

イソフラボン腸内細菌代謝産物S-エコールの雌性特異的食欲低下作用の機構解明
—液体クロマトグラフィー-四重極-飛行時間型質量分析を用いた
雌ラット胆汁中 S-エコール抱合体の同定—

藤谷美菜*・小林拓広・岸田太郎

愛媛大学大学院農学研究科生命機能学専攻応用生命化学コース栄養科学教育分野

**Mechanism of Female-Specific Anorectic Effect of the Microbial-Derived
Isoflavone Metabolite *S*-equol
—Identification of *S*-equol Conjugates in Bile of Female Rat using Liquid
Chromatography-Electrospray Ionization Quadrupole Time-of-Flight Mass
Spectrometry Analysis—**

Mina FUJITANI*, Takuhiro KOBAYASHI and Taro KISHIDA

Department of Biological Resources, Faculty of Agriculture, Ehime University,
Matsuyama 790-8566

ABSTRACT

Appetite control is an effective approach for obesity and its comorbidities. In the previous study, we have shown that *S*-equol produced by the intestinal microbiota after ingestion of its precursor daidzein, an isoflavone present in soy, decreases food intake specifically in female rats. Although *S*-equol is an estrogen receptor β agonist, anorectic effect of estradiol is more pronounced in male rats than in female rats. It is possible that their anorectic effects may be mediated by different mechanisms. Previous studies from our and other laboratories indicated that *S*-equol metabolizes to glucuronide and sulfate conjugates in liver and small intestine and undergoes an efficient enterohepatic circulation. Furthermore, we performed a procedure in which bile taken from female donor rats fed the daidzein diet was infused into the duodenum in other female rats fed the control diet. The bile infusion significantly decreased food intake in female rats, suggesting that the *S*-equol metabolites in bile induced the anorectic effect. Conjugate forms of *S*-equol have been determined in rat plasma and urine, but not bile. In this study, bile samples were collected after feeding of daidzein diet for 2 weeks in male and female Sprague-Dawley rats. Bile samples were subjected to direct electrospray ionization quadrupole time-of-flight mass spectrometry (ESI-Q-TOF-MS/MS) analysis for the identification of *S*-equol metabolites. MS fragmentation

*〒790-8566 松山市樽味3-5-7

patterns indicated that S-equol metabolites in bile were the 7-sulfate conjugate and the 4'-glucuronide conjugate in female rats. One or both of these conjugates may contribute to the anorectic effect. We speculated that female specific S-equol conjugates contribute to the anorectic effect, but S-equol 7-sulfate and the 4'-glucuronide were also detected in bile of male rats. Further studies are needed to determine whether sex differences in the conjugation of S-equol are associated with the female-specific anorectic effect. *Soy Protein Research, Japan* **21**, 159-166, 2018.

Key words : soy isoflavone, daidzein, equol, conjugate, appetite, enterohepatic circulation

肥満は世界的に大きな健康問題である。食欲のコントロールはその効果的なアプローチであるが、長期間食欲をコントロールし続けることは容易ではない。理想的な肥満治療法の確立のために食欲調節機構の全容解明が必要だと考えられ、研究が続けられている。我々は主要な大豆イソフラボン・ダイゼインを雌ラットに与えると、食欲低下を引き起こすこと、レプチン受容体の変異やエストロゲン欠乏による過食性肥満ラットでも長期に渡って食欲と体重を低下させることを明らかにしている¹⁻³⁾。この作用機構を解明することは、食欲調節機構のさらなる理解と、新規の肥満治療法の確立に寄与するものであると考えられる。

ダイゼインを摂取した雌ラットでは、血中濃度はダイゼインよりもその腸内細菌代謝物S-エコールの方がはるかに高いこと¹⁻³⁾、S-エコールの混餌投与（150 mg/kg飼料）でも同様の雌特異的な効果がみられたことから、食欲低下作用の作用物質はS-エコールであることが示唆された。S-エコールはエストロゲン受容体 β の選択的アゴニストであることが示されており⁴⁻⁵⁾、中枢神経系のエストロゲン受容体 β がエストラジオールの食欲低下作用に関与することが報告されている⁶⁾。しかし、我々の以前の研究で、ダイゼインおよびS-エコール混餌投与（150 mg/kg飼料）とエストラジオール皮下投与（4.2 μ g/day/rat）の作用を比較したところ、エストラジオールの食欲低下作用は雌よりも内因性エストロゲン分泌の少ない雄でより顕著にみられ、S-エコールによる食欲低下は単純にエストロゲン受容体 β を介して引き起こされるわけではなく、未知の機構で引き起こされている可能性が示された。

雌ラットにS-エコールを混餌投与した場合、投与開始後数日間は有意な食欲低下がみられなかったことから、この期間に起こる何らかの変化が本効果の発現に重要であると推測し、S-エコールの体内分布の変化を摂取開始から5日目まで調べたところ、S-エコールは体循環中に比べてはるかに多く腸肝循環中に存在して

おり、S-エコールの胆汁中濃度は数日の摂取によって次第に上昇していくことが明らかとなった。さらに、我々はダイゼインを投与された雌ラットの胆汁を、ダイゼインを投与されていない雌ラットの十二指腸より注入したところ、注入11時間後以降で飼料摂取量が有意に低下したことを報告した⁷⁾。小腸は、食欲抑制性消化管ホルモンを分泌することにより食欲調節に関与することがよく知られており、フラボノイド類が小腸上皮細胞を刺激し、消化管ホルモンの分泌に影響を与えるかもしれないと考えられている^{8,9)}。ダイゼインを摂取した雌ラットの胆汁中に食欲低下作用の鍵となるS-エコール代謝物が存在し、それが小腸で作用することにより、食欲低下効果が引き起こされるのかもしれない。吸収されたS-エコールのほとんどは、肝臓や小腸で代謝され、血液および尿中でグルクロン酸抱合体や硫酸抱合体として存在することが既に報告されている^{10,11)}。ラット胆汁中にどのようなS-エコール抱合体が存在するのかは不明であった。そこで本研究では、四重極-飛行時間型質量分析計（Q-TOF-MS/MS）を用い、雌ラット胆汁中に存在する主なS-エコール抱合体タイプを推測した。また、それらが雌特異的食欲低下作用に関与しているかもしれないと考え、雄ラット胆汁中にも存在するのかを検討した。

方 法

1. 飼育および胆汁採取の方法

6週齢の雌雄SD系ラットをコントロール飼料（C飼料, AIN93G組成）またはダイゼイン添加飼料（D飼料, 300 mg/kg飼料）で2週間飼育した（各々雄C飼料摂取群8匹, 雄D飼料摂取群25匹, 雌C飼料摂取群8匹, 雌D飼料摂取群28匹）。飼料摂取量を毎日記録した。最終日に胆汁を1.5 mL採取し、分析まで-60°Cで保存した。

Table 1. Parameters of analysis condition

Parameters	Conditions
Instrument	Q-TOF-MS/MS (XEVO G2-S qTOF)
Ionization mode	Electrospray ionization, negative-ion mode
Capillary voltage	2,500 V
Desolvation temperature	450°C
Cone Gas	50 L/h
Desolvation Gas	1,000 L/h
Collision energy	15-30 eV

Table 2. The proposed S-equal conjugate

	Exact mass (u)
Aglycon	242.094
Monoglucuronide conjugate	418.126
Monosulfate conjugate	322.051
Diglucuronide conjugate	594.158
Disulfate conjugate	402.008
Sulfate-glucuronide diconjugate	498.083

2. 胆汁中S-エコール抱合体の同定

Q-TOF-MS/MS (XEVO G2-S qTOF, ウォーターズ)を用いた。イオン化, MS測定, MS/MS測定条件は既報¹⁰⁾をもとに決定した (Table 1)。雌ラットの胆汁中からS-エコール代謝物を0.1%ギ酸-アセトニトリルで抽出し, クロマト分離を介さず, 負イオン検出のエレクトロスプレーイオン化 (ESI) による質量スペクトルを測定した。各種S-エコール抱合体の計算精密質量と測定精密質量の一致するイオンが検出された場合, 同位体イオン比, 同位体イオン質量差を理論値と比較し, 雌ラット胆汁中の主なS-エコール抱合体を推測した。次に, 雌雄のラットの胆汁から同様にS-エコール代謝物を抽出し, クロマト分離を介さず, MS/MS装置に導入し, S-エコールモノ硫酸抱合体由来およびS-エコールモノグルクロン酸抱合体由来と推測された脱プロトン化イオンに関して, 衝突誘起解離 (CID)を用いた断片化処理を行い, 得られたフラグメント情報を既報¹⁰⁾およびラセミ体エコール標品の場合と比較することにより胆汁中S-エコール抱合体の構造を推測した。

3. 統計方法

体重および飼料摂取量は各群の平均値 ± 標準誤差で表し, unpaired *t*-testを用いて比較した。 $p < 0.05$ をもって有意とした。

結果と考察

我々の以前の研究^{1, 2)}と同様に, ダイゼイン摂取によって雌特異的に飼料摂取量が有意に減少した (Fig.

1)。このラットの胆汁からS-エコール代謝物を抽出し, クロマト分離を介さず直接MS装置に導入し, 測定した。分子組成式を推定するにあたり, 質量と同位体パターンが候補を絞り込む要素である。そこで, Table 2に示した各種S-エコール抱合体の脱プロトン化イオンの計算精密質量と測定精密質量の一致するイオンを検索し, それらについて同位体イオン比, 同位体イオン質量差を理論値と比較した (Fig. 2)。その結果, m/z 321, 417に負イオンが検出され, S-エコールモノ硫酸抱合体由来, S-エコールモノグルクロン酸抱合体由来の脱プロトン化分子 (それぞれ $C_{15}H_{13}O_6$, $C_{21}H_{21}O_9$) と推測された。

次に, この2種の代謝物についてCIDによる断片化処理を行い, フラグメント情報から構造推定を試みた。まずラセミ体エコール標品について解析した (Table 3)。Schwenらの報告¹⁰⁾と同様に, プロダクトイオンが m/z 147 ($C_9H_7O_2$), m/z 93 (C_6H_5O) に認められ, これらはS-エコールの脱プロトン化分子 (m/z 241)のクロマン-7-オール部分とフェノール部分の間のC-C結合の開裂によって生じたと推測された。 m/z 135 ($C_8H_7O_2$) と m/z 121 ($C_7H_5O_2$) にもピークが確認された。これらは, m/z 147のさらなる開裂によって生じたものと考えられる。次に, 雌ラット胆汁について解析し, ラセミ体エコール標品の場合と比較した。S-エコールモノ硫酸抱合体由来の脱プロトン化分子 (m/z 321)をプリカーサーイオンとするプロダクトイオンが, m/z 241, 135, 121, 93に検出された (Table 4)。 m/z 241にみられたピークはプリカーサーイオンから硫酸部分の脱離によって生じたと推測される。無修飾のフェノール部分に由来すると考えられるプロダクトイオン (m/z 93) が確認されたことから, 硫酸の結合位置は7位の水酸基であることが示唆された。S-エコールモノグルクロン酸抱合体由来の脱プロトン化分子 (m/z 417)をプリカーサーイオンとするプロダクトイオンが, m/z 241, 175, 113に検出された (Table 5)。 m/z 241にみられたピークはプリカーサーイオンからグルクロン酸部分の脱離によって生じたと推測さ

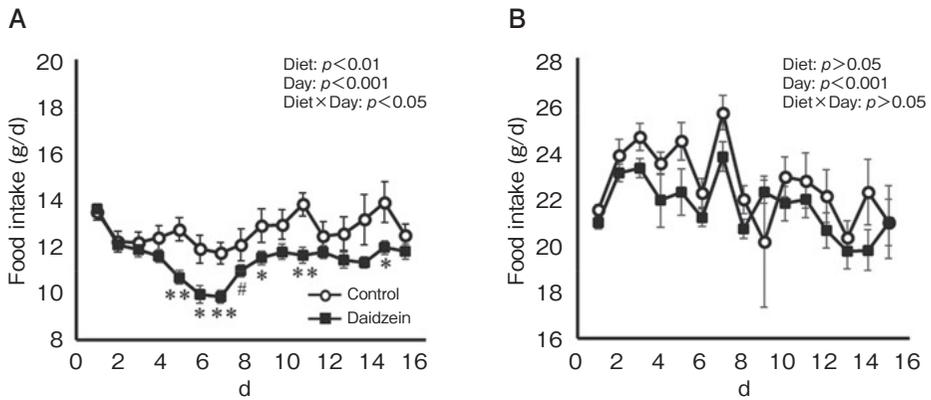


Fig. 1. Daily changes in food intake in female (A) and male (B) rats. Each value represents the mean \pm standard error. The asterisks show a significant difference relative to the control group (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$), and the number signs show a trend relative to the control group ($p < 0.1$), determined by three-way repeated ANOVA with Bonferroni post-hoc analysis.

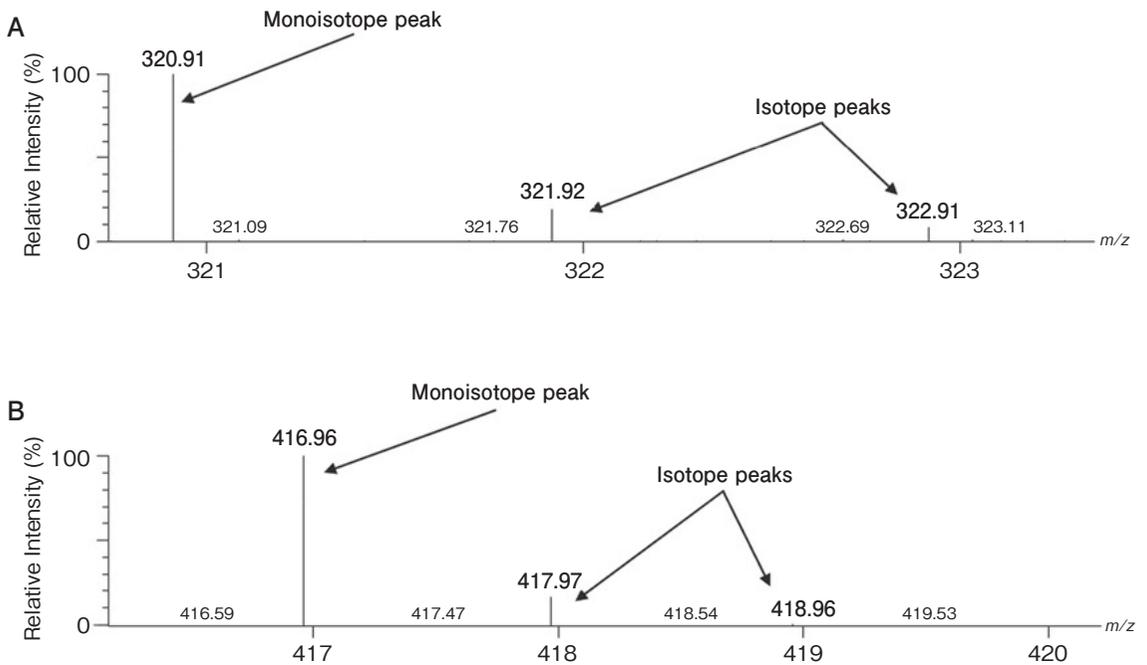


Fig. 2. Mass spectra of the electrospray generated molecular anion at m/z 321 and its isotope peaks (A), and the molecular anion at m/z 417 and its isotope peaks (B) in bile of female rats.

れる。一方で、ラセミ体エコール標品の場合にみられた m/z 93 にプロダクトイオンが検出されなかったことから、グルクロン酸の抱合位置は4'位の水酸基であることが示唆された。これらの結果から、雌ラット胆汁中でS-エコールは、主に7位硫酸抱合体および4'位グルクロン酸抱合体として存在すると考えられる。そして、我々のこれまでの研究⁹⁾と合わせて、この2種の抱合体のいずれかまたは両方が食欲低下効果の発現に関与すると考えられる。

ラットにおいて大豆イソフラボンの抱合代謝には顕著な雌雄差があることが報告されている¹²⁾。我々は、S-エコールの場合も抱合代謝に雌雄差があり、雄ラット胆汁には作用型S-エコール抱合体が存在しないために、効果が発現しないのではないかと推測した。そこ

で、S-エコール7位硫酸抱合体および4'位グルクロン酸抱合体が雄ラットの胆汁中にも存在するのかを検討したが、MS/MSスペクトル解析の結果、雄ラット胆汁中でも両方のS-エコール抱合体が存在することが示唆された (Table 4, 5)。我々は以前、ダイゼインを摂取させた雌ラットでは雄ラットに比して、胆汁中総S-エコールおよびS-エコール抱合体濃度はいずれも約2倍高いことを報告している⁹⁾。今後、S-エコール抱合代謝の雌雄差が、雌特異的に効果が発現することと関連があるのかを明らかにするため、本研究でラット胆汁中に存在することが明らかとなったS-エコール7位硫酸抱合体および4'位グルクロン酸抱合体の胆汁中濃度を測定し、雌雄で比較する必要がある。

Table 3. Monoisotopic calculated exact masses (EM) and measured accurate masses (AM) of product ions resulting from the collision-induced dissociation of the electrospray generated ion of equol (precursor ion) as standard

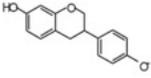
	EM (m/z)	AM (m/z)	$\Delta m/z$	Molecular formula	Proposed structures
Precursor ion	241.09	241.26	0.08	$C_{15}H_{13}O_3^-$	
Product ions	147.05	147.11	0.08	$C_9H_7O_2^-$	
	135.05	135.11	0.08	$C_8H_7O_2^-$	
	121.03	121.09	0.08	$C_7H_5O_2^{2-}$	
	93.04	93.10	0.08	$C_6H_5O^-$	

Table 4. Monoisotopic calculated exact masses (EM) and measured accurate masses (AM) of product ions resulting from the collision-induced dissociation of the electrospray generated ion at m/z 321 (precursor ion) from bile of female and male rats

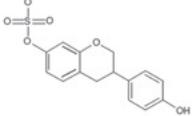
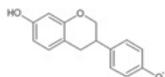
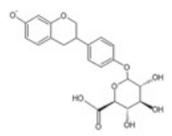
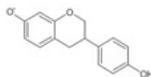
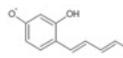
	EM (m/z)		AM (m/z)	$\Delta m/z$	Molecular formula	Proposed structures
Precursor ion	321.04	Female	321.12	0.08	$C_{15}H_{13}O_6S^-$	
		Male	321.13	0.09		
Product ions	241.09	Female	241.17	0.08	$C_{15}H_{13}O_3^-$	
		Male	241.18	0.09		
	135.05	Female	135.13	0.08	$C_8H_7O_2^-$	
		Male	135.13	0.09		
	121.03	Female	121.11	0.08	$C_7H_5O_2^{2-}$	
		Male	121.12	0.09		
	93.04	Female	93.11	0.08	$C_6H_5O^-$	
		Male	93.01	-0.02		

Table 5. Monoisotopic calculated exact masses (EM) and measured accurate masses (AM) of product ions resulting from the collision-induced dissociation of the electrospray generated ion at m/z 417 (precursor ion) from bile of female and male rats

	EM (m/z)		AM (m/z)	$\Delta m/z$	Molecular formula	Proposed structures
Precursor ion	417.12	Female	417.23	0.11	$C_{21}H_{21}O_9^-$	
		Male	417.22	0.10		
Product ions	241.09	Female	241.18	0.09	$C_{15}H_{13}O_3^-$	
		Male	241.21	0.12		
	175.08	Female	175.11	0.03	$C_{11}H_{11}O_2^-$	
		Male	175.11	0.04		
	113.10	Female	113.11	0.01	$C_7H_{13}O^-$	
		Male	113.11	0.01		

要 約

食欲制御は肥満とその関連疾患の効果的な解決策である。我々は、ダイゼインおよびその腸内細菌代謝物S-エコールをラットに混餌投与すると、雌特異的に食欲が低下することを見出した。S-エコールはエストロゲン受容体 β に作用することが知られているが、エストラジオール投与による食欲抑制作用はS-エコールの場合とは異なり、内因性エストロゲン分泌の少ない雄で雌よりも顕著にみられることから、両者の食欲低下の作用機構は異なると考えられる。これまでに、S-エコールの体内動態に関する研究により、S-エコールはほとんどがグルクロン酸抱合体および硫酸抱合体として多くが腸肝循環中に存在することが示されている。さらに、我々は、ダイゼインを投与された雌ラットの胆汁を、ダイゼインを投与されていない雌ラットの十二指腸より注入したところ、飼料摂取量が有意に低下することを示した。これらのことから、雌ラットの胆汁中に食欲低下効果の鍵となるS-エコール抱合体が存在するのではないかと考えたが、ラット胆汁中に存在するS-エコール抱合体タイプは特定されていなかった。そこで本研究では、Q-TOF型MS装置を用い、ダイゼインを摂取したラット胆汁中S-エコール抱合体の特定を試みた。その結果、雌ラット胆汁中でS-エコールは主に7位硫酸抱合体および4位グルクロン酸抱合体として存在していることが示唆された。この2種の抱合体のいずれかまたは両方が食欲低下効果の発現に関与すると推測される。次に我々は、効果の発現には雌特異的に代謝され胆汁中に分泌されるS-エコール抱合体が関与しているのではないかと考え検討したが、雄ラット胆汁中でも7位硫酸抱合体および4位グルクロン酸抱合体が検出された。今後は、これらの胆汁中濃度を測定し、雌雄で比較する必要がある。

文 献

- 1) Kishida T, Mizushige T, Ohtsu Y, Ishikawa S, Nagamoto M, Izumi T, Obata A and Ebihara K (2008): Dietary soy isoflavone-aglycone lowers food intake in female rats with and without ovariectomy. *Obesity* (Silver Spring), **16**, 290-297.
- 2) Fujitani M, Mizushige T, Bhattarai K, Iwahara A, Aida R, Segawa T and Kishida T (2015): Dynamics of appetite-mediated gene expression in daidzein-fed female rats in the meal-feeding method. *Biosci Biotechnol Biochem*, **79**, 1342-1349.
- 3) Fujitani M, Mizushige T, Bhattarai K, Iwahara A, Aida R and Kishida T (2015): The daidzein- and estradiol- induced anorectic action in CCK or leptin receptor deficiency rats. *Biosci Biotechnol Biochem*, **79**, 1164-1171.
- 4) Setchell KD, Clerici C, Lephart ED, Cole SJ, Heenan C, Castellani D, Wolfe BE, Nechemias-Zimmer L, Brown NM, Lund TD, Handa RJ and Heubi JE (2005): S-equol, a potent ligand for estrogen receptor beta, is the exclusive enantiomeric form of the soy isoflavone metabolite produced by human intestinal bacterial flora. *Am J Clin Nutr*, **81**, 1072-1079.
- 5) Muthyala RS, Ju YH, Sheng S, Williams LD, Doerge DR, Katzenellenbogen BS, Helferich WG and Katzenellenbogen JA (2004): Equol, a natural estrogenic metabolite from soy isoflavones: convenient preparation and resolution of R- and S-equols and their differing binding and biological activity through estrogen receptors alpha and beta. *Bioorg Med Chem*, **12**, 1559-1567.
- 6) Liang YQ, Akishita M, Kim S, Ako J, Hashimoto M, Iijima K, Ohike Y, Watanabe T, Sudoh N, Toba K, Yoshizumi M and Ouchi Y (2002): Estrogen receptor β is involved in the anorectic action of estrogen. *Int J Obes Relat Metab Disord*, **26**, 1103-1109.
- 7) エクオールの食欲抑制効果に関する機構解明－エクオールの抱合代謝産物の解析－, 水重貴文, 藤谷美菜, 山下由起, 山内佳也, 村上 聖, 岸田太郎, 海老原 清 (2012): 大豆たん白質研究, **15**, 165-169.
- 8) Pinent M, Blay M, Serrano J and Ardévol A (2017): Effects of flavanols on the enteroendocrine system: Repercussions on food intake. *Crit Rev Food Sci Nutr*, **57**, 326-334.

- 9) Oteiza PI, Fraga CG, Mills DA and Taft DH (2018): Flavonoids and the gastrointestinal tract: Local and systemic effects. *Mol Aspects Med*, **61**, 41-49. doi: 10.1016/j.mam.2018.01.001. Epub 2018 Jan 12.
- 10) Schwen RJ, Nguyen L and Jackson RL (2012): Elucidation of the metabolic pathway of S-equol in rat, monkey and man. *Food Chem Toxicol*, **50**, 2074-2083.
- 11) Legette LL, Prasain J, King J, Arabshahi A, Barnes S and Weaver CM (2014): Pharmacokinetics of equol, a soy isoflavone metabolite, changes with the form of equol (dietary versus intestinal production) in ovariectomized rats. *J Agric Food Chem*, **62**, 1294-1300.
- 12) Soukup ST, Helppi J, Müller DR, Zierau O, Watzl B, Vollmer G, Diel P, Bub A and Kulling SE (2016): Phase II metabolism of the soy isoflavones genistein and daidzein in humans, rats and mice: a cross-species and sex comparison. *Arch Toxicol*, **90**, 1335-1347.