

植物由来生理活性物質の微生物代謝に関する研究

戸部 泰佑（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）

1. 背景および目的

カテキンはフラボノイド化合物の一種であり、植物により生合成される。カテキンは多様な生理活性をもっているため注目されており、食品・健康分野において広く利用されている。その一方で、微生物によるカテキン代謝に関する研究は限られている。本研究室はカテキン代謝微生物 A 株を単離し、同株のカテキン代謝経路に関する研究を行っている。近年、新たにカテキン代謝微生物 B 株の単離に成功した。B 株は A 株と異なるカテキン代謝活性を有するため、B 株におけるカテキン代謝酵素の同定および諸性質の解明を目的として研究を行った。

2. 方法

カテキン代謝酵素の精製

1) クロマトグラフィーを用いた酵素精製

カテキン最少培地で培養した B 株から無細胞抽出液（CFE）を調製し、各種クロマトグラフィーに供することによって新規カテキン代謝酵素の精製を行った。

2) N 末端アミノ酸配列の決定

精製酵素標品を PVDF 膜に転写し、エドマン分解法によりカテキン代謝酵素の N 末端部分アミノ酸配列を決定した。

3) BLAST 検索による酵素遺伝子の探索

決定した N 末端アミノ酸配列をクエリとして、B 株のゲノム DNA 配列および NCBI のデータベースに対して検索を行った。

B 株の全ゲノム DNA 塩基配列決定

2) 全ゲノム解析

B 株を栄養培地で培養後にゲノム抽出を行い、本株の全ゲノム DNA の塩基配列決定を行った。

3. 結果と考察

カテキン代謝酵素の精製および遺伝子クローニング

カテキン最少培地で大量培養した B 株から調製した CFE を硫酸アンモニウム沈殿で分画した。その後、各種クロマトグラフィーに供することでカテキン代謝酵素を精製した。

本酵素の N 末端部分アミノ酸配列を決定し、そのアミノ酸配列をクエリとして B 株のドラフトゲノム DNA 配列に対して検索を行ったが、カテキン代謝酵素遺伝子は見つからなかった。

そこで、精製酵素を大量に調製するため酵素の精製条件を検討し直した。最終的に、SDS-PAGE 上で単一になるまで目的酵素の精製に成功し、その N 末端部分アミノ酸配列を決定した。しかし、

カテキン代謝酵素遺伝子は B 株のドラフトゲノム DNA 配列上に見つからなかった。NCBI のデータベースに対して、本酵素の N 末端部分アミノ酸配列をクエリとして相同性検索を行った結果、本配列と高い相同性のアミノ酸配列が N 末端に存在する酵素は見つからなかった。この結果より、B 株のもつカテキン代謝酵素はこれまでに報告のない新規酵素と示唆された。

B 株の全ゲノムシーケンス

本研究室の先行研究では、B 株のドラフトゲノム DNA 配列はイルミナ社の NGS を用いて決定していたため、多数のコンティグからなりギャップが多く存在していた。決定した N 末端部分アミノ酸配列が B 株のドラフトゲノム DNA 配列上に見つからなかった原因はこのギャップがあるためと考えた。そこで、リード長の長い PacBio 社の long-read sequencing による B 株の全ゲノム DNA の塩基配列決定を行っている。