

論文内容の要旨

氏名 高橋 健司

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およ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芳香族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 β -5'結合を持つフェニルクマラン型化合物、デヒドロジコニフェリルアルコール (DCA)の代謝経路およ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 γ 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 γ 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バニリンおよび 5-ホルミルフェルラ酸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、キノヘモプロテインアルコールデヒドロゲナーゼ遺伝子とアリアルアルコールデヒドロゲナーゼ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 γ 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 および 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 個のアルデヒドデヒドロゲナーゼ遺伝子に着目し、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、複数のアルコールデヒドロゲナーゼとアルデヒドデヒドロゲナーゼ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) フラビンアデニンジヌクレオチド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 つのオキシダーゼ遺伝子 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、グルコース・メタノール・コリンオキシドレダクターゼファミリー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* および *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 γ 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オキシダーゼ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 γ 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 Q₁₀) 誘導体である CoQ₀ と CoQ₁ 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、シトクロム *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。