

令和元年6月26日現在

機関番号：23303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K17999

研究課題名(和文)「芳香族アミン類」が形作る宿主-腸内微生物間共生機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of host-intestinal microbial symbiosis mechanism formed by aromatic amines

研究代表者

小柳 喬 (Koyanagi, Takashi)

石川県立大学・生物資源環境学部・准教授

研究者番号：20535041

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)：ドーパミン(DA)は、宿主-腸内細菌相互作用の有力な候補物質の一つである。本研究では、腸内細菌優勢種のうちGAM培地で培養可能な32種についてDA産生能を精査し、腸管内において実際にDA産生を担う菌種の特定を試みた。その結果、DAを著量産生できる菌種は腸球菌 *Enterococcus faecalis* のみであることが明らかになったほか、芳香族アミノ酸脱炭酸酵素ホモログを保持する他の4菌種も少量のDA産生能を示したものの、他の芳香族アミン群と遜色ないDA産生能を示したのは *E. faecalis* のみであった。このことから、本菌種の腸管内におけるDA産生への高い寄与が窺われた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腸内細菌の代謝産物を介した宿主相互作用は、疾病の予防治癒、プロバイオティクスの有用機能解明の観点から益々重要な学問分野となっている。本課題は宿主-微生物応答に関与する物質として芳香族アミン類に着目し、産生菌を正確に特定することにより、新奇な共生メカニズムを解明する点で高い学術的意義をもつものとして遂行した。特にドーパミン(DA)のようなカテコールアミン類は哺乳類の中枢・抹消組織において神経伝達物質・ホルモンとして機能する物質として古くから重要視されており、本研究で明らかになった菌種レベルでの優勢種によるDA産生能は、腸内代謝物と宿主の生理状態の相関解明のうえで極めて重要な知見となる。

研究成果の概要(英文)：Dopamine (DA) is one of the potential candidates for host-intestinal bacterial interactions. In this study, we examined the DA production ability of 32 species that can be cultured in GAM medium among enteric dominant bacterial species, and tried to identify the species actually responsible for DA production in the intestinal tract. As a result, it became clear that only *Enterococcus faecalis* is able to produce a significant amount of DA, and the other four species carrying the aromatic amino acid decarboxylase homolog also showed a low DA-producing ability. However, only *E. faecalis* showed the ability to produce DA comparable to other aromatic amines. This indicated a high contribution of this species to DA production in the intestinal tract.

研究分野：食品微生物学、応用微生物学

キーワード：芳香族アミン ドーパミン 微生物代謝 腸内細菌 アミノ酸脱炭酸酵素 腸内代謝物

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 増え続ける炎症性腸疾患と腸内細菌叢の関連性

多様化する現代人の食生活は腸内環境の変化をもたらし、QOL に様々なネガティブな影響を与え始めている。その中でも、潰瘍性大腸炎やクローン病といった炎症性腸疾患の患者数は国内で 18 万人を数え、現在増加の一途をたどっている (難病情報センター 2012 年資料)。炎症性腸疾患は根治療法の見つかっていない慢性持続型の難病であり、遺伝的・環境的因子が複雑に絡み合っており発症すると考えられているが、食生活の欧米化に伴う腸内細菌叢変化との関連が現在発症機序として注目されている。昨今の腸内細菌研究により多くの宿主腸管の生理状態との相関が明らかにされているが、どのような種の細菌の寄与のもとに発症が促進されまた抑制されるかについては、最終的な原因特定には至っておらず未解明の部分が多岐にわたる。

(2) 腸内ドーパミン (DA) 濃度と炎症性腸疾患の関連性～芳香族アミン類の疾患関与への可能性

近年、炎症性腸疾患を発症した腸管組織において、ドーパミン (DA) 濃度の顕著な低下が報告された。DA は腸管におけるイオン輸送、細胞透過性、免疫応答に重要な役割を果たしているほか、病原性細菌の感染性にも関与していることが近年次々と明らかにされ、DA 濃度の適正維持が腸管の健全性に重要であることが示唆されている (引用文献 -)。DA は芳香族アミノ酸である「ドーパ」が脱炭酸されて生じる物質であり、「芳香族アミン類」に分類される。DA は腸管上皮細胞内で合成されるが、腸内細菌によっても多量に生成されることが報告されている。しかし、DA 産生を担う細菌種もまた未解明である。

昨今、腸管免疫応答と腸内細菌との関連性が国内外で盛んに報告されている。腸内の主要細菌の一種である *Clostridium* 属細菌の存在が制御性 T 細胞を活性化し炎症緩和に繋がること (引用文献)、腸内細菌により産生される酪酸が制御性 T 細胞の分化に重要な役割を果たすこと (引用文献) など、これまで着目されなかった低分子の微生物代謝産物が宿主の免疫応答に大きな影響を与えていることが近年次々と詳らかになっている。DA は上述の通り、潰瘍性大腸炎やクローン病において腸管組織での濃度が顕著に低下することから、昨今脚光を浴びている酪酸のように微生物により腸管内に供給され、何らかの宿主応答に関与している可能性は極めて高い。

2. 研究の目的

本研究では、芳香族アミン類が腸管内のある種の環境均衡を作り出していると仮定し、その解明のための実験を行った。芳香族アミン類は DA 以外にもフェネチルアミン、チラミン、ノルエピネフリンなどが存在し、これらは極めて低い濃度で交感神経への作用や腸間膜血管系の弛緩作用など様々な生理活性を示して消化プロセスに大きな影響を与えることが知られている (引用文献)。すなわち、炎症性腸疾患のような腸管における難治性疾患も、芳香族アミン類の均衡性崩壊が発症の一因となっている可能性があり、さらに示唆に富むことに、これら微量アミン類の生成酵素は、腸管内に存在する *Lactobacillus* および *Enterococcus* といった乳酸菌などのいわゆる善玉と呼ばれる細菌群によって数多く保持されていることが確認されている (引用文献)。本研究ではこれらの背景から、芳香族アミン類が消化・免疫などを含めた腸管メンテナンスの重要な一端を担っていると予想し、その腸内細菌による産生プロファイルと宿主に及ぼされる影響を精査することを目的として遂行した。

3. 研究の方法

(1) 腸内細菌優勢種の培養

本研究では、腸内細菌優勢種のうち Gifu Anaerobe Medium (GAM) を用いて培養可能な 32 種について DA 産生能を精査した。各菌種を嫌気チャンパー内にて植菌し、絶対嫌気下において液体培養を行った。培養の際は、L-ドーパ (DA の前駆体である芳香族アミノ酸) および主要芳香族アミノ酸 (aromatic amino acid, AAA) 3 種 (L-チロシン、L-フェニルアラニン、および L-トリプトファン) をともに 1 mM ずつ含む D+AAA 最少培地の他、L-ドーパ濃度を 2.5 mM に補強した GAM 培地 (GAM+2.5D) を用いた。

(2) 腸内細菌優勢種による DA およびその他の芳香族アミン産生能の確認

各菌種の培養上清中への DA および芳香族アミン群 (チラミン、フェネチルアミン、およびトリプタミン) の産生濃度については、HPLC を用いて測定を行った。

4. 研究成果

(1) 腸内細菌優勢種における DA 産生菌種の特定

腸内細菌優勢種のうち GAM 培地で培養可能な 32 種について、芳香族アミノ酸である L-ドーパから DA への変換能を精査した。主要 3 種芳香族アミノ酸 (チロシン・フェニルアラニン・トリプトファン) 各 1 mM に加えて 1 mM L-ドーパを含む D+AAA 最少培地で各菌を培養した結果、ドーパミンを著量生産できる菌種は *Enterococcus faecalis* 1 種のみに限られることが明らかとなった (図 1)。すなわち本菌種が腸管内においてドーパミン産生に高く寄与していることが窺われた。また、ドーパからドーパミンへの変換率は 1 %以下と極めてわずかながらも、

Ruminococcus gnavus にも産生能がみられた。

そこで、ヒト腸内常在細菌による DA 産生能をさらに精査するため、上記腸内細菌優勢 32 菌種をさらに高濃度の L-ドーパ (2.5 mM) を含む GAM+2.5D 培地にて培養し、培養上清中への DA 蓄積量を評価した。その結果、上述の *E. faecalis* および *R. gnavus* 以外に、3 菌種 (*Blautia hansenii*, *Clostridium asparagiforme*, および *Clostridium nexile*) において極めてわずかながら DA 産生能がみられることが明らかになった。

また、上記 DA 産生 5 種について、他の主要芳香族アミン (フェネチルアミン、チラミン、およびトリプタミン) に対する DA の産生能を D+AAA 培地において比較したところ、*E. faecalis* において培養上清中のフェネチルアミン蓄積濃度が 0.2 mM、チラミンの蓄積濃度が 0.6 mM であったのに対し、DA 蓄積量は 0.4 mM と遜色ない濃度であった (培養開始後 50 時間おける測定値)。このことは、腸内細菌優勢種において本菌種のみが DA 主要産生菌であるという上述の推測と一致していた。それに対し、他の 4 菌種においては他の芳香族アミン群に対する DA 蓄積濃度は数十分の一以下と極めて低く、これら菌種は DA 生産腸内細菌としては相対的に重要視され得ないということが示唆された。

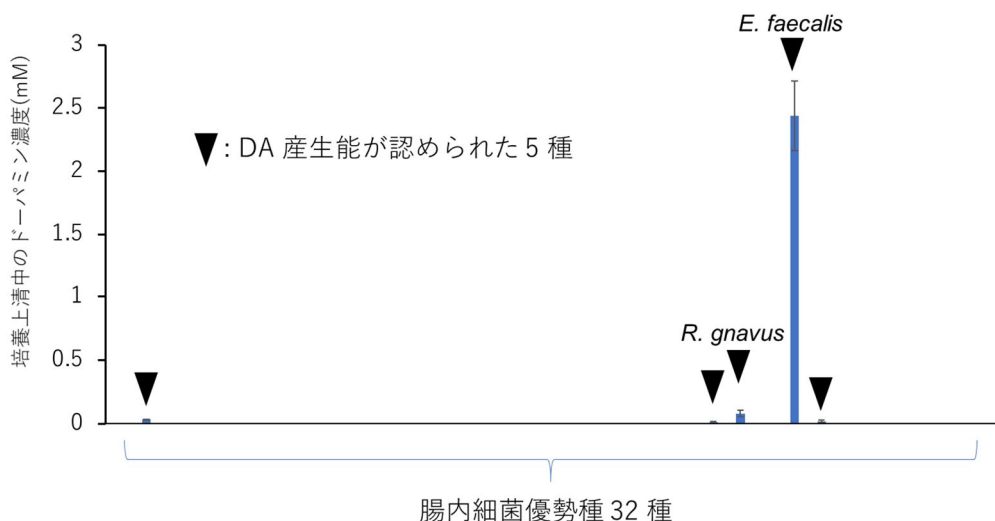


図 1 腸内細菌優勢種のうち GAM 培地で培養可能な 32 菌種の DA 産生プロファイル

(2) 芳香族アミノ酸脱炭酸酵素の腸管内 DA 産生への関与の可能性

(1) において述べた菌種群が芳香族アミノ酸脱炭酸酵素 (Aromatic Amino Acid Decarboxylase, AADC) を保持するかをゲノム情報より調べたところ、いずれの菌種も AADC もしくはそのホモログを有していたことから、腸内細菌において AADC およびそのホモログが DA 産生能を与えることが改めて示唆された。特に *R. gnavus* においてトリプトファンを主要基質とする脱炭酸酵素として既に報告済みの酵素が 1 つ見出され、本酵素が DA 産生に関わっている可能性が高いと考えられた。また、*E. faecalis* についてはチロシンに特異性の高い芳香族アミノ酸脱炭酸酵素 (TYDC) が存在することが古くから知られており、本菌種の TYDC 欠損株においてドーパミン生産能も消失することから、この酵素が本菌種の強い DA 生成能を担っていることが確認された。

本研究の結果より、ヒト腸内共生細菌の優勢種のうち DA 生成を行えるのは一部の菌種のみであり、その生成の基盤は AADC により担われていることが強く示唆された。また、*Enterococcus* 属等の乳酸菌が有する AADC 群は、他の細菌や動植物の酵素とアミノ酸配列の相同性が低く、ドーパへの高い反応性などもこのようなタンパク質の構造の違いに起因する可能性もあると考えられた。

< 引用文献 >

- Zhang et al., *Neurogastroenterol Motil*, 2010, 22:e325-334.
- Sarkar et al., *Brain Behav Immun*, 2010, 24:525-528.
- Asano et al., *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2012, 303:G1288-1295.
- Atarashi et al., *Science*, 2011, 331:337-341.
- Furusawa et al., *Nature*, 2013, 504:446-450.
- Broadley et al., *Br J Nutr*, 2009, 101:1645-1652.
- Liu et al., *J Food Prot*, 2014, 77:592-598.
- Zhang et al., *Protein Expr Purif*, 2014, 94:33-39.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

特になし

6. 研究組織

(1) 研究分担者

なし

(2) 研究協力者

研究協力者氏名： 栗原新

ローマ字氏名： Shin Kurihara

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。