

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 8 日現在

機関番号：32682

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450104

研究課題名(和文) スフィンゴ脂質の経口投与による疾病の予防・抑制と腸内細菌によるその効果の増強

研究課題名(英文) Augmentation of dietary sphingolipids utilization with the novel intestinal bacterium and its application to the alleviation or prevention of colon diseases

研究代表者

浅沼 成人 (Asanuma, Narito)

明治大学・農学部・専任准教授

研究者番号：50366902

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：植物性食品に含まれるグルコシルセラミド(GluCer)をセラミドに転換することで、その生理効果を高めることを目標として、GluCer水解能の高い新規菌をイヌの糞便より単離した。本菌はGluCerを分解してセラミドを生成するが、セラミドを分解することなく蓄積するので、本菌の利用により多量の植物性セラミドを回収することが可能となった。GluCerを給与したマウスに、本菌を投与すると、GluCer水解が増加すること、大腸炎モデルマウスでは炎症の重篤化が緩和されることを示した。本新規菌の活用(プロバイオティクス等)による食事性GluCerの生理効果の増大と、疾病の予防と抑制への応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：A novel anaerobic bacterium capable of hydrolyzing plant glucosylceramide (GluCer) was isolated from canine feces. This isolate hydrolyzed GluCer to ceramide without producing sphingoids at a higher rate than other bacteria. This enables the production of large amounts of ceramide. Oral administration of the isolate to mice fed diets supplemented with GluCer enhanced GluCer digestion without showing acute toxicity. Oral administration of the isolate with dietary GluCer to dextran sodium sulfate (DSS)-treated mice (inflammatory bowel disease model) alleviated the symptoms of colitis including body weight loss, diarrhea, and bloody stool. Myeloperoxidase (MPO) activity levels in colonic tissue were increased greatly in response to DSS, but probiotic utilization of this isolate lowered MPO activity significantly. Thus, this novel isolate might be used as a probiotic to augment the bioactive effects of dietary GluCer without the adverse effects.

研究分野：農学

キーワード：スフィンゴ脂質 腸内細菌 プロバイオティクス セラミド グルコシルセラミド 炎症性腸疾患

## 1. 研究開始当初の背景

スフィンゴ脂質の代謝中間体は、細胞内シグナル伝達におけるセカンドメッセンジャーなどの機能を有し、生命機能の制御において重要な役割を果たしていることが明らかにされつつある。天然のスフィンゴ脂質給源としては動物性スフィンゴミエリン(SM)と植物性のグルコシルセラミド(GluCer)が代表的であり、SMは主に肉、魚、乳、および鶏卵に、一方のGluCerは主に米や麦などの穀類や大豆に含まれる。しかし、生理活性を持つのはSMやGluCerではなく、それらの加水分解によって生じるセラミド、およびそれが更に分解されたスフィンゴイドである。

SMもGluCerも、経口摂取した場合にはセラミドやスフィンゴイドに分解されないと吸収されない。SMは腸管内で動物の酵素によりある程度分解されるので、比較的吸収され易いと考えられている。これに対し、GluCerは多くの植物性食品やその残渣(食品加工時に排除される部分)に多く含まれており入手し易いが、小腸内で分解・吸収されにくく、かなりの部分が糞中に排泄される。このことは、GluCerは小腸内での分解・吸収を免れて大腸に到達し易いことを意味している。従って、腸内細菌によって大腸内で分解されれば、大腸で吸収されるセラミドやスフィンゴイドが増加することになり、大腸癌や炎症性腸疾患(Inflammatory bowel disease; IBD)の予防・抑制に役立つことが期待される。

GluCerの水解能を持つ菌として、土壌由来の*Paenibacillus* sp.と*Rhodococcus* sp.の2菌がこれまでに報告されていたが、いずれも

長鎖のアシル基をもつ植物由来のGluCerの分解能が極めて低く、植物性GluCerの実質的な分解は不可能であった。すなわち、腸管内で植物性GluCerをセラミドに水解する菌の詳細については知られていない。

## 2. 研究の目的

ヒトの腸内細菌やラットの盲腸内細菌の中にグルコシルセラミダーゼ活性を持つものが存在することが報告されていることから、腸内細菌の中にはGluCer水解能を持つ菌が存在すると考えられる。

そこで、本研究ではGluCer水解能の高い新規の腸内細菌を発見し、それをプロバイオティクスとして利用することで、大腸癌やIBDの予防・治療に役立てることを目的とする。この研究期間内では、次の4点からアプローチを行う。

研究(1) “GluCer水解活性の高い新規の腸内細菌の探索と単離”; 種々の動物の糞便を用いて、長鎖のアシル基を持つ植物性GluCerを水解できる腸内細菌を探索し、その分離培養を試みる。

研究(2) “新規GluCer水解菌の特性解析によるセラミド製造法の確立”; 新規菌の至適培養条件およびGluCer水解条件を検討し、効率的なセラミド製造法(菌にGluCerからセラミドを生成させ、それを精製する)を確立する。

研究(3) “新規GluCer水解菌のプロバイオティクス利用の検討”; 調製したセラミドを用いて、その生理効果を実験動物で確認する。また、新規菌をプロバイオティクスとして利

用して、動物の腸管内で GluCer からセラミドを生成させる方法を検討する。

研究(4) “ GluCer 水解酵素の精製と遺伝子のクローニング ”; GluCer 水解酵素の精製と遺伝子のクローニングを行い、セラミド生成を増大させるように育種・改良することを狙う。

### 3. 研究の方法

研究(1) 種々の動物から糞便を採取し、基礎液体培地に種々の寒天を加えた培地で培養し、形成されたコロニーを回収した。GluCer 含有培地で各コロニーを培養し、培養後の GluCer 残存量とセラミド生成量を測定することで、高 GluCer 水解菌を探索した。すなわち、濃縮した培養液から有機溶媒により総脂質を抽出し、アルカリ加水分解法によりグリセロリン脂質を分解した。薄層クロマトにより GluCer とセラミドを分離し、各々のスフィンゴ脂質の量を測定した。また、分離された菌から遺伝子を抽出した。16SrRNA 遺伝子を PCR により増幅し、得られた PCR 産物の塩基配列を決定し、菌種の同定と系統解析を行った。

研究(2) 単離された新規菌の増殖特性及び GluCer 水解酵素の特性を解析し、セラミド生成に最適な条件を検討した。また、培養液から効率的にセラミドを精製・回収する方法を検討した。

研究(3) 薬剤により実験的 IBD を誘発したマウスにセラミドを経口投与し、糞の形状、腸管上皮細胞の形態、血中イムノグロブリン量等を観察することで、セラミドの生理効果

を検討した。また、GluCer 単独投与または GluCer と新規菌の同時投与時を比較し、菌の投与により GluCer の利用効率が増加することや IBD の症状がより大きく緩和されるかどうかを観察し、新規菌のプロバイオティクス利用について検討した。

研究(4) 新規菌の GluCer 水解酵素をコードする遺伝子を決定することを目的に、その精製を行った。方法としては、硫酸沈殿において酵素画分を回収し、限外濾過により酵素液を濃縮した。逆相、ゲル濾過、イオン交換などの各種クロマト法を組み合わせることで酵素タンパクの精製を行った。

### 4. 研究成果

研究(1) 約 6,000 個のコロニー(菌株)を供試したところ、イヌの糞便由来の一菌株で GluCer 水解能が見られた。本菌は GluCer を分解してセラミドを生成するが、セラミドを分解することなく蓄積していくことから、本菌はグルコシルセラミダーゼ(GCase)は持つが、セラミダーゼは持たないものと推測された。また、その GluCer の分解産物がセラミドであることを薄層クロマト及び質量分析により確認した。16SrRNA 遺伝子の相同性からは、*Clostridium coccooides* グループに属するが、他菌との同一性は 94 %以下であり、芽胞形成能もないことから、新規の菌である可能性が高いと考えられた。

研究(2) 新規菌の培養液を培養上清と菌体画分に分離し、GCase 活性を比較したところ、90 %近くの活性が培養上清から検出されたことから、本菌の GCase は菌体外に分泌され

る酵素と思われた。また、本菌の菌体タンパク量あたりの GCCase 比活性は、以前に報告した *Blautia glucerasei* HFTH-1 の倍近くあり、GluCer 水解能がより高い菌であると思われた。また、新規菌は GluCer の類似化合物は水解しなかったことから、その GCCase は GluCer に特異的であると考えられた。従って、新規菌を腸管内で増やすことができれば、消化管内での GluCer からのセラミド産生を増加させられると考えられる。そこで、増殖特性について解析したところ、多糖類の分解能が低く、更に利用できる糖基質の種類が少ないことも明らかになった。本菌は腸管内では少ない単糖を他菌と競合しなくてはならず、エネルギー枯渇の状況にあると推測された。しかし、本菌はフルクトオリゴ糖の利用が可能であり、糞中細菌混合系(本菌を含む)にフルクトオリゴ糖を添加したところ、GluCer の水解が増加したことから、フルクトオリゴ糖をプロバイオティクスとして利用することで、本菌の生息数を増加させることも腸管内の GluCer 水解を増強する手段の一つになると考えられた。

研究(3) 新規菌の安全性を確認するため、その生菌粉末をマウスに 1 ヶ月間給与したが、急性毒性は見られなかった。そこで、本菌のプロバイオティクス利用が食餌性 GluCer の利用に及ぼす影響を動物試験により検討した。すなわち、GluCer 単独投与時または GluCer と新規単離菌の同時投与時を比較したところ、菌との同時投与により GluCer の利用効率が増加した。次に、セラミドの生理効果の一つとして IBD に及ぼす影響について調べた。薬

剤により実験的大腸炎を誘発したマウスに GluCer を経口投与したところ、血便や軟便の程度が改善される傾向は見られたが、その効果はわずかなものであった。しかし、セラミドを投与した場合には、糞便がより正常化した。更に、炎症の重篤化による体重の低下も軽減された。組織切片の観察、血中イムノグロブリンの量や好中球の走化性も、セラミドの投与により低下した。従って、GluCer よりもセラミドを給与した場合の方が、腸管からの吸収効率が良く、生理効果が増加したと考えられた。また、新規菌と GluCer を同時に給与した場合にも、セラミド給与時と同様な炎症抑制効果が見られた。それ故、この新規菌の腸管内の存在数が増えるように工夫することで、食事性 GluCer の利用量が増加し、その生理機能が更に高くなると考えられた。研究(4) 培養液上清を回収し、酵素溶液とし、その至適 pH 及び至適温度を明らかにし、酵素活性の測定条件を決定した。硫酸沈殿画分を回収し、透析したサンプルをイオン交換クロマトとゲル濾過法を組み合わせることで、比活性は 100 倍近くに増加した。しかし、その過程で総活性値が大きく低下してしまい、単一タンパクの回収には至らなかった。方法を改善し、再検討の必要があると考えられた。

本研究において、GluCer を水解する能力の高い新規菌を単離した。GluCer を給与したマウスに、本菌を経口投与したところ、GluCer 水解が増加した。また、本菌の投与による急性毒性は見られなかった。糞中微生物混合系に本菌を添加した場合にも、GluCer の水解が

増加したことから、本菌は、動物の大腸内でも増殖しえると考えられた。従って、GluCerを摂取した場合に、新規菌をプロバイオティクスとして使用することで、大腸におけるGluCer水解が増加し、食事性GluCerの生理効果が増大し、大腸炎の緩和などに役立てることができると考えられた。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

Asanuma N, Yokoyama S, Hino T. Effects of nitrate addition to a diet on fermentation and microbial populations in the rumen of goats, with special reference to *Selenomonas ruminantium* having the ability to reduce nitrate and nitrite. *Animal Science Journal*, 査読有, Vol.86, 2015, 378-384., 10.1111/ asj.12307

川田実生, 浅沼成人. 食事性グルコシルセラミドによる皮膚バリア機能の改善と大腸炎の緩和・抑制. 明治大学農学部研究報告, 査読有, Vol.65, 2016, 83-93., <http://hdl.handle.net/10291/17936>

[学会発表] (計 10 件)

Asanuma N, Tsukamoto A, Yamaya M, Probiotic effects of the newly ceramide-producing bacterium with dietary supplementation of glucosylceramide, International Scientific Conference on Probiotics and Prebiotics (IPC2014), 2014.06.24 Yokoyama S, Asanuma N, Application of plant ceramide to modulate

intestinal microflora, International Scientific Conference on Probiotics and Prebiotics (IPC2014), 2014.06.24

Asanuma N, Probiotic utilization of the novel glucosylceramide-hydrolyzing bacterium to the alleviation of inflammatory bowel disease, 14th International Nutrition & Diagnostics Conference (INDC2014), 2014.09.02

Asanuma N, Effects of oral administration of the *Butyrivibrio* group bacterium on the inflammatory dry skin condition in chronic irritant contact dermatitis, 6th Congress of European Microbiologists (FEMS2015), 2015.06.07 Asanuma N,

Immunomodulatory effects of lipopolysaccharide from the *Butyrivibrio* group bacterium isolated from the goat rumen, 15th International Nutrition & Diagnostics Conference (INDC2015), 2015.10.05 Asanuma N, Application of

plant ceramide as antibacterial agent to prevent *Escherichia coli* O157:H7 infection, IV International Conference on Antimicrobial Research (ICAR2016), 2016.06.29 Kawata M, Tsukamoto A,

Asanuma N, Characterizations of plant glucosylceramide hydrolyzing bacteria isolated from canine feces, 16th International Nutrition & Diagnostics Conference (INDC2016), 2016.10.03

Tsukamoto A, Kawata M, Asanuma N, Augmentation of the utilization of dietary

glucosylceramide by the novel Bacterium A,  
16th International Nutrition & Diagnostics  
Conference (INDC2016), 2016.10.03

Akutsu S, Kawahara N, Asanuma N,  
Inhibition of melanogenesis by plant  
ceramide in B16 melanoma cells, 16th  
International Nutrition & Diagnostics  
Conference (INDC2016), 2016.10.03

Kawahara N, Akutsu S, Asanuma N,  
Availability of dog feces as the amino acid  
source for *Butyrivibrio fibrisolvens*, 16th  
International Nutrition & Diagnostics  
Conference (INDC2016), 2016.10.03

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

浅沼 成人 (ASANUMA, Narito)

明治大学・農学部生命科学科・准教授

研究者番号：5 0 3 6 6 9 0 2