

博士論文

*Sphingobium* 属細菌におけるフェニルクマラン型  
リグニン由来化合物代謝系の解明

平成 27 年 (2015 年) 12 月

長岡技術科学大学大学院

工学研究科

生物統合工学専攻

高 橋 健 司

## 目次

### 序章

1. 研究背景	1
2. 木質成分	1
3. リグニンの生合成	3
4. 高分子リグニンの生分解	5
5. <i>Sphingobium</i> sp. SYK-6 株におけるリグニン由来化合物の分解	6
6. バイオ燃料とリグニン改変植物	10
7. リグニンの工業利用	12
8. 微生物における phenylcoumaran 型化合物の分解	13
9. 本研究の目的	14

### 第1章 *Sphingobium* sp. SYK-6 株における dehydrodiconiferyl alcohol (DCA) の代謝経路の解明

緒言	16
----	----

材料と方法	16
-------	----

#### 結果

1. SYK-6 株による DCA 代謝産物の同定	19
2. SYK-6 株による DCA-C 代謝産物の同定	20
3. SYK-6 株による DCA-CC 代謝産物の同定	21
4. DCA 代謝に関与する酵素の特性	23
5. DCA 代謝に関与する酵素の局在	23

考察	25
----	----

### 第2章 DCA 及び DCA-L 変換酵素遺伝子の同定と機能解析

緒言	28
----	----

材料と方法	28
-------	----

#### 結果

1. DCA 変換酵素遺伝子のスクリーニング	34
------------------------	----

2. SLG_05620 と SLG_24930 の相同遺伝子の探索と大腸菌での発現	37
3. SLG_05620 と SLG_24930 の相同遺伝子産物の DCA 変換活性	39
4. DCA-L 変換酵素遺伝子の推定	40
<b>考察</b>	44
<b>第3章 DCA-C 変換酵素遺伝子の同定と機能解析</b>	
<b>緒言</b>	46
<b>材料と方法</b>	46
<b>結果</b>	
1. DCA-C 変換酵素遺伝子の探索	53
2. SYK-6 株ゲノム上における SLG_09480 と SLG_09500 の遺伝子配置と転写単位	53
3. DCA-C 変換酵素遺伝子 <i>phcC</i> と <i>phcD</i> の同定	54
4. PhcC と PhcD の局在	57
5. <i>phcC</i> と <i>phcD</i> の発現と酵素精製	58
6. PhcC と PhcD の DCA-C 変換活性	59
7. PhcC と PhcD の立体選択性	60
8. PhcC と PhcD の至適温度と至適 pH	61
9. PhcC と PhcD のフラビン補因子の同定	61
10. PhcC と PhcD の基質特異性	62
11. PhcC と PhcD の電子受容体	63
<b>考察</b>	65
<b>総括</b>	70
<b>謝辞</b>	72
<b>引用文献</b>	73
<b>Supplemental content</b>	78

## 本研究で用いられている主な略語

DCA,	dehydrodiconiferyl alcohol
DCA-L,	3-(2-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-3-(hydroxymethyl)-7-methoxy-2,3-dihydrobenzofuran-5-yl)acrylaldehyde
DCA-C,	3-(2-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-3-(hydroxymethyl)-7-methoxy-2,3-dihydrobenzofuran-5-yl)acrylic acid
DCA-CL,	3-(3-formyl-2-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-7-methoxy-2,3-dihydrobenzofuran-5-yl)acrylic acid
DCA-CC,	5-(2-carboxyvinyl)-2-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-7-methoxy-2,3-dihydrobenzofuran-3-carboxylic acid
DCA-S,	3-(4-hydroxy-3-(4-hydroxy-3-methoxystyryl)-5-methoxyphenyl)acrylic acid
DCA-AC,	2-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-5-(3-hydroxyprop-1-enyl)-7-methoxy-2,3-dihydrobenzofuran-3-carboxylic acid
DCA-LC,	2-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-7-methoxy-5-(3-oxoprop-1-enyl)-2,3-dihydrobenzofuran-3-carboxylic acid
GGE,	guaiacylglycerol- $\beta$ -guaiacyl ether
HMPPD,	1,2-bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)propane-1,3-diol
PDC,	2-pyrone-4,6-dicarboxylate
PQQ,	pyrroloquinoline quinone
FAD,	flavin adenine dinucleotide
PMS,	1-methoxy-5-methylphenazinium methylsulfate
CoQ <sub>0</sub> ,	2,3-dimethoxy-5-methyl-1,4-benzoquinone
CoQ <sub>1</sub> ,	2,3-dimethoxy-5-methyl-6-(3-methyl-2-butenyl)-1,4-benzoquinone
ADH,	alcohol dehydrogenase
ALDH,	aldehyde dehydrogenase
HPLC,	高速液体クロマトグラフィー
ESI-MS,	エレクトロスプレーイオン化法マスマスペクトロメトリー
LC-MS,	液体クロマトグラフィーマスマスペクトロメトリー

## 序章

## 1. 研究背景

2013 年の気候変動に関する政府間パネル (IPCC) 第 5 次評価報告書において、1950 年代以降に温室効果ガス濃度は増加し続けており、大気と海洋は温暖化し、それに伴う雪氷の減少及び海面水位の上昇が確認されていると報告された。この原因として現代社会がエネルギー及びマテリアル生産の多くを化石資源に依存していることが挙げられる。また、化石資源は有限であり、将来的に枯渇することが懸念されている。このような地球温暖化の原因となる温室効果ガスの排出抑制及び安定した資源確保の観点から、化石資源に代わる新しい資源として再生可能でカーボンニュートラルな植物バイオマスの利用に大きな期待が寄せられている。植物バイオマスからの燃料生産として、アメリカやブラジルなどでサトウキビやトウモロコシからのバイオエタノール製造が行われているが、人口増加が続く中での食糧からの燃料生産に批判が高まっており、農作物の非可食部や木質及び草本系バイオマスからの燃料やマテリアルの生産が求められている。日本においては、木質バイオマスである林地残材がほとんど利用されておらず、有効な利用方法が必要とされている (Table. 1; バイオマス活用推進基本計画, 2010)。

**Table 1.** 日本におけるバイオマスの利用率<sup>a</sup>

バイオマスの種類	発生量/年 (ton)	利用率 (%)
廃棄物バイオマス		
家畜排泄物	88,000,000	90
下水汚泥	78,000,000	77
黒液	14,000,000 <sup>b</sup>	100
紙	27,000,000	80
食品廃棄物	19,000,000	27
工業残材	3,400,000 <sup>b</sup>	95
建設残材	4,100,000	90
未利用バイオマス		
農作物非可食部	14,000,000	85 <sup>c</sup>
林地残材	8,000,000 <sup>b</sup>	0

<sup>a</sup> バイオマス活用推進基本計画, 2010<sup>b</sup> 乾燥重量<sup>c</sup> すき込みを含む

## 2. 木質成分

木質成分は、主に細胞壁成分であるセルロース、ヘミセルロース及びリグニンから構成される。セルロースは D-glucose が  $\beta$ -1,4 グリコシド結合で重合したホモ多糖で木質成分の 40~50% を占めている (Table 2) (1)。 $\beta$ -1,4 グリコシド結合した D-glucose は直鎖上の配置をとり、結晶化して細胞壁の骨格となるセルロースマイクロフィブリルを形成している。ヘミセルロースは、D-xylose、D-arabinose、D-mannose や D-galactose 等を構成ユニットとする無定形のヘテロ多糖であり木質成分中の 15~25% を占める。細胞壁においてヘミセルロースは不均一に分布し、セルロースと水素結合、リグニンと共有結合によって会合している。リグニンは針葉樹で 25~35%、広葉樹で 20~35%、草本系では 10~25% 含まれている (Table 2)。リグニンの機能としてはセルロースマイクロフィブリル及びヘミセルロースの接着や細胞同士を接着させることで細胞壁と

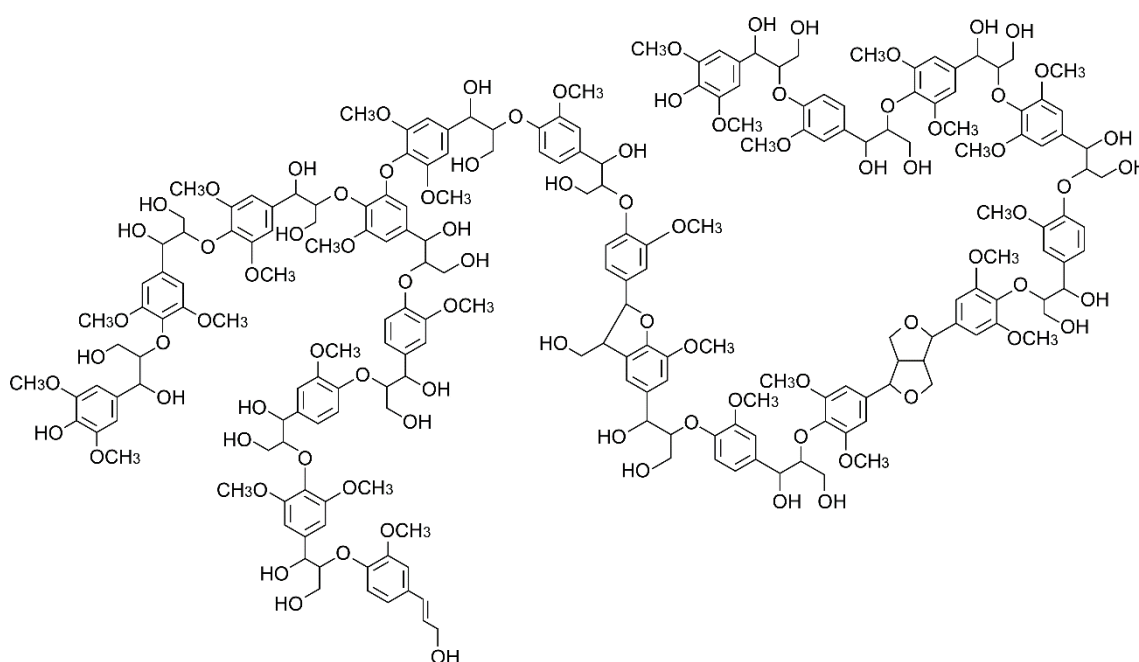
## 序章

植物体に物理的強度を付与する役割を担っている (2)。また、疎水的な性質から木部細胞壁の水による膨潤を抑制し、水分の散失を防いで

いる。リグニンの化学構造は複雑で微生物による分解を受け難いため植物体を微生物の侵食から保護していると考えられている (Fig. 1)。

**Table 2.** 植物におけるリグノセルロースの存在比 (1)

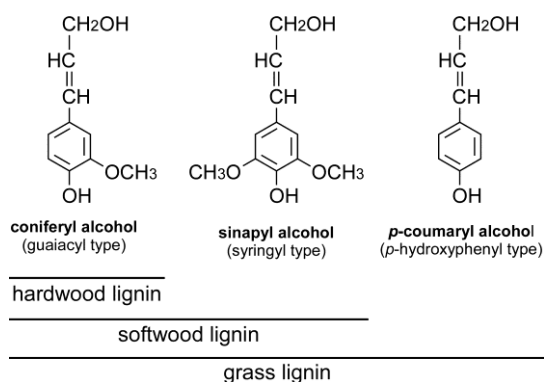
植物体	セルロース (%)	ヘミセルロース (%)	リグニン (%)	参考文献
ススキ	45-52	24-33	9-13	(3)
スイッチグラス	32-37	26-33	17-18	(4)
トウモロコシ葉茎	37	31	18	(5)
ポプラ	42-48	16-22	21-27	(6)
マツ	46	23	28	(7)



**Fig. 1.** 推定のリグニンの化学構造 (8).

### 3. リグニンの生合成

リグニンは細胞質でのモノリグノールの合成、細胞壁への輸送、及び重合を通して生成する。モノリグノールにはフェニルプロパノイド化合物 (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>) である *p*-coumaryl alcohol、coniferyl alcohol、sinapyl alcohol の3種類が存在し (Fig. 2) (9)、これらが脱水素重合することによってリグニンが形成される。モノリグノールの生合成は細胞質において行われ、phenylalanine から桂皮酸モノリグノール経路によって合成される (108, 109) (Fig. 3)。最初に phenylalanine は脱アミノ化された桂皮酸となり、次いで芳香環 4 位の水酸化により *p*-coumarate に変換される。*p*-coumarate の側鎖 C<sub>γ</sub>位が還元されることにより *p*-coumaryl alcohol が生成する。また、*p*-coumarate は芳香環の水酸化とメチル化を受け、側鎖 C<sub>γ</sub>位の還元により coniferyl aldehyde へ変換される。coniferyl aldehyde には側鎖 C<sub>γ</sub>位がさらに還元された coniferyl alcohol へ変換される経路と芳香環の水酸化及びメチル化を受けた後に側鎖 C<sub>γ</sub>位の還元により sinapyl alcohol が生成する経路が存在する。



**Fig. 2.** リグニンを構成するモノリグノールの構造.

細胞質中で合成されたモノリグノールの細胞壁への移行には、ゴルジ小胞または小胞体を介した輸送、疎水性モノリグノールの受動拡散による細胞膜の透過、液胞を介した輸送、及びトランスポーターによる輸送が関わることが推定されている (10)。これまでに、モノリグノールの細胞膜輸送に ATP-binding cassette transporter の関与が報告されている (11, 12)。しかし、モノリグノールの細胞壁への輸送の全容は明らかになっておらず、今後の更なる解明が望まれている。

細胞質から輸送されたモノリグノールは、セルロースマイクロフィブリルの間隙を埋めるヘミセルロースゲル中に拡散されると考えられている。ヘミセルロースゲル中に拡散したモノリグノールは過酸化水素の存在下における peroxidase や laccase の作用によって 1 電子酸化されてフェノキシラジカルとなり、カップリング反応によりキノンメチドなどの中間体となり準安定化する。その後、水またはヒドロキシ基の付加により安定化したβ-aryl ether (β-O-4'型)、phenylcoumaran (β-5'型)、pinoresinol (β-β'型) が主要なリグニン二量体として生成する (Fig. 4) (13, 14)。β-aryl ether はモノリグノールのカップリング反応によるβ-O-4'結合の生成に伴い Cβ位に不斉炭素が導入され、続いてキノンメチド中間体が水付加反応を受けて Cα位も不斉炭素となりエリスロ型及びスレオ型のβ-aryl ether が生成する。Phenylcoumaran と pinoresinol は、カップリング反応によって生成した環化反応が可能な分子内水酸基を持つキノンメチド中間体が再芳香環化することで生成する。生成した二量体は再度ラジカル化され、カップリング反応を繰り返すことにより高分子リグニンが生成する (108, 109)。針葉樹、広葉樹及び草本

植物ではリグニンの構造単位が異なり、広葉樹はグアイアシル型 (coniferyl alcohol) とシリンギル型 (sinapyl alcohol) の2つを含むのに対して、針葉樹のリグニンはグアイアシル型のみである (Fig. 2) (9)。草本リグニンはグアイアシル型、シリンギル型に加えて *p*-ヒドロキシフェニル型 (*p*-coumaryl alcohol) も含んでいる。

また、リグニンは不斉炭素を数多く含むが光学活性を示さない。これはモノリグノールの重合過程において立体選択的な酵素の制御を受けておらず、後の反応も化学的に進行するため、各二量体の異性体が等量生成するためと考えられている (15, 16)。

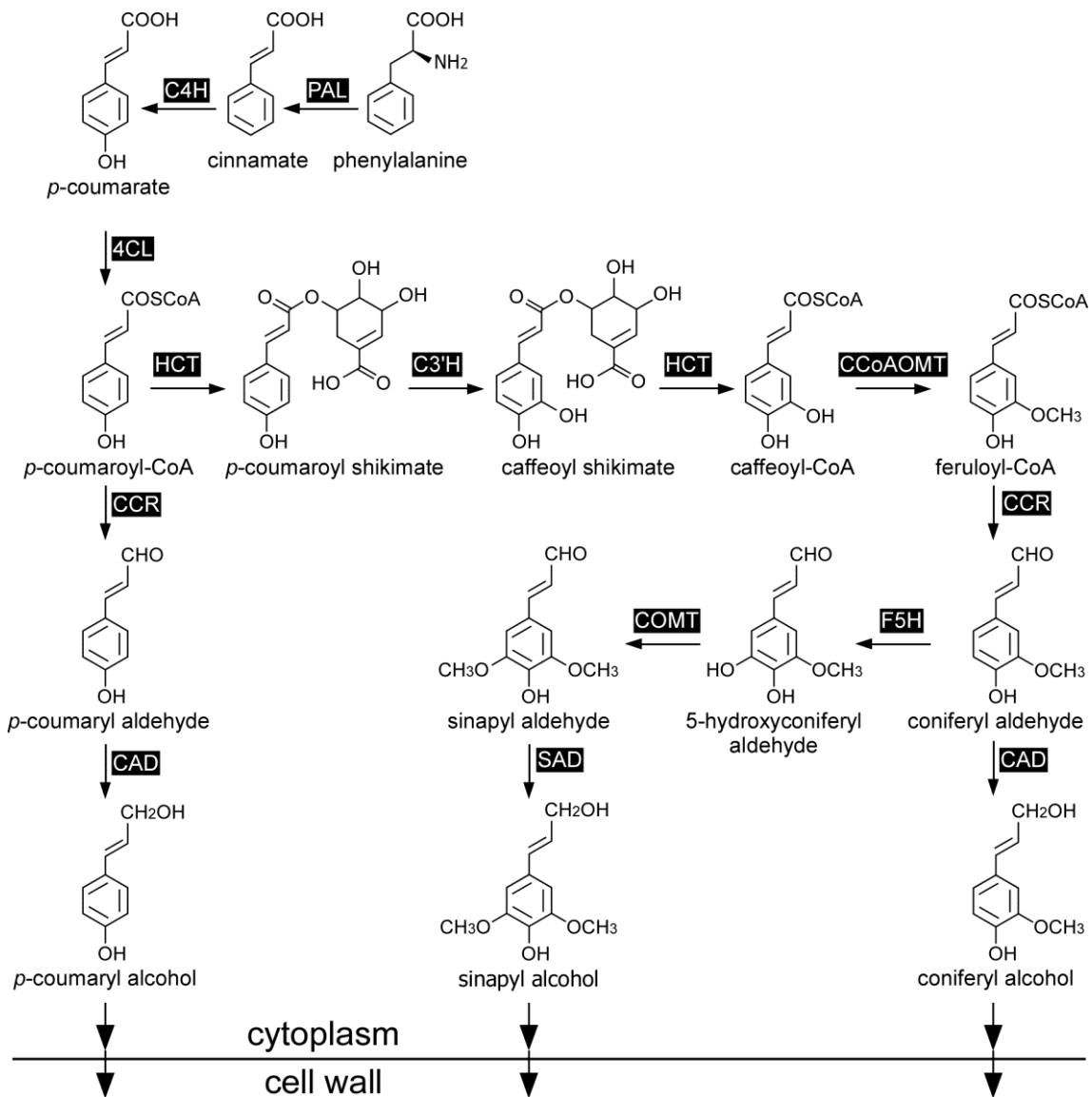
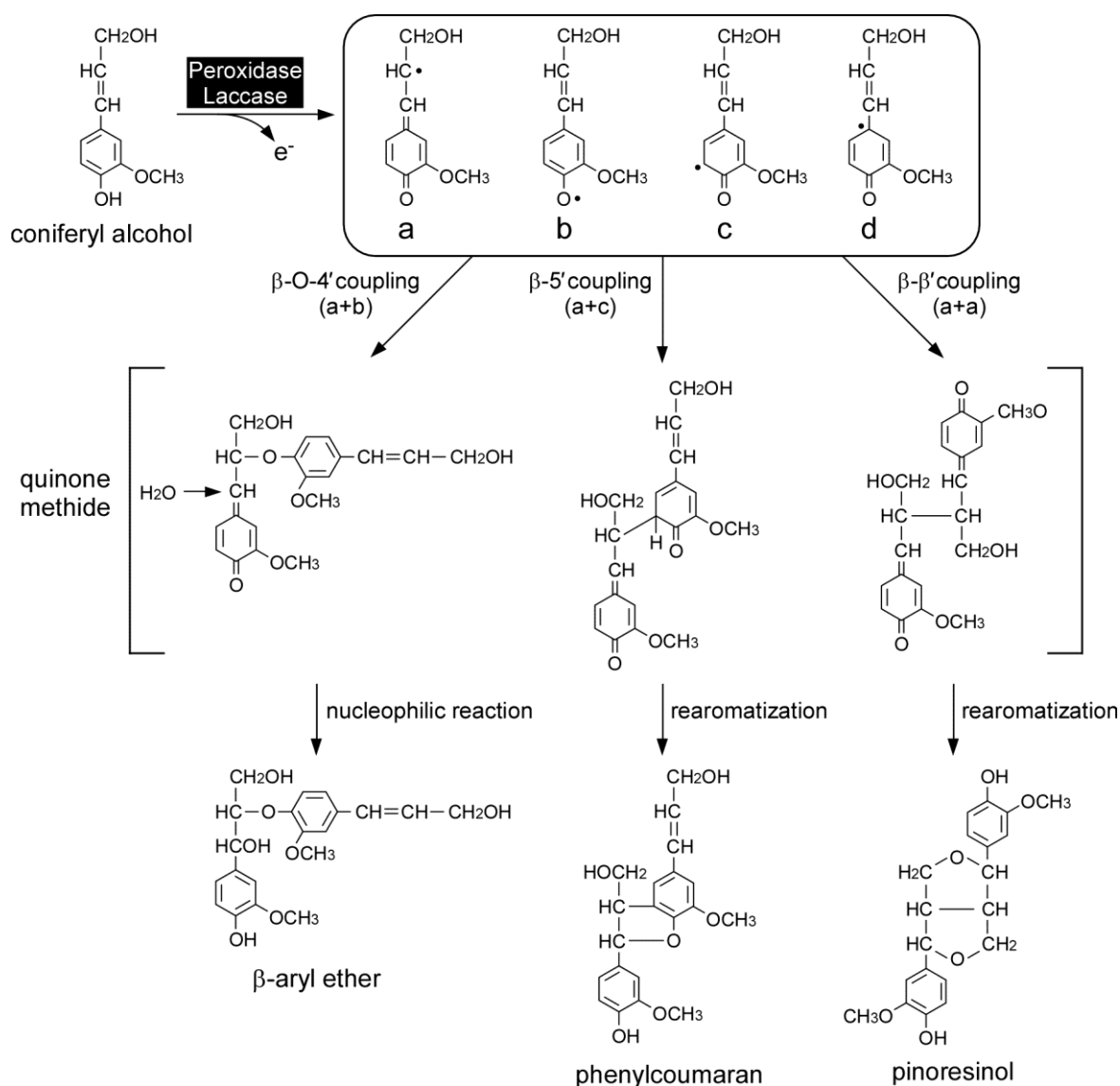


Fig. 3. 植物におけるモノリグノールの生合成経路.

Enzyme: PAL, phenylalanine ammonia lyase; C4H, cinnamate 4-hydroxylase; 4CL, 4-coumarate: CoA ligase; HCT, hydroxycinnamoyl-CoA: shikimate hydroxycinnamoyl transferase; C3'H, *p*-coumarate 3'-hydroxylase; CCoAOMT, caffeoyl CoA 3-*O*-methyltransferase; CCR, cinnamyl-CoA reductase; F5H, ferulate 5-hydroxylase; COMT, caffeate 3-*O*-methyltransferase; CAD, cinnamyl alcohol dehydrogenase; SAD, sinapyl alcohol dehydrogenase.





**Fig. 4.** Coniferyl alcohol のラジカルカップリング反応による $\beta$ -aryl ether ( $\beta$ -O-4'結合), phenylcoumaran ( $\beta$ -5'結合), pinoresinol ( $\beta$ - $\beta'$ 結合) の生成.

#### 4. 高分子リグニンの生分解

自然界において木材腐朽を行う微生物として担子菌、子囊菌、及び不完全菌などが知られている。この中で、リグニン分解に関与する微生物の多くは白色腐朽菌に属しており、*Phanerochaete chrysosporium* や *Trametes versicolor* がリグニン分解菌として知られてい

る。現在までにリグニン分解酵素として laccase (E. C. 1. 10. 3. 2)、lignin peroxidase (E. C. 1. 11. 1. 14)、manganese peroxidase (E. C. 1. 11. 1. 13)、versatile peroxidase (E. C. 1. 11. 1. 16) の4種類の酵素が報告されてきた (17, 18)。Laccase は内部に  $\text{Cu}^{2+}$  を持ち、フェノール化合物を1電子酸化するがメディエーターの存在下では非フェノール化合物も酸化することができる。Lignin

peroxidase は補因子としてヘムを有し、リグニンモデル化合物及び非フェノール化合物を含む広い基質に対して高い酸化能を示す。Manganese peroxidase は  $Mn^{2+}$  を  $Mn^{3+}$  に酸化する活性を持ち、反応により生成した  $Mn^{3+}$  が有機酸と複合体を形成して酸化剤として機能する。Versatile peroxidase は lignin peroxidase と manganese peroxidase の両方の活性を示す。これらの酵素により 1 電子酸化反応を受けたリグニンの芳香環はカチオンラジカルを生成し、高分子リグニン中の C-C 結合や C-O-C 結合が開裂されて低分子化される (19, 20)。

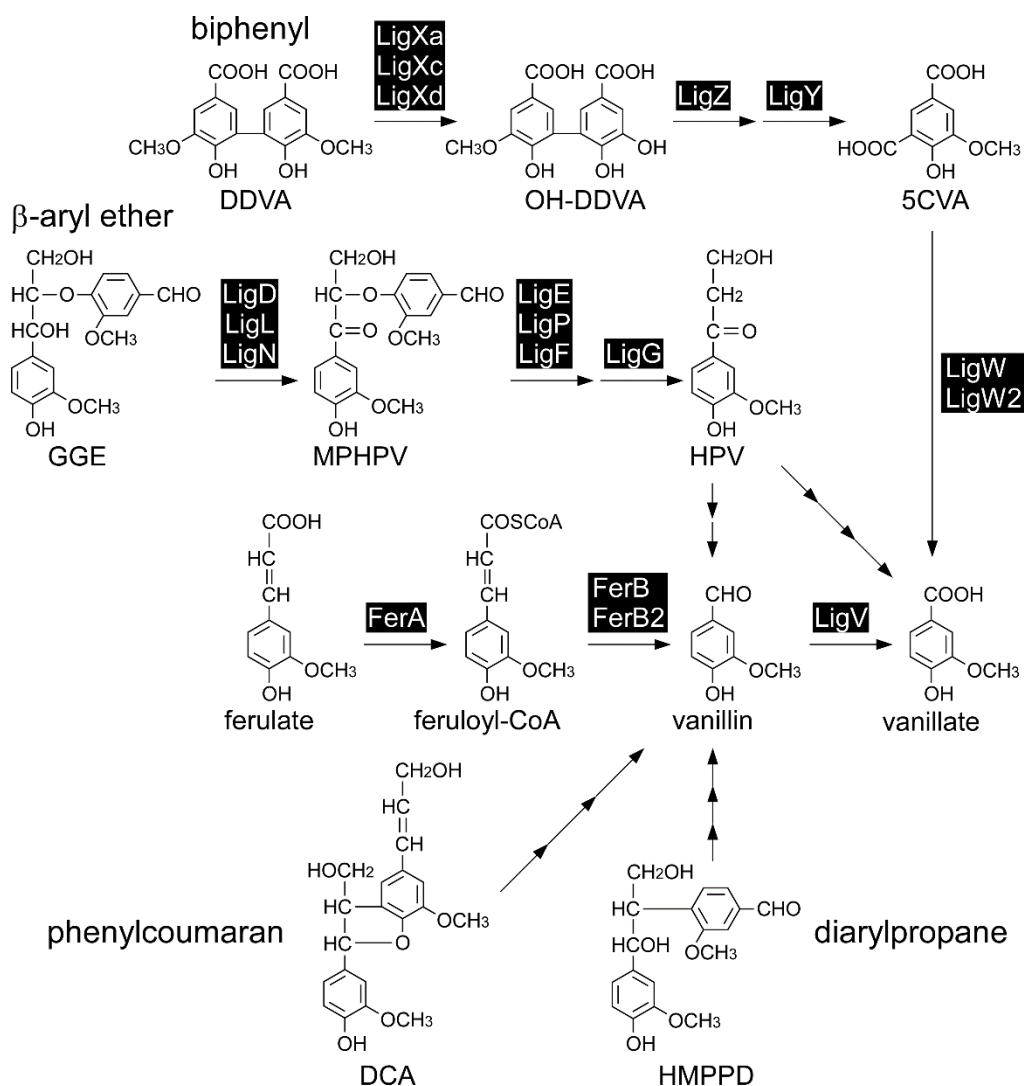
最近、バクテリアにおいて laccase や dye-decolorizing peroxidase (Dyp; E. C. 1.11.1.19) を有する株が報告され、これら酵素がリグニン分解に関与することが示唆されている (21-23)。しかしながら、自然界におけるバクテリアの高分子リグニン分解への関与の程度は未知であり、今後の更なる解明が必要とされている。一方、低分子化されたリグニン由来の芳香族化合物に対してはバクテリアがそれらの無機化に大きく寄与していると考えられている (24, 25)。従って、バクテリアによるリグニン由来化合物の分解系を明らかにすることは、地球上の炭素循環を理解する上で極めて重要である。

## 5. *Sphingobium* sp. SYK-6 株におけるリグニン由来化合物の分解

*Sphingobium* sp. SYK-6 株は、リグニン由来化合物代謝系が最も詳細に解明されているバク

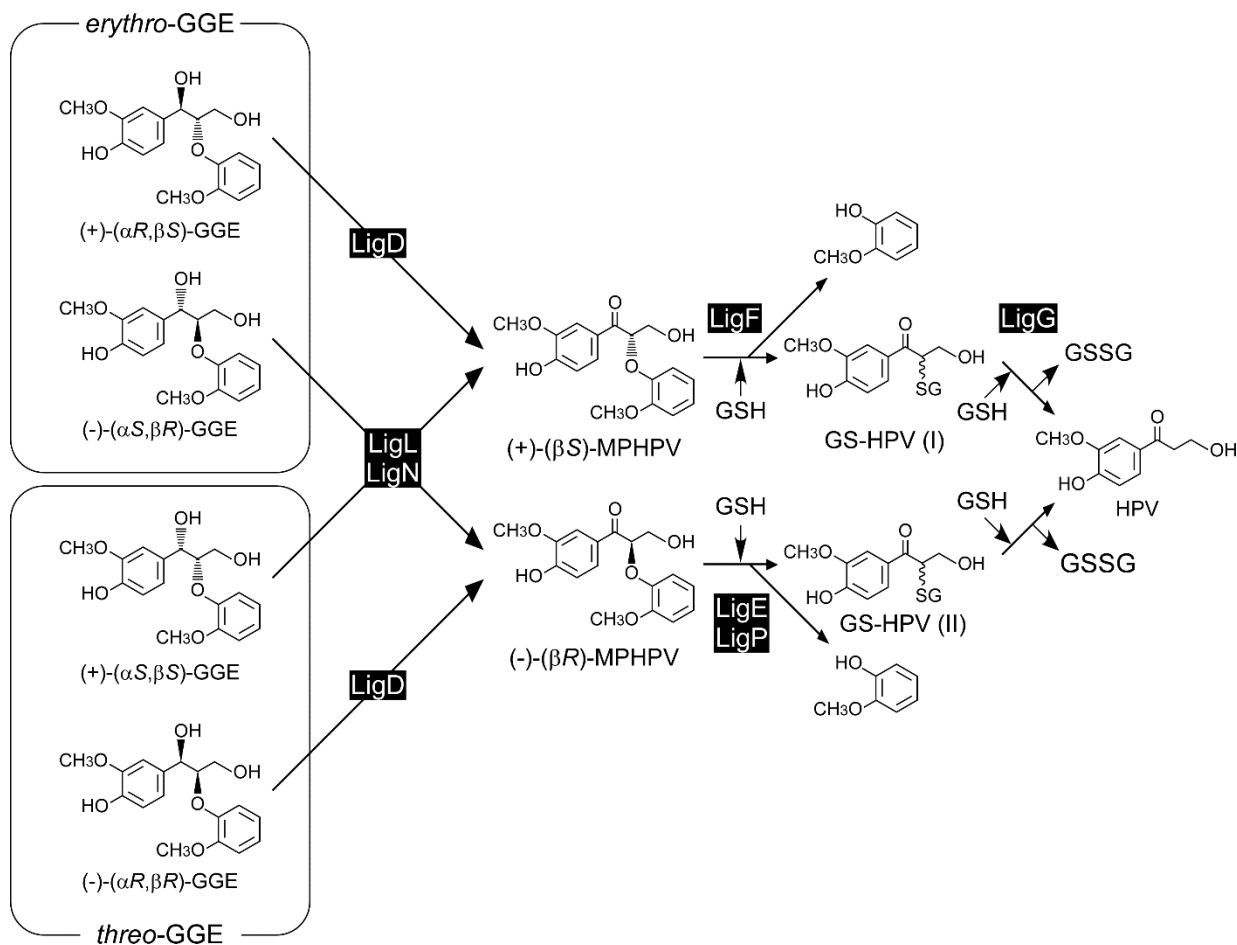
テリアであり、 $\alpha$ -プロテオバクテリアに属する好気性細菌である。本株はリグニン由来の biphenyl 化合物である 5,5'-dehydrodivanillate (DDVA) の資化性菌として製紙工場の希釈されたパルプ廃液中から単離された (26)。SYK-6 株は、biphenyl、 $\beta$ -aryl ether、phenylcoumaran 及び diarylpropane などのリグニン由来二量体化合物をはじめ、ferulate、vanillin、vanillate、syringaldehyde 及び syringate などの単量体化合物を唯一の炭素源、エネルギー源として生育することが可能である。現在までに、SYK-6 株の  $\beta$ -aryl ether、biphenyl 及びリグニン由来単量体化合物の代謝に関与する酵素遺伝子の同定と機能解明がなされてきた (Fig. 5)。

$\beta$ -aryl ether のモデル化合物である guaiacylglycerol- $\beta$ -guaiacyl ether (GGE) の代謝には、立体選択的な酵素群が関与することが明らかにされている。GGE に含まれる 4 つの立体異性体は最初に C $\alpha$ -dehydrogenase である LigD または LigL/LigN による C $\alpha$ 位の酸化を受け、生じたエナンチオマーは glutathione S-transferase (GST) である LigF または LigE/LigP による C $\beta$ 位へのグルタチオンの求核攻撃によるエーテル開裂を受ける (Fig. 6) (27-29)。続いて GST である LigG によって、LigF の作用で生じたエーテル開裂物質からグルタチオンが脱離され  $\beta$ -hydroxypropiovanillone (HPV) が生成する (27, 30)。一方、LigE/LigP の作用で生じたエーテル開裂物質には異なる GST が働くことが示唆されている。一連の反応で生成する HPV はさらなる代謝を受け vanillate を経て代謝されることが示されている (27)。



**Fig. 5.** SYK-6 株におけるリグニン由来化合物の代謝経路.

Enzymes: LigXa, DDVA oxygenase; LigXc, ferredoxin; LigXd, ferredoxin reductase; LigZ, OH-DDVA *meta*-cleavage dioxygenase; LigY, OH-DDVA *meta*-cleavage compound hydrolase; LigW and LigW2, 5CVA decarboxylase; LigD, LigL, and LigN,  $\alpha$ -dehydrogenase; LigE, LigP, and LigF,  $\beta$ -etherase (glutathione *S*-transferase); LigG, glutathione-removing enzyme (glutathione *S*-transferase); FerA, feruloyl-CoA synthetase; FerB and FerB2, feruloyl-CoA hydratase/lyase; LigV, vanillin dehydrogenase. Abbreviations: DDVA, 5,5'-dehydrodivanillate; OH-DDVA, 2,2',3-trihydroxy-3'-methoxy-5,5'-dicarboxybiphenyl; 5CVA, 5-carboxyvanillate; GGE, guaiacylglycerol- $\beta$ -guaiacyl ether; MPHPV,  $\alpha$ -(2-methoxyphenoxy)- $\beta$ -hydroxypropiovanillone; HPV,  $\beta$ -hydroxypropiovanillone; DCA, dehydrodiconiferyl alcohol; HMPPD, 1,2-bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)propane-1,3-diol.



**Fig. 6.** SYK-6 株における立体特異的な GGE の変換.

Enzymes: LigD, LigL, and LigN, C $\alpha$ -dehydrogenase; LigE, LigP, and LigF,  $\beta$ -etherase (glutathione S-transferase); LigG, glutathione-removing enzyme (glutathione S-transferase). Abbreviations: GGE, guaiacylglycerol- $\beta$ -guaiacyl ether; MPHPV,  $\alpha$ -(2-methoxyphenoxy)- $\beta$ -hydroxypropiovanillone; GS-HPV,  $\alpha$ -glutathionyl- $\beta$ -hydroxypropiovanillone; HPV,  $\beta$ -hydroxypropiovanillone; GSH, reduced glutathione; GSSG, oxidized glutathione.

biphenyl のモデル化合物である DDVA は、ゲノム上に分散して存在する遺伝子にコードされる oxygenase (LigXa)、ferredoxin (LigXc)、ferredoxin reductase (LigXd) の 3 成分から構成される DDVA O-demethylase によって脱メチルを受けて OH-DDVA に変換される (31)。その後、OH-DDVA meta-cleavage dioxygenase (LigZ) 及び hydrolase (LigY) による芳香環開裂と側鎖開裂を受けて 5-carboxyvanillate に変換され (32, 33)、2つの 5-carboxyvanillate decarboxylase (LigW,

LigW2) による脱炭酸を経て vanillate に変換される (34, 35)。SYK-6 株は pinoresinol を完全分解できないが、pinoresinol から lariciresinol を経由して secoisolariciresinol までの 2 段階を pinoresinol reductase (PinZ) により変換する (Fig. 7) (36)。ferulate は feruloyl-CoA synthetase (FerA) によって C $\gamma$ 位に CoA が付加された feruloyl-CoA に変換された後、2つの feruloyl-CoA hydratase/lyase (FerB, FerB2) によりアセチル CoA が脱離し、vanillin へと変換される (37,

38)。vanillin は vanillin dehydrogenase (LigV) によって vanillate へと酸化される (39)。FerA 及び FerB は sinapinate を syringaldehyde に変換する活性も有しており (37, 38)、syringaldehyde は DesV と LigV を中心とした複数の aldehyde dehydrogenase によって syringate へと酸化される (Fig. 8) (110)。

SYK-6 株はグアイアシル型及びシリンギル型のリグニン由来化合物をそれぞれ vanillate と syringate を経由して代謝する (Fig. 9)。vanillate はテトラヒドロ葉酸依存性の vanillate/3-O-methylgallate O-demethylase (LigM) によって脱

メチルを受けて protocatechuate (PCA) に変換された後 (40)、PCA 4,5-開裂経路によって代謝される (41)。一方、syringate はテトラヒドロ葉酸依存性の syringate O-demethylase (DesA) により 3-O-methylgallate に変換される (42)。3-O-methylgallate は LigM によって脱メチルされて gallate に変換されてから芳香環開裂を受ける経路と DesZ 及び LigAB によって芳香環開裂を受ける二つの経路によって代謝され、両経路は PCA 4,5-開裂経路に合流する (43-45)。これらの経路の内、gallate が芳香環開裂を受ける経路が主要であることが示されている (44)。

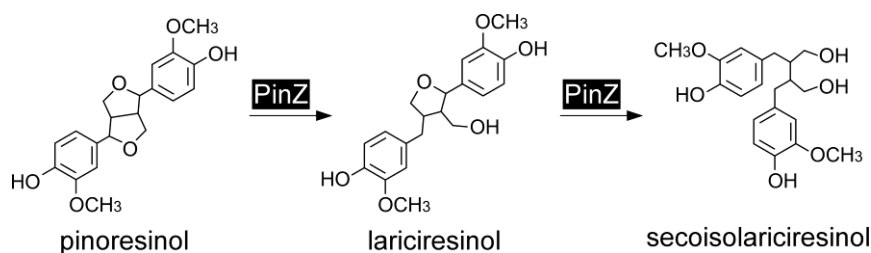


Fig. 7. SYK-6 株の pinoresinol reductase (PinZ) による pinoresinol の変換。

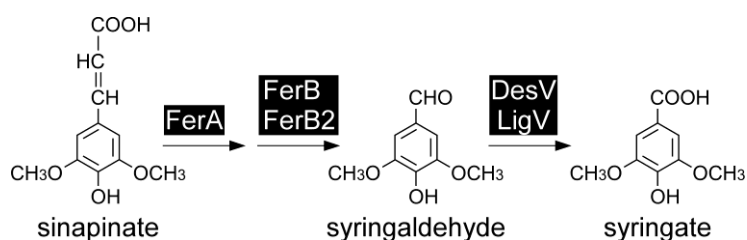
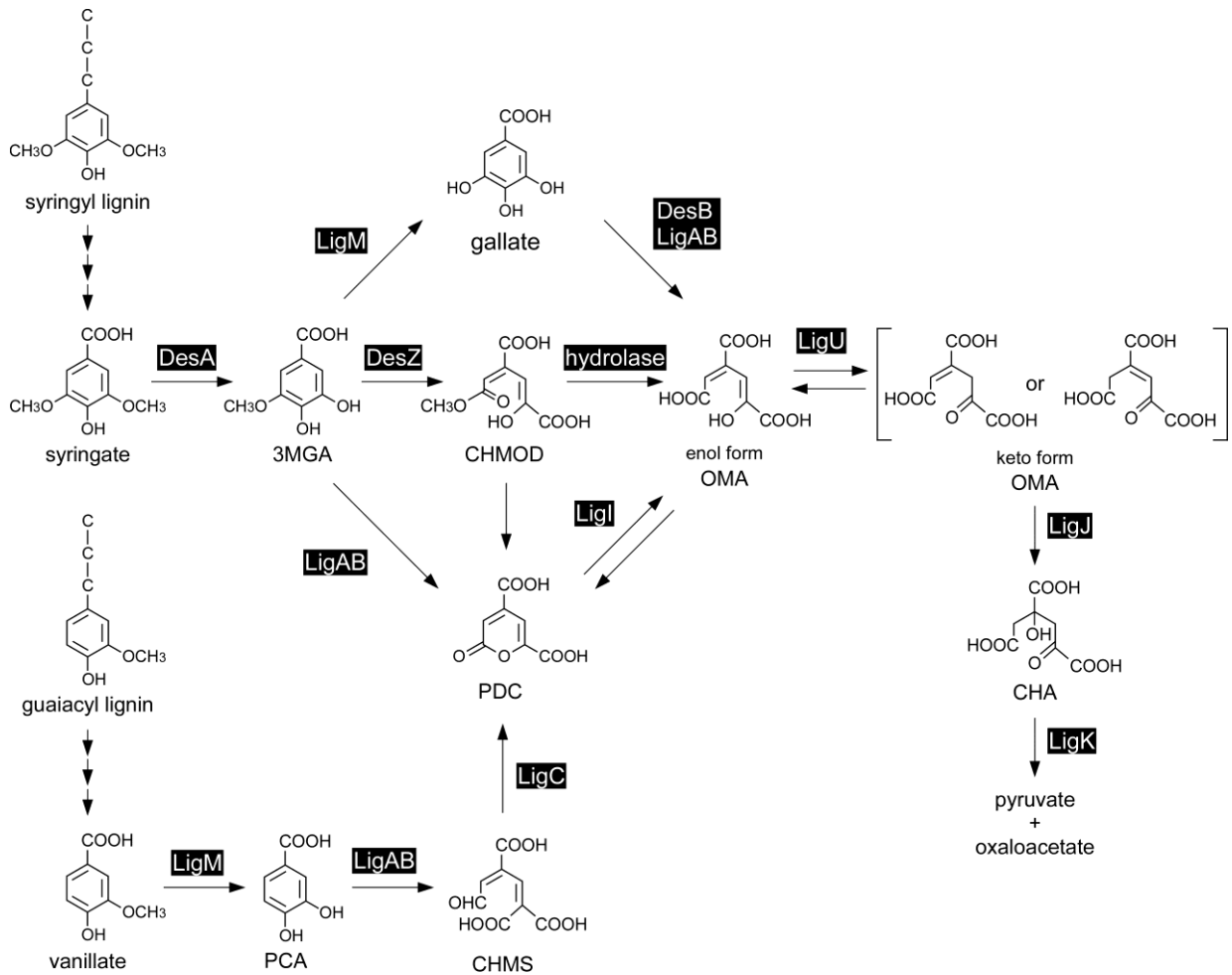


Fig. 8. SYK-6 株の feruloyl-CoA synthetase (FerA), feruloyl-CoA hydratase/lyase (FerB and FerB2), aldehyde dehydrogenase (DesV and LigV) による sinapinate の変換。



**Fig. 9.** SYK-6 株における vanillate 及び syringate の代謝経路。

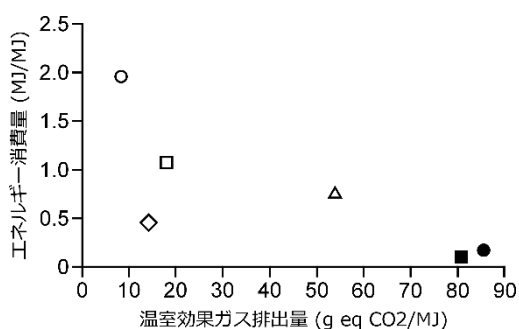
Enzymes: LigM, vanillate/3MGA *O*-demethylase; LigAB, PCA 4,5-dioxygenase; LigC, CHMS dehydrogenase; LigI, PDC hydrolase; LigU, OMA tautomerase; LigJ, OMA hydratase; LigK, CHA aldolase; DesA, syringate *O*-demethylase; DesZ, 3MGA 3,4-dioxygenase; DesB, gallate dioxygenase. Abbreviations: PCA, protocatechuate; CHMS, 4-carboxy-2-hydroxy-6-semialdehyde; PDC, 2-pyrone-4,6-dicarboxylate; OMA, 4-oxalomesaconate; CHA, 4-carboxy-4-hydroxy-2-oxoadipate; 3MGA, 3-*O*-methylgallate; CHMOD, 4-carboxy-2-hydroxy-6-methoxy-6-oxohexa-2,4-dienoate.

## 6. バイオ燃料とリグニン改変植物

木質バイオマスからのエタノール生産は、主に前処理、糖化、発酵、濃縮の4段階からなっており、CO<sub>2</sub>の発生量は低いですがエネルギー消費量が高いという問題を抱えている (Fig. 10; みずほ情報総研株式会社, 2008)。木質バイオマスを前処理・酵素糖化法で糖化する際の前処理と

しては、微粉碎処理などの物理的処理、希硫酸処理やアルカリ蒸解などの化学的処理、菌類を用いた生物的処理など様々な方法が検討されている (46, 47)。しかし、リグニンの強固な物性や複雑な構造、及び難分解性のため、脱リグニンを行うこれらの前処理に多くのエネルギーや薬品が投入されることが系全体のエネルギー消費量増大の大きな要因となっている (48,

49)。また、リグニンが糖化酵素に吸着し、糖化効率の低下を招くことも知られている (50)。これらのことから、遺伝子操作によって植物細胞壁中のリグニン量を低減させることや脱リグニンが容易なリグニン構造に改変することにより、リグノセルロースの糖化効率及びその後の発酵プロセスの効率を改善することが強く望まれている。



**Fig. 10.** 燃料 1MJ 製造時のエネルギー消費量と CO<sub>2</sub> 排出量。

Symbols: gasoline (black circle); diesel fuel (black square); corn (white triangle); sugarcane (white square); oil palm (white diamond); wood (white circle). (みずほ総合研究所, 2008)

これまでに植物の桂皮酸モノリグノール経路に関与するさまざまな遺伝子をダウンレギュレーションされた植物が作出され、リグニン量や構造に与える影響が調べられてきた (51)。アルファルファやポプラにおいて *cinnamate 4-hydroxylase* (C4H)、*hydroxycinnamoyl-CoA: shikimate hydroxycinnamoyl transferase* (HCT)、*coumaroyl shikimate 3-hydroxylase* (C3'H) 及び *caffeoyl CoA 3-O-methyltransferase* (CCoAOMT) などの発現を抑制した組換え体のリグニン量と酵素糖化効率が調べられ、リグニン量を人為的に低下させることによって糖化効率が向上することが示されている (52-54)。しかし、これ

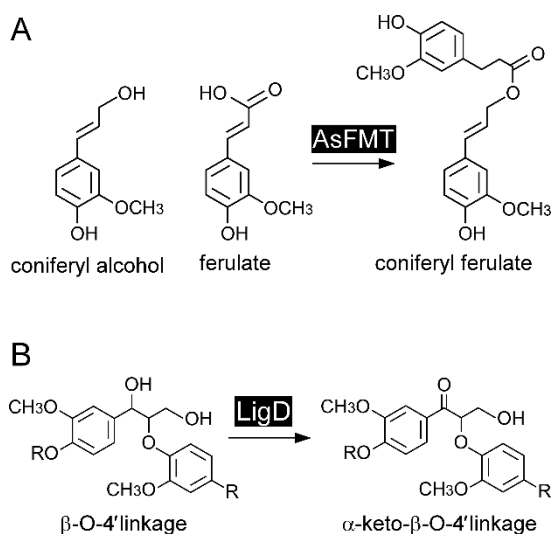
らの桂皮酸モノリグノール経路に関与する遺伝子のダウンレギュレーションによって、植物の生育遅延や矮化、組織及び器官の形態変化などの異常が観察される場合がある (55, 56)。モノリグノールの生合成に関与する遺伝子を抑制することはリグニン含有量の減少による細胞強度の低下を引き起こすだけではなく、フラボノイドなどの二次代謝産物の生産にも影響を及ぼすことが生育阻害や形態異常を引き起こす要因と考えられている (56, 57)。そのため、桂皮酸モノリグノール経路に関わる遺伝子を直接改変する方法とは異なる新たなリグニン改変技術の確立が望まれている。

最近、新たなリグニン改変技術の一つとして *monolignol ferulate transferase* を植物において発現させることで、通常のリグニン中には存在しない *monolignol-ferulate* 結合をリグニンに導入する方法が報告された (58)。これまでに *coniferyl ferulate* を分子中に持つ人工リグニンが作製され、アルカリ処理による分解を受け易いことが示されている (59)。実際に *Arabidopsis* 由来の *monolignol ferulate transferase* (AsFMT, At3g26040) を導入したポプラのリグニン中において *sinapyl ferulate* と *coniferyl ferulate* が観察され、形質に影響を与えずに糖化効率が向上したことが報告されている (Fig. 11 A) (58)。

植物のモノリグノールの生合成に関与する遺伝子を制御することにより正常な生育に支障をきたすことから、バクテリア由来のモノリグノール変換酵素遺伝子を植物に導入することでリグニン構造を改変する研究も行われている。*Pseudomonas fluorescens* AN103 株由来の *hydroxycinnamoyl-CoA hydratase/lyase* (O69762) を導入した *Arabidopsis* の変異体においてリグニン量や糖化効率、生育能などが調べられてい

る (60)。組換え体では野生株と比較して生育に影響を与えることなく、リグニンの減少及び低分子化が観察され、糖化効率が向上したことが報告されている。

また、細胞壁で生成するリグニン二量体をターゲットとすることで植物体への影響を抑えたリグニン改変を行うことができる可能性がある。リグニン中に含まれる $\beta$ -aryl ether 結合の C $\alpha$ 位をケト構造に変換するとアルカリ中での分解性が促進されることが知られている (61)。リグニン中に最も多く含まれる $\beta$ -aryl ether 結合の C $\alpha$ 位をケト構造へ改変することを目的として、SYK-6 株由来の C $\alpha$ -dehydrogenase 遺伝子 (*ligD*) を導入した *Arabidopsis* の組換え体が作出された (Fig. 11B) (62)。本組換え体からは LigD 活性が検出され、リグニン分子中の C $\alpha$ 位ケト構造が野生株と比較して有意に増加していることが示された。この様にリグニン生合成の新たな制御ツールとして、SYK-6 株が具備する特異性の高い酵素群が有力な候補に挙げられている。



**Fig. 11.** (A) Monolignol ferulate transferase (AsMFT) による coniferyl ferulate の合成. (B) LigD によるアルコール型 $\beta$ -O-4' 結合のケト型への変換.

## 7. リグニンの工業利用

リグニンの工業利用としては製紙用パルプの製造過程に発生する黒液の利用が挙げられる。黒液はパルプ原料の木材からリグニンを除去する際に発生する可溶化されたリグニンや薬剤等を含む溶液で、薬剤成分の除去及び濃縮後に燃焼されパルプ製造のエネルギー源として利用されている。また、高分子リグニンを工業的に利用する方法としてリグニン-フェノール誘導体の利用が挙げられる。リグノセルロースにフェノール誘導体を加え、酸性水溶液中で攪拌することによってリグニンを含むフェノール層とセルロースを含む水層に分離することができる (63)。本方法によって得られたリグニン-フェノール誘導体はプラスチックや接着剤、ポリマー原料などに利用できることが報告されている (63)。

一方、リグニンを低分子化し、バクテリア等を用いて特定の有用物質に変換する技術の開発が期待されている。*P. putida* KT2440株はリグニン由来化合物である ferulate、*p*-coumarate、caffate、vanillateなどを代謝できることが示唆されており (64)、窒素源枯渇下で生分解性ポリマーやバイオ燃料の前駆体となる polyhydroxyalkanoates (PHA) を生成することが知られている。最近、*P. putida* KT2440株を用いてトウモロコシ茎葉をアルカリ処理して得られたリグニンからPHAを生産したことが報告されている (65)。また、*Ralstonia eutropha* H16株はリグニンの誘導体である4-hydroxybenzoate存在下においてPHAを生成することが知られている。最近、*R. eutropha* H16株は4-hydroxybenzoateからPHAを乾燥重量で63% (wt) まで蓄積できることが報告され、gentisate及び



protocatechuateを炭素源とした場合においても PHAを蓄積することが示された (66)。

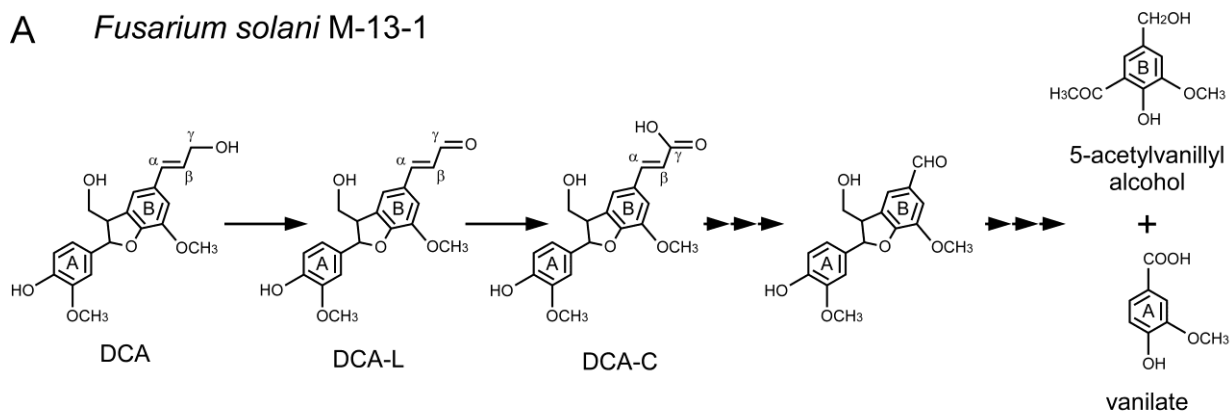
当研究室と東京農工大学、森林総合研究所との共同研究の過程で、SYK-6株がリグニン由来化合物の中間代謝物として生成する 2-pyrone-4,6-dicarboxylate (PDC) (Fig. 7) が高機能性有機材料の原料化合物として利用できることが見出された。PDCは重縮合することによってポリマー化することが可能であり、合成された PDC ポリエステルは、高い熱安定性と金属及びガラスを強力に接着する性質を有している (67)。また、PDCを骨格とするエポキシ接着剤が合成され、金属、木材を問わず強固な接着性を示すことが報告されている (68)。リグニンをアルカリ-ニトロベンゼンで酸化することによって vanillin が比較的高収率で得られることから (69)、SYK-6株及び *P. putida* の酵素遺伝子を利用

した vanillin からの PDC 生産系が構築されている (70)。今後、多様な構造のリグニン由来化合物からの PDC 生産系の構築が望まれることから、SYK-6株の様々なリグニン二量体化合物の代謝に関与する酵素遺伝子と機能を明らかにする必要がある。

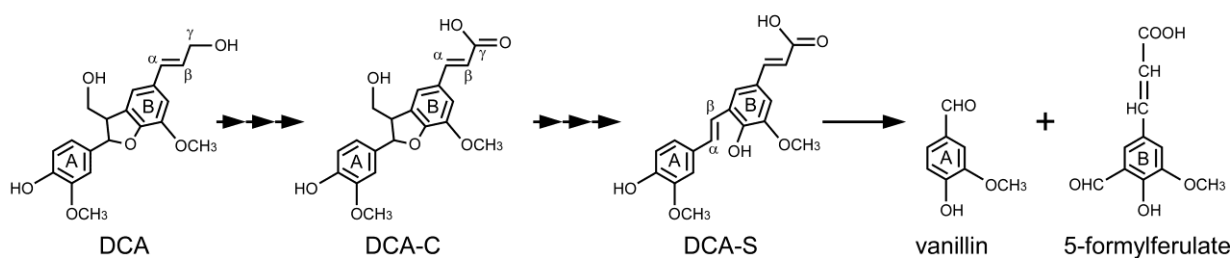
## 8. 微生物における phenylcoumaran 型化合物の分解

これまでに phenylcoumaran 型化合物である dehydrodiconiferyl alcohol (DCA) の分解経路については真菌である *Fusarium solani* M-13-1 株と  $\alpha$ -プロテオバクテリアの *Sphingomonas paucimobilis* TMY1009 株において報告されている (Fig. 12)。

### A *Fusarium solani* M-13-1



### B *Sphingomonas paucimobilis* TMY1009



**Fig. 12.** (A) *Fusarium solani* M-13-1 株における推定の DCA 代謝経路. (B) *Sphingomonas paucimobilis* TMY1009 株における推定の DCA 代謝経路.

*F. solani* M-13-1 株は土壤中から DCA を唯一の炭素源・エネルギー源として生育できる株として単離され、DCA 培養時に中間体として得られた化合物から分解経路が推定されている (71)。*F. solani* M-13-1 株において DCA は B 環側鎖 C $\gamma$ 位アルコールがアルデヒドに酸化された DCA-L を経由してカルボン酸に酸化された DCA-C に変換される (Fig. 12A)。その後、DCA-C の B 環側鎖が C $\alpha$ -C $\beta$  開裂を受け、5-acetylvanillyl alcohol と vanillate を経由して代謝されると推定されている。一方、*S. paucimobilis* TMY1009 株では DCA 変換能を欠損した種々の変異株を用いて中間代謝物の同定が行われた (72)。その結果、DCA-C、DCA-C の A 環側鎖 C $\gamma$ 位が脱離した DCA-S、5-formylferulate、vanillate が検出された。これらの結果から、DCA は初めに B 環側鎖 C $\gamma$ 位アルコールがカルボン酸に酸化され、その後 A 環側鎖 C $\gamma$ 位が脱離し、C $\alpha$ -C $\beta$  開裂を受けて 5-formylferulate と vanillin が生成すると推定されている (Fig. 12B)。また、*S. paucimobilis* TMY1009 株において DCA-S を 5-formylferulate と vanillin に変換する活性を有する lignostilbene  $\alpha,\beta$ -dioxygenase が 4 種報告されている (73, 74)。

## 9. 本研究の目的

Phenylcoumaran はリグニン中に含まれる分子間結合の約 3~10% を占めており (75)、植物におけるリグニン生合成初期段階で形成される主要な二量体化合物の一つであることが知られている (13, 14)。従って、バクテリアによる phenylcoumaran の代謝系を明らかにすることは、微生物によるリグニン分解機構の解明に繋が

るだけでなく、リグニン代謝系遺伝子を植物のリグニン構造の改変やリグニンからの物質生産に利用する上で不可欠であると考えられる。しかし、現在までにバクテリアにおける phenylcoumaran の代謝に関する知見は、代謝経路の一部が明らかにされているに過ぎず、酵素及び遺伝子に関する情報はほとんど得られていない。

リグニン由来化合物分解菌の *Sphingobium* sp. SYK-6 株は、phenylcoumaran 型化合物である DCA の分解能を有するが、本株においても代謝経路及び本代謝経路に関与する酵素遺伝子に関する知見は得られていなかった。本研究では SYK-6 株における DCA の詳細な代謝経路を推定するとともに、代謝に関与する酵素遺伝子を同定し、酵素遺伝子の機能を解明することを目的とした。

本論文は、序章、第 1 章、第 2 章及び第 3 章で構成されており、序章では、研究背景及びこれまでに行われてきた微生物、特にバクテリアにおけるリグニン由来化合物代謝に関する研究を中心に概説した。

第 1 章では、SYK-6 株の細胞抽出液を用いて DCA の代謝産物を同定することによって DCA の代謝経路を推定した。さらに DCA の各代謝段階における補因子の要求性、変換活性の誘導性、そして変換酵素の細胞内局在性を明らかにした。

第 2 章では、DCA 代謝の第 1 段階と第 2 段階に関わる酵素遺伝子の同定を試みた。初めに SYK-6 株の遺伝子ライブラリーから DCA 変換能を宿主に与える酵素遺伝子を単離し、単離した遺伝子と相同性を有する複数の酵素遺伝子の機能解析を行った。続いて DCA 変換酵素によって DCA から生成する DCA-L の変換酵素

## 序章

遺伝子を同定するために、関与が推定された aldehyde dehydrogenase 遺伝子について網羅的な解析を行った。

第3章では、DCA-L 変換酵素によって DCA-L から生成する DCA-C の変換に関与する酵素

遺伝子を第1章で得られた知見と遺伝子の発現プロファイルから予想し同定を行った。同定された DCA-C 変換酵素遺伝子については、遺伝子産物の酵素学的諸性質を明らかにした。

## 第1章 *Sphingobium* sp. SYK-6 株における dehydrodiconiferyl alcohol (DCA) の代謝経路の解明

### 緒言

Phenylcoumaran はリグニン中に含まれる分子間結合の約 3~10% を占めており (75)、植物におけるリグニン生合成初期段階で形成される主要な二量体化合物の一つである (13, 14)。これまでに、phenylcoumaran 型モデル化合物 dehydrodiconiferyl alcohol (DCA) の生分解に関する知見は *Fusarium solani* M-13-1 株及び *Sphingomonas paucimobilis* TMY1009 株において報告されている。M-13-1 株において、DCA は最初に B 環側鎖 C $\gamma$ 位がアルデヒドに変換された DCA-L を經由して B 環側鎖 C $\gamma$ 位がカルボン酸に酸化された DCA-C へと変換される (Fig. 12A) (71)。その後、DCA-C の B 環側鎖 C $\alpha$ -C $\beta$ 間で開裂が起きた後、5-acetylvanyillyl alcohol と vanillate へと変換されて代謝される。一方、TMY1009 株において、DCA は B 環側鎖 C $\gamma$ 位がカルボン酸に酸化された DCA-C へと変換さ

れた後、A 環側鎖 C $\gamma$ 位が脱離した DCA-S へと変換され、A 環側鎖 C $\alpha$ -C $\beta$ 開裂を受けて 5-formylferulate と vanillin へと変換されて代謝される (Fig. 12B) (72)。TMY1009 株においては DCA-S の A 環側鎖 C $\alpha$ -C $\beta$ 開裂活性を示す lignostilbene  $\alpha,\beta$ -dioxygenase が報告されているが、両株ともに DCA の詳細な代謝経路及び代謝に関わる他の酵素遺伝子の同定には至っていない。

*Sphingobium* sp. SYK-6 株は DCA の分解能を有するが、代謝経路及び代謝に関与する酵素遺伝子は明らかにされていない。第1章では、SYK-6 株における DCA の詳細な代謝経路を推定することを目的として、SYK-6 株の細胞抽出液を用いて DCA の代謝中間体を同定し、各反応段階について補因子要求性、酵素活性の誘導性、酵素の細胞内局在を調べた。

### 材料と方法

#### 供試菌、プラスミド、培養条件

SYK-6株はlysogeny broth (LB; 10 g/liter of bacto tryptone, 5 g/liter of yeast extract, and 5 g/liter of NaCl) もしくは Wx-SEMP (10 mM sucrose, 10 mM glutamate, 0.13 mM methionine, and 10 mM proline) 培地 (38) を用いて30°Cで培養した。振盪培養に

おける振盪速度はL字管での培養が160 rpm、バツフル付きフラスコでの培養は120 rpmとした。

#### 酵素、試薬、基質、遺伝子操作

各種酵素及び試薬の使用方法はそれぞれTakara Bio Inc. (Shiga, Japan), Tokyo Chemical Industry Co.

Ltd. (Tokyo, Japan), Toyobo Co. Ltd. (Osaka, Japan), Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Tokyo, Japan), Sigma Chemical Co. Ltd. (Missouri, USA), New England Biolabs Inc. (Massachusetts, USA) の取扱説明書に従って使用した。DCA, DCA-C, DCA-CC, DCA-S, 5-formylferulateは森林総合研究所の菱山正二郎博士から譲り受けたものを用いた。これらの基質は100 mMとなるようにdimethyl sulfoxide (DMSO) で溶解して-30°Cで保存した。基本的な遺伝子操作は、Molecular cloning (111) 及びバイオ実験イラストレイテッド第2巻 (112) に従った。

### HPLCの分析条件

High-performance liquid chromatography [HPLC; ACQUITY ultraperformance liquid chromatography (UPLC) system; Waters] 及びACQUITY TQ detector (Waters) を用いた分析条件を以下に示す。移動相は0.1%のギ酸を含むアセトニトリル25%と水75%として流速は0.3 ml/minで分析した。カラムはTSKgel ODS-140HTP column (2.1 by 100 mm; Tosoh) を使用した (76)。Electrospray ionization-mass spectrometry (ESI-MS) の検出はnegative-ion modeで行った。検出条件はcapillary voltage, 3.0 kv; cone voltage, 10-40 V; source temperature, 120°C; desolvation temperature, 350°C; desolvation gas flow rate, 650 liters/h; and cone gas flow rate, 50 liters/hで分析を行った (76)。

### SYK-6株の細胞抽出液の調製

SYK-6株をLBで24 h培養した培養液を5,000 × g, 15 min, 4°Cで遠心分離して集菌し、菌体をWx培地で洗浄してOD<sub>600</sub>が0.2となるようにWx-SEMP培地に植菌した。DCAで誘導をかける場合はOD<sub>600</sub>が0.5になるまで培養し、DCAを終濃度2 mMとなるように添加してさらに2 h培養した。培養液を

5,000 × g, 15 min, 4°Cの遠心分離して集菌し、菌体を50 mM Tris-HCl buffer pH 7.5 (buffer A) で洗浄した。Buffer Aで懸濁した菌体を超音波破碎機 (UD-201; Tomy Seiko Co. Ltd.) (36) によって細胞を破碎した。得られた菌体破碎液を19,000 × g, 15 min, 4°Cで遠心分離することにより不溶性画分を除き、上清を細胞抽出液として得た。細胞抽出液の一部については、限外ろ過フィルター (Amicon Ultra-0.5 mL Centrifugal Filters; Merck Millipore) を用いて3 kDa以下の画分を除去した。タンパク量の定量はProtein Assay Kit (Bio-Rad Laboratories Inc.) を用いた Bradford法で行い、標準タンパク質にはウシ血清アルブミン (Bio-Rad Laboratories Inc.) を用いた。

### DCA変換産物の同定

Buffer Aを用いて、「SYK-6株の細胞抽出液の調製」で得られた細胞抽出液 (DCA, 500 µg of protein/ml; DCA-C, 1.0 mg of protein/ml; DCA-CC, 100 µg of protein/ml) と100 µMのDCA, DCA-C, DCA-CCを500 µM NAD<sup>+</sup>の存在下または非存在下において30°Cで反応させた。DCA, DCA-C, DCA-CCとそれぞれ10 min, 60 min, 10 min反応させ、反応液にメタノールを等量加えて酵素反応を停止させた。反応液を19,000 × g, 15 min, 4°Cで遠心分離して不溶化したタンパク質を除き、上清を「HPLCの分析条件」に従ってLC-MSで分析した。DCA及びDCAの変換産物の検出は230 nmで行い、DCA-C、DCA-CC及び両基質の変換産物の検出は290 nmで行った。

### SYK-6株の細胞抽出液の画分

「SYK-6株の細胞抽出液の調製」で得られた細胞抽出液9 mlを120,000 × g, 60 min, 4°Cで超遠心した (Optima XPN-100; Beckman Coulter, Inc.)。得ら

## 第 1 章

れた上清 (約8 ml) と沈殿物をそれぞれ可溶性画分と膜画分とした。膜画分は1 mlのbuffer Aに懸濁した。タンパク量の定量はDC protein assay kit (Bio-Rad Laboratories Inc.) を用いたLowry法で行い、標準タンパク質にはウシ血清アルブミン (Bio-Rad Laboratories Inc.) を使用した。

### SYK-6株のDCA代謝に関わる酵素の活性測定

「SYK-6 株の細胞抽出液の調製」と「細胞抽出液の分画」に従って調製した細胞抽出液、可溶性画分、及び膜画分 (DCA, 300 µg of protein/ml; DCA-C, 500 µg of protein/ml; DCA-CC, 50 µg of protein/ml; DCA-S, 200 µg of protein/ml) と 100 µM の DCA 及び DCA-C を各補因子の存在下 [500 µM NAD<sup>+</sup>; 400 µM pyrroloquinoline quinone (PQQ) + 400 µM 1-methoxy-5-methylphenazinium methylsulfate

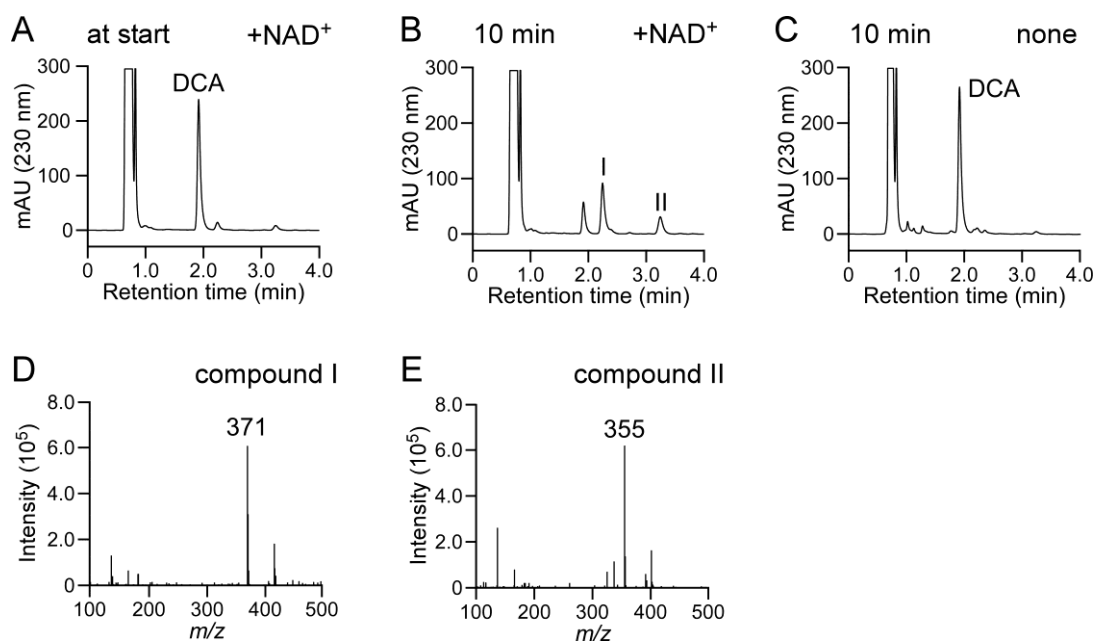
(PMS) + 3 mM CaCl<sub>2</sub>; 400 µM flavin adenine dinucleotide (FAD) + 400 µM PMS] または非存在下において反応させ、100 µM の DCA-CC 及び DCA-S は補因子を添加せずに反応させた。DCA, DCA-C, DCA-CC, DCA-S をそれぞれ 30°C で 10, 30, 5, 10 min 反応させ、methanol を等量加えて酵素反応を停止させた。反応液を 19,000 × g, 15 min, 4°C で遠心分離して得られた上清に終濃度 17% となるように 50% acetonitrile を加えて HPLC で分析した。「HPLC の分析条件」に従って分析を行い、DCA, DCA-C, DCA-CC, DCA-S の検出波長はそれぞれ 277, 327, 324, 323 nm とした。酵素活性の 1 unit (U) は、1 min 当たりに 1 µmol の基質を減少させる酵素量と定義し、酵素の比活性は U/mg of protein で表した。

## 結果

## 1. SYK-6 株による DCA 代謝産物の同定

SYK-6 株における DCA の詳細な代謝経路を推定するために、2 mM DCA 存在下で培養した SYK-6 株の細胞抽出液による DCA の変換産物の同定を行った。SYK-6 株の細胞抽出液 (500  $\mu\text{g}$  of protein/ml) と 100  $\mu\text{M}$  DCA を 10 min 反応させ、反応液を液体クロマトグラフィー-マスマスペクトロメトリー (LC-MS) で分析した。しかし、DCA の減少量が少なく、変換産物の同定には至らなかった (Fig. 13C)。そこで、500  $\mu\text{M}$   $\text{NAD}^+$  の存在下で SYK-6 株の細胞抽出液 (500  $\mu\text{g}$  of protein/ml) と 100  $\mu\text{M}$  DCA を 10 min 反応させ、反応液を LC-MS で分析した。その結果、

DCA の減少と保持時間 2.3 min (compound I) と 3.2 min (compound II) に反応産物のピークが検出された (Fig. 13A, B)。Compound I と DCA-C 標品の保持時間及び脱プロトン化イオンの  $m/z$  の比較から compound I は DCA-C であることが示された (Fig. 13D)。エレクトロスプレーイオン化法マスマスペクトロメトリー (ESI-MS) 分析 (ネガティブモード) の結果から compound II の脱プロトン化イオンの  $m/z$  は 355 であることが示され、compound II は DCA の B 環側鎖  $\text{C}_\gamma$  位アルコールがアルデヒドに酸化された DCA-L であると推定された (Fig. 13E)。以上の結果から、DCA は DCA-L を経由して DCA-C へと酸化されることが示唆された (Fig. 14)。



**Fig. 13.** SYK-6 株の細胞抽出液による DCA の変換。

DCA 存在下で培養した SYK-6 株の細胞抽出液 (500  $\mu\text{g}$  of protein/ml) を 500  $\mu\text{M}$   $\text{NAD}^+$  存在下または非存在下で 100  $\mu\text{M}$  DCA と 10 min 反応させ、反応液を LC-MS で分析した。HPLC 分析は検出波長 230 nm で行った。(A)  $\text{NAD}^+$  存在下における SYK-6 株細胞抽出液と DCA の反応直後の HPLC クロマトグラム。(B)  $\text{NAD}^+$  存在下における SYK-6 株細胞抽出液と DCA の反応 10 min 後の HPLC クロマトグラム。(C)  $\text{NAD}^+$  非存在下における SYK-6 株細胞抽出液と DCA の反応 10 min 後の HPLC クロマトグラム。(D, E) compound I 及び II のネガティブイオン ESI-MS スペクトル。

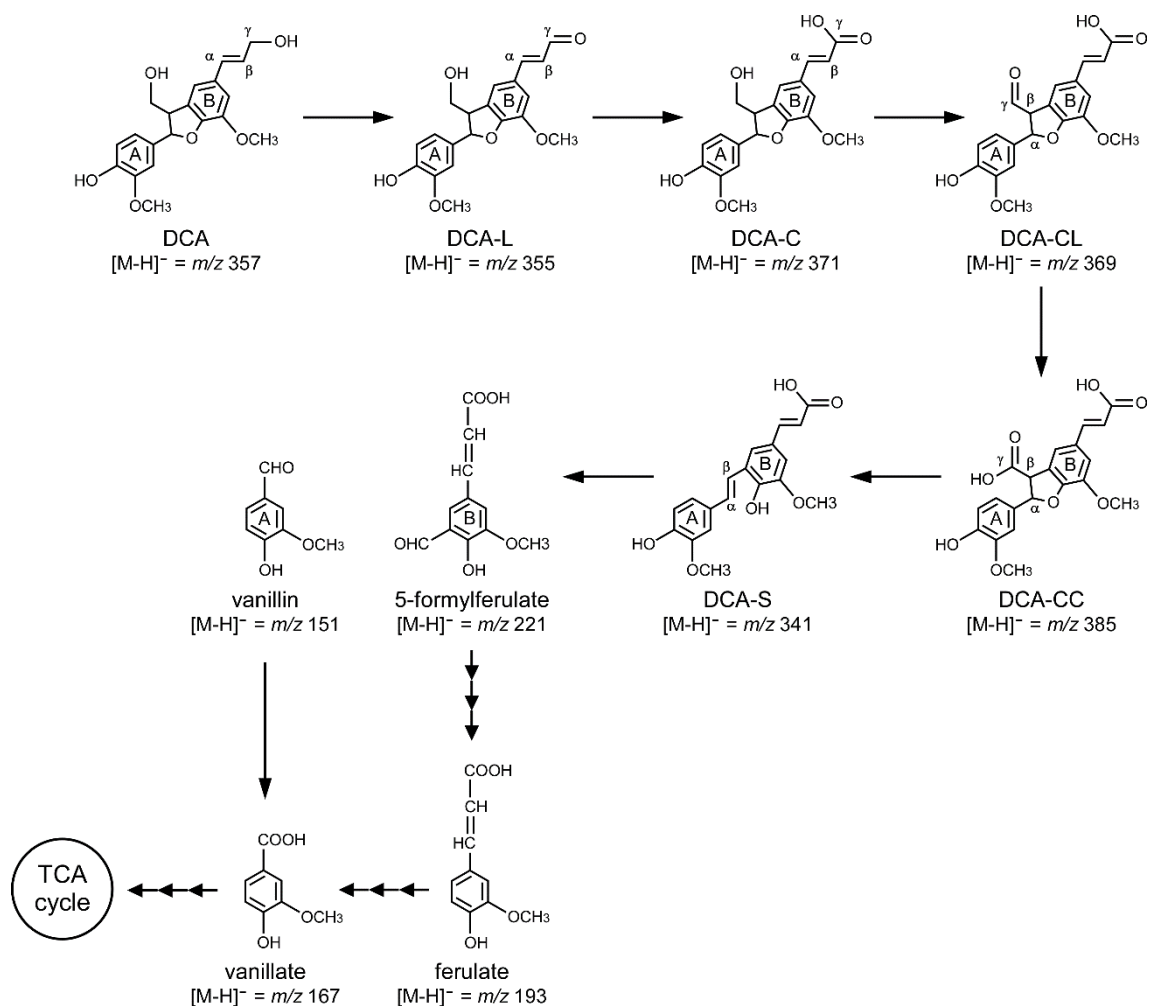


Fig. 14. SYK-6 株における DCA の代謝経路.

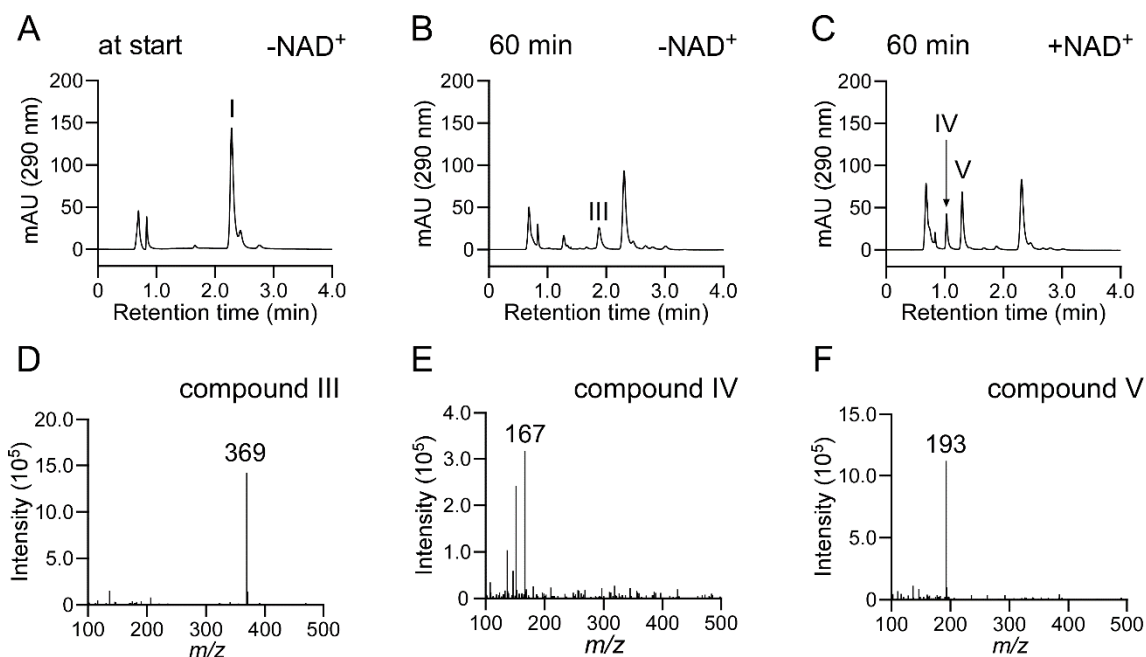
化合物名の下に DCA 及び各代謝物の脱プロトン化イオンの  $m/z$  を示す.

## 2. SYK-6 株による DCA-C 代謝産物の同定

DCA-C の変換産物を同定するために、2 mM DCA 存在下で培養した SYK-6 株の細胞抽出液を用いて DCA-C の分解実験を行った。限外ろ過によって 3 kDa 以下の低分子画分をほとんど除いた SYK-6 株の細胞抽出液 (1 mg of protein/ml) を 100  $\mu$ M DCA-C と 60 min 反応させ、LC-MS で分析した結果、保持時間 1.9 min に反応産物のピーク (compound III) が検出された (Fig. 15B)。ESI-MS 分析 (ネガティブモード) を行った結果、本化合物の脱プロトン化イ

オンの  $m/z$  は 369 であることが示され、compound III は DCA-C の A 環側鎖 C $\gamma$ 位アルコールがアルデヒドに酸化された DCA-CL であると推定された (Fig. 15D)。一方、限外ろ過した SYK-6 株の細胞抽出液 (1 mg of protein/ml) に 500  $\mu$ M NAD<sup>+</sup> を添加した場合、100  $\mu$ M DCA-C から保持時間 1.0 min (compound IV) と 1.3 min (compound V) のピークが検出された (Fig. 15C)。compound IV と compound V は標品の保持時間及び脱プロトン化イオンの  $m/z$  との比較から、それぞれ vanillate と ferulate であると同定された (Fig. 15E, F)。以上の結果から DCA-C





**Fig. 15.** 低分子画分を除いた SYK-6 株の細胞抽出液による DCA-C の変換.

DCA 存在下で培養した SYK-6 株の細胞抽出液から限外濾過によって低分子画分を除いた粗酵素 (1 mg of protein/ml) を 500  $\mu$ M NAD<sup>+</sup> 存在下または非存在下で 100  $\mu$ M DCA-C と 60 min 反応させ、反応液を LC-MS で分析した. HPLC 分析は検出波長 290 nm で行った. (A) NAD<sup>+</sup> 非存在下における SYK-6 株粗酵素と DCA-C の反応直後の HPLC クロマトグラム. (B) NAD<sup>+</sup> 非存在下における反応 60 min 後の HPLC クロマトグラム. (C) NAD<sup>+</sup> 存在下における反応 60 min 後の HPLC クロマトグラム. (D) compound III のネガティブイオン ESI-MS スペクトル. (E) compound IV のネガティブイオン ESI-MS スペクトル. (F) compound V のネガティブイオン ESI-MS スペクトル.

は補酵素の添加を必要としない酵素によって DCA-CL に変換され、その後、NAD<sup>+</sup> 依存性の aldehyde dehydrogenase (ALDH) によって酸化された後、vanillate と ferulate に分解されると推定された (Fig. 14)。

### 3. SYK-6 株による DCA-CC 代謝産物の同定

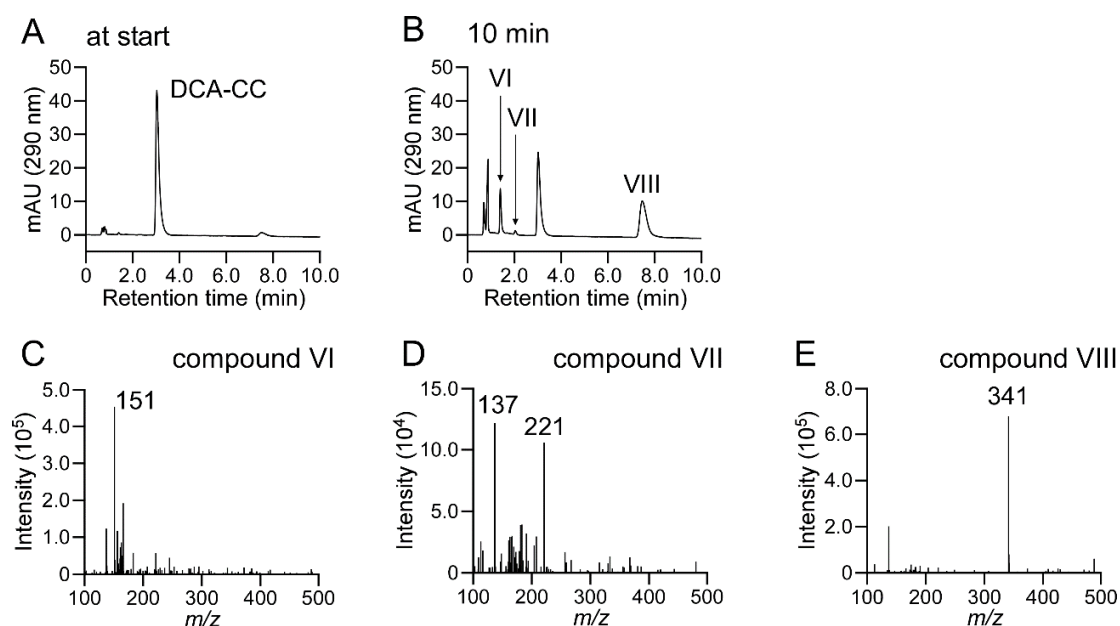
DCA-C は DCA-CL へと変換された後、vanillate と ferulate に変換されることが示されたが DCA-CL から vanillate 及び ferulate までの中間代謝物の同定には至っていない。しかしながら、限外ろ過によって低分子画分を除いた

SYK-6 株の細胞抽出液を DCA-C と反応させた場合に DCA-CL が生成したのに対して、NAD<sup>+</sup> 存在下においては vanillate 及び ferulate まで変換した。これらの結果から DCA-CL は NAD<sup>+</sup> 依存性の ALDH によって酸化されることが示唆された。この反応によって DCA-CL は A 環側鎖 C<sub>7</sub>位アルデヒドがカルボン酸に酸化された DCA-CC に変換されると予想された。そこで、DCA の中間代謝物と推定された DCA-CC の代謝経路を同定するために、2 mM DCA 存在下で培養した SYK-6 株の細胞抽出液 (100  $\mu$ g of protein/ml) と 100  $\mu$ M DCA-CC を 10 min 反応させ、反応液を LC-MS で分析した。その結果、

DCA-CC の減少と保持時間 1.4 min (compound VI) と 2.0 min (compound VII) 及び 7.5 min (compound VIII) に反応産物のピークが検出された (Fig. 16B)。compound VI と compound VII は標品の保持時間及び脱プロトン化イオンの  $m/z$  との比較から、それぞれ vanillin と 5-formylferulate であると同定された (Fig. 16C, D)。一方、compound VIII の保持時間と脱プロトン化イオンの  $m/z$  は DCA-CC の A 環側鎖 C $\gamma$ 位カルボン酸が脱離したスチルベン化合物である DCA-S 標品と一致した (Fig. 16E)。以上の結果から DCA-CC は A 環側鎖 C $\gamma$ 位が脱炭酸して DCA-S に変換された後、C $\alpha$ -C $\beta$  開裂を受けて vanillin と 5-formylferulate に変換されたことが

示唆された (Fig. 14)。また、DCA-C 及び DCA-S の変換産物としてそれぞれ ferulate と 5-formylferulate が観察されたことから、5-formylferulate は 5 位のホルミル基が脱離して ferulate に変換されると推定された。

*F. solani* M-13-1 株 及び *S. paucimobilis* TMY1009 株において DCA 変換の代謝経路が部分的に示されていたが、本研究では SYK-6 株における DCA 中間代謝物の解析をから Fig. 14 に示す DCA 代謝経路を推定した。本経路は基本的に TMY1009 株で報告された経路と同様であったが、本研究によって経路の詳細が明確となり関与する酵素系の推定が可能となった。



**Fig. 16.** SYK-6 株の細胞抽出液による DCA-CC の変換.

DCA 存在下で培養した SYK-6 株の細胞抽出液 (100  $\mu$ g of protein/ml) を 100  $\mu$ M DCA-CC と 10 min 反応させ、反応液を LC-MS で分析した. HPLC 分析は検出波長 290 nm で行った. (A) SYK-6 株細胞抽出液と DCA の反応直後の HPLC クロマトグラム. (B) 反応 10 min 後の HPLC クロマトグラム. (C) compound VI のネガティブイオン ESI-MS スペクトル. (D) compound VII のネガティブイオン ESI-MS スペクトル. (E) compound VIII のネガティブイオン ESI-MS スペクトル.

#### 4. DCA 代謝に関与する酵素の特性

SYK-6 株の DCA 代謝に関わる酵素の特性を知るために、SYK-6 株における DCA、DCA-C、DCA-CC、DCA-S に対する変換活性の誘導性について調査を行った。また、DCA と DCA-C の変換への  $\text{NAD}^+$ 、pyrroloquinoline quinone (PQQ) + 1-methoxy-5-methylphenazinium methylsulfate (PMS)、flavin adenine dinucleotide (FAD) + PMS の添加効果を調べた。DCA 存在下または非存在下で培養した SYK-6 株の細胞抽出液 (300  $\mu\text{g}$  of protein/ml) を上述の各補因子の存在下で DCA と反応させ変換能を調べた。その結果、DCA 存在下で培養した SYK-6 株の細胞抽出液の DCA に対する変換活性は、 $\text{NAD}^+$  を添加した時に最も高い 170 mU の活性を示し、PQQ + PMS または FAD + PMS を添加した場合には  $\text{NAD}^+$  添加時の 35~43% の比活性が観察された (Table 3)。また、 $\text{NAD}^+$  添加時の活性は DCA の存在、非存在下で培養した細胞において同等であったことから、 $\text{NAD}^+$  依存性の DCA 酸化酵素をコードする遺伝子は構成的に発現していることが示唆された。

DCA-C (100  $\mu\text{M}$ ) に対する SYK-6 株の細胞抽出液 (500  $\mu\text{g}$  of protein/ml) の比活性は、FAD + PMS 添加時に有意な活性化が観察された (Table 3)。DCA 存在下で培養した細胞由来の抽出液の FAD + PMS 存在下における DCA-C 変換活性は、DCA 非存在下で培養した細胞由来の抽出液と比較して約 1.7 倍高かった (Table 3)。この結果から、DCA 培養下で DCA-C 変換活性は低いレベルで誘導されることが示唆された。また、DCA-C 存在下で培養した場合においても DCA-C 変換活性が誘導されることが示された。DCA-CC と DCA-S の変換活性は、DCA 存在下

で培養した場合にそれぞれ約 1.8 倍と 1.3 倍に活性化された。

#### 5. DCA 代謝に関与する酵素の局在

DCA 代謝に関与する酵素の局在性を明らかにするために、SYK-6 株の細胞抽出液を超遠心により可溶性画分と沈殿画分 (膜画分) に分画した。その結果、可溶性画分と膜画分は質量比で全タンパク質のそれぞれ 75% 及び 9.4% と算出された。細菌における一般的な膜タンパク質の量比は 20~30% であり、本研究において分画された膜画分の割合は低い値であった。超遠心による分画後、上清と沈殿画分の間に中間層が生成していたことから、細胞外多糖の存在により膜画分の一部が完全に沈殿しなかったために膜タンパク質の収率が低下したものと推定された。

DCA 変換活性が細胞質と細胞膜のどちらに存在しているかを調べるために、10 mg の細胞抽出液に含まれる可溶性画分 (7.5 mg) と膜画分 (0.94 mg) の DCA、DCA-C、DCA-CC、DCA-S に対する活性を比較した。その結果、DCA 変換活性は可溶性画分に  $\text{NAD}^+$  を添加した時の活性が主要であることが示され (Table 3)、細胞質に局在する酵素が DCA の酸化に主要な役割を果たすことが示唆された。一方、FAD + PMS 添加時の DCA-C 変換活性は可溶性画分と膜画分の両方で観察され (Table 3)、分画の際に膜画分の一部が回収できなかったことを考慮すると、DCA-C 変換酵素が細胞質と細胞膜に同等に存在すると考えられた。また、DCA-CC 及び DCA-S の変換活性はいずれも可溶性画分のみ検出され (Table 3)、これら酵素が細胞質に存在することが示唆された。

第 1 章

**Table 3.** SYK-6株の細胞抽出液，可溶性画分，膜画分のDCAとDCA誘導体に対する変換活性

Substrate	Fraction	Cofactor	Activity <sup>a</sup> (mU)		
			SEMP	SEMP + DCA	SEMP + DCA-C
DCA	Cell extract	None	21 ± 7	36 ± 3	46 ± 10
		NAD <sup>+</sup>	160 ± 2	170 ± 2	140 ± 1
		PQQ + PMS	61 ± 2	59 ± 0.6	56 ± 0.2
		FAD + PMS	43 ± 0.8	73 ± 3	74 ± 4
	Soluble	None	5.7 ± 3	11 ± 6	– <sup>c</sup>
		NAD <sup>+</sup>	110 ± 2	120 ± 2	–
		PQQ + PMS	20 ± 0.4	16 ± 2	–
		FAD + PMS	15 ± 3	16 ± 1	–
	Membrane	None	6.8 ± 0.4	12 ± 0.4	–
		NAD <sup>+</sup>	6.3 ± 0.1	13 ± 0.7	–
		PQQ + PMS	18 ± 0.2	18 ± 0.1	–
		FAD + PMS	9.4 ± 0.3	21 ± 0.8	–
DCA-C	Cell extract	None	3.5 ± 0.4	14 ± 0.8	6.0 ± 0.6
		NAD <sup>+</sup>	2.4 ± 1	14 ± 0.2	6.4 ± 1
		PQQ + PMS	3.2 ± 0.5	16 ± 0.3	9.1 ± 2
		FAD + PMS	19 ± 0.6	32 ± 0.4	27 ± 0.7
	Soluble	None	ND <sup>b</sup>	1.7 ± 0.2	–
		NAD <sup>+</sup>	ND	1.4 ± 0.5	–
		PQQ + PMS	1.3 ± 0.3	3.0 ± 0.1	–
		FAD + PMS	5.3 ± 0.6	6.9 ± 0.2	–
	Membrane	None	0.8 ± 0.04	3.0 ± 0.1	–
		NAD <sup>+</sup>	0.7 ± 0.05	3.1 ± 0.08	–
		PQQ + PMS	0.8 ± 0.1	3.2 ± 0.05	–
		FAD + PMS	2.4 ± 0.02	3.8 ± 0.07	–
DCA-CC	Cell extract	None	1300 ± 30	2400 ± 70	2200 ± 100
	Soluble	None	1300 ± 20	2100 ± 10	–
	Membrane	None	ND	ND	–
DCA-S	Cell extract	None	180 ± 40	240 ± 20	–
	Soluble	None	130 ± 8	190 ± 20	–
	Membrane	None	ND	4.1 ± 2	–

<sup>a</sup> SYK-6 株の細胞抽出液 (10 mg of protein)とそこに含まれる可溶性画分 (7.5 mg of protein) と膜画分 (0.94 mg of protein)の酵素活性をそれぞれ mU/10 mg of protein, mU/7.5 mg, mU/0.94 mg として示す. それぞれの値は 3 回測定した平均値を示す. ± は標準偏差を示す.

<sup>b</sup> ND, not detected.

<sup>c</sup> (–), not tested.

## 考察

SYK-6 株の細胞抽出液を用いた DCA の変換実験において、補酵素の非存在下では DCA の変換活性が低く変換産物がほとんど生成しなかった。しかし  $\text{NAD}^+$  の存在下では DCA-L と DCA-C の生成が観察された (Fig. 13B, C)。これらの結果から DCA は、最初に B 環側鎖  $\text{C}_\gamma$  位アルコールがアルデヒドに酸化された DCA-L に変換され、続いてカルボン酸へと酸化された DCA-C を生成すると推定された。また少なくとも DCA の酸化には  $\text{NAD}^+$  依存性の酵素が関与することが予想された。

DCA-C と限外ろ過によって 3 kDa 以下の低分子画分を除いた SYK-6 株の細胞抽出液を反応させた結果、DCA-C の A 環側鎖  $\text{C}_\gamma$  位がアルデヒドに酸化された DCA-CL の生成が観察された (Fig. 15B)。さらに同反応を  $\text{NAD}^+$  存在下において行ったところ、vanillate と ferulate が生成した (Fig. 15C)。これらの結果から DCA-C は DCA-CL に変換され、その反応には補因子の添加を必要としない酵素が関与することが示唆された。また、A 環側鎖  $\text{C}_\gamma$  位がカルボン酸に酸化された DCA-CC の生成は観察されなかったが、DCA-CL が  $\text{NAD}^+$  の存在下で変換を受けたことから、DCA-CL が  $\text{NAD}^+$  を補酵素とする ALDH によって DCA-CC に酸化されて代謝されることが予想された。DCA-CC は SYK-6 株の細胞抽出液によってスチルベン型化合物である DCA-S 及び vanillin と 5-formylferulate へと変換されることが示され (Fig. 16)、これらの反応は補因子の添加を必要としなかった。

以上の結果から SYK-6 株において DCA は、Fig. 14 に示す経路で代謝されることが強く示唆された。本経路において、i) DCA は初めに B

環側鎖  $\text{C}_\gamma$  位がアルデヒドに酸化された DCA-L に酸化される。ii) DCA-L は B 環側鎖  $\text{C}_\gamma$  位がカルボン酸に酸化された DCA-C に酸化される。iii) DCA-C は A 環側鎖  $\text{C}_\gamma$  位がアルデヒドに変換された DCA-CL に酸化される。iv) DCA-CL は A 環側鎖  $\text{C}_\gamma$  位がカルボン酸に酸化された DCA-CC に酸化される。v) DCA-CC は脱炭酸を受けて DCA-S に変換される。vi) DCA-S は A 環側鎖の  $\text{C}_\alpha$ - $\text{C}_\beta$  開裂を受けて vanillin と 5-formylferulate に変換される。vii) 5-formylferulate は 5 位のホルミル基が脱離して ferulate へと変換される。*F. solani* M-13-1 株において DCA は DCA-L を経由して DCA-C へと変換されるが、その後、DCA-C の B 環側鎖の  $\text{C}_\alpha$ - $\text{C}_\beta$  開裂を受けて代謝されることが示唆されており (71)、SYK-6 株とは異なる代謝経路と考えられた。一方、*S. paucimobilis* TMY1009 株において DCA は、DCA-C を経由して DCA-S へと変換され、vanillin と 5-formylferulate に変換されて代謝されることが示されており (72)、SYK-6 株と同一の代謝経路であると考えられた。

本章では SYK-6 株の細胞抽出液及び細胞抽出液を分画して調製した可溶性画分と膜画分を用いて各反応段階に関与する酵素の細胞内局在性を調べるとともに、DCA 及び DCA-C の変換については補因子要求性について調査を行った。DCA の変換活性を  $\text{NAD}^+$ 、PQQ + PMS、FAD + PMS 存在下で比較したところ、 $\text{NAD}^+$  存在時に PQQ + PMS または FAD + PMS 存在時と比較して 2.6~3.7 倍の比活性を示した (Table 3)。このことから SYK-6 株における DCA の変換は、主に  $\text{NAD}^+$  依存性の酵素が関与することが示唆された。さらに、 $\text{NAD}^+$  依存性の DCA 変換酵素

は細胞質に局在すること、PQQ 及び FAD 依存の変換活性は可溶性画分と膜画分の両方に局在することが示唆された。また、NAD<sup>+</sup>及び PQQ 依存性の DCA 変換酵素遺伝子は構成的に発現していることが示唆された。

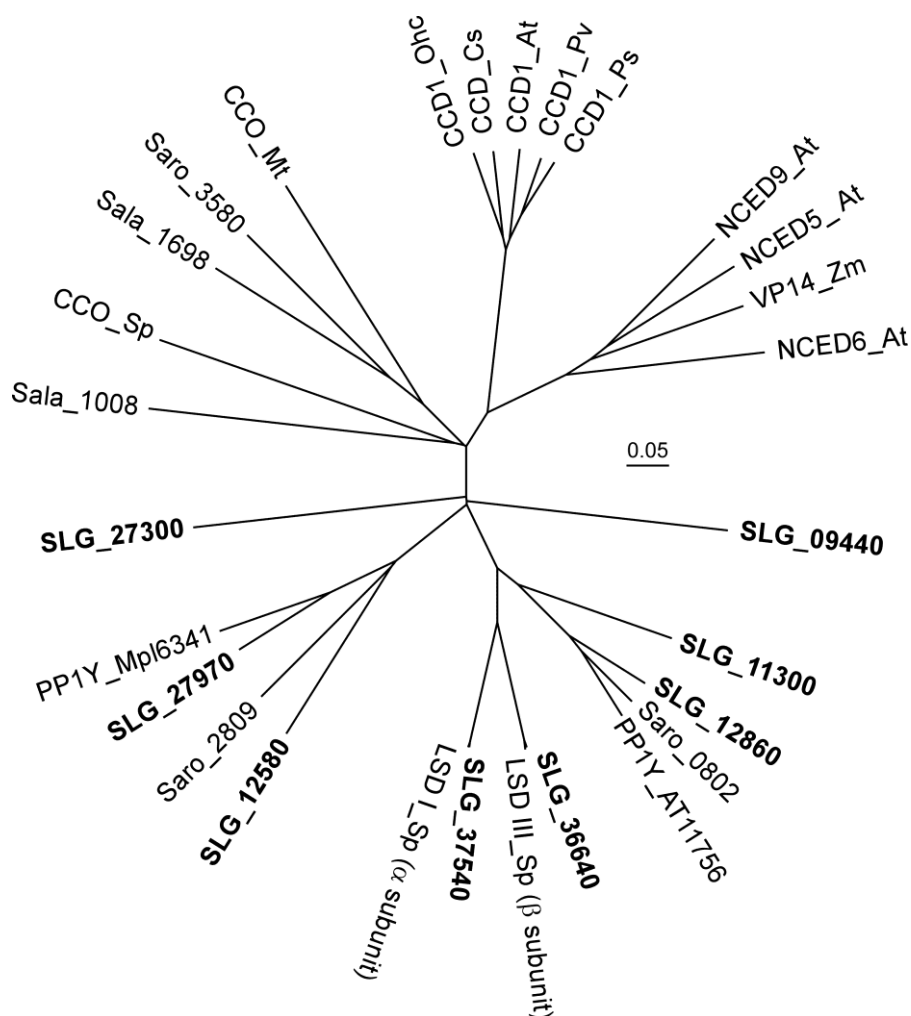
DCA-C の変換は、FAD + PMS を添加した場合にのみ活性の上昇 (2.3 倍) が観察された (Table 3)。これらの結果から、DCA-C の変換には FAD 要求性の oxidoreductase が関与することが予想された。また、本酵素は膜と細胞質の両者に局在することが示唆され、DCA または DCA-C 存在下での培養時に低いレベルで誘導されることが示された (Table 3)。

DCA-CC 変換活性は、補因子の非存在下で可溶性画分に検出されたことから、DCA-CC 変換酵素は、補因子の添加を必要としない細胞質に存在する酵素であることが示唆された (Table 3)。また本酵素は DCA または DCA-C の存在下での培養時に低いレベルで誘導されることが示された (Table 3)。

DCA-S 変換活性も補因子の非存在下で可溶性画分に検出されたことから、補因子の添加を必要としない細胞質に存在する酵素であることが示唆された (Table 3)。また、本酵素も DCA-C 及び DCA-CC 変換酵素と同様に DCA の存在

下での培養時に低いレベルで誘導されることが示された (Table 3)。*S. paucimobilis* TMY1009 株における DCA-S の変換には、lignostilbene  $\alpha,\beta$ -dioxygenase (LSD) が関与することが示唆されている (73, 74)。TMY1009 株には  $\alpha\alpha$ 、 $\alpha\beta$ 、 $\beta\beta$ 、 $\gamma\gamma$  サブユニットから構成される 4 種の LSD の存在が報告されており、 $\beta\beta$  及び  $\gamma\gamma$  から構成される酵素が DCA-S に対して高い変換能を示すことが報告されている (73, 74)。しかし、実際に DCA-S の変換に関与する酵素遺伝子は明らかにされていない。TMY1009 株の LSD の内、 $\alpha$  サブユニット (Q53353) と  $\beta$  サブユニット (Q52008) をコードする遺伝子の塩基配列が明らかにされており (77, 78)、SLG\_37540 及び SLG\_36640 が  $\alpha$  サブユニットと  $\beta$  サブユニットのそれぞれに 98% 以上のアミノ酸配列相同性を示した。加えて SYK-6 株のゲノム中には、SLG\_37540 及び SLG\_36640 以外にも TMY1009 株の LSD  $\alpha$  サブユニット及び  $\beta$  サブユニットと 35~58% のアミノ酸配列相同性を示す 6 つの遺伝子が存在することが示された (Fig. 17)。今後、SYK-6 株の LSD 遺伝子の破壊株を作製し、DCA-S の変換に関与する遺伝子を明らかにしていく必要がある。

第1章



**Fig. 17.** 既知または推定のlignostilbene α,β-dioxygenaseとcarotenoid dioxygenaseの系統樹。

Lignostilbene α,β-dioxygenases : LSD I\_Sp, lignostilbene α,β-dioxygenase isozyme I of *S. paucimobilis* TMY 1009 (Q53353); LSD III\_Sp, lignostilbene α,β-dioxygenase isozyme III of TMY 1009 (Q52008). Carotenoid dioxygenases : VP14\_Zm, 9-*cis*-epoxycarotenoid dioxygenase of *Zea mays* (O24592); NCED5\_At, 9-*cis*-epoxycarotenoid dioxygenase of *Arabidopsis thaliana* (Q9C6Z1); NCED9\_At, 9-*cis*-epoxycarotenoid dioxygenase of *A. thaliana* (Q9M9F5); CCD1\_Ps, carotenoid 9,10 (9',10')-cleavage dioxygenase of *Pisum sativum* (Q8LP17); CCD\_Cs, carotenoid 9,10 (9',10')-cleavage dioxygenase of *Crocus sativus* (Q84KG5); CCD1\_Pv, carotenoid 9,10 (9',10')-cleavage dioxygenase 1 of *Phaseolus vulgaris* (Q94IR2); CCD1\_At, carotenoid 9,10 (9',10')-cleavage dioxygenase 1 of *A. thaliana* (O65572); CCD1\_Ohc, carotenoid 9,10 (9',10')-cleavage dioxygenase 1 of *Oncidium hybrid cultivar* (C3VEQ4); CCO\_Mt, carotenoid 13,14/15,15'-oxygenase of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (P9WPR5); CCO\_Sp, 8'-apo-β-carotenal 15,15'-oxygenase of *Synechocystis* sp. PCC 6803 (P74334). Putative lignostilbene α,β-dioxygenases and carotenoid dioxygenases: SLG\_09440, SLG\_11300, SLG\_12860, SLG\_36640, SLG\_37540, SLG\_12580, SLG\_27970 and SLG\_27300 of *Sphingobium* sp. SYK-6; Saro\_0802, Saro\_2809 and Saro\_3580 of *Novosphingobium aromaticivorans* DSM 12444; PP1Y\_AT11756 and PP1Y\_Mpl6341 of *Novosphingobium* sp. PP1Y; Sala\_1008 and Sala\_1698 of *Sphingopyxis alaskensis*.

## 第2章 DCA 及び DCA-L 変換酵素遺伝子の同定と機能解析

## 緒言

第1章の解析から、SYK-6株においてDCAがFig. 14に示される経路で代謝されることが強く示唆された。本章では、DCA代謝に関与する酵素遺伝子を解明するための第一歩として、DCA及びDCA-Lの変換に関与する酵素遺伝子の同定を試み、各遺伝子の機能解析を行った。

第1章のSYK-6株の細胞抽出液を用いたDCAの変換実験において、DCAのDCA-Lへの変換活性はNAD<sup>+</sup>を添加した場合に顕著に高いことが示された。また、NAD<sup>+</sup>要求性の本酵素活性は細胞質に局在し、DCA培養時に誘導されなかったことから、これらの酵素遺伝子は構成的に発現していることが示唆された。また、PQQ + PMS または FAD + PMS を添加した時においてもDCA変換活性の促進が観察された。これらの結果からDCAの変換にはNAD<sup>+</sup>を要求するdehydrogenaseを中心にPQQまたはFAD

及び電子受容体を必要とする酵素が関与することが予想された。一方、DCA-LはB環側鎖C $\gamma$ 位のアルデヒドがカルボン酸に酸化されたDCA-Cに変換されることが示された。SYK-6株の細胞抽出液を用いたDCAの変換において、NAD<sup>+</sup>の存在下でDCAはDCA-Lを経由してDCA-Cに変換されたことから、本反応にNAD<sup>+</sup>依存性のaldehyde dehydrogenase (ALDH)が関与すると予想した。

本章ではDCA変換酵素遺伝子を単離するために、SYK-6株の遺伝子ライブラリーからスクリーニングを行い、単離した酵素遺伝子及びそれらのホモログについて機能解析を行った。また、DCA-L変換酵素遺伝子を同定するために、以前作製されたSYK-6株のALDH遺伝子発現ライブラリーを用いて、DCA-Lの変換活性を調査した。

## 材料と方法

## 供試菌、プラスミド、培養条件

第2章で使用した菌株とプラスミドはTable 4に示した。SYK-6株の培養は第1章と同様に行った。遺伝子破壊株はLB培地を用いて30°Cで培養した。*Pseudomonas putida* PpY1100株はLBを用いて30°Cで培養した。必要に応じてkanamycin (Km) 及び

nalidixic acid (Nal) をそれぞれ50 mg/lと25 mg/lで使用した。*E. coli*はLBを用いて37°Cで培養した。*E. coli*の形質体の選択培地に加える抗生物質濃度は、ampicillin (Ap) とKmをそれぞれ100 mg/lと25 mg/lとした。



## 第2章

**Table 4.** 第2章で使用した菌株及びプラスミド

Strain or plasmid	Relevant characteristic(s) <sup>a</sup>	Reference or source
<i>Sphingobium</i> sp.		
SYK-6	Wild type; NaI <sup>r</sup> Sm <sup>r</sup>	(79)
SME044	SYK-6 derivative; <i>bzaA::bla</i> ; NaI <sup>r</sup> Sm <sup>r</sup> Ap <sup>r</sup>	(80)
<i>Pseudomonas putida</i>		
PpY1100	NaI <sup>r</sup> Sm <sup>r</sup>	(79)
<i>E. coli</i>		
BL21(DE3)	F <sup>-</sup> <i>ompT hsdSB</i> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) <i>gal dcm</i> (DE3); T7 RNA polymerase gene under control of the <i>lacUV5</i> promoter	(81)
HB101	<i>recA13 supE44 hsd20 ara-14 proA2 lacY1 galK2 rpsL20 xyl-5 mtl-1</i>	(82)
NEB 10-beta	$\Delta$ ( <i>ara-leu</i> ) 7697 <i>araD139 fhuA</i> $\Delta$ <i>lacX74 galK16 galE15 e14-<math>\phi</math>80dlacZ<math>\Delta</math>M15 recA1 relA1 endA1 nupG rpsL</i> (Sm <sup>r</sup> ) <i>rph spoT1</i> $\Delta$ ( <i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i> )	New England Biolabs
Plasmids		
pVK100	Broad-host-range cosmid vector; Km <sup>r</sup> Tc <sup>r</sup>	(83)
pRK2013	Tra <sup>+</sup> Mob <sup>+</sup> ColE1 replicon; Km <sup>r</sup>	(84)
pBluescript II KS(+)	Cloning vector; Ap <sup>r</sup>	(85)
pT7Blue	Cloning vector; Ap <sup>r</sup>	Novagen
pET-16b	Expression vector; T7 promoter, Ap <sup>r</sup>	Novagen
pCold-TF	Expression vector; <i>cspA</i> promoter, Ap <sup>r</sup>	Takara Bio
pV39	pVK100 with partially SalI-digested fragments of SYK-6 carrying SLG_24930	This study
pV44	pVK100 with partially SalI-digested fragments of SYK-6 carrying SLG_05620	This study
pV66	pVK100 with partially SalI-digested fragments of SYK-6 carrying SLG_05620	This study
pV82	pVK100 with partially SalI-digested fragments of SYK-6 carrying SLG_24930	This study
pV123	pVK100 with partially SalI-digested fragments of SYK-6 carrying SLG_24930	This study
pKS66-15	pBluescript II KS(+) with 1.5-kb SalI fragment carrying SLG_05620 from pV66	This study
pKS82-09	pBluescript II KS(+) with 0.9-kb SalI fragment carrying SLG_24930 from pV82	This study
pKS82-12	pBluescript II KS(+) with 1.2-kb SalI fragment carrying SLG_24930 from pV82	This study
pT04410	pT7Blue with a 2.0-kb PCR-amplicon carrying SLG_04410	This study
pT05620	pT7Blue with a 2.2-kb PCR-amplicon carrying SLG_05620	This study
pT07280	pT7Blue with a 2.2-kb PCR-amplicon carrying SLG_07280	This study
pT12260S	pT7Blue with a 0.8-kb BamHI fragment of a PCR-amplicon carrying SLG_12260	This study
pT12260L	pT7Blue with a 1.3-kb NdeI-BamHI fragment of a PCR-amplicon carrying SLG_12260	This study
pT09420	pT7Blue with a 1.2-kb PCR-amplicon carrying SLG_09420	This study
pT09790	pT7Blue with a 1.2-kb PCR-amplicon carrying SLG_09790	This study
pT24930	pT7Blue with a 1.2-kb PCR-amplicon carrying SLG_24930	This study
pT24940	pT7Blue with a 1.1-kb PCR-amplicon carrying SLG_24940	This study
pCTF04410	pCold-TF with a 2.0-kb NdeI-BamHI fragment carrying SLG_04410 from pT04410	This study
pCTF05620	pCold-TF with a 2.2-kb NdeI-BamHI fragment carrying SLG_05620 from pT05620	This study
pCTF07280	pCold-TF with a 2.2-kb NdeI-BamHI fragment carrying SLG_07280 from pT07280	This study
pCTF12260	pCold-TF with a 2.1-kb NdeI-BamHI fragment carrying SLG_12260 from pT12260S and pT12260L	This study
pET09420	pET-16b with a 1.2-kb NdeI-BamHI fragment carrying SLG_09420 from pT09420	This study
pET09790	pET-16b with a 1.2-kb NdeI-BamHI fragment carrying SLG_09790 from pT09790	This study
pET24930	pET-16b with a 1.2-kb NdeI-BamHI fragment carrying SLG_24930 from pT24930	This study
pET24940	pET-16b with a 1.1-kb NdeI-BamHI fragment carrying SLG_24940 from pT24940	This study

<sup>a</sup> NaI<sup>r</sup>, Sm<sup>r</sup>, Ap<sup>r</sup> and Km<sup>r</sup>, resistance to nalidixic acid, streptomycin, ampicillin and kanamycin, respectively.

### 酵素、試薬、基質、遺伝子操作

各種酵素及び試薬の使用方法は第1章で示したメーカーの取扱説明書に従った。基本的な遺伝子操作は、第1章と同様に行った。

### 三親接合による宿主への遺伝子導入

宿主の *P. putida* PpY1100株、ヘルパープラスミド pRK2013を持つ *E. coli* HB101株、及びコスミドベクター pVK100に構築した SYK-6株の SalI 遺伝子ライブラリーを持つ *E. coli* HB101株をそれぞれ選択培地で培養した。各菌体を LB に 1% (vol/vol) 植

## 第2章

菌してOD<sub>600</sub>が0.5になるまで培養した。各培養液を1 mlずつ混合し、ニトロセルロースメンブレン (0.45  $\mu\text{m}$  by 22 mm; Advantec) に菌体を捕集した。メンブレンをLB寒天培地上に菌体を捕集した面が上になるように置いて30°Cで4 h培養した。メンブレンに捕集した菌体を1 mlのLBで懸濁してKmとNalを含むLB寒天培地に塗布して接合伝達体を選択した。

### サザンハイブリダイゼーション解析

サザンハイブリダイゼーション解析は、DIG DNA labeling kit 及び DIG nucleic acid detection kit (Roche Diagnostics) の説明書に従って行った。

破壊株の全DNAもしくはDCA分解活性を示した形質転換体から単離したコスミドを制限酵素処理後に0.8%アガロースゲル電気泳動で分離し、脱プリン及びアルカリ処理を行った。その後、ゲルからバキュームブロッター (model 785; Bio-Rad Laboratories Inc.) を用いてナイロンメンブレン (Hybond-N<sup>+</sup>; GE Healthcare) にDNAを転写した。メンブレンを風乾し、UVを5 min照射してDNAをメンブレンに固定した。プレハイブリダイゼーションを65°Cで1 h行った。DIG DNA labeling Kitを用いたランダムプライマー法により目的のDNA断片をジゴキシゲニン標識してプローブを作製した。プローブを添加して65°Cで8 h以上ハイブリダイゼーションを行い、メンブレン上のDNAを標識した。メンブレンを洗浄液1 (300 mM NaCl, 30 mM Na-citrate $\cdot$ 2H<sub>2</sub>O, 0.1% SDS) で2回洗浄した後、洗浄液2 (15 mM NaCl, 1.5 mM Na-citrate $\cdot$ 2H<sub>2</sub>O, 0.1% SDS) を用いて65°Cで2回洗浄した。buffer 1 (pH7.5; 0.1 M maleate, 0.15 M NaCl) でメンブレンを洗浄した後、buffer 2 (buffer 1 + 10% blocking stock solution) によりブロッキング処理をした。酵素標識抗体 (Anti-Digoxigenin-AP-conjugate) を含

むbuffer 2にメンブレンを浸して酵素免疫測定法 (ELISA法) によりメンブレン上のDNAを標識した。メンブレンをbuffer 1で洗浄して未反応の抗体を除去した後、buffer 3 (pH9.5; 0.1 M Tris-HCl, 0.1 M NaCl, 50 mM MgCl<sub>2</sub>) で平衡化した。発光基質 CDP-Star (Roche Diagnostics) を添加してalkaline phosphatase反応によってメンブレン上のシグナルを化学発光検出解析装置 (LumiVisionPro 140 EX; TAITEC) で検出した。

### 塩基配列の決定

塩基配列の決定は、CEQ Dye Terminator Cycle Sequencing (DTCS)-Quick Start Kit (Beckman Coulter, Inc.) を用いてサンプルの調製を行い、CEQ 2000XL genetic analysis system (Beckman Coulter, Inc.) を使用した。シークエンス解析にはMacVector (MacVector, Inc.) を用いた。相同性検索はNational Center for Biotechnology InformationのBLASTP program (86) を使用した。マルチプルアライメントとペアワイズアライメントにはそれぞれEMBL-EBIのClustalW2 (87) 及びEMBOSS program (88) を利用した。

### DCA変換酵素遺伝子のスクリーニング

「三親接合による宿主への遺伝子導入」により得られた300株の形質転換体を50  $\mu\text{M}$  DCAとKmを含む1/5 LB (2.0 g/l bacto tryptone, 1.0 g/l yeast extract, 5 g/l NaCl) において1,500 rpm, 30°Cで培養した。培養12 h後、培養液を19,000  $\times$  g, 15 min, 4°Cの遠心分離によって菌体を除き、得られた上清を「HPLCの分析条件」に従ってHPLCで分析した。DCA分解活性を示した形質転換体から単離したコスミドをSalIで消化して「サザンハイブリダイゼーション解析」に従ってサザン解析を行った。プローブには各コスミドのSalI消化断片を用いた。

サザン解析で交雑が見られた SalI 断片を pBluescript II KS(+) にサブクローニングして「シーケンス解析」に従って各 SalI 断片の塩基配列を決定した。

### SLG\_05620及びSLG\_24930ホモログの発現プラスミドの構築

SYK-6 株の total DNA を鋳型として quinohemoprotein ADH をコードする SLG\_05620 と相同性を有する SLG\_04410, SLG\_05620, SLG\_07280 と aryl ADH をコードする SLG\_24930 と相同性を有する SLG\_09420, SLG\_09790, SLG\_24940 を増幅するプライマー (Table 5) 及び PrimeSTAR GXL DNA Polymerase (Takara Bio Inc.) を用いた PCR によって 5'末端に NdeI 部位を、そして 3'末端に BamHI 部位を付加した各遺伝子の全長を含む DNA 断片を得た。得られた増幅断片を NdeI-BamHI で消化して pT7Blue の同部位に挿入し、pT04410, pT05620, pT07280, pT09420, pT09790, pT24930, pT24940 を作製した。各プラスミドに導入した遺伝子の塩基配列は「シーケンス解析」に従って確認した。SLG\_05620 のホモログは pCold-TF の NdeI-BamHI 部位に挿入して pCTF04410, pCTF05620, pCTF07280 を取得した。SLG\_24930 のホモログは pET-16b の NdeI-BamHI 部位に挿入して pET09420, pET09790, pET24930, pET24940 を得た。SLG\_12260 は遺伝子領域内部に BamHI サイトが存在したため、PCR 増幅産物を NdeI-BamHI 消化し、pT7Blue を NdeI-BamHI 消化したプラスミドと BamHI 消化したプラスミドにそれぞれ挿入して pT12260L と pT12260S を作製した。塩基配列の確認後、それぞれのプラスミドから遺伝子断片を切り出し、pCold-TF に挿入して pCTF12260 を作製した。

### SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動

遺伝子の発現及び変性条件下での分子量測定は、濃縮ゲル5%、分離ゲル12%のSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) によって行った。煮沸により変性させた10 µgの細胞抽出液を100 Vの定電圧で120 min泳動した。泳動終了後にゲルを染色液 [0.1% (wet/vol) Coomassie Brilliant Blue R-250, 50% methanol, 5% acetate] に浸して室温で30~60 min振とうした。ゲルを純水で洗浄後、脱色液 (40% methanol, 10% acetate) に浸して室温で脱色した。分子量マーカータにはSharp Pre-stained Protein Standard (invitrogen) とFull-Range Rainbow Molecular Weight Markers (GE Healthcare) を用いた。

### 大腸菌を宿主に用いた SLG\_05620 及び SLG\_24930ホモログの発現

Quinohemoprotein ADHをコードするSLG\_05620のホモログの発現プラスミドであるpCTF04410、pCTF05620、pCTF07280、pCTF12260は*E. coli* NEB-10β株に導入し、aryl ADH をコードするSLG\_24930のホモログの発現プラスミド、pET09420、pET09790、pET24930、pET24940は*E. coli* BL21(DE3) 株に導入した。各菌株をLB + Apで12 h以上前培養を行い、得られた前培養液をLB + Apに1% (vol/vol) 植菌し、30°CでOD<sub>600</sub>が0.5になるまで培養した。終濃度1 mMとなるようにisopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) を加え、NEB-10β形質転換体は16°Cで24 h誘導し、BL21(DE3) 形質転換体は30°Cで4 h誘導を行った。培養液を5,000 × g, 5 min, 4°Cで遠心分離して集菌し、菌体をbuffer Aで洗浄した後、各菌体をbuffer Aで懸濁して超音波破碎機によって細胞を破碎した。粗酵素溶液を19,000 × g, 15 min, 4°Cで遠心分離することにより不溶性画分を除き、上清を細胞抽出液として得た。各遺伝子の発現については「SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動」に従って調べた。

Table 5. 第2章で使用したDNAプライマーの塩基配列

Plasmid	primer	Sequences (5' to 3')
pCTF04410	04410F	GGAGGGATCATATGCGTTCGTTCC
	04410R	GGGGGATCCTGAATGGGCCGTGC
pCTF05620	05620F	AGGGGAACATATGGCAAGGCAGGCAAAGC
	05620R	GCGGATCCTGCGAGGCGACCG
pCTF07280	07280F	TGATCGGGCATATGTGCCTGCTGGCG
	07280R	TCGGGGATCCCGGATGGCGCTCC
pCTF12260	12260F	GGAATGAGCATATGAAGCGATGG
	12260R	CGGGATCCGGCAGTTTTTCAACACC
pET09420	09420F	GACTGAGCCATATGAAGATCACCCG
	09420R	CGTGGATCCAGTGCCGTAAGC
pET09790	09790F	GAGGAGATCATATGAAGACACGTGC
	09790R	GTGGATCCCGGAAACGAAAAGC
pET24930	24930F	GGAGCAACATATGACCACGACCACCC
	24930R	TGGGATCCTCTCGGCATGTTCCGG
pET24940	24940F	ATGACACACATATGCGCGCCGC
	24940R	CGAAGGATCCAGTGGCCCGAAAAGC

### SLG\_05620及びSLG\_24930ホモログ遺伝子産物の酵素活性

「大腸菌を宿主に用いた SLG\_05620 及び SLG\_24930ホモログの発現」に従って調製した細胞抽出液 (10~100 µg of protein/ml) と 100 µM の DCA, DCA-C, coniferyl alcohol, vanillyl alcohol を各補因子 (SLG\_24930ホモログ [aryl ADH], 500 µM NAD<sup>+</sup>; SLG\_05620ホモログ [quinohemoprotein ADH], 400 µM PQQ + 400 µM PMS + 3 mM CaCl<sub>2</sub>) の存在下において 30°C で反応させた。それぞれ 1~10 min 反応させ、methanol を等量加えて酵素反応を停止させた。反応液を 19,000 × g, 15 min, 4°C で遠心分離して不溶化したタンパク質を除去し、得られた上清に終濃度 17% となるように 50% acetonitrile を加えて HPLC で分析した。DCA と DCA-C は「HPLC の分析条件」に従って分析した。Coniferyl alcohol と vanillyl alcohol の分析条件は 0.1% のギ酸を含むアセトニトリルと水を 15:85 及び 5:95 としたものをそれぞれ移動相として流速は 0.3 ml/min で分析した。DCA, DCA-C, coniferyl

alcohol, vanillyl alcohol の検出波長はそれぞれ 277, 327, 263, 279 nm とした。

### DCA-L の調製

pET24930 を導入した *E. coli* BL21(DE3) 株を LB + Ap で 12 h 以上培養を行い、得られた前培養液を LB + Ap に 1% (vol/vol) 植菌し、30°C で OD<sub>600</sub> が 0.5 になるまで培養した。終濃度 1 mM となるように IPTG を加え、30°C で 4 h 誘導を行った。培養液を 5,000 × g, 5 min, 4°C で遠心分離して集菌し、菌体を buffer A で洗浄した。菌体を 50 ml の buffer A に OD<sub>600</sub> が 5.0 となるように懸濁し、DCA を終濃度 2 mM となるように加えて、30°C で 36 h 培養した。培養液を 5,000 × g, 15 min, 4°C で遠心分離して上清を回収した。等量の ethyl acetate を加えて懸濁し、ethyl acetate 画分を回収した。この操作を 3 回繰り返した。得られた ethyl acetate 画分をロータリーエバポレーター (Tokyo Rikakikai Co. Ltd.) で濃縮し、benzene : ethyl acetate : methanol (7:3:2) を展開溶媒として、薄層クロマトグラフィー (Silica Gel 60

F254; Merck Millipore) を用いて分離した。DCA-Lの検出には254 nmのトランスイルミネーターを用いた。 $R_f$  値0.73に観察されたDCA-Lのスポットを掻き取り、ethyl acetateで抽出し、遠心エバポレーター (CVE-3000; Tokyo Rikakikai Co. Ltd.) を用いて減圧乾固した。得られた粉末状のDCA-LをDMSO溶液に溶解して「HPLCの分析条件」に従って分析した。DCA-Lの検出波長は346 nmとした。

### 大腸菌を宿主に用いたaldehyde dehydrogenase (ALDH) 遺伝子の発現

当研究室の後藤によって作製されたSYK-6株に存在する23種のALDH遺伝子発現プラスミドを*E. coli* BL21(DE3) 株に導入した。各菌株をLB + Apで前培養を行い、得られた培養液をLB + Apに1% (vol/vol) 植菌して30°CでOD<sub>600</sub>が0.5になるまで培養した。終濃度1 mMとなるようにIPTGを加えて30°Cで4 h培養を行った。培養液を5,000 × g, 5 min, 4°Cの遠心分離で集菌し、菌体をbuffer Aで洗浄した。各菌体をbuffer Aで懸濁して超音波破碎機によって細胞を破碎した。細胞破碎液を19,000 × g, 15 min, 4°Cで遠心分離することにより不溶性画分を除き、上清を細胞抽出液として得た。各遺伝子の発現については「SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動」に従って調べた。

### ALDHの酵素活性

「大腸菌を宿主用いたaldehyde dehydrogenase (ALDH) 遺伝子の発現」に従って調製した各ALDHを含む細胞抽出液 (10~100 µg of protein/ml) と100 µMのDCA-Lを500 µM NAD<sup>+</sup>の存在下において30°Cで反応させた。それぞれ1~10 min反応させ、methanolを等量加えて酵素反応を停止させた。反応液を19,000 × g, 15 min, 4°Cで遠心分離して不溶化したタンパク質を除去し、得られた上清に終濃度17%となるように50% acetonitrileを加えてHPLCで分析した。「HPLCの分析条件」に従って分析を行い、DCA-Lの検出波長は346 nmとした。

### SLG\_27910破壊株のDCA-L変換能

SLG\_27910 破壊株 (SME044) をLBで24 h培養し、得られた前培養液をLBに1% (vol/vol) 植菌して30°Cで12 h培養した。培養液を5,000 × g, 15 min, 4°Cで遠心分離して集菌し、菌体をbuffer Aで洗浄した。菌体をbuffer Aで懸濁してOD<sub>600</sub>が0.5となるように調製したSME044の休止細胞と100 µM DCA-Lを1,500 rpm, 30°Cで反応させた。経時的に試料を分取して19,000 × g, 15 min, 4°Cで遠心分離して菌体を除去することにより反応を停止させた。上清を「HPLCの分析条件」に従って分析し、DCA-Lの検出波長は346 nmとした。

結果

1. DCA 変換酵素遺伝子のスクリーニング

DCA変換に関与する酵素遺伝子を単離するために、SYK-6株の遺伝子ライブラリーをDCA変換能をほとんど持たない*Pseudomonas putida*

PpY1100株に導入してDCA変換能を獲得した組換え体を選抜した。300株の形質転換体からDCA変換能を有するクローンをHPLCによってスクリーニングした結果、DCA変換能を示す9個のクローンが得られた (Fig. 18, 19)。

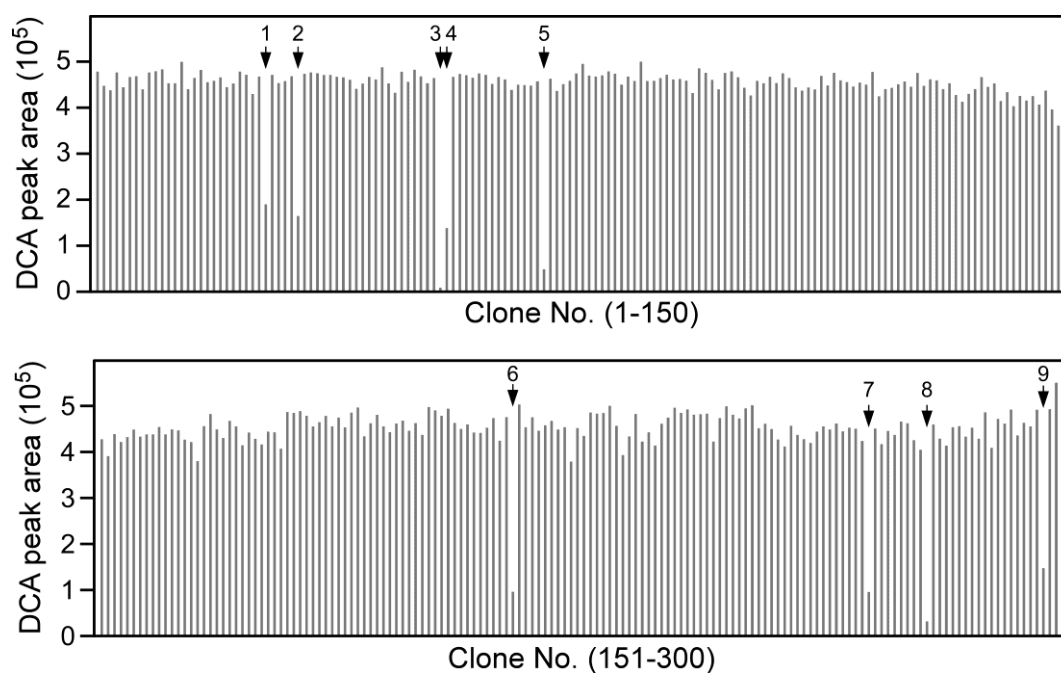
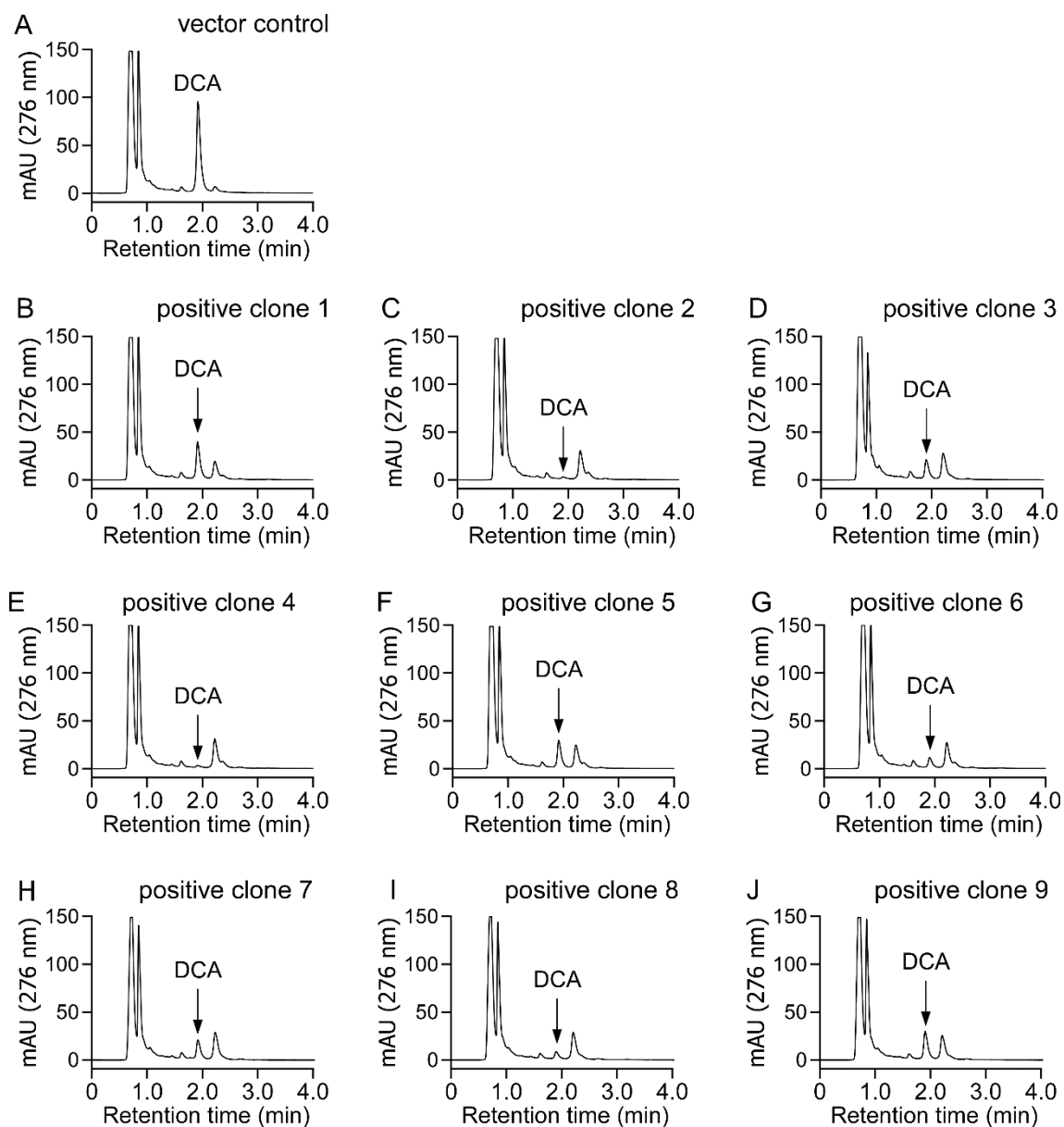


Fig. 18. DCA 変換酵素遺伝子のスクリーニング.

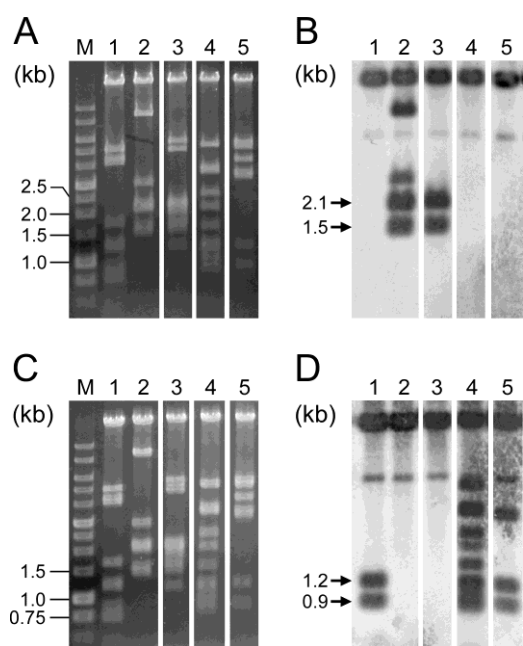
300クローンの各形質転換体のDCA変換能をHPLC分析におけるDCAピーク面積の減少で示した. DCAの検出波長は276 nmとした.



**Fig. 19.** 形質転換体による DCA 変換の HPLC 分析.

SYK-6株の遺伝子ライブラリーを導入した*P. putida* PpY1100株の形質転換体を50  $\mu$ M DCA, 1/5LB, 50 mg/l カナマイシンを含む200  $\mu$ lの培地で12 h培養し、培養上清をHPLCで分析した。HPLCの分析波長は276 nmとした。(A) pVK100ベクターを導入した形質転換体のHPLCクロマトグラム。(B-J) DCA変換能を示す形質転換体のHPLCクロマトグラム。DCAの保持時間, 1.9 min.

これらのポジティブクローンから5つのコスミド pV39、pV44、pV66、pV82、pV123が単離された。DCA変換酵素遺伝子が存在するコスミド中のDNA断片を同定するために、全てのコスミドクローンのSalI消化物に対して、pV44とpV82をプローブとしたサザンハイブリダイゼーション解析を行い、共通して存在するSalI断片を調べた。その結果、pV44をプローブにした場合はpV44とpV66に共通した2.1 kbと1.5 kbのSalI断片が含まれることが示された (Fig. 20A, B)。pV82をプローブにした場合はpV39、pV82、pV123に共通して1.2 kbと0.9 kbのSalI断片が含まれることが示された (Fig. 20C, D)。



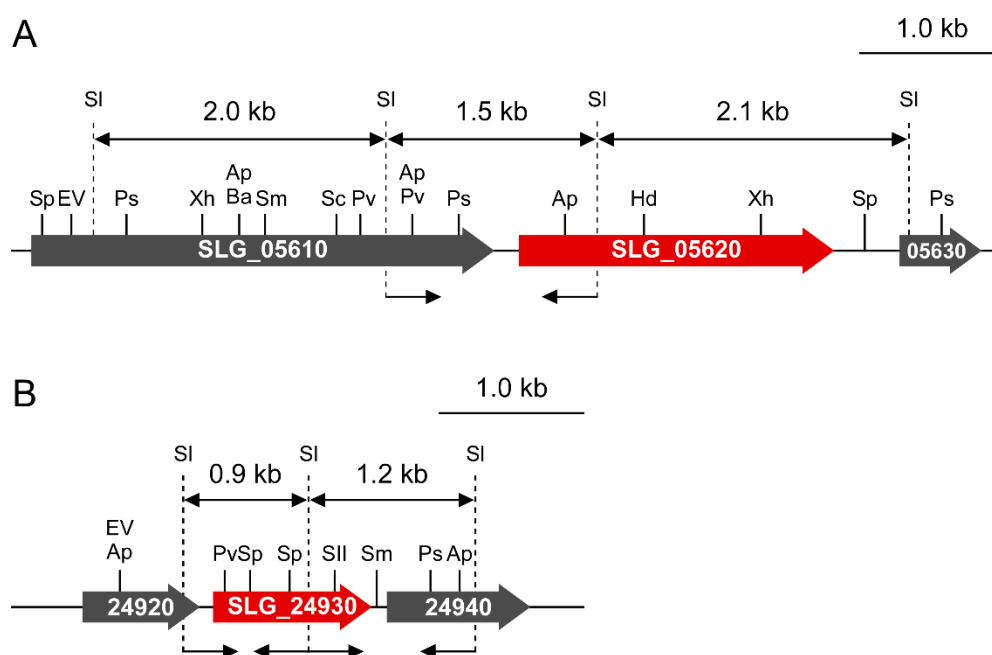
**Fig. 20.** 宿主に DCA 変換能を与えるコスミドのサザンハイブリダイゼーション解析.

(A, C) 各コスミドの SalI 消化物のアガロースゲル電気泳動. (B) pV44 の SalI 消化物を DIG 標識してプローブに用いたサザン解析. (C) pV82 の SalI 消化物をプローブに用いたサザン解析. Lanes: 1, pV39; 2, pV44; 3, pV66; 4, pV82; 5, pV123; M, molecular size markers.

pV44とpV66に共通して含まれる1.5-kb SalI断片の両末端の塩基配列を決定した結果、本断片はSLG\_05610とSLG\_05620の一部を含むことが示された (Fig. 21A)。また、1.5-kb断片の両隣には2.0 kbと2.1 kbのSalI断片が存在することから、これらはサザン解析で交雑が見られた断片であると考えられた。これら3つのSalI断片からなる領域に完全なオープンリーディングフレーム (ORF) としてはSLG\_05620のみ存在した。SLG\_05620は*P. putida* HK5株のquinohemoprotein alcohol dehydrogenase (quinohemoprotein ADH)-IIB、quinohemoprotein ADH-IIG (89) 及び *Comamonas testosteroni* ATCC15667 株のquinohemoprotein ethanol dehydrogenase (90) とアミノ酸レベルで43~50%の相同性を示した。

pV39、pV82、pV123 の共通断片である 1.2-kb と 0.9-kb SalI 断片の両末端の塩基配列を決定した結果、本領域は SLG\_24920、SLG\_24930、SLG\_24940 を含むことが示された (Fig. 21B)。これら断片中に完全な ORF として含まれているのは SLG\_24930 のみであった。SLG\_24930 は *P. putida* mt-2 株の TOL プラスミド上にコードされている aryl ADH 遺伝子 *xlyB* (91) 及び *Castellaniella defragrans* 65Phen 株の geraniol dehydrogenase (92) とアミノ酸レベルでそれぞれ 46%と 42%の相同性を示した。また、本酵素遺伝子は *Streptomyces* sp. NL15-2K 株の coniferyl alcohol dehydrogenase と 35%の相同性を示した (93)。





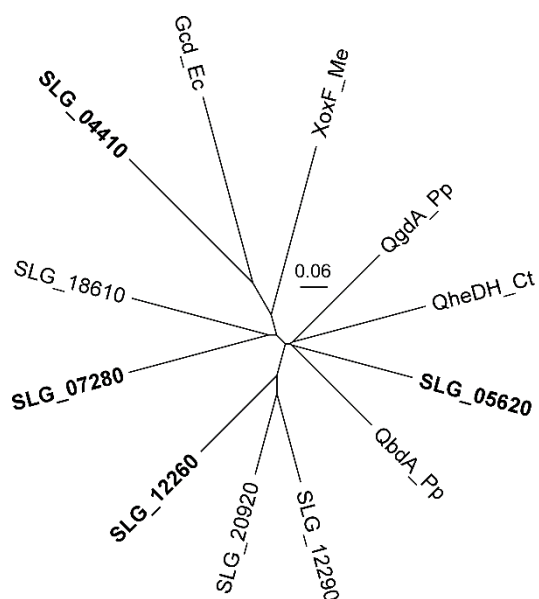
**Fig. 21.** 宿主に DCA 変換能を与えるコスミドに共通して含まれる DNA 断片.

(A) pV44 と pV66 に共通して含まれる DNA 断片. (B) pV39, pV82, pV123 に共通して含まれる DNA 断片. ORF の下にある細い矢印は、塩基配列を決定した領域を示す. 制限酵素: Ap, ApaI; Ba, BamHI; EV, EcoRV; Hd, HindIII; Ps, PstI; Pv, PvuII; Sc, SacI; SII, SacII; SI, SalI; Sm, SmaI; Sp, SphI; Xh, XhoI.

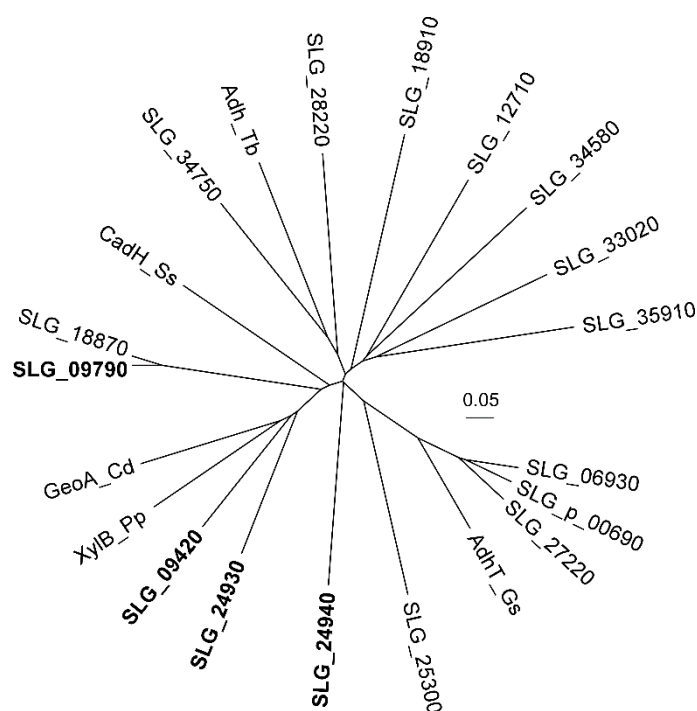
## 2. SLG\_05620 と SLG\_24930 の相同遺伝子の探索と大腸菌での発現

SYK-6 株のゲノム中には、SLG\_05620 と 24~46% のアミノ酸配列相同性を示す 6 個の遺伝子 (Fig. 22) 及び SLG\_24930 と 21~43% のアミノ酸配列相同性を示す 15 個の遺伝子 (Fig. 23) が存在することが予測された。これらの遺伝子産物が DCA の酸化活性を有するかを調べるために、SLG\_05620 と 3 つの推定 quinoxinoprotein ADH 遺伝子 (SLG\_04410、SLG\_07280、SLG\_12260) 及び SLG\_24930 と 3 つの推定 aryl ADH 遺伝子 (SLG\_09420、

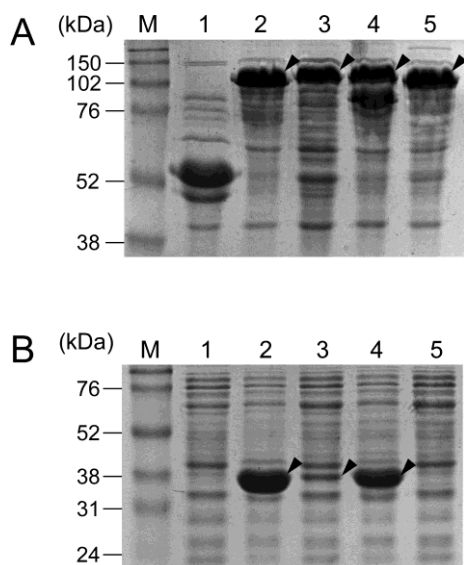
SLG\_09790、SLG\_24940) を選択し、各遺伝子を pET-16b に挿入した発現プラスミドを作製後、*E. coli* で発現させた。しかし、推定 quinoxinoprotein ADH をコードする SLG\_05620、SLG\_04410、SLG\_07280、SLG\_12260 の発現が観察されなかったため、コールドショック遺伝子プロモーターを利用した pCold-TF を用いてトリガーファクター融合タンパク質として発現させた。各細胞抽出液の SDS-PAGE の結果、SLG\_09790 は発現量が低く、SLG\_24940 はほとんど発現が観察されなかったが、他の遺伝子については十分な発現が見られた (Fig. 24)。



**Fig. 22.** SYK-6 株に存在する 7 個の SLG\_05620 ホモログと既知の quinoheмоprotein ADH の系統樹. 太字は本研究において解析を行った SYK-6 株の遺伝子を示す. Enzymes: Gcd\_Ec, quinoheмоprotein glucose dehydrogenase of *E. coli* K-12 (P15877); XoxF\_Me, methanol dehydrogenase of *Methylobacterium extorquens* AM1 (P16027); QgdA\_Pp, quinoheмоprotein ADH (ADH IIG) of *P. putida* HK5 (Q4W6G0); QheDH\_Ct, quinoheмоprotein ethanol dehydrogenase of *Comamonas testosteroni* ATCC 15667 (Q46444); QbdA\_Pp, quinoheмоprotein ADH (ADH IIB) of *P. putida* HK5 (Q8GR64).



**Fig. 23.** SYK-6株に存在する16個のSLG\_24930ホモログと既知のaryl ADHの系統樹. 太字は本研究において解析を行った SYK-6 株の遺伝子を示す. Enzymes: XylB\_Pp, benzyl ADH of *P. putida* mt-2 (P39849); GeoA\_Cd, geraniol dehydrogenase of *Castellaniella defragrans* 65Phen (H1ZV38); CadH\_Ss, coniferyl alcohol dehydrogenase II of *Streptomyces* sp. NL15-2K (M5AJW4); Adh\_Tb, isopropanol dehydrogenase of *Thermoanaerobacter brockii* HTD4 (P14941); AdhT\_Gs, ADH of *Geobacillus stearothermophilus* NCA1503 (P12311).



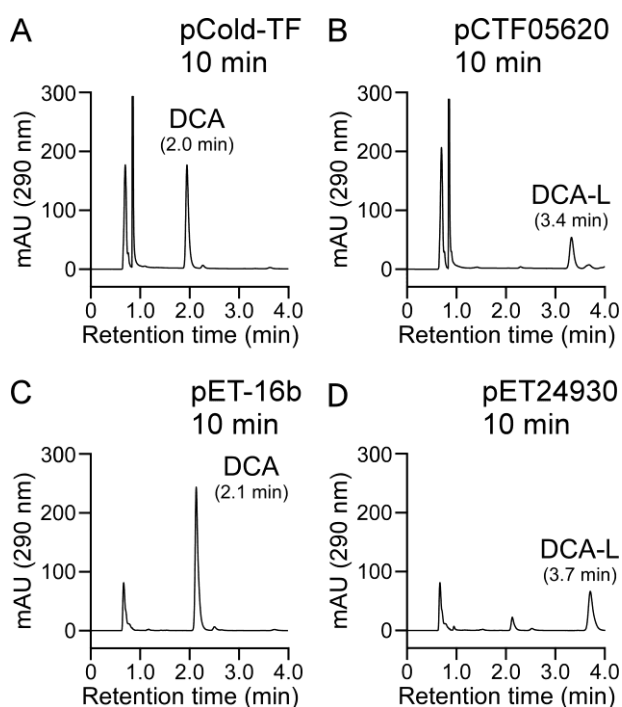
**Fig. 24.** SYK-6株が持つSLG\_05620及びSLG\_24930ホモログの*E. coli*における発現.

SDS-12% PAGEによって10  $\mu$ gのタンパク質を分離してクーマシーブリリアントブルーによって染色した. (A) SLG\_05620ホモログ (quinoprotein ADH) を発現させた*E. coli* NEB10 $\beta$ の細胞抽出液. Lanes: 1, pCold-TF (vector); 2, pCTF04410; 3, pCTF05620; 4, pCTF07280; 5, pCTF12260. (B) SLG\_24930ホモログ (aryl ADH)を発現させた*E. coli* BL21(DE3) の細胞抽出液. Lanes: 1, pET-16b (vector); 2, pET09420; 3, pET09790; 4, pET24930; 5, pET24940; M, molecular size markers.

### 3. SLG\_05620 と SLG\_24930 の相同遺伝子産物の DCA 変換活性

SLG\_05620 及び SLG\_24930 相同遺伝子を発現させた *E. coli* の細胞抽出液 (10~100  $\mu$ g of protein/ml) と 100  $\mu$ M の DCA、DCA-C、coniferyl alcohol 及び vanillyl alcohol を 400  $\mu$ M PQQ + PMS もしくは 500  $\mu$ M NAD<sup>+</sup>の存在下で反応させ、各基質に対する変換活性を調べた。その結果、SLG\_04410 を除く 7 つの遺伝子産物において DCA に対する変換活性が検出され DCA-L の生成が観察された (Fig.25, Table 6)。中でも

SLG\_05620 遺伝子産物が高い比活性 (210  $\pm$  20 mU/mg of protein) を示した。一方、SLG\_09790 と SLG\_24940 の発現量は低かったにも関わらず、両遺伝子産物は他のものと同等の比活性を有していた。



**Fig. 25.** SLG\_05620 及び SLG\_24930 を発現させた *E. coli* の細胞抽出液による DCA の変換.

SLG\_05620 を導入した *E. coli* の細胞抽出液 (10  $\mu$ g of protein/ml) は 400  $\mu$ M PQQ + PMS 存在下で 100  $\mu$ M DCA と反応させ、SLG\_24930 を導入した *E. coli* の細胞抽出液 (100  $\mu$ g of protein/ml) は 500  $\mu$ M NAD<sup>+</sup>存在下で 100  $\mu$ M DCA と反応させた。それぞれ 30°C で 10 min 反応させ、反応液を LC-MS で分析した。HPLC 分析の検出波長は 290 nm とした. (A) pCold-TF を導入した *E. coli* の細胞抽出液と DCA の反応 10 min 後の HPLC クロマトグラム. (B) SLG\_05620 を導入した *E. coli* の細胞抽出液と DCA の反応 10 min 後の HPLC クロマトグラム. (C) pET-16b を導入した *E. coli* の細胞抽出液と DCA の反応 10 min 後の HPLC クロマトグラム. (D) SLG\_24930 を導入した *E. coli* の細胞抽出液と DCA の反応 10 min 後の HPLC クロマトグラム.

**Table 6.** SLG\_05620とSLG\_24930ホモログ遺伝子産物の DCA及び他のリグニン由来化合物に対する酸化活性

Gene products	Specific activity <sup>a,b</sup> (mU/mg of protein)			
	DCA	DCA-C	Coniferyl alcohol	Vanillyl alcohol
Quinohemoprotein ADH homologs				
SLG_04410	ND	ND	ND	ND
SLG_05620	210 ± 20	ND	63 ± 3	35 ± 2
SLG_07280	45 ± 4	2.2 ± 0.1	23 ± 7	ND
SLG_12260	36 ± 0.2	0.6 ± 0.1	280 ± 50	5.4 ± 0.5
Aryl ADH homologs				
SLG_09420	57 ± 7	ND	58 ± 3	2.1 ± 0.3
SLG_09790	50 ± 1	ND	34 ± 2	ND
SLG_24930	49 ± 2	ND	38 ± 8	18 ± 3
SLG_24940	36 ± 0.5	ND	25 ± 3	1.3 ± 0.3

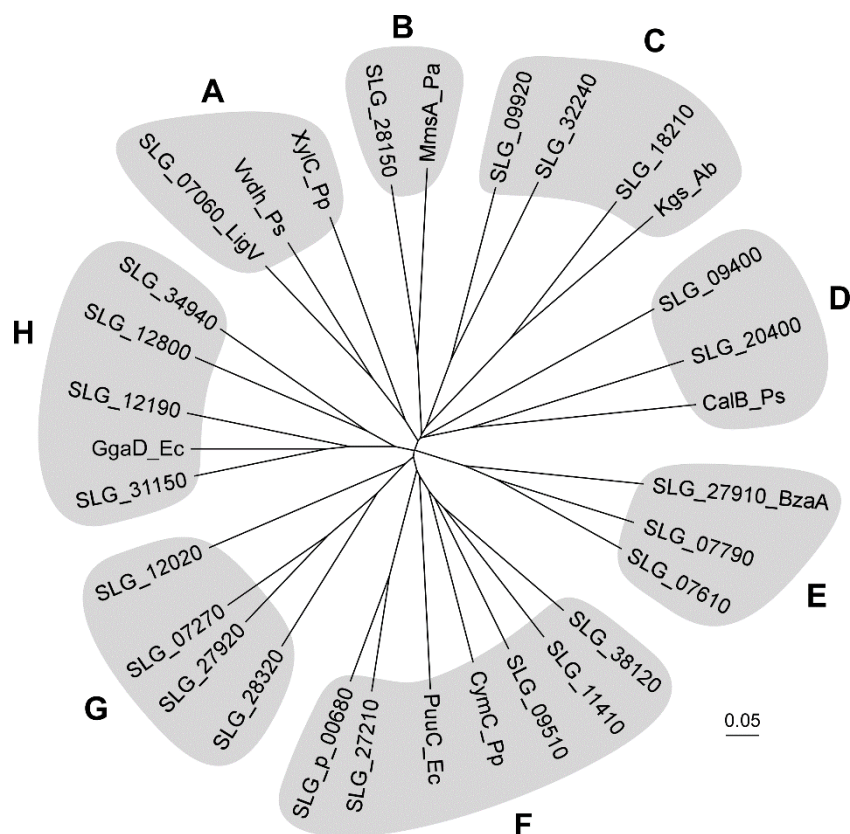
<sup>a</sup>ND, not detected.<sup>b</sup>それぞれの値は3回測定した平均値を示す.

± は標準偏差を示す.

DCA に対して活性を示した全ての遺伝子産物において coniferyl alcohol 変換活性が観察され、特に SLG\_12260 において高い比活性 (280 ± 50 mU/mg of protein) が検出された。一方、vanillyl alcohol に対しては活性が無い、もしくは活性が低い傾向が示された。また、SYK-6 株のゲノム中には、これら酵素遺伝子と類似した遺伝子が他に 15 個存在しており (Fig. 22, 23)、DCA の変換には基質特異性の広い多数の ADH 遺伝子が関与することが予想された。また、本研究で発現させた 8 つの遺伝子産物の内、SLG\_07280 と SLG\_12260 が DCA-C に対して弱い活性 (2.2 mU/mg of protein 及び 0.6 mU/mg of protein) を持つことが示された。

#### 4. DCA-L 変換酵素遺伝子の推定

SYK-6 株において DCA-L は B 環側鎖 C<sub>γ</sub>位アルデヒドがカルボン酸に酸化した DCA-C に変換されると推定され、この反応には aldehyde dehydrogenase (ALDH) 遺伝子が関与すると考えられた。SYK-6 株のゲノム中には 23 個の推定 ALDH 遺伝子が存在する。これら遺伝子と benzaldehyde、4-hydroxybenzaldehyde、4-nitrobenzaldehyde、succinic semialdehyde、2-carboxybenzaldehyde、phenylacetaldehyde、betainealdehyde、coniferyl aldehyde の分解に関与する ALDH 遺伝子のアミノ酸配列のアライメントによって作製した系統樹から、これらの遺伝子は大きく 8 個のクラスター A から H に分かれることが示された (Fig. 26)。



**Fig. 26.** SYK-6 株に存在する LigV を含む 23 個の ALDH と既知 ALDH の系統樹。

Enzymes: Vdh\_Ps, vanillin dehydrogenase of *Pseudomonas* sp. HR199 (O05619); XylC\_Pp, benzaldehyde dehydrogenase of *P. putida* MT53 (P43503); MmsA\_Pa, methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase of *P. aeruginosa* PAO1 (P28810); Kgs\_Ab,  $\alpha$ -ketoglutaric semialdehyde dehydrogenase of *Acinetobacter bayli* ADP1 (Q6FFQ0); CalB\_Ps, coniferyl aldehyde dehydrogenase of *Pseudomonas* sp. HR199 (O86447); CymC\_Pp, cuminaldehyde dehydrogenase of *P. putida* F1 (O33455); PuuC\_Ec, 3-hydroxypropionaldehyde dehydrogenase of *E. coli* K12 (P23883); GgaD\_Ec, succinate-semialdehyde dehydrogenase of *E. coli* K12 (P25526); SLG\_07060\_LigV, vanillin dehydrogenase of SYK-6 (G2IMC6).

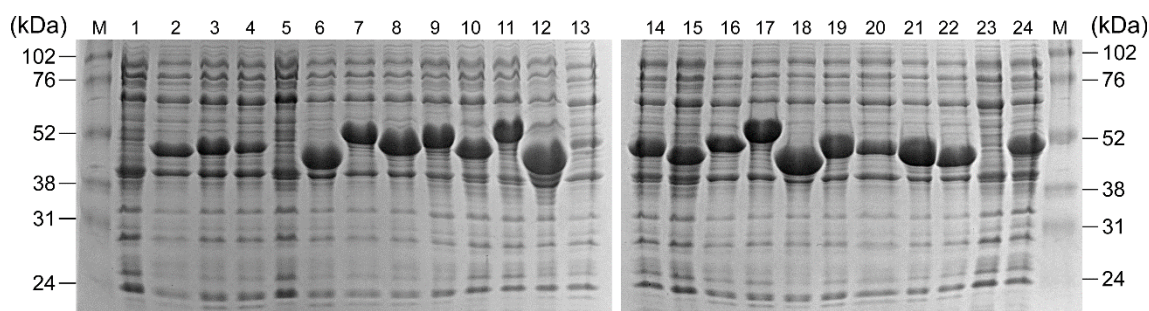
SYK-6 株に存在する 23 個の推定 ALDH 遺伝子の産物の内、DCA-L 酸化能を有するものを明らかにするために、各遺伝子を pET-21a に挿入した発現プラスミドを *E. coli* BL21(DE3) 株に導入し、組換え体から細胞抽出液を得た。細胞抽出液の SDS-PAGE の結果、SLG\_32240 と SLG\_34940 の発現は見られなかったが、それ以外については十分な量の遺伝子産物の生産が観察された (Fig. 27)。各細胞抽出液 (10~100  $\mu$ g of protein/ml) と 100  $\mu$ M DCA-L を 500  $\mu$ M NAD<sup>+</sup>

の存在下で反応させた結果、クラスター E と G に属する 4 つの遺伝子産物 (SLG\_27910、SLG\_07790、SLG\_07610、SLG\_07270) が比較的高い DCA-L 酸化活性を示し、DCA-C の生成が観察された (Fig. 28, Table 7)。特に SLG\_27910 遺伝子産物が最も高い比活性 1,800  $\pm$  180 mU/mg を示した。SYK-6 株における SLG\_27910 の DCA-L 酸化への関与を調べるために、以前作製された SLG\_27910 破壊株 (SME044) を用いて (80)、DCA-L 変換能を調べた。その結果、

## 第2章

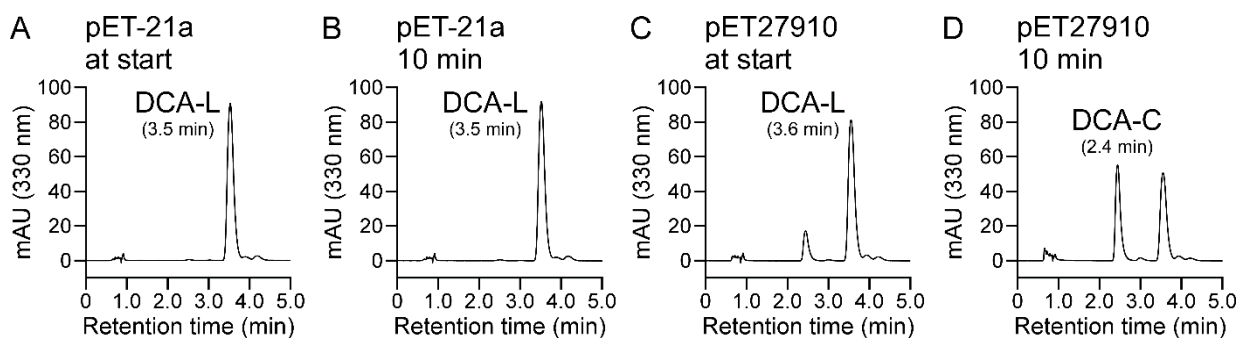
野生株と比較して DCA-L 変換に有意な遅延が観察された (Fig. 29)。DCA-L に対して高い酸化活性を示した SLG\_27910、SLG\_07790、SLG\_07610、SLG\_07270 は vanillin 及び

syringaldehyde に対しても高い酸化活性を持つことから (80)(110)、DCA-L の変換には基質特異性の広い複数の ALDH 遺伝子が関与していると考えられる。



**Fig. 27.** SYK-6株が持つ推定ALDH及び*ligV*の*E. coli*における発現.

SDS-12% PAGEによって23個のALDH遺伝子をそれぞれ導入した*E. coli*の細胞抽出液 (10  $\mu$ g of protein) を分離し、クーマシーブリリアントブルーによって染色した. Lanes: M, molecular size markers; 1, pET-21a(+); 2, SLG\_31150; 3, SLG\_12190; 4, SLG\_12800; 5, SLG\_34940; 6, SLG\_27910; 7, SLG\_07790; 8, SLG\_07610; 9, SLG\_28320; 10, SLG\_27920; 11, SLG\_07270; 12, SLG\_12020; 13, SLG\_38120; 14, SLG\_11410; 15, SLG\_09510; 16, SLG\_27210; 17, SLG\_p\_00680; 18, SLG\_20400; 19, SLG\_18210; 20, SLG\_09400; 21, SLG\_28150; 22, SLG\_09920; 23, SLG\_32240; 24, SLG\_07060.



**Fig. 28.** SLG\_27910 を発現させた *E. coli* の細胞抽出液による DCA-L の変換.

SLG\_27910 を導入した *E. coli* の細胞抽出液 (10  $\mu$ g of protein/ml) を 500  $\mu$ M  $\text{NAD}^+$  存在下で 100  $\mu$ M DCA-L と 10 min 反応させ反応液を HPLC で分析した. HPLC 分析は検出波長 330 nm で行った. (A) pET-21a を導入した *E. coli* の細胞抽出液と DCA-L の反応直後の HPLC クロマトグラム. (B) pET-21a を導入した *E. coli* の細胞抽出液の反応後 10 min の HPLC クロマトグラム. (C) SLG\_27910 を導入した *E. coli* の細胞抽出液と DCA-L の反応直後の HPLC クロマトグラム. (D) SLG\_27910 を導入した *E. coli* の細胞抽出液の反応後 10 min の HPLC クロマトグラム.

## 第 2 章

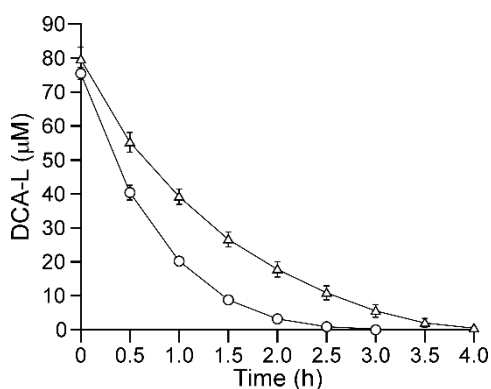
**Table 7.** SYK-6株由来ALDHのDCA-Lに  
対する酸化活性

Cluster	Gene products	Specific activity <sup>a,b</sup> (mU/mg of protein)
A	SLG_07060 (LigV)	ND
B	SLG_28150	ND
C	SLG_09920	8 ± 2
C	SLG_32240	ND
C	SLG_18210	ND
D	SLG_09400	ND
D	SLG_20400	60 ± 1
E	SLG_27910 (BzaA)	1800 ± 200
E	SLG_07790	420 ± 3
E	SLG_07610	360 ± 40
F	SLG_38120	63 ± 0.3
F	SLG_11410	30 ± 2
F	SLG_09510	20 ± 1
F	SLG_27210	ND
F	SLG_p_00680	6 ± 3
G	SLG_28320	51 ± 4
G	SLG_27920 (BzaB)	58 ± 0.5
G	SLG_07270	330 ± 20
G	SLG_12020	5 ± 3
H	SLG_31150	ND
H	SLG_12190	ND
H	SLG_12800	75 ± 30
H	SLG_34940	ND

<sup>a</sup> ND, not detected.

<sup>b</sup> それぞれの値は3回測定した平均値を示す.

± は標準偏差を示す.



**Fig. 29.** SYK-6 株と SME044 (SLG\_27910 破壊株)の DCA-L 変換能.

SYK-6 株及び SME044 を LB で培養し,  $OD_{600}=0.5$  に調整した各菌体の休止細胞と  $100\ \mu\text{M}$  DCA-L を反応させ, 経時的に反応上清をサンプリングし HPLC で DCA-L 量を測定した. Symbols: SYK-6 (circles); SME044 (triangles). それぞれの値は 3 回測定した平均値を示す. エラーバーは標準偏差を示す.



## 考察

第2章では、DCA 及び DCA-L の変換能を有する酵素をコードする遺伝子の同定と機能解析を行った。DCA 変換酵素遺伝子を単離するために、SYK-6 株の遺伝子ライブラリーからスクリーニングを行い、quinohemoprotein ADH をコードする SLG\_05620 と aryl ADH をコードする SLG\_24930 を単離した。SYK-6 株のゲノム中におけるこれら遺伝子のホモログの存在を調べたところ、SLG\_05620 と 24~46% のアミノ酸配列相同性を示す遺伝子が 6 個、SLG\_24930 と 21~43% のアミノ酸配列相同性を示す遺伝子が 15 個存在することが示された (Fig. 22, 23)。これらの遺伝子産物が DCA の酸化活性を有するかを調べるために、SLG\_05620 を含む 4 つの quinohemoprotein ADH 遺伝子 (SLG\_04410、SLG\_07280、SLG\_12260) と SLG\_24930 を含む 4 つの aryl ADH 遺伝子 (SLG\_09420、SLG\_09790、SLG\_24940) を選択し、*E. coli* で発現させた。その結果、SLG\_04410 を除くすべての遺伝子産物で有意な DCA 変換活性が認められた (36~210 mU/mg of protein; Table 6)。これらの結果から SYK-6 株には DCA の酸化能を有する多数の quinohemoprotein ADH と aryl ADH が存在することが明らかとなった。第1章の解析において、SYK-6 株の細胞抽出液の DCA 変換活性は NAD<sup>+</sup>依存性の活性が主要であったことを考慮すると (Table 3)、SYK-6 株細胞中での DCA の酸化には、SLG\_24930 をはじめとする複数の aryl ADH が主要な役割を担っていると考えられる。

本章で解析した ADH の中で SLG\_04410 を除く 7 つの ADH が DCA に加えて coniferyl alcohol に対して変換活性を示した (23~280 mU/mg of

protein; Table 6)。しかし、vanillyl alcohol (C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub> 構造) に対しては活性がない、もしくは低い活性を示したことから (<35 mU/mg of protein; Table 6)、これらの ADH は coniferyl alcohol (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub> 構造) の誘導体を良い基質とすることが示唆された。また、quinohemoprotein ADH をコードする SLG\_07280 と SLG\_12260 が DCA-C に対して弱い活性 (2.2 ± 0.1 mU/mg of protein と 0.6 ± 0.1 mU/mg of protein) を持つことが示された (Table 6)。これらの遺伝子が DCA-C の変換に関与している可能性も考えられるが、SYK-6 株の細胞抽出液による DCA-C 変換が FAD 添加時に顕著に活性化されたことから (Table 3)、DCA-C の変換にはこれらとは異なる FAD 依存性酵素が関与すると考えられる。

DCA-L の DCA-C への酸化に関与する酵素遺伝子を単離するために、以前作製された SYK-6 株の ALDH 遺伝子発現ライブラリーに含まれる 23 個の遺伝子産物の DCA-L 変換活性を調べた。その結果、各遺伝子の発現量が異なるために単純に比較することはできないが、相対的に高い比活性 (>330 mU/mg of protein) を示した SLG\_27910、SLG\_07790、SLG\_07610、SLG\_07270 が DCA-L 変換酵素遺伝子の候補に挙げられた。最も高い比活性を示した SLG\_27910 の破壊株 (SME044) において DCA-L 変換能に有意な低下が観察されたことから (Fig. 29)、SLG\_27910 が部分的に DCA-L の変換に関与することが示唆された。しかし SME044 は DCA-L の変換能を保持しており、DCA-L の酸化に複数の ALDH が関与することが強く示唆された。

今後、DCA-L 変換に関与する ALDH 遺伝子



## 第 2 章

を同定するためには、SYK-6 株の精製 ALDH 遺伝子産物の DCA-L 変換活性を評価し、真に比活性の高い酵素をコードする遺伝子について多重破壊株を作製して DCA-L 変換活性を調べ

ていく必要がある。また、ALDH 以外の酸化酵素が DCA-L の変換に関わる可能性も否定できないため、SYK-6 株からの DCA-L 変換酵素の精製も検討する必要がある。

## 第3章 DCA-C 変換酵素遺伝子の同定と機能解析

## 緒言

SYK-6 株において、DCA は初めに B 環側鎖 C $\gamma$ 位が酸化されて DCA-C に変換され、その後 DCA-C の A 環側鎖 C $\gamma$ 位がアルデヒドに酸化された DCA-CL を経由して DCA-CC へと変換されることが示された。第 2 章において quinohemoprotein ADH をコードする SLG\_07280 と SLG\_12260 の遺伝子産物が DCA-C 変換活性を有することが示された。しかし、quinohemoprotein ADH は反応に PQQ を要求するのに対して、SYK-6 株の細胞抽出液による DCA-C の変換は FAD + PMS 存在下での活性が主要であり、これら遺伝子産物とは異なる FAD

依存性酵素が DCA-C の変換に関与することが示唆された。第 1 章の解析から、DCA-C 変換酵素は上述の特性に加えて、細胞質と細胞膜の両方に局在すること、また DCA-C 変換活性が DCA または DCA-C 存在下での培養時に 1.4~1.7 倍促進されることが示されている。

第 3 章では、以上の情報を基にして、DCA 存在下での培養時に誘導性を示す FAD 依存性の oxidase 遺伝子を探索することによって DCA-C 変換酵素遺伝子を同定し、同遺伝子の機能解析を行った。

## 材料と方法

## 供試菌、プラスミド、培養条件

第3章で使用した菌株とプラスミドはTable 8に示した。SYK-6株及び遺伝子破壊株の培養は第1章と同様に行った。必要に応じてKm及びtetracycline (Tc) をそれぞれ50 mg/lと12.5 mg/lの濃度で使用した。*E. coli*の培養は2章と同様に行った。

## 酵素、試薬、基質、遺伝子操作

各種酵素及び試薬の使用方法は第1章で示したメーカーの取扱説明書に従った。基本的な遺伝子操作は、第1章と同様に行った。DCA-AC, HMPPD,  $\beta$ -hydroxypropiovanilonは森林総合研究所の菱山正

二郎博士から譲り受けたものを用いた。これらの基質は100 mMとなるようにdimethyl sulfoxide (DMSO) で溶解して-30°Cで保存した。

*phcC-phcD* 破壊用プラスミドの作製

SYK-6 株の total DNA を鋳型として *phcC* から *phcD* を増幅するように設計したプライマー (Table 9) 及び PrimeSTAR GXL DNA Polymerase (Takara Bio Inc.) を用いた PCR によって、*phcC* の C 末端に HindIII 部位が付加された *phcC* から *phcD* を含む 3.9 kb の DNA 断片を得た。得られた増幅断片を HindIII-BamHI で消化し、pT7Blue の同部

### 第3章

位に挿入し、pT09480-500 を作製した。pT09480-500 を HincII で消化して内部の *phcC* 上流から *phcD* 下流までを含む領域を削除し、同部位に pIK03 から EcoRV によって切り出したカナマイシン耐性遺伝子を含む 1.3-kb 断片 (カナマイシンカ

セット) を挿入して pT09480-500K を作製した。本プラスミドを SphI-BamHI で消化し 3.0 kb 断片を pK19*mobsacB* の同部位に挿入し *phcC-phcD* 破壊用プラスミド pKmb09480-500K を作製した。

**Table 8.** 第3章で使用した菌株及びプラスミド

Strain or plasmid	Relevant characteristic(s) <sup>a</sup>	Reference or source
<i>Spingobium</i> sp.		
SYK-6	Wild type; NaI <sup>r</sup> Sm <sup>r</sup>	(79)
SME110	SYK-6 derivative; <i>phcC::kan</i> ; NaI <sup>r</sup> Sm <sup>r</sup> Km <sup>r</sup>	This study
SME111	SYK-6 derivative; <i>phcD::kan</i> ; NaI <sup>r</sup> Sm <sup>r</sup> Km <sup>r</sup>	This study
SME112	SYK-6 derivative; <i>phcC-phcD::kan</i> ; NaI <sup>r</sup> Sm <sup>r</sup> Km <sup>r</sup>	This study
<i>E. coli</i>		
BL21(DE3)	F <sup>-</sup> <i>ompT hsdSB</i> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) <i>gal dcm</i> (DE3); T7 RNA polymerase gene under control of the <i>lacUV5</i> promoter	(81)
HB101	<i>recA13 supE44 hsd20 ara-14 proA2 lacY1 galK2 rpsL20 xyl-5 mtl-1</i>	(82)
NEB 10-beta	<i>araD139 Δ(ara-leu)7697 fhuA lacX74 galK (φ80 ΔlacZ M15) recA1 endA1 nupG rpsL (Sm<sup>r</sup>) Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC)</i>	New England Biolabs
Plasmids		
pT7Blue	Cloning vector; Ap <sup>r</sup>	Novagen
pBluescript II KS(+)	Cloning vector; Ap <sup>r</sup>	(85)
pET-16b	Expression vector; T7 promoter, Ap <sup>r</sup>	Novagen
pJB866	RK2 broad-host-range expression vector; Tc <sup>r</sup> P <sub>m</sub> <i>xylS</i>	(94)
pJB861	RK2 broad-host-range expression vector; Km <sup>r</sup> P <sub>m</sub> <i>xylS</i>	(94)
pK19 <i>mobsacB</i>	<i>oriT sacB</i> ; Km <sup>r</sup>	(95)
pIK03	KS(+) with a 1.3-kb EcoRV fragment carrying <i>kan</i> of pUC4K; Ap <sup>r</sup> Km <sup>r</sup>	(42)
pKS09480-500	KS(+) with a 3.9-kb PCR-amplicon carrying <i>phcC</i> and <i>phcD</i>	This study
pKS09480	KS(+) with a 2.4-kb BglII-BamHI fragment carrying <i>phcC</i> from pKS09480-500	This study
pKS09500	KS(+) with a 2.7-kb XhoI-SacI fragment carrying <i>phcD</i> from pKS09480-500	This study
pKS09480K	pKS09480 with a 1.3-kb EcoRV fragment carrying <i>kan</i> from pIK03 into HincII site of <i>phcC</i>	This study
pKS09500K	pKS09500 with a 1.3-kb EcoRV fragment carrying <i>kan</i> from pIK03 into HincII site of <i>phcD</i>	This study
pKmb09480K	pK19 <i>mobsacB</i> with a 3.7-kb KpnI-BamHI fragment carrying disrupted <i>phcC</i> of pKS09480K	This study
pKmb09500K	pK19 <i>mobsacB</i> with a 4.0-kb KpnI-SacI fragment carrying disrupted <i>phcD</i> of pKS09500K	This study
pT09480-500	pT7Blue with a 3.9-kb PCR-amplicon carrying <i>phcC</i> and <i>phcD</i>	This study
pT09480-500K	pT09480-500 with a 1.3-kb EcoRV fragment carrying <i>kan</i> from pIK03 into HincII site of <i>phcC</i> and <i>phcD</i>	This study
pKmb09480-500K	pK19 <i>mobsacB</i> with a 3.0-kb SphI-BamHI fragment carrying disrupted <i>phcC</i> and <i>phcD</i> of pT09480-500K	This study
pT09480	pT7Blue with a 1.7-kb PCR-amplicon carrying <i>phcC</i>	This study
pT09500	pT7Blue with a 1.8-kb PCR-amplicon carrying <i>phcD</i>	This study
pT09480Xba	pT7Blue with a 1.8-kb XbaI-BamHI fragment carrying <i>phcC</i> from pT09480	This study
pT09500Xba	pT7Blue with a 1.9-kb XbaI-BamHI fragment carrying <i>phcD</i> from pT09500	This study
pET09480	pET-16b with a 1.7-kb NdeI-BamHI fragment carrying <i>phcC</i> from pT09480	This study
pET09500	pET-16b with a 1.8-kb NdeI-BamHI fragment carrying <i>phcD</i> from pT09500	This study
pJBVI09480	pJB866 with a 1.8-kb HindIII-BamHI fragment carrying <i>phcC</i> from pT09480Xba	This study
pJBVI09500	pJB866 with a 1.9-kb HindIII-BamHI fragment carrying <i>phcD</i> from pT09500Xba	This study
pJBI09480	pJB861 with a 1.8-kb KpnI-BamHI fragment carrying <i>phcC</i> from pJBVI09480	This study
pJBI09500	pJB861 with a 1.9-kb KpnI-BamHI fragment carrying <i>phcD</i> from pJBVI09500	This study

<sup>a</sup> NaI<sup>r</sup>, Sm<sup>r</sup>, Ap<sup>r</sup>, Km<sup>r</sup>, and Tc<sup>r</sup>, resistance to nalidixic acid, streptomycin, ampicillin, kanamycin, and tetracycline, respectively.

Table 9. 第3章で使用した DNA プライマーの塩基配列

Plasmid	Primer	Sequences (5' to 3')
pKS09480-500	9480FB	GCGGGATCCACGGCGGGAAGAGGG
	9500SD	ATCTTCACCGGGCCGCGCCGTAGC
pET09480	9480RN	AACTCTGACATATGGCCAGCAAACG
	9480FB	GCGGGATCCACGGCGGGAAGAGGG
pET09500	9500RN	CCGAGAGCATATGAATCATCATGAACTCC
	9500FB	GAAGGATCCGATATAGCGCTCGAAATCC
RT-PCR	9500-480R	GCACATCGTCATAGCTCCA
	9500-480F	GGCATCTTCCTCAACCTGT

### *phcC* 破壊用プラスミドの作製

「*phcC-phcD* 破壊用プラスミドの作製」に従って PCR によって、*phcC* の C 末端に HindIII 部位が付加された *phcC* から *phcD* を含む 3.9 kb の DNA 断片を得た。得られた増幅断片を HindIII-BamHI で消化し、pBluescript II KS(+) の同部位に挿入し、pKS09480-500 を作製した。pKS09480-500 を BglII (平滑化)-BamHI で消化して *phcC* の全長を含む 2.4-kb の DNA 断片を、pBluescript II KS(+) の XhoI (平滑化)-BamHI 部位に挿入して pKS09480 を作製した。pKS09480 を HincII で消化してカナマイシンカセットを挿入することにより *phcC* が破壊されたプラスミド pKS09480K を作製した。pKS09480K を KpnI (平滑化)-BamHI で消化し破壊された *phcC* を含む 3.7-kb 断片を pK19*mobsacB* の SalI (平滑化)-BamHI 部位に挿入して *phcC* 破壊用プラスミド pKmb09480K を構築した。

### *phcD* 破壊用プラスミドの作製

pKS09480-500 を XhoI-SacI で消化し *phcD* の全長を含む 2.7-kb の DNA 断片を pBluescript II KS(+) の同部位に挿入することで pKS09500 を作製した。pKS09500 を HincII で消化してカナマイシンカセットを挿入することにより *phcD* が破壊されたプラスミド pKS09500K を作製した。pKS09500K を KpnI-SacI で消化した後、平滑化して破壊された *phcD* を含む 4.0-kb 断片を pK19*mobsacB* の SmaI に挿入して *phcD* 破壊用プラスミド pKmb09500K

を構築した。

### 遺伝子破壊株の作製

SYK-6 株を LB で 24 h 前培養した後、LB に 1% (vol/vol) 植菌して OD<sub>600</sub> が 0.5 になるまで培養した。培養液を 19,000 × g, 15 min, 4°C で遠心分離して集菌し、菌体を 0.3 M sucrose で 2 回洗浄し、300 μl の 0.5 M sucrose に懸濁した。菌体懸濁液 100 μl に対して 1 μg のプラスミド DNA (pKmb09480K, pKmb09500K, pKmb09480-500K) を加え、Gene pulser (Bio-Rad Laboratories Inc.) を用いて抵抗 800 Ω、電圧 12 kV/cm、静電容量 25 μF の条件でパルスをかけた。パルス後、1 ml の LB を加えて 30°C で 6 h 培養した。LB + Km 寒天培地に塗布して相同組換えを起こした株を選抜した。得られた Km 耐性株を 10% sucrose を含む LB + Km で 24 h 培養した。培養液を新たな 10% sucrose を含む LB + Km に 2% (vol/vol) 植菌して 30°C で 24 h 培養した。この操作を 3 回繰り返した後、培養液を LB で希釈して 10% sucrose を含む LB + Km 寒天培地に塗布した。得られたコロニーを遺伝子破壊株候補とした。

### total DNA の回収

SYK-6 株及び遺伝子破壊株を LB で 24 h 培養し、培養液を 19,000 × g, 15 min, 4°C で遠心分離して集菌した。菌体を STE buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl; pH 8.0) で洗浄し、同

buffer に懸濁した。終濃度が 2 g/l となるように lysozyme を加えて混合し、37°C で 15~60 min 静置した。終濃度が 0.2 g/l となるように proteinase K を加えて軽く混合し、37°C で 15~60 min 間静置した。終濃度が 0.5% となるように 10% SDS を混合し、65°C で 15~60 min 静置して溶菌させた。フェノールクロロホルム処理後にエタノール沈殿を行って total DNA を回収した。total DNA を含む沈殿物を RNase A を含む TE buffer に溶解し、37°C にて 1 h の RNA 消化を行って total DNA 試料とした。

### 遺伝子破壊株のサザンハイブリダイゼーション解析

各遺伝子の破壊を確認するために SYK-6 株及び各遺伝子破壊株候補の全 DNA を制限酵素で消化した後、0.8%のアガロースゲル電気泳動で分離し、「第2章のサザンハイブリダイゼーション解析」に従いサザン解析を行った。*phcC*、*phcD* 及び *phcC-phcD* 遺伝子破壊の確認には、全 DNA の HindIII-EcoRI、PstI-SalI 及び XhoI 消化物を使用した。検出のためのプローブにはそれぞれ pT09480、pT09500、pKS9480-9500 から切り出した *phcC* 全長を含む 1.7-kb NdeI-BamHI 断片、*phcD* 全長を含む 1.8-kb NdeI-BamHI 断片及び *phcC-phcD* 全長を含む 3.9-kb Hind-BamHI 断片を用いた。また、*kan* の検出には pIK03 から切り出した *kan* を含む 1.3-kb EcoRV 断片をプローブに用いた。作製した *phcC* 破壊株、*phcD* 破壊株及び *phcC-phcD* 破壊株をそれぞれ SME110、SME111 及び SME112 と命名した。

### 遺伝子破壊株の休止細胞を用いた DCA 及び DCA-C 変換実験

SME110、SME111、及び SME112 を LB で 24 h 前培

養を行い、前培養液を LB に 1% (vol/vol) 植菌して 30°C で 12 h 培養した。培養液を 5,000 × g, 15 min, 4°C で遠心分離して集菌し、菌体を buffer A で洗浄した。菌体を buffer A で懸濁して OD<sub>600</sub> が 0.5 及び 1.0 となるように調製した SME110、SME111、SME112 の休止細胞と 100 μM の DCA 及び DCA-C をそれぞれ 1,500 rpm, 30°C で反応させた。経時的に試料を分取して 19,000 × g, 15 min, 4°C で遠心分離することにより菌体を除いて反応を停止させた。上清を「第1章の HPLC の分析条件」に従って分析し、DCA 及び DCA-C の検出波長はそれぞれ 277 nm と 327 nm とした。

### Chiral-HPLC による DCA と DCA-C の分離

Chiral-HPLC を用いた DCA-C の分析には、ACQUITY UPLC I-Class system (waters) を用いた。移動相は 0.1% のギ酸を含む アセトニトリル 25% と水 75% とし、流速 0.7 ml/min、室温で分析した。カラムは Chiralcel OD-RH column (4.6 by 150 mm; DAICEL) を使用した。

### *phcC* 及び *phcD* 発現プラスミドの作製

SYK-6 株の total DNA を鋳型として *phcC* (SLG\_09480) と *phcD* (SLG\_09500) をそれぞれ増幅するように設計したプライマー (Table 9) 及び PrimeSTAR GXL DNA Polymerase (Takara Bio, Inc.) を用いた PCR によって、5'末端に NdeI 部位及び 3'末端に BamHI 部位が付加された各遺伝子の全長を含む DNA 断片を得た。得られた増幅断片を NdeI-BamHI で消化して pT7Blue の同部位に挿入し、pT09480 と pT09500 を作製した。各プラスミドに導入した遺伝子の塩基配列は「第2章のシーケンス解析」に従って確認した。*phcC* と *phcD* を含む DNA 断片を NdeI-BamHI で切り出して pET-16b の同部位に挿入して *E. coli* での発現用プ

ラスミド pET09480 と pET09500 を取得した。

pET09480 と pET09500 を XbaI-BamHI で消化して得られた DNA 断片を pT7Blue の同部位に挿入して pT09480Xba と pT09500Xba を作製した。これらのプラスミドを HindIII-BamHI で切り出して *phcC* と *phcD* を含む DNA 断片を pJB866 の同部位に挿入して相補用プラスミド pJBVI09480 と pJBVI09500 を作製した。これら相補用プラスミドを KpnI-BamHI で消化して得られた DNA 断片を pJB861 の同部位に挿入して SYK-6 株での発現用プラスミド pJBI09480 と pJBI09500 を作製した。

### 破壊株の相補実験

エレクトロポレーションによって SME110 及び SME111 に pJBVI09480 と pJBVI09500 をそれぞれ導入した。これらの株を LB + Tc で 36 h 以上前培養を行い、得られた前培養液を LB + Tc に 2% (vol/vol) 植菌し、30°C で 24 h 培養した。終濃度 1 mM となるように *m*-toluate を加え、30°C で 12 h 誘導を行った。培養液を 5,000 × *g*, 15 min, 4°C で遠心分離して集菌し、菌体を buffer A で洗浄した。菌体を buffer A で懸濁して OD<sub>600</sub> が 1.0 となるように調製して 100 μM の DCA-C と 1500 rpm, 30°C で反応させた。経時的に試料を分取して 19,000 × *g*, 15 min, 4°C で遠心分離することにより菌体を除いて反応を停止させた。上清を「第1章の HPLC の分析条件」に従って分析し、DCA-C の検出波長は 330 nm とした。

### *E. coli* における *phcC* と *phcD* の発現及び分画

*phcC* 及び *phcD* 発現プラスミド pET09480 と pET09500 を導入した *E. coli* BL21(DE3) 株を LB + Ap で 12 h 以上前培養を行い、得られた前培養液を LB + Ap に 1% (vol/vol) 植菌し、30°C で OD<sub>600</sub> が 0.5 になるまで培養した。終濃度 0.1 mM とな

るように IPTG を加え、16°C で 24 h 培養を行った。培養液を 5,000 × *g*, 5 min, 4°C で遠心分離して集菌し、菌体を buffer A で洗浄した。両菌体を buffer A で懸濁して超音波破碎機によって細胞を破碎した。菌体破碎液を 19,000 × *g*, 15 min, 4°C で遠心分離することにより不溶性画分を除き、上清を細胞抽出液として得た。さらに細胞抽出液から「第1章の細胞抽出液の分画」に従って膜画分を取得した。各遺伝子の発現は「第1章の SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動」に従って調べた。

### SYK-6 株における *phcC* と *phcD* の発現

*phcC* 及び *phcD* 発現プラスミド pJBI09480 と pJBI09500 を導入した SYK-6 株を LB + Km で 24 h 以上前培養し、得られた前培養液を LB + Km に 1% (vol/vol) 植菌し、30°C で 12 h 培養した。終濃度 1 mM となるように *m*-toluate を加え、30°C で 12 h 培養を行った。細胞抽出液及び膜画分は「*E. coli* における *phcC* と *phcD* の発現及び第1章の細胞抽出液の分画」と同様の方法で調製した。

### PhcC 及び PhcD の局在性

「SYK-6 株における *phcC* と *phcD* の発現」により調製した細胞抽出液 (100 μg of protein/ml)、可溶性画分 (PhcC, 200 μg of protein/ml; PhcD, 500 μg of protein/ml) 及び膜画分 (20 μg of protein/ml) を 100 μM DCA-C と 300 μM FAD + 300 μM PMS の存在下で 3 min (PhcC) または 5 min (PhcD) 反応させ、methanol を等量加えて酵素反応を停止させた。反応液を 19,000 × *g*, 15 min, 4°C で遠心分離して得られた上清に終濃度 17% となるように 50% acetonitrile を加えて HPLC で分析した。分析は「第1章の HPLC の分析条件」に従い、DCA-C の検出波長は 327 nm とした。

### DCA-C 変換産物の同定

「*E. coli* における *phcC* と *phcD* の発現及び分画」に従って調製した膜画分 (PhcC, 10 µg of protein/ml; PhcD, 100 µg of protein/ml) と 200 µM DCA-C を 300 µM FAD + 300 µM PMS の存在下において 30°C で反応させた。それぞれ 30 min 反応させ、methanol を等量加えて酵素反応を停止させた。反応液を 19,000 × g, 15 min, 4°C で遠心分離して不溶化したタンパク質を除去し、得られた上清に終濃度 17% となるように 50% acetonitrile を加えて HPLC で分析した。分析は「HPLC の分析条件」に従い、DCA-C の検出波長は 327 nm とした。

### PhcC と PhcD の精製

「*E. coli* における *phcC* と *phcD* の発現及び分画」で得られた PhcC 及び「SYK-6 株における *phcC* と *phcD* の発現」で得られた PhcD を含む膜画分から Membrane Protein Purification Kit (GE Healthcare) を用いて両酵素の精製を行った。界面活性剤は *n*-dodecyl-β-D-maltoside, *n*-decyl-β-D-maltopyranoside, lauryldimethylamine-*N*-oxide, *n*-dodecylphosphocholine, dodecyl octaethylene glycol ether, cyclohexyl-1-pentyl-β-D-maltoside, *n*-octyl-β-D-glucoside を使用した。精製には His Mag Sepharose Ni (GE Healthcare) を利用した。各酵素の精製度合は「第1章の SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動」に従って調べた。

### 薄層クロマトグラフィーによる DCA-C の分離

「DCA-C 変換産物の同定」によって得られた反応液に 0.2 N HCl を加えて pH を 2.0 以下にした。等量の ethyl acetate を加えて混合し、12,000 rpm, 1 min, 室温で遠心分離して ethyl acetate 層を回収した。この操作を 3 回繰り返した。得られた ethyl acetate 層を遠心エバポレーター (CVE-3000;

Tokyo Rikakikai Co. Ltd.) で濃縮し、benzene : ethyl acetate : acetate (10:3:1) を展開溶媒として、薄層クロマトグラフィー (Silica Gel 60 F254; Merck Millipore) を用いて分離した。DCA-C の検出には 254 nm のトランスルミネーターを用いた。R<sub>f</sub> 値 0.41 に観察された DCA-C のスポットを掻き取り、ethyl acetate で抽出し、遠心エバポレーターを用いて減圧乾固した。得られた粉末状の DCA-C を 25% acetonitrile 溶液に溶解し、「Chiral-HPLC による DCA と DCA-C の分離」に従って分析を行った。DCA-C の検出波長は 327 nm とした。

### PhcC 及び PhcD の DCA-C 及びリグニン由来化合物の変換能

「*E. coli* における *phcC* と *phcD* の発現及び分画」に従って調製した膜画分 (PhcC, 5 µg of protein/ml; PhcD, 50 µg of protein/ml) と 100 µM の DCA, DCA-L, DCA-C, DCA-AC, GGE, HMPPD, coniferyl alcohol, β-hydroxypropiovanillone, vanillyl alcohol を 300 µM FAD + 300 µM PMS の存在下において 30°C で反応させた。PhcC は 3 min 及び PhcD は 5 min 反応させ、methanol を等量加えて酵素反応を停止させた。反応液を 19,000 × g, 15 min, 4°C で遠心分離して不溶化したタンパク質を除去し、得られた上清を HPLC で分析した。DCA, DCA-L, DCA-C は「第1章の HPLC の分析条件」に従って分析した。GGE, HMPPD, coniferyl alcohol, β-hydroxypropiovanillone, vanillyl alcohol は 0.1% のギ酸を含むアセトニトリルと水をそれぞれ 20:80, 5:95, 15:85, 10:90, 5:95 の比率で混合した溶媒を移動相とし、流速は 0.3 ml/min で分析した。DCA, DCA-L, DCA-C, GGE, HMPPD, coniferyl alcohol, β-hydroxypropiovanillone, vanillyl alcohol の検出波長はそれぞれ 277, 346, 327, 277, 279, 263, 304, 279 nm とした。

#### PhcC 及び PhcD の至適温度、至適 pH 及び電子受容体

「*E. coli*における *phcC*、*phcD* の発現及び分画」に従って調製した膜画分 (PhcC, 5 µg of protein/ml; PhcD, 50 µg of protein/ml) と 100 µM DCA-C を 300 µM FAD + 300 µM PMS の存在下において、反応温度を 10~50°C の範囲に設定して DCA-C 変換活性を調べた。反応を開始する前に反応溶液を所定の温度で 3 min 保温した後に DCA-C 変換活性を調べた。50 mM GTA buffer (50 mM 3,3-dimethylglutaric acid, 50 mM Tris, 50 mM 2-amino-2-methyl-1,3-propanediol; pH 5.0-9.0) 及び 50 mM CHES buffer [50 mM 2-(*N*-cyclohexylamino)ethanesulfonic acid; pH 8.6-10.0] を用いて各 pH で DCA-C 変換活性を上述の条件で調べた。

電子受容体として PMS の代わりに 2,3-dimethoxy-5-methyl-*p*-benzoquinone (CoQ<sub>0</sub>) もしく

は 2,3-dimethoxy-5-methyl-6-(3-methyl-2-butenyl)-1,4-benzoquinone (CoQ<sub>1</sub>) を用いて上述の条件で DCA-C 変換活性を調べた。

#### PhcC 及び PhcD のフラビン補因子の同定

「*E. coli*における *phcC* と *phcD* の発現及び分画」に従って調製した PhcC または PhcD を含む膜画分 485 µg を純水 100 µl に懸濁し 10 min 煮沸して PhcC 及び PhcD を変性させた。反応液を 19,000 × *g*, 15 min, 4°C で遠心分離してタンパク質を除去し、得られた上清を HPLC で分析した。移動相は 0.1%のギ酸を含むアセトニトリル 10%と水 90%として、流速は 0.5 ml/min とした。カラムは Acquity UPLC BEHC18 column (2.1 by 100 mm; Waters) を使用した。FAD の検出波長は 266 nm とした。



## 結果

## 1. DCA-C 変換酵素遺伝子の探索

DCA-C 変換に関与する酵素遺伝子を単離するために、SYK-6 株の遺伝子ライブラリーを DCA-C 変換能がない *Pseudomonas putida* PpY1100 株及び *Sphingomonas sanguinis* IAM 12578 株に導入して DCA-C 変換能を示す組換え体を選抜した。しかし、約 1,000 個の組換え体について DCA-C 変換能を調べたが DCA-C 変換活性を示す組換え体は得られなかった。

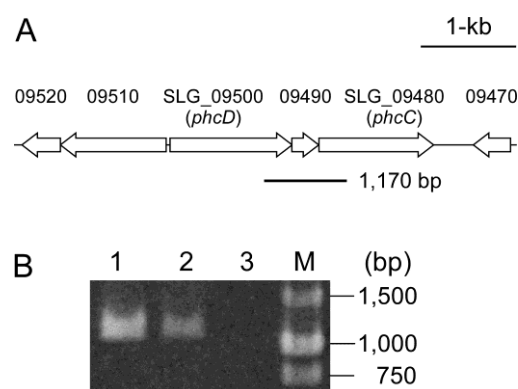
SYK-6 株において FAD + PMS 存在下での DCA-C 酸化活性が、DCA 培養時に低レベルで誘導されたことから (Table 3)、DNA マイクロアレイ解析によって、SEMP 培養時と比較して SEMP + DCA 培養時に誘導される FAD 要求性の酸化還元酵素をコードする遺伝子を探索した。その結果、SEMP 培養時と比較して DCA 培養時に 2.3 倍 ( $P$  value < 0.081) と 2.2 倍 ( $P$  value < 0.013) に発現がそれぞれ誘導される glucose-methanol-choline (GMC) oxidoreductase family に属する SLG\_09480 と SLG\_09500 が見出された (Table S1)。これら遺伝子の発現は DCA の代謝中間体であるバニリン酸の存在下で培養した場合には誘導されなかったことから、DCA 培養時に特異的に誘導されたことが示唆された。

## 2. SYK-6 株ゲノム上における SLG\_09480 と SLG\_09500 の遺伝子配置と転写単位

SLG\_09480 及び SLG\_09500 はいずれも TTG を開始コドンとし、それぞれ 541 アミノ酸と 576 アミノ酸をコードしていた。SLG\_09480 と SLG\_09500 は、機能未知の SnoaL\_2 like domain

を含む 126 アミノ酸の hypothetical protein をコードする SLG\_09490 を挟み、並んで存在した (Fig. 30A)。SLG\_09480 と SLG\_09500 はアミノ酸配列レベルで 42% の相同性を示し、*E. coli* K-12 株の choline dehydrogenase (96) とそれぞれ 41% と 40% の相同性を示した。

SLG\_09480 及び SLG\_09500 が同一の転写単位であるかを調べるために、DCA 存在下で培養した SYK-6 株の total RNA を用いて RT-PCR 解析を行った。その結果、SLG\_09480-SLG\_09500 間の増幅が見られたことから、これら遺伝子がオペロンを形成していることが示された (Fig. 30B)。



**Fig. 30.** *phcC-phcD* 遺伝子間領域の RT-PCR 解析. (A) *phcC* 及び *phcD* 周辺の ORF マップ. ORF の下にある線は RT-PCR の増幅領域を示す. (B) RT-PCR 増幅産物のアガロースゲル電気泳動. PCR は SYK-6 株の total DNA (lane 1); SYK-6 株の total RNA 逆転写反応産物 (lane 2); SYK-6 株の total RNA (lane 3) を用いて行った. M, molecular size markers.

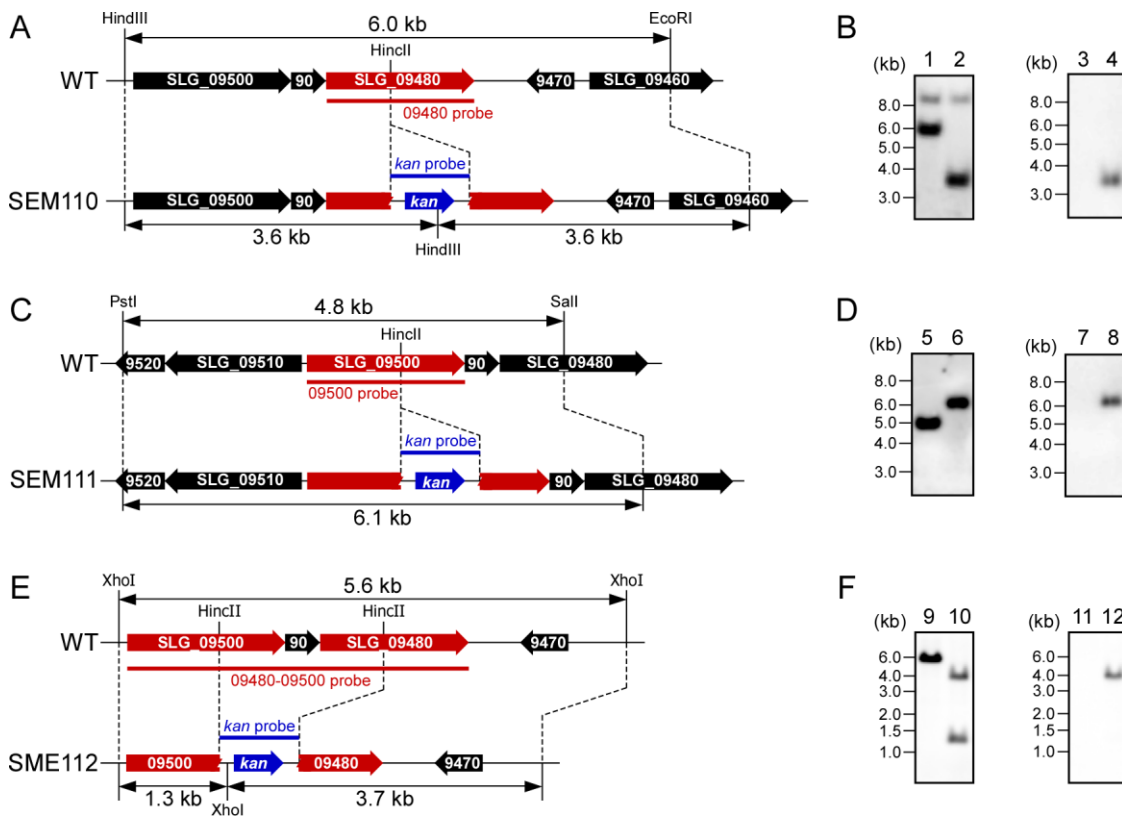
SLG\_09480 と SLG\_09500 近傍に DCA 代謝に関与する可能性のある遺伝子が存在するかを調べたところ、MarR-type transcriptional regulator をコードする SLG\_09520 と lignostilbene  $\alpha,\beta$ -

dioxygenase をコードする SLG\_09440 が存在した。これら遺伝子が SLG\_09480 と SLG\_09500 の転写制御及び DCA-S の変換に関与する可能性があるため、今後、遺伝子破壊株を作製し検証する必要がある。SLG\_09420 は aryl ADH をコードしており、第2章でその遺伝子産物が DCA の酸化能を有することが示された (Table 6)。また、SLG\_09400 と SLG\_09510 は ALDH をコードするが、第2章でこれらの遺伝子産物には DCA-L の変換活性がないまたは比較的低い活性 ( $20 \pm 1$  mU/mg of protein) を示すことを

確認している (Table 7)。

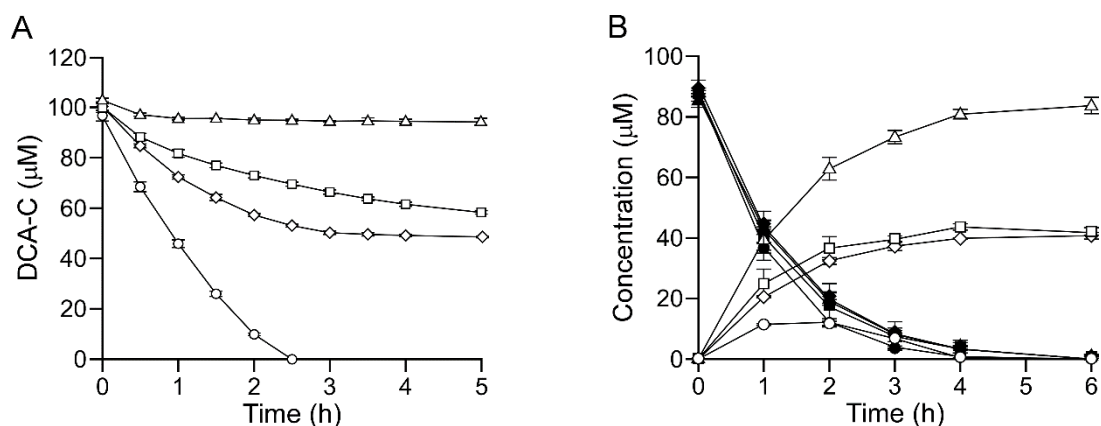
### 3. DCA-C 変換酵素遺伝子 *phcC* と *phcD* の同定

SLG\_09480 と SLG\_09500 が DCA-C の変換に関与しているかを調べるために相同組換えによって SLG\_09480 破壊株 (SME110)、SLG\_09500 破壊株 (SME111)、及び SLG\_09480 SLG\_09500 二重破壊株 (SME112) を作製した (Fig. 31)。



**Fig. 31.** SLG\_09480, SLG\_09500, SLG\_09480-9500 破壊株のサザンハイブリダイゼーション解析.

(A, C, E) SME110, SME111, SME112 における *kan* 挿入領域の模式図. (B) SME110 のサザン解析. Lanes: 1 and 3, SYK-6 株の全 DNA HindIII-EcoRI 消化物; 2 and 4, SME110 の全 DNA HindIII-EcoRI 消化物. DIG 標識した 09480 プローブ (lane 1, 2) と *kan* プローブ (lane 3, 4) を用いてハイブリダイゼーションを行った. (D) SME111 のサザン解析. Lanes: 5 and 7, SYK-6 株の全 DNA PstI-Sall 消化物; 6 and 8, SME111 の全 DNA PstI-Sall 消化物. DIG 標識した 09500 プローブ (lane 5, 6) と *kan* プローブ (lane 7, 8) を用いてハイブリダイゼーションを行った. (F) SME112 のサザン解析. Lanes: 9 and 11, SYK-6 株の全 DNA XhoI 消化物; 10 and 12, SME112 の全 DNA XhoI 消化物. DIG 標識した 09480-9500 プローブ (lane 9, 10) と *kan* プローブ (lane 11, 12) を用いてハイブリダイゼーションを行った.



**Fig. 32.** SME110, SME111, SME112 の DCA-C 及び DCA 変換能.

(A) LB で培養した SYK-6 株, SME110, SME111, SME112 の休止細胞 ( $OD_{600} = 1.0$ ) による  $100 \mu\text{M}$  DCA-C の変換. (B) LB で培養した SYK-6 株, SME110, SME111, SME112 の休止細胞 ( $OD_{600} = 0.5$ ) による  $100 \mu\text{M}$  DCA の変換と DCA-C の蓄積. 経時的に反応上清をサンプリングし HPLC を用いて分析を行った. Symbols: SYK-6 (circles); SME110 (squares); SME111 (diamonds); SME112 (triangles). 黒と白のシンボルはそれぞれ DCA と DCA-C の濃度を示す. それぞれの値は 3 回測定した平均値を示す. エラーバーは標準偏差を示す.

各破壊株の休止細胞と  $100 \mu\text{M}$  DCA-C を反応させ HPLC で変換活性を調べた結果、SME110 と SME111 の DCA-C 変換活性は顕著に低下しており、野生株が 2.5 h の反応で  $100 \mu\text{M}$  DCA-C の全てを変換するのに対して 5 h の反応において基質の約 50% が残存した (Fig. 32A)。さらに SME112 においては DCA-C の変換活性が消失した。一方、各破壊株の休止細胞を DCA と反応させた場合、DCA の変換速度に変化は見られなかったが、野生株が DCA の代謝中に DCA-C をほとんど蓄積しなかったのに対して、SME110 と SME111 は添加した DCA の約 50% モルに相当する DCA-C を蓄積した (Fig. 32B)。また、SME112 は添加した DCA とほぼ等モルの DCA-C を蓄積した。以上の結果から、SYK-6 株において SLG\_09480 と SLG\_09500 は DCA-C の変換に必須の遺伝子であることが明らかとなり、各遺伝子をそれぞれ *phcC* 及び *phcD* と命名した。

SME110 及び SME111 が DCA-C の約 50% を

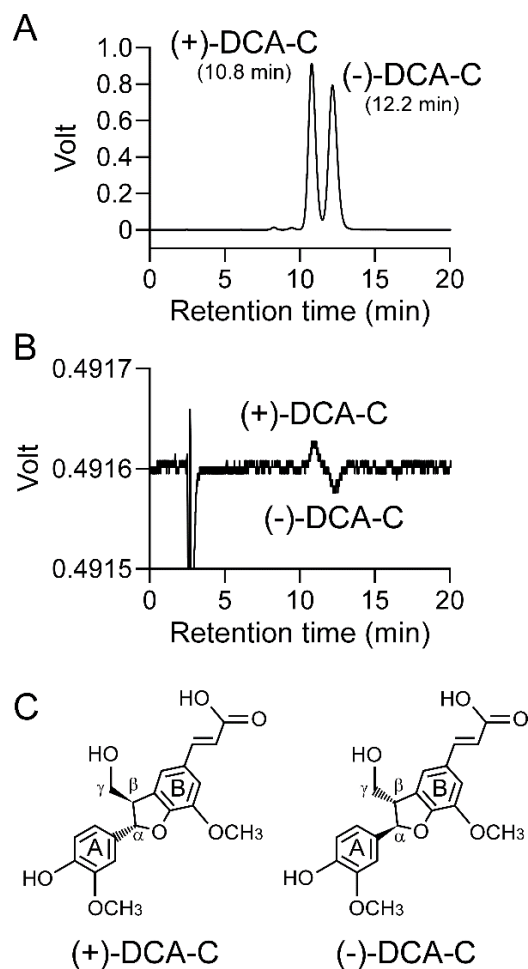
変換したことから、PhcC と PhcD が DCA-C に含まれると考えられる立体異性体の (+)-DCA-C と (-)-DCA-C のいずれかを認識していることが予想された。DCA-C 標品に含まれる立体異性体を調べるために DCA-C を chiral-HPLC で分析した結果、保持時間 10.8 min と 12.2 min の 2 つのピークに分離され、DCA-C 標品に 2 つの異性体が含まれていることが示された (Fig. 33A)。旋光度分析の結果から前のピークが (+)-DCA-C、後ろのピークが (-)-DCA-C であることが明らかとなった (Fig. 33B)。DCA-C 標品には (+)-DCA-C (ca. 49.6%) と (-)-DCA-C (ca. 50.4%) がほぼ等量ずつ含まれていた。

SME110 と SME111 の休止細胞を  $100 \mu\text{M}$  DCA-C と 5 h 反応させ、反応液を chiral-HPLC で分析した。その結果、SME110 の反応液では (-)-DCA-C がほぼ消失し、(+)-DCA-C が残存した (Fig. 34B)。一方、SME111 との反応においては逆の結果が得られた (Fig. 34C)。以上の結果から、PhcC と PhcD は、それぞれ (+)-DCA-C と

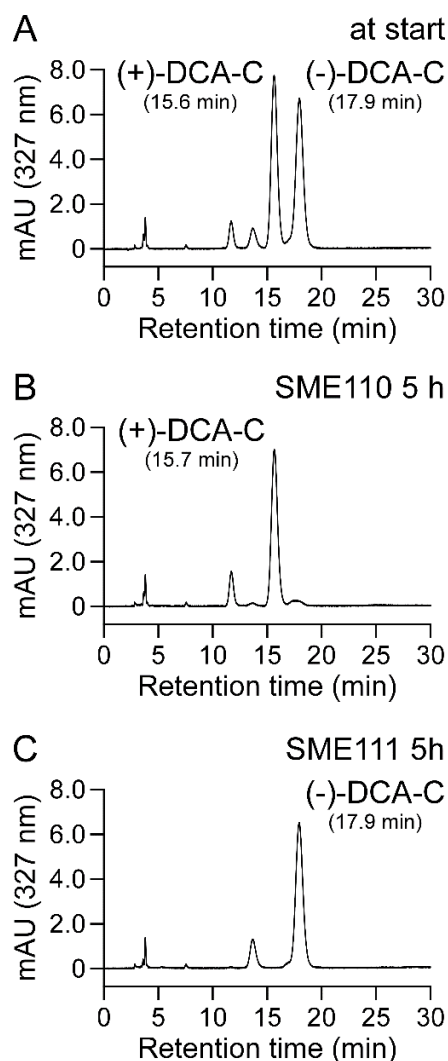
(-)-DCA-Cに高い特異性を持つことが強く示唆された。

DCA-C 変換能の欠損が真に *phcC* と *phcD* を破壊したことに起因するのかを調べるために *phcC* 及び *phcD* を pJB866 ベクターに組み込んだ pJBVI09480 と pJBVI09500 をそれぞれ導入

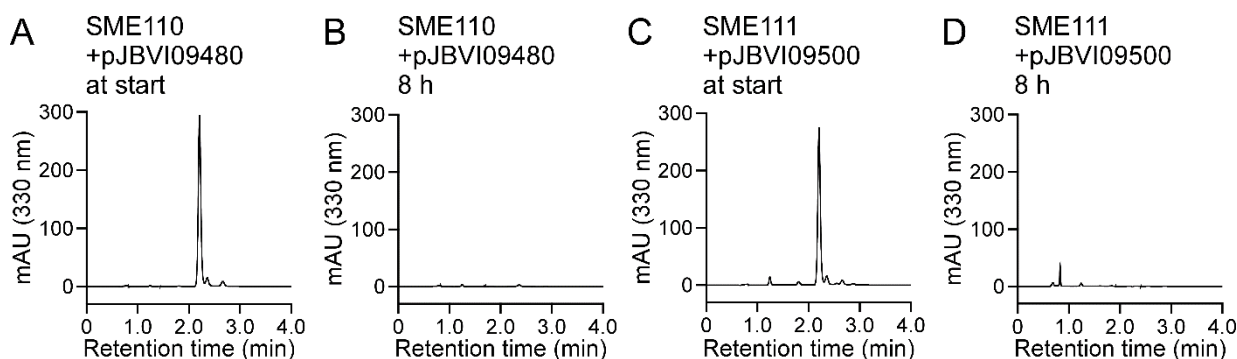
した SME110 と SME111 の休止細胞を用いて DCA-C の変換能を調べた。その結果、相補プラスミドを導入した SME110 と SME111 は DCA-C を完全に変換することが示された (Fig. 35)。以上の結果から両遺伝子が DCA-C の変換に必須であることが明らかとなった。



**Fig. 33.** Chiral-HPLC による DCA-C の分離。  
(A) UV 検出器 (327 nm) によるクロマトグラム。  
(B) 旋光度計によるクロマトグラム。  
(C) (+)-DCA と (-)-DCA の絶対配置はそれぞれ (2*S*,3*R*)-DCA 及び (2*R*,3*S*)-DCA であることが報告されている (97)。



**Fig. 34.** SME110 及び SME111 の DCA-C に対する立体選択性。  
LB で培養した SME110 及び SME111 の休止細胞 (OD<sub>600</sub> = 1.0) と 200 μM DCA-C を反応させ、経時的に反応上清をサンプリングし chiral-HPLC で分析した。検出波長は 327 nm とした。(A) SEM110 と DCA-C の反応直後の chiral-HPLC クロマトグラム。  
(B) SEM110 と DCA-C の反応 5 h 後の chiral-HPLC クロマトグラム。  
(C) SEM111 と DCA-C の反応 5 h 後の chiral-HPLC クロマトグラム。



**Fig. 35.** 相補プラスミドを導入した SME110 及び SME111 の DCA-C 変換能.

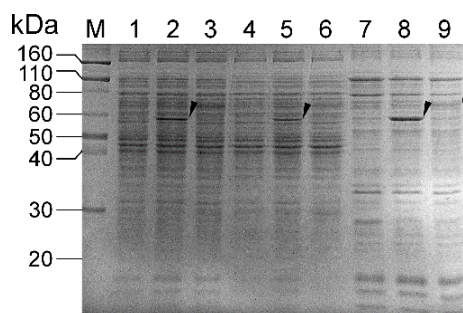
相補プラスミドを導入した SME110 及び SME111 の休止細胞 ( $OD_{600} = 1.0$ ) と  $100 \mu\text{M}$  DCA-C を反応させ、経時的に反応上清をサンプリングし HPLC で分析した. 検出波長は  $330 \text{ nm}$  とした. (A) *phcC* 相補プラスミド pJBVI09480 を導入した SEM110 と DCA-C の反応直後の HPLC クロマトグラム. (B) pJBVI09480 を導入した SEM110 と DCA-C の反応 8 h 後の HPLC クロマトグラム. (C) *phcD* 相補プラスミド pJBVI09500 を導入した SEM111 と DCA-C の反応直後の HPLC クロマトグラム. (D) pJBVI09500 を導入した SEM111 と DCA-C の反応 8 h 後の HPLC クロマトグラム.

#### 4. PhcC と PhcD の局在

第1章での解析から、SYK-6株においてDCA-C変換酵素は可溶性画分と膜画分の両方に局在することが示された (Table 3)。そこで、PhcC と PhcD の SYK-6 株における細胞内局在性を明らかにするために、pJB861 をベクターに用いて *phcC* と *phcD* を SYK-6 株で発現させ、DCA 酸化活性の細胞内局在性を調べた。

*phcC* と *phcD* をそれぞれ発現させた細胞から得られた抽出液の DCA-C 変換活性は SYK-6 株と比較して、それぞれ 95 倍 ( $180 \pm 4 \text{ mU/mg of protein}$ ) と 26 倍 ( $49 \pm 4 \text{ mU/mg of protein}$ ) に上昇した。これらの結果から導入した両遺伝子が SYK-6 株において強く発現したことが示された。細胞抽出液を超遠心によって可溶性画分と膜画分に分離し、SDS-PAGE によって解析した結果、PhcC の生産を示す  $59 \text{ kDa}$  のバンドが可溶性画分と膜画分の両方で観察され、PhcD については膜画分に  $65 \text{ kDa}$  のバンドが見られた (Fig. 36)。細胞抽出液  $10 \text{ mg}$  あたりの PhcC と

PhcD を含む各膜画分 (PhcC,  $1.1 \text{ mg}$ ; PhcD,  $1.2 \text{ mg}$ ) の DCA-C 変換活性はそれぞれ  $340 \pm 40 \text{ mU}$  と  $330 \pm 60 \text{ mU}$  であり、可溶性画分 (PhcC,  $6.8 \text{ mg}$ ; PhcD,  $6.7 \text{ mg}$ ) にはそれらの  $162\%$  ( $550 \pm 5 \text{ mU}$ ) 及び  $11\%$  ( $37 \pm 3 \text{ mU}$ ) の活性が観察された。これらの結果から PhcC と PhcD は存在比に違いがあるものの細胞膜と細胞質の両方に局在することが示唆された。



**Fig. 36.** *phcC* と *phcD* の SYK-6 株での発現.

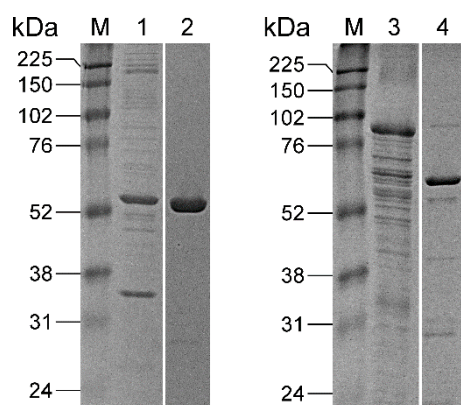
SDS-12% PAGE によって *phcC* または *phcD* を導入した SYK-6 株の細胞抽出液、可溶性画分、膜画分 (各  $10 \mu\text{g of protein}$ ) を分離し、クーマシーブリリアントブルーによって染色した. Lanes: 1, 4, and 7, pJB861 (vector); 2, 5, and 8, pJBVI09480 (*phcC*); 3, 6, and 9, pJBVI09500 (*phcD*); 1-3, 細胞抽出液; 4-6, 可溶性画分; 7-9, 膜画分; M, molecular size markers.



### 5. *phcC* と *phcD* の発現と酵素精製

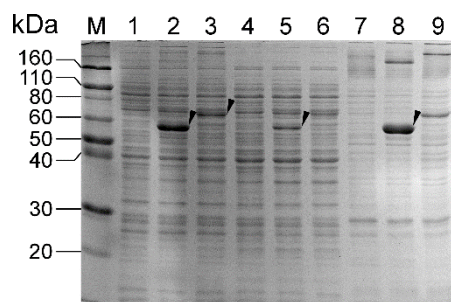
PhcC と PhcD の酵素学的諸性質を明らかにするために、N 末端に His タグを融合した *phcC* と *phcD* を *E. coli* 及び SYK-6 株で発現させ精製を試みた。*phcC* を pET-16b に導入したプラスミドを *E. coli* で発現させ、*n*-dodecyl- $\beta$ -D-maltoside 及び他の 6 種類の界面活性剤を用いて膜画分から酵素を可溶化し、精製を行った (Fig. 37)。しかし、精製 PhcC の DCA-C に対する比活性は、300  $\mu$ M FAD の存在下において膜画分の約 12% ( $260 \pm 20$  mU/mg) にまで低下した。一方、His-

tag 融合 *phcD* を pJB861 に導入したプラスミドを SYK-6 株で発現させ、膜画分から界面活性剤を用いて可溶化後、精製を行ったが、300  $\mu$ M FAD + PMS の存在下において精製 PhcD は失活していた。また、*phcC* を発現させた *E. coli* の可溶性画分から精製した PhcC は失活していた。そこで本研究では、*phcC* と *phcD* を高発現させた *E. coli* の細胞抽出液から調製した膜画分を用いて酵素学的諸性質を調べることにした。膜画分において、*phcD* は *phcC* と比較して発現量が低いものの、両遺伝子産物の解析には十分な発現が得られた (Fig. 38)。



**Fig. 37.** *E. coli* 及び SYK-6 株で生産させた PhcC と PhcD の精製.

SDS-12% PAGE によって 10  $\mu$ g のタンパク質を分離し、クーマシーブリリアントブルーによって染色した. Lanes: 1-2, *E. coli* BL21(DE3) cells harboring pET09480 (*phcC*); 3-4, SYK-6 cells harboring pJB109500 (*phcD*); 1 and 3, 膜画分; 2 and 4, Ni Sepharose 溶出画分; M, molecular size markers.



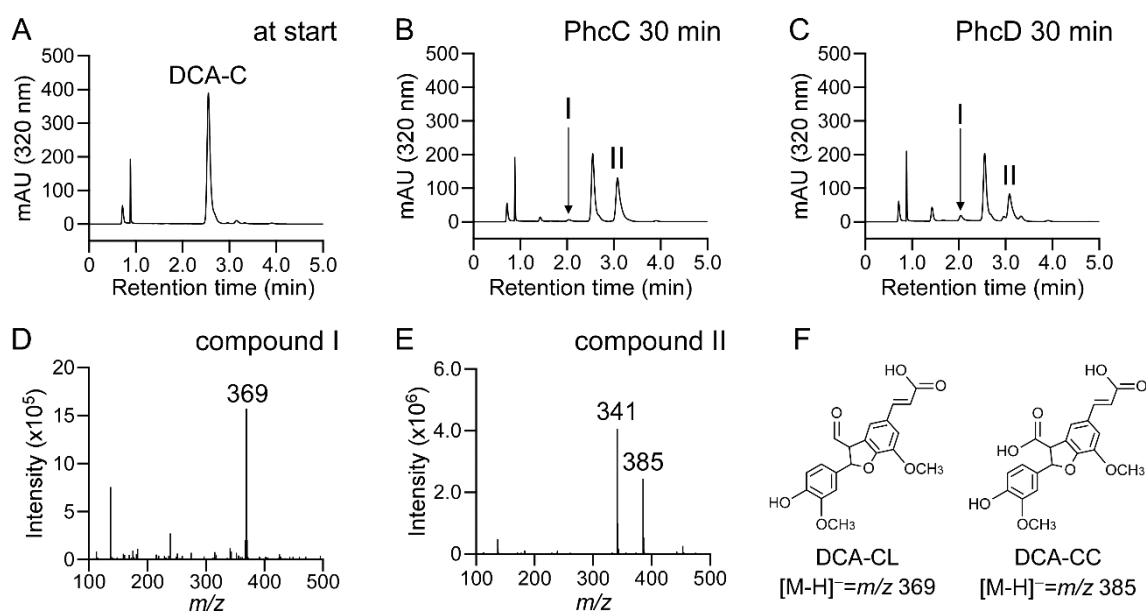
**Fig. 38.** *E. coli* BL21(DE3) での *phcC* 及び *phcD* の発現.

SDS-12% PAGE によって 10  $\mu$ g のタンパク質を分離し、クーマシーブリリアントブルーによって染色した. Lanes: 1, 4, and 7, *E. coli* BL21(DE3) cells pET-16b (vector); 2, 5, and 8, *E. coli* BL21(DE3) cells pET09480 (*phcC*); 3, 6, and 9, pET09500 (*phcD*), 1-3, 細胞抽出液; 4-6, 可溶性画分; 7-9, 膜画分; M, molecular size markers.

## 6. PhcC と PhcD の DCA-C 変換活性

PhcC と PhcD が実際に DCA-C の酸化能を有するかを調べるために PhcC (10  $\mu\text{g}$  of protein/ml) または PhcD (100  $\mu\text{g}$  of protein/ml) を含む膜画分と 200  $\mu\text{M}$  DCA-C を 300  $\mu\text{M}$  FAD + PMS の存在下で 30 min 反応させ、反応液を HPLC で分

析した。その結果、保持時間 3.1 min に DCA-CC が主生成物として検出され、少量の DCA-CL (保持時間 2.0 min) の生産が見られた (Fig. 39)。これらの結果から、PhcC 及び PhcD は DCA-C の A 環側鎖 C $\gamma$ 位アルコールの酸化能を有することが示された。

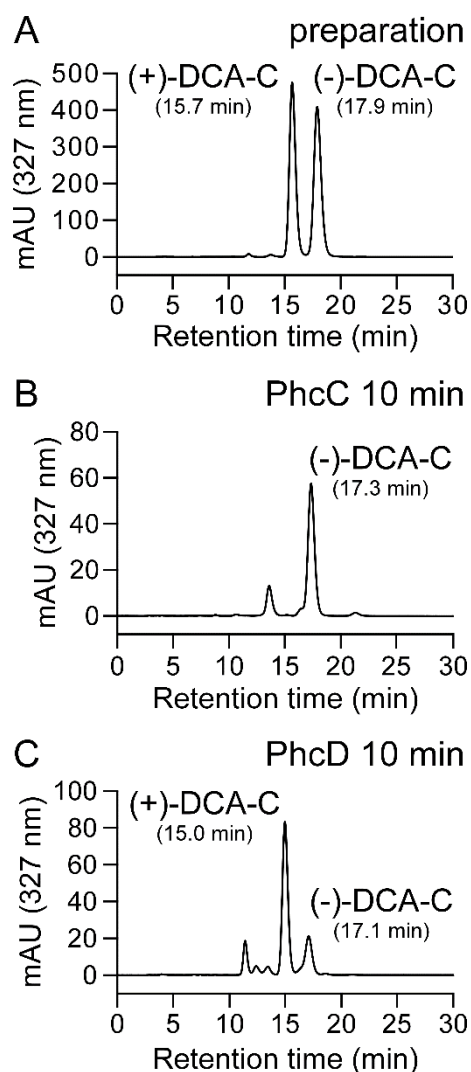


**Fig. 39.** *phcC* 及び *phcD* を発現させた *E. coli* の膜画分による DCA-C の変換。

PhcC または PhcD を含む膜画分 (PhcC, 10  $\mu\text{g}$  of protein/ml; PhcD, 100  $\mu\text{g}$  of protein/ml) を 300  $\mu\text{M}$  FAD + PMS 存在下で 200  $\mu\text{M}$  DCA-C と 30 min 反応させ反応液を LC-MS で分析した。HPLC 分析は検出波長 320 nm で行った。(A) PhcC を含む膜画分と DCA-C の反応直後の HPLC クロマトグラム。(B) PhcC を含む膜画分の 30 min 反応後の HPLC クロマトグラム。(C) PhcD を含む膜画分と DCA-C の 30 min 反応後の HPLC クロマトグラム。(D) compound I のネガティブイオン ESI-MS スペクトル。(E) compound II のネガティブイオン ESI-MS スペクトル。(F) DCA-CL と DCA-CC の構造。

## 7. PhcC と PhcD の立体選択性

*phcC* 及び *phcD* 破壊株の解析から、PhcC と PhcD が DCA-C の異なる立体異性体に特異性を持つことが示唆された。両酵素の DCA-C 異性体に対する立体選択性を確かめるために、PhcC または PhcD を含む膜画分 (PhcC, 10  $\mu$ g of protein/ml; PhcD, 100  $\mu$ g of protein/ml) と 200  $\mu$ M DCA-C を 300  $\mu$ M FAD + PMS の存在下で 10 min 反応させた。Chiral-HPLC においては DCA-C と生成物である DCA-CC の保持時間が近接しているため、反応で残存した DCA-C を薄層クロマトグラフィーで分離回収し、その後 chiral-HPLC で分析した。その結果、PhcC 及び PhcD と DCA-C の反応においてそれぞれ (-)-DCA-C と (+)-DCA-C が残存していることが示された (Fig. 40)。以上の結果から、PhcC 及び PhcD がそれぞれ (+)-DCA-C と (-)-DCA-C に対して特異性を持つことが明らかとなった。



**Fig. 40.** *phcC* 及び *phcD* を発現させた *E. coli* の膜画分の DCA-C に対する立体選択性。

PhcC または PhcD を含む膜画分 (PhcC, 10  $\mu$ g of protein/ml; PhcD, 100  $\mu$ g of protein/ml) を 300  $\mu$ M FAD + PMS 存在下で 200  $\mu$ M DCA-C と 10 min 反応させ反応液を LC-MS で分析した。HPLC 分析は検出波長 327 nm で行った。(A) DCA-C 標品の chiral-HPLC クロマトグラム。(B) PhcC を含む膜画分と DCA-C との反応 10 min 後に残存した DCA-C の chiral-HPLC クロマトグラム。(C) PhcD を含む膜画分と DCA-C との反応 10 min 後に残存した chiral-HPLC クロマトグラム。

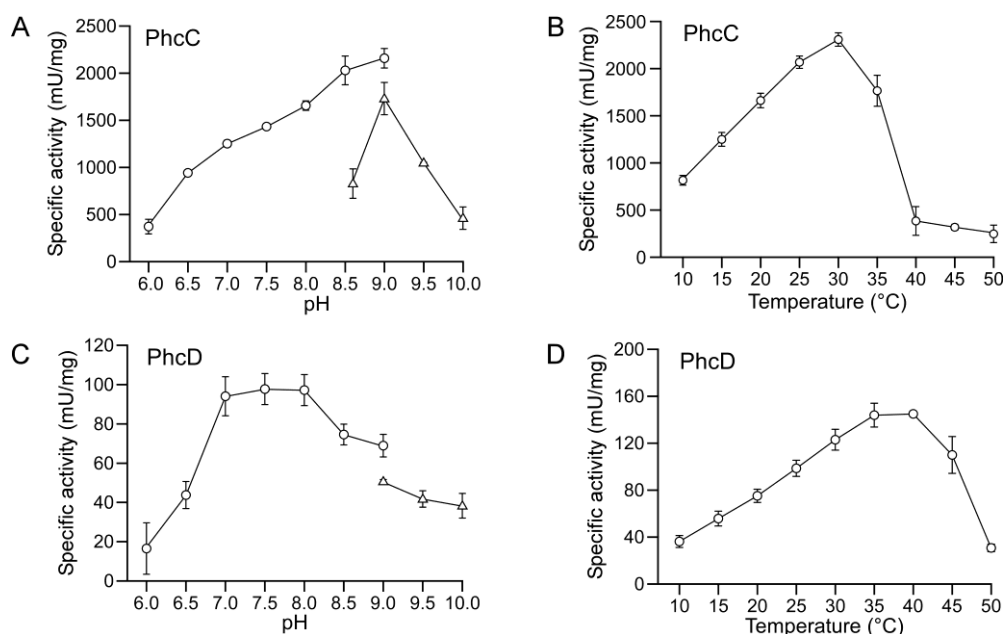


## 8. PhcC と PhcD の至適温度と至適 pH

PhcC または PhcD を含む膜画分 (PhcC, 5  $\mu$ g of protein/ml; PhcD, 50  $\mu$ g of protein/ml) と 100  $\mu$ M DCA-C を 300  $\mu$ M FAD + PMS 存在下で反応させ、PhcC 及び PhcD の DCA-C 変換における至適温度と至適 pH を測定した。至適 pH は GTA buffer (pH 5.0~9.0) と CHES buffer (pH 8.6~10.0) を用いて 30°C で調べた。至適温度は GTA buffer (PhcC, pH 9.0; PhcD, pH 7.5) を用いて 10~50°C の間で反応させることで至適温度を調べた。その結果、PhcC の至適温度は 30°C で至適 pH は 9.0、PhcD の至適温度は 40°C で至適 pH は 7.0~8.0 であった (Fig. 41)。

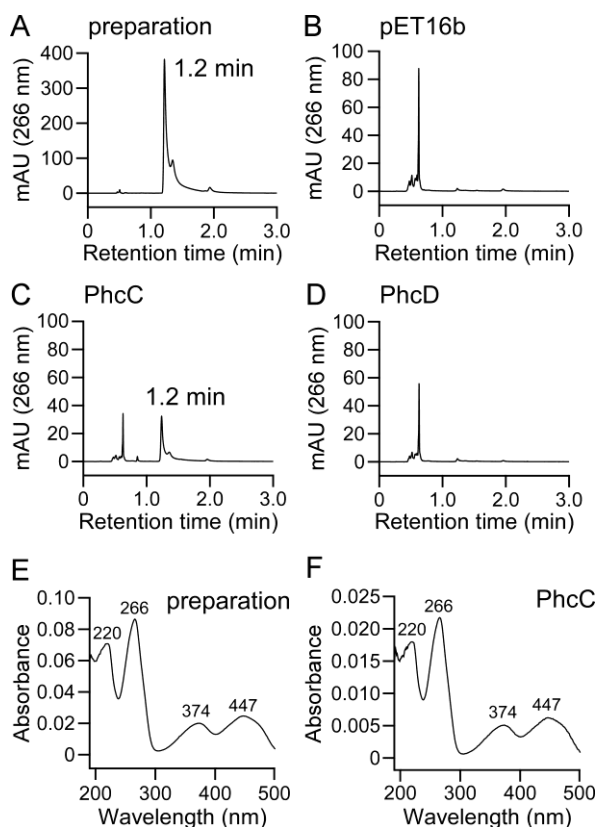
## 9. PhcC と PhcD のフラビン補因子の同定

GMC oxidoreductase family に属する酵素は FAD を補因子として要求することが知られている (98)。そこで、PhcC と PhcD に結合しているフラビンを調べるために *phcC* または *phcD* を発現させた *E. coli* の膜画分 (485  $\mu$ g) を 100  $\mu$ l の純水で懸濁し、10 min 煮沸して上清を HPLC で分析した。FAD 標品との比較の結果、PhcC は補欠分子族として FAD を含むことが示された (Fig. 42C, E)。一方、PhcD の煮沸物上清からは有意なピークは検出されなかった (Fig. 42D)。これは、PhcD の発現量が PhcC と比較してかなり低く、検出限界以下であったためと考えられた。



**Fig. 41.** PhcC 及び PhcD の至適温度と至適 pH.

(A and C) PhcC 及び PhcD の至適 pH. GTA buffer (pH 5.0~9.0) と CHES buffer (pH 8.6~10.0) を用いて PhcC または PhcD を含む膜画分 (PhcC, 5  $\mu$ g of protein/ml; PhcD, 50  $\mu$ g of protein/ml) と 100  $\mu$ M DCA-C を 300  $\mu$ M FAD と 300  $\mu$ M PMS の存在下において 30°C で反応させ、基質の減少量から比活性を求めた. (B and D) PhcC 及び PhcD の至適温度. GTA buffer (PhcC, pH 9.0; PhcD, pH 7.5) を用いて PhcC または PhcD を含む膜画分 (PhcC, 5  $\mu$ g of protein/ml; PhcD, 50  $\mu$ g of protein/ml) と 100  $\mu$ M DCA-C を 300  $\mu$ M FAD と 300  $\mu$ M PMS の存在下で 10~50°C で反応させ、基質の減少量から比活性を求めた.それぞれの値は 3 回測定した平均値を示す. エラーバーは標準偏差を示す.



**Fig. 42.** PhcC と PhcD に含まれるフラビン補因子の同定.

PhcC または PhcD を含む膜画分を純水に懸濁し 10 min 煮沸することでフラビンを抽出して HPLC で分析した. HPLC の検出は 266 nm で行った. (A) FAD 標品 (50  $\mu$ M) の HPLC クロマトグラム. (B) pET-16b を導入した *E. coli* の膜画分を煮沸した上清の HPLC クロマトグラム. (C) PhcC を煮沸した上清の HPLC クロマトグラム. (D) PhcD 抽出成分の HPLC クロマトグラム. (E) FAD 標品の UV-VIS スペクトル. (F) PhcC を煮沸した上清の UV-VIS スペクトル.

### 10. PhcC と PhcD の基質特異性

PhcC と PhcD の基質特異性を調べるために、それぞれを含む膜画分 (PhcC, 5  $\mu$ g of protein/ml; PhcD, 50  $\mu$ g of protein/ml) と 100  $\mu$ M

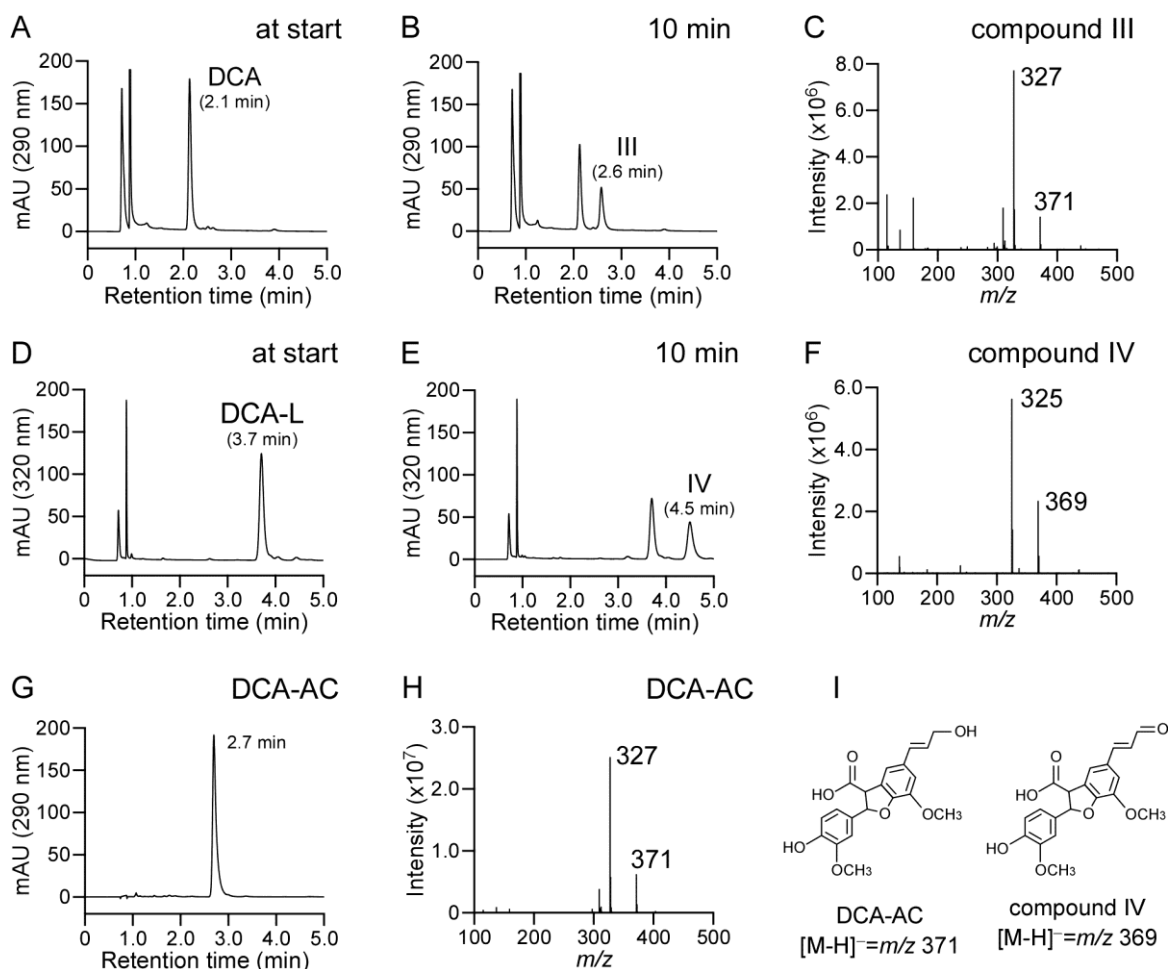
の DCA、DCA-L、DCA-C、 $\beta$ -O-4'型化合物 (GGE) 及び  $\beta$ -1'型化合物 (HMPPD)、リグニン由来モノマーの coniferyl alcohol、 $\beta$ -hydroxypropiovanillone、vanillyl alcohol を 300  $\mu$ M FAD + PMS の存在下で反応させ、反応液を HPLC で分析した. その結果、PhcC 及び PhcD は DCA に対してそれぞれ  $2,200 \pm 100$  mU/mg of protein と  $230 \pm 8$  mU/mg of protein の活性を示し、DCA-C に対する活性 ( $2,100 \pm 300$  mU/mg of protein 及び  $180 \pm 20$  mU/mg of protein) と同等の値を示した (Table 10). PhcC と DCA との反応で生成した産物を LC-MS で解析した結果、DCA の A 環側鎖 C $\gamma$ 位アルコールがカルボン酸に酸化されていることが示された (Fig. 43B, C). また PhcC と PhcD は DCA-L に対しても活性を有しており DCA-C に対する活性の 67% 及び 47% を示した. PhcC と DCA-L との反応によって生成した産物も A 環側鎖 C $\gamma$ 位アルコールがカルボン酸に酸化されていることが示された (Fig. 43E, F). PhcC は coniferyl alcohol に対して DCA-C に対する比活性の約 4% の活性を示したが、PhcC 及び PhcD は他のリグニン二量体化合物や単量体化合物に対して活性を示さなかった.

**Table 10.** PhcC 及び PhcD の DCA 及びリグニン由来化合物に対する酸化活性

Substrate	Specific activity <sup>a, b</sup> (mU/mg)	
	PhcC	PhcD
DCA	$2200 \pm 100$	$230 \pm 8$
DCA-L	$1400 \pm 100$	$85 \pm 20$
DCA-C	$2100 \pm 300$	$180 \pm 20$
GGE	ND	ND
HMPPD	ND	ND
Coniferyl alcohol	$80 \pm 20$	ND
$\beta$ -Hydroxypropiovanillone	ND	ND
Vanillyl alcohol	ND	ND

<sup>a</sup> ND, not detected.

<sup>b</sup> それぞれの値は 3 回測定した平均値を示す.  
± は標準偏差を示す.



**Fig. 43.** *phcC* 及び *phcD* を発現させた *E. coli* の膜画分による DCA と DCA-L の変換.

PhcC または PhcD を含む膜画分 (PhcC, 5 µg of protein/ml; PhcD, 50 µg of protein/ml) を 300 µM FAD + PMS 存在下で 200 µM DCA もしくは DCA-L と 10 min 反応させ、反応液を LC-MS で分析した. HPLC 分析の検出波長は、DCA 及び DCA-L を基質とした時、それぞれ 290 nm と 320 nm とした. (A) PhcC を含む膜画分と DCA の反応直後の HPLC クロマトグラム. (B) PhcC を含む膜画分の反応 10 min 後の HPLC クロマトグラム. (D) PhcC を含む膜画分と DCA-L の反応直後の HPLC クロマトグラム. (E) PhcC を含む膜画分と DCA-L の反応 10 min 後の HPLC クロマトグラム. (F) DCA-AC と compound IV の構造. (G) DCA-AC 標品の HPLC クロマトグラム. (H) DCA-AC 標品のネガティブイオン ESI-MS スペクトル. (I) DCA-AC と compound IV の構造.

## 11. PhcC と PhcD の電子受容体

*phcC* と *phcD* をそれぞれ発現させた SYK-6 株での DCA-C 酸化活性に基づくと、約半分の PhcC と大部分の PhcD が細胞膜に存在すると考えられた. 従って、SYK-6 株の DCA-C 酸化反応においては、膜に存在するユビキノ

(CoQ<sub>10</sub>) を電子受容体として利用している可能性が考えられた. そこで、PMS の代わりに CoQ<sub>10</sub> 誘導体である 2,3-dimethoxy-5-methyl-*p*-benzoquinone (CoQ<sub>0</sub>) もしくは 2,3-dimethoxy-5-methyl-6-(3-methyl-2-butenyl)-1,4-benzoquinone (CoQ<sub>1</sub>) を用いて PhcC と PhcD の DCA-C 変換活性を調べた. PhcC または PhcD を含む膜画分

(PhcC, 5  $\mu$ g of protein/ml; PhcD, 50  $\mu$ g of protein/ml) と 200  $\mu$ M DCA-C を 300  $\mu$ M FAD と 300  $\mu$ M CoQ<sub>0</sub> もしくは CoQ<sub>1</sub> の存在下で反応させ、反応液を HPLC で分析した。その結果、PhcC では CoQ<sub>0</sub> 及び CoQ<sub>1</sub> を用いた時にそれぞれ 2,000  $\pm$  200 mU/mg of protein と 1,900  $\pm$  600 mU/mg of protein、PhcD では 180  $\pm$  20 mU/mg of protein と 160  $\pm$  10 mU/mg of protein の比活性が得られた (Table 11)。これらの値は PMS を電子受容体とした場合とほぼ同等であったことから、PhcC と PhcD はユビキノン系を電子受容体として利用することが強く示唆された。

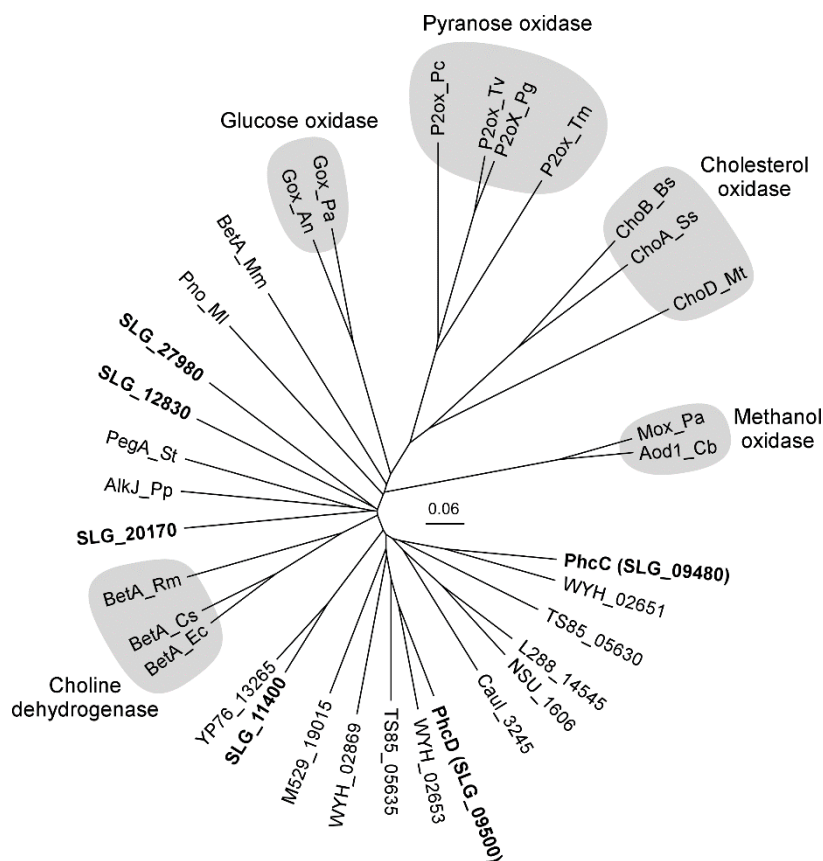
**Table 11.** PhcC 及び PhcD の電子受容体存在下における DCA-C 酸化活性

Electron acceptor	Specific activity <sup>a</sup> (mU/mg)	
	PhcC	PhcD
PMS	2100 $\pm$ 300	180 $\pm$ 20
CoQ <sub>0</sub>	2000 $\pm$ 200	180 $\pm$ 10
CoQ <sub>1</sub>	1900 $\pm$ 600	160 $\pm$ 10
None	770 $\pm$ 300	60 $\pm$ 10

<sup>a</sup>それぞれの値は3回測定した平均値を示す。  
 $\pm$  は標準偏差を示す。



### 第3章



**Fig. 45.** PhcC及びPhcDと既知または推定のGMC oxidoreductase family enzymeの系統樹.

GMC oxidoreductase family enzymes: PhcC (SLG\_09480) and PhcD (SLG\_09500), DCA-C oxidases of *Sphingobium* sp. SYK-6; BetA\_Ec, choline dehydrogenase of *E. coli* K-12 (P17444); BetA\_Cs, choline dehydrogenase of *Chromohalobacter salexigens* DSM 3043 (Q9L4K0); BetA\_Rm, choline dehydrogenase of *Rhizobium meliloti* 1021 (P54223); AlkJ\_Pp, alcohol dehydrogenase of *Pseudomonas putida* GPo1 (Q9WWW2); PegA\_St, polyethylene glycol dehydrogenase of *Sphingopyxis terrae* (Q93I49); Pno\_Ml, pyridoxine 4-oxidase of *Microbacterium luteolum* YK-1 (Q9AJD6); BetA\_Mm, 5-hydroxymethylfurfural oxidase of *Methylovorus* sp. MP688 (E4QP00); Gox\_An, glucose oxidase of *Aspergillus niger* NRLL-3 (P13006); Gox\_Pa, glucose oxidase of *Penicillium amagasakiense* (P81156); P2ox\_Pc, pyranose 2-oxidase of *Phanerochaete chrysosporium* BKM-F-1767 (Q6QWR1); P2ox\_Tv, pyranose 2-oxidase of *Trametes versicolor* (P79076); P2ox\_Pg, pyranose 2-oxidase of *Phlebiopsis gigantea* DSM 13218 (Q6UG02); P2ox\_Tm, pyranose 2-oxidase of *Tricholoma matsutake* (Q8J2V8); ChoB\_Bs, cholesterol oxidase of *Brevibacterium sterolicum* (P22637); ChoA\_Ss, cholesterol oxidase of *Streptomyces* sp. SA-COO (P12676); ChoD\_Mt, cholesterol oxidase of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (P9WMV9); Mox\_Pa, methanol oxidase of *Pichia angusta* (P04841); Aod1\_Cb, alcohol oxidase of *Candida boidinii* S2 (Q00922). Putative GMC oxidoreductase family enzymes: SLG\_11400, SLG\_12830, SLG\_20170, and SLG\_27980 of *Sphingobium* sp. SYK-6; WYH\_02651, WYH\_02653, and WYH\_02869 of *Altererythrobacter atlanticus* 26DY36; TS85\_05630 and TS85\_05635 of *Sphingomonas* sp. WHSC-8; L288\_14545 of *Sphingobium quisquiliarum* P25; NSU\_1606 of *Novosphingobium pentaromativorans* US6-1; Caul\_3245 of *Caulobacter* sp. K31; M529\_19015 of *Sphingobium ummariense* RL-3; YP76\_13265 of *Sphingobium chungbukense* DJ77.

Chiral-HPLC 解析から DCA-C 標品には (+)-DCA-C と (-)-DCA-C がほぼ等量含まれており (Fig. 32)、PhcC と PhcD はそれぞれ (+)-DCA-C と (-)-DCA-C に高い立体選択性を示す oxidase であることが明らかとなった (Fig. 33, Fig. 40)。SYK-6 株において *phcC* と *phcD* はそれぞれ (+)-DCA-C と (-)-DCA-C の変換に必須であることが示され (Fig. 31A)、*phcC phcD* 二重破壊株は DCA-C の変換能を失い、DCA とのインキュベーションによって、添加した DCA とほぼ等モルの DCA-C を蓄積した (Fig. 32B)。これらの結果から、DCA が DCA-C を経由して代謝され、DCA-C の変換に PhcC と PhcD が必須であると結論された。これまでに当研究室において、SYK-6 株による  $\beta$ -aryl ether 化合物である GGE の変換において、4 つの立体異性体を特異的に認識して  $\alpha$ 位アルコールの酸化を行う  $\alpha$ -dehydrogenase (LigD, LigL, LigN) と  $\alpha$ -dehydrogenase 反応産物である 2 つの立体異性体に対してエナンチオ選択的にエーテル開裂を行う glutathione *S*-transferase (LigF, LigE, LigP) が関与することが明らかにされてきた (Fig. 6) (27-29)。本研究で示された様に、SYK-6 株は  $\beta$ -aryl ether だけでなく phenylcoumaran 型のリグニン由来化合物についても立体異性体を分解するために必要とされる酵素系を獲得してきたことが示された。特に *phcC* と *phcD* が 1 つの転写単位を構成して、低いレベルではあるが DCA 培養下で誘導されることからそのことが伺える (Fig. 30, Table 3)。*phcC* と *phcD* は DCA 異性体を炭素源として利用するために、SYK-6 株もしくは、その祖先において生じた遺伝子重複を通して獲得されてきたもの可能性が考えられる。*phcC* と *phcD* に相同性を示すタンパク質をデータベースから検索したところ、

*Altererythrobacter atlanticus* 26DY36 (WYH\_02651, WYH\_02653) と *Sphingomonas* sp. WHSC-8 (TS85\_05630, TS85\_05635) において *phcC* 及び *phcD* と高いアミノ酸配列相同性 (51-65%) を示す遺伝子がセットで存在した (Fig. 45)。両株のこれら遺伝子産物が DCA-C の類似化合物を立体選択的に酸化する能力を有する可能性が考えられる。なお本研究は、ラセミ体に含まれる各異性体に対して、それぞれが高い立体選択性を示す GMC oxidoreductase family に属する 2 つの酵素を明らかにした初めての研究である。

SYK-6 株において DCA-C 変換活性は、細胞質と細胞膜の両方に観察された (Table 3)。この結果と対応して、*phcC* と *phcD* を SYK-6 株で発現させた際に両酵素は細胞質と細胞膜の両方に局在し、特に高発現した *phcC* においては FAD + PMS 存在下で細胞質と細胞膜で同等の DCA-C 変換活性を示した。SYK-6 株における PhcC と PhcD の細胞内局在性と類似して、GMC oxidoreductase family に属する *Sphingopyxis terrae* の polyethylene glycol dehydrogenase (PegA) も可溶性画分と膜画分の両方に局在することが報告されている (101)。また同じく GMC oxidoreductase family に属する *P. putida* GPo1 株の alcohol dehydrogenase (AlkJ) は膜に局在することが示されている (102)。PhcC、PhcD、PegA 及び AlkJ はいずれもシグナル配列及び膜貫通ドメインを持たないことから、これら酵素は膜表在性タンパク質であると推定される。これらの酵素がどのようにして膜に局在しているかについては興味深く、今後の解析が必要である。また、PegA と AlkJ はそれぞれユビキノン (CoQ<sub>10</sub>) 及びその誘導体 (CoQ<sub>0</sub> 及び CoQ<sub>1</sub>) を電子受容体として利用可能であることが示さ

れている (102, 103)。さらに CoQ<sub>1</sub> 及び基質の存在下で AlkJ から cytochrome *c* への電子伝達が観察されており、AlkJ 及び PegA は基質から奪った電子を呼吸鎖に伝達することが示唆されている (102, 103)。一方、PhcC と PhcD も同様にユビキノン誘導体である CoQ<sub>0</sub> と CoQ<sub>1</sub> を電子受容体として利用可能であり、PMS を電子受容体とした時と同等の DCA-C 酸化活性を示した。さらに、DNA マイクロアレイ解析から、SYK-6 株の DCA 培養時に vanillate 培養時と比較して、cytochrome *c* family protein をコードする SLG\_38090 が約 6 倍に誘導されることが示された (Fig. S1)。これら全ての結果から、膜に局在する PhcC と PhcD は DCA-C 酸化時に得られた電子をユビキノンを渡し、SLG\_38090 がコードする cytochrome *c* を経由して呼吸鎖に電子伝達することが推測された。一方、細胞質に存在する PhcC 及び PhcD は酸素を電子受容体とすることが可能かもしれないが、反応効率が低く (Table 11)、有毒な H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を生成することから、細胞質に存在する PhcC と PhcD は *in vivo* における DCA-C の変換には主要な役割を担っていないと考えられる。

PhcC と PhcD を含む膜画分によって DCA-C はカルボン酸誘導体である DCA-CC に変換され、アルデヒド誘導体である DCA-CL の生成は微量であった (Fig. 39)。この結果は、両酵素が DCA-C をカルボン酸誘導体まで酸化する能力を有することを示唆している。GMC oxidoreductase family に属する aryl alcohol oxidase (AAO) はさまざまな benzyl alcohol 誘導体を benzaldehyde に酸化する活性を有する。その一方で、AAO はいくつかの芳香族アルデヒドに対して酸化能を示す。エリソギ由来 AAO の benzaldehyde の酸化活性は benzyl alcohol の酸化活性の 1% 未満であ

るが、4-nitrobenzaldehyde の酸化活性は 4-nitrobenzyl alcohol 酸化活性の約半分の値を示す (104)。このアルデヒド誘導体からのカルボン酸誘導体の生成機構は、アルデヒド誘導体の水和反応で *gem*-diol が生成し、この中間体を AAO が酸化することによると考えられている (105)。同様の反応は、betaine aldehyde を経由して choline を glycine betaine まで酸化する *Arthrobacter globiformis* の choline oxidase においても知られている (106)。以上のことから、PhcC または PhcD と DCA-C との反応によって DCA-CL の *gem*-diol が生成し、その後 DCA-CL *gem*-diol が DCA-CC まで酸化したことが推定される。しかし、本研究では PhcC と PhcD を含む大腸菌の膜画分を用いて実験を行っていることから、今後は精製した酵素を用いて DCA-C の反応産物を検証する必要がある。また、第1章において SYK-6 株の細胞抽出液から限外ろ過により低分子画分を除去した粗酵素と DCA-C を反応させた結果、DCA-CL の生成が観察された (Fig. 13)。さらに反応液に NAD<sup>+</sup> を添加すると DCA-CL が DCA-CC に変換された。これらの結果から、PhcC と PhcD は DCA-C を DCA-CL に酸化し、さらに DCA-CC まで酸化する能力を有しているが、細胞質に存在する NAD<sup>+</sup> 依存性 ALDH も DCA-CL の DCA-CC への酸化に働いているものと推定される。

PhcC と PhcD が酸化可能な基質を調べたところ、これら酵素は DCA-C 酸化活性と同等の DCA の A 環側鎖酸化活性を有していた。この結果から PhcC と PhcD によって DCA の A 環側鎖が初めに酸化される経路が存在する可能性が考えられた。しかしながら SYK-6 株の細胞抽出液を用いた DCA 変換実験では、B 環側鎖 C<sub>γ</sub> 位アルコールが酸化された DCA-L と DCA-C



### 第3章

が検出されたのに対して DCA の A 環側鎖 Cy 位アルコールが酸化された化合物は検出されなかった (Fig. 13)。さらに *phcC phcD* 二重破壊株の SME112 と野生株の DCA 変換能に差異が

見られなかったことから、SYK-6 株において PhcC と PhcD は DCA の変換には関与しないと考えられる (Fig. 31B)。

## 総括

*Sphingobium* sp. SYK-6 株は、リグニンの主要な分子間結合を持つさまざまなリグニン由来の二量体及び単量体化合物を唯一の炭素源・エネルギー源として生育できるバクテリアである。SYK-6 株の多様なリグニン由来化合物代謝に関わる酵素遺伝子を解明することによって、これら遺伝子を利用したリグニンからの工業原料生産系の構築や木質バイオマスの効率的な有効利用に資するリグニンの構造改変が可能になると期待される。本研究では、これまでに明らかにされていなかった $\beta$ -5'結合を持つ phenylcoumaran 型化合物、dehydrodiconiferyl alcohol (DCA) の代謝経路及び本代謝経路に関与する酵素遺伝子について解析を行った。

SYK-6 株による DCA の代謝産物の解析から、DCA は初めに B 環側鎖 C $\gamma$  位アルコールがカルボン酸に酸化された DCA-C へと変換され、その後、DCA-C の A 環側鎖 C $\gamma$  位アルコールがカルボン酸に酸化され、脱炭酸を受けた後にスチルベン型構造を経て vanillin 及び 5-formylferulate に代謝されることが示唆された。SYK-6 株の遺伝子ライブラリーから宿主に DCA 変換能を与える酵素遺伝子として、quinohemoprotein alcohol dehydrogenase 遺伝子と aryl alcohol dehydrogenase 遺伝子にそれぞれ相同性を示す SLG\_05620 と SLG\_24930 が単離された。これらの遺伝子産物は、DCA を DCA の B 環側鎖 C $\gamma$  位がアルデヒドに酸化された DCA-L に変換する活性を有していた。SYK-6 株のゲノム中には、SLG\_05620 及び SLG\_24930 と相同性を示す複数の酵素遺伝子が存在し、少なくとも両遺伝子を含む 7 つの遺伝子の産物が DCA 変換活性を有することが示された。一方、DCA-L の酸化に関与する酵素遺伝子として、SYK-6 株に存在する 21 個の aldehyde dehydrogenase 遺伝子に着目し、各遺伝子産物の DCA-L 酸化活性を調べた。その結果、4 つの遺

伝子産物に顕著な活性が見られた。これらの中で高い酵素活性を示した SLG\_27910 の遺伝子破壊株において DCA-L 変換の有意な低下が観察された。以上の結果から、DCA から DCA-C への変換に関わる 2 段階の酸化反応には、複数の alcohol dehydrogenase と aldehyde dehydrogenase が関与すると結論された。

SYK-6 株の細胞抽出液を用いた実験から DCA-C 変換酵素は、i) FAD の存在下で活性化されること、ii) 細胞膜と細胞質の両者に局在すること、iii) DCA 培養時に比活性が約 1.7 倍と低レベルに誘導されることが示された。これらの情報と DNA マイクロアレイ解析の結果に基づき、候補遺伝子として DCA 培養時に約 2 倍に発現が誘導される 2 つの oxidase 遺伝子 SLG\_09480 (*phcC*) と SLG\_09500 (*phcD*) を見出した。これら遺伝子の推定アミノ酸配列は、glucose-methanol-choline oxidoreductase family に属する酵素と相同性を有し、reverse transcription-PCR 解析から両遺伝子が 1 つのオペロンとして転写されていることが示された。*phcC* 破壊株と *phcD* 破壊株の DCA-C 変換活性が SYK-6 株と比較して顕著に低下し、*phcC phcD* 二重破壊株が DCA-C 変換活性を失ったことから、これら遺伝子が DCA-C の変換に必須であることが明らかとなった。*phcC* 及び *phcD* を大腸菌で発現させ、膜画分を用いて PhcC と PhcD の酵素学的諸性質を解析した。PhcC と PhcD による DCA-C 変換能を調べた結果、これら酵素は DCA-C の A 環側鎖 C $\gamma$  位アルコールをカルボン酸に酸化する活性を持つことが示された。キラルカラムを用いた高速液体クロマトグラフィー分析から、PhcC と PhcD は、それぞれ (+)-DCA-C と (-)-DCA-C の変換に特異的

な立体選択的 oxidase であることが明らかとなった。さまざまなリグニン由来化合物を用いて基質特異性を調べたところ、PhcC と PhcD は DCA とその誘導体の A 環側鎖 C $\gamma$  位の酸化に特異的に作用することが示された。PhcC と PhcD の大部分が膜に局在することから、両酵素の電子受容体は膜に存在することが推定された。実際に両酵素はユビキノン (coenzyme Q<sub>10</sub>) 誘導体である CoQ<sub>0</sub> と CoQ<sub>1</sub> を電子受容体として利用可能であり、加えて DCA 培養時にシトクロム *c* をコードする SLG\_38090 の発現が顕著に誘導されることが示された。以上の事実から、膜に局在する PhcC と PhcD は DCA-C を酸化する際にユビキノンに電子を渡し、cytochrome *c* を経由して呼吸鎖に電子を伝達することが示唆された。

本研究では、これまでほとんど知見のなかった微生物(バクテリア)における phenylcoumaran

型化合物 DCA の詳細な代謝経路を推定し、DCA 及びその中間代謝物である DCA-L 及び DCA-C の変換に関与するまたは関与が示唆される酵素遺伝子を明らかにした。今後、残る酵素遺伝子に加えて、DCA-C 代謝系遺伝子の転写制御や DCA の細胞内への取り込み機構を明らかにしていく必要があるが、本研究で得られた知見は微生物によるリグニンからの有用物質生産を図る上で重要な基盤になると考えられる。また、DCA 代謝に関与する酵素遺伝子を用いて植物中のリグニン生合成で生じる DCA の構造を変化させることが原理的には可能であるが、DCA の構造を大幅に変化させるには、複数の遺伝子を植物で発現させなければならない。今後、DCA 代謝系遺伝子の改変等によって、より少数の反応段階で効果的に DCA の構造を変化させることができる酵素系の開発が望まれる。

## 謝辞

本論文は筆者が修士課程と博士課程における研究成果をまとめたものであり、多数の人の支援を受けて完成に至りました。また、研究を進めるうえで辛く厳しいことが多数ありましたがその都度、様々な方に助けられ、研究能力だけではなく人間として大きく成長できたと感じております。本当にありがとうございました。

本研究を遂行する上で欠かすことのできない微生物代謝工学研究室という素晴らしい研究の場と奥深くやりがいのある研究テーマを御提供いただき、また、研究の遂行と論文の作成において終始御指導・御鞭撻を賜り、研究者としての道を教えて下さった長岡技術科学大学微生物代謝工学研究室・政井英司教授に心から感謝致します。

研究に必要な知識や技術を教えて頂いただけでなく、図表の書き方及びプレゼンテーションの技術を教えて下さり、熱心に私の面倒を見

て下さった長岡技術科学大学微生物代謝工学研究室・上村直史助教に心から感謝致します。

本研究を遂行するにあたり、御指導・御教示を賜りました長岡技術科学大学環境微生物工学研究室・福田雅夫教授に心から御礼申し上げます。また、多くの適切な御助言を与えて下さった同研究室の笠井大輔助教に深く感謝致します。

本研究で使用した多くの基質を合成して頂いた森林総合研究所・菱山正二郎博士に心より感謝いたします。また、マイクロアレイ解析を行っていただいたマレーシア・日本国際工科院の原啓文准教授に深く感謝いたします。第3章の一部を担当して頂きました当研究室の廣瀬優作氏及び荒木拓馬氏に感謝の意を表します。

最後に、研究活動に際し数多くの御支援・御協力を賜った研究室の皆様、研究生活を温かく見守ってくれた家族に心からの謝意を記します。

## 公表論文

**Takahashi K, Kamimura N, Hishiyama S, Hara H, Kasai D, Katayama Y, Fukuda M, Kajita S, Masai E.** 2014. Characterization of the catabolic pathway for a phenylcoumaran-type lignin-derived biaryl in *Sphingobium* sp. strain SYK-6. *Biodegradation* **25**:735-745.

**Takahashi K, Hirose Y, Kamimura N, Hishiyama S, Hara H, Araki T, Kasai D, Kajita S, Katayama Y, Fukuda M, Masai E.** 2015. Membrane-associated glucose-methanol-choline oxidoreductase family enzymes PhcC and PhcD are essential for enantioselective catabolism of dehydrodiconiferyl alcohol. *Appl Environ Microbiol* **81**:8022-8036.

## 引用文献

- Ragauskas AJ, Beckham GT, Biddy MJ, Chandra R, Chen F, Davis MF, Davison BH, Dixon RA, Gilna P, Keller M, Langan P, Naskar AK, Saddler JN, Tschaplinski TJ, Tuskan GA, Wyman CE.** 2014. Lignin valorization: improving lignin processing in the biorefinery. *Science* **344**:1246843.
- Campbell MM, Sederoff RR.** 1996. Variation in lignin content and composition: mechanisms of control and implications for the genetic improvement of plants. *Plant Physiol* **110**:3-13.
- Brosse N, Dufour A, Meng X, Sun Q, Ragauskas A.** 2012. Miscanthus: a fast-growing crop for biofuels and chemicals production. *Biofuels Bioprod Bior* **6**:580-598.
- David K, Ragauskas AJ.** 2010. Switchgrass as an energy crop for biofuel production: A review of its ligno-cellulosic chemical properties. *Energy Environ Sci* **3**:1182-1190.
- Saha BC, Yoshida T, Cotta MA, Sonomoto K.** 2013. Hydrothermal pretreatment and enzymatic saccharification of corn stover for efficient ethanol production. *Ind Crop Prod* **44**:367-372.
- Sannigrahi P, Ragauskas AJ, Tuskan GA.** 2010. Poplar as a feedstock for biofuels: A review of compositional characteristics. *Biofuels Bioprod Bior* **4**:209-226.
- Huang F, Ragauskas A.** 2013. Extraction of Hemicellulose from Loblolly Pine Woodchips and Subsequent Kraft Pulping. *Ind Eng Chem Res* **52**:1743-1749.
- Ralph J, Lundquist K, Brunow G, Lu F, Kim H, Schatz PF, Marita JM, Hatfield RD, Ralph SA, Christensen JH, W. B.** 2004. Lignins: Natural polymers from oxidative coupling of 4-hydroxyphenylpropanoids. *Phytochem Rev* **3**:29-60.
- Vanholme R, Demedts B, Morreel K, Ralph J, Boerjan W.** 2010. Lignin biosynthesis and structure. *Plant Physiol* **153**:895-905.
- Sibout R, Höfte H.** 2012. Plant cell biology: the ABC of monolignol transport. *Curr Biol* **22**:R533-R535.
- Miao YC, Liu CJ.** 2010. ATP-binding cassette-like transporters are involved in the transport of lignin precursors across plasma and vacuolar membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**:22728-22733.
- Alejandro S, Lee Y, Tohge T, Sudre D, Osorio S, Park J, Bovet L, Lee Y, Geldner N, Fernie AR, Martinoia E.** 2012. AtABCG29 is a monolignol transporter involved in lignin biosynthesis. *Curr Biol* **22**:1207-1212.
- Morreel K, Ralph J, Kim H, Lu F, Goeminne G, Ralph S, Messens E, Boerjan W.** 2004. Profiling of oligolignols reveals monolignol coupling conditions in lignifying poplar xylem. *Plant Physiol* **136**:3537-3549.
- Morreel K, Dima O, Kim H, Lu F, Nicolaes C, Vanholme R, Dauwe R, Goeminne G, Inzé D, Messens E, Ralph J, Boerjan W.** 2010. Mass spectrometry-based sequencing of lignin oligomers. *Plant Physiol* **153**:1464-1478.
- Suzuki S, Umezawa T.** 2007. Biosynthesis of lignans and norlignans. *J Wood Sci* **53**:273-284.
- Ralph J, Peng J, Lu F, Hatfield RD, Helm RF.** 1999. Are lignins optically active? *J Agric Food Chem* **47**:2991-2996.
- Lundell TK, Mäkelä MR, Hildén K.** 2010. Lignin-modifying enzymes in filamentous basidiomycetes-ecological, functional and phylogenetic review. *J Basic Microbiol* **50**:5-20.
- Martínez AT, Speranza M, Ruiz-Dueñas FJ, Ferreira P, Camarero S, Guillén F, Martínez MJ, Gutiérrez A, del Río JC.** 2005. Biodegradation of lignocellulosics: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. *Int Microbiol* **8**:195-204.
- ten Have R, Teunissen PJ.** 2001. Oxidative mechanisms involved in lignin degradation by white-rot fungi. *Chem Rev* **101**:3397-3413.
- Pollegioni L, Tonin F, Rosini E.** 2015. Lignin-degrading enzymes. *FEBS J* **282**:1190-1213.
- Majumdar S, Lukk T, Solbiati JO, Bauer S, Nair SK, Cronan JE, Gerlt JA.** 2014. Roles of small laccases from *Streptomyces* in lignin degradation.

- Biochemistry **53**:4047-4058.
22. **Ahmad M, Roberts JN, Hardiman EM, Singh R, Eltis LD, Bugg TD.** 2011. Identification of DypB from *Rhodococcus jostii* RHA1 as a lignin peroxidase. *Biochemistry* **50**:5096-5107.
  23. **Brown ME, Barros T, Chang MC.** 2012. Identification and characterization of a multifunctional dye peroxidase from a lignin-reactive bacterium. *ACS Chem Biol* **7**:2074-2081.
  24. **Bugg TD, Ahmad M, Hardiman EM, Singh R.** 2011. The emerging role for bacteria in lignin degradation and bio-product formation. *Curr Opin Biotechnol* **22**:394-400.
  25. **Bugg TD, Ahmad M, Hardiman EM, Rahmanpour R.** 2011. Pathways for degradation of lignin in bacteria and fungi. *Nat Prod Rep* **28**:1883-1896.
  26. **Masai E, Katayama Y, Fukuda M.** 2007. Genetic and biochemical investigations on bacterial catabolic pathways for lignin-derived aromatic compounds. *Biosci Biotechnol Biochem* **71**:1-15.
  27. **Masai E, Ichimura A, Sato Y, Miyauchi K, Katayama Y, Fukuda M.** 2003. Roles of the enantioselective glutathione *S*-transferases in cleavage of  $\beta$ -aryl ether. *J Bacteriol* **185**:1768-1775.
  28. **Sato Y, Moriuchi H, Hishiyama S, Otsuka Y, Oshima K, Kasai D, Nakamura M, Ohara S, Katayama Y, Fukuda M, Masai E.** 2009. Identification of three alcohol dehydrogenase genes involved in the stereospecific catabolism of arylglycerol- $\beta$ -aryl ether by *Sphingobium* sp. strain SYK-6. *Appl Environ Microbiol* **75**:5195-5201.
  29. **Tanamura K, Abe T, Kamimura N, Kasai D, Hishiyama S, Otsuka Y, Nakamura M, Kajita S, Katayama Y, Fukuda M, Masai E.** 2011. Characterization of the third glutathione *S*-transferase gene involved in enantioselective cleavage of the  $\beta$ -aryl ether by *Sphingobium* sp. strain SYK-6. *Biosci Biotechnol Biochem* **75**:2404-2407.
  30. **Meux E, Prosper P, Masai E, Mulliert G, Dumarçay S, Morel M, Didierjean C, Gelhaye E, Favier F.** 2012. *Sphingobium* sp. SYK-6 LigG involved in lignin degradation is structurally and biochemically related to the glutathione transferase omega class. *FEBS Lett* **586**:3944-3950.
  31. **Yoshikata T, Suzuki K, Kamimura N, Namiki M, Hishiyama S, Araki T, Kasai D, Otsuka Y, Nakamura M, Fukuda M, Katayama Y, Masai E.** 2014. Three-component *O*-demethylase system essential for catabolism of a lignin-derived biphenyl compound in *Sphingobium* sp. strain SYK-6. *Appl Environ Microbiol* **80**:7142-7153.
  32. **Peng X, Egashira T, Hanashiro K, Masai E, Nishikawa S, Katayama Y, Kimbara K, Fukuda M.** 1998. Cloning of a *Sphingomonas paucimobilis* SYK-6 gene encoding a novel oxygenase that cleaves lignin-related biphenyl and characterization of the enzyme. *Appl Environ Microbiol* **64**:2520-2527.
  33. **Peng X, Masai E, Katayama Y, Fukuda M.** 1999. Characterization of the meta-cleavage compound hydrolase gene involved in degradation of the lignin-related biphenyl structure by *Sphingomonas paucimobilis* SYK-6. *Appl Environ Microbiol* **65**:2789-2793.
  34. **Peng X, Masai E, Kitayama H, Harada K, Katayama Y, Fukuda M.** 2002. Characterization of the 5-carboxyvanillate decarboxylase gene and Its role in lignin-related biphenyl catabolism in *Sphingomonas paucimobilis* SYK-6. *Appl Environ Microbiol* **68**:4407-4415.
  35. **Peng X, Masai E, Kasai D, Miyauchi K, Katayama Y, Fukuda M.** 2005. A second 5-carboxyvanillate decarboxylase gene, *ligW2*, is important for lignin-related biphenyl catabolism in *Sphingomonas paucimobilis* SYK-6. *Appl Environ Microbiol* **71**:5014-5021.
  36. **Fukuhara Y, Kamimura N, Nakajima M, Hishiyama S, Hara H, Kasai D, Tsuji Y, Narita-Yamada S, Nakamura S, Katano Y, Fujita N, Katayama Y, Fukuda M, Kajita S, Masai E.** 2013. Discovery of pinoresinol reductase genes in sphingomonads. *Enzyme Microb Technol* **52**:38-43.
  37. **Masai E, Harada K, Peng X, Kitayama H, Katayama Y, Fukuda M.** 2002. Cloning and characterization of the ferulic acid catabolic genes of *Sphingomonas paucimobilis* SYK-6. *Appl Environ Microbiol* **68**:4416-4424.
  38. **Kasai D, Kamimura N, Tani K, Umeda S, Abe T, Fukuda M, Masai E.** 2012. Characterization of FerC, a MarR-type transcriptional regulator, involved in transcriptional regulation of the ferulate catabolic operon in *Sphingobium* sp. strain SYK-6. *FEMS Microbiol Lett* **332**:68-75.
  39. **Masai E, Yamamoto Y, Inoue T, Takamura K, Hara H, Kasai D, Katayama Y, Fukuda M.** 2007. Characterization of *ligV* essential for catabolism of vanillin by *Sphingomonas paucimobilis* SYK-6. *Biosci Biotechnol Biochem* **71**:2487-2492.
  40. **Abe T, Masai E, Miyauchi K, Katayama Y, Fukuda M.** 2005. A tetrahydrofolate-dependent *O*-demethylase, LigM, is crucial for catabolism of vanillate and syringate in *Sphingomonas paucimobilis* SYK-6. *J Bacteriol* **187**:2030-2037.
  41. **Kamimura N, Masai E.** 2014. The protocatechuate 4,5-cleavage pathway: overview and new findings, p 207-226. *In* Nojiri H, Tsuda M, Fukuda M, Kamagata Y (ed), *Biodegradative Bacteria*.
  42. **Masai E, Sasaki M, Minakawa Y, Abe T, Sonoki T, Miyauchi K, Katayama Y, Fukuda M.** 2004. A novel tetrahydrofolate-dependent *O*-demethylase gene is essential for growth of *Sphingomonas paucimobilis* SYK-6 with syringate.

- J Bacteriol **186**:2757-2765.
43. **Kasai D, Masai E, Miyauchi K, Katayama Y, Fukuda M.** 2004. Characterization of the 3-*O*-methylgallate dioxygenase gene and evidence of multiple 3-*O*-methylgallate catabolic pathways in *Sphingomonas paucimobilis* SYK-6. J Bacteriol **186**:4951-4959.
  44. **Kasai D, Masai E, Miyauchi K, Katayama Y, Fukuda M.** 2005. Characterization of the gallate dioxygenase gene: three distinct ring cleavage dioxygenases are involved in syringate degradation by *Sphingomonas paucimobilis* SYK-6. J Bacteriol **187**:5067-5074.
  45. **Kasai D, Masai E, Katayama Y, Fukuda M.** 2007. Degradation of 3-*O*-methylgallate in *Sphingomonas paucimobilis* SYK-6 by pathways involving protocatechuate 4,5-dioxygenase. FEMS Microbiol Lett **274**:323-328.
  46. **Mosier N, Wyman C, Dale B, Elander R, Lee YY, Holtzapple M, Ladisch M.** 2005. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. Bioresour Technol **96**:673-686.
  47. **Hendriks AT, Zeeman G.** 2009. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. Bioresour Technol **100**:10-18.
  48. **Taherzadeh MJ, Karimi K.** 2008. Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: a review. Int J Mol Sci **9**:1621-1651.
  49. **Alvira P, Tomás-Pejó E, Ballesteros M, Negro MJ.** 2010. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. Bioresour Technol **101**:4851-4861.
  50. **Várnai A, Mäkelä MR, Djajadi DT, Rahikainen J, Hatakka A, Viikari L.** 2014. Carbohydrate-binding modules of fungal cellulases: occurrence in nature, function, and relevance in industrial biomass conversion. Adv Appl Microbiol **88**:103-165.
  51. **Vanholme R, Morreel K, Ralph J, Boerjan W.** 2008. Lignin engineering. Curr Opin Plant Biol **11**:278-285.
  52. **Chen F, Dixon RA.** 2007. Lignin modification improves fermentable sugar yields for biofuel production. Nat Biotechnol **25**:759-761.
  53. **Wang H, Xue Y, Chen Y, Li R, Wei J.** 2012. Lignin modification improves the biofuel production potential in transgenic *Populus tomentosa*. Ind Crop Prod **37**:170-177.
  54. **Mansfield SD, Kang KY, Chapple C.** 2012. Designed for deconstruction--poplar trees altered in cell wall lignification improve the efficacy of bioethanol production. New Phytol **194**:91-101.
  55. **Voelker SL, Lachenbruch B, Meinzer FC, Kitin P, Strauss SH.** 2011. Transgenic poplars with reduced lignin show impaired xylem conductivity, growth efficiency and survival. Plant Cell Environ **34**:655-668.
  56. **Besseau S, Hoffmann L, Geoffroy P, Lapierre C, Pollet B, Legrand M.** 2007. Flavonoid accumulation in *Arabidopsis* repressed in lignin synthesis affects auxin transport and plant growth. Plant Cell **19**:148-162.
  57. **Naoumkina MA, Zhao Q, Gallego-Giraldo L, Dai X, Zhao PX, Dixon RA.** 2010. Genome-wide analysis of phenylpropanoid defence pathways. Mol Plant Pathol **11**:829-846.
  58. **Wilkerson CG, Mansfield SD, Lu F, Withers S, Park JY, Karlen SD, Gonzales-Vigil E, Padmakshan D, Unda F, Rencoret J, Ralph J.** 2014. Monolignol ferulate transferase introduces chemically labile linkages into the lignin backbone. Science **344**:90-93.
  59. **Grabber JH, Hatfield RD, Lu F, Ralph J.** 2008. Coniferyl ferulate incorporation into lignin enhances the alkaline delignification and enzymatic degradation of cell walls. Biomacromolecules **9**:2510-2516.
  60. **Eudes A, George A, Mukerjee P, Kim JS, Pollet B, Benke PI, Yang F, Mitra P, Sun L, Cetinkol OP, Chabout S, Mouille G, Soubigou-Taconnat L, Balzergue S, Singh S, Holmes BM, Mukhopadhyay A, Keasling JD, Simmons BA, Lapierre C, Ralph J, Loqué D.** 2012. Biosynthesis and incorporation of side-chain-truncated lignin monomers to reduce lignin polymerization and enhance saccharification. Plant Biotechnol J **10**:609-620.
  61. **Rahimi A, Ulbrich A, Coon JJ, Stahl SS.** 2014. Formic-acid-induced depolymerization of oxidized lignin to aromatics. Nature **515**:249-252.
  62. **Tsuji Y, Vanholme R, Tobimatsu Y, Ishikawa Y, Foster CE, Kamimura N, Hishiyama S, Hashimoto S, Shino A, Hara H, Sato-Izawa K, Oyarce P, Goeminne G, Morreel K, Kikuchi J, Takano T, Fukuda M, Katayama Y, Boerjan W, Ralph J, Masai E, Kajita S.** 2015. Introduction of chemically labile substructures into *Arabidopsis* lignin through the use of LigD, the Calpha-dehydrogenase from *Sphingobium* sp. strain SYK-6. Plant Biotechnol J **13**:821-832.
  63. **Funaoka M.** 2013. Sequential transformation and utilization of natural network polymer "LIGNIN". React Funct Polym **73**:396-404.
  64. **Jiménez JI, Miñambres B, García JL, Díaz E.** 2002. Genomic analysis of the aromatic catabolic pathways from *Pseudomonas putida* KT2440. Environ Microbiol **4**:824-841.
  65. **Linger JG, Vardon DR, Guarnieri MT, Karp EM, Hunsinger GB, Franden MA, Johnson CW, Chupka G, Strathmann TJ, Pienkos PT, Beckham GT.** 2014. Lignin valorization through integrated biological funneling and chemical catalysis. Proc Natl Acad Sci U S A **111**:12013-

- 12018.
66. **Tomizawa S, Chuah JA, Matsumoto K, Doi Y, Numata K.** 2014. Understanding the limitations in the biosynthesis of polyhydroxyalkanoate (PHA) from lignin derivatives. *ACS Sustainable Chem Eng* **2**:1106-1113.
67. **Hishida M, Shikinaka K, Katayama Y, Kajita S, Masai E, Nakamura M, Otsuka Y, Ohara S, Shigehara K.** 2009. Polyesters of 2-pyrone-4,6-dicarboxylic acid (PDC) as bio-based plastics exhibiting strong adhering properties. *Polym J* **41**:297-302.
68. **Hasegawa Y, Shikinaka K, Katayama Y, Kajita S, Masai E, Nakamura M, Otsuka Y, Ohara S, Shigehara K.** 2009. Tenacious epoxy adhesives prepared from lignin-derived stable metabolic intermediate. *Sen'i Gakkaishi* **65**:359-362.
69. **Wu G, Heitz M, Chornet E.** 1994. Improved alkaline oxidation process for the production of aldehydes (vanillin and syringaldehyde) from steam-explosion hardwood lignin. *Ind Eng Chem Res* **33**:718-723.
70. **Otsuka Y, Nakamura M, Shigehara K, Sugimura K, Masai E, Ohara S, Katayama Y.** 2006. Efficient production of 2-pyrone 4,6-dicarboxylic acid as a novel polymer-based material from protocatechuate by microbial function. *Appl Microbiol Biotechnol* **71**:608-614.
71. **Ohta M, Higuchi T, Iwahara S.** 1979. Microbial degradation of dehydrodiconiferyl alcohol, a lignin substructure model. *Arch Microbiol* **121**:23-28.
72. **Habu N, Samejima M, Yoshimoto T.** 1988. Metabolic pathway of dehydrodiconiferyl alcohol by *Pseudomonas* sp. TMY1009. *Mokuzai Gakkaishi* **34**:1026-1034.
73. **Kamoda S, Saburi Y.** 1993. Structural and enzymatical comparison of lignostilbene- $\alpha,\beta$ -dioxygenase isozymes, I, II, and III, from *Pseudomonas paucimobilis* TMY1009. *Biosci Biotechnol Biochem* **57**:931-934.
74. **Kamoda S, Terada T, Saburi Y.** 1997. Purification and some properties of lignostilbene- $\alpha,\beta$ -dioxygenase isozyme IV from *Pseudomonas paucimobilis* TMY1009. *Biosci Biotechnol Biochem* **61**:1575-1576.
75. **Capanema EA, Balakshin MY, Kadla JF.** 2005. Quantitative characterization of a hardwood milled wood lignin by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J Agric Food Chem* **53**:9639-9649.
76. **Fukuhara Y, Inakazu K, Kodama N, Kamimura N, Kasai D, Katayama Y, Fukuda M, Masai E.** 2010. Characterization of the isophthalate degradation genes of *Comamonas* sp. strain E6. *Appl Environ Microbiol* **76**:519-527.
77. **Kamoda S, Saburi Y.** 1993. Cloning, expression, and sequence analysis of a lignostilbene- $\alpha,\beta$ -dioxygenase gene from *Pseudomonas paucimobilis* TMY1009. *Biosci Biotechnol Biochem* **57**:926-930.
78. **Kamoda S, Saburi Y.** 1995. Cloning of a lignostilbene- $\alpha,\beta$ -dioxygenase isozyme gene from *Pseudomonas paucimobilis* TMY1009. *Biosci Biotechnol Biochem* **59**:1866-1868.
79. **Katayama Y, Nishikawa S, Nakamura M, Yano K, Yamasaki M, Morohoshi N, Haraguchi T.** 1987. Cloning and expression of *Pseudomonas paucimobilis* SYK-6 genes involved in the degradation of vanillate and protocatechuate in *P. putida*. *Mokuzai Gakkaishi* **33**:77-79.
80. **Yamamoto Y, Kasai D, Kamimura N, Masai E.** 2012. Isolation and characterization of *bzaA* and *bzaB* of *Sphingobium* sp. strain SYK-6, which encode aromatic aldehydes dehydrogenases with different substrate preferences. *Transactions on GIGAKU* **1**:01009/01001-01006.
81. **Studier FW, Moffatt BA.** 1986. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol* **189**:113-130.
82. **Bolivar F, Backman K.** 1979. Plasmids of *Escherichia coli* as cloning vectors. *Methods Enzymol* **68**:245-267.
83. **Ditta G, Stanfield S, Corbin D, Helinski DR.** 1980. Broad host range DNA cloning system for gram-negative bacteria: construction of a gene bank of *Rhizobium meliloti*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**:7347-7351.
84. **Figurski DH, Helinski DR.** 1979. Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided in trans. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**:1648-1652.
85. **Short JM, Fernandez JM, Sorge JA, Huse WD.** 1988.  $\lambda$  ZAP: a bacteriophage  $\lambda$  expression vector with in vivo excision properties. *Nucleic Acids Res* **16**:7583-7600.
86. **Johnson M, Zaretskaya I, Raytselis Y, Merezuk Y, McGinnis S, Madden TL.** 2008. NCBI BLAST: a better web interface. *Nucleic Acids Res* **36**:W5-W9.
87. **Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG.** 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* **23**:2947-2948.
88. **Rice P, Longden I, Bleasby A.** 2000. EMBOSS: The european molecular biology open software suite. *Trends Genet* **16**:276-277.
89. **Toyama H, Fujii A, Matsushita K, Shinagawa E, Ameyama M, Adachi O.** 1995. Three distinct quinoprotein alcohol dehydrogenases are expressed when *Pseudomonas putida* is grown on different alcohols. *J Bacteriol* **177**:2442-2450.
90. **de Jong GA, Geerloff A, Stoorvogel J, Jongejan JA, De Vries S, Duine JA.** 1995. Quinohaemoprotein ethanol dehydrogenase from



- Comamonas testosteroni*: Purification, characterization, and reconstitution of the apoenzyme with pyrroloquinoline quinone analogues. *Eur J Biochem* **230**:899-905.
91. **Shaw JP, Harayama S.** 1990. Purification and characterisation of TOL plasmid-encoded benzyl alcohol dehydrogenase and benzaldehyde dehydrogenase of *Pseudomonas putida*. *Eur J Biochem* **191**:705-714.
92. **Lüddecke F, Wülfiging A, Timke M, Germer F, Weber J, Dikfidan A, Rahnfeld T, Linder D, Meyerdierks A, Harder J.** 2012. Geraniol and geraniol dehydrogenases induced in anaerobic monoterpene degradation by *Castellaniella defragrans*. *Appl Environ Microbiol* **78**:2128-2136.
93. **Nishimura M.** 2013. Molecular cloning and expression of the *Streptomyces* coniferyl alcohol dehydrogenase gene in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif* **89**:109-115.
94. **Blatny JM, Brautaset T, Winther-Larsen HC, Karunakaran P, Valla S.** 1997. Improved broad-host-range RK2 vectors useful for high and low regulated gene expression levels in gram-negative bacteria. *Plasmid* **38**:35-51.
95. **Schäfer A, Tauch A, Jäger W, Kalinowski J, Thierbach G, Pühler A.** 1994. Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. *Gene* **145**:69-73.
96. **Lamark T, Kaasen I, Eshoo MW, Falkenberg P, McDougall J, Strøm AR.** 1991. DNA sequence and analysis of the *bet* genes encoding the osmoregulatory choline-glycine betaine pathway of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **5**:1049-1064.
97. **Hirai N, Okamoto M, Udagawa H, Yamamuro M, Kato M, Koshimizu K.** 1994. Absolute configuration of dehydrodiconiferyl alcohol. *Biosci Biotechnol Biochem* **58**:1679-1684.
98. **Dijkman WP, de Gonzalo G, Mattevi A, Fraaije MW.** 2013. Flavoprotein oxidases: classification and applications. *Appl Microbiol Biotechnol* **97**:5177-5188.
99. **Romero E, Gadda G.** 2014. Alcohol oxidation by flavoenzymes. *Biomol Concepts* **5**:299-318.
100. **Kiess M, Hecht HJ, Kalisz HM.** 1998. Glucose oxidase from *Penicillium amagasakiense* Primary structure and comparison with other glucose-methanol-choline (GMC) oxidoreductases. *Eur J Biochem* **252**:90-99.
101. **Kawai F, Kimura T, Fukaya M, Tani Y, Ogata K, Ueno T, Fukami H.** 1978. Bacterial oxidation of polyethylene glycol. *Appl Environ Microbiol* **35**:679-684.
102. **Kirmair L, Skerra A.** 2014. Biochemical analysis of recombinant AlkJ from *Pseudomonas putida* reveals a membrane-associated, flavin adenine dinucleotide-dependent dehydrogenase suitable for the biosynthetic production of aliphatic aldehydes. *Appl Environ Microbiol* **80**:2468-2477.
103. **Ohta T, Kawabata T, Nishikawa K, Tani A, Kimbara K, Kawai F.** 2006. Analysis of amino acid residues involved in catalysis of polyethylene glycol dehydrogenase from *Sphingopyxis terrae*, using three-dimensional molecular modeling-based kinetic characterization of mutants. *Appl Environ Microbiol* **72**:4388-4396.
104. **Guillén F, Martínez AT, Martínez MJ.** 1992. Substrate specificity and properties of the aryl-alcohol oxidase from the ligninolytic fungus *Pleurotus eryngii*. *Eur J Biochem* **209**:603-611.
105. **Ferreira P, Hernández-Ortega A, Herguedas B, Rencoret J, Gutiérrez A, Martínez MJ, Jiménez-Barbero J, Medina M, Martínez AT.** 2010. Kinetic and chemical characterization of aldehyde oxidation by fungal aryl-alcohol oxidase. *Biochem J* **425**:585-593.
106. **Fan F, Germann MW, Gadda G.** 2006. Mechanistic studies of choline oxidase with betaine aldehyde and its isosteric analogue 3,3-dimethylbutyraldehyde. *Biochemistry* **45**:1979-1986.
107. **Kamimura N, Aoyama T, Yoshida R, Takahashi K, Kasai D, Abe T, Mase K, Katayama Y, Fukuda M, Masai E.** 2010. Characterization of the protocatechuate 4,5-cleavage pathway operon in *Comamonas* sp. strain E6 and discovery of a novel pathway gene. *Appl Environ Microbiol* **76**:8093-8101.
108. 福島 和彦, 船田 良, 杉山 淳司, 高部 圭司, 梅澤 俊明, 山本 浩之. 木質の形成. 2011. ISBN 978-4-86099-252-1
109. 西谷 和彦, 梅澤 俊明. 植物細胞壁. 2013. ISBN 978-4061538184
110. 後藤 孝之. リグニン代謝関連遺伝子の網羅的機能解析. 2011. 修士論文.
111. **Sambrook J, Russell DW.** Molecular cloning. 2001. ISBN 978-0879695774
112. 中山 広樹, 西方 敬人. バイオ実験イラストレイテッド第2巻. 1995. ISBN 978-4879621498

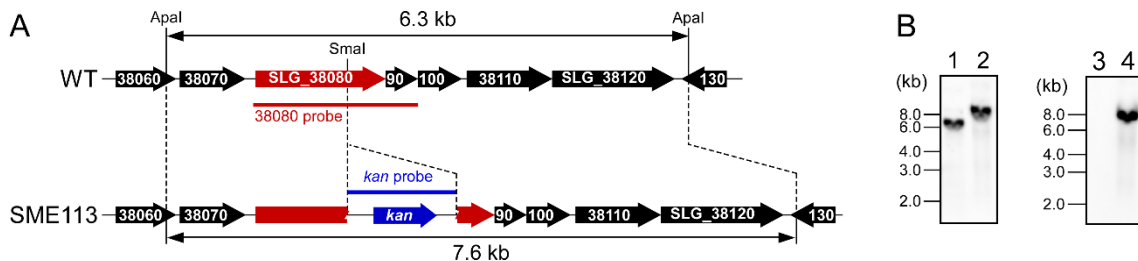
## Supplemental content

## SLG\_38080 の単離

SYK-6 株において FAD 存在下での DCA-C 酸化活性が、DCA 培養時に低レベルで誘導されたことから (Table 3)、DNA マイクロアレイ解析によって、SYK-6 株の SEMP 培養時と比較して SEMP + DCA 培養時に誘導される FAD 要求性の酸化還元酵素をコードする遺伝子を探索した。その結果、SEMP 培養時と比較して DCA 培養時に 6.7 倍に誘導される FAD 結合 oxidase と同源性を示す SLG\_38080 が見出された。本遺伝子は DCA の代謝中間体であるバニリン酸の存在下で培養した場合には誘導されなかったことから、DCA 培養時に特異的に誘導されたことが示唆された。

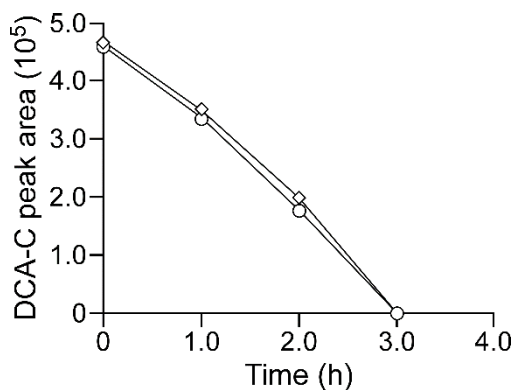
## SLG\_38080 破壊株の DCA-C 変換能

SLG\_38080 が DCA-C の変換に関与しているかを調べるために相同組換えによって SLG\_38080 破壊株を作製した (Fig. S1)。本研究において作成した SLG\_38080 破壊株を SME113 と命名した。本破壊株の休止細胞と 100  $\mu$ M DCA-C を反応させ HPLC で変換活性を調べた結果、SME113 の DCA-C 変換活性は野生株とほとんど同等であった (Fig. S2)。以上のことから SLG\_38080 は DCA-C の変換に関与しないことが示された。



**Fig. S1.** 38080 株のサザンハイブリダイゼーション解析。

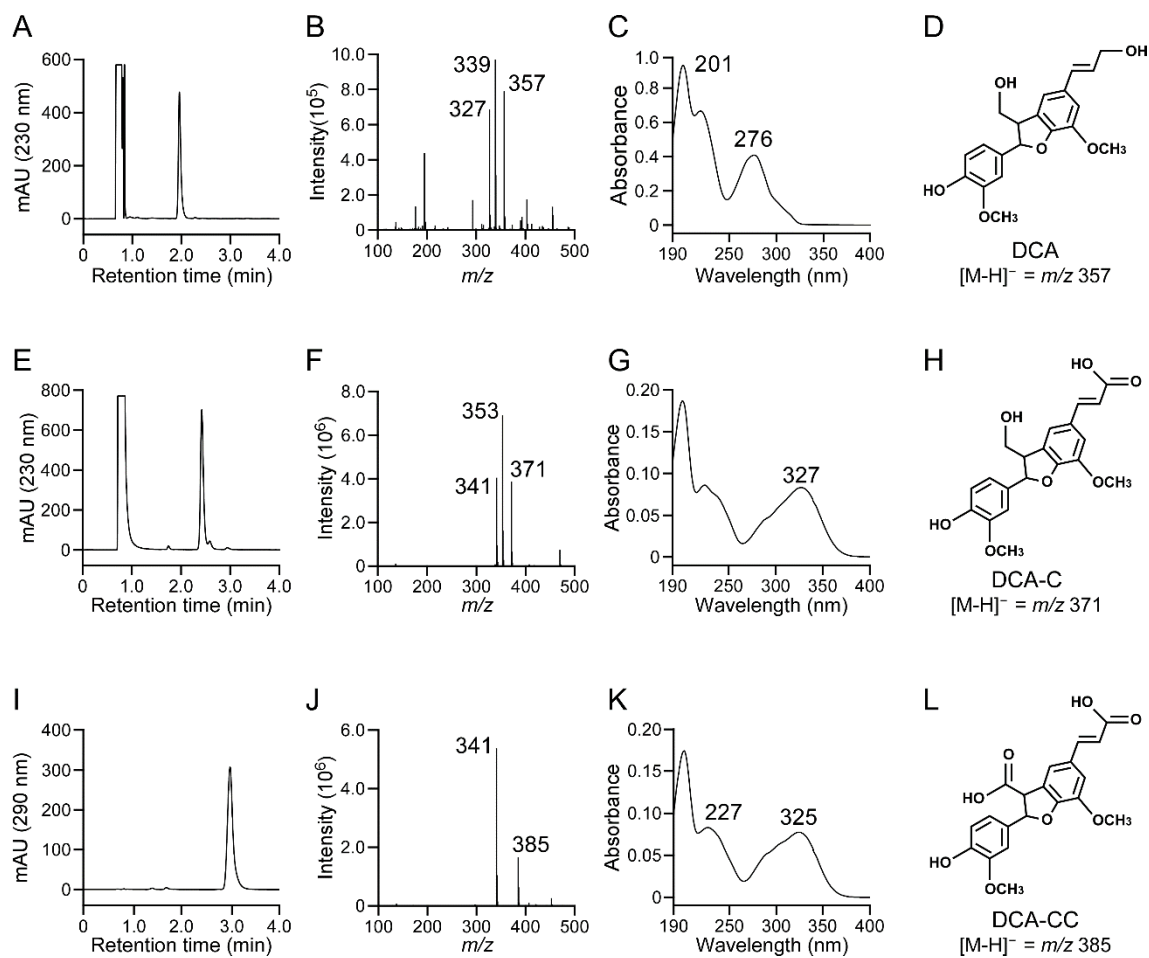
(A) SME113 における *kan* 挿入領域の模式図。(B) SME113 のサザン解析。Lanes: 1 and 3, SYK-6 株の全 DNA *Apal* 消化物; 2 and 4, SME113 の全 DNA *Apal* 消化物。DIG 標識した SLG\_38080 プローブ (lane 1, 2) と *kan* (lane 3, 4) プローブを用いてハイブリダイゼーションを行った。



**Fig. S2.** SME113 の DCA-C 分解能。

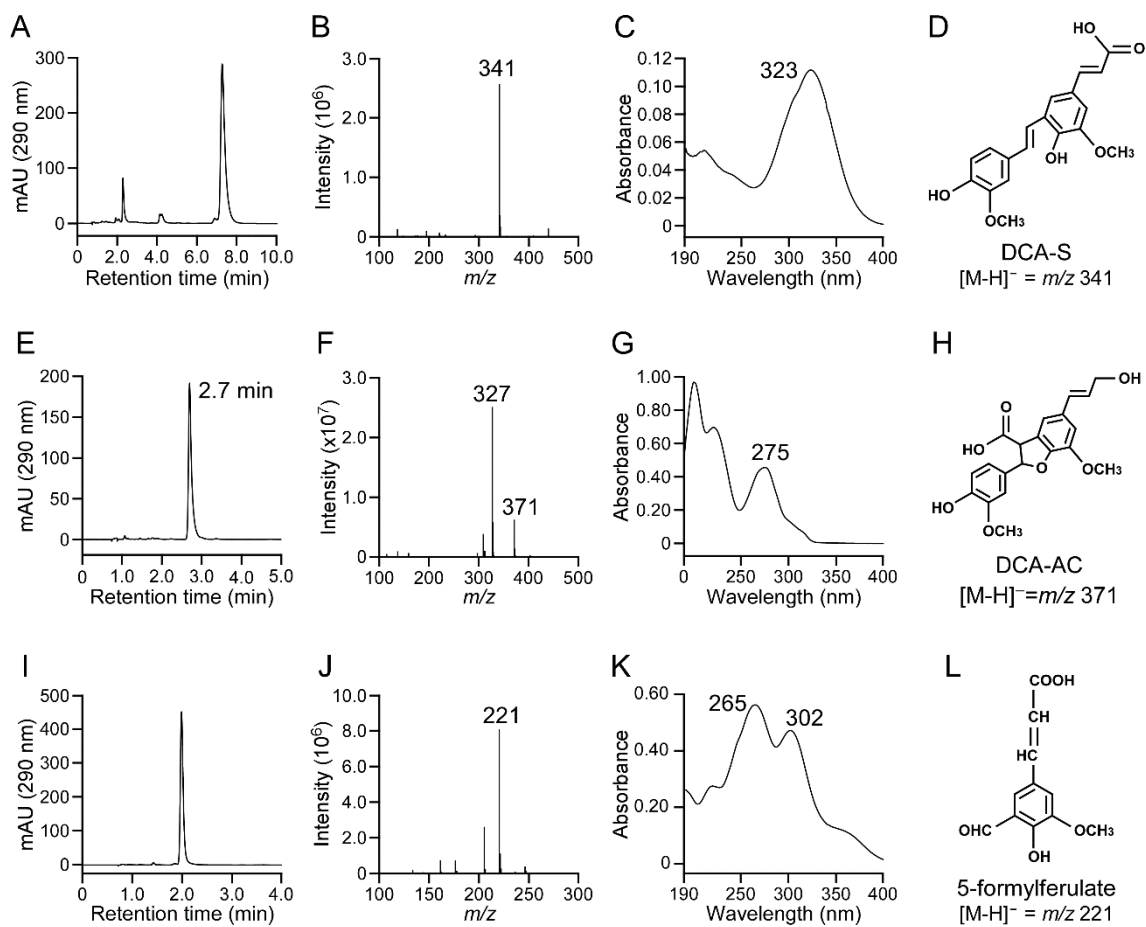
SYK-6 株及び SME113 を Wx-SEMP で培養し、OD<sub>600</sub>=0.5 に調整した各菌体の休止細胞と 100  $\mu$ M DCA-C を反応させ、経時的に反応上清をサンプリングし、HPLC で分析した。SYK-6 株と SME113 の DCA-C 分解を HPLC 分析における DCA-C のピーク面積 (検出波長, 327 nm) の減少で示した。Symbols: SYK-6 (circles); SME113 (diamonds)。

Supplemental content



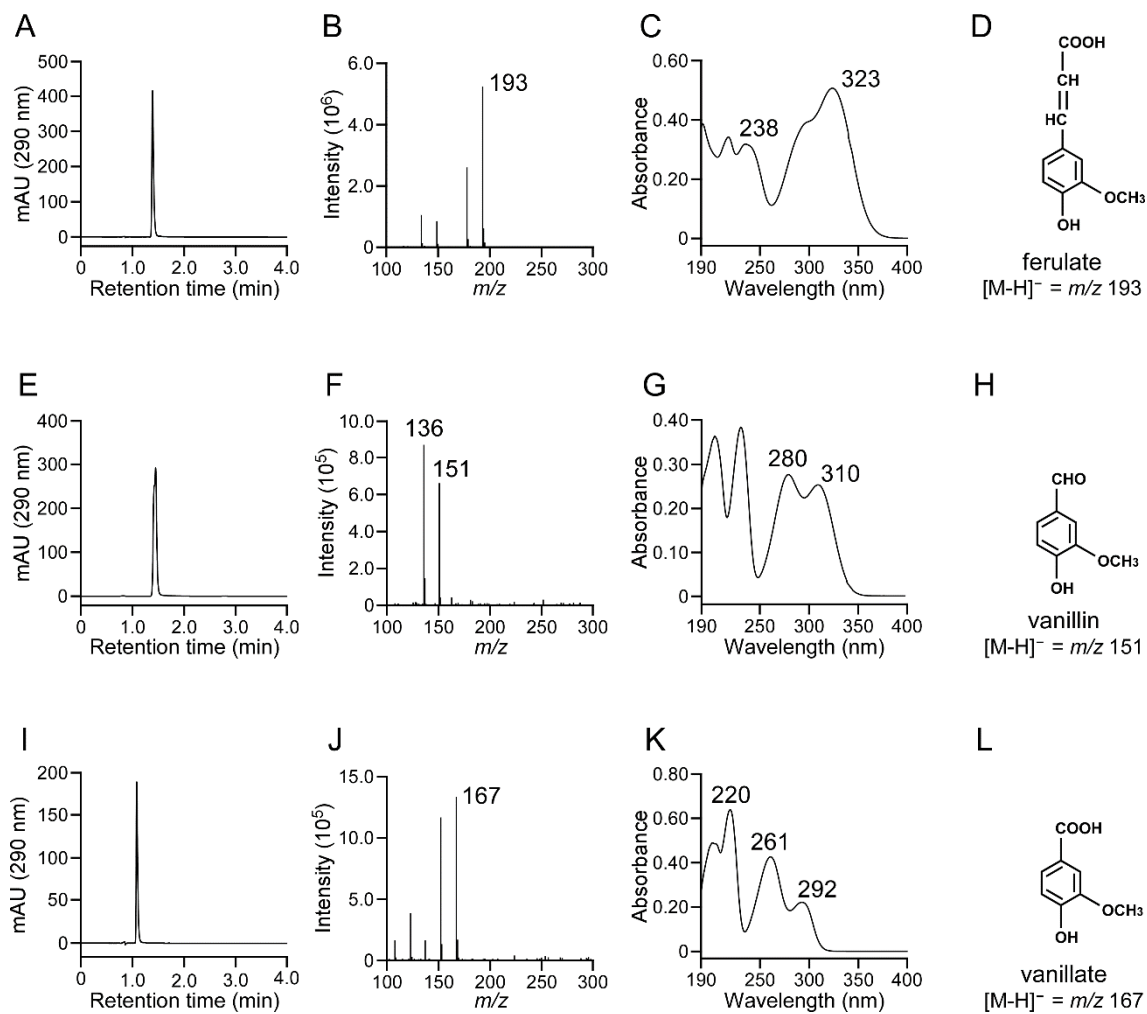
**Fig. S3.** 標品の HPLC クロマトグラム, UV-VIS スペクトル, ネガティブイオン ESI-MS スペクトル及び化学構造. (A-D) DCA; (E-H) DCA-C; (I-L) DCA-CC.

Supplemental content



**Fig. S4.** 標品の HPLC クロマトグラム, UV-VIS スペクトル, ネガティブイオン ESI-MS スペクトル及び化学構造. (A-D) DCA-S; (E-H) DCA-AC; (I-L) 5-formylferulate.

Supplemental content



**Fig. S5.** 標品の HPLC クロマトグラム, UV-VIS スペクトル, ネガティブイオン ESI-MS スペクトル及び化学構造. (A-D) ferulate; (E-H) vanillin; (I-L) vanillate.

### **Microarray preparation.**

An array of 5,542 specific oligonucleotides (5,447 45-mer and 95 35-mer; melting temperature,  $72 \pm 5^\circ\text{C}$ ) was designed based on the *Sphingobium* sp. SYK-6 genome sequence (GenBank accession no. AP012222 and AP012223). The oligonucleotides were designed using sequences from the 4,063 putative genes and synthesized by Sigma-Genosys (Sigma-Aldrich) and printed onto glass slides by Kaken-Geneqs. As a positive control, all of the oligonucleotides were mixed and printed at the corners of each subgrid.

### **RNA isolation and cDNA synthesis for microarray analysis.**

Cells of SYK-6 were grown in Wx-SEMP until the OD600 of the culture reached 0.5. Cultures were further incubated with 2 mM DCA for 2 h, with 2 mM vanillate for 6 h, or without any substrates for 2 h. Total RNA was isolated using Isogen II reagent (Nippon Gene) according to the manufacturer's instructions. Purified RNA was then treated with RNase-free DNase I (Roche) to remove any contaminated DNA. RNA samples isolated from three independent cultures were used for cDNA synthesis. Total RNA (6  $\mu\text{g}$ ) was labeled using an indirect method in which aminoallyl-dUTPs were incorporated by reverse transcription using a mixture of two kinds of random hexamers, normal GC content (Invitrogen) and high GC content (70%) (Sigma), 5-(3-aminoallyl)-dUTP (Ambion), and PrimeScript II reverse transcriptase (TaKaRa Bio Inc.). The RNA template was then degraded through incubation with 0.2 N NaOH and 0.1 M EDTA, followed by a neutralization using 1 M HEPES (pH 7.5). For a control of microarray hybridization, genomic DNA (gDNA) was prepared. gDNA was

isolated from SYK-6 and fragmented by sonication to an average size of 1,000 bp. Resultant gDNA (4  $\mu\text{g}$ ) was labeled using 5-(3-aminoallyl)-dUTP and Klenow fragment (Roche). Cy3 and Cy5 dyes were coupled to the aminoallyl-dUTP in the cDNA and gDNA, respectively, in the presence of 0.1M sodium bicarbonate (pH 9.0). The unlabeled dyes were removed using the QIAquick PCR purification system (Qiagen).

### **Microarray hybridization and data analysis.**

We performed duplicate competitive hybridization experiments using equal amounts of Cy3- and Cy5-labeled probes. Hybridizations were performed in a GeneTac HybStation instrument (Genomic Solutions). Hybridized arrays were immediately scanned using a GenePix 4000B scanner (Axon Instruments), and the spot intensities were quantified using Image 6.1 (BioDiscovery). To clarify the expression pattern of Wx-SEMP plus DCA–Wx-SEMP and Wx-SEMP plus vanillate–Wx-SEMP, *in silico* analysis was conducted by the LIMMA (linear model for microarray analysis) loess (subgrid) method using ArrayPipe 2.0. Average normalized expression ratios (treatment/control) were calculated for each gene and tested for significant variation between treatments (analysis of variance [ANOVA]).

### **Reverse transcription-PCR (RT-PCR).**

Total RNA was prepared from SYK-6 cells grown with DCA according to the method described above. cDNA was synthesized by the method described previously (107) except for using PrimeScript II reverse transcriptase. PCR was performed with the resultant cDNA with primers 5'-

## Supplemental content

GCACATCGTCATAGCTCCA-3' and 5'-GGCATCTTCCTCAACCTGT-3' and Q5 Hot Start highfidelityDNAPolymerase (New England BioLabs Inc.). A control PCR was performed with reverse transcriptase-negative samples to verify the absence of genomic DNA contamination. The resultant PCR products were subjected to agarose gel electrophoresis.

### **Microarray data accession number.**

Details of the microarray design, transcriptomic experimental design, and transcriptomic data have been deposited in the NCBI Gene Expression Omnibus (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) and are accessible through GEO series accession number GSE71789.

## Supplemental content

Table S1. DCA 培養時に誘導される遺伝子の発現誘導倍率

Gene	Product	DCA <sup>a</sup> (P value)	VA <sup>b</sup> (P value)	Expression (DCA/VA)
SLG_38050	TonB-dependent receptor-like protein	35.4 (0.0007)	1.5 (0.0258)	23.1
SLG_38040	hypothetical protein	21.9 (0.0002)	1.1 (0.2385)	19.4
SLG_12740 ( <i>ligM</i> )	vanillate/3-O-methylgallate O-demethylase	18.6 (0.0005)	15.5 (0.0045)	1.2
SLG_25000 ( <i>desA</i> )	syringate O-demethylase	12.6 (0.0008)	34.1 (0.0029)	0.4
SLG_38070	oxidoreductase	12.0 (0.0013)	1.1 (0.2630)	11.4
SLG_34630	efflux pump outer membrane protein	11.0 (0.0032)	1.3 (0.0951)	8.2
SLG_12940	NAD-dependent formate dehydrogenase subunit gamma	10.2 (0.0009)	9.6 (0.0012)	1.1
SLG_38090	cytochrome <i>c</i> family protein	8.5 (0.0003)	1.4 (0.0627)	5.9
SLG_12930	NAD-dependent formate dehydrogenase subunit beta	8.5 (0.0065)	11.1 (0.0124)	0.8
SLG_12910	NAD-dependent formate dehydrogenase subunit alpha	8.4 (0.0010)	5.6 (0.0007)	1.5
SLG_30940	cold shock protein	8.4 (0.0027)	1.3 (0.0767)	6.5
SLG_20730	acetolactate synthase small subunit	8.1 (0.0007)	2.4 (0.0410)	3.4
SLG_09330	TonB-dependent receptor-like protein	6.9 (0.0016)	1.6 (0.1215)	4.2
SLG_37530	protocatechuate 4,5-dioxygenase subunit alpha	6.6 (0.0051)	13.5 (0.0066)	0.5
SLG_38080	FAD-linked oxidase	6.5 (0.0003)	1.0 (0.4855)	6.7
SLG_10210	hypothetical protein	6.4 (0.0655)	2.4 (0.0531)	2.7
SLG_25010	hydrolase	6.3 (0.0097)	4.7 (0.0011)	1.4
SLG_09360	hypothetical protein	6.1 (0.0031)	1.0 (0.6698)	6.0
SLG_11720	polyribonucleotide nucleotidyltransferase	6.1 (0.0008)	1.7 (0.0342)	3.5
SLG_12890	formate dehydrogenase accessory protein	6.0 (0.0058)	4.8 (0.0740)	1.3
SLG_38030	major facilitator superfamily protein	5.6 (0.0019)	1.1 (0.2185)	4.9
SLG_09340	hydrolase	5.6 (0.0016)	1.4 (0.0210)	4.0
SLG_34620	efflux pump inner membrane protein	5.5 (0.0021)	1.0 (0.7019)	5.4
SLG_03330 ( <i>desB</i> )	gallate_dioxygenase	5.3 (0.0002)	7.9 (0.0099)	0.7
SLG_25030 ( <i>ferB</i> )	feruloyl-CoA hydratase/lyase	5.1 (0.0007)	0.6 (0.4226)	8.2
SLG_12760 ( <i>ligH</i> )	10-formyltetrahydrofolate synthetase	5.1 (0.0001)	3.1 (0.0248)	1.7
SLG_34600	hypothetical protein	5.0 (0.0003)	1.3 (0.4270)	3.8
SLG_27990	hypothetical protein	4.9 (0.0022)	9.6 (0.0060)	0.5
SLG_20720	hypothetical protein	4.9 (0.0031)	2.2 (0.0061)	2.3
SLG_19730	hypothetical protein	4.8 (0.0030)	1.5 (0.0328)	3.3
SLG_21740	hypothetical protein	4.8 (0.0121)	1.6 (0.1302)	3.0
SLG_12920	molybdopterin-guanine dinucleotide biosynthesis protein A	4.8 (0.0112)	3.3 (0.0077)	1.4
SLG_26230	hypothetical protein	4.7 (0.0218)	4.2 (0.0316)	1.1
SLG_35530	50S ribosomal protein L5	4.7 (0.0032)	0.8 (0.5012)	5.5
SLG_20710	acetolactate synthase large subunit	4.7 (0.0003)	1.4 (0.0076)	3.5
SLG_12750	5,10-methylenetetrahydrofolate reductase	4.7 (0.0002)	3.4 (0.0116)	1.4
SLG_23110	NADH-quinone oxidoreductase subunit H	4.6 (0.0124)	1.7 (0.0369)	2.7
SLG_28690	hypothetical protein	4.6 (0.0241)	5.4 (0.0389)	0.8
SLG_15690	hypothetical protein	4.3 (0.0610)	0.7 (0.9926)	5.8
SLG_12860	hypothetical protein	4.2 (0.0003)	4.3 (0.0019)	1.0
SLG_05470	hypothetical protein	4.2 (0.0094)	0.9 (0.9118)	4.7
SLG_19900	conjugal transfer protein TraU	4.2 (0.0297)	2.4 (0.0723)	1.7
SLG_30920	hypothetical protein	4.0 (0.0015)	0.8 (0.1199)	5.3
SLG_p_00200	hydrolase	4.0 (0.0034)	0.9 (0.2339)	4.2
SLG_04720	hypothetical protein	4.0 (0.0398)	2.1 (0.0792)	1.9
SLG_31760	hypothetical protein	3.9 (0.0265)	7.1 (0.0095)	0.6
SLG_00860	hypothetical protein	3.9 (0.0005)	1.1 (0.0535)	3.6
SLG_01450	translation initiation factor IF-3	3.8 (0.0130)	2.0 (0.0045)	1.9
SLG_38060	hypothetical protein	3.8 (0.0050)	1.1 (0.7131)	3.6
SLG_06970	ABC transporter permease	3.8 (0.0508)	6.6 (0.0611)	0.6



Supplemental content

Gene	Product	DCA <sup>a</sup> ( <i>P</i> value)	VA <sup>b</sup> ( <i>P</i> value)	Expression (DCA/VA)
SLG_24880	acetate kinase	3.8 (0.0491)	2.3 (0.0155)	1.6
SLG_12900	NAD-dependent formate dehydrogenase subunit delta	3.7 (0.0005)	4.1 (0.0066)	0.9
SLG_22590	transcription antitermination protein	3.7 (0.0164)	0.8 (0.0103)	4.4
SLG_00400	membrane-bound lytic murein transglycosylaseA	3.6 (0.0090)	3.6 (0.0305)	1.0
SLG_24980	hypothetical protein	3.6 (0.0151)	2.2 (0.0046)	1.6
SLG_37270	primosomal protein N'	3.6 (0.0733)	1.7 (0.0929)	2.1
SLG_p_00210	hypothetical protein	3.6 (0.0094)	1.1 (0.6673)	3.3
SLG_23670	MarR family transcriptional regulator	3.6 (0.0117)	2.8 (0.0085)	1.3
SLG_29490	metalloprotease	3.6 (0.0019)	2.2 (0.0023)	1.6
SLG_09380	hypothetical protein	3.6 (0.0059)	0.5 (0.0316)	7.7
SLG_26040	conjugal transfer protein TrbC	3.5 (0.0333)	1.2 (0.0614)	3.1
SLG_00340	inner membrane protein	3.5 (0.0062)	0.8 (0.2750)	4.5
SLG_30930	hypothetical protein	3.5 (0.0021)	0.9 (0.3048)	4.1
SLG_08190	sugar transporter	3.5 (0.0010)	1.8 (0.0110)	1.9
SLG_09370	hypothetical protein	3.5 (0.0184)	0.8 (0.0584)	4.3
SLG_09260	TonB-dependent receptor-like protein	3.4 (0.0065)	1.8 (0.1073)	1.9
SLG_12560	hypothetical protein	3.4 (0.0069)	4.6 (0.0085)	0.7
SLG_26050	conjugal transfer protein TrbB	3.4 (0.0125)	1.1 (0.0515)	3.1
SLG_16690	AsnC family transcriptional regulator	3.4 (0.0006)	0.8 (0.0186)	4.0
SLG_09530	hypothetical protein	3.3 (0.0079)	1.6 (0.0077)	2.0
SLG_p_00180	lgt prolipoprotein diacylglyceryl transferase	3.3 (0.0036)	1.6 (0.0213)	2.1
SLG_17250	50S ribosomal protein L25	3.3 (0.0042)	1.0 (0.7026)	3.2
SLG_11350	major facilitator superfamily protein	3.3 (0.2977)	1.5 (0.5911)	2.2
SLG_09490	hypothetical protein	3.3 (0.0184)	1.1 (0.1037)	2.9
SLG_12520 ( <i>ligJ</i> )	4-oxalomesaconate hydratase	3.3 (0.0055)	5.7 (0.0109)	0.6
SLG_16650	aromatic-ring-hydroxylating dioxygenase subunit beta	3.2 (0.0032)	0.9 (0.0660)	3.7
SLG_12820	major facilitator superfamily protein	3.2 (0.0039)	2.2 (0.0001)	1.5
SLG_16640	aromatic-ring-hydroxylating dioxygenase subunit alpha	3.2 (0.0040)	0.9 (0.0210)	3.6
SLG_36650	hypothetical protein	3.2 (0.1265)	1.2 (0.3950)	2.8
SLG_32600 ( <i>ligP</i> )	beta etherase	3.1 (0.0019)	1.6 (0.0046)	2.0
SLG_00090	hypothetical protein	3.1 (0.0016)	1.0 (0.4303)	3.1
SLG_06840	3-oxoacyl-(acyl-carrier-protein) synthase III	3.1 (0.0389)	1.8 (0.0767)	1.7
SLG_12870	MarR family transcriptional regulator	3.1 (0.0050)	3.5 (0.0055)	0.9
SLG_06940	efflux pump outer membrane protein	3.1 (0.0636)	2.4 (0.1234)	1.3
SLG_25990	conjugal transfer protein TrbF	3.1 (0.0153)	1.5 (0.2711)	2.1
SLG_08780	major facilitator superfamily protein	3.0 (0.0015)	1.0 (0.6588)	3.1
SLG_19400	hypothetical protein	3.0 (0.0743)	1.5 (0.1834)	2.0
SLG_10200	glycosyltransferase	3.0 (0.5096)	2.3 (0.1040)	1.3
SLG_08900	phosphate transport system ATP-binding protein	3.0 (0.0036)	2.9 (0.0673)	1.0
SLG_05170	aspartate-semialdehyde dehydrogenase-like protein	3.0 (0.0243)	1.0 (0.9460)	2.9
SLG_02940	flagellar hook-basal body protein	3.0 (0.0958)	1.7 (0.0061)	1.8
SLG_12490 ( <i>ligC</i> )	CHMS dehydrogenase	3.0 (0.0049)	4.7 (0.0286)	0.6
SLG_13690	tryptophan synthase subunit alpha	3.0 (0.4473)	1.6 (0.0634)	1.9
SLG_14710	protein translocase subunit	3.0 (0.0197)	4.0 (0.0145)	0.7
SLG_03820	hypothetical protein	3.0 (0.0008)	12.2 (0.0105)	0.2
SLG_24950 ( <i>mdlC</i> )	benzoylformate decarboxylase	3.0 (0.0618)	2.7 (0.0544)	1.1
SLG_36180	hypothetical protein	2.9 (0.0116)	0.7 (0.1530)	4.0
SLG_15730	nicotinamide nucleotide transhydrogenase subunit alpha 1	2.9 (0.0016)	2.0 (0.0781)	1.5
SLG_12850	hypothetical protein	2.9 (0.0136)	3.1 (0.0003)	0.9
SLG_13240	hypothetical protein	2.9 (0.0112)	0.9 (0.3129)	3.1
SLG_38390	cytochrome <i>c</i> oxidase <i>cbb3</i> -type subunit II	2.9 (0.0040)	13.2 (0.0052)	0.2

Supplemental content

Gene	Product	DCA <sup>a</sup> ( <i>P</i> value)	VA <sup>b</sup> ( <i>P</i> value)	Expression (DCA/VA)
SLG_12570 ( <i>ligI</i> )	2-pyrone-4,6-dicarboxylic acid hydrolase	2.9 (0.0121)	2.4 (0.1330)	1.2
SLG_05250	50S ribosomal protein L36	2.9 (0.0265)	1.1 (0.2594)	2.7
SLG_38100	hypothetical protein	2.8 (0.0080)	1.0 (0.4350)	2.9
SLG_p_00700	copper resistance protein	2.8 (0.1025)	5.6 (0.0026)	0.5
SLG_04900	hypothetical protein	2.8 (0.1540)	1.0 (0.4459)	2.8
SLG_25020 ( <i>ferA</i> )	feruloyl-CoA synthetase	2.8 (0.0029)	1.2 (0.0308)	2.3
SLG_28340	oxidoreductase	2.8 (0.0738)	1.6 (0.3486)	1.8
SLG_30770	phosphopantetheine adenylyltransferase	2.8 (0.0004)	1.1 (0.0541)	2.4
SLG_04400	hypothetical protein	2.8 (0.0029)	2.5 (0.0361)	1.1
SLG_30370	conjugal transfer protein TrbC	2.7 (0.0503)	2.4 (0.0406)	1.2
SLG_25040	MarR family transcriptional regulator	2.7 (0.0241)	0.8 (0.3200)	3.2
SLG_23100	NADH-quinone oxidoreductase subunit I	2.7 (0.0024)	1.9 (0.1076)	1.4
SLG_24860	poly-beta-hydroxybutyrate polymerase	2.7 (0.0020)	2.0 (0.0152)	1.4
SLG_23130	hypothetical protein	2.7 (0.0001)	2.2 (0.0024)	1.2
SLG_27040	hypothetical protein	2.7 (0.0389)	0.7 (0.0617)	3.9
SLG_30230	hypothetical protein	2.7 (0.0247)	1.3 (0.4043)	2.1
SLG_35680	elongation factor G	2.7 (0.0029)	1.5 (0.0113)	1.9
SLG_29410	ferric uptake regulation protein	2.7 (0.0005)	0.9 (0.0029)	3.1
SLG_15530	(3R)-hydroxymyristoyl-(acyl-carrier-protein) dehydratase	2.6 (0.0023)	1.6 (0.0214)	1.6
SLG_09520	MarR family transcriptional regulator	2.6 (0.0213)	1.7 (0.0557)	1.6
SLG_38370	cytochrome <i>c</i> oxidase cbb3-type subunit III	2.6 (0.1042)	26.6 (0.0113)	0.1
SLG_29710	glycosyltransferase	2.6 (0.0300)	2.6 (0.0244)	1.0
SLG_35570	50S ribosomal protein L29	2.6 (0.0141)	2.2 (0.0027)	1.2
SLG_08880	phosphate regulon transcriptional regulatory protein	2.6 (0.0002)	1.9 (0.0064)	1.4
SLG_37760	hypothetical protein	2.6 (0.0016)	1.5 (0.0100)	1.8
SLG_31380	hypothetical protein	2.6 (0.0001)	0.9 (0.4576)	2.9
SLG_36670	inorganic pyrophosphatase	2.6 (0.0007)	1.0 (0.9374)	2.6
SLG_p_01350	hypothetical protein	2.6 (0.0293)	1.9 (0.0033)	1.4
SLG_30170	chromate transport protein	2.6 (0.0607)	1.7 (0.0186)	1.5
SLG_24480	hypothetical protein	2.6 (0.0855)	4.0 (0.0271)	0.6
SLG_21960	hypothetical protein	2.6 (0.0219)	1.9 (0.2129)	1.4
SLG_07010	catalase	2.6 (0.0723)	0.7 (0.9925)	3.5
SLG_12500 ( <i>ligB</i> )	protocatechuate 4,5-dioxygenase subunit beta	2.6 (0.0044)	5.0 (0.0231)	0.5
SLG_p_01300	ParA-like protein	2.6 (0.0248)	2.2 (0.0531)	1.1
SLG_05320	hypothetical protein	2.6 (0.0053)	0.8 (0.1377)	3.3
SLG_01440	hypothetical protein	2.6 (0.0120)	0.9 (0.2955)	3.0
SLG_07080	delta-1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase	2.6 (0.0156)	1.1 (0.8727)	2.4
SLG_04910	acetyltransferase	2.6 (0.0028)	2.1 (0.0365)	1.2
SLG_35940	hydrolase	2.5 (0.0490)	3.1 (0.0789)	0.8
SLG_35610	30S ribosomal protein S19	2.5 (0.0149)	1.2 (0.0893)	2.0
SLG_29300	glutamate synthase (NADPH) large chain	2.5 (0.0027)	3.1 (0.0057)	0.8
SLG_21320	30S ribosomal protein S18	2.5 (0.0815)	3.5 (0.1372)	0.7
SLG_15210	hypothetical protein	2.5 (0.0034)	1.6 (0.3128)	1.6
SLG_12530	phosphogluconate dehydrogenase	2.5 (0.0232)	6.2 (0.0078)	0.4
SLG_12770	hypothetical protein	2.5 (0.0191)	2.9 (0.0642)	0.9
SLG_02490	biopolymer transport protein TolR/ExbD	2.5 (0.0057)	1.9 (0.0547)	1.3
SLG_23680	multidrug resistance protein A	2.5 (0.0175)	2.0 (0.0524)	1.2
SLG_07490	efflux pump periplasmic linker protein	2.5 (0.0223)	0.7 (0.2745)	3.4
SLG_12100	hypothetical protein	2.5 (0.0313)	2.3 (0.0305)	1.1
SLG_17980	nitrogen regulation protein	2.4 (0.0088)	1.5 (0.0024)	1.7
SLG_01690	hypothetical protein	2.4 (0.0081)	1.2 (0.1240)	2.0

## Supplemental content

Gene	Product	DCA <sup>a</sup> ( <i>P</i> value)	VA <sup>b</sup> ( <i>P</i> value)	Expression (DCA/VA)
SLG_19580	peptidase S8 family protein	2.4 (0.0186)	1.2 (0.0452)	2.0
SLG_20510	glycosyltransferase	2.4 (0.0064)	1.1 (0.7325)	2.2
SLG_20740	ketol-acid reductoisomerase	2.4 (0.0198)	1.8 (0.0158)	1.3
SLG_09770	hypothetical protein	2.4 (0.0081)	1.3 (0.0010)	1.8
SLG_29390	ribosomal-protein-alanine acetyltransferase	2.4 (0.0113)	1.3 (0.0426)	1.8
SLG_33550	hypothetical protein	2.4 (0.0062)	1.8 (0.0447)	1.4
SLG_13030	hypothetical protein	2.4 (0.0173)	1.8 (0.0303)	1.4
SLG_p_01290	ParB-like protein	2.4 (0.0224)	1.3 (0.2911)	1.8
SLG_34610	efflux pump periplasmic linker protein	2.4 (0.0105)	0.7 (0.0802)	3.4
SLG_16560	30S ribosomal protein S1	2.4 (0.0164)	1.8 (0.0068)	1.3
SLG_23040	biotin protein ligase	2.4 (0.0030)	1.8 (0.0014)	1.3
SLG_31010	hypothetical protein	2.3 (0.0584)	1.2 (0.6516)	1.9
SLG_37260	transaldolase	2.3 (0.0202)	2.2 (0.0340)	1.1
SLG_31900	hypothetical protein	2.3 (0.0081)	0.5 (0.1105)	4.7
SLG_19920	mating pair stabilization protein	2.3 (0.1771)	1.2 (0.0908)	2.0
SLG_28090	glutathione S-transferase	2.3 (0.0108)	1.4 (0.1600)	1.6
SLG_15460	ribosome-recycling factor	2.3 (0.0087)	1.7 (0.0609)	1.3
SLG_05310	methionine aminopeptidase	2.3 (0.0401)	0.9 (0.8108)	2.5
SLG_09480	choline dehydrogenase	2.3 (0.0809)	1.2 (0.0158)	2.0
SLG_23120	NADH-quinone oxidoreductase subunit G	2.3 (0.0274)	2.7 (0.0160)	0.9
SLG_14020	Na(+)/H(+) antiporter subunit E	2.3 (0.0244)	1.4 (0.0344)	1.7
SLG_12510 ( <i>ligA</i> )	protocatechuate 4,5-dioxygenase subunit alpha	2.3 (0.0046)	4.2 (0.0093)	0.5
SLG_10220	glycosyltransferase	2.3 (0.0550)	1.4 (0.0115)	1.7
SLG_01990	outer membrane lipoprotein carrier protein	2.3 (0.1066)	1.6 (0.0925)	1.4
SLG_35490	50S ribosomal protein L18	2.3 (0.0164)	2.3 (0.0043)	1.0
SLG_35110	hypothetical protein	2.3 (0.0757)	1.4 (0.0731)	1.6
SLG_13700	hypothetical protein	2.2 (0.0150)	1.1 (0.2388)	2.1
SLG_09850	hypothetical protein	2.2 (0.0915)	2.2 (0.0035)	1.0
SLG_01680	bifunctional purine biosynthesis protein	2.2 (0.3404)	2.1 (0.1201)	1.1
SLG_03650	epoxide hydrolase	2.2 (0.0694)	1.8 (0.0176)	1.2
SLG_28910	hypothetical protein	2.2 (0.0003)	1.2 (0.0101)	1.9
SLG_05070	hypothetical protein	2.2 (0.0069)	1.9 (0.1621)	1.2
SLG_01590	hypothetical protein	2.2 (0.0805)	1.7 (0.7009)	1.3
SLG_08230	hypothetical protein	2.2 (0.0212)	0.9 (0.6918)	2.4
SLG_33740	GTP-binding protein	2.2 (0.0031)	0.8 (0.0433)	2.7
SLG_05910	UDP-N-acetylmuramoylalanine-D-glutamate_ligase	2.2 (0.0038)	2.8 (0.0292)	0.8
SLG_08940	phosphate regulon sensor protein	2.2 (0.0181)	2.0 (0.0490)	1.1
SLG_05140	helicase	2.2 (0.0285)	1.0 (0.7026)	2.2
SLG_12410	hypothetical protein	2.2 (0.0209)	1.1 (0.3475)	2.0
SLG_09500	choline dehydrogenase	2.2 (0.0128)	0.7 (0.0062)	3.3
SLG_18960	pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha	2.2 (0.0189)	2.1 (0.0024)	1.1
SLG_00360	glutathione S-transferase	2.2 (0.1529)	1.8 (0.1141)	1.2
SLG_19100	hypothetical protein	2.2 (0.0165)	1.3 (0.0204)	1.7
SLG_09960	hypothetical protein	2.2 (0.0455)	2.0 (0.0517)	1.1
SLG_31460	3-oxoadipate CoA-transferase subunit alpha	2.2 (0.0093)	0.7 (0.0083)	3.2
SLG_15470	undecaprenyl pyrophosphate synthase	2.2 (0.0037)	1.5 (0.0087)	1.4
SLG_35100	hypothetical protein	2.2 (0.0106)	1.5 (0.0555)	1.5
SLG_05630	alkyl hydroperoxide reductase subunit C	2.2 (0.0151)	1.1 (0.1904)	1.9
SLG_12810 ( <i>ligW2</i> )	5-carboxyvanillate decarboxylase	2.2 (0.0129)	1.2 (0.1218)	1.8

<sup>a</sup> Wx-SEMP 培地での培養に対する Wx-SEMP-DCA 培地での培養における各遺伝子の発現誘導倍率.

<sup>b</sup> Wx-SEMP 培地での培養に対する Wx-SEMP-vanillate 培地での培養における各遺伝子の発現誘導倍率.