

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：12301

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K14810

研究課題名（和文）食物繊維レスポonderに特徴的なマイクロバイオーム・遺伝子・酵素の解明

研究課題名（英文）Elucidating the microbiome, genes, and enzymes unique to fiber responders

研究代表者

杉山 友太（Sugiyama, Yuta）

群馬大学・食健康科学教育研究センター・助教

研究者番号：80908749

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：食物繊維の保健効果が得られるヒト「レスポonder」と得られないヒト「ノンレスポonder」が存在し、腸内細菌叢が両者の差異を担うと考えられているが、その分子基盤は不明である。本研究は、グルコマンナン（KGM）をモデル食物繊維として、ヒト糞便培養を用いて腸内細菌叢と代謝物への作用を評価した。KGMにより種々の保健効果が報告されているParabacteroides sp.の占有率が増加し、さらに増加の程度に個人差があることを見出した。KGM添加によりプロピオン酸が増加傾向を示した。加えて、KGMによるParabacteroides sp.の増加は他の腸内細菌種との相互作用により生じることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

食物繊維の保健効果における腸内細菌叢の重要性が報告されている。食物繊維の保健効果を担う腸内細菌を同定し、同菌を介した食物繊維の保健効果発現機構を遺伝子レベルで解明することが出来れば、糞便中の腸内細菌由来遺伝子解析を通じて個人の腸内環境に合わせた食物繊維の処方やシンバイオティクスの開発に繋がる。本研究では、グルコマンナンをモデル食物繊維として、腸内細菌叢を反映した糞便培養を用いて、種々の保健効果が報告されているParabacteroides属細菌の占有率が増加すること、さらにKGMによる本菌の増加は他の腸内細菌とのKGMを介した相互作用により生じることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：There are “responders” who can obtain the health benefits of dietary fiber and “non-responders” who cannot, and it is thought that the gut microbiota is responsible for the difference between the two. However, the specific gut bacteria species and molecular mechanisms that distinguish responders from non-responders are unknown. In this study, we used human fecal culture to evaluate the effects of dietary fiber on the gut microbiota and metabolite production, using glucomannan (KGM) as a model dietary fiber. We found that the proportion of Parabacteroides sp., for which various health benefits have been reported, increased with KGM and that there were individual differences in the extent of the increase. The addition of KGM tended to increase propionic acid. In addition, it was suggested that the increase in Parabacteroides sp. by KGM was due to interactions with other gut bacteria.

研究分野：応用微生物学

キーワード：腸内細菌 食物繊維 遺伝子

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

食物繊維は、肥満の改善 (1) や循環器疾患の発症リスクの低減 (2) 等の保健効果が報告され、機能性成分として様々な食品に応用されている。しかし、食物繊維のヒトに対する保健効果は決して一様ではなく、摂取により効果が得られるヒト「レスポnder」と得られないヒト「ノンレスポnder」が存在する。この両者の差異に腸内細菌叢および腸内細菌が産生する代謝物が関与していることが近年明らかとなり (3)、食物繊維の保健効果を全てのヒトが一様に得るためには、食物繊維の保健効果発現機構について、腸内細菌叢を起点とした理解が必須であることが分かってきた。しかしながら、これまでの食物繊維摂取による腸内細菌叢への作用は、菌叢変化を属レベルで解析した観察研究にとどまってお (4)、代謝物の産生量や組成が種レベルで大きく異なる (5) ことを鑑みると、十分に解析されているとは言えない。

2. 研究の目的

本研究では、和食に使用されるコンニャクに特徴的な食物繊維であるグルコマンナン (Konjac glucomannan, KGM) をモデル食物繊維とした。その上で KGM レスポnder 特異的に検出あるいは優勢化する腸内細菌種を単離・同定し、食物繊維の資化機構と資化により生じる代謝物の産生機構 (レスポnder/ノンレスポnderの決定を担う機構) を遺伝子・タンパク質レベルで解明することを目指した。

3. 研究の方法

3-1. 糞便培養を用いた KGM の菌叢への影響評価

群馬大学「人を対象とする医学系研究倫理審査委員会」による承認を得た上で、健常成人 10 名より糞便を提供して頂いた。糞便を KGM、グルコース (Glc) およびマンノース (Man) を終濃度 0.1% となるよう添加した糖分解測定用 Gifu anaerobic medium (GAM) で培養した。培養後、培養物からゲノム DNA を抽出し、菌叢解析に供した。ゲノム DNA の抽出は、既報に従って行った (6)。菌叢解析は、株式会社 生物技研に依頼し、16S rRNA 遺伝子の V3-V4 領域を使用した。

3-2. 糞便培養液中の短鎖脂肪酸解析

KGM、Glc あるいは Man 添加培地を用いた糞便培養液中の各短鎖脂肪酸組成解析は、群馬大学 共同利用機器部門に依頼した。

3-3. KGM 分解酵素の解析

KGM 添加により存在比が増加した菌種において KGM 分解を担うと予想した酵素について大腸菌を用いて組換えタンパク質を調製した。C 末端に 6× His-tag を付加して発現し、Ni-NTA カラムを用いて精製した。精製タンパク質について性状解析を行った。酵素活性は、酵素により KGM から遊離する還元糖を 3,5-dinitrosalicylic acid 法 (7) で定量し、評価した。

3-4. KGM 資化能の評価

KGM 添加によって存在比が増加した菌種について、理化学研究所バイオリソースセンター微生物材料開発室より基準株を購入し、KGM 添加培地での OD₆₀₀ を測定した。最少培地は既報 (8) に従い調製し、KGM を終濃度 0.1% となるよう添加した。

4. 研究成果

4-1. KGM 添加による腸内細菌叢の変化と短鎖脂肪酸産生への影響

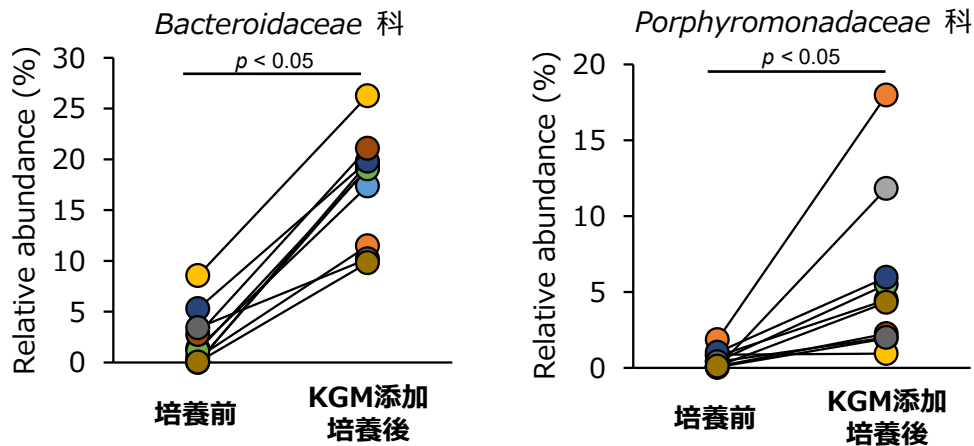


図 1. KGM 添加による *Bacteroidaceae* および *Porphyromonadaceae* 科細菌の占有率変化

糖分解測定用 GAM を基礎培地として、各糖を終濃度 0.1%となるよう添加し 48 時間培養し、培養後の存在量を解析した。
paired *t*-test を使用して有意差検定を行った。

Glc および Man 添加と比較して、KGM 添加により、腸内細菌科レベルで *Bacteroidaceae* および *Porphyromonadaceae* の相対存在量の増加が認められた (図 1)。本研究では、*Porphyromonadaceae* 科細菌のうち、これまでに種々の保健効果が報告されている *Parabacteroides* sp. の KGM による有意な増加に着目した。*Parabacteroides* sp. の増加の程度には、個人差が見られ、*Parabacteroides* sp. の優勢化の程度が KGM の保健効果に影響していると推察した。培養上清中の短鎖脂肪酸を比較した結果、KGM 添加は Glc あるいは Man 添加に比べてプロピオン酸量が高い傾向が見られた。しかし、菌叢解析と同様、産生量については、個人差が見られた。KGM により占有率が増加した *Parabacteroides* sp. を糖分解測定用 GAM に KGM を添加した培地で培養した結果、プロピオン酸、イソ吉草酸、イソ酪酸を産生した。加えて菌叢解析で増加が認められた *Bacteroidaceae* 科細菌に属する *Bacteroides* sp. もプロピオン酸産生能を示すことから、KGM による菌叢変化を反映する結果であった。

4-2. *Parabacteroides* sp. における KGM 分解酵素の解析

KGM 添加により増加が見られた *Parabacteroides* sp. において KGM 分解を担う酵素を種々のデータベースを用いて推定、大腸菌を発現宿主として組換えタンパク質を発現し、精製した (図 2A)。KGM を含む種々の β 1-4 マンナンに対する加水分解活性を評価した結果、KGM に対して高い活性を示し、次いで Locust bean gum (LBG) に活性を示した。一方で、

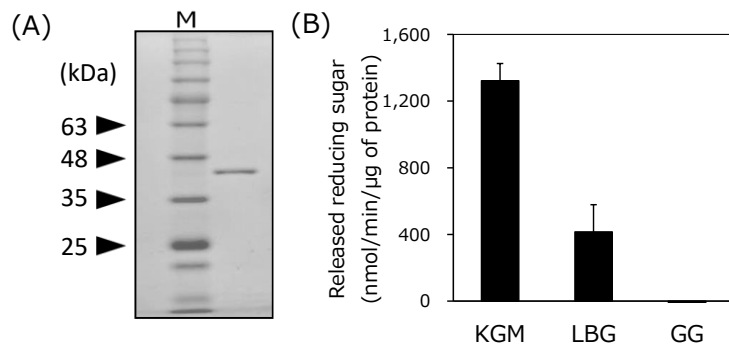


図 2. KGM 分解酵素の精製と β -マンナン分解活性評価
(A) 精製酵素の SDS-PAGE 結果 (M, marker)
(B) β 1-4 マンナンに対する加水分解活性比較

β 1-4 マンナンの中でもガラクトースによる修飾が多い Guar gum (GG) に対する加水分解活性は認められなかった (図 2B)。 β 1-4 マンナンに加えマンノオリゴ糖を基質として解析した解析の結果、マンノビオース (Man β 1-4Man) を遊離することが示された。

4-3. *Parabacteroides* sp. の KGM 資化能

KGM を単一炭素源とした最少培地で KGM 資化能を評価した。この結果、KGM により存在量が増加した *Parabacteroides* sp. は、ゲノム上に上記で同定した β -マンナン分解酵素を持つにもかかわらず、生育しなかった。しかし、マンノオリゴ糖 (2~6 糖) 含む最少培地では生育した (図 3)。以上より、本菌は他の腸内細菌が KGM を分解し、産生したマンノオリゴ糖を資化することで存在量が増加したことが示唆された。

今後、KGM 存在下で *Parabacteroides* sp. の生育を促進する腸内細菌種・株および菌種間のクロスフィーディング機構の解明を進める予定である。

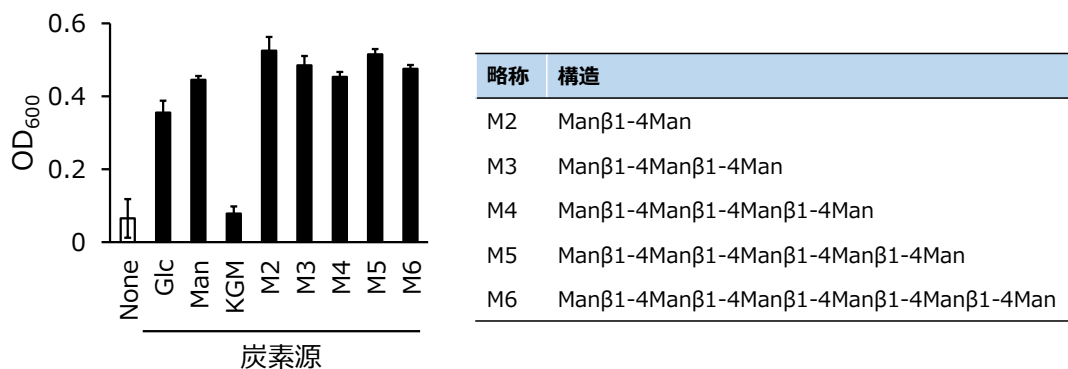


図 3. *Parabacteroides* sp. の KGM およびマンノオリゴ糖資化能

5. 参考文献

- (1) Rachel Gibson *et al.*, *Nutrients* 11:1839 (2019)
- (2) Diane E Threapleton *et al.*, *BMJ* 347:f6879 (2013)
- (3) Sofia M. Murga-Garrido *et al.*, *Microbiome* 9:117 (2021)
- (4) Hannah C Wastyk *et al.*, *Cell* 184:4137-4153 (2021)
- (5) Hassan Zafar and Milton H Saier Jr, *Gut Microbes* 13:1848158 (2021)
- (6) Yuta Sugiyama *et al.*, *Gut Microbes* 14:2128605 (2022)
- (7) Gail Lorenz Miller, *Analytical Chemistry* 31:426-428 (1959)
- (8) Nicole M Koropatkin *et al.*, *Structure* 16:1105-1115 (2008)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 杉山友太
2. 発表標題 食物繊維の分解を担う腸内細菌と遺伝子の解析
3. 学会等名 糖質関連酵素研究の若手シンポジウム
4. 発表年 2024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
---------	---------