

脂溶性ビタミン代謝微生物の探索

常陸 カイル（筑波大学 生物学類） 指導教員：熊野 匠人（筑波大学 生命環境系）

背景・目的

腸内細菌叢は糞便 1g あたり千億個程度存在しており、彼らは宿主から供給される栄養分の一部を利用して生活している。腸内細菌叢の役割としては免疫機能、腸内環境の維持などがあげられるが、ビタミンの生合成もその役割の一つである。腸内細菌叢によって生合成されるビタミンは多くが報告されているが一方でビタミンの分解についてはその報告例は少ない。

方法・結果

ビタミンの分解に関わる腸内細菌を 2 種の分離源からスクリーニングした。これによりビタミンを分解する 2 種の細菌（A 菌と B 菌）が単離された。遺伝子解析の結果、それぞれからビタミン分解酵素が精製された。

活性測定は 5 mM ビタミンを含む、50 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.2) に粗酵素液を添加し、37°C で行った。反応後、アセトニトリル添加で反応を停止し、高速液体クロマトグラフィーを用いて確立した測定系で分析することで酵素活性を調べた。A 菌から精製したビタミン分解酵素の N 末端アミノ酸配列を解析し、本菌のゲノム中より一致する ORF を同定した。ORF をアミノ酸配列に翻訳し BLAST データベースで検索すると、グラム陽性菌由来糖変換酵素と相同性を示した。本遺伝子をクローニングし、大腸菌で異種発現させたところ、精製した酵素はビタミンを分解した。

また、B 菌からもビタミン分解酵素遺伝子をクローニングし、組換え酵素を用いてビタミン分解活性の検出を HPLC で試みた。その結果、基質であるビタミンの減少は確認できたものの反応産物のピークは確認することができなかった。これまでに報告されているビタミンの酸化反応後の産物であれば、今回用いた HPLC の分析条件でも検出できる。このことから、今回の反応産物が紫外線吸収を持たない構造を有している新規化合物の可能性が考えられた。ガスクロマトグラフィーやカラムを順相の液体クロマトグラフィーにして検討したもののやはり反応産物を確認することはできなかった。

また、LC/MS の結果から酵素反応後に増加しているピークを見出した。しかしながら再現性良くピークを検出することは難しかった。これはビタミン分解酵素が安定でなく、活性が短時間で失われてしまったためだと考えられる。

今後の予定

反応産物を同定し、大まかな代謝経路の考察などを行った後、酵素の諸性質を解明する予定である。