

## D-アミノ酸を新たな生物系素材とする新規機能性食品開発拠点の形成

著者	加藤 志郎, 稲垣 賢二, 老川 典夫, 清水 栄人, 中川 航希, 平田 夏希, 細見 亮太, 福永 健治, 吉田 宗弘, 松村 吉信, 岡島 浩平
雑誌名	関西大学研究拠点形成支援経費研究成果報告書
発行年	2021-03-18
権利	1 This is the peer reviewed version of the the article, which has been published in final form at <a href="https://doi.org/10.1016/j.ab.2019.05.018">https://doi.org/10.1016/j.ab.2019.05.018</a> . 2,3,5 日本微量栄養素学会の許諾を得て公開しています。 4 インフォーマ マーケッツ ジャパン株式会社の許諾を得て公開しています。
URL	<a href="http://doi.org/10.32286/00022981">http://doi.org/10.32286/00022981</a>

## 乳酸菌によるセレンの蓄積と代謝

岡 島 浩 平<sup>1)</sup>, 老 川 典 夫<sup>1, 2, 3)</sup>

(<sup>1)</sup>関西大学大学院理工学研究科\*, (<sup>2)</sup>関西大学化学生命工学部, (<sup>3)</sup>関西大学先端科学技術推進機構)

(受付 2018 年 8 月 28 日, 受理 2018 年 9 月 19 日)

### Accumulation and metabolism of selenium by lactic acid bacteria

Kouhei OKAJIMA<sup>1)</sup> and Tadao OIKAWA<sup>1, 2, 3)</sup>

<sup>1)</sup>Graduate School of Science and Engineering, Kansai University\*

<sup>2)</sup>Faculty of Chemistry, Materials and Bioengineering, Kansai University

<sup>3)</sup>High Technology Research Core, Kansai University

#### Summary

Selenium (Se) is one of essential micronutrients for mammals and several bacteria. But selenium causes rapid toxicity depending on the type and concentration of Se species. Many lactic acid bacteria are able to detoxify inorganic Se to elemental selenium [Se(0)] and to organic forms like selenocysteine (SeCys), selenomethionine (SeMet), and methylselenocysteine (MeSeCys). Se-enriched probiotics and fermented foods have some health benefits, e.g. antioxidative and antimutagenic. For example, administration of sodium selenite in the dosage of 1-16 mg/L is suitable for selenium enrichment in *Lactobacillus bulgaricus* and can enhance nutritive value and biological effect in the organism by elevating the contents of essential elements including P, Mg, Mn, Ca, and total amino acids.

In this mini review, we describe the accumulation and biotransformation of Se by lactic acid bacteria and the selenium-enriched functional fermented foods produced with lactic acid bacteria.

#### 1. はじめに

セレン (Se) は、哺乳類を含むさまざまな動物の必須微量元素であり<sup>1)</sup>, Se が欠乏するとガンや高血圧症, 認知低下, 白筋疾患, 骨格筋疾患等が引き起こされる<sup>2)</sup>。また Se を過剰に摂取すると, エンドーコリン機能の崩壊や甲状腺及び成長ホルモン合成の阻害が引き起こされる。さらに Se の過剰摂取は, チオールとの相互作用や活性酸素 (ROS) の産生に起因する DNA 損傷を引き起こす可能性がある。Se の栄養価は, 主に摂取する食物中の Se 種の濃度や種類に依存する。Se の推奨食餌許容量 (RDA) は 55 mg/日であり, ヒトの摂取許容上限量は 400 mg/日である<sup>2)</sup>。無機 Se は毒性が強く, 生体内で Se は主に L-セレンシステイン等の含セレンアミノ酸として存在する。また Se は, 一部の原核生物にとっても必須微量元素ではあるが, Se 種の形態や濃度に依存して急性毒性を引き起こすことが知られている<sup>3)</sup>。たとえば *Thauera selenatis* や *Bacillus arsenicoselenatis* などの微生物は, セレンオキシアニオンを嫌気呼吸電子伝達系の末端電子受容体として利用している<sup>3)</sup>。多くの微生物は, 細胞内に取り込まれた無

機 Se を元素状 Se [Se(0)], セレノシステイン (SeCys), セレノメチオニン (SeMet), メチルセレノシステイン (MeSeCys) などに変換することによって解毒している<sup>4)</sup>。これまでに乳酸菌による Se の取り込みについていくつかの報告がされてきたが, 細胞内へ取り込まれた後の Se の代謝やその生理的な機能については未解明な点が多い。

そこで本稿では, 乳酸菌による Se の取り込みと代謝に焦点を当て, これまでの報告に基づいて概説するとともに今後の展望について述べる。

#### 2. 乳酸菌による Se の蓄積と代謝

多くの乳酸菌は無機 Se を取り込み元素状 Se または有機 Se に変換し代謝することで, 菌体内に Se を蓄積することができる<sup>5)</sup>。菌体内に蓄積される有機 Se 種としては, システインまたはメチオニンの硫黄原子を Se 原子と置き換えた SeCys, SeMet, メチル化した Se 化合物をあげることができる。乳酸菌による Se の蓄積は Calomme らによって初めて報告された<sup>6)</sup>。その後 *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus brevis* などの乳

\*所在地: 大阪府吹田市山手町3-3-35 (〒564-8680)

酸菌株が培地中に亜セレン酸を添加すると、Seをセレンシステイン等の含セレンアミノ酸の形で菌体内に蓄積することが報告された<sup>7)</sup>。また近年、*Enterococcus durans*が、15 mg/Lの亜セレン酸ナトリウムを添加したBHI培地中で増殖し、6時間後に定常期に達し、その菌体内に蓄積されたSe量は2.6 mg/gに達することが報告された<sup>8)</sup>。これらの乳酸菌を含め、これまでに報告されている主な乳酸菌及びビフィズス菌によるSeの菌体内への取り込みと蓄積についてTable 1にまとめた。

また、Seは、濃度によって乳酸菌の生育に与える影響が異なるということが知られている。高濃度のSeが培地中に添加されると乳酸菌の生育は阻害されるが、低濃度のSeが培地中に添加されると乳酸菌の生育が促進されることが報告されている<sup>13)</sup>。Xiaらは、0～16 mg/Lの亜セレン酸を含むMRS培地中で生育させた*L. bulgaricus*の菌体内の含有アミノ酸量を測定し、Asp, Thr, Ala, Val, Ile, Proの増加とSer, His, Argの減少を確認した。また、培地中に4 mg/Lの亜セレン酸ナトリウムを含む培地で生育させた*L. bulgaricus*は、亜セレン酸非含有培地で生育させた菌体よりも多くのP, Mg, Mn, Caを含むこ

とを明らかにした。これらの結果から、*L. bulgaricus*によるSeの代謝は、本菌の菌体内のアミノ酸濃度に影響をもたらし、各種ミネラルの含有量を増加させることから、本菌の栄養価の向上につながる可能性も示唆された<sup>9)</sup>。Zhangらは、2.5～10 µg/mlの亜セレン酸ナトリウムを培地中に添加し、*Bifidobacterium animalis* 01を生育させ、菌体内に取り込まれる有機Seの割合を調べたところ、77%以上のSeがSeMetに変換され蓄積していることを明らかにした。LC-ESI-MS分析によって蓄積が確認されたSeMetは、メチオニンの硫黄原子のSe原子への置換により菌体内に非特異的に取り込まれたと考えられている。また、*Streptococcus salivarius* K12, *L. rhamnosus* 67B, *L. acidophilus* L10, *B. lactis* LAFTI B94では、菌体内でSeMetからジメチルダイセレンナイド (DMDS<sub>2</sub>Se) とジメチルセレンナイド (DMSe) が生成され、亜セレン酸存在下ではDMDS<sub>2</sub>Se, DMSe及び元素状Seが生成された<sup>19)</sup>。これらのDMSeとDMDS<sub>2</sub>Seの生成は亜セレン酸濃度に依存し、高濃度(5.78 mM)ではDMDS<sub>2</sub>Seが、低濃度(0.58 mM)ではDMSeが生成されるということが明らかとなっている<sup>19)</sup>。また、これらの乳酸菌の菌体内に蓄積されたSeは、

**Table 1** Assimilation and accumulation of selenium by lactic acid bacteria and bifidobacterial\*

Microorganism	Se added in medium	Se produced in cell	Remarks
<i>Lactobacillus brevis</i>	Se (IV)	SeCys	Selenium was nonspecifically incorporated into bacterial proteins in the form of selenocysteine.
<i>Lactobacillus caei</i>	Se (IV)	SeCys	
<i>Lactobacillus delburueckii</i> subsp. <i>Bulgaricus</i>	Se (IV)	SeCys	
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Se (IV)	SeCys	
<i>Lactobacillus acidophilus</i> L10	Se (IV)	DMSe, DMDS <sub>2</sub> Se, Se(0)	
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> 67B	Se (IV)	DMSe, DMDS <sub>2</sub> Se, Se(0)	
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	Se (IV)	Se(0)	
<i>Lactobacillus fermentum</i> LB7	Se (IV)	Se(0), Se-enriched biomass	The administration of sodium selenite enhanced nutritive value and biological effects in the organism by elevating the contents of essential elements including P, Mg, Mn, Zn, Ca, and total amino acids.
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> LB3	Se (IV)	Se(0)	Sodium selenite supplementation increased the expression of selenocysteine lyase in <i>Lactobacillus reuteri</i> .
<i>Lactobacillus reuteri</i>	Se (IV)	Organic selenium	
<i>Bifidobacterium animalis</i> 01	Se (IV)	SeMet	Most of selenium (over 77%) was incorporated in bacterial cells into organic fraction at low sodium selenite concentration.
<i>Bifidobacterium lactis</i> LAFTI B94	Se (IV)	DMSe, DMDS <sub>2</sub> Se, Se(0)	The metabolic transformation of selenite increased with time, reaching a plateau after 24 h of fermentation.
<i>Enterococcus faecalis</i> LAB14	Se (IV)	Se-enriched biomass	
Yoghurt bacteria	Se (IV)	SeCys	
<i>Streptococcus salivarius</i> K12	Se (IV)	DMSe, DMDS <sub>2</sub> Se, Se(0)	
Sauerkraut natural fermentative bacteria	Se (IV)	SeMeSeCys	
<i>Bifidobacterium. lactis</i> LAFTI B94	SeMet	DMSe, DMDS <sub>2</sub> Se	
<i>Lactobacillus. rhamnosus</i> 67B	SeMet	DMSe, DMDS <sub>2</sub> Se	
<i>Streptococcus. salivarius</i> K12	SeMet	DMSe, DMDS <sub>2</sub> Se	
<i>Streptococcus thermophilus</i>	NaHSeO <sub>3</sub>	Se(0)	

\*The data in this table were in part cited from reference 2).

SeMet, SeCys の生合成に使用され、過剰に取り込まれた Se 化合物は元素状 Se [Se(0)] に変換され生育培地中で赤色を呈する<sup>9)</sup>。さらに菌体内に取り込まれた Se は *E. faecalis* の Se 依存性キサンチンデヒドロゲナーゼの活性を上昇させることが明らかとなっている<sup>10)</sup>。これまでに、*Escherichia coli* などの代表的な微生物の Se 代謝は良く研究されている<sup>11)</sup>。一方、多くの乳酸菌が Se の取り込み能を持つことが報告されているにも関わらず、未だそれら乳酸菌の Se 代謝の解明には至っていない。*E. coli* の Se 代謝では特にグルタチオン/チオール反応系が重要であるが、近年乳酸菌についても同様の反応系の存在が報告された<sup>12)</sup>。しかし、乳酸菌のグルタチオン/チオール反応系が Se 代謝に関わっているという明確な証拠は不明瞭なままである。また、亜セレン酸の培地への添加は、*Lactobacillus reuteri* のセレノシステインβリアーゼ (*Lr-SCL*) の発現量を上昇させるということが報告されている<sup>14)</sup>。本酵素は PLP (ピリドキサル5'-リン酸) を補酵素とし、NiFS フェミリータンパク質と高い配列相同性を持つ。*Lr-SCL* は L-セレノシステインを基質とし、L-アラニンとセレン化水素 (または元素状 Se) に分解する反応を触媒する。*Lr-SCL* は高い基質特異性を示し、硫黄アナログである L-システインを基質としない。*Lr-SCL* はセレノタンパク質中にセレノシステインを取り込む重要な役割を担い、Se 代謝において鍵となる酵素である。セレノシステインから *Lr-SCL* の酵素反応で生じたセレン化水素は、亜セレン酸ナトリウムの細胞内での還元によって生成したセレン化水素よりも、効率的にセレノタンパク質中に取り込まれることが明らかとなっている<sup>14)</sup>。微生物由来のセレノシステインβリアーゼ (SCL) の酵素科学的性質はこれまで *E. coli* や *Citrobacter* 属細菌の酵素について報告があるが、乳酸

菌の SCL 活性の報告はわれわれの知る限り当研究室の報告のみである<sup>15)</sup>。今後本酵素をはじめとする乳酸菌の Se 代謝関連酵素が足がかりとなり、乳酸菌による Se 代謝の解明が進展することが期待される。

### 3. Se 強化乳酸菌の機能性食品への応用と今後の展望

Se 濃度、培地の pH、培養温度等を最適化することにより、Se を蓄積し代謝を行う乳酸菌やビフィズス菌を用いた Se 強化発酵乳の開発が近年さかんに行われている。Alzate らは 2 μg/g の Se (IV) を含む Se 強化発酵乳の開発を試みた。しかし、彼らは、高濃度の Se を含む発酵乳は金属 Se 臭を発生しピンク色に着色することからヒトの消費には不相当であると考えた。このようなピンク色の呈色と独特の金属 Se 臭は、乳酸菌やビフィズス菌が乳酸発酵時に Se を代謝した結果生じた元素状 Se に起因する。また、2 μg/g の Se (IV) 存在下での乳酸発酵によって SeCys, MeSeCys, SeMet 等の有機 Se 化合物も生成し、これらの一部は含セレノタンパク質中に取り込まれることが報告されている<sup>16,17)</sup>。このように Se 強化発酵乳はヒトが食品として利用するにはまだ改善の余地があるが、乳酸発酵を Se 存在下で行うと生成したヨーグルトの乳清量が増加し、より良好な水分含量の製品ができることが明らかとなっている<sup>16)</sup>。

また、食品に添加した Se は、ヒトの抗酸化状態を改善することが知られている。このような Se の機能は、主にヒトのグルタチオンペルオキシダーゼ、チオレドキシシンレダクターゼ、ヨードチロニンデオディナーゼ、セレノプロテイン P<sup>20)</sup> などの含セレノタンパク質の活性増強に起因す

Table 2 Se-enriched functional foods commercially available\*

Product name	Producer	Country	Health benefit
Kalsis	Catalysis	USA	Reconstruction of bone mass.
Lacto bio Se	Bio Man Life Science	Italy	Anti-aging (preserves the integrity of DNA, proteins), improves the immune system, regulates the function of the thyroid, enhances male fertility, reduces the risks in the circulation.
Lactomicrosel	Dr. Aliment Functional Food Research Brand and Marketing	Hungary	Increased bioavailability, non toxic form, reduces the risk of cancer, reduces ageing and promotes longevity, binds and eliminate toxins from body
Selenium Food Complex	New Chapter	USA	More active than purified Se, enhanced detoxification, easy to digest.
ProbioSe	Tensall Bio-Tech Co Ltd	Taiwan	Highly bioavailable selenium.
Lesik Se ferments	Ferments of life	Belgium	Fights fatigue, constipation and diarrhea, puffiness, intestinal flora problems and hypermeability, helps body in eliminating toxins and helps body cells to function normally, reducer and antioxidant.
Combivet-Se	Pharmateka	Hungary	Bacteriolytic and antistress effect, strengthening of immune system, inhibiting the proliferation of bacteria with the purpose of prevention.
Throat Biotics™	Healthy Biotics Inc	USA	Boost natural immunity and helps body to fight germs and viruses that cause the common cold and flu.

\*The data in this table were in part cited from reference 2).

**Table 3** Proposed health benefits of Se-enriched probiotics and fermented foods\*

Se-enriched product or microorganism	Health benefit
Yoghurt	Improved nutritional value
Sauerkraut	Improved nutritional value
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	Improved nutritional value
<i>Lactobacillus buchneri</i> Lb-26	Improved bioavailability of Se
Fermented milk	Improved bioavailability of Se
<i>Enterococcus faecium</i> 74	Antipathogenic activity; Antimutagenic; Hypocholesterolemic effect
<i>Lactobacillus</i>	Antioxidative activity
<i>Bifidobacterium longum</i>	Anticarcinogenic activity
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Anticarcinogenic activity
<i>Lactobacillus brevis</i>	Anticarcinogenic activity

\*The data in this table were in part cited from reference 2).

ることが明らかとなっている。*B. animalis* 01 細胞の抗酸化活性は、Se 濃度の増加に伴って増加することが知られている<sup>21)</sup>。また、発酵前のサワークラウトへの Se の添加は、有機 Se 化合物の生成に起因すると考えられる抗酸化活性を約 1.75 倍増加させる<sup>13)</sup>。さらに、Se を豊富に含むプロバイオティクスは、いくつかの動物モデルで抗酸化反応を促進することが明らかとなっており、さまざまな疾患状態を改善することが知られている。また Se が豊富な乳酸菌の経口補給は、グルタチオンペルオキシダーゼ及びスーパーオキシドジスムターゼのような、主要な抗酸化酵素の活性を増強および維持することによって、実験的に誘発された肝臓損傷を防ぐことが報告されている<sup>22)</sup>。この他にも Se 強化機能性食品は、抗ガン活性や抗病原性活性を持つことも報告されている<sup>18)</sup>。これまでに海外で商品化された乳酸菌及びビフィズス菌を用いた主な Se 強化健康食品を Table 2 にまとめた。

また、これらの Se 強化健康食品がもたらす健康への効果を Table 3 にまとめた。

以上のように、乳酸菌を用いた Se 強化食品の健康への効果は徐々に解明されてきており、サプリメントや健康補助食品として実用化例が増加しつつある。これまでに実用化された Se 強化健康食品が引き起こす毒性や副作用の報告は一例も無い。今後、乳酸菌の Se 代謝関連酵素の酵素科学的性質や生理的な機能を詳細に明らかにすることにより、Se 強化乳酸菌を用いた新規な機能性食品の開発が進展することが期待される。

### 謝 辞

本ミニレビュー中で引用した研究（参考文献 15）は、関西大学研究拠点形成支援経費（2018 年度）及び関西大学先端科学技術推進機構機能性食品開発研究グループの経費（2018 年度）によって実施されたものである。

### 参考文献

1) 三原久明 / 鉄硫黄クラスターおよびセレンタンパク質

の生合成を司る硫黄・セレン脱離酵素群の発見と分子機能解析 / 生化学 第 83 巻 第 1 号, 1003-1015, (2011)

- 2) Sarang Dilip Pophaly, Poonam, Prashant Singh, Hitesh Kumar, Suridhir Kumar Tomar / Selenium enrichment of lactic acid bacteria and bifidobacteria: A functional food perspective / Trend in Food Science & Technology, 39, 135-145, (2014)
- 3) Stolz, J. F., & Oremland, R. S. (1999). Bacterial respiration of arsenic and selenium. FEMS Microbiology Reviews, 23, 615e627.
- 4) Rother, M. (2012). Selenium metabolism in prokaryotes. Selenium, 457e470.
- 5) Sarang Dilip Pophaly, Poonam, Prashant Singh, Hitesh Kumar, Suridhir Kumar Tomar / Selenium enrichment of lactic acid bacteria and bifidobacteria: A functional food perspective / Trend in Food Science & Technology, 39, 135-145, (2014)
- 6) Calomme, M. R., Van den Branden, K., & Vanden Berghe, D. A. (1995). Selenium and *Lactobacillus* species. Journal of Applied Microbiology, 79, 331e340.
- 7) Andreoni, V., Luischi, M. M., Cavalca, L., Erba, D., & Ciappellano, S. (2000). Selenite tolerance and accumulation in the *Lactobacillus* species. Annals of Microbiology, 50, 77e88.
- 8) Pieniz, S., Andrezza, R., Anghinoni, T., Camargo, F., & Brandelli, A. (2014). Probiotic potential, antimicrobial and antioxidant activities of *Enterococcus durans* strain LAB18s. Food Control, 37, 251e256.
- 9) Xia, S. K., Chen, L., & Liang, J. Q. (2007). Enriched selenium and its effects on growth and biochemical composition in *Lactobacillus bulgaricus*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 55, 2413e2417.
- 10) Srivastava, M., Mallard, C., Barke, T., Hancock, L. E., & Self, W. T. (2011). A selenium-dependent xanthine dehydrogenase triggers biofilm proliferation

- in *Enterococcus faecalis* through oxidant production. *Journal of Bacteriology*, 193, 1643e1652.
- 11) Turner, R. J., Weiner, J. H., & Taylor, D. E. (1998). Selenium metabolism in *Escherichia coli*. *Biometals*, 11, 223e227.
  - 12) Kullisaar, T., Songisepp, E., Aunapuu, M., Kilk, K., Arend, A., Mikelsaar, M., et al. (2010). Complete glutathione system in probiotic *Lactobacillus fermentum* ME-3. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 46, 481e486.
  - 13) Penas, E., Martinez-Villaluenga, C., Frias, J., Sanchez-Martinez, M. J., Perez-Corona, M. T., Madrid, Y., et al. (2012). Se improves indole glucosinolate hydrolysis products content, Se-methylselenocysteine content, antioxidant capacity and potential anti-inflammatory properties of sauerkraut. *Food Chemistry*, 132, 907e914.
  - 14) Lamberti, C., Mangiapane, E., Pessione, A., Mazzoli, R., Giunta, C., & Pessione, E. (2011). Proteomic characterization of a selenium metabolizing probiotic *Lactobacillus reuteri* Lb2 BM for nutraceutical applications. *Proteomics*, 11, 2212e2221.
  - 15) 岡島浩平, 大塚政志, 細見亮太, 吉田宗弘, 山中一也, 老川典夫. (2018) 乳酸菌 *Leuconostoc mesenteroides* LK-151 のセレン耐性能の評価とセレンのシステインβ-リアーゼホモログの機能解析. 第35回日本微量栄養学会学術集会講演要旨集, 12.
  - 16) Alzate, A., Canas, B., Perez-Munguia, S., Hernandez-Mendoza, H., Perez-Conde, C., Gutierrez, A. M., et al. (2007). Evaluation of the inorganic selenium biotransformation in selenium-enriched yogurt by HPLC-ICP-MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 9776e9783.
  - 17) Alzate, A., Fernandez-Fernandez, A., Perez-Conde, M. C., Gutierrez, A. M., & Camara, C. (2008). Comparison of biotransformation of inorganic selenium by *Lactobacillus* and *Saccharomyces* in lactic fermentation process of yogurt and kefir. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 8728e8736.
  - 18) Chen, L., Pan, D. D., Zhou, J., & Jiang, Y. Z. (2005). Protective effect of selenium-enriched lactobacillus on CCl4-induced liver injury in mice and its possible mechanisms. *World Journal of Gastroenterology*, 11, 5795e5800.
  - 19) Krittaphol, W., McDowell, A., Thomson, C. D., Mikov, M., & Fawcett, J. P. (2011). Biotransformation of L-selenomethionine and selenite in rat gut contents. *Biological Trace Element Research*, 139, 188e196.
  - 20) Rayman, M. P. (2000). The importance of selenium to human health. *The Lancet*, 356, 233e241.
  - 21) Shen, Q., Zhang, B., Xu, R., Wang, Y., Ding, X., & Li, P. (2010). Antioxidant activity *in vitro* of the selenium-contained protein from the Se-enriched *Bifidobacterium animalis* 01. *Anaerobe*, 16, 380e386.
  - 22) Chen, L., Pan, D. D., Zhou, J., & Jiang, Y. Z. (2005). Protective effect of selenium-enriched *Lactobacillus* on CCl4-induced liver injury in mice and its possible mechanisms. *World Journal of Gastroenterology*, 11, 5795e5800.