

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 23 日現在

機関番号：13102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26850046

研究課題名(和文) デッドエンド化合物の生成を回避する細菌の代謝機構

研究課題名(英文) Bacterial catabolic system for the prevention of dead-end product formation

研究代表者

上村 直史 (KAMIMURA, Naofumi)

長岡技術科学大学・工学研究科・助教

研究者番号：50646528

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：リグニン分解のモデル細菌である *Sphingobium* sp. SYK-6株において、 β -アリールエーテル化合物は還元エーテル開裂を経てバニロイル酢酸に変換された後、酵素非依存的な脱炭酸によりアセトバニロンを生成する。本研究では、アセトバニロンが多成分カルボキシラーゼのAcvABCDEFによりバニロイル酢酸に変換された後、coenzyme Aエステルを経由してバニリン酸を生成して代謝されることを見出し、バクテリアの β -アリールエーテル代謝の全体像を初めて明らかにした。これら代謝経路に関する知見は、リグニンから工業原料化合物を生産する微生物システムの開発に大きく貢献する。

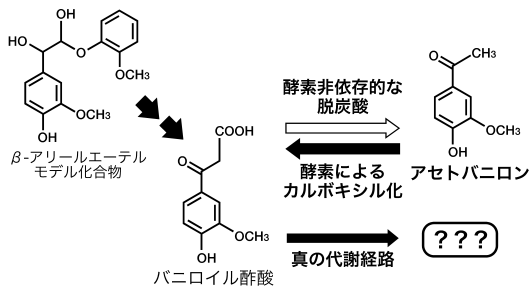
研究成果の概要(英文)：In *Sphingobium* sp. strain SYK-6, a model bacterium for the lignin catabolism, the β -arylether dimer is converted to vanilloyl acetic acid via the reductive ether cleavage. The resultant vanilloyl acetic acid is then subjected a non-enzymatic decarboxylation to generate acetovanillone. Here, we determined the catabolic pathway of acetovanillone and also identified the genes responsible for the first step of acetovanillone catabolism. In SYK-6, acetovanillone is initially carboxylated to produce vanilloyl acetic acid by a multiple component enzyme, AcdABCDEF, and then further converted to vanillate via the formation of coenzyme A ester. These findings enable us to understand the overview of β -arylether catabolic pathway for the first time, and are also valuable for the biological lignin valorization.

研究分野：応用微生物学

キーワード： β -アリールエーテル リグニン *Sphingobium*属細菌 カルボキシラーゼ アセトフェノン バニリン酸

1. 研究開始当初の背景

リグニン自然界で最も豊富に存在する芳香族高分子化合物であり、その微生物分解は地球における炭素循環に大きく関与する。リグニン中の芳香族単位を連結する多様な結合様式のうち、β-アリアルエーテル結合はリグニンの約 50%を占める。本結合を有するリグニン由来の芳香族二量体は、リグニン代謝のモデル細菌である *Sphingobium* sp. SYK-6 株においてエーテル開裂等を受けてバニロイル酢酸に変換された後、酵素非依存的な脱炭酸によりアセトバニロンを生産する。



これまでに、SYK-6 株においてアセトバニロンは側鎖開裂を受けてバニリンに至ると考えられてきた。しかし、数年にわたる β-アリアルエーテル代謝研究を通じて得られたデータから、アセトバニロンがデッドエンドでありカルボキシ化を受けてバニロイル酢酸に戻ってから代謝されるという着想を得た。

SYK-6 株のトランスクリプトーム解析から、アセトバニロン存在下での培養時に推定のカルボキシラーゼ遺伝子を含む *acvABCDEF* クラスターの転写が誘導されることが示されている。AcvA と AcvB はフェノールリン酸化酵素の及びサブユニットと、AcvC、AcvD、AcvE、AcvF はそれぞれピオチンカルボキシリキアータンパク質、ピオチンカルボキシラーゼ、カルボキシリキ基転移サブユニット、HAD superfamily 脱リン酸化酵素と相同性を示したことから、アセトバニロンは AcvAB によるリン酸化を受けた後、AcvF による脱リン酸化を経て、AcvCDE によるピオチン由来カルボキシリキ基の付加を受けてバニロイル酢酸に変換されると予想された。

2. 研究の目的

リグニン中の主要単位間結合である β-アリアルエーテル結合のバクテリア代謝の解明を目指し、その代謝過程で生じるデッドエンド化合物・アセトバニロンの変換機構を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 代謝経路の決定と酵素遺伝子の同定

SYK-6 株の休止細胞および細胞抽出液を調製し、アセトバニロン、β-アリアルエー

テル化合物の GGE、バニロイル酢酸と反応させた。各化合物の分解で生じた中間体を液体クロマトグラフィー・マススペクトロメトリー (LC-MS) 分析により同定した。

代謝経路情報からそこに関わる酵素を推定し、SYK-6 株のゲノムにおける候補遺伝子を選抜した。アセトバニロンの分解が誘導的であることから、各種リグニン系基質で培養した菌体を用いたトランスクリプトーム解析 (DNA マイクロアレイ) を行い、候補遺伝子を絞込んだ。各候補遺伝子の破壊株を作製し、アセトバニロンおよび GGE 代謝への関与を調べた。

(2) カルボキシ化酵素成分の決定

アセトバニロンのカルボキシ化を担うと推定されたリン酸化酵素成分 (2 遺伝子) とカルボキシラーゼ成分 (4 遺伝子) を広宿主域発現ベクターに連結し、アセトバニロン変換能を欠損した株に導入した。得られた形質転換体を用いてアセトバニロン変換実験を行い、これら 6 遺伝子でアセトバニロンのカルボキシ化能が付与されるかどうか評価した。

GE、バニロイル酢酸と反応させた。各化合物の分解で生じた中間体を液体クロマトグラフィー・マススペクトロメトリー (LC-MS) 分析により同定した。

(3) 細胞毒性の評価

SYK-6 株の休止細胞を調製し、本株がエネルギー源として利用可能なリグニン由来芳香族化合物 (フェルラ酸、バニリン酸、プロトカテク酸等) 糖・アミノ酸混合液、LB 培地とアセトバニロンの存在下、非存在下で反応させた。テトラゾリウム塩を利用して呼吸活性を測定し、アセトバニロンによる細胞毒性の評価を行った。

4. 研究成果

アセトバニロンがバニロイル酢酸に変換された後の代謝経路を明らかにすることを目的とし、アセトバニロン、GGE、バニロイル酢酸変換産物の同定を行った。その結果、バニロイル酢酸はこれまで代謝産物として予想されていたバニリンを経由せずにバニリン酸へと変換されることが明らかとなった。DNA マイクロアレイ解析からアセトバニロンでの培養時にフェルラ酸 coenzyme A (CoA) トランスフェラーゼをコードする *ferA* とフェルラ酸 CoA エステルを変換する酵素をコードする *ferB* の転写が誘導されることが示された。SYK-6 株において *ferA* と *ferB* の転写は MarR 型制御タンパク質の FerC により負に制御されており、フェルラ酸の CoA エステル存在下で抑制が解除されることが明らかとなっている。また、FerC はフェルラ酸の CoA エステルだけでなく多様なヒドロキシケイ皮酸 CoA エステルをエフェクターとして認識する。以上の知見と、フェルラ酸とバニロイル酢酸の化学構造が類似していることから、バニロイル酢酸が CoA エステルを

經由して代謝されることが考えられた。そこで、FerA の精製酵素とバニロイル酢酸を反応させた結果、極めて変換活性は弱いもののバニロイル酢酸の CoA エステルが生成することが示された。一方、FerB 精製酵素は本 CoA エステルの変換能を示さなかった。以上の結果から、アセトバニロンはバニロイル酢酸に変換された後、CoA の付加によりバニロイル酢酸 CoA エステルを經由し、バニリン酸へと変換されることが示唆された。

SYK-6 株におけるアセトバニロンからバニリン酸への代謝過程に関わる遺伝子を明らかにするため、アセトバニロンのカルボキシル化に関わると推定された *acvA*, *acvB*, *acvC*, *acvD*, *acvE*, *acvF* について遺伝子破壊株を作製し、*ferA* 破壊株、*ferB* 破壊株とともに代謝への関与を調べた。その結果、*acvA*, *acvB*, *acvC*, *acvD*, *acvE*, *acvF* の各破壊株はいずれもアセトバニロンでの生育能、変換能をほぼ欠損したことから、これら遺伝子がアセトバニロンのカルボキシル化に不可欠であることが明らかとなった。一方、*ferA* 破壊株、*ferB* 破壊株ではアセトバニロン及びバニロイル酢酸の変換能の低下並びに中間体の蓄積が見られなかったことから、SYK-6 株において両遺伝子はアセトバニロン代謝に関わらないことが示された。SYK-6 株には *ferA* と 40% のアミノ酸配列同一性を示す推定の acyl-CoA synthetase が 2 つ、*ferB* では 24-29% の同一性を示す推定の enoyl-CoA hydratase が 4 つ存在する。今後、これら遺伝子についてバニロイル酢酸からバニリン酸までの変換への関与を調べることにより、アセトバニロン代謝の全体像が明確になると期待される。

acvABCDEF クラスターの直上流には AraC 型制御因子と相同性を示す *acvR* が存在しており、本遺伝子産物が *acvABCDEF* の転写を制御していることが予想された。そこで、*acvR* 破壊株を作製し、アセトバニロンでの生育能、変換能を野生株と比較した。その結果、*acvR* 破壊株はアセトバニロン生育能・変換能の両方を欠損していたことから、本遺伝子が *acvABCDEF* クラスターの転写を正に制御することが示唆された。トランスクリプトーム解析から、SYK-6 株ではアセトバニロンでの培養時において *acvABCDEF* クラスターや *ferA*, *ferB* に加えて鞭毛構成タンパク質、クオラムセンシング、酸化ストレス応答など、酵素遺伝子以外にも多数の遺伝子の転写が誘導されることが示されている。AcvR による制御遺伝子の範囲について興味もたれる。

アセトバニロンのカルボキシル化反応に必要な酵素成分を明らかにするために、AV 変換能を欠損している *acvR* 破壊株に *acvABCDEF* クラスターをプラスミドで導入・発現させ、アセトバニロン変換能を評価した。その結果、アセトバニロンの変換とバニリン酸の生産が観察された。さらに本遺伝子群をアセトバニロン変換能および *acvABCDEF* 相同遺伝子を持たない

Sphingobium japonicum UT26S 株にて発現させた。その結果、本形質転換体においてアセトバニロンのバニロイル酢酸への変換活性が観察され、*acvABCDEF* 遺伝子セットがアセトバニロンカルボキシル化能を有することが明らかとなった。

アセトバニロンと同様の化学的特徴を有する 4-ヒドロキシアセトフェノン等の化合物は細胞毒性を示すことが知られている。また、SYK-6 株はフェルラ酸、バニリン、バニリン酸、シリングアルデヒド、シリング酸など多様なリグニン由来芳香族酸・芳香族アルデヒドにおいて良好に生育するが、アセトバニロンでは極めて微弱な生育しか示さず、3 mM を超えた濃度では生育を示さない。これが、アセトバニロンの毒性による影響であるかどうか調査した。SYK-6 株の休止細胞をアセトバニロン存在下および非存在下で各種リグニン由来芳香族化合物、糖・アミノ酸混合培地、栄養培地の LB とインキュベートし、呼吸活性を経時的に評価した。その結果、いずれの培地においても 0.5 mM 以上のアセトバニロンの存在下で呼吸活性が低下し、SYK-6 株においてアセトバニロンが細胞毒性化合物として作用することが示された。これより、SYK-6 株におけるアセトバニロンの変換は、 β -アリールエーテル代謝時において不安定な代謝中間体から非自律的に生じるアセトバニロンの炭素源・エネルギー源化に加えて、毒性デッドエンド化合物の無害化という意義も有すると推察された。

本研究により、SYK-6 株の β -アリールエーテル代謝において、アセトバニロンのカルボキシル化が *acvABCDEF* により担われており、本遺伝子群の転写が AraC 型転写制御因子の AcvR により正に制御され、アセトバニロンにより誘導されることが明らかとなった。さらにバニロイル酢酸が CoA の付加を経てバニリン酸に至ることを見出した。 β -アリールエーテル代謝はクエン酸回路に至るまで 20 近い酵素反応に関わる長大な経路である。本経路においてブラックボックスであったバニロイル酢酸およびアセトバニロンの代謝経路がバニリン酸に連結することが明らかとなり、 β -アリールエーテル代謝経路の全体像を把握することに成功した。バニリン酸は脱メチルによりプロトカテク酸へと変換された後、高機能性ポリマー原料となる 2-ピロン-4,6-ジカルボン酸や *cis,cis*-ムコン酸等に変換できる。本研究で得られた知見は β -アリールエーテルから上述の工業原料を生成する微生物変換システムの開発に大きく貢献するものである。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 0 件)

〔学会発表〕(計 9件)

Yudai Higuchi, Toru Shobuda, **Naofumi Kamimura**, Hirofumi Hara, Daisuke Kasai, Yoshihiro Katayama, Masao Fukuda, Eiji Masai.
CHARACTERIZATION OF THE ACETOVANILLONE DEGRADATION PATHWAY IN *SPHINGOBIUM* SP. STRAIN SYK-6.

International GIGAKU conference 2014
2014年6月21日、Nagaoka

樋口雄大、菖蒲田透、**上村直史**、原啓文、笠井大輔、片山義博、福田雅夫、政井英司
Sphingobium sp. SYK-6株におけるアセトバニロン代謝経路の同定
第59回リグニン討論会
2014年9月12日、福井

樋口雄大、菖蒲田透、**上村直史**、原啓文、笠井大輔、片山義博、福田雅夫、政井英司
Sphingobium sp. SYK-6株におけるアセトバニロン代謝系
2014年度環境微生物系合同大会
2014年10月23日、浜松

樋口雄大、竹浪寛樹、青木翔吾、**上村直史**、菱山正二郎、原啓文、笠井大輔、片山義博、福田雅夫、政井英司
Sphingobium sp. SYK-6株におけるβ-アリールエーテル代謝中間体の代謝経路及び酵素遺伝子の解明
第60回リグニン討論会
2015年11月5日、筑波

Yudai Higuchi, Hiroki Takenami, Toru Shobuda, **Naofumi Kamimura**, Shojiro Hishiyama, Daisuke Kasai, Yoshihiro Katayama, Masao Fukuda, Eiji Masai.
INVESTIGATION OF THE CATABOLIC PATHWAY FOR ACETOVANILLONE IN *SPHINGOBIUM* SP. STRAIN SYK-6
Lignobiotech IV symposium
2016年6月21日、Madrid

樋口雄大、竹浪寛樹、菖蒲田透、**上村直史**、菱山正二郎、笠井大輔、片山義博、福田雅夫、政井英司
Sphingobium sp. SYK-6株におけるβ-アリールエーテル下流代謝系の解明
第57回新潟生化学懇話会
2016年6月25日、新潟

竹浪寛樹、樋口雄大、**上村直史**、笠井大輔、片山義博、福田雅夫、政井英司
Sphingobium sp. SYK-6株におけるacetovanillone変換酵素遺伝子群の機能と転写制御
2016年10月28日、京都

Yudai Higuchi, Hiroki Takenami, Toru Shobuda,

Naofumi Kamimura, Shojiro Hishiyama, Daisuke Kasai, Yoshihiro Katayama, Masao Fukuda, Eiji Masai.

Characterization of the catabolic pathway and genes for acetovanillone in *Sphingobium* sp. strain SYK-6

STI-GIGAKU 2017 international conference
2017年1月5日、Nagaoka

樋口雄大、竹浪寛樹、青木翔吾、**上村直史**、菱山正二郎、笠井大輔、片山義博、福田雅夫、政井英司

Sphingobium sp. SYK-6株におけるβ-aryl ether代謝中間体・β-hydroxypropiovanillone変換酵素遺伝子の機能解析

2017年度 日本農芸化学会
2017年3月18日、京都

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織
(1)研究代表者
上村 直史 (KAMIMURA Naofumi)
長岡技術科学大学・工学研究科・助教

研究者番号：50646528

(2)研究分担者
なし

(3)連携研究者
なし

(4)研究協力者

樋口 雄大 (HIGUCHI Yudai)

長岡技術科学大学・工学研究科・生物統合工
学専攻 博士1年

竹浪 寛樹 (TAKENAMI Hiroki)

長岡技術科学大学・工学研究科・生物機能工
学専攻 修士1年