

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 10 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H02441

研究課題名(和文)腸内細菌脂質代謝の解析に基づく新規機能性脂質の創出

研究課題名(英文) Analysis and application of lipid metabolisms in gut microorganisms for creation of novel functional lipids

研究代表者

小川 順 (Jun, Ogawa)

京都大学・農学研究科・教授

研究者番号：70281102

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 32,600,000円

研究成果の概要(和文)：食事由来の不飽和脂肪酸が腸内細菌により飽和化されることを見いだした。本代謝の中間体として水酸化脂肪酸、オキソ脂肪酸などを同定し、これらの脂肪酸の宿主組織における存在を確認した。また、これらの代謝中間体に様々な生理機能を見いだした。リノール酸由来の水酸化脂肪酸は、腸管バリアを保護する機能を有した。他にも、水酸化脂肪酸、オキソ脂肪酸が、PPARs、LXR、TRPV1、GPR40、GPR120を介して宿主の代謝や生理に影響を与えていることが見いだされた。これらの知見は、腸内細菌が脂質代謝を介してヒトの健康に影響を与えている可能性を示している。

研究成果の概要(英文)：Polyunsaturated fatty acids derived from dietary lipids were found to be saturated by gut microbes with hydroxy, oxo, and conjugated fatty acids as intermediates. We confirmed the existence of these fatty acids in host tissues depending on the existence of gut microbes and evaluated their physiological activity. An initial hydroxy fatty acid metabolite of linoleic acid, contributed to recovery from damage to the intestinal epithelial barrier. Furthermore, hydroxy fatty acids and oxo fatty acids controlled host metabolisms and physiologies through interactions with nuclear receptors, such as PPARs and LXR, TRPV1 and GPRs (GPR40 and GPR120). These observations suggest that the fatty acid molecular species formed specifically in the intestinal tract by gut microbial metabolism can influence the health of the host. These findings revealed that it is possible to enhance health by controlling gut microbial fatty acid metabolism and the fatty acid composition of dietary lipids.

研究分野：応用微生物学

キーワード：腸内細菌 脂質代謝 乳酸菌 機能性脂質 プロバイオティクス

1. 研究開始当初の背景

腸内細菌が健康に与える影響に関心が集まっている。一方、肥満に伴う生活習慣病の増加から脂質代謝改善が望まれており、未開拓であった腸内細菌脂質代謝の解明が急務となってきた。これまでの代謝解析はヒト代謝に基づく既知代謝産物の化合物構造情報に基づいており、腸内細菌に特異な代謝産物を見逃していた。ところが近年、腸内細菌の健康への関与が、これらの特異な代謝物の特徴的な生理機能を介したものである例が見いだされてきている。

2. 研究の目的

本研究では、申請者らが新たに見いだした腸内細菌における不飽和脂肪酸飽和化代謝の解析を基軸に、腸管内脂質代謝制御による新たな健康増進基盤の確立を目指す。

3. 研究の方法

新規な代謝産物の同定と宿主組織における分布の解析、代謝産物の生理機能解析に取り組む、これらの研究により、生活習慣病などの予防・治療に有効な、新たな機能性脂質、プロバイオティクスを創出する。

4. 研究成果

(1) 腸内細菌における脂質代謝の解析

乳酸菌 *Pediococcus* sp. AKU 1080 における脂肪酸代謝を解明すべく、リノール酸を基質とする反応に供したところ、3種類の水酸化脂肪酸が生成した。得られた水酸化脂肪酸を分取・精製し、GC-MS, NMR 分析等に供した結果、10-hydroxy-*cis*-12-octadecenoic acid、13-hydroxy-*cis*-9-octadecenoic acid 及び 10,13-dihydroxy-octadecanoic acid と同定した (図1)。

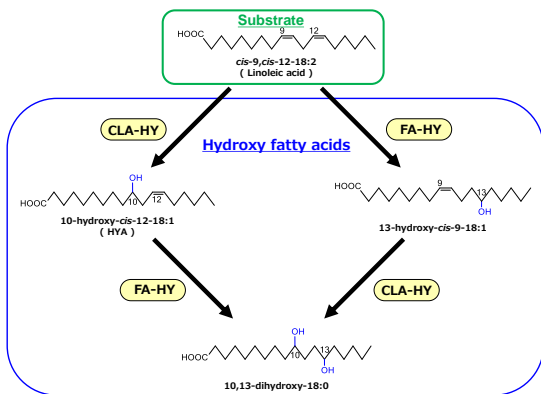


図1. 乳酸菌 *Pediococcus* sp. AKU 1080 におけるリノール酸代謝

本反応を詳細に検討したところリノール酸のΔ9位を水和する酵素とΔ12位を水和する酵素の異なる2つの水和酵素の関与が示唆された。また、本菌はリノール酸同様に分子内にΔ9位とΔ12位のシス型二重結合を有するα-リノレン酸、γ-リノレン酸、ステアリド酸にも作用し、それぞれに対応した水酸化脂肪酸を生成する事を明らかにした。

(2) 代謝物の生理機能解析

① 10-hydroxy-*cis*-12-octadecenoic acid (HYA) の腸管バリア保護機能

HYA の腸管バリア保護機能メカニズムを明らかにするために、MAPK 経路との関わりに着目して検討を行った。HYA は、MAPK 経路の一つである ERK のリン酸化を促進した。一方、p38 や JNK のリン酸化には影響を与えなかった。また、GW1100 (GPR40 antagonist) 存在下では、HYA による ERK リン酸化が消失したことから、HYA は GPR40 を介して ERK をリン酸化することが明らかとなった。さらに、HYA は IFN-γ によって誘導された TNFR2 発現を抑制したが、U0126 (MEK inhibitor) の共存によってその効果が消失した。これらの知見は、HYA が GPR40/MEK-ERK を介して TNFR2 発現を制御し、腸管バリア保護効果を発揮することを示唆している (図2)。

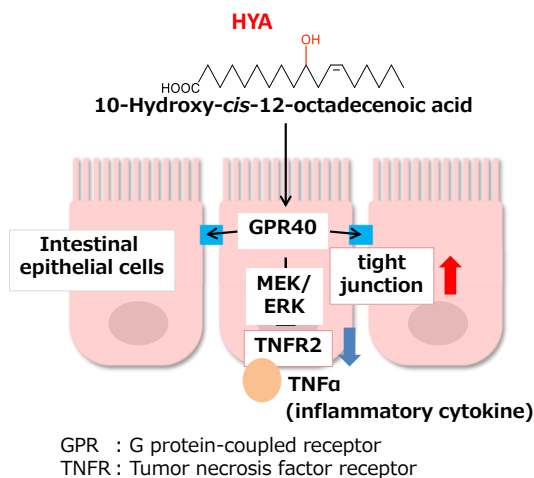


図2. HYA の腸管バリア保護機能メカニズム

② Transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) に着目した検討

TRPV1 に着目した検討を行った。TRPV1 は交感神経活性化を介してエネルギー代謝を亢進することから、肥満や生活習慣病の予防において有効な標的分子であると考えられており、近年では他の食品成分によっても活性化されることが報告されている。そこで、本研究では食餌脂肪酸の乳酸菌代謝物の TRPV1 活性化能及び、それを介した生体内でのエネルギー消費亢進作用について検討した。

TRPV1 活性化作用について、培養細胞を用

いたカルシウムイメージングにより評価したところ、食餌脂肪酸乳酸菌代謝物のうち、リノール酸由来の代謝物、10-keto-12-*cis*-octadecenoic acid (KetoA) が最も強い活性化能を有することが示唆された。

### ③ KetoA の TRPV1 を介したエネルギー代謝亢進作用の検討

KetoA の TRPV1 を介したエネルギー代謝亢進作用を動物個体レベルで検討した。

食餌誘導性肥満モデル動物である C57BL/6 マウスに対する 10 週間の混餌投与を行った結果、0.1%KetoA 摂取群において、体重増加抑制・体脂肪蓄積抑制作用およびインスリンやレプチンなどの血中パラメータの改善が認められた。また、酸素消費量および直腸温の上昇が認められた。褐色脂肪組織などにおいてエネルギー消費に重要な脱共役タンパク質 1 (UCP1) 発現量について検討したところ、KetoA 摂取群において、鼠径部白色脂肪組織における UCP1 発現量の増加が認められた。一方、TRPV1 ノックアウトマウスでは KetoA 摂取による上記の変化はいずれも認められなくなった。従って、KetoA 摂取は TRPV1 活性化を介してエネルギー消費を亢進させ、肥満に伴う代謝異常症の予防・改善作用を示すことが示唆された (図 3)。

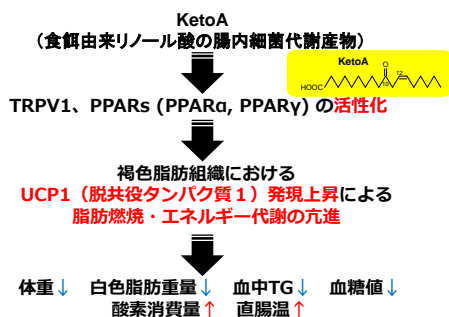


図 3. KetoA のエネルギー代謝亢進作用

### (3) 新規機能性脂肪酸の生産プロセス開発

#### ① HYA 生産プロセスの開発

*Lactobacillus plantarum* AKU 1009a 由来水和酵素 CLA-HY を大量発現する形質転換大腸菌を作製し、その洗浄菌体を触媒として用いた。油脂、洗浄菌体の共存下においてリパーゼを添加し反応時間ごとに水酸化脂肪酸の生産量を評価した。リノール酸を含有する油脂を基質とし、7 種類のリパーゼの加水分解能を調べた結果、Lipase AY 30 が最も高い加水分解能を示した。1 ml の反応系において、小麦胚芽油 500 mg、洗浄菌体 (湿菌体 200 mg) の共存下 Lipase AY 30 を 0.5 mg を添加した時に水酸化脂肪酸の生産量が最大となった。反応温度 37°C さらに 4°C と変化させることにより、リノール酸含有油脂から変換率 88% (対リノール酸変換率) で HYA を

得た。

### (4) 機能性脂肪酸の選抜とデザイン

① HYA 含有トリアシルグリセロールの開発  
血糖値上昇抑制機能、抗炎症機能などを示す代謝物 HYA に関し、HYA を構成脂肪酸として含有するトリアシルグリセロール (TG) をデザインし合成法を検討した。

食品製造工程に使用可能なリパーゼに、植物油、遊離型の HYA を 30%程度含有する遊離脂肪酸混合物を加え、ヘキサン存在下でアシル基転移反応を行った。*Rhizomucor miehei* 由来の固定化リパーゼを用いた場合に高いアシル基転移活性を認め、至適条件下、反応後の TG における HYA 含有率は 35%程度まで向上した。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 19 件)

- ① Hirata, A., S. Kishino, S.B. Park, M. Takeuchi, N. Kitamura, J. Ogawa. "A novel unsaturated fatty acid hydratase toward C16 to C22 fatty acids from *Lactobacillus acidophilus*." *J. Lipid Res.*, 56, 1340-1350 (2015)  
DOI:10.1194/jlr.M059444
- ② Nanthirudjanar, T., H. Furumoto, J. Zheng, Y.L. Kim, T. Goto, N. Takahashi, T. Kawada, S.B. Park, A. Hirata, N. Kitamura, S. Kishino, J. Ogawa, T. Hirata, T. Sugawara. "Gut microbial fatty acid metabolites reduce triacylglycerol levels in hepatocytes." *Lipids*, 50, 1093-1102 (2015) DOI:10.1007/s11745-015-4067-z
- ③ Takeuchi, M., S. Kishino, S.B. Park, N. Kitamura, J. Ogawa. "Characterization of hydroxy fatty acid dehydrogenase involved in polyunsaturated fatty acid saturation metabolism in *Lactobacillus plantarum* AKU 1009a." *J. Mol. Catal., B Enzym.* 117, 7-12 (2015)  
DOI:10.1016/j.molcatb.2015.03.020
- ④ Takeuchi, M., S. Kishino, A. Hirata, S.B. Park, N. Kitamura, J. Ogawa. "Characterization of the linoleic acid  $\Delta 9$  hydratase catalyzing the first step of polyunsaturated fatty acid saturation metabolism in *Lactobacillus plantarum* AKU 1009a." *J. Biosci. Bioeng.*, 119, 636-641 (2015)  
DOI:10.1111/jam.13088
- ⑤ Furumoto, H., T. Nanthirudjanar, T. Kume, Y. Izumi, S.B. Park, N. Kitamura,

- S. Kishino, J. Ogawa, T. Hirata, T. Sugawara.  
 "10-Oxo-*trans*-11-octadecenoic acid generated from linoleic acid by a gut lactic acid bacterium *Lactobacillus plantarum* is cytoprotective against oxidative stress." *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 296, 1-9 (2016) DOI:10.1016/j.taap.2016.02.012
- ⑥ Takeuchi, M., S. Kishino, S.B. Park, N. Kitamura, H. Watanabe, A. Saika, M. Hibi, K. Yokozeki, J. Ogawa. "Production of dicarboxylic acids from novel unsaturated fatty acids by laccase-catalyzed oxidative cleavage." *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 80, 2132-2137 (2016) DOI:10.1080/09168451.2016.1200457
- ⑦ 小川順, 岸野重信. "腸内細菌の脂肪酸代謝と代謝産物の生理機能." *The Lipid*, 27, 27-31 (2016)
- ⑧ 本郷翔子, 森本育美, 山上小百合, 古田美咲, 滝澤祥恵, 井上飛鳥, 青木淳賢, 東山繁樹, 吉田守克, 宮里幹也, 岸野重信, 小川順, 中田理恵子, 井上裕康. "長鎖不飽和脂肪酸とその腸内細菌代謝物による GPR120 活性化の検討." *脂質生化学研究*, 58, 53-54 (2016)
- ⑨ 米嶋靖記, 岸野重信, 小川順. "腸内細菌が作る機能性脂肪酸「HYA」の効果." *メディカル・サイエンス・ダイジェスト*, 42, 40-44 (2016)
- ⑩ 小川順, 岸野重信. "総説・腸内細菌と栄養代謝." *栄養 Trends of Nutrition*, 2, 16-19 (2017)
- ⑪ Kaikiri, H., J. Miyamoto, T. Kawakami, S.B. Park, N. Kitamura, S. Kishino, Y. Yonejima, K. Hisa, J. Watanabe, T. Ogita, J. Ogawa, S. Tanabe, T. Suzuki. "Supplemental feeding of a gut microbial metabolite of linoleic acid, 10-hydroxy-*cis*-12-octadecenoic acid, alleviates spontaneous atopic dermatitis and modulates intestinal microbiota in NC/Nga mice." *Int J Food Sci Nutr.*, 68, 941-951 (2017) DOI: 10.1080/09637486.2017.1318116
- ⑫ Kim, M., T. Furuzono, K. Yamakuni, Y. Li, Y. I. Kim, H. Takahashi, R. Ohue-Kitano, H.F. Jheng, N. Takahashi, Y. Kano, R. Yu, S. Kishino, J. Ogawa, K. Uchida, J. Yamazaki, M. Tominaga, T. Kawada, T. Goto. "10-oxo-12(*Z*)-octadecenoic acid, a linoleic acid metabolite produced by gut lactic acid bacteria, enhances energy metabolism by activation of TRPV1." *FASEB J.*, 31, 5036-5048 (2017) DOI:10.1096/fj.201700151R
- ⑬ 岸野重信, 小川順. "乳酸菌に特異な脂肪酸代謝と代謝産物の生理機能について." *日本乳酸菌学会誌*, 28, 58-65 (2017)
- ⑭ 高橋信之, 上原万里子, 岸野重信, 小川順, 河田照雄. "特集腸内細菌-糖尿病・肥満にまつわる 10 topics II 各論-トピック 10- PPAR $\alpha$  活性化による食後高脂血症改善作用と腸内細菌叢." *糖尿病診療マスター*, 15, 520-524 (2017)
- ⑮ Yang, H.E., Y. Li, A. Nishimura, H.F. Jheng, A. Yuliana, R. Kitano-Ohue, W. Nomura, N. Takahashi, C.S. Kim, R. Yu, N. Kitamura, S.B. Park, S. Kishino, J. Ogawa, T. Kawada, T. Goto. "Synthesized enone fatty acids resembling metabolites from gut microbiota suppress macrophage-mediated inflammation in adipocytes." *Mol Nutr Food Res*, 61, 1700064 (2017) DOI:10.1002/mnfr.2017000
- ⑯ 米嶋靖記, 岸野重信, 小川順. "腸内細菌が作る機能性脂肪酸「HYA」の効果" *アレルギーの臨床*, 37(12), 80-84 (2017)
- ⑰ 岸野重信, 小川順. "腸内細菌が作る修飾脂肪酸について" *化学工業*, 69, 7-13 (2018)
- ⑱ Ohue-Kitano, R., Y. Yasuoka, T. Goto, N. Kitamura, S.B. Park, S. Kishino, I. Kimura, M. Kasubuchi, H. Takahashi, Y. J. Li, Y. S. Yeh, H.F. Jheng, M. Iwase, M. Tanaka, S. Masuda, T. Inoue, H. Yamakage, T. Kusakabe, F. Tani, A. Shimatsu, N. Takahashi, J. Ogawa, N. Satoh-Asahara, T. Kawada. " $\alpha$ -Linolenic acid-derived metabolites from gut lactic acid bacteria induce differentiation of anti-inflammatory M2 macrophages through G protein-coupled receptor 40." *FASEB J.*, 32, 304-318 (2018) DOI: 10.1096/fj.201700273R
- ⑲ Sulijaya, B., N. Takahashi, M. Yamada, M. Yokoji, K. Sato, Y. Aoki-Nonaka, T. Nakajima, S. Kishino, J. Ogawa, K. Yamazaki. "The anti-inflammatory effect of 10-oxo-*trans*-11-octadecenoic acid (KetoC) on RAW 264.7 cells stimulated with *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide." *J. Periodont. Res.*, in press, (2018) DOI: 10.1111/jre.12564
- [学会発表] (計 21 件)
- ① 竹内道樹, 岸野重信, 朴時範, 北村苗穂子, 日比慎, 小川順. ラッカーゼによる水酸化脂肪酸及びオキソ脂肪酸のジカルボン酸への変換, 日本生物工学会第 67 回大会, 2015 年, 鹿児島

- ② 古菌智也、後藤剛、山國加成衣、金英一、金みんじ、北村苗穂子、朴時範、岸野重信、内田邦敏、高橋信之、小川順、富永真琴、河田照雄、食餌脂肪酸の腸内細菌代謝物摂取は肥満に伴う代謝異常症を改善する、日本農芸化学会 2016 年度大会、2016 年、札幌
- ③ 宮本潤基、長谷川沙恵、粕渕真由、岸野重信、米島靖記、菅原達也、小川順、木村郁夫、腸内細菌脂肪酸代謝物 10-hydroxy-*cis*-12-octadecenoic acid (HYA)による腸管ホルモン分泌系を介した代謝改善機能評価、日本農芸化学会 2016 年度大会、2016 年、札幌
- ④ 朴時範、岸野重信、竹内道樹、米島靖記、小川順、乳酸菌由来水和酵素を活用したリノール酸含有油脂からの水酸化脂肪酸生産、日本農芸化学会 2016 年度大会、2016 年、札幌
- ⑤ 田辺香緒里、岸野重信、北村苗穂子、竹内道樹、小川順、*Pediococcus* 属乳酸菌による水酸化脂肪酸生産、日本農芸化学会 2016 年度大会、2016 年、札幌
- ⑥ 中辻亮太、岸野重信、米島靖記、小川順、脂質代謝異常症改善に有用な 10-oxo-*cis*-12-octadecenoic acid を生産する微生物の探索、日本農芸化学会 2016 年度大会、2016 年、札幌
- ⑦ 竹内道樹、岸野重信、北村苗穂子、日比慎、小川順、ラッカーゼ-メディエーターシステムが触媒する酸化的開裂反応による水酸化脂肪酸及びオキソ脂肪酸からのジカルボン酸の生産、日本農芸化学会 2016 年度大会、2016 年、札幌
- ⑧ 吉井未貴、岸野重信、植田和光、小川順、松尾道憲、乳酸菌由来脂肪酸によるコレステロールトランスポーター ABCA1 と ABCG1 の活性化、日本農芸化学会 2017 年度大会、2017 年、京都
- ⑨ 西岡杏菜、斎藤貴将、岸野重信、植田和光、小川順、松尾道憲、乳酸菌由来脂肪酸によるマクロファージにおける炎症抑制作用の解析、日本農芸化学会 2017 年度大会、2017 年、京都
- ⑩ 宮本潤基、粕渕真由、中島啓、米島靖記、岸野重信、入江潤一郎、菅原達也、有田誠、小川順、伊藤 裕、木村郁夫、腸内細菌脂肪酸代謝物の代謝改善作用、日本農芸化学会 2017 年度大会、2017 年、京都
- ⑪ 岸野重信、雑賀あずさ、谷実歩、小川順、10-hydroxy-octadecanoic acid の酵素的脱水反応における *cis/trans* 異性体制御、日本農芸化学会 2017 年度大会、2017 年、京都
- ⑫ Shigenobu Kishino, Kousuke Mihara, Jun Ogawa, Novel conjugated PUFAs produced by anaerobic bacteria via the biohydrogenation of C20 PUFAs, AOCs Annual Meeting, 2017 年、米国
- ⑬ Jun Ogawa, Michiki Takeuchi, Shigenobu Kishino, Polyunsaturated Fatty Acid Saturation Metabolism of Gut Lactic Acid bacteria Affecting Host Health via Bio-active Fatty Acid Generation, The 9th Asian Conference on Lactic Acid Bacteria, 2017 年、韓国
- ⑭ 小川順、竹内道樹、岸野重信、腸内細菌代謝と健康、第 5 回がんと代謝研究会、2017 年、札幌
- ⑮ 米島靖記、岸野重信、小川順、腸内細菌の脂質代謝を活用した新規機能性脂肪酸、第 69 回日本生物工学会大会、2017 年、東京
- ⑯ Jun Ogawa, Riku Usami, Michiki Takeuchi, Shigenobu Kishino, Enzymes from gut microorganisms involved in food component metabolism, 19th Japanese-German Workshop on Enzyme Technology, 2017 年、ドイツ
- ⑰ Jun Ogawa, Michiki Takeuchi, Shigenobu Kishino, Yasunori Yonejima, Enzymes involved in polyunsaturated fatty acid saturation metabolism in lactic acid bacteria and its application for functional lipid synthesis, Enzyme Engineering XXIV, 2017 年、フランス
- ⑱ 小川順、竹内道樹、安藤晃規、岸野重信、食と腸内細菌が維ぐ健康、日本歯周病学会 60 周年記念京都大会、2017 年、京都
- ⑲ 小川順、食・腸内細菌・健康の相関解明を目指した代謝物研究、近畿化学協会 バイオ部会 平成 29 年度 第 2 回例会、2017 年、大阪
- ⑳ 岸野重信、外山大地、嶋田渉、小川順、水酸化脂肪酸を構成脂肪酸として含有するトリアシルグリセロールの合成、日本農芸化学会 2018 年度大会、2018 年、東京
- ㉑ 外山大地、岸野重信、米島靖記、小川順、水酸化脂肪酸をアシル基として有するトリアシルグリセロールの脱酸方法の検討、日本農芸化学会 2018 年度大会、2018 年、東京

[図書] (計 7 件)

- ① Ogawa, J., M. Hibi, S. Kishino. "Chapter 22. Biocatalytic Introduction of Chiral Hydroxy Groups using Oxygenases and Hydratases." Green Biocatalysis, 545-556 (2016)
- ② 小川順, 岸野重信. "第 2 節 腸内細菌と脂肪酸代謝." ヒトマイクロバイオーム研究最前線, 第 2 編 腸内マイクロバイオームの生態と機能, 第 2 章 腸内細菌叢と代謝, 159-167, 服部正平監修, 株式会社エヌ・ティー・エス (2016)

- ③ 岸野重信. "2-5 乳酸菌による機能性脂肪酸生産." 食と微生物の事典・第2章 食材に付加価値をつける微生物, P126-127, 北本勝ひこ・春田伸・丸山潤一・後藤慶一・尾花望・斉藤勝晴編, 朝倉書店 (2017)
- ④ 岸野重信. "4-15 腸内微生物の代謝." 食と微生物の事典・第4章 食とヒト常在微生物, P348-349, 北本勝ひこ・春田伸・丸山潤一・後藤慶一・尾花望・斉藤勝晴編, 朝倉書店 (2017)
- ⑤ Ogawa, J. M. Takeuchi, S. Kishino. "Hydratase, Dehydrogenase, Isomerase, and Enone Reductase Involved in Fatty Acid Saturation Metabolism" Lipid Modification by Enzymes and Engineered Microbes, Chapter 6, 119-137, Edited by Uwe T. Bornscheuer, AOCs press, (2018)
- ⑥ 小川順, 岸野重信, 米島靖記. "乳酸菌の脂肪酸変換機能とその産業利用" 酵母菌・麹菌・乳酸菌の産業応用展開, pp. 193-200, 五味勝也, 阿部敬悦監修, シーエムシー出版 (2018)
- ⑦ 米島靖記, 小川順, 岸野重信. "第14章 乳酸菌を利用した機能性脂肪酸" 腸内細菌の応用と市場, pp. 38-46, シーエムシー出版, (2018)

[産業財産権]

- 出願状況 (計0件)  
○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.hakko.kais.kyoto-u.ac.jp/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小川 順 (OGAWA, Jun)  
京都大学・大学院農学研究科・教授  
研究者番号：70281102

(2) 研究分担者

後藤 剛 (GOTO, Tsuyoshi)  
京都大学・大学院農学研究科・准教授  
研究者番号：11550311

岸野 重信 (KISHINO, Shigenobu)  
京都大学・大学院農学研究科・助教  
研究者番号：40432348

菅原 達也 (SUGAWARA, Tatsuya)  
京都大学・大学院農学研究科・教授  
研究者番号：70378818

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者  
なし