

令和 6 年 6 月 13 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K02092

研究課題名(和文) 難消化性食品成分による0157志賀毒素の吸着除去

研究課題名(英文) Adsorption and removal of 0157 Shiga toxin by indigestible food ingredients

研究代表者

金丸 芳 (KANEMARU, Kaori)

徳島大学・大学院社会産業理工学研究部(生物資源産業学域)・教授

研究者番号：00243676

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：難消化性食品や難消化性成分について、志賀毒素産生性大腸菌0157産生志賀毒素(Stx)吸着能を検討した。その結果、スジアオノリ由来のラムナン硫酸、アラメ由来のフコイタン、キトサン(カニ由来)に顕著なStx吸着能を見出した。有効成分とStxの吸着により、腸管細胞CACO-2へのStx結合が阻止され、アポトーシス誘導を介する細胞死を回避していた。ラムナン硫酸やフコイタンの吸着能は構成糖比や高分子度に起因し、アミノ基を有するキトサンの吸着能は高分子度に起因するが、アミノ基の数もその吸着能に大きく関与すると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究において吸着能を見出した難消化性食品は、常食摂取に対応する濃度範囲で吸着能を示しているため、安全かつ安価な吸着除去が期待できる。吸着能を有する食品の常食摂取による感染予防、有用な吸着能を有する加工食品の開発、吸着除去剤への応用開発などに繋がると考える。その結果、感染予防や病態改善が期待できると考える。

研究成果の概要(英文)：The adsorption capacities of non-digestible foods and non-digestible ingredients for Shiga toxin (Stx) produced by Shiga toxin-producing *Escherichia coli* 0157 were investigated. As a result, we found that rhamnan sulfate from *Sujiaonori* (*Ulva prolifera*), fucoidan from *arame* (*Eisenia bicyclis*), and chitosan (from crab) had remarkable Stx adsorption capacity. The adsorption of active ingredients and Stx prevented Stx binding to intestinal cell CACO-2, thus avoiding apoptosis-induced cell death. The adsorption capacities of rhamnan sulfate and fucoidan were attributed to the ratio of constituent sugars and the degree of high molecular weight, while the adsorption capacity of chitosan with amino groups was attributed to the degree of high molecular weight, and the number of amino groups may also play a significant role in their adsorption capacity.

研究分野：食品衛生学

キーワード：志賀毒素 吸着 難消化性成分 0157

1. 研究開始当初の背景

志賀毒素産生性大腸菌(Shiga toxin-producing *Escherichia coli*; STEC) O157:H7 は志賀毒素(Stx)を産生し、溶血性尿毒症症候群(HUS)を併発して致死もあり得る。Stx は B-subunit が細胞の Gb3 受容体に結合し A-subunit が細胞内に侵入し毒性を示す。抗菌剤は菌体内の Stx が放出され重篤化もある。そのため Stx が細胞内に侵入する前に吸着し体外に除去する「吸着除去剤」が有効と考えている。しかし、Stx は構造上クラスター化するため、そのクラスターに対応する吸着材が必要となり、高分子の吸着材の合成が検討されていた。当初は食品成分による吸着はほとんど検討されていない状況であった。Stx を食品由来の難消化性成分により吸着除去できれば、感染予防、病態改善が期待できる。しかし Stx 吸着が可能な食品は我々が報告した納豆のポリグルタミン酸(PGA)とウスバアオノリのラムナン硫酸以外にはあまり見出されていなかった。我々は食品由来の難消化性成分が Stx を吸着して細胞への結合を阻止すれば感染予防や病態改善が期待できると考えている。そこで Stx を吸着する食品成分をさらに探索することが必要と考え、本研究に着手した。

2. 研究の目的

吸着能を有する難消化性成分が多数見出されることにより、吸着除去剤の有用化のみならず、常食による感染予防や有用な機能性食品の開発に繋がると考える。本研究は Stx を吸着除去する難消化性食品成分を見出し、吸着能を明らかにすることを目的とする。PGA やラムナン硫酸の吸着能に加え、他の多様な食品群から志賀毒素吸着能を有する食品を検索する。吸着能を有する食品の有効成分の単離同定解析を行い、結腸細胞モデルを用いて吸着と細胞毒性への軽減の関係性を検討し、機能解析を行う。吸着能を有する食品やその有効成分により、安全かつ安価な吸着除去が期待できる。

3. 研究の方法

(1) Stx の分離・調整

Escherichia coli O157:H7 sakai を LB 培地で 37°C・20 時間振盪培養した菌体および培養液から Stx (10 mM phosphate buffer (pH 7.4) + 0.5% BSA) を調整した。ポリグルタミン酸(PGA)、グルタミン酸、グルタル酸を各々固定化した Sepharose を調整しカラムとした。カラムにより 0.85% NaCl を含むリン酸緩衝液で Stx1, Stx2 の分離・精製を行い、3 種の成分のうち Stx1, 2 の分離に適しているかを検討した。

(2) 難消化性食品成分を含む食品群の Stx 吸着能の検索

高い吸着能を示す食品抽出液、食品由来成分を検索するために、食品として黒ニンジン(皮むき)、ニンジン(皮むき)、オクラ、長いも、レンコン、ラディッシュ、キャベツ、レタス、もやし、小松菜、のり、海藻類(ワカメ、アラメ、ヒジキ、コンブ、スジアオノリ、ミリンソウ)を、食品由来成分としてグアーガム、 α -シクロデキストリン、ラミナラン、フコイダン、キトサン、コンドロイチン硫酸 C ナトリウム、リグニン、イヌリン、キシラン、カラギーナン、アラビアゴム、ペクチン、アルギン酸を検討した。これらを粉体に調整して 20 倍容の水を加え、オートクレーブ(121°C, 15 分)にて抽出液を調整し(5%抽出液)、Stx 吸着活性をみた。

Stx の吸着活性測定は、食品やその成分の水溶液と Stx 溶液を混和し、限外濾過後に結合した Stx と結合しない Stx を免疫学的に定量し、吸着能をみた。すなわち、5%抽出液と Stx 溶液(256 ng/mL in 10 mM phosphate buffer (pH 7.4) + 0.5% BSA)を 1 : 1 で 15 分混和したのち限外濾過(100kDa, 12000×g, 20 分)により吸着 Stx と非吸着 Stx に分離した。分離した Stx の力価を逆受身ラテックス法(VTEC-RPLA, デンカ生研)で測定し、吸着率を算出した。

(3) 吸着活性成分の分離・同定

吸着能を示す食品抽出物については EtOH や MgCl₂ による沈殿、次いで TOYOPEARL DEAE 650M イオン交換カラムクロマトによる分画によって活性成分を得た。活性成分について、GC-MS で糖組成の分析、ロジズン酸法で硫酸基測定、SEC(GFC)カラムを用いた HPLC で分子量測定を行った。

(4) Stx 吸着による CACO-2 に対する Stx 毒性軽減

CACO-2 腸管細胞は 20%FBS-MEM 培地で 37°C・CO₂ 5%で 4 日間培養して 5×10⁴ cells/mL に調整した。活性成分と Stx 存在下で培養したのち、細胞の生死を Cell Counting Kit-8 (同仁化学)で測定し、細胞の生存率によって、活性成分が毒性軽減を示すかを検討した。さらに、アポトーシス誘導を Annexin-V 染色、Cell cycle を PI 染色にて測定した。活性成分が Stx 吸着す

ることによる CACO-2 に対する Stx 毒性軽減も検討した。

4. 研究成果

(1) Stx の調整方法の確立

PGA-, Glutarate- Sepharose は Stx1 を吸着せず, Stx2 を吸着し, 吸着した Stx2 は 0.5 M NaCl で溶出された。一方, Glutamate-Sepharose は Stx1 も吸着する確率が高く, 分離には適していないと判明した。さらに Glutarate-Sepharose の方が PGA-Sepharose より Stx1 非吸着と Stx2 の吸着の差が大きく, 分離能が良かった。よって Glutarate-Sepharose カラムは Stx1・2 の分離が可能であり, 最も適していると考えた。今後の研究で O157 培養から Glutarate-Sepharose による Stx の調整までを一貫して行うことが可能となった。Stx は 256 ng/mL (10 mM phosphate buffer, pH 7.4 + 0.5% BSA) に調整して用いた。

(2) 海藻による吸着能

スジアオノリ, ワカメ, アラメ, ヒジキ, コンブ, ミリンソウのうち, スジアオノリ, アラメが顕著な吸着能を示した。

① スジアオノリ

スジアオノリ抽出液は Stx1 を 94%, Stx2 を 100% 吸着し, 最も顕著な吸着活性を示した。スジアオノリの活性成分は, 糖組成は Rhamnose が最も多く, Xylose, Glucose, Galactose, Glucuronic acid を含有しており, 硫酸基含有量 7%, 平均分子量 30,000 のラムナン硫酸であると示唆された。スジアオノリ由来ラムナン硫酸(UpR) 1 mg は Stx1 を 99%, Stx2 を 98% 吸着し顕著な活性を示した。UpR 100 µg は Stx と同時添加すると, Stx1, 2 共に生細胞率を 20% ほど上昇させ, 吸着による毒性軽減が示唆された。また, UpR の吸着は硫酸基含有の違いによる差はあまり影響しなかった。むしろ, 構成糖や分子量の違いによる吸着能の差異が示唆された。

② アラメ

アラメ抽出液は Stx1 を 100%, Stx2 を 82.5% 吸着し, Stx1, 2 双方に顕著な活性を示した。その活性成分は, 糖組成は Fucose が最も高く, 次いで Mannose, Galactose, さらに Glucuronic acid, Xylose, Glucose も含有しており, 硫酸基含有量 35.5%, 平均分子量 25,000 のフコイダンと示唆された。アラメ由来フコイダン(EbF, 1 mg)は Stx 1, 2 双方の 75% を吸着し顕著な活性を示した。EbF 100 µg は Stx と同時添加すると, Stx1 生細胞率を 20%, Stx2 を 80% ほど上昇させ, 吸着による毒性軽減が示唆された。フコイダンは硫酸基含有によって吸着能の差異がみられた。

(3) 野菜による吸着能

野菜のうち, オクラ, レンコン, 長いものが顕著な吸着能を示した。特に, オクラ抽出液は Stx1 を 100%, Stx2 を 87.5% 吸着した。今回, その有効成分の解析は行ってはいないが, オクラのぬめりには, ガラクタン, アラバン, ペクチンなどが挙げられるため, これらの成分の関与が考えられる。

(4) 食品由来成分による吸着能

検討した食品由来成分のうち, キトサン(カニ由来)とグアーガムに顕著な Stx 吸着能が認められた。そこで, キトサンについてさらに検討した。

キトサンは, 分子量測定の結果, 平均分子量 90,000, 370,000, 800,000, 920,000 の 4 種について検討した。各々 100 µg/mL で Stx1, 2 共に顕著な吸着を示した。特に, 分子量 920,000 と最も高分子であるキトサン, 分子量は 90000 と最も小さいがグルコサミン量が多いキトサン, この双方に顕著な吸着能がみられた。またアミノ基は持たないがカルボキシメチル基(-CH₂-COOH)をもつカルボキシメチルセルロース(CMC)では Stx1 を 50%, Stx2 を 82.5% 吸着とキトサンほどではないが吸着能を示した。アミノ基もカルボキシル基も持たない微結晶セルロース Avicel は Stx1, 2 双方とも吸着しなかった。さらにキトサンは加水分解することで吸着能が無くなった。これらを総合すると, キトサンは高分子であることに加え, グルコサミン(アミノ基)の比率が吸着に影響していることと示唆された。キトサン(100 ng)は Stx 1 との吸着により細胞生存率 30%, Stx2 との吸着により細胞生存率 20% 上昇し, 毒性軽減がみられた。

また, 今回, ラムナン硫酸, フコイダン, キトサンは pH6~7, 15°C~25°C で最も吸着活性を示していた。

(5) 有効成分のアポトーシス細胞死への影響

Stx1, 2 は, 双方とも CACO-2 のアポトーシスを誘導し, 特に Stx2 の方がアポトーシス誘導率は高い。有効成分であるラムナン硫酸, フコイダン, キトサンが吸着することで CACO-2 細胞のアポトーシス誘導率を抑制していた。有効成分による Stx 吸着はアポトーシス誘導の抑制を介して細胞死を回避していることが示唆された。

(6) 吸着による細胞結合性への影響

有効成分(ラムナン硫酸, フコイダン, キトサン)と Stx が吸着したものを CACO-2 細胞モデルに接触させ, 一定時間後に培地中の遊離 Stx 量(有効成分は吸着)は減少していなかった。このことより細胞への結合は阻止されていると考えられた。

難消化性食品や難消化性成分について, 志賀毒素産生性大腸菌 O157 産生志賀毒素(Stx)吸着能を検討した。その結果, スジアオノリ由来のラムナン硫酸, アラメ由来のフコイダン, キトサン(カニ由来)に顕著な Stx 吸着能を見出した。有効成分と Stx の吸着により, 腸管細胞 CACO-2 への Stx 結合が阻止され, アポトーシス誘導を介する細胞死を回避していた。ラムナン硫酸やフコイダンの吸着能は構成糖比や高分子度に起因し, アミノ基を有するキトサンの吸着能は高分子度に起因するが, アミノ基の数もその吸着能に大きく関与すると考えられる。

本研究において吸着能を見出した難消化性食品は, 常食摂取に対応する濃度範囲で吸着能を示しているため, 安全かつ安価な吸着除去が期待できる。吸着能を有する食品の常食摂取による感染予防, 有用な吸着能を有する加工食品の開発, 吸着除去剤への応用開発などに繋がると考える。その結果, 感染予防や病態改善が期待できると考える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3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 0件）

1. 著者名 Ali Hanif, Morito Katsuya, Hasi Rumana Yesmin, Aihara Mutsumi, Hayashi Junji, Kawakami Ryushi, Kanemaru Kaori, Tsuchiya Koichiro, Sango Kazunori, Tanaka Tamotsu	4. 巻 1867
2. 論文標題 Characterization of uptake and metabolism of very long-chain fatty acids in peroxisome-deficient CHO cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids	6. 最初と最後の頁 159088 ~ 159088
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbalip.2021.159088	査読の有無 有
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 Hasi Rumana Yesmin, Ishikawa Toshiki, Sunagawa Keigo, Takai Yoshimichi, Ali Hanif, Hayashi Junji, Kawakami Ryushi, Yuasa Keizo, Aihara Mutsumi, Kanemaru Kaori, Imai Hiroyuki, Tanaka Tamotsu	4. 巻 596
2. 論文標題 Nonspecific phospholipase C3 of radish has phospholipase D activity towards glycosylinositol phosphoceramide	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 FEBS Letters	6. 最初と最後の頁 3024 ~ 3036
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/1873-3468.14520	査読の有無 有
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 Sasaki Chizuru, Tamura Satoshi, Suzuki Miyuki, Etomi Kanako, Nii Nobuya, Hayashi Junji, Kanemaru Kaori	4. 巻 14
2. 論文標題 Continuous microwave-assisted step-by-step extraction of bioactive water-soluble materials and fucoidan from brown seaweed Undaria pinnatifida waste	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Biomass Conversion and Biorefinery	6. 最初と最後の頁 7673 ~ 7682
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s13399-022-03035-6	査読の有無 有
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 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Hanif Ali, Katsuya Morito, Rumana Yesmin Hasi, Mutsumi Aihara, Junji Hayashi, Ryushi Kawakami, Kaori Kanemaru, Koichiro Tsuchiya and Tamotsu Tanaka
2. 発表標題 Uptake and metabolism of very-long-chain fatty acid in animal cells
3. 学会等名 第63回日本脂質生化学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高橋 啓子, 三木 章江, 宇野 美和子, 川端 紗也花, 後藤 月江, 長尾 久美子, 松下 純子, 近藤 美樹, 坂井 真奈美, 金丸 芳
2. 発表標題 徳島県の家庭料理行事食の特徴 -ひな祭りの楽しい思い出-遊山箱-
3. 学会等名 日本調理科学会2021年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Rumana Yesmin Hasi, Naohiro Imura, Toshiki Ishikawa, Hiroyuki Imai, Yoshimichi Takai, Hanif Ali, Mutsumi Aihara, Junji Hayashi, Ryushi Kawakami, Kaori Kanemaru and Tamotsu Tanaka
2. 発表標題 Production of phytoceramide 1- phosphate and inositol glycan by glycosylinositol phosphoceramide specific phospholipase D activity in plants
3. 学会等名 第62回日本生化学 中国・四国支部例会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 三木 章江, 高橋 啓子, 後藤 月江, 川端 紗也花, 長尾 久美子, 松下 純子, 坂井 真奈美, 近藤 美樹, 金丸 芳
2. 発表標題 徳島県の家庭料理 地域の特徴 -地域で親しまれてきた料理-
3. 学会等名 日本調理科学会2022年度大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐々木 千鶴, 新居 美香, 林 順司, 金丸 芳
2. 発表標題 ワカメ非可食部の資源化を目的とした連続水熱処理による有用物質生産法の開発
3. 学会等名 日本食品工学会2022年度大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山下 晶央, 山崎 義輝, 佐々木 千鶴, 林 順司, 川上 竜巳, 金丸 芳
2. 発表標題 アラメ(<i>Eisenia bicyclis</i>)によるEHEC 0157 産生志賀毒素吸着
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度中四国支部大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山崎 義輝, 山下 晶央, 佐々木 千鶴, 林 順司, 川上 竜巳, 金丸 芳
2. 発表標題 鳴門産スジアオノリ(<i>Ulva prolifera</i>)の志賀毒素吸着活性
3. 学会等名 日本農芸化学会中四国支部第64回講演会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 林 順司, 川上竜巳, 平田 章, 金丸 芳, 大島敏久, 櫻庭春彦
2. 発表標題 超好熱アーキア由来FAD依存性D-乳酸脱水素酵素のX線結晶構造解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2023年度中四国・西日本支部合同大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 山田萌加, 林順司, 川上竜巳, 金丸芳, 大島敏久, 櫻庭春彦
2. 発表標題 新規二機能型融合酵素ジアミノピメリン酸脱炭酸酵素/アスパラギン酸キナーゼに関する研究
3. 学会等名 日本農芸化学会中四国支部第67回講演会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 伊澤命吹, 林順司, 川上竜巳, 金丸芳, 大島敏久, 櫻庭春彦
2. 発表標題 ピロリン-5-カルボン酸レダクターゼの触媒機構の解明
3. 学会等名 日本農芸化学会中四国支部第67回講演会
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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

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