

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 19 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14727

研究課題名(和文) 易消化性多糖とペプチドを作る乳酸菌による高齢者の脆弱化防止能ヨーグルトの構築

研究課題名(英文) Construction of new functional yogurt with prevent ability to frail of elderly person by lactic acid bacteria with production ability of digestible exopolysaccharide and peptides

研究代表者

齋藤 忠夫 (SAITO, TADAO)

東北大学・農学研究科・教授

研究者番号：00118358

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト大腸において殺菌能力を発揮するのは酢酸と乳酸を作り出すビフィズス菌であり、高齢者の腸内健康を守るのに重要である。本研究では、糖源の不足する大腸内でビフィズス菌に利用性の高い菌体外多糖を作り出し同菌の増殖に寄与するビフィズス菌(Bifidobacterium longum SBT2928)を発見した。また筋肉増強に必須のロイシンに富むペプチドを微量生成するLactobacillus gasseriiも発見した。これらの有用菌を用いて製造したヨーグルトには、高齢者の腸内腐敗を防止し、小腸でも多糖やペプチドを生成することで、脆弱化しがちな老人性フレイルからの脱却に有効であることが期待された。

研究成果の概要(英文)：Bifidobacteria is most important bacterial family to protect for intestinal health of elderly persons which produce acetic acid and lactic acid showing strong bacterial killing ability in human large intestine. In this study, some Bifidobacteria strains were successfully isolated which produce exopolysaccharides as carbohydrate source to contribute to the increase of another Bifidobacterial strains under the conditions of lacking carbohydrate in large intestine. In the yogurt with isolated useful bacteria, we expect to prevent the Frail of elderly persons by preventing intestinal disease and increase of activity in Gut.

研究分野：応用微生物学

キーワード：ビフィズス菌 乳酸菌 菌体外多糖 腸内腐敗 フレイル 機能性ヨーグルト

1. 研究開始当初の背景

病原性細菌の動物腸管や標的器官への認識・結合性は古くから良く研究されているが、乳酸菌やビフィズス菌などの有用菌(善玉菌)に対する消化管付着機構研究は極めて遅れていた。近年、胃酸・胆汁酸耐性があり、腸管に付着性を示すことで増殖して宿主に有益な保健生理効果をもたらす「プロバイオティクス」と呼ばれる腸管に住む特殊な乳酸菌群が注目され、わが国でもトクホ(特定保健用食品)として、有用菌は積極的に発酵乳・ヨーグルトに利用されている。我々も、これまでの研究でヒト大腸ムチンの ABO 式血液型抗原(A 型は GalNAc, B 型は Gal, O 型は Fuc が抗原決定基)を認識して結合する「血液型乳酸菌」を多数発見した。また、最近では、ヒト大腸ムチンの結合糖鎖に発現している糖鎖抗原を認識する付着因子(アドヘシン)として、Surface layer protein A (SlpA)、グリセルアルデヒド3リン酸脱水素酵素(GAPDH)、システイン結合性 ABC トランスポーター、Elongation Factor Tu (EFTu)などを続々と発見している。この成果を上げたのは、我々が開発した、ヒト大腸ムチンを精製し、センサーチップ上に固定し、菌体を反応させることで付着性を検討する Biacore という機器を用いた新手法を開発したことに尽きる。本研究では、この手法を利用してヒト腸に結合性を示し継続的に易消化性多糖やロイシンペプチドを生産する乳酸菌を小腸内で利用する新アイデアを含んでいる特徴的な研究であった。

2. 研究の目的

平成 26 年の日本人男女の平均寿命は 84 歳となり、世界一の長寿国を維持している。しかし、実際の健康寿命は 70 歳代と平均寿命との差は大きく、多くの高齢者の晩年は寝たきりで QOL が低下している。この原因には骨粗鬆症、骨折、筋力低下等があるが、「食事量減少による脆弱化を防止する」ことが最も肝要である。我々は、これ

までヒト腸管付着性乳酸菌の探索・選抜・高度利用を目指し、ヒト腸管付着性を評価するバイオセンサーBiacore を用いた新手法を開発した。本研究では、アミロースを高濃度に生産する乳酸菌や筋肉増強に必須のロイシンを含むペプチドを生産する小腸結合性の有用菌を見出したい。そこで、「ヒト腸管付着性が高く、腸内で易消化性の多糖と筋肉用ペプチドを継続して作り供給する乳酸菌」を発見・利用して「高齢者の栄養摂取を小腸内で行うことで脆弱化を防ぎ健康寿命を延ばす」という新視点での乳酸菌の高度利用を目指すことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 菌体外に易消化性多糖を菌体外多糖(EPS)として生産する菌の選抜

我々は、菌体外多糖の研究も行っており、珍しい化学構造を示すものも多数報告している。しかし、最近植物性食品から単離した *L.plantarum* の一菌株に、アミロース様の易消化性多糖を産生することを見出した。より広くスクリーニングをすれば、同様の乳酸菌やビフィズス菌を多く見出すことが可能であると推定される。乳酸菌の分析対象は、動物性起源より各種国産の糠漬けやキムチ、サワークラウトなどのピクルス類にまで対象を広げ、これらの食品の確保と乳酸菌菌体の培養法による単離を行う。菌種の分類と同定は 16sDNA 解析および API50CH により行う。菌株は、乳酸桿菌用の選択培地として汎用されている MRS broth (Difco)で、37℃, 18 時間で 2 回継代培養後に、-80℃に保存する。東北大学病院より分譲されたヒト大腸標本正常部位よりムチン層を採取する。ヒト大腸ムチン(HCM)および血液型糖鎖抗原を用いて、プラズモン共鳴(SPR)を利用したバイオセンサーBIACORE-1000 によりムチン糖鎖と親和性の高い乳酸菌をマススクリーニングする。

本装置は、表面プラズモン共鳴現象を利用して生体分子間での相互作用を非標識下で分析可能な極めて優れた装置であり、腸管内での付着性機構をシミュレート可能である。また、申請者世界で初めて BIACORE を用いて開始した手法(Uchida *et al.*, *Res. Microbiol.*, **157**, 659-665, 2006)を用いて実施する。

(2) 菌体外に分岐鎖アミノ酸(BCAA)を単独またはペプチドとして生産する菌の選抜

老年期の筋肉減少は、筋肉の約 30-40%を占めるとい分岐鎖アミノ酸を効率良く摂取する必要がある。特にロイシン、バリン、イソロイシンの摂取は重要である。これらのアミノ酸を単体またはペプチド体の形で分泌する乳酸菌をスクリーニングする。

(3) 多糖およびペプチドの化学構造解析

単離された菌体外多糖の中で、アミロース様構造を持つものを選抜し、その化学構造を解明する。方法は、¹H-NMR により結合配向性を、糖質組成分析で構成糖を決定し、結合位置は完全メチル化後の GC-MS 分析で行い、総合的に一次元および二次元 NMR により完全化学構造を決定する。また、ペプチドに関してはアミノ酸組成分析と Edman 分解による配列分析により、完全化学構造を決定する。とくに、ロイシンに富むペプチドの存在を重視するが、その他にもバリン、イソロイシンに富むものを決定する

(4) ヒト腸管高付着性でアミロース様多糖およびロイシン高含有ペプチドを持続的に腸内生産する乳酸菌を用いた機能性ヨーグルトの作成

選抜されたヒト腸管付着性が高く、かつ菌体外に易消化性のアミロース様化学構造を示す菌体外多糖を生産し、また分岐鎖アミノ酸のバリンやロイシンやイソロイシンに富むペプチド類を菌体外に生産する乳酸菌を用いてヨーグルトを作成する。乳酸菌

の腸内移送には、緩衝能が高く、酸素や紫外線透過性の低い素材である「乳」を用いるのが一番好ましい。ヨーグルトの基本となるブルガリア菌とサーモフィルス菌を添加し、同時にスクリーニング菌を用いることで、機能性を高めたヨーグルトを製造することが可能となる。乳酸発酵により生産されたヨーグルト中に、確実に菌体外多糖とペプチドが含まれていることを確認する。

(5) 腸内細菌叢のターミナル RFLP 法による評価検討と栄養改善性の評価

機能性ヨーグルト摂取の前後で、変化する腸内細菌叢を明らかにするために、微生物群集の多様性解析に用いられる分子生物学的手法として、最近注目される方法にターミナル RFLP があり、これを適用してポランティア糞便中の難培養性菌を含めた供試乳酸菌株の動向を調べる。制限酵素としては 4 種類の *Hha* I, *Msp* I, *Hae* III, *Alu* I を使用し、糞便中の常在菌から直接 DNA を取り出し、制限酵素切断した 16s-rDNA を電気泳動させ、多様性をマクロビオータプロファイラー(解析ソフト)で検討する。

4. 研究成果

(1) 菌体外に易消化性多糖を菌体外多糖(EPS)として生産する菌の選抜

改良スキムミルク培地からの精製菌体外多糖(EPS)の生産量により優れた菌株をスクリーニングした結果、*Bifidobacterium longum* SBT2928(ビフィズス菌 SP 株)は、培地 1 L あたり約 312mg と高い生産量を示すことが分かった。¹H-NMR 分析では、構成糖(Glc)の C-1 炭素に結合する 型のケミカルシフト値が 5.4 ppm に観察された。EPS 糖鎖の主骨格構造に由来するプロトン群のシグナルは 3.5 ~ 4.2 ppm に検出された。本 EPS に最適な資化試験は、水溶性の低さと濁度の高さから平板培養法であるが、どの試験方法においても SBT2928 自身による

EPS の資化性は確認出来なかった。一方、他のビフィズス菌株である *Bifidobacterium longum* MCC180 による資化試験では、EPS 添加培地でわずかに菌の増殖が見られ、他の腸内細菌に資化される可能性が示唆された。この知見は極めて意義深く、小腸以降の下部消化管において枯渇する可能性の高い糖源を供給できる可能性がある。さらに、他のヒト腸管由来の乳酸菌や有害菌でも EPS の資化性試験を行い、EPS を生産する意義と重要性を検討中である。

(2) 菌体外に分岐鎖アミノ酸(BCAA)を単独またはペプチドとして生産する菌の選抜

約 100 種類以上の研究室保有の乳酸菌ライブラリーを用いて、小腸内での増殖により腸内で分岐鎖アミノ酸(BCAA)に富むペプチドを自ら生産する菌株は、極めて僅少であった。*Lactobacillus gasseri* (ガセリ菌)の一部にその可能性を示す菌株を発見することが出来た。

(3) ビフィズス菌 SP 株の生産する菌体外多糖の化学構造解析

Bifidobacterium longum SBT2928 (ビフィズス菌 SP 株)が生産する特徴的な菌体外多糖は、酸性多糖と中性多糖から成り、前者は後者の 4.5 倍量多く存在した。また、グルコースのみを構成糖とするホモグルカンであり、結合配向性は NMR 解析の結果

型のみであった。完全および部分加水分解後の単糖およびオリゴ糖の TLC 分析および NMR 解析により、マルトース(Glc 1-4Glc)のみが検出され、繰り返し単位がマルトースであるアミロース様構造であった。

また、極めて興味深いことに、本多糖に結合する酸性基は、リン酸基および硫酸基の存在は否定され、亜硝酸基であることが示唆された。この様な多糖の存在は文献例がなく、極めて有用な微生物資源であると考えられた。

(4) ヒト腸管高付着性でアミロース様多糖およびロイシン高含有ペプチドを持続的に腸内生産する乳酸菌を用いた機能性ヨーグルトの作成

亜硝酸基を結合したマルトースを繰り返し単位とする酸性多糖を生産するビフィズス菌 SP 株と、ロイシンリッチなペプチドが微量生産するガセリ菌を用いて、試験的に機能性ヨーグルトを作成して、試飲および試食をすることが出来た。

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0件)

[学会発表](計3件)

Tadao SAITO

Recent strategy of development of functional yogurts using probiotics and prebiotics in Japan.

The 5th AFSLAB (Asian Federation of Society for Lactic Acid Bacteria) International Symposium.

Invited presentation.

(November 28, 2016, Howard International House, Taipei, Taiwan)

Tadao SAITO

Recent strategy of development of functional yogurts using probiotics in Japan.

The 4th International Scientific Symposium on Probiotics and Prebiotics.

Invited presentation.

(November 3, 2016, Sari Pan Pacific Hotel, Jakarta, Indonesia).

Tadao SAITO

Development of new functional

yogurts using probiotic lactic acid bacteria (LAB) and/or Bifidobacteria and the future strategy in Japan.

Invited presentation.

International Scientific Conference
2016 Probiotics and Prebiotics
(IPC2016).

Invited presentation

(July 21, Budapest Marriot Hotel,
Budapest, Hungary).

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

齋藤 忠夫 (SAITO Tadao)
東北大学・大学院農学研究科・教授
研究者番号：00118358

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：