

<令和4年度助成>

## 腸内環境への影響に着目した食事性たんぱく質の評価

細見 亮太

(関西大学 化学生命工学部)

### 目的

私たちは食事から様々な種類のたんぱく質を摂取している。摂取する食事性たんぱく質の由来によって、たんぱく質を構成するアミノ酸組成や消化器系での消化吸収効率が異なる。たんぱく質の栄養価に関して、食事性たんぱく質に含まれるべき必須アミノ酸組成（アミノ酸評点パターン）と、たんぱく質中の各必須アミノ酸量をそれぞれ比較することで、たんぱく質の栄養価をスコア化している（アミノ酸スコア）。最近ではアミノ酸スコアに、たんぱく質に含まれる各必須アミノ酸の回腸末端消化率を加味した Digestible Indispensable Amino Acid Score（消化性必須アミノ酸スコア）の使用が推奨されている<sup>1)</sup>。

メタゲノム解析を中心とする網羅解析技術の進歩から、腸内細菌叢は宿主の代謝、免疫応答、情動や行動に影響を与え、肥満や糖尿病などの代謝性疾患、アルツハイマー病などの脳神経疾患など、多種多様な疾患の要因となることが明らかにされつつある。食事は腸内細菌叢に影響を及ぼす因子の1つであり、とくに難消化性成分は腸内細菌叢に直接作用できることから影響は大きい。食事性たんぱく質の消化器系における未消化たんぱく質残渣をレジスタントプロテイン（RP）と呼び、これまでに腸内細菌叢の制御に役立つ可能性が示唆されている<sup>2)</sup>。一方で、RPの腸内細菌による異化反応によって、疾患の危険因子であるアンモニア、硫化水素、インドールなどの代謝物が産生されるため、負の影響も示唆されている<sup>3)</sup>。

これまで食事性たんぱく質の栄養価は、宿主への

アミノ酸の供給という観点でのみ評価されており、腸内細菌の栄養源となることは考慮されていない。宿主の健康状態に大きな影響を及ぼすことが次々に報告されている腸内細菌叢への食事性たんぱく質の影響を評価することは、食事性たんぱく質の栄養機能性の理解につながる。そこで本研究では、腸内細菌に直接作用できるRPの成分組成および腸内細菌叢への影響を明らかにすることを目的とした。日本人の食品群別たんぱく質摂取量において大きな割合を占めている米、小麦、豆類（大豆）、魚介類（白身魚および赤身魚）、肉類（牛、豚および鶏肉）、卵類（卵白）、乳類（カゼインおよび乳清）といった多種類のたんぱく質に着目し、これらのたんぱく質源について、人工消化モデルを用いてRPを採取し、その成分組成を評価した。さらに、RPを唯一窒素源とした培地を用いて、マウス腸内に生息している *Ligilactobacillus murinus* の増殖に対する影響を評価した。

### 実験方法

#### 1. 食事性たんぱく質の調製

スケトウダラ（白身魚）、マグロ赤身（赤身魚）、牛、豚、鶏むね肉（鶏）を凍結乾燥後、*n*-ヘキサン/エタノール（2：1 v/v）を用いて脱脂・粉末化した。大豆たんぱく質は不二製油株式会社、米たんぱく質は亀田製菓株式会社より供与いただいた。他のたんぱく質（カゼイン、乳清たんぱく質 [乳清]、卵白アルブミン [卵]、小麦グルテン [小麦]）は市販品を使用した。

## 2. RP の採取および成分分析

人工消化モデルを用いて、消化管下部まで到達する可能性のある RP を採取した。すなわち、各たんぱく質粉末を 100 mL 容三角フラスコに 5 g 秤量し、蒸留水 50 mL を加え、塩酸で pH 2.0 に調整し、豚由来ペプシン 200 mg を加え反応を開始した。37°C、100 rpm で振盪し、120 分間消化を行った。その後水酸化ナトリウム溶液で pH 7.4 に調整後、豚由来パンクレアチン 180 mg を加え同様に 120 分間消化した。ペプシン消化では pH 2.0、パンクレアチン消化では pH 7.4 になるように調整した。経時的に人工消化液を採取し、トリクロロ酢酸による除たんぱく後、600 × g、20 秒間遠心分離した上清のアミノ酸量をトリニトロベンゼンスルホン酸吸光光度法で求めた。パンクレアチン消化後、消化液を 80°C の温浴に 20 分間静置して酵素反応を停止した。次いで、消化液を透析セルロースチューブ（分画分子量 1 万）に移し、48 時間透析後、凍結乾燥を行った。凍結乾燥後の粉末について、一般成分組成、構成たんぱく質アミノ酸組成、分子量および可溶性たんぱく質量を測定した。

## 3. *Ligilactobacillus murinus* の増殖

MRS 培地で *L. murinus* の前培養を行い、人工消

化モデルで得た各 RP を唯一窒素源とした合成培地で本培養を行った。6 時間培養後、希釈平板法によりコロニー形成単位 (CFU) の計測を行った。

## 4. 動物実験

対照餌料にたんぱく質源はカゼインとする AIN 93G 餌料 (CAS 群)、対照餌料にカゼイン由来 RP および白身魚由来 RP を 2% 置換した餌料 (それぞれ CAS+CRP および CAS+FRP 群) を調製した。実験餌料を 4 週齢雄 C57BL/6J マウスに 28 日間給餌後、常法に従い解剖し、盲腸を摘出した。盲腸内容物から DNA を抽出し、メタ 16S 解析に供した。

## 結果および考察

### 1. RP の生成率および成分分析

試験たんぱく質粉末の粗たんぱく質量はどれも約 80 ~ 90% であった。人工消化モデルで採取した試験たんぱく質の RP 生成率を図 1 に示した。卵が一番高い値を示したが、卵白アルブミンは水への溶解性が低く消化液中で凝集しており、酵素による消化反応が進んでいなかったことが影響していると考えた。RP 生成率は、動物性たんぱく質 (卵は除く) では約 8 ~ 15%、植物性たんぱく質では約 16 ~ 25%

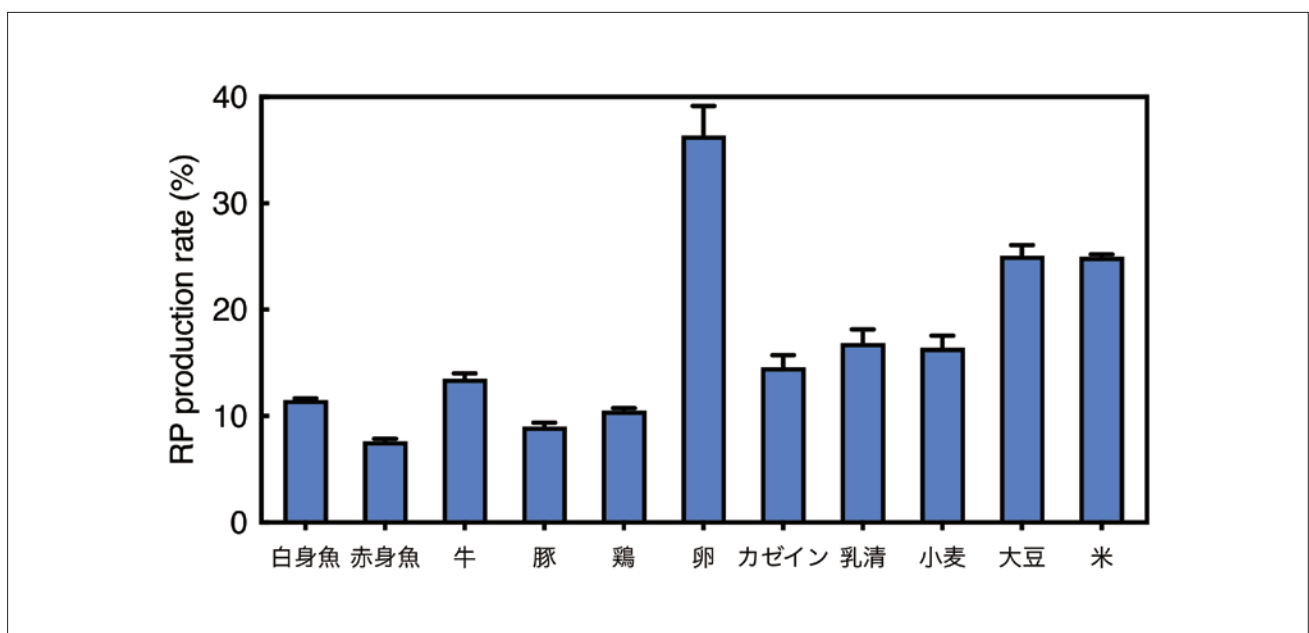


図 1 試験たんぱく質の難消化性たんぱく質 (RP) 生成率  
たんぱく質を人工消化モデルで消化・透析した後の残渣を RP とした。平均値 ± 標準誤差

であった。一般的に、植物性たんぱく質は動物性たんぱく質よりも消化性が低いことが知られており、本試験で得られた RP 生成率も同様の傾向が見られた。RP の成分分析を行ったところ、粗たんぱく質量はいずれの試験たんぱく質でも約 60～70%を示した。また RP の構成たんぱく質アミノ酸組成は、消化前の組成と同様の傾向を示した。

RP の分子量を Tricine-SDS-PAGE で評価した。動物性たんぱく質のうちミオシンとアクチンを主要な構成たんぱく質とする白身魚、赤身魚、牛、豚および鶏は、約 3,000～6,500 Da にスメア状に染色された。一方、植物性たんぱく質は、3,000～6,500 Da のスメア状に染色されているものに加えて、いくつかバンド状にも染色された。植物性たんぱく質中には、消化酵素に対して耐性のあるたんぱく質が含まれているため、そのたんぱく質が消化されずに RP に含まれていたと考えた。

## 2. *L. murinus* の増殖に与える影響

これまでに当研究室では、白身魚たんぱく質の摂取は盲腸内の *L. murinus* を含む *Lactobacillus* 属の構成比率がカゼイン、乳清および鶏むね肉たんぱく質を摂取した場合よりも有意に増加することを動物実験で確認している (Unpublished data)。*L. murinus*

はげっ歯類特有の細菌であり、ヒト腸内細菌叢には存在しておらず<sup>4)</sup>、ヒトの腸内細菌叢に対する影響を検討するには不適當な細菌である。しかし、ヒトを対象とした試験では、食生活において様々なたんぱく質を摂取しており、1種類のたんぱく質の摂取による腸内細菌叢の変化は評価できないが、動物実験では、1種類のたんぱく質の摂取による腸内細菌叢の変化が評価できる。そのため本研究では、当研究室の動物実験の結果から、*L. murinus* を選択した。RP を唯一窒素源とする培地を用い、*L. murinus* の増殖に及ぼす影響を評価した (図 2)。その結果、小麦と乳清 RP は、他の RP と比較して、*L. murinus* 数が低かったが、他の RP と大きな違いはないと考えた。マウス腸内の主要な乳酸菌である *L. murinus* は、どのたんぱく質の RP も窒素源として利用できることがわかった。

## 3. マウス腸内 *Lactobacillus* 属の構成比率に与える影響

これまでに当研究室では、白身魚たんぱく質の摂取はマウスおよびラット腸内 *Lactobacillus* 属の構成比率がカゼインの摂取と比較して有意に増加することを幾度も確認している。この腸内 *Lactobacillus* 属の増加には、盲腸にまで到達する RP の影響が大

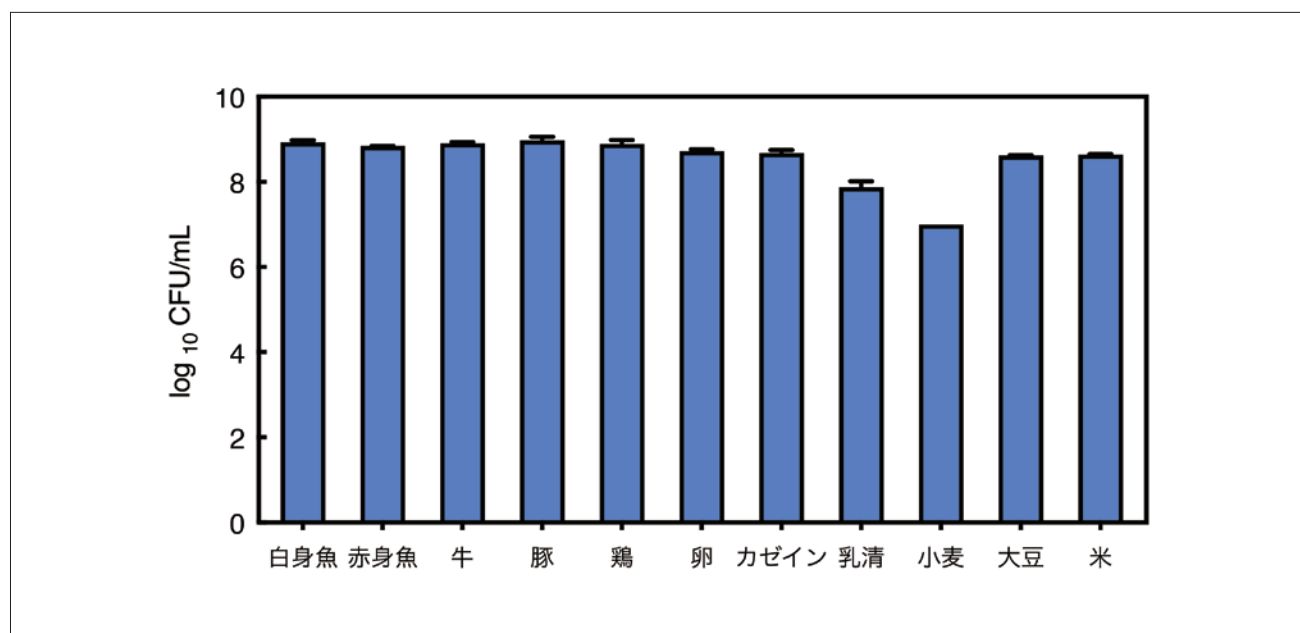


図2 難消化性たんぱく質 (RP) が *Ligilactobacillus murinus* の増殖に及ぼす影響  
RP を唯一窒素源とする培地で *L. murinus* を 6 時間培養後の菌数を示した。平均値±標準誤差

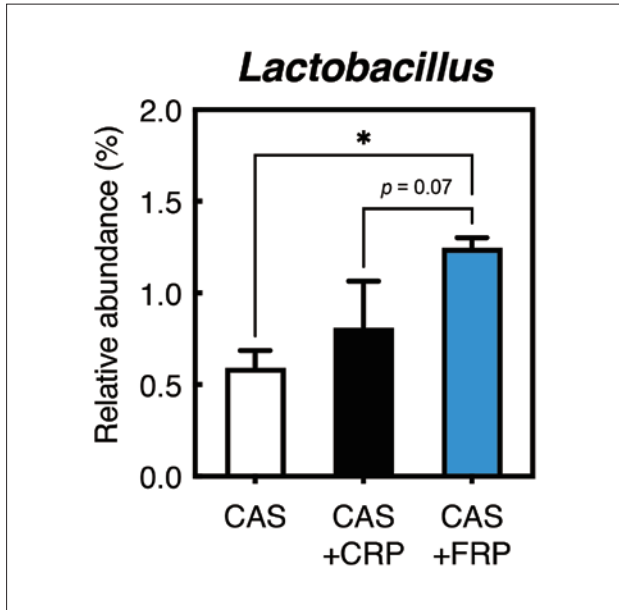


図3 難消化性たんぱく質の給餌が盲腸内 *Lactobacillus* 属構成比率に及ぼす影響  
試験餌料を4週間給餌したマウスの盲腸内 *Lactobacillus* 属の構成比率を示した。CAS: 20%カゼイン餌料、CAS+CRP: 18%カゼイン+2%カゼインRP餌料、CAS+FRP: 18%カゼイン+2%白身魚RP餌料。平均値±標準誤差

きいと考え、カゼインをベースとする餌料にカゼインおよび白身魚たんぱく質RPを添加して、マウスに給餌した。28日間給餌後の盲腸内 *Lactobacillus* 属の構成比率を示した(図3)。CAS+FRP群の *Lactobacillus* 属の構成比率は、CAS群と比較して有意に高値を示し、餌料中のRP濃度が同等のCAS+CRP群と比較しても高い傾向にあった( $p = 0.07$ )。本試験ではどのRPでも *L. murinus* の増殖に大きな影響の違いは見られなかったが(図2)、実際にRPをマウスに投与した場合には、*Lactobacillus* 属の構成比率に違いが見られた。一種類の細菌を用いた結果と動物実験の結果が相関しなかった理由として、腸内には数多くの種類の細菌が生息しており、これ

らが互いに影響を及ぼしながら共生していることがあげられる。そのため現在、食事性たんぱく質の腸内細菌叢に及ぼす影響を理解していくために、RPの評価に適した腸内細菌発酵培養モデルの構築を進めている。今後、この腸内細菌発酵培養モデルを用いて、RPと腸内環境(腸内細菌叢およびその代謝物)の関連について評価する予定である。

#### 謝辞

本研究の遂行にあたり、研究助成を賜りました公益財団法人浦上食品・食文化振興財団に厚く御礼を申し上げます。

#### 参考文献

- 1) Dietary protein quality evaluation in human nutrition. Report of an FAQ Expert Consultation. (2013). FAO food and nutrition paper, 92, 1-66.
- 2) Ogita, T., Namai, F., Mikami, A., Ishiguro, T., Umezawa, K., Uyeno, Y., & Shimosato, T. (2021). A Soybean Resistant Protein-Containing Diet Increased the Production of Reg3 $\gamma$  Through the Regulation of the Gut Microbiota and Enhanced the Intestinal Barrier Function in Mice. *Frontiers in nutrition*, 8, 701466.
- 3) Rodríguez-Romero, J. J., Durán-Castañeda, A. C., Cárdenas-Castro, A. P., Sánchez-Burgos, J. A., Zamora-Gasga, V. M., & Sáyo-Ayerdi, S. G. (2021). What we know about protein gut metabolites: Implications and insights for human health and diseases. *Food chemistry X*, 13, 100195.
- 4) Hemme, D., Raibaud, P., Ducluzeau, R., Galpin, J. V., Sicard, P., & Van Heijenoort, J. (1980). *Lactobacillus murinus* n. sp., a new species of the autochthonous dominant flora of the digestive tract of rat and mouse. *Annales de microbiologie*, 131(3), 297-308.

## Evaluation of dietary protein with a focus on its effect on gut microbiota

**Ryota HOSOMI**

*Department of Life Science and Biotechnology, Kansai University*

The nutritional value of dietary protein has heretofore been assessed only with respect to the supply of amino acids to the host. This does not take into account the fact that dietary protein is a source of nutrition for gut bacteria, which has a significant impact on the health status of the host. Therefore, in this study, resistant proteins (RPs) were collected from various dietary protein sources using an *in vitro* digestion model, and their compositions were evaluated. The rate of RP production was lower for animal protein and higher for plant protein. The amino acid composition of RP showed a trend similar to its composition prior to digestion, while the molecular weight of RPs ranged from 3.0-6.5 kDa. The effect of RP on the growth of *Ligilactobacillus murinus* in the gut of mice was assessed in a medium in which RPs were the sole source of nitrogen, and it was found that any RPs could be used as a nitrogen source. When mice were fed casein RP and fish RP, the proportion of *Lactobacillus*, to which *L. murinus* belongs increased in the fish RP, which differed from the results from the *in vitro* study. This discrepancy may be because the gut is inhabited by numerous bacteria, which symbiotically engage in cross-talk with each other. To understand the effects of dietary protein on gut microbiota, our research team is currently constructing a gut bacterial fermentation model suitable for assessing RP. In the future, this gut bacterial fermentation model will be used to assess the relationship between RP and the gut environment (gut microbiota and metabolites).