

C-配糖体代謝酵素に関する研究

兵頭 悠 (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】

植物や細菌は多様な二次代謝産物を合成することが知られている。これらの化合物は、しばしば糖付加修飾 (配糖化) されることで水溶性や化学的安定性が増大する。このように配糖化を受けた化合物のことを配糖体と呼び、その中には疾病予防や治療への効果が認められるものもある。例えば、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化合物には、抗糖尿病作用や抗がん作用が認められている。一般的に、配糖体は糖と非糖部分がグリコシド結合を介して結合した構造をとっており、その中で最も広く見られるのは酸素原子を介し結合した O 配糖体である。一方で、C 配糖体は糖と非糖部分の炭素原子同士が直接結合した特徴的な構造をとっており、その構造ゆえに極めて高い化学的安定性を示す。しかし、その化学合成法にはいくつかの課題が残されている。一方、生体触媒による合成はそれらの課題を解決できる可能性があることから、新たな C 配糖体合成法として注目されている。

先行研究では、土壌からスクリーニングを行うことで、C 配糖体合成反応に関与する土壌細菌の一種を単離した。そこで本研究では、土壌微生物由来の酵素を利用した新たな C 配糖体合成法を確立するために、本菌に含まれる C 配糖体代謝酵素の同定および諸性質の解明を目指した。

【結果・方法】

C 配糖体代謝酵素の精製

培養した本株から無細胞抽出液を調製し、各種カラムクロマトグラフィーに供することによって C 配糖体代謝酵素の精製を試みた。HPLC を用いた活性測定では、産物の生成量から活性の有無を判断した。カラムクロマトグラフィーの結果から、目的酵素が少なくとも 2 種類存在する可能性が示唆された。そこで、それぞれを酵素 A、酵素 B と呼ぶことにした。

酵素 A については、SDS-PAGE 上で観察されるバンドが 2 種類のみになるまで精製することができた。このうちバンドの濃度と酵素活性に相関が見られる方を推定目的酵素 A と仮定した。本タンパク質を SDS-PAGE 上から PVDF 膜へ転写した後、エドマン分解法によって N 末端部分アミノ酸配列を決定した。この配列をクエリとして、本株のゲノム DNA 配列に対して検索を行ったところ、酵素 A 遺伝子に対応する ORF をドラフトゲノム上に見出すことができた。

酵素 B についても、HPLC を用いた活性測定および SDS-PAGE による分子量検討を行うことにより、推定目的酵素 B を SDS-PAGE 上に特定することができた。現在、こちらの酵素が SDS-PAGE 上で単一になるような精製条件を検討している。

本株の全ゲノム DNA 塩基配列決定

精製した推定目的酵素のアミノ酸配列を本株のドラフトゲノム上の ORF と比較するため、専用のキットを用いてゲノム抽出を行い、本株の全ゲノム DNA の塩基配列決定を行った。

推定目的酵素遺伝子のクローニング

本株のドラフトゲノム上に見出した、推定目的酵素 A に対応する ORF のクローニングを行った。まず、本 ORF を含むプラスミドを作製した。こちらのプラスミドを大腸菌発現系に組み込んで大量培養した後、その無細胞抽出液を調製した。こちらをカラムクロマトグラフィーに供し、推定目的酵素 A のみを含む画分を取得した。HPLC に供して活性測定を行ったところ、こちらの画分に活性は確認されなかった。現在、酵素 A 精製の際に SDS-PAGE 上で見られたもう一方のタンパク質が、本酵素の活性に関与している可能性を考慮し、こちらのタンパク質の同定を試みている。