

ヒト腸内細菌由来プエラリン代謝酵素の単離と 遺伝子クローニング

申請代表者 中村 賢一 鈴鹿医療科学大学薬学部
所内共同研究者 朱 姝 生薬資源科学分野

助手
助教

【報告セミナー要旨】

【目的】

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。一般的に配糖体は消化管から吸収されにくく、消化管下部でヒト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与していると考えられている。配糖体の一群には、アグリコン部と糖部が直接C-C結合したC-配糖体が存在する。C-配糖体は他の配糖体に比べて化学的に安定であるが、一部のヒト腸内細菌はC-配糖体のC-C結合を開裂し、アグリコンを生成することが知られている。しかし、腸内細菌由来C-配糖体代謝酵素はこれまで同定されていない。

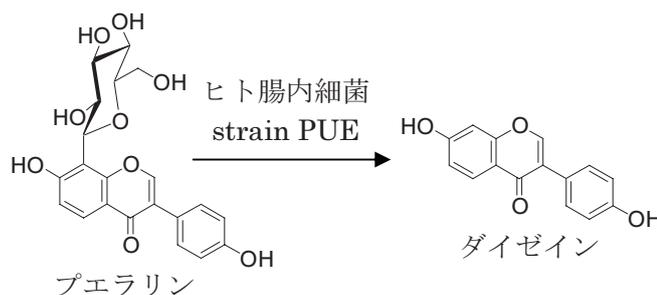
我々は、葛根に含まれるイソフラボンC-配糖体「プエラリン」に着目して腸内細菌による代謝研究を行い、これまでにプエラリンを代謝するヒト腸内細菌株 strain PUE を単離し、また、本代謝反応には3種類以上のプエラリン代謝酵素群、 Mn^{2+} 、 NAD^+ 、fructose 1,6-bisphosphateが必要であることを明らかにしてきた。プエラリン代謝に必要な2種類の酵素を精製し、N末端アミノ酸配列をそれぞれ決定した。本研究では、ヒト腸内細菌由来プエラリン代謝に関わる酵素遺伝子のクローニングを目的として実験を行った。

【方法】

プエラリン代謝酵素のN末端アミノ酸配列の相同性検索を行い、相同性が高いと推定されるタンパク質を探索した。プエラリン代謝酵素のN末端アミノ酸配列、および推定タンパク質の内部アミノ酸配列を基に縮重プライマーを設計し、strain PUEのゲノムDNAを鋳型にPCRを行った。得られたPCR産物の塩基配列を解析した結果、*Dorea longicatena*の塩基配列と高い相同性を示した。そこで、*Dorea longicatena*の既知塩基配列を基にプライマーを設計してPCR、さらにサブクローニングを繰り返して行い、プエラリン代謝酵素遺伝子、および周辺領域の塩基配列を解析した。

【結果・考察】

Strain PUEのゲノムDNAの解析を行い、プエラリン代謝酵素遺伝子を含む約3.7 kbpの塩基配列を決定した。本配列中には、既に精製した2種類のプエラリン代謝酵素遺伝子が隣接してコードされており、それらのアミノ酸配列は



*Dorea longicatena*由来の推定タンパク質 (WP_028088395.1、WP_028088396.1) と高い相同性を示した。また本配列中には、部分アミノ酸配列を含めて5種類のタンパク質がコードされており、これらのタンパク質がプエラリン誘導性のプエラリン代謝オペロンを形成している可能性が示唆された。今後、これらのタンパク質の大腸菌発現系を構築し、プエラリン C-配糖体代謝活性を確認するとともに、C-配糖体代謝酵素の触媒機構を解明する予定である。

■背景・目的

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。一般的に配糖体は消化管から吸収されにくく、消化管下部でヒト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。

配糖体の一類には、アグリコン部と糖部が直接 C-C 結合した C-配糖体が存在する。C-配糖体は O-配糖体と異なり、酸やグリコシダーゼ処理に対して安定である。一部のヒト腸内細菌は、C-配糖体の C-C 結合を開裂しアグリコンを生成することが報告されているが、腸内細菌由来 C-配糖体代謝酵素はこれまで同定されていない。

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含まれている。C-配糖体のプエラリンは腸内細菌による代謝を受け、アグリコンのダイゼインに変換される。生じたダイゼインは腸内細菌によるさらなる代謝を受け、女性ホルモン様作用を示すエクオールなどに変換されることが知られている (図1)。プエラリンはカッコンに2%以上含まれる主イソフラボンであることから、腸内細菌が産生するプエラリン代謝酵素は、カッコンの薬効と密接に関わっていると考えられる。我々は、C-配糖体のプエラリンをダイゼインに代謝するヒト腸内細菌株の単離を試み、グラム陰性、偏性嫌気性菌株 strain PUE を単離し、16S rRNA 遺伝子の相同性から、本菌株を *Dorea* 属の細菌と同定している¹⁾。これまでの研究から、strain PUE によるプエラリン代謝反応には、3種類以上のプエラリン代謝酵素群が関与し、それらの酵素活性は、 Mn^{2+} 、 NAD^{+} 、fructose 1,6-bisphosphate の添加により顕著に上昇することを明らかにしている²⁾。プエラリン代謝に必要な複数のタンパク質のうち、2種類のタンパク質 (タンパク質 A、B) を精製し、タンパク質 A の N 末端

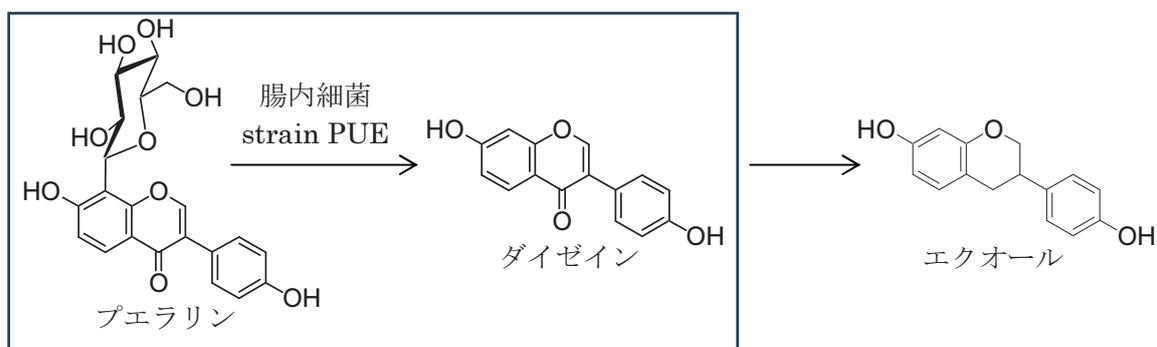


図1 腸内細菌によるプエラリンの代謝反応

アミノ酸配列 14 残基、タンパク質 B の N 末端アミノ酸配列 30 残基をそれぞれ決定している。しかし、プエラリン代謝に関わる各酵素タンパク質の全アミノ酸配列の決定には至っておらず、C-配糖体代謝反応における各酵素タンパク質の機能や役割は解明されていない。

本研究は、ヒト腸内細菌 strain PUE 由来プエラリン代謝に関わる酵素遺伝子群をクローニングし、各酵素タンパク質を同定するとともに、プエラリン C-配糖体代謝反応の反応機構を解明する目的で実験を行った。

■結果・考察

(1) プエラリン代謝に関わる酵素遺伝子のクローニング

原核生物では、特定の化合物代謝に関連する一連の酵素遺伝子群がゲノム上に隣接してコードされ、遺伝子クラスター（オペロン）を形成している例が多い。例えば、ダイゼインをエクオールに代謝する腸内細菌では、ダイゼイン代謝に必要な 4 種類の酵素タンパク質が同一の遺伝子クラスターに存在することが報告されている³⁾。Strain PUE によるプエラリン代謝反応には 3 種類以上の酵素タンパク質が必要であり、そのうち、精製した 2 種類の酵素タンパク質 A、B は、いずれもプエラリン誘導性のタンパク質であることを明らかにしている。これらのことから、プエラリン代謝に必要な複数の酵素タンパク質遺伝子は strain PUE のゲノム DNA 上に隣接してコードされ、プエラリン誘導性のオペロンを形成していると推測される。そこで、タンパク質 A、B をコードする遺伝子領域、およびその周辺領域について、DNA の塩基配列の解析を計画した。

初めに、タンパク質 A、B 遺伝子の塩基配列を解析するため、プロテインシーケンサーにより決定したタンパク質 A、B の N 末端アミノ酸配列情報を基に、それぞれ縮重プライマーを設計した。タンパク質 A、B の内部アミノ酸配列は未同定のため、タンパク質 A、B と相同性を示す推定タンパク質の内部アミノ酸配列から、縮重プライマーを設計した。設計した各種縮重プライマーを用い、strain PUE のゲノム DNA を鋳型に degenerate PCR を行った。その結果、タンパク質 A の N 末端アミノ酸配列と、タンパク質 B の内部アミノ酸配列を基に設計した縮重プライマーの組み合わせにより、約 1.7 kbp の DNA 断片が増幅した（図 2）。得られた PCR 産物を pGEM-T Easy Vector に組み込んだ後、大腸菌 DH5α に導入し、その後、数クローンについて精製プラスミドの塩基配列を DNA シーケンサーで解析した。解析した塩基配列を BLAST で検索した結果、本配列は *Dorea longicatena* のゲノム DNA の塩基配列と非常に高い相同性を示した。また、本配列にはタンパク質 A、B 遺伝子が隣接してコードされていた。

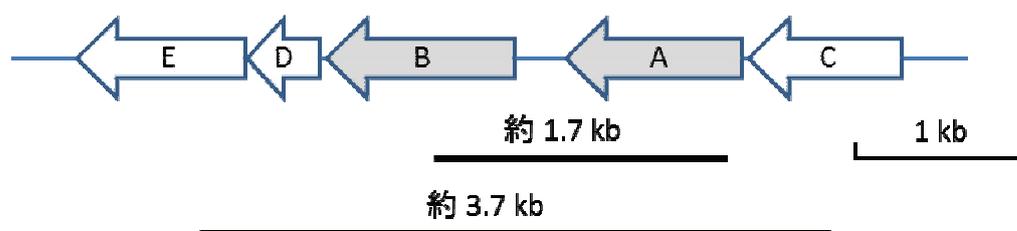


図2 プエラリン代謝に関わるタンパク質 A、B 遺伝子、およびその周辺領域の塩基配列の解析
Strain PUE のゲノム DNA を鋳型に PCR、さらにサブクローニングを繰り返して行い、プエラリン代謝酵素群（タンパク質 A ~ E）をコードする約 3.7kbp の塩基配列を解析した。

タンパク質A、B遺伝子の部分塩基配列が*Dorea longicatena*の塩基配列と相同性を示したため、タンパク質A、B遺伝子の周辺領域の塩基配列も*Dorea longicatena*の塩基配列と類似していると予測された。*Dorea longicatena*は、全ゲノム配列が解析された微生物種である。そこで、*Dorea longicatena*の既知塩基配列からプライマーを設計し、strain PUEのゲノムDNAを鋳型にPCR、さらにサブクローニングを繰り返して行うことにより、約3.7 kbpの塩基配列を解析した(図2)。本配列中には、タンパク質A、B遺伝子の全長を含む5種類のタンパク質(タンパク質A～E)がコードされると推測された。

得られた塩基配列に基づき、タンパク質A～Eのアミノ酸配列を各々推定した。タンパク質A遺伝子は348のアミノ酸をコードしており、精製タンパク質AのN末端アミノ酸配列14残基が、その配列と完全に一致した。タンパク質Aの推定分子量は39074であり、精製タンパク質AのSDS-PAGE分析結果、約38kDaと一致した。タンパク質Aの推定アミノ酸配列は*Dorea longicatena*由来の推定タンパク質(WP_028088396.1)と99%一致しており、そのアミノ酸配列をBLAST検索した結果、本タンパク質はGfo/Idh/MocAファミリー酸化還元酵素と高い相同性を示した。

タンパク質B遺伝子は367のアミノ酸をコードしており、そのアミノ酸配列は*Dorea longicatena*由来の推定タンパク質(WP_028088395.1)と99%一致していた。タンパク質Bの推定分子量は40329であり、精製タンパク質BのSDS-PAGE分析結果、約40kDaとよく一致した。タンパク質Bの推定アミノ酸配列をBLAST検索した結果、本タンパク質もGfo/Idh/MocAファミリー酸化還元酵素と推定された。しかし、タンパク質Bの推定アミノ酸配列と精製タンパク質BのN末端アミノ酸配列30残基の間に、一部不一致が認められた。不一致の原因は不明であるが、今後、より詳細な検討を行う予定である。

タンパク質A、B遺伝子の周辺領域には、タンパク質C～Eがコードされていた。タンパク質Cの部分推定アミノ酸配列は、*Dorea longicatena*由来の推定タンパク質(WP_028088397.1)と非常に高い相同性を示した。そこで、WP_028088397.1についてBLAST検索を行った結果、本タンパク質はAP-endonucleaseと86%、sugar phosphate isomerase/epimeraseと78%の相同性を示した。タンパク質D遺伝子は143のアミノ酸をコードしており、その推定アミノ酸配列は*Dorea longicatena*由来の推定タンパク質(WP_028088394.1)と99%一致した。タンパク質Dの推定アミノ酸配列をBLAST検索した結果、機能既知のタンパク質とは相同性を示さなかった。タンパク質Eの部分推定アミノ酸配列は、*Dorea longicatena*由来の推定タンパク質(WP_028088393.1)と非常に高い相同性を示した。そこで、WP_028088393.1についてBLAST検索を行った結果、本タンパク質はxylose isomeraseと31%の相同性を示した。

以上の結果より、タンパク質A～Eをコードする遺伝子を含む本DNA領域がプエラリン代謝酵素群をコードするオペロンである可能性が示唆された。今後、タンパク質A～Eの大腸菌発現系を構築し、プエラリンC-配糖体代謝活性を確認する予定である。

(2) プエラリン代謝反応における酵素反応中間体の構造決定

Strain PUEによるプエラリンからダイゼインへの代謝反応には、複数の酵素タンパク質が関与している。このため、本代謝反応は1段階の酵素反応ではなく、酵素反応中間体を經由する多段階の酵素反応であると予測される。そこで、プエラリン代謝反応における酵素反応中間体を同定する目的で、研究を行った。

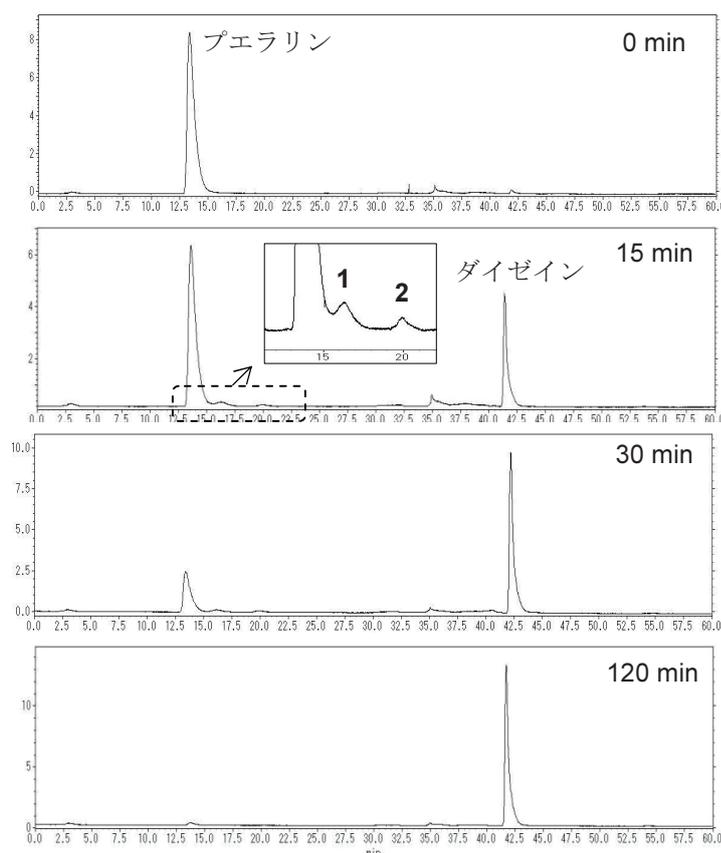


図3 部分精製酵素によるプエラリン代謝反応の経時的HPLC分析

部分精製したプエラリン代謝酵素にプエラリン (0.5 mM)、 Mn^{2+} (1 mM)、 NAD^+ (1 mM)、FBP (5 mM) を加えて37° Cでインキュベートし、経時的にHPLCで分析した。

HPLC条件 カラム: InertSustain C18, 3 mm, 4.6×150 mm、溶媒: 12% アセトニトリル0.05% TFA (0～30分)、30% アセトニトリル0.05% TFA (32～60分)、流速: 0.8 mL/min、検出波長: 256 nm。

初めに、部分精製したプエラリン代謝酵素にプエラリン (0.5 mM)、 Mn^{2+} (1 mM)、 NAD^+ (1 mM)、FBP (5 mM) を加えて37° Cでインキュベートし、経時的にHPLCで分析した (図3)。その結果、反応開始15分後に酵素反応中間体と予測される2つの新規ピーク (1, 2) が検出された。反応溶液から1を分取し、 1H -NMRを測定したところ、その構造はプエラリン糖部分3位が酸化された3'-oxo-puerarinと推定された。そこで、パラジウム錯体 [(neocuproine)-PdOAc] $_2$ OTf $_2$ を用いた糖3位選択的酸化法⁴⁾により、プエラリンから3'-oxo-puerarinを合成し、 1H -NMRスペクトルを比較することにより、1を3'-oxo-puerarinと同定した (図4)。部分精製酵素に各種補因子を添加し、プエラリンまたは1を基質に酵素反応を行った。その結果、1はプエラリンよりも数倍速くダイゼインに代謝された。これらの結果より、1がプエラリン代謝反応における酵素反応中間体であることが示唆された。

次に、中間体2の構造を決定するため、酵素反応溶液から2を分取し、 1H -NMRを測定した。しかし、分取した2の量が少なく、構造決定には至らなかった。各種検討した結果、1の水溶液にfructose 1,6-bisphosphateを添加し、室温で20分間インキュベーションすることにより、1と2の混合物を生

じることを見出した。生じた2を分取し、二次元NMR等の機器分析により構造を解析した結果、2は2'-oxo-puerarin (2a)、および、その分子内環化物 (2b) の互変異性体の混合物であった (図4)。

プエラリン代謝に関わるタンパク質A、Bはいずれも Gfo/Idh/MocA ファミリー酸化還元酵素と相同性を示した。本研究により単離、構造決定した中間体はプエラリン糖部分が酸化された化合物であったことから、これらの酵素タンパク質が、プエラリンから中間体への酸化反応を触媒している可能性が示唆された。今後、プエラリンから中間体、中間体からダイゼインへの代謝を触媒する各酵素タンパク質を同定する予定である。

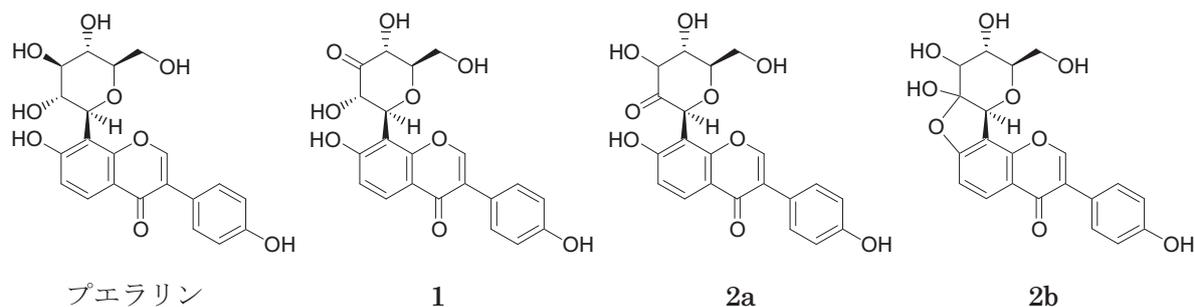


図4 プエラリン代謝反応における酵素反応中間体1、2 (2a、2b) の構造
 プエラリン代謝反応溶液中に検出された中間体1、2の構造を決定した。中間体2は2aと2bの互変異性体の混合物であった。

■結論

プエラリンをダイゼインに代謝する腸内細菌 strain PUEのDNAの解析を行い、プエラリン代謝に関わるタンパク質A、B遺伝子、およびその周辺領域の塩基配列を解析した。得られた約3.7 kbpの塩基配列にはタンパク質A、B遺伝子を含む5種類のタンパク質A～Eがコードされており、本DNA領域がプエラリン代謝酵素群をコードするオペロンである可能性が示唆された。

プエラリン代謝反応における酵素反応中間体の探索を行い、中間体1と2 (2a、2bの互変異性体)の構造を決定した。今後、タンパク質A～Eの大腸菌での発現系を構築し、発現タンパク質のプエラリン代謝活性等を検討する予定である。

【参考文献】

- 1) Jin J.S. *et al.*, *Biol. Pharm. Bull.*, **31**, 1621-1625 (2008)
- 2) Nakamura K. *et al.*, *Biol. Pharm. Bull.*, **36**, 635-640 (2013)
- 3) Shimada Y. *et al.*, *Appl. Environ. Microbiol.*, **78**, 4902-4907 (2012)
- 4) Jäger M. *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **52**, 7809-7812 (2013)