

令和元年6月17日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15241

研究課題名(和文)新規ピペリン代謝の基礎および応用研究

研究課題名(英文)Study on the novel piperine metabolism

研究代表者

熊野 匠人(KUMANO, Takuto)

筑波大学・生命環境系・助教

研究者番号：70585025

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではピペリン分解酵素を初めて微生物より単離精製し、遺伝子配列を同定することができた。本酵素は培地にピペリンが存在する時のみ発現が見られたことから、誘導酵素であった。さらに、本酵素の諸性質として、酵素動力学定数の算出を行うとともに、酵素阻害剤として約20種類の低分子化合物と金属の影響について検討を行った。一方で、酵素遺伝子のクローニングには成功したものの、大腸菌、放線菌(*Streptomyces* 1種、*Rhodococcus* 5種)を宿主とした異種発現は成功しなかった。本研究により、ピペリンの天然における代謝の初発反応を初めて解明することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、コショウに含まれるピペリンの天然における代謝の初発反応が明らかになった。微生物よりピペリン分解酵素の単離精製に成功し、これまでわかっていなかった新規酵素が発見できたことは学術的に重要な成果である。本研究ではピペリン分解産物の構造についても明らかにした。代謝産物がわかればその生理活性についても研究をすることができる。

研究成果の概要(英文)：Piperine-degrading enzyme was purified from a microorganism and a gene for coding the enzyme was identified. The enzyme was expressed in the microorganism only when piperine was added into the culture medium. The basic characteristics of the enzyme were investigated.

研究分野：応用微生物学

キーワード：ピペリン 加水分解 微生物代謝

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

コショウは古くから世界中で親しまれてきた香辛料である。独特の辛味はピペリンというコショウに含まれるアルカロイドの一種によるもので、コショウなどの植物によって、ピペロイル-CoA とピペリジン環の縮合で合成される。ピペリンは様々な生理活性が知られている一方で、自然環境においてどのように分解されているのかについての報告は無く、その代謝過程や酵素、遺伝子についても未解明であった。

2. 研究の目的

ピペリンはコショウなどの植物が合成するアルカロイドの一種であり、構造中にユニークな 3 級アミド結合を有する。コショウの辛み成分でもあり、特徴的な生理活性としては、肝臓の P450 による薬物代謝を阻害することが知られている。そのため、ピペリンと薬剤を同時に摂取すると薬剤が生体内で代謝され難くなり、生物学的利用能が上昇することが知られている。一方で、ピペリン自体がどのように代謝されるかということは分かっていない。そこで本研究では、ピペリンを資化する微生物をスクリーニングした。既にピペリンを単一の窒素源もしくは炭素源として生育することが可能な微生物を取得し、ピペリン代謝産物として 3 級アミド結合が分解されたピペリン酸を検出している。本研究では、初発の反応を触媒すると考えられるピペリンの 3 級アミド結合分解酵素の機能解析を主な目的とした。

3. 研究の方法

(1) ピペリン分解酵素の単離精製

ピペリン変換活性を高めるべく、本菌の培養条件の検討を行った。その後、硫酸分画、疎水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によりピペリン分解酵素の精製を行った。

精製が完了したピペリン分解酵素の N 末端部分アミノ酸配列の情報を基に、ゲノム中より精製酵素の部分アミノ酸配列に一致する ORF を検索した。

(2) ピペリン分解産物の同定

ピペリンにピペリン分解酵素を作用させると、ピペリン酸が生じることは LC/MS での標品との比較により確認した。ピペリンの構造を考慮すると、反応産物はピペリン酸だけでなく、ピペリジン環由来のものが生じていると考えられた。そこで、アミンと反応する試薬を用いて検出を試みた。

(3) ピペリン分解酵素の機能解析

ピペリン分解酵素精製後、本酵素の K_m 、 k_{cat} などの酵素学的諸性質、および各種金属と低分子化合物による酵素活性への影響について調べた。

(4) ピペリン分解酵素の大量発現系の構築

ピペリン分解酵素遺伝子をクローニングし、大腸菌用発現プラスミドを構築した。得られた大腸菌発現ベクターで大腸菌を形質転換し、異種発現を試みた。大腸菌で目的酵素が十分得られないときは放線菌など他の宿主も検討した。

(5)ピペリン分解産物の酵素合成

ピペリン酸はピペロナル等の原料に用いられるが、現在はピペリンを強アルカリで分解し生成するのが一般的である。そこで、本菌から精製したピペリン分解酵素をピペリンに作用させることで、環境負荷が小さく簡便なピペリン分解産物の酵素的生産を行った。

4．研究成果

(1)ピペリン分解酵素の単離精製

培養条件の検討で、栄養培地にピペリンを添加して培養することで、培養開始 12 時間後にピペリン分解活性が最大となることがわかった。また、ピペリン分解活性は培養上清にあったので、まず培養上清に 80%飽和濃度の硫酸を加え、上清中のタンパク質を沈殿させ濃縮した。その後、疎水カラム、陰イオン交換カラムクロマトグラフィーにより精製し、収率は 0.5%ながら比活性約 10 倍に精製することができた。

培養上清より精製したピペリン分解酵素の N 末端部分アミノ酸配列を決定した。本菌のゲノムに対し、上記 N 末端部分アミノ酸配列をクエリとしてローカルブラストにより検索したところ、一致する遺伝子配列を見出した。

(2)ピペリン分解産物の同定

ピペリンにピペリン分解酵素を作用させた反応溶液に 4-Fluoro-7-nitrobenzofurazan (NBD-F) というアミン (1 級、2 級アミン) 検出試薬をさらに反応させ、LC/MS で分析した。NBD-F が付加したと考えられる産物の分子量は 248 であった。これはピペリジンに NBD-F が付加した化合物の分子量と一致した。したがって、ピペリン分解酵素はピペリンをピペリン酸とピペリジンに加水分解する酵素であることが判明した。

(3)ピペリン分解酵素の機能解析

様々な濃度のピペリンを基質とした時の反応速度を測定し、酵素動学的パラメーターを算出した。本酵素のピペリンに対する K_m は $0.5 \mu\text{M}$ 、 k_{cat} が $0.157 (\text{sec}^{-1})$ であった。また、本酵素の活性は、金属では亜鉛、カドミウム、コバルト、鉛、水銀、ニッケルに強く阻害され、銅、硫酸鉄に約 40%阻害された。低分子化合物では、キレート剤に特に強く阻害され、SH 阻害剤、還元剤、セリン修飾阻害剤によってもある程度阻害された。

(4)ピペリン分解酵素の大量発現系の構築

ピペリン分解酵素の異種発現については大腸菌、放線菌 (*Streptomyces lividans*、*Rhodococcus* 5 種) を宿主とし、各々ベクターについては誘導剤添加によりタンパク質が発現する誘導型と恒常的にタンパク質が発現する恒常型の 2 種類を検討したが発現することができなかった。また、本酵素は分泌型であるため N 末端にはシグナル配列が付加している。そこで、シグナル配列を除去して発現する試みも行ったが、発現は見られなかった。

(5)ピペリン分解産物の酵素合成

ピペリン分解酵素の異種発現には成功しなかったため、簡便に、かつ大量に反応産物を生産するのに十分な酵素が得られなかった。今後、別の方法での異種発現による組換え酵素の高発現や菌体そのものを触媒として用いる方法の検討等が必要であると考えられた。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計3件)

- 木村 澪、熊野匠人、栗崎 誠、橋本 義輝、小林 達彦
放線菌由来植物アルカロイド分解酵素の機能解析
日本農芸化学会大会 2019 年度大会 (2019 年)
- 熊野 匠人、栗崎 誠、橋本 義輝、小林 達彦
放線菌由来植物アルカロイド分解酵素の機能解析
2018 年度日本放線菌学会 (2018 年)
- 熊野 匠人、栗崎 誠、木村 澪、橋本 義輝、小林 達彦
植物アルカロイド分解微生物の探索
日本農芸化学会大会 2018 年度大会 (2018 年)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

なし

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

熊野 匠人 (KUMANO Takuto)
筑波大学・生命環境系・助教
研究者番号：70585025

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。