

植物由来生理活性物質代謝関連酵素の基礎研究

藤村 建仁 (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)

1. 背景及び目的

お茶の成分として知られるカテキンやその誘導体はポリフェノールの一種で、抗酸化作用や抗がん作用などの様々な生理活性作用を有しており、食品・健康分野において多く利用されている。これまで、微生物によるカテキン代謝について、プロトカテキ酸やフロログルシノールカルボン酸といった中間代謝産物などの報告があるものの、代謝に関わる酵素を精製し、諸性質の解明を行った例はほとんどない。

本研究室では、土壌からスクリーニングを行い、カテキン代謝菌株(A株)を単離している。本株よりカテキン代謝に関わる酵素を精製し、カテキン代謝経路を発見した。また、本株より、カテキンを化合物Xへと変換するカテキン変換酵素を精製し、代謝経路の解明、カテキン変換酵素遺伝子(遺伝子X)のクローニングに成功している。さらに、その周辺の複数の機能未知遺伝子の発現ベクターを構築し、大腸菌を宿主とした異種発現株を用いることにより、カテキンを化合物Yへと変換する酵素遺伝子(遺伝子Y)、化合物Yを化合物Zへと変換する酵素遺伝子(遺伝子Z)を同定し、カテキン代謝菌の新たなカテキン代謝経路を発見した。

本研究では、カテキン代謝経路中の化合物Zの代謝に関与する酵素遺伝子を同定し、その酵素の精製および諸性質の解析を行うことで、A株のもつカテキン代謝経路を解明することを目的とした。

2. 方法

1) 化合物Zのさらなる代謝の解明

先行研究において、遺伝子X周辺に存在するすべての遺伝子を導入した異種発現株で、化合物Yを基質として休止菌体反応を行ったところ、化合物Yは分解されるが、化合物Zは蓄積しないことを見出した。この結果より、遺伝子X周辺に存在する遺伝子の中に、化合物Zの代謝に関与する酵素遺伝子が存在することが示唆された。化合物Zは市販されていないため、化合物Yと精製した遺伝子Z産物を反応させ、生成した化合物Zを基質として使用することとした。しかし、反応により生成した化合物Zは短時間ではHPLC上でピークとして検出されるが、翌日には検出されなないためは不安定と考えられた。現在、化合物Zの安定化条件や、さらに効率的な化合物Zの調製方法の検討を予定している。

2) 遺伝子X周辺に存在する遺伝子破壊株の作成

前述したように遺伝子X周辺の複数の機能未知遺伝子の中に、化合物Zの代謝に関与する酵素遺伝子が存在することが示唆されている。化合物Zの代謝に関与する酵素遺伝子を同定するために、周辺の各遺伝子を一つずつノックアウトした遺伝子破壊株の網羅的構築を予定している。遺伝子破壊株の作成には、モバイルグループIIイントロンとIEP(LtrA)を利用することにした。LtrAはモバイルグループIIイントロンを高頻度かつ特異的に標的遺伝子に挿入するため、その結果、標的遺伝子破壊株が構築できる。まず、A株で遺伝子破壊株が構築できるかどうか検討する

ために、遺伝子Xの破壊株の構築を試みた。遺伝子破壊株作成のため、遺伝子X特異的モバイルグループIIイントロン遺伝子とLtrA遺伝子をm-toluic acid誘導型プロモーター支配下に挿入した遺伝子X破壊用プラスミドを構築した。本プラスミドを大量調製したのちA株を形質転換した。形質転換したA株を抗生物質とm-toluic acidを含む培地で培養し、遺伝子破壊を誘導した。

1. 結果および考察

遺伝子Z産物の精製酵素と基質の化合物Yを反応させ化合物Zを生成した。しかし、化合物Zは不安定であり、精製して基質として利用することはできなかった。生成した化合物Zは自然に酸化されてしまったと考えている。そのため、今後は化合物Zを安定的に保持する方法を検討する予定である。

構築した遺伝子X破壊用プラスミドでA株を形質転換することは成功したが、誘導剤を添加して培養しても遺伝子遺伝子X破壊株は構築できなかった。これは、遺伝子Xを破壊するために選んだ標的位置が遺伝子破壊効率に影響を与えている可能性もあるため、現在は遺伝子Xの異なる位置を標的として選び、新たな遺伝子X破壊用プラスミドを作成している。また、遺伝子Xだけでなく、遺伝子Y、遺伝子Zについても同様の方法で遺伝子破壊株の作成を予定している。