

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：37604

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2022

課題番号：18K14940

研究課題名（和文）ヒト腸内細菌由来C-配糖体代謝酵素の触媒機構の解明

研究課題名（英文）Catalytic mechanism of C-glycoside metabolizing enzymes from human intestinal bacteria

研究代表者

中村 賢一（Nakamura, Kenichi）

九州保健福祉大学・薬学部・講師

研究者番号：70512002

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究の目的は、腸内細菌由来の「C-配糖体代謝酵素群」を同定し、C-C結合開裂反応の酵素触媒機構を解明することである。これまでの研究から、C-配糖体プエラリン代謝反応は中間体（プエラリン酸化物）を経由する2段階の酵素反応であることが明らかになっている。本研究では、3-oxo-グルコース存在下、プエラリンをプエラリン酸化物に代謝する酵素DgpAを同定した。また、プエラリン酸化物をダイゼインと糖誘導体（1,5-anhydro-D-erythro-hex-1-en-3-ulose）に代謝する酵素DgpB-DgpC複合体の推定酵素触媒機構を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

配糖体は高極性・高分子量のため経口摂取後に消化管から吸収されにくく、消化管下部で腸内細菌による種々の代謝を受ける。腸内細菌による配糖体の代謝は、漢方薬の薬効発現と密接に関わっていることが知られている。葛根湯の構成生薬である「カッコン」には、イソフラボンC-配糖体のプエラリンが多量に含まれている。本研究で同定したプエラリンC-配糖体代謝酵素は新規酵素であり、また、カッコンに含まれる主要成分の代謝酵素であることから、本研究は葛根等の薬効発現機構を解明する一助になると考える。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study was to identify a catalytic mechanism of C-glycoside metabolizing enzyme derived from intestinal bacteria. Previous studies revealed that the puerarin metabolic reaction is a two-step enzymatic reaction. In this study, we identified the enzyme DgpA, which metabolizes puerarin to 3"-oxo-puerarin, in the presence of 3-oxo-glucose. We also revealed the mechanism of the enzyme DgpB-DgpC complex that metabolize the intermediate (3"-oxo-puerarin) to daidzein and 1,5-anhydro-D-erythro-hex-1-en-3-ulose.

研究分野：天然物化学

キーワード：C-配糖体 腸内細菌 代謝酵素 生薬 プエラリン

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

漢方薬は熱水で煎じて服用するため、その煎液には配合生薬の化学成分のうち、親水性の配糖体が多量に溶出している。配糖体は高極性・高分子量のため経口摂取後に消化管から吸収されにくく、消化管下部で腸内細菌による種々の代謝を受ける。腸内細菌による配糖体の代謝は、漢方薬の薬効発現と密接に関わっており、例えば生薬「ダイオウ」に含まれる瀉下成分センノシドは、腸内細菌によりレインアンスロンへと代謝されて初めて活性体となり、瀉下作用を示すことが知られている。

葛根湯の構成生薬である「カッコン」には、イソフラボン C-配糖体のプエラリンが多量に含まれている。C-配糖体はアグリコン部と糖部が直接 C-C 結合しているため、一般的な O-配糖体とは異なり、グリコシダーゼ処理や、酸処理に対して安定であることが知られている。一部の腸内細菌は C-配糖体をアグリコンに代謝することが報告されているが、腸内細菌が産生する C-配糖体代謝酵素の酵素触媒機構は、これまで明らかにされていなかった。

我々はこれまで、プエラリンをダイゼイン (アグリコン) と D-グルコースに代謝するヒト腸内細菌株 strain PUE を用いて研究を行ってきた。その結果、プエラリンからダイゼインへの代謝反応は中間体としてプエラリン酸化物 (3"-oxo-プエラリン) を経由する 2 段階の酵素反応であり、プエラリン酸化物をダイゼインに代謝する酵素 DgpB-DgpC 複合体を同定している (図 1)。しかし、プエラリンの酸化に関与する酵素は同定されておらず、また、プエラリン酸化物の C-グリコシド結合開裂後の糖部分に由来する代謝物も未同定であった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、腸内細菌由来の「C-配糖体代謝酵素群」を同定し、C-C 結合開裂反応の酵素触媒機構を解明することである。

3. 研究の方法

(1) タンパク質 DgpA の調製

腸内細菌 strain PUE のゲノム DNA を精製し、ゲノム DNA を鋳型に PCR を行い、dgpA 遺伝子を増幅した。常法に従い、pET-21a(+)ベクターに挿入後、形質転換を行い、タンパク質 DgpA を発現誘導する組換え大腸菌を作成した。2 段階のカラムクロマトグラフィー (陰イオン交換カラムクロマトグラフィー、疎水性カラムクロマトグラフィー) により、DgpA タンパク質を精製した。

(2) プエラリン代謝活性の測定

リン酸緩衝液 (pH 7.4) に酵素 DgpA (1 µg)、酵素 DgpB-DgpC 複合体 (1 µg)、プエラリン (終濃度 0.5 mM)、3-oxo-グルコース (終濃度 5 mM) を加え (全量 100 µL) 37 °C、30 分間インキュベートした。酵素反応溶液にメタノール (300 µL) を加えて酵素反応を停止後、ODS カラムを用いた HPLC 法により、代謝物を分析した。

4. 研究成果

(1) タンパク質 DgpA の性質と酵素活性

DgpA と 3-oxo-グルコースによるプエラリン酸化反応

これまでの研究から、腸内細菌 strain PUE によるプエラリン代謝反応は中間体 (プエラリン酸化物) を経由する 2 段階の酵素反応であり、中間体をダイゼイン (アグリコン) に代謝する酵素 DgpB-DgpC 複合体を同定している。しかし、プエラリンを中間体に酸化する酵素は未同定であった。次世代シーケンサーにより腸内細菌 strain PUE の全ゲノム配列を解析した結果、既に同定済みの dgpB、dgpC 遺伝子の近傍に dgpA 遺伝子がコードされていた。アミノ酸配列情報から、DgpA は Gfo/Idh/MocA ファミリー酸化還元酵素と予測された。本ファミリーに属する酵素にはグルコース-フルクトースオキシドレダクターゼなどがあり、それらの多くは NAD(P) を補酵素として糖類の酸化還元反応に関与している。そこで、DgpA がプエラリンの糖部分の酸化反応を触媒する酵素であると予想し、DgpA の酵素活性の測定を行った。種々検討した結果、DgpA は 3-oxo-グルコースの存在下、プエラリンを酸化し、中間体 (プエラリン酸化物) を生成することを明らかにした (図 1)。また、2 種類の酵素 (DgpA、DgpB-DgpC 複合体) と 3-オキシグルコース存在下、プエラリンがダイゼインに代謝されることを確認した。

DgpA に結合する補酵素 NAD(H) の同定

精製 DgpA の UV スペクトルにおいて、340 nm 付近にブロードピークが検出されたことから、NAD(H) や NADP(H) が酵素に強く結合していることが示唆された。そこで、DgpA に結合している補酵素を同定するため、冷却したメタノールで DgpA を処理し、遊離した補酵素を HPLC で分析し

た。その結果、NAD⁺、NADH 標品と同一溶出時間にピークが検出されたことから、DgpA は NAD(H) 結合型の酵素であることが明らかになった。

3-oxo-グルコースの役割の解明

DgpA は 3-oxo-グルコース存在下、プエラリンを中間体（プエラリン酸化物）に代謝する。本反応において、3-oxo-グルコースはプエラリンとの間の酸化還元反応により、グルコースに代謝されと予測された。3-oxo-グルコースの役割を確認する目的で、DgpA による酵素逆反応を計画した。すなわち、基質としてプエラリン酸化物とグルコースを用い、DgpA による酵素逆反応を行い、生成物を確認した。その結果、プエラリン酸化物がプエラリンへと還元されたことから、DgpA はプエラリンと 3-oxo-グルコースの間の酸化還元反応を触媒する酵素であることが確認できた（図 1）。

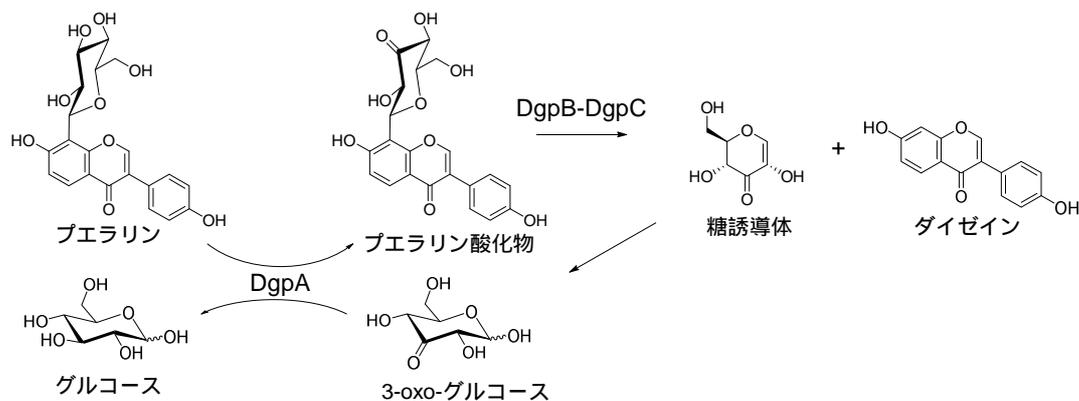


図 1 DgpA, DgpB-DgpC 複合体による推定プエラリン C-配糖体代謝機構

(2) DgpB-DgpC 複合体による中間体（プエラリン酸化物）の代謝反応

プエラリン酸化物の糖部分由来代謝物の同定

これまでの研究から、DgpB-DgpC 複合体による中間体（プエラリン酸化物）の代謝物としてダイゼインは同定されていたが、糖部分に由来する代謝物は不明であった。そこで、糖部分由来代謝物を同定する目的で、プエラリン酸化物を基質に DgpB-DgpC による代謝反応を行った。糖部分に由来する代謝物を精製後、各種機器分析により構造解析を行った結果、糖部分由来代謝物を糖誘導体（1,5-anhydro-D-erythro-hex-1-en-3-ulose）と同定した（図 1）。

C-グリコシド結合の開裂機構の推定

DgpB-DgpC 複合体が触媒する C-グリコシド結合の開裂機構を図 2 に示す。初めに、プエラリン酸化物の糖部分 2 位の水素が引き抜かれてエノラートイオンが生成し、アグリコン部のフェノール性ヒドロキシ基がケト-エノール互変異性化したのち、矢印で示す電子の流れにより、ダイゼインと糖誘導体が生じると考えている。

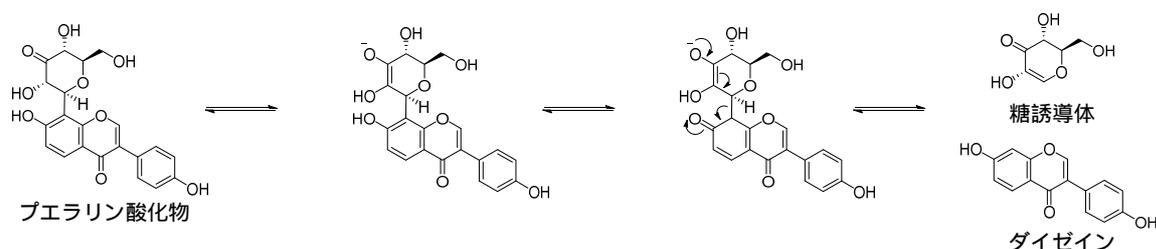


図 2 DgpB-DgpC 複合体が触媒する C-グリコシド結合の開裂機構

以上、本研究により、ヒト腸内細菌由来 C-配糖体代謝酵素の触媒機構、特に strain PUE 由来酵素によるプエラリン代謝機構を明らかにした。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 中村 賢一	4. 巻 58
2. 論文標題 腸内細菌酵素による生薬成分C-配糖体の代謝	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 ファルマシア	6. 最初と最後の頁 567 ~ 571
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14894/faruawpsj.58.6_567	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nakamura Kenichi, Zhu Shu, Komatsu Katsuko, Hattori Masao, Iwashima Makoto	4. 巻 86
2. 論文標題 Deglycosylation of the Isoflavone C-Glucoside Puerarin by a Combination of Two Recombinant Bacterial Enzymes and 3-Oxo-Glucose	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Applied and Environmental Microbiology	6. 最初と最後の頁 e00607-20
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/AEM.00607-20	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nakamura Kenichi, Zhu Shu, Komatsu Katsuko, Hattori Masao, Iwashima Makoto	4. 巻 42
2. 論文標題 Expression and Characterization of the Human Intestinal Bacterial Enzyme Which Cleaves the C-Glycosidic Bond in 3-Oxo-puerarin	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biological and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 417 ~ 423
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/bpb.b18-00729	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 中村賢一
2. 発表標題 ヒト腸内細菌由来酵素による生薬成分C-配糖体の代謝
3. 学会等名 第2回 宮崎県北サイエンスフォーラム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中村賢一
2. 発表標題 ヒト腸内細菌による和漢薬成分の代謝研究～C-配糖体puerarinの代謝機構の解析～
3. 学会等名 第37回和漢医薬学会 次世代を担う若手研究者の会シンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中村賢一、中根汐梨、Shu Zhu、小松かつ子、服部征雄、岩島誠
2. 発表標題 腸内細菌由来酵素群によるC-配糖体puerarinの代謝機構の解析
3. 学会等名 日本生薬学会第66回年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中村賢一、日置紘太郎、伊達知世、葉山舜臣、Shu Zhu、小松かつ子、服部征雄、岩島誠
2. 発表標題 ヒト腸内細菌が産生する mangiferin 代謝酵素の機能解析
3. 学会等名 日本生薬学会第65回年会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------