

令和 6 年 6 月 19 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05437

研究課題名(和文)植物由来乳酸菌が産生するイソフラボン配糖体特異的糖質分解酵素の解析

研究課題名(英文) Analysis of isoflavone glycoside-specific glucosidase produced by plant-derived lactic acid bacteria

研究代表者

城 斗志夫 (JOH, Toshio)

新潟大学・自然科学系・教授

研究者番号：00251794

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではイソフラボン配糖体分解能が異なる乳酸菌株を用い、 β -グルコシダーゼの解析を通して配糖体分解能の違いの要因の解明を試みた。合成基質とイソフラボン配糖体であるダイジンの2種類の基質を用い菌体の酵素活性を測定したところ、低分解能株は合成基質にしか活性を示さなかったが、高分解能株はダイジンに対しても活性を示し、高分解能株には配糖体特異的酵素が存在することを明らかにした。また、複数の高分解能株について酵素の局在性を調べた結果、配糖体非特異的酵素と配糖体特異的酵素はともに細胞壁に存在し、非特異的酵素は細胞壁に強固に結合しているが、特異的酵素は緩やかにしか結合していないことがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

大豆中のイソフラボンの大部分は吸収されにくい配糖体として存在し、吸収率の向上には一部の腸内細菌が産生する β -グルコシダーゼによる配糖体からの糖の分解が不可欠である。本研究においていくつかの乳酸菌株の β -グルコシダーゼを調べたところ、イソフラボン配糖体の分解能の違いによらず一定の酵素活性を示すが、高いイソフラボン配糖体分解能を持つ乳酸菌株だけが配糖体特異的分解酵素を持つことを明らかにした。この知見は大豆イソフラボンの吸収効能を高める乳酸菌発酵食品の開発につながり、人々の健康増進に大きな貢献が期待できる成果である。

研究成果の概要(英文)：In this study, we used lactic acid bacteria strains with different isoflavone glycoside decomposition abilities and attempted to elucidate the reasons for the differences in glycoside decomposition abilities through analysis of β -glucosidase. When the enzyme activity of bacterial cells was measured using two types of substrates: a synthetic substrate and daidzin, an isoflavone glycoside, the low-decomposition strain showed activity only against the synthetic substrate, but the high-decomposition strain showed activity against daidzin. The results showed that the high-decomposition strain contained a isoflavone glycoside-specific enzyme. In addition, when examining the localization of enzymes in the two high-decomposition strains, it was found that both glycoside non-specific enzymes and glycoside-specific enzymes were present in the cell wall, and the non-specific enzyme was tightly bound to the cell wall. However, specific enzymes were found to be only loosely bound.

研究分野：食品科学

キーワード：イソフラボン 乳酸菌 β -グルコシダーゼ

1. 研究開始当初の背景

イソフラボンは女性ホルモンであるエストロゲンに類似した構造を持ち、弱い女性ホルモン様作用を示す。このため大豆イソフラボンの摂取は、性ホルモンが発症に関係する前立腺ガンや乳ガンの予防、女性ホルモンの分泌量の減少に起因する骨粗鬆症や更年期障害の予防および症状の緩和などに有効と考えられている。

大豆中のイソフラボンはアグリコンに糖が結合した配糖体として存在し、そのままでは吸収されにくい。効率の良い吸収には糖が分解されアグリコンになる必要があるが、ヒトはイソフラボン配糖体に作用する消化酵素を持たず、その分解は腸内細菌が産生するβ-グルコシダーゼに依存している。しかし、腸内細菌叢には個人差があるため、イソフラボンの吸収率はヒトにより異なり一般に15%程度と低い。また、ある種の腸内細菌はアグリコンの一種、ダイゼインを女性ホルモン様作用が10~100倍強いエクオールに代謝する。その作用の強さから、最近では摂取した大豆イソフラボンの女性ホルモン様作用は、アグリコンそのものによるものではなく、代謝産物であるエクオールの働きと考えられている。よって、大豆イソフラボンを吸収可能な形に変え、さらにエクオールへの代謝を促進させるには、配糖体の効率の良いアグリコン化が不可欠であり、この反応に関わるβ-グルコシダーゼの分解能を高める必要がある。しかし、アグリコン化やエクオールを生成する微生物の研究は多いが、それら微生物が産生する酵素の解析に関する研究は少なく、本研究ではこの点に焦点を当て取り組む。

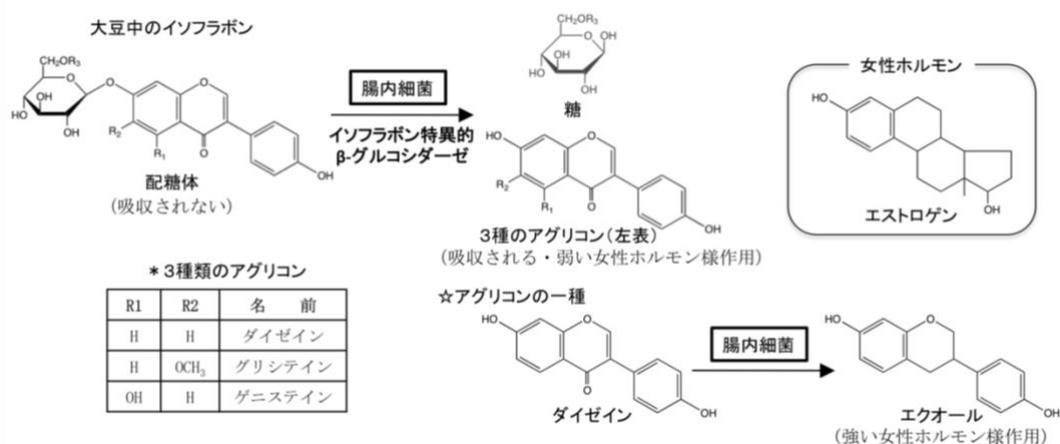


図1 大豆イソフラボンの腸内細菌による代謝

2. 研究の目的

本研究の目的は、申請者が植物性食材から単離したイソフラボン配糖体分解能が異なる乳酸菌株を用い、菌が産生するβ-グルコシダーゼの解析を通して配糖体分解能の高さの要因を解明することである。

3. 研究の方法

1) 菌体のβ-グルコシダーゼ活性測定

本研究では当研究室で各種植物性食材から単離したイソフラボン配糖体分解能が異なる乳酸菌9菌株を用いた(表1)。各菌株はMRS培地で前培養後、除タンパク質豆乳培地(*参照)で30℃、48時間培養した。培養物を遠心分離することで集菌し、菌体を一定濃度になるよう10 mM McIlvaine氏緩衝液(pH 5.4)に懸濁することで菌体懸濁液を調製した。

β-グルコシダーゼの活性は、イソフラボン配糖体であるダイゼインを基質に用いたHPLC法、合成基質であるp-ニトロフェニルβ-D-グルコピラノシド(β-pNPG)を基質に用いた吸光度法の2つの方法で測定し、前者をイソフラボン配糖体特異的酵素の活性、後者を非特異的酵素の活性として評価した。

*除タンパク質豆乳培地: 乳酸菌を豆乳で培養すると、産生する酸により豆乳のタンパク質が変性凝固するためβ-グルコシダーゼ活性を持つ菌体を豆乳発酵物から取り出すことができない。そこで本研究では、豆乳を酸処理することで沈殿するタンパク質を遠心分離により除去後、pHを6.5に調整した培地を用いた。

表1 本研究で使用了した乳酸菌株

配糖体分解能	菌株名	属種
高分解株	So1	<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>
	KM3	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
	Pru1	<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>
中分解株	Mi	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
	NAR4	<i>Weisella confusa</i>
	HKM5	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
低分解株	Ret5	<i>Lactococcus lactis</i>
	Sugy6-4	<i>Leuconostoc lactis</i>
	Seiji5-1	<i>Leuconostoc citreum</i>

2) β -グルコシダーゼの局在性と基質特異性

調製した菌体懸濁液を冷却しながら超音波破砕機で破砕した。破砕液を冷却遠心機（日立 CR21G、ローターRPR20-2）で 16,000 rpm、30 分間、4°C で遠心分離し、得られた上清を細胞内画分 1 とした。沈澱を 10 mM McIlvaine 氏緩衝液 (pH 5.4) に懸濁し、再び遠心分離し、得られた上清を細胞内画分 2 とした。この操作をもう一度繰り返して細胞内画分 3 を調製し、沈澱を緩衝液に懸濁し、細胞壁画分とした。これらの画分を酵素液として 2 種類の基質、ダイジンと β -pNPG を用いて酵素活性を測定した。

4. 研究成果

1) 菌体の β -グルコシダーゼ活性測定 (図 2)

合成基質である β -pNPG とイソフラボン配糖体であるダイジンの 2 種類の基質を用い菌体の酵素活性を測定した。 β -pNPG に対する活性は中分解能株である NAR4 で最も高く、次いで高分解能株 So1、中分解能株 Mi の順であり、分解能との相関はみられなかった。一方、ダイジンに対する活性は、高分解能株である KM3、So1、Pru1、次いで中分解能株である HKM5、Mi、NAR4 の順で高く、低分解能株の 3 株はダイジンに対しほとんど活性を示さなかった。このようにダイジンに対する活性は、分解能と非常に良く一致していた。これらの結果から、 β -pNPG に対して作用する β -グルコシダーゼと、イソフラボン配糖体に対して作用する β -グルコシダーゼが別々に存在し、各株の分解能はダイジンに対して作用する酵素の活性により決まることが示された。

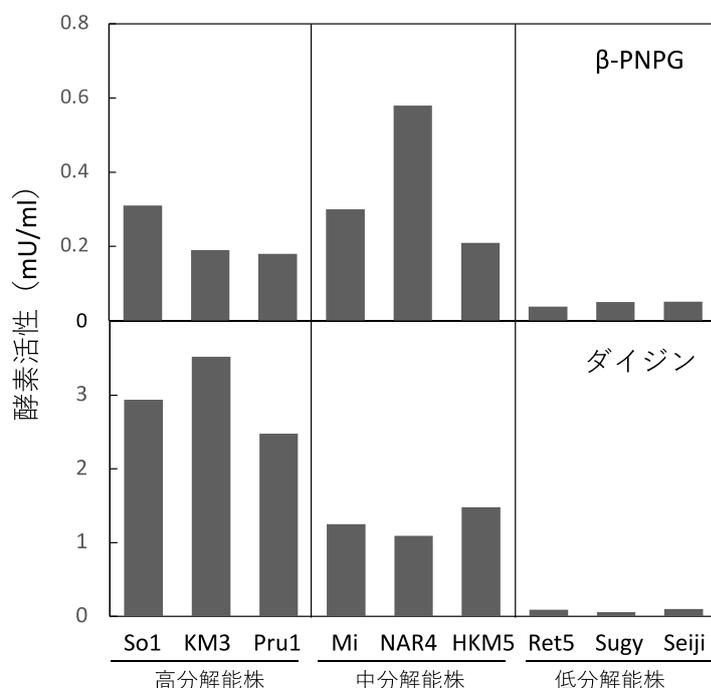


図2 各菌の β -pNPGとダイジンに対する酵素活性

2) β -グルコシダーゼの局在性と基質特異性 (図3)

Leuconostoc mesenteroides KM3 と *Leuconostoc pseudomesenteroides* So1 の2株の高分解能株を用い、 β -グルコシダーゼの局在性と基質特異性を調べた。その結果、 β -pNPG を基質に用いた場合、いずれの株でも細胞壁画分で活性が見られたが、細胞内画分では全く活性を示さなかった。一方、ダイジンを基質に用いた場合、細胞壁画分は全く活性を示さなかったが、細胞内画分1~3の全てで活性が見られた。また、その活性は細胞壁の洗浄を繰り返すたびに高くなり、いずれの株でも細胞内画分3で最も高い活性を示した。本結果は、KM3とSo1のいずれの株も、配糖体非特異的酵素と配糖体特異的酵素が細胞壁に存在し、配糖体非特異的酵素は細胞壁に強固に結合しているが、特異的酵素は緩やかに結合していることを示唆している。

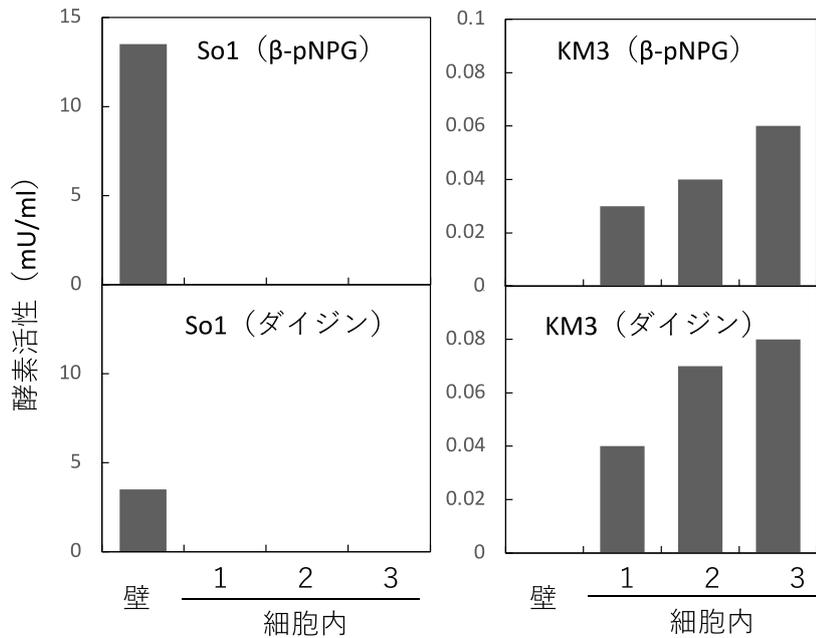


図3 So1とKM3における β -グルコシダーゼの局在性

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------