

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20H02946

研究課題名（和文）微生物による多様な新規クルクミン代謝の解明

研究課題名（英文）Functional analysis of novel microbial curcumin metabolism

研究代表者

橋本 義輝（HASHIMOTO, Yoshiteru）

筑波大学・生命環境系・准教授

研究者番号：00323254

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,700,000円

研究成果の概要（和文）：クルクミンはカレーの黄色色素として知られており、ターメリック（ウコン）に含まれ抗酸化作用や抗がん作用等の種々の生理活性を示す化合物であるが、クルクミン代謝に関わる酵素の発見および諸性質の解明は我々の発見した大腸菌由来の酵素のみであった。
本研究では、大腸菌由来の代謝酵素とは異なる変換反応を行う代謝経路をもつ複数の微生物から、代謝中間化合物や代謝に関わる酵素をそれぞれ解析し、微生物のもつ多様な代謝経路の一部を解明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

クルクミンの代謝経路・代謝酵素はほぼ未解明の状況であり、本研究により自然界には多様なクルクミン代謝経路の存在が判明しつつある。それらを明らかにする本研究は微生物による天然物代謝系研究分野など基礎的研究の見地で意義深い。

クルクミン自身も生理活性作用をもつが、その代謝産物がさらに強い生理活性作用を示すことが知られている。未知のクルクミン代謝経路や代謝酵素が明らかとなれば、それらを利用した代謝中間化合物の新規生産法の確立が可能であり、応用的見地からも意義深い。

研究成果の概要（英文）：Curcumin is a plant-derived secondary metabolite exhibiting antitumor, neuroprotective, anti-diabetic activities, and so on. We previously isolated *Escherichia coli* exhibiting curcumin-converting activity, and discovered an enzyme showing this activity (CurA) and named it NADPH-dependent curcumin/dihydrocurcumin reductase.

In order to elucidate novel microbial metabolic pathways of curcumin, here, we identified new metabolic intermediate metabolites of curcumin, and analyzed another enzyme exhibiting curcumin-converting activity different from that of CurA.

研究分野：応用微生物学

キーワード：微生物 酵素

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

クルクミンはターメリック (ウコン) に含まれる黄色色素で、薬理作用を有するポリフェノールの一種である。古くから肝機能を改善する漢方薬として、最近ではお酒の飲み過ぎや二日酔いに効くドリンク剤や健康食品として広く用いられ、近年、その生理作用と医学的有用性が盛んに研究されている。クルクミンの生理作用として、抗酸化作用や抗がん作用、抗炎症作用などが知られている。このように植物由来の生理活性物質の生理活性への注目は非常に高い。クルクミン代謝産物として知られる化合物が、*in vitro* の試験でクルクミンより高い抗酸化活性を示すことから、クルクミンがもつ生理活性の活性本体であると考えられている。自然界においてクルクミンは植物により高生産されるものの、クルクミン代謝産物の生産量はごく僅かである。また、クルクミン代謝は既に解明されているイメージはあるが、一部の代謝産物が同定されているだけである。クルクミンおよびそれらの代謝産物は配糖体化、硫酸化されることがわかっている。しかし、代謝産物が同定され代謝経路は推定されているだけで、その変換反応に関わる酵素は (微生物からヒトに至るすべての生物において) 全く不明であった。

このような状況の中、我々は、カレー・ウコンなど食品として摂取したクルクミンがヒトの中でどのように代謝されるかに興味を持ち、ヒトの便を分離源としてクルクミンを含む培地で生育する菌のスクリーニングを行った。その結果、クルクミンに作用する腸内微生物を発見し、大腸菌 (*Escherichia coli*) がクルクミンをジヒドロクルクミン、テトラヒドロクルクミンに変換することを見いだした。また、大腸菌からこの代謝酵素を世界で初めて同定し、NADPH-dependent curcumin/dihydrocurcumin reductase (CurA) と命名し発表した [*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 6615 (2011)]。

本成果はクルクミン代謝酵素の初めての発見報告例でもあるが、大腸菌がもつクルクミン代謝系の初発酵素を解明したに過ぎない。そこで、テトラヒドロクルクミンを介したクルクミンの代謝経路の解明を目指す研究構想に至った。一方、微生物の多様性を考慮すると、多様な代謝系の存在が予想される。土壌環境をスクリーニング源としてクルクミン代謝微生物を探索した。その結果、クルクミンを基質として大腸菌の代謝産物 (ジヒドロクルクミンやテトラヒドロクルクミン) とは異なるクルクミン代謝産物を生成する複数の微生物を単離した。

2. 研究の目的

本研究は、我々が単離した複数の微生物のもつ多様な代謝経路を代謝中間化合物・酵素・遺伝子レベルで解明することを目的としている。

3. 研究の方法

それぞれの微生物について、主に以下の方法で研究を行った。

(1) 代謝産物の同定

検出された新たな代謝産物については、HPLC 等を用いて精製し、質量分析装置等を用いて同定する。

(2) 代謝酵素の精製

まず培地・培養条件検討等を行い、目的とする酵素の最適発現条件を決定する。その後、決定した条件下で大量に微生物を培養・集菌し、無細胞抽出液を調製する。硫酸沈殿、イオン交換カラムクロマトグラフィー、疎水カラムクロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィーなどの手法を組み合わせ、当該酵素活性を指標とし、酵素を単離精製する。

(3) 代謝酵素の諸性質解明

精製酵素に関して、酵素の安定性や反応の最適温度や最適 pH など、酵素の物理化学的・酵素学的諸性質などを詳細に解明する。

4. 研究成果

クルクミン代謝産物として HPLC でジヒドロクルクミン、テトラヒドロクルクミンが検出できる微生物 A のクルクミン代謝に関わる酵素は大腸菌と同様に CurA であるが、テトラヒドロクルクミン以降の代謝が大腸菌とは異なることが判明していた。

本菌のクルクミン代謝産物としてジヒドロクルクミン、テトラヒドロクルクミンとは異なるピークが HPLC で検出できたことから、質量分析装置を用いて分子量を決定した結果、クルクミンからの本代謝産物をヘキサヒドロクルクミンと同一化することに成功した。本菌において、ヘキサヒドロクルクミンはテトラヒドロクルクミンを基質として変換されることが示唆された。

そこで本菌のテトラヒドロクルクミン変換活性を高めるべく、培地組成、培養時間や添加化合物の種類などを変え、本菌の培養条件の検討を行った。調製した無細胞抽出液の活性を測定することで、本酵素活性が最大となる最適培養条件を確立した。本条件で大量培養した菌体を用いて無細胞抽出液を調製し、硫安沈殿や各種クロマトグラフィーを用いてテトラヒドロクルクミン変換酵素の精製を行っているが、SDS-PAGE 上で単一バンドまで精製できていない。

クルクミンを基質として本菌と反応させると、微生物 B では、ジヒドロクルクミン、テトラヒドロクルクミンとは異なる 2 つのピークが HPLC で検出できた。質量分析装置を用いてこれらの分子量を決定し、それぞれの化合物を同一化することに成功した。両反応産物の分子量の和はクルクミンの分子量よりも 18 大きいことが判明した。さらに、 $H_2^{18}O$ および ^{18}O を用いた同位体実験から水分子由来の酸素原子が 1 分子取り込まれていた。以上のことから、本微生物は、CurA とは異なり、クルクミンを開裂（加水分解）して 2 つの産物を生じる反応を触媒する酵素でクルクミンを分解・代謝することが示唆された。

本微生物のクルクミン開裂活性を高めるべく、培地への添加化合物の種類、培養液量や培養時間などを変え、本微生物の培養条件の検討を行った。調製した無細胞抽出液の活性を測定することで、本酵素活性が最大となる最適培養条件を確立した。本菌を大量調製し、各種クロマトグラフィーを用いて、極く微量であるが SDS-PAGE 上で単一バンドになるまで精製することに成功した。さらに、精製した酵素の N 末端部分アミノ酸配列を決定し、ドラフトゲノム DNA 中より本微生物のクルクミン開裂酵素遺伝子を同一化することにも成功した。

クルクミン開裂酵素の発現プラスミドを種々構築し、これらの発現プラスミドで、いくつかの発現用大腸菌を形質転換し、異種発現を行った。種々検討した結果、pET-24a(+)を用いてクルクミン開裂酵素の発現プラスミドを構築し、大腸菌 BL21-Codonplus(DE3)-RIL 株で、クルクミン開裂酵素の誘導発現に成功した。本酵素の精製条件についても種々検討し、硫酸アンモニウム分画、疎水クロマトグラフィー、陰イオン交換クロマトグラフィーを行い、本微生物菌体から直接クルクミン開裂酵素を精製するよりも少ないステップで精製酵素標品を大量に調製する方法を確立した。本酵素の精製酵素標品の大量調製方法が確立できたことで、クルクミン開裂酵素の諸性質の解析が可能となった。クルクミン開裂酵素精製標品を用いて本酵素の反応の最適温度や最適 pH など、一部の諸性質を決定した。

大腸菌や上記の微生物とは異なり、クルクミン含有固体培地上に生育した微生物 C の周囲を囲むように透明なハローが形成された。大腸菌の CurA、上記クルクミン開裂酵素はいずれも細胞内に局在するが、本菌のクルクミン代謝に関わる酵素は菌体外に分泌されていると予想されるため大腸菌や上記微生物のクルクミン代謝酵素とも異なることが示唆された。

クルクミンを基質として培養上清と反応し生じる変換産物の HPLC の保持時間および吸収スペクトル、LC-MS を用いて決定した分子量は大腸菌や上記微生物でクルクミン代謝産物と同一化したジヒドロクルクミン、テトラヒドロクルクミン、ヘキサヒドロクルクミン、クルクミン開裂酵素の反応産物とは異なっていた。高分解能質量分析装置や LC-MS/MS を用いた実験により本菌のクルクミン代謝産物の構造を決定した。

本菌のクルクミン代謝に関わる酵素は細胞外酵素と示唆されたことから、クルクミン変換酵素の発現量を増加させるべく、スクリーニングに用いた培地に対して条件検討を行い、本酵素の最適発現条件を確立した。本条件で大量培養した培養上清から、種々の精製条件の検討を行い、本酵素のSDS-PAGE上での単一精製に成功した。精製したクルクミン変換酵素標品を用いて、本酵素の安定性や酵素反応の最適温度や最適pHを決定した。

さらに、精製したクルクミン変換酵素のN末端部分アミノ酸配列を決定するとともに、本菌のゲノムDNAを調製し、次世代シーケンサーにより塩基配列を決定した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 橋本義輝、佐藤伽音、熊野匠人、小林達彦
2. 発表標題 新規クルクミン代謝微生物の単離と代謝産物の同定
3. 学会等名 第75回日本生物工学会大会
4. 発表年 2023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
研究分担者	小林 達彦 (KOBAYASHI Michihiko) (70221976)	筑波大学・生命環境系・教授 (12102)	

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
---------	---------