

平成 30 年 5 月 9 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07448

研究課題名 (和文) 食品由来廃棄物を有効活用した新規ビフィズス菌増殖因子の創成

研究課題名 (英文) Production of novel prebiotics for intestinal bifidobacteria from food wastes

研究代表者

芦田 久 (Ashida, Hisashi)

近畿大学・生物理工学部・教授

研究者番号：40379087

交付決定額 (研究期間全体) : (直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要 (和文) : 食品製造・加工過程において生成する2つの廃棄物を有効活用して、腸のビフィズス菌を増やす食品素材の生産を試みた。

- (1) 食肉加工過程で生成するブタ胃ムチンのO-結合型糖鎖をビフィズス菌由来の酵素、あるいは菌体を用いて分解することにより、ビフィズス菌特異的な増殖活性のある2糖ガラクト-N-ビオースの生産を検討した。
- (2) 梅干し製造過程で生成する梅酢由来の梅ポリフェノールによるビフィズス菌増殖効果を見出し、増殖の鍵酵素であるビフィズス菌由来の2種類のGH43エキソ- $\alpha$ -アラビノフラノシダーゼをクローニングした。梅ポリフェノールの腸内細菌フローラ改善効果について、マウスを用いて評価した。

研究成果の概要 (英文) : The production of prebiotics for intestinal bifidobacteria from two food wastes was studied.

- (1) By using bifidobacterial glycosidases or cells, bifidogenic disaccharide galacto-N-biose was released from wasted mucin, which contains abundant O-glycans. A novel 6-sulfo-N-acetylglucosaminidase, an essential enzyme for degradation of terminally sulfated glycans, was identified. A bifidobacterial strain defective in incorporation of galacto-N-biose was also screened, which is suitable for production of the disaccharide.
- (2) Mume-polyphenols prepared from umesu, a waste of umeboshi production, was found to enhance bifidobacterial growth. The major phenolic compound, prunose, was assimilated by *B. catenulatum* and *B. pseudocatenulatum*, which express prunose-specific ferulate esterase. Arabinan-like polysaccharides was degraded by two novel GH43 exo- $\alpha$ -arabinofuranosidases from *B. longum*. Effects of orally administrated mume-polyphenols on intestinal microbiota was evaluated using mice.

研究分野：微生物学

キーワード：ビフィズス菌

## 1. 研究開始当初の背景

近年、腸の健康が全身の健康の基礎になっていると考えられるようになってきた。腸の健康を維持・充進させるには、腸内細菌叢に占める善玉菌の割合を増やすことが重要である。ビフィズス菌は哺乳類の腸管に生息する共生菌で、宿主に良い影響を与える善玉菌の代表的菌種である。ビフィズス菌は「経口摂取することで宿主に良い影響を与える生きた微生物」と定義されるプロバイオティクスとしても広く認知されており、ヨーグルトに添加され、あるいは生菌製剤として市販されている。

申請者は共同研究者らとともに、ビフィズス菌によるヒトミルクオリゴ糖の特異的な代謝系路を明らかにすることで、ヒトミルクオリゴ糖の構成単位である2糖ラクト・N・ビオース (GalB1-3GlcNAc) がビフィズス菌に特異的に利用されることを突き止めた。全く同じ経路で、ムチンのO-結合型糖鎖の基部に存在するガラクト・N・ビオース (GalB1-3GalNAc) もビフィズス菌に取り込まれて利用されることが明らかになった。しかしながら、ラクト・N・ビオース/ガラクト・N・ビオースを安価に供給することは困難であった。

## 2. 研究の目的

本研究課題では、食品製造・加工過程において生成する2つの廃棄物を有効活用して、腸のビフィズス菌を増やす食品素材の生産を試みる。

ひとつは食肉加工過程で生成するブタ胃ムチンであり、ムチンのO-結合型糖鎖をビフィズス菌由来の酵素、あるいは菌体を用いて分解することにより、ビフィズス菌特異的な増殖活性のある2糖ガラクト・N・ビオースを生産する。

もうひとつは梅干し製造過程で生成する梅酢由来のポリフェノール・多糖を利用する。和歌山県では、梅酢から吸着樹脂を用いて梅ポリフェノールを大量調製する技術確立しており、新たな食品素材としての応用展開を図っている。梅ポリフェノールが *in vitro* 試験においてビフィズス菌の増殖を促進することを見出しており、本研究ではそのメカニズムを明らかにするとともに、動物を用いて腸内細菌叢の調節効果を評価することを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) 胃ムチンからのガラクト・N・ビオース生産関連

胃ムチンの非還元末端のキャップ構造には、シアル酸、 $\alpha$ -GlcNAc、ABO式血液型抗原などが存在し、微生物酵素による分解を妨げている。これらの構造に作用するビフィズ

ス菌由来の酵素をこれまでに同定してきたが、硫酸化糖のキャップ構造に作用する酵素については未知であったため、硫酸化GlcNAcに作用する酵素をゲノム情報から探索する。

申請者が見出した、ムチンの基部に作用するビフィズス菌由来の新規GH129ファミリー酵素 $\alpha$ -N-アセチルガラクトサミニダーゼの結晶構造を明らかにする。

菌体反応による胃ムチンからのガラクト・N・ビオース生産に適した菌株を、変異処理により育種するか、菌株ライブラリーから探索する。

### (2) 梅ポリフェノール関連

ゲル濾過を用いて、梅ポリフェノールを多糖画分とフェノール配糖体画分に分ける。それぞれがビフィズス菌にどのように利用されるかを明らかにして、それに関わる酵素群を特定する。

梅ポリフェノールをマウスに投与し、腸内細菌フローラへの影響、肥満や脂質代謝への影響を評価する。

## 4. 研究成果

(1) 従来、*B. bifidum* JCM 1254 株由来の $\beta$ -N-アセチルグルコサミニダーゼとして申請者らが報告したBbhIIが、6位が硫酸化されたGlcNAcに10倍以上よく作用するスルフォグリコシダーゼであることを明らかにした。

(2) *B. bifidum* JCM 1254 株から見出した新規GH129ファミリーに属する酵素であるNagBbの結晶構造解析に成功した。基質認識に金属イオン(カルシウムイオン)が関与し、反応に重要であるという、これまでのグリコシダーゼには見られない特異な機構をもつ酵素であることを明らかにした。

(3) 菌体反応により、ブタ胃ムチンからガラクト・N・ビオース/ラクト・N・ビオースを調製することを目的として、これら2糖の資化性を欠損した*B. bifidum*を各寄託機関の保有株からスクリーニングしたところ、最適な1株を見出した。本菌株は、おそらく2糖のABCトランスポーター遺伝子に変異があるため、菌体内への取り込みが起こらない。そのため、菌体とムチンを反応させた場合、反応上清に2糖を蓄積するので、生産性が極めて高くなった。

(4) 梅ポリフェノール粉末に含まれる多糖を分解する*B. longum* subsp. *longum* JCM 1217由来のGH43酵素、BLLJ\_1852とBLLJ\_1853をクローニングした。両者ともアラビナンによく作用する $\text{exo-}\alpha$ -アラビノフラノシダーゼであり、BLLJ\_1852は $\alpha$ 1,2-結合と $\alpha$ 1,3-結合のアラビノフラノシドに、BLLJ\_1853は $\alpha$ 1,5-結合のアラビノフラノシドに特異的に作用

した。これらの結果から、前者がアラビナンの側鎖に、後者がアラビナンの主鎖に作用することで、アラビナンを分解し、梅ポリフェノール粉末に含まれるアラビナン様の多糖の資化に関わることが示された。

(5) 梅ポリフェノールの主要成分であるプルノースは、アセチル化ショ糖にフェルラ酸がエステル結合したものである。プルノースが、成人の腸管に多い *B. catenulatum* や *B. pseudocatenulatum* の増殖を促進させることを見出した。これらのビフィズス菌は、プルノースに特異的なフェルラ酸エステラーゼを発現しており、本酵素によりアセチル化ショ糖を遊離させ、資化しているものと示唆された。

(6) 梅ポリフェノールの腸内細菌フローラ改善効果について、BALB/c マウスを用いて評価した。梅ポリフェノールの経口投与により、悪玉菌である *Clostridium indorls* や *Oscillospira* 属が有意に減少し、酢酸などの有機酸を生成する *Acetatifactor muris* や *Ruminococcus bromii* が有意に増加した。しかしながら、BALB/c マウスにはビフィズス菌が生息していなかったため、ビフィズス菌に対する影響は評価できなかった。

次に、高脂肪食を投与した C57BL/6J に対する梅ポリフェノールの効果を評価した。ビフィズス菌は高脂肪食により検出限界以下にまで減少したが、高脂肪食に梅ポリフェノールを 1% 添加することで、わずかではあるが有意に回復した。また、高脂肪食で誘導された肥満型の高 *Clostridia/Bacteroidia* 比のフローラが、梅ポリフェノールにより改善されることを明らかにした。体重増加や血清中性脂肪の上昇も抑制させたことから、腸内細菌フローラの改善による抗肥満効果も示唆された。

## 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 10 件)

① Higashiyama T, Umekawa M, Nagao M, Katoh T, Ashida H, Yamamoto K  
Chemo-enzymatic synthesis of the glucagon containing *N*-linked oligosaccharide and its characterization.  
Carbohydr Res 455 92-96 (2017) [査読有り]  
Doi: 10.1016/j.carres.2017.11.007

② Katoh T, Maeshibu T, Kikkawa KI, Gotoh A, Tomabechi Y, Nakamura M, Liao WH, Yamaguchi M, Ashida H, Yamamoto K, Katayama T  
Identification and characterization of a

sulfoglycosidase from *Bifidobacterium bifidum* implicated in mucin glycan utilization.  
Biosci Biotech Biochem 81 2018-2027 (2017)  
[査読有り]  
Doi: 10.1080/09168451.2017.1361810

③ Sato M, Liebschner D, Yamada Y, Matsugaki N, Arakawa T, Wills SS, Hattie M, Stubbs KA, Ito T, Senda T, Ashida H, Fushinobu S  
The first crystal structure of a family 129 glycoside hydrolase from a probiotic bacterium reveals critical residues and metal cofactors.  
J Biol Chem 292 12126-12138 (2017) [査読有り]  
Doi: 10.1074/jbc.M117.777391

④ Abe Y, Inoue H, Ashida H, Maeda Y, Kinoshita T, Kitada S  
Glycan region of GPI anchored-protein is required for cytotoxic oligomerization of an anticancer parasporin-2, Cry46Aa1 protein, from *Bacillus thuringiensis* strain A1547.  
J Invertebr Pathol 142 71-81 (2017) [査読有り]  
Doi: 10.1016/j.jip.2016.11.008

⑤ Sugiyama Y, Katoh T, Honda Y, Gotoh A, Ashida H, Kurihara S, Yamamoto K, Katayama T  
Application study of 1,2- $\alpha$ -L-fucosynthase: introduction of Fuc $\alpha$ 1-2Gal disaccharide structures on *N*-glycan, ganglioside, and xyloglucan oligosaccharide.  
Biosci Biotech Biochem 81 283-291 (2017)  
[査読有り]  
Doi: 10.1080/09168451.2016.1254532

⑥ 芦田 久  
消化管ムチンを介した微生物と宿主の相互作用  
化学と生物 54 901-908 (2016) [査読無し]  
[https://katosei.jsbba.or.jp/view\\_html.php?aid=703](https://katosei.jsbba.or.jp/view_html.php?aid=703)

⑦ Shimada Y, Ashida H  
Microbial diversity of 'narezushi' from Wakayama Prefecture, western Japan  
Mem. Faculty. B.O.S.T. Kindai University (38) 1-10 (2016) [査読無し]  
<http://id.nii.ac.jp/1391/00018280/>

⑧ Sugiyama Y, Gotoh A, Katoh T, Honda Y, Yoshida E, Kurihara S, Ashida H, Kumagai H, Yamamoto K, Kitaoka M, Katayama T  
Introduction of H-antigens into oligosaccharides and sugar chains of glycoproteins using highly efficient 1,2- $\alpha$ -L-fucosynthase.  
Glycobiology 26 1235-1247 (2016) [査読有り]  
Doi: 10.1093/glycob/cww085

⑨ 島田良美、香川昂雅、普家崇史、堀西朝子、尾崎嘉彦、芦田 久  
梅ポリフェノールのマウス腸内細菌フロー

ラ改善効果  
近畿大学生物理工学部紀要 (37) 1-10 (2016)  
[査読無し]  
<http://id.nii.ac.jp/1391/00017618/>

⑩ Gotoh A, Katoh T, Sugiyama Y, Kurihara S, Honda Y, Sakurama H, Kambe T, Ashida H, Kitaoka M, Yamamoto K, Katayama T  
Novel substrate specificities of two lacto-*N*-biosidases towards  $\beta$ -linked galacto-*N*-biose-containing oligosaccharides of globo H, Gb5, and GA1.  
Carbohydr Res 408 18-24 (2015) [査読有り]  
Doi: 10.1016/j.carres.2015.03.005

[学会発表] (計 17 件)

① 伏信進矢、山田千早、佐藤真与、後藤愛那、荒川孝俊、芦田 久、片山高嶺  
ビフィズス菌由来ヒト糖鎖分解酵素の基質認識と触媒機構  
ConBio2017 (ワークショップ 2AW27-5)  
神戸国際会議場 (兵庫県神戸市)  
2017年12月7日(木)

② 芦田 久  
梅ポリフェノールのマウス腸内細菌フローラ改善効果  
石川県立大学腸内細菌共生機構学寄附講座 (IFO) シンポジウム「北陸の微生物研究」  
金沢東急ホテル (石川県金沢市)  
2017年8月31日

③ 米野雅大、芦田 久  
*Bifidobacterium longum* のアラビナン分解系の解析  
第36回日本糖質学会年会 (ポスター P-158)  
旭川市民文化会館 (北海道旭川市)  
2017年7月21日

④ 加藤紀彦、前洪貴子、吉川慶一、後藤愛那、山口真範、芦田 久、山本憲二、片山高嶺  
ムチンの硫酸化糖鎖に作用するビフィズス菌由来スルフォグリコシダーゼ  
第18回関西グライコサイエンスフォーラム (一般講演4)  
京都大学医学部 (京都府京都市)  
2017年5月13日

⑤ 加藤紀彦、前洪貴子、吉川慶一、後藤愛那、芦田 久、山本憲二、片山高嶺  
ムチン糖鎖に作用するビフィズス菌由来スルフォグリコシダーゼの同定と機能解析  
日本農芸化学会 2017年度大会 (一般講演 2J33p03)  
京都女子大学 (京都府京都市)  
2017年3月18日

⑥ 佐藤真与、Dorothee Liebschner、山田悠介、松垣直宏、千田俊哉、荒川孝俊、芦田 久、伏信進矢  
GH129  $\alpha$ -*N*-アセチルガラクトサミニダーゼの金属結合サイトと阻害剤を用いた解析  
日本農芸化学会 2017年度大会 2J33p04  
京都女子大学 (京都府京都市)  
2017年3月18日

⑦ Thida Chaiwangsri, Takashi Koyanagi, Hisashi Ashida, Chiaki Matsuzaki, Takane Katayama  
Isolation and identification of lactic acid bacteria from fermented fish and screening of bacteriocin-producing bacteria  
The 2nd joint seminar. Core to Core Program A. Advanced Research Networks. (Poster PI-8)  
Bangsaen Heritage Hotel, Chonburi, Thailand  
14-15 Nov. 2016

⑧ 米野 雅大、芦田 久  
*Bifidobacterium longum* のアラビノ多糖・オリゴ糖資化メカニズムと関連する酵素群の解析  
日本応用糖質科学会平成 28 年度大会 (一般講演 Ca-6)  
福山大学 (広島県福山市)  
2016年9月14日(水)

⑨ 佐藤真与、Dorothee Liebschner、荒川孝俊、山田悠介、千田俊哉、芦田 久、伏信進矢  
GH129 ファミリー  $\alpha$ -*N*-アセチルガラクトサミニダーゼの X 線結晶構造解析  
日本応用糖質科学会平成 28 年度大会 (一般講演 Dp-15)  
福山大学 (広島県福山市)  
2016年9月14日(水)

⑩ 米野 雅大、鈴木 里奈、芦田 久  
Sd<sup>a</sup>抗原/GM2に作用するビフィズス菌由来のバイファンクショナル酵素  
第35回日本糖質学会年会 (ポスター P-089)  
高知市文化プラザかるぽーと (高知県高知市)  
2016年9月2日(金)

⑪ 米野雅大、速水穂乃香、芦田 久  
アラビナン分解に関わる *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* の 2 つの新奇  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase  
日本乳酸菌学会 2016 年度大会 (一般講演 16-1-20)  
北里大学薬学部 (東京都港区)  
2016年7月9日(土)

⑫ 芦田 久、米野 雅大、速水 穂乃香  
*Bifidobacterium longum* subsp. *longum* のヘミセルロース分解酵素遺伝子クラスターの解析

日本農芸化学会 2016 年度大会 (ポスター  
4D026)  
札幌コンベンションセンター (北海道札幌  
市)  
2016 年 3 月 30 日 (水)

⑬ 米野雅大、速水穂乃香、芦田 久  
*Bifidobacterium longum longum* がもつ新規の  
アラビノース含有糖鎖分解酵素遺伝子クラ  
スターの解析  
第 64 回 日本応用糖質科学会大会 (一般講演  
Da-5)  
奈良春日野国際フォーラム薨 (奈良県奈良  
市)  
2015 年 9 月 16 日 (水)

⑭ 向井麻衣、守田美咲、前田直樹、福永悟史、  
島田良美、芦田 久  
梅酢に含まれる糖質のプレバイオティック  
効果  
第 64 回 日本応用糖質科学会大会 (一般講演  
Dp-3)  
奈良春日野国際フォーラム薨 (奈良県奈良  
市)  
2015 年 9 月 16 日 (水)

⑮ 芦田 久  
ヒトとの共生に関わるビフィズス菌のグリ  
コシダーゼ  
第 16 回 関西グライコサイエンスフォーラム  
(招待講演)  
大阪大学 (大阪府豊中市)  
2015 年 5 月 16 日 (土)

⑯ 米野雅大、速水穂乃香、芦田 久  
*Bifidobacterium longum subsp. longum* JCM  
1217 がもつ新規のアラビノース含有糖鎖分  
解酵素遺伝子クラスターの解析  
2015 年度 乳酸菌学会泊まり込みセミナー  
(一般講演)  
サンライズ淡路 (兵庫県南あわじ市)  
2015 年 5 月 15 日 (金)

⑰ 福永悟史、中林直也、島田良美、芦田 久  
和歌山県産本なれ鮓の菌叢解析と有用乳酸  
菌の探索  
2015 年度 乳酸菌学会泊まり込みセミナー  
(一般講演)  
サンライズ淡路 (兵庫県南あわじ市)  
2015 年 5 月 15 日 (金)

[その他]  
ホームページ等  
<https://researchmap.jp/ashida/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

芦田 久 (ASHIDA, Hisashi)  
近畿大学・生物理工学部・教授  
研究者番号：40379087