

植物性プレバイオティクス候補物質の探索とその評価

伊達康博・縫島裕美・中西裕美子・梅原三貴久・福田真嗣・大野博司・菊地淳
理化学研究所 植物科学研究センター メタボローム研究推進部門 先端 NMR メタボミクスチーム
〒230-0045 神奈川県横浜市鶴見区末広町 1 丁目 7 番 22 号 電話: 045-503-9490
Fax: 045-503-9489 E-mail: kikuchi@psc.riken.jp

宿主にとっては難分解性であるが、一部の微生物が分解できる多糖類は、整腸作用、プレバイオティクス効果等、宿主の健康維持・増進において重要な働きを有している。しかし、地球環境に多様に存在する植物・藻類にはその機能について評価されていない多糖類も多数存在することから、未利用多糖類バイオマスの有効利用法を見出したいと目論んでいる。その一端として本研究では、種々の食品成分からプレバイオティクス候補物質を探索することのできる *in vitro* 培養スクリーニング法を構築した。本手法および *in vivo* 試験による評価を行うことで、ネギ粘性多糖類は微生物叢の代謝変動を促すプレバイオティクスとしての効果があることが示唆された。

1. はじめに

ヒトの腸内に共生する微生物叢は、宿主にとって難分解性である多糖類を利用して、整腸作用、プレバイオティクス効果等を促すとともに[1]、肥満や代謝性疾患等にも関与していることが報告されている[2,3]。また最新の研究動向によると、食生活の違いに応じて多様な多糖類分解酵素を獲得することも報告された[4]。しかしながらこれら難分解性の多糖類を介した腸内共生細菌と宿主との相互作用に関する科学的根拠は乏しく、その詳細な分子メカニズムは明らかとなっていないのが現状である。そこで我々はこれまでに、セルロース等の難分解性多糖類を用いて、複雑な腸内環境の変動あるいは代謝動態を追跡する種々の技術開発を報告してきた[5-7]。しかし、地球環境に多様に存在する植物・藻類にはその機能について評価されていない多糖類も多数存在し、付加価値がなく廃棄されている場合も多いことから、これら多糖類バイオマスの有効利用法を見出したいと目論んでいる。その一端として本研究では、種々の食品成分からプレバイオティクス候補物質を簡便にスクリーニングすることのできる *in vitro* 培養スクリーニング法を構築し、植物性プレバイオティクス候補物質の探索とその評価を試みた。

2. 解析データおよび方法

(1) *in vitro* 培養スクリーニング

プレバイオティクス候補物質をスクリーニングするため、マウス腸内微生物叢を用いて *in vitro* 培養を行った。*in vitro* 培養では、既知のプレバイオティクス食品群、あるいは各種食品成分を用いて糞便中腸内微生物群を嫌氣的に培養し、12 時間後の腸内微生物群およびその代謝物群を統計学的に評価することによりスクリーニングを行った。

(2) *in vivo* 摂食試験による評価

in vitro 試験によってスクリーニングされた食品成分を乾燥重量で 5% となるように通常食 (CLEA Rodent Diet CA-1) に混ぜた試験食を作製し、通常食と試験食を一週間ずつ交互に四週間与えた時の腸内環境の変動を、NMR メタボローム解析や群集構造解析等を用いて統計学的に評価した。

3. 結果と考察

(1) *in vitro* 培養スクリーニング

フラクトオリゴ糖やラフィノース、スタキオースなどのオリゴ糖は、プレバイオティクス食品としての効果があることは周知の事実であり、製品としても流通している。本研究では、これら 3 種類のプレバイオティクス食品群と、食品成分を何も添加せずに培養したコントロール群を基準として、多糖類試薬からネギ等の食品に至る 15 種類の食品およびその成分について *in vitro* 培養スクリーニングを行い、プレバイオティクス

候補物質の探索を行った。

NMR メタボローム解析により得られた代謝産物のスペクトルを主成分分析 (PCA) によって解析した結果、タマネギ、ネギおよびネギ粘性多糖類は、既知のプレバイオティクス食品群にクラスタリングされた (図 1・右)。一方、その他の食品成分については、コントロール群にクラスタリングされた。

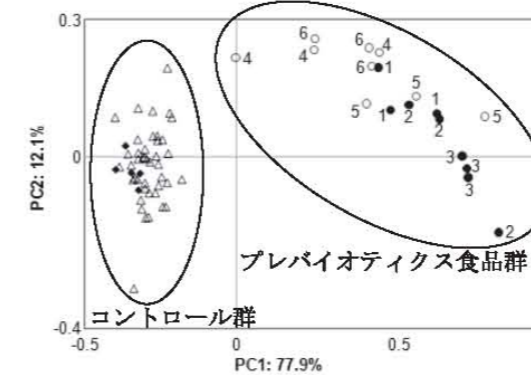


図 1. *in vitro* 培養によるプレバイオティクス候補物質のスクリーニング

1: ネギ粘性多糖類, 2: ネギ, 3: タマネギ, 4: フラクトオリゴ糖, 5: ラフィノース, 6: スタキオース, ◆コントロール, △その他の食品成分

次に、これらのクラスタリングに寄与している物質の同定を行ったところ、各群のクラスタリングには、乳酸や酢酸等の有機酸が大きく寄与していることが明らかとなった。また、プレバイオティクス食品群では、pH も下がっていることが明らかとなった。

さらに DGGE 法を用いて微生物群集構造を解析したところ、主要な微生物群として数種類の乳酸菌が培養に伴い菌数を増加させていたものの、どの試験区においても類似したバンドパターンを示し、プレバイオティクス食品群とコントロール群の間に有意な違いは観察されなかった。従って、乳酸産生量の増加は乳酸菌数の増加によるものではなく、乳酸菌の代謝変動によるものと考えられた。

そこで、乳酸菌における代謝経路の変化についても解析するために、乳酸産生の鍵酵素である乳酸脱水素酵素 (LDH) の mRNA の発現量を Real-time PCR 法により定量したところ、ネギの粘性多糖類添加群では、LDH の mRNA 発現量が顕著に増加していることが明らかとなった。以上のことから、ネギ粘性多糖類は乳酸菌の代謝変動を促すプレバイオティクスとしての効果があることが示唆された。

(2) *in vivo* 摂食試験による評価

ネギ粘性多糖類の *in vivo* における効果を検討するた

め、8 週齢の BALB/cA マウスを用いて摂食試験を行った。*in vitro* 試験と同様に PCA を用いて解析した結果、マウス糞便中および尿中の代謝産物は摂食させた餌の違いに基づいてクラスタリングされた。特に糞便中の代謝産物では、乳酸や酢酸等の有機酸がクラスタリングに寄与しており、その産生量は通常食摂食時と比べ相対的に増加傾向にあることが明らかとなった (図 2)。また、DGGE 法を用いて糞便中腸内微生物群の変動についても解析したところ、通常食と比べ試験食摂食期間において乳酸菌数が増加する傾向にあった。以上のことから、ネギ粘性多糖類はマウスの腸内環境においても乳酸菌の増殖を促し、乳酸や酢酸等の有機酸産生量を増加させる効果があることが明らかとなった。

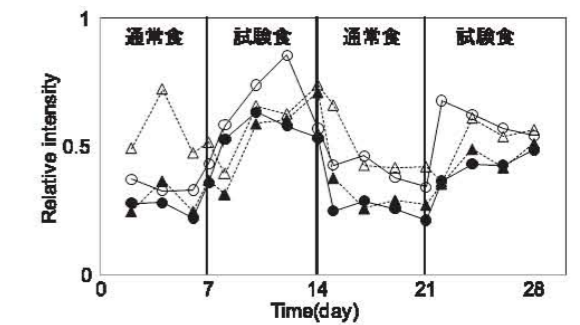


図 2. *in vivo* 試験における糞便中有機酸量の経時変化
●個体 A 乳酸, ○個体 A 酢酸, ▲個体 B 乳酸, △個体 B 酢酸

4. 今後の展望

本研究では、*in vitro* 培養スクリーニング法を用いて、プレバイオティクス候補物質を探索するとともに、スクリーニングされたネギ粘性多糖類の *in vivo* における評価を行い、植物性プレバイオティクス食品としての可能性を示した。今後の研究展開としては、食品成分由来の植物性プレバイオティクス候補物質を有効活用するため、多糖類の詳細なキャラクターゼーションを行うとともに、ヒトへの応用も視野に入れた腸内環境への詳細な影響評価を試みている。

参考文献

- [1] Saulnier DMA, et al.: Curr. Opin. Biotechnol., 20, 135-141 (2009)
- [2] Ley RE, et al.: Nature, 444, 1022-1023 (2006)
- [3] Vijay-Kumar M, et al.: Science, 328, 228-231 (2010)
- [4] Hehemann JH, et al.: Nature, 464, 908-912 (2010)
- [5] Date Y, et al.: J. Biosci. Bioeng., 110, 87-93 (2010)
- [6] Fukuda S, et al.: PLoS ONE, 4, e4893 (2009)
- [7] Morita H, et al.: DNA Res., 15, 151-161 (2008)