



研究員
及川 大樹

・経歴
2022年 東北大学大学院 博士課程修了
2022年 京都大学大学院
日本学術振興会 特別研究員 (PD)
2025年 京都大学大学院 博士研究員

ポリフェノール化合物によるインドール産生抑制の 機能解析およびその代謝性の評価

1. 研究背景

インドキシル硫酸は生体内において酸化ストレスの発生を誘導し、細胞の線維化や腎機能低下など、ヒトの健康機能を低下させる事例が多く報告されている¹⁾。インドキシル硫酸は、ヒト腸内細菌由来の酵素：トリプトファンインドールリアーゼ (TIL) によって産生する²⁾。インドールはそのほとんどが食餌成分に含まれるアミノ酸を由来とすることから、実験者は、腸内細菌由来の同代謝の制御を通じて、生体内におけるインドキシル硫酸の蓄積を抑制させようと試みた。

実験者のこれまでの研究により、フラボノイドやリグナンなどのポリフェノールと称される化合物の多くが TIL 酵素に対して阻害活性を有することが確認された。これらのうち、特に、フロレチンが TIL の酵素活性を強力に阻害することを見出した (未発表データ)。フロレチンはリンゴをはじめとする食用植物に含まれるポリフェノール化合物で、ヒトへの健康機能性に関する報告も多く存在する³⁾。そのため、これらの成分を日常的に摂取することにより腸内でのインドールの生成を抑制できるのではないかと考えた。本研究ではその応用性を評価するため、フロレチンによる腸内細菌のインドール生成に対する抑制効果とその機序について *in vitro* で解析を行った。

2. 研究方法

2.1 酵素反応の速度論解析

酵素反応の速度論解析の手法を用いて、フロレチンによる酵素への阻害効果を検証した。基質であるトリプトファンと大腸菌の TIL を含む反応液にフロレチンを添加し、反応後の反応液中のインドールを定量した。反応液に含まれるトリプトファンの濃度を変化させ、各定量結果を酵素反応の速度論解析に用いられるミカエリス-メンテンの式に代入することにより、酵素への阻害定数を算出した。また、同式の逆数プロットを用いて阻害様式を推定した。後述のチロシンフェノールリアーゼ (TPL) 酵素を用いた速度論解析では、基質である

チロシンと *Pantoea agglomerans* 由来の TPL を含む反応液を用いて同様に反応試験を行った後、反応後の反応液中のフェノールを定量することで、同様に阻害定数および阻害様式を解析した。

2.2 菌体によるインドール生成に対する抑制効果

フロレチンを用いて、菌体由来のインドール生成に対する抑制効果を検証した。はじめに、*tii* の相同遺伝子を保有するような菌種を網羅的にスクリーニングした。スクリーニングでは、各菌種の基準株を菌株保存機関より購入して用いたほか、実験者の所属機関に保有するヒト糞便からの分離株を使用した。同菌株を、TIL の基質となるトリプトファンを含む反応液中で嫌氣的に反応させ、反応後の反応液に含まれるインドールを定量して、インドールの生成活性を菌種間で比較した。次に、代表的な菌株を用いて、前述の反応液にフロレチンを終濃度 200 μM となるように加えて同様に反応させ、フロレチンの存在下・非存在下で反応液中での菌体によるインドールの生成活性を比較した。

2.3 腸内細菌によるフロレチンの代謝性および菌体の生育への影響

2.2 で使用した反応液について、反応開始の前後で反応液に含まれるフロレチンの濃度をそれぞれ定量し、反応液に含まれる菌体によるフロレチンの分解活性を確認した。また、反応後の反応液の一部を十分に懸濁して、GAM 寒天培地に塗布して 1~3 日間嫌氣的に静置させ、静置後の寒天培地上に生育するコロニーをカウントし、これを培地間で比較することで、フロレチンの添加が菌体の生育に与える影響を評価した。

3. 結果と考察

3.1 酵素反応の速度論解析

酵素反応の速度論解析により、フロレチンによる TIL 酵素の阻害効果を定量的に算出した。酵素反応におけるミカエリス-メンテンの式を用いて速度論パラメータを算出した結果、フロレチンによる大腸菌由来の TIL 酵素に対する阻害定数は 23.7 μM と算出され (図 1)、既往の植物由来の TIL 阻害剤と同程度の阻害活性を有することが確認された^{4,5)}。同式を用いた両逆数プロットによる阻害様式の推定の結果、フロレチンは基質と競合する形で大腸菌の TIL を阻害することが示唆された。また、フロレチンは TIL のみならず、細菌由来のチロシンフェノールリアーゼ (TPL) 酵素に対しても阻害活性を発揮し、アミノ酸由来のフェノールの生成を阻害することが確認された。フェノールから代謝されて生じるフェニル硫酸は、インドキシル硫酸と同様に腎機能悪化等の健康機能性低下を誘引することが知られるため⁶⁾、フロレチンによる同代謝の制御も健康機能性の低下防止に資すると考える。フロレチンによる TPL に対する阻害定数は 181 μM と算出され、阻害様式は TIL の場合と同様に基質と競合するような阻害様式であると推定された。

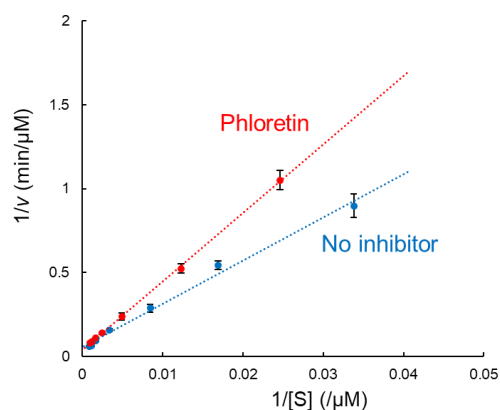


図1. 大腸菌の TIL 酵素反応における速度論解析の両逆数プロット
赤：フロレチン存在下、青：フロレチン非存在下での酵素反応 ($n=3$)。

3.2 菌体によるインドール生成に対する抑制効果

til の相同遺伝子を保有する種々の腸内細菌種について、インドールの生成活性を確認したところ、特に腸内細菌科に属する菌種において、インドールを生成する菌種が多いことが確認された。加えて、バクテロイデス属細菌でもインドールの生成活性を有する菌種が散見された。

これらのうち代表的な菌種について、各菌種によるインドール生成活性に対し、フロレチンを用いたその抑制効果を検証した。TIL の基質となるトリプトファンを含む反応液に、インドール生成活性が確認された各菌種およびフロレチンを添加して嫌氣的に反応させ、反応後の反応液に含まれるインドールを定量し、その結果をフロレチンの存在下・非存在下の場合で比較した。解析の結果、フロレチンは *Citrobacter koseri*、*Kluyvera intermedia*、*Morganella morganii*、および、*Providencia alcalifaciens* によるインドールの生成をそれぞれ有意に低下させた (図2)。この結果を受けて、フロレチンは菌種の種類によらず *til* の相同遺伝子を保有する種々の菌体に対して、そのインドールの生成活性を抑制する効果を発揮することが確認された。

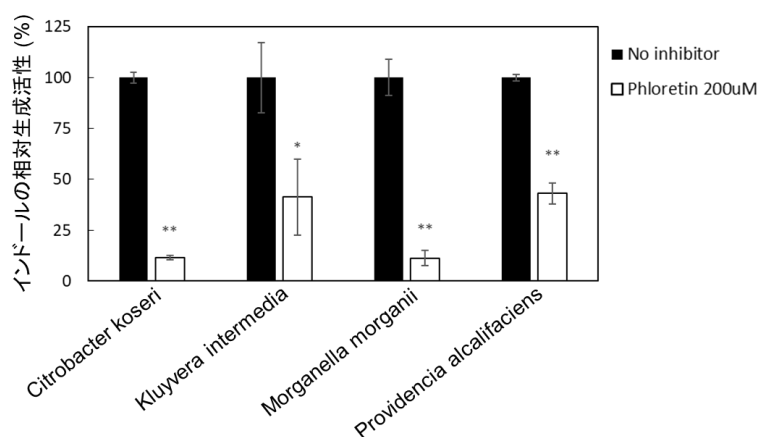


図2. フロレチン存在下・非存在下での種々の細菌種におけるインドール生成活性
(* , $p < 0.05$; ** , $p < 0.01$ assessed by Student *t*-test, $n=3$)

3.3 腸内細菌によるフロレチンの代謝性および菌体の生育への影響

3.2で使用した反応液に含まれるフロレチンを定量し、その濃度を反応の前後で比較した。その結果、検証を行った各菌株について、いずれも反応の前後でフロレチンの濃度に有意な差は確認されなかったことから、同反応条件においてフロレチンは菌体による代謝は受けずに反応液中に残存することが示唆された。また、反応後の反応液の一部を寒天培地に塗布して嫌気条件下で静置させ、寒天培地上に生成するコロニー数を算出したところ、コロニー数について、フロレチンの存在下・非存在下で有意な差は確認されなかった。そのため、前述の結果と併せて、フロレチンは反応液中において菌体の生育に影響を与えず、TILの酵素活性を阻害することにより、菌体によるインドールの生成を抑制したことが窺える。ただし、一部の細菌の反応液を塗布した寒天培地では、フロレチン含有培地でのコロニー数が非含有培地でのコロニー数と比較して減少傾向であることが確認されたことから、フロレチンは一部の細菌の生育を抑制する可能性があるが、今回確認された結果が反応条件によるものであるか、フロレチンの濃度依存的なものであるか等について、今後は詳細な解析が必要と考える。

4. 謝辞

本研究の実施にあたり、ご支援を賜りました公益財団法人サッポロ生物科学振興財団ならびにご関係の皆様には衷心より御礼申し上げます。

5. 引用文献

- 1) Niwa, T. (2010). Uremic toxicity of indoxyl sulfate. *Nagoya J Med Sci.* 72, 1-11.
- 2) Phillips, R. S. *et al.*, (2014). The role of substrate strain in the mechanism of the carbon-carbon lyases. *Bioorg Chem.* 57, 198-205.
- 3) Casarini, T. P. A. *et al.*, (2020). Dermatological applications of the flavonoid phloretin. *Eur J Pharmacol.* 889, 173593.
- 4) 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.
- 5) Oikawa, D. *et al.*, (2025). Suppression of fecal phenol production by oral supplementation of sesamol: inhibition of tyrosine phenol-lyase by sesamol. *Food Funct.* 16, 3542-3552.
- 6) Kikuchi, K. *et al.*, (2019). Gut microbiome-derived phenyl sulfate contributes to albuminuria in diabetic kidney disease. *Nat. Commun.* 10, 1835.