

令和 4 年 6 月 10 日現在

機関番号：32658

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2021

課題番号：17K12889

研究課題名(和文)ラクトバチルス属のコリノイド合成能とプロバイオティクス素材としての基礎的検討

研究課題名(英文)Fundamental studies on the ability of Lactobacillus species to synthesise corrinoid compounds.

研究代表者

谷岡 由梨(TANIOKA, YURI)

東京農業大学・国際食料情報学部・准教授

研究者番号：30553250

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究で使用したコリノイド生産乳酸菌の中にB12を産生する株はなく、ヒトにおいて不活性なシュードB12であったため、培地にコリノイド合成に必要なコバルトやグルタミンを添加し、生成されるコリノイド化合物を調べたところ、コリノイド生成量は増加し、生育の促進が観察され、シュードB12とともに、同定には至らなかったが、無添加時には検出されなかったコリノイド化合物が検出された。コリノイド生産乳酸菌の人工消化耐性に及ぼす影響を検討したところ、pH2では20%程度まで減少し、培地にコバルトやグルタミンを添加しても生残率に変化はなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒト糞中には、B12以外の下方配位子の塩基が異なる多様なコリノイドが存在することが報告されており、腸内細菌はB12やそれ以外のコリノイドを利用、またはリモデリングしていると考えられる。本研究で得られたコリノイド生産乳酸菌の人工消化耐性やコリノイド化合物の基礎的な情報は、新規プロバイオティクス素材としての可能性を示した成果になると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Corrinoid-producing Lactobacillus in this study didn't produce true B12 but pseudovitamin B12 inactive for human. When cobalt and glutamine, which are necessary for corrinoid biosynthesis, were added to the medium and the corrinoid compounds produced were examined, an increase in corrinoid production and growth enhancement were observed. The effect of corrinoid-producing Lactobacillus on the tolerance of artificial digestion found to be reduced to 20% at pH 2, and the addition of cobalt or glutamine to the medium did not change the survival rate.

研究分野：食品科学

キーワード：コリノイド合成乳酸菌 人工消化

1. 研究開始当初の背景

日本は、2000 万人超の 70 歳以上の人口を抱えた少子高齢社会へと変わり健康寿命の延伸が重要な課題となっている。中高齢者は、年齢と共に、食嗜好の変化(菜食中心で動物性食品の摂取不足)、身体及び生体調節機能の衰えが起こりやすい。また、加齢により腸内環境が変化することが知られている。最近では、腸内細菌叢と糖尿病や癌など疾病との関連が明らかにされつつある。またこれら以外にも、中高齢者において胃酸分泌の低下や萎縮性胃炎が多発していることが報告されている。現代社会は飽食の時代と言われ、ビタミン欠乏を引き起こすことは非常に少ない。しかし、飽食による偏食によって、栄養成分の中には、欠乏の手前の不足や低栄養状態が引き起こされる場合がある。

ビタミン B₁₂(B₁₂)は、動物性食品に主に含まれ、細胞内への B₁₂ 吸収には胃酸分泌が関与している。従って、上述した中高齢者の胃酸分泌の低下などの食環境の変化は、B₁₂ 不足や低栄養を招きやすい。事実、中高齢者で B₁₂ 欠乏症状の一つである神経障害が多発している。対策として、薬やサプリメントの摂取が有効であるが、我が国の食環境に配慮し出来るだけ日常食品から摂取することで B₁₂ 低栄養や不足を防ぎ、健康寿命の延伸につなげていくことが望ましいと考えられる。

B₁₂ は、テトラピロール骨格を有し、その中心にコバルトが配位している。コバルトには、下方配位子が配位しており、B₁₂ では 5,6-ジメチルベンズイミダゾールを有する構造をしているが、下方配位子がアデニンに置換した構造をしているシュード B₁₂ などが存在する。これらはコリノイド化合物と総称される。B₁₂ の吸収は、唾液腺から分泌されるハプトコリン(HC)、胃壁細胞から分泌される内因子(IF)、トランスコバラミン(TC)が関与する。シュード B₁₂ は、これら B₁₂ 結合タンパク質との親和性が低いので摂取しても吸収されないため、ヒトにおいてビタミンとして機能しない。しかし、微生物は、B₁₂ 以外のシュード B₁₂ などを補酵素として利用できる。申請者は、B₁₂ 低栄養を未然に防ぐことを目的とし、これまで食品におけるコリノイド化合物について詳細に解析してきた。その結果、スピルリナなどの原核藻類を原料とした栄養補助食品や魚介類、特に巻き貝において、B₁₂ ではなくシュード B₁₂ が多量に含まれていることを明らかにした。また、原核藻類が自らコバルトを取り込みシュード B₁₂ を生合成し B₁₂ 依存性メチオニン合成酵素の補酵素として利用することを報告している。また、巻き貝は、食物連鎖により微生物が生産したコリノイド化合物を貝内臓に取り込んでいると考えられた。腸内細菌叢と疾病の関連が報告されており、今後、腸内環境を良好に保つ、あるいは改善するプロバイオティクス素材は益々重要になると考える。

2. 研究の目的

ヒトは微量の B₁₂ を効率よく吸収するために、B₁₂ 結合タンパク質を介した吸収経路を発達させてきた。したがって、上述したとおりシュード B₁₂ など下方配位子の異なるコリノイド化合物を摂取しても B₁₂ 結合タンパク質との親和性が低いため、吸収されず排泄される。しかし、我々の排泄物(糞)には、B₁₂ 以外の下方配位子の異なる多様なコリノイドが存在することが報告されている。この知見は、腸内細菌叢によって B₁₂ から他のコリノイド化合物に変換あるいは新規生合成していることを示唆しており、食生活の変化や疾病等により変化する可能性も考えられ大変興味深い。

そこで、本研究では、加齢による腸内環境を良好に維持すること、および食環境の変化による動物性食品の摂取不足による B₁₂ 低栄養・不足状態を未然に防ぐことを目的とし、乳酸菌のコリノイド化合物の特性やプロバイオティクス素材としての基礎的検討を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

コリノイド化合物生産乳酸菌の培養には、乳酸菌の研究に一般的に用いられる MRS 培地を用い微好気培養し、所属大学に保管している乳酸菌 5 属 (*L. coriniformis*, *L. plantarum*, *L. reuteri*, *L. collinoides*) を培養した。培養後、コリノイド化合物量の定量には、菌体と培地に分け、各画分のコリノイド量を日本食品標準成分表で採用されている微生物法を用い測定した。さらに、コリノイド化合物は、その構造内にコバルトを含むことから、コバルトとグルタミンを原料に合成される。したがって、培地中へのグルタミンとコバルト添加・無添加、およびグルタミン濃度別における生育態度とコリノイド化合物含量の測定を行った。

乳酸菌が生成するコリノイド化合物の同定を行うために、バイオオートグラムによる簡易同定と LCMSMS による同定を行った。化合物抽出液を 50~100 pg になるように標準 B₁₂ 並びにシュード B₁₂ 溶液とともにシリカゲル 60 の TLC アルミニウムシートに負荷し、展開溶媒 (2-プロパノール / アンモニア水 / 蒸留水 (7: 2: 1)) を用いて室温・暗黒下で展開させた。展開した TLC プレートは風乾後、B₁₂ 依存性大腸菌 *E. coli* 215 によるバイオオートグラム分析を行った。精製したアワビ内臓 B₁₂ 化合物、標準 B₁₂ ならびにシュード B₁₂ を 0.1% (v/v) 酢酸に溶解し、メンブレンフィルター (Nanosep MF, 0.4 μm) での過した後、2 μL を Ultra-Fast LC/LCMS-IT-TOF システム (島津社製) で分析した。HPLC カラムは InertSustain column (3 μm, 2.0 × 100 mm, GL サイエンス社製) を用い、カラム温度 40 °C、流速 0.2 mL/min で、B₁₂ 化合物を移動相 A (0.1% (v/v) 酢酸) と移動相 B (100% メタノール) のリニアグラジェント (0-5 min, 15% B; 5-11 min, 15-90 % B; 11-15 min, 90-15 % B) で溶出した。

ESI-MS はポジティブイオンモードで、衝突ガスにはアルゴンを使用した。本実験で使用した LC/ESI-MS 条件下では B₁₂ 化合物は 2 価イオンを形成するため、B₁₂ 化合物の検出は各標準コリノイド化合物の分子イオン (M + 2H)²⁺ (B₁₂ (C₆₃H₉₀CoN₁₄O₁₄P, 1356.4011) (m/z 678.2915), 7-アデニルシアノコバミド (シュード B₁₂) (C₅₉H₈₃CoN₁₇O₁₄P, 1345.5532) (m/z 672.7766)) で行った。

人工消化系 (強酸性下) におけるコリノイド生産乳酸菌の耐性を検討するために、5 ml の MRS 培地が入った 15 ml 試験管を 4 本用意し、コリノイド生産乳酸菌の培養液をそれぞれ 1ml ずつ接種した。MRS 培地に培養液のみ接種したものと、シアノ B₁₂ (27 μg/ml) もしくは硫酸コバルト (12 μg/ml) を 50 μl, または B₁₂ と Co の両方を 5 μl ずつ添加したもの計 4 本を 37 °C で 24 時間前後培養した。前培養液について、それぞれ分光光度計で吸光度 (Abs_{660nm}) を測定した。また、滅菌生理食塩水で希釈後 200 μl を MRS 寒天培地に混釈し、37 °C で 48 時間培養した。次に、15 ml チューブに先ほどの前培養液 200 μl, 0.5% NaCl 溶液, 4% ペプシン溶液 (pH 2 及び 3) を 1ml 加え、37 °C で振とうさせ、人工消化を開始した。開始直後から 30 分ごとに培養液を回収、滅菌生食で希釈し、200 μl を MRS 寒天培地に混釈した後 37 °C で 48 時間培養した。その後、生菌数を測定し、生残率 (%、各回収時間時における生菌数 / 0 時間時における生菌数 × 100) を算出した。

4. 研究成果

培地への B₁₂ 構成成分添加が乳酸菌のコリノイド生成に及ぼす影響について検討を行ったところ、乳酸菌 (*L. coriniformis*, *L. plantarum*, *L. reuteri*, *L. collinoides*) は、MRS 液体培地に B₁₂ 合成に必要な成分、グルタミン (Gln), グルタミン酸 (Glu), 硫酸コバルト (Co) を添加した。今回使用した菌全てにおいて、培地に Glu を添加したものは、培地中の pH が低下するため、Gln 添加に比べ、生菌数の減少が観察された。*L. coryniformis* は、Co と Glu 添加により、コリノイド化合物生成量が無添加に比べ増加したことから、本菌株が Co と Glu を取り込み、コリノイドを生合成していると考えられた。Co と Glu 添

加培地におけるコリノイドを同定したところ、*L. pentosus* は、 B_{12} のみであったが、*L. collinoides* は B_{12} と未同定の B_{12} 化合物が、*L. coryniformis* は B_{12} とシュード B_{12} が検出された。以上の結果から、培地への B_{12} 構成成分の添加は、乳酸菌の生育、コリノイド量やコリノイド化合物に影響を及ぼすことが示唆された。

コリノイド化合物の同定には、LC/ESI-MS/MS が用いられ、高額な機器を必要とする。また、現在使用されている B_{12} 定量菌株 (*Lactbacillus delbrueckii* ATCC7830) は、 B_{12} だけでなくシュード B_{12} などにおいて不活性なコリノイド化合物にも反応するため、*Lactbacillus delbrueckii* ATCC7830 に換わる B_{12} 定量菌株が必要とされている。その代替え菌株として *Lactbaccillus delbrueckii* NRIC0700 株が報告されている。そこで、本菌株の B_{12} への反応性を確認するとともに、シュード B_{12} とアルカリ耐性因子への反応性を検討した。アルカリ耐性因子の調製には即席油揚げ麺を用い、抽出は日本食品標準成分表分析マニュアルに準じて行った。成分表における即席油揚げ麺の B_{12} 含量は微量である。NRIC0700 株を用いたところ、 B_{12} は検出されずアルカリ耐性因子が $0.2 \mu\text{g}/100\text{g}$ 含まれていた。また、シアノシュード B_{12} を濃度 ($0-100\text{pg}/\text{tube}$) に分け、NRIC0700 株の生育反応を検討したところ、シアノ B_{12} と同程度の生育を認めた。以上のことから、*L. derbrueckii* NRIC 0700 株も、ATCC7830 株同様、アルカリ耐性因子を補正し、 B_{12} 以外のコリノイドを含む食品の測定には注意が必要であることが示唆された。

ゲノム情報が公開されている乳酸菌の中には、 B_{12} 合成経路や B_{12} 依存性酵素遺伝子と相同性を有する種が存在しているが、プロバイオティクスとして利用されている乳酸菌は少ない。データベース検索により、 B_{12} 合成経路や B_{12} 依存性酵素遺伝子と相同性を有する種を明らかにし、 B_{12} 生成量等が人工消化系における菌の生残性に影響するか検討した。乳酸菌の中には、 B_{12} 依存性リボヌクレオチドレダクターゼ (RNR) のみ、 B_{12} 依存性 RNR と B_{12} 生合成経路の一部を有する種、どちらも有しない種が存在していた。 B_{12} 合成経路を有し、 B_{12} 依存性 RNR のみを有する種について、 B_{12} 依存性 RNR の測定を行った。RNR はリボヌクレオチドからデオキシリボヌクレオチドへの変換を触媒しており DNA 合成に關与するため、対数期に酵素活性が高いと考え、その細胞の酵素活性の測定を試みたが、酵素活性の検出には至らなかった。次に、予備実験より、コリノイドが生成されていると示唆された乳酸菌を用いて、生育に伴うコリノイド量を検討したところ、対数期から蓄積され始め、定常期までに微増していた。

コリノイド構成成分であるコバルトや B_{12} を培地へ添加することによる生育、コリノイド生成量の変化や人工消化系を用いた菌の生残性について検討したところ、*L. collinoides* の生育は無添加と同程度であった。一方、*L. fermentum* は培地に B_{12} 添加したところ対数増殖期が早まる傾向が見られた。

コリノイド合成乳酸菌のコリノイド量は、調べた菌株全て、無添加培地においてコリノイド化合物が検出された。そこで、高速液体クロマトグラフィによる簡易同定を行ったところ、 B_{12} とシュード B_{12} が検出された。また、培地にコバルトや B_{12} を添加すると、 B_{12} やシュード B_{12} 以外のコリノイド化合物が検出されることが示唆された。人工消化系を用いた *L. collinoides* の生残性は、pH2 では 180 分経過時には 20% まで生残性が減少しており、培地への構成成分添加で前培養した菌の使用は生残性に影響を与えなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 BITO T, FUJII K, SHIMIZU T, KITAMURA Y, TANIOKA Y, TAKENAKA S, YABUTA Y, FURUSHO T, AIMI T, SCHWARZ J, WATANABE F	4. 巻 44
2. 論文標題 Determination of Vitamin B12 Content of Sauerkraut (Pickled Cabbage) Products and Plant-Derived Lactic Acid Bacteria	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 日本食品保蔵学会誌	6. 最初と最後の頁 293-301
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 谷岡由梨	4. 巻 93
2. 論文標題 シュードビタミンB12の生理機能の解明と食品化学的研究	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 ビタミン	6. 最初と最後の頁 47-51
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 谷岡由梨、田中尚人、山内淳、古庄律
2. 発表標題 ビタミンB12定量菌株として選抜された乳酸菌の各種定量因子に対する生育反応
3. 学会等名 ビタミン学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 谷岡由梨、小磯香織、竹中重雄、石田裕、古庄律、渡辺文雄
2. 発表標題 培地へのビタミンB12構成成分添加が乳酸菌のコリノイド生成に及ぼす影響
3. 学会等名 ビタミン学会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------