

研究課題 (テーマ)	メタゲノム解析による微生物由来ポリフェノール抱合体加水分解酵素の探索		
研究者	所属学科等	職	氏名
代表者	生物工学科	准教授	生城 真一
分担者	生物工学科 生物工学科	教授 助教	伊藤 伸哉 戸田 弘
研究結果の概要			
<p>◎ポリフェノール抱合体加水分解能評価系の構築及び微生物由来ポリフェノール抱合体加水分解酵素のスクリーニング</p> <p>遺伝子組み換えにより抱合体生産能を有する出芽酵母菌体を用いて、ケルセチン及びイソラムネチンのグルクロン酸あるいは硫酸抱合体の大量合成系の検討を行った。</p> <p>サル由来 UDP-グルクロン酸転移酵素 (UGT1A1) 発現酵母を用いてケルセチンの5種のグルクロン酸抱合体 (Di-G, 7,3, 4', 3'位) を数十ミリグラム合成することに成功した。また、ヒト由来硫酸基転移酵素を用いて2種の抱合部位の異なる硫酸抱合体の合成系を確立した。ケルセチンのメチル化体であるイソラムネチンについても抱合体合成に成功し、3種のグルクロン酸抱合体については NMR による構造決定 (7,3, 4'位) を行った。また、抱合体精製における過程において抱合体を安定に取得するノウハウを得ることができた。これら抱合体は市販されておらずポリフェノール加水分解評価系の基質として極めて有用である。</p> <p>◎メタゲノム解析によるポリフェノール抱合体加水分解酵素遺伝子の探索・機能解析</p> <p>細菌類および腹足動物(リンゴマイマイ)由来アルキル化合物硫酸エステル加水分解酵素(スルファターゼ)遺伝子配列を参考にデータベースより類似遺伝子を検索し、各種スルファターゼ遺伝子のアミノ酸配列を得た。これらのアミノ酸配列を基に系統樹作成及びアミノ酸配列アライメントを作成し、保存性の高いアミノ酸配列領域を探索した。これらの保存領域の配列を基に縮重プライマーを作成し、腸内細菌群より抽出したメタゲノムサンプルを鋳型として PCR を行った。当グループではこれまでに、メタゲノムより PCR により目的とする遺伝子を増幅し直接クローニング・発現解析を行う S-GAM 法を確立していることより、本課題においても S-GAM 法によるスルファターゼ遺伝子の取得、解析を試みた。しかし、PCR 条件の検討にもかかわらず、目的とする遺伝子断片の増幅は得られなかった。そこで2段階の PCR により目的遺伝子の増幅を行う nested-PCR の手法を試みたが、目的遺伝子産物の増幅は確認できていない。腸内細菌群では既知スルファターゼとは異なるファミリーの酵素が機能している可能性が示唆される。</p>			
今後の展開			
<p>今回合成したケルセチン及びイソラムネチン抱合体を用いて市販されている加水分解酵素による感受性を解析していく。さらに共同研究グループにより探索された腸内細菌由来新規酵素による感受性を解析していく。また、レスベラトロールなどのスチルベン系ポリフェノールの抱合体についても大量合成系を確立していく。今回参考にした既知スルファターゼとは異なるファミリーのスルファターゼ遺伝子をもとに新たにプライマー設計および遺伝子増幅を試みる。また、腸内細菌の近縁種で明らかになっているゲノム配列情報を基に、スルファターゼ類似遺伝子の探索とその遺伝子合成、機能解析を試みる。</p>			