

A Study of Equol Producing Mechanism of a New Genus of Intestinal Bacteria *Asaccharobacter celatus* AHU1763

(新属腸内細菌 *Asaccharobacter celatus* AHU1763 による
エクオール生成のメカニズムの研究)

学位論文内容の要旨

Asaccharobacter celatus AHU1763 is a Gram-positive, obligate anaerobic, non-spore forming, rod-shaped bacteria. It was successfully isolated from rat cecal content. By this bacterium, it can convert daizein(DAI) to equol(EQL), which later compound has been reported to lower the risk of breast and prostate cancer in human. In present, current evident for the biotransformation of DAI to EQL in bacteria is unavailable. The aims of our studies are to determine enzymatic reaction involved in the conversion reaction of DAI to EQL and identify the enzyme that responsible for these reactions.

Conventional methods for cultivating the anaerobic bacteria are standing the culture medium under the ambient anaerobic conditions, which resulting in the slow growth of the anaerobic bacteria. Previous data from Minamida *et al.*, 2006 shows DAI was metabolized to EQL completely after 4 d of cultivation. We develop a new method for cultivation of this bacterium by stirring the culture medium under strictly anaerobic conditions. Cells entered stationary-phase of growth after 9 and 84 h when it was cultured by stirring and static method, respectively. DAI was completely metabolized to EQL faster when this bacterium was cultured under stirring condition.

The location of enzymes responsible for changing DAI to EQL was investigated. It was found that, Change of DAI to dihydrodaidzein(DHD) was detected mainly when the culture supernatant was used as a crude enzyme, and some change was also detected in cell extract and cell debris. Change of DHD to EQL was detected mainly when cell debris was used as a crude enzyme, and some change was also detected from the cell extract. Both crude enzymes require NADPH for its reactions. Then, we investigate certain parameters that might affect the efficiency of the enzymes, such as assayed and storage conditions, including temperature and pH values. It was found that, crude enzymes which responsible for changing DAI to DHD and DHD to EQL, could assayed only

under strictly anaerobic conditions. In addition, efficiency of the enzyme responsible for changing DAI to DHD dropped after the culture supernatant was exposed to a normal atmospheric environment for even 5 min. The efficiency in changing DAI to DHD from the culture supernatant increased from pH 4.0 and reached a maximum at pH 6.0, while the efficiency in changing DHD to EQL from cells debris increased from pH 4.0 and reached a maximum at pH 7.0. The highest enzyme efficiency from both DAI to DHD and DHD to EQL was obtained from incubating the culture supernatant and cell debris at 30°C.

Shotgun cloning method was used to clone the gene encoded enzymes. But after analyzed 5,000 colonies, no recombinant *E. coli* clone that could metabolize DHD or EQL from DAI was obtained. Perhaps, number of recombinant colony selection is not enough, or the insertion fragment is not long enough, or enzymes responsible for metabolite DAI are not work in *E. coli* Top10 host system.

To further identify, the protein sequences of these enzymes which can be degenerated to the DNA sequences were investigated. Before identification, reduction the protein from crude enzyme that does not involve for the enzymatic reaction must be done. Reduction the other proteins, purification using chromatography columns was performed. In this study, ion exchange chromatography and hydrophobic interaction chromatography was used to purify this enzyme. Crude enzyme from the culture supernatant was partial purified using QXL followed by Butyl-S FF column. SDS-PAGE was performed to visualize the protein bands in the purified protein fraction. 4 protein bands which related to the fraction with the enzymatic efficiency were obtained. From 4 interested protein bands, 3 of them could sequences. For the first band that has a molecular weight around 80 kDa, N-terminal amino acid sequences are MKKNQHFPQLFE. After this sequenced was blasted with NCBI database, it similar to hypothetical protein from *Flavobacteriales* bacterium with 80%, 80%, and 10% of identity, positive and gap, respectively. For the second band that has a molecular weight around 54 kDa, N-terminal amino acid sequence is MQQVNVKSEIGNLKK. It is similar to arginine deiminase from *Lactococcus lactis* with 75%, 83%, and 0% of identity, positive and gap, respectively. The third band hat has a molecular weight around 50 kDa, N-terminal amino acid sequences are DQAAENQAEANAAL. This protein is also similar to hypothetical protein from *Chlamydomonas reinhardtii* with 100%, 100%, and 0% of identity, positive and gap, respectively. For the forth protein band, N-terminal amino acid sequences could not sequences. However, the result from N-terminal sequencing is not enough for identification of this enzyme. 2-D gel SDS-PAGE and identification of the protein spot were performed. 5 candidate protein spots, which presence in the purified fraction with the efficiency for changing DAI to DHD but do not

presence in the fraction without the efficiency for changing DAI to DHD, were obtained. Peptide mass fingerprinting was generated from each spot and they were not matched to any protein sequences in the mascot search database. To further identification of each spot with N-terminal sequencing will be performed.

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 浅 野 行 蔵

副 査 教 授 横 田 篤

副 査 准教授 曾 根 輝 雄

学 位 論 文 題 名

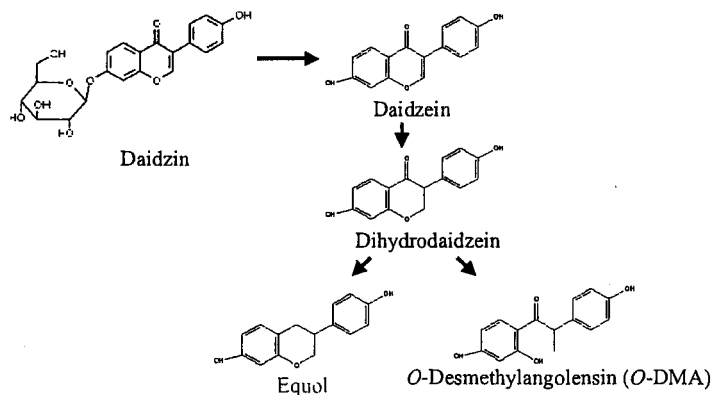
A Study of Equol Producing Mechanism of a New Genus of Intestinal Bacteria *Asaccharobacter celatus* AHU1763

(新属腸内細菌 *Asaccharobacter celatus* AHU1763 による
エクオール生成のメカニズムの研究)

本論文は英文 120 頁、図 26、表 15、8 章からなり、参考論文 1 編が付されている。

Asaccharobacter celatus AHU1763 は、北海道大学で発見された新属新種の腸内細菌である。*Asaccharobacter* は、グラム陽性菌で、偏性嫌気性、無孢子、桿菌、高 GC 含量の細菌である。ラットの盲腸内容物から分離された。この細菌は、イソフラボンのダイゼイン (Daizein, 以下 DAI と称す) をエクオール (Equol, 以下 EQL と称す) に単独の菌で変換することの出来る分類学的に最初に確定された微生物である。DAI から EQL への想定される反応物を図に示した。イソフラボン類は、弱いエストロゲン活性があるので、骨粗鬆症や乳がんなど女性ホルモンが関係する病気の予防作用があることが有名である。イソフラボン類の中でも EQL がもっとも機能性が高いことも知られている。ところが、大豆などイソフラボンを食べても血中の EQL 濃度が上がるひとは、30% から 50% であり、これらの人は、DAI から EQL へ変換できる腸内細菌 (群) を持っていると言われていた。本研究で使用したのは、単独の微生物で DAI → EQL への変換ができる株であり、これらの変換に寄与する酵素の情報にはなかった。

本論文では、本株独特の EQL への変換について、活性など種々の性質を調べた。本菌の培養条件を種々検討した結果、高い変換速度を達成する事が出来た。即ち、GAM に 1% Arg を加えた培地で、200



μM の DAI を 3 時間以内に EQL へと変換する条件を見いだした。厳密な嫌気性条件（窒素 85%、二酸化炭素 10%、水素 5%）において、攪拌しながらの培養で最高速度となった。また、EQL への変換酵素群は、誘導的酵素群であった。酵素誘導は、菌の生育が定常期になった後でも数時間で十分量が誘導された。変換された後、EQL 濃度は下がらず、菌にとって栄養素になっていないように観察された。

DAI からの変換を行う酵素について、それらの補酵素と存在の場所を調べた。変換の酵素の局在位置を調べるのに、培養液上清、菌体表層・細胞膜など厳密に分画した。種々の補酵素を添加して転換反応を調べた結果、DAI からの変換は、まず、ジヒドロダイゼイン (Dihydrodaidzein, 以下 DHD と称す) を生成し、これに関わる酵素は、菌体外酵素として分泌される、補酵素は NADPH であった。この酵素の至適温度は 30℃、至適 pH は 6.0 であった。DHD から続いて生成される物質は、EQL であった。この段階の酵素は、細胞膜に存在していると予想され、補酵素は、NADPH であった。至適温度は 30℃、至適 pH は 7.0 であった。さらにそれぞれの酵素は、厳密に嫌気性であって一度空気に晒される活性を失った。このことから全ての試験は、嫌気チャンバーの中で実施する必要があった。

第一ステップである DAI からの変換酵素の精製を試みた。予め DAI による誘導をかけて培養した培養上清を調製し、イオン交換カラム続いて疎水カラムを用いて、活性画分を集めた。全ての操作を嫌気チャンバー内で実施する必要があったので、容量を拡大できずに困難な実験であった。QXL カラムの活性画分を、続いて Butyl-S FF カラムで分画した。しかし、これでは単独のタンパク質にはならなかった。活性画分を 2 次元 SDS-PAGE を用いて展開し、DAI で誘導をかけた際にしか現れない 5 つのタンパクスポットを変換酵素の候補とした。N 末分析を行ったが、近いタンパクがデータベースになかったか、タンパク量が不十分であった。

以上、本研究では、新属腸内細菌 *Asaccharobacter celatus* の DAI から EQL への変換機構に関する新たな知見を得ることができた。以上の成果は、イソフラボンの利用に関する腸内細菌群の機能関与する食品の機能性開発に大きく寄与するものである。

よって、審査員一同は、Charin Thawornkuno が博士（農学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた。