腸内細菌が産生する食事脂質代謝物の機能解析と応用

Functional Analysis and Application of Food Lipid Metabolites Produced by Gut Microorganisms

岸野 重信

京都大学大学院 農学研究科
応用生命科学専攻
〒606-8502
京都市左京区北白川追分町

Shigenobu KISHINO
Division of Applied Life Sciences,
Graduate School of Agriculture,
Kyoto University
Kitashirakawa-oiwakecho, Sakyo-ku,
Kyoto 606-8502, Japan

小川 順

京都大学大学院 農学研究科
応用生命科学専攻
〒606-8502
京都市左京区北白川追分町

Jun OGAWA
Division of Applied Life Sciences,
Graduate School of Agriculture,
Kyoto University
Kitashirakawa-oiwakecho, Sakyo-ku,
Kyoto 606-8502, Japan

米島 靖記

日東薬品工業株式会社 研究開発本部
研究部 菌・代謝物研究センター
〒617-0006
京都府向日市上植野町南開 35-3

Yasunori YONEJIMA
R&D Division, Nitto Pharmaceutical
Industries, Ltd.
35-3 Minamibiraki, Kamiueno-cho,
Muko, Kyoto 617-0006, Japan

論文要旨：食事より摂取した脂質は宿主体内で代謝され、エネルギー源や生体膜分子として利用されるほか、シグナル伝達物質としての役割も担う。また、脂質は宿主と共生関係にある腸内細菌によっても代謝され、その代謝で特徴的に生じる脂肪酸が宿主の脂肪酸組成に影響を与えていることが明らかとなり、一般的に摂取量の多い脂肪酸であるリノール酸などの食事脂質に由来する脂肪酸の腸内細菌代謝物に様々な生理活性が報告されている。このように、これまで栄養素として考えられてきた脂肪酸が宿主及び腸内細菌によって代謝されることで様々な生理活性を発揮する可能性が示唆されており、これら脂肪酸を利用した医薬品及び機能性食品の開発や腸管内で機能性脂肪酸を産生するプロバイオティクスの開発が期待される。我々は、腸内細菌が産生する脂肪酸の内、リノール酸から代謝される初期代謝産物 10-hydroxy-*cis*-12-octadecenoic acid（以下HYA）について、食品向けの実用化開発を現在実施しており、本稿ではHYAの機能と実用化に向けた取り組みについて紹介する。

Abstract: Lipids ingested from a meal are metabolized in the host body, used as energy sources and biomembranes, and also play a role as a signaling substance. Lipids are also metabolized by intestinal bacteria that are in symbiotic relationship with the host, and it becomes clear that fatty acid metabolites affect the fatty acid composition of the host. Furthermore, fatty acid metabolites, such as abundantly occurring linoleic acid metabolites, by intestinal bacteria have been reported to have various physiological activities. Thus, it has been suggested that fatty acids, which have been thought of as nutrients, are metabolized by hosts and intestinal bacteria, thereby may exhibit various physiological activities. Development of pharmaceuticals and functional foods using these gut microbial fatty acid metabolites and development of probiotics that produce functional fatty acid metabolites in the intestinal tract are expected. We are currently investigating practical functional food application of 10-hydroxy-*cis*-12-octadecenoic acid (HYA), a first compound metabolized from linoleic acid by intestinal bacteria. In this paper, we introduce HYA's functions and efforts toward practical application.

Key words: functional lipid, HYA, hydroxy fatty acids, lactic acid bacteria, unsaturated fatty acid-metabolism

1 腸内細菌の不飽和脂肪酸代謝の発見

食事より摂取した脂質は、ヒトの膵リパーゼによりモノアシルグリセロールと遊離型脂肪酸とに分解され小腸で吸収される。小腸で吸収されなかった遊離型脂肪酸はそのまま大腸へと運ばれるが、遊離型不飽和脂肪酸は腸内細菌に代表される嫌気性細菌に対して生育阻害を示すことが報告されている。そのため反芻動物のルーメン細菌は、遊離型不飽和脂肪酸の解毒機構として不飽和脂肪酸飽和化代謝を有することが知られていたが、その詳細な代謝経路は不明であった。我々は、腸内細菌の一種である乳酸菌を用いて乳酸菌に特異的な不飽和脂肪酸代謝を探索し、興味深い代謝を複数見出している。

1・1 飽和化代謝

小腸に存在が確認されている乳酸菌のうち、*Lactobacillus plantarum* が複雑な経路で食事脂質の主な構成脂

肪酸であるリノール酸の二重結合を1つ飽和化することを見出した (Fig. 1)¹⁾。本代謝には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)) が関与し、水酸化脂肪酸やオキソ脂肪酸、共役脂肪酸など多種多様な代謝中間体が存在する。さらに、本代謝は、リノール酸のみならず、亜麻仁油やエゴマ油に含まれる代表的なオメガ3脂肪酸である α -リノレン酸や、月見草油に含まれる γ -リノレン酸に対しても作用し、それぞれ対応した水酸化脂肪酸やオキソ脂肪酸、共役脂肪酸、二重結合が1つ飽和化された部分飽和脂肪酸など、さまざまな修飾脂肪酸が生産される。

1・2 水和化代謝

乳酸菌 *Lactobacillus acidophilus* や *Pediococcus* sp. は、リノール酸を複数の水酸化脂肪酸へと代謝する (Fig. 2)^{2,3)}。本代謝には、 $\Delta 12$ 位の二重結合を認識して C13 位に水

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

Fig. 2 乳酸菌 *Lactobacillus acidophilus* によるリノール酸水和化代謝

酸基を導入する水和酵素 FA-HY1 と $\Delta 9$ 位の二重結合を認識して C10 位に水酸基を導入する水和酵素 FA-HY2 が存在し、リノール酸は各水和酵素の作用により 13-hydroxy-*cis*-9-octadecenoic acid (18:1) や 10-hydroxy-*cis*-12-18:1 (HYA)、10,13-dihydroxy-octadecanoic acid (18:0) へと変換される。さらに *L. acidophilus* 由来 FA-HY1 は、炭素数 18 の不飽和脂肪酸のみならず、炭素数 20 や 22 の不飽和脂肪酸にも作用し、アラキドン酸からは 15-hydroxy 脂肪酸を、DHA からは 14-hydroxy 脂肪酸をそれぞれ水和反応により生成することを見出している³⁾。

2 乳酸菌由来不飽和脂肪酸代謝物の生理機能

乳酸菌の不飽和脂肪酸代謝によって得られる様々な代謝物について、乳酸菌由来脂肪酸変換酵素を発現する形質転換大腸菌を活用して生産法および高純度化法を確立し、得られた代謝物を用いて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、抗酸化など様々な観点から生理機能評価を試みたところ、興味深い機能を数多く見出した。例えば、リノール酸の初期代謝物である水酸化脂肪酸 HYA に見出した生理機能として、DSS 誘導腸炎モデルマウスを用いた実験で腸管上皮バリアの損傷を回復する機能を⁴⁾、歯周炎モデルマウスにおいて歯槽骨吸収と炎症性サイトカインの発現を抑制する作用を⁵⁾、ピロリ菌誘導マストリンパ腫モデルマウスを用いた実験でピロリ菌特異的な抗菌活性によるマストリンパ腫の発症抑制⁶⁾ などを確認している。

さらに、HYA や HYA の代謝物であるオキソ脂肪酸

KetoA (10-oxo-*cis*-12-18:1) に LXR を介した脂質代謝制御の可能性⁷⁾ を、さらには、KetoA にカプサイシン受容体 (TRPV1) の活性化能及び、TRPV1 を介したエネルギー消費亢進作用⁸⁾ を確認している。

これらの結果は、乳酸菌の不飽和脂肪酸代謝に依存して腸管内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。

3 HYA の存在

3・1 腸内細菌に依存する脂肪酸代謝物

HYA 等の特異な不飽和脂肪酸代謝物は、宿主による代謝ではなく腸内細菌による特異な代謝で生成していることを確認するため、通常飼料で飼育した Specific-pathogen-free (SPF) マウスと Germ-free (GF: 無菌) マウスの結腸、小腸、血漿における遊離脂肪酸の分子種とその分布を比較した。その結果、リノール酸の代謝物である水酸化脂肪酸 HYA と 13-hydroxy-*cis*-9-18:1 及びオレイン酸の代謝物である水酸化脂肪酸 10-hydroxy-18:0 (HYB) が各種組織中に確認され、さらに確認された水酸化脂肪酸の量が SPF マウスにおいて GF マウスよりも顕著に多かったことから、これらの脂肪酸が腸内細菌の存在に依存して生成していることが示唆された¹⁾ (Fig. 3)。

3・2 食品における存在

CLA-HY 相同遺伝子の分布を KEGG データベース (<http://www.genome.jp/kegg/>) 上のゲノム情報を基に調査したところ、*L. plantarum* の他、*Lactobacillus*

Fig. 3 リノール酸, オレイン酸代謝物の生体内における存在

rhamnosus, *Lactobacillus brevis* などの乳酸菌にその存在を認めた。これらの乳酸菌は漬物やヨーグルトなどの一般的な発酵食品に確認される菌種である。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(29 mg/100 g), チョコレート(5 mg/100 g), すぐき漬(2.8 mg/100 g), 味噌(2.8 mg/100 g)にHYAが比較的多く検出された。

また、糠床の熟成研究において不飽和脂肪酸代謝物の存在が確認されている。野菜を漬けた糠床ではトリグリセリドが経時的に減少するが、野菜を漬けない糠床ではその減少はわずかであり、糠床中では、野菜に由来するリパーゼによりトリグリセリドが遊離脂肪酸に分解されたと考えられた。更に、脂肪酸組成の変化に着目すると、野菜を漬けている糠床では、糠油の主要構成脂肪酸であるオレイン酸とリノール酸が減少し、オレイン酸の代謝産物であるHYBとリノール酸の代謝産物である10,13-dihydroxy-18:0が増加したことから、糠床中では、野菜に由来するリパーゼによって遊離したオレイン酸やリノール酸を、乳酸菌が対応する水酸化脂肪酸へと変換していることが示唆された⁹⁾。

4 HYAの製造技術開発

4・1 リノール酸からのHYAの変換反応

L. plantarum AKU 1009aは京都大学大学院農学研究科のカルチャーコレクションよりリノール酸からHYA

へ代謝変換する活性が高い株として選抜された乳酸菌である。本反応は*L. plantarum* AKU 1009aが産生する酵素(CLA-HY)により触媒される。そこで、CLA-HYを高発現する形質転換大腸菌を作成し、本株を用いてHYAの効率的な生産を試みた。リノール酸を基質に形質転換大腸菌, Flavin Adenine Dinucleotide (FAD), Reduced Nicotinamide Adenine Dinucleotide (NADH)を加え、100 mM リン酸緩衝液(pH 6.5)に懸濁し、37℃、嫌気条件下でインキュベートした。反応開始後6時間で収率80%に到達し、そこから反応温度を18℃に下げることにより約20時間で収率90%に到達、さらに5℃まで下げることにより約48時間で収率98%に到達した(Fig. 4)。

4・2 食用油からのHYAの変換反応

形質転換大腸菌で確立した技術を基盤として、我々はHYAの食品向けの工業生産を検討した。本反応はリノール酸を基質とするため、リノール酸含量の多い食品原料を市場に流通する食用油の中から探索し、サフラワー油を原材料に選定した。サフラワー油は食用油中最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いる。次に反応に使用する乳酸菌の培養条件の最適化を行った。本乳酸菌は培養開始後20~36時間で定常期となり、その間CLA-HYの酵素活性は維持されることを確認した。培養液1Lあたり湿菌体約3gが得られる培養条件を確

Fig. 4 形質転換大腸菌を用いた水酸化脂肪酸生産方法

立し、培養液を遠心分離して湿菌体の状態とし、これを冷凍保存することで酵素活性は維持された。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。CLA-HYはトリグリセリドに反応しない為、まず、サフラワー油をリパーゼを用いて遊離脂肪酸に分解した。本酵素反応は補酵素としてFADを要求し、更にNADHによって活性化される¹⁰⁾。これら補酵素は高価なため、原料として添加せず、乳酸菌菌体をそのまま加えることで菌体内より補った。pHに関してはサフラワー油の鹼化に伴いpHが下がるため、反応時に水酸化ナトリウムでpHを6に調整することで酵素活性を維持した。添加する乳酸菌には乳化剤のような効果もあり、油と乳酸菌懸濁液を高速攪拌するだけで、うまく混ざりあい、ほぼ均一な状態となった。これらの条件を組み合わせ、食用油を原材料に純度50%のHYAの生産に成功した (Fig. 5)。

5 HYAの血糖値改善作用

Gタンパク質共役受容体 (GPCR) を安定発現させた細胞を用いたアッセイにより、HYAが長鎖脂肪酸受容体であるGPR40, GPR120に対してアゴニスト活性を有することが判っている。GPR40, GPR120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おり¹¹⁾、HYAに血糖値を改善する作用が期待できると考えられた。

Fig. 5 サフラワー油を基質としたHYA変換反応

5・1 臨床試験

高血糖は血管内皮障害や炎症を引き起こすが、特に食後の数時間の血糖値の急上昇 (血糖値スパイク) により血管が損傷し、動脈硬化が進み、心筋梗塞や脳梗塞のリスクが高まると言われている。健康診断で測定される空腹時血糖ではわからないことから、「隠れ糖尿病」とも言われ、国内に1,400万人以上いると推定されている。以上のことから、糖尿病予備軍でも食後血糖の急激な変

Fig. 6 HYA 含有食品摂取時の食後血糖値の推移
 平均値 $\pm$ SD (N=55)
^{abc} 異符号間に有意差あり; $p < 0.01$, by Tukey's multiple comparison tests

P: プラセボ摂取
 L: HYA 1,000 mg 含有食品摂取
 H: HYA 2,000 mg 含有食品摂取

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、糖尿病の予防に役立つものと考えられた。そこで、我々は、食後血糖値が上昇しやすい方 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値への影響を検討した。

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、HYA1,000 mg 含有食品摂取群、HYA2,000 mg 含有食品摂取群の 3 群を比較した。試験食品を水またはぬるま湯と共に嚥まずに摂取させ、摂取後、負荷食品 (米飯 300 g) 及び補助食品 (親子丼のもと 210 g) 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 及び 120 分後に採血し、血糖値を測定した。主要評価項目である血糖 AUC では、HYA の低用量摂取 (1,000 mg) と HYA の高用量摂取 (2,000 mg) とともに、プラセボ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 分及び 60 分の血糖値、血糖 Cmax においても、プラセボと比較して、HYA を低用量及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 (Fig. 6)¹²⁾。

6 まとめ

これまで食事由来の脂質は単なる貯蔵栄養源と思われてきた。本稿では、食事由来脂肪酸が乳酸菌などの腸内細菌の代謝に依存して様々な修飾脂肪酸 (水酸化脂肪酸、オキシ脂肪酸、エノン型オキシ脂肪酸、共役脂肪酸、部分飽和脂肪酸など) へと変換され、それらが宿主の健康に影響を与えることを紹介した。これらの知見は、以前より抗炎症、抗肥満効果が報告されてきた乳酸菌あるいは不飽和脂肪酸に関して、その機能発現の実態を化合物レベルで説明しうるものであり、さらに、乳酸菌により生産される修飾脂肪酸が、宿主の健康維持において重要な意味を持つことを示唆するものである。

HYA の工業生産は、腸内細菌脂質代謝物を機能性素材として活用する初めての試みである。また、食品応用可能な腸内細菌である乳酸菌によるリノール酸変換技術を他の脂肪酸に応用することで、様々な水酸化脂肪酸やオキシ脂肪酸の合成が可能であり、派生する新たな脂肪酸代謝物開発への展開も検討している。今後、HYA のみならず、乳酸菌により生産される様々な修飾脂肪酸を新たな健康素材として活用することが期待される。

文 献

- 1) Kishino, S. *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **110**, 17808-17813 (2013).
- 2) Takeuchi, M. *et al. Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **115**, 386-393 (2013).
- 3) Hirata, A. *et al. J. Lipid Res.* **56**, 1340-1350 (2015).
- 4) Miyamoto, J. *et al. J. Biol. Chem.* **290**, 2902-2918 (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) Nanthirudjanar, T. *et al. Lipids* **50**, 1093-1102 (2015).
- 8) Kim, M. *et al. FASEB J.* **31**, 5036-5048 (2017).
- 9) 小崎道雄. 乳酸発酵の文化譜. 中央法規出版 (1996).
- 10) Takeuchi, M. *et al. J. Biosci. Bioeng.* **119**, 636-641 (2015).
- 11) Itoh, Y. M. *et al. Nature* **422**, 173-176 (2003).
- 12) Yonejima, Y. *et al. Progress in Medicine* **37**, 1105-1111 (2017).