

令和 5 年 6 月 1 日現在

機関番号：34419

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19096

研究課題名（和文）難消化性ペプチドを用いた革新的な腸内細菌制御法の開発

研究課題名（英文）Development of an innovative strategy to control gut microbes using indigestible peptides

研究代表者

栗原 新（Kurihara, Shin）

近畿大学・生物理工学部・准教授

研究者番号：20630966

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：糖質に関連する難消化性成分である食物繊維は腸内細菌制御剤として盛んに利用されている一方で、タンパクに関連する難消化性成分である難消化性ペプチドは腸内細菌制御剤として未利用である。そこで、大豆由来難消化性ペプチドが腸内細菌叢へ与える影響を解析した。ヒトの腸内常在菌叢に最優勢51菌種について、難消化性ペプチドがその増殖に与える影響を純粋培養にて解析したところ、難消化性ペプチドは試験を行った11種のBacteroides属細菌のうち9菌種の増殖を抑制した。次に糞便培養系に難消化性ペプチドを添加して培養を行ったところ、Bacteroides属細菌の増殖を特異的に抑制した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、上市されている様々なプレバイオティクス（食物繊維）の世界的な市場規模は年間160億ドルに上り、今後も成長していくと予想されている。一方で、三大栄養素の残り2種に対応する難消化性脂質、難消化性タンパク質（あるいは難消化性ペプチド）は、著量が腸へ流入していることが予想されるために腸内細菌叢制御剤として非常に有望であるにも関わらず、この観点からはほとんど研究されておらず、難消化性脂質、難消化性ペプチドの腸内細菌叢制御剤としての市場も存在しない。本研究がさらに発展すれば、人類の腸内細菌制御法に革新的な新技術を加えることになり、数十億ドル規模の大きなビジネスチャンスに繋がる。

研究成果の概要（英文）：Dietary fibre, a non-digestible component related to carbohydrates, is widely used as a modulator of gut microbiota, whereas non-digestible peptides, a protein-related non-digestible component, are not yet exploited as a modulator of gut microbiota. Therefore, we investigated the effects of non-digestible peptides from soybean on the gut microbiota. The effect of non-digestible peptides on the growth of the 51 most prevalent bacteria in the human gut commensal microbiota was analysed in culture, and found that non-digestible peptides inhibited the growth of nine of the 11 Bacteroides species tested. Next, when non-digestible peptides were added to a faecal culture system, they specifically inhibited the growth of Bacteroides spp.

研究分野：応用微生物学

キーワード：難消化性ペプチド 腸内細菌 Bacteroides 糞便培養 ヒト腸内常在菌叢最優勢種

1. 研究開始当初の背景

21 世紀初頭に開発された次世代シーケンサによる糞便中の核酸配列の解読により、腸内常在菌叢の構成菌種・割合が明らかとなった。また、肥満・糖尿病・自閉症等の全身の疾患が腸内常在菌叢の組成と深く関連することが報告され、腸内常在菌叢は「もう一つの臓器」と呼ばれはじめた。腸内常在菌叢の制御はこの「もう一つの臓器」を制御することであり、制御法が完成すれば上記の様々な疾患は大きく改善し、人類の健康寿命は大きく伸長すると考えられる。ヒト腸内常在菌叢には善玉菌、悪玉菌のほか、機能未知であり急性疾患の原因とはならない「日和見菌」と呼ばれる細菌が含まれる。近年の健康成人のヒト腸内常在菌叢における最優勢種の解析の結果、ヒト腸内常在菌叢の 90% 以上が日和見菌で占められることが明らかとなった。さらに、これらの日和見菌の中に長期間のうちに少しずつ宿主に悪影響を与えるもの、あるいは *Faecalibacterium prausnitzii* のように少しずつ好影響を与えるものが存在することが明らかとなりつつある。したがって、今後の腸内細菌制御においては日和見菌についての研究の進行を注視しつつ、日和見菌の組成を最適化することが重要であると考えられる。

経口摂取される様々な食品中の成分は易消化性成分と難消化性成分に大別でき、消化管の上流(小腸など)では、宿主による易消化性成分の消化・吸収が行われ、大腸へ流れ込む成分は難消化性成分がほとんどを占めると考えられる。消化管の最末端に位置する大腸には、大量の腸内細菌が息息しており、上部消化管から流入する様々な成分に曝されている。

糖質、脂質、タンパク質は三大栄養素と呼ばれ、ヒトはその生命維持や身体活動の為にこれらを消化・吸収し利用している。これらの栄養素の中の代表的な難消化性成分として、糖質の一種である食物繊維が挙げられる。食物繊維はヒト大腸に流れ込み、腸内細菌が利用可能であり、腸内細菌制御を目的として経口摂取される「プレバイオティクス」は、この食物繊維の一種である。現在、上市されている様々なプレバイオティクスの世界的な市場規模は年間 160 億ドルに上り、今後も成長していくと予想されている。一方で、三大栄養素の残り 2 種に対応する難消化性脂質、難消化性タンパク質(あるいは難消化性ペプチド)は、著量が腸へ流入していることが予想されるために腸内細菌叢制御剤として非常に有望であるにも関わらず、この観点からはほとんど研究されておらず、難消化性脂質、難消化性ペプチドの腸内細菌叢制御剤としての市場も存在しない。難消化性ペプチドは、おからなどの大豆製品を生産に伴い生成する残渣に多量に含まれているが、用途が限られているために、これらは現在かなりの量が廃棄されている。

したがって、難消化性ペプチドの腸内細菌叢制御剤としての市場を開拓することは数十億ドル規模の大きなビジネスチャンスに繋がり、人類の腸内細菌制御法に革新的な新技術を加えることに繋がる。

2. 研究の目的

未利用の大豆由来難消化性ペプチドが腸内細菌叢へと与える影響を解析する

3. 研究の方法

培地の調製と日欧ヒト腸内常在菌叢最優勢種の培養

GAM 培地に馬脱繊維血液を終濃度 5% で添加した GB 培地培地を調製し、日欧ヒト腸内常在菌叢最優勢種の前培養に用いた。詳細な培養法は既報に従った (Front. Endocrinol. 2023, in press, doi: 10.3389/fendo.2023.1056866)。大豆由来難消化性ペプチドを終濃度で 0.5% (w/v) で含有する GAM 培地を調製し、本培養に用いた。

糞便培養

ヒト糞便を GAM 培地あるいは大豆由来難消化性ペプチドを終濃度で 0.5% (w/v) で含有する GAM に懸濁し、糞便培養の初期 OD₆₀₀ を 0.01 とし、37 °C で嫌気培養した。培養液を遠心し、沈殿を次世代シーケンス解析に供した。

糞便培養物の 16S rDNA シーケンス

糞便培養物を 0.1 mm ジルコニア/シリカビーズと 3.0 mm ジルコニアビーズを用いてビーズ破砕後にキットを用いて抽出した。得られた DNA をテンプレートとして、16S rRNA 遺伝子ライブラリーを調製し、MiSeq システム (Illumina, San Diego, CA, USA) を用いて、2 × 300-base-pair プ

ロトコルでシーケンスした。詳細は既報に従った (Nutrients 2021, 13:2029.)

4. 研究成果

大豆由来難消化性ペプチドは純粋培養系において、日欧ヒト腸内常在菌叢最優勢種のうち、*Bacteroides* 属細菌の増殖を特異的に抑制する

前培養を GB 培地、本培養を GAM 培地で培養した際に培養可能な日欧ヒト腸内常在菌叢最優勢 51 菌種および、ピフィズ菌・乳酸菌・酪酸菌等を、可溶化大豆由来難消化性ペプチドを終濃度 0.5% で添加した GAM 培地と、可溶化大豆由来難消化性ペプチドを添加していない GAM 培地で 60 時間、嫌気培養した際の増殖度 (OD₆₀₀) を測定し、比較した。さらに、可溶化大豆由来難消化性ペプチドを添加した GAM 培地における前述の 65 菌種の腸内細菌の生育度 (OD₆₀₀) を、可溶化大豆由来難消化性ペプチドを添加しない GAM 培地における生育度 (OD₆₀₀) で除したのちに 100 を乗ずることにより、可溶化大豆由来難消化性ペプチドによる増殖への影響 (%) を算出した。

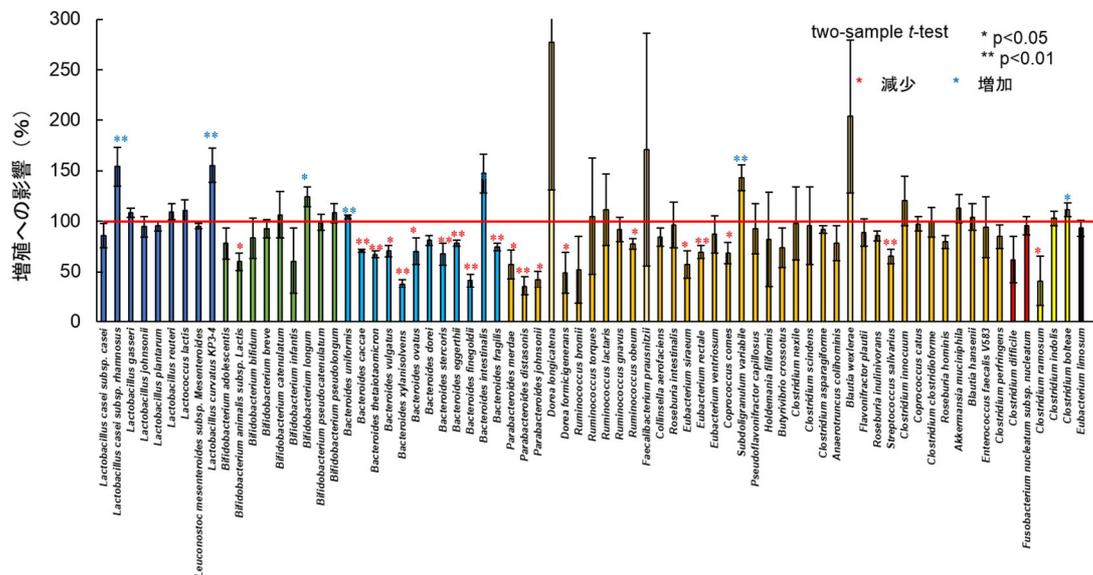


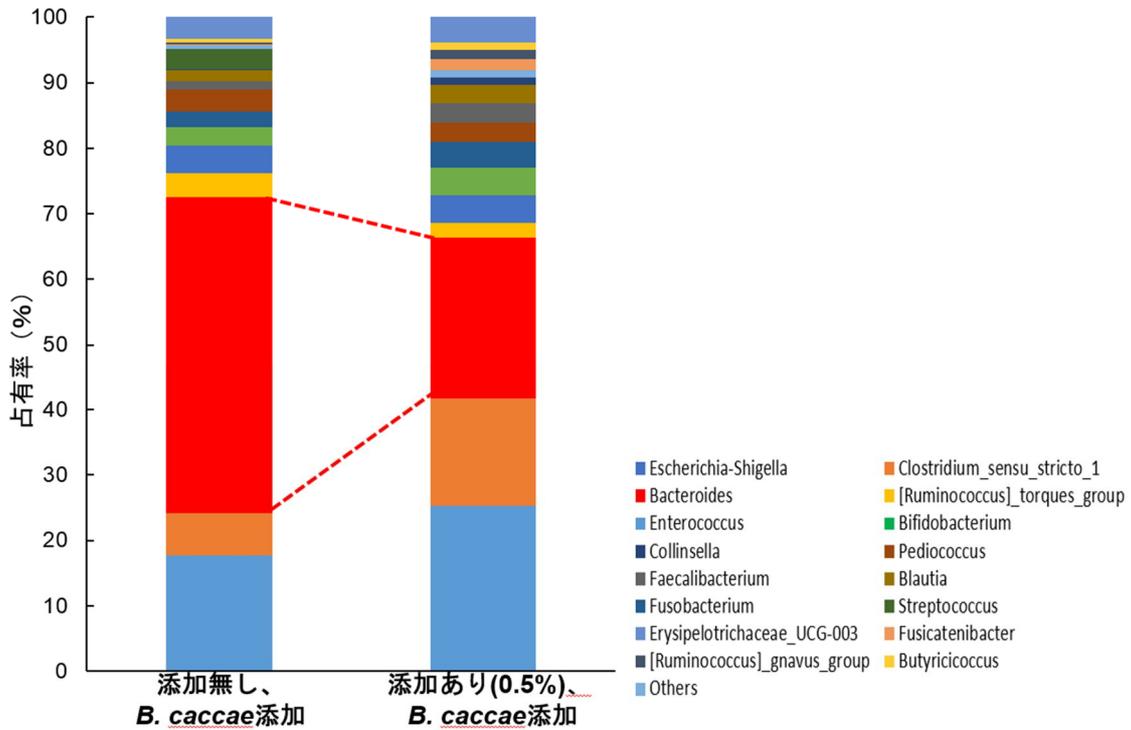
図 1 大豆由来難消化性ペプチドによる腸内細菌の増殖促進・抑制効果 (純粋培養)

大豆由来難消化性ペプチドを添加した培地における培養開始 24 時間後の増殖度 (OD₆₀₀) を、可溶化大豆由来難消化性ペプチドを添加しない培地 (コントロール) における培養開始 60 時間後の増殖度 (OD₆₀₀) で除し、100 を乗ずることによって増殖への影響 (%) を算出した。青色は乳酸菌、緑色はピフィズ菌、水色はバクテロイデス属細菌、赤色は悪玉菌、黄色は酪酸産生菌、黒色はアセトゲンに対する増殖への影響 (%) を示した。対応のある母平均の差の検定で統計処理を行った。*は $p < 0.05$ 、**は $p < 0.01$ を表す。赤あるいは青で示したアスタリスクは、細菌の増殖が大豆由来難消化性ペプチド添加により減少あるいは促進されたことをそれぞれ示した。

この結果、ヒト腸内常在菌叢最優勢 32 種に含まれる *Bacteroides* 属細菌 11 菌種の内、腸管バリアを破壊する *Bacteroides caccae* (Cell 167:1339-1353. (2016))、大腸がん発生を促進する可能性がある *Bacteroides fragilis* (Science 359:592-597. (2018)) 等、健康に悪影響を及ぼす可能性のある菌種を含む 9 菌種の生育が抑制された (図 1)。

大豆由来難消化性ペプチドはヒト糞便培養系において、*Bacteroides* 属細菌の増殖を特異的に抑制する

B. caccae の前培養液とヒト糞便の懸濁液を同じ初期濁度 (OD₆₀₀ = 0.01) で大豆由来難消化性ペプチドを添加した GAM 培地に接種し、24 時間、嫌気培養した培養液から DNA を抽出し、次世代シーケンサにて 16S rRNA 遺伝子解析を行った。この結果、大豆由来難消化性ペプチドを終濃度 0.5% で GAM 培地に添加することにより、今回試験した 7 名の糞便を用いた全ての糞便培養液において、*Bacteroides* 属細菌の占有率が低下した (図 2, $n = 7$, 48.4% → 24.7%, $p = 0.0032$)。この結果はヒト腸内常在菌叢最優勢種を大豆由来難消化性ペプチドを終濃度 0.5% で添加して純粋培養した際に、*Bacteroides* 属細菌の増殖が選択的に抑制されたという実験結果 (図 1) と一致していた。一方で、他の腸内細菌属の占有率には統計学的に有意な変動は観察されなかった。



**図2 大豆由来難消化性ペプチドによる腸内細菌の増殖促進・抑制効果
(*B. caccae*を添加した糞便培養)**

大豆由来難消化性ペプチドを0.5%で添加した、あるいは添加しないGAM培地に7人の糞便ドナーの糞便および*B. caccae*を同じ初期濁度(OD₆₀₀ = 0.01)で接種し、37℃、嫌気条件で、それぞれ24時間培養した。得られた菌体からDNAを抽出して次世代シーケンサで解析し、属毎の占有率の平均値を帯グラフに示した。帯グラフ上で各細菌属を示す色について、グラフの凡例に示した。赤色の帯で*Bacteroides*属細菌の占有率を示した。

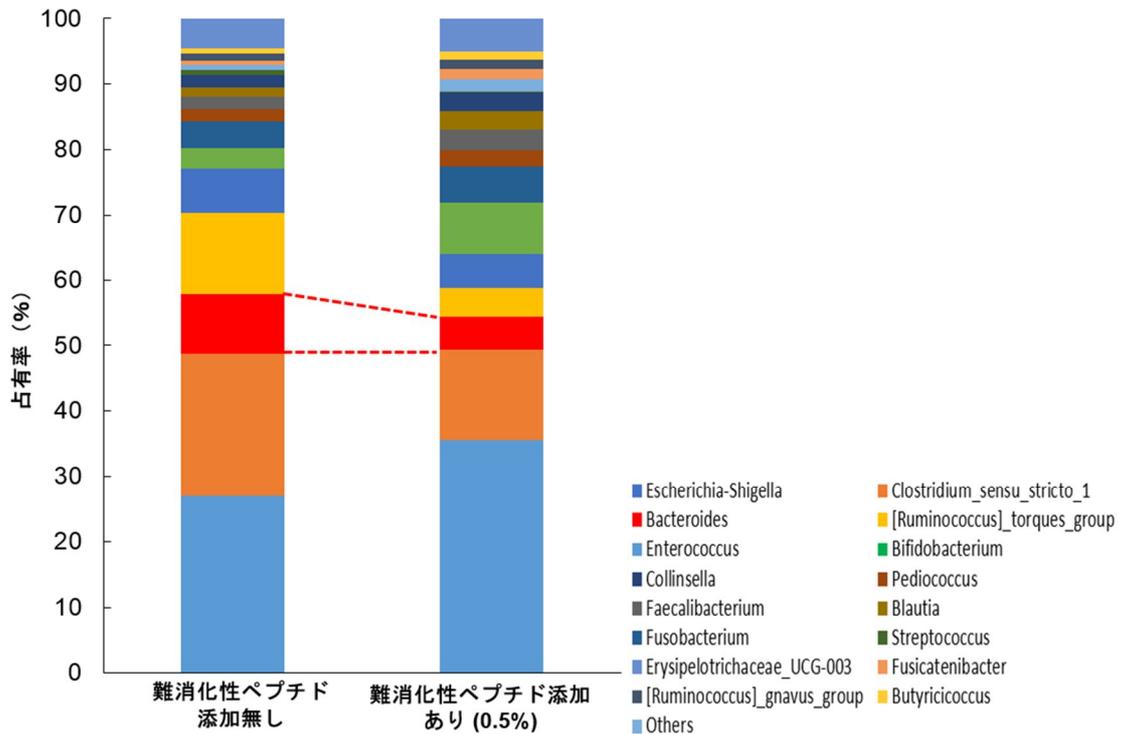


図3 大豆由来難消化性ペプチドによる腸内細菌の増殖促進・抑制効果(糞便培養)

大豆由来難消化性ペプチドを0.5%で添加した、あるいは添加しないGAM培地に7人の糞便ドナーの糞便を初期濁度(OD₆₀₀)0.01で接種し、37℃、嫌気条件で、それぞれ24時間培養した。得られた菌体からDNAを抽出して次世代シーケンサで解析し、属毎の占有率の平均値を帯グラフに示した。帯グラフ上で各細菌属を示す色について、グラフの凡例に示した。赤色の帯で*Bacteroides*属細菌の占有率を示した。

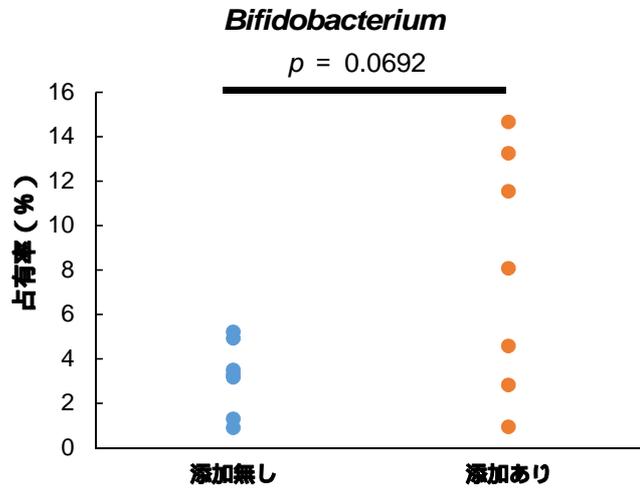


図4 Bifidobacterium属細菌の占有率の変化

糞便ドナー7人分の*Bifidobacterium*属細菌の占有率について示した。青色が可溶性大豆由来難消化性ペプチドを0.5%で添加しなかった培地、赤色が添加した培地での占有率を示す。

次に、ヒト糞便の懸濁液を初期濁度 ($OD_{600} = 0.01$) で大豆由来難消化性ペプチドを添加した培地に接種し、24時間嫌気培養した共培養液を、次世代シーケンサにて16S rRNA遺伝子解析を行ったところ、今回試験した7名分の糞便の内、*Bacteroides*属細菌が極端に少なかった2名を除く5名で大豆由来難消化性ペプチドを終濃度0.5%でGAM培地に添加することにより、*Bacteroides*属細菌の占有率が低下した。7名のドナーに由来する糞便における平均値では、大豆由来難消化性ペプチドの糞便培養への添加により*Bacteroides*属細菌の占有率が9.1%から

5.1%へと減少傾向にあった ($p = 0.0716$ 、図4)。この結果は純粋培養時と類似していた。

また糞便ドナー7名中5名で、大豆由来難消化性ペプチドを終濃度0.5%でGAM培地に添加することにより、善玉菌である*Bifidobacterium*属細菌の占有率が3.2%から8.0%へと増加傾向にあった ($p = 0.0692$ 、Figure 3-3-2-8、3-3-3-2)。

以上を総合すると、大豆由来難消化性ペプチドは、ヒト腸管内において悪玉菌である可能性が示唆されている*Bacteroides*属細菌を「狙い撃ち」で減少させる素材であることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 網 優太、平野 里佳、金 倫基、栗原 新
2. 発表標題 大豆由来難消化性ペプチドによるヒト腸内常在菌叢改善効果の解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度京都大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 網 優太、平野 里佳、金 倫基、栗原 新
2. 発表標題 大豆由来難消化性ペプチドによるヒト腸内常在菌叢改善効果の解析
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 栗原新
2. 発表標題 食品成分を用いた腸内細菌叢の制御
3. 学会等名 第2回 腸内デザイン学会年会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 腸内細菌改善剤	発明者 栗原 新、平垣内 一子、齋藤 努、片瀬 満	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2022-014261	出願年 2022年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
研究 分 担 者	金 倫基 (Kim Yungi) (00620220)	慶應義塾大学・薬学部(芝共立)・教授 (32612)	

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