

称号及び氏名	博士(応用生命科学) 河野 麻実子
学位授与の日付	平成21年3月31日
論文名	<i>Bifidobacterium longum</i> JBL05 が産生する新規多糖の構造と生理機能に関する研究
論文審査委員	主査 北村 進一 副査 切畑 光統 副査 乾 博

## 論文要旨

### 第一章 緒論

ビフィズス菌や乳酸菌は、腸内細菌叢の改善や整腸作用だけでなく、免疫賦活作用、感染防御作用、抗アレルギー作用等を有することが知られており、プロバイオティクスとして広く利用されている。人の腸管では100種類、100兆個以上の腸内細菌が腸内フローラを形成しており、外来から来た微生物は容易に定着できない(コロナイゼーション・レジスタンス)と言われる。ビフィズス菌は腸内フローラにおける優勢菌のひとつであるが、一部のビフィズス菌は菌体外に多糖を産生することが知られており、コロナイゼーションや腸管への定着に寄与しているという報告がある。しかしながら、その構造や生理機能に関する研究は進んでいない。その要因のひとつとして、ビフィズス菌の増殖には高い嫌気度が要求されるため、菌の増殖および多糖の大量調製が難しいことが挙げられる。そこで、本研究ではまず、人の腸管より分離された *Bifidobacterium longum* JBL05 が、菌体外多糖を大量に生産する系を構築し、次に、その一次構造を明らかにした。さらに、本ビフィズス菌が腸管由来の菌であるので、腸管における生理機能に着目し、菌体外多糖の腸管免疫調節作用について、パイエル板細胞を用いて、サイトカイン産生量、IgA産生量を測定することによって検討した。また、本多糖の産業利用のひとつとして化粧品素材としての可能性にも着目し、保水性に関わる物性および皮膚保湿作用について検討を行った。

## 第二章 ビフィズス菌産生多糖の生産性向上

*B. longum* JBL05 をラクトース、プロテアーゼ処理を行った分解脂乳を含む培地で静置培養したところ、市販MRS培地で培養したものより高い粘度上昇が認められた。さらに、pHコントロール培養を行ったところ、2倍以上の多糖生産量が認められ、培養40時間後で2.9 g/L培養液もの多糖を得ることができた。次に、この基本培地を用いて、嫌気条件の検討を行った。培養液中の溶存酸素濃度(DO)が0.05-0.5 ppmの間では、最大増殖菌数に大きな変化がないにもかかわらず、多糖生産量は0.3 ppm以上になると顕著に減少することがわかった。嫌気用ガスとしてはCO<sub>2</sub>を用いた際に最も多糖生産量が多く、100% N<sub>2</sub>を用いた場合は、菌の増殖および多糖産生のいずれも認められなかった。また、N<sub>2</sub>とCO<sub>2</sub>の混合比を変えた嫌気条件下で培養した場合、CO<sub>2</sub>濃度が20%以上であれば最大増殖菌数および最大多糖生産量ともに変化はなかったが、それ以下になるとCO<sub>2</sub>濃度の減少とともに、いずれも減少した。これらの結果より、*B. longum* JBL05 は、菌の増殖および多糖産生にCO<sub>2</sub>が必要であると考えられた。*B. longum*が持ちうる主要な代謝経路のうち、ホスホエノールピルビン酸(PEP)からオキサロ酢酸(OAA)への代謝反応はCO<sub>2</sub>を必要とする。そこで、100% N<sub>2</sub>による嫌気条件下、OAA(1 g/L)を添加して培養を行ったところ、増殖菌数が100% CO<sub>2</sub>下培養とほぼ同様まで回復したことから、CO<sub>2</sub>濃度20%以下で菌の増殖が抑制されたのは、CO<sub>2</sub>の減少によりOAAへの代謝反応が抑えられたことによるものであることが明らかとなった。しかし、多糖生産量は100% CO<sub>2</sub>嫌気条件下培養の1/2程度にとどまっており、多糖の生合成にはCO<sub>2</sub>を要求する他の代謝反応が関与していることが推察された。これらの結果から、*B. longum* JBL05 の増殖および多糖産生におけるCO<sub>2</sub>要求性が示唆されるとともに、最適な培地および嫌気条件(20%以上のCO<sub>2</sub>使用、DO=0.05 ppm)が示された。

## 第三章 ビフィズス菌産生多糖の一次構造解析

酵素分解脂乳培地で*B. longum* JBL05 を静置培養し、粘度の上昇した培養液から60%エタノールで沈殿する画分を集め、ビフィズス菌産生多糖画分を得た。これを、イオン交換樹脂カラムおよびゲル濾過カラムで精製した。得られた多糖画分を加水分解し、アセチル化後GC分析により構成糖を明らかにし、メチル化分析、NMR分析により、構造解析を行った。その結果、本ビフィズス菌産生多糖は、ガラクトース、グルコース、ラムノースから成り、その構成糖比が4:2:1で、1繰り返し単位が7糖から成る多糖であることがわかった(Fig. 1)。さらに、本多糖はピルビン酸を含み、その含有量は、1繰り返し単位(7糖)に対し0.74(モル比)の割合であることが明らかとなった。決定された構造より、本多糖がこれまでに報告のない新規の多糖であることが明らかとなった。また、GPC-MALLSによる分子量測定の結果、本多糖の重量平均分子量( $M_w$ )は、 $5.4 \times 10^5$  g/molであった。

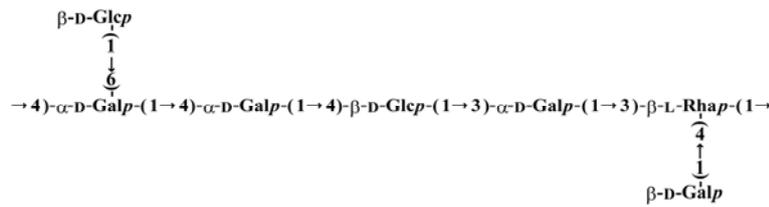


Figure 1 Repeating unit of the EPS produced by *B. longum* JBL05.

#### 第四章 マウスパイエル板細胞における免疫調節作用

C3H/HeJ マウス (8W, 雌) よりパイエル板細胞を調製し、pH コントロール培養後、膜を使用して精製を行ったビフィズス菌産生多糖を添加して 5 日間培養した。その後、培養上清中のサイトカイン産生量および IgA 産生量を ELISA 法にて測定した。また、同マウスより調製した骨髄細胞に、本培養上清を添加して 6 日間培養後、細胞増殖数を測定し、パイエル板免疫調節作用の指標とした。その結果、ビフィズス菌産生多糖添加濃度依存的に、骨髄細胞の増殖促進効果が認められ、本多糖の添加によりパイエル板細胞から骨髄細胞増殖促進因子が産生されること、また、本多糖がパイエル板免疫調節作用を有する可能性が示唆された。このとき、パイエル板細胞培養上清中の IL-4, IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$  の産生量が増加しており、特に IL-6 産生量増加が顕著であることが認められた。パイエル板細胞におけるサイトカイン mRNA の発現量も、同様に増加していたことより、細胞レベルでのサイトカイン産生促進が示唆された。これより、骨髄細胞増殖促進因子のひとつとしてこれまでも報告がある IL-6 の関与が考えられた。また、培養上清中の IgA 産生量についても増加が見られたことより、本多糖の添加により、IL-6 産生が促進され、IgA 産生 B 細胞への分化が促進し、IgA 産生量が増加したものと推察された。さらに、ビフィズス菌産生多糖がもつピルビン酸の有無および分子量が、本活性に及ぼす影響を調べた。その結果、脱ピルビン酸多糖や低分子化多糖では顕著な活性の増加が認められなかったことより、本活性には高分子量であり、また、ピルビン酸を有することが必要であることが示唆された。

#### 第五章 化粧品素材としての機能特性

ビフィズス菌産生多糖の化粧品素材としての可能性を探るべく、保水効果が高いと言われ、広く利用されているヒアルロン酸との比較検討を行った。ヒアルロン酸の高い保水作用の一因として水和水量が挙げられるが、本多糖の水和水量を示差走査熱分析法で測定したところ、多糖 1 g あたり 0.3 g であり、ヒアルロン酸の 0.4 g には及ばなかった。しかしながら、異なる評価法ではヒアルロン酸を上回る結果を得た。すなわち、ビフィズス菌産生多糖水溶液から 60 °C でフィルムを作製し、湿度 75.7% の高湿度下に放置した後、湿度 33% の低湿度下に移動することでフィルムの吸放湿特性を調べたところ、ヒアルロン酸と比較して、水分を離しにくく、保持する効果が高い傾向が認められた。

また、低湿度下で水分放出後のフィルムの状態は、ヒアルロン酸では縮む傾向が認められたが、本多糖では認められず形を維持しており、これも塗布時の良好な物性に関与する特徴と考えられた。また、長期塗布試験の結果、塗布1ヵ月後の経皮水分蒸散量および角質水分量において、ヒアルロン酸と同程度の変化が認められた。これらの特性より、化粧品素材としての有用性が示唆された。

## 第六章 総括

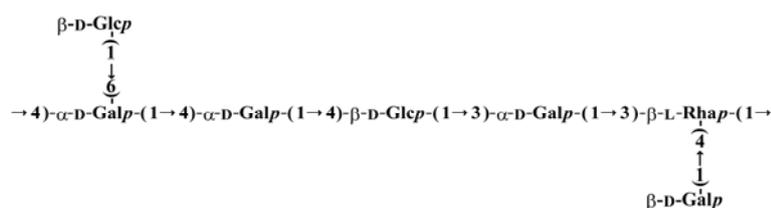
本研究では、人の腸内より分離された *Bifidobacterium longum* JBL05 がこれまでに報告のない菌体外多糖を産生することを明らかにし、また生産性向上検討により、産業利用可能な生産法を確立した。本多糖の物性として、水和水量は一般の多糖と同様の特性を示したが、60℃で作製したフィルムは高い水分保持効果を示した。本多糖水溶液の長期塗布試験ではヒアルロン酸に匹敵する効果が得られており、これらは本多糖の化粧品素材としての産業利用につながる基盤となった。また、本多糖は人の腸内より分離された菌が産生することより、腸管における作用が非常に興味深いところである。本研究の結果、パイエル板細胞における免疫調節作用を有することが示唆されたこと、さらに、その構造や分子量との関係についての知見が得られたことは、食品としての産業利用における基礎的知見になり、今後の展開が期待される。

## 審査結果の要旨

ビフィズス菌や乳酸菌は、腸内細菌叢の改善や整腸作用だけでなく、免疫賦活作用、感染防御作用、抗アレルギー作用等を有することが知られており、プロバイオティクスとして広く利用されている。ビフィズス菌は腸内フローラにおける優勢菌のひとつであるが、一部のビフィズス菌は菌体外に多糖を産生することが知られており、コロナイゼーションや腸管への定着に重要な働きをしている。しかしながら、その構造や生理機能に関する研究は進んでいない。その要因のひとつとして、菌の増殖および多糖の大量調製が難しいことが挙げられる。そこで、本研究ではまず、人の腸管より分離された *Bifidobacterium longum* JBL05 が、菌体外多糖を大量に生産する系を構築し、次に、その一次構造を明らかにした。さらに、腸管における生理機能に着目し、腸管免疫調節作用について調べた。また、本多糖の産業利用のひとつとして化粧品素材としての可能性に着目し、保水性に関わる物性および皮膚保湿作用について検討を行った。

まず、ビフィズス菌産生多糖の生産性向上を目指して、培養条件の検討を行ったところ、菌の増殖および多糖産生にはCO<sub>2</sub>が必要であることが分かった。*B. longum*が持ちうる主要な代謝経路のうち、ホスホエノールピルビン酸(PEP)からオキサロ酢酸(OAA)への代謝反応はCO<sub>2</sub>を必要とする。そこで、100 % N<sub>2</sub>による嫌気条件下、OAA(1 g/L)を添加して培養を行ったところ、増殖菌数が100 % CO<sub>2</sub>下培養とほぼ同様まで回復したことから、CO<sub>2</sub>濃度20 %以下で菌の増殖が抑制されたのは、CO<sub>2</sub>の減少によりOAAへの代謝反応が抑えられたことによるものであることが明らかとなった。これらの結果から、最適な培地および嫌気条件(20 %以上のCO<sub>2</sub>使用、D0=0.05 ppm)を決めた。

次にビフィズス菌産生多糖の一次構造解析をメチル化分析、NMR分析などにより行った。その結果、本ビフィズス菌産生多糖は、ガラクトース、グルコース、ラムノースから成り、その構成糖比が4:2:1で、繰り返し単位が7糖から成る下に示す構造の多糖であることがわかった。さらに、本多糖はピルビン酸を含み、その含有量は、1繰り返し単位(7糖)に対し0.74(モル比)の割合であることが明らかとなった。決定された構造より、本多糖がこれまでに報告のない新規の多糖であることが明らかとなった。また、本多糖の重量平均分子量( $M_w$ )は、 $5.4 \times 10^5$  g/molであった。



さらにマウスパイエル板細胞における免疫調節作用について調べ、本多糖の添加によりパイエル板細胞から骨髄細胞増殖促進因子が産生されること、また、本多糖がパイエル板免疫調節作用を有する可能性が示唆された。このとき、パイエル板細胞培養上清中のIL-4, IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ の産生量が増加しており、特にIL-6産生量増加が顕著であることが認められた。パイエル板細胞におけるサイトカインmRNAの発現量も、同様に増加していたことより、細胞レベルでのサイトカイン産生促進が示唆された。これより、骨髄細胞増殖促進因子のひとつとしてこれまでも報告があるIL-6の関与が考えられた。また、培養上清中のIgA産生量についても増加が見られたことより、本多糖の添加により、IL-6産生が促進され、IgA産生B細胞への分化が促進し、IgA産生量が増加したものと推察された。

また、ビフィズス菌産生多糖の化粧品素材としての可能性を探るべく、吸放湿特性を調べたところ、ヒアルロン酸と比較して、水分を離しにくく、保持する効果が高い傾向が認められた。また、長期塗布試験の結果、塗布1ヵ月後の経皮水分蒸散量および角質水分量において、ヒアルロン酸と同程度の変化が認められた。これらの特性より、化粧品素材としての有用性が示唆された。

本研究では、人の腸内より分離された*Bifidobacterium longum* JBL05がこれまでに報告のない菌体外多糖を産生することを明らかにし、また生産性向上検討により、産業利用可能な生産法を確立した。ビフィズス菌の多糖の構造を決定した初めての論文である。本多糖がパイエル板細胞における免疫調節作用を有することが示唆された。また、

本多糖水溶液の長期塗布試験ではヒアルロン酸に匹敵する効果が得られており、これらは本多糖の化粧品素材としての産業利用につながる基盤となった。

本研究により、食品、化粧品、などで利用するための重要な基礎的知見が得られたと考えられる。よって、本論文の審査ならびに最終試験の結果と併せて、博士(応用生命科学)の学位を授与することを適当と認める。