

腸内細菌叢の代謝制御によるポリアミン産生技術を用いた機能性食品の開発



協同乳業株式会社研究所 松本光晴

はじめに

腸内細菌叢と健康の関連性の研究は、長年、菌種構成を調べるアプローチで行われて来たが、腸内細菌叢の低分子代謝産物は、吸収され血中に移行し全身の細胞へ作用する可能性が高く、菌種構成より直接的に健康に影響を与えていると考えられる。筆者は、代謝産物の中でも生理活性物質ポリアミンに着目している。ポリアミンは低分子の塩基性物質で、プトレッシン、スベルミジン、スベルミン等の総称で、核酸の合成や安定化、細胞の増殖や分化、オートファジーなど多方面の生命現象に関与し、総じて、細胞健全性の維持に不可欠な物質である。筆者は「腸内細菌の代謝制御で安定的にポリアミンを産生させる技術を開発すれば、様々な生体の老化現象が抑制され、結果的には健康寿命の伸長に繋がる」との仮説を構築し、仮説の立証とこれを実現するための技術開発と製品化を目指した。

1. メタボロミクスを用いた腸内細菌叢が宿主に与える影響の基礎データの収集

筆者は、腸内細菌叢の代謝産物を極力把握する必要があると考え、当時、技術確立された直後のキャピラリー電気泳動-飛行時間型質量分析装置によるメタボロミクスを腸内環境研究に応用した。無菌マウスと菌叢定着マウスの結腸内容物メタボロームを比較した結果、多くの代謝産物が腸内細菌叢の影響を受けていることを明らかにした<sup>1)</sup>。更に、結腸内容物、結腸組織、血液、前頭前皮質のメタボロームの各代謝産物濃度の群間比から、血液および脳にまで移行している代謝産物の存在を示唆した<sup>2)</sup>。これは、腸内細菌由来の代謝制御で疾病予防や健康増進効果が得られる可能性を強く示唆し、代謝産物の制御技術の開発に取り組むきっかけとなった。また、筆者らは、この研究で消化管下部のポリアミンが腸内細菌叢由来であることを見出した<sup>1)</sup>。

2. 腸内細菌叢を利用したポリアミン産生技術の開発

2-1. プロバイオティクス

腸内細菌叢の代謝(産物)に影響を与えるには、腸管内で増殖し、常在細菌に刺激を与える強いプロバイオティクスが必須と考えられる。筆者は、耐酸性が強い *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* LKM512 菌株(以下ビフィズス菌 LKM512) を選出し、ヒト腸管内で増殖することを確認した<sup>3)</sup>。

2-2. ポリアミン産生誘導物質の探索

ビフィズス菌 LKM512 摂取で便中ポリアミン濃度の平均値の増加は認められたが、低濃度の被験者では増えない傾向が強く、幅広いヒトで精度高くポリアミンを増やす技術開発に挑んだ。当初、ポリアミン産生菌を探索したが再現性なく、腸内細菌のポリアミン産生誘導物質の探索へと発想を切り替えた。候補物質は、食事由来バイアスが無い糞便試料を得るために4日間の厳密な統一食摂取後の糞便をメタボロミクス解析し探索し

た。検出221成分からヒト腸管内で主要なプトレッシン(生理活性を有するスベルミジン、スベルミンの前駆体)と正の相関性を有する物質を抽出し、最終的に、全てのヒト糞便でプトレッシン濃度の上昇が認められたアルギニン(Arg)を見出した<sup>4)</sup>。げっ歯類への Arg 経口投与で糞便プトレッシン濃度が投与量依存的に上昇し、血中ではスベルミジンの上昇を確認した。同時に、ビフィズス菌 LKM512 と Arg を併用投与で効果が上昇することも認めた。

2-3. 腸内ハイブリッド・プトレッシン生合成機構

安定同位体 Arg を用いたラベル化解析の結果、プトレッシン産生は、特定の産生菌に依存するのではなく、複数の腸内細菌の相互作用に依存することが判明した<sup>5)</sup>。そこで、ヒト腸内主要菌群それぞれの代表的な菌種14種を Arg 含有培地で混合培養した結果、プトレッシン濃度が単独培養平均の約40倍になることを見出した。2菌種ずつの組合せで混合培養した結果、*Escherichia coli* と *Enterococcus faecalis* の組合せが最高濃度を示し、これはビフィズス菌 LKM512 の添加で有意に増強された。この現象を、培養条件の違い(pH等)による影響、培養液中の物質動態および文献情報を統合し、「腸内ハイブリッド・プトレッシン生合成機構」を提唱した(図1)。これは、*E. coli* と *E. faecalis* の遺伝子欠損菌株および相補菌株を用いた実験で証明した。すなわち、ビフィズス菌の産生する酸をトリガーとして、*E. coli*等が保有する Arg を利用した耐酸性機構(副

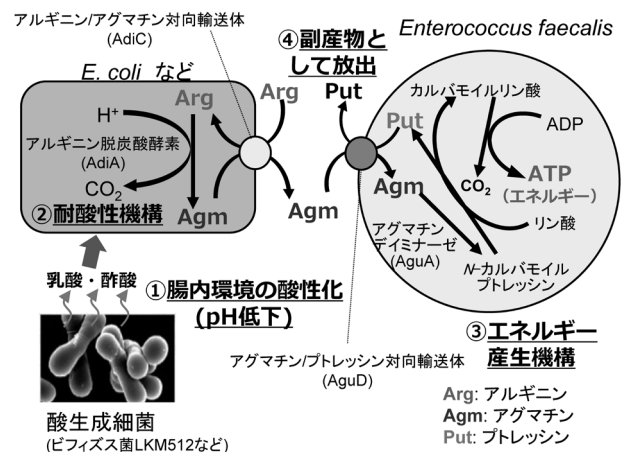


図1. 腸内ハイブリッド・プトレッシン生合成機構

① ビフィズス菌等の酸で腸内の pH が低下(本機構のトリガー)。② Arg を利用する耐酸性機構を保有する腸内細菌(*E. coli*等)は、この機構を作動させ菌体内 pH を中性に保つ。その際、環境中の Arg を取り込み、菌体外にアグマチンを放出。③アグマチンを利用した ATP 産生機構を保有する腸内細菌(*E. faecalis*)がこの機構を作動させて ATP を産生。④その際、アグマチンを取り込み、副産物としてプトレッシンを菌体外に放出される。

産物としてアグマチンを菌体外に放出)と、*E. faecalis* が保有するアグマチンを利用した ATP 産生機構により、副産物としてプトレッシンが腸内環境中に放出されるという、異菌種間の独立した代謝経路が合わさった経路である。また、この機構に関与する腸内細菌はヒト腸内で普遍的に存在する可能性も糞便培養と *in silico* 解析で認めた<sup>6)</sup>。

### 3. マウスにおける健康寿命伸長効果

14ヶ月齢マウス(日本人平均寿命換算で約50歳)にピフィズス菌 LKM512 と Arg を長期併用経口投与した結果、寿命伸長が認められた<sup>4)</sup>。我々以外の複数の研究グループもポリアミン含有飼料でマウス寿命伸長効果を報告しており<sup>7)</sup>、外因性ポリアミン供給が寿命伸長効果を有することはほぼ確実と考えられる。また、モリス水迷路試験による空間認識・学習記憶力の測定を行った結果、投与開始前に群間差は無かったが、投与6ヶ月後には Arg と LKM512 併用投与群の成績が有意に高くなり、加齢時の学習記憶力への有効性が示された<sup>4)</sup>。

### 4. 血管内皮機能をターゲットとしたヒト臨床試験

上述の腸内ポリアミン増強技術を反映させた食品を用いて、ポリアミンの有するオートファジー促進作用および抗炎症作用と直接的に関わっている血管内皮機能を標的とした臨床試験を行った。血管内皮機能障害は、動脈硬化症の初期症状で、この段階での治療介入や生活習慣の改善により回復が可能と考えられている。BMI が高めの健常成人(平均年齢45歳)を対象に、糞便ポリアミン濃度上昇が認められる量のピフィズス菌 LKM512 と Arg を含有したヨーグルト(LKM512+Arg YG)による12週間の無作為化二重盲試験を実施した<sup>8)</sup>。その結果、LKM512+Arg YG 群ではプラセボ群と比較して、血管内皮機能(反応性充血指数)の改善が認められ、動脈硬化症予防への有効性が示された。これを裏付けるように、収縮期血圧および血小板数の改善も認められた。また、LKM512+Arg YG 群ではプラセボ群と比較し、糞便中プトレッシン濃度が有意に高く、同時に血清スベルミジンが有意に高濃度であった。これらの結果は、LKM512+Arg YG の摂取により腸内でプトレッシンが生合成され生体に吸収され、生体内でプトレッシンより変換されたスベルミジンの作用により血管内皮機能が改善したことを示唆している。我々が知る限り、動脈硬化症予防食品として血中脂質等の改善を示した食品素材やプロバイオティクスは複数存在するが、病態と直接的に関連している血管内皮機能に有効性を示した報告は存在しない。従って、新しいタイプの動脈硬化症予

防食品の完成といえる。本ヨーグルトは2019年10月より販売している。

### おわりに

一連の研究は、メタボロミクスを用いて糞便中代謝産物を解析する基礎研究データを基盤に、腸内ポリアミン産生物質の探索研究、マウスを用いた評価研究、食品化のための技術開発を行った応用研究、この技術のメカニズムを遺伝子レベルで解明した基礎研究を経て、臨床試験で狙い通りの成果を得た経緯を有する。これが、科学的根拠を有する機能性食品の開発を目指す企業における基礎研究から応用研究そしてアウトプットまでの新しい研究開発ストラテジーの提示となれば嬉しい。

### (引用文献)

- 1) Matsumoto M et al. Impact of intestinal microbiota on intestinal luminal metabolome. *Sci. Rep.* 2: 233 (2012).
- 2) Matsumoto M et al. Cerebral low-molecular metabolites influenced by intestinal microbiota: a pilot study. *Front. Syst. Neurosci.* 7: 9 (2013).
- 3) Matsumoto M et al. Dynamics of fecal microbiota in hospitalized elderly fed probiotic LKM512 yogurt. *Microbiol. Immunol.* 53: 421-432 (2009).
- 4) Kibe R et al. Upregulation of colonic luminal polyamines produced by intestinal microbiota delays senescence in mice. *Sci. Rep.* 4: 4548 (2014).
- 5) Nakamura A et al. Intestinal luminal putrescine is produced by collective biosynthetic pathways of the commensal microbiome. *Gut Microbes* 10: 159-171 (2019).
- 6) Kitada Y et al. Bioactive polyamine production by a novel hybrid system comprising multiple indigenous gut bacterial strategies. *Sci. Adv.* 4: eaat0062 (2018).
- 7) Madeo F et al. Spermidine in health and diseases. *Science* 359: eaan2788 (2018).
- 8) Matsumoto M et al. Endothelial function is improved by inducing microbial polyamine production in the gut: a randomized placebo-controlled trial. *Nutrients* 11: 1188 (2019).

謝辞 本賞にご推薦して頂き、また腸内細菌研究の基盤、自由な発想で研究すること、研究成果を論文にまとめる重要性をご教授賜りました理化学研究所辨野義己先生に深謝致します。研究の基礎と機能性食品の可能性を学生時代に教えて頂いた信州大学名誉教授細野明義先生に御礼申し上げます。一連の研究で常にディスカッションをして頂いた近畿大学栗原新先生に感謝致します。共同研究を実施して頂いた多くの先生方、糞便メタボロミクスの条件検討等でご協力頂きましたヒューマン・メタボローム・テクノロジーズ株式会社、臨床試験で注文の多いプロトコルに対応して頂きました株式会社アイメックRDに感謝致します。また、アウトプットが不透明な基礎研究段階から商品化まで、約20年にも及ぶ一連の研究を公認して頂き自由に研究できる環境を与えて頂きました協同乳業株式会社の山崎直昭元社長、尾崎玲前社長、後藤正純社長に心より御礼申し上げます。本研究成果は、協同乳業(株)研究所技術開発グループの歴代メンバーのご尽力により得られたものです。ここに改めて感謝の意を表します。本研究で得られた腸内ポリアミン産生促進技術は、農研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支援を受けて得られたものです。

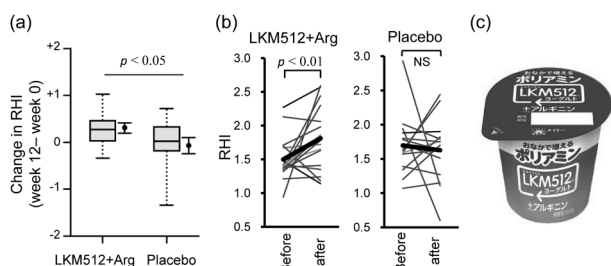


図3. LKM512+Arg ヨーグルトの血管内皮機能への効果 (a) 血管内皮機能(RHI)の変化量。(b) 血管内皮機能(RHI)の群内変化。黒太線は平均値を表す。RHI: Relative hypertension index, 反応充血指数。(c) 商品化したヨーグルト。