

シマイサキ (*Rhynchopelates oxyrhynchus*) の腸内細菌による胆汁酸の変換

小倉 嘉夫¹、武岡 美佑²、堀田 久子¹、内田 清久¹

¹ 神戸女子大学家政学部管理栄養士養成課程

² 香川大学大学院教育学研究科学校教育専攻

Bile Acid Conversion by an Intestinal Bacterium of Seafish, Shimaisaki (*Rhynchopelates oxyrhynchus*)

Yoshio OGURA¹, Miyu TAKEOKA², Hisako HOTTA¹ and Kiyohisa UCHIDA¹

¹ Faculty of Home Economics, Kobe Women's University,

² Graduate School of Education School Education major, Kagawa University

要 約

須磨沖で採取したシマイサキ腸内から7 α -hydroxysteroid dehydrogenase 活性と7 β -hydroxysteroid dehydrogenase 活性を有する *Peptostreptococcaceae* の嫌気性菌を得た。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の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しては作用が弱かった。

キーワード：胆汁酸, *Peptostreptococcaceae*, 7 α -ヒドロキシステロイド脱水素酵素, 7 β -ヒドロキシステロイド脱水素酵素, 胆汁酸水解酵素, シマイサキ

I. 緒 言

腸内細菌は腸管内で一次胆汁酸から二次胆汁酸を生成する。7 α 水酸基の脱水酸化反応によりコール酸 (CA) からデオキシコール酸 (DCA) を、ケノデオキシオキシコール酸 (CDCA) からリトコール酸 (LCA) を生成する。そればかりではなく、腸内細菌は脱抱合反応、脱水素反応などにより多種類の二次胆汁酸を生成する¹⁻²⁾。生成された二次胆汁酸のうち、DCAやLCAなどは生体に不利益な胆汁酸と考えられているが、ウルソデオキシコール酸 (UDCA) は原発性胆汁性肝硬変 (PBC) (原発性胆汁性胆管炎に病名変更) や薬物性肝障害の治療 (肝細胞膜保護作用) に有効な胆汁酸である。

先に、我々は図1に示した腸内細菌の胆汁酸変換によりヒト糞便からCAあるいはCDCAをUCAあるいはUDCAに変換する、つまり、7位水酸基を異性化する腸内細菌を単離

報告したが³⁾、今回、他の動物種 (魚類) の腸内細菌による胆汁酸の変換について検討した。その結果、須磨沖の海産魚類 (シマイサキ) の腸内細菌から高い7 α -脱水素活性と7

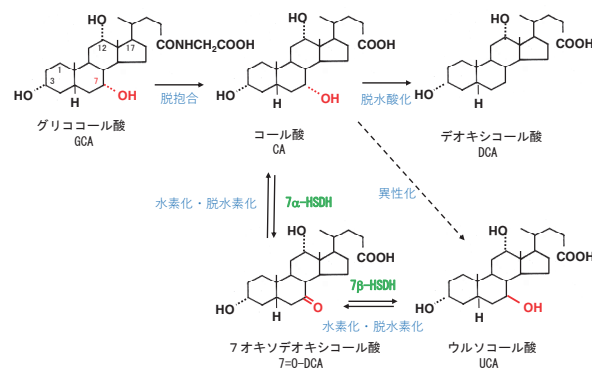


図1 腸内細菌による胆汁酸変換の略図

※ステロイド骨格中の番号は炭素番号を示す。

※異性化は一般的には直接起こるものではなく、7=O体を經由すると考えられている。

※7 α -、7 β -HSDH: 7 α -、7 β -Hydroxysteroid dehydrogenase

β -脱水素活性を示す菌を見出したので報告したい。

実験方法

1. 供試菌

須磨沖の海産魚類(シマイサキ)の腸内容物から単離した7 α -Hydroxysteroid dehydrogenase (7 α -HSDH)と7 β -Hydroxysteroid dehydrogenase (7 β -HSDH)活性を有する菌(FA-11)を用いて, in vitroの培養系で胆汁酸の変換を検討した。単離した嫌気性菌株(F-11)の同定は株式会社テクノスルガ・ラボに依頼した。

2. 標準標品及び試薬

本実験で使用した胆汁酸のうち, コール酸(CA), ケノデオキシコール酸(CDCA), ウルソデオキシコール酸(UDCA)は和光純薬工業株式会社から入手し, ウルソコール酸(UCA)は当研究室の保管品であり, タウロコール酸(TCA), グリココール酸(GCA)はナカライテスクから入手した。7-オキシリトール酸(7=O-LCA), 7-オキシデオキシコール酸(7=O-DCA)はN-bromosuccinimide による選択的酸化⁴⁾により合成した。

3. 培養方法

7 α -、7 β -HSDH活性を保有する菌(FA-11株)を, 各種胆汁酸(0.3 mM)を添加したmodified peptone yeast extract-glucose (MPYG) medium⁵⁾に接種し, 37°Cで1~4日間, あるいは, 0~24時間, アネロバック嫌気ジャー(三菱ガス化学, 東京)により嫌気培養を行った。7 α -OH胆汁酸の酸化反応の基質としてはCA, CDCA, GCA, TCAを, 還元反応の基質としては7=O-CDCAおよび7=O-LCAを用いた。実験はそれぞれ1回行った。

4. 胆汁酸分析

培地中の胆汁酸は既報の方法⁶⁾により塩酸性下でエーテル抽出を行い, 高速液体クロマトグラフィー(HPLC)分析を行った。分離用カラムとしてCOSMOSIL Packed Column (Cholest 4.6 mm ID×150 mm; ナカライテスク)を, 反応用カラムとして3 α -hydroxysteroid dehydrogenase (3 α -HSD)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HPLCで行い, 酵素カラムにより胆汁酸と反応して生成されたNADHを蛍光

検出器で励起波長: 345 nm, 蛍光波長: 470 nmにより測定した。

薄層クロマトグラフィー(TLC)分析では, 胆汁酸添加培養液をエタノールで除タンパク後, 胆汁酸を抽出し, 胆汁酸分画用溶媒(イソオクタン: 酪酸エチル: 1-ブタノール: 酪酸=40:20:6:5, v/v)⁷⁾を用いて展開し, リンモリブデン酸噴霧による発色で検出した。用いた薄層板は濃縮ゾーン付シリカゲル60(メルク社)を使用した。

実験結果

供試菌の単離および同定

シマイサキの腸内細菌からPYG寒天培地を用いて嫌気性菌21種のコロニーを分離した(FA-1~FA-21)。図2は各コロニーをCAあるいはUCAを添加した液体培地で4日間培養し, 培養液中の胆汁酸組成をTLCで展開し調べた成績である。FA-11株のみにCAからUCAへの高い変換が認められた。

供試菌(FA-11)はグラム陰性桿菌で, 16S rDNA部分塩基配列の解析結果から*Peptostreptococcaceae*と推定された。

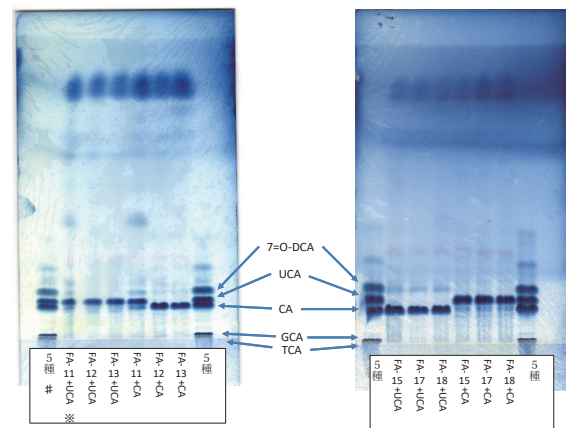


図2 TLCによる各コロニーのCAあるいはUCAを添加(4日間後)の培養液中の胆汁酸組成変化

※ FA-11+UCA: 株名+添加胆汁酸

＃ 5種スタンダードサンプルはTCA:タウロコール酸, GCA:グリココール酸, CA:コール酸, 7=O-DCA:7オキシデオキシコール酸, UCA:ウルソコール酸

FA-11株の胆汁酸変換

CAあるいはCDCA(各0.3 mM)を添加したMPYG培地で, FA-11株を1~4日間培養した場合の胆汁酸組成の変化を図3に示す。CAは培養1日目まで約20%にまで低下し, 約60%がUCAに, 約20%が7=O-DCAに変換された。この数値は培養4日目までほぼ一定であった。CDCAはCAと同様

に1日目に約50%がUDCAに、約25%が7=O-LCAに変換された。UDCAへの変換は4日目まではほぼ一定であったが、7=O-LCAへの変換量は2日以降漸減した。なお、UCAからCAへの変換は4日間の培養期間ではほとんど認められなかった。

抱合胆汁酸であるTCAあるいはGCA (各0.3 mM) を添加した場合の成績は図4に示すとおりである。培養1日目にTCAは全て脱抱合され、2日目に約65%が遊離型のUCAに、約18%が7=O-DCAへ変換された。UCAの生成量は3日目以降ほぼ一定であった。GCAの脱抱合反応はTCAほど強くなく、培養4日目で約32%であった。また、遊離型のUCAへの変換も4日目で約8%に留まった。GCAの変換で

は未同定物質XとYが両者で約10数%生成された。

CA, TCA, GCAについて培養24時間までの変換を観察した(図5)。CAは3時間目から減少が見られ、24時間で35%にまで低下した。7=O-DCAへの変換は3時間後から始まり12時間で最高になったが以後漸減した。一方、UCAへの変換は12時間後から始まり24時間で約40%に達した。TCAは3時間以降急激に脱抱合が進み、12時間でほとんど脱抱合された。この変化に対応して、遊離型のCAは3時間後から増加し12時間後に最高値を示した。7=O-DCAへの変換は3時間後から始まり12時間後に最大になったが以後低下傾向を示した。この低下に一致してUCAが増加した。GCAは24時間までほとんど変化が認められなかった。

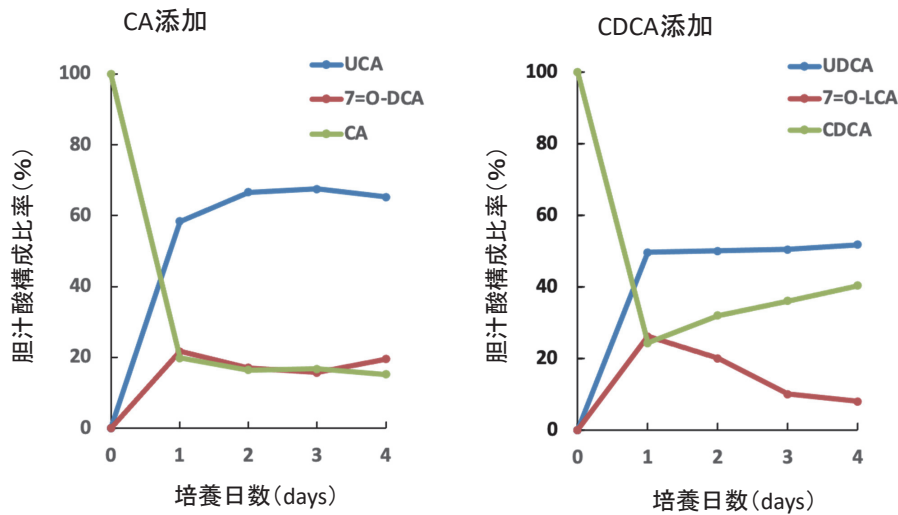


図3 FA-11株による0.3mM 胆汁酸添加における培地中の胆汁酸構成

CA: コール酸、7=O-DCA: 7オキシデオキシコール酸、UCA: ウルソコール酸、CDCA: ケノデオキシコール酸、7=O-LCA: 7オキシリトコール酸、UDCA: ウルソデオキシコール酸

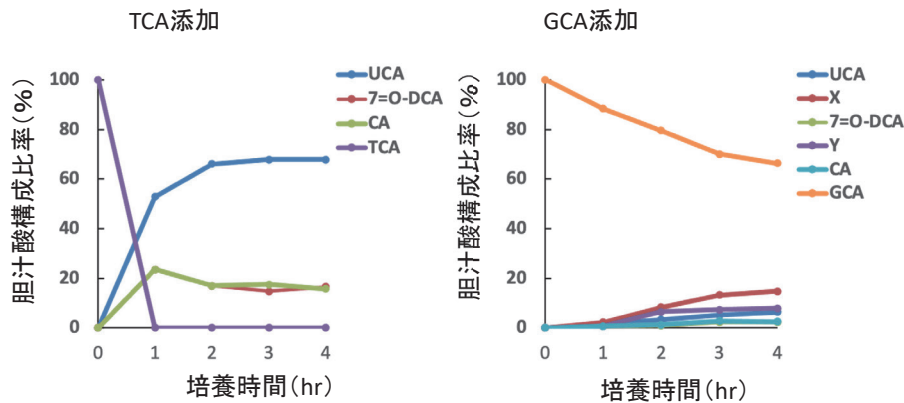


図4 FA-11株による0.3mM 抱合胆汁酸添加における培地中の胆汁酸構成

TCA: タウロコール酸、GCA: グリココール酸、CA: コール酸、7=O-DCA: 7オキシデオキシコール酸、UCA: ウルソコール酸、X及びY: 未同定物質

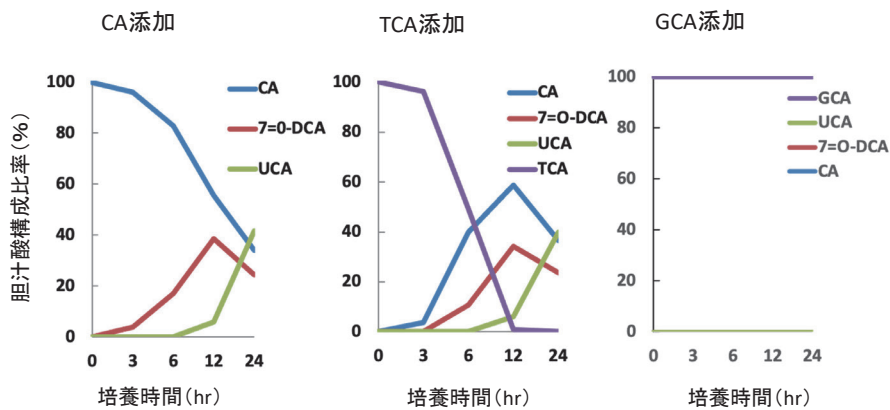


図5 FA-11株による0.3mM 胆汁酸添加における胆汁酸経時変換
TCA: タウロコール酸、GCA: グリココール酸、CA: コール酸、7-O-DCA: 7オキシデオキシコール酸、UCA: ウルソコール酸

考察

腸内細菌の胆汁酸に対する作用は脱抱合、脱水酸化、脱水素化および水素化が主な作用である¹⁻³⁾。我々はこれまでヒト糞便中の腸内細菌から脱水素化に関して、7 α -HSDH活性を持つ*Bacteroides* sp. T-40と7 β -HSDH活性を持つ*Clostridium innocuum* T94を組み合わせることでCDCAからのUDCAへの変換が起こる事を報告した³⁾。

今回、我々は魚類腸内細菌を検討する過程で、須磨沖で得られたシマイサキの腸内細菌から7 α -HSDH活性と7 β -HSDH活性を同時に有する*Peptostreptococcaceae*の嫌気性菌を得た。この菌はCAやCDCAの7 α -水酸基を7 β -水酸基に変換するが、逆反応はわずかであった。図3で見られた7-O-LCAの漸減は図1に示したように7-O-LCAが7 α -HSDHによる還元作用によってCDCAへ変換されたものと考えられる。CDCAに対して単一の菌が7 α -、7 β -HSDHの両活性を有する例は、既に*Clostridium absonum*⁸⁾、*Clostridium baratii*⁹⁾や*Peptostreptococcus productus*¹⁰⁻¹¹⁾にも報告されている。今回得られた菌は16S rDNA部分塩基配列から*Paeniclostridium*属および*Paraclostridium*属などから構成される*Peptostreptococcaceae*のクラスター内に含まれるが、既知属とは異なる分子系統学的位置を示したので、平野ら¹⁰⁾による*Peptostreptococcus productus*とは異なると思われる。

さらに、この菌はタウリン抱合の胆汁酸を効率的に脱抱合するがグリシン抱合胆汁酸に対しては作用が弱い。腸内細菌の脱抱合作用に基質特異性が有ることは既に知られて

いる¹²⁾。例えば、*Bifidobacterium longum*や*Bacteroides fragilis*などはタウリン抱合胆汁酸とグリシン抱合胆汁酸に対してほぼ近い活性を示すが、*Clostridium perfringens*や*Peptostreptococcus intermedius*はタウリン抱合胆汁酸に高い活性を示し、逆に、*Lactobacillus brevis*や*Streptococcus faecalis* II-136などはグリシン抱合胆汁酸に高い活性を示すことが報告されている。

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: 腸内細菌と胆汁酸代謝 腸内細菌学雑誌, 11, 81-88 (1998.)
- 2) 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 -, 神戸女大学家政学部紀要, 44, 1-22 (2011)
- 3) 小倉嘉夫, 伊藤喜久治, 稲垣佳映, 鈴木孝夫, 内田清久: *Bacteroides* sp. T40 と*Clostridium innocuum* T-94の組み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)
- 4) Fieser, L.F. and Rajagopalan, S.: Selective oxidation with N-bromosuccinimide. I. Cholic acid, J. Am. Chem. Soc., 71, 3935-3938 (1949)
- 5) Hirano, S., Nakama, R., Tamaki, M., Masuda, N. and Oda, H.: Isolation and characterization of thirteen intestinal microorganisms capable of 7 α -dehydroxylating bile acids. Appl. Environ. Microbiol., 41, 737-745 (1981)
- 6) 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)
- 7) Van den Ende A, Rådecker, C.E., Mairuhu, W.M.,

- van Zanten, A.P.: Improved extraction Procedure for determination of bile acids in feces, *Clin. Chim. Acta*, 121, 95-109 (1982)
- 8) Macdonald, I.A., Hutchison, D.M. and Forrest, T.P.: Formation of urso- and ursodeoxycholic acids from primary bile acids by *Clostridium absonum*, *J. Lipid Res.*, 22, 458-466 (1981)
- 9) Lepercq, P., Gerard, P., Geguet, F., Raibaud, R., Grill, J.P., Relano, P., Cayueda, C. and Juste, C.: Epimerization of chenodeoxycholic acid to ursodeoxycholic acid by *Clostridium baratii* isolated from human feces, *FEBS Microbiol. Lett.*, 235, 65-72 (2004)
- 10) Hirano, S. and Masuda, N.: Characterization of NADP-dependent 7β -hydroxysteroid dehydrogenases from *Peptostreptococcus productus* and *Eubacterium aerofaciens*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 43, 1057-1063 (1982)
- 11) Edenharder R., Pfützner, M. and Hammann, R.: Characterization of NAD-dependent 3α - and 3β -hydroxysteroid dehydrogenase and of NADP-dependent 7β -hydroxysteroid dehydrogenase from *Peptostreptococcus productus*. *Biochim. Biophys. Acta*, 1004, 230-238 (1989)
- 12) Kobashi, K., Nishizawa, I., Yamada, T., et al: A new hydrolase specific for taurine-conjugates of bile acids, *J. Biochem.*, 84, 495-497 (1978)

Abstract

We isolated a bacterium possessing 7α -hydroxysteroid dehydrogenase and 7β -hydroxysteroid dehydrogenase activities from the intestinal contents of seafish, Shimaisaki (*Rhynchopelates oxyrhynchus*) obtained from the sea of Suma. This bacterium was identified to belong to the family *Peptostreptococcaceae* and converted 7α -hydroxyl group of cholic and chenodeoxycholic acids to 7β -hydroxyl group, forming ursocholic and ursodeoxycholic acids, respectively. Activities of the reverse reactions were low. This bacterium also hydrolyzed taurine-conjugated bile acids effectively but did glycine-conjugates to a lesser extent.

Key words: bile acid, *Peptostreptococcaceae*, 7α -hydroxysteroid dehydrogenase, 7β -hydroxysteroid dehydrogenase, bile acid hydrolase, *Rhynchopelates oxyrhynchus*