

乳酸菌代謝と美味しい健康生活

小川 順^{1*}・岸野 重信²

食品に含まれる成分は、私たちの体内で消化され、さまざまな化合物へと変換を受けたのち吸収される。最終的にどのような化合物として吸収されるかが、私たちの健康に影響をあたえていると思われる。これらの化合物の生成には、私たち自身の代謝活性のみならず、腸内細菌による代謝が少なからず関わっていると考えられる。腸内細菌の数は、ヒトの体細胞数60兆に対し100兆を超えると言われ、その種も100種を超えると言われている。このことから、腸内細菌による食品成分の代謝を把握し、代謝産物が与える影響を評価することは、健康生活の維持にとって大切なことであろう(図1)。

我々は、このような発想から、腸内細菌の一種であり食品産業にて広く利用されている乳酸菌を対象に、食品成分代謝の解明、ならびに代謝産物の生理機能解析に取り組んでいる。本稿では、食品の美味しさに関わる成分である核酸と油脂の乳酸菌代謝を取り上げる。核酸代謝については、痛風などの要因となる高尿酸血症の予防を目的とした研究を、油脂代謝に関しては、嫌気性細菌に特徴的な不飽和脂肪酸の飽和化代謝の解析と、その代謝中間体の生理機能解析に端を発する研究を紹介し、腸内細菌代謝が宿主の健康に与える影響を議論してみたい。

乳酸菌核酸代謝の高尿酸血症予防への応用

日本人成人男性の約20%が高尿酸血症であると言わ

れ、痛風ばかりでなく、高血圧、糖尿病、高脂血症、動脈硬化の要因となっている。尿酸の前駆体となるプリン体は、肉、魚、卵、ビールなどに多く含まれ、高尿酸血症の対症療法としてプリン体を多く含む食品の制限が行われる。しかしながら、旨味成分であるプリンヌクレオチドも制限されることから、食品の美味しさが減ずることとなり、患者にとって苦痛となっている。

我々は、消化管内で乳酸菌がプリン体を分解することができれば、体内へのプリン体の吸収を抑制でき、血中

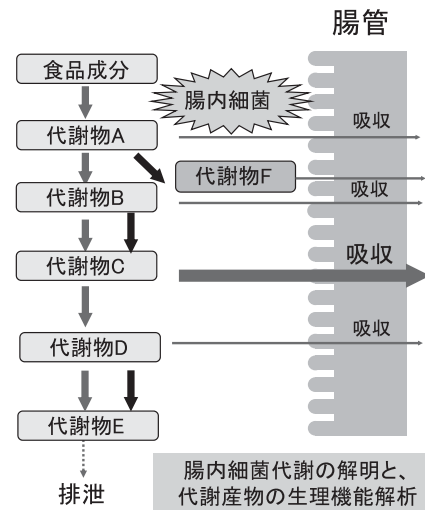


図1. 腸管内物質代謝と代謝産物。灰色矢印は宿主自身の代謝経路、黒矢印は、腸内細菌独自の代謝経路。

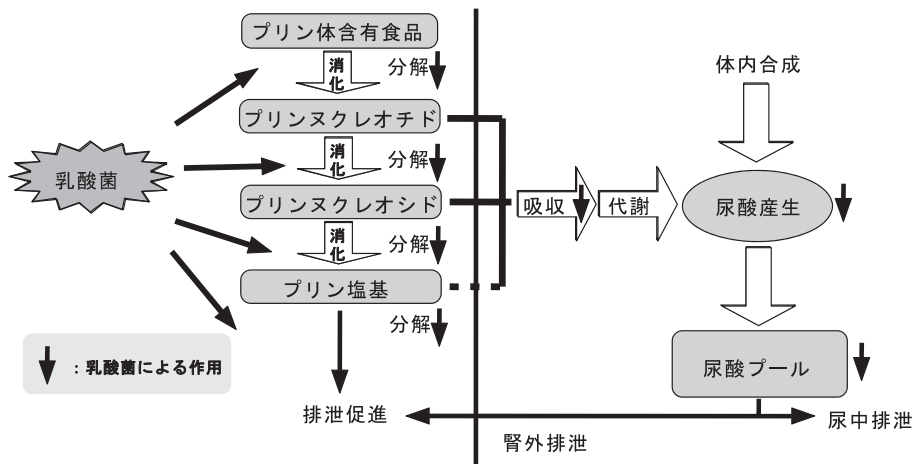


図2. 腸内細菌代謝を活用する高尿酸血症予防

* 著者紹介 ¹ 京都大学大学院農学研究科応用生命科学専攻 (教授) E-mail: ogawa@kais.kyoto-u.ac.jp
² 京都大学大学院農学研究科応用生命科学専攻

尿酸値を低減できるのではないかと考えた。

ヒト腸管におけるプリン体代謝の律速段階はプリンヌクレオシド分解、つまりイノシン、アデノシン、グアノシンの分解であると想定されている。実際、腸管内では、プリン体はおもにイノシン、グアノシンの形で存在すると報告されている。また、プリンヌクレオシドは、その代謝産物であるプリン塩基に比べて血中尿酸値の上昇を招きやすいと報告されている。そこで、乳酸菌による分解の対象となるプリン体として、イノシン、グアノシンを設定した。スクリーニングには、あらかじめ栄養培地にて培養した種々の乳酸菌の洗浄菌体を用い、腸内環境を考慮した、37°C、pH 7.0、嫌気下の反応条件にてイノシン、グアノシンの代謝能を評価した。

食経験がある乳酸菌を中心に、*Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc* および *Pediococcus* 属を含む約270株の乳酸菌を対象に検討を行った。基質として加えたプリンヌクレオシド(イノシン、グアノシン)を活発に分解する菌株として *Lactobacillus mali*, *L. vaccinostrercus*, *L. brevis*, *L. fermentum*, *L. homohiochii*, *L. pentosus* を含む13株を選抜した。これらのうち、プロバイオティクス用途に適するものは、おもに植物性発酵食品、ならびに魚類、食肉の発酵食品から分離された11株であった。これらを対象に食餌性高尿酸血症モデルラットを用いた血中尿酸値上昇抑制効果を解析した。

8週齢 Wister 系雄性ラットにウリカーゼ阻害剤 (2.5% オキシネート) を加えた食餌を与えることにより、尿酸分解能が低下した状態を誘導した。これに、プリン体として1%RNA を飼料に加えることにより、高い血中尿酸値を示すラットを作出した。この食餌性高尿酸血症モデルラットに、先に選抜した食品由来の乳酸菌11株 (*L. brevis*, *L. fermentum*, *L. pentosus*) の一夜培養菌体 (1.0×10^9 CFU) を経口投与し、摂取前、摂取2, 5, 8日目に尾静脈採血し、血中尿酸値をリタングステン法で測定した。対照群 (2.5% オキシネートと1%RNA を与えたもの) および無処置群 (2.5% オキシネートを与えたもの) には生理食塩水を投与した。試験期間中、各群の体重増加量および摂取量に群間差を認めなかった。

無処置群では、血中尿酸値の大きな変化は見られなかったが、対照群の血中尿酸値は経時的に上昇し、5日目に最高値を示した。これに対し乳酸菌投与は血中尿酸値の上昇抑制傾向を示し、5日目において *L. fermentum* 185株投与群は対照群に対して有意に低値を示し、*L. fermentum* 195株投与群および *L. pentosus* 223株投与群は低値傾向を示した。このメカニズムを解明すべく、効果のあった

上記の3株のプリン体代謝をより詳細に解析した。

L. fermentum 185株, *L. fermentum* 195株, *L. pentosus* 223の3株について、さまざまなプリンヌクレオチド、プリンヌクレオシド、プリン塩基、尿酸に対する分解活性を評価した。いずれの菌株においても、アデノシンをアデニンに、イノシンをヒポキサンチンに、グアノシンをグアニン、キサンチンに代謝する活性が見いだされた。つまり、これらの乳酸菌においては、ヌクレオシダーゼ様活性が顕著であり、プリンヌクレオシドをプリン塩基へと迅速に変換する一方で、プリン塩基をさらに代謝する活性は微弱であるという結果が得られた。

プリン塩基はプリンヌクレオシドよりも腸管から吸収されにくいと報告されている。経口投与された乳酸菌は、腸管からの吸収を受けやすいプリンヌクレオシドを、吸収されにくいプリン塩基へ変換することにより、腸管から血中へのプリン体吸収を抑制するとともに、腸管を通じて溶解度の低いプリン塩基の排泄を促進し、最終的に体内の尿酸プールを減少する効果を発揮していると考えられた。

以上の結果により、乳酸菌を、高尿酸血症予防効果が期待できるプロバイオティクスとして利用できる可能性が示された。

乳酸菌脂肪酸代謝の解明と代謝産物の生理機能解析

マグロのとろや、牛肉のサシなど、油を含む食品は美味しいものである。食の欧米化も手伝って油脂の摂取が増えるにつれ、メタボリックシンドロームが増加傾向にある。これらが背景となり、脂質吸収のおもな場となる腸管内における脂質代謝に関心が集まっている。我々は、腸内細菌の脂質代謝を解析することにより、腸管内脂質代謝制御を介した健康増進に関わる基盤情報を収集するとともに、見いだされる酵素機能を機能的脂質生産に応用する研究を展開している。

腸内細菌に代表される嫌気性細菌において遊離型の高度不飽和脂肪酸 (PUFA) が毒性を示し、また、嫌気性細菌が遊離型PUFAの解毒機構としてPUFA飽和化活性を有することが知られていたが、その詳細は不明であった。筆者らは、機能的脂質として期待される共役脂肪酸の微生物生産を研究する過程で^{1,2)}、腸内細菌の一種である乳酸菌におけるPUFA飽和化代謝の詳細を解明するに至った。

L. plantarum AKU1009aは、不飽和結合への水和反応とそれに引き続く脱水を伴う二重結合の転位反応により、リノール酸を共役型リノール酸 (CLA) へと変換する。この共役異性化酵素系の解明を試みた結果、3つ

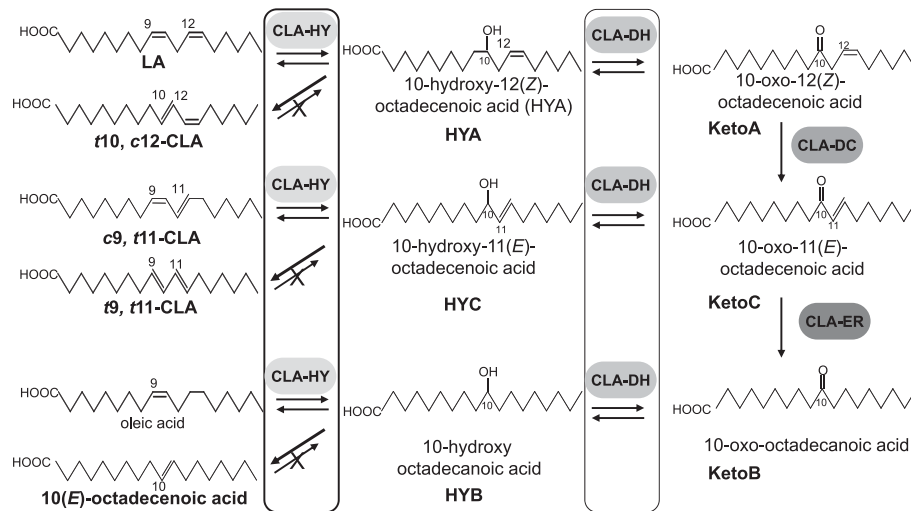


図3. *Lactobacillus plantarum* AKU 1009aにおける不飽和脂肪酸飽和化代謝

のタンパク質 (CLA-HY, CLA-DH, CLA-DC) の関与が明らかとなった^{3,4)}。一方, *L. plantarum* WCFS1株のゲノム情報を精査したところ, CLA-DH, CLA-DCが隣接して存在していること, さらに, CLA-DH, CLA-DCに隣接シトロレダクターゼとアノテーションされる遺伝子が存在することが判明した。そこで, *L. plantarum* AKU1009aの相同遺伝子をクローニングし大腸菌にて発現させるとともに, 本タンパク質 (CLA-ER)の機能解析を試みた。その結果, CLA-HY, CLA-DH, CLA-DC, CLA-ERの4つのタンパク質の共存下において, リノール酸がオレイン酸ならびに10-*trans*-オクタデセン酸への飽和化されることが判明した。この4種の酵素により触媒されるPUFA飽和化経路を以下のように予想している。

すなわち, リノール酸の水酸化脂肪酸への水和 (CLA-HYが触媒), 水酸化脂肪酸の酸化 (CLA-DHが触媒) と引き続く二重結合の転移によるエノンの生成 (CLA-DCが触媒), さらに, エノンの還元 (CLA-ERが触媒) を経て, それまでの反応を折り返すように進行するカルボニル還元 (CLA-DHが触媒), 脱水反応 (CLA-HYが触媒) により飽和化を完結する一連のルートを主経路とし, さまざまな水酸化脂肪酸, オキソ脂肪酸, 共役リノール酸を生じる分岐路を伴った複雑な代謝の存在が推定された (図3)⁵⁾。

上述のPUFA飽和化酵素系のうち, CLA-HY, CLA-DH, CLA-DCを活用することにより共役脂肪酸類の生産が可能となる。機能性食品用途を鑑み, 乳酸菌を対象にこれらの酵素活性の高い菌株, すなわち共役脂肪酸高生産株をリノール酸からの共役リノール酸 (CLA)

の生産を指標に探索した。CLAには, 発がん抑制作用, 抗肥満作用などが報告されており, 新たな機能性脂質として注目されている。探索の結果, *L. acidophilus*や*L. plantarum*などの乳酸菌が, リノール酸を *cis*-9,*trans*-11-オクタデセン酸 (CLA1) ならびに *trans*-9,*trans*-11-オクタデセン酸 (CLA2) へと変換することを見いだした。また, 反応中間体としての水酸化脂肪酸が生成することから, さまざまな水酸化脂肪酸の変換を検討した結果, リシノール酸 (12-ヒドロキシ-*cis*-9-オクタデセン酸) からのCLA生産ならびにリシノール酸の天然資源であるヒマシ油からのCLA生産が可能であることを明らかにした。これらの反応を利用し, CLAの新規生産法, すなわち, ①リノール酸の異性化によるCLA生産法, ②リシノール酸 (ヒマシ油) の脱水反応によるCLA生産法を確立した。また, *L. plantarum*による α -リノレン酸および γ -リノレン酸の代謝を解析した結果, リノール酸と同様に, 分子内の *cis*-9,*cis*-12構造が *cis*-9,*trans*-11もしくは *trans*-9,*trans*-11の共役ジエン構造に変換されることを見いだした。この結果に基づき, *L. plantarum*の休止菌体を酵素源とする α -リノレン酸ならびに γ -リノレン酸由来の共役脂肪酸生産プロセスを開発している。

乳酸菌における新たな不飽和脂肪酸飽和化代謝の発見と関与する酵素機能の解析に基づき, 本代謝系の中間体である水酸化脂肪酸, オキソ脂肪酸, 共役脂肪酸, 非メチレン型不飽和脂肪酸などの希少脂肪酸を生産する基盤技術を確立した。あわせて, 得られた生成物を純度95%以上にまで精製する技術も開発している。

これらの提供可能となった希少脂肪酸を活用して, 現在, 哺乳類体内での希少脂肪酸の存在を解析するととも

に、腸管バリア機能制御、脂肪酸合成・脂質代謝制御、免疫制御、炎症抑制などの観点から生理機能評価を試みており、興味深い機能が判明しつつある。

たとえば、水酸化脂肪酸（10-ヒドロキシ-*cis*-12-18:1）に腸管上皮バリアの損傷を回復する機能を⁶⁾、また、オキソ脂肪酸類にLXR受容体を介した脂肪酸合成抑制の可能性を見いだしている⁷⁾。これらの結果は、腸内細菌の代謝活性に依存して腸管内にて特異的に生成する脂肪酸分子種が、宿主であるヒトの健康に何らかの影響を与えている可能性を示唆している。今後、腸内細菌叢推移の指標となる腸管内メタゲノム情報と、腸内細菌脂質代謝、さらには、代謝により生成する希少脂肪酸の生理機能を重層的に解析することにより、希少脂肪酸の作用点を明確にするとともに、腸内細菌による腸管内脂質代謝制御を介した健康増進の可能性を探っていきたい。

まとめ

乳酸菌に代表される腸内細菌の代謝研究から、さまざまな食品成分の変換化合物とその生理機能に関する知見

が蓄積されつつある。これらの化合物の動態を腸内細菌の菌叢相推移、代謝、酵素活性、遺伝子発現を介して制御することが、健康増進をサポートする新たな方法論となることを期待したい。

謝 辞

本研究の一部は、生研センターイノベーション創出基礎的研究推進事業の支援を受けて行われました。

文 献

- 1) Ogawa, J. *et al.*: *J. Biosci. Bioeng.*, **100**, 355 (2005).
- 2) Kishino, S. *et al.*: *Lipid Technol.*, **21**, 177 (2009).
- 3) Kishino, S. *et al.*: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **75**, 318 (2011).
- 4) Kishino, S. *et al.*: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **416**, 188 (2011).
- 5) Kishino, S. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, doi: 10.1073/pnas.1312937110
- 6) 宮本潤基ら, 2013年度日本農芸化学会大会, 2A22a15.
- 7) Nanthirudjanar, T.ら, 2013年度日本農芸化学会大会, 2A20p10.