

総 説

津田かぶ由来乳酸菌 (*Lactobacillus brevis* 119-2) の コレステロール低下効果

Cholesterol-lowering effect of *Lactobacillus brevis* 119-2 isolated from Tsuda Kabu

渡部 忍*

動脈硬化症は、癌に次ぐ第二の国民病と言われ大きな問題になっている。本報では、地域に根差した新たな機能性食品開発を目的に、島根県の特産品「津田かぶ」から分離したγアミノ酪酸 (GABA) 高生産性乳酸菌 (*Lactobacillus brevis* 119-2) の動脈硬化予防の可能性について解説する。*Lactobacillus brevis* 119-2は、人工消化液に耐性を示し、ヒト腸管上皮細胞への付着性が確認された。*In vitro*で菌体への能動的コレステロールの吸着を示し、*In vivo*では、*Lactobacillus brevis* 119-2を経口投与したコレステロール負荷ラットの血中総コレステロール及びLDLコレステロールの低下、LH比 (LDLコレステロール値/HDLコレステロール値の比) の改善が認められ、肝臓の遺伝子発現解析の結果、コレステロール合成律速酵素HMG-CoA reductaseの発現に関与する遺伝子発現変動、LDLコレステロール輸送に関わるLDLリセプター遺伝子の発現上昇、胆汁酸合成経路の律速酵素遺伝子の発現上昇が確認された。

津田かぶ由来GABA高生産性乳酸菌 (*Lactobacillus brevis* 119-2) は、食事と共に摂取することで、生きて腸まで届き、食事由来のコレステロールの一部を腸管上皮上に能動的に吸着し腸管吸収を阻害するとともに、肝臓のコレステロール恒常性に関連する遺伝子の発現に影響を及ぼすことで、血中総コレステロール及びLDLコレステロールの低下を示したものと推察された。GABAによる血圧上昇抑制効果に加え、血中コレステロール低下効果により、動脈硬化を予防する機能性食品素材として有望な乳酸菌である可能性が示唆された。

1. はじめに

乳酸菌は古くから酒、醤油、味噌、チーズ、漬物などの発酵食品に利用されてきたが、1900年にMetchnikoffにより「ヨーグルト長寿説」が提唱されて以来、保健効果に関する研究が盛んにおこなわれてきた (乳酸菌研究集談会, 2003)。近年は、免疫賦活作用¹⁾、整腸作用²⁾、肝臓疾患予防効果³⁾など様々な機能が報告されている。こうした機能を利用した健康食品の開発も盛んにおこなわれ、特定保健用食品の市場調査 (2009年度調査 厚生労働省) によると乳酸菌関連の市場は約3000億円で特定保健用食品の半分以上を占めているとしている。

一方、動脈硬化 (粥状動脈硬化) は、低密度リポ蛋白質 (LDL) が血管内皮下に蓄積し、隆起 (プラーク) が発生した状態で、発生した臓器によって脳梗塞、心筋梗塞などの症状の原因になるとされる⁴⁾。また、脂質異常症、糖尿病、高血圧などの危険因子が集積した状態をメタボリック症候群といい、動脈硬化の発生リスクを相乗的に高めるとされる。メタボリック症候群の該当者数は、近年の高脂肪、高コレステロールを含む食事に加え、運動不足などが原因で、国内では予備群を含めて2000万人を超えと言われる。

*機能性食品産業化プロジェクトチーム (現: 生物応用科, 高齢化社会対応の素材開発プロジェクトチーム)

世界でも4から5人に一人がメタボリック症候群に該当するといわれ、大きな問題となっている。動脈硬化のリスク要因の一つとされる血清コレステロールは、1%低下すると動脈硬化の発生リスクが2~3%低下するとの報告がある⁵⁾。

そこで、我々は本研究において、動脈硬化の予防を目的に、島根県の特産品である「津田かぶ」から、動脈硬化症の危険因子の一つである血圧上昇に対する抑制効果が知られるGABAを生産する乳酸菌*Lactobacillus brevis* 119-2を分離し、本菌の血清コレステロール低下効果を*in vitro*, *in vivo*で評価した。さらに、DNAマイクロアレイによる肝臓遺伝子発現の網羅的解析により、コレステロール低下機序を検討し、本乳酸菌の動脈硬化予防に対する有用性を検討した。

2. *L. brevis* 119-2によるGABA生産 及びプロバイオティクスの検証

GABAは、血圧上昇抑制作用^{6),7)}、リラックス作用⁷⁾が知られる機能性成分で、特定保健用食品の有効成分としても利用されており図1 (A)に示す構造の非タンパク質構成アミノ酸である。グルタミン酸を基質にグルタミン酸脱炭酸酵素により生成することが知られている (図1 (B))⁸⁾。GABA生産乳酸菌は、津田かぶ、津田かぶ漬け、桑葉、ワ

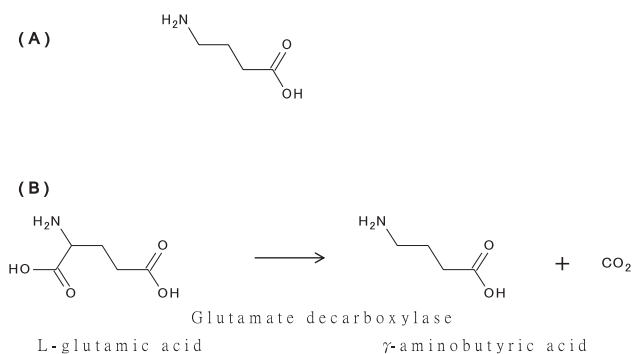


図1 GABAの構造とGABA生成反応

(A) GABAの構造, (B) グルタミン酸を基質とした脱炭酸反応によるGABA生成反応

サビ葉, ワサビ漬けなど県内特産品を分離源とし, グルタミン酸ナトリウムからGABAへの変換効率を指標にスクリーニングを行った. 津田かぶ及び津田かぶ漬けから分離したGABA生産乳酸菌株は, 16S rDNA相同性及び形態観察・性状試験, API同定キット (bioMerieux Japan社製) の結果, 両菌株とも *Lactobacillus brevis* と判定し, それぞれ *L. brevis* 119-2 (119-2株, 津田かぶ由来), *L. brevis* 119-6 (119-6株, 津田かぶ漬け由来) とした. 119-2株, 119-6株は, GABA変換効率70~74%を示し, 高い変換効率を示す *L. brevis* NBRC12005¹⁰⁾と同程度の変換効率を示した (図2).

次に, 119-2株のプロバイオティクスを評価した. プロバイオティクスとは, 「腸内フローラバランスを改善することにより動物に有益な効果をもたらす生菌添加物」¹¹⁾と定義され, 経口摂取した乳酸菌が胃液及び胆汁酸耐性を示し, 且つ腸管内である程度の期間生育可能であることが重要と考えられている. そこで, pH2.0~3.0に調整した0.32%pepsin含有MRS液体培地を人工胃液とし, 37℃, 4時間培養後の生菌数を指標に胃液耐性を評価した. また, 胆汁末 (Oxgall) 含有MRSを用い16時間培養後のOD₆₅₀を指標に胆汁酸耐性を評価した. さらに腸管内での生育の可能性としては, 腸管内にある程度滞留することが前提となるので腸管上皮細胞Caco-2細胞への付着性を評価した. いずれの試験もプロバイオティクスとして知られている *Lactobacillus rhamnosus* GG ATCC 53103¹²⁾ (GG株) を比較対照に用い評価した.

人工胃液に対して, 119-2株は, GG株と同程度の耐性を示したのに対し, 119-6株はpH2.5で徐々に減少し, 4時間後には10⁵cfu/mlを下回った (図3 (A)). 一方, 胆汁酸耐性では, GG株及び119-6株が, Oxgallにより, 濃度依存的に生育阻害されたのに対し, 119-2株は生育促進する傾向が見られ, 高い胆汁酸耐性を示した (図3 (B)). 一般にグラム陽性菌は細胞外膜がないため界面活性作用に感受性が高い. 119-2株の高い胆汁末耐性の原因は不明だが興味

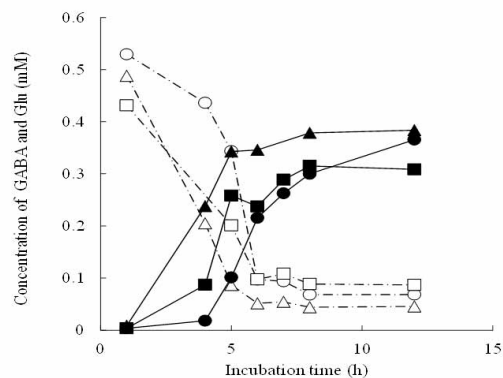


図2 培養中のGABA及びグルタミン酸の経時変化
 黒色マーカー; GABA濃度, 白色マーカー; グルタミン酸濃度.
 ○; 119-2株, □; 119-6株, △; *L. brevis* NBRC12005.

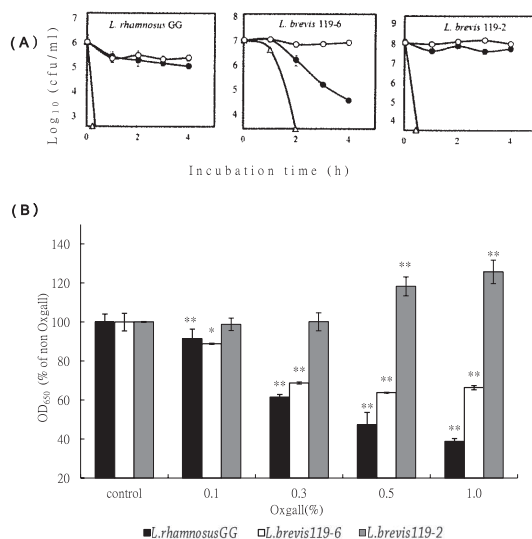


図3 *L. brevis* 119-2 の人工消化液耐性

(A) 人工胃液耐性試験結果. △, ●, ○はそれぞれpH2.0, pH2.5, pH3.0を示す. (B) 胆汁酸耐性試験結果. 誤差範囲は, 平均値±標準偏差 (n = 3) を示す.

*, **; controlに対して, それぞれ有意水準 $p < 0.05$, $p < 0.01$ で有意差あり.

深い結果となった. さらに, 腸管上皮細胞への付着性については, 119-2株, 119-6株は, とともにGG株と同程度の付着が確認された (図4 (A), (B)). 腸管上皮細胞への付着性は, 腸内細菌と競合することで病原性細菌の体外への排泄を促す効果が期待できるほか, より長時間腸管内にとどまることから酸生成等による菌叢バランスの改善など腸内環境改善効果, 腸内でのGABA生成も期待できる^{13),14)}.

これらの結果は, 津田かぶから分離したGABA生産乳酸菌 *L. brevis* 119-2を定期的に摂取することで生きた状態で腸に達し, 一定期間滞留することを示し, 本菌株がプロバイオティクスとして有用であることが示唆された.

3. *In vitro*での乳酸菌によるコレステロール低下効果

乳酸菌による血清コレステロール低下機序は, 複数報告

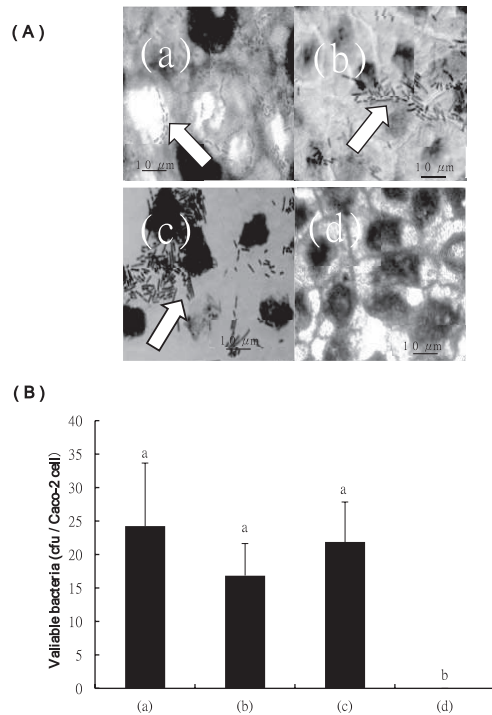


図4 分離乳酸菌の腸管上皮細胞付着性

(A) 腸管上皮細胞の顕微鏡写真 (矢印は付着した乳酸菌を示す)。 (a) ; *L. rhamnosus* GG, (b) ; *L. brevis* 119-2, (c) ; *L. brevis* 119-6, (d) ; *Lactococcus lactis* NBRC12007. (B) 腸管上皮細胞へ付着した生菌数. 誤差範囲は, 平均値±標準偏差 (n = 3), カラム上の異なる文字 (a, b) は有意差を示す (p<0.05).

されている。胆汁酸脱抱合作用による胆汁酸の腸管吸収阻害は, 胆汁酸を体外へ排出し, その結果不足した胆汁酸を補うため肝臓でのコレステロール代謝が促進される¹⁵⁾。また, 腸管内でのコレステロール代謝¹⁶⁾や菌体膜へのコレステロールの吸着・取り込みによる体外への排出¹⁷⁾などにより, 腸管からのコレステロール吸収阻害が考えられている¹⁸⁾。

津田かぶ由来乳酸菌119-2株の*in vitro*でのコレステロール低下効果を確認するため, 胆汁酸脱抱合作用, 菌体へのコレステロール吸着, コレステロールの代謝作用を評価し, また顕微鏡観察を行い菌体のコレステロール吸着性について評価した。

119-2株を抱合胆汁酸の一種であるタウロコール酸ナトリウム含有MRS液体培地で培養し, 生成したコール酸を定量し, 胆汁酸脱抱合作用が認められている *Lactobacillus acidophilus* ATCC43121^{15),19)} (ATCC株) と比較し評価した。図5に, 24時間培養後のコール酸量を示した。コール酸はタウロコール酸の脱抱合生成物であるが, 119-2株ではコール酸は検出されず, 添加したタウロコール酸ナトリウムが同量検出された。一方ATCC株では3.5mMのコール酸が検出され, 添加したタウロコール酸ナトリウムほぼ全量が脱抱合された。このことから, 119-2株は, 胆汁酸脱抱合作

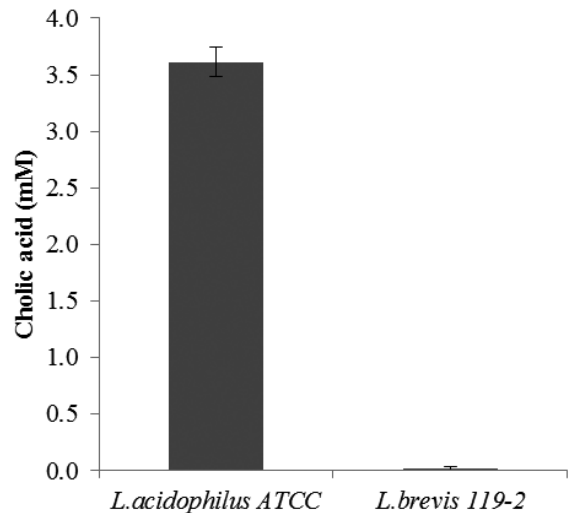


図5 *L. brevis* 119-2の胆汁酸脱抱合作用

培地に3.5mMタウロコール酸を添加し, 培養後のコール酸濃度を示した。誤差範囲は, 平均値±標準偏差 (n=3)。

用を示さないことが示唆された。

次に, 菌体のコレステロール吸着, 代謝分解効果を検証した。119-2株をコレステロール含有MRS液体培地で培養し, 定期的にサンプリングした。培養液は, 遠心分離により上清 (培養液画分) と沈殿に分け, 沈殿を水に懸濁し菌体画分とし, 遠心管をヘキサソで洗浄し沈殿画分とした。各画分に含まれるコレステロールを定量し, 初発のコレステロール量を100として図6に示した。また, 培養液のOD₆₅₀を測定し試験菌の生育指標とした。培養液画分のコレステロールは経時的に減少し, 菌体画分では, 試験菌の増殖に伴い増加し, 培養27時間目の各画分に含まれるコレステロールの総量は97%で, 培養前後でコレステロール量に変化はなかった。このことから, コレステロールは選択的に菌体画分に凝集するが, 代謝分解による他の物質への変換は生じていないことが確認された。

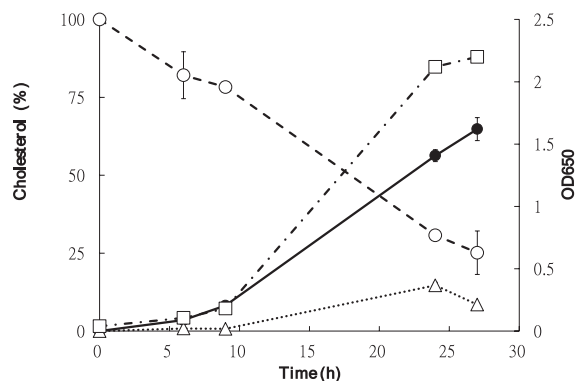


図6 *L. brevis* 119-2培養液中のコレステロールの挙動

○, □, △はそれぞれ培養液, 菌体, 沈殿物中に含まれるコレステロールを初発濃度で標準化した。●は乳酸菌の生育状況の指標OD₆₅₀を示した。

さらに、121℃、15分処理した119-2株（死菌）のコレステロール除去率は、ATCC株、119-2株（未加熱；生菌）が60%程度であるのに対し119-6株と同程度の7.7%と低く（図7）、死菌ではコレステロール吸着効果は認められなかった。119-2株生菌は増殖に伴い能動的に培地中のコレステロールを菌体に吸着していることが推察された。実際、培養後の菌体をコレステロール染色試薬Filipin IIIで染色し蛍光観察を行うと、図8の通り119-2株で強い蛍光が観察された。一方、コレステロール除去率が低い119-6株では、蛍光が観察されなかった。

以上のことから、津田かぶ由来乳酸菌119-2株は、生きて腸まで届き、コレステロールを能動的に吸着し、菌体と共に体外へ排泄することで、コレステロールの腸管吸収を阻害することが示唆された。

4. 動物を用いたコレステロール低下効果試験

*In vitro*の結果を検証するため、コレステロール含有飼料を摂取したSprague-Dawley (SD) ラットに、*L. brevis*

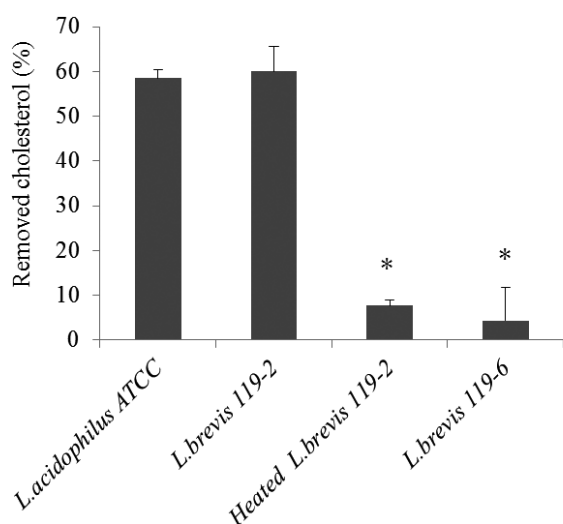


図7 生菌及び熱処理菌体のコレステロール除去効果
Heated *L. brevis* 119-2は、121℃、15分処理した後凍結乾燥し、試料とした。誤差範囲は、平均値±標準偏差 (n=3)。

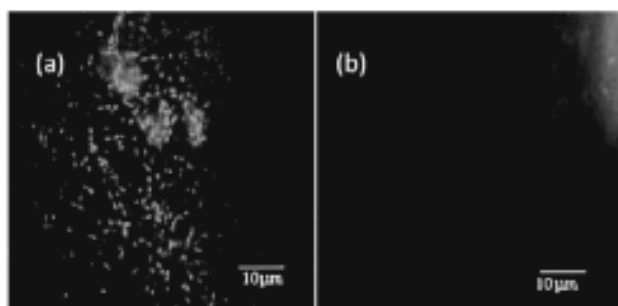


図8 乳酸菌の蛍光顕微鏡写真（コレステロール染色）
(a) *L. brevis* 119-2, (b) *L. brevis* 119-6.

119-2株の菌体乾燥粉末を投与し、コレステロール低下効果を評価した。

4週齢のSDラットに標準食を自由摂取させ1週間馴化した後、体重を指標に各群10匹ずつ表1に示した試験区に分けた。d119-2株群は、熱処理により失活させた試験区として119-2株を121℃、15分処理した後、凍結乾燥した粉末を試料とした。各試験区について表1に示す飼料と水を自由摂取させ、摂餌量、体重を定期的に測定した。2週間後に解剖し、血液及び各種臓器を回収し、血液生化学的検査及び組織重量を測定した。摂餌量及び最終体重（表2）は、群間で有意差は見られなかった。表3に血清及び肝臓コレステロール値を示した。コントロール群は、標準食群に対し肝臓及び血清総コレステロール（T-CHO）、血清LDLコレステロール（LDL-C）が有意に上昇し、血清HDLコレステロール（HDL-C）は有意に低下した。119-2株群は、コントロールに対し、肝臓T-CHO及び血清T-CHO、LDL-Cが有意に低下した。肝臓T-CHOはd119-2株に対し高い傾向が見られた。d119-2株では *in vitro* の結果からの予想に反し血清T-CHO低下が確認され、肝臓T-CHOは、低下傾向が見られた。一方、コレステロール低下効果が報告されているATCC株は、今回の試験条件では、血清T-CHOで有意な低下は見られなかった。しかし、HDL-Cが標準食群と同程度まで有意に増加した。近年、動脈硬化の指標としてLH比（LDL-C値/HDL-C値）が注目されている²⁰。LH比が低くなると動脈硬化発症リスクも減少し、ヒトでは1.5以下が良いとされる。本試験でのLH比は、119-2株群、d119-2株群、ATCC株群それぞれで1.4、1.2、2.2を示し、コントロール3.0に対しいずれも低下を示した。さらに詳細に検討すると、LH比の低下は、119-2株群及びd119-2株群では、LDL-C低下が大きく寄与するのに対しATCC株群ではHDL-Cの上昇が影響する違いが見られ、菌株に依存することが示唆された。

コレステロール以外の血液検査項目では、肝臓機能障害（AST, ALT, ALP, LDH, GGT, TP, ALB）や腎臓機能障害（BUN, CRE, ）、膵臓や様々な組織の障害（AMY, CPK）糖尿病や通風（GLU, UA）の指標はすべて、標準食群の数値に対し有意な変動は見られなかった（表4）。

表1 試験区及び飼料配合

試験区	飼料構成(%)			
	乾燥菌体	基礎飼料	コレステロール	コール酸
119-2株/d119-2株	5.0	93.5	1.0	0.5
ATCC株	5.0	93.5	1.0	0.5
コントロール	-	98.5	1.0	0.5
標準食	-	100.0	-	-

表2 摂取カロリー及び最終体重

項目	試験区				
	119-2株	d119-2株	ATCC株	コントロール	標準食
摂取カロリー (kcal / rat)	100.4 ± 7	93.1 ± 10	99.0 ± 6	105.8 ± 6	88.0 ± 7.3
最終体重 (g)	234.3 ± 14.5	225.4 ± 13.5	221.5 ± 15.0	233.1 ± 11.7	228.0 ± 13.6

表3 血清及び肝臓コレステロール値

項目	試験区				
	119-2株	d119-2株	ATCC株	コントロール	標準食
肝臓					
コレステロール (mg / g)	50.1 ± 12.6*	52.4 ± 7.6	46.4 ± 10.0*	62.5 ± 12.9	2.5 ± 0.28*
血清					
総コレステロール (mg / dL)	79 ± 12*	79 ± 9*	125 ± 37	106 ± 35	59 ± 6*
HDLコレステロール (mg / dL)	28 ± 8	26 ± 5	36 ± 6*	24 ± 5	36 ± 6*
LDLコレステロール (mg / dL)	40 ± 12*	32 ± 12*	80 ± 38	71 ± 31	23 ± 3*
LH比**	1.4	1.2	2.2	3.0	0.6

*コントロールに対し有意水準5%で有意差あり

**LH比=LDLコレステロール値/HDLコレステロール値

この結果, *L. brevis* 119-2株を2週間摂取し続けても肝臓, 腎臓などの臓器に対し障害を起こすことなく血清コレステロール値を改善する結果となった。また, 図9に肝臓切片の顕微鏡観察結果を示した。コレステロール摂取により増加した脂肪滴様小胞(矢印の先)は, 乳酸菌摂取により減少することが確認され, コレステロールだけでなく脂質代謝にも影響することが示唆された。

以上の結果から *in vitro* で示唆された119-2株の血清コレ

ステロール低下効果は, 動物試験により確かめられた。肝臓中のコレステロール値は, 死菌体より生菌体摂取で高くなる傾向がみられ, 菌体への吸着による腸管吸収阻害効果が示唆されたもののその差は僅かで, 血清コレステロールでは, 熱処理により失活したd119-2株群でも有意な低下効果が確認された。これらのことから, *in vivo* では菌体への吸着によるコレステロールの腸管吸収阻害とは別に, 主要なコレステロール低下機序の存在が示唆された。

表4 コレステロール以外の血液検査結果

項目	試験区				
	119-2株	d119-2株	ATCC株	コントロール	標準食
CPK (U / L)	272 ± 53	253 ± 37	254 ± 64	260 ± 28	266 ± 38
AST (U / L)	77 ± 31	73 ± 9	61 ± 8	70 ± 8	70 ± 12
ALT (U / L)	23 ± 16	21 ± 5	18 ± 3	20 ± 3	19 ± 3
LDH (U / L)	221 ± 34	233 ± 30	230 ± 35	265 ± 46	263 ± 58
GGT (U / L)	10 ± 0	< 10	10 ± 0	10 ± 0	< 10
ALP (U / L)	1205 ± 236	1111 ± 299	1167 ± 168	1227 ± 159	912 ± 161
AMY (U / L)	2064 ± 201	2019 ± 279	1897 ± 263	1870 ± 259	1881 ± 354
GLU (mg / dL)	107 ± 8	103 ± 9	95 ± 12	104 ± 11	108 ± 8
UA (mg / dL)	0.5 ± 0.0	0.5 ± 0.0	0.5 ± 0.0	0.5 ± 0.0	0.5 ± 0.0
BUN (U / dL)	13.4 ± 3.1	12.8 ± 1.4	12.8 ± 2.1	13.2 ± 1.9	11.7 ± 1.8
CRE (mg / dL)	< 0.2	< 0.2	< 0.2	< 0.2	< 0.2
TBIL (mg / dL)	< 0.2	< 0.2	0.2 ± 0.0	< 0.2	0.2 ± 0.0
TP (g / dL)	5.9 ± 0.2	5.9 ± 0.2	5.9 ± 0.2	5.9 ± 0.2	5.3 ± 0.2
ALB (g / dL)	3.8 ± 0.1	3.7 ± 0.1	3.8 ± 0.1	3.7 ± 0.2	3.5 ± 0.1

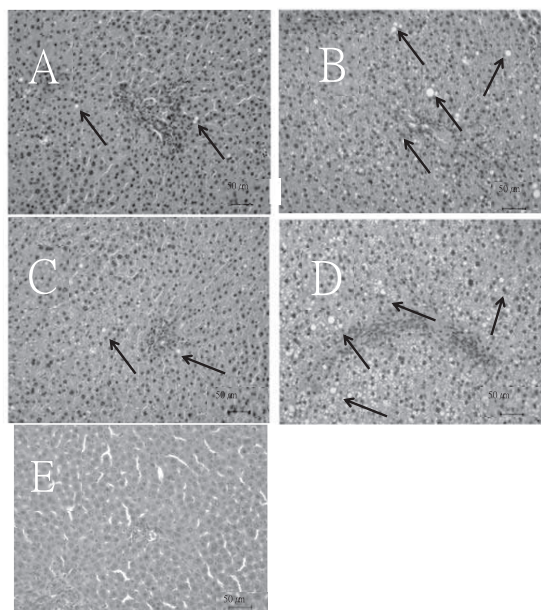


図9 肝臓切片の顕微鏡写真
(ヘマトキシリンエオジン染色)

(A), (B), (C), (D), (E)はそれぞれ119-2株, d119-2株, ATCC株, コントロール, 標準食群を示す。矢印は脂肪滴様小胞を示す。

そこで、肝臓遺伝子発現の網羅的解析により119-2株のコレステロール低下効果の作用機序及び119-2株とATCC株のLH比改善効果の違いについて検討することとした。

5. 網羅的遺伝子発現解析による *L. brevis* 119-2の *in vivo* 血清コレステロール低下作用機序の検討

近年、機能性食品の生理機能効果の解明にニュートリゲノミクス (Nutrition (栄養) + Genomics (遺伝学)) の手法が用いられる。機能性食品を摂取した時の遺伝子の発現変動を網羅的に解析することで機能性食品の生理機能を明らかにすることが可能となる。また、肝臓はさまざまな酵素反応が行われる器官であり、コレステロールの合成、代謝など恒常性維持に強くかかわっている。そこで、動物試験で確かめられた119-2株のコレステロール低下効果の作用機序を明らかにするためDNAマイクロアレイを用い119-2株摂取ラットの肝臓遺伝子発現解析を行った。さらにLH比低下に関し119-2株とATCC株の違いについて、また、肝臓の脂肪蓄積についてQuantitative RT-PCR (qRT-PCR) を用い検討を行った。

DNAマイクロアレイの結果、119-2株摂取によって680個の遺伝子が有意に発現上昇し、また、604個の遺伝子は有意に発現低下した。それぞれの遺伝子群をアノテーション解析し、GO termにカテゴライズした結果、発現上昇した遺伝子は図10に、発現低下した遺伝子は図11に示すGO termにカテゴライズされた。このうち最も深い階層にある15個のGO termに含まれる遺伝子は、Fatty acid metabolic process, Cholesterol homeostasisなど脂質代謝

GO-ID	GO terms (category)	p-Value
0065007	Biological process	
0058088	Biological regulation	3.48E-03
0042632	Lipid homeostasis	2.30E-03
0042632	Sterol homeostasis	2.30E-03
0019216	Cholesterol homeostasis	1.08E-03
0071840	Regulation of lipid metabolic process	
0030031	Cellular component organization or biogenesis	
0009987	Cell projection assembly	3.77E-03
0051186	Cellular process	
0006732	Cofactor metabolic process	1.16E-03
0019439	Coenzyme metabolic process	3.36E-03
0006091	Aromatic compound catabolic process	1.47E-03
0022900	Generation of precursor metabolites and energy	2.57E-06
0008152	Electron transport chain	1.02E-03
0055114	Metabolic process	
0018942	Oxidation-reduction process	3.96E-10
0044042	Lipid catabolic process	3.63E-03
0006073	Glucan metabolic process	2.74E-03
0005977	Cellular glycan metabolic process	2.74E-03
0005996	Glycogen metabolic process	2.74E-03
0019318	Monosaccharide metabolic process	2.35E-04
0006006	Hexose biosynthesis	2.94E-04
0006094	Glucose metabolic process	2.88E-05
0015980	Gluconeogenesis	2.97E-03
0016054	Energy derivation by oxidation of organic	3.96E-05
0046395	Organic acid catabolic process	9.31E-04
0006090	Carboxylic acid catabolic process	9.31E-04
0006631	pyruvate metabolic process	6.24E-04
0009064	Fatty acid metabolic process	6.37E-05
0019740	Glutamine family amino acid process	6.21E-04
0050896	Nitrogen utilization	
0010033	Response to stimulus	
0031960	Response to organic substance	1.45E-04
0051384	Response to corticosteroid	8.28E-04
0025260	Response to glucocorticoid stimulus	4.52E-04
	Acute inflammatory response	1.75E-03

FDR-corrected p-value of the categories appearing in the deepest hierarchy is shadowed.

図10 発現上昇したGO terms (p<0.005).

GO-ID	GO terms (category)	p-Value
0048002	biological process	
0019882	antigen processing and presentation of peptide antigen	5.12E-04
	antigen processing and presentation	1.14E-03
0002474	antigen processing and presentation of peptide antigen via MHC class I	1.92E-03
0051270	regulation of cell motion	2.81E-03
0051271	negative regulation of cellular component movement	2.08E-03

FDR-corrected p-value of the categories appearing in the deepest hierarchy is shadowed.

図11 発現低下したGO terms (p<0.005)

に関連する遺伝子とResponse to glucocorticoid stimulus, Gluconeogenesis, Glycogen metabolic processなど糖新生に関わる遺伝子、またCell projection assemblyの細胞形態形成に関連する遺伝子が発現上昇していることが確認された。また、有意な発現低下をした遺伝子のGO termは、免疫にかかわるAntigen processing and presentation of peptide antigen via MHC class1と細胞の様々な活動を制御するNegative regulation of cellular component movementにカテゴライズされた。

これらの遺伝子の内、コレステロール代謝及び脂質代謝に関連する遺伝子を表5に示した。このうちInsig 1, 2遺伝子は発現上昇が認められたが、Srebp 2に作用しコレステロール合成酵素HMG-CoA reductaseの発現抑制に関与する^(21,22)ことが知られている。また、体内のコレステロールを減少させる主要な経路の一つである、肝臓内コレステロールを胆汁酸に代謝する胆汁酸合成経路の律速酵素をコードする遺伝子Cyp7a1は、乳酸菌摂取により有意に発現上昇することが確認された。また、血中のLDLコレステロールを肝臓に取り込むLDL受容体遺伝子Ldlrは、乳酸菌摂取群で有意に発現上昇した。Ldlr遺伝子の発現上昇は、血中のコレステロール低下に貢献するだけでなく、血中の

表5 乳酸菌投与ラットの肝臓で発現したコレステロール代謝及び脂質代謝関連遺伝子

遺伝子タイトル	遺伝子シンボル	遺伝子発現
Cholesterol homeostasis		
insulin induced gene 1	Insig1	↑
insulin induced gene 2	Insig2	↑
sterol regulated binding protein 2	Srebp2*	↓
cytochrome P450, family 7, subfamily a, polypeptide 1	Cyp7a1	↑
Sulfotransferase 1A1	Sult1a1	↑
low-density lipoprotein receptor gene	Ldlr*	↑
βoxidation		
acyl-Coenzyme A dehydrogenase, short/branched chain	Acadsh	↑
enoyl Coenzyme A hydratase, short chain, 1, mitochondrial	Echs1	↑
hydroxyacyl-Coenzyme A dehydrogenase/3-ketoacyl-Coenzyme A thiolase/enoyl-Coenzyme A hydratase (trifunctional protein), beta subunit	Hadhb	↑
electron-transferring-flavoprotein dehydrogenase	Etfdh	↑

* qRT-PCRで確認, ↑発現上昇遺伝子, ↓発現低下遺伝子

LH比の改善効果にも影響していると考えられる。以上の結果から乳酸菌119-2株は、肝臓遺伝子の発現に関与し血清及び肝臓コレステロール低下に寄与したものと推察された。119-2株摂取によるコレステロール低下効果の作用機序として、図12に示す経路が想定された。

コレステロール代謝関連以外の遺伝子は、図10に示すFatty acid metabolic processのGO termに濃縮されたβ酸化に関連する遺伝子の発現上昇が見られた。肝臓組織の切片観察では、コレステロール摂取により増加した脂肪滴様小胞体が乳酸菌摂取により明らかに減少することが確認された(図9)。β酸化に関連する発現上昇遺伝子がこれらの脂質代謝に寄与していることが示唆された。

また、乳酸菌摂取はコレステロール低下に関与するだけでなくLH比の改善にも関与することが確認された。血中のLDLコレステロールの低下作用機序として、肝臓に発現するLDL receptor (Ldlr) が大きく関与する³⁾。また、HDLコレステロールの上昇には肝臓でのリポ蛋白質合成に深く関与するATP-binding cassette sub-family A member 1 (Abca1) の発現^{23),24)}及びAngiotensin-like 3

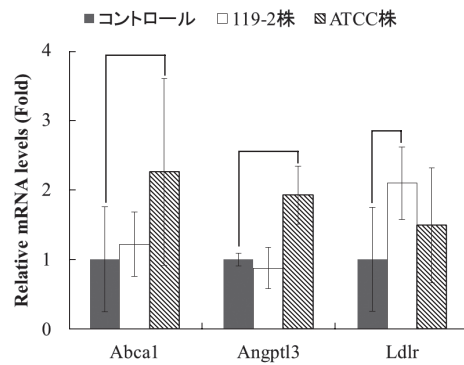


図13 LH比変動に関連する遺伝子発現のqRT-PCR分析
HDLコレステロール上昇及びLDLコレステロール低下関連遺伝子発現。誤差範囲は、平均値±標準偏差、コントロールに対し有意水準p<0.05を有意差ありと判定した。

(Angptl3)²⁵⁾や、血中のHDLコレステロールをLDLに転送するコレステロールエステル転送蛋白質(CETP)も関与しているといわれる^{26),27)}。そこで、これらの遺伝子発現及び血清中のCETP活性を測定した。その結果、HDLコレステロール増加に寄与すると思われるAbca1, ngptl3はATCC株摂取で高い発現が見られ、LDL低下に関与するLdlrは119-2株摂取で強い発現が見られた(図13)。一般に、Ldlrが高発現すると、LDLコレステロールの血中から肝臓への輸送が促進され、結果として血中LDLコレステロールが低下する。また、血清中のCETP活性は119-2株群、ATCC株群ともに対照群に比べ高い傾向を示したものの有意な差は見られなかった(図14)。

これらの結果から、119-2株及びATCC株摂取は、Ldlr及びAbca1, Angptl3の遺伝子発現に関与してLH比の改善に寄与したことが示唆された。以上のように、乳酸菌摂取によるコレステロール低下効果は肝臓のさまざまな遺伝

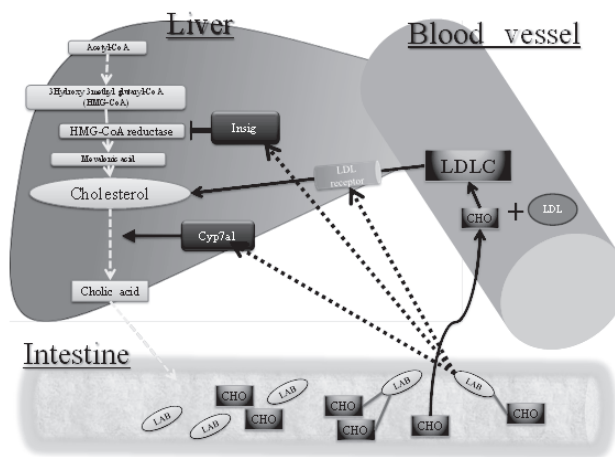


図12 *L. brevis* 119-2摂取によるコレステロール低下効果の予想される作用機序

CHO; コレステロール, LAB; *L. brevis* 119-2を示した。実線矢印は、コレステロールの取り込み経路及び遺伝子の発現経路を示し、破線矢印は乳酸菌による影響を示した。また、白線破線矢印はコレステロール合成代謝経路を示した。

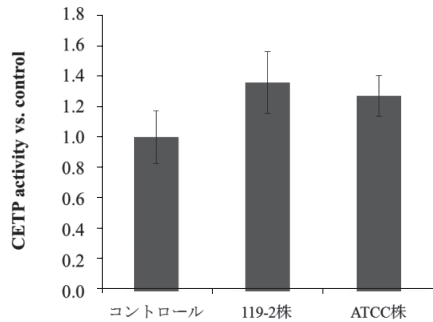


図14 乳酸菌摂取による血清CETP活性

結果はコントロール値で標準化し、誤差範囲は、平均値±標準偏差で表した。

子発現に影響を及ぼし血中及び肝臓コレステロール低下、LH比の改善、肝臓脂肪の低下効果を示していること示唆された。

6. ま と め

以上の結果、本県特産品「津田かぶ」から分離したGABA生産乳酸菌*Lactobacillus brevis* 119-2は、人工消化液耐性及び腸管上皮細胞への付着性により、腸内細菌叢の改善効果、腸管内でのGABA生成による血圧上昇抑制効果が期待される²⁸⁾。また、119-2株の菌体を摂取したラットにおいて、血清及び肝臓コレステロール低下効果、LH比改善効果、脂肪肝改善効果など複数の機能が確認された²⁹⁾。これらの効果は熱処理菌体でも確認されたことから、機能性食品製造のスターターとしての利用に加え、菌体自体を機能性食品素材としてサプリメントへの利用も期待できる。また、本乳酸菌の肝臓遺伝子の網羅的解析により、免疫調節や糖尿病に関連する遺伝子の変動が確認されており、新たな機能の解明にも興味をもたれるところである。

近年の機能性食品市場において乳酸菌は特定保健用食品市場の半分以上を占めるなど中心的な素材といえる。今後、本菌株を用いた機能性食品開発が行われ、動脈硬化の効率的な予防に役立つことを期待する。

謝 辞

本研究を遂行するにあたりご指導とご鞭撻を賜りました九州大学大学院農学研究院 教授 園元謙二博士をはじめ関係各位に深甚なる謝意を表します。

文 献

- 1) Masuda, S.; Yamaguchi, H.; Kurokawa, T.; Shirakami, T.; Tsuji, R. F.; Nishimura, I. Immunomodulatory effect of halophilic lactic acid bacterium *Tetragenococcus halophilus* Th221 from soy sauce moromi grown in high-salt medium. *International Journal of Food Microbiology*. 2008, vol. 121, no. 3, p. 245-252.
- 2) Charernjiratragul, W.; Bhoopong, P.; Kantachote, D.;

- Jomduang, S.; Kong-Ngoen, R.; Nair, G. B.; Vuddhakul, V. Inhibitory Activity of Lactic Acid Bacteria Isolated from Thai Fermented Food against Pandemic Strains of *Vibrio Parahaemolyticus*. *Journal of Food Safety*. 2010, vol. 30, no. 1, p. 67-82.
- 3) Segawa, S.; Wakita, Y.; Hirata, H.; Watari, J. Oral Administration of heat-killed *Lactobacillus brevis* SBC8803 ameliorates alcoholic liver disease in ethanol-containing diet-fed C57BL/6N mice. *International Journal of Food Microbiology*. 2008, vol. 128, no. 2, p. 371-377.
- 4) Stanley, J. C. Why is LDL-cholesterol bad cholesterol? *Lipid Technology*. 2008, vol. 20, no. 9, p. 208-210.
- 5) Manson, J. E.; Tosteson, H.; Satterfield, S.; Hebert, P.; O'Connor, G. T.; Buring, J. E.; Hennekens, C. H. The primary prevention of myocardial infarction. *New England Journal of Medicine*. 1992, vol. 326, no. 21, p. 1406-1416.
- 6) Kimura, M.; Hayakawa, K.; Sansawa, H. Involvement of γ -aminobutyric acid (GABA) B receptors in the hypertensive effect of systemically administered GABA in spontaneously hypertensive rats. *The Japanese Journal of Pharmacology*. 2002, vol. 89, p. 388-394.
- 7) Inoue, K.; Shirai, T.; Ochiai, H.; Kasao, M.; Hayakawa, M.; Kimura, M.; Sansawa, H. Blood-pressure-lowering effect of a novel fermented milk containing γ -aminobutyric acid (GABA) in mild hypertensives. *European Journal of Clinical Nutrition*. 2003, vol. 57, p. 490-495.
- 8) Abdou, A. M.; Higashiguchi, S.; Horie, K.; Kim, M.; Hatta, H.; Yokogoshi, H. Relaxation and immunity enhancement effects of gamma-aminobutyric acid (GABA) administration in humans. *BioFactors*. 2006, vol. 26, no. 3, p. 201-208.
- 9) Hanaoka, Y. Studies on Preservation of Soy Sauce : (VI) Enzymic Decomposition of L-Glutamic Acid and L-Aspartic Acid in Soy Sauce by *Lactobacilli*. *Hakkokogakuzashi*. 1967, vol. 45, no. 4, p. 312-319.
- 10) Ueno, Y.; Hiraga, K.; Mori, Y.; Oda, K. Isolation and Utilization of a Lactic Acid Bacterium, Producing a High Level of γ -Aminobutyric Acid (GABA). *Seibutsukougakukaishi*. 2007, vol. 85, no. 3, p. 109-114.
- 11) Fuller, R. Probiotics in man and animals. *Journal of Applied Bacteriology*. 1989, vol. 66, p. 365-378.
- 12) Lebeer, S.; Verhoeven, T. L. A.; Perea Velez, M.; Vanderleyden, J.; De Keersmaecker, S. C. J. Impact of Environmental and Genetic Factors on Biofilm Formation by the Probiotic Strain *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Applied and Environmental Microbiology*. 2007, vol. 73, no. 21, p. 6768-6775.
- 13) Maffei, H. V. L.; Nobrega, F. J. Gastric pH and microflora of normal and diarrhoeic infants. *Gut*. 1975, vol. 16, p. 719-726.
- 14) Todoriki, K.; Mukai, T.; Sato, S.; Toba, T. Inhibition of adhesion of food-borne pathogens to Caco-2 cells by *Lactobacillus* strains. *Journal of Applied Microbiology*. 2001, vol. 91, p. 154-159.
- 15) Klaver, F. A. M.; Meer, R. V. D. The assumed assimilation of cholesterol by *Lactobacilli* and *Bifidobacterium bifidum* is due to their bile salt-deconjugating activity. *Applied and*

- Environmental Microbiology. 1993, vol. 59, no. 4, p. 1120-1124.
- 16) Lye, H. S.; Rusul, G.; Liong, M. T. Removal of cholesterol by lactobacilli via incorporation and conversion to coprostanol. Journal of Dairy Science. 2010, vol. 93, no. 4, p. 1383-1392.
- 17) Kimoto, H.; Ohmomo, S.; Okamoto, T. Cholesterol removal from media by Lactococci. Journal of Dairy Science. 2002, vol. 85, no. 12, p. 3182-3188.
- 18) Gilliland, S. E.; Nelson, C. R.; Maxwell, C. Assimilation of Cholesterol by *Lactobacillus acidophilus*. Applied and Environmental Microbiology. 1985, vol. 49, no. 2, p. 377-381.
- 19) Nguyen, T. D.; Kang, J. H.; Lee, M. S. Characterization of *Lactobacillus plantarum* PH04, a potential probiotic bacterium with cholesterol-lowering effects. International Journal of Food Microbiology. 2007, vol. 113, no. 3, p. 358-361.
- 20) Daike, Y.; Mizoguchi, M.; Matayoshi, H.; Sadamoto, T.; Yanagawa, C.; Yakushiji, F.; Sadamoto, K. Efficacy of LDL-C/HDL-C ratio in elderly hyperlipidemic patients with diabetes for predicting carotid artery intima-media thickness. Progress in Medicine. 2012, vol. 32, p. 1321-1325.
- 21) Anderson, R. G. W. Joe Goldstein and Mike Brown: from cholesterol homeostasis to new paradigms in membrane biology. Trends in Cell Biology. 2003, vol. 13, no. 10, p. 534-539.
- 22) Hampton, R. Y. Cholesterol homeostasis: ESCAPE from the ER. Current Biology. 2000, vol. 10, p. 298-301.
- 23) Fitzgerald, M. L.; Mujawar, Z.; Tamehiro, N. ABC transporters, atherosclerosis and inflammation. Atherosclerosis. 2010, vol. 211, no. 2, p. 361-370.
- 24) Haghpassand, M.; Bourassa, P. A. K.; Francone, O. L.; Aiello, R. J. Monocyte/macrophage expression of ABCA1 has minimal contribution to plasma HDL levels. Journal of Clinical Investigation. 2001, vol. 108, no. 9, p. 1315-1320.
- 25) Shimamura, M.; Matsuda, M.; Yasumo, H.; Okazaki, M.; Fujimoto, K.; Kono, K.; Shimizugawa, T.; Ando, Y.; Koishi, R.; Kohama, T.; Sakai, N.; Kotani, K.; Komuro, R.; Ishida, T.; Hirata, K.; Yamashita, S.; Furukawa, H.; Shimomura, I. Angiopoietin-like protein3 regulates plasma HDL cholesterol through suppression of endothelial lipase. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology. 2007, vol. 27, no. 2, p. 366-372.
- 26) Herrera, V. L.; Tsikoudakis, A.; Didishvili, T.; Ponce, L.R.; Bagamasbad, P.; Gantz, D.; Herscovitz, H.; Van Tol, A.; Ruiz-Opazo, N. Analysis of gender-specific atherosclerosis susceptibility in transgenic [hCETP] 25DS rat model. Atherosclerosis. 2004, vol. 177, no. 1, p. 9-18.
- 27) Van Der Steeg, W. A.; Hovingh, G. K.; Klerkx, A. H.; Hutten, B. A.; Nootenboom, I. C.; Levels, J. H.; Van Tol, A.; Dallinga-Thie, G. M.; Zwinderman, A. H.; Kastelein, J. J.; Kuivenhoven, J. A. Cholesteryl ester transfer protein and hyperalphalipoproteinemia in Caucasians. Journal of Lipid Research. 2007, vol. 48, no. 3, p. 674-682.
- 28) Watanabe, S.; Katsube, T.; Sonomoto, K. Cholesterol-lowering effects of *lactobacillus brevis* isolated from turnip "Tsuda Kabu". Food science and technology research. 2012, vol. 18, no. 6, p. 825-834.
- 29) Watanabe, S.; Katsube, T.; Hattori, H.; Sato, H.; Ishijima, T.; Nakai, Y.; Abe, K.; Sonomoto, K. Effect of *Lactobacillus brevis* 119-2 isolated from Tsuda kabu red turnips on cholesterol levels in cholesterol-administered rats. Journal of Bioscience and Bioengineering. 2013, vol. 116, no. 1, p. 45-51.