

脂質がつなぐもの： 生物工学的脂質研究が導く新しい学際研究と産業（後編）

腸内細菌が産生する食事脂質代謝物とその生理機能

岸野 重信^{1*}・米島 靖記²・小川 順¹

はじめに

我々が食事により摂取した脂質は体内で代謝・吸収され、エネルギー源として利用されるほか、脂質メディエーターなどのシグナル伝達物質としても役割を担うことが明らかとなっている。腸内細菌はヒトの健康に寄与することが近年盛んに報告されているが、どのようなメカニズムでヒトの健康に寄与しているかを明らかにしている報告例は少ない。

我々は、食事により摂取した脂質が腸内細菌によってどのように代謝されるのか、さらに、その代謝物がヒトにどのような影響を与えるのかについて検討を行った。

1. 腸内細菌による不飽和脂肪酸代謝

1-1 飽和化代謝 腸内細菌の一種である乳酸菌 *Lactobacillus plantarum* が、食事由来脂質の主な構成脂肪酸である炭素数18で $\Delta 9$ 位、 $\Delta 12$ 位に *cis* 型二重結合を有する不飽和脂肪酸リノール酸 (*cis*-9,*cis*-12-octadecadienoic acid (18:2)) や α -リノレン酸 (*cis*-9,*cis*-12,*cis*-15-

octadecatrienoic acid (18:3)) などの $\Delta 12$ 位の二重結合を複雑な経路で飽和化することを見いだした(図1にはリノール酸を基質とした代謝経路の例を示す)¹⁾。本代謝経路は、4つの不飽和脂肪酸変換酵素[水和脱水酵素(CLA-HY)、酸化還元酵素(CLA-DH)、異性化酵素(CLA-DC)、エノン還元酵素(CLA-ER)]からなり、水酸化脂肪酸やオキソ脂肪酸、共役脂肪酸など複数の代謝産物が関与している¹⁾。

さらに、腸内細菌である *Clostridium bif fermentans* による不飽和脂肪酸飽和化代謝も見いだしている(図2)。本代謝は、リノール酸などの炭素数18の不飽和脂肪酸以外にも、アラキドン酸や魚油に含まれているエイコサペンタエン酸(EPA)などの炭素数20の不飽和脂肪酸を基質とした際にも観察された。本代謝では、メチル基末端から数えて6番目と9番目の炭素-炭素結合($\omega 6$ 位ならびに $\omega 9$ 位)に *cis* 型二重結合を有する不飽和脂肪酸が、 $\omega 7$ 、 $\omega 9$ 共役脂肪酸を経て $\omega 7$ 不飽和脂肪酸へと部分的に飽和化される(図2)²⁾。

1-2 水和化代謝 腸内細菌の一種である乳酸菌

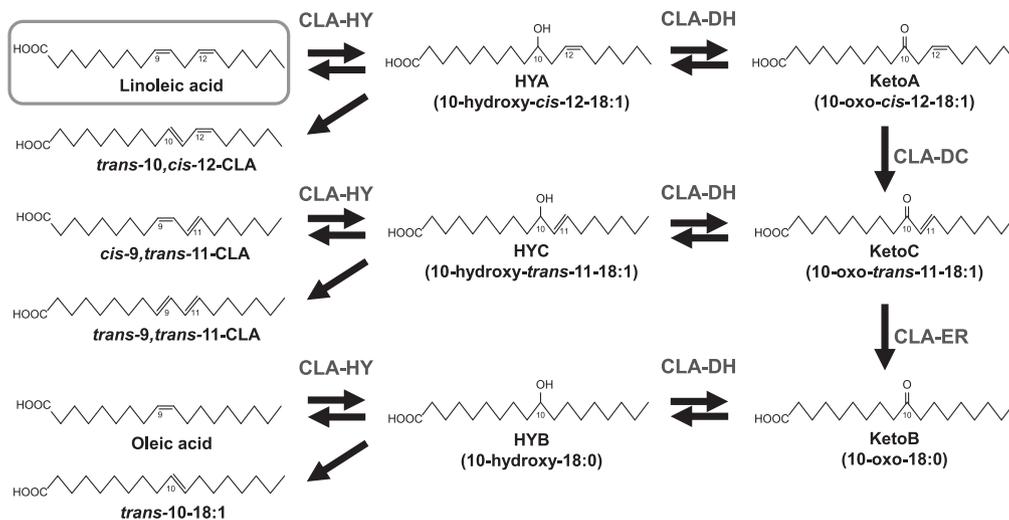


図1. 乳酸菌 *Lactobacillus plantarum* によるリノール酸飽和化代謝

* 著者紹介 京都大学大学院農学研究科(准教授) E-mail: kishino.shigenobu.3e@kyoto-u.ac.jp

¹京都大学大学院農学研究科, ²Noster株式会社R&D本部

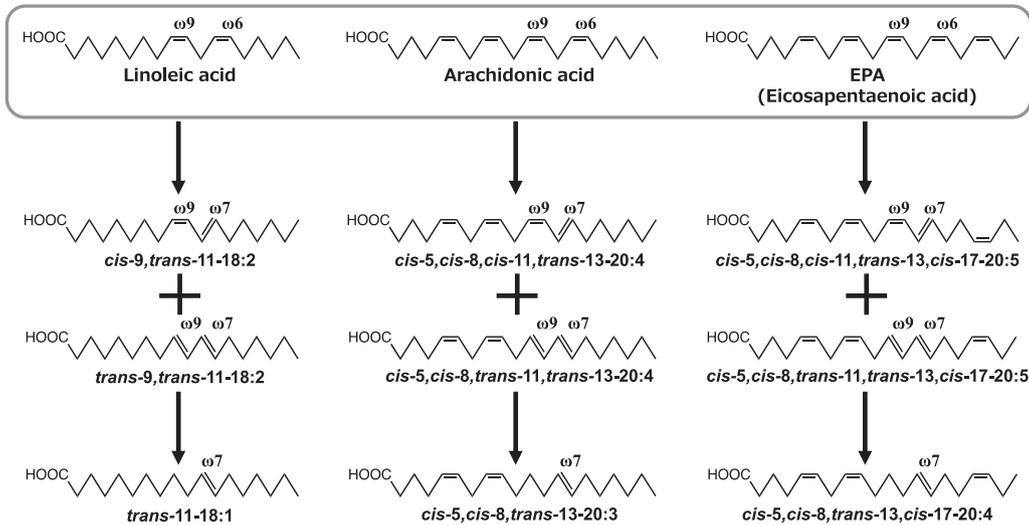


図2. *Clostridium bif fermentans*による不飽和脂肪酸飽和化代謝

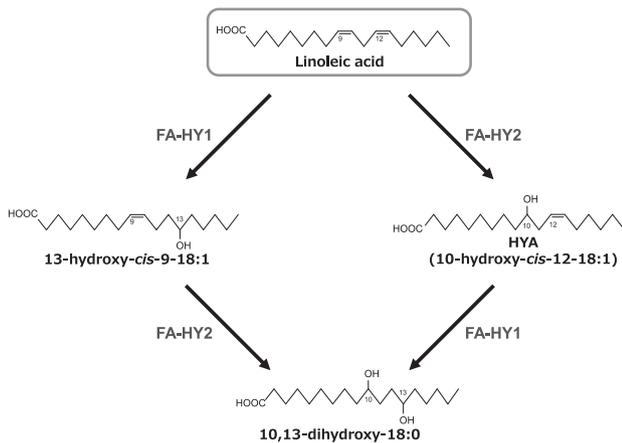


図3. 乳酸菌 *Lactobacillus acidophilus* によるリノール酸水酸化代謝

Lactobacillus acidophilus が、リノール酸や α -リノレン酸の二重結合を水和し、さまざまな水酸化脂肪酸へと代謝することを見いだした(図3にはリノール酸を基質とした代謝経路の例を示す)³⁾。本菌は、異なる位置の二重結合を認識する2つの水和酵素(FA-HY1およびFA-HY2)を有しており、リノール酸や α -リノレン酸を基質とした場合、FA-HY1は $\Delta 12$ 位の cis 型二重結合を認識しC13位に水酸基を導入し、FA-HY2は $\Delta 9$ 位の cis 型二重結合を認識しC10位に水酸基を導入する。さらに、FA-HY1は炭素数18の不飽和脂肪酸のみならず、アラキドン酸(C15位に水酸基を導入)や魚油に含まれている炭素数22のドコサヘキサエン酸(DHA:C14位に水酸基を導入)などにも作用することを明らかにした³⁾。

さらに、腸内細菌である *Clostridium* 属細菌の一種が、リノール酸や α -リノレン酸、EPA、DHAなどを水和し、さまざまな水酸化脂肪酸を生産することも見いだしている。

2. 乳酸菌由来不飽和脂肪酸代謝物の生理機能

不飽和脂肪酸の乳酸菌代謝物が宿主に与える影響について、さまざまな角度から検討がなされ、多様な生理機能が見いだされている。たとえば、上皮組織のバリア機能としては、腸管、口腔内での作用が認められている。デキストラン硫酸ナトリウム(DSS)誘導腸炎モデルマウスにリノール酸の初期代謝物である水酸化脂肪酸HYA(10-hydroxy- cis -12-octadecenoic acid(18:1))を経口投与すると、HYAが腸管上皮細胞に発現している長鎖脂肪酸受容体GPR40を介して炎症性サイトカインの産生を抑制し、腸管上皮バリア機能の回復により炎症が抑制され、腸炎の症状が緩和されると報告された⁴⁾。また、歯周炎モデルマウスを用いた実験で、HYAの摂取が炎症性サイトカインの発現抑制と歯槽骨吸収抑制を介して、歯周病原菌 *Porphyromonas gingivalis* によって引き起こされる歯肉上皮バリア機能障害を改善することが報告された⁵⁾。抗菌活性に関しては、HYAが長鎖ブレニル鎖を持つメナキノン産生細菌(ヘリコバクターやカンピロバクターなど)に対して特異的な抗菌作用を有することが見いだされた。ピロリ菌(*Helicobacter pylori* SS1株およびTN2GF4株)感染マウスにHYAを経口投与すると胃内のピロリ菌数を低下させ、さらに、ハイルマニイ菌(*Helicobacter suis* TKY株)感染胃MALT(Mucosa Associated Lymphoid Tissue)リンパ腫モデルマウスにHYAを経口投与すると、胃MALTリンパ腫の発症を抑制することが報告された⁶⁾。代謝に関する作用としては、高脂肪食負荷肥満モデルマウスにHYAを投与すると、肥満の症状およびインスリン抵抗性が改善することが見い

だされた⁷⁾。また、HYAの代謝物であるKetoA (10-oxo-cis-12-18:1) には、カプサイシン受容体 (TRPV1) の活性化作用および、TRPV1を介したエネルギー消費亢進作用が報告されている⁸⁾。ここでは主にリノール酸の初期代謝産物HYAに関連する生理機能について例をあげたが、他の代謝物についてもさまざまな生理機能が報告されている。これらの結果は、乳酸菌などの腸内細菌によって代謝され生じた脂肪酸代謝物が、宿主の健康に寄与する可能性を示唆している。

3. HYAの存在

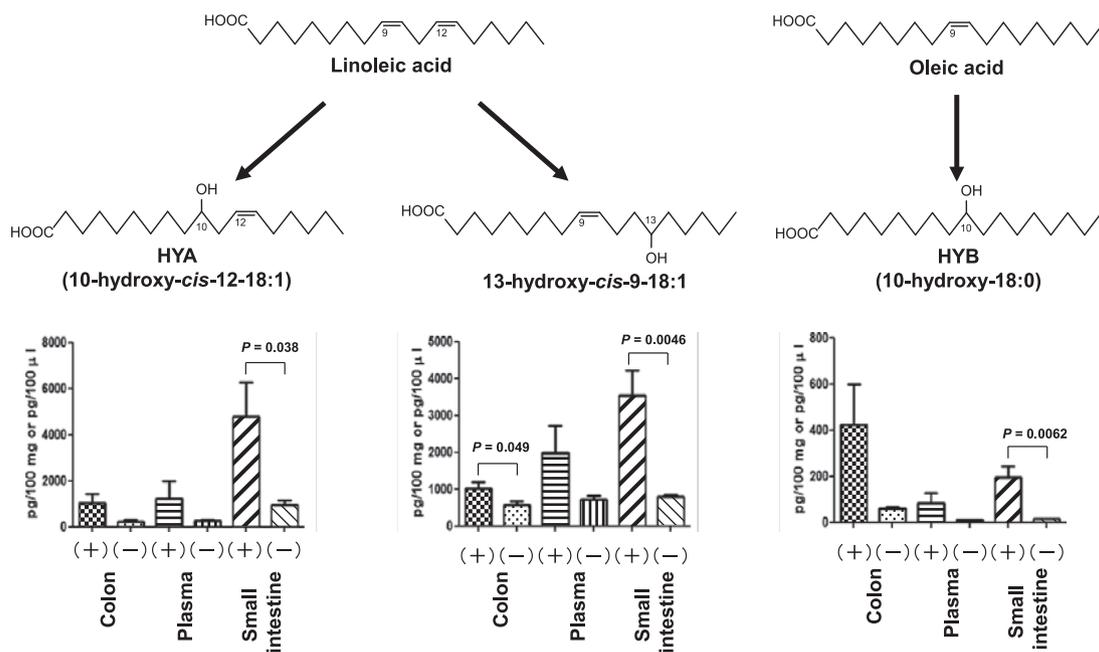
3-1 腸内細菌に依存する不飽和脂肪酸代謝物 筆者らは、食事由来脂質が腸内細菌による代謝を受けてさまざまな脂肪酸代謝物となり、それら代謝物が腸管に存在、さらに宿主に移行していることを確認している (図4)¹⁾。SPFマウス (specific-pathogen-freeマウス) とGFマウス (germ-freeマウス：無菌マウス) の結腸、小腸、血漿中の遊離脂肪酸を測定し、その分布を比較したところ、リノール酸の代謝物であるHYAおよび13-hydroxy-cis-9-18:1、オレイン酸の代謝物であるHYB (10-hydroxy-octadecanoic acid (18:0)) がSPFマウスの小腸においてGFマウスよりも顕著に多かったことから、これらの脂肪酸代謝物が腸内細菌に依存して生成していることが示唆された。また、高脂肪食負荷マウスにおいて、HYAの摂取により、腸内細菌叢の菌種構成が変化し、*Lactobacillaceae*

の比率が増加すること、また、小腸中の脂肪酸代謝物組成が変化し、リノール酸の代謝物であるKetoAが増加することが報告された⁷⁾。*Lactobacillaceae*に分類される*Lactobacillus*属細菌の多くがリノール酸代謝酵素を有することから、HYAの摂取が、腸内細菌叢の菌種構成の変化を伴って小腸中の脂肪酸組成を変化させる可能性が考えられた。

3-2 食品中のHYA 筆者らは、発酵食品から単離した乳酸菌ライブラリー約200種を対象に、リノール酸をHYAへ変換する水和活性の有無を評価したところ、*Lactobacillus plantarum*の他、*Lactobacillus rhamnosus*、*Lactobacillus brevis*、*Lactobacillus sakei*、*Lactobacillus curvatus*などの乳酸菌が水和活性を有することを見いだした。そこで、いくつかの発酵食品についてHYAの含有量を測定したところ、チーズ、すぐき、味噌、糠漬けなどにHYAが比較的多く検出されたことから、発酵過程において、素材中のリノール酸が代謝されてHYAが生成したと考えられた。

4. HYAの製造技術開発

4-1 食用油からのHYA生産 HYAが発酵食品中に検出されたことが、食品素材と乳酸菌をタンク内で反応させ、HYAを工業的に生産する着想を得るきっかけとなった。HYAを大量生産するためには、基質となるリノール酸を多く含む食用油が原材料として必要となる。



(+) : Specific-pathogen-free mice, (-) : Germ-free mice

図4. リノール酸, オレイン酸代謝物の生体内における存在

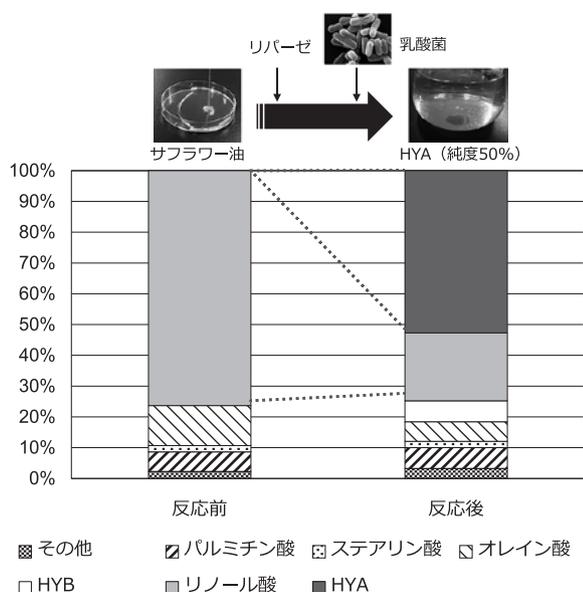


図5. サフラワー油を基質としたリノール酸のHYAへの変換反応

そこで、リノール酸含量の高い食用油を、市場に流通する食用油の中から探索し、サフラワー油を選定した。サフラワー油は食用油中もっともリノール酸含量の高い油脂であり、育種改良によりリノール酸含量が70%を超えるものが市販されており、価格も比較的安価で大量調達が可能である。次に、反応に使用する乳酸菌の選抜を行った。乳酸菌ライブラリー約200種を対象に、リノール酸をHYAへと変換する水和活性の高い乳酸菌の探索を行い、*L. plantarum*を選抜した。次に選抜した*L. plantarum*の培養条件の最適化を行った。培地組成、培養温度、攪拌数、培養時間を検討し、培養液1Lあたり湿菌体約6gが得られる培養条件の確立に成功した。続いて、サフラワー油を原材料とした乳酸菌によるリノール酸変換反応の最適化を行った。本反応ではトリグリセリド体のリノール酸は基質とならず、遊離型のリノール酸が基質となることから、リパーゼを用いてサフラワー油の加水分解を行った。反応pHに関しては、サフラワー油の加水分解に伴いpHが低下するため、反応時に水酸化ナトリウムを添加して本水和酵素の至適pHであるpH6を維持した。添加する乳酸菌には乳化剤様作用があることから、乳化剤を使用しなくても高速攪拌することで均一に懸濁することができた。これらの条件を組み合わせると、HYAを約50%含有する植物油乳酸菌代謝物のパイロットスケールでの生産に成功した(図5)。

5. HYAの血糖値改善作用

Gタンパク質共役受容体(GPCR)を安定発現させた

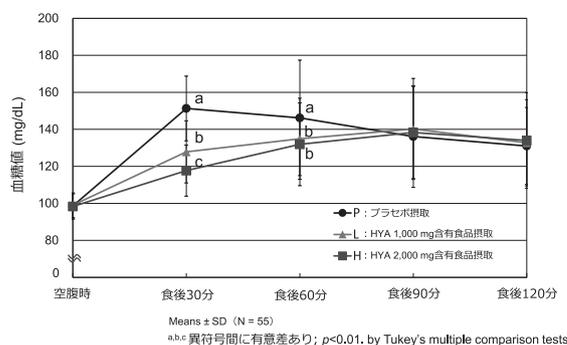


図6. HYA含有食品摂取時の食後血糖値の推移(用量設定試験)

細胞を用いたアッセイにより、HYAが長鎖脂肪酸の受容体であるGPR40に対してアゴニスト活性を有することを見いだしている。GPR40のリガンドはインクレチン誘導を介した糖尿病の治療の標的として着目されていることから、HYAに血糖値の改善作用が期待できると考えられた。

5-1 臨床試験

食後の血糖値が急激に上昇し、その後速やかに正常値に戻る現象を血糖値スパイクという。健康診断で測定される空腹時血糖の値が正常の範囲であっても、血糖値スパイクを発症する方は隠れ糖尿病と呼ばれ、国内に1,400万人以上いると推定されている。食後高血糖が糖尿病発症の危険因子であることは明白であるが、心血管疾患発症の危険因子であることもわかってきている。食後血糖の急激な変化をケアすることは非常に重要であり、日常的に摂取できるもので効果が得られれば、糖尿病の予防だけでなく、心血管疾患を予防するうえで役立つものと考えられた。そこで筆者らは、食後血糖値が上昇しやすい方(事前検査時の食後30分の血糖値が140~199 mg/dLの者)60名を対象として、純度50%のHYAを含有するカプセル(HYA含有食品)を摂取したときの食後血糖への影響を検討した(図6)。

試験デザインは3way-無作為化二重盲検クロスオーバー試験とし、プラセボ摂取群、HYA 1,000 mg含有食品摂取群、HYA 2,000 mg含有食品摂取群の3群を比較した(用量設定試験)。試験食品を水またはぬるま湯とともに嚙まずに摂取させ、摂取後、負荷食品(米飯300g)および補助食品(親子丼のもと210g)を10分かけて摂取させた。採血は負荷食品摂取前、摂取後30、60、90および120分後に実施し、採取した血液を用いて有効性の評価を行った。主要評価項目である血糖値濃度時間曲線下面積(血糖AUC)では、HYAの低用量摂取(1,000 mg)とHYAの高用量摂取(2,000 mg)ともに、プラセボ摂取と比較して有意に低値を示した。また、副次評価項目である負荷食品摂取後30分および60分の血

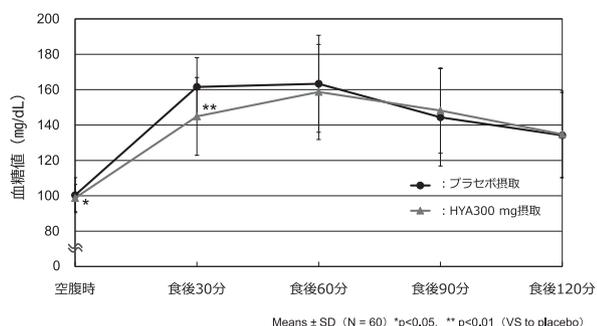


図7. HYA含有食品摂取時の食後血糖値の推移(効果確認試験)

糖値, 血糖のピーク値(血糖Cmax)においても, プラセボ摂取と比較して, HYAを低用量および高用量摂取することで有意に低値を示した. また, 本試験条件下での副次作用として5名に計5件の腹部症状(軟便, 下痢, 腹痛)が見られた. 以上の結果より, HYAを含有する食品を食直前に単回摂取することで, 食後の血糖値上昇を有意に抑制することが確認された⁹⁾.

HYA量として, 1,000 mg摂取, 2,000 mg摂取で同程度の顕著な効果が見られたことから, さらに低用量でも十分な効果が得られると想定された. そこで, 食後血糖値が上昇しやすい方(事前検査時の食後30分の血糖値が140~199 mg/dLの者)60名を対象として, 純度50%のHYAを含有するカプセル(HYA含有食品: 内容量600 mg, HYAとして300 mg含有)を摂取したときの食後血糖値への影響を検討した(図7).

試験デザインは無作為化二重盲検クロスオーバー試験とし, プラセボ摂取群, HYA 300 mg含有食品摂取群の2群を比較した(効果確認試験). 試験対象者, 摂取方法は先に実施した用量設定試験と同じ条件で行った. 本品摂取により, 主要評価項目である血糖AUCはプラセボと比較して有意に低値を示した. また, 食後30分の血糖値の上昇を有意に抑制した. 本試験条件下での副次作用として1名に腹部症状(下痢, 腹痛)が見られたが症状は軽度であった. 以上の結果より, HYAの摂取が食後の血糖値の上昇を緩やかにし, 血糖値スパイクに対して改善効果を示すことが期待された¹⁰⁾.

6. おわりに

微生物の酵素を活用した物質変換は, 化学合成では難しい有用物質の生産を可能とする. 本研究開発の基盤技術である, 乳酸菌由来の酵素を用いた不飽和脂肪酸の代謝変換は, 多様な物質の生産を可能とするだけでなく, 食事として摂取した脂質が, 腸内細菌によって代謝された後, 宿主にどのような影響を及ぼすかを解明する研究を進展させた. 実際, モデル動物を用いた個々の脂肪酸の有効性研究だけでなく, 脂質を対象とする網羅的なメタボローム解析(リポドミクス)の研究者からの腸内細菌脂質代謝物に対する関心も高まっており, 脂質とその健康に対する影響についての知見を得るための研究が広く進められている. 実用化研究については, リノール酸の初期代謝物であるHYAに関して先行して進め, 食品向けの素材として純度50%の植物油乳酸菌代謝物のパイロットスケールでの生産に成功し, 本品を用いて, 臨床試験での有効性, 安全性の確認も終えた. 現在HYAの商品化が計画されており, 乳酸菌により生産される脂肪酸代謝物の新たな健康素材としての活用が期待される.

最後に, 本特集の一連の研究に携わってくださった多くの共同研究の先生方, 研究室の学生・職員の皆様に厚くお礼申し上げます.

文 献

- 1) Kishino, S. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **110**, 17808 (2013).
- 2) Kishino, S. *et al.*: *Lipid Technology*, **21**, 177 (2009).
- 3) Hirata, A. *et al.*: *J. Lipid Res.*, **56**, 1340 (2015).
- 4) Miyamoto, J. *et al.*: *J. Biol. Chem.*, **290**, 2902 (2015).
- 5) Yamada, M. *et al.*: *Sci. Rep.*, DOI: 1038/s414598-018-27408-y (2018).
- 6) Matsui, H. *et al.*: *Helicobacter*, **22**, e12430 (2017).
- 7) Miyamoto, J. *et al.*: *Nat. Commun.*, **10**, 4007 (2019).
- 8) Kim, M. *et al.*: *FASEB J.*, **31**, 5036 (2017).
- 9) Yonejima, Y. *et al.*: *Prog. Med.*, **37**, 1105 (2017).
- 10) Yonejima, Y. *et al.*: *Prog. Med.*, **39**, 1147 (2019).