

令和 5 年 6 月 20 日現在

機関番号：32658

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K05780

研究課題名(和文)腸を酸化ストレスから防御する過酸化還元乳酸菌システムの構築

研究課題名(英文)Exploitation of probiotic system capable of reducing peroxides

研究代表者

新村 洋一(Nimura, Youichi)

東京農業大学・生命科学部・教授

研究者番号：00180563

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：腸の過酸化分解活性強化は、腸の疾病防御に有効と期待される。我々は、菌体外過酸化脂肪酸を毒性の低いヒドロキシン体に還元する乳酸菌*Lactobacillus plantarum* P1-2株を分離した。この分離株は低濃度から高濃度までの各過酸化物質に高い還元活性を示した。線虫酸素感受性短寿命突然変異体における検討では、酸化ストレス防御効果を有することが明らかとなった。この防御効果を示す臓器を明らかにすべく、ラットにおける酸化ストレス防御力測定系を構築し供試したところ、*L. plan.*P1-2株投与群に大腸粘膜中の脂質過酸化指標値の低下を認めた。現在、本分離株の反応機構解明と応用を目指している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腸には疾病防御の要であり、過酸化物質は各種疾病の原因物質であるが、腸の過酸化分解活性は通常組織より低い。従って、積極的に菌体外過酸化脂肪酸を還元できる乳酸菌が分離できれば、その生菌剤による腸内疾患の防止や治療の可能性が期待されるが、研究報告は見いだせない。

私達は、目的の乳酸菌、*Lactobacillus plantarum* P1-2株の分離に成功し、線虫の酸素感受性短寿命突然変異体投与では、酸化ストレス防御効果が認められた。そこで、ラットに供試したところ、乳酸菌投与群に大腸粘膜中の脂質過酸化指標値の低下を認めた。乳酸菌による生体内過酸化脂肪酸還元は学術的、応用面での発展が期待される。

研究成果の概要(英文)：Reinforcement of hydroperoxide-eliminating activity in the intestines and colon should prevent associated diseases. We successfully isolated an alternative lactic acid bacterium, *Lactobacillus plantarum* P1-2, that can efficiently reduce environmental fatty acid hydroperoxides to hydroxy derivatives through a 2-electron reduction. The strain exhibited a wide concentration range with regard to the environmental reducing activity for hydroperoxide. Given this, the isolate orally administered to the oxygen-sensitive short-lived nematode mutant, and this resulted in a significant expansion of its lifespan. This observation suggests that *L. plantarum* P1-2 inhibit internal oxidative stress. To determine the specific organs involved in this response, we performed a similar experiment in rats, involving induced lipid peroxidation by iron-overloading. We observed that only *L. plantarum* P1-2 inhibited colonic mucosa lipid peroxidation in rats with induced oxidative stress.

研究分野：応用微生物学

キーワード：過酸化脂肪酸還元乳酸菌 プロバイオティックス 過酸化脂肪酸 過酸化還元 抗酸化ストレス

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

腸には疾病防御の要であり、過酸化物は各種疾病の原因物質であるが、腸の過酸化分解活性は通常組織より低い。Alejandraらは、パチルスのカタラーゼを *Lactococcus lactis* に導入し、この過酸化水素還元能力を付与した乳酸菌には、マウスで大腸ガン発生の抑制効果があることを報告した (Alejandra *et al.*, 2008)。Lipid hydroperoxides は、過酸化水素と同様に活性酸素種 (ROS) との反応によって生じる後期反応性 hydroperoxides で、腸内疾患の因子として注目されており (Marguerite *et al.*, 1998) 種々の抗酸化剤による治療が試みられている (Yoshikawa *et al.*, 1993, Naito *et al.*, 1995, Muller *et al.*, 1984)。Itoらは、鉄剤投与による消化管脂質過酸化を誘導したマウスに *S. thermophilus* YIT2001 株を投与し、大腸ホモジネートの脂質過酸化指標の値が低下することを報告した (Ito *et al.*, 2003)。従って、積極的に菌体外の lipid hydroperoxides を還元できる乳酸菌が分離できれば、そのような生菌剤による腸内疾患の防止や治療の可能性が期待される。

私達は、目的の乳酸菌、*Lactobacillus plantarum* P1-2 株の分離に成功し、線虫の酸素感受性短寿命突然変異体投与では、酸化ストレス防御効果が認められた (平成 24 年度基盤 C 新村)。そこで本申請では、ラットで酸化ストレス防御活性系を確立し、分離株を供試したところ、乳酸菌投与群に大腸粘膜中の脂質過酸化指標値の低下を認めた。乳酸菌による生体内過酸化脂肪酸還元は学術的にも、応用面でも報告が見いだせず、新規のプロバイオティクス資材開発が期待される。

### 2. 研究の目的

本申請の最終目的は、乳酸菌による腸内の酸化ストレス防御系の確立である。すでに、過酸化脂肪酸を還元無毒化する乳酸菌株の分離に成功し、線虫酸素感受性短寿命突然変異体での酸化ストレス防御効果を観察している (平成 24 年度基盤 C 新村, Watanabe *et al.*, 2020)。線虫系では乳酸菌の効果発現部位の特定が難しいため、ラットを用いるバイオアッセイ (ラット) 系の確立し、分離株の過酸化脂質還元活性の *in vivo* での発現を検討し、乳酸菌による腸内の酸化ストレス防御系の確立を目指す。

### 3. 研究の方法

#### (1) 鉄剤投与による脂質過酸化誘導ラットへの乳酸菌投与方法

本試験では徳島大学の動物実験委員会が定める動物の取り扱いや動物実験の方法を定めたガイドラインに従いすべての試験を行った (permit number: 11,013)。6 週齢、Wistar 雄性ラット (SLC、静岡) を試験に供し、 $23 \pm 1$ 、12 時間明暗周期にて飼育した。基礎飼料は AIN-76 を基礎飼料とし、各実験段階に応じて鉄剤配合飼料、鉄剤と乳酸菌配合飼料とした (表 1)。供試菌は、過酸化水素分解活性の高い *Pediococcus pentosaceus* Be1 株 (図 1)、過酸化脂肪酸分解活性の高い *L. plantarum* P1-2 株 (図 1)、標準株として *S. thermophilus* NRIC0256<sup>T</sup> を用いた。各乳酸菌末は、GYP 培地を用いて培養した乳酸菌体を遠心分離によって回収し、保護剤として 10% 脱脂粉乳溶液と混合後、凍結乾燥処理して調製した。乳酸菌乾燥重量 : 脱脂粉乳重量 = 1 : 9 となるよう調製した。各試験で使用した乳酸菌数は 1g 当たり生菌として約 100 億の乳酸菌を含んでいた。調製した乳酸菌末は基礎飼料に混合後、投与まで -18℃ に保管した。飼料は自由摂取とし、24 時間毎に交換した。1 週間の基礎飼料投与による予備飼育期間後、消化管内に脂質過酸化を誘導する為、フマル酸鉄 (WAKO) と乳酸菌末を配合した飼料を 2 週間投与した。ラットの体重は毎日記録した。剖検前日 15~20 時間前に絶食後、ジエチルエーテルによる深部麻酔を施し、心臓または腹部大動脈から採血し屠殺後、血漿、胃、小腸、大腸、肝臓を摘出した。胃、小腸、大腸は粘膜を採取した (図 2)。



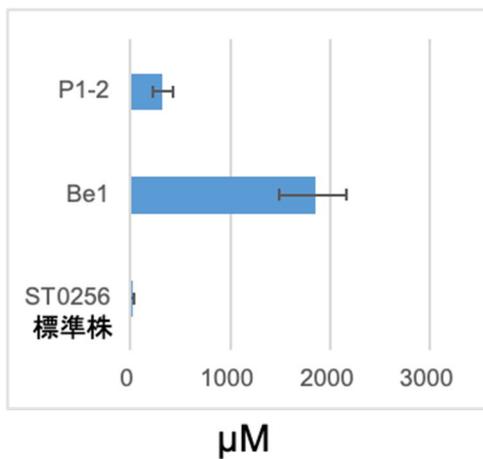
図 1. 飼育、採取法

表 1 . 飼料の組成

	AIN-76	対照群	鉄食群	乳酸菌末
重石酒酸コリン	0.2	0.2	0.2	0.2
DLメチオニン	0.3	0.3	0.3	0.3
ビタミンMIX	1.0	1.0	1.0	1.0
ミネラルMIX	3.5	3.5	3.5	3.5
セルロースパウダー	5.0	4.4	3.9	3.9
コーン油	5.0	5.0	5.0	5.0
β-コーンスターチ	15.0	12.3	12.3	12.3
カゼイン	20.0	18.3	18.3	18.3
スクロース	50.0	50.0	50.0	50.0
フマル酸鉄	—	—	0.5	0.5
スキムミルク	—	5.0	5.0	—
乳酸菌末	—	—	—	5.0

(単位:パーセント)

### 過酸化水素



### 過酸化リノール酸

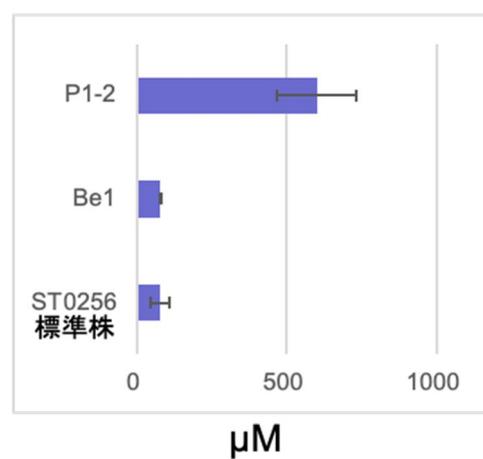


図 2 . 供試乳酸菌株の過氧化物分解活性

#### (2)ラット臓器の脂質過酸化度測定方法

各臓器および臓器粘膜を氷中でホモジネートし、脂質過酸化指標を測定した。脂質過酸化の指標として、臓器ホモジネート中のマロンジアルデヒド(以下、MDA)を比色法(Mihara and Uchiyama, 1990)にて測定した。臓器ホモジネートのタンパク質濃度は Bradford 法で測定し、臓器ホモジネート当りの MDA 値として算出した。フマル酸鉄投与による脂質過酸化指標 (MDA)の上昇検討では対応のない t 検定にて統計解析を行い、乳酸菌末投与による脂質過酸化指標の変動に対しては non-repeated ANOVA による検証後、SNK Test による多重検定を行い、有意水準  $P < 0.05$  として統計解析を行った。

#### 4 . 研究成果

生体内で生成される過酸化水素、lipid hydroperoxides は細胞毒性を有し、種々の疾病や老化などを引き起こす因子として考えられている。*Pediococcus pentosaceus* Be1 株は過酸化水素、*Lactobacillus plantarum* P1-2 株は lipid hydroperoxides を構成する fatty acid hydroperoxides を 2 電子還元する活性を有する(図 2)。線虫の酸素感受性短寿命突然変異体 *C. elegans fer-15; mev-1* 株は、スーパーオキシド分解系を欠如しているため、過酸化物を細胞内で生成しており、両分離株投与による生体内過酸化物低減化が推測された。両分離株を各々、線虫に投与したところ、予想通り、両分離株ともに線虫の平均寿命延長効果を示した(平成 24

年度基盤C 新村)。さらに、分離株の作用する臓器を明らかにすべく、臓器ごとに酸化ストレス防御力評価を可能にする系の構築を試みた。Itoらは、マウスでフマル酸鉄投与による酸化ストレス *in vivo* 評価系を報告していたが (Ito *et al.*, 2003)、臓器の特定には、臓器摘出の容易なラットが有利と考えられた。Itoらのマウスに対するフマル酸鉄投与条件を基にラットへの投与量を検討し、フマル酸鉄投与ラットの大腸粘膜、肝臓を含む各臓器の内における脂質過酸化指標である MDA を定量した。マウス大腸粘膜 (Ito *et al.*, 2001) と、ラット肝臓での報告 (Bruce *et al.*, 1983, Younes *et al.*, 1990) と同様、大腸粘膜と肝臓で MDA 量の有意な増加を認めた。胃や小腸で MDA 値の上昇は観察されなかった。一連の消化器官系であるが、大腸とは異なり、胃では胃液によってフマル酸鉄が溶解し消化物中に拡散した為、また、小腸の粘膜は大腸と比べてターンオーバーが速いため、過酸化脂質が細胞に蓄積する前に細胞が代謝された為と考えられる。大腸の粘膜では、鉄剤投与による MDA 量の有意な上昇が観察された。この結果は、大腸粘膜が他の消化管粘膜に比べて抗酸化活性が低い事 (Miyamoto, *et al.*, (2001)) が考えられる。*P. pentosaceus* Be1 株と *L. plantarum* P1-2 株の生菌体をフマル酸鉄により酸化ストレスを与えたラットに投与した。その結果、*P. pentosaceus* Be1 株投与群の MDA 量は鉄剤投与群とほとんど差を示さなかったが (図 3) *L. plantarum* P1-2 株を投与した群は大腸粘膜中の MDA 量の有意な低下を認めた (図 4)。一方、*L. plantarum* P1-2 株、*S. thermophilus* NR1C0256<sup>T</sup> を加熱殺菌した死菌末をラット (n=3) に投与した群では、大腸粘膜および肝臓ホモジネート中の MDA 量に変動は認められなかった。これらの結果は、*L. plantarum* P1-2 株の生菌体投与により、大腸の lipid peroxidation の進行が抑えられることを示唆する。

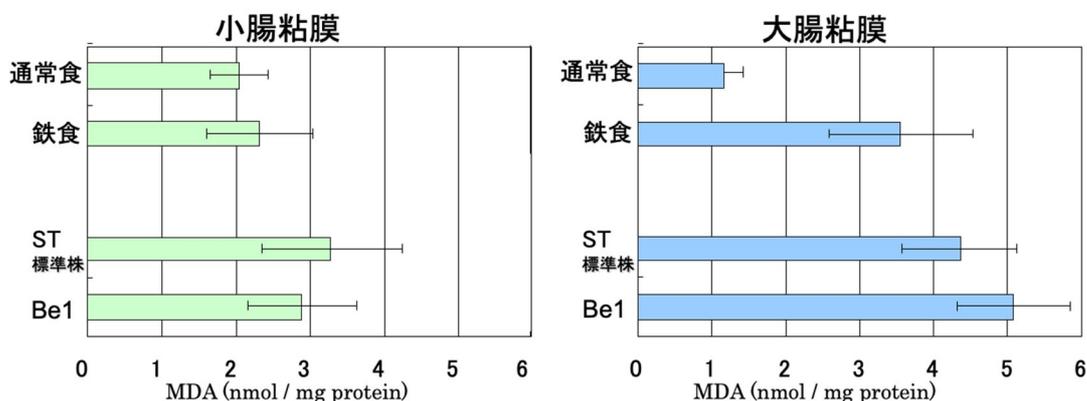


図 3 . 鉄剤投与によるラット消化管の脂質過酸化指標 (Watanbe *et al.*, PLOS ONE 2000 より改変)

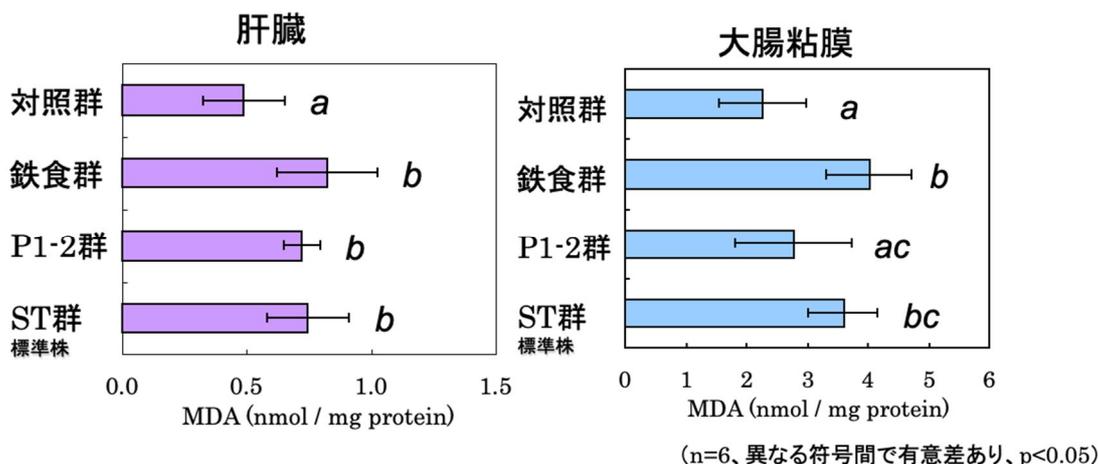


図 4 . 鉄剤投与によるラット消化管の脂質過酸化指標 (Watanbe *et al.*, PLOS ONE 2000 より改変)

Lipid hydroperoxides は、生体内の活性酸素 (特に過酸化物質) と二価の鉄イオンとの反応 (フェントン反応) で生成したヒドロキシラジカルの生体脂質の不飽和脂肪酸に作用して生成されると考えられる。今回ラットで観測されたフマル酸鉄添加による大腸の脂質過酸化指標 (MDA) の上昇はフェントン反応促進とそれによる lipid hydroperoxides 生成量の増加を示唆し、

*L. plantarum* P1-2 株添加による MDA 量の減少は、フェントン反応の抑制、あるいは lipid hydroperoxides 還元反応の促進に起因する可能性を示唆する。Ito らは、マウスへのフマル酸鉄添加による MDA の上昇と、*S. thermophilus* YIT2001 株添加による低減効果を観察しているが (Ito *et al.*, 2003)、同菌株の MDA 減少機構は未だ不明である。*L. plantarum* P1-2 株添加による MDA 減少機構も不明であるが、同株は、*in vitro* で高い linoleic acid hydroperoxide 還元活性を有している。哺乳動物の消化管はリノール酸をはじめとする不飽和脂肪酸に富み、内因性、外因性の活性酸素により lipid peroxidation が惹起することが知られている (Miyamoto, *et al.*, (2001))。過酸化水素還元活性は高いが、fatty acid hydroperoxides 還元活性の低い *P. pentosaceus* Be1 株では *in vivo* での菌体外 lipid hydroperoxides 還元活性が観察されない。従って、*L. plantarum* P1-2 株添加による MDA 減少効果は、同株の菌体外 fatty acid hydroperoxides 還元活性に起因する可能性がある。

私たちは、過酸化水素還元菌 *P. pentosaceus* Be1 株が Mn-カタラーゼと NADH peroxidase の 2 種の過酸化水素分解酵素により強力な過酸化水素分解力を示すことを報告し (Watanabe *et al.*, 2015)、この活性が熱処理によって失活する事を見いだしている。*L. plantarum* P1-2 株の *in vitro* の linoleic acid hydroperoxide 還元活性は熱処理で失活した。従って、*L. plantarum* P1-2 株の過酸化物還元酵素が菌体外の linoleic acid hydroperoxide 還元機能する可能性もある。反応機構は不明であるが、微生物による菌体外の alkyl hydroperoxides、linoleic acid hydroperoxide 還元の報告は、本論文が初めてである。

本菌の無細胞抽出液を疎水クロマトグラフィー (TOYOPEARL Butyl 650S)、イオンクロマトグラフィー (DEAE Sepharose)、アフィニティークロマトグラフィー (Red Sepharose、5-ADP-sepharose) に供したところ、50kDa、45kDa、48kDa の酵素が得られた。過酸化水素分解活性を持つ画分から精製された酵素は NADH を電子供与体として過酸化水素に対して活性を示した。過酸化脂肪酸分解活性を持つ画分から精製された 2 種酵素は NAD(P)H を電子供与体として過酸化脂肪酸還元活性を示した。この 3 種の酵素のアミノ酸配列を BLAST 解析したところ、過酸化水素還元酵素は機能既知である *Enterococcus faecalis* の NADH peroxidase と 74% の Similarity を示したが、他 2 種酵素に過酸化脂肪酸を分解の報告は見いだせない。現在、反応機構解析と X 線結晶解析を行っている。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Akira Abe, Miki Hiraoka, Fumiko Matsuzawa, Sei-ichi Aikawa, Youichi Niimura	4. 巻 1865
2. 論文標題 Esterification of side-chain oxysterols by lysosomal phospholipase A2	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BBA - Molecular and Cell Biology of Lipids	6. 最初と最後の頁 1388-1981
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbalip.2020.158787	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Tomonori Suzuki, Shinya Kimata, Junichi Satoh, Kouji Takeda, Daichi Mochizuki, Ken Kitano, Akio Watanabe, Etsuo Yoshimura, Masataka Uchino, Shinji Kawasaki, Akira Abe, Youichi Niimura	4. 巻 11
2. 論文標題 Free Flavin Participates in Iron and Also Oxygen Metabolism in Bacteria	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Bacteriology & Parasitology	6. 最初と最後の頁 1-7
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.35248/2155-9597.20.11.379.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Akio Watanabe, Takuro Yamaguchi, Kaeko Murota, Naoaki Ishi, Junji Terao, Sanae Okada, Naoto Tanaka, Shinya Kimata, Akira Abe, Tomonori Suzuki, Masataka Uchino, Youichi Niimura	4. 巻 15(2)
2. 論文標題 Isolation of lactic acid bacteria capable of reducing environmental alkyl and fatty acid hydroperoxides, and the effect of their oral administration on oxidative-stressed nematodes and rats	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 1-18
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 オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Shin-ichiro Miyashita, Yoshimasa Sagane, Takamasa Uchino, Shura Karatsu, Keita Hosoya, Ihsun Huang, Koichi Niwa, Toshihiro Watanabe, Yoichi Niimura, Tomonori Suzuki,	4. 巻 25
2. 論文標題 Atomic force microscopic image data of botulinum neurotoxin complexes with different molecular sizes	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Data in brief	6. 最初と最後の頁 1-5
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 オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Junichi Satoh, Shinya Kimata, Shota Nakamoto, Tatsuya Ishii, Eisuke Tanaka, Sayuri Yumoto, Kouji Takeda, Etsuro Yoshimura, Yu Kanasaki, Taichiro Ishige, Keisuke Tanaka, Akira Abe, Shinji Kawasaki, and Youichi Niimura	4. 巻 65
2. 論文標題 Free flavins accelerate release of ferrous iron from iron storage proteins by both free flavin-dependent and -independent ferric reductases in Escherichia coli	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J. Gen. Appl. Microbiol.,	6. 最初と最後の頁 308-315
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2323/jgam.2019.03.001	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 Fumio Arisak, Youichi Niimur, Allen P. Mintonc,	4. 巻 583
2. 論文標題 Comparison of composition-gradient sedimentation equilibrium and composition-gradient static light scattering as techniques for quantitative characterization of biomolecular interactions: A case study	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Analytical Biochemistry	6. 最初と最後の頁 1-9
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 オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計5件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 鈴木智典、糸田侑花、野口龍生、植松悠、石塚雄一、村崎友彦、渡邊昭夫、野村佳歩、阿部晃、新村洋一、内野昌孝
2. 発表標題 過酸化脂肪酸を還元するLactobacillus plantarum P1-2株によるプロバイオティクス資材の開発
3. 学会等名 日本農芸化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 鈴木智典、奥山貴人、相本健吾、松永一太、渡邊昭夫、武田晃治、野村佳歩、阿部晃、新村洋一、内野昌孝
2. 発表標題 L. plantarum P1-2株の酸化ストレス防御機構に関する研究
3. 学会等名 日本農芸化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 鈴木智典、加藤紗弥、木俣真弥、酒井陽一、高山努、中本忠宏、中島聖也、福島多一、武田晃治、吉村悦郎、野村佳歩、阿部晃、新村洋一、内野昌孝
2. 発表標題 酸素耐性嫌気性菌 <i>Amphibacillus xylanus</i> と通性好気性菌 <i>E.coli</i> における“嫌気ストレス”に関する研究
3. 学会等名 日本農芸化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 鈴木智典、奥山貴人、松永一太、相本健吾、渡邊昭夫、武田晃治、野村佳歩、阿部晃、新村洋一、内野昌孝
2. 発表標題 過酸化脂肪酸還元乳酸菌の酸化ストレス防御機構
3. 学会等名 日本食品補蔵学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大野 由依、木俣 真弥、齋藤 迅成、松本 滉平、尾崎 和帆、川越 樹、田中 啓介、酒井 陽一、高山 努、中本 忠宏、武田 晃治、吉村悦郎、阿部 晃、川崎 信治、新村 洋一
2. 発表標題 O2耐性菌 <i>Amphibacillus xylanus</i> の“嫌気ストレス”に関する研究 [第2報]
3. 学会等名 2020, 3月 日本農芸化学会大会
4. 発表年 2020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
---------	---------