

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：34509

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26850085

研究課題名(和文)ポリフェノールによるビフィズス菌の機能性増強に関する分子機序の解明

研究課題名(英文) Enhancement of health functions of bifidobacteria by polyphenols and its underlying molecular mechanisms

研究代表者

川畑 球一 (Kawabata, Kyuichi)

神戸学院大学・栄養学部・講師

研究者番号：60452645

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：ポリフェノールによるビフィズス菌の抗炎症活性増強メカニズムを解明するため、変動する菌体タンパク質をプロテオーム解析することを目的とした。ケルセチン応答性の異なるビフィズス菌2株を用いて二次元電気泳動を行い、スポットを解析した結果、統計的に有意に異なる6つのスポットを見出した。さらにMascot解析により、これらのタンパク質を推定した。また、ケルセチン応答性を示す菌株におけるケルセチンの菌体膜会合性は、応答性を示さない菌株の約10倍高いことが明らかとなり、ケルセチンは膜タンパク質に影響を及ぼしている可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We performed the proteomic analysis to investigate an action mechanism of polyphenol for enhancing the anti-inflammatory activity of bifidobacteria. *Bifidobacterium adolescentis* JCM1275 and JCM1251, which are sensitive and insensitive strains to quercetin, respectively, were treated with quercetin for 3h under the anaerobic condition. Proteins extracted from these bacteria were separated by 2D electrophoresis (isoelectric focusing and SDS-PAGE). Gel image analysis showed six spots with statistically significant differences, suggesting that these spots may be a protein associated with the quercetin-enhanced anti-inflammatory activity of bifidobacteria. Additionally, the binding level of quercetin to the outer membrane of JCM1275 strain was 10-fold higher than that of JCM1251 strain, indicating that quercetin may affect a membrane protein of bifidobacteria to induce the anti-inflammatory activity.

研究分野：食品微生物学

キーワード：ビフィズス菌 ポリフェノール 抗炎症作用 機能的相互作用 プロテオミクス

1. 研究開始当初の背景

これまでの研究で、ビフィズス菌 (*Bifidobacterium adolescentis*) の抗炎症活性をケルセチンが増強することを見出し、*B. adolescentis* が抗炎症活性成分を産生していることも確認してきた。しかし、抗炎症活性成分およびその産生にかかわる分子機序は不明であった。

2. 研究の目的

本研究では、ケルセチン処理した *B. adolescentis* のタンパク質について変動が見られるタンパク質をプロテオミクスにより解析および同定し、*B. adolescentis* の抗炎症活性における関連性およびケルセチンの分子機序を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

B. adolescentis JCM1275 株および 1251 株は理研バイオリソースセンターより購入した。*B. adolescentis* とケルセチンを DMEM に添加し、3 時間嫌気条件下で培養したのち、遠心操作によって菌体ペレットを回収した。これを lysis buffer (7M 尿素、2M チオ尿素、4% CHAPS、10mM Tris、pH8) に懸濁し、超音波処理後、遠心して上清を菌体タンパク質抽出物として回収した。菌体タンパク質は各種精製法 (クリーンアップキット、TCA アセトン沈殿および限外ろ過フィルター) により精製し、等電点電気泳動 (pH3-8) および SDS-PAGE (5-20%) により分離した。染色後、PDQuest Advanced (BioRad) によりスポット解析し、有意に変動のあったスポットは切り出して LCMS および Mascot 解析によりタンパク質を同定した。レドックスサイクル法は Paz ら (J. Biol. Chem., 266(2):689-92, 1991) に倣い、反応液を pH12 に変更して行った。

4. 研究成果

(1) タンパク質抽出および電気泳動の条件最適化

まず、*B. adolescentis* のタンパク質抽出について、超音波の強度および処理時間を変えて検討し、効率が最も良い条件を見出した。そして、ビフィズス菌のプロテオーム解析に関する論文を参考に菌体タンパク質の二次元電気泳動を行ったところ、バックグラウンドにスメアが現れたためスポットの解析に影響が見られた。そこで、抽出したタンパク質の精製法を比較検討し、限外ろ過フィルターを用いることでスメアを除去することに成功した (図 1)。

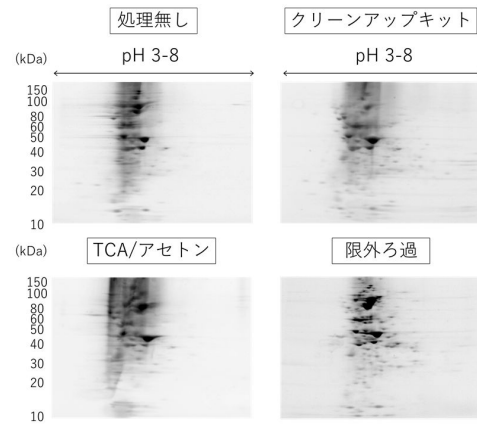


図 1 菌体タンパク質の精製法の比較結果
菌体タンパク質を各種精製法に供したのち、同量のタンパク質を用いて二次元電気泳動を行った。

(2) ケルセチンによって変動する菌体タンパク質の同定

B. adolescentis JCM1275 株はケルセチンによって抗炎症活性が増強するが、1251 株は増強が見られないことをすでに確認している。そこで、これらの菌株を比較することにより、ケルセチン処理によって変動し、*B. adolescentis* の抗炎症活性にかかわる菌体タンパク質の同定を目指した。両菌株を DMSO もしくはケルセチン存在下で 3 時間嫌気培養し、菌体タンパク質を抽出して二次元電気泳動に供した。画像解析の結果、6 つのスポットが統計的に有意に変動していた (図 2 および 3)。スポット 1 は両株に発現しており、ケルセチン処理で減少した。スポット 2 および 3 は 1275 株に多く存在し、スポット 2 のみがケルセチン処理で増加した。スポット 4 および 6 は両株で発現しており、1275 株でのみケルセチン処理で増加した。スポット 5 は 1251 株で多く発現しており、ケルセチン処理で減少した。これらの結果から、1251 株はケルセチンに対して感受性があるものの、抗炎症活性にかかわるタンパク質群に欠損などがあると推察された。そして、そのような可能性のあるスポットは 2、3、4 および 6 であり、Mascot 解析の結果、それぞれ aldo-keto reductase、GMP synthase、acetate kinase および keto-acid reductoisomerase であることが示唆された。

ケルセチンと同様の作用を示すポリフェノールとして、EGCg、タキシフォリンおよびフロレチンをこれまでに見出している。そこでこれらの菌体タンパク質への影響についてもプロテオーム解析したが、変動したスポットはほとんど見られず、ケルセチンとの共通性もなかったことから、これらのポリフェノールは異なる分子機序で作用している可能性が示唆された。

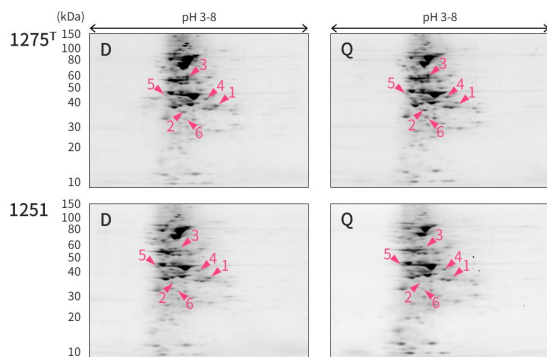


図2 二次元電気泳動の結果
B. adolescentis 1275株および1251株について、DMSOもしくはケルセチンとともに3時間嫌気培養し、抽出したタンパク質を用いて二次元電気泳動を行った。

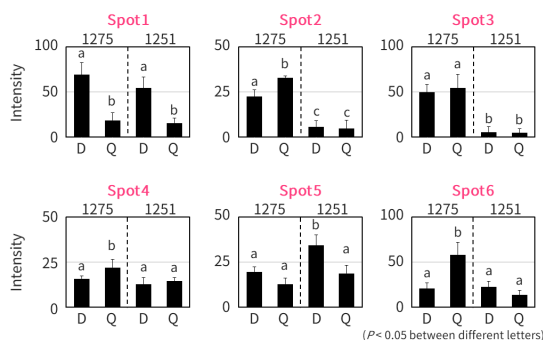


図2 変動スポットの解析結果
 二次元電気泳動のゲルを画像解析し、統計的に有意であったスポットを抽出した。

(3) ケルセチンの菌体膜会合性の検討

プロテオーム解析の結果から、ケルセチンは、菌体膜に存在するタンパク質に作用して抗炎症活性を誘導している可能性が考えられた。そこで、まず、ケルセチンの菌体膜会合性についてレドックスサイクル法により定量的に解析した。その結果、ケルセチンは菌体膜に会合しており、その会合性は1275株に対して1251株の10倍高いことが確認できた。

これらの結果より、ケルセチンは、*B. adolescentis*の菌体タンパク質に影響を及ぼすことが明らかとなり、これが*B. adolescentis*の抗炎症活性発現に繋がる可能性が強く示唆された。さらに、ケルセチンは菌体膜会合性を有していたことから、膜タンパク質に作用している可能性も示唆された。

ポリフェノールと腸内フローラの相互作用に関する研究において、そのほとんどはポリフェノール代謝物に注目しており、菌体に生じる影響を解析した報告は見られない。したがって、本研究成果は非常に新規性が高く、ポリフェノールや腸内フローラの機能性研究の発展に繋がるものと考えられる。本研究成果は、基礎研究としてだけでなく、健康効果を引き出す食事と腸内フローラの組合せやプロバイオティクスの高機能化などにも

将来的に応用できると期待される。

今後は、ケルセチンによって変動した菌体タンパク質の機能解析、ポリフェノールが結合する*B. adolescentis*の膜タンパク質に着目した分子機序のさらなる解明および *ex vivo* や *in vivo* におけるポリフェノールとビフィズス菌の機能的相互作用の解析に取り組む予定である。

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 2 件)

(1) Kawabata K. (corresponding author), Kato Y., Baba N., Hagiwara K., Tamura A., Baba S., Natsume M., Ohigashi H., Effects of phytochemicals on *in vitro* anti-inflammatory activity of *Bifidobacterium adolescentis*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 79(5):799-807, 2015, <http://dx.doi.org/10.1080/09168451.2015.1006566> 査読有り

(2) Kawabata K. (corresponding author), Mukai R., Ishisaka A., Quercetin and related polyphenols: new insights and implications for their bioactivity and bioavailability. *Food & Function*, 6(5):1399-417, 2015, <https://dx.doi.org/10.1039/C4F001178C> 査読有り

〔学会発表〕(計 6 件)

(1) 萩原光太、馬場信行、田村明、馬場星吾、夏目みどり、川畑球一 『*Bifidobacterium adolescentis*の株間における抗炎症活性およびケルセチン応答性の比較解析』 第19回日本フードファクター学会学術集会、鹿児島、2014年11月8日

(2) Kawabata K., Hagiwara K., Baba N., Tamura A., Natsume M., Comparison and proteomic analysis of anti-inflammatory activity and quercetin responsibility among strains of *Bifidobacterium adolescentis*. International Conference on Polyphenols and Health, Tours, France, 29 October, 2015

(3) 川畑球一、萩原光太、馬場信行、村上茂、田村明、馬場星吾、夏目みどり、石井剛志 『ビフィズス菌のポリフェノール応答性および機能的変化に関するプロテオーム解析』 日本農芸化学会関西支部第494回講演会、京都、2016年5月21日

(4) 川畑球一、馬場信行、萩原光太、村上茂、田村明、夏目みどり、石井剛志 『ビ

フィズス菌の抗炎症作用に関する特性解析』
日本農芸化学会関西支部第 495 回講演会、大
阪、2016 年 7 月 9 日

(5) 川畑球一 『非栄養性成分と腸内細菌
の機能性発現における相互作用』 第 22 回
FSF 学術集会、ゆのこう美春閣、2016 年 9 月
9 日

(6) 川畑球一 『ポリフェノールによるビ
フィズス菌の機能性向上～カテキンの有用
性～』 第 13 回日本カテキン学会年次学術
大会、グランシップ(静岡県コンベンション
アーツセンター) 2016 年 10 月 27 日

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称：有機酸の産生促進剤、並びに炎症性腸
疾患の予防及び/又は改善剤」
発明者：田村 明、川畑球一、夏目みどり
権利者：株式会社 明治
種類：物の発明
番号：特願 2014-264242
出願年月日：2014 年 12 月 26 日
国内外の別： 国内

〔その他〕

ホームページ等
神戸学院大学栄養学部食品機能学部門
<http://www.nutr.kobegakuin.ac.jp/~foods>
ci/

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川畑 球一 (KAWABATA KYUICHI)
神戸学院大学栄養学部・講師
研究者番号：60452645