

腸内細菌叢の形成に及ぼす大豆たん白質食の影響に関する研究

谷 史人^{*1,2}・Ho Le Quynh CHAU^{2,3}・川口奈津美¹・中元昌広^{1,4}・榊田哲哉^{1,2}

¹京都大学大学院農学研究科食品生物科学専攻 ²京都大学大学院地球環境学術資源循環学廊

³(現)Faculty of Animal Sciences, Hue University of Agriculture and Forestry

⁴(現)農林水産省 消費・安全局 農産安全管理課

Effects of Soy Protein Isolate on the Phylogenetic Composition of Gut Microflora

Fumito TANI^{*1,2}, Ho Le Quynh CHAU^{2,3}, Natsumi KAWAGUCHI¹,
Masahiro NAKAMOTO^{1,4} and Tetsuya MASUDA^{1,2}

¹Laboratory of Food Environmental Science, Division of Food Science and Biotechnology,
Graduate School of Agriculture, Kyoto University, Kyoto 606-8502

²Laboratory of Global Food Science, Department of Natural Resources, Graduate School of
Global Environmental Studies, Kyoto University, Kyoto 606-8502

³Present address: Faculty of Animal Sciences, Hue University of Agriculture and Forestry,
Hue City, Vietnam

⁴Present address: Food Safety and Consumer Affairs Bureau,
Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries, Tokyo 100-8950

ABSTRACT

Numerous gut microflora reside in the gastrointestinal tract to form mutualistic symbiosis with host animals. However, it remains unknown about how food composition affects mutualistic symbiosis of gut microflora and also how changes in gut microflora control the activity of mucosal immunity. To address these problems, we compared the changes in the phylogenetic composition of gut microflora in mice fed three different kinds of diets: a 60 kcal% high-fat (HF) diet, a 45 kcal% HF diet, and a carbohydrate-rich control diet (10 kcal% fat). C57BL/6 mice fed HF diets after weaning gained body weight more rapidly compared to those fed the control diet. Quantitative analyses of blood plasma showed a significant increase in the level of total cholesterol and triglycerides in groups fed HF diets. Quantitative real-time PCR revealed that the ratio of the *Firmicutes* phylum to eubacteria increased in the 60 kcal% HF diet group, but not in the 45 kcal% HF diet group, despite the fact that mice of both groups had almost the same body weights at 20 weeks of age. On the other hand, the ratio of the *Bacteroides* genus decreased in all three diet groups. Flow cytometric analyses demonstrated that the frequency of CD3⁺ T cells and

*〒611-0011 京都府宇治市五ヶ庄

CD103⁺ dendritic cells in mesenteric lymph nodes significantly decreased with the increase in fat concentration in the diets. When soy peptide Hi-nute AM was given at the concentration of 5% in drinking water, the ratio of the *Bacteroides* genus in 60 kcal% HF diet group rapidly dropped even at 8 weeks of age, suggesting the possible control of phylogenetic components of gut microflora by soy peptide. *Soy Protein Research, Japan* **15**, 61-67, 2012.

Key words : *Bacteroides*, dendritic cells, *Firmicutes*, gut microflora, high-fat diet, mucosal immunity, mutualistic symbiosis, soy peptide Hi-nute AM

脊椎動物の消化管には、数百種類の腸内細菌が棲息しており、宿主の生体防御系と相利共生の営みを繰り返している。日和見感染からの防御、粘膜バリアーの損傷の修復や全身性の自己免疫疾患への影響などに深くかかわっている¹⁻³。共生細菌あるいは病原菌によって活性化される自然免疫系の細胞が作りだす環境に応じて、CD4⁺ T細胞は多様な機能を獲得するようになる⁴。誕生時の腸管内環境は、腸内細菌が存在しないため、Th2に偏向している。誕生後、腸内細菌の定着とともにTh1に徐々にシフトするが、様々な食餌をとるとともに、腸内細菌の種類や量は変化する。食の欧米化に伴って腸内細菌が変動することや^{5,6}、脂肪組織におけるCD4⁺ Foxp3⁺ 制御性T細胞 (Tregs) が減少することも報告されてきている⁷。粘膜組織にはさまざまな白血球が存在する。なかでも、パイエル板、粘膜固有層や腸間膜リンパ節 (MLNs) に代表される腸管関連リンパ組織には、多様な樹状細胞 (DCs) やマクロファージ (Mφ) などの抗原提示細胞 (APCs) が散在している。このようなAPCsが、上皮細胞などと相互作用する環境下において、抗原に対して寛容を誘導するのか、免疫を誘導するのかを決めている⁸。しかし、食餌成分によって腸内細菌叢の形成が変化し、それが粘膜免疫系にどのような影響を及ぼすのか、特に、APCsに対してどのような作用を示すのかについてはあまり明らかにされていない。本研究においては、高脂肪食の摂取が腸内細菌叢の形成と粘膜系のAPCsに及ぼす影響について解析した。

方 法

抗体と試薬

本研究では、以下の抗体を用いた。ビオチン標識抗CD3ε (clone 145-2C11; eBioscience), PE標識抗CD11c (clone HL3; BD Biosciences), 抗CD16/CD32 (clone 93; eBioscience), APC標識抗CD45 (clone 30-F11; BioLegend), FITC標識抗CD103 (clone 2E7;

eBioscience), APC標識抗I-A/I-E (clone M5/114.15.2; eBioscience), 蛍光色素標識ストレプトアビジン (eBioscience)。その他の一般試薬は、和光純薬またはナカライテスクより購入した。

動物と組織サンプル

C57BL/6系統の3週齢雄マウスを日本SLC社より購入した。マウスは、各12時間の明暗サイクル下、22℃にて飼養した。すべての動物実験は、京都大学動物実験委員会の承認のもとにおいて行った。平均体重約15 gとなる3群に分け、4週齢から20週齢に至るまで脂肪含量の異なる3種類の飼料 (Table 1) にて飼養した。マウスの体重は毎週測定した。

糞便は、2週間ごとに3日間連続して採集した。糞便重量の10倍量のPBSを添加し粉碎し、ゲノムDNAを抽出するまで-80℃にて保存した。20週齢後、採血と腸間膜リンパ節 (MLNs) の採集を行った。血液サンプルに終濃度40 μg/mLのヘパリンを加え、遠心後 (4,000 rpm, 10 min), 血漿を回収した。総コレステロール量、遊離脂肪酸量、トリグリセリドおよび血中グルコース濃度を測定した。

菌体DNAの抽出

糞便懸濁液200 μLに、抽出緩衝液 (200 mM Tris-HCl, 80 mM EDTA, pH 8.0) 200 μL, 10% SDS 50 μL, 直径0.1 mmガラスビーズ0.3 g, TE飽和フェノール 500 μLを加えた。Bead smash 12を用いて、5,000 rpmの速度で30 sec間振とうした。遠心後、上清を回収し、フェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール (pH 7.9, 24:25:1) でDNAを抽出した。RNaseによる処理後、エタノール沈殿によりDNAを回収した。

プライマーの設計と定量的リアルタイムPCR

腸内細菌のグループを検出するために用いたプライマーはTable 2に示すとおりである。

定量的リアルタイムPCR (qRT-PCR) は、Smart Cycler system (Cepheid, USA) を用いて25 μLの容量にて行った。アンプリコンの増幅は、95℃, 2 minを1サイクル, 95℃, 20 sec; 58℃, 20 sec; 72℃, 30 secを40

サイクルで行った。増幅後のPCR産物をアガロース電気泳動にて調べた。Smart Cycler Softwareを用いて Threshold cycle (C_T) 値を解析した。

フローサイトメトリーによる免疫細胞の解析

MLNsを摘出後、0.5 mg/mLコラゲナーゼIと30 μg/mL DNase Iを含むRPMI 1640培地にて組織を消化した。消化物を40-μmセルストレーナーに通して、PBSにて洗浄後、細胞を回収した。50万個の細胞を、

抗CD16/CD32抗体の存在下、表面抗原に特異的な種々の蛍光色素またはビオチン標識された抗体0.5 μgと4℃、30 minインキュベートした。洗浄後、間接蛍光法の場合は、蛍光標識ストレプトアビジンと4℃、10 min反応させた。測定は、7-AAD存在下でFACSCalibur (BD Biosciences) にて行い、データの解析は、生細胞を対象に、FlowJo software (Tomy Digital Biology Co., Ltd) を用いて行った。

Table 1. Ingredients and chemical composition of experimental diets

Formula	10 kcal% fat diet		45 kcal% fat diet		60 kcal% fat diet	
%	g	kcal	g	kcal	g	kcal
Protein	19	20	24	20	26	20
Carbohydrate	67	70	41	35	26	20
Fat	4	10	24	45	35	60
Total kcal/g	3.8		4.7		5.2	
Ingredient	g	kcal	g	kcal	g	kcal
Casein	200	800	200	800	200	800
L-cysteine	3	12	3	12	3	12
Corn starch	315	1,260	72.8	291	0	0
Maltodextrin 10	35	140	100	400	125	500
Sucrose	350	1,400	172.8	691	68.8	272
Cellulose, BW 200	50	0	50	0	50	0
Soybean oil	25	225	25	225	25	225
Lard	20	180	177.5	1,598	245	2,205
Mineral mix S10026	10	0	10	0	10	0
Dicalcium phosphate	13	0	13	0	13	0
Calcium carbonate	5.5	0	5.5	0	5.5	0
Potassium citrate, 1 H ₂ O	16.5	0	16.5	0	16.5	0
Vitamin mix V10001	10	40	10	40	10	40
Choline bitartrate	2	0	2	0	2	0
FD&C yellow dye	0.05	0	0	0	0	0
FD&C red dye	0	0	0.05	0	0	0
FD&C blue dye	0	0	0	0	0.05	0
Total	1,055.05	4,057	858.15	4,057	773.85	4,057

Table 2. Sequences of oligonucleotide primers

Target organism	Primer set	Sequence (5'-3')	Product size (bp)	Reference
All eubacteria	Uni331F	TCCTACGGGAGGCAGCAGT	466	(9)
	Uni797R	GGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTT		
Bacteroides	Bac303F	GAAGGTCCCCCACATTG	418	(10)
	Bac708R	CAATCGGAGTTCTTCGTG		
Firmicutes	Firm350	GGCAGCAGTRGGGAATCTTC	464	(11)
	Firm814R	ACACYTAGYACTCATCGTTT		

結 果

高脂肪食の摂取と腸内細菌叢の変動

10 kcal%脂肪食 (CHO) 群, 45 kcal%脂肪食 (45 kcal% HF) 群と60 kcal%脂肪食 (60 kcal% HF) 群のマウスの体重変化を調べた (Fig. 1). 9週齢から10週齢まではそれぞれの群間においてあまり差は見られなかったが, 10週齢以降において, 45 kcal% HF群と60 kcal% HF群のマウスの体重が顕著に増加しはじめた. 20週齢時における60 kcal% HF群の平均体重は49.73 g, 45 kcal% HF群の平均体重は46.80 g, CHO群の平均体重は32.45 gであり, HF両群のマウスの体重は, CHO群と比べて有意に ($p < 0.001$) 増加していた. しかし, 60 kcal% HF群と45 kcal% HF群の間には若干の差は認められたものの有意ではなかった.

20週齢後のマウス血中の総コレステロール量, 遊離脂肪酸量, トリグリセリド濃度を調べた. CHO食群に比べて, 60 kcal% および45 kcal% HF群において, 遊離脂肪酸量は増加傾向にあるのを示したのに対して, 総コレステロール量とトリグリセリド濃度は有意に ($p < 0.01$) 増加していた. しかし, 血中グルコース量には差がなかった (Fig. 2).

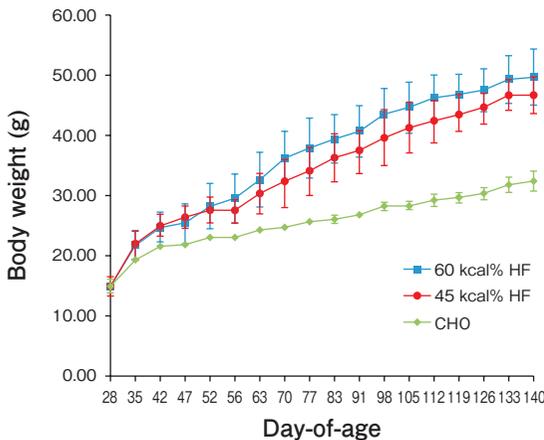


Fig. 1. Changes in body weight of mice. A symbol indicates the average of body weight of mice in each group. Green diamond shows the average of body weight of mice fed CHO. Red circle and blue square show those of mice fed 45 kcal% (Red) and 60 kcal% (Blue) HF, respectively. Four mice were used for each diet group (N=4).

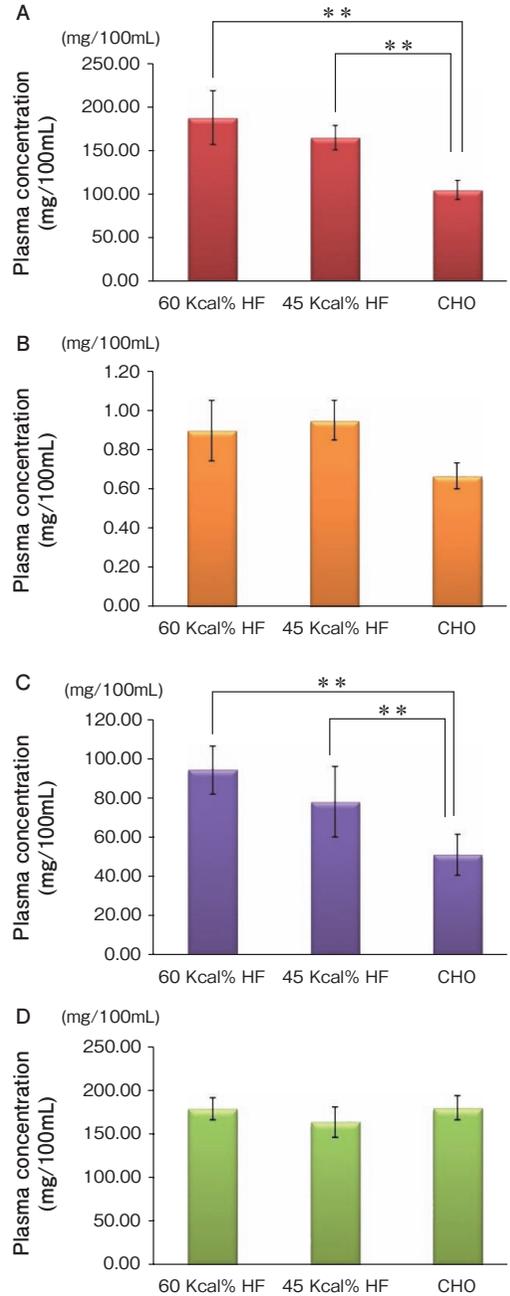


Fig. 2. Changes of metabolic parameters in plasma samples. Total cholesterol (A), free-fatty acids (B), triglycerides (C), and glucose concentration (D) in plasma samples were determined using commercially available kits provided by Wako according to the manufacturer's directions. Statistical difference was determined by Turkey test with a 5% level of probability, and denoted by $**p < 0.01$, compared with the control group of mice fed CHO.

経時的に、マウスの腸内細菌叢の*Bacteroides*属と*Firmicutes*門の菌体が真正細菌に占める割合を定量的リアルタイムPCR (qRT-PCR) を用いて解析した (Fig. 3). *Bacteroides*属の割合は、4週齢から12週齢において減少する傾向にあるものの、HF群において大きくばらつく傾向にあった。しかし、17週齢以降では、いずれの群においても割合が収束し低値を示した。一方、*Firmicutes*門の割合は、同時期において減少したが、CHO群と45 kcal% HF群では6週齢までの減少が著しかったのに対して、60 kcal% HF群では減少傾向が緩やかであった。しかし、12週齢以降、60 kcal% HF群では割合が顕著に増加したが、45 kcal% HF群ではあまり増加しなかった。

粘膜免疫系への高脂肪食摂取の影響

60 kcal%および45 kcal% HF群のマウスのMLNsにおけるCD3⁺細胞の割合は、ともにCHO群に比べて有意に ($p < 0.01$) 低下した (Fig. 4A)。一方、誘導型の制御性T細胞 (iTregs) の産生誘導にかかわるとされているCD103⁺樹状細胞 (DCs) の頻度を調べてみると、食餌中の脂肪含量に応じてCD103⁺ DCsの頻度が低下し、CHO群に比べて、45 kcal% HF群と60 kcal% HF群ではそれぞれ有意に ($p < 0.05$ と $p < 0.01$) 減少した (Fig. 4B)。

大豆ペプチドの投与による腸内細菌叢への影響

高脂肪食摂取のマウスに大豆ペプチド (Hi-nute AM) を飲料として与えたときの腸内細菌叢形成に及ぼす影響を調べた。60 kcal% HF群のマウスに、イオン交換水あるいは5%大豆ペプチド水を与えて飼養し、2週間ごとに糞便中の腸内細菌の割合をqRT-PCRで解析した。4週齢と8週齢の*Bacteroides*属の割合を比較すると、イオン交換水を給水していた群においては8週齢目においても*Bacteroides*属の割合にばらつきが見られたが、大豆ペプチドを給水した試験群においては*Bacteroides*属の割合のばらつきが非常に小さく低値を示した。この現象は、CHO群の17週齢以降に観察された腸内細菌の分布形態によく似ていることから、大豆ペプチド水の投与は腸管内におけるエネルギー代謝を炭水化物優位な食餌群の様相に戻すはたらきの可能性があるが期待された。

考 察

代謝におけるエネルギーバランスは、食餌から引き出されるエネルギー量と体内での消費量との関係で決まる。低脂肪で炭水化物を多く含む飼料で通常飼養したマウスの小腸遠位部から採取した腸内細菌を無

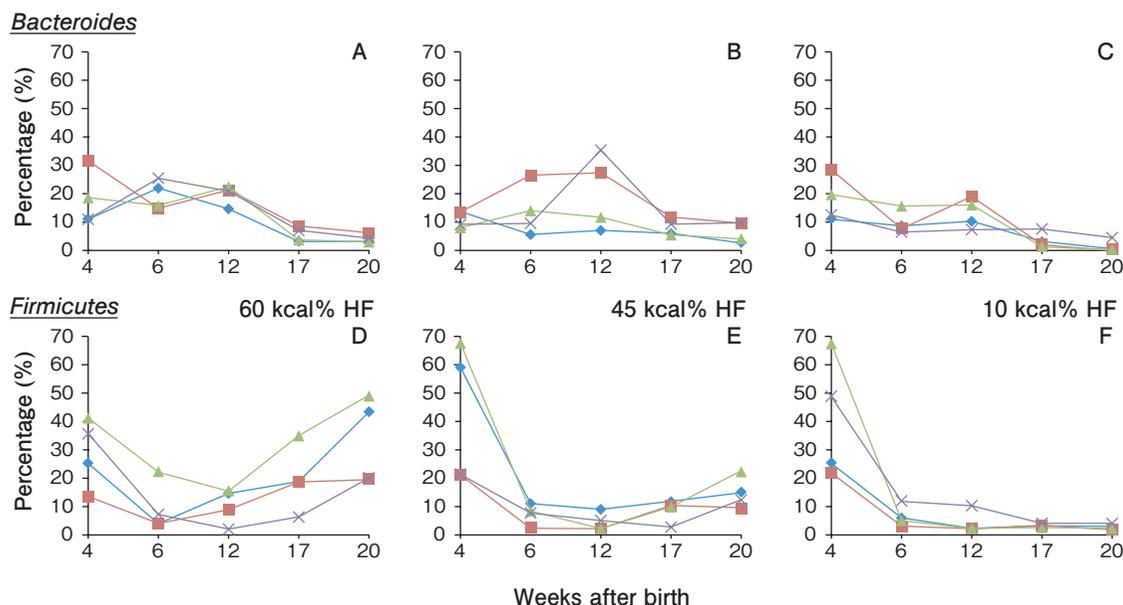


Fig. 3. Changes of gut microbial ecology by high-fat diets. (A, D) Changes of *Bacteroides* (A) or *Firmicutes* (D) in all eubacteria of mice fed 60 kcal% HF; (B, E) Changes of *Bacteroides* (B) or *Firmicutes* (E) in all eubacteria of mice fed 45 kcal% HF; (C, F) Changes of *Bacteroides* (C) or *Firmicutes* (F) in all eubacteria in mice fed CHO. Four mice were used for each diet group (N=4). In each diet group, red square, blue diamond, green triangle, and purple cross indicate the individual mouse.

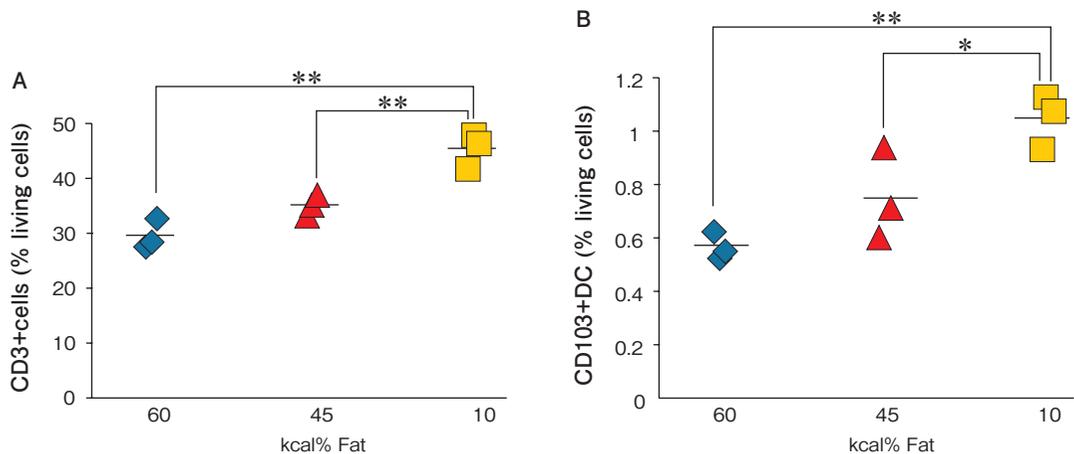


Fig. 4. Effects of high-fat diets on MLN-derived T cells and dendritic cells. Fluorescence was analyzed for living cells gated in the presence of 7-AAD using a FACSCalibur (BD Biosciences). The frequencies of CD3⁺ T cells (A) and CD103⁺ dendritic cells (B) was analyzed with FlowJo software (Tomy Digital Biology Co., Ltd). A bar indicates the average of percentage of immune cells in each group. Statistical difference was determined by Tukey test with a 5% level of probability, and denoted by * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, compared with the control group of mice fed HF.

菌マウスに接種すると、10～14日以内に体脂肪が上昇することが知られている¹²⁾。宿主が消化できない植物由来の多糖類を分解する酵素グリコシダーゼをもつ微生物は多糖類を利用する¹³⁾。このようにして産生された単糖や短鎖脂肪酸 (SCFA) は宿主に吸収された後、肝臓に送られ、宿主は脂質に変換している。ヒトの場合と同様に、マウスの腸内細菌の90%以上は *Bacteroidetes* 門と *Firmicutes* 門で占められている¹⁴⁾。ヒトやマウスにおいて、高脂肪食は肥満を誘導し、腸内細菌の生態系を変動させるが、*Firmicutes* 門のなかの *Mollicutes* 綱が極めて優位を占めることが網羅的な遺伝子解析により報告された^{5, 6)}。本実験において、qRT-PCRを用いて *Mollicutes* 綱のグループを定量することを試みたが、最適なプライマーの設計とPCR条件

を見出すことができず今後の課題として残っている。

インスリン抵抗性を示す肥満マウスにおいて脂肪組織のCD4⁺ Foxp3⁺ Tregsが減少していることが知られている⁷⁾。脂肪組織のCD4⁺ T細胞の状態変化を導き出す一つの因子として、腸管粘膜に存在するAPCsの変化に着目することはあり得る。先行研究から、制御性にはたらくTregsの産生には粘膜組織に局在するCD103⁺ DCsが目ざされている。腸管などの粘膜組織におけるCD103⁺ DCsの機能分化にはビタミンAとTGF- β が重要である。実際、*Mollicutes* 綱の菌体成分が、上皮細胞や粘膜固有層にあるDCsの前駆細胞にどのように作用するのかを明らかにすることは重要な課題である。

要 約

我々は、消化管内に棲息している膨大な数の腸内細菌と相利共生関係にある。しかし、食餌成分がこの共生系にどのように影響するのか、また、腸内細菌の変化が粘膜免疫系をどのように変化させるのかについては明らかではない。我々は、60 kcal%、45 kcal%、10 kcal%脂肪食をマウスに与え、脂肪含量が腸内細菌叢の形成に及ぼす影響を調べた。4週齢の離乳後、60%および45%の高脂肪食を与えた両群のマウスの体重は経時的に増加した。20週齢時の血中パラメーターを調べると、血中グルコース量は変わらなかったものの、高脂肪食群のマウスでは、総コレステロール量とトリグリセリド濃度が有意に増加しており、遊離脂肪酸量の増加傾向も観察された。糞便中の真正細菌に対する *Firmicutes* 門の細菌を定量的リアルタイムPCRで解析したところ、10 kcal%と45 kcal%脂肪食群では比率が高くないのに対して、60 kcal%脂肪食群では顕著に増加した。一方、*Bacteroides*

属の割合はいずれも減少した。摂取する脂肪の増加とともに腸間膜リンパ節におけるCD3⁺ T細胞とCD103⁺樹状細胞の頻度が減少した。また、大豆ペプチドを5%で飲料に添加して与えると、60 kcal%脂肪食群においてでさえ8週齢ですでに*Bacteroides*属の減少が認められたことから、大豆ペプチドの投与によって腸内細菌の制御ができる可能性を示唆した。

文 献

- 1) Bäckhed F, Ley RE, Sonnenburg JL, Peterson DA and Gordon JI (2005): Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science*, **307**, 1915-1920.
- 2) Macpherson AJ and Harris NL (2004): Interactions between commensal intestinal bacteria and the immune system. *Nat Rev Immunol*, **4**, 478-485.
- 3) Rakoff-Nahoum S and Medzhitov R (2006): Role of the innate immune system and host-commensal mutualism. *Curr Top Microbiol Immunol*, **308**, 1-18.
- 4) Seder RA and Paul WE (1994): Acquisition of lymphokine-producing phenotype by CD4⁺ T cells. *Annu Rev Immunol*, **12**, 635-673.
- 5) Ley RE, Turnbaugh PJ, Klein S and Gordon JI (2006): Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature*, **444**, 1022-1023.
- 6) Turnbaugh PJ, Bäckhed F, Fulton L and Gordon JI (2008): Diet-induced obesity is linked to marked but reversible alterations in the mouse distal gut microbiome. *Cell Host Microbe*, **3**, 213-223.
- 7) Feuerer M, Herrero L, Cipolletta D, Naaz A, Wong J, Nayer A, Lee J, Goldfine AB, Benoist C, Shoelson S and Mathis D (2009): Lean, but not obese, fat is enriched for a unique population of regulatory T cells that affect metabolic parameters. *Nat Med*, **15**, 930-939.
- 8) Belkaid Y and Oldenhove G (2008): Tuning microenvironments: induction of regulatory T cells by dendritic cells. *Immunity*, **29**, 362-371.
- 9) Nadkarni MA, Martin FE, Jacques NA and Hunter N (2002): Determination of bacterial load by real-time PCR using a broad-range (universal) probe and primers set. *Microbiology*, **148**, 257-266.
- 10) Bernhard AE and Field KG (2000): Identification of nonpoint sources of fecal pollution in coastal waters by using host-specific 16 S ribosomal DNA genetic markers from fecal anaerobes. *Appl Environ Microbiol*, **66**, 1587-1594.
- 11) Mühling M, Woolven-Allen J, Murrell JC and Joint I (2008): Improved group-specific PCR primers for denaturing gradient gel electrophoresis analysis of the genetic diversity of complex microbial communities. *ISME J*, **2**, 379-392.
- 12) Turnbaugh PJ, Ley RE, Mahowald MA, Magrini V, Mardis ER and Gordon JI (2006): An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature*, **444**, 1027-1031.
- 13) Sonnenburg JL, Xu J, Leip DD, Chen CH, Westover BP, Weatherford J, Buhler JD and Gordon JI (2005): Glycan foraging *in vivo* by an intestine-adapted bacterial symbiont. *Science*, **307**, 1955-1959.
- 14) Ley RE, Peterson DA and Gordon JI (2006): Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. *Cell*, **124**, 837-848.