

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	教授	生城真一
	生物工学	教授	伊藤 伸哉
	生物工学	講師	戸田 弘
研究結果の概要			
<p>◎ポリフェノール抱合体ライブラリーを用いた加水分解評価系の構築と腸内微生物による加水分解反応の解析</p> <p>前年度の申請において異物抱合酵素発現酵母を用いて部位特異的なケルセチン抱合体（グルクロン酸抱合体：4種、硫酸抱合体：3種）及びイソラムネチン抱合体（グルクロン酸抱合体：3種）を合成することに成功した。市販サルファターゼにおけるケルセチン硫酸抱合体に対する加水分解反応をHPLCにより解析したところ、B環の4位に結合した硫酸基は他の部位（7位、3位）に比べて加水分解反応に耐性をもつことが示された。また、グルクロン酸抱合体については63種のヒト由来常在性腸内細菌による加水分解反応について解析した。嫌気培養条件下においてケルセチン7位グルクロン酸抱合体を添加し、24時間後の菌体培養液中の抱合体をHPLCにより定量してところ、約半数の菌種について抱合体に対する加水分解能を有することが明らかになった。ほぼ100%のケルセチンへの変換効率を有する菌株には腸内細菌優勢種や乳酸菌に属する菌種が存在した。これら腸内細菌群による加水分解能は、ケルセチンを含めた食品中ポリフェノールの腸肝循環及びポリフェノールの生体利用率に関与する可能性が示された。</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。また、ヒト糞便サンプルより抽出・調製したメタゲノムDNAを次世代シーケンスにより網羅的に解析し、その配列中よりスルファターゼに共通性の高いアミノ酸配列を取得した。これらの配列をデータベースにより検索し、類似の配列を持つ最近由来スルファターゼ様遺伝子配列を取得した。これらの全長アミノ酸配列をコードする遺伝子を合成し、大腸菌による異宿主発現を試みた。しかしながら、大腸菌細胞中においてこれらの遺伝子産物はすべて不溶性タンパク質として発現し、可溶性タンパク質を得ることはできなかった。また、合成遺伝子のコドン使用頻度を大腸菌に最適化したものを作製し、同様に組換え酵素の発現を試みたがやはり有意な可溶性タンパク質は得られなかった。</p> <p>本申請による共同研究を基盤にして、平成30年度より基盤研究(B)の課題の一部として助成を受けることができ、今後の進展につなげることが可能となった。</p>			
今後の展開			
<p>2年間にわたる本研究グループによる重点領域研究において、抱合酵素発現酵母を用いることによりケルセチンについて部位特異的な抱合体（グルクロン酸、硫酸）を調製し、加水分解反応の解析系を構築することができた。腸内細菌培養液にケルセチン抱合体を添加し、いくつかの菌種において加水分解産物が得られることが明らかにしたことから、当該菌種のゲノム配列を探索し、ケルセチン加水分解酵素遺伝子の取得と異宿主発現を試みる。</p>			