慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	食事が腸内細菌叢及び腸内代謝物質に与える影響の評価
Sub Title	Evaluation of the effect of diet on gut microbiota and metabolites
Author	石井, 千晴(Ishii, Chiharu)
Publisher	慶應義塾大学湘南藤沢学会
Publication year	2013
Jtitle	生命と情報 No.20 (2013.) ,p.74- 83
JaLC DOI	
Abstract	腸内細菌は消化管での消化吸収の補助や粘膜免疫システムの構築, さらにはビタミンの供給など種々の役割を担っている。一方で, 腸内細菌叢のバランスが崩れると, 大腸がんなどをはじめとする腸管関連疾患, アレルギー, 肥満などのメタボリックシンドロームの発症につながることが知られている。近年の報告から腸内細菌の構成は, 宿主の食習慣に依存し、大きく3つのタイプに分類されることが明らかになった。ゆえに腸内細菌をコントロールして腸内環境を良好に保つためには「食事」「腸内細菌」「宿主」の関係を理解することが重要であるが, この三者がどのようなメカニズムで相互作用しているのかは未だ不明瞭である。本研究は, 細菌叢解析と代謝物質解析を組み合わせたオミクス解析を行うことで, この三者間の関係を明らかにすることを目的としている。修士論文は高脂肪食またはプロバイオティクスの影響を考察する2つの章で構成されているが, ダイジェストではその中から高脂肪食が腸内環境に与える影響について記述する。高脂肪食が腸内細菌と宿主に与える影響を明らかすることを目的に、通常食または高脂肪食を52週間摂取させた人エフローラ定着マウスから経時的採取した糞便を対象として、16 S rRNAクローンライブラリー法による細菌叢解析と、CE-TOF/MSによる糞便中代謝物質のメタボローム解析を行った。通常食群と高脂肪食群の腸内細菌プロファイルについて多変量解析手法の一つである判別分析を行った結果、高脂肪食群でLachnospiraceae, Oscilliospira, Prevotellaの割合が多く, Bacteroidesの割合が少ないことが分かった。またメタボローム解析の結果, 高脂肪食群ではアミノ酸をはじめとして, 腸内細菌が産生することが知られているビタミンB6などの代謝物が減少していた。これらの結果は, 食習慣によって生じた腸内細菌叢の変化が, 腸内代謝物質にプロファイルに影響を及ぼしている可能性を示唆している。
Notes	慶應義塾大学湘南藤沢キャンパス先端生命科学研究会 2013年度学生論文集 修士論文ダイジェスト
Genre	Technical Report
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KO92001004-00000020-0074

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

2013年度　修士論文ダイジェスト

食事が腸内細菌叢及び腸内代謝物質に与える影響の評価

Evaluation of the effect of diet on gut microbiota and metabolites

政策・メディア研究科　修士課程2年

石井　千晴

要旨

腸内細菌は消化管での消化吸収の補助や粘膜免疫システムの構築、さらにはビタミンの供給など種々の役割を担っている。一方で，腸内細菌叢のバランスが崩れると，大腸がんなどをはじめとする腸管関連疾患，アレルギー，肥満などのメタボリックシンドロームの発症につながることが知られている．近年の報告から腸内細菌の構成は，宿主の食習慣に依存し、大きく3つのタイプに分類されることが明らかになった。ゆえに腸内細菌をコントロールして腸内環境を良好に保つためには「食事」「腸内細菌」「宿主」の関係を理解しすることが重要であるが，この三者がどのようなメカニズムで相互作用しているのかは未だ不明瞭である．本研究は，細菌叢解析と代謝物質解析を組み合わせたオミクス解析を行うことで，この三者間の関係を明らかにすることを目的としている．修士論文は高脂肪食またはプロバイオティクスの影響を考察する2つの章で構成されているが，ダイジェストではその中から高脂肪食が腸内環境に与える影響について記述する。高脂肪食が腸内細菌と宿主に与える影響を明らかすることを目的に、通常食または高脂肪食を52週間摂取させた人工フローラ定着マウスから経時的採取した糞便を対象として、16S rRNAクローンライブラリー法による細菌叢解析と、CE-TOF/MSによる糞便中代謝物質のメタボローム解析を行った。通常食群と高脂肪食群の腸内細菌プロファイルについて多変量解析手法の一つである判別分析を行った結果、高脂肪食群でLachnospiraceae，Oscilliospira，Prevotellaの割合が多く，Bacteroidesの割合が少ないことが分かった．またメタボローム解析の結果、高脂肪食群ではアミノ酸をはじめとして、腸内細菌が産生することが知られているビタミンB6などの代謝物が減少していた。これらの結果は、食習慣によって生じた腸内細菌叢の変化が，腸内代謝物質にプロファイルに影響を及ぼしている可能性を示唆している。

キーワード: 腸内細菌、高脂肪食、メタボローム、16S rRNAクローンライブラリー法

1. 序論

ヒトの腸には重さにして約1.5 kg，数百種類にも及ぶ腸内細菌が生息しており，難消化性の糖類の分解や食物からの栄養素摂取量の調整，免疫システムの構築，人体で生産することのできないビタミン類の生産などを担っている．腸内細菌は我々の生命活動を強力にサポートする存在である一方で，腸内細菌叢のバランスが崩れると，大腸がんなどをはじめとする様々な腸疾患（Garrett WS *et al.*, Cell, 131, 2007; Arthur JC *et al.*, Science, 338, 2012），2型糖尿病などのメタボリックシンドローム（Vijay-Kumar *et al.*, Science, 328, 2010），肥満の発症（Matam *et al.*, Science, 328, 2010）などにつながることが示唆されている．腸内細菌の構成は，食習慣によっていくつかのグループ（エンテロタイプ）に分類することができ，高脂肪，高タンパク質などの食事習慣の特徴によって特徴的な菌が異なることが示され（Arumugam *et al.*, Nature, 473, 2011），食習慣が腸内細菌の構成を決定する重要な要素であることが明らかになっている．ゆえに腸内細菌をコントロールして腸環境を良好に保ち，疾病を予防するためには「食事」「腸内細菌」「宿主」の関係を理解しすることが重要であるが，この三者がどのようなメカニズムで相互作用しているのかは未だ不明瞭である．そこで本研究は，高脂肪食を長期にわたって摂取したマウスを対象に、細菌叢解析と代謝物質解析を組み合わせたオミクス解析を行うことで，三者間の関連性を明らかにすることを目的としている．

2. 対象と手法

3.2.1. 対象

本研究では，人工フローラマウスに通常飼料を与える群と，人工フローラマウスに高脂肪食を与える群の2 群のマウス(各n=2)から経時的（8,12,24,36,52 週の5 ポイント）に採取された計20 サンプルの糞便を対象としている．以降サンプル名は週齢，食事条件，個体を組み合わせた名前で表記する．例えば8N2と書かれているサンプルは8週齢の通常食群の2番の個体を示している．なお，本研究は財団法人実験動物中央研究所（実中研）との共同研究であり，マウスからのサンプリングは実中研が行った．

3.2.2. GS Juniorを用いた16S rRNA遺伝子のシーケンシング

糞便サンプルからQIAGEN 社のQIAamp DNA Stool Kit を用いてDNA を抽出した． 16S rRNA遺伝子配列を増幅するため、バクテリア特異的なユニバーサルプライマーである341F（5'-CCTACGGGAGGCAGCAG-3'）と907R（5'-CCGTCAATTCCTTTRAGTTT-3'）(Wilms, R., *et al.* 2006)を用いてPCRを行った． GS juniorによるシークエンスに必要なアダプターと，サンプル識別に必要なタグ配列を付加するために2nd PCRを行った．精製した2nd PCR産物の塩基配列をRoche社GS juniorを用いてシークエンスした。得られた塩基配列についてQiime1.7 (http://qiime.org/) (Caporaso *et al.*, Nat. Methods, 2010)を用いて97%の類似性でOperational Taxonomic Unit (OTU, 操作的分類単位)を作成し，Ribosomal Database Project (RDP)の配列をリファレンスとして各OTUの細菌種の推定を行った．

3.2.3. CE-TOFMSによる代謝物質濃度の測定

糞便サンプル10 mgに50%メタノール(内部標準であるMethionine sulfone, CSA, MESをそれぞれ

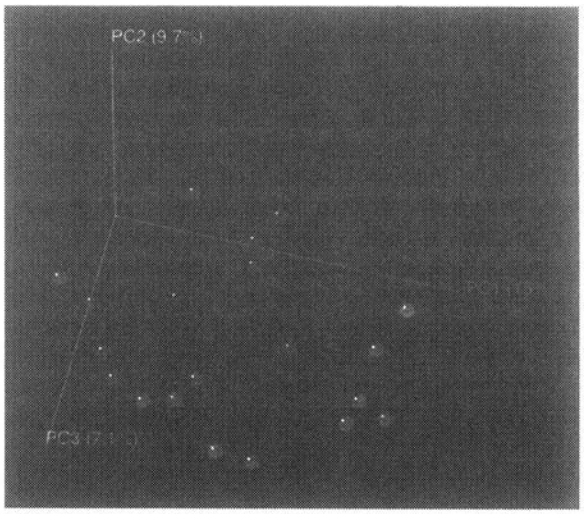
200 μM 含む)を400 μl混合し，3 mmジルコニアビーズ3個と0.1 mmジルコニアビーズ約0.1 gを加え，3,5000 rpm，3分破砕することで糞便中成分を抽出した．溶液を15,000×g，5 分遠心分離し，上清を限外濾過フィルターで濾過することで，タンパク質を取り除いた．ろ液を真空乾燥機で40°C，3時間乾燥させ，40 μLのMilliQで再溶解したものをサンプルとした．それらのサンプルの質量電荷比と泳動時間をcapillary electrophoresis time-of-flight mass spectrometry（CE-TOFMS）を用いて測定した．CE-TOFMSによる代謝物質の測定は先端研究科学研究所の中西裕美子氏が行った．

3. 結果と議論

3.3.1. 通常食群と高脂肪食群の細菌叢構造の比較

各個体の細菌叢コミュニティー全体の差異を客観的な指標を用いて評価するため，Unifrac解析を行った．Unifrac解析は，細菌叢コミュニティーを構成している各細菌の系統的な距離も考慮した上で，細菌叢同士の類似度を評価する手法である． Unifrac解析には細菌叢コミュニティーに含まれる菌の種類のみを評価するunweighetedと菌の種類に加えてその割合も同時に評価するweighetedの2通りの評価方法がある．Unweightedの主座標分析の結果，通常食群（青）のプロットと高脂肪食群（赤）のプロットは異なるクラスターを形成した（図1A）． weighetedの主座標分析の結果においても，通常食群と高脂肪食群のプロットは異なるクラスターを形成した（図1B）．このことから２群間で細菌の種類にもその割合にも差異があり，食事条件の違いは細菌叢のコミュニティー構造を変化させることが示された。

A



B

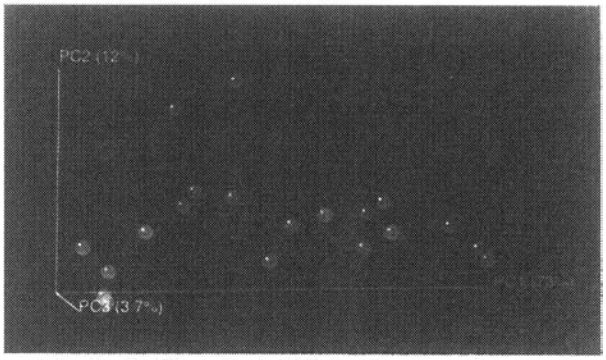


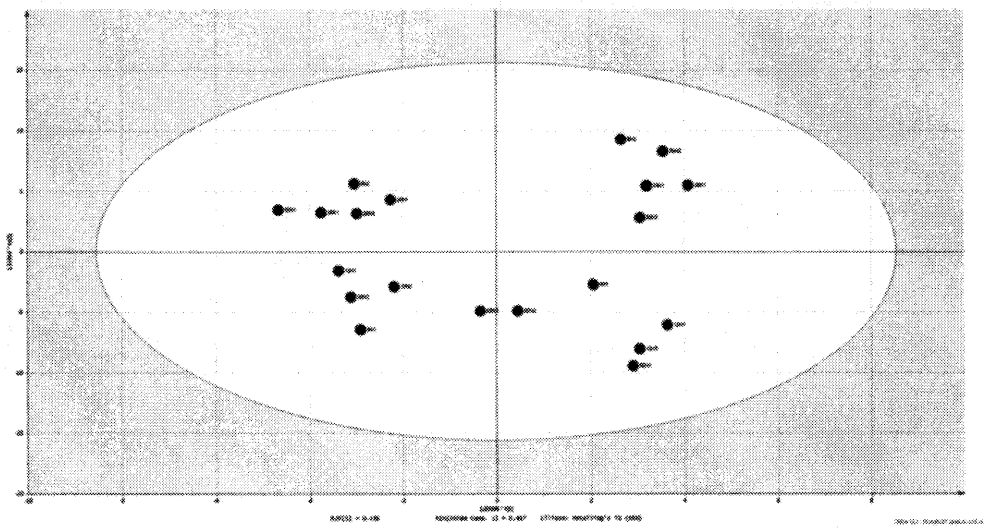
図1 細菌叢の主座標分析の3Dプロット

（A）unweighted，（B）weightedのUnifrac解析による主座標分析の結果．青の球は通常食群，赤の球は高脂

肪食群を示している．

通常食群と高脂肪食群の細菌叢コミュニティーの差異の形成に寄与している菌を明らかにするため，orthogonal projections to latent structures discriminant analysis（OPLS-DA）を行った．OPLS-DAとは多変量解析の一種で，異なる試験群（健常者データの患者データなど）を分離しようとした際に，群間の分離に寄与している要素を明らかにすることができる手法である．OPLS-DAにはSIMCA version13を用いた．

A



B

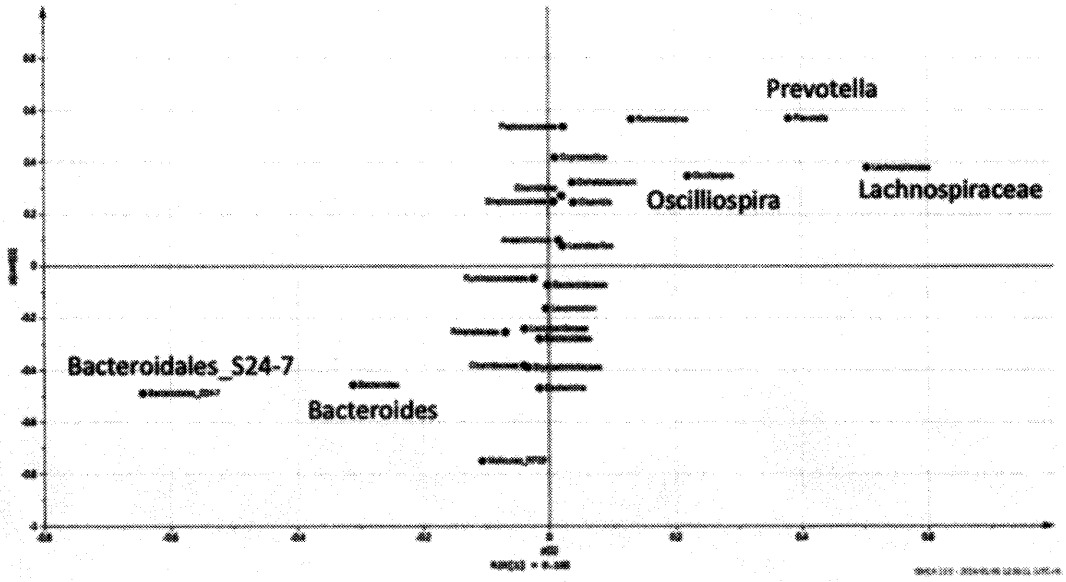


図2 OPLS-DA解析による通常食群と高脂肪食群の細菌叢の比較

（A）OPLS-DA解析を行った際の各サンプルのプロット．青は通常食群，赤は高脂肪食群を表している．
（B）Aのプロットに寄与している要素を示すSプロット．紫はFirmicutes門，緑はBacteroidetes門を示している．

OPLS-DAの結果，２つの群が明確にクラスター分けされた（図2A）．図2Bは図3 Aの分離に寄

与する要素を示すSプロットと呼ばれる図で，中央から離れて左右の端にプロットされる要素ほど，図2 Aでのクラスタリングに大きな影響を与えると判断する．Sプロットから通常食群ではBacteroidales綱に属するS24-7科及びBacteroides属が多いこと，高脂肪食群ではPrevotella属，Oscilliospira属及びLachnospiraceae科が多いことが，細菌叢構造の違いに特に寄与していることがわかった．高脂肪食摂取や肥満に関わる腸内細菌叢の門ベルでの変化として，高脂肪食を摂取した野生型マウスやレプチン遺伝子欠損による肥満発症モデルマウス（ob/obマウス），肥満体型のヒトにおいて，Firmicutes門が増加し，Bacteroidetes門が減少するということが過去の先行研究から報告されている（Turnbaugh *et al.*, Cell Host Microbe., 2008; Ley *et al.*, PNAS, 2005; Turnbaugh *et al.*, Nature, 2006）．図2Bにおいても通常食群で特徴的な菌がBacteroidetes門のみで構成されているのに対して，高脂肪食群で特徴的な菌の半分以上はFirmicutes門に属していることから，本研究においてもFirmicutes門が多いということが高脂肪食群の特徴であることを示した．

一方，より細かい分類である科や属レベルでの変化をみると，Bacteroidetes門の中でも，Prevotella属は高脂肪食群に多いのに対して，S24-7科やBacteroides属は通常食群で多いことが観察され，同じ門の中でも科や属によって異なる挙動を示すことが分かった．

3.3.2. 通常食群と高脂肪食群の代謝物質プロファイルの比較

通常食群と高脂肪食群の間で有意に差がある代謝物質を明らかにするため，マンホイットニーのU検定を行った．有意差が認められた（P値＜0.05）であった物質は63物質あったが，そのうち61物質は高脂肪食群で濃度が低下していた（図3）．

高脂肪食群で減少していた代謝物質の特徴をとらえるため，Metabolite Set Enrichment Analysis（MSEA）を用いて，高脂肪食群でどのような代謝経路の物質が減少していたのかを調べた（図4）．

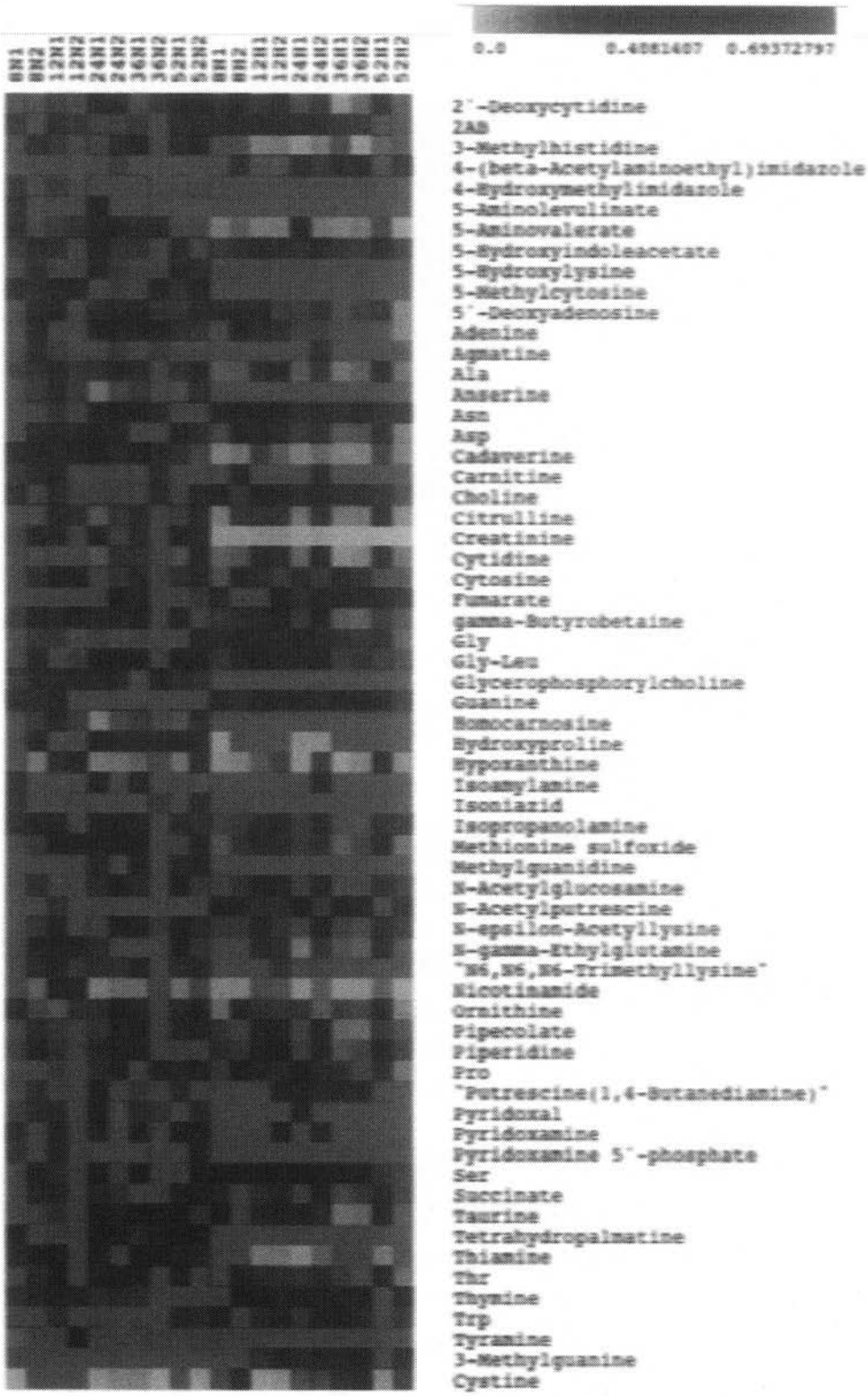


図3 マンホイットニーのU検定において有意差があった（P値< 0.05）代謝物質の相対濃度を示すヒートマップ

ヒートマップの色は同一代謝物質内で濃度が最大であったサンプルの濃度を1とした際の，各サンプルの相対的濃度を示し，赤は濃度が高く，緑は低い．

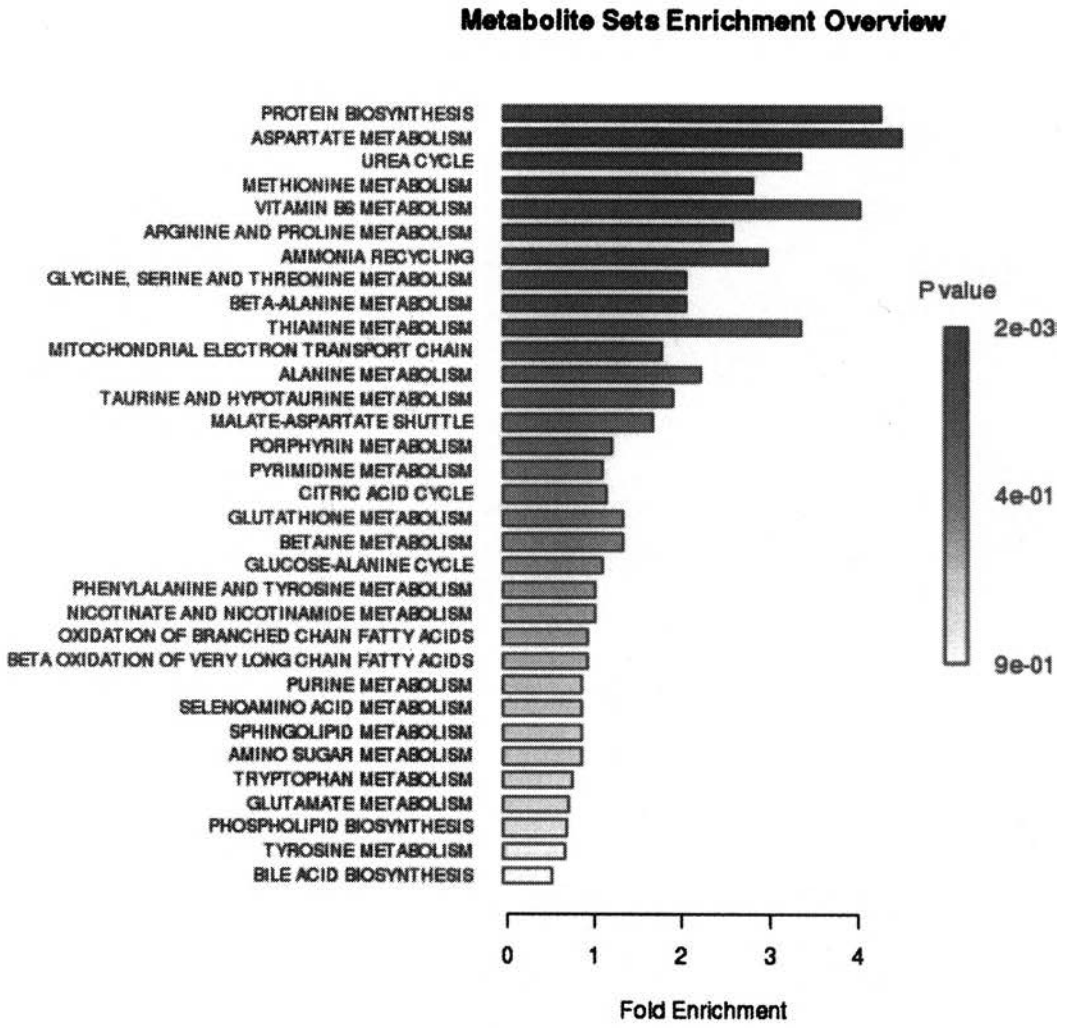


図4 MSEAの結果

棒グラフの色はP値を，長さは確立的に対象の代謝経路に含まれる代謝物質の個数の期待値と実際に対象の代謝経路に該当した代謝物質の個数の比を示し，長いほど期待値より多くの代謝物質が代謝経路上にマッピングされたことを示す.

その結果，タンパク質合成やアスパラギン酸代謝経路に含まれるような各種アミノ酸（Alanine，Proline，Threonine，Asparagine，Aspartic acid，Tryptophanなど），ビタミンB6代謝関連物質（Pyridoxamine，Pyridoxal，Pyridoxamine 5'-phosphate）が特に減少していた（図4）．ビタミンB6は腸内細菌が産生する物質として知られており（Sumi *et al*.,J Nutr., 1977），ビフィズス菌がその産生に関わっているという報告もある（Taguchi *et al*.,1984）．脂質代謝との関連では，脂質を含む肉や魚を摂取した際に，ビタミンB6の必要量が増加するという報告や，ビタミンB6が欠乏した状態であると同じ食事を取っても血液中のコレステロール値が増加しやすいという報告(Vijayammal *et al*,.J Biol Sci., 1978)がある．従って，高脂肪食の摂取によって細菌叢の構成が変化し，ビタミンB6の生成が減少した可能性や，過剰に摂取した脂質を代謝するためにビタミンB6を多く消費したことによって，高脂肪食群でビタミンB6濃度が減少した可能性が考えられる.

3.3.3. 腸内細菌と代謝物質の相関関係

腸内細菌と代謝物質濃度の関連を明らかにするため，Qiimeを用いてプロクラステス解析を行っ

た．プロクラステス解析は，異なる評価軸によって作成されたプロットを，回転・拡大・縮小によってなるべくプロット同士が近似するように変換（プロクラステス変換）することによって，同サンプルから異なる手法を用いて取得したデータ同士の関連性を評価するための手法である．

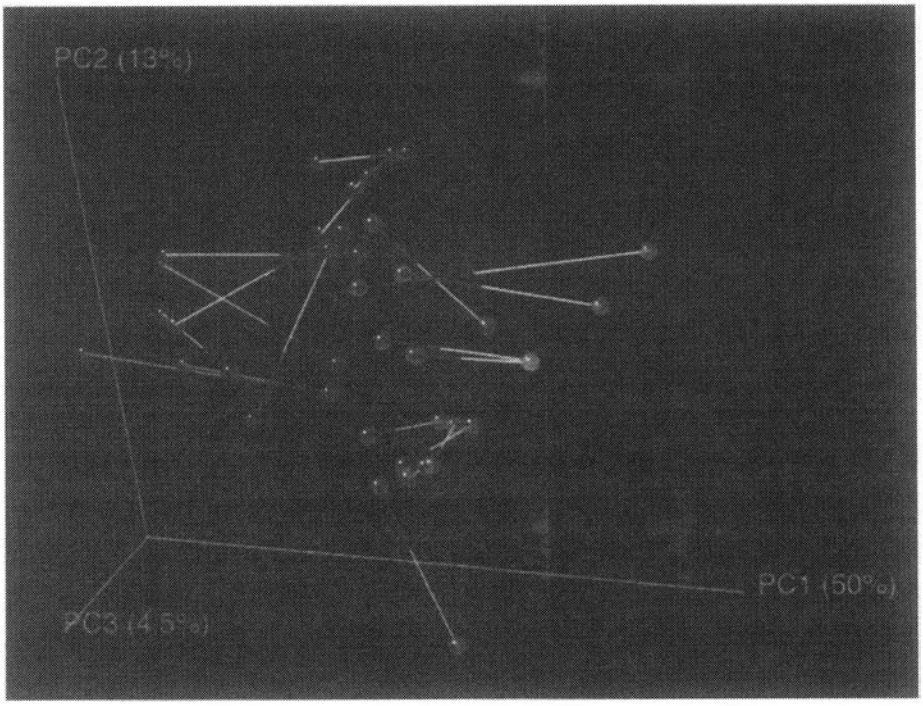


図5 プロクラステス解析の結果（3Dプロット）

一つの球は各サンプルの細菌叢もしくは代謝物質プロファイルを示し，青の球は通常食群，赤の球は高脂肪食群のサンプルを表す．同じサンプル由来の細菌叢プロファイルと代謝物質プロファイルのプロットは線で結ばれており，赤線側が細菌叢プロファイル，白線側が代謝物質プロファイルを表す．

プロクラステス解析の結果，通常食群と高脂肪食群のプロットはそれぞれの食事条件によって異なるクラスターを形成し，同じサンプル由来の細菌叢と代謝物質のプロファイルは同じクラスターに属した（図5）．このことから，食事の差異によって細菌叢にも代謝物質にも変化が生じることが確かめられた．さらに，その変化は細菌叢，代謝物質プロファイルで独立して起こるのではなく，細菌叢—代謝物質の間で相互作用を持ちながら変化していることが示された．

そこで，どのような代謝物質濃度と腸内細菌の組み合わせが関連性を持っているのかをより詳細に調べるため，各個体の加齢に伴う代謝物質濃度及び各細菌の割合の変動パターンの類似性を，スピアマンの順位相関係数を用いて算出した．これによって導き出された代謝物質—細菌間の正の相関関係（P値<0.05以下の組み合わせ）を可視化するため，Cytoscape 2.8を用いてネットワーク図を描画した（図6）．

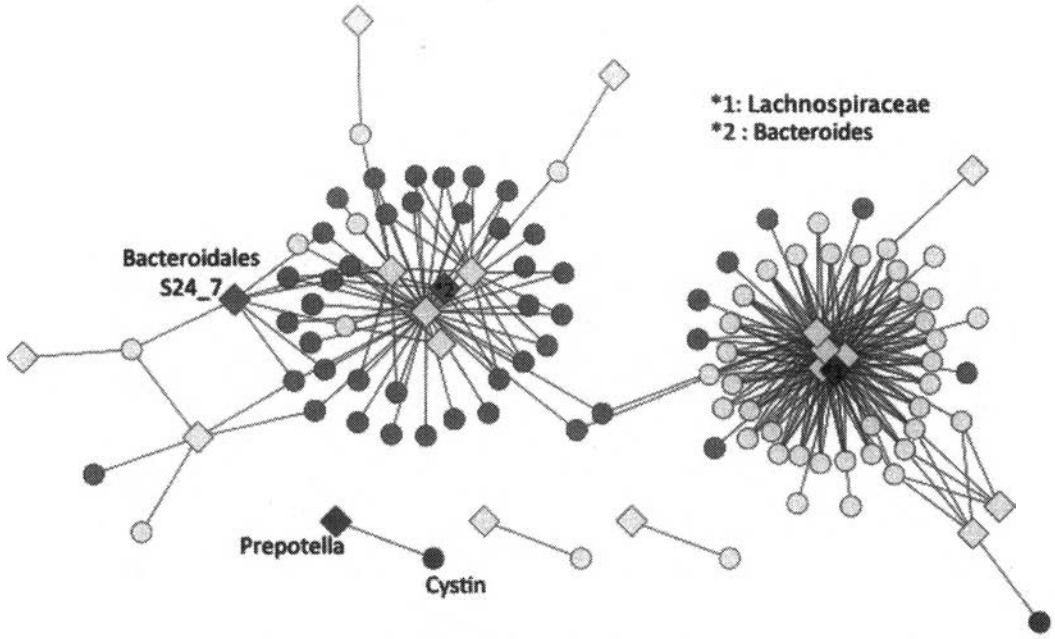


図6 細菌—代謝物質の相関関係を示すネットワーク図

それぞれの円は代謝物質，ひし形は細菌を表し，線で繋がれた細菌—代謝物質の組み合わせは正の相関関係（スピアマンの順位相関係数でP値＜0.05）を有していることを示す．緑の円またはひし形は通常食群で有意に多く，オレンジの円のまたはひし形は高脂肪食群で有意に多いこと（マンホイットニーのU検定でP値＜0.05）であることを表している．

ネットワーク図から細菌—代謝物質の関連には2つのクラスターがあることが分かる．左のクラスターには通常食群で有意に増加している代謝物質（緑で塗られたノード）のほとんどが含まれており，またそれらの代謝物質と通常食群で多いBacteroides，S24-7が正の相関関係を持っている．一方右のクラスターには通常食群で蓄積している代謝物質は少なく，クラスターの中心には高脂肪食群で多いLachnospiraceaeが位置している．

このことから，細菌-代謝物質間の関係にはいくつかのグループがあり，ある細菌や代謝物質の増減に応じて，同じグループに属する細菌や代謝物質濃度も合わせて増減するような相互作用が働いていることが示唆される．加えて食事条件の違いによって，通常食群と高脂肪食では異なる細菌—代謝物質クラスターが活性化している様子が観察でき，通常食群では左のクラスターに属するような菌種，代謝経路が活発に働いた結果，様々な代謝物質の蓄積をまねいたのではないかと考えられる．

4. 結論

以上の結果から，高脂肪食を摂取した際の腸内細菌叢は，Firmicutes門の菌が増加し，中でもOscilliospira属及びLachnospiraceae科が通常食群と高脂肪食群の分離に寄与していることが示唆された．Bacteroidetes門の細菌は科や属によって異なる傾向を示し，Prevotella属は高脂肪食群で多く，S24-7科及びBacteroides属は通常食群に多いことが示された．代謝物質プロファイルからは高脂肪食群において，通常食群に比べて様々な代謝物質濃度が低下していることが観察され，中でもアミノ酸代謝，ビタミンB6代謝の代謝物質が高脂肪食群で減少することが明らかになった．このような食事条件に基づく，細菌叢や代謝物質の変化は細菌叢，代謝物質それぞれで独立して起こるのではなく，細菌叢—代謝物質の間で相互作用を持ちながら変化していることがプロクラステス解析

から示された．また，細菌-代謝物質間の関係にはいくつかのグループがあり，同じグループに属する細菌や代謝物質は同じ変動パターンを共有していることがネットワーク解析から示された．加えて食事条件の違いによって，通常食群と高脂肪食では異なる細菌—代謝物質クラスターが活性化している様子が観察でき，通常食群ではBacteroides属を中心としたクラスターが活発に働いたことによって，様々な代謝物質の蓄積が見られたのではないかという可能性を示唆した．

5. 謝辞

本研究を進めるにあたって，メタボロームの測定データを提供してくださった中西裕美子さん，適宜適切なアドバイスを下さった福田真嗣さんに感謝いたします。また、村上慎之介さん、馬場藤貴さんをはじめとする常在菌グループのみなさまにもおせわになりました。このダイジェストとほぼ同様の結果については、2012年11月にアメリカ合衆国、サンアントニオで開催されたProbiotics-2012にてポスター発表をさせて頂き、Student Poster Awardを受賞致しました。このような結果を得られたことも上記の方々や、共同研究先であり，検体を提供していただいた財団法人実験動物中央研究所、このような研究の機会を与えてくださった冨田勝教授のお力添えあってのことだと感じております。心より感謝を申し上げます．ありがとうございました．

6. 参考文献

Arthur, J.C., Perez-Chanona, E., Muhlbauer, M., Tomkovich, S., Uronis, J.M., Fan, T.J., Campbell, B.J., Abujamel, T., Dogan, B., Rogers, A.B. *et al.* (2012) Science (New York, N.Y.), 338, 120-123.

Arumugam, M., Raes, J., Pelletier, E., Le Paslier, D., Yamada, T., Mende, D.R., Fernandes, G.R., Tap, J., Bruls, T., Batto, J.M. *et al.* (2011) Nature, 473, 174-180.

Caporaso, J.G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F.D., Costello, E.K., Fierer, N., Pena, A.G., Goodrich, J.K., Gordon, J.I. *et al.* (2010) Nature methods, 7, 335-336.

Garrett, W.S., Lord, G.M., Punit, S., Lugo-Villarino, G., Mazmanian, S.K., Ito, S., Glickman, J.N. and Glimcher, L.H. (2007) Cell, 131, 33-45.

Ley, R.E., Backhed, F., Turnbaugh, P., Lozupone, C.A., Knight, R.D. and Gordon, J.I. (2005) Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 102, 11070-11075.

Sumi, Y., Miyakawa, M., Kanzaki, M. and Kotake, Y. (1977) 107, 1707-1714.

Turnbaugh, P.J., Backhed, F., Fulton, L. and Gordon, J.I. (2008) Cell host & microbe, 3, 213-223.

Turnbaugh, P.J., Ley, R.E., Mahowald, M.A., Magrini, V., Mardis, E.R. and Gordon, J.I. (2006) Nature, 444, 1027-1031.

Vijay-Kumar, M., Aitken, J.D., Carvalho, F.A., Cullender, T.C., Mwangi, S., Srinivasan, S., Sitaraman, S.V., Knight, R., Ley, R.E. and Gewirtz, A.T. (2010) Science (New York, N.Y.), 328, 228-231.

Vijayammal, P.L. and Kurup, P.A. (1978) Australian journal of biological sciences, 31, 7-20.