

<平成 27 年度助成>

ヒト腸内細菌叢によるクルクミン代謝に関する研究

丹羽 利夫¹⁾・横山 慎一郎²⁾

(¹⁾ 修文大学 健康栄養学部、²⁾ 岐阜県産業技術センター 食品部)

目的

近年、腸内細菌が生体に及ぼす影響が示唆されてきている。その一方で、菌あるいは物質レベルでの解明についてはまだ十分とは言えないのが現状である。

そのような中、筆者らも大豆イソフラボノイドのヒト腸内細菌に関する研究を進め、代謝産物の化学構造ならびに生理機能について検討してきた¹⁾。また、これらの代謝においてみられるような二重結合の還元・カルボニルの還元・脱メチル化といった代謝反応により、他のポリフェノールも代謝できるのではないかと考えた。そこで、近年その生理機能が世界中で注目されるとともに、上述の三つの代謝反応が起こる可能性のあるクルクミンについて研究することにした。

本研究においては主に以下の2点について検討を行った。

- 1 ヒト由来大豆イソフラボノイド代謝菌 (SY8519 株, YY7918 株) によるクルクミン代謝
- 2 ヒト腸内細菌によるクルクミン代謝

1. ヒト由来大豆イソフラボノイド代謝菌 (SY8519 株, YY7918 株) によるクルクミン代謝

当初、クルクミン、テトラヒドロクルクミンの HPLC 分析がうまくいかなかったため、まず菌を含む Gifu Anaerobic Medium (GAM) 500 ml に 50 μ M となるようクルクミンを添加し、培養したものを酢酸エチルで抽出し、TLC により分析した。その結

果 YY7918 株ではほとんど反応が生じていないのに対し、SY8519 株ではテトラヒドロクルクミンと思われるスポットが確認された。そこで、まずは分取 TLC による精製により実際の重量を測定することにした。10 mM クルクミン溶液を与え、最終濃度 50 μ M とした GAM 500 ml に SY8519 株を添加し、嫌気条件下 37 $^{\circ}$ C で 4 日間培養したものを酢酸エチルにより抽出した後、分取 TLC により精製した。精製をしたものの TLC の結果を Fig.1 に示す。

TLC を UV254 nm で観察後、リンモリブデン酸エタノール溶液でスポットを観察した。Fig.1 では T (テトラヒドロクルクミンの標品)、MT (テトラヒドロクルクミンの標品と精製したテトラヒドロクルクミンのミックス)、Te (精製したテトラヒドロクルクミン) を比較すると、ほぼ同じ発色時間で同位置にスポットが確認でき、テトラヒドロクルクミンが確認できた。また粗抽出液にマイナーなスポットが存在していたことから、クルクミンの分解産物として報告があるフェルラ酸と比較した。F (フェルラ酸

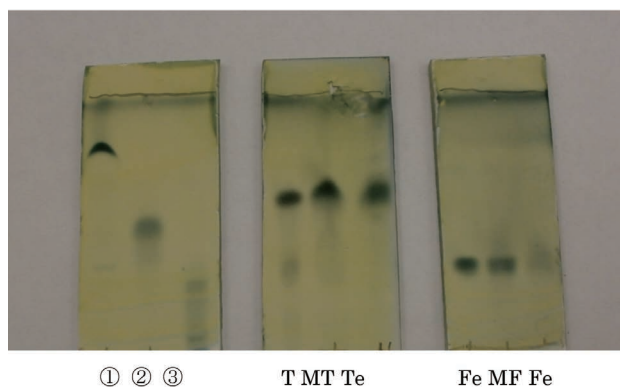


Fig.1 SY8519 株によるクルクミンの代謝反応生成物の TLC (発色: リンモリブデン酸)
T: テトラヒドロクルクミン標品、MT: テトラヒドロクルクミンの標品と精製したテトラヒドロクルクミンのミックス、Te: テトラヒドロクルクミン相当部分精製サンプル
フェルラ酸についても同様

の標品)、MF (フェルラ酸の標品と精製したフェルラ酸のミックス)、Fe (精製したフェルラ酸) を比較すると、Fe にもフェルラ酸が少量ながら含まれていることが示唆された。なお Fig.1 において①②③はテトラヒドロクルクミン、フェルラ酸以外の回収画分であり、菌を添加しない場合にも観測されたことから、現時点でこれらは培地等に由来する成分と考えられる。

同様に培地のみでクルクミンを培養したもので、Fig.1 と同じく分取 TLC により精製したのもでもフェルラ酸と思われるスポットを確認できたことから、フェルラ酸生成は菌の代謝によるものではなく、自然分解により生じることが示唆された。

クルクミンの自然分解物はいくつか報告されており、その中にフェルラ酸も含まれる。ただフェルラ酸は酸化的条件下でクルクミンから生成すると考えられるが、今回、嫌氣的培養条件下かつチオグリコール酸を含むような培地においても確認された。この点について坂元ら²⁾はフェルラ酸の生成が溶存酸素と反比例すると報告しており、フェルラ酸生成は酸化のみでは説明できないと考えられる。いずれにせよ、食べ残しを含め、カレーなどにおいても一晩寝かせることによりクルクミンからフェルラ酸への変換が生じているものと推察される。

分取 TLC による重量測定の結果、クルクミン 9.2 mg を添加した腸内細菌 SY8519 株を含む培地 500 ml に対して、5.3 mg のテトラヒドロクルクミン、1.5

mg のフェルラ酸が代謝産物として精製できた。また、菌なし培地 500 ml より 2.3 mg のフェルラ酸が得られた。これらのことから、クルクミンは腸内細菌 SY8519 株によりテトラヒドロクルクミンに代謝されることが分かった。また、菌なしの結果から、クルクミンは SY8519 株を含む状態よりも培地のみの方がフェルラ酸への自然分解が進むことが考えられる。この原因としては、テトラヒドロクルクミンからのデヒドロフェルラ酸への変換が行われにくいと推測されるが、詳細は不明である。

さらに詳細な検討のため HPLC 分析を行ったところ、分取 TLC で精製したサンプルにおいて標品とほぼ同じ 13.1 分にピークが確認できたことから、TLC で確認できた通り、SY8519 株はクルクミンをテトラヒドロクルクミンに代謝することが確認された (Fig. 2)。しかし他にも多くのピークがみられており、面積比からテトラヒドロクルクミン量を算出したところ、2.2 mg となった。真空乾燥時の重量 5.3 mg と比較すると、約 40% になる。ただし、今回用いた標品テトラヒドロクルクミンの HPLC 分析では、ベースラインの盛り上がりや、不純物の存在もみられており、十分な精度で定量できたとは考えていない。とはいえ、少なくとも SY8519 株によりクルクミンからテトラヒドロクルクミンが生成されることが明らかとなった。なお、菌なし培地のみではテトラヒドロクルクミンに相当するピークはみられなかった。

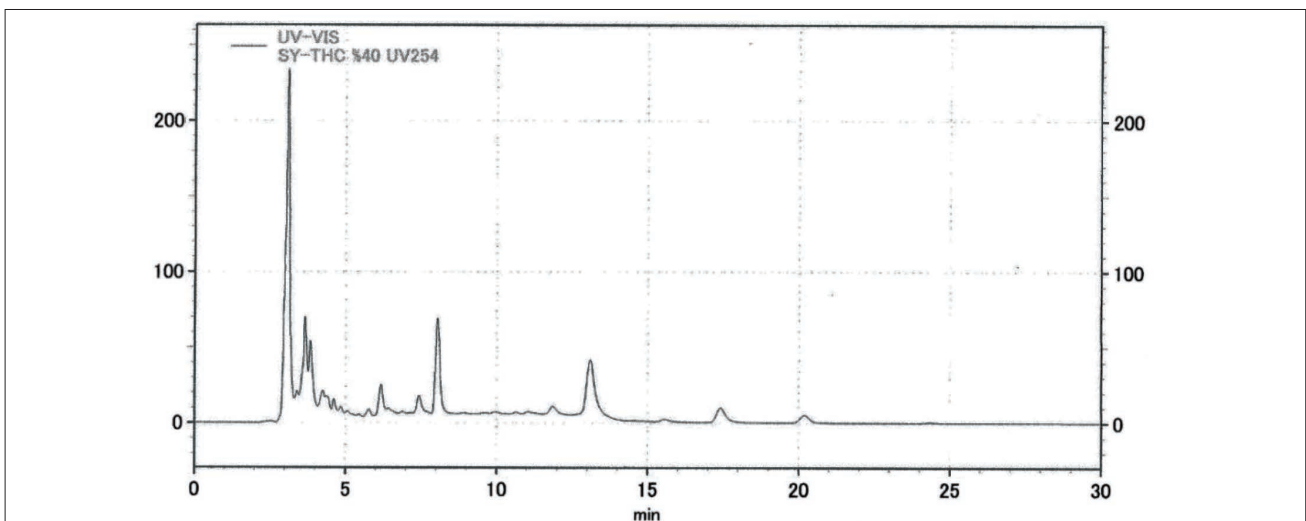


Fig.2 SY8519 株によるクルクミン代謝産物 (テトラヒドロクルクミン) の HPLC 結果

フェルラ酸についても同様に行い HPLC で測定したところ、フェルラ酸と考えられるピークが確認できた。TLC でも確認できた通り、菌なし培地での培養で、クルクミンは自然分解によりフェルラ酸を産生することが確認された。しかしながら他のピークもあり、分取 TLC 精製サンプル中には不純物も含まれていたことが確認された。

次に、クルクミンおよびその代謝産物の活性比較を行うため、クルクミンの生理機能として報告されている³⁾ Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1) への影響について、マウス脂肪細胞を用いて実験を行った (Fig. 3)。なお実験操作に関しては市販の ELISA kit を leptin から MCP-1 に変更したのみで、既報¹⁾ に準じて行った。

フェルラ酸についてはデータにばらつきがあり記載していないが、クルクミンおよびテトラヒドロクルクミン間で有意な差はないものと考えられる。またこの点については、control にもばらつきがあるため、次項で記載する代謝産物も含め、今後さらに検討が必要だと考えている。

今回観測されたような腸内細菌によるクルクミンからテトラヒドロクルクミンへの変換については、その酵素を含め報告がされており⁴⁾、このような変換が腸内細菌によって広く行われる可能性があるが、その代謝による生理機能変化については *in vitro* の評価が多く、今後フェルラ酸あるいは後述の代謝産物への変換に伴う生理機能を含めて明らかにしていく必要がある。

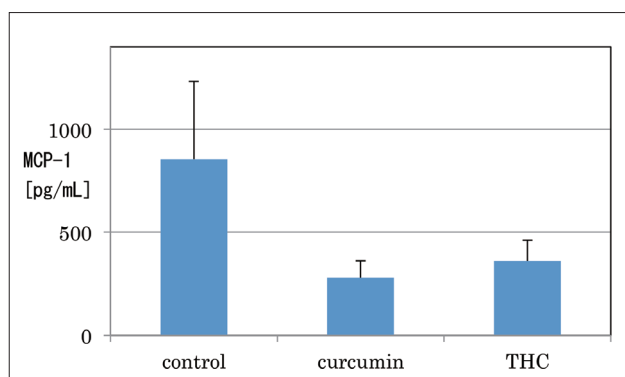


Fig.3 クルクミンおよびテトラヒドロクルクミン (THC) の MCP-1 低下作用

2. ヒト腸内細菌によるクルクミン代謝

テトラヒドロクルクミン以外の新たなクルクミンのヒト腸内細菌代謝産物の探索を行うため、ヒト糞便中腸内細菌をクルクミンと培養した。その中で 1C と名付けた細菌サンプルをクルクミンと培養することにより、TLC 上新たな生成物を確認した (Fig. 4a)。そこでこの生成物の精製・構造解析を行うことにした。

なお、1C は希釈と 96 穴プレートでの培養をしながら精製を進めたものであるが、現時点では Fig.5 に示すような 2 種類 (以上) の菌を含むことが分かっている。この点については後述のように、最近まで代謝産物の HPLC 分析条件を確立することができず、大量培養して抽出・TLC を行う必要があったため、うまく進めることができなかったことが大きな要因である。しかしながらその後 HPLC 分析条件が進展したため、今後、菌の単離を進める予定である。

腸内細菌群 1C とクルクミンを培養後、酢酸エチルで抽出し、分取 TLC および分取 HPLC で精製を行った。しかし、分取 HPLC では精製後、カラムをメタノール洗浄したところに生成物が存在していた。この原因としては同じ ODS ではあるものの、分析カラムと分取カラムのメーカーが異なることによる特性の違い、あるいはいずれかのカラムの劣化という可能性が考えられたが、現時点で詳細は不明である。しかしながらこのようにして得られたものは、Fig.4b のように TLC 上ほとんど不純物がみられなかったため、¹H NMR (400 MHz, acetone-d₆) の測定を行った。この結果から得られた代謝産物はクルクミンと

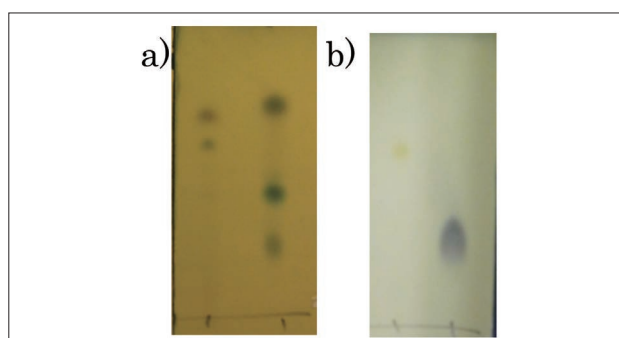


Fig.4 クルクミン代謝産物の TLC
a) 左からクルクミン、粗抽出物 b) 左からクルクミン、分取 HPLC 後メタノール回収品

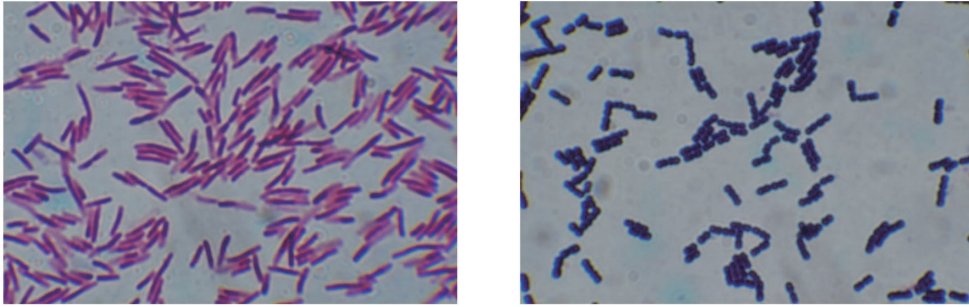


Fig.5 1C サンプル中の微生物顕微鏡写真 (染色)

比べ、

- ・トランスの二重結合が消失
- ・OCH₃ 由来のシグナルが消失
- ・カルボニルの α 位のメチレンが消失 (ベンゼン環の消失がないことから)
- ・分子の対称性が消失 (ベンゼン環のプロトンがきれいに出不いことから)
- ・3.30 ppm に 1H のシグナルが存在する

ことが示唆された。そこで、この代謝産物として Fig.6 のような構造を考えた。さらにこの化学構造を検証するため LC-MS/MS (AB Sciex, 3200 QTRAP) の測定を行ったところ [M - H]⁻により m/z 331 が確認できた。これは C₁₉H₂₄O₅ の推定構造を支持する結果であった。

このような、主鎖のカルボニル基を失った骨格を持つクルクミノイド代謝産物の報告は存在している^{5, 6)}。しかしながら、さらに文献を調べる必要があるものの、この代謝産物は現時点で報告がみつからないため、今後は高分解能マススペクトルや二次元 NMR も視野に入れ、さらにデータをそろえる必要がある。

さらにこれまで筆者らが行ってきた大豆イソフラボノイドの代謝研究同様、クルクミンとその代謝産物の生理機能の比較を行いたいと考えている。またこの代謝産物に関連して上記の生理機能変化はもち

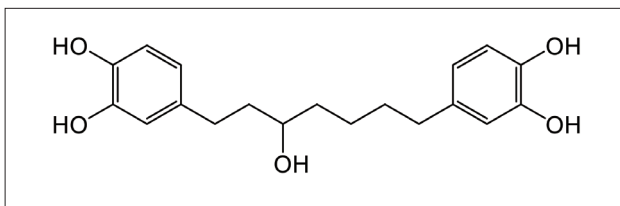


Fig.6 クルクミン代謝産物推定構造

ろんのこと、

- ・アルコール部分の立体選択性
- ・中間体の化学構造解析を含めた代謝経路
- ・ヒト生体内で生成しうるか (どれくらいのヒトで確認されるか)
- ・代謝に関与する真の菌の特定

といったことが今後の検討課題であり、将来的にはこのようなクルクミンや大豆イソフラボノイド代謝を指標とした、腸内細菌叢の違いによる疾病リスクの解明につなげたいと考えている。

謝 辞

本研究を行うにあたり、多大なご援助を賜りました公益財団法人 浦上食品・食文化振興財団に厚く御礼申し上げます。

またテトラヒドロクルクミンサンプルをご提供いただくとともに、LC-MS/MS 測定にもご協力いただいた愛知学院大学 大澤俊彦教授ならびに望月美佳助教に深謝いたします。

参考文献

- 1) Niwa, T., Yokoyama, S., Ito, T., Osawa, T., Reduction of leptin secretion by soy isoflavonoids in murine adipocytes in vitro. *Phytochem. Lett.*, 3, 122 (2010).
- 2) 坂元 (佐々木) 文歩, 佐藤恭子, 阿部雅美, 米谷民雄 クルクミン類の光安定性に及ぼす溶存酸素の影響, *日本食品化学学会誌* 5, 211 (1998).
- 3) Jain, S.K., Rains, J., Croad, J., Larson, B., Jones, K., Curcumin supplementation lowers TNF- α , IL-6, IL-8, and MCP-1 secretion in high glucose-treated cultured monocytes and blood levels of TNF- α , IL-6, MCP-1, glucose, and glycosylated hemoglobin in Diabetic rats. *Antioxid. Redox Signal.*, 11, 241 (2009).
- 4) Hassaninasab, A., Hashimoto, Y., Tomita-Yokotani, K.,

Kobayashi, M., Discovery of the curcumin metabolic pathway involving a unique enzyme in an intestinal microorganism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 108, 6615 (2011).

- 5) Zang, Y., Qiu, F., Liu, Y., Qu, G., Yao, X., Isolation and identification of phase 1 metabolites of demethoxycurcumin in rats. *Drug. Metab. Dispos.*, 35, 1564 (2007).
- 6) Li, J., Wei, J-Q., Wang, K., Chen, L-X., Yao, X-S., Qiu, F., Isolation and identification of phase 1 metabolites of demethoxycurcumin in rats. *Planta Med.*, 78, 1351 (2012).

Study of the curcumin metabolism by human intestinal bacteria

Toshio Niwa¹⁾, Shin-ichiro Yokoyama²⁾

¹⁾*Faculty of Health and Nutrition, Shubun University*

²⁾*Department of Food Technology Industrial Technology Center,
Gifu Prefectural Government*

We studied the metabolism of curcumin using two soy isoflavonoid-metabolizing bacteria, strains YY7918 and SY8519. The equol producing bacterium, YY7918, did not metabolize curcumin, except for producing a small amount of the degradation product, ferulic acid. On the other hand, strain SY8518 produced tetrahydrocurcumin. We then examined the activity of curcumin and related compounds for the production of Monocyte Chemoattractant Protein-1 *in vitro*. Tetrahydrocurcumin exhibited an activity similar to that of curcumin in murine adipocytes. We also attempted to isolate other metabolite(s) of curcumin via incubation with human feces. One bacterial sample, named 1C, produced metabolites other than tetrahydrocurcumin from curcumin. We purified one metabolite that lost the ¹H NMR signals corresponding to the *trans*-double bonds and OCH₃. We also analyzed the profiles using TLC and measured the mass spectrum of the metabolites. Based on the results, we considered that the structure is 3-hydroxy-1,7-bis(3,4-dihydroxyphenyl) heptane.