

大豆たん白質難消化性画分による大腸内フローラの変動解析

西村直道*・三田由紀・櫻井麻衣子・山本達朗・太田 徹

名寄市立大学保健福祉学部栄養学科

Effect of Soy Resistant Protein on Fermentation and Microbiota in the Large Intestine

Naomichi NISHIMURA, Yuki MITA, Maiko SAKURAI,
Tatsuro YAMAMOTO and Toru OTA

Department of Nutritional Sciences, Faculty of Health and Welfare Science,
Nayoro City University, Nayoro 096-8641

ABSTRACT

To determine the mechanisms by which the supply of nitrogen into the large intestine modifies the fermentation, we examined changes in fermentation and microbiota in the large intestine by the administration of both pectin (PE) and soy resistant protein (SRP). In experiment 1, PE and SRP were fermented *in vitro* and samples were taken at 0, 5, 10 and 24 h, and pH change, production of short-chain fatty acid and ammonia, and organic matter disappearance were determined. In experiment 2, rats were fed the control, PE and PE+SRP diets for 10 d, and cecal short chain fatty acid concentration and cecal microbiota were determined. In experiment 1, propionate and butyrate production was increased by SRP in a dose-dependent manner, suggesting that the supply of nitrogen by SRP plays a crucial role in an increased propionate and butyrate production. The addition of SRP also increased ammonia production dose-dependently, but the ammonia concentration decreased after h 10, suggesting that ammonia produced is used as a nitrogen source by intestinal bacteria. In experiment 2, the contents and concentrations of cecal propionate and butyrate were significantly higher in rats fed the PE+SRP diet than in those fed the control and the PE diets. According to PCR-DGGE analysis, the feeding of pectin resulted in new clusters of cecal microbiota. The addition of SRP to the PE diet caused little change in clusters of the cecal microbiota. However, a particular band, which indicates one species of bacteria, was observed in rats fed the PE+SRP diet only. In conclusion, when pectin is fermented by intestinal bacteria, SRP seems to increase

*〒096-8641 名寄市西4条北8丁目1

propionate and butyrate production through the activation of particular bacterium. *Soy Protein Research, Japan* **10**, 48-54, 2007.

Key words: soy resistant protein, large intestine, fermentation, microbiota, rat

ペクチンは水溶性食物繊維であり、ヒトは普段野菜や果物から得ている。また、ペクチンは増粘剤としても利用され、加工食品を通じて摂取している。ペクチンは大腸で腸内細菌により発酵され、短鎖脂肪酸が多量に生成される。中でも酢酸生成量が多く、プロピオン酸生成や酪酸の生成は少ない。酪酸は大腸上皮細胞のエネルギー源となり増殖を促進することが知られている¹⁾。さらに、酪酸はがん化細胞の分化やアポトーシスを誘導するため、発がん抑制に寄与していると考えられている^{2,3)}。したがって、大腸内を酪酸発酵優勢にすることは大腸疾病予防につながると思われる。

我々は窒素源として大豆たん白質難消化性画分 (SRP) をペクチンと同時に与えたとき、プロピオン酸や酪酸の生成比が増大することを以前に見出した (第59回日本栄養・食糧学会発表, 論文未発表)。これはSRPによる腸内フローラの変動, SRPの発酵基質としての利用, もしくはその両者によると推察される。しかし、この詳細についてまったくわかっていない。したがって、本研究では、窒素供給による大腸発酵の変動機構を詳細に明らかにするため、ペクチンとSRPを同時に与えたときの大腸発酵の変動と大腸内フローラの変動を調べることを目的とした。

方 法

食物繊維源

試験食物繊維として太陽化学(株)から供与されたペクチン (PE) を使用した。

SRPの調製

たん白質源として分離大豆たん白質 (たん白質含量81%, 不二製油(株)) を用いた。分離大豆たん白質を水に懸濁し、塩酸でpH 1.8~2.0に調製した後、基質に対し1%量のペプシンを加え、37℃, 5時間処理した。反応後、炭酸水素ナトリウムでpHを7.2にし、基質の3%量のパンクレアチンを添加し、37℃で14時間反応した。反応後に酸性にし、遠心分離後得られた沈澱画分を水に懸濁しpH 7.0に調整した。この懸濁液を脱塩し、凍結乾燥した後に得られた粉末をSRPとした。得られたSRPの窒素含量はケルダール法で測定した。

実験1: ラット腸内フローラによるペクチン発酵に対するSRPの影響 (*in vitro*実験)

4週齢のSprague-Dawley (SD) 系雄ラットをAIN-93基本飼料で10日間飼育後、盲腸内容物を嫌気的に取り出し、脱酸素滅菌水で10倍希釈し、滅菌ガーゼで残渣を除いた。この調製液を植菌液とした。基本培地はSCFAを除いたFlickingerら⁴⁾の培地を用いた (Table 1)。試験発酵基質にPE (糖質源) を植菌後に1%, SRP (窒素源) を植菌後にたん白質量として0.125, 0.25, 0.5%となるように添加した。また、試験発酵基

Table 1. Composition of medium used for *in vitro* fermentation

Component	unit/L
	mL
Solution A ¹	330.0
Solution B ²	330.0
Trace mineral solution ³	10.0
Water-soluble vitamin mix ⁴	20.0
Folate: biotin solution ⁵	5.0
Riboflavin solution ⁶	5.0
Hemin solution ⁷	2.5
Resazurin ⁸	1.0
Water	296.4
	g
Yeast extract	0.5
Trypticase	0.5
Na ₂ CO ₃	4.0
Cysteine HCl·H ₂ O	0.5

¹Composition (g/L): NaCl, 5.4; KH₂PO₄, 2.7; CaCl₂·H₂O, 0.16; MgCl₂·6H₂O, 0.12; MnCl₂·4H₂O, 0.06; CoCl₂·6H₂O, 0.06; (NH₄)₂SO₄, 5.4.

²Composition: K₂HPO₄, 2.7 g/L.

³Composition (mg/L): EDTA·2Na, 500; FeSO₄·7H₂O, 200; ZnSO₄·7H₂O, 10; MnCl₂·4H₂O, 3; H₃BO₃, 20; CoCl₂·6H₂O, 20; CuCl₂·2H₂O, 1; NiCl₂·6H₂O, 2; Na₂MoO₄·2H₂O, 3.

⁴Composition (mg/L): thiamin-HCl, 100; D-pantothenic acid, 100; niacin, 100; pyridoxine, 100; *p*-aminobenzoic acid, 5; vitamin B-12, 0.25.

⁵Composition (mg/L): folic acid, 10; D-biotin, 2; NH₄HCO₃, 100.

⁶Composition: riboflavin, 10 mg/L in 5 mmol/L HEPES.

⁷Hemin, 500 mg/L in 10 mmol/L NaOH.

⁸Resazurin, 1 g/L in distilled water.

質にPEのみを添加したものおよびブランクとして試験発酵基質を添加しないものを用意した。植菌液は植菌後に盲腸内容物量として2%となるよう添加し、37°Cで嫌気バッチ培養を行った。植菌液調製および植菌、培養の一連の操作は二酸化炭素ガスを充満させた嫌気下で行った。培養0, 5, 10および24時間目に各試験群で6本ずつ培養を停止し、pH, SCFA生成量, アンモニア量および有機物消失率を測定した。SCFA生成量はPE 1g当たりのSCFA生成量で表した。

実験2：ラット大腸におけるペクチン発酵に対するSRPの影響 (*in vivo*実験)

SD系雄ラット(4週齢)18匹をコントロール食(Table 2)で1週間予備飼育後、体重を基準に3群に組み分けた。それぞれにコントロール食、5%ペクチン(PE)食、PE+2.5%SRP食(Table 2)を10日間与えた。ペクチンはコントロール食のセルロースと置換し、SRPはスクロースと置換して添加した。試験飼育最終日にネプタール麻酔下で各群の盲腸をただちに採取し、盲腸壁および内容物重量、pHを測定した。また、短鎖脂肪酸濃度および腸内フローラパタンの解析のため、盲腸内容物を採取した。短鎖脂肪酸、高速液体クロマトグラフィで測定した。腸内フローラパタンは盲腸内容物中の腸内細菌よりDNAを抽出し、16S rDNAの特異的領域を増幅した後に、DGGE(変性グラジエントゲル電気泳動)法で解析した。細菌DNAの抽出はISOFECAL for Beads Beating(ニッポンジーン)を用い、マルチビーズショッカー(安井器械)でビーズ破砕(2,700 rpm, 1 min)して調製した。PCRは、94°C, 2 min, 1 cycle; 94°C, 30 sec, 52°C→47°C(1°C down/2 cycles), 30 sec, 72°C, 30 sec, 2 cycle×6; 94°C, 30 sec, 47°C, 30 sec, 72°C, 30 sec, 30 cycle; 72°C, 10 min, 1 cycleの条件で増幅を行っ

た。プライマーは、forward primer, 5'-CGCCCGCCGCGCGGGCGGGCGGGGCGGGGCACGGGGCCCTACGGGIGGCIGCA; reverse primer, 5'-TIACCGIICTICTTGGCACCTT-3'を用いた。DGGEは変性剤濃度勾配を35~60%(100%変性剤:7 mol/L尿素+40%ホルムアミド)の8%アクリルアミドで、60 Vで18時間泳動した。温度は60°Cで実施した。泳動後にエチジウムブロマイドで染色し、UV検出した。バンドパタンの類似度はQuantity One(Bio-Rad社)を用いて算出し、UPGMA法でクラスター解析を行った。特異的なバンドを採取し、DNAシーケンス解析を行い、BLAST解析により細菌種の同定を行った。

統計処理

実験結果は一元分散分析により検定し、有意差が認められた場合、Tukeyの多重有意差検定により比較検定した。有意差水準は $p < 0.05$ とした。

結 果

SRPの調製

分離大豆たん白質のたん白質の人工消化率は窒素換算で89.0%であった。調製したSRPの組成は、たん白質が64.8%、糖質が28.5%、脂質が0.1%以下、灰分が4.0%、水分が2.7%だった。

実験1：ラット腸内フローラによるペクチン発酵に対するSRPの影響 (*in vitro*実験)

Fig. 1にSRPとPEを共存させた場合の発酵によるSCFA生成変動を示した。発酵による短鎖脂肪酸生成量はいずれもSRPの用量依存的に増加した。培養24時間後、0.5% SRPの共存でPE 1g当りの酢酸、プロピオン酸および酪酸の生成量はSRP無添加に比べ、それぞれ20%、70%、60%上昇した。

Table 2. Composition of the experimental diets

Ingredients	Control diet	PE diet	PE+SRP diet
		g/kg	
Casein	200.0	200	200
Corn starch	529.5	529.5	529.5
Sucrose	100	100	61.4
Soybean oil	70	70	70
Mineral mixture (AIN-93G)	35	35	35
Vitamin mixture (AIN-93)	10	10	10
Cellulose	50	—	—
Pectin	—	50	50
L-Cystine	3	3	3
Choline bitartrate	2.5	2.5	2.5
Soy resistant protein (SRP) ¹	—	—	38.6

¹SRP contained 25 g protein/kg diet.

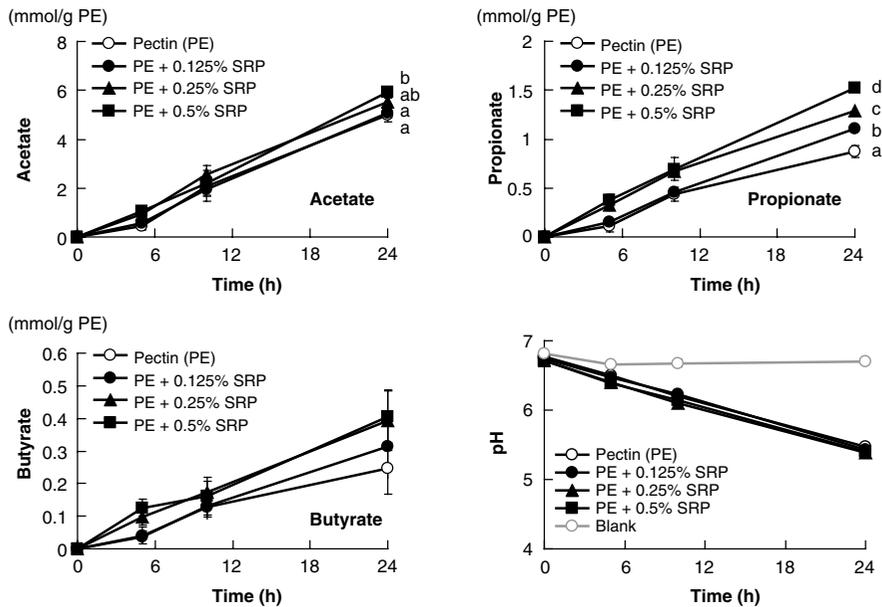


Fig. 1. Effect of SRP on pH and the production of short chain fatty acids for the fermentation of pectin with rat cecal microbiota (*In vitro* experiment). Each point is the mean of six samples; vertical bars represent SEM. Values at each time point not sharing a common letter are significantly different ($p < 0.05$). Statistical comparisons were made with Tukey's post-hoc test. PE, pectin; SRP, soy resistant protein.

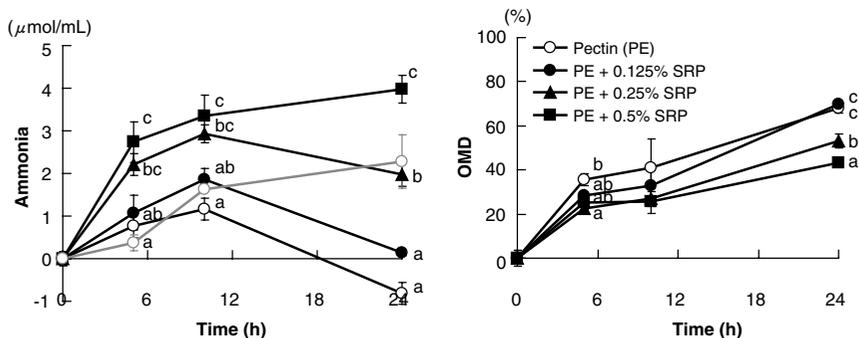


Fig. 2. Effect of SRP on the production of ammonia and the organic matter disappearance for the fermentation of pectin with rat cecal microbiota (*In vitro* experiment). Each point is the mean of six samples; vertical bars represent SEM. Values at each time point not sharing a common letter are significantly different ($p < 0.05$). Statistical comparisons were made with Tukey's post-hoc test. OMD, organic matter disappearance; PE, pectin; SRP, soy resistant protein.

アンモニア量はSRPの添加量に依存して増加した (Fig. 2)。しかし、0.5% SRP添加群を除き、培養24時間後のアンモニア量は培養10時間後のそれに比べ、低下した。一方、有機物消失率は、SRP添加量が多くなるほど、有意に低かった (Fig. 2)。

実験2：ラット大腸におけるペクチン発酵に対するSRPの影響 (*in vivo*実験)

体重増加量および摂食量はコントロール食群に比

べ、PE+SRP食群で低下する傾向がみられたが、統計的有意差には至らなかった。盲腸内容物重量および盲腸壁重量はコントロール食群に比べ、PE食群およびPE+SRP食群で有意に増加した (Table 3)。しかし、PE食群とPE+SRP食群の間に有意な差はみられなかった。盲腸内容物のpHはPEを与えた2群でコントロール食群よりも有意に低かった (Table 3)。盲腸内容物中のプロピオン酸および酪酸の濃度および量は、

PE+SRP食群でコントロール食群に比べ有意に高かった。PE+SRP食群の酪酸濃度および量はPE食群よりも有意に高値を示した (Table 4)。

盲腸内容物中の腸内フローラバタンはPE摂取により変動し、コントロール食群とは異なるクラスターを形成した。しかし、SRPをペクチンと同時に投与したラットの腸内フローラはペクチン単独で投与したラットと独立したクラスターを形成するには至らなかった。PE+SRP食群のDGGE像にのみにみられたバンド (Fig. 3-Aの白枠内) のDNA塩基配列をBLAST検索した結果、*Clostridium methylpentosum* sp.と98%の相同性を示した。

考 察

*In vitro*バッチ培養とラットを用いた両実験で、SRPをペクチンと同時に投与したとき、プロピオン酸と酪酸の生成量が有意に増加した。このSRPの作用は用量依存的に強くなることが*in vitro*実験で認められ

Table 3. Effect of SRP on weights of cecal wall and content and pH of cecal content in rats fed pectin (*In vivo* experiment)¹

Groups ²	Wall	Content	pH
	g	g	
Control	0.598±0.046 ^a	1.94±0.09 ^a	7.00±0.09 ^b
PE	0.879±0.058 ^b	3.16±0.46 ^b	6.51±0.07 ^a
PE+SRP	0.795±0.055 ^b	3.08±0.24 ^b	6.30±0.11 ^a

¹Values are means ± SEM (n=6). Values in a column with different superscript letters are significantly different ($p<0.05$).

²PE, rats fed the pectin diet; PE+SRP, rats fed the PE diet supplemented with 2.5% SRP.

Table 4. Effect of SRP on concentrations and contents of short chain fatty acids in rats fed pectin (*In vivo* experiment)¹

Groups ²	Short chain fatty acids (SCFA)				SCFA molecular ratio Ace/Pro/But
	Acetate	Propionate	Butyrate	Total	
	$\mu\text{mol}/\text{cecum}$				
Control	72.0 ± 7.3 ^a	25.4 ± 1.4 ^a	10.3 ± 1.6 ^a	108 ± 9 ^a	—
PE	180 ± 24 ^b	69.5 ± 16.7 ^{ab}	17.9 ± 3.1 ^a	268 ± 38 ^b	—
PE+SRP	213 ± 25 ^b	99.7 ± 25.2 ^b	58.8 ± 15.4 ^b	371 ± 64 ^b	—
	$\mu\text{mol}/\text{g}$				
Control	37.3 ± 3.8 ^a	13.1 ± 0.4 ^a	5.26 ± 0.77 ^a	55.6 ± 4.7 ^a	67/24/ 9
PE	57.5 ± 2.3 ^b	21.0 ± 2.0 ^{ab}	6.44 ± 1.23 ^a	84.9 ± 3.4 ^{ab}	68/25/ 8
PE+SRP	69.2 ± 6.1 ^b	32.1 ± 7.1 ^b	19.2 ± 4.6 ^b	121 ± 17 ^b	61/25/15

¹Values are means ± SEM (n=6). Values in a column with different superscript letters are significantly different ($p<0.05$).

²PE, rats fed the pectin diet; PE+SRP, rats fed the PE diet supplemented with 2.5% SRP.

た。我々は以前にSRPが大腸内でペクチン発酵を促進し、プロピオン酸と酪酸の生成を亢進させることを見出した (未発表)。本研究でも同様の作用が認められたことから、SRPを用いた窒素供給によるプロピオン酸や酪酸の生成の促進が再現高い作用であることを裏付けている。酪酸は正常な大腸粘膜上皮細胞のエネルギー源として利用され¹⁾、さらに細胞の分化やアポトーシスを誘導するため、大腸がん発症を抑制すると考えられている^{2,3)}。Moritaらは以前にオリゴメチオニンを用いて、難消化性たん白質が盲腸内酪酸生成量を増加させることを示唆している⁵⁾。したがって、大腸内への窒素供給は大腸内環境の正常化に重要であり、SRPはそれを実現できる素材だと考えられる。

我々はさらに以前にSRPが他のたん白質の難消化性画分に比べ、可溶性画分が多く、腸内細菌に利用されやすいことを明らかにした (未発表)。しかし、SRPの利用のされ方はまったくわかっていない。大きく分けてSRPが酪酸生成の発酵基質として利用される可能性とプロピオン酸や酪酸生成能の強い腸内細菌種を活性化する可能性の2つが考えられる。本実験で腸内フローラバタンはSRP添加で大きく変動しなかった。しかし、PE+SRP食を与えたラットでのみ特定の細菌種 (*Clostridium methylpentosum* sp.と推定される) が観察され、発酵変動に寄与している可能性が示唆された。*Clostridium methylpentosum* sp.はヒトから分離された腸内細菌であり、ラムノースを資化し、酢酸やプロピオン酸生成に関わる⁶⁾。したがって、SRPの共存によりこの細菌種が増加し、ペクチンが分解されて生成されるラムノースを発酵基質とし、プロピオン酸生成を亢進するかもしれない。今のところ、SRPが発酵基質として利用される可能性は完全に否定はできないが、腸内細菌叢の変動を伴って大腸発酵を改変する可

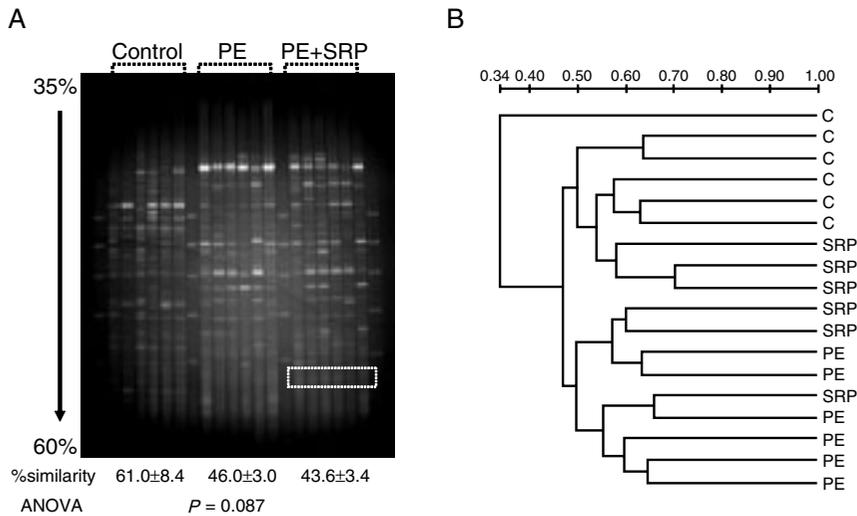


Fig. 3. Effect of SRP on cecal microbiota in rats fed pectin (*In vivo* experiment). (A) Banding patterns of polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE) in cecal content from rats fed the control, PE and PE+SRP diets. (B) Dendrogram representing pectin and SRP-associated correlations of PCR-DGGE banding patterns in cecal content from rats fed the control, PE and PE+SRP diets.

能性が高いと思われる。

本研究の*in vitro*バッチ培養でSRPによるアンモニア生成の増加が示された。ウシにおけるルーメン発酵で過剰な窒素供給がアンモニア生成を増加させることが知られている⁷⁾。したがって、大腸内への窒素の供給によりアンモニア生成が促進された可能性が高い。アンモニアは細胞毒性が強く、大腸がん発症を誘導することが知られている⁸⁾。そのため、適正な窒素供給によりアンモニア生成量を最小限にし、大腸がん発症を抑制すると考えられる酪酸の生成を増大させることが重要である。*in vitro*バッチ培養でSRP添加量少ないとき、アンモニア量が培養10時間目以降低下することが示された。これはSRPが不足し、生成されたアンモニ

アがさらに腸内細菌に利用されたものと推察される。このことから、ペクチンの25%以下のSRP添加はアンモニア生成を著しく増大させることなく、プロピオン酸や酪酸の生成を促進できるかもしれない。

以上より、ペクチンの発酵時にSRPを供給すると、プロピオン酸や酪酸の生成が亢進することが再確認された。したがって、SRPによる窒素源の供給が発酵変動に寄与する可能性が示された。また、SRPの供給が特定の腸内細菌種の活性化に関与し、それが発酵を改変している可能性が示唆された。窒素供給はアンモニア生成を促す可能性もあるため、今後さらにアンモニア生成量が増加しない条件を詳細に見出すことが重要であると思われる。

要 約

窒素供給による大腸発酵の変動機構を明らかにするため、ペクチンと大豆たん白質難消化性画分(SRP)を与えたときの大腸発酵の変動と大腸内フローラの変動を調べた。ペクチンとSRPを添加した培地に盲腸内容物を植菌後、培養した。SRPの濃度に依存し酪酸の生成量が増加した。以上より、SRPによる窒素供給が酪酸生成の増加に重要な役割を果たすことが示唆された。また、SRPの添加量に依存しアンモニア量が増加したが、培養後半には減少した。このため腸内細菌がアンモニアを窒素源として利用していることが判明した。ラットにセルロース食、ペクチン食(PE)、PE+SRP食を与えた結果、盲腸内容物中酪酸量および濃度はSRP添加で有意に増加した。SRP投与による腸内フローラの変動は大きくなかったが、特定の細菌種の活性化が認められた。以上より、SRPは特定細菌種の活性化を介してペクチン発酵時に酪酸生成を増加させると思われる。SRPは大腸内環境の正常化を実現するために重要な素材であると考えられる。

文 献

- 1) Roediger WE (1980): Role of anaerobic bacteria in the metabolic welfare of the colonic mucosa in man. *Gut*, **21**, 793-798.
- 2) Augeron C and Laboisse CL (1984): Emergence of permanently differentiated cell clones in a human colonic cancer cell line in culture after treatment with sodium butyrate. *Cancer Res*, **44**, 3961-3969.
- 3) Hague A, Elder DJ, Hicks DJ and Paraskeva C (1995): Apoptosis in colorectal tumour cells: induction by the short chain fatty acids butyrate, propionate and acetate and by the bile salt deoxycholate. *Int J Cancer*, **60**, 400-406.
- 4) Flickinger EA, Hatch TF, Wofford RC, Grieshop CM, Murray SM and Fahey GC Jr (2002): *In vitro* fermentation properties of selected fructooligosaccharide-containing vegetables and *in vivo* colonic microbial populations are affected by the diets of healthy human infants. *J Nutr*, **132**, 2188-2194.
- 5) Morita T, Kasaoka S, Hase K and Kiriyama S (1999): Oligo-L-methionine and resistant protein promote cecal butyrate production in rats fed resistant starch and fructooligosaccharide. *J Nutr*, **129**, 1333-1339.
- 6) Himelbloom BH and Canale-Parola E (1989): *Clostridium methylpentosum* sp. nov.: a ring-shaped intestinal bacterium that ferments only methylpentoses and pentoses. *Arch Microbiol*, **151**, 287-293.
- 7) James T, Meyer D, Esparza E, Depeters, EJ and Perez-Monti H (1999): Effects of dietary nitrogen manipulation on ammonia volatilization from manure from Holstein heifers. *J Dairy Sci*, **82**, 2430-2439.
- 8) Topping DC and Visek WJ (1976): Nitrogen intake and tumorigenesis in rats injected with 1,2-dimethylhydrazine. *J Nutr*, **106**, 1583-1590.