

令和元年6月14日現在

機関番号：34509

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15271

研究課題名(和文) 酢酸摂取が腸内細菌叢構成に与える影響に関する研究

研究課題名(英文) Effect of acetic acid administration on the composition of gut microbiota

研究代表者

吉村 征浩 (Yoshimura, Yukihiro)

神戸学院大学・栄養学部・准教授

研究者番号：60455566

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：近年、腸内細菌叢が産生した短鎖脂肪酸(SCFA)が宿主の健康状態に非常に重要な役割を担うことが明らかとなっている。SCFAのうち、酢酸を摂取すると生活習慣病の予防に役立つことが示されており、そのような酢酸の機能性は、酢酸代謝および受容体を介したシグナル伝達により発揮されると考えられている。本研究では、酢酸摂取が宿主の腸内細菌叢構成に与える影響を明らかにすることを目的とした。酢酸をSDラットに摂取させると、腸内細菌叢構成が明確に変化することが細菌の16S rRNAのPCR-DGGE法による解析で明らかとなり、メタゲノム解析によって、ある種の乳酸菌が酢酸摂取によって有意に増加することが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、酢酸摂取が腸内細菌叢構成を変化させ、ある種の乳酸菌が増加することを明らかとした。この種は、マウスにおいて、免疫応答の抑制的制御や0157大腸菌感染による大腸炎抑制に関する制御性T細胞の分化を促進することが示されており、酢酸摂取がアレルギー症状の緩和や大腸炎を予防する可能性を示唆している。また、本研究において、糞便から摂取した酢酸(安定同位体ラベルのd4酢酸)が検出できなかったことから、摂取酢酸は速やかに吸収され、腸管まで到達できないことをあらためて示した。腸管に到達することがない酢酸がどのような機構を介して宿主の腸内細菌叢構成を調整しているのに興味を持たれる。

研究成果の概要(英文)：Recently, the evidences have been revealed that short-chain fatty acid (SCFA) produced by gut microbiota plays important roles in host physiology. The acetic acid intake helps the prevention of the lifestyle-related disease. Mechanisms underlying the effect may be caused through the metabolism of acetic acid and the signal transduction of receptors called GPR43. Aim of this study is to reveal the effect of acetic acid intake on composition of host gut microbiota. PCR-DGGE using fecal bacterial 16S rRNA gene revealed that the composition of fecal microbiota from SD-rats which were administered acetic acid was different from that of control rats. Metagenome analysis of fecal microbiota showed that the abundance of *Lactobacillus* sp. significantly increased by intake of acetic acid.

研究分野：食品機能学

キーワード：酢酸 腸内細菌叢 *Lactobacillus*属

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

腸内細菌叢を良好に保つことは健康長寿を達成する上で重要である。

近年の分子生物学的手法を用いた腸内細菌の解析から、哺乳類の腸管には約 1,000 種、あるいはそれ以上の細菌種が宿主と相互作用しながら増殖しており、これらは全体として腸内細菌叢と呼ばれている。腸内細菌叢は宿主の状態（肥満、糖尿病、免疫、ガン、精神疾患、炎症など）に大きな影響を及ぼし、“細菌叢構成の乱れ”は多くの疾患の原因となる可能性が示唆されている。細菌叢構成は様々な要因（例えば食事内容、宿主の遺伝的要因、抗生物質など）により可逆的に変化することが知られており、加えて、腸内細菌叢を移植することで特定の疾患が改善したとの報告も多数ある。従って、腸内細菌叢構成を調節する（整える）ことは多くの疾患に対する予防や治療につながることを期待され、健康長寿の要となると考えられる。

腸内細菌叢が産生する短鎖脂肪酸（SCFA）の重要性と投与酢酸の腸内細菌叢への影響

腸内細菌叢は宿主による消化を免れた未消化物を分解する消化器官様の機能を担い、様々な代謝物を作り出す。哺乳類は食物繊維を消化することができず、食物繊維は腸内細菌叢の作用により主に酢酸、プロピオン酸、酪酸などの短鎖脂肪酸（SCFA）へと変換され、一部の腸内細菌に利用される他、消化管上皮より吸収され、宿主に利用される。近年、腸内細菌叢と宿主との関連において、腸内細菌叢が産生した SCFA が様々な機構を介して、非常に重要な役割を担うことが明らかとなった。例えば、酪酸は大腸上皮細胞のエネルギー源として重要なだけでなく、HDAC 阻害を介して免疫応答の抑制に重要な役割を担う大腸粘膜の制御性 T 細胞 (Treg) の分化誘導に寄与し、大腸の粘膜免疫システムの制御（大腸炎抑制）に関与する(1)。プロピオン酸や酢酸は腸管粘膜における胸腺由来 Treg の維持(2)、好中球のアポトーシスの誘導(3)、腸管上皮のバリア機能制御(4)など宿主免疫に重要な役割を担う。また、SCFA は宿主の食欲や脂肪細胞に作用し、宿主の代謝機能に影響を及ぼすことから、生活習慣病予防としての機能も注目されている。以上のように、腸内細菌叢によって産生される SCFA の宿主への影響を調べた例は多いが、経口投与した酢酸などの SCFA が、腸内細菌叢へ及ぼす影響に関して調べられた例は少ない。そこで本研究では、酢酸摂取が宿主の腸内細菌叢構成に与える影響を明らかにすることを目的とした。

申請者の研究室では、酢酸摂取が生活習慣病予防に役立つことを示してきた(5, 6)。経口摂取した酢酸は血中に移行し、末梢組織細胞表面の受容体（GPR41, GPR43）を介したシグナル伝達により機能を発揮し、加えて、細胞内に取り込まれた酢酸は、アセチル CoA 合成酵素による代謝に伴った AMPK 活性化を介して代謝制御に関与する(7)。また、代謝産物であるアセチル CoA も代謝中間体として重要な役割を担うだけでなく、タンパク質アセチル化を介して転写や酵素活性の調節を担う。酢酸は、以上のような機構を介して機能を発揮していると考えられる。一部の腸内細菌が産生した酢酸や他の SCFA は、腸内環境を弱酸性に変化させ、SCFA をエネルギー源として利用する細菌の生育を促進すると考えられることから、申請者は、摂取した外来性の酢酸も腸内環境並びに腸内細菌叢構成を変化させ、宿主に影響を及ぼしていると考えた。これまでに食物繊維による糞中 SCFA 量並びに腸内細菌叢構成変化の解析例は多く発表されているが、摂取した SCFA の腸内細菌叢構成への影響を調べた例はほとんどない。これは摂取した SCFA の大部分が上部消化管に到達するまでに吸収され、大腸部まで到達するのは微量であるという考えから調査されていないものと考えられる。しかしながら、申請者は、長期間(32 ~ 65 週齢)の酢酸投与(0.3%になるように酢酸を飼育水に添加)がラットの糞中の細菌叢構成を変化させることを確認しており(図 1)、投与酢酸は、ある程度腸内へ到達していると考えている。

研究期間内に明らかにすること

以上のようなことを踏まえ、申請者は 2 年間の研究期間中に、糞中の SCFA を GC-TOFMS により定量し、経口投与された酢酸(重水素酢酸)の腸内到達量を決定する。また、腸内細菌叢構成の変化を、PCR-DGGE 法により定性的に捉え、16S rDNA を標的とした定量的 PCR により属レベルの解析、次世代シーケンサーを用いたメタゲノム解析により種レベルの変化および機能的な変化を定量的に捉え、酢酸投与が宿主の腸内細菌叢構成に与える影響を明らかにする。

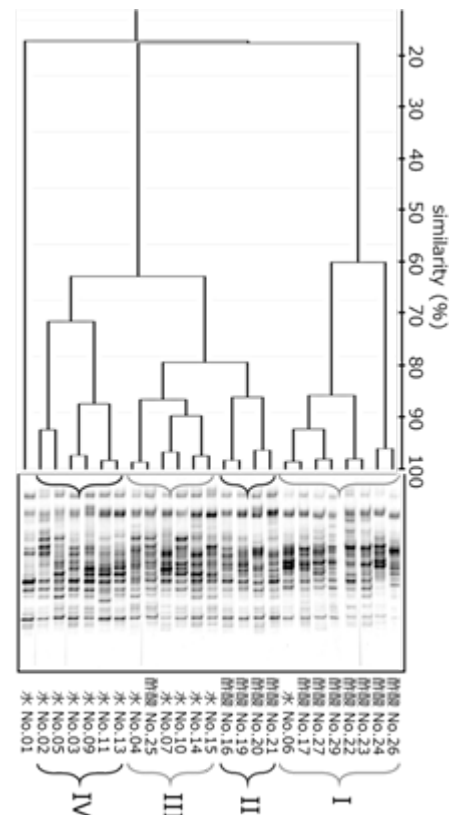


図 1 長期間酢酸投与が腸内細菌叢構成に及ぼす影響 (PCR-DGGE クラスタ解析)

参考文献

- (1)Furusawa, Y., Obata, Y., Fukuda, S. et al. (2013). Nature. 504, 446-450
- (2)Maslowski, K.M., Vieira, A.T., Ng, A. et al. (2009). Nature. 461, 1282-1286
- (3)Smith, P.M., Howitt, M.R., Panikov, N. et al. (2013). Science. 341, 569-573
- (4)Fukuda, S., Toh, H., Hase, K. et al. (2011). Nature. 469, 543-547
- (5)Yamashita, H., Fujisawa, K., Ito, E. et al. (2007). Biosci Biotechnol Biochem. 71, 1236-1243
- (6)Yamashita, H., Maruta, H., Jozuka, M. et al. (2009). Biosci Biotechnol Biochem. 73, 570-576
- (7)Maruta, H., Yoshimura, Y., Araki, A. et al. (2016). PLoS One. 11, e0158055

2. 研究の目的

申請者が所属する研究室では、酢酸の機能性に注目し、酢酸摂取が生活習慣病予防に役立つことを示してきた。そのような酢酸の機能性は、酢酸代謝を介した機構および受容体を介したシグナル伝達により発揮されると考えられているが、申請者は、酢酸が腸内細菌叢構成に影響を与えることも要因の一つであると考えた。本研究では、酢酸摂取が宿主の腸内細菌叢構成に与える影響を明らかにすることを目的とした。本研究においては、安定同位体である酢酸-d4（重水素酢酸）をラットに経口投与し、投与酢酸の腸内到達量を GC-TOFMS により正確に定量し、腸内細菌叢構成の変化を分子生物学的手法およびメタゲノム解析を用いて定量的に捉えることで、酢酸摂取が宿主の腸内細菌叢構成に与える影響を明らかにしたい。

3. 研究の方法

本研究では、酢酸摂取が腸内細菌叢構成に及ぼす影響を明らかにするために、ラットに週 5 日間 1%酢酸（重水素酢酸, 0.5 mL/100 g BW）を胃ゾンデで 1 日 1 回経口投与し、24 時間の糞サンプルを毎週末に回収する（ ）。腸内細菌叢構成の経時変化を解析するため、糞サンプル中の細菌 DNA の 16S rRNA 遺伝子可変領域を PCR により増幅し、分子生物学的手法により定量解析を行う（ 、 ）。また、GC-TOFMS を用いて、糞サンプル中の SCFA を定量することで、酢酸による細菌叢変化と SCFA 量との関連性および腸内到達量を明らかにする（ ）。

平成 29 年度

酢酸投与およびサンプル調製

SD ラット（オス 9 週齢）を購入し、1 週間の予備飼育後、酢酸群と水群に分け（5 個体ずつ）、それぞれ週に 5 日間、1%酢酸（重水素酢酸）もしくは飼育水を体重 100 g あたり 0.5 mL を 1 日 1 回体重測定後に胃ゾンデにより経口投与する（ヒトが飲料として飲むことができる濃度、量を想定）。餌と飲料水は自由摂取とする。毎週末、24 時間に排泄された糞サンプルを回収する。なお、糞中の細菌 DNA は 72 時間の室温放置により変化しないことが先行研究で確かめられている（8）。糞サンプル中の DNA を抽出キットにより抽出し、下記の方法により糞サンプル中の細菌叢 DNA の構成変化を調べ、水群と酢酸群で違いが見られるまで投与を続ける。2 か月程度、違いが生じない場合、結果が出ている長期間の継続投与に切り替える。違いが生じた後、数週間投与をせず糞サンプルを回収し、起こった変化が可逆的な変化であるかどうかを調べる。

PCR-DGGE(Denaturing Gradient Gel Electrophoresis)による腸内細菌叢クラスター解析

得た DNA を鋳型として、5' に GC リッチな配列(GC クランプ)を付加したプライマーを用いて、細菌 16s rRNA 遺伝子の可変領域 V3 を PCR により増幅させる。増幅産物を変性剤(尿素、ホルムアミド)の濃度勾配を作ったアクリルアミドゲルにて 60 温度制御下で電気泳動する。泳動中、増幅産物の GC クランプ以外の部分は解離し、増幅産物は解離部分の DNA 配列の T_m に従ってゲル中の特定の変性剤濃度で泳動が停止する。従って、増幅産物泳動パターンが異なる場合、腸内細菌叢の構成が異なることを意味する。解析ソフト GelJ(9)もしくは市販の解析ソフトを用いて、泳動結果のクラスター解析を行い、各サンプル間の細菌叢構成の差異を分析する。この解析により、腸内細菌叢構成の変化・差異を捉えることができる。また、各群で泳動度の異なる DNA バンドの塩基配列を決定し、Ribosomal Database Project(10)を利用し細菌種の同定を行うことも可能であるが、時間および必要経費の問題から下記の方法で種レベルの解析を行う。

GC-TOFMS による糞サンプル中の SCFA 定量

糞サンプルの SCFA は、文献(11)に従い 0.5%リン酸溶液中で凍結融解することで抽出し、その後、酢酸エチルによる液液抽出を行い、GC-TOFMS を用いて定量を行う。重水素酢酸を利用するため、投与酢酸と内在性の酢酸を質量の違いにより区別し検出することができ、摂取酢酸の腸到達量および糞中 SCFA 量を同時に定量することができる。

平成 30 年度

リアルタイム PCR による門レベルでの腸内細菌の定量解析

細菌の門レベル、あるいは属・種レベル特異的な 16S rRNA 遺伝子をターゲットとしたプライマーが多数開発されており、それらプライマーを利用し、定量的リアルタイム PCR を行うことで、サンプル中の細菌門もしくは属・種の定量的解析を行う。

メタゲノム解析による細菌叢解析および機能解析

次世代シーケンサーを利用し、16S rRNA PCR 産物の塩基配列を網羅的に解析し、相同性検索および系統分類解析を行い、水群、酢酸群で腸内細菌叢の構成変化を種レベルで定量的に解析する。

参考文献

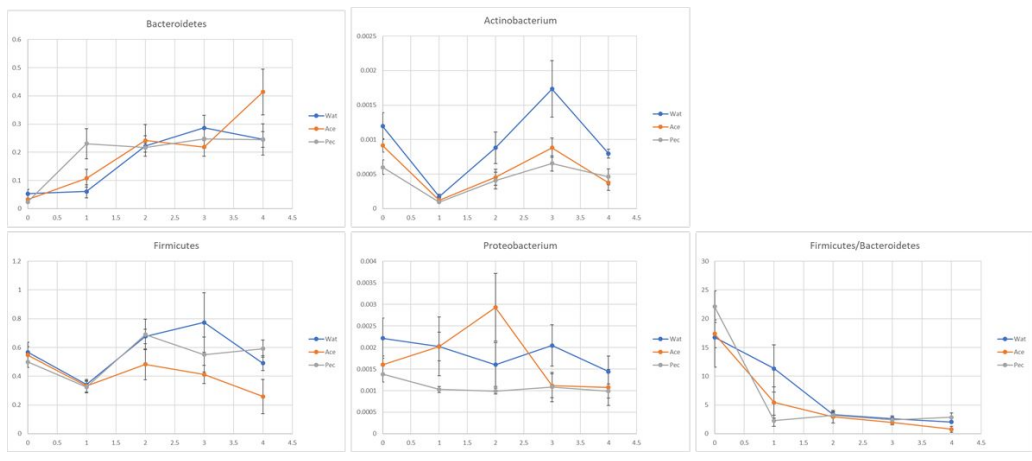
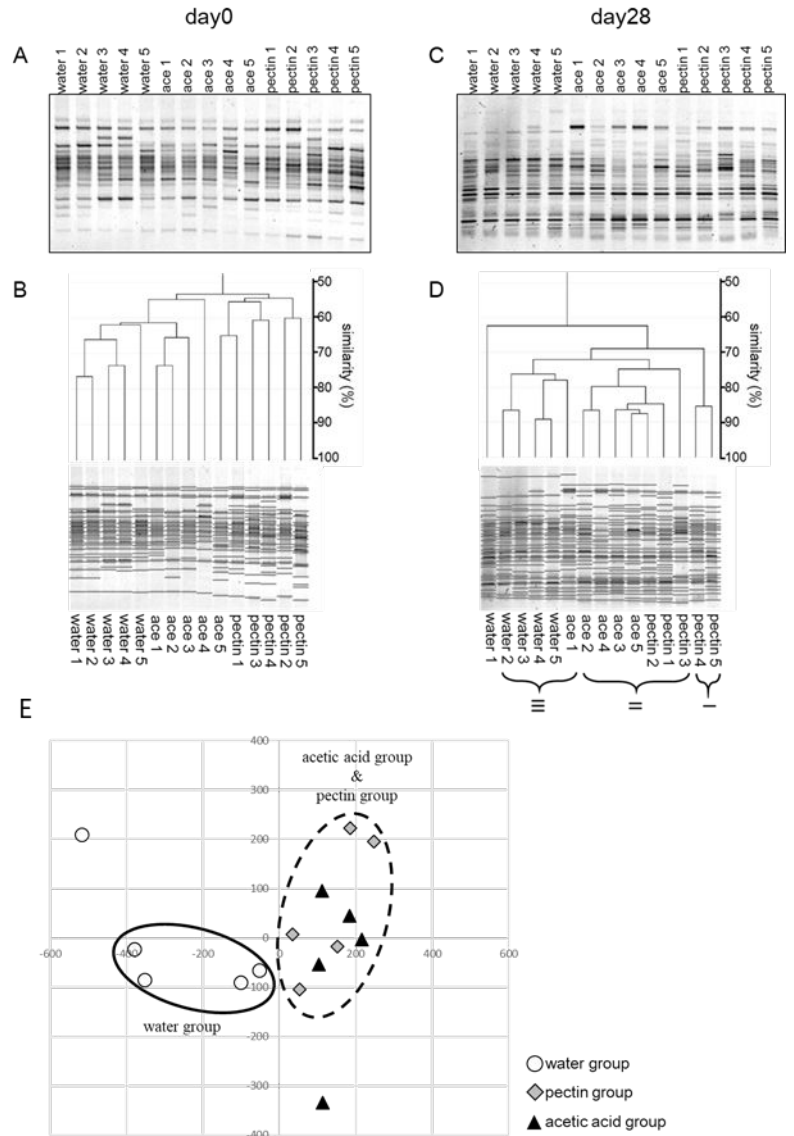
- (8)Heras, J., Dominguez, C., Mata, E. et al. (2015). BMC bioinformatics. 16, 270
- (9)Cole, J.R., Wang, Q., Cardenas, E. et al. (2009). Nucleic acids research. 37, D141-145
- (10)Garcia-Villalba, R., Gimenez-Bastida, J.A., et al. (2012). J Sep Sci. 35, 1906-1913
- (11)Roesch, L.F., Casella, G., Simell, O. et al. (2009). Open Microbiol J. 3, 40-46

4. 研究成果

酢酸摂取が腸内細菌叢構成に与える影響

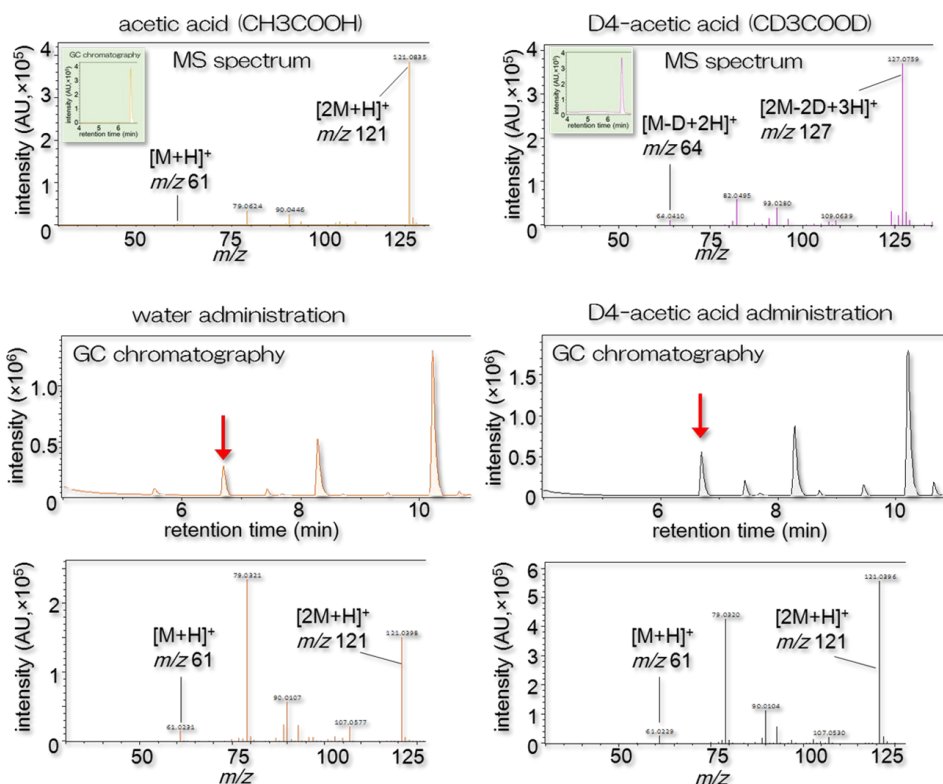
酢酸を摂取させる前の腸内細菌叢構成をPCR-DGGE法により解析すると、各サンプル間の similarity は低く、明確な差は見られなかった(図1A,B)。28日間酢酸あるいはペクチンを摂取させたラットの腸内細菌叢構成を比較したところ、各サンプル間の similarity が高まり、水を飲ませた水群が多いクラスター、酢酸群とペクチン群が混在するクラスター、ペクチン群のみで構成されるクラスターに分かれた(図1C,D)。腸内細菌叢構成のパターンを多次元尺度法により距離に置き換え、2次元上にプロットしたところ、酢酸群およびペクチン群が近くに存在し、水群がそこから離れて存在しているプロット図が得られた(図1E)。このことから、酢酸摂取によりペクチンを摂取した場合と同様な腸内細菌叢の変化が起きていることが示唆された。

次に、酢酸摂取によって腸内細菌叢にどのような変化が起きているかを確かめるため、リアルタイムPCR法により、腸内の優勢門である Bacteroidetes 門、Firmicutes 門、Actinobacterium 門、gammaProteobacterium 門の定量を行った。その結果、28日後において、酢酸群では、水群、ペクチン群と比較して Bacteroidetes 門が増加した。Firmicutes 門は、摂取14日後から酢酸群で低下し、Actinobacterium 門は、水群と比較して、酢酸群、ペクチン群で低い結果となった。肥満と関連性があるとされる Firmicutes 門 / Bacteroidetes 門の比は、摂取7日目に酢酸群とペクチン群で水群と比較して低く、摂取28日後に酢酸群で有意に低くなっていった(図2)。



酢酸摂取による糞中短鎖脂肪酸量の変化

SD ラットへ 1%重水素酢酸 (d4-酢酸、Ace 群) もしくは飼育水 (Wat 群) を体重 100 g あたり 0.5 mL、1 日 1 回体重測定後に胃ゾンデにより、1 か月間にわたり投与した。糞便サンプル中の短鎖脂肪酸解析の結果、d4-酢酸を摂取させた個体の糞便中に存在する酢酸は、分子量が 60 であり、摂取させた d4-酢酸の分子量 64 とは異なることが判明し、摂取させた d4-酢酸の多くは大腸まで到達せず、上部消化管で吸収されていることが示唆された。



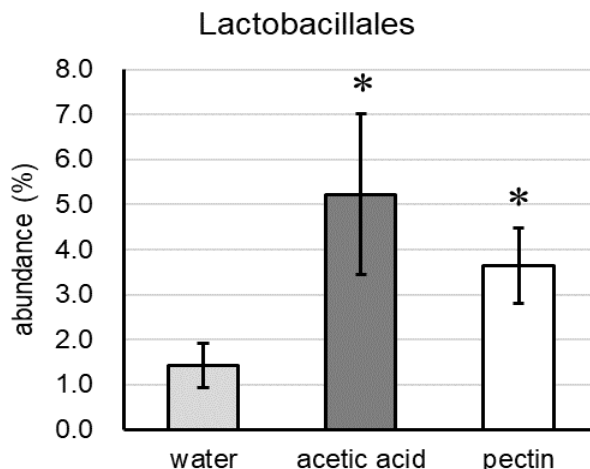
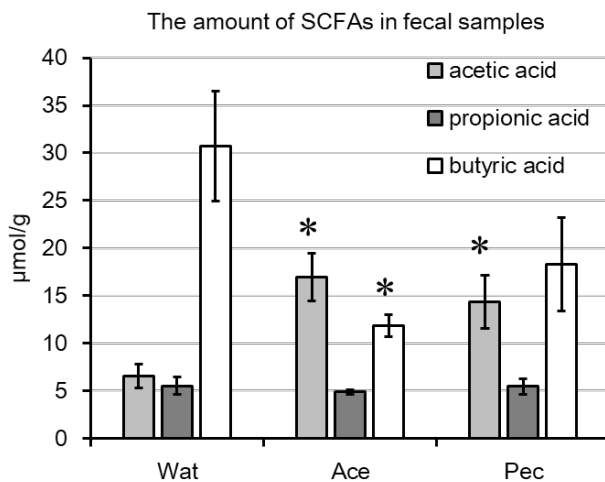
また、Wat 群と比較して Ace 群では統計的に有意に酪酸量が低下し、酢酸量が増加することが分かった。以上のことは、酢酸摂取により腸内細菌叢構成が変化した結果、腸内細菌叢により生成される短鎖脂肪酸分子種が変化することを示唆している。

次世代シーケンサーを用いたメタゲノム解析

次世代シーケンサーを用いた 16S rRNA 遺伝子をターゲットとした腸内細菌叢解析の結果、上位 30 位までの優占種において、酢酸群で *Lactobacillus* 属のある細菌種が有意に増加し、いくつかの未同定の細菌種の増減が見られた。*Lactobacillus* 属の細菌の全体に占める割合を求めたところ、酢酸群と同様にペクチン群においても、水群と比較して有意に増加していることが分かった。

まとめ

本研究では、酢酸摂取が腸内細菌叢構成を変化させるかどうか調べることを目的とした。その結果、酢酸摂取により、腸内細菌叢構成が変化し、特に *Lactobacillus* 属のある細菌種が有意に増加した。この種は、マウスにおいて、免疫応答の抑制的制御や 0157 大腸菌感染による大腸炎抑制に関与する制御性 T 細胞の分化を促進することが示されており、酢酸摂取がアレルギー症状の緩和や大腸



炎を予防する可能性を示唆している。また、本研究において、糞便から摂取した酢酸（安定同位体ラベルの d4 酢酸）が検出できなかったことから、摂取酢酸は速やかに吸収され、腸管まで到達できないことをあらためて示した。腸管に到達することがない酢酸がどのような機構を介して宿主の腸内細菌叢構成を調整しているのか興味を持たれる。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Shuhei Yamada, Nobuhiro Zaima, Yukihiro Yoshimura, Shiori Inaba, Takamichi Fujimori, Tetsuya Sogon, Tatsuya Moriyama, Visualization of the distribution of anthocyanin species in mice eyeball by MALDI-Mass Spectrometry Imaging, Rapid Commun Mass Spectrom, 35, 380-384, 2018, DOI: 10.1002/rcm.8050

Nitta Yoko, Yoshimura Yukihiro, Ganeko Natsuki, Ito Hideyuki, Okushima Nobuyuki, Kitagawa Masaaki, Nishinari Katsuyoshi, Utilization of Ca²⁺-induced setting of alginate or low methoxyl pectin for noodle production from Japonica rice, LWT, 97, 362-369, 2018, DOI: 10.1016/j.lwt.2018.07.027

〔学会発表〕(計 8 件)

井上里加子、小川亜紀、吉村征浩、浅井美穂、住吉和子、入江康至、習慣的甘酒摂取による腸内環境への影響について、第 3 9 回日本臨床栄養学会総会、2017

磯野千晶、近藤千尋、榎岡沙梨、丸田ひとみ、吉村征浩、伊東佳邦、花田恭孝、平澤久紀、三宅剛史、山下広美、瀬戸内海沿岸海域で養殖されたマガキの脂肪酸および遊離アミノ酸含有量の季節変動、第 7 1 回日本栄養・食糧学会大会、2017

丸田ひとみ、吉村征浩、荒木彩、高橋義孝、山下広美、加齢に伴うラット骨格筋における生化学的变化に関する研究、第 7 1 回日本栄養・食糧学会大会、2017

吉村征浩、岩田三有紀、丸田ひとみ、山下広美、酢酸摂取がラットの腸内細菌叢組成に与える影響、第 7 1 回日本栄養・食糧学会大会、2017

吉村征浩、岩田三有紀、山下広美、酢酸摂取がラット腸内細菌叢構成に与える影響、第 9 0 回日本生化学会大会、2017

岡本菜瑠、井上里加子、麻野綾香、山辺啓三、小川亜紀、山下広美、吉村征浩、住吉和子、入江康至、米麹甘酒摂取による腸内環境への影響、第 72 回日本栄養・食糧学会大会、2018

井上里加子、山辺啓三、小川亜紀、山下広美、吉村征浩、住吉和子、入江康至、米麹甘酒による便秘改善効果について、第 72 回日本栄養・食糧学会大会、2018

吉村征浩、トリアセチン摂取がラット腸内細菌叢構成に与える影響、中性脂肪学会第 2 回学術集会、2018