



Studies on the Metabolic Pathway of (-)- Epigallocatechin Gallate by Rat Enterobacteria and the Effect of the Metabolites on Glucose Tolerance in Mice

Takagaki, Akiko

(Degree)

博士 (農学)

(Date of Degree)

2020-03-25

(Date of Publication)

2023-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第7796号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1007796>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



博士論文内容の要旨

氏名 高垣晶子専攻・講座 生命機能科学専攻・応用生命化学講座

論文題目 (外国語の場合は、その和訳を併記すること。)

Studies on the Metabolic Pathway of (-)-Epigallocatechin Gallate by Rat
Enterobacteria, and the Effect of the Metabolites on Glucose Tolerance in Mice

(ラット腸内細菌による(-)エピガロカテキンガレートの代謝経路の解明と、
同代謝産物のマウス耐糖能への影響に関する研究)

指導教員 芦田均教授

Chapter 1

緑茶ポリフェノールである茶カテキンの健康効果は、生活習慣病予防や抗ガン作用などを筆頭に、様々な生体機能性が研究されている。茶カテキンの生体機能性に関するメカニズム解明の重要性から、茶カテキンの吸収・分布・排出などに関する研究報告も数多くなされているが、茶カテキン自体の体内吸収率は低値であることも複数報告されている。

先行研究として、Wistar ラットにトリチウムラベル化エピガロカテキンガレート(-)-[4-³H] EGCG を経口投与し、放射活性評価によるラットでの EGCG の動態を検証した報告がある。その研究報告では、EGCG の生体利用率は 0.26% である一方で、腸内細菌分解物の吸収率は投与量の 30~40% であると見積もられ、EGCG 本体よりも腸内細菌分解物が主に体内へ吸収されることが示された。また(-)-[4-³H]EGCG 経口投与後のラット尿中主要代謝物として 5-(3',5'-dihydroxyphenyl)- γ -valerolactone-glucuronide が同定されたことから、EGCG の腸内細菌による主要代謝物は 5-(3',5'-dihydroxyphenyl)- γ -valerolactone (BM6) である可能性が示された。しかしながら、EGCG の腸管での腸内細菌による代謝経路や、代謝に関連する腸内細菌等の詳細な研究報告はこれまで殆どなかった。

本研究では、緑茶カテキンの生体機能性に関する作用機序解明を目的として、緑茶カテキンの中でも最も高含量な EGCG に焦点を絞り、ラット腸内細菌叢における代謝経路の解明、代謝に関わる腸内細菌の同定、主要代謝物の生体内機能性への寄与に関する検討を行った。

Chapter 2

EGCG のラット腸内での代謝経路の解明を試みる目的で、まず EGCG からガレートを脱離する菌のスクリーニングを行った。169 種類の腸内細菌株を用いて EGCG を基質に嫌気培養を行った結果、*Enterobacter aerogenes*, *Raoultella planticola* (*Klebsiella planticola*), *K. pneumoniae* susp. *pneumoniae*, *Bifidobacterium longum* subsp. *Infantis* で EGCG を加水分解し、エピガロカテキン(EGC)と没食子酸に分解することが分かった。

次に EGC を基質に代謝経路の解明を試みた。まず Wistar ラットから採取した新鮮な糞便を嫌気条件下で培養し、腸内細菌叢を得た。1mM の EGC を含むリン酸緩衝液 (pH7.2) 中にラット腸内細菌叢を入れ、37°C で嫌気培養を行った。24 時間毎にサンプリングを行い、HPLC 分析で EGC の代謝を確認した。試験に用いた腸内細菌叢は、異なる個体のラットを使用して、数十回の反復試験を実施した。その結果、ラット菌叢の違いにより 3 つの異なる EGC 代謝経路を見出した。また、出現した代謝物は分取 HPLC による精製と、LC-MS 分析および NMR 分析により構造決定を行い、ラット腸内細菌叢における EGC の代謝経路を推定した。本研究において見出した EGCG の 3 つの代謝経路のうち、最も主要と見なす代謝経路を以下に記す。

(氏名： 高垣晶子 NO. 2)

まず EGC の C 環の 1 位と 2 位の間で還元的に開環し、1-(3',4',5'-trihydroxyphenyl)-3-(2'',4'',6''-trihydroxyphenyl)propan-2-ol (BM3)が生成され、次に B 環の 4' 位の水酸基が脱離し 1-(3',5'-dihydroxyphenyl)-3-(2'',4'',6''-trihydroxyphenyl)propan-2-ol (BM4)が生成された。次いで A 環のプロログルシノール構造が分解した 5-(3',4'-dihydroxyphenyl)-4-hydroxyvaleric acid (BM5)と 5-(3',5'-dihydroxyphenyl)- γ -valerolactone (BM6)が生成された。In vitro での試験結果から、主要代謝物としては BM5 が蓄積されたことから、腸管での主要代謝物は BM5 と見なされた。

この結果を検証する目的で、EGCG 経口投与後のラット糞中代謝物について定量分析を行った。その結果、糞中には BM5 が最も高含量で検出されたことから、*in vitro*での試験で提唱した代謝経路は *in vivo*を反映する代謝経路であることが確認された。

Chapter 3

Chapter2の研究から、ラット腸管における EGCGの主要代謝物は BM5 と想定された。しかしながら、先行研究報告では(-)-[4-³H]EGCG 経口投与後のラット尿中代謝物は BM6 のグルクロン酸抱合体であったことから、腸管での主要代謝物 (BM5) と尿中代謝物 (BM6) が異なる結果となった。一般的に茶カテキン摂取後の尿からは hydroxyphenyl- γ -valerolactone の報告例が多いことから、BM5 の 1 位のカルボキシル基と 4 位の水酸基間で脱水縮合し、体内でのラクトン化が生じている可能性が考えられた。このため、体内での BM5 のラクトン化に関する検討する目的で、BM5 をラットに静脈投与し、尿中代謝物の分析を行った。酵素処理により、脱抱合した尿中代謝物を定量分析した結果、BM5 静脈投与後の尿中からは、BM5 の抱合体とアグリコンが主に検出されたが、ラクトン化した BM6 は検出されなかった。この結果から、BM5 は体内での血液循環中にラクトン化する可能性は低いと考えられた。

次に、腸管からの吸収過程におけるラクトン化を検証する目的で、*in vitro* 腸管反転法による試験を行った。BM5、BM6 をそれぞれ同濃度で含む緩衝液中で反転腸管をインキュベートし、1 時間毎に内液中の代謝物の定量分析を行った。その結果、BM5 はアグリコンが腸管膜を通過し、4 時間のインキュベートにより内液に移行した BM5 の積算値は約 50 μ M だった。一方で、BM6 は腸管通過の際にグルクロン酸抱合体を受ける事が明らかになり、内液に通過した BM6 のグルクロン酸抱合体の積算値は、4 時間で約 220 μ M であった。以上の結果から、BM5 よりも BM6 の方が腸管通過が容易である可能性が示され、腸管通過の差異による吸収率の違いから、EGCG 経口投与後に主に体内へと吸収される主要代謝物は BM6 である可能性が高いと考えられた。

Chapter 4

EGC の主要代謝経路に関わる腸内細菌の単離同定を行った。GAM 寒天培地を用いてラット糞便より採取した腸内細菌の画線培養を繰り返し行う事で、菌叢の絞り込みを行い、EGC 代謝能を有する腸内細菌を単離同定した。

(氏名： 高垣晶子 NO. 3)

EGC の C 環の 1 位と 2 位の間を還元的に開環し、BM3 に変換する菌として *Adlercreutzia equolifaciens* MT4s-5 を単離・同定した。また、近縁菌として購入した *Eggerthella lenta* JCM9979 も同様に EGC を BM3 に変換する事を見出した。さらに、カテキン代謝菌のスクリーニングにおいて、C 環を開環する *Ad. equolifaciens* MT4s-5 や *Eq. lenta* JCM9979 は、*Escherichia coli* や、*Butyricimonas synergistica*, *Butyricimonas virosa* のような水素および/またはギ酸を供与する共生菌が存在する場合に、EGC の B 環 4' 位の水酸基の脱離反応も行い、BM3 を BM4 に変換することが見出された。16SrDNA の相同性を確認した際、単離菌株である *Ad. equolifaciens* MT4s-5 はイソフラボンであるダイゼインをエクオールへ変換する菌株と相同性が高かったことから、市販のイソフラボン代謝菌を数菌株購入し、EGC の代謝能を確認した。その結果、*Asaccharobacter celatus* JCM 14811 は EGC を BM3 に変換し、水素存在下でさらに BM4 を生成することが明らかになった。

次に BM3 または BM4 の A 環のプロログルシノール構造を開環する菌のスクリーニングを行い、BM4 を BM5、BM6 に変換する腸内細菌として *Flavonifactor plautii* MT42 をラット腸内細菌叢から単離同定した。

以上の結果から、EGC の代謝に関わる主要な菌の分離同定に成功し、腸管での EGCG 代謝が複数の菌株により段階的に行われていることが明らかになった。また、カテキン代謝菌とダイゼイン代謝菌に共通性があることも見出された。

Chapter 5

腸内細菌代謝物が、緑茶カテキン摂取後の健康効果に寄与する可能性を検討する目的で、EGCG 代謝物の機能性評価を行った。緑茶飲用の健康作用は、多様な研究報告があるが、本研究では緑茶の健康効果のひとつとして既に報告されている、血糖値上昇抑制作用に着目し、代謝物の耐糖能に関する検討を行った。作用機序としては、近年、生活習慣病のターゲット因子のひとつと考えられている、骨格筋での糖取り込み作用に着目して試験を行った。

骨格筋 L6 細胞における糖取り込み促進作用を、EGCG 代謝物 11 種類について検討した結果、BM6、BM9、BM10、BM12 で有意な糖取り込み作用が確認された。さらに体内での主要代謝物である BM6 に着目し、詳細な L6 骨格筋細胞での糖取り込みに関する検討を行った。その結果、BM6 には L6 骨格筋細胞における糖輸送担体 GLUT4 の膜移行促進作用と、その下流域にあるシグナル伝達経路の一つである AMPK リン酸化作用があることが確認され、BM6 は AMPK シグナル伝達経路を活性化により、GLUT4 膜移行促進作用を促進し、有意に L6 筋細胞への糖取り込みを促進することを見出した。

実際に ICR マウスを使用した糖負荷試験を行い、体内での耐糖能改善作用を検討した。その結果、BM6 の 32mg/kg/BW 投与群で有意な食後血糖値の上昇を抑制する作用が見いだされ、EGCG 腸内細菌代謝物が生体での耐糖能改善の機能性因子として働く事を確認した。

(氏名： 高垣晶子 NO. 4)

Chapter 6 (APPENDIX)

近年の報告で、緑茶カテキン飲用後のヒト尿中代謝物として BM6 以外に 5-(3', 4', 5'-trihydroxyphenyl)- γ -valerolactone (BM10) も報告なされている。このため、BM6 と同様に BM10 の耐糖能改善作用の検討を行った。その結果、BM10 は BM6 と同様に L6 骨格筋細胞における GLUT4 の膜移行促進作用や、インスリン非依存型のシグナル伝達経路である AMPK のリン酸化促進作用を有することを見出し、有意に L6 筋管細胞への糖取り込みを促進することが確認された。また ICR マウスを用いた糖負荷試験でも、BM10 の有意な食後血糖値の上昇抑制作用を確認し、BM10 が体内での血糖値調整因子として働く事を確認した。

Chapter 7

以上、本研究では、EGCG のラット腸内細菌叢での代謝経路の解明、体内での主要代謝物の確認、EGCG 代謝に関わる腸内細菌の単離同定、および主要代謝物 BM6 の耐糖能改善作用を明らかにした。これまで緑茶飲用後の健康効果については数多くの報告例があったが、その作用機序に関する詳細な研究報告は殆どなかった。本論文における一連の研究結果は緑茶飲用による健康効果の作用機序の一旦を解明し、緑茶飲用後の血糖値調整作用には緑茶カテキン自体の効果に加えて、腸内細菌分解物も機能性因子として寄与している事を見出した。

緑茶飲用後の生体での生理活性は、本研究で検討した血糖値調整作用以外にも、体脂肪燃焼促進作用、抗ガン作用など、様々な機能性が報告されている。腸内細菌代謝物が生体機能性に与える影響に関しては、まだ研究報告が少なく、引き続き検討を続けたいと考える。

氏名	高垣 晶子		
論文 題目	Studies on the Metabolic Pathway of (-)-Epigallocatechin Gallate by Rat Enterobacteria and the Effect of the Metabolites on Glucose Tolerance in Mice (ラット腸内細菌による (-) -エピガロカテキンガレート代謝経路の解明と、同代謝産物のマウス耐糖能への影響に関する研究)		
審査 委員	区 分	職 名	氏 名
	主 査	教授	芦田 均
	副 査	教授	白井 康仁
	副 査	教授	竹中 慎治
	副 査	准教授	山下 陽子
	副 査		
印			
要 旨			
<p>緑茶は日本人の日常に深く浸透し、日常生活の中で最も良く飲まれている飲料のひとつである。緑茶の健康効果は、体脂肪燃焼促進や、コレステロール低下、糖尿病予防などを始め、様々な機能が既に学術的に証明されており、日本のみならず、世界各国でも広く知られるようになってきている。これらの健康効果に関与する成分は、多くの場合、緑茶ポリフェノールである茶カテキンであると報告されていることから、茶カテキンの生体機能調節能に関する作用機構解明は重要である。一方で、緑茶カテキン自体の体内吸収率が低いことが報告されており、緑茶カテキン類の吸収・分布・排出に関する研究報告も多くあるが、腸内細菌による緑茶カテキンの代謝は不明な点が多い。このような背景から、本学位論文は、学位申請者が、緑茶カテキンの中でも最も多く含まれている(-)-Epigallocatechin Gallate (EGCG)の、ラットにおける腸内での代謝経路の解明、代謝に関わる腸内細菌の同定、体内における主要代謝物の機能性の一つとして耐糖能に及ぼす効果を検討し、これらの研究成果を取り纏めたものである。</p> <p>本学位論文は、General Introduction、本編4章、附章、ならびにGeneral Discussionからなる。</p> <p>第1章のGeneral Introductionでは、申請者が所属する三井農林株式会社で実施された、トリチウムラベル化したEGCGのラットにおける動態試験の結果と代謝に関する先行研究を中心に、これまでの研究報告をもとに背景をまとめている。[4-³H]-EGCGを経口投与したラットでのEGCGの生体利用率は0.26%であり、一方で腸内細菌分解物として体内に吸収される分解物は、投与量の30~40%であると推定されたことと、腸内細菌による分解物は体内循環後に尿中に排泄されるが、尿中に排泄された代謝物を同定した結果、主要な代謝物は5-(3',5'-dihydroxyphenyl)-γ-valerolactone 3'-O-β-glucuronideであると同定されたことを記載している。このように、EGCG摂取後の体内において、EGCGよりも腸内細菌分解物が主に体内へ吸収されることが明らかになったことから、摂取後の体内におけるEGCG代謝経路の解明や、腸内細菌代謝物が体内で果たす役割に関して、詳細な解明が必要であることを論じている。</p> <p>第2章では、EGCGのラット腸内での代謝経路の解明を試みるため、EGCGからガレートを脱離する菌のスクリーニングを行った。169種類の腸内細菌株を用いてEGCGを基質に培養を行った結果、<i>Enterobacter aerogenes</i>、<i>Raoultella planticola</i> (<i>Klebsiella planticola</i>)、<i>K. pneumoniae</i>、<i>Bifidobacterium longum</i>の菌株でEGCGを加水分解し、EGCと没食子酸に分解することが分かった。次に、EGCの代謝経路の解明をWistarラットより採取した新鮮な糞便から培養して得た腸内細菌叢の解析から実施した結果、EGCはいくつかの中間体を経て腸内細菌の代謝を受ける事を明らかにし、菌叢の違いにより、3つの代謝経路を見出した。このうち、最も主要な代謝経路は、EGCのC環の1位と2位の間で選元的に開環し、1-(3',4',5'-trihydroxyphenyl)-3-(2",4",6"-trihydroxyphenyl)propan-2-ol (BM3)が生成され、次にB環の4'位の水酸基が脱離し1-(3',5'-dihydroxyphenyl)-3-(2",4",6"-trihydroxyphenyl)propan-2-ol (BM4)を生成する。次いで、A環のプロログルシノール構造が分解した5-(3',4'-dihydroxyphenyl)-4-hydroxyvaleric acid (BM5)と5-(3',5'-dihydroxyphenyl)-γ-valerolactone (BM6)が生成される。<i>In vitro</i>の試験では主要代謝物としてBM5が蓄積されたが、EGCG経口投与後の糞中からもBM5が最も高含量で検出されたことから、<i>in vitro</i>での試験で提唱した代謝経路は<i>in vivo</i>での試験で検証できたことを示している。</p>			

氏名	高垣 晶子
<p>第2章の結果から、EGCGのラット腸管での主要代謝物はBM5と想定されたが、第1章で示した先行研究で[4-³H]-EGCGを経口投与したラットでの尿中代謝物はBM6のグルクロン酸抱合体と報告されており、腸管での主要代謝物と尿中での代謝物の構造が異なる結果となった。そこで、第3章では、この齟齬を解明するため、まず腸管での主要代謝物のBM5が体内でBM6に変換する可能性を調べた。BM5をラットに静脈投与し、尿中代謝物の測定を行った結果、尿中からはBM5の抱合体とアグリコンが主に検出され、血液循環中にBM5がBM6に変換する可能性は低いと考えられた。次に、腸管からの吸収過程においてBM5がBM6へ変換する可能性について検討するため、反転腸管を用いて吸収過程での検討を行った。その結果、BM5では腸管を通過する代謝物濃度が低いが、BM6はグルクロン酸抱合体を受けた後にBM5よりも高濃度で腸管を通過することが判った。すなわち、腸管で生成する主要代謝物はBM5であるが、BM6の方が腸管を通過しやすく、吸収率が高いことが判り、主に体内に吸収される代謝物はBM6であることを明らかにしている。</p>	
<p>第4章では、EGCの主要代謝経路に関わる腸内細菌の単離同定を行った結果を示している。すなわち、EGCのC環の1位と2位の間に還元的に開環し、BM3に変換する菌として<i>Adlercreutzia equolifaciens</i> MT4s-5を単離・同定した。また、近縁菌である<i>Eggerthella lenta</i> JCM9979も同様に、EGCをBM3に変換することを確認した。さらに、カテキン代謝菌であり、C環を開環する<i>Ad. Equolifaciens</i> MT4s-5や<i>Eg. lenta</i> JCM9979は、<i>Escherichia coli</i>や、<i>Butyricimonas synergistica</i>、<i>Butyricimonas virosa</i>のような水素および/またはギ酸を供与する共生菌が存在する場合に、種間で水素またはギ酸を転移することによりEGCのB環4位の水酸基の脱離を行い、BM3をBM4に変換することも見出した。興味深いことに、<i>Ad. Equolifaciens</i> MT4s-5はイソフラボンであるダイゼインをエクオールへ変換する菌株と相同性が高いことから、イソフラボン代謝菌によるEGCの代謝能を確認した。その結果、<i>Asaccharobacter celatus</i> JCM 14811は、EGCをBM3に変換し、水素存在下でさらにBM4を生成することを明らかにした。次に、BM3またはBM4のA環のプロログルシノール構造を開環する菌の探索を行い、BM4をBM5やBM6に変換する腸内細菌として<i>Flavonifactor plautii</i> MT42を単離・同定した。以上の結果から、EGCの代謝に関わる主要な菌の分離同定に成功し、腸管でのEGCG代謝は複数の菌により段階的に行われていることが明らかにしている。また、上述のように、カテキン代謝菌とダイゼイン代謝菌に共通性があることも見出している。</p>	
<p>第5章では、腸内細菌代謝物が、緑茶の生体調節機能に寄与する可能性を検討する目的で、EGCG代謝物の血糖調節について検討した結果を示している。まず、EGCG代謝物11種類について、ラット骨格筋由来L6筋管細胞におけるグルコースの取り込み試験を実施したところ、BM6、BM9、BM10、ならびにBM12において有意なグルコース取り込み促進作用があることを見出している。そこで、第3章で明らかにしたEGCGの体内に吸収される主要代謝物であるBM6について、詳細な解析を実施したところ、BM6はL6筋管細胞において、AMP-activated protein kinaseのリン酸化を介して糖輸送担体GLUT4の細胞膜移行を促進させることでグルコースの取り込みを促進することを明らかにしている。また、ICRマウスを用いて糖負荷試験を行い、体内での耐糖能改善作用を検討した結果、BM6はグルコース負荷による一過的な高血糖を有意に抑制することから、耐糖能改善効果があることを明らかにしている。</p>	
<p>第6章は、APPENDIXであり、緑茶摂取後の尿中代謝物として、BM6とともに見出されており、かつ第5章の探索試験で効果を示したBM10について、第5章と同様の試験を実施した結果を示している。BM10は、BM6と同様にAMP-activated protein kinaseのリン酸化を介してGLUT4の細胞膜移行を促進させることでグルコースの取り込みを促進し、糖負荷試験でも耐糖能改善効果を有することを明らかにしている。</p>	
<p>第7章は、General Discussionであり、本学位論文で見出した研究成果を取り纏め、その意義として、緑茶カテキンの機能性は、親化合物だけでなく腸内細菌代謝物も寄与していることとその重要性を論じている。</p>	
<p>以上のように、本学位論文は、代表的な茶カテキンであるEGCGについて、そのラットにおける代謝経路の解明、EGCG代謝菌の分離・同定、腸管主要代謝物の吸収過程の解明、および主要代謝物の機能性として耐糖能改善効果を研究したものであり、これまで知られていなかった緑茶カテキンEGCGの腸管細菌による代謝と生じた代謝物の機能性について重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって、学位申請者の高垣 晶子は、博士（農学）の学位を得る資格があると認める。</p>	