2023 年度　一般財団法人杉山産業化学研究所研究助成　報告書

京都大学　大学院工学研究科　佐藤 喬章

【研究題目】

悪玉腸内細菌における機能未知キナーゼの解析

【背景と目的】

ヒトの腸内には 1,000 種類以上、約 100 兆個もの細菌が生息しており、それらがバランスを保ちながら細菌叢を形成している。この腸内細菌叢はヒトが合成できない補酵素の生産、ヒトが消化できなかった未消化物の分解、病原性細菌の増殖抑制など、ヒトに大きな利益をもたらしており、臓器の一つとさえ言われている [1]。一方で、細菌叢は加齢などによって変化することが知られており、悪玉菌が増加しすぎるなどそのバランスが崩れる（ディスバイオシス）ことによりヒトの健康が損なわれる可能性が指摘されている。これまでに細菌叢の菌叢解析は盛んに行われてきているが、個々の腸内細菌の代謝には未解明な部分が多く残されている。また、悪玉菌特異的な酵素や代謝系があり、その阻害剤が開発できれば悪玉菌特異的な増殖抑制が可能ではないかと考え、腸内細菌の代謝研究を進めている [2]。キナーゼは化合物をリン酸化して活性化し、代謝を進める重要な酵素である。本研究では、腸内悪玉細菌において“キナーゼ, ホスホフルクトキナーゼ B ファミリー”と大まかな機能は推定されているものの、基質や真の機能が不明なキナーゼ（以下 HypoK とする）の基質および機能を解明することを目的とした。

【研究成果】

まず、His タグを付加した HypoK をコードする遺伝子を化学合成し、pET21a(+)を基にした遺伝子発現ベクターを作製した。大腸菌を用いて本遺伝子を発現させ、組換え型タンパク質を調製した。さらに、精製用の各種カラムを用いてほぼ単一となるまで精製した。ピルビン酸キナーゼ/乳酸デヒドロゲナーゼ(PK/LDH)をカップリング酵素として用いてリン酸基供与体である ATP から生成する ADP を定量することにより（図 1)、様々な化合物に対する精製タンパク質のキナーゼ活性を網羅的に評価した。

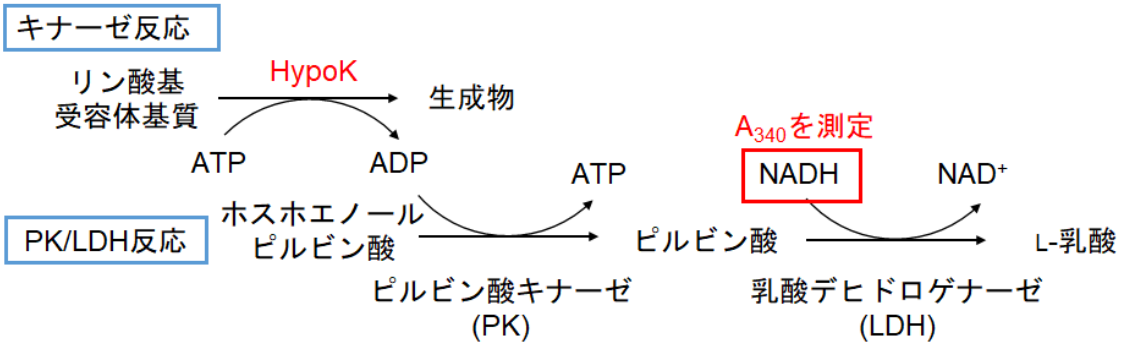


図 1. PK/LDH 法の原理

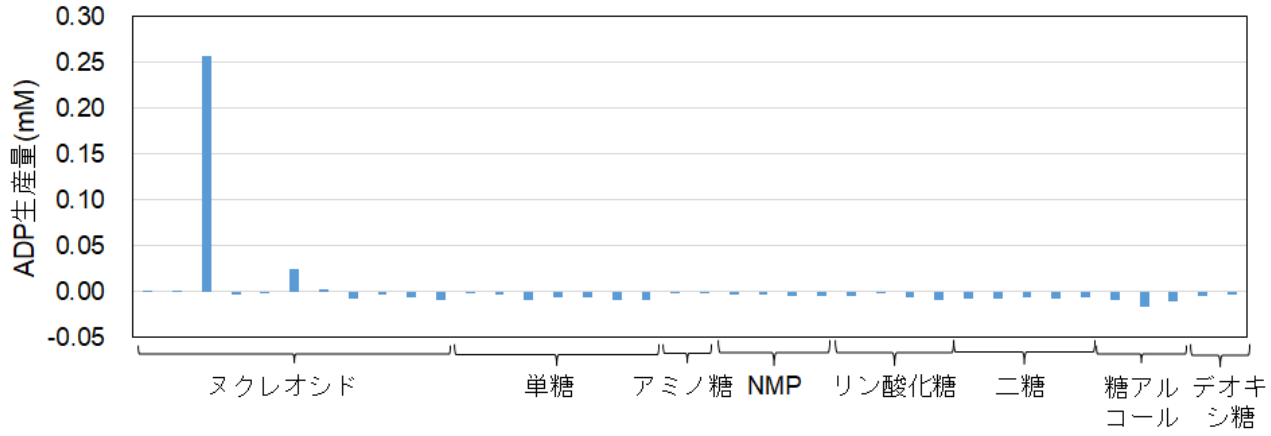


図 2. 様々なリン酸基受容体に対する網羅的キナーゼ活性解析

その結果、ヌクレオシドの内 1 つの化合物に対して顕著な活性を示すことが明らかとなった（図 2）。一方、本ヌクレオシドの 2’位のヒドロキシ基がないデオキシヌクレオシドおよび 5’位のヒドロキシ基がリン酸化されているヌクレオシド-5’-モノリン酸に対しては活性を示さなかった。二価カチオンの要求性を検討したところマグネシウムイオンを用いた際に最も高い活性を示した。また、温度依存性を検討したところ 40℃が至適反応温度であった。さらに反応産物に対して NMR 解析を行い、HypoK がどのヒドロキシ基をリン酸化しているのかも同定した。

本ヌクレオシドは何らかの代謝により細胞内で生成しているのか、細胞外から取り込んでいるのか、その両方なのかは不明である。しかし、どちらにせよ本酵素はヌクレオシドの資化に寄与している可能性が考えられた。そこで、細胞を用いた *in vivo* 実験を行い生理的機能についての知見を得ることを試みた。研究対象である悪玉腸内細菌はバイオセーフティーレベルが 2 であり、その培養には特定の培養設備が必要となることから、HypoK の遺伝子ホモログを有し、系統学的に近く同じ属に分類される微生物を用いて検討を行った。具体的には本ヌクレオシドを培地に添加した際に増殖度が上がり資化性を示すかを検討したが、ヌクレオシドの添加・非添加で増殖に差は見られなかった。今回試した培地は栄養豊富な培地であったために差が見られなかった可能性もあるため、今後は栄養源の少ない培地を用いて資化性を検討していく予定である。

【参考文献】

1) “Diversity of the human intestinal microbial flora”, Eckburg P.B., Bik E.M., Bernstein C.N., Purdom E., Dethlefsen L., Sargent M., Gill S.R., Nelson K.E., Relman D.A. ***Science***, **308**: 1635-8 (2005)
2) “The Lreu_1276 protein from *Limosilactobacillus reuteri* represents a third family of dihydroneopterin triphosphate pyrophosphohydrolases in bacteria”, Kachi K., Sato T., Nagasawa M., Cann I., Atomi H. ***Appl. Environ. Microbiol.*** **90**: e0081424 (2024)