

梅ポリフェノールの肥満モデルマウスに対するプレバイオティック効果と ビフィズス菌増殖メカニズム

米野 雅大¹, 伊藤 あずさ², 大東 夏海², 吉原 侑希¹, 鈴木 利雄³, 永井 宏平^{1,4}, 芦田 久^{1,2}

要旨

梅干し製造時の副産物として生じる梅酢から合成吸着剤を用いて調製された梅ポリフェノール（梅 PP）は、約 12% のフェノール化合物と約 65% の糖質を含む食品素材である。本研究では、高脂肪食で誘導した肥満モデルマウスに対する梅 PP のプレバイオティック効果を評価した。5 週齢の C57BL/6J kwl SPF マウスを 3 群に分け、標準食、高脂肪食、または 1.0% 梅 PP を含む高脂肪食を自由摂取させ、5 週間飼育した。梅 PP 群は高脂肪食群に対し、体重増加の抑制傾向と、血清中性脂肪の有意な低下が見られた。盲腸重量および盲腸内容物の酢酸と n-酪酸の含有量は、高脂肪食群で減少傾向であったが、梅 PP 群で回復傾向を示した。盲腸内容物の細菌フローラを T-RFLP（Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism）法により解析したところ、高脂肪食群で検出限界以下にまで減少したビフィズス菌が、梅 PP 群でわずかではあるが有意に回復した。また、Bacteroidetes 門に属する *Bacteroides* 属や *Prevotella* 属は、高脂肪食群に対して梅 PP 群で増加傾向であった。Firmicutes 門に属する Lactobacillales 目や Clostridia 綱は、標準食群に対して高脂肪食群で有意に増加したが、梅 PP 群では高脂肪食群と差がなかった。肥満型フローラの指標である Firmicutes/Bacteroidetes 比は、標準食群では 0.2 であったが、高脂肪食群で 1.6 と高値になり、梅 PP 群では 1.1 と中間的な値となった。梅 PP のビフィズス菌増殖メカニズムを調べるために *in vitro* で増殖試験を行ったところ、ヒト成人の腸管に生息するいくつかのビフィズス菌が梅 PP を糖質源として利用できることが明らかになった。アラビナン特異的な *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* JCM 1217 由来の 2 種の α -L-アラビノフラノシダーゼ（BLLJ_1852 と BLLJ_1853）を梅 PP に作用させたところ、アラビノースを遊離した。梅 PP はアラビナン様の多糖を含み、これがビフィズス菌増殖因子のひとつであることが示唆された。

キーワード：梅、肥満、脂質代謝、腸内細菌、プレバイオティクス

1. 緒論

和歌山県は果実生産が盛んであるが、なかでもウメ（*Prunus mume* Siebold et Zuccarini）果実の収穫量の全国順位は 1 位で、平成 29 年には全国の 62% を占めている⁽¹⁾。ウメ果実は大部分が梅干しへと加工され消費されている。梅干しは、古来より日本人の食生活を支えてきた伝統的な保存食品である。完熟ウメ果実を約 1 ヶ月間塩漬けし、その後に天日干しされたものが白干し梅であるが、塩漬け中に副産物として大量の梅酢が発生する。梅酢はウメ果実由来のポリフェノールや可溶性多糖を多く含むが、塩分濃度が高いため、あまり有効利用されていない。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・粉末化する技術が開発された。これを梅ポリフェノール（梅 PP）と名付け、新規の機能性食品素材としての応用展開が進められている。梅 PP は約 12% のフェノール化合物、約 65% の糖

受付日 2018 年 8 月 20 日、受理日 2018 年 9 月 9 日

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および JSPS 科研費 JP15K07448 の助成金を受けたものである。

1. 近畿大学大学院生物理工学研究科 生物工学専攻, 〒649-6493 和歌山県紀の川市西三谷 930

2. 近畿大学生物理工学部 食品安全工学科, 〒649-6493 和歌山県紀の川市西三谷 930

3. 大阪府立大学 生物資源開発センター, 〒599-8531 大阪府堺市中央区学園町 1-2

4. 近畿大学生物理工学部 遺伝子工学科, 〒649-6493 和歌山県紀の川市西三谷 930

質、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、フェルラ酸などのヒドロキシ桂皮酸類である⁽²⁾。ヒドロキシ桂皮酸類の一部は、アセチル化ショ糖とエステル結合し、ウメの花や果実に特徴的な糖エステル化合物であるプルノースを構成している^(3,4)。その他の糖質は水溶性の多糖類で、平均鎖長約 100 残基と見積もられているが、詳細な構造は明らかではない。

私たちは以前に、標準食を給餌した BALB/c マウス（日本チャールズ・リバー）に梅 PP を投与し、腸内細菌フローラへの影響を評価した⁽⁵⁾。梅 PP 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 OTU (operational taxonomic unit) を減少させ、酢酸や酪酸を生産するとされる OTU を増加させた。これらの結果から、梅 PP には腸内細菌フローラの改善効果、すなわちプレバイオティック効果があることが示唆された。しかしながら、このマウスの腸内にはビフィズス菌が全く生息していなかったため、梅 PP のビフィズス菌への効果を調べるができなかった。SPF マウスは、飼育施設によって腸内細菌フローラが大きく異なることが知られている。その後、C57BL/6J マウス（紀和実験動物研究所）の腸内にはビフィズス菌が生息することがわかったため、改めて梅 PP 投与試験を実施することにした。本研究では、高脂肪食を給餌した C57BL/6J 肥満モデルマウスに対して梅 PP を投与し、肥満型の腸内細菌フローラに対する効果について調べた。動物実験の結果から、梅 PP にビフィズス菌増殖促進効果が認められたため、いくつかのヒト由来ビフィズス菌の *in vitro* 増殖促進試験をおこない、増殖促進メカニズムの解明を試みた。

2. 材料と方法

2.1 梅 PP

梅 PP (lot no. 121210) は株式会社サンアクティス（大阪市）より供与していただいたものを使用した。

2.2 動物実験

5 週齢の C57BL/6J kwl SPF マウスは株式会社紀和実験動物研究所（和歌山県紀美野町）より購入した。AIN-93M 飼料と HFD-60 飼料はオリエンタル酵母工業株式会社（東京都板橋区）より購入した。温度 $20.0 \pm 2.0^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $50 \pm 30\%$ の環境で飼育し、餌と水は自由に摂取させた。5 日間の馴化期間の後に体重を測定し、各群が均等になるよう 3 群に分けた。標準食群には AIN-93M 飼料+2.0%セルロース粉末、高脂肪食群には HFD-60 飼料+2.0%セルロース粉末、梅 PP 群には HFD-60 飼料+1.0%梅 PP+1.0%セルロース粉末を、それぞれ与えた。各群とも♂4 匹、♀4 匹で試験を行った。週に 3 回、採餌量と体重を測定した。5 週間後に解剖した後、採血し、盲腸を採取・重量測定した。また、♂については副辜丸脂肪を採取し重量を測定した。解剖前の絶食は実施しなかった。本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 血液成分の測定

中性脂肪はラボアッセイトリグリセライド（和光純薬工業株式会社、大阪市）、総コレステロールはコレステロール E-テストワコー（和光純薬）を用いて測定した。

2.4 盲腸内容物の解析

盲腸を採取後、盲腸内容物のみを搾り取り、 -80°C で解析まで保存した。T-RFLP (Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism) 解析と有機酸の測定は、株式会社テクノスルガラボ（静岡県静岡市）に於いて実施した。T-RFLP では、PCR で増幅させた 16S rRNA 遺伝子を制限酵素 *BstI* で切断した断片を解析に用いた。

2.5 統計

高脂肪食群に対して、片側 t 検定により検定した。p<0.05 の場合、有意な差があるものと判断した。

2.6 菌株および培地

Bifidobacterium bifidum JCM 1254、*B. adolescentis* JCM 7046、*B. longum* subsp. *longum* JCM 1217 は理化学研究所バイオリソース研究センター（茨城県つくば市）より入手した。前培養には GAM Broth（日水製薬株式会社、東京都台東区）を、増殖試験には糖質制限培地を使用した。糖質制限培地は 1.0% Bacto Peptone（BD, NJ, USA）、0.5% Bacto Yeast Extract（BD）、0.5% 酢酸ナトリウム三水和物（和光純薬）、0.2% クエン酸水素二アンモニウム（和光純薬）、0.02% 硫酸マグネシウム七水和物（和光純薬）、0.08% L-システイン塩酸塩一水和物（和光純薬）、1.36% L-アスコルビン酸（和光純薬）、0.44% 無水炭酸ナトリウム（和光純薬）を混合し調製した。

2.7 ビフィズス菌増殖試験

B. bifidum JCM 1254、*B. adolescentis* JCM 7046、*B. longum* subsp. *longum* JCM 1217 を GAM 液体培地で 24 時間嫌気培養した。集菌しリン酸緩衝生理食塩水（PBS）に懸濁した後、終濃度が OD₆₀₀=0.25 になるように各培地で希釈した。5.0% 梅 PP 溶液及び 5.0% グルコース溶液を 0.45µm フィルターで除菌した後、梅 PP は終濃度 0.1% および 0.5%、グルコースは終濃度 1.0% になるように糖質制限培地に添加した。96 ウェルプレートに各培地を分注した後に、マイクロシール R（MSB1001, Bio-Rad, CA, USA）で空気が入らないように上面をシールし、パワースキャン HT（大日本住友製薬、大阪市）を用いて 37℃ で 36 時間インキュベートし、1 時間ごとに OD₆₀₀ を測定した。

2.8 ビフィズス菌由来α-L-アラビノフラノシダーゼによる梅 PP 多糖の分解試験

当研究室でクローニングした *B. longum* subsp. *longum* JCM 1217 由来の糖質加水分解酵素ファミリー 43（GH43）および GH51 の組換えα-L-アラビノフラノシダーゼを大腸菌 *Escherichia coli* BL21(λDE3) で発現させたのち、His GraviTrap（GE Healthcare, IL, USA）で精製して用いた。0.1mg の梅 PP と 5µg の各酵素を 50µl の 1.0mM 酢酸ナトリウム緩衝液（pH5.5）中で、37℃ で 24 時間インキュベートし、シリカゲル 60 TLC プレート（Merck Millipore, MA, USA）で糖を分析した。1-ブタノール：酢酸：水（2: 1: 1）で展開後、アセトン：アニリン：ジフェニルアミン：リン酸（100: 1: 1: 10）を噴霧し、オーブンを用いて 150℃ で 15 分程度加熱した。

3. 結果

3.1 梅 PP の抗肥満効果と脂質代謝改善効果

5 週齢の C57BL/6J kwl SPF マウスを 3 群に分け、標準食、高脂肪食、1.0% 梅 PP を含む高脂肪食を与え、5 週間飼育した。1 日あたりの採餌量は、標準食群に対して高脂肪食群でやや減少し、梅 PP 群でも同様であった（図 1AB）。体重は、標準食群に対して高脂肪食群でより増加して肥満傾向を示したが、梅 PP 群♂では高脂肪食群と体重変化量は変わらなかったものの（図 1C）、梅 PP 群♀では体重増加が有意に抑制されていた（p=0.03）（図 1D）。梅 PP 群♂の副睾丸脂肪量は、高脂肪食群と比較して、有意差はないが減少傾向が見られた（p=0.25）（図 1E）。血清の中性脂肪は、♂♀とも高脂肪食で有意に上昇し、梅 PP 群♂で減少傾向（p=0.087）（図 1F）、梅 PP 群♀で有意に減少した（p=0.04）（図 1G）。血清の総コレステロールについては、高脂肪食群に対して梅 PP 群で変化は見られなかった（図 1HI）。以上の結果から、梅 PP には高脂肪食摂取時における血中中性脂肪を低下させる可能性が示唆された。

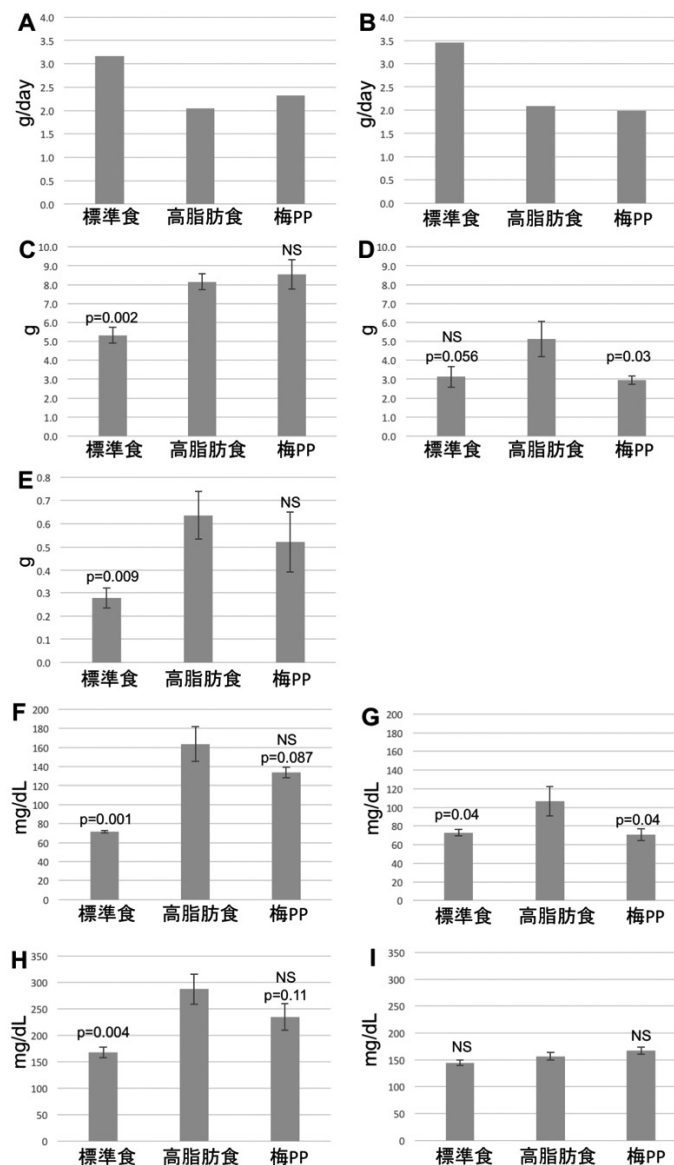


図1 梅 PP の体重と血中脂質への影響

A. 採餌量 (♂)、B. 採餌量 (♀)、C. 体重増加量 (♂)、D. 体重増加量 (♀)、E. 副睪丸脂肪重量 (♂)、F. 血清中性脂肪濃度 (♂)、G. 血清中性脂肪濃度 (♀)、H. 血清総コレステロール濃度 (♂)、I. 血清総コレステロール濃度 (♀)。

C-I の誤差バーは標準誤差 (n=4)、p 値は高脂肪食群に対する片側 t 検定確率、NS は有意差なしを示す。

3.2 梅 PP の盲腸内環境への影響

マウスの盲腸はヒトの大腸に相当し、腸内細菌を多く含む。腸内細菌の良好な生育の指標となる盲腸重量は、高脂肪食群♂では標準食群に対して有意に減少し、梅 PP 群で回復傾向を示した (p=0.15) (図 2A)。♀では各群に差異はなかった (図 2B)。腸内細菌により生成される盲腸内の短鎖脂肪酸および乳酸含量については、♂試料のみで測定した。酢酸と n-酪酸は、高脂肪食群で減少し、梅 PP 群で回復する傾向が見られた (図 2CD)。乳酸は、高脂肪食群で顕著に減少し (p=0.002)、梅 PP 群でさらに減少した (p=0.01) (図 2E)。梅 PP に高脂肪食による変化を回復させる効果を想定し片側 t 検定を実施したが、両側 t 検定であっても有意な減少である (p=0.02)。

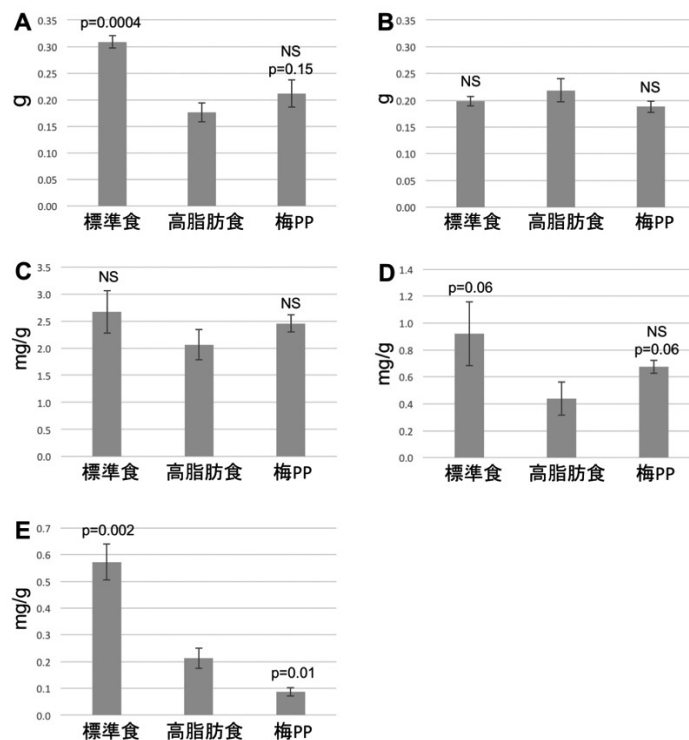


図2 梅 PP の盲腸重量と盲腸内有機酸含量への影響

A. 盲腸重量 (♂)、B. 盲腸重量 (♀)、C. 盲腸内容物の酢酸含量 (♂)、D. 盲腸内容物の n-酪酸含量 (♂)、E. 盲腸内容物の乳酸含量 (♂)。

誤差バーは標準誤差 (n=4)、p 値は高脂肪食群に対する片側 t 検定確率、NS は有意差なしを示す。

3.3 梅 PP の腸内細菌フローラへの影響

T-RFLP 法を用いて、盲腸内容物の細菌フローラを解析した。腸内細菌フローラには性差は認められなかったため、♂♀各 4 匹のデータを合わせて解析した (図 3A)。ヒト腸内細菌のデータベースを参照して種群を推定したが、標準食群に対して高脂肪食群と梅 PP 群で同定不能なシグナルが約 4 倍に増加した (図 3B)。 *Bifidobacterium* 属は、高脂肪食群で検出限界以下にまで減少したが、梅 PP 群でわずかながら有意に回復した (図 3C)。乳酸菌目 (Lactobacillales) は高脂肪食群で有意に増加し (p=0.05)、梅 PP 群では高脂肪食群と差がなかった (図 3D)。 *Bacteroides* 属は標準食群と高脂肪食群で変化が無く、梅 PP 群で増加傾向が見られた (図 3E)。 *Prevotella* 属は標準食群で最も優勢なグループで、全体の約 60%を占めるが、高脂肪食群では顕著に減少し (p<0.001)、梅 PP 群で有意に回復した (p=0.03) (図 3F)。 Clostridia 綱は、胆汁酸耐性の高いものが多いため、高脂肪食群で有意に増加したが (p=0.01)、梅 PP 群では高脂肪食群と差がなかった (図 3G)。肥満型フローラの指標となる Firmicutes/Bacteroidetes 比を、Firmicutes 門に属する Lactobacillales 目と Clostridia 綱の和と、Bacteroidetes 門に属する *Bacteroides* 属と *Prevotella* 属の和の比から算出した。標準食群では 0.2 であったが、高脂肪食群で 1.6 と高値になり、梅 PP 群では 1.1 と中間的な値となった。これらの結果から、梅 PP には、高脂肪食で誘導された肥満型のフローラを、健常型のフローラの方へ改善するプレバイオティック効果があることが示された。

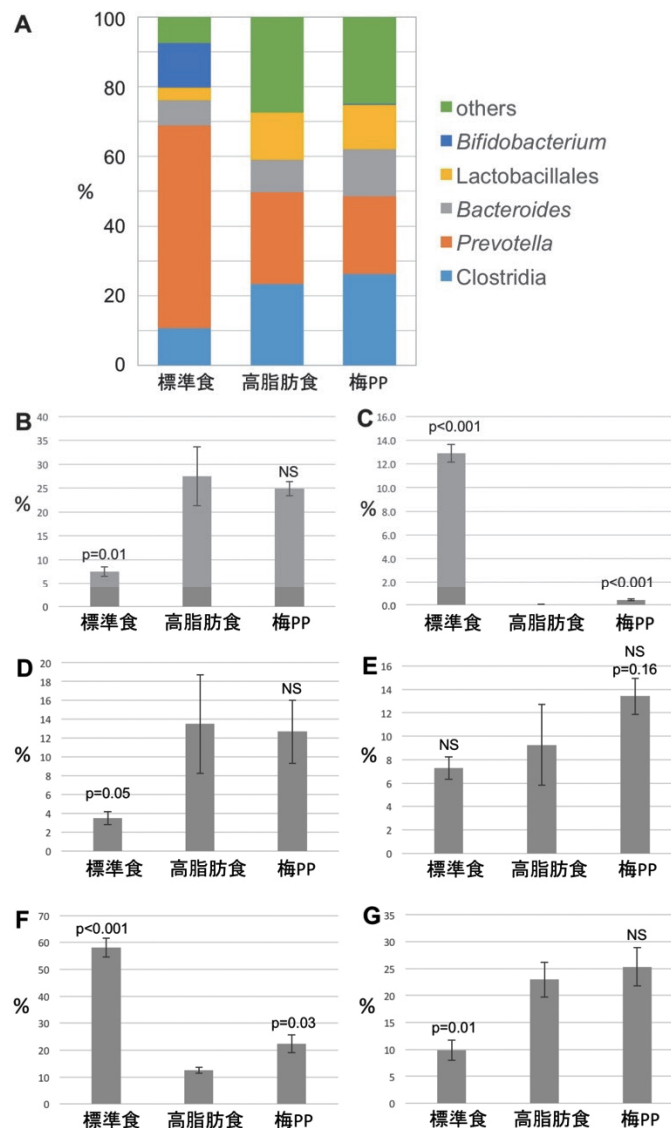


図3 梅PPの腸内細菌フローラへの影響

A. T-RFLP分析、B. 未同定種の割合、C. *Bifidobacterium* 属の割合、D. *Lactobacillales* 目の割合、E. *Bacteroides* 属の割合、F. *Prevotella* 属の割合、G. *Clostridia* 綱の割合。

B-Gの誤差バーは標準誤差 (n=8)、p値は高脂肪食群に対する片側t検定確率、NSは有意差なしを示す。

3.4 ビフィズス菌増殖試験

マウス盲腸内容物のT-RFLP解析から、梅PPにはビフィズス菌の増殖促進効果があることが示唆された。梅PPには一部のグラム陰性菌に対して弱い抗菌活性があることが報告されている⁽⁶⁾。そこで、梅PPがビフィズス菌の増殖を直接促進しているのか、他の腸内細菌の増殖を抑制することで相対的なビフィズス菌の割合が増加したのかを確かめるために、*in vitro*における純粋培養系でビフィズス菌の増殖促進試験を行った。ヒト由来の世代間の分布特性の異なる代表的な3菌種、すなわち、乳児の腸管に多い *B. bifidum* JCM 1254、成人の腸管に多い *B. adolescentis* JCM 7046、乳児・成人の両方に生息する *B. longum* subsp. *longum* JCM 1217 を評価に用いた。糖質を制限した培地に、梅PPまたはグルコースを添加し、菌の増殖を経時的にモニターしたところ、*B. adolescentis* JCM 7046 と *B. longum* subsp. *longum* JCM 1217 では梅PP含有培地での良

好な増殖が確認できた (図 4AB)。しかしながら、*B. bifidum* JCM 1254 においてはグルコース培地では増殖したもの、梅 PP 培地での増殖は認められなかった (図 4C)。この結果から、成人に多いビフィズス菌では、梅 PP は糖質源として利用され、増殖を促進することが判明した。

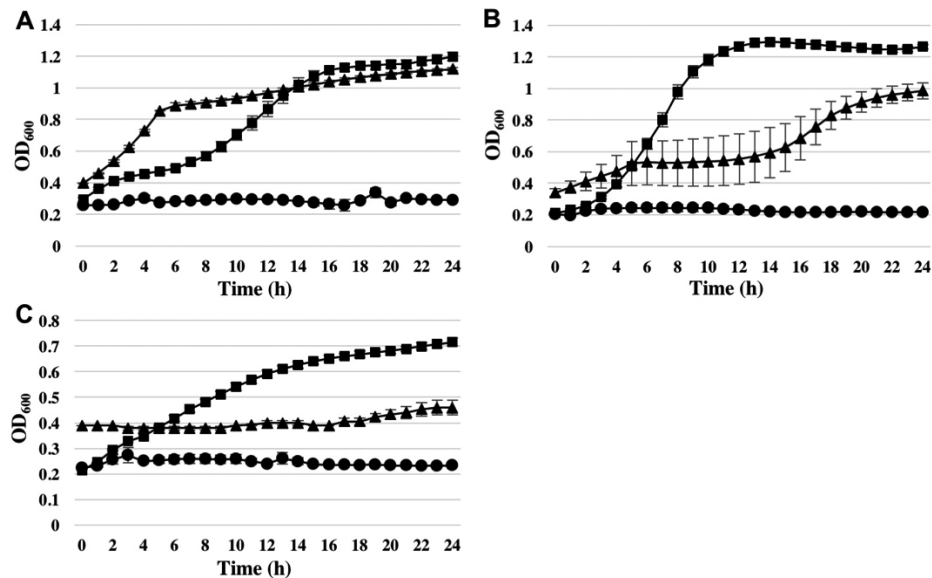


図 4 梅 PP 含有培地におけるビフィズス菌の増殖

A. *B. adolescentis* JCM 7046、B. *B. longum* subsp. *longum* JCM 1217、C. *B. bifidum* JCM 1254。

▲. 梅 PP、■. グルコース、●. 糖質なし。誤差バーは標準誤差 (n=3) を示す。

3.5 梅 PP の酵素分解試験

梅 PP には約 65%の糖質が含まれるが、その主要成分はアセチル化ショ糖の桂皮酸エステルであるプルノースと可溶性の多糖類であり、遊離の単糖は含まれていない。また、酸加水分解後の単糖組成分析の結果、梅 PP にはアラビノースが比較的多く含まれていることがわかっている (未発表)。そこで、糖質成分のうち多糖類に含まれるアラビノースがビフィズス菌により分解され利用されている可能性を検証した。公開されている *B. longum* subsp. *longum* JCM 1217 のゲノムには、 α -L-アラビノフラノシダーゼ候補遺伝子として糖質加水分解酵素ファミリー43 (GH43) に属するものが 9 個、GH51 に属するものが 4 個存在する。これらのうち、私たちは、GH43 に属する 3 個 (BLLJ_1850、BLLJ_1852、BLLJ_1853) と GH51 に属する 4 個 (BLLJ_0101、BLLJ_0445、BLLJ_0474、BLLJ_1650) について、遺伝子クローニングと大腸菌での組換え酵素発現に成功している。これらの各組換え酵素を梅 PP に作用させたところ、GH43 に属する BLLJ_1852 と BLLJ_1853 を作用させた時にアラビノースの遊離が確認できた (図 5)。さらに、これら 2 種の組換え酵素を共存させるとアラビノースの遊離量が増加し、梅 PP から重量比約 20%のアラビノースが遊離した (図 5)。BLLJ_1852 はアラビナンの側鎖に存在する Ara α 1,2Ara α 1-R 構造と Ara α 1,3Ara α 1-R 構造に、BLLJ_1853 はアラビナン主鎖の Ara α 1,5Ara α 1-R 構造に作用することを明らかにしている⁽⁷⁾。一方、アラビノキシランの側鎖のアラビノフラノシド結合に作用する GH43 の BLLJ_1850やGH51 の酵素は、梅 PP からアラビノースをほとんど遊離させなかった。以上の結果と酵素の基質特異性から、梅 PP にはアラビナン様の多糖が含まれ、これがビフィズス菌の α -L-アラビノフラノシダーゼにより分解されて、遊離したアラビノースが利用されたものと考えられた。

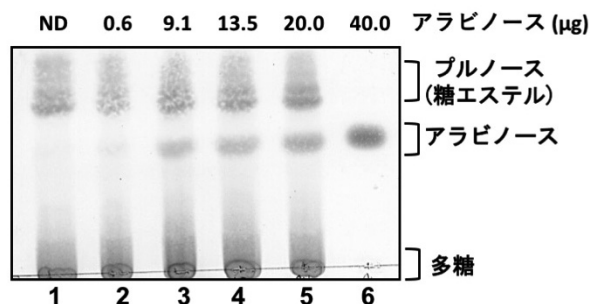


図5 *B. longum* subsp. *longum* JCM 1217 由来 GH43 α -L-アラビノフラノシダーゼによる梅 PP の分解とアラビノースの遊離

1. 梅 PP (100 μ g)のみ、2. 梅 PP+BLLJ_1850、3. 梅 PP+BLLJ_1852+UP、4. 梅 PP+BLLJ_1853、
5. 梅 PP+BLLJ_1852+BLLJ_1853、6. アラビノース標準品 (40.0 μ g)。

図の上には、アラビノースの各スポット強度を ImageJ で定量し、標準品 (40.0 μ g) のスポット強度との相対値から換算した重量値を示す。ND, 検出できず。

4. 考察

4.1 肥満モデルマウスに対する梅 PP のプレバイオティック効果

梅 PP は梅酢から調製されるため、成分は食経験のある梅由来のものであり、安全性は高いと考えられる。実際にマウスを用いた経口投与試験で、単回投与 5g/kg 体重、連続投与 1mg/kg 体重において毒性・変異原性がないことが確認された⁽⁸⁾。また、ヒト臨床試験でも、安全性は確認されている⁽⁹⁾。梅 PP および類似の梅由来成分の食品機能としては、血圧低下作用^(9,10)、抗骨粗鬆症活性⁽¹¹⁾、ピロリ菌生育阻害⁽¹²⁾、食後血糖値上昇抑制作用⁽¹³⁾、運動模倣効果⁽¹⁴⁾などが検討されている。

本研究では、高脂肪食で誘導した肥満モデルマウスに対する効果を評価した。5 週間という比較的短い投与期間であったため、有意な差異が出ていない項目もあるが、血清の中性脂肪は明らかな低下傾向を示し、それに伴い体重増加も抑制傾向を示した。この理由としては、脂質の吸収抑制と代謝亢進が考えられる。肝臓における網羅的な遺伝子発現解析も実施しているが、高脂肪食により発現低下した脂肪酸の β 酸化パスウェイが、梅 PP 群で回復している傾向が見られるので (未発表)、後者の脂質代謝のうち異化経路に関連する遺伝子の発現亢進によるものであると考えている。梅 PP には抗疲労効果や運動模倣効果もあると報告されているので、脂質代謝に限定されずエネルギー代謝が高まっている可能性もある。腸内細菌フローラ解析の結果、高脂肪食で誘導された肥満型フローラから、健常型フローラの方に回復させる効果も認められた。無菌マウスを用いた実験では、肥満型の腸内細菌フローラを移植することで肥満を誘導することができると報告されている⁽¹⁵⁾。すなわち、肥満型のフローラは肥満の原因であり、梅 PP はこの原因を打ち消すことで抗肥満効果を発揮していると考えられる。

盲腸内の短鎖脂肪酸では、酢酸と n-酪酸が高脂肪食群で低下し、梅 PP 群で回復する傾向が見られた。腸内の酢酸は、病原性大腸菌 O-157:H7 の感染を防御するなどの効果をもつことが知られている⁽¹⁶⁾。ビフィズス菌は糖を発酵して乳酸と酢酸を生成する特異なヘテロ乳酸発酵経路をもつが、梅 PP 群におけるビフィズス菌のわずかな回復が酢酸の増加に寄与した可能性がある。一方、乳酸は梅 PP 群で低下した。腸内細菌が利用する単糖がヘキソースからペントースに変化すると、代謝産物が乳酸から酢酸にシフトするという報告がある⁽¹⁷⁾。アラビノースを多く含む梅 PP 多糖がビフィズス菌に利用されることで、乳酸が減少して酢酸が増加したものと考察できる。

ビフィズス菌とともに有意な変化を示した腸内細菌は *Prevotella* 属である。ヒトでは、食生活のタイプによって、*Prevotella* 属が多い型、*Bacteroides* 属が多い型、*Clostridia* 綱に属する *Ruminococcus* 属が多い型

に分けられる⁽¹⁸⁾。*Prevotella* 型は、食物繊維を多く摂取するヒトに見られるタイプで、肥満者には少ない。マウスにおいても、梅 PP に含まれる糖質により *Prevotella* 属が増加して肥満が抑制されたと考えられる。

高脂肪食が引き起こす腸内細菌フローラの特徴のひとつに、*Clostridia* の増加が挙げられる。高脂肪食は十二指腸における胆汁酸の分泌を促進するが、その結果、胆汁酸に耐性をもつ *Clostridia* が増加する。*Clostridia* の中には、胆汁酸-7 α -デヒドロキシラーゼにより二次胆汁酸であるデオキシコール酸やリトコール酸を生成するものがあり、これら二次胆汁酸は再吸収されて肝臓の肝星細胞を傷害し、肝癌を誘発する作用があることが知られている^(19,20)。*Clostridia* については、T-RFLP 解析の結果、*Clostridium* cluster IV、*Clostridium* subcluster XIVa、*Clostridium* cluster XI、*Clostridium* cluster XVIII の4つのクラスターに分けてデータが得られたが、いずれも高脂肪食群と梅 PP 群で有意な差は認められなかった。

以上のとおり、梅 PP は *Clostridia* を抑えることはできないが、*Prevotella* 属や *Bacteroides* 属を増やすことで Firmicutes/Bacteroidetes 比の高い肥満型フローラを改善し、また、ビフィズス菌を増やすことにより、脂質代謝や抗肥満効果を示すことが考えられた。

4.2 梅 PP のビフィズス菌増殖促進効果

本研究の後半では、ヒトが梅 PP を摂取した場合を想定して、主にヒト腸管に見られるビフィズス菌に対する梅 PP の増殖促進効果について検討した。ビフィズス菌は、炭素源として糖を要求するが、消化管下部には腸内細菌が利用できる単糖や二糖は限定される。そのためビフィズス菌は、多種多様な糖加水分解酵素をもち、ヒトが消化できない難消化性の糖質を利用している。幅広い年代のヒト腸内に存在する *B. longum* subsp. *longum* では、糖加水分解酵素遺伝子がゲノム中の全遺伝子のうち 4.3% も占めている。これは他の生物種、例えばヒト (*Homo sapiens*) では約 0.4%、キイロショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) では約 0.5%、出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) では約 1.0% であるのと比較すると、非常に大きな割合であることがわかる。また、ビフィズス菌は、ヒトの年代によって生息する種が変化することが知られている⁽²¹⁾。乳児の腸管に多い *B. bifidum* や *B. longum* subsp. *infantis* は、フコース、シアル酸、ガラクトース、N-アセチルグルコサミン、N-アセチルガラクトサミンなどを含むミルクオリゴ糖や消化管ムチン糖鎖を利用するための酵素群を備えている⁽²²⁻²⁵⁾。一方、成人の腸管に多い *B. adolescentis* は、アラビノースやキシロースを含む植物由来の糖鎖の分解に適した酵素の候補遺伝子を多数保有している。*B. longum* subsp. *longum* は乳児から成人まで幅広く分布するが、ミルクオリゴ糖やムチン糖鎖と植物糖鎖の両方に作用する酵素群の候補遺伝子をもっている。梅 PP を単一の糖質源として添加した培地での試験では、予想どおり *B. longum* subsp. *longum* と *B. adolescentis* で旺盛な増殖が見られ、*B. bifidum* ではほとんど見られなかった。

ミルクオリゴ糖や消化管ムチン糖鎖の分解に関わるビフィズス菌の酵素群は、私たちの研究グループを中心としたいくつかのグループによりかなりよく解明されているが、植物由来の糖鎖の分解酵素系はまだ未解明な点が多い。最近私たちは、*B. longum* subsp. *longum* JCM 1217 のゲノム中に存在する α -L-アラビノフラノシダーゼ遺伝子クラスターの機能解析を行っている⁽⁷⁾。それらの組換え酵素を梅 PP に作用させたところ、1,2/3- α -L-アラビノフラノシダーゼである BLLJ_1852 と 1,5- α -L-アラビノフラノシダーゼである BLLJ_1853 を作用させた時に、アラビノースの遊離が確認された。ふたつの酵素を同時に作用させるとアラビノースの遊離量の増加が観察され、梅 PP 重量の約 20% のアラビノースが遊離した。BLLJ_1852 と BLLJ_1853 は、それぞれアラビナンの側鎖と主鎖を特異的に切断する酵素であるため、梅 PP 多糖にはアラビナン様の構造が存在し、これが分解されていると考えられる。ビフィズス菌はペントースリン酸経路をもっており、遊離したアラビノースを利用することができる。これまでも、アラビノオリゴ糖によるビフィズス菌増殖促進効果やプレバイオティック効果についてはいくつかの報告があることから⁽²⁶⁻²⁸⁾、梅

PP もヒト成人に対してビフィズス菌増殖を介したプレバイオティック効果を発揮することが期待できる。

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および JSPS 科研費 JP15K07448 の助成を受けたものである。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。

5. 参考文献

1. 農林水産省近畿農政局 (2017) 平成 29 年産うめの果樹面積、収穫量及び出荷量 (和歌山県). Kinki 農林水産統計.
2. 山西妃早子ら (2012) 地域イノベーション戦略支援プログラム (都市エリア型) 「和歌山の特産果実と独自技術を活用した新機能性食品・素材の開発」事業報告書, pp. 47–54 (公益財団法人わかやま産業振興財団).
3. 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.
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. 島田良美, 香川昂雅, 普家崇史, 堀西朝子, 尾崎嘉彦, 芦田久 (2016) 梅ポリフェノールのマウス腸内細菌フローラ改善効果. *Mem Faculty B.O.S.T., Kindai University* (37), 1–10.
6. Mitani T, Ota K, Inaba N, Kishida K, Koyama HA (2018) Antimicrobial activity of the phenolic compounds of *prunus mume* against Enterobacteria. *Biol Pharm Bull* 41, 208–212.
7. Komeno M, Hayamizu H, Fujita K, Ashida H (2018) Two novel α -L-arabinofuranosidase from *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* belonging to glycoside hydrolase family 43 cooperatively degrade arabinan: *Appl Environ Microbiol*, in press.
8. 志賀勇介, 土田辰典, 原雄大, 岸田邦博, 前田正信, 宮下和久, 藤原真紀, 山西妃早子, 矢野史子, 三谷隆彦 (2011) 梅酢ポリフェノール抽出物の安全性の検討. *Mem Faculty B.O.S.T., Kinki University* (28), 31–40.
9. 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* 19, 444–451.
10. 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.
11. 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.
12. 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.

13. 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. *Food Preservation Science* 40, 119–125.
14. 佐藤夏海, 高橋斉, 坂井田和裕, 高田善浩, 矢野史子, 荒木章吾, 藤田勝也, 白木琢磨, 志賀勇介, 岸田邦博, 山西妃早子, 福西伸一, 三谷隆彦 (2013) 梅果汁成分による抗疲労効果(第 2 報). *果樹協会報* 656, 1-8.
15. Turnbaugh PJ, Ley RE, Mahowald MA, Magrini V, Mardis ER, Gordon JI (2006) An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature* 444, 1027-1031.
16. Fukuda S, Toh H, Hase K, Oshima K, Nakanishi Y, Yoshimura K, Tobe T, Clarke JM, Topping DL, Suzuki T, Taylor TD, Itoh K, Kikuchi J, Morita H, Hattori M, Ohno H (2011) Bifidobacteria can protect from enteropathogenic infection through production of acetate. *Nature* 469, 543–547.
17. Siovakova L, Dusková D, Marounek M. (2002) Fermentation of pectin and glucose, and activity of pectin-degradation enzymes in the rabbit caecal bacterium *Bifidobacterium pseudolongum*, *Lett Appl Microbiol* 36, 126–130.
18. Arumugam M, Raes J, Pelletier E, Le Paslier D, Yamada T, et al. (2011) Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature* 473, 174–180.
19. Ridlon JM, Kang DJ, Hylemon PB (2006) Bile salt biotransformations by human intestinal bacteria. *J Lipid Res* 47, 241–259.
20. Yoshimoto S, Loo TM, Atarashi K, Kanda H, Sato S, Oyadomari S, Iwakura Y, Oshima K, Morita H, Hattori M, Honda K, Ishikawa Y, Hara E, Ohtani N (2013) Obesity-induced gut microbial metabolite promotes liver cancer through senescence secretome. *Nature* 499, 97–101.
21. Mitsuoka T (2014) Establishment of intestinal bacteriology. *Biosci Microbiota Food Health* 33, 99–116.
22. Sela DA, Chapman J, Adeuya A, Kim JH, Chen F, Whitehead TR, Lapidus A, Rokhsar DS, Lebrilla CB, German JB, Price NP, Richardson PM, Mills DA (2008) The genome sequence of *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* reveals adaptations for milk utilization within the infant microbiome. *Proc Natl Acad Sci USA* 105, 18964-18969.
23. Ashida H, Miyake A, Kiyohara M, Wada J, Yoshida E, Kumagai H, Katayama T, Yamamoto K (2009) Two distinct α -L-fucosidases from *Bifidobacterium bifidum* are essential for the utilization of fucosylated milk oligosaccharides and glycoconjugates. *Glycobiology* 19, 1010-1017.
24. Miwa M, Horimoto T, Kiyohara M, Katayama T, Kitaoka M, Ashida H, Yamamoto K (2010) Cooperation of β -galactosidase and β -N-acetylhexosaminidase from bifidobacteria in assimilation of human milk oligosaccharides with type 2 structure. *Glycobiology* 20, 1402-1409.
25. Kiyohara M, Tanigawa K, Chaiwangsri T, Katayama T, Ashida H, Yamamoto K (2011) An exo- α -sialidase from bifidobacteria involved in the degradation of sialyloligosaccharides in human milk and intestinal glycoconjugates. *Glycobiology* 21, 437-447.
26. Suzuki Y, Tanaka K, Amano T, Asakura T, Muramatsu N (2004) Utilization by intestinal bacteria and digestibility of arabino-oligosaccharides *in vitro*. *J Japan Soc Hort Sci* 73, 574–579.
27. Holck J, Lorentzen A, Vignæs LK, Licht TR, Mikkelsen JD, Meyer AS (2011) Feruloylated and nonferuloylated arabino-oligosaccharides from sugar beet pectin selectively stimulate the growth of *Bifidobacterium* spp. in human fecal *in vitro* fermentations. *J Agric Food Chem* 59, 6511–6519.

28. Laere K, Hartemink R, Bosveld M, Schols H, Voragen A. 2000. Fermentation of plant cell wall derived polysaccharides and their corresponding oligosaccharides by intestinal bacteria. *J Agric Food Chem* 48, 1644–1652.

Ume polyphenol: prebiotic effects on diet-induced obesity mice and growth-promoting mechanism for bifidobacteria

Masahiro Komeno¹, Azusa Ito², Natsumi Ohigashi², Yuki Yoshihara¹, Toshio Suzuki³,
Kouhei Nagai^{1,4}, and Hisashi Ashida^{1,2}

Ume polyphenol is a dried food material containing 12 % phenolic compounds and 65 % polysaccharides, which is prepared from a liquid fraction “*umezu*”, the byproduct of pickled Japanese apricot. We evaluated prebiotic effects of ume polyphenol on high fat diet-induced obesity mice. Five-week old C57BL/6J kwl SPF mice were distributed equally into three groups, and fed with a normal diet, a high fat diet, or a high fat diet supplemented with 1.0 % ume polyphenol, for 5 weeks. Ume polyphenol-fed mice showed a tendency toward anti-obesity and a significant anti-hyperlipidemia. The cecal weight and the concentration of acetic acid and n-butyric acid in cecal contents were on the decrease in high fat diet-fed mice, and on the increase in ume polyphenol-fed mice. Terminal-restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis was employed to evaluate bacterial flora in cecal contents. *Bifidobacterium* became undetectable in high fat diet-fed mice, whereas it increased to detectable level in ume polyphenol-fed mice. *Bacteroides* and *Prevotella* belonging to the phylum Bacteroidetes were more predominant in ume polyphenol-fed mice than in high fat diet-fed mice. Lactobacillales and Clostridia belonging to the phylum Firmicutes were increased in both high fat diet and ume polyphenol-fed mice. Firmicutes/Bacteroidetes ratios that correlate with obesity, in normal diet, high fat diet, and ume polyphenol-fed mice were 0.2, 1.6, and 1.1, respectively. To estimate the mechanism by which ume polyphenol stimulates the growth of bifidobacteria, we cultured several bifidobacterial strains with ume polyphenol in sugar-restricted medium. Several bifidobacteria of human origin were found to use ume polyphenol as a carbohydrate source. Two arabinan specific α -L-arabinofuranosidases (BLLJ_1852 and BLLJ_1853) from *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* JCM 1217 could release arabinose from polysaccharides in ume polyphenol. Ume polyphenol contains arabinan-like polysaccharides that are possible prebiotics for intestinal bifidobacteria.

Key words: *Prunus mume*, obesity, lipid metabolism, intestinal microbiota, prebiotics

Received 20 August 2018, Accepted 9 September 2018.

This work was supported by Wakayama Prefecture regional innovation strategy support program and JSPS research grant JP15K07448.

1. Major in Biotechnological Science, Graduate School of Biology-Oriented Science and Technology, Kindai University, Wakayama 649-6493, Japan
2. Department of Science and Technology on Food Safety, Faculty of Biology-Oriented Science and Technology, Kindai University, Wakayama 649-6493, Japan
3. Center for R&D of Bioresources, Osaka Prefectural University, Osaka 599-8531, Japan
4. Department of Genetic Engineering, Faculty of Biology-Oriented Science and Technology, Kindai University, Wakayama 649-6493, Japan