

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 16 日現在

機関番号：34104

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18891

研究課題名(和文) プエラリンC-配糖体代謝酵素群の大腸菌での発現系の構築とC-C結合開裂機構の解明

研究課題名(英文) Cloning, expression, purification, and characterization of enzymes that cleave puerarin C-glucosidic bond.

研究代表者

中村 賢一 (Kenichi, Nakamura)

鈴鹿医療科学大学・薬学部・助手

研究者番号：70512002

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：生薬「カッコン」には、イソフラボンC-配糖体のプエラリンが多く含まれている。我々は、プエラリンをダイゼインに代謝する腸内細菌株strain PUEを用いて研究を行い、本菌株が産生するプエラリンC-配糖体代謝酵素群の大腸菌での発現系を構築した。大腸菌に発現させた組換え酵素タンパク質を用いて酵素反応を行った結果、プエラリンからダイゼインへのC-配糖体代謝反応が進行した。

研究成果の概要(英文)：Puerarin is an isoflavone C-glucoside contained in the roots of Pueraria lobata Ohwi. We previously isolated a human intestinal bacterium, called strain PUE, which can metabolize puerarin to daidzein. In this study, cloning, expression, purification, and characterization of enzymes that cleave puerarin C-glucosidic bond from strain PUE were accomplished.

研究分野：天然物化学

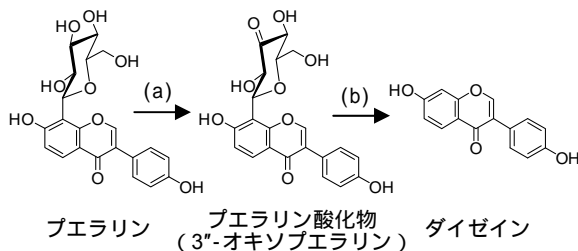
キーワード：C-配糖体 腸内細菌 プエラリン 代謝酵素

## 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 2% 以上含まれている。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、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 - 配糖体代謝酵素は、これまで同定されていない。

我々はこれまで、プエラリンをダイゼインと 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'-オキソプエラリンとその互変異性体) を経由する数段階の酵素反応であり、複数の酵素が本代謝反応に関与することを明らかにしている (図 1)。また、strain PUE が産生するプエラリン代謝酵素群に関する研究を行い、プエラリンをプエラリン酸化物に代謝する酵素 (プエラリン酸化酵素 (図 1-a)) の精製を行い、酵素の部分アミノ酸配列情報を得ている。一方、プエラリン酸化物をダイゼインに代謝する酵素 (プエラリン酸化物代謝酵素 (図 1-b)) の精製・同定には至っていない。



(a) プエラリン酸化酵素, (b) プエラリン酸化物代謝酵素

図 1 腸内細菌株 strain PUE 由来の酵素が触媒するプエラリン C - 配糖体代謝反応

生薬、漢方薬の化学成分にはプエラリン以外にも様々な C - 配糖体が含まれているため、C - 配糖体代謝酵素は漢方薬の薬効と密接に関わっていると考えられる。また近年、SGLT2 阻害薬 (糖尿病治療薬) などの新たな C - 配糖体医薬品が開発されており、今後、C - 配糖体代謝酵素の臨床的重要性が増して

いくと予測される。

このような背景から、我々は腸内細菌株 strain PUE 由来のプエラリン代謝酵素の研究を計画した。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、腸内細菌株 strain PUE が産生するプエラリン C - 配糖体代謝酵素群を同定し、プエラリン代謝に関わる各酵素タンパク質の機能を解析することにより、プエラリン C - 配糖体代謝機構を解明することである。

## 3. 研究の方法

### (1) プエラリン酸化物代謝酵素の精製と部分アミノ酸配列の解析

GAM 培地を用いて腸内細菌株 strain PUE を嫌氣的に培養後、菌体を超音波ホモジナイザーで破碎し、粗酵素液を調製した。粗酵素液を数段階のカラムクロマトグラフィーに付し、プエラリン酸化物をダイゼインに代謝するプエラリン酸化物代謝酵素を部分精製した。プロテインシーケンサーを用い、プエラリン酸化物代謝酵素の N 末端アミノ酸配列を解析した。

### (2) 腸内細菌株 strain PUE の全ゲノム配列の解析

次世代シーケンサーを用い、strain PUE の全ゲノム配列を解析した。プエラリン酸化酵素、またはプエラリン酸化物代謝酵素の N 末端アミノ酸配列情報を基に、それぞれの酵素タンパク質をコードする遺伝子を同定した。

### (3) 大腸菌を用いた酵素タンパク質発現系の構築

#### 酵素タンパク質発現大腸菌の作製

プエラリン酸化酵素、またはプエラリン酸化物代謝酵素をコードする遺伝子の塩基配列情報を基にプライマーを設計し、腸内細菌株 strain PUE のゲノム DNA を鋳型に PCR を行い、遺伝子を増幅した。増幅した遺伝子を pET-21a(+) ベクターにライゲーションし、得られたベクターを大腸菌 BL21(DE3) 株に導入して、酵素タンパク質発現大腸菌を得た。

#### 組換え酵素タンパク質の調製

酵素タンパク質発現大腸菌を LB 培地で培養後、IPTG (isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside) を添加し、目的の酵素タンパク質を誘導した。菌体を緩衝液に懸濁後、超音波ホモジナイザーで菌体を破碎し、粗酵素液を得た。粗酵素液を数段階のカラムクロマトグラフィーに付し、目的の酵素タンパク質を精製した。

#### 4. 研究成果

##### (1) プエラリン酸化酵素の機能解析

プエラリン酸化酵素の大腸菌発現系の構築とプエラリン代謝活性の評価

研究の方法の項に従い、腸内細菌株 strain PUE のゲノム DNA 上のプエラリン酸化酵素をコードする遺伝子を同定し、プエラリン酸化酵素の大腸菌発現系を構築した。プエラリン酸化酵素は約 39 kDa のタンパク質であり、Blast 検索の結果、Gfo/Idh/MocA family 酸化還元酵素と相同性を示した。

組換え大腸菌から精製したプエラリン酸化酵素を用い、プエラリンを基質に 37°C で酵素反応を行い、HPLC で代謝物を分析した。その結果、プエラリン酸化酵素のみを用いた条件では、プエラリンからプエラリン酸化物への代謝反応は進行しなかった。種々検討した結果、酵素反応溶液にジヒドロキシアセトン 1-リン酸を添加することにより、プエラリン糖 3 位の酸化反応が進行することを見出した。

プエラリン酸化酵素の補因子（ジヒドロキシアセトン 1-リン酸）の役割の解明

我々は、プエラリン酸化反応におけるジヒドロキシアセトン 1-リン酸の役割を、酸化還元反応における水素の受容体と予測した。そこで、ジヒドロキシアセトン 1-リン酸の還元体であるグリセロール 1-リン酸を補因子に用い、プエラリン酸化物を基質に酵素反応を行い、水素の授受によりプエラリンが生成するか検討した。その結果、(R)-グリセロール 1-リン酸を補因子に用いた条件では、プエラリン酸化物からプエラリンへの還元反応が進行した。一方、(S)-グリセロール 1-リン酸を用いた場合、反応は進行しなかった。これらの結果から、プエラリン酸化酵素は図 2 の反応を可逆的に触媒する酵素であることを明らかにした。

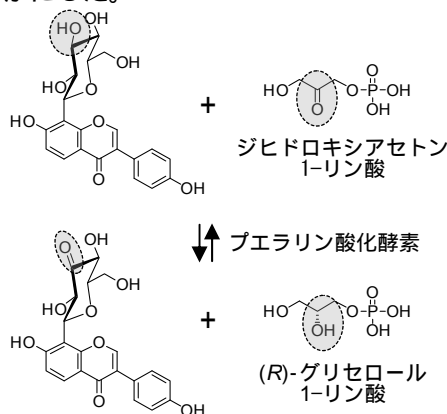


図 2 プエラリン酸化酵素が触媒する酵素反応

##### (2) プエラリン酸化物代謝酵素の機能解析

研究の方法の項に従い、腸内細菌株 strain

PUE の粗酵素液を調製し、プエラリン酸化物代謝酵素を精製した。腸内細菌株 strain PUE のゲノム DNA 上のプエラリン酸化物代謝酵素をコードする遺伝子を同定し、プエラリン酸化物代謝酵素の大腸菌発現系を構築した。プエラリン酸化物代謝酵素は約 37 kDa のタンパク質と約 16 kDa のタンパク質の複合体であった。Blast 検索の結果、約 37 kDa のタンパク質はキシロース異性化酵素と相同性を示した。約 16 kDa のタンパク質は機能既知タンパク質と相同性を示さなかった。

組換え大腸菌から精製したプエラリン酸化物代謝酵素を用い、プエラリンまたはプエラリン酸化物を基質に 37°C で酵素反応を行い、HPLC で代謝物を分析した。その結果、プエラリン酸化物を基質に用いた場合は代謝物としてダイゼインが検出されたが、プエラリンを基質に用いた条件では、代謝は進行しなかった。プエラリン酸化物代謝酵素は補因子を添加していない条件下でも、プエラリン酸化物をダイゼインに代謝した。

##### (3) プエラリンからダイゼインへの代謝反応

プエラリン酸化酵素、プエラリン酸化物代謝酵素と補因子のジヒドロキシアセトン 1-リン酸を同時に用い、プエラリンを基質に 37°C で酵素反応を行い、代謝物を HPLC で分析した。その結果、プエラリン C-配糖体代謝反応が進行し、アグリコンのダイゼインが検出された。

現在、これらの成果をまとめた論文を作成中である。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 4 件)

中村賢一、有竹萌音、鍋島渉、Shu ZHU、小松かつ子、服部征雄、岩島誠  
腸内細菌由来 C-配糖体代謝酵素の基質特異性の解析  
日本薬学会第 137 年会  
2017 年 03 月 24 日～27 日  
仙台国際センター（宮城県仙台市）

中村賢一、大洲章裕、各務有里、川口宗一郎、Shu ZHU、小松かつ子、服部征雄、岩島誠  
プエラリン酸化物をダイゼインに代謝する腸内細菌由来酵素の機能解析  
日本生薬学会第 63 回年会  
2016 年 09 月 24 日～25 日  
富山国際会議場（富山県富山市）

中村 賢一、黒川梨佐、大洲章裕、各務

有里、川口宗一郎、Shu ZHU、小松かつ子、  
服部征雄、岩島誠  
腸内細菌由来 C-配糖体マンギフェリン代  
謝酵素の精製と機能解析  
日本薬学会第 136 年会  
2016 年 03 月 26 日～29 日  
パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）

中村賢一、河合礼薫、Shu ZHU、  
小松かつ子、服部征雄、岩島誠  
腸内細菌 strain PUE 由来プエラリン  
C-配糖体代謝酵素遺伝子群の同定  
第 32 回和漢医薬学会学術大会  
2015 年 08 月 22 日～23 日  
富山国際会議場（富山県富山市）

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）  
取得状況（計 0 件）

## 6．研究組織

### (1)研究代表者

中村 賢一（Kenichi Nakamura）  
鈴鹿医療科学大学・薬学部・助手  
研究者番号：70512002