

## 腸内細菌由来機能未知酵素に関する研究

青木 祐人（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】

近年、腸内細菌が宿主の健康に対して大きな影響を与えることが明らかになってきている。その一つの要因は、食物に含まれる化合物を腸内細菌が代謝し、その代謝産物が宿主に対して生理活性を示すことである。したがって、腸内細菌がもつ代謝酵素機能の解明は、医療や製薬などの分野において重要な意義をもつと考えている。

カテキンはフラボノイドの一種であり、お茶、リンゴ、プラム、ココア、赤ワインなどの様々な食用植物に含まれており、血圧上昇の抑制や、血中コレステロールおよび血糖値の調節、抗酸化作用などヒトの健康に関わる様々な活性を示すことが知られている。カテキンの腸内細菌による分解・代謝に関する報告はいくつか存在するものの、代謝酵素についての報告はほとんどなされていない。

本研究室では、腸内細菌由来のカテキン代謝酵素の新規発見と機能解明のため、ヒト腸内細菌を対象に、候補となる遺伝子の絞り込みおよび同定を行ってきた。これまでに、(+)-カテキンから代謝産物 C1 が代謝されること、C1 から代謝産物 C2 が生成されることされることが明らかになっているが、C1 から C2 の反応を触媒する酵素は未だ特定されていない。

本研究では、カテキン代謝産物 C1 を代謝する酵素の同定を目的として、候補遺伝子 X の異種発現と機能解析を試みた。

## 【方法】

## 腸内細菌からの DNA 抽出

脱酸素剤で嫌気状態を保った密閉容器内で、GAM 培地で満たしたねじ口試験管に腸内細菌を植菌し 37℃ で 2 日間培養した。培養した菌体を遠心分離し、キットを用いて DNA を抽出した。

## 目的遺伝子のクローニング

目的領域のプライマーを作成し、2 ステップ PCR でクローニングした。PCR 溶液をアガロースゲル電気泳動し、目的バンドの切り出しおよびゲル抽出を行った。得られたインサートを *Nde*I と *Xho*I によって制限酵素処理した大腸菌発現用プラスミドにクローニングした。

## 大腸菌での目的遺伝子の発現

構築したプラスミドを大腸菌コンピテントセルに形質転換し、培養した。集菌した菌体を破碎し、遠心して無細胞抽出液を得た。それを SDS-PAGE に供した。

## C1 との反応

無細胞抽出液と休止菌体液（培養後の菌体を緩衝液で懸濁したもの）それぞれに C1 を添加し、37℃ で一晩インキュベートしたのち、反応溶液を高速液体クロマトグラフィ（HPLC）に供した。

## 【結果・考察】

SDS-PAGE では、無細胞抽出液において目的遺伝子由来するタンパク質の明瞭なバンドは確認されなかった。また、HPLC の結果、無細胞抽出液、休止菌体どちらの反応についても C1 の減少は確認されなかった。可溶性画分の発現量増加を目的に、金属イオンの添加やエタノールの添加を行ったが、発現量は増加しなかった。

これらの結果から、宿主として大腸菌は目的遺伝子の発現に適していないことが示唆された。今回用いた腸内細菌はグラム陽性菌であり、さらにゲノム DNA が GC リッチである<sup>[1]</sup>。一方、大腸菌はグラム陰性菌であり、GC 含量も異なることから、腸内細菌の遺伝子を発現する宿主として、大腸菌は不適切である可能性が考えられた。そのため、今後はグラム陽性で GC リッチな放線菌を宿主にして酵素発現を試みる。

当研究室で開発された大腸菌 - 放線菌シャトルベクターを用いることで、プラスミド構築までを操作および培養が比較的容易な大腸菌で行い、酵素発現のステップを放線菌で行う予定である。

## 【参考】

- [1] 江崎孝行. (2006). 腸内に生息する細菌の系統. *腸内細菌学雑誌* 20: 237-244.
- [2] 藤澤倫彦. (2016). ヒト腸内グラム陽性細菌の分類の現状. *腸内細菌学雑誌* 30: 177-190.