

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 16 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26870393

研究課題名(和文) ヒト小腸優勢乳酸桿菌のペプチド要求性に関する研究

研究課題名(英文) Research on peptide requirement of lactobacilli resident in human small intestine

研究代表者

荒川 健佑 (ARAKAWA, Kensuke)

岡山大学・環境生命科学研究科・准教授

研究者番号：50609930

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)：ヒト小腸に常在する乳酸桿菌のガセリ菌は様々な保健効果を有することが知られる。しかし、その栄養要求性は不明で、発酵スターターとしての食品利用は制限されていた。本研究では、ガセリ菌の生育因子がペプチドであることを明らかにし、そのペプチド要求性が低い菌体外プロテアーゼ活性に起因することを示唆する結果を得た。次いで、ペプチド添加に頼らないガセリ菌による発酵乳製造法として、発酵基材をプロテアーゼ(特にペプシン)処理する方法、および特定の乳酸球菌と共培養する方法を新たに開発した。さらに、ガセリ菌が外因性ペプチドだけでなく、内因性ペプチド(ペプシン消化胃ムチン)をも窒素源として利用可能なことを突き止めた。

研究成果の概要(英文)：Lactobacillus gasseri is well-known as a species of probiotic lactic acid bacteria resident in human small intestine. However, the usability of Lb. gasseri as a fermentation starter was limited, because of its indefinite auxotrophy. In this study, we first revealed that Lb. gasseri requires peptides for growth, and that the peptide requirement would be caused by low activity of cell-envelope proteinases of Lb. gasseri. Next, we developed new two methods for milk fermentation using Lb. gasseri without any supplementation of peptides. In a method, fermentation was achieved after hydrolysis of milk proteins using food-grade proteinases particularly pepsin. In another, cocultivation with selected coccal strains of lactic acid bacteria was used. In addition, it was found that Lb. gasseri can assimilate endogenous peptides such as pepsinolytic hydrolysates of gastric mucin, as well as exogenous peptides generated from orally ingested food proteins.

研究分野：酪農科学, 畜産物利用学, 食品加工学, 食品微生物学, 乳酸菌学, 発酵学

キーワード：乳酸菌 Lactobacillus gasseri 乳 大豆 ムチン ペプチド プロテアーゼ ペプシン

1. 研究開始当初の背景

近年、分子生物学や分析技術の急速な発展に伴い、哺乳動物の腸内細菌叢の全容が徐々に解明されつつある。ヒト小腸では乳酸桿菌である *Lactobacillus gasseri* が常在細菌種の1つとされ、宿主であるヒトに有益な効果をもたらすプロバイオティクスとしてよく研究されている (Reuter, *Curr. Issues Intest. Microbiol.*, 2001; Selle & Klaenhammer, *FEMS Microbiol. Rev.*, 2013)。しかし、その生理機能の解明が進む一方で、*Lb. gasseri* の栄養特性等の基本的な微生物学的性質については明らかにされてこなかった。特に、*Lb. gasseri* 等の腸内常在乳酸桿菌は、乳等の食品素材中では良好に生育しないことが経験的に知られていたにもかかわらず、その原因は不明なままであった。そのような背景の中で、研究代表者らは、酵母エキスもしくはプロテオースペプトンを添加することによって、*Lb. gasseri* が乳中で良好に生育することを2008年に報告した (Arakawa *et al.*, *Anim. Sci. J.*, 2008)。本報告の中で、遊離アミノ酸、糖、脂質、核酸、ミネラル、ビタミンといった他の栄養成分の添加では生育が向上せず、ペプチドを豊富に含む酵母エキスとプロテオースペプトンのみが有効であったことは、ペプチドが *Lb. gasseri* の乳中生育因子であることを強く示唆していた。しかし、その後、*Lb. gasseri* 等の腸内常在乳酸桿菌の栄養特性に関する研究に大きな進展はなく、本助成研究開始時まで至っていた。

2. 研究の目的

本助成研究では、腸内常在の代表的なプロバイオティクスである *Lb. gasseri* の発酵スターターとしての有効利用を目指し、まず、同菌種の栄養要求性を調べることにした。特に、先行研究の結果に基づいて、そのペプチド要求性について明らかにすることとした。次いで、*Lb. gasseri* を発酵乳製造のスターターとして用いるための新手法として、ペプチド添加に頼るのではなく、乳タンパク質のプロテアーゼ分解に着目した発酵法の開発を試みた。また、このプロテアーゼ処理法を活用して、*Lb. gasseri* による発酵大豆製品(豆乳、オカラ)の開発も行った。さらに、プロテアーゼ処理にも頼らない別の発酵法として、選抜乳酸球菌と *Lb. gasseri* との共培養法を確立することとした。加えて、哺乳動物の消化管内での *Lb. gasseri* の生存戦略の一端を解明するために、ペプシン消化胃ムチンに対する資化性について調べ、同菌種が外因性のペプチドだけでなく、内因性のペプチドをも窒素源として利用する可能性があることを *in vitro* にて検証することとした。

3. 研究の方法

(1) *Lb. gasseri* のペプチド要求性について

Lb. gasseri 3菌株を供試菌とし、カゼイン(タンパク質混合物)、カゼインの酵素分解物であるトリプトン(ペプチド混合物)もしくはカゼインの酸分解物であるカザミノ酸(遊離アミノ酸混合物)を添加したMRS-N培地(乳酸桿菌用のMRS培地から窒素源を除いた培地)および還元脱脂乳にて培養し、生育性を培養液pHと濁度にて経時測定した。

(2) *Lb. gasseri* およびその他の乳酸桿菌の菌体外プロテアーゼ活性について

Lb. gasseri のペプチド要求性は、同菌種の菌体外プロテアーゼ活性が低いことに起因することが考えられた。そこで、*Lb. gasseri* を含む各種乳酸桿菌の菌体外プロテアーゼ活性を以下の通りに測定することとした。腸管常在性乳酸桿菌として *Lb. gasseri* (5菌株)、*Lb. crispatus*、*Lb. gallinarum*、*Lb. johnsonii*、*Lb. reuteri* を用い、乳業用乳酸桿菌として *Lb. casei*、*Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*、*Lb. helveticus*、*Lb. zaeae* を用いた。これらの乳酸桿菌を培養後に集菌洗浄し、カゼインと反応後、遊離したペプチド量を測定することによって、プロテアーゼ活性とした。

(3) *Lb. gasseri* を用いた発酵乳製造におけるプロテアーゼ処理の利用について

Lb. gasseri をプロテアーゼ処理した各種乳培地(ヒト母乳、牛乳、還元脱脂乳、還元チーズホエイ、酸ホエイ培地、カゼイン培地)で培養し、生育性を培養液pH、滴定酸度、および生菌数にて経時測定した。プロテアーゼ処理には、食品利用可能なペプシン、トリプシン、 α -キモトリプシン、レンネット、フィシン、プロメライン、パパインを用いた。

(4) *Lb. gasseri* を用いた発酵大豆製品製造におけるペプシン処理の利用について

まず、MRS-N培地に未処理もしくはペプシン処理した大豆タンパク質を添加して、その培地中での *Lb. gasseri* の生育性(培養液pH、生菌数)を比較することにより、同菌種の大豆タンパク質資化能を調べた。次に、豆乳および12.5-50.0%オカラ懸濁液をペプシン処理し、*Lb. gasseri* を接種・培養した。ペプシン処理の有効性は、培養物pHと生菌数を経時測定することで調べた。

(5) *Lb. gasseri* を用いた発酵乳製造における選抜乳酸球菌との共培養法の活用について

まず、研究室保有の乳酸球菌59菌株を供試菌に用いて、37℃での生育性、および *Lb. gasseri* に対する生育促進作用を調べた。選抜した2菌株については、糖資化性パターン分析(API 50CHL)および16S rRNA遺伝子配列の解析などから菌種同定した後、*Lb. gasseri* との乳中共培養試験に供した。共培養の効果は、培養液pH、滴定酸度、および *Lb. gasseri* と選抜乳酸球菌のそれぞれの生

菌数を経時測定することで評価した。

(6) *Lb. gasseri* のペプシン消化胃ムチン資化性について

ペプシン消化胃ムチンを添加した MRS-N 培地にて *Lb. gasseri* を培養し、生育性を培養液 pH、濁度および生菌数にて経時測定することで、同菌種のペプシン消化胃ムチン資化性を評価した。また、ペプシン消化胃ムチンを添加した培地で培養した *Lb. gasseri* 菌体の形態および細胞サイズを位相差光学顕微鏡ないし走査型電子顕微鏡にて観察・測定し、菌体細胞の形態およびサイズに与えるペプシン消化胃ムチンの影響を調べた。

4. 研究成果

(1) *Lb. gasseri* のペプチド要求性について

Lb. gasseri はカゼインおよびカザミノ酸を添加した MRS-N 培地および還元脱脂乳では良好に生育しなかったが、トリプトンの添加によってその生育性は大幅に向上した。窒素源以外の栄養成分を添加した還元脱脂乳で良好な生育が認められなかった先行研究 (Arakawa et al., Anim. Sci. J., 2008) の結果と合わせて、*Lb. gasseri* の生育因子はペプチドであることが示された。

(2) *Lb. gasseri* およびその他の乳酸桿菌の菌体外プロテアーゼ活性について

Lb. gasseri がペプチド要求性を示す要因の 1 つとして、菌体外プロテアーゼが不十分なために、乳タンパク質を十分に分解できず、窒素源を必要量得られていない可能性が示唆された。そこで、*Lb. gasseri* および同様にペプチド要求性が示唆された腸内常在性の乳酸桿菌 (乳中生育緩慢乳酸桿菌) の菌体外プロテアーゼ活性測定を行った。その結果、菌体外プロテアーゼ活性が明らかな乳業用乳酸桿菌 (対照) と比較して、*Lb. gasseri* 等の腸内常在乳酸桿菌の活性は顕著に低いことが明らかとなった。本結果は、用いた腸内常在性乳酸桿菌種のゲノムに明確な菌体外プロテアーゼ遺伝子が見られないデータベース上の情報と一致しており、菌体外プロテアーゼの不備または不足が *Lb. gasseri* のペプチド要求性の要因の 1 つであることを示していた。

(3) *Lb. gasseri* を用いた発酵乳製造におけるプロテアーゼ処理の利用について

Lb. gasseri のペプチド要求性が示されたことから、発酵基材中にペプチドが豊富に遊離していれば同菌種による発酵が可能となると考え、乳素材をプロテアーゼ処理した後に、菌接種・培養を行うことを試みた。その結果、乳素材 (乳タンパク質) の種類にかかわらず、事前のプロテアーゼ処理によって乳中で *Lb. gasseri* が良好に生育することが明らかとなった。また、試験に用いた食品利用

可能なプロテアーゼのうち、レンネットを除く全てにおいて *Lb. gasseri* の生育向上が確認された。中でも、ペプシン処理の効果が最も高かった。また、ペプシン処理した牛乳中では、*Lb. gasseri* だけでなく、他の腸内常在性の乳酸桿菌の生育性向上も見られた。

(4) *Lb. gasseri* を用いた発酵大豆製品製造におけるペプシン処理の利用について

Lb. gasseri を含む腸内常在乳酸桿菌を用いた新たな発酵乳製造法として、乳素材のペプシン処理が有効であることが示されたことから、同手法を発酵大豆製品製造に利用できないかと考え、まずは、*Lb. gasseri* の大豆タンパク質および大豆ペプチドの資化能について検証した。その結果、大豆タンパク質を添加した MRS-N では良好な生育性は見られなかったが、ペプシン処理した大豆タンパク質 (すなわち大豆ペプチド) の添加によって、*Lb. gasseri* の生育性が大幅に向上することが明らかとなった。このことは、乳素材での結果と合わせて、タンパク質の種類は然程重要ではなく、窒素源としてのサイズ (ペプチドであること) が *Lb. gasseri* の生育にとっては重要であることを示唆していた。次に、豆乳およびオカラ懸濁液を発酵基材に用いてペプシン処理の有効性を検証したところ、未処理では *Lb. gasseri* は良好に生育しなかったが、ペプシン処理を経ることによって、両大豆素材は十分に発酵することが明らかとなった。同様の結果は、他の腸内常在乳酸桿菌でも見られ、ペプシン処理がこれらの乳酸桿菌を用いた発酵乳・発酵大豆製品製造に有用であることが示された。

(5) *Lb. gasseri* を用いた発酵乳製造における選抜乳酸球菌との共培養法の活用について

これまでの研究によって、*Lb. gasseri* を含む腸内常在乳酸桿菌を用いた発酵乳製造にペプチドの添加もしくはプロテアーゼ処理が有用であることが示された。しかし、添加物の利用は消費者に敬遠される傾向にあり、その上、これらの手法によるペプチドの富化は苦味や雑味を生じる可能性があることから、最善の発酵法とは言い難い。そこで、添加物や事前の酵素処理に頼らない発酵法として、乳酸球菌との共培養法を確立することとした。共培養乳酸球菌の選抜は、当研究室保有の乳酸球菌 59 菌株を供試菌として、*Lb. gasseri* の生育至適温度である 37℃での生育能と、乳中での *Lb. gasseri* の生育促進効果の評価することにより実施した。その結果、*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 4B254 と *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum* OR-1 の 2 菌株を共培養乳酸球菌として選抜した。以上より、ペプチド添加やプロテアーゼ処理に頼らない *Lb. gasseri* による発酵乳製造法として、本選抜 2 菌株を用いた共培養法を確立するに至った。

(6) *Lb. gasseri* のペプシン消化胃ムチン資化性について

消化酵素であるペプシンによるタンパク質分解が *Lb. gasseri* 等の腸内常在乳酸桿菌の生育に有用であることが示されたことから、経口摂取した食品タンパク質が胃内で加水分解され、生じたペプチドが小腸に常在している同菌群の窒素源として利用されている可能性が示唆された。すなわち、乳タンパク質や大豆タンパク質は腸内の *Lb. gasseri* 等乳酸桿菌の「プレ」プレバオティクスになっていると推察された。また、食品タンパク質のような外因性のタンパク質だけでなく、消化管ムチンに含まれるような内因性のタンパク質も *in vivo* ではペプシン消化を経て、*Lb. gasseri* 等の窒素源として利用されている可能性が示唆された。そこで、ペプシン消化胃ムチンの *Lb. gasseri* 生育性に与える影響を *in vitro* で調べることにした。その結果、ペプシン消化胃ムチンは窒素源として *Lb. gasseri* の生育に利用され、大幅にその生育性を向上させていることが明らかとなった。またペプシン消化胃ムチンは生育性向上に貢献するだけでなく、*Lb. gasseri* の菌体サイズを縮小させていることが顕微鏡観察により示された。すなわち、ペプシン消化胃ムチンは *Lb. gasseri* の細胞伸長抑制因子としても働いていることが示唆された。これらの作用は *in vivo* でも起きていることが想定され、消化管内だけでなく、生体内のムチンがプロテアーゼ分解を経て *Lb. gasseri* の窒素源になっていると考えられる。特に、*Lb. gasseri* は腔内に常在し、細菌叢のバランスを整える重要な役割を果たしており (Lamont *et al.*, *BJOG*, 2011)、これまでその栄養源は不明であったが、本結果から、腔ムチンを利用している可能性が示唆されることとなった。

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 1 件、査読有り)

K. Arakawa, K. Matsunaga, S. Takihiro, A. Moritoki, S. Ryuto, Y. Kawai, T. Masuda, T. Miyamoto. *Lactobacillus gasseri* requires peptides, not proteins or free amino acids, for growth in milk. *Journal of Dairy Science* 98, 1593-1603, 2015. DOI: 10.3168/jds.2014-8860.

[学会発表](計 15 件)

丸山晃嗣, 守時亜衣, 峰雪仁美, 川井泰, 増田哲也, 森田英利, 宮本拓, 荒川健佑. *Lactobacillus gasseri* と乳中共生乳酸球菌の菌体外プロテアーゼ活性測定. *日本乳酸菌学会 2017 年度大会*, 福岡, 2017 年 7 月.
荒川健佑, 龍頭壮磨, 松永佳奈子, 川井泰, 増田哲也, 森田英利, 宮本拓.

Lactobacillus gasseri の生育性に及ぼすペプシン消化胃ムチンの影響. *日本乳酸菌学会 2017 年度大会*, 福岡, 2017 年 7 月.
荒川健佑, 龍頭壮磨, 松永佳奈子, 川井泰, 増田哲也, 森田英利, 宮本拓. *Lactobacillus gasseri* の生育性に与えるペプシン消化胃ムチンの影響. *日本畜産学会第 122 回大会*, 兵庫, 2017 年 3 月.
脇本彩加, 井上雄大, 高橋礼実, 田中勝, 春日元氣, 荒川健佑, 森田英利, 宮本拓, 川井泰, 増田哲也. 乳中における *Lactobacillus gasseri* LA39 の生育とガセリシン A 生産性の評価. *日本畜産学会第 122 回大会*, 兵庫, 2017 年 3 月.
龍頭壮磨, 荒川健佑, 松永佳奈子, 川井泰, 増田哲也, 森田英利, 宮本拓. *Lactobacillus gasseri* のペプシン消化胃ムチン資化能に関する研究. *平成 28 年度岡山大学農学部・岡山県農林水産総合センター畜産研究所研究成果検討会*, 岡山, 2016 年 12 月.
龍頭壮磨, 荒川健佑, 松永佳奈子, 川井泰, 増田哲也, 宮本拓. *Lactobacillus gasseri* はペプシン消化胃ムチンを資化する. *平成 28 年度酪農科学シンポジウム*, 神奈川, 2016 年 9 月.

K. Arakawa, K. Matsunaga, A. Moritoki, S. Takihiro, S. Ryuto, Y. Kawai, T. Masuda, T. Miyamoto. Milk fermentation with peptide-requiring *Lactobacillus gasseri* using advance pepsinolysis. *17th AAAP Animal Science Congress*, Fukuoka (Japan), August 2016.

守時亜衣, 峰雪仁美, 荒川健佑, 川井泰, 増田哲也, 森田英利, 宮本拓. *Lactobacillus gasseri* と乳酸球菌の共培養に関する研究. *平成 27 年度酪農科学シンポジウム*, 北海道, 2015 年 9 月.

春日元氣, 阿部麻衣子, 河野真由子, 村田美希, 富樫史香, 松田よう子, 安田朱里, 川井泰, 荒川健佑, 宮本拓, 増田哲也. 食品グレード培地「FR」におけるガセリシン A およびガセリシン T の生産に最適な培地成分濃度と培養時間の検討. *日本畜産学会第 119 回大会*, 栃木, 2015 年 3 月.
荒川健佑, 峰雪仁美, 川井泰, 増田哲也, 宮本拓. *Lactobacillus gasseri* の乳中生育性を向上させる共培養乳酸球菌株の選抜. *日本農芸化学会 2015 年度大会*, 岡山, 2015 年 3 月.

守時亜衣, 松永佳奈子, 龍頭壮磨, 滝廣宗平, 荒川健佑, 宮本拓. *Lactobacillus gasseri* はペプチドを生育因子とする. *平成 26 年度岡山大学農学部・岡山県農林水産総合センター畜産研究所研究成果検討会*, 岡山, 2014 年 12 月.

荒川健佑, 松永佳奈子, 滝廣宗平, 守時亜衣, 川井泰, 増田哲也, 宮本拓. *Lactobacillus gasseri* およびその近縁乳

酸桿菌種は乳中でペプチドを要求する。
平成26年度酪農科学シンポジウム, 東京,
2014年9月。

春日元気, 吉田光希, 松島裕樹, 荒川健佑,
川井泰, 宮本拓, 増田哲也. 食品添加用酵
母エキスをを用いた *Lactobacillus gasseri*
用食品グレード培地の創製と生育促進物
質の検索. 平成26年度酪農科学シンポジ
ウム, 東京, 2014年9月。

春日元気, 吉田光希, 松島裕樹, 荒川健佑,
川井泰, 宮本拓, 増田哲也. 食品添加用酵
母エキスをを用いた *Lactobacillus gasseri*
用の食品グレード培地の創製と生育促進
物質の検索. 日本乳酸菌学会2014年大会,
広島, 2014年7月。

荒川健佑, 松永佳奈子, 川井泰, 増田哲也,
宮本拓. *Lactobacillus gasseri* とその近縁
種のペプチド要求性について. 日本乳酸
菌学会2014年大会, 広島, 2014年7月。

〔産業財産権〕

出願状況(計2件)

名称: ラクトバチルス属乳酸菌培養用食品グ
レード培地、ラクトバチルス属乳酸菌の培
養方法及びラクトバチルス属乳酸菌培養
物の製造方法。

発明者: 増田哲也, 川井泰, 宮本拓, 荒川健
佑。

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 特願2014-041974, 特開2015-167474。

出願年月日: 2014年3月4日出願, 2015年9
月28日公開。

国内外の別: 国内

名称: 消化管内および糞便由来乳酸菌培養用
乳もしくは豆乳由来組成物、培養用又は発
酵用原料及び乳酸発酵物。

発明者: 荒川健佑, 宮本拓, 松永佳奈子, 川井
泰, 増田哲也。

権利者: 荒川健佑, 宮本拓, 川井泰, 増田哲
也。

種類: 特許

番号: 特願2013-164359, 特願2014-031518,
特開2015-050993。

出願年月日: 2013年8月7日出願, 2014年2
月21日出願, 2015年3月19日公開。

国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ

岡山大学大学院環境生命科学研究科動物
応用微生物学分野 HP

[http://www.gels.okayama-u.ac.jp/profile/
kouza/areas07_animal.html](http://www.gels.okayama-u.ac.jp/profile/kouza/areas07_animal.html)

岡山大学農学部動物応用微生物学ユニッ
ト HP

[http://www.okayama-u.ac.jp/user/agr/pr
ofile/nougaku03_7.html](http://www.okayama-u.ac.jp/user/agr/profile/nougaku03_7.html)

6. 研究組織

(1)研究代表者

荒川 健佑 (ARAKAWA Kensuke)

岡山大学・大学院環境生命科学研究科・准教
授

研究者番号: 50609930