

質量分析計を用いて腸内細菌叢が産生するD-アミノ酸を新発見

—高感度ハイスループトット・キラルアミノ酸解析でD-アミノ酸研究に新展開—

協同乳業株式会社の松本光晴主幹研究員、株式会社島津製作所、大阪大学・島津分析イノベーション共同研究講座の飯田順子招へい教授(島津製作所分析計測事業部ライフサイエンス事業統括部シニアマネージャー)らのグループは、大阪大学工学研究科福崎英一郎教授と島津製作所により共同開発された、「LC-MS/MSキラルアミノ酸高感度一斉分析法」※を応用し、腸内細菌叢が産生するキラルアミノ酸を高感度に測定可能な分析手法を開発しました。測定には島津製作所の高速度液体クロマトグラフ質量分析計(LC-MS/MS)を用います。本分析法において12種類の遊離型D-アミノ酸が腸内細菌叢により産生されていることを見出しました。また、そのうちの9種類のD-アミノ酸は、腸管腔内を遊離し存在していることが初めて確認されました。D-アミノ酸は、近年、生体内での生理活性が注目されています。本分析法を用いることで、D-アミノ酸を介した腸内細菌叢の機能研究への貢献につながります。この成果は、12月17日(日本時間)に英国科学ジャーナル「Scientific Reports」に公開されました。

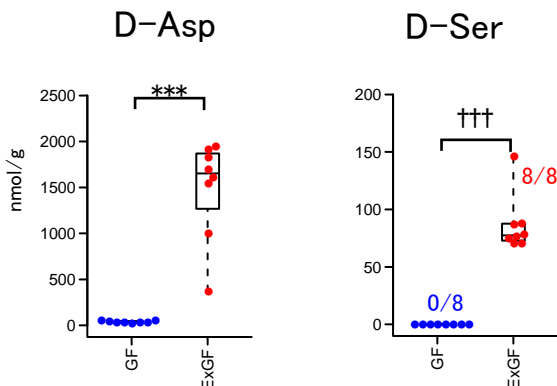
※大阪大学大学院工学研究科・福崎研究室は、誘導体化を必要とせず、キラルカラムを用い、わずか10分でキラルアミノ酸を高感度に一斉分析する方法を開発しました。この方法を大阪大学・島津分析イノベーション共同研究講座で発展させて製品化につなげました。

【概要】

近年、様々な生理活性や疾病との関わりが注目されているD-アミノ酸は、腸内細菌研究分野においても、小腸で腸内細菌由来のD-アミノ酸を基質として宿主が過酸化水素を産生し、病原菌を殺菌することが報告されています。しかし、腸管腔内の遊離D-アミノ酸は、盲腸内からわずか4種類が確認されているのみで、大腸管腔内の報告例は皆無でした。本研究では、LC-MS/MSキラルアミノ酸高感度一斉分析法をベースに結腸内容物が測定可能で誘導体化不要な前処理法及び測定メソッドを開発し、無菌マウスおよび通常菌叢定着マウスの結腸内容物を試料とした腸内細菌叢由来のD-アミノ酸の検出を試みました。

その結果、14種類の遊離D-アミノ酸が検出され、そのうち12種類(D-Ala、D-Arg、D-Asp、D-Gln、D-Glu、D-allo-Ile、D-Leu、D-Lys、D-Met、D-Phe、D-Ser、D-Trp)の濃度は、通常菌叢定着マウスにおいて無菌マウスと比較し、有意に高く、腸内細菌叢により生合成され腸管腔中に放出されていることが確認されました(下図)。このうち、D-Arg、D-Gln、D-allo-Ile、D-Leu、D-Lys、D-Met、D-Phe、D-Ser、D-Trpは腸管腔内から初の検出となります。また、これらのD-アミノ酸の産生に関与している可能性が高い腸内細菌を探索した結果、Firmicutes門、特にLachnospiraceae科、Ruminococcaceae科、Erysipelotrichaceae科に属する細菌の関与が示唆されました。

この結果は、LC-MS/MSキラルアミノ酸高感度一斉分析法が、結腸内容物のキラルアミノ酸の測定において精度の高い定性・定量分析が可能であり、微量D-アミノ酸の検出に適していることを示しています。また、本分析法は誘導体化などの煩雑なサンプル処理が不要なうえ、解析時間が短くハイスループトットな測定が可能です。新たな腸内細菌叢由来の生理活性物質と期待されるD-アミノ酸を対象にした研究に貢献できると考えられます。



無菌マウスと腸内細菌叢定着マウスの結腸内容物中の遊離D-アミノ酸濃度の比較(抜粋)

青: 無菌マウス(GF)

赤: 通常菌叢定着マウス(元無菌マウス)(Ex-GF)

*濃度による有意な群間差(*** $p < 0.001$)

† 検出率による有意差(††† $p < 0.001$ 、数字は検出検体数/総検体数を示す)

多重比較はFalse Discovery Rateで補正した

【研究背景】

腸内細菌叢と宿主のクロストークにおいて、腸内常在菌により代謝産生される低分子化合物は重要因子である。これらの一部は、腸管上皮細胞を直接的に刺激し、大腸管腔内から吸収され血中に移行すれば宿主の細胞に直接的に影響を与える可能性が高い。

長年、生体を構成しているのはL-アミノ酸のみと考えられていたが、D-アミノ酸が微量ながら存在することが明らかになり、近年、その様々な生理機能や疾病との関わりに注目が集まっている。特に脳内の遊離D-Serが中枢神経系のN-methyl-D-Aspartate (NMDA) receptorに結合し生理的作用を発揮することはホットな研究対象となっている。同様に、腸管内の遊離D-アミノ酸は、腸上皮細胞や粘膜固有層の免疫細胞の受容体を介して、生体に影響を与える因子である可能性が考えられる。腸内細菌叢由来のD-アミノ酸は、1965年に血液中のD-Alaが腸内細菌由来であると推察されたものの、その後の研究は停滞し、近年の機器分析技術の進展により、尿および血液中のD-Alaは腸管常在菌由来であることが認められた。しかし、腸管腔内の遊離D-アミノ酸を対象にした研究はわずかしかない。最近、盲腸内容物の抽出物を二次元HPLC法で解析し、D-Ala以外に3種のD-アミノ酸(D-Asp、D-Glu、D-Pro)が腸内細菌叢に産生されていることが報告されたが、細菌培養液や発酵食品から様々なD-アミノ酸が検出されていることを考慮すると、腸管腔内には4種類以上の遊離D-アミノ酸が存在すると考えるのが妥当である。そこで、我々は、福崎らが開発した、微量D-アミノ酸の検出が可能なLC-MS/MSによるキラルアミノ酸高感度一斉分析法(*J Biosci Bioeng* 123:134-138, 2017)を用いて腸内細菌叢由来のD-アミノ酸の解析を試みた。

【方法】

①マウスの結腸内容物

雄性無菌(GF)マウス(Jcl:MCH (ICR), 6週齢) 16匹を2群に分け、通常環境下で飼育しているマウスの糞便を経口投与し通常菌叢定着マウス(元無菌マウス: Ex-GFマウス)群とそのままの飼育を継続したGFマウス群を作製した。4週間後(10週齢)、結腸内容物を回収し、生理的リン酸緩衝液で腸内細菌の菌体を破壊しないように試料中に遊離している低分子代謝産物を抽出した。

② LC-MS/MSキラルアミノ酸高感度一斉分析

高速液体クロマトグラフ質量分析計は、Nexera X2システムおよびLCMS-8060(島津製作所)を用い(図1)、カラムはダイセル製CROWNPAK CR-I (+) およびCROWNPAK CR-I (-) (3 mmI.D. × 150 mmL, 5μ m)を使用した。それぞれの成分のピーク面積値は内部標準物質(DL-Alanine-2,3,3-d4)により補正した。なお、マウス糞便抽出物とした際の本解析法の再現性は、全キラルアミノ酸の変動係数が20%未満(大半が10%未満)と高いことを確認済みである(図2)。



図1. 高速液体クロマトグラフ質量分析計「LCMS-8060システム」
島津製作所が2015年より発売

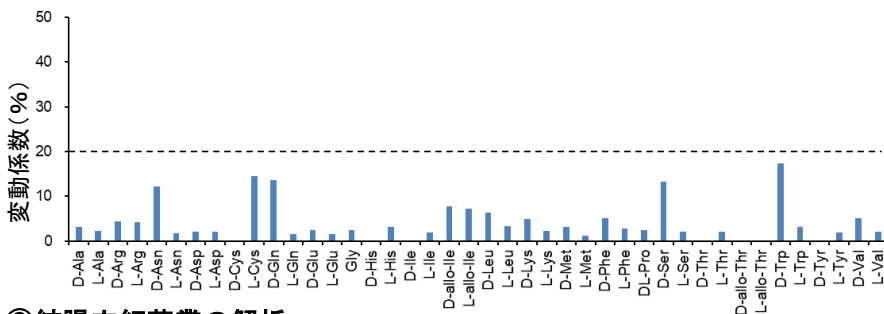


図2. 糞便試料を対象とした時のLC-MS/MSキラルアミノ酸高感度一斉分析法の再現性
通常菌叢マウスの糞便から検出された35種類のキラルアミノ酸のピーク面積値を基に変動係数(%)を算出した。

③結腸内細菌叢の解析

約20 mgの結腸内容物を600 μ Lの抽出溶液(60 mM Tris-HCl, 30 mM EDTA、及び0.8% SDS)に懸濁し、ガラスビーズ法にて菌体を破碎し、DNAを抽出し、フェノール・クロロホルム・イソアミルアルコール沈殿等でDNAを精製した。細菌の16S rRNA遺伝子のV1-V2領域対象に、次世代型シーケンサーIonPGMで解析した。シーケンスデータは、QIIMEソフトウェアで解析し、RDPクラシファイヤー ver.11.5を用いて分類を行った。

④統計処理

各検出アミノ酸濃度の群間比較はMann-Whitney U-test、検出率の比較はFisher's exact testでR version 3.3.2にて実施した。多重比較はFalse Discovery Rateで補正した。Dアミノ酸産生菌の推測のための Partial Least Squares (PLS) 解析はSIMCA 14、Spearman's rank correlation test はSPSS ver.22で実施した。

【結果と考察】

①結腸内容物中の遊離D-アミノ酸

LC-MS/MSキラルアミノ酸高感度一斉分析法により、結腸内容物から、キラルアミノ酸分析ができないDL-Proを除いた全20種のD-アミノ酸のうち14種類のD-アミノ酸(D-Ala、D-Arg、D-Asn、D-Asp、D-Gln、D-Glu、D-His、D-*allo*-Ile、D-Leu、D-Lys、D-Met、D-Phe、D-Ser、D-Trp)が検出された。14種類中12種類のD-アミノ酸が、腸内細菌叢定着マウスで無菌マウスと比較して有意に高い濃度を示した(図3)。具体的には、D-Ala、D-Gln、D-Leu、D-*allo*-Ile、D-Lys、D-Phe、D-Serは、無菌マウスからほとんど検出されず、腸内細菌叢定着マウスでの検出率が有意に高かった。また、D-Arg、D-Asp、D-Glu、D-Met、D-Trpは腸内細菌叢定着マウスで無菌マウスより有意に濃度が高かった。D-Hisは腸内細菌叢定着マウス8検体中5検体、無菌マウス8検体中1検体から検出され、有意差は認められなかったが検出限界値を0として検定した場合、腸内細菌叢定着マウスで無菌マウスより有意に濃度が高かった($p < 0.05$)。D-Asnは無菌マウスの方が腸内細菌叢定着マウスより有意に濃度が高かった。D-Cys、D-Ile、D-Thr、D-*allo*-Thr、D-Tyr、D-Valは両群マウスともに検出されなかった。

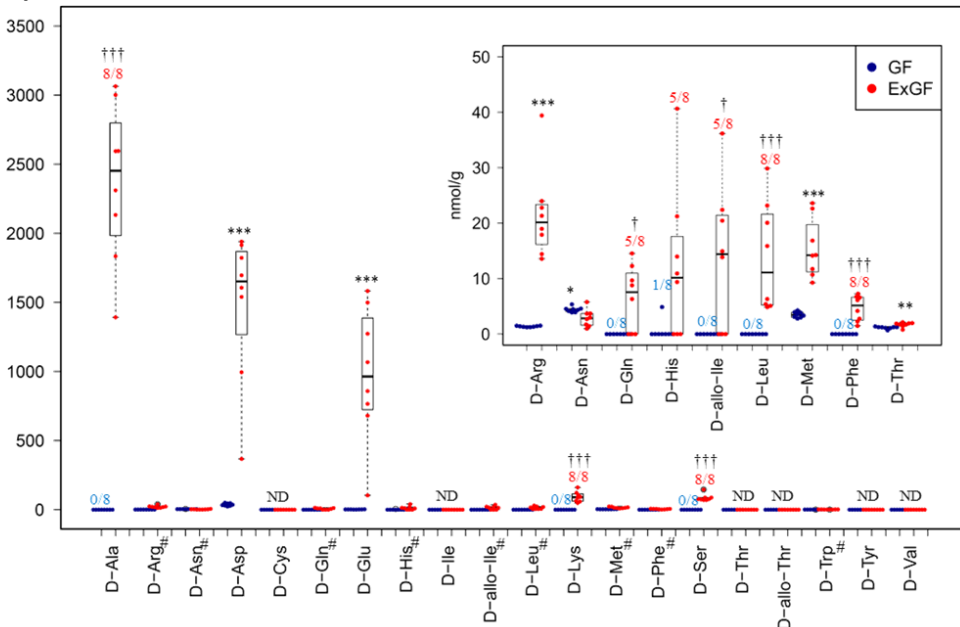


図3. 無菌および菌叢定着マウスの結腸内容物中のD-アミノ酸濃度
青: 無菌マウス (GF), 赤: 通常菌叢定着マウス (Ex-GF)

数字は検出個体数/検体数を示す。
*濃度による群間差 ($*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$).

†検出率による有意差 ($†p < 0.05$, $†††p < 0.001$)

#右上に拡大スケールで示した。

ND: Not detected

次に、結腸内のD-アミノ酸が飼料由来ではないことを確認するため、飼料中の遊離D-アミノ酸濃度を測定し、結腸内容物および飼料の固形物含量から、飼料が消化吸収および腸内細菌の作用を受けることなく飲水および消化液で希釈されたと仮定した場合の結腸到達時の推測濃度を算出し(飼料結腸到達時の推測濃度 = 飼料中濃度 / [飼料固形物量 (93.5%) / 結腸内容物固形物含量 (16~42%)])、実測値と比較した(図4)。D-Gln、D-His、D-Serは飼料中から検出されず、腸内細菌叢由来であることが確認された。D-Ala、D-Arg、D-Asp、D-Glu、D-*allo*-Ile、D-Leu、D-Lys、D-Met、D-Phe、D-Valは飼料中に含まれたが、無菌マウスの実測値が検出限界以下か推測値より大幅に低値であることから摂取後に生体に吸収されることが認められた。これらのうち、D-MetとD-Valを除く8種のD-アミノ酸の腸内細菌叢定着マウスの実測値は、推測濃度を大幅に超えており、腸内細菌により産生されていることが確認された。D-AsnとD-Trpは無菌マウスにおける実測値が推測濃度より若干低いものの、結腸内容物中に残存しており、吸収されにくいことが判明した。

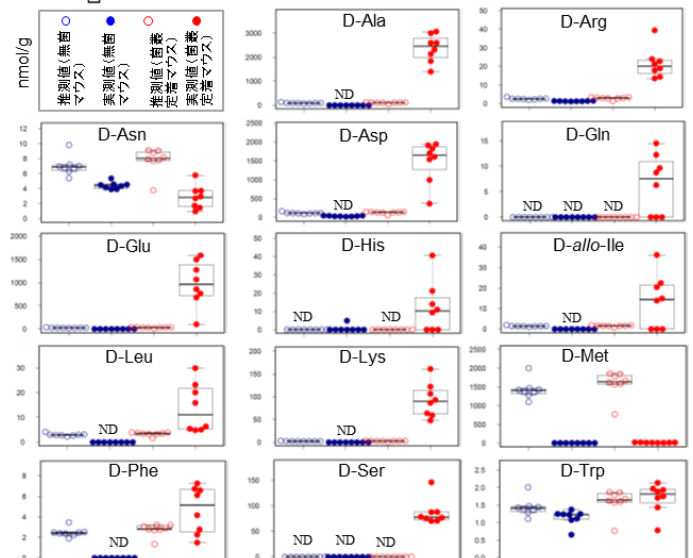


図4. 飼料中D-アミノ酸の結腸到達時の推測濃度と実測値の比較(結腸内より検出されたD-アミノ酸のみ抜粋)

左から、無菌マウス推測濃度(白抜き青)、同実測値(青)、腸内菌叢定着マウス推測濃度(白抜き赤)、同実測値(赤)

②結腸内容物中の遊離L-アミノ酸

同法により、結腸内容物から全20種のL-アミノ酸の内、L-*allo*-Thrを除く全てのL-アミノ酸が検出された。また、Glyおよび本法ではD型とL型の識別が困難なProも検出された。L-Ala、L-Arg、L-Asp、L-Glu、L-His、L-Ile、L-Leu、L-Lys、L-Met、L-Phe、L-Ser、L-Trp、L-Tyr、L-ValおよびGlyが腸内細菌叢定着マウスで無菌マウスと比較して有意に高濃度、L-Thrが高い傾向を示した(図)5。また、L-*allo*-Ileは腸内細菌叢定着マウスでの検出率が無菌マウスより有意に高かった。

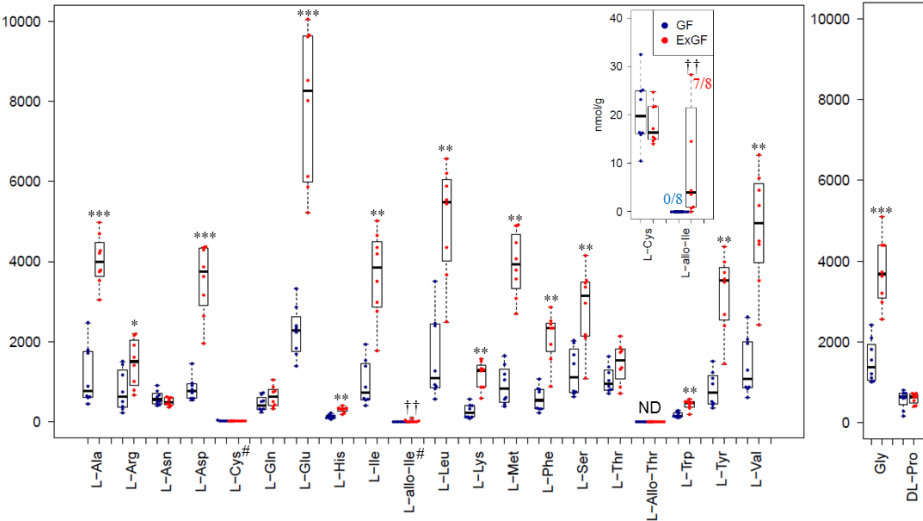


図5. 無菌および菌叢定着マウスの結腸内容物中のL-アミノ酸濃度
 青: 無菌マウス (GF), 赤: 通常菌叢定着マウス (Ex-GF)
 数字は検出個体数/検体数を示す。
 *濃度による群間差 ($p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$).
 †検出率による有意差 ($p < 0.05$, $††p < 0.001$)
 #右上に拡大スケールで示した。
 ND: Not detected

D-アミノ酸と同様に、飼料中の遊離L-アミノ酸濃度と、結腸内容物および飼料の固形物含量から、飼料中のL-アミノ酸の結腸到達時の推測濃度を算出し、実測値と比較した(図6)。L-CysおよびL-*allo*-Thr以外のL-アミノ酸は飼料中から検出された。L-Asn、L-*allo*-Ile、L-Trpは無菌マウスの実測値が推測濃度より低く、飼料中のこれらは、摂取後に生体に吸収されることが認められた。一方、無菌マウスの実測値が推測濃度より高いL-アミノ酸が10種検出され(L-Cys、L-Gln、L-His、L-Ile、L-Leu、L-Phe、L-Ser、L-Thr、L-Tyr、L-Val)、これらは飼料中のタンパク質が宿主の消化過程で分解され生じたことが示唆される。また、腸内細菌叢定着マウスの実測値が推測濃度より高く、且つ無菌マウスの実測値と比較し有意に高かった14種(L-Ala、L-Arg、L-Asp、L-Glu、L-His、L-Ile、L-*allo*-Ile、L-Leu、L-Met、L-Lys、L-Phe、L-Ser、L-Tyr、L-Val)は、飼料由来ではなく、腸内細菌叢により産生されていることが明らかになった。

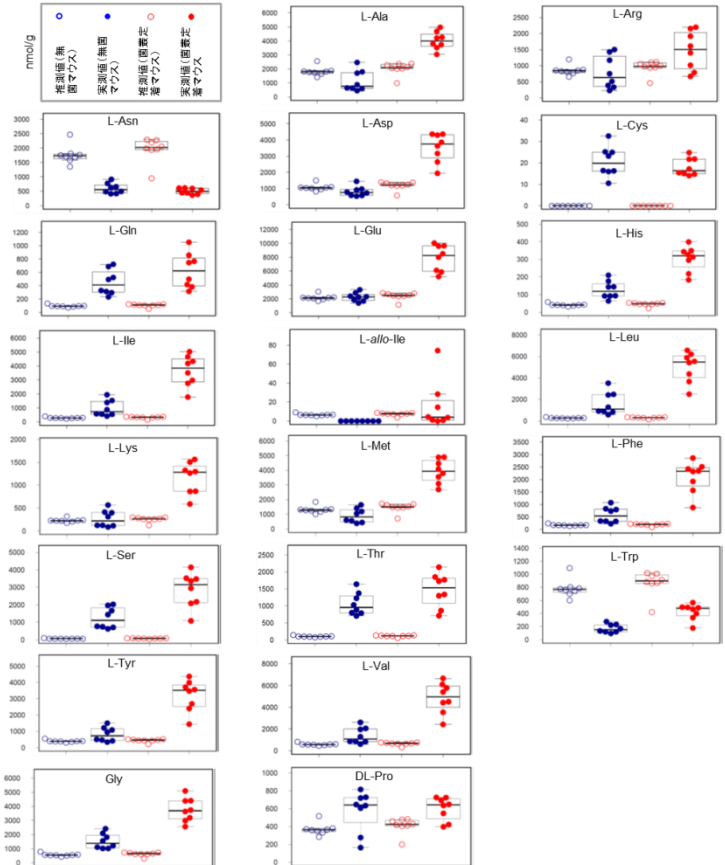


図6. 飼料中L-アミノ酸の結腸到達時の推測濃度と実測値の比較 (Gly, DL-Pro含む)
 左から、無菌マウス推測濃度(白抜き青)、同実測値(青)、腸内菌叢定着マウス推測濃度(白抜き赤)、同実測値(赤)

③遊離D-アミノ酸産生に関連する腸内細菌の探索

腸内細菌叢定着マウスの結腸内菌叢を16S rRNA遺伝子アンプリコンシーケンスにより解析した結果、7門、15綱、21目、39科、71属が検出された(DDBJ Sequence Read Archive accession number: DRA006827)。腸内細菌叢による産生が認められた12種のD-アミノ酸の産生に関与している腸内常在菌を推測するため、説明変数を検出された腸内細菌(属)、応答変数を各D-アミノ酸としてPartial Least Squares (PLS)解析を行った。その結果、全てのD-アミノ酸に対しPLS回帰直線は良いモデルを示し、Variable Influence on the Projection (VIP)値が1以上の重要度が高い菌属が各D-アミノ酸から20程度ピックアップされた。さらに、相関関係を解析し、VIP値が1以上且つ有意な相関関係が認められた組合せが各D-アミノ酸から1~4菌属が見つかった。これら腸内細菌と各D-アミノ酸との相関関係を図7に示す。有意な相関性を示した細菌の全てがFirmicutes門で、中でも、Lachnospiraceae科の細菌が高頻度で、続いてRuminococcaceae科およびErysipelotrichaceae科に属する細菌が多かった。特定の菌属が特定のD-アミノ酸と強い相関性を示すのではなく、複数の腸内細菌が各D-アミノ酸濃度と相関性を示すと同時に、各細菌が複数のD-アミノ酸とも相関性を示した。

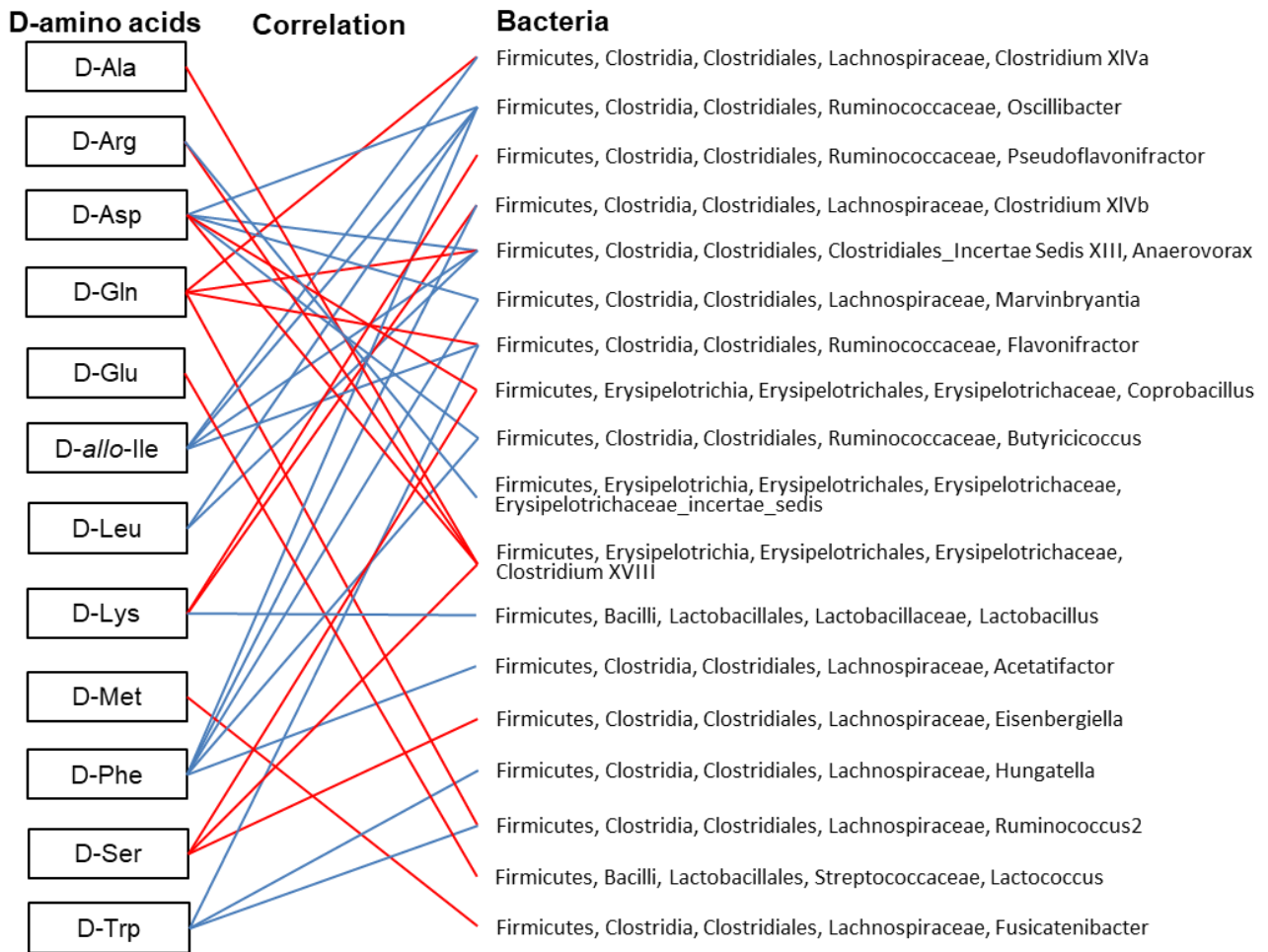


図7. D-アミノ酸濃度と腸内細菌(属)の相対存在率による相関関係

赤線: 正の相関性 青線: 負の相関性

PLS解析によるVIP値が1以上、且つ有意な相関性が認められた菌属を掲載した。

現在、腸内細菌叢由来のD-アミノ酸が生体内に移行し、生理活性を調整したことを示す報告は存在しない。しかし、脳内D-Serは、脳細胞内でセリンラセマーゼによりL-Serから合成されていることが知られているが、セリンラセマーゼ・ノックアウトマウスの脳内D-Ser含量は80-90%が減少するものの、10~20%は残存し、セリンラセマーゼ依存性ではないD-Serの存在を示唆している。すなわち、脳内D-Serの一部は腸内細菌叢由来である可能性もある。また、他の機能未知のD-アミノ酸にも生体への影響を有する可能性が考えられ、今後の研究課題である。

本研究で検出されたD-アミノ酸数が、盲腸内容物を解析した先行研究(*Nat Microbiol* 1: 16125, 2016)と比較して大幅に多いのは、解析対象が結腸内容物と盲腸内容物で異なる点や腸内菌叢の差異に起因する可能性はあるものの、本研究で用いたLC-MS/MSキラルアミノ酸高感度一斉分析法が、従来法と比較して、高感度に遊離D-アミノ酸の検出が可能なることに起因すると考えられる。すなわち、2次元HPLC法の蛍光検出に対して、本法は質量分析による検出のため定性能が向上し、試料中に含まれる夾雑物由来の成分の影響を受けることなく精度の高い定性・定量分析が可能になるからである。さらに、前処理作業の単純化、分析時間の短縮化および再現性の高さは特筆すべき点である。具体的には、誘導体化作業が不要なため、前処理の時間・工程を大幅に削減でき、誘導体化時に生じる副反応が無く、高い再現性が得られる。また、複数アミノ酸の同時分析が不可能な二次元HPLCは対象アミノ酸数に比例して分析時間が長くなるのに対し、本分析法は1試料あたり2分析実施し合計約20分間でProを除く全てのタンパク質構成アミノ酸を測定できる。従って、特定の疾病患者群と健常人群の糞便中D-アミノ酸プロファイリングの比較のような、多検体を対象とするハイスループット解析には適している。本研究成果を受けて、多くの研究者が腸内常在菌-宿主クロストークに関連する低分子代謝産物としてのD-アミノ酸の可能性を調べることに期待する。

【用語解説】

- **D-アミノ酸**: アミノ酸は、光学異性体(分子構造が鏡像関係)であるL型とD型が存在する(グリシンを除く)。長年、生物界に存在するアミノ酸はL-アミノ酸のみと考えられていたが、近年、分析技術の進歩に伴い、D-アミノ酸が微量ではあるが広く存在していることが分かった。ほ乳類も例外ではなく、D-アミノ酸が生体内に存在し、近年、様々な生理活性を有することが明らかになりつつある。
- **キラルアミノ酸**: L-アミノ酸とD-アミノ酸を識別しつつ両者を含んだ呼称
- **LC-MS/MS**: 高速液体クロマトグラフと四重極アナライザーを持つ質量分析計を結合させた液体クロマトグラフ質量分析計。今回は世界最高感度と検出スピードを両立した高速液体クロマトグラフ質量分析計「LCMS-8060」を利用。
- **16S rRNA遺伝子アンプリコンシーケンス**: 16S rRNA遺伝子は、進化速度が比較的遅く、種のレベルにおいて高い相同性を示すことから、細菌の系統分類に用いられている。具体的には、16S rRNA遺伝子の菌種毎に差異がある配列部位(可変領域)を標的とし、試料から抽出したゲノム中のその配列をPCR増幅し、その増幅物(アンプリコン)を次世代型DNAシーケンサーで解読し、その違いに基づく細菌集団(本試験では腸内細菌叢)をプロファイリングする技術
- **腸内細菌分類の門・科・属**: 生物を系統分類学的に分類する際の分類階級。分類階級を上位から並べると、門、綱、目、科、属、種の順となる。すなわち、複数の近縁種が集まって構成されるのが属、同様に、複数の近縁属が集まって構成されるのが科となる。

【論文】

ジャーナル: Scientific Reports

タイトル: Free D-amino acids produced by commensal bacteria in the colonic lumen

(日本語タイトル: 腸内細菌叢により産生される結腸内の遊離D-アミノ酸)

著者: Mitsuharu Matsumoto¹, Akihiro Kunisawa^{2,3}, Takanari Hattori^{2,3}, Shuichi Kawana², Yusuke Kitada¹, Hazuki Tamada¹, Shinichi Kawano^{2,3}, Yoshihiro Hayakawa², Junko Iida^{2,3}, Eiichiro Fukusaki^{3,4}

(¹ 協同乳業(株)研究所技術開発グループ, ² 株島津製作所, ³ 大阪大学・島津分析イノベーション共同研究講座,

⁴ 大阪大学大学院工学研究科)