

博士學位論文

食品由来植物成分による健康促進効果の
分子メカニズムの解析

食品由来植物成分による健康促進効果の分子メカニズムの解析

米野雅大

近畿大学大学院

生物理工学研究科 生物工学専攻

米野雅大

博士學位論文

食品由来植物成分による健康促進効果の
分子メカニズムの解析

2019 年 1 月 23 日

近 畿 大 学 大 学 院

生物理工学研究科 生物工学専攻

米 野 雅 大

目次

第1章 序論	2
第2章 マクロファージ細胞内でのオートファジーを介した炎症反応終結 メカニズムの解析	7
2-1 緒言	8
2-2 方法・材料	13
2-3 結果	21
2-4 考察	39
第3章 <i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>longum</i> におけるアラビナン分解に重要な2つの α -L-アラビノフラノシダーゼの解析	44
3-1 緒言	45
3-2 方法・材料	51
3-3 結果	59
3-4 考察	80
第4章 肥満モデルマウスに対する梅ポリフェノールの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	85
4-1 緒言	86
4-2 方法・材料	89
4-3 結果	93
4-4 考察	105
第5章 総括	111
引用文献	116
原著論文	139
— 謝辞 —	

第 1 章

序論

食とは元来、生命活動に必要なエネルギーや生合成不能な栄養素を得るためのものである。しかし、近年の豊かな食糧供給や食生活の多様化による過剰な栄養やエネルギー補給が、肥満・高血圧をはじめとする生活習慣病を引き起こす要因となっている。食生活やライフスタイルの改善が最良の予防・改善策であるが、発症の予防や健康維持のために食品がもつ機能性を利用することも選択肢の1つである。そのような健康志向の高まりから食品がもつ3次機能に関する研究が盛んに行われている。

食品機能性評価において、非常に多くの成分が混在する食品中から機能成分を特定し、有効量を決定することが必須であるため、種々の単一の化合物をターゲットに試験・研究が進められることが多い。しかし、そのような報告の中には、細胞内環境に与える影響やその作用の分子機構について詳しく解析されていないものも存在する。非栄養性の化合物が生体に及ぼす影響を知るためには、まず細胞単位で遺伝子やタンパク質レベルでどのような影響を与えるか、知見を得る必要がある。さらに、細胞から組織、個体に広げた幅広い解析を行う必要があり、領域を跨いだ研究も必要にもなる。また、我々の消化管の一部である腸管には自己の細胞数よりも多くの腸内細菌が棲息しており、それらへの影響も考慮しなければならない。腸内細菌叢の変化が我々宿主の健康や疾患に与える影響が非常に大きい事が解ってきているためである。そこで本論文では、ポリフェ

ノールの細胞内の栄養センサーの調節(飢餓模倣効果)による抗炎症効果の細胞レベルでの解析、植物性多糖のビフィズス菌による分解機構の解析、および機能性食品素材「梅ポリフェノール」の肥満モデルマウスの腸内細菌叢へ与える影響の解析の3つの研究について報告する。

まず第2章では、動脈硬化症や糖尿病といった生活習慣病の発症原因である慢性炎症反応に対する植物由来ポリフェノールの抑制機構について明らかにすることを目的とした。植物由来ポリフェノールに抗炎症効果を謳う報告が多くなされている。これらの多くは炎症物質の産生量低下や炎症物質をコードする遺伝子発現量の低下を指標としている。しかしながら、これらポリフェノールの効果は細胞内の反応にどのような影響を与え、どのようなシグナルを介して下流の遺伝子発現調節に至るのかが明らかでないものも多い。ポリフェノールの食品機能性として抗酸化活性はよく知られているが、抗炎症作用やオートファジー活性化作用に関する報告も多く存在する[1]。レスベラトロールを代表とする一部のポリフェノールは mTOR を制御することも知られており、細胞内栄養センサーの調節を介して飢餓模倣効果を発揮する可能性が考えられる[2]。ポリフェノールによるオートファジーの活性化と、オートファジーを介した抗炎症メカニズムの解明は、細胞内における炎症終息機構に関する新たな知見につながるだけではな

く、新たな抗炎症効果を有する化合物の探索にも応用できる可能性がある。

次に第3章では、腸内細菌の中でも宿主に有益な働きをする善玉菌の代表であるビフィズス菌の植物性多糖分解機構を明らかにすることを目的とした。腸内環境改善のために、繊維質やオリゴ糖を多く含む食品の摂取が推奨されている。それらは宿主の消化酵素により分解されず腸に到達し、一部の腸内細菌に利用されることで腸内細菌叢を改善するためである。しかしながら、腸内細菌による植物性多糖の分解機構は完全には明らかにされていない。ビフィズス菌に関しては、母乳由来のオリゴ糖や宿主消化管から分泌されるムチン等の糖タンパク質糖鎖の分解経路はこれまでに比較的良好に研究されているものの、植物性多糖の利用に関してはほとんど報告がない。そこで本研究では、植物由来のヘミセルロースの中でも割合の多いアラビナンに着目し、ビフィズス菌におけるアラビナン分解の分子機構を明らかにすることを目的とした。この研究は、ビフィズス菌のヒト成人の消化管への定着機構の理解につながるだけでなく、成人のビフィズス菌を増殖させる新たな難消化性食品素材(プレバイオティクス)の開発につながる可能性がある。

第4章では、肥満モデルマウスを用いて、新規食品素材である「梅ポリフェノール」のビフィズス菌に対するプレバイオティクス効果を検討した。「梅ポリフェノール」

は、和歌山県において梅干し製造過程で大量に生成する梅酢から吸着樹脂を用いてポリフェノールを回収した食品素材である。梅由来のポリフェノールに加え、果肉から溶出したと考えられる可溶性の多糖類を含むことがわかっている。「梅ポリフェノール」についてはこれまでに、さまざまな健康増進効果などが検討されており、すでに飲料などの製品にも応用されている。しかしながら、ビフィズス菌を含む腸内細菌叢への影響については十分に調べられていない。本研究では、高脂肪食を与えたマウスに「梅ポリフェノール」を摂食させて、抗肥満効果、および腸内細菌叢の変化と短鎖脂肪酸の量・種類の変化を評価した。さらに、いくつかのビフィズス菌株を用いて *in vitro* で増殖促進効果の評価し、「梅ポリフェノール」のビフィズス菌に対する増殖効果の分子メカニズムについて考察した。

以上のとおり、植物由来食品成分による健康促進効果の分子メカニズムを明らかにするために、実験動物、動物細胞、微生物などさまざまな研究対象を用いて、細胞および個体レベルでの知見を得ることを目的として研究を実施した。

第2章

マクロファージ細胞内でのオートファジーを
介した炎症反応終結メカニズムの解析

2-1. 緒言

脊椎動物の免疫システムは、先天的に有している自然免疫機構と、後天的に獲得する獲得免疫機構が存在する。マクロファージは単球から分化した遊走性を有する白血球の一種であるが、自然免疫と獲得免疫の両方に関わる重要な免疫細胞である。自然免疫に関しては、異物を貪食し消化分解するほか、貪食した異物を認識してさまざまな炎症物質を分泌することで異物を撃退する。一方、獲得免疫においては、貪食して分解した異物の断片ペプチドを細胞表面の MHC クラス II 分子に乗せて抗原提示し、抗原特異的に活性化したヘルパーT 細胞 (Th1)からのシグナルを受け取ることができる。

病原体に特有な成分をパターン認識受容体により検知し、炎症性サイトカインや I 型インターフェロンを産生することで病原体を排除する仕組みは、自然免疫の最も重要な機構である[3]。代表的なパターン認識受容体に TLR (Toll-like receptor)が存在する。TLR は I 型膜貫通型受容体であり、細胞外のロイシンリッチリピートを含む領域で病原体関連分子パターン(PAMPs; Pathogen-associated molecular patterns)を認識する[4]。TLR はヒトでは 10 種(TLR1~TLR10)、マウスでは 12 種の存在が確認されており、TLR1~TLR9 はどちらの種でも保存されている[4]。細胞表面型の TLR は TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 ならびに TLR6 である。マクロファージには TLR5 以外のものが発現している。TLR2 は

TLR1 や TLR6 と複合体を形成して存在し、グラム陽性菌のペプチドグリカンやリポタ
イコ酸、真菌のザイモサン、インフルエンザウイルスのヘマグルチニンなど多種多様な
微生物の PAMPs をリガンドとして認識する[5]。しかしながら TLR2 複合体(TLR2-TLR1,
TLR2-TLR6)は炎症性サイトカインの産生を誘発するが、I 型インターフェロンの産生は
誘導しない。

TLR4 は炎症性サイトカインと I 型インターフェロンのどちらも産生誘導する。また
TLR4 のリガンドはグラム陰性菌の細胞壁の主要な成分であるリポ多糖(LPS;
Lipopolysaccharide)であることから TLR メンバーの中でも最も研究が進んでいる。しか
し実際には TLR4 は LPS だけでなく自己成分をも認識する。細胞死が誘導されると、バ
イグリカン[6]、ヒアルロン酸断片[7]、バーシカン[8]、フィブロネクチン[9]などの自己
タンパク質が細胞内のプロテアーゼで分解されリガンドとなる。バイグリカンは炎症性
サイトカインの産生を誘導するが、*tlr4*^{-/-}マウスではその反応が起こらない[6]。TLR4 が
活性化されると TIR ドメインを持つアダプタータンパク質である MyD88 と会合する。
リガンドの刺激を受けると直ちに、MyD88 は IRAK-4 を TLRs に呼び寄せる。IRAK-4
によりリン酸化され活性化した IRAK-1 は、E3 ユビキチンリガーゼである TRAF6 (TNF
receptor associated factor 6)と会合する。TRAF6 は自身をポリユビキチン化し、それを足

場として諸因子が結合した TRAF6 複合体を形成する[10]。そしてその複合体が TAK1 や IKK をリン酸化することで I κ B がプロテアソームによる分解を受け NF- κ B を遊離させる。遊離した NF- κ B は核内に移行して、転写因子として機能し炎症性サイトカインの発現を誘導する。

細胞内のタンパク質や小器官のバルク分解機構であるオートファジーが、この TLR シグナルに対して抑制的に機能することが明らかになりつつある。オートファジー関連遺伝子である *atg16ll* の変異が炎症性腸疾患であるクローン病の発症に関与している[11]。これを裏付けるように *atg16ll*^{-/-}マウスのパネート細胞では炎症関連遺伝子の発現が顕著に増加しており[12]、オートファジーが炎症反応のブレーキに重要な役割を果たす可能性があることが考えられる。

オートファジーは真核生物に広く保存されている。二重膜構造をもつ細胞小器官であるオートファゴソームに不要タンパクやオルガネラが包み込まれ、そのオートファゴソームがリソソームと融合することで内容物を分解する [13,14]。オートファジーの進行には ATG 遺伝子群が関与している。ATG 遺伝子は酵母で現在約 40 種類ほど見つかっており、真核生物の多くで保存されている。なかでもオートファジーの進行において ULK1/2 (Atg1), Atg13 の ULK1 複合体と Atg12, Atg7, Atg10, Atg5, Atg16 の Atg12 共有結

合システムと Atg8, Atg4, Atg7, Atg3 の Atg8 共有結合システムが重要な役割を果たす。

ULK1 複合体はオートファジーの開始に必要なシステムで、Atg12 共有結合システムと Atg8 共有結合システムはオートファゴソーム形成において重要である。酵母 Atg8 のヒトホモログの 1 つに LC3 がある。LC3 は proLC3 として生合成され、C 末端側 22 残基が Atg4 によって切断され可溶型の LC3-I として細胞質中で存在している。オートファジーが開始すると、LC3-I の C 末端に Atg7, Atg3 の働きによりホスファチジルエタノールアミン(PE)が結合し、オートファゴソーム膜局在型の LC3-II となる[15]。そのため LC3-II/LC3-I 比や LC3-II 量の増加はオートファジー活性化の指標として広く使用されている。また LC3 は隔離膜末端が融合しオートファゴソームの口を閉じる際に必要なタンパクである[16]。オートファジーには非選択的に細胞質成分を分解する非選択型オートファジーと、特定のタンパク質や小器官を分解する選択型オートファジーが存在する。選択型オートファジーの基質となりうる不要タンパクはほとんどがユビキチンで修飾されている。選択型オートファジーにおいて分解基質輸送に重要な役割を果たすのは p62 というタンパクである。p62 はオートファゴソーム膜に局在する LC3 と相互作用し[17,18]、ユビキチン結合ドメインも有するタンパクである。p62^{-/-}マウスでは神経変性[19]や肥満症[20]の表現型が見られることから、オートファジー以外にも体重維持・神

経保護・ストレス耐性などの生理機能に重要な役割を果たしていると考えられている。

自然免疫応答のメカニズムはよく調べられている。またオートファジーなどの細胞内分解系が自然免疫応答に深く関わっていることも明らかとなってきた[11]。しかしながら自然免疫応答の終息機構について実験的に示された報告はほとんどない。加齢とともに見られる慢性炎症はオートファジーの機能低下と一定の相関が見られる。また慢性炎症疾患のうちいくつかは *atg* 遺伝子に変異が見られることも判明している。このことから自然免疫応答の終息にはオートファジーが関与しているのではないかと考え、オートファジーをターゲットに炎症反応の終息機構の解析を行うことを本研究の目的とした。

2-2. 材料・方法

2-2-1. 培養細胞株

本研究では RAW264.7 cell (mouse macrophage murine leukemia virus-induced tumor cell) を使用した。

2-2-2. 培地

本研究に用いる細胞の cell culture には通常の培地は DMEM - low glucose (D6046-500mL, Sigma) を使用し、アミノ酸飢餓処理時には DMEM high glucose without Amino Acids (048-33575, Wako) を使用した。培地は開封時に 500 mL に対して、Fetal Bovine Serum (NICHIREI BIOSCENCES INC.) 55 mL と Penicillin/Streptomycin (nacalai tesque) 5 mL を加えた。Fetal Bovine Serum は使用前に非働化(56°Cで30分インキュベート)してから使用した。

2-2-3 培養

2-2-3-1 通常培養

RAW264.7 細胞は、CO₂ インキュベーターを用いて、37°Cで培養した。コンフルエントになるまで培養した細胞は、Trypsin-EDTA 液(Sigma)を用いて dish から剥がし、回収した細胞を、4,000 ×g , 5 分, 25°Cで遠心し、上清を除去し、DMEM で懸濁し、一部の

細胞を新しい培地プレートに加えて継代培養を行った。

2-2-3-2 LPS 処理

サンプルに供する細胞は 6 well プレートに 2.5×10^5 / well で播種した。LPS 処理を事前にするサンプルは 6 well プレートに播種した翌日に LPS を 2 mg/mL となるように添加した。LPS は Lipopolysaccharides from *Escherichia coli* O55:B5 (L2880, Sigma) を PBS に溶解したものを使用した。各サンプルの調製条件は試験によって異なるため試験毎に結果の項に記載した。

2-2-4 細胞抽出液の調製

培養が終了した細胞を、培地を回収した後 PBS で洗浄・吸引し、新たな PBS で回収し、 $4,000 \times g$, 5 分, 25°C で遠心分離し上清を取り除き回収した。回収した細胞を Lysis buffer (20 mM Tris HCl, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1 mM オルトバナジン酸ナトリウム, protease inhibitor) を加え懸濁して、氷上で 30 分静置した。この溶解液を $6,000 \times g$, 3 分, 4°C で遠心し、上清を回収し細胞ライセート液とした。ライセート液は、泳動用サンプルとして、使用分以外は、 -20°C で保存した。

2-2-5 SDS-PAGE

SDS-PAGE は Leammli 法[21]で行った。分子量マーカーとして Precision Plus Protein

Prestained Standard Dual Extra (BIO-RAD)を使用した。泳動後、ウエスタンブロットに用いた。

2-2-6 Western blotting (WB)

SDS-PAGE 後のゲルを PVDF 膜 (Immobilon-P, Merck) に転写した。なお PVDF 膜は使用前にメタノールに 10 分浸した後、転写バッファーに浸した。転写バッファー浸したろ紙 3 枚の上に PVDF 膜、ゲルさらにその上に、転写バッファーに浸したろ紙を 3 枚重ねてサンドイッチを形成した後セミドライ式ブロッキング装置を用いてブロッキングを行った。ブロッキング終了後、PVDF 膜をブロッキング液 (1% skim milk/TBST) でブロッキングした。ブロッキング液で希釈した 1 次抗体と反応させた。反応後、PVDF 膜を TBSt で洗い、2 次抗体と反応させた。2 次抗体も 1 次抗体同様に、ブロッキング液で希釈をした。反応後、TBSt で洗浄し、Pierce Western Blotting Substrate Plus (Thermo) を用いて化学発光させた。

2-2-7 使用抗体

本研究に使用した抗体は Table 1 に記載した。

2-2-8 Immunocytochemistry (IC)

滅菌処理を施したカバーガラスに 0.1%ゼラチン溶液 (190-15805, Wako)をコーティン

グした。その後 6 well プレートに沈め方法 2-2-2 と同様に細胞を播種し、所定の処理を施しサンプルを作成した。カバーガラスを回収し、-20°Cのメタノールに 10 分浸漬して固定化処理を行った後に、-20°Cのアセトンに 1 分間浸漬して透過処理を行った。続いて 1% BSA/PBS で 1 時間ブロッキング処理をした。その後 PBS_t で 3 回洗浄を行った。1 次抗体を PBS に希釈した。1 次抗体液をカバーガラスに滴下し室温で 1 時間反応を行った。その後 PBS_t で 3 回洗浄を行った。2 次抗体を PBS に希釈した。2 次抗体には Alexa Fluor 594 (Invitrogen)を用いた。2 次抗体液をカバーガラスに滴下し室温で 30 分反応を行った。その後 PBS_t で 3 回洗浄を行った。スライドガラス表面に封入材を滴下して、このカバーガラスを反転させて乗せサンプルを封入した。封入材は ProLong Diamond Antifade Mountant (Invitrogen)を使用した。カバーガラスの端をマニキュアで固定しよく風乾させた。蛍光顕微鏡は IX81(OLYMPUS)を用い、対物レンズは油浸 40 倍レンズを使用した。撮影・編集には MetaMorph (Molecular Devices)ソフトウェアを用いた。

2-2-9 semi-qRT-PCR

培養が終了した細胞を、培地を回収した後 TRIzol 試薬 (Life Technologies Japan Ltd.) で細胞を溶解し、試薬手順通りに RNA 画分を抽出した。この RNA 画分をイソプロパノール沈殿により精製・濃縮したのち RNase free water に溶解した。この RNA 500 ng を

Prime Script RT-PCR kit (TaKaRa Bio Ltd.)で手順に従い逆転写を行った。この逆転写反応液を用いて SpeedSTAR HS (TaKaRa Bio Ltd.)で PCR を行った。なお PCR に用いたプライマーの配列は Table. 2 に示す。PCR 反応液を 7%ポリアクリルアミドゲル、TBE バッファーで電気泳動を行った。マーカーには 100 kb DNA Ladder (TaKaRa Bio Ltd.)を用い、染色には SYBR Gold nucleic acid gel stain (Invitrogen)を用いた。検出されたバンドを画像解析ソフト ImageJ で半定量化を行った。各遺伝子の値は *gapdh* 遺伝子の値を元に補正した。Table 1 に使用したプライマーの配列を記載する。

2-2-10 Griess 試験

一酸化窒素測定には、Nitric Oxide Assay kit (CELL BIOLABS.INC) を用いた。培養上清を回収し、キット通りに操作し、比色定量法で培地中に含まれる Nitric Oxide の量を定量した。

2-2-11 ELISA

IL-6 と TNF- α の検出に Mouse IL-6 ELISA kit (KMC0061, Invitrogen)及び TNF-Mouse ELISA kit (KMC3011, Invitrogen)を用いた。サンプルには所定の処理を施した細胞の培養上清を用いた。キット通りに操作し、比色定量法で培地中に含まれる IL-6 及び TNF- α の量を定量した。

2-2-12 siRNA

siRNA の実験には Silencer Select Pre-designed siRNA (invitrogen) の Atg5 (#4390771) を購入した。細胞への導入にはリポフェクション法を用い、リポフェクタミンは Lipofectamine RNAiMAX Transfection Reagent (invitrogen) を使用した。サンプルに供する細胞は前日に 6 well プレートに 1.0×10^5 /well で播種した。RNAi MAX 試薬の手順に沿って 6 pmol の siRNA を RAW264.7 細胞にトランスフェクションした。目的遺伝子のサイレンシングの確認は目的タンパクの減少あるいは消失を WB で確認した。

2-2-13 co-Immunoprecipitation (co-IP)

IP に使用するビーズは SureBeads Protein G Magnetic Beads (Bio-Rad Laboratories, Inc.) を使用した。このビーズをサンプル 1 つにつき 30 μ L 使用した。目的の抗体をビーズに 1/1000 量加えた。このビーズ・抗体液を 4 $^{\circ}$ C、振盪条件下でオーバーナイト反応させた。培養が終了した細胞を、培地を回収した後 PBS で洗浄・吸引し、新たな PBS で回収し、3,000 $\times g$, 5 分, 25 $^{\circ}$ C で遠心し上清を取り除き回収した。回収した細胞を IP-Lysis buffer(150 mM NaCl, 0.05% Triton-X100, 1 mM オルトバナジン酸ナトリウム, protease inhibitor)を加え懸濁して、氷上で 30 分静置した。この溶解液を 16,000 $\times g$, 5 分, 4 $^{\circ}$ C で遠心し、上清を回収し細胞ライセート液とした。このライセート液の 25%を Input 用に

-20°Cで保管した。残りの 75%のライセート液を IP に供した。75%のライセート液に抗体付ビーズ液を 30 mL 添加して 120 分、4 °C、振盪条件下で反応させた。反応後、ビーズを回収し、洗浄を行った後に SDS-PAGE サンプルバッファーで 90°Cで 10 分加熱し溶出させた。この溶出液を IP のサンプルとし、WB で解析を行った。

Table 1 本研究で使用した抗体一覧

抗体名	型番、メーカー
AKT Rabbit Ab	#9272, CST
P-AKT(S473)(D9E)XP Rabbit mAb	#4060, CST
mTOR Rabbit Ab	#2972, CST
phospho-mTOR(S2448)(D9C2)XP Rabbit mAb	#2971, CST
PI3 Kinase p85(19H8) Rabbit mAb	#4257, CST
P-PI3K p85(Y458)/p55(Y199)Rabbit Ab	#4228, CST
Anti-LC3 pAb	#PM036, MBL
Anti-p62/SQSTM1 pAb	#PM045, MBL
Anti-mouse TRAF6	#597, MBL
Anti-Atg5 pAb	#PM050, MBL
GAPDH (D16H11)XP Rabbit mAb	#5174, CST
Goat anti-rabbit IgG-HRP	#sc-2301, Santa Cruz Biotechnology

Table 2 本研究で使用した qRT-PCR 用プライマーの配列

primer name	Primer sequence
<i>inos</i> (Sense)	5'- TGGGAATGGAGACTGTCCCAG - 3'
<i>inos</i> (Antisense)	5'- GGGATCTGAATGTGATGTTTG - 3'
<i>il-6</i> (Sense)	5' - CATCCAGTTGCCTTCTTGGGA - 3'
<i>il-6</i> (Antisense)	5' - CATTGGGAAATTGGGGTAGGAAG - 3'
<i>gapdh</i> (Sense)	5'- GCCAAGGTCATCCATGACAAC - 3'
<i>gapdh</i> (Antisense)	5'- GAGGGGCCATCCACAGTCT - 3'

2-3. 結果

2-3-1 炎症反応におけるオートファジー活性化の経時変化

炎症反応とオートファジーの関連についてはいくつかの論文により報告されている。

細胞内に侵入した細菌の分解[22]や IL-1b 分泌にオートファジーシステムが必要である[23]ことやMHCクラスIIへの抗原提示に必要である[24,25]など様々な報告が存在する。

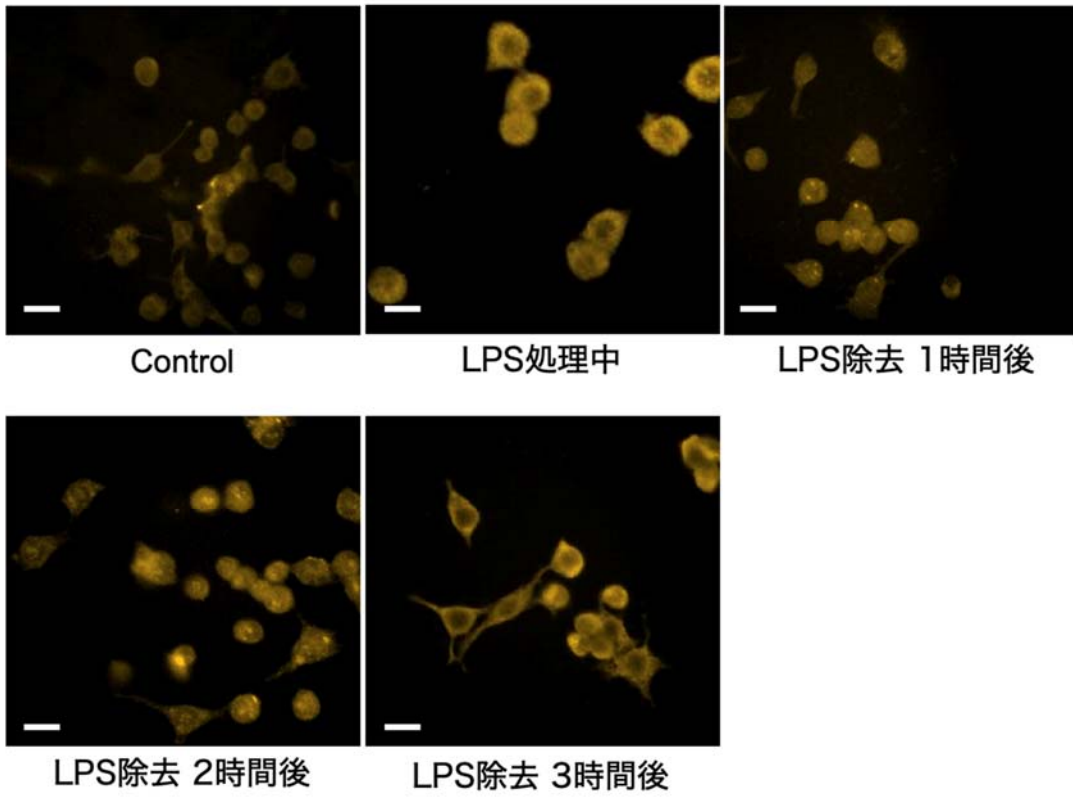
そこで非炎症時 (LPS 処理なし)、炎症時 (24 時間の LPS 処理)、炎症終了 (LPS 除去) 後 1、2、3 時間後の 5 フェーズに分割してマクロファージ内のオートファジーの挙動を観察した。

オートファジーの活性化は、オートファゴソームに局在した LC3 を免疫染色したのち、形成したドットを蛍光顕微鏡観察することで評価できる[26]。オートファジーが起っていない非炎症時には細胞質全体に LC3 が確認できるもののドットの形成はない。一方で、LPS 処理を行うと細胞膜側に沿って小さなドットの形成が確認された。LPS を除去した後は、除去後 1~2 時間において比較的大きなドットの形成が確認された(Fig. 1A,B)。このことより LPS に曝露されたマクロファージ細胞内では LPS 曝露が終了した後、炎症反応が終結へ向かう際にオートファジーが活性化されることが判明した。

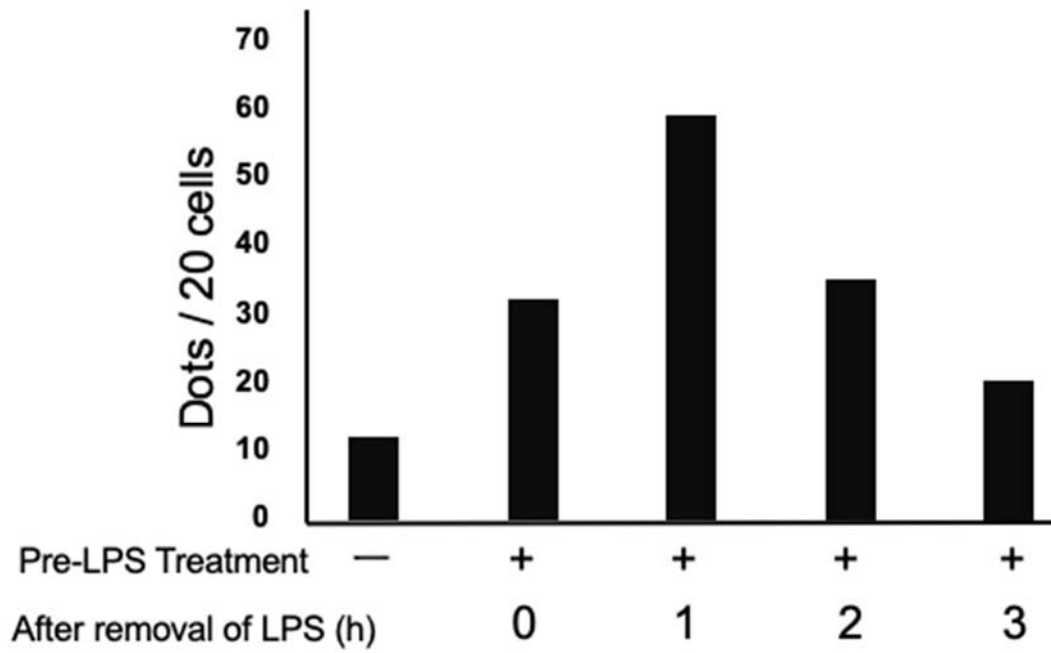
次にこのオートファジーはどのようなシグナル経路で活性化されたのかを検討した。

オートファジーは生来、飢餓に対する防御反応で栄養・細胞増殖に関与するシグナル伝達系により制御される[27]。この伝達系の最も主要なものに AKT/mTOR を介した伝達系が存在する[27]。リン酸化 mTOR はオートファジーの開始を担うタンパク質である Atg13 を直接リン酸化することでオートファジーの抑制に関与する[28]。そこで mTOR とその上流である AKT、PI3Kinase のリン酸化レベルを経時変化を調べた。その結果、オートファジーの活性化が確認された LPS 除去後 1～2 時間後と同一の時期に mTOR の顕著な脱リン酸化が確認された。またこの mTOR の脱リン酸化の前後において AKT の顕著なリン酸化も確認された(Fig. 1C)。一般的に mTOR を介するオートファジーは mTOR の脱リン酸化とオートファジーの活性化が同調する。このことから LPS 除去後 1～2 時間後のオートファジーの活性化は mTOR を介したものである可能性が考えられた。

A



B



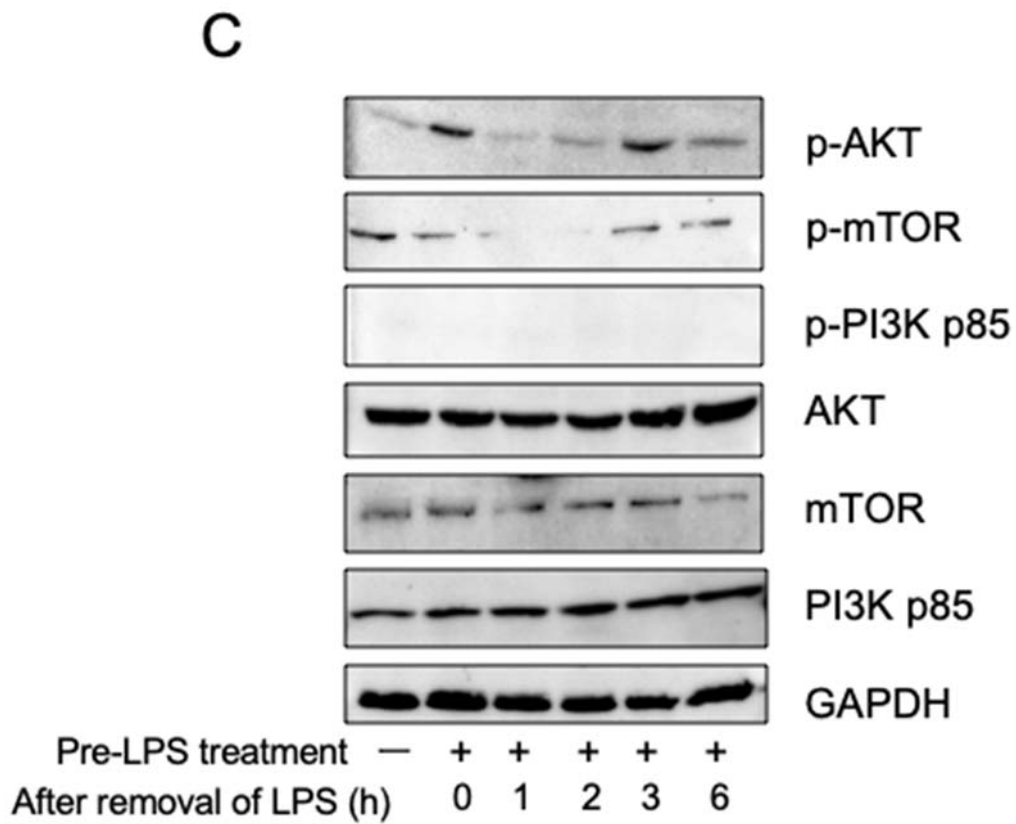


Fig. 1 炎症反応時におけるオートファジーの挙動解析

(A) RAW264.7 細胞をカバーガラス上に培養し、LC3 を IC した写真。通常時(左上)、LPS 曝露時(中央上)、LPS 曝露後、LPS 除去をしてから 1 時間(右上)・ 2 時間(左下)・ 3 時間(中央下)の 5 サンプルで行った。各写真左下の白線は 0.1 mm を示す。(B) LC3 のドット数を計数したグラフ。(C) RAW264.7 細胞を培養し、通常時、LPS 曝露時、LPS 曝露後、LPS 除去をしてから 1 時間・ 2 時間・ 3 時間・ 6 時間時の主要なオートファジー関連シグナル伝達タンパク質のリン酸化レベルを WB で検出した。

2-3-2 炎症性サイトカインの産生量はオートファジー活性化レベルと反比例する

前項で、炎症反応終息時に mTOR を介したオートファジーが活性化する可能性を示した。そこで、外部刺激により強力にオートファジーを活性化すると炎症物質・炎症性サイトカインの産生がどのように変化するのかを検討した。mTOR 依存的なオートファジーはアミノ酸飢餓により容易にかつ強力に活性化することができる [29]。そこで炎症反応を惹起させた RAW264.7 細胞にアミノ酸飢餓処理を施し、炎症時に放出される一酸化窒素 (NO) 量を測定した。まず RAW264.7 細胞に LPS 処理を行った。その後全ての培地を除去し、LPS を含まない通常培地 (AA⁺) 交換群とアミノ酸フリー培地 (AA⁻) 交換群と LPS 処理を行わなかったコントロール群を作成して、その後3時間培養した。その結果、AA⁻交換群において NO 産生量がコントロール群と同程度であった (Fig. 2A)。炎症反応後アミノ酸飢餓に曝すと NO 産生量が通常培地より 50%低下しており、アミノ酸飢餓により強力にオートファジーを活性化すると炎症物質の産生が低下した。またこの細胞を回収し *inos* 遺伝子の発現量も確認したところ、AA⁺交換群ではコントロール群に対して4倍程発現していたのに対して、AA⁻交換群では1.5倍まで抑えられていた(Fig. 2B)。このことから炎症後にアミノ酸飢餓によってオートファジーを活性化すると NO 産生量の減少スピ

ードが早くなることが明らかとなった。アミノ酸飢餓条件下で炎症性物質・炎症性サイトカインの産生量を抑えられる可能性を示した。しかし、このアミノ酸飢餓による反応がオートファジー活性化によるものかどうかは断定できなかった。

この炎症物質の低下が NO 固有の現象ではないことを確認するために炎症性サイトカインである IL-6 や TNF- α でも同じ試験を行い確認した。この試験では AA⁺交換後 LPS 刺激を継続した LPS 群を追加した。その結果、IL-6 においては AA⁺交換群では LPS 群に対して産生量が 77.72 ± 5.64 pg/mL 下がったのに対して、AA⁻交換群では 119.67 ± 5.13 pg/mL 下がった (Fig. 2C)。TNF- α においては AA⁺交換群では LPS 群に対して産生量が 68.98 ± 14.78 pg/mL 下がったのに対して、AA⁻交換群では 82.13 ± 17.51 pg/mL 下がった (Fig. 2D)。IL-6 及び TNF- α においても NO 程の顕著な差は見られなかったが、炎症後にアミノ酸飢餓によってオートファジーを活性化すると炎症性サイトカインの減少スピードが早くなることが明らかとなった。ここま
でから炎症後に炎症反応の早期終結にはオートファジーの活性化が重要であることが示唆された。

アミノ酸飢餓条件下で炎症性物質・炎症性サイトカインの産生量を抑えられる可能性を示した。しかし、このアミノ酸飢餓による反応がオートファジー活性化によ

るものかどうかは断定できない。そこでオートファゴソーム形成に必須である Atg5 の遺伝子ノックダウン (KD) し、オートファゴソームの形成を一過的に阻害した RAW264.7 細胞を用いて前述と同様の試験を行い IL-6 及び TNF- α の検出を行った。トランスフェクションによる細胞への影響を考慮し、WT RAW264.7 細胞もリポフェクタミン処理を施した。RNAi 処理が出来ているかは WB にてタンパク量を確認したところ siAtg5 群において Atg5 の顕著な減少が確認できたことからこれを用いて試験を行った(Fig. 2E)

IL-6 においては WT RAW264.7 細胞では LPS 群に対して産生量が 77.72 ± 5.64 pg/mL 下がったのに対して、Atg5 KD RAW264.7 細胞では 56.25 ± 11.00 pg/mL 下がった (Fig. 2F)。TNF- α においては WT RAW264.7 細胞では LPS 群に対して産生量が 68.98 ± 14.78 pg/mL 下がったのに対して、Atg5 KD RAW264.7 細胞では 35.28 ± 9.70 pg/mL 下がった (Fig. 2G)。WT RAW264.7 細胞は培地交換により LPS を除去すると炎症性サイトカインの産生量が減少していくが、Atg5 をノックダウンすると WT よりも産生量が減らなかった。このことからやはり、炎症反応終結時の炎症性サイトカイン産生の低下はオートファジーが関与している可能性が示唆された。

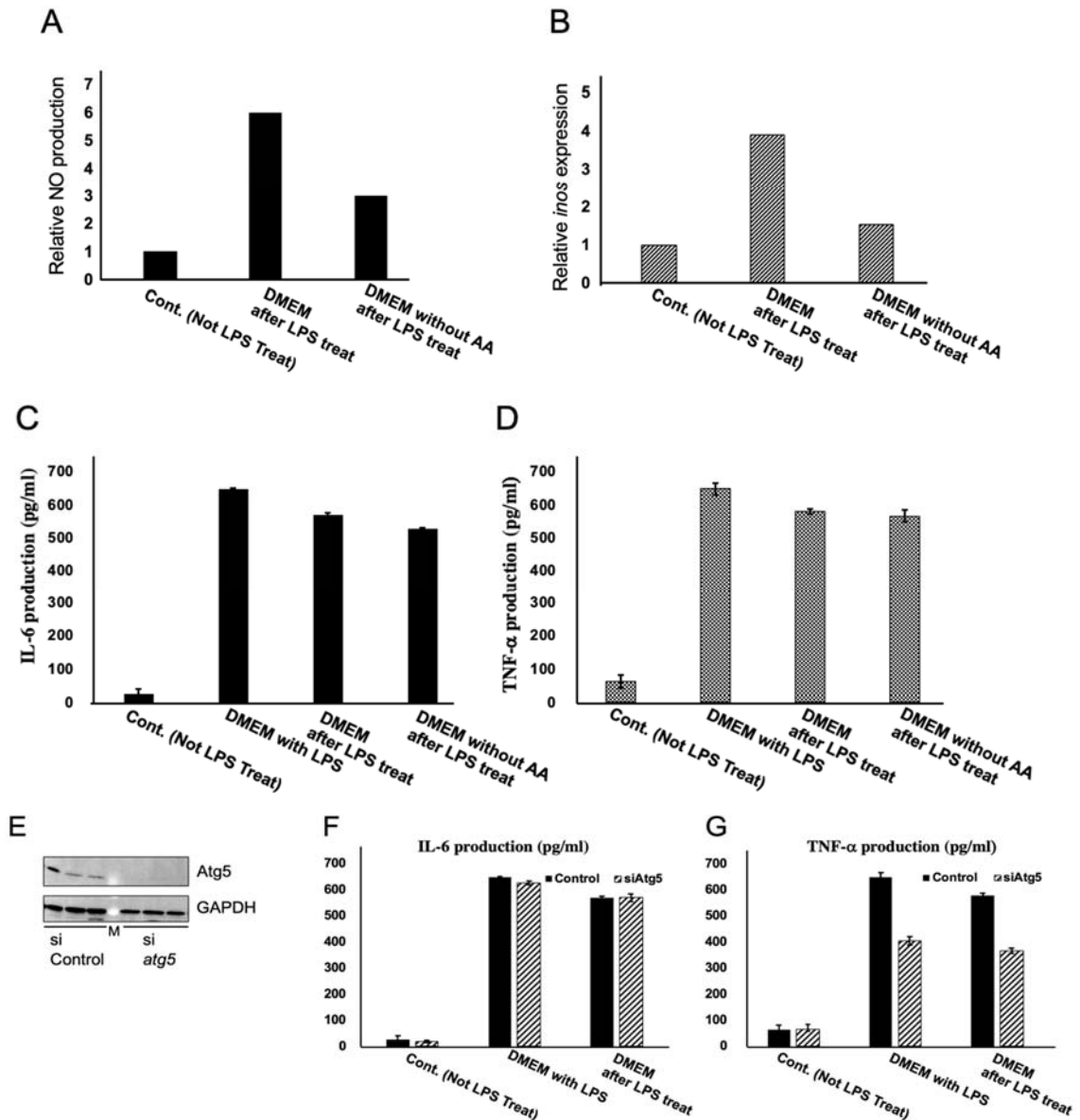


Fig. 2 炎症性サイトカインの産生量はオートファジー活性化レベルと逆相関する RAW264.7 細胞に前処理として 24 時間 LPS 処理を施し、その後 LPS 不含の DMEM あるいはアミノ酸不含の DMEM に交換し 3 時間後の NO 産生量(A)と *inos* 遺伝子発現量(B)、また 6 時間後の IL-6 産生量(C)と TNF- α 産生量(D)。IL-6 と TNF- α は LPS 処理を継続した群も作成した。Atg5 KD を WT RAW264.7 細胞と Atg5 KD RAW264.7 細胞を用いて Atg5 タンパク量を確認するために WB をした(E)。si RNA 処理を 12 時間行い WT RAW264.7 細胞と Atg5 KD RAW264.7 細胞を作成したのちそれを用いて前処理として 24 時間 LPS 処理を施し、その後 LPS 不含の DMEM に交換する群と LPS も再度添加する群を用意し 6 時間インキュベートした時の IL-6 産生量(F)と TNF- α 産生量(G)。誤差バーは標準偏差(SE) n = 4。AA は amino acid。

2-3-3 オートファジーは TLR シグナル伝達タンパクを選択的に分解する

TLR4 シグナル伝達系の細胞内シグナルはまず MyD88 が TLR4 の細胞質領域に結合するところから始まる。この MyD88 は IRAK を介して TRAF6 をリン酸化する。その後 TRAF6 は自己ユビキチン化を行い、種々のタンパクと会合して下流の TAK1, IKK をリン酸化する。IKK は I κ B α をユビキチン化してプロテアソームで一部を分解させることで NF- κ B を遊離させる。このように TRAF6 は TLR4 シグナル伝達系において上流と下流を結ぶシグナル反応に重要な役割を果たすタンパクである。前述のように TRAF6 の活性化メカニズムは明らかになっているが、炎症終結時における活性化 TRAF6 の除去・分解メカニズムの詳細は明らかにされていない。そこで選択的オートファジーに着目しこれを検討した。選択的オートファジーの基質の選択輸送には p62 というタンパクが関与している。p62 はユビキチン結合ドメイン(UBA)と LC3 結合ドメイン(LIR)を有するオートファジーにおけるアダプタータンパクである。また p62 はオートファジーにより基質とともに分解されるので p62 の減少はオートファジー活性化の指標となりうる[18]。p62 は TRAF6 と TRAF6 結合(TB)ドメインを介して結合することが知られている[30]。そこで p62 が TRAF6 と結合し、オートファゴソームへ輸送され分解されるという仮説を立てた。p62 と TRAF6 が炎症のどの時期にまた、どれくらいの量が結合するかを検討した。まず細胞内の p62、TRAF6 のタンパク量の変化を確認するために LPS

処理、アミノ酸飢餓処理、Bafilomycin A1 処理の有無別にサンプルを作成し、そのライゼートを WB で直接検出した(Fig. 3A)。まず LPS 処理をすると処理しないものと比べ p62 の量が大きく増加し、TRAF6 も微増した。アミノ酸飢餓によりオートファジーを活性化すると、p62、TRAF6 共にその量が大きく減少した。またこの減少は LPS 処理の有無に関わらず見られた。V 型 ATPase 阻害剤である Bafilomycin A1 は、リソソーム内の分解酵素を阻害しオートリソソーム内容物の分解が行われなくなる。Bafilomycin A1 を添加した群では p62、TRAF6 の分解が抑制されたことから、これらの減少にはオートファジーが関与している可能性が考えられた。次に通常時、炎症時及びオートファジー活性化時(炎症終結期模倣時)の RAW264.7 細胞を溶解しタンパクを抽出した後に、p62 抗体を用いて co-IP を行い p62 に結合する TRAF6 を WB により検出した。アミノ酸飢餓によるオートファジーの活性化において p62 および TRAF6 の分解が確認された(Fig. 3A)ため、培養中全てのサンプルに Bafilomycin A1 を添加し、p62-TRAF6 がオートファジーによって分解されてしまうのを防いだ。その結果いずれの時期も co-IP p62 サンプルに TRAF6 のバンドが確認された(Fig. 3B)。このことから少なくとも p62 は TRAF6 と常時結合していることが確認できた。直接結合しているのか、他のタンパクを介して結合しているのかは確認できなかった。次にこの TRAF6 がオートファゴソーム上の LC3 と

結合しているかを確認した。co-IP p62 と同様に細胞溶解液から抗 LC3 抗体を用いて co-IP LC3 サンプルを作成し、LC3 に結合している TRAF6 を WB で検出した。その結果炎症時以外は LC3 と TRAF6 は一定量結合していることが判明した(Fig. 3C)。LC3 と TRAF6 の結合を示した報告は見られないが、双方のタンパクと結合できうる p62 を介して結合していると考えられる。LPS 処理をしている炎症時には LC3 に結合している TRAF6 の量は減少する(Fig. 3C)。が、これは炎症時には TRAF6-p62 が LC3 へのリクルートが抑制されている可能性が考えられた。

これより、p62 と TRAF6 は細胞内で同調して増減し、TRAF6 の分解は p62 を介した選択的オートファジーによるものである可能性が示唆された。

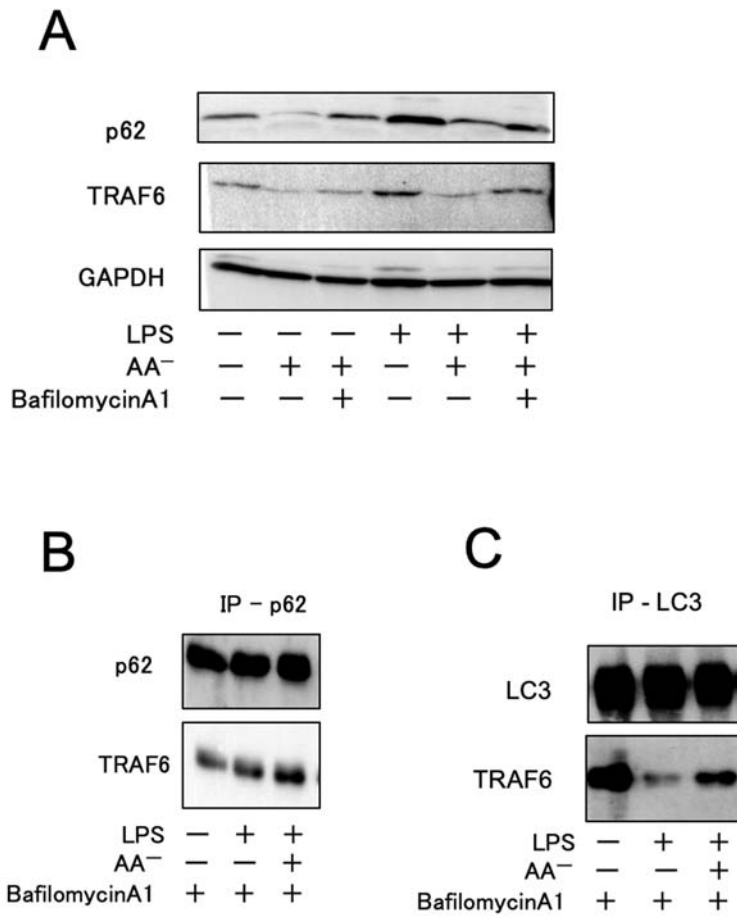


Fig. 3 選択的オートファジーは TRAF6 の分解を担っている

RAW264.7 細胞に無処理、LPS 処理、LPS+アミノ酸飢餓処理を行い 12 時間培養した後に回収・溶解し、p62 抗体(A)もしくは LC3 抗体(B)で IP したものをまた IP しない通常ライセート(C)を WB で解析した。オートファゴソーム内容物の分解を抑制する目的で Bafilomycin A1 を各処理時に必要なサンプルに添加した。Bafilomycin A1 は DMSO に溶解し、終濃度 0.1 μ M で使用した。

2-3-4 炎症反応終息時にオートファジー関連タンパクと TRAF6 の量は顕著に変動する

2-3-3において TRAF6 は p62 を介して選択的オートファジーで分解されることが明らかとなった。2-3-3 は条件を模倣するために試薬処理を行い細胞にとって各条件において極限環境でのタンパク量の変化を観察した。2-3-1 から炎症反応終結時にオートファジーが活性化することが明らかになっている。そこで炎症が起こり、終結する自然状態での細胞内タンパク量変動の検出を行い、炎症終結時に活性化するオートファジーによる TRAF6、p62、LC3 タンパク量の変化・相互作用を確認した。

まず LPS 処理を行い、培地を交換した後に 0~8 時間のあいだ 1 時間ごとに細胞を回収・溶解し、TRAF6 抗体で co-IP を行った。この時ライセートの一部を IP せず保管した。両サンプルを WB で解析を行い、必要に応じてバンドの濃さも定量化を行った。co-IP TRAF6 から培地交換後 2 時間で p62 のタンパク量が一過的に減少した(Fig. 4A, B)。Input サンプルでは LPS 添加以後に p62 が著しく増加するため(Fig. 3A)、p62 の増減でのオートファジーの確認はできなかった。Input サンプルの結果より TRAF6 自体のタンパク量も減少しており、LPS を除去してから 2 時間でシグナル伝達に関与した TRAF6 が分解されていると考えられる。アミノ酸飢餓時のように p62 と TRAF6 の顕著な減少は、LPS 刺激の有無だけでは見られなかった。これは炎症終結時に活性化されるオート

ファジーは軽微であるが、アミノ酸飢餓で活性化されるオートファジーは強力であることからその活性化レベルまた、活性化時間の違いによるものであることが考えられる。

炎症終結時オートファジーは LPS 除去後 1~2 時間で活性化される(Fig. 1A)ことからこの TRAF6 タンパク量の変動はオートファジーが関与している可能性を示唆している。

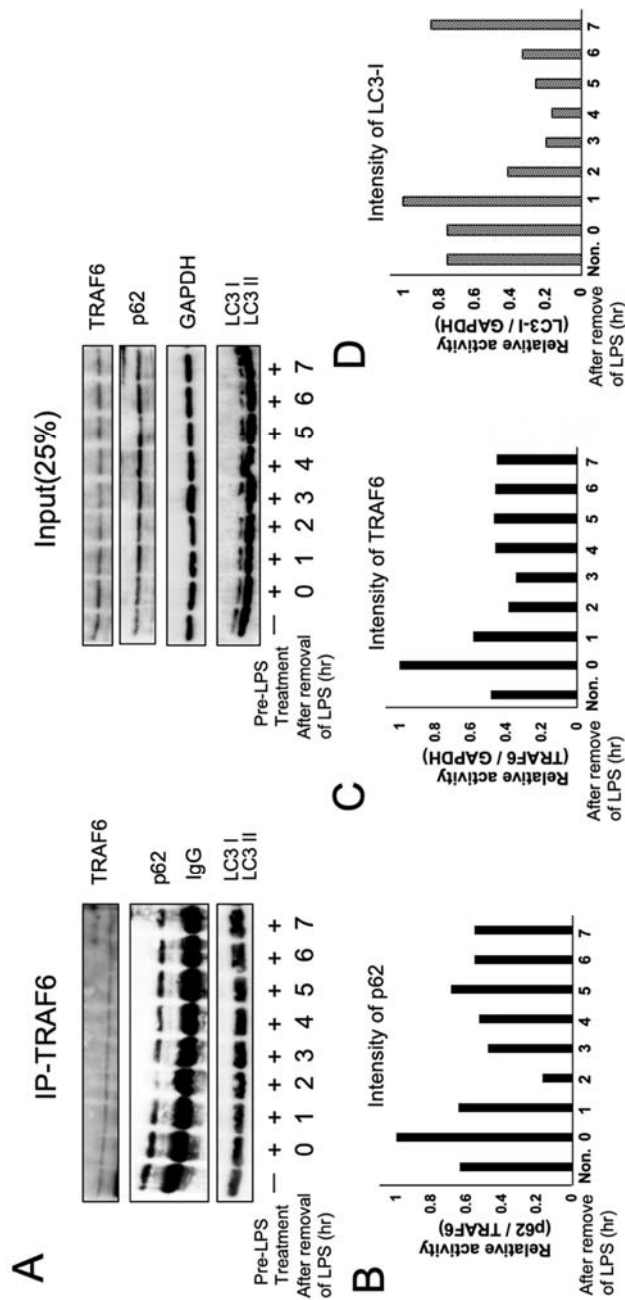


Fig. 4 オートファジー関連タンパクと TRAF6 の量の経時変化

RAW264.7 細胞に前処理として 24 時間 LPS 処理をした後に培地を交換し 0~7 時間の間 1 時間おきに細胞を回収した。回収した細胞を溶解した後の溶解液の 75%を抗 TRAF6 抗体で IP した。残りの 25%は Input サンプルとして保管しておいた。両サンプルを WB で TRAF6, p62, LC3 を検出した(A)。IP-TRAF6 サンプルの p62 バンド(B)と Input サンプルの TRAF6 バンド(C)と LC3-I バンド(D)の濃さを画像解析ソフト Image J を用いて解析を行った。

2-3-5 レスベラトロールを用いたオートファジー依存的抗炎症活性の検討

レスベラトロールはブドウ(*Vitis spp.*)やイタドリ(*Fallopia japonica*)などに多く含まれるポリフェノールの1種である。レスベラトロールはオートファジーを強く活性化させることができる[1]。レスベラトロールは SIRT1 に作用し、AMPK を介して AKT/mTOR 依存的なオートファジーを活性化することが知られている[31]。そこでレスベラトロールはアミノ酸飢餓と同じ経路で炎症反応終結を促進できるのではないかと考えた。まずレスベラトロールがオートファジーを活性化できる最小濃度の探索を行った。レスベラトロールは Sigma-Aldrich 社より購入し DMSO に溶解し使用した。RAW264.7 細胞に各濃度のレスベラトロールで 12 時間処理し、オートファジーの指標である p62 の減少を確認したところ 5 μ M 以上で p62 の減少が見られた(Fig. 5A)。p62 と TRAF6 の相互作用はレスベラトロール処理で変化が起きるのか、無処理群、LPS 処理後培地交換した群、LPS 処理後 5 μ M レスベラトロールを処理した群を用意し、細胞を溶解した後に抗 TRAF6 抗体で co-IP を行いそのサンプルを抗 p62 抗体を用いた WB で検出を行った。レスベラトロール処理を行った群は行っていない 2 群と比べて TRAF6 と p62 その後作用は強くなっていることが判明した(Fig.5B)。これにより TRAF6 はオートファジーによる分解を受けやすくなると考えられる。最後にレスベラトロールが炎症を抑制できるの

かを検討するために炎症性サイトカインである IL-6 の遺伝子発現量を確認した。全ての群に LPS 処理を行いその後、無処理群、追 LPS 群、アミノ酸飢餓群、レスベラトロール群に分けて 3 時間処理を行った。無処理群との優劣の比較をするため 3 時間処理した。処理後、cDNA を調製して qRT-PCR を行った。LPS を除去すると il-6 発現量が 60% 低下したが、アミノ酸処理では 80% まで低下した。レスベラトロール処理では LPS 処理時と比べて 90%、LPS からの無処理群と比較して 75% 低下した (Fig. 5C)。このことからレスベラトロールは mTOR 依存的にオートファジーを活性化させ、TRAF 6 の分解を促進することで NF- κ B の核内移行を妨げ炎症性サイトカインの 1 つである IL-6 の遺伝子発現量を大きく低下させることが明らかとなった。このようにアミノ酸飢餓を模倣できる化合物であれば、一定の抗炎症効果が期待できる可能性がある。

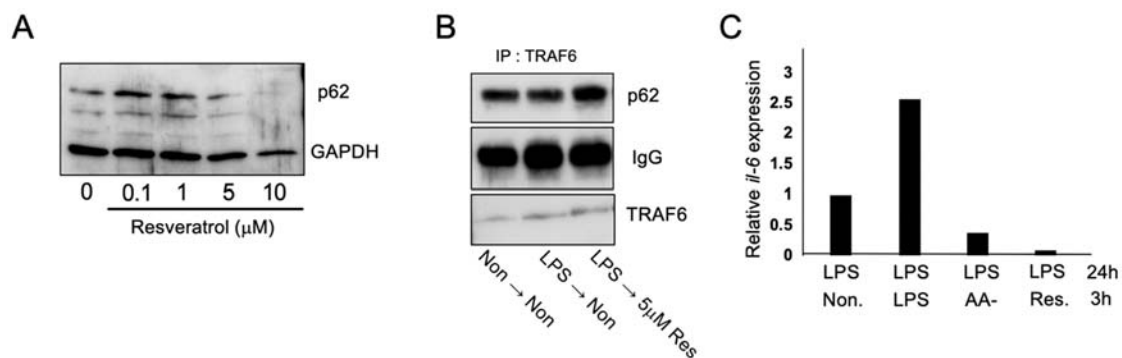


Fig. 5 レスベラトロールを用いたオートファジー依存的抗炎症活性の検討

(A) RAW264.7 細胞を 0, 0.1, 1, 5, 10 mM レスベラトロールで 12 時間処理したのち回収し、細胞溶解液を WB で p62 を検出した。(B) コントロール、LPS 処理から培地交換して無処理、LPS 処理から培地交換して 5 μM レスベラトロール処理をした細胞を溶解し、抗 TRAF6 抗体で co-IP を行い、WB で p62, TRAF6 を検出した。(C) LPS を前処理した細胞を無処理、LPS 継続処理、アミノ酸飢餓処理、5 μM レスベラトロール処理 3 時間行った。その細胞を回収し cDNA を調製し、il-6 プライマーペアを用いて qRT-PCR を行った。LPS-無処理群を 1 として発現量を相対比として示した。

2-4. 考察

はじめに LPS 曝露による炎症中および炎症後におけるオートファジーの挙動を確認した。LPS 除去後 1~2 時間後においてオートファゴソームの形成が促進し、一時的な mTOR 依存的なオートファジの活性化が確認された。このオートファジーは AKT 以下のシグナル伝達がオートファジーを活性化する方向に進んだことによって起こったが、本研究の試験では AKT 直上の PI3Kinase には変化は見られなかった(Fig. 1B)。本来の飢餓応答のオートファジーであれば各レセプターが受容した刺激が細胞膜下に存在する PI3Kinase の働きによって AKT に伝えられるが、別経路で AKT に作用したと考えられる。AKT には直接 IKK をリン酸化する作用がある[32]。今回の AKT リン酸化は mTOR の脱リン酸化を引き起こしオートファジーを活性化させ TLR-MyD88-TRAF6 伝達系から離脱し、AKT から IKK への伝達を切り替えることで炎症反応終息へ向けた準備である可能性があると考えた。そのことを示すように LPS を除去した点(0 hour)に AKT がリン酸化され、オートファジーの活性化が収まってきた時期(3 hour)にもう一度リン酸化されている。LPS 除去後、3 時間以後の AKT リン酸化は解除され TLR-MyD88-TRAF6 伝達系及び AKT-IKK 伝達系の両方が遮断されることで細胞内での炎症反応は終結を迎えると考えられる。TLR-MyD88-TRAF6 伝達系においてはこの LPS 除去後の AKT のリ

ン酸化による mTOR 依存的なオートファジーの活性化が炎症終結において大きな鍵を握っていると考えられた。この時期に *atg* 遺伝子の変異などで mTOR 依存的なオートファジーの活性が起こらないもしくは遅れると、炎症反応が終結に向かわず慢性炎症を引き起こしてしまう原因になるのではないかと考えられる。健常なヒトでも老化とともに慢性炎症が発生しやすくなる傾向にある。それに相関し加齢に伴って *atg* 遺伝子の発現低下や変異が上昇するといった報告も存在する[33]。このようなことから薬剤など外部的な力を利用して mTOR 依存的なオートファジーの活性を維持することは健康維持の側面から見ても重要であると言える。

TLR-MyD88-TRAF6 伝達系においてシグナルの減弱は AP による NF- κ B の機能抑制[34]や Regnase1 による炎症性サイトカインをコードする mRNA の分解[35]が明らかとなっているが、IKK より上流の減弱機構はあまり解明されていなかった。今回、オートファジーが TRAF6 を分解することによる IRAK1 から TAK1/2 までの間のシグナル遮断を示した(Fig. 6A, B)。活性化 TRAF6 は蓄積すると皮膚においては乾癬などの原因になることが報告されている[36]ことから不必要な時には分解される必要があるタンパクでもあると考えられる。p62 と TRAF6 が常時結合できるのは炎症のシグナル伝達以外の TRAF6 が不必要な時には合成と分解の均衡を取ることで不必要な炎症反応を引き起

こさない為のシステムではないかと考える。炎症時 TRAF6 は LC3 との相互作用が弱かった(Fig. 3C)が、これは炎症時においては TRAF6 が分解されるのを防ごうとしているものであると考えられる。しかしながら、選択的オートファジーの基質輸送メカニズムの複雑さや活性化 TRAF6 が高度にユビキチン化されていることが解析やデータの解釈を複雑にし、そのメカニズムの解明には至らなかった。この点に関しては活性化 TRAF6 の挙動や NBR1 のような p62 以外のオートファジーにおけるアダプタータンパクとの作用などを視野に入れ検討される必要があると考えられる。炎症反応のシグナル伝達系においてユビキチン化は活性化と分解が紙一重であり、TRAF6 や I κ B α といった炎症反応伝達においてポイントとなるタンパクの活性化がリン酸化ではなくユビキチン化であることは、非活性化時において素早く分解することができるようになっているのではないと思われる。

近年健康ブームの高まりから、食品由来成分の機能性の解析が盛んに行われている。炎症反応の抑制も例外ではなく、炎症性サイトカインの産生抑制や遺伝子発現の抑制など根拠は異なるものの様々な成分(分子)から抗炎症効果に関する報告が存在する[37]。またオートファジー活性化に関する報告も増えている[1]。しかしながらレスベラトロールやケルセチンなどこの抗炎症効果とオートファジー活性化を示す化合物はほとん

どが重複しておりその機能性がオーバーラップしている[1,37]。また、mTOR をターゲットにしたオートファジー活性化薬で有名な Rapamycin は臨床では免疫抑制剤として使用されている。このことから炎症抑制とオートファジーが密接な関係にあることが伺える。このオートファジーの大半が mTOR を介することから外部刺激による mTOR 依存的なオートファジーの活性化は炎症反応の低減に大きな役割を果たすと考えられる。本研究及びの結果からも mTOR の脱リン酸化を指標としたオートファジー活性化の検出は新たな抗炎症物質のスクリーニング法になりうる可能性を秘めている。本研究の進展が様々な疾病の原因となりうる慢性炎症の解決に寄与できると考えている。

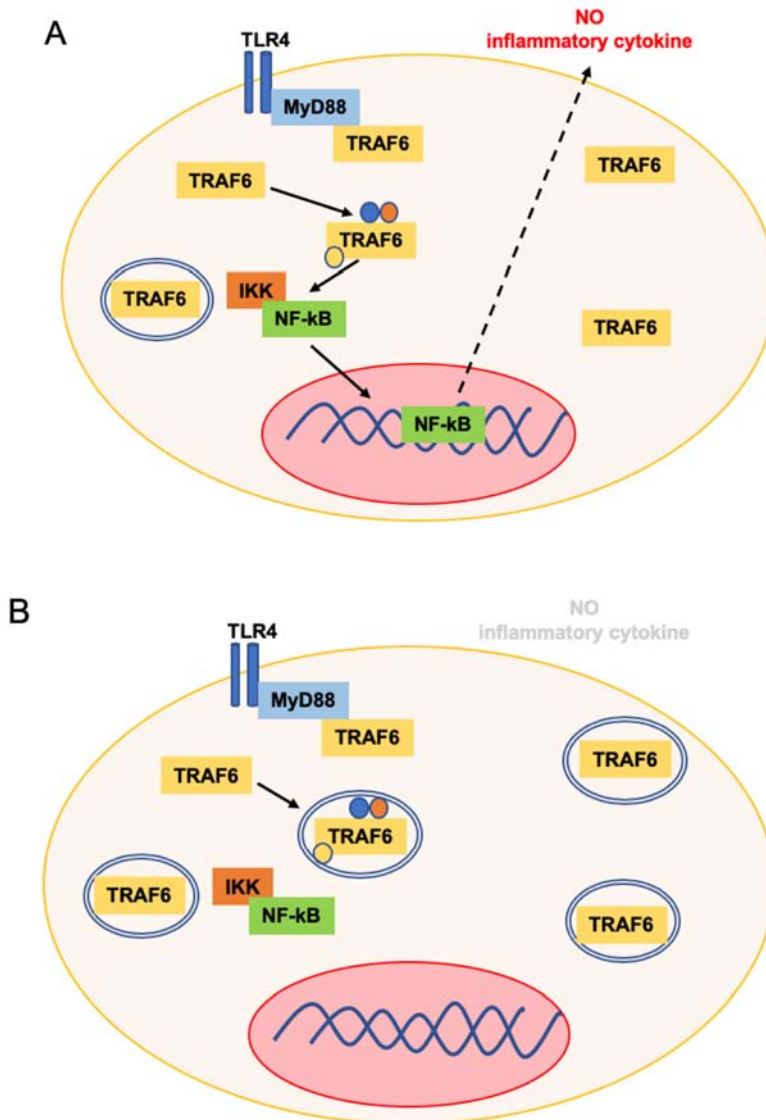


Fig. 6 p62-TRAF6 はオートファゴソームへ運ばれることで TLR シグナルは減弱する炎症が発生している時(A)から炎症が終息に移行する時(B)、オートファジーが活性化し、p62 のはたらきにより TRAF6 がオートファゴソームに輸送される。TRAF6 が分解されることにより NF-κB の核内移行が起こらなくなり炎症物質をコードする遺伝子の転写が抑制され、結果として炎症反応がおさまる。

第3章

Bifidobacterium longum subsp. *longum* における
アラビナン分解に重要な
2つの α -L-アラビノフラノシダーゼの解析

3-1. 緒言

ヒトの腸内には数百種以上、約 100 兆個の腸内細菌が棲息している。この数は宿主であるヒトの細胞数よりはるかに多く、腸内細菌と宿主の細胞との相互作用によって、宿主の体内環境は影響を受けると考えられている。ビフィズス菌(*Bifidobacterium* 属)はヒト大腸における腸内菌叢の主要な構成菌群の一つである。ビフィズス菌はグラム陽性、カタラーゼ陰性の桿菌であり、糖を資化して乳酸と酢酸を生成することから乳酸菌に分類される。しかし、ビフィズス菌と狭義の乳酸菌は分類学上大きく異なる細菌群であり [38]、狭義の乳酸菌において主要な菌属である *Lactobacillus* 属や *Lactococcus* 属 は Firmicutes 門に属する一方で、*Bifidobacterium* 属は Actinobacteria 門に属する。また、ヒト大腸内での存在量も大きく異なり、ビフィズス菌は乳酸菌の 100 倍以上存在すると報告されている [39]。ビフィズス菌は主にヒトや動物の腸管から単離されるが、その生息種は年齢によって異なる。ヒト成人の糞便から検出されるビフィズス菌の割合は検出方法によって異なるが全ての菌のうち 10%程度で、*Bifidobacterium adolescentis*, *B. pseudocatenulatum*, *B. longum* subsp. *longum* が主要である [38, 40, 41]。一方で、母乳栄養児の糞便からはビフィズス菌が最優勢で検出され [42]、*B. breve*, *B. bifidum*, *B. longum* subsp. *longum*, *B. longum* subsp. *infantis* が高頻度で検出される。ビフィズス菌は腸の善玉

菌の代表であり、「適量を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利用されている。

ビフィズス菌は消化管下部（小腸下部～大腸）に棲息する。この消化管下部には腸内細菌が容易に代謝できる単糖などの糖成分はほとんどないため、ビフィズス菌は多様な糖加水分解酵素を有しており、限られた糖質を効率的に利用することができる[43]。ゲノムプロジェクト株である *B. longum* NCC2705 におけるゲノム解析の結果から、ORF 全体のうち約 8.5%が糖質分解と代謝に関わるタンパク質をコードしていると予測されている [44]。

私たちを含むいくつかの研究グループにより、乳児腸内のビフィズス菌 *B. bifidum*、*B. longum* subsp. *infantis* および *B. longum* subsp. *longum* がヒト母乳由来のオリゴ糖 [44-52]および消化管から分泌されるムチンなどの糖タンパク質のセリン/スレオニン結合型糖鎖[53-59]を利用できることが報告されている。

食物繊維は食品標準成分表においてヒトの消化酵素で消化されない食品中の難消化性成分の総体と定義されている [60]。食物繊維の一部は消化管下部に棲息する腸内細菌の発酵を受けて代謝され、ヒトの健康にとって有用な生理作用を示すことが特徴である。「経口摂取することで腸内細菌フローラを調節し宿主に良い影響を与える食品成分」

と定義されるプレバイオティクスは、①消化管上部で分解・吸収されない、②大腸に共生する有益な細菌の選択的な栄養源となり、それらの増殖を促進する、③大腸の腸内フローラ構成を健康的なバランスに改善し維持する、④人の健康の増進維持に役立つ、の4条件を満たすことがWHOの指針である。難消化性オリゴ糖によるプレバイオティック効果の代表的なものに、便性状改善や排便の促進、短鎖脂肪酸の増加などが存在する。この短鎖脂肪酸には、脂質代謝の改善や環境を酸性にすることで *Clostridium* 属菌などの有害菌の生育抑制や、それが産生する2次胆汁酸などの変異原性物質や有害物質の減少、免疫機能の調節などの効果があることも見いだされている。[61, 62]

アラビノースは、五炭糖及びアルドースに分類される糖の一種である。他の単糖とは異なり、自然界ではD体ではなく大部分がL体で存在するという特徴を持つ。L-アラビノースは小腸で吸収され難いことが、ネズミやニワトリ、ブタなどで明らかにされている[63-66]。アラビノースを含む多糖には主にアラビノキシラン、アラビノガラクトン、アラビナンの3種がある。アラビノキシランは、針葉樹やイネ科植物に含まれるヘミセルロースの一つである。針葉樹ヘミセルロースとしてはグルコマンナンの次に多く含まれ、含有率は10%程度に達する。 β 1,4結合したキシロースの主鎖に対し、キシロース10残基当たり、 α 1,2結合または α 1,3結合でL-アラビノフラノースが1残基、 α 1,2

結合で 4-O-メチルグルクロン酸が 2 残基結合している。アラビノガラクトンはおもにアラビノース残基とガラクトース残基からなる多糖であり、大きく分けてタイプ I とタイプ II がある。タイプ I アラビノガラクトンは 1,4- β -D-ガラクトンを主鎖とし、一部のガラクトース残基の C3 位にアラビノフラノシル- α 1,5-アラビノフラノース残基が結合したものである。タイプ II アラビノガラクトンは 1,3- β -D-ガラクトンを主鎖とし、一部のガラクトース残基の C6 位にさまざまな糖残基が結合したものを基本構造としており、アラビナンは、1,5- α -L-アラビノフラノース鎖を主鎖とし、ところどころの L-アラビノフラノース残基の C3 位または C2 位に、 α -L-アラビノフラノース残基が結合している [67]。以上の多糖の簡便な構造を Fig. 7 にまとめた

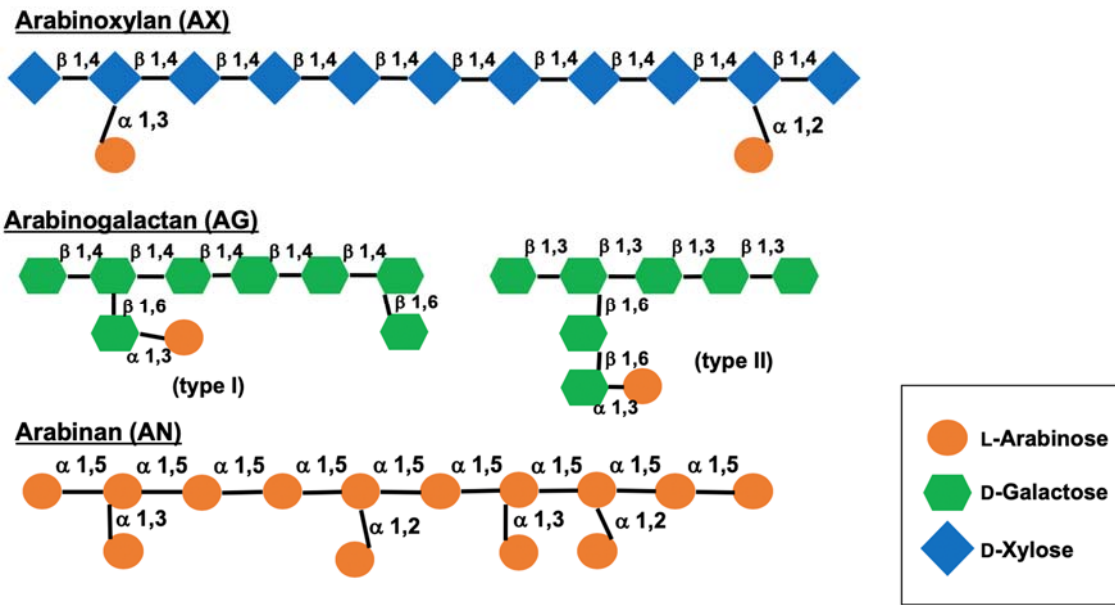


Fig. 7 アラビノキシラン、アラビノガラクトタン、アラビナンの構造の模式図

以前の研究で、アラビナン、アラビノキシラン、アラビノガラクトタンなどの植物マトリックス多糖類由来のオリゴ糖が、成人型ビフィズス菌の潜在的な炭水化物源であることが示唆されている[68]。しかし、ビフィズス菌がどのようにアラビナンを利用するのかはよくわかっていない。そこで、幼児と成人の両方の腸に生息する *B. longum* subsp. *longum* におけるアラビナン分解のメカニズムを理解することを目的に植物多糖分解酵素の解析を行った。糖質関連酵素データベース(CAZy) (<http://www.cazy.org>) には、*B. longum* subsp. *longum* JCM 1217 由来の 23 の Glycoside Hydrolase (GH) ファミリーに属する 59 個のグリコシダーゼが登録されている。私はこれらの GH ファミリーのうち、 α -L-アラビノフラノシダーゼ、 β -キシロシダーゼ、アラビナーゼ、およびキシラナーゼなどのヘミセルロース分解グリコシダーゼを含む GH43 ファミリーに注目した。11 個の GH43 ファミリードメインを含む 9 個の ORF が、*B. longum* subsp. *longum* JCM 1217 のゲノム中に存在する。特に、5 つの GH43 ファミリーORF、BLLJ_1850 – BLLJ_1854 はゲノム中で連続し遺伝子クラスターを形成する。本研究において、私は 2 つの GH43 ファミリーに分類され、BLLJ_1852 にコードされる GH43 subfamily 27 (GH43_27) に属する BIArafC と BLLJ_1853 にコードされる GH43 subfamily 22 (GH43_22) に属する BIArafB をクローニングし性質を解析した。

3-2. 材料と方法

3-2-1. 培地及び培養法

・大腸菌

使用菌株は Table 3 にまとめた。液体培地は、LB 培地 (BD) を使用し、寒天培地は、同液体培地に 寒天 (Wako) を終濃度で 2 % 添加して作製した。培地は調製後、オートクレーブ滅菌した。Table 4 のプラスミド保有株を培養する際は、アンピシリン (Wako) を終濃度 100 μ g/ml となるように添加した。37 $^{\circ}$ C、好気条件で培養した。

・ビフィズス菌

使用菌株は Table 3 にまとめた。液体培地には、GAM ブイヨン (日水製薬) を使用し、寒天培地は、同液体培地に 寒天 (Wako) を終濃度で 2 % 添加して作製した。培地は調製後、オートクレーブ滅菌した。37 $^{\circ}$ C、嫌気条件で培養した。なお嫌気培養は、AnaeroPack-Anaero (三菱ガス化学) 及び密閉容器を用いた。

3-2-2. ゲノム抽出

GAM 培地で 24 時間培養した *B. longum* subsp. *longum* JCM1217 株を回収した。Nucleo Spin (Takara) を用いて手順通りに操作し DNA を抽出した。抽出した DNA の保管は 4 $^{\circ}$ Cで行った。

3-2-3. 発現プラスミドの構築

B. longum subsp. *longum* JCM 1217 ゲノム上の機能未知遺伝子 *bllj_1852* の配列のうち N 末端シグナル配列と C 末端膜貫通領域のアミノ酸配列を除いた領域を対象として、その DNA 配列を PCR で増幅させる DNA プライマーを設計した (Table 5)。プライマーは、PCR 産物の 5'-末端側に *NdeI*、3'-末端側に *HindIII* の制限酵素サイトが組み込まれるように設計した。*B. longum* subsp. *longum* JCM 1217 ゲノムを鋳型として、KOD plus ver. 2 (TOYOBO) を用いて PCR を行い、pET23b ベクターを *NdeI* と *HindIII* で処理した。制限酵素処理した PCR 増幅断片と pET23b ベクターを Ligation High ver. 2 (TOYOBO) を用いてライゲーションし、pBlArafC 発現プラスミド (*pET23b-T7_p-bllj_1852-His₆⁺ bla⁺*) を構築した。

機能未知遺伝子 *bllj_1853* も同様に、N 末端シグナル配列と C 末端膜貫通領域のアミノ酸配列を除いた領域を対象として DNA 配列を特異的に増幅する DNA プライマーを用いた PCR で増幅した (Table 6)。PCR 増幅断片と pET23b ベクターを *EcoRI* と *XhoI* で処理した後ライゲーションし、発現プラスミド pBlArafB (*pET23b-T7_p-bllj_1853-His₆⁺ bla⁺*) を構築した。

Table 3 本研究における使用菌株

株	用途
<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>longum</i> JCM1217	ゲノム抽出、増殖試験
<i>Bifidobacterium longum</i> NCC 2705	増殖試験
<i>Escherichia coli</i> DH5 α	発現ベクター作製
<i>Escherichia coli</i> BL21 λ DE3 Δ lacZ	リコンビナント酵素発現

Table 4 本研究で使用したプラスミド

Plasmid	
pET23b	<i>ColE1 replicon rop⁺ bla⁺ lacI_q T7_p-His₆</i>
pBlArafC	<i>pET23b-T7_p-bllj_1852-His₆⁺ bla⁺</i>
pBlArafB	<i>pET23b-T7_p-bllj_1853-His₆⁺ bla⁺</i>

Table 5 pBlArafC のクローニングに使用したプライマーの配列

primer name	primer sequence
BLLJ_1852 F	GGAATTCCATATGGATACCGTTCCGACCAATAATCTCATC
BLLJ_1852 R	CCCAAGCTTAGACAGACCGAGCTTGTTGCCCG

Table 6 pBlArafB のクローニングに使用したプライマーの配列

Oligo name	Sequence
BLLJ_1853 F	GGAATTCCATATGGATACCGTTCCGACCAATAATCTCATC
BLLJ_1853 R	CCCAAGCTTAGACAGACCGAGCTTGTTGCCCG

3-2-4. 大腸菌の形質転換

コンピテントセルは野島法[70]で調製し、使用までは-80°Cで保存した。コンピテントセル 50 μ L にプラスミド溶液を加え、氷上で 30 分静置した後にヒートショック処理 (42°C、45 秒) をした。素早く氷冷した後に 500 μ L の SOC 培地(2% Pepton, 0.5% Yeast extract, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM Glucose)を添加して 37 °Cで 40 分インキュベートした後に LB アンピシリン寒天培地に適当量塗布し、37 °Cで培養しコロニーを出現させた。プラスミド作製には *E. coli* DH5 α を、リコンビナント酵素発現には *E. coli* BL21 (λ DE3) $\Delta lacZ$ 株のコンピテントセルを使用した。

3-2-5. プラスミド抽出

プラスミド抽出には High pure plasmid collection kit (Roche) を用いて手順通りに操作を行いプラスミドを回収した。抽出したプラスミドは-20 °Cで保管した。

3-2-6. リコンビナントタンパクの発現と精製

各プラスミドを導入した *E. coli* BL21(λ DE3) $\Delta lacZ$ を LB アンピシリン培地に植菌し、37°Cで振とう培養を行い、OD₆₀₀ 値が 0.3 ~ 0.5 となった時に氷冷した後に、IPTG (Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside) (Nacalai) を終濃度 0.5 mM になるように添加した。その後、25 °Cで 12 時間振とう培養を行い、目的タンパクの発現を誘導した。培養終了

後、遠心分離にて集菌した。回収した菌を BugBuster Protein Extraction Reagent (Novagen) で溶菌させ、手順通りに操作を行い無細胞抽出液を調製した。得られた無細胞抽出液を His GraviTrap column (GE healthcare) を用いて推奨の緩衝液を使用し精製した。その後、溶出緩衝液に含まれるイミダゾールを除去するために 10 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH5.5) に対して 4°C で終夜透析した。

3-2-7. 酵素活性の測定

合成基質 *p*NP (*p*-nitrophenyl)-glycoside を用いた酵素反応の解析は、酵素反応によって人工基質 *p*NP-glycoside から遊離した *p*NP を、アルカリ条件下で比色定量する方法で酵素活性を測定した。適当な反応条件で酵素反応を行い、反応停止時には 500 mM Na₂CO₃ を反応液の 1.5 倍量添加し反応停止し、405 nm における吸光度を測定した。

天然基質に対する作用は、酵素と基質を 37°C で終夜反応させたものを薄層クロマトグラフィーを用いて評価した。天然基質として、コムギ由来アラビノキシラン (Megazyme)、テンサイ由来アラビナン (Megazyme)、ブナ由来アラビノガラクトン (東京化成) を使用した。遊離アラビノースは L-Arabinose/D-Galactose Assay Kit (Megazyme) を用いて定量した。

3-2-8. 薄層クロマトグラフィー (TLC)

天然基質と合成2糖の分析を行う際に薄層クロマトグラフィー (TLC) を行った。TLC プレートとして TLC Silica Gel 60 (Merck) を使い、展開溶媒と発色試薬は Table 7 のものを用いた。展開後、スプレービンを用いて発色試薬を十分に噴霧した後に、ガラス板に挟み 150°C で 12 分程度加熱した。

3-2-9. SDS-PAGE

SDS-PAGE は Leammli 法[20]で行った。分子量マーカーとして Precision Plus Protein Prestained Standard Dual Extra (BIO-RAD) を使用した。泳動後、EzStain Aqua (ATTO) を用いてタンパク質を染色した。

3-2-10. 遺伝子発現量解析

培養が終了した菌体を、集菌した後 TRIzol 試薬 (Life Technologies Japan Ltd.) で菌体を溶解し、試薬手順通りに RNA 画分を抽出した。この RNA 画分をイソプロパノール沈殿により精製・濃縮したのち RNase free water に溶解した。この RNA 500 ng を Prime Script RT-PCR kit (TaKaRa Bio Ltd.) で手順に従い逆転写を行った。この逆転写反応液を用いて SpeedSTAR HS (TaKaRa Bio Ltd.) で PCR を行った。なお PCR に用いたプライマーはクローニングに使用したものと同一ものを使用した。PCR 反応液を 0.8% アガロース

ゲル、TAE バッファーで電気泳動を行った。マーカーには 2-log DNA Ladder (NEB)を用い、染色には SYBR Gold nucleic acid gel stain (Invitrogen)を用いた。検出されたバンドを画像解析ソフト ImageJ を用いて定量した。

3-2-11. ビフィズス菌増殖試験

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 $OD_{600}=0.25$ になるように各培地で希釈した。5.0%アラビナン溶液、5.0%アラビノース溶液及び 5.0%グルコース溶液を $0.45\mu\text{m}$ フィルターで除菌した後、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°C で 48 時間インキュベートし、3 時間ごとに OD_{600} を測定した。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。調製後、オートクレーブ滅菌を行った。

Table 7 TLC の展開溶媒と発色試薬

天然基質の展開溶媒

ブタノール : 酢酸 : DW = 2 : 1 : 1

合成 2 糖の展開溶媒

クロロホルム : メタノール : 酢酸 = 6 : 1 : 1

*展開溶媒の混合比は全て容積比

発色試薬の組成

Reagent	volume
Acetone	10 mL
Aniline	0.1 mL
Diphenylamine	0.1 g
Phosphoric acid	1 mL

3-3. 結果

3-3-1. *B. longum* subsp. *longum* JCM 1217 のアラビナン培地における増殖

アラビノオリゴ糖はビフィズス菌に対するプレバイオティクスとして作用する[68]。

一方、アラビナンについては、*B. longum* subsp. *longum* の株間で資化能が異なることが知られている [71,72]。そこでまず初めに、ヒトにおいて乳児から成人の腸内に幅広く生息するビフィズス菌種である *B. longum* subsp. *longum* JCM 1217 が、アラビナンを唯一の炭素源として増殖できるかどうかを調べた (Fig. 8)。本菌株は、アラビナンおよびアラビノースを含む培地でほぼ同等に増殖できることが明らかになった。この結果から、本菌株はアラビナンをアラビノースに分解して利用していることが示唆された。

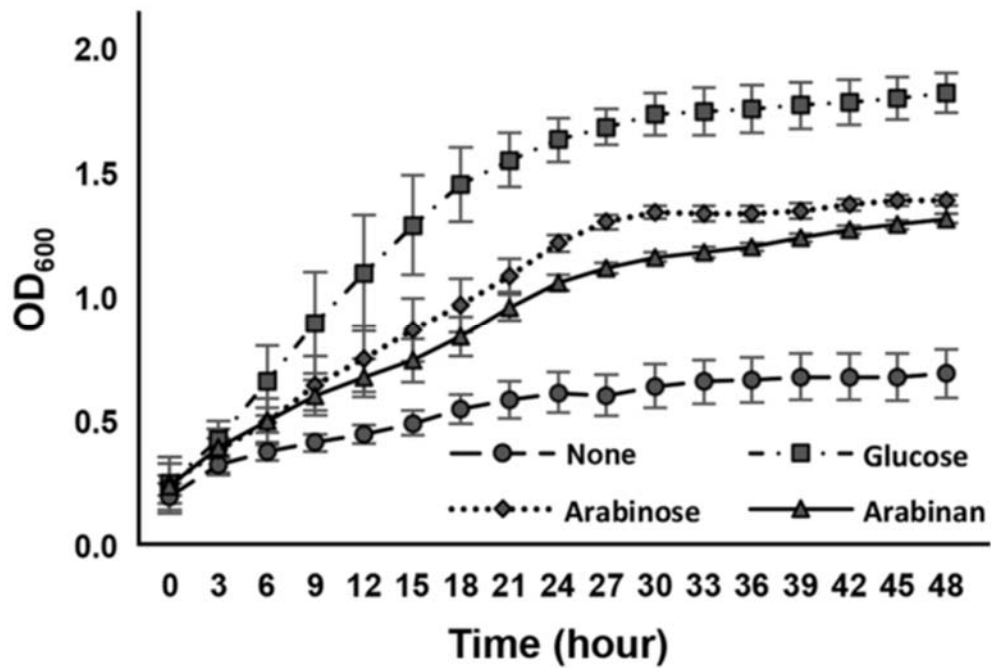


Fig. 8 *B. longum* subsp. *longum* JCM 1217 のアラビナン培地における増殖
 菌をそれぞれの糖を2%加えた糖質制限培地で、嫌気条件下37°Cで培養した。48時間培養しその間3時間ごとにOD₆₀₀を測定した。誤差バーはSD ($n=6$)。

3-3-2. アラビナン存在下における BLLJ_1852 と BLLJ_1853 の発現

アラビナン分解に関わるグリシダーゼを同定するために、*B. longum* subsp. *longum* JCM 1217 のゲノム情報を調べたところ、GH43 に属する遺伝子 BLLJ_1850–BLLJ_1854 が遺伝子クラスターを形成していることが明らかになった。これらのうち、BLLJ_1854 は既にアラビノガラクタンに作用する BI α -L-アラビノフラノシダーゼであることが報告されている[73]ので、残る BLLJ_1850–BLLJ_1853 の4つの遺伝子のアラビナン存在下とグルコース存在下における発現量を RT-PCR により調べた。その結果、BLLJ_1852 と BLLJ_1853 は、アラビナン存在下でグルコース存在下の場合のそれぞれ 4.0 倍と 5.4 倍に発現量が増加した(Fig. 9)。BLLJ_1850 は発現量が大きく変化しなかった。BLLJ_1851 は今回の RT-PCR 条件では検出できなかった。この結果から、BLLJ_1852 と BLLJ_1853 はアラビナン分解と利用に関わることが強く示唆された。

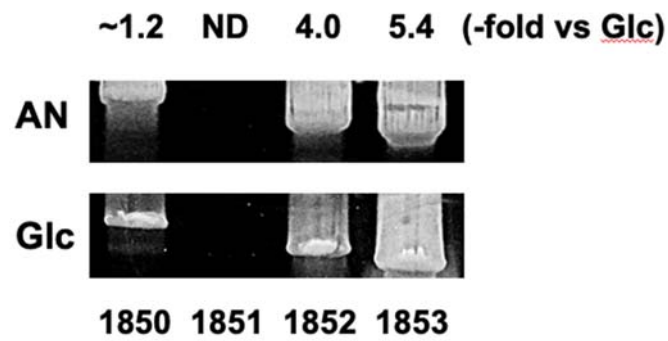


Fig. 9 アラビナン存在時の BLLJ_1850~BLLJ_1853 の遺伝子発現量

糖質をグルコースのみとアラビナンのみに制限し培養した *B. longum* subsp. *longum* JCM 1217 の *blj_1850~blj_1853* の qRT-PCR。電気泳動後の各レーンのバンドの濃さを解析ソフトを用いて数値化し、相対値を各レーンの上に記載した。相対値は $n = 3$ でその平均値を用いた。

3-3-3. BIArafC, BIArafB のアミノ酸配列の解析

遺伝子 BLLJ_1852 の全長は 3738 bp で、1246 アミノ酸残基をコードし、分子量は 137 kDa であることが推定された。遺伝子 BLLJ_1853 の全長は 3291 bp で、1097 アミノ酸残基からなり、分子量は 120 kDa であることが推定された。いずれも N 末端にシグナル配列、C 末端付近に膜貫通領域を持ち、細胞質可溶性でないことから細胞外に配向した膜酵素であることが示唆された (Fig. 10)。両酵素とも、GH43 ドメイン以外に機能が不明である LamG ドメインや Bacterial Ig-like ドメインを有していた。

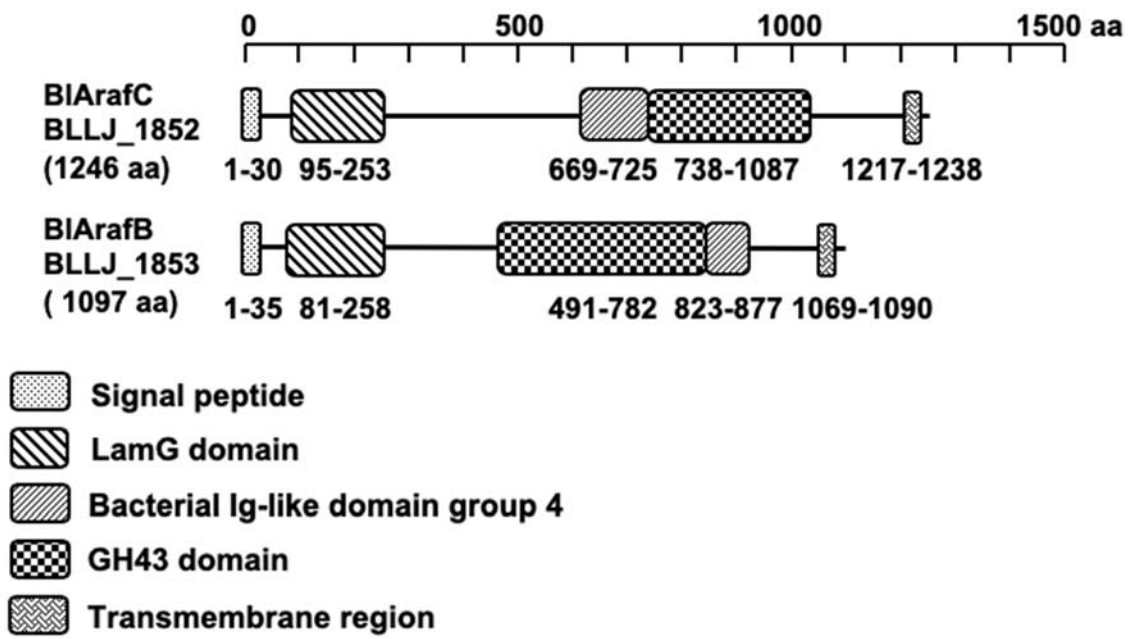


Fig. 10 各酵素のドメイン構造

3-3-4. リコンビナントタンパク質の発現・精製

BLLJ_1852 を PCR によりクローニングし、pET23b に挿入し構築した発現プラスミド pBIArafC を大腸菌 *E.coli* BL21 (λ DE3) Δ lacZ に導入し、IPTG で誘導発現・精製し、BLLJ_1852 リコンビナントタンパク質を得た。これを 1 mM 酢酸ナトリウム Buffer で透析した。BLLJ_1852 の酵素活性を pNP-glycoside 基質で確認したところ、pNP- α -L-arabinofuranoside (pNP- α -Araf) のみを分解したことから BLLJ_1852 は α -L-arabinofuranosidase であることが明らかとなった。機能未知遺伝子 BLLJ_1852 を BIArafC と命名した。この BIArafC を SDS-PAGE に供したところ、推定分子量とほぼ一致する 137 kDa の位置に単一のバンドが確認できた (Fig. 11)。同様に、BLLJ_1853 を PCR によりクローニングし、pET23b に挿入し構築した発現プラスミド pBIArafB を用いて BLLJ_1853 リコンビナントタンパク質を得た。これを 1 mM 酢酸ナトリウム Buffer で透析した。BLLJ_1853 の酵素活性を pNP-glycoside 基質で確認したところ、pNP- α -Araf のみを分解したことから BLLJ_1853 は α -L-arabinofuranosidase であることが明らかとなった。機能未知遺伝子 BLLJ_1853 を BIArafB と命名した。この BIArafB を SDS-PAGE に供したところ、推定分子量とほぼ一致する 120 kDa の位置に単一のバンドが確認できた (Fig. 12)。

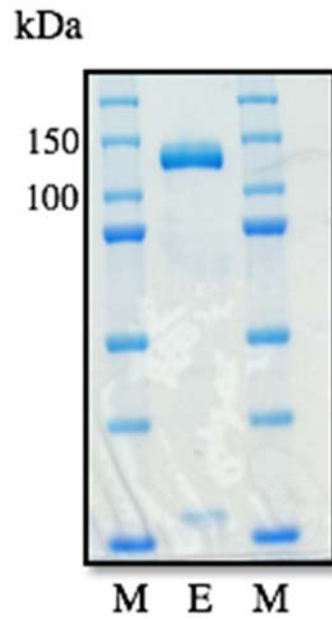


Fig. 11 リコンビナント BlAraC の SDS-PAGE

10%アクリルアミドゲルを用いて電気泳動を行った。M: marker, E: recombinant BlAraC

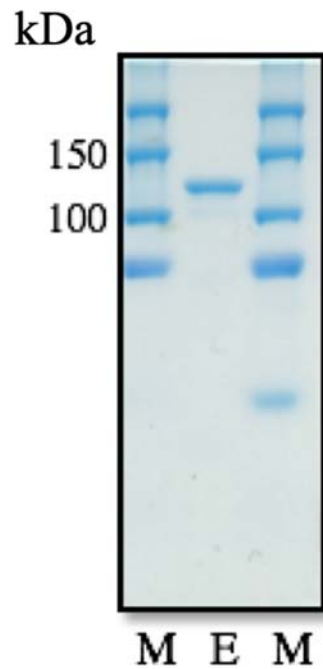


Fig. 12 リコンビナント BlAraB の SDS-PAGE

10%アクリルアミドゲルを用いて電気泳動を行った。M: marker, E: recombinant BlAraB

3-3-5. BI α rafC の酵素化学的諸性質の解析

基質として *p*NP- α -Araf を用いて、BI α rafC 生化学的性質を調べた。至適 pH は 6.0、酵素活性を有する安定 pH の範囲は pH 5.0 - 10.0 であった (Fig. 13A)。最適温度は 45°C、十分な活性を有する安定温度は 20~50°Cにおいて 1 時間の処理で 70%以上の活性を保持していた (Fig. 13B)。*p*NP- α -Araf に対する K_m 、 k_{cat} 、および k_{cat} / K_m 値は、それぞれ 9.8mM、19.2s⁻¹、および 1.9s⁻¹mM⁻¹であった。BI α rafC は、*p*NP- α -Arap、*p*NP- β -Xylp、*p*NP- β -Xylp などの他の *p*NP 基質には全く作用しなかった(Fig. 15A)ことから、 α 結合の Araf に特異的な α -L-アラビノフラノシダーゼであることが明らかになった。

3-3-6. BI α rafB の酵素化学的諸性質の解析

基質として *p*NP- α -Araf を用いて、BI α rafB の生化学的性質を調べた。至適 pH は 6.0 であったが、活性を有する安定 pH の範囲は pH 9.0 - 10.0 であり BI α rafC とはかなり異なっていた (Fig. 14A)。最適温度は 40°C であった。十分な活性を有する温度安定性については 60°Cでもまだ活性を保持していた (Fig. 14B)。そこで、より高い温度での活性を試験し、20~90°Cで 50%を超える活性が維持されることを見出した (Fig. 14C)。*p*NP- α -Araf に対する BI α rafB の速度論的パラメーターは、この基質に対する活性が低いために決定することができなかった。BI α rafB も BI α rafC と同様、*p*NP- α -Araf 以外の *p*NP 基

質には全く作用しなかった。

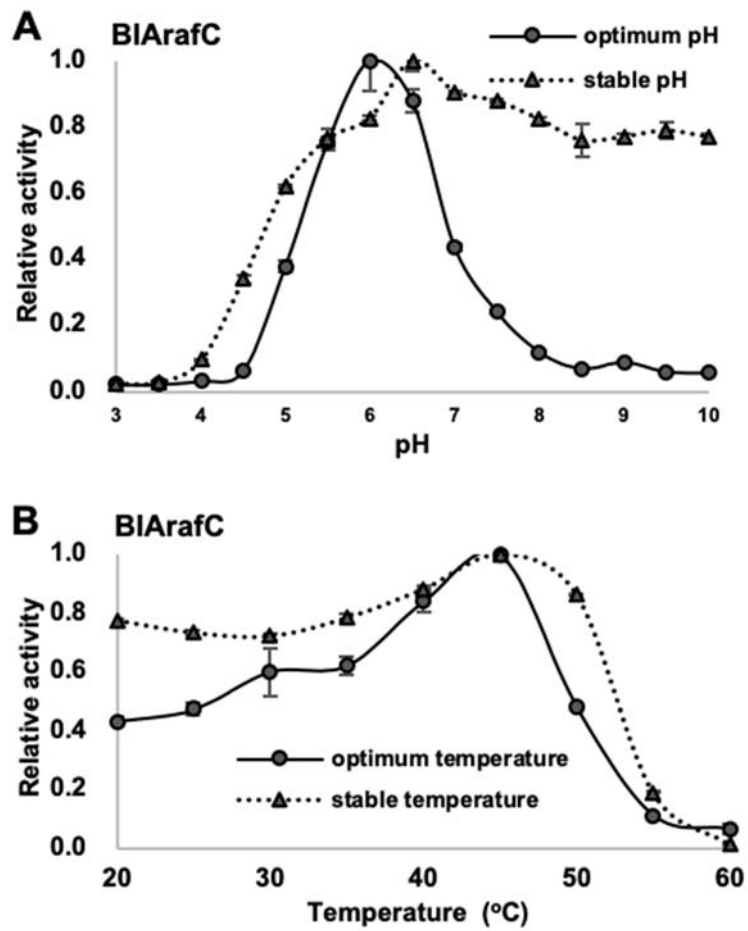


Fig. 13 BI ArafC の諸性質

pNP- α -Araf を 37°C で組み換え酵素とインキュベートした。(A) BI ArafC に対する pH の影響。pH 安定性試験は酵素を各 pH 緩衝液中 37°C で 16 時間曝したのち、pH 6.0 のバッファーで活性を測定した。(B) BI ArafC に対する温度の影響。温度安定性試験は、酵素を酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.0) 中各温度で 1 時間プレインキュベートした後に、37°C で活性を測定した。エラーバーは SD を示す (n=3)。

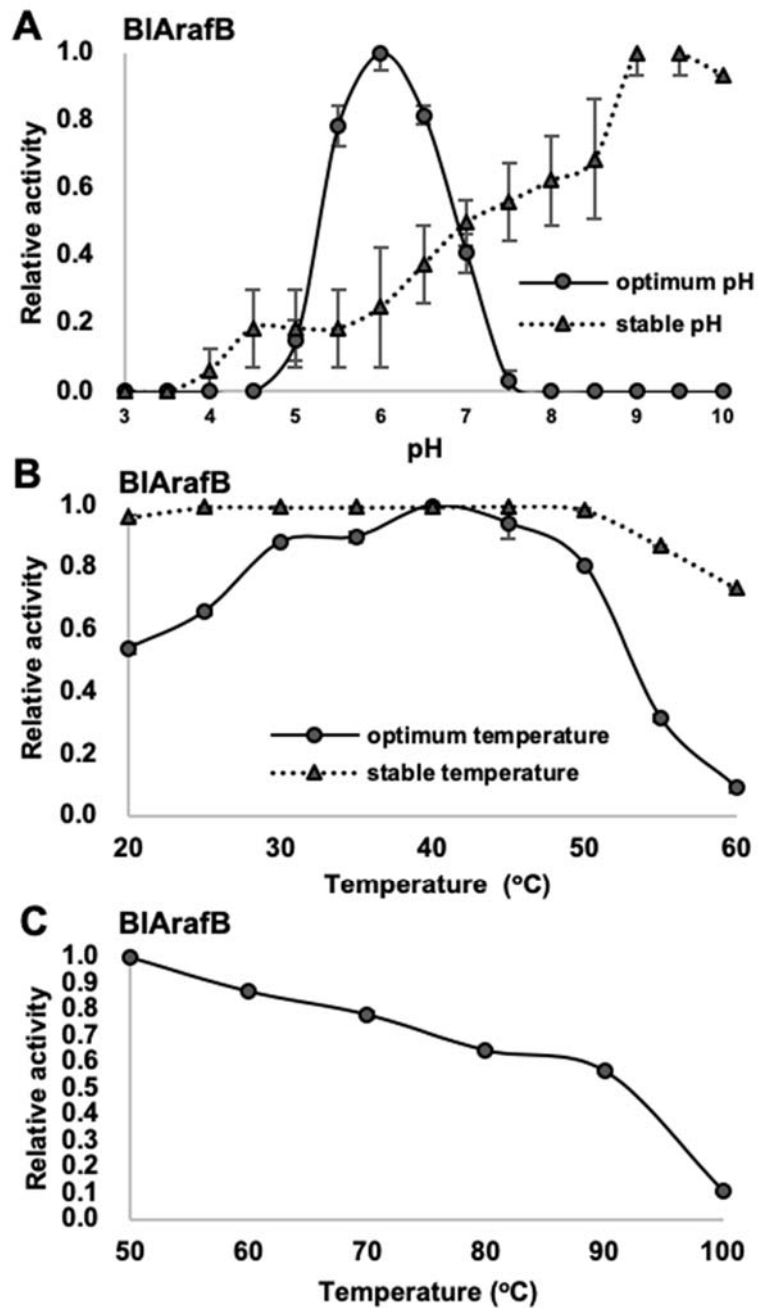


Fig. 14 BI ArafB の諸性質

pNP- α -Araf を 37°C で組み換え酵素とインキュベートした。(A) BI ArafC に対する pH の影響。pH 安定性試験は酵素を各 pH 緩衝液中 37°C で 16 時間曝したのち、pH 6.0 のバッファーで活性を測定した。(B) BI ArafC に対する温度の影響。温度安定性試験は、酵素を酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.0) 中各温度で 1 時間プレインキュベートした後に、37°C で活性を測定した。(C) BI ArafB の高温における熱安定性 エラーバーは SD を示す (n=3)。

3-3-7. BI_{ArafC} 及び BI_{ArafB} の反応に 2 価金属イオンが及ぼす影響

いくつかの GH43 グリコシダーゼはそれらの活性部位にカルシウムイオンを有すると報告されている[74,75]。pNP- α -Araf に対する組換え BI_{ArafC} および BI_{ArafB} の活性を、様々な二価金属イオンの存在下で測定した。試験した全ての二価金属イオン (Zn²⁺、Mn²⁺、Cu²⁺、Ca²⁺、Co²⁺、Mg²⁺、および Ni²⁺) の存在下で、BI_{ArafC} 活性は約 1.5 倍増加した。対照的に、BI_{ArafB} 活性はこれらの金属イオンによって増強されず、Cu²⁺によって激しく阻害された (Fig. 15A)。両方のグリコシダーゼは EDTA によって阻害され、二価の金属イオンが必要であることを示唆している (Fig. 15A)。BI_{ArafC} は、BI_{ArafB} よりも EDTA に対してより影響を受けた (Fig. 15B)。次に、EDTA 処理酵素にこれらの金属イオンを添加することでこれらの EDTA 処理酵素を回復できるかどうかを調べた。BI_{ArafC} と BI_{ArafB} を 100 μ M EDTA で 4°C、16 時間処理した後、反応液に各金属イオンを加えて活性を測定した。BI_{ArafB} は Zn²⁺以外で EDTA 処理前まで活性が回復した。BI_{ArafC} はすべての金属イオンで EDTA の作用を打ち消し、活性が大きく上昇した。(Fig. 15C)。

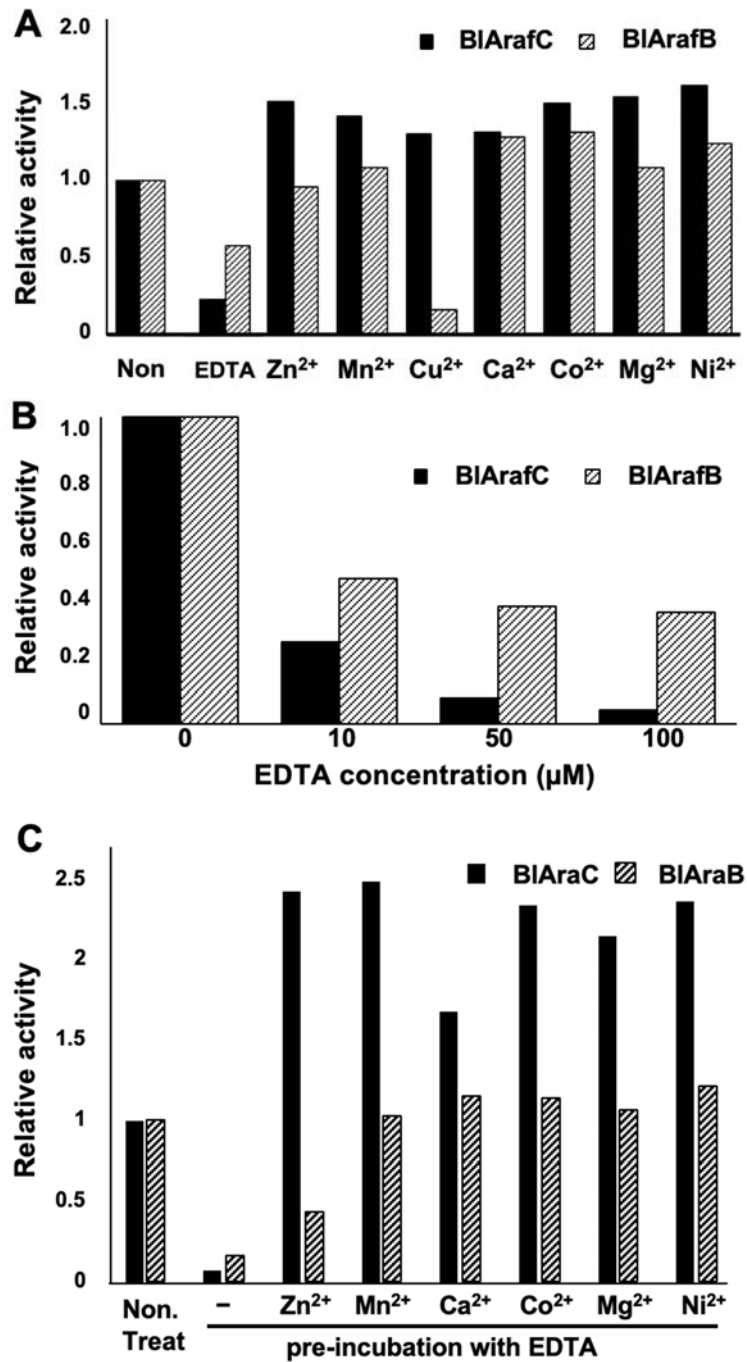


Fig. 15 BI AraC および BI AraB の活性に対する二価金属イオンの効果

(A) BI AraC および BI AraB に対する金属イオンの影響。二価金属イオンを 5.0mM で添加した。

(B) BI AraC および BI AraB に対する様々な濃度の EDTA の効果。(C) EDTA 処理後の金属イオン

の添加による酵素活性の回復。全ての実験において、*pNP-α-Araf* を基質として用いた。

3-3-8. BI_{ArafC} 及び BI_{ArafB} の基質特異性

まず合成基質に対する BI_{ArafC} および BI_{ArafB} の特異性を調べた。認識されうる可能性のある基質(*p*NP- α -Araf, - α -Arap, - β -Xylp, - β -Galp)を用いた。BI_{AraC} および BI_{AraB} のいずれの酵素も *p*NP- α -Araf にのみ作用した(Fig. 16A)。次に天然基質に対する BI_{ArafC} および BI_{ArafB} の特異性を調べた。BI_{ArafC} はアラビナンおよびアラビノキシランの両方から L-アラビノースを遊離させたが、BI_{ArafB} はアラビナンのみから L-アラビノースを遊離した (Fig. 16B, C)。アラビナンの α 1,5-poly-L-アラビノフラノシル主鎖には、 α 1,2- および α 1,3- アラビノフラノシル側鎖がある。アラビノキシランのキシラン主鎖上には、同じ α 1,2- および α 1,3-アラビノフラノシル側鎖が存在する。したがって、結合特異性に調べるために次の3つの合成アラビノビオース、Araf α 1,2Araf α 1-OMe, Araf α 1,3Araf α 1-OMe, および Araf α 1,5Araf α 1-OMe を使用した。BI_{ArafC} は α 1,2- および α 1,3- 結合に作用したのに対して、BI_{ArafB} は α 1,5 結合にのみ作用した (Fig. 16D)。これらの結果は、BI_{ArafC} がアラビナンおよびアラビノキシランの側鎖を加水分解し、そして BI_{ArafB} がアラビナンの骨格を加水分解することが示唆される。BI_{ArafC} と BI_{ArafB} は異なる結合特異性を有するので、我々はアラビナン分解についての BI_{ArafC} と BI_{ArafB} の同時インキュベーションの効果の評価した (Fig. 16E)。BI_{ArafC} および

BlArafB をアラビナンと同時インキュベートしたとき、分解の相加効果が観察された。

5つの基質からのL-アラビノースの遊離速度を定量した (Table 8)。両酵素はアラビナンに対して最も高い活性を示した。BlArafC はアラビノキシランに作用したが、その速度はアラビナンのわずか 0.9%であった。合成グリコシド、pNP- α -Araf および 4-methylumbelliferyl- α -Araf (4MU- α -Araf) は、両方の酵素によって非常にゆっくりと加水分解された。pNP- α -Araf および 4MU- α -Araf に対する BlArafC の比活性は、アラビナンに対する比のそれぞれ 1.4%および 0.9%にすぎず、BlArafB の比活性は、アラビナンに対する比のそれぞれ 0.2%および 5.2%であった。

Fig.16 BlArafC および BlArafB の基質特異性

基質を BlArafC または BlArafB と 37°Cで一晩インキュベートし、TLC で分析した。(A) 合成基質に対する作用。α-Araf, pNP-α-L -arabinofuranoside; α-Arap, pNP-α-L -arabinopyranoside; β-Xylp, pNP-β-xylopyranoside; β-Galp, pNP-β-galactopyranoside; Ara, standard L-arabinose; Xyl, standard D-xylose; Gal, standard D-galactose. (B) 天然基質に対する BlArafC の作用。AX, arabinoxylan; AG, arabinogalactan; AN, arabinan; Ara, standard L-arabinose. (C) 天然基質に対する BlArafB の作用。AX, arabinoxylan; AG, arabinogalactan; AN, arabinan; Ara, standard L-arabinose. (D) 合成二糖基質に対する BlArafC および BlArafB の作用。α2, Ara α 1,2Ara α 1-OMe; α3, Ara α 1,3Ara α 1-OMe; α5, Ara α 1,5Ara α 1-OMe; Ara, standard L-arabinose. (E) アラビナン分解に対する BlArafC および BlArafB の同時インキュベーションの相乗効果。アラビナンを BLLJ_1852 および BLLJ_1853 の一方または両方と共にインキュベートした。放出されたL-アラビノースの量を測定し、そしてアラビナンの加水分解 (%) をパネルの上を示した。

3-3-9. GH43遺伝子クラスターがアラビナン資化に及ぼす影響

5個のGH43遺伝子（BLLJ_1850–BLLJ_1854）は *B. longum* subsp. *longum* JCM 1217 ゲノム上でクラスターを形成している（Fig. 17A）。データベースに登録されているいくつかの *B. longum* subsp. *longum* 株のゲノムを比較したところ、このGH43クラスターはすべての株で保存されてるわけではないことが明らかになった。これらの菌株のうち、*B. longum* NCC 2705 はBLLJ_1850–BLLJ_1853を欠損していた。またこれらの遺伝子クラスターと相同性の高い遺伝子は見られなかった。そこで、BLLJ_1852 とBLLJ_1853のアラビナン資化における重要性を調べるために、*B. longum* subsp. *longum* JCM 1217 と *B. longum* NCC 2705 の2菌株の、糖質制限培地をベースにしたアラビナン培地における増殖を比較した。*B. longum* subsp. *longum* JCM 1217 はグルコース培地ほどではないが、アラビナン培地やアラビノース培地で十分に生育が確認された。しかしながら、本遺伝子クラスターを有さない *B. longum* NCC 2705 は、アラビナン培地でほとんど生育できなかった（Fig. 17C）。両菌株の遺伝子の差異はこの遺伝子領域だけではないが、この結果から、BLLJ_1852 とBLLJ_1853 は *B. longum* subsp. *longum* のアラビナン資化に重要である可能性が考えられた。

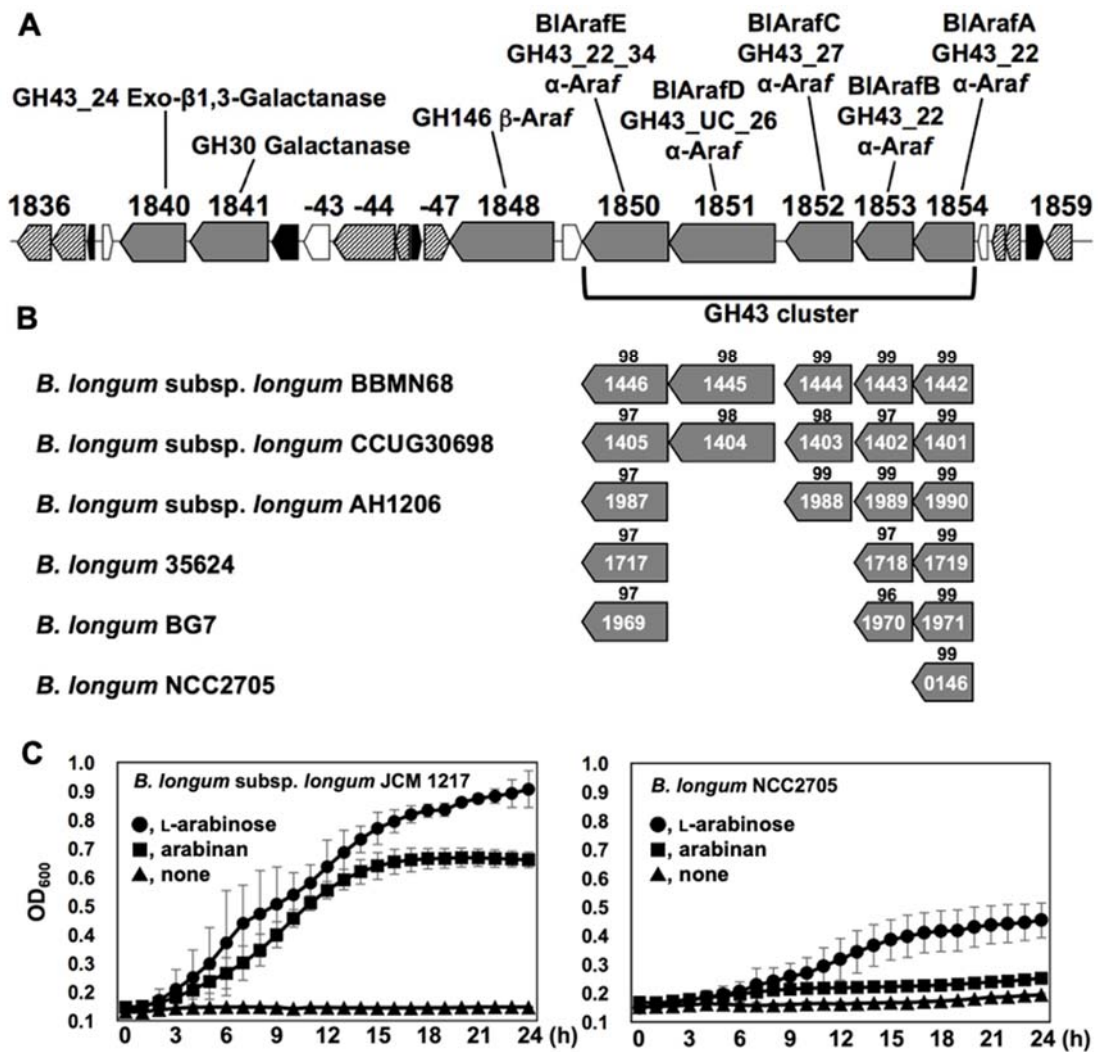


Fig. 17 アラビノース分解酵素遺伝子クラスターと*B. longum*の糖資化性試験

(A) *B. longum* subsp. *longum* JCM 1217におけるヘミセルロース分解遺伝子クラスターの地図。Gray boxes, glycosidases; striped boxes, sugar transporters; black boxes, transcriptional regulators; white boxes, hypothetical proteins (B) 様々な*B. longum*株における保存されたGH3クラスター地図。ボックスの上に示されたスコアは、*B. longum* subsp. *longum* JCM 1217とアミノ酸配列の相同性(%)を示した。(C) 1.0%アラビナンを添加した糖制限基礎培地中での*B. longum* subsp. *longum* JCM 1217および*B. longum* NCC2705の増殖。菌株は37°C、嫌気性条件下で培養した。エラーバーはSDを示す (n=3)。 Symbols: circle, L-arabinose; square, arabinan; triangle, no sugar.

Table 8 様々な基質に対する BlArafC 及び BlArafC の比活性

	<i>p</i> NP	4MU	AN	AX	AG
BlArafC	1.00	0.62	70.23	0.62	nd
BlArafB	0.009	0.23	4.42	nd	nd

反応混合物を 37°C で 30 分間インキュベートした。放出された L-Arabinose を酵素測定法により測定した数値は BlArafC の *p*NP の値を基準に相対値で示す。

*p*NP, *p*NP- α -l-arabinofuranoside; 4MU, 4-methylumbelliferyl- α -l-arabinofuranoside; AN, sugar-beet arabinan; AX, wheat arabinoxylan; AG, larch wood arabinogalactan; nd, not detected.

3-4. 考察

GH43はCAZyデータベースに10,000以上の配列が登録されている大規模なファミリーで、現在37のサブファミリーに分類されている[76]。GH43には、*B. longum* subsp. *longum* JCM 1217由来の11個のGH43ドメインを含む9個の酵素がリストアップされている。それらは、8つの異なるサブファミリーに属する10個のドメインと1個の未分類ドメインであり、非常に多様化している。これらのうち、本論文で明らかにしたBlArafC (GH43_27) およびBlArafB (GH43_22) を含む4つのGH43酵素がこれまでに機能解析されている。

GH43_29に属するHypAA (BLLJ_0213)は、植物糖タンパク質のAraf α 1-3Araf β 1-2Araf β 1-2Araf β 1-ヒドロキシプロリンの非還元末端の α 1,3-結合Arafを特異的に分解する α -L-アラビノフラノシダーゼである[77]。GH43_24に属するBLLJ_1840は、タイプIIアラビノガラクトタンの主鎖に作用するexo- β 1,3-ガラクタナーゼである[78]。本研究では、exo- α -L-アラビノフラノシダーゼであるBlArafC (GH43_27) とBlArafB (GH43_22) が協調してアラビナンを分解することを見出した。BlArafCはアラビナン中の α 1,2結合および α 1,3結合のアラビノフラノース側鎖を分解し、BlArafBはアラビナン主鎖の α 1,5結合のアラビノフラノースを非還元末端から分解する。BlArafCは、Araf α 1,2/3Xylp β 1-Rを含むアラビノキシランにも非常に緩やかに作用したが、Araf α 1,3Galp β 1-Rを含むアラビノガラクトタンに

は作用しなかった。*Araf*、*Xylp*および*Galp*はC2およびC3位置にエクアトリアルの水ドロキシル基を有するが、*Galp*のみC4位置にアキシャルの水ドロキシル基を有するので、*BlArafC*はアグリコンのC4水ドロキシル基の厳密な認識機構を有することが示唆される。

予備的な検討により、*BlArafE* (BLLJ_1850; GH43_22_34)、*BlArafD* (BLLJ_1851; GH43_unclassified subfamily_26)、および*BlArafA* (BLLJ_1854; GH43_22)もまた、 α -L-アラビノフラノシダーゼであることを明らかにしている。*BlArafE*はアラビノキシランによく作用し、アラビノガラクタンに緩やかに作用した。また、*BlArafD*はアラビナンによく作用し、アラビノキシランに緩やかに作用した(投稿準備中)。*BlArafA* (BLLJ_1854)はアラビノガラクタンには速やかに作用するが、アラビナンには緩やかに作用した[72]。BLLJ_0213を除いて、これらのGH43酵素は遺伝子クラスターを形成するが、機能的冗長性はほとんどない (Fig14A)。

GH43 27は、細菌由来の酵素に限定される小さなサブファミリーである。これまでのところ、*Paenibacillus* sp E18由来のAbf43B α -L-アラビノフラノシダーゼ (GenBank登録番号AFC38437) [79]および*Geobacillus thermoleovorans* IT-08

由来のGbtXyl43B β -D-xylosidase (ABD48561) [80]のみが実験的に調べられている。前者はpNP- α -L-Arafを加水分解したが、アラビナンとアラビノキシランは加水分解せず、

後者はpNP- β -D-Xylpとキシランを加水分解した。BlArafCはアラビナン分解性exo-1,2-1,3- α -L-アラビノフラノシダーゼであるため、BlArafCの基質特異性はAbf43BおよびGbtXyl43Bのそれとは全く異なる。BlArafCのGH43_27ドメイン（アミノ酸738~1087）のアミノ酸配列は、対応するAbf43BおよびGbtXyl43Bのドメインとそれぞれ10%および9%の相同性しかなかった。一方、成人型ビフィズス菌にはより高い45-50%の相同性をもつホモログが存在する。それらは、*B. adolescentis* ATCC 15703由来のBAD_0149、*B. catenulatum* 由来のBBCT_0647、*B. pseudocatenulatum* 由来のBBPC_0158、および*B. scardovii*由来のBBSC_0258である。しかしながら、ゲノムデータが入手可能な*B. longum*の株の中では、*B. longum* 35264、*B. longum* BG7、および*B. longum* NCC2705 (Fig. 17B)のようないくつかの株でBLLJ_1852ホモログは欠失していた。

GH43_27と比較して、サブファミリーGH43_22は比較的大きく、細菌に加えて真核生物（いくつかの糸状菌）および古細菌に広く分布している。このサブファミリーでは、実験的に証明されていないが、*B. adolescentis*由来のBAD_1527がendo- β -1,4-キシラナーゼと推測されている[81]。*B. longum* subsp. *longum* JCM 1217には、このサブファミリーに属する3つの酵素、BlArafE (BLLJ_1850; GH43_22_34)、BlArafB、およびBlArafA (BLLJ_1854)があり、これらはそれぞれ上記のようにアラビノキシラン、アラビナン、

およびアラビノガラクトタンに対して異なる基質特異性を示す。*B. longum*株内では、*B. longum* NCC 2705を除いて、BLLJ_1853およびBLLJ_1850のホモログが保存されているのに対して、BLLJ_1854ホモログはすべての株で保存されている (Fig. 10B)。BlArafB (BLLJ_1853)はアラビナン分解性exo-1,5- α -L-アラビノフラノシダーゼである。同様の基質特異性を有する酵素は、サブファミリーGH43_26に分類されている。それらは、*Streptomyces avermitilis* MA-4680由来のAbf43K (BAC68753)[82,83]、ならびに*Cellvibrio japonicus* Ueda107由来のAbf43K (ACE82749)と Abf43L (ACE84379) [84]である。しかしながら、BlArafBのアミノ酸配列は、Araf43Aと13%、Abf43Kと11%、およびAbf43Lと15%の相同性であり、進化の起源が異なる可能性が高い。exo-1,5- α -L-アラビノフラノシダーゼ活性をもつ酵素は、他のGHファミリーであるGH51にも存在し、*Bacillus subtilis* 168株由来のAbfA (CAA99595) [85]が報告されている。

B. longum subsp. *longum*は、幼児および成人の腸内に広く分布していることが知られている。ヒト分離株の比較ゲノム解析に関する最近の研究により、このGH43遺伝子クラスターが成人由来の株によく保存されていることを明らかとなった [86]。アラビナン利用におけるこの遺伝子クラスターの重要性は、いくつかのヒトから単離された株において*in vitro*の培養実験によっても示されている [87,88]。これらの知見は、この遺伝

子クラスターが、野菜や穀物を消費する成人腸内における*B. longum* subsp. *longum* の定着にとって重要であることを示唆している。この遺伝子クラスターを保有する株は、ビフィズス菌集団および腸内生態系内でのアラビナンのクロスフィーディングにおいても重要な役割を果たす可能性がある。

第4章

肥満モデルマウスに対する梅ポリフェノールの 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

4-1. 緒言

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年には全国生産量の62%を占めている[89]。

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。日本の伝統的な加工食品は発酵食品が多いが、梅干しは発酵を必要としない食品である。梅干しは完熟ウメ果実を約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[90]。ヒドロキシ桂皮酸類の一部は、アセチル化シヨ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[91, 92]。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。

ヒトの腸内には 500~1,000 種類、100 兆個以上の腸内細菌が存在する。腸内細菌は主に宿主の食餌から栄養を得ており、宿主が消化できない物質から主要なエネルギーを得ている。また腸内細菌が生産する有機酸などの代謝物が宿主に利用されることも多い。宿主と腸内細菌叢はこのような関係を保ち共生している。近年、次世代型シーケンサーの開発により、腸内細菌の単離培養を介さずに、総 DNA の塩基配列により菌を分類・同定することができるようになっている。

当研究室では以前に、標準食を給餌した BALB/c SPF 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[93]。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ことができなかった。ところで、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 SPF 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。

4-2. 材料及び方法

4-2-1. 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。

4-2-2. 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。各群とも雄 4 匹, 雌 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。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)。

4-2-3. 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。

4-2-4. 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。

4-2-5. 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 0.45mm 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°C で 36 時間インキュベートし、1 時間ごとに OD₆₀₀ を測定した。

4-2-6. 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

3 章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(λ DE3) 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 5mg の各酵素を 50ml の 1.0 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH5.5) 中で、37°C 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°C で 15 分程度加熱した。

4-3. 結果

4-3-1. 梅 PP の抗肥満効果

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 (Fig.18A, B)。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 雄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 (Fig. 18C)、梅 PP 雌群では体重増加が有意に抑制されていた ($p=0.03$) (Fig. 18D)。

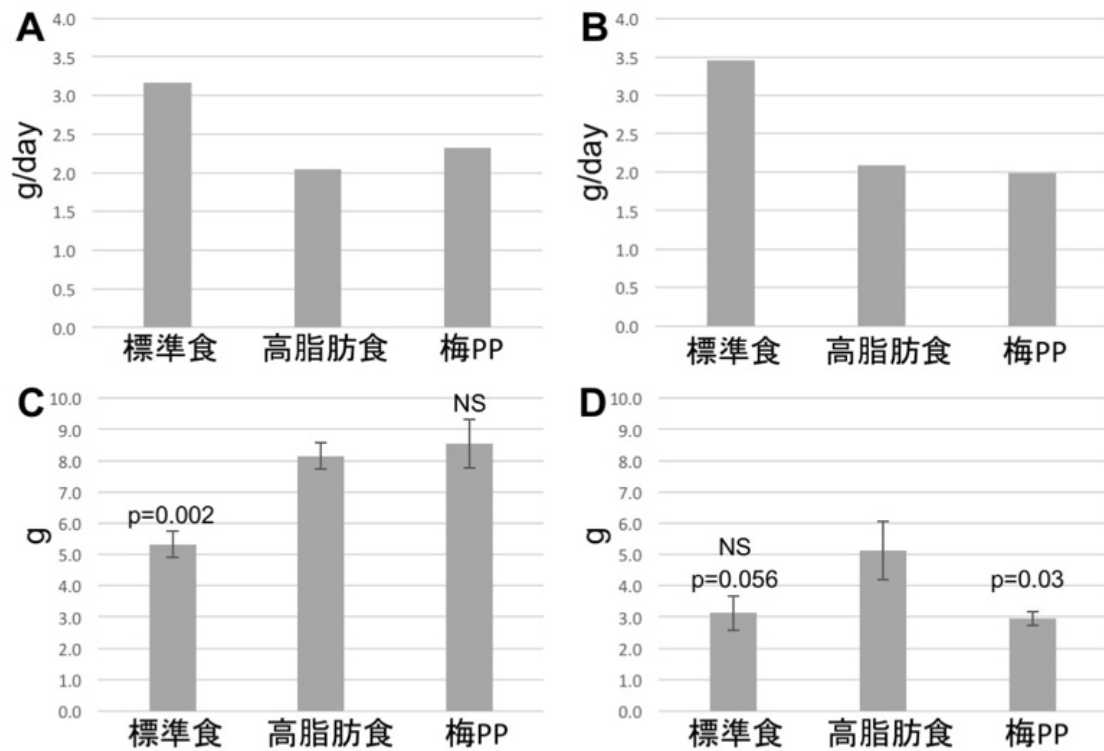


Fig. 18 梅 PP の体重と血中脂質への影響

A. 雄群の採餌量、B. 雌群の採餌量、C. 雄群の体重増加量、D. 雌群の体重増加量
 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。

4-3-2. 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、高脂肪食群雄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 ($p=0.15$) (Fig. 19A)。雌では各群に差異はなかった (Fig. 19B)。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、雄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 (Fig. 19C, D)。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 ($p=0.01$) (Fig. 19E)。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 ($p=0.02$)。

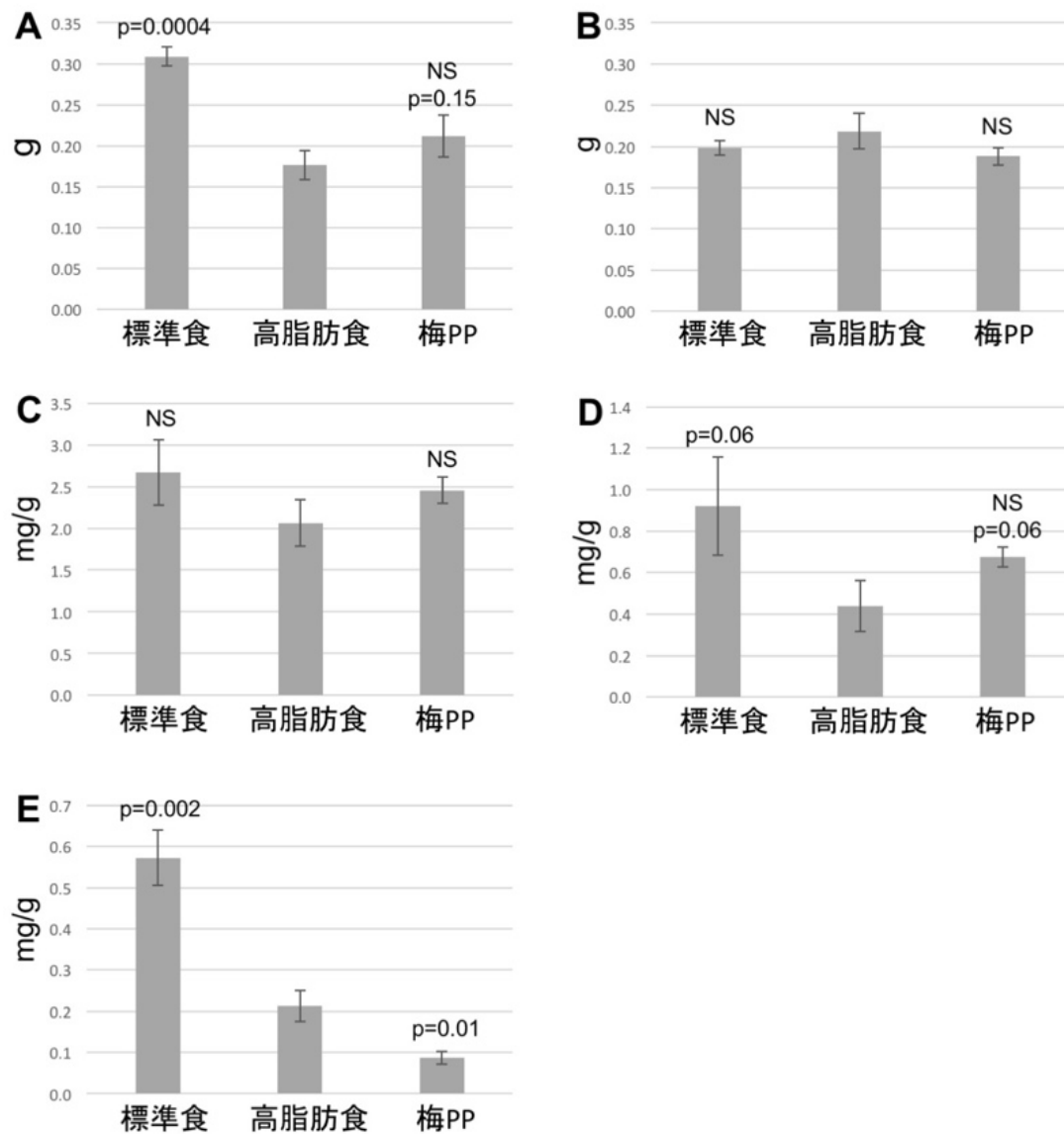


Fig. 19 梅 PP の盲腸重量と盲腸内有機酸含量への影響

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

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。

4-3-3. 梅 PP の腸内細菌フローラへの影響

梅 PP は消化酵素による分解を受け、単糖や消化可能な多糖の大半は大腸到達時には失われている。宿主腸内で梅 PP が菌叢にどのような影響を与えるのかをマウスを使い検討した。

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、雌雄各 4 匹のデータを合わせて解析した (Fig. 20A)。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 (Fig. 20B)。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 群でわずかではあるが有意に回復した (Fig. 20C)。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無かった (Fig. 20D)。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 (Fig. 20E)。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 ($p=0.03$) (Fig. 20F)。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無かった (Fig. 20G)。Bacteroides は肥満の人ではその数が減少することが

知られている[94]。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。

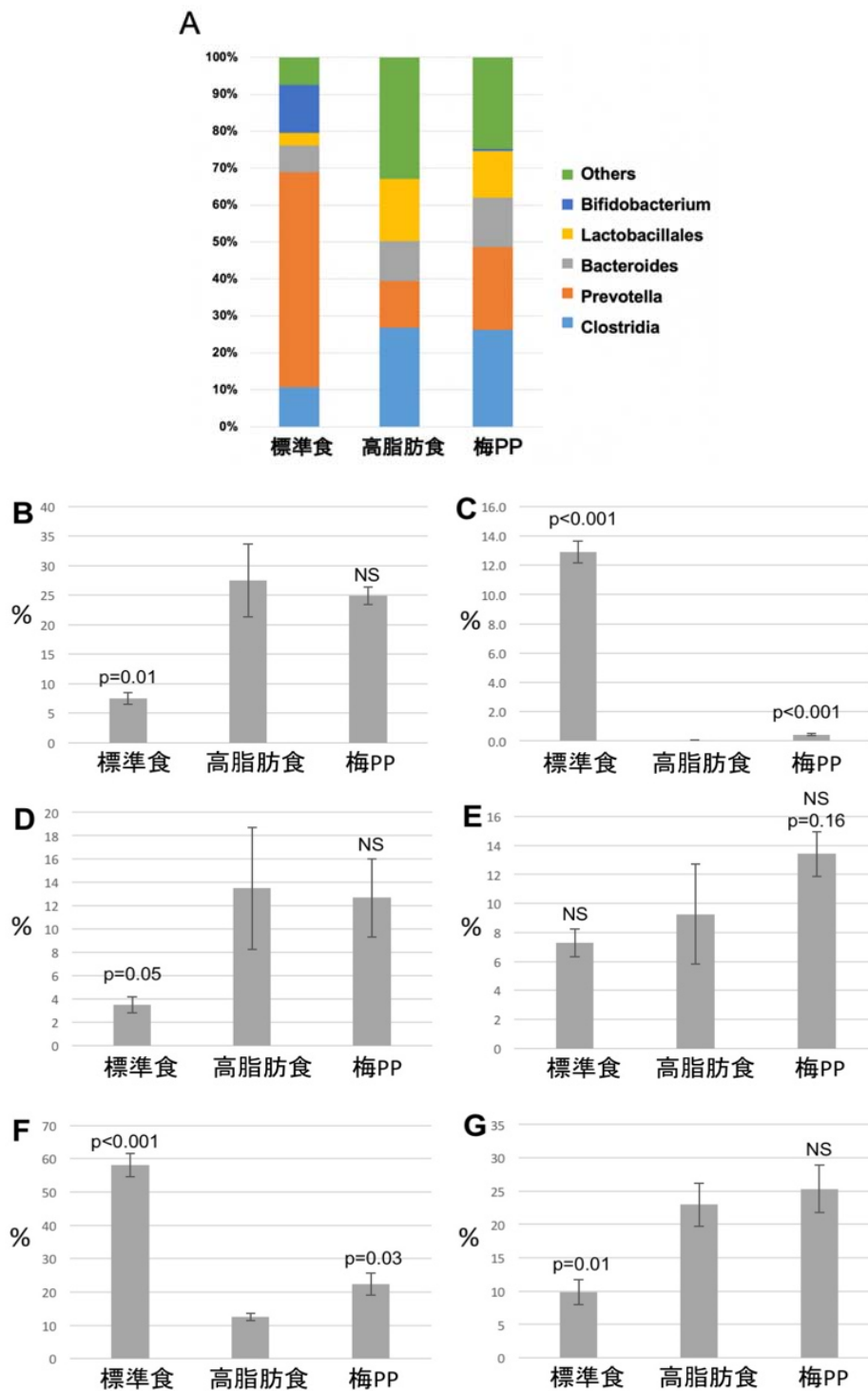


Fig. 20 梅 PP の腸内細菌フローラへの影響

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。

4-3-4. 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[95]。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 (Fig. 21A, B)。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の、梅 PP 培地での増殖は認められなかった (Fig. 21C)。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。

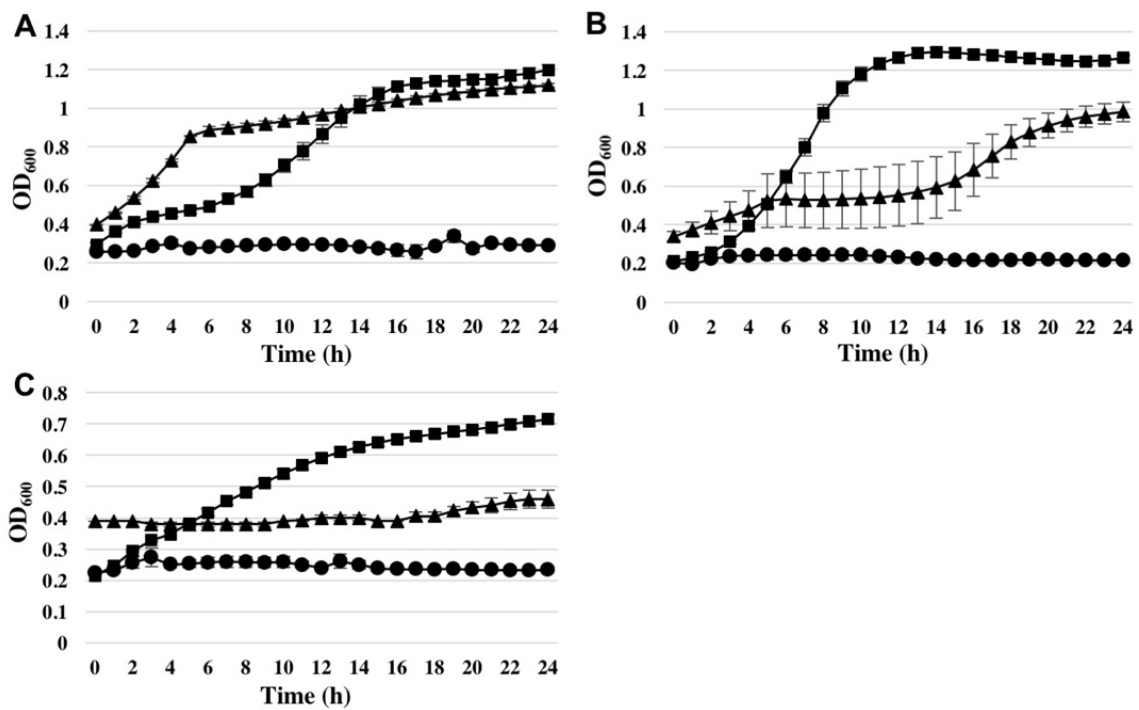


Fig. 21 梅 PP 含有培地におけるビフィズス菌の増殖

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。

4-3-5. 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ヨ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）。梅 PP の投与で増加した腸内細菌には、梅 PP 中のアラビノースを含む多糖を利用し増殖するものがあると考えられる。アラビノオリゴ糖はビフィズス因子として知られ、ビフィズス菌を選択的に増殖させる効果がある[69, 96]。そこで乳児・成人両方の腸内に存在している *B. longum* subsp. *longum* JCM 1217 が梅 PP 中のアラビノース含有多糖を分解・利用して増殖す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 [BlArafE (BLLJ_1850), BlArafC (BLLJ_1852), BlArafB (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 BlArafC と BlArafB を作用させた時にアラビノースの遊

離が確認できた(Fig. 22)。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 (Fig. 20)。

3 章で BI_{ArafC} 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、BI_{ArafB} 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。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 BI_{ArafE} (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。

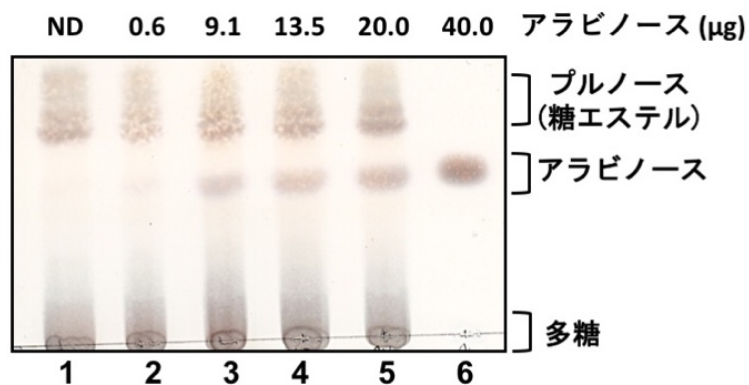


Fig. 22 *B. longum* subsp. *longum* JCM 1217 由来 GH43 α -1-アラビノフラノシダーゼによる梅 PP の分解とアラビノースの遊離

1. 梅 PP (100 μ g)のみ、2. 梅 PP+BlArafE、3. 梅 PP+BlArafC、4. 梅 PP+BlArafB、5. 梅 PP+BlArafC+BlArafB、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。

4-4. 考察

4-4-1. 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 1 mg/kg 体重において毒性・変異原性がないことが確認された[97]。また、ヒト臨床試験でも、安全性は確認されている[98]。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[99]、抗骨粗鬆症活性[100]、ピロリ菌生育阻害[101]、食後血糖値上昇抑制作用[102]、運動模倣効果[103]などが検討されている。

本章では、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。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[104]。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[105]。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[106]。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[107]。*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[109,109]。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。

4-4-2. 梅 PP のビフィズス菌増殖促進効果

本章の後半では、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* JCM 1217 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

ジヨウバエ (*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[110]。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[49-52]。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しう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。梅 PP にはアラビノースをはじめとする糖質を多く含む。そこで3章の組換え酵素を梅 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 BI_{ArafC} と 1,5- α -L-アラビノフラノシダーゼである BI_{ArafB} 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。BI_{ArafC} と BI_{ArafB} 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、ビフィズス菌の増殖因子の探索が精力的に行われてきたが、天然物としてはほとんどがミルク由来の難消化性オリゴ糖である[111]。ミルク由来以外で実用化されたものは、キシロオリゴ糖である[112]。その他には、ラクトースやスクロースを原材料にして、 β -ガラクトシダーゼやフルクトフラノシダーゼの糖転移反応を利用して生産されたガラクトオリゴ糖やフルクトオリゴ糖も実用化されている。これらは、特に乳児用の粉ミルクに配合されている。しかし、乳児と成人とではビフィズス菌の種類の構成が異なり、資化する糖質も変化してくる。そこで成人の菌種に特化した増殖因子の探索が必要であるが、成人の菌種は多様でありまたビフィズス菌以外の腸内細菌も多様な糖質分解酵素を有するので、選択性の点で非常に高い壁が存在する。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[69,113,114]、梅 PP は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。

第 5 章

総括

我々は生命維持に必要な不可欠な栄養素とエネルギーを摂取する目的で食餌をとっている。しかしながら、昨今の豊かな食糧事情で我々は必要以上の栄養素やエネルギーを摂取してしまい、食餌が疾病の原因を生み出してしまっているという問題がある。疾病を発症する前であれば、食生活の見直しによりこの問題は解決することも可能でもある。また、ポリフェノールや難消化性多糖のような機能性のある食品成分を必要に応じて摂取することで、疾病の緩和や予防になる。食品は日々摂取するものであるため、医薬品とは異なり継続的に摂取することが可能である。そのような観点から、日々の食事により健康を目指す志向が高まりつつある。科学的エビデンスがあり健康の維持増進に役立つ特定保健用食品に加えて、栄養機能食品や機能性表示食品が消費者に選ばれる傾向にある。その一方で、梅干しの殺菌作用やヨーグルトの整腸作用のように古来から経験的に健康に良い効果があることが解っている食品も好まれる傾向にある。そこで、このような食品に含まれる非栄養的な成分がヒトの健康に与える分子メカニズムを明らかにする目的で本論文では3つの研究を実施した。

2章では、炎症終息の新規分子機構の解析と食品に含まれる植物ポリフェノールでの抗炎症作用について報告をした。炎症が終息する際に TLR は栄養センサーである AKT/mTOR のリン酸化レベルを調節することによって細胞内分解・リサイクル機構で

あるオートファジーを活性化させていることを明らかにした。以前からオートファジーと免疫系の関連は考えられていたが、炎症終息時においてこの2つの関連性を示した報告はなく、重要な報告であると考えられる。また TLR による炎症伝達系で重要な役割を果たす TRAF6 は、オートファジー関連タンパクと相互作用し、オートファゴソームへと輸送され分解される可能性を示した。この章の最後では上述の2つの現象を恣意的に引き起こすことで炎症反応を抑制できることを、果実に含まれるポリフェノールの1種であるレスベラトロールで実証した。これは栄養センサーである AKT/mTOR のリン酸化レベルを調節する機能のある化合物で再現可能であると考えられる。食餌中の成分で細胞内栄養センサーの調節、すなわち飢餓模倣効果をもつ成分を摂取すれば、慢性的な炎症反応の緩和に役立つと思われる。

3 章ではビフィズス菌がアラビノース含有多糖をどのように分解するかを報告した。ヒト腸内に乳児・成人関わらず幅広く存在する *B. longum* subsp. *longum* はアラビノオリゴ糖を利用し増殖することができる。*B. longum* subsp. *longum* の基準株 *B. longum* subsp. *longum* JCM 1217 は、主鎖及び側鎖がアラビノースで構成されるアラビナンを分解し生育できることを見出した。本菌のゲノム中からアラビノース含有糖鎖の分解に関わることが予想される菌体外の糖質加水分解酵素遺伝子クラスターを発見し、その遺伝子の中

からアラビナン分解に重要な役割を果たす2遺伝子を特定した。その遺伝子産物である BI ArafC (BLLJ_1852)及び BI ArafB (BLLJ_1853)の遺伝子クローニングにより組換え酵素を取得し、性質解析を行った。酵素の最適 pH が弱酸性よりであることや2価金属イオンの存在が酵素活性を上昇させることを示した。本研究によってアラビナン分解の詳細なメカニズムを解析したが、これは成人の腸管におけるビフィズス菌の定着機構を明らかにしたのみならず、植物多糖を利用した新たなプロバイオティクスの創出につながる可能性がある。

4章では、高度な利用がなされていない梅酢より調製された新規食品素材である梅ポリフェノールのプロバイオティクス効果を検討した。近年、我々の食生活は欧米化の一途をたどり、腸管は多くの脂肪分に晒されるようになった。それに伴って腸内フローラも肥満型のフローラへと変化してしまっている。そこでマウスに高脂肪食を摂取させ、その高脂肪食とともに梅ポリフェノールを摂取させるとどのような変化があるかを報告した。梅ポリフェノールを摂取させた群では体重増加が抑えられた。また腸内細菌叢も肥満型の菌叢からの改善が見られた。また特筆すべきは高脂肪食で検出されなかった *Bifidobacterium* 属菌が少数ではあるが検出されている点である。この現象の本質を捉えるために菌体の培養試験や3章で報告した植物多糖に作用する酵素を用いて分解試験

を行ったところ、梅ポリフェノールに含まれる可溶性多糖を分解できそれを利用して
る可能性を明らかにした。

本論文は以上3つの報告からなる。研究成果は、食品がもつ健康促進効果の分子メカ
ニズムの解明の一端を担うものであり、今後の機能性食品開発や食生活改善、食育の一
助になればと考えている。医学の進歩や生活環境の改善で年々世界各国の平均寿命が増
加しているが、寿命が伸びても健康寿命が伸びなければ、長寿に対する喜びは半減する。
医学の進歩とともに栄養学・食品機能学の進歩が必要であり、本論文中の3つ研究成果
はこれを支持するものである。これらの報告が今後成長すべき医学のみに頼らない食か
らの健康寿命の延長に貢献していくのではないかと考えている。

引用文献

1. Pallauf K, Rimbach G. (2013) Autophagy, polyphenols and healthy ageing. *Ageing Res Rev.* 1:237-252.
2. Park D, Jeong H, Lee MN, Koh A, Kwon O, Yang YR, Noh J, Suh PG, Park H, Ryu SH. (2016) Resveratrol induces autophagy by directly inhibiting mTOR through ATP competition. *Sci Rep.* 6:21772.
3. Kawai T, Akira S, (2009) The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition. *Int. Immunol.* 21:317-337.
4. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. (2006) Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124:783-801.
5. Janeway CA Jr, Medzhitov R. (2002) Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol.* 20:197-216.
6. Schaefer L, Babelova A, Kiss E, Hausser HJ, Baliova M, Krzyzankova M, Marsche G, Young MF, Mihalik D, Götte M, Malle E, Schaefer RM, Gröne HJ. (2005) The matrix component biglycan is proinflammatory and signals through Toll-like receptors 4 and 2 in macrophages. *J Clin Invest.* 205:2223-2233.

7. Jiang D, Liang J, Fan J, Yu S, Chen S, Luo Y, Prestwich GD, Mascarenhas MM, Garg HG, Quinn DA, Homer RJ, Goldstein DR, Bucala R, Lee PJ, Medzhitov R and Noble PW. (2005) Regulation of lung injury and repair by Toll-like receptors and hyaluronan. *Nat Med.* 205:1173-1179.
8. Kim S, Takahashi H, Lin WW, Descargues P, Grivennikov S, Kim Y, Luo J L and Karin M. (2009) Carcinoma-produced factors activate myeloid cells through TLR2 to stimulate metastasis. *Nature.* 457:102-106.
9. Okamura Y, Watari M, Jerud ES, Young DW, Ishizaka ST, Rose J, Chow J C and Strauss J F 3rd. (2001) The extra domain A of fibronectin activates Toll-like receptor 4. *J Biol Chem.* 276:1029-1023.
10. Yamazaki K, Gohda J, Kanayama A, Miyamoto Y, Sakurai H, Yamamoto M, Akira S, Hayashi H, Su B, Inoue J (2009) Two mechanistically and temporally distinct NF- κ B activation pathways in IL-1 signaling. *Sci Signal*, 93:ra66,
11. Hampe J, Franke A, Rosenstiel P, Till A, Teuber M, Huse K, Albrecht M, Mayr G, De La Vega FM, Briggs J, Günther S, Prescott NJ, Onnie CM, Häsler R, Sipos B, Fölsch UR, Lengauer T, Platzer M, Mathew CG, Krawczak M and Schreiber S. (2007) A genome-wide

- association scan of nonsynonymous SNPs identifies a susceptibility variant for Crohn disease in ATG16L1. *Nat Genet.* 39:207-221.
12. Cadwell K, Liu JY, Brown SL, Miyoshi H, Loh J, Lennerz JK, Kishi C, Kc W, Carrero JA, Hunt S, Stone CD, Brunt EM, Xavier RJ, Sleckman BP, Li E, Mizushima N, Stappenbeck TS and Virgin HW 4th. (2008) A key role for autophagy and the autophagy gene Atg16l1 in mouse and human intestinal Paneth cells. *Nature* 456:259-263.
 13. Levine B, Mizushima N, Virgin H. W. (2011) Autophagy in immunity and inflammation. *Nature* 469:323-335.
 14. Mizushima N, Yoshimori T, Ohsumi Y (2011) The role of Atg proteins in autophagosome formation. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 27:107-132.
 15. Kabeya Y, Mizushima N, Ueno T, Yamamoto A, Kirisako T, Noda T, Kominami E, Ohsumi Y, Yoshimori T (2000) LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *EMBO J.* 19:5720-5728.
 16. Fujita N, Hayashi-Nishino M, Fukumoto H, Omori H, Yamamoto A, Noda T, Yoshimori T (2008) An Atg4B mutant hampers the lipidation of LC3 paralogues and causes defects in autophagosome closure. *Mol. Biol. Cell* 19:4651-4659.

17. Komatsu M, Waguri S, Koike M, Sou YS, Ueno T, Hara T, Mizushima N, Iwata J, Ezaki J, Murata S, Hamazaki J, Nishito Y, Iemura S, Natsume T, Yanagawa T, Uwayama J, Warabi E, Yoshida H, Ishii T, Kobayashi A, Yamamoto M, Yue Z, Uchiyama Y, Kominami E, Tanaka K. (2007) Homeostatic levels of p62 control cytoplasmic inclusion body formation in autophagy-deficient mice. *Cell* 131:1149-1163.
18. Pankiv S, Clausen TH, Lamark T, Brech A, Bruun JA, Outzen H, Øvervatn A, Bjørkøy G, Johansen T. (2007) p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy. *J. Biol. Chem.* 282:24131-24145.
19. Ramesh BJ, Lamar SM, Peng J, Strom AL, Kemppainen R, Cox N, Zhu H, Wooten MC, Diaz-Meco MT, Moscat J, Wooten MW. (2008) Genetic inactivation of p62 leads to accumulation of hyperphosphorylated tau and neurodegeneration. *J. Neurochem.* 106:107-120.
20. Rodriguez A, Durán A, Selloum M, Champy MF, Diez-Guerra FJ, Flores JM, Serrano M, Auwerx J, Diaz-Meco MT., Moscat J. (2006) Mature-onset obesity and insulin resistance in mice deficient in the signaling adapter p62. *Cell Metab.* 3:211-222.

21. Laemmli UK. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
22. Fujita N, Morita E, Itoh T, Tanaka A, Nakaoka M, Osada Y, Umemoto T, Saitoh T, Nakatogawa H, Kobayashi S, Haraguchi T, Guan JL, Iwai K, Tokunaga F, Saitoh K, Ishibashi K, Akira S, Fukuda M, Noda T, Yoshimori T. (2013) Recruitment of the autophagic machinery to endosomes during infection is mediated by ubiquitin. *J Cell Biol.* 203:115-128.
23. Kimura T, Jia J, Kumar S, Choi SW, Gu Y, Mudd M, Dupont N, Jiang S, Peters R, Farzam F, Jain A, Lidke KA, Adams CM, Johansen T, Deretic V. (2017) Dedicated SNAREs and specialized TRIM cargo receptors mediate secretory autophagy. *EMBO J.* 36:42-60.
24. Nedjic J, Aichinger M, Mizushima N, Klein L. (2009) Macroautophagy, endogenous MHC II loading and T cell selection: the benefits of breaking the rules. *Curr Opin Immunol.* 21:92-97.
25. Cooney R, Baker J, Brain O, Danis B, Pichulik T, Allan P, Ferguson DJ, Campbell BJ, Jewell D, Simmons A. (2010) NOD2 stimulation induces autophagy in dendritic cells influencing bacterial handling and antigen presentation. *Nat Med.* 16:90-97.

26. Kabeya Y, Mizushima N, Ueno T, Yamamoto A, Kirisako T, Noda T, Kominami E, Ohsumi Y, Yoshimori T. (2000) LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *EMBO J.* 19:5720-5728.
27. Kamada Y, Funakoshi T, Shintani T, Nagano K, Ohsumi M, Ohsumi Y. (2000) Tor-mediated induction of autophagy via an Apg1 protein kinase complex. *J. Cell Biol.* 150:1507-1513.
28. Jung CH, Ro SH, Cao J, Otto NM, (2010) Kim DH. mTOR regulation of autophagy. *FEBS Lett.* 584:1287-1295.
29. Blommaart EFC, Luiken JJFP, Blommaart PJE., van Woerkom GM, Meijer AL. (1995) Phosphorylation of ribosomal protein S6 is inhibitory for autophagy in isolated rat hepatocytes. *J. Biol. Chem.* 270:2320-2326.
30. Linares JF, Duran A, Yajima T, Pasparakis M, Moscat J, Diaz-Meco MT. (2013) K63 polyubiquitination and activation of mTOR by the p62-TRAF6 complex in nutrient activated cells. *Mol Cell* 51:283-296.
31. Song J, Huang Y, Zheng W, Yan J, Cheng M, Zhao R, Chen L, Hu C, Jia W. (2018) Resveratrol reduces intracellular reactive oxygen species levels by inducing autophagy through the AMPK-mTOR pathway. *Front Med.* 6:697-706.

32. Madrid LV, Mayo MW, Reuther JY, Baldwin AS Jr. (2001) Akt stimulates the transactivation potential of the RelA/p65 Subunit of NF-kappa B through utilization of the Ikappa B kinase and activation of the mitogen-activated protein kinase p38. *J Biol Chem.* 276:18934-18940.
33. Zhang C, Cuervo AM, (2008) Restoration of chaperone-mediated autophagy in aging liver improves cellular maintenance and hepatic function. *Nat Med.* 14:959-965.
34. 松田直之. (2008) 生体侵襲のメディエーターと転写因子. *救急・集中治療.* 20:1192-1206
35. Mino T, Murakawa Y, Fukao A, Vandenbon A, Wessels HH, Ori D, Uehata T, Tarte S, Akira S, Suzuki Y, Vinuesa CG, Ohler U, Standley DM, Landthaler M, Fujiwara T, and Takeuchi O. (2015) Regnase-1 and roquin regulate a common element in inflammatory mRNAs by spatiotemporally distinct mechanisms. *Cell* 161: 1058-1073
36. Dainichi T, Kitoh A, Otsuka A, Nakajima S, Nomura T, Kaplan. H D, Kabashima K. (2018) The epithelial immune microenvironment (EIME) in atopic dermatitis and psoriasis. *Nat. Immunology* 19:1286-1298

37. Rengasamy KRR, Khan H, Gowrishankar S, Lagoa RJL, Mahomoodally FM, Khan Z, Suroowan S, Tewari D, Zengin G, Hassan STS, Pandian SK. (2018) The role of flavonoids in autoimmune diseases: therapeutic updates. *Pharmacol Ther.* 18:30174-30178.
38. Matsuki T, Yahagi K, Mori H, Matsumoto H, Hara T, Tajima S, Ogawa E, Kodama H, Yamamoto K, Yamada T, Matsumoto S, Kurokawa K. (2016) A key genetic factor for fucosyllactose utilization affects infant gut microbiota development. *Nat Commun* 7:11939.
39. 松木隆広. (2008) ビフィドバクテリウムと免疫. *腸内細菌学雑誌* 22: 253-261
40. Ishibashi N, Yaeshima T, Hayasawa H. (1997) Bifidobacteria: their significance in human intestinal health. *Malays J Nutr* 3:149-159.
41. Ogata T, Nakamura T, Anjitsu K, Yaeshima T, Takahashi S, Fukuwatari Y, Ishibashi N, Hayasawa H, Fujisawa T, Iino H. (1997) Effect of *Bifidobacterium longum* BB536 administration on the intestinal environment, defecation frequency and fecal characteristics of human volunteers. *Biosci Microflora* 16:53-58.
42. 渡辺幸一 (2011).日本乳酸菌学会編, 乳酸菌とビフィズス菌のサイエンス, p.81-83, 京都大学学術出版会

43. Larson G, Falk P, Hoskins LC. (1988) Degradation of human intestinal glycosphingolipids by extracellular glycosidases from mucin-degrading bacteria of the human fecal flora. *J Biol Chem.* 263:10790-10798.
44. Schell MA, Karmirantzou M, Snel B, Vilanova D, Berger B, Pessi G, Zwahlen MC, Desiere F, Bork P, Delley M, Pridmore RD, Arigoni F. (2002) The genome sequence of *Bifidobacterium longum* reflects its adaptation to the human gastrointestinal tract. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99:14422-14427.
45. Turrone F, Milani C, Duranti S, Mahony J, van Sinderen D, Ventura M. (2018) Glycan utilization and cross-feeding activities by bifidobacteria. *Trends Microbiol* 26:339-350.
46. Gotoh A, Katoh T, Sakanaka M, Ling Y, Yamada C, Asakuma S, Urashima T, Tomabechi Y, Katayama-Ikegami A, Kurihara S, Yamamoto K, Harata G, He F, Hirose J, Kitaoka M, Okuda S, Katayama T. (2018) Sharing of human milk oligosaccharides degradants within bifidobacterial communities in faecal cultures supplemented with *Bifidobacterium bifidum*. *Sci Rep* 8:13958.
47. Kitaoka M, Tian J, Nishimoto M. (2005) Novel putative galactose operon involving lacto-*N*-biose phosphorylase in *Bifidobacterium longum*. *Appl Environ Microbiol* 71:3158–3162.

48. Wada J, Ando T, Kiyohara M, Ashida H, Kitaoka M, Yamaguchi M, Kumagai H, Katayama T, Yamamoto K. (2008) *Bifidobacterium bifidum* lacto-N-biosidase, a critical enzyme for the degradation of human milk oligosaccharides with a type 1 structure. *Appl Environ Microbiol* 74:3996-4004.
49. 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 U S A* 105:18964-18969.
50. 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.
51. 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.

52. 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.
53. Bunesova V, Lacroix C, Schwab C. (2016) Fucosyllactose and L-fucose utilization of infant *Bifidobacterium longum* and *Bifidobacterium kashiwanohense*. *BMC Microbiol* 16:248.
54. James K, Motherway MO, Bottacini F, van Sinderen D. (2016) *Bifidobacterium breve* UCC2003 metabolises the human milk oligosaccharides lacto-*N*-tetraose and lacto-*N*-neo-tetraose through overlapping, yet distinct pathways. *Sci Rep* 6:38560.
55. Thongaram T, Hoeflinger JL, Chow J, Miller MJ. (2017) Human milk oligosaccharide consumption by probiotic and human-associated bifidobacteria and lactobacilli. *J Dairy Sci* 100:7825-7833.
56. Yamada C, Gotoh A, Sakanaka M, Hattie M, Stubbs K, Katayama-Ikegami A, Hirose J, Kurihara S, Arakawa T, Kitaoka M, Okuda S, Katayama T, Fushinobu S. (2017) Molecular insight into evolution of symbiosis between breast-fed infants and a member of the human gut microbiome *Bifidobacterium longum*. *Cell Chem Biol* 24:515-524.e5.

57. Fujita K, Oura F, Nagamine N, Katayama T, Hiratake J, Sakata K, Kumagai H, Yamamoto K. (2005) Identification and molecular cloning of a novel glycoside hydrolase family of core 1 type *O*-glycan-specific endo- α -N-acetylgalactosaminidase from *Bifidobacterium longum*. *J Biol Chem* 45: 37415-37422.
58. Kiyohara M, Nakatomi T, Kurihara S, Fushinobu S, Suzuki H, Tanaka T, Shoda S, Kitaoka M, Katayama T, Yamamoto K, Ashida H. (2012) α -N-Acetylgalactosaminidase from infant-associated bifidobacteria belonging to novel glycoside hydrolase family 129 is implicated in alternative mucin degradation pathway. *J Biol Chem* 287:693-700.
59. Wakinaka T, Kiyohara M, Kurihara S, Hirata A, Chaiwangsri T, Ohnuma T, Fukamizo T, Katayama T, Ashida H, Yamamoto K. (2013) Bifidobacterial α -galactosidase with unique carbohydrate-binding module specifically acts on blood group B antigen. *Glycobiology* 23:232-240.
60. Shimada Y, Watanabe Y, Wakinaka T, Funeno Y, Kubota M, Chaiwangsri T, Kurihara S, Yamamoto K, Katayama T, Ashida H. (2015) α -N-Acetylglucosaminidase from *Bifidobacterium bifidum* specifically hydrolyzes α -linked *N*-acetylglucosamine at

nonreducing terminus of *O*-glycan on gastric mucin. *Appl Microbiol Biotechnol* 99:3941-3948.

61. 日本食品標準成分表 2015 年版 (七訂)
62. Yasui H, Mike A, Ohwaki M. (1989) Immunogenicity of *Bifidobacterium breve* and change in antibody production in Peyer's patches after oral administration. *J Dairy Sci.* 72:30-35.
63. Yasui H, Ohwaki M. (1991) Enhancement of immune response in Peyer's patch cells cultured with *Bifidobacterium breve*. *J Dairy Sci.* 74:1187-1195.
64. F. Coni (1925) The fate of sugar in the animal body. *J. Biol. Chem.* 66: 691-715.
65. P. V. Wagh and P. E. Waibel (1967) Alimentary absorption of L-arabinose and D-xylose in chicks. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med* 124:421-424
66. B. Schutte, J. de Jong and E. J. van Weerden (1992) Nutritional implications of L-arabinose in pigs. *British Journal of Nutrition* 68:195-207.
67. Westphal Y, Kühnel S, de Waard P, Hinz SW. A, Schols H. A, Voragen AG. J, Gruppen H. (2010) Branched arabino-oligosaccharides isolated from sugar beet arabinan. *Carbohydr Res* 345:1180-1189.

68. Laere K, Hartemink R, Bosveld M, Schols H, Voragen A. (2000) Branched arabinooligosaccharides isolated from sugar beet arabinan. *J Agric Food Chem* 48:1644-1652.
69. Holck J, Lorentzen A, Vignæs LK, Licht TR, Mikkelsen JD, Meyer AS. (2011) Feruloylated and nonferuloylated arabinooligosaccharides from sugar beet pectin selectively stimulate the growth of *Bifidobacterium* spp. in human fecal *in vitro* fermentations. *J Agric Food Chem* 59:6511-6519.
70. Inoue H, Nojima H, Okayama H. (1990) High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 96(1) : 23-28.
71. O'Callaghan A, Bottacini F, O'Connell Motherway M, van Sinderen D. (2015) Pangenome analysis of *Bifidobacterium longum* and site-directed mutagenesis through by-pass of restriction-modification systems. *BMC Genomics* 16:832.
72. Arboleya S, Bottacini F, O'Connell-Motherway M, Ryan CA, Ross RP, van Sinderen D, Stanton C. (2018) Gene-trait matching across the *Bifidobacterium longum* pan-genome reveals considerable diversity in carbohydrate catabolism among human infant strains. *BMC Genomics* 19:33.

73. Fujita K, Sakamoto A, Kaneko S, Kotake T, Tsumuraya Y, Kitahara K. (2018) Degradative enzymes for type II arabinogalactan side chains in *Bifidobacterium longum* subsp. *longum*. *Appl Microbiol Biotechnol in press*
74. De Sanctis D, Inácio JM, Lindley PF, Sá-Nogueira I, Bento I. (2010) New evidence for the role of calcium in the glycosidase reaction of GH43 arabinanases. *FEBS J* 277:4562-4574.
75. Jordan DB, Braker JD, Wagschal K, Lee CC, Chan VJ, Dubrovskaya I, Anderson S, Wawrzak Z. (2015) X-ray crystal structure of divalent metal-activated β -xylosidase, RS223BX. *Appl Biochem Biotechnol* 117:637-648.
76. Mewis K, Lenfant N, Lombard V, Henrissat B. (2016) Dividing the large glycoside hydrolase family 43 into subfamilies: a motivation for detailed enzyme characterization. *Appl Environ Microbiol* 82:1686-1692.
77. Fujita K, Kitahara K, Suga T. (2012) Functional analysis of degradative enzymes for hydroxyproline-linked β -L-arabinofuranosides in *Bifidobacterium longum*. *Trends Glycosci Glycotech* 24:215-224.

78. Fujita K, Sakaguchi T, Sakamoto A, Shimokawa M, Kitahara K. (2014) *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* exo- β -1,3-galactanase, an enzyme for the degradation of type II arabinogalactan. *Appl Environ Microbiol* 80:4577-4584.
79. Shi P, Chen X, Meng K, Huang H, Bai Y, Luo H, Yang P, Yao B. (2013) Distinct actions by *Paenibacillus* sp. strain E18 α -L-arabinofuranosidases and xylanase in xylan degradation. *Appl Environ Microbiol* 79:1990-1995.
80. Ratnadewi AAI, Fanani M, Kurniasih SD, Sakka M, Wasito EB, Sakka K, Nurachman Z, Puspaningsih NNT. (2013) β -D-xylosidase from *Geobacillus thermoleovorans* IT-08: biochemical characterization and bioinformatics of the enzyme. *Appl Biochem Biotechnol* 170:1950-1964.
81. Amaretti A, Bernardi T, Leonardi A, Raimondi S, Zanoni S, Rossi M. (2012) Fermentation of xylo-oligosaccharides by *Bifidobacterium adolescentis* DSMZ 18350: kinetics, metabolism, and β -xylosidase activities. *Appl Microbiol Biotechnol* 97:3109-3117.
82. Ichinose H, Yoshida M, Fujimoto Z, Kaneko S. (2008) Characterization of a modular enzyme of exo-1,5- α -L-arabinofuranosidase and arabinan binding module from *Streptomyces avermitilis* NBRC14893. *Appl Environ Microbiol* 80:399-408.

83. Fujimoto Z, Ichinose H, Maehara T, Honda M, Kitaoka M, Kaneko S. (2010) Crystal structure of an Exo-1,5- α -L-arabinofuranosidase from *Streptomyces avermitilis* provides insights into the mechanism of substrate discrimination between exo- and endo-type enzymes in glycoside hydrolase family 43. *J Biol Chem* 44:34134-34143.
84. Cartmell A, McKee L, Peña MJ, Larsbrink J, Brumer H, Kaneko S, Ichinose H, Lewis RJ, Viksø-Nielsen A, Gilbert HJ, Marles-Wright J. (2011) The structure and function of an arabinan-specific α -1,2-arabinofuranosidase identified from screening the activities of bacterial GH43 glycoside hydrolases. *J Biol Chem* 17:15483-15495.
85. Inácio JM, Correia IL, de Sá-Nogueira I. (2008) Two distinct arabinofuranosidases contribute to arabino-oligosaccharide degradation in *Bacillus subtilis*. *Microbiology* 154:2719-2729.
86. Odamaki T, Bottacini F, Kato K, Mitsuyama E, Yoshida K, Horigome A, Xiao J-ZZ, van Sinderen D. (2018) Genomic diversity and distribution of *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* across the human lifespan. *Sci Rep* 8:85.
87. O'Callaghan A, Bottacini F, O'Connell Motherway M, van Sinderen D. (2015) Pangenome analysis of *Bifidobacterium longum* and site-directed mutagenesis through by-pass of restriction-modification systems. *BMC Genomics* 16:832.

88. Arboleya S, Bottacini F, O'Connell-Motherway M, Ryan CA, Ross RP, van Sinderen D, Stanton C. (2018) Gene-trait matching across the *Bifidobacterium longum* pan-genome reveals considerable diversity in carbohydrate catabolism among human infant strains. *BMC Genomics* 19:33.
89. 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*.
90. 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).
91. 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.
92. 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.

93. 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. 近畿大学生物理工学部紀要 (37),1-10.
94. Turnbaugh PJ, Hamady M, Yatsunenko T, Cantarel BL, Duncan A, Ley RE, Sogin ML, Jones WJ, Roe BA, Affourtit JP, Egholm M, Henrissat B, Heath AC, Knight R, Gordon JI. (2009) A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature*, 457:480-484
95. 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.
96. Suzuki Y., Tanaka K., Nano T., Asakura T., Muramatsu N. (2004) Utilization by intestinal bacteria and digestibility of arabino-oligosaccharides *in vitro*. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 73(6):574-579
97. 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. 近畿大学生物理工学部紀要 (28):31-40.
98. 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.
99. Takemura S, Yoshimasu K, Mure K, Fukumoto J, Nishio N, Kitano N, Kishida K, Yano F, Mitani T, Takeshita T, Miyashita K (2013) 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. *Open J Prev Med* 3:561-569.
100. 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.
101. 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.
102. 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.

103. 佐藤夏海, 高橋齊, 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. 果樹協会報 656:1-8.
104. 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.
105. 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.
106. Siovakova L, Dusková D, Marounek M. (2002) Fermentation of pectin and glucose, and activity of pectin-degrading enzymes in the rabbit caecal bacterium *Bifidobacterium pseudolongum*. *Lett Appl Microbiol* 36:126-130.
107. Arumugam M, Raes J, Pelletier E, Le Paslier D, Yamada T, Mende DR, Fernandes GR, Tap J, Bruls T, Batto JM, Bertalan M, Borrueal N, Casellas F, Fernandez L, Gautier L, Hansen T, Hattori M, Hayashi T, Kleerebezem M, Kurokawa K, Leclerc M, Levenez F, Manichanh C,

Nielsen HB, Nielsen T, Pons N, Poulain J, Qin J, Sicheritz-Ponten T, Tims S, Torrents D, Ugarte E, Zoetendal EG, Wang J, Guarner F, Pedersen O, de Vos WM, Brunak S, Doré J; MetaHIT Consortium, Antolín M, Artiguenave F, Blottiere HM, Almeida M, Brechot C, Cara C, Chervaux C, Cultrone A, Delorme C, Denariáz G, Dervyn R, Foerstner KU, Friss C, van de Guchte M, Guedon E, Haimet F, Huber W, van Hylckama-Vlieg J, Jamet A, Juste C, Kaci G, Knol J, Lakhdari O, Layec S, Le Roux K, Maguin E, Mérieux A, Melo Minardi R, M'rini C, Muller J, Oozeer R, Parkhill J, Renault P, Rescigno M, Sanchez N, Sunagawa S, Torrejon A, Turner K, Vandemeulebrouck G, Varela E, Winogradsky Y, Zeller G, Weissenbach J, Ehrlich SD, Bork P. (2011) Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature* 473:174-180.

108. Ridlon JM, Kang DJ, Hylemon PB (2006) Bile salt biotransformations by human intestinal bacteria. *J Lipid Res* 47:241-259.

109. 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.

110. Mitsuoka T (2014) Establishment of intestinal bacteriology. *Biosci Microbiota Food Health* 33:99-116.
111. 布浦 直樹、山本 憲二、熊谷 英彦 (1997) ビフィズス菌の酵素でビフィズス因子を作る. *化学と生物* 35(6):451-457
112. 岡崎昌子、藤川茂昭、松元信也 (1990) キシロオリゴ糖のビフィズス菌増殖効果. *日本栄養・食糧学会誌* 43(6):395-401
113. 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.
114. 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.

原著論文

Masahiro Komeno, Honoka Hayamizu, Kiyotaka Fujita, Hisashi Ashida (2019) Two novel α -L-arabinofuranosidases from *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* belonging to glycoside hydrolase family 43 cooperatively degrade arabinan. Appl Environ Microbiol. 85 (6) in press. DOI : <https://doi.org/10.1128/AEM.02582-18>.

米野雅大, 伊藤あずさ, 大東夏海, 吉原侑希, 鈴木利雄, 永井宏平, 芦田 久
(2018) 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. Mem Faculty B.O.S.T., Kindai University (42):1-12.

謝辞

本研究を行うにあたり、御指導、御鞭撻を受け賜りました近畿大学生物理工学部 食品安全工学科 芦田久 教授に深く感謝致します。本論文を査読して頂いた主査の近畿大学生物理工学部 食品安全工学科 尾崎嘉彦 教授、副主査の近畿大学生物理工学部 食品安全工学科 東慶直 教授に深く感謝致します。実験設備を提供して頂き、また助言等を賜りました近畿大学生物理工学部 食品安全工学科 白木琢磨 准教授に深く御礼申し上げます。マウス試験において解剖・試料採取の協力ならびに RAW264.7 細胞を分与して頂いた近畿大学生物理工学部 遺伝子工学科 永井宏平 准教授ならびに分子情報解析学研究室の皆様へ深謝致します。

また、*E. coli* BL21 λ DE3 Δ lacZ 株を御提供して頂いた京都大学大学院 生命科学研究科 片山高嶺 教授、ならびに合成アラビノ 2 糖を御提供して頂いた琉球大学農学部 亜熱帯生物資源科学科 金子哲 教授ならびに *B. longum* subsp. *longum* の GH43 アラビノフラノシダーゼに関して御助言を頂きました鹿児島大学農学部 食料生命化学科 藤田清貴 准教授に深く御礼申し上げます。

最後に、長きにわたり大変お世話になりました食品免疫学研究室の皆様へ感謝致します。