

エクオール産生菌の遺伝子マーカー開発(第1報)

小寺美有紀、鈴木徹*、江崎孝之**、横山慎一郎

Development of Detective Marker about Equol-Producing Bacteria (I)

Miyuki KODERA, Tohru SUZUKI*, Takayuki EZAKI** and Shin-ichiro YOKOYAMA

エクオールは他の大豆イソフラボンと比べて高い抗酸化活性を有し、更年期症状の緩和作用等が期待されることから強い関心を集めている。しかし、エクオール産生能は腸内細菌叢の環境に依存し、日本人全体で30~40%程度しかエクオールを産生することはできず、その要因も遺伝的要因であるか食生活による要因であるかも明らかとされていない。本稿では、腸内におけるエクオール産生菌の検出技術を開発するため、2種類のプライマー候補についての評価を行い、複数のヒト検体で検討した。その結果、尿中エクオールの検出有無と対応した形で糞便中エクオール産生菌が検出されることが確認された。

1. はじめに

アジア地域では、古来より大豆食品を摂取しており、乳がん、前立腺がん、骨粗鬆症、更年期障害といったホルモン性疾患の罹患率が欧米よりも少ないことが報告されている。この一因に、大豆に含まれる大豆イソフラボン類との関連が示唆されている。

エクオールはダイゼインが腸内細菌の働きで変換された抗酸化作用の高い代謝物である。エクオールはエストロゲンレセプターとの親和性が高く、エストロゲン様活性を示すため、骨粗鬆症や更年期障害の緩和作用が期待されている。しかし、エクオールを産生可能か否かはエクオール産生菌の宿主か否かに影響され、個人差が大きい。エクオール産生者の判定には、現在、尿中に排泄されたエクオール量を測定する方法が用いられている。しかし、エクオール産生環境の改善を図るには、エクオール産生菌自体の概要を捉える必要がある。我々はこれまでに、エクオール産生菌の一つである*Eggerthella* sp. YY7918株およびそのエクオール代謝遺伝子の単離と同定に成功した¹⁾²⁾。本稿では、腸内におけるエクオール産生菌の所在の有無に着目し、これまで実用化されていないエクオール産生菌検出技術(遺伝子マーカー)の開発を目指してマーカーについて評価を行った。

2. 実験方法

2.1 プライマー候補を用いたPCR増幅および増幅産物の確認

ダイゼインからエクオールの産生に関与する酵素をコードする遺伝子群よりプライマー設計を行った。複数のエクオール産生菌およびエクオール非産生菌に対してをSimpliAmp ThermalCycler (Applied Biosystems)を用いてPCRを行った。PCR条件は、初期変性95°C2分を1サイクル

変性95°C20秒、伸長反応60°C30秒を30サイクル行った。PCR反応後は、2.5%アガロースゲルにて電気泳動(100V、25分)を行った。SYBR Green I (タカラバイオ)を用いて染色し、増幅の有無について確認を行った。

2.2 尿中エクオール量の測定

Uenoらの方法³⁾に一部改変を加え、測定を行った。尿100 μ Lに対して、 β -グルクロニダーゼ含有酵素液を100 μ L(4000 U)を添加し35°Cで一晩加水分解処理を行った。反応液に酢酸エチル1 mLを添加し、攪拌機(Taitec E-36)を用いて15分間混合した。4°C、12,000 rpm、5分間遠心分離を行った後上清を回収し、窒素ガス雰囲気下で乾固した。上清を80%EtOH溶液に再溶解し、HPLCによる分析と解析を行った。分析は、Alliance e2695分離モジュールと2998 PDA検出器を備えたEmpower 3 システム(Waters)により行った。流速は0.45 mL/minとし、A液:0.05%含有りん酸水溶液/9%酢酸エチル含有MeOH混液=4/1(v/v)とB液:2%酢酸エチル含有MeOHを用いたグラジエント条件により溶出させた。B液の割合におけるグラジエント条件は以下のとおりである(t=時間(分))。t₀₋₁₀,B=25-50%; t_{10-17.9},B=50%; t₁₈₋₂₃,B=90%; t₂₃,B=25%とした。試料5 μ Lを注入し、CORTECS T3 カラム(Waters)により分離を行った。分離後、検出波長を280nmで定量を行った。エクオールの検出下限は1 μ M、定量下限は3 μ Mとした。

2.3 糞便中エクオール産生菌の定量

糞便はEZ-Beads (AMR)を用いて粉碎処理を行い、フェノールクロロホルム法を用いてDNAの抽出を行った。抽出したDNAは2 ng/ μ Lに希釈し、SYBR Green qPCR Mix(Toyobo)を用いてPCR反応溶液を作成した。Step One (Applied Biosystems)を用いて、初期変性95°C2分を1サイクル、変性95°C20秒、伸長反応60°C30秒で40サイクルのリアルタイムPCR反応を行った。

3. 結果と考察

*岐阜大学応用生物科学部

**岐阜大学医学部

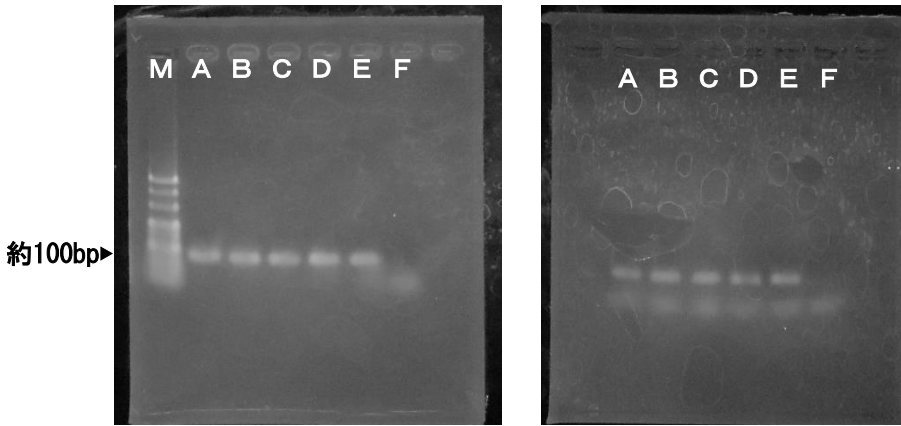


図1 プライマー候補A(左)およびプライマー候補B(右)を用いた場合の電気泳動写真(M:分子量マーカー、A: *Slackia equolifaciens*、B: *Eggerthella* sp.YY7918、C: *Asaccharobacter celatus*、D: *Adlercreutzia equolifaciens*、E: *Slackia isoflavoniconvertens*、F: *Slackia exigua* (エクオール非産生菌))

3.1 検出用のプライマー検討

PCR後の増幅についてアガロース電気泳動を行った結果を図1に示した。プライマー候補A、プライマー候補B共に、複数のエクオール産生菌 (*Slackia equolifaciens*、*Eggerthella* sp.YY7918、*Asaccharobacter celatus*、*Adlercreutzia equolifaciens*、*Slackia isoflavoniconvertens*) について、該当箇所であるA~Eが各々増幅されたことが確認された。対して、エクオール非産生菌である*Slackia exigua*について、該当箇所であるFではいずれのプライマー候補においても増幅が確認されなかった。このため、いずれのプライマー候補においても検出法に適用できる可能性があった。

次に、エクオール産生菌のゲノムDNAを段階希釈し2種のプライマー候補を用いてリアルタイムPCRにて測定を行った。測定後に検量線を作成し比較検討を行った。

プライマー候補Aとプライマー候補Bの検量線を図2に示した。

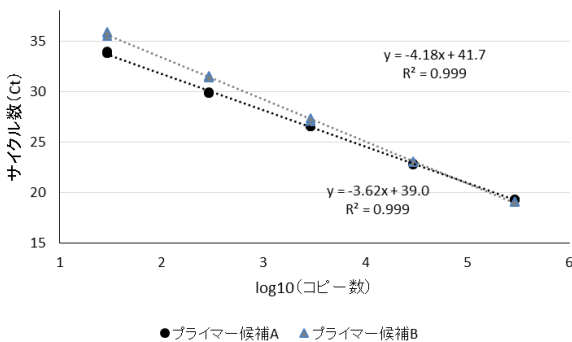


図2 各種プライマー候補を用いた検量線

図2においてプライマー候補Aでは傾きは-3.6であるのに対してプライマー候補Bでは傾きは-4.2であった。増幅効率を算出する計算式($e=10^{-(1/\text{傾き})}-1$)を用いて算出したところ、プライマー候補Aの増幅効率率は90%であるのに対して、

プライマー候補Bの増幅効率率は73%であった。リアルタイムPCRにおける傾きと増幅効率の推奨範囲は、それぞれ-3.0~-4.0および80%~120%である。このため、推奨範囲に近い結果となったプライマー候補Aを検出用のプライマーとして採用することとした。

3.2 ヒト検体への適用

5名の有志ボランティア参加者について、尿中エクオールの定量および糞便中エクオール産生菌の定量を行った結果を表1および図3に示した。

表1 尿中エクオールおよび糞便中エクオール産生菌数

被験者	尿中エクオール濃度 (μM)	糞便中エクオール産生菌数 (copies/g feces)
A	3.9	$10^{7.6}$
B	15	$10^{5.9}$
C	7.7	$10^{5.8}$
D	検出下限未満	検出下限未満
E	検出下限未満	検出下限未満

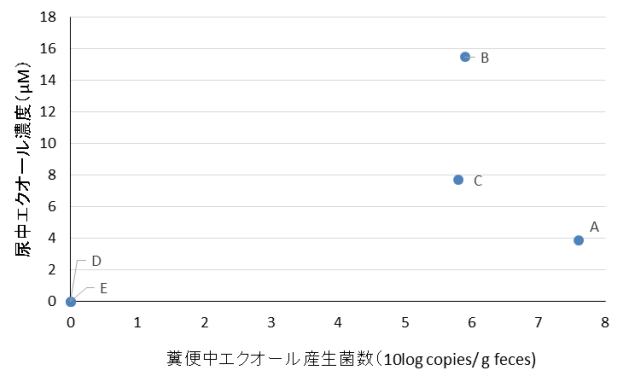


図3 尿中エクオール濃度と糞便中エクオール産生菌数

表1、図3に示すとおり、尿中エクオールが検出されなかったエクオール非産生者2名について、糞便中エクオール産生菌数も検出されなかった。これに対して、尿中エクオールが検出されたエクオール産生者3名においては、糞便中エクオール産生菌も検出されることが確認された。この3名における糞便1g中のエクオール産生菌数について、 10^5 から 10^8 までの間であった。腸内細菌は、全体で糞便1g中に約 10^{11} 個存在しており、その内ビフィズス菌は約 10^{10} 個存在している⁴⁾。本稿で定量したエクオール産生菌から計算すると、腸内細菌叢全体の0.01%以下の比率で存在していることが推測された。これはビフィズス菌数の約1%以下であり、エクオール産生菌は少ない比率で存在しているにもかかわらず、エクオール産生に寄与していることが示唆された。尿中エクオール濃度とエクオール産生菌数の散布図を図3に示す。尿中エクオールが検出された3名についてエクオール産生菌数は個人差があり、尿中エクオール濃度との関係性については被験者数を増やして検討する必要がある。本稿で開発したプライマー候補Aではヒト検体においても糞便中エクオール産生菌の検出有無が識別できていたことが確認された。

4. まとめ

腸内におけるエクオール産生菌の検出技術を開発する

ため、複数のプライマー候補についてエクオール産生菌およびエクオール非産生菌における増幅の有無を確認し、各々の検量線を作成した。いずれのプライマー候補においてもエクオール産生菌に特異的に増幅されることが確認されたが、検量線の傾きと増幅効率の良いプライマー候補Aを検出用に選定した。複数のヒト検体で検討したところ、尿中エクオールの検出有無と対応した形で糞便中エクオール産生菌が検出されることが確認された。

【謝 辞】

本研究を行うにあたり、ボランティア協力いただいた皆様に心から御礼申し上げます。

【参考文献】

- 1) S. Yokoyama *et al.*, *Journal of Bacteriology*, 193, pp.1687-1691, 2011
- 2) Y. Kawada *et al.*, *Bioscience of Microbiota, Food and Health*, 35 (3), pp.113-121, 2016
- 3) T. Ueno *et al.*, *Journal of functional foods*, 7, pp. 129-135, 2014
- 4) 光岡知足, 腸内細菌学雑誌, 25, pp.113-124, 2011