研究成果報告書 科学研究費助成事業

今和 3 年 5 月 6 日現在

機関番号: 10101

研究種目: 基盤研究(C)(一般)

研究期間: 2018~2020

課題番号: 18K05810

研究課題名(和文)パエニバチルス酵素による紅藻ダルス・キシロオリゴ糖の調製とその腸内菌叢改善作用

研究課題名(英文)Preparation of xylooligosaccharides from red alga dulse by Paenibacillus enzyme and their effect on intestinal microflora

研究代表者

岸村 栄毅 (Kishimura, Hideki)

北海道大学・水産科学研究院・教授

研究者番号:50204855

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文): 紅藻ダルス(Palmaria palmata)由来キシランを酵素分解して調製したダルスに特有のキシロオリゴ糖(XOS)である -(1,3/1,4)-キシロトリオース(DX3)がピフィズス菌の一種 Bifidobacterium adolescentisに対して選択的増殖促進作用を示すことを明らかにした。そして、B. adolescentis内におけるDX3の分解経路を明らかにした。また、Streptomyces属の放線菌由来の2種キシラナーゼ (StXyI-10及びStXyI-11)を併用し、 -(1,3/1,4)-XOS高含有のオリゴ糖調製法を確率した。

研究成果の学術的意義や社会的意義 「 -1,4結合」と「 -1,3結合」が混在した特異な構造を持つキシロオリゴ糖の生理活性に関する詳細な研究 は成されていない。本研究において、ダルス由来の -(1,3/1,4)-キシロトリオース(DX3)が、陸上植物由来の -(1,4)-キシロトリオース(X3)とは異なる生理活性を有することが明らかになった。すなわち、DX3はX3より ジフィズス菌に対する選択的増殖促進作用を示した。 グルスは主として北海道沿岸に分布する紅藻であるが、冬季に養殖コンブへの陽当たりを遮る雑海藻として除

去されている。本研究の成果を受け、ダルスの新規機能性素材・地域資源としての有効活用が期待される。

研究成果の概要(英文): We prepared the -(1,3/1,4)-xylotriose (DX3) by enzymatic digestion of the xylan from red alga dulse (Palmaria palmata). The DX3 has a selective growth-promoting effect on Bifidobacterium adolescentis, which is a type of bifidobacterium. In addition, we clarified the degradation pathway of the DX3 in B. adolescentis.

On the other hand, we expressed two xylanases (StXyl-10 and StXyl-11) from Streptomyces thermogrises NBRC100772. Then, we established the condition for preparation of the dulse-XOS with -(1,3/1,4)-XOS content by using StXyI-10 and StXyI-11 together.

研究分野: 水產資源利用学

キーワード: ダルス 源 キシラン キシロオリゴ糖 ビフィズス菌 キシラナーゼ キシロシダーゼ 未利用資 紅藻

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等に ついては、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1.研究開始当初の背景

キシランは植物の細胞壁を構成するヘミセルロースの一種であり、地球上でセルロースに次いで多く存在するバイオマスである。陸上植物のキシランは重合度 70-200 のポリマーとして存在し、そこから調製される重合度 2-10 のキシロオリゴ糖(XOS)はヒトの腸内細菌に利用されることで健康効果を発揮することが知られる。例えば、トウモロコシ由来キシランを酵素消化した-1,4-XOS は少量でビフィズス菌増殖促進作用を発揮する[引用文献]。また、緑藻クビレヅタ由来キシランから調製した-1,3-XOS はガン細胞アポトーシス誘導作用・メラニン形成抑制作用を示す[引用文献]。

一方、我々は、北海道のコンブ養殖現場で多量に除去される未利用の紅藻ダルス(Palmaria palmata)が乾燥重量当たり約 40%の炭水化物を含有し、その約 80%がキシランであることを見出した。そして、ダルスのキシランが「-(1,4) 結合と-(1,3) 結合が混在」した特異な構造を有することを明らかにした。以上のことから、我々は、ダルス由来-(1,3/1,4) - XOS が、陸上植物の-(1,4) - XOS と緑藻の-(1,3) - XOS の生理機能を併せ持つ、また、それらに加えて新規な生理機能を持つ可能性もあると考えるに至った。

2. 研究の目的

我国において、ダルスは主として北海道沿岸に分布するが、冬季に養殖コンブへの陽当たりを遮る雑海藻として除去されている。しかし、その資源量は道南地域だけで1,000-2,000 t/年と見積もられ、新規地域資源としての活用が期待されている。また、我々は、北海道の海岸の海藻堆積物から採集された Paenibaci//us sp. PSY-1 株がエンド型キシラナーゼを産生することを見出した。

そこで本研究では、ダルス由来 - (1,3/1,4)-XOS が腸内細菌の増殖に及ぼす影響の検証と酵素法によるダルス由来 - (1,3/1,4)-XOS の効率的調製法の確立を目的とした。

3.研究の方法

(1) ダルス由来 - (1,3/1,4)-XOS が腸内細菌の増殖に及ぼす影響の検証 試料及び試薬

試料ダルスは北海道函館市で採取後、-30 で凍結保存したものを用いた。

キシロース(X1) -(1,4)-キシロビオース(X2) -(1,4)-キシロトリオース(X3) グルコース(G1) L-システイン塩酸塩一水和物及びペプシン(1:10,000、ブタ胃粘膜由来)は富士フイルム和光純薬より購入した。スクラーゼ $X(Trichoderma\ longibrachiatum$ 由来)は三菱ケミカルフーズより購入した。馬脱繊維血液はコスモ・バイオより購入した。

下記 10 種菌株は理化学研究所 微生物材料開発室より購入した。

Bifidobacterium adolescentis JCM 7046

Bifidobacterium longum subsp. infantis JCM 1222

Bifidobacterium longum subsp. longum JCM 1217

Bacteroides vulgatus JCM 5826

Bacteroides thetaiotaomicron JCM 5827

Lactobacillus casei JCM 1134

Lactobacillus acidophilus JCM 1132

Lactobacillus salivarius JCM1040

Clostridium paraputrificum JCM 1293

Eubacterium limosum JCM 6421

ダルス由来キシランの調製

凍結乾燥して粉末化した試料ダルスに対して 40 倍容量(v/w)の蒸留水を加え、121 で 20 分間の加熱処理を行った後、4 、15,000×g、10 分間の遠心分離により上清と沈殿に分けた。得られた上清を凍結乾燥し、上清乾燥物-1 とした。沈殿に対しては再び 40 倍容量(v/w)の蒸留水を加え、121 で 20 分間の加熱処理を行った後、遠心分離により得られた上清を凍結乾燥し、上清乾燥物-2 とした。上清乾燥物-1 及び 2 を蒸留水に溶解して蒸留水に対して室温で 24 時間透析した後、透析内液を遠心分離した。得られた上清を凍結乾燥し、これをダルス由来キシランとした。

ダルス由来 - (1,3/1,4)-XOS の調製

10 mM 酢酸バッファー (pH 6.0) に溶解したダルス由来キシラン (10 mg/mL) を 2wt%のスクラーゼ X で加水分解した (50 、6 時間)。分解溶液に 2 倍容量のエタノールを添加し、撹拌した後、遠心分離した。得られた上清をエバポレーターで乾固した後、乾固物に対して 5% (w/v) になるよう蒸留水を加えて溶解し、活性炭 25 g を充填したガラスカラム (3 cm × 35 cm) に供し

た。蒸留水 500 mL を添加した後、溶媒のエタノール濃度を 10-25%まで溶出量 500 mL おきに 5% ずつ上昇させることで糖を溶出し(流速 2.0 mL/min) 10 mL ずつ分取した。非還元末端側に -(1,3)-キシロシル結合を持つキシロトリオ ス(DX3)含有画分を回収し、エバポレーター及び 凍結乾燥処理することで得られた乾燥物を DX3 とした。

XOS 組成の分析

活性炭カラムクロマトグラフィーで分取した各画分中の XOS 組成は、各画分を 4 倍量の 100% アセトニトリルに懸濁した後、HPLC に供することで同定した。すなわち、アセトニトリル:水 (80:20、v/v) で平衡化したカラム (Sugar-D、 4.6 $mx \times 250$ mx) に、懸濁した各画分を 100 μ L 負荷し、同溶媒 (流速 1.0 mxL/mxin、RI 検出)で溶出した。X1、X2 及び X3 を標準物質として使用し、それらの保持時間と比較することで成分を同定した。

試験培地の調製

供試糖(G1、X1、X3 及びDX3)を20 mg/mLになるよう蒸留水に溶解し、ろ過滅菌した。Peptone-Yeast-Fildes(PYF)液体培地に対して、終濃度0.5%になるようにろ過済供試糖を添加し、試験培地を調製した。

腸内細菌の培養

供試菌株は GAM 寒天平板(日水製薬)で培養した後、1% G1 含有 PYF 液体培地に植え継ぎ、37 で嫌気的に前培養したものを用いた。試験培地に 1×10⁷ CFU/tube の各種腸内細菌を接種し、37 で 96 時間嫌気培養した。菌の増殖は試験培地の濁度及び pH を測定することにより判定した。供試糖を含まない PYF 培地における値をブランクとした。

Bif. adolescent is 及び Bac. vulgatus の培養における試験培地の濁度の経時変化の測定と同様に調製した試験培地に 1 × 10⁷ CFU/tube の Bif. adolescent is 及び Bac. vulgatus を接種し、37 で嫌気培養した。Bif. adolescent is 及び Bac. vulgatus の増殖は、24、28 及び 32時間培養後の試験培地の濁度を測定することで評価した。

Bif. adolescent is 由来 XOS 加水分解酵素の大腸菌発現及び変異体作製定法に従って作製した。

(2) 酵素法によるダルス由来 -1,3/1,4-XOS の効率的調製法の確立 試料及び試薬

ダルスは、北海道函館市で採取後、-30 で凍結保存したものを用いた。

X1、X2 及び X3 は富士フイルム和光純薬より購入した。 -(1,4)-キシロテトラオース (X4) -(1,4)-キシロペンタオース (X5) ビーチウッド由来グルクロノキシラン (GX) 及び小麦由来アラビノキシラン (AX) はメガザイムより購入した。

放線菌 Streptomyces thermogriseus NBRC100772 由来のゲノム DNA は、NITE Biological Resource Center (NBRC)より購入した。

S. thermogriseus 由来キシラン加水分解酵素の大腸菌発現

定法に従って発現した。

キシラナーゼ活性測定

10 mM リン酸緩衝液 (pH 6.5) に溶解した 10 mg/ml GX に 1.0 μ g/ml の酵素を添加し、60 で 10 分間反応を行い、生じた還元糖量を DNS 法で定量した。1 分間に 1.0 μ mol の還元糖を生じる酵素量を 1 U とした。

酵素反応物中の生成物組成は TLC により分析した。

4. 研究成果

(1) ダルス由来 DX3 が腸内細菌の増殖に及ぼす影響の検証

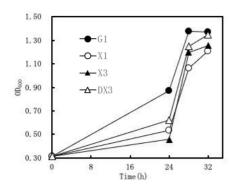
10 種腸内細菌の増殖に及ぼす DX3 の影響

DX3 は本研究で使用した Bifidobacterium 属及び Bacteroides 属に資化されたが、Lactobacillus属、Clostridium属及び Eubacterium属には資化されなかった。また、DX3の資化率は成人の腸内に最も多く生息する Bif. adolescentis において最も高かった。

Bif. adolescent is の増殖に及ぼす DX3 の影響

そこで、 $Bif.\ adolescent\ is\ DV \ Bac.\ vulgatus$ を 37 で嫌気培養し、経時的に試験培地の濁度を測定した。その結果、 $Bif.\ adolescent\ is$ は DX3 を X3 と同様に資化したが、 $Bac.\ vulgatus$ では DX3 の資化が X3 と比較して遅かった(図 1)。このことから、DX3 はビフィズス菌の増殖を選択的に促進する因子として期待された。また、DX3 は非還元末端側に -(1,3)-キシロシル結合を、X3 は -(1,4)-キシロシル結合を持つ。 $Bif.\ adolescent\ is$ は非還元末端側の結合様式に違いがあるにもかかわらず DX3 及び X3 を同様に代謝したことから、 -(1,4)-結合切断酵素に加えて DX3 加水分解の鍵となる -(1,3)-結合切断酵素を有すると考えられた。





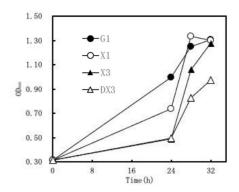


図1. Bif. adolescentis の増殖に及ぼす DX3 の影響
(A) Bif. adolescentis(n=2), (B) Bac. Vulgatus(n=2),

ダルス由来キシランを用いた腸内細菌の共培養試験

ダルス由来キシランを供試糖として *Bif. adolescentis* を培養した結果、増殖しなかった。しかしながら、*Bac. vulgatus* と共培養することで *Bif. adolescentis* の増殖が確認された。これは、*Bac. vulgatus* がダルス由来キシランをオリゴ糖に分解し、生じたキシロオリゴ糖を B*if. adolescentis* が利用したことに起因すると考えられられた。

Bif. adolescent is の DX3 分解経路の検討

CAZy データベースを基に各腸内細菌の有する XOS 分解酵素を比較し、DX3 分解酵素を予測した。その結果、Bif. adolescent is の有する特異的な DX3 加水分解酵素は、GH43_11 酵素である BAD0428 及び BAD1203 と GH43_12 酵素である BAD0423 であると推察された。そこで、BAD0428、BAD0423 及び BAD1527 を大腸菌により発現し、これらのキシロシダーゼ活性測定及び各種 XOS に対する反応物解析を行った。その結果、Bif. adolescent is は、まず BAD0423 により DX3 の - (1,3)-結合を切断して X2 と X1 に分解し、次に BAD0428 により X2 を 2 分子の X1 に分解すると示唆された。

BAD0423 の構造・機能解析

DX3 加水分解の鍵となる -(1,3)-結合切断酵素が BAD0423 であることが強く示唆されたことから、その活性発現に必要なアミノ酸残基について検討した。すなわち、機能既知 GH43 酵素とのアミノ酸配列比較から、BAD0423 の触媒残基、サブサイト+1 及び+2 と予想される残基を AIaに置換した変異酵素 7 種 (D18A、Y81A、D150A、Q177A、W216A、E218A 及び S239A)を作製した。その結果、Q177 A は野生型酵素と同様に DX3 に対して高活性を示したが、他 6 種の変異酵素は DX3 に対して活性を示さなかった。これらのことから、DX3 の -(1,3)-結合切断には D18、Y81、D150、W216、E218 及び S239 が必須であると考えられた。

(2) 酵素法によるダルス由来 - (1,3/1,4)-XOS の効率的調製法の確立

PSY-1 株由来キシラナーゼの調製

PSY-1 株から調製した粗キシラナーゼの活性は低く、異なる菌株からのキシラナーゼの探索が必要と考えられた。

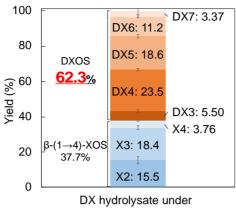
放線菌由来キシラナーゼの探索

産業利用を見据えて、比較的温度安定性の高いエンド型キシラン加水分解酵素を持つと考えられる S. thermogriseus から探索することとした。すなわち、ゲノム DNA より代表的なエンド型キシラナーゼである Glycoside Hydrolase family (GH) の 10 及び 11 に属する 2 種酵素 (StXyI-10 及び StXyI-11) の遺伝子を取得し、大腸菌により発現した。StXyI-10 は至適温度 70 、至適 pH7.0 で、50 、24 時間のインキュベーションにおいて安定であった。しかし、キシラン分解物中に X1 が多く検出された。一方、StXyI-11 は至適温度 60 、至適 pH6.0-7.0 で、60 、24 時間のインキュベーションで 52%の活性を保持した。また、StXyI-11 のダルス由来キシラン加水分解物から X1 は検出されず、重合度 3-7 の XOS が多く検出された。

StXyI-10 及び StXyI-11 を用いたダルス由来 XOS の調製条件の検討

上記項目 で得られた StXyI-10 及び StXyI-11 の酵素化学的特性を踏まえ、ダルス由来キシランから効率良く XOS を調製する条件を検討した。その結果、最初に StXyI-10 により加水分解し、次いで StXyI-11 により加水分解する 2 段階の分解反応によって、 -(1,3/1,4)-XOS 高含有

(62.3%)の XOS を調製することができた(図2)。



the optimal condition

図 2. StXyI-10 及び StXyI-11 を用いたダルス由来 XOS の調製

X2: -(1,4)-キシロビオース

X3: -(1,4)-キシロトリオース

X4: -(1,4)-キシロテトラオース

DX3: - (1,3/1,4) - キシロトリオース

- (1,3/1,4) - キシロテトラオース DX4:

DX5: - (1,3/1,4) - キシロペンタオース

DX6: - (1,3/1,4) - キシロヘキサオース

DX7: - (1,3/1,4) - キシロヘプタオース

< 引用文献 >

Masako Okazaki, Shigeaki Fujikawa, Nobuya Matsumoto, Effect of xylooligosaccharide on the growth of Bifidobacteria、Bifidobacteria and Microflora、vol.9、1990、pp.77-86

Reiko Maeda、Tomoaki Ida、Hideshi Ihara、Tatsuji Sakamoto、Induction of apoptosis in MCF-7 cells by -1,3-xylooligosaccharides from *Caulerpa lentillifera*, Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, vol.76, 2012, 1032-1034

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件(うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件)

〔雑誌論文〕 計5件(うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件)	
1 . 著者名	4.巻
Yamamoto Yohei、Kishimura Hideki、Kinoshita Yasunori、Saburi Wataru、Kumagai Yuya、Yasui	82
Hajime、Ojima Takao 2 . 論文標題 Enzymatic production of xylooligosaccharides from red alga dulse (Palmaria sp.) wasted in	5.発行年 2019年
Japan 3.雑誌名 Process Biochemistry	6.最初と最後の頁 77-86
掲載論文のDOI(デジタルオブジェクト識別子)	査読の有無
10.1016/j.procbio.2019.03.030	有
オープンアクセス	国際共著
オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	
1.著者名	4.巻
岸村栄毅	²³
2 . 論文標題	5 . 発行年
北海道大学発バイオイノベーション -水産副次産物の有効利用-	2019年
3.雑誌名	6.最初と最後の頁
FOOD STYLE 21	28 - 29
掲載論文のDOI(デジタルオブジェクト識別子)	査読の有無
なし	無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著
1 . 著者名	4.巻
Kobayashi Manami、Kumagai Yuya、Yamamoto Yohei、Yasui Hajime、Kishimura Hideki	174
2 . 論文標題 Identification of a Key Enzyme for the Hydrolysis of -(1 3)-Xylosyl Linkage in Red Alga Dulse Xylooligosaccharide from Bifidobacterium Adolescentis	5 . 発行年 2020年
3.雑誌名	6.最初と最後の頁
Marine Drugs	1-13
掲載論文のDOI(デジタルオブジェクト識別子)	査読の有無
10.3390/md18030174	有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著
	Т. <u>ж</u>
1.著者名	4 . 巻
岸村栄毅、熊谷祐也	46
2.論文標題	5 . 発行年
紅藻ダルス由来キシロオリゴ糖のプレバイオティクスとしての可能性	2020年
3.雑誌名	6.最初と最後の頁
Medical Science Digest	416-417
掲載論文のDOI(デジタルオプジェクト識別子) なし	査読の有無無無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著

1 . 著者名	4.巻
Yuki Nishida、Yuya Kumagai、Shunta Michiba、Hajime Yasui、Hideki Kishimura	502
2.論文標題 Efficient extraction and antioxidant capacity of mycosporine-like amino acids from red alga dulse Palmaria palmata in Japan	5 . 発行年 2020年
3.雑誌名	6 . 最初と最後の頁
Marine Drugs	1-19
掲載論文のDOI(デジタルオブジェクト識別子)	査読の有無
10.3390/md18100502	有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著

〔学会発表〕 計8件(うち招待講演 1件/うち国際学会 1件)

1.発表者名

山本陽平、小林真奈美、熊谷祐也、山崎浩司、安井 肇、尾島孝男、岸村栄毅

2 . 発表標題

紅藻ダルス由来 -(1 3)/ -(1 4)-キシロトリオースのBifidobacterium属細菌選択増殖作用の検討

3 . 学会等名

平成31年度 日本水産学会春季大会

4 . 発表年 2019年

1.発表者名 岸村栄毅

2 . 発表標題

海藻の栄養・機能性成分(蛋白・多糖類)

3 . 学会等名

海藻活用シンポジウム(招待講演)

4 . 発表年

2019年

1.発表者名

小林真奈美・熊谷祐也・岸村栄毅

2 . 発表標題

Bifidobacterium adolescentisの -(1 3)/ -(1 4)-キシロトリオース分解機構に関する研究

3 . 学会等名

令和1年度 第5回 北海道大学部局横断シンポジウム

4.発表年

2019年

双王尹夕

Manami Kobayashi, Yuya Kumagai, Hideki Kishimura

2 . 発表標題

A search for -(1 3)/ -(1 4)-xylotriose degradation enzyme from Bifidobacterium adolescentis

3.学会等名

12th Joint International Symposium on Food Science and Technology among NUS, TUMSAT, HU, KU and ZGU, 1-2 December 2019, National University of Singapore (国際学会)

4.発表年

2019年

1.発表者名

栗田大輝、熊谷祐也、安井 肇、岸村栄毅

2 . 発表標題

紅藻ダルス由来キシランの簡易調製法の開発とその酵素分解物によるBifidobacteriumの増殖

3 . 学会等名

令和2年度 日本水産学会 北海道支部大会

4.発表年

2020年

1.発表者名

藤井勇樹、熊谷祐也、岸村栄毅、畑中唯史

2 . 発表標題

放線菌Streptomyces thermogriseusエンド型キシラナーゼを用いた紅藻ダルス -(1 3)/ -(1 4)-キシロオリゴ糖調製法の開発

3.学会等名

2020年度 日本農芸化学会北海道支部/日本栄養・食糧学会北海道支部 合同学術講演会

4.発表年

2020年

1.発表者名

小林真奈美、熊谷祐也、岸村栄毅

2.発表標題

Bifidobacterium adolescentisの (1 3)-キシロシル-キシロビオース分解機構の解明

3.学会等名

令和2年度 日本応用糖質科学会 北海道支部 支部賞授賞式・受賞公演およびシンポジウム

4. 発表年

2021年

	1.発表者名 藤井勇樹、熊谷祐也、岸村栄毅、畑中唯史				
	2 . 発表標題 紅藻ダルス由来 -(1 3)/ -(1 4)-キシロオリゴ糖調製法の開発およびエンド型キシラナーゼの基質特異性				
	3 . 学会等名 令和2年度 日本応用糖質科学会 北海道支部 支部賞授賞式・受賞公演およびシンポジウム				
I	4 . 発表年 2021年				
	〔図書〕 計0件				
	〔産業財産権〕				
	〔その他〕				
ホームページ等 https://shindofuji-nippon.com/?s=ダルス https://repun-app.fish.hokudai.ac.jp/course/view.php?id=94					
г	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		
	尾島 孝男	北海道大学・水産科学研究院・教授			
	研究分 (OJIMA Takao) 担者				
	(30160865)	(10101)			

相手方研究機関

7.科研費を使用して開催した国際研究集会

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

〔国際研究集会〕 計0件

共同研究相手国