

## 世界初、腸内環境と健康・疾病の関連性の解明に新たな突破口 腸内常在菌が産生する物質の全貌を明らかに 協同乳業、理化学研究所、東海大学医学部、HMT社の共同研究

協同乳業株式会社の松本光晴主任研究員らは、(独)農業・食品産業技術総合研究機構・生物系特定産業技術研究支援センター「イノベーション創出基礎的研究推進事業」の平成21年度課題「健康寿命伸長のための腸内ポリアミン濃度コントロール食品の開発」(研究代表者:松本光晴)の研究において、**世界で初めて、腸内常在菌\*1の活動と関わりのある約120種類の成分を検出することに成功しました**。本研究結果は、英国ネイチャー(Nature)の姉妹誌である「サイエンティフィック・リポーツ(Scientific Reports) 電子版」で本日1月25日に公開されました。

腸内常在菌は人の健康に多大な影響を与えていますが、腸内常在菌が産生する物質(代謝産物)は血中にも移行するため、腸内常在菌よりも直接的に健康に関与している可能性が高いと考えられます。本研究では、腸内常在菌の代謝産物の全貌を明らかにする目的で、同じ両親から生まれたマウスを2群(無菌マウスと通常菌叢定着マウス\*2)に分け、広範囲の成分を分離・分析することが可能なCE-TOFMS \*3を用い、大腸内容物のメタボローム解析\*4を実施し腸内常在菌の代謝産物を網羅的に解析しました。

その結果、179成分が検出され、**腸内常在菌が産生する物質、吸収する物質、影響を与えない物質など、腸内常在菌の活動と関わりのある代謝産物の詳細が世界で初めて明らかになりました**。具体的には、多くの生理活性アミン\*5(GABA、ポリアミンの一種であるプトレッシン等)は腸内常在菌により産生されていることや、既存の知見、例えば、発がんに関与する胆汁酸の脱抱合に強く関与していること等も確認されました。

一方で、**これまで腸管内に存在していることすら知られていなかった多数の成分が検出された**と同時に、酸化ストレスマーカーであるオフタルミン酸が無菌マウスからのみ、自然免疫との関連性があるプロスタグランジンE2が通常菌叢定着マウスのみから検出される等、多くの新発見がありました。また、腸内常在菌主要グループの菌数と各代謝産物濃度との相関性を調べたところ、腸内での構成比が高い菌種ではなく、構成比が比較的低い腸内常在菌の方が、代謝産物濃度の差に強く影響を与えている可能性が示唆されました。

本研究成果は、腸内常在菌と健康に関する研究において、最も研究が遅れていた代謝産物に焦点を当てて網羅的に調べた初めての研究であり、医学、免疫学、生理学、薬学、栄養学、細菌学など幅広い分野に活用することができる基礎的データと考えられます。将来的には、様々な疾病患者の大便メタボロームデータを集積することで、病気の発症メカニズムの解明や、検便で特定の疾病の発症リスクを推定できる時代が来ると考えられ、本研究成果はそれに繋がる第一歩となります。

### 【用語解説】

- \*1 腸内常在菌: ヒトの大腸内には1,000種類以上の腸内細菌が存在しており、一人あたり160種類程度、100兆個が棲息している。健康への影響が非常に強く、腸の疾病以外にも、免疫系の疾患、肥満や寿命にも関与していることが明らかになり、近年研究が盛んに行われている。
- \*2 通常菌叢定着マウス: マウスを無菌環境で生育させ、4週目に通常環境で飼育しているマウスの糞便懸濁液を経口投与し、通常菌叢を定着させたマウス。無菌マウスと比較することで腸内常在菌の影響を直接的に調べることができる。
- \*3 CE-TOFMS: キャピラリー電気泳動(Capillary Electrophoresis; CE)と飛行時間型質量分析計(Time-of-Flight Mass Spectrometer; TOFMS)を組み合わせた分析装置で、高分離能と高感度を併せ持つ質量分析計。広範囲の成分分析が可能。
- \*4 メタボローム解析(メタボロミクス): 細胞や生体内に存在するアミノ酸や糖、脂質などの代謝物質を網羅的に測定し、生命現象を総合的に理解しようとする研究分野。
- \*5 アミン: アンモニアの水素原子を炭化水素基で置換した化合物の総称。

本件に関するお問合せ先

# 参考資料

## 《研究の概要》

### ■背景

ヒト大腸内には1,000種類以上、一人あたり160種類程度、大腸全体では100兆個にも及ぶ腸内常在菌が棲息しており、生体の健康状態との関連は密接で、免疫系、大腸ガン、肥満、脳の発達、寿命などへの影響が報告されています。低分子の腸内常在菌の代謝産物は、腸上皮細胞に吸収され血中に移行し全身の細胞への影響も高く、腸内常在菌の菌体成分より健康や疾病に強く関与していると推測できますが、詳細な研究は殆どなされていません(図1)。全代謝産物(メタボローム)を解析するメタボロミクスは、細胞や生体内に存在するアミノ酸や糖、脂質などの代謝物質を網羅的に測定し、生命現象を総合的に理解しようとする研究分野です。特に、近年開発されたキャピラリー電気泳動-飛行時間型質量分析計(CE-TOFMS)(図2)は、電荷を持つ成分の全ての分離分析に適しており、分離能、感度共に最も高く、最も広範囲の成分を解析できるため、大腸内容物のメタボローム解析に最適なツールであると考えられました。

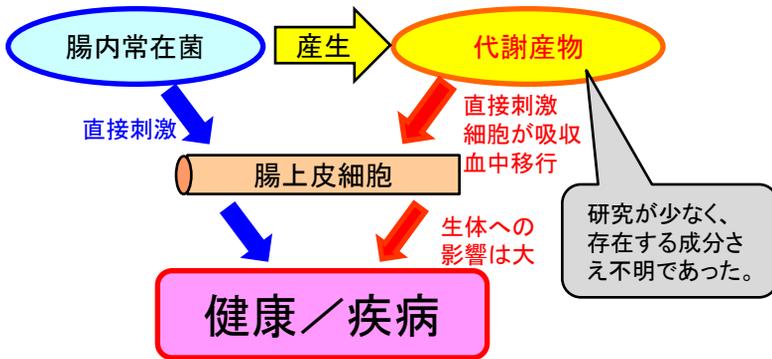


図1. 腸内代謝産物の位置づけ

代謝産物は短鎖脂肪酸やポリアミンなど、一部の活性の強い成分のみが研究されてきましたが、100成分以上を網羅的に解析した報告はありません。



図2.CE-TOFMS

キャピラリー電気泳動(CE、左側)と飛行時間型質量分析計(TOFMS、右側)を組み合わせた分析装置で、広範囲の成分分析が可能です。

### ■方法

遺伝的偏りをなくすため、BALB/cマウスを兄妹交配した同腹仔の雄性マウスを、無菌マウスと、生後4週目に通常菌叢の糞便懸濁液を経口投与し通常菌叢を定着させたマウスの2群に分けて実験しました。マウスは滅菌チップを敷き無菌室内で飼育し、滅菌水および滅菌通常飼料を自由摂取させました。この試験は2度繰り返し実施しました(図3)。マウスは7週齢で大腸内容物をメタボロミクス解析用試料としました。本研究は遊離代謝産物がターゲットであるため、腸内常在菌の菌体内代謝産物が混在しないよう、菌体が破裂しない条件で抽出したものを試料とし、CE-TOFMSで解析しました。また、飼料由来の成分も確認するために、同様に前処理し、飼料抽出物のメタボローム解析を実施しました。また、通常菌叢定着マウスは主要な腸内細菌グループを16S rRNA遺伝子を用いた定量PCRで測定しました。

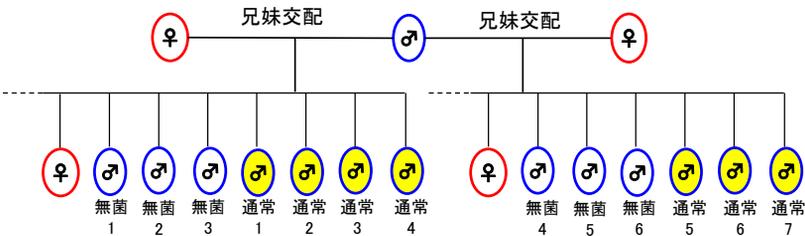


図3. 使用マウスの家系図

親マウスは同親から同時に生まれた個体を使用しました。

### ■結果

無菌マウスおよび通常菌叢定着マウスの大腸内メタボローム解析の結果、179成分が同定されました。階層型クラスタリング(検出成分の個体ごとのパターンによるグループ分け)の結果を図4に示します。無菌マウスと通常菌叢定着マウスのメタボロームに明らかな差があることが認められ、腸内常在菌の有無が大腸内メタボロームに多大な影響を与えることが確認されました。

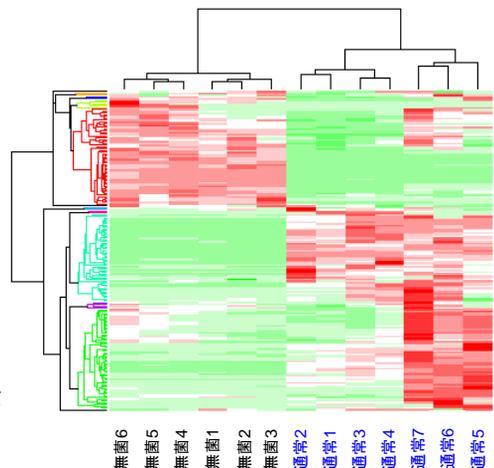


図4. 検出成分の階層型クラスタリング

赤色が相対的に多く検出された成分、緑色が少なく検出された成分を示します。

飼料中からは250成分が検出・同定され、大腸内容物と飼料で共通して検出された成分は131成分で、大腸内のみ存在した成分は48成分でした。飼料中のみ検出された119成分は小腸で生体に完全に吸収された成分といえます。大腸内メタボロームにより得られた179成分を相対値および検出率で有意差検定したところ、46成分は無菌マウスで通常菌叢定着マウスより有意に高濃度、77成分は無菌マウスで通常菌叢定着マウスより有意に低濃度であり、両者に有意差がなかった成分が56成分存在しました。一例を図5に示します。GABAや、ポリアミンの一種であるブトレッシン等の生理活性アミンは、前駆物質のアミノ酸には両者の差がないものが殆どであるため、腸内常在菌の作用で産生されていることが確認されました。自然免疫との関連性があるプロスタグランジン E2が通常菌叢定着マウスのみから検出されたことは興味深い結果です。また、大腸内の多くのアミノ酸は腸内常在菌の影響が少ないことがわかりました。一方、酸化ストレスマーカーであるオフタルミン酸が無菌マウスでのみ検出されたことから、無菌マウスは酸化ストレスを受けている可能性があること等の新しい知見も得られました。

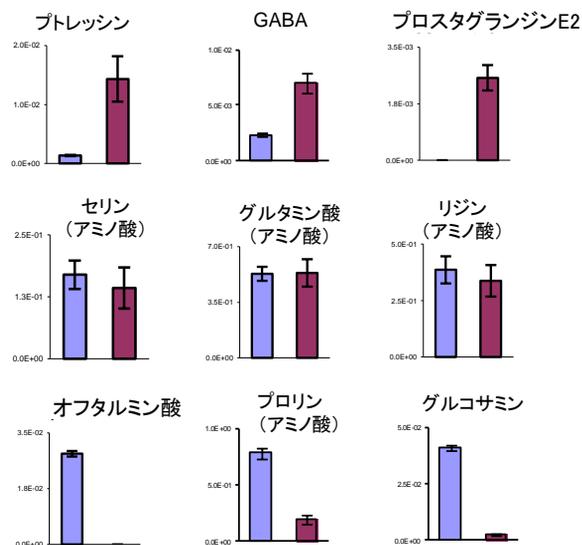


図5 代謝産物の濃度比較例

無菌マウス(青紫)と通常菌叢定着マウス(赤紫)を示します。腸内常在菌により産生される成分(上段)、腸内常在菌の存在の影響を受けない成分(中段)、生体および食事由来で、腸内常在菌により吸収あるいは分解される成分(下段)。

また、通常菌叢定着マウス間でも差がある代謝産物が約20成分(GABA、アルギニンなど)存在し、これらがどの腸内常在菌の影響を受けているのかを検証するため、腸内常在菌主要グループ菌数と各代謝産物濃度との相関性を調べました。その結果、*Bacteroides*属や*Clostridium*属など最優勢菌種ではなく、マイナーな腸内常在菌(*Enterococcus*属、*Lactobacillus*属およびEnterobacteriaceae)が代謝産物濃度の差に強く影響を与えている可能性が示唆されました。

## 《今後の展望》

本研究で腸内常在菌の影響を受けていることが認められた成分が、生体にどのような影響を及ぼすかを検討するために、血中への移行や大腸組織への移行を確認する必要があります。さらに、プロバイオティクスの保健機能メカニズムをメタボロミクスのアプローチにより解明することも「科学的根拠のある機能性食品」の開発のためには重要な課題と考えております。また、代謝産物は腸内細菌と異なり、生体への影響を直接的に調べることが容易です。本研究にて、大腸内での存在が初めて確認された多くの成分は、大腸上皮細胞へ直接的刺激を与えている可能性が極めて高いため、培養細胞系や組織培養系にて細胞の反応を調べることで、腸内常在菌-宿主クロストークに関わる新たな作用機序や新規マーカーの発見が期待できます。将来的には、様々な疾病患者の大便メタボロームデータを集積することで、発症メカニズムの解明や、検便で特定の疾病の発症リスクを推定できる時代が来ると考えられ、それに繋がる第一歩となることを期待しています。

## 論文

### Impact of intestinal microbiota on intestinal luminal metabolome.

Mitsuharu Matsumoto, Ryoko Kibe, Takushi Ooga, Yuji Aiba, Shin Kurihara, Emiko Sawaki, Yasuhiro Koga, Yoshimi Benno

### 腸内常在菌の代謝産物の全貌

著者(所属)

松本光晴\* (協同乳業(株)研究所技術開発室、(独)理化学研究所イノベーション推進センター 辨野特別研究室)

木邊量子 (独)理化学研究所イノベーション推進センター 辨野特別研究室)

大賀拓史(ヒューマン・メタボローム・テクノロジー株式会社 バイオマーカー・分子診断事業部)

相場勇志(東海大学医学部基礎医学系感染症研究室)

栗原新(京都大学大学院生命科学研究科統合生命科学専攻、現在Emory University School of Medicine在籍)

澤木笑美子(協同乳業(株)研究所技術開発室)

古賀泰裕(東海大学医学部基礎医学系感染症研究室)

辨野義己((独)理化学研究所イノベーション推進センター 辨野特別研究室)

\*責任著者