

令和 5 年 6 月 8 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：20K11576

研究課題名(和文) 腸内細菌叢の多様性を決定づける因子としてのビタミンB12・類縁体の役割

研究課題名(英文) Significance of vitamin B12 and its analogs as determinants of colonic microbiota diversity.

研究代表者

西村 直道 (Nishimura, Naomichi)

静岡大学・農学部・教授

研究者番号：10341679

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)：本研究では難消化性糖質の高アミロースデンプン(HACS)による大腸プロピオン酸生成の障害と細菌叢の多様性低下に大腸内におけるVB12不足が関与するかどうかを調べた。その結果、腸内細菌が有するプロピオン酸生成経路の補酵素であるVB12の不足により生じることを明らかにし、大腸内VB12濃度を63 pmol/g以上を保つようVB12を大腸に供給すれば、プロピオン酸生成経路が正常化することが示唆された。また、VB12投与によりHACSで生じる細菌叢の多様性低下が回復することも判明した。さらに、大腸にCoを供給すると腸内細菌によるVB12/類縁体合成が進み、プロピオン酸生成が正常化することを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

潰瘍性大腸炎を患った人の大腸ではコハク酸蓄積が認められる。また、コハク酸が消化管粘膜における炎症を誘導することが知られている。そのため、本研究結果はコハク酸による炎症誘導を抑える上で重要な基礎知見となりうると考えられる。

また、難消化性糖質のみを大腸にデリバリーし、大腸発酵を誘導することがこれまでに多く研究されているが、そのときに必要な因子を適切に供給することが大腸発酵の正常化に欠かせないことを示したものであり、今後さまざまな因子による大腸発酵の制御について研究が進むと考える。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated whether VB12 deficiency in the colon is responsible for the impaired colonic propionate production and decreased diversity of the colonic microbiota caused by high amylose cornstarch (HACS), a non-digestible saccharides. The results revealed that it is caused by a deficiency of VB12, a cofactor in the propionate production pathway of colonic bacteria, and suggested that the propionate production pathway can be normalized if VB12 is supplied to the colon to maintain a colonic VB12 concentration of 63 pmol/g or higher. It was also found that VB12 administration restores the reduced diversity of the colonic microbiota that occurs in HACS intake. Furthermore, we showed that supplying Co to the large intestine increased VB12 and its analog synthesis by colonic bacteria and normalized propionate production in the large intestine.

研究分野：栄養化学

キーワード：ビタミンB12 大腸発酵 プロピオン酸 コハク酸 腸内細菌叢 コバルト 難消化性糖質

1. 研究開始当初の背景

腸内細菌叢の多様性低下を発端とする細菌叢の攪乱 (dysbiosis) は、ヒトの生理に障害を与え、さまざまな疾病発症に関与している。したがって、細菌叢の多様性を高く保持することが重要である。しかし、高多様性を駆動する因子は不明なままである。腸内細菌の多くはビタミン B₁₂ (以下、VB₁₂) を必要とするが、その合成能をもたないため、一部の細菌が合成する VB₁₂ とその類縁体 (VB₁₂/類縁体) に依存する。したがって、VB₁₂ が不足した場合、VB₁₂ 合成能が低い細菌種の占有率が低下し、多様性の低下を招く可能性が高い。VB₁₂ は腸内細菌のコハク酸経路の補酵素成分として機能し、プロピオン酸生成に関与する (Fig.1)。コハク酸経路は腸内細菌によるプロピオン酸生成の主要経路であり、VB₁₂ が不足した場合この経路の中間体であるコハク酸で代謝停止し、大腸内に放出される可能性が予想される。大腸上皮からのコハク酸の吸収率は 5% 程度であるため、生成したコハク酸は蓄積しやすく大腸管腔内の pH を低下させる。これにより細菌叢の多様性はさらに低下しうる。したがって、VB₁₂/類縁体を大腸に安定供給すれば、コハク酸蓄積を解消し、さらに細菌叢の高多様性を駆動すると推定される。

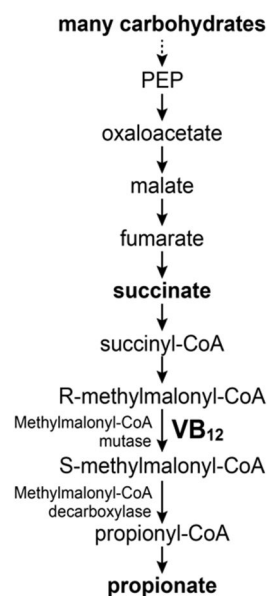


Fig.1 Succinate pathway

2. 研究の目的

上記の背景をもとに、本研究では難消化性糖質でコハク酸経路を刺激したラットを用い、細菌叢の多様性とコハク酸経路の正常化 (プロピオン酸生成の正常化とコハク酸蓄積の解消) に及ぼす VB₁₂ の作用を解明することを目的とした。すなわち、(1) 難消化性糖質投与のコハク酸経路の正常化に必要な VB₁₂ 要求量の推定と細菌叢の多様性、(2) Co による腸内細菌由来の VB₁₂/類縁体供給量増加とコハク酸経路の正常化、(3) VB₁₂/類縁体供給に寄与する腸内細菌種の同定、を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

実験動物に SD 系雄ラット (Slc:SD, 日本エスエルシー) を用いた。なお、以上の動物実験を静岡大学動物実験委員会で承認 (承認番号: 2020A-15, 2021A-5, 2022A-13) を得て行った。

(1) 難消化性糖質投与のコハク酸経路の正常化に必要な VB₁₂ 要求量の推定と細菌叢の多様性
 高アミロースデンプン (HACS) 摂取ラットの大腸内 VB₁₂ 濃度変化とプロピオン酸生成障害
 難消化性糖質である HACS を投与したときの大腸内コハク酸蓄積に対する大腸内 VB₁₂ 濃度の寄与を明らかにするため、HACS 用量を変えたときの盲腸内 VB₁₂ 濃度変動を調べた。ラットに对照 (C) 飼料、および HACS を 5%、10%、20%、30% 添加した C 飼料 (5H、10H、20H、30H) をそれぞれ 14 日間与えた。なお、すべての飼料に 0.025 mg/kg の VB₁₂ を添加した。試験最終日に盲腸内容物中の VB₁₂ 濃度、有機酸濃度を測定した。

HACS 食摂取ラットのプロピオン酸生成の正常化と細菌叢の多様性に及ぼす VB₁₂ の影響

HACS 投与時の大腸内コハク酸蓄積が大腸への VB₁₂ 供給の充足により解消されるかを明らかにするため、VB₁₂ を用量依存的に投与した HACS 摂取ラットの盲腸内有機酸濃度および腸内細菌叢の多様性変化を調べた。

1) ラットに 0.025 mg/kg VB₁₂ 添加 C (0.025VB₁₂C) 飼料、0.025 mg/kg、0.25 mg/kg、2.5 mg/kg、35 mg/kg VB₁₂ を添加した 20% HACS 飼料 (0.025VB₁₂H、0.05VB₁₂H、0.1VB₁₂H、0.2VB₁₂H) をそれぞれ 14 日間与えた。試験最終日に盲腸を摘出し、盲腸内容物中の VB₁₂ 濃度、有機酸濃度を測定した。

2) ラットに 0.025 mg/kg VB₁₂ 添加 C (0.025VB₁₂C) 飼料、0.025 mg/kg、0.05 mg/kg、0.1 mg/kg、0.2 mg/kg VB₁₂ を添加した 20% HACS 飼料 (0.025VB₁₂H、0.05VB₁₂H、0.1VB₁₂H、0.2VB₁₂H) をそれぞれ 14 日間与えた。

(2) Co による腸内細菌由来の VB₁₂/類縁体供給量増加と細菌叢の多様性変化

Co を与えたラットの盲腸内 VB₁₂ 濃度、有機酸濃度、および腸内細菌叢に与える影響を明らかにするため、ラットに VB₁₂ 無添加の C 食、20% HACS 食、およびそれぞれに Co として 0.2 mg/kg 添加した飼料を 14 日間与えた。試験最終日に盲腸内容物中の VB₁₂ 濃度、有機酸濃度および腸内細菌叢を解析した。

(3) VB₁₂/類縁体供給に寄与する腸内細菌種の同定

ラット大腸内の VB₁₂ 生成細菌を同定するため、Co 添加 C 食を 8 日間与えたラットの盲腸内

容物を嫌氣的に採取した後, Co として 20 mg/L 添加した VB₁₂ 無添加液体培地で嫌気集積培養した。続いてロールチューブ法によるコロニー分離と上記と同様の培地による嫌気液体培養を行い, 培地中 VB₁₂ 濃度の高いコロニーを検索した。コロニーから DNA を抽出した後, 16S rDNA の全塩基配列を解析し, BLAST により細菌種を同定した。

4. 研究成果

(1) 難消化性糖質投与のコハク酸経路の正常化に必要な VB₁₂ 要求量の推定

高アミロースデンプン (HACS) 摂取ラットの大腸内 VB₁₂ 濃度変化とプロピオン酸生成障害体重増加量、摂食量および VB₁₂ 摂取量において群間に有意な差はなかった。HACS 投与の多い 20H 食群および 30H 食群の盲腸内 VB₁₂ 濃度は低値を示した (Fig.2A)。盲腸内コハク酸濃度は HACS の用量依存的に高値を示したのに対し、プロピオン酸濃度は低下した (Fig.2B)。HACS 用量の増加によるこれらの変化は、大腸への HACS 過剰供給によりコハク酸経路のコハク酸からプロピオン酸への代謝が抑制されたためと考えられる。これらの結果より、HACS 投与量の増加によるコハク酸経路の活性化が、腸内細菌の VB₁₂ 要求量を上昇させ、大腸内コハク酸蓄積に寄与することが示唆される。

HACS 摂取ラットの プロピオン酸生成の正常化に及ぼす影響

体重増加量および摂食量において群間に有意な差はなかった。VB₁₂ 摂取量は高 VB₁₂ 添加食群ほど有意に高値を示し、それとともに盲腸内 VB₁₂ 濃度も有意に高かった (データ未掲載)。盲腸内コハク酸濃度は 0.025VB₁₂H 食群に比べ 0.25 mg/kg 以上の VB₁₂ 添加飼料を与えた HACS 摂取群で低下したのに対し、プロピオン酸濃度は高値を示した (Fig.3A)。以上の結果より、HACS 投与によるコハク酸蓄積は VB₁₂ 投与により解消されることが判明した。また、細菌種

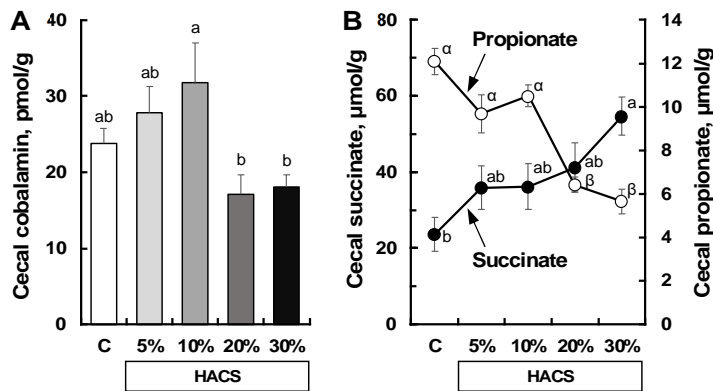


Fig.2 Changes in the cecal cobalamin (A), succinate and propionate concentrations (B) in rats given either a control diet or a diet containing 5-30% high amylose corn starch.

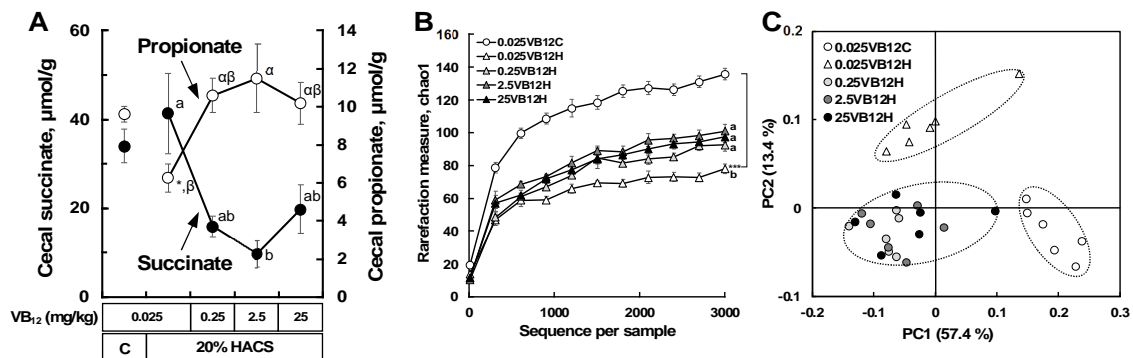


Fig.3 Dose-response of vitamin B₁₂ on the cecal concentrations of succinate and propionate (A) and the α - and β -diversities (B and C) of cecal microbiota in rats given a diet containing 20% high amylose corn starch.

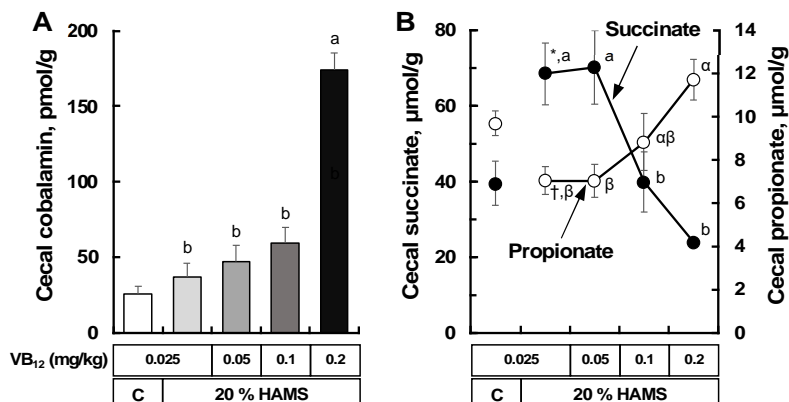


Fig.4 Dose-response of vitamin B₁₂ on the cecal concentrations of VB₁₂ (A), succinate and propionate

の多様性を示す。多様性は、HACS 投与により有意に低下し、完全ではないものの VB₁₂ を同時に投与することにより多様性が有意に回復した (Fig. 3B)。細菌種の構成比を加味した多様性は、0.025VB₁₂C 食群と 0.025VB₁₂H 食群では異なるクラスターを形成し、HACS 投与により細菌叢の変動が認められたが、VB₁₂ 投与量を増やしたラットの細菌叢はさらに異なるクラスターを形成した (Fig. 3C)。盲腸内コハク酸とプロピオン酸の濃度変化は 0.025~0.2 mg/kg の範囲で VB₁₂ を投与した場合でも同様の変化を示し (Fig. 4A, 4B) 盲腸内 VB₁₂ 濃度とコハク酸濃度の間には相関関係が示され、べき乗回帰で表された (Fig. 5)。0.025VB₁₂C 食群の盲腸内コハク酸濃度を HACS によるコハク酸蓄積前の濃度であると仮定し先のべき乗回帰式を用いると、HACS 投与時にコハク酸蓄積しない最小 VB₁₂ 濃度は 63 pmol/g と算出された。したがって、HACS 投与時に盲腸内 VB₁₂ 濃度が 63 pmol/g 以上となるように VB₁₂ を供給すれば、HACS によるコハク酸蓄積が引き起こされないと考えられる。

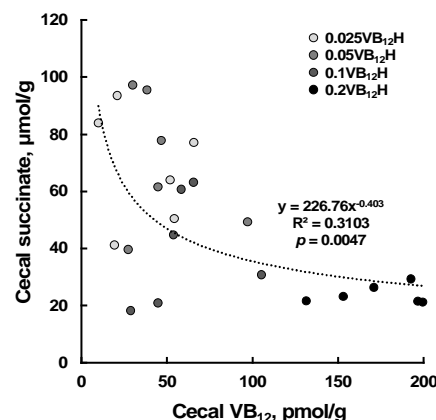


Fig.5 Correlation between cecal VB₁₂ and succinate concentrations.

(2) Co による腸内細菌由来の VB₁₂/類縁体供給量増加とコハク酸経路の正常化

Co 添加食を与えたラットの盲腸内のみ Co は検出された (Table 1)。Co 非投与ラットの盲腸内 VB₁₂ 濃度は C 食群に比べ HACS 食群で低下し、HACS 投与による VB₁₂ 濃度の低下が確認された。Co 非投与ラットに比べ Co 投与ラットの盲腸内 VB₁₂ 濃度は C 食群で 10 倍、HACS 食群で 39 倍それぞれ上昇した。Co 投与により盲腸内コハク酸濃度は有意に低下し、プロピオン酸濃度は有意に上昇した。これは食餌による高 VB₁₂ 投与時と同様の変化であり、盲腸内に流入した Co を利用して一部の腸内細菌種が VB₁₂/類縁体を合成し、それを他の腸内細菌も含め利用し、コハク酸蓄積が解消されたと考えられる。Co や HACS による盲腸内の総細菌コピー数は変化は認められず (Table 1)、このコハク酸およびプロピオン酸濃度の変化は細菌増殖とは関係がないと考えられる。一方、盲腸内細菌

Table 1 Caecal tissue and content weight, cecal organic acid concentration and total bacterial counts of rats given either the control (C) or 20% high amylose cornstarch (HACS) diets, with or without 0.2 mg/kg Co supplementation.

	Co-free		0.2 mg/kg Co*		Two-way ANOVA		
	Control	HACS	Control	HACS	RS	Co	Interaction
Cecum							
Tissue, g	0.72 ± 0.02 ^c	1.50 ± 0.08 ^a	0.66 ± 0.01 ^c	0.99 ± 0.05 ^b	—	—	—
Content, g	3.57 ± 0.21 ^c	11.6 ± 1.1 ^a	2.80 ± 0.17 ^c	5.40 ± 0.43 ^b	<0.001	<0.001	<0.001
pH	7.54 ± 0.09	5.81 ± 0.04	7.97 ± 0.04	6.09 ± 0.04	<0.001	<0.001	0.216
Co, nmol/g	ND	ND	5.50 ± 0.28	4.97 ± 0.17	—	—	—
VB ₁₂ equivalent, pmol/g	48.5 ± 5.9 ^c	25.8 ± 1.5 ^d	495 ± 60 ^b	996 ± 178 ^a	0.779	<0.001	<0.001
Succinate, μmol/g	46.9 ± 6.6	73.6 ± 6.8	6.27 ± 0.95	17.1 ± 4.4	0.030	<0.001	0.643
Propionate, μmol/g	7.62 ± 0.43	5.62 ± 0.39	15.0 ± 0.5	10.4 ± 1.5	<0.001	<0.001	0.571
Acetate, μmol/g	33.3 ± 2.3 ^c	36.3 ± 4.1 ^{bc}	46.8 ± 1.8 ^b	110 ± 7 ^a	<0.001	<0.001	<0.001
n-Butyrate, μmol/g	4.74 ± 0.44	7.13 ± 1.72	6.67 ± 0.38	9.13 ± 1.26	0.043	0.024	0.856
Ammonia, μmol/g	9.23 ± 1.18 ^a	9.25 ± 0.67 ^a	9.29 ± 0.62 ^a	4.94 ± 1.19 ^b	0.036	0.038	0.034
Cecal bacteria							
Total bacterial counts, log ₁₀ copies/g	12.2	12.1 ± 0.2	12.2 ± 0.0	12.4 ± 0.0	0.624	0.177	0.548

Values are means ± SE, n = 6. ^{a,b,c,d}Values in a column not sharing a common superscript letter are significantly different (P < 0.05).

*Cobalt carbonate was used as the cobalt source. RS, resistant starch.

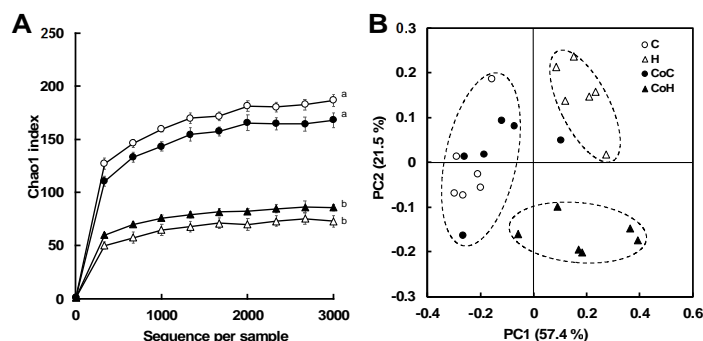


Fig.6 α - and β -diversities (A and B) of cecal microbiota in rats given either the control or 20% high amylose cornstarch (HACS) diets, with or without 0.2 mg/kg Co supplementation. ○, the group given the Co-free, control diets (C group); △, the group given the Co-free, 20% HACS diets (H group); ●, the group given the control diet supplemented with 0.2 mg/kg cobalt (CoC group); ▲, the group given the 20% HACS diet supplemented with 0.2 mg/kg cobalt (CoH group).

叢の多様性は HACS により有意な低下が認められたが、Co による多様性回復は部分的であることが示唆された (Fig.6A)。これは Co の投与量が多かったため、細菌叢の回復にも影響が現れたのかもしれない。また、多様性についてみると、C 食を与えたラットにおいて Co の有無は細菌叢のクラスターに違いを示さなかったが、HACS 投与ラットでは Co の存在により異なる細菌叢クラスターが形成された (Fig.6B)。したがって、HACS 投与に Co による細菌叢変化も生じることが示唆された。この変化もコハク酸とプロピオン酸濃度の変動と関係している可能性があるため今後検討する必要がある。

(3) VB₁₂/類縁体供給に寄与する腸内細菌種の同定

VB₁₂ 生成細菌として 2 コロニーを獲得し、それらの 16S rDNA 塩基配列はそれぞれ *Enterococcus* sp. と 100%、*B. thetaiotaomicron* と 99.7% の相同性を示した。

以上をまとめると、HACS 投与のような難消化性糖質をラットに与えると盲腸内にコハク酸の蓄積が認められるが、これは腸内細菌叢が有するコハク酸経路 (主要なプロピオン酸生成経路) の補酵素である VB₁₂ の不足により生じることが明らかとなった。大腸内の VB₁₂ 濃度を 63 pmol/g 以上を保つよう VB₁₂ を大腸にデリバリーすれば、HACS 投与によるコハク酸蓄積は減弱し、プロピオン酸生成が正常化することが示唆された。また、VB₁₂ 投与により HACS 投与で生じる細菌叢の多様性低下は回復することも判明した。さらに、VB₁₂ の構成成分である Co を投与し、大腸に Co を供給すると腸内細菌による VB₁₂/類縁体合成が進み、これにより HACS によるコハク酸蓄積が解消し、プロピオン酸生成が正常化することを示した。これはコハク酸による炎症誘導を抑える上で重要な知見となりうると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3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 GOTO Tomoya, UMEDA Tomoki, HINO Shingo, MORITA Tatsuya, NISHIMURA Naomichi	4. 巻 68
2. 論文標題 Oral Intake of Slowly Digestible -Glucan Such as Resistant Maltodextrin Leads to Increased Secretion of Glucagon-Like Peptide-2 in Rats and Helps Thicken Their Ileal Mucosae	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Nutritional Science and Vitaminology	6. 最初と最後の頁 104 ~ 111
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3177/jnsv.68.104	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 西村直道	4. 巻 225
2. 論文標題 大腸発酵で発生する水素分子は有益な分子として生体の生理に貢献する	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 FFIジャーナル	6. 最初と最後の頁 369-375
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 Sun Shumin, Araki Yuki, Hanzawa Fumiaki, Umeki Miki, Kojima Takaaki, Nishimura Naomichi, Ikeda Saiko, Mochizuki Satoshi, Oda Hiroaki	4. 巻 93
2. 論文標題 High sucrose diet-induced dysbiosis of gut microbiota promotes fatty liver and hyperlipidemia in rats	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Nutritional Biochemistry	6. 最初と最後の頁 108621 ~ 108621
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jnutbio.2021.108621	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4件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山田千尋, 梅田友貴, 川瀬貴博, 塚原隆充, 井上亮, 山下寛人, 一家崇志, 日野真吾, 森田達也, 西村直道
2. 発表標題 大腸へのビタミンB12供給は腸内細菌によるプロピオン酸生成と細菌叢の多様性維持に必須である
3. 学会等名 第75回日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山田千尋, 川瀬貴博, 塚原隆充, 井上亮, 山下寛人, 一家崇志, 日野真吾, 森田達也, 西村直道
2. 発表標題 ラット大腸内コバルト濃度の上昇は腸内細菌によるビタミンB12生成を促す
3. 学会等名 第79回日本栄養・食糧学会中部支部大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 梅田友貴, 山田千尋, 川瀬貴博, 塚原隆充, 日野慎吾, 森田達也, 西村直道
2. 発表標題 シアノコバラミンは高アミロースデンプン過剰投与ラットの大腸内コハク酸蓄積を消失させる
3. 学会等名 日本食物繊維学会第25回学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山田千尋, 梅田友貴, 川瀬貴博, 塚原隆充, 山下寛人, 一家崇志, 日野真吾, 森田達也, 西村直道
2. 発表標題 大腸へのコバルト供給はラット盲腸内コハク酸蓄積を解消する
3. 学会等名 日本食物繊維学会第25回学術集会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 西村直道	4. 発行年 2020年
2. 出版社 情報機構	5. 総ページ数 226
3. 書名 腸内細菌叢の基礎知識と研究開発における留意点	

〔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
---------	---------