

フラボノイド代謝腸内細菌に関する研究

小綿 慧莉 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 小林 達彦 (筑波大学 生命環境系)

背景・目的

フラボノイド化合物はフラバンを基本骨格として有し、植物の二次代謝産物として産生される化合物である。このフラボノイド化合物には、抗酸化作用や抗炎症効果、抗腫瘍効果などの生理活性があることが知られており、フラボノイド化合物が豊富に含まれる食品類を摂取することは、健康増進につながると考えられている。食品や飲料などを通じて経口摂取されたフラボノイド化合物は、小腸に吸収されるだけでなく、その一部は大腸に移行し、大腸内に生息する腸内細菌によって分解を受ける場合がある。そして、腸内細菌によってフラボノイド化合物が分解されることによって生じた代謝産物の一部には、その化合物そのものにも、フラボノイド化合物が有するような生理活性があるということが認められつつある。フラボノイド化合物の腸内環境における代謝について様々な研究が行われている中で、私は、あるフラボノイド化合物の、腸内環境における代謝過程を明らかにした研究に着目した。この研究では、フラボノイド化合物の代謝産物、およびそのような代謝に関わる菌株の一部のみが同定されているだけで、代謝に関わる菌株が有する代謝酵素や遺伝子については明らかとされていない。この研究で明らかとされた代謝経路の中で産生される化合物の一部には、有用な生理活性が報告されていることから、そのような化合物を産生することに働く代謝酵素やその遺伝子について解明することは、化合物そのものの有用性を向上させることにつながると考えられる。以上の背景から私は、あるフラボノイド化合物の腸内環境における代謝経路のうち、代謝の中間産物を、さらに代謝して生理活性がある別の化合物に変換する反応に着目し、そのような反応に関わる腸内細菌が有する代謝酵素や、その遺伝子を同定することを目標として研究を行った。

方法・結果

以下、フラボノイド化合物を代謝することにより化合物 X を産生する腸内細菌を A 株、A 株が産生した化合物 X をさらに代謝し、生理活性を有する別の化合物 Y に代謝する腸内細菌を B 株と記す。また、物質の変換には関係しないが、A 株の代謝を促進する腸内細菌を C 株と記す。本研究では A 株が産生する化合物 X を化合物 Y へ変換する反応を担う B 株の代謝酵素および遺伝子の同定を目指した。

まず、B 株の休止菌体反応によって化合物 Y が産生されるような反応の条件検討を行った。基質となるフラボノイド化合物を添加した液体培地に、A 株および C 株を植菌し 48 時間共培養した後、培養液に B 株を植菌し、さらに 48 時間共培養を行った。その後、培養液を遠心して A 株、B 株、C 株が混合した休止菌体を回収した。この休止菌体に、A 株の基質であるフラボノイド化合物を添加してインキュベーションを行い、その反応液上清を LC/MS で分析した。その結果、基質として添加したフラボノイド化合物が A 株と B 株に連続的に代謝され、B 株の代謝産物である化合物 Y が反応液上清に産生されたことが確認された。

次に、それぞれ個別に培養した A 株、B 株、C 株から調製した

休止菌体を混合して反応させた場合でも可能なのか、以下の条件検討を行った。まず、B 株の培養条件の検討を行った。B 株を単独で培養する際に、基質を何も添加しない培地、A 株の基質となるフラボノイド化合物を添加した培地、B 株の基質となる化合物 X を添加した培地を用いて、それぞれ B 株を培養し、菌体を回収した。回収した B 株休止菌体に A 株と C 株の休止菌体およびフラボノイド化合物を添加してインキュベーションし、それぞれの菌体が反応液中に産生した化合物 Y の量を比較したところ、化合物 X を添加して培養した B 株菌体は、他の条件で培養した B 株菌体に比べて、化合物 Y 産生量が多いことが分かった。これは B 株の有する代謝酵素が A 株代謝産物 X の存在下で発現が誘導される、誘導酵素である可能性を示唆している。これらのことから、活性の高い B 株を得るためには、基質となる化合物の存在下で培養する必要があるということが明らかとなった。一方、B 株と A 株の菌体を混合して反応させずに、A 株の代謝産物である化合物 X の抽出液を基質として添加し、B 株による反応を検討したが、添加した基質 X の変換は確認できなかった。

これらの休止菌体反応における条件検討の結果から、反応に最適と思われる条件のもと、B 株の無細胞抽出液を用いた反応を検討した。B 株の無細胞抽出液と A 株および C 株の休止菌体を混合し、フラボノイド化合物を添加して反応を試みたが、A 株代謝産物 X の産生までしか反応が進行せず、B 株の産物である化合物 Y の産生は認められなかった。

現在、pH や補酵素など B 株の無細胞抽出液の反応に適切な条件の検討を行っている。