

微生物による配糖体化合物新規代謝経路に関する研究

渡辺 聖実 (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

植物はフラボノイド、アルカロイドなど多種多様な二次代謝産物を合成することが知られており、その中には、抗酸化作用や抗がん作用など、疾病の予防や治療への効果が認められるものもある。このような植物が生産する化合物の多くは、糖付加修飾(配糖化)され元の化合物よりも安定性や水溶性が増し、液胞や細胞壁などに貯蔵されている。具体例として、葛餅や葛湯、生薬として知られる葛根の原料となっているクズ属植物の主に根に含まれる配糖体フラボノイドは、がんや糖尿病などへの効能が期待されるなど有用な生理活性を持っている。植物に含まれる配糖体化合物がヒトに摂取された場合、一般的には小腸に存在する酵素や腸内細菌によって糖が外れ、アグリコン(配糖体の非糖部分)は腸管より吸収され血液循環によって運ばれて各組織の細胞内において生理活性を示し、糖が脱離しなかった場合は吸収されず腸内にとどまり腸内において生理活性を示すと考えられている。したがって、配糖体化合物の糖脱離反応は生理活性を理解するうえで非常に重要であるといえる。体内に吸収されたアグリコンや代謝されなかった配糖体化合物は抱合体になるなどして最終的には体外へ排出されると考えられている。

一方で、天然において植物体に含まれる配糖体化合物が土壌に落ちた場合、その化合物は未来永劫そこにとどまるわけではなく土壌中の微生物によって分解されると考えられるが、どのような微生物によってどのように代謝されるのかはあまり明らかになっておらず、アグリコン部分も含めると、その代謝経路全貌を酵素レベルで明らかにした例はない。

当研究室では、葛由来の配糖体化合物を単一の炭素源とした培地を作成し、各所より収集した土壌サンプルを添加して集積培養することで、代謝(資化)微生物をスクリーニングし、細菌の一種を取得した。また、本菌より配糖体化合物代謝の初発酵素を単離同定した。

本研究では、本酵素の諸性質の解明を目的とした。

方法・結果

諸性質の解明については、温度やpH、基質濃度などの条件を変化させたり阻害剤を添加したりした際の反応速度を求めることによって、酵素動学的パラメーターを決定し、温度安定性・依存性、pH安定性・依存性、阻害剤や金属の影響について明らかにすることができた。酵素反応速度はHPLC等を用いて測定を行った。これらの結果により、これまでほとんど知られていなかった土壌微生物由来の配糖体フラボノイド代謝酵素の詳細な性質を明らかにすることができた。

また、フラボノイド代謝酵素の構造を解析し詳細な反応機構を解明するため、酵素の結晶化を試みた。これまでに酵素精製方法の検討や市販されている様々な結晶化スクリーニング試薬を用いて行ったが、まだ結晶は得られていない。

今後の予定

引き続き、配糖体化合物代謝酵素の構造解析のために結晶化を行っていく。結晶が得られれば、活性に関与するアミノ酸残基の同定などの詳細な反応機構や基質特異性についても明らかにしていきたい。