

申請者	学科名	栄養学科	職名	准教授	氏名	田中 晃一
調査研究課題	野菜に含まれるシステイン誘導体をシステインスルホキシドに変換する乳酸菌の探索					
調査研究組織	氏名	所属・職		専門分野	役割分担	
	代表					
	分担者					
調査研究実績の概要	<p><b>【背景】</b></p> <p>ヒトの生命機能維持には5大栄養素（糖質、タンパク質、脂質、ビタミン、ミネラル）が必要であるが、最近「第6の栄養素」として食物繊維、「第7の栄養素」としてファイトケミカルが位置づけられるようになった。ファイトケミカルとは植物中に存在する天然の化学物質で、近年それらが有する抗酸化作用や抗菌作用などをヒトの健康維持・改善に役立てようとする食品機能性研究が盛んになっている。ポリフェノール、カテキン、イソフラボンなど、特定保健用食品として認定された商品の有効成分の大部分はファイトケミカルである。本研究課題において、私はファイトケミカル的一种であるシステインスルホキシドに注目した。システインスルホキシドは植物中に含まれるアミノ酸の一種であるシステイン誘導体が酸化されることにより生じ、糖尿病予防、血中コレステロール排出、疲労回復など、様々な健康維持・促進効果を示すことが明らかとなっている。そこで、システイン誘導体を酸化して野菜に含まれるシステインスルホキシドを増加させる働きを持つ乳酸菌を見いだすことができれば、野菜と一緒に摂取することで相乗的な健康増進効果をもたらすプロバイオティクスとして利用できるのではないかと考えた。</p>					

<p>調査研究実績 の概要</p>	<p><b>【研究実績】</b></p> <p>① <b>自然界からの野生乳酸菌の収集</b></p> <p>システイン誘導体を酸化する活性を有する乳酸菌を探索するため、樹木や草本、花、果実、土壌など、自然界より様々な分離源を採取して乳酸菌の集積培養をおこなった。不溶性の炭酸カルシウムを混合した白亜寒天培地で単一コロニー化し、菌体より分泌される乳酸により炭酸カルシウムが溶解することで、周辺にクリアゾーンが形成された乳酸菌コロニーを選別した。このようにして最終的に222株の野生乳酸菌株を収集した。</p> <p>② <b>メチオニン酸化活性を有する乳酸菌株のスクリーニング</b></p> <p>収集した野生乳酸菌株コレクションをもちいて、システイン誘導体を酸化する活性を有する乳酸菌をスクリーニングした。システイン誘導体と構造が類似する含硫アミノ酸であるメチオニンを含む溶液を、それぞれの乳酸菌菌体と混合して、休止菌体反応をおこなった。上清を薄層クロマトグラフィーにより解析し、メチオニンが酸化された結果生じるメチオニンスルホキッドが検出されるサンプルを探索した。その結果、強いメチオニン酸化活性を有する10株を選抜することができた。</p> <p>③ <b>メチオニン酸化活性を有する野生乳酸菌の菌種同定</b></p> <p>本研究課題で求める乳酸菌菌株はプロバイオティクスや機能性食品の製造に利用することを想定しているため、ヒトに対する病原性を持たず、摂取しても安全な菌種であることが望まれる。従って、選抜した10株の菌種の同定をおこなった。それぞれの菌株よりゲノムDNAを調製し、PCRにより16SリボソームDNA領域を増幅した。続いて、ダイレクトシーケンシングにより塩基配列を決定し、ゲノムデータベースに登録されている配列と相同性検索をおこなうことで菌種の同定を試みた。その結果、10株のうち6株は<i>Lactobacillus sakei</i>、4株は<i>Lactococcus lactis</i>であることが明らかとなった。これらはいずれも発酵食品の製造にもちいられており、食経験が豊富な安全性の高い菌種である。</p> <p>④ <b>メチオニン酸化メカニズムの解析</b></p> <p>次に、分離した乳酸菌が有するメチオニン酸化メカニズムについて検討を行った。好気条件下と嫌気条件下でメチオニン酸化活性を比較したところ、嫌気条件下では活性がほとんど検出されなかった。従って、空気中の酸素分子を要求する反応であることが示唆された。また、乳酸菌が生成した過酸化水素がメチオニンの酸化に関わる可能性について確かめるため、それぞれの菌株の休止菌体反応上清に含まれる過酸化水素濃度を定量したところ、<i>Lactococcus lactis</i>では高濃度の過酸化水素の蓄積が見いだされたのに対し、<i>Lactobacillus sakei</i>からはほとんど過酸化水素が検出されなかった。これらの結果より、今回分離した2種の乳酸菌株は、それぞれ異なるメカニズムでメチオニンの酸化をおこなっている可能性が示唆された。</p>
<p>成果資料目録</p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. A silkworm infection model to study the <i>Vibrio vulnificus</i> virulence genes Mai Yamamoto, Takashige Kashimoto, Yukihiro Yoshimura, Nao Tachibana, Shiho Kuroda, Yoshiko Miki, Sou Kitabayashi, Ping Tong, Jianbo Xiao, <u>Koichi Tanaka*</u>, Hiroshi Hamamoto, Kazuhisa Sekimizu, Koichiro Yamamoto * Corresponding author Molecular Medicine Reports, 2016, 14 (5), 4243-4247. (2016)</li> <li>2. バイオミディア「切れないハサミも使いよう」 <u>田中晃一</u> 日本生物工学会誌、第94巻、6号、345 (2016)</li> </ol>