

学位論文題名

Cholic Acid Transport Properties of Lactobacilli
and Bifidobacteria(ラクトバチルス属菌性とビフィドバクテリウム属菌性における
コール酸輸送に関する研究)

学位論文内容の要旨

胆汁酸塩は胆汁酸にグリシンあるいはタウリンが抱合した化合物であり、脊椎動物において脂質の乳化と消化に重要な役割を演じている。これらは肝臓でコレステロールから合成され、十二指腸へ分泌され、腸管循環を受ける。6 mmolの胆汁酸塩プールの内、およそ1 mmolが毎日糞便中に排泄され、コレステロールからの合成によって置き換えられる。腸管循環において、胆汁酸塩は腸内フローラによって2つの主な修飾反応を受ける。一つはbile salt hydrolaseによる脱抱合反応で、これにより胆汁酸が生成する。ついでこれらは7 α -脱水酸化反応により二次胆汁酸に変換される。これらの微生物変換反応によって生成された胆汁酸は、一般的に腸内細菌に対して毒性を示し、その生育を阻害することが知られている。本研究の目的は、ヒトの胆汁酸として最も一般的なコール酸を取り上げ、腸内細菌とコール酸の関わりをその生育阻害作用と輸送に注目して明らかにし、これによって腸内細菌の役割を考察すると共に、プロビオティック作用メカニズムの一端を解明することである。

1. *Lactobacillus*属, *Bifidobacterium*属菌株のコール酸感受性

コール酸が*Lactobacillus*属, *Bifidobacterium*属菌株に対してどの程度の生育阻害を示すのか、また*Lactobacillus*属乳酸菌のコール酸感受性が分離起源によってどの様に異なるのかを調べた。約20株の*Lactobacillus*属乳酸菌についてMRS培地(1/2濃度で調製)を用いた生育試験により、生育量を1/2に阻害するコール酸濃度(IC₅₀)を求めたところ、乳製品由来の*Lactobacillus*属乳酸菌は0.5~1.0mM、腸管由来の菌株は1.0~2.0mM、またそれ以外の分離起源の菌株は0.5~2.5mMと広い分布を示した。この結果は、少なくとも腸管由来の菌株は乳製品由来の菌株よりもコール酸耐性が強い傾向があることを示している。また、腸管由来の*Bifidobacterium*属10菌株では、1.0~2.0mMのIC₅₀であった。腸管内には高濃度の胆汁酸が存在しており、腸管由来の菌株は胆汁酸耐性を有する必要があることを考えると、これらの結果は合理的である。

2. *Lactobacillus*属, *Bifidobacterium*属菌株によるコール酸の蓄積

放射性同位元素でラベルしたコール酸を用いた輸送実験の結果、*Lactobacillus*属菌株と*Bifidobacterium*属菌株では、細胞がグルコースによってエネルギー化されると、コール酸

は細胞内に蓄積されることが見出された。この結果は、毒性の強いコール酸を排出せず逆に取り込む点で予想に反するものであり、むしろこれらの菌株の特性であると考えられた。このコール酸取込みの駆動力は、次のような実験結果に基づいてプロトン駆動力の ΔpH 成分であることが明らかにされた：(1) ΔpH 成分を選択的に消去するナイジェリシンを添加すると、細胞内に蓄積されたコール酸が一気に放出される、(2)細胞外 pH を低下させて ΔpH 成分を増大させるとコール酸の蓄積が促進される、などである。特に種々の *Lactobacillus*属菌株におけるコール酸蓄積量の比較から、蓄積量は細胞内 pH に依存し、細胞内 pH との間に明瞭な相関があることが示された。このことから、コール酸の蓄積は蛋白質のトランスポーターによって媒介される現象ではなく、疎水性弱酸と細菌細胞膜（リン脂質二重層）を隔てての ΔpH との相互作用に基づくものであることが示唆された。すなわち、コール酸は pKa 値6.4の弱酸であり、生理的条件下では非解離状態のコール酸分子が多数存在し、これらは細胞内に入ることができる。エネルギー化された細胞内はアルカリ環境にあるため、コール酸分子は解離し、生じたコール酸アニオンは極性が高いため細胞膜を通過できなくなり、その結果細胞内に蓄積されるものと考えられる。これらのことは、細胞内へのコール酸の蓄積は、その細胞がコール酸排出活性を持たず、細胞内 pH が細胞外 pH より高い場合に成立することを示している。

輸送実験の結果、*Lactobacillus*属菌株と*Bifidobacterium*属菌株は外部コール酸濃度が1~2mMの場合にもコール酸を取り込むことが示された。この結果は、腸管内における胆汁酸（塩）濃度が0.1mM~10mMであることを考慮すると、コール酸の取込みが実際に腸管内で起こっている可能性を示している。

3. コール酸取込みとプロバイオティック機能の関連性について

胆汁酸蓄積に関するこのような新しい現象の発見は、*Lactobacillus*属菌株や*Bifidobacterium*属菌株のプロバイオティック機能を解明する上で重要な示唆を与える。すなわち、これらの細菌をヨーグルトや発酵乳などを通じて大量に供給することによって、ヒトの胆汁酸代謝に影響を与える可能性が考えられる。生菌数を増大させるには、難消化性オリゴ糖や食物繊維によって腸内の*Lactobacillus*属菌株や*Bifidobacterium*属菌株を活性化する方法もあり、これによって胆汁酸蓄積を持続的に行わせることが期待できる。胆汁酸はヒト腸管細胞に毒性を示し、発癌プロモーターであることが知られている。従って、腸管内から胆汁酸を除去することは、大腸内容物の毒性を低下させ、それ故、大腸癌発症リスクの低減にも有効である可能性が考えられる。さらに、胆汁酸排出が促進されるとコレステロールからの胆汁酸塩の合成が引き起こされるであろう。もしこのコレステロールが血清LDL-コレステロールから供給されるならば、血清コレステロールレベルが腸管内での胆汁酸代謝によって低下する可能性もたらされる。これらのプロバイオティック機構は今後の検討課題である。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 富 田 房 男
副 査 教 授 横 田 篤
副 査 助 教 授 浅 野 行 蔵

学 位 論 文 題 名

Cholic Acid Transport Properties of Lactobacilli and Bifidobacteria

(ラクトバチルス属菌性とビフィドバクテリウム属菌性における
コール酸輸送に関する研究)

胆汁酸塩は胆汁酸にグリシンあるいはタウリンが抱合した化合物であり、脊椎動物において脂質の乳化と消化に重要な役割を演じている。これらは肝臓でコレステロールから合成され、十二指腸へ分泌され、腸管循環を受ける。腸管循環において、胆汁酸塩は腸内フローラによって二つの主な修飾反応を受ける。一つは脱抱合反応で、これにより胆汁酸が生成する。ついでこれらは7 α -脱水酸化反応により二次胆汁酸に変換される。これらの微生物変換反応によって生成された胆汁酸は、腸内細菌に対して毒性を示し、その生育を阻害することが知られている。

本研究の目的は、ヒトの胆汁酸として最も一般的なコール酸を取り上げ、腸内細菌とコール酸の関わりをその生育阻害作用と輸送に注目して明らかにし、これによって腸内細菌の役割とプロバイオティック作用メカニズムの一端を解明することである。

1. *Lactobacillus*属, *Bifidobacterium*属菌株のコール酸感受性

コール酸が*Lactobacillus*属, *Bifidobacterium*属菌株に対してどの程度の生育阻害を示すのかを調べた。約20株の*Lactobacillus*属乳酸菌について生育量を1/2に阻害するコール酸濃度 (IC₅₀) を求めたところ、乳製品由来の*Lactobacillus*属乳酸菌は0.5~1.0mM, 腸管由来の菌株は1.0~2.0mM, またそれ以外の分離起源の菌株は0.5~2.5mMと広い分布を示した。従って、腸管由来の菌株は乳製品由来の菌株よりもコール酸耐性が強いことがわかった。また、腸管由来の*Bifidobacterium*属10菌株は、1.0~2.0mMのIC₅₀を示した。腸管内には高濃度の胆汁酸が存在しており、腸管由来の菌株は胆汁酸耐性を有する必要があることを考えると、これらの結果は合理的である。

2. *Lactobacillus*属, *Bifidobacterium*属菌株によるコール酸の蓄積

放射性同位元素でラベルしたコール酸を用いた輸送実験の結果、*Lactobacillus*属菌株と*Bifidobacterium*属菌株では、細胞がグルコースによってエネルギー化されると、コール酸は細胞内に蓄積されることが見出された。この結果は、毒性の強いコール酸を排出せず逆

に取り込む点で予想に反するものであるが、これらの菌株の特性であると考えられた。コール酸取込みの駆動力は、次の2つの実験結果に基づいて、プロトン駆動力の ΔpH 成分であることが明らかにされた：(1) ΔpH 成分を選択的に消去するナイジェリシンを添加すると蓄積されたコール酸が速やかに放出される；(2)細胞外 pH を低下させて ΔpH 成分を増大させるとコール酸の蓄積が促進される。

さらに、種々の*Lactobacillus*属菌株における細胞内 pH とコール酸蓄積量の間に関係が見出された。このことは、コール酸の蓄積は蛋白質のトランスポーターを介するものではなく、疎水性弱酸が細菌細胞膜（リン脂質二重層）を隔てて ΔpH に応じて分配される現象であることを示している。コール酸は pK_a 値6.4の弱酸であり、生理的条件下では非解離状態のコール酸分子が多数存在し、これらは細胞内に入ることができる。エネルギー化された細胞内はアルカリ環境にあるため、コール酸分子は解離し、生じたコール酸アニオンは極性が高いため細胞膜を通過できなくなり、その結果細胞内に蓄積されるものと考えられる。

3. コール酸取込みとプロバイオティック機能の関連性について

今回明らかにされた腸内細菌による胆汁酸蓄積は、胆汁酸の糞便を通じての体外排出を促進することにつながると考えられる。このことは、*Lactobacillus*属菌株や*Bifidobacterium*属菌株のプロバイオティック機能を解明する上で重要な示唆を与える。まず、胆汁酸はヒト腸管細胞に毒性を示し、発癌プロモーターであることが知られている。従って、腸管内から胆汁酸を除去することは、大腸内容物の毒性を低下させ、それ故、大腸癌発症リスクの低減に有効であろう。さらに、胆汁酸排出が促進されるとコレステロールからの胆汁酸塩の合成量が増大するであろう。もしこのコレステロールが血清LDL-コレステロールから供給されるならば、血清コレステロールレベルが低下する可能性がある。今後は動物実験などでこれらの可能性を検証する必要がある。

今回の申請者の研究による、*Lactobacillus*属菌株と*Bifidobacterium*属菌株によるコール酸の取込みは新発見であり、これらの細菌のプロバイオティックメカニズムの解明およびプロバイオティック製品の開発に大きく貢献するものと考えられる。

よって審査員一同は、Peter Kurdiが博士（農学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた。