



渡邊 崇人 (京都大学生存圏研究所)

共同研究者：藤原 秀彦 (別府大学食物栄養科学部) 末永 光 (産業技術総合研究所細胞分子工学研究部門)
廣瀬 遵 (宮崎大学工学教育研究部) 木村 信忠 (産業技術総合研究所生物プロセス研究部門)



我々はこれまでに土壤中より *Pseudomonas* 属や *Rhodococcus* 属を始めとするビフェニル/ポリ塩化ビフェニル (PCB) 分解細菌を十数株単離し、それらの遺伝生化学的研究及びゲノム解析を行ってきた。その結果、これらの細菌は、ビフェニル/PCB 等の環境汚染物質だけではなく、様々な芳香族化合物の分解・代謝に関与する遺伝子を有していると予想された。一方、これらの環境汚染物質分解細菌は新規な芳香族化合物分解系を獲得した末端リグニン分解細菌の一種とも考えられている。本研究は、リグノセルロース系バイオマスからの有用芳香族化合物生産を行う上でビフェニル/PCB 分解細菌を利用できるのかどうか、その可能性について探ることを目的とした。

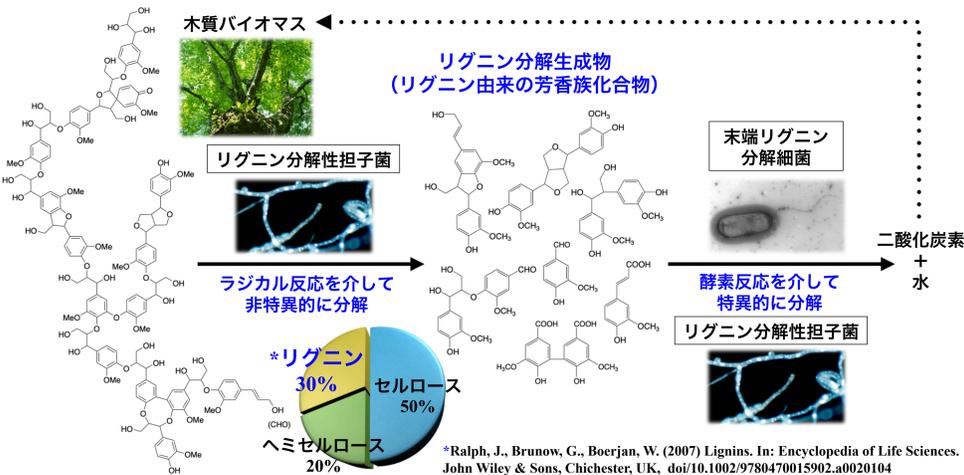


図1 リグニンの生分解 自然界から供給される芳香族化合物の多くは植物リグニン由来である。リグニンは難分解性の不定形の芳香族化合物である。しかしながら、唯一リグニン分解性担子菌 (白色腐朽菌) によってリグニンは分解され、最終的に無機化 (二酸化炭素と水まで分解) される。なお、リグニンが部分的に分解される過程で土壌環境中にリグニン分解生成物 (リグニン由来の芳香族化合物) が放出される。土壌環境中にはこのリグニン由来の芳香族化合物を分解できる細菌が数多く存在する。これらの細菌もリグニンの末端分解に大きく関与していることから「末端リグニン分解細菌」と呼んでいる。

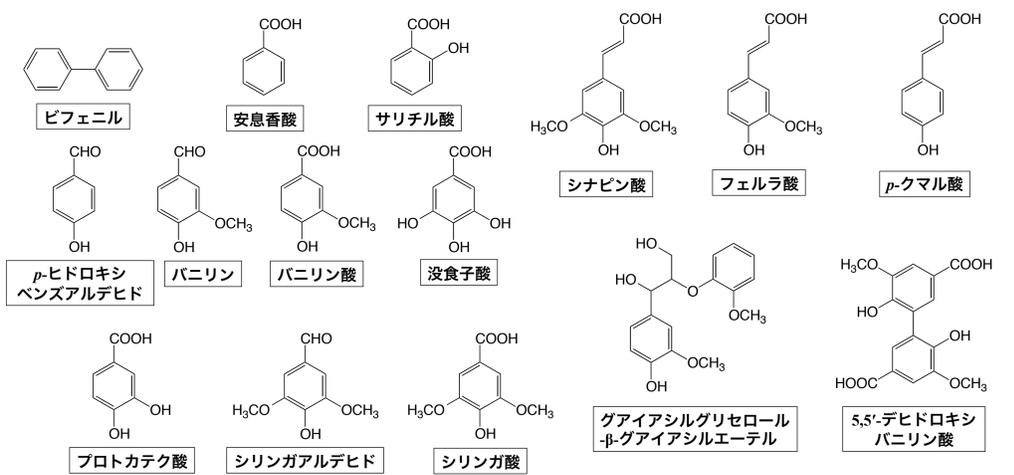


図2 資性試験で用いた芳香族化合物 最初に、我々が所有するビフェニル/PCB 分解細菌がリグニンの構成成分やその分解生成物を含め様々な芳香族化合物を唯一の炭素源として資化するのか試験した。その結果、シリングル骨格を持つ化合物やリグニンダイマーモデル化合物を資化できる株はほとんどなかったものの、種によって資化性が大きく異なっていたことが分かった。なお、今回用いたビフェニル/PCB 分解細菌は、以下の 12 株である：*Pseudomonas abietaniphila* KF701; *Pseudomonas aeruginosa* KF702; *Pseudomonas putida* KF703; *Pseudomonas furukawii* (*Pseudomonas pseudoalcaligenes*) KF707; *Cupriavidus basilensis* KF708; *Cupriavidus pauculus* KF709; *Pseudomonas toyotomiensis* KF710; *Comamonas testosteroni* KF712; *Pseudomonas putida* KF715; *Pseudomonas stutzeri* KF716; *Pseudomonas abietaniphila* KF717; *Rhodococcus wratislaviensis* T301. これらの株は、全てゲノム解析を終了している (下記の文献参照)。

図3 *Pseudomonas putida* KF703 株の発現プロファイル 様々な芳香族化合物 (図2) を用いた資性試験の結果を基に、多くの芳香族化合物 (基質) を資化し、生育も良好な株を選択した。そして、芳香族化合物の分解・代謝に関する酵素等を探索、分離・同定するために、二次元電気泳動法をベースとしたプロテオミクスを試みた。今回は、一例として *P. putida* KF703 株について報告する。

(A) 基質を添加及び非添加の培養条件で KF703 株より調製した 2 種類のタンパク質を異なる波長を持つ 2 種類の蛍光色素でそれぞれ標識し、混合後、二次元電気泳動に供した。泳動後、それぞれの蛍光波長でゲルイメージを異なる色で取得し、それらを重ね合わせることで色の違いから発現量の変化を視覚的に捉えることが可能となった。なお、本手法は、研究代表者が選択したリグニン分解性白色腐朽菌のプロテオミクスで用いてきた蛍光ディファレンスゲル二次元電気泳動法を細菌用に最適化したものである [Watanabe et al., 2017]。また、これにより芳香族化合物の添加によって誘導されるタンパク質のスポットを容易に特定できる。右図のゲルイメージにおいては、基質の添加によって発現量が増加したタンパク質、発現量が減少したタンパク質、基質の添加時と非添加時において同程度の発現量であるタンパク質をそれぞれ、赤、緑、黄色で示した。

(B) 蛍光ディファレンスゲル二次元電気泳動法により分離したタンパク質については、トリプシンを用いてゲル内消化し、MALDI-TOF-MS による測定及びゲム情報を用いた検索 (Mascot 検索) によりタンパク質の同定に繋げていくことが可能となった。今回は、これら一連のプロテオミクスにより発現量に差があるタンパク質と発現量が多いタンパク質を優先的に同定することにした。同定できたタンパク質を推定される機能によって分類した結果、芳香族化合物の分解・代謝酵素や輸送等に関与するタンパク質が多いことが分かった。今後も引き続き、他の株や様々な基質を用いて解析を進めることで、様々な (リグニン由来の) 芳香族化合物の添加時に発現している有用な分解・代謝酵素だけではなく、直接関与してなくても芳香族化合物の分解・代謝に重要な役割を果たすタンパク質も同定できると考えられる。得られた情報は、有用芳香族化合物生産のための代謝経路の推定やモデリング、さらに、*Pseudomonas* 属細菌等の分子育種に繋げる。なお、現在、一次元目と二次元目のゲルのサイズを大幅に大きくし、蛍光ディファレンスゲル二次元電気泳動のタンパク質の分離能をさらに向上させることを試みている。

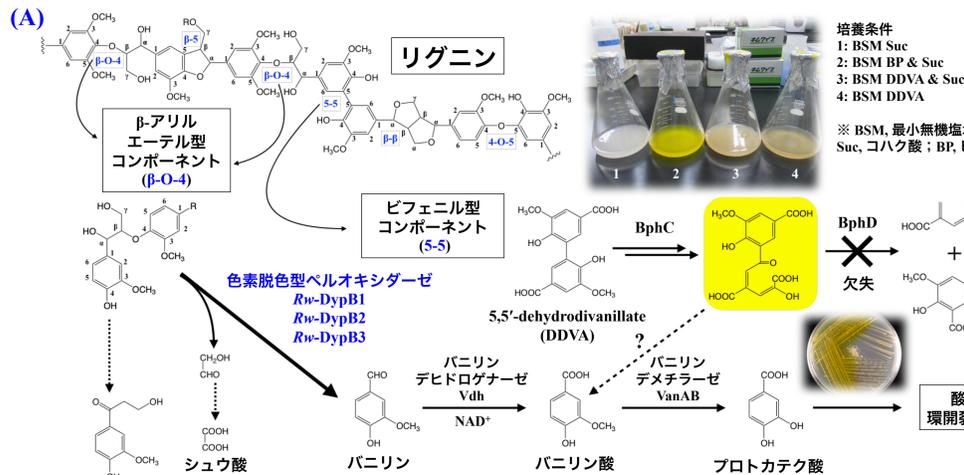
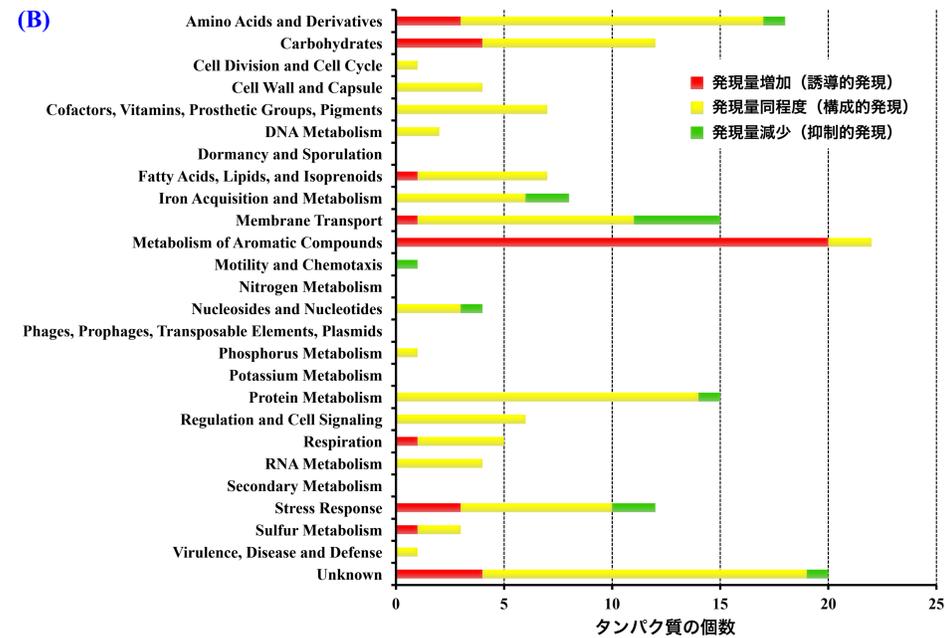
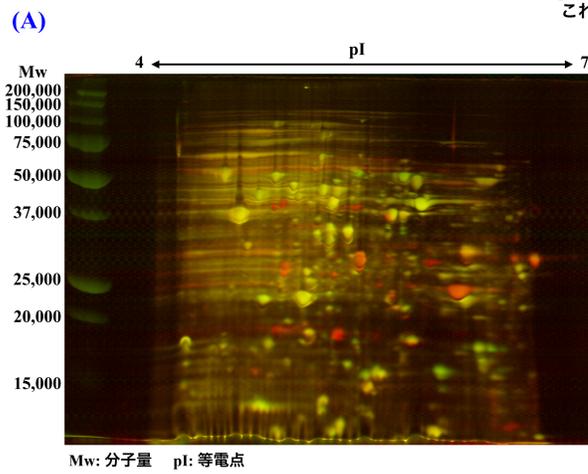
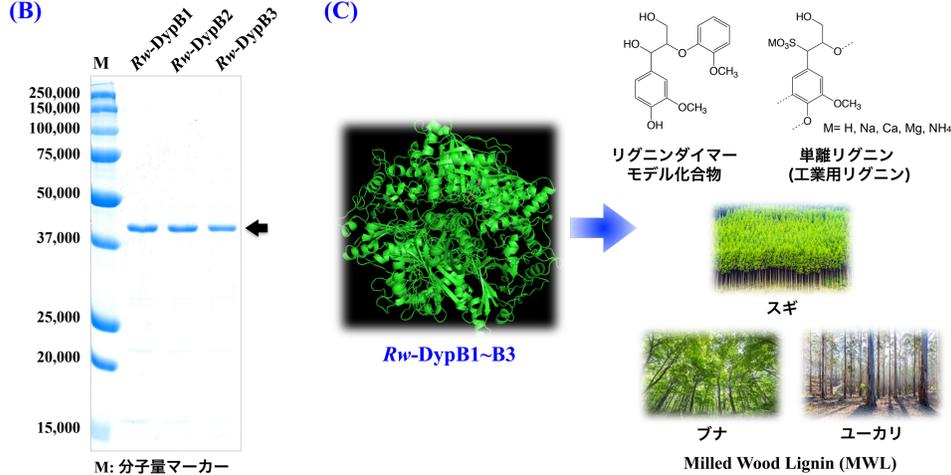


図4 *Rhodococcus wratislaviensis* T301 株のリグニン由来 β -アリルエーテル型及びビフェニル型コンポーネントの化合物の代謝 リグニンの結合様式は多種多様であるが、 β -アリルエーテル型結合 (β -O-4) がその約半分を占める主要な結合である。それ以外にビフェニル環を構成する 5-5 結合もある。(A) 我々がゲノム解析した 12 株のビフェニル/PCB 分解細菌のゲノム情報を精査すると、様々な芳香族化合物 (リグニン分解生成物も含む) を分解・代謝する遺伝子をゲノム上に有していることが分かった。その一例として T301 株には、3 個の色素脱色型ペルオキシダーゼ (dye-decolorizing peroxidase) 遺伝子 (*Rw-dypB1*, *Rw-dypB2*, *Rw-dypB3*) が存在した。これらの遺伝子は、強力な PCB 分解菌である *R. jostii* RHA1 株で初めて報告された細菌由来のリグニンペルオキシダーゼ遺伝子と相同性が高かった [Ahmad et al., *Biochemistry* 50, 5096-5107 (2011); Sainsbury et al., *ACS Chem. Biol.* 8, 2151-2156 (2013)]。なお、T301 株は、ビフェニル/PCB 分解酵素の一つである BphC (2,3-dihydroxybiphenyl dioxygenase) を欠失しているため、ビフェニルを資化できず、その結果、同じくビフェニル/PCB 分解酵素の BphD (2,3-dihydroxybiphenyl dioxygenase) によりメタ開裂した環開裂黄色化合物の蓄積が生じる。しかしながら、リグニン由来のビフェニル型コンポーネント 5,5'-dehydrodivanillate (DDVA) では、その蓄積がなく、資化できるというユニークな特徴があった。(B) 単離した *Rw-dypB1*, *Rw-dypB2*, *Rw-dypB3* を *Rhodococcus* 属細菌の発現系で高発現及び精製に成功した。精製酵素においては、ヘムの再構成を行い、リグニン分解酵素の活性測定で多用されている ABTS (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)) を用いて活性測定を行ったところ、代表的な白色腐朽菌 *Phanerochaete chrysosporium* のリグニン分解酵素に匹敵する活性を示した。(C) 現在、 β -アリルエーテル型結合を有するリグニンダイマーモデル化合物、リグノスルホン酸やクラフトリグニン等の単離リグニン (工業リグニン) に対する活性を調べている。さらに、天然リグニンに構造が類似している MWL について、スギ、ブナ、ユーカリで調製ができたので、これらに対する活性についても調べていく予定である。



結論：ビフェニル/PCB 分解細菌のゲノム情報の精査やプロテオミクスを詳細に行うことにより、リグニン由来を含め様々な芳香族化合物の分解・代謝に関連する有用な酵素や遺伝子を数多く見つけることができ、リグノセルロース系バイオマスからの有用芳香族化合物生産へのこれら分解細菌の利用価値が高まると考えられる。

本研究に関連する研究代表者及び共同研究者の文献：
 Hirose et al. *Genes* 10, 404 (2019) doi: 10.3390/genes10050404; Kimura et al. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 68, 1429-1435 (2018) doi: 10.1099/ijsem.0.002670; Watanabe et al. *J. Microbiol. Methods* 142, 63-70 (2017) doi: 10.1016/j.mimet.2017.09.009; Suenaga et al. *Environ. Microbiol. Rep.* 9, 589-598 (2017) doi: 10.1111/1758-2229.12561; Suenaga et al. *Genome Announc.* 5(7):e01624-16. doi: 10.1128/genomeA.01624-16 (2017); Hirose et al. *Genome Announc.* 3(5):e01215-15. doi: 10.1128/genomeA.01215-15 (2015); Hirose et al. *Genome Announc.* 3(5):e01214-15. doi: 10.1128/genomeA.01214-15 (2015); Fujihara et al. *Genome Announc.* 3(3):e00517-15. doi: 10.1128/genomeA.00517-15 (2015); Fujihara et al. *Genome Announc.* 3(3):e00473-15. doi: 10.1128/genomeA.00473-15 (2015); Watanabe et al. *Genome Announc.* 3(2):e00223-15. doi: 10.1128/genomeA.00223-15 (2015); Watanabe et al. *Genome Announc.* 3(2):e00222-15. doi: 10.1128/genomeA.00222-15 (2015); Suenaga et al. *Genome Announc.* 3(2):e00143-15. doi: 10.1128/genomeA.00143-15 (2015); Suenaga et al. *Genome Announc.* 3(2):e00142-15. doi: 10.1128/genomeA.00142-15 (2015); Kimura et al. *Genome Announc.* 3(2):e00059-15. doi: 10.1128/genomeA.00059-15 (2015).