

食品成分の腸内細菌変換による健康増進効果の遺伝学的解析

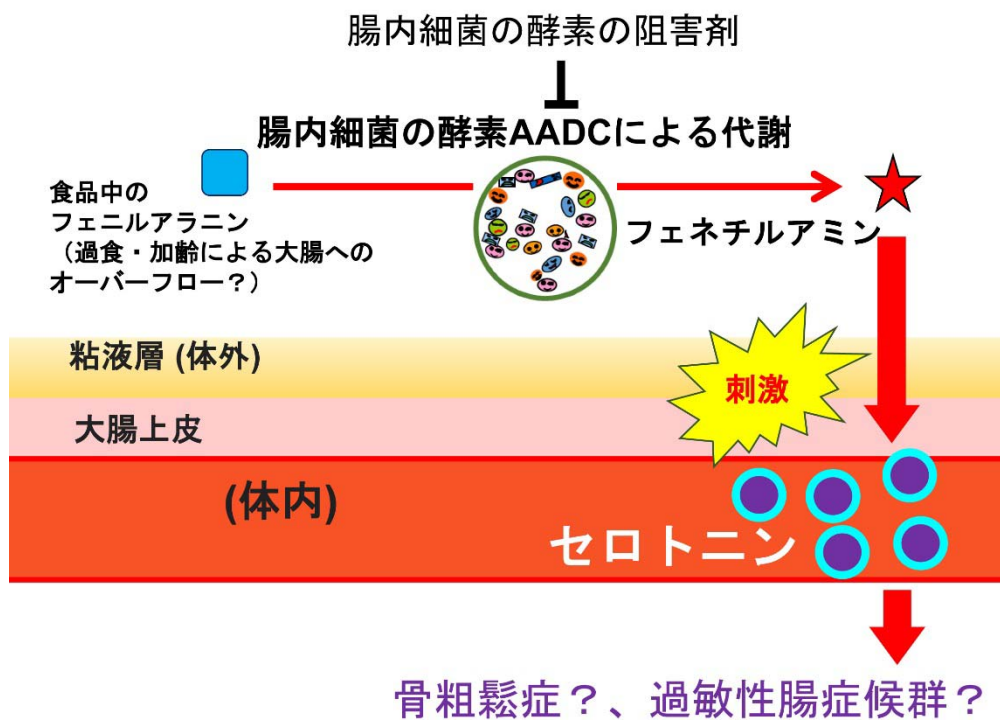
研究代表者:

栗原 新 石川県立大学生物資源環境学部(現・近畿大学生物理工学部)

共同研究者:

岡本 成史 金沢大学医薬保健研究域

小柳 喬 石川県立大学生物資源環境学部



腸内細菌叢の芳香族アミノ酸脱炭酸酵素 AADC によってフェニルアラニンから変換されたフェネチルアミンが、宿主によるセロトニンの産生促進を通じて骨粗鬆症等を発症させます。

1. 研究の背景と達成目標

21世紀初頭から糞便中のDNA、RNAの次世代シーケンス解析が精力的に行われ、腸内常在菌叢と様々な疾病との関連が明らかとなった。腸内細菌の菌体は複雑な免疫機構や厚い粘液層などの腸管バリア機構に阻まれ、直接組織に達することは稀であるが、腸内細菌の代謝産物は上皮細胞を通過して宿主体内に入ることから、腸内細菌制御はその代謝産物制御によって最も効率的に実現すると考えられる。しかし、腸内常在菌の遺伝子機能の多くは未知であり、腸内細菌の代謝産物を制御し人類の健康に資するためには、腸内における産生メカニズムを解明する必要がある。そこで、腸内細菌のヒト健康に重要な影響を与える代謝産物の産生に必要な遺伝子に着目し、遺伝子-代謝産物-宿主の健康状態の連関を解明することで、腸内細菌の制御に向けた基礎科学的知見を得ることを本研究の目的とした。

本研究では、腸内常在菌が産生する代謝産物フェネチルアミンに注目し、

①腸内細菌のフェネチルアミン合成系遺伝子(*aadc*)によって産生されたフェネチルアミンが及ぼす宿主への影響の解析による、遺伝子-代謝産物-宿主の健康状態の連関の解明

②ヒト腸内常在菌叢最優勢種と石川県発酵食品由来乳酸菌の混合培養によるフェネチルアミン高生産ペアのスクリーニングおよびそのフェネチルアミン高生産機構を解明

の2点を達成目標として研究を行った。

2. 主な研究成果と社会、学術へのインパクト

•動物の糞便内に存在する腸内常在菌の *aadc* 遺伝子の量に依存して宿主の大腸組織中のセロトニン濃度が上昇することを示した。

フェネチルアミン産生ヒト腸内常在菌叢最優勢種の一つである *Enterococcus faecalis* の *aadc* 破壊株・相補株を定着させたマウスを作成し、芳香族アミノ酸の一種であるフェニルアラニンを多量に含む餌を与えたところ、*aadc* を大量発現する *aadc* 相補株を定着したマウスの大腸でセロトニン産生量が有意に増加していた。また、ヒト糞便中の *aadc* 遺伝子量とPEA産生能に有意な正の相関があることを示した。末梢のセロトニンは骨代謝および蠕動運動を促進することが知られており、セロトニン濃度を適正レベルに抑制することで、骨粗鬆症や過敏性腸症候群の治療につながる可能性が考えられた。

これまでに腸内細菌が腸管内の芳香族アミノ酸チロシンを脱炭酸して生じたチラミンが宿主のセロトニン産生を促進することは報告されていたが、この機構を腸内細菌の菌種および遺伝子レベルまで示したのは本研究が初めてであり、次項に示すような大きな利点を得られる。

•ヒト腸内常在菌叢最優勢種に含まれる腸内細菌のフェネチルアミン産生が、既にパーキンソン病の治療に用いられている宿主を対象としたAADC阻害剤によって阻害されることを示した。

本研究では宿主に対する安全性が既に確立され、既に一般に処方されている宿主由来AADCの阻害剤を用いて腸内細菌由来AADCを阻害し、腸管内でのフェネチルアミン生成を抑制することを最終的な目的とした。*In vitro* でAADC阻害剤と共にフェネチルアミン産生ヒト腸内常在菌叢最優勢種の一つである *E. faecalis* を培養したところ、そのフェネチルアミン産生が大きく抑制された。このことは、腸内代謝産物の遺伝子の特定により、目的代謝産物の濃度の最適化を通じた疾病の制御の可能性を示している。

•発酵食品由来細菌により、腸内常在菌のフェネチルアミン産生を増強できることを示した。

石川県産発酵食品由来乳酸菌12種とフェネチルアミン産生ヒト腸内常在菌叢最優勢5種を混合培養し培養上清中のフェネチルアミン濃度を定量したところ、サバなれずし由来乳酸菌 *Lactobacillus parabuchneri* SN1-8 が腸内常在菌のフェネチルアミン産生を最大3倍、誘導した。このことは、前項のフェネチルアミン濃度の産生抑制と同様に、必要に応じてフェネチルアミン濃度を増強できる技術開発の可能性を示している。

3. 研究成果

(a) ヒト腸内常在菌叢最優勢種のうち、5 菌種がフェニルアラニンを著量生産し、この産生には芳香族アミノ酸脱炭酸酵素 (AADC) が必要である。

芳香族アミノ酸脱炭酸酵素(AADC)は、ヒト腸内常在菌叢最優勢種に含まれる一部の菌種に見出され、腸管内で芳香族アミノ酸(チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、DOPA)の脱炭酸に関わる酵素である。

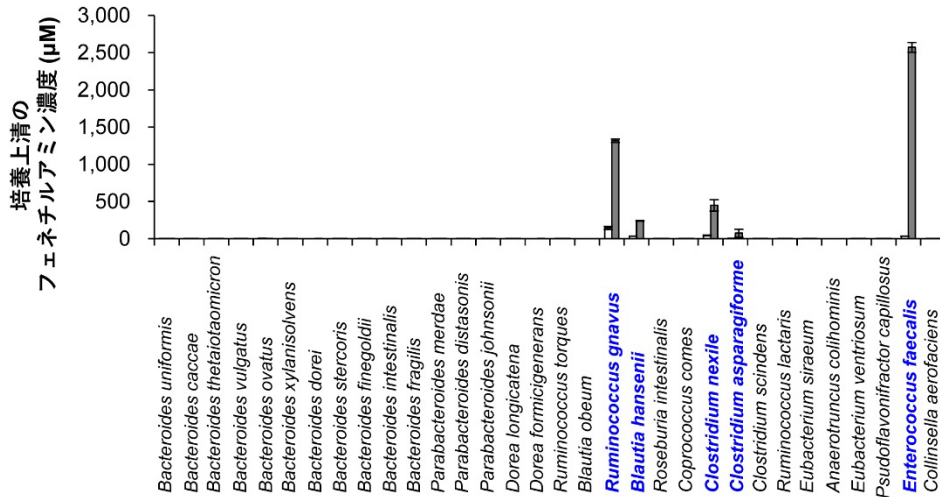


Fig. 1 ヒト腸内常在菌叢最優勢 32 種のうちフェネチルアミンを産生する 5 菌種

ヒト腸内常在菌叢最優勢 56 種のうち、GAM で培養可能な 32 菌種について GAM で培養した。各細菌の生育曲線を作成し、増殖期 (白色バー)・定常期 (灰色バー) の培養上清をサンプリングし、そのフェネチルアミン濃度を高速液体クロマトグラフィー (HPLC) にて測定した。(n = 3)。フェネチルアミン産生が観察された菌種を青色で示した。

我々はこれまでに研究で、ヒト腸内常在菌叢最優勢 56 種 (Nature 513: 59–64. 2014.) のうち、菌株保存・分譲機関から入手可能な 44 種について、腸内細菌用の汎用培地である GAM (J. Med. Microbiol. 40: 179–187. 1994.) における生育の可否を調べた。この結果、試験を行った 44 菌種のうち 32 種が GAM で培養可能であり、これはヒト腸内常在菌叢最優勢 56 種の 57%、入手可能な 44 種の 79% であった (Biosci. Biotechnol. Biochem. 81: 2009–2017. 2017.)。これらのヒト腸内常在菌叢最優勢 32 種の培養上清を網羅的に解析したところ、フェニルアラニンの脱炭酸産物であるフェネチルアミンを著量 (数 100・M 以上) 生産する菌種が *E. faecalis* を含めて 5 菌種存在した (Fig. 1)。またこれら 5 菌種の中で *E. faecalis* および

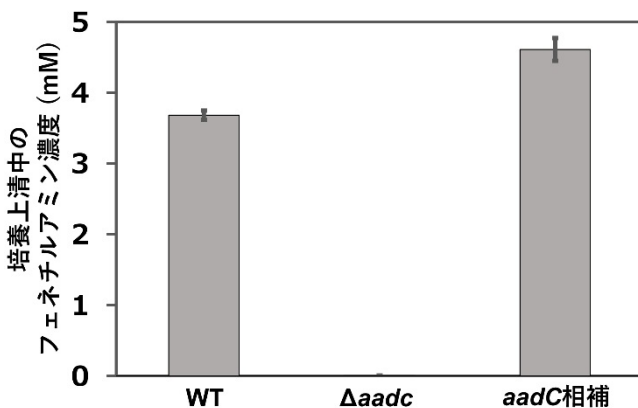


Fig. 2 *Enterococcus faecalis* のフェネチルアミン産生は *aadC* 遺伝子に依存する

E. faecalis の野生株 (WT)、*aadC* 破壊株 ($\Delta aadC$)、*aadC* 相補株 ($aadC^+$ / $\Delta aadC$) を GAM で培養し、培養上清中のフェネチルアミンを高速液体クロマトグラフィー (HPLC) にて定量した。

に解析したところ、フェニルアラニンの脱炭酸産物であるフェネチルアミンを著量 (数 100・M 以上) 生産する菌種が *E. faecalis* を含めて 5 菌種存在した (Fig. 1)。またこれら 5 菌種の中で *E. faecalis* および *Ruminococcus gnavus* については、AADC に依存するフェネチルアミン産生能が、これまで *E. faecalis* で報告のある AADC に依存するチラミン産生能に匹敵することが明らかとなった。また、*E. faecalis* の *aadC* 遺伝子破壊株および相補株を作成し、その培養上清中のフェネチルアミン濃度を定量したところ、野生株で存在したフェネチルアミンが *aadC* 遺伝子破壊株では消失し、相補株ではフェネチルアミン産生能が回復した (Fig. 2)。

(b) 動物の糞便内に存在する腸内常在菌の *aadC* 遺伝子の量に依存して宿主の大腸組織中のセロトニン濃度が上昇する

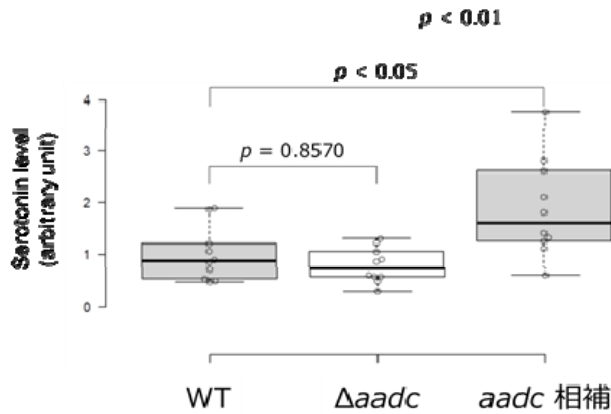


Fig. 3 腸内細菌の *aadC* 遺伝子が与える腸管セロトニンレベルへの影響

抗生物質処理後、*E. faecalis* の野生株 (WT)、*aadC* 破壊株 ($\Delta aadC$)、*aadC* 相補株を定着させたマウスの腸管中のセロトニン濃度を測定した。統計処理には Kruskal-wallis and Steel-Dwass の多重検定を行った。(n = 10)。

唆された。

この可能性を実証する目的で、ヒト腸内常在菌叢最優勢種の一種であり遺伝子操作が可能な *E. faecalis* の *aadC* 破壊株、*aadC* 相補株を定着させたマウスにフェネチルアミンの前駆体であるフェニルアラニンを通量の 10 倍量含む精製餌を与え、腸管内腔の AADC 量、フェネチルアミンおよび腸管セロトニン濃度を定量した。*E. faecalis* の腸管内腔中の菌数は $1 \times 10^9 \sim 1 \times 10^{10}$ copies/g 糞便であり、*aadC* の存在量は *aadC* 破壊株定着マウスで、野生株あるいは *aadC* 相補株と比較して 10,000 倍以下であった。このことは、*aadC* 遺伝子の腸管内腔での有無に関して適切なモデルが作成できたことを示している。しかし、予想に反して全てのサンプルにおいてフェネチルアミンは検出されなかった。一方で、*aadC* 破壊株を定着させたマウス群と *aadC* 相補株を定着させたマウス群の間で大腸組織中のセロトニン量に有意な差 ($p < 0.01$) が認められた (Fig. 3)。このことは、腸管内の腸内細菌の *aadC* 量に宿主のセロトニンレベルが影響されることを示している。

(c) ヒト糞便中の *aadC* 量とフェネチルアミン産生量は相関する

腸管内腔のフェネチルアミンは腸管に存在するエンテロクロマフィン細胞を刺激して、そのセロトニン産生を誘導すると考えられる。セロトニンは脳のシナプス間隙において情報伝達を担う重要な神経伝達物質として有名であるが、脳に存在するセロトニンは全身に存在するセロトニンの 10% に過ぎず、末梢に存在する 90% のセロトニンは腸管のエンテロクロマフィン細胞で産生される。このセロトニンは、骨形成および蠕動運動の調節に重要な役割を果たしていることがこれまでの研究でわかっている。したがって、食品中のフェニルアラニンが腸内細菌によってフェネチルアミンに変換され、これがエンテロクロマフィン細胞を刺激することで、末梢のセロトニン濃度を上昇させ、骨形成および蠕動運動の調節を行っているという可能性が示

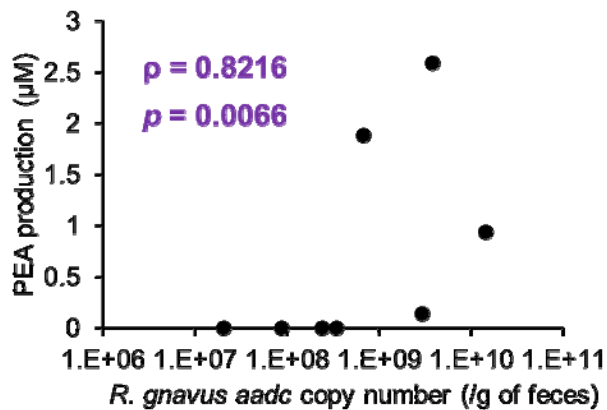


Fig. 4 ヒト糞便中の *aadC* 遺伝子量とフェネチルアミン産生能の相関

ヒト糞便を 20% (v/w) 含む PBS 懸濁液に 1 mM のフェニルアラニンを加えてインキュベートし、HPLC でフェネチルアミン濃度を定量し、フェニルアラニンを添加せずに糞便懸濁液をインキュベートした際のフェネチルアミン濃度を差し引いた値をフェネチルアミン産生量とした。同じ糞便について *R. gnavus* 由来の *aadC* のコピー数を定量 PCR で測定した。統計処理はスピアマンの相関解析により行った。

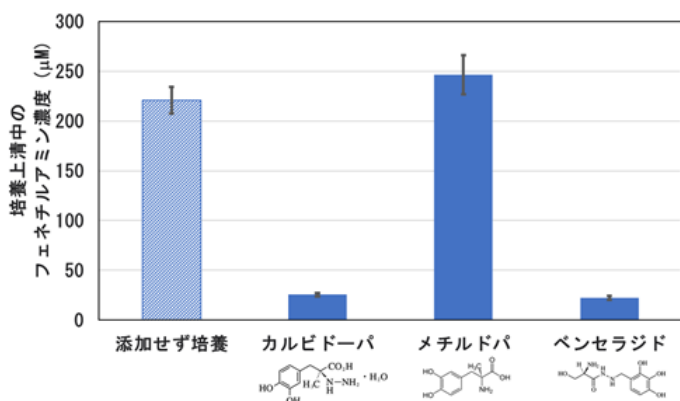


Fig. 5 AADC 阻害剤によるフェネチルアミン産生量の低下

E. faecalis を GAM もしくは AADC 阻害剤 (カルビドパ、メチルドパ、ベンセラジド) を終濃度 1.5 mM で添加した GAM で培養し、培養上清中のフェネチルアミン濃度を HPLC で定量した。(n = 3)

脳関門に阻まれ、脳内で薬効を示すことができない。これを防ぐ目的で、ヒト由来の AADC に対する阻害剤が L-DOPA と共に処方されている。このヒト由来の AADC に対する阻害剤を用いて腸内細菌由来の AADC の活性を阻害し、フェネチルアミン産生を抑制することが可能であることを示す目的で以下の実験を行った。既に治療薬として用いられているカルビドパ (Carbidopa Monohydrate)、メチルドパ (3-(3,4-Dihydroxyphenyl)-2-methyl-L-alanine Sesquihydrate) およびベンセラジド (Benserazide Hydrochloride) を、終濃度が 1.5 mM になるように GAM にそれぞれ添加して *E. faecalis* の培養を行い、培養上清中のフェネチルアミン濃度を定量した。この結果、カルビドパとベンセラジドを添加して培養した場合に、これらの薬剤を添加しなかった場合と比較して、培養上清中のフェネチルアミン濃度は 10% 以下に低下した (Fig. 5)。

(e) 石川県産発酵食品に由来する細菌により、腸内常在菌のフェネチルアミン産生を増強できる

石川県産発酵食品由来乳酸菌 12 種とフェネチルアミン産生ヒト腸内常在菌叢最優勢 5 種をそれぞれ混合培養し培養上清中のフェネチルアミン濃度を定量したところ、サバなれずし由来乳酸菌 *Lactobacillus parabuchneri* SN1-8 が腸内常在菌のフェネチルアミン産生を最大 3 倍、誘導した (Fig. 6)。

ヒト糞便中の *aadc* 量とフェネチルアミン産生量が相関することを示す目的で、9 名の健康成人から糞便を収集し、糞便 1 g あたりの *aadc* のコピー数に対してフェニルアラニンを糞便に混合した際のフェネチルアミンの産生量をプロットしたところ、有意な正の相関 ($p = 0.0066$) があった (Fig. 4)。

(d) ヒト腸内常在菌 *E. faecalis* の *in vitro* におけるフェネチルアミン産生はパーキンソン病の治療薬である AADC 阻害剤によって大きく抑制される

パーキンソン病の経口治療薬である L-DOPA は血液脳関門を突破して脳に到達した後に宿主の AADC によって脱炭酸され、ドーパミンになることで治療効果を発揮する。一方で、末梢でも L-DOPA の脱炭酸は行われ、この結果末梢でドーパミンが生じると血液

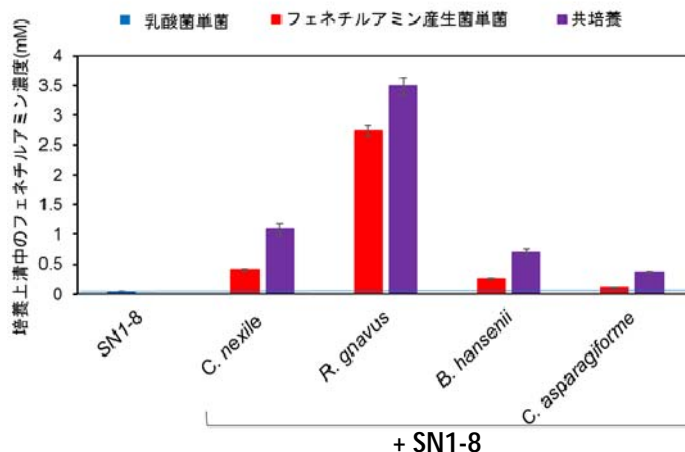


Fig. 6 石川県産サバのなれずしに由来する乳酸菌 *Lactobacillus parabuchneri* SN1-8 株のヒト腸内常在菌叢最優勢フェネチルアミン産生菌のフェネチルアミン産生能の増強効果

青色のバーで *Lactobacillus parabuchneri* SN1-8 株を単独で培養した際のフェネチルアミン濃度、赤色のバーでフェネチルアミン産生菌 4 菌種を単独で培養した際の培養上清中のフェネチルアミン濃度、紫色のバーでフェネチルアミン産生菌 4 菌種と *Lactobacillus parabuchneri* SN1-8 株を共培養した際の培養上清中のフェネチルアミン濃度を示した。(n = 3)。

4. 今後の展開

21 世紀に入り爆発的に進歩した核酸配列の解読技術により、腸内常在菌叢の組成と様々な疾病と関連の存在が明らかとなり、腸内細菌研究は世界的なブームとなっている。一方で、腸内細菌の遺伝子機能については DNA 配列の解読に留まり、その過半数の配列は機能予測すらままならない状態が続いている。腸内細菌の多くの代謝産物について、腸内細菌の遺伝子-腸内細菌の代謝産物-宿主の健康状態の関連が明らかとなれば、腸内細菌の遺伝子機能に注目することで、腸内細菌の代謝産物の制御による宿主の健康状態の制御が可能となる。本研究でその一端が明らかとなった腸内細菌の *aadc* 遺伝子の産物によるフェネチルアミンの産生と宿主のセロトニンの産生の関連、さらに AADC 阻害剤あるいは石川県産発酵食品由来乳酸菌による腸内細菌のフェネチルアミン産生の抑制あるいは促進は、腸内細菌制御によるヒトの健康の制御に繋がる重要な技術開発の一例であり、今後同様の研究が行われ、実用化されることで人類の健康寿命の延伸は新たなフェイズに入ると考えられる。

5. 発表実績

特許

1. 栗原 新, 杉山 友太, 岡本 成史. 末梢セロトニンまたは腸内芳香族アミンの増加を伴う疾患の予防または治療用医薬組成物および末梢セロトニンまたは腸内芳香族アミンの増加を伴う疾患の予防または治療用薬剤のスクリーニング方法. 特願 2019-026780.

学会発表

2. 杉山 友太, ○河田 明輝, 奈良 未沙希, 小柳 喬, 片山 高嶺, 栗原 新. ヒト腸内細菌優占種の芳香族アミン生成能および大腸菌を用いた異種発現による芳香族アミノ酸炭酸酵素 (AADC) ホモログの性状解明. 日本農芸化学会 2017 年度大会. 京都市東山区. (2017).

講演

3. 栗原 新. 腸内細菌の代謝産物が及ぼす生体への影響とその制御. 平成 30 年度発酵と代謝研究会講演会『人のインサイド空間に迫る ~Society5.0+が実現するヒューマンサステイナブルシステム~』. 東京都新宿区. (2019).

4. 栗原 新. ヒト腸内常在菌叢最優勢種の機能を培養と遺伝子操作によって解明する. 第 52 回無菌生物ノートバイオロジー学会. 川崎市. (2019).

5. 栗原 新. 食品成分の腸内細菌変換の遺伝学的解析とその利用. 食品開発展 2018. 東京都港区. (2018).

6. 栗原 新. 腸内細菌栄養学の可能性. マッチングフォーラム in にいがた 2018. 新潟市. (2018).

7. 栗原 新. 培養と遺伝子操作によるヒト腸内常在菌叢最優勢種の機能解明. 腸内菌未来フォーラム. 和光市. (2018).