



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

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(-)-エピガロカテキングア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

農学研究科生命機能科学専攻
146A471A 高垣晶子

要旨

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グアレート(-)-[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。

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 環のフ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、生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の事が明らかになり、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の方が腸管通過率が高い可能性が示され、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て行い、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。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*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*Eg. 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。緑茶飲用後の健康作用は、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 筋管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。

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、緑茶飲用後による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。