

図 6 16S rDNA 塩基配列に基づき分離菌 A およびその近縁菌種の系統解析結果。今回決定した塩基配列については太字で示した。系統樹は近隣結合法により作成し、比較塩基数は 1299 bp、アウトグループとして *Lactobacillus casei* subsp. *casei* ATCC 393^T および *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ATCC 11842^T を用いた。括弧内はアクセシオンナンバー。T: type strain, Lc.: *Lactococcus*.

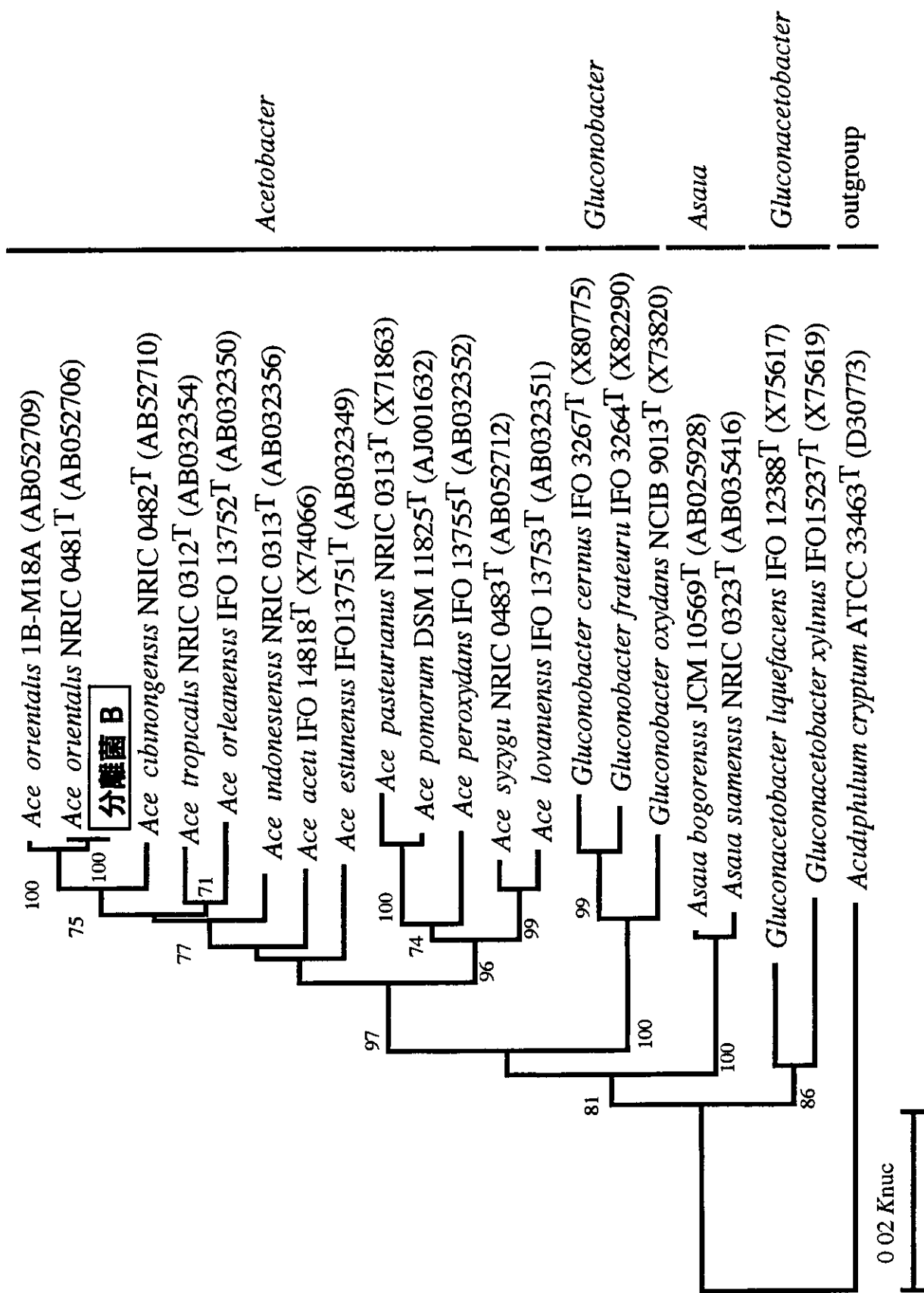


図7 16S rDNA 塩基配列に基づく分離菌 B およびその近縁菌種の系統解析結果。今回決定した塩基配列については太字で示した。系統樹は近隣結合法により作成し、比較塩基数は 1321 bp、アウトグループとして *Acidiphilium cryptum* ATCC 33463^T を用いた。括弧内はアクセシオンナンバー。T type strain, Ace. *Acetobacter*.

表 15 分離菌 A の DNA/DNA 相同性試験結果

Strain	Value of DNA/DNA similarity (%) with the strain				
	分離菌 A	DSM 20069 ^T	JCM 5805 ^{Ta}	JCM 1180 ^{Tb}	JCM 10343 ^{Tc}
分離菌 A	100	108	85	50	5
<i>Lactococcus lactis</i> subsp <i>cremoris</i> DSM 20069 ^T	64	100	64	40	4

^T type strain
 a *Lactococcus lactis* subsp *lactis* JCM 5805^T
 b *Lactococcus lactis* subsp *hordniae* JCM 1180^T
 c *Lactococcus garvieae* JCM 10343^T

表 16 分離菌 B の DNA/DNA 相同性試験結果

Strain	Value of DNA/DNA similarity (%) with the strain				
	分離菌 B	NBRC 16606 ^T	NBRC 16605 ^{Ta}	NBRC 16470 ^{Tb}	NBRC 13752 ^{Tc}
分離菌 B	100	92	34	28	24
<i>Acetobacter orientalis</i> NBRC 16606 ^T	91	100	28	21	23

^T type strain
 a *Acetobacter cibinongensis* NBRC 16605^T
 b *Acetobacter tropicalis* NBRC 16470^T
 c *Acetobacter orleanensis* NBRC 13752^T

する 10 菌種とそれぞれ近縁であった (図 9)。 *L. rhamnosus* GG については、系統解析の結果、既存の *L. rhamnosus* と異なる系統的位存在し、菌種に特徴的なクラスターを形成していなかった (未掲載)。

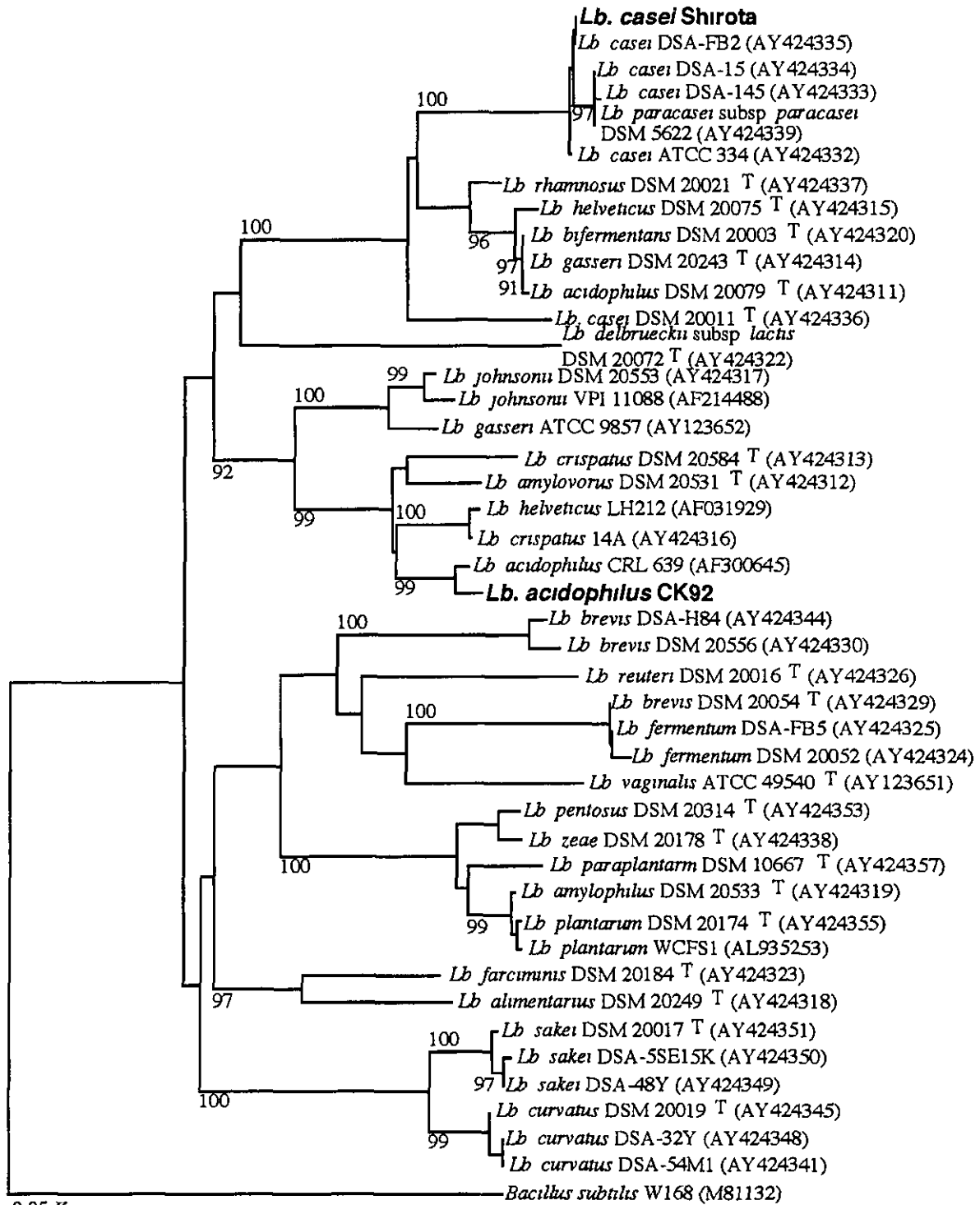


図8 *groEL* 塩基配列に基づく *Lactobacillus* 菌種の系統解析結果。今回決定した塩基配列については太字で示した。系統樹は近隣結合法により作成し、比較塩基数は 351 bp、アウトグループとして *Bacillus subtilis* W168 を用いた。括弧内はアクセッションナンバー。T type strain, *Lb* *Lactobacillus*。

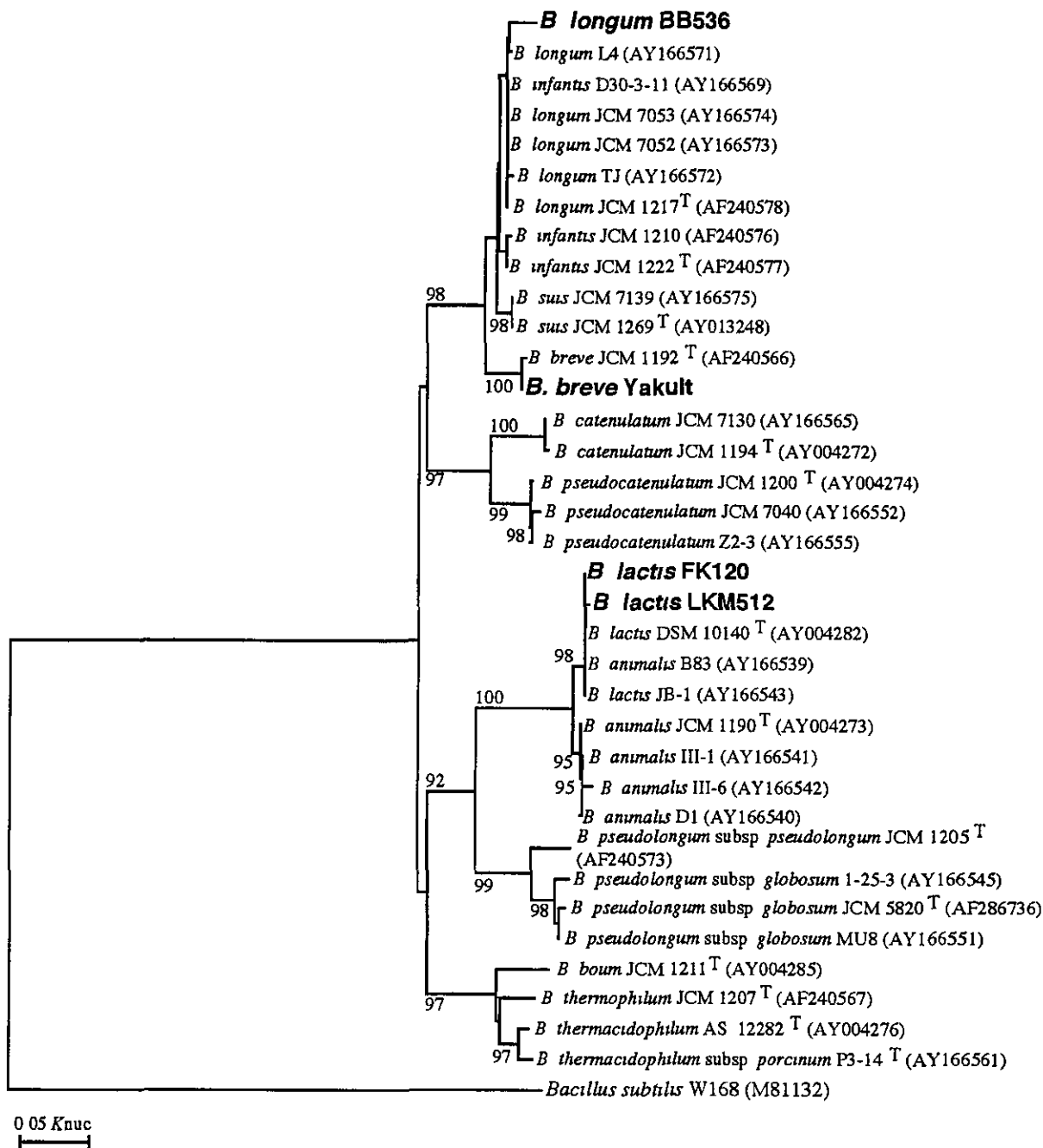


図9 *groEL* 塩基配列に基づく *Bifidobacterium* 菌種の系統解析結果。今回決定した塩基配列については太字で示した。系統樹は近隣結合法により作成し、比較塩基数は 374 bp、アウトグループとして *Bacillus subtilis* W168 を用いた。括弧内はアクセッションナンバー。T type strain, *B Bifidobacterium*。

実験 2-3 菌種、菌株特異的プライマーの設計および適用

実験 2-2 の過程で得られた *groEL* 塩基配列情報をもとに、関与成分である、5 種 6 株およびその近縁種それぞれに特異的なプライマーを設計した (表 12)。*B. lactis* FK120 と *B. lactis* LKM512 については、同種かつ近縁であったため (図 9)、共通のプライマーを設計した (表 12)。今回単離

した関与成分 8 株と発酵乳等に用いられる代表的な菌種の基準株 10 株について、特異性を調べた結果、いずれの場合においても、目的とする菌種を特異的に検出することが出来た (図 10、表 17)。

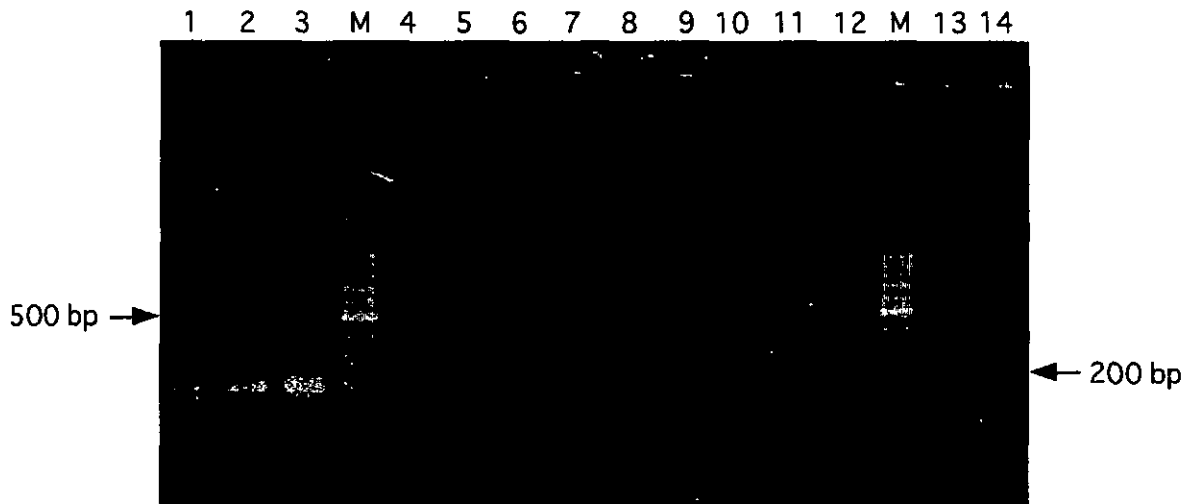


図 10 特異的プライマー (BIFlacF、BIFlacR) 適用結果例

Abbreviations 1, *Bifidobacterium lactis* FK120, 2, *B. lactis* LKM512, 3, *B. animalis* DSM 10140^T, 4, *B. breve* JCM 1192^T, 5, *B. longum* JCM 1217^T, 6, *Lactobacillus acidophilus* JCM 1132^T, 7, *L. helveticus* JCM 1120^T, 8, *L. casei* JCM 1134^T, 9, *L. rhamnosus* JCM 1136^T, 10, *L. gasseri* JCM 1131^T, 11, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* JCM 1002^T, 12, *Streptococcus thermophilus* DSM 20617^T, 13, *L. acidophilus* CK92, 14, *L. casei* Shirota, T, type strain

【考察】

本研究の目的は一般家庭に広まっているプロバイオイクス機能を有する、および有すると考えられる食品素材についてその表示の妥当性および安全性を検討することである。そのため、カスピ海ヨーグルト種菌セットに含まれている菌について詳細な種同定を行い、分類学的な帰属を決定し (研究 1)、特定保健用食品に含まれている菌種、菌株に特異的なプライマーを設計、その有用性を検討した (研究 2)。

本研究により、*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* であると考えられた分離菌 A の 16S rDNA 塩基配列は、亜種の基準株である DSM 20069^T の塩基配列と 100 % 同一であることが明らかとなった。現在、種の簡易同定には 16S rDNA 塩基配列が用いられており、同種であると強く示唆された。しかしながら、カスピ海ヨーグルトは一般家庭に食品として広まっているため、確実な同定の際に用いられる DNA/DNA 相同性試験を行い、近縁とされた基準株との相同値を調べた。相同値は、分離菌 A をプローブとした際に基準株と 108 %、基準株をプローブとした際に分離菌 A と 64 % (表 15) と平均 86 % を示し、Johnson の提案する DNA/DNA 相同値の数値と分類階級との対応 (32、33) より、同一亜種内とされる 70% を上回っていた。しかしながら、同種であるが別亜種である *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* の基準株 JCM 5805^T に対しても、分離菌 A をプローブ

表 17 菌種、菌株特異的プライマー適用結果^a

Strain	特異的プライマーセット ^c				
	LBaciF	LBcasF	BIFbreF	BIFlacF	BIFlonF
	LBaciR	LBcasR	BIFbreR	BIFlacR	BIFlonR
<i>L. acidophilus</i> CK92	+	-	-	-	-
<i>L. acidophilus</i> JCM 1132 ^T	+	-	-	-	-
<i>L. casei</i> Shirota	-	+	-	-	-
<i>L. casei</i> JCM 1134 ^T	-	-	-	-	-
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> JCM 1002 ^T	-	-	-	-	-
<i>L. helveticus</i> JCM 1120 ^T	-	-	-	-	-
<i>L. gasserii</i> JCM 1131 ^T	-	-	-	-	-
<i>L. rhamnosus</i> GG	-	-	-	-	-
<i>L. rhamnosus</i> JCM 1136 ^T	-	-	-	-	-
<i>B. breve</i> Yakult	-	-	+	-	-
<i>B. breve</i> JCM 1192 ^T	-	-	+	-	-
<i>B. lactis</i> FK120	-	-	-	+	-
<i>B. lactis</i> LKM512	-	-	-	+	-
<i>B. lactis</i> DSM 10140 ^T	-	-	-	+	-
<i>B. longum</i> BB536	-	-	-	-	+
<i>B. longum</i> JCM 1217 ^T	-	-	-	-	+
<i>S. salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i> ^b 1131	-	-	-	-	-
<i>S. thermophilus</i> DSM 20617 ^T	-	-	-	-	-

T, type strain, *L*, *Lactobacillus*; *B*, *Bifidobacterium*, *S*, *Streptococcus*

a +, 増幅, -, 増幅せず

b 現在の学名は *S. thermophilus*

c 表 12 参照

とした際に 85 % を示し (表 15)、分離菌 A の帰属についてさらなる検討が必要と考えられた。*Lactococcus lactis* には、亜種が 3 種存在するため、DNA/DNA 相同試験の結果だけでは同定が困難であると考え、昨年度行ったアピ 50 CH の結果について再度精査した。その結果、*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* に属する菌種が陽性率 80 % を示す、リボース、アルブチン、セロビオース、マルトース、トレハロース、ゲンチオヒオースいずれにおいても、分離菌 A の発酵性は陰性であった。従って、昨年度の結果および今年度調べた 16S rDNA 塩基配列、DNA/DNA 相同値の結果より、分離菌 A は、*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* に帰属することが明らかとなった。分離菌 B の 16S rDNA 塩基配列は、*Acetobacter orientalis* の基準株 NRIC 0481^T の塩基配列と 99.9 % 一致し、

系統解析の結果、*A. orientalis* と最も近縁となり、*A. cibinongensis*、*A. tropicalis*、*A. orleanensis* と近縁であることが明らかとなった (図 7)。そこで、これら 4 菌株との DNA/DNA 相同値を調べたところ、分離菌 B をプローブとした際に *A. orientalis* の基準株 NBRC16606^T (= NRIC 0481^T) と 92 %、基準株をプローブとした際に 91 % を示し (表 16)、分離菌 B は *Acetobacter orientalis* に帰属することが明らかとなった。これら帰属が明らかとなった 2 株の種について、文献的にその安全性について調べた結果、*Lactococcus lactis* subsp *cremoris* については、発酵乳や、チーズのスターター等の乳製品より分離される菌種 (34, 35)。一方、*Acetobacter orientalis* は、2001 年に提唱された比較的新しい種であり、これまでインドネシア以外の分離例がない (36)。しかしながら分離源は果実、大豆発酵食品等 (36) であり、分離菌 A、B いずれの菌種も主に食品、食物から分離される安全な菌であると考えられた。また、近年の研究により、腸管通過性の可能性が示唆されるなど (37, 38)、今後もカスピ海ヨーグルトのプロバイオティクス機能について研究、検討する必要があると考えられた。

現在、特定保健用食品の関与成分として用いられている菌種は、9 種 12 株存在する (表 1)。これらの菌数測定を行う方法は培養法のみであり、対象とする菌株によっては、複雑な選択培地が必要で時間を要し、煩雑であった。そこで、近年腸内細菌、土壌細菌の菌叢の検索に用いられるようになった菌種特異的プライマーを用いた検出、定量法 (2, 3) に着目し、特定保健用食品への適用について検討した。また、微生物の系統解析は主に 16S rDNA 塩基配列が用いられることが多かったが、近年他の遺伝子、DNA gyrase subunit B (39)、Elongation factor Tu (40)、*groEL* (41, 42, 43) 等についても系統解析が行われるようになった。16S rDNA は、ゲノムプロジェクトの結果等より複数コピーがあることが知られている (44, 45) が、*groEL* はほとんどの細菌において、コピー数が 1 つであると考えられている (46)。そこで、本研究では、*groEL* に着目して特異的プライマーの設計を行った。9 種すべて単離出来るように、市販されている製品より 8 品目を選択、購入し、単離を試みた結果、7 種、8 株の関与成分が単離された (表 6)。この中で、データベースの蓄積が豊富である *Lactobacillus* 菌種および *Bifidobacterium* 菌種についてのみ塩基配列の決定および系統解析 (図 8, 図 9) を行い、特異的プライマー設計のための基礎データとした。ほとんどの菌株については、既に配列が決定されている同じ種と最も近縁となり、クラスターを形成した (図 8, 図 9)。しかしながら、*L. rhamnosus* GG のみ既存の *L. rhamnosus* とは別の系統枝に位置し、特異的プライマーの作成は困難であると考えられたため、最終的に 5 種 6 株について特異的プライマーの設計を行った。5 種それぞれおよび近縁な菌種で構成されるクラスター毎に特徴的な配列を利用して 5 組のプライマーセットを構築した (表 12)。*Lactobacillus* 菌種用プライマーと *Bifidobacterium* 菌種用プライマーでは、PCR 反応条件が異なっている。これは、*Bifidobacterium* 菌種用プライマーについて *Lactobacillus* 菌種用と同じ条件で PCR 反応を行ったところ、3 セットいずれの反応においても非特異的バンドが認められたため、それを解消すべく、PCR サイクル条件を 2 ステップとして反応溶液中の MgSO₄ 濃度を下げた (1 mM → 0.75 mM) ことによる (表 14, 図 5)。従って、これら 5 組のプライマーセットは、PCR 法を用いた際にいずれも目的とする菌種のみバンドが確認され、非特異的なバンド、プライマーダイマー等は認められない (図 10, 表 17) プライマーであり、関与成分の確認、検出に用いることが可能であると考えられた。ところで、*L. casei* の基準株である JCM 1134^T は *L. casei* Shirota 用のプライマーセット (LBcasF、LBcasR) では増幅されない (表 12)。これは系統的な位置が若干異なり (図 8)、プライマー領域の配列が異なることによるものであるが、本研究の主目的は関与成分の検出であるため特に問題ない

と考えられた。これまで「お腹の調子を整える」特定保健用食品の関与成分の菌数測定は指定の培地で培養するのみであり、分子レベルの確認は行われていなかったため、安全性について不明の部分もあった。しかしながら、本研究の結果により全ての菌種についてはないが、既存の関与成分について迅速に菌種の確認を行うことが可能であり、安全性が確認できると考えられた。今後、新たに特定保健用食品となる製品が数多く申請されてくると考えられる。しかしながら、現在関与成分とされている種は 9 種と製品数に比べそれほど多くなく (表 1)、またほとんどは同じ菌株を使用して新たな製品として市販されているため、本研究にて構築したプライマーセットを利用できると考えられる。また、新たな菌種においても、同種であれば適用可能であることが考えられる。今後、培養を経ないで菌数定量に応用するためには定量性、検出限界等の検討が必要であるが、菌種の確認は十分に可能であり、本研究の結果は特定保健用食品、新しく特定保健用食品となる関与成分の新たな分析方法に応用可能であると考えられた。

【参考文献・ホームページアドレス】

- 1) Arai, S Global view on functional foods Asian perspectives *Br J Nutr*, 88 Suppl 2, S139-S143, 2002
- 2) Matsuki, T, Watanabe, K., and Tanaka, R. Genus- and species-specific PCR primers for the detection and identification of bifidobacteria. *Curr Issues Intest Microbiol*, 4, 61-69, 2003
- 3) Kabir, S, Rajendran, N, Amemuya, T, and Itoh, K. Real-time quantitative PCR assay on bacterial DNA. In a model soil system and environmental samples *J Gen Appl Microbiol*, 49, 101-109, 2003
- 4) Brosius, J, Dull, T J, Sleeter, D D, and Noller, H F Gene organization and primary structure of a ribosomal RNA operon from *Escherichia coli* *J Mol Biol*, 148, 107-127, 1981
- 5) <http://www.ddbj.nig.ac.jp/>
- 6) <http://www.ddbj.nig.ac.jp/E-mail/homology-j.html>
- 7) Thompson, J D, Higgins, D G, and Gibson, t J CLUSTAL W improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice *Nucleic Acid Res*, 22, 4673-4680, 1994
- 8) Kimura, M and Ota, T On the stochastic model for estimation of mutation distance between homologous proteins *J Mol Evol*, 2, 87-90, 1972
- 9) Saito, H. and Nei, M. The neighbor-joining method. a new method for reconstructing phylogenetic trees *Mol Biol Evol*, 4, 406-425, 1987
- 10) Felsenstein, J Confidence limits on phylogenies an approach using the bootstrap *Evolution*, 39, 783-791, 1985
- 11) Saito, H. and Miura, K. Preparation of transforming deoxyribonucleic acid by phenol treatment. *Biochem, Biophys, Acta*, 72, 619-629, 1983
- 12) Kageyama, A., Poonwan, N, Yazawa, K, Mikami, Y, and Nishimura, K. *Nocardia asiatica* sp nov, isolated from patients with nocardiosis in Japan and clinical specimens from Thailand. *Int J Syst Evol Microbiol*, 54, 125-130, 2004
- 13) Ezaki, T, Hashimoto, Y, and Yabuuchi, E. Fluorometric deoxyribonucleic acid-deoxyribonucleic acid hybridization in microdilution wells as an alternative to membrane filter hybridization in which

- radioisotopes are used to determine genetic relatedness among bacterial strains *Int. J. Syst. Bacteriol.* , 39, 224-229, 1989
- 14) Gibson, G R. and Roberfroid, M. B Dietary modulation of the human colonic microbiota. Introducing the concept of prebiotics *J Nutr*, 125, 1401-1412, 1995
 - 15) Fuller, R. Probiotics in man and animal *J Appl Bact* , 66, 365-378, 1989
 - 16) Michetti, P , Dorta, G , Wiesel, P H, Brassart, D , Verdu, E., Herranz, M., Felley, C., Porta, N , Rouvet, M., Blum, A. L., and Cortesy-Theulaz, I Effect of whey-based culture supernatant of *Lactobacillus acidophilus (johnsonii)* La1 on *Helicobacter pylori* infection in humans *Digestion*, 60, 203-209, 1999
 - 17) Felley, C P, Cortesy-Theulaz, I , Rivero, J L., Sipponen, P, Kaufmann, M., Bauerfeind, P, Wiesel, P H., Brassart, D , Pfeifer, A , Blum, A L , and Michetti, P Favourable effect of an acidified milk (LC-1) on *Helicobacter pylori* gastritis in man. *Eur. J Gastroenterol Hepatol* , 13, 25-29, 2001
 - 18) Kimura, K, Sakamoto, I , Igarashi, M, Takagi, A , Miwa, T , and Koga, Y Effects of yogurt containing *Lactobacillus gasseri* OLL2716 (LG21) on decrease of *Helicobacter pylori* and the improvement of mucosal inflammation in the stomach of human infected with *H pylori* *J Nutr Food* , 4, 29-34, 2001
 - 19) Fabia, R, Ar' Rajab, A , Johansson, M. L., Andersson, R., Willen, R., Jeppsson, B , Molin, G , and Bengmark, S Impairment of bacterial flora in human ulcerative colitis and experimental colitis in the rat. *Digestion*, 54, 248-255, 1993
 - 20) Favier, C., Neut, C., Mizon, C , Cortot, A., Colombel, J F, and Mizon, J Fecal beta-D-galactosidase production and Bifidobacteria are decreased in Crohn's disease *Dig Dis Sci* , 42, 817-822, 1997
 - 21) Gupta, P, Andrew, H, Kirschner, B S , and Guandalini, S Is lactobacillus GG helpful in children with Crohn's disease? Results of a preliminary, open-label study *J Pediatr Gastroenterol Nutr* , 31, 453-457, 2000
 - 22) Matsumoto, S , Watanabe, N , Imaoka, A , and Okabe, Y Preventive effects of *Bifidobacterium*- and *Lactobacillus*- fermented milk on the development of inflammatory bowel disease in senescence-accelerated mouse P1/Yit strain mice *Digestion*, 64, 92-99, 2001
 - 23) Bjorksten, B , Naaber, P, Sepp, E, and Mikelsaar, M. The intestinal microflora in allergic Estonian and Swedish 2-year-old children. *Clin Exp Allergy* 29, 342-346, 1999
 - 24) Kirjavaine, P V, Salminen, S J , and Isolauri, E Probiotic bacteria in the management of atopic disease underscoring the importance of viability *J Pediatr Gastroenterol Nutr* , 36, 223-227, 2003
 - 25) Kalliomaki, M, Salminen, S , Poussa, T , Arvilommi, H., and Isolauri, E. Probiotics and prevention of atopic disease 4-year follow-up a randomised placebo-controlled trial *Lancet*, 361, 1869-1871, 2003
 - 26) [http //www.nyusankin.or.jp/new/kaminogawa1.html/](http://www.nyusankin.or.jp/new/kaminogawa1.html/)
 - 27) Hesse, C , Andersson, B , and Wold, A. E. Gram-positive bacteria are potent inducers of monocytic interleukin-12 (IL-12) while gram-negative bacteria preferentially stimulate IL-10 production. *Infect Immun.*, 68, 3581-3586, 2000
 - 28) Pochard, P, Gosset, P, Grangette, C , Andre, C , Tonnel, A. B , Pestel, J , and Mercenier, A Lactic acid bacteria inhibit TH2 cytokine production by mononuclear cells from allergic patients *J Allergy Clin Immunol* , 110, 617-623, 2002
 - 29) Hesse, C , Hanson, L. A , and Wold, A. E. Lactobacilli from human gastrointestinal mucosa are strong stimulators of IL-12 production. *Clin Exp Immunol* , 116, 276-282, 1999

- 30) He, F, Monta, H., Ouwehand, A. C., Hosoda, M., Hiramatsu, M., Kunsaki, J., Isolaun, E., Benno, Y., and Salminen, S Stimulation of the secretion of pro-inflammatory cytokines by *Bifidobacterium* strains *Microbiol Immunol* 46, 781-785, 2002
- 31) Rose, T M., Schultz, E. R., Henikoff, J G., Pietrokovski, S., McCallum, C. M., and Henikoff, S Consensus-degenerate hybrid oligonucleotide primers for amplification of distantly-related sequences *Nucleic Acid Res*, 26, 1628-1635, 1998
- 32) Johnson, J L. Use of nucleic acid homologies in the taxonomy of anaerobic bacteria. *Int J Syst Bacteriol*, 23, 308-315, 1973
- 33) Johnson, J L. Nucleic acid in bacterial classification. In Krieg NR, Holt JG (eds) *Bergey's manual of systematic bacteriology vol 1* Williams & Wilkins, Baltimore, pp8-11, 1984
- 34) Salama, M. S., Sandine, W E., and Giovannoni, S J Isolation of *Lactococcus lactis* subsp *cremoris* from nature by colony hybridization with rRNA probes *Appl Environ Microbiol*, 59, 3941-5, 1993
- 35) Collins, Y F., McSweeney, P L., and Wilkinson, M. G Evidence of a relationship between autolysis of starter bacteria and lipolysis in cheddar cheese during ripening *J Dairy Res*, 70, 105-113, 2003
- 36) Lisdianty, P., Kawasaki, H., Seki, T., Yamada, Y., Uchimura, T., and Komagata, K. Identification of *Acetobacter* strains isolated from Indonesian sources, and proposals of *Acetobacter syzygi* sp nov., *Acetobacter cibinongensis* sp nov., and *Acetobacter orientalis* sp nov. *J Gen Appl Microbiol*, 47, 119-131, 2001
- 37) Grahn, B E., Holm, S E., Lilja, H., and Sellgren, K. Interference of a *Lactococcus lactis* strain on the human gut flora and its capacity to pass the stomach and intestine *Sand J Nutr*, 38, 2-4, 1994
- 38) Kimoto, H., Nomura, M., Kobayashi, M., Mizumachi, K., and Okamoto, T Survival of lactococci during passage through mouse digestive tract. *Can. J Microbiol*, 49, 707-711, 2003
- 39) Seo, P S. and Yokota, A The phylogenetic relationships of cyanobacteria inferred from 16S rRNA, *gyrB*, *rpoC1* and *rpoD1* gene sequences *J Gen Appl Microbiol*, 49, 191-203, 2003
- 40) Ventura, M., Canchaya, C., Meylan, V., Klaenhammer, T R., and Zink, R. Analysis, characterization, and loci of the *tuf* genes in *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species and their direct application for species identification. *Appl Environ Microbiol*, 69, 6908-8922, 2003
- 41) Viale, A. M., Arakaki, A. K., Soncini, F C., and Ferreyra, R. G Evolutionary relationships among eubacterial groups as inferred from GroEL (chaperonin) sequence comparisons *Int J Syst Bacteriol*, 44, 527-533, 1994
- 42) Jian, W, Zhu, L., and Dong, X. New approach to phylogenetic analysis of the genus *Bifidobacterium* based on partial HSP60 gene sequences *Int J Syst Evol Bacteriol*, 51, 1633-1638, 2001
- 43) Zhu, L., Li, W., and Dong, X Species identification of genus *Bifidobacterium* based on partial HSP60 gene sequences and proposal of *Bifidobacterium thermacidophilum* subsp *porcinum* subsp nov. *Int J Syst Evol Microbiol*, 53, 1619-1623, 2003
- 44) Kaneko, T, Sato, S., Kotani, H., Tanaka, A., Asamizu, E., Nakamura, Y., Miyajima, N., Hirose, M., Sugiura, M., Sasamoto, S., Kimura, T., Hosouchi, T., Matsuno, A., Muraki, A., Nakazaki, N., Naruo, K., Okumura, S., Shumoto, S., Takeuchi, C., Wada, T., Watanabe, A., Yamada, M., Yasuda, M., and Tabata, S Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp PCC 6803 II Sequence determination of the entire genome and assignment of potential protein-coding regions *DNA*

Res , 3, 109-136, 1996

- 45) Candela, M , Vitali, B , Matteuzzi, D , and Brighi, P Evaluation of the *rrn* operon copy number in *Bifidobacterium* using real-time PCR. *Lett Appl Microbiol* , 38, 229-232, 2004
- 46) Segal, G and Ron, E. Z. Regulation and organization of the *groE* and *dnaK* operons in Eubacteria. *FEMS Microbiol Lett* , 138, 1-10, 1996

「機能性脂肪酸含有食品素材の安全性及び有用性に関する研究」
分担研究者 静岡県立大学食品栄養科学部 合 田 敏 尚

【研究目的】

生活習慣病の発症を抑制するために脂肪の摂取量を過剰にしないことが薦められている一方で、不飽和脂肪酸のもつシグナル伝達因子としての有用な生理機能も明らかにされてきた。近年、多価不飽和脂肪酸を高濃度に含む脂肪酸含有食品素材や、グリセロール骨格に結合する脂肪酸の配置や数に特徴をもたせた脂肪酸含有食品素材も開発され、その一部はすでに特定保健用食品として認可されている。これまで本研究において機能性脂肪酸含有食の安全性と有用性について脂質代謝関連遺伝子の発現調節の面から検討を行ってきた。平成13年度には脂肪酸の組成を大きく偏らせた各種の脂質をラットに投与するとともに、脂肪酸の示す核内受容体 PPAR の活性化因子としての特徴を培養細胞を用いて系統的に検討し、アラキトン酸を中心とする多価不飽和脂肪酸が PPAR α を介して小腸および肝臓における脂質 ヒタミン A 吸収関連遺伝子の発現を促進する一方、脂肪組織では脂肪分化の指標遺伝子の発現を低下させることを明らかにした。平成14年度にはアラキトン酸をグリセロール骨格の sn-1 位あるいは sn-2 位にのみ結合した構造脂質を添加した飼料をラットに投与し、特にアラキトン酸が sn-2 位に配置された構造脂質により、小腸における PPAR α 標的遺伝子の発現が顕著に促進することを明らかにした。

アラキトン酸のような長鎖脂肪酸に対し、炭素数 8~12 の中鎖の脂肪酸からなる中性脂肪は、中鎖脂肪(medium-chain triacylglycerol, MCT)と呼ばれ、従来から栄養学的価値が注目されている。中鎖脂肪酸は一般的な長鎖脂肪酸と消化吸收機構が明らかに異なり、肝臓において速やかに酸化分解される[1, 2]。そのため、エネルギーとして利用されやすく、脂肪細胞への蓄積も起こりにくいことから、抗肥満作用が期待され、特定保健用食品の関与成分としても利用されている。中鎖脂肪酸のこのような効果は、幾つかの脂質代謝に関わる遺伝子の発現を制御することによってもたらされると考えられるか、その詳細な作用機構については殆ど報告されていない。そこで本年度は中鎖脂肪酸摂取の影響を検討するために、ラットにカプリル酸 (C8:0) のみで構成される MCT を添加した食餌を 2 週間摂取させ、脂質代謝に及ぼす影響を検討した(実験 I)。次に、アラキトン酸と中鎖脂肪酸で構成される構造脂質の摂取の影響を検討するために、アラキドン酸とカプリル酸からなり、アラキドン酸が sn-1 (8A) または sn-2 位 (8A8) に配位する構造脂質を含む食餌をラットに 2 週間摂取させ、血清脂質レベルの変動を観察し、さらに肝臓における脂質代謝関連遺伝子の発現変動を検討した(実験 II)。

【実験方法】

動物飼育

【実験 I】中鎖脂肪酸含有脂質の大量投与による影響

5週齢 Sprague Dawley 系雄ラット 12 匹(日本 SLC より購入)を 1 週間馴化した後、6 週齢になったラットを 3 群に分け、それぞれ低脂肪食(2.4%コーン油含, Low Fat)、長鎖脂肪酸含有高脂肪食

(24.7%コーン油含, LCT)あるいは、中鎖脂肪酸含有高脂肪食(2.4%コーン油+22.3% glyceryl trioctanoate 含, MCT)を2週間摂取させた。MCT食には必須脂肪酸欠乏を防ぐために最低限のコーン油を添加し、全脂質の割合がLCT食と同量になるようにした。食餌は一日の摂取エネルギーが各群間で同じになるように摂取量を調節し(pair-feeding)、その摂取量および体重を毎日測定した。各種食餌組成を表1に示す。

表1 食餌組成【実験Ⅰ】

(g/kg diet)	Low Fat	LCT	MCT
Vitamin-free casein	157	159	159
β-corn starch	526	36	36
FAT			
Corn oil	24	247	24
Glyceryl trioctanoate	-	-	223
AIN93 Mineral mix	28	28	28
AIN93 Vitamin mix	8	8	8
DL-Methionine	2.4	2.4	2.4
Choline bitartrate	1.6	1.6	1.6
Agar(2%)	253	518	518

【実験Ⅱ】中鎖脂肪酸およびアラキドン酸含有構造脂質投与による影響

6週齢SD系雄ラット20匹(日本SLCより購入)を4群に分け、それぞれ低脂肪食(2.4%コーン油含、Low Fat)、8P8食(5.3% 1,3-dioctanoyl-2-palmitoylglycerol)、88A食(5.7% 1,2-dioctanoyl-3-arachidonoylglycerol)または8A8食(5.7% 1,3-octanoyl-2-arachidonoylglycerol)を2週間摂取させた。すべての餌に必須脂肪酸欠乏にならないように最低限のコーン油を添加した。食餌は一日の摂取エネルギーが各群間で同じになるように摂取量を調節し(pair-feeding)、その摂取量および体重を毎日測定した。各種食餌組成を表2に示す。

表2 食餌組成【実験Ⅱ】

(g/kg diet)	Low Fat	8P8	88A	8A8
Vitamin-free casein	157	157	157	157
β-corn starch	526	412	403	403
FAT				
Corn oil	24	24	24	24
8P8	-	53	-	-
88A	-	-	57	-
8A8	-	-	-	57
AIN93 Mineral mix	28	28	28	28
AIN93 Vitamin mix	8	8	8	8
DL-Methionine	2.4	2.4	2.4	2.4
Choline bitartrate	1.6	1.6	1.6	1.6
Agar(2%)	253	314	319	319

各組織の採取と総 RNA の抽出

実験食摂取開始 2 週間後にラットを断頭・屠殺し(午前 10 時から 11 時の間)、採取した空腸を、氷冷したシエチルピロカーボネート処理した生理食塩水で灌流し内容物を除き、水分を除いた後、重量を測定した。また肝臓および各白色脂肪組織については組織全体の重量を測定した。更に Chomczynski らの方法[3]により、空腸中央部、肝臓、副睾丸脂肪組織それぞれ 100mg から総 RNA を抽出・調製し、遺伝子発現量測定に用いた。また断頭・屠殺時に血液を採取し、血清画分のトリグリセライド濃度および総コレステロール濃度については測定キント(それぞれトリクリセライト E-テストワコーおよび総コレステロール E-テストワコー)を用いて定量を行なった。

ノーザンブロット法による遺伝子発現解析

各組織より抽出した総 RNA (10 μ g または 30 μ g) を 2 Mホルムアルデヒド含 1%アガロースゲルにより電気泳動を行なった後、ナイロンメンブレン (Hybond N+, アマシャム) に一晚 20xSSC 緩衝液でトランスファーさせた。総 RNA をトランスファーしたメンブレンを 10%硫酸デキストランを含むハイブリダイゼーション溶液を用い 42°C で 2 時間プレハイブリタイスを行なった後、ランダムプライマー法で ³²P 標識した各 cDNA プローブを用い、更に 42°C で 16 時間以上ハイブリダイゼーションを行なった。ハイブリダイゼーション終了後、メンブレンを Washing 液 I (2x SSPE, 0.5%SDS) を用い 42°C で 10 分間 (2 回) インキュベートし、引き続き Washing 液 III (0.1x SSPE, 0.5%SDS) を用い 42°C で 15 分間 (1 回) インキュベートし、メンブレンの洗浄を行なった。洗浄したメンブレンをイメージングプレート (フシフィルム) に 1 日から 2 日間感光させ、メンブレン上の mRNA のシグナル強度をハイオイメージアナライザー STORM (モレキュラーダイナミクス) で解析した。

2step 逆転写-PCR(RT-PCR)法による遺伝子発現量の測定

ラット肝臓から抽出した総 RNA 1 μ g を用い、RT-PCR 法により各遺伝子発現量を解析した。逆転写反応には Omniscript RT Kit(QIAGEN)を用い、マニュアルにもとづき反応を行った。次いで逆転写反応後の試料 1 μ l と PCR 用酵素 Ex-Taq(タカラバイオ)を用い目的遺伝子の増幅を行った。表3には PCR 反応に用いた各遺伝子の特異的プライマーの配列を示した。PCR 反応は Gene Amp PCR System 9700(アプライトハイオシステム)を用いた。エチシウムブロマイトを含むアガロースゲル電気泳動を行った後、検出された増幅産物のシグナル強度を FluorImager S1 (Molecular Dynamics) により解析した。各目的遺伝子の発現量の定量化はコントロール遺伝子 18S rRNA で補正した値とした。

表3 RT-PCR反応に使用したプライマーの塩基配列

遺伝子名		プライマー配列 (5'→3')	cDNAサイズ(bp)
脂肪酸合成酵素 (FAS)	forward	CCCTGAGCAGAGATCCTGAG	586
	reverse	GCACACAGGGACCGAGTAAT	
アセチルCoAカルボキシラーゼ (ACC)	forward	AGGAGGGAAGGGAATCAGAA	514
	reverse	ATCACCCCAAGGAGATACCC	
アシルCoA合成酵素 (ACS)	forward	AACGATGTAGATGGCTTCC	536
	reverse	CTTCAGGTTCTGGAGGCTTG	
ジアンリグリセロールアシル転移酵素 (DGAT-2)	forward	TGCGAGTACCTGATGTCTG	543
	reverse	GCACCTCAGTATATGGAAGG	
アポリipoprotein B (apoB)	forward	GATGCAACTCGATTCAAGCA	566
	reverse	CCTTTGATGAGAGCCAGAGG	
18S rRNA	forward	CCGCAGCTAGGAATAATGGA	498
	reverse	AACTAAGAACGGCCATGCAC	

統計処理

得られたデータについて分散分析法を用いて検定を行い、これについて有意差が認められた場合は Tukey の多群検定を行った。危険率 5%以下のものは有意差とみなした。

【結果】

【実験 I】中鎖脂肪酸含有脂質の大量投与による影響

1 ラットの体重増加量および各組織重量への影響

長鎖脂肪酸(LCT)あるいは中鎖脂肪酸(MCT)を多く含む高脂肪食、または LCT からなる低脂肪(Low Fat)食で 2 週間飼育したラットの体重を解剖前に測定し、飼育期間での体重増加量を求めた(表 4)。食餌摂取量は pair-feeding を行い、各ラットの摂食量が同じになるようにした。その結果、Low Fat 群に比へ LCT 群では体重の増加が大きい傾向が見られたが、MCT 群では体重増加は LCT 群よりも有意に低値を示し、更に Low Fat 群と比べても低い傾向にあった。組織重量について測定したところ(表 4)、肝臓重量には各群間で大きな変化は見られなかった。各白色脂肪組織の相対重量は体重の増加量と同しく、LCT 群に比へ、MCT 群で有意に低値を示していた。なかでも腎周囲白色脂肪組織(RWAT)はその差が最も大きかった。

2 血清脂質への影響

各食餌で 2 週間飼育したラットを 5 時間絶食させた後に断頭して得られた血清を用い、血清総コレステロール(T-Chol)濃度およびトリグリセリド(TG)濃度を測定した(表 4)。その結果、血清 T-Chol 濃度は各群間で有意な差は見られなかったが、Low Fat 群に比へ LCT および MCT 群で低値を示す傾向にあった。一方血清 TG 濃度においては MCT 群で Low Fat 群、LCT 群に比へ 1.9 倍の高値を示した。

表4 ラット体重増加量、各組織重量および血清脂質濃度

	Low fat	LCT	MCT
Body weight(g) before feeding	174.8±3.5	180.3±1.0	178.8±3.3
after feeding	263.8±6.0	284.3±7.4	259.0±6.9
Body weight gain (g/14days)	95.5±3.9 ^{ab}	104.0±7.1 ^a	80.3±4.3 ^b
Diet intake (g/day)	25.9±1.0	27.1±0.5	25.5±0.5
Liver weight (g/100g body weight)	4.53±0.26	4.63±0.17	4.79±0.01
Epididymal adipose tissue weight(g/100g body weight)	1.20±0.12 ^{ab}	1.85±0.18 ^a	1.19±0.11 ^b
Mesentery adipose tissue weight(g/100g body weight)	1.21±0.07 ^a	1.57±0.07 ^b	1.15±0.04 ^a
Renal adipose tissue weight(g/100g body weight)	2.17±0.08 ^a	2.84±0.15 ^b	1.52±0.13 ^c
Serum triacylglycerol(mg/dl)	121.3±10.5 ^a	120.8±25.3 ^a	234.5±34.7 ^b
Serum total cholesterol(mg/dl)	71.1±6.4	50.4±4.5	54.4±4.2

表1に示した各食餌でラットを2週間飼育し、体重増加量および一日平均食餌摂取量を測定した。5時間の絶食後、断頭屠殺し全血を採取し、肝臓、副睾丸白色脂肪組織、腸間膜白色脂肪組織および腎周囲白色脂肪組織の各重量を測定した。解剖後、それぞれのラットから採取した血清のトリグリセリド濃度および総コレステロール濃度を測定した。結果は平均値±SEM(n=4)で表した。a,b 異なるアルファヘンツを持つ群間はp<0.05で有意差あり。

3 遺伝子発現レベルへの影響

1) ラット空腸における PPAR α および AOX mRNA の発現変動 各食餌で 2 週間飼育したラットの空腸におけるペルオキシソーム増殖剤活性化受容体(peroxisome proliferator activated receptor, PPAR) α mRNA 発現量は Low Fat 群に比べ LCT 群、MCT 群で共に有意な増大が見られた(図 1-A)。また脂肪酸 β 酸化系酵素であるアシル CoA オキシダーゼ(AOX)の mRNA 発現量も LF 群に比べ LCT 群および MCT 群で有意に増大した(図 1 B)。

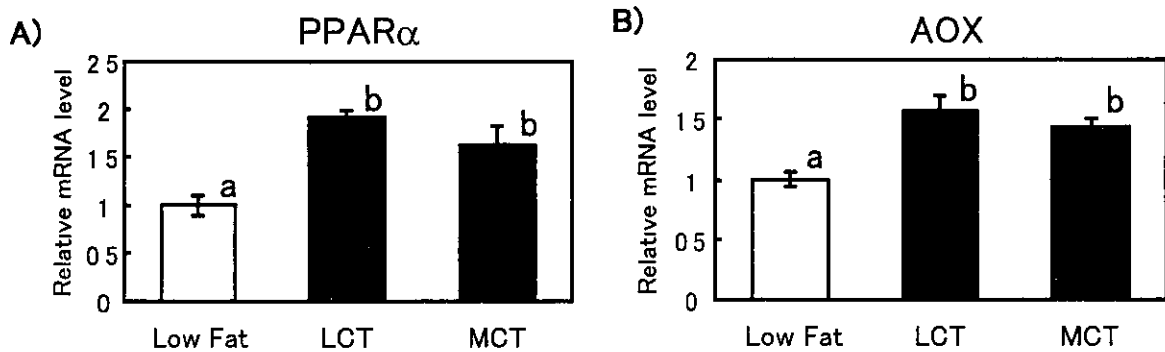


図1 長鎖脂肪(LCT)又は中鎖脂肪(MCT)の高脂肪食摂取によるラット空腸におけるPPAR α および AOX mRNAの発現変動 A) PPAR α mRNAはreal-time RT-PCR法で測定した。GAPDH mRNAを内部標準として補正した後、シグナルの濃さを比較することによってグラフ化した。B) AOX mRNA発現量は18S rRNAを内部標準として補正した後、シグナルの濃さを比較することによってグラフ化した。結果はいずれもLow Fat食群を1とした相対値で表し、平均値 \pm SEM(n=4)で示した。a,b 異なるアルファヘットを持つ群間はp<0.05で有意差あり(Tukeyの検定)。

2) ラット肝臓における脂質代謝関連遺伝子の発現変動

ラット肝臓における PPAR α mRNA 発現量は Low Fat 群に比べ、LCT および MCT 群のいずれにおいても増大する傾向が見られたか、特に LCT 群において顕著であった(図 2)。また、AOX mRNA 発現量も同様に Low Fat 群に比べ LCT 群で顕著に増大し、MCT 群でも増大傾向が見られた(図2)。

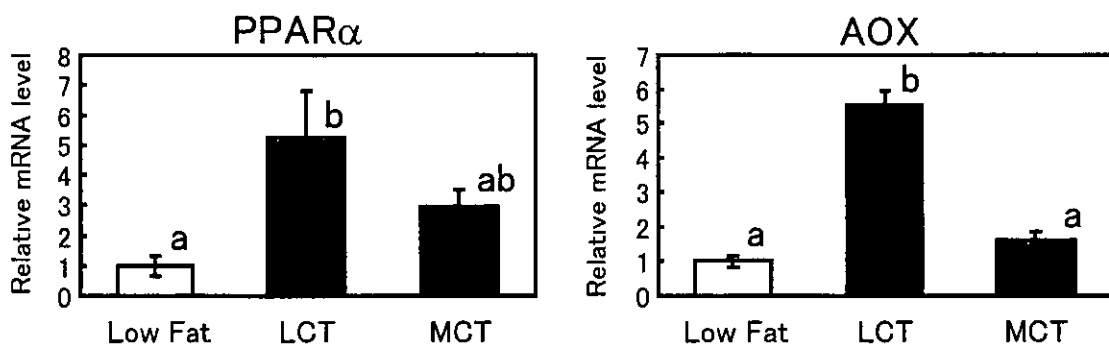


図2 長鎖脂肪(LCT)又は中鎖脂肪(MCT)の高脂肪食摂取によるラット肝臓における PPAR α および AOX mRNAの発現変動 各mRNA発現量は18S rRNAを内部標準として補正した後、シグナルの濃さを比較することによってグラフ化した。結果はいずれもLow Fat食群を1とした相対値で表し、平均値 \pm SEM(n=4)で示した。a,b 異なるアルファヘットを持つ群間はp<0.05で有意差あり(Tukeyの検定)。

一方、脂肪酸合成に関わる脂肪酸合成酵素(FAS)やアセチル CoA カルボキシラーゼ(ACC)の mRNA 発現量は Low Fat 群と比較して LCT 群では減少したのに対し、MCT 群ではほとんど変動は見られなかった(図3)。トリグリセリド(TG)合成に関わるアシル CoA シンセターゼ(ACS)やシアシルグリセロール アシルトランスフェラーゼ(DGAT)の mRNA 発現量においては MCT 群で増大傾向が見られた(図4)。また、肝臓で合成された TG が VLDL を形成し、血中へ放出されるのに関わるアポリポタンパク質 B(Apo B) mRNA 量は MCT 群で増大する傾向が見られた(図5)。同様に VLDL の形成に関与するミクロソームトリグリセリド 転送タンパク(MTP)mRNA 量は Low Fat 群に比べ LCT 群で5倍の顕著な増大を示し、MCT 群においても18倍の有意な増大を示した(図5)。

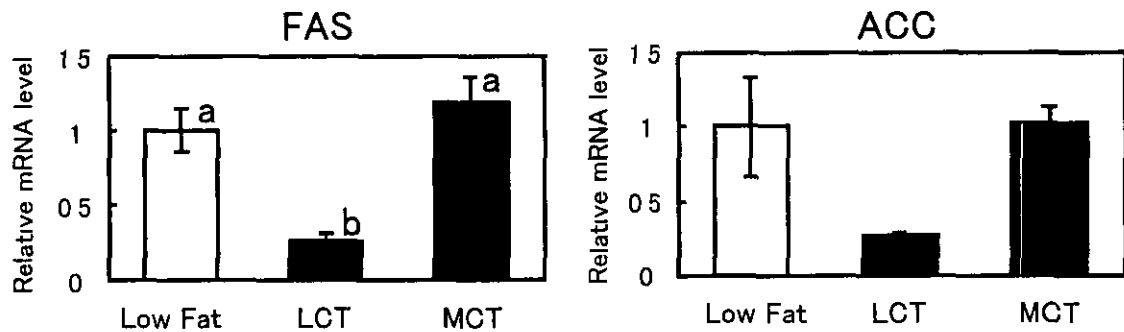


図3 長鎖脂肪(LCT)又は中鎖脂肪(MCT)の高脂肪食摂取によるラット肝臓における脂肪酸合成系遺伝子の発現変動 各mRNA発現量は18S rRNAを内部標準として補正した後、シグナルの濃さを比較することによってグラフ化した。結果はいずれもLow Fat食群を1とした相対値で表し、平均値±SEM(LF, MCT, n=4, LCT, n=3)で示した。a, b 異なるアルファヘントを持つ群間はp<0.05で有意差あり(Tukeyの検定)。

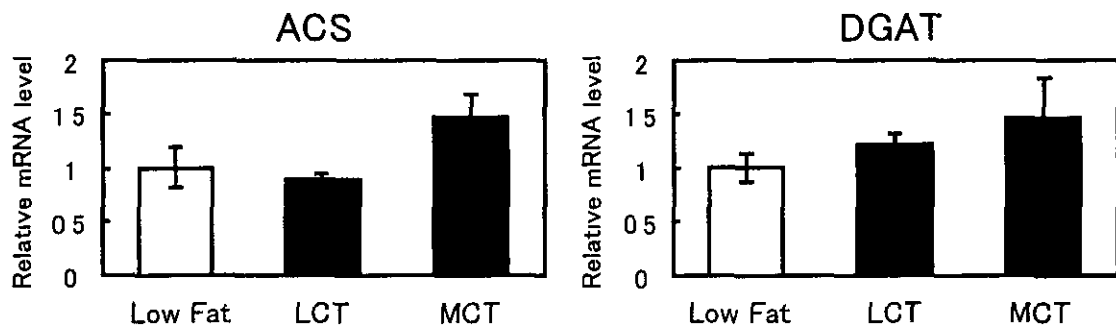


図4 長鎖脂肪(LCT)又は中鎖脂肪(MCT)の高脂肪食摂取によるラット肝臓におけるトリグリセリド合成系遺伝子の発現変動 各mRNA発現量は18S rRNAを内部標準として補正した後、シグナルの濃さを比較することによってグラフ化した。結果はいずれもLow Fat食群を1とした相対値で表し、平均値±SEM(LF, MCT, n=4, LCT, n=3)で示した。

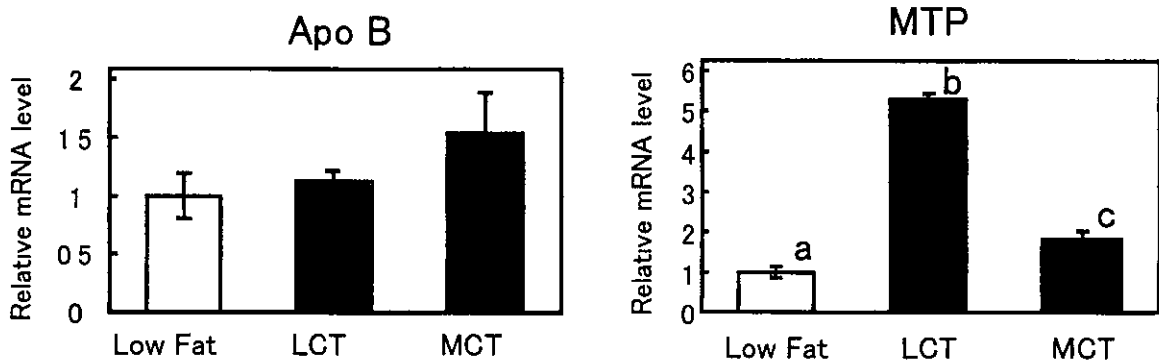


図5 長鎖脂肪(LCT)又は中鎖脂肪(MCT)の高脂肪食摂取によるラット肝臓におけるトリグリセリド輸送系遺伝子発現への影響 各 mRNA 発現量は 18S rRNA を内部標準として補正した後、シグナルの濃さを比較することによってグラフ化した。結果はいずれも Low Fat 食群を 1 とした相対値で表し、平均値 ± SEM (LF, MCT, n=4, LCT, n=3) で示した。a, b 異なるアルファベットを持つ群間は $p < 0.05$ で有意差あり (Tukey の検定)。

3) ラット白色脂肪組織における PPAR 遺伝子の発現変動

ラット副睪丸白色脂肪組織における PPAR δ mRNA の発現量は Low Fat 群に比へ LCT、MCT 群で約 2 倍に増大したが、PPAR γ mRNA 発現量に関してはほとんど変動は見られなかった (図 6-A)。一方、ラット腎周囲白色脂肪組織における PPAR δ mRNA の発現量は LCT 群で Low Fat 群に比へ約 3 倍、MCT 群においては約 5 倍の増大が見られた (図 6-B)。また PPAR γ mRNA 発現量は Low Fat 群に比べ LCT 群で有意に増大したか、MCT 群ではほとんど変動は見られなかった (図 6-B)。

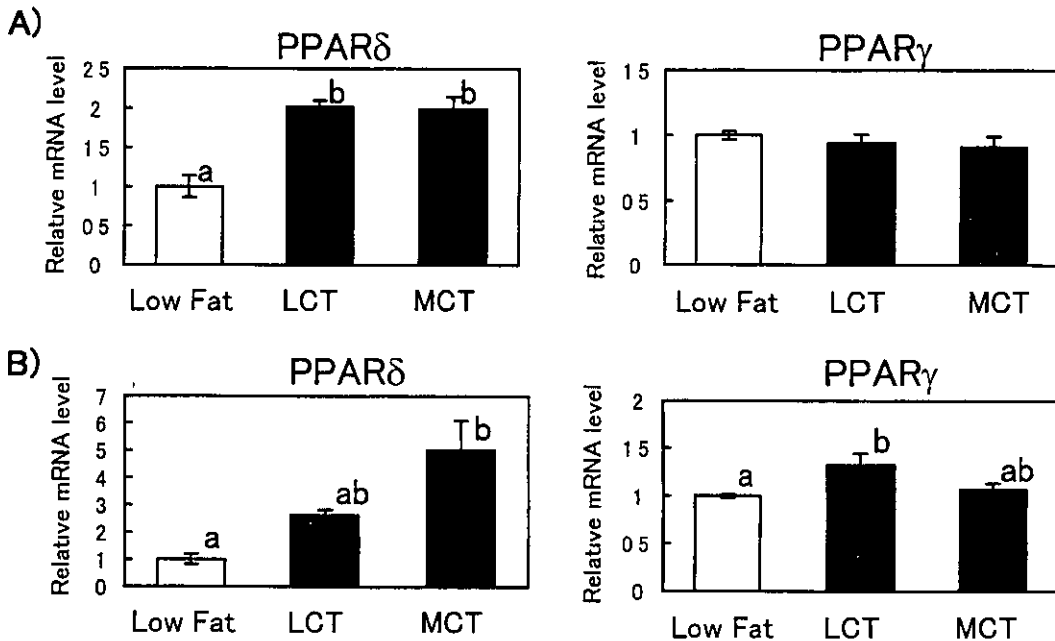


図6 長鎖脂肪(LCT)又は中鎖脂肪(MCT)の高脂肪食摂取によるラット副睪丸(A)および腎周囲白色脂肪組織(B)における PPAR δ および PPAR γ 遺伝子の発現変動 各 mRNA 発現量は 18S rRNA を内部標準として補正した後、シグナルの濃さを比較することによってグラフ化した。結果はいずれも Low Fat 食群を 1 とした相対値で表し、平均値 ± SEM (n=4) で示した。a, b 異なるアルファベットを持つ群間は $p < 0.05$ で有意差あり (Tukey の検定)。

【実験Ⅱ】アラキドン酸・中鎖脂肪酸含有構造脂質摂取による影響

1 ラットの体重 各組織重量への影響

中鎖脂肪酸とパルミチン酸(8P8)あるいは中鎖脂肪酸とアラキドン酸(88A、8A8)からなる構造脂質を含む食餌、または低脂肪(Low Fat)食で2週間ラトを飼育し、2週間の体重変動を測定したところ、各群間で大きな変化は見られなかった(表5)。組織重量においては肝臓重量に大きな差は見られなかった。白色脂肪組織重量はLow Fat群に比べ8P8群で高い傾向が見られたが、構造脂質摂取群間で比較すると、副睾丸白色脂肪組織および腎周囲白色脂肪組織においてはパルミチン酸を含む8P8群よりもアラキドン酸を含む群(88A および 8A8)の方が低い傾向が見られた。さらにどの白色脂肪組織においても、それらの重量は88A群に比べ8A8群の方が低い傾向が見られた(表5)。

2 血清脂質への影響

各食餌で2週間飼育したラトを5時間絶食させた後に断頭して得られた血清を用い、血清総コレステロール(T-Chol)濃度およびトリグリセライド(TG)濃度を測定した(表5)。血清 T-Chol 濃度はLow Fat群に比べ各種の構造脂質摂取により減少する傾向が見られた。血清 TG 濃度は8P8群でLow Fat群に比べ約2倍もの上昇が見られたが、アラキドン酸を含む構造脂質群ではその上昇を抑えられた。特に血清 TG 濃度の上昇を抑える効果はアラキドン酸を2位に持つ8A8群でより強く見られた。

表5 ラット体重増加量、各組織重量および血清脂質濃度

	Low fat	8P8	88A	8A8
Body weight(g) before feeding	213.0±1.9	214.6±2.5	214.4±3.0	213.0±1.9
after feeding	279.0±7.0	282.6±2.7	287.2±4.0	282.4±5.5
Body weight gain (g/14days)	64.8±5.8	66.6±2.7	71.0±4.0	69.6±4.3
Diet intake (g/day)	22.8±0.6	24.0±0.1	23.7±0.3	23.2±0.2
Liver weight (g/100g body weight)	3.88±0.26	4.03±0.19	4.29±0.14	4.08±0.18
Epididymal adipose tissue weight(g/100g body weight)	1.28±0.06	1.60±0.09	1.41±0.12	1.27±0.16
Mesentery adipose tissue weight(g/100g body weight)	1.04±0.08	1.18±0.06	1.32±0.09	1.07±0.08
Renal adipose tissue weight(g/100g body weight)	1.54±0.11	2.04±0.08	1.85±0.13	1.51±0.16
Serum triacylglycerol(mg/dl)	127.3±13.9 ^a	264.0±33.9 ^b	190.7±26.1 ^{ab}	136.3±18.9 ^a
Serum total cholesterol(mg/dl)	86.4±8.1	69.6±2.4	70.1±9.2	66.0±8.1

表2に示した各食餌でラトを2週間飼育し、体重増加量および一日平均食餌摂取量を測定した。5時間の絶食後、断頭屠殺し全血を採取し、肝臓、副睾丸白色脂肪組織、腸間膜白色脂肪組織および腎周囲白色脂肪組織の各重量を測定した。解剖後、それぞれのラトから採取した血清のトリグリセリド濃度および総コレステロール濃度を測定した。結果は平均値±SEM(n=5)で表した。a,b異なるアルファベットを持つ群間はp<0.05で有意差あり。

3 ラット肝臓における脂質代謝関連遺伝子発現変動への影響

ラット肝臓におけるPPAR α mRNA量はLow Fat群に比べ8P8および88A群ではほとんど変動が見られなかったが8A8群で増大する傾向が見られた(図7)。PPAR α の標的遺伝子であるAOX mRNA発現量は各群に差は見られなかった(図7)。脂肪酸合成酵素(FAS)やアセチルCoAカルボキシラーゼ(ACC)のmRNA発現量はLow Fat群に比べ8P8群では差がなかったが、アラキドン酸を含む構造脂質群では有意に減少した。さらに88Aおよび8A8群で有意な減少が見られ、その減少は特に8A8群で大きい傾向にあった(図8)。アシルCoAシンターゼ(ACS)のmRNA発現量はLF群に比べ、8P8群および88A群では差が見られなかったが、8A8群で減少する傾向が見られた(図9)。シアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼ(DGAT)のmRNA発現量においてはLow Fat群に比