

カワハギ (*Stephanolepis cirrhifer*) の腸内細菌による胆汁酸の変換

野田 二千翔¹、堀田 久子¹、内田 清久¹、小倉 嘉夫¹

¹ 神戸女子大学大学院家政学研究科食物栄養学専攻

Bile acid conversion by an intestinal bacterium of seafish, Kawahagi (*Stephanolepis cirrhifer*)

Nichika NODA¹, Hisako HOTTA¹, Kiyohisa UCHIDA¹ and Yoshio OGURA¹,

¹ Faculty of Home Economics, Kobe Women's University

要 約

須磨沖で採取したカワハギ腸内から7 α -Hydroxysteroid dehydrogenaseと7 β -Hydroxysteroid dehydrogenase活性を有する*Clostridium* sp.の菌を得た。この菌はコール酸やケノデオキシコール酸の7 α -水酸基を7 β -水酸基に変換し、ウルソコール酸やウルソデオキシコール酸を生成した。逆反応はわずかであった。さらにこの菌はタウリン抱合胆汁酸を効率的に脱抱合したが、グリシン抱合胆汁酸に対する活性は胆汁酸種によって異なり、グリコケノデオキシコール酸には緩やかに脱抱合しウルソデオキシコール酸を生成したがグリココール酸には活性を示さなかった。

キーワード：胆汁酸、*Clostridium* sp.、7 α -ヒドロキステロイドデヒドロゲナーゼ、7 β -ヒドロキステロイドデヒドロゲナーゼ、胆汁酸ヒドロラーゼ、カワハギ

緒 言

コール酸 (CA) やケノデオキシコール酸 (CDCA) は肝臓で生合成される一次胆汁酸である¹⁾。これらの胆汁酸は肝臓でタウリンもしくはグリシンと抱合し胆汁中に分泌され、腸管からの脂質吸収を促進する。胆汁酸自身は回腸でほとんどが再吸収され肝臓に戻り腸肝循環を形成する。一部の胆汁酸は吸収されず大腸に流出し腸内細菌によりデオキシコール酸 (DCA) やリトコール酸 (LCA) などの二次胆汁酸に変換される¹⁻²⁾。二次胆汁酸は生体に有害なものや有益なものが存在する³⁾。DCAは大腸がんのプロモーター⁴⁾として知られ、LCAは胆汁うっ滞の発症に関与する⁵⁾と考えられている。一方、ウルソデオキシコール酸 (UDCA) は胆石溶解剤⁶⁻⁷⁾や原発性胆汁性胆管炎 (PBC) の治療薬⁸⁻⁹⁾として使用されている。

二次胆汁酸の生成、つまり腸内細菌による胆汁酸変換の概略は、図1に示す如く、脱抱合反応、脱水酸化反応、脱水素反応、およびその逆反応である水素化反応を行い、

一次胆汁酸から二次胆汁酸を生成する¹⁾。

先に、Oguraらは一次胆汁酸であるCDCAをUDCAへ変換することが出来る7 α -Hydroxysteroid dehydrogenase (7 α -HSDH) 活性と7 β -Hydroxysteroid dehydrogenase (7 β -HSDH) 活性を有する菌をヒトの糞便中から単離し報告した¹⁰⁾。

同様な活性を持つ菌を種々の動物で検索し、須磨沖で採取されたシマイサキ (*Rhynchopelates oxyrhynchus*) にもCDCAをUDCAに変換する菌が存在することを明らかにした¹¹⁾。そこで当研究室では、様々な海産魚類の腸内細菌による胆汁酸変換反応を調べたところ、須磨沖で採取されたカワハギ (*Stephanolepis cirrhifer*) から7 α -HSDHと7 β -HSDH酵素活性を持つ腸内細菌を単離特定できた。この菌はシマイサキから採取した菌とは異なるが、カワハギから採取した腸内細菌の特性や胆汁酸変換反応について調べたのでその結果を報告したい。

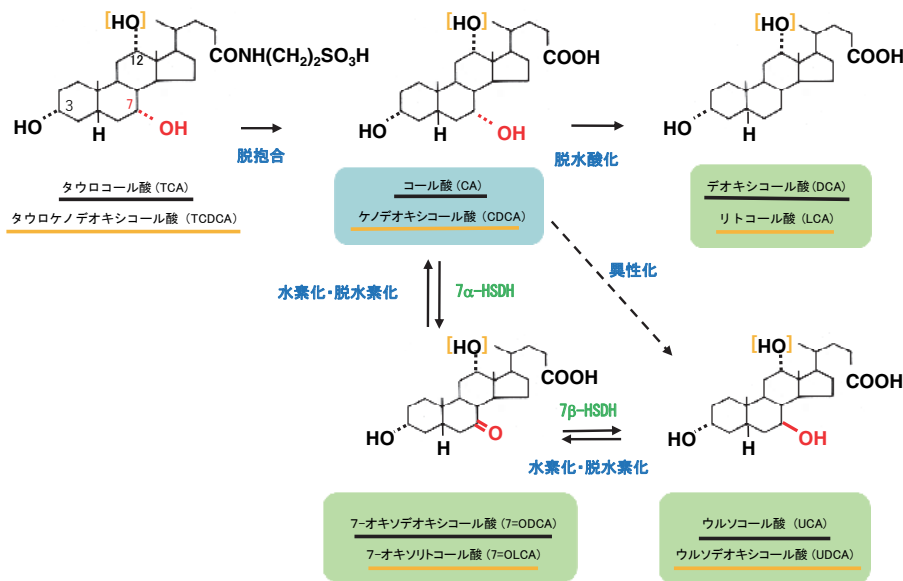


図1 腸内細菌による胆汁酸変換の概略

■ : 一次胆汁酸 ■ : 二次胆汁酸
 — : タウロコール酸の変換 - - : タウロケノデオキシコール酸の変換
 [] : ケノデオキシコール酸系胆汁酸は12α-OHを欠く。

実験方法

1. 実験材料

供試魚は兵庫県神戸市須磨沖で捕獲されたカワハギを用いた。魚体から腸管部分を取り出した後、腸管後部を切開し、無菌的に腸内容物を採取した。

2. 供試菌

カワハギの腸内容物から単離した7α-HSDH活性と7β-HSDH活性を有する嫌気性菌株をFK-322株と命名し実験に用いた。

3. 胆汁酸の標準標品

コール酸 (CA)、CDCAおよびUDCAは和光純薬株式会社から、タウロコール酸 (TCA)、タウロケノデオキシコール酸 (TCDCA)、グリココール酸 (GCA) およびグリコケノデオキシコール酸 (GCDCA) はナカライテスクから入手した。ウルソコール酸 (UCA) は当研究室の保管品である。7-オキシデオキシコール酸 (7=ODCA) および7-オキシリトコール酸 (7=OLCA) は、N-bromosuccinimideによる選択的酸化¹²⁾により合成した。

4. 培地

単一菌の分離にはGAM寒天培地を使用した。胆汁酸変換能を観察するためには、modified peptone yeast extract-glucose (MPYG) medium¹³⁾を使用した。

5. 培養

培養は*in vitro*の培養系で行った。MPYG液体培地に0.2 mMの各種胆汁酸を添加し、FK-322株を接種後、37℃で1～4日間、アネロパック嫌気ジャー (三菱ガス化学、東京) を用いて嫌気培養した。7α-OH胆汁酸の酸化反応の基質としては、CA、CDCA、UCA、UDCA、TCA、TCDCA、GCAおよびGCDCAを用いた。還元反応の基質としては、7=ODCAと7=OLCAを用いた。

6. 供試菌の同定

供試菌の嫌気性菌株であるFK-322株の同定は株式会社テクノスルガ・ラボに依頼した。

7. 胆汁酸分析

7α-HSDHおよび7β-HSDH活性を有する菌株のスクリーニングを行うための定性的な分析には薄層クロマトグラフィー (TLC) を、胆汁酸の変換を観察するための定量的

な分析には高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いた。

TLC分析では、胆汁酸添加培養液を塩酸性下でエーテル抽出しサンプルとした。胆汁酸分画用溶媒 (イソオクタン:酢酸エチル:1-ブタノール:酢酸=40:20:6:5 v/v)¹⁴⁾ を用いて1時間45分展開した。リンモリブデン酸を噴霧後、800 Wのトースターで加熱し発色させた。薄層板には濃縮ゾーン付きシリカゲル60 (メルク社) を使用した。

HPLCでは、培養液中の胆汁酸を既報の方法¹⁵⁾ により抽出し分析試料とした。HPLCには、分離用カラムとしてPACKED COLUMN (Bilepak II 4.6 mm ID ×125 mm:日本分光) を、反应用カラムとして3 α -Hydroxysteroid dehydrogenase (3 α -HSDH) 固定化酵素カラム (Enzymepak 3 α -HSD:日本分光) を装着した。日立Chromasterシステムを用いてHPLC分析を行い、酵素カラムで胆汁酸と反応させ、生成されたNADHを蛍光検出器で測定した。励起波長:345 nm、蛍光波長:470 nmで行った。

実験結果

供試菌の選別

EG寒天培地を用いてカワハギの腸内内容物から数十個のコロニーを採取した。図2はその中でCAをUCAに変換する活性を示したFK-322株を用い、CAを添加したPYG液体培地で4日間嫌気培養を行い、0日目と4日目の培養液中の胆汁酸組成をTLC分析した結果である。他の菌株でCAからUCAへの変換を示す菌株が1株あったが、TLC上でUCA変換が強かったFK-322株を選別して解析を行った。

供試菌の同定

図3はFK-322株のコロニー像、図4はFK-322株のグラム染色像である。菌の同定は株式会社テクノスルガ・ラボに依頼したが、解析結果よりFK-322株はグラム陰性桿菌であり、16S rDNA部分塩基配列の解析結果から *Clostridium* sp.であると推定された。

FK-322株の胆汁酸変換

各種胆汁酸添加における胆汁酸構成比率の経時変化の成績を図5~8に示した。図5に示すように、CA系胆汁酸添加培養ではCAが減少し、代わって7=ODCAとUCAが増加した。7=ODCA添加培養では、7=ODCAが減少し、

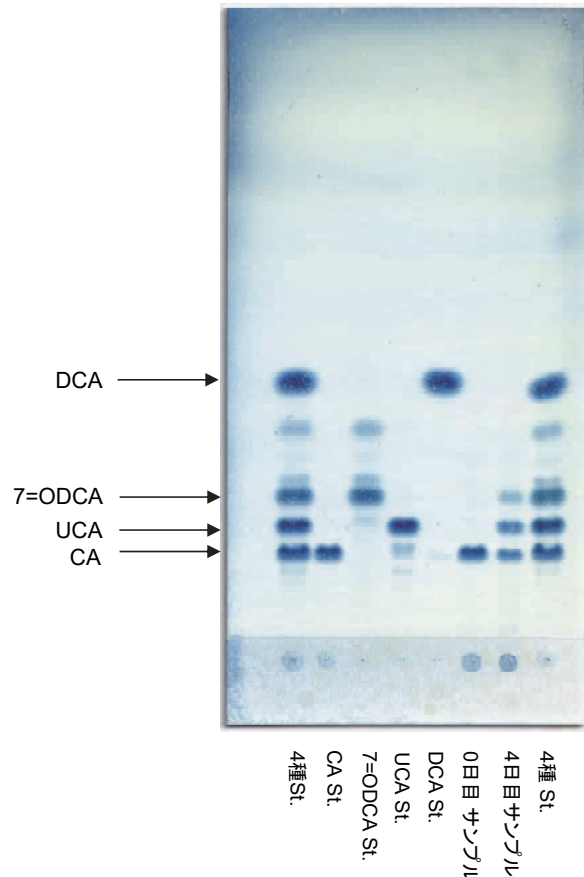


図2 FK-322株のコール酸添加培養0日目と4日目における胆汁酸変換のTLC展開

CA:コール酸 7=ODCA:7-オキシデオキシコール酸
UCA:ウルソコール酸 DCA:デオキシコール酸
サンプル: CA添加培養液 St.:標準胆汁酸
4種St: CA, 7=ODCA, UCA, DCA

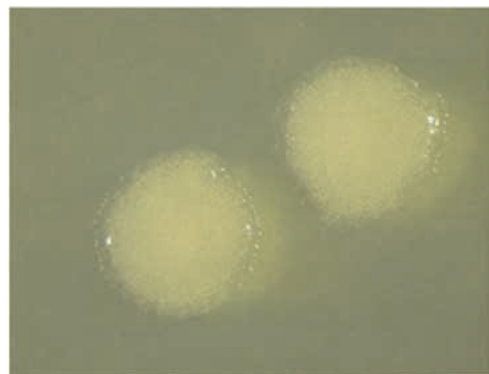


図3 FK-322株のコロニー像

CAとUCAが増加した。UCA添加培養では変化が見られなかった。

CDCA系胆汁酸添加培養では、図6に示すように、CDCAが1Hで著しく減少し、代わって7=OLCAとUDCAが増加した。7=OLCA添加培養でも7=OLCAは1Hで著しく減少し、CDCAとUDCAがわずかに増加した。UDCA

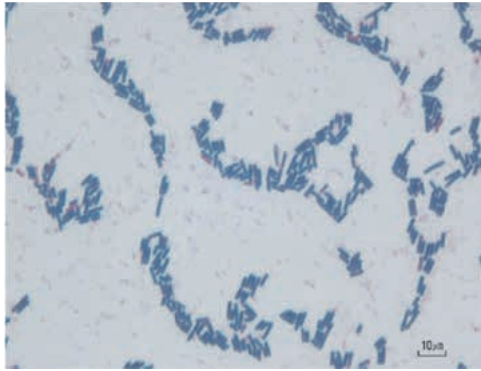


図4 FK-322株のグラム染色像

添加培養では変化は見られなかった。

タウリン抱合胆汁酸添加培養では、図7に示すようにTCAが減少し、CA、7=ODCAおよびUCAが増加した。TCDCA添加培養でもTCDCAが減少し、CDCA、7=OLCAおよびUCDAが増加した。

グリシン抱合胆汁酸添加培養では、図8に示すようにGCAでは変化が見られなかったが、GCDCAではGCDCAが緩やかに減少し代わってUDCAが増加した。

以上の成績からカワハギの腸内容物から単離したFK-322株は、添加した7 α -OH胆汁酸を7-オキシ胆汁酸と7 β

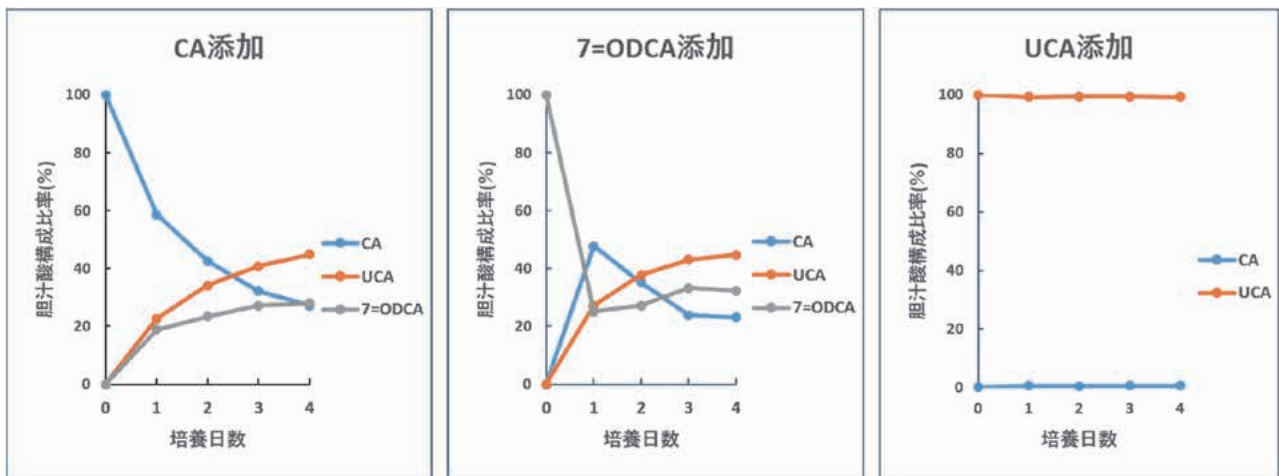


図5 CA系胆汁酸 (CA、7=ODCA、UCA) 添加における培地中の胆汁酸構成比率経時変化

CA: コール酸、7=ODCA: 7-オキシデオキシコール酸、UCA: ウルソコール酸

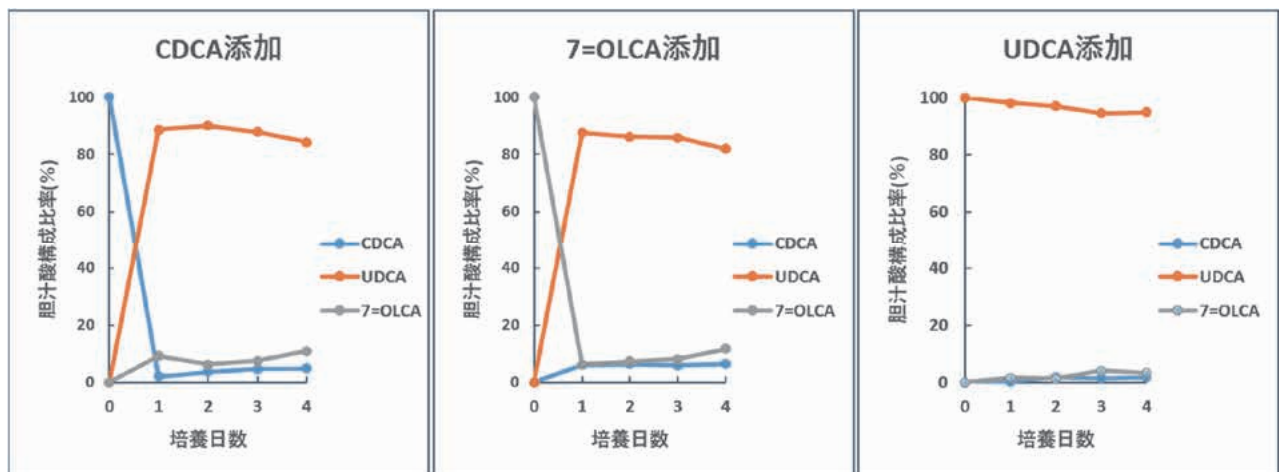


図6 CDCA系胆汁酸 (CDCA、7=OLCA、UDCA) 添加における培地中の胆汁酸構成比率経時変化

CDCA: ケノデオキシコール酸、7=OLCA: 7-オキソリトコール酸、UDCA: ウルソデオキシコール酸

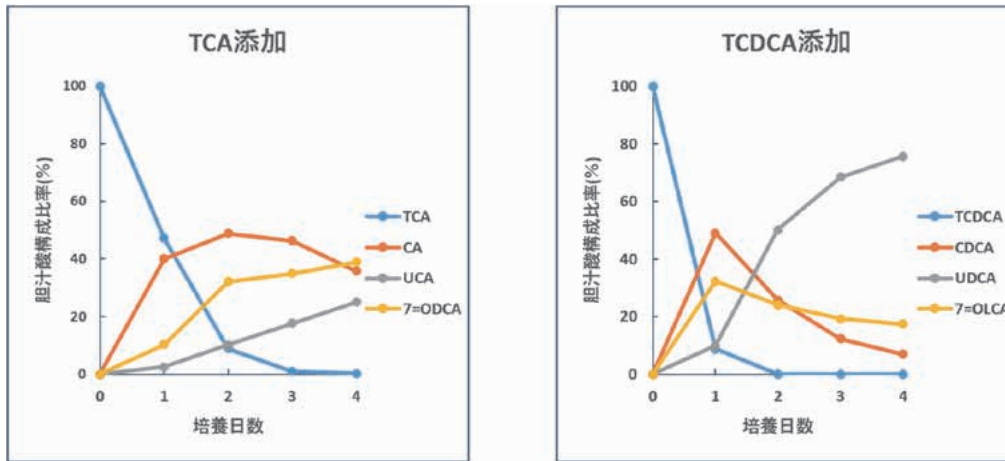


図7 タウリン抱合胆汁酸(TCA、TCDCA)添加における培地中の胆汁酸構成比率経時変化

TCA: タウロコール酸、CA: コール酸、UCA: ウルソコール酸、7=ODCA: 7-オキシデオキシコール酸
 TCDCA: タウロケノデオキシコール酸、CDCA: ケノデオキシコール酸、UDCA: ウルソデオキシコール酸
 7=OLCA: 7-オキシソリトコール酸

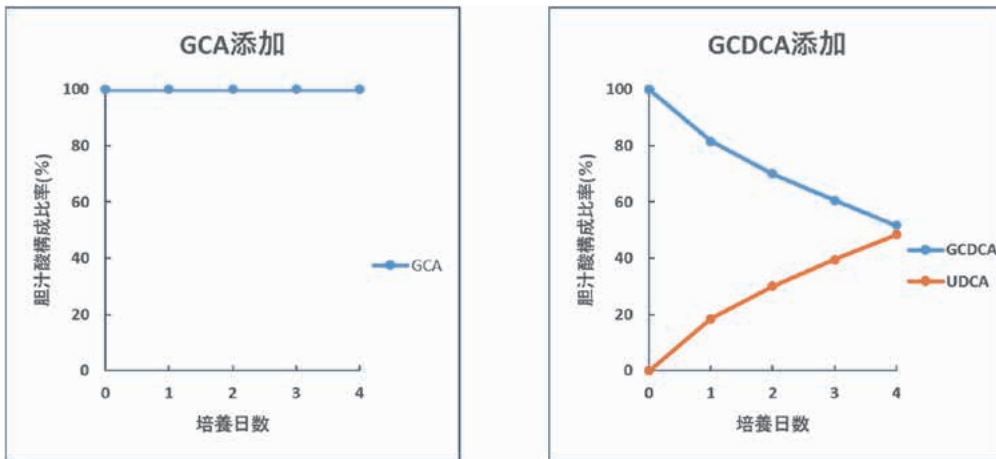


図8 グリシン抱合胆汁酸 (GCA、GCDCA) 添加における培地中の胆汁酸構成比率経時変化

GCA: グリココール酸、GCDCA: グリコケノデオキシコール酸、UDCA: ウルデオキシコール酸

-OH胆汁酸に変換する菌株であることが判明した。さらに、FK-322株はタウリン抱合胆汁酸に対しては高い脱抱合活性を示したが、グリシン抱合胆汁酸に対する脱抱合活性は低いという成績であった。

考察

腸内細菌の胆汁酸に対する作用は脱抱合、脱水酸化、脱水素化および逆反応である水素化が主な作用である¹⁶⁾。我々はこれまでヒトの糞便やシマイサキの腸内容物からCDCAをUDCAへ変換する腸内細菌を報告した¹⁰⁻¹¹⁾。

今回、胆汁酸の7 α -水酸基を7 β -水酸基へ変換する*Clostridium*属の腸内細菌 (FK-322株) をカワハギの腸内容物から分離した。この菌は同様の活性を示すシマイサキの腸内細菌*Peptostreptococcaceae*¹¹⁾とは異なる。FK-322

株は7 α -脱水素化と逆反応である7 β -水素化によって7 α -水酸基を7 β -水酸基へ変換する。この変換では中間体として7-ケト体が観察されたことにより、7 α -水酸基から7-ケト体への変換と7-ケト体から7 β -水酸基への変換という2段階の反応によることが明らかになった。さらに、CAからの変換に比してCDCAからの変換は著しく活性が高いことも示した。中間体である7-ケト体を培地に添加した実験では、7-ケト基 (7=ODCA、7=OLCA) の7 α -水酸基への還元より7 β -水酸基への還元活性が高かった (図5、図6)。また、7=ODCAに比して7=OLCAの7 β -水酸基への還元が高い活性を示した。それら還元物であるUCAとUDCA添加の実験では脱水素化はほとんど起こらなかった (図5、図6)。なお、7-ケト基の7 α -及び7 β -水酸基への還元の優位性は動物種族で異なることが知られている¹⁷⁾。

魚類には胆汁アルコールの硫酸エステルを胆汁主成分とするものと、胆汁酸としてコール酸のタウリン抱合体を主成分とするものがあることが知られている¹⁷⁾。また、グリシン抱合胆汁酸は見出されていない。脱抱合反応に関してカワハギのFK-322株はタウリン抱合体に高い脱抱合活性を示したが、グリシン抱合体については、GCAはほとんど反応しなかったが、GCDCAについては緩やかな脱抱合反応が見られた。その理由についてはカワハギの腸内細菌の持つ脱抱合酵素の胆汁酸種に対する親和性の違いが関係すると考えられる。

今回の成績から*Clostridium*属のFK-322株は主にタウリン抱合胆汁酸に高い脱抱合活性と、7 α -水酸基の7 β -水酸基へのエピメリ化活性を有することが明らかとなった。UDCAはヒトにとって有益な胆汁酸であることはよく知られている。魚類でもUDCAは消化酵素活性を上昇させ栄養素の蓄積を促進させることが報告されている¹⁸⁻²⁰⁾。また、肝機能減退による発育障害に使用できる医薬品として利用されている²¹⁾。腸内細菌によるUDCAへの変換能の探索はヒト以外にも他の動物種に対する有益な胆汁酸として腸内からの持続的供給に対して期待できるものと考えられる。

利益相反

本研究における利益相反は存在しない。

文 献

- 1) 内田 清久:胆汁酸と胆汁、1-4 (2009)、創英社/三省堂書店、東京
- 2) Macdonald, I.A., Bokkenheuser, V.D., Winter, I., McLernon, A.M. and Mosbach, E.H.: Degradation of steroids in the human gut, *J. Lipid Res.*, 24, 675-700 (1983)
- 3) Lenci, I., Milana, M., Signorello, A., Grassi, G. and Baiocchi, L.: Secondary bile acids and the biliary epithelia: The good and bad, *World J. Gastroenterology*, 29, 357-366 (2023)
- 4) Narisawa, T., Magadia, N.E., Weisburger, J.H. and Wynder, E.L.: Promoting effect of bile acids on colon carcinogenesis after intrarectal instillation of *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine in rats, *J. Natl. Cancer Inst.*, 53, 1093-1097 (1974)
- 5) Fisher, M.M., Magnusson, R. and Miyai, K.: Bile acid metabolism in mammals. I. Bile acid-induced intrahepatic cholestasis, *Lab. Invest.*, 25, 88-91 (1971)
- 6) Tint, S., Salen, G., Colalio, A., Graber, D., Varga, D., Speck, J. and Shefer, S.: Ursodeoxycholic acid: A safe and effective agent for dissolving cholesterol gallstones, *Ann. Intern. Med.*, 97, 351-356 (1982)
- 7) Leuschner, J., Leuschner, M., Sieratzki, J., Kurtz, W. and Hübner, K.: Gallstone dissolution with ursodeoxycholic acid in patients with chronic active hepatitis and two years follow-up. A pilot study, *Dig. Dis. Sci.*, 30, 642-649 (1985)
- 8) Osuga, T., Tanaka, N., Matsuzaki, Y. and Aikawa, T.: Effect of ursodeoxycholic acid in chronic hepatitis and primary biliary cirrhosis, *Dig. Dis. Sci.*, 34, 49S-51S (1989)
- 9) Poupon, R.E., Lindor, K.D., Cauch-Dudek, E.R., Poupon, R. and Heathcote, E.J.: Combined analysis of randomized controlled trials of ursodeoxycholic acid in primary biliary cirrhosis, *Gastroenterology*, 113, 884-890 (1997)
- 10) 小倉嘉夫、伊藤喜久治、稲垣佳映、鈴木孝夫、内田 清久: *Bacteroides* sp.T-40と*Clostridium innocum* T-94の組合わせによるケノデオキシコール酸のウルソデオキシコール酸への変換、神戸女子大学家政学部紀要、49、11-17 (2016)
- 11) 小倉嘉夫、武岡美佑、堀田久子、内田清久: シマイサキ (*Rhynchopelates oxyrhynchus*) の腸内細菌による胆汁酸の変換、神戸女子大学家政学部紀要、55、8-12 (2022)
- 12) Fieser, L.F. and Rajagopalan, S.: Selective oxidation with *N*-bromosuccinimide, I. cholic acid, *J. Am. Chem. Soc.*, 71, 3935-3938 (1949)
- 13) Hirano, S. and Masuda, N.: Characterization of NADP-dependent 7 β -hydroxysteroid dehydrogenases from *Peptostreptococcus productus* and *Eubacterium aerofaciens*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 43, 1057-1063 (1982)
- 14) Van den Ende, A., Rädercker, C.E., Mairuhu, W.M. and Van Zanten, A.P.: Improved extraction procedure for determination of bile acids in feces, *Clin. Chim. Acta*, 121, 95-109 (1982)
- 15) Ogura, Y., Yamaga, N., Kido, Y., Katayama, R., Yamada, K. and Uchida, K.: Aerobic and anaerobic biotransformation of bile acids by *Escherichia coli* (I), *Bioscience and Microflora*, 22, 133-137 (2003)
- 16) 内田 清久、小倉嘉夫: 胆汁酸の話 —腸内細菌との関係及び関連する話題—、神戸女子大学家政学部紀要、44、1-22 (2011)
- 17) 穂下剛彦: 動物の進化と胆汁酸、胆道、8、311-323 (1994)
- 18) Alam, Md.S., Teshima, S., Ishikawa, M. and Koshio, S.: Effects of ursodeoxycholic acid on growth performance and digestive enzyme activities of juvenile red bream, *Pagrus major*, *SUISANZOSHOKU*, 49, 53-59 (2001)
- 19) 弟子丸修、黒水克宣、米康夫: ハマチに対する飼料脂質およびウルソデオキシコール酸の至適量、Bulletin of the Japanese Society of Fisheries, 48, 1265-1279 (1982)
- 20) 舞田正志、立木宏幸、貝原聡彦、坂脇玲子、池田弥生: シラスウナギに対するウルソデオキシコール酸の薬理効果、*Nippon Suisan Gakkaishi*, 62, 129-130 (1996)
- 21) 農林水産省: 消費・安全局畜水産安全管理課、水産用医薬品の使用について、第29報、(平成28年1月31日)

Abstract

We isolated a bacterium possessing 7 α -hydroxysteroid dehydrogenase and 7 β -hydroxysteroid dehydrogenase activities from the intestinal contents of a seafish, Kawahagi (*Stephanolepis cirrhifer*) obtained from the sea of Suma. This bacterium was identified to belong to *Clostridium* sp.. This bacterium can convert the 7 α -hydroxyl groups of cholic acid and chenodeoxycholic acid to the 7 β -hydroxyl groups, producing ursocholic acid and ursodeoxycholic acid, respectively. However, the reverse reaction was minimal. Furthermore, this bacterium efficiently deconjugated taurine-conjugated bile acids, but the activity to glycine-conjugated bile acids varied depending on the bile acid species. Glycochenodeoxycholic acid was slowly deconjugated producing ursodeoxycholic acid, but glycocholic acid was not deconjugated.

Key words: bile acid, *Clostridium* sp., 7 α -hydroxysteroid dehydrogenase, 7 β -hydroxysteroid dehydrogenase, bile acid hydrolase, *Stephanolepis cirrhifer*