

ケストースが持つ多様な生理機能の解明と実用化に向けた取り組み

誌名	日本栄養・食糧学会誌 : Nippon eiy ō shokury ō gakkaishi = Journal of Japanese Society of Nutrition and Food Science
ISSN	02873516
著者名	門田,吉弘 北浦,靖之 遠藤,明仁 栃尾,巧
発行元	日本栄養・食糧学会
巻/号	73巻4号
巻号補足	
掲載ページ	p. 123-131
発行年月	2020年8月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



ケストースが持つ多様な生理機能の解明と 実用化に向けた取り組み

(令和元年度日本栄養・食糧学会技術賞受賞)

門 田 吉 弘^{*1}, 北 浦 靖 之², 遠 藤 明 仁³, 栃 尾 巧¹

(2020年3月18日受付; 2020年5月18日受理)

要旨: ケストースは、スクロースに1分子のフルクトースが結合した三糖のオリゴ糖である。我々は、プレバイオティクスとして流通している種々のオリゴ糖との比較試験を実施し、ケストースが、最も幅広い腸内有用菌に対して良好な増殖を示すオリゴ糖であることを明らかにした。さらに、ケストースの継続的な摂取によって、アレルギー疾患や生活習慣病を予防・改善できる可能性も明らかにしており、ケストースが様々な生理機能を有するプレバイオティクスとして、人々の健康維持に貢献できる可能性を示した。また、我々は、ケストースの実用化に関する研究として、工業的製造の際に使用される酵素の改良にも取り組んでいる。本稿では、ケストースによる有用菌増殖効果をはじめとして、ケストースが有する様々な生理機能および、製造酵素の改良に向けた取り組みについて紹介する。

キーワード: ケストース, プレバイオティクス, アレルギー疾患, 生活習慣病, 酵素改良

1. ケストースとは

次世代シーケンサーによるメタ16S解析の登場によって、腸内マイクロバイオータの研究は著しい進展を見せており、特に、腸内細菌叢の乱れと疾患との関連性や、疾患の発症に直接的に関わる腸内細菌が次々と報告されている。また、このような流れを受け、腸内環境をより良い状態に維持する食品にも注目が集まっている。腸内環境を改善する食品は、主として「適量摂取することで、宿主に有益な効果をもたらす生きた微生物」であるプロバイオティクス¹⁾と、「腸内細菌を活性化することで、宿主に有益な作用をもたらす非生物性の食品成分」であるプレバイオティクス²⁾の2種類が存在する。プロバイオティクスを含むヨーグルトは、我々にとって身近な健康食品として定着しており、その健康効果について検証した研究結果も多数報告されている。しかしながら、プロバイオティクスは生菌であるため、食品保存中に生理活性に変化が生じるといった課題が存在する。一方で、難消化性オリゴ糖に代表されるプレバイオティクスは、野菜や果物に含まれているため安全性が高く、食品加工耐性にも優れることから、プロバイオティクスが抱える課題の解決が可能な食品として注目されている。

ケストースは、スクロースに1分子のフルクトースが結合した三糖のオリゴ糖(図1)で、タマネギやライ麦など、我々が日常的に摂取する野菜や果物にも少量ながら含まれている。ケストースは、吸湿性が極めて低く、耐熱性にも優れるため食品加工時の利便性が高く、砂糖に類似した甘みを示すことから砂糖の代替品としての使用も可能である。また、ケストースは難消化性を示し、経口摂取後は消化されることなく消化管下部へと輸送され腸内細菌により選択的に利用されるため、プレバイオティクスとなり得る条件を備えている³⁾。ケストースは、工業的には、スクロースに糸状菌由来の β フルクトフラノシダーゼ(β -fructofuranosidase: β -FFase)という酵素を反応させることにより製造されるが、糸状菌由来の β -FFaseはケストース以外に、四糖のニストースや五糖のフラクトシルニストースなどの高分子の副生成物を生成する課題が存在する。

我々は、ケストースのプレバイオティクス効果に着目し、様々な効果の検証を実施している。また、同時に量産化に向け、酵素工学的手法を用いて、ケストースをより効率的に生成する β -FFaseの改良を行っている。本稿では、上記の生理的機能のいくつかを示すとともに、量産化に向けた酵素工学的アプローチに関し紹介する。

* 連絡者・別刷請求先 (E-mail: y-kadota@bfsci.co.jp)

¹ 物産フードサイエンス株式会社研究開発センター (478-0046 愛知県知多市北浜町 24-12)

² 名古屋大学大学院生命農学研究科応用生命科学専攻 (464-8601 愛知県名古屋市中区千種区不老町)

³ 東京農業大学生物産学学部食香粧化学科 (099-2493 北海道網走市八坂 196)

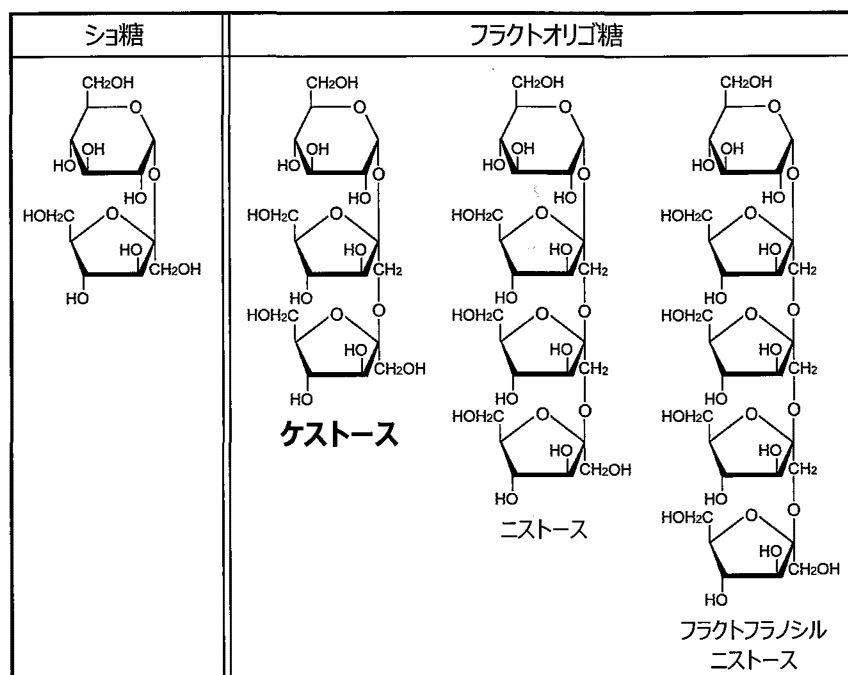


図1 ケストースならびにフラクトオリゴ糖の構造

2. 腸内細菌に対するケストースの効果

2.1 腸管系乳酸菌およびビフィズス菌に対する効果

ヒトの消化管内に約1,000種類存在すると言われている腸内細菌の中でも、宿主に有益な効果を与える腸内細菌は有用菌として扱われる⁴⁾。ヒトにおいては、*Lactobacillus* 属および *Bifidobacterium* 属が主要な有用菌に位置づけられており、プロバイオティクスとして広く利用されている⁵⁾。一方で、プレバイオティクスも腸内の *Lactobacillus* 属および *Bifidobacterium* 属を増加させる方法として有効であることが明らかとなっている⁶⁾。現在、市場には、キシロオリゴ糖、フラクトオリゴ糖、ガラクトオリゴ糖をはじめとした多様なプレバイオティクスが流通しており、それぞれ腸内細菌叢への影響が検討されている⁷⁻⁹⁾。しかしながら、各プレバイオティクスによる *Lactobacillus* 属および *Bifidobacterium* 属の増殖への影響を比較した報告はなされていない。

我々は、ヒト腸内で見いだされる12菌種18菌株の *Lactobacillus* 属細菌および7菌種15菌株の *Bifidobacterium* 属細菌のそれぞれを、種々のプレバイオティクスとともに培養し、有用菌の増殖に与える影響を比較した。その結果、*Lactobacillus* 属および *Bifidobacterium* 属ともに、ケストースが最も多くの細菌において良好な増殖をもたらすことが明らかとなった(表1)¹⁰⁾¹¹⁾。特に、*Bifidobacterium* 属細菌は四糖のフラクトオリゴ糖であるニストースと比べ、ケストースで優位に生育が促進されることを明らかにした(表1)。

2.2 酪酸産生菌に対する効果

腸内の有用菌が宿主にとって有益な効果を及ぼす機序

の一つとして、腸内細菌によって産生される短鎖脂肪酸の関与が報告されている¹²⁾¹³⁾。特に酪酸は、免疫寛容を司る制御性T細胞の分化を誘導することが報告されており、アレルギー疾患の予防と関連性があることが注目されている¹⁴⁾。腸内にて酪酸を産生する細菌は、酪酸産生菌と呼ばれ、ヒトの腸内においては *Faecalibacterium prausnitzii* および *Clostridium* cluster XIVa に分類される *Anaerostipes caccae* などが報告されている¹⁵⁾¹⁶⁾。これら酪酸産生菌は、近年の研究において、ビフィズス菌および乳酸菌に続く次世代の有用菌として注目されているが、酸素への感受性が高く生菌の維持が困難であることなど、様々な課題から、プロバイオティクスとしての開発は難しい状況である。

我々は、酪酸産生菌の増殖に対するケストースの影響について検討し、ケストースを摂取することで *F. prausnitzii* および *Clostridium* cluster XIVa が増加することを明らかにした¹⁷⁾¹⁸⁾。さらに、*Clostridium* cluster XIVa に分類される *Anaerostipes caccae* は、我々が試験した様々なプレバイオティクスの中ではケストースのみを資化することも明らかとした(表1)¹⁶⁾。

3. アレルギー疾患に対するケストースの効果

アレルギーは、「免疫反応に基づく生体に対する全身的または局所的な障害」と定義されており、液性免疫反応に基づくⅠ、Ⅱ、Ⅲ型アレルギーと、細胞性免疫反応に基づくⅣ型アレルギーに大別される¹⁹⁾。我が国では、全人口の約2人に1人が何らかのアレルギー疾患に罹患しており、特にⅠ型アレルギーに分類されるアトピー性皮膚炎およびアレルギー性鼻炎、喘息の罹患率が高い傾

表 1 種々のオリゴ糖による有用菌増殖効果の比較検討

	Kes	Nys	FOSs	XOSs	Raf	LS
<i>Lactobacillus</i>						
<i>acidophilus</i> NRIC 1547 ^T						
<i>acidophilus</i> NRIC 0525						
<i>delbrueckii</i> JCM 1012 ^T					+	
<i>gasseri</i> JCM 1639 ^T						
<i>johnsonii</i> NRIC 0220 ^T						
<i>plantarum</i> NRIC 1067 ^T	++		+		++	++
<i>plantarum</i> NRIC 1068 ^T	++				++	++
<i>rhamnosus</i> JCM 1136 ^T						+
<i>rhamnosus</i> GG						
<i>paracasei</i> NRIC 0625	++	++	++			++
<i>paracasei</i> NRIC 1028						
<i>paracasei</i> NRIC 1044	+++	+++	+++			+++
<i>sakei</i> NRIC 1071 ^T						
<i>sakei</i> NRIC 0126	+		+			
<i>fermentum</i> NRIC 1752 ^T					+	
<i>fermentum</i> NRIC 1047	+					+
<i>reuteri</i> JCM 1112 ^T	+				+	+
<i>citreum</i> NRIC 1776 ^T	+					
<i>Bifidobacterium</i>						
<i>adolescentis</i> JCM 1275 ^T	++	+++	+++	+	++	+++
<i>adolescentis</i> JCM 1251	+					
<i>lactis</i> JCM 10602 ^T	+++	++	+	+	+++	+++
<i>bifidum</i> JCM 1255 ^T						
<i>bifidum</i> JCM 1254						
<i>breve</i> JCM 1192 ^T	+++	+	+	+	++	++
<i>breve</i> JCM 7016	+++		+	+	+++	+++
<i>catenulatum</i> JCM 1194 ^T	+++	++	+		+	++
<i>longum</i> JCM 1217 ^T	++		+		++	++
<i>longum</i> JCM 7052	++		+		+	
<i>longum</i> JCM 11340	+++		+	+	+++	+++
<i>infantis</i> JCM 1222 ^T	+++	+	+	++	+++	+++
<i>infantis</i> JCM 1210	++	++	+++	++	+++	+++
<i>infantis</i> JCM 1272	+++		+	+	+++	+++
<i>pseudocatenulatum</i> JCM 1200 ^T	+		++		+++	++
<i>Clostridium</i> cluster XIVa						
<i>Anaerostipes caccae</i> JCM 13470 ^T	++					
<i>Blautia coccoides</i> JCM 1395 ^T	++	+	++		+++	++
<i>Blautia producta</i> JCM 1471 ^T		+				
<i>Blautia hansenii</i> JCM 14655 ^T	+		+			
<i>Ruminococcus gnavus</i> JCM 6515 ^T	+++	+++	+++		++	
<i>Ruminococcus faecis</i> JCM 15917 ^T	+		+		+++	+++

各オリゴ糖を添加した培地に嫌気培養し、培養終了後の濁度を 660 nm における吸光度 (OD₆₆₀) にて評価した。1.0 ≤ OD₆₆₀ < 1.5 の場合には + を、1.5 ≤ OD₆₆₀ < 2.0 の場合には ++ を、2.0 ≤ OD₆₆₀ の場合には +++ を表記した。

向にあると言われている。

1999年, Bjorksten *et al.* によって, アトピー性皮膚炎患児の腸内では *Lactobacillus* 属が減少していることが報告されたことに端を発し²⁰⁾, 腸内細菌叢とアレルギー疾患との関係について様々な研究がなされるようになった。2001年には Kalliomäki *et al.* が, *Bifidobacterium* 属の少ない幼児ほどアトピー性皮膚炎に罹患しやすく²¹⁾, プロバイオティクス (*Lactobacillus rhamnosus* GG) の摂取がアトピー性皮膚炎の予防に有効であること²²⁾を報告しており, 腸内の乳酸菌, ビフィズス菌群がアレルギー疾患の予防に深く関与する可能性が示唆されている。これらの報告から, 我々は, 「乳酸菌群, ビフィズス菌群に対し, 幅広い資化性を示すとともに, 免疫寛容を誘導する酪酸を産生する酪酸産生菌を特異的に増加させるケストースは, アレルギー疾患の予防改善効果を示すのではないか」との仮説を立て, 複数の臨床試験を実施してきた。本稿では, 乳幼児アトピー性皮膚炎および小児通年性アレルギー性鼻炎に対するケストースの効果について紹介する。

3.1 ケストースによる乳幼児アトピー性皮膚炎改善効果

アトピー性皮膚炎と診断された0-3歳の乳幼児30名を2群に分け, 1日あたり1-2gのケストースまたはマルトース(プラセボ)を継続的に摂取させた。試験開始時および試験開始から6週間後, 12週間後に Intensity Score of Atopic Dermatitis (ISAD) および Severity Scoring of Atopic Dermatitis (SCORAD) によって皮疹の重症度を判定した結果, ケストースを摂取させた群のみ ISAD スコアおよび SCORAD スコアが有意に減少した。また, 試験開始から6週間後の ISAD スコアおよび SCORAD スコア, 試験開始から12週間後の SCORAD スコアは, プラセボ群と比較してケストース群において有意な低値を示した(図2)²³⁾。

我々は, 続いて0-5歳の乳幼児アトピー性皮膚炎患児65名を対象とし, ケストースの摂取がアトピー性皮膚炎の重症度および糞便中に存在する *F. prausnitzii* の菌数に与える影響について検討した。その結果, ケストースの摂取によって糞便中における *F. prausnitzii* の菌数が増加するとともに, アトピー性皮膚炎の重症度スコア

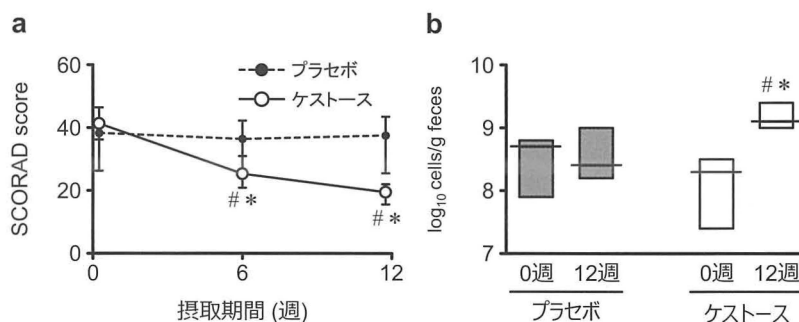


図2 乳幼児アトピー性皮膚炎に対するケストースの効果

皮疹の重症度 (a) および糞便中のビフィズス菌数 (b) を中央値および四分位範囲で示した。同じ試験食品内での比較は, Wilcoxon の符号付順位検定にて実施した。有意基準は $p < 0.05$ とし, 試験開始時との有意差を # で示した。また, 同じ摂取期間における試験食品間の比較には Mann-Whitney の U 検定を用いた。有意水準は $p < 0.05$ とし, 有意差を * で示した。

表2 アトピー性皮膚炎の皮疹と腸内細菌との相関関係

Groups	The improvement in SCORAD score	Correlation between the improvement in SCORAD score and the increase in bacterial counts			
		<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>		<i>Bifidobacterium catenulatum</i>	
		Rs	P	Rs	P
Placebo ($n=12$)	3.99 (-4.67-9.18)	0.11	>0.05	0.55	>0.05
Kestose ($n=16$)	4.05 (0.90-9.86)	0.52	0.044	0.33	>0.05

アトピー性皮膚炎に罹患した2-5歳の乳幼児を無作為に2群に分け, ケストースまたはマルトース(プラセボ)を摂取させた。皮疹の評価には SCORAD を使用しており, 試験食品の摂取による SCORAD スコアの変化を皮疹の改善度とし, その中央値および四分位範囲を示した。また, 糞便中における *Faecalibacterium prausnitzii* および *Bifidobacterium catenulatum* のコピー数は, リアルタイム PCR 法にて測定した。試験期間中における *Faecalibacterium prausnitzii* および *Bifidobacterium catenulatum* のコピー数の変化と皮疹の改善度との相関について検討するために, Spearman の順位相関係数 (Rs) を算出し, p 値とともにそれを示した。

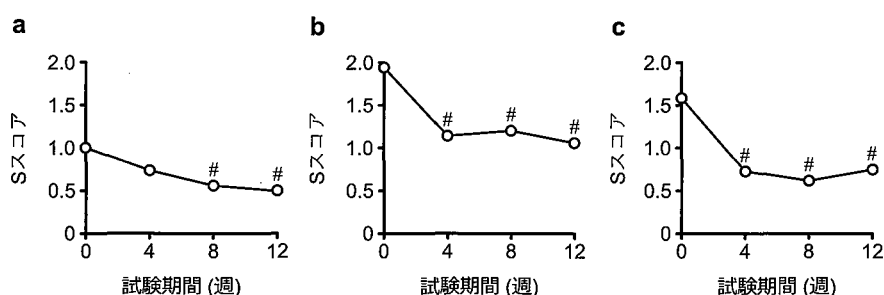


図3 小児通年性アレルギー性鼻炎に対するケストースの効果
くしゃみ (a) および鼻水 (b)、鼻閉 (c) の重症度 (Sympton スコア: S スコア) を経時的に評価し、その平均値を示した。統計解析には Wilcoxon の符号付順位検定を使用した。有意水準を $p < 0.05$ とし、試験開始時との有意差を # で示した。

が漸減することが明らかとなった (表2)²⁴⁾。

3.2 ケストースによる小児通年性アレルギー性鼻炎改善効果

中等症以上の通年性アレルギー性鼻炎に罹患した学童58名を被験ボランティアとし、オープン試験を実施した。被験ボランティアには、1日あたり1-2gのケストースを継続的に摂取させ、試験期間中の鼻症状 (鼻閉、鼻水、くしゃみ) の変化および日常生活への支障度、薬物使用状況をアレルギー日誌に記録させた。

アレルギー日誌をもとに、鼻症状の重症度 (Sympton スコア: S スコア) を奥田分類の変法によって判定した結果、全ての鼻症状において、ケストースの摂取によるSスコアの減少が確認された (図3)。さらに、日常生活への支障度およびアレルギー日誌の薬物使用状況から算出した薬物スコア (Medication スコア: M スコア) においても、ケストースの摂取によるスコアの減少が確認された。以上の結果より、ケストースは通年性アレルギー性鼻炎に対しても改善効果を有する可能性が示唆された²⁵⁾。

4. インスリン感受性に対するケストースの効果

インスリン感受性が低下し、膵臓より分泌されたインスリンが抹消組織にて十分に作用しない状態は、インスリン抵抗性と定義される²⁶⁾。インスリン抵抗性の初期段階では、低下したインスリンの作用を補うべくインスリンの分泌が促進されるため、血中インスリン濃度が増加することが知られている²⁶⁾。また、インスリン抵抗性は、2型糖尿病の他に脂質異常症および高血圧を誘導することも明らかになっており、生活習慣病の主要原因であると考えられている²⁷⁾。

前述したように、腸内細菌と疾患との関係に関する研究は、主にアレルギー疾患を中心に実施されてきたが、2013年、Ridaura *et al.* によって、肥満者の糞便を移植されたマウスの体脂肪が増加することが報告され²⁸⁾、生活習慣病と腸内細菌叢との関係も注目されるようになった。2017年には、健康者の糞便を移植された肥満者においてインスリン感受性が亢進することが報告されてお

り²⁹⁾、腸内細菌叢がインスリン抵抗性においても重要な働きを示すことが明らかとなった。また、腸内細菌が分泌する短鎖脂肪酸が、インスリン抵抗性を改善する可能性も報告されている³⁰⁾。一方、プレバイオティクスに関しては特定成分の摂取により、インスリン抵抗性の改善を示した報告は存在しない。本稿では、ケストースがインスリン抵抗性に与える影響について検討するために実施した動物試験の結果を報告する。

8週齢のSprague-Dawley系雄性ラットを、標準食 (AIN-93G) またはケストースを5%配合した飼料にて4週間飼育した後に、摂食下で解剖を実施した。解剖時に採取した盲腸内容物を用いて、乳酸菌および酪酸産生菌 (*Clostridium* cluster XIVa) のコピー数と短鎖脂肪酸含量を測定した結果、標準食と比較して、ケストースを配合した飼料にて飼育した群において *Bifidobacterium* 属および *Clostridium* cluster XIVa のコピー数が有意に増加した。また、ケストースを配合した飼料にて飼育した群において、盲腸内容物中における酢酸および酪酸の含量が有意な高値を示した。血糖値は全ての群において同様の値を示したが、ケストースを5%含む飼料にて飼育した群の血清インスリン濃度が、標準食群と比較して有意な低値を示した。これらの結果は、ケストースによってインスリン感受性が亢進する可能性を示唆しており、ケストースがインスリン抵抗性改善効果を有することが期待される (表3)¹⁸⁾。

5. グルタチオンSトランスフェラーゼ (GST) の発現に与えるケストースの効果

消化管下部に存在する腸内細菌によって産生された短鎖脂肪酸は、腸上皮細胞に吸収され、その一部はエネルギー源として使用される³¹⁾。また、腸上皮細胞にて使用されなかった短鎖脂肪酸は、門脈を経て肝臓へ運ばれることが報告されている³²⁾。これらの報告より、我々は、ケストースによって増加した短鎖脂肪酸の標的となる臓器の一つとして肝臓に着目し、ケストースが肝臓の遺伝子発現に与える影響について検討した。

雄性ICRマウスを2群に分け、標準飼料 (AIN-93G)

表3 ケストースがラットの血清インスリン濃度に与える影響

	対照食群	ケストース食群
Concentrations of blood component		
Serum glucose (mg/dL)	207 ± 11	188 ± 7
Serum insulin (ng/mL)	4.34 ± 0.51	2.01 ± 0.24*
Amounts of SCFA in cecum content (CC)		
Acetate (μmol/g CC)	35.4 ± 1.7	65.4 ± 7.2*
Propionate (μmol/g CC)	13.2 ± 0.9	10.5 ± 1.3
Butyrate (μmol/g CC)	2.3 ± 0.2	22.8 ± 1.9*
Bacterial counts in cecum content		
Lactobacillus (log10 cells/g CC)	8.8 (8.6-8.9)	8.9 (8.8-9.1)
Bifidobacterium (log10 cells/g CC)	7.1 (7.0-7.2)	10.9 (10.7-10.9)*
Clostridium cluster XIVa (log10 cells/g CC)	9.7 (9.5-9.8)	10.4 (10.3-10.5)*

血液成分の濃度および盲腸内容物中の短鎖脂肪酸含量は、平均値および標準誤差で示し、盲腸内容物中の腸内細菌数は中央値および四分位範囲を示した。有意水準を $p < 0.05$ とし、対照食群との有意差を*で示した。

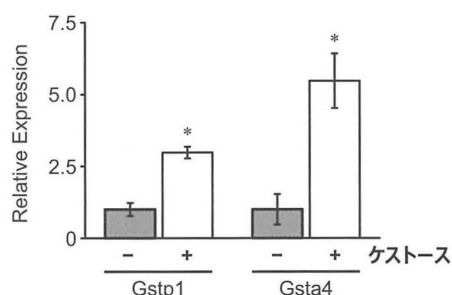


図4 マウス肝臓におけるグルタチオン転移酵素の遺伝子発現に対するケストースの効果
mRNAの発現量を平均値および標準誤差で示した。統計解析には、 t 検定を使用した。有意水準を $p < 0.05$ とし、試験開始時との有意差を*で示した。

と5%ケストース含有飼料を与え飼育した。飼育開始から4週間後に解剖を実施し、肝臓を採取した。続いて、採取した肝臓からRNAを抽出し、酸化ストレスおよび老化に関係する遺伝子に関して、マイクロアレイを使用した網羅解析およびqRT-PCRによるmRNA発現量の測定を実施した。その結果、ケストース含有飼料で飼育したマウスの肝臓では、グルタチオン抱合に関係するタンパク質であるGsta1およびGsta4のmRNA発現量が、標準飼料と比較して有意な高値を示すことが明らかとなった(図4)。さらに、肝臓におけるGST活性を測定した結果、コントロール飼料と比較してケストース飼料にて飼育した群において高値を示す傾向が見られた。GSTは過酸化物質やフリーラジカルなど細胞毒となりうる異物化合物とグルタチオンとの結合を触媒し、体外への排出を促すことから解毒酵素として知られている。我々は、ケストースがグルタチオン抱合の亢進を介して、肝臓の機能維持に寄与しているのではないかと考え、現在も検討を続けている³³⁾。

6. ケストースの量産化に向けて～酵素工学的アプローチ～

ケストースは、スクロースを起源原料として、 β -FFase

という酵素により生成される。広義的には、 β -FFaseは、Glucose hydrolase (GH) familyに分類され、さらに真菌由来のGH32 familyおよび細菌由来のGH68 familyに分類される。工業的には、主に真菌である*Aspergillus*属由来の β -FFaseが使用されており、食品添加物酵素としても認められている³⁴⁾。しかしながら、GH32に分類される β -FFaseはフルクトース転移活性が強く、ケストースにさらにフルクトースが付加された四糖のニストースや五糖のフルクトフラノシルニストースなど、高分子のフラクトオリゴ糖が生成されるという課題が存在している。そこで、我々は、GH64に属する β -FFaseに着目し、ケストースを効率的に生成するための酵素改良を実施した。

6.1 効率的に β -FFaseをスクリーニングする実験系の構築

β -FFaseの酵素改良をより効率的に進めるために、選択的かつ簡易的に β -FFaseの変異体をスクリーニングする手法の確立に着手した。*Bacillus subtilis*由来のアンカータンパク質であるPgsAに着目し、PgsAと β -FFaseの融合タンパク質の遺伝子をコードしたプラスミドを複製し、大腸菌に導入した。そして、この大腸菌を増殖・回収し、破碎工程を挟まずにケストース生成の基質であるスクロースと反応させた結果、ケストースの生成が確認された。

この結果は、大腸菌の細胞膜表層に β -FFaseが発現していることを示唆しており、この手法を用いることで、大腸菌を可溶化することなく β -FFaseの活性測定が可能となることから、様々な細菌由来の β -FFaseを効率よくスクリーニングする手法として適していると考えられる³⁵⁾。

6.2 *Beijerinckia indica* 由来 β -FFaseを用いた酵素改良

ケストースを効率よく製造するためには、高いケストース合成活性を有しながらもニストース合成活性の低い β -FFaseが必要となる。そこで、前述した手法を用いて、様々な細菌由来 β -FFaseの活性を評価した。その結

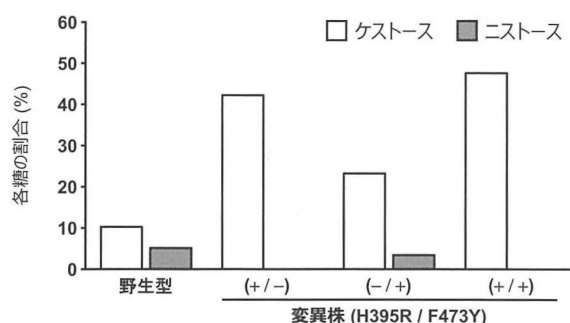


図5 β -フルクトフラノシダーゼ活性

20% (w/v) のスクロース溶液に各酵素を添加し、50°Cで反応させた。反応後の上清中におけるケストースおよびニストース濃度を HPLC にて測定し、全糖量に対するケストースおよびニストースの割合を示した。

果、*Beijerinckia indica* 由来 β -FFase は、ケストースとニストースの生成バランスが前者に傾いていることが明らかとなった。

続いて、*B. indica* 由来 β -FFase を基準とした酵素改良を実施すべく、大腸菌表層提示法を用いて *B. indica* 由来 β -FFase の立体構造を調べた。そして、いくつかの推定基質認識部位に存在するアミノ酸をターゲットとして、サチュレーションによるポイントミューテーションを実施し、構築したスクリーニング法を用いてミュータントのスクリーニングを行った結果、395 番目のヒスチジンをアルギニンに、473 番目のフェニルアラニンをチロシンに変異させた β -FFase は、ケストースの生成率が高く、ニストースの生成が抑制されることが示された (図5)。

我々は、この変異体のケストース生成能の向上は、ニストースへのフルクトース転移活性が抑制されているためであると推測しており、その仮説を証明するため、現在、変異させた β -FFase の結晶構造解析を進めている。

7. おわりに

近年のメタ 16S 解析技術の発展により複雑な腸内細菌の構造解析が飛躍的に進み、様々な疾患と腸内細菌叢の関係が報告されている。一方、プレバイオティクスがどのように腸内環境を改善し、疾病の予防や治療に貢献できるのかといった研究分野はまだまだ発展の余地があると感じている。我々が研究開発を進めているケストースは、現在流通しているプレバイオティクスの中でも有用菌増殖効果が強く、アレルギー疾患を改善することが明らかとなっている。さらに、ケストースは、インスリン抵抗性や酸化ストレスといった様々な疾患に関わる現象に対しても有益な効果を有する可能性が示されており、医療費の高騰により機能性食品への期待が高まっている現代社会をリードする食品素材へ成長していくと考えている。今後は、酵素工学的技術をより発展させることで、ケストースの安定的かつ大量製造を実現し、近い未来、全ての人々が日常的にケストースを摂取する社会

を実現させるべく、日々研究活動に邁進していきたい。

なお、本稿で紹介した我々が行ったヒト試験ならびに動物実験は全て倫理審査委員会および動物実験倫理審査委員会において承認されたものである。

利益相反

以下の申告すべき COI 状態がある。

北浦靖之、遠藤明仁：研究費 (物産フードサイエンス株式会社)。

文 献

- Sanders ME (2008) Probiotics: definition, sources, selection, and uses. *Clin Infect Dis* 46 (Suppl 2): S58-61. (Discussion): S144-51.
- Pineiro M, Asp NG, Reid G, Macfarlane S, Morelli L, Brunser O, Tuohy K (2008) FAO technical meeting on prebiotics. *J Clin Gastroenterol* 42 (Suppl 3 Pt 2): S156-9.
- Oku T, Nakamura M, Hashiguchi-Ishiguro M, Tanabe K, Nakamura S (2009) Bioavailability and laxative threshold of 1-kestose in human adults. *Dyn Biochem Process Biotechnol Mol Biol* 3 (S1): 90-5.
- O'Callaghan A, van Sinderen D (2016) Bifidobacteria and their role as members of the human gut microbiota. *Front Microbiol* 7: 925.
- Aizawa E, Tsuji H, Asahara T, Takahashi T, Teraishi T, Yoshida S, Koga N, Hattori K, Ota M, Kunugi H (2019) *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* counts in the gut microbiota of patients with bipolar disorder and healthy controls. *Front Psychiatry* 9: 730.
- Markowiak P, Śliżewska K (2017) Effects of probiotics, prebiotics, and synbiotics on human health. *Nutrients* 9: E1021.
- Scholtens PA, Alliet P, Raes M, Alles MS, Kroes H, Boehm G, Knippels LM, Knol J, Vandenplas Y (2008) Fecal secretory immunoglobulin A is increased in healthy infants who receive a formula with short-chain galacto-oligosaccharides and long-chain fructooligosaccharides. *J Nutr* 138: 1141-7.
- Azcarate-Peril MA, Ritter AJ, Savaiano D, Monteagudo-Mera A, Anderson C, Magness ST, Klaenhammer TR (2017) Impact of short-chain galactooligosaccharides on the gut microbiome of lactose-intolerant individuals. *Proc Natl Acad Sci USA* 114: E36-75.
- Finegold SM, Li Z, Summanen PH, Downes J, Thames G, Corbett K, Dowd S, Krak M, Heber D (2014) Xylooligosaccharide increases bifidobacteria but not lactobacilli in human gut microbiota. *Food Funct* 5: 436-45.
- Endo A, Nakamura S, Konishi K, Nakagawa J, Tochio T (2016) Variations in prebiotic oligosaccharide fermentation by intestinal lactic acid bacteria. *Int J Food Sci Nutr* 67: 125-32.
- Ose R, Hirano K, Maeno S, Nakagawa J, Salminen S, Tochio T, Endo A (2018). The ability of human intestinal anaerobes to metabolize different oligosaccharides: novel means for microbiota modulation? *Anaer*

- obe* 51: 110–9.
- 12) den Besten G, van Eunen K, Groen AK, Venema K, Reijngoud DJ, Bakker BM (2015) Short-chain fatty acids in control of body weight and insulin sensitivity. *Nat Rev Endocrinol* 11: 577–91.
 - 13) Canfora EE, Jocken JW, Blaak EE (2013) The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism. *J Lipid Res* 54: 2325–40.
 - 14) Furusawa Y, Obata Y, Fukuda S, Endo TA, Nakato G, Takahashi D, Nakanishi Y, Uetake C, Kato K, Kato T, Takahashi M, Fukuda NN, Murakami S, Miyauchi E, Hino S, Atarashi K, Onawa S, Fujimura Y, Lockett T, Clarke JM, Topping DL, Tomita M, Hori S, Ohara O, Morita T, Koseki H, Kikuchi J, Honda K, Hase K, Ohno H (2013) Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells. *Nature* 504: 446–450.
 - 15) Rivière A, Selak M, Lantin D, Leroy F, De Vuyst L (2016) Bifidobacteria and butyrate-producing colon bacteria: importance and strategies for their stimulation in the human gut. *Front Microbiol* 7: 979.
 - 16) Van den Abbeele P, Belzer C, Goossens M, Kleerebezem M, De Vos WM, Thas O, De Weirldt R, Kerckhof FM, Van de Wiele T (2013) Butyrate-producing *Clostridium* cluster XIVa species specifically colonize mucins in an *in vitro* gut model. *ISME J* 7: 949–61.
 - 17) Tochio T, Kadota Y, Tanaka T, Koga Y (2018) 1-Kestose, the smallest fructooligosaccharide component, which efficiently stimulates *Faecalibacterium prausnitzii* as well as bifidobacteria in humans. *Foods* 7: E140.
 - 18) Tochio T, Kitaura Y, Nakamura S, Sugawa C, Takahashi M, Endo A, Shimomura Y (2016) An alteration in the cecal microbiota composition by feeding of 1-kestose results in a marked increase in the cecal butyrate content in rats. *PLoS One* 11: e0166850.
 - 19) Dispenza MC (2019) Classification of hypersensitivity reactions. *Allergy Asthma Proc* 40: 470–3.
 - 20) Bj rkst n B, Naaber P, Sepp E, Mikelsaar M (1999) The intestinal microflora in allergic Estonian and Swedish 2-year-old children. *Clin Exp Allergy* 29: 342–6.
 - 21) Kalliom ki M, Kirjavainen P, Eerola E, Kero P, Salminen S, Isolauri E (2001) Distinct patterns of neonatal gut microflora in infants in whom atopy was and was not developing. *J Allergy Clin Immunol* 107: 129–34.
 - 22) Kalliom ki M, Salminen S, Arvilommi H, Kero P, Koskinen P, Isolauri E (2001) Probiotics in primary prevention of atopic disease: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 357: 1076–9.
 - 23) Shibata R, Kimura M, Takahashi H, Mikami K, Aiba Y, Takeda H, Koga Y (2009) Clinical effects of kestose, a prebiotic oligosaccharide, on the treatment of atopic dermatitis in infants. *Clin Exp Allergy* 39: 1397–403.
 - 24) Koga Y, Tokunaga S, Nagano J, Sato F, Konishi K, Tochio T, Murakami Y, Masumoto N, Tezuka JI, Sudo N, Kubo C, Shibata R (2016) Age-associated effect of kestose on *Faecalibacterium prausnitzii* and symptoms in the atopic dermatitis infants. *Pediatr Res* 80: 844–51.
 - 25) Kadota Y, Tochio T, Koga Y, Shibata R, Uchizono A (2017) 1-kestose ameliorates perennial allergic rhinitis. *The Allergy in Practice* 37: 54–9 (in Japanese).
 - 26) Petersen MC, Shulman GI (2018) Mechanisms of insulin action and insulin resistance. *Physiol Rev* 98: 2133–223.
 - 27) McFarlane SI, Banerji M, Sowers JR (2001) Insulin resistance and cardiovascular disease. *J Clin Endocrinol Metab* 86: 713–8.
 - 28) Ridaura VK, Faith JJ, Rey FE, Cheng J, Duncan AE, Kau AL, Griffin NW, Lombard V, Henrissat B, Bain JR, Muehlbauer MJ, Ilkayeva O, Semenkovich CF, Funai K, Hayashi DK, Lyle BJ, Martini MC, Ursell LK, Clemente JC, Van Treuren W, Walters WA, Knight R, Newgard CB, Heath AC, Gordon JI (2013) Gut microbiota from twins discordant for obesity modulate metabolism in mice. *Science* 341: 1241214.
 - 29) Kootte RS, Levin E, Saloj rvi J, Smits LP, Hartstra AV, Udayappan SD, Hermes G, Bouter KE, Koopen AM, Holst JJ, Knop FK, Blaak EE, Zhao J, Smidt H, Harms AC, Hankemeijer T, Bergman JJGHM, Romijn HA, Schaap FG, Olde Damink SWM, Ackermans MT, Dallinga-Thie GM, Zoetendal E, de Vos WM, Serlie MJ, Stroes ESG, Groen AK, Nieuwdorp M (2017) Improvement of insulin sensitivity after lean donor feces in metabolic syndrome is driven by baseline intestinal microbiota composition. *Cell Metab* 26: 611–9.
 - 30) Canfora EE, Jocken JW, Blaak EE (2015) Short-chain fatty acids in control of body weight and insulin sensitivity. *Nat Rev Endocrinol* 11: 577–91.
 - 31) Cook SI, Sellin JH (1998) Review article: short chain fatty acids in health and disease. *Aliment Pharmacol Ther* 12: 499–507.
 - 32) Bloemen JG, Venema K, van de Poll MC, Olde Damink SW, Buurman WA, Dejong CH (2009) Short chain fatty acids exchange across the gut and liver in humans measured at surgery. *Clin Nutr* 28: 657–61.
 - 33) Tochio T, Ueno Y, Kitaura Y, Shinohara M, Kadota Y, Minoda K, Shimomura Y, Osawa T (2019) Feeding of 1-kestose induces glutathione-S-transferase expression in mouse liver. *Foods* 8: E69.
 - 34) Hirayama M, Sumi N, Hidaka H (1989) Purification and properties of a fructooligosaccharide-producing β -fructofuranosidase from *Aspergillus niger* ATCC 20611. *Agric Biol Chem* 53: 667–73.
 - 35) Fujii T, Tochio T, Hirano K, Tamura K, Tono zuka T (2018) Rapid evaluation of 1-kestose producing β -fructofuranosidases from *Aspergillus* species and enhancement of 1-kestose production using a PgsA surface-display system. *Biosci Biotechnol Biochem* 82: 1599–605.

J Jpn Soc Nutr Food Sci 73: 123–131 (2020)

Review

Physiological Functions of Kestose and Practical Approaches for Its Commercial Application

(JSNFS Award for Technology and Innovation (2019))

Yoshihiro Kadota^{*,1}, Yasuyuki Kitaura², Akihito Endo³, and Takumi Tochio¹

(Received March 18, 2020; Accepted May 18, 2020)

Summary: Kestose is a type of oligosaccharide known to be well fermented by intestinal bacteria. We have demonstrated that kestose has various physiological functions, such as promotion of gut health, improvement of allergic diseases, and prevention of metabolic syndrome. These findings indicate that kestose is a prebiotic component that contributes to maintenance of health in humans through several physiological functions. We have also tried to improve the activity of an enzyme involved in kestose synthesis. Here we describe research on the physiological functions and practical uses of kestose.

Key words: kestose, prebiotic, allergic disease, metabolic syndrome, enzyme improvement

* Corresponding author (E-mail: y-kadota@bfsci.co.jp)

¹ Research and Development Center, B Food Science Co., Ltd., 24-12 Kitahama-machi, Chita, Aichi 478-0046, Japan

² Department of Applied Biosciences, Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya University, Furo-cho, Chikusa-ku, Nagoya, Aichi 464-8601, Japan

³ Department of Food, Aroma and Cosmetic Chemistry, Faculty of Bioindustry, Tokyo University of Agriculture, 196 Yasaka, Abashiri, Hokkaido 099-2493, Japan