



2021 年 11 月 17 日

国立大学法人筑波大学

大学共同利用機関法人高エネルギー加速器研究機構

C-配糖体の安定な炭素－炭素結合を切断する酵素の機能と立体構造を解明

植物が作るさまざまな化合物の多くは糖と結合しています。これは、細胞内で安定に溶けやすくするためです。これらは一般に、酸素原子を介して糖と化合物が結合する O-配糖体という形をとりますが、天然には、炭素原子に直接糖が結合した C-配糖体も存在します。C-配糖体は、糖の炭素が化合物の炭素と炭素－炭素結合しているため、極めて安定で、O-配糖体と比較すると数は少ないですが、葛根湯などの漢方薬や赤色食用色素など、日常生活の中で摂取することもある化合物です。これらの配糖体化合物を体内に摂取すると、腸内細菌によって糖部分が切断されることで活性化、吸収され、薬効を示します。この、糖を切断する役割は、腸内細菌のもつ酵素が担っていると考えられていましたが、酵素の詳しい性質は分かっていませんでした。

本研究では、腸内細菌と土壌細菌の双方から、C-配糖体の炭素－炭素結合を切断する酵素を発見し、その機能を解析しました。このような酵素が土壌細菌から見つかったのは今回が初めてです。さらに、酵素の結晶構造も明らかにし、これに基づいて、腸内細菌が炭素－炭素結合切断反応によって食物成分を活性化する酵素的メカニズムを世界に先駆けて解明しました。本研究は、ヒトなどの生物内と土壌などの自然環境中での C-配糖体の代謝を初めて捉えたもので、C-配糖体代謝のメカニズムを解き明かすきっかけになると考えられます。

研究代表者

筑波大学生命環境系

小林 達彦 教授

高エネルギー加速器研究機構物質構造科学研究所

千田 俊哉 教授

研究の背景

植物や微生物が生産する化合物の多くは糖が結合した状態（配糖体^{注1)}）として生体内に保存されています。その中で C-配糖体は糖を構成する炭素と糖以外の部分（アグリコン）の炭素が直接結合した構造をしており、酸素原子を介して糖がアグリコンに結合している O-配糖体と比較して極めて強固に結合しています（図1）。C-配糖体は O-配糖体に比べて数は少ないですが、漢方薬や食用色素など生活の中で私たちが摂取する化合物にもみられます。例えば、葛根湯の原料である葛の根に含まれるプエラリンや、かまぼこやお菓子の天然赤色色素として使われるカルミン酸はいずれも C-配糖体です。これらの配糖体化合物は、体内で腸内細菌によって糖部分が切り離され、活性化されることで多様な生理活性を示します。しかしながら、その分解のメカニズムについては、C-配糖体の炭素—炭素結合を切断し、アグリコンと糖に分ける酵素が腸内細菌から見つかったものの、まだ未知の部分が多く、これらの酵素の自然界における一般性も明らかになっていませんでした。

研究内容と成果

本研究グループは、糖の炭素—炭素結合切断酵素（C-C 結合切断酵素）についてデータベースを解析した結果、腸内細菌から土壌細菌まで幅広い種類の細菌が C-C 結合切断酵素をもっており、腸内だけでなく、自然界全体で、C-配糖体が代謝され循環していることを見いだしました。自然環境中の細菌から C-C 結合切断酵素が発見されたのは初めてです。どの細菌の C-C 結合切断酵素も、2種類のタンパク質（糖異性化酵素と機能未知酵素）が複合体を形成し、一つの酵素として働きます。試験管内での酵素機能の解析から、プエラリン（葛の根に含まれるイソフラボン的一种）などの C-配糖体はいずれの細菌においても、まず酸化酵素によって糖の部分が酸化されて 3'-oxo-C-配糖体になってから C-C 結合切断酵素で分解されることが判明しました（図2）。また、本酵素は金属イオンを反応に用いることも明らかとなりました。

次に、全ての酵素において、さまざまな 3'-oxo-C-配糖体を準備し、基質の選択性^{注2)}を調べたところ、アグリコン部分の構造に対しては寛容である一方、構造中の糖の結合位置は厳密に認識していることが分かりました。さらに、細菌の C-C 結合切断酵素について、高エネルギー加速器研究機構（KEK）物質構造科学研究所（IMSS）放射光実験施設フォトンファクトリー（PF）^{注3)}での X 線結晶構造解析^{注4)}と、同じく構造生物学研究センターのクライオ電子顕微鏡を利用した単粒子解析^{注5)}により、この酵素の立体構造の解明にも成功しました（図3）。腸内細菌由来の酵素と土壌細菌由来の酵素のアミノ酸配列の類似度は 40%程度ですが、全体構造はよく似ており、反応に重要なアミノ酸残基（活性部位）もよく保存されていました。また、それぞれの酵素の構造解析から、活性部位の空間の形が、基質として受け入れられる 3'-oxo-C-配糖体の糖の位置を認識していることも見いだしました。酵素の立体構造が明らかになったことで、2種類のタンパク質がどのように結合しているのか、どのように基質を受け入れるのかだけでなく、反応する際の構造変化や、反応に関与するアミノ酸や金属も特定され、詳細な反応機構が結晶構造に基づいて初めて提案されました。

今後の展開

C-配糖体は、配糖体の中で唯一加水分解されない配糖体です。配糖体が体内で生理活性を発現するためには、糖が外れて体内に吸収される必要があると言われており、本研究は、漢方薬や食品に含まれる C-配糖体の体内における分解・吸収のメカニズムを世界に先駆けて明らかにしました。これらの成果は、新たなプロドラッグ^{注6)} 様化合物の創出や酵素の医薬品、食品添加などに対する利用へとつながり、薬学、

食品化学の発展への貢献が期待されます。さらに、自然界における C-配糖体代謝の C-C 結合切断酵素も明らかになったことから、今後、天然における C-配糖体代謝も解明され得ると考えられます。

参考図

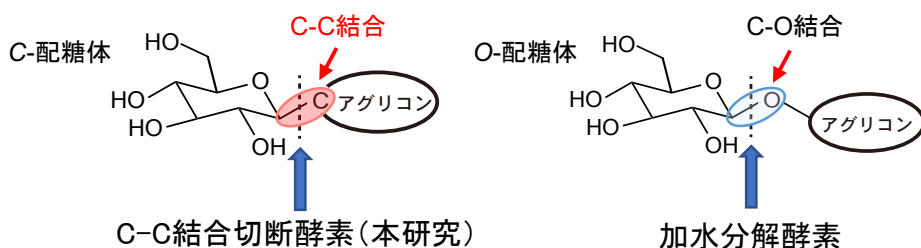


図1 C-配糖体と O-配糖体の構造

C-配糖体（左図）は糖（各図の左側部分）がアグリコンと C-C 結合している。C-配糖体のピンクの色がついている部分が C-C 結合。一方、よくみられる O-配糖体（右図）は糖とアグリコンが、水色で示したように酸素原子を介して C-O 結合している。それぞれ、糖とアグリコンの切断箇所を点線で示した。

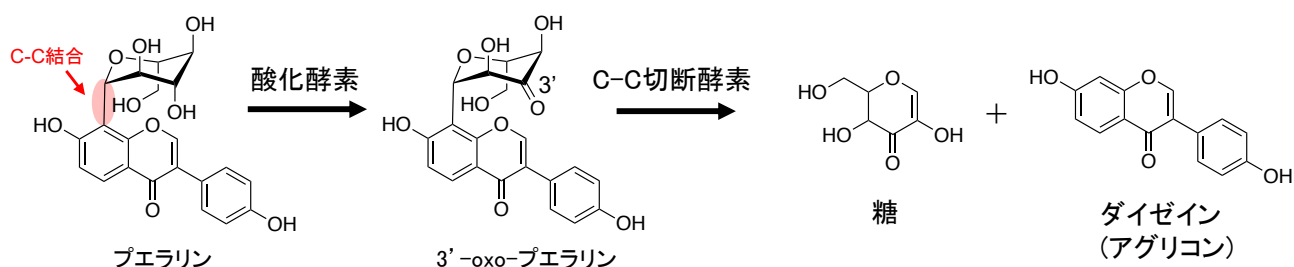


図2 プエラリンの C-C 結合切断反応

プエラリンはまず酸化酵素によって糖の 3' の位置が酸化されて 3'-oxo-プエラリンとなり、C-C 切断酵素によって糖とダイゼイン（プエラリンのアグリコン）に分断される。

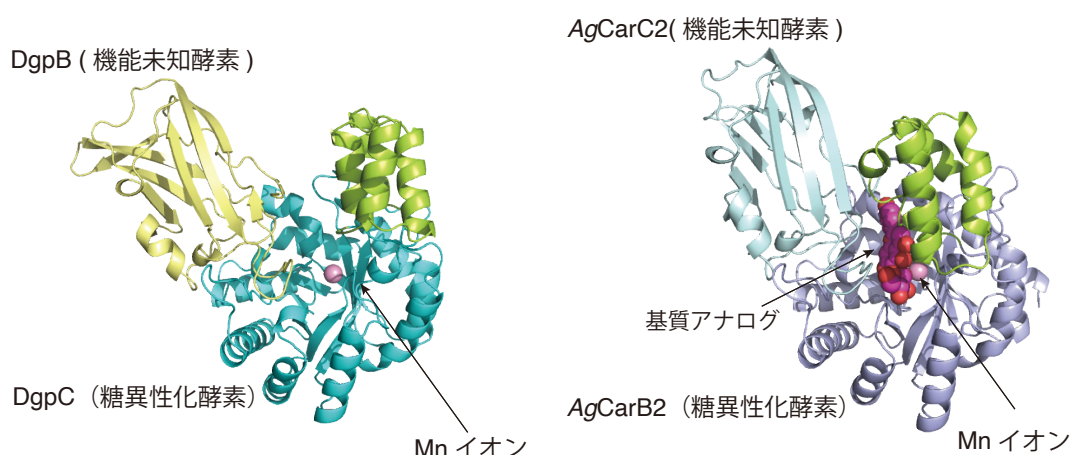


図3 C-C 結合切断酵素の結晶構造

腸内細菌由来の C-C 結合切断酵素（左）と、土壌細菌由来の酵素（右）。基質結合や反応に関わるアミノ酸、金属を特定した。Mn イオン：マンガンイオン

用語解説

注1) 配糖体

アグリコン（非糖部分）に糖が結合した化合物。

注2) 基質の選択性

基質は酵素と反応する化合物のことで、酵素ごとに反応する基質が異なることを基質の選択性という。

注3) 放射光実験施設フォトンファクトリー

KEK つくばキャンパスにある放射光施設。電子加速器から生まれる放射光で、物質・生命の構造から機能発現のしくみを明らかにする研究を推進している。PF リング (2.5 GeV)、PF アドバンスストリング (PF-AR, 6.5 GeV) という、特徴ある2つの放射光専用の光源加速器を有し、KEK で培ってきた放射光技術・加速器技術により世界最先端の研究の場を提供している。

注4) X線結晶構造解析

酵素は特定の条件で結晶になる。これにX線をあてて得られた反射像を解析し、立体構造を明らかにする。本研究における結晶構造解析に関するデータ収集は、KEK IMSS の PF (ビームライン BL-1A, BL-17A) を用いて行った。

注5) 単粒子解析

透過型電子顕微鏡法の一つで、酵素試料をグリッド上に配置し、極低温において撮影して得られた透過画像を画像処理することで酵素の立体構造を解析する手法。本研究におけるクライオ電子顕微鏡に関するデータ収集は、KEK IMSS の Talos Arctica G2 を用いて行った。

注6) プロドラッグ

体内に入ってから構造変化して薬効を示す薬。

研究資金

本研究は、科研費 (JP16H06443, JP19K15703, JP19K05784, JP19H05687, JP20H00490, JP20K22700, JP21K18246)、および国立研究開発法人日本医療研究開発機構 (AMED) 創薬等ライフサイエンス研究支援基盤事業 創薬等先端技術支援基盤プラットフォーム (BINDS) の課題番号 JP20am0101071、国立研究開発法人 新エネルギー・産業技術総合開発機構 (NEDO: JPNP20011) JST さきがけ (JPMJPR20DA)、公益財団法人不二たん白質研究振興財団のサポートを受けて実施されました。

掲載論文

【題 名】 C-Glycoside metabolism in the gut and in nature: Identification, characterization, structural analyses and distribution of C-C bond-cleaving enzymes

(自然界および腸内における C-配糖体代謝: C-C 結合切断酵素の発見、機能解析、構造解析および分布)

【著者名】 Takahiro Mori¹, Takuto Kumano², Haibing He¹, Satomi Watanabe², Miki Senda³, Toshio Moriya³, Naruhiko Adachi³, Sanae Hori², Yuzu Terashita², Masato Kawasaki³, Yoshiteru Hashimoto², Takayoshi Awakawa¹, Toshiya Senda^{2,3}, Ikuro Abe¹, Michihiko Kobayashi²

¹The University of Tokyo; ²University of Tsukuba; ³High Energy Accelerator Research Organization (KEK)

【掲載誌】 Nature Communications

【掲載日】 2021 年 11 月 2 日

【DOI】 10.1038/s41467-021-26585-1