

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 16 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05357

研究課題名(和文)放線菌Rhodococcus sp. LC-2株のルミクロム分解機構の解明

研究課題名(英文)Lumichrome biodegradation mechanism in Rhodococcus sp. LC-2.

研究代表者

土肥 裕希(Doi, Yuki)

筑波大学・生命環境系・助教

研究者番号：20705412

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では放線菌Rhodococcus sp. LC-2株のルミクロム分解機構を解明した。ルミクロムはビタミンB2として知られているリボフラビンから化学または酵素反応によって産生されるが、その環境動態は明らかにされていなかった。

トランスクリプトーム解析によって、LC-2株が有する線状プラスミド上の特定の遺伝子群の発現がルミクロム存在下で顕著に増加することを見出した。この遺伝子群の遺伝子破壊株、コードされている酵素タンパク質の機能、およびLC-2株のルミクロム培養物から検出された分解中間体の構造の解析などから、ルミクロムは水酸化、加水分解、脱アミノ、脱炭酸を経て分解されることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、未解明であったルミクロムの環境動態に着目し、土壌細菌によるルミクロムの微生物分解機構の一部を解明した。さらに、その分解酵素の系統および機能解析から、微生物がルミクロム分解のための機能を進化・獲得していたことを見出した。

本研究の成果は、微生物の新たな代謝機能を見出しただけでなく、環境中に漏出したビタミンの環境動態に新たな知見を提供したことから、微生物学だけでなく、環境学・生態学の面でも高い学術的意義があると考えられる。また、リボフラビンは植物バイオマスに豊富に含まれることから、それを分解代謝する土壌細菌の動態は畑作に最適な菌叢の構築と維持においても重要な知見となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to clarify the mechanism degrading lumichrome in Actinobacterium Rhodococcus sp. LC-2. Lumichrome is generated from riboflavin, which is well-known as vitamin B2, via chemical and/or enzymatic reactions, and its environmental dynamics remained unclear.

Using transcriptome analysis, we found a gene cluster whose expression is specifically controlled by lumichrome, which was encoded on a linear plasmid. The disruptants of genes included in the lumichrome-inducible gene cluster were not able to degrade lumichrome, indicating that enzymes encoded by the gene cluster involved in the lumichrome degradation. Analysis of those enzyme functions and of metabolites produced from LC-2 degrading lumichrome demonstrated that lumichrome degradation is proceeded through hydroxylation, twice hydrolations, deamination, and decarboxylation. These results partially identified detail mechanisms on the bacterial lumichrome degradation pathway.

研究分野：応用微生物学

キーワード：ルミクロム リボフラビン ビタミン 放線菌 複素環式化合物 生分解

## 1. 研究開始当初の背景

リボフラビンはビタミン B<sub>2</sub> として知られており、その活性型であるフラビンモノヌクレオチド(FMN)やフラビンアデニンジヌクレオチド(FAD)は、生物が生体機能を維持するために必要な補因子である。リボフラビンは主に植物や微生物によって生合成されることから、季節ごとの植物が生い茂る土壌や人工的な刈取りを繰り返す畑作土壌では、植物体などから土壌環境中にリボフラビンが過剰に供給(放出)される。

リボフラビンは、ルミクロム(lumichrome)のピラジン環に五炭糖が結合している(図1)。この結合は光や酸素酸化によって切断されるが、一部の細菌は酵素を用いてルミクロムから五炭糖をリビトールとして切断・資化する。このことは、土壌環境中のリボフラビンはルミクロムと五炭糖に分解された後、五炭糖が微生物によって資化されていることを示している。一方、土壌環境中にルミクロムが蓄積した例はないことから、ルミクロムも何らかの作用によって分解されているはずであるが、その環境動態は未解明であった。

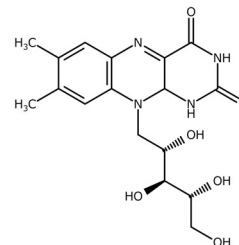


図1. リボフラビンの化学構造

申請者は畑作土壌などからルミクロム分解菌の単離を試み、ルミクロムを無機物まで分解することができる放線菌 *Rhodococcus* sp. LC-2 株等の複数の細菌を得た。これらの結果は、リボフラビンに由来するルミクロムが微生物によって分解されることを強く示唆している。微生物のルミクロム分解機構を解明することは、自然環境中に放出されたリボフラビンの循環を明らかにし、それは生態系の物質循環の全容を理解するために重要である。

## 2. 研究の目的

本研究では、申請者によって土壌から単離されたルミクロム資化性の放線菌 *Rhodococcus* sp. LC-2 株のルミクロム分解機構の解明を目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) ルミクロム分解にかかわる遺伝子の同定

*Rhodococcus* sp. LC-2 株(以下、LC-2 株)のルミクロム分解にかかる遺伝子は、下記の手法を用いて探索および同定した。

#### ① ランダム変異株作製法

*Rhodococcus* 属用に開発されたトランスポゾン(Tn)変異株作製用プラスミド(pTNR-CA、産業総合研究所)をエレクトロポレーション法によってLC-2株に導入し、そのランダム変異株(Tn変異株)を作製した。得られたTn変異株をルミクロムと若干の栄養源(0.1% yeast extract)を含むM9平板培地にレプリカし、ルミクロムが示す黄色の呈色を消失させない、すなわちルミクロムを分解できないTn変異株を選択した。これらのTn変異株から全ゲノムDNAを抽出し、適当な制限酵素で消化した後にセルフライゲーションを行った。これを鋳型に用いてインバースPCRを行い、その増幅産物をシーケンス解析に供することでTn挿入部位(=変異遺伝子)を同定した。

#### ② トランスクリプトーム解析

ルミクロムを含まないM9液体培地とルミクロムを含むM9液体培地でそれぞれLC-2株を培養し、各菌体から抽出したRNAをRNAシーケンス解析に供した。ルミクロム存在下で発現量が増加した遺伝子を、ルミクロム分解にかかわる遺伝子候補として列挙した。続いて、相同組換え法を用いて候補遺伝子の遺伝子破壊株を作製し、そのルミクロム分解能や生成される分解中間体を検証した。

### (2) ルミクロム分解経路の同定

LC-2株のルミクロム分解経路は、以下の2つの方法を組み合わせて実施することで同定した。

#### ① ルミクロム分解中間体の検出

ルミクロム存在下で培養されたLC-2株の培養液や細胞抽出液を経時的に高速液体クロマトグラフ(HPLC)や液体クロマトグラフ質量分析計(LC-MS)に供することで、ルミクロムの分解中間体を検出し、その質量を同定した。

#### ② ルミクロム分解経路の同定

LC-2株の無細胞抽出液(CFE)とルミクロムや他の基質と反応させて得られた反応生成物をLC-MS/MSに供することで、得られた質量とプロダクトイオンスペクトルのパターンを(2)の①で検出された化合物と比較・照合した。また、(1)で見出されたルミクロム分解を触媒すると考

えられる酵素の組換えタンパク質を調製し、それらをルミクロムや分解中間体の候補化合物と反応させ、得られた反応生成物を同様に照合した。発現宿主に大腸菌を用いたタンパク質発現には PET システム(メルク)を、LC-2 株を用いた場合には pNit および pTip ベクターシリーズ(北海道システムサイエンス)を使用した。また、質量とプロダクトイオンスペクトルから構造が予測できない化合物については、H-NMR 解析によってその化学構造を決定した。

#### 4. 研究成果

##### (1) ルミクロム分解にかかわる遺伝子の同定

LC-2 株の Tn 変異株を 6,500 株作製し、ルミクロム分解能が低下あるいは消失した Tn 変異株を 59 株獲得した。これらの変異部位を同定した結果、GM6098-6102 遺伝子間に顕著に変異が重複していた(図 2)。しかしながら、これらの遺伝子にコードされている酵素タンパク質の機能からは、ルミクロム分解への具体的な関与は見出されず、Tn 変異株に変異遺伝子を相補するプラスミドを導入してもルミクロム分解の消失は回復しなかった。また、培地に当該酵素によって供給される基質(D-リボースなど)を添加しても、これら Tn 変異株のルミクロム分解能は相補されなかった。このように、Tn を用いたランダム変異株作製法では、LC-2 株のルミクロム分解にかかる遺伝子とそれらの機能を明らかにすることはできなかった。

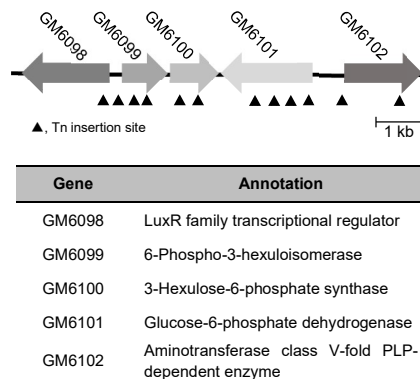


図 2. Tn 挿入部位が最も重複した遺伝子群.

トランスクリプトーム解析では、ルミクロムの添加によって発現量が大幅に増加する遺伝子群(GM6114-6140)が見出された(図 3)。LC-2 株のゲノム DNA はひとつの染色体と 2 つのプラスミド(線状および環状)から構成されており、上記の遺伝子群は線状プラスミド上にコードされていた。この遺伝子クラスターは、大きく分けて 6 つのグループ(GM6114-6118、GM6120-6124、GM6126-6129、GM6130-6131、GM6132-6133、GM6134-6140)から形成されており、酵素タンパク質をコードするグループの遺伝子(詳細は後述)を破壊すると LC-2 株のルミクロム分解能は消失した。このことから、この遺伝子クラスターが LC-2 株のルミクロム分解に関与していることが明らかになった。

##### Strain LC-2, GM6114 to GM6140 genes (on linear plasmid)

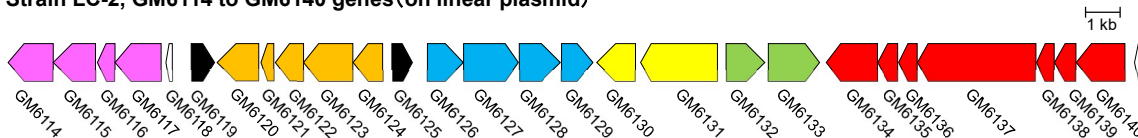


図 3. ルミクロム添加によって遺伝子発現量が大幅に増加した遺伝子群とその構造.

##### (2) ルミクロム分解経路の同定

ルミクロム存在下で培養された LC-2 株の培養物からは、HPLC 上において 5 つの推定分解中間体が検出された。このうち、最も早期に検出された化合物(X0)の質量は、ルミクロムの質量から 16 増加した 258 であった。X0 の生成は推定 cytochrome P450 oxidoreductase をコードする GM6131 遺伝子の破壊で消失し、その遺伝子破壊株のルミクロム分解能は顕著に低下した。このことから、LC-2 株のルミクロム分解の初発反応は、GM6131 タンパク質による水酸化反応であることが示唆された。大腸菌を用いて調製した GM6131 の組換えタンパク質(rGM6131)は cytochrome P450 に特徴的な吸収波長を示し、NADH 依存的にルミクロムから X0 と同様の化合物を生成した。NMR 解析によって、X0 はルミクロムの 8 位のメチル基(12 番目の炭素原子)が水酸化された 12-hydroxylumichrome(12-HLC)と同定された。アミノ酸配列を基にした系統解析の結果、GM6131 タンパク質は同酵素ファミリーの機能既知のグループには属さなかった。これらから、ルミクロム分解の初発反応は 8 位のメチル基の水酸化であり、この反応を触媒するこの新規な GM6131 タンパク質を cytochrome P450-dependent lumichrome-8-methylhydroxylase と同定した(図 4)。

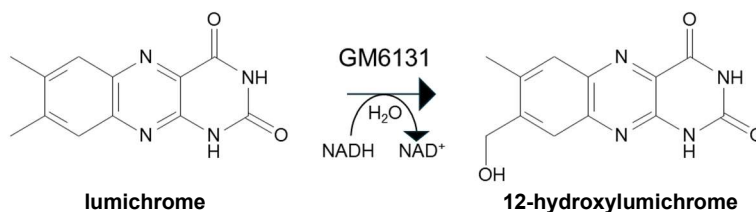


図 4. LC-2 株によるルミクロム分解の初発反応機構.

培養物から検出された残り 4 つの推定分解中間体の質量は、260 (P1)、217 (P2)、276 (X1)、233 (X2) であった。P1 と P2 は GM6131 遺伝子破壊株のルミクロム培養物、および、その CFE とルミクロムとの反応によっても検出された。一方で、X1 と X2 はいずれも検出されなかったことから、P1 と P2 はルミクロム由来の化合物であり、X1 と X2 は 12-HLC 由来の化合物であることが示唆された。P1 および X1 の質量はルミクロムおよび 12-HLC からそれぞれ 18 増加していたことから、それらはルミクロムおよび 12-HLC が加水分解された化合物であることが示唆された。GM6140 遺伝子破壊株はルミクロム分解能を失い、P1、P2 および X1、X2 のいずれも生成しなかった。GM6140 遺伝子にコードされている酵素タンパク質の組換えタンパク質 (rGM6140) は、ルミクロムおよび 12-HLC からそれぞれ P1 および X1 と同様の化合物を生成し、P1 のプロダクトイオンスペクトルのパターンはルミクロムのピリミジン環部位が加水分解されて環開裂した 2-[(aminocarbonyl)amino]-3-carboxy-6,7-dimethylquinoxaline のそれと一致した。rGM6140 の基質特異性を検証した結果、本酵素は 12-HLC に対して最も高い比活性を示し、ルミクロムおよびアロキサジンに対する比活性は 12-HLC に対するその 50% および 10% であった。また、ルマジンに対しては活性を示さなかった。これらの結果から、rGM6140 はルミクロムや 12-HLC のピリミジン環を特異的に加水分解することが明らかになった。アミノ酸配列を基にした系統解析では、GM6140 タンパク質は機能既知のグループには属さなかったことから、本酵素も新規酵素であることが示された。これらの結果から、ルミクロム分解の次反応は加水分解反応によるピリミジン環部位の環開裂であり、この反応を触媒する新規な GM6140 タンパク質を 12-hydroxylumichrome hydrolase と同定した (図 5)。

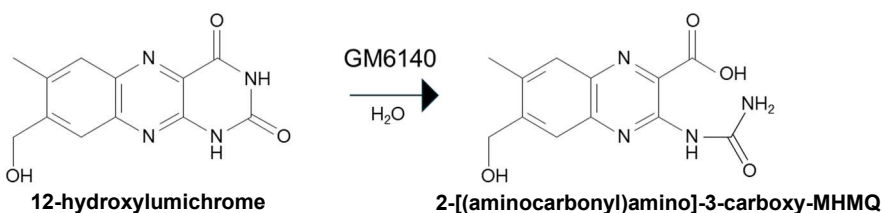


図 5. LC-2 株による 8-HLC の分解機構。

GM6140 遺伝子の下流に位置する GM6139 遺伝子破壊株のルミクロム培養物からは P1 および X1 は検出されたが、P2 および X2 は検出されなかった。GM6139 遺伝子にコードされている酵素タンパク質は cysteine hydrolase ファミリーに属し、その組換えタンパク質は P1 および X1 からそれぞれ P2 および X2 と同様の化合物を産生した。P2 のプロダクトイオンスペクトルのパターンは P1 のカルバモイル基が脱離された化合物である 2-amino-3-carboxy-6,7-dimethylquinoxaline のそれと一致したことから、ルミクロムや 12-HLC は GM6140 タンパク質によってそのピリミジン環部位が加水分解され、続いて GM6139 タンパク質による加水分解によってカルバモイル基が脱離されることが示された (図 6)。GM6131 遺伝子の破壊が LC-2 株のルミクロム分解能を消失させた結果と GM6140 タンパク質が 12-HLC に最も高い比活性を示した結果を合わせると、X0 (12-HLC)、X1 (2-[(aminocarbonyl)amino]-3-carboxy-MHMQ)、X2 (2-amino-3-carboxy-MHMQ) と進む反応が主要なルミクロム分解経路であることが示された。また、アミノ酸配列を基にした系統解析では、GM6139 タンパク質も機能既知のグループには属さなかったことから、新規な酵素であることが強く示唆された。ただし、GM6131 や GM6140 遺伝子破壊株とは異なり、GM6138 遺伝子破壊株のルミクロム分解能は完全に消失しなかったことから、同反応を触媒する酵素が他にも存在することが示唆された。

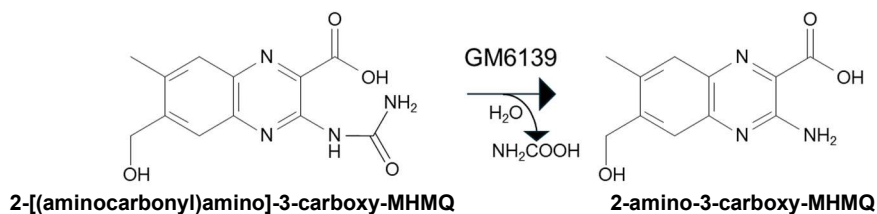


図 6. LC-2 株による 2-[(aminocarbonyl)amino]-3-carboxy-MHMQ の分解機構。

GM6140、GM6139 遺伝子の下流の遺伝子には、xanthine oxidoreductase (GM6138-6137)、sulfopyruvate decarboxylase (GM6136-6135)、adenine deaminase (GM6134) と相同性を示すタンパク質がそれぞれコードされていた。よって、2-carboxy-3-amino-MHMQ (X2) は GM6136-35 タンパク質によって脱炭酸あるいは GM6134 タンパク質によって脱アミノされることが示唆された。LC-2 株を用いて調製した組換え GM6136-6135 タンパク質 (rGM6136-35) または GM6134 タンパク質 (rGM6134) を 2-amino-3-carboxy-MHMQ と反応させた結果、rGM6134 タンパク質はそのアミノ基を脱アミノ化して 2-oxo-3-carboxy-MHMQ を生成した。一方、rGM6136-35 タンパク質は 2-amino-3-carboxy-MHMQ とは反応せず、チアミンピロリン酸 (TPP) 存在下で 2-oxo-3-carboxy-MHMQ の

カルボキシ基を脱炭酸して 2-oxo-MHMQ を生成した。このことから、2-amino-3-carboxy-MHMQ は GM6134 タンパク質による脱アミノ化反応を受けた後に GM6136-6135 タンパク質によって脱炭酸されることが示された (図 7)。また、GM6134 遺伝子破壊株ではルミクロム分解能が顕著に低下した一方で、GM6136-6135 遺伝子破壊株のルミクロム分解能は野生株とほぼ同等であった。これは、同反応を行う酵素が別途に存在する、あるいは化学的な脱炭酸反応が起きている可能性が考えられた。

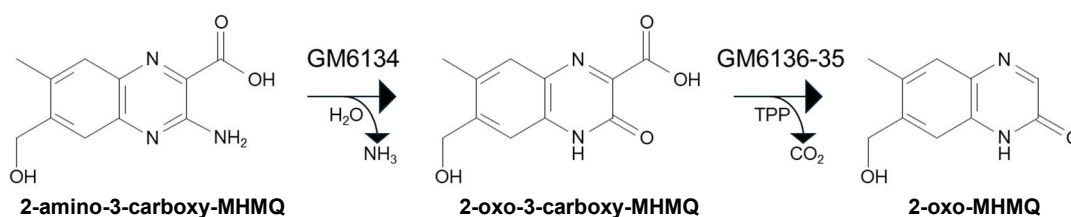


図 7. LC-2 株による 2-amino-3-carboxy-MHMQ の分解機構。

GM6134-GM6140 遺伝子群において、まだ未登場であった xanthine oxidoreductase と相同性を示すタンパク質をコードした GM6138-6137 遺伝子を破壊すると、そのルミクロム分解能が低下した。よって、3-oxo-MHMQ は、GM6138-6137 タンパク質によって 2,3-dioxo-MHMQ に酸化されることが示唆された (図 8)。また、dioxygenase 様酵素タンパク質をコードした GM6117-6115 遺伝子を破壊すると、同様にルミクロム分解能が消失したことから、2,3-dioxo-MHMQ は、次いで dioxygenase 様酵素タンパク質によって酸化的に環開裂されると考えられた (図 8)。環開裂後の化合物は、当該遺伝子クラスターにコードされている残りの酵素タンパク質によってさらに分解されていくと考えられる。

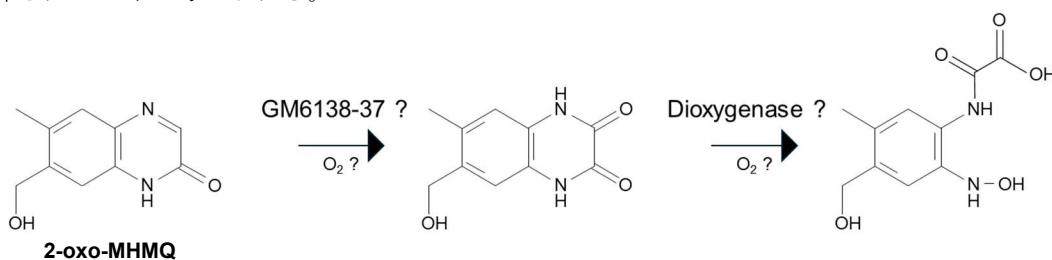


図 8. LC-2 株による 2-oxo-MHMQ の分解反応の予想。

本研究で同定された *Rhodococcus* sp. LC-2 株のルミクロム分解経路を 図 9 に示す。このように、本研究ではルミクロム分解遺伝子クラスターにコードされていたルミクロム分解酵素の機能を明らかにし、ルミクロム分解経路の一部を同定することに成功した。系統解析においてこれらのルミクロム分解酵素が機能既知の酵素ファミリーとは異なるグループを形成したことは、これらの酵素、しいては分解遺伝子クラスターがルミクロム分解のために進化・獲得されたことを示している。本研究の成果は、微生物の代謝の多様性に関する知見を拡充させ、リボフラビンから生じるルミクロムの環境動態に微生物分解という新たな経路を提示した。

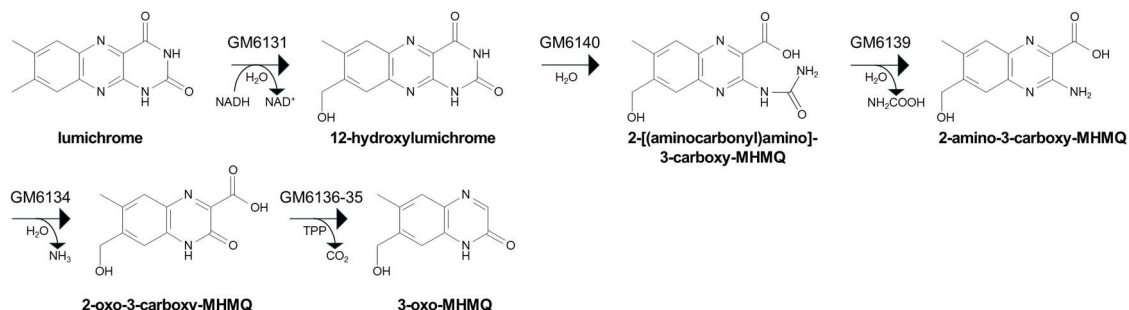


図 9. 本研究で同定された *Rhodococcus* sp. LC-2 株のルミクロム分解経路。

<略語>

12-HLC, 12-hydroxylumichrome  
 MHMQ, 6-methyl-7-hydroxymethylquinoxaline

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 塩田 大地, 土肥 裕希, 高谷 直樹
2. 発表標題 Rhodococcus sp. LC-2 株のルミクロム分解機構の解明
3. 学会等名 環境バイオテクノロジー学会 2023年度大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 土肥 裕希, 塩田 大地, 高谷 直樹
2. 発表標題 Rhodococcus sp. LC-2株のルミクロム分解を担う新規Cytochrome P450水酸化酵素の解析
3. 学会等名 日本農芸化学会関東支部 2023年度大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 塩田 大地, 土肥 裕希, 高谷 直樹
2. 発表標題 Rhodococcus sp. LC-2 株のルミクロム分解機構の解明
3. 学会等名 日本微生物生態学会 第36回大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 塩田 大地, 土肥 裕希, 高谷 直樹
2. 発表標題 Rhodococcus sp. LC-2 株のルミクロム分解機構の解明
3. 学会等名 日本農芸化学会 2024年度大会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 鈴木 麻菜美, 前田 典歩, 土肥 裕希, 高谷 直樹
2. 発表標題 土壌微生物生態系におけるリボフラビン動態
3. 学会等名 日本微生物生態学会 第34回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 土肥 裕希, 鈴木 麻菜美, 前田 典歩, 尾崎 紗代子, 高谷 直樹
2. 発表標題 微生物生態系における細菌のリボフラビンおよびルミクロム分解
3. 学会等名 環境バイオテクノロジー学会 2021年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 鈴木 麻菜美, 尾崎 紗代子, 土肥 裕希, 高谷 直樹
2. 発表標題 Rhodococcus sp. LC-2株のルミクロム分解機構の解明
3. 学会等名 日本農芸化学会関東支部 2021年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 鈴木 麻菜美, 前田 典歩, 土肥 裕希, 高谷 直樹
2. 発表標題 微生物生態系におけるルミクロム分解機構の解明
3. 学会等名 日本農芸化学会 2022年度大会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------