

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25450098

研究課題名(和文) イソフラボンを代謝する腸内細菌の比較ゲノム解析

研究課題名(英文) Comparative genomic analysis of intestinal bacteria involved in isoflavone metabolism

研究代表者

横山 慎一郎 (Yokoyama, Shin-ichiro)

岐阜大学・応用生物科学部・研究員

研究者番号：30291008

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：カルチャーコレクション由来のEquol生産菌3菌株のゲノム解析を行い、既知の生産菌2株のゲノム、およびEquol代謝酵素関連遺伝子2種間でEquol代謝酵素関連遺伝子の比較解析を行ったところ、3つの系統学的グループに分けられることを明らかにした。また、上記遺伝子群よりPCR用プライマーを設計し、上記の菌株ゲノムを鋳型にリアルタイムPCRを行ったところ、同効率で増幅されることを確認した。さらに、Equol産生者5名、および非産生者5名の糞便を採取し、抽出したトータルゲノムを鋳型に、上記プライマーを用いて増幅を試みたところ、Equol産生者のみ増幅が確認された。

研究成果の概要(英文)：Nucleotide sequences of 3 equol-producing bacteria derived from culture collection were analyzed and comparative genome analysis was performed together with 2 other known bacterial genomes and 2 gene cluster related to equol metabolism. The comparative genome analysis indicated that the genes are divided into 3 phylogenetic groups. In addition, PCR primers were designed from the gene cluster and real time PCR was carried out using the bacterial genomes as templates, it was confirmed that amplification was carried out with the same efficiency. Furthermore, feces of 5 equol producers and 5 non-producers were collected and amplification was attempted using the total extracted genome as a template, using the same primers, amplification of only equol producers was confirmed.

研究分野：微生物学

キーワード：腸内細菌 エクオール イソフラボン ゲノム 遺伝子マーカー

1. 研究開始当初の背景

本研究は、これまで明らかにしてきたダイズイソフラボン的一种である Daidzein を、Equol あるいは O-DMA に代謝する能力を有する腸内細菌の研究を進展させ、より健康福祉に役立てるための基礎知見を得るものである。

我々はこれまで、Equol 生産菌としてヒト糞便中より *Eggerthella* sp. YY7918 株を単離し、その微生物学的諸性質を明らかとするとともに、その全ゲノム配列を解析したことを報告している。また、O-DMA 生産性腸内細菌についても、ヒト糞便中より新属の *Clostridium* rRNA cluster XIVa SY8519 株を単離し、全ゲノム配列について報告している。

2. 研究の目的

Daidzein を、Equol あるいは O-DMA に代謝する能力を有する腸内細菌の比較ゲノム解析を行い、特にイソフラボン代謝に関わる遺伝子群、および代謝菌の分類学的な知見を得る事を目的とした。また生体内におけるこれらの菌の存在割合と代謝物量との相関を明らかにすることで、今後の研究進展が待たれるイソフラボン摂取と腸内フローラ、生理作用および健康影響との関係を解明する研究の礎とする事を目的とした。

3. 研究の方法

嫌気性菌の培養には GAM 培地を、遺伝子組換え体の培養には LB 培地を用いた。嫌気培養にはアネロパック・ケンキおよび嫌気ジャー(三菱ガス化学製)を用いた。代謝物の定量分析は高速液体クロマトグラフィーにて行った。

全ゲノムの塩基配列解析には Pac-Bio RSII (トミーデジタルバイオロジー製)を、比較ゲノム解析には *in silico* Molecular Cloning(インシリコバイオロジー製)を用いた。PCR用のプライマー構築には解析ソフト(Primer 3 Plus: <http://primer3plus.com/>)等を用いた。リアルタイム PCR は StepOne (Thermo Fisher Scientific Inc.製)を用いて行った。

4. 研究成果

Eggerthella sp. YY7918 株のゲノム解析を行う過程で、*Lactococcus* sp. 20-92 株で報告されている Equol 代謝関連酵素と各々99%と高い相同性を示す3つの遺伝子を本菌に見出し、それぞれ *eqlA*、*eqlB* および *eqlC* と命名した。*Lactococcus* sp. 20-92 株の例を参考に、*eqlA* は Daidzein reductase、*eqlB* は Dihydrodaidzein reductase、および *eqlC* は Tetrahydrodaidzein reductase をそれぞれコードすると考えられた。これらの遺伝子を pColdII にクローニングし、本組換えプラスミドを *Escherichia coli* BL21(DE3)株に導入し、Daidzein reductase、Dihydrodaidzein reductase および Tetrahydrodaidzein reductase を発現させ、His-Tag を用いたアフィニティークロマトグ

ラフィーによって精製した。この結果、これら3種の酵素が Daidzein から Equol への変換に関与することを確認した。精製された Daidzein reductase は、NADPH の存在下で Daidzein を Dihydrodaidzein に変換した。Dihydrodaidzein reductase は、NADPH の存在下で Dihydrodaidzein を Tetrahydrodaidzein に変換した。どちらの酵素も NADH では活性を示さなかった。Tetrahydrodaidzein reductase は補助因子 NAD(P)H の非存在下においても Tetrahydrodaidzein を変換し、Dihydrodaidzein も副産物として生成した。したがって、Tetrahydrodaidzein reductase は還元酵素ではなく、新しいタイプのジスムターゼであることが強く示唆された。また、近縁の *Lactococcus garvieae* の全ゲノム GC 含量は 39%であるにもかかわらず、*Lactococcus* sp. 20-92 由来の Equol 代謝関連遺伝子群は、*Eggerthella* sp. YY7918 株および Coriobacteriaceae 科(56~60%)細菌の全ゲノムと同様に 64%と高 GC 含量であった。以上の結果は、Equol 産生に関連する遺伝子群は Coriobacteriaceae 科に属する高 GC 含量の細菌中で進化し、その後 *Lactococcus* sp. 20-92 株に水平伝播されたことを示唆する。

次に、イソフラボン代謝腸内細菌の比較ゲノム解析を試みた。O-DMA 生産菌として新たに単離したイソフラボン代謝腸内細菌(*Slackia* 2F 株)あるいはカルチャーコレクションに登録されている Equol 非生産性 *Eggerthella* 属細菌を含む 11 株のドラフトゲノム解析を行った。解析の結果、ドラフトゲノム解析ではイソフラボン代謝腸内細菌に特徴的な遺伝子配列の抽出が困難であることが判明した。よって、目的をイソフラボン代謝関連遺伝子配列の抽出に絞り、このうち Equol 生産菌である *Asaccharobacter celatus* JCM 14811 株(ラット盲腸内容物由来菌株)、*Slackia equolifaciens* JCM 16059 株、*Slackia isoflavoniconvertens* JCM 16137 株、および O-DMA 生産菌である *Slackia exigua* JCM 11022 株および *Slackia* 2F 株については、完全長のゲノム解析を行うこととした。

今回解析した Equol 代謝腸内細菌 3 菌株の他、以前ゲノム解析を完了した *Eggerthella* sp. YY7918 株および他者によって報告のある *Adlercreutzia equolifaciens* JCM 14793 株、ゲノム解析はなされていないものの、Equol 代謝酵素関連遺伝子についての報告がある *Lactococcus* sp. 20-92 株および *Slackia* sp. NATTS 株を加えた 7 菌株由来の Equol 代謝酵素関連遺伝子クラスターについて比較解析を行った。その結果、当該遺伝子群は系統学的に、3つのグループに分けられることを明らかにした。すなわち、*Eggerthella* sp. YY7918 株、*Slackia equolifaciens* および *Lactococcus* sp. 20-92 株のグループ、*Asaccharobacter celatus* および *Adlercreutzia equolifaciens* のグループ、および *Slackia isoflavoniconvertens* および *Slackia* sp. NATTS のグループに分かれた。他

方で、*O*-DMA 生産菌では、3 菌株間で比較ゲノム解析を行ったにもかかわらず、イソフラボン代謝に関わる遺伝子群を推測することは困難であった。

ここまでの研究で得られた知見をもとに、生体内における Equol 生産菌の消長を捉えることが可能な遺伝子マーカーを構築することを検討した。上記にて比較解析を行った 7 菌株由来の Equol 代謝酵素関連遺伝子をもとに、相同性の高い塩基配列 89bp を抽出し、プライマーを設計した。このプライマーを用い、上記の Equol 生産菌ゲノムを鋳型としてリアルタイム PCR を行ったところ、いずれの菌ゲノム DNA でもほぼ同効率で増幅されることを確認した。なお、検出限度は 1pg であった。一方、ネガティブコントロールとして使用した、*O*-DMA 生産菌である *Clostridium* rRNA cluster XIVa SY8519 株、*Slackia exigua* JCM 11022 株および *Slackia*_2F 株では増幅断片は確認されなかった。

続いて、このプライマーが実用に適するか否かの検討を行った。まず学内ボランティアを募って、イソフラボンサプリメント摂取後の尿を採取し、高速液体クロマトグラフィーにて尿中 Equol を測定することで Equol 生産能の有無について調査した。調査の結果を踏まえ Equol 産生者 5 名、および非産生者 5 名を選別し、その糞便を採取し、糞便より抽出した全ゲノムを鋳型に、上記プライマーを用いてリアルタイム PCR による増幅を試みた。その結果、Equol 産生者にのみ遺伝子の増幅が確認された。また、その検出限度は 5ng であった。これより本プライマーは、糞便中に Equol 生産菌が存在するか否か確認するための遺伝子マーカーとして使用可能であることが示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 1 件)

The production of *S*-equol from daidzein is associated with a cluster of three genes in *Eggethella* sp. YY7918. KAWADA Y, YOKOYAMA S, YANASE E, NIWA T, SUZUKI T. Bioscience of Microbiota, Food and Health Vol. 35 (3), 113–121, 2016. 査読有

〔学会発表〕(計 3 件)

Eggethella sp. YY7918 株由来の急黄色酵素ダイゼインレダクターゼの機能解析.川田結花, 五島智子, 澤村理恵, 横山慎一郎, 丹羽利夫, 柳瀬笑子, 稲垣瑞穂, 海老原章郎, 山口圭一, 加藤雄太, 桑田一夫, 櫻田修, 鈴木徹. 日本農芸化学会 2017 年度大会(京都女子大), 2017

Eggethella sp. YY7918 株のジヒドロダイゼインラセマーゼの解析.川田結花, 五島智子, 横山慎一郎, 丹羽利夫, 鈴木徹. 日本農

芸化学会 2015 年度大会(岡山大学), 2015

Eggethella sp. YY7918 由来のエクオール産生酵素ダイゼインレダクターゼの酵素学的性質. 五島智子, 川田結花, 横山慎一郎, 鈴木徹. 日本農芸化学会 2015 年度大会(岡山大学), 2015

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

横山 慎一郎 (YOKOYAMA, Shin-ichiro)
岐阜大学・応用生物科学部・研究員
研究者番号: 30291008

(2)研究分担者

鈴木 徹 (SUZUKI, Tohru)
岐阜大学・応用生物科学部・教授
研究者番号: 20235972

(3)連携研究者

()

研究者番号:

(4)研究協力者

()

