らかとなった。

非発現株に比べると、推定カロテノイド修飾遺伝子発現株は、酸化ストレス耐性が向上する傾向にあった。

本研究成果によって、乳酸菌の新たなカロテノイド生合成機構の存在が示唆された。

(2) ヒト細胞に対する抗酸化作用

乳酸菌が生産する主要なカロテノイド(図 1 に示したジapoニューロスポレン)以外にも、その派生物質として、複数種のカロテノイドが存在していた(図 2)。そこで、ジapoニューロスポレンおよびその派生物を生産する乳酸菌発現株からカロテノイドをメタノール抽出し、酢酸エチルおよび塩および水を添加して酢酸エチル層を回収することで、水溶性夾雑物を排除した。この夾雑分を軽減したカロテノイド粗抽出物を試験に用いた。コントロールとして、カロテノイド遺伝子を挿入していないベクターを導入した株の抽出物を用いた。細胞に対する抗酸化作用は OxiSelect Cellular Antioxidant Assay Kit (Green Fluorescence) を使用し、細胞はヒト結腸腺癌由来 HT-29 およびヒト肝癌由来 HepG2 細胞を用いた。

HepG2 細胞を用いた試験では、抽出物による抗酸化作用は確認できなかった。一方、HT-29 細胞を用いた試験では、ジapoニューロスポレンおよび派生物質発現株の抽出物において、抗酸化作用を示す傾向が確認された。今後、精製カロテノイドについて、同様の試験を行うことが必要であると考えられる。本研究によって、乳酸菌の生産するカロテノイドが新たな抗酸化物質として利用できることが示唆された。

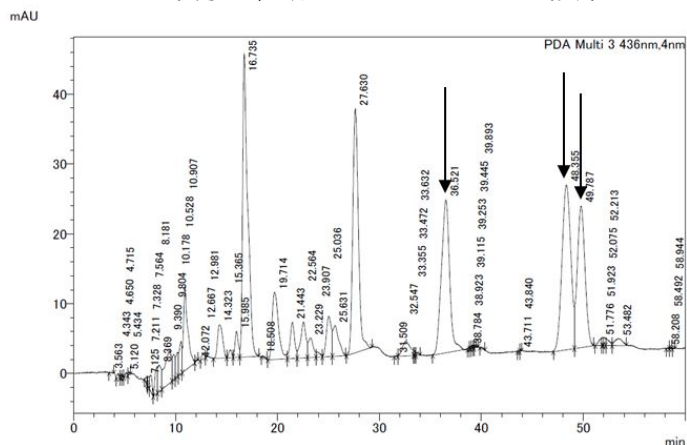


図 2. カロテノイド抽出物のHPLC解析
黒矢印は、新規カロテノイド候補物質を示す

細胞に対する抗酸化作用は OxiSelect Cellular Antioxidant Assay Kit (Green Fluorescence) を使用し、細胞はヒト結腸腺癌由来 HT-29 およびヒト肝癌由来 HepG2 細胞を用いた。

HepG2 細胞を用いた試験では、抽出物による抗酸化作用は確認できなかった。一方、HT-29 細胞を用いた試験では、ジapoニューロスポレンおよび派生物質発現株の抽出物において、抗酸化作用を示す傾向が確認された。今後、精製カロテノイドについて、同様の試験を行うことが必要であると考えられる。本研究によって、乳酸菌の生産するカロテノイドが新たな抗酸化物質として利用できることが示唆された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計2件)

Tatsuro Hagi, Miho Kobayashi, Masaru Nomura, Whole-transcriptome analysis of oxidative stress response genes in carotenoid-producing *Enterococcus gilvus*, Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 査読有, 82(6), 2018, pp1053-1057
doi: 10.1080/09168451.2017.1399790

Shun Ohki, Tatsuro Hagi, Kazuma Nakano, Akino Shiroma, Hinako Tamotsu, Makiko Shimoji, Misuzu Shinzato, Noriko Ashimine, Maiko Minami, Tetsuhiro Nakanishi, Kuniko Teruya, Kazuhito Satou, Naoko Moriya, Miho Kobayashi, Masaru Nomura, Chise Suzuki, Takashi Hirano, Complete Genome Sequence of Carotenoid-Producing *Enterococcus gilvus* CR1, Isolated from Raw Cow's Milk, Microbiology Resource Announcements, 査読有, 7(10), 2018, pii: e00988-18
doi: 10.1128/MRA.00988-18

[学会発表](計5件)

萩 達朗、小林 美穂、守谷 直子、木元 広実、野村 将、乳酸菌が生産するカロテノイドの生産機構と生理作用、2018年度日本乳酸菌学会泊まり込みセミナー、2018

Hagi Tatsuro, Naoko Moriya, Hiromi Kimoto, Kobayashi Miho, Nomura Masaru, Microarray analysis of the effect of carotenoid-producing recombinant *Lactococcus lactis* on THP-1 cells, IPC2018, 2018

Hagi Tatsuro, Kobayashi Miho, Nomura Masaru, Modification of carotenoid pigment from yellow to orange color in lactic acid bacteria, IUMS2017, 2017

Tatsuro Hagi, Carotenoid-based Stress Response Mechanism in Lactic Acid Bacteria, 5th Asian Federation of Societies for Lactic Acid Bacteria International Symposium, 2016

Tatsuro Hagi, Miho Kobayashi, Masaru Nomura, Transcriptome analysis of carotenoid-producing *Enterococcus gilvus* under carotenoid-inducing culture condition, 5th

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称：オレンジ色乳酸菌

発明者：萩達朗、小林美穂、野村将

権利者：国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構

種類：特許

番号：特許願 2017 - 128282 号

出願年：平成29年

国内外の別：国内

取得状況(計0件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。