

# 乳酸菌がもつ抗酸化作用の分子基盤解明

筑波大学医学医療系

小林 麻己人

Heat-treated cells of *Lactococcus lactis* strain H61 have been reported to exhibit anti-aging effects on human skin and being considered for application in cosmetics. However, the mechanism of the effects is not clear. I have been studying the antioxidant effects of various dietary phytochemicals using zebrafish as a model animal. In this study, I tried to evaluate the antioxidant effect of *Lactococcus lactis* strain H61 by utilizing zebrafish. As a result, I found that strain H61 exerts its antioxidant effect in zebrafish larvae, in which the relationship between biological effects and genetic mutations is easy to analyze. Using this system, the antioxidant effect of strain H61 was shown to be not mediated by the Nrf2 pathway, which is the master mechanism of cellular antioxidant response. Furthermore, we generated zebrafish mutants that disrupted key genes in the mitochondrial biosynthesis pathway or the innate immune response pathway, paving the way to identify this unknown mechanism.

## 1. 緒言

65歳以上の高齢者人口が1/3を占めるようになり、本邦はいよいよ超高齢化社会を迎えようとしている。その中で、抗酸化活性をもつ食品やサプリメントが生活習慣病の予防に有効と注目され、中でもNrf2経路というストレス防御システムを活性化させる食品成分の研究が国内外で進んでいる<sup>1,2)</sup>。ところが最近、Nrf2経路はがん増進にも働くことが報告され、安全性が危惧されるようになってきた。また、Nrf2経路は年齢を重ねるにつれ、活性化力が減弱するという報告もされている。これらのことは、健常人、特に健常な高齢者にとって、Nrf2経路以外の抗酸化経路を活性化させる食品やサプリメントの摂取の方が望ましいことを示唆するが、そのような経路はまだ見つかっていない。

化粧品に関しても抗酸化成分を含有する商品のニーズが高まっており、実際、ビタミンCやE等の抗酸化物質を含有する商品が多く市販されている。ただし、これらは酸化ストレスを直接除去する抗酸化成分であり、安定性が低い上、量的に多く必要とされる。一方、Nrf2経路等を活性化して、細胞内部の抗酸化物質や抗酸化タンパク質を誘導する間接型の抗酸化成分は、持続性が高く、少量でも効果があることが期待される。Nrf2経路の活性化がUVから肌を守ることは示されており、既にNrf2経路を活性化させる植物成分を配合した化粧品も市販され始めている。ただし、前述の通り、Nrf2経路にも問題があり、Nrf2経路以

外の抗酸化経路を活性化させる化粧品の開発が期待される。

乳酸菌は腸内細菌叢を調整するプロバイオティクスとして注目を集めてきたが、最近では菌体成分そのものもつバイオジェニクスとしての機能にも注目が集まっている。実際、乳酸菌成分入りの化粧品も市販され始めている。本研究課題で研究対象となっている乳酸菌H61株もその一つである<sup>3)</sup>。乳酸菌成分の効果の一端は皮膚細胞に対する抗酸化作用と考えられているが、その分子メカニズムに関してはほとんどわかっていない。

研究代表者は、Nrf2経路を介する抗酸化活性の研究をゼブラフィッシュというモデル動物を用いて長年行ってきた<sup>4-6)</sup>。この過程で、様々な食品成分がNrf2を活性化し、動物個体内で抗酸化活性を発揮させることを見出してきた<sup>7-9)</sup>。一方、農研機構の木元広実博士は乳酸菌研究の第一人者で、多くの菌株を保持・解析すると同時に、機能性の高い菌株に関しては特許を取得し、動物試験・ヒト介入試験を行い、女性の肌健康への効用を実証した上で、H61株含有ヨーグルトの商品化に導いている<sup>10)</sup>。加えて最近では、ヒト表皮角化細胞への直接添加でUVダメージからの保護効果を示し、化粧品成分への応用の可能性も示している<sup>11)</sup>。本課題研究では木元博士に乳酸菌H61株をご提供いただき、その抗酸化作用の実体同定を目的にゼブラフィッシュを用いた解析を試みた。

## 2. 方法

### 2.1. ゼブラフィッシュに対する乳酸菌の抗酸化作用の解析

抗酸化作用の測定は遠藤らの方法<sup>9)</sup>に従い、受精後3.5日のゼブラフィッシュ稚魚24匹に対し、乳酸菌溶液を12時間前処理後、洗浄し、新たに酸化ストレス剤として過酸化水素溶液を48時間処理し、12時間ごとの生存率を計測した。ゼブラフィッシュ系統には野生型AB系統とNrf2



Elucidation of the molecular basis of antioxidant effects of lactic acid bacteria

Makoto Kobayashi

Faculty of Medicine, University of Tsukuba

変異型 *nfe2l2a<sup>fh318</sup>* 系統<sup>7)</sup>を用いた。乳酸菌は農研機構・木元博士からご供与いただいたH61株とG50株の加熱処理菌体の凍結乾燥品を用いた。

## 2.2. CRISPR-Cas9によるゲノム編集

CRISPR-Cas9によるゲノム編集は小谷らの方法<sup>12)</sup>で行った。標的配列に相補的なcrRNA、Cas9との結合に必要なtracrRNA、Cas9タンパク質の3者を1細胞期のゼブラフィッシュ胚に注入した。注入胚を成魚まで育成し、PCR及びDNAシーケンスを用いたジェノタイピングで目的の遺伝子破壊に成功したF0世代を選び出し、野生型成魚との交配でF1世代を作出した。

## 2.3. 遺伝子発現解析

乳酸菌等を処理したゼブラフィッシュ稚魚における遺伝子発現変動をqPCR及びRNA-seqにより行った。いずれも乳酸菌等を処理した稚魚の抽出total RNAを用いた。qPCRは、total RNAを鋳型として合成したcDNAを用いてSYBR Green法で行った。RNA-seqはつくばi-Laboratoryで実施した。一次解析データをもとに、野生型とNrf2変異型稚魚の両方で無処理のコントロールよりも1.5倍以上の発現上昇が見られた遺伝子に着目した。これらをヒト遺伝子名に変換し、DAVIDによるパスウェイ解析を行った。

## 3. 結果

### 3.1. ゼブラフィッシュに対する乳酸菌の抗酸化作用

野生型4日稚魚に対し過酸化水素処理をしたところ、24時間後には75%以上が致死となった(図1)。この条件下で乳酸菌H61株を12時間前処理すると有意に生存率が上が

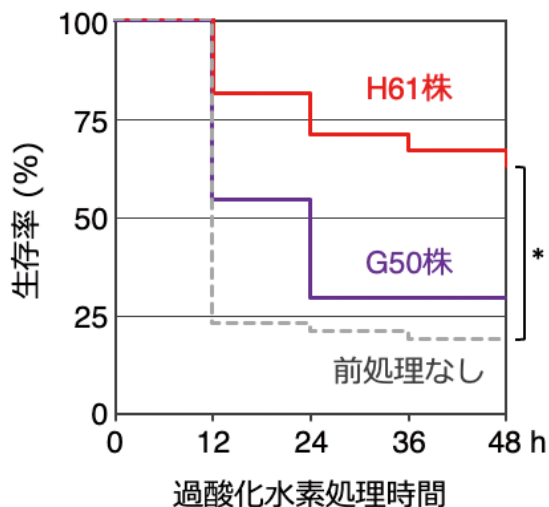


図1 乳酸菌株の抗酸化作用  
野生型3.5日稚魚にH61株またはG50株の125µg/ml溶液を12時間前処理した後、2.8mM過酸化水素溶液を曝露させ12時間ごとに生存率を測定した。\* p<0.05。

り、致死率が25%程度に下がった。この結果は、H61株の前処理がゼブラフィッシュ体内の抗酸化力を高めることを示唆する。一方、G50株ではこの効果が観察されなかったことから、H61株特異的な作用であることが示された。

### 3.2. Nrf2変異型ゼブラフィッシュ系統を用いた解析

直接的抗酸化剤であるビタミンCやEではこうした効果は観察されないことから、H61株の抗酸化作用はゼブラフィッシュ体内の抗酸化経路を活性化する間接的作用と推測された。細胞や動物の抗酸化力を間接的に高めるしくみとしてNrf2経路が知られている。そこでH61株の抗酸化作用がNrf2経路の活性化を介するものかをNrf2変異型系統(*nfe2l2a<sup>fh318</sup>*)で検証した(図2)。*nfe2l2a<sup>fh318</sup>*ホモ変異型稚魚を用いてH61株の抗酸化作用を解析したところ、Nrf2ホモ変異型稚魚においてもH61株の前処理がコントロールに比べて有意に生存率を向上させた。この結果は、H61株の抗酸化作用がNrf2経路の活性化を介さないものである可能性を示唆した。

### 3.3. H61株処理による遺伝子発現変動

H61株の抗酸化作用がどのような生体経路を介するかを調べるために、H61株処理により発現変動する遺伝子群をRNA-seq法で探索した。浮かび上がった遺伝子群を用いてパスウェイ解析を行ったところ、ミトコンドリアタンパク質をコードする遺伝子群の多くが発現亢進していた。検証のために、いくつかのミトコンドリアタンパク質遺伝子に対してqPCR解析を行ったところ、弱いながらもH61株により発現誘導される傾向があることがわかり(図3)、

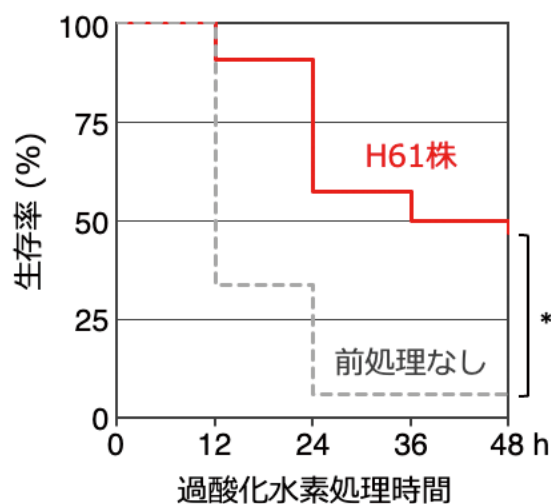


図2 Nrf2変異型稚魚に対するH61株の抗酸化作用  
*nfe2l2a<sup>fh318</sup>*ホモ変異型3.5日稚魚にH61株を12時間前処理した後、2.2mM過酸化水素溶液を曝露させ12時間ごとに生存率を測定した。\* p<0.05。

ミトコンドリア生合成が亢進している可能性を示唆された。

製をCRISPR-Cas9を用いて試みた。その結果、Myd88破壊系統の作製にも成功した。

### 3. 4. 遺伝子破壊ゼブラフィッシュ系統の作製

H61株によるミトコンドリア生合成亢進が抗酸化作用に関与する可能性が浮かび上がったので、ミトコンドリア生合成経路が異常な時に、H61株の抗酸化作用がどうなるかを検証することにした。そのために、まずミトコンドリア生合成に関わる転写因子Sirt1及びPGC-1 $\alpha$ の遺伝子破壊ゼブラフィッシュをCRISPR-Cas9を用いて作製した。いずれもゲノム編集に成功したが、Sirt1破壊系統に関してはF1世代まで系統化できた。この*sirt1*<sup>it326</sup>系統は7bpの塩基欠損が導入されたフレームシフト変異系統であり、その産物は酵素活性ドメインを失うと予想される(図4)。

H61株には免疫賦活作用があることも知られており<sup>3)</sup>、その作用は自然免疫応答機構を介すると予想されている。H61株による抗酸化作用にも自然免疫応答が必要である可能性もあり、その検証のために自然免疫応答が減弱したゼブラフィッシュを用いた解析を試みることにした。乳酸菌による自然免疫応答はToll様受容体-Myd88経路を介するので、Myd88を破壊したゼブラフィッシュ系統の作

### 4. 考 察

本研究により、乳酸菌H61株がゼブラフィッシュの抗酸化作用を高めることを明らかにできた。このことは、より高抗酸化力のある乳酸菌探索にゼブラフィッシュが有用であることを示すとともに、遺伝子破壊系統の活用により作用メカニズムを遺伝学的に解明できる可能性が示唆された。実際、Nrf2変異型系統を用いた解析の結果、H61株の抗酸化作用はNrf2経路以外の生体経路を介すると推測された。Nrf2経路とがん増進の関係が危惧されているため、H61株がNrf2以外の経路を介して抗酸化作用を発揮することは、化粧品の開発応用を考える上で朗報となりうる。

次にH61株の抗酸化作用を介する生体経路を明らかにするために、H61株処理により発現変動する遺伝子群をRNA-seq解析で探索し、ミトコンドリア生合成が関与する可能性を見いだした。その検証のためにSirt1及びPGC-1 $\alpha$ 遺伝子を破壊したゼブラフィッシュ系統を作製し

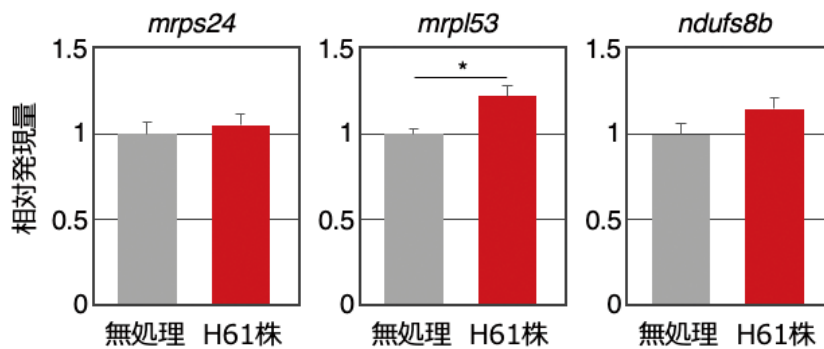


図3 ミトコンドリア関連遺伝子の発現誘導  
H61株を12時間前処理した野生型4日稚魚を用いて*mrps24*、*mrpl53*、*ndufs8b*遺伝子の発現解析をqPCRにより行い、無処理稚魚を1とした時の相対発現量を解析した。\* p<0.05。

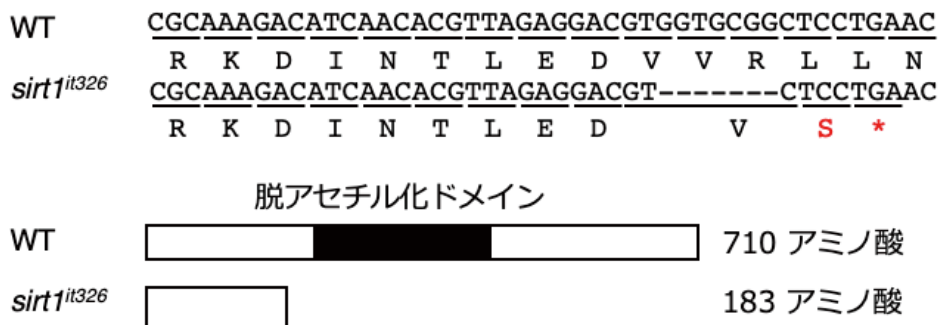


図4 Sirt1破壊系統の作製  
CRISPR-Cas9によりSirt1遺伝子領域に7bp欠損のフレームシフト変異を導入した(*sirt1*<sup>it326</sup>)。生じるタンパク質は脱アセチル化ドメインを含むC末3/4が欠失していると予想される。

た。ただ、抗酸化作用の解析までには至らず、今後の課題として残った。一方、H61株が自然免疫応答遺伝子群を弱いながらも誘導することがRNA-seq解析によりわかった。そこで自然免疫の関与を検証するためにMyd88破壊系統も作製したが、こちらの解析も今後の課題である。今回のRNA-seq解析ではミトコンドリア生合成以外の経路は浮かび上がらなかった。技術的な問題である可能性もあり、別手段としてマイクロアレイ解析も現在行っている。

H61株の作用が遺伝子発現変動を伴わない可能性もある。その場合は遺伝子発現解析を基盤とした戦略では作用機構に迫ることができない。そこで現在、乳酸菌側から迫る戦略も開始している。具体的にはH61株を成分分離し、どの成分に抗酸化作用があるか絞り込むアプローチと、H61株の変異株を作製・解析し、どのような乳酸菌遺伝子が抗酸化作用に関与するかを探索するアプローチである。まだ開始したばかりで今後の結果が待たれる。

#### (引用文献)

- 1) M. Kobayashi & M. Yamamoto: Molecular mechanisms activating the Nrf2-Keap1 pathway of antioxidant gene regulation. *Antioxid. Redox Signal.* **7**: 385-394 (2005).
- 2) M. Kobayashi & M. Yamamoto: Nrf2-Keap1 regulation of cellular defense mechanisms against electrophiles and reactive oxygen species. *Adv. Enzyme. Reg.* **46**: 113-140 (2006).
- 3) H. Kimoto-Nira: New lactic acid bacteria for skin health via oral intake of heat-killed or live cells. *Anim. Sci. J.* **89**: 835-842 (2018).
- 4) M. Kobayashi *et al.*: Identification of the interactive interface and phylogenetic conservation of the Nrf2-Keap1 system. *Genes Cells* **7**: 807-820 (2002).
- 5) M. Kobayashi *et al.*: The antioxidant defense system Keap1-Nrf2 comprises a multiple sensing mechanism for responding to a wide range of chemical compounds. *Mol. Cell. Biol.* **29**: 493-502 (2009).
- 6) K. Mukaigasa *et al.*: Nrf2 activation attenuates genetic endoplasmic reticulum stress induced by a mutation in the phosphomannomutase 2 gene in zebrafish. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **115**: 2758-2763 (2018).
- 7) K. Mukaigasa *et al.*: Genetic evidence of an evolutionarily conserved role for Nrf2 in the protection against oxidative stress. *Mol. Cell. Biol.* **32**: 4455-4461 (2012).
- 8) Y. Fuse *et al.*: Nrf2-dependent protection against acute sodium arsenite toxicity in zebrafish. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **305**: 136-142 (2016).
- 9) Y. Endo *et al.*: Evaluation of antioxidant activity of spice-derived phytochemicals using zebrafish. *Int. J. Mol. Sci.* **21**: 1109 (2020).
- 10) H. Kimoto-Nira *et al.*: Effects of ingesting milk fermented by *Lactococcus lactis* H61 on skin health in young women: a randomized double-blind study. *J. Dairy Sci.* **97**: 5898-5903 (2014).
- 11) H. Kimoto-Nira *et al.*: Towards application of water extract from heat-killed *Lactococcus lactis* H61 as a cosmetic ingredient. *Lett. Appl. Microbiol.* **68**: 530-536 (2019).
- 12) H. Kotani *et al.*: Efficient multiple genome modifications induced by the crRNAs, tracrRNA and Cas9 protein complex in zebrafish. *PLoS One* **10**: e0128319 (2015).