

令和 2 年 5 月 28 日現在

機関番号：21601  
研究種目：若手研究(B)  
研究期間：2017～2019  
課題番号：17K12903  
研究課題名（和文）味噌由来エクオール産生菌の同定と前立腺肥大症に対するエクオールの作用機序の解明  
研究課題名（英文）Identification of Equol producing bacteria and Preventive effect of equol on the development of bladder dysfunction secondary to bladder outlet obstruction  
研究代表者  
宮崎 希 (Miyazaki, Nozomu)  
福島県立医科大学・医学部・助教  
研究者番号：40725876  
交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：豆味噌中に含まれるエクオール産生を担う細菌の同定を行い、Pediococcus属菌を同定することができた。このPediococcus属菌が持つエクオール産生に関する遺伝子の同定を試みたが、単独発現した酵素でのエクオール産生は確認できず同定には至らなかった。また、下部尿路閉塞ラットにおいてエクオールは膀胱機能障害の発生を予防した。その機序は、抗酸化作用だけでなく神経保護作用（膀胱における徐神経予防）が関与していることが示唆された。

#### 研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでに報告のあるエクオール産生菌のほとんどが腸内細菌から単離されたものであるが、本研究では食品から単離している。そして食品から単離されたエクオール産生菌は機能性食品やプロバイオティクスへの応用が期待できる。またエクオールの機能として中枢神経における神経保護は培養細胞実験で報告があるが、動物を用いて膀胱内の神経（末梢神経）保護作用を示唆する報告はまだない。

研究成果の概要（英文）：We identified the bacteria responsible for equol production in soybean miso, and it was a bacterium of the genus *Pediococcus*. We identified the equol producing gene possessed by this bacteria, but we could not confirmed equol production by the enzyme isolated from this bacteria. In addition, equol prevented the development of bladder dysfunction in rats with bladder outlet obstruction. It was suggested that the mechanism involves not only an antioxidative effect but also a neuroprotective effect.

研究分野：微生物と抗老化

キーワード：エクオール エクオール産生菌 植物性エストロゲン 抗酸化作用 神経保護作用 過活動膀胱

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 植物性エストロゲンのエクオールは、大豆イソフラボンのダイゼインが菌の代謝によって産生される。私たちは、このエクオールが味噌の中でも特に豆味噌に比較的多く含まれることを先行研究で発見した。そこで、エクオール含有が確認できた豆味噌からエクオール産生菌を分離同定し、プロバイオティクスへの応用や機能性食品として味噌の価値を高めることができないかと考えた。

(2) また、これまでにエクオールは抗酸化作用、性ホルモン関連がんの抑制作用などを示すことが報告されている。そこで、私たちは酸化ストレスが病態の発生に関与していることが示唆されている下部尿路閉塞ラットにおける膀胱機能障害の発生においてエクオールが予防効果を示すのではないかと考えた。

### 2. 研究の目的

(1) エクオール含有が確認できた豆味噌からエクオール産生菌を分離同定し、その菌をプロバイオティクスへ応用できるか検討する。

(2) 下部尿路閉塞ラットを用いて、エクオール投与により膀胱機能障害の発生を予防できるか検討し、その機序を明らかにする。

### 3. 研究の方法

(1) エクオール産生菌の同定とプロバイオティクスへの応用

豆味噌から単離した菌のエクオール産生能の確認：豆味噌から単離した約 100 菌をそれぞれ単独培養し、培養上清のエクオール含有量を UPLC により解析した。大豆イソフラボンの基質として豆乳を培地に添加し培養した。

単離したエクオール産生菌のエクオール産生関連酵素の同定：細菌から DNA を抽出しこれまでに報告のあるエクオール産生菌 (Eggerthella, Adlercreutzia, Slackia) のエクオール産生関連酵素遺伝子をもとにプライマーを作製し PCR により検出した。

単離したエクオール産生菌の全ゲノムシーケンス解析： によりエクオール産生が確認できた菌の全ゲノムシーケンスを外注により行った。

プロバイオティクスへの応用：単離したエクオール産生菌の食中毒の原因となる生体アミン産生能を各アミン前駆物質を基質として添加し培地の pH 変化を指標に確認した。

(2) 下部尿路閉塞ラットにおける膀胱機能障害に対するエクオールの予防効果の検討

動物の群分けと実験スケジュール：8 週齢の雄性 SD ラットを通常餌群 (6 匹、6 匹) とエクオール添加餌群 (6 匹) に群分けし 1 週間飼育した。その後、通常餌群は偽手術を施した Sham 群、下部尿路閉塞手術を施した N-B00 群に分け、エクオール添加餌群は下部尿路閉塞手術を施し E-B00 群として飼育した。術後 4 週間の時点で代謝ゲージにより 24 時間尿をサンプリングし、その後膀胱内圧測定により排尿動態を評価した。膀胱内圧測定後に安楽死させ、膀胱を摘出しその後の実験に使用した。

覚醒下膀胱内圧測定：測定の前日に膀胱瘻増設手術を行い、膀胱に圧測定用のカテーテルを留置した。カテーテルを介して 10 ml/h の流量で生理食塩水を膀胱内に注入し、排尿時の膀胱内圧、一回排尿量、排尿間隔を記録した。

酸化ストレスマーカーの測定：代謝ゲージによりサンプリングした 24 時間尿を使用して、DNA 酸化ストレスマーカーの 8-oxo-dG (8-OHdG) と脂質過酸化マーカーの malondialdehyde (MDA) を測定し、抗酸化作用を評価した。

ウェスタンブロット法によるタンパク質の定量：膀胱からタンパク質を抽出し、下部尿路閉塞における膀胱機能障害の発生に伴い発現が増加するコネキシン 43 (Cx43) 発現を測定した。

組織学的検討：下部尿路閉塞による膀胱の徐神経を評価するために、神経細胞をニューロフィラメント抗体を用いて免疫蛍光染色し残存神経細胞数を測定した。

### 4. 研究成果

(1) エクオール産生菌の同定とプロバイオティクスへの応用

豆味噌から単離した菌のエクオール産生能の確認：豆味噌から分離した菌を用いて、豆乳を基質として添加した培地で単独培養した上清を UPLC で解析した結果、いくつかの菌でエクオールを検出できた。(図 1)

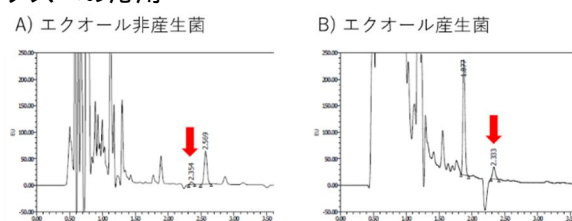


図1 培養上清のUPLC測定

単離したエクオール産生菌のエクオー

ル産生関連酵素の同定： においてエクオール産生が確認できた菌のエクオール産生関連遺伝子を同定するために、これまでにエクオール産生菌として報告のある3菌種 (Eggerthella, Adlercreutzia, Slackia) をもとにプライマーを作製し (表1) PCRにより産生遺伝子の検出を行った。しかしながら、今回単離したエクオール産生菌の持つエクオール産生関連遺伝子は3つの型のどれにも反応せず、これまでに報告のあるエクオール産生関連遺伝子とは相同性の低い遺伝子だと考えられた。

表1 エクオール産生関連遺伝子検出用プライマー

Eggerthella type	Fw: 5' -atggcacaattcgatgttgagta-3' Rv: 5' -cctacatagtgagatcgcggtgg-3'
Adlercreutzia type	Fw: 5' -atggcgttcgatactgagtacgacc-3' Rv: 5' -cgccctcggactcggcgacc-3'
Slackia type	Fw: 5' -gcgtcgtgtataagacctgc-3' Rv: 5' -tcggccgcaagcgatggcc-3'

単離したエクオール産生菌の全ゲノムシーケンズ解析：外注により行った全ゲノムシーケンズの結果、今回の研究で単離したエクオール産生菌の16S rDNAシーケンズは *Pediococcus pentosaceus* と相同性を示したため、植物性乳酸球菌 *Pediococcus* 属の *Pediococcus pentosaceus* と同定した。

Unicycler (unicycler\_A-7.fna)

配列名	Form	Contig Length
1	Circular	1,823,674
2	Circular	41,074
3	Circular	35,981
4	Circular	12,527

図2 アセンブリー解析結果

プロバイオティクスへの応用：食中毒の原因となる生体アミンとしてヒスタミン、チラミン、カダベリン、プトレシンの4つの産生能を確認した。その結果、ヒスタミン産生において陽性と確認できた。そのため、プロバイオティクスへ応用するのは安全性の観点から難しいと判断した。

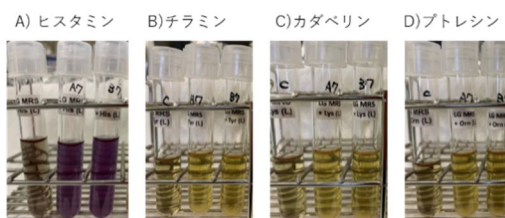


図3 生体アミン産生能確認試験

## (2) 下部尿路閉塞ラットにおける膀胱機能障害に対するエクオールの予防効果の検討

覚醒下膀胱内圧測定：Sham群、N-B00群、E-B00群における膀胱内圧測定を行い排尿時の膀胱内圧、一回排尿量、排尿間隔を比較した。その結果、Shamラットに比べB00処置ラットでは膀胱内圧の上昇、一回排尿量の減少、排尿間隔の短縮がみられたが、エクオール摂取群では一回排尿量が有意に増加し、排尿間隔が有意に延長された (図4)。この結果からエクオール摂取はB00に伴う膀胱過活動の発生を予防することが示唆された。

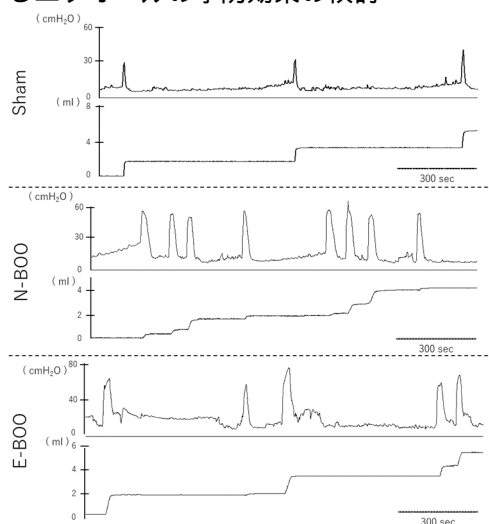


図4 膀胱内圧測定

酸化ストレスマーカーの測定：エクオールの代表的な作用として抗酸化作用が報告されている。本研究においてもエクオールの抗酸化作用が膀胱過活動の発生予防における主なメカニズムであることが予想されたため、尿中のDNA酸化ストレスマーカーの8-OHdGおよび脂質過酸化マーカーのMDAを測定し、膀胱における酸化ストレスを評価した。Shamラットに比べB00ラットでは8-OHdG、MDAともに有意な増加がみられた。エクオール摂取B00ラットでは、8-OHdGは変わらず増加がみられたが、MDAはN-B00群に比べその増加は有意に軽減されていた。このことから、エクオール摂取は脂質の過酸化、つまりは細胞膜への酸化ストレスを選択的に軽減していることが示唆された。

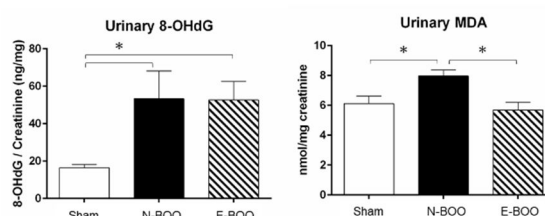


図5 尿中酸化ストレスマーカー

ウェスタンブロット法によるタンパク質の定量：下部尿路閉塞に伴う膀胱過活動の発生では膀胱組織でのギャップ結合タンパクのコネキシン 43 (Cx43) 発現が増加することが報告されており、過活動の発生に関与していると考えられている。そこでエクオールがタンパク発現にも影響を及ぼすのかを検討した。その結果、N-B00 群ではCx43 タンパク発現の有意な増加がみられるが、E-B00 群ではその増加が顕著に抑制されていた。

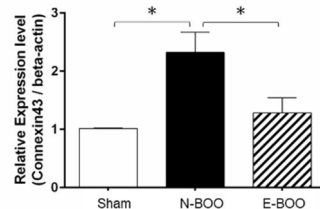


図6 Cx43タンパク発現

組織学的検討：エクオールには抗酸化作用に加え、神経保護作用があることが報告されている。したがって B00 に伴って発生する徐神経に対するエクオールの予防効果をニューロフィラメント H 抗体を用いた免疫蛍光組織染色によってニューロフィラメント H 抗体陽性神経細胞数の変化を検討した。その結果、Sham ラットに比べ B00 ラットでは顕著な神経細胞数の減少が確認できた。一方エクオール摂取 B00 ラットでは神経細胞数減少が軽減されていた。このことからエクオール摂取によって、下部尿路閉塞に伴う徐神経が軽減されていることが示唆された。

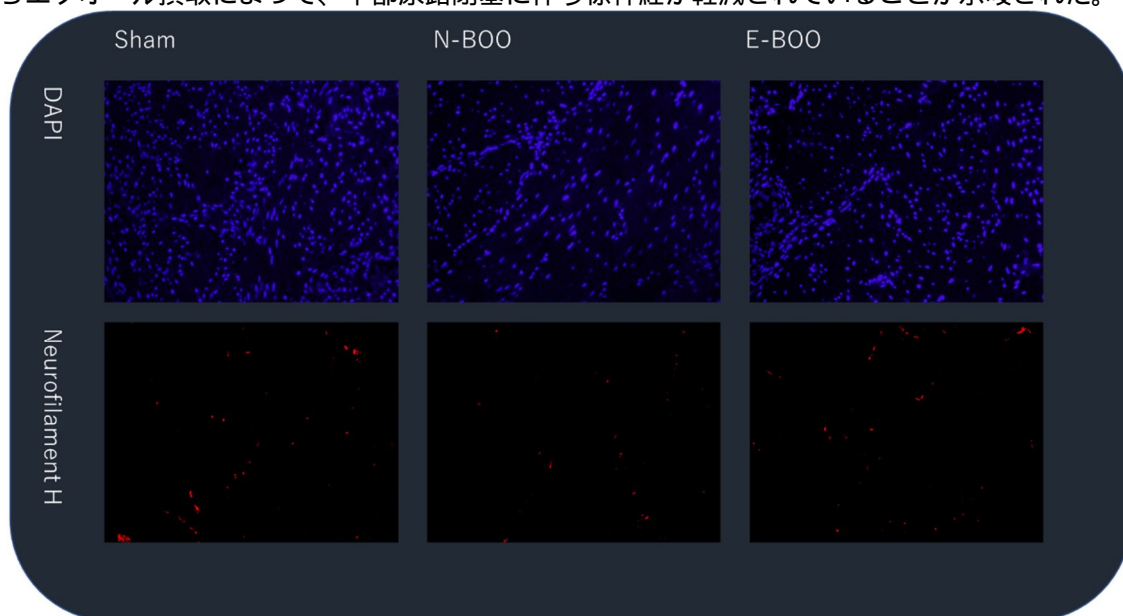


図7 ニューロフィラメントH抗体による膀胱の免疫蛍光組織染色

以上のことから、エクオールは下部尿路閉塞に伴う膀胱過活動の発生を予防することが示唆された。そしてそのメカニズムは、エクオールによる抗酸化作用と神経細胞保護作用が関与していることが考えられた。今後は、これらの作用がどのような分子メカニズムによって引き起こされているのかを明らかにしていく必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 宮崎希、菅原麻莉、濱田浩輝、錫谷達夫
2. 発表標題 大豆イソフラボン代謝物のエクオールによる膀胱過活動発生の予防効果
3. 学会等名 第72回日本細菌学会東北支部総会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----