

含窒素ヘテロ環化合物の微生物による分解に関する研究

木村 滯 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 小林 達彦 (筑波大学 生命環境系)

背景・目的

植物はアルカロイドに分類される多種多様な含窒素ヘテロ環化合物を生産する。そのような物質の中には抗菌作用、鎮痛作用、抗がん作用などが認められ、医薬品に利用されているものもある。しかし、これらの物質の明確な作用機序やそれらの代謝・分解機構は未だに明らかにされていないものが多い。

先行研究では、含窒素ヘテロ環化合物を代謝する菌・酵素および遺伝子の同定とその酵素の精製が行われた。

本研究では、植物由来の含窒素ヘテロ環化合物を分解する微生物を用いた分解産物や分解経路の解明を目的として、本酵素の大量調製のための異種発現と精製効率を上昇させるための精製条件の検討を試みた。

方法・結果

先行研究により同定された含窒素ヘテロ環化合物代謝微生物 (以下 A 株) のゲノムを抽出し、PCR により目的酵素 (以下酵素 X) 遺伝子を増幅した。増幅した酵素 X の遺伝子断片を大腸菌発現用ベクター pET24a(+) にクローニングし、大腸菌 BL21 (DE3) 株を形質転換して酵素 X の異種発現を試みた。しかし、酵素 X の発現は見られなかった。

そこで、当研究室で開発された放線菌を宿主とする異種発現系を用いて酵素 X の発現を試みた。A 株のゲノムから PCR により酵素 X の遺伝子を増幅し、当研究室で開発された大腸菌-放線菌シャトルベクターにライゲーションした。ライゲーション産物で大腸菌を形質転換して得られた複数のコロニーからプラスミドを抽出し、シークエンスにより正しい配列のインサートが挿入されているプラスミドを得た。次に、得られたプラスミドを用いて放線菌を形質転換し、形質転換体を得た。2YT 培地にカナマイシンと基質となる含窒素ヘテロ化合物を加え、誘導剤としてイソバレロニトリルまたは ϵ -カプロラクタムを添加し、この形質転換体を 28°C で 3 日間培養した。菌体が生育したものは集菌を行い、培養上清を回収した。それらの培養上清と基質である含窒素ヘテロ化合物を混合し、28°C でインキュベートした。インキュベート後、反応溶液を HPLC により分析し、基質の減少量および産物の増加量を確認した。しかし、異種発現によって本酵素を大量調製するに至らなかった。

異種発現により大量の酵素が得られなかったため、酵素 X を A 株から精製する手順の見直しを行った。具体的には、硫酸アンモニウム沈殿、陰イオン交換クロマトグラフィー (DEAE Sepharose, ResourceQ)、疎水性クロマトグラフィー (Butyl) の各過程の条件検討を行い、精製効率を向上させた。

今後の予定

含窒素ヘテロ化合物代謝酵素を精製後、詳細な酵素学的諸性質の解明を行う予定である。