

# 卵殻膜およびその分解物が腸内生態系におよぼす影響の解明

神戸大学大学院農学研究科・助教 福田 伊津子

## ■ 緒 言

近年、健康と腸内細菌叢との関連性に対する関心が高まりを見せている。機能性食品の中でも特に、乳酸菌やビフィズス菌といったプロバイオティクス市場は拡大傾向にあるが、個々人の常在細菌叢と比較すると摂取するプロバイオティクスの存在比は非常に低く、腸内定着性は低い。一方、腸内細菌叢の基質として働き、健康に有益な効果をもたらすとされるプレバイオティクスの認知度は低く、その重要性を訴求していく必要がある。プレバイオティクスとは、1995年にGibsonとRoberfroidによって定義された言葉で、「有用菌数の増殖を促進、あるいは、有害菌を抑制することによって、宿主の健康に有利に働く非消化性食品成分」のことを示す<sup>1)</sup>。有用菌である *Lactobacillus* 属細菌と *Bifidobacterium* 属細菌等は、ヒトの大腸内に多く存在している<sup>2)</sup>。プレバイオティクスの代表例として、オリゴ糖やイヌリンなどの食物繊維が挙げられるが<sup>3)</sup>、難消化性のタンパク質ではその効果の検証はあまり進んでいない。

卵殻膜は分子量が比較的大きなコラーゲンやヒアルロン酸が豊富で消化されにくいことが知られており、プレバイオティクスとしての機能が期待できる。腸内細菌叢の構成は個々人によって異なるため、最適なプレバイオティクスは個々人によって異なる。本研究では、個々人の腸内細菌叢の構成バランスおよびその代謝産物である短鎖脂肪酸の組成比を再現できる培養系ヒト腸内細菌叢モデル(Kobe University Human Intestinal Microbiota Model[KUHIMM])<sup>4)</sup>を小型化した KUHIMM in Bottle (KUHIMMiB)を用いた。共同研究者の報告より、卵殻膜はプロテアーゼの中でもエラスターゼに分類される酵素群により分解されやすいことが明らかとなっており、同酵素による分解物の効果を乳酸菌やビフィズス菌の単菌における評価だけでなく、KUHIMMiBにて個人ごとの細菌叢について網羅的に解析することで、卵殻膜のプレバイオティクス効果を検証した。

腸内細菌はビタミンや短鎖脂肪酸のようなヒトの体に必要な栄養素を作り出す役目を果たしているほか、ヒトが摂り入れた食物や薬の成分を代謝し、その代謝物がヒトの健康に影響を与えることが知られていることから<sup>5)</sup>、腸内細菌叢だけでなく、腸管上皮細胞を用いた粘膜バリア機能への影響についても検証し、腸内生態系への影響を評価した。

## ■ 方 法

### (a)試薬

KUHIMMiBの培養では、GAM糖分解用半流動性培地(日水製薬株式会社、東京、日本)の寒天をろ過除去後、0.5g/L グルコースを添加したものを基礎培地とした。新鮮糞便は10名の健康なボランティアから提供されたものを嫌気性菌用凍結乾燥保護剤 PreserWell (MPR)にて10倍希釈し、使用時まで-80℃で保存した。なお、ヒト糞便の採取および使用について、神戸大学大学院医学研究科倫理委員会の承認(No. 1902; 申請課題名「培養系ヒト大腸フローラモデル構築に係る研究」; 承認日:平成28年5月10日)を得た。

### (b)rLasB\_indicaの調製と同酵素による卵殻膜の加水分解

既報の方法に従い<sup>6)</sup>、rLasB\_indica発現大腸菌を培養し、培養菌体から回収した rLasB\_indica を再活性化後、DEAE-Toyopearl カラムクロマトグラフィーにて精製した。同酵素にて卵殻膜 EMパウダー(300)(キューピー株式会社; EMP)を分解し、フィルターろ過および遠心濾過膜により可溶性ペプチド画分(eggshell membrane protein fraction A, ELA)<sup>6)</sup>とした。

### (c)使用した乳酸菌(*Lactobacillus* 属)およびビフィズス菌(*Bifidobacterium* 属)と培養試験

培地組成と試験菌株を列挙する。[NBRC No. 301 培地(*L. acidophilus* NBRC 13951、*L. casei* NBRC 15883、*L. fermentum* NBRC 15885、*L. plantarum* NBRC 15891、*L. brevis* NBRC107147)、NBRC No. 804 培地(*L. delbrueckii* NBRC 3202)、NBRC No. 814 培地(*L. lactis* subsp *lactis* NBRC 100933)、NBRC No. 383 培地(*B. bifidum* NBRC 100015、)、NBRC No. 1545(*B. longum* NBRC 114494)]。試験菌株はい

ずれも属する種の Type culture である。試験培地に ELA を終濃度 0.5mM (glycylglycylglycine 換算) となるよう添加し、30°C または 37°C で嫌氣的に静置培養を行い、OD<sub>560</sub> を測定することで菌の増殖を評価した。また、(e) で述べるペプチダーゼ活性試験には ELA 無添加の培地で培養して得られた菌体を 20mM リン酸カリウムナトリウム緩衝液 (pH7.0) にて約 50mg (湿菌体重)/mL となるように懸濁した菌体を用いた。

#### (d) KUHIMMiB による腸内細菌叢培養とプレバイオティクス評価

ヒト糞便希釈液の培養には KUHIMMiB を用いた。50mL 容の培養瓶に基礎培地を 20mL 入れ、ブチルゴム栓とアルミシールで密栓後、真空ポンプで 5 分間脱気し、78% 窒素、20% 二酸化炭素、2% 水素の混合ガスを 0.1MPa となるよう約 15 秒間曝気した。この操作を 2 回繰り返して、培地中の溶存酸素を除去し、混合ガスに置換した。凍結保存した糞便希釈液は、37°C の湯浴中で急速に融解後、1,000rpm で 1 分間遠心分離した上清 50μL を添加し、37°C で静置培養した。これに EMP または ELA を 83.33mg/mL となるよう加えた。溶媒コントロールとして滅菌水を同量加えた。培養開始 30 時間後の培養液を回収し、プレバイオティクス評価に供した。

KUHIMMiB の 30 時間培養液から既報<sup>4)</sup>の通りゲノム DNA 溶液を調製し、使用時まで -20°C に保存した。ゲノム DNA 溶液は、TP700 Thermal Cycler Dice Real Time System Lite (タカラバイオ, 滋賀, 日本) を用いて既報の通り<sup>4)</sup>リアルタイム PCR を行った。本研究では全菌数 (All eubacteria) に加えて、科または属レベルで *Clostridium coccoides* group、*Clostridium leptum* group、*Bifidobacterium*、*Lactobacillus*、*Enterococcus*、Enterobacteriaceae group、*Bacteroides fragilis* group、*Prevotella*、の 9 種の 16S rRNA 遺伝子に対して特異的な配列のプライマーを用いて定量した (表 1)。培地中の短鎖脂肪酸 (コハク酸、乳酸、酢酸、プロピオン酸、酪酸) は、既報<sup>4)</sup>に従い HPLC (Shimadzu, 京都, 日本) を用いて定量した。

#### (e) *Lactobacillus* 属 *Bifidobacterium* 属の休止菌体による小麦粉由来加水分解物 (wheat flour hydrolysate protein, WFHP) と ELA の加水分解

WFHP の調製は既報の方法に従った<sup>7)</sup>。WFHP または ELA 溶液 (200μL) に対して (c) で述べた休止菌体溶液 (50μL) を添加し、30°C で 6 時間反応を行った。遠心上清を回収し、Tricine-SDS-PAGE に供した。電気泳動は、ATTO 社製の既製ゲル (P-T16.5S) および泳動用緩衝液 (AE-1415 EzRunT) を用い、同社提供のマニュアルに従って行った。

#### (f) 細胞培養と処理

腸管上皮細胞はヒト大腸杯細胞株 HT29-mtx を使用した。HT29-mtx 細胞を  $2 \times 10^6$  個となるよう 60mm dish (Corning) に播き、14 日間培養した。培養期間は 2 ~ 3 日ごとに 1 回培地を交換し、播種後 14 日目に短鎖脂肪酸を作用させた。短鎖脂肪酸を 24 時間処理後の培地を吸引除去後、PBS (-) で洗浄し、セパゾール 1mL を添加して細胞を回収した。常法に従い RNA 溶液を調製し、使用時まで -80°C で保存した。

#### (g) mRNA 発現量解析

得られた RNA 溶液は逆転写反応により cDNA 化し、ムチン (MUC 2) およびタイトジャンクション (TJ) 関連タンパク質であるオクルディン (OCLN)、クローディン (CLDN) 4、ZO-1、リファレンス遺伝子として  $\beta$ -actin の発現量を表 2 に示す特異的プライマーを用いて解析した。

## ■ 結 果

#### (a) 卵殻膜が腸内細菌叢構成に及ぼす影響

卵殻膜が腸内細菌叢構成に及ぼす影響を調べるためにリアルタイム PCR を用いて細菌叢の分析を行った (図 1)。その結果、ELA 添加群において、検体 4、9、10 で *Bifidobacterium* の有意な増加が認められた。また、検体 4、5、6、11 で *Lactobacillus* の増加傾向が見られた。そこで、*Bifidobacterium* と *Lactobacillus* に着目し、コントロールを基準として増殖率を算出した (図 2)。*Bifidobacterium* では、検体 5 と 11 では差は見られなかったが、検体 4、6、9、10 では、ELA 添加群において 2 倍程度増加する傾向が見られた。また、*Lactobacillus* では、検体 9 以外は、ELA 添加群においておよそ 1.5 倍から 5 倍程度増加する傾向が見られた。

(b)卵殻膜が細菌叢多様性に及ぼす影響

培養後のゲノム DNA 溶液を次世代シーケンサーによってメタ 16S rRNA 解析を行った(図 3)。α 多様性評価では、卵殻膜添加によるシャノン指数の増加傾向が見られたものの、有意差は見られなかった(表 3)。また、β 多様性解析からは、コントロール群と ELA 添加群の二点間がそれほど離れておらず、ELA 添加による変化は認められなかった(図 4)。

(c)卵殻膜が短鎖脂肪酸産生に及ぼす影響

KUHIMMiB にて培養後の上清の短鎖脂肪酸量を測定したところ、卵殻膜添加により、短鎖脂肪酸量のわずかな増加傾向が見られるものの、有意差は認められなかった(図 5)。

(d)ELA の乳酸菌・ビフィズス菌増殖促進活性の評価

単菌培養にて乳酸菌・ビフィズス菌の増殖促進活性を評価したところ、試験した乳酸菌の中で特に *L. acidophilus* NBRC 13951、*L. brevis* NBRC107147、*L. fermentum* NBRC 15885 の 4 種の乳酸菌について促進活性が見られた(図 6)。

(e)試験菌株による WFHP および ELA の加水分解

WFHP に対しては、*L. acidophilus* NBRC 13951、*L. delbrueckii* NBRC 3202、*L. plantarum* NBRC 15891、*B. longum* NBRC 114494 において加水分解が顕著に見られた(図 7)。一方、ELA に対しては *L. acidophilus* NBRC 13951 および *B. bifidum* NBRC 100015 において加水分解が顕著に見られた。

(f)短鎖脂肪酸によるムチンおよび TJ 関連タンパク質の mRNA 発現量変化

短鎖脂肪酸による MUC2 の mRNA 発現量の変化を調べたところ、いずれの濃度においてもコントロール群との間に有意差は認められなかった(図 8)。短鎖脂肪酸による TJ 関連タンパク質の mRNA 発現量の変化を調べたところ、OCDN は 100mM プロピオン酸、100mM 酪酸で有意に増加した(図 9A)。CLDN4 は 20 および 100mM プロピオン酸、20 および 100mM 酪酸、短鎖脂肪酸混合物で有意に減少した(図 9B)。ZO-1 の発現量に有意差は認められなかった(図 9C)。

## ■ 考 察

本研究では、卵殻膜が腸内生態系に及ぼす影響について、ヒト腸内細菌叢モデル KUHIMMiB、単菌培養、並びにヒト腸管上皮細胞を用いて調べた。ヒト大腸内においては、難消化性食物繊維などの多糖類を基質として、ピルビン酸を経て乳酸からプロピオン酸が産生される経路と、オキサロ酢酸からコハク酸、次いでプロピオン酸が産生される経路がある<sup>8)</sup>。さらに、ピルビン酸から acetyl-CoA を経て酪酸産生、あるいは酢酸から酪酸産生へとつながる代謝経路もあり、腸内細菌叢によって産生される短鎖脂肪酸の最終産物は酢酸、プロピオン酸、酪酸である<sup>8)</sup>。

卵殻膜の添加による培養の結果、ELA 添加により *Bifidobacterium* 属や *Lactobacillus* 属といった有用菌の増加傾向が見られた(図 1, 2)。卵殻膜には、20 種類のアミノ酸が豊富に含まれ、その中でもシスチンが多く含まれており<sup>9)</sup>、ビフィズス菌はシステインの要求性が高いことが知られている<sup>10)</sup>。そのため、従来の培地ではビフィズス菌にとって培地中のシステイン量が生育の律速段階となっているが、卵殻膜、特に酵素分解した卵殻膜ペプチドを加えることで、システイン量が増加したため、ビフィズス菌数が増加したと考えられた。しかし、卵殻膜添加によって有用菌の増加は認められたものの、腸内細菌代謝産物である短鎖脂肪酸量(図 5)やインドール類、アンモニア量の有意な変化は認められず(データ不掲載)、プレバイオティクス効果としてはいささか不十分な結果となった。一方で、β 多様性解析の結果から、卵殻膜は腸内細菌叢に影響をあまり及ぼさないということが分かったが(図 3, 4)、上記の結果と合わせると、卵殻膜は有用菌のみをターゲットとして増やすことができる食品素材であるとも言える。

乳酸菌 9 種について ELA の増殖促進効果を調べた結果、4 種について顕著な効果が見られた(図 6)。乳酸菌は、菌体外および菌体内ペプチダーゼを有しているものがあることから、異分解性の WFHP および卵殻膜由来 ELA を基質として試験菌株の休止菌体と反応し、加水分解特性を調べた(図 7)。その結果、加水分解活性が高い乳酸菌において、必ずしも ELA による増殖促進効果が見られなかった。よって、ELA を構成するポリペプチドがペプチダーゼによって加水分解され、菌体内に取り込まれたペプチドが促進効果を示すのではなく、ELA にもともと含まれるオリゴペプチドが寄与していると考えた。

短鎖脂肪酸による MUC 2 の mRNA 発現量の変化については、いずれの種類においても 100mM で増加傾向を示したものの、有意差は認められなかった(図 8)。このことから、短鎖脂肪酸はそれぞれ単体ではムチンの分泌量を増加させないものの、相互作用することで増加させる可能性が考えられた。さらに、TJ 関連タンパク質の mRNA 発現量の変化を調べたところ、プロピオン酸、酪酸は 100mM において OCDN の発現量を有意に増加させ、酢酸についても増加させる傾向にあった(図 9)。また、CLDN には少なくとも 24 種類のタイプが存在することが報告されており、その中でも CLDN 4 は大腸で発現することが知られている<sup>11)</sup>。本研究においてはプロピオン酸、酪酸、短鎖脂肪酸混合物は CLDN 4 の発現量を減少させることが分かったが、CLDN 4 が TJ の強弱に対してどのように働いているのかについては未だ明らかとなっていないため、今後検討を重ねる必要がある。

## ■ 要 約

ELA は、6 名中 3 名の腸内細菌叢モデルで *Bifidobacterium* の増殖効果を示し、ELA の生理活性として乳酸菌増殖促進効果を見出した。ELA は腸内細菌叢代謝物である短鎖脂肪酸産生量に影響を及ぼさなかったが、短鎖脂肪酸は腸管上皮細胞のタイトジャンクションを増強させることが示唆された。

## ■ 文 献

1. Gibson GR, Roberfroid MB, Dietary modulation of the human colonic microbiota introducing the concept of prebiotics. *J. Nutr.*, 125, 1401-1412(1995)
2. 森下芳行, 腸内細菌を健康に活かすプロバイオティクスとプレバイオティクス, 日本食物繊維研究会誌, 4(2), 47-56(2000)
3. 境 洋平, プレバイオティクス, 腸内細菌学雑誌, 33, 165-174 (2019)
4. Sasaki D, et al., Low amounts of dietary fibre increase in vitro production of short-chain fatty acids without changing human colonic microbiota structure. *Scientific Reports*, 8, Article number : 435 (2018)
5. 陳 琮湜, 腸内細菌とフィトエストロゲン, 腸内細菌学雑誌 26. 171-181(2012)
6. Takenaka S, et al., Characterization of an organic-solvent-stable elastase from *Pseudomonas indica* and its potential use in eggshell membrane hydrolysis. *Process Biochem.*, 85, 156-163(2019).
7. Di Cagno R, et al., Proteolysis by sourdough lactic acid bacteria : Effects on wheat flour protein fractions and gliadin peptides involved in human cereal intolerance. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68, 623-633(2002)
8. Rowland I, et al., Gut microbiota functions : metabolism of nutrients and other food. *Eur. J. Nutr.*, 5, 1-24(2018)
9. 一般社団法人日本鶏卵協会 HP. <https://www.jpao.or.jp/>
10. 日本乳酸菌学会, 乳酸菌とビフィズス菌のサイエンス, 京都大学学術出版会(2010)
11. Barmeyer C, et al., Claudin-related intestinal diseases. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 42, 30-38(2015)

表 1. 細菌叢構成の解析に用いたプライマー配列

標的	Sequence	Product size (nt)	Standard DNA	Reference
全菌数	5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAGT-3' 5'-GTATTACCGCGGCTGCTGGCAC-3'	200	<i>F. prausnitzii</i> ATC 43888	Bartosch et al., Appl Environ Microbiol (2004) 70:3575-81
<i>Clostridium</i> <i>coccoides</i> group	5'-AAATGACGGTACCTGACTAA-3' 5'-CTTTGAGTTTCATTCTTGCGAA-3'	440	<i>Blautia coccoides</i> JCM 1395 <sup>T</sup>	Matsuki et al., Appl Environ Microbiol (2004) 70:7220-28
<i>Clostridium</i> <i>leptum</i> group	5'-GCACAAGCAGTGGAGT-3' 5'-CTTCCTCCGTTTGTCAA-3'	239	<i>F. prausnitzii</i> ATCC 27768 <sup>T</sup>	Matsuki et al., Appl Environ Microbiol (2004) 70:7220-28
<i>Bacteroides fragilis</i> group	ATAGCCTTTCGAAAGRAAGAT CCAGTATCAACTGCAATTTA	495	<i>B. fragilis</i> JCM 11019	Matsuki et al., Appl Environ Microbiol (2002) 68:5445-51
<i>Prevotella</i>	CACRGTAACGATGGATGCC GGTCGGGTTGCAGACC	513	<i>P. melaninogenica</i> JCM 6325	Matsuki et al., Appl Environ Microbiol (2004) 70:7220-28
<i>Bifidobacterium</i> 属	5'-TCGCGTC(C/T)GGTGTGAAAG-3' 5'-CCACATCCAGC(A/G)TCCAC-3'	243	<i>B. longum</i> JCM 2117	Rinttila et al., J Appl Microbiol (2007) 97:1166-77
<i>Lactobacillus</i> 属	5'-AGCAGTAGGGAATCTTCCA-3' 5'-CACCGCTACACATGGAG-3'	341	<i>L. plantarum</i> 22A-3	Rinttila et al., J Appl Microbiol (2007) 97:1166-77
Enterobacteriaceae group	5'-CATTGACGTTACCCGAGAAGAAGC-3' 5'-CTCTACGAGACTCAAGCTTGC-3'	195	<i>E. coli</i> ATCC 43888	Bartosch et al., Appl Environ Microbiol (2004) 70:3575-81
<i>Enterococcus</i> 属	5'-CCCTTATTGTTAGTTGCCATCATT-3' 5'-ACTCGTTGTACTTCCCATTGT-3'	144	<i>Ec. casseliflavus</i> JCM 8723	Rinttila et al., J Appl Microbiol (2007) 97:1166-77

表 2. mRNA 発現量解析に用いたプライマー配列

標的	Sequence	Product size (bp)
MUC 2	F : 5'- ACCCCAAGCCCTTCTACGAG -3' R : 5'- GAGTGGATGCCGTTGATGGT -3'	259
OCLN	F : 5'- CTCCCTGGCACCGTTGG -3' R : 5'- GCCTGGATGACATGGCTGAT -3'	132
CLDN 4	F : 5'- TCTCCTCTGTTCCGGGTAGG -3' R : 5'- CGTCCATCCACTCTGCACTT -3'	128
ZO-1	F : 5'- GAATGATGGTTGGTATGGTGCG -3' R : 5'- TCAGAAGTGTGTCTACTGTCCG -3'	192
$\beta$ -actin	F : 5'- CGACAGGATGCAGAAGGAG -3' R : 5'- ACATCTGCTGGAAGGTGGA -3'	128

表 3. 卵殻膜添加による細菌叢の  $\alpha$  多様性 (シャノン指数) への影響

検体番号	コントロール	ELA
4	4.171	4.514
5	3.105	3.095
6	3.426	3.566
9	3.967	3.948
10	3.784	4.156
11	3.799	3.640

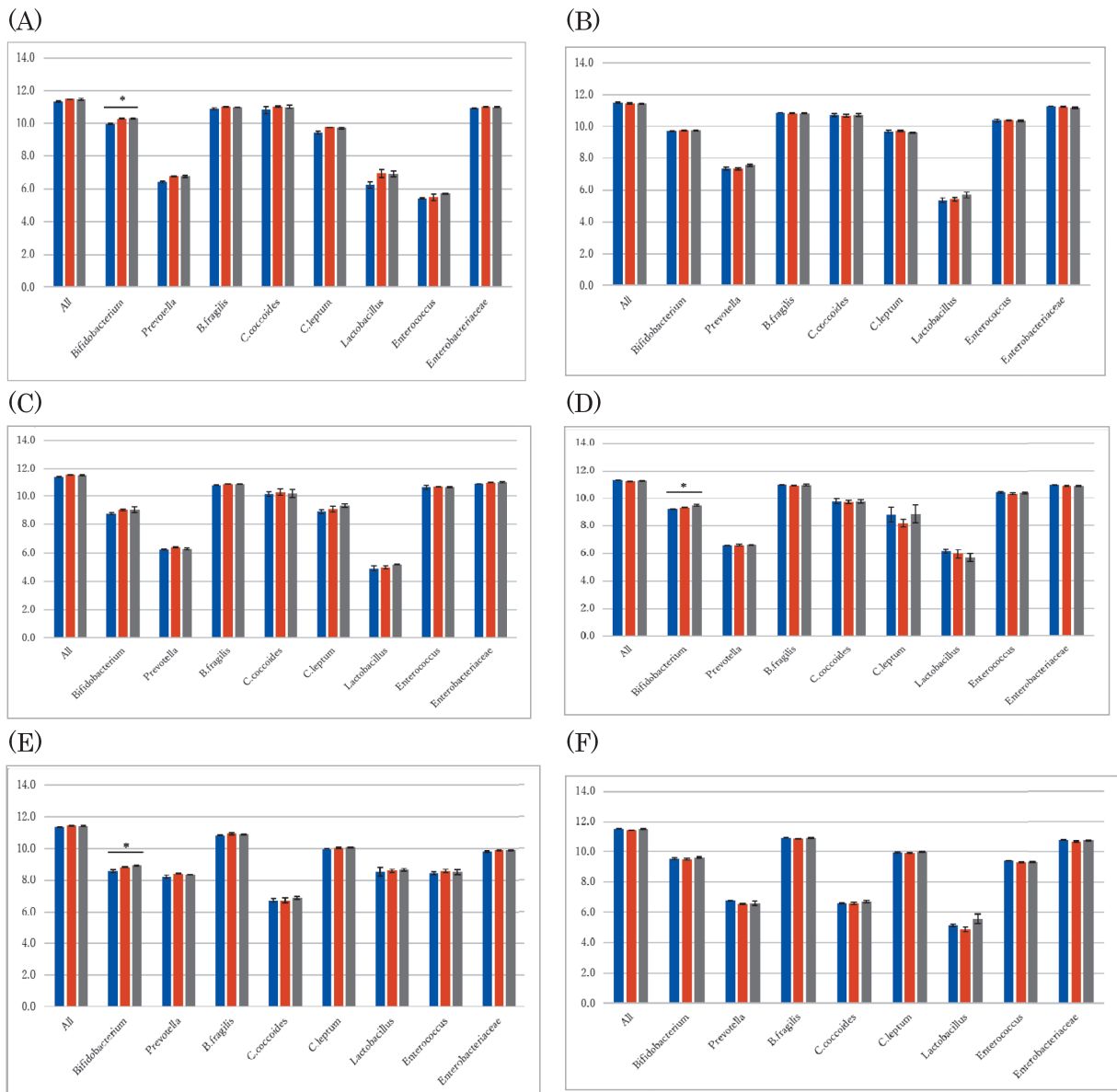
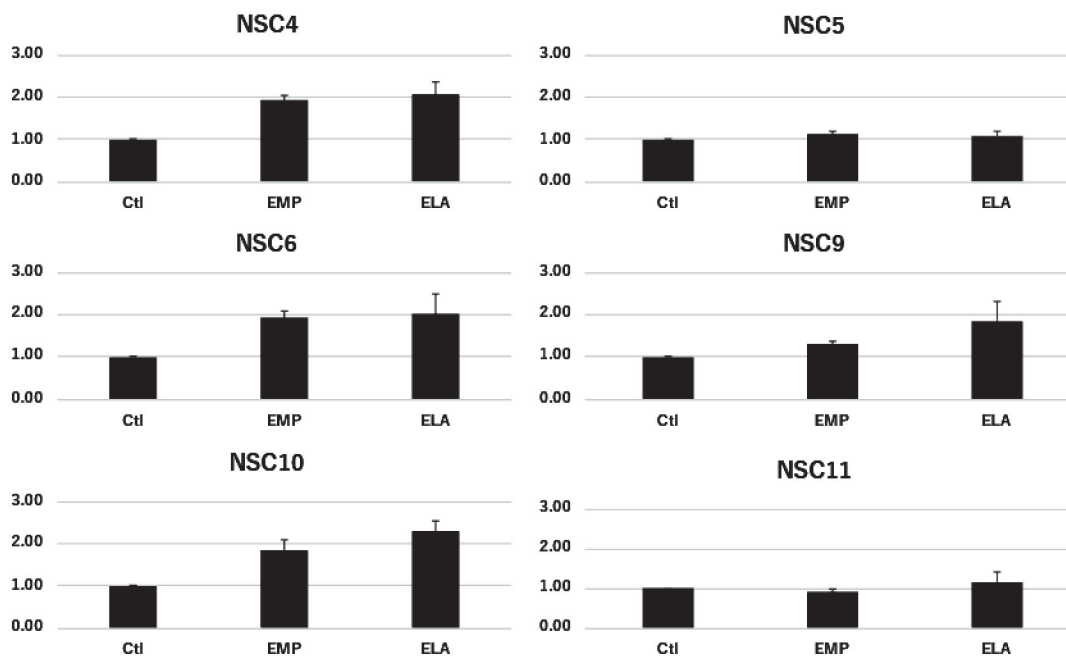


図 1. 卵殻膜添加による細菌叢構成の変化

コントロール(青棒)、EMP 添加培地(橙棒)または ELA 添加培地(灰色棒)に(A)検体 4、(B)検体 5、(C)検体 6、(D)検体 9、(E)検体 10 または (F)検体 11 の糞便希釈液を播種し、30 時間培養した。培養液から細菌叢のゲノム DNA を採取し、リアルタイム PCR に供して、全菌数(All)、*Clostridium coccoides* group(*C. coccoides*)、*Clostridium leptum* group(*C. leptum*)、*Bifidobacterium*、*Lactobacillus*、*Enterococcus*、Enterobacteriaceae group(Enterobacteriaceae)、*Bacteroides fragilis* group(*B. fragilis*)、*Prevotella* をターゲットとして定量した。データは、培地 1mL あたりの細菌数を Log10 値で平均値±標準偏差(n=3)として示した。Tukey 検定を行い、\*p<0.05 で有意差を示した。

(A)



(B)

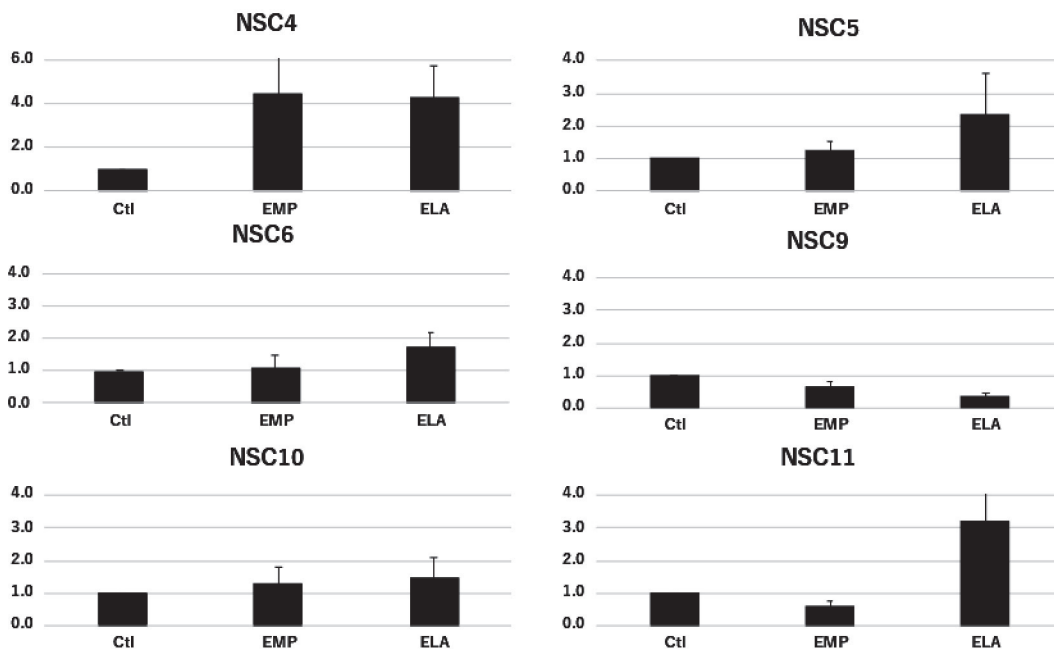
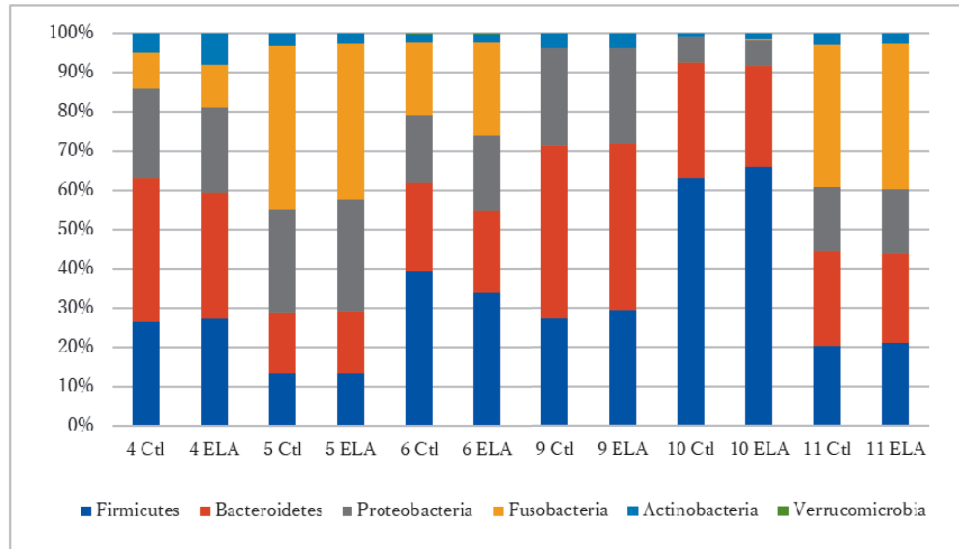


図 2. 卵殻膜添加による *Bifidobacterium* および *Lactobacillus* の増殖率の変化  
リアルタイム PCR にて (A) *Bifidobacterium* 及び (B) *Lactobacillus* の菌数を測定した。コントロールを 1 とし、平均値±標準偏差 (n=3) として示した。

(A)



(B)

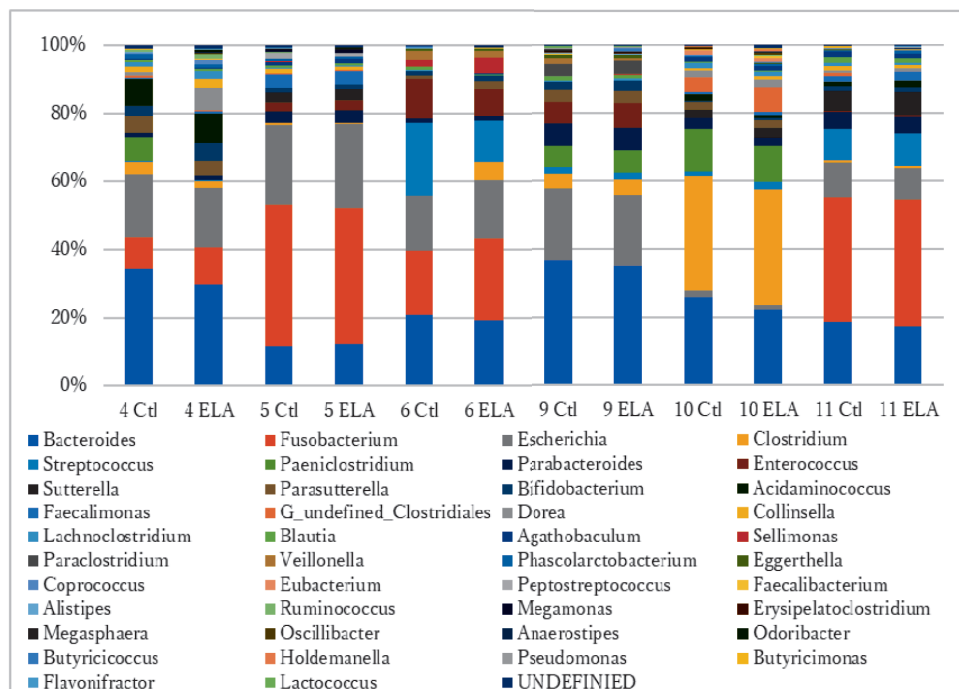


図 3. 卵殻膜添加による細菌叢の多様性に及ぼす影響

ゲノム DNA 溶液をメタ 16S rRNA 解析に供した。(A)門レベルの細菌叢構成、(B)科レベルの細菌叢構成解析結果を示した。

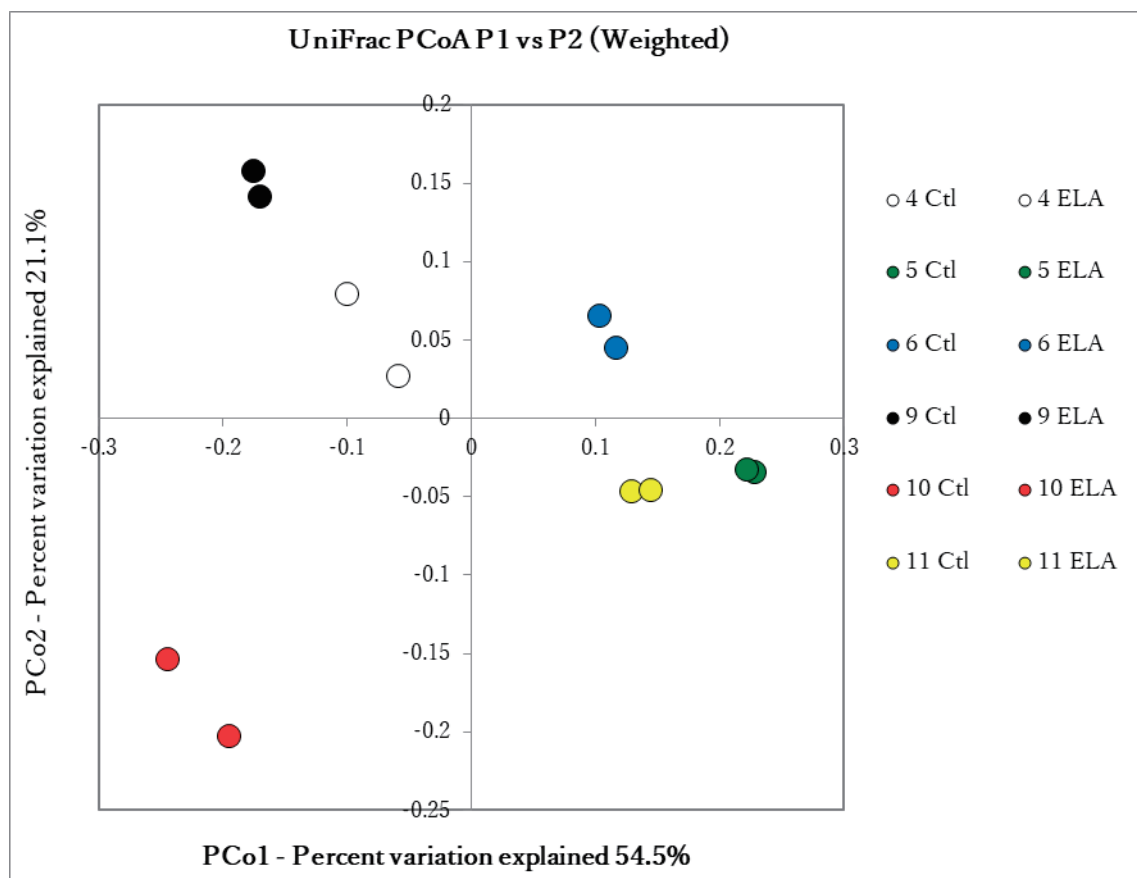


図 4. 卵殻膜添加による細菌叢の  $\beta$  多様性への影響  
ゲノム DNA 溶液をメタ 16S rRNA 解析に供し、 $\beta$  多様性解析を行った。

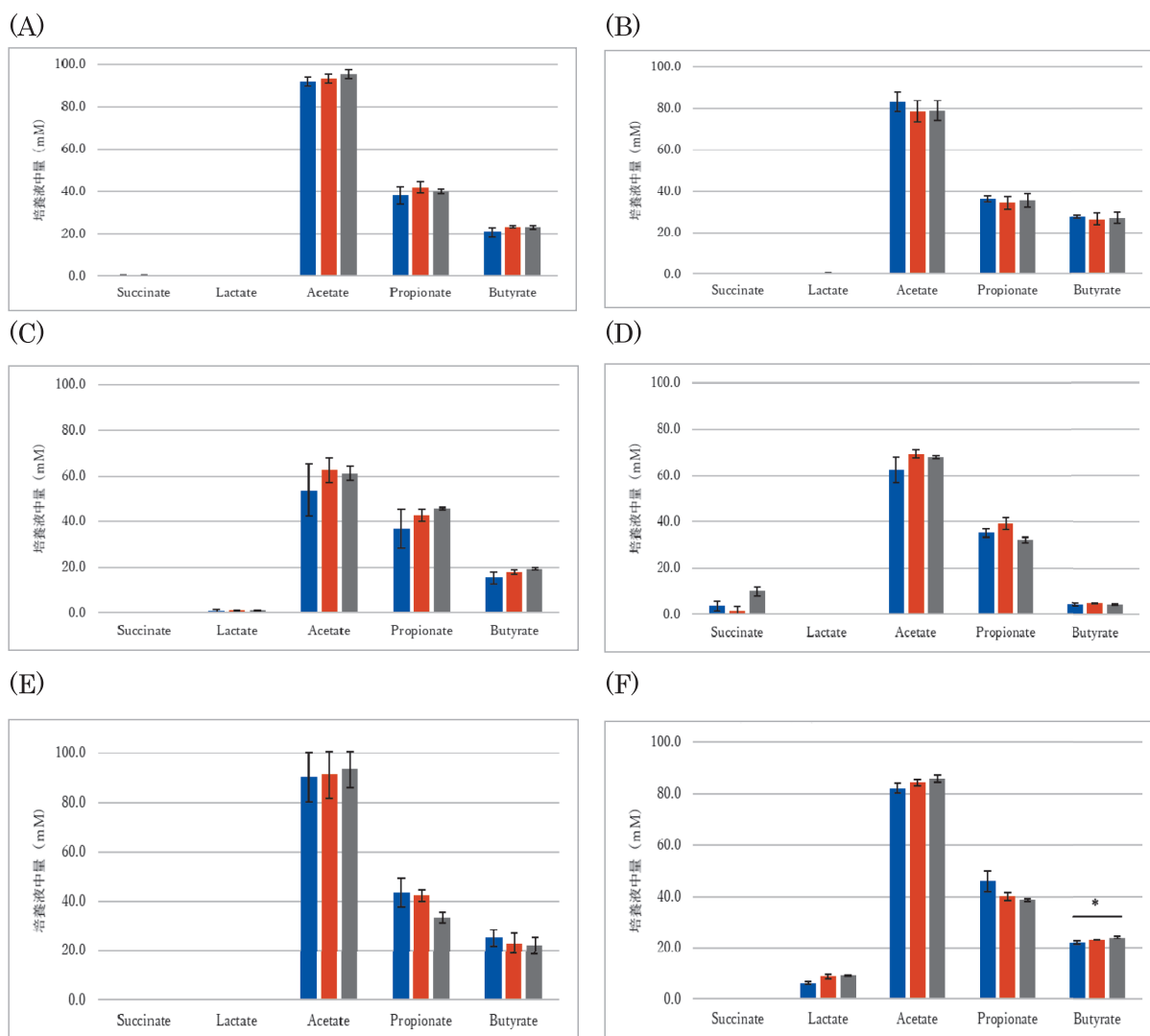


図 5. 卵殻膜添加による短鎖脂肪酸産生量の変化  
 コントロール(青棒)、EMP 添加培地(橙棒)および ELA 添加培地(灰色棒)に(A)検体 4、(B)検体 5、  
 (C)検体 6、(D)検体 9、(E)検体 10 または (F)検体 11 の糞便希釈液を播種し、30 時間後の培養上清を  
 HPLC に供して短鎖脂肪酸を定量した。データは培養液中の短鎖脂肪酸濃度 (mM) の平均値±標準偏  
 差(n=3)で示した。Tukey 検定を行い、\* $p<0.05$  で有意差を示した。

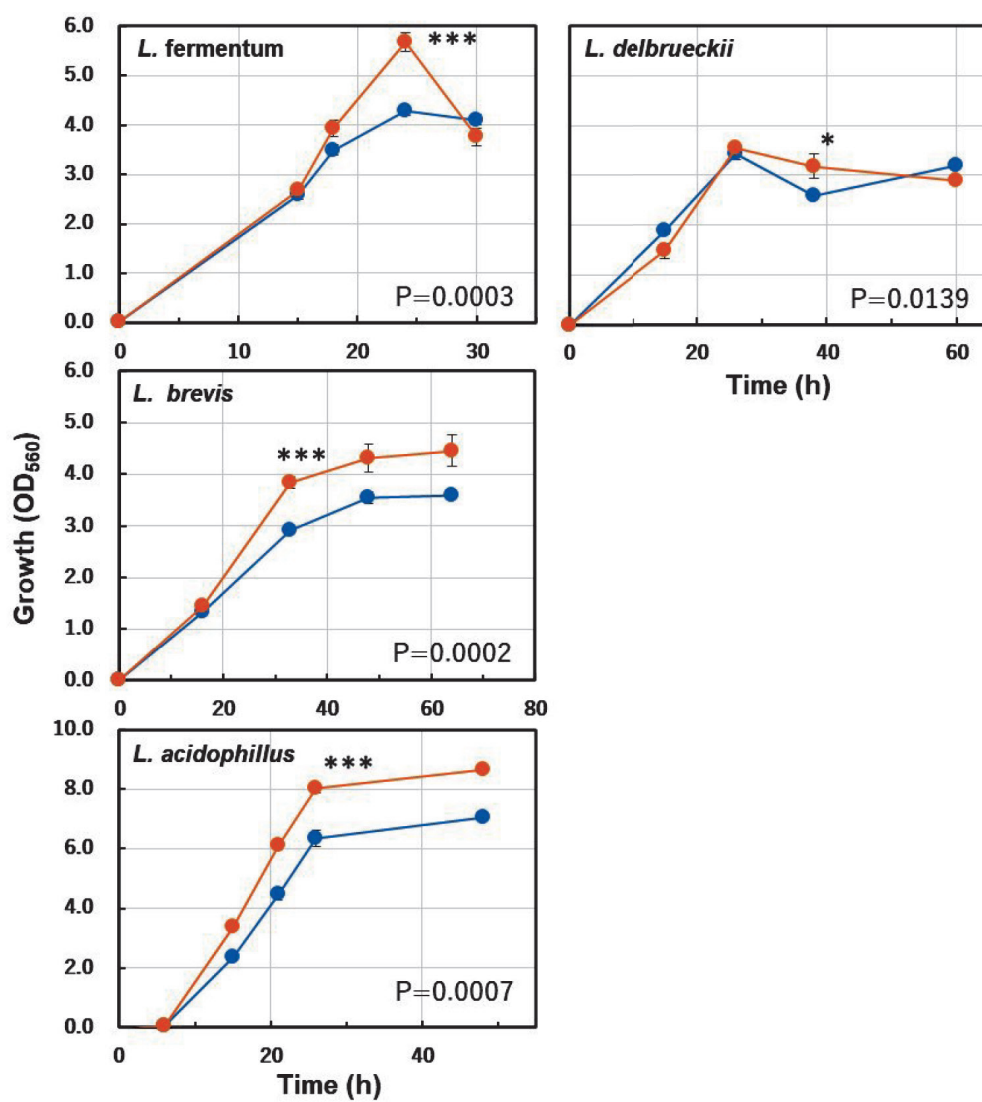


図 6. 乳酸菌に対する卵殻膜加水分解物の増殖促進効果  
rLASB\_indica による卵殻膜分解物 ELA を NBRC 標準培地 (301、804、383、および 1545) に添加し、乳酸菌は試験管内で 30℃ または 37℃ で嫌気条件下で静置培養した (青線, コントロール; 橙線, ELA 添加)。OD<sub>560</sub> を測定することで菌の増殖を評価した。

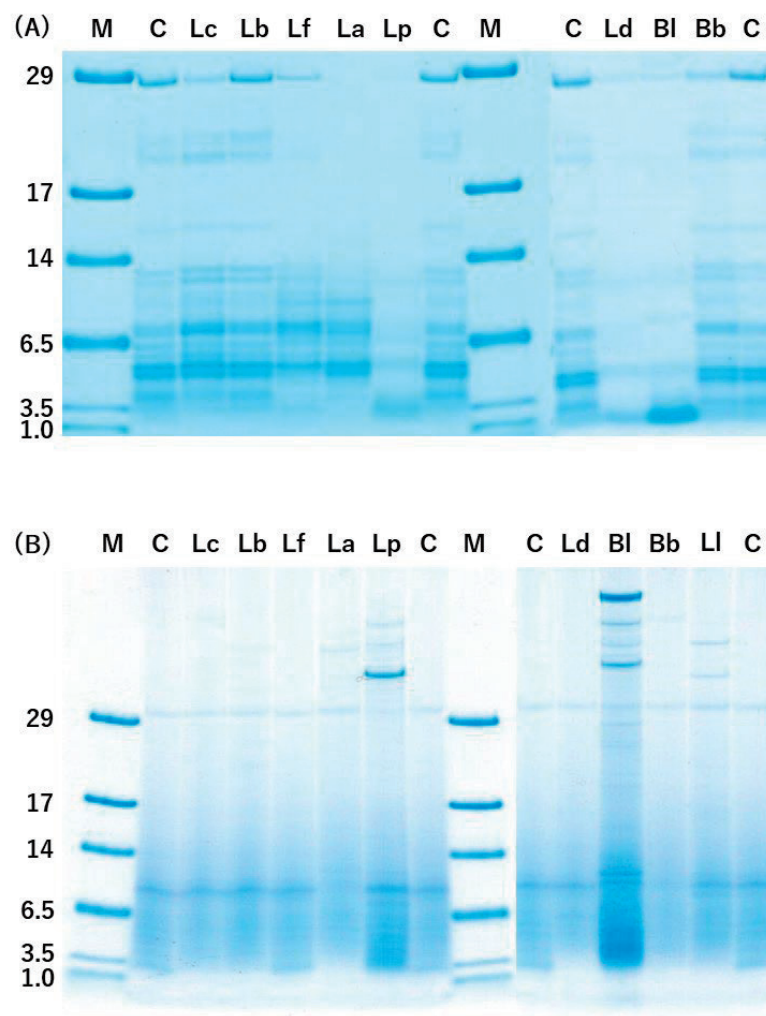


図 7. 乳酸菌の休止菌体による小麦粉由来加水分解物および卵殻膜加水分解物の加水分解  
 (A) 試験に供した乳酸菌のタンパク質分解活性の予備スクリーニング (B) 卵殻膜加水分解物に対するタンパク質分解活性  
 乳酸菌は NBRC 培地で培養し、(A) 小麦粉加水分解物または (B) ELA を含む反応混液と混合後、30℃ で 24 時間インキュベートし、上清をトリシン -SDS-PAGE で分析した。

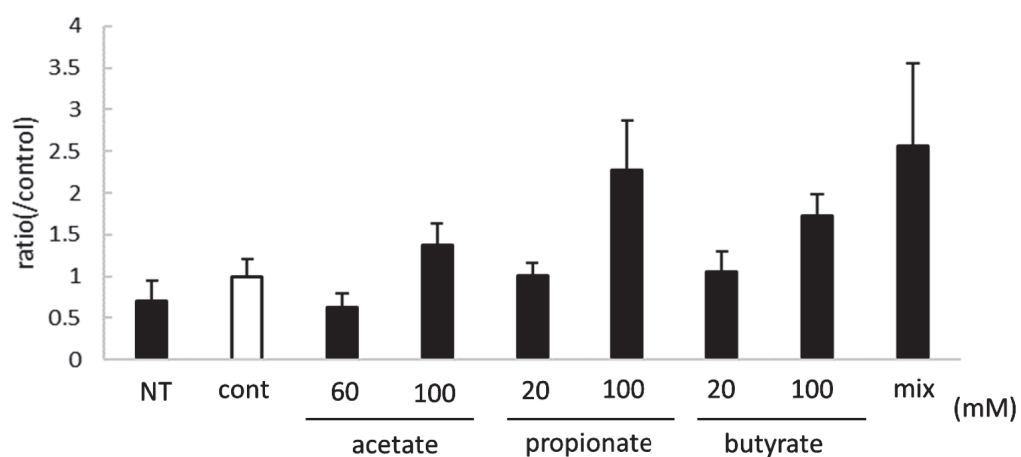
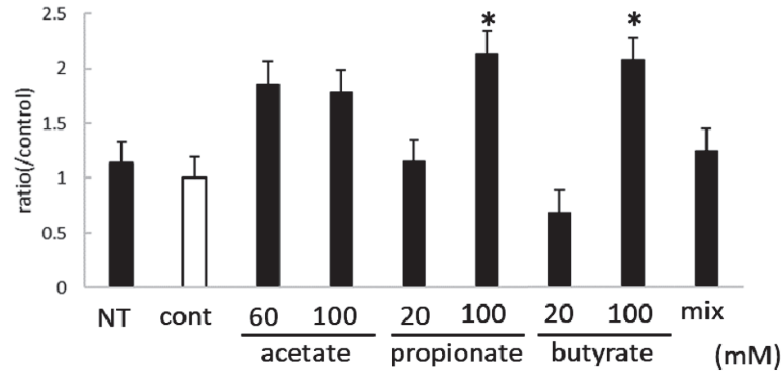


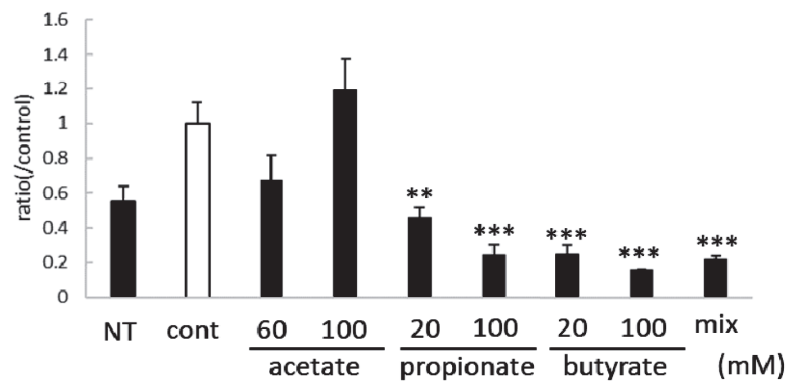
図 8. 短鎖脂肪酸による MUC 2 発現量の変化

14 日間培養して分化させた HT29-mtx 細胞に 60 または 100mM 酢酸、20 または 100mM プロピオン酸、20 または 100mM 酪酸、60mM 酢酸+20mM プロピオン酸+20mM 酪酸(mix)でそれぞれ処理し、24 時間後に抽出した RNA を用いて定量 PCR を行い、MUC 2 発現量を解析した(n=3)。

(A)



(B)



(C)

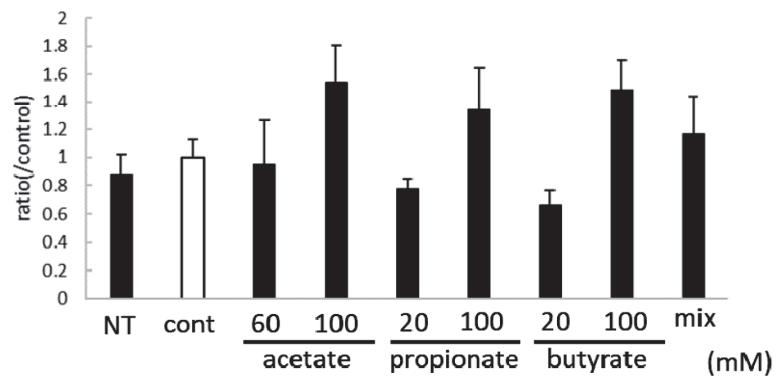


図 9. 短鎖脂肪酸による TJ 関連タンパク質の発現量の変化

14 日間培養して分化させた HT29-mtx 細胞に 60 または 100mM 酢酸、20 または 100mM プロピオン酸、20 または 100mM 酪酸、60mM 酢酸+20mM プロピオン酸+20mM 酪酸(mix) でそれぞれ処理し、24 時間後に抽出した RNA を用いて定量 PCR を行い、(A)OCLN、(B)CLDN4、(C)ZO-1 の発現量を解析した(n=3)。