

腸内細菌による植物由来生理活性物質の分解に関する研究

山本 一茶（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】

カテキンはフラボノイド化合物の一種であり、緑茶などに多く含まれている。カテキンには抗酸化作用、抗腫瘍作用、抗菌作用などの生理活性があることが知られており、あらゆる疾患の予防に役立っている。経口摂取されたカテキンは、小腸ではほとんど吸収されず、大腸へと運ばれる。運ばれたカテキンは大腸内に生息する腸内細菌によって代謝される。腸内細菌によって産生される代謝産物の一部にも抗酸化作用や認知症予防といった生理活性が認められているものもあるため、カテキンを摂取することでもたらされる健康効果の発揮にはカテキンそのものだけでなく、その腸内細菌由来代謝産物も大きな貢献を果たしている可能性が考えられる。

先行研究により、カテキンはA細菌によってカテキンの環が開いたC-1およびC-2へと変換され、その後B細菌によりそれぞれ吉草酸やラクトンへと変換されることが明らかになっている。また、当研究室の先行研究により、C-1、C-2から吉草酸、ラクトンに変換されるまでの経路を解析するとともに、2つの中間産物（C-1-A、C-1-B / C-2-A、C-2-B）を同定している。

そこで私はB細菌により起こる反応の中でも、C-1-A / C-2-AからそれぞれC-1-B / C-2-Bへ加水分解される反応に着目した。この反応は酵素Xも酵素Yも触媒可能である。本研究ではこれらの酵素の諸性質解明を目的とした。

【方法】

酵素精製

目的遺伝子を導入した大腸菌を培養後、細胞破碎を行い、無細胞抽出液を調製した。その後、His trap カラムを用いて目的酵素を精製した。

基質の調製

反応液にC-1およびC-2と反応に必要な酵素と補酵素を加え、C-1-AおよびC-2-Aを生成した。その後、HPLCを用いて反応液の中からC-1-AおよびC-2-Aのみを分取した。

キネティックパラメーターの測定

さまざまな濃度の基質（C-1-A または C-2-A）と一定量の酵素を反応させることでできる生成物（C-1-B または C-2-B）をLC-MSで検出し、そこから得られるピーク面積から生成物量を求めた。求めた値からSV plotを作成し、 K_m 、 V_{max} 、 k_{cat} 等を算出した。

【結果・考察】

酵素精製

SDS-PAGEを行ったところ目的酵素の分子量付近に濃いバンドが見られ、精製に成功した。

基質の調製

分取したものをLC-MSを用いて分析したところ、目的化合物のみが大きなピークとして見られ、精製することができた。

キネティックパラメーターの測定

得られた K_m 、 k_{cat} の値から触媒効率を求めたところ、基質がC-1-Aのときは酵素Xの方が触媒効率が高かった。一方、基質がC-2-Aのときは酵素Yの方が触媒効率が高かった。このことより、腸内では酵素XがC-1-Aを生理的に代謝し、酵素YがC-2-Aを生理的に代謝していることが示唆された。

今後は酵素X、酵素Yの詳細な生化学的解析を行う予定である。