

## 次世代プレバイオティクス：麹菌プロテアーゼ

楊 永寿<sup>1</sup>・加藤 範久\*<sup>1</sup>・黒田 学<sup>2</sup>  
山口庄太郎<sup>2</sup>・井上 淳詞<sup>3</sup>・渡辺 敏郎<sup>4</sup>

## はじめに

日本食の特徴の一つとして麹菌 (*Aspergillus*) を使った伝統的な発酵食品がある。その代表例として味噌や醤油、漬物、清酒、酒粕などがあり、近年、それらの美味しさが世界から注目を集めている。しかしながら、麹菌発酵食品の健康機能性、およびその機能性における麹菌の役割に関しては不明な点が多い。筆者らは、泡盛麹菌でごぼうを発酵させ、発酵ごぼう(ごぼう麹)と元のごぼうとの比較を行い、この問題についてのヒントをつかむべく解析を試みた。その結果、元のごぼうと比較して、発酵ごぼうをラットに摂取させると、腸内のビフィズス菌が著しく増加し、腸内環境に有益な短鎖脂肪酸も増加していた<sup>1)</sup>。これらの観察を契機に、発酵ごぼうの活性本体の解明を行ってきた。その解析過程で、ある種の麹菌由来のプロテアーゼ剤の摂取もビフィズス菌を著しく増加させることが見いだされた<sup>2)</sup>。さらに、そのプロテアーゼの中から酸性プロテアーゼが活性本体の一部として特定された<sup>3)</sup>。本稿では、これらの一連の研究について紹介するとともに、麹菌発酵食品の健康機能性における麹菌プロテアーゼの役割やその作用機構についても考察を加える。

## 麹菌プロテアーゼ剤の腸内環境改善作用

5%発酵ごぼう添加食の摂取により腸内ビフィズス菌の増加を見いだしたことから、発酵ごぼうのどのような成分が関与しているかが次の主要な課題であった。その活性は発酵ごぼうの菌体外成分(水抽出物)に認められ、100°Cで加熱するとビフィズス菌増加効果が消失した。そのため、タンパク質性の消化酵素のような高分子画分が関与しているのではないかと推定していた。麹菌はプロテアーゼなど消化酵素を多量に菌体外に分泌することが特徴で、発酵食品の製造に寄与している。幸いなことに、多種類の麹菌由来プロテアーゼ剤(食品加工用、整腸剤用など)が市販されている。そこで、さまざまなプロテアーゼ剤を餌に0.2%添加してラットに摂取させ腸内環境について検討を行った<sup>2)</sup>。発酵ごぼうの菌体外成

分では元のごぼうと比較してタンパク質含量がわずかに増え(おそらく麹菌のプロテアーゼなど)、5%発酵ごぼう添加食相当に換算すると、およそ0.2%となることから、この量のプロテアーゼ剤を添加した。その結果、黄麹菌 (*Aspergillus oryzae*) 由来のプロテアーゼ剤のプロテアーゼA「アマノ」SD(以下、Amano proteaseと略、天野エンザイム株式会社、名古屋)の餌への添加により盲腸内ビフィズス菌が著しく増加することが見いだされた(図1)。この効果は劇的であり、500倍以上の増加と驚くべき変動であった。これらの効果は熱失活させたAmano proteaseを摂取させた場合は完全に消失していた。さらに、Amano proteaseは腸内の有益な短鎖脂肪酸のプロピオン酸や酪酸も顕著に増加させていた(図2)。これらの短鎖脂肪酸は数種の受容体を介して大腸における炎症や発がんの抑制などに寄与すると考えられている<sup>4)</sup>。また、これらの短鎖脂肪酸はビフィズス菌の生育も促進する<sup>4)</sup>。一方、ビフィズス菌はこれらの短鎖脂肪酸の産生に一部関与している<sup>4)</sup>。さらに、Amano proteaseは糞中のimmunoglobulin A (IgA:腸管免疫に

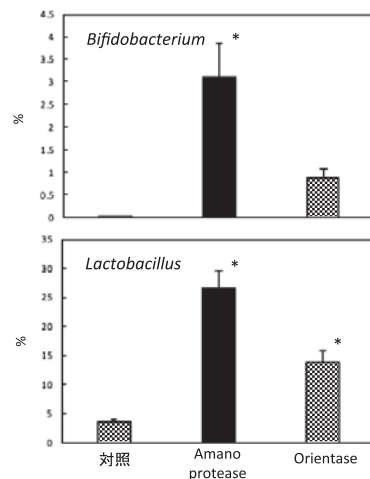


図1. 麹菌由来プロテアーゼ剤 (Amano protease, および Orientase) 添加食摂取のラット盲腸内ビフィズス菌、およびラクトバチルスに及ぼす影響。縦軸は総菌数の割合 (%) で示した。平均±SE。\*P<0.05 (対照群との比較, Tukey's multiple range test)。

\*著者紹介 広島大学大学院生物圏科学研究科(名誉教授) E-mail: nkato@hiroshima-u.ac.jp.jp  
<sup>1</sup>広島大学大学院生物圏科学研究科, <sup>2</sup>天野エンザイム株式会社, <sup>3</sup>株式会社あじかん  
<sup>4</sup>園田学園女子大学人間健康学部

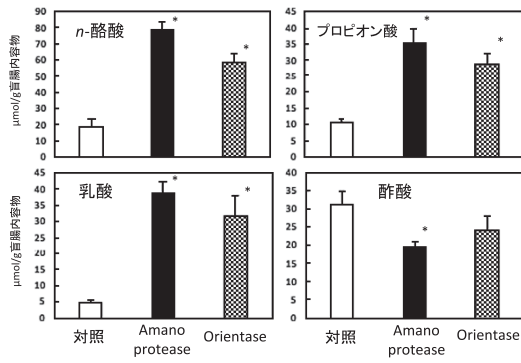


図2. 麹菌由来プロテアーゼ剤 (Amano protease, および Orientase) 添加食摂取のラット盲腸内短鎖脂肪酸に及ぼす影響. 平均±SE. \*P < 0.05 (対照群との比較, Tukey's multiple range test).

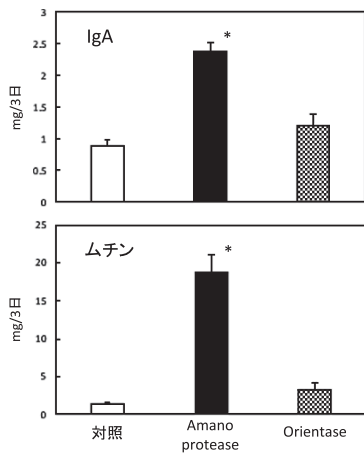


図3. 麹菌由来プロテアーゼ剤 (Amano protease, および Orientase) 添加食摂取のラット糞中IgA, およびムチンに及ぼす影響. 平均±SE. \*P < 0.05 (対照群との比較, Tukey's multiple range test).

関与) やムチン (腸管バリアー機能に関与) も増加させていたことから, 腸管免疫やバリアー機能の改善にも寄与していると思われる (図3)<sup>2)</sup>. 同様に *Aspergillus niger* 由来のプロテアーゼ剤の Orientase (Orientase AY, エイチビアイ株式会社, 宍粟市) にも同様なビフィズス菌増加作用が見られたが, Amano proteaseほど顕著ではなかった<sup>2)</sup>. これらの結果から, ある種の麹菌由来のプロテアーゼを摂取させると腸内の善玉菌が増加し, ビフィズス菌やIgA, ムチンを増加させることが示された.

Amano protease 摂取に対する善玉菌や短鎖脂肪酸, IgA, およびムチンの応答はオリゴ糖などのプレバイオティクスを摂取した時に見られる応答と類似している. そこで, 10%フラクトオリゴ糖 (fructo-oligosaccharides: FOS) 添加と 0.1% Amano protease 添加の盲腸内の善玉菌に対する影響の比較を行った (図4). その結果, 0.1%

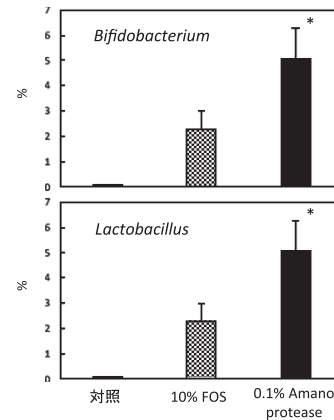


図4. 10% フラクトオリゴ糖 (FOS) 添加食, および 0.1% Amano protease 添加食摂取のラット盲腸内ビフィズス菌, およびラクトバチルスに及ぼす影響. 平均±SE. \*P < 0.05 (対照群との比較, Tukey-Kramer HSD test).

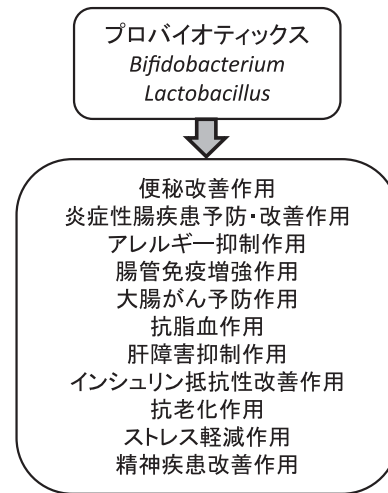


図5. プロバイオティクスの健康機能性

Amano protease 群でビフィズス菌とラクトバチルスの菌の割合が劇的に増加していたが, 10% FOS 群ではそれらの増加は遥かに少なかった. これらの結果から, Amano protease は FOS と比べて少なくとも 100 倍以上の善玉菌増加効果が見られることになる. オリゴ糖やイヌリンなど従来のプレバイオティクスは善玉菌の餌となることで善玉菌の生育促進に関わるとされていたが, 麹菌プロテアーゼ摂取の場合はそのような機構は考えにくい. 他, 別の機構が関与していると思われる. いずれにせよ, まったく新しいタイプのプレバイオティクスの登場となった.

腸内マイクロフローラの中で, ビフィズス菌は宿主にとってプラスの健康機能性を有する代表的なプロバイオティクスである (図5). 実際, ビフィズス菌はさまざま

まな疾病, たとえば便秘, 炎症性腸疾患 (inflammatory bowel disease: IBD), アレルギー, 大腸がん, インシュリン抵抗性などに対して予防的・抑制的に働く<sup>5-7)</sup>. 最近の研究では, ビフィズス菌は精神疾患に対してもポジティブな影響を及ぼすことが報告されている<sup>8)</sup>. また, ヒトでは年齢とともにビフィズス菌が減少することから, ビフィズス菌を増加させる機能性食品が求められている. その代表例としてイヌリンや上述のオリゴ糖などの難消化性多糖類がプレバイオティクスとして知られ, 今や代表的なサプリメントとして広く利用されている<sup>9)</sup>.

### 麹菌由来酸性プロテアーゼのビフィズス菌増加作用

麹菌由来のプロテアーゼ剤にはアルカリ性プロテアーゼ, 中性プロテアーゼや酸性プロテアーゼなどの複数のプロテアーゼが含まれている<sup>10)</sup>. あらかじめ低分子画分を集め, テストしたところ, ビフィズス菌増加効果は見られず, 高分子画分 (分子量5千以上) に活性成分が検出された. さらに高分子画分を熱失活させたところ, ビフィズス菌の増加効果は完全に消失した. そこで, Amano proteaseに含まれるプロテアーゼのいくつかを精製して, ラットに摂取させたところ, 酸性プロテアーゼにのみ善玉菌増加作用が見いだされた (表1)<sup>3)</sup>. さらに, 酸性プロテアーゼ活性をトリクロロ酢酸で失活させると, その効果も消失した. したがって, 酸性プロテアーゼの活性そのものも必須であると思われる. しかしながら, 本実験では酸性プロテアーゼを0.1% Amano protease相当分 (すなわち, 0.0096%) を餌に添加した場合は, ビフィズス菌増加作用は弱く, 4倍量の添加 (0.0384%) で有意な増加が見られた (表1)<sup>3)</sup>. これらの結果から, 酸性プロテアーゼはAmano proteaseの活性本体の一つとして考えられ, 他にさらに重要な活性本体が存在すると思われた.

表1. 麹菌由来の酸性プロテアーゼ (AcP) 添加食摂取のラット盲腸内容物のビフィズス菌に及ぼす影響.

	<i>Bifidobacterium</i>	<i>Lactobacillus</i>
	(%)	
対照	0.17 ± 0.13	5.4 ± 1.2
0.0096%AcP	1.93 ± 0.34	7.3 ± 2.0
0.0384%AcP	10.33 ± 2.43*	31.7 ± 12.3*
0.1%Amano protease	12.17 ± 2.58*	35.8 ± 1.54*

平均 ± SE. \*P < 0.05 (対照群との比較, Tukey-Kramer HSD test)

### 麹菌プロテアーゼによるビフィズス菌増加の機構

プレバイオティクスという言葉は, 1995年にGibsonとRoberfroidにより提唱されたものである<sup>11)</sup>. プレバイオティクスとは, 大腸内の特定の細菌の増殖および活性を選択的に変化させることより, 宿主に有利な影響を与え, 宿主の健康を改善する難消化性食品成分と定義された. この概念によると, (1) プレバイオティクスは消化管上部で加水分解, 吸収されないこと. (2) 大腸に共生する善玉菌の選択的な基質であり, それらの細菌の増殖を促進し, または代謝を活性化する. (3) プレバイオティクスは腸内フローラのバランスを改善できる. (4) プレバイオティクスの摂取は宿主の健康に有益な効果をもたらす. これらの中で(2)のビフィズス菌などの善玉菌の選択的な基質であるというのが従来のオリゴ糖などのプレバイオティクスの特徴であり, 麹菌プロテアーゼの場合とは異なっている. 筆者らの研究により, 麹菌の産生する酸性プロテアーゼ活性そのものが善玉菌の増加に関与するという証拠が初めて明らかとなった. また摂取量で比較しても, 従来のオリゴ糖などのプレバイオティクスよりはるかに少ない量で顕著な増加効果が見られた. こうした特徴から従来のプレバイオティクスとは根本的に異なる作用機構が考えられ, プレバイオティクスの基本概念を変える可能性がある.

これまでの情報を総合して考えると, 酸性プロテアーゼは酸性条件下でも比較的安定であり, 胃 (酸性条件) を通過する場合も一部が失活しないで小腸や大腸にまで到達しているものと思われる. ビフィズス菌はもともと他の菌と比べて生育が弱く, 腸内フローラの中でも相対的な存在量は非常に少ない. おそらく未消化のタンパク質などの食餌成分が大腸内に移行しても他の菌に利用機会が奪われていることが考えられる. そのため, 通常はビフィズス菌の利用できるアミノ酸が限られているが,

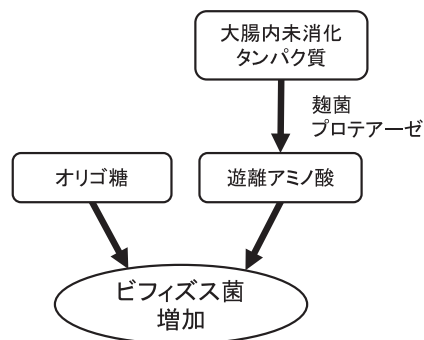


図6. 麹菌プロテアーゼ摂取のビフィズス菌増加作用の機構 (仮説)

大腸内での酸性プロテアーゼが未消化のタンパク質を加水分解することによって遊離のアミノ酸が増え、ビフィズス菌の生育に有利な環境となっているのではないかと考えられる(図6)。実際に、筆者らの最近の研究によれば、Amano protease 摂取により、盲腸内のさまざまな遊離のアミノ酸が著しく増加していた(論文投稿中)。一方、タンパク質摂取の不足条件下では、Amano protease の善玉菌増加効果は消失し、遊離アミノ酸の増加も抑制されていた。これらの結果から、麹菌プロテアーゼ作用の機構として大腸内での遊離アミノ酸の増加が少なくとも一部関係しているのではないかと考えられる。

### おわりに

本稿で麹菌プロテアーゼの新規機能性として腸内環境改善作用を紹介した。麹菌由来のプロテアーゼ剤はすでに食品加工や消化酵素剤などの医療用医薬品に用いられている。本研究によって、こうしたプロテアーゼ剤の摂取による腸内環境の改善という新たな効能へと用途が広がることが期待される。そのためには、大腸炎など疾病モデル動物での麹菌プロテアーゼの効果の調査、さらに臨床試験も必要である。本研究は麹菌発酵食品の健康機能性に関してもまったく新しい視点を提供するものであり、麹菌発酵食品の健康機能性の根拠を与えることになった。最近、世界各国のヒトの糞便のメタゲノム解析が行われ、日本人にはビフィズス菌が比較的多いことが報告された<sup>12)</sup>。これは日本人が麹菌発酵食品を食べていることと関係があるのか新たな疑問が湧いてくる。さらに麹菌の酵素バイオテクノロジーの分野においても新た

な領域の突破口となることが期待される。麹菌以外にもテンペやチーズなどの発酵食品の製造に使われている *Rhizopus* や *Penicillium* などのプロテアーゼについても同様なビフィズス菌増加効果が見られるか検討を行う必要がある。また、麹菌由来の酸性プロテアーゼは、従来のオリゴ糖などのプレバイオティクスとはまったく異なる新型のプレバイオティクスと思われ、従来のプレバイオティクスの常識を覆すものとなった。そのためプレバイオティクスの学問領域そのものの発展にも大きく寄与することになり、次世代のプレバイオティクス研究の幕開けとなった。

### 文 献

- 1) Okazaki, Y. *et al.*: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **77**, 53 (2013).
- 2) Yang, Y. *et al.*: *Biomed. Rep.*, **3**, 715 (2015).
- 3) Yang, Y. *et al.*: *Nutr. Res.*, **44**, 60 (2017).
- 4) Sivaprakasam, S. *et al.*: *Pharmacol. Ther.*, **164**, 144 (2016).
- 5) Tojo, R. *et al.*: *World J. Gastroenterol.*, **20**, 15163 (2014).
- 6) Krumbeck, J. *et al.*: *Curr. Opin. Gastroenterol.*, **32**, 110 (2016).
- 7) Arboleya, S. *et al.*: *Front. Microbiol.*, **7**, 1204 (2016).
- 8) Rogers, G. B. *et al.*: *Mol. Psychiatry*, **21**, 738 (2016).
- 9) Markowiak, P. and Śliżewska, K.: *Nutrients*, **9**, 1021 (2017).
- 10) 山形洋平: *化学と生物*, **54**, 109 (2016).
- 11) Gibson, G. R. and Roberfroid, M. B.: *J. Nutr.*, **125**, 1401 (1995).
- 12) Nishijima, S. *et al.*: *DNA Res.*, **23**, 125 (2016).