

博士論文

Sphingobium 属細菌におけるリグニン主要代謝中間体
分解酵素遺伝子の転写制御システム

令和 3 年 (2021 年) 3 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

荒木 拓馬

目次

序章	1
1. 研究背景	1
2. 木質成分とその利用	2
3. リグニンの構造と生合成	4
4. リグニンの生分解	5
5. 微生物の代謝能を利用したリグニン有効利用方法	7
6. <i>Sphingobium</i> sp. SYK-6 株のリグニン由来芳香族化合物代謝系	7
7. バクテリアにおける vanillate と syringate の代謝	16
8. SYK-6 株における vanillate/syringate 代謝と C ₁ 代謝	20
9. リグニン由来芳香族化合物からのポリマー原料生産	23
10. バクテリアにおけるリグニン由来芳香族化合物代謝の制御	25
11. SYK-6 株のリグニン由来芳香族化合物代謝系遺伝子の転写制御	34
12. 本研究の目的	39
第 1 章 <i>Sphingobium</i> sp. SYK-6 株における vanillate および syringate 分解酵素遺伝子群の転写制御システム	40
第 1 節 緒言	40
第 2 節 結果	42
1. <i>Sphingobium</i> sp. SYK-6 株における vanillate および syringate 変換の誘導性	42
2. <i>desA</i> 、 <i>ligM</i> および <i>desB</i> の転写誘導性	43
3. Vanillate/syringate 代謝系遺伝子群の転写制御因子の同定	46
4. <i>desR</i> 破壊株および <i>desQ</i> 破壊株における <i>desA</i> 、 <i>ligM</i> および <i>desB</i> の転写誘導性	48
5. <i>desR</i> の転写誘導性	49
6. <i>desB</i> および <i>ligM</i> のプロモーター領域の同定	51
7. <i>desR</i> の <i>E. coli</i> における発現と DesR の精製および分子量分析	53
8. <i>desB</i> 、 <i>ligM</i> および <i>desA</i> 上流領域への DesR の結合能	54
9. <i>desR</i> 上流領域への DesR の結合能	56
10. 変異 IR 配列に対する DesR の結合能	57
11. DesR のエフェクター分子の同定	59
第 3 節 考察	61
第 4 節 材料と方法	67

第2章 <i>Sphingobium</i> sp. SYK-6 株における syringate 脱メチル酵素	
遺伝子 <i>desA</i> の転写制御システム	77
第1節 緒言	77
第2節 結果	78
1. <i>Sphingobium</i> sp. SYK-6 株における <i>desA</i> の転写制御因子の同定	78
2. <i>desX</i> 破壊株における <i>desA</i> 、 <i>ligM</i> 、 <i>desB</i> 、 <i>ferB</i> 、SLG_25010 および <i>desX</i> の転写誘導性	83
3. <i>ferB-ferA</i> -SLG_25010- <i>desA</i> 遺伝子クラスターのオペロン構造	85
4. SLG_25010- <i>desA</i> オペロンのプロモーター領域の同定	87
5. <i>desX</i> の <i>E. coli</i> における発現と DesX の精製	89
6. SLG_25010- <i>desA</i> オペロンのプロモーター領域への DesX の結合能	90
7. <i>ferB</i> 、 <i>ligM</i> および <i>desB</i> プロモーター領域への DesX の結合能	92
8. DesX のエフェクター分子の同定	94
第3節 考察	95
第4節 材料と方法	100
総括	108
謝辞	111
公表論文	113
引用文献	114

本論文で用いている主な略語

VA	vanillate
PCA	protocatechuate
SA	syringate
3MGA	3- <i>O</i> -methylgallate
GA	gallate
PDC	2-pyrone-4,6-dicarboxylate
FA	ferulate
SEMP	10 mM sucrose、10 mM glutamate、0.13 mM methionine および 10 mM proline
H ₄ folate	tetrahydrofolate
DesA	H ₄ folate-dependent SA <i>O</i> -demethylase
LigM	H ₄ folate-dependent VA/3MGA <i>O</i> -demethylase
DesB	GA dioxygenase
DesR	MarR 型転写制御因子 (<i>desB</i> 、 <i>ligM</i> オペロンおよび <i>desR</i> の転写リプレッサー)
DesQ	LysR 型転写制御因子
DesX	IclR 型転写制御因子 (SLG_25010- <i>desA</i> オペロンの転写リプレッサー)
qRT-PCR	quantitative reverse transcription-PCR
RT-PCR	reverse transcription-PCR
EMSA	electrophoretic mobility shift assay
IR	inverted repeat
desBp1–desBp6, desBp	EMSA に用いた <i>desB</i> 上流領域の標識または非標識プローブ
ligMp1–ligMp6, ligMp	EMSA に用いた <i>ligM</i> 上流領域の標識または非標識プローブ
desAp1–desAp9	EMSA に用いた <i>desA</i> 上流領域の標識または非標識プローブ
desRp1–desRp2	EMSA に用いた <i>desR</i> 上流領域の標識または非標識プローブ
ferBp	EMSA に用いた <i>ferB</i> 上流領域の標識または非標識プローブ

序章

1. 研究背景

18 世紀半ばの産業革命以降、我々人類は石油、石炭、および天然ガスなどの化石資源を利用することで経済成長を遂げてきた。しかし、化石資源に依存した経済成長は資源の枯渇や地球温暖化などの深刻な環境問題を引き起こすに至った。実際に、2013 年の IPCC (気候変動に関する政府間パネル) 第 5 次評価報告書において、1950 年代以降に化石資源由来の温室効果ガス濃度は増加し続けており、それに伴い雪氷の減少および海面水位の上昇が確認されていると報告された。また、2015 年にフランス・パリで開催された COP21 (国連気候変動枠組条約第 21 回締約国会議) では、2020 年以降の温暖化対策の法的枠組みとなる「パリ協定」が 196 の国と地域によって採択された。このパリ協定では、世界の平均気温上昇を産業革命以前と比較して 2°C 未満に抑えること、さらには 1.5°C に抑える努力を追求することが掲げられた。また、産業革命以降急激に活発化した人間活動により経済・社会の基盤である地球の持続可能性が危ぶまれていることを発端に、2015 年に国連サミットで Sustainable Development Goals (SDGs; 持続可能な開発目標) が採択された。SDGs は、持続可能な世界を実現するための 2016 年から 2030 年までの国際目標であり、17 のゴールと 169 のターゲットから構成されている。

これらに加え、再生可能な生物資源とバイオテクノロジーを活用して地球規模での課題を解決しながら経済成長を図る「バイオエコノミー」という考え方が欧米を中心に台頭してきている。OECD (経済協力開発機構) によると、2030 年には世界のバイオ市場の規模が全 GDP の 2.7% (約 200 兆円) に拡大し、工業分野が市場全体の約 4 割を占め最も大きくなると予測されている (1)。このような背景のもと、化石資源に依存した消費型社会から再生可能資源を基軸とした資源循環型社会への転換は急務である。

化石資源の代替となる資源として、再生可能でカーボンニュートラルな植物バイオマスが注目されている。中でも、木質バイオマスは地球上に最も豊富に存在する樹木由来のバイオマスであり、その賦存量は極めて膨大である。日本では、林地残材として年間発生量が約 800 万トンあるにもかかわらず、その利用率は 2016 年時点で約 9% に留まっており、有効な利用方法の確立が望まれている (Table I) (2)。

Table I. 日本におけるバイオマスの利用率^a

バイオマスの種類	発生量/年 (トン) ^b	利用率 (%)
廃棄物系		
家畜排泄物	81,000,000	87
下水汚泥	78,000,000	63
黒液	13,000,000	100
紙	27,000,000	81
食品廃棄物	17,000,000	24
製材工場等残材	6,400,000	97
建築発生木材	5,000,000	94
未利用系		
農作物非食用部 ^c	13,000,000	32
林地残材	8,000,000	9

^a バイオマス活用推進基本計画 (平成 28 年) (2)より一部抜粋.

^b 黒液, 製材工場等残材, 林地残材については乾燥重量.
他のバイオマスについては湿潤重量.

^c すき込みを除く.

2. 木質成分とその利用

木質バイオマスは植物細胞壁の主要成分であるセルロース、ヘミセルロースおよびリグニンから構成される。これらの成分が木質中で占める割合は植物体によって異なるものの、セルロースが 32–52%、ヘミセルロースが 16–33%、そしてリグニンが 9–34%となっている (Table II) (3-5)。地球上で最も豊富に存在する再生可能資源であるセルロースは、D-グルコースが β -1,4 グリコシド結合した直鎖状のホモ多糖であり、木質中では直鎖状高分子同士が水素結合によりセルロースミクロフィブリルを形成し結晶化しているが、一部は非晶状態として存在することが知られている。セルロースは主に紙・パルプ工業や繊維工業での生産原料や食品添加物として利用されている他、セルラーゼなどによる糖化处理を受けた後、バイオエタノール生産の原料として一部利用されている (6-8)。また最近では、木材からセルロース繊維を分離して微細化することで得られるセルロースナノファイバーが新たなバイオ系ナノ素材として注目されている (9)。ヘミセルロースは、セルロースおよびペクチンを除いた多糖類の総称であり、D-キシロース、D-マンノースおよび D-ガラクトースなどが重合した複雑なヘテロ多糖である。ヘミセルロースは植物種、存在部位によって成分に違いが見られ、広葉樹においては 4-O-メチルグルクロノキシランが全ヘミセルロースの約 90%を占め、針葉樹においてはアラビノグルクロノキシランとグルコマンナンがそれぞれ全ヘミセルロース中の約 30%と 60%を占める (10)。木質中でヘミセルロースはセルロースと水素結合によって会合し、リグニンとは化学結合 (エーテル、エステル、グリコシド結合)を形成している。ヘミセルロースは紙・パルプ工業において利用される他に、キシロオリゴ糖やキシリトールに変換

して機能性食品として利用されている。また、ヘミセルロースは糖化处理によってグルコースまたはキシロースなどの単糖への変換が可能であり、これら単糖を原料としたバイオエタノール生産プロセスの開発が進められている (11)。

一方で、リグニンはヒドロキシフェニルプロパン (C6-C3)構造を有するモノリグノールがランダムに重合したヘテロな高分子芳香族化合物である (Fig. I)。リグニンは、複雑で不均一な構造を形成し難分解性を示すため、工業的な有効利用法は開発途上にある。現在は主に紙・パルプ工業やエタノール生産プロセスで熱源として用いられる他、コンクリート減水剤や分散剤などへの利用に限定されている (12, 13)。リグニンはセルロースに次いで豊富に存在する再生可能資源であり、芳香環を有する構造的特徴から工業原料として石油化学の一部を代替する潜在性を秘めている。したがってリグニンを付加価値の高いマテリアルへと変換するなどの有効利用法の確立が望まれる。

Table II. 植物細胞壁の構成成分

植物区分	植物種	各成分の割合 (%)		
		セルロース	ヘミセルロース	リグニン
針葉樹	マツ	46	23	28
針葉樹	スギ	39–48	19–23	33–34
広葉樹	ブナ	44	28	24
広葉樹	ポプラ	42–48	16–22	21–27
広葉樹	ユーカリ	39–46	24–28	29–32
草本	ススキ	45–52	24–33	9–13
草本	スイッチグラス	32–37	26–33	17–18

本表は文献 (3-5)をもとに作成した。

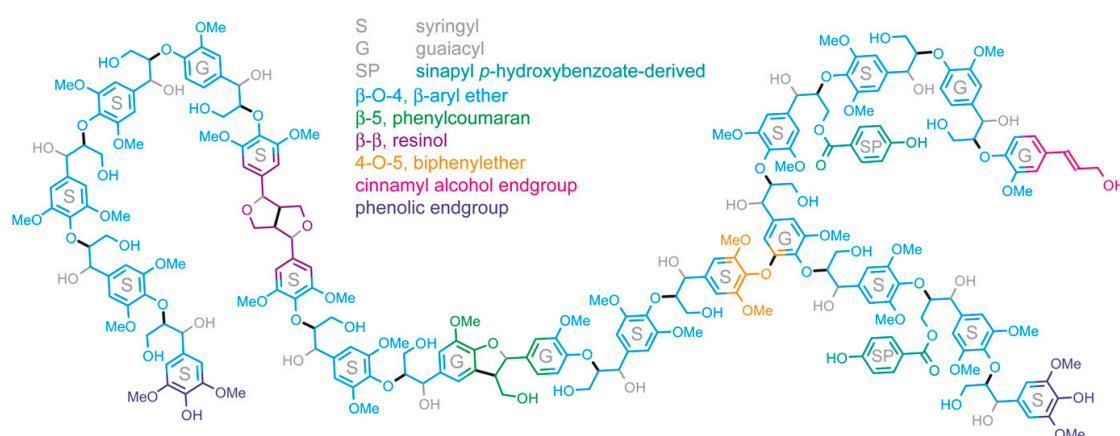


Fig. I. リグニンの推定構造.

本図面は, Vanholme et al., 2010, Lignin biosynthesis and structure (14)から引用した。

3. リグニンの構造と生成

リグニンは、ヒドロキシフェニルプロパン (C6-C3)構造を有する coniferyl alcohol (guaiacyl 型)、sinapyl alcohol (syringyl 型)、および *p*-coumaroyl alcohol (*p*-hydroxyphenyl 型) の3種のモノリグノールを基本骨格としている (Fig. IIA) (15)。植物の種類によりリグニンを構成するモノリグノールは異なっており、針葉樹リグニンは guaiacyl 型と低い割合の *p*-hydroxyphenyl 型、広葉樹リグニンは guaiacyl 型と syringyl 型を基本骨格として有する (Fig. IIA) (14, 15)。草本リグニンは、guaiacyl 型と syringyl 型に加えて、針葉樹リグニンより高い割合で *p*-hydroxyphenyl 型が含まれている (Fig. IIA) (14, 15)。2010 年頃からこれらモノリグノールに加え、ferulate や *p*-coumarate 等の hydroxycinnamate (16, 17)、フラボノイド類の tricin (18)、そしてモノリグノールと ferulate のエステル抱合体等 (19)も部分的にリグニンに取り込まれていることが示されている (Fig. IIB)。

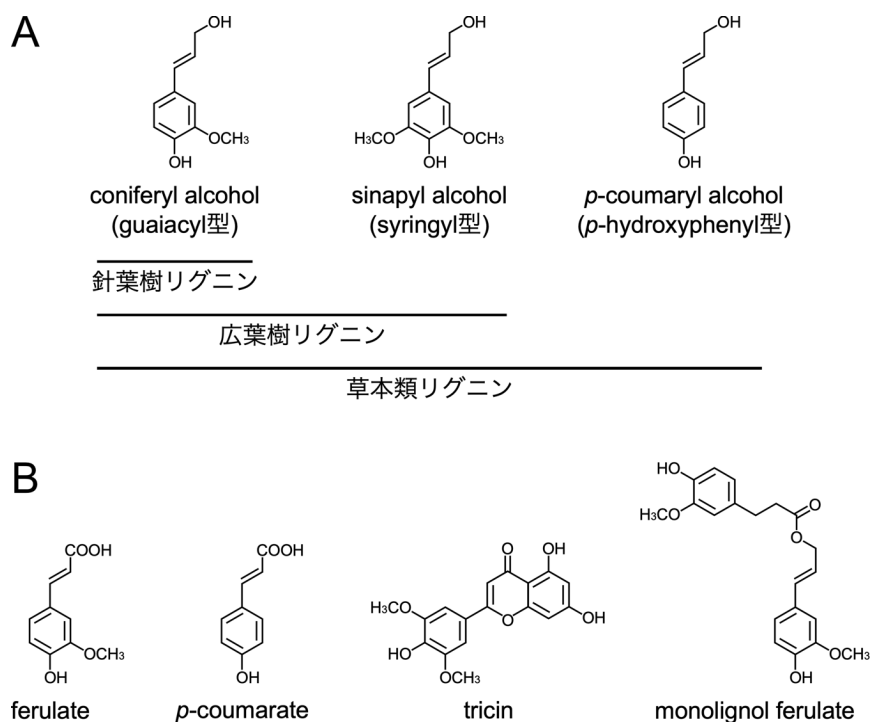


Fig. II. リグニンを構成するモノリグノール類.

(A) モノリグノールの構造. (B) 近年新たに見出されたリグニンの構成単位.

モノリグノールは、細胞質において phenylalanine から経皮酸モノリグノール経路によって合成される (14, 15)。その後、モノリグノールは細胞壁へと輸送され、peroxidase や laccase の作用によって一電子酸化されてフェノキシラジカルとなり、それらがランダムなカップリング反応により β -O-4 (β -aryl ether)、5-5 (biphenyl)、 β -5 (phenylcoumaran)、 β -1 (diarylpropane)、 β - β (pinoresinol)、および 4-O-5 (biphenyl ether)などのさまざまな単位

間結合を生じる (Fig. III) (13)。最終的にこれら結合を介した複雑なネットワークが形成され、多様な構造をとる高分子としてリグニンが生成する (Fig. I)。このようなリグニンの複雑で不均一かつ安定な高次構造は、植物細胞壁の強固さに加え、微生物分解への耐性も与えており、木質バイオマスの工業利用への大きな障壁となっている (20, 21)。

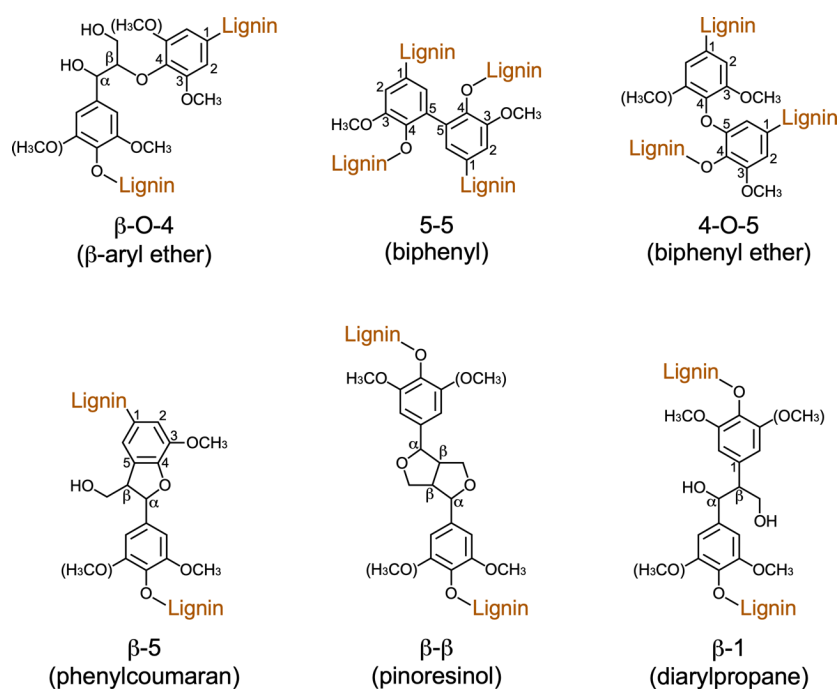


Fig. III. リグニンを構成するさまざまな単位間結合。

4. リグニンの生分解

自然界におけるリグニンの生分解は主に高分子リグニンの低分子化と、それにより生成する多様な低分子芳香族化合物の無機化の 2 つのステップにより進行すると考えられている(22-24)。高分子リグニンの低分子化には、主に白色腐朽菌などの担子菌類が関与する。高分子リグニンの分解に関わる代表的な白色腐朽菌としては *Phanerochaete chrysosporium* や *Ceriporiopsis subvermispora* などが知られており、*P. chrysosporium* がリグニンに加え、セルロースおよびヘミセルロースも分解するのに対して、*C. subvermispora* は、木質中のリグニンを選択的に低分子化することが知られている (25, 26)。これらの白色腐朽菌等が分泌する lignin peroxidase、manganese peroxidase、versatile peroxidase、laccase、および dye-decolorizing peroxidase によりリグニンは一電子酸化を受けて、C-C 結合、C-O-C 結合が開裂し低分子化される(27-29)。Lignin peroxidase は補欠分子族としてヘムを有し、過酸化水素を電子受容体として利用する他、veratryl alcohol をメディエーターとして利用する。本酵素は anisyl alcohol、veratryl alcohol、およびβ-aryl

ether のモデル化合物である 1-(3,4-dimethoxyphenyl)-2-(2-methoxyphenoxy)propane-1,3-diol などの非フェノール性の広い基質に対して高い酸化能を示す。Manganese peroxidase も同様に補欠分子族としてヘムを有し、過酸化水素を電子受容体として利用する。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。本酵素は主にフェノール性基質に対して酸化能を示す。Versatile peroxidase は lignin peroxidase と manganese peroxidase の両方の活性を示す。Laccase は内部に Cu^{2+} を持ち、酸素を電子受容体として利用する。本酵素は主にフェノール性基質を一電子酸化するが、メディエーターの存在下では非フェノール性基質も酸化することができる。Dye-decolorizing peroxidase は補欠分子族としてヘムを有し、電子受容体として過酸化水素を利用するが、他の peroxidase とはアミノ酸配列類似性を示さない。また本酵素は manganese peroxidase と同様に Mn^{2+} を Mn^{3+} に酸化する活性を持ち、主にフェノール性基質に対して酸化能を示す。

Dye-decolorizing peroxidase は、*Rhodococcus* 属や *Pseudomonas* 属、および *Amycolatopsis* 属などのバクテリアにおいて幅広く見つかっている (30-34)。さらに *Streptomyces* 属細菌においては laccase が見出されており (35)、*Pseudomonas stutzeri* の multi copper oxidase である CopA は高分子リグニンの分解活性を示すことが報告されている (36)。これらに加えて、ごく最近、北米の針葉樹林土壤中で ^{13}C 標識リグニンの分解実験とメタゲノム解析が行われ、高分子リグニンがバクテリアによってのみ分解されたことを示唆する結果が得られている (37)。以上のことから、自然界においてバクテリアも高分子リグニンの分解に一部寄与することが示唆されている。一方、バクテリアは低分子化されたリグニン由来の芳香族化合物の無機化に大きく寄与していると考えられている (22-24, 38)。バクテリアは地球上で莫大な存在量をほこるリグニンの最終分解を担うと考えられることから、バクテリアのリグニン由来芳香族化合物の分解経路、それに関わる酵素の機能、遺伝子情報、ならびに転写制御システムを解明することは、地球上の炭素循環を理解する上で極めて重要である (23, 24, 39)。また、バクテリアが有するリグニン由来芳香族化合物の分解酵素群はリグニンからの有価物生産に応用できると期待されている (23, 40, 41)。

5. 微生物の代謝能を利用したリグニン有効利用方法

リグニンは工業的に利用しやすい単一の化合物に変換することが困難であることから、主に紙・パルプ工業においてエネルギー回収のための熱源として利用されてきた。しかし近年では、石油化学を一部代替するような基幹化合物をリグニンから生産することが期待されており、各種のバイオリファイナリー技術を統合したリグニン利用のための戦略が提案されている (42, 43)。リグニンを水素添加による還元処理、アルカリ酸化処理または酸/塩基触媒を用いた化学処理等によって分解することで、さまざまな芳香族化合物が生成する (42)。このため、リグニンの化学処理によって得られた低分子芳香族化合物の混合物をバクテリアが持つ多種多様で特異的に機能する変換酵素系を利用して均一で工業的に利用価値の高い化合物へと集約する方法が注目されている (41, 44)。これは"Biological funneling"と呼ばれ、バクテリアが持つ変換酵素系の多様性に応じて多様な化学物質へと変換できる可能性が示されている。そのため、バクテリアによるリグニン分解に関する研究は世界的に重要度が増してきている。

6. *Sphingobium* sp. SYK-6 株のリグニン由来芳香族化合物代謝系

Sphingobium sp. SYK-6 株は、リグニン由来芳香族化合物の微生物代謝において最も解析が進んでいるバクテリアであり、リグニン由来の biphenyl 型化合物である 5,5'-dehydrodivanillate (DDVA)の資化性細菌として製紙工場の希釈されたパルプ廃液槽から単離された (45)。SYK-6 株は α -proteobacteria に属するグラム陰性好気性細菌であり、 β -aryl ether 型 (β -O-4 結合)、biphenyl 型 (5-5 結合)、phenylcoumaran 型 (β -5 結合)、および diarylpropane 型 (β -1 結合)のリグニン由来芳香族二量体化合物をはじめ、ferulate (FA)、vanillin、vanillate (VA)、syringaldehyde、syringate (SA)などの芳香族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 (Fig. IV) (23, 24)。これまでに、二量体化合物の guaiacylglycerol- β -guaiacyl ether (GGE) (β -aryl ether 型化合物)、DDVA (biphenyl 型化合物)および dehydrodiconiferyl alcohol (DCA) (phenylcoumaran 型化合物)、そして単量体化合物の FA、vanillin、VA、syringaldehyde および SA の代謝に関わる多くの酵素遺伝子が同定され、機能が明らかにされてきた。以下に SYK-6 株におけるリグニン由来芳香族化合物代謝の概要を述べる。

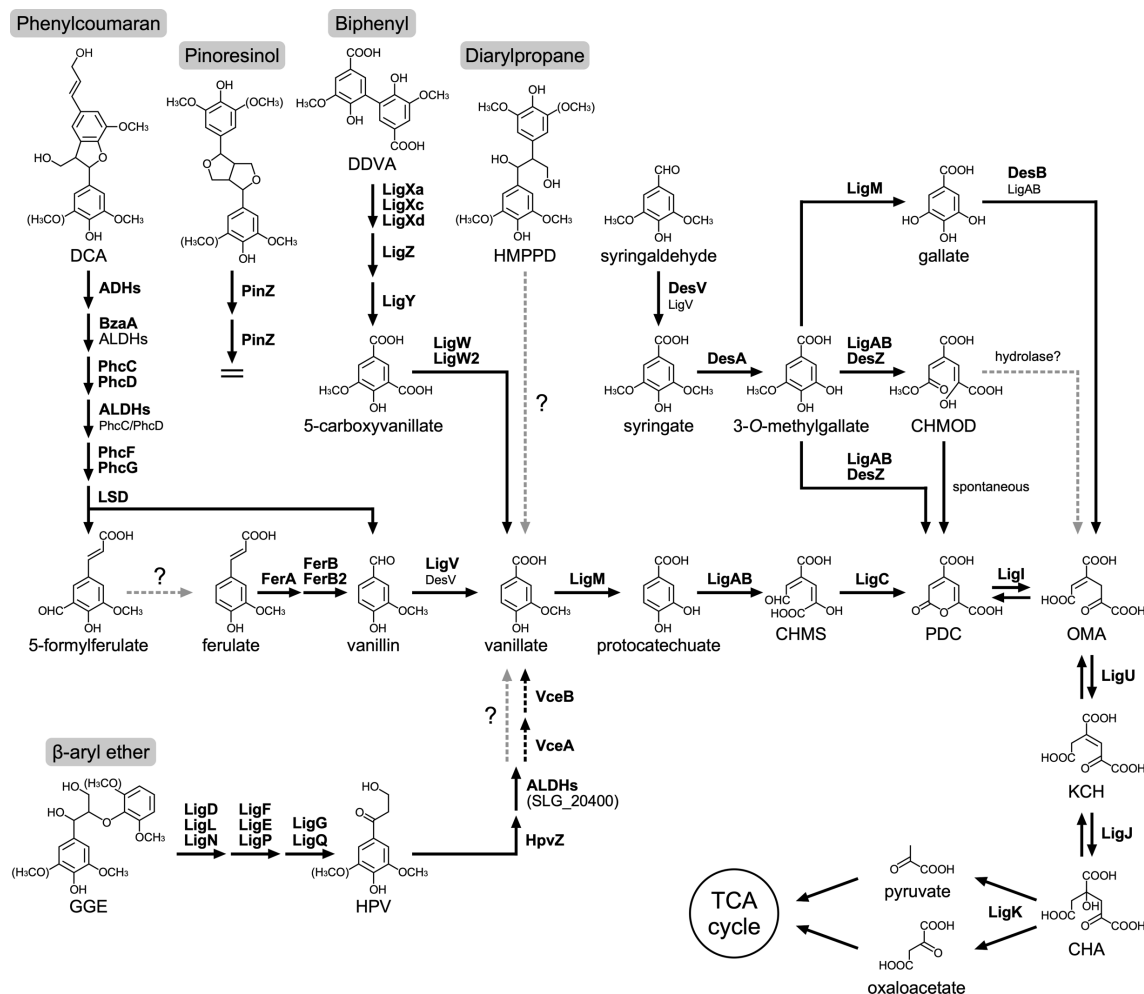


Fig. IV. *Spingobium* sp. SYK-6 株におけるリグニン由来二量体/単量体芳香族化合物の代謝経路. Enzymes: ADHs, alcohol dehydrogenases; ALDHs, aldehyde dehydrogenases; BzaA, benzaldehyde-derivatives dehydrogenase; PhcC and PhcD, 3-(2-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-3-(hydroxymethyl)-7-methoxy-2,3-dihydrobenzofuran-5-yl)acrylate (DCA-C) oxidases; PhcF and PhcG, 5-(2-carboxyvinyl)-2-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-7-methoxy-2,3-dihydrobenzofuran-3-carboxylate (DCA-CC) decarboxylases; LSD, lignostilbene α,β -dioxygenase; PinZ, pinoresinol/lariciresinol reductase; LigXa, DDVA *O*-demethylase oxygenase component; LigXc, DDVA *O*-demethylase ferredoxin component; LigXd, DDVA *O*-demethylase ferredoxin reductase component; LigZ, 2,2',3-trihydroxy-3'-methoxy-5,5'-dicarboxybiphenyl (OH-DDVA) *meta*-cleavage dioxygenase; LigY, OH-DDVA *meta*-cleavage compound hydrolase; LigW and LigW2, 5-carboxyvanillate decarboxylases; LigD, LigL and LigN, C α -dehydrogenases; LigF, LigE and LigP, β -etherases (glutathione *S*-transferases); LigG and LigQ, glutathione removing enzymes (glutathione *S*-transferases); HpvZ, HPV oxidase; VceA, vanilloyl acetic acid (VAA)-converting enzyme; VceB, vanilloyl-CoA thioesterase; FerA, feruloyl-CoA synthetase; FerB and FerB2, feruloyl-CoA hydratases/lyases; LigV, vanillin dehydrogenase; DesV, syringaldehyde dehydrogenase; LigM, vanillate/3-*O*-methylgallate *O*-demethylase; LigA and LigB, small and large subunits, respectively, of protocatechuate 4,5-dioxygenase; LigC, CHMS dehydrogenase; LigI, PDC hydrolase; LigU, OMA delta-isomerase; LigJ, KCH hydratase; LigK, CHA aldolase; DesA, syringate *O*-demethylase; DesZ, 3-*O*-methylgallate 3,4-dioxygenase; DesB, gallate dioxygenase.

Fig. IV. -continued.

Abbreviations: GGE, guaiacylglycerol- β -guaiacyl ether; HPV, β -hydroxypropiovanillone; DCA, dehydrodiconiferyl alcohol; DDVA, 5,5'-dehydrodivanillate; HMPPD, 1,2-bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,3-propanediol; CHMS, 4-carboxy-2-hydroxymuconate-6-semialdehyde; PDC, 2-pyruvate-4,6-dicarboxylate; OMA, 4-oxalomesaconate; KCH, 2-keto-4-carboxy-3-hexenedioate; CHA, 4-carboxy-4-hydroxy-2-oxoadipate; CHMOD, 4-carboxy-2-hydroxy-6-methoxy-6-oxohexa-2,4-dienoate; TCA, tricarboxylic acid.

 β -aryl ether 代謝

β -O-4 結合は、リグニン中の分子間結合の約 50%を占める最も主要な結合様式である。SYK-6 株における β -aryl ether 代謝系は、モデル化合物である guaiacylglycerol- β -guaiacyl ether (GGE)を用いて解析されてきた (Fig. V)。*erythro* と *threo* のジアステレオマーを有する GGE は (46, 47)、LigD、LigL および LigN の 3 つの C α -dehydrogenase によって酸化される (48)。LigD は (α R, β S)-GGE と (α R, β R)-GGE をそれぞれ (β S)- α -(2-methoxyphenoxy)- β -hydroxypropiovanillone (MPHPV)と(β R)-MPHPV に酸化する。LigL と LigN は(α S, β R)-GGE と(α S, β S)-GGE をそれぞれ(β R)-MPHPV と(β S)-MPHPV に酸化する。MPHPV は LigE、LigF および LigP の 3 つの glutathione S-transferase (GST)によって、立体選択的な C β 位の ether 開裂を受けて glutathione (GSH)が付加した α -glutathionyl- β -hydroxypropiovanillone (GS-HPV)と guaiacol を生成する (49-51)。GS-HPV の各立体異性体は、GST である LigG および LigQ による GSH の脱離を受けて β -hydroxypropiovanillone (HPV)へと変換される (49, 52)。HPV は glucose-methanol-choline (GMC) oxidoreductase family に属する HpvZ によって vanilloyl acetaldehyde に酸化された後に、aldehyde dehydrogenase により酸化され vanilloyl acetic acid (VAA)へと変換される (53)。VceA と VceB によって VAA は VA に変換されることが示されているが、VAA の代謝に実際に関与する酵素系はまだ明らかにされていない (54)。また、SYK-6 株において HPV (guaiacyl 型)のアナログ基質である syringyl 型の β -hydroxypropiosyringone (HPS)は、HPV 代謝に関わる一連の酵素群により SA へと変換されることが示されている (53, 54)。

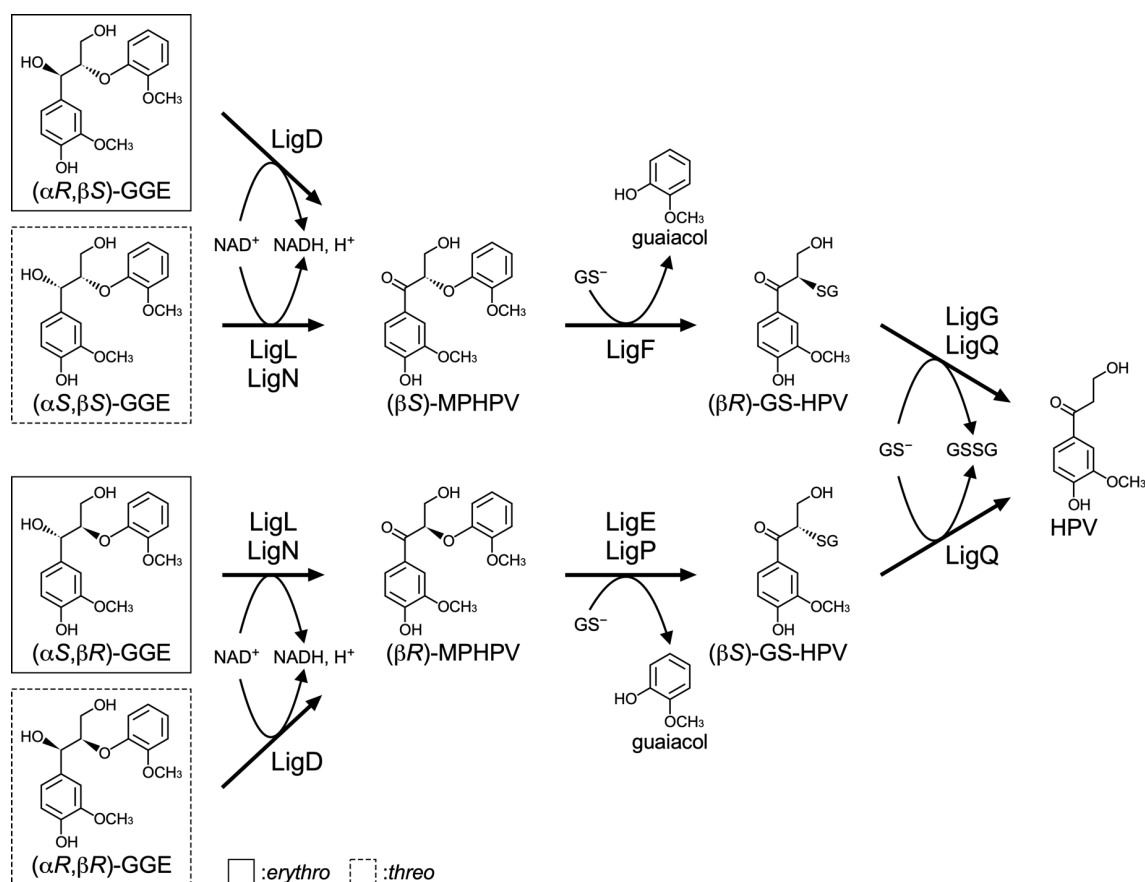


Fig. V. SYK-6 株における GGE 異性体の代謝経路.

Enzymes: LigD, LigL and LigN, α -dehydrogenases; LigF, LigE and LigP, β -etherases (glutathione *S*-transferases); LigG and LigQ, glutathione removing enzymes (glutathione *S*-transferases). Abbreviations: GGE, guaiacylglycerol- β -guaiacyl ether; MPPHV, α -(2-methoxyphenoxy)- β -hydroxypropiovanillone; GS-HPV, α -glutathionyl- β -hydroxypropiovanillone; HPV, β -hydroxypropiovanillone; GS^- , reduced glutathione; GSSG, oxidized glutathione.

Biphenyl 代謝

Biphenyl 型モデル化合物である DDVA は、外膜輸送体である TonB-dependent receptor の DdvT、および内膜輸送体である major facilitator superfamily transporter の DdvK によりプロトン駆動力を利用して細胞内に取り込まれる (55, 56)。細胞内に取り込まれた 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、2,2',3-trihydroxy-3'-methoxy-5,5'-dicarboxybiphenyl (OH-DDVA) に変換される (Fig. VI) (57)。その後、OH-DDVA *meta*-cleavage dioxygenase (LigZ) および hydrolase (LigY) による芳香環開裂と側鎖開裂を受けて 5-carboxyvanillate (5CVA) に変換され (58, 59)、2 つの 5CVA decarboxylase (LigW/LigW2) による脱炭酸を経て VA に変換される (Fig. VI) (60, 61)。

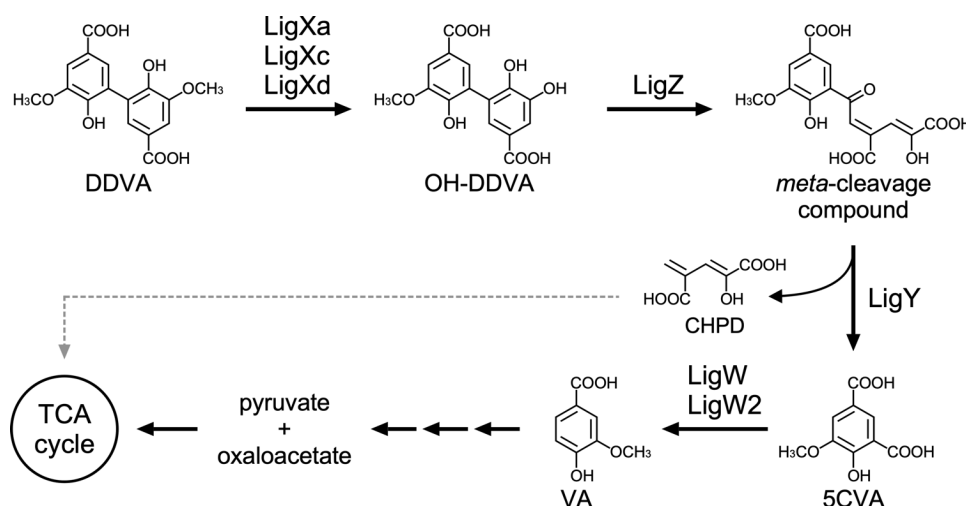


Fig. VI. SYK-6 株における DDVA の代謝経路.

Enzymes: LigXa, DDVA *O*-demethylase oxygenase component; LigXc, DDVA *O*-demethylase ferredoxin component; LigXd, DDVA *O*-demethylase ferredoxin reductase component; LigZ, OH-DDVA *meta*-cleavage dioxygenase; LigY, OH-DDVA *meta*-cleavage compound hydrolase; LigW and LigW2, 5CVA decarboxylases. Abbreviations: DDVA, 5,5'-dehydrodivanillate; OH-DDVA, 2,2',3-trihydroxy-3'-methoxy-5,5'-dicarboxybiphenyl; CHPD, 4-carboxy-2-hydroxypenta-2,4-dienoate; 5CVA, 5-carboxyvanillate; VA, vanillate; TCA, tricarboxylic acid.

Phenylcoumaran 代謝

Phenylcoumaran 型モデル化合物である dehydrodiconiferyl alcohol (DCA)にはエナンチオマーが存在し、複数の alcohol dehydrogenase および aldehyde dehydrogenase によって DCA の B 環側鎖 C γ 位の hydroxy 基が carboxy 基に酸化され、3-(2-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-3-(hydroxymethyl)-7-methoxy-2,3-dihydrobenzofuran-5-yl)acrylate (DCA-C)に変換される (Fig. VII) (62)。その後、DCA-C エナンチオマーは GMC oxidoreductase family に属する PhcC および PhcD によって A 環側鎖 C γ 位の hydroxy 基の酸化を経て 5-(2-carboxyvinyl)-2-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-7-methoxy-2,3-dihydrobenzofuran-3-carboxylate (DCA-CC)に変換される (Fig. VII) (63)。PhcC と PhcD はそれぞれ(+)-DCA-C と(-)-DCA-C を立体選択的に変換することが明らかにされている。DCA-CC エナンチオマーは、decarboxylase に分類される PhcF および PhcG により立体選択的に A 環側鎖 C γ 位の脱炭酸を受けて stilbene 構造を有する 3-(4-hydroxy-3-(4-hydroxy-3-methoxystyryl)-5-methoxyphenyl)acrylate (DCA-S)に変換され (64)、その後 lignostilbene α,β -dioxygenase による側鎖二重結合の開裂を受けて 5-formyl FA と vanillin に変換される (Fig. VII)。

Ferulate 代謝

FA は、feruloyl-CoA synthetase である FerA によって C γ 位に CoA が付加された feruloyl-CoA に変換された後、feruloyl-CoA hydratase/lyase である FerB または FerB2 により acetyl-CoA が脱離し、vanillin へと変換される (Fig. IV) (65)。また、FerAB により sinapinate は syringaldehyde に変換されることが示されている (65)。

Vanillin および syringaldehyde 代謝

Vanillin および syringaldehyde は、aldehyde dehydrogenase によって酸化され、それぞれ VA と SA に変換される (Fig. IV)。Vanillin の変換には LigV が主要に関わり、syringaldehyde の変換には DesV が主に関与することが示されている (66, 67)。

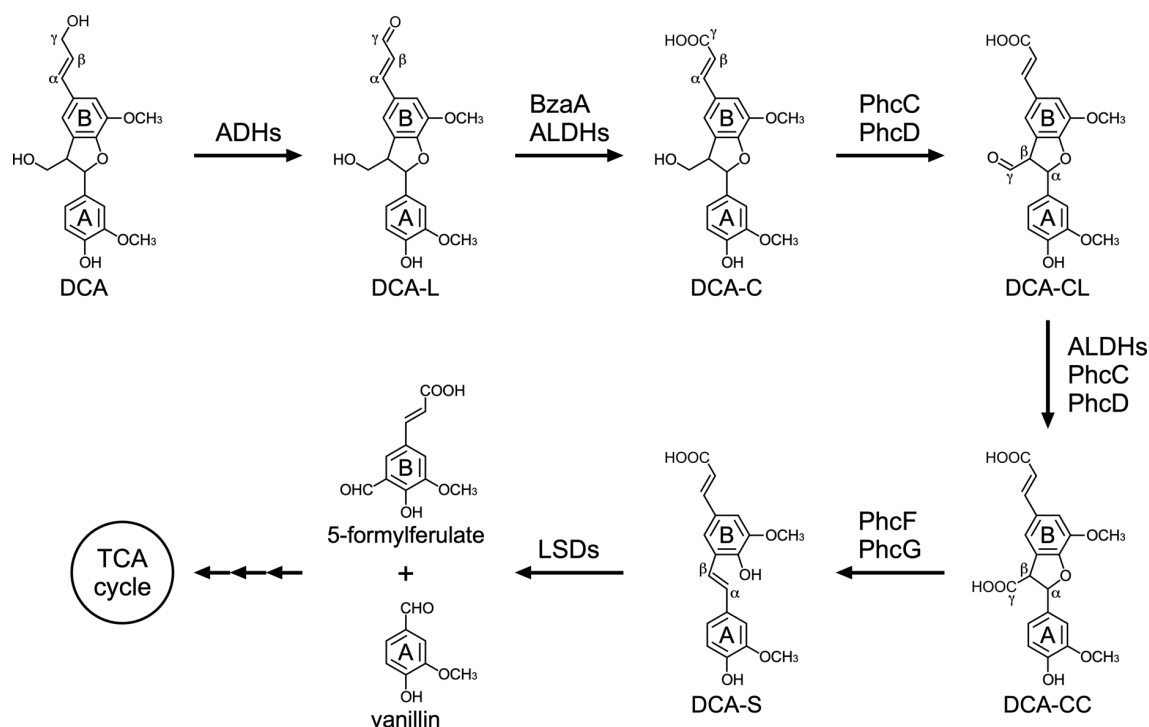


Fig. VII. SYK-6 株における DCA の代謝経路.

Enzymes: ADHs, alcohol dehydrogenases; ALDHs, aldehyde dehydrogenases; BzaA, benzaldehyde-derivatives dehydrogenase; PhcC and PhcD, DCA-C oxidases; PhcF and PhcG, DCA-CC decarboxylases; LSDs, lignostilbene α,β -dioxygenases. Abbreviations: 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)acrylate; 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-carboxylate; DCA-S, 3-(4-hydroxy-3-(4-hydroxy-3-methoxystyryl)-5-methoxyphenyl)acrylic acid; TCA, tricarboxylic acid.

Vanillate および syringate 代謝

VA は、tetrahydrofolate (H₄folate)依存性の VA *O*-demethylase である LigM により脱メチルを受け protocatechuate (PCA)へと変換される (Fig. VIII) (68)。その後、PCA は PCA 4,5-開裂経路により代謝される (Fig. VIII) (69)。

一方、SA は LigM と 49%のアミノ酸配列相同性を示す H₄folate 依存性の SA *O*-demethylase (DesA)により脱メチルを受け 3-*O*-methylgallate (3MGA)へと変換される (Fig. VIII) (70)。生成した 3MGA は、i) LigM による脱メチルと gallate (GA) dioxygenase (DesB) と PCA 4,5-dioxygenase (LigAB)による GA の芳香環開裂により PCA 4,5-開裂経路の中間体である 4-oxalomusaconate (OMA)に変換される経路、ii) 3MGA 3,4-dioxygenase (DesZ)および LigAB によって 4-carboxy-2-hydroxy-6-methoxy-2,4-dienoate (CHMOD)に変換されて OMA へと代謝される経路、iii) LigAB と DesZ によって PCA 4,5-開裂経路の中間体である 2-pyrone-4,6-dicarboxylate (PDC)に変換される経路の 3 つの経路で代謝される (Fig. VIII) (71-73)。遺伝子破壊株の解析から、これら 3 つの経路のうち LigM と DesB が関与する GA 開裂経路が主要な役割を担うことが示されている (71)。

Protocatechuate 代謝

PCA の取り込みシステムについては内膜輸送が明らかになっており、major facilitator superfamily transporter の PcaK によりプロトン駆動力を利用して細胞内に取り込まれることが示されている (74)。取り込まれた PCA は、PCA 4,5-開裂経路によって pyruvate と oxaloacetate へと変換される (Fig. VIII) (23, 69)。PCA 4,5-開裂経路において、PCA は LigAB により芳香環開裂を受け 4-carboxy-2-hydroxymuconate-6-semialdehyde (CHMS)に変換される (75)。CHMS は酵素非依存的に閉環した後、CHMS dehydrogenase (LigC)によって PDC へと酸化され、PDC hydrolase (LigI)によって OMA へと変換される (76, 77)。その後、OMA は OMA delta-isomerase (LigU)により 2-keto-4-carboxy-3-hexenedioate (KCH)へと変換され (78)、KCH hydratase (LigJ)および 4-carboxy-4-hydroxy-2-oxoadipate (CHA) aldolase (LigK)により CHA を経て pyruvate と oxaloacetate に分解され (79, 80)、tricarboxylic acid (TCA)回路に合流し無機化される。

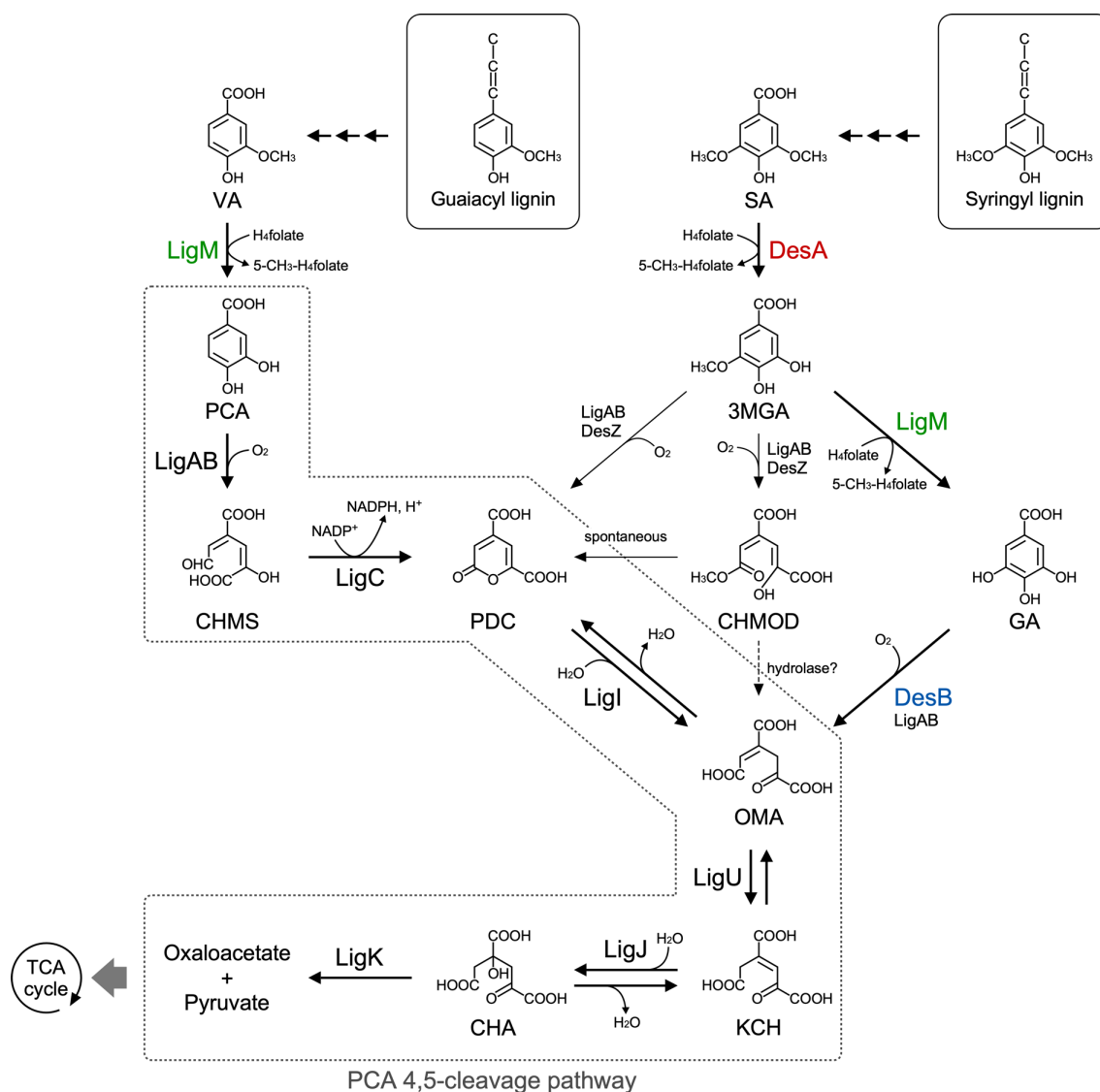


Fig. VIII. SYK-6 株における VA/SA 代謝経路.

Enzymes: LigM, VA/3MGA *O*-demethylase; LigA and LigB, small and large subunits, respectively, of PCA 4,5-dioxygenase; LigC, CHMS dehydrogenase; LigI, PDC hydrolase; LigU, OMA delta-isomerase; LigJ, KCH hydratase; LigK, CHA aldolase; DesA, SA *O*-demethylase; DesZ, 3MGA 3,4-dioxygenase; DesB, GA dioxygenase. Abbreviations: VA, vanillate; PCA, protocatechuate; CHMS, 4-carboxy-2-hydroxymuconate-6-semialdehyde; PDC, 2-pyrone-4,6-dicarboxylate; OMA, 4-oxalomesaconate; KCH, 2-keto-4-carboxy-3-hexenedioate; CHA, 4-carboxy-4-hydroxy-2-oxoadipate; SA, syringate; 3MGA, 3-*O*-methylgallate; CHMOD, 4-carboxy-2-hydroxy-6-methoxy-6-oxohexa-2,4-dienoate; GA, gallate; H₄folate, tetrahydrofolate; 5-CH₃-H₄folate, 5-methyl-tetrahydrofolate; TCA, tricarboxylic acid.

以上のように、SYK-6 株は guaiacyl 型および syringyl 型構造を有するさまざまなリグニン由来芳香族化合物をそれぞれ VA と SA に集約して代謝する (Fig. VIII)。SYK-6 株の他にも、真菌である *Paecilomyces variotii* において sinapinate は SA を、グラム陽性細菌である *Microbacterium* sp. RG1 株および *Streptomyces* sp. NL15-2K 株において syringaldehyde と vanillin はそれぞれ SA と VA を、グラム陰性細菌である *Pseudomonas putida* KT2440 株において FA は VA を、そして *Novosphingobium aromaticivorans* DSM 12444 株において sinapinate と FA はそれぞれ SA と VA を経由して代謝されることが報告されている (81-85)。したがって、VA と SA はリグニンの微生物分解で生じる主要な代謝中間体に位置づけられる。

7. バクテリアにおける vanillate と syringate の代謝

リグニン由来芳香族化合物に特有な methoxy 基を持つ VA および SA は、脱メチルを受けた後に芳香環開裂経路で代謝される。リグニン由来芳香族化合物の脱メチルは、methoxy 基を hydroxy 基へと変換し、種々の芳香環開裂 dioxygenase の基質となる diol 構造へと導くリグニン生分解の必須反応である。

Vanillate 代謝

バクテリアの VA 脱メチルシステムは oxygenase 型と tetrahydrofolate (H₄folate)依存型の 2 つのタイプが知られている。Oxygenase 型の VA 脱メチルシステムは、*Pseudomonas* 属細菌等で見出された VA O-demethylase (VanAB) が広く知られている。VanAB は oxygenase (VanA) と reductase (VanB) の二成分から構成され、class IA oxygenase に属する。本システムは NADH を補酵素として要求し、VanB が NADH からの電子を VanA に伝達し、VanA は受け取った電子によって分子内に取り込んだ酸素分子を活性化し VA を PCA へと変換する (Fig. IXA)。好気性細菌である *Pseudomonas* 属細菌 (86, 87)、*Acinetobacter baylyi* ADP1 株 (88) および *Caulobacter crescentus* (89, 90) などのグラム陰性細菌、そして *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 (91)、*Rhodococcus jostii* RHA1 株 (92) および *Streptomyces* sp. NL15-2K 株 (93, 94) などのグラム陽性細菌は、VanAB により VA を PCA へと変換し、PCA は PCA 3,4-開裂経路で代謝される。

H₄folate 依存型の VA 脱メチルシステムは、嫌気性細菌である *Acetobacterium dehalogenans* (95-98)、*Acetobacterium woodii* (99)、*Desulfotobacterium hafniense* (100) および *Moorella thermoacetica* (formerly *Clostridium thermoaceticum*) (101, 102) において報告された。これらのうち、*M. thermoacetica* を除く全ての細菌の VA 脱メチルシステムは、2 種類の methyltransferase (MT I および MT II)、corrinoid protein (CP) および activation protein (AE) の 4 つの異なるタンパク質によって構成されている (Fig. IXB)。本システムでは、

MTI と MTII により VA の methoxy 基の methyl 部分が CP を経由して H₄folate に転移され、PCA と 5-methyl-H₄folate が生成する (Fig. IXB)。また AE は、誤って酸化された corrinoid を ATP 依存的に還元すると考えられている。一方、*M. thermoacetica* は、AE が関与しない MTI、MTII および CP による VA 脱メチルシステムを有する。*M. thermoacetica* において、VA の脱メチルで生成する 5-methyl-H₄folate は、炭酸固定に働く Wood-Ljungdahl 経路 (Acetyl-CoA 経路) の methyl 基供与体として機能する (101, 102)。一般に、嫌気性条件下で PCA は carboxy 基に CoA が付加された後に 3-hydroxybenzoyl-CoA を経てβ酸化により代謝されると考えられている(103, 104)。しかし、上述した VA 脱メチル活性を有する嫌気性細菌の PCA 代謝については報告例がなく、これらのバクテリアにおいて PCA がどのような経路で代謝されるかは不明である。

一方で、好気性の SYK-6 株は、VA の methoxy 基の methyl 部分を H₄folate に直接転移させる H₄folate 依存性の VA O-demethylase (LigM) により VA を PCA へと変換する (Fig. VIII) (68)。最近、LigM の X 線結晶構造解析が実施され、その立体構造が明らかとなった (105, 106)。本解析により、Tyr247 が LigM の活性に必須であることが示され、Tyr247 の hydroxy proton と VA の methoxy 基の酸素の孤立電子対との相互作用が methyl 部分の H₄folate への転移を促進することが示唆されている (105)。VA の脱メチル反応によって生成した PCA は、LigAB が関与する PCA 4,5-開裂経路によって代謝される (Fig. VIII) (23, 69)。また、SYK-6 株と系統的に近縁な *Novosphingobium aromaticivorans* DSM 12444 株 (107, 108) において、VA は SYK-6 株と同様の経路で代謝されることが示された (81, 109)。

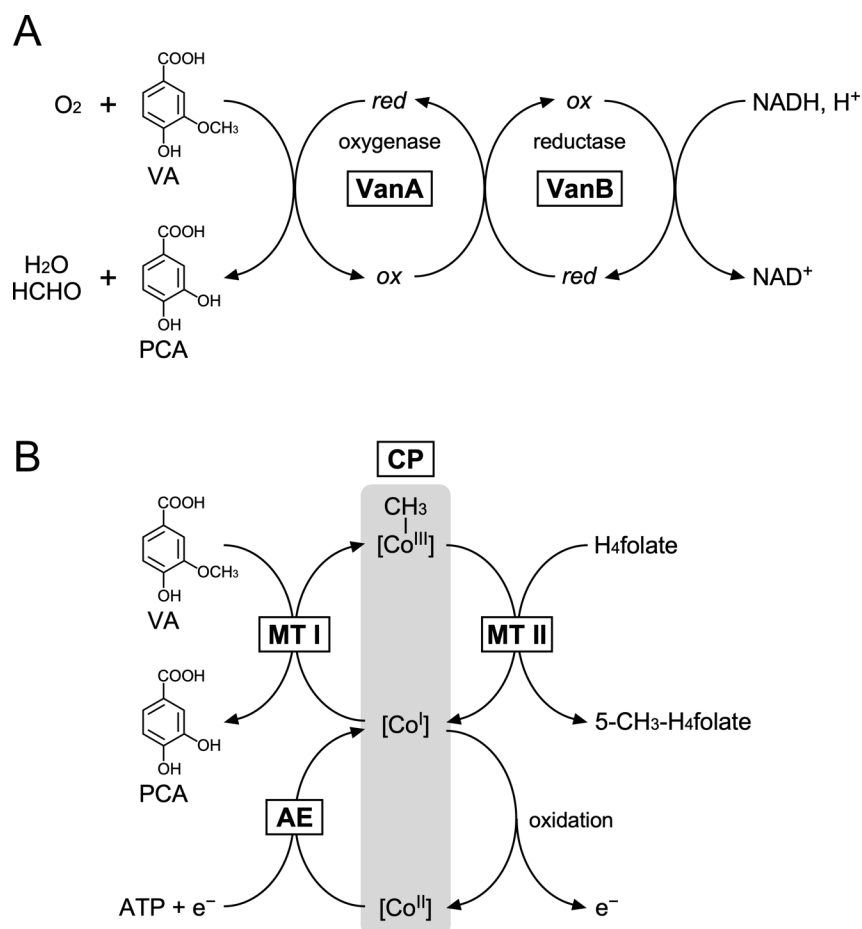


Fig. IX. 報告されている VA の脱メチル反応.

(A) 好気性細菌における酸素添加型脱メチル反応. (B) 嫌気性細菌における H₄folate 依存型の脱メチル反応. Enzymes: VanA, VA O-demethylase oxygenase subunit; VanB, VA O-demethylase reductase subunit; MT I, methyltransferase I; MT II, methyltransferase II; CP, corrinoid protein with cobalt (Co) in the respective oxidation state; AE, activating enzyme. Abbreviations: VA, vanillate; PCA, protocatechuate; H₄folate, tetrahydrofolate; 5-CH₃-H₄folate, 5-methyl-tetrahydrofolate.

Syringate 代謝

バクテリアにおける SA 代謝系の解析例は VA 代謝系と比較して極めて少なく、SYK-6 株を除いてその詳細はほとんど明らかとなっていない。1970–80 年代に Dagley らにより *Pseudomonas* 属細菌を中心に SA 代謝経路の解析が行われ、概要を把握する知見が得られたが (110-114)、現在までにその酵素学的・遺伝学的な解析はほとんど行われていない。SA を資化できない *P. putida* KT2440 株において、SA 代謝中間体である GA の分解に関わる *gal* 遺伝子群の機能が明らかにされたが (115, 116)、SA 分解性 *Pseudomonas* 属細菌の SA 代謝の全容は依然として不明である。

2000 年代に入り当研究室で SYK-6 株の SA 代謝系について酵素学的・遺伝学的な解析が行われ、SA が複数の芳香環開裂経路を経由して PCA 4,5-開裂経路に合流して代謝

されることが示され、これらの経路に関わる酵素遺伝子とそれらの機能が明らかにされた (70-73)。前述のとおり、SYK-6 株において SA は、LigM と相同性を示す H₄folate 依存性の SA O-demethylase (DesA)により脱メチルを受け 3MGA へと変換される (Fig. VIII)。生成した 3MGA は 3 つの経路に分岐して代謝され (Fig. VIII)、その中でも LigM と DesB が関与する GA 開裂経路が主要な役割を担うことが示されている (71)。最近、*N. aromaticivorans* DSM 12444 株の SA 代謝に関わる酵素遺伝子が調査され、本株は SYK-6 株の有する SA 代謝経路の 2 つと類似する経路を持つことが報告された (81, 109)。DSM 12444 株において SA は、DesA による脱メチルを受けて 3MGA へと変換される。生成した 3MGA は LigAB/LigAB2 による環開裂を受けて CHMOD に変換された後、methylesterase (DesC)および *cis-trans* isomerase (DesD)により OMA へと変換され PCA 4,5-開裂経路に流入すると推定されている(81, 109)。また、DSM 12444 株のゲノム上に DesB および DesZ のホモログは存在しないが、3MGA は LigM および DmtS による脱メチルと LigAB/LigAB2 による芳香環開裂により GA を経由して OMA へと変換されることも示されている (109)。DSM 12444 株の SA 代謝において、GA を経由する経路は代謝フラックスの約 15%を占めると示唆されており、CHMOD を経由する経路が主要な役割を担うと考えられている (81, 109)。

近年、環境中から SA 分解菌として、*Oceanimonas doudoroffii* (117)、*Microbacterium* sp. RG1 株 (85)、*Pandoraea norimbergensis* LD001 株 (118)、*Pseudomonas* sp. NGC7 株 (119) および *Serratia* sp. JHT01 株と *Serratia liquefacien* PT01 株 (120)が単離されている。また Oshlag らは、SA を唯一の炭素源として利用できない *Rhodopseudomonas palustris* CGA009 株 (121, 122)に対し、SA 含有培地を用いて光照射嫌気性条件下で継代培養することで SA 代謝能を獲得させた *R. palustris* SA008.1.07 株を単離している (123)。これらのバクテリアのうち、*Microbacterium* sp. RG1 株において SA 代謝に関わる酵素遺伝子群が推定されている (85)。RG1 株において SA は、SYK-6 株および DSM 12444 株と同様に DesA による脱メチル受け 3MGA へと変換された後、GA または PDC を経由して PCA 4,5-開裂経路に合流し代謝されることが考えられている (85)。

8. SYK-6 株における vanillate/syringate 代謝と C₁ 代謝

SYK-6 株による VA、SA および 3MGA の脱メチルにおいて、各基質の methoxy 基に由来する methyl 部分は H₄folate に転移し 5-methyl-H₄folate が生成する (68, 70)。5-methyl-H₄folate は生物に共通して保存されている C₁ 代謝を経て、必須アミノ酸である methionine や、thymidine および purine といった核酸類、N-formyl-methionyl tRNA の生合成系に接続することが知られている (124)。

5-methyl-H₄folate を入り口とする C₁ 代謝はほとんど知られておらず、SYK-6 株や同様の脱メチルシステムを持つバクテリアの他には、chloromethane 資化性細菌である *Methylobacterium extorquens* CM4 株 (125-128) において 5-methyl-H₄folate を出発とする C₁ 代謝が報告されている (125, 127)。CM4 株における chloromethane のメチル基転移は、corrinoid 結合型の methyltransferase I (CmuA) と methyltransferase II (CmuB) によって進行する (Fig. XA)。chloromethane の methyl 部分は初めに CmuA によって corrinoid である cobalamin に転移し、その後 CmuB によって H₄folate に転移して 5-methyl-H₄folate が生成する (125, 126)。生成した 5-methyl-H₄folate は 5,10-methylene-H₄folate reductase (MetF)、5,10-methylene-H₄folate dehydrogenase/5,10-methylene-H₄folate cyclohydrolase (FolD) および 10-formyl-H₄folate hydrolase (PurU) が担う C₁ 代謝経路によって formic acid と H₄folate へ変換される (Fig. XA)。これら酵素遺伝子は全て CM4 株の持つプラスミド pCMU01 上にコードされており、*purU-folD* と *metF-cmuB* はそれぞれオペロンを形成し、*cmuA* は *purU-folD* オペロン上流に逆向きの転写方向で存在する (Fig. XB) (129)。また、chloromethane 生育中でこれら遺伝子の転写が誘導されることが明らかとなっている (129, 130)。

SYK-6 株において、*ligM* の直下流には 5-methyl-H₄folate を介した C₁ 代謝に関与すると考えられる *metF* および 10-formyl-H₄folate synthetase をコードする *ligH* が存在し、*ligM-metF-ligH* はオペロンを形成することが明らかとなっている (Fig. XV) (23, 131)。したがって SYK-6 株は、CM4 株と類似した 5-methyl-H₄folate を介した C₁ 代謝系を持つことが示唆されている (Fig. XI) (68, 70)。SYK-6 株は VA の脱メチル産物である PCA を唯一の炭素源として生育させた場合に methionine 要求性を示すことから、本株における VA、SA および 3MGA の脱メチルが methionine 生合成に必須であると考えられている (Fig. XI) (68, 70)。実際に、methoxy 基を ¹³C 標識した vanillin を用いた SYK-6 株の代謝フラックス解析が行われ、methionine の生成が VA の脱メチルに強く依存することが示された (132)。さらに、C₁ 代謝を介して生成する serine および histidine も、生成量の約 5 割が VA の脱メチルに依存することが示された (132)。以上のように、SYK-6 株のリグニン由来芳香族化合物代謝において脱メチルは、VA および SA の変換ステップとし

て重要なだけでなく、 C_1 代謝を介した生命活動に必要な各化合物を供給するという意義も持ち合わせている。

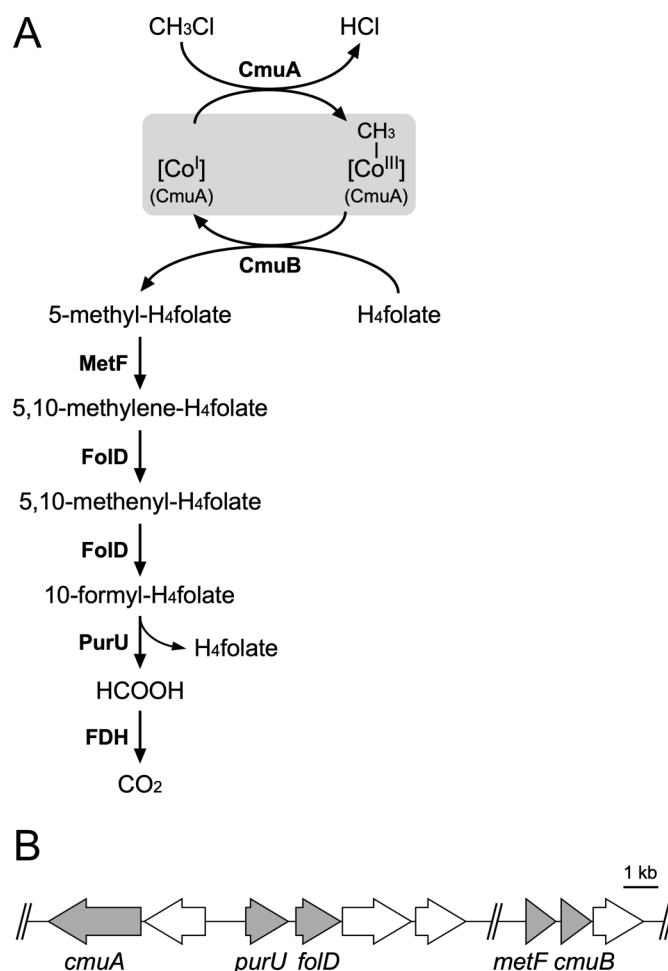


Fig. X. *Methylobacterium extorquens* CM4 株の C_1 代謝経路.

本図面は、文献 (127, 129, 130) をもとに作製した. (A) CM4 株の推定の C_1 代謝経路. Enzymes: CmuA, chloromethane-corrinoid methyltransferase; CmuB, methyl-cobalamin- H_4 folate methyltransferase; MetF, 5,10-methylene- H_4 folate reductase; FoID, 5,10-methylene- H_4 folate dehydrogenase/5,10-methylene- H_4 folate cyclohydrolase; PurU, 10-formyl- H_4 folate hydrolase; FDH, formate dehydrogenases; MxaF, methanol dehydrogenase alpha subunit; Fae, formaldehyde activating enzyme; MtdA, NAD(P)-dependent 5,10-methylene- H_4 folate/ H_4 MPT dehydrogenase; MtdB, NAD(P)-dependent methylene- H_4 MPT dehydrogenase; Mch, 5,10-methenyl- H_4 MPT cyclohydrolase; FhcABCD, formyltransferase-hydrolase complex; Fch, 5,10-methenyl- H_4 folate cyclohydrolase; FtfL, 10-formate- H_4 folate ligase. Abbreviations: H_4 folate, tetrahydrofolate; H_4 MPT, tetrahydromethanopterin. (B) CM4 株の pCMU01 上の遺伝子座.

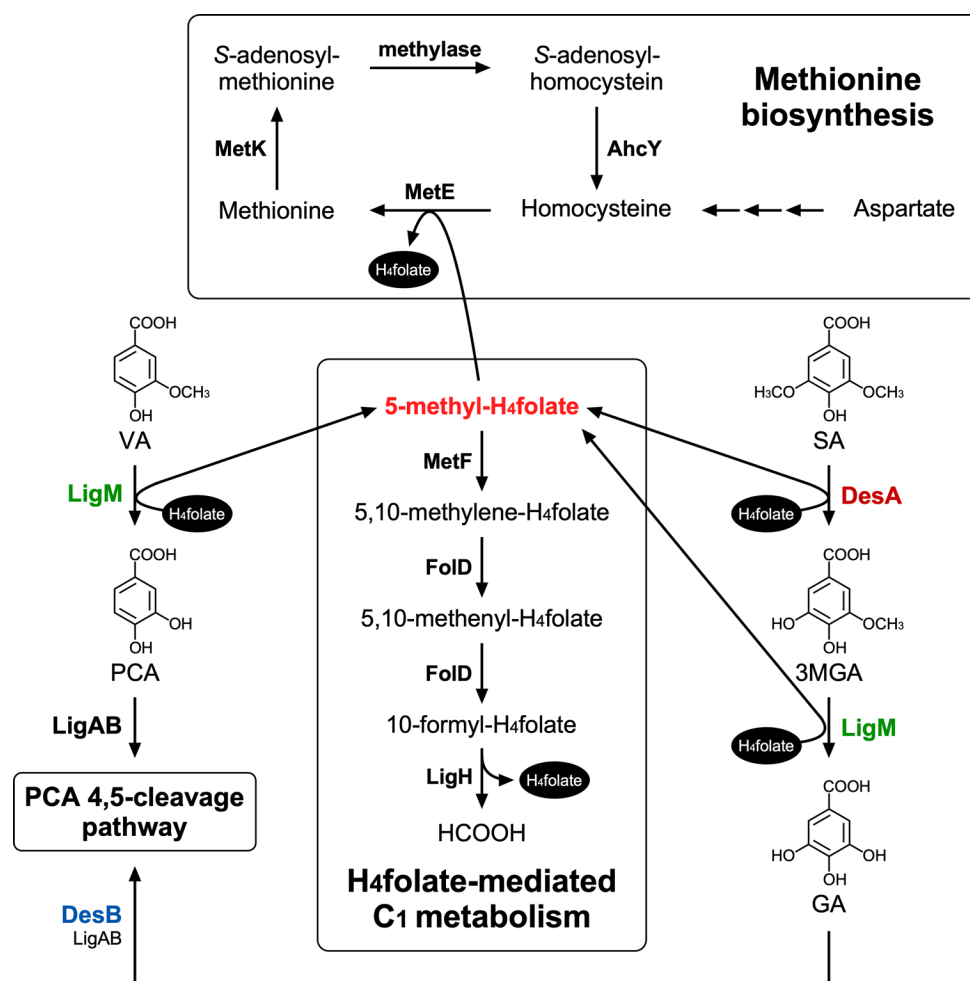


Fig. XI. SYK-6 株の C1 代謝経路および推定の methionine 生合成経路.

Enzymes: MetE (SLG_27170), methionine γ -lyase; MetK (SLG_33270), S-adenosylhomocysteine hydrolase; AhcY (SLG_23600), S-adenosylhomocysteine hydrolase; MetF, 5,10-methylene-H₄folate reductase; FoID, 5,10-methylene-H₄folate dehydrogenase/5,10-methylene-H₄folate cyclohydrolase; LigH, 10-formyl-H₄folate synthetase; LigM, VA/3MGA O-demethylase; LigAB, PCA 4,5-dioxygenase; DesA, SA O-demethylase; DesB, GA dioxygenase. Abbreviations: VA, vanillate; PCA, protocatechuate; SA, syringate; 3MGA, 3-O-methylgallate; GA, gallate; H₄folate, tetrahydrofolate. methionine 生合成経路の各酵素をコードすると推定された遺伝子について locus_tag を示す.

9. リグニン由来芳香族化合物からのポリマー原料生産

SYK-6 株のリグニン由来芳香族化合物代謝の下流経路である PCA 4,5-開裂経路の中間代謝物として生成する PDC は (Fig. IV)、高機能性ポリマーの原料化合物として有用であることが示されている (133)。PDC は pyrone 環に 2 つの carboxy 基を持つ擬芳香環様構造を持ち、これまでに PDC を骨格としたポリエステル、ポリアミド、およびポリウレタンなどが開発されている (134-138)。PDC を bis(β -hydroxyethyl)terephthalate (BHT) との重縮合によって合成した PDC-BHT コポリエステルは、約 260°C の高い熱安定性を有し、工業的に広く利用されているアルミニウム、真鍮、銅、鉄、ステンレス、およびガラスを極めて強力に接着する性質 (30–60 MPa の引張り強度)を示す (134, 135)。また、PDC を骨格とするエポキシ接着剤が開発されている (138)。PDC に 2 つのグリシジル基を付加したジグリシジル PDC、硬化剤である無水有機酸、そして硬化促進剤であるベンジルメチルアミンを混合して固化させたエポキシ接着剤は、ステンレスに対して約 90 MPa、鉄同士の接着では 115 MPa という高い接着強度を示す。

PDC はバクテリアの代謝中間体であることから、PDC をベースとしたポリマーには生分解性が期待される。一方で、PDC は化学合成することが困難とされており、有機化学的な大量合成は見込めない。そのため、これまでに SYK-6 株をはじめとするバクテリアのリグニン由来芳香族化合物の代謝酵素遺伝子を利用した PDC 生産系が報告されている。SYK-6 株の *ligABC* を導入した *Pseudomonas putida* PpY1100 株による PCA からの PDC 生産系が構築され、85%以上の収率で 15 g/L 以上の PDC が得られることが報告されている (40)。この生産系を発展させ、*ligABC* に加えて PpY1100 株の *vanAB* (VA O-demethylase 遺伝子)と SYK-6 株の *ligV* (vanillin dehydrogenase 遺伝子)、*ferA* (feruloyl-CoA synthetase 遺伝子)、*ferB* (feruloyl-CoA hydratase/lyase 遺伝子)、および *desZ* を導入した *P. putida* PpY1100 株が作製され、kraft lignin、Japanese cedar、または birch のアルカリニトロベンゼン酸化で得られた vanillin、syringaldehyde、および VA 等を含む抽出物からの PDC 生産も行われている (139)。本生産系では、140 $\mu\text{g/ml}$ の kraft lignin 抽出物から 53 $\mu\text{g/ml}$ 、1140 $\mu\text{g/ml}$ の Japanese cedar 抽出物から 655 $\mu\text{g/ml}$ 、1150 $\mu\text{g/ml}$ の birch 抽出物から 483 $\mu\text{g/ml}$ の PDC をそれぞれ生産している (139)。また、*ligABC*、*vanAB* および *ligV* を導入した PpY1100 株を用いた生産系では、VA から 100 g/L 以上の PDC 生産が可能であることが示されている (140)。

最近、Perez らにより *N. aromaticivorans* DSM 12444 株のリグニン由来芳香族化合物代謝系を利用した PDC 生産が行われた (141)。Perez らは、PDC を蓄積する DSM 12444 株の遺伝子破壊株である ΔligI 株および $\Delta\text{ligI}\Delta\text{desCD}$ 株を作製し、FA、VA、および SA などの複数のリグニン由来芳香族化合物 (各 3 mM)から PDC を高収率 (66–100%)で生産した。さらに、Rahimi らの方法 (142, 143)に従い 4-acetoamide-TEMPO/HNO₃/HCl 触媒シス

テムによって poplar lignin の C α 位を酸化し、その後のギ酸/ギ酸ナトリウムを用いた ether 結合開裂反応によって得られたリグニン由来芳香族化合物の抽出物 (1 mM guaiacyl-diketone、0.35 mM syringyl-diketone、0.37 mM SA、0.12 mM syringaldehyde、0.44 mM VA、0.1 mM vanillin、および 0.93 mM *p*-hydroxybenzoate の混合物)を原料とした場合にも、59%の収率で PDC を生産することに成功している。また Johnson らは、*P. putida* KT2440 株の *pcaHG* (PCA 3,4-dioxygenase 遺伝子)を破壊し *ligABC* を新たに導入した組換え体を用いて 4-hydroxybenzoate から 58.0 g/L の PDC (収率 80.7%)を生産している (144)。

PDC 以外にも、*Pseudomonas putida* 等を基盤とした *p*-coumarate、*p*-hydroxybenzoate、および VA からの *cis,cis*-muconate (ccMA) (145-147)や polyhydroxyalkanoate (PHA)生産系 (44)の開発が盛んに進められている。ccMA は、多様なポリマー原料化合物に化学変換が可能な基幹化合物であり、バイオ生産した ccMA から adipate および hexamethylene diamine を化学変換により調製し凡用合成繊維である nylon 6,6 を合成できることが実証されている (148, 149)。PHA は広範な微生物によって産生される天然のポリエステルであり、酵素的に完全分解される特性から生分解性プラスチックとしての利用が推進されている。当研究室においても、利用価値の高い糖や有機酸などを炭素源として使用せず、リグニン由来芳香族化合物のみを利用して生育しながら ccMA を生産する *Pseudomonas* 属細菌が作出されている (119)。また、*Pseudomonas* 属細菌以外にも、グラム陽性細菌の *Amycolatopsis* sp. ATCC 39116 株を用いた guaiacol 等からの ccMA 生産、および *C. glutamicum* ATCC 13032 株を用いた pine のリグニン加水分解物からの ccMA 生産が報告されている (150, 151)。

有価物生産菌の育種は代謝酵素遺伝子の破壊や導入が主流であったが、近年、転写制御因子の破壊による物質生産能の改良が報告されている (152, 153)。KT2440 株のリグニン由来芳香族化合物代謝酵素遺伝子の一部は、グローバルレギュレーターである Crc (catabolite repression control)によって制御されており、*crc* 遺伝子を破壊することで *p*-coumarate および FA からの ccMA 生産能が向上することが示された (153)。また、Bentley らは、KT2440 株の解糖系に関与する酵素遺伝子群を負に制御する HexR を破壊することで、glucose からの ccMA 生産速度が向上することを報告した (152)。

このように、代謝系に本来備わる制御システムを人工的に調節することで有価物生産の効率を向上させることが可能であることから、バクテリアの代謝を利用したリグニン由来芳香族化合物からの高効率な有価物生産系を開発するにあたり、分解に関わる酵素遺伝子を同定・解明するだけでなく、それら遺伝子の転写制御システムを明らかにすることが望ましい。

10. バクテリアにおけるリグニン由来芳香族化合物代謝の制御

自然界においてバクテリアは、温度、栄養環境、毒性物質の存在といったさまざまなパラメーターが変遷する環境下で生存するため、それらの変化に柔軟かつ迅速に対応する機構を獲得してきた。その機構の一つに、特定因子に応答して必要な遺伝子の転写量をコントロールする転写制御システムが存在する。一般的に、転写制御因子は DNA に直接結合し、RNA ポリメラーゼ (RNAP) のプロモーター領域への親和性をコントロールすることで目的遺伝子の転写調節を行っている。バクテリアの芳香族代謝系遺伝子(群)の転写は、センサーとして機能する histidine kinase とレギュレーターとして機能する response regulator の二成分で構成される two-component regulatory systems、または effector-specific regulator のみで構成される one-component regulatory systems によって制御を受けることが知られている (154-156)。

Two-component regulatory systems は、細胞内膜局在性の histidine kinase と細胞質に局在する response regulator 間のリン酸リレーを介して機能する。はじめに、ペリプラズムに露出した histidine kinase のセンサードメインが芳香族化合物等をシグナルとして感知することで ATP 依存的に中央ドメインの His 残基を自己リン酸化する。その後、His 残基のリン酸基が response regulator の N 末端に保存された Asp 残基に転移することで DNA への親和性が変化し、転写調節が行われる。芳香族代謝を制御する two-component regulatory systems として、これまでに *P. putida* F1 株および *P. putida* DOT-T1 株の好氣的 toluene 代謝に関与する *todXFC1C2BADEGIH* の制御を担う TodS/TodT (157, 158)、*Thauera aromatica* の嫌氣的 toluene 代謝を制御する TdiS/TdiR および TutC/TutB (159, 160)、*Rhodococcus* sp. M5 株の biphenyl/polychlorobiphenyl 代謝を制御する BpdS/BpdT (161)、*Pseudomonas* 属細菌の styrene 代謝系遺伝子群である *styABCD* を制御する StyS/StyR (162-165)、*Rhodococcus jostii* RHA1 株の biphenyl/polychlorinated biphenyl 代謝を制御する BphS1/BphT1 および BphS2/BphT2 (166, 167)等が報告されている。しかし、リグニン由来芳香族化合物の代謝制御に two-component regulatory systems が関与する例は報告されていない。

One-component regulatory systems を構成する effector-specific regulator は、細胞質に局在し、同一分子内に入力ドメインであるリガンド結合モチーフと出力ドメインである DNA 結合モチーフを有する (155)。effector-specific regulator の DNA 結合モチーフは、helix-turn-helix (HTH)モチーフが最も一般的であることが報告されている (168)。effector-specific regulator は、エフェクター分子として芳香族化合物などの小分子や金属イオンを認識し結合することでその構造に変化が生じる。構造の変化は DNA 結合モチーフにも影響するため、DNA への親和性が変化し転写調節が行われる。effector-specific regulator は、出力ドメインである DNA 結合モチーフの配列と構造に基づいて複数の異

なるファミリーに分類される (155, 156)。One-component regulatory systems は、バクテリアの toluene、phenol および catechol などの多様な芳香族化合物の代謝制御を担うことが報告されている (155)。

現在までに、リグニン由来芳香族化合物である DDVA、FA を含む *p*-hydroxycinnamates、VA、PCA および *p*-hydroxybenzoate の分解に関わる酵素遺伝子 (群) の転写制御システムが明らかにされている (Table III)。これらの転写制御システムに関与する転写制御因子は、MarR 型、IclR 型、GntR 型、PadR 型または LysR 型転写制御因子に属し、すべて one-component regulatory systems に分類される (Table III) (155)。以下に各転写制御因子群の特徴を概説する。また、SYK-6 株で明らかとなっているリグニン由来芳香族化合物代謝系遺伝子 (群) の転写制御システムについては、「11. SYK-6 株のリグニン由来芳香族化合物代謝系遺伝子の転写制御」で詳細を述べる。

Table III. リグニン由来芳香族化合物代謝系遺伝子の転写制御システム

Catabolic substrate	Organism	Taxon ^a	Catabolic gene(s)	Inducer(s)	Regulatory protein	Accession number	Regulator family	Regulation	References
DDVA	<i>Sphingobium</i> sp. SYK-6	α	<i>ligXa</i>	DDVA	DdvR	BAK65453	MarR	Repressor	(56, 169)
<i>p</i> -hydroxycinnamates	<i>Rhodococcus jostii</i> RHA1	Gm ⁺	<i>couNOM, couHTL</i>	<i>p</i> -coumaroyl-CoA, feruloyl-CoA	CouR	5CYV_A	MarR	Repressor	(170)
	<i>Rhodopseudomonas palustris</i> CGA009	α	<i>couAB</i>	<i>p</i> -coumaroyl-CoA	CouR	CAE27235	MarR	Repressor	(171)
	<i>Acinetobacter</i> sp. ADP1	γ	<i>hcaABCDE</i>	<i>p</i> -hydroxycinnamoyl-CoA	HcaR	AAP78949	MarR	Repressor	(172)
	<i>Agrobacterium fabrum</i> C58	α	<i>atu1416-1415, atu1417, hcaR-atu1421</i>	<i>p</i> -coumaroyl-CoA, feruloyl-CoA	HcaR	AAK87215	MarR	Repressor	(173)
	<i>Corynebacterium glutamicum</i> ATCC 13032	Gm ⁺	<i>phd</i> genes	ND	PhdR	CAF18855	MarR	Repressor	(174)
ferulate	<i>Sphingobium</i> sp. SYK-6	α	<i>ferBA</i>	<i>p</i> -coumaroyl-CoA, feruloyl-CoA, sinapoyl-CoA	FerC	BAK67179	MarR	Repressor	(175)
	<i>Pseudomonas fluorescens</i> BF13	γ	<i>ech-vdh-fcs-aat-fcd</i>	feruloyl-CoA	FerR	CAD60265	MarR	Activator/Repressor	(176)
vanillate	<i>Acinetobacter</i> sp. ADP1	γ	<i>vanAB</i>	ND	VanR	AAC27105	GntR	Repressor	(177)
	<i>Caulobacter crescentus</i> CB15N	α	<i>vanAB</i>	vanillate	VanR	AAK24363	GntR	Repressor	(89)
	<i>Corynebacterium glutamicum</i> ATCC 13032	Gm ⁺	<i>vanABK</i>	vanillate	VanR	BAB99775	PadR	Repressor	(178)
	<i>Agrobacterium fabrum</i> C58	α	<i>atu1418, atu1419, atu1420</i>	5,10-methylene-H ₄ folate	Atu1419	AAK87212	GntR	Repressor	(179)
protocatechuate	<i>Sphingobium</i> sp. SYK-6	α	<i>ligJABC, ligKUI</i>	protocatechuate, gallate	LigR	BAK65929	LysR	Activator	(180)
	<i>Corynebacterium glutamicum</i> ATCC 13032	Gm ⁺	<i>pcaHG</i>	protocatechuate	PcaO	BAB99787	LAL ^b	Activator	(181)
	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> A348	α	<i>pcaDCHGB</i>	β -carboxy- <i>cis</i> , <i>cis</i> -muconate, γ -carboxymuconolactone	PcaQ	AAA91130	LysR	Activator	(182, 183)
	<i>Sinorhizobium meliloti</i> 1021	α	<i>pcaDCHGB</i>	ND	PcaQ	CAC49892	LysR	Activator	(184, 185)
	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	α	<i>pcaIJ</i>	β -ketoadipate	PcaR	undeposited	IclR	ND	(186)
	<i>Pseudomonas putida</i> PRS2000	γ	<i>pcaHG, pcaTBDC, pcaIJ, pcaK, pcaF</i>	β -ketoadipate	PcaR	Q52154	IclR	Activator	(187-189)
	<i>Acinetobacter</i> sp. ADP1	γ	<i>pcaIJFBDKCHG</i>	protocatechuate	PcaU	AAC37157	IclR	Activator/Repressor	(190-192)
	<i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2)	Gm ⁺	<i>pcaIJFHGBL</i>	protocatechuate	PcaV	CAB45578	MarR	Repressor	(193)
	<i>Acinetobacter</i> sp. ADP1	γ	<i>pobA</i>	<i>p</i> -hydroxybenzoate	PobR	AAC37162	IclR	Activator	(194, 195)
	<i>Streptomyces coelicolor</i> M600	Gm ⁺	<i>pobA</i>	<i>p</i> -hydroxybenzoate	PobR	CAB38580	IclR	Repressor	(196)

ND, not determined

^a α , alphaproteobacteria; γ , gammaproteobacteria; Gm⁺, Gram positive bacteria^bLAL, large ATP-binding LuxR family.

MarR 型転写制御因子

MarR 型転写制御因子は、*E. coli* の多剤耐性 (multiple antibiotic resistance, mar)獲得に関わる *marRAB* オペロンを負に制御する MarR (197)と相同性を示す転写制御因子の一群である (198, 199)。MarR 型転写制御因子は、バクテリアの主要な転写制御因子ファミリーの一つであり、2017 年に報告された Ensembl bacteria ゲノムデータベース (<https://bacteria.ensembl.org/index.html>)解析では、各バクテリアが平均 7 個の MarR パラログを有していることが示されている (200)。MarR 型転写制御因子が制御する遺伝子の機能は、抗生物質耐性、外的ストレス耐性、病原性因子、芳香族化合物代謝、二次代謝産物の生合成およびグリオキシル酸回路などの中心代謝というように多様である (200-202)。一般的に MarR 型転写制御因子は、溶液中で homodimer を形成し、自身をコードする遺伝子の近傍に存在する制御対象遺伝子(群)のプロモーター領域に結合して転写を直接抑制するリプレッサーとして機能する。また、同時に自身の転写も抑制する。転写抑制解除のためには、転写誘導物質である小分子リガンドや活性酸素種などのシグナルが必要である (201, 202)。

MarR 型転写制御因子は、N 末端から C 末端にかけて “ $\alpha 1$ - $\alpha 2$ - $\beta 1$ - $\alpha 3$ - $\alpha 4$ - $\beta 2$ - $\beta 3$ - $\alpha 5$ - $\alpha 6$ ” といったトポロジーを形成する (201)。このうち、N 末端と C 末端にそれぞれ存在する $\alpha 1$ 、 $\alpha 5$ および $\alpha 6$ は二量体化ドメインを構成し、本ドメインの疎水性相互作用および水素結合により homodimer を形成する。また、アミノ酸配列の中央には winged-HTH (wHTH)モチーフを含む DNA 結合ドメインが存在する。MTTR における wHTH モチーフのコア領域は $\alpha 2$ - $\alpha 3$ - $\alpha 4$ で構成される HTH 部分であり、この HTH 部分が DNA の主溝と結合する (201)。一方、 $\beta 2$ - $\beta 3$ で構成される wing 部分は DNA の副溝と相互作用する (201)。MarR 型転写制御因子において、dimer の形成がそれぞれの monomer に存在する DNA 結合ドメインの位置を決定することが示されており、二量体化が MarR 型転写制御因子と DNA との親和性に影響を与えることが示唆されている (203, 204)。

MarR 型転写制御因子は、制御対象遺伝子(群)のプロモーター領域に含まれる 16-20 塩基程度の完全または不完全な inverted repeat (IR)配列を認識して DNA に結合する。MarR 型転写制御因子の多くは小分子リガンド、特にフェノール型化合物を認識することで立体構造が変化し DNA への結合性が変化する。また、分子内の Cys 残基の酸化によるジスルフィド結合の形成に伴う立体構造の変化によって調節されるものも存在する。Table III に示したリグニン由来芳香族化合物の代謝制御に関わる MarR 型転写制御因子のうち、*Streptomyces coelicolor* A3(2)株の PCA 代謝系遺伝子群 (*pcaIJFHGBL*)を制御する PcaV (193)、*Rhodopseudomonas palustris* CGA009 株の *p*-hydroxycinnamates 代謝に関与する *couAB* を制御する CouR_{Rpa} (171)および *Rhodococcus jostii* RHA1 株の *p*-

hydroxycinnamates 代謝に関与する *cou* 遺伝子群を制御する $\text{CouR}_{\text{RHA1}}$ (170)については、X 線結晶構造解析を通して詳細な転写調節メカニズムが明らかとなっている。

PcaV homodimer は、*pcaIJFHGBL* オペロンのプロモーター領域に結合して本オペロンの転写を負に制御する。エフェクター分子である PCA が PcaV に結合すると、 PcaV の wHTH モチーフが二量体化ドメイン方向に約 15° 回転し構造変化が生じる (193)。これにより PcaV の DNA への親和性が低減しプロモーター領域から解離するため、*pcaIJFHGBL* オペロンの転写抑制が解除される。また、 PcaV は PCA と構造の類似する 4 つの化合物 (3,5-dihydroxybenzoate, 3-hydroxybenzoate, 4-hydroxybenzoate, 2,5-dihydroxybenzoate) とそれぞれ結合することが示されているが、これら化合物に対する解離定数 ($4.34\text{--}147\ \mu\text{M}$) は PCA に対する解離定数 ($0.67\ \mu\text{M}$) と比較して大きく異なり、 PcaV は PCA に対し高いリガンド選択性を有することが示唆されている (193)。 $\text{CouR}_{\text{RHA1}}$ homodimer は、*cou* 遺伝子群のプロモーター領域に結合し転写を負に制御するが、*p*-coumarate および FA の代謝中間体である *p*-coumaroyl-CoA と feruloyl-CoA をエフェクター分子として認識することで DNA から解離する (170)。 $\text{CouR}_{\text{RHA1}}\text{-}p\text{-coumaroyl-CoA}$ 複合体の X 線結晶構造解析から、 $\text{CouR}_{\text{RHA1}}$ のエフェクター結合に伴う DNA 解離メカニズムは PcaV のメカニズムと異なることが示されている。 $\text{CouR}_{\text{RHA1}}$ は *p*-coumaroyl-CoA と結合するものの、wHTH モチーフは二量体化ドメイン方向に約 6° 程度しか回転せず、構造全体として大きな変化は生じない (170)。*p*-coumaroyl-CoA の CoA 部分はリン酸基により負に帯電しており、 $\text{CouR}_{\text{RHA1}}$ への結合時に DNA 結合ドメインの電荷を大きく負に偏らせる。このため、DNA と $\text{CouR}_{\text{RHA1}}$ の DNA 結合ドメイン間に静電的な反発力が生じ、 $\text{CouR}_{\text{RHA1}}$ は DNA から解離すると考えられている (170)。 $\text{CouR}_{\text{RHA1}}$ と 36% のアミノ酸配列相同性を示す CouR_{Rpa} は、 $\text{CouR}_{\text{RHA1}}$ と同様に *p*-coumaroyl-CoA とエフェクター分子として認識し DNA から解離することが示されている (171)。 $\text{CouR}_{\text{Rpa}}\text{-}p\text{-coumaroyl-CoA}$ 複合体の X 線結晶構造解析から、 CouR_{Rpa} は PcaV のようにエフェクター結合に伴う明確な構造変化は生じない (205)。 CouR_{Rpa} は $\text{CouR}_{\text{RHA1}}$ と同様の転写調節メカニズムを有することから、負に帯電した CoA 部分に由来する静電的反発力により DNA から解離すると予想されるが、詳細な DNA 解離メカニズムについては議論されていない。

IcIR 型転写制御因子

IcIR 型転写制御因子は、*E. coli* のグリオキシル酸経路に関わる *aceBAK* オペロンを制御する IcIR (206, 207) と相同性を示す転写制御因子の一群である (208, 209)。IcIR 型転写制御因子はバクテリアに広く保存されており、制御対象とする遺伝子(群)の機能はグリオキシル酸経路の調節、芳香族化合物代謝、クオラムセンシング、多剤耐性、植物病原性、および孢子形成など多岐に渡る (208)。IcIR 型転写制御因子はリプレッサー、アクチベーターおよびその両方の機能をもつ 3 つのタイプに分けられる。

IcIR 型転写制御因子は、N 末端に wHTH モチーフを含む DNA 結合ドメインが存在し、C 末端にはエフェクター結合および多量体形成に関与するドメインが保存されている (208, 209)。IcIR 型転写制御因子の多くは、dimer または dimer of dimer を形成することで DNA に結合する。また、DNA 結合時には IR 配列または direct repeat 配列を認識する。芳香族化合物代謝を制御する IcIR 型転写制御因子において、認識する IR 配列には保存性があることが示されている (210)。

リグニン由来芳香族化合物の代謝制御に関わる IcIR 型転写制御因子は比較的多く、*Acinetobacter* sp. ADP1 株の *p*-hydroxybenzoate 分解を制御する PobR (194, 195)、ADP1 株の PCA 代謝に関与する *pca* 遺伝子群を制御する PcaU (190, 191, 211)、*Pseudomonas putida* の PCA 代謝に関与する *pca* 遺伝子群を制御する PcaR (187-189) などが報告されている。

ADP1 株の PobR は、*p*-hydroxybenzoate 3-hydroxylase をコードする *pobA* と、その直上流に逆向きの転写方向で存在する自身の転写を制御する (194, 195)。PobR は *pobA*-*pobR* 遺伝子間領域に結合し、エフェクター分子である *p*-hydroxybenzoate の非存在下では両遺伝子の転写を抑制する。*p*-hydroxybenzoate の存在下では自身の転写を抑制しつつ、*pobA* の転写を活性化することが示されている。また、*p*-hydroxybenzoate の存在下で PobR の DNA 結合位置は変化しないことから、*p*-hydroxybenzoate との結合によるコンホメーションの変化が PobR と RNAP の相互作用に影響を与え、*pobA* の転写調節を切り替えていると考えられている (195)。

PcaU は、PCA 3,4-開裂酵素遺伝子群 *pcaIJFBDKCHG* ならびに quinate/shikimate 分解酵素遺伝子群 *quiBCX* の転写を制御する (190, 191)。ADP1 株において、*pca* 遺伝子群と *qui* 遺伝子群は *pca-qui* オペロンを構成しており、*pcaU* は *pcaI* の直上流に逆向きの転写方向で存在している。PcaU は dimer を形成することで *pcaU*-*pcaI* 遺伝子間領域に結合し、両遺伝子(群)の転写を抑制するが、エフェクター分子である PCA の存在下では自身の転写を抑制しつつ、*pca-qui* オペロンの転写を活性化することが示されている (190, 191, 211)。PcaU は PobR と同様に、エフェクター分子の存在下でも DNA 結合能は変化しないため、PCA の結合が PcaU のコンホメーション変化を引き起こし、*pca-qui* オペロンの転写調節を切り替えていると推測される。

P. putida の PCA 3,4-開裂経路を担う *pca* 遺伝子群は、*pcaHG*、*pcaIJ*、*pcaK*、*pcaF* および *pcaTBDC* の転写単位で構成されており、PcaR は *pcaHG* を除くすべての遺伝子 (群) の転写を制御している (188, 189)。通常 PcaR は *pcaIJ*、*pcaK*、*pcaF* および *pcaTBDC* の転写を抑制しているが、PCA 代謝中間体である β -ketoadipate の存在下ではこれら遺伝子 (群) の転写を活性化する (187, 188)。一方、 β -ketoadipate の有無にかかわらず、自身の転写を常に抑制する。PcaR は dimer または dimer of dimer を形成し、*pcaR* または *pcaIJ* プロモーター領域にそれぞれ結合すると示唆されている (189)。また、*pcaIJ* プロモーターにおいて、 β -ketoadipate の存在下で PcaR-RNAP-DNA 複合体の形成が促進されることが示されている (189)。これは、PcaR が β -ketoadipate と結合することで *pcaIJ* プロモーターの -35 と -10 配列の距離を最適化するように作用し、RNAP の動員を促進したのだと考えられている。

GntR 型転写制御因子

GntR 型転写制御因子は、*Bacillus subtilis* の gluconate (*gnt*)代謝系オペロン (*gntRKPZ*) を制御する GntR (212, 213) と相同性を示す転写制御因子の一群である (214)。GntR 型転写制御因子は広範なバクテリアに存在するが、中でも *proteobacteria* に最も多く分布しており、細胞の運動性、菌糸成長、抗生物質生産、抗生物質耐性、プラスミド転移、病原性、脂質代謝、糖代謝、および芳香族化合物を含む有機酸代謝など多様な遺伝子の制御に関与する (156, 215, 216)。GntR 型転写制御因子は、制御対象遺伝子(群)の転写を活性化または抑制し、同時に自身の転写を抑制する (215)。

GntR 型転写制御因子は、N 末端に wHTH モチーフを含む DNA 結合ドメインが存在し、C 末端にはエフェクター結合モチーフと多量体化を担うドメインが保存されている (217)。これらのうち、N 末端の DNA 結合ドメインは非常に類似しているが C 末端ドメインには相違が見られ、C 末端側アミノ酸配列の比較から GntR 型転写制御因子は FadR、HutC、MocR、YtrA、AraR、DevA および PlmR の計 7 つのサブファミリーに分類される (217-221)。GntR 型転写制御因子は溶液中で dimer を形成するが、サブファミリーごとに C 末端部分が形成するドメイン構造に多様性が見られ、その全体構造はサブファミリー間で大きく異なっている (217)。リグニン由来芳香族化合物の代謝制御に関与する GntR 型転写制御因子 VanR は、これらサブファミリーの中でもアミノ酸代謝や有機酸代謝の制御を担う制御因子が多く含まれる FadR サブファミリーに分類される (218)。

VanR は、*Acinetobacter* sp. ADP1 株および *Caulobacter crescentus* CB15N 株において、VA 脱メチル酵素遺伝子 *vanAB* の転写を制御する (89, 177)。ADP1 株および CB15N 株において、*vanAB* オペロンの転写は VanR により負に制御される。両株において *vanAB* のプロモーター活性は VA 存在下で誘導されることが示されているものの、VA が VanR

のエフェクター分子として機能するかは調査されておらず、その詳細な転写調節メカニズムは不明である。また、CB15N 株において、*vanAB* プロモーターは VA と構造の類似する vanillin または vanillyl alcohol の存在下でも誘導されることが示されている (89)。

PadR 型転写制御因子

PadR 型転写制御因子は、乳酸菌の一種である *Pediococcus pentosaceus* において phenolic acid decarboxylase 遺伝子 (*padA*) を負に制御する PadR (222) と相同性を示す転写制御因子の一群である (178, 223-228)。PadR 型転写制御因子は主にグラム陽性細菌において見出されおり、芳香族代謝、毒素生産、多剤耐性および抗生物質生産などの制御に関与する (178, 222-228)。PadR 型転写制御因子の多くは制御対象遺伝子(群)の転写を抑制するリプレッサーとして機能し、抑制解除にエフェクター分子を必要とする。*Bacillus subtilis* において phenolic acid decarboxylase 遺伝子 (*padC*) の転写を制御する PadR は、*padC* プロモーター領域に結合し通常 *padC* の転写を抑制しているが、*p-coumarate* または FA をエフェクター分子として認識することで DNA から解離し *padC* の抑制を解除することが明らかとなっている (224, 229)。一方、*Vibrio cholerae* のコレラ毒素生産の制御に関わる AphA はアクチベーターとして機能することが知られている (225)。

PadR 型転写制御因子は、N 末端に wHTH モチーフを含む DNA 結合ドメインが存在し、C 末端には多量体形成に関与するドメインが保存されている。また、PadR 型転写制御因子は C 末端ドメインの長さに応じて、さらに 2 つのサブファミリーに分けられる (226)。*V. cholerae* の AphA (225)、*Listeria monocytogenes* LO28 株の薬剤排出ポンプをコードする *mdrL* の制御に関わる LadR (226) および *P. pentosaceus* と *B. subtilis* の PadR (222, 224) はサブファミリー1 に分類され、80-90 残基の C 末端ドメインを有する。一方、*Lactococcus lactis* MG1363 株の薬剤排出ポンプをコードする *lmrCD* の制御に関わる LmrR (227) および *Bacillus cereus* ATCC 14579 の多剤耐性を制御すると考えられている *bcPadR1* と *bcPadR2* (230) はサブファミリー2 に分類され、20-30 残基の C 末端ドメインを有する。

Corynebacterium glutamicum ATCC 13032 の VA 代謝系遺伝子 *vanABK* を制御する VanR は、GntR 型転写制御因子に属しサブファミリー1 に分類される (178)。*C. glutamicum* において VA 脱メチル酵素遺伝子 *vanAB* は、推定の VA トランスポーターをコードする *vanK* とオペロンを形成している。*vanR* は *vanABK* の直上流に逆向きの転写方向で存在しており、VanR は *vanR-vanA* 遺伝子間領域に存在する IR 配列を認識して DNA に結合し、*vanABK* の転写を抑制する (178)。VA は VanR のエフェクター分子として機能し抑制解除に働くが (178)、これは VA と結合した VanR の構造に変化が生じ DNA への親和性が低減するためと考えられている (231)。

LysR 型転写制御因子

LysR 型転写制御因子は、*E. coli* において diaminopimelate の lysine への脱炭酸を触媒する diaminopimelate decarboxylase 遺伝子 (*lysA*) を正に制御する LysR (232) と相同性を示す転写制御因子の一群である (233)。LysR 型転写制御因子は、バクテリアにおいて最大級の転写制御因子群を構成し、芳香族化合物代謝、アミノ酸合成、細胞内の酸化応答、およびカルビン回路などの制御に関与する (156, 233, 234)。一般的に LysR 型転写制御因子は、自身の直上流逆向きの転写方向で存在する遺伝子(群)の転写を正に制御し、同時に自身の転写を抑制する。誘導物質の有無にかかわらず DNA 結合能を持つが、転写活性化には誘導物質を必要とする。芳香族化合物代謝を制御する LysR 型転写制御因子の多くは、代謝基質またはその中間体をエフェクター分子として認識する (156)。

LysR 型転写制御因子は、N 末端に HTH モチーフを含む DNA 結合ドメインが存在し、C 末端にはエフェクター結合や多量体化を担うドメインが含まれている。また、DNA 結合ドメインは RNAP と相互作用することが示されており、DNA 結合だけでなく転写活性化にも重要であることが示唆されている (235, 236)。現在までに、*Ralstonia eutropha* NH9 株の chlorocatechol 代謝系遺伝子 *cbnABCD* を制御する CbnR (237)、*Acinetobacter* sp. ADP1 株の benzoate 代謝系遺伝子 *benABCDE* を制御する BenM (238) などの立体構造が明らかにされている。LysR 型転写制御因子は溶液中で dimer または tetramer で存在するが、DNA-タンパク質複合体形成時には dimer of dimer または tetramer で DNA に結合することが示されている (233, 239)。DNA 結合時には、制御対象遺伝子(群)の転写開始点から上流約 65 塩基を中心として存在する T-N₁₁-A モチーフを含む不完全な IR 配列を認識する。

11. SYK-6 株のリグニン由来芳香族化合物代謝系遺伝子の転写制御

前述したように、SYK-6 株のリグニン由来芳香族化合物代謝については、分解系を構成する酵素遺伝子の解析が中心に行われてきた (Fig. IV)。また、近年では、SYK-6 株のリグニン由来芳香族化合物の輸送に関わる知見も得られ始め、輸送系と分解系を合わせてこれまでに 40 以上の酵素遺伝子が同定され、その詳細な機能が明らかにされている。一方、全容が明らかになりつつあるリグニン由来芳香族化合物代謝系において、その制御系に関する知見は限定的である。これまでに、DDVA、FA および PCA 代謝系酵素遺伝子群は転写レベルで制御を受けることが明らかとなっており、VA/SA 代謝系酵素遺伝子群の制御系についても一部知見が得られている。

DDVA 代謝系遺伝子群の転写制御

DDVA は、DdvT および DdvK により細胞内に取り込まれた後、4 段階の酵素反応を受けて VA へと変換され代謝される (Fig. XII)。DDVA 代謝系遺伝子群のうち *ddvT*、*ddvK*、*ligZ*、および *ligY* は *ddvT* オペロンを形成し、*ddvT* オペロン下流に存在する *ligXa* はその下流の SLG_07760 と *ligXa* オペロンを形成する (Fig. XII) (169)。両オペロンの転写は、*ligXa* 直上流に逆向きの転写方向で存在する MarR 型転写制御因子 DdvR により負に制御されている (Fig. XII) (56, 169)。一方、ゲノム上に分散して存在する *ligXc*、*ligXd*、*ligW*、および *ligW2* は構成的に発現することが示されている (169)。また *ddvR* は、*ddvR* 下流に同転写方向で存在する 3 つの遺伝子と *ddvR* オペロンを形成するが、その発現は構成的であることが示唆されている (169)。DdvR は、*ddvT* オペロンおよび *ligXa* オペロンの推定プロモーター領域に存在する IR 配列を認識して各プロモーター領域に結合すると考えられている。また、DDVA が DdvR のエフェクター分子として機能し DdvR の DNA 結合を阻害することから、DDVA が *ddvT* オペロンおよび *ligXa* オペロンの転写抑制解除に働くことが示唆されている (Fig. XII) (56, 169)。

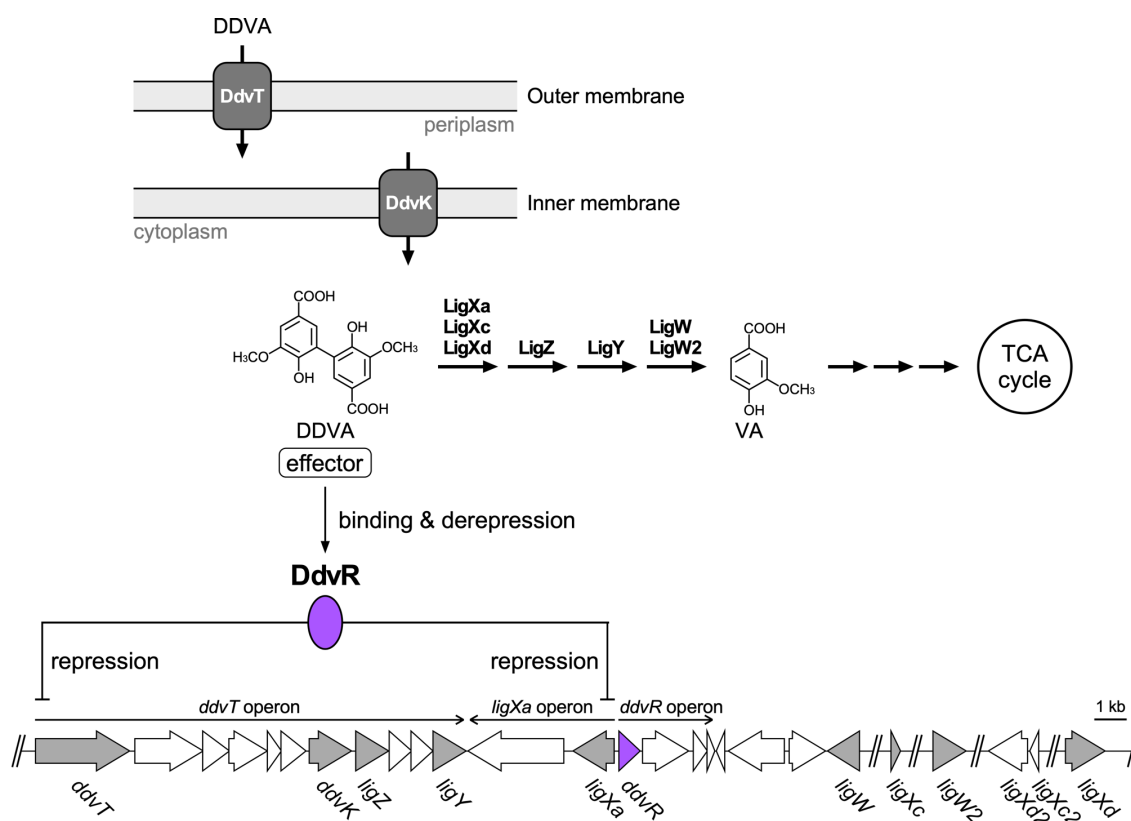


Fig. XII. SYK-6 株における DDVA 代謝系遺伝子群の転写制御システム.

DdvR は *ddvT* オペロンおよび *ligXa* オペロンのプロモーター領域に結合し、両オペロンの転写を負に制御する. DDVA が DdvR のエフェクター分子として作用し、DdvR による転写抑制を解除する. Enzymes: DdvT, DDVA outer membrane transporter; DdvK, DDVA inner membrane transporter; DdvR, MarR-type transcriptional regulator; LigXa, DDVA *O*-demethylase oxygenase component; LigXc, DDVA *O*-demethylase ferredoxin component; LigXd, DDVA *O*-demethylase ferredoxin reductase component; LigZ, OH-DDVA *meta*-cleavage dioxygenase; LigY, OH-DDVA *meta*-cleavage compound hydrolase; LigW and LigW2, 5CVA decarboxylases. Abbreviations: DDVA, 5,5'-dehydrodivanillate; VA, vanillate.

Ferulate 代謝系遺伝子群の転写制御

FA は、FerA および FerB/FerB2 により vanillin へと変換され、VA を経由して PCA4,5-開裂経路により代謝される (Fig. IV) (65)。ferBA はオペロンを構成し、本オペロンの転写は ferB 直上流に逆向きの転写方向で存在する MarR 型転写制御因子 FerC により負に制御される (Fig. XIII) (175)。ferA の下流には SLG_25010 および desA が存在するが、SLG_25010 は FA 培養時において ferBA オペロンの同一転写単位に含まれないことから、ferBA オペロンと SLG_25010-desA は異なる転写単位であることが示唆されている。また、ferB2 は ferC-ferBA と異なる遺伝子座に位置しており、その転写量は ferB の転写量の約 10%以下であるため、FA 代謝への FerB2 の関与は低いと考えられている (175)。FerC は溶液中で二量体を形成し、ferBA オペロンの転写開始点から-10 配列までを覆うように存在する IR 配列 (5'-ATGCTATGGCTTATAGCAT-3' [下線は IR 部分を示す]) と結合し、IR 配列の half site それぞれに FerC の単量体サブユニットが結合すると考えられている。また、feruloyl-CoA が FerC のエフェクター分子として機能することから、feruloyl-CoA が ferBA オペロンの転写抑制解除に必要であると示唆されている (Fig. XIII)。さらに、feruloyl-CoA だけでなく、p-coumaroyl-CoA および sinapoyl-CoA も FerC のエフェクター分子として作用することが示されている (175)。

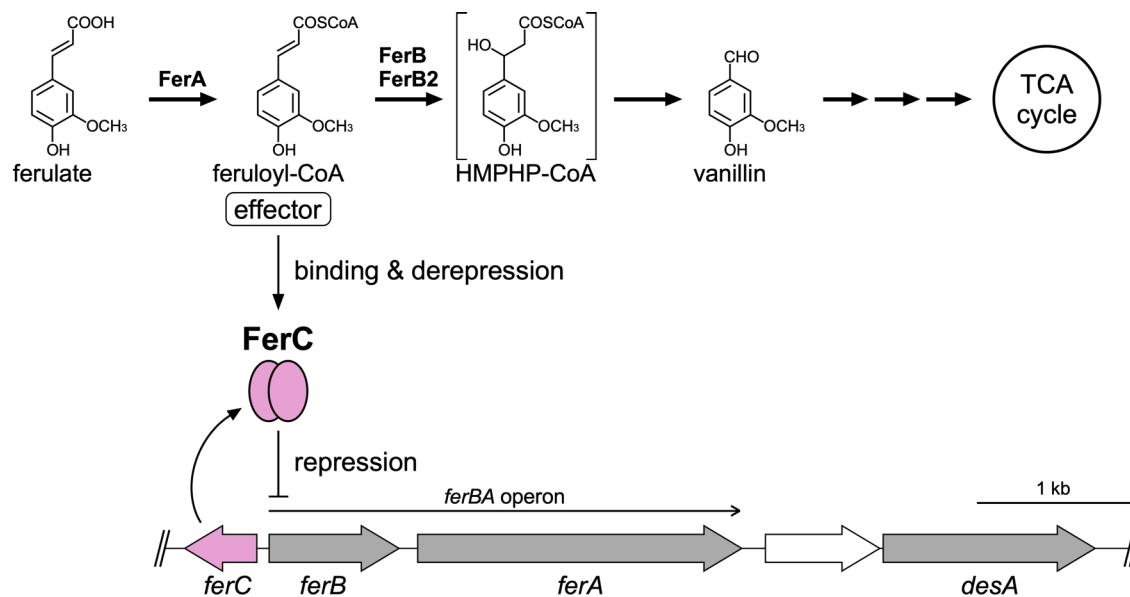


Fig. XIII. SYK-6 株における FA 代謝系遺伝子群の転写制御システム。

FerC は ferB プロモーター領域に結合し、ferBA オペロンの転写を負に制御する。FA 代謝中間体である feruloyl-CoA が FerC のエフェクター分子として作用し、FerC による転写抑制を解除する。Enzymes: FerC, MarR-type transcriptional regulator; FerA, feruloyl-CoA synthetase; FerB and FerB2, feruloyl-CoA hydratases/lyases. Abbreviations: HMPHP-CoA, 4-hydroxy-3-methoxyphenyl-β-hydroxypropionyl-CoA.

Protocatechuate 4,5-開裂経路遺伝子群の転写制御

PCA 4,5-開裂経路において PCA は、LigAB による 4,5-開裂とそれに続く 5 段階の酵素反応を受けて最終的に pyruvate と oxaloacetate に変換される (Fig. VIII) (23, 69)。PCA 4,5-開裂系遺伝子群は、*ligKUI-lsdA* オペロン (*ligK* オペロン)、*ligJABC* オペロン (*ligJ* オペロン)、およびモノシストロニックな *ligR* の 3 つの転写単位で構成される。*ligK* オペロンと *ligJ* オペロンの転写は LysR 型転写制御因子 LigR により正に制御され、PCA または SA 代謝の中間体である GA の存在下でこれら遺伝子群の転写が活性化される (Fig. XIV) (180)。また、*ligR* の転写は自身により常に抑制される。LigR は dimer of dimer を形成し、*ligK* および *ligJ* プロモーター領域において各転写開始点に対して -77 から -51、および -80 から -48 の領域にそれぞれ結合するとともに、DNA を屈曲させることが示されている (180)。また、PCA または GA が LigR のエフェクター分子として作用することで LigR の結合による DNA の屈曲角度が増大し、*ligK* プロモーター領域においては保護領域が -77 から -35 に拡大することから、LigR の結合領域が -35 配列まで広がることと DNA の屈曲角度が増大することが転写活性化に重要であると考えられている (180)。

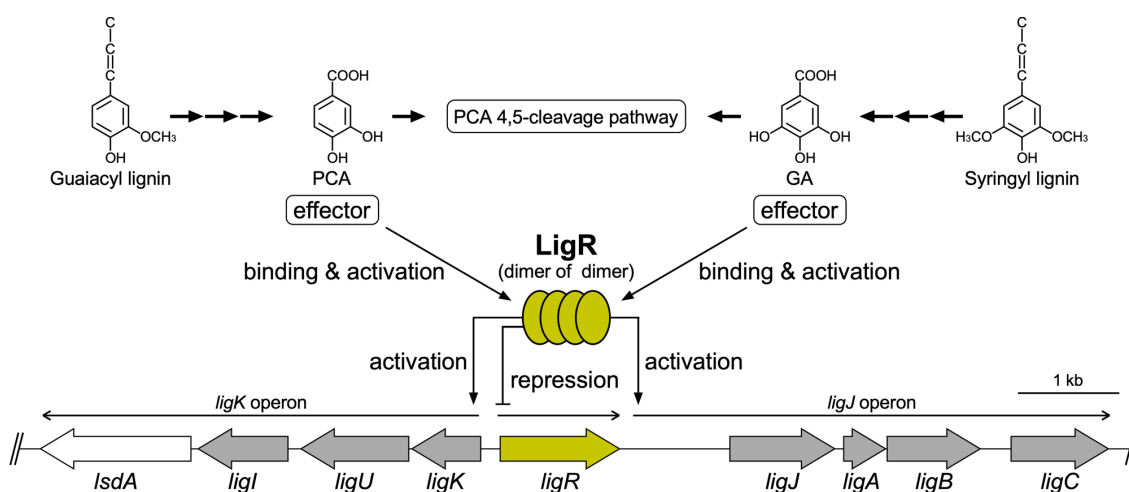


Fig. XIV. SYK-6 株における PCA 4,5-開裂酵素遺伝子群の転写制御システム。

guaiacyl 型および syringyl 型のリグニン由来化合物は、それぞれ PCA または GA へと代謝され、PCA 4,5-開裂経路を経て TCA 回路に合流する。LigR は *ligJ* および *ligK* プロモーター領域に結合し、両オペロンの転写をエフェクター分子である PCA または GA に応答して活性化する。また、*ligR* の転写は自身により常に抑制される。Enzymes: LigR, LysR-type transcriptional regulator. Abbreviations: PCA, protocatechuate; GA, gallate.

Vanillate/sringate 代謝系遺伝子群の転写制御

VA/SA 代謝に関与する *ligM* (SLG_12740)、SA 代謝に関与する *desA* (SLG_25000) および *desB* (SLG_03330) は、SYK-6 株の染色体上に異なる遺伝子座で存在している (Fig. XV) (23, 24)。これら遺伝子のうち、*desB* はモノシストロニックな転写単位であるが、*ligM* は C₁ 代謝に関与する *metF* および *ligH* とオペロンを構成している (Fig. XV) (23, 24)。*desA* の直上流には同一転写方向に推定の hydrolase をコードする SLG_25010 および *ferBA* オペロンが存在する。先に述べたように FA 培養時に SLG_25010 は *ferBA* オペロンに含まれないことが示されているが (175)、SA 培養時には *ferB-ferA-SLG_25010-desA* はオペロンを形成することが示唆されており (70) (Fig. XV)、本遺伝子クラスターの転写単位は明確になっていない。

また、*desA*、*ligM* オペロンおよび *desB* のプロモーター解析が行われ、*desA* と *ligM* オペロンの転写は VA および SA 培養時に誘導され、*desB* の転写は少なくとも SA 培養時に誘導されることが示唆されている (131, 240)。これらのうち、*ligM* オペロンと *desB* の転写開始点が決定されており、両転写開始点の上流には大腸菌の σ^{70} 依存性プロモーターの結合コンセンサス配列である -35 および -10 配列が見出されている (131, 240)。さらに、*desB* の転写制御因子を同定するために *desB* 上流領域結合タンパク質の探索が行われ、MarR 型転写制御因子と相同性を示す DesR (SLG_12870) と LysR 型転写制御因子と相同性を示す DesQ (SLG_14170) が見出された (Fig. XVI)。*desR* 破壊株および *desQ* 破壊株を用いた解析から、DesR が *ligM* および *desB* の転写を負に制御することが示唆されており、VA/SA 代謝系遺伝子群の転写制御システムについての知見が一部得られている (241)。

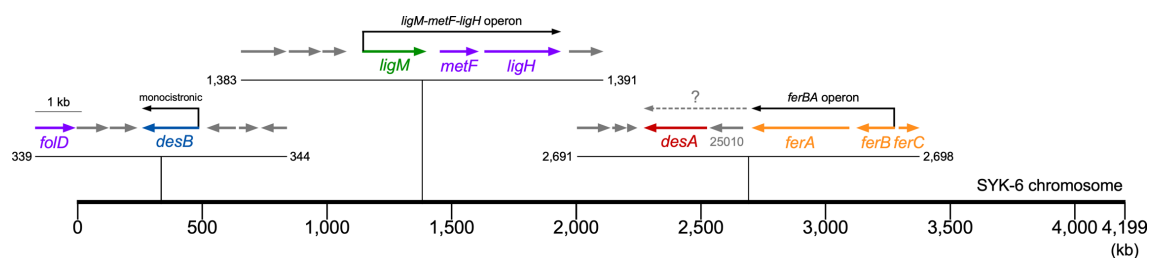


Fig. XV. SYK-6 株における *desA*, *ligM* および *desB* 周辺の遺伝子マップ。

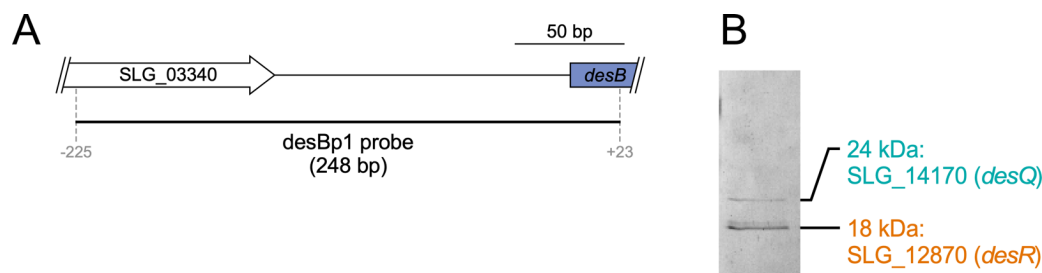


Fig. XVI. *desB* 上流領域結合タンパク質の単離.

(A) *desB* の上流領域. タンパク質の単離に用いられた DNA 断片 (*desBp1* probe)は黒いバーで示した. (B) *desB* 上流領域に結合性を示すタンパク質の電気泳動結果. LB で培養した SYK-6 株の細胞抽出液と, streptavidin ビーズに結合させた biotin 標識 *desBp1* probe を反応させ, 得られたタンパク質を SDS-PAGE により分離した. 検出された 18 kDa と 24 kDa の 2 つのタンパク質のバンドはトリプシン消化されペプチドマスフィンガープリンティングにより分析された.

12. 本研究の目的

高分子リグニンの化学処理によって得られる不均一で多様な低分子芳香族化合物を、*Sphingobium* sp. SYK-6 株が持つ代謝酵素系を利用して基幹化合物である PDC や ccMA へと変換し、これらを原料に高機能性および汎用性の高い有機材料を得ることができれば、リグニンの有効利用が可能であると期待される。SYK-6 株を基盤とした高効率なリグニン変換システムを構築するには、本株が持つリグニン由来芳香族化合物の取り込みおよび分解に関わる遺伝子の同定と機能の解明に加えて、これら遺伝子の転写制御システムを明らかにすることが極めて重要である。

SYK-6 株において、これまで 40 を超えるリグニン由来芳香族化合物代謝系遺伝子が同定、解析され、これら遺伝子のうち DDVA 代謝、FA 代謝、および PCA 4,5-開裂経路に関わる酵素遺伝子について転写制御システムが明らかにされてきた。しかし、リグニン生分解において重要な代謝中間体に位置づけられる VA および SA の代謝酵素遺伝子の転写制御システムについては、一部知見が得られているもののその詳細は不明である。リグニン生分解の最終段階である VA と SA 代謝の制御システムを明らかにすることは、自然界における炭素循環の理解に不可欠だけでなく、リグニンから高効率に有価物を生産する微生物株の創出に有用と考えられる。本研究では、SYK-6 株の VA/SA 代謝制御の全容解明を目的とし、本株の VA/SA 代謝の主要代謝酵素遺伝子である *desA*、*ligM* および *desB* の転写制御システムについて解析を行った。

第1章

***Sphingobium* sp. SYK-6 株における vanillate および syringate 分解酵素遺伝子群の転写制御システム**

第1節 緒言

微生物の代謝機能を利用して、リグニンの低分子化で得られる不均一で多様なリグニン由来の芳香族化合物をポリマー原料等の有価物に変換する Biological funneling は、リグニンの利用価値を高める有望な手段として期待されている (41)。 *Sphingobium* sp. SYK-6 株は、リグニン由来の二量体および単量体化合物の代謝系が最も明らかにされているバクテリアであり、本株およびその代謝系はリグニン由来芳香族化合物の有価物への変換系を構築する上で有用である (23, 24)。 SYK-6 株は、guaiacyl 型および syringyl 型リグニンに由来するさまざまなリグニン由来芳香族化合物をそれぞれ vanillate (VA) と syringate (SA) に集約的に変換し、その後ポリマー原料となる 2-pyrone-4,6-dicarboxylate (PDC) を経由して代謝する (Fig. VIII)。 VA および SA はリグニンの化学的低分子化処理によって生じる主要分解物であることから (242, 243)、SYK-6 株を基盤とした高効率なリグニンからの有価物生産系を構築するには、これら化合物の代謝に関与する酵素遺伝子を同定し、その転写制御システムを明らかにすることが望まれる。

SYK-6 株において、VA は tetrahydrofolate (H₄folate) 依存性の VA/3-*O*-methylgallate (3MGA) *O*-demethylase である LigM により脱メチルを受け protocatechuate (PCA) へと変換された後、PCA 4,5-開裂経路を経て代謝される (Fig. VIII)。 一方、SA は H₄folate 依存性の SA *O*-demethylase である DesA により脱メチルを受け 3MGA へと変換される (Fig. VIII)。 生成した 3MGA は 3 つの経路に分岐して代謝されるが、その中でも LigM による脱メチルと gallate (GA) dioxygenase である DesB による環開裂を受け PCA 4,5-開裂経路に合流する経路が主要であることが示されている (Fig. VIII) (71)。

以上のように、SYK-6 株の VA/SA 代謝に関わる酵素遺伝子が同定・解析され、それらの詳細な機能が明らかにされてきた (68, 70-73, 105, 106, 244)。 VA/SA 代謝の転写制御については、代謝経路下流の PCA 4,5-開裂経路に関わる酵素遺伝子群の転写が、PCA および GA をエフェクターとする LysR 型転写制御因子である LigR によって正に制御されることが明らかとなっている (Fig. XIV) (180)。 しかし、SYK-6 株における VA/SA 代謝酵素遺伝子 *ligM*、および SA 代謝酵素遺伝子である *desA*、*desB* の転写制御システムは不明である。 以前、当研究室において *desB* の転写制御因子を同定するために *desB*

上流領域に結合するタンパク質の探索が行われ、MarR 型転写制御因子と相同性を示す *desR* (SLG_12870) および LysR 型転写制御因子と相同性を示す *desQ* (SLG_14170) が見出されている (Fig. XVI)。第 1 章では、SYK-6 株の VA/SA 代謝系遺伝子の転写制御システムを明らかにすることを目的として、*desA*、*ligM* および *desB* の転写制御への *desR* および *desQ* の関与を調査した。

第2節 結果

1. *Sphingobium* sp. SYK-6 株における vanillate および syringate 変換の誘導性

Sphingobium sp. SYK-6 株における vanillate (VA) および syringate (SA) の変換が誘導的であるかどうかを明らかにするため、非誘導条件または誘導条件で培養した SYK-6 株の休止菌体を用いて VA と SA の変換能を調べた。非誘導条件として 10 mM sucrose、10 mM glutamate、0.13 mM methionine、10 mM proline を含む Wx 培地 (Wx-SEMP)、誘導条件として 5 mM VA または SA を含む Wx-SEMP 培地 (Wx-SEMP + VA または Wx-SEMP + SA) で培養した SYK-6 株の休止菌体 ($OD_{600} = 5.0$) を調製し、200 μ M の VA または SA と反応させ、経時的に反応液をサンプリングし HPLC 分析を行った。その結果、両化合物の変換速度は非誘導条件と比較して VA または SA 存在下で培養した場合に有意に上昇した (Fig. 1-1)。VA および SA の 0–10 分間における変換速度は、SEMP と比較して VA 存在下で培養した場合に 6.5 倍と 3.2 倍に、SA 存在下で培養した場合に 6.9 倍と 3.6 倍にそれぞれ上昇することが示された (Table 1-1)。これらの結果から、SYK-6 株における VA および SA の変換は、VA と SA での培養時に誘導されることが明らかとなった。

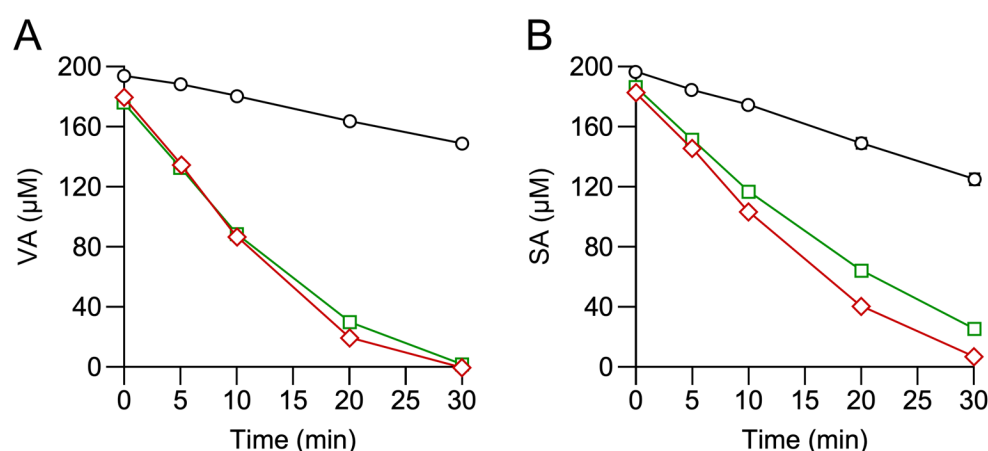


Fig. 1-1. SYK-6 株の休止細胞を用いた VA と SA の変換.

Wx-SEMP (○), Wx-SEMP + VA (□) および Wx-SEMP + SA (◇) 培地でそれぞれ培養した SYK-6 株の休止菌体 ($OD_{600} = 5.0$) を調製し、200 μ M の VA (A) または SA (B) と反応させた。経時的に反応上清をサンプリングし、HPLC を用いて基質の減少量を測定した。実験はそれぞれ 3 回ずつ行いその平均値を示した。エラーバーは標準偏差を示す。エラーバーはシンボルの後ろに隠れている。

Table 1-1. SYK-6 株の VA および SA の変換速度

Substrate	Culture conditions	Activity ($\mu\text{M}/\text{min}$) ^{a,b}	Fold change ^c
VA	Wx-SEMP	1.4	1.0
	Wx-SEMP + VA	8.7	6.5
	Wx-SEMP + SA	9.3	6.9
SA	Wx-SEMP	2.2	1.0
	Wx-SEMP + VA	7.0	3.2
	Wx-SEMP + SA	7.9	3.6

^a 反応 0–10 分間の変換速度を示す。

^b それぞれの値は 3 回測定した平均値を示す。

^c Wx-SEMP 培養時の値を 1.0 とした時の各誘導倍率を示す。

2. *desA*、*ligM* および *desB* の転写誘導性

当研究室で実施された SYK-6 株および *desR* 破壊株 ($\Delta desR$; Fig. 1-2A)を用いた解析から、*desA*、*ligM* および *desB* の転写制御の概要が示された (241)。しかし、定量的逆転写 PCR (qRT-PCR)解析による各遺伝子の発現量の評価が十分ではなかったため、本研究ではこれらについて再解析を行った。

Wx-SEMP、Wx-SEMP + VA および Wx-SEMP + SA で培養した SYK-6 株から total RNA を単離し、逆転写反応により cDNA を合成した。得られた cDNA と *desA*、*ligM* および *desB* の内部領域をそれぞれ増幅するプライマーペア (Table 1-3)を用いて qRT-PCR 解析を行い、各遺伝子の転写量を測定した。サンプル間の転写量を比較するための内部標準には 16S rRNA 遺伝子を用いた。その結果、*desA*、*ligM* および *desB* の転写量は、SEMP と比較して VA 存在下で培養した場合に 37 倍、17 倍、7.4 倍に、SA 存在下で培養した場合に 32 倍、12 倍、5.8 倍にそれぞれ増大することが示された (Fig. 1-3A)。したがって、これら遺伝子の転写は VA または SA 存在下で誘導されることが示された。

desA、*ligM* および *desB* の転写が VA と SA により誘導されるのか、あるいはそれらの中間代謝物で誘導されるのかを検証するために、VA または SA の中間代謝物である protocatechuate (PCA)、3-*O*-methylgallate (3MGA) および gallate (GA) 存在下 (5 mM)での培養時における各遺伝子の転写誘導性を調べた。Wx-SEMP + PCA、Wx-SEMP + 3MGA および Wx-SEMP + GA で培養した SYK-6 株から単離した total RNA を鋳型に cDNA を合成し、qRT-PCR 解析を行い各遺伝子の転写量を測定した。その結果、各遺伝子の転写量は SEMP と比較して 0.9–1.9 倍であり、顕著な誘導性は観察されなかった (Fig. 1-3A)。これらの結果から、VA と SA が *desA*、*ligM* および *desB* の誘導物質として機能することが強く示唆された。

VA または SA が真に *desA*、*ligM* および *desB* の誘導物質として機能するかを調べるために、両化合物の変換能 (脱メチル活性) を欠損した *desA ligM* 二重破壊株 (DDAM 株) (68) を用いてこれら遺伝子の qRT-PCR 解析を行った。Wx-SEMP、Wx-SEMP + VA および Wx-SEMP + SA 培地で培養した DDAM 株から単離した total RNA を用いて qRT-PCR 解析を行い、*desA*、*ligM* および *desB* の転写量を測定した。その結果、DDAM 株における *desA*、*ligM* および *desB* の転写量は SEMP と比較して VA 存在下で培養した場合にそれぞれ 18 倍、23 倍、13 倍に、SA 存在下で培養した場合にそれぞれ 46 倍、23 倍、13 倍に上昇し、いずれも野生株と同等以上に増大した (Fig. 1-3B)。以上の結果から、VA および SA が *desA*、*ligM* および *desB* の誘導物質として機能することが示され、SYK-6 株の VA と SA 変換の誘導は転写段階に依存することが明らかとなった。

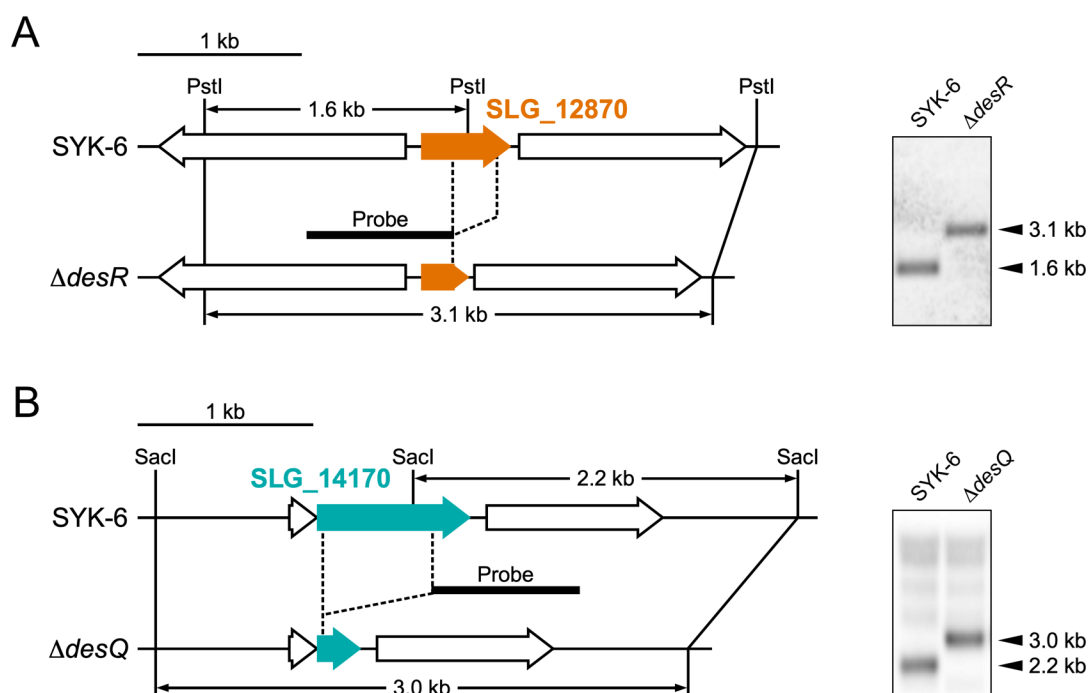


Fig. 1-2. SLG_12870 破壊株 ($\Delta desR$) および SLG_14170 破壊株 ($\Delta desQ$) の作製.

(A and B) 左側パネルは SYK-6 株における SLG_12870 (A) および SLG_14170 (B) の破壊の模式図を示す。右側パネルは SLG_12870 および SLG_14170 破壊株のサザンハイブリダイゼーション解析の結果を示す。digoxigenin 標識した各プローブ (左側パネルに黒いバーで示した) を用いて、SYK-6 株および $\Delta desR$ 株の total DNA PstI 消化物または SYK-6 株および $\Delta desQ$ 株の total DNA SacI 消化物に対するサザンハイブリダイゼーションを行った。 $\Delta desR$ 株および $\Delta desQ$ 株において、SLG_12870 では TTG から TAG まで全長 519 bp のうち 188–453 塩基、および SLG_14170 では GTG から TAG まで全長 888 bp のうち 33–667 塩基の領域がそれぞれ削除された。

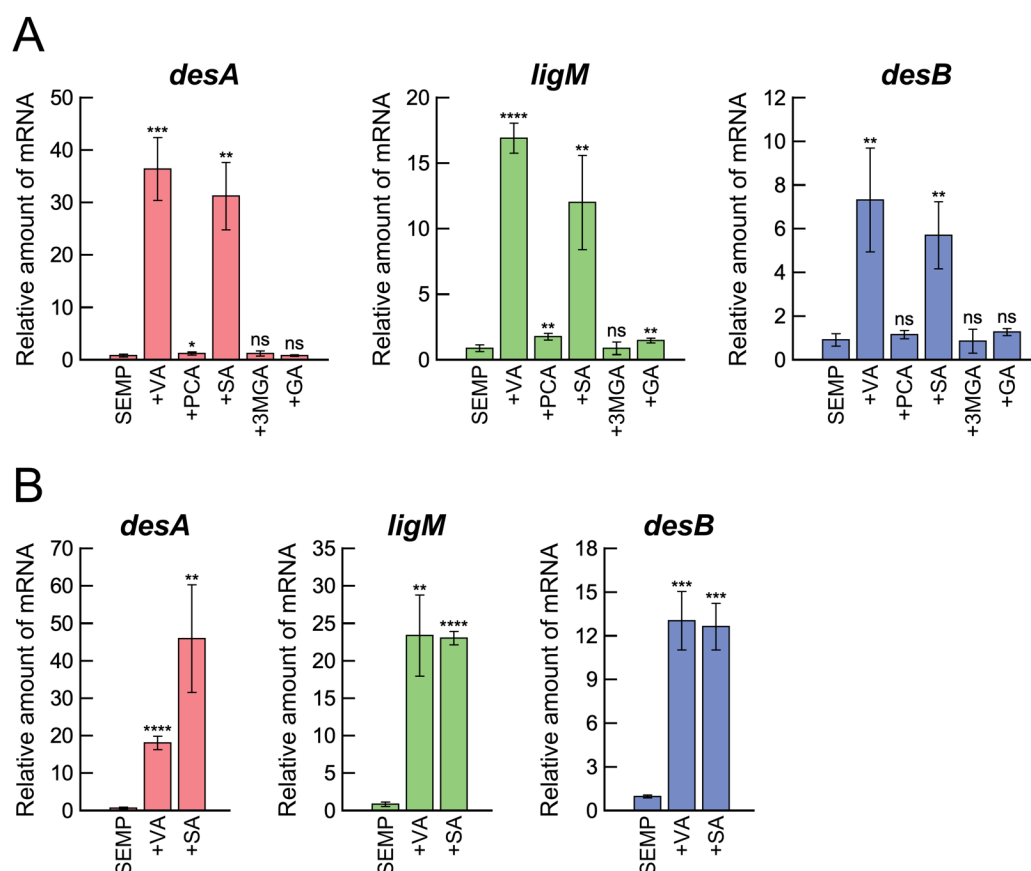


Fig. 1-3. SYK-6 株および DDAM 株における *desA*, *ligM* および *desB* の転写誘導性.

5 mM の VA, PCA, SA, 3MGA または GA の存在下/非存在下で培養した SYK-6 株 (A) および 5 mM の VA または SA の存在下/非存在下で培養した DDAM 株 (B) から total RNA を抽出し, qRT-PCR 解析により *desA*, *ligM* および *desB* の転写量を測定した. 各サンプル間の転写量を比較するための内部標準には SYK-6 株の 16S rRNA を用いた. Relative amount of mRNA は Wx-SEMP での mRNA 量を 1.0 とした場合の各培養条件の相対 mRNA 量を示す. 測定はそれぞれ 3 回ずつ行いその平均値を示した. エラーバーは標準偏差を示す. 統計処理は Student's *t* test を用いて行った. ns, $P > 0.05$; *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$; ****, $P < 0.0001$.

3. Vanillate/syringate 代謝系遺伝子群の転写制御因子の同定

当研究室で行われた *desB* 上流領域結合タンパク質の探索により、MarR 型転写制御因子および LysR 型転写制御因子とそれぞれ相同性を示す DesR (SLG_12870) と DesQ (SLG_14170) が *desB* 上流領域結合タンパク質の候補として見出された。DesR および DesQ の *desB* 上流領域への結合性を調べるため、野生株および当研究室で作製された $\Delta desR$ 株と *desQ* 破壊株 ($\Delta desQ$; Fig. 1-2B) (241) の細胞抽出液を用いて *desB* 上流領域に対する electrophoretic mobility shift assay (EMSA) を行った。Wx-SEMP、Wx-SEMP + VA および Wx-SEMP + SA 培地で培養した野生株、 $\Delta desR$ 株および $\Delta desQ$ 株からそれぞれ細胞抽出液を調製し、*desB* の開始コドンに対して -225 から +23 までの領域を含む *desBp1* プローブと反応させた (Fig. 1-4A)。その結果、野生株および $\Delta desQ$ 株の細胞抽出液を用いた場合、いずれの培養条件においても DNA-タンパク質複合体を示すシフトバンドが観察された (Fig. 1-4B)。一方 $\Delta desR$ 株においては、いずれの条件で培養した細胞抽出液を用いてもシフトバンドは観察されなかった (Fig. 1-4B)。したがって、DesR は *desB* 上流領域に結合することが示され、DesQ は同領域に結合しないことが示唆された。

desR および *desQ* の破壊が VA/SA 代謝に影響するかを調べるため、 $\Delta desR$ 株および $\Delta desQ$ 株の 5 mM VA または SA での生育能を野生株と比較した。その結果、 $\Delta desR$ 株の VA または SA での生育能は野生株と比較して有意に早くなったが、 $\Delta desQ$ 株の生育能は野生株と同等であった (Fig. 1-4C and D)。 $\Delta desR$ 株における VA/SA 生育能の変化が *desR* の破壊に起因するかを調べるため、pJB866 の P_m プロモーター制御下に *desR* の全長 519 bp を含む約 1.9 kb の DNA 断片を挿入した相補プラスミド pJBdR を作製し、pJBdR およびベクター (pJB866) をそれぞれ導入した $\Delta desR$ 株および野生株の VA 生育能を測定した。その結果、pJBdR を保持した $\Delta desR$ 株の VA 生育能はベクターを保持した $\Delta desR$ 株よりも遅延した (Fig. 1-4E)。同様に、pJBdR を保持した野生株においても VA 生育能の遅延が観察された (Fig. 1-4E)。これらのことから、 $\Delta desR$ 株における表現型の変化は *desR* の破壊に起因することが示された。以上の結果から、DesR は *desB* 上流領域に結合し、VA/SA 代謝系遺伝子の少なくとも一部を負に制御することが強く示唆された。一方、DesQ は VA/SA 代謝制御に関与しないことが示唆された。

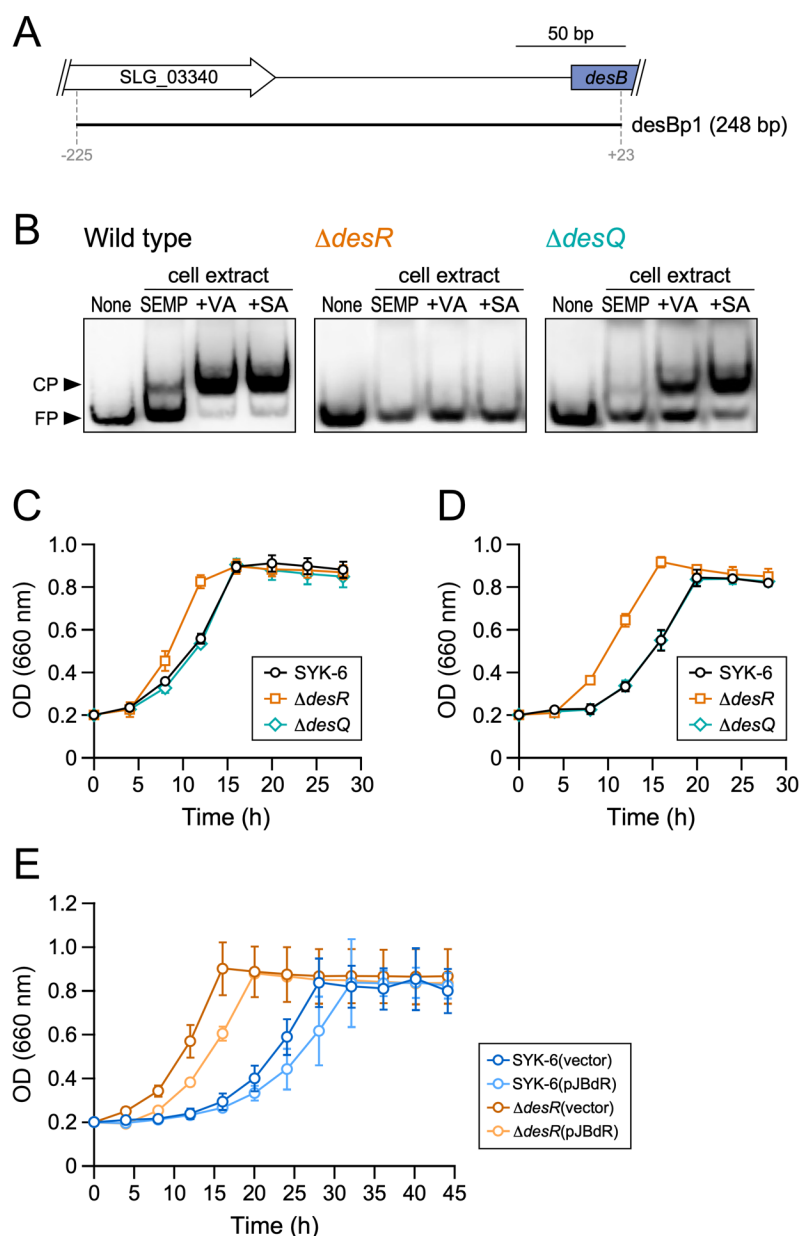


Fig. 1-4. *desB* 上流領域結合タンパク質の特性.

(A) *desB* 上流領域と EMSA に用いた DNA 断片. (B) SYK-6 株, $\Delta desR$ 株および $\Delta desQ$ 株の細胞抽出液を用いた *desB* 上流領域に対する EMSA. Wx-SEMP, Wx-SEMP+VA および Wx-SEMP+SA 培地でそれぞれ培養した SYK-6 株, $\Delta desR$ 株および $\Delta desQ$ 株から細胞抽出液を調製し, 細胞抽出液の非存在下 (None) または存在下 (4 μ g of protein) で 500 pM の digoxigenin 標識した *desBp1* プロープと 20°C で 20 分間反応させた. 反応液を 5% 非変性ポリアクリルアミドゲルにより分離し, シグナルを発光基質により検出した. CP, DNA-protein complex; FP, free probe. (C and D) $\Delta desR$ 株および $\Delta desQ$ 株の VA または SA での生育能. LB で前培養した SYK-6 株, $\Delta desR$ 株および $\Delta desQ$ 株を 5 mM VA (C) または 5 mM SA (D) を含む Wx 液体培地に植菌し, OD₆₆₀ の値を経時的に測定した. 測定はそれぞれ 3 回ずつ行いその平均値を示した. エラーバーは標準偏差を示す.

Fig. 1-4. -continued.

(E) *desR* 相補株の VA 生育能. pJB866 (vector) または pJBdR を保持した SYK-6 株および $\Delta desR$ 株を 5 mM VA を含む Wx 液体培地に植菌し, OD₆₆₀ の値を経時的に測定した. SYK-6(pJB866) と $\Delta desR$ (pJB866) の VA 生育能は pJB866 を保持しない株 (C) と比較して遅延したが, これは形質転換体の培地に加えた tetracycline の影響によるものと思われる. 測定はそれぞれ 3 回ずつ行いその平均値を示した. エラーバーは標準偏差を示す.

4. *desR* 破壊株および *desQ* 破壊株における *desA*、*ligM* および *desB* の転写誘導性

desR が VA/SA 代謝系遺伝子群の転写制御に関与するかどうかを調べるために、 $\Delta desR$ 株を用いて *desA*、*ligM* および *desB* の qRT-PCR 解析を行った。Wx-SEMP、Wx-SEMP + VA および Wx-SEMP + SA で培養した $\Delta desR$ 株から total RNA を単離し、逆転写反応により cDNA を合成した。得られた cDNA を用いて *desA*、*ligM* および *desB* の qRT-PCR 解析を行い、各遺伝子の転写量を測定し野生株の値と比較した。その結果、 $\Delta desR$ 株における非誘導時の *ligM* と *desB* の転写量は、野生株の非誘導時に比べそれぞれ 20 倍および 9.4 倍に高くなった (Fig. 1-5A)。また、 $\Delta desR$ 株における VA および SA 誘導時の *ligM* の転写量はそれぞれ 19 倍と 19 倍、*desB* の転写量はそれぞれ 7.7 倍と 9.5 倍に増大し、いずれも非誘導時と同等であった (Fig. 1-5A)。したがって、*ligM* と *desB* の転写は DesR によって負に制御されることが明らかとなり、この制御が *ligM* と *desB* の受ける唯一の制御であることが強く示唆された。一方、 $\Delta desR$ 株における非誘導時の *desA* の転写量は野生株の非誘導時と比較して 1.6 倍高かったが、野生株および $\Delta desR$ 株の VA または SA 誘導時の転写量を大きく下回った (Fig. 1-5A)。したがって、*desA* の転写は DesR とは異なる転写制御因子によって制御されることが示唆された。

同様に、 $\Delta desQ$ 株を用いて *desA*、*ligM* および *desB* の qRT-PCR 解析を行い、*desQ* がこれら遺伝子の転写制御に関与するかどうかを調べた。Wx-SEMP、Wx-5 mM VA および Wx-5 mM SA で培養した $\Delta desQ$ 株の total RNA を鋳型に合成した cDNA を用いて *desA*、*ligM* および *desB* の qRT-PCR 解析を行い、各遺伝子の転写量を野生株の値と比較した。その結果、 $\Delta desQ$ 株における非誘導時の *desA*、*ligM* および *desB* の転写量は、野生株の非誘導時の転写量と同等であった (Fig. 1-5B)。また、 $\Delta desQ$ 株において *desA*、*ligM* および *desB* の転写は VA または SA の存在下で野生株と同等に誘導された (Fig. 1-5B)。したがって、*desQ* の破壊は *desA*、*ligM* および *desB* の転写変動に影響せず、DesQ は VA/SA 代謝制御に関与しないと結論された。

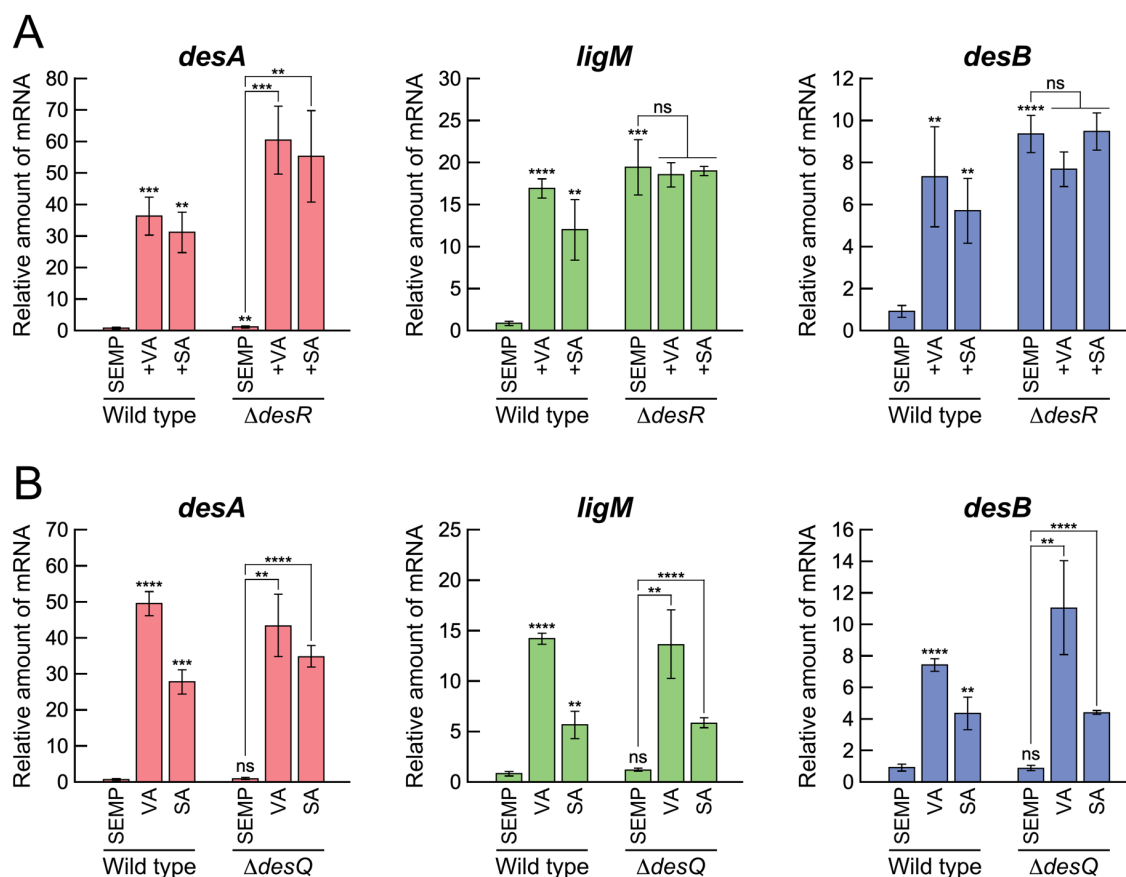


Fig. 1-5. $\Delta desR$ 株および $\Delta desQ$ 株における *desA*, *ligM* および *desB* の転写誘導性.

5 mM の VA または SA の存在下/非存在下で培養した $\Delta desR$ 株 (A) および $\Delta desQ$ 株 (B) の total RNA を用いて, qRT-PCR により *desA*, *ligM* および *desB* の転写量を測定し, それぞれ同条件で培養した野生株の値と比較した. 各サンプル間の転写量を比較するための内部標準には SYK-6 株の 16S rRNA を用いた. Relative amount of mRNA は SYK-6 株の Wx-SEMP での mRNA 量を 1.0 とした場合の各培養条件の相対 mRNA 量を示す. 測定はそれぞれ 3 回ずつ行いその平均値を示した. エラーバーは標準偏差を示す. 統計処理は Student's *t* test を用いて行った. ns, $P > 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$; ****, $P < 0.0001$.

5. *desR* の転写誘導性

desR の転写誘導性を評価するために, 野生株における *desR* の qRT-PCR 解析を行った. Wx-SEMP, Wx-SEMP+VA, Wx-SEMP+SA, Wx-SEMP+PCA, Wx-SEMP+3MGA または Wx-SEMP+GA で培養した SYK-6 株から total RNA を単離し, 逆転写反応により cDNA を合成した. 得られた cDNA と *desR* の内部領域を増幅するプライマーペア (Table 1-3) を用いて qRT-PCR 解析を行い, *desR* の転写量を測定した. サンプル間の転写量を比較するための内部標準には 16S rRNA 遺伝子を用いた. その結果, *desR* の転写量は SEMP と比較して VA および SA の存在下で培養した場合にそれぞれ 6.4 倍, 4.8 倍に増大し, PCA, 3MGA または GA の存在下で培養した場合は 0.9–1.3 倍であった (Fig. 1-

6A)。したがって、*desR* の転写は VA または SA の存在下で誘導されることが示された。また、VA および SA 変換能を欠く DDAM 株において *desR* の転写量は VA および SA の存在下で 5.7 倍および 5.1 倍に増大したことから (Fig. 1-6B)、VA および SA が *desR* の誘導物質として機能することが明らかとなった。

一般に、MarR 型転写制御因子は自身をコードする遺伝子の転写を負に制御することが知られている (199, 201)。*desR* が自身によって制御されているかどうかを調べるため、 $\Delta desR$ 株における *desR* の qRT-PCR 解析を行い、野生株の値と比較した。その結果、 $\Delta desR$ 株における非誘導時の *desR* の転写量は、野生株の非誘導時に比べ 4.5 倍高くなった (Fig. 1-6A)。また、 $\Delta desR$ 株における VA および SA 誘導時の *desR* の転写量は野生株の非誘導時の 4.9 倍と 4.5 倍に増大し、 $\Delta desR$ 株の非誘導時と同等であった (Fig. 1-6A)。以上の結果から、*desR* の転写は *ligM* および *desB* と同様に DesR によって負に制御されることが明らかとなった。

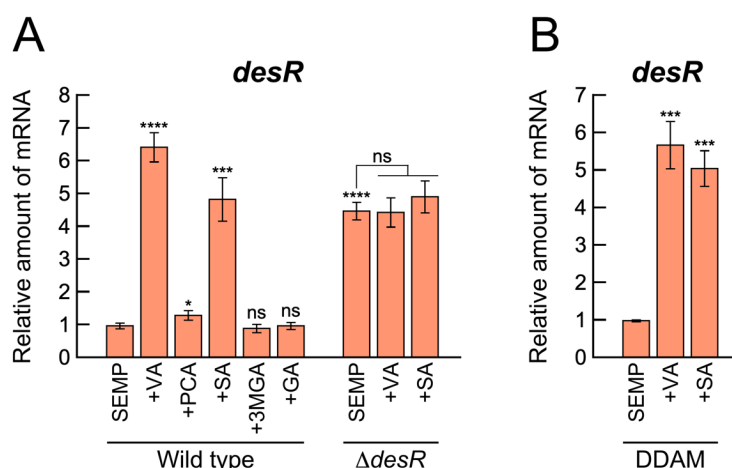


Fig. 1-6. SYK-6 株, $\Delta desR$ 株および DDAM 株における *desR* の転写誘導性.

5 mM の VA, PCA, SA, 3MGA または GA の存在下/非存在下で培養した SYK-6 株 (A) および 5 mM の VA または SA の存在下/非存在下で培養した $\Delta desR$ 株 (A) または DDAM 株 (B) から total RNA を抽出し、qRT-PCR 解析により *desR* の転写量を測定した。各サンプル間の転写量を比較するための内部標準には SYK-6 株の 16S rRNA を用いた。Relative amount of mRNA は SYK-6 株または DDAM 株の Wx-SEMP での mRNA 量を 1.0 とした場合の各培養条件の相対 mRNA 量を示す。測定はそれぞれ 3 回ずつ行いその平均値を示した。エラーバーは標準偏差を示す。統計処理は Student's *t* test を用いて行った。ns, $P > 0.05$; *, $P < 0.05$; ***, $P < 0.001$; ****, $P < 0.0001$ 。

6. *desB* および *ligM* のプロモーター領域の同定

当研究室で行われたプライマー伸長法による *desB* および *ligM* の転写開始点の同定により、*desB* の転写開始点は *desB* の開始コドンの 109 塩基上流に位置する A 残基であり、*ligM* の転写開始点は *ligM* の開始コドンの 68 塩基上流に位置する C 残基であることが明らかにされた (Fig. 1-7A and B) (131, 240)。さらに、両遺伝子の転写開始点上流には、大腸菌の σ^{70} 依存性プロモーター配列に保存されている-35 および-10 配列が見出されている (Fig. 1-7A and B)。そこで、推定された-35 および-10 配列が *desB* および *ligM* の転写に関与するかを調べるために、*desB* および *ligM* の上流領域についてプロモーター解析を行った。LacZ レポーターアッセイ用のプラスミドには、プロモータープロンプベクター pPR9TZ の *lacZ* 上流に *desB* 上流 205 bp を含む 663 bp の DNA 断片、または *ligM* 上流 323 bp を含む 506 bp の DNA 断片をそれぞれクローニングした pRDBX および pPLMBS を用いた (Fig. 1-7C and D)。各プラスミドを保持する SYK-6 株を Wx-SEMP、Wx-SEMP + VA または Wx-SEMP + SA で培養し、 β -galactosidase 活性を指標にプロモーター活性を測定した。その結果、ベクター導入株の β -galactosidase 活性はいずれの培養条件でも同等であったが、Wx-SEMP 培養した pRDBX または pPLMBS 導入株の β -galactosidase 活性は、同条件で培養したベクター導入株の値と比較して 2.3 倍と 9.4 倍にそれぞれ増大した (Fig. 1-7C and D)。さらに、pRDBX または pPLMBS 導入株の β -galactosidase 活性は、SEMP と比較して VA 存在下で培養した場合にそれぞれ 3.5 倍と 4.3 倍、SA 存在下で培養した場合に 3.1 倍と 3.2 倍に増大した (Fig. 1-7C and D)。したがって、*desB* および *ligM* の上流に VA/SA 誘導性のプロモーターが存在し、推定の-35 および-10 配列がプロモーターとして機能することが強く示唆された。

また、*desB* および *ligM* のプロモーター領域には 15 塩基からなる inverted repeat (IR) 配列の IR-B (5'-GTTTGTGTCACATAC-3' [下線は IR 部分を示す]) と IR-M (5'-GTTTGTGTAACATAC-3' [下線は IR 部分を示す]) がそれぞれ存在した (Fig. 1-7A and B)。IR-B は *desB* の転写開始点に対し+23 から+37 の位置に存在していた。一方、IR-M は *ligM* の転写開始点に対し-40 から-26 の領域に位置し、*ligM* プロモーター領域の-35 配列を覆うように存在していた。IR-B と IR-M は、15 塩基のうち 14 塩基が一致する高い相同性を示したことから、両 IR 配列が DesR の結合配列であると推測された。

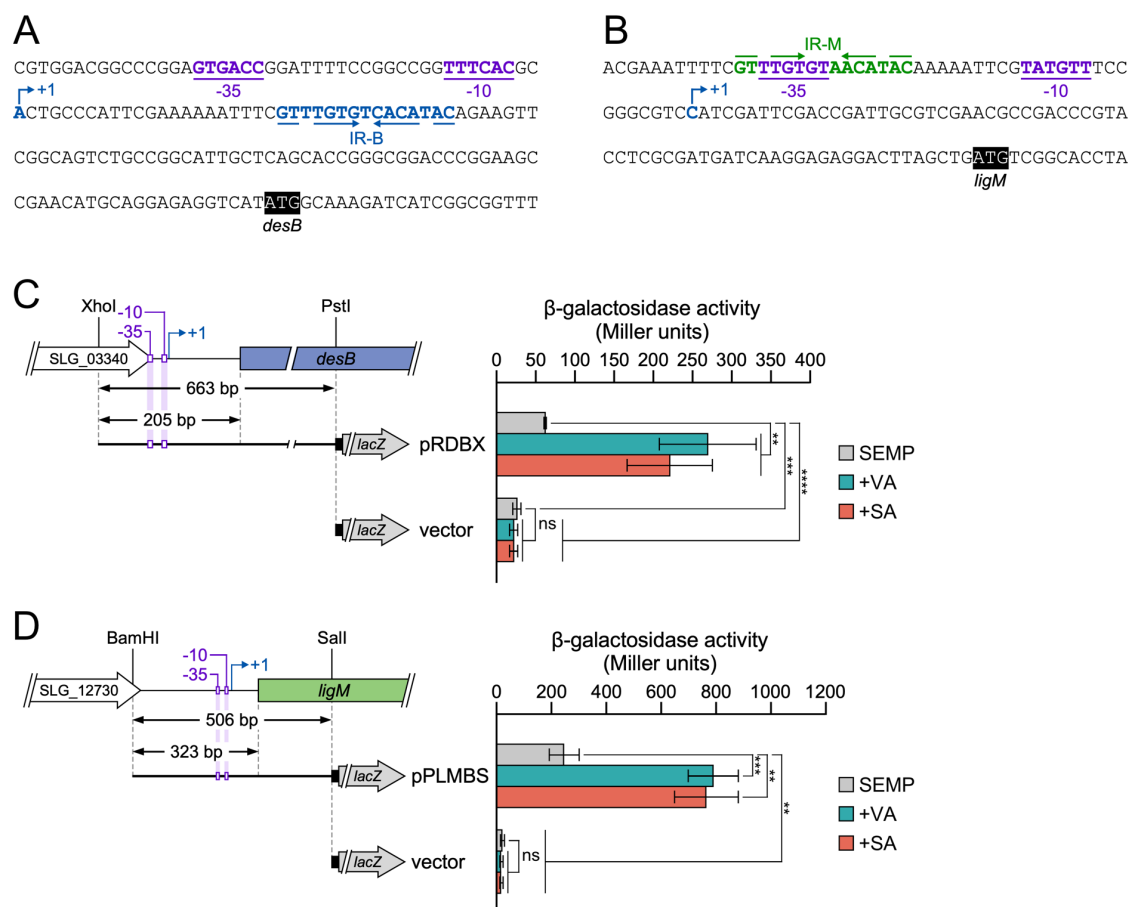


Fig. 1-7. *desB* および *ligM* のプロモーター領域の同定.

(A and B) *desB* (A) および *ligM* (B) のプロモーター領域の塩基配列. *desB* および *ligM* の開始コドンは黒四角に白字で示した. 転写開始点は青色矢印 (+1) で示した. 推定の -35/-10 配列は紫色の下線で示した. IR 配列である IR-B および IR-M はそれぞれ青色および緑色の矢印で示した. (C and D) *desB* (C) および *ligM* (D) のプロモーター解析. (左パネル) プロモーター解析に用いた DNA 領域. 黒いバーは pPR9TZ (vector) に挿入した DNA 断片を示す. *desB* および *ligM* の転写開始点は青色矢印 (+1) で示した. 推定の -35/-10 配列の位置は紫色の四角で示した. (右パネル) Wx-SEMP, Wx-SEMP + VA または Wx-SEMP + SA で培養した各レポータープラスミドを保持する SYK-6 株の β -galactosidase 活性. 測定はそれぞれ 3 回ずつ行いその平均値を示した. エラーバーは標準偏差を示す. 統計処理は Student's *t* test を用いて行った. ns, $P > 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$; ****, $P < 0.0001$.

7. *desR* の *E. coli* における発現と DesR の精製および分子量分析

精製 DesR を得るために、His タグを融合した *desR* を *E. coli* で発現させ、遺伝子産物の精製を行った。*desR* の全長を pCold I に挿入した pCIdR を *E. coli* BL21(DE3)株に導入し、*cspA* プロモーター制御下で His タグ融合 *desR* を発現させた。培養液から細胞抽出液を調製し SDS-PAGE で分離した結果、約 20 kDa を示すタンパク質の生産が観察された (Fig. 1-8A)。このサイズは、His タグ融合した DesR の推定アミノ酸配列から予測された理論分子量 (21,522) に近似していた。さらに、Co アフィニティークロマトグラフィーにより DesR がほぼ単一に精製されたことが示された (Fig. 1-8A)。

DesR の溶液中における多量体構造を明らかにするため、精製 DesR を用いてゲルろ過クロマトグラフィーを行った。その結果、溶出容量 20 ml にピークが観察され (Fig. 1-8B)、分子量マーカーとの比較から DesR の分子量は 42.2 kDa と見積もられた (Fig. 1-8C)。His タグ融合 DesR 単量体の理論分子量が 21,522 であることから、DesR は溶液中で homodimer を形成していることが強く示唆された。この特徴は、これまで報告されている他の MarR 型転写制御因子と一致している (199, 201, 202)。

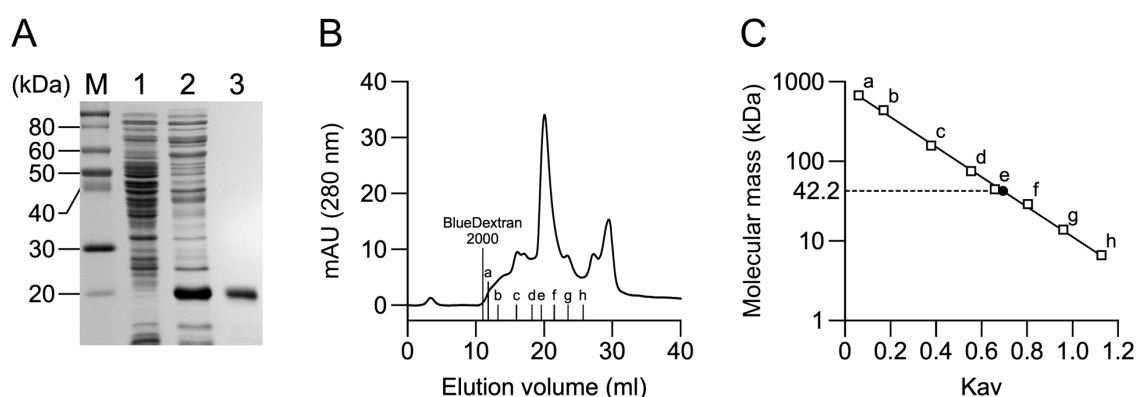


Fig. 1-8. *E. coli* BL21(DE3)株における *desR* の発現と DesR の精製および分子量分析.

(A) *E. coli* BL21(DE3)株における *desR* の発現と Co アフィニティークロマトグラフィーによる DesR の精製. SDS-12% PAGE によって 10 μ g または 1 μ g のタンパク質を分離し、クーマシーブルーリアントブルーによって染色した. Lanes: M, 分子量マーカー; 1, pCold I (vector)を保持した *E. coli* BL21(DE3)株の細胞抽出液 (10 μ g protein); 2, pCIdR を保持した *E. coli* BL21(DE3)株の細胞抽出液 (10 μ g protein); 3, His spin trap TALON により精製した DesR (1.0 μ g protein). (B) 精製 DesR のゲルろ過クロマトグラフィー. カラムに Superdex 200 increase 10/300 GL を用いて、10 mM リン酸 (pH 7.4)と 140 mM NaCl 存在下において DesR の分子量を測定した. カラムの排除体積は Blue Dextran 2000 の保持時間より求めた. 標準タンパク質は thyroglobulin (a, 669 kDa), ferritin (b, 440 kDa), aldolase (c, 158 kDa), conalbumin (d, 75.0 kDa), ovalbumin (e, 44.0 kDa), carbonic anhydrase (f, 29.0 kDa), ribonuclease A (g, 13.7 kDa)および aprotinin (h, 6.5 kDa)を用いた. (C) DesR の分子量の推定. 検量線は標準タンパク質を用いて作製した. DesR の推定分子量は黒丸で示した.

8. *desB*、*ligM* および *desA* 上流領域への DesR の結合能

一般に、MarR 型転写制御因子は、制御される遺伝子のプロモーター領域に存在する IR 配列を認識して DNA に結合する (199, 201, 202)。*desB* および *ligM* のプロモーター領域には、互いに相同性を示す IR-B と IR-M がそれぞれ存在した (Fig. 1-7A and B)。そこで、DesR が *desB* および *ligM* のプロモーター領域に結合するかどうかを調べるため、EMSA を行った。*desB* および *ligM* の上流領域を段階的に含む DNA 断片 [desBp1–desBp4 (Fig. 1-9A)、ligMp1–ligMp4 (Fig. 1-9B)] をそれぞれ digoxigenin 標識し、精製 DesR とインキュベートした。その結果、*desB* プロモーター領域においては、IR-B を含む desBp1、desBp2 および desBp3 プローブで DNA-DesR 複合体を示すシフトバンドの形成が観察されたが、IR-B を含まない desBp4 プローブではシフトバンドは形成されなかった (Fig. 1-9A)。これらの結果から、DesR は *desB* 上流領域に結合することが示され、その結合には IR-B が重要であると示唆された。さらに、*ligM* プロモーター領域においては、IR-M を含む ligMp1 および ligMp2 プローブで DNA-DesR 複合体を示すシフトバンドの形成が観察され、IR-M を含まない ligMp3 および ligMp4 プローブではシフトバンドは形成されなかった (Fig. 1-9B)。これらの結果から、DesR は *ligM* 上流領域に結合することが示され、その結合には IR-M が重要であると示唆された。次に、DesR が *desA* の上流領域に結合するかどうかを調べるために、*desA* の内部から上流領域について約 1.7 kb の範囲をカバーする desAp1–desAp5 (Fig. 1-9C) をプローブに用いて EMSA を行った。その結果、いずれのプローブにおいても DNA-DesR 複合体を示すシフトバンドは形成されず (Fig. 1-9C)、DesR は *desA* 上流領域に結合しないことが示された。また、desAp1–desAp5 プローブがカバーする約 1.7 kb の領域には IR-B および IR-M と相同性を示す配列は存在しなかった。qRT-PCR 解析において *desA* の転写には *desR* 破壊の影響が観察されなかったことと合わせて (Fig. 1-5A)、DesR は *desA* の転写制御に関与しないことが支持された。

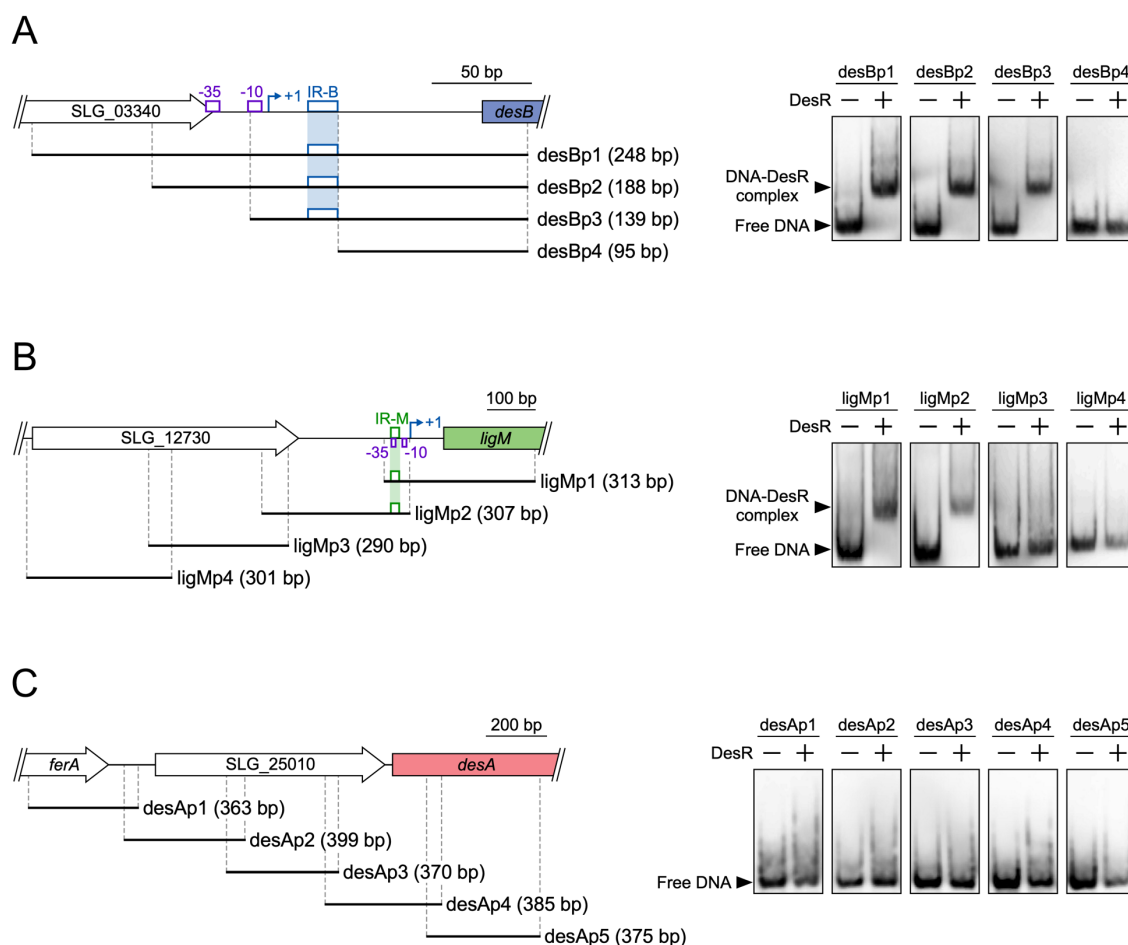


Fig. 1-9. *desB*, *ligM* および *desA* 上流領域における DesR の結合解析.

(A–C) 左側パネルは *desB* (A), *ligM* (B) および *desA* (C) のそれぞれの上流領域と EMSA に用いた DNA 断片を示す. *desB* および *ligM* の転写開始点は青色矢印 (+1) で, -35/-10 配列は紫色の四角でそれぞれ示した. IR-B および IR-M は青色と緑色の四角でそれぞれ示した. 右側パネルは各 DNA プローブに対する DesR の EMSA の結果を示す. DesR の非存在下 (-) または存在下 (+, 240 nM) で 500 pM の digoxigenin 標識した desBp1–desBp4 プローブ, ligMp1–ligMp4 プローブまたは desAp1–desAp5 プローブと 20°C で 20 分間反応させた. 反応液を 5% 非変性ポリアクリルアミドゲルにより分離し, シグナルを発光基質により検出した.

9. *desR* 上流領域への DesR の結合能

DesR が *desR* 上流領域に結合するかどうかを調べるために、*desR* と SLG_12860 の遺伝子間領域を含む 317 bp の *desRp1* プローブを作製し (Fig. 1-10A)、DesR の *desRp1* プローブへの結合性を EMSA で解析した。その結果、DesR 存在下において DNA-DesR 複合体を示すシフトバンドの形成が観察され、DesR が *desR* 上流領域に結合することが明らかとなった (Fig. 1-10B)。*desR* の開始コドンに対し-76 から-62 の位置には、IR-B および IR-M と相同性を示す IR-R (5'-GTATGCTACGCTTAC-3' [下線は IR 部分を示す]) が存在した (Fig. 1-10C and D)。したがって、DesR は IR-R を認識して *desR* 上流に結合することが示唆された。

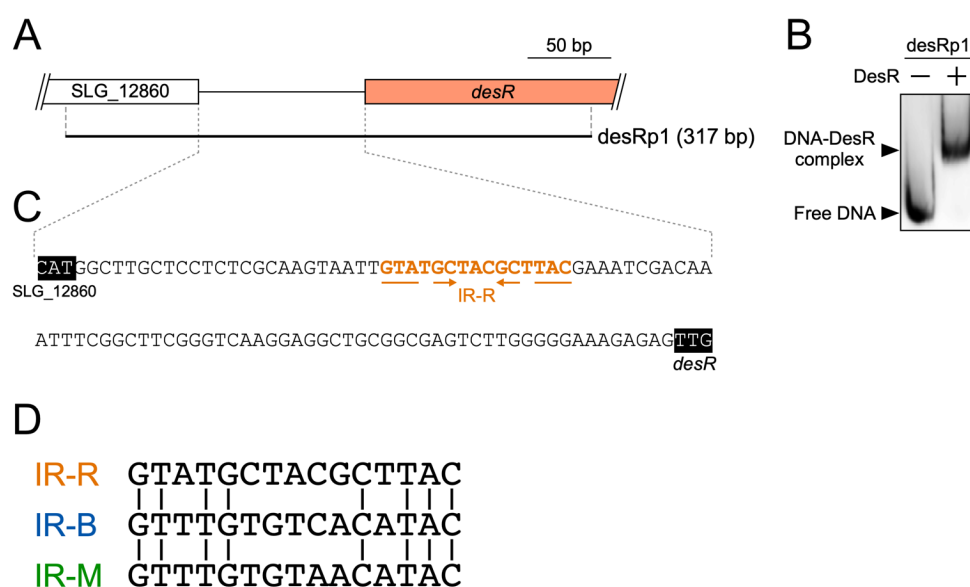


Fig. 1-10. *desR* 上流領域における DesR の結合解析.

(A) *desR* の上流領域と EMSA に用いた DNA 断片. (B) *desRp1* プローブに対する DesR の EMSA. DesR の非存在下 (-)または存在下 (+, 240 nM)で 500 pM の digoxigenin 標識した *desRp1* プローブと 20°C で 20 分間反応させた. 反応液を 5%非変性ポリアクリルアミドゲルにより分離し、シグナルを発光基質により検出した. (C) SLG_12860-*desR* 遺伝子間領域の塩基配列. SLG_12860 と *desR* の開始コドンは黒四角に白字で示す. IR 配列 (IR-R)はオレンジの矢印で示す. (D) IR-R, IR-B および IR-M の塩基配列の比較. 保存されている塩基は垂直線で示す.

10. 変異 IR 配列に対する DesR の結合能

DesR が結合する *desB* および *ligM* のプロモーター領域、そして *desR* の上流領域には、DesR の結合に重要な配列と考えられる IR-B、IR-M および IR-R がそれぞれ見出された (Fig. 1-10D)。これら IR 配列が DesR の DNA 結合に必須かどうかを明らかにするために、変異を導入したそれぞれの IR 配列を含むプローブ DNA に対する DesR の結合性を調べた。*desB* プロモーター領域において、IR-B を DNA の 3' および 5' 末端にそれぞれ有する *desBp5* および *desBp6* プローブを作製し EMSA を行った (Fig. 1-11A)。その結果、両プローブにおいて DNA-DesR 複合体を示すシフトバンドが形成された (Fig. 1-11A)。Fig. 1-11A に示すように *desBp5* と *desBp6* プローブ中の IR-B の 5' 側に 2 塩基 (m2nt)、3 塩基 (m3nt) または 6 塩基 (m6nt) の変異を導入したプローブ DNA を調製し、DesR との結合性を調べた。その結果、IR-B への変異塩基数が多いほどシフトバンドの形成が阻害された (Fig. 1-11A)。*ligM* プロモーター領域においても IR-M を DNA の 3' および 5' 末端にそれぞれ有する *ligMp5* および *ligMp6* プローブを作製し、DesR との結合性を調べた (Fig. 1-11B)。その結果、両プローブにおいて DNA-DesR 複合体を示すシフトバンドの形成が確認された (Fig. 1-11B)。*ligMp5* と *ligMp6* の配列中に存在する IR-M へ変異を導入したプローブ DNA を調製し、DesR との結合性を調べた。その結果、IR-M への変異塩基数が増加するほどシフトバンドの形成が阻害された (Fig. 1-11B)。*desR* 上流領域において、IR-R を 5' 末端に含む *desRp2* プローブと *desRp2* の IR-R に 5 塩基 (m5nt) の変異を導入したプローブ DNA を作製し、DesR との結合性を調べた (Fig. 1-11C)。その結果、IR-R に変異を導入した場合に DNA-DesR 複合体を示すシフトバンドの減少が観察された (Fig. 1-11C)。以上の結果から、IR-B、IR-M および IR-R が DesR の DNA 結合に必須であることが明らかとなった。

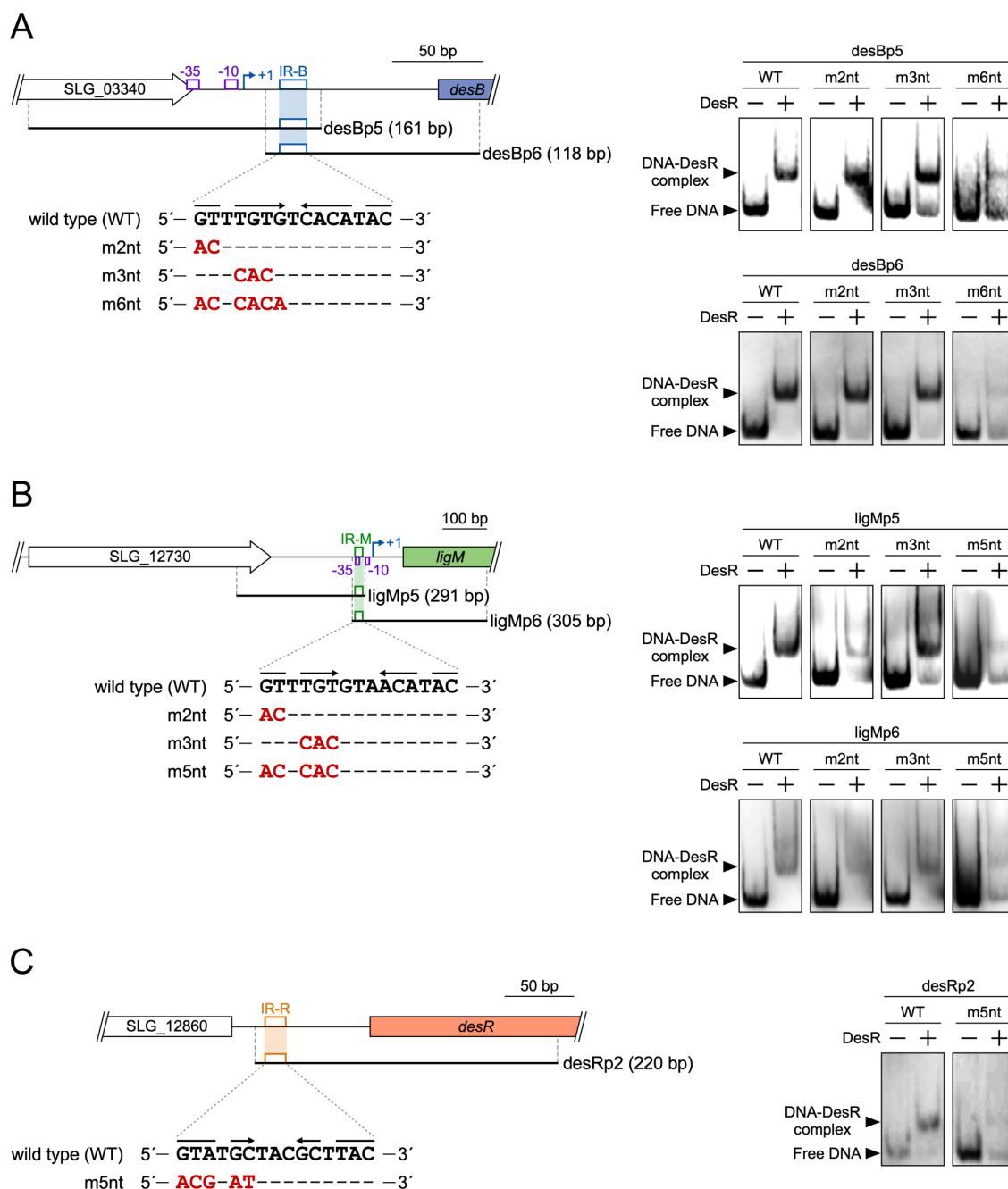


Fig. 1-11. *desB*, *ligM* および *desR* の上流領域における IR 配列の変異解析.

(A–C) 左側パネルは *desB* (A), *ligM* (B) および *desR* (C) のそれぞれの上流領域と EMSA に用いた変異 IR 配列を含む DNA 断片を示す. *desB* および *ligM* の転写開始点は青色矢印 (+1) で, -35/-10 配列は紫色の四角でそれぞれ示す. IR-B, IR-M および IR-R は青色, 緑色およびオレンジの四角でそれぞれ示す. 各 IR 配列に導入した変異塩基は赤字で示す. 右側パネルは各 DNA プローブに対する DesR の EMSA の結果を示す. DesR の非存在下 (-) または存在下 (+, 240 nM) で 500 pM の digoxigenin 標識した各 DNA プローブと 20°C で 20 分間反応させた. 反応液を 5% 非変性ポリアクリルアミドゲルにより分離し, シグナルを発光基質により検出した. 特定のプローブにおいて, DesR の存在下でシフトバンドの強度は未知の理由で弱かった.

11. DesR のエフェクター分子の同定

qRT-PCR 解析により、VA と SA が *desB*、*ligM* および *desR* の誘導物質であることが示された (Fig. 1-3B and 1-6B)。そこで、VA および SA が DesR の DNA 結合能に影響を与えるかどうかを調べるため、VA または SA 存在下での DesR の *desB* と *ligM* プロモーター領域および *desR* 上流領域に対する結合性を EMSA で解析した。その結果、いずれのプローブ DNA を用いた場合でも VA 存在下では濃度依存的に DNA-DesR 複合体を示すシフトバンドが減少し、50 mM の VA 存在下でシフトバンドが完全に消失した (Fig. 1-12)。一方 SA では、VA と同様に濃度依存的にシフトバンドの減少が観察されたが、DesR の DNA 結合に及ぼす影響は VA と比較して弱かった (Fig. 1-12)。これらのことから、VA と SA は DesR のエフェクター分子として機能し、DesR による *desB*、*ligM* および *desR* の転写抑制を解除することが明らかとなった。また、DesR に対する VA と SA の親和性は異なることが推測された。

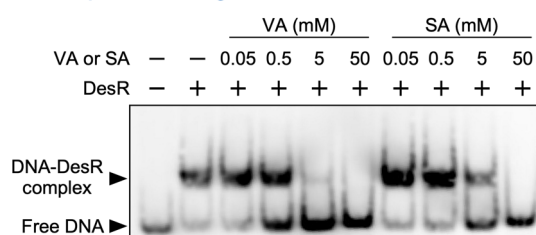
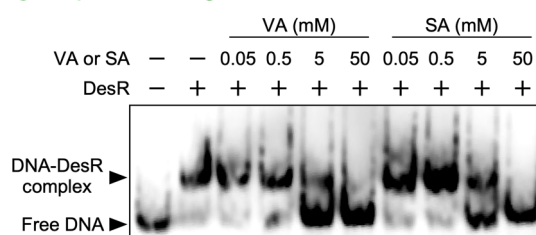
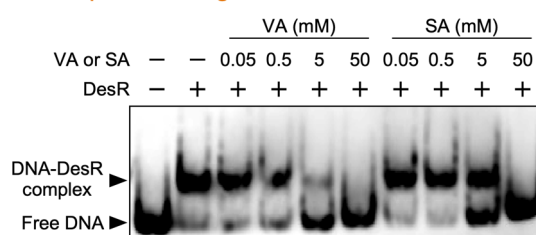
desB upstream region*ligM* upstream region*desR* upstream region

Fig. 1-12. VA または SA 存在下における DesR の DNA 結合解析.

VA または SA の非存在下 (—)/存在下 (0.05, 0.5, 5, or 50 mM)にて, DesR (24 nM)と *desB* (desBp2), *ligM* (ligMp1)または *desR* (desRp1)の上流領域を含む各 DNA プローブ (500 pM)を 20°C で 20 分間反応させた. 反応液を 5%非変性ポリアクリルアミドゲルにより分離し, シグナルを発光基質により検出した.

第3節 考察

第1章では、*desB* 上流領域結合タンパク質として同定された DesR が、*ligM* および *desB* の転写制御因子であることを明らかにした。一方、DesR と同様に *desB* 上流領域結合タンパク質として同定された DesQ は VA/SA 代謝制御に関与しないと結論された。qRT-PCR 解析および EMSA から、DesR は *ligM* および *desB* プロモーター領域に結合することで両遺伝子の転写を負に制御し、VA または SA が DesR に結合することでその抑制が解除されることが示された (Fig. 1-5, 1-9 and 1-12)。DesR が DNA に結合する際の認識配列となる IR-M は *ligM* の転写開始点に対し-40 から-26 の位置に、また IR-B は *desB* の転写開始点に対し+23 から+37 の位置にそれぞれ存在している (Fig. 1-7A and B)。IR-M は-35 配列を覆うように位置していたことから、*ligM* プロモーター領域において DesR は RNA ポリメラーゼ (RNAP) の結合を妨げると考えられる。一方、IR-B は *desB* の転写開始点下流に位置しているため、*desB* プロモーター領域において DesR は RNAP の DNA 上の進行を妨害し、転写伸長を阻害すると推測される。*E. coli* K-12 株において 4-hydroxyphenylacetate 代謝系遺伝子群 (*hpaGEDFHI*) を制御する MarR 型転写制御因子 HpaR は、*hpaR-hpaG* 遺伝子間領域の 2 つの結合サイト (OPR1 および OPR2) に結合し、*hpaG* オペロンと *hpaR* 自身のリプレッサーとして機能する (245)。OPR2 は *hpaR* の転写開始点に対し+34 から+60 の位置に存在しており、HpaR は OPR2 に結合することで *hpaR* プロモーター上で RNAP の転写伸長を阻害すると考えられている (245)。転写開始点と転写制御因子の結合位置の関係性から、DesR による *desB* の転写抑制は HpaR の *hpaR* 自身の転写抑制と類似のメカニズムで行われると考えられる。一方、HpaR は *hpaG* プロモーター上に-10 配列と *hpaG* の転写開始点を覆うように存在する OPR1 にも結合し、ループ構造を形成して *hpa* 遺伝子群の転写を抑制すると考えられている (245)。しかし、*desB* 上流領域には IR-B と相同性を示す配列は他に存在しなかった。したがって、DesR はループ構造を形成せず、RNAP による転写伸長を阻害することで *desB* の転写を抑制していると考えられる。qRT-PCR 解析から、*desR* の転写は DesR 自身によって抑制され、誘導物質である VA または SA の存在下でその抑制が解除されることが明らかとなった (Fig. 1-6)。また、DesR は IR-B および IR-M と相同性を示す IR-R を認識して *desR* 上流領域に結合することが示された (Fig. 1-10 and 1-11C)。

バクテリアの芳香族化合物代謝を制御する MarR 型転写制御因子の多くは、低分子フェノール化合物をエフェクター分子として認識することでその DNA 結合が解除される (200, 202)。*Streptomyces coelicolor* A3(2) の PCA 代謝を制御する PcaV は、構造の類似する 5 つの化合物 (PCA, 3,5-dihydroxybenzoate, 3-hydroxybenzoate, 4-hydroxybenzoate, 2,5-dihydroxybenzoate) をエフェクター分子として認識し、これら化合物に対する解離定数は

0.67–147 μM と大きく異なる (193)。また、*E. coli* K-12 株の HpaR は 4-hydroxyphenylacetate, 3-hydroxyphenylacetate, 3,4-dihydroxyphenylacetate をエフェクター分子として認識し、SYK-6 株の FerC は feruloyl-coenzyme A (CoA), sinapoyl-CoA, *p*-coumaroyl-CoA を認識することが報告されている (175, 245)。SYK-6 株において、DesR は VA と SA をエフェクター分子として認識するが、両者で DesR の DNA 結合を阻害する濃度に違いがあり、VA の方が SA よりも DesR に対する親和性が高いと推測された (Fig. 1-12)。SYK-6 株は 5 mM VA または SA を単一炭素源として生育した場合、対数増殖期に入る時間がそれぞれ 10 時間および 14 時間であり、VA と比較して SA を炭素源とした場合、約 4 時間の遅延が認められた (Fig. 1-4C and D)。一方、 ΔdesR 株における VA/SA 生育時の対数増殖期に入る時間は両基質ともに約 8 時間であり、VA と SA でほとんど差異は観察されなかった (Fig. 1-4C and D)。したがって、DesR の VA と SA に対する親和性の違いが、SYK-6 株の VA と SA での対数増殖期が開始する時間の違いに影響している可能性が考えられる。

本研究の結果から、SYK-6 株の VA/SA 代謝と転写制御の関係は次のように考えられる。VA 代謝においては、はじめに VA が DesR に結合することで *ligM* オペロンの転写抑制が解除され、LigM により VA が PCA へと変換される (Fig. 1-13)。PCA は LigR のエフェクター分子であるため (180)、生成した PCA と結合した LigR が PCA 4,5-開裂酵素遺伝子群の転写を活性化し、PCA が代謝され TCA サイクルに流入する (Fig. 1-13)。SA 代謝においては、はじめに未同定の因子に制御されている *desA* の転写が SA により誘導され、DesA により SA が 3MGA へと変換される (Fig. 1-13)。SA 存在下では DesR の脱抑制が起こり *ligM* と *desB* の転写が同時に誘導されるため、3MGA は LigM により脱メチルを受け GA に変換され、DesB による GA の環開裂の後、PCA 4,5-開裂経路へと流入する (Fig. 1-13)。GA は LigR のエフェクター分子であるため (180)、GA と結合した LigR は PCA 4,5-開裂酵素遺伝子群の転写を活性化し、代謝が進行する。SA 代謝は 3MGA で 3 つの経路に分岐するが、PCA 4,5-開裂経路が働くには LigR のエフェクター分子である GA の生成が必須である (180)。したがって、SA 代謝において *ligM* オペロンの転写誘導は下流代謝経路遺伝子を誘導する上でも必須のプロセスと言える。また、VA および SA 存在下では *desR* の転写が誘導されるため (Fig. 1-6)、細胞内 DesR 濃度が VA/SA 代謝酵素とともに増大することから、VA/SA が培地から消失すると瞬時に *ligM* および *desB* の転写が抑えられると推定される。

SYK-6 株の LigM および DesA による脱メチルにおいて、VA と SA の methoxy 基の methyl 部分は H₄folate に転移し 5-methyl-H₄folate が生成する (Fig. XI)。SYK-6 株において 5-methyl-H₄folate は、5,10-methylene-H₄folate reductase (MetF)、5,10-methylene-H₄folate dehydrogenase/5,10-methylene-H₄folate cyclohydrolase (FolD) と 10-formyl-H₄folate synthetase

(LigH)が関与する C₁ 代謝を経由し、核酸やアミノ酸の合成系に接続している (Fig. XI) (23, 124, 132)。ligM は metF および ligH とともに ligM-metF-ligH オペロンを構成しているため (23)、本オペロンの発現は SYK-6 株の生育において必須と言える。ligM の発現が DesR によって制御される事実から、DesR はリグニン由来芳香族化合物の資化だけでなく C₁ 代謝を制御するという重要な役割を有していると考えられる。SYK-6 株は、methoxy 基を持たない PCA を唯一の炭素源として生育する場合に methionine 要求性を示すことから (70)、5-methyl-H₄folate の生成は VA および SA の脱メチル過程に依存していると考えられている。一方でその他の栄養要求性が見られないことから、5,10-methylene-H₄folate は serine hydroxymethyltransferase (GlyA)により serine から生成し、Fold による酸化を受けて 10-formyl-H₄folate を生産できると考えられている。

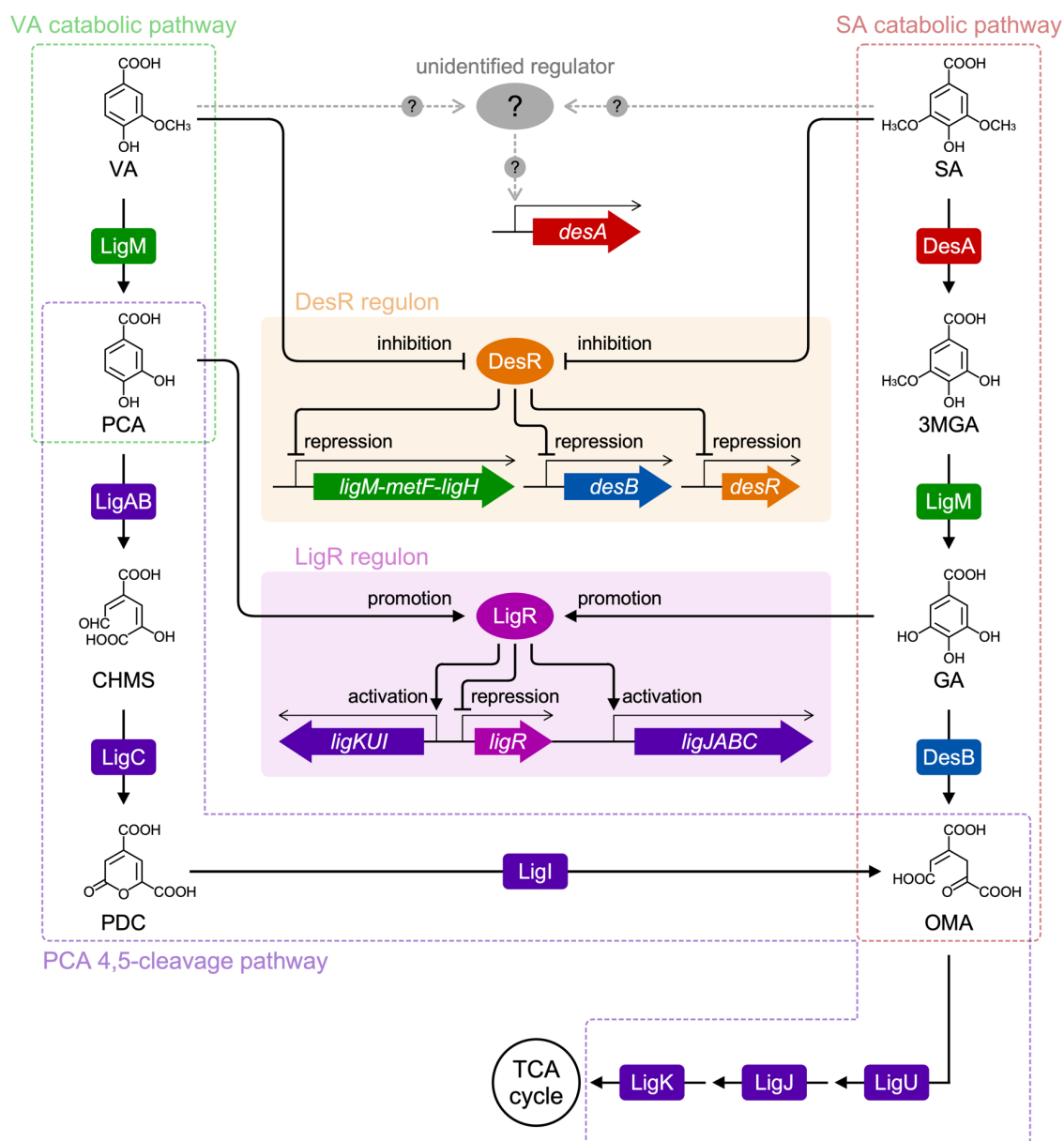


Fig. 1-13. *Spingobium* sp. SYK-6 株における VA/SA 代謝とその転写制御システム.

DesR による *desB*, *ligM* および *desR* の転写制御, および LigR による PCA 4,5-開裂酵素遺伝子群の転写制御については考察の項目で詳細を述べた. DesR regulon: *ligM-metF-ligH* オペロン, *desB*, and *desR*. LigR regulon: *ligJABC* オペロン, *ligKUI* オペロン, and *ligR*.

Novosphingobium aromaticivorans DSM 12444 株は、SYK-6 株と類似した VA 代謝系を有している。DSM 12444 株において VA は、SYK-6 株の LigM と 78% のアミノ酸配列相同性を示す Saro_2861 遺伝子産物 (LigM_{NA}) によって PCA へと変換された後、PCA 4,5-開裂経路により代謝されると考えられている (Fig. 1-14) (81, 109)。DSM 12444 株のゲノム中には、SYK-6 株の DesR と 51% のアミノ酸配列相同性を示す Saro_0803 が見出されたため (Fig. 1-14)、ligM_{NA} の転写は Saro_0803 遺伝子産物によって制御されているのかもしれない。*Agrobacterium fabrum* C58 株における VA から PCA の変換には、SYK-6 株の LigM と 56% のアミノ酸配列相同性を示す Atu1420 が関与することが示されている (246)。また、C58 株の VA 脱メチル反応で生じた 5-methyl-H₄folate は、SYK-6 株の MetF と 29% のアミノ酸配列相同性を示す Atu1418 によって 5,10-methylene-H₄folate に変換されると考えられている。ごく最近、C58 株の *atu1418* および *atu1420* の転写は GntR 型転写制御因子と相同性を示す Atu1419 によって負に制御されることが報告された (179)。Atu1419 は、*C. crescentus* CB15N 株、*Acinetobacter* sp. ADP1 株および *P. putida* KT2440 株の GntR 型転写制御因子である VanR とそれぞれ 34%、31% および 39% のアミノ酸配列相同性を示した。一方、C58 株のゲノム中には SYK-6 株の *desR* と相同性を示す遺伝子は存在しなかった。以上のことから、LigM ホモログが関与する VA 代謝系を有するこれらバクテリアにおいて、代謝酵素遺伝子とその制御遺伝子の組み合わせは一定ではないことが示された。バクテリアの芳香族代謝において、代謝系と制御系遺伝子はそれぞれ独立して進化してきたことが提唱されており (247, 248)、LigM の制御システムも例外ではないと考えられる。

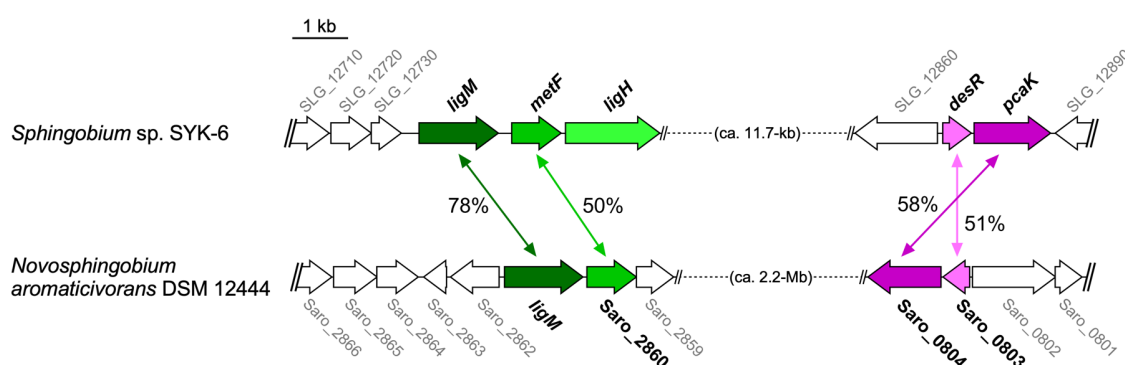


Fig. 1-14. *Sphingobium* sp. SYK-6 株と *N. aromaticivorans* DSM 12444 株における *ligM* および *desR* 周辺領域の遺伝子構成の比較。

アミノ酸配列相同性を示す遺伝子は両矢印で示した。各数字は対応する遺伝子のアミノ酸配列相同性を EMBOSS Needle pairwise alignment program で算出したものを示す。

qRT-PCR 解析および EMSA から、*desR* の破壊は *desA* の転写誘導性に影響を与えず (Fig. 1-5A)、DesR は *desA* 上流領域に結合しなかったため (Fig. 1-9C)、DesR は *desA* の転写制御に関与しないことが明らかとなった。また、DesQ も *desA* の転写制御に関与しないことが示された (Fig. 1-5B)。一方で、*desA* の転写は *ligM* および *desB* と同様に VA または SA の存在下で顕著に誘導されたため (Fig. 1-3)、*desA* の発現は転写段階で調節を受けることが示された。これらのことから、SYK-6 株における *desA* の転写は未同定の転写制御因子によって制御されることが強く示唆された (Fig. 1-13)。

第4節 材料と方法

試供菌、プラスミド、プライマー、培養条件

第1章で使用した菌株とプラスミドは Table 1-2 に、そして PCR に使用したプライマーは Table 1-3 にそれぞれ示した。培地には栄養培地として lysogeny broth (LB) 培地 (10 g/l Bacto Tryptone, 5 g/l Yeast Extract, 5 g/l NaCl)、および無機塩培地として Wx 培地 (Table 1-4) (175) を用いた。Wx 培地には必要に応じて、5 mM の vanillate (VA)、protocatechuate (PCA)、syringate (SA)、3-*O*-methylgallate (3MGA)、gallate (GA) または SEMP (10 mM sucrose, 10 mM glutamate, 0.13 mM methionine, 10 mM proline) を添加し使用した。固体培地に加える寒天の濃度は 15 g/l とした。振盪培養における振盪速度は L 字試験管での培養が 160 rpm、バッフル付きフラスコでの培養が 120 rpm または 200 rpm とした。*Sphingobium* sp. SYK-6 株とその遺伝子破壊株は 30°C で好気条件下にて培養した。必要に応じて、SYK-6 株とその遺伝子破壊株の培地には 300 mg/l の carbenicillin (Cb)、50 mg/l の kanamycin (Km)、12.5 mg/l の tetracycline (Tc) または 12.5 mg/l の nalidixic acid (Nal) を添加した。*Escherichia coli* NEB 10-beta 株はクローニング実験に、*E. coli* BL21(DE3) 株はタンパク質の高生産に用いた。*E. coli* は 30°C または 37°C で好気条件下にて培養した。*E. coli* の形質転換体の選択培地には 100 mg/l の ampicillin (Ap) または 25 mg/l の Km を添加した。

試薬、基質、酵素、および遺伝子操作

各種試薬および酵素は、FUJIFIM Wako Pure Chemical Corporation、Takara Bio Inc.、Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.、Nacalai Tesque Inc.、Toyobo Co., Ltd.、Nippon Gene、Sigma-Aldrich Co. LLC.、New England Biolabs. Inc.、Roche Diagnostics K.K.、Promega Corporation、QIAGEN、Thermo Fischer Scientific, Inc. および Fluorochem Ltd. から購入し付属の取り扱い説明書に従って使用した。基本的な遺伝子操作は、Molecular cloning A Laboratory Manual 4th edition およびバイオ実験イラストレイテッド第2巻 (秀潤社) に従った。VA、PCA、SA および GA は、Tokyo Chemical Industry Co., Ltd. または Sigma-Aldrich Co. LLC. から購入した。3MGA は Fluorochem Ltd. から購入した。VA、PCA および SA は 0.5 M の濃度で pH 7.0–8.0 となるように 1–2N NaOH aq. を用いてそれぞれ溶解し、-20°C で保存した。3MGA および GA は 1M の濃度となるように 100% の dimethyl sulfoxide (DMSO) にそれぞれ溶解し、-20°C で保存した。

Table 1-2. 第 1 章で使した菌株およびプラスミド

Strain or plasmid	Relevant characteristic(s) ^a	Reference or source
<i>Sphingobium</i> sp.		
SYK-6	Wild type; Nal ^r Sm ^r	(45)
DDAM (SME021)	SYK-6 derivative; <i>ligM::bla desA::kan</i> ; Nal ^r Sm ^r Cb ^r Km ^r	(68)
$\Delta desR$ (SME047)	SYK-6 derivative; ΔSLG_12870 (<i>desR</i>); Nal ^r Sm ^r	(241)
$\Delta desQ$ (SME058)	SYK-6 derivative; ΔSLG_14170 (<i>desQ</i>); Nal ^r Sm ^r	(241)
<i>E. coli</i>		
NEB 10-beta	$\Delta(ara-leu)$ 7697 <i>araD139 fhuA $\Delta lacX74$ galK16 galE15 e14-$\phi 80$dlacZΔM15 recA1 relA1 endA1 nupG rpsL</i> (Sm ^r) <i>rph spoT1 $\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)$</i>	New England Biolabs
BL21(DE3)	F ⁻ <i>ompT hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻) gal dcm</i> (DE3); T7 RNA polymerase gene under control of the <i>lacUV5</i> promoter	(249)
Plasmids		
pT7Blue	Cloning vector; T7 promoter; Ap ^r	Novagen
pBluescript II KS(+)	Cloning vector; Ap ^r	(250)
pColdI	Expression vector; <i>cspA</i> promoter; Ap ^r	Takara Bio
pJB866	RK2 broad-host-range expression vector; Tc ^r P _m <i>xylS</i>	(251)
pPR9TT	Translational fusion LacZ reporter vector; Ap ^r Cm ^r	(252)
pQF50	Broad-host-range transcriptional fusion vector containing a promoterless <i>lacZ</i> ; Ap ^r	(253)
pPR9TZ	pPR9TT with a 3.6-kb <i>Sma</i> I- <i>Sca</i> I fragment containing <i>lacZ</i> from pQF50 replacing the 3.2-kb <i>Bam</i> HI fragment	(180)
pJBdR	pJB866 with a 1.9-kb PCR amplified <i>Hind</i> III- <i>Eco</i> RI fragment carrying <i>desR</i>	This study
pEVXH	KS(+) with a 3.1-kb <i>Xho</i> I- <i>Eco</i> RV fragment carrying <i>desB</i>	(71)
pRDBX	pPR9TZ with a 0.7-kb <i>Xho</i> I- <i>Pst</i> I fragment carrying the <i>desB</i> promoter region from pEVXH	This study
pBSM4.7	KS(+) with a 4.7-kb <i>Sma</i> I fragment carrying <i>ligM</i>	(68)
pPLMBB	pPR9TZ with a 1.0-kb <i>Bam</i> HI fragment carrying the <i>ligM</i> promoter region from pBSM4.7	This study
pPLMBS	0.5-kb <i>Sal</i> I deletion of <i>ligM</i> intragenic region of pPLMBB	This study
pT1542	pT7Blue with a 0.5-kb PCR amplified fragment carrying <i>desR</i>	This study
pCIdR	pColdI with a 0.5-kb <i>Nde</i> I- <i>Bam</i> HI fragment carrying <i>desR</i> from pT1542	This study

^aNal^r, Sm^r, Cb^r, Km^r, Ap^r, Tc^r, and Cm^r, resistance to nalidixic acid, streptomycin, carbenicillin, kanamycin, ampicillin, tetracycline, and chloramphenicol, respectively.

Table 1-3. 第 1 章で使したプライマーの塩基配列

Purposes	Primers	Sequences (5' to 3')
qRT-PCR analysis	16S_F	GCGCAGAACCTTACCAACGT
	16S_R	AGCCATGCAGCACCTGTCA
	desA_F	GCCTTCGCCTTCCTCAACTA
	desA_R	CACCGGAACCCACTGCTT
	ligM_F	ACGTACTGCTTCGCCTTGTG
	ligM_R	GCTCTCCGACACGATGATCA
	desB_F	TTTCGAGCATTATTCGCATTTC
	desB_R	TCCGCAGGCGAATATTCCT
	desR_F	TTGGAAGCAAGAGATAGACAGCAT
	desR_R	TCGTCCGCGCATTCAAG
Gene complementation	12870_T_F	CGAAGCTTAGATTTCATAGAGGCACAC (HindIII)
	12870_B_R	CGAATTCAGCGAGCGATTGATCTTCTC (EcoRI)
Protein expression	desR_NdeI_F	AAGACATATGGAAGCAAGAGATAG (NdeI)
	desR_NdeI_R	AATCTATTCGTGGATACGGC
EMSAs	desBp1_F	GCCGTTCCCTCTCAGGC
	desBp2_F	ACAGAGCTTGCCGTG
	desBp3_F	TTCACGCACTGCCCATTCTG
	desBp4_F	AGAAGTTCGGCAGTCTGC
	desBp_R	AAACCGCCGATGATCTTTGC
	ligMp1_F	GGGGCACGAAATTTTCGTTTG
	ligMp1_R	GTCGACCATGTGGTGGGT
	ligMp2_F	ATGGACGAGGGCTTCACG
	ligMp2_R	ACGCCCCGAAACATACGAAT
	ligMp3_F	TCGACGACAATCCCTCGG
	ligMp3_R	ATCCTTGCCATCCCAGCC
	ligMp4_F	AGAGGACGCAGGCATGAAC
	ligMp4_R	ATAGCCCACCCGGTCGAT
	desAp1_F	CTGCAGGATGTGCGCC
	desAp1_R	GTGAATGCCAGCCCCAAA
	desAp2_F	GCATGACCTTTCAATTGTGCG
	desAp2_R	AAGTGAATGCCGGTGCTGAT
	desAp3_F	AGATCATTCGCCGCGCA
	desAp3_R	ATGGCTTCATGCTGCACC
	desAp4_F	ACCGGCGCCGATGATGC
	desAp4_R	TGGTTGAAGAGCACGGCGG
	desAp5_F	AACTGGCGCAACGAGCA
	desAp5_R	CTGCAGCTGGAAGCGATAGT
	desRp1_F	ACCAGGTTTCGGAATGTCGCA
	desRp1_R	GGAAGCCGATGATGTCGTCG
	desBp5_IR-B_R	GAACCTTCTGTATGTGACACAAACGAAATTTT
	desBp5_IR-B_m2nt_R	GAACCTTCTGTATGTGACACAAGTGAAATTTT
	desBp5_IR-B_m3nt_R	GAACCTTCTGTATGTGACGTGAACGAAATTTT
	desBp5_IR-B_m6nt_R	GAACCTTCTGTATGTGATGTGAGTGAAATTTT
	desBp6_IR-B_F	AAAATTTTCGTTTGTGTACATACAGAAGTTC
	desBp6_IR-B_m2nt_F	AAAATTTTCACTTGTGTACATACAGAAGTTC
	desBp6_IR-B_m3nt_F	AAAATTTTCGTTTACGTACATACAGAAGTTC
	desBp6_IR-B_m6nt_F	AAAATTTTCACTCACATCACATACAGAAGTTC
	ligMp5_IR-M_R	GAATTTTGTATGTTACACAAACGAAATTTT
	ligMp5_IR-M_m2nt_R	GAATTTTGTATGTTACACAAGTGAAATTTT
	ligMp5_IR-M_m3nt_R	GAATTTTGTATGTTACGTGAACGAAATTTT
	ligMp5_IR-M_m5nt_R	GAATTTTGTATGTTACGTGAGTGAAATTTT
	ligMp6_IR-M_F	AAATTTTCGTTTGTGTAACATACAAAAATTC
	ligMp6_IR-M_m2nt_F	AAATTTTCACTTGTGTAACATACAAAAATTC
	ligMp6_IR-M_m3nt_F	AAATTTTCGTTTACGTAAACATACAAAAATTC
	ligMp6_IR-M_m5nt_F	AAATTTTCACTCACGTAAACATACAAAAATTC
	desRp2_IR-R_F	AAGTAATTGTATGCTACGCTTACGAAATCGA
	desRp2_IR-R_m5nt_F	AAGTAATTACGTATTACGCTTACGAAATCGA

Table 1-4. Wx 培地の組成 (per liter)

Wx medium	Solution I	100 ml
	Solution II	10 ml
Solution I	KH ₂ PO ₄	17.0 g
	Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	98.0 g
	(NH ₄) ₂ SO ₄	10.0 g
Solution II	MgSO ₄ ·7H ₂ O	10.0 g
	FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.5 g
	SSS	100 ml
Stock salt solution (SSS)	MgO	10.75 g
	CaCO ₃	2.00 g
	FeSO ₄ ·7H ₂ O	4.50 g
	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	1.44 g
	MnSO ₄ ·4H ₂ O	1.12 g
	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.25 g
	CoSO ₄ ·7H ₂ O	0.28 g
	H ₃ BO ₃	0.06 g
	12N HCl	51.3 ml

SYK-6 株の休止細胞を用いた vanillate および syringate の変換実験

SYK-6 株を LB 培地で 24 時間前培養した。培養液を集菌した後、菌体を Wx buffer (Wx 培地から Solution II を除いたもの [see Table 1-4]) で 2 回洗浄し、同 buffer に懸濁した。OD₆₀₀ = 0.2 となるように 30 ml の Wx-SEMP 培地に植菌し、30°C で OD₆₀₀ = 0.5–0.6 になるまで培養した。その後、誘導条件では VA または SA を終濃度 5 mM になるように添加し、6 時間培養した (細胞は対数増殖期にあり約半分の VA または SA が培地中から消費された状態である)。非誘導条件においては、OD₆₀₀ = 0.5–0.6 になった後、さらに 2 時間培養した (細胞は対数増殖期にある)。培養液を集菌した後、菌体を 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5) で 2 回洗浄および懸濁し、休止細胞とした。得られた休止細胞を OD₆₀₀ = 5.0 になるように同 buffer に懸濁し、終濃度 200 μM の VA または SA を加え、300 μl の反応系にて 30°C、1,500 rpm の往復振盪で 30 min 反応を行った。経時的に 50 μl の培養液をサンプリングし (0, 5, 10, 20, and 30 min)、5 min 遠心分離して菌体を除去し反応を停止した。反応上清を 30 μl 回収し蒸留水で 10 倍に希釈した後、「HPLC 分析」に記載した方法で分析を行った。

HPLC 分析

「SYK-6 株の休止細胞を用いた vanillate および syringate の変換実験」で調製した反応液を孔径 0.20 μm のフィルター (Millex-LG, Millipore) を用いてろ過した後、High-performance liquid chromatography [HPLC; ACQUITY ultraperformance liquid chromatography (UPLC) system; Waters] により分析した。カラムには TSKgel ODS-140HTP column (2.1 by 100 mm; Tosoh) を使用し、移動相は 0.1% の formic acid を含む acetonitrile 10% と water 90% の組成で流速 0.5 ml/min とした。VA および SA の検出波長は、それぞれ 260.3 nm および 274.4 nm とした。

SYK-6 株および遺伝子破壊株の細胞抽出液の調製

SYK-6 株、 $\Delta desR$ 株および $\Delta desQ$ 株を LB 培地で 24 時間前培養した。培養液を集菌した後、菌体を Wx buffer で 2 回洗浄および懸濁した。OD₆₀₀ = 0.2 となるように 100 ml の Wx-SEMP 培地に植菌し、30°C で OD₆₀₀ = 0.5–0.6 になるまで培養した。その後、誘導条件では VA または SA を終濃度 5 mM になるように添加し、6 時間培養した。非誘導条件においては、OD₆₀₀ = 0.5–0.6 になった後、さらに 2 時間培養した。培養液を集菌した後、菌体を 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5) で 2 回洗浄し、同 buffer に懸濁した。超音波破碎装置 (UD-201; Tomy Seiko) により細胞を破碎し、19,000 × g、15 min、4°C で遠心分離を行った。上清を回収し、終濃度 0.1% (wt/vol) となるように streptomycin 溶液を加え混和し、19,000 × g、15 min、4°C で遠心分離を行い夾雑 DNA を除去した。上清を細胞抽出液として回収し、以下に示す「Bradford 法によるタンパク質の定量」に従い全タンパク質濃度を測定した。

Bradford 法によるタンパク質の定量

タンパク質の定量は Bradford 法 (254) で行った。方法はプロテインアッセイ CBB 溶液 (Nacalai Tesque Inc.) に付属の説明書に従い、分光光度計 (V630-BIO; Jasco) を用いて測定した。標準タンパク質にはウシ血清アルブミン溶液 (Nacalai Tesque Inc.) を用いた。

total RNA の単離

SYK-6 株、DDAM 株、 $\Delta desR$ 株および $\Delta desQ$ 株を LB 培地で 24 時間前培養した。培養液を集菌した後、菌体を Wx buffer で 2 回洗浄および懸濁した。SYK-6 株、DDAM 株および $\Delta desR$ 株は、OD₆₀₀ = 0.2 となるように 10 ml の Wx-SEMP 培地に植菌し、30°C で OD₆₀₀ = 0.5–0.6 になるまで培養した。その後、誘導条件では VA、PCA、SA、3MGA または GA を終濃度 5 mM になるように添加し、VA、SA および 3MGA においては 6 時間、PCA および GA においては 2 時間培養した。非誘導条件においては、OD₆₀₀ = 0.5–0.6 になった後、さらに 2 時間培養した。 $\Delta desQ$ 株 (および比較対象とする SYK-6 株) は Wx buffer で懸濁後、OD₆₀₀ = 0.2 となるように 10 ml の Wx-SEMP 培地、Wx-5 mM VA 培地、Wx-5 mM SA 培地にそれぞれ植菌し、30°C で OD₆₀₀ = 0.5–0.6 になるまで培養した。

培養液を集菌した後、illustra RNAspin Mini RNA Isolation Kit (GE Healthcare) を用いて total RNA を単離した。total RNA に対して DNase I (Takara Bio) を用いた DNA 分解処理を行った後、phenol-chloroform 抽出および ethanol 沈殿処理による分解 DNA の除去操作を 2 回行い、最終的に 10–20 μ l の diethylpyrocarbonate-treated water に溶解した。以上の操作はすべて手袋とマスクを装着して行った。得られた total RNA の純度は V630-BIO を用いて測定し、濃度は蛍光光度計 (Quantus™ Fluorometer; Promega) にて QuantiFluor® RNA System (Promega) を用いて測定した。

逆転写反応による cDNA の調製

逆転写反応による complementary DNA (cDNA) の調製の操作方法は、PrimeScript II 1st strand cDNA Synthesis Kit (Takara Bio) の取扱説明書に従った。単離した 1 μ g の total RNA、キットに付属の 50 mM Random 6 mers、10 mM dNTP Mixture を含む全量を 10 μ l とし、65°C で 5 min 保温

した後、氷上で急冷させた。さらに、5×Primescript Buffer、40 U/μl RNase Inhibitor、200 U/μl 逆転写酵素 (PrimeScript reverse transcriptase)を加えて全量を 20 μl とし混和した後、逆転写反応を行った。反応は 30°C で 10 min 保温した後、42°C で 30 min 保温することで行った。各サンプルについて、逆転写酵素を含まないネガティブコントロールも調製し、ゲノム DNA が混入していないことを確認した。得られた cDNA は NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (Takara Bio)キットを用いて精製し、30 μl の Elution buffer NE (5 mM Tris-HCl, pH8.5)にて溶出した。

定量的逆転写 PCR (qRT-PCR)解析

SYK-6 株、DDAM 株および $\Delta desR$ 株の qRT-PCR 解析は、cDNA を鋳型とし、Fast SYBR Green master mix (Applied Biosystems)と StepOne real-time PCR system (Applied Biosystems)を用いて行った。基本的な操作方法是取扱説明書に従って行った。リアルタイム PCR に用いたプライマーは、すべて付属のソフトウェア (Primer Express version 2.0; Applied Biosystems)を用いて設計した (Table 1-3)。PCR 反応は 2 μl の cDNA 溶液、2 μl の 9 μM プライマーおよび 10 μl の SYBR Green PCR master mix を含む全量 20 μl とした。反応液を調製後、3,000 rpm で 1 min 常温遠心して気泡を除去するとともに反応液を well の底に集約した。リアルタイム PCR 反応の蛍光モニタリングは StepOne real-time PCR detector を用いて行った。サイクルコンディションは、95°C-15 sec、60°C-1 min を 40 サイクルとし、反応後 60°C から 95°C まで 1°C/min の速度で徐々に温度を上昇させて増幅産物の融解曲線 (melting curve)を作製した。

$\Delta desQ$ 株 (および比較対象とする SYK-6 株)の qRT-PCR 解析は、cDNA を鋳型とし、Thunderbird SYBR qPCR mixture (Toyobo Co., Ltd.)と LightCycler 480 System II (Roche Diagnostics K.K.)を用いて行った。基本的な操作方法是取扱説明書に従って行った。リアルタイム PCR に用いたプライマーは、すべて Primer Express version 2.0 software program (Applied Biosystems)を用いて設計した (Table 2-3)。PCR 反応は 2 μl の cDNA 溶液、10 pmol の遺伝子特異的プライマーおよび 10 μl の Thunderbird SYBR qPCR mixture を含む全量 20 μl とした。反応液を調製後、3,000 rpm で 1 min 常温遠心して気泡を除去するとともに反応液を well の底に集約した。リアルタイム PCR 反応の蛍光モニタリングは LightCycler 480 System II を用いて行った。サイクルコンディションは、95°C-3 sec、60°C-30 sec を 40 サイクルとし、反応後 60°C から 95°C まで 2°C/min の速度で徐々に温度を上昇させて増幅産物の融解曲線 (melting curve)を作製し、増幅の特異性を検証した。

各サンプルの転写量を比較するためのハウスキーピング遺伝子として SYK-6 株の 16S rRNA を用いた。DDAM 株および $\Delta desR$ 株において *desA*、*ligM* および *desR* を増幅するために、DDAM 株および $\Delta desR$ 株にそれぞれ残ったこれら遺伝子の 5'領域を増幅するように特定のプライマーを設計した。各 mRNA および 16S rRNA の量は、標準 DNA を使用して測定した。

生育試験

SYK-6 株、 $\Delta desR$ 株および $\Delta desQ$ 株を 10 ml の LB 培地で 24 時間培養した。培養液を集菌した後、Wx buffer で 2 回洗浄し、1 ml の Wx buffer に懸濁した。得られた菌体は、5 mM の VA または SA を含む 5 ml の Wx 培地に OD₆₆₀=0.2 となるように植菌した。菌体の生育能は、TVS062CA

bio-photorecorder (Advantec Co., Ltd.)を用いて 30°C で 60 rpm の速度で振盪し、OD₆₆₀ を継時的に測定することで調べた。

total DNA の回収

SYK-6 株を NaI を含む LB 培地で 12 時間培養し、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 (pH 8.0; 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl) 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 60 分間静置した。さらに終濃度が 0.2 g/l となるように proteinase K を加えて軽く混合し、37°C で 60 分間静置した。その後、終濃度が 0.5% となるように 10% SDS を混合し、65°C で 60 分間静置して溶菌させた。phenol-chloroform 処理後に isopropanol 沈殿を行い total DNA を回収した。Total DNA を含む沈殿物は、RNase A を含む TE buffer に溶解し、37°C にて 1 時間 RNA 消化を行い、total DNA 試料とした。Total DNA 試料は 4°C で保存した。

desR 相補株の生育試験

desR 相補用プラスミドを作製するため、SYK-6 株の total DNA を鋳型に Table 1-3 に示した 12870_T_F および 12870_B_R を用いて PCR を行い、*desR* の全長を含む約 1.9 kb の増幅産物を得た。*desR* を含む DNA 断片を pJB866 の HindIII-EcoRI サイトに挿入し、pJBdR を作製した。pJB866 および pJBdR を SYK-6 株または $\Delta desR$ 株に以下に示す「エレクトロポレーション法によるプラスミド DNA の導入」に従ってそれぞれ導入し *desR* 相補株を得た。

SYK-6(pJB866 または pJBdR)株および $\Delta desR$ (pJB866 または pJBdR)株をそれぞれ Tc を含む 10 ml の LB 培地で 24 時間培養した。培養液を集菌した後、Wx buffer で 2 回洗浄し、1 ml の Wx buffer に懸濁した。得られた菌体は、Tc および *P_m* プロモーターの誘導物質として 1 mM の *m*-toluate を含む 5 mM の VA を添加した 5 ml の Wx 培地に OD₆₆₀ = 0.2 となるように植菌した。相補株の生育能は、TVS062CA を用いて 30°C で 60 rpm の速度で振盪し、OD₆₆₀ を継時的に測定することで調べた。

エレクトロポレーション法によるプラスミド DNA の導入

NaI を含む 10 ml の LB 培地で SYK-6 株またはその遺伝子破壊株を 24 時間前培養し、10 ml の同培地に 2% 植菌して OD₆₆₀ = 0.5 になるまで培養した。培養液を集菌した後、菌体を 1 ml の 0.5 M sucrose で 2 回洗浄し、300 μ l の同溶液に懸濁した。100 μ l の菌体懸濁液にプラスミド DNA を約 1 μ g/ μ l となるように加え、Gene pulser (Bio-Rad Laboratories, Inc.)を用いて抵抗 200 Ω 、電圧 2.5 kV、静電容量 25 μ F の条件でパルスをかけた。パルス後、直ちに 1 ml の SOC 培地を加えて 30°C で 4 時間振盪培養した。培養後、導入したプラスミドに対応する抗生物質を含む LB 寒天培地に塗布し、プラスミドを保持した株を選抜した。

LacZ レポーターアッセイ用プラスミドの作製

pPR9TZ に含まれるプロモーターレスの *lacZ* 上流に、pEVXH から切り出した *desB* 上流 205 bp を含む 663 bp の XhoI-PstI 断片を挿入し、*desB* プロモーター活性測定用のレポータープラスミド

pRDBX を得た。pPR9TZ の *lacZ* 上流に、pBSM4.7 から切り出した *ligM* 内部から上流までを含む約 1.0 kb の BamHI 断片を挿入し、pPLMBB を得た。pPLMBB を SalI 消化し、挿入した領域を *ligM* の上流 323 bp を含む 506 bp に削減することで、*ligM* プロモーター活性測定用のレポータープラスミド pPLMBS を作製した。

LacZ レポーターアッセイ

pRDBX、pPLMBS およびベクター (pPR9TZ) を「エレクトロポレーション法によるプラスミド DNA の導入」に従って、SYK-6 株にそれぞれ導入した。各プラスミドを導入した SYK-6 株を Cb を含む LB 培地で 24 時間前培養した。培養液を集菌した後、菌体を Wx buffer で 2 回洗浄および懸濁した。OD₆₀₀ = 0.2 となるように Cb を含む 10 ml の Wx-SEMP 培地に植菌し、30°C で OD₆₀₀ = 0.5–0.6 になるまで培養した。その後、誘導条件では VA または SA を終濃度 5 mM になるように添加し 6 時間培養した。非誘導条件においては、OD₆₀₀ = 0.5–0.6 になった後、さらに 2 時間培養した。

培養液を集菌した後、菌体を Wx buffer で 2 回洗浄し OD₆₀₀ = 5.0 (*Abs*₆₀₀ = 5.0) となるように同 buffer に懸濁した。得られた懸濁液 20 µl (*v* = 0.02 ml) と 80 µl の permeabilization solution (100 mM Na₂HPO₄, 20 mM KCl, 2 mM MgSO₄, 0.8 mg/ml hexadecyltrimethylammonium bromide, 0.4 mg/ml sodium deoxycholate, 5.4 µl/ml β-mercaptoethanol) を混合し 30°C で 30 分間保温した。その後、600 µl の substrate solution (60 mM Na₂HPO₄, 40 mM NaH₂PO₄, 1 mg/ml 2-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside, 2.7 µl/ml β-mercaptoethanol) を加え、30°C で 5 分間反応させた (*t* = 5 min)。反応後、700 µl の stop solution (1 M Na₂CO₃) を加えた。得られた反応液を 19,000 × *g* で 1 分間遠心した後、上清の *Abs*₄₂₀ を測定した。β-galactosidase 活性は、改変した Miller assay ([https://openwetware.org/wiki/Beta-Galactosidase_Assay_\(A_better_Miller\)](https://openwetware.org/wiki/Beta-Galactosidase_Assay_(A_better_Miller))) (255, 256) に従い、Miller units [$1000 \times Abs_{420} / (t \times v \times Abs_{600})$] として導出した。*Abs*₄₂₀、*t*、*v* そして *Abs*₆₀₀ はそれぞれ、absorbance of the *o*-nitrophenol、reaction time (min)、volume of culture solution (ml) そして cell density を示す。

E. coli における *desR* の発現と DesR の精製

SLG_12870 (*desR*) をコードする配列は、SYK-6 株の total DNA を鋳型に Table 1-3 に示した *desR*_NdeI_F および *desR*_NdeI_R を用いて PCR にて増幅した。増幅した 0.5 kb の DNA 断片を pET-16b に TA クローニングし pT1542 を得た。pT1542 の 0.5 kb NdeI-BamHI 断片を pCold I の同サイトに挿入し pCIdR を得た。*E. coli* BL21(DE3) 株に pCIdR を導入し、Ap を含む LB 培地で 12 時間前培養を行った。得られた培養液を同培地に終濃度 1% となるように植菌し、30°C で OD₆₀₀ = 0.5 になるまで培養した後、16°C で 30 分間静置し、終濃度 1 mM の isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) を加えてさらに 16°C で 24 時間誘導培養を行った。*desR* を高発現させた *E. coli* 培養液を 5,000 × *g*、5 min、4°C で集菌し、500 mM NaCl、40 mM imidazole を含む 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5) で 2 回洗浄後、同 buffer に懸濁した。超音波破碎装置により細胞を破碎し、19,000 × *g*、15 min、4°C で遠心分離を行った。上清を細胞抽出液として回収し、500 mM NaCl と 40 mM imidazole を含む 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5) であらかじめ平衡化した His Spin Trap TALON (GE Healthcare) にアプライし、100 × *g*、1 min、4°C で遠心した。夾雑タンパク質の

溶出には 500 mM NaCl と 40 mM imidazole を含む 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5)を用いて 5 回洗浄し、500 mM NaCl と 150 mM imidazole を含む 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5)で目的タンパク質を溶出させた。その後、遠心式限外ろ過フィルターAmicon Ultra (10 kDa cut, Merck)を用いて脱塩と濃縮を行った。また、DesR は実験前に遠心式ろ過メンブレン Ultrafree-MC filter (Merck)によって不溶物を除去した。タンパク質の定量は「Bradford 法によるタンパク質の定量」に従った。

SDS-PAGE 解析

desR の発現および変性条件での分子量測定は、濃縮ゲル 5%、分離ゲル 12%の SDS-PAGE によって行った。煮沸変性させたタンパク質溶液を 100 V の定電圧で 120 分間泳動した。泳動終了後にゲルを染色液 [0.1% (wt/vol) Coomassie Brilliant Blue R-250, 50% methanol, 5% acetate]に浸して室温で 30–60 分間振盪させた。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。分子量マーカーには Novex Sharp Pre-stained Protein Standard (Thermo Fischer Scientific, Inc.)を用いた。

ゲルろ過クロマトグラフィー

約 400 μ g の精製 DesR、Blue Dextran 2000 および標準タンパク質 (チログロブリン [5.0 mg/ml, 669 kDa]、フェリチン [0.3 mg/ml, 440 kDa]、アルドラーゼ [4.0 mg/ml, 158 kDa]、コンアルブミン [3.0 mg/ml, 75.0 kDa]、オブアルブミン [4.0 mg/ml, 44.0 kDa]、カーボニック・アンヒドラーゼ [3.0 mg/ml, 29.0 kDa]、RNase A [3.0 mg/ml, 13.7 kDa]、アプロチニン [3.0 mg/ml, 6.5 kDa])を、140 mM の NaCl を含む 10 mM H₃PO₄ buffer (pH 7.4)で平衡化したゲルろ過カラム (Superdex 200 increase 10/300 GL; GE Healthcare)にそれぞれアプライし、BioAssist eZ system (Tosoh)にて流速 1.0 ml/min で分離した。カラム容積 (ベッドボリューム)、Blue Dextran 2000 と各標準タンパク質が溶出した時の溶出液量 (ml)をそれぞれ V_t 、 V_o および V_e として、 $K_{av} = (V_e - V_o)/(V_t - V_o)$ の式から K_{av} 値を求め検量線を作製し、DesR の分子量を算出した。

digoxigenin 標識した DNA プローブの作製

Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)の基本的な操作方法は、digoxigenin gel shift kit 2nd generation (Roche)の取扱説明書に従った。プローブとして用いた DNA 断片は、Table 1-3 に示すプライマーと SYK-6 株の total DNA を鋳型に用いて PCR により増幅した。目的の DNA 断片を 2%アガロースゲルで分離し抽出した後、ethanol 沈殿により濃縮した。得られたペレットを蒸留水で溶解し、DNA 濃度を蛍光光度計 (Quantus™ Fluorometer)にて QuantiFluor® dsDNA System (Promega)を用いて測定した。得られた 1.5 pmol の DNA 断片は、キットに付属の terminal transferase により 3'末端を digoxigenin-11-ddUTP で標識した。

DNA-タンパク質結合反応

EMSA における DNA-タンパク質結合反応は、SYK-6 株および遺伝子破壊株の細胞抽出液 (4 μ g of protein)または精製 DesR (10 ng [0.24 pmol dimer]または 100 ng [2.4 pmol dimer])、5 fmol の digoxigenin 標識 DNA プローブ、1 μ g の poly-[d(I-C)]および Binding buffer (1 \times) [20 mM HEPES, 1

mM EDTA, 10 mM (NH₄)₂SO₄, 1 mM dithiothreitol, 0.2% (wt/vol) Tween 20, 30 mM KCl, pH 7.6]を含む全量 10 μ l とした。DNA プローブと buffer 等を混合した後、細胞抽出液または DesR を加えて穏やかに混合し、20°C で 20 分間保温した。DesR とエフェクター分子の会合を調べる場合は、VA または SA を終濃度 0.05、0.5、5 または 50 mM となるように反応系に 1 μ l 加えた。

メンブレンへの転写とシグナルの検出

結合反応後のサンプルは直ちに氷上で冷やし、2.5 μ l の 5 \times loading buffer (0.25 \times TBE buffer, 60%; glycerol, 40%; bromphenol blue, 0.2% [wt/vol])を加えて混合した。その後、5%非変性ポリアクリルアミドゲル (sterilized water, 3.1 ml; 5 \times TBE buffer [Tris, 445 mM; Boric acid, 445 mM; EDTA, 10 mM], 1.0 ml; 30% acrylamide, 0.85 ml; 10% ammonium peroxodisulfate, 23 μ l; TEMED, 3.85 μ l)を用いて、泳動 buffer に 0.5 \times TBE を使用して 80 V の定電圧で 4°C にて 1–2 時間泳動を行った。

DNA のメンブレンへの転写はエレクトロブロッティング法によって行った。Trans Blot SD (Bio-Rad Laboratories)の陽極側からフィルターペーパー (Bio-Rad Laboratories)、Hybond-N+メンブレン (GE Healthcare)、泳動後のゲル、そしてフィルターペーパーの順に重ねて 15 V の定電圧で 10–20 分間トランスファーした。メンブレンとフィルターペーパーはあらかじめ 0.5 \times TBE で平衡化したものを用いた。

ブロッティング終了後、DNA 断片が転写されたメンブレンに UV Closslinker (CX-2000; UVP)を用いて UV 照射し (3000 \times 100 μ J/cm², 20 sec)、DNA のクロスリンクを行った。メンブレンを洗浄用 buffer (100 mM malate, 150 mM NaCl [pH 7.5 with NaOH])に浸し、室温でシーソー (Wave-SI slim; TAITEC Corporation)を用いて 5 分間混和しながら洗浄した。その後、ブロッキング溶液 (洗浄用 buffer + 1% blocking reagent)に移し室温で 30 分間混和した。メンブレンのブロッキング処理が終了した後、1/10,000 量の抗 digoxigenin 抗体 (Anti-Digoxigenin-AP, Roche)を含むブロッキング溶液に交換し、室温で 30 分間混和することで酵素免疫測定法 (ELISA 法)によりメンブレン上の DNA を標識した。洗浄用 buffer を用いて室温で 15 分間の振盪を 2 回繰り返しメンブレンを洗浄し、未反応の抗体を除去した後、検出用 buffer (100 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl [pH 9.5 with HCl])で 5 分間振盪を行いメンブレンを平衡化した。6 μ l の CDP-Star (Roche)溶液を含む 200 μ l の検出用 buffer を、平衡化したメンブレンのブロッティング面に拡散および浸透させた。OHP シートでメンブレンを覆い、余剰の CDP-Star 溶液をフィルム外にしごき出した。Alkaline phosphatase 反応によるメンブレン上のシグナルを化学発光検出解析装置 (LumiVision PRO image analyzer; Aisin Seiki)で検出・撮影した。

統計解析

統計解析は、GraphPad Prism 8 (GraphPad Software)を使用し、Student's *t* test を用いた pairwise 比較により行った。<0.05 の *P* 値は統計的に有意であることを示す。

第2章

***Sphingobium* sp. SYK-6 株における syringate 脱メチル酵素 遺伝子 *desA* の転写制御システム**

第1節 緒言

第1章の解析から、*Sphingobium* sp. SYK-6 株の vanillate (VA)/syringate (SA)代謝酵素遺伝子 *ligM*、および SA 代謝酵素遺伝子である *desA*、*desB* の転写は VA または SA の存在下で顕著に誘導されることが示され、VA および SA がこれら遺伝子の誘導物質であることが明らかとなった (Fig. 1-3)。 *desB* 上流領域結合タンパク質として単離されたもののうち、LysR 型転写制御因子 DesQ はいずれの遺伝子の転写制御にも関与しなかったが (Fig. 1-5B)、MarR 型転写制御因子 DesR は *ligM* および *desB* のプロモーター領域に結合し、両遺伝子の転写を負に制御することが示された (Fig. 1-5 and 1-9)。そして、VA および SA がエフェクターとして機能することで DesR による転写抑制を解除することが明らかとなった (Fig. 1-12)。しかし、DesR は *desA* の転写制御に関与しないことが示された (Fig. 1-5A and 1-9C)。第2章では、*desA* の転写制御システムを解明するために *desA* の転写制御因子を同定し、機能解析を行った。

第2節 結果

1. *Sphingobium* sp. SYK-6 株における *desA* の転写制御因子の同定

Sphingobium sp. SYK-6 株において *desA* 上流領域に結合するタンパク質の有無を調べるため、SYK-6 株の細胞抽出液を用いて *desA* 上流領域に対する electrophoretic mobility shift assay (EMSA)を行った。非誘導条件として 10 mM sucrose、10 mM glutamate、0.13 mM methionine そして 10 mM proline を添加した Wx 培地 (Wx-SEMP)、誘導条件として 5 mM の VA または SA を添加した Wx-SEMP 培地 (Wx-SEMP + VA または Wx-SEMP + SA)で培養した SYK-6 株から細胞抽出液を調製し、digoxigenin 標識した *desAp1*–*desAp5* プローブとそれぞれ反応させた (Fig. 2-1A)。その結果、いずれの培養条件で調製した細胞抽出液を用いた場合も *desAp2* プローブだけで DNA-タンパク質複合体を示す明確なシフトバンドが観察された (Fig. 2-1B)。さらに、*desA* の誘導物質である SA および VA (5 mM)の存在下において *desAp2* プローブと Wx-SEMP 培養した SYK-6 株の細胞抽出液を用いた EMSA を行ったところ、両化合物の存在下でシフトバンドが消失することが示された (Fig. 2-1C)。以上の結果から、SYK-6 株の細胞内には *desAp2* 領域に結合するタンパク質が存在し、その結合は SA または VA の存在下で阻害されることが示された。

SYK-6 株のゲノム上の *desA* 周辺領域に着目すると、*desA* 上流には ferulate (FA)代謝に関与する *ferBA* オペロンとその制御を担う MarR 型転写制御因子 *ferC* が存在する (Fig. 2-1A) (175)。一方、*desA* 下流には IclR 型転写制御因子と相同性を示す機能未知の SLG_24970 が存在する (Fig. 2-1A, Table 2-1)。一般的にバクテリアの芳香族代謝系遺伝子(群)は、ゲノム上の近傍に存在する転写制御因子により制御を受ける (156)。そこで、*desAp2* プローブに結合した因子が *ferC* または SLG_24970 の遺伝子産物であるかどうかを調べるため、以前当研究室で構築された *ferC* 破壊株 (Δ *ferC* 株) (175)と、本研究で相同組換えによって作製した SLG_24970 破壊株 (Δ 24970 株) (Fig. 2-2)の細胞抽出液を用いて *desAp1*–*desAp4* プローブに対する EMSA を行った。Wx-SEMP 培地で培養した Δ *ferC* 株および Δ 24970 株から細胞抽出液を調製し EMSA を行ったところ、 Δ *ferC* 株の細胞抽出液を用いた場合には野生株と同様に *desAp2* プローブだけで DNA-タンパク質複合体を示すシフトバンドが形成されたが、 Δ 24970 株の細胞抽出液ではシフトバンドは形成されなかった (Fig. 2-1D)。また、DesR および DesQ の遺伝子破壊株を用いて同様の解析を行ったところ、野生株および Δ *ferC* 株と同様の結果を示した (Fig. 2-1D)。以上の結果から、SLG_24970 の遺伝子産物が *desAp2* 領域に結合することが示唆された。以後、SLG_24970 を *desX* と命名し、DesX の SA/VA 代謝制御への関与を調査した。

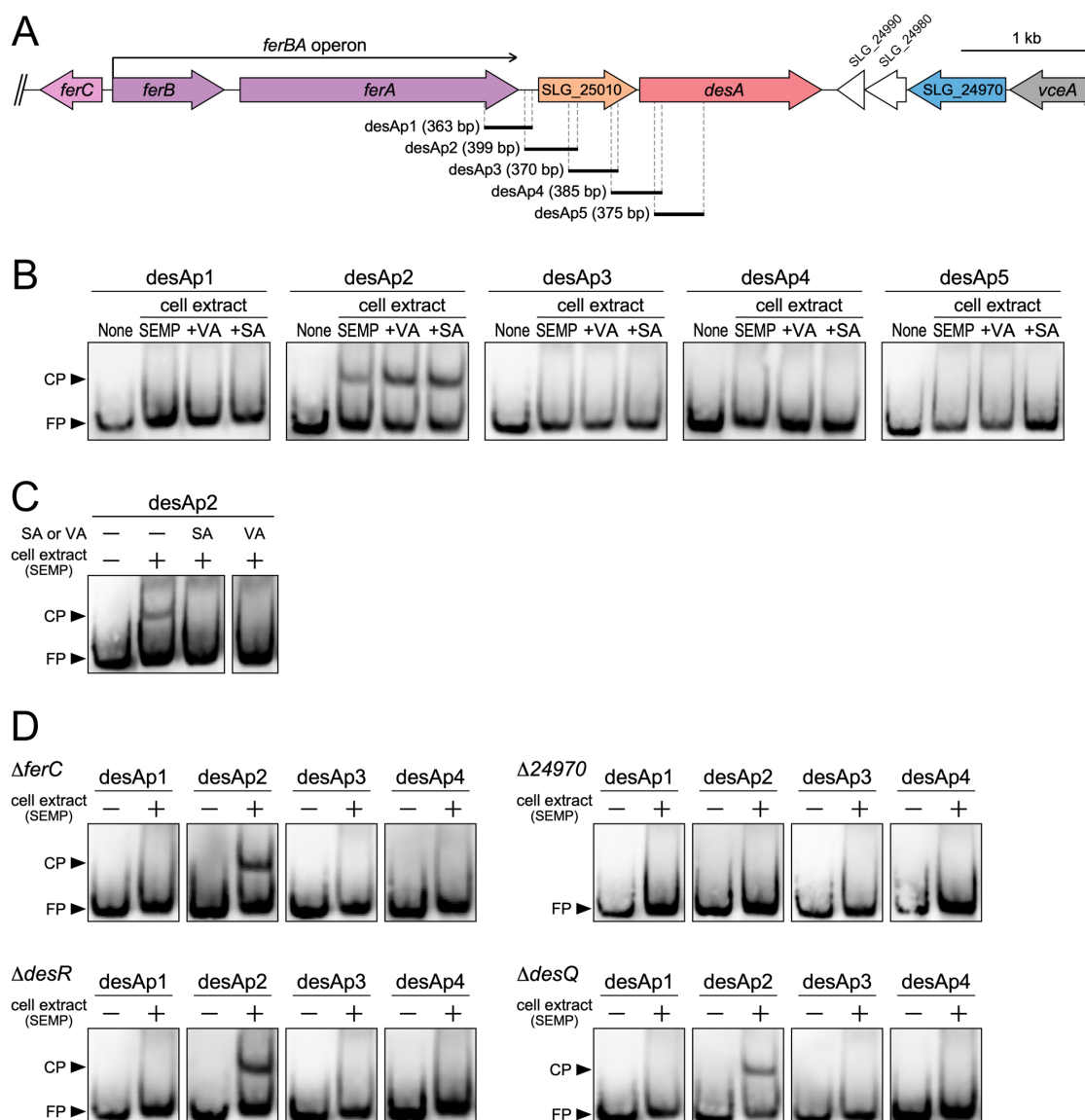


Fig. 2-1. *desA* 上流領域結合性タンパク質の同定.

(A) *desA* 周辺の遺伝子マップ. *ferC*, MarR-type transcriptional regulator gene; *ferB*, feruloyl-CoA hydratase/lyase gene; *ferA*, feruloyl-CoA synthetase gene; *SLG_25010*, putative hydrolase gene; *SLG_24970* (*desX*), IclR-type transcriptional regulator gene; *vceA*, vanilloyl acetic acid/3-(4-hydroxy-3,5-dimethoxyphenyl)-3-oxopropanoic acid-converting enzyme gene (54). 遺伝子マップ下の黒いバーは EMSA に使用した DNA 断片 (*desAp1*–*desAp5* プローブ)を示す. (B) SYK-6 株の細胞抽出液を用いた *desAp1*–*desAp5* プローブに対する EMSA. Wx-SEMP, Wx-SEMP + VA または Wx-SEMP + SA で培養した SYK-6 株から細胞抽出液を調製し, 細胞抽出液の非存在下 (None)または存在下 (0.4 μg protein/ μl)で, 500 pM の digoxigenin 標識した *desAp1*–*desAp5* プローブと 20°C で 20 分間反応させた. 反応液を 5%非変性ポリアクリルアミドゲルにより分離し, シグナルを発光基質により検出した. CP, DNA-protein complex; FP, free probe.

Fig. 2-1. -continued.

(C) SA または VA 存在下での SYK-6 株の細胞抽出液を用いた desAp2 プローブに対する EMSA. 5 mM の SA または VA の存在下/非存在下にて, Wx-SEMP 培養した SYK-6 株から調製した細胞抽出液の非存在下 (-)または存在下 (+, 0.4 $\mu\text{g protein}/\mu\text{l}$)で 500 pM の desAp2 プローブと 20°C で 20 分間反応させた. 反応液を 5%非変性ポリアクリルアミドゲルにより分離し, シグナルを発光基質により検出した. CP, DNA-protein complex; FP, free probe. (D) ΔferC 株, Δ24970 株, ΔdesR 株および ΔdesQ 株の細胞抽出液を用いた desAp1-desAp4 プローブに対する EMSA. Wx-SEMP で培養した ΔferC 株, Δ24970 株, ΔdesR 株および ΔdesQ 株から細胞抽出液を調製し, 細胞抽出液の非存在下 (-)または存在下 (+, 0.4 $\mu\text{g protein}/\mu\text{l}$)で 500 pM の desAp1-desAp4 プローブと 20°C で 20 分間反応させた. 反応液を 5%非変性ポリアクリルアミドゲルにより分離し, シグナルを発光基質により検出した. CP, DNA-protein complex; FP, free probe.

Table 2-1. SLG_24970 と既知の IclR 型転写制御因子のアミノ酸配列相同性

ITTRs ^a	Accession number	Identity (%) ^b	Organism	Function of target gene(s)	Reference
PcaR	AAA57136.1	22.3	<i>Pseudomonas putida</i> PRS2000	protocatechuate catabolism	(188)
PcaU	AAC37157.1	24.0	<i>Acinetobacter baylyi</i> ADP1	protocatechuate catabolism	(190)
AllR	AAB93847.1	23.7	<i>Escherichia coli</i> K-12	allantoin catabolism	(257)
XynR	AAB08693.1	25.5	<i>E. coli</i> K-12	xylonate catabolism	(258)
KdgR	AAC74897.1	19.9	<i>E. coli</i> K-12	sugar acids catabolism	(259)
TsaQ1	AAP69991.1	19.2	<i>Comamonas testosteroni</i> T-2	<i>p</i> -toluenesulfonate degradation	(260)
TphR _{II}	BAE47083.1	21.6	<i>Comamonas</i> sp. E6	terephthalate catabolism	(210)
IphR	BAH70273.1	26.5	<i>Comamonas</i> sp. E6	isophthalate catabolism	(261)
TtgV	AAK69562.1	23.4	<i>P. putida</i> DOT-T1E	multidrug and solvent efflux	(262)
PobR	AAC37162.1	22.3	<i>A. baylyi</i> ADP1	<i>p</i> -hydroxybenzoate catabolism	(194)
PbaR	ALA09398.1	21.6	<i>Sphingobium wenxiniae</i> JZ-1T	3-phenoxybenzoate catabolism	(263)
MhpR	BAA82877.1	23.6	<i>C. testosteroni</i> TA441	<i>m</i> -hydroxybenzoate catabolism	(264)
HmgR	AAN70195.1	20.1	<i>P. putida</i> KT2440	homogentisate catabolism	(265)
TsdR	ABG93672.1	23.3	<i>Rhodococcus jostii</i> RHA1	γ -resorcyate catabolism	(266)
OphR	ABP48117.1	23.4	<i>Rhodococcus</i> sp. DK17	phthalate catabolism	(267)
CatR	AGT94972.1	25.5	<i>Rhodococcus erythropolis</i> CCM2595	catechol catabolism	(268)
NpdR	AAK38101.1	21.2	<i>R. erythropolis</i> HL PM-1	2,4,6-trinitrophenol degradation	(269)
GenR	BAC00418.1	21.7	<i>Corynebacterium glutamicum</i> ATCC 13032	3-hydroxybenzoate/gentisate catabolism	(270)
IclR	AAA24008.1	24.5	<i>E. coli</i> K-12	glyoxylate shunt	(207)

^a IclR 型転写制御因子 (IclR-type transcriptional regulator, ITTR)

^b アミノ酸配列相同性は EMBOSS Needle pairwise alignment program で算出した.

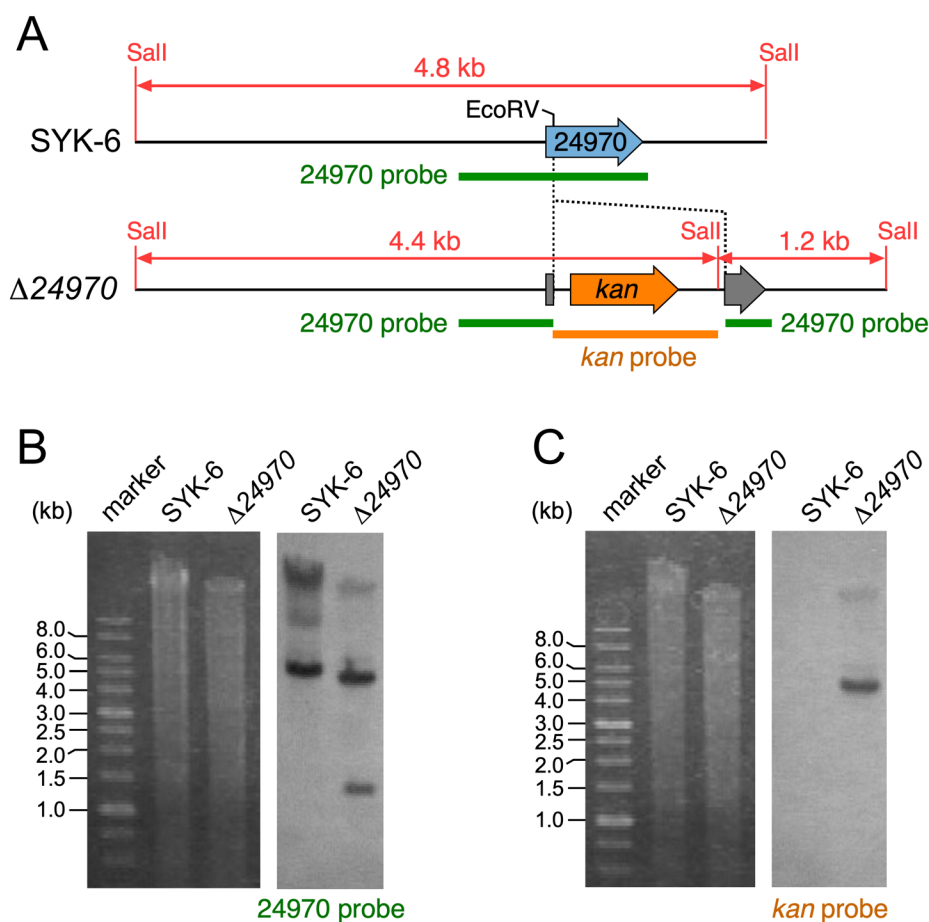


Fig. 2-2. SLG_24970 破壊株 ($\Delta 24970$)の作製.

(A) $\Delta 24970$ 株における *kan* 挿入領域の模式図. (B and C) $\Delta 24970$ 株のサザンハイブリダイゼーション解析. SYK-6 株および $\Delta 24970$ 株から抽出した total DNA を *Sal*I 消化し, digoxigenin 標識した SLG_24970 プローブ (pUC401 由来の約 1.4 kb の *Apa*I 断片)(B)または *kan* プローブ (pIK03 由来の約 1.3 kb の *Eco*RV 断片)(C)とハイブリダイゼーションを行った.

ferC および *desX* の破壊が SYK-6 株の SA および VA 代謝に影響するかどうかを調べるために、 $\Delta ferC$ 株と $\Delta desX$ 株の SA および VA 生育能を野生株と比較した。野生株、 $\Delta ferC$ 株および $\Delta desX$ 株を 5 mM SA または VA を含む Wx 培地で培養したところ、 $\Delta ferC$ 株は野生株と同等の生育能を示した (Fig. 2-3A and B)。一方、 $\Delta desX$ 株においては野生株よりも SA での生育がやや早くなり、VA でも SA ほど明確ではないものの同様の傾向が観察された (Fig. 2-3A and B)。これらの結果から、DesX は *desAp2* 領域に結合し *desA* の転写を負に制御することが示唆された。また、FerC は SYK-6 株の SA/VA 代謝制御に関与しないことが示唆された。

$\Delta desX$ 株における SA/VA 生育能の変化が *desX* の破壊に起因するかを調べるため、pJB866 の P_m プロモーター制御下に *desX* の全長 750 bp を含む約 1.1 kb の DNA 断片を

挿入した相補プラスミド pJB24970 を作製し、pJB24970 およびベクター (pJB866) をそれぞれ導入した野生株および $\Delta desX$ 株の 5 mM SA での生育能を測定した。その結果、pJB24970 を保持する $\Delta desX$ 株の SA 生育能はベクターを保持する $\Delta desX$ 株と比較して遅延することが示され、ベクターを保持する野生株と同等であった (Fig. 2-3C)。また、pJB24970 を保持した野生株の SA 生育にも遅延が生じた (Fig. 2-3C)。以上の結果から、 $\Delta desX$ 株における表現型の変化は *desX* の破壊によって生じたことが示された。

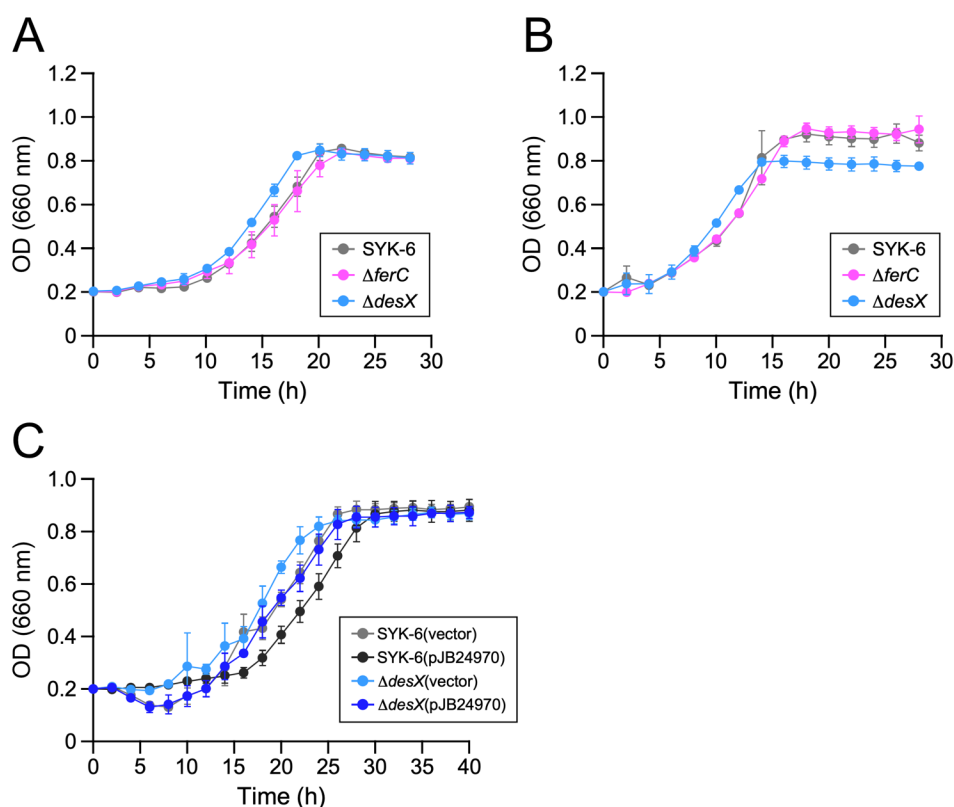


Fig. 2-3. SYK-6 株, $\Delta ferC$ 株および $\Delta desX$ 株の SA または VA での生育能.

(A and B) SYK-6 株, $\Delta ferC$ 株および $\Delta desX$ 株の SA (A) または VA (B) での生育能. LB 培地で前培養した SYK-6 株, $\Delta ferC$ 株および $\Delta desX$ 株を 5 mM SA (A) または 5 mM VA (B) を含む Wx 液体培地に植菌し、OD₆₆₀ の値を経時的に測定した. 測定はそれぞれ 3 回ずつ行いその平均値を示した. エラーバーは標準偏差を示す. (C) *desX* 相補株の SA 生育能. pJB866 (vector) または pJB24970 を保持した SYK-6 株および $\Delta desX$ 株を 5 mM SA を含む Wx 液体培地に植菌し、OD₆₆₀ の値を経時的に測定した. SYK-6(pJB866) と $\Delta desX$ (pJB866) の SA 生育能は pJB866 を保持しない株 (A) と比較して遅延したが、これは形質転換体の培地に加えた tetracycline の影響によるものと思われる. 測定はそれぞれ 3 回ずつ行いその平均値を示した. エラーバーは標準偏差を示す.

2. *desX* 破壊株における *desA*、*ligM*、*desB*、*ferB*、SLG_25010 および *desX* の転写誘導性

desX が SA/VA 代謝系遺伝子群の転写制御に関与するかどうかを調べるため、 $\Delta desX$ 株を用いて *desA*、*ligM* および *desB* の qRT-PCR 解析を行った。非誘導条件として Wx-SEMP、誘導条件として Wx-5 mM SA および Wx-5 mM VA で培養した SYK-6 株および $\Delta desX$ 株から抽出した total RNA を用いて qRT-PCR 解析を行い、*desA*、*ligM* および *desB* の転写量を測定した。その結果、野生株において *desA*、*ligM* および *desB* の転写量は非誘導時と比較して SA 存在下で培養した場合に 28 倍、5.7 倍および 4.4 倍に、VA 存在下で培養した場合に 50 倍、14 倍および 7.6 倍にそれぞれ上昇した (Fig. 2-4A–C)。これらの誘導倍率は第 1 章における結果と同等であった (Fig. 1-3A)。 $\Delta desX$ 株における非誘導時の *desA* の転写量は、野生株の非誘導時の転写量に比べ 48 倍に上昇し、野生株の VA での誘導時の値と同等であった (Fig. 2-4A)。したがって、*desA* の転写は DesX によって負に制御されることが明らかとなった。また、 $\Delta desX$ 株の非誘導時と SA および VA での誘導時の転写量がほぼ同等であったことから、DesX による抑制が *desA* の受ける唯一の制御であることが強く示唆された。一方、 $\Delta desX$ 株における非誘導時の *ligM* および *desB* の転写量は野生株の非誘導時と同等であり、野生株と同様に SA 培養時に 6.3 倍と 3.6 倍、VA 培養時に 16 倍と 10 倍にそれぞれ誘導されたため (Fig. 2-4B and C)、*ligM* と *desB* の転写制御に DesX は関与しないことが示された。

SYK-6 株のゲノム上において、*desA* 上流には同転写方向に推定の hydrolase をコードする SLG_25010 および *ferBA* オペロンが存在する (Fig. 2-1A)。SLG_25010 および *ferB* の転写が DesX による制御を受けるかどうかを調べるため、これら遺伝子の qRT-PCR 解析を行った。その結果、野生株および $\Delta desX$ 株における *ferB* の転写量は、非誘導時および SA または VA での培養時において同等の値を示した (Fig. 2-4D)。このことから、DesX は *ferBA* オペロンの転写制御に関与しないことが示された。一方、野生株における SLG_25010 の転写量は、非誘導時と比較して SA または VA での培養時に 11 倍と 39 倍にそれぞれ上昇することが示された (Fig. 2-4E)。一方、 $\Delta desX$ 株における非誘導時の SLG_25010 の転写量は、野生株の非誘導時の転写量に比べ 59 倍に上昇し、SA または VA 誘導時の転写量 (44 倍と 51 倍) と同等以上であった (Fig. 2-4E)。これらのことから、SLG_25010 の転写は *desA* とともに DesX により負に制御されており、SA および VA が SLG_25010 の誘導物質として機能することが強く示唆された。*desX* の転写誘導性を調べるため、野生株における *desX* の転写量を測定した。その結果、野生株における *desX* の転写量は培養条件にかかわらず同等の値を示した (Fig. 2-4F)。したがって、*desX* は構成的に発現していることが示唆された。

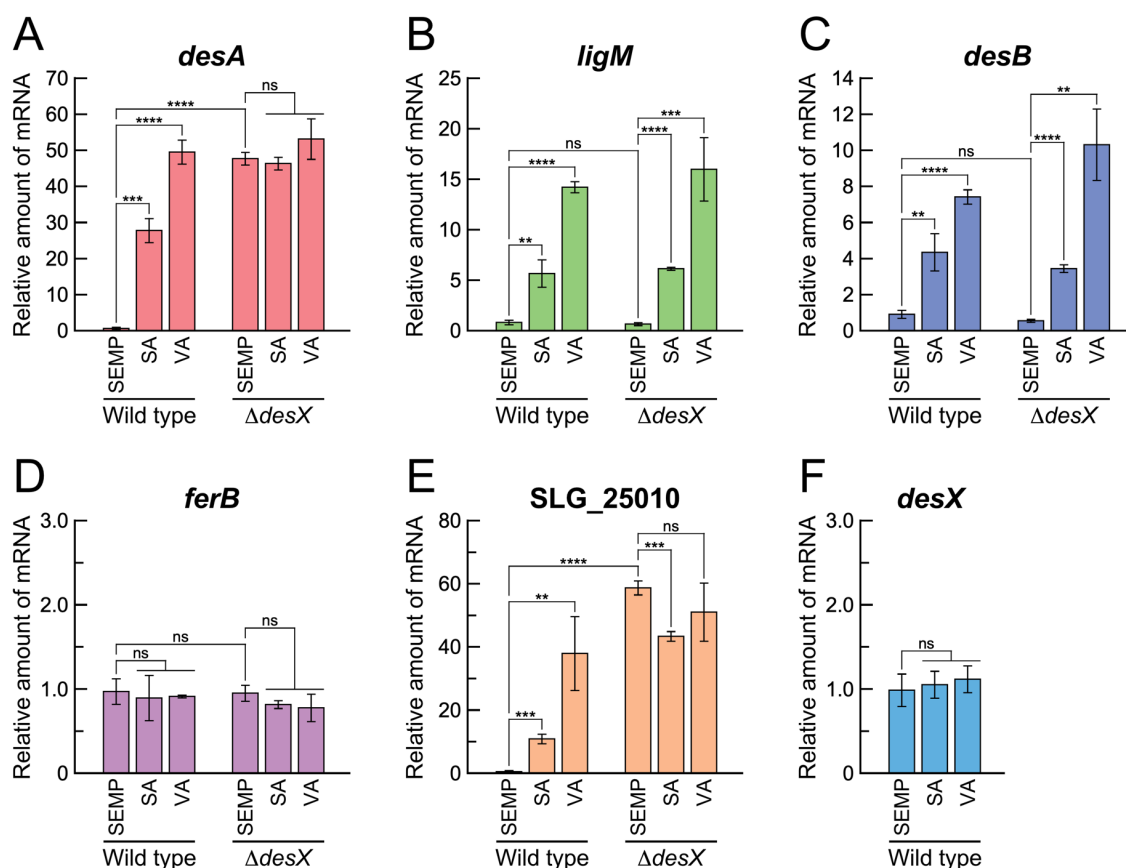


Fig. 2-4. SYK-6 株および $\Delta desX$ 株における *desA*, *ligM*, *desB*, *ferB*, *SLG_25010* および *desX* の転写誘導性.

Wx-SEMP, Wx-5 mM SA および Wx-5 mM VA で培養した SYK-6 株と $\Delta desX$ 株から total RNA を抽出し, qRT-PCR 解析により *desA* (A), *ligM* (B), *desB* (C), *ferB* (D), *SLG_25010* (E) および *desX* (SYK-6 株でのみ測定した) (F) の転写量を測定した. 各サンプル間の転写量を比較するための内部標準には SYK-6 株の 16S rRNA を用いた. Relative amount of mRNA の値は, SYK-6 株の Wx-SEMP での mRNA 量を 1.0 とした場合の各培養条件の相対 mRNA 量を示す. 測定はそれぞれ 3 回ずつ行いその平均値を示した. エラーバーは標準偏差を示す. 統計処理は Student's *t* test を用いて行った. ns, $P > 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$; ****, $P < 0.0001$.

3. *ferB-ferA-SLG_25010-desA* 遺伝子クラスターのオペロン構造

当研究室の解析により、*ferB-ferA-SLG_25010-desA* 遺伝子クラスターは SA での培養時にオペロンを形成することが示されている (70)。一方、FA での培養時に *ferB* と *ferA* はオペロンを形成するが、*SLG_25010* は同一の転写単位に含まれないことが示されている (175)。本研究において、*ferB* と *SLG_25010-desA* は SA および VA での培養時に転写誘導性が異なることが示された (Fig. 2-4A, D, and E)。そこで、*ferB-ferA-SLG_25010-desA* 遺伝子クラスターの転写単位を再調査するため、非誘導条件として Wx-SEMP、誘導条件として Wx-5 mM SA、Wx-5 mM VA または Wx-5 mM FA で培養した SYK-6 株から抽出した total RNA とそれぞれの遺伝子間領域を特異的に増幅するプライマーペア (Table 2-3)を用いて RT-PCR 解析を行った (Fig. 2-5A)。その結果、非誘導条件では *ferB-ferA* の増幅産物のみ観察された (Fig. 2-5B)。SA/VA/FA 誘導条件では、*ferB-ferA* に加えて *ferA-SLG_25010* および *SLG_25010-desA* の増幅産物も観察された (Fig. 2-5C-E)。しかし、いずれの培養条件においても *ferA-desA* の増幅産物は観察されなかった (Fig. 2-5B-E)。これらのことから、*ferB-ferA-SLG_25010-desA* は *ferBA* オペロンおよび *SLG_25010-desA* オペロンの2つの転写単位で構成されることが示唆された。SA/VA/FA 誘導条件では *ferA-SLG_25010* の増幅が観察されたが (Fig. 2-5C-E)、これは *ferB* プロモーターからのリードスルーに起因すると考えられる。*ferA-SLG_25010* の増幅が非誘導条件では見られず、*ferBA* オペロンを誘導しない SA/VA 誘導条件で見られた理由については後ほど考察する。

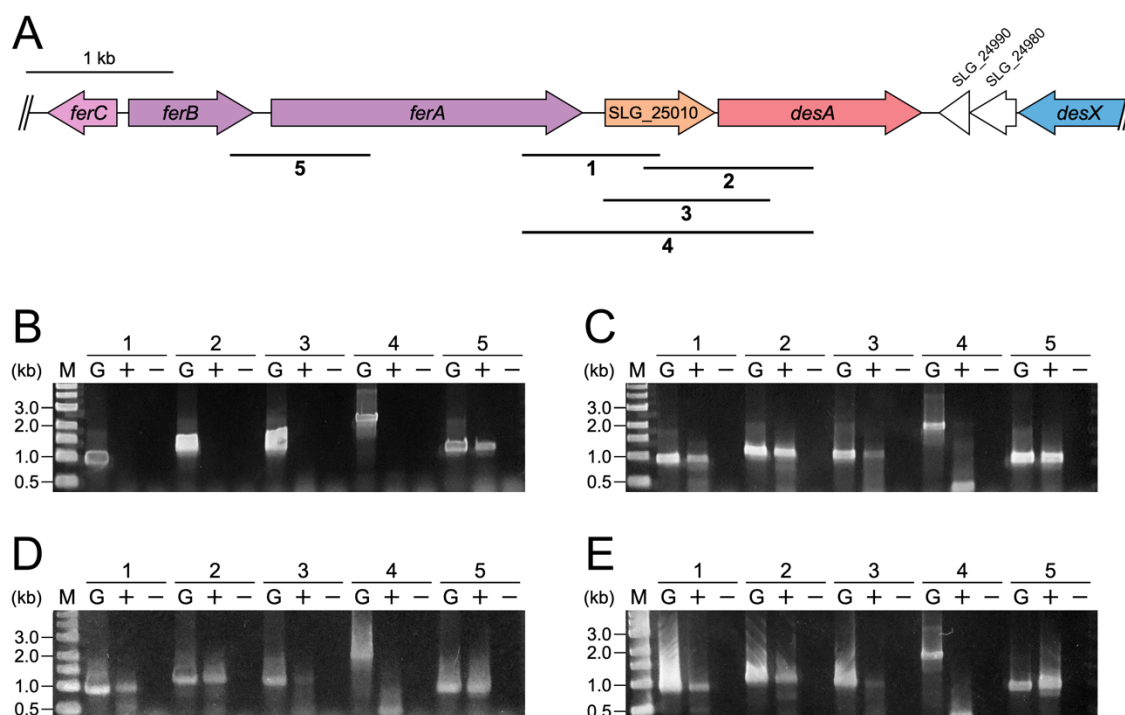


Fig. 2-5. *ferB-ferA-SLG_25010-desA* 遺伝子クラスターの RT-PCR 解析.

(A) *ferB-ferA-SLG_25010-desA* 遺伝子クラスター周辺の遺伝子マップ. 遺伝子マップ下の黒いバーと数字は RT-PCR での増幅領域を示す. (B-E) RT-PCR 増幅産物のアガロース電気泳動. PCR に使用した cDNA は, Wx-SEMP (B), Wx-5 mM SA (C), Wx-5 mM VA (D) および Wx-5 mM FA (E) で培養した SYK-6 株から抽出した total RNA を用いて合成した. *ferA-SLG_25010* (lanes 1; expected size, 932 bp), *SLG_25010-desA* (lanes 2 and 3; 1,155 bp and 1,132 bp, respectively), *ferA-desA* (lanes 4; 1,987 bp) および *ferB-ferA* (lanes 5; 955 bp) の各遺伝子間領域を特異的に増幅するプライマーペアは Table 2-3 に示す. Lanes: M, 分子量マーカー; G, SYK-6 株のゲノム DNA を鋳型としたコントロール PCR; ‘+’ と ‘-’, それぞれ逆転写酵素を含むまたは含まずに RT-PCR した際の産物を示す.

4. SLG_25010-*desA* オペロンのプロモーター領域の同定

SLG_25010-*desA* オペロンのプロモーター領域を同定するために、*lacZ* をレポーター遺伝子としたプロモーター解析を行った。*ferA* 内部から *desA* 内部までの約 1.4 kb の領域を段階的に含む DNA 断片をプロモータープローブベクター pSEVA225 の *lacZ* 上流にクローニングし、pSDA1、pSDA2、pSDA3 および pSDA4 を作製した (Fig. 2-6A)。各プラスミドを保持する SYK-6 株を、非誘導条件として Wx-SEMP、誘導条件として Wx-5 mM SA および Wx-5 mM VA で培養し、 β -galactosidase 活性を指標にプロモーター活性を測定した。その結果、pSDA2 導入株のプロモーター活性だけが SA または VA 培養時に顕著に誘導され、SEMP 培養と比較してそれぞれ 12 倍の活性上昇が観察された (Fig. 2-6A)。したがって、*ferA* と SLG_25010 の遺伝子間領域に SA/VA 誘導性プロモーターが存在することが示唆された。

SLG_25010-*desA* オペロンの転写開始点を決定するために、蛍光標識したオリゴヌクレオチドを用いてプライマー伸長法を行った。SA の存在下で培養した SYK-6 株から単離した total RNA と SLG_25010 内部に設計した PE25010 プライマーを用いてプライマー伸長法を行った結果、76 bp の伸長産物が得られた (Fig. 2-6B)。この結果から、SLG_25010-*desA* オペロンの転写開始点は、SLG_25010 の開始コドンから 10 塩基上流に存在する T 残基であることが示唆された (Fig. 2-6B)。SLG_25010-*desA* オペロンの転写開始点上流には、*E. coli* の σ^{70} 依存性プロモーター配列に保存されている -35 および -10 配列が見出された (Fig. 2-6B)。さらに、推定の -10 配列と重なる -21 から -4 の領域には、18 bp の完全な inverted repeat (IR) 配列である IR-DA (5'-TCTTCGTATATACGAAGA-3') が存在した (Fig. 2-6B)。

次に、推定された -35 および -10 配列が SLG_25010-*desA* オペロンの転写に関与するかどうかを調べるため、推定のプロモーター領域についてデリーション解析を行った。SA/VA 誘導的なプロモーター活性が観察された pSDA2 の上流 140 bp を削除した pSDA2a、推定の -35 配列を削除した pSDA2b、および推定の -35 と -10 配列を削除した pSDA2c を作製し、これらプラスミドを保持した SYK-6 株の β -galactosidase 活性を測定した (Fig. 2-6A)。その結果、pSDA2a 導入株のプロモーター活性は pSDA2 導入株と同様に非誘導時と比較して SA または VA での培養時にそれぞれ 9.4 倍に上昇した (Fig. 2-6A)。一方、pSDA2b または pSDA2c 導入株では、誘導/非誘導にかかわらずプロモーター活性がほぼ消失した (Fig. 2-6A)。これらのことから、推定された -35 および -10 配列が SLG_25010-*desA* オペロンのプロモーターとして機能することが強く示唆された。

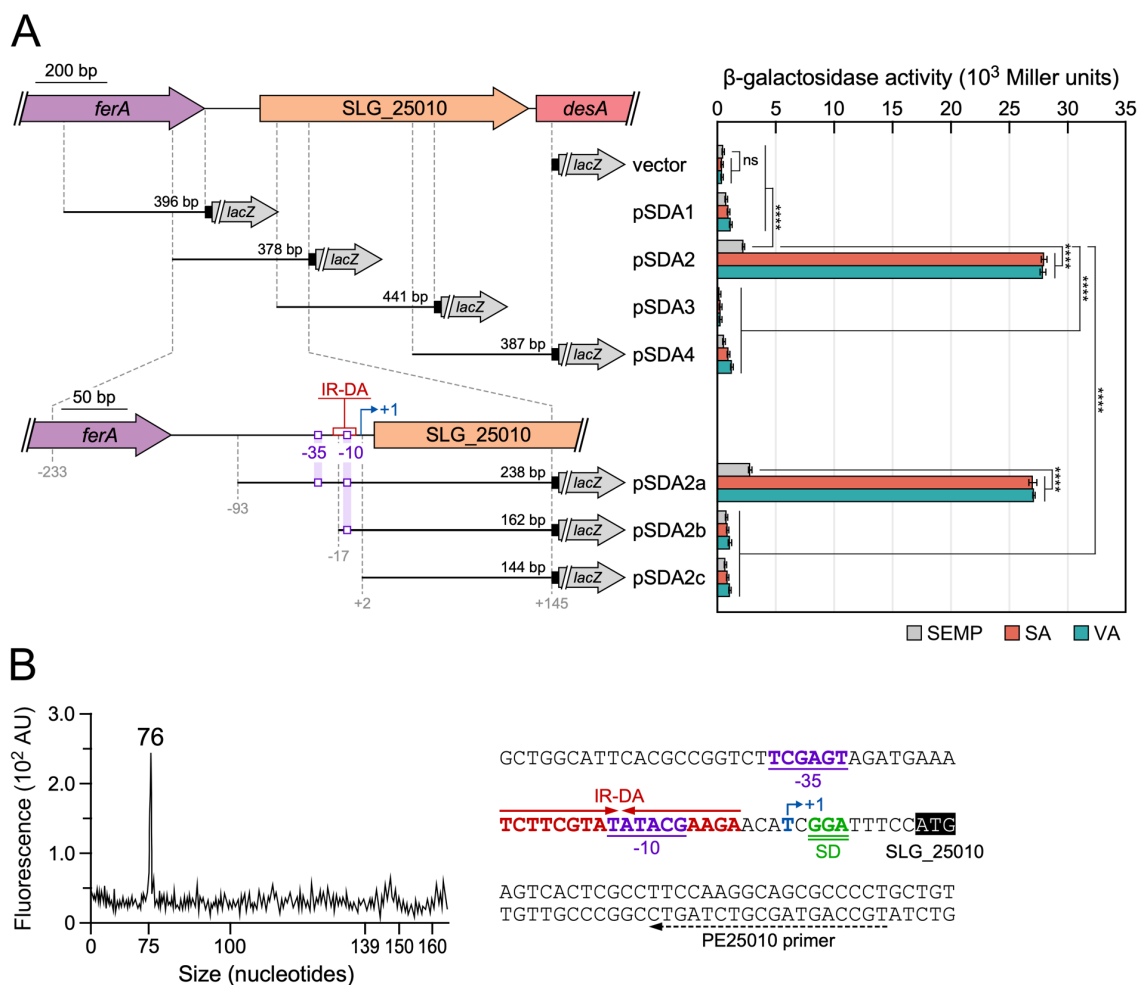


Fig. 2-6. SLG_25010-*desA* オペロンのプロモーター領域の同定.

(A) *desA* 上流領域のプロモーター解析. (左パネル) プロモーター解析に用いた DNA 領域. 黒いバーは pSEVA225 (vector) に挿入した DNA 断片を示す. SLG_25010-*desA* オペロンの転写開始点は青色矢印 (+1) で示した. 推定の -35/-10 配列と IR-DA の位置はそれぞれ紫色と赤色の四角で示した. (右パネル) Wx-SEMP, Wx-5 mM SA または Wx-5 mM VA で培養した各レポータープラスミドを保持する SYK-6 株の β -galactosidase 活性. 測定はそれぞれ 3 回ずつ行いその平均値を示した. エラーバーは標準偏差を示す. 統計処理は one-way ANOVA with Dunnett's multiple-comparison test を用いて行った. ns, $P > 0.05$; ****, $P < 0.0001$. (B) プライマー伸長法による SLG_25010-*desA* オペロンの転写開始点の決定. Wx-5 mM SA で培養した SYK-6 株から抽出した total RNA と 5' 末端を 6-carboxyfluorescein で蛍光標識した PE25010 プライマーを用いて逆転写反応を行った. (左パネル) キャピラリーシーケンサー ABI3730xl による逆転写産物のフラグメント解析結果. サイズスタンダードには 350ROX を使用し, 伸長産物の塩基数から転写開始点の位置を同定した. AU, arbitrary units. (右パネル) SLG_25010-*desA* オペロンのプロモーター領域の塩基配列. SLG_25010 の開始コдонは黒四角に白字で示した. 転写開始点は青色矢印 (+1) で示した. 推定の -35/-10 配列は紫色の下線で示した. IR-DA は赤色矢印で示した. 推定の Shine-Dalgarno (SD) 配列は緑色の下二重線で示した. PE25010 プライマーの位置は破線矢印で示した.

5. *desX* の *E. coli* における発現と DesX の精製

精製 DesX を得るために、His タグを融合した *desX* を *E. coli* で発現させ、遺伝子産物の精製を行った。*desX* の全長を pET-16b に挿入した p16bdX を *E. coli* BL21(DE3)株に導入し、T7 プロモーターの制御下で His タグ融合 *desX* を発現させた。培養液から細胞抽出液を調製し SDS-PAGE で分離した結果、約 29 kDa を示すタンパク質の生産が観察された (Fig. 2-7)。このサイズは、His タグ融合した DesX の推定アミノ酸配列から予測された理論分子量 (28,968) に近似していた。さらに、Ni アフィニティークロマトグラフィーにより DesX がほぼ単一に精製されたことが示された (Fig. 2-7)。

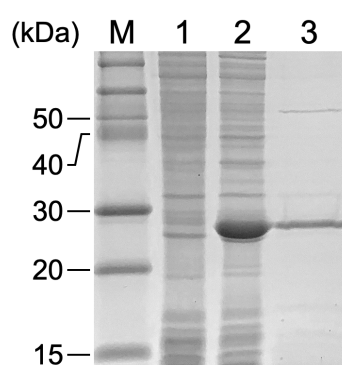


Fig. 2-7. *E. coli* BL21(DE3)株における *desX* の発現と DesX の精製.

SDS-12% PAGE により分離したタンパク質をクーマシーブリリアントブルーにより染色した. Lanes: M, 分子量マーカー; 1, pET-16b (vector)を保持した *E. coli* BL21(DE3)株の細胞抽出液 (10 µg protein); 2, p16bdX を保持した *E. coli* BL21(DE3)株の細胞抽出液 (10 µg protein); 3, His spin trap により精製した DesX (1.0 µg protein).

6. SLG_25010-*desA* オペロンのプロモーター領域への DesX の結合能

DesX が SLG_25010-*desA* オペロンのプロモーター領域に結合するかどうかを調べるために EMSA を行った。SLG_25010-*desA* オペロンの周辺領域を段階的に含む DNA 断片 (desAp1-desAp5 プローブ) を調製し、精製 DesX とインキュベートした (Fig. 2-8A)。その結果、desAp1、desAp3、desAp4 および desAp5 プローブではシフトバンドが観察されなかったが、desAp2 プローブにおいて DNA-DesX 複合体を示すシフトバンドの形成が観察された (Fig. 2-8B)。また、異なる濃度の DesX を desAp2 プローブとインキュベートしたところ、いずれの濃度においても 1 つのシフトバンドのみが観察された (Fig. 2-8C)。したがって、desAp2 領域内には 1 つの DesX 結合部位が存在すると考えられた。desAp2 領域内には SLG_25010-*desA* オペロンの転写開始点上流に見出された IR-DA が存在した (Fig. 2-6B and 2-8A)。DesX の結合領域を限定するために、IR-DA を含まない desAp6 と desAp8 プローブおよび IR-DA を含む desAp7 プローブを用いて EMSA を行った (Fig. 2-8A)。desAp6-desAp8 プローブと精製 DesX をそれぞれインキュベートした結果、IR-DA を含まない desAp6 および desAp8 プローブでは DNA-DesX 複合体を示すシフトバンドが形成されなかったが、IR-DA を含む desAp7 プローブではシフトバンドが形成された (Fig. 2-8D)。したがって、SLG_25010-*desA* オペロンのプロモーター領域への DesX の結合には IR-DA が重要であることが強く示唆された。

IR-DA が DesX の結合に必須であるかどうかを明らかにするために、変異を導入した IR-DA を含む DNA 断片に対する DesX の結合性を調査した。野生型の IR-DA を DNA 断片の 3'末端に有する desAp9 プローブを調製し EMSA を行った (Fig. 2-8A)。その結果、DesX 存在下において DNA-DesX 複合体を示すシフトバンドが形成された (Fig. 2-8E)。次に、desAp9 プローブに存在する IR-DA の全長 18 bp のうち left half site の 9 塩基、right half site の 9 塩基にそれぞれ変異を導入した DNA 断片 (desAp9mL および desAp9mR) を調製し (Fig. 2-8A)、DesX とインキュベートした。その結果、desAp9 プローブと比較してこれらのプロローブを用いた場合に DNA-DesX 複合体を示すシフトバンドが著しく減少した (Fig. 2-8E)。以上の結果から、IR-DA が DesX の DNA 結合に必須であることが明らかとなった。

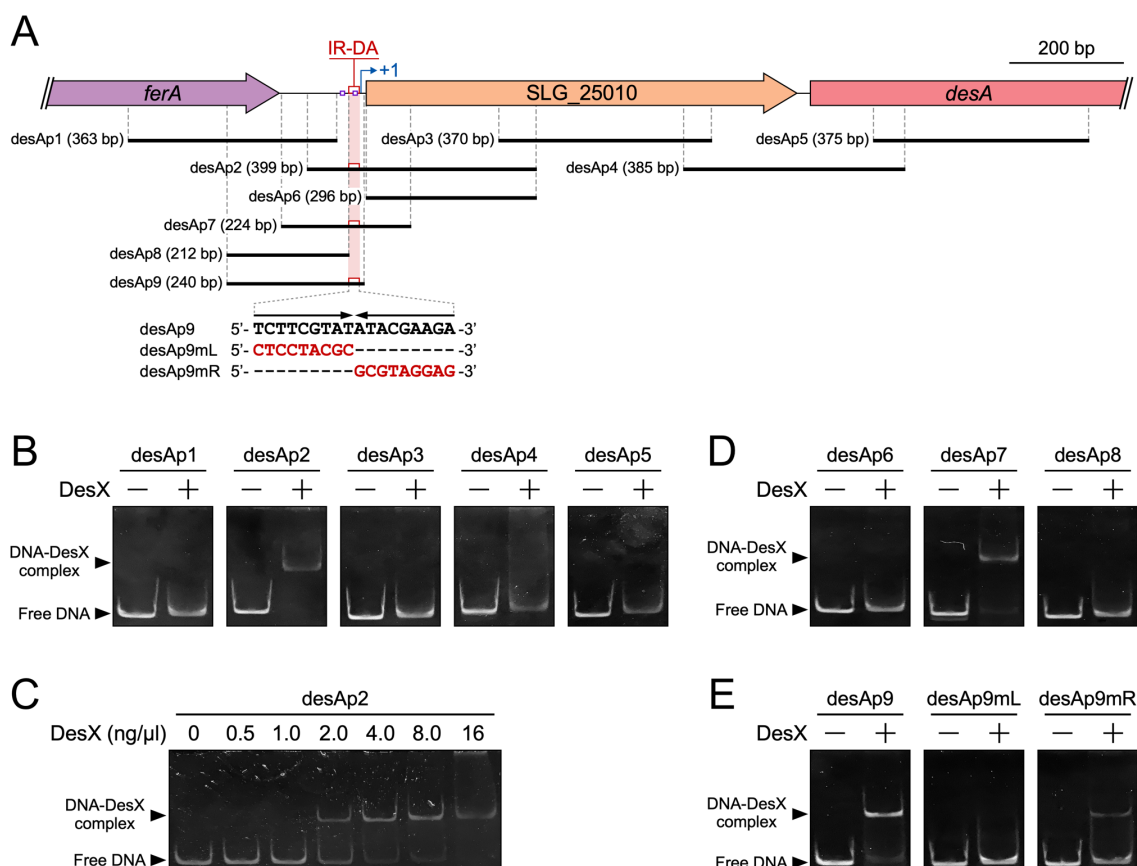


Fig. 2-8. *SLG_25010-desA* オペロンのプロモーター領域における DesX の結合解析.

(A) EMSA に用いた DNA 断片. *SLG_25010-desA* オペロンの転写開始点は青色矢印 (+1) で示した. -35/-10 配列と IR-DA の位置はそれぞれ紫色と赤色の四角で示した. *desAp9mL* および *desAp9mR* に導入した IR-DA の変異塩基は赤字で示した. (B and D) DesX を用いた *desAp1-desAp5* プローブ (B) および *desAp6-desAp8* プローブ (D) に対する EMSA. DesX の非存在下 (-) または存在下 (+, 8 ng protein/μl) で 400 pM の各 DNA プローブと 20°C で 20 分間反応させた. 反応液を 5% 非変性ポリアクリルアミドゲルにより分離し, SYBR Gold で染色した後に blue LED で DNA を検出した. (C) 異なる濃度の DesX を用いた *desAp2* プローブに対する EMSA. DesX の非存在下 (0 ng/μl) または存在下 (0.5-16 ng protein/μl) で 400 pM の *desAp2* プローブと 20°C で 20 分間反応させた. 反応液を 5% 非変性ポリアクリルアミドゲルにより分離し, SYBR Gold で染色した後に blue LED で DNA を検出した. (E) DesX を用いた *desAp9* プローブおよび変異 IR-DA 配列を含む DNA プローブ (*desAp9mL* および *desAp9mR*) に対する EMSA. DesX の非存在下 (-) または存在下 (+, 8 ng protein/μl) で 400 pM の各プローブと 20°C で 20 分間反応させた. 反応液を 5% 非変性ポリアクリルアミドゲルにより分離し, SYBR Gold で染色した後に blue LED で DNA を検出した.

7. *ferB*、*ligM* および *desB* プロモーター領域への DesX の結合能

DesX が *ferB*、*ligM* および *desB* プロモーター領域に結合するかを調べるため、各遺伝子のプロモーター領域に対する EMSA を行った (Fig. 2-9)。FerC の結合配列が存在する *ferB* プロモーター領域、DesR の結合配列が存在する *ligM* および *desB* プロモーター領域をそれぞれ含む DNA 断片を調製し DesX とインキュベートした結果、いずれの DNA 断片においても DNA-DesX 複合体を示すシフトバンドは形成されず、SA または VA の存在下でも結果は同様であった (Fig. 2-9)。以上の結果と、*ferB*、*ligM* および *desB* プロモーター領域には IR-DA と相同性を示す配列が存在しないことから、DesX は *ferB*、*ligM* および *desB* プロモーター領域に結合しないことが示された。さらに qRT-PCR 解析において、*ferB*、*ligM* および *desB* の転写には *desX* 破壊の影響が観察されなかったことから (Fig. 2-4B, C and D)、DesX は *ferBA* オペロン、*ligM* および *desB* の転写制御に関与しないと結論された。

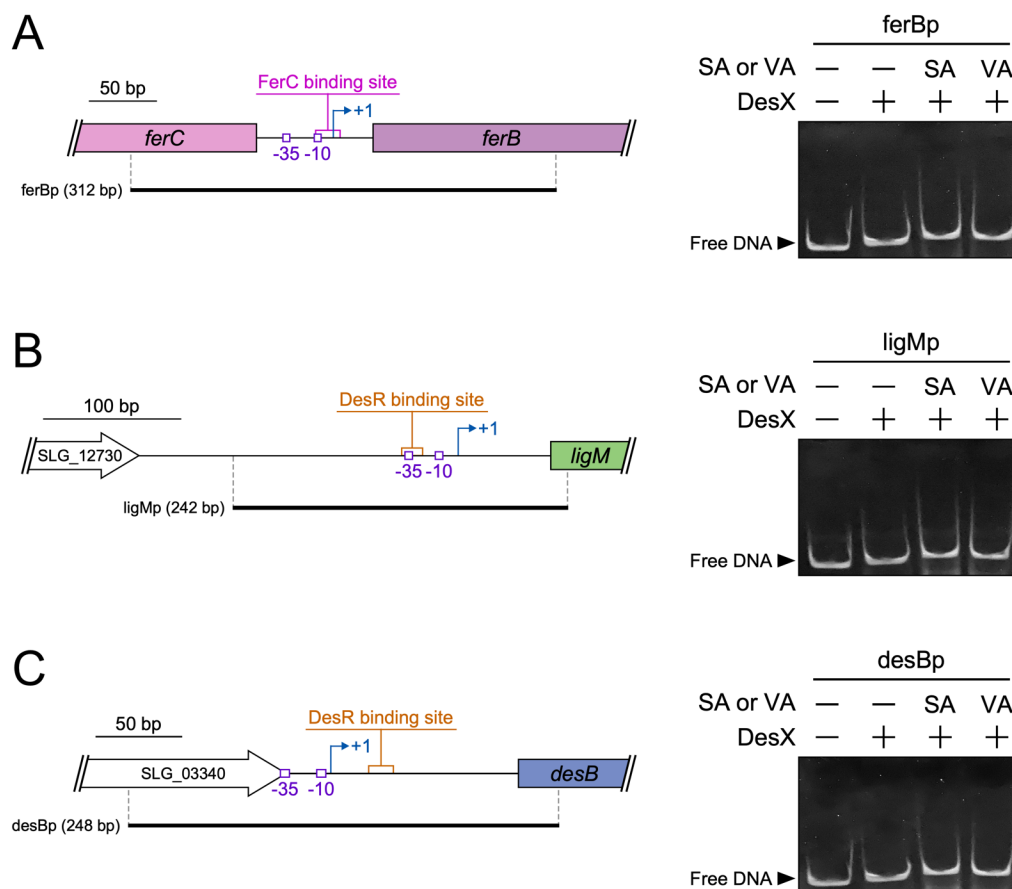


Fig. 2-9. *ferB*, *ligM* および *desB* プロモーター領域における DesX の結合解析.

(左パネル) *ferB* (A) (175), *ligM* (B) および *desB* (C) のプロモーター領域. EMSA に用いた各 DNA プロローブは黒いバーで示した. 各遺伝子の転写開始点は青色矢印 (+1) で示した. -35/-10 配列の位置は紫色の四角で示した. *ferB* プロモーター領域における FerC の結合配列および *ligM*/*desB* プロモーター領域における DesR の結合配列はそれぞれピンクとオレンジの四角で示した. (右パネル) DesX を用いた各 DNA プロローブに対する EMSA. SA/VA の非存在下 (-) または存在下 (50 mM) にて, DesX (8 ng protein/ μ l) と 400 pM の各 DNA プロローブを 20°C で 20 分間反応させた. 反応液を 5% 非変性ポリアクリルアミドゲルにより分離し, SYBR Gold で染色した後に blue LED で DNA を検出した.

8. DesX のエフェクター分子の同定

第1章の解析から、SA と VA が *desA* の誘導物質であることが明らかとなった (Fig. 1-3B)。また、本章においてもオペロンを形成する SLG_25010 と *desA* の転写が SA または VA の存在下で誘導されることが示された (Fig. 2-4A and E)。SA および VA が DesX の SLG_25010-*desA* オペロンのプロモーター領域への結合性に影響を与えるかどうかを調べるため、SA または VA の存在下で DesX の desAp2 プローブに対する EMSA を行った。その結果、SA 存在下では濃度依存的に DNA-DesX 複合体を示すシフトバンドが減少し、5 mM の SA 存在下でシフトバンドが完全に消失した (Fig. 2-10)。VA を用いた場合も SA と同様に濃度依存的にシフトバンドの減少が観察されたが、50 mM でシフトバンドが完全に消失した (Fig. 2-10)。これらのことから、SA と VA は DesX のエフェクター分子として機能し、DesX による転写抑制を解除することが明らかとなった。また、SA は VA と比較してより低濃度で DesX の DNA 結合に影響を及ぼしたことから、DesX に対する両化合物の親和性は異なることが示唆された。

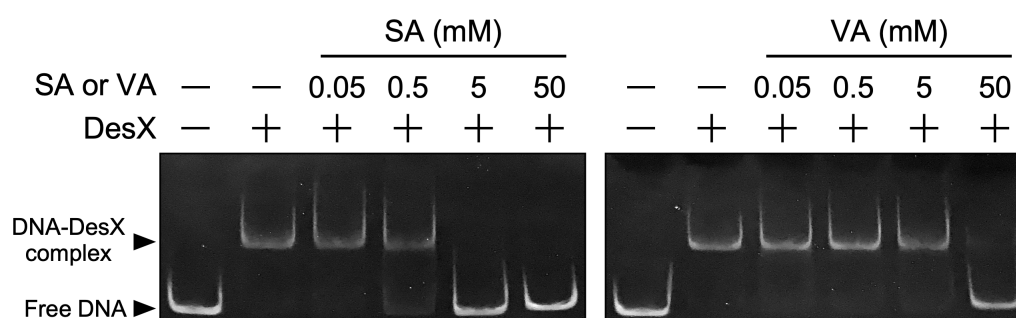


Fig. 2-10. SA または VA 存在下における DesX の DNA 結合解析.

SA または VA 存在下における IR-DA を含む desAp2 プローブに対する DesX の EMSA. SA/VA の非存在下 (—) または存在下 (0.05, 0.5, 5, or 50 mM) にて, DesX (4 ng protein/μl) と 400 pM の desAp2 プローブを 20°C で 20 分間反応させた. 反応液を 5% 非変性ポリアクリルアミドゲルにより分離し, SYBR Gold で染色した後に blue LED で DNA を検出した.

第3節 考察

第2章では、SYK-6株において *desA* の制御に関与する転写制御因子として IclR 型転写制御因子 DesX を同定し、DesX の関与する *desA* の転写制御システムを明らかにした。RT-PCR 解析の結果、*ferB-ferA-SLG_25010-desA* 遺伝子クラスターは *ferBA* オペロンと *SLG_25010-desA* オペロンの2つの転写単位で構成され (Fig. 2-5)、*SLG_25010-desA* オペロンの転写開始点は *SLG_25010* 開始コドンの10塩基上流の T 残基であることが示された (Fig. 2-6B)。qRT-PCR 解析から、DesX は *SLG_25010-desA* オペロンの転写を負に制御する唯一の制御因子であること (Fig. 2-4A and E)、また、DesX は *ligM* および *desB* の転写制御に関与しないことが示された (Fig. 2-4B, C, and 2-9)。これは両遺伝子の転写が DesR による単独の制御を受けることを示した第1章の結果を支持した (Fig. 1-5)。これまでに、バクテリアにおける芳香族化合物の代謝制御に関わるさまざまな転写制御因子が解析・報告されている (155)。中でも IclR 型転写制御因子は、他の転写制御因子ファミリーと異なり芳香族化合物代謝の制御においてアクチベーターとリプレッサーの両者が存在する (155)。一般に、アクチベーターとして機能する IclR 型転写制御因子は、誘導物質存在下において代謝酵素遺伝子(群)の転写を正に制御する一方、誘導物質の有無にかかわらず自身の転写を抑制することが知られている (155, 208)。アクチベーターである GenR、MhpR、PcaU、および PobR は、制御対象プロモーターの-35 配列上流に結合し RNAP をリクルートすると考えられている (156, 270)。一方、リプレッサーとして機能する IclR 型転写制御因子は制御対象遺伝子を負に制御し、エフェクター存在下でその抑制が解除される (261, 265, 271, 272)。 *P. putida* において HmgR は、homogentisate 代謝酵素遺伝子群 *hmgABC* の転写を制御するリプレッサーとして機能する (265)。HmgR は-10 配列と転写開始点を覆うように結合するため、RNAP のプロモーターへの結合と競合すると考えられている。 *Comamonas* sp. E6 株において isophthalate 代謝系遺伝子群を制御する IphR は、制御対象の *iph* プロモーター領域に対して HmgR に類似した結合様式を示す (261)。このような結合様式を示すリプレッサー型の IclR 型転写制御因子は RNAP のプロモーターへの結合を遮断すると考えられている (208)。EMSA の結果、DesX は *SLG_25010* プロモーターの-10 配列と重なる IR-DA に結合することが示された (Fig. 2-8)。したがって、DesX は RNAP のプロモーター領域への結合を遮断することで *SLG_25010-desA* オペロンの転写を抑制していると考えられた。

DesX は SA と VA の両方をエフェクター分子として認識することが示された (Fig. 2-10)。この結果と第1章の知見から、SYK-6株における SA 代謝は次のように逐次的に代謝酵素遺伝子群が発現することで効率的に進行すると考えられた。はじめに、細胞内で syringyl 型リグニン由来化合物の分解によって生じた、もしくは細胞外から直接取り

込まれた SA が DesX に結合することで *desA* の転写抑制が解除され、DesA により SA が 3MGA へと変換される。SA 存在下では DesR の脱抑制も起こるため、制御下にある *ligM* および *desB* の転写が誘導され、LigM により 3MGA は GA に変換される。その後、生成した GA は DesB による環開裂を受け OMA へと変換され PCA 4,5-開裂経路に流入する。GA は LigR のエフェクター分子であるため (180)、GA と結合した LigR により PCA 4,5-開裂酵素遺伝子群の転写が活性化され、OMA 以降の代謝が迅速に進行する。

DesX および DesR は、どちらも VA および SA をエフェクター分子として認識する (Fig. 1-12 and 2-10)。DesR にとってこの性質は、VA と、SA 代謝中間体の 3MGA の両方の脱メチルに働く *ligM* の転写制御に関わることから合理的である。一方、SA の脱メチルに主に働く DesA は、破壊株の解析から VA の変換にも部分的に関与することが示されている (68, 70)。したがって、DesX が SA に加えて VA をエフェクター分子として認識することで、VA のより効率的な変換を可能としているのかもしれない。*in vitro* において DesX は VA よりも SA に対し高い親和性を持つことが示唆された (Fig. 2-10)。SA と VA の変換能を欠損した DDAM 株における *desA* の転写量は、VA 誘導時よりも SA 誘導時の方が高く (Fig. 1-3B)、DesX のエフェクター特異性を反映した結果が示された。一方、野生株における *desA* の転写量は DDAM 株とは異なり、SA 誘導時よりも VA 誘導時の方が高い値を示した (Fig. 1-3A and 2-4A)。この理由は明確ではないが、野生株では VA/SA が DDAM 株のように蓄積せず、その存在量は VA/SA の細胞内への取り込み速度と変換速度の両者に影響されると考えられるため、*in vitro* の結果を直接反映しなかったのかもしれない。さらに、EMSA では DesX が DNA から解離するのに mM 濃度のエフェクター分子を必要としたが (Fig. 2-10)、この理由も現時点では不明である。高濃度のエフェクター分子を必要とする現象は DesR でも同様に観察された (Fig. 1-12)。

SLG_25010-*desA* オペロンの転写開始点は、SLG_25010 の開始コドンの 10 塩基上流に位置し (Fig. 2-6B)、SLG_25010 の開始コドンから 8-6 塩基上流に弱い Shine-Dalgarno 配列が見られた (Fig. 2-6B)。SLG_25010-*desA* オペロンの推定 mRNA の配列を用いて ribosome binding site (RBS) calculator (273)により SLG_25010 と *desA* の translation initiation rate を調べた結果、SLG_25010 は 1.77 であったのに対し、*desA* は 2,395 であった。これらの値を *ferB* (2,577)、*ferA* (230)、*ligM* (177) および *desB* (6,023) の translation initiation rate と比較したところ、*desA* は生成する mRNA から十分に翻訳されると考えられた。一方、SLG_25010 の値 (1.77) はこれら遺伝子と比較して極めて低く、SLG_25010 は生成する mRNA から翻訳される可能性は低いと推測された。RT-PCR 解析により、*ferA*-SLG_25010 遺伝子間領域において VA、SA および FA 培養時に *ferB* プロモーターからのリードスルーが観察された (Fig. 2-5)。SEMP 培養時に *ferA*-SLG_25010 の増幅が観察されず、*ferBA* オペロンを誘導しない SA および VA での培養時に同領域の増幅が観察された理由とし

て、SEMP 培養時には SLG_25010-*desA* オペロンのプロモーター領域に DesX が結合するため *ferB* プロモーターからの転写が DesX の結合部位付近で阻害されたのに対して、SA および VA 培養時には DesX が解離するため *ferB* プロモーターからの転写が進行したと推察される。*ferB* プロモーターが誘導されない SEMP 培養時に *ferB-ferA* の増幅が観察されたことから、*ferB* プロモーターが誘導されない SA/VA 培養時には、基底レベルの *ferB* プロモーターからの転写によって *ferA*-SLG_25010 が転写されたと思われる。*ferB* プロモーターのリードスルーで生成する mRNA 配列を用いて RBS calculator により SLG_25010 の translation initiation rate を調べた結果、その値は 82 であった。したがって、このリードスルーによって生成する mRNA が SLG_25010 の翻訳に必要とされるのかもしれない。

SLG_25010 は hydrolase とアノテーションされているが、その機能は明らかとなっていない。SYK-6 株の SA 代謝下流で生じる CHMOD は、自発的に PDC に変換される一方で hydrolase によって OMA に変換されると考えられているが、本 hydrolase 遺伝子は同定されていない (Fig. VIII) (72)。可能性の 1 つとして、SLG_25010 が CHMOD の加水分解に関与することが考えられる。*N. aromaticivorans* DSM 12444 株は、SYK-6 株と類似した SA 代謝系を有している (81, 109)。DSM 12444 株において、SA は SYK-6 株の DesA と 71% のアミノ酸配列相同性を示す Saro_2404 遺伝子産物 (DesA_{NA}) (Fig. 2-11) によって 3MGA に変換されたのち、CHMOD を経由して代謝される (81, 109)。CHMOD から OMA への変換には methylesterase (DesC [Saro_2864]) と *cis-trans* isomerase (DesD [Saro_2865]) が関与することが示されている (81)。DSM 12444 株のゲノム中には SLG_25010 のオルソログは存在しなかったが、SYK-6 株のゲノム中には *desC* と 45% のアミノ酸配列相同性を示す SLG_12720 および *desD* と 40% のアミノ酸配列相同性を示す SLG_07230 が見出された (Fig. 2-11)。今後、SYK-6 株において、SLG_25010、SLG_12720、SLG_07230 の CHMOD 変換への関与の有無を調べる必要がある。

BLAST 検索により、DSM 12444 株のゲノム中には、SYK-6 株の DesX と 51% のアミノ酸配列相同性を示す Saro_2407 が *desA*_{NA} (Saro_2404) の近傍に見出された (Fig. 2-11)。また、*desA*_{NA} と Saro_2403 との遺伝子間領域には、IR-DA と 18 塩基のうち 10 塩基が一致する 18 bp の不完全な IR 配列 (5'-TTTTCAAGCACGCGAAAA-3' [下線は IR 部分を示す]) が存在した (Fig. 2-11)。以上の事実から、*desA*_{NA} の転写は Saro_2407 遺伝子産物によって制御されている可能性が高いと考えられる。

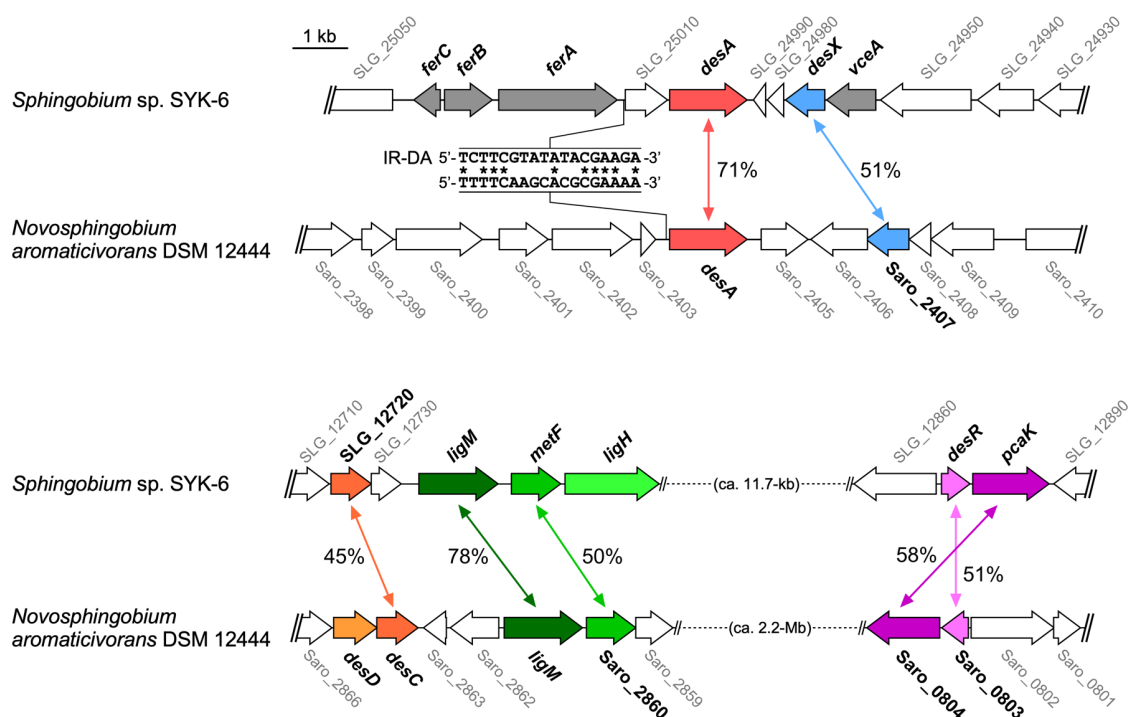


Fig. 2-11. *Sphingobium* sp. SYK-6 株と *N. aromaticivorans* DSM 12444 株における *desA*, *desX*, *ligM* および *desR* 周辺領域の遺伝子構成の比較.

アミノ酸配列相同性を示す遺伝子は両矢印で示した. 各数字は対応する遺伝子のアミノ酸配列相同性を EMBOSS Needle pairwise alignment program で算出したものを示す. IR-DA および *desA*_{NA} の上流領域に見出された IR-DA に類似した IR 配列をそれぞれ示す. アスタリスクは保存されている塩基を示す.

植物の進化と植物細胞壁中のリグニン組成の変化は密接な関係にあることが知られている。針葉樹は約 2.9–3.2 億年前に登場したとされ、リグニン組成として *guaiacyl* 型リグニンと微量の *p*-hydroxyphenyl 型リグニンを含む (274)。一方、広葉樹は針葉樹に遅れ約 0.9–1.3 億年前に登場し、進化の過程で *syringyl* 型リグニンの生合成経路を獲得したと考えられている (274, 275)。SYK-6 株で DesR に制御される *ligM* オペロンは、針葉樹リグニンを構成する *guaiacyl* 型リグニンを分解するために進化の過程で獲得されたと推定される。*syringyl* 型リグニンは *guaiacyl* 型リグニン以降に登場したことを踏まえると、バクテリアは環境中のリグニン組成の変化に対応するために SA 代謝システムを新たに獲得してきたと考えられる。SYK-6 株においては DesR に制御される C₁ 代謝系遺伝子とカップリングした VA 代謝系遺伝子 (*ligM-metF-ligH* オペロン) が確立されたのちに、SA 代謝に必要な *desA* が DesX による転写制御を受ける形で独立して獲得された可能性が考えられる。SA の DesA と LigM による連続した脱メチルにより生成する GA に対する PCA 4,5-dioxygenase (LigAB) と 3MGA 3,4-dioxygenase (DesZ) の V_{\max}/K_m は DesB の値の 6% と 1% と極めて低い (71, 244)。そのため、GA を効率よく環開裂する酵素 (DesB) が必要となり、*desB* はその後 DesR レギュロンの一部に取り込まれたのかもしれない。

第4節 材料と方法

試供菌、プラスミド、プライマー、培養条件

第2章で使用した菌株とプラスミドはTable 2-2に、そしてPCRに使用したプライマーはTable 2-3にそれぞれ示した。SYK-6株とその遺伝子破壊株、および*E. coli*の培養は第1章に示した方法と同様に行った。

Table 2-2. 第2章で使用した菌株およびプラスミド

Strain or plasmid	Relevant characteristic(s) ^a	Reference or source
<i>Sphingobium</i> sp.		
SYK-6	Wild type; Nal ^r Sm ^r	(45)
$\Delta ferC$ (SME043)	SYK-6 derivative; <i>ferC::kan</i> ; Nal ^r Sm ^r Km ^r	(175)
$\Delta desX$ (SME085)	SYK-6 derivative; SLG_24970 (<i>desX</i>):: <i>kan</i> ; Nal ^r Sm ^r Km ^r	This study
$\Delta desR$ (SME047)	SYK-6 derivative; $\Delta desR$; Nal ^r Sm ^r	(241)
$\Delta desQ$ (SME058)	SYK-6 derivative; $\Delta desQ$; Nal ^r Sm ^r	(241)
<i>E. coli</i>		
NEB 10-beta	$\Delta(ara-leu)$ 7697 <i>araD139 fhuA $\Delta lacX74$ galK16 galE15 e14-ϕ80dlacZΔM15 recA1 relA1 endA1 nupG rpsL (Sm^r) rph spoT1 $\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)$</i>	New England Biolabs
BL21(DE3)	F ⁻ <i>ompT hsdSβ(rB⁻ mB⁻) gal dcm</i> (DE3); T7 RNA polymerase gene under control of the <i>lacUV5</i> promoter	(249)
Plasmids		
pUC18	Cloning vector; Ap ^r	(276)
pBluescript II KS(+)	Cloning vector; Ap ^r	(250)
pK19mobsacB	<i>oriT sacB</i> ; Km ^r	(277)
pIK03	pBluescript II KS(+) with a 1.3-kb EcoRV fragment carrying <i>kan</i> of pUC4K; Ap ^r Km ^r	(70)
pJB866	RK2 broad-host-range expression vector; Tc ^r P _m <i>xyIS</i>	(251)
pSEVA225	RK2 <i>ori lacZ</i> promoter probe broad host range vector; Km ^r	(278)
pET-16b	Expression vector; T7 promoter, Ap ^r	Novagen
pUC401	pUC18 with a 4.8-kb SalI fragment carrying SLG_24970 (<i>desX</i>)	(70)
pKPEV	pBluescript II KS(+) with a 1.0-kb PstI-EcoRV fragment of pUC401	This study
pKPEVK	pKPEV with a 1.3-kb EcoRV fragment of pIK03 carrying <i>kan</i>	This study
pMPEVK	pK19mobsacB with a 2.3-kb PstI-SalI fragment of pKPEVK	This study
pKNIF	pBluescript II KS(+) with a 1.2-kb NruI fragment of pUC401	This study
pMPEVKNI	pMPEVK with a 1.2-kb SalI-EcoRI fragment of pKNIF	This study
pJB24970	pJB866 with a 1.1-kb PCR amplified HindIII-BamHI fragment carrying <i>desX</i>	This study
pSDA1	pSEVA225 with a 396-bp fragment carrying the sequence between positions -548 and -153 relative to the SLG_25010 initiation codon	This study
pSDA2	pSEVA225 with a 378-bp fragment carrying the sequence between positions -243 and +135 relative to the SLG_25010 initiation codon	This study
pSDA2a	pSEVA225 with a 238-bp fragment carrying the sequence between positions -103 and +135 relative to the SLG_25010 initiation codon	This study
pSDA2b	pSEVA225 with a 162-bp fragment carrying the sequence between positions -27 and +135 relative to the SLG_25010 initiation codon	This study
pSDA2c	pSEVA225 with a 144-bp fragment carrying the sequence between positions -9 and +135 relative to the SLG_25010 initiation codon	This study
pSDA3	pSEVA225 with a 441-bp fragment carrying the sequence between positions +48 and +488 relative to the SLG_25010 initiation codon	This study
pSDA4	pSEVA225 with a 387-bp fragment carrying the sequence between positions +430 and +816 relative to the SLG_25010 initiation codon	This study
p16bdX	pET-16b with a 750-bp NdeI-BamHI fragment carrying <i>desX</i>	This study

^aNal^r, Sm^r, Km^r, Ap^r, and Tc^r, resistance to nalidixic acid, streptomycin, kanamycin, ampicillin, and tetracycline, respectively.

Table 2-3. 第2章で使したプライマーの塩基配列

Purposes	Primers	Sequences (5' to 3')
qRT-PCR analysis	16S_qF	GCGCAGAACCTTACCAACGT
	16S_qR	AGCCATGCAGCACCTGTCA
	desA_qF	GCCTTCGCCTTCCTCAACTA
	desA_qR	CACCGGAACCCACTGCTT
	ligM_qF	GCTCTCCGACACGATGATCA
	ligM_qR	ACGTAAGCTTCGCCTTGTG
	desB_qF	TTTCGAGCATTATTCGCATTTC
	desB_qR	TCCGCAGGCGAATATTCCT
	ferB_qF	CCGGTGGAACGGGAAGA
	ferB_qR	CCACGCCACGTTGTTCAC
	25010_qF	GACATGCTGTGGCAGATGTG
	25010_qR	CGCATCTGCCGCTCATA
	desX_qF	CAGAAGGTGGACTCGTCGT
	desX_qR	AGGATATCGAGCGTGCG
RT-PCR analysis	RTferB_F	TGACGTACGACAATGCGGAA
	RTferA_F	TGACGCCCTCCATCATTCTCG
	RTferA_R	ATGATCCGCGTCTTCTCGTC
	RT25010_F1	ATGAGTCACTCGCCTTCCA
	RT25010_F2	TCAGCACCAGGCAATCACTT
	RT25010_R	GCATCGATGAGGGCATCCAT
	RTdesA_R1	CCGACGAGGTTGAACTGGTT
	RTdesA_R2	TCATAATCCGCCAGGGAC
Gene complementation	pJB24970_F	GACGTACCATGGGAAGCTTGACACGATCTACCTGCGCA
	pJB24970_R	CCTGCAGGATATCTGGATCCTCTCGTGGGACTGGTCAT
Primer extension	PE25010 ^a	ACGGTCATCGCAGATCAG
Promoter assay	pSDA1_F	ACCTGCAGGCATGCAAGCTTTCCATCATTCTCGACGGCG
	pSDA1_R	ATGTTTTTCTCCTAAGCTTTCAGTCCACCAGCATCAGG
	pSDA2_F	ACCTGCAGGCATGCAAGCTTGCATCCAGGAAGTCTGAT
	pSDA2a_F	ACCTGCAGGCATGCAAGCTTGCATGACCTTTCAATTGTGCG
	pSDA2b_F	ACCTGCAGGCATGCAAGCTTTCGTATATACGAAGAATATCGG
	pSDA2c_F	ACCTGCAGGCATGCAAGCTTTCGATTTCATGATCACTCG
	pSDA2_R	ATGTTTTTCTCCTAAGCTTTTCCCCATAGCCCGCAA
	pSDA3_F	ACCTGCAGGCATGCAAGCTTCTGATCTGCGATGACCGT
	pSDA3_R	ATGTTTTTCTCCTAAGCTTTCGCATCTGCCGCTCATA
	pSDA4_F	ACCTGCAGGCATGCAAGCTTGACATGCTGTGGCAGATGTG
	pSDA4_R	ATGTTTTTCTCCTAAGCTTTTCCGGCATTGTCCAGCA
Protein expression	p16bdX_F	TATCGAAGGTGCTCATATGATCCAGAAGGTGGACTC
	p16bdX_R	CTTTGTTAGCAGCCGGATCCTCAGCGGTCGCCAAG
EMSAs	desAp1_F	CTGCAGGATGTGCGCC
	desAp1_R	GTGAATGCCAGCCCCAAA
	desAp2_F	GATGACCTTTCAATTGTGCG
	desAp2_R	AAGTGAATGCCGGTGCTGAT
	desAp3_F	AGATCATTGCGCGCGCA
	desAp3_R	ATGGCTTCATGCTGCACC
	desAp4_F	ACCGGCGCCGATGATGC
	desAp4_R	TGGTTGAAGAGCACGGCGG
	desAp5_F	AACTGGCGCAACGAGCA
	desAp5_R	CTGCAGCTGGAAGCGATAGT
	desAp6_F	ATGAGTCACTCGCCTTCCA
	desAp7_F	TTCCCTCTGCACGACGT
	desAp7_R	GTGCCCAGATACGGTCATC
	desAp8_F	GCGCATCCAGGAAGTCTGAT
	desAp8_R	TTTCATCTACTCGAAGACCGG

Table 2-3. –continued.

Purposes	Primers	Sequences (5' to 3')
EMSAs	IR-DA_R	AATCCGATGTTCTTCGTATATACGAAGATTTCATCT
	IR-DA_mL_R	AATCCGATGTTCTTCGTATGCGTAGGAGTTTCATCT
	IR-DA_mR_R	AATCCGATGTCTCTACGCATACGAAGATTTCATCT
	ferBp_F	ATATTGTCGAGCGGGCTG
	ferBp_R	ATCTGGCGGTTGAGCTTG
	desBp_F	GCCGTTCCCCTCTCAGGC
	desBp_R	AAACCGCCGATGATCTTTGC
	ligMp_F	GTTTCCGCCTGGTCTGAA
	ligMp_R	AGGTGCCGACATCAGCTA

^a Primer labeled with 6-carboxyfluorescein at the 5' end.

試薬、基質、酵素、および遺伝子操作

各試薬、基質および酵素等は、第1章で示したメーカーの取扱説明書に従って使用した。Ferulate (FA)はSigma-Aldrich Co. LLC.から購入し、0.2 M の濃度で pH 7.0–8.0 となるように 1–2N NaOH aq.を用いて溶解し、-20°C で保存した。基本的な遺伝子操作は、第1章に示した方法と同様に行った。

SYK-6 株および遺伝子破壊株の細胞抽出液の調製

SYK-6 株とその遺伝子破壊株は、第1章の「SYK-6 株および遺伝子破壊株の細胞抽出液の調製」に従って培養し、細胞抽出液を調製した。細胞抽出液の全タンパク質濃度は、第1章の「Bradford 法によるタンパク質の定量」に従って測定した。

digoxigenin 標識または非標識 DNA プローブの調製

Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)の基本的な操作方法は、digoxigenin gel shift kit 2nd generation (Roche)の取扱説明書に従った。SYK-6 株および遺伝子破壊株の細胞抽出液を用いた EMSA に使用した digoxigenin 標識 DNA プローブは、Table 2-3 に示したプライマーと SYK-6 株の total DNA を用いて第1章の「digoxigenin 標識した DNA プローブの調製」に従って調製した。精製 DesX を用いた EMSA に使用した非標識 DNA プローブは、Table 2-3 に示すプライマーと SYK-6 株の total DNA を鋳型に用いて PCR により増幅した。目的の DNA 断片を 2%アガロースゲルで分離した後、NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (Takara Bio)キットを用いて抽出・精製し、20–40 µl の Elution buffer NE (5 mM Tris-HCl, pH8.5)にて溶出した。得られた DNA 溶液は、QuantusTM Fluorometer (Promega)にて QuantiFluor® dsDNA System (Promega)を用いて濃度を測定し、非標識 DNA プローブとした。

DNA-タンパク質結合反応

EMSA における SYK-6 株および遺伝子破壊株の細胞抽出液を用いた DNA-タンパク質結合反応は、第1章の「DNA-タンパク質結合解析」に従って行った。精製 DesX を用いた DNA-タンパク質結合反応は、DesX (0.5–16 ng protein/µl)、4 fmol の非標識 DNA プローブおよび 1× binding buffer [20 mM HEPES, 1 mM EDTA, 10 mM (NH₄)₂SO₄, 1 mM dithiothreitol, 0.2% (wt/vol) Tween 20, 30 mM KCl, pH 7.6]を含む全量 10 µl とした。非標識 DNA プローブと buffer を混合した後、DesX

を加えて穏やかに混合し、20°C で 20 分間保温した。細胞抽出液または DesX とエフェクター分子の会合を調べる場合は、VA または SA を終濃度 0.05、0.5、5 または 50 mM となるように反応系に 1 μ l 加えた。

シグナルおよび DNA の検出

結合反応後のサンプルは直ちに氷上で冷やし、2.5 μ l の 5 \times loading buffer (0.25 \times TBE buffer, 60%; glycerol, 40%; bromphenol blue, 0.2% [wt/vol])を加えて混合した。その後、5%非変性ポリアクリルアミドゲル (sterilized water, 3.1 ml; 5 \times TBE buffer [Tris, 445 mM; Boric acid, 445 mM; EDTA, 10 mM], 1.0 ml; 30% acrylamide, 0.85 ml; 10% ammonium peroxodisulfate, 23 μ l; TEMED, 3.85 μ l)を用いて、泳動 buffer に 0.5 \times TBE を使用して 80 V の定電圧で 4°C にて 1–2 時間泳動を行った。

digoxigenin 標識した DNA プローブの検出は、第 1 章の「メンブレンへの転写とシグナルの検出」に従って行った。非標識 DNA プローブの検出は、泳動終了後のゲルを 1/10,000 に希釈した SYBRTM Gold nucleic gel stain (Thermo Fischer Scientific, Inc.)を含む 0.5 \times TBE buffer に浸し、遮光して室温で 30 分間染色した。染色後のゲルは OHP シートで覆い、BluPAD Dual LED Blue/White Light Transilluminator (Bio-Helix Co., Ltd.)を用いて 470 nm の Blue LED を照射し、DNA を検出した。

SLG_24970 破壊株 (Δ desX 株)の作製

pUC401 (131)を PstI-EcoRV で消化して得た SLG_24970 の上流領域を含む 1.0 kb の DNA 断片を pBluescript II KS(+)の対応する制限酵素サイトに挿入し、pKPEV を得た。pIK03 を EcoRV で消化して得た Km 耐性遺伝子 (*kan*)を含む 1.3 kb の DNA 断片を、pKPEV の同サイトに挿入し pKPEVK を作製した。pKPEVK を PstI-SalI で消化して得られた 2.3 kb の DNA 断片を pK19*mobsacB* の対応する制限酵素サイトに挿入し、pMPEVK を得た。pUC401 を NruI 消化して得られた SLG_24970 の下流領域を含む 1.2 kb の DNA 断片を、pBluescript II KS(+)の EcoRV サイトにクローニングし pKNIF を得た。pKNIF から 1.2 kb の NruI フラグメントを含む 1.2 kb の SalI-EcoRI フラグメントを取得し、pMPEVK の対応する制限酵素サイトに挿入することで SLG_24970 破壊用プラスミド pMPEVKNI を構築した。

第 1 章の「エレクトロポレーション法によるプラスミド DNA の導入」に従って pMPEVKNI を SYK-6 株に導入し、相同組換えが起こり Km 耐性を獲得した株を、LB + Km 寒天培地で選抜した。選抜した株を 10% sucrose を含む LB + Km で 24 時間培養した。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 時間培養した。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の候補とし、以下に示す「遺伝子破壊株のサザンハイブリダイゼーション解析」に従って遺伝子の破壊を確認した。

遺伝子破壊株のサザンハイブリダイゼーション解析

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

第1章の「total DNA の回収」に従って SYK-6 株および遺伝子破壊株から total DNA を回収し、SalI 処理した後に 0.8%アガロースゲル電気泳動で分離し、脱プリンおよ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+; GE Healthcare)に DNA を転写した。メンブレンを風乾し、UV を 5 分間照射して 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 時間行った。DIG DNA labeling kit を用いてランダムプライマー法により digoxigenin 標識したプローブを加えて 65°C で 8 時間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 digoxigenin で標識した。メンブレンを洗浄液 1 (300 mM NaCl, 30 mM Sodium citrate dihydrate, 0.1% SDS)で 2 回洗浄した後、洗浄液 2 (15 mM NaCl, 1.5 mM Sodium citrate dihydrate, 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。Alkaline phosphatase で標識された抗 digoxigenin 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交代を除去した後、buffer 3 (pH9.5; 0.1 M Tris-HCl, 0.1 M NaCl, 50 mM MgCl₂)で平衡化した。発光基質 CDP-Star (Roche Diagnostics K.K.)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 LumiVision PRO image analyzer で検出した。

SLG_24970 の検出には pUC401 から切り出した SLG_24970 を含む 1.4 kb の ApaI 断片 (SLG_24970 プローブ)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 の EcoRV 断片 (*kan* プローブ)を用いた。作製した SLG_24970 破壊株は Δ *desX*株と命名した。

SYK-6 株および遺伝子破壊株の生育試験

SYK-6 株、 Δ *ferC* 株および Δ *desX*株を 10 ml の LB 培地で 24 時間培養し、第1章の「生育試験」に従って SA または VA での生育能を測定した。

desX 相補株の生育試験

desX (SLG_24970)相補用プラスミドを作製するため、SYK-6 株の total DNA を鋳型に Table 2-3 に示したプライマーを用いて PCR を行い、*desX* の全長を含む約 1.1 kb の増幅産物を得た。得られた DNA 断片を NEBuilder HiFi DNA assembly cloning kit (New England Biolabs, Inc.)を用いて pJB866 の HindIII-BamHI サイトに挿入し、*desX* 相補用プラスミド (pJB24970)を作製した。pJB866 および pJB24970 を、第1章の「エレクトロポレーション法によるプラスミド DNA の導入」に従って SYK-6 株および Δ *desX*株にそれぞれ導入し、*desX* 相補株を得た。

SYK-6(pJB866 または pJB24970)株および Δ *desX*(pJB866 または pJB24970)株を、それぞれ Tc を含む 10 ml の LB 培地で 24 時間培養した。培養液を集菌した後、Wx buffer で 2 回洗浄し、1 ml の Wx buffer に懸濁した。得られた菌体は、Tc および P_m プロモーターの誘導物質として 1 mM の *m*-toluate を含む 5 mM の SA を添加した 5 ml の Wx 培地に OD₆₆₀ = 0.2 となるように植菌した。相補株の生育能は、TVS062CA を用いて 30°C で 60 rpm の速度で振盪し、OD₆₆₀ を継続的に測定することで調べた。

total RNA の単離

SYK-6 株および $\Delta desX$ 株を LB 培地で 24 時間前培養した。培養液を集菌した後、菌体を Wx buffer で 2 回洗浄および懸濁した。OD₆₀₀ = 0.2 となるように 10 ml の Wx-SEMP 培地、Wx-5 mM SA 培地、Wx-5 mM VA 培地または Wx-5 mM FA 培地に植菌し、30°C で OD₆₀₀ = 0.5–0.6 になるまで培養した。培養液を集菌した後、第 1 章の「total RNA の単離」に従って total RNA を調製した。

逆転写反応による cDNA の調製

逆転写反応による cDNA の調製は、第 1 章の「逆転写反応による cDNA の調製」に従って行った。

定量的逆転写 PCR (qRT-PCR)解析

qRT-PCR 解析は、cDNA を鋳型とし、Thunderbird SYBR qPCR mixture (Toyobo Co., Ltd.)と LightCycler 480 System II (Roche Diagnostics K.K.)を用いて行った。基本的な操作方法是取扱説明書に従って行った。リアルタイム PCR に用いたプライマーは、すべて Primer Express version 2.0 software program (Applied Biosystems)を用いて設計した (Table 2-3)。PCR 反応は 2 μ l の cDNA 溶液、10 pmol の遺伝子特異的プライマーおよび 10 μ l の Thunderbird SYBR qPCR mixture を含む全量 20 μ l とした。反応液を調製後、3,000 rpm で 1 min 常温遠心して気泡を除去するとともに反応液を well の底に集約した。リアルタイム PCR 反応の蛍光モニタリングは LightCycler 480 System II を用いて行った。サイクルコンディションは、95°C-3 sec、60°C-30 sec を 40 サイクルとし、反応後 60°C から 95°C まで 2°C/min の速度で徐々に温度を上昇させて増幅産物の融解曲線 (melting curve)を作製し、増幅の特異性を検証した。各サンプルの転写量を比較するためのハウスキーピング遺伝子として SYK-6 株の 16S rRNA を用いた。各 mRNA および 16S rRNA の量は、標準 DNA を使用して測定した。

Reverse transcription (RT)-PCR 解析

RT-PCR 解析は、1 μ l の cDNA 溶液を鋳型に、各遺伝子間領域を特異的に増幅するプライマー (Table 2-3)と Q5 Hot Start high-fidelity DNA polymerase (New England Biolabs. Inc.)を用いて PCR を行った。得られた PCR 産物を 0.8%のアガロース電気泳動によって分離した。

LacZ レポーターアッセイ用プラスミドの作製

SYK-6 株の total DNA を鋳型に、Table 2-3 に示したプライマーを用いて PCR を行い、*desA* 内部から上流領域までを段階的に含む DNA 断片をそれぞれ調製した。得られた DNA 断片を、NEBuilder HiFi DNA assembly cloning kit を用いて pSEVA225 (278)に含まれるプロモーターレスの *lacZ* 上流の HindIII サイトに挿入し、プロモーター活性測定用のレポータープラスミドを作製した。

LacZ レポーターアッセイ

レポータープラスミドを第1章の「エレクトロポレーション法によるプラスミド DNA の導入」に従って、SYK-6 株にそれぞれ導入した。レポータープラスミドを保持した SYK-6 株を、Km を含む LB 培地で 24 時間前培養した。培養液を集菌した後、菌体を Wx buffer で 2 回洗浄および懸濁した。Km を含む 10 ml の Wx-SEMP 培地、Wx-5 mM SA 培地または Wx-5 mM VA 培地に $OD_{600} = 0.2$ となるように植菌し、30°C で $OD_{600} = 0.5-0.6$ になるまで培養した。

培養液を集菌した後、菌体を Wx buffer で 2 回洗浄し $OD_{600} = 2.0$ ($Abs_{600} = 2.0$) となるように同 buffer に懸濁した。得られた菌体懸濁液を用いて、第1章の「LacZ レポーターアッセイ」に従って β -galactosidase 活性を測定した。

プライマー伸長法

SYK-6 株を Wx-5 mM SA 培地で培養した後、第1章の「total RNA の単離」に従って total RNA を調製した。得られた 5 μ g の total RNA を鋳型とし、SLG_25010 の内部に特異的に結合する 6-carboxyfluorescein で標識した蛍光プライマー (Table 2-3) を 2 pmol 用いて第1章の「逆転写反応による cDNA の調製」に従って逆転写産物を調製した。サイズスタンダードに 350ROX を使用し、キャピラリーシーケンサー ABI3730xl (Applied Biosystems) により逆転写産物のフラグメント解析を行った。フラグメント解析は株式会社マクロジェン・ジャパンに委託した。

E. coli における *desX* の発現と DesX の精製

desX をコードする配列は、SYK-6 株の total DNA を鋳型に Table 2-3 に示したプライマーを用いて PCR にて増幅した。得られた DNA 断片を、NEBuilder HiFi DNA assembly cloning kit を用いて pET-16b の NdeI-BamHI サイトに挿入し、p16bdX を作製した。

E. coli BL21(DE3) 株に p16bdX を導入し、Ap を含む LB 培地で 12 時間前培養を行った。得られた培養液を同培地に終濃度 1% となるように植菌し、30°C で $OD_{600} = 0.5-0.6$ になるまで培養した後、終濃度 1 mM の IPTG を加えてさらに 30°C で 4 時間誘導培養を行った。*desX* を高発現させた *E. coli* 培養液を 5,000 \times g、5 min、4°C で集菌し、300 mM NaCl、100 mM imidazole を含む 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5) で 2 回洗浄後、同 buffer に懸濁した。超音波破碎装置により細胞を破碎し、19,000 \times g、15 min、4°C で遠心分離を行った。上清を細胞抽出液として回収し、300 mM NaCl と 100 mM imidazole を含む 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5) であらかじめ平衡化した His SpinTrap (GE Healthcare) にアプライし、100 \times g、1 min、4°C で遠心した。夾雑タンパク質の溶出には 300 mM NaCl と 100 mM imidazole を含む 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5) を用いて 3 回洗浄し、300 mM NaCl と 500 mM imidazole を含む 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5) で目的タンパク質を溶出させた。その後、遠心式限外ろ過フィルター Amicon Ultra (10 kDa cut) を用いて脱塩と濃縮を行った。また、DesX は実験前に遠心式ろ過メンブレン Ultrafree-MC filter によって不溶物を除去した。

タンパク質の定量は、第1章の「Bradford 法によるタンパク質の定量」に従って行った。DesX の発現と精製については、第1章の「SDS-PAGE 解析」に従って調べた。

統計解析

統計解析は、GraphPad Prism 8 を使用して行った。Dunnett's test の多重比較による一元配置分散分析 (one-way ANOVA) と Student's *t* test を用いた pairwise 比較をそれぞれ使用した。< 0.05 の *P* 値は統計的に有意であることを示す。

総括

植物細胞壁の主要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再生可能な芳香族資源であるため、持続可能な社会の構築の観点からその利活用が望まれている。しかし、リグニンは *p*-hydroxyphenylpropanoids がランダムに重合した不均一な高分子化合物であるため、分解して特定の化合物に変換することが困難であり、その有効利用法は開発途上にある。近年、有効なリグニン利用法として、高分子リグニンを化学的に低分子化し、得られる不均一で多様な低分子芳香族化合物を **biological funneling** と称されるバクテリアの代謝系を利用して工業的に有用な基幹化合物へと変換させる戦略が注目を集めている。

Sphingobium sp. SYK-6 株は、世界で最もリグニン由来芳香族化合物の代謝系が明らかにされたバクテリアであり、リグニン由来のさまざまな二量体および単量体芳香族化合物を唯一の炭素源・エネルギー源として生育できる。SYK-6 株は、guaiacyl 型および syringyl 型構造を有する多様なリグニン由来芳香族化合物をそれぞれ vanillate (VA) と syringate (SA) に集約して代謝し、その後の代謝過程でポリマー原料としての利用が期待される 2-pyrone-4,6-dicarboxylate (PDC) を生成する。VA と SA は自然界におけるリグニンの生分解過程で生じる重要な代謝中間体であると同時に、リグニンの化学的低分子化処理で生じる主要分解産物である。したがって、SYK-6 株における VA/SA 代謝とその制御系を解明することは、地球上における炭素循環の理解につながるだけでなく、リグニンから得られる多様な芳香族化合物を高効率に PDC 等の基幹化合物に変換する微生物株を構築する上で有用な情報を与えるものと期待される。

SYK-6 株において VA は、tetrahydrofolate (H₄folate) 依存性の VA *O*-demethylase (LigM) により脱メチルを受け protocatechuate (PCA) へと変換された後、PCA 4,5-開裂経路によって代謝される。一方 SA は、LigM と 49% のアミノ酸配列相同性を示す H₄folate 依存性の SA *O*-demethylase (DesA) によって脱メチルを受け 3-*O*-methylgallate (3MGA) へと変換される。その後 3MGA は 3 つの経路に分岐して代謝されるが、その中でも LigM による脱メチルと gallate (GA) dioxygenase (DesB) による環開裂を受け PCA 4,5-開裂経路に合流する経路が主要な役割を担うことが明らかとなっている。これまでに、SYK-6 株の VA/SA 代謝に関与する *ligM* (SLG_12740)、SA 代謝に関与する *desA* (SLG_25000) および *desB* (SLG_03330) の機能についてはその詳細が解析されてきた。一方、SYK-6 株の染色体上で異なる遺伝子座に存在するこれら遺伝子がどのような発現調節を受けるかは明らかにされていなかった。本研究では、SYK-6 株の VA/SA 代謝制御の全容解明を目的とし、本株の VA/SA 代謝の主要代謝酵素遺伝子である *desA*、*ligM* および *desB* の転写制御システムについて解析を行った。

第1章では、はじめに *desB* 上流領域に結合性を示すタンパク質の候補として見出された MarR 型転写制御因子と相同性を示す DesR (SLG_12870) および LysR 型転写制御因子と相同性を示す DesQ (SLG_14170) の *desA*、*ligM* および *desB* の転写制御への関与を調査した。SYK-6 株の VA/SA 変換は VA および SA 誘導的であり、*desA*、*ligM* および *desB* の転写は VA および SA 特異的に誘導され、両化合物がこれら遺伝子の誘導物質であることが明らかとなった。遺伝子破壊株の解析から、DesR が *desB* および *ligM* の転写を負に制御することが示された。一方、DesR は *desA* の転写制御に関与しないことが示唆された。また、DesQ はいずれの遺伝子の転写制御にも関与しなかった。DesR によって制御を受ける *desB* および *ligM* の上流には VA/SA 誘導性のプロモーターが存在し、これらのプロモーター領域には互いに高い相同性を示す 15 塩基の不完全な inverted repeat (IR) 配列 IR-B と IR-M がそれぞれ見出され、IR-B は *desB* の転写開始点下流に位置し、IR-M は *ligM* プロモーター領域の -35 配列を覆うように存在していた。DesR は IR-B および IR-M をそれぞれ認識して *desB* および *ligM* プロモーター領域に結合することが示され、VA または SA が DesR のエフェクター分子として機能することで DesR の DNA 結合を阻害することが明らかとなった。また、DesR は *desR* 上流領域に存在する IR-B および IR-M と相同性を示す IR-R を認識して DNA に結合し、*desR* 自身の転写を負に制御することが明らかとなった。一方、DesR は *desA* 周辺領域に結合しないことが示され、*desA* が DesR とは異なる転写制御因子によって制御されることが示された。

第2章では、*desA* (SLG_25000) の転写制御因子として、*desA* の3遺伝子下流に存在する IclR 型転写制御因子と相同性を示す *desX* (SLG_24970) を同定し、DesX による *desA* の転写制御システムを明らかにした。遺伝子破壊株の解析から、DesX は *desA* および *desA* 直上流に存在する推定の hydrolase 遺伝子 SLG_25010 の転写を負に制御することが明らかとなった。一方、DesX は *ligM*、*desB*、そして *desA* 上流に存在する ferulate 代謝系遺伝子 *ferBA* の転写制御には関与しないことが示された。*ferB-ferA-SLG_25010-desA* 遺伝子クラスターは、*ferBA* オペロンと SLG_25010-*desA* オペロンに分かれており、*ferA-SLG_25010* 遺伝子間領域に SA/VA 誘導的なプロモーターが存在した。本プロモーター領域には、-10 配列を覆うように 18 塩基の完全な IR 配列である IR-DA が存在し、DesX は本 IR 配列を認識して SLG_25010-*desA* オペロンのプロモーター領域に結合することが明らかとなった。また、SA および VA が DesX のエフェクター分子として機能し、DesX の DNA 結合を阻害することが示された。一方、DesX は SA/VA の有無にかかわらず、*ligM*、*desB* および *ferB* プロモーター領域に結合しないことから、DesX が *ligM*、*desB* および *ferBA* の転写制御に関与しないことが支持された。

本研究では、リグニン由来芳香族化合物代謝のモデルバクテリアである *Sphingobium* sp. SYK-6 株において、リグニン生分解の主要中間体である VA と SA の代謝制御シス

テムの全容を明らかにした。これまでバクテリアにおける VA の変換とその制御系は、*Pseudomonas* 属等のグラム陰性菌ならびにグラム陽性菌である *Corynebacterium glutamicum* において VA の脱メチルに働く oxygenase 型の VanAB システムと GntR 型または PadR 型転写制御因子の VanR が報告されてきた。本研究で、SYK-6 株において H₄folate 依存性の VA 脱メチル酵素 LigM が MarR 型転写制御因子 DesR によって制御されることが明らかになった。*Novosphingobium aromaticivorans* DSM 12444 株は、SYK-6 株と同様に LigM により VA を変換し、ゲノム上に SYK-6 株の DesR と 51% のアミノ酸配列相同性を示す MarR 型転写制御因子が存在することから、DSM 12444 株においても DesR による制御システムが保存されている可能性がある。最近 *Agrobacterium fabrum* C58 株において、SYK-6 株の LigM と 56% のアミノ酸配列相同性を示す VA 脱メチル酵素遺伝子が GntR 型転写制御因子によって制御されることが報告された。バクテリアにおける芳香族化合物の代謝系と制御系遺伝子はそれぞれ独立して進化してきたと考えられており、LigM の制御システムも例外ではないと考えられる。一方、バクテリアの SA 代謝の解析例は極めて少なく、その制御系に関しては SYK-6 株以外では明らかとなっていない。DSM 12444 株は SYK-6 株に類似した SA 代謝系を有しており、*desA* ホモログの 3 遺伝子下流に *desX* ホモログが存在した。したがって *desA* が関与する SA 分解系を有するバクテリアでは *desX* による制御システムが保存されていることが示唆される。今後、DSM 12444 株を含む他の *desA* 保持菌株における転写制御システムについての解析が望まれる。また、最近では SA を代謝する *Pseudomonas* 属細菌も報告されており、これらの代謝系遺伝子および制御に関する研究の進展が待たれる。

本研究で得られた結果は、リグニンからの高効率な有価物生産を達成する微生物株の創製に重要な知見を提供すると期待される。これまで、主に *Pseudomonas* 属細菌をプラットフォームとするリグニン由来芳香族化合物からの有価物生産が行われてきたが、これらは単量体芳香族化合物を原料としたものである。リグニンの化学的低分子化処理では、単量体に加えて二量体を含むオリゴマーも生成するため、SYK-6 株のように二量体を代謝可能なバクテリアをプラットフォームに用いることが望ましい。SYK-6 株の VA/SA 代謝系は DesR および DesX によって負の制御を受けるため、これら制御因子の破壊株を用いることでリグニン由来芳香族化合物からの有価物生産効率を向上させられる可能性がある。産業規模でのリグニンの有効利用を実現するためには、実バイオマスの化学処理と組み合わせたプロセスを念頭に置く必要があり、多様なリグニン由来芳香族化合物の変換が可能な SYK-6 株をプラットフォームに用いた新たな有価物生産系の開発が推進されることを期待する。

謝辞

本論文は、筆者が博士後期課程の研究成果をまとめたものであり、多くの方々の御支援と御指導を受け完成させることができました。博士論文を上梓するにあたり、お世話になった皆様方にこの場をお借りして感謝の意を申し上げます。

本研究を遂行する上で欠かせない微生物代謝工学研究室という素晴らしい研究の場を提供して頂き、研究の進行および本論文の執筆にあたって終始多大なる御指導、御鞭撻を賜りました長岡技術科学大学 工学研究科 生物機能工学専攻 政井英司教授に心より深く感謝致します。政井英司教授には、研究に行き詰まった際に的確なアドバイスを賜っただけでなく、優しく力強い言葉で何度も鼓舞して頂きました。また、時には厳しく御指導頂き、これらを通して私自身の至らなさを実感することが出来たことは、今後の研究者としての努力の糧になるものであります。

筆者が微生物代謝工学研究室に配属された当初から、基礎的な実験技術をはじめとし研究に関わる多くのことを御教授頂きました長岡技術科学大学 工学研究科 生物機能工学専攻 上村直史助教に心より深く感謝致します。上村直史助教には、研究者として生きていく上での心構えや考え方、組織の中での立ち振舞、後進の育成など、研究以外にも多くの御助言を頂きました。これらは筆者の思考の基礎となっており、人間として大きく成長できた糧になったと感じております。

長岡技術科学大学 工学研究科 生物機能工学専攻 解良芳夫教授、小笠原渉教授、高橋祥司教授、笠井大輔准教授には、御多忙中にもかかわらず学位審査に際して貴重なアドバイスを頂きました。心より感謝致します。また、長岡技術科学大学 工学研究科 生物機能工学専攻 佐藤武史准教授には修士論文審査時に多くの御助言を与えて頂きました。心より感謝致します。

本研究をスタートさせるきっかけとなった「DesR と DesQ の単離・同定」を行って頂きました笠井大輔准教授に深く感謝致します。また、本研究に取り組む基盤を築いて頂きました阿部友邦博士、熊野修太氏に深く感謝致します。本研究の前任者であり、第1章の基盤を築いて頂きました梅田周佑氏に深く感謝致します。第1章において、DesR の分子量分析をサポートして頂きました川津風花氏、DesR のエフェクター分子の同定をサポートして頂きました新沼皐氏、*desB* と *ligM* のプロモーターアッセイをサポートして頂きました保里明日香氏に深く感謝致します。第2章において、RT-PCR 解析とプラスミド構築を行って頂いた棚谷建太氏に深く感謝致します。

微生物代謝工学研究室に配属された当初から研究生活に関わるさまざまなことを御教授頂いただけでなく、身体を張って研究室をいつも笑いに包んでくれた高橋健司博士に心より御礼申し上げます。基礎的な実験技術を御教示頂いただけでなく、研究成果に

【謝辞】

ついて深く意見交換し的確なアドバイスをして頂きました森光佑博士に心より御礼申し上げます。学部編入当初から志を共に学んできた同輩であり、微生物代謝工学研究室での研究室生活において日々切磋琢磨し合いお互いを高め合ってきた弘前大学 農学生命科学部 分子生命科学科 樋口雄大助教に心より御礼申し上げます。また同じ研究室の同輩として、苦楽を共にし、支え合いながら過ごしてきた小林巽氏と廣瀬優作氏に心より御礼申し上げます。折に触れて意見交換して頂いただけでなく、その研究に取り組む姿勢から常に私自身の研究に対するモチベーションを刺激し続けてくれました藤田雅也博士に心より御礼申し上げます。

筆者が博士後期課程在籍中にもかかわらず、国立研究開発法人 森林研究・整備機構 森林総合研究所という次なる活躍の場を与えて頂いただけでなく、入所後、業務において全面的にサポートして頂きました森林資源化学研究領域 中村雅哉研究専門員 (前森林資源化学研究領域長)に心より感謝の意を表します。入所後の基本的な業務内容や研究活動だけでなく社会人としての立ち振舞方を御指導頂くと共に、未熟な私自身を叱咤激励し常に鼓舞し続けてくれました森林資源化学研究領域 微生物工学研究室 大塚祐一郎主任研究員に心より感謝の意を表します。第2章の qRT-PCR 解析を実施するにあたり、リアルタイム定量 PCR 装置を使用させて頂き、早く操作方法を御教示頂きました森林資源化学研究領域 微生物工学研究室 山口宗義主任研究員に心より感謝の意を表します。学位取得に向け御配慮頂いただけでなく、職場での業務において全面的にサポートして頂きました森林資源化学研究領域 微生物工学研究室 高野麻理子室長に心より感謝の意を表します。

また、この場では書き切れませんでしたが、微生物代謝工学研究室で関わった多くの先輩方や後輩たち、森林総合研究所 森林資源化学研究領域をはじめとした職場の皆様、そして陰ながらに応援して下さいました友人達に心より感謝申し上げます。

最後に、博士課程への進学を快諾して頂き、長くに渡る学生生活を温かくそして辛抱強く見守り応援し続けて下さった両親、博士後期課程の非常に苦しい時期に精神的に支え続けてくれた妻、コロナ禍にもかかわらず育児に多大なる御支援を頂きました妻の両親、そして日々健やかに成長してくれている息子に心より深く感謝申し上げます。

令和3年3月

荒木 拓馬

公表論文

Takuma Araki, Shusuke Umeda, Naofumi Kamimura, Daisuke Kasai, Shuta Kumano, Tomokuni Abe, Chika Kawazu, Yuichiro Otsuka, Masaya Nakamura, Yoshihiro Katayama, Masao Fukuda, Eiji Masai. 2019. Regulation of vanillate and syringate catabolism by a MarR-type transcriptional regulator DesR in *Sphingobium* sp. SYK-6. *Scientific Reports* 9:18036

Takuma Araki, Kenta Tanatani, Naofumi Kamimura, Yuichiro Otsuka, Muneyoshi Yamaguchi, Masaya Nakamura, Eiji Masai. 2020. The syringate *O*-demethylase gene of *Sphingobium* sp. strain SYK-6 is regulated by DesX, while other vanillate and syringate catabolism genes are regulated by DesR. *Applied and Environmental Microbiology* 86(22):e01712-20

引用文献

1. **Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD).** 2009. The Bioeconomy to 2030: Designing a Policy Agenda, Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD): Paris, France.
2. **農林水産省.** 2016. バイオマス活用推進基本計画.
3. **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.
4. **Phaiboonsilpa N, Yamauchi K, Lu X, Saka S.** 2010. Two-step hydrolysis of Japanese cedar as treated by semi-flow hot-compressed water. *J Wood Sci* **56**:331-338.
5. **Rabemanolontsoa H, Saka S.** 2013. Comparative study on chemical composition of various biomass species. *RSC Adv* **3**:3946-3956.
6. **Lynd LR, Liang X, Biddy MJ, Allee A, Cai H, Foust T, Himmel ME, Laser MS, Wang M, Wyman CE.** 2017. Cellulosic ethanol: status and innovation. *Curr Opin Biotechnol* **45**:202-211.
7. **Suhas, Gupta VK, Carrott PJ, Singh R, Chaudhary M, Kushwaha S.** 2016. Cellulose: A review as natural, modified and activated carbon adsorbent. *Bioresour Technol* **216**:1066-1076.
8. **Seguchi M, Tabara A, Fukawa I, Ono H, Kumashiro C, Yoshino Y, Kusunose C, Yamane C.** 2007. Effects of size of cellulose granules on dough rheology, microscopy, and breadmaking properties. *J Food Sci* **72**:E79-E84.
9. **Nechyporchuk O, Belgacem MN, Bras J.** 2016. Production of cellulose nanofibrils: A review of recent advances. *Ind Crops Prod* **93**:2-25.
10. **福島和彦 船田良, 杉山淳司, 高部圭司, 梅澤俊明, 山本浩之 編.** 2011. 木質の形成 第2版, 海青社, ISBN 978-4-86099-252-1.
11. **Taghizadeh-Alisaraei A, Motevali A, Ghobadian B.** 2019. Ethanol production from date wastes: Adapted technologies, challenges, and global potential. *Renew Energ* **143**:1094-1110.
12. **Doherty WO, Mousavioun P, Fellows CM.** 2011. Value-adding to cellulosic ethanol: Lignin polymers. *Ind Crops Prod* **33**:259-276.
13. **Zakzeski J, Bruijninx PC, Jongerius AL, Weckhuysen BM.** 2010. The catalytic valorization of lignin for the production of renewable chemicals. *Chem Rev* **110**:3552-3599.
14. **Vanholme R, Demedts B, Morreel K, Ralph J, Boerjan W.** 2010. Lignin biosynthesis and structure. *Plant Physiol* **153**:895-905.
15. **Boerjan W, Ralph J, Baucher M.** 2003. Lignin biosynthesis. *Annu Rev Plant Biol* **54**:519-546.
16. **Ralph J.** 2010. Hydroxycinnamates in lignification. *Phytochem Rev* **9**:65-83.
17. **Vanholme R, Morreel K, Darrah C, Oyarce P, Grabber JH, Ralph J, Boerjan W.** 2012. Metabolic engineering of novel lignin in biomass crops. *New Phytol* **196**:978-1000.
18. **Lan W, Rencoret J, Lu F, Karlen SD, Smith BG, Harris PJ, Del Río JC, Ralph J.** 2016. Tricin-lignins: occurrence and quantitation of tricin in relation to phylogeny. *Plant J* **88**:1046-1057.
19. **Karlen SD, Zhang C, Peck ML, Smith RA, Padmakshan D, Helmich KE, Free HC, Lee S, Smith BG, Lu F, Sedbrook JC, Sibout R, Grabber JH, Runge TM, Mysore KS, Harris PJ, Bartley LE, Ralph J.** 2016. Monolignol ferulate conjugates are naturally incorporated into plant lignins. *Sci Adv* **2**:e1600393.
20. **Miedes E, Vanholme R, Boerjan W, Molina A.** 2014. The role of the secondary cell wall in plant resistance to pathogens. *Front Plant Sci* **5**:358.
21. **Ferrer JL, Austin MB, Stewart C, Jr., Noel JP.** 2008. Structure and function of enzymes involved

- in the biosynthesis of phenylpropanoids. *Plant Physiol Biochem* **46**:356-370.
22. **Bugg TDH, Ahmad M, Hardiman EM, Rahmanpour R.** 2011. Pathways for degradation of lignin in bacteria and fungi. *Nat Prod Rep* **28**:1883-1896.
 23. **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.
 24. **Kamimura N, Takahashi K, Mori K, Araki T, Fujita M, Higuchi Y, Masai E.** 2017. Bacterial catabolism of lignin-derived aromatics: new findings in a recent decade: update on bacterial lignin catabolism. *Environ Microbiol Rep* **9**:679-705.
 25. **Fernandez-Fueyo E, Ruiz-Dueñas FJ, Ferreira P, Floudas D, Hibbett DS, Canessa P, Larrondo LF, James TY, Seelenfreund D, Lobos S, Polanco R, Tello M, Honda Y, Watanabe T, Watanabe T, Ryu JS, Kubicek CP, Schmoll M, Gaskell J, Hammel KE, St John FJ, Vanden Wymelenberg A, Sabat G, Splinter BonDurant S, Syed K, Yadav JS, Doddapaneni H, Subramanian V, Lavín JL, Oguiza JA, Perez G, Pisabarro AG, Ramirez L, Santoyo F, Master E, Coutinho PM, Henrissat B, Lombard V, Magnuson JK, Kues U, Hori C, Igarashi K, Samejima M, Held BW, Barry KW, LaButti KM, Lapidus A, Lindquist EA, Lucas SM, Riley R, et al.** 2012. Comparative genomics of *Ceriporiopsis subvermispora* and *Phanerochaete chrysosporium* provide insight into selective ligninolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**:5458-5463.
 26. **Hori C, Gaskell J, Igarashi K, Kersten P, Mozuch M, Samejima M, Cullen D.** 2014. Temporal alterations in the secretome of the selective ligninolytic fungus *Ceriporiopsis subvermispora* during growth on aspen wood reveal this organism's strategy for degrading lignocellulose. *Appl Environ Microbiol* **80**:2062-2070.
 27. **Martínez AT, Camarero S, Ruiz-Dueñas FJ, Martínez MJ.** 2018. Biological lignin degradation, p 199-225. *In* Beckham GT (ed), *Lignin Valorization: Emerging Approaches*. Royal Society of Chemistry.
 28. **ten Have R, Teunissen PJ.** 2001. Oxidative mechanisms involved in lignin degradation by white-rot fungi. *Chem Rev* **101**:3397-3413.
 29. **Pollegioni L, Tonin F, Rosini E.** 2015. Lignin-degrading enzymes. *FEBS J* **282**:1190-1213.
 30. **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.
 31. **Rahmanpour R, Bugg TD.** 2015. Characterisation of Dyp-type peroxidases from *Pseudomonas fluorescens* Pf-5: Oxidation of Mn(II) and polymeric lignin by Dyp1B. *Arch Biochem Biophys* **574**:93-98.
 32. **Brown ME, Walker MC, Nakashige TG, Iavarone AT, Chang MC.** 2011. Discovery and characterization of heme enzymes from unsequenced bacteria: application to microbial lignin degradation. *J Am Chem Soc* **133**:18006-18009.
 33. **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.
 34. **Granja-Travez RS, Persinoti GF, Squina FM, Bugg TDH.** 2020. Functional genomic analysis of bacterial lignin degraders: diversity in mechanisms of lignin oxidation and metabolism. *Appl Microbiol Biotechnol* **104**:3305-3320.
 35. **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.
 36. **Strachan CR, Singh R, VanInsberghe D, Ievdokymenko K, Budwill K, Mohn WW, Eltis LD, Hallam SJ.** 2014. Metagenomic scaffolds enable combinatorial lignin transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**:10143-10148.
 37. **Wilhelm RC, Singh R, Eltis LD, Mohn WW.** 2019. Bacterial contributions to delignification and

lignocellulose degradation in forest soils with metagenomic and quantitative stable isotope probing. *ISME J* **13**:413-429.

38. **Vicuña R.** 1988. Bacterial degradation of lignin. *Enzyme Microb Technol* **10**:646-655.
39. **Schlesinger WH.** 1977. Carbon balance in terrestrial detritus. *Ann Rev Ecol Syst* **8**:51-81.
40. **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.
41. **Beckham GT, Johnson CW, Karp EM, Salvachua D, Vardon DR.** 2016. Opportunities and challenges in biological lignin valorization. *Curr Opin Biotechnol* **42**:40-53.
42. **Schutyser W, Renders T, Van den Bosch S, Koelewijn SF, Beckham GT, Sels BF.** 2018. Chemicals from lignin: an interplay of lignocellulose fractionation, depolymerisation, and upgrading. *Chem Soc Rev* **47**:852-908.
43. **Becker J, Wittmann C.** 2019. A field of dreams: Lignin valorization into chemicals, materials, fuels, and health-care products. *Biotechnol Adv* **37**:107360.
44. **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.
45. **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.
46. **Akiyama T, Magara K, Matsumoto Y, Meshitsuka G, Ishizu A, Lundquist K.** 2000. Proof of the presence of racemic forms of arylglycerol- β -aryl ether structure in lignin: studies on the stereo structure of lignin by ozonation. *J Wood Sci* **46**:414-415.
47. **Akiyama T, Magara K, Meshitsuka G, Lundquist K, Matsumoto Y.** 2015. Absolute configuration of β - and α -asymmetric carbons within β -O-4-structures in hardwood lignin. *J Wood Chem Technol* **35**:8-16.
48. **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- β -aryl ether by *Sphingobium* sp. strain SYK-6. *Appl Environ Microbiol* **75**:5195-5201.
49. **Masai E, Ichimura A, Sato Y, Miyauchi K, Katayama Y, Fukuda M.** 2003. Roles of the enantioselective glutathione *S*-transferases in cleavage of β -aryl ether. *J Bacteriol* **185**:1768-1775.
50. **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 β -aryl ether by *Sphingobium* sp. strain SYK-6. *Biosci Biotechnol Biochem* **75**:2404-2407.
51. **Gall DL, Kim H, Lu F, Donohue TJ, Noguera DR, Ralph J.** 2014. Stereochemical features of glutathione-dependent enzymes in the *Sphingobium* sp. strain SYK-6 β -aryl etherase pathway. *J Biol Chem* **289**:8656-8667.
52. **Higuchi Y, Sato D, Kamimura N, Masai E.** 2020. Roles of two glutathione *S*-transferases in the final step of the β -aryl ether cleavage pathway in *Sphingobium* sp. strain SYK-6. *Sci Rep* **10**:20614.
53. **Higuchi Y, Aoki S, Takenami H, Kamimura N, Takahashi K, Hishiyama S, Lancefield CS, Ojo OS, Katayama Y, Westwood NJ, Masai E.** 2018. Bacterial catabolism of β -hydroxypropiovanillone and β -hydroxypropiosyringone produced in the reductive cleavage of arylglycerol- β -aryl ether in lignin. *Appl Environ Microbiol* **84**:e02670-17.
54. **Higuchi Y, Kato R, Tsubota K, Kamimura N, Westwood NJ, Masai E.** 2019. Discovery of novel

enzyme genes involved in the conversion of an arylglycerol- β -aryl ether metabolite and their use in generating a metabolic pathway for lignin valorization. *Metab Eng* **55**:258-267.

55. **Fujita M, Mori K, Hara H, Hishiyama S, Kamimura N, Masai E.** 2019. A TonB-dependent receptor constitutes the outer membrane transport system for a lignin-derived aromatic compound. *Commun Biol* **2**:432.
56. **Mori K, Niinuma K, Fujita M, Kamimura N, Masai E.** 2018. DdvK, a novel major facilitator superfamily transporter essential for 5,5'-dehydrodivanillate uptake by *Sphingobium* sp. strain SYK-6. *Appl Environ Microbiol* **84**:e01314-18.
57. **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.
58. **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.
59. **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.
60. **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.
61. **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.
62. **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.
63. **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.
64. **Takahashi K, Miyake K, Hishiyama S, Kamimura N, Masai E.** 2018. Two novel decarboxylase genes play a key role in the stereospecific catabolism of dehydrodiconiferyl alcohol in *Sphingobium* sp. strain SYK-6. *Environ Microbiol* **20**:1739-1750.
65. **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.
66. **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.
67. **Kamimura N, Goto T, Takahashi K, Kasai D, Otsuka Y, Nakamura M, Katayama Y, Fukuda M, Masai E.** 2017. A bacterial aromatic aldehyde dehydrogenase critical for the efficient catabolism of syringaldehyde. *Sci Rep* **7**:44422.
68. **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.
69. **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: how bacteria degrade, survive, adapt, and evolve. Springer Japan, Tokyo, Japan.
 70. **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.
 71. **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.
 72. **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.
 73. **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.
 74. **Mori K, Kamimura N, Masai E.** 2018. Identification of the protocatechuate transporter gene in *Sphingobium* sp. strain SYK-6 and effects of overexpression on production of a value-added metabolite. Appl Microbiol Biotechnol **102**:4807-4816.
 75. **Noda Y, Nishikawa S, Shiozuka K, Kadokura H, Nakajima H, Yoda K, Katayama Y, Morohoshi N, Haraguchi T, Yamasaki M.** 1990. Molecular cloning of the protocatechuate 4,5-dioxygenase genes of *Pseudomonas paucimobilis*. J Bacteriol **172**:2704-2709.
 76. **Masai E, Momose K, Hara H, Nishikawa S, Katayama Y, Fukuda M.** 2000. Genetic and biochemical characterization of 4-carboxy-2-hydroxymuconate-6-semialdehyde dehydrogenase and its role in the protocatechuate 4,5-cleavage pathway in *Sphingomonas paucimobilis* SYK-6. J Bacteriol **182**:6651-6658.
 77. **Masai E, Shinohara S, Hara H, Nishikawa S, Katayama Y, Fukuda M.** 1999. Genetic and biochemical characterization of a 2-pyrone-4,6-dicarboxylic acid hydrolase involved in the protocatechuate 4, 5-cleavage pathway of *Sphingomonas paucimobilis* SYK-6. J Bacteriol **181**:55-62.
 78. **Hogancamp TN, Raushel FM.** 2018. Functional annotation of LigU as a 1,3-allylic isomerase during the degradation of lignin in the protocatechuate 4,5-cleavage pathway from the soil bacterium *Sphingobium* sp. SYK-6. Biochemistry **57**:2837-2845.
 79. **Hara H, Masai E, Miyauchi K, Katayama Y, Fukuda M.** 2003. Characterization of the 4-carboxy-4-hydroxy-2-oxoadipate aldolase gene and operon structure of the protocatechuate 4,5-cleavage pathway genes in *Sphingomonas paucimobilis* SYK-6. J Bacteriol **185**:41-50.
 80. **Hogancamp TN, Mabanglo MF, Raushel FM.** 2018. Structure and reaction mechanism of the LigJ hydratase: an enzyme critical for the bacterial degradation of lignin in the protocatechuate 4,5-cleavage pathway. Biochemistry **57**:5841-5850.
 81. **Cecil JH, Garcia DC, Giannone RJ, Michener JK.** 2018. Rapid, parallel identification of catabolism pathways of lignin-derived aromatic compounds in *Novosphingobium aromaticivorans*. Appl Environ Microbiol **84**:e01185-18.
 82. **Mukherjee G, Sachan A, Ghosh S, Mitra A.** 2006. Conversion of sinapic acid to syringic acid by a filamentous fungus *Paecilomyces variotii*. J Gen Appl Microbiol **52**:131-135.
 83. **Nishimura M, Kawakami S, Otsuka H.** 2018. Molecular cloning and characterization of vanillin dehydrogenase from *Streptomyces* sp. NL15-2K. BMC Microbiol **18**:154.

84. **Plaggenborg R, Overhage J, Steinbüchel A, Priefert H.** 2003. Functional analyses of genes involved in the metabolism of ferulic acid in *Pseudomonas putida* KT2440. *Appl Microbiol Biotechnol* **61**:528-535.
85. **Ravi K, García-Hidalgo J, Brink DP, Skyvell M, Gorwa-Grauslund MF, Lidén G.** 2019. Physiological characterization and sequence analysis of a syringate-consuming Actinobacterium. *Bioresour Technol* **285**:121327.
86. **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.
87. **Mohan K, Phale PS.** 2017. Carbon source-dependent inducible metabolism of veratryl alcohol and ferulic acid in *Pseudomonas putida* CSV86. *Appl Environ Microbiol* **83**:e03326-16.
88. **Segura A, Bünz PV, D'Argenio DA, Ornston LN.** 1999. Genetic analysis of a chromosomal region containing *vanA* and *vanB*, genes required for conversion of either ferulate or vanillate to protocatechuate in *Acinetobacter*. *J Bacteriol* **181**:3494-3504.
89. **Thanbichler M, Iniesta AA, Shapiro L.** 2007. A comprehensive set of plasmids for vanillate- and xylose-inducible gene expression in *Caulobacter crescentus*. *Nucleic Acids Res* **35**:e137.
90. **Chatterjee DK, Bourquin AW.** 1987. Metabolism of aromatic compounds by *Caulobacter crescentus*. *J Bacteriol* **169**:1993-1996.
91. **Merkens H, Beckers G, Wirtz A, Burkovski A.** 2005. Vanillate metabolism in *Corynebacterium glutamicum*. *Curr Microbiol* **51**:59-65.
92. **Chen HP, Chow M, Liu CC, Lau A, Liu J, Eltis LD.** 2012. Vanillin catabolism in *Rhodococcus jostii* RHA1. *Appl Environ Microbiol* **78**:586-588.
93. **Nishimura M, Ishiyama D, Davies J.** 2006. Molecular cloning of *Streptomyces* genes encoding vanillate demethylase. *Biosci Biotechnol Biochem* **70**:2316-2319.
94. **Nishimura M, Nishimura Y, Abe C, Kohhata M.** 2014. Expression and substrate range of *Streptomyces* vanillate demethylase. *Biol Pharm Bull* **37**:1564-1568.
95. **Kaufmann F, Wohlfarth G, Diekert G.** 1998. *O*-demethylase from *Acetobacterium dehalogenans*: substrate specificity and function of the participating proteins. *Eur J Biochem* **253**:706-711.
96. **Kaufmann F, Wohlfarth G, Diekert G.** 1998. *O*-demethylase from *Acetobacterium dehalogenans*: cloning, sequencing, and active expression of the gene encoding the corrinoid protein. *Eur J Biochem* **257**:515-521.
97. **Engelmann T, Kaufmann F, Diekert G.** 2001. Isolation and characterization of a veratrol:corrinoid protein methyl transferase from *Acetobacterium dehalogenans*. *Arch Microbiol* **175**:376-383.
98. **Schilhabel A, Studenik S, Vödisch M, Kreher S, Schlott B, Pierik AJ, Diekert G.** 2009. The ether-cleaving methyltransferase system of the strict anaerobe *Acetobacterium dehalogenans*: analysis and expression of the encoding genes. *J Bacteriol* **191**:588-599.
99. **Berman MH, Frazer AC.** 1992. Importance of tetrahydrofolate and ATP in the anaerobic *O*-demethylation reaction for phenylmethylethers. *Appl Environ Microbiol* **58**:925-931.
100. **Studenik S, Vogel M, Diekert G.** 2012. Characterization of an *O*-demethylase of *Desulfitobacterium hafniense* DCB-2. *J Bacteriol* **194**:3317-3326.
101. **Naidu D, Ragsdale SW.** 2001. Characterization of a three-component vanillate *O*-demethylase from *Moorella thermoacetica*. *J Bacteriol* **183**:3276-3281.
102. **Pierce E, Xie G, Barabote RD, Saunders E, Han CS, Detter JC, Richardson P, Brettin TS, Das A, Ljungdahl LG, Ragsdale SW.** 2008. The complete genome sequence of *Moorella thermoacetica* (f. *Clostridium thermoaceticum*). *Environ Microbiol* **10**:2550-2573.
103. **Carmona M, Zamarro MT, Blázquez B, Durante-Rodríguez G, Juárez JF, Valderrama JA, Barragán MJ, García JL, Díaz E.** 2009. Anaerobic catabolism of aromatic compounds: a genetic

- and genomic view. *Microbiol Mol Biol Rev* **73**:71-133.
104. **Durante-Rodríguez G, Gómez-Álvarez H, Blázquez B, Fernández-Llamosas H, Martín-Moldes Z, Sanz D, Nogales J, Carmona M, Díaz E.** 2018. Anaerobic pathways for the catabolism of aromatic compounds, p 333-390. *In* Beckham GT (ed), *Lignin Valorization: Emerging Approaches*. Royal Society of Chemistry.
 105. **Harada A, Kamimura N, Takeuchi K, Yu HY, Masai E, Senda T.** 2017. The crystal structure of a new *O*-demethylase from *Sphingobium* sp. strain SYK-6. *FEBS J* **284**:1855-1867.
 106. **Kohler AC, Mills MJL, Adams PD, Simmons BA, Sale KL.** 2017. Structure of aryl *O*-demethylase offers molecular insight into a catalytic tyrosine-dependent mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* **114**:E3205-E3214.
 107. **Aylward FO, McDonald BR, Adams SM, Valenzuela A, Schmidt RA, Goodwin LA, Woyke T, Currie CR, Suen G, Poulsen M.** 2013. Comparison of 26 sphingomonad genomes reveals diverse environmental adaptations and biodegradative capabilities. *Appl Environ Microbiol* **79**:3724-3733.
 108. **Fredrickson JK, Balkwill DL, Drake GR, Romine MF, Ringelberg DB, White DC.** 1995. Aromatic-degrading *Sphingomonas* isolates from the deep subsurface. *Appl Environ Microbiol* **61**:1917-1922.
 109. **Perez JM, Kontur WS, Gehl C, Gille DM, Ma Y, Niles AV, Umana G, Donohue TJ, Noguera DR.** 2020. Functional pathway redundancy in the metabolism of plant-derived phenolics by *Novosphingobium aromaticivorans*. *bioRxiv*.
 110. **Tack BF, Chapman PJ, Dagley S.** 1972. Metabolism of gallic acid and syringic acid by *Pseudomonas putida*. *J Biol Chem* **247**:6438-6443.
 111. **Spurnins VL, Dagley S.** 1975. Alternative routes of aromatic catabolism in *Pseudomonas acidovorans* and *Pseudomonas putida*: gallic acid as a substrate and inhibitor of dioxygenases. *J Bacteriol* **124**:1374-1381.
 112. **Kersten PJ, Dagley S, Whittaker JW, Arciero DM, Lipscomb JD.** 1982. 2-pyrone-4,6-dicarboxylic acid, a catabolite of gallic acids in *Pseudomonas* species. *J Bacteriol* **152**:1154-1162.
 113. **Kersten PJ, Chapman PJ, Dagley S.** 1985. Enzymatic release of halogens or methanol from some substituted protocatechuic acids. *J Bacteriol* **162**:693-697.
 114. **Sze IS, Dagley S.** 1987. Degradation of substituted mandelic acids by *meta* fission reactions. *J Bacteriol* **169**:3833-3835.
 115. **Mazurkewich S, Brott AS, Kimber MS, Seah SY.** 2016. Structural and kinetic characterization of the 4-carboxy-2-hydroxymuconate hydratase from the gallate and protocatechuate 4,5-cleavage pathways of *Pseudomonas putida* KT2440. *J Biol Chem* **291**:7669-7686.
 116. **Nogales J, Canales A, Jiménez-Barbero J, Serra B, Pingarrón JM, García JL, Díaz E.** 2011. Unravelling the gallic acid degradation pathway in bacteria: the *gal* cluster from *Pseudomonas putida*. *Mol Microbiol* **79**:359-374.
 117. **Numata K, Morisaki K.** 2015. Screening of marine bacteria to synthesize polyhydroxyalkanoate from lignin: contribution of lignin derivatives to biosynthesis by *Oceanimonas doudoroffii*. *ACS Sustain Chem Eng* **3**:569-573.
 118. **Bandounas L, Wierckx NJ, de Winde JH, Ruijsenaars HJ.** 2011. Isolation and characterization of novel bacterial strains exhibiting ligninolytic potential. *BMC Biotechnol* **11**:94.
 119. **Shinoda E, Takahashi K, Abe N, Kamimura N, Sonoki T, Masai E.** 2019. Isolation of a novel platform bacterium for lignin valorization and its application in glucose-free *cis,cis*-muconate production. *J Ind Microbiol Biotechnol* **46**:1071-1080.
 120. **Tian JH, Pourcher AM, Peu P.** 2016. Isolation of bacterial strains able to metabolize lignin and lignin-related compounds. *Lett Appl Microbiol* **63**:30-37.

121. **Austin S, Kontur WS, Ulbrich A, Oshlag JZ, Zhang W, Higbee A, Zhang Y, Coon JJ, Hodge DB, Donohue TJ, Noguera DR.** 2015. Metabolism of multiple aromatic compounds in corn stover hydrolysate by *Rhodopseudomonas palustris*. *Environ Sci Technol* **49**:8914-8922.
122. **Harwood CS, Gibson J.** 1988. Anaerobic and aerobic metabolism of diverse aromatic compounds by the photosynthetic bacterium *Rhodopseudomonas palustris*. *Appl Environ Microbiol* **54**:712-717.
123. **Oshlag JZ, Ma Y, Morse K, Burger BT, Lemke RA, Karlen SD, Myers KS, Donohue TJ, Noguera DR.** 2020. Anaerobic degradation of syringic acid by an adapted strain of *Rhodopseudomonas palustris*. *Appl Environ Microbiol* **86**:e01888-19.
124. **Maden BE.** 2000. Tetrahydrofolate and tetrahydromethanopterin compared: functionally distinct carriers in C₁ metabolism. *Biochem J* **350**:609-629.
125. **Vannelli T, Messmer M, Studer A, Vuilleumier S, Leisinger T.** 1999. A corrinoid-dependent catabolic pathway for growth of a *Methylobacterium* strain with chloromethane. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**:4615-4620.
126. **Studer A, Vuilleumier S, Leisinger T.** 1999. Properties of the methylcobalamin:H₄folate methyltransferase involved in chloromethane utilization by *Methylobacterium* sp. strain CM4. *Eur J Biochem* **264**:242-249.
127. **Studer A, Stupperich E, Vuilleumier S, Leisinger T.** 2001. Chloromethane: tetrahydrofolate methyl transfer by two proteins from *Methylobacterium chloromethanicum* strain CM4. *Eur J Biochem* **268**:2931-2938.
128. **Kato Y, Asahara M, Arai D, Goto K, Yokota A.** 2005. Reclassification of *Methylobacterium chloromethanicum* and *Methylobacterium dichloromethanicum* as later subjective synonyms of *Methylobacterium extorquens* and of *Methylobacterium lusitanum* as a later subjective synonym of *Methylobacterium rhodesianum*. *J Gen Appl Microbiol* **51**:287-299.
129. **Studer A, McAnulla C, Büchele R, Leisinger T, Vuilleumier S.** 2002. Chloromethane-induced genes define a third C₁ utilization pathway in *Methylobacterium chloromethanicum* CM4. *J Bacteriol* **184**:3476-3484.
130. **Roselli S, Nadalig T, Vuilleumier S, Bringel F.** 2013. The 380 kb pCMU01 plasmid encodes chloromethane utilization genes and redundant genes for vitamin B₁₂- and tetrahydrofolate-dependent chloromethane metabolism in *Methylobacterium extorquens* CM4: a proteomic and bioinformatics study. *PLoS One* **8**:e56598.
131. **阿部友邦.** 2007. バクテリアによるリグニン由来化合物の脱メチル機構. Doctor's thesis in Nagaoka University of Technology.
132. **Varman AM, He L, Follenfant R, Wu W, Wemmer S, Wrobel SA, Tang YJ, Singh S.** 2016. Decoding how a soil bacterium extracts building blocks and metabolic energy from ligninolysis provides road map for lignin valorization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **113**:E5802-E5811.
133. **Shikinaka K, Otsuka Y, Nakamura M, Masai E, Katayama Y.** 2018. Utilization of lignocellulosic biomass via novel sustainable process. *J Oleo Sci* **67**:1059-1070.
134. **Michinobu T, Hishida M, Sato M, Katayama Y, Masai E, Nakamura M, Otsuka Y, Ohara S, Shigehara K.** 2008. Polyesters of 2-pyrone-4,6-dicarboxylic acid (PDC) obtained from a metabolic intermediate of lignin. *Polym J* **40**:68-75.
135. **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.
136. **Michinobu T, Bito M, Yamada Y, Tanimura M, Katayama Y, Masai E, Nakamura M, Otsuka Y, Ohara S, Shigehara K.** 2009. Fusible, elastic, and biodegradable polyesters of 2-pyrone-4,6-dicarboxylic acid (PDC). *Polym J* **41**:1111-1116.

137. **Michinobu T, Bito M, Tanimura M, Katayama Y, Masai E, Nakamura M, Otsuka Y, Ohara S, Shigehara K.** 2009. Mechanical properties of poly (L-lactide) films controlled by blending with polyesters of lignin-derived stable metabolic intermediate, 2-pyrone-4,6-dicarboxylic acid (PDC). *Polym J* **41**:843-848.
138. **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.
139. **Qian Y, Otsuka Y, Sonoki T, Mukhopadhyay B, Nakamura M, Masai E, Katayama Y, Okamura-Abe Y, Jellison J, Goodell B.** 2016. Engineered microbial production of 2-pyrone-4,6-dicarboxylic acid from lignin residues for use as an industrial platform chemical. *Bioresources* **11**:6097-6109.
140. 国立研究開発法人森林研究・整備機構ほか. 2-ピロン-4,6-ジカルボン酸の製造方法. 特願 2020-044525. .
141. **Perez JM, Kontur WS, Alherech M, Coplien J, Karlen SD, Stahl SS, Donohue TJ, Noguera DR.** 2019. Funneling aromatic products of chemically depolymerized lignin into 2-pyrone-4-6-dicarboxylic acid with *Novosphingobium aromaticivorans*. *Green Chem* **21**:1340-1350.
142. **Rahimi A, Ulbrich A, Coon JJ, Stahl SS.** 2014. Formic-acid-induced depolymerization of oxidized lignin to aromatics. *Nature* **515**:249-252.
143. **Rahimi A, Azarpira A, Kim H, Ralph J, Stahl SS.** 2013. Chemoselective metal-free aerobic alcohol oxidation in lignin. *J Am Chem Soc* **135**:6415-6418.
144. **Johnson CW, Salvachúa D, Rorrer NA, Black BA, Vardon DR, John PCS, Cleveland NS, Dominick G, Elmore JR, Grundl N, Khanna P, Martinez CR, Michener WE, Peterson DJ, Ramirez KJ, Singh P, VanderWall TA, Wilson AN, Yi X, Biddy MJ, Bomble YJ, Guss AM, Beckham GT.** 2019. Innovative chemicals and materials from bacterial aromatic catabolic pathways. *Joule* **3**:1523-1537.
145. **Johnson CW, Salvachúa D, Khanna P, Smith H, Peterson DJ, Beckham GT.** 2016. Enhancing muconic acid production from glucose and lignin-derived aromatic compounds via increased protocatechuate decarboxylase activity. *Metab Eng Commun* **3**:111-119.
146. **Sonoki T, Takahashi K, Sugita H, Hatamura M, Azuma Y, Sato T, Suzuki S, Kamimura N, Masai E.** 2018. Glucose-free *cis,cis*-muconic acid production via new metabolic designs corresponding to the heterogeneity of lignin. *Acs Sustain Chem Eng* **6**:1256-1264.
147. **Salvachúa D, Johnson CW, Singer CA, Rohrer H, Peterson DJ, Black BA, Knapp A, Beckham GT.** 2018. Bioprocess development for muconic acid production from aromatic compounds and lignin. *Green Chem* **20**:5007-5019.
148. **Vardon DR, Rorrer NA, Salvachúa D, Settle AE, Johnson CW, Menart MJ, Cleveland NS, Ciesielski PN, Steirer KX, Dorgan JR, Beckham GT.** 2016. *cis,cis*-Muconic acid: separation and catalysis to bio-adipic acid for nylon-6,6 polymerization. *Green Chem* **18**:3397-3413.
149. **Kohlstedt M, Starck S, Barton N, Stolzenberger J, Selzer M, Mehlmann K, Schneider R, Pleissner D, Rinkel J, Dickschat JS, Venus J, J BJHvD, Wittmann C.** 2018. From lignin to nylon: cascaded chemical and biochemical conversion using metabolically engineered *Pseudomonas putida*. *Metab Eng* **47**:279-293.
150. **Barton N, Horbal L, Starck S, Kohlstedt M, Luzhetskyy A, Wittmann C.** 2018. Enabling the valorization of guaiacol-based lignin: integrated chemical and biochemical production of *cis,cis*-muconic acid using metabolically engineered *Amycolatopsis* sp ATCC 39116. *Metab Eng* **45**:200-210.
151. **Becker J, Kuhl M, Kohlstedt M, Starck S, Wittmann C.** 2018. Metabolic engineering of

- Corynebacterium glutamicum* for the production of *cis,cis*-muconic acid from lignin. Microb Cell Fact **17**:115.
152. **Bentley GJ, Narayanan N, Jha RK, Salvachúa D, Elmore JR, Peabody GL, Black BA, Ramirez K, De Capite A, Michener WE, Werner AZ, Klingeman DM, Schindel HS, Nelson R, Foust L, Guss AM, Dale T, Johnson CW, Beckham GT.** 2020. Engineering glucose metabolism for enhanced muconic acid production in *Pseudomonas putida* KT2440. Metab Eng **59**:64-75.
 153. **Johnson CW, Abraham PE, Linger JG, Khanna P, Hettich RL, Beckham GT.** 2017. Eliminating a global regulator of carbon catabolite repression enhances the conversion of aromatic lignin monomers to muconate in *Pseudomonas putida* KT2440. Metab Eng Commun **5**:19-25.
 154. **Busch A, Mesa-Torres N, Krell T.** 2017. The family of two-component systems that regulate hydrocarbon degradation pathways, p 1-22. In Krell T (ed), Cellular Ecophysiology of Microbe, Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology. Springer International Publishing.
 155. **Durante-Rodríguez G, Gómez-Álvarez H, Nogales J, Carmona M, Díaz E.** 2017. One-component systems that regulate the expression of degradation pathways for aromatic compounds, p 1-39. In Krell T (ed), Cellular Ecophysiology of Microbe, Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology. Springer International Publishing.
 156. **Tropel D, van der Meer JR.** 2004. Bacterial transcriptional regulators for degradation pathways of aromatic compounds. Microbiol Mol Biol Rev **68**:474-500.
 157. **Lau PC, Wang Y, Patel A, Labbé D, Bergeron H, Brousseau R, Konishi Y, Rawlings M.** 1997. A bacterial basic region leucine zipper histidine kinase regulating toluene degradation. Proc Natl Acad Sci U S A **94**:1453-1458.
 158. **Mosqueda G, Ramos-González MI, Ramos JL.** 1999. Toluene metabolism by the solvent-tolerant *Pseudomonas putida* DOT-T1 strain, and its role in solvent impermeabilization. Gene **232**:69-76.
 159. **Coschigano PW, Young LY.** 1997. Identification and sequence analysis of two regulatory genes involved in anaerobic toluene metabolism by strain T1. Appl Environ Microbiol **63**:652-660.
 160. **Leuthner B, Heider J.** 1998. A two-component system involved in regulation of anaerobic toluene metabolism in *Thauera aromatica*. FEMS Microbiol Lett **166**:35-41.
 161. **Labbé D, Garnon J, Lau PC.** 1997. Characterization of the genes encoding a receptor-like histidine kinase and a cognate response regulator from a biphenyl/polychlorobiphenyl-degrading bacterium, *Rhodococcus* sp. strain M5. J Bacteriol **179**:2772-2776.
 162. **O'Leary ND, Duetz WA, Dobson AD, O'Connor KE.** 2002. Induction and repression of the *sty* operon in *Pseudomonas putida* CA-3 during growth on phenylacetic acid under organic and inorganic nutrient-limiting continuous culture conditions. FEMS Microbiol Lett **208**:263-268.
 163. **Panke S, Witholt B, Schmid A, Wubbolts MG.** 1998. Towards a biocatalyst for (*S*)-styrene oxide production: characterization of the styrene degradation pathway of *Pseudomonas* sp. strain VLB120. Appl Environ Microbiol **64**:2032-2043.
 164. **Santos PM, Leoni L, Di Bartolo I, Zennaro E.** 2002. Integration host factor is essential for the optimal expression of the *styABCD* operon in *Pseudomonas fluorescens* ST. Res Microbiol **153**:527-536.
 165. **Velasco A, Alonso S, García JL, Perera J, Díaz E.** 1998. Genetic and functional analysis of the styrene catabolic cluster of *Pseudomonas* sp. strain Y2. J Bacteriol **180**:1063-1071.
 166. **Takeda H, Yamada A, Miyauchi K, Masai E, Fukuda M.** 2004. Characterization of transcriptional regulatory genes for biphenyl degradation in *Rhodococcus* sp. strain RHA1. J Bacteriol **186**:2134-2146.
 167. **Takeda H, Shimodaira J, Yukawa K, Hara N, Kasai D, Miyauchi K, Masai E, Fukuda M.** 2010. Dual two-component regulatory systems are involved in aromatic compound degradation in a

- polychlorinated-biphenyl degrader, *Rhodococcus jostii* RHA1. J Bacteriol **192**:4741-4751.
168. **Ulrich LE, Koonin EV, Zhulin IB.** 2005. One-component systems dominate signal transduction in prokaryotes. Trends Microbiol **13**:52-56.
 169. **新沼 卓.** 2019. *Sphingobium* 属細菌におけるビフェニル型リグニン由来化合物代謝系遺伝子群の転写制御システム. Master's thesis in Nagaoka University of Technology.
 170. **Otani H, Stogios PJ, Xu X, Nocek B, Li SN, Savchenko A, Eltis LD.** 2015. The activity of CouR, a MarR family transcriptional regulator, is modulated through a novel molecular mechanism. Nucleic Acids Res **44**:595-607.
 171. **Hirakawa H, Schaefer AL, Greenberg EP, Harwood CS.** 2012. Anaerobic *p*-coumarate degradation by *Rhodopseudomonas palustris* and identification of CouR, a MarR repressor protein that binds *p*-coumaroyl coenzyme A. J Bacteriol **194**:1960-1967.
 172. **Parke D, Ornston LN.** 2003. Hydroxycinnamate (*hca*) catabolic genes from *Acinetobacter* sp. strain ADP1 are repressed by HcaR and are induced by hydroxycinnamoyl-coenzyme A thioesters. Appl Environ Microbiol **69**:5398-5409.
 173. **Meyer T, Renoud S, Vigouroux A, Miomandre A, Gaillard V, Kerzaon I, Prigent-Combaret C, Comte G, Moréra S, Vial L, Lavire C.** 2018. Regulation of hydroxycinnamic acid degradation drives *Agrobacterium fabrum* lifestyles. Mol Plant Microbe Interact **31**:814-822.
 174. **Kallscheuer N, Vogt M, Kappelmann J, Krumbach K, Noack S, Bott M, Marienhagen J.** 2016. Identification of the *phd* gene cluster responsible for phenylpropanoid utilization in *Corynebacterium glutamicum*. Appl Microbiol Biotechnol **100**:1871-1881.
 175. **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.
 176. **Calisti C, Ficca AG, Barghini P, Ruzzi M.** 2008. Regulation of ferulic catabolic genes in *Pseudomonas fluorescens* BF13: involvement of a MarR family regulator. Appl Microbiol Biotechnol **80**:475-483.
 177. **Morawski B, Segura A, Ornston LN.** 2000. Repression of *Acinetobacter* vanillate demethylase synthesis by VanR, a member of the GntR family of transcriptional regulators. FEMS Microbiol Lett **187**:65-68.
 178. **Morabbi Heravi K, Lange J, Watzlawick H, Kalinowski J, Altenbuchner J.** 2015. Transcriptional regulation of the vanillate utilization genes (*vanABK* operon) of *Corynebacterium glutamicum* by VanR, a PadR-like repressor. J Bacteriol **197**:959-972.
 179. **Vigouroux A, Meyer T, Naretto A, Legrand P, Aumont-Nicaise M, Di Cicco A, Renoud S, Doré J, Lévy D, Vial L, Lavire C, Moréra S.** 2021. Characterization of the first tetrameric transcription factor of the GntR superfamily with allosteric regulation from the bacterial pathogen *Agrobacterium fabrum*. Nucleic Acids Res **49**:529-546.
 180. **Kamimura N, Takamura K, Hara H, Kasai D, Natsume R, Senda T, Katayama Y, Fukuda M, Masai E.** 2010. Regulatory system of the protocatechuate 4,5-cleavage pathway genes essential for lignin downstream catabolism. J Bacteriol **192**:3394-3405.
 181. **Zhao KX, Huang Y, Chen X, Wang NX, Liu SJ.** 2010. PcaO positively regulates *pcaHG* of the β -ketoadipate pathway in *Corynebacterium glutamicum*. J Bacteriol **192**:1565-1572.
 182. **Parke D.** 1996. Characterization of PcaQ, a LysR-type transcriptional activator required for catabolism of phenolic compounds, from *Agrobacterium tumefaciens*. J Bacteriol **178**:266-272.
 183. **Parke D.** 1993. Positive regulation of phenolic catabolism in *Agrobacterium tumefaciens* by the *pcaQ* gene in response to β -carboxy-*cis,cis*-muconate. J Bacteriol **175**:3529-3535.
 184. **MacLean AM, MacPherson G, Aneja P, Finan TM.** 2006. Characterization of the β -ketoadipate

- pathway in *Sinorhizobium meliloti*. Appl Environ Microbiol **72**:5403-5413.
185. **MacLean AM, Anstey MI, Finan TM.** 2008. Binding site determinants for the LysR-type transcriptional regulator PcaQ in the legume endosymbiont *Sinorhizobium meliloti*. J Bacteriol **190**:1237-1246.
 186. **Parke D.** 1995. Supraoperonic clustering of *pca* genes for catabolism of the phenolic compound protocatechuate in *Agrobacterium tumefaciens*. J Bacteriol **177**:3808-3817.
 187. **Parales RE, Harwood CS.** 1993. Regulation of the *pcaIJ* genes for aromatic acid degradation in *Pseudomonas putida*. J Bacteriol **175**:5829-5838.
 188. **Romero-Steiner S, Parales RE, Harwood CS, Houghton JE.** 1994. Characterization of the *pcaR* regulatory gene from *Pseudomonas putida*, which is required for the complete degradation of *p*-hydroxybenzoate. J Bacteriol **176**:5771-5779.
 189. **Guo Z, Houghton JE.** 1999. PcaR-mediated activation and repression of *pca* genes from *Pseudomonas putida* are propagated by its binding to both the -35 and the -10 promoter elements. Mol Microbiol **32**:253-263.
 190. **Gerischer U, Segura A, Ornston LN.** 1998. PcaU, a transcriptional activator of genes for protocatechuate utilization in *Acinetobacter*. J Bacteriol **180**:1512-1524.
 191. **Trautwein G, Gerischer U.** 2001. Effects exerted by transcriptional regulator PcaU from *Acinetobacter* sp. strain ADP1. J Bacteriol **183**:873-881.
 192. **Dal S, Trautwein G, Gerischer U.** 2005. Transcriptional organization of genes for protocatechuate and quinate degradation from *Acinetobacter* sp. strain ADP1. Appl Environ Microbiol **71**:1025-1034.
 193. **Davis JR, Brown BL, Page R, Sello JK.** 2013. Study of PcaV from *Streptomyces coelicolor* yields new insights into ligand-responsive MarR family transcription factors. Nucleic Acids Res **41**:3888-3900.
 194. **DiMarco AA, Averhoff B, Ornston LN.** 1993. Identification of the transcriptional activator *pobR* and characterization of its role in the expression of *pobA*, the structural gene for *p*-hydroxybenzoate hydroxylase in *Acinetobacter calcoaceticus*. J Bacteriol **175**:4499-4506.
 195. **DiMarco AA, Ornston LN.** 1994. Regulation of *p*-hydroxybenzoate hydroxylase synthesis by PobR bound to an operator in *Acinetobacter calcoaceticus*. J Bacteriol **176**:4277-4284.
 196. **Zhang R, Lord DM, Bajaj R, Peti W, Page R, Sello JK.** 2018. A peculiar IclR family transcription factor regulates *para*-hydroxybenzoate catabolism in *Streptomyces coelicolor*. Nucleic Acids Res **46**:1501-1512.
 197. **Cohen SP, Hächler H, Levy SB.** 1993. Genetic and functional analysis of the multiple antibiotic resistance (*mar*) locus in *Escherichia coli*. J Bacteriol **175**:1484-1492.
 198. **Sulavik MC, Gambino LF, Miller PF.** 1995. The MarR repressor of the multiple antibiotic resistance (*mar*) operon in *Escherichia coli*: prototypic member of a family of bacterial regulatory proteins involved in sensing phenolic compounds. Mol Med **1**:436-446.
 199. **Wilkinson SP, Grove A.** 2006. Ligand-responsive transcriptional regulation by members of the MarR family of winged helix proteins. Curr Issues Mol Biol **8**:51-62.
 200. **Grove A.** 2017. Regulation of metabolic pathways by MarR family transcription factors. Comput Struct Biotechnol J **15**:366-371.
 201. **Perera IC, Grove A.** 2010. Molecular mechanisms of ligand-mediated attenuation of DNA binding by MarR family transcriptional regulators. J Mol Cell Biol **2**:243-254.
 202. **Deochand DK, Grove A.** 2017. MarR family transcription factors: dynamic variations on a common scaffold. Crit Rev Biochem Mol Biol **52**:595-613.
 203. **Linde HJ, Notka F, Metz M, Kochanowski B, Heisig P, Lehn N.** 2000. In vivo increase in resistance to ciprofloxacin in *Escherichia coli* associated with deletion of the C-terminal part of

- MarR. Antimicrob Agents Chemother 44:1865-1868.
204. **Andrésen C, Jalal S, Aili D, Wang Y, Islam S, Jarl A, Liedberg B, Wretling B, Mårtensson LG, Sunnerhagen M.** 2010. Critical biophysical properties in the *Pseudomonas aeruginosa* efflux gene regulator MexR are targeted by mutations conferring multidrug resistance. Protein Sci **19**:680-692.
 205. **Cogan DP, Baraquet C, Harwood CS, Nair SK.** 2018. Structural basis of transcriptional regulation by CouR, a repressor of coumarate catabolism, in *Rhodopseudomonas palustris*. J Biol Chem **293**:11727-11735.
 206. **Cortay JC, Nègre D, Galinier A, Duclos B, Perrière G, Cozzzone AJ.** 1991. Regulation of the acetate operon in *Escherichia coli*: purification and functional characterization of the IclR repressor. EMBO J **10**:675-679.
 207. **Sunnarborg A, Klumpp D, Chung T, LaPorte DC.** 1990. Regulation of the glyoxylate bypass operon: cloning and characterization of *iclR*. J Bacteriol **172**:2642-2649.
 208. **Molina-Henares AJ, Krell T, Eugenia Guazzaroni M, Segura A, Ramos JL.** 2006. Members of the IclR family of bacterial transcriptional regulators function as activators and/or repressors. FEMS Microbiol Rev **30**:157-186.
 209. **zhou Y, Huang H, Zhou P, Xie J.** 2012. Molecular mechanisms underlying the function diversity of transcriptional factor IclR family. Cell Signal **24**:1270-1275.
 210. **Kasai D, Kitajima M, Fukuda M, Masai E.** 2010. Transcriptional regulation of the terephthalate catabolism operon in *Comamonas* sp. strain E6. Appl Environ Microbiol **76**:6047-6055.
 211. **Popp R, Kohl T, Patz P, Trautwein G, Gerischer U.** 2002. Differential DNA binding of transcriptional regulator PcaU from *Acinetobacter* sp. strain ADP1. J Bacteriol **184**:1988-1997.
 212. **Fujita Y, Fujita T, Miwa Y, Nihashi J, Aratani Y.** 1986. Organization and transcription of the gluconate operon, *gnt*, of *Bacillus subtilis*. J Biol Chem **261**:13744-13753.
 213. **Fujita Y, Fujita T.** 1987. The gluconate operon *gnt* of *Bacillus subtilis* encodes its own transcriptional negative regulator. Proc Natl Acad Sci U S A **84**:4524-4528.
 214. **Haydon DJ, Guest JR.** 1991. A new family of bacterial regulatory proteins. FEMS Microbiol Lett **63**:291-295.
 215. **Hoskisson PA, Rigali S.** 2009. Chapter 1: Variation in form and function the helix-turn-helix regulators of the GntR superfamily. Adv Appl Microbiol **69**:1-22.
 216. **Suvorova IA, Korostelev YD, Gelfand MS.** 2015. GntR family of bacterial transcription factors and their DNA binding motifs: structure, positioning and co-evolution. PLoS One **10**:e0132618.
 217. **Jain D.** 2015. Allosteric control of transcription in GntR family of transcription regulators: A structural overview. IUBMB Life **67**:556-563.
 218. **Rigali S, Derouaux A, Giannotta F, Dusart J.** 2002. Subdivision of the helix-turn-helix GntR family of bacterial regulators in the FadR, HutC, MocR, and YtrA subfamilies. J Biol Chem **277**:12507-12515.
 219. **Franco IS, Mota LJ, Soares CM, de Sá-Nogueira I.** 2006. Functional domains of the *Bacillus subtilis* transcription factor AraR and identification of amino acids important for nucleoprotein complex assembly and effector binding. J Bacteriol **188**:3024-3036.
 220. **Hoskisson PA, Rigali S, Fowler K, Findlay KC, Buttner MJ.** 2006. DevA, a GntR-like transcriptional regulator required for development in *Streptomyces coelicolor*. J Bacteriol **188**:5014-5023.
 221. **Lee MH, Scherer M, Rigali S, Golden JW.** 2003. PlmA, a new member of the GntR family, has plasmid maintenance functions in *Anabaena* sp. strain PCC 7120. J Bacteriol **185**:4315-4325.
 222. **Barthelmebs L, Lecomte B, Divies C, Cavin JF.** 2000. Inducible metabolism of phenolic acids in *Pediococcus pentosaceus* is encoded by an autoregulated operon which involves a new class of

- negative transcriptional regulator. *J Bacteriol* **182**:6724-6731.
223. **Gury J, Barthelmebs L, Tran NP, Diviès C, Cavin JF.** 2004. Cloning, deletion, and characterization of PadR, the transcriptional repressor of the phenolic acid decarboxylase-encoding *padA* gene of *Lactobacillus plantarum*. *Appl Environ Microbiol* **70**:2146-2153.
 224. **Nguyen TK, Tran NP, Cavin JF.** 2011. Genetic and biochemical analysis of PadR-*padC* promoter interactions during the phenolic acid stress response in *Bacillus subtilis* 168. *J Bacteriol* **193**:4180-4191.
 225. **De Silva RS, Kovacikova G, Lin W, Taylor RK, Skorupski K, Kull FJ.** 2005. Crystal structure of the virulence gene activator AphA from *Vibrio cholerae* reveals it is a novel member of the winged helix transcription factor superfamily. *J Biol Chem* **280**:13779-13783.
 226. **Huillet E, Velge P, Vallaëys T, Pardon P.** 2006. LadR, a new PadR-related transcriptional regulator from *Listeria monocytogenes*, negatively regulates the expression of the multidrug efflux pump MdrL. *FEMS Microbiol Lett* **254**:87-94.
 227. **Madoori PK, Agustindari H, Driessen AJ, Thunnissen AM.** 2009. Structure of the transcriptional regulator LmrR and its mechanism of multidrug recognition. *EMBO J* **28**:156-166.
 228. **Flórez AB, Álvarez S, Zabala D, Braña AF, Salas JA, Méndez C.** 2015. Transcriptional regulation of mithramycin biosynthesis in *Streptomyces argillaceus*: dual role as activator and repressor of the PadR-like regulator MtrY. *Microbiology* **161**:272-284.
 229. **Tran NP, Gury J, Dartois V, Nguyen TK, Seraut H, Barthelmebs L, Gervais P, Cavin JF.** 2008. Phenolic acid-mediated regulation of the *padC* gene, encoding the phenolic acid decarboxylase of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **190**:3213-3224.
 230. **Fibriansah G, Kovács Á T, Pool TJ, Boonstra M, Kuipers OP, Thunnissen AM.** 2012. Crystal structures of two transcriptional regulators from *Bacillus cereus* define the conserved structural features of a PadR subfamily. *PLoS One* **7**:e48015.
 231. **Kwak YM, Park SC, Na HW, Kang SG, Lee GS, Ko HJ, Kim PH, Oh BC, Yoon SI.** 2018. Crystal structure of the VanR transcription factor and the role of its unique α -helix in effector recognition. *FEBS J* **285**:3786-3800.
 232. **Stragier P, Richaud F, Borne F, Patte JC.** 1983. Regulation of diaminopimelate decarboxylase synthesis in *Escherichia coli*. I. Identification of a *lysR* gene encoding an activator of the *lysA* gene. *J Mol Biol* **168**:307-320.
 233. **Maddocks SE, Oyston PCF.** 2008. Structure and function of the LysR-type transcriptional regulator (LTTR) family proteins. *Microbiology* **154**:3609-3623.
 234. **Schell MA.** 1993. Molecular biology of the LysR family of transcriptional regulators. *Annu Rev Microbiol* **47**:597-626.
 235. **Lochowska A, Iwanicka-Nowicka R, Zaim J, Witkowska-Zimny M, Bolewska K, Hryniewicz MM.** 2004. Identification of activating region (AR) of *Escherichia coli* LysR-type transcription factor CysB and CysB contact site on RNA polymerase alpha subunit at the *cysP* promoter. *Mol Microbiol* **53**:791-806.
 236. **Stauffer LT, Stauffer GV.** 2005. GcvA interacts with both the α and σ subunits of RNA polymerase to activate the *Escherichia coli* *gcvB* gene and the *gcvTHP* operon. *FEMS Microbiol Lett* **242**:333-338.
 237. **Muraoka S, Okumura R, Ogawa N, Nonaka T, Miyashita K, Senda T.** 2003. Crystal structure of a full-length LysR-type transcriptional regulator, CbnR: unusual combination of two subunit forms and molecular bases for causing and changing DNA bend. *J Mol Biol* **328**:555-566.
 238. **Ezezioka OC, Haddad S, Clark TJ, Neidle EL, Momany C.** 2007. Distinct effector-binding sites enable synergistic transcriptional activation by BenM, a LysR-type regulator. *J Mol Biol* **367**:616-

629.

239. **Sainsbury S, Ren J, Nettleship JE, Saunders NJ, Stuart DI, Owens RJ.** 2010. The structure of a reduced form of OxyR from *Neisseria meningitidis*. *BMC Struct Biol* **10**:10.
240. **熊野修太.** 2009. リグニン由来化合物代謝系遺伝子群の転写制御. Master's thesis in Nagaoka University of Technology.
241. **梅田周佑.** 2014. *Sphingobium* 属細菌におけるバニリン酸およびシリンガ酸代謝系遺伝子の転写制御システム. Master's thesis in Nagaoka University of Technology.
242. **Gosselink RJ, Teunissen W, van Dam JE, de Jong E, Gellerstedt G, Scott EL, Sanders JP.** 2012. Lignin depolymerisation in supercritical carbon dioxide/acetone/water fluid for the production of aromatic chemicals. *Bioresour Technol* **106**:173-177.
243. **Schutyser W, Kruger JS, Robinson AM, Katahira R, Brandner DG, Cleveland NS, Mittal A, Peterson DJ, Meilan R, Román-Leshkov Y, Beckham GT.** 2018. Revisiting alkaline aerobic lignin oxidation. *Green Chem* **20**:3828-3844.
244. **Sugimoto K, Senda M, Kasai D, Fukuda M, Masai E, Senda T.** 2014. Molecular mechanism of strict substrate specificity of an extradiol dioxygenase, DesB, derived from *Sphingobium* sp. SYK-6. *PLoS One* **9**:e92249.
245. **Galán B, Kolb A, Sanz JM, García JL, Prieto MA.** 2003. Molecular determinants of the *hpa* regulatory system of *Escherichia coli*: the HpaR repressor. *Nucleic Acids Res* **31**:6598-6609.
246. **Campillo T, Renoud S, Kerzaon I, Vial L, Baude J, Gaillard V, Bellvert F, Chamignon C, Comte G, Nesme X, Lavire C, Hommais F.** 2014. Analysis of hydroxycinnamic acid degradation in *Agrobacterium fabrum* reveals a coenzyme A-dependent, beta-oxidative deacetylation pathway. *Appl Environ Microbiol* **80**:3341-3349.
247. **Cases I, de Lorenzo V.** 2001. The black cat/white cat principle of signal integration in bacterial promoters. *EMBO J* **20**:1-11.
248. **de Lorenzo V, Pérez-Martín J.** 1996. Regulatory noise in prokaryotic promoters: how bacteria learn to respond to novel environmental signals. *Mol Microbiol* **19**:1177-1184.
249. **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.
250. **Short JM, Fernandez JM, Sorge JA, Huse WD.** 1988. λ ZAP: a bacteriophage λ expression vector with *in vivo* excision properties. *Nucleic Acids Res* **16**:7583-7600.
251. **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.
252. **Santos PM, Di Bartolo I, Blatny JM, Zennaro E, Valla S.** 2001. New broad-host-range promoter probe vectors based on the plasmid RK2 replicon. *FEMS Microbiol Lett* **195**:91-96.
253. **Farinha MA, Kropinski AM.** 1990. Construction of broad-host-range plasmid vectors for easy visible selection and analysis of promoters. *J Bacteriol* **172**:3496-3499.
254. **Bradford MM.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**:248-254.
255. **Zhang X, Bremer H.** 1995. Control of the *Escherichia coli* *rrnB* P1 promoter strength by ppGpp. *J Biol Chem* **270**:11181-11189.
256. **Miller JH.** 1972. Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
257. **Rintoul MR, Cusa E, Baldomà L, Badia J, Reitzer L, Aguilar J.** 2002. Regulation of the *Escherichia coli* allantoin regulon: coordinated function of the repressor AllR and the activator AllS. *J Mol Biol* **324**:599-610.

258. **Shimada T, Momiyama E, Yamanaka Y, Watanabe H, Yamamoto K, Ishihama A.** 2017. Regulatory role of XynR (YagI) in catabolism of xylonate in *Escherichia coli* K-12. *FEMS Microbiol Lett* **364**:fnx220.
259. **Murray EL, Conway T.** 2005. Multiple regulators control expression of the Entner-Doudoroff aldolase (Eda) of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **187**:991-1000.
260. **Tralau T, Cook AM, Ruff J.** 2003. An additional regulator, TsaQ, is involved with TsaR in regulation of transport during the degradation of *p*-toluenesulfonate in *Comamonas testosteroni* T-2. *Arch Microbiol* **180**:319-326.
261. **Kamimura N, Inakazu K, Kasai D, Fukuda M, Masai E.** 2012. Regulation of the isophthalate catabolic operon controlled by IphR in *Comamonas* sp. strain E6. *FEMS Microbiol Lett* **329**:186-192.
262. **Rojas A, Segura A, Guazzaroni ME, Terán W, Hurtado A, Gallegos MT, Ramos JL.** 2003. In vivo and in vitro evidence that TtgV is the specific regulator of the TtgGHI multidrug and solvent efflux pump of *Pseudomonas putida*. *J Bacteriol* **185**:4755-4763.
263. **Cheng M, Chen K, Guo S, Huang X, He J, Li S, Jiang J.** 2015. PbaR, an IclR family transcriptional activator for the regulation of the 3-phenoxybenzoate 1',2'-dioxygenase gene cluster in *Shingobium wenxiniae* JZ-1T. *Appl Environ Microbiol* **81**:8084-8092.
264. **Arai H, Yamamoto T, Ohishi T, Shimizu T, Nakata T, Kudo T.** 1999. Genetic organization and characteristics of the 3-(3-hydroxyphenyl)propionic acid degradation pathway of *Comamonas testosteroni* TA441. *Microbiology* **145**:2813-2820.
265. **Arias-Barrau E, Olivera ER, Luengo JM, Fernandez C, Galan B, Garcia JL, Diaz E, Minambres B.** 2004. The homogentisate pathway: a central catabolic pathway involved in the degradation of L-phenylalanine, L-tyrosine, and 3-hydroxyphenylacetate in *Pseudomonas putida*. *J Bacteriol* **186**:5062-5077.
266. **Kasai D, Araki N, Motoi K, Yoshikawa S, Iino T, Imai S, Masai E, Fukuda M.** 2015. γ -Resorcyate catabolic-pathway genes in the soil actinomycete *Rhodococcus jostii* RHA1. *Appl Environ Microbiol* **81**:7656-7665.
267. **Choi KY, Kang BS, Nam MH, Sul WJ, Kim E.** 2015. Functional identification of OphR, an IclR family transcriptional regulator involved in the regulation of the phthalate catabolic operon in *Rhodococcus* sp. strain DK17. *Indian J Microbiol* **55**:313-318.
268. **Veselý M, Knoppová M, Nesvera J, Pátek M.** 2007. Analysis of *catRABC* operon for catechol degradation from phenol-degrading *Rhodococcus erythropolis*. *Appl Microbiol Biotechnol* **76**:159-168.
269. **Nga DP, Altenbuchner J, Heiss GS.** 2004. NpdR, a repressor involved in 2,4,6-trinitrophenol degradation in *Rhodococcus opacus* HL PM-1. *J Bacteriol* **186**:98-103.
270. **Chao H, Zhou NY.** 2013. GenR, an IclR-type regulator, activates and represses the transcription of *gen* genes involved in 3-hydroxybenzoate and gentisate catabolism in *Corynebacterium glutamicum*. *J Bacteriol* **195**:1598-1609.
271. **Yamamoto K, Ishihama A.** 2003. Two different modes of transcription repression of the *Escherichia coli* acetate operon by IclR. *Mol Microbiol* **47**:183-194.
272. **Lorca GL, Ezersky A, Lunin VV, Walker JR, Altamentova S, Evdokimova E, Vedadi M, Bochkarev A, Savchenko A.** 2007. Glyoxylate and pyruvate are antagonistic effectors of the *Escherichia coli* IclR transcriptional regulator. *J Biol Chem* **282**:16476-16491.
273. **Salis HM, Mirsky EA, Voigt CA.** 2009. Automated design of synthetic ribosome binding sites to control protein expression. *Nat Biotechnol* **27**:946-950.
274. **Martone PT, Estevez JM, Lu F, Ruel K, Denny MW, Somerville C, Ralph J.** 2009. Discovery

- of lignin in seaweed reveals convergent evolution of cell-wall architecture. *Curr Biol* **19**:169-175.
275. **Weng JK, Chapple C.** 2010. The origin and evolution of lignin biosynthesis. *New Phytol* **187**:273-285.
 276. **Yanisch-Perron C, Vieira J, Messing J.** 1985. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**:103-119.
 277. **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.
 278. **Silva-Rocha R, Martinez-Garcia E, Calles B, Chavarria M, Arce-Rodriguez A, de Las Heras A, Paez-Espino AD, Durante-Rodriguez G, Kim J, Nikel PI, Platero R, de Lorenzo V.** 2013. The Standard European Vector Architecture (SEVA): a coherent platform for the analysis and deployment of complex prokaryotic phenotypes. *Nucleic Acids Res* **41**:D666-D675.