

C-配糖体代謝酵素の機能および結晶構造解析

Functional characterization and crystallization analyses of C-glycoside-metabolizing enzymes

○熊野 匠人^{1,2}、渡辺 聖実¹、堀 早苗¹、寺下 柚子¹、森 貴裕³、何 海兵³、千田 美紀⁴、橋本 義輝^{1,2}、千田 俊哉⁴、阿部 郁朗³、小林 達彦^{1,2} (1筑波大生命、²MiCS、³東大院薬、⁴高エネ機構物構研構造生物)

○Takuto Kumano^{1,2}, Satomi Watanabe¹, Sanae Hori¹, Yuzu Terashita¹, Takahiro Mori³, Haibing He³, Miki Senda⁴, Yoshiteru Hashimoto^{1,2}, Toshiya Senda⁴, Ikuro Abe³, Michihiko Kobayashi^{1,2} (1Univ. of Tsukuba, ²MiCS, ³Univ. of Tokyo, ⁴KEK)

【背景】お菓子やジュースなど食品や化粧品の着色に使用される天然の赤色色素カルミン酸はコチニールカイガラムシが生産する C-配糖体である。C-配糖体はアグリコン（非糖部分）の炭素骨格に糖のアノマー炭素が直接 C-C 結合（以下、C-グリコシド結合とする）した配糖体で、他に葛に含まれるプエラリンや、マンゴーに含まれるマンギフェリンなど 100 種類以上が植物や昆虫、微生物から単離され知られている。一般的な配糖体である O-配糖体の O-グリコシド結合と比べて C-グリコシド結合は熱や酸に安定で、グリコシダーゼによる酵素的な分解も受けない。そのような性質から、他の配糖体とは異なった代謝経路により分解・代謝されることが予想された。最近、C-配糖体を代謝する腸内細菌から C-配糖体代謝酵素が報告され、2 段階の反応で C-グリコシド結合が分解されることが明らかになった。本研究では、土壌細菌から同定した C-配糖体代謝に関与する 2 種類の酵素およびそのホモログ酵素について諸性質解明を行い、ホモログ酵素については結晶構造解析も行った。

【方法】C-配糖体カルミン酸代謝微生物は、カルミン酸を単一炭素源とする培地で土壌から集積培養し単離した。カルミン酸代謝活性を指標にして各種クロマトグラフィー等により C-配糖体代謝酵素の精製を行った。ホモログ酵素についてはデータベース検索により見出し、大腸菌で異種発現させ精製した。

【結果】C-配糖体カルミン酸の代謝酵素として CarA および CarB、CarC を同定した。CarA は C-配糖体の糖の 3 位を酸化する FAD 依存的オキシダーゼで新規酵素であった¹⁾。データベース検索の結果、腸内細菌にはホモログ酵素は見られず、土壌細菌には広く分布していることが分かり、自然環境中の C-配糖体代謝の初発反応を担っていると推定された。また、CarB と CarC はヘテロダイマーを形成し、C-C 結合を切断して糖部分とアグリコンを分離する酵素であった²⁾。こちらは腸内細菌・土壌細菌に共通してホモログ酵素が見られた。また、本発表では基質特異性や両酵素のホモログ酵素の結晶構造に基づいた反応機構についても報告する。

1) Nature Communications, 6294 [2021], 2) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 118, e2106580118 [2021]

C-glycosides are glycosides in which the anomeric carbon of a sugar is directly attached to the carbon skeleton of an aglycon (non-sugar part) (hereinafter referred to as C-glycosidic linkage). More than 100 types of glycosides have been isolated from plants, insects, and microorganisms, including carminic acid which are used for food staining. Compared to the O-glycosidic linkages of O-glycosides, C-glycosidic linkages are more stable against heat and acid, and are not hydrolyzed by glycosidases. Because of these properties, the metabolic pathway of C-glycosides was expected to be different from that of other glycosides. Recently, a C-glycoside metabolizing enzyme was reported from intestinal bacteria that metabolizes C-glycosides, and it was clarified that the C-glycosidic linkage is degraded in a two-step reaction. In this study, we investigated the properties of two enzymes (CarA and CarB/C) and their homologues involved in C-glycoside metabolism identified from soil bacteria, and the crystal structure of the homologues was also analyzed. CarA is a novel FAD-dependent oxidase that oxidizes the C3-position of the sugar of C-glycoside¹⁾. A database search revealed that the homologous enzymes of CarA were not found in intestinal bacteria, but were widely distributed in soil bacteria, suggesting that they are responsible for the primary reaction of C-glycoside metabolism in the natural environment. In addition, CarB and CarC are enzymes that formed heterodimers and separated the sugar moiety from the aglycon by cleaving the C-C bond²⁾. Homologous enzymes of CarB/C were commonly found in intestinal and soil bacteria. The reaction mechanism based on the crystal structures of homologous enzymes of both enzymes will also be reported in our presentation.

1) Nature Communications, 6294 [2021]

2) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 118, e2106580118 [2021].

C-glycoside, metabolism, crystallization