

令和 4 年 9 月 8 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K05784

研究課題名(和文)新規C-C結合切断・形成酵素の機能解析と天然・非天然型C-配糖体の新規合成法開発

研究課題名(英文)Characterization of enzymes involved in C-glycosides 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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：天然には植物などが生産する様々な配糖体が存在し、それらの中には漢方薬に含まれるなど生理活性が注目される化合物も存在する。一般的な配糖体は糖が酸素原子に結合したO-配糖体であるのに対し、本研究対象とした化合物は炭素(C)に結合したC-配糖体である。C-配糖体はO-配糖体に比べて熱、酸、酵素に対して安定であり、分解されにくいと考えられていた。本研究ではこのC-配糖体を代謝する微生物から、C-配糖体を効率的に分解できる酵素を発見し、その性質を詳細に明らかにするとともに立体構造の解明にも成功した。本研究成果は今後のC-配糖体代謝研究のさらなる発展に貢献すると期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

C-配糖体が他のO-配糖体とは全く異なる経路で代謝されることを解明し、その反応に関わる2種の酵素を同定した。さらに本研究により世界で初めて微生物由来のC-配糖体代謝酵素2種の結晶構造解析が明らかになった。結晶構造の解明により、反応を触媒するアミノ酸が特定され詳細な反応機構を提案することができた。C-配糖体を代謝する酵素が明らかになったことでそれらの酵素を利用し、分解されにくいC-配糖体を分解することで新たな生理活性物質の創出にも繋がる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：In nature, there are various glycosides produced by plants and other organisms, and some of these compounds have attracted attention for their bioactivity. While most glycosides are O-glycosides, in which a sugar is attached to an oxygen atom, the compounds in this study are C-glycosides, in which a sugar is attached directly to carbon of aglycone. C-glycosides are more stable against heat, acid, and enzymes than O-glycosides. In this study, we discovered enzymes that can efficiently degrade C-glycosides from microorganisms that catabolize C-glycosides, and succeeded in clarifying their detailed biochemical properties as well as their three-dimensional structures. The results of this research are expected to contribute to the further development of research on C-glycoside metabolism in the future.

研究分野：応用微生物学

キーワード：C-配糖体 微生物

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

配糖体はフラボノイドなどの化合物に糖が付加した化合物で、糖がアグリコン（配糖体の糖以外の部分）と結合する原子の種類によって、*O*-配糖体、*C*-配糖体、*N*-配糖体、*S*-配糖体に分類される。配糖体は糖が付加することで化合物の安定性向上や可溶性向上、生理活性の変化が見込まれている。一般的に存在する配糖体は*O*-配糖体であるが、*C*-配糖体も植物などを中心に300種類以上が報告されている。*C*-配糖体の特徴は、他の配糖体と異なりアグリコンの炭素に糖の炭素原子が強固なC-C結合で直接結合していることである。天然には植物、昆虫、微生物が生合成した様々な*C*-配糖体が存在するが、それらの化合物が微生物によってどのように分解代謝されるのかについては不明であった。特に天然において*C*-配糖体が最も分解されるであろう土壌中における土壌細菌による*C*-配糖体の分解については、全く報告されていなかった。また、腸内では腸内細菌により*C*-配糖体が分解されることが知られていたが、分解酵素は同定されておらず、微生物による*C*-配糖体代謝は酵素・遺伝子レベルでは未知であった。

### 2. 研究の目的

*C*-配糖体の微生物による分解経路が酵素レベルでは未知であったため、*C*-配糖体分解微生物の取得、さらにその微生物から*C*-配糖体分解酵素を同定することを目的とした。本研究ではカイガラムシという甲虫の一種が生産するカルミン酸という世界的に利用されている*C*-配糖体化合物の食用色素を基質として代謝微生物を取得し、分解酵素を同定し、生化学的解析と結晶構造解析により詳細に機能解析を行うこととした。

### 3. 研究の方法

#### (1) カルミン酸分解微生物のスクリーニング

まず、筑波大学周辺から土壌サンプルを集め、カルミン酸分解微生物のスクリーニングを行なった。スクリーニング培地にはカルミン酸を唯一の炭素源として含有する合成培地を用いた。この培地で生育した微生物をカルミン酸資化能をもつ微生物の候補株として単離した。単離した微生物それぞれについて、純粋培養を行い、菌体を破砕した後に遠心分離で菌体残渣を除去し、無細胞抽出液を調製した。各微生物から調製した無細胞抽出液とカルミン酸との反応を試み、HPLC等でカルミン酸分解活性を検討した。

#### (2) カルミン酸分解酵素の精製・同定

分解活性が見られたカルミン酸分解菌よりカルミン酸分解活性を指標に各種カラムクロマトグラフィにより目的酵素を精製した。(1)と同様に調製した無細胞抽出液をイオン交換カラムや疎水カラム等を用いて分画し、得られたフラクションそれぞれについてカルミン酸を加えて分解活性を測定した。活性があったフラクションについては、さらに別のカラムを利用して分画し、精製を進めた。最終的にSDS-PAGE上で単一になるまで精製し、目的酵素のN末端部分アミノ酸配列を解析した。並行して、カルミン酸分解菌のゲノムを決定し、目的酵素のN末端部分アミノ酸配列と一致する遺伝子を同定した。

#### (3) カルミン酸分解酵素およびホモログ酵素のクローニング・異種発現・精製

同定した遺伝子については、大腸菌用発現ベクターにクローニングし、大腸菌で異種発現を行い、組換え酵素を精製した。また、本酵素と相同性のあるホモログ酵素についても別の土壌細菌から同様にクローニング・異種発現・精製した。精製はNi Affinityカラムを用いてHisタグ精製により行った。

#### (4) カルミン酸分解酵素の機能解析

これら精製した組換え酵素を用いて、カルミン酸に対する酵素動力学定数 ( $K_m$ ,  $V_{max}$ ,  $k_{cat}$ ) や至適反応条件 (pH, 温度)、各種金属、阻害剤による酵素活性への影響の検討を行った。また、基質特異性解明のため、カルミン酸以外の購入可能な複数の*C*-配糖体、*O*-配糖体も基質として反応を試み、カルミン酸分解酵素およびそのホモログ酵素のそれら基質に対する比活性を算出した。また、結晶構造解析とホモログ酵素のアミノ酸相同性に基づいて変異酵素も作成し、活性に重要なアミノ酸残基の特定も試みた。

#### (5) カルミン酸分解酵素ホモログの結晶構造解析

土壌細菌よりクローニングした複数の*C*-配糖体分解酵素について、酵素濃度・緩衝液の種類などを検討しながら調製し、それぞれ各種結晶化試薬を用いて結晶化を試みた。結晶が得られた条件についてはさらにpHや沈殿剤濃度、結晶化温度の検討を行った。また、アポ酵素に加えて、基質アナログのソーキングもを行い、酵素基質複合体構造の解明も行った。

### 4. 研究成果

#### (1) 土壌微生物由来カルミン酸代謝酵素の同定と機能解析

スクリーニングによって土壌からカルミン酸資化微生物 5-2b 株を取得した。高速液体クロマトグラフィ

(HPLC)等による分析の結果、5-2b株によるカルミン酸の代謝初発反応は糖をアグリコンから分離する反応で、その反応は2段階(2つの酵素が関与)で進行することがわかった。最初の反応は糖の3位の水酸基を酸化しケトに変換する反応で、続く反応は3位が参加された糖とアグリコンの間のC-C結合を切断する反応であった。それぞれの反応を担う酵素の精製を行い、ゲノムから遺伝子を特定したところ、カルミン酸代謝酵素CarAおよびCarBを同定した。最初の酸化反応を担うCarAはカルミン酸と分子状酸素から3'-oxo-カルミン酸と過酸化水素を生じ、補酵素としてFADを用いるC-配糖体酸化酵素で、新規酵素であることが明らかになった(下図)。また、2段階目の反応を担うC-C結合切断酵素CarBは既知の酵素と高い相同性を示さない新規酵素で、CarAによって生じた3'-oxo-カルミン酸に作用し糖とケルメス酸(カルミン酸のアグリコン)を生じた。CarBは2つのサブユニットからなるヘテロダイマーの酵素で活性中心に2価の金属を保持しており、活性に必須であった。また、データベースより他の土壌細菌もCarA/Bホモログをもっていることがわかり、それらについても2種の菌からCarAホモログ2つ、CarBホモログ3つをクローニング、異種発現、機能解析を行い、CarA/B同様、C-配糖体代謝活性を有することを明らかにした。

各種C-, O-配糖体に対し基質特異性を検討した結果、CarA、CarBはスクリーニングに用いた基質であるカルミン酸に対して最も強い活性を示した一方、他の土壌細菌からクローニングしたホモログ酵素はそれぞれ別のC-配糖体フラボノイドに強い活性を示し、さらにそれらは、フラボノイドに対する糖の位置によって、基質を認識していることが示唆された。また、CarAおよびそのホモログ酵素はO-配糖体に対しても活性を示したが、C-配糖体に対する活性と比較して100分の1程度であったためCarAは上述の通りC-配糖体酸化酵素とした。

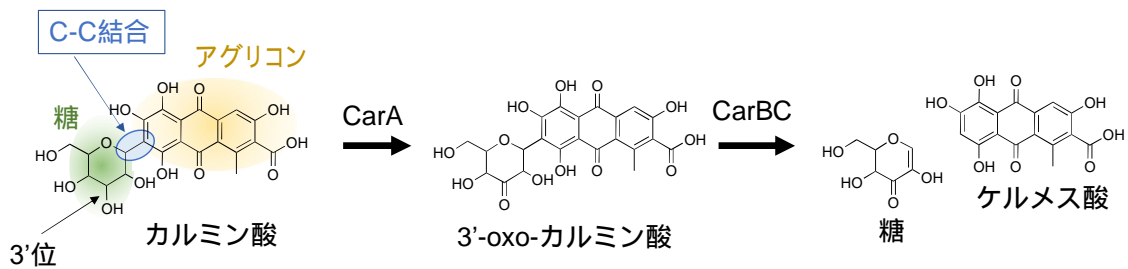
### (2) C-配糖体代謝酵素の結晶構造解析

同定したC-配糖体代謝酵素について結晶化を試み、CarA、CarB酵素のホモログ酵素の結晶化に成功し、X線結晶構造解析により、両酵素の構造を明らかにした。アポ型の酵素だけでなく、CarAホモログ酵素と補酵素FADとの共結晶構造、CarBホモログ酵素と基質アナログとの共結晶構造も取得することができた。これにより両酵素の活性中心、基質や補酵素が結合した場合に動くドメインを特定し、構造変化を明らかにすることができた。さらに活性中心のアミノ酸残基をアラニンに置換した変異酵素を作成し活性測定を行って、反応に関与するアミノ酸残基も同定することができ、両酵素について初めて立体構造に基づく反応機構を提唱した。また、CarBについては、活性に必須な金属と結合するアミノ酸残基も同定し、それらはホモログ酵素間でよく保存されていることがわかった。

### (3) 天然におけるC-配糖体代謝の解明

同定した土壌細菌由来C-配糖体代謝酵素を用いて、様々なC-配糖体を基質に反応を試みた。その結果、アントラキノン骨格を持つカルミン酸だけでなく、C-配糖体フラボノイドに活性を示す酵素も同定することができ、さらに、糖の付加する位置によって基質特異性が異なることが判明した。また、本研究で同定したC-配糖体代謝酵素はO-配糖体に対しても一部活性を示したが、その活性はC-配糖体に対するものと比較して100分の1程度であった。そのため、今回同定した酵素はC-配糖体に特化した酵素で、C-配糖体が加水分解酵素によって分解されるO-配糖体等の他の配糖体とは、天然において全く異なる特異的な経路で代謝されることが明らかになった。また、ごく最近、腸内細菌からもC-配糖体代謝酵素が報告された。腸内細菌も土壌細菌同様2段階の反応でC-配糖体のC-C結合を切断し糖を切り離す。C-C結合切断酵素(CarB)は腸内細菌のC-C結合切断酵素とアミノ酸配列相同性があったものの、(糖の3位を酸化する)最初の反応を触媒する酵素(CarA)と腸内細菌の糖酸化酵素は相同性のない酵素であった。土壌細菌由来のCarAがFAD依存の酸素を使う酸化酵素であったのに対して、腸内細菌から報告された糖酸化酵素はNAD依存で酸素を用いない全く異なるファミリーの酵素であった。酸素の存在する土壌環境と、酸素のない腸内に生育する細菌によって代謝に酸素を必要とするかどうか異なることは、非常にリーズナブルで、それぞれの環境で細菌がC-配糖体代謝を進化させてきたのだと考えられる。本研究により、腸内だけでなく土壌中においても微生物によるC-配糖体代謝が広く見られ、様々なC-配糖体に対して微生物がその分解を担っていることが推測された。

本研究により、2つの新規酵素「C-配糖体酸化酵素」「C-配糖体C-C結合切断酵素」を土壌細菌から同定することができた。また、C-配糖体代謝酵素の結晶構造を初めて明らかにすることができ、これまで未知であった土壌細菌のC-配糖体代謝について酵素・遺伝子レベルで詳細に解明することができたことは基礎科学的に重要な意義を有すると考えている。今後、さらにC-配糖体代謝酵素研究が進むことで未知の酵素の発見や、様々な天然C-配糖体化合物から新たな代謝産物の発見も期待される。



図：CarA、CarBによるカルミン酸(C-配糖体)の代謝

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2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 2件）

1. 著者名 Kumano Takuto, Hori Sanae, Watanabe Satomi, Terashita Yuzu, Yu Hong Yang, Hashimoto Yoshiteru, Senda Toshiya, Senda Miki, Kobayashi Michihiko	4. 巻 118
2. 論文標題 FAD-dependent C-glycoside?metabolizing enzymes in microorganisms: Screening, characterization, and crystal structure analysis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 e2106580118
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.2106580118	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Mori Takahiro, Kumano Takuto, He Haibing, Watanabe Satomi, Senda Miki, Moriya Toshio, Adachi Naruhiko, Hori Sanae, Terashita Yuzu, Kawasaki Masato, Hashimoto Yoshiteru, Awakawa Takayoshi, Senda Toshiya, Abe Ikuro, Kobayashi Michihiko	4. 巻 12
2. 論文標題 C-Glycoside metabolism in the gut and in nature: Identification, characterization, structural analyses and distribution of C-C bond-cleaving enzymes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 6294
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-021-26585-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 渡辺 聖実、堀 早苗、寺下 柚子、橋本 義輝、熊野 匠人、小林 達彦
2. 発表標題 土壌微生物におけるC-配糖体代謝の初発酵素反応
3. 学会等名 日本農芸化学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 渡辺 聖実、草刈 雅和、寺下 柚子、熊野 匠人、橋本 義輝、小林 達彦
2. 発表標題 配糖体分解微生物の単離と産物の同定
3. 学会等名 日本農芸化学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 堀 早苗、寺下 柚子、熊野 匠人、橋本 義輝、小林 達彦
2. 発表標題 C-配糖体代謝酵素の探索と解析
3. 学会等名 日本農芸化学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 堀 早苗、熊野 匠人、寺下 柚子、橋本 義輝、小林 達彦
2. 発表標題 赤色色素代謝微生物及び酵素の探索
3. 学会等名 日本放線菌学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 熊野 匠人、渡辺 聖実、堀 早苗、寺下 柚子、森 貴裕、何 海兵、千田 美紀、橋本 義輝、千田 俊哉、阿部 郁朗、小林 達彦
2. 発表標題 C-配糖体代謝酵素の機能および結晶構造解析
3. 学会等名 日本農芸化学会
4. 発表年 2022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
---------	---------