

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：12102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26660055

研究課題名(和文) ウコン生理活性成分の微生物代謝

研究課題名(英文) Microbial degradation of bioactive substance from turmeric

研究代表者

小林 達彦 (KOBAYASHI, Michihiko)

筑波大学・生命環境系・教授

研究者番号：70221976

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：クルクミンはウコンに含まれ薬理作用を有する黄色色素で、その代謝に関わる酵素は未同定であった中、大腸菌がクルクミンを代謝できることを発見した。本研究では、環境中の微生物が担う代謝経路を解明することを目指した。

土壌より単離したクルクミン代謝活性を示す微生物が、大腸菌のクルクミン代謝化合物とは異なるクルクミン代謝産物を生成することを見だし、多様なクルクミン代謝経路の存在が示唆された。生理学的試験や資化性試験等を行い、本菌の同定を行った。本菌からクルクミン代謝酵素を単離精製することに成功し、本酵素によるクルクミンからの最終産物を同定した。

研究成果の概要(英文)： While enzymes involved in the metabolism of curcumin, a yellow pigment, derived from the rhizomes of a plant (*Curcuma longa* Linn) were unknown, we previously purified curcumin-converting enzyme from *E. coli* and characterized. Here, we isolated microorganisms that degrade a curcumin from soil.

From the microorganism exhibiting the highest activity among newly isolated microorganisms, we identified a novel metabolite of curcumin, and found that the metabolite is different from those from *E. coli*. Based upon the physiological characteristics, the isolated microorganism was identified. We succeeded in the purification of the curcumin-converting enzyme and identification of its enzymatic reaction product.

研究分野：応用微生物学

キーワード：微生物 酵素

1. 研究開始当初の背景

クルクミンは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。

ジヒドロクルクミン(DHC)やテトラヒドロクルクミン(THC)といったクルクミン代謝産物は、*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。しかし、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、DHCやTHCの生産量はごく僅かである。また、クルクミンからDHCを経由してTHC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、微生物によりクルクミンの代謝産物を得ることを目的として研究を行ってきた。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をスクリーニングした結果、大腸菌(*Escherichia coli*)がクルクミンをDHCやTHC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)と命名した。

2. 研究の目的

本研究では、ヒト(腸内細菌を含む)がもつクルクミン代謝経路のほかに、環境中の微生物が担う代謝経路を解明することを目指す。

ウコン栽培土壌環境中において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単離に成功している。予備的検討により、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、クルクミン代謝産物の同定と代謝酵素の精製を目的とする。

3. 研究の方法

(1) クルクミン代謝産物の同定

クルクミン分解に関わる微生物・酵素の探索を行い、ウコン栽培土壌よりクルクミン分解菌のスクリーニングに既に成功している。また、最も高い活性を示した本菌を用いてクルクミン代謝産物を予備的に調べた結果、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)によってDHCやTHCとは異なるピークが検出された。

今回、本菌の菌体あるいは無細胞抽出液を用いてクルクミンと反応させ、反応産物を溶媒抽出し、分取HPLCにより単離精製を試みた。精製したクルクミン代謝産物は各種方法により構造決定を試みた。

(2) クルクミン変換酵素活性が向上する最適培養条件の決定と精製

まず、クルクミン変換活性を高めるべく、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向上する最適培養条件の検討を行った。その後、決定した条件で大量に培養し、(クルクミン変換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-PAGE上で単一バンドになるまでクルクミン変換酵素の単離精製を試みた。得られる精製酵素標品を用いて酵素化学的諸性質の検討を行った。

4. 研究成果

(1) クルクミン代謝産物の同定

ウコン栽培土壌より単離した本菌の菌体を用いてクルクミンと反応させた後、株式会社島津製作所の高速度液体クロマトグラフィー(HPLC) LC-10ADvpシステムを用いたHPLCに供した結果、DHCおよびTHCとは異なる保持時間の新たなピークを検出した。新たなピークの吸収スペクトルはDHCおよびTHCの吸収スペクトルとは異なっていた。休止菌体反応を行った反応液を島津製作所のHPLC質量分析システムLCMS-8030を用いてクルクミン代謝産物の質量を決定した結果、DHCおよびTHCとは異なる化合物と同定した。本クルクミン代謝産物は、(我々が見いだした)大腸菌でのクルクミン代謝経路中では見られない化合物であったため、多様なクルクミン代謝経路の一端を解明することに成功した。

形態観察を行った結果、本菌は平板培地上でピンク～赤橙色のコロニーを形成した。本菌の栄養細胞は多極出芽により増殖し、真菌糸を形成したが、有性生殖器官の形成は認められなかった。また、生理学的試験や資化性試験等を行った結果、本菌はグルコースを発酵せず、窒素源として硝酸を資化したが、炭素源としてイノシトールおよびD-グルクロン酸を資化しなかった。また、ジアゾニウム・ブルー反応および尿素の加水分解試験はともに陽性であった。各種試験および26S rRNA遺伝子解析の結果、本菌は酵母の1種であることが判明した。バクテリアとは異なる酵母がクルクミン資化微生物として単離できたことから、真核生物も含む多様な微生物によりクルクミンが資化されることが明らかとなった。

(2) クルクミン変換酵素活性が向上する最適培養条件の決定と精製

クルクミン変換酵素の活性測定は、HPLC LC-10ADvp システムに接続した Cosmosil 5C18-AR II カラム(ナカライテスク株式会社)を用い、基質であるクルクミンの減少量を定量することで行った。サンプルのタンパク質濃度はブラッドフォード法に従って測定した。

本菌のクルクミ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。まず、最少培地に炭素源として添加する各種糖類の効果を検討した。マンニトールやグリセロールを炭素源として添加すると、培養液中の菌体量はクルクミンを炭素源とした時よりも増加した。しかし、マンニトールやグリセロール添加時のクルクミン変換活性はクルクミンを炭素源とした培養でのクルクミン変換活性よりも低かった。また、グルコースやスクロースを炭素源として添加すると、菌体の増殖は抑制された。炭素源としていずれの糖を添加して培養した場合でも、クルクミン変換活性は、クルクミンを炭素源とした時よりも低かったことから、培地への糖類の添加を行わないことに決定した。培地に添加するクルクミン量を検討した結果、0.04%のクルクミンを添加した時に、最もクルクミン変換活性が高いことが判明した。さらに、坂口フラスコへの培地量や培養時間を検討し、培地を300 ml 入れた 2L 坂口フラスコで、28℃、24 時間培養した時に、最も高いクルクミン変換活性を示し、最適培養条件を確立した。

この最適条件において本菌を大量に培養した。培養液を遠心することにより集菌を行い、久保田製作所の INSONATOR 201M を使用して細胞を破碎した。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。

目的とするクルクミン代謝酵素の精製を試みたが、精製の過程で活性が低下することが判明したため、各種金属や化合物などの添加効果を検討した結果、NADPH の添加により活性が回復することが明らかとなった。しかしながら、継続して本酵素の純化を試みたものの、本酵素の不安定さのため精製は難航した。そこで、本菌を最適培養条件で何度も大量培養を行い、本酵素の精製条件の詳細な検討を行った。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を最適化することにより、SDS-PAGE 上で約 4 万の分子量を示す単一バンドにまでクルクミン変換酵素を精製することに成功した。

得られた本精製標品を用いてクルクミンと反応させ、NADPH 依存的に生成する 2 種類の反応産物をそれぞれ、DHC、THC と同定した。酵素反応産物の経時変化を分析し、本酵素がクルクミンを反応中間産物・DHC に還元し、さらに反応最終産物・THC まで還元する反応を触媒することが判明した。この結果より、環境中に存在する本菌も腸内に存在する大腸菌と同様の酵素 NADPH-dependent

curcumin/dihydrocurcumin reductase をクルクミン代謝に関与する初発酵素として利用することを明らかにした。

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 1 件)

1) ○ 橋本 義輝、ハサニナサブ アザム、熊野 匠人、小林 達彦、"クルクミン代謝酵素の精製"、第 89 回日本生化学会大会、平成 28 年 9 月 27 日、仙台国際センター・東北大学 (宮城県・仙台市)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小林 達彦 (KOBAYASHI, Michihiko)
筑波大学・生命環境系・教授
研究者番号：70221976

(2) 研究分担者

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

橋本 義輝 (HASHIMOTO, Yoshiteru)

筑波大学・生命環境系・准教授
研究者番号：00323254

(3) 連携研究者
なし

(4) 研究協力者
なし