

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：12102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14484

研究課題名(和文) 土壌微生物による新規ターメリック代謝

研究課題名(英文) Turmeric degradation by microorganisms from soil

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) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：ターメリックに含まれる生理活性物質クルクミンはポリフェノールの一種で、我々が大腸菌からクルクミン代謝酵素を初めて発見したが、それ以外の代謝酵素の報告例はない。本研究では、大腸菌とは異なる代謝産物を生成する土壌微生物のクルクミン代謝を解析した。
本土壌細菌から精製した酵素の部分アミノ酸配列情報を基に、本酵素の構造遺伝子のクローニングに成功した。また、強力なT7プロモーター支配下に本遺伝子を連結することで構築した発現プラスミドを用いて、大腸菌を宿主として本酵素の大量発現系を構築した。組換え酵素を精製し、本酵素の諸性質の一部を解析した。

研究成果の概要(英文)： Although enzymes involved in the degradation of curcumin included in turmeric were unclear, we previously obtained curcumin-converting enzyme from *E. coli* and characterized. From soil, we also isolated the other microorganism with the ability of curcumin-degradation.

The N-terminal partial amino acid sequences of the curcumin-converting enzyme purified from the microorganism were determined. Based on the sequence information, we succeeded in cDNA cloning of the gene coding for the enzyme, and determination of the whole nucleotide sequence of the gene. We also succeeded in the construction of its expression plasmid, and overexpression of the curcumin-converting enzyme in *E. coli* carrying the resultant plasmid.

研究分野：応用微生物学

キーワード：酵素 微生物

1. 研究開始当初の背景

ターメリックに含まれる生理活性物質クルクミンは薬理作用を示すポリフェノール的一种である。肝機能を改善する漢方薬として古くから、最近ではサプリメント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。

クルクミン代謝産物として知られているジヒドロクルクミンやテトラヒドロクルクミンが *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、これら代謝産物がクルクミンのもつ生理活性の活性本体であると考えられている。しかし、自然界において植物により生産されるクルクミン量に対し、ジヒドロクルクミンやテトラヒドロクルクミンの生産量は非常に少ない。また、ジヒドロクルクミンを経由してクルクミンからテトラヒドロクルクミンに変換される経路は同定されているものの、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)同定されていない。

このような状況の中、我々は、微生物によるクルクミンの代謝経路およびそれに関わる酵素の解析を目的として研究を行ってきた。まず、ヒトの便を分離源としてクルクミン含有培地で生育する菌のスクリーニングを行い、大腸菌 (*Escherichia coli*) がクルクミンをジヒドロクルクミン経路でテトラヒドロクルクミンに変換することを見いだした。大腸菌からこの代謝酵素を世界で初めて精製し、その諸性質を解析し、NADPH-dependent curcumin/dihydrocurcumin reductase と命名した。

2. 研究の目的

本研究では、大腸菌のクルクミン代謝産物である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代謝産物を生成する土壌微生物を単離し、その代謝経路の解明と代謝酵素の機能解析を行うことを目的とする。

既に、ウコン栽培土壌を分離源として環境中に存在するクルクミン分解能のある微生物の探索を行い、複数の候補微生物の中から最も高い活性を示した微生物(以下、本菌とする)を本研究では対象とする。本菌から、クルクミン代謝酵素遺伝子をクローニングし、クルクミン代謝酵素の異種大量発現系を構築後、クルクミン代謝酵素の諸性質を解析することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) クルクミン代謝酵素遺伝子のクローニング

精製が完了したクルクミン代謝酵素は電気泳動後、PVDF膜に転写して切り出し、プロテインシーケンサーにて分析し、クルクミン代謝酵素のN末端部分アミノ酸配列を決定する。その情報を基にオリゴヌクレオチドプライマーを作成し、PCR法を用いて本酵素の構造遺伝子をクローン化し塩基配列を決定する。

(2) クルクミン代謝酵素の大量発現系の構築

クルクミン代謝酵素遺伝子を強力プロモーターの支配下においた発現プラスミドを構築する。得られた発現プラスミドで大腸菌を形質転換し、異種発現を試みる。その後、様々な培養条件の検討を行い、本菌のクルクミン分解酵素活性が高くなる最適培養条件の検討を行う。

(3) クルクミン代謝酵素の精製と諸性質の解析

大量培養した菌体を用いて、(クルクミン分解活性を測定しながら)各種クロマトグラフィー操作によって、SDS-ポリアクリルアミドゲル上で単一バンドになるまでクルクミン分解酵素を単離精製する。得られる精製酵素標品を用いて酵素化学的諸性質を明らかにする。

4. 研究成果

(1) クルクミン代謝酵素遺伝子のクローニング

本クルクミン代謝酵素は不安定であるため本菌を最適培養条件で大量培養を行い、硫酸アンモニウムによる分画と、各種カラムクロマトグラフィー操作による最適化した方法でクルクミン代謝酵素の精製を行った。本クルクミン代謝酵素の精製標品をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動に供した。電気泳動後、タンパク質をPVDF膜に転写し、20残基のN末端部分アミノ酸配列を決定した。

本菌のクルクミン代謝酵素活性が高くなる培養条件で培養し、対数増殖期に達した時に培養液を遠心することにより集菌を行った。集菌した菌体を液体窒素で急冷し、細胞を粉砕処理した。得られた菌体粉末を溶菌バッファーに懸濁し、溶菌処理後、カラムを用いて total RNA を抽出した。その後、DNase 処理を行い、オリゴ dT プライマーを用いて

逆転写酵素処理を行い、mRNA-cDNA hybrid を合成した。さらに、RNaseH 処理を行うことで single-strand cDNA を調製した。

クルクミン代謝酵素の精製標品の N 末端部分アミノ酸配列情報を基にオリゴヌクレオチドプライマーを作成し、本菌から調製した single-strand cDNA を鋳型として PCR 法を用いて、本酵素の構造遺伝子の cDNA クローニングに成功した。さらに、構造遺伝子全長の塩基配列を決定するとともに、本構造遺伝子が存在する領域の本菌のゲノム DNA の塩基配列を決定し、両者を比較することで、本酵素遺伝子のエキソン領域・イントロン領域を決定した。

本菌の構造遺伝子から推定されるアミノ酸配列は、大腸菌の NADPH-dependent curcumin/dihydrocurcumin reductase のアミノ酸配列と相同性を示し、アミノ酸配列レベルでも本菌のクルクミン代謝酵素は NADPH-dependent curcumin/dihydrocurcumin reductase と似ていることが示唆された。

(2) クルクミン代謝酵素の大量発現系の構築

クルクミン代謝酵素の構造遺伝子を PCR 法を用いて増幅し、制限酵素処理した pET-24a(+)ベクターの強力な T7 プロモーター支配下に本遺伝子を連結することで発現プラスミドを構築した。得られた発現プラスミドで大腸菌 BL21 Codonplus (DE3)-RIL 株を形質転換し、異種発現を試みた。イソプロピル-β-チオガラクトピラノシド (IPTG) 誘導により培養した菌体を集菌し、無細胞抽出液を調製し、酵素活性測定を行った結果、クルクミン代謝酵素活性を示した。無細胞抽出液を SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動に供した結果、本菌から精製したクルクミン代謝酵素のバンドと同じ位置にタンパク質のバンドが認められ、可溶性への発現に成功した。

次に、大腸菌で異種発現したクルクミン代謝酵素の活性を高めるべく、様々な培養条件の検討を行った。坂口フラスコへの培地量、誘導剤 IPTG の濃度、IPTG 添加後の培養温度と培養時間を検討し、培地を 500 ml 入れた 2 L 坂口フラスコで、IPTG を最終濃度で 0.1 mM 添加後、28°C、24 時間培養した時に、最も高いクルクミン代謝活性を示し、最適培養条件を確立した。

(3) クルクミン代謝酵素の精製と諸性質の解析

前述の最適培養条件において発現プラスミドを導入した大腸菌 BL21 Codonplus (DE3)-RIL 株を大量に培養した。培養液を遠心することにより集菌を行い、細胞

を破碎した。破碎後、得られた画分を遠心し、上清を無細胞抽出液として調製した。硫酸アンモニウムによる分画と、各種カラムクロマトグラフィー操作により、SDS-ポリアクリルアミドゲル上で単一バンドにまでクルクミン代謝酵素を精製することに成功した。

精製した標品を用いて、クルクミン代謝酵素の分子量や、最適温度・pH や、温度安定性、pH 安定性やキネティックパラメーターなど本酵素の諸性質を決定し、大腸菌の NADPH-dependent curcumin/dihydrocurcumin reductase の性質と比較した。

本菌のクルクミン代謝に関わる初発酵素は大腸菌と同じ NADPH-dependent curcumin/dihydrocurcumin reductase であったが、本菌は大腸菌のクルクミン代謝経路中では見られないジヒドロクルクミンおよびテトラヒドロクルクミンとは異なる化合物をクルクミン代謝産物とする。本研究において、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真核生物が土壤に存在することを実証し、多様な微生物によるクルクミン代謝が示唆された。

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 0 件)

[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

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

小林 達彦 (KOBAYASHI, Michihiko)

筑波大学・生命環境系・教授

研究者番号：70221976

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

(3) 連携研究者
なし

(4) 研究協力者
なし