

---

**トピックス**

---

## フラボノイドおよびポリメトキシフラボノイドの腸内細菌による生体内変換 Biotransformation of flavonoids and polymethoxyflavonoids by enteric bacterium

フラボノイドの一種であるポリメトキシフラボノイド(PMFs)は、細胞増殖抑制作用<sup>1)</sup>、抗炎症作用<sup>2)-4)</sup>、記憶障害改善作用<sup>5)</sup>、脂質代謝改善作用<sup>6)</sup>、血管機能調節作用<sup>7)8)</sup>、男性ホルモン産生促進作用<sup>9)</sup>など、様々な健康機能性に関わっていることが知られている。このような生理活性作用が発揮されるメカニズムを明らかにするためには、生体内におけるPMFsの代謝、吸収などの体内動態を調べる必要がある。生体内における吸収に関連した研究では、小腸の*in vitro*モデルとして汎用されているヒト結腸癌由来Caco-2細胞を用いた試験において、PMFsの一種であるnobiletinが消化管上皮に蓄積し、小腸で代謝される可能性を示唆した報告がある<sup>10)</sup>。代謝に関連した最近の研究では、PMFsではないものの、ポリフェノールの一種であるエピガロカテキンガレートにおける組織内での代謝分布を可視化した知見<sup>11)</sup>がある。

また、これらの生体内における代謝系に腸内細菌が重要な役割を担っており、フラボノイド配糖体が腸内細菌の作用により糖とアグリコンに分解され、さらにフラボノイド骨格が環開裂により分解されることが知られている<sup>12)</sup>。例えば、大豆には、ゲニステイン、ダイゼイン、ダイジンなどといった、いわゆる大豆イソフラボンが豊富に含まれており、ダイジンから腸内細菌による代謝により生成する(S)-equolは強力な植物エストロゲン活性を有するイソフラボン代謝物であることから、食品の二次代謝産物による機能性素材として注目されている<sup>13)</sup>。本稿では、このようなフラボノイドにおける代謝研究のうち、ヒト腸内細菌によるPMFsあるいはフラボノイド類の生体内変換に着目した研究結果を中心に紹介する。

Kimらのグループは、多種類のPMFsを豊富に含むことで知られている、タイ原産のショウガ科の植物である*Kaempferia parviflora*の根茎を対象として、次の検討を行った<sup>14)</sup>。はじめに、*Kaempferia parviflora*のエタノール抽出物から得られたPMFs混合物を健康なヒト糞便サンプルより調製した細菌培養物に加え、37℃

で3日間反応させた。これより得た抽出液の薄層クロマトグラフィーによるスクリーニング試験の結果から、PMFsの代謝活性を有する偏性嫌気性グラム陽性菌を単離し、それがヒト腸内細菌*Blautia* sp. MRG-PMF1であると同定した。次に、PMFs混合物と*Blautia* sp. MRG-PMF1を37℃で3日間培養し、代謝生成物をHPLCにて分析した。この結果、*Blautia* sp. MRG-PMF1によるPMFsの生体内変換により、chrysin, apigenin, 3-methylkeampferol および 3-methylquercetin が新たに生成したことが明らかとなった(図1)。PMFsは構造中の芳香族メチルエーテル基により化学的に安定な生理活性物質であり、またエーテル結合の開裂には通常強酸または強塩基かつ高温といった厳しい反応条件が必要であるが、嫌気条件、室温下のマイルドな条件において、このような脱メチル化が腸内細菌の生体内変換により起きることが見いだされ、その他にもO-glucose基およびO-rutinosyl基に対する脱グリコシル化が認められたことは興味深い。Kimらは、さらに詳細なPMFs代謝の情報を得るため、5,7-dimethoxyflavone (5,7-DMF) および 5,7,4'-trimethoxyflavone (5,7,4'-TMF)の経時的な生体内変換を調べた結果、5,7-DMFから5-methylchrysinを介しchrysinに至る代謝経路と5,7,4'-TMFからthevetiaflavoneを介しapigeninに至る代謝経路がそれぞれ明らかとなった。また、5-メトキシ基と比較し、7-メトキシ基においてより迅速な脱メチル化が観察された。一方、フラボンの3-メトキシ基は加水分解されなかった。このような生体内変換により、これまで報告がない様々なフラボノイドがPMFsの脱メチル化、あるいは脱グリコシル化により産生され、新たな機能性を発揮する可能性がある。

最近、同じ研究グループから*Blautia* sp. MRG-PMF1の作用機構についていくつか報告されている<sup>15)16)</sup>。12種類のPMFsおよびCo-Corrinoid酵素の阻害剤を用いた検討から、メトキシ基を持つPMFsの脱メチル化がCo-Corrinoid酵素により触媒されていることが示唆された<sup>15)</sup>。このことは、エチル基、プロピル基など、他のアルキル基を持つケルセチン誘導体は代謝されず、

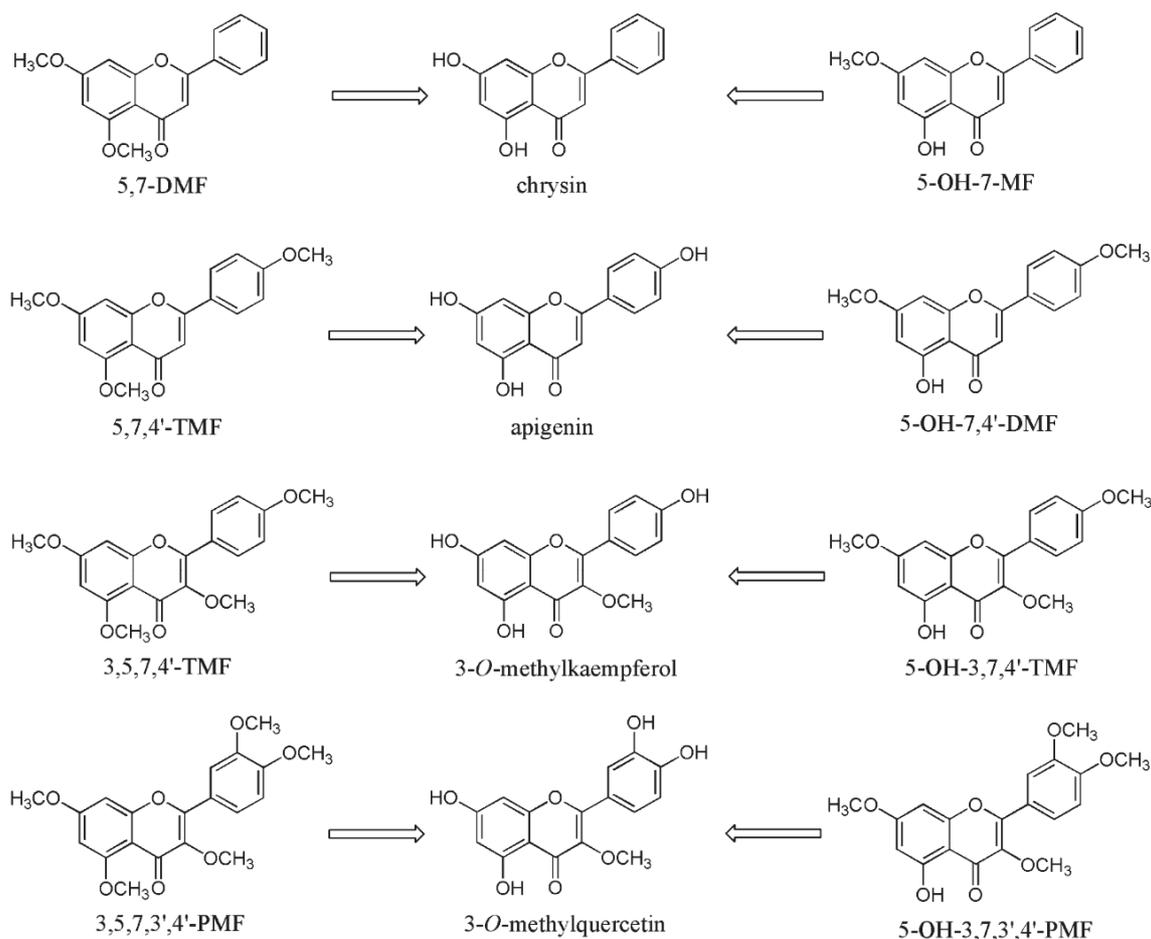


図1 *Blautia* sp. MRG-PMF1によるポリメトキシフラボノイド混合物の生物変換<sup>14)</sup>

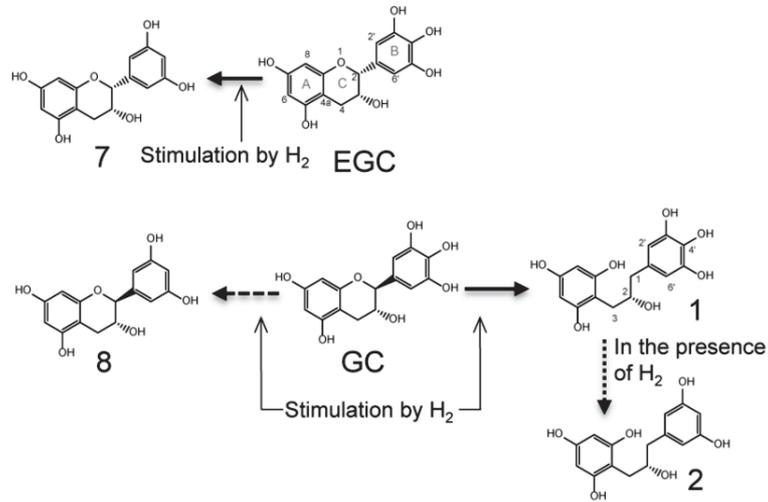
メトキシ基を持つ syringic acid および vanilic acid では速やかに代謝されたことから示された。この他、*Blautia* sp. MRG-PMF1によるクルクミノイドの脱メチル化について報告されている<sup>16)</sup>。

一方、Takagaki らの研究グループは、PMFs と異なり、メトキシ基を持たないフラボノイド類であるエピガロカテキン (ECG) およびガロカテキン (GC) がイソフラボンを代謝する腸内細菌 *Adlercreutzia equolifaciens* JCM 14793 (*Ad. equolifaciens* JCM 14793), *Asaccharobacter celatus* JCM 14811 (*As. celatus* JCM 14811), *Slackia equolifaciens* JCM 16059 (*S. equolifaciens* JCM 16059) および *Slackia isoflavoniconvertens* JCM 16137 により生体内変換されることを報告している<sup>17)</sup>。この報告では、*Ad. equolifaciens* JCM 14793 において EGC で 4'-脱ヒドロキシ化と GC で C 環の開裂が、*As. celatus* JCM 14811 において EGC で 4'-脱ヒドロキシ化と C 環の開裂、そして GC で 4'-脱ヒドロキシ化のみが、また *S. equolifaciens* JCM 16059 において EGC および GC で C 環の開裂のみが起こることが示された(図2)。さらに、*Ad.*

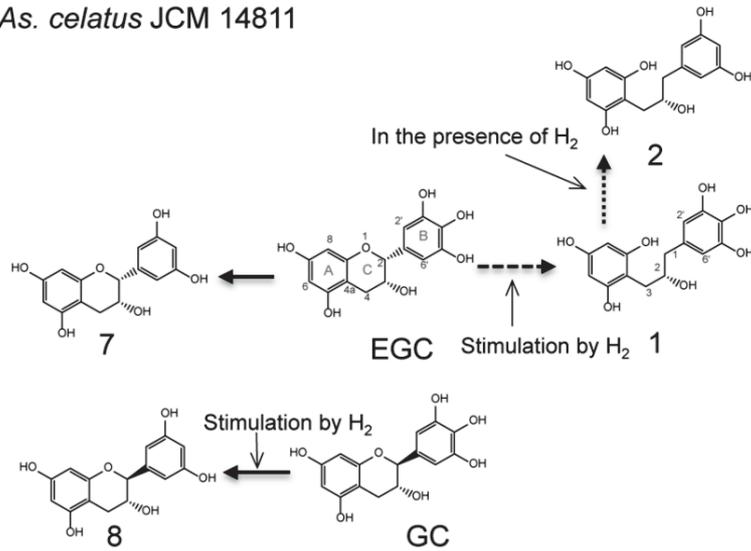
*equolifaciens* JCM 14793 および *As. celatus* JCM 14811 では、水素存在下において EGC 代謝物のピロガロール部分の *p* 位の脱ヒドロキシ化が促進されることが明らかとなった。一方、*Ad. equolifaciens* JCM 14793 および *As. celatus* JCM 14811 において、エピガロカテキンガレート、あるいはガロカテキンガレートといったガレート型カテキンから生じる没食子酸やピロガロールの *p* 位の脱ヒドロキシ化はみられなかった。また、これらの反応は *Slackia isoflavoniconvertens* JCM 16137 においては認められなかった。これらの結果は、細菌の系統によって基質および反応部位特異性が異なること、さらには同一の細菌であっても腸内環境条件により異なる代謝産物を産生する可能性を示唆している。

また、Chen らの研究グループはヒト以外での腸内細菌叢による代謝研究として、桑の実から精製した3種類のアントシアニン (cyanidin-3-glucoside, cyanidin-3-rutinoside および delphinidin-3-rutinoside) および SD 系ラットの糞便上清を混合培養し、経時的な代謝物の生成を LC-MS/MS にて同定した結果を報告している<sup>18)</sup>。

*Ad. equolifaciens* JCM 14793



*As. celatus* JCM 14811



*S. equolifaciens* JCM 16059

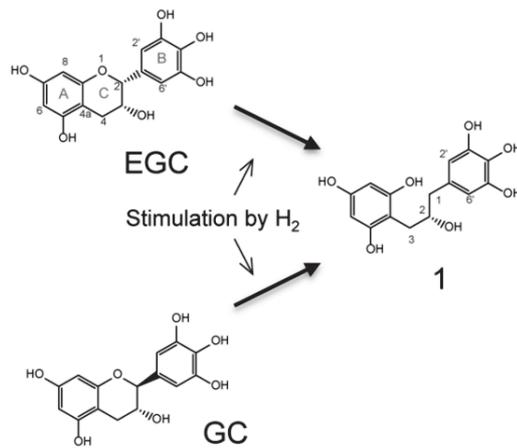


図2 イソフラボン代謝細菌によるエピガロカテキンおよびガロカテキンの生体内変換<sup>17)</sup>

この報告では、モノグルコシド結合がジグルコシド結合よりも容易に分解され、さらに B 環構造のヒドロキシ基の数に比例して急速に分解されること、幅広い種類の中間生成物および代謝物が生成することが示唆された。

本稿では、主に特定の腸内細菌における PMFs も含めたフラボノイド類の生体内変換について紹介したが、これに関わらず腸内細菌叢がヒトの健康に大きく影響することは数多くの研究から証明されており、ここに焦点を当てたメタボロミクス研究、さらには腸内細菌叢全体を網羅的に解析するメタゲノミクスが益々発展していくものと思われる。腸内細菌叢の機能を理解するためには、これらの研究から得られたデータの蓄積が重要であり、蓄積されたデータを活用することで、関連する様々な疾病の予防、治療に寄与する将来を見据えた今後の研究動向に注目していきたい。

(2018.11.22 受付)

**Key Words:** polymethoxyflavonoid, flavonoid, biotransformation, gut microbiota, demethylation

<sup>1</sup>Japan Food Research Laboratories, Tama, Tokyo 206-0025, Japan

<sup>2</sup>Laboratory of Nutrition, Graduate School of agricultural Science, Tohoku University, Sendai, Miyagi 980-8572, Japan  
Satoru Horigome<sup>1</sup>, Hitoshi Shirakawa<sup>2</sup>, Michio Komai<sup>2</sup>

<sup>1</sup>一般財団法人 日本食品分析センター

<sup>2</sup>東北大学大学院農学研究科栄養学分野  
堀籠 悟<sup>1</sup>, 白川 仁<sup>2</sup>, 駒井 三千夫<sup>2</sup>

## 文 献

- 1) Kawaii S, Tomono Y, Katase E, Ogawa K, Yano M (1999) Antiproliferative activity of flavonoids on several cancer cell lines. *Biosci Biotechnol Biochem* **63**, 896-899
- 2) Matsui T, Ito C, Itoigawa M, Okada T, Furukawa H (2009) Effect of natsudaoid isolated from Citrus plants on TNF- $\alpha$  and cyclooxygenase-2 expression in RBL-2H3 cells. *J Pharm Pharmacol* **61**, 109-114
- 3) Yuasa K, Tada K, Harita G, Fujimoto T, Tsukayama M, Tsuji A (2012) Sudachitin, a polymethoxyflavone from *Citrus sudachi*, suppresses lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in mouse macrophage-like RAW264 cells. *Biosci Biotechnol Biochem* **76**, 598-600
- 4) Horigome S, Yoshida I, Tsuda A, Harada T, Yamaguchi A, Yamazaki K, Inohana S, Isagawa S, Kibune N, Satoyama T, Katsuda S, Suzuki S, Watai M, Hirose N, Mitsue T, Shirakawa H, Komai M (2014) Identification and evaluation of anti-inflammatory compounds from *Kaempferia parviflora*. *Biosci Biotechnol Biochem* **78**, 851-860
- 5) Onozuka H, Nakajima A, Matsuzaki K, Shin RW, Ogino K, Saigusa D, Tetsu N, Yokosuka A, Sashida Y, Mimaki Y, Yamakuni T, Ohizumi Y (2008) Nobiletin, a citrus flavonoid, improves memory impairment and A $\beta$  pathology in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J Pharmacol Exp Ther* **326**, 739-744
- 6) Tsutsumi R, Yoshida T, Nii Y, Okahisa N, Iwata S, Tsukayama M, Hashimoto R, Taniguchi Y, Sakaue H, Hosaka T, Shuto E, Sakai T (2014) Sudachitin, a polymethoxylated flavone, improves glucose and lipid metabolism by increasing mitochondrial biogenesis in skeletal muscle. *Nutr Metab (Lond)*, doi:10.1186/1743-7075-11-32
- 7) Yorsin S, Kanokwiroon K, Radenahmad N, Jansakul C (2016) Increased vascular eNOS and cystathionine- $\gamma$ -lyase protein after 6 weeks oral administration of 3,5,7,3',4'-pentamethoxyflavone to middle-aged male rats. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **389**, 1183-1194
- 8) Horigome S, Yoshida I, Ito S, Inohana S, Fushimi K, Nagai T, Yamaguchi A, Fujita K, Satoyama T, Katsuda S, Suzuki S, Watai M, Hirose N, Mitsue T, Shirakawa H, Komai M (2017) Inhibitory effects of *Kaempferia parviflora* extract on monocyte adhesion and cellular reactive oxygen species production in human umbilical vein endothelial cells. *Eur J Nutr* **56**, 949-964
- 9) Horigome S, Maeda M, Ho HJ, Shirakawa H, Komai M (2016) Effect of *Kaempferia parviflora* extract and its polymethoxyflavonoid components on testosterone production in mouse testis-derived tumour cells. *J Funct Foods* **26**, 529-538
- 10) Murakami A, Kuwahara S, Takahashi Y, Ito C, Furukawa H, Juichi M, Koshimizu K, Ohigashi H (2001) *In vitro* absorption and metabolism of nobiletin, a chemopreventive polymethoxyflavonoid in citrus fruits. *Biosci Biotechnol Biochem* **65**, 194-197
- 11) Kim YH, Fujimura Y, Hagihara T, Sasaki M, Yukihiro D, Nagao T, Miura D, Yamaguchi S, Saito K, Tanaka H, Wariishi H, Yamada K, Tachibana H (2013) *In situ* label-free imaging for visualizing the biotransformation of a bioactive polyphenol. *Sci Rep*, doi:10.1038/srep02805
- 12) 宮澤陽夫, 仲川清隆, 浅井明 (2000) 天然抗酸化物質の吸収と代謝. *化学と生物* **38**, 104-114
- 13) 白井健 (2006) 大豆に含まれるゲニステイン, ダイゼインおよびその代謝産物エクオールの分子生物学的薬理作用の検討およびその生体内濃度の臨床的意義. *大豆たん白質研究* **9**, 153-157
- 14) Kim M, Kim N, Han J (2014) Metabolism of *Kaempferia parviflora* polymethoxyflavones by human intestinal bacterium *Bautia* sp. MRG-PMF1. *J Agric Food Chem* **62**, 12377-12383
- 15) Burapan S, Kim M, Han J (2017) Demethylation of polymethoxyflavones by human gut bacterium, *Bautia* sp. MRG-PMF1. *J Agric*

- Food Chem* **65**, 1620-1629
- 16) Burapan S, Kim M, Han J (2017) Curcuminoid demethylation as an alternative metabolism by human intestinal microbiota. *J Agric Food Chem* **65**, 3305-3310
- 17) Takagaki A, Nanjo F (2015) Biotransformation of (-)-epigallocatechin and (-)-gallocatechin by intestinal bacteria involved in isoflavone metabolism. *Biol Pharm Bull* **38**, 325-330
- 18) Chen Y, Li Q, Zhao T, Zhang Z, Mao G, Feng W, Wu X, Yang L (2017) Biotransformation and metabolism of three mulberry anthocyanin monomers by rat gut microflora. *Food Chem* **237**, 887-894