

令和 4 年 6 月 19 日現在

機関番号：10105

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2021

課題番号：18K11039

研究課題名（和文）プロバイオティクス乳酸菌の体内時計改善を介した代謝調節機構の解明

研究課題名（英文）Metabolic modification by probiotic lactic acid bacteria via modification of circadian rhythm

研究代表者

渡辺 純（WATANABE, JUN）

帯広畜産大学・畜産学部・教授

研究者番号：10374729

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、プロバイオティクス乳酸菌の肥満抑制の作用機序を時計遺伝子の発振変動を介したエネルギー代謝の概日リズム調整という観点から明らかにし、代謝調節機能を有する食品設計に活用することを目的とした。消化管内で生残性を示す漬物由来乳酸菌株のうち、胆汁酸加水分解酵素(BSH)活性の高い菌株は、高脂肪食により誘導される体脂肪蓄積を抑制したが、BSH活性の低い菌株にはその効果は認められなかった。脱抱合型胆汁酸であるデオキシコール酸は、体内時計を同調したHepG2細胞の時計遺伝子発現の振幅を増大させ、脂質代謝への関連も示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでに肥満抑制作用を示すプロバイオティクス乳酸菌が報告されている。本研究では、乳酸菌により生じる脱抱合型胆汁酸がエネルギー代謝の概日リズム調節を通じて抗肥満作用を示すという作業仮説を検証した。データは十分ではないものの、この仮説を支持する知見が得られた。本研究の成果をさらに検証することで、概日リズムが関与する肥満のみならず種々の疾病改善効果を有する食品設計につながることを期待される。

研究成果の概要（英文）：This research project aimed to clarify anti-obesity activities of probiotic lactic acid bacteria (LAB) via the modification of circadian rhythm. LAB from Japanese pickles were screened based on survivability in GI tract atmosphere and bile salt hydrolase (BSH) activity. Isolate with high BSH activity showed anti-adiposity effect in high-fat diet administered mice, although that with low BSH activity failed to show the effect. Deoxycholic acid, a deconjugated bile acid, increased oscillation of clock gene expressions and affected lipid metabolism in circadian synchronized HepG2 cells.

研究分野：食品機能科学

キーワード：プロバイオティクス 乳酸菌 体内時計 代謝調節 胆汁酸

1. 研究開始当初の背景

肥満人口が増加傾向にあるが、肥満は種々の疾病の発症リスクを増加させることから、肥満への対応の必要性が広く認識されている。肥満は脂肪組織が肥大化し、体脂肪が過剰に蓄積した状態である。肥満の改善には食事介入が重要であり、摂取カロリーの抑制が指導される。一方で、肥満の改善を意図した食品成分の代謝調節機能に関する研究が行われてきた (Sun *et al*, 2105, Mi *et al*, 2017)。一部のプロバイオティクス乳酸菌は、実験動物において高脂肪食摂取による肥満を抑制するばかりでなく (Kawano *et al*, 2016)、ヒト介入試験においても体脂肪率の減少効果が示されている。

申請者らは、日本食の特徴的な食材の 1 つである漬物から 200 株以上の乳酸菌を分離・同定するとともに、消化管内環境に耐性を示し、プロバイオティクスとして有望な菌株を複数選抜してきた。また、分離株の中に高い胆汁酸加水分解酵素活性を示し肥満抑制に有望な乳酸菌株を見出した。消化管内には膨大な腸内細菌が棲息しているが、摂取されたプロバイオティクス乳酸菌を含め腸内細菌の体内への侵入は防御されている。消化管内のプロバイオティクス乳酸菌が遠隔的に体脂肪の蓄積を改善するメカニズムとしては、腸管からの食餌脂質の吸収抑制、腸管上皮細胞に由来するエキソソームが血流を介して脂肪細胞に作用して脂肪蓄積を抑制すること (Aoki-Yoshida *et al*, 2017) などが報告されている。一方で、体内時計の乱れが肥満を促進することが報告され (Zarrinpar *et al*, 2014)、体内時計の正常化はエネルギー代謝の概日リズムの正常化を通じて肥満の抑制につながる可能性が示唆されている。一部のプロバイオティクスや腸内細菌が有する胆汁酸加水分解酵素 (BSH) は、胆汁中に含まれる抱合型胆汁酸を脱抱合する。BSH 活性を有する乳酸菌の投与により、高脂肪食摂取による体重増加が抑制されることが報告された (Michael *et al*, 2017)。また、本酵素の反応産物である遊離胆汁酸投与により肝臓での時計遺伝子の発振が変動することが報告されている (Joyce *et al*, 2014)。以上の知見は、プロバイオティクス乳酸菌の概日リズム改善を介した代謝調節機能を示唆するものであり、とりわけ胆汁酸加水分解酵素による消化管内胆汁酸組成の変化がその分子作用機序である可能性を示唆する。しかしながら、プロバイオティクス乳酸菌が示す肥満抑制作用の機序としてエネルギー代謝の概日リズム調整に関する研究報告はなされていなかった。

2. 研究の目的

本研究は、プロバイオティクス乳酸菌の肥満抑制の作用機序を時計遺伝子の発振変動を介したエネルギー代謝の概日リズム調整という観点から明らかにし、代謝調節機能を有する食品設計に活用することを目的とした。

具体的には、(1)プロバイオティクス乳酸菌による肥満抑制が、エネルギー代謝の概日リズム変化を介することを明らかにし、(2)エネルギー代謝の概日リズム変化が、時計遺伝子の発振変化を伴うことを明らかにするとともに、(3)時計遺伝子の発振変化をもたらず作用機序を腸内の代謝産物に注目して明らかにすることとした。

3. 研究の方法

(1) プロバイオティクス乳酸菌の選抜と肥満抑制作用の検討

0.3%胆汁末を含む MRS 中での乳酸菌分離株の増殖を測定することにより胆汁酸耐性を、pH を 2.5 に調整した MRS 中で 2 時間処理した時の生残率を測定することにより低 pH 耐性を評価した。また、6mM タウロコール酸を含む MRS で乳酸菌分離株を 24 時間培養し、生成するコール酸をフルフラールと硫酸を用いて比色定量して胆汁酸加水分解酵素活性を測定した。

雄性 C57BL/6J マウス 48 匹を馴化後に 1 群 12 匹ずつにわけ、通常脂肪食飼料 (AIN93M)、高脂肪食 (HFD, HFD60; オリエンタル酵母)、あるいは乳酸菌 1×10^9 CFU/g を添加した HFD で 8 週間飼育した。体重の推移と解剖時の脂肪組織重量を測定するとともに、小腸および結腸組織より RNA を抽出し、RT-PCR により時計遺伝子 (*Clock*, *Bmal1*) 発現を測定した。

(2) HepG2 細胞における脂質代謝に及ぼす脱抱合型胆汁酸の時計遺伝子調節を介した影響

ヒト肝臓がん由来細胞株 HepG2 を 24 時間無血清の DMEM/Ham F12 培地で 24 時間培養し、50% ウシ胎児血清を含む DMEM/Ham F12 培地で 2 時間処理して時計遺伝子を同調した。その後、100 μ M デオキシコール酸 (DCA) 含有あるいは非含有の無血清培地に切り替え、経時的に RNA を抽出し、RT-PCR により時計遺伝子 (*Clock*, *Per 1*, *Bmal1*) 発現を測定した。また、同様な条件で HepG2 細胞を処理し、DCA に加えて 0.4mM パルミチン酸を添加して 18 時間培養し、脂肪酸合成酵素 (*Fas*) の発現を測定した。

4. 研究成果

(1) プロバイオティクス乳酸菌の選抜と肥満抑制作用の検討

漬物より分離した乳酸菌株から胆汁酸耐性、低 pH 耐性を有する菌株を選抜し、BSH 活性を評価したところ *Lactobacillus plantarum* #53 株が最も高い活性を示した。また、#25F 株の BSH 活性は胆汁酸耐性、低 pH 耐性を有する *L. plantarum* 分離株の中で最も低かった (図 1)。これら 2 種の乳酸菌株を高脂肪食 (HFD) に添加してマウスに 8 週間摂取させたところ、いずれの乳酸菌株とも HFD により誘導される体重増加に有意な影響を及ぼさなかったが、腎周囲脂肪組織重量は BSH 活性の高かった #53 株摂取群においてのみ増加が抑制され、BSH 活性の低かった #25F 株ではその効果が見られなかった (図 2)。しかしながら、回腸および結腸における時計遺伝子の発現に及ぼす乳酸菌投与の影響は観察されなかった。脂肪組織の採取などのある程度の時間を要し、解剖を複数の日数に分けて実施したもののほぼ同一の時間に臓器を回収するのが困難であり、これが時計遺伝子の発現変動が観察されなかった要因の 1 つとして考えられた。

(2) HepG2 細胞における脂質代謝に及ぼす脱抱合型胆汁酸の時計遺伝子調節を介した影響

血清処理により時計遺伝子発現を同調した HepG2 細胞を脱抱合型胆汁酸の 1 つである DCA で処理したところ、時計遺伝子発現の振幅が未処理と比較して有意に増大した (図 3)。このような作用は抱合型胆汁酸であるタウロデオキシコール酸には認められなかった。パルミチン酸処理による脂肪酸合成酵素発現上昇は、血清処理により時計遺伝子発現を同調し DCA を処理した際は発現上昇の抑制傾向が見られたが (図 4)、血清処理を行わずに DCA を処理しても抑制作用は限定的であった。このことは、脱抱合型胆汁酸の時計遺伝子調節を介した脂質代謝調節の可能性を示唆するものと考えられた。

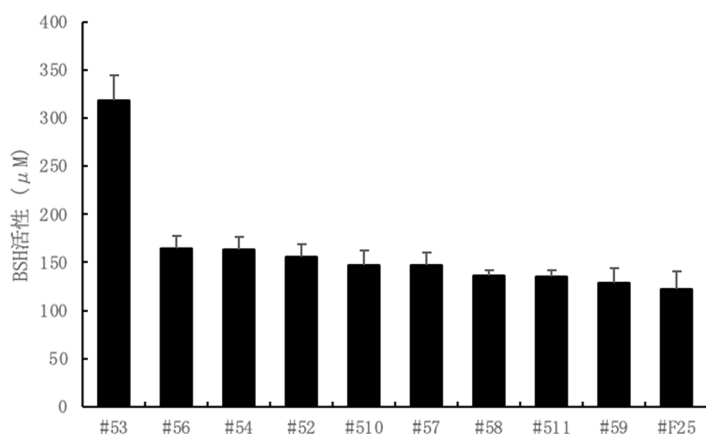


図 1 *Lactobacillus plantarum* 分離株の胆汁酸加水分解酵素 (BSH) 活性
BSH 活性は生成物であるコール酸濃度 (平均値±SD) として表した

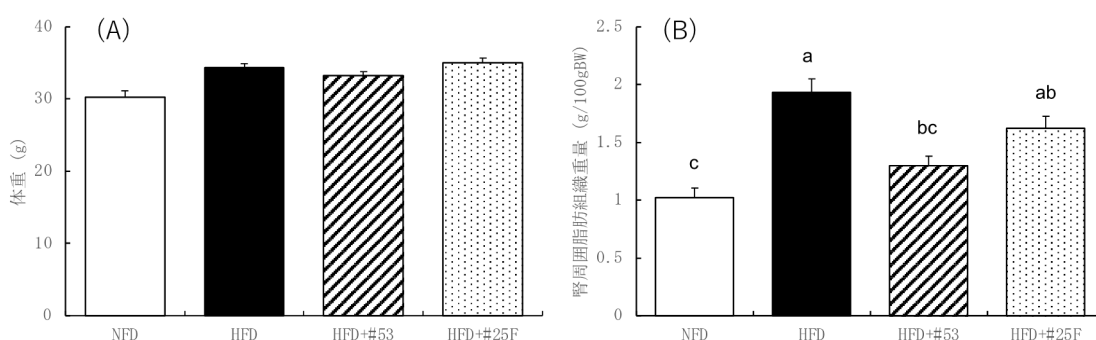


図 2 標準脂肪食 (NFD)、高脂肪食 (HFD) および乳酸菌 (#53 および #25F) 添加 HFD 摂取マウスの体重 (A) と腎周囲脂肪組織重量 (B)
平均値±SEM (n=12) として表した。異なる文字は群間で有意差のあることを示す。

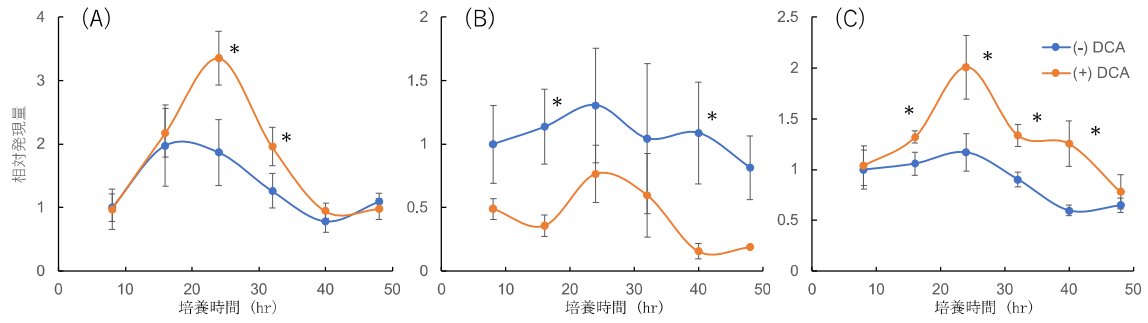


図3 血清処理した HepG2 細胞における時計遺伝子発現 ((A)*Clock*, (B)*Per 1*, (C)*Cry 1*) の発現変動に及ぼすデオキシコール酸処理の影響
 平均値±SD として表した。*は処理区間に発現量の有意差があることを示す。

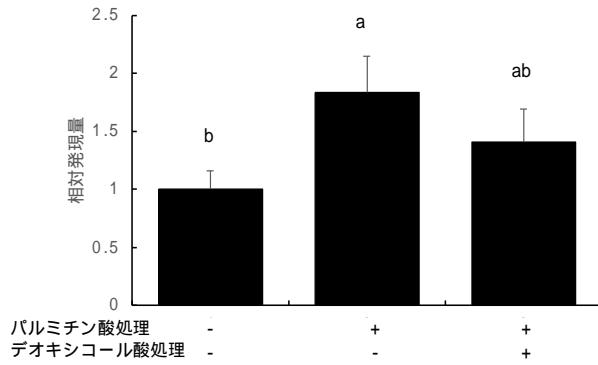


図4 血清処理した HepG2 細胞におけるパルミチン酸誘導による脂肪酸合成酵素発現に及ぼすデオキシコール酸添加の影響
 平均値±SD として表した。異なる文字は群間で有意差のあることを示す。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yin T., Bayanjargal S., Fang B., Inaba C., Mutoh M., Kawahara T., Tanaka S., Watanabe J.	4. 巻 11
2. 論文標題 Lactobacillus plantarum Shinshu N-07 isolated from fermented Brassica rapa L. attenuates visceral fat accumulation induced by high-fat diet in mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Beneficial Microbes	6. 最初と最後の頁 1~14
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3920/BM2020.0009	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Jun Watanabe, Tingyu Yin, Bayanjargal Sandagdorj, Bowen Fang, Takeshi Kawahara, and Sachi Tanaka
2. 発表標題 Anti-obesity effect of Lactobacillus plantarum Shinshu N-07 isolated from fermented Brassica rapa L.
3. 学会等名 IPC2019（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 渡辺純、Tingyu Yin、Bayanjargal Sandagdorj、Bowen Fang、河原岳志、田中沙智
2. 発表標題 野沢菜漬け由来Lactobacillus plantarum Shinshu N-07株の食事誘導肥満抑制作用
3. 学会等名 日本食品科学工学会第66回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 渡辺純
2. 発表標題 北海道の食資源の有効利用を意図したプロバイオティクス・腸内細菌研究からのアプローチ
3. 学会等名 北海道支部シンポジウム「北海道におけるこれからの栄養・食糧学」（招待講演）
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------