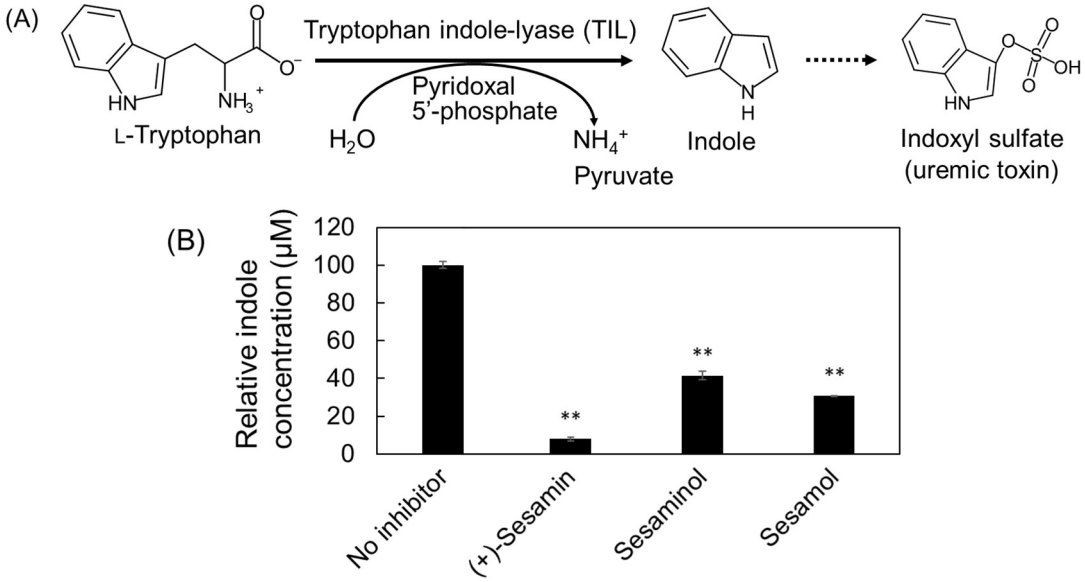
ゴマリグナンによる腸内腐敗物質の蓄積阻害に関する研究

及川　大樹
京都大学大学院 生命科学研究科

研究の目的

Indole は腸内細菌によって生産される代表的な腐敗物質として知られ，本化合物自身は便の悪臭の原因となるほか，その代謝物である indoxyl sulfate は酸化ストレスの発生や細胞老化・線維化を誘発する[1]．Indole は食餌に含まれる tryptophan を由来とし，腸内細菌が生成する酵素：tryptophan indole-lyase（TIL）によるアミノ酸発酵によって生成・蓄積する（図）[2]．申請者は，腸内細菌由来の TIL の酵素活性を制御することで，生体内における indole の蓄積を抑制し，前述の健康被害の予防に効果的であると考えた．既往の研究により，ゴマに含まれる(+)-sesamin，sesaminol，sesamol 等のゴマリグナンと称される化合物およびその誘導体が TIL を強力に阻害することが明らかになっている（図）[3]．食品として用いられるゴマの摂取により indole の蓄積を抑制できれば，治療薬としてではなく，食生活という日常的な面から健康被害の予防・増悪阻止につなげられる．その第一歩として，TIL を発現する腸内細菌や宿主に対し，同化合物がもたらす影響と indole の生成抑制効果を明らかにすることが不可欠となる．

本研究では，ゴマリグナン類の投与がもたらす腸内細菌や宿主体内への影響と indole の生成抑制効果を解析し，「酵素阻害を起点とした，腸内腐敗物質による健康被害の新たな予防方法」の樹立を目指す．



図．Indoxyl sulfate の生成機構とゴマリグナンによる TIL の酵素阻害活性
(A)腸内細菌由来の TIL による indole および indoxyl sulfate の生成機構，(B)TIL に対して阻害活性を示すゴマリグナン類の選抜

方法

1. 菌体による indole の生成抑制効果の検証

ヒト腸管においての存在が報告され，*til* の相同遺伝子を保有するような菌種を網羅的に探索した．探索には，各菌種の基準株を菌株保存機関より購入して本実験に用いたほか，実験者の所属機関に保有するヒト糞便分離株を使用した．同菌株を，TIL の基質となる tryptophan を添加した反応液中で嫌気的にインキュベートし，反応後の反応液上清に含まれる indole の蓄積量を HPLC により定量して，菌種間での indole の蓄積量を比較解析した．このうち，代表的な菌株を用いて，前述の反応液に基質である tryptophan に加え，ゴマリグナン類も添加した反応液中で同菌株をインキュベートし，阻害剤の添加の有無による indole の生成抑制効果を評価した．反応液中のゴマリグナン類の濃度も同時に測定したほか，反応液の一部を腸内細菌分離用の寒天培地に塗布してコロニー数を定量し，菌株の生育やゴマリグナン類の代謝への影響を考察した．

2. マウスへのゴマリグナン類の投与効果の検証

モデルマウスを 2 群に分け，一方の群には動物実験用飼料である AIN-76 および水分を与え，もう一方には AIN-76 に加えて sesamol を含む水分を与えてそれぞれ飼育を行った. 7 日間の飼育期間中に各個体から糞便を採取し, 糞便中のゲノム DNA を抽出して 16S rDNA の V3-V4 領域の増幅により 16S アンプリコン解析を行った．配列解析の結果を基に，群間での多様性解析や菌種の存在比の比較解析を実施した．

結果

1. 菌体による indole の生成抑制効果の検証

ヒト腸由来の種々の腸内細菌を，tryptophan を含む反応液中でインキュベートし，反応液上清に含まれる indole の蓄積量を HPLC で解析した結果，一部の *Bacteroidaceae* 科の細菌において indole の産生が確認されたほか，*Enterobacteriaceae* 科や *Morganellaceae* 科の細菌において高濃度の indole の蓄積が散見された．このうち，*Bacteroides thetaiotaomicron*，*Citrobacter koseri*，*Enterobacter* sp.の各菌株を用いて，前述の反応液に同菌株およびゴマリグナン類を添加してインキュベートし，同様に反応後の反応液上清に含まれる indole の蓄積量を定量した．その結果，ゴマリグナン類のうち sesamol を反応液に添加した場合において，sesamol 未添加時と比較して indole の蓄積を有意に減少させる結果が，いずれの菌種を用いた反応液においても確認された．加えて，反応液上清に含まれる sesamol の濃度を同様に HPLC で解析したところ，反応の前後において sesamol の濃度に有意な差は確認されなかった．反応終了後の各反応液の一部を腸内細菌分離用の寒天培地に塗布して嫌気的にインキュベートし，コロニー数をカウントしたとこ

ろ，sesamol の添加の有無にかかわらず，各反応液中の生菌数に有意な差は確認されなかった．以上より，sesamol は腸に内在する細菌種由来の indole の生成を抑制する効果が *in vitro* で確認された．その際，sesamol は同菌種により代謝・分解されず，投与した sesamol が菌体の生育に影響を与えないことも明らかとなった．

2. マウスへのゴマリグナン類の投与効果の検証

マウスの糞便からゲノム DNA を抽出し，16S rDNA の配列の増幅による 16S アンプリコン解析を実施し，sesamol を投与したマウスの糞便と未投与のマウスの糞便とで，菌叢の比較解析を行った．α 多様性解析の結果，群間で amplicon sequence valiants 数に有意差は確認されなかった．加えて，Bray-Curtis 非類似度に基づく主座標分析においても，群間の菌叢は低い非類似性を示した．群間での菌種の相対存在比を比較した結果，一部の菌種についてその存在比に有意な差が確認されたのみで，*til* の相同遺伝子を有する細菌種については有意な増減は見られなかった．これらのことから，sesamol の投与はマウスの腸内細菌叢に対してほとんど影響を与えないことが確認された．

結論

本研究により，ゴマリグナン類のうち sesamol の投与はマウスの腸内での菌叢構造にほとんど影響を与えず，菌体による indole の産生を抑制することが確認された．また，sesamol 自身は同菌種により代謝されず，検証を行った濃度範囲において投与した sesamol は菌体の生育に影響を与えないことも併せて確認された. 前述のように sesamol は腸内細菌由来の TIL 酵素に対して阻害活性を示すことから，今回確認された菌体による indole の生成抑制活性の機序の一つとして，投与した sesamol による TIL の酵素阻害の可能性が示唆された．

文献

1) Shimizu, H., *et al*., (2011) NF-κB plays an important role in indoxyl sulfate-induced cellular senescence, fibrotic gene expression, and inhibition of proliferation in proximal tubular cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* **301**, C1201-C1212.
2) Phillips, R. S., Demidkina, T. V., and Faleev, N. G. (2014) The role of substrate strain in the mechanism of the carbon–carbon lyases. *Bioorg Chem*. **57**, 198-205.
3) Oikawa, D. *et al*., (2022) (+)-Sesamin, a sesame lignan, is a potent inhibitor of gut bacterial tryptophan indole-lyase that is a key enzyme in chronic kidney disease pathogenesis. *Biochem Biophys Res Commun*. **590**,158-162.