

腸内細菌由来ポリアミンを機能性成分とした 健康寿命伸長食品の開発

松本 光晴

はじめに

腸内細菌叢と健康/疾病の関連性の研究は、長年、菌種構成を調べるアプローチで行われてきた。次世代型DNAシーケンサーの出現により、世界中で多くの研究成果が発表されている。一方で、腸内細菌由来の代謝産物の研究は遅れをとっているが、この中には、腸管腔から吸収され、血中に移行し全身の細胞へ作用する可能性が高いものがあり、健康/疾病との関りは、菌種構成よりむしろ直接的と考えられる。筆者らは、代謝産物の中でも生理活性が高いポリアミンに着目し、腸内細菌の代謝をコントロールして腸内ポリアミン濃度を高める技術を開発し、それが生体へ与える影響を評価してきた。本稿では、これらの一連の研究で得られた知見を紹介する。

細胞の健全化に必須のポリアミン

ポリアミンは低分子の塩基性物質であり、プトレッシン、スペルミジン、スペルミンなどの総称である。核酸の合成や安定化、細胞の増殖や分化など多方面の生命現象に関与し、抗変異原性や抗酸化作用も知られている¹⁾。一言で述べると、細胞機能の健全化に不可欠な物質で、これを裏付けるように、加齢に伴い、組織中のポリアミン合成や濃度が低下することがマウスで報告されている²⁾。ヒトでは、30～50歳代と比較し60～80歳代の血中ポリアミン濃度が低値である一方で、90～100歳代の長寿者では60～80歳代より高濃度であることが報告されている³⁾。

食事由来のポリアミンは、ほぼすべて消化管上部で生体に吸収される⁴⁾。一方で、消化管下部のプトレッシンとスペルミジンは腸内細菌叢由来である⁵⁾。筆者は、食事由来ポリアミンは一過性であるのに対し、腸内細菌叢の代謝制御でポリアミン産生を誘導すれば、継続的かつ多量に生体に供給できると考え、「腸内細菌に安定的にポリアミンを産生させる技術を開発すれば、さまざまな保健効果が得られ、結果的には健康寿命の伸長につながる」との仮説を構築した。興味深いことに、筆者らが本仮説に則り研究成果を得たのとほぼ同時期に、ポリアミン経口投与がモデル生物（線虫、ショウジョウバエなど）

の寿命伸長を促すこと⁶⁾、高ポリアミン飼料摂取マウスでも同様の効果が報告された⁷⁾。最近では、マウスへのスペルミジン経口投与によるオートファジー誘導作用により、心血管系の機能維持、肝繊維症や肝細胞癌の予防による寿命伸長が報告され^{8,9)}、その保健機能の総説も存在する¹⁰⁾。

メタボロミクスを用いた

腸管腔内ポリアミン増強物質のスクリーニング

腸管内ポリアミンを増やす方法として、当初、筆者らはプロバイオティクスの経口投与を試みていた。複数の小規模ヒト試験で、*Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* LKM512株（以下、ビフィズス菌LKM512）の経口投与で統計学的に便中ポリアミンが増加する結果が得られたが、増加する被験者は約7割程度で、特に、糞便中ポリアミンが低濃度の被験者では増加しないケースが多発し謎であった。また、ポリアミン産生菌の探索として300株程度のヒト糞便分離菌株を糞便に接種して培養実験を実施してきたが、複数の被験者由来の糞便で安定してポリアミン濃度を上昇させる菌種（菌株）は検出できなかった。そこで、発想を転換し、糞便中に腸内細菌叢のポリアミン産生を誘導する低分子物質が存在すると考え、統一食を摂取し、食事の影響をなくしたヒト糞便をキャピラリー電気泳動-飛行時間型質量分析装置によるメタボロミクスで探索した¹¹⁾。ヒト腸管内でもっとも高濃度で存在し、活性の強いスペルミジンとスペルミンの前駆体であるプトレッシンに着目し、それと各検出成分との相関性を調べた結果、28成分に有意な相関性が認められた。この中から、糞便培養系でスクリーニングを行った結果、すべてのヒト糞便への添加でプトレッシン濃度の上昇が観察されたアルギニンをポリアミン増強物質として決定した。マウスおよびラットへのアルギニン経口投与でも糞便内プトレッシン濃度が投与量依存的に上昇すること（図1a）、さらに血中では経口投与4-8時間後にスペルミジンが上昇することを認めた（図1b）¹¹⁾。これは、腸管腔のプトレッシンが生体内に吸収されスペルミジンに変換されることを示唆している。

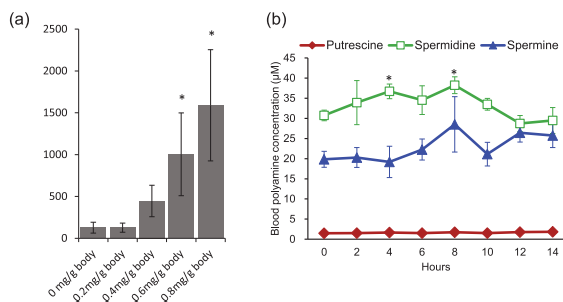


図1. アルギニン経口投与による糞便および血中ポリアミン濃度の影響. Mean ± SEM. (a) 9週齢雄性マウスに3時間の絶食後、アルギニンを各濃度で強制経口投与後、3–4時間後の糞便抽出液を用いて測定した (n = 8). **p* < 0.05, ***p* < 0.01 (vs. 0 mg/body). (b) 頸静脈カニューレ挿入ラット (雄性, 9週齢) に3時間の絶食後、アルギニン (0.9 mg/body) を強制経口投与し経時的に採血した (n = 5). **p* < 0.05 (vs. pre-treatment: 0 h).

腸内ハイブリッド・プトレッシン合成機構

複数菌種による合成・放出 長年のポリアミン産生菌の探索研究で、単独菌種の添加による糞便培養では再現性の高い菌種の特定には至らなかったことから、複数の腸内細菌が関与している合成・放出経路が存在すると発想を転換した。その結果、ヒト腸内細菌叢の主要グループのそれぞれ代表的な細菌14種をアルギニン含有培養液で混合培養した結果、プトレッシン濃度が単独培養時の平均の約10倍になることを見いだした。さらに、2菌種ずつの組合せで混合培養した結果、*Escherichia coli* と *Enterococcus faecalis* の組合せが最高濃度を示し、単独培養時の約8倍のプトレッシンを培養液中に放出することが認められた¹²⁾。

共培養によるプトレッシン合成経路 *E. coli* と *En. faecalis* を単独培養し、その培養液 (菌体除去後) でもう一方の菌を培養した結果、*E. coli* 培養中に、アルギニンの減少、アグマチンの増加、プトレッシンの微増が観察され、続いてその培養液で *En. faecalis* を培養すると、アルギニンとアグマチンの消失に伴いプトレッシンの増加が確認された。一方、*En. faecalis* 単独培養液で大腸菌を培養してもプトレッシンの産生は認められなかった。この結果から、*E. coli* がアルギニンを利用して放出するアグマチンを *En. faecalis* が吸収し、プトレッシンを放出していることが認められた。以上の結果および過去の研究報告から、*E. coli* が保有するアルギニンを利用する耐酸性機構と *En. faecalis* が保有するアグマチンを利用したATP産生機構が組み合わさることで、アルギニンからプトレッシンが作られ、放出されているとの仮説を立案した (図2の *E. coli* と *En. faecalis* の箇所参照)。

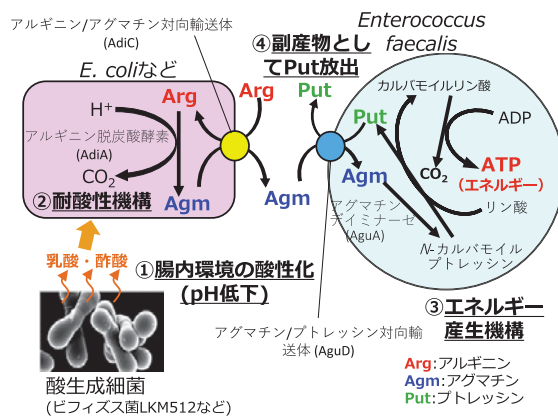


図2. 腸内ハイブリッド・プトレッシン合成機構の概要図 (文献12を改変)。①ビフィズス菌などの酸生成細菌由来の酢酸・乳酸などで、腸内環境が酸性化する (pH低下)。この酸性化が本機構のトリガーとなる。②酸性環境で生き残るためアルギニンを利用する耐酸性機構を保有する腸内常在菌 (*E. coli* など) は、この機構を作動させ、菌体内pHを中性に保つ。その際、環境中のアルギニンを取り込み、菌体外にアグマチンを放出する。③アグマチンを利用したATP (エネルギー) 産生機構を保有する腸内常在菌 (*En. faecalis*) は、放出されたアグマチンを取り込み、この機構を作動させてATPを産生する。④その際、アグマチンを取り込み、副産物としてプトレッシンが菌体外に放出され、腸管内プトレッシン濃度が上昇する。

この仮説を検証するために、*E. coli* のアルギニンを利用した耐酸性機構に関与しているアルギニン/アグマチン対向輸送体 (A_{di}C) の遺伝子の欠損菌株と相補菌株を作製し、これらを用いて混合培養実験を行った。その結果、遺伝子欠損株を使用した場合は、プトレッシン放出が消滅し、相補株を使用した場合はプトレッシン放出量が回復し、本合成経路のプトレッシン放出にA_{di}Cが関与することが確認された。同様の実験を *E. coli* のアルギニン脱炭酸酵素 (A_{di}A)、*En. faecalis* のアグマチン/プトレッシン対向輸送体 (A_{gu}D) に対しても行い、同様の結果を得た。以上の結果から、上記仮説は正しいことが遺伝子・分子レベルで証明された¹²⁾。

本合成経路のトリガー ビフィズス菌は酢酸と乳酸を放出する。*E. coli* と *En. faecalis* によるプトレッシンの放出は、酸性条件 (pH 5.0~6.5) で促進されることから、ビフィズス菌が腸内環境を酸性化 (pH低下) することでプトレッシン放出を促進する可能性が推測された。そこで、経口投与でポリアミン濃度上昇を確認済みのビフィズス菌 LKM512 を用いて、*E. coli* と *En. faecalis* を共培養した結果、プトレッシンの増加が確認された。また、これら3菌種を用いたノトバイオオートマウス実験を行った結果、3菌種すべてが定着したマウスの糞便は、*E. coli* と *En. faecalis* の2菌種が定着したマウスの糞便よりも、pHが低く、糞便中プトレッシン濃

度が高い結果が得られた。もちろん、ビフィズス菌が存在しなくても腸管内に酸生成菌が存在すれば、本経路は活性化する。筆者らが知る限り、3菌種の組合せによる生合成経路の報告例はなく、しかも遺伝子レベルで解明されており、腸内細菌叢による代謝産物の研究分野において重要な知見である¹²⁾。

本生合成経路のヒト腸管内での普遍性 ヒト新鮮糞便を中性～酸性域の緩衝液で希釈し嫌気培養した結果、酸性域ではブトレッシン濃度が増加することが認められ、ヒト腸内細菌叢においても、腸内環境の酸性化が、ハイブリット・ポリアミン生合成機構のトリガーとなることが確認された。

*E. coli*はヒト腸内ではマイナーであるため、*E. coli*の耐酸性機構に関与する遺伝子(AdiA, AdiC)のホモログを保有する*Fusobacterium varium*を用いて、*En. faecalis*との組合せで、混合培養系およびノトバイオオートマウス実験を行い、ブトレッシンが放出されることを確認した。これは、ハイブリット・ポリアミン生合成機構は特定の2菌種(*E. coli*と*En. faecalis*)だけではなく、同様の耐酸性機構を保有する他の腸内細菌の存在下でも機能することを示している¹²⁾。

マウスにおける健康寿命伸長効果

ビフィズス菌LKM512とアルギニンを12か月齢マウスに半年間投与して比較したところ、それぞれに老年病の主要因である炎症マーカーや老化マーカーの抑制効果が認められたが、併用することでもっとも効果が高まった。そこで14か月齢ICRマウス(日本人平均寿命換算すると50歳前後に相当、n=70/群)を用いてビフィズス菌LKM512とアルギニン(LKM512+Arg)の併用経口

投与を行った。LKM512+Argの週3回の経口投与によりICRマウスで寿命が伸長し、腸内ポリアミン濃度の上昇が寿命伸長に有効であることが確認できた(図3a)¹¹⁾。本実験系ではLKM512+Arg投与によるポリアミン以外の変動ファクター(たとえば腸内細菌叢変動)も存在すると考えられるため、ポリアミンの効果と断定できない。しかしながら、ポリアミンの経口投与によるマウスの寿命伸長効果は他のグループからも報告されており⁷⁻⁹⁾、ポリアミンの効果である可能性はきわめて高いと考えている。

また、脳機能の維持にも着目し、モリス水迷路試験による空間認識・学習記憶力の測定を行った。1週間の訓練期間を終えた後のプローブ試験の結果、投与開始前は両群間に差がなかったが、投与6か月後(20か月齢)にはLKM512+Arg投与群の方が有意に成績が高く、加齢時の学習記憶力の維持にポリアミンの有効性が示唆された(図3b)¹¹⁾。寿命伸長効果と同様に、LKM512+Arg投与は、ポリアミン以外の変動ファクターが存在するため、ポリアミンの効果と断定はできない。しかしながら、スペルミジンとスペルミンは脳内のグルタミン酸受容体であるN-methyl-D-aspartate(NMDA)レセプターに結合し、その活性化および抑制化を介して学習・記憶力に関与していることや^{13,14)}、ポリアミン合成阻害による学習記憶の低下がラットで報告されており¹⁵⁾、ポリアミンが脳機能に影響を与えているのは間違いない。一方、腸管腔内ポリアミンが脳組織に到達するには血液脳関門を通過する必要があるが、それが認められた報告はない。しかしながら、ショウジョウバエの研究では、スペルミジン経口投与により、加齢に伴う記憶力低下が抑制され、それがオートファジー誘導に依存することが報告されている¹⁶⁾。筆者らは、血液脳関門経由ではなく、迷走神経

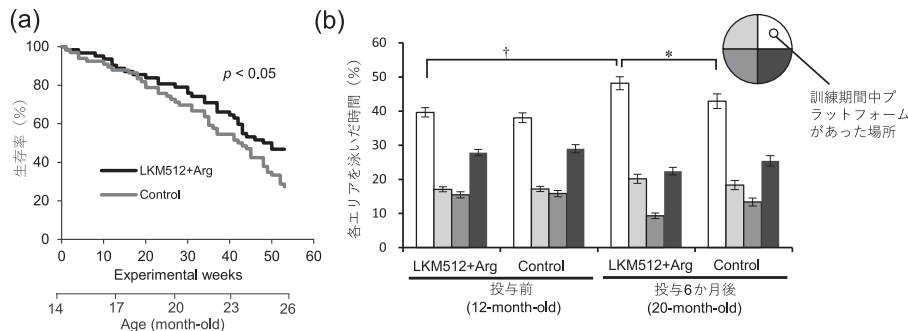


図3. マウスへのLKM512+アルギニン投与が寿命および空間認識学習力に及ぼす影響。(a) 生存曲線(Kaplan-Meier survival curve)。雌性マウス(n=70/群)。(b) モリス水迷路試験でのプローブ試験結果。決まった場所に透明プラットフォームを置き(水面下に置きマウスからは見えない)、3回/日、1週間の訓練(実際に泳がせて位置を覚えさせる。一定時間内にプラットフォームに到達できなかった場合は、プラットフォームに人為的に乗せて15秒間景色を覚えさせる)を繰り返し、プローブ試験ではプラットフォームを取り除き、そのエリアを遊泳した時間を比較する(棒グラフの色は右上の位置を示す)。* $p < 0.05$ (Student's *t*-test), † $p < 0.01$ (paired *t*-test)。

経路や臓器間ネットワークを介して作用している可能性を推測しており、今後の課題である。

血管内皮機能をターゲットとしたヒト臨床試験

ポリアミンの有する抗炎症作用やオートファジー促進作用から有効性が期待される血管内皮機能を対象にヒト効果判定試験を行った¹⁷⁾。BMIが高めの健常成人(平均年齢45歳)を対象に、ビフィズス菌LKM512とアルギニン含有ヨーグルト(LKM512+Argヨーグルト)およびプラセボ(これらを含まない通常ヨーグルト)の12週間のランダム化二重盲検並行群間比較試験を実施した。その結果、LKM512+Argヨーグルト群ではプラセボ群と比較して、血管内皮機能(EndoPATで評価)の有意な改善効果が認められた(図4)。また、この効果を裏付けるように、LKM512+Argヨーグルト群ではプラセボ群と比較し、摂取12週目に血圧が低い傾向を示し、血小板数が有意に減少した。さらに、LKM512+Argヨーグルト群ではプラセボ群と比較し、糞便中プトレッシン濃度が有意に高く、同時に血清スペルミジンが有意に高濃度であった。これらの結果は、LKM512+Argヨーグルトの摂取により腸内でプトレッシンが生合成され生体に吸収され、その後、生体内でプトレッシンより変換されたスペルミジンの作用により血管内皮機能が改善したことを示唆している。これは、本技術(機能性食品)がヒトにおいても効果を発揮し、超高齢社会に突入した我が国において健康寿命の伸長に有効である可能性を強く示唆している。

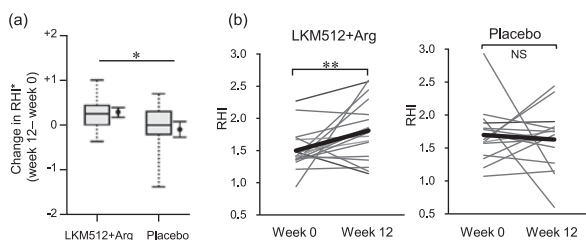


図4. LKM512 + アルギニン含有ヨーグルトが血管内皮機能に与える影響。(a) 血管内皮機能(RHI^{※注})の変化量。箱ひげ図のひげは5%値と95%値、箱は四分位範囲(25%–75%)、箱中の線は中央値を示し、箱ひげ図横に平均値(黒点)と標準誤差を表記した。 $*p < 0.05$ (Two-way ANOVA)。(b) 血管内皮機能(RHI)の群内変化。黒い太線は平均値を表す。 $**p < 0.01$ (paired *t*-test)；NS：差なし。

※注 RHI (Relative hyperemia index, 反応充血指数)：EndoPATで測定した血管内皮機能を表す数値。両手の指2本にプローブを装着して、指先の脈波を計測する。途中で片腕を駆血し、駆血前後の脈波の差から算出する。

また、腸内環境研究分野においては、個体差の大きい腸内細菌に特定の代謝産物(生理活性物質)を産生させ、その血中移行を確認し、保健効果を得ることに成功した重要な知見である。

おわりに

ポリアミンと他の多くの動植物由来の機能性食材との間には、本稿で示した生命活動の本質に関わる点や機能の多様性以外にも決定的な違いがある。それは、他のほとんどの機能性食材候補がヒトの体内で合成されない物質、たとえばポリフェノールなどは植物体内で合成されるのに対し、ポリアミンは我々の細胞内に合成系および分解系を保有し、生体内に普遍的に存在しているきわめて希な物質である点である。すなわち、生体への親和性が他の食材と比較して圧倒的に高い物質であり、一般の機能性食材の実用化において障壁となる吸収や過剰摂取の問題はほとんどなく、超高齢社会対策にきわめて有望な物質と考えられる。

謝 辞

本研究成果の一部は、農研機構生物系特定産業技術研究支援センター・イノベーション創出基礎的研究推進事業の支援を受けて得られたものである。一連の研究で常にディスカッションをいただいた辨野義己先生(理化学研究所)と栗原新先生(近畿大学)に深謝致します。糞便メタボロミクスの条件検討などご協力いただきましたヒューマン・メタボローム・テクノロジーズ(株)に感謝致します。

文 献

- 1) Medina, M. A. *et al.*: *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, **38**, 23 (2003).
- 2) Das, R. *et al.*: *Exp. Gerontol.*, **17**, 95 (1982).
- 3) Pucciarelli, S. *et al.*: *Rejuvenation Res.*, **15**, 590 (2012).
- 4) Uda, K. *et al.*: *J. Gastroenterol. Hepatol.*, **18**, 554 (2003).
- 5) Matsumoto, M. *et al.*: *Sci. Rep.*, **2**, 233 (2012).
- 6) Eisenberg, T. *et al.*: *Nat. Cell Biol.*, **11**, 1305 (2009).
- 7) Soda, K. *et al.*: *Exp. Gerontol.*, **44**, 727 (2009).
- 8) Eisenberg, T. *et al.*: *Nat. Med.*, **22**, 1428 (2016).
- 9) Yue, F. *et al.*: *Cancer Res.*, **77**, 2938 (2017).
- 10) Madeo, F. *et al.*: *Science*, **359** (2018).
- 11) Kibe, R. *et al.*: *Sci. Rep.*, **4**, 4548 (2014).
- 12) Kitada, Y. *et al.*: *Sci. Adv.*, **4**, eaat0062 (2018).
- 13) Williams, K. *et al.*: *Mol. Pharmacol.*, **45**, 803 (1994).
- 14) Masuko, T. *et al.*: *Mol. Pharmacol.*, **55**, 957 (1999).
- 15) Gupta, N. *et al.*: *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **100**, 464 (2012).
- 16) Gupta, V. K. *et al.*: *Nat. Neurosci.*, **16**, 1453 (2013).
- 17) Matsumoto, M. *et al.*: *Nutrients*, **11**, 1188 (2019).