

## Short Report

## セロビオース構造を含む新規分岐オリゴ糖の酵素合成とその腸内細菌叢改善

## 効果の検討

志村洋一郎, 石山美穂, 加藤朋子, 田村佳奈, 水野善則, 安達隆史, 阿部友美, 福島淳, 稲元民夫

秋田県立大学生物資源科学部応用生物科学科

腸内容物から作られるヒナのサルモネラ感染防御用生菌剤 (CE 剤) の改良を目指して, 食物繊維 (セルロース) の部分構造であるセロビオース構造をもつ分岐オリゴ糖の腸内細菌叢改善効果について, CE 剤をモデル腸内細菌叢としその添加効果を検討した. オリゴ糖は酵素的な糖転移反応で合成し, 液体クロマトグラフィにて 3 つの生成物を分取した. 生成物の MS および  $^1\text{H-NMR}$  スペクトルを測定しセロビオース構造の保持を確認した. それらの混合物を終濃度 1% となるようにモデル腸内細菌叢へ添加培養し, 経時的にサンプリングし 16S リボソーム RNA 遺伝子を用いた変性剤濃度勾配ゲル電気泳動 (DGGE) にてその変化を解析した. DGGE 解析において, セロビオース転移物添加培養で *Lactobacillus* 属菌と *Enterococcus* 属菌のバンド強度が無添加培養と比べ増加した. パノース添加培養とセロビオースおよびパノース添加培養で *Enterococcus* 属菌のバンド強度が増したが, それ以外でのバンド強度の変化は顕著ではなかった. セロビオース構造をもつ分岐オリゴ糖添加は CE 剤の細菌叢改良への有用性を示唆した.

キーワード: オリゴ糖, 腸内細菌叢, プレバイオティクス, プロバイオティクス, アミラーゼ, 糖転移反応

鶏肉・鶏卵による食中毒の起因菌は, サルモネラが主であったが, 生育環境や加工・流通における衛生状態の改善により我が国では 1999 年以降減少傾向にあり, カンピロバクター食中毒が主に

なっている (図 1). しかし, サルモネラ食中毒は毎年のように死者を出す重篤な疾患なため, このコントロールは重要である. 特に発展途上国では予断を許さない状況であり, 世界保健機関 (WHO) と国連の農業食糧機関 (FAO) は薬剤耐性菌発生抑制のために抗菌剤の使用ではなく, 生菌剤と他の方法の併用を推奨している (2009). Nurmi と Rantala (1973) は成鶏の腸内細菌叢をヒナに与えサルモネラ感染が低下する事を見だし, 腸内細菌叢によるサルモネラ排除効果は「Competitive Exclusion (CE, 競合的排除)」効果によるものとした. この生菌剤を CE 剤と呼び, 現在産卵鶏にも適用されている. 稲元らは食中毒起因菌の変化に伴う対策として CE 剤の強化・改良に取り組んできた (Shimura ら, 2015).

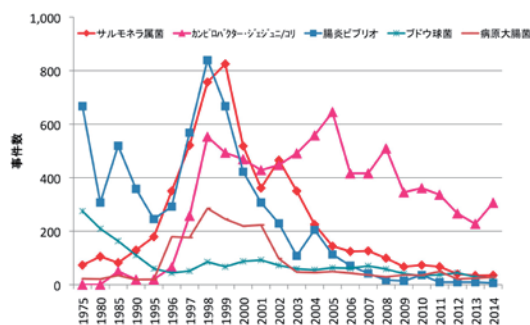


図1 細菌性食中毒発生件数の年次推移

厚生労働省統計データ ([http://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou\\_inyou/shokuhin/syokuchu/04.html#j4-2](http://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou_inyou/shokuhin/syokuchu/04.html#j4-2)) より改変

一方で、著者らは *Thermoactinomyces vulgaris* R-47 から遺伝子クローニングされたアミラーゼ (TVA II) の反応速度論的解析やその立体構造解析から基質認識機構の解明に取り組んできた (Tonozuka ら, 1995; Shimra ら, 1998; Kamitori ら, 1999; Shimura ら, 1999; Ichikawa ら, 2000; Ohtaki ら, 2001; Yokota ら, 2001; Mizuno ら, 2005). TVA II は、プルランを水解し三糖パノースを生成する酵素で、反応系にグルコースや糖アルコールなどが存在するとパノシル基を転移し新規オリゴ糖を生成する特徴を持つ (図 2; Tonozuka ら, 1994; Shimura ら, 2011). パノースは  $\alpha$ 1-6 結合と  $\alpha$ 1-4 結合をもつ分岐オリゴ糖の一つであり、ヒト消化管内の酵素では分解さ

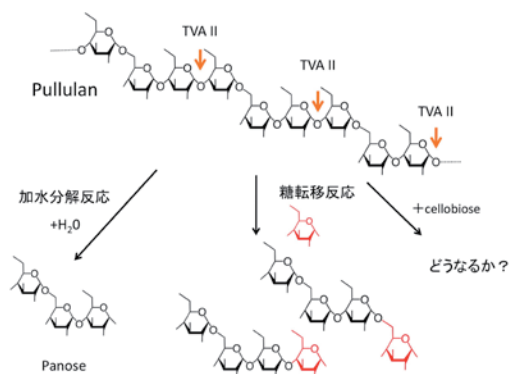


図2 TVA IIのプルランに対する反応様式

れにくく腸管下部にまで到達する.そのため、糖転移反応により生じた分岐オリゴ糖も下部消化管に到達する可能性があり、鶏盲腸内容培養物である CE 剤の改良にオリゴ糖が利用できるものと考えた.そこで、本研究では食物繊維 (セルロース) の構成糖であるセロビオースを糖転移反応の受容体とした新規オリゴ糖を酵素合成し、それにより生じたオリゴ糖を添加培養し生菌剤内の菌叢に与える影響を検討した.

## 材料と方法

### 糖転移反応とオリゴ糖精製

糖転移反応は 5%プルランと 5%セロビオースとを含む基質液 300 mlに、プルラン分解活性として 0.5 単位/mlになるように精製酵素を添加して反応を開

始し、40°Cで 72 時間反応した. 反応液を分取用液体クロマトグラフィに供しオリゴ糖を分取した. オリゴ糖の構造は、ESI-MS 装置 Exactive (ThermoSCIENTIFIC) で分子量 (MS) を、JMN-ECP-400 (JEOL) で <sup>1</sup>H-NMR スペクトルを測定し確認した.

### 腸内細菌叢へのオリゴ糖添加実験

市販 SPF 鶏盲腸内容培養物をモデル腸内細菌叢として、終濃度 1%となるようにオリゴ糖を添加し 37°Cで経時的にサンプリングしながら 72 時間まで静置培養した. なお、セロビオースおよびパノース添加、パノース添加、セロビオース添加、グルコース添加、および無添加培養も行った.

分取した培養液から全 DNA を抽出後、Myzer らの方法 (1993) に従い、細菌の 16S rRNA 遺伝子を PCR 法で部分増幅し、変性剤濃度勾配ゲル電気泳動 (DGGE) 法により菌叢の変化を確認した.

## 結果と考察

プルラン分解性アミラーゼの糖転移反応で、セロビオース構造をもつ分岐オリゴ糖を合成した. 反応液を分取用液体クロマトグラフィに供し、糖転移生成物と考えられる 3 つのピークが確認された (図 3). いずれも MS にて  $m/z$  827 [M-H]<sup>-</sup>が、また <sup>1</sup>H-NMR にて  $\beta$ 1-4 結合のシグナルが観測され、セロビオース構造を保持する五糖である事が確認された. TVA II

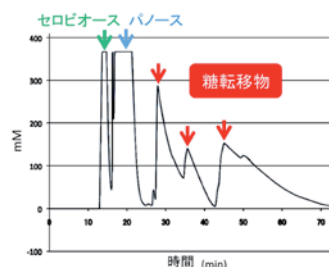


図3 分取用HPLCでの溶出パターン

カラム、Mightysil RP18 GP Aquo (φ20×250mm、関東化学); 移動相、MilliQ水; 流速、4ml/min; 示差屈折検出器 (Hitach L-7490) を使用.

は、グルコースを糖転移反応の受容体とした場合、その C4 位あるいは C6 位に三糖のパノシル基を転移し四糖を生成することから (Tonozuka ら, 1994),

セロビオースの C6 位, C10 位, および C12 位が新たな結合に関わっていることが推察された。

個別成分の精製量が十分ではなかったため 3 成分の混合物について, モデル腸内細菌叢への添加実験を行なった。変化の顕著であった 48 時間目のサンプルについて PCR-DGGE による菌叢解析の結果を示す (図 4)。セロビオース転移物添加培養では, *Lactobacillus* sp. と *Enterococcus* sp. に相当するバンド強度が高くなり, 菌数増加が推定された。また, セロビオースおよびパノース添加あるいはパノース添加培養において, *Streptococcus* sp. に相当するバンドの強度が濃くなったが, バンド位置が異なり, 異なる種であると推測された。

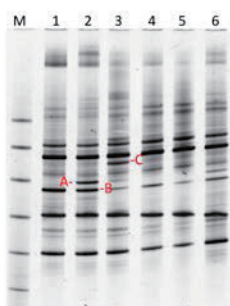


図4 PCR-DGGEによるオリゴ糖添加培養液の菌叢解析

レーン1. セロビオース+パノース混合液添加培養; レーン2. セロビオース転移物添加培養; レーン3. パノース添加培養; レーン4. グルコース添加培養; レーン5. セロビオース添加培養; レーン6. 無添加培養。いずれも48時間目の培養液を使用。菌の添加濃度は終濃度1%。シーケンス結果: バンドA. *Lactobacillus* sp.; バンドB. *Enterococcus* sp.; バンドC. *Enterococcus* sp. ゲル条件: 変性剤濃度勾配30%~50%, 8%アクリルアミドゲル; 泳動条件: 130V, 5時間, 60°C。

構成菌不明な成鶏盲腸内容物などから CE 剤を調製する際に, 本研究で合成した様なオリゴ糖の添加培養は乳酸菌数の増加に繋がり, CE 剤の改良や強化になる可能性がある。市販 CE 剤や鶏腸内細菌由来の分離菌による病原性大腸菌やカンピロバクターの腸管定着抑制効果や *Clostridium perfringens* 排除効果が報告されており (Ahoら, 1992; Schoeni と Doyle, 1992; Hofacre ら, 1998), このような CE 剤の強化や改良は排除対象病原菌の範囲を広げるかもしれない。平飼いの必要な比内地鶏などの地鶏生産に *Lactobacillus* や *Enterococcus* のような乳酸菌を強化した CE 剤を使用することは病原菌感染予防に繋がる可能性もある。

本研究は, 酵素的にセロビオース構造をもつ分岐オリゴ糖を合成し, CE 剤として用いる鶏盲腸内容培養物をモデル腸内細菌叢としてそのオリゴ糖添加培

養を行い, PCR-DGGE 法にて菌叢の面から効果を検討した。セロビオース転移物添加培養において, *Lactobacillus* sp. と *Enterococcus* sp. のバンド強度の増加が観察されたことから, 生菌 (CE) 剤中の菌叢の改善に寄与することが示唆された。

## 謝辞

本研究は, 科学研究費 (若手 B, 18780076) および秋田県立大学学長プロジェクト若手・スタートアップ研究費の資金援助を受け行われた。モデル腸内細菌叢は (株) 科学飼料研究所から分与を受けた。この場をお借りして感謝を申し上げます。分取用液体クロマトグラフィ装置を貸与いただいた王敬銘准教授に感謝致します。<sup>1</sup>H-NMR および MS 測定に秋田県立大学生物資源科学部共通機器委員会に多大な協力をいただいた。また, DNA 配列解析に秋田県立大学バイオテクノロジーセンターにご協力をいただいた。御礼申し上げます。

## 文献

- Aho, M., Nuotio, L., Nurmi, E., & Kiiskinen, T. (1992). Competitive exclusion of campylobacters from poultry with K-bacteria and Broilact. *International Journal of Food Microbiology*, 15, 265-275.
- Ichikawa, K., Tonozuka, T., Yokota, T., Shimura, Y., & Sakano, T. (2000). Analysis of catalytic residues of *Thermoactinomyces vulgare* R-47  $\alpha$ -amylase II (TVA II) by site-directed mutagenesis. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 64, 2692-2695.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations and the World Health Organization. (2009). *Salmonella and Campylobacter in chicken meat. Microbiological risk assessment series 19*. ISBN1726-5274.
- Kamitori, S., Kondo, S., Okuyama, K., Yokota, T., Shimura, Y., Tonozuka, T., & Sakano, Y. (1999). Crystal structure of *Thermoactinomyces vulgare*

- R-47  $\alpha$ -amylase II (TVA II) hydrolyzing cyclodextrins and pullulan at 2.6 Å resolution. *Journal of Molecular Biology*, 287, 907-921.
- Hofacre, C.L., Froyman, R., Gautrias, B., George, B., Goodwin, M.A., & Brown, J. (1998) Use of Aviguard and other intestinal bioproducts in experimental *Clostridium perfringens*-associated necrotizing enteritis in broiler chickens. *Avian Diseases*, 42, 579-584.
- Mizuno, M., Ichikawa, K., Tonzuka, T., Ohtaki, A., Shimura, Y., Kamitori, S., Nishikawa, A., & Sakano, Y. (2005). Mutagenesis and structural analysis of *Thermoactinomyces vulgaris* R-47  $\alpha$ -amylase II (TVA II). *Journal of Applied Glycoscience*, 52, 225-231.
- Muyzer, G., De Waal, E.C., & Uitterlinden, A.G. (1993). Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 59, 695-700.
- Nurmi, E. & Rantala, M. (1973). New aspects of Salmonella infection in broiler production. *Nature*, 241, 210-211.
- Otaki, A., Kondo, S., Shimura, Y., Tonzuka, T., Sakano, Y., & Kamitori, S. (2001). Role of Phe286 in the recognition mechanism of cyclomaltooligosaccharides (cyclodextrins) by *Thermoactinomyces vulgaris* R-47 alpha-amylase 2 (TVA II); X-ray structures of the mutant TVA IIs, F286A and F286Y, and kinetic analysis of the Phe286-replaced mutant TVA IIs. *Carbohydrate Research*, 334, 309-313.
- Shimura Y., Oh, K., Kon, M., Yamamoto, E., Mizuno, Y., Adachi, T., Abe, T., Tamogami, S., Fukushima, J., Inamoto, T., & Tonzuka, T. (2011). Enzymatic synthesis of novel branched sugar alcohols mediated by the transglycosylation reaction of pullulan-hydrolyzing amylase II (TVA II) cloned from *Thermoactinomyces vulgaris* R-47. *Carbohydrate Research*, 346, 1842-1847
- Shimura, Y., Shoji, N., Tanikawa, T., Obayashi, T., Honda, J., Tanaka, M., Sasaki, Y., Fukushima, J., & Inamoto, T. (2015) Nurmi-type culture prepared using culture media without L-cysteine enhance *Salmonella* exclusion in hatched layer chicks. *Journal of Poultry Science*. submitting.
- Shimura, Y., Tonzuka, T., & Sakano, Y. (1998). The action of two  $\alpha$ -amylase, TVA I and TVA II, from *Thermoactinomyces vulgaris* R-47 on glucosyl cyclodextrin. *Journal of Applied Glycoscience (Oyo Toshitsu Kagaku)*, 45, 393-395
- Shimura, Y., Wang, Q., & Sakano, Y. (1999). Subsite structure of  $\alpha$ -amylase II (TVA II) from *Thermoactinomyces vulgaris* R-47. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 63, 2199-2201.
- Shoeni, J.L. & Doyle, M.P. (1992) Reduction of *Campylobacter jejuni* colonization of chicks by cecum-colonizing bacteria producing anti-*C. jejuni* metabolites. *Applied and Environmental Microbiology*, 58, 664-670.
- Tonzuka, T., Sakai, H., Ohta, T., & Sakano, Y. (1994) *Carbohydrate Research*, 261, 157-162.
- Tonzuka, T., Mogi, S., Shimura, Y., Ibuka, A., Sakai, S., Matsuzawa, H., Sakano, Y., & Ohta T. (1995). Comparison of primary structures and substrate specificities of two pullulan-hydrolyzing  $\alpha$ -amylase. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1252, 35-42.
- Yokota, T., Tonzuka, T., Shimura, Y., Ichikawa, K., Kamitori, S., & Sakano, Y. (2001). Structures of *Thermoactinomyces vulgaris* R-47  $\alpha$ -amylase II complexed with substrate analogues. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 65, 619-626.

〔平成 27 年 6 月 30 日受付〕  
〔平成 27 年 7 月 31 日受理〕

## Enzymatic Synthesis of Novel Branched Oligosaccharides with Cellobiosyl Unit and Probiotic Effect of the Products for Enterobacterial Flora

Yoichiro Shimura, Miho Ishiyama, Tomoko Kato, Kana Tamura, Yoshinori Mizuno, Takashi Adachi, Tomomi Abe, Jun Fukushima, Tamio Inamoto

*Department of Biotechnology, Faculty of Bioresource Sciences, Akita Prefectural University*

To improve of competitive exclusion (CE) agent, which made from gastrointestinal contents of specific pathogen free chicken and is prophylactic used with *Salmonella* infection of chick, we estimated the efficacy of a novel oligosaccharide with cellobiosyl unit used CE agent as a model enterobacterial flora. A novel oligosaccharide was made by an enzymatic transglycosylation reaction, and three transfer products were fractioned by preparative high performance liquid chromatography. Cellobiosyl unit signals were detected in the products by mass and nuclear magnetic resonance spectrum. The mixture of three transfer products was added a culture with enterobacterial flora to be final concentration of 1% (v/v), reaction mixture was fractioned periodically, and bacterial flora of the culture was analyzed by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) using PCR amplicon of partial 16S rRNA gene. In the culture added cellobiose transfer products, intensities of two bands corresponding *Lactobacillus* and *Enterococcus* spp. were increased more than control. In the culture added to panose or both cellobiose and panose, intensity of the band corresponding *Enterococcus* spp. was increased. The addition of oligosaccharides with cellobiosyl unit to CE agent would contribution to improve the efficiency of the agent via changing of lactic acid bacteria number.

**Keywords:** oligosaccharides, intestinal bacterial flora, prebiotics, probiotics, amylase, transglycosylation reaction