

ゴマ由来生理活性物質の微生物代謝に関する研究

神村 和音 (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)

目的・背景

セサミンは抗酸化作用や血中コレステロール低下作用、脂質低下作用などの様々な生理活性作用を持つことで知られ、近年は機能性食品やサプリメントといった利用により注目を集めている。しかし、その代謝に関してヒトやマウスにおいては報告があるものの、微生物によるセサミン代謝や酵素が同定された例は無かった。よって本研究で微生物におけるセサミン代謝酵素の同定と精製が行われたところ、SesA という新規酵素によってセサミンがセサミンモノカテコール、ジカテコールへと変換されることが明らかとなった。さらにその後の研究によって、SesA 近傍遺伝子 ORF2, ORF3, ORFX, ORFXX によりセサミンジカテコールから段階的に化合物Dへと移行する一連の代謝経路が提案された。しかし、その中で化合物A, 化合物Bから化合物Cへの変換のために必要となる酵素、ORFXの詳細な働きについてはいまだ不明のままであった。そこで本研究ではORFXの諸性質解明を目的とした。

方法・結果

ORFX 諸性質解明のため、まず ORFX 反応の基質である化合物A, 化合物Bを大量に得ることを目的とした。化合物A, Bは安定性に欠け、研究室で長期間保存することは難しい。そのため、より安定なセサミンジカテコールから、ORF2, ORF3が触媒する反応によって化合物A, 化合物Bを手に入れることを考えた。そのために反応液の組成と反応条件を検討し、効率的に化合物A, 化合物Bを得る方法を調査した。結果的に、前任者が考案した組成では、セサミンジカテコールが過剰であったことが明らかとなった。前任者の組成に対してセサミンジカテコールを1/10量にしても、反応生成物量に大幅な差は見られなかった。よって、基質量をより削減できる効率的な組成であるとして、今後はセサミンジカテコール量を従来の1/10の量に変更してアッセイを行っていくこととした。また、反応液中のORF2の量を大幅に増やすことによって、単位時間中の基質から反応産物への変換がより活発になるのではないかと考えた。実際にORF2を10倍量添加することにより、反応時間中の基質減少速度および反応産物生成速度の大幅な増加という結果を得ることができた。しかし、その後の実験により2ステップ反応として働くORF2とORF3のバランスが乱れることにより、かえって非効率的な組成であったことが明らかとなった。さらに、その後の実験により、従来の組成においてもORF2が過剰であったことが判明したため、ORF2は従来の組成に対して1/5量添加することとした。

これまでの実験では前任者が精製し、-80°C保存されていた酵素を用いて実験を行っていた。酵素が残り少なくなっていたので、自分でもORF2, ORF3, ORFXXの精製を行った。各酵素遺伝子がクローニングされた発現用プラスミドを用いて大腸菌を形質転換し、培養した後に菌体を破碎して、遠心分離して得た無細胞抽出液を、2種類のカラムに供し分画した。各過程において得られたフラクションをSDS-PAGEに供することにより、目的タンパ

ク質の発現や精製の程度を確認した。最終的に精製に成功した酵素ORF2, ORF3を用いて同様のアッセイを行ったところ、セサミンジカテコールから化合物A, 化合物Bへの移行速度が飛躍的に上昇したことが明らかとなった。しかし、それから一か月半ほど経過した後に同じ組成でアッセイを行った場合、反応速度は約半分ほどに低下してしまった。このことから、ORF2, ORF3といった酵素は時間経過により比較的短時間で活性が低下してしまう可能性が示唆された。今後はこれらの酵素の再精製を行うとともに、活性を残したまま長期間保存する方法についても探していきたい。また、これまで先行研究から得られた知見と反し、ジカテコールからの代謝において化合物Dが観察できていなかったため、ORFXXの精製が不完全であると予想していた。しかし新たに精製したORFXXを用いた場合であっても同様に化合物Dは確認できなかった。いまだに先行研究で提案されたジカテコールから化合物Dまでの経路の観察ができていないため、これを目標としつつ、pH依存性や温度依存性、反応産物の同定といったORFXの諸性質解明を進めていきたい。