

# 論文内容の要旨

## Abstract of Dissertation

氏名 Name 藤田 雅也

植物細胞壁の主要な構成成分であるリグニンは、地球上で最も豊富に存在する芳香族資源であるが、その構造に起因する難分解性と不均一性から有効な利用法が確立されていない。近年、高分子リグニンの化学処理による低分子化と細菌の低分子芳香族化合物の代謝システムを組み合わせた、リグニンからの有価物生産が高い注目を集めている。グラム陰性菌に属する *Sphingobium* sp. SYK-6株は、リグニンに由来する様々な芳香族化合物を代謝可能なリグニン分解のモデル細菌であり、代謝中間体としてポリマー原料となる有価物を生産する。これまでにリグニン由来芳香族化合物の代謝に関与するSYK-6株の代謝酵素遺伝子が多数明らかにされてきたが、細胞膜を介したリグニン由来芳香族化合物の取り込み、特に細胞外膜における取り込みシステムに関する知見は得られていなかった。細菌が有する代謝システムを利用し、リグニンから得られる芳香族化合物を高効率に有価物へと変換する組換え細菌を構築する上で、リグニン由来芳香族化合物を細胞内へと取り込むトランスポーターの情報はきわめて有用である。本研究では、SYK-6株の外膜におけるリグニン由来芳香族化合物の取り込みシステムの解明を目的とし、外膜トランスポーター遺伝子の同定と機能解析を行うとともに、同定した外膜トランスポーターの物質生産への応用について検討した。加えて、生命活動を司る様々な酵素の補因子として働き、SYK-6株におけるリグニン由来芳香族化合物の代謝に必要な鉄の獲得システムの同定を行った。

SYK-6株は、外膜で受動的に芳香族化合物を取り込むポーリンOmpWと相同性を示す遺伝子を有していたが、本遺伝子はリグニン由来芳香族化合物の取り込みには関与しないことが示された。一方、SYK-6株は、炭素源となる芳香族化合物の取り込みへの関与が知られていなかったTonB-dependent receptor (TBDR)をコードすると推定される遺伝子を74個と きわめて多く有していた。TBDRは細菌の外膜に普遍的に存在し、内膜のTonB-ExbB-ExbD複合体 (Ton複合体)から伝達されるプロトン駆動力由来のエネルギーを利用して siderophoreやvitamin B12、糖類などを取り込む。DNAマイクロアレイ解析の結果から、SYK-6株の74個のTBDR様遺伝子のうち、17個のTBDR様遺伝子がリグニン由来芳香族化合物の存在下での培養時に2倍以上の転写誘導を受けることが示された。ビフェニル型リグニン由来二量体化合物である5,5'-dehydrodivanillate (DDVA)により4.87倍の転写誘導を受ける *ddvT*は、SYK-6株のDDVA代謝系遺伝子クラスターの最も上流に位置しており、遺伝子破壊株の解析から、DDVAの取り込みに関与することが示された。またDdvTは外膜に局在し、そのN末端領域にはTonBとの相互作用部位が存在したことから、DdvTがTBDRとしての生化学的特徴を有することが示された。*ddvT*の高発現がDDVAからのポリマー原料となる代謝中間体2-pyrone-4,6-dicarboxylic acid (PDC)の生産速度に与える影響を、PDC変換酵素遺伝子破壊株を用いて調査したところ、*ddvT*の高発現によりDDVA変換量とPDC生産量が有意に向上することが示された。

SYK-6株はTon複合体成分遺伝子として、*tonB*をコードすると推定される遺伝子を6つ、*exbB*と*exbD*についてはそれぞれ3つずつ有していた。これらのうち、

*tonB1-exbB1-exbD1-exbD2*はオペロンを形成し、その遺伝子産物はDDVAの取り込みを担うTon複合体を構成することが強く示唆された。*tonB1*オペロン遺伝子はSYK-6株の生育に必須であり、DDVA以外の様々なリグニン由来芳香族化合物の取り込みにも関与することが示唆された。また、*exbB2/tolQ*と*exbD3/tolR*は細胞膜の安定化を担うTol-Palシステムを構成することが示唆された。

*tonB2*およびその直下流に位置するTBDR遺伝子の*fiuA*は、鉄制限条件下においてオペロンとして転写され、SYK-6株の外膜における鉄獲得に中心的な役割を持つことが示された。また、*fiuA*以外に少なくとも3つのTBDR遺伝子 (SLG\_04340, SLG\_04380, SLG\_10860)が鉄の獲得に関わることが示唆された。内膜では、Fe(II)トランスポーターの*feoB*が鉄の獲得に関与することが示された。同定された鉄獲得に関与する多くの遺伝子の転写は、ferric uptake regulator (Fur)をコードする*fur1*によって鉄濃度に応答した制御を受けることが強く示唆された。さらにSYK-6株は、リグニン由来芳香族化合物の中間代謝物であるprotocatechuateをsiderophoreとして利用し鉄を獲得するシステムも有することが示唆された。