

平成 28 年 6 月 21 日現在

機関番号：32658

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24580125

研究課題名(和文)腸を酸化ストレスから防御するプロバイオティクス乳酸菌の開発

研究課題名(英文)Development of pro-biotic lactic acid bacteria protecting intestine from oxidation stress

研究代表者

新村 洋一 (NIIMURA, YOUICHI)

東京農業大学・応用生物科学部・教授

研究者番号：00180563

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：腸疾患防御には、腸のストレス防御が要といわれてきたが、腸の過酸化脂質分解活性は通常組織の1/10以下である。そこで、申請者は発酵食品から菌体外の過酸化脂質を、強力還元する乳酸菌 *Lactobacillus plantarum* P2株を分離した。本株は、過酸化脂質還元力は強いが、過酸化水素還元力は低い。そこで、菌体外過酸化水素を還元する乳酸菌 *Pediococcus pentosaceus* Be1株を新たに分離した。

本申請では、両分離株の過酸化脂質還元力の生体内発現の検討のため、線虫によるバイオアッセイ系を構築した。さらに両株の過酸化脂質還元活性の *in vivo* での発現を実証した。

研究成果の概要(英文)：In order to develop a pro-biotic lactic acid bacteria system protecting intestine from oxidation stress, lactic acid bacteria, *Lactobacillus plantarum* P2 was isolated from fermented food. While *L. plantarum* P2 exhibited high scavenging activity for environmental alkyl hydroperoxide, its activity for environmental hydrogen peroxide was not so high. Next, *Pediococcus pentosaceus* Be1 exhibiting high scavenging activity for environmental hydrogen peroxide was isolated from fermented vegetable. The scavenging activity for environmental peroxide *in vivo* of the two isolates were demonstrated by bio-assay system established with *Caenorhabditis elegans fer-15; mev-1*.

研究分野：応用微生物学

キーワード：乳酸菌 プロバイオティクス 過酸化脂質 過酸化脂質分解 活性酸素防御系 バイオアッセイ系開発
Caenorhabditis elegans

1. 研究開始当初の背景

(1)腸疾患防御には、腸のストレス防御と、腸内還元環境の維持が要といわれてきた。ストレス時に腸内外で過酸化物が発生するが、腸の分解活性は通常組織の1/10以下である。腸の強化法として、強力な過酸化還元酵素を持つ微生物の導入が考えられるが、既知報告に見いだせない。申請者は種々の発酵食品からスクリーニングを行い、菌体外の過酸化脂質を、強力還元する乳酸菌 *Lactobacillus plantarum* P2 株を分離した(平成18年度基盤C 新村)。分離株 *L. plan.* P2 株は、過酸化脂質還元力は強いが、過酸化水素還元力は低い。そこで、菌体外過酸化水素を還元する乳酸菌 *Pediococcus pentosaceus* Be1 株を新たに分離した。本株は、菌体外過酸化水素を *in vitro* で迅速に還元した(平成21年度基盤C 新村)。

(2) 両株の過酸化脂質還元活性の *in vivo* での発現を検討した。線虫は全ゲノムが解読され、様々な突然変異体が作出され、変異体を用いた薬剤試験が行われている。線虫は、通常時に大腸菌を食して成長するため、乳酸菌での酸化ストレスモデル系の確立が必要となる。そこで、線虫酸素感受性短寿命突然変異体を用いてバイオアッセイ(線虫)系の確立を試みた。

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、過酸化脂質に加え、過酸化水素を還元無毒化する乳酸菌株の分離に成功している。本申請では、線虫酸素感受性短寿命突然変異体を用いてバイオアッセイ(線虫)系の確立し、分離株の過酸化脂質還元活性の *in vivo* での発現を検討した。

3. 研究の方法

(1)培養条件

乳酸菌分離株 *Lactobacillus plantarum* P2 株と *Pediococcus pentosaceus* Be1 株に加え、食品由来乳酸菌株の Type Strain として *Streptococcus thermophilus* NR1C0256^T を選択し、過酸化水素、過酸化アルキル、過酸化脂質分解能力について比較をした。

Lactobacillus plantarum P2 株、*Pediococcus pentosaceus* Be1 株を 37℃、GYP 培地にて、好気振盪培養し、*Streptococcus thermophilus* NR1C0256^T は、好気振盪培養での生育が悪いため 37℃ で GYP 培地を静置培養した。

(2)過酸化水素、過酸化クメン、過酸化脂質分解能力の評価方法

各微生物が対数増殖期後期もしくは定常期初期となるようダブルビーム分光光度計を 660nm にて測定しながら培養し、遠心分離(約 17,000G、1 分)により培養菌体を回収した。回収した培養菌体は 50mM pH7.0 リン酸バッファーで二回洗浄した。ダブルビーム

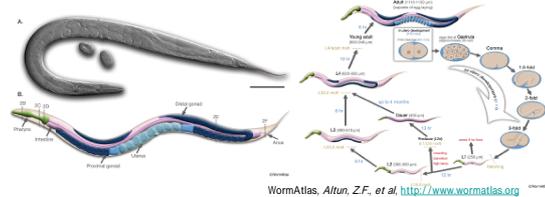
分光光度計にて 660nm = 1.6 に調整して菌体懸濁液とした。過酸化水素分解評価試験では菌体懸濁液を 4 倍希釈し、470 μl を 2.0ml エッペンチューブに入れ、各終濃度 0.3、1.0、3.0mM となるよう過酸化水素 10 μl を加え、終濃度 50mM となるようグルコースを 20 μl 加え、37℃ で 1.5 時間震盪(140rpm、水平振盪)し還元反応を試みた後、遠心処理(約 17,000G、1 分)して上清の過酸化水素、過酸化アルキル、過酸化脂質残量を評価した。

(3)乳酸菌の線虫酸素感受性短寿命突然変異体への投与方法

線虫 *Caenorhabditis elegans fer-15;mev-1* 株は、東海大学医学部基礎医学系分子生命科学で管理、飼育されている変異体を使用した(図1)。通常飼料の大腸菌 *Escherichia coli* OP50 株を投与した群、乳酸菌 *Lactobacillus plantarum* P2 株を投与した群、*Pediococcus pentosaceus* Be1 株を投与した群、対照乳酸菌として *Streptococcus thermophilus* NR1C0256^T 株投与群を用い寿命を評価した。寿命評価では同試験を 4 回行った。卵を NGM 培地に環境下にて播種し 20 環境下で孵化させた。続いて標準飼料である *E. coli* OP50 株が十分に生育した NGM 培地にて L4 ステージ(成虫)まで成長させた。その後、pH 緩衝能力を有する改良 GYP 培地の中央部に被検菌(OP50 株群、P1-2 株群、ST 株群)を滴下し、線虫を各群 10 匹 × 10 プレートに移し替え、25 環境下にて全ての線虫が死滅するまで観察した。

C. Elegans

1. 大腸菌(*Escherichia coli* OP50株)を飼料として成長。
雌雄同体、成虫体長約1mm、最大寿命30日。
2. 表皮、消化器系、生殖系、神経、筋肉を有し、
動物として必要最低限の機能を整えている。
3. 短期間で成体となり、哺乳類と比べ簡単に寿命評価が可能。



「図 1」

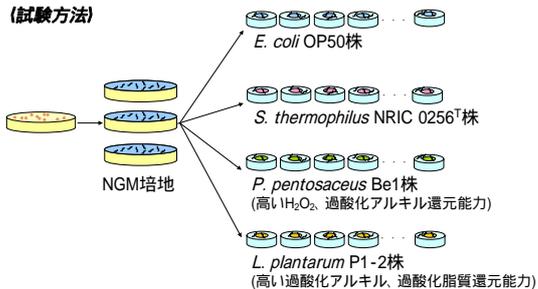
NGM 培地は NaCl (WAKO) 3.0g、Bacto-peptone (DIFCO) 2.5g、Agar Powder (WAKO) 17g、イオン交換水 975ml を溶解後オートクレーブにて滅菌し、1M Potassium phosphate buffer 25ml、1M MgSO₄ (WAKO) 1.0ml、1M CaCl₂ (WAKO) 1.0ml、Cholesterol (5mg/ml EtOH) (WAKO) 1.0ml を添加後、9cm シャーレに分注し寒天平板とした。改良 GYP 培地はペプトン(日本製薬) 2.5g、Yeast Extract (DIFCO) 2.5g、Glucose (WAKO) 1.0g、BCP(WAKO) 0.06g、Agar(WAKO) 17g、イオン交換水 897ml を溶解後オートクレーブにて滅菌し、1M MES (pH6.0) (同仁化学、NaOH にて pH 調整) 100.0ml、1M MgSO₄ (WAKO) 1.0ml、1M CaCl₂ (WAKO) 1.0ml、

Cholesterol (5mg/ml EtOH) (WAKO) 1.0ml を添加後、3.5cm シャーレに分注し寒天平板とした。乳酸菌はプロバイオティクスとして宿主に有益な影響を与える事が知られている。そこで過酸化アルキル、過酸化脂質分解能力を有する乳酸菌の投与効果を検証する為に、酸化ストレスモデル生物による有効性を評価した。線虫 *Caenorhabditis elegans* は酸化ストレスが関与する研究でモデル生物として広く用いられている。そこで、線虫酸素高感受性短寿命突然変異体 *C. elegans fer-15;mev-1* 株に各種過酸化物分解能力の高い菌株、低い菌株を投与して寿命測定を行い、その有効性を検証した。

線虫突然変異体試験法: *fer-15* 突然変異を高温環境 (25) にて飼育した場合、生殖能 *mev-1* 突然変異: スーパーオキシドを消去する事ができないことから酸素感受性を示す。大気条件下で飼育した場合、野生株に比べて短寿命となり、消化管内部に脂質過酸化由来の老化性色素リポフスチンが沈着する。本研究では両方の突然変異を有する *C. elegans fer-15;mev-1* 株を使用した。これにより酸化ストレス環境下における線虫の寿命評価を行った(図 2)。

C. elegans fer-15;mev-1 株を用いた寿命延長効果、老化性色素評価

(試験方法)



「図 2」

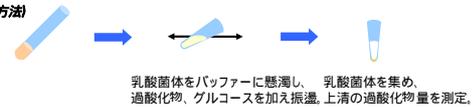
4. 研究成果

(1) 微生物培養菌体による外部の過酸化アルキル、過酸化脂質分解の特性

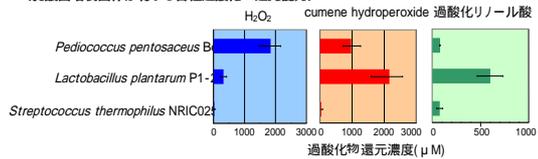
S. thermophilus NRIC0256^T は過酸化水素、過酸化アルキル、過酸化脂質の分解活性をほとんど示さなかった。一方 *P. pentosaceus* Be1 株は、過酸化水素に対して、特に高い分解活性を示し、過酸化アルキルに対しても、分解活性を示したが、過酸化脂質への分解活性は低かった。*L. plantarum* P2 株の過酸化水素分解活性は高くないが、過酸化アルキルと過酸化脂質に高い分解活性を示した(図 3)。*P. pentosaceus* Be1 株の高い過酸化水素分解活性は、本株が複数の過酸化水素分解酵素を持つことにより (Watanabe et al. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 62,75-82 2016)、*L. plantarum* P2 株の高い過酸化アルキル、過酸化脂質分解活性には、新規の過酸化物分解酵素が関与する可能性が示唆されている(平成 21 年度基盤 C 新村)。

乳酸菌培養菌体が有する過酸化還元能力の評価

(試験方法)



(乳酸菌培養菌体が有する各種過酸化還元能力)



「図 3」

(2) 過酸化脂質分解能力を有する乳酸菌の酸素感受性線虫短寿命突然変異体への投与効果

C. elegans fer-15;mev-1 株に乳酸菌を投与した結果、すべての乳酸菌は通常飼料に比べて平均寿命を延長する結果が得られた。対照乳酸菌群として設定した *S. thermophilus* NRIC0256^T 投与群に比べ平均寿命は、分離乳酸菌 *P. pentosaceus* Be1 株投与群で 1 日、*L. plantarum* P2 株投与群で 2 日間有意に延長される結果であった。この傾向は繰り返し試験をした場合でも同様であった(表 1)。

供試菌株	試験1	試験2	試験3	試験4	比較対象
<i>S. thermophilus</i> NRIC0256 ^T 株	<i>p</i> <0.1	<i>p</i> >0.1	<i>p</i> <0.001	<i>p</i> >0.1	vs. <i>E. coli</i> OP50株
<i>P. pentosaceus</i> Be1株	<i>p</i> <0.05	<i>p</i> <0.1	<i>p</i> <0.001	<i>p</i> <0.001	vs. <i>S. thermophilus</i> NRIC0256 ^T 株
<i>L. plantarum</i> P1-2株	<i>p</i> <0.001	<i>p</i> >0.1	<i>p</i> <0.001	<i>p</i> <0.1	vs. <i>S. thermophilus</i> NRIC0256 ^T 株

「表 1」

死滅直前の線虫消化管に沈着したりポフスチンを観察した結果、両株ともリポフスチンの沈着による蛍光は対照と比べて減少傾向にあったが、*L. plantarum* P2 株投与群の蛍光は顕著であった。この結果は、蛍光顕微鏡の結果であり、定量化には無細胞抽出液での活性判定が必要になる。

C. elegans fer-15;mev-1 株が孵化直後から乳酸菌を投与することを試みたが、生育にばらつきが見られた。この結果は、孵化時の幼虫の口物の大きさが約 1 μm であることから、大きさが異なる乳酸菌を摂取できずにいた事が原因であると推測した。成虫となった L4 ステージにおいても大腸菌および乳酸菌を投与する事を試みた。前述のとおり過酸化脂質の還元には生菌体に糖を供給する事が重要であることから、NGM 培地に糖を添加した結果、乳酸菌のみならず標準飼料である大腸菌においても線虫が忌避行動を示し、正当な寿命評価ができなかった。これは糖を添加したときに大腸菌および乳酸菌が代謝産物である酸を生成し、pH が低下するためであった。著者らは低 pH に対する対応策として、GOOD のバッファーを使用して解決した。これらの問題を解決する事で初めて線虫の寿命評価が可能となった。

過酸化脂質に対する挙動に関わらず、乳酸菌は通常飼料の大腸菌と比較し宿主の平均寿命が延長した結果から、乳酸菌が線虫に対

してプロバイオティクス効果を示す事が推定された。*C. elegans fer-15;mev-1* 株は宿主自身の酸化ストレス対応系のうち、スーパーオキシドを除去する酵素を有しておらず、スーパーオキシドを除去する酵素が補完された場合において最長寿命が延長することが知られている。今回の結果は過酸化アルキル、過酸化脂質分解能力が高い *L. plantarum* P2 株投与群および過酸化水素分解能力の高い *P. pentosaceus* Be1 株の 2 株と、過酸化脂質、過酸化水素分解能力が低い *S. thermophilus* NR1C0256^T 投与群、標準飼料 *E. coli* OP50 株の順番で平均寿命延長効果がより高い結果であった。

哺乳動物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、粘膜細胞の炎症により過酸化脂質が増加する事が知られている。過酸化脂質の発生は微生物や宿主の代謝に伴って発生する活性酸素や二価の鉄イオンが引き起こすフェントン反応が原因といわれている。菌体外の過酸化脂質を分解する乳酸菌が宿主への保健効果を示す部位を特定すべく、ラットでの試験を行う予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 8 件)

(1) A. Watanabe, C. Kaneko, Y. Hamada, K. Takeda, S. Kimata, T. Matsumoto, A. Abe, N. Tanaka, S. Okada, M. Uchino, J. Satoh, J. Nakagawa and Y. Niimura. Isolation of lactic acid bacteria exhibiting high scavenging activity for environmental hydrogen peroxide from fermented foods and its two scavenging enzymes for hydrogen peroxide.

J. Gen. Appl. Microbiol. 62,75-82 2016 査読あり

(2) Hotaka Atarashi, Shinji Kawasaki, Yoichi Niimura, Naoto Tanaka, Sanae Okada, Yuh Shiwa, Akihito Endo, and Junichi Nakagawa,

Identification of sirtuin and its target as the ribosomal protein S4 in *Lactobacillus paracasei*

J. Gen. Appl. Microbiol., 62, 98-105 (2016) 査読あり

(3) J. Satoh, H. Koshino, K. Sekino, S. Ito, R. Katsuta, K. Takeda, E. Yoshimura, F. Shinmachi, S. Kawasaki, Y. Niimura and T. Nukada. *Cucumis sativus* secretes 4-ketoriboflavin under iron-deficient conditions.

Biosci. Biotech. Biochem. 80(2), 363-367, 2016 査読あり

(4) T. Arai, S. Kimata, D. Mochizuki, K. Hara, T. Z. M. Odaka, M. Yohda, F. Arisaka

S. Kanamaru, T. Matsumoto, S. Yajima, J. Sato, S. Kawasaki, Y. Niimura. NADH oxidase and alkyl hydroperoxide reductase subunit C (peroxiredoxin) from *Amphibacillus xylanus* form an oligomeric assembly.

FEBS Open Bio (2015) 電子ジャーナル 査読あり

(5) Adaptive response of *Amphibacillus xylanus* to normal aerobic and forced oxidative stress conditions.

D. Mochizuki, T. Arai, M. Asano, N. Sasakura, T. Watanabe, Y. Shiwa, S. Nakamura, Y. Katano, S. Fujinami, N. Fujita, A. Abe, J. Sato, J. Nakagawa, Y. Niimura,

Microbiology. 160, p340-352 (2014) 査読あり

(6) Purification and characterization of oxygen-inducible heme catalase from oxygen-tolerant *Bifidobacterium asteroides*.

Hayashi K, Maekawa I, Tanaka K, Ijyuin S, Suzuki I, Niimura Y, Kawasaki S.

Microbiology. 159, p 89-95 (2013) 査読あり

(7) Evolution and diversification of oxygen metabolisms of aerotolerant anaerobes in the order *Bacillales* and other bacterial taxonomic groups.

Mochizuki D, Tanaka N, Ishikawa M, Endo K, Shiwa Y, Fujita N, Sato J, Niimura Y.

The Bulletin of BISMIS, 3, 1-17 (2012) 査読あり

(8) Chloroplast NADPH-Dependent Thioredoxin Reductase from *Chlorella vulgaris* Alleviates Environmental Stresses in Yeast Together with 2-Cys Peroxiredoxin

T. Machida, A. Ishibashi, A. Kirino, J. Sato, S. Kawasaki, Y. Niimura, K. Honjoh, T. Miyamoto

PLoS ONE 20120900 電子ジャーナル(2012) 査読あり

[学会発表](計 8 件)

(1) 佐藤純一, 越野広雪, 関野滉太, 金子元優, 伊藤晋作, 勝田亮, 武田晃治, 吉村悦郎, 新町文絵, 川崎信治, 額田恭郎, 新村洋一 生物の代謝産物としてキュウリで初めて見つかったリボフラビン(ビタミン B2)誘導体とその分布 日本農芸化学会(2016、札幌)

(2) 木俣真弥, 名須川哲哉, 及川雅人, 新地大輔, 富塚駿, 吉村悦郎, 有賀智子, 阿部晃, 武田晃治, 佐藤純一, 川崎信治, 新村洋一 *Amphibacillus xylanus* の好気代謝における遊離フラビンと SH 化合物に関する研究 日本農芸化学会(2016、札幌)

(3) 佐藤純一, 越野広雪, 関野滉太, 松村大甫, 伊藤晋作, 勝田亮, 武田晃治, 吉村悦

郎, 新町文絵, 川崎信治, 額田恭郎, 新村洋一 代謝産物として初めて見つかったリボフラビン(ビタミン B2)誘導体 食香粧研究会 (2015, 東京)

(4)木俣真弥, 望月大地, 原敬太, 松本崇, 矢嶋俊介, 有坂文雄, 金丸周司, 佐藤純一, 川崎信治, 新村洋一 *Amphibacillus xylanus* の NADH oxidase (Nox)-AhpC (Prx)複合体の溶液構造 日本農芸化学会 (2015, 岡山)

(5)木俣真弥, 富塚駿, 名須川哲哉, 望月大地, 藤田信之, 阿部晃, 中川純一, 佐藤純一, 川崎信治, 新村洋一 *Amphibacillus xylanus* における遊離フラビンが関与する好気代謝と微生物界における遊離フラビンの分布 (第2報) 日本農芸化学会 (2015, 岡山)

(6)工藤貴靖, 岡田拓也, 井山朗典, 大矢浩士, 岡田沙紀, 新村洋一, 川崎信治 絶対嫌気性菌 *Clostridium* 属細菌の O₂ 代謝機構に関する研究 日本農芸化学会 (2015, 岡山)

(7)大形篤史, 加藤史郎, 國分雪絵, 木村雄介, 新村洋一, 川崎信治 ピフィズス菌の O₂ 感受性に関する原因酵素に関する研究 日本農芸化学会 (2015, 岡山)

(8)岡田和隆, 長嶋雄大, 浅野朋美, 小俣翼, 加藤聖子, 田邊義和, 宮田彩美, 新村洋一, 川崎信治 過酷な生育環境から単離された微細藻類がもつ新奇な環境ストレス耐性機構の解析 日本農芸化学会 (2015, 岡山)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

取得状況(計 1 件)

名称: 産業財産権: 「過酸物分解酵素」(過酸化脂質還元酵素)

発明者: 渡邊昭夫, 新村洋一, 川崎信治, 武田晃治,

権利者: 大洋香料

番号: 特許 第 5535559 号

査定日: 2014 年 5 月 9 日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

新村 洋一 (NIIMURA Youichi)

東京農業大学・応用生物科学部。教授

研究者番号: 00180563

(2) 研究分担者

(0 人)

研究者番号:

(3) 連携研究者

(0 人)

研究者番号: