

腸内乳酸菌に対する胆汁酸の生育阻害機構の エネルギー代謝解析

横田 篤*・Peter Kurdi

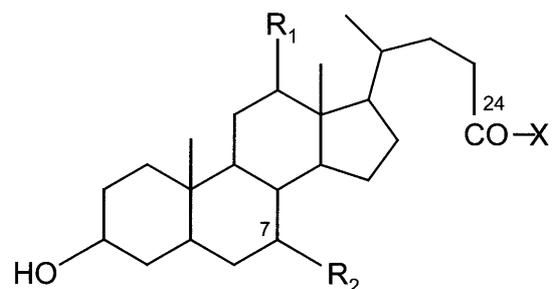
消化液の成分である胆汁酸が腸内細菌の生育を阻害することはよく知られているが、その阻害機構についての知見はきわめて乏しい。しかしこれを明らかにすることは基礎科学として重要であるだけでなく、高濃度の胆汁酸が存在する腸内環境で十分に機能を発揮できる高機能プロバイオティクスを開発する基盤となる。そこで本稿では、プロバイオティクスとして重要視されている *Lactobacillus* 属、*Bifidobacterium* 属などの腸内乳酸菌に対する胆汁酸の生育阻害機構について検討した筆者らの結果を中心に紹介する。胆汁酸はその界面活性作用や疎水性から細胞膜に作用すると考えられており、これまで膜損傷、疎水性弱酸としての細胞内 pH の酸性化などのストレスが想定されてきた。しかし微生物細胞においてこれらを明瞭に裏付ける実験結果はこれまで報告されていない。筆者らは胆汁酸と細胞膜との相互作用を詳細に検討し、胆汁酸が腸内乳酸菌のプロトン駆動力（生体エネルギー）を完全に消去するプロトンコンダクターとして作用することによって生育阻害を引き起こす機構を明らかにした。この新知見は腸内乳酸菌における胆汁酸ストレスのエネルギー代謝的側面を明確にしたものであり、この分野の今後の研究に意義ある指針を与えるものと思われる。

ヒト腸管内の胆汁酸とその代謝

本稿の理解のために、はじめにヒト腸管内に見いだされる胆汁酸の構造と代謝について簡単に紹介する。胆汁酸はステロイド化合物であり、腸管内で脂質の乳化に働き消化を助ける重要な役割を果たしている消化液の成分である。まず胆汁酸は肝臓で血清コレステロールを原料に 24 位のカルボキシル基にタウリンあるいはグリシンがアミド結合した抱合体として生合成され、十二指腸に分泌される。その代表的な分子種はコール酸、ケノデオキシコール酸の抱合体であるタウロコール酸 (TCA)、タウロケノデオキシコール酸、グリココール酸 (GCA)、グリコケノデオキシコール酸であるが、量的にはコール酸の抱合体が圧倒的に多い。これらは小腸において役割を果たした後、大部分は小腸から再吸収されて肝臓に戻される腸肝循環によってリサイクルされている。しかし一

部の抱合胆汁酸は種々の腸内細菌により脱抱合反応を受け、タウリンやグリシンが除去されてコール酸 (CA) やケノデオキシコール酸 (CDCA) などの遊離胆汁酸に変換される。¹⁾ さらに CA や CDCA の一部は、*Clostridium* 属などの腸内細菌により 7 位の水酸基が除去され、それぞれデオキシコール酸 (DCA) やリトコール酸 (LCA) に変換される。²⁾ これらステロイド骨格に変化を受けた胆汁酸を二次胆汁酸と総称する。特に DCA, LCA には大腸ガンの発症促進作用が知られている。再吸収されなかったこれらの胆汁酸は糞便とともに体外排泄により失われる。これらの構造を図 1 にまとめて示した。

物理化学的な性状により区別すると、pKa 値は TCA (1.4) << GCA (4.4) < CA (6.4) ≒ DCA (6.58) となり、特に TCA がスルホン酸であるためきわめて低い値を示すが、CA, DCA などの遊離胆汁酸は弱酸である。ステロイド骨格に付く水酸基の数は CA が 3 個、DCA, CDCA が 2 個、LCA が 1 個である。疎水性の強さは LCA > CDCA ≒ DCA > CA の順となり、LCA は水不溶性である。したがって、CA, DCA, CDCA はいずれも疎水性弱酸である。



| 胆汁酸の種類 | R1 | R2 | X |
|-------------------|----|----|---|
| コール酸 (CA) | OH | OH | OH |
| デオキシコール酸 (DCA) | OH | H | OH |
| ケノデオキシコール酸 (CDCA) | H | OH | OH |
| リトコール酸 (LCA) | H | H | OH |
| タウリン抱合体 | - | - | NH(CH ₂) ₂ SO ₃ H |
| グリシン抱合体 | - | - | NHCH ₂ COOH |

図 1. 胆汁酸の構造

*著者紹介 (代表) 北海道大学大学院農学研究科応用生命科学専攻 (教授) 〒060-8589 札幌市北区北 9 条西 9 丁目
TEL. 011-706-2501 FAX. 011-706-4961 E-mail: yokota@chem.agr.hokudai.ac.jp

腸内乳酸菌の胆汁酸取込み活性の発見

胆汁酸が腸内乳酸菌に及ぼす生育阻害などの生理的影響の基礎的知見を得る目的で、種々の *Lactobacillus* 属 (5種13株), *Bifidobacterium* 属 (7種9株) 菌株の胆汁酸輸送 (取込み/排出) 活性を調べた.^{3,4)} その結果, 試験したすべての菌株において CA がエネルギー依存的に細胞内に取り込まれることを見いだした. CA の蓄積倍率 (細胞内 CA 濃度/細胞外 CA 濃度) は, *Bifidobacterium* 属の場合で2~8倍であり, *Lactobacillus* 属においてもほぼ同程度であった. さらに生体エネルギー論的解析により, その取込み機構を明らかにした (図2). 腸内乳酸菌は発酵的糖代謝により乳酸や酢酸などの有機酸を生産し, これに伴って ATP が生成される. ATP は菌体形成のエネルギー源として利用されるほか, 細胞膜上の H⁺-ATPase を駆動して細胞内から細胞外に水素イオンをくみ出すために用いられ, 細胞内が有機酸によって酸性化されるのを防いでいる. これらの結果, 細胞膜を隔てて水素イオンの濃度勾配が形成され, 細胞内は細胞外に比べて相対的にアルカリ性に, 電気的にはマイナスとなる. 前者の膜内外の pH 勾配を ΔpH , 後者の電位差を膜電位 ($\Delta\psi$) と呼び, これらの和が化学浸透圧エネルギーであるプロトン駆動力を形成する. プロトン駆動力は生体エネルギーとして物質輸送などのさまざまなエネルギー源として利用される. CA は弱酸 ($\text{pK}_a = 6.4$) なので, 図2に示したように中性の腸管内では非解離型分子がかなりの割合で存在する. 非解離型分子は電荷がないので極性が低く, リン脂質二重層から成る細胞膜を越えて容易に細胞内に拡散する. 細胞内に入った CA はアルカリ条件で

中和され, 水素イオンを失って解離型 CA となるが, これは極性が高いために細胞膜を通過することができなくなる. アルカリ性条件の細胞内では酸性条件の細胞外より CA の解離度が高くなり, 一方で細胞内外の非解離型 CA 分子の濃度は等しくなるように平衡が達成されるので, 最終的には解離型と非解離型 CA の総和は細胞内の方が細胞外より高くなる. これが CA 蓄積のメカニズムである. *Lactobacillus* 属および *Bifidobacterium* 属菌株の細胞内 pH を pH 感受性蛍光プローブによって測定した結果, 形成された ΔpH の値と取込みの実測値の間には, Henderson-Hasselbalch の式で計算される理論値によく一致する相関が見られ, この取込み機構の妥当性が裏付けられている. さらに抱合胆汁酸である TCA は極性が強い ($\text{pK}_a = 1.4$) ためリン脂質二重層から成る細胞膜を通過できないとされているが,⁶⁾ 脱抱合活性を持たない *Lactobacillus* 属には取込まれないことを確認している. つまり腸内乳酸菌の CA 取込み過程はトランスポーターが関与するものではなく, 細胞膜, ΔpH , 遊離胆汁酸 (弱酸) という3者の共存で起こる ΔpH を駆動力とする拡散である. 細胞毒性の強い CA を取込むことは一見合理性を欠いているが, この取込み機構によってある程度理解できる. また, 我々が使用しているすべての *Bifidobacterium* 属菌株は CA をまったく代謝せず, 栄養源として利用していないことも確認しており, この機構を裏付ける事実と考えている. 以上の実験結果は, 胆汁酸と細菌細胞の相互作用を明らかにした初めての知見である.

胆汁酸取込み活性の発見から
胆汁酸生育阻害機構の解明

腸内乳酸菌による胆汁酸の取込みは, 当然, 腸内乳酸菌の生育時にも起こっているであろう. したがって, 胆汁酸による生育阻害はその取込みに伴う現象と推定される. 胆汁酸の取込みは ΔpH を消費して起こるので, 胆汁酸は細胞内を酸性化することになるが, これまで胆汁酸による細胞内の酸性化を実測した例はない. 生育阻害機構はこの酸性化に密接に関連して, 酸性化そのもの, あるいは酸性化により $\Delta\text{pH}=0$ となる脱エネルギー化が原因であることが想像されたが, むろんいずれも実証例はない. そこで次の実験を行った.

1) 胆汁酸の最小生育阻止濃度 (MIC) の決定 まず, CA や DCA の腸内乳酸菌に対する MIC を, 乳酸菌の標準培地である MRS 液体培地における生育実験により決定した (投稿中). 表1には代表的な結果を示したが, *Lactobacillus* 属と *Bifidobacterium* 属菌株いずれにおいて

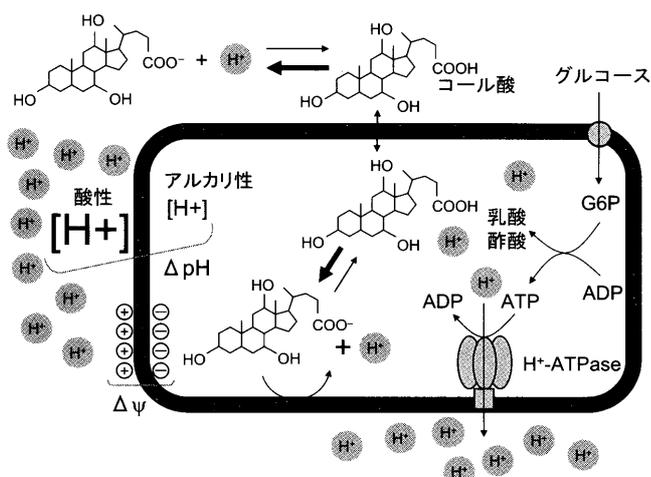


図2. 腸内乳酸菌のエネルギー代謝と胆汁酸の取込み機構. G6P, グルコース 6-リン酸. (文献5) より改変).

も、CA については数 mM、DCA についてはほぼその 1/10 の濃度であった。この結果から明らかなように、DCA の阻害は CA に比べて約 10 倍強いことがわかる。表 1 には示していないが CDCA の MIC も DCA と同程度であった。これらのことから、胆汁酸の生育阻害の強さは、それぞれの疎水性と対応していることが示された。

2) 細胞内 pH に及ぼす外部胆汁酸濃度の影響 腸内乳酸菌による胆汁酸の取込み量は、その取込み機構から外部胆汁酸濃度が高いほど増大し、これに伴う細胞内の酸性化も顕著になるものと想像される。そこで外部胆汁酸濃度の上昇により細胞内 pH がどのように変化するかを多数の *Lactobacillus* 属、*Bifidobacterium* 属菌株について pH 感受性蛍光プローブを用いて実測した。その結果予想通り、外部 CA 濃度の増大に応じて細胞内 pH の低下が観察され、どの菌株でも外部 CA 濃度が数 mM の範囲で細胞内 pH が細胞外 pH と同一となる（すなわち $\Delta\text{pH}=0$ ）ことが明らかになった（投稿中）。表 1 には各株の ΔpH を完全に消去する外部 CA 濃度を示した。驚くべきことに、この CA 濃度は、前項で決定した各株の MIC とほぼ一致していた（表 1）。さらに DCA を用いても同様の現象が観察されたが、 $\Delta\text{pH}=0$ を与える DCA 濃度は CA の約 1/10 であり、この場合も各菌株の MIC とほぼ一致することが明らかとなった（表 1）。図 3 には、外部 CA、DCA 濃度を増大させた時の細胞内 pH の変化の典型例を示した。

以上 1)、2) の結果から、CA や DCA による生育阻害は細胞内の酸性化による ΔpH の消去により細胞がエネルギー欠乏（ $\Delta\text{pH}=0$ ）に陥るためであることが強く示唆された。

3) $\Delta\Psi$ に及ぼす外部胆汁酸濃度の影響 2) において胆汁酸は ΔpH に影響を与えることが示されたが、プロトン駆動力の電気化学的成分である $\Delta\Psi$ はどのような影響を受けるのであろうか。これを明らかにすることは、胆

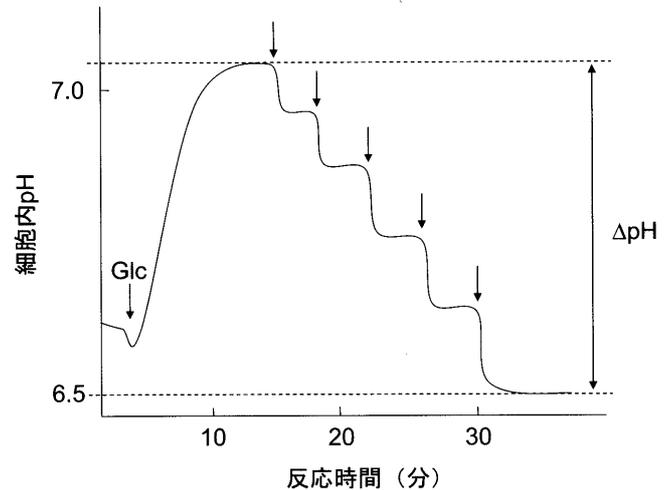


図3. 細胞内 pH におよぼす外部胆汁酸濃度の影響. 図は多くの腸内乳酸菌を用いて得られた実験結果を一般化したものである。反応系にグルコース (Glc) を添加して乳酸発酵を開始させると、図 2 に示した機構により細胞内 pH が上昇し、 ΔpH が形成される。矢印で示した時点で反応系に CA あるいは DCA を添加すると、添加量に応じて細胞内 pH が低下し、ある濃度に達すると外部 pH (この図の場合は 6.5) と同一になる ($\Delta\text{pH}=0$)。

汁酸の作用様式を明確にするために決定的に重要である。もし $\Delta\Psi$ が保持されるならば、胆汁酸は弱酸として細胞内の酸性化のみを引き起こすことになる。一方、 $\Delta\Psi$ が消去される場合は ΔpH の消去と合わせてプロトン駆動力そのものが完全に消去されることになり、この場合はプロトンコンダクターすなわち脱共役剤としての作用様式となる。 $\Delta\Psi$ 感受性蛍光プローブを用いた測定により、*Lactobacillus* 属、*Bifidobacterium* 属菌株いずれにおいても、CA、DCA は外部濃度依存的に $\Delta\Psi$ を低下させることが見いだされた（投稿中）。 $\Delta\Psi=0$ を与える CA、DCA 濃度は MIC や $\Delta\text{pH}=0$ を与えるそれぞれの濃度より若干低いが（表 1）、やはり DCA 濃度は CA 濃度のほぼ 1/10 であった。CDCA についても、DCA と同程度の低濃度で ΔpH と $\Delta\Psi$ を消去することを *Bifidobacterium* 属菌株にお

表1. 腸内乳酸菌の生育を阻止する、あるいは ΔpH 、 $\Delta\Psi$ を消去する胆汁酸の最小濃度

| 菌株 | CA 濃度 (mM) | | | DCA 濃度 (mM) | | |
|---|------------|-------------------------|--------------------|-------------|-------------------------|--------------------|
| | MIC | ΔpH diss. | $\Delta\Psi$ diss. | MIC | ΔpH diss. | $\Delta\Psi$ diss. |
| <i>Lactobacillus salivarius</i> JCM1044 | 6.0 | 7.0 | 3.0 | 0.7 | 0.8 | 0.3 |
| <i>Lactobacillus gasseri</i> JCM1131 ^T | 7.0 | 6.5 | 3.5 | ND | 1.0 | 0.7 |
| <i>Bifidobacterium breve</i> JCM1192 ^T | 5.0 | 6.0 | 3.0 | 0.5 | 0.8 | 0.3 |

ΔpH diss.: ΔpH を消去する胆汁酸の最小濃度

$\Delta\Psi$ diss.: $\Delta\Psi$ を消去する胆汁酸の最小濃度

ND: 測定していない

いて確認した。これらの結果は CA, DCA, CDCA がプロトンコンダクターとして作用し、腸内乳酸菌細胞をエネルギー欠乏状態に陥れるために生育阻害を引き起こす機構を明白に示すものである。一方、データには示していないが、同じ実験系で、酢酸、プロピオン酸、酪酸などの腸管内に存在する短鎖脂肪酸は細胞内 pH を低下させたが、逆に $\Delta\Psi$ を増大させることが観察され、胆汁酸とは異なり、弱酸としての作用だけであることが分かった(投稿中)。またこれらの短鎖脂肪酸は高濃度で添加しても腸内乳酸菌の生育阻害を起こさないことも確認した。

以上 1), 2), 3) の結果は、胆汁酸の生育阻害とエネルギー代謝に及ぼす影響をはじめて明確に結び付けた成果であり、胆汁酸がプロトンコンダクターとして作用することを結論付けた点で、大きな意義がある。

胆汁酸分子のプロトンコンダクターとしての作用機構

以上の検討で胆汁酸の生育阻害機構はほぼ明らかにできたが、これですべてが解決したわけではない。一般論としてプロトンコンダクターとしての作用が成立するためには、その分子がプロトン化、脱プロトン化のいずれの分子形態においても脂質二重層からなる細胞膜を越えて自由に移動できる必要がある(図4)。合成脱共役剤であるジニトロフェノールや CCCP などは、分子全体が疎水性であるだけでなく、それらの解離型の負電荷が分子内の一部に偏らずに分散する性質を有し、このためどちらの分子形態でも容易に細胞膜を通過できる。胆汁酸の場合は、プロトン化した CA, DCA, CDCA は細胞膜を通過できるが、DCA, CDCA は CA に比べて疎水性が強

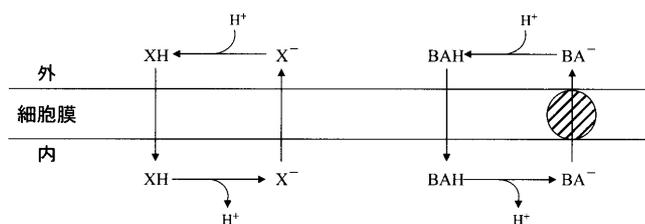


図4. 合成脱共役剤と胆汁酸のプロトンコンダクター作用機構。合成脱共役剤(XH)は、極性を持つ解離型分子(X⁻)も細胞膜を自由に通過できるので、細胞膜内外の水素イオンの濃度勾配が解消される。胆汁酸(BAH)の場合は、解離型分子(BA⁻)が細胞膜を通過できないので、BA⁻の通過を促進する膜タンパク質(図中の⊙)が必要となる。

いため通過速度は約10倍高速であることがモデル膜小胞を用いた実験で証明されている。⁶⁾このことが生育阻害やプロトン駆動力消去に要するDCA, CDCA濃度がCAの約1/10であることと関連しているものと考えられる。一方、CA, DCA, CDCAの解離型は細胞膜を実質上通過できないことが同様の実験で証明されている。筆者らも実際に腸内乳酸菌から細胞膜のリン脂質を抽出して膜小胞を作成し、これを用いてCA, DCA, CDCAの解離型が実質上意味ある膜透過性を示さないことを観察している(投稿中)。以上の結果は、腸内乳酸菌の細胞膜には解離型胆汁酸を通過させる作用をもつ何らかの輸送タンパク質が存在することを強く示唆している(図4)。ミトコンドリアの内膜には解離型脂肪酸を輸送するいくつかの輸送タンパク質が知られており,⁷⁾腸内乳酸菌にも類似の膜タンパク質が機能しているのかもしれない。これらの解明のためには、今後さらに検討が必要である。

本稿では、「ストレスバイオテクノロジー」の話題として、胆汁酸が腸内乳酸菌に及ぼすストレスに焦点を当て、筆者らの研究を中心に解説した。冒頭に述べたように、胆汁酸ストレスの実態についての理解は極めて不十分である。筆者らはこれまでの研究で、腸内乳酸菌が胆汁酸を取込む活性を有していること、またその取込み機構を明らかにした。さらにこれまで曖昧であった腸内乳酸菌に対する胆汁酸の生育阻害機構が、プロトンコンダクターとしてエネルギー欠乏をひき起こすためであることを明らかにした。これらの基盤的知見が、今後、高機能プロバイオティクス開発などのバイオテクノロジーに生かされることが期待される。

文 献

- 1) Tanaka, H. et al.: *J. Dairy Sci.*, **82**, 2530 (1999).
- 2) Kitahara, M. et al.: *Int. J. Sys. Evol. Microbiol.*, **50**, 971 (2000).
- 3) Kurdi, P. et al.: *J. Bacteriol.*, **182**, 6525 (2000).
- 4) Kurdi, P. et al.: *Microbiology*, **149**, 2031 (2003).
- 5) 横田 篤: 医学のあゆみ, **207**, 862 (2003).
- 6) Kamp, F. and Hamilton, J. A.: *Biochemistry*, **32**, 11074 (1993).
- 7) Wojtczak, L. and Wieckowski, M. R.: *J. Bioenerg. Biomembr.*, **31**, 447 (1999).