

梅ポリフェノールのマウス腸内細菌フローラ改善効果

島田良美、香川昂雅、晋家崇史、堀西朝子、尾崎嘉彦、芦田 久

要旨

梅ポリフェノール（梅 PP）は、梅干製造の過程で大量に生じる梅酢から合成吸着剤を用いて回収したポリフェノール成分を濃縮・乾燥させた粉末である。BALB/c マウスを3群に分け、対照飼料（AIN-93M）、4%梅 PP 含有飼料、2%ラフィノース含有飼料をそれぞれ自由摂取させ、2週間飼育した。梅 PP 群では対照群に比較して、盲腸重量および摂食量に有意な増加が見られたが、体重には有意な差はなかった。ラフィノース群でも同様の傾向が見られたが、盲腸重量の増加は有意ではなかった。各マウスの盲腸内容物から全 DNA を抽出し、16S リボソーム RNA 遺伝子の V4 領域 254 塩基対の DNA 断片を PCR で増幅させたのち、イルミナ MiSeq システムでシーケンスすることにより腸内細菌フローラを解析した。梅 PP 群では、硫化水素、アンモニア、インドール、吉草酸などの腐敗臭を生産するとされる *Clostridium indolis*、*Oscillospira* sp.、*Anaerotruncus* sp. に代表される OTU（operational taxonomic unit）の有意な減少が認められた。一方、酢酸や酪酸を生産するとされる *Acetatifactor muris* に代表される OTU、難消化性糖を資化して酢酸を生産するとされる *Ruminococcus bromii* に代表される OTU が顕著に増加していた。主成分分析の結果、梅 PP 群はラフィノース群とは傾向の異なるフローラの変化が認められた。これらの結果から、梅 PP はラフィノースとは異なる作用メカニズムにより腸内細菌フローラを改善する効果があることが示唆された。

キーワード：腸内細菌、メタゲノム解析、プレバイオティクス、ポリフェノール、ウメ

1. 緒論

和歌山県はウメ（*Prunus mume* Siebold et Zuccarini）の果実の生産量が日本で最も多い県である。ウメ果実の大部分は、梅干に加工され、消費されている。古来より梅干には胃腸の調子を整える効果、抗菌効果、抗疲労効果などがあるとされてきた。近年、梅干や梅抽出物には血圧低下作用⁽¹⁻³⁾、ラジカル捕捉作用⁽⁴⁾、抗酸化作用^(5, 6)、抗骨粗鬆症活性⁽⁵⁾、ピロリ菌の生育阻害⁽⁷⁾、血液凝固阻害⁽⁸⁾、 α -グルコシダーゼ阻害と食後血糖上昇抑制作用⁽⁹⁾などのさまざまな健康増進効果があることが報告されている。

ところで、梅干の製造過程で大量に生じる梅酢は、高濃度の食塩を含むため高度な利用がなされていないのが現状である。近年、和歌山県では、梅酢から合成吸着剤を用いてポリフェノール化合物を回収し、濃縮・乾燥・粉末化する技術が開発され、これを梅ポリフェノール（梅 PP）として新たな機能性食品素材としての応用展開を図っている。梅 PP は約 65%の糖質、約 12%のフェノール化合物、約 4%の水分を含み、フェノール化合物の主成分は、カフェ酸、クマル酸、フェルラ酸などの桂皮酸類であることが報告されている⁽¹⁰⁾。一部の糖質は、これらの桂皮酸類がエステル結合した糖エステルの形で存在しており⁽⁴⁾、残りの糖質は水溶性の多糖であるが詳細な構造は明らかにされていない。

近年、腸内細菌が宿主の健康に大きな影響を与えていることが認識されるようになった。梅 PP を経口摂取した場合、体内に吸収される前に腸内細菌に影響を及ぼすことが考えられるが、これまでにこの点に関する評価は全くなされていない。そこで本研究では、マウスを用いて梅 PP の腸内細菌フローラに及ぼす影響を、メタゲノム解析により明らかにすることを目的とした。

2. 材料と方法

2. 1 梅ポリフェノール (梅 PP)

梅 PP (Lot. 100525) はわかやま産業振興財団から供与されたものを使用した。これは、梅酢を Diaion HP-20 カラムクロマトグラフィーに供し、水で洗浄したのち 60% エタノールで溶出された画分を乾燥させた粉末である。

2. 2 動物実験

BALB/c マウス (♀, 8 週齢) は日本チャールズ・リバーから購入した。温度と湿度は、それぞれ 20.0 ± 2.0 °C、 50 ± 30 % の環境で飼育し、餌と水は自由に摂取させた。1 週間の予備飼育期間は AIN-93M 飼料 (オリエンタル酵母) を給餌し、その後マウスを無作為に 3 群に分けて、対照飼料 AIN-93M (4 頭)、4 % (w/w) 梅 PP 含有飼料 (5 頭)、2 % (w/w) D(+)-ラフィノース 8 水和物 (和光純薬工業) 含有飼料 (4 頭) を与えて 2 週間飼育した。体重と食餌摂取量を毎日測定した。2 週間後に解剖して、盲腸重量を測定し、内容物を採取した。動物実験は近畿大学生物理工学部動物実験小委員会の承認を得て実施した (承認番号 KABT-25-003)。

2. 3 DNA 抽出

各個体の盲腸内容物約 100 mg を 2 ml の生理食塩水に完全に懸濁した。25 °C で 5 分間静置した後、上清を取り、 $4,000 \times g$ で 15 分間遠心分離した。沈殿画分を取り、NucleoSpin Tissue (Macherey-Nagel) を用いて総 DNA を抽出した。

2. 4 16S リボソーム RNA 遺伝子 V4 領域の PCR

細菌の同定に有効とされる 16S リボソーム RNA 遺伝子の V4 領域 (254 塩基対)⁽¹¹⁾ を KOD-Plus-Ver. 2 (東洋紡) を用いた PCR により増幅させた。前項で抽出した総 DNA をテンプレートにして、プライマー 515F (5'-GTGCCAGCMGCCGCGGTAA-3') と 806R (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3') を使用した。PCR 反応は、98 °C, 10 秒、55 °C, 30 秒、68 °C, 60 秒のサイクルを 20 回繰り返した。アガロースゲル電気泳動に供し、254 塩基対のバンドを切り出し、Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) を用いて抽出した。これをテンプレートにして、イルミナ MiSeq システムでの解析に必要なアダプター配列および個体識別のための 12 塩基の固有のバーコード配列 (下線部分; 対照 1, CTAGTCGCTGGT; 対照 2, GTGCCCACTT-GA; 対照 3, CGAAAGCATTCC; 対照 4, CTTACTGCTT; 梅 PP1, GAGAGGGATCAC; 梅 PP2, GGTGTGA-GAAAG; 梅 PP3, CCGGAATCCATA; 梅 PP4, GCGTAAACCCAA; 梅 PP5, AATCCGGTCACC; ラフィノース 1, ACCTACTTGTCT; ラフィノース 2, CATTGTCCCTAT; ラフィノース 3, CATTGGGAGTTC; ラフィノース 4, GTTGACCATCGC) を含むプライマー-R_806_rcbc##### (5'-CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATNNNNN-NNNNNNNAGTCAGTCAGCCGGACTACHVGGGTWTCTAAT- 3') と 515F2 (5'-AATGATACGGCGACCACC-GATCTACTATGGTAATTGTGTGCCAGCMGCCGCGGTAA-3') を用いて 2 度目の PCR をおこなった。反応は伸長反応を 72 °C とした点以外は、1 回目の PCR と同条件でおこなった。増幅した DNA 断片をアガロースゲルから抽出し、各個体の PCR 産物をそれぞれ 80 ng ずつ混合し、シーケンス解析に供した。

2. 5 DNA 配列の解析

シーケンス解析にはイルミナ MiSeq システム⁽¹²⁾ と MiSeq Reagent Kit v3 (Illumina) を用いた。配列データは MiSeq Control Software v2.3.0.3、Real Time Analysis v1.18.42、および Consensus Assessment of Sequence

and Variation v1.8.2 で解析した。

2. 6 細菌種の推定

両端からのシーケンス配列をペアリングして 254 塩基のコンティグを作成し、CD-HIT-OTU v0.0.1 (<http://weizhong-lab.ucsd.edu/cd-hit-otu/>)を用いて、相同性の閾値を 0.97 に設定しクラスタリングして、OTU (operational taxonomic unit) を構築した⁽¹³⁾。代表配列について、QIIME v1.7 (<http://qiime.org/>)⁽¹⁴⁾を用い、学習配列として GreenGenes gg_13_5⁽¹⁵⁾を採用して RDP classifier v2.2 (<http://rdp.cme.msu.edu/index.jsp>)⁽¹⁶⁾により系統分類を行った。解析はブートストラップ値>0.8 でおこなった。各 OTU の代表配列を、BLAST プログラム v2.2.20 を用いて DDBJ 16S ribosomal RNA database v.2014_02_11 を検索して菌種を推定した。

2. 7 α 多様性指数

レアファクション解析には QIIME を用いた⁽¹⁴⁾。 α 多様性指数として、Chao1 推定量と Shannon 指数を算出した。

2. 8 統計解析

Dunnett 法を用いて、有意水準を 5%に設定して、対照群との多重比較をおこなった (<http://www.gen-info.osaka-u.ac.jp/MEPHAS/>)。主成分分析には Easy PCA (<http://hoxom-hist.appspot.com/pca.html>)を用いた。

3. 結果

3. 1 体重、食餌量の変化と盲腸重量

9 週齢の BALB/c マウスを 3 群に分け、対照飼料、4 % (w/w) 梅 PP 含有飼料、2 % (w/w) ラフィノース含有試料を与えて 2 週間飼育した。対照群の体重は 5 日目までやや減少し、その後ゆるやかに増加した。同様に、ラフィノース群では 2 日目までわずかに減少し、その後増加に転じた。梅 PP 群は試験期間を通じて上昇した (図 1)。試験終了時の体重は、梅 PP 群とラフィノース群は対照群に比べやや重い傾向を示したが、有意な差ではなかった (表 1)。一方、1 日当たりの食餌量は、梅 PP 群とラフィノース群ではともに対照群に比べ有意に多かった (表 1)。

盲腸重量は梅 PP 群が対照群に比較して有意に高く、ラフィノース群も対照群より高い傾向であったが、こちらは有意な差ではなかった。盲腸内容物の pH は梅 PP 群とラフィノース群で低下傾向が見られ、ラフィノース群は対照群に対して有意であった (表 1)。

3. 2 メタゲノムデータの品質評価と α 多様性

盲腸内容物より全 DNA を抽出し、これを鋳型に 16S リボソーム RNA 遺伝子の V4 領域を PCR で増幅させ、イルミナ MiSeq システムでシーケンスした。各個体の試料から $6.9\sim 23 \times 10^5$ リードの配列データが得られ、低品質のデータを除いた $3.0\sim 9.9 \times 10^5$ リードの配列データを以後の解析に用いた (表 2)。平均リード数は群間で有意差はなかった。相同性の閾値 0.97 で配列データをクラスタリングした結果、149 の OTU が得られた。試料ごとの OTU 数は 134~144 で、群間で有意差はなかった。Chao1 推定量は、全試料において観察された OTU 数よりも 0.9 から 13 大きかった。Shannon 指数は 3.9~5.0 の値となり、群間で有意差はなかった (表 2)。Chao1 推定量からは、検出されていない稀な配列の存在が示唆されるものの、レアファクション解析ではいずれの指数も 10 万リードまでで飽和に達し、実質的に十分なリード数が解析に供されたと考えられた (図 2)。

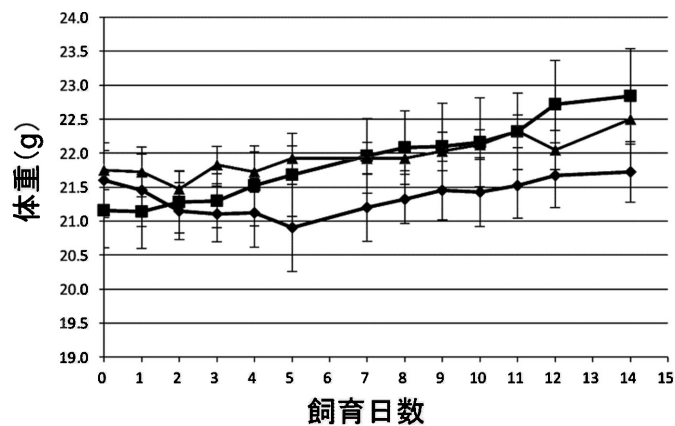


図1 飼育期間における体重の変化

データは平均値±標準誤差で示す。対照群 (◆, n=4)、梅 PP 群 (■, n=5)、ラフィノース群 (▲, n=4)。

表1 体重、採餌量、盲腸重量、および盲腸内容物の pH

	対照	梅PP	ラフィノース
試験開始時体重 (g)	21.6 ± 0.6	21.2 ± 0.6	21.8 ± 0.3
試験終了時体重 (g)	21.7 ± 0.4	22.8 ± 0.7	22.5 ± 0.4
食餌量 (g/day/mouse)	2.2 ± 0.1	2.9 ± 0.1*	2.5 ± 0.1*
盲腸重量 (g)	0.175 ± 0.016	0.222 ± 0.013*	0.202 ± 0.010
盲腸内容物のpH	7.18 ± 0.08	7.00 ± 0.04	6.88 ± 0.06*

データは平均値±標準誤差 (対照群 n=4、梅 PP 群 n=5、ラフィノース群 n=4) で示す。

*対照群に対して有意差有り ($p < 0.05$ 、Dunnett 検定)。

表2 シークエンス結果と α 多様性指数

試験群	マウス	総リード数	分析リード数	OTU数	Chao1 推定量	Shannon 指数
対照	C1	2,307,856	985,348	137	137.908	4.263
	C2	1,020,472	447,094	140	141.213	4.763
	C3	1,775,376	764,489	141	143.480	4.624
	C4	1,848,646	799,773	143	144.400	4.450
梅PP	UPP1	1,753,330	754,924	142	153.195	4.880
	UPP2	1,774,454	749,957	144	145.740	4.770
	UPP3	1,592,262	698,670	142	142.595	4.681
	UPP4	687,400	301,550	139	142.592	4.549
	UPP5	944,236	421,742	138	142.605	4.356
ラフィノース	RAF1	1,395,840	595,152	138	141.930	3.933
	RAF2	1,200,742	512,053	143	143.987	5.037
	RAF3	1,349,674	591,178	142	155.475	4.510
	RAF4	1,615,010	693,153	134	135.425	4.488

3. 3 腸内細菌フローラの変化

RDP classifier を用いて推定した各群の属レベルの細菌フローラを示す (図 3)。また、各群で存在比率に有意な差があったカテゴリーについて、含まれる OTU の代表配列をもとに BLAST 検索により代表種を推定した結果とその割合をまとめた (表 3)。

最も割合の多い属は各群共通で、Clostridiales 目の未同定属であった (対照、梅 PP、ラフィノース群においてそれぞれ 22.6、24.8、24.5 %)。対照群で次に多い属は Lachnospiraceae 科の未同定属 (21.9 %) で、代表配列の BLAST 検索の結果 *Clostridium indolis* (E-value 1.00E-121) またはその近縁種と推定されたが、この属は梅 PP 群とラフィノース群では有意に減少していた (9.08、8.98 %)。対照群で 3 番目に多い *Para-bacteroides* 属は、各群で同程度の割合で検出された (15.0、15.5、19.1 %)。次いで *Oscillospira* 属は、対照群で 14.8 %、ラフィノース群で 11.7 % であったが、梅 PP 群では対照群に比較して有意に少なく 9.0 % であった。次の未同定細菌は対照群では 5.90 % 存在したが、梅 PP 群やラフィノース群では極めて少なかった (1.20、0.55 %)。このカテゴリーの細菌については、目レベルの分類学的情報さえ得られなかった。Clostridiales 目の 1 属は対照群ではその次に位置するが (4.45 %)、梅 PP 群のみで顕著に増大して 20.1 % を占めていた。この属は BLAST 検索の結果、*Acetatifactor muris* (E-value 1.00E-128) あるいはその近縁種と推定された。Lachnospiraceae 科の 1 属は、*Eubacterium plexicaudatum* (E-value 1.00E-132) と推定された。この属は、梅 PP 群では有意差はないものの増加傾向で (2.40 vs 5.26 %)、ラフィノース群で有意に増加した (2.40 vs 13.3 %)。

以下、存在比率が 5 % 未満のカテゴリーについて記載する。*Ruminococcus bromii* を代表とする *Ruminococcus* 属は対照群に比較して梅 PP 群で有意に高く (2.35 vs 3.06 %)、ラフィノース群で有意に低かった (2.35 vs 1.43 %)。*Bacteroides caccae* を代表とする *Bacteroides* 属は、梅 PP 群、ラフィノース群で減少傾向があり、後者では有意であった。Ruminococcaceae 科の未同定属は *Anaerotruncus* sp. (E-value 1.00E-129) と推定されたが、梅 PP 群でのみ有意に低下していた (1.28 vs 0.34 %)。一方、*Dorea* 属はラフィノース群においてのみ有意に増加していた (0.23 vs 3.05 %)。その他の属に分類されたものとして、Actinobacteria 門の属、Lactobacillales 目の属、*Enterococcus* 属、*Anaeroplasma* 属などが少数ずつ検出された。

第一主成分から第三主成分までを用いた主成分分析の結果、梅 PP はラフィノースとは異なる作用を示すことが示唆された (図 4)。

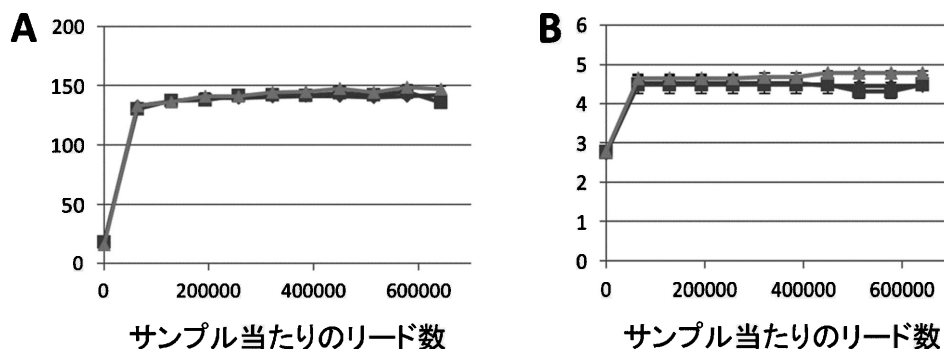


図 2 α 多様性指数のレアファクション解析

Chao1 推定量(A)と Shannon 指数 (B)のレアファクションプロット。

対照群 (◆)、梅 PP 群 (■)、ラフィノース群 (▲)。

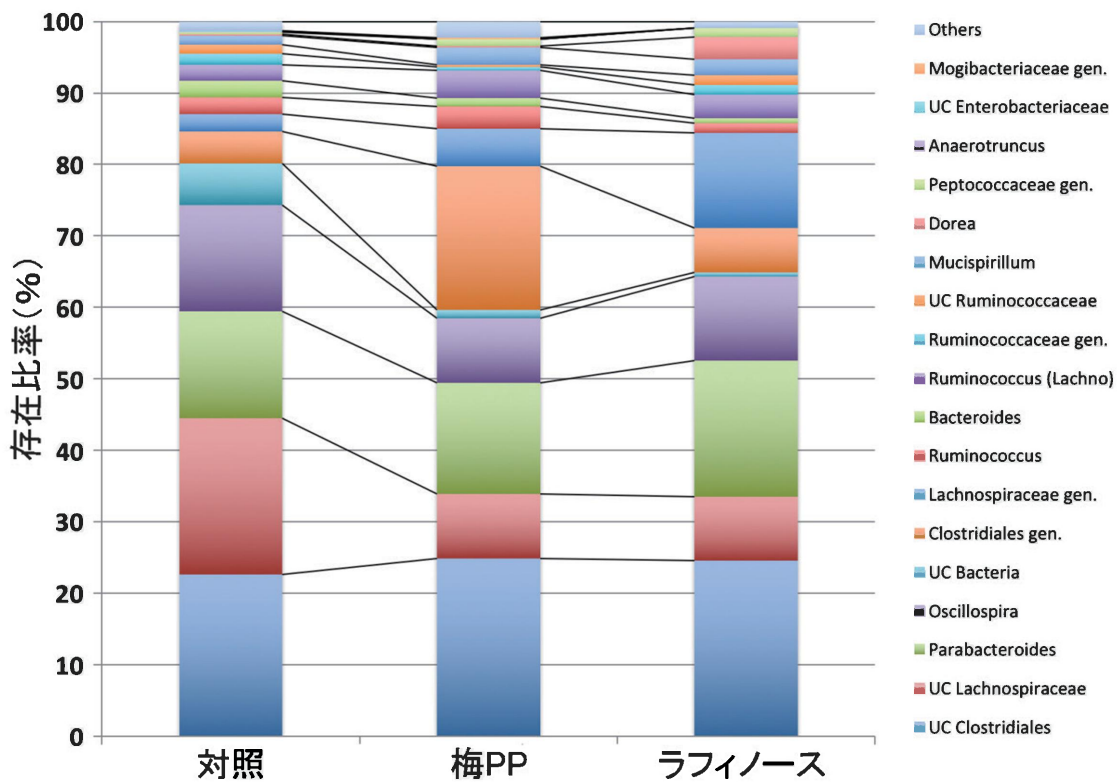


図3 属レベルの細菌群の構成

各 OTU を属レベルで統合し、0.1%以上を構成する属について、対照群において存在比率の高いものから積み上げて示した。0.1%未満の属は“Others”に含めた。UC, unclassified; gen., genus.

表3 群間で存在比率が有意に異なるカテゴリーの代表種

RDP classifier	代表種	対照	梅PP	ラフィノース
UC Lachnospiraceae	<i>Clostridium indolis</i>	21.9 ± 3.7	9.08 ± 1.31*	8.98 ± 3.25*
<i>Oscillospira</i>	<i>Oscillospira</i> sp.	14.8 ± 1.3	9.02 ± 0.61*	11.7 ± 0.77
Clostridiales gen.	<i>Acetatifactor muris</i>	4.45 ± 0.49	20.1 ± 3.08*	6.28 ± 1.60
Lachnospiraceae gen.	<i>Eubacterium plexicaudatum</i>	2.40 ± 0.43	5.26 ± 1.62	13.3 ± 1.09*
<i>Ruminococcus</i>	<i>Ruminococcus bromii</i>	2.35 ± 0.24	3.06 ± 0.12*	1.43 ± 0.26*
<i>Bacteroides</i>	<i>Bacteroides caccae</i>	2.33 ± 0.55	1.18 ± 0.08	0.63 ± 0.21*
UC Ruminococcaceae	<i>Anaerotruncus</i> sp.	1.28 ± 0.16	0.34 ± 0.02*	1.40 ± 0.46
<i>Dorea</i>	<i>Dorea</i> sp.	0.23 ± 0.09	0.26 ± 0.02	3.05 ± 0.73*
<i>Anaerotruncus</i>	<i>Anaerotruncus colihominis</i>	0.10 ± 0.04	0.00 ± 0.00*	0.00 ± 0.00*
Mogibacteriaceae gen.	<i>Mogibacterium</i> sp.	0.00 ± 0.00	0.16 ± 0.04*	0.00 ± 0.00

図3の各カテゴリーを構成する OTU のうち、存在比率が最も高いものの代表配列を BLAST 検索した結果を代表種として示す。存在比率は平均値±標準誤差 (対照群 n = 4、梅 PP 群 n = 5、ラフィノース群 n = 4) で示す。

*対照群に対して有意差有り ($p < 0.05$ 、Dunnett 検定)。

4. 考察

新規な機能性食品素材である梅 PP の腸内細菌フローラ改善効果を、マウスを用いて評価した。ビフィズス菌増殖効果がある代表的なプレバイオティクスのひとつであるラフィノースを陽性対照として設定した。梅 PP は約 65 %の糖質を含むことから、糖質含量をおおよそ同じにするために、梅 PP は 4 %、ラフィノースは 2 %を標準飼料に添加した。両試験群とも対照群と比較して体重変化に有意な差が認められなかったことから、含まれる糖質はラフィノース同様マウスによってほぼ消化吸収されず盲腸に到達したものと考えられる。梅 PP は渋味のある食品素材であるが、マウスがこれを忌避したわけではないことは、食餌量が対照群よりむしろやや多いことから明らかである。一方、盲腸重量は梅 PP 群で有意に増加した。この結果から、腸内発酵性が高まったと判断でき、梅 PP の整腸作用が示唆される。また、両試験群において、盲腸内の pH の低下傾向が見られたことも注目に値する。

In vitro の培養試験において、梅 PP は数種のビフィズス菌に対して増殖促進効果を示したため(未発表)、陽性対照群としてビフィズス菌増殖因子であるラフィノース群を設定したが、マウスの盲腸内からビフィズス菌は検出できなかった。飼育施設や環境に依存するが、マウス腸内にはビフィズス菌が生息しない場合が多いようである。今後、ビフィズス菌をもつ動物、あるいは人工的にビフィズス菌を定着させた動物を用いて評価する必要がある。

16S リボソーム RNA 遺伝子 V4 領域を用いたメタゲノム解析の結果、各マウスの試料から十分な数のリードが得られ、合計 149 の OTU が構築された。各試料の OTU 数に有意な差はなく、149 の OTU のうち 145 が全ての群に共通であった。梅 PP 群、ラフィノース群の腸内細菌フローラは、対照群と比較して、いずれも顕著な違いを示した。主成分分析の結果から、梅 PP はラフィノースとは異なる作用を示すことが示唆された。ラフィノースは純品の糖質であるのに対し、梅 PP は腸内発酵性を有する水溶性多糖と弱い抗菌作用を示すフェノール化合物を含むことより、複雑な効果を発揮しているものと考えられる。

梅 PP 群とラフィノース群で減少していた OTU の代表種 *Clostridium indolis* は、硫化水素、アンモニア、インドールなどの腐敗臭を発生させる細菌として知られている。また、*Anaerotruncus* 属もインドール生成細菌であるが、*Anaerotruncus* sp. で代表される OTU も梅 PP 群で減少していた。梅 PP 群においてのみ減少していた *Oscillospira* 属細菌は、悪臭の原因である吉草酸を生成することで知られる。

一方、梅 PP 群で顕著に割合が増加していた OTU を代表する *Acetatifactor muris* は、酢酸と酪酸を 3 : 1 の割合で生成する細菌である⁽¹⁷⁾。近年、酢酸や酪酸などの短鎖脂肪酸が腸内環境の良好な維持に重要であることが示唆されている。*Acetatifactor muris* はマウスに特異的に見出される種であるが、同様の作用がヒトでも見られるならば良い効果が期待できる。*Ruminococcus bromii* で代表される OTU も梅 PP 群で顕著に増加していたが、この細菌はヒトの腸内にも見られ、難消化性のレジスタントスターチの摂取により大腸内で増加し、これにともない酢酸や酪酸の量が増加することが報告されている^(18, 19)。*Ruminococcus bromii* はラフィノース非資化性であるため⁽²⁰⁾、ラフィノース群では減少した。また、梅 PP 群における個体間のばらつきが大きく有意差が認められなかったものの、存在比率の平均値が 2 倍以上に増加していた *Lachnospiraceae* gen. の代表種である *Eubacterium plexicaudatum* も酪酸生産菌である⁽²¹⁾。

以上のとおり、梅 PP は、腐敗臭を生成する細菌群を減少させ、短鎖脂肪酸を増やす細菌群を顕著に増加させる傾向が認められることから、新しいタイプのプレバイオティクスとして応用可能であると考えられる。今後、ヒトにおける臨床試験の実施が期待される。

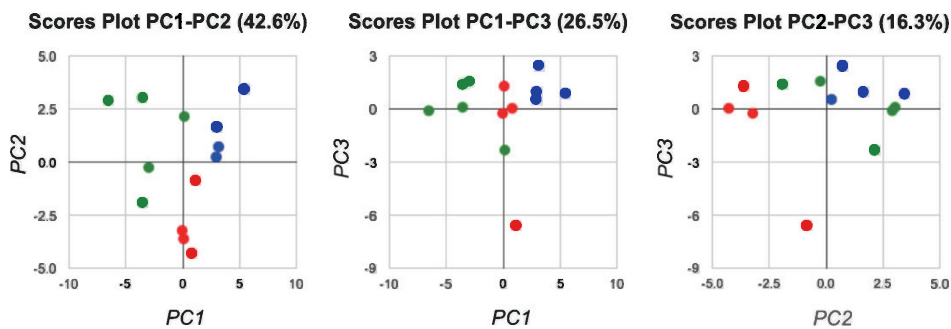


図4 主成分分析

第一主成分から第三主成分について二次元プロットを作成した。

対照群 (青)、梅 PP 群 (緑)、ラフィノース群 (赤)。

謝辞

本研究は和歌山県・地域イノベーション戦略支援プログラムの一環として行った。研究の遂行にあたりお世話になった、わかやま産業振興財団の関係諸氏に感謝する。また、技術面で有益な助言をいただいた、石川県立大学の小柳喬准教授に感謝する。

参考文献

1. Ina H, Yamada L, Matsumonoto K, Miyazaki T (2004) Effect of benzyl glucoside and chlorogenic acid from *Prunus mume* on adrenocorticotrophic hormone (ACTH) and catecholamine levels in plasma of experimental menopausal model rats. *Biol Pharm Bull.* 27, 136–137.
2. Takemura S, Yoshimasu K, Fukumoto J, Mure K, Nishio N, Kishida K, Yano F, Mitani T, Takeshita T, Miyashita K (2014) Safety and adherence of Umezu polyphenols in the Japanese plum (*Prunus mume*) in a 12-week double-blind randomized placebo-controlled pilot trial to evaluate antihypertensive effects. *Environ Health Prev Med.* (6), 444–451.
3. Takemura S, Yoshimasu K, Mure K, Fukumoto J, Nishio N, Kitano N, Kishida K, Yano F, Mitani T, Takeshita T, Miyashita K (2013) Are umezu polyphenols in the Japanese plum (*Prunus mume*) protective against mild hypertension and oxidation? Evidence from a double-blind randomized placebo-controlled trial. *Open J Prev Med.* 3, 561–569.
4. Matsuda H, Morikawa T, Ishiwada T, Managi H, Kagawa M, Higashi Y, Yoshikawa M (2003) Medicinal flowers. VIII. Radical scavenging constituents from the flowers of *Prunus mume*: structure of prunose III. *Chem Pharm Bull (Tokyo).* 51, 440–443.
5. Yan XT, Lee SH, Li W, Sun YN, Yang SY, Jang HD, Kim YH (2014) Evaluation of the antioxidant and anti-osteoporosis activities of chemical constituents of the fruits of *Prunus mume*. *Food Chem.* 156, 408–415.
6. Shi J, Gong J, Liu J, Wu X, Zhang Y (2009) Antioxidant capacity of extract from edible flowers of *Prunus mume* in China and its active components. *LWT-Food Sci Tech.* 42, 477–482.
7. Miyazawa M, Utsunomiya H, Inada K, Yamada T, Okuno Y, Tanaka H, Tatematsu M (2006) Inhibition of *Helicobacter pylori* motility by (+)-Syringaresinol from unripe Japanese apricot. *Biol Pharm Bull.* 29, 172–173.

8. Yoshikawa M, Murakami T, Ishiwada T, Morikawa T, Kagawa M, Higashi Y, Matsuda H (2002) New flavonol oligoglycosides and polyacylated sucroses with inhibitory effects on aldose reductase and platelet aggregation from the flowers of *Prunus mume*. *J Nat Prod.* 65, 1151–1155.
9. Kishida K, Suzuki M, Heya Y, Yamazaki Y, Horinishi A, Ozaki Y (2014) Phenolic extract from Japanese apricot fruit (*Prunus mume* Sieb et Zucc.) inhibits disaccharidase activity in the small intestine and suppresses the postprandial elevation of glucose levels in rats. *日本食品保蔵科学会誌* 40(3) 119–125.
10. Mitani T, Horinishi A, Kishida K, Kawabata T, Yano F, Mimura H, Inaba N, Yamanishi H, Oe T, Negoro K, Mori H, Miyake Y, Hosoda A, Tanaka Y, Mori M, Ozaki Y (2013) Phenolics profile of mume, Japanese apricot (*Prunus mume* Sieb. et Zucc.) fruit. *Biosci Biotechnol Biochem.* 77, 1623–1627.
11. Liu Z, DeSantis TZ, Andersen GL, Knight R (2008) Accurate taxonomy assignments from 16S rRNA sequences produced by highly parallel pyrosequencers. *Nucleic Acids Res.* 36, e120.
12. Caporaso JG, Lauber CL, Walters WA, Berg-Lyons D, Huntley J, Fierer N, Owens SM, Betley J, Fraser L, Bauer M, Gormley N, Gilbert JA, Smith G, Knight R (2012) Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. *ISME J.* 6, 1621–1624.
13. Li W, Fu L, Niu B, Wu S, Wooley J (2012) Ultrafast clustering algorithms for metagenomic sequence analysis. *Brief Bioinform.* (6), 656–668.
14. Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK, Fierer N, Peña AG, Goodrich JK, Gordon JI, Huttley GA, Kelley ST, Knights D, Koenig JE, Ley RE, Lozupone CA, McDonald D, Muegge BD, Pirrung M, Reeder J, Sevinsky JR, Turnbaugh PJ, Walters WA, Widmann J, Yatsunenkov T, Zaneveld J, Knight R (2010) QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat Methods.* 7, 335–336.
15. DeSantis TZ, Hugenholtz P, Larsen N, Rojas M, Brodie EL, Keller K, Huber T, Dalevi D, Hu P, Andersen GL (2006) Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. *Appl Environ Microbiol.* 72, 5069–5072.
16. Wang Q, Garrity GM, Tiedje JM, Cole JR (2007) Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Appl Environ Microbiol.* 73, 5261–5267.
17. Pfeiffer N, Desmarchelier C, Blaut M, Daniel H, Haller D, Clavel T (2012) *Acetatifactor muris* gen. nov., sp. nov., a novel bacterium isolated from the intestine of an obese mouse. *Arch. Microbiol.* 194, 901–907
18. Abell GC, Cooke CM, Bennett CN, Conlon MA, McOrist AL (2008) Phylotypes related to *Ruminococcus bromii* are abundant in the large bowel of humans and increase in response to a diet high in resistant starch. *FEMS Microbiol Ecol.* 66, 505–515.
19. Ze X, Duncan SH, Louis P, Flint HJ (2012) *Ruminococcus bromii* is a keystone species for the degradation of resistant starch in the human colon. *ISME J.* 6, 1535–1543.
20. Moore WEC, Cato EP, Holdeman LV (1972) *Ruminococcus bromii* sp. n. and emendation of the description of *Ruminococcus* Sijpestein. *Int J Syst Bacteriol.* 22, 78–80.
21. Wilkins TD, Fulghum RS, Wilkins JH (1974) *Eubacterium plexicaudatum* sp. nov., an anaerobic bacterium with a subpolar tuft of flagella, isolated from a mouse cecum. *Int J Syst Evol Microbiol.* 24, 408–411.

英文抄録

Effect of orally administered *ume* polyphenol on the cecal microflora of mice

Yoshimi Shimada, Takamasa Kagawa, Takafumi Fuke, Asako Horinishi, Yoshihiko Ozaki and Hisashi Ashida

To evaluate the effect of *ume* polyphenol (UPP) prepared from a liquid fraction “*umezu*”, the byproduct of Japanese traditional pickled plums “*umeboshi*”, on the intestinal microflora, BALB/c mice were fed with AIN-93M diets (control), AIN-93M containing 2% (w/w) UPP, or 4% (w/w) raffinose for 2 weeks. The cecal weight of UPP fed mice, but not raffinose fed mice, was significantly heavier than that of the control mice. The V4 region (254 bp) of 16S ribosomal RNA gene was amplified from the cecal contents by PCR, sequenced by Illumina MiSeq system, and phylogenetically assigned basically with RDP classifier. UPP group had significantly lower proportion of putrefactive bacterial OTUs (operational taxonomic units), which are represented by *Clostridium indolis*, *Oscillospira* sp. and *Anaerotruncus* sp., than control. In contrast, acetate- and/or butyrate-producing bacterial OTUs represented by *Acetatifactor muris* and *Ruminococcus bromii* were remarkably higher compared to the control. Principal component analysis showed that UPP and raffinose had different effects on microflora. We suggest that UPP improves the microflora of intestines by the mechanism different from raffinose.

Keywords: intestinal bacteria, metagenomics, prebiotics, polyphenol, *Prunus mume*