

乳酸菌由来抗酸化物質の同定と高酸化活性株の選抜

山本 裕司
(北里大学 獣医学部)

研究の目的

酸素は呼吸代謝における良質な電子の受容体であるが、活性酸素に由来する毒性を示す危険な存在でもある。酸素から発生するスーパーオキシド、過酸化水素、ヒドロキシラジカルといった活性酸素種は、その反応性の高さ故に DNA、蛋白質、脂質といった様々な生体分子を酸化する。このため、ヒトをはじめとする高等生物は活性酸素に対する防御機構を発達させてきた。しかしながら、癌や炎症、循環器系疾患などの酸素ストレスが関与するとされる様々な疾患を予防し、健康的な生活を営むためには、食品などからポリフェノール、ビタミン、カロテンなどの抗酸化物質を摂取することが望ましいと考えられている¹⁾。

乳酸菌は、糖源の 50%以上を乳酸に変換する菌の総称であるが、人や動物に様々な有益な生理作用をもたらす微生物として長年に渡って研究が行われている。乳酸菌には、感染防御作用、免疫賦活作用、整腸作用などの様々な生理作用が報告されており、近年は、酸素ストレスが関与するとされる疾患モデルの病態を改善させる効果も報告されている^{2,3)}。このような報告は、乳酸菌が酸化作用を持つ可能性を示唆している。これまでに乳酸菌では、マンガン SOD や NADH ペルオキシダーゼをはじめとする幾つかの酸化蛋白質が報告されている。我々は、乳酸菌の新たな酸化蛋白質として、鉄結合蛋白質である Dpr 分子を見出したが⁴⁾、その研究の過程で乳酸菌の菌体破砕液に低分子のフェントン反応阻害活性が存在することを見出した。乳酸菌を含めバクテリアでは、蛋白質性の酸化因子は多数報告されているものの、グルタチオン以外の低分子の酸化物質の報告例はきわめて少ない。もし、乳酸菌由来の低分子の酸化物質を同定することができれば、新たな酸化物質の素材として食品などの幅広い分野で利用されることが期待される。そこで、本研究では、乳酸菌由来酸化物質の同定を目指し、まず始めに研究室保存の乳酸菌 100 株から酸化能の高い株を選抜し、その活性物質の諸性質について検討することを目的とした。

方法

TBARS 法による酸化活性の測定には、64 mM NaCl と 4 mM deoxyribose を含む 10 mM MOPS 緩衝液 (pH 7.0) 0.3 ml に、乳酸菌の菌体破砕液を終濃度 10 μ g/ml で添加した後、この混合液に過酸化水素および硫酸アンモニウム第一鉄をそれぞれ終濃度 100 および 10 μ M となるよう添加することで反応を開始した。15 分間 37°C で加温後、1 % TBA 溶液と 2.8 % TCA 溶液を 0.25 ml ずつ添加し、10 分間煮沸した。反応液を冷却したのち、励起光 532 nm 蛍光 553 nm で蛍光の測定を行った。

ORAC 法の測定方法は Gillespie らの方法に従った⁵⁾。測定試料には乳酸菌の菌体破砕液を用い、標準酸化物質である Trolox で作成した検量線から、酸化活性を Trolox

表1. TBARS法によって選抜した抗酸化活性の高い乳酸菌上位10株

Strain	Inhibition(%)
<i>Lactobacillus sakei</i> PP6-S	69.5
<i>Lactobacillus casei</i> JCM8129	64.7
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> PP9-1	61.3
<i>Pediococcus pentosaceus</i> JCM5890	60.7
<i>Lactobacillus paraplantarum</i> PP7-4	60.2
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> HS86-1	59.1
<i>Lactobacillus sakei</i> PP2-2	56.3
<i>Lactobacillus casei</i> JCM1134	55.2
<i>Lactobacillus plantarum</i> PP7-3	53.6
<i>Leuconostoc lactis</i> HS32-1	51.4

表2. ORAC法によって選抜した抗酸化活性の高い乳酸菌上位10株

Strain	μmol TE/g total protein
<i>Lactobacillus casei</i> JCM20024	572
<i>Lactobacillus sakei</i> PP4-S	566
<i>Lactobacillus plantarum</i> HS47-1	469
<i>Lactobacillus plantarum</i> JCM1149	466
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> ATCC53103	457
<i>Lactobacillus plantarum</i> HS66-1	422
<i>Lactobacillus paracasei</i> JCM2769	412
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> PP9-1	394
<i>Lactobacillus casei</i> JCM1134	394
<i>Lactobacillus sakei</i> PP4-1	392

換算で算出した。ORAC 値は、菌体破碎液総蛋白質あたりの Trolox 換算値で記載した。

結果

乳酸菌の抗酸化活性の測定には、フェントン反応の阻害活性やヒドロキシラジカルの消去活性を測定する TBARS 法と、米国農務省 (USDA) において食品の抗酸化活性の指標として用いられている ORAC 法の2つを用いた⁵⁾。研究室保存の乳酸菌 100 株を対象として、TBARS 法によって乳酸菌菌体破碎液の抗酸化活性を測定した結果、全ての株で活性が検出され、ヒドロキシラジカル生成阻害率は 9.5~69.5% となった。活性の高かった 10 株を表 1 に記載したが、多くは *Lactobacillus* 属の乳酸菌であり、魚の発酵食品から分離した *Lactobacillus sakei* PP6-S 株がもっとも高い活性を示した。

ORAC 法では、72 株の抗酸化活性を測定し、ORAC 値として 82.5~572.2 μmol TE/g total protein の値が得られた。活性の高かった 10 株を表 2 に記載したが、*Leuconostoc mesenteroides* PP9-1 株を除いて、全ての株は *Lactobacillus* 属の乳酸菌であった。

次に、TBARS 法と ORAC 法で得られた抗酸化活性の高い株を対象として、活性の諸性質について検討した。限外濾過膜で乳酸菌の菌体破碎液を 10 kDa 以上と以下に分画したところ、いずれのアッセイ法でも低分子画分に活性の 32~77% が回収された。また TBARS 法で検出された活性は 100°C の熱処理やプロテアーゼ処理に耐性であった。ORAC 法による活性も比較的高い熱安定性を示した。プロテアーゼ処理では、ORAC 値が約 2.8 倍増加したので、菌体蛋白質の分解産物であるペプチドなども活性を示すと考えられた。

結論

本研究では、研究室保存の乳酸菌 100 株を対象として、抗酸化活性の測定と抗酸化能の高い株の選抜を行った。抗酸化活性の測定には、TBARS 法と ORAC 法の2つの手法を用いたが、いずれの方法においても全ての株で抗酸化活性を検出することができた。抗酸化活性の高い株としては、TBARS 法では *Lactobacillus sakei* PP6-S 株が、ORAC 法では、*Lactobacillus casei* JCM20024 株が選抜された。抗酸化活性の諸性質について検討した結果、選抜された2株については低分子画分にも活性が存在することが明らかとな

った。今後本研究で得られた株を用い、活性物質の単離・同定を進めることで、乳酸菌由来の新規抗酸化物質の発見に繋がると期待される。

参考文献

- 1) Huang, D., B. Ou & R. L. Prior. (2005) The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J Agric. Food. Chem.* **53**: 1841-1856.
- 2) Ito, M., K. Ohishi, Y. Yoshida, T. Okumura, T. Sato, W. Yokoi & H. Sawada. (2008) Preventive effect of *Streptococcus thermophilus* YIT 2001 on dextran sulfate sodium-induced colitis in mice. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **72**: 2543-2547.
- 3) Forsyth, C. B., A. Farhadi, S. M. Jakate, Y. Tang, M. Shaikh & A. Keshavarzian. (2009) *Lactobacillus* GG treatment ameliorates alcohol-induced intestinal oxidative stress, gut leakiness, and liver injury in a rat model of alcoholic steatohepatitis. *Alcohol* **43**: 163-172.
- 4) Yamamoto, Y., L. B. Poole, R. R. Hantgan & Y. Kamio. (2002) An iron-binding protein, Dpr, from *Streptococcus mutans* prevents iron-dependent hydroxyl radical formation in vitro. *J Bacteriol.* **184**: 2931-2939.
- 5) Gillespie, K. M., J. M. Chae & E. A. Ainsworth. (2007) Rapid measurement of total antioxidant capacity in plants. *Nat. Protoc.* **2**: 867-870.