

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 14 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24780133

研究課題名(和文)腸内フローラネットワーク解析によるプレバイオティクス効果の解明

研究課題名(英文)Evaluation of the effects of prebiotics on murine gut microbial ecology by multi-omic based network analysis

研究代表者

中西 裕美子(Nakanishi, Yumiko)

慶應義塾大学・政策・メディア研究科・研究員

研究者番号：10614274

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：プレバイオティクスであるラフィノースの効果について、マウスに5%ラフィノース餌を摂食させ、糞便中のメタボローム解析と腸内細菌叢解析を行って評価した。ラフィノース摂食による腸管内のビフィズス菌の増加に関連して、腸管内の代謝物は劇的に変化し、今までに報告のあった乳酸が増加するだけでなく、アミノ酸がラフィノース食により顕著に増加することが明らかとなり、アミノ酸の蓄積が腸管内における栄養状態の改善やプロバイオティクス効果にも関与する可能性が予測された。

研究成果の概要(英文)：Raffinose is a non-digestive prebiotic oligosaccharide that has been reported to significantly increase the number of beneficial gut microbiota, such as Bifidobacterium. The purpose of this study is to evaluate the effects of raffinose dietary supplementation on murine gut microbial ecology using mass spectrometry-based metabolome analysis and analysis of fecal microbial composition using 16S rRNA sequencing. We analyzed male 8-weeks-old BALB/c mice that were fed a diet containing 5% raffinose for a week. Murine fecal metabolites were dramatically changed during after intake of raffinose supplemented diet, especially amino acids were significantly increased, indicating that amino acids might be play a role in prebiotic effects of raffinose degradation and fermentation.

研究分野：メタボロミクス

キーワード：メタボローム 腸内細菌 プレバイオティクス

1. 研究開始当初の背景

プレバイオティクスとは「宿主の健康に有用な腸内細菌を選択的に増殖・活性化させる難消化性食品」であり、オリゴ糖類や、難消化性の食物繊維を指す。オリゴ糖や食物繊維は宿主が分解できないため、腸管内で乳酸菌などの善玉菌が分解・代謝することで、善玉菌が増殖し腸内細菌叢が改善される。腸内細菌叢の改善により、栄養学的、免疫学的な有益な効果が報告されているが、腸内細菌叢の詳細なメカニズムについては報告例が少なく、腸内細菌叢のメカニズム解明と腸内細菌叢の制御法が求められている。そこで、本研究では、腸内細菌由来の代謝物をキャピラリー電気泳動質量分析計(CE-MS)や液体クロマトグラフィー質量分析計(LC-MS)により特定し、マウス腸内細菌のメタボローム解析を行い、同時に、次世代シーケンサーを使用した腸内細菌叢解析を行い、プレバイオティクスによる善玉菌の増殖作用、善玉菌増殖による機能代謝物質の特定を行い、プレバイオティクス効果のメカニズム解明を目指す。

2. 研究の目的

(1)プレバイオティクス投与により変動する腸内細菌と代謝物質の同定

プレバイオティクスの1つであるラフィノースを用いて、マウス実験を行う。ラフィノース摂食群と非摂食群の比較により、ラフィノース摂食により変動する腸内細菌叢と腸内で産生される代謝物質を明らかにする。

(2)腸内細菌叢と代謝物の統合解析

腸内細菌叢データと代謝物データを用い、時系列での腸内細菌と代謝物濃度の変動の関連性を解析する。

3. 研究の方法

(1)Balb/c マウスを用いた動物実験

8 週齢の Balb/c マウスを用意し、通常食群(♀5 匹)、5%ラフィノース食摂食群(♀5 匹)に分け、8 日間飼育し、その間、糞便を経時的に採取した。

(2)メタボローム解析

糞便から代謝物の抽出を行い、CE-MS を用いて水溶性代謝物質を計測し、ラフィノースを含む糖類は LC-MS により計測した。

(3)腸内細菌叢解析

糞便からバクテリアの DNA を抽出し、バクテリアの 16S rRNA 遺伝子の V2-V3 領域を増幅するユニバーサルプライマーを用いて PCR を行い、PCR 産物を次世代シーケンサー 454GSFLXJr (Roche) を用いてシーケンスを行った。

シーケンスデータは解析ソフト QIIME (<http://qiime.sourceforge.net/>) を使用し腸内細菌の同定を行った。

4. 研究成果

(1)メタボローム解析結果

ラフィノースの資化性と糞便中の各糖濃度の変化

投与したラフィノースの資化性を調べるため、ラフィノースを摂食させたマウスの糞便を 1 日ごと採取し、糞便中の糖濃度について LC-MS を用いて測定を行った。ラフィノース摂食後、5 日ほどで糞便中から検出されるラフィノースがほぼ検出限界以下になることが分かった(図 1)。また、ラフィノースを構成する糖である、スクロース、フルクトース、及び、ガラクトースもラフィノースと同様に変動していたため、ラフィノースが分解され、分解物の 2 糖や単糖もそのまま腸内で資化されていることがわかった。また、餌にはラフィノース以外の糖源として、コーンスターチが含まれているため、スターチの分解物である、グルコース、マルトース、マルトトリオースの糞便中濃度を調べたところ、ラフィノースと近い変動であり、ラフィノース摂食によりスターチの資化性も増加していることが分かった。

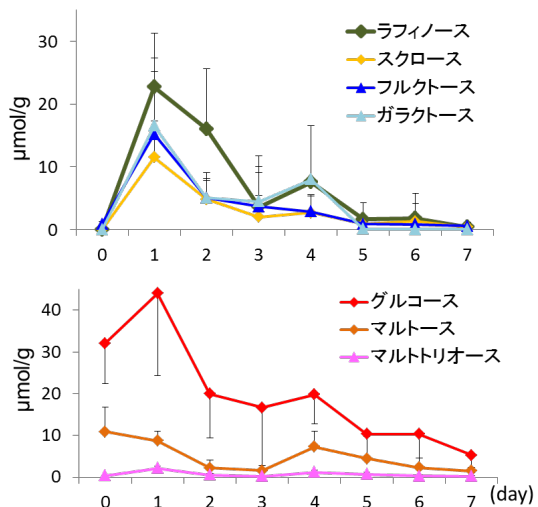


図 1.ラフィノース摂食マウスの糞便中糖濃度の変化

横軸はラフィノースを摂食後の日数。縦軸は糞便中の代謝物濃度。

糞便中代謝物の変動

LC-MS と CE-MS で計測したすべての糞便中代謝物について、Z-score を計算し、K-means クラスタリング法により 5 つのクラスターに分類し変動の傾向を調べた(図 2)。クラスター 1 には一次胆汁酸や有機酸が含まれ、ラフィノース摂食後、減る傾向にあった。クラスター 2、3、4 はラフィノース摂食後 1、2、3 日目で最も蓄積し、以降減る傾向にあった。クラスター 5 の代謝物はアミノ酸、ビタミン、及び、乳酸であり、ラフィノース摂食後 4 日目以降、継続して蓄積することがわかった。これらの代謝物の傾向から、ラフィノース食に変えてまず始めに、ラフィノースの資化を含む糖代謝が変化し、その後、代謝経路としては下流の TCA 回路やアミノ酸代謝

に影響が出ていることが考えられ、ラフィノース摂食により腸内の代謝が劇的に変化していることが明らかになった。

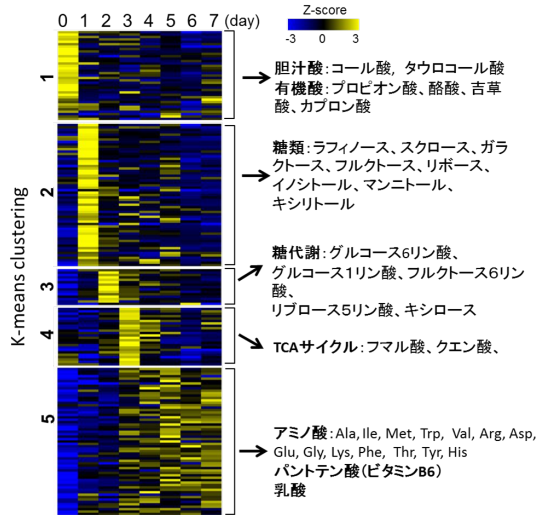


図 2. 糞便中代謝物質の経時変化
各代謝物質の濃度から z-score を計算し、ラフィノース摂食後 0 から 7 日目までの変化を相対的に示した。K-means クラスタリング解析により代謝物の変動傾向を 5 つのクラスターに分類した。それぞれのクラスターに含まれる主な代謝物質について右側に示した。

(2)ラフィノース摂食マウスの腸内細菌叢解析

オリゴ糖であるラフィノースを摂食させると、ビフィズス菌 (*Bifidobacterium* 属の細菌) が増殖することが知られている。ラフィノース摂食後 0~7 日目までの腸内細菌叢を次世代シーケンサーにより網羅的に解析した。その結果、ラフィノース摂食群 5 個体中 4 個体 (図 3b,3c,3d, 及び, 3e) で *Bifidobacterium* 科 (*Bifidobacterium* 属が含まれる) の細菌の増殖が観察されたが、一度増殖してもまた減少する傾向にあり、その結果、5 個体中 2 個体 (図 3b と 3e) で *Bifidobacterium* 科の細菌が 7 日目まで増殖し続ける (定着する) ことが分かった (図 3)。*Bifidobacterium* 科の細菌が定着しない個体では *S24-7* 科の細菌と *Verrucomicrobiaceae* 科の細菌が増殖した。また、*Bifidobacterium* 科の細菌が増殖する個体では、ラフィノース摂食後 3~4 日目に増加してくることが分かった。一方で、*Bifidobacterium* 科の細菌が増殖しない個体では、*Rikenellaceae* 科の細菌が 3~4 日目に増加してくる傾向がみられた。*S24-7* 科の細菌と *Rikenellaceae* 科の細菌は *Bacteroidales* 目に属し、*Bacteroidales* 目の細菌の中には様々な多糖の分解酵素をもつ細菌もいるため、これらの細菌もラフィノースの資化性が高く、*Bifidobacterium* 科の細菌と糖源であるラフィノースの奪い合いになることが予測された。

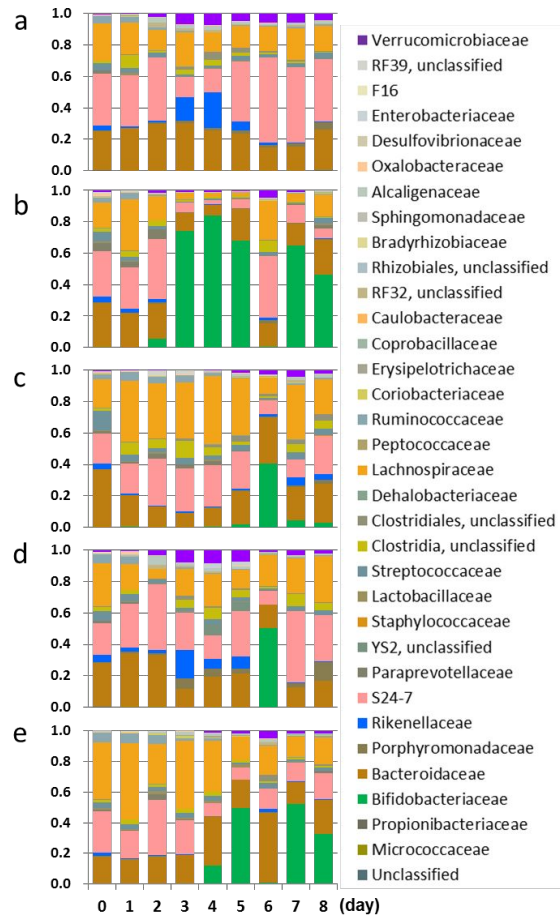


図 3. ラフィノース摂食マウスの腸内細菌叢の変化
グラフの縦軸は各細菌の割合。a~e はマウスの個体。腸内細菌は科レベルでの分類結果である。

(3)ラフィノースのプレバイオティクス効果
メタボローム解析の結果から、*Bifidobacterium* 科の細菌が定着した個体ではラフィノースの分解と共に糞便中の乳酸、アスパラギン酸やグルタミン酸が増加していることがわかった (図 4)。ビフィズス菌は乳酸を多量に産生するため、乳酸の増加は *Bifidobacterium* 科の細菌の増加に起因すると考えられる。ラフィノース摂食マウスは通常食摂食マウスと比較し腸管組織が厚く、腸管も長いことから腸内の栄養状態が改善しているが、これは腸内細菌が産生した乳酸が腸管上皮細胞のエネルギー源として利用されるため、*Bifidobacterium* 科の細菌の定着が栄養状態の改善に寄与している可能性がある。しかし、今回のメタボローム解析の結果から、ラフィノース摂食により糞便中の乳酸だけではなくアミノ酸の増加が顕著に確認されており、アミノ酸の蓄積が腸管内における栄養状態の改善やプロバイオティクス効果にも関与する可能性があることが示唆された。

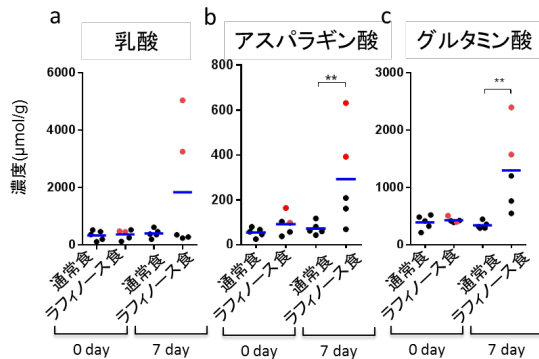


図 4. マウス糞便中の乳酸、アスパラギン酸、及び、グルタミン酸の濃度
各ドットはマウス個体を示し、赤いドットは *Bifidobacterium* 科の細菌が増殖した個体 (図 3b と 3c) であり、黒いドットはそれ以外の個体及び、通常食群の個体を示す。
*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$ (Mann-Whitney の U 検定)

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 0 件)

〔学会発表〕(計 3 件)

中西 裕美子、ラフィノース接食マウスの腸内フローラ解析とメタボローム解析、日本農芸化学会 2013 年度 仙台大会、2013 年 3 月 24 日~2013 年 3 月 28 日、東北大学 川内北キャンパス (仙台)

中西 裕美子、Evaluation of the effects of age on murine gut ecosystems by multi-omics analysis、第 2 回マトリョーシカ型生物学研究会・公開国際シンポジウム、2013 年 7 月 23 日~2013 年 7 月 26 日、ホテル京都ガーデンパレス (京都)

Yumiko Nakanishi、A metabolomics evolution of the effects of raffinose on murine gut microbial ecology、Metabolomics2014、2014 年 6 月 23 日~2014 年 6 月 26 日、マリカホール (山形県鶴岡市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中西 裕美子 (NAKANISHI, Yumiko)
慶應義塾大学・政策・メディア研究科・研究員

研究者番号：10614274

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし