

2022年8月19日

報道関係者各位

慶應義塾大学薬学部

D型トリプトファンが腸内の病原菌の増殖を抑え 腸炎を予防することを発見

—腸内環境を改善する新規機能性素材の開発に期待—

慶應義塾大学、明治ホールディングス株式会社を中心とする研究グループは、D-アミノ酸の一つであるD-トリプトファン（D-Trp）が腸内の病原細菌や病原性片利共生細菌（注1）の増殖を抑え、腸炎を予防することを発見しました。本研究は慶應義塾大学薬学部の金倫基（きむ ゆんぎ）教授、明治ホールディングス株式会社を中心とする研究グループの成果です。

L-アミノ酸は、タンパク質の構成要素として機能するため、あらゆる生命に不可欠です。対照的に、L-アミノ酸の鏡像異性体（注2）であるD-アミノ酸の機能については長い間不明でした。しかし、D-アミノ酸も生体内に存在し、哺乳類や微生物の生理機能に重要な役割を果たしていることが明らかになってきました。D-アミノ酸は主に細菌によって作られますが、腸内細菌によっても生成され、強力な殺菌分子として機能することが知られています。そのため、D-アミノ酸は腸内で有害な細菌に直接的に作用し、腸内環境を健全に保つ役割を果たしているのではと考えました。

本研究では、D-Trpが腸管病原細菌の増殖を抑え、腸炎を予防することを明らかにしました。また、D-Trpが、菌体内のトリプトファン代謝を変化させることにより腸管病原細菌の増殖を抑制していることも分かりました。以上のことから、D-Trpは腸内環境を改善するモジュレーター（変動因子）として機能することが示唆されました。

D-アミノ酸が細菌の必須構成成分であることは以前から知られていましたが、哺乳類においても、神経伝達の調節や腎機能の向上、さらにタンパク質機能への影響など、多様な生理機能を有することが明らかになってきました。本研究結果から、D-Trpが腸内の病原細菌や病原性片利共生菌に直接作用し、これらの増殖を抑制するというD-アミノ酸の新たな機能が解りました。

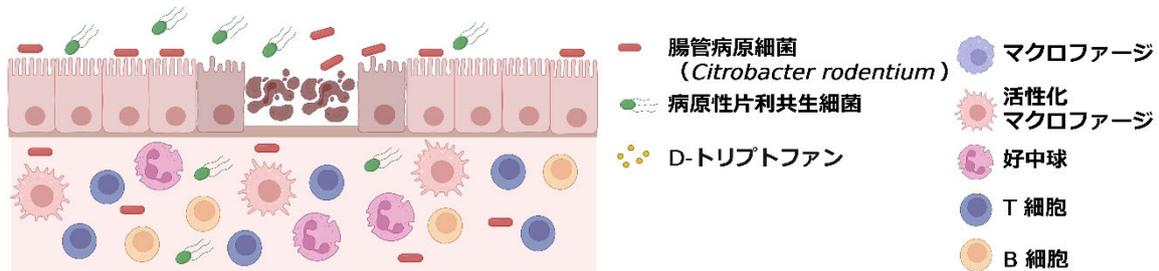
D-Trpは、腸内環境を改善する新規機能性素材としての開発だけでなく、腸管病原細菌による感染症や炎症性腸疾患などの腸炎に対する予防・治療への応用も期待されます。

本研究成果は2022年8月2日（米国東部標準時）に国際学術誌『iScience』（電子版）に掲載されました。

1. 本研究のポイント

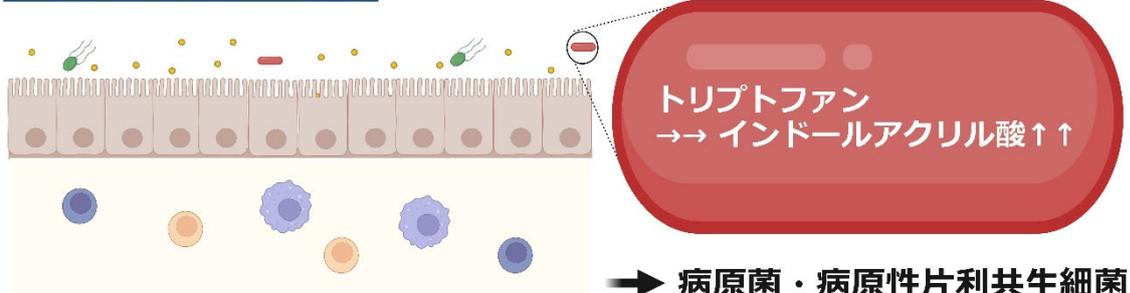
- ・D-Trpは腸管病原細菌の増殖を抑え、感染性腸炎を抑制する。
- ・D-Trpは、特定の腸内細菌（病原性片利共生細菌）を減少させることにより、大腸炎を抑制する。
- ・D-Trp投与によって菌体内で増加するインドールアクリル酸が、腸管病原細菌の増殖を抑制する。

D-トリプトファンなし



→腸炎発症

D-トリプトファンあり



→腸炎発症抑制

図1. 本研究の概念図

D-トリプトファン (D-Trp) は腸内の病原細菌や病原性片利共生細菌の増殖を抑え、腸炎を予防する。腸内に D-Trp が少ない場合、腸管病原細菌の侵入や、腸管片利共生細菌の病原性発揮により、多数の炎症性の免疫細胞が集積し、腸炎が引き起こされる。一方、腸内に D-Trp が多い場合、腸内の病原性細菌の増殖が抑えられ、腸炎の発症が抑えられる。D-Trp による病原性細菌の増殖抑制には菌体内のトリプトファン代謝の変化、すなわち、菌体内でインドールアクリル酸が増加することが関与している。

2. 研究の背景

L-アミノ酸は、酵素や抗体、ホルモンなどのタンパク質の構成要素であるため、生体の維持に必須な物質です。一方、D-アミノ酸は、細菌の細胞壁 (ペプチドグリカン) の構成成分として知られていますが、その機能は非常に限定的であると考えられてきました。また、哺乳動物においては通常、生体内に D-アミノ酸は存在しないとされてきました。しかし、分析技術の進歩によって、D-セリン、D-アスパラギン酸、D-アラニン、D-システインなどの D-アミノ酸が哺乳類の組織中に存在し、多くの生理学的プロセスに重要な役割を果たしていることが明らかになってきました。また、腸内細菌によっても多様な D-アミノ酸が作られており、腸内に存在しています。D-アミノ酸は殺菌作用を持つことが知られていることから、外来からの病原性細菌の増殖を阻止し、腸内細菌叢 (注3) のバランスを維持する上で重要な役割を果たしていることが考えられます。しかし、D-アミノ酸が腸管病原細菌や腸内細菌に与える影響については不明な点が多く残されていました。

3. 研究の内容・結果

まず、腸管病原細菌の増殖における各 D-アミノ酸の阻害効果を試験管内で比較しました。対照群 (D-アミノ酸非添加群) と比較して、ほとんどの D-アミノ酸、特に D-メチオニン (D-Met) と D-Trp の添加により、マウスの腸管病原体である *Citrobacter rodentium* (*C. rodentium*) (注4) の増殖が抑制されました (図 2A)。次に、D-Met と D-Trp が *C. rodentium* に感染したマウスに防御的に働くかどうかを検証しました。D-Met の投与は、*C. rodentium* 感染後のマウスの生存率を大きくは上げませんでした、死亡日数を延長しました (図 2B)。一方、D-Trp の投与は、*C. rodentium* 感染マウスの生存率を用量依存的に改善しました (図 2C)。そこで次に、D-Trp がマウス腸内の *C. rodentium* の増殖を阻害できるかどうかを観察しました。対照 (非投与) マウスと L-トリプトファン (L-Trp) 投与マウスでは、*C. rodentium* は感染 3 日目に糞便中で検出され、その後さらに増加し、6 日目から 9 日目まで上昇したままでした。ところが、D-Trp 投与マウスでは、感染 3 日目に *C. rodentium* が糞便中で検出されましたが、6 日目から 9 日目まで減少しました (図 2D)。以上の結果から、D-Trp は *C. rodentium* の腸内での増殖を抑制することにより、致死的な腸管感染症を防ぐことが解りました。

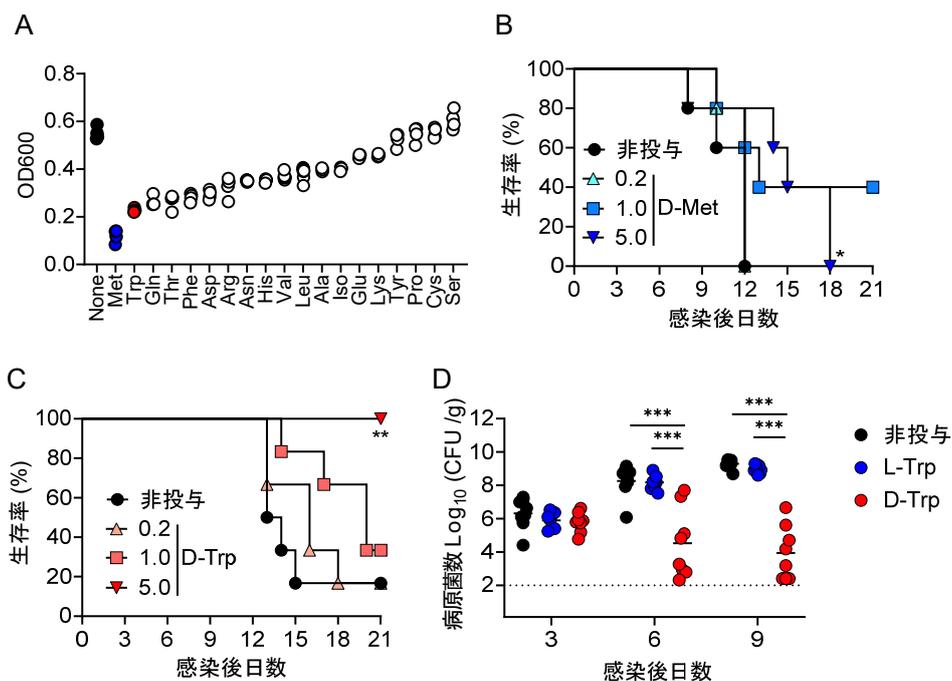


図 2. D-トリプトファン (D-Trp) は、腸管病原細菌の増殖を抑制する。

(A) 腸管病原細菌である *Citrobacter rodentium* (*C. rodentium*) を 50mM の各 D-アミノ酸存在下で 24 時間培養後の OD600 値 (菌液の濁度) を測定した。

(B, C) 対照飼料または、D-メチオニン (D-Met) (B) または D-Trp (C) を 0.2%, 1%, 5% 添加した飼料を与えたマウスに *C. rodentium* を感染させ、生存率を観察した。

(D) 対照飼料または、D-Trp あるいは L-トリプトファン (L-Trp) を 5% 添加した飼料を与えたマウスに *C. rodentium* を感染させ、経時的に糞便中の病原菌 (*C. rodentium*) 数を算定した。

各ドットは、個々のサンプルまたはマウス。* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$

次に、D-Trp が腸内細菌によって引き起こされる腸炎を抑制するかどうかを検証しました。腸内細菌依存的な腸炎を誘導するデキストラン硫酸ナトリウム (DSS) をマウスに投与すると、体重の低下とともに、大腸に強い炎症が惹起されます (図 3A-C)。しかし、D-Trp 投与マウスにおいては、DSS を飲ませても体重はほとんど低下せず、腸炎も引き起こされませんでした (図 3A-C)。以上の結果から、D-Trp は腸内細菌によって引き起こされる腸炎に対する防御作用も有することが明らかとなりました。

これらの結果から、D-Trp の投与は腸内細菌叢を変化させていると考えられました。そこで次に、D-Trp 投与後の腸内細菌叢の組成を解析しました。その結果、主成分分析によって示されるように、D-Trp 投与によって、腸内細菌叢の組成が変化することが明らかになりました (図 4A)。D-Trp で処理されたマウスでは、Lactobacillaceae 科、Tannerellaceae 科、Bacteroidaceae 科に属する細菌群の割合の増加と、Lachnospiraceae 科、Muribaculaceae 科、Rikenellaceae 科に属する細菌群の割合の減少が見られました (図 4、B、C)。実際に、D-Trp 投与で腸内の相対割合が低下した Lachnospiraceae 科細菌である *Clostridium saccharolyticum* は、D-Trp 存在下で増殖が強く抑制されましたが、D-Trp 投与で腸内の相対割合が増加した Lactobacillaceae 科の *Lactobacillus murinus* (現在は *Ligilactobacillus murinus* に名称変更) は、D-Trp の有無で増殖能に違いは見られませんでした。以上の結果から、D-Trp は特定の腸内細菌の増殖を阻害することで、腸炎を抑制している可能性が示唆されました。

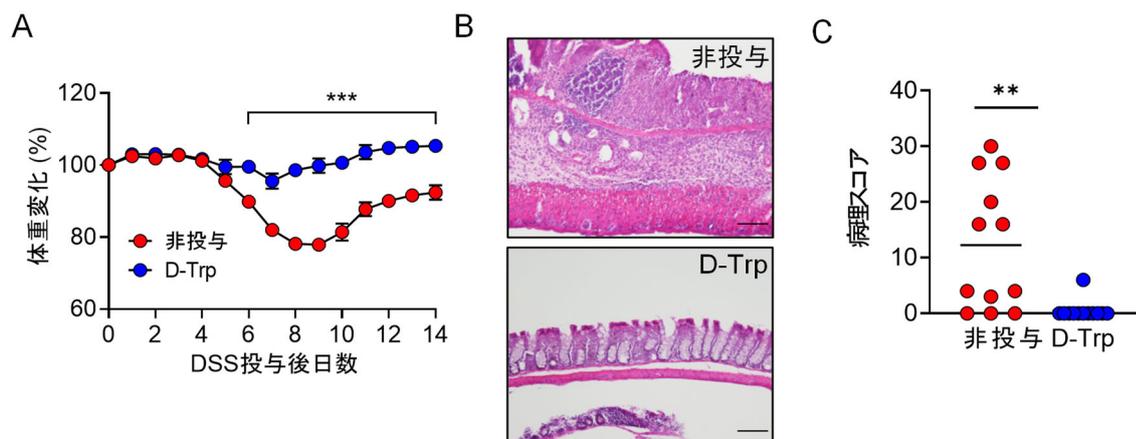


図 3. D-トリプトファン (D-Trp) は、実験的腸炎を抑制する。

対照マウスまたは、D-Trp を投与したマウスに腸炎惹起物質である DSS (デキストラン硫酸ナトリウム) を 5 日間飲ませ (投与開始日を 0 日)、腸炎を誘導した。

(A) DSS 投与後の体重変化。

(B, C) DSS 投与開始後 10 日目の病理組織像 (HE 染色。スケールバー: 100 μm) (B) と病理スコア (C)

各ドットは、個々のマウスまたは平均±標準誤差。** p < 0.01; *** p < 0.001

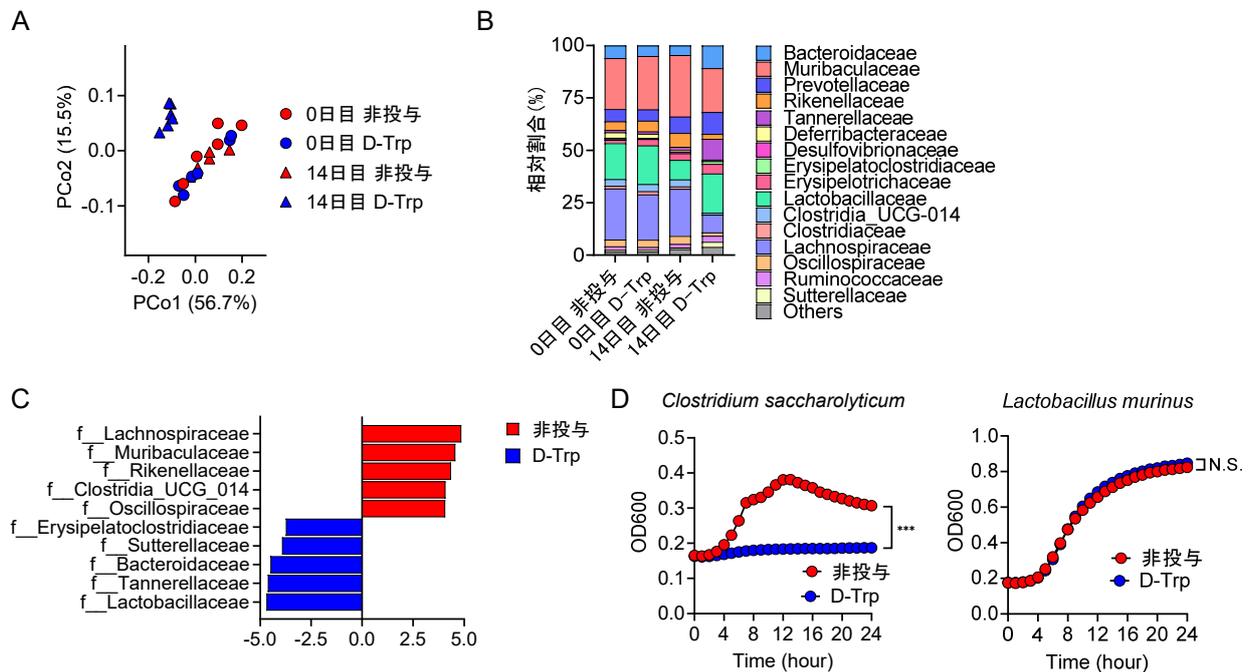


図4. D-トリプトファン (D-Trp) は腸内細菌叢の組成を変化させる。

(A-C) D-Trpを5%添加した飼料をマウスに14日間与えた後の腸内細菌叢の変化を観察した。

(A) 腸内細菌叢の主座標分析(距離が離れているほど腸内細菌叢の組成が異なる)。

(B) 腸内細菌叢の組成(相対割合)。色は各細菌属に対応。

(C) 群間比較解析(LEfSe, Linear discriminant analysis effect size)。群間の腸内細菌叢の違いを可視化。

(D) D-Trp投与で腸内の相対割合が低下した Lachnospiraceae科細菌である *Clostridium saccharolyticum* または、相対割合が増加した Lactobacillaceae科の *Lactobacillus murinus* (現在は *Ligilactobacillus murinus* に名称変更) を20mMのD-Trp存在下で24時間培養時のOD600値(菌液の濁度)の変化を測定した。各ドットは、個々のマウスまたは平均±SEM。*** $p < 0.001$; N.S.有意差なし

最後に、D-Trpが細菌の代謝にどのように影響しているかを検証しました。まず、*C. rodentium* を L-Trp または D-Trp の存在下で培養した後の菌体内の代謝物を比較しました。その結果、L-Trp 添加時と比べて D-Trp 添加時に菌体内で有意に増加している代謝物が見つかりました(図5A)。その中で、インドールアクリル酸が D-Trp 添加時に菌体内で非常に多く検出されました(図5A, B)。そこで、インドールアクリル酸の存在下で *C. rodentium* を培養したところ、その増殖が抑制されることが解りました(図5C)。さらに、インドールアクリル酸を含む飼料を与えたマウスに *C. rodentium* を感染させたところ、対照マウスと比べて生存率が有意に向上しました(図5D)。また、感染後9日目の糞便中の *C. rodentium* の菌数も、対照マウスと比べてインドールアクリル酸摂取マウスで有意に減少していました。以上のことから、D-Trpによって菌体内で増加するインドールアクリル酸が腸管病原細菌である *C. rodentium* の増殖を抑制することが明らかとなりました。

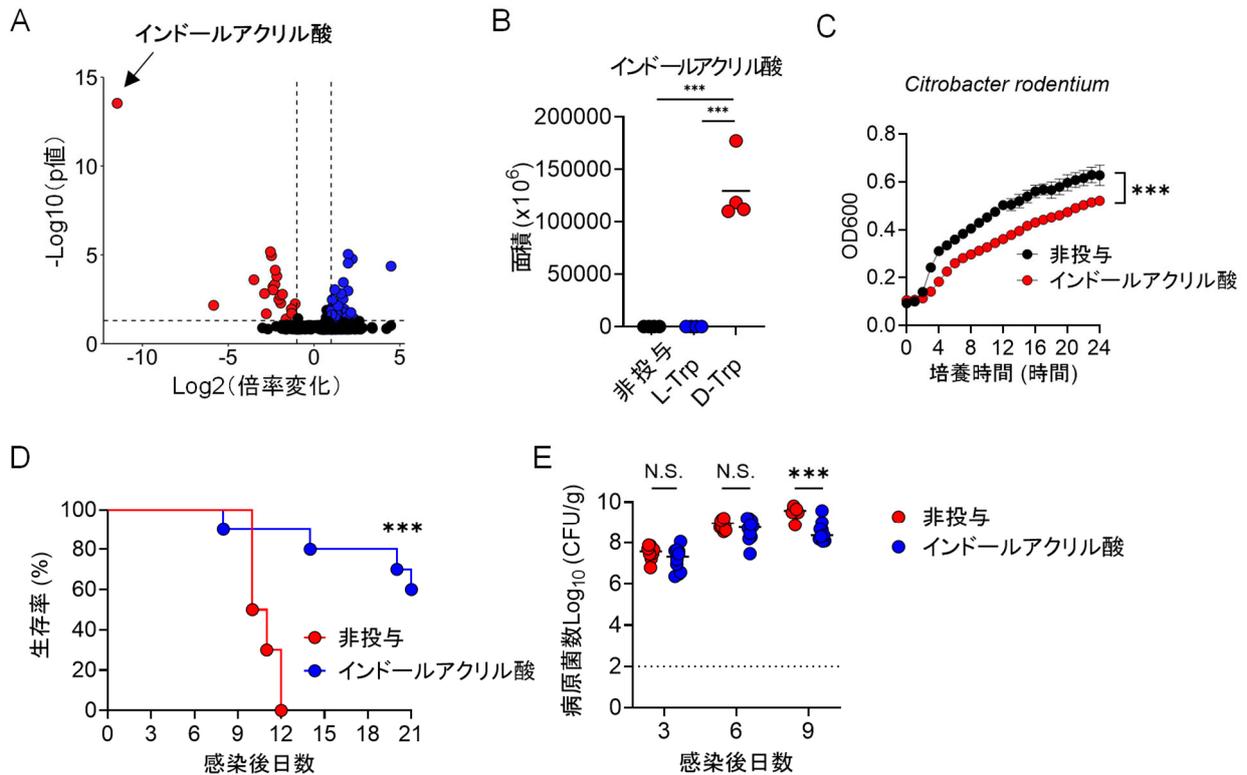


図5. D-トリプトファン (D-Trp) 投与により菌体内で増加するインドールアクリル酸は腸管病原細菌の増殖を抑制する。

(A,B) 腸管病原細菌である *Citrobacter rodentium* (*C. rodentium*) を 50 mM L-トリプトファン (L-Trp) または D-Trp の存在下で 24 時間培養した。細胞内代謝物の相対量の有意性と差の大きさを示した散布図 (ボルケーノプロット。赤色: D-Trp で多い代謝物、青色: L-Trp で多い代謝物) (A)。細胞内インドールアクリル酸の相対量 (B)。

(C) *C. rodentium* を 2mM のインドールアクリル酸存在下で 24 時間培養時の OD600 値 (菌液の濁度) の変化を測定した。

(D, E) 対照飼料またはインドールアクリル酸を 2.5% 添加した飼料を与えたマウスに *C. rodentium* を感染させた。感染後の生存率 (D)。糞便中の病原菌 (*C. rodentium*) 数を経時的に算定 (E)。

各ドットは、個々のマウスまたは平均±標準偏差。*** $p < 0.001$; N.S. 有意差なし

4. 結論

腸内細菌によって産生される代謝物の中には宿主生理機能を向上させ、疾患病態を軽減させる物質が存在します。しかし、機能が明らかにされた腸内細菌由来代謝物はまだほんの一部です。ヒトの 100 倍以上の遺伝子を持つと言われている腸内細菌叢は、機能未知な代謝物を介して我々の健康状態に大きく影響を及ぼしていると考えられます。本研究では多様な働きを持つことが次第に明らかにされ、また、腸内細菌によっても産生される D-アミノ酸の新たな役割を見つけることができました。D-Trp は、腸炎惹起性の細菌に直接的に作用し、増殖を抑制することから、感染性腸炎や炎症性腸疾患に対する効果が期待できます。

5. 論文情報

〈タイトル〉 D-Tryptophan suppresses enteric pathogen and pathobionts and prevents colitis by modulating microbial tryptophan metabolism.

〈著者名〉 Natsumi Seki, Tatsuki Kimizuka, Monica Gondo, Genki Yamaguchi, Yuki Sugiura, Masahiro Akiyama, Kyosuke Yakabe, Jun Uchiyama, Seiichiro Higashi, Takeshi Haneda, Makoto Suematsu, Koji Hase, Yun-Gi Kim* (*責任著者)

〈雑誌〉 『iScience』(電子版)

〈DOI〉 <https://doi.org/10.1016/j.isci.2022.104838>

<用語説明>

- (注1) 病原性片利共生細菌：宿主と共生する細菌の中で、特定の環境下でのみ宿主に悪影響を及ぼし得る菌。英語では **pathobiont** という。
- (注2) 鏡像異性体：分子の構成原子は全く同じだが、立体構造だけが左右逆になっている分子。これらは互いに鏡に写した関係にあり、一方を **L 体**、もう一方を **D 体** という。
- (注3) 腸内細菌叢：ヒトの腸管内には数百種類、**100 兆**個ほどの細菌が絶えず増殖を続けている。これらは腸内細菌と呼ばれ、複雑な生態系を構築している。この腸内細菌集団のことを腸内細菌叢と呼んでいる。
- (注4) *Citrobacter rodentium*：ヒトに感染する腸管病原性大腸菌や腸管出血性大腸菌と同一の病原遺伝子を保有するマウスの腸管病原体。大腸上皮細胞に強固に接着し、炎症と大腸の肥厚を引き起こす。感受性の高いマウスに対しては致死的な下痢症を引き起こす。

※ご取材の際には、事前に下記までご一報くださいますようお願い申し上げます。

※本リリースは文部科学記者会、科学記者会、各社科学部等に送信させていただいております。

<研究内容についてのお問い合わせ先>

慶應義塾大学薬学部 創薬研究センター

教授 金 倫基 (きむ ゆんぎ)

TEL : 03-5400-2624

E-mail : ykim@keio.jp

<本リリースの配信元>

慶應義塾広報室 (山中)

TEL : 03-5427-1541 FAX : 03-5441-7640

Email : m-pr@adst.keio.ac.jp

<https://www.keio.ac.jp/>