

腸内細菌によるイソフラボンとクルクミンの代謝について

Metabolism of soy isoflavones and curcumin by Intestinal Bacteria

丹羽 利夫

要 旨

ヒトの腸内には体細胞数と同じほどの微生物が住んでいるともいわれ、近年腸内細菌が私たちのカラダに及ぼす影響が明らかにされつつある。そのメカニズムについては現在精力的に研究が進められているが、その一つとして微生物による代謝産物による効果が指摘されている。著者らも近年、大豆イソフラボノイドやクルクミンのヒト腸内細菌による代謝研究に取り組んできており、それらを中心に、近年の腸内細菌による植物由来ポリフェノール代謝研究について紹介する。

キーワード：大豆イソフラボノイド、クルクミン、腸内細菌、代謝

2021年12月20日受付，2022年1月25日受理

ニトログリセリンといえばノーベル賞で有名なダイナマイトの原料として有名であるが、その一方において狭心症の治療薬としても利用される。ニトログリセリンが狭心症に有効であることは知られていたものの、そのメカニズムは長い間不明であり、還元作用により生成する一酸化窒素（NO）の作用が明らかにされたのは20世紀後半になってからである¹⁾。また微生物により亜硝酸から産生されるNOがハムやソーセージの発色に関与することから、亜硝酸ナトリウムや硝酸カリウムなどが発色剤として用いられることも管理栄養士養成課程で学ぶ。さらに管理栄養士養成施設ではある種のカビにより傷んだピーナッツの発がん物質として知られるアフラトキシンの作用メカニズムに生体内酸化酵素（P450）が関与することも学ぶであろう。このように生理機能物質は我々の体に入ったのち、代謝と呼ばれる様々な化学変換を受けることによって活性が増えたり減ったりすることがある。

諸説あるものの、ヒトの体は本来の体細胞とともに、同数のヒトの腸内細菌叢を構成する微生物群（腸内細菌）が存在するともいわれる²⁾。それゆえ近年ではこのような腸内細菌が肥満やガンなどに関与し我々の体に大きく影響を及ぼすという考え方がなされている^{3,4)}。また1990年代にはアメリカにおいてデザイナーフーズプロジェクトが進められ、いわゆるポリフェノールと呼ばれる植物由来の機能性成分についての研究が活発に行われ、緑茶のカテキン、カレーのクルクミン、大豆のイソフラボン、赤ワインのポリフェノールなどの健康効果が広く認知されるようになり、様々な健康食品が市販されている。その一方において、これらのポリフェノールが本当に効くのかといえば、その報告には効く・効かない相対するものがあり、まだまだ確実に効くとは言えない状況にある。そのようななかポリフェノールの消化管を含むヒト生体内での代謝の差がデータのばらつきになるのではないかという考え方が生じ、その過程で腸内細菌による代謝にも注目が集まるようになった。

そこで本稿では、著者らが近年進めてきた大豆イソフラボノイドおよびクルクミンの腸内細菌による代謝についてまとめてみたい。

なお本職の研究者は英語の総説を読むと思われるので、本稿では市中研究者さらには一般の方の読み物ともなるよう簡潔に記載した。

1. 大豆イソフラボン

大豆イソフラボンはそのエストロゲン様作用、すなわち女性ホルモンとして働くことが注目され、女性ホルモン低下が原因とされる更年期障害のホルモン補充療法とともに紹介されることが多い。大豆イソフラボンの多くは配糖体などの形で存在するものの、その代表的アグリコン（ポリフェノール部分）としてはFig. 1に示すダイゼイン (1) 並びにそのフェノール性水酸基が一つ増えたゲニステイン (2) があり、一般的にゲニステインの方がその生理機能が高いとされている。しかしながら近年ダイゼインから腸内細菌により産生されるエクオール (3) の生理機能が高いことが示され⁵⁻⁷⁾、いくつかのサプリメントとしても市販されている。著者もこのような大豆イソフラボンの腸内細菌による代謝に着目し研究を進めた一人であるが、その研究対象は生理機能というよりもその化学構造変化である。有機化学的に見るとエクオールはその構造に不斉炭素と呼ばれる炭素原子を有することから、S体とR体が存在し、ヒト生体内ではS体が生成するとされている⁸⁾。これは我々が鏡に自分を映した際に、自分が右利きであれば鏡の自分は左利きとなるように、ほとんど区別がつかないが厳密には異なるものとなる。そのため、有機化学的にはこのような関係を鏡像体と呼び、SとRはその表記法の一つである。

しかしながらエクオールの活性は強いといってもゲニステインとの違いは数倍程度というレベルであった⁵⁻⁷⁾。また著者らの研究開始当時から腸内細菌によってはダイゼインから*O*-desmethylangolensin (*O*-DMA, 4) が産生さ

れるとの報告があったものの、その絶対立体配置は不明であった。このような時期に横山らがヒト由来エクオール産生菌ならびに*O*-DMA産生菌を単離し、名古屋大学大学院生命農学研究科大澤俊彦教授（当時）を通じて共同研究を開始することとなり、現在までその研究体制が、著者の不安定な身分により時に途切れそうになりながらも、現在まで続いている。

上述のようにエクオールはその生理機能の高さから活発な研究がなされていたものの、*O*-DMAの絶対立体配置並びにその生理機能に関する報告も少なかったことから、当時研究者の少なかった*O*-DMAについて研究を進めることとした。とはいうものの、なかなか妙案がわからず、*O*-DMAを分解したものを分析することで何とかできるのではないかとおぼろげに考えていた。幸いなことに研究対象としていた*O*-DMA産生菌(SY8519株)⁹⁾はゲニステインを2-(4-hydroxyphenyl) propionic acid (2-HPPA) へ代謝すること (Fig. 1) ならびに、2-(*S*)-phenylpropionic acidが市販されていたこと、さらには何とかお金を工面し10万円以上する光学分割カラムを購入できたことから、S体およびR体の2-HPPAの両鏡像体を直接分離できるようになった。そこで2-(*S*)-phenylpropionic acidからS体の2-HPPAを合成し、光学分割カラムを用いたhigh performance liquid chromatography (HPLC) により微生物由来2-HPPAと比較することで、ゲニステインと*O*-DMA産生菌であるSY8519株から*R*-2-HPPA (5)が産生されることを明らかにするとともに、マウス脂肪細胞を用いた試験によりゲニステインに見られる、食欲をコントロールするレプチン低下作用が、2-HPPAに代謝されることで全く見られなくなることを明らかにした¹⁰⁾。ちなみにレプチンは食欲調節因子として発見され、レプチンレセプター異常を有するマウスの姿はなかなかのインパクトを持つ。著作権もあり載せられないが興味があればdb/dbマウスなどで検索すれば見つかるでしょう。それゆえ、単純

に言えばレプチンを低下させることは肥満につながる可能性もある。しかしながら肥満になると血中レプチンが増加することならびに、近年レプチンの作用が食欲調節のみならず多岐にわたることが示唆されており¹¹⁻¹³⁾、このようなレプチン低下が有益なのかりスクなのか現時点では不明である。

とはいえ、2-HPPA鏡像体を分離するHPLC条件を確立できたことから、*O*-DMAを2-HPPAに分解し、その立体を明らかにすることで、*O*-DMAの立体構造を明らかにできると考えた。そこで、*O*-DMAを基質としBaeyer-Villiger反応により2-HPPAを調製し、その立体についてHPLCにより確認したところ、*R*体であったことから、*O*-DMAについても*R*-2-HPPAと同じ立体構造を有すると決定した (Fig. 1)。また、*O*-DMAについてもダイゼインのレプチン低下作用がこの代謝により全く見られなくなることを明らかにした¹⁴⁾。

これらの結果から我々は、大豆イソフラボノイドをエクオールに代謝するよりも、*O*-DMAに代謝するヒトの方が、生理機能への影響は大きいのではないかと考えている。実際近年の疫学研究においてはエクオール産生のみならず、*O*-DMA産生についても検討しているものもあり、*O*-DMA産生との相関が高いとする報告も見られるようになった¹⁵⁾。現状、*O*-DMAの入手に難があることもあってか、このようなデータは十分ではないものの、今後の進展が期待される。

2. クルクミン

本学着任から間もなくさる財団より研究助成募集があり、クルクミンのヒト腸内細菌による代謝をさせてほしいとお願いしたところ普通自動車を買える程度の研究費をいただくことができたことならびに、当時理科学実験室改修が行われ、総務課(当時) K氏より「改修に伴い除却予定の実験機材ですがつかえるものがあればもって行っていいですよ」と言われ、幸運にも

いくつかのお宝が眠っていたことから、クルクミンのヒト腸内細菌による代謝研究を進めることとなった。

クルクミン (6) といえ左党の方には「ウコンの力」で知られるものの、二日酔いのみならず、抗ガン作用やアルツハイマー病抑制など様々な作用が期待される物質である¹⁶⁾。その一方においてその強力な着色(ようするにカレーの色)、水にほとんど溶けないなど実用上問題があり、さらには溶液中の安定性が低く、摂取後の吸収も低いと数多くの問題が指摘され、経口投与では効果は期待できないのではないかとまでいわれているのは知る人ぞ知る事実である。とはいっても、「ウコンの力」を飲むと次の日全然違う(個人の感想です)という声もある。

そこで、クルクミンを摂取することにより生体内でなんらかの代謝が起こり、それら代謝産物が機能を発揮する可能性が指摘されている。そこで我々はクルクミンの活性の一部を腸内細菌代謝産物が担っているのではないかと考えた。とはいえ、クルクミンのヒト生体内代謝に関しては当然いくつかの研究がなされており、それらによればFig. 2に示すように主鎖の還元されたテトラヒドロクルクミン (THC, 8)、ヘキサヒドロクルクミン (HHC)、オクタヒドロクルクミン (OHC) あるいはそのグルクロン酸や硫酸抱合体であった。そこでヒト腸内細菌とクルクミンを反応させその新規生成物を探したところ、「1C」と名付けた腸内細菌群とクルクミンを嫌気条件で反応させることで「何か」ができることを確認した。このものを病院で使うMagnetic Resonance Imaging (MRI) と基本原理を同じとするNuclear Magnetic Resonance (NMR) という分析機器により解析を行ったところ、上述のTHC, HHC, OHCではないことが明らかとなった。そこで、さらに詳細な解析を進めたところ3-hydroxy-1,7-bis(3,4-dihydroxyphenyl)heptaneと推測された。このものと平面構造は同じとし、3*R*の2

級アルコールを持つrubranolがハンノキから単離されていた¹⁷⁾。とはいえハンノキを伐採することもできず、岐阜県高山市にある(株)カネモク様にお問い合わせしたところご快諾いただいたことからハンノキ樹皮よりrubranolを単離し、クルクミン代謝産物とともにテトラメチル体とした。このテトラメチル体を化学合成により調製し、その鏡像体を分離できるHPLC条件を確立したのち、分析を行ったところクルクミンと「1C」との反応生成物の絶対立体配置はrubranolの鏡像体であることが明らかとなり「鏡の中のrubranol」ということで「kabranol」と名付けようと思い検索したところ既に存在していたためやむなく(?)「kazuranol (7)」と命名した。さらにkazuranolの生理機能について、クルクミンの生理作用として報告されているmonocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) 低下作用について検討を行ったところ100 μ Mの濃度ではクルクミンには細胞毒性がみられた。一方kazuranolでは細胞毒性は見られず、クルクミンと同程度の活性を有するという結果となった¹⁸⁾。

このクルクミンからkazuranolへの代謝は一段階で起こるとは考えにくいことからヒト腸内細菌群「1C」はkazuranol産生に関与する微生物が複数存在すると考えられたため、関連微生物単離を進めることとした。こちらも民間の研究助成により中古ながら遠心エバポレーターを入手し、分離した菌とクルクミンとの培養液を有機溶媒で抽出し、遠心エバポレーターで濃縮後分析するという一連の工程が確立でき、操作自体はシステムティックに進めることができたものの、いくらやってもクルクミンを代謝する菌が取れてこない。そうこうしているうちに助成期間も終わりに近づき、報告書を書かなくてはならないという状態になり、なかば自棄になり他の研究目的のため調製し実験台においてあったデメチルテトラヒドロクルクミンを基質にしたところ代謝が確認され、デメチルテトラヒドロクルクミンをデメチルヘキサヒド

ロクルクミンへと変換する微生物2a1-2bを単離することができた¹⁹⁾。確認のため単離した微生物にTHCを反応させてもカルボニル基が一つ還元されたHHCに代謝されることが確認できた。kazuranolと同様に、HHCにも鏡像体が存在することから、旋光度等を比較することによって高立体選択的に5R-HHC (9) が生成していることが確認された。その一方で、2a1-2b株はクルクミン自身とは直接反応しないことも分かった。

生体内においてHHCが生成されることは知られていたが、その立体については現在までに明らかにされていない。この点について我々はHHCのグルクロン酸抱合体に着目した。有機化学的説明は略すが、鏡像体にもう一つ光学活性な物質をつけると鏡像体ではなくなる。すなわち、5R-HHCのグルクロン酸抱合体と5S-HHCのグルクロン酸抱合体は鏡像体ではなくなり、簡単に分離できるようになる。しかしながら既報^{20,21)}では生体内で検出されたHHCのグルクロン酸抱合体はHPLC上ワンピークすなわち単一であると記載されている。このことは生体内のHHCが光学活性であることを示唆するものと考えているが、詳細は今後の課題である。

16S rDNAによるクラスター解析により上記で単離された微生物2a1-2bは*Enterococcus avium*と同定された。そこで外部機関より*Enterococcus avium*, *E. faecalis*, *E. faecium*を入手しTHCと反応させたところ、*E. avium*のみに明らかな5R-HHC産生が確認された(投稿準備中)。このことは我々が単離した*E. avium*にかぎらず、多くの*E. avium*が5R-HHCを産生することを示唆するものと考えている。

さらにクルクミンからkazuranolへの代謝を明らかにするため、HHCの代謝について検討したところ、2a1-2b株はTHCを基質としてHHCを経てOHCを生成することが明らかとなった。HHCよりもさらにややこしいことに厳密に言えばOHCにはFig. 2のように3R,

5*R*-OHC (10), 3*S*,5*S*-OHC, *meso*-OHC (11) の3種類存在することから、現在その解明に取り組んでいる。

またクルクミンやここに挙げたクルクミン代謝産物はその構造上ジアリルヘプタノイドに分類される。ジアリルヘプタノイドは先の ruburanol を含め、自然界にも存在し、様々な作用を有することが知られる。また腸内細菌以外の微生物がクルクミンを代謝するとの報告もいくつかなされている。このようなことから「クルクミンを代謝すること」は微生物にとっては単に邪魔なもの（毒性や生育阻害）を排除するためなのか、あるいは何らかのメリットがある物質を作っているのかは不明であるが、このよ

うな物質が我々の体内においてクルクミンから代謝・産生されることには何らかの意味があるのではないかと考えている。

冒頭のニトログリセリンのように、体内で代謝を受けて思わぬ生理機能を発現するものもあるかもしれない。今後、ポリフェノールに限らずホルモンなどの内因性の生理活性物質を用いて、このような腸内細菌によるものを含め生体内での代謝研究が進展し、多くのことが明らかにされるものと期待し、また著者自身もこのような研究に少しでも貢献できればと考えている。

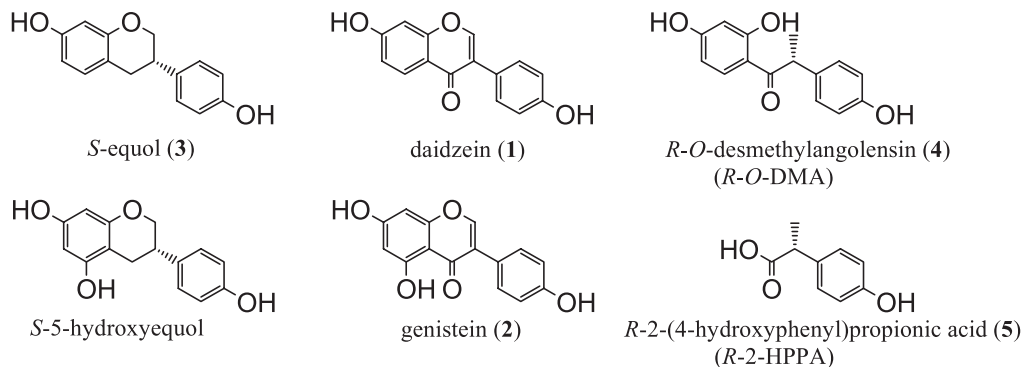


Figure 1 Structures of soy isoflavones and metabolites.

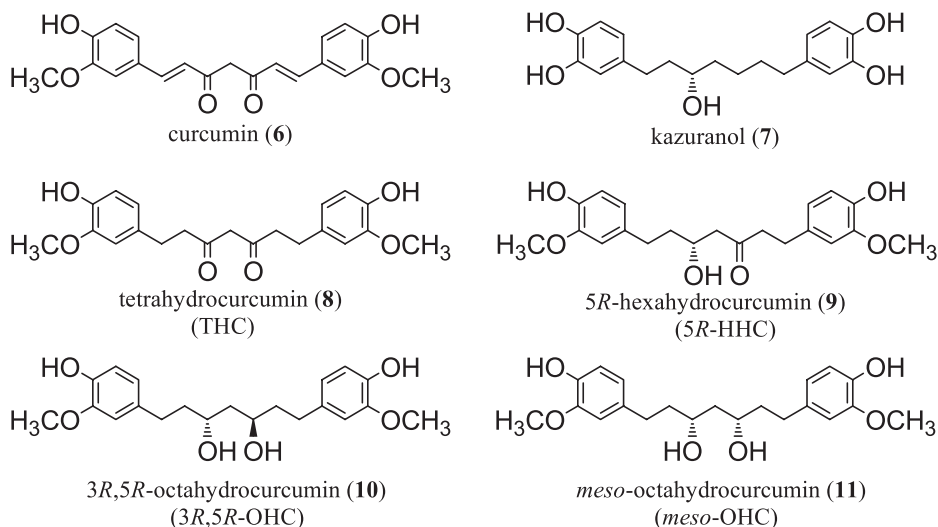


Figure 2 Structures of curcumin and metabolites.

参考文献

- 1) Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, *et al.*, Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84, 9265–9269 (1987).
- 2) Sender R, Fuchs S, Milo R, Revised estimates for the number of human and bacteria cells in the body. *PLoS Biol.*, 14, e1002533 (2016).
- 3) Aymeric L, Donnadieu F, Mulet C, *et al.*, Colorectal cancer specific conditions promote *Streptococcus gallolyticus* gut colonization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 115, E283–E291 (2018).
- 4) Natividad JM, Lamas B, Pham HP, *et al.*, *Bilophila wadsworthia* aggravates high fat diet induced metabolic dysfunctions in mice. *Nat. Commun.*, 9, 2802 (2018).
- 5) Rimbach G, de Pascual-Teresa S, Ewins BA, *et al.*, Antioxidant and free radical scavenging activity of isoflavone metabolites. *Xenobiotica*, 33, 913–925 (2003).
- 6) Joy S, Siow RCM, Rowlands DJ, *et al.*, The isoflavone equol mediates rapid vascular relaxation. *J. Biol. Chem.*, 281, 27335–27345 (2006).
- 7) Jiang Y, Gong P, Madak-Erdogan Z, *et al.*, Mechanisms enforcing the estrogen receptor β selectivity of botanical estrogens. *FASEB J.*, 27, 4406–4418 (2013).
- 8) Setchell KDR, Clerici C. Equol: history, chemistry, and formation. *J. Nutr.*, 140, 1355–1362S (2010).
- 9) Yokoyama S, Niwa T, Osawa T, *et al.*, Characterization of an *O*-desmethylangolensin-producing bacterium isolated from human feces. *Arch. Microbiol.*, 192, 15–22 (2010).
- 10) Niwa T, Yokoyama S, Osawa T, Effect of the genistein metabolite on leptin secretion in murine adipocytes *in vitro*. *Food Chem.*, 138, 122–125 (2013).
- 11) Eleftheriou F, Takeda S, Ebihara K, *et al.*, Serum leptin level is a regulator of bone mass. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101, 3258–3263 (2004).
- 12) Simonds SE, Pryor JT, Ravussin E, *et al.*, Leptin mediates the increase in blood pressure associated with obesity. *Cell*, 159, 1404–1416 (2014).
- 13) Shin MK, Eraso CC, Yun-Ping Mu YP, *et al.*, Leptin Induces Hypertension Acting on Transient Receptor Potential Melastatin 7 Channel in the Carotid Body. *Circ. Res.*, 125, 989–1002 (2019).
- 14) Niwa T, Yokoyama S, Matsugasaki N, *et al.*, Stereochemical determination of *O*-desmethylangolensin produced from daidzein. *Food Chem.*, 171, 153–156 (2015).
- 15) Frankenfeld CL, C Atkinson C, K Wähälä K, *et al.*, Obesity prevalence in relation to gut microbial environments capable of producing equol or *O*-desmethylangolensin from the isoflavone daidzein. *Eur. J. Clin. Nutr.*, 68, 526–530 (2014).
- 16) Imran M, Nadeem M, Khan MA, *et al.*, Curcumin and its allied analogues: Epigenetic and health perspectives – a review. *Czech J. Food Sci.*, 35, 285–310 (2017).
- 17) Park JY, Jeong HJ, Kim JH, *et al.*, Diarylheptanoids from *Alnus japonica* inhibit papain-like protease of severe acute respiratory syndrome coronavirus. *Biol. Pharm. Bull.*, 35, 2036–2042 (2012).
- 18) Niwa T, Yokoyama S, Mochizuki M, *et al.*, Curcumin metabolism by human intestinal bacteria *in vitro*. *J. Funct. Foods*, 61, 103463 (2019).
- 19) Niwa T, Yokoyama S, Mochizuki M, *et al.*, Production of optically active hexahydrocurcumin by human intestinal bacterium *in vitro*. *Biol. Pharm. Bull.*, 44, 136–139 (2021).
- 20) Ireson C, Orr S, Jones DJL, *et al.*, Characterization of metabolites of the

chemopreventive agent curcumin in human and rat hepatocytes and in the rat *in vivo*, and evaluation of their ability to inhibit phorbol ester-induced prostaglandin E₂ production. *Cancer Res.*, 61, 1058–1064 (2001).

- 21) Harigae T, Nakagawa K, Miyazawa T, *et al.*, Metabolic fate of poly-(lactic-co-glycolic acid)-based curcumin nanoparticles following oral administration. *Int. J. Nanomedicine*, 11, 3009–3022 (2016).

Metabolism of soy isoflavones and curcumin by Intestinal Bacteria

Toshio Niwa

Toshio Niwa: *Faculty of Health and Nutrition, Shubun University, 6 Nikkocho, Ichinomiya, Aichi 491-0938, Japan*

Abstract

A recent report described that the number of the intestinal bacterial cells is comparable to that of the human somatic cells. Although the beneficial mechanisms of bacteria are still under investigation, their metabolism has attracted attention due to the different activities to those of substrates. We have been studied the metabolism of soy isoflavones and curcumin by human intestinal bacteria. We herein summarized our recent studies using human intestinal bacteria.

Keywords: isoflavone, curcumin, metabolism, microflora