

令和 5 年 6 月 20 日現在

機関番号：13801

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K05936

研究課題名(和文) エンドトキシンの無毒化を意図したアルカリホスファターゼの誘導とその作用機序の解析

研究課題名(英文) Dietary induction of intestinal alkaline phosphatase intended to detoxify endotoxin and analysis of its mechanism of action.

研究代表者

日野 真吾 (HINO, Shingo)

静岡大学・農学部・准教授

研究者番号：70547025

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)：腸内細菌が産生するリポポリサッカライド(LPS)の血中移行を介して惹起される炎症が種々の慢性疾患の背景にあることが示唆されている。一方、腸管型アルカリホスファターゼ(IAP)がLPSを弱毒化する機能を有することが遺伝子破壊動物を用いた試験で示された。本研究課題では、IAPを誘導する食事成分の探索とその有効性の検証を目的として実施した。本課題において腸管でのアルカリホスファターゼ活性およびLPS分解活性を高める食事成分として発芽玄米を見出した。一方で、このアルカリホスファターゼ活性の上昇は既報から推定されるIAPの増加によるものではなく、別の分子種の増加によることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本課題において腸管でのアルカリホスファターゼ活性(AP)およびLPS分解活性を高める食事成分として新規に発芽玄米を見出した。一方で、このAP活性の上昇は既報から推定されるIAPの増加によるものではないことが示唆された。これらの結果は、既報の経路とは異なるLPS無毒化経路の存在を示唆しており、LPS無毒化による生活習慣病の発症予防および腸管恒常性維持という点において新しい視点を提供すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：It has been suggested that inflammation induced by lipopolysaccharides (LPS) produced by intestinal bacteria and transferred into the bloodstream causes various chronic diseases. Additionally, studies using genetically modified animals have shown that intestinal alkaline phosphatase (IAP) attenuates LPS toxicity. This research aimed to search for dietary components that induce IAP and verify their efficacy. We found that germinated brown rice increases alkaline phosphatase activity and LPS dephosphorylation activity in the intestinal tract. However, the increase in alkaline phosphatase activity was not due to an increase in IAP as previously reported, but was suggested to be due to an increase in another type of alkaline phosphatase.

研究分野：栄養化学

キーワード：アルカリホスファターゼ エンドトキセミア リポポリサッカライド

## 1. 研究開始当初の背景

腸内細菌が産生するエンドトキシンの1つであるリポポリサッカライド(LPS)の血中移行を介して惹起される炎症 (metabolic endotoxemia)が種々の慢性疾患の背景にあることが示唆されている。一方、腸管型アルカリホスファターゼ (IAP) がLPSを弱毒化する機能を有することが遺伝子破壊動物を用いた試験で示された。IAPの作用機序の全容は不明であるが、食事によって内因性のIAPを誘導することができれば、メタボリックシンドロームの有望な予防・治療法となる可能性がある。

## 2. 研究の目的

食事による内因性IAPの誘導因子およびLPS無毒化、メタボリックシンドロームの発症・増悪阻止作用を明らかにするとともに、小腸上部に高発現するIAPが腸内細菌叢に由来するLPSを弱毒化する機序の解析を試みる。この成果は、多くの慢性疾患に関わる腸管の恒常性維持機構の基本的理解に寄与するとともに慢性疾患予防のための食事戦略に寄与できると考えている。

## 3. 研究の方法

### (1) 小腸におけるアルカリホスファターゼ活性の分布と糞便のアルカリホスファターゼ活性

動物実験には6週齢 (体重120-140 g) のWistar系雄ラット (日本SLC株) 6匹を用い、室温 $24 \pm 1$ 、相対湿度 $55 \pm 5\%$ で12時間の明暗周期 (7:00-19:00 点灯) の条件下飼育した。ラットは搬入・順化させた後、標準飼料を水道水とともに14日間自由摂取させた。試験開始13日目には1日分の糞便を回収し、IAP活性の測定まで $-80$ で保存した。試験飼育終了後、小腸、盲腸を摘出した。小腸は、全長を測定した後、幽門から10 cmを十二指腸として採取し、残りを2等分し、上部を空腸、下部を回腸として各部位ごとに分割した。空腸、回腸についてはそれぞれの中央部10 cmを採取した。各部位の粘膜は小腸各部位を切り開き、生理食塩水で洗浄し、水分を除いた後、量り取った。重量を記録後、解剖終了まで液体窒素中で保存し、解剖終了後はIAP活性の測定まで $-80$ で保存した。盲腸粘膜の採取は小腸と同様に行った。なお、全ての動物実験は静岡大学実験動物委員会において定められた「実験動物に関する指針」に沿って実施した。

### (2) 全粒粉摂取の腸管IAP活性誘導効果

動物実験には、6週齢 (体重160-180 g) のSD系雄ラット (日本SLC株) 24匹を用い、室温 $24 \pm 1$ 、相対湿度 $55 \pm 5\%$ で12時間の明暗周期 (7:00-19:00 点灯) の条件下、ステンレス製ゲージ内で個別に飼育した。ラットは搬入・順化させた後、体重を基準に4群に分け、各実験飼料を水道水とともに28日間自由摂取させた。AIN-76組成のビタミンおよびミネラル混合物を用い、コーンスターチを炭水化物、カゼインをタンパク、コーンオイルを脂質とした飼料にコーンスターチとの置き換えで5.5%のセルロースを添加した飼料を対照飼料 (CS群)とした。また、対照飼料中のコーンスターチとの置き換えで小麦全粒粉 (WF群)、発芽玄米粉 (RF群)を60%、大麦全粒粉 (BF群)を30%添加した飼料を設けた。なお、化学分析の結果をもとに食物繊維、タンパク質、脂質の含量をそれぞれセルロース、カゼイン、コーンオイルの添加量を調節することで各飼料の栄養成分含量を可及的に一致させた。また、アミノ酸分析の結果をもとに第一制限アミノ酸であるMetがCS飼料中の含有量に達しない場合は別途L-Metを添加した。試験飼育終了後、(1)と同様に小腸各部位 (十二指腸、空腸、回腸) 10 cmの粘膜を採取し重量を記録後、液体窒素中で凍結後、 $-80$ で保存した。

### (3) 発芽玄米粉の腸管IAP活性誘導効果

動物実験には、6週齢（体重 160-180 g）のSD系雄ラット（日本SLC株）18匹を用い、室温  $24 \pm 1$  °C、相対湿度  $55 \pm 5\%$  で12時間の明暗周期（7:00-19:00 点灯）の条件下、ステンレス製ゲージ内で個別に飼育した。ラットは搬入・順化させた後、体重を基準に3群に分け、各実験飼料を水道水とともに28日間自由摂取させた。AIN-76組成のビタミンおよびミネラル混合物を用い、コーンスターチを炭水化物、カゼインをタンパク、コーンオイルを脂質とした飼料にコーンスターチとの置き換えで5.5%のセルロースを添加した飼料を対照飼料（CS群）とした。また、対照飼料中のコーンスターチとの置き換えで発芽玄米粉を30%または60%添加した飼料を設けた。なお、化学分析の結果をもとに食物繊維、タンパク質、脂質の含量をそれぞれセルロース、カゼイン、コーンオイルの添加量を調節することで各飼料の栄養成分含量を可及的に一致させた。試験飼育終了後、(1)と同様に小腸各部位（十二指腸、空腸、回腸）10 cmの粘膜を採取し重量を記録後、液体窒素中で凍結後、 $-80$  °Cで保存した。

#### (4) アルカリホスファターゼ活性およびLPS脱リン酸化活性の測定

酵素溶液には小腸および盲腸の粘膜に1% Triton X-100（富士フィルム和光純薬）および1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF, 富士フィルム和光純薬) を含む10 mM TBS (pH 7.3) を小腸では15 mL、盲腸では7.5 mL加えた後、ポリトロンホモジナイザー処理（4 °C, 30秒 x 2回）し、遠心分離後（7,000 x g, 4 °C, 15分）得られた上清を用いた。IAP活性はp-ニトロフェニルリン酸基質法に準拠したALP活性測定キット（ラボアッセイALP, 富士フィルム和光純薬）を用いて測定した。LPS脱リン酸化活性の測定は上述の酵素溶液および基質には1 mM MgCl<sub>2</sub> および10 μM ZnCl<sub>2</sub> を含む10 mM TBS (pH 8.0またはpH 9.0) で4 mg/mLとなるように調製したLPS溶液を使用した。LPSから遊離したリン酸量をマラカイトグリーン法により測定した。脱リン酸化活性はタンパク質1 mg当りの1時間における遊離リン酸量として表した。また、L-Pheを添加した基質溶液を調製し、L-Phe存在下（30 mM）で先と同様に反応させた後、遊離したリン酸量を測定し、L-Phe存在下での各酵素溶液の活性を非IAPの活性、総活性から非IAP活性を除いたものIAP活性として算出した。

#### (5) 統計解析

各データの統計処理は、Bartlett検定により分散の均一性を確認した後、部位間の差の検定を一元配置分散分析（one-way analysis of variance, ANOVA）後、Tukey-Kramerテストを行った。不等分散を示すデータについては、実数値を対数に変換後、再度Bartlett検定を行い、等分散であることが確認できた場合は上記に示した解析を行い、不等分散の場合はKruskal-Wallis検定で  $p < 0.05$  の場合、Steel-Dwassテストを行った。いずれの統計解析結果も、危険率が5%未満のとき有意とみなした。

### 4. 研究成果

#### (1) 小腸におけるアルカリホスファターゼ活性の分布と糞便のアルカリホスファターゼ活性

IAP活性はタンパク質1 mg当りの比活性では、十二指腸が  $3.5 \pm 0.2$ 、空腸が  $0.8 \pm 0.0$ 、回腸が  $0.11 \pm 0.01$ 、回腸末端が  $0.07 \pm 0.01$  unit/mg proteinであり、十二指腸粘膜で最も高く、従来の報告通り回腸末端にかけて急激に低下していた。また、それぞれの部位のL-Pheによる阻害実験の結果、小腸ではいずれの部位でも90%以上が、糞便では80%程度が阻害された。

#### (2) 全粒粉摂取の腸管IAP活性誘導効果

試験飼育期間中の飼料摂取量および体重増加量に対照のCS群との間に差は認められなかったが、盲腸組織重量、内容物量については対照に比べWF群およびBF群で有意な上昇が認められ、盲腸内容物pHはWF群およびBF群で有意な低下が認められた（Table 1）。盲腸内容物の有機酸濃度では、プロピオン酸、総SCFA、コハク酸および総有機酸濃度で、対照に比べBF群で有意な上昇が認められた。また、コハク酸濃度はWF群でも有意な上昇が認められた。

人工基質であるp-NPPを用い測定した小腸IAP(Phe sen.)およびno-IAP(Phe insen.)活性は、空腸部ではRF群は対照に比べ50%程度の上昇が認められたが、データのばらつきのため有意な差には至らなかった（Figure 1）。

LPSを基質として用いた場合、小腸IAPおよびno-IAP活性は人工基質での活性パターンと異なっ

Table 1 Food intake, body weight gain and intestinal variables in rats fed control diet (CS) or a diet containing whole wheat flour (WF), whole barley flour (BF) or germinated brown rice flour (RF) for 28 days

	CS	WF	BF	RF	ANOVA
Food intake, g /28 d	595.6 $\pm$ 12.6 <sup>ab</sup>	590.4 $\pm$ 12.6 <sup>ab</sup>	548.4 $\pm$ 10.2 <sup>b</sup>	624.5 $\pm$ 20.9 <sup>a</sup>	< 0.05
Body weight gain, g /28 d	179 $\pm$ 6.6	178.9 $\pm$ 4.0	169.9 $\pm$ 8.1	186.6 $\pm$ 12.4	0.58
Food efficiency, /28 d	0.30 $\pm$ 0.01	0.30 $\pm$ 0.01	0.31 $\pm$ 0.01	0.30 $\pm$ 0.01	0.84
Small intestine length, cm	117.2 $\pm$ 2.6	116.2 $\pm$ 1.9	118.8 $\pm$ 2.2	117.2 $\pm$ 3.1	0.90
Cecum					
Tissue, g	0.89 $\pm$ 0.05 <sup>c</sup>	1.06 $\pm$ 0.03 <sup>b</sup>	1.42 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>	0.77 $\pm$ 0.03 <sup>c</sup>	< 0.01
Contents, g	2.8 $\pm$ 0.2 <sup>c</sup>	5.9 $\pm$ 0.4 <sup>b</sup>	8.5 $\pm$ 0.8 <sup>a</sup>	2.9 $\pm$ 0.0 <sup>c</sup>	< 0.01
pH	7.7 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>	6.8 $\pm$ 0.2 <sup>bc</sup>	6.3 $\pm$ 0.1 <sup>c</sup>	7.3 $\pm$ 0.2 <sup>ab</sup>	< 0.01
Organic acids, μmol/ g cecal contents					
Acetate	32.0 $\pm$ 2.2 <sup>b</sup>	39.5 $\pm$ 3.3 <sup>ab</sup>	37.9 $\pm$ 2.6 <sup>ab</sup>	43.3 $\pm$ 3.0 <sup>a</sup>	0.06
Propionate	12.9 $\pm$ 1.2 <sup>b</sup>	21.0 $\pm$ 0.9 <sup>a</sup>	24.6 $\pm$ 1.4 <sup>a</sup>	14.2 $\pm$ 1.1 <sup>b</sup>	< 0.01
n-Butyrate	4.2 $\pm$ 0.5	5.5 $\pm$ 1.0	5.1 $\pm$ 0.6	5.2 $\pm$ 0.5	0.60
SCFA	49.1 $\pm$ 3.7 <sup>b</sup>	66.0 $\pm$ 3.8 <sup>a</sup>	67.5 $\pm$ 4.1 <sup>a</sup>	62.7 $\pm$ 4.2 <sup>ab</sup>	< 0.05
Succinate	7.1 $\pm$ 3.8 <sup>c</sup>	33.6 $\pm$ 7.3 <sup>ab</sup>	47.9 $\pm$ 3.8 <sup>a</sup>	18.8 $\pm$ 6.6 <sup>bc</sup>	< 0.01

ており、特に空腸、回腸部では総アルカリフォスファターゼ活性に占める non-IAP 活性の割合が半分程度を占めた。全粒粉摂取によるこれらの活性は、いずれの部位においてもデータのばらつきのため群間に差はなかったが、RF 群の空腸および回腸部の no-IAP 活性は対照群と比べ、それぞれ 50% または 80% 上昇した。この結果は群間でほとんど差がない IAP 活性とは対照的であった。

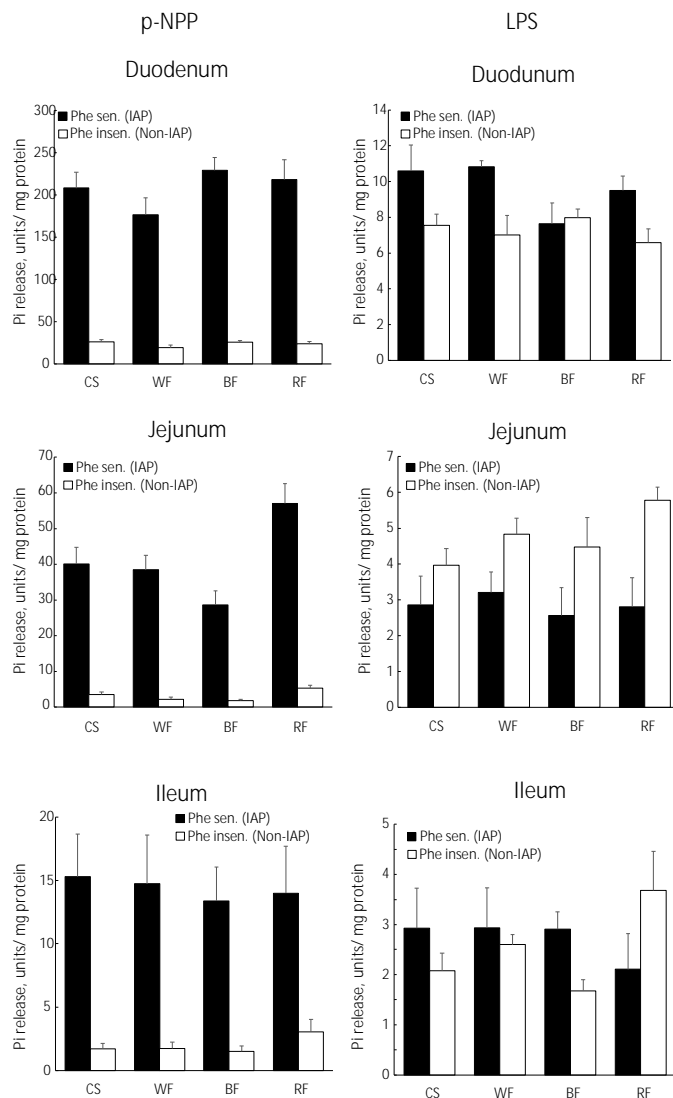


Figure 1 Phenylalanine sensitive and insensitive alkaline phosphatase activities in rats fed the control diet (CS) or a diet containing whole wheat flour (WF), whole barley flour (BF) or germinated brown rice flour (RF) for 28 days. Data are means  $\pm$ SE, n=6. p-NPP and lipopolysaccharides (LPS) were used as substrate. Unit of enzyme activities at pH 9.8 (p-NPP) and pH 8.0 (LPS) was defined as the amount of enzyme releasing inorganic phosphate per hour (umol/hour).

### (3) 発芽玄米粉の腸管 IAP 活性誘導効果

試験飼育期間中の飼料摂取量，体重増加量，盲腸組織重量，内容物量ならびに盲腸内容物 pH に群間で差は認められなかった。

人工基質である p-NPP を用い測定した小腸 IAP (Phe sen.) および no-IAP (Phe insen.) 活性は，空腸部では RF 群は対照に比べ 50% 程度の上昇が認められたが，有意な差には至らなかった (Figure 2)。一方，LPS を基質として用いた場合，空腸および回腸の no-IAP 活性が全粒粉摂取により有意に増加した。この結果は群間でほとんど差がない IAP 活性とは対照的であった。

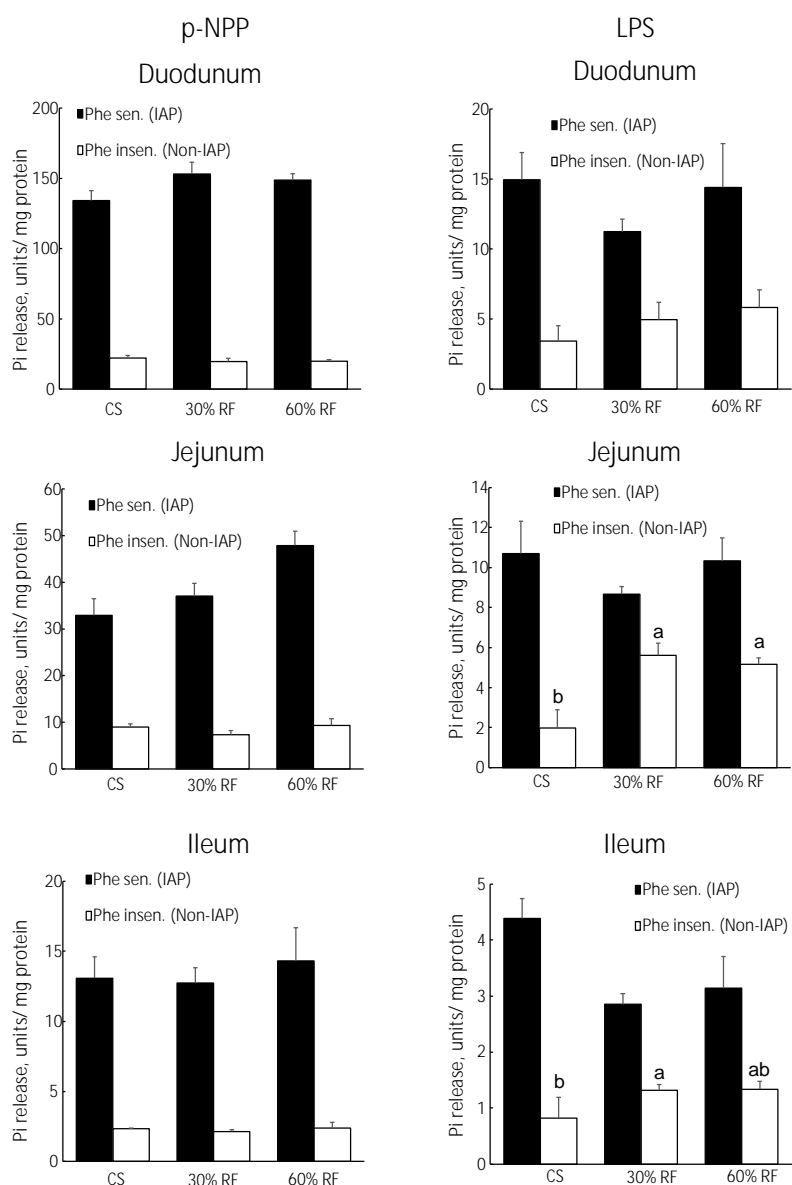


Figure 2 Phenylalanine sensitive and insensitive alkaline phosphatase activities in rats fed the control diet (CS) or a diet containing 30 or 60% germinated brown rice flour (RF) for 28 days

Data are means  $\pm$ SE, n=6. p-NPP and lipopolysaccharides were used as substrate. Unit of enzyme activity at pH 9.8 (p-NPP) and pH 9.0 (LPS) was defined as the amount of enzyme releasing inorganic phosphate per hour ( $\mu$ mol/hour).

上記(2)および(3)の動物試験の結果から、空腸および回腸粘膜のアルカリホスファターゼ活性を上昇させる食事因子として発芽玄米粉を明らかにした。この発芽玄米粉による活性上昇は人工基質では観察されずLPSを基質として用いた場合にのみ観察された。また、LPSの脱リン酸化は、IAPの阻害剤であるL-Pheにより阻害されなかった。腸管にはIAPの他にも複数のアイソザイムが存在することから、これらの増加が発芽玄米粉摂取時のLPS脱リン酸化活性に関わっていると考えられた。このことは(1)の試験からも観察されたようにIAPの活性が十二指腸で最も高く、小腸下部では低くなることと矛盾しない。

さらなる実験が必要ではあるが、他のIAPアイソザイムがLPSの脱リン酸化および弱毒化に関与している可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 SEKI Manami, MIWA Akiho, OHSAKA Fumina, KARATSU Yugo, TSURUTA Takeshi, HINO Shingo, MORITA Tatsuya, SONOYAMA Kei	4. 巻 41
2. 論文標題 Local free fatty acids trigger the expression of lipopolysaccharide-binding protein in murine white adipose tissue	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Bioscience of Microbiota, Food and Health	6. 最初と最後の頁 54 ~ 65
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.12938/bmfh.2021-061	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 -

1. 著者名 Miyata Takaaki, Mizushima Takayasu, Miyamoto Nobuyuki, Yamada Takahiro, Hase Koji, Fukushima Michihiro, Nishimura Naomichi, Hino Shingo, Morita Tatsuya	4. 巻 86
2. 論文標題 Skate-skin mucin, rich in sulfated sugars and threonine, promotes proliferation of <i>Akkermansia muciniphila</i> in feeding tests in rats and in vitro fermentation using human feces	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 397 ~ 406
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/bbb/zbac003	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0件

〔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
---------	---------