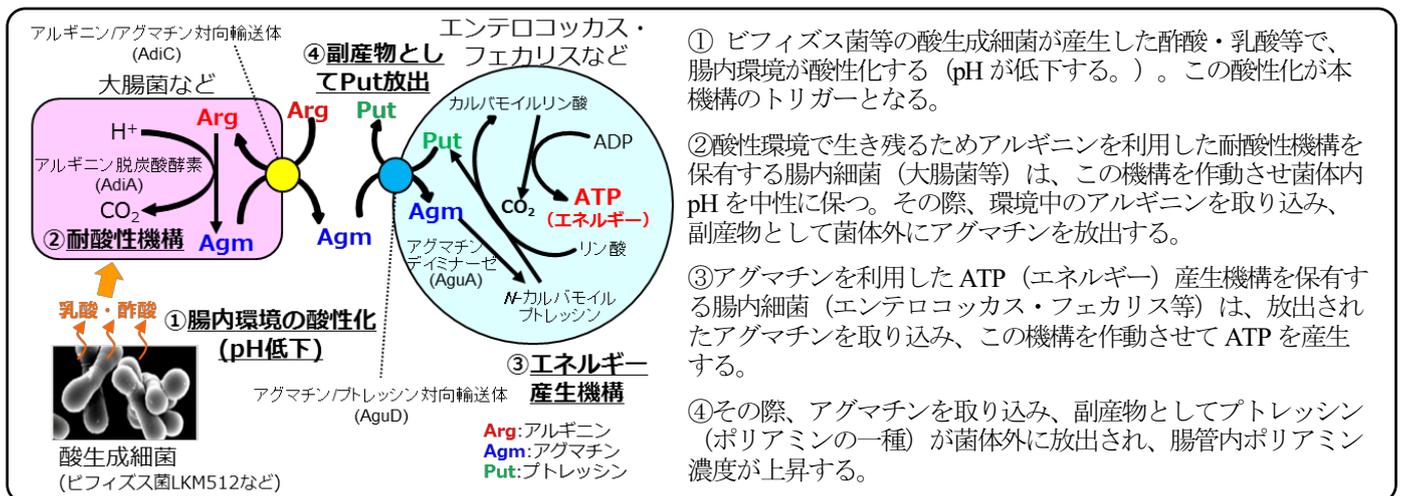


個々の腸内細菌の生き残り戦略が組み合わさることで 機能的物質ポリアミンが産生されていることを発見 ～ポリアミンで予防・軽減が期待される疾患（心血管疾患など）への応用が期待される～

石川県立大学 腸内細菌共生機構学寄附講座 (IFO) 栗原 新 寄附講座准教授は、協同乳業株式会社の松本光晴主幹研究員、京都大学の東樹宏和准教授、理化学研究所の辨野義己特別招聘研究員らとの共同研究で、腸内ポリアミンが複数の腸内細菌の代謝経路を経由して生合成され、その生合成経路はビフィズス菌等が産生する酸により作動することを遺伝子レベルで明らかにしました。この研究成果は、米国 *Science* の姉妹誌「*Science Advances*」で 6 月 27 日（日本時間 6 月 28 日午前 4 時）に公開されました。

【要約】

腸内細菌の活動により生成される物質（代謝産物）は、ヒトの健康に大きな影響を与えています。腸内細菌は難培養性細菌も含め 1,000 種以上が確認され、腸管内ではこれらが複雑に相互作用していると考えられます。しかし、その複雑さ故に、特定の代謝産物の生合成・放出メカニズムを解明する研究は殆ど行われていません。ポリアミンは、最近の研究で、動脈硬化等の心血管系疾患の予防作用や炎症やオートファジー誘導を介した寿命延伸作用が明らかになり、世界的に注目されている物質です。ヒトを含む動物にとって重要なポリアミン供給源の一つは、腸内細菌の産生するポリアミンです。私達は、ビフィズス菌 LKM512 とアルギニンの併用経口投与によって腸内のプトレッシン（ポリアミンの一種で機能的性を有するスペルミジン等の前駆体）濃度が高まり、マウスの健康寿命が延伸することを報告してきました (*Sci. Rep.* 2012. 2:233.) が、腸内細菌によるプトレッシンの生合成・放出メカニズムについては未解明でした。本研究では、ビフィズス菌等の酸生成細菌が産生する酸をトリガーとし、複数の腸内細菌の独立した代謝経路（生き残り戦略）、すなわち、耐酸性機構（酸から身を守るしくみ）とエネルギー産生機構が組み合わさった、プトレッシン放出経路『ハイブリッド・ポリアミン生合成機構』を遺伝子レベルの解析により明らかにしました（下図参照）。



この知見は、ビフィズス菌等が作る酸の機能として古くからいわれてきた「有害菌の抑制」や「蠕動運動の活性化」とは異なる新規機能の発見を意味します。また、このハイブリッド・ポリアミン生合成機構は、遺伝子および分子レベルで実証されており、不確定因子が無いことから、ヒト応用研究において、腸内ポリアミン濃度コントロール技術が確立され、保健効果が得られる蓋然性が高いと考えられます。

【今後の展開】

腸管到達性がよく腸管内の pH を低下させ、他の腸内細菌の生育阻害を起こさない (ポリアミン産生などの働きを阻害しない) 乳酸菌を、石川県の発酵食品等から分離することができれば本研究と同様のポリアミン増産効果が見込まれます。

【研究背景】

ポリアミンはプトレッシン、スペルミジン及びスペルミンの総称であり、全ての生物が細胞内に保有し、様々な生命活動に関与し、また、その濃度は加齢とともに減少することが知られています。近年ポリアミンは、アンチエイジングに効果的な生体への介入の一つとして、カロリー制限、断食、運動、レスベラトロール、ラパマイシン、メトフォルミンと共に挙げられたほかに(Cell 157: 1515, 2014)、マウスへの投与で心臓機能が改善することや(Nat. Med. 22:1428-1438, 2016)、ハエへの投与により認知力向上(Nat. Neurosci. 16: 1453-1460, 2013.)ならびに寿命伸長(Nat Cell Biol. 11: 1305-1314, 2009.)が起こることが報告されています。一連の発見は注目を集めており、今春には米国科学誌Scienceに健康との関わりについて総説が掲載されました(Science 359: eaan2788, 2018)。我々は、ポリアミンの供給源として腸内細菌に着目し、腸内細菌にポリアミンを産生させることで、加齢に伴い減少したポリアミンを補うことができ、ヒトの健康寿命を延長させると考え研究を進めてきました。一連の研究で、ビフィズス菌 LKM512 とアルギニン(Arg)をマウスに併用投与することで、腸内プトレッシン(ポリアミンの一種、スペルミジンの前駆体)濃度が増加し、寿命が伸長することと学習記憶力が向上することを報告してきました(Sci Rep. 4: 4548, 2014.)。しかしながら、腸内細菌によるポリアミン放出メカニズムは未解明でした。また、我々は長年、ポリアミン産生菌の探索を行いました。有望な菌種の発見には至りませんでした。そこで、発想を転換し、特定のポリアミン産生菌が存在するのではなく、複数の腸内細菌が関与している合成・放出経路が存在すると考え、アプローチしたのが本研究です。

【研究内容】

最初に、ヒト腸内細菌の主要グループからそれぞれ代表細菌を選出し(14種)、Argを含む培養液で全てを混合して培養すると、プトレッシン濃度が単独培養時の10倍になることを発見しました。そこで、2菌種ずつの組合せで混合培養した結果、*Escherichia coli* (大腸菌)と*Enterococcus faecalis* (フェカリス菌)を混合培養した場合、単独培養時の約8倍のプトレッシンを培養液中に放出することが認められました(図1A)。そこで、これら2菌を複数菌種によるポリアミン生合成経路のモデルとして実験を進めました。次に、大腸菌とフェカリス菌を単独培養し、その培養液(菌体除去後)でもう一方の菌を培養する実験を行いました。その結果、大腸菌培養中に、Argの減少、アグマチンの増加、プトレッシンの微増が観察され、続いてその培養液でフェカリス菌を培養すると、Argの消失、アグマチンの消失に伴い、プトレッシンの増加が確認されました(図1B)。一方、フェカリス菌単独培養時は、Argは減少しましたが、アグマチンとプトレッシンの産生は認められず、その培養液で大腸菌を培養してもプトレッシンの産生は認められませんでした(図1C)。この結果から、大腸菌がArgを利用して放出するアグマチンをフェカリス菌が吸収し、プトレッシンを放出していることが確認されました。

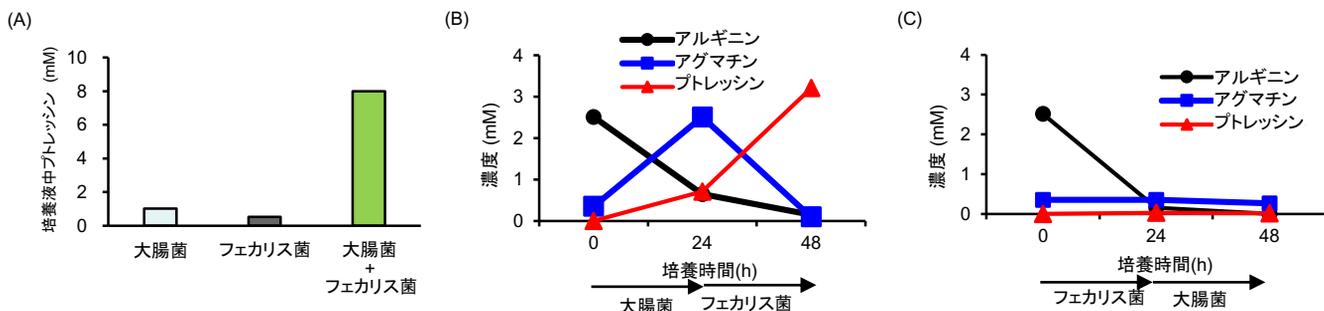


図1 大腸菌およびフェカリス菌の混合培養によるプトレッシン産生

(A) 大腸菌とフェカリス菌を単独培養および混合培養後の培養液中プトレッシン濃度の比較。(B) 大腸菌培養液(24時間、菌体除去)にフェカリス菌を添加した時の培養液中のアルギニン、アグマチン及びプトレッシン濃度の経時的変化。(C)フェカリス菌培養液(24時間、菌体除去)に大腸菌を添加した時の培養液中のアルギニン、アグマチン及びプトレッシン濃度の経時的変化。

以上の結果および過去の研究報告から、大腸菌が保有するArgを利用する耐酸性機構(菌体内pHを中性に保つための水素イオンを排出する生命活動)とフェカリス菌が保有するアグマチンを利用したATP産生機構(栄養源が乏しい環境でエネルギーを得るための生命活動)が組み合わせることで、Argからプトレッシンが作られ、放出されているとの仮説を立案しました(ハイブリット・ポリアミン生合成機構)(図2)。

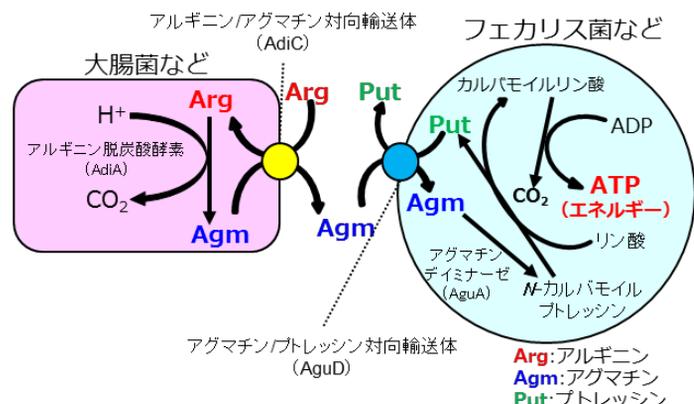


図2 大腸菌とフェカリス菌によるプトレッシン産生メカニズムの仮説(ハイブリット・ポリアミン生合成機構)

大腸菌はアルギニン/アグマチン対向輸送体(AdiC)を介してアルギニンを吸収し、そのアルギニンは菌体内のアルギニン脱炭酸酵素(AdiA)によってアグマチンとなり、AdiCを介して放出される。フェカリス菌はアグマチン/プトレッシン対向輸送体(AguD)を介してアグマチンを吸収し、そのアグマチンは菌体内のアグマチンデイミナーゼ(AguA)等の酵素反応によってプトレッシンとなり、AguDを介して菌体外に放出される。

Arg:アルギニン
Agm:アグマチン
Put:プトレッシン

この仮説を検証するために、大腸菌のArgを利用した耐酸性機構に関与しているArg/アグマチン対向輸送体(AdiC)の遺伝子の欠損菌株^{*1}と相補菌株^{*2}を作製し、これらを用いて混合培養実験を行いました。その結果、遺伝子欠損株を使用した場合は、プトレッシン放出が消滅し、相補株を使用した場合はプトレッシン放出量が回復しました(図3A)。これにより、本合成経路のプトレッシン放出にAdiCが関与することが示されました。同様の実験を大腸菌のアルギニン脱炭酸酵素(AdiA)(データ示さず)、フェカリス菌のアグマチン/プトレッシン対向輸送体(AguD)に対しても行い、同様の結果が得られました(図3B)。以上の結果から、ハイブリット・ポリアミン生合成機構の仮説(図2)は正しいことが遺伝子・分子レベルで証明されました。

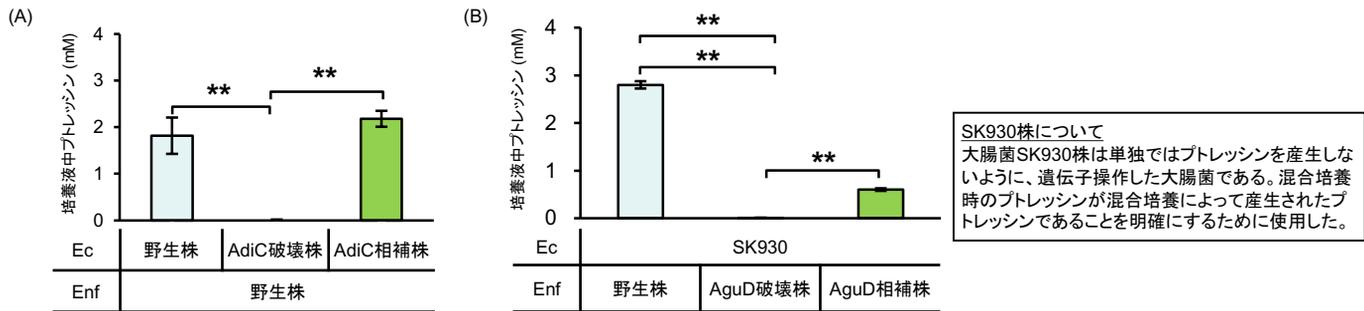


図3 大腸菌とフェカリス菌によるハイブリット・ポリアミン生合成機構の証明

(A)フェカリス菌の野生株と大腸菌のアルギニン・アグマチン対向輸送体遺伝子の破壊株と遺伝子相補株を混合培養によるプトレッシン産生量の比較。(B)大腸菌SK930とフェカリス菌のアグマチン/プトレッシン対向輸送体遺伝子の破壊株と遺伝子相補株を混合培養によるプトレッシン産生量の比較。エラーバーは標準誤差を示す。Ec: 大腸菌, Enf: フェカリス菌。** $p < 0.01$ (One-way ANOVA with Tukey's test)。

ビフィズス菌はエネルギーを得るために酢酸と乳酸を放出し、腸内を酸性にすることが知られています。大腸菌とフェカリス菌によるプトレッシンの放出は、酸性条件(pH5.0~6.5)で促進されることから、ビフィズス菌が腸内環境を酸性化(pH低下)することでプトレッシン放出を促進する可能性が考えられました。そこで、大腸菌とフェカリス菌にビフィズス菌(9種類)を各々添加・混合培養し、培養液中のプトレッシン濃度を測定しました。その結果、ビフィズス菌種(菌株)によってプトレッシン放出を促進する作用が異なることが認められました(図4A)。データは示しませんが(論文ではSupplementary Informationとして掲載)、プトレッシン産生が認められなかったロングム菌は、大腸菌やフェカリス菌の生育を阻害することでポリアミン・ハイブリッド合成経路が作動しないことがわかりました。

次に、この現象が生体内でも生じるかを確認するために、最もプトレッシン放出誘導が強かった*Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* LKM512(ビフィズス菌LKM512)を用いて、大腸菌およびフェカリス菌と共に定着したノバイオートマウス^{*3}を作製し実験を行いました。その結果、3菌種全てが定着したマウスの糞便は、大腸菌とフェカリス菌のみが定着したマウスの糞便よりも、pHが低く、糞便中プトレッシン濃度が高い結果が得られました(図4B)。これは、動物腸内で、ビフィズス菌等の酸生成菌が腸内環境を酸性にすることで、ハイブリット・ポリアミン生合成機構が作動しプトレッシン放出が誘導されることを証明しています。

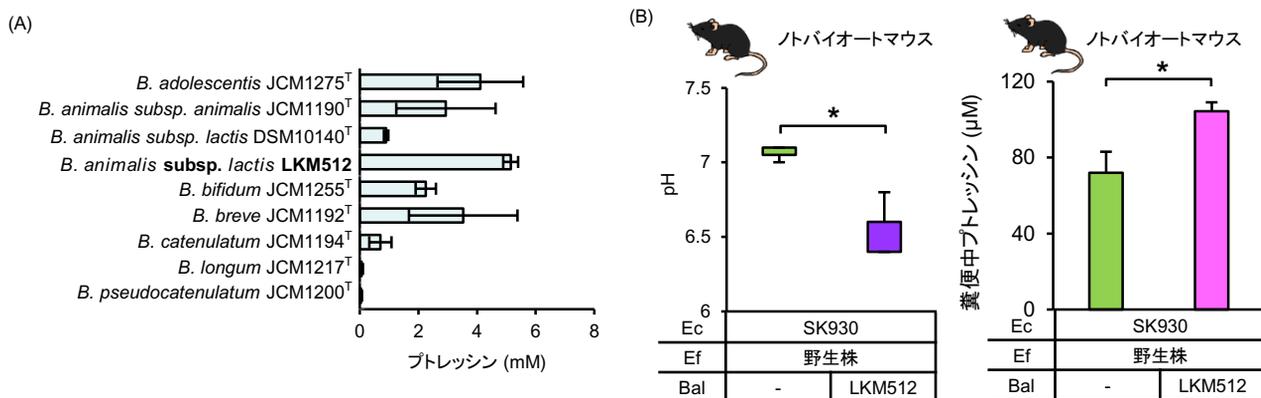


図4 ビフィズス菌がハイブリット・ポリアミン生合成機構に与える影響

(A)各種(各菌株)ビフィズス菌(9菌株)と、大腸菌(SK930=プトレッシン非放出株)およびフェカリス菌(野生株)の混合培養によるプトレッシン産生量の比較。(B)大腸菌(SK930株)、フェカリス菌(野生株)、及び*B. animalis* subsp. *lactis* LKM512を定着したノバイオートマウスの糞便中pHとプトレッシン濃度。エラーバーは標準誤差を示す。Ec: 大腸菌, Enf: フェカリス菌。* $p < 0.05$ (One-way ANOVA with Tukey's test)。

次に、ヒト腸内でハイブリッド・ポリアミン合成機構が普遍的に作動していることを確認する実験を行いました。ヒト新鮮糞便を中性～酸性域の緩衝液でpHを調整し培養後、プトレッシン濃度を測定しました。その結果、酸性に調整された培地(pH 6以下)で培養を行った場合にプトレッシン濃度が増加することが認められました(図5A)。この結果により、ヒト腸内菌叢においても、腸内環境の酸性化が、ハイブリット・ポリアミン合成機構のトリガーとなることが確認されました。次に、大腸菌-フェカリス菌以外の組合せのハイブリッド・ポリアミン合成機構が存在する可能性を検討しました。大腸菌の耐酸性機構に関与する遺伝子(AdiA, AdiC)を保有する腸内細菌をゲノム情報から推測し、*Fusobacterium varium*等を見出し、*F. varium*とフェカリス菌の組合せで、混合培養系およびノバイオートマウス実験を行い、プトレッシンが放出されることを確認しました(図5B)。すなわち、ハイブリット・ポリアミン合成機構は特定の2菌種(大腸菌とフェカリス菌)だけではなく、同様の遺伝子を保有する腸内細菌においても機能することが認められ、遺伝子レベルでの腸内細菌研究の重要性が示唆されました。

最後に、ハイブリット・ポリアミン合成機構に関与する遺伝子を持つ細菌群が同じヒト(同一個体)の腸内に共に存在しているかをバイオインフォマティクスにて検証しました。具体的には、複数地域(米国都心部、ベネズエラ、マラウイ)のヒトの糞便メタゲノムの登録データを用い耐酸性機構に関与する遺伝子(AdiA, AdiC)を保有する可能性が高い細菌群とアグマチンを利用したATP産生機構に関与する遺伝子(AguAとAguD)を保有する可能性が高い細菌群が同一個体の腸内に存在したのかをSymbiont-symbiont network解析にて調べました。その結果、AdiAとAdiCを保有する細菌群の一部とAguAとAguDを保有する細菌群の一部には、ヒトの腸管内で共存するものが存在することが見つかりました(図5C)。また、ビフィズス菌は耐酸性機構を保有する大腸菌と多くの個体で共存していることもわかりました。また、ヒト糞便メタトランスクリプトーム解析の登録データより、AgiA, AdiC, AguAが実際のヒト腸内で発現していることも確認されました(データ示さず。論文ではSupplementary Informationとして掲載)。これらの結果から、本研究で発見したハイブリット・ポリアミン合成機構はヒト腸管内で普遍的に機能していることが示唆されました。

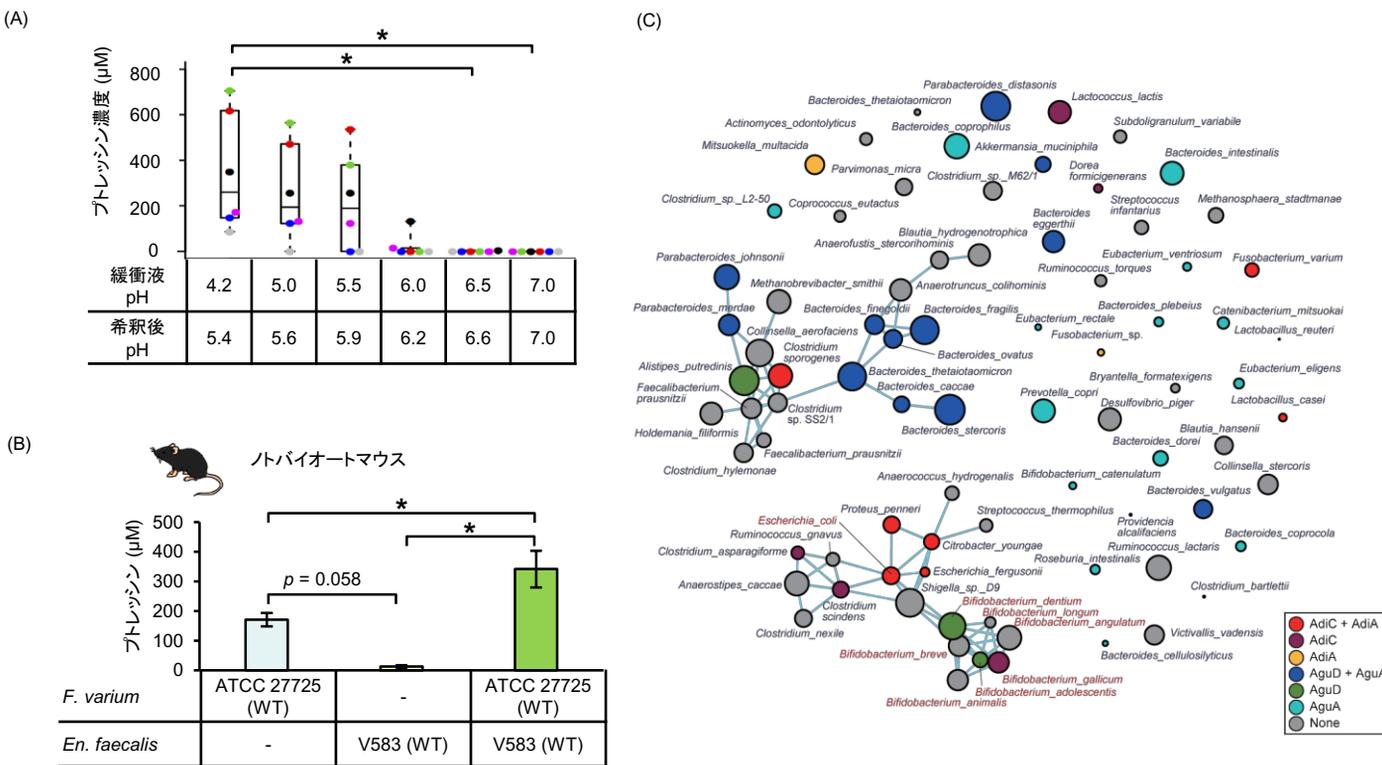


図5 ハイブリッド・ポリアミン合成機構の普遍性

(A) 中性～酸性pHの緩衝液でヒト糞便を培養後のプトレッシン濃度。同色の点は同個体の糞便データを示す。エラーバーは標準誤差を示す。* $p < 0.05$ (Steel-Dwass test). (B) *F. varium* とフェカリス菌定着ノバイオートマウスの糞便プトレッシン濃度。 (C) AdiA, AdiC, AguA 及びAguD のホモログ (類似配列遺伝子) を保有する細菌群のSymbiont-symbiont network解析。青線で結ばれた菌種は、同一ヒト糞便中に共存する頻度が高い細菌の組み合わせを示している。ビフィズス菌と大腸菌は赤文字で示す。各菌種の円サイズは菌数を、円の色は以下の菌群を示す。赤: AdiCおよびAdiAを有する細菌、ピンク色: AdiCを有する細菌、金色: AdiAを有する細菌、青色: AguDおよびAguAを有する細菌、黄緑色: AguDを有する細菌、スカイブルー: AguAを有する細菌、灰色: その他の細菌。

【結論】

- ✓ 本研究では、ビフィズス菌等の酸生成細菌が産生する酸をトリガーとし、複数の腸内細菌の独立した代謝経路(耐酸性機構とエネルギー酸性機構)が組み合わせり、プトレッシンが環境中に放出される経路(ハイブリッド・ポリアミン生合成機構)を見出しました。
- ✓ ビフィズス菌等が産生する酸(腸内環境の酸性化)の効果に関して、有害菌の抑制や蠕動運動の活性化がいられていますが、本研究により腸内酸性化の新しい作用(生理活性物質ポリアミンの産生誘導)が明らかになりました。
- ✓ 腸内細菌の代謝産物の中には、本研究のターゲットであるプトレッシンと同様に、複数の細菌によって産生されている物質が多数存在すると考えられます。また、これらの代謝産物は腸内細菌の生命現象の副産物として捉えることも重要です。従って、これらの生合成経路は、メタゲノム解析やメタトランスクリプトーム解析により、個々の細菌の生合成遺伝子を対象とした解析で見出される可能性は低く、培養系や遺伝子操作技術を駆使したアプローチが重要であると考えられます。

【今後の展望】

近年、ポリアミン(特にスペルミジン)は、細胞内の不要になった物質を分解し再利用する生命現象である“オートファジー”を促進することで、様々な保健効果を誘導することが明らかになりつつあります。中でも、心血管系の健全性を維持する作用が注目され、動脈硬化とそれに付随して発症する狭心症、心筋梗塞や脳梗塞の予防に役立つ可能性を期待されています。本研究で明らかにしたハイブリッド・ポリアミン生合成機構は、遺伝子および分子レベルで実証されていることから、ヒト応用研究において、腸内ポリアミン濃度コントロール技術が確立され、保健効果が得られる蓋然性が高いと考えられます

本研究で発見されたハイブリッド・ポリアミン生合成経路を作動させることで体内に効率的にポリアミンを供給する目的で、腸管到達性がよく腸管内のpHを低下させ、他の腸内細菌の生育阻害を起こさないような乳酸菌を、本県の発酵食品から分離することが出来れば、全く新しい機能性を本県産発酵食品に付与することが可能です。

【論文】

ジャーナル: Science advances

タイトル: Bioactive polyamine production by a novel hybrid system comprising multiple indigenous gut bacterial strategies

著者: Yusuke Kitada¹, Koji Muramatsu¹, Hirokazu Toju², Ryoko Kibe³, Yoshimi Benno³, Shin Kurihara⁴*, Mitsuharu Matsumoto^{1,3}*

¹協同乳業(株)・研究所技術開発グループ, ²京都大学・生態学研究センター, ³理化学研究所・辨野特別研究室, ⁴石川県立大学・腸内細菌共生機構学寄附講座(IFO), *共同責任著者.

【用語説明】

*1 遺伝子欠損菌株: 目的とする遺伝子が破壊された欠損した細菌を指す。遺伝子が欠損すると、目的遺伝子が関わっている生命活動(酵素反応、物質の輸送等)が機能しなくなる。

*2 遺伝子相補菌株: 遺伝子欠損株で欠損した遺伝子を、プラスミドDNAに組み込み、再導入した細菌株のこと。微生物実験では一般的な方法であり、目的遺伝子の役割を厳密に特定するために用いる方法。

*3 ノトバイオートマウス: 無菌マウス(腸内細菌等が全く存在していないマウス)に特定の微生物のみが定着した状態のマウスのこと。ノトバイオートマウスを用いることで、特定の微生物が生体に与える影響を直接判定することができる。

*4 Symbiont-symbiont network解析: 複数の個々に分かれた集団に対して、その中の多くの集団の中で同時に存在する個体の組み合わせや、多くの集団の中で同時に存在しない個体の組み合わせを統計的に解析する手法。

【寄附講座について】

公益財団法人発酵研究所からのご寄附により、石川県立大学に平成25年10月に設立され、平成31年3月まで設置予定の講座です。

講座Web: <http://host-microbe.ishikawa-pu.ac.jp/> 講座Blog: <http://symbiogenic.blogspot.com/>