

令和 3 年 10 月 11 日現在

機関番号：84510

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K14383

研究課題名(和文) 共生細菌由来の新奇酵素によるリグニンの変性

研究課題名(英文) Denaturation of lignin by a novel enzyme from commensal bacteria

研究代表者

今井 岳志 (Imai, Takeshi)

兵庫県立工業技術センター・その他部局等・研究員

研究者番号：30785241

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：リグニン変性への関与が示唆されたヘムタンパク質の生理機能解明を目指した。結果、リグニン特異的な酵素では無かったが、特定の酸化ストレスから細胞を守る強力な抗酸化酵素の一種である事が判明した。ルーメン内等の共生関係下では、当該の細菌は植物破砕物由来の酸化ストレスに曝されることになるため、当該酵素の寄与が示唆される。また、当該酵素は細胞外に局在し、比較的広い基質特異性を示すことからリグニン等の細胞外のフェノール類を電子供与体として利用している可能性も示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究はこれまで機能不明であった、細菌に広く分布しているタンパク質が、特定の活性を有したユニークな新奇酵素であることを明らかにするとともに、その生理機能の解明を果たした。その機能は酸化ストレス下に置かれた細菌がどのように適応しているかという、現在も未解明な領域の一端を説明する重要なものであった。これは哺乳類と共生する細菌あるいは病原性細菌とも深い関わりがあるため、応用的な意義も持つ。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to elucidate the physiological function of a heme protein that was suggested to be involved in lignin degeneration. As a result, although this enzyme was not specific to lignin, it was revealed to be a kind of strong antioxidant enzyme that protects cells from oxidative stress. In the lumen and oral cavity, the bacteria is exposed to oxidative stress derived from plant homogenates, suggesting the contribution of this enzyme. Further, since the enzyme is localized extracellularly and exhibits a relatively broad substrate specificity, it was also suggested that extracellular phenols such as lignin may be used as an electron donor.

研究分野：分子微生物学

キーワード：酸化 酵素 グルタチオン バイオフィルム 共生

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ペルオキシダーゼは過酸化物の酸素原子を賦活することで電子供与体を酸化あるいは過酸化物を還元する酵素で、古細菌、真正細菌、真核生物に至るあらゆる生物において保存されている。その役割は多岐に渡り、活性酸素の除去、代謝、特定の化合物の生合成など基質特異性や発現部位により様々である。細胞内外で発生する過酸化物は過酸化水素のみならず、アルキル化合物の過酸化物も存在しており、特にヒトにおいては血中や組織内に存在するセレンタンパク質のグルタチオンペルオキシダーゼ 4 (GPX4) が過酸化水素よりも過酸化脂質や過酸化脂肪酸に対して高い特異性を示すことが報告されている。その他にもアルキルヒドロペルオキシサイドレダクターゼ(ペルオキシレドキシシン)、リピッドヒドロペルオキシサイドペルオキシダーゼなどがチオール (-SH) を電子供与体として過酸化アルキルを還元している。

一方で、細菌においてはこれら細胞内外の過酸化アルキルの制御方法は未だに不明な点が多く、関連酵素や基質となる電子受容体、電子供与体のほとんどが未解明である。細菌が環境中で接する過酸化物は数多く存在するが、反芻動物ルーメン内に共生する細菌においてはリノール酸あるいはリノレン酸の過酸化物が遭遇しうる主たる過酸化アルキルの一つと考えられている。牧草を含めた草本類は細胞が破砕された際に過酸化リノール酸および過酸化リノレン酸を多量に放出するため、反芻動物のルーメンおよび口腔内の微生物は咀嚼の度にこれらの過酸化物に曝されることになる。これまでに申請者は反芻動物のルーメン内で共生していることが報告されているグラム陽性菌 *Bacillus licheniformis* が、過酸化脂肪酸を還元可能なヘム依存型の酵素を有することを見出した。これまで発見されている過酸化脂肪酸を還元可能な酵素はチオールを電子供与体としているが、本酵素はチオール非依存的であり、pH7-9 において難分解性で複雑な構造を持つリグニンの構成単位であるフェノール類 (グアイアコール、カテコールなど) を電子供与体として過酸化脂肪酸を還元可能なユニークな性質を持つ (図1)。そのため、植物中に含まれるリグニンを電子供与体とした反応を担っていることが予想された。しかしながら、基質を含め、当該酵素の細菌における実際の生理機能は不明であった。

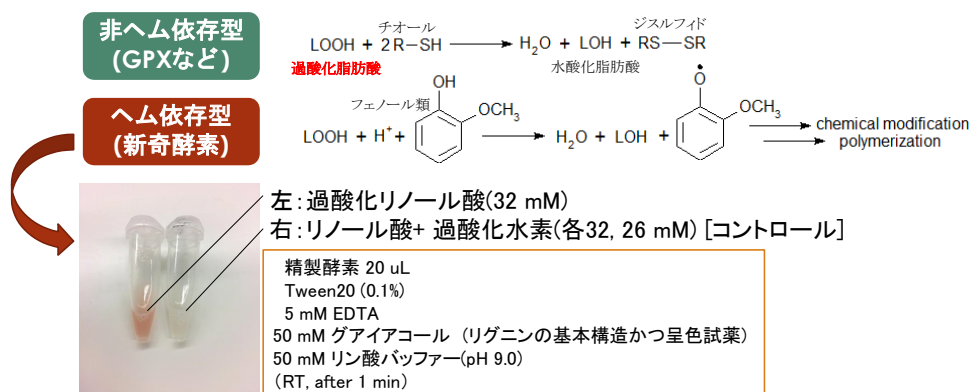


図1 これまでに報告されている過酸化脂肪酸還元反応と新奇酵素による反応

2. 研究の目的

本研究計画では当該酵素の基質や諸性質をさらに評価することで生理機能を解明し、細菌における生理的な役割の解明を目指した。また、バイオインフォマティクス解析により、当該酵素の登場時期や分布を比較することで、進化生物学的な位置付けを明らかにする。植物を栄養源とする生物は、リグニンを変性あるいは分解しなければセルロースやヘミセルロースを効率よく利用することができない。環境中のリグニンの分解に関しては、白色腐朽菌がこれまでによく研究されており、リグニンに対して高い基質特異性を有するリグニンペルオキシダーゼや非特異的なラジカル反応を利用するマンガンペルオキシダーゼによって分解されることが知られている。しかしながら反芻動物による消化を経るリグニンは、ルーメン内の微生物の中でも特に細菌によって変性を受けることが報告されている。一方でどのような細菌あるいは酵素が関与しているかは不明であった。

3. 研究の方法

① 組換えによる新奇酵素の大量発現および精製

当該の新奇酵素は既にオープンカラムにより精製したものが少量あるが、今後さらなる評価を行うためにはより多くの精製酵素が必要となる。そこで、*E. coli* (pET system) および *B. choshinensis* (BIC system) を宿主とした発現株を作成し、当該酵素を大量取得した。また、精製酵素から抗体を作製し、細菌における局在解析等を実施した。

② 近縁種の遺伝子破壊株を用いたフェノタイプ解析

当該酵素の遺伝子は近縁種で遺伝子解析の進んだモデル生物 *B. subtilis* にも保存されており、配列もほぼ一致していることから、同様の生理機能を有していることが予想された。そこでナショナルバイオリソースプロジェクト (NBRP) から当該遺伝子破壊株を入手し、野生株と比較したフェノタイプの解析と過酸化脂質の定量をすることで、当該酵素が実際に過酸化脂質の除去に寄与しているか評価した。

③ 酵素反応試験

グアイアコール、シリングアルデヒド、カテコール、クラフトリグニンといった、リグニンアナログのフェノール類を電子供与体とし、過酸化脂質を含め、いくつかの過酸化物を電子受容体として当該酵素の機能を調べた。さらに②の結果を受け、*in vitro* の酵素反応系で同様の現象を再現できないかを検証した。

④ 進化生物学的考察

本酵素や関連するタンパク質の配列情報の保存状況を生物全体で比較することで、本菌と生態系との関わりや、進化生物学的な位置づけを解析した。

4. 研究成果

具体的な遺伝子名や一部データ等、詳細に関しては公表可能となった後に、改めて追記予定。

【基質の探索】

精製酵素を用いて、リグニンアナログを基質とした酵素活性測定を実施し、ペルオキシダーゼ活性を有することを確認した。一方で、当初想定していた電子受容体である過酸化脂質に関しては、活性が見られるものの、比較的短時間でヘムの酸化変性が起きることが判明し、真の基質が別に存在する可能性が示唆された。

さらに、*B. subtilis* の当該遺伝子破壊株中の過酸化脂肪酸量を定量したところ、破壊株においても過酸化脂肪酸量に有意差が見られなかったことから（図2）、電子受容体に関しては過酸化脂肪酸以外の過酸化物と結論づけた。

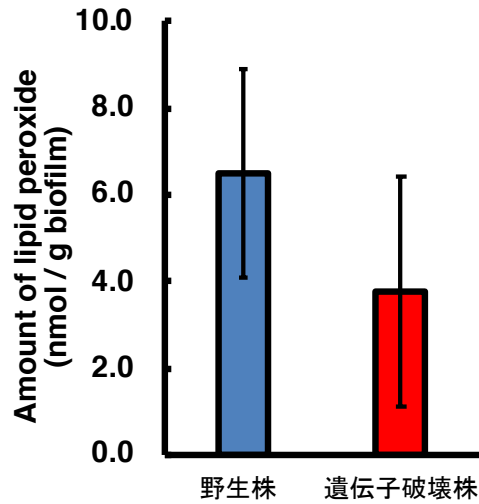


図2 菌体およびバイオフィルム中の過酸化脂質の定量

【電子受容体の探索】

当初の仮説と矛盾する結果が得られたため、新たなアプローチを加えることで本研究の目的である当該酵素の生理的な機能解明を目指した。すなわち、破壊株におけるフェノタイプ変化を観察し、どのような影響が見られるかを詳細に評価することで、真の電子受容体の絞り込みを試みた。

その結果、当該遺伝子破壊株ではバイオフィルムの形成異常が起きていることがわかった（図3）。通常、*B. subtilis* の正常なバイオフィルムは撥水性を有しているが、不完全なバイオフィルムではその撥水性が失われる事が知られている。さらに、そこからバイオフィルム形成に関わる特定のタンパク質の変化を調べた結果、酸化重合によるアグリゲーションが起きている事が明らかとなった（図4）。このことから、当該酵素が特定の酸化還元反応により、菌体表面のタンパク質を酸化変性から守っている事が示唆された。さらに、*in vitro* の実験系で反応を再現した。

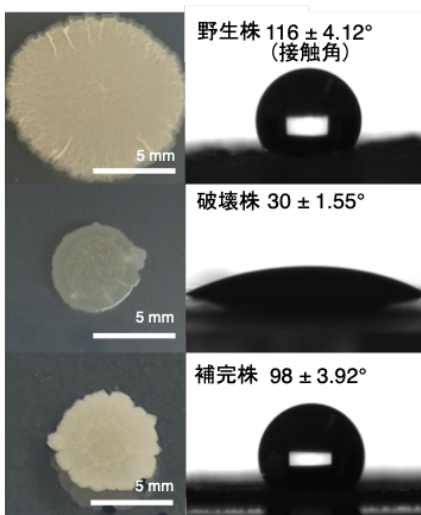


図3 バイオフィルムの形成異常

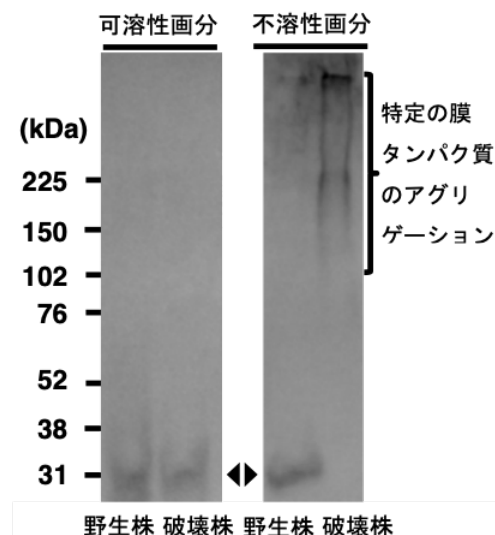


図4 当該遺伝子破壊株における特定の膜タンパク質のアグリゲーション

【進化生物学的考察】

当該遺伝子のオーソログを保存する細菌種の特徴をバイオインフォマティクス解析により調べたところ、グルタチオン(GSH)合成酵素の遺伝子と相互排他的な関係にある事がわかった。GSHは動物を含むほとんどの真核生物が有する還元性の低分子で、細胞内の酸化還元電位を司っている。GSHは種々の活性酸素種(ROS)やROSによって連鎖的に引き起こされる酸化反応を抑制し、細胞を構成する分子の酸化修飾・変性を防いでいる。上述の試験から当該酵素が基質とする事が明らかになった分子の還元にも、GSHが関与している可能性が動物細胞においては報告されている。これは、汎用的なGSHシステムを持たない細菌種では、各種の酸化ストレスの種類ごとに特化した抗酸化の仕組みが存在しており、当該酵素もその仕組みの一つである事を示唆している。

【結論】

このように、*in vivo, in vitro, in silico*の実験結果間で矛盾の無い、基質探索の半ばに見出した仮説を一貫して支持するデータが得られ、目的であった当該酵素の生理的な機能説明が概ね達成された。その役割は当初想定していた過酸化脂質の還元やリグニン分解を目的とするものではなく、特定の酸化ダメージから細胞を保護するというものであった。一方で、当該の新奇酵素の電子受容体は明らかになったが、電子供与体は不明なままであり、局在も細胞外であるため、リグニンなどのフェノール類が関与している可能性もある。反応機序等の詳細は公表可能となった後日に改めて追記予定だが、草本類の細胞が破砕された際に多量に放出される過酸化リノール酸および過酸化リノレン酸などの、外部からもたらされるROSからの細胞の保護に深く関わっており、反芻動物のルーメンおよび口腔内における細菌の生存に寄与している事が示唆された。

また、当該酵素遺伝子のオーソログは多くの細菌種に広く分布しているものの、これまでに機能不明であった。本研究により、当該の新奇酵素はGSHとならび、生物の好気的な環境への進出・適応に大きく貢献した重要な抗酸化因子である事が示唆された。

本研究結果は後日に投稿論文にて公表予定。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 新奇酸化還元酵素の用途特許出願	発明者 今井岳志、三原久明	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特開2019-176809	出願年 2018年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	三原 久明 (Mihara Hisaaki) (30324693)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------