

# 博士論文

$\beta$ -Etherase system が果たすリグニンセンサー機能と  
新規  $\beta$ -etherase の反応特性

群馬大学大学院理工学府 理工学専攻

物質・生命理工学領域

熊川 恵理

<b>第 1 章</b>	<b>序論</b>	
1	地球規模の炭素循環と海洋生態系	1
2	有用資源としての木材：木質バイオマス	1
3	リグニンの複雑な構造と環境中の生分解	2
4	細菌が持つリグニン $\beta$ -O-4 結合の代謝経路	5
5	$\beta$ -O-4 結合開裂酵素： $\beta$ -etherase	6
6	細菌の代謝能や生産酵素を利用したリグニン利活用技術	6
7	<i>Novosphingobium</i> sp. MBES04 株	8
8	<i>Altererythrobacter</i> sp. B11	8
9	本研究の目的	9
<b>第 2 章</b>	<b>MBES04 株が保有する <math>\beta</math>-etherase system が果たすリグニンセンサー機能</b>	
1	諸言	10
2	実験方法	
	試薬、化合物	12
	菌株、培養条件	12
	比較ゲノム	15
	MBES04 株の増殖評価と生産物の分析	15
	$\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子をレポーターとするプラスミドの作製	15
	$\beta$ -ガラクトシダーゼ活性測定	16
3	結果と考察	
	エネルギー獲得に重要な遺伝子セット	17
	GGGE、バニリン、APA-リグニンからの主要な生産物解析	19
	GGGE、バニリン、APA-リグニンに対する転写応答	22
	G-II 遺伝子クラスターを制御するゲノム領域の探索	28
	G-II 遺伝子クラスターの発現エフェクター分子の同定	29
4	本章の結論	30
<b>第 3 章</b>	<b>B11 株の新規 <math>\beta</math>-etherase の特性解析</b>	
1	緒言	32
2	実験方法	
	試薬、基質化合物	33
	菌株、培養条件	33
	B11 株の GGGE 変換	35
	HPLC の分析条件	35

	$\beta$ -Etherase の候補遺伝子の探索と系統解析	35
	組換えタンパク質の発現と精製	35
	酵素活性アッセイ	36
	酵素反応物の分析	36
	酵素反応物のキラル分析	37
	変異体プラスミドの作製	37
	酵素タンパク質のモデリング	37
	反応速度論的解析	37
3	結果と考察	
	B11 株のリグニンモデル代謝能	38
	候補 $\beta$ -etherase のアミノ酸配列の系統解析	39
	候補 $\beta$ -etherase のアミノ酸配列アライメント	41
	酵素活性評価	43
	AbLigF2 の立体選択性	45
	AbLigF2 の生化学的特性	46
	AbLigF2 の温度安定性	49
	触媒アミノ酸残基の同定	49
4	本章の結論	52
	<b>第 4 章 総括</b>	<b>53</b>
	<b>参考文献</b>	<b>55</b>
	<b>謝辞</b>	<b>62</b>

## 第1章 序論

### 1. 地球規模の炭素循環と海洋生態系

地球表層に存在する炭素は大気域－陸域－海域間を循環している。IPCC 評価報告書によると大気中に存在する炭素量を基準として、陸域生態系ではおよそ3倍、海域には50倍程度の炭素量が算出されている(Climatic Change 2021—The Physical Science Basis 2021)。産業革命以降、社会の活発化によって人為的に大気域に蓄積するCO<sub>2</sub>濃度が急増し、今日では地球温暖化また気候変動の決定的な要因となっている。化石燃料の燃焼など人為的に発生したCO<sub>2</sub>の一部はそのまま大気中に留まるが、多くは陸域と海域に取り込まれる。陸域生態系では主に植物の光合成により有機物が生産され、生態内部に固定化される。海域においては海洋表層でプランクトンや藻類の光合成、化学的なCO<sub>2</sub>の溶解によって供給される。地下圏には広大な岩石圏が広がり、莫大量の炭素(炭素塩や有機物)が堆積している。海域に供給される有機物の例として木材がある。木材などの陸域有機物は最終的に海底に行き着き、そこでは多様性に富む特殊な微生物コミュニティが形成される(Fagervold *et al.* 2012)。木材分解群衆やその分解物を栄養にする者、または化学合成群衆が集合する。微生物による陸域起源の有機物の分解は全球的な炭素サイクルを理解する上で無視できない重大なプロセスである。

### 2. 有用資源としての木材：木質バイオマス

持続可能な社会を目指して、2015年の国連サミットで Sustainable Development Goals (SDGs; 持続可能な開発目標)が掲げられた。この声明を皮切りに再生可能なエネルギーや環境への負荷が低いクリーンエネルギーの技術開発がより一層加速して取り組まれてきた。化石燃料および化学製品への依存を克服し、持続可能な資源の活用を進めるために植物由来のバイオマス資源の効果的な利用が注目される。前述の通り植物バイオマスは太陽光と水で成長し、大気中から二酸化炭素を取り込み体内に固定する。これらの炭素を汎用化成品への転換が実現すればカーボンニュートラルに貢献することが期待される。その中でも木質資源は地球上に莫大量存在し安定的な供給が見込める上に、バイオエタノール生産の主原料に使われるサトウキビやトウモロコシと異なって、食糧との競合問題を回避できるという利点もある。このようにバイオマス資源の普及が期待されているものの、日本における利用量はエネルギー利用全体のわずか4%に留まっている(経済産業省 資源エネルギー庁, エネルギー白書, 2020)。

木質バイオマスはセルロース、ヘミセルロース、リグニンで構成され、その割合は木材の種類によって異なる(Rabemanolontsoa *et al.* 2013)。セルロースは木材組成で最大を占め、グルコースが直鎖状に連結した多糖類である(Ragauskas *et al.* 2014)。水素結合によりマイクロフィブリルを形成し、細胞壁全体に線状繊維として存在する(Suhas *et al.* 2016)。ヘミセルロースはセルロースより分子量が低く、キシロース、マンノース、ガラクトース、アラビノース、ラムノース等のさまざまな単糖・多糖で構成される。これらは紙や衣料用の繊維としての利用技術が確立している他、バイオエタノールの原料など工業的にも使われている(Taghizadeh-Alisaraei *et al.* 2019)。化学的前処理を経て食品添加物や機能性食品としての利活用も進んでいる(Mu *et al.* 2019)。リグニンは共有結合によってヘミセルロースに強固に結合し、セルロース、ヘミセルロース間を充填しながら存在する。主に熱源として工場で利用される他、分散剤や接着剤などの低価値な利用に限定される

(Doherty *et al.* 2011; Ragauskas *et al.* 2014)。セルロースやヘミセルロースの利用が進む一方で、リグニンは不要となり除去対象とされてきた。

### 3. リグニンの複雑な構造と環境中の生分解

植物細胞壁を構成する主要な成分であるリグニンは、植物種によって異なる構成比を保ちながら多糖類であるセルロースとヘミセルロースと結合する(Rabemanolontsoa *et al.* 2013)。疎水性の特性は導管への防水性をもたらし、植物体に物理的な強度を与える。これにより微生物による腐朽を防ぐ重要な役割を果たす(Ferrer *et al.* 2008; Miedes *et al.* 2014)。リグニンは、フェニルプロパノン骨格(C6 - C3)を有するコニフェニルアルコール、シナピルアルコール、*p*-クマリルアルコールの3種類のモノリグノール(Figure 1-1)が不規則に酵素脱水素重合した繰り返し構造を持たない芳香族ポリマーである (Figure 1-2, Zakzeski *et al.* 2010; Anderson *et al.* 2019)。芳香族を含むほぼ唯一のバイオマスであり、化石資源の代替や高付加価値材料の創出への可能性を示唆する。リグニン内の結合は芳香環の結合位置により多岐にわたり、様々な結合が形成される。その中でも $\beta$ -O-4結合が最も多く存在し、近年の研究ではリグニン中の70%<の結合を占めると報告された(Anderson *et al.* 2019)。

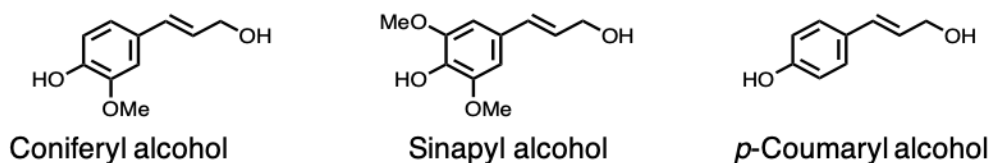


Figure 1-1. リグニンを構成するモノリグノール構造

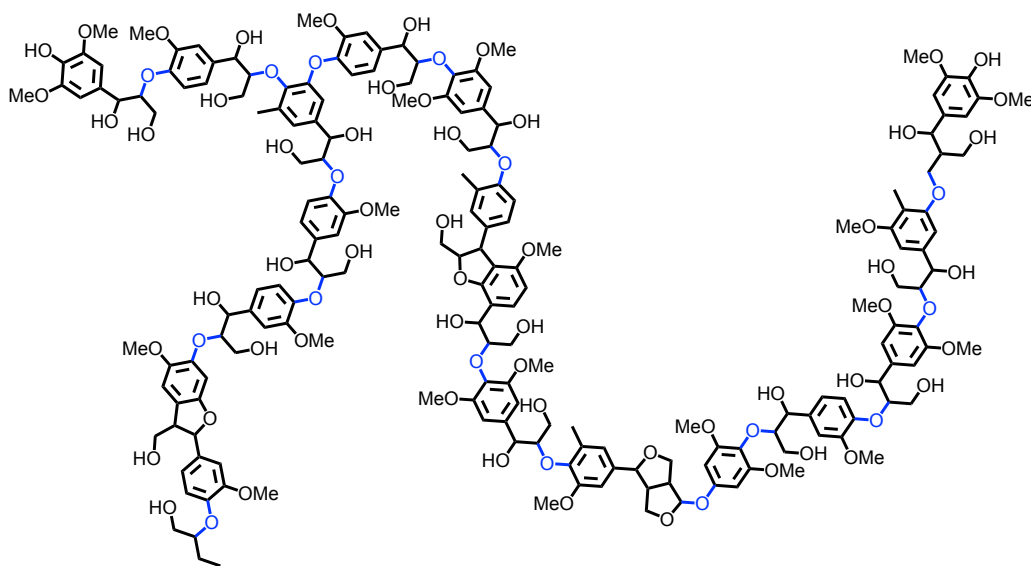


Figure 1-2. リグニンの推定構造

本図面は Vanholme *et al.* 2010; Anderson *et al.* 2019 を参考に作図した。

環境中のリグニンの生分解は低分子化と、それによって生じる不均一な芳香族化合物の無機化の二段階によって進行する(Masai *et al.* 2007; Bugg *et al.* 2011a; Kamimura *et al.* 2019)。白色腐朽菌類等によるリグニンの低分子化は土壌、木材、植物など広範な自然環境に広がっている。それらが菌体外に分泌するリグニンペルオキシダーゼやラッカーゼによって、酸化的にリグニンを低分子化する(Martínez *et al.* 2005; Bugg *et al.* 2011b; Abdel-Hamid *et al.* 2013)。生成された不均質な芳香族化合物は細菌によって無機化される。*Sphingobium* sp. SYK-6 株(Masai *et al.* 2007)を筆頭に、*Sterptomyces*(Crawford *et al.* 1983)、*Rhodococcus* (Sainsbury *et al.* 2013)、*Pseudomonas* (Austin *et al.* 2015; Kohlstedt *et al.* 2018)属細菌のいくつかの菌株で無機化の過程がおおよそ解明している。リグニン由来の芳香環は水酸化によってバニリンおよびプロトカテク酸へと収束し、オルト開裂経路またはメタ開裂経路を経て開環する。最終的に TCA 回路に入ることによって細菌はこれらをエネルギー源とする(Figure 1-3, Seaton *et al.* 2018, Lee *et al.* 2019)。

リグニンは陸域有機炭素の主成分であり、森林や土壌だけでなく海洋環境など自然界に広く分布する。これらは河川から海洋環境へ年間に約  $4.0 \times 10^{11}$  kg (0.4 Gt)の膨大な量流入する(Bianchi 2011)。環境細菌は地球上に広範に分布するリグニンの最終分解者を果たすことから、細菌が持つリグニン由来芳香族化合物への転写応答や代謝経路、分解酵素の機能を理解することは、全球的な炭素サイクルの包括的な理解へと波及する。

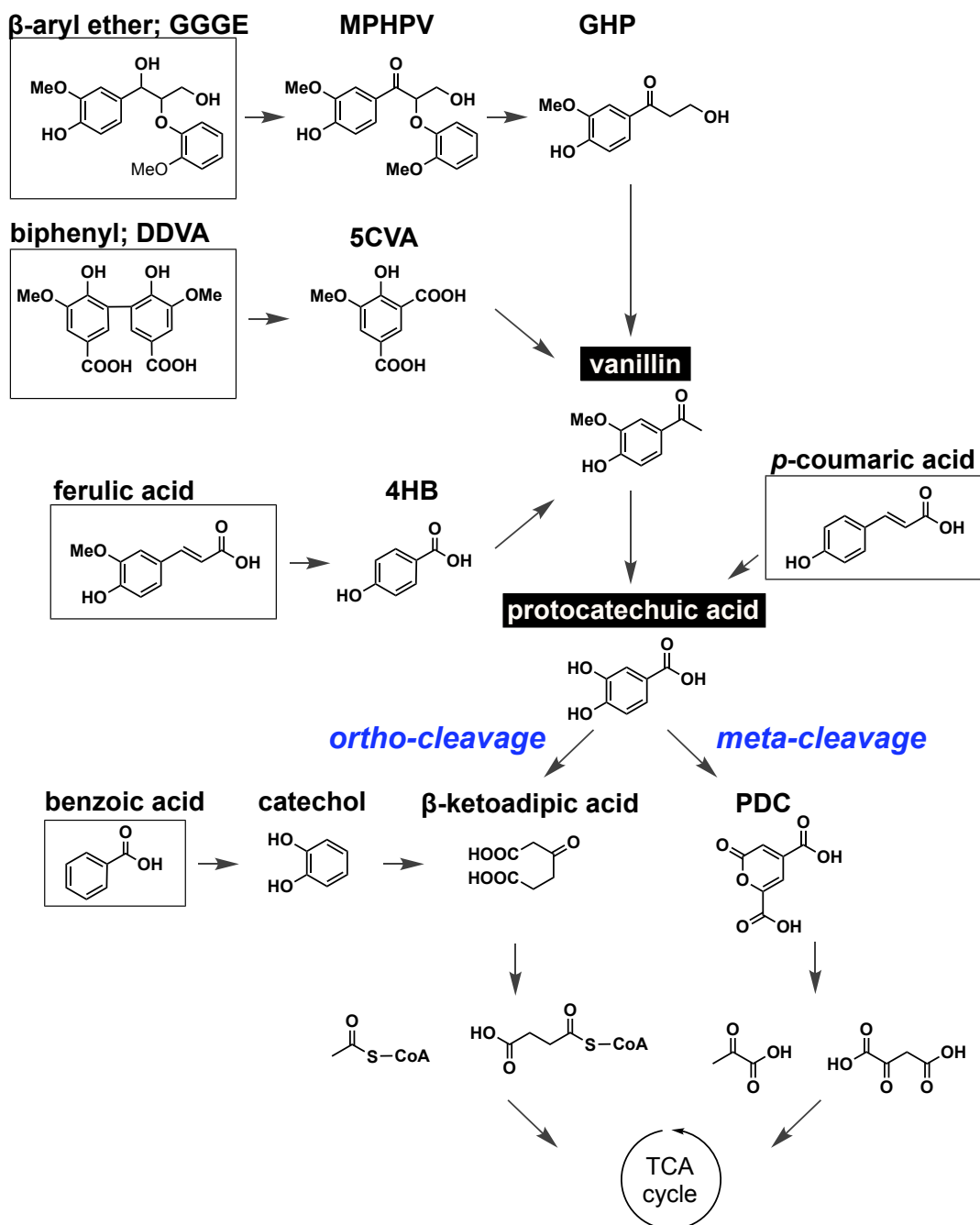


Figure 1-3. 細菌によるリグニン由来芳香族化合物の代謝経路

本図面は Lee *et al.* 2019 を参考に作図した。

GGGE; guaiacylglycerol- $\beta$ -guaiacyl ether, MPHPV; (2-methoxyphenoxy)hydroxypropiovanillone, GHP; guaiacylhydroxypropanone, DDVA; 5,5'-dehydrodivanillate, 5CVA; 5-carboxyvanillate, 4HB; 4-hydroxy benzoate, PDC; 2-pyrone-4,6-dicarboxylate, TCA; tricarboxylic acid.

#### 4. 細菌が持つリグニン $\beta$ -O-4 結合の代謝経路

リグニン分子内の  $\beta$ -O-4 結合( $\beta$ -エーテル結合)は最も多くの存在比を占めることから、この結合の開裂はリグニン分解において極めて重要な反応段階である。白色腐朽菌が分泌する酸化分解酵素はラジカル反応を使用して非選択的にリグニンを開裂すると知られている(Hatakka 1994)。一方で一部の細菌は 3 段階のカスケード反応を経てリグニン主要結合を絶対選択的に開裂する(Tanamura *et al.* 2011)。その代謝能を持つ *Novosphingobium* sp. MBES04 株の  $\beta$ -O-4 結合代謝プロセスを Figure 1-4 に示す(Ohta *et al.* 2015)。

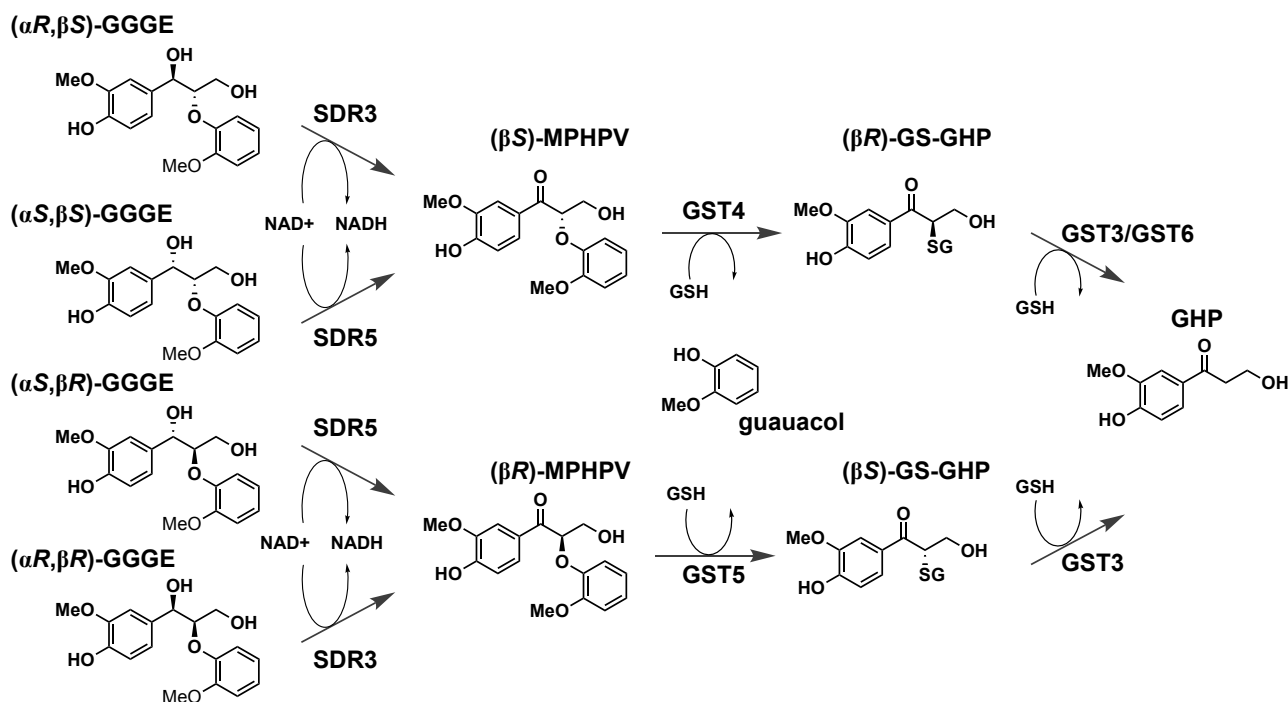


Figure 1-4.  $\beta$ -Etherase systemを介したリグニン二量体モデル化合物の変換

GGGE; guaiacylglycerol- $\beta$ -guaiacyl ether, MPPHV; (2-methoxyphenoxy)hydroxypropiovanillone, GS-GHP; glutathione-conjugated guaiacylhydroxypropanone, GHP; guaiacylhydroxypropanone,  $\text{NAD}^+$ ; oxidized form of nicotinamide adenine dinucleotide, NADH; reduced form of NAD, SDR; short-chain dehydrogenases, GST; glutathione s-transferase

リグニン  $\beta$ -O-4 二量体モデル GGGE は三段階のカスケード反応を経て単量体へと変換される。初段階反応には酸化還元酵素である short chain dehydrogenase/reductase (SDR)に分類される  $\text{C}\alpha$ -dehydrogenase によって  $\text{NAD}^+$ を補酵素として  $\text{C}\alpha$ 位が酸化される(Sato *et al.* 2009)。第二段階目の反応は glutathione S-transferase ファミリー(GST)に分類される酵素によって還元型グルタチオン(GSH)を補酵素として触媒され、 $\beta$ 位に GSH が付加した GS-GHP とグアヤコルが生成する(Masai *et al.* 1993)。GSH 付加を受けると同時に  $\beta$ -O-4 結合は開裂を受け、この反応を触媒する酵素は  $\beta$ -etherase と呼ばれる。第三段階目の反応は glutathione lyase が担い GS-GHP は GSH が脱離しグアイアシルヒドロキシプロパノン(GHP)、そのメトキシ体シリングルヒドロキシプロパノン (SHP)へと変換する(Kontur *et al.* 2018)。この一連の代謝経路を  $\beta$ -etherase system、第二段反応を担う  $\beta$ -O-4 結合開裂酵素を  $\beta$ -etherase と呼ばれている。反応基質はリグニンがラセミ体構造を形成するため



に C $\alpha$  位、C $\beta$  位を中心に複数の異なる立体異性体があり、本代謝の第一、第二段階反応酵素は優れた立体選択性を持っている。最終産物 GHP はリグニン基本骨格 C6-C3 構造を保持することから、リグニンバイオ変換の優れたツールになると考えられる。しかし、 $\beta$ -O-4 結合が受ける還元的な変換プロセスは水素移動を介して進行するため(Reiter *et al.* 2013)、細菌はこの反応によって還元力を消費する。 $\beta$ -etherase system 産物 GHP のさらなる変換は SYK-6 株で発見され、GHP は C $\gamma$  位の酸化によりバニロイル酢酸へ、その後 CoA 付加により活性化され、最終的にバニリン酸へと変換され TCA 回路に合流する(Higuchi *et al.* 2018, 2019)。芳香族低分子化合物が無機化される際にエネルギー収支が正になる。この代謝系は Sphingomonadales 目に分類される *Sphingobium* 属(Masai *et al.* 2003)、*Novosphingobium* 属(Ohta *et al.* 2015 ; Kontur *et al.* 2018)、*Erythrobacter* 属(Palamuru *et al.* 2015)の細菌でのみ確認されている。

#### 5. $\beta$ -O-4 結合開裂酵素 : $\beta$ -etherase

$\beta$ -Etherase system の酵素群のうち第 2 段階反応で  $\beta$ -O-4 結合を開裂する役割を担う酵素が  $\beta$ -etherase である。本酵素は第 1 段階反応にて C $\alpha$  位が酸化され、ケト基が形成された化合物に初めて作用する。GST スーパーファミリーに属し GSH 依存性トランスフェラーゼの一つである。GST スーパーファミリー酵素は GSH 結合を介して細胞の解毒プロセスに関与する多機能酵素である。 $\beta$ -O-4 結合開裂における絶対選択性によってリグニン解重合への応用が有望視されるが、これまで Sphingomonadales 目の限られた数種だけが報告され特徴付けられている。MBES04 株由来の  $\beta$ -etherase である GST4 は C $\beta$  位が(S)型立体異性体化合物を、GST5 は C $\beta$  位が(R)型を選択的に変換する(Ohta *et al.* 2015)。同活性を示す *Sphingobium* 属 SYK-6 株由来酵素ではそれぞれ LigF と LigE が対応する(Masai *et al.* 2003)。GST4/LigF 様  $\beta$ -etherase はさらに LigF1、LigF2 の 2 つのサブグループに区分され(Kontur *et al.* 2019)、最も解析の進む LigF1 グループ(LigF、NaLigF1、NsLigF、EbLigF、GST4)間の配列相同性は 56~96%だった。LigF は X 線結晶構造解析により溶液中で N 末端チオレドキシンドメインと C 末端  $\alpha$  ヘリックスドメインを有するホモ二量体を形成した状態で存在し触媒活性を持つことが明らかになった(Helmich *et al.* 2016)。LigF2 グループ(NaLigF2)は LigF ホモログに対して 36~42%の相同性を示す。Kontur は *Novosphingobium aromaticivorans* 由来のヘテロ二量体  $\beta$ -etherase (BaeAB)が  $\beta$ (R)型化合物を立体特異的に開裂することを報告した。BaeAB と LigF は異なる立体異性体を開裂するにもかかわらず、BaeA ホモログは進化的に LigF と近縁だった(Kontur *et al.* 2019)。BaeA ホモログ(BaeA、NsBaeA、SxeBaeA)間の配列相同性は 52~74%だった。Gall、Picart らは BLAST 検索により新規  $\beta$ -etherase の探索を試みたが、やや低い配列相同性(既報酵素に対して 36%)を示した候補酵素は期待された etherase 活性を示さなかった(Gall *et al.* 2014; Picart *et al.* 2014)。GST スーパーファミリーに属する酵素は広範な生物種に存在する一般的な酵素であるために、配列相同性解析だけでは膨大な種類が候補となり、真の  $\beta$ -etherase と他の GST 酵素を区別するのは困難である。活性な新規  $\beta$ -etherase を同定するには反応機構や反応に関与する重要なアミノ酸に関する知見が必要である。

#### 6. 細菌の代謝能や生産酵素を利用したリグニン利活用技術

今日において実装しているバイオリファイナリー技術の一例にバイオ燃料生産がある(Himmel *et al.* 2007)。これらはバイオマスから熱化学的や酵素的な前処理によって五炭糖と六炭糖を生産し、その後微生物の発酵特性を利用してアルコールを生産するアプローチである。一般にこの反応は高

いアルコール耐性を有する酵母が優勢とされるが、光合成細菌シアノバクテリアも注目を浴びてきた(de Farias Silva *et al.* 2016)。これらは光合成能、強靱な増殖能を有し CO<sub>2</sub>を原料としてアルコールを作る最大の利点を持つ。セルロースやヘミセルロースは糖としての利用が進む一方、木材の前処理によって同時に生産されるリグニン由来物質の利用は未だ途上段階である。先駆的なバイオ燃料のプラントが世界中で稼働しているため、日々膨大なリグニン混合物が生産される可能性が高いことを考えると、広範囲のリグニン変換技術がさらに要求される。リグニンの価値化は既存のバイオリファイナリー技術との統合で実現できると考えられる。

バイオマスの前処理法として熱化学反応を使用して酸、塩基、熱水、蒸気、有機溶媒やイオン液体を用いる手法とセルラーゼ、キシラナーゼによる酵素加水分解法が検討された(Mosier *et al.* 2005)。前者は高温高压条件で反応が進行するため処理時間を短縮できる利点があるが、厳しい反応条件により設備の耐久性や、有毒でかつ危険な化合物を反応系中で必要とする。一方で、酵素処理は穏やかな条件で反応が進行し、エネルギーコストが低い利点が挙げられる。持続可能性の観点から環境低負荷な手法として関心が集まるが、反応速度の低さや酸化的開裂によって生じたフラグメントの再重合によって不均一な生成物となる課題がある(Chandra *et al.* 2007)。非選択的なバイオマスの前処理法はリグニンがこれまで工業規模で評価されず、エネルギーと熱生産に使用されてきた一つの要因である(Zakzeski *et al.* 2010; Behling *et al.* 2016)。

不均一で多様な芳香族化合物と糖の混合物を細菌が持つ多様な代謝系によって産業的に価値のある基幹物質へ転換する戦略を biological funneling と定義し、評価が高まりつつある(Linger *et al.* 2014; Beckham *et al.* 2016)。バイオマス加水分解物の副生成物には、酢酸などの有機酸、フルフラールや 5-ヒドロキシメチルフルフラールなどのフラン化合物、および 4-ヒドロキシベンズアルデヒドなどのフェノール化合物、バニリン、およびシリンガアルデヒドが高濃度に含まれ、これらは微生物の細胞増殖を阻害する(Klinke *et al.* 2004)。細菌が持つ多様性と特殊環境への適応能を活かし、阻害剤への抵抗と物質生産代謝を競合させることによって、それらの微生物はバイオマス前処理混合物から有用物質生産を実現するために検討されている。放線菌 *Corynebacterium glutamicum* は工業的にアミノ酸を高生産する細菌である。バイオマスの加水分解物中の阻害剤に対して高い耐性を示し、多様な発酵条件への適応が証明されている(Sakai *et al.* 2007)。遺伝子操作された *C. glutamicum* はクラフトパルプの酵素加水分解物からポリマー産業で貴重な原料となるイタコン酸を生産した(Hanh *et al.* 2023)。その他の例では  $\gamma$ -proteobacteria 綱の *Pseudomonas* 属細菌は過酷な環境に対する潜在的な耐性により(Silby *et al.* 2011)、多くの研究が報告されている。*P. putida* KT2440 株を用いてムコン酸(Akutsu *et al.* 2022)、2-pyrone-4,6-dicarboxylic acid (PDC, Notonier *et al.* 2021)、トウモロコシ茎の酵素処理物からのポリヒドロキシアルカン酸(Salvachúa *et al.* 2020)が生産されている。また、Jose M. Perezらは広葉樹と草を代表するハードメープル、ポプラ、ソルガム、スイッチグラスをパラジウム炭素(Pd-C)触媒を用いて解重合した画分に PDC 下流代謝を欠損させた *Novosphingobium aromaticivorans* DSM12444 株を与え、リグニン分解中間体産物である PDC を高生産させた。解重合リグニンで測定された全芳香族化合物からの生産量は 71.1~100(mol)%だった(Perez *et al.* 2021, 2022)。微生物生産した化合物と化学合成法を組み合わせることでポリマーを作製した報告例もある。代謝改変を加えた *Sphingobium* sp. SYK-6 株は針葉樹のアルカリ酸化物を原料として基幹化合物であるバニリン酸を高生産し、得られたバニリン酸からポリエチレンバニレート合成した(Higuchi *et al.* 2023)。しかしながら、これらの生産物はいずれもリグニン固有の C6-C3 構造の側鎖や環構造を逸しており、リグニン原料の貴重な炭素を損失している。他方で C6-C3 構

造を温存した手法として  $\beta$ -etherase system の酵素群を応用した酵素法がある。針葉樹の杉、広葉樹のユーカリをボールミルで磨砕した Milled wood lignin を原料に *Novosphingobium* sp. MBES04 由来の 6 つの酵素セットを同時に反応させ、フェニルプロパンモノマーを生産した(Ohta *et al.* 2015)。さらなる化学処理と組み合わせビスフェノール化合物やコニフェリルアルコールの生産が実証された(Ohta *et al.* 2017)。これら化合物は硬化剤、薬、機能性食品や化粧品へと転用が見込まれる。Daniel L. Gall らは SYK-6 株と DSM12444 株由来の LigD、LigN、LigE、LigF、NaGST<sub>NU</sub>(または LigG)と GSH リサイクル酵素 *Allochromatium vinosum* 由来の AvGR を用いて分子量 9,000~12,000 のポプラのリグニンオリゴマーから単量体 SHP を酵素生産した(Gall *et al.* 2018)。酵素法は酵素失活による反応効率の低下により、安定的な連続利用は難しい。細菌の遺伝子改変技術が容易になりつつあることから、酵素法より細菌細胞を物質生産工場と模したバイオ生産の方が効率が良い。植物種によってバイオマスの修飾度が異なること、またバイオマス前処理から生産される化合物の多様性やその複雑さを考慮すると、バイオ生産法に資する細菌宿主の選択肢は多い方が望ましい。

## 7. *Novosphingobium* sp. MBES04 株

*Novosphingobium* sp. MBES04 (MBES04 株) は  $\alpha$ -proteobacteria 綱 Sphingomonadales 目 *Novosphingobium* 属に分類され、太平洋沿岸沖駿河湾の水深 260 m の沈木から単離された(Ohta *et al.* 2012)。Sphingomonadales 目細菌は特異な環境適応能により、自然界に広範に棲みつき、海域に限らず土壌や工業廃棄物、植物表面から単離される。土壌有機物の分解や工業廃棄物の浄化、または植物との共生関係を維持する特性を持つ。細胞は炭素の長鎖構造を持つ強い疎水性膜で覆われ、疎水性化合物の取り込みに長けている。MBES04 株はリグニン  $\beta$ -O-4 結合二量体モデル化合物である GGGE のエーテル結合を  $\beta$ -etherase system を機能させ開裂する。しかし MBES04 株は  $\beta$ -etherase system 産物である GHP 下流の代謝セットを保有せず、GHP は菌体外に排出した(Ohta *et al.* 2015)。この特性は  $\beta$ -etherase system を保有する細菌の中でも極めて稀な特性で、エネルギー消費反応である  $\beta$ -etherase system をゲノム上に保有する生理学的意義も明らかになっていない。物質生産の観点からは潜在的な排出系の保有は、菌体内に生産物が毒性濃度まで過剰に蓄積することを回避できる点で好都合である。MBES04 株がリグニン変換の優れた宿主になり得る可能性を有する。

## 8. *Altererythrobacter* B11 株

*Altererythrobacter*. B11 株 (B11 株) は  $\alpha$ -proteobacteria 綱 Sphingomonadales 目 *Altererythrobacter* 属に分類する。*Altererythrobacter* 属は Kwon らによって報告され、これに属する様々な種は海水や干潟等の海洋圏から頻繁に取得されている(Kwon *et al.* 2007; Liao *et al.* 2017)。B11 株は日本の鹿島沖(北緯 36.07 度、東経 141.79 度)水深 2,100 m、海底 9 m の堆積物から分離された(Maeda *et al.* 2018)。B11 株の 16S rRNA 遺伝子配列は海洋固有種と報告される *Altererythrobacter* 26DY36T(Wu *et al.* 2014, 2015)に 98.1%の相同性を示すと報告され、B11 株も同じ特徴を有すると示唆される。本株は単離過程の炭素源として椎茸の廃菌床が使用された。自然界において高分子リグニンは担子菌類によって低分子化されるため、椎茸はリグニンの一次分解者であり廃菌床にはリグニン部分分解物が含まれる。これらに集積した B11 株はリグニン分解能を持つと期待される。先行研究では  $\beta$ -etherase system を保有する細菌の一種である *Erythrobacter* sp. SG61-1L は *Sphingobium* sp. SYK-6 株よりも著しく高い速度でリグニンモデル二量体化合物を分解した(Palamuru *et al.* 2015)。さらに熱

湿地堆積物のメタゲノム、メタトランスクリプトーム解析により *Altererythrobacter* spp. が高温環境でリグニン分解に関与することが明らかになり、リグニン価値化のための耐熱性酵素の供給源として機能する可能性があることが報告された(Levy-Booth *et al.* 2021)。以上のことから、これまで研究例の乏しい *Erythrobacter* 属および *Altererythrobacter* 属が、優れた  $\beta$ -etherase 能力を有する分離株の有力な供給源になると研究対象として検討され始めた。

## 9. 本研究の目的

リグニンの高付加価値化に向けて、近年は環境負荷が低く、かつ優れた特異的変換能を有した酵素や人工的に代謝改変した微生物を用いる手法が検討されてきた。しかし、これまでリグニン原料からバイオ生産した化合物はリグニン由来の芳香環を開環した有機酸や側鎖の C3 構造が脱離した化合物に限られていた。リグニン最小単位であるフェニルプロパンモノマーの選択的な生産はこれまで酵素法でのみ実現され、バイオ生産法では検討されてこなかった。酵素法ではコスト面での課題や酵素精製の煩雑さ、さらには酵素の連続的な使用において限界がある。近年は遺伝子改変技術が容易になってきたこともあり、微生物細胞を使ったアプローチに研究は集中している。したがって、 $\beta$ -etherase system を標的としたリグニンからのフェニルプロパンモノマーのバイオ生産がリグニン原料の価値を維持した状態で取り出せる点で有望なツールとなると考えた。MBES04 株は  $\beta$ -etherase system の機能が確認された株の中で唯一最終産物 GHP の排出系を持ち、生産宿主として最適と考えた。本株をバイオ生産の宿主とするには基礎的なエネルギー獲得経路また、 $\beta$ -O-4 結合化合物への応答の理解は生産株を設計する上で不可欠な情報である。加えて、MBES04 株が  $\beta$ -etherase system を機能させる生理学的に未解明な意義を明らかにする必要がある。本研究は MBES04 株を宿主とした  $\beta$ -etherase system を介した機能性化合物 GHP 生産を達成するための基盤情報の取得を目的とする。第 2 章で MBES04 の基礎的なエネルギー獲得経路を KEGG から予測し、他の近縁株と比較する。次に  $\beta$ -O-4 結合含有化合物を用いたトランスクリプトーム解析の結果を解析し、リグニン関連化合物への応答を理解する。第 3 章では  $\beta$ -etherase system の鍵酵素となる  $\beta$ -etherase の反応特性や反応機構の一端を明らかにすることを目的として、これまで酵素学的諸性質の解析が進んでいない  $\beta(R)$ 型-etherase の LigF2 クレードを対象に調査する。本研究はリグニン変換スマート細菌の創出に向けた細菌の基礎情報を提供する他に、リグニン存在環境下での細菌の応答性の理解に貢献する。

## 第2章

### *Novosphingbium* MBES04 株が保有する $\beta$ -etherase system が果たすリグニンセンサー機能

#### 1. 諸言

*Novosphingbium*. MBES04 株は幅広い芳香族モノマーやエステル化合物に対して分解能を持つ。以前の研究でバニリン、シリングアルデヒド、クマル酸、フェルラ酸、シナピン酸、カフェ酸、バニリン酸、シリング酸、安息香酸、プロトカテク酸、クロロゲン酸、ヴェラトリルアルコールに対して代謝活性を示し、単一炭素源として利用可能だった(Figure 2-1, Ohta *et al.* 2012, 2015)。しかし、リグニン主要結合  $\beta$ -O-4 二量体モデル(GGGE)中で培養すると  $\beta$ -etherase system を経てグアシアシルヒドロキシプロパノン(GHP)とグアヤコルが生産され、以後の代謝は進行せず菌体外に排出された。同様に広葉樹 *Quercus myrsinifolia* 由来のジオキサン抽出水溶性画分中で培養すると培地中に GHP とそのメトキシ化合物シリングルヒドロキシプロパノン(SHP)が生産された(Ohta *et al.* 2015)。MBES04 株はリグニン由来芳香族モノマーは完全に代謝し異化できるが、リグニン二量体やそれ以上の多量体に対してはフェニルプロパノンモノマーを主要な代謝産物として蓄積し、それ自体を無機化しエネルギー源として利用できなかった(Figure 2-1)。 $\beta$ -Etherase system の一連の反応は細菌にとってエネルギーを消費する反応であり、MBES04 株がこの一見無駄とも思われる代謝系を持つ意義として、エネルギー獲得以外の役割を持つと示唆された。先行研究において GGGE によって応答する遺伝子が定量 PCR 法により調べられた(Ohta *et al.* 2015)。GGGE に対して発現上昇した遺伝子として、トルエンや安息香酸など芳香族化合物の分解や脂肪酸分解のエネルギー代謝遺伝子 (*p*-cresol methylhydroxylase、3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase、acetyl-CoA acyltransferase)が見つかり、MBES04 株が GGGE と接触後に増殖を促進すると予想された。さらに、転写調節因子である PadR と CopG が弱い誘導を示した。これはフェノール酸に対するストレス応答とされる。このように MBES04 株は GGGE を感知して芳香族分解遺伝子やストレス応答遺伝子を発現しながら抵抗を示したが、培養実験で見られる  $\beta$ -etherase system やその下流の代謝遺伝子の活性化は観察されなかった(Ohta *et al.* 2015)。本株が  $\beta$ -O-4 結合化合物存在下で  $\beta$ -etherase system を駆動させる時の遺伝子レベルでの応答は未解明であり、これらの応答を明らかにすることで、MBES04 株を用いた GHP 高生産株の創出に向けた指針が得られると考えた。

本章ではバイオマス分解中から頻繁に放出される炭素源を対象に本株が持つそれらの代謝経路を KEGG から予測し、エネルギー獲得への寄与を調べる。続いて以前に行われたトランスクリプトーム解析の結果を詳細に再解読し、機能的な  $\beta$ -etherase system を備える意義を遺伝子の転写応答から予測する。

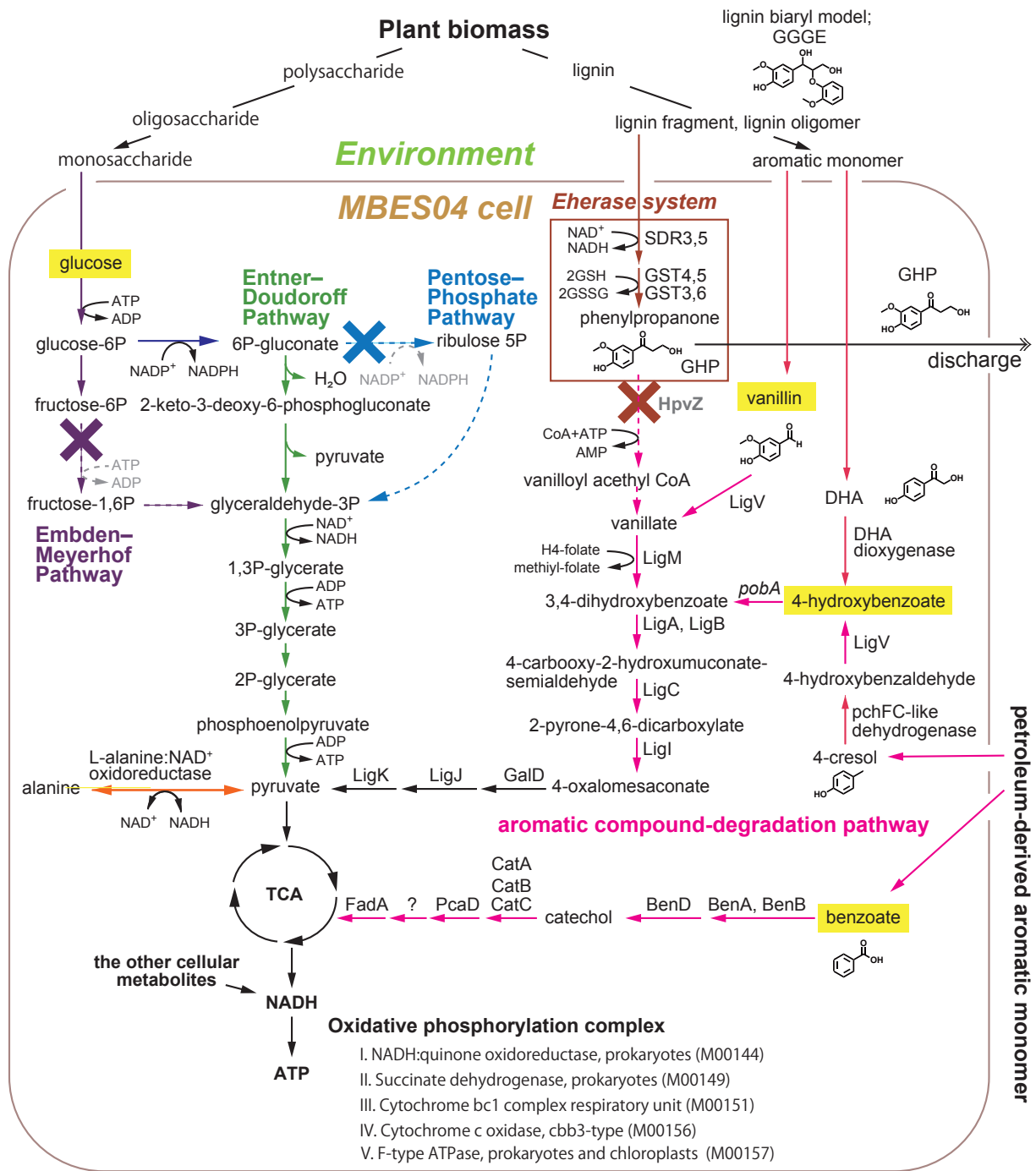


Figure 2-1. 解糖、芳香族化合物の分解およびエーテラーゼ系に関するMBES04株の代謝経路の予測。Embden-Meyerhof 経路、Entner-Doudoroff 経路、Pentose phosphate 経路をそれぞれ紫、緑、青で示す。Etherase system と芳香族化合物分解経路はそれぞれ茶とマゼンタで示した。MBES04 株が炭素源として利用する基質を黄色のボックスで強調した(Ohta *et al.* 2015)。

## 2. 実験方法

### 試薬、化合物

本試験で使用した各試薬は特記しない場合、富士フイルム和光純薬株式会社から購入した特級品である。Guaiacylglycerol- $\beta$ -guaiacyl ether (GGGE)、guaiacylhydroxylpropanone (GHP)、syringylhydroxylpropanone (SHP)、veratryl alcohol (VA) は東京化成工業株式会社から購入した。veratrylglycerol- $\beta$ -guaiacyl ether (VGGE)、 $\beta$ -guaiacyl- $\alpha$ -veratrylglycerone (GVG) は先行研究(Ohta *et al.* 2015)に従って合成した。2,4'-dihydroxyacetophenone (DHA)は MolPort 社から購入した。芳香族化合物は 100mM 濃度に dimethyl sulfoxide (DMSO) に溶かし、 $-30^{\circ}\text{C}$  で保存した。LB (Miller) 培地 (1% of tryptone, 0.5% of yeast extract, 1% of NaCl) はナカライテスク株式会社から購入した。APA-リグニンの調整は Nishimura らの記載の手順通りに調整された(Nishimura *et al.* 2022)。Eucalyptus globulus 木粉 1g をボールミル (Planetary Ball Mill P-6, Fritsch Japan 株式会社) で 3 時間粉碎し、粉碎物は  $50^{\circ}\text{C}$  の温和な条件下で酢酸と過酢酸混合物を溶媒として調製された。

### 菌株、培養条件

第 2 章で使用した供試菌とプラスミドは Table 2-1 に示した。Novosphingobium sp. MBES04 (NBRC114556) は 5 mM  $\text{MgSO}_4$  を添加した LB 培地(基礎培地)、もしくはダイゴ人工海水 SP (富士フイルム和光純薬工業株式会社) を製造元推奨添加量の 0.25 倍量を添加した LB 培地(LBASW 培地)、または 5 mM  $\text{MgSO}_4$  を添加した 0.1 倍量の LB 培地(低栄養培地)下で  $30^{\circ}\text{C}$  で好氣的に増殖させた。大腸菌 S17-1  $\lambda$ pir 株はクローニング実験に、DH5 $\alpha$  株はプラスミド複製実験に使用し、LB 培地にて  $37^{\circ}\text{C}$  で培養した。培地には必要に場合に、kanamycin; 25 mg/L、tetracycline; 10 mg/L、nalidixic acid; 30 mg/L、Ampicillin; 100 mg/L を添加した。細胞の増殖は波長 600 nm における培養液の濁度 ( $\text{OD}_{600}$ ) を測定し評価した。プラスミド DNA の調整は Roche High Pure plasmid isolation kit (Merck KGaA) を使用した。DNA フラグメントの精製は Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) を使用した。プライマーは FASMAC 社から購入し、配列は Table 2-2 に記載した。

Table 2-1. 本章で使用了した菌株とプラスミド

Strain or plasmid	Relevant genotype and main characteristics	Reference or source
<b>Strains</b>		
<i>Novosphingobium</i> sp. strain MBES04	Wild-type strain (NBRC114556)	Ohta <i>et al.</i> (2015)
MBE <i>lacZ</i>	MBES04 transformed by pQF- <i>lacZ</i> :: P <sub>ClusterG-II</sub> , <i>Tcr</i>	This study
<i>Escherichia coli</i> DH5 $\alpha$	<i>F'</i> , $\Phi$ 80 <i>dlacZ</i> $\Delta$ M15, $\Delta$ ( <i>lacZYA</i> <i>argF</i> )U169, <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> ( <i>rK</i> <sup>-</sup> , <i>mK</i> <sup>+</sup> ), <i>phoA</i> , <i>supE44</i> , $\lambda$ , <i>thi-1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i>	TOYOBO Co., LTD (Osaka, Japan)
<i>Escherichia coli</i> S17-1 $\lambda$ pir	Tp <sup>r</sup> Sm <sup>r</sup> <i>recA thi hsdRM</i> <sup>+</sup> RP42::Tc::Mu::Km Tn7 $\lambda$ pir phage lysogen	de Lorenzo <i>et al.</i> (1994)
<b>Plasmids</b>		
pQF	pCM62 with <i>cymR</i> <sup>*</sup> , PQ5, and MCS for N- and C-terminal fusions to 3 $\times$ FLAG tag; <i>Tcr</i> (Addgene plasmid #48095)	Kaczmarczyk <i>et al.</i> (2013)
pQF- <i>lacZ</i>	pQF with <i>lacZ</i> (Addgene plasmid #48094)	Kaczmarczyk <i>et al.</i> (2013)
pQF- <i>lacZ</i> :: P <sub>ClusterG-II</sub> 600bp	pQF- <i>lacZ</i> with the 600 bp PCR amplicon carrying cluster G-II promoter region	This study
pQF- <i>lacZ</i> :: P <sub>ClusterG-II</sub> 300bp	pQF- <i>lacZ</i> with the 300 bp PCR amplicon carrying cluster G-II promoter region	This study
pQF- <i>lacZ</i> :: P <sub>ClusterG-II</sub> 260bp	pQF- <i>lacZ</i> with the 260 bp PCR amplicon carrying cluster G-II promoter region	This study
pQF- <i>lacZ</i> :: P <sub>ClusterG-II</sub> 220bp	pQF- <i>lacZ</i> with the 220 bp PCR amplicon carrying cluster G-II promoter region	This study
pQF- <i>lacZ</i> :: P <sub>ClusterG-II</sub> 200bp	pQF- <i>lacZ</i> with the 200 bp PCR amplicon carrying cluster G-II promoter region	This study
pQF- <i>lacZ</i> :: P <sub>ClusterG-II</sub> 180bp	pQF- <i>lacZ</i> with the 180 bp PCR amplicon carrying cluster G-II promoter region	This study
pQF- <i>lacZ</i> :: P <sub>ClusterG-II</sub> 150bp	pQF- <i>lacZ</i> with the 150 bp PCR amplicon carrying cluster G-II promoter region	This study
pQF- <i>lacZ</i> :: P <sub>ClusterG-II</sub> 75bp	pQF- <i>lacZ</i> with the 75 bp PCR amplicon carrying cluster G-II promoter region	This study



Table 2-2. 本章で使用したプライマーの塩基配列

Primers	Sequences (5'→3')	Template DNA
PClusterG-II_Cloning_Fw_600bp	CCCATCTCGAACTCGGACG	<i>Novosphingobium</i> sp. MBES04 genome
PClusterG-II_Cloning_Rv_600bp	GGTGGTGGTCCTCTCCATC	<i>Novosphingobium</i> sp. MBES04 genome
PClusterG-II_Cloning_Fw_300bp	GGAGCAGCCCGGTAGCTCGT	<i>Novosphingobium</i> sp. MBES04 genome
PClusterG-II_Cloning_Fw_260bp	CGTAGGTTCAAATCCTACCC	<i>Novosphingobium</i> sp. MBES04 genome
PClusterG-II_Cloning_Fw_220bp	CGCCAAGCCCCCGCCGCTC	<i>Novosphingobium</i> sp. MBES04 genome
PClusterG-II_Cloning_Fw_200bp	CTGCGCCGGGGGGCTTGGCG	<i>Novosphingobium</i> sp. MBES04 genome
PClusterG-II_Cloning_Fw_180bp	TATCTGGGACACGCGTGCGC	<i>Novosphingobium</i> sp. MBES04 genome
PClusterG-II_Cloning_Fw_150bp	ATCGCGCTGCGCGCAGATCC	<i>Novosphingobium</i> sp. MBES04 genome
PClusterG-II_Cloning_Fw_75bp	CCGGACCAAGCAAGGCGTTG	<i>Novosphingobium</i> sp. MBES04 genome
Promoter infusion_Fw_600bp	CGATGGAGAGGACCACCACCATGACCATGATTACGGATTCCTG	pQF- <i>lacZ</i>
Promoter infusion_Rv_600bp	ACGTCCGAGTTCGAGATGGGCAGCAAAAAGGCCAGGAACC	pQF- <i>lacZ</i>
Promoter infusion_Rv_300bp	ACGAGCTACCGGGCTGCTCCCAGCAAAAAGGCCAGGAACC	pQF- <i>lacZ</i>
Promoter infusion_Rv_260bp	GGGTAGGATTTGAACCTACGCAGCAAAAAGGCCAGGAACC	pQF- <i>lacZ</i>
Promoter infusion_Rv_220bp	GAGCGGCGGGGGGCTTGGCGCAGCAAAAAGGCCAGGAACC	pQF- <i>lacZ</i>
Promoter infusion_Rv_200bp	CGCCAAGCCCCCGGCGCAGCAGCAAAAAGGCCAGGAACC	pQF- <i>lacZ</i>
Promoter infusion_Rv_180bp	GCGCACGCGTGTCCCAGATACAGCAAAAAGGCCAGGAACC	pQF- <i>lacZ</i>
Promoter infusion_Rv_150bp	GGATCTGCGCGCAGCGCGATCAGCAAAAAGGCCAGGAACC	pQF- <i>lacZ</i>
Promoter infusion_Rv_75bp	CAACGCCTTGCTTGGTCCGGCAGCAAAAAGGCCAGGAACC	pQF- <i>lacZ</i>

## 比較ゲノム解析

対象株の全ゲノム配列は次のアクセッション番号を使って GenBank から取得した(FR856862.1; *Novosphingobium* sp. PP1Y, CP000248.1; *N. aromaticovorans* DSM12444, AP012222.1; *Sphingobium* sp. SYK-6; AP018498.1; *Alteireythrobacter* sp. B11)。デジタル DNA-DNA ハイブリダイゼーション(dDDH)は genome-to-genome distance calculator 3.0 と組み込まれたプログラム gbdp2\_blastplus (<https://ggdc.dsmz.de/ggdc.php#>) を使用して計算した。平均ヌクレオチド同一性(ANI)の改良版 OrthoANI 値は、Lee らによる計算ツール (version 0.93.1) を使用して計算した(Lee *et al.* 2016)。

## MBES04 株の増殖評価と生産物の分析

MBES04 株を基礎培地で一晚培養した。培養液を基礎培地へ継代し、3 時間培養した。集菌後、低栄養培地へ懸濁して培地を置換した。細胞懸濁液を、GGGE (2.5 mM)、バニリン (2.5 mM)、APA-リグニン (0.1%)をそれぞれ添加した低栄養培地へ、OD<sub>600</sub> が 0.1 まで接種した。DMSO (5.0%) も同様に添加し、コントロールとして使用した。培養は 30 °C で 24 時間好氣的に振とう培養した。0 時間と 24 時間の培養サンプルは直ちに 5 mM MgSO<sub>4</sub> を含む 1% NaCl で連続希釈し、50 µg/mL ストレプトマイシンを含む基礎寒天培地へ 50 µL 植菌した。30 °C で 48 時間培養後、mL 単位あたりのコロニー数を数え、コロニー形成単位 (CFU/mL) と定義した。0 時間培養と 24 時間培養の間の生存細胞数の差は、CFU<sub>24</sub> 時間から CFU<sub>0</sub> 時間を引くことで CFU 増加として表した。MBES04 株を基礎培地で一晚培養した。前培養液を基礎培地に継代し、3 時間培養した。GGGE(2.5 mM)、バニリン(2.5 mM)、APA-リグニン(0.1%)を含む基礎培地に、回収した培養液を接種した。30 °C で 24 時間培養し、2 時間ごとにサンプルを採取した。採取したサンプルにフェルラ酸エチルをその後の分析の内部標準物質として最終濃度 0.1 mM で添加した。抽出工程は 3 倍量の酢酸エチルで 3 回繰り返した。有機層を回収し N<sub>2</sub> 下で風乾させ、0.1% のギ酸を含む 20% アセトニトリルに溶解して LC-MS 分析した。LC-MS 分析の条件は、大田らの条件(Ohta *et al.* 2017)に従った。

## β-ガラクトシダーゼ遺伝子をレポーターとするプラスミドの作製

β-ガラクトシダーゼ遺伝子をレポーターとするプロモーター活性評価プラスミドは、pQF-*lacZ* を親プラスミドとして構築された(Table 2-1、Kaczmarczyk *et al.* 2013)。pQF-*lacZ* の *lacZ* 発現制御領域をクラスター G-II の推定プロモーター領域(P<sub>ClusterG-II</sub>)に置換した。MBES04 株ゲノムの MBENS4\_1161 遺伝子の開始コドンから上流領域の 600bp、300bp、260bp、220bp、200bp、180bp、150bp、75bp を、MBES04 株ゲノムから Table 2-2 に示すプライマーセットで PCR でクローニングした。増幅したフラグメントと PCR で線状化した pQF-*lacZ* を用いて infusion cloning reaction (タカラバイオ) した。得られたプラスミド (pQF-*lacZ*:: P<sub>ClusterG-II600bp</sub>) のマップを Figure 2-2 に示す。プロモーター領域長をプラスミド名の末尾に付記した。

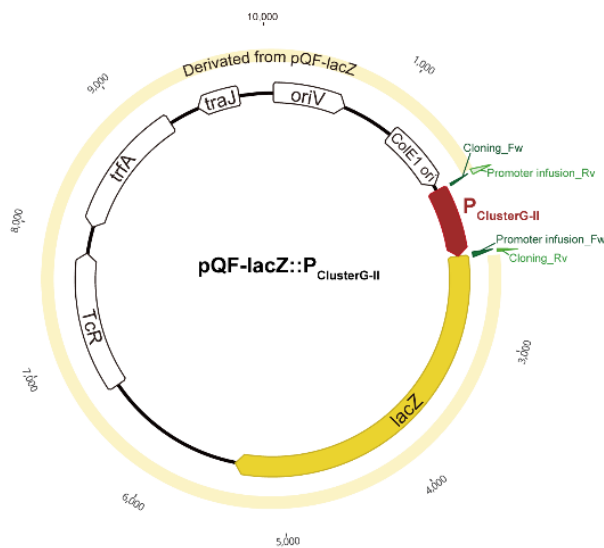


Figure 2-2. プロモーターアッセイ用プラスミドのマップ

pQF-lacZ::P<sub>ClusterG-II</sub> の特徴: *oriV*; *incP* 複製起点, ColE1 *ori*; 高コピー数 ColE1/pMB1/pBR322/pUC複製起点, P<sub>ClusterG-II</sub>; クラスター-G-IIおよびL-IIIの推定プロモーター領域, *lacZ*; β-ガラクトシダーゼ遺伝子, TcR; テトラサイクリン排出タンパク質遺伝子(*tetA*), *trfA*; トランス作用性複製タンパク質 (*oriV*アクチベーター) 遺伝子, *traJ*; *oriT*認識タンパク質遺伝子

### β-ガラクトシダーゼ活性測定

プロモーター領域長の異なる 8 つのプラスミド pQF-lacZ::P<sub>ClusterG-II</sub> を大腸菌 S17-1 λpir へ導入した。形質転換体と MBES04 株を共培養し、プラスミドは接合伝達法により MBES04 株に導入された。得られたプロモーターアッセイ株 (MBE*lacZ* 株) は 30 °C で 16 時間、基礎培地で培養した。集菌後基礎培地で洗浄し、1 mM のリグニン関連低分子化合物 (DHA, 2,4'-dihydroxyacetophenone; DMP, dimethoxyphenol; GGGE, guaiacylglycerol-β-guaiacyl ether; GHP, guaiacylhydroxypropanone; GVG, β-guaiacyl-α-veratrylglycerone; MPHPV, (2-methoxyphenoxy) hydroxypropiovanillone; VA, veratryl alcohol; VGGE, veratrylglycerol-β-guaiacyl ether, Vanillin, guaiacol) を含む基礎培地へ培養液全体の 10 分の 1 量を植菌し、さらに 30 °C で 16 時間培養した。リグニン関連低分子化合物と等量の DMSO を添加したものを陰性対象とした。16 時間後の培養液を β-ガラクトシダーゼ活性測定に供した。活性測定は、Miller らの手法 (Miller 1972) を修正した Zhang らの方法 (Zhang *et al.* 1995) に従った。経時変化実験では、培養液を 2 時間ごとに 22 時間サンプルを回収し、回収直後に培養液の濁度と β-ガラクトシダーゼ活性を測定した。培養液の濁度は波長 600 nm における吸光度 (Abs600 nm)、培養液と β-ガラクトシダーゼ基質 *o*-nitrophenyl-β-galactoside との反応液は波長 420 nm における吸光度 (Abs420nm) で測定した。β-ガラクトシダーゼ活性は  $1000 \times \text{Abs}_{420 \text{ nm}} / (\text{Abs}_{600 \text{ nm}} \times \text{反応時間} \times \text{反応容量})$  の計算式により導入し Miller units と表した。

### 3. 結果と考察

#### エネルギー獲得に重要な遺伝子セット

MBES04株の基礎的なエネルギー獲得代謝系を理解するために、KEGG pathway databaseに従って主要炭素源であるグルコース代謝に関与する酵素の存在を確認した。MBES04株は解糖経路のうち6-phosphofructokinase [EC: 2.7.1.11] を欠きEmbden-Meyerhof経路(EMP)に欠陥が見つかった。また、Pentose phosphate 経路(PPP)の6-phosphogluconate dehydrogenase [EC: 1.1.1.44, EC: 1.1.1.343] を欠損していた(Figure 2-3)。一方でEntner-Doudoroff経路(EDP)は完全に保有し、EDPがMBES04株のグルコース代謝において主要な役割を果たすと示唆された。さらに酸化的リン酸化に必要な5つの複合体をコードも完全に備えていた。したがって、MBES04株は酸化的リン酸化をエネルギー獲得の重要な経路とすると考えられた。MBES04株はバニリンや4-ヒドロキシ安息香酸などのC1側鎖を持つリグニン由来芳香族モノマーの完全な異化を可能にする遺伝子セットを備えており、これは本株がこれらを単一炭素源として利用でき細胞増殖する結果を裏付ける(Figure 2-1、Figure 2-3、Ohta *et al.* 2015)。しかし安息香酸代謝の一部に欠損があり3-oxoadipate CoA-transferase をコードするPcaIJを代替する遺伝子の存在が示唆された。中心炭素代謝に部分的欠損があるが、芳香族モノマー分解の完全な遺伝子レパートリーやそれら遺伝子が実働することを考慮すると、エネルギー獲得の観点で代謝系を補完しMBES04株の巧みなエネルギー獲得戦略がうかがえる。

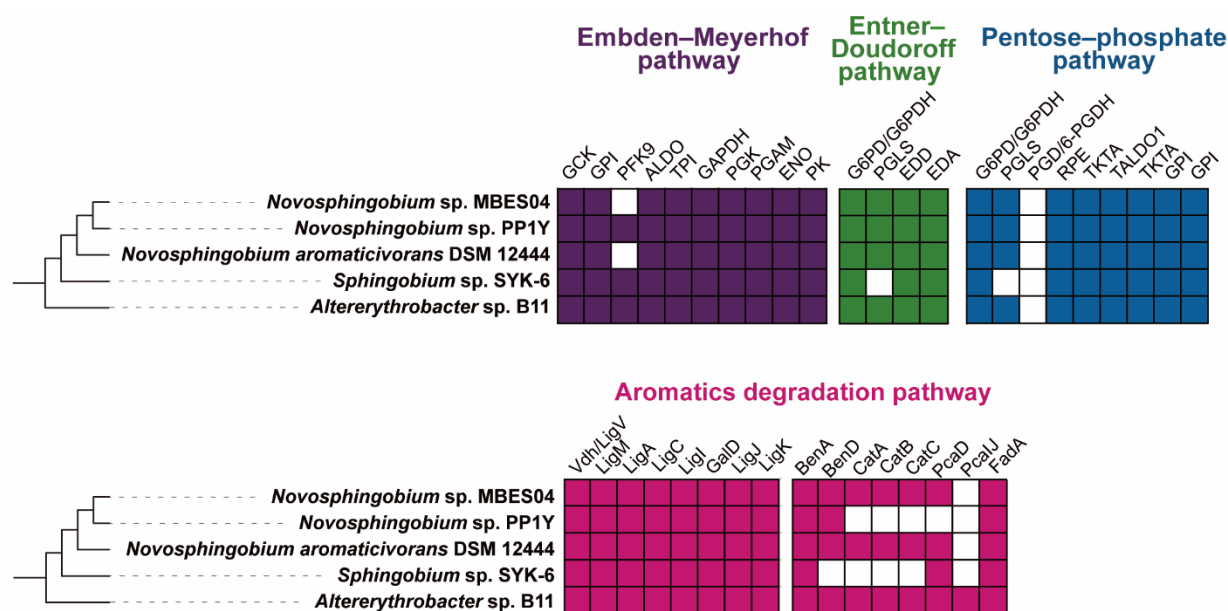


Figure 2-3. MBES04株とetherase systemを持つ近縁株とのゲノム比較

菌株の系統樹は neighbor-joining 法により構築した。タイル図は解糖系(Embden-Meyerhof 経路[紫]、Entner-Doudoroff 経路[緑]、Pentose phosphate 経路[青])と、バニリン(左図)と安息香酸/カテコール(右図)の芳香族分解経路[マゼンタ]の遺伝子の有無を示している。アノテーションは主に Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes のオルソロググループへの遺伝子の分類に基づいて行われた。バニリン脱水素酵素は、BLASTP 検索で LigV オルソログ(同一性 70%以上)が見つかった場合が存在するとみなした。参照した酵素の略号を Table 2-3 に示す。

Table 2-3. KEGG 代謝経路に基づく各酵素の略号とその機能、割り当てられた EC 番号

Enzyme abbr.	Functional description	EC number
<b>Embden–Meyerhof pathway</b>		
GCK	glucokinase	2.7.1.2
GPI	glucose-6-phosphate isomerase	5.3.1.9
PFK9	6-phosphofructokinase	2.7.1.11
ALDO	fructose-bisphosphate aldolase	4.1.2.13
TPI	triosephosphate isomerase	5.3.1.1
GAPDH	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	1.2.1.12
PGK	phosphoglycerate kinase	2.7.2.3
PGAM	2,3-bisphosphoglycerate-dependent phosphoglycerate mutase	5.4.2.11
ENO	enolase	4.2.1.11
PK	pyruvate kinase	2.7.1.40
<b>Entner–Doudoroff pathway</b>		
G6PD	glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	1.1.1.49
G6PDH	glucose-6-phosphate dehydrogenase	1.1.1.363
PGLS	6-phosphogluconolactonase	3.1.1.31
EDD	phosphogluconate dehydratase	4.2.1.12
EDA	2-dehydro-3-deoxyphosphogluconate aldolase	4.1.2.14
<b>Pentose–phosphate pathway</b>		
G6PD	glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	1.1.1.49
G6PDH	glucose-6-phosphate dehydrogenase	1.1.1.363
PGLS	6-phosphogluconolactonase	3.1.1.31
PGD	6-phosphogluconate dehydrogenase	1.1.1.44
6-PGDH	phosphogluconate dehydrogenase	1.1.1.343
RPE	ribose 5-phosphate isomerase A	5.1.3.1
TKTA	transketolase	2.2.1.1
TALDO1	transaldolase	2.2.1.2
TKTA	transketolase	2.2.1.1
GPI	glucose-6-phosphate isomerase	5.3.1.9
GPI	glucose-6-phosphate isomerase	5.3.1.9
<b>Aromatics degradation pathway</b>		
Vdh, LigV	vanillin dehydrogenase	1.2.1.67
LigM	vanillate/3-O-methylgallate O-demethylase	2.1.1.341
LigA	protocatechuate 4,5-dioxygenase, alpha chain	1.13.11.8
LigC	2-hydroxy-4-carboxymuconate semialdehyde hemiacetal dehydrogenase	1.1.1.312
LigI	2-hydroxy-4-carboxymuconate semialdehyde hemiacetal dehydrogenase	3.1.1.57
GalD	4-oxalomesaconate tautomerase	5.3.2.8
LigJ	4-oxalomesaconate hydratase	4.2.1.83
LigK	4-hydroxy-4-methyl-2-oxoglutarate aldolase	4.1.3.17
BenA	benzoate/toluate 1,2-dioxygenase subunit alpha	1.14.12.10
BenD	dihydroxycyclohexadiene carboxylate dehydrogenase	1.3.1.25
CatA	catechol 1,2-dioxygenase	1.13.11.1
CatB	muconate cycloisomerase	5.5.1.1
CatC	muconolactone D-isomerase	5.3.3.4
PcaD	3-oxoadipate enol-lactonase	3.1.1.24
PcaIJ	3-oxoadipate CoA-transferase	2.8.3.6
FadA	acetyl-CoA acyltransferase	2.3.1.16

エネルギー獲得経路を機能的な  $\beta$ -etherase system を持つ他菌株と比較するために *Novosphingobium* sp. PP1Y、*N. aromaticovorans* DSM12444、*Sphingobium* sp. SYK-6、*Altereythrobacter* sp. B11 について調査した。5 株間の全ゲノム配列類似性は、デジタル DNA-DNA ハイブリダイゼーション (dDDH)(Meier-Kolthoff *et al.* 2013)、および平均ヌクレオチド同一性(ANI)の改良版 OrthoANI(Lee *et al.* 2016; Yoon *et al.* 2017)分析により推定した。MBES04 株の dDDH 値と OrthoANI 値は、4 株に対してそれぞれ 13.4~18.9、70.3~76.6%の範囲だった (Table 2-4)。菌株間のゲノム類似性が種の境界とされるカットオフ値以下であり (dDDH 値 > 70%、OrthoANI 値 > 95%)、ゲノム近縁性は低いことが示された。5 菌株全てにおいて解糖系に関する 3 つの経路のうち少なくとも 1 つを欠損していた (Figure 2-3)。PP1Y 株、SYK-6 株、B11 株は PPP 経路において MBES04 株と同じ欠損があった。同様に DSM12444 株は EMP 経路に同じ欠損があった。SYK-6 株は多くの糖と有機酸で十分に培養できなかった (Masai *et al.* 2007; Kamimura *et al.* 2017)。これはリン酸化酵素系に関与する遺伝子の欠如により、糖の輸送とリン酸化が不十分であることが原因であった (Varman *et al.* 2016)。我々の以前の実験による知見では B11 株はグルコースを炭素源として十分な増殖を示し細胞密度を高めた。B11 株は EMP、EDP 経路の遺伝子セットを完全に備えており、グルコース利用は効率的であった。

Table 2-4. *Novosphingobium* sp. MBES04 を基準としたデジタル DNA-DNA ハイブリダイゼーション (dDDH) および平均ヌクレオチド同一性 (OrthoANI) の値

Strain	<i>Novosphingobium</i> sp. PP1Y	<i>Novosphingobium aromaticovorans</i> DSM12444	<i>Sphingobium</i> sp. SYK-6	<i>Altereythrobacter</i> sp. B11
OrthoANI (%)	76.5	73.3	70.3	72.1
dDDH (%)	18.9	14.9	13.4	13.7

#### GGGE、バニリン、APA-リグニンからの主要な生産物解析

トランスクリプトームに供した MBES04 株が代謝的に活性であったことを証明するために、低栄養培地 (5 mM MgSO<sub>4</sub> を添加した 0.1 倍量の LB 培地) に GGGE、バニリン、APA-リグニンを添加し MBES04 株の増殖を確認した。基質に選択した APA-リグニンは培地に添加した際に溶媒比率の減少により不溶物が沈殿してしまうため、液体培養液では正しく菌体増殖を評価できなかった。そのため細胞増殖の評価は 24 時間の液体培養後、培養液を寒天培地に定量的に塗布しさらに 2 日間培養させコロニーを発生させた。24 時間後に発生したコロニー数から 0 時間のコロニー数の差分をコロニー形成単位 (CFU) として評価した。非添加対象とした DMSO と比較して、GGGE、vanillin、APA-リグニンの添加は増殖に影響を与えず、0.1 倍量の LB 培地成分を含む条件で 24 時間後に 10<sup>8</sup> オーダー程度のコロニーを形成した (Table 2-5)。



Table 2-5. 栄養制限下におけるGGGE、バニリン及びAPA-リグニン添加によるMBES04株の増殖

	concentration	colony forming unit (CFU/mL)
GGGE	2.5 mM	$2.6 \pm 0.4 \times 10^8$
vanillin	2.5 mM	$1.4 \pm 0.2 \times 10^8$
APA-lignin	0.1%	$2.0 \pm 0.2 \times 10^8$
DMSO	5.0%	$2.4 \pm 0.1 \times 10^8$

以降に示すトランスクリプトーム解析に用いた MBES04 株は GGGE、バニリン、APA-リグニン接触から 4 時間後の細胞を使用した。RNA 調整時に MBES04 株が生存し代謝活動をしていたことを証明するために基礎培地(5 mM MgSO<sub>4</sub> を添加した LB 培地)で培養し、代謝物を LC-MS を使用して分析した。GGGE からの GHP 生産は培養開始から 4 時間後に GHP が検出可能なレベルに達し、24 時間以内に完了した (Figure 2-4A)。バニリンは培養開始から 2 時間以内に完全に分解され、高い代謝能力を示した(Figure 2-4B)。APA-リグニンは接触から 4 時間後に GHP および SHP が検出可能なレベルで生産された(Figure 2-4C)。これらの生成物が APA-リグニン分解中に etherase system によって生成される化合物であることを確認するために、大田らの以前の報告に記載された方法に従って、APA-リグニンの酵素反応物を分析した(Ohta *et al.* 2017)。Etherase system の酵素群によって生成された主な反応生成物は GHP と SHP であり、MBES04 株から得られたピークと保持時間、m/z が一致した(Figure 2-5)。この結果から培養細胞は APA-リグニンに含まれる GGGE や低分子の  $\beta$ -O-4 結合含有化合物に対して etherase system を機能させ、生産物の GHP と SHP は APA-リグニンからの微生物変換による主要な生産物だった。APA-リグニン培養液の 0 時間後(コントロール)と 24 時間後のそれぞれのサンプル群における代謝物の多変量解析から GHP、SHP が 2 群の代謝産物の特徴付ける最も重要な化合物であると示唆された(Figure 2-6)。

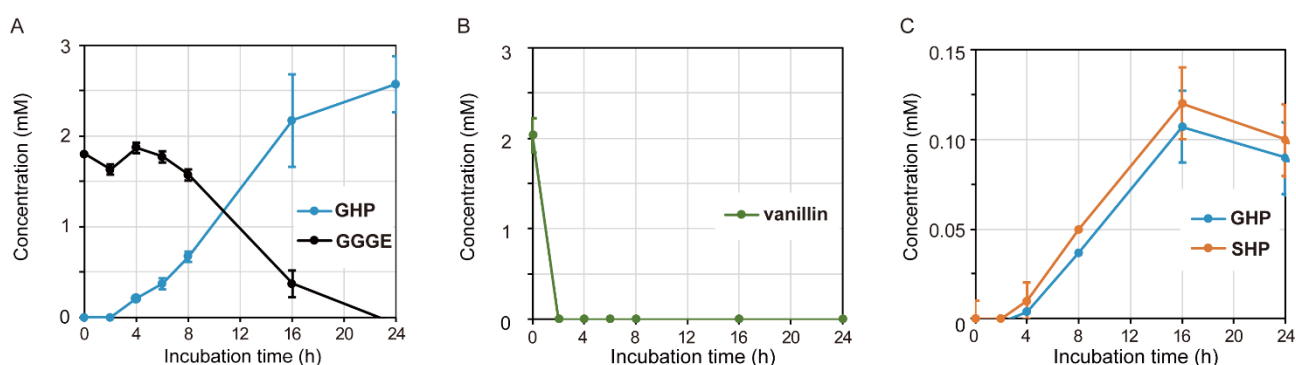


Figure 2-4. MBES04によるGGGE、バニリンおよびAPA-リグニンの時間経過ごとの代謝反応—晩培養したMBES04株を回収し、2.5 mM GGGE(A)、2.5 mM バニリン(B)、0.1% APA-リグニン(C)を添加した基礎培地中で、30 °Cで24時間インキュベートした。

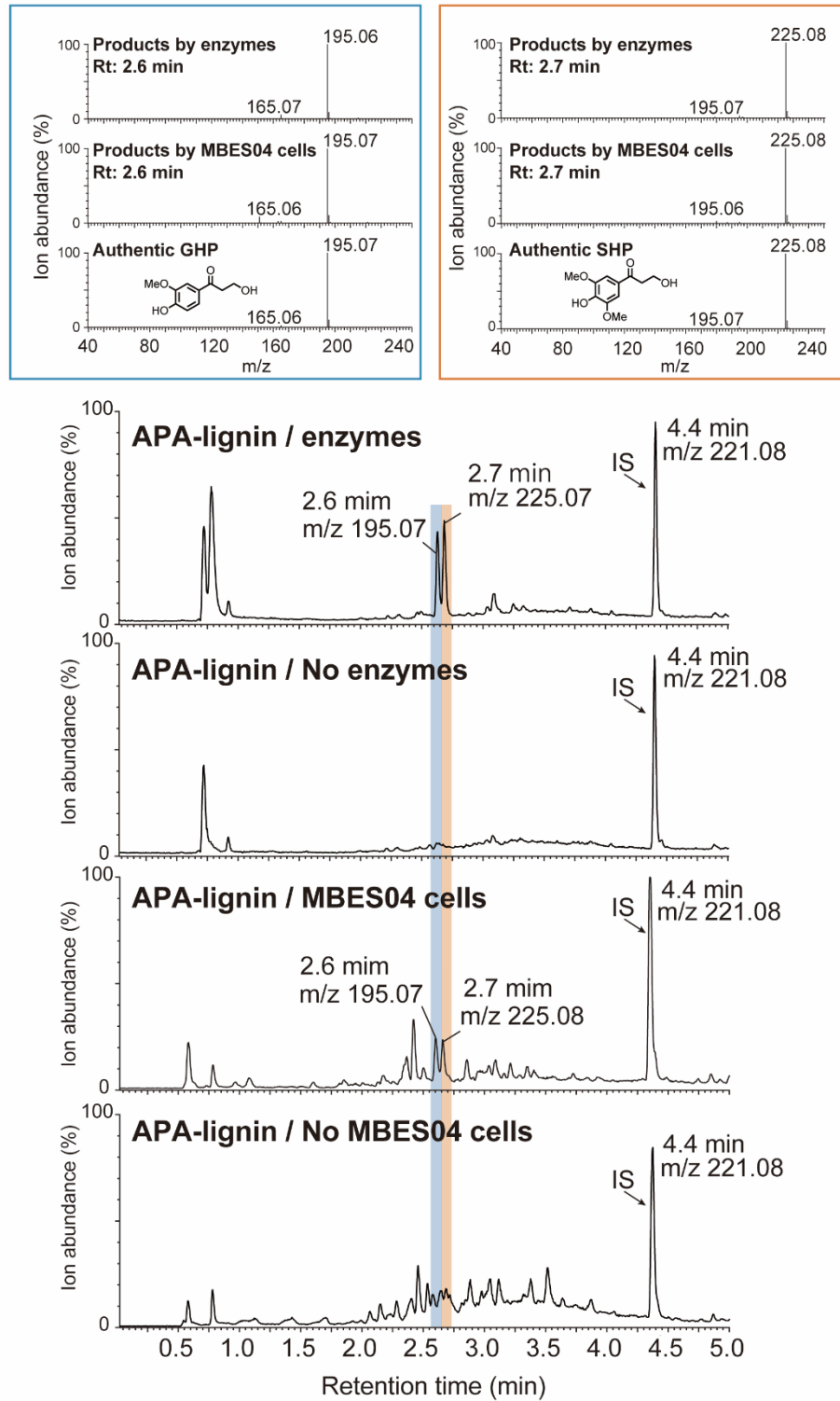


Figure 2-5. APA-リグニンと MBES04 株による反応物と酵素反応物のトータルイオンクロマトグラム及び生成物 GHP、SHP のマススペクトル

5 つの酵素 (SDR3、SDR5、および GST3-5) と 0.2% APA-リグニンを、20 mM 還元グルタチオンおよび 10 mM NAD<sup>+</sup>存在下で、pH 8.5、15 °C で 24 時間インキュベートした。MBES04 株を 0.1% APA-リグニンを含む基礎培地中で 30 °C で 24 時間インキュベートした。サンプルは酢酸エチルで抽出され、液体クロマトグラフィー質量分析 (LC-MS) で分析した。IS は内部標準、水色の標識は GHP、オレンジは SHP を表す。



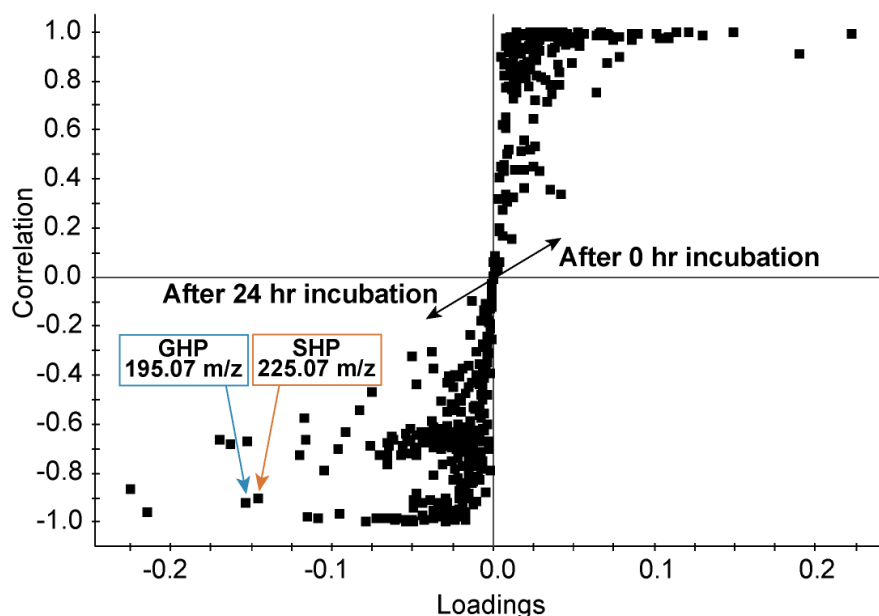


Figure 2-6. MBES04 株による APA-リグニンの代謝物

MBES04 株を 0.1% APA-リグニンを含む基礎培地中で 30 °C で 24 時間インキュベートした。サンプルは酢酸エチルで抽出した後に液体クロマトグラフィー質量分析 (LC-MS) に供した。LC-MS で取得した生データはデータ処理のために Progenesis QI (version 3.0、waters 社)に取り込み、m/z、保持時間および強度に基づいて自動的にピークピッキングを行った。サンプルは培養 0 時間後と培養 24 時間後の 2 群に分類し、ANOVA 計算にてグループ間の差異を検定し、統計的有意性のレベルを 95% (p 値<0.05) に設定した。統計分析は多変量統計分析ソフト EZinfo (version 3.03、Umetrics データベース) を使用して実行された。2 群を最も差別化する代謝物は X 軸(Loadings)の絶対値が大きく、Y 軸(Correlation)が 1 または -1 に近い位置にプロットされる。

#### GGGE、バニリン、APA-リグニンに対する転写応答

GGGE、バニリン、APA-リグニンを基質としてトランスクリプトーム解析が行われた。今回再解析した元データは以前に大田らによって取得された。GGGE は  $\beta$ -etherase system によって開裂を受ける最小のリグニンモデル化合物として選ばれた。バニリンは非生物学的な処理により木材から発生する主要な芳香族モノマーであり、リグニンの微生物変換アプローチにおいて biological funneling の重要な中間体代謝物である。 $\beta$ -Etherase system の基質ではないことから、リグニン由来の芳香族モノマーが遺伝子発現に与える影響を確認するために採用された。APA-リグニンは木材から酢酸と過酢酸混合物を溶媒に用いて抽出した高分子リグニン画分である(Nishimura *et al.* 2022)。温和な条件で脱リグニンを起こすため、主要な分子内結合  $\beta$ -O-4 結合が保存され、抽出物には植物由来の多糖類やリグニン由来の低分子芳香族化合物も含まれる。サンプルは GGGE(G)、バニリン(V)、APA-リグニン(L)、DMSO(D; 非添加対象)添加後、4 時間経過した細胞から RNA を単離・精製し、cDNA を作成された。得られた cDNA は次世代シーケンサーによって mRNA 配列を決定し、

MBES04 株ゲノムにコードされた遺伝子にマッピングされた。遺伝子発現量は遺伝子の長さより総リード数で正規化された RPKM(reads per kilobase of gene per million mapped sequence reads)単位で表された(大田ら、第 63 回リグニン討論会要旨集, 2018)。

GGGE 存在下ではコントロールと比較して 82 個の遺伝子の発現レベルが 2 倍以上に増加し、21 個の遺伝子で 1/2 倍未満減少した(Figure 2-7、Table 2-6)。最も発現量が増加したものは locus tag; MBESNS4\_1161 で 44.58 倍変化した。興味深いことに、これに続いてゲノム上で隣接する locus tag; MBESNS4\_1160~MBENS4\_1158 がそれぞれ 16.46、7.84、2.87 倍顕著に誘導した。これら遺伝子はクラスター G-II とされた。最も高度に誘導された遺伝子 (MBENS4\_1161) は、2,4-dihydroxyacetophenone dioxygenase と割り当てられ、2,4-dihydroxyacetophenone (DHA)から 4-ヒドロキシ安息香酸を生成すると推定された。本株は DHA を唯一の炭素源として利用できないが、4-ヒドロキシ安息香酸へと変換されると下流代謝へと流せることからエネルギー獲得の応答を示すと示唆された。他の 3 つの遺伝子の産物は推定タンパク質で、遺伝子の機能を理解するには、タンパク質レベルのさらなる研究が必要である。locus tag; MBESNS4\_0134 は 9.87 倍の強い発現誘導し、隣接遺伝子(MBESNS4\_0132~0136)も連動して発現した(クラスター G-I)。このクラスターは *p-cresol methylhydroxylase* (*pchF*、*pchC*)と推定タンパク質遺伝子で構成された。この酵素は 4-cresol や 2,4-xyleneol に含まれる芳香環側鎖のメチル基をヒドロキシ基に酸化することで、メトキシ化芳香族化合物の分解に重要な役割を果たす(Cunane *et al.* 2000; Chen *et al.* 2014)。ヒドロキシ化によって 4-cresol から 4-hydroxybenzoic acid が生成し、芳香族分解経路を介してさらなるエネルギー獲得が可能になる (Figure 2-1)。

バニリンの添加は 19 個の遺伝子で発現レベルが有意に増加し 64 個の遺伝子で減少した。全体的な遺伝子発現が抑制され、2.5 mM 濃度のバニリンに対する毒性が示された。抑制された遺伝子のうち locus tag; MBENS4\_1124 ~ MBENS4\_1133 のクラスター V-II が最も顕著で、0.11~0.28 倍に発現が低下した(Figure 2-7、Table 2-6)。これらは酸化リン酸化複合体のシトクロム c サブユニット (*ccoP*、*ccoQ*、*ccoO*、*ccoN*) から構成された。さらに 30S および 50S リボソームタンパク質遺伝子(MBENS4\_4412 ~ MBES04\_4421: クラスター V-III)の発現レベルが 0.32 倍~0.40 倍抑制された。バニリン異化に関連する芳香族開環ジオキシゲナーゼである 3 つの *ligAB* 遺伝子ホモログのうち 2 つの遺伝子の発現が有意に抑制された (locus tag; MBENS4\_1991 および MBENS4\_1992 に対して 0.12 倍、0.13 倍、MBENS4\_2242 および MBENS4\_2243 に対してそれぞれ 0.41 倍と 0.49 倍)。タンデムに位置する *ligC* (locus tag; MBENS4\_1953)、および他の *ligAB* 遺伝子 (locus tag; MBENS4\_1954 と MBENS4\_1955)の発現レベルに有意な変化は見られなかった。本株のエネルギー産生に重要な役割を果たす酸化リン酸化複合体遺伝子の強い抑制によって、毒性濃度のバニリンに反応してリボソームタンパク質の産生が減少し、全体的なエネルギー産生が抑制されたと示唆された。さらにバニリン異化に関連する遺伝子も抑制されており、バニリンの迅速で完全な代謝能を考慮すると、RNA 調製時までには MBES04 株はバニリンの異化と解毒を完了させ、エネルギー消費を節約した休眠状態にあったことを示している。

APA-リグニンの添加による遺伝子全体の挙動は GGGE とバニリンの存在下で有意に変動した遺伝子の組合せで説明できる。全体の内 59 個の遺伝子で発現レベルが有意に増加し、同様に 59 個の遺伝子で減少を確認した。特筆すべき遺伝子は GGGE で高発現誘導したクラスター G-II と同じ遺伝子セットで驚異的な発現 (7.59 ~ 88.55 倍) を示した。一方、バニリンで顕著に抑制されたクラスター V-II と同じ遺伝子セットで重度の抑制 (0.03 ~ 0.21 倍) が観察された。APA-リグニンと GGGE

接触時に共通して薬剤排出ポンプをコードする遺伝子が発現した。locus tag; MBENS4\_2629 ~ MBENS4\_2632 は転写制御因子である TetR と RND ファミリートランスポーターをコードする。RND ファミリートランスポーターは、*Rizobium* ( $\alpha$ -proteobacteria), *Ralstonia* ( $\beta$ -proteobacteria) *Pseudomonas* ( $\gamma$ -proteobacteria) および他の属の細菌株において、重金属、疎水性化合物、両親媒性物質、根粒形成因子などのさまざまな化合物の排出に関与する (Nies 2003; Zgurskaya *et al.* 2021)。転写調節因子の TetR ファミリーをコードする遺伝子はグラム陰性菌に広く分布する。以前に多剤耐性遺伝子における TetR ファミリー転写因子の役割が *Salmonella* 菌や他の病原性細菌において実証されている (Colclough *et al.* 2019)。しかし、MBES04 株の TetR 様調節因子の機能をより理解するにはさらなる研究が必要である。

Etherase system に関与する遺伝子は GGGE で 1.27~1.75 倍、バニリンで 0.79~1.09 倍、APA リグニンで 0.71~1.58 倍だった。RNA 採取時は培養実験で etherase system 産物 GHP、SHP が検出され始めたタイミングであり、その後培養を続けると生産量は増加した (Figure 2-4A, Figure 2-4C)。Etherase system 遺伝子の低い発現応答は GHP と SHP の生産に伴ってその後増加した可能性もある。また、低い転写応答だが本株が GHP と SHP を生産する役割においてに十分な発現量だった可能性も考えられる。APA-リグニンと GGGE から共通して高発現遺伝子クラスター (クラスター G-II) が見つかった。培養実験から GHP および SHP は APA-リグニンと GGGE から生産される共通の主要代謝物だった。この結果は、GHP がクラスター G-II を誘導するエフェクター化合物である可能性を示唆する。Etherase system は MBES04 株がリグニン断片に遭遇した際に典型的な表現型の特徴を与えている。

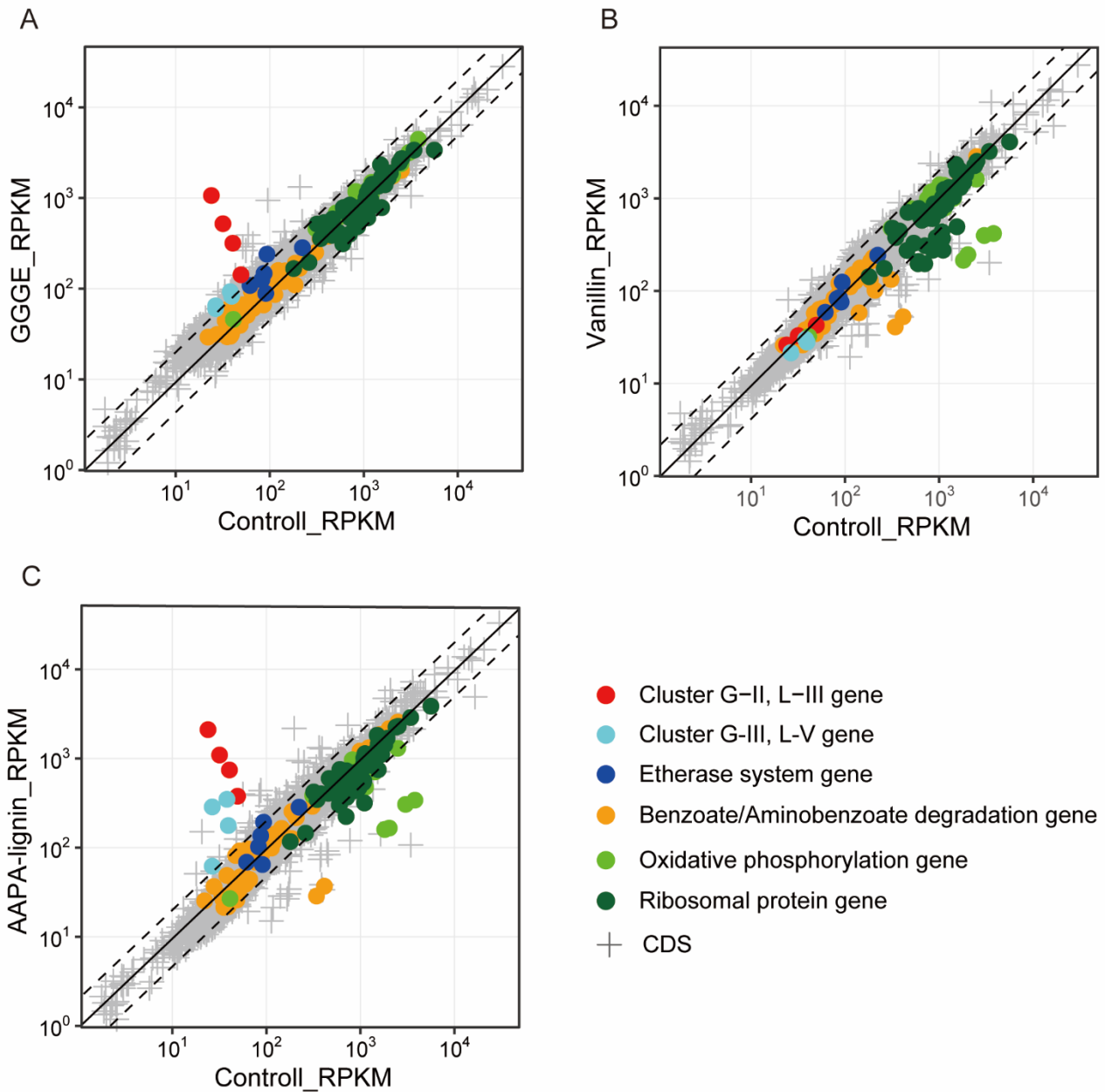


Figure 2-7. GGGE、バニリンおよび APA-リグニン存在下でのゲノム発現の比較

コントロールに対する GGGE(A)、バニリン(B)、APA-リグニン(C)処理の発現量を示す。遺伝子発現量は遺伝子の長さとして正規化された RPKM(reads per kilobase of gene per million mapped sequence reads)単位で表された。赤色、水色、青色は、それぞれクラスターG-II、L-III、G-III/L-V の遺伝子、および以前に同定された etherase system の遺伝子の発現値を示す。オレンジ、薄緑、濃緑はそれぞれ、安息香酸/アミノ安息香酸分解、酸化リン酸化、リボソームタンパク質の代謝経路に関与する遺伝子の発現値を示す。灰色の「+」記号は MBES04 株のその他の遺伝子(CDS; coding sequence)の発現値 (RPKM $\geq$ 1)を示す。有意な発現増加(2倍)と減少(0.5倍)を示した遺伝子は点線の上下に描かれている。

Table 2-6. GGGE、バニリン、APA-リグニン存在下で発現する遺伝子クラスター

Cluster	Gene rocus	Substrate dependency	FC_GGGE	FC_vanillin	FC_APA-Lignin	BLAST hit_Description
G-I	MBESNS4_0132	GGGE(+)	2.19	0.79	0.67	TetR family transcriptional regulator
	MBESNS4_0133	GGGE(+)	3.05	0.87	0.72	hypothetical protein
	MBESNS4_0134	GGGE(+), APA-lignin(+)	9.87	1.03	2.08	hypothetical protein
	MBESNS4_0135	GGGE(+)	4.75	0.91	1.17	FAD-binding oxidoreductase, p-cresol methylhydroxylase subunit
	MBESNS4_0136	GGGE(+)	2.97	0.90	0.79	hypothetical protein, p-cresol methylhydroxylase subunit
L-II, V-II	MBESNS4_1124	APA-lignin(-), vanillin(-)	0.69	0.14	0.10	histidine kinase
	MBESNS4_1125	APA-lignin(-), vanillin(-)	0.88	0.13	0.08	oxygen-independent coproporphyrinogen III oxidase
	MBESNS4_1126	APA-lignin(-), vanillin(-)	1.19	0.28	0.18	cbb3-type cytochrome oxidase assembly protein CcoS, cytochrome oxidase maturation protein Cbb3
	MBESNS4_1127	APA-lignin(-), vanillin(-)	1.11	0.24	0.20	heavy metal translocating P-type ATPase
	MBESNS4_1128	APA-lignin(-), vanillin(-)	1.27	0.23	0.21	cytochrome c oxidase cbb3-type accessory protein CcoH
	MBESNS4_1129	APA-lignin(-), vanillin(-)	1.24	0.17	0.15	cytochrome c oxidase accessory protein CcoG, 4Fe-4S ferredoxin
	MBESNS4_1130	APA-lignin(-), vanillin(-)	1.05	0.13	0.10	cytochrome c oxidase, cbb3-type subunit III, cb-type cytochrome c oxidase subunit III
	MBESNS4_1131	APA-lignin(-), vanillin(-)	1.17	0.11	0.09	CcoQ/FixQ family Cbb3-type cytochrome c oxidase assembly chaperone, cb-type cytochrome c oxidase subunit IV
	MBESNS4_1132	APA-lignin(-), vanillin(-)	0.89	0.12	0.08	cytochrome c oxidase, cbb3-type subunit II
	MBESNS4_1133	APA-lignin(-), vanillin(-)	1.01	0.12	0.09	cytochrome c oxidase, cbb3-type subunit I, cb-type cytochrome c oxidase subunit I
MBESNS4_1134	APA-lignin(-), vanillin(-)	0.96	0.06	0.03	OmpW family protein	
G-II, L-III	MBESNS4_1158	APA-lignin(+), GGGE(+)	2.87	0.86	7.59	molecular chaperone GroES
	MBESNS4_1159	APA-lignin(+), GGGE(+)	7.84	0.79	18.37	NAD(P)-dependent oxidoreductase, short-chain dehydrogenase/reductase SDR
	MBESNS4_1160	APA-lignin(+), GGGE(+)	16.46	1.04	34.58	hypothetical protein, tRNA modification GTPase
	MBESNS4_1161	APA-lignin(+), GGGE(+)	44.58	1.09	88.55	2,4'-dihydroxyacetophenone dioxygenase

G-III, L-V	MBESNS4_2629	APA-lignin(+), GGGE(+)	2.45	0.79	9.19	TetR family transcriptional regulator
	MBESNS4_2630	APA-lignin(+), GGGE(+)	2.43	0.80	10.77	RND transporter
	MBESNS4_2631	APA-lignin(+), GGGE(+)	2.10	0.71	4.51	hemolysin D, RND family multidrug resistance secretion protein
	MBESNS4_2632	APA-lignin(+), GGGE(+)	2.27	0.81	2.34	MFS transporter, MFS transporter DHA2 family multidrug resistance protein B
G-IV	MBESNS4_4278	GGGE(+)	5.63	0.92	1.37	transporter, outer membrane protein
	MBESNS4_4279	GGGE(+)	6.61	1.04	1.47	multidrug efflux RND transporter permease subunit, hydrophobe/amphiphile efflux-1 (HAE1) family transporter
	MBESNS4_4280	GGGE(+)	4.75	0.95	1.34	membrane fusion protein
	MBESNS4_4281	GGGE(+)	6.30	0.60	1.93	hypothetical protein
V-III	MBESNS4_4412	vanillin(-), APA-lignin(-)	0.51	0.32	0.48	30S ribosomal protein S17
	MBESNS4_4413	vanillin(-)	0.59	0.33	0.54	50S ribosomal protein L29
	MBESNS4_4414	vanillin(-)	0.55	0.34	0.52	50S ribosomal protein L16
	MBESNS4_4415	vanillin(-)	0.52	0.33	0.50	30S ribosomal protein S3
	MBESNS4_4416	vanillin(-)	0.57	0.32	0.51	50S ribosomal protein L22
	MBESNS4_4417	vanillin(-), APA-lignin(-)	0.59	0.34	0.51	30S ribosomal protein S19
	MBESNS4_4418	vanillin(-)	0.64	0.38	0.48	50S ribosomal protein L2
	MBESNS4_4419	vanillin(-)	0.79	0.41	0.50	50S ribosomal protein L23
	MBESNS4_4420	vanillin(-)	0.84	0.43	0.51	50S ribosomal protein L4
	MBESNS4_4421	vanillin(-)	0.82	0.40	0.55	50S ribosomal protein L3

## G-II 遺伝子クラスターを制御するゲノム領域の探索

クラスターG-II の発現を誘導するエフェクター化合物を探索するために、レポーター株を構築した。一般に転写開始点から 500 bp 上流の領域に、何らかの転写制御因子が結合して下流遺伝子の転写を制御することが多いとされるが、G-II クラスター遺伝子上流にプロモーターとして働く -35 と -10 配列の大腸菌コンセンサス配列はなかった。RNA シーケンシングの結果、クラスター上流の 100bp までの領域に多くの RNA リードが出現したことから、この領域に -35 と -10 として働く配列があると考えられた。プロモーター領域を同定するため MBENS4\_1161 の上流 1~600 bp を対象に 600bp、300bp、260bp、220bp、180bp、150bp、75bp を  $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子の開始コドンの上流に接続して、プロモーターアッセイプラスミド(pQF-*lacZ*::P<sub>Cluster</sub>)を調整した (Figure 2-2)。プラスミド pQF-*lacZ*::P<sub>Cluster600</sub> を MBES04 株に導入し、取得したレポーターアッセイ株を MBElacZ<sub>600</sub> とした。同様にその他領域長のレポーター株も作製し計 7 株を得た。MBElacZ 株を 1 mM の GGGE を含む基礎培地で培養し、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性を測定することでプロモーター活性を評価した。非誘導対象として GGGE の代わりに DMSO を用いた。非誘導条件の Miller units は  $1.0 \pm 0.1 \times 10^3$  検出された。75bp、150bp、180bp 領域を連結したレポーター株の Miller units はそれぞれ  $1.1 \times 10^3$ 、 $1.2 \times 10^3$ 、 $1.0 \times 10^3$  であり非誘導条件と変化がなく、GGGE によって誘導されなかった。200bp~600bp 領域の Miller units は  $7.5 \sim 9.9 \times 10^3$  検出され、300bp 領域で最も増大した (Figure 2-8)。遺伝子クラスターの転写を制御する領域は 180bp~220bp 領域にあることを示した。この領域にコンセンサス配列は見当たらなかった。

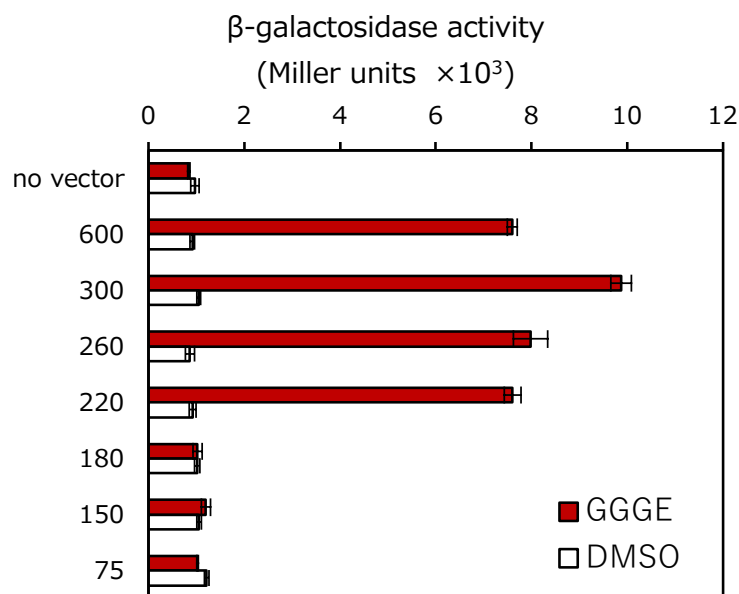


Figure 2-8. 遺伝子クラスターG-II の発現制御領域の同定

遺伝子クラスターG-II の上流領域 600bp、300bp、260bp、220bp、180bp、150bp、75bp をそれぞれ *lacZ* に連結させたプロモーターアッセイプラスミドを用いて評価した。レポータープラスミド(pQF-*lacZ*::P<sub>ClusterG-II600bp</sub>~pQF-*lacZ*::P<sub>ClusterG-II75bp</sub>)を保持する MBES04 株に導入した 7 株と野生株の  $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性を測定した。GGGE を 1 mM 添加した基礎培地で 16 時間培養後、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性を測定した。 $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性は *o*-nitrophenyl- $\beta$ -galactoside を用いて測定し、ミラーユニットとして表した。エラーバーは独立した 3 回の培養から算出されたガラクトシダーゼ活性の平均値の標準誤差を表す。



## G-II 遺伝子クラスターの発現を誘導するエフェクター分子の同定

MBE*lacZ*<sub>600</sub> 株を GGGE、VGGE、MPHPV、GVG、GHP、vanillin、veratryl alcohol、2,6-dimethoxyphenol、DHA、guaiacol を添加した基礎培地で培養し、β-ガラクトシダーゼ活性を測定した (Figure 2-9)。最も強い誘導は GHP で起こり、GGGE、MPHPV、DHA でも誘導が観察された。対照的に、バニリンまたはメトキシフェノールでは誘導が起きなかった。次に、GGGE、MPHPV、GHP を用いた経時的な観察では GHP で 6 時間後に誘導が起こるのに対し、GGGE と MPHPV では 12 時間後に誘導された (Figure 2-10)。これらは、GGGE および MPHPV は、本株の内在性の etherase system によって、GGGE と MPHPV は最終産物である GHP に変換された後、エフェクター分子として機能することが示唆された。したがって、GHP がクラスター遺伝子の発現を誘導するエフェクター化合物として働くことを証明した。リグニン由来の芳香族分子の異化遺伝子のエフェクターは、etherase system を有するいくつかの細菌について報告されている (Kamimura *et al.* 2010; Uchendu *et al.* 2021)。バニリン酸、ガリク酸、プロトカテク酸 (Araki *et al.* 2019, 2020) およびヒドロキシシナモイル CoA (Kasai *et al.* 2012) は、異化作用を調節するエフェクターとして作用する。最近の研究では *Aromatoleum aromaticum* EbN1<sup>T</sup> (β-proteobacteria) における TetR 型転写抑制因子 PprR に関する研究では、環境細菌は CoA チオエステルをエフェクターとして形成することで、低濃度のリグニン由来の 3-フェニルプロパノートを感知した (Vagts *et al.* 2021)。本研究はフェニルプロパノンモノマーがエフェクター分子として機能することを示した最初の報告であり、MBES04 株はフェニルプロパノンの分解は促進せずに、他のリグニン誘導体化合物の分解を促進した。

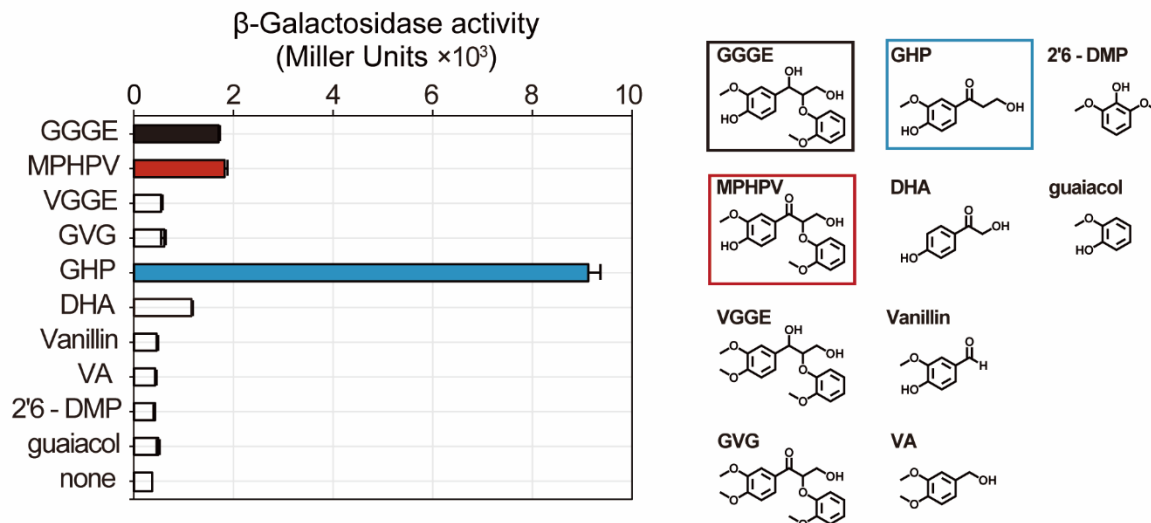


Figure 2-9. 遺伝子クラスターG-II の発現を誘導するエフェクター分子のスクリーニング *lacZ* レポータープラスミド (pQF-*lacZ*::P<sub>ClusterG-II600bp</sub>) を保持する MBES04 株 (MBE*lacZ* 株) の β-ガラクトシダーゼ活性を測定した。リグニン関連化合物、GGGE、MPHPV、VGGE、GVG、GHP、DHA、Vanillin、VA、2,6-DMP、または guaiacol を各 1 mM 添加した基礎培地で 16 時間培養後、β-ガラクトシダーゼ活性を測定した。β-ガラクトシダーゼ活性を測定し Miller unit で表した。エラーバーは独立した 4 回の培養から算出されたガラクトシダーゼ活性の平均値の標準誤差を表す。GGGE, guaiacylglycerol-β-guaiacyl ether; MPHPV, (2-methoxyphenoxy) hydroxypropiovanillone; VGGE, veratrylglycerol-β-guaiacyl ether; GVG, β-guaiacyl-α-veratrylglycerone GHP, guaiacylhydroxypropanone; DHA, 2,4'-dihydroxyacetophenone; DMP, dimethoxyphenol; VA, veratryl alcohol.



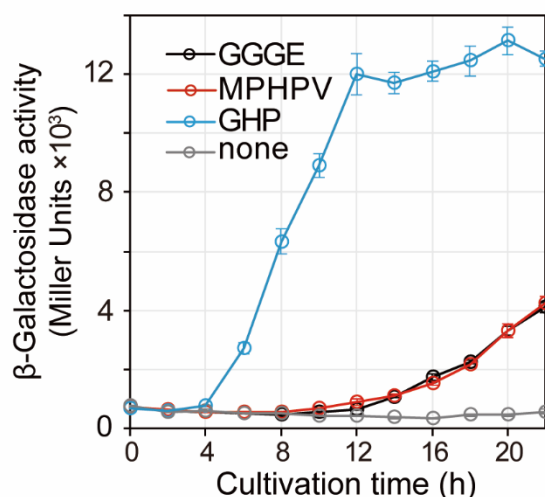


Figure 2-10. 遺伝子クラスターG-IIの発現を誘導するエフェクター分子の同定  
 1 mMのGGGE、MPHPV、GHPを添加した基礎培地で培養したMBElacZ株のβ-ガラクトシダーゼ活性の変化を、2時間ごとのサンプリング直後に測定したβ-ガラクトシダーゼ活性を測定しMiller unitで表した。GGGEおよびMPHPVはいずれも、培養中にMBElacZ株の内在性 etherase system によってGHPおよびグアイアコルに変換された。エラーバーは独立した4回の培養から算出されたガラクトシダーゼ活性の平均値の標準誤差を表す。

#### 4. 本章の結論

NovosphingobiumのMBES04株は、リグニン主要結合であるβ-O-4結合を特異的かつ還元的に切断するβ-etherase systemの最終生成物としてフェニルプロパノンモノマーを蓄積するが、それらをエネルギーとして利用せず培地中に放出する。生産されたフェニルプロパノンモノマーはリグニン基本骨格を持つ重要な前駆体化合物でリグニン高付加価値化に向けた標的化合物となることから、本株はリグニンバイオ変換の宿主に展開できると考えた。本章では本株を宿主として検討するための基礎的なエネルギー獲得を理解し、リグニン由来化合物への応答を明らかにすることを目的とした。本株は解糖系の一部に欠損が確認されたが、バニリンや4-ヒドロキシ安息香酸などのC1側鎖を持つリグニン由来芳香族モノマーを酸化的分解により完全に異化する遺伝子セットを保有していた。本株はこれらの芳香族化合物を単一炭素源として利用できることから、エネルギー獲得の観点において、完全でない糖代謝経路を芳香族化合物分解によって補っていると考えられた。またβ-O-4結合最小モデル化合物GGGEとβ-O-4結合を高い割合で含む広葉樹(Eucalyptus globulus)から抽出したAPA-リグニン存在下では共通する遺伝子クラスターを驚異的に発現誘導させ応答した。これはバニリンでは誘導されなかった。最も強く誘導された遺伝子は2,4'-dihydroxyacetophenone dioxygenaseで植物由来の芳香族アグリコンであるC6-C2化合物を本株がエネルギー源として利用可能なC6-C1化合物へと酸化的に変換し、エネルギー生産につながる。その他に多剤耐性や毒性化合物の排出に関連する遺伝子を発現し、バイオマス抽出時に発生する毒性を示す芳香族、ヘテロ芳香族化合物へ抵抗が確認された。G-II、L-III遺伝子クラスターは共通のプロモーターによって転写制御されており、β-etherase system産物のフェニルプロパノンモノマーが遺伝子誘導のエフェクターの一つとして働いていた。これらの結果は、本株のβ-etherase syste

は常に稼働しており、リグニン断片を感知すると即座にフェニルプロパノンモノマーを生産し、全体の遺伝子発現プロファイルを動的に変化させる。本株の  $\beta$ -etherase system はリグニン化合物に対するセンサーとしての機能することを示した(Figure 2-11)。このリグニン応答センサーはリグニン断片存在下で特異的に目的代謝のスイッチを入れるバイオものづくりの革新的なツールになる可能性がある。グルコースやアラニンの添加は  $\beta$ -etherase system からの GHP 生産を加速させ、本株が  $\beta$ -etherase system 駆動時にエネルギー要求状態にあることを示唆する。解糖系の欠損を補足し、バイオマス前処理化合物に含まれる化合物への耐性を付与することで、MBES04 株の生存を高めながらフェニルプロパンモノマーの高生産につながると考えられる。

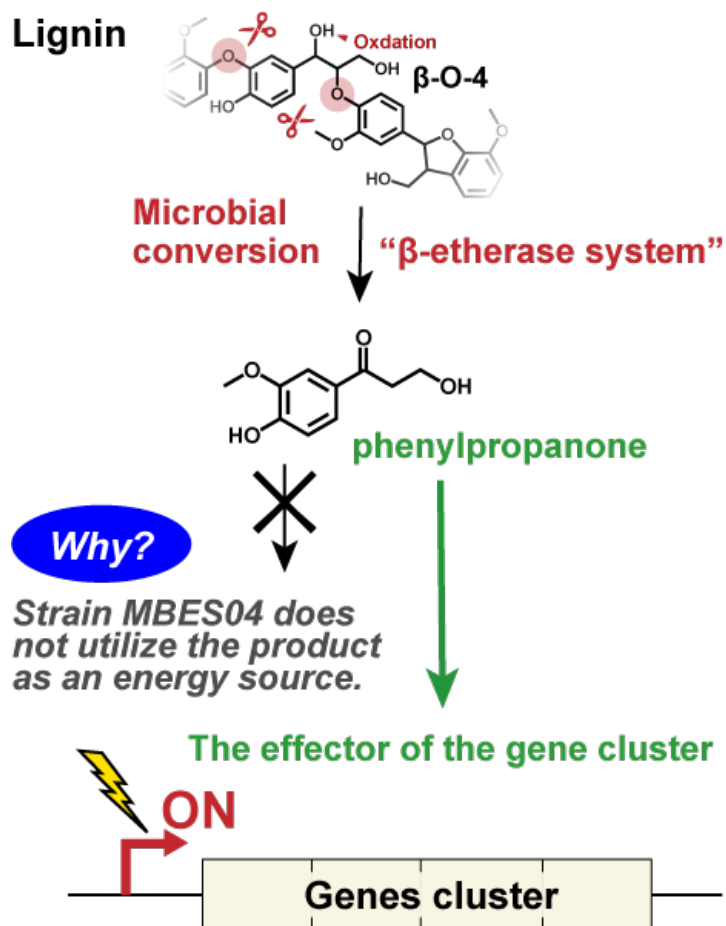


Figure 2-11. 本章の概要図

### 第3章 *Altererythrobacter* sp. B11 株の新規 $\beta$ -etherase の反応特性解析

#### 1. 緒言

$\beta$ -Etherase system はリグニンからのフェニルプロパンモノマーを選択的に生産する有望な代謝系である。前章では *Novosphingobium* sp. MBES04 株の  $\beta$ -etherase system はフェニルプロパンモノマー生産することでリグニン断片を感知する機能を持つことがわかった。MBES04 株を高生産株へと育種するためには高活性な  $\beta$ -etherase system を導入することが不可欠であり、そのためには  $\beta$ -etherase system の個々の反応特性や反応機構の理解が必要となる。 $\beta$ -O-4 結合開裂を触媒する  $\beta$ -etherase はラセミ化合物であるリグニン断片を絶対選択的に認識する。この反応は構造情報に基づき SN2 求核置換反応で進行すると推測された(Helmich *et al.* 2016)。この仮説は、その後の Prates らによる量子力学/分子力学シミュレーションを用いた解析においても支持された(Prates *et al.* 2019)。さらに、Helmich らは GSH 結合部位のアミノ酸が置換された LigF を用いて、S14 が GSH 結合または触媒反応における遷移ステップの安定化に関与する可能性を示した(Helmich *et al.* 2016)。Kontur らは BaeA の S14 がターンオーバーよりもむしろ基質結合に役割を果たし、N15 が基質結合と触媒反応の両方、特に GSH の活性化に重要な役割を果たすことを示した(Kontur *et al.* 2019)。*Ceriporiopsis subvermispota* から単離された真菌 GST では、N22、N24、Y46 が酵素活性の鍵となる残基として同定された(Osman *et al.* 2019; Wan Osman *et al.* 2019)。しかしながら、私の知る限りでは、細菌の  $\beta$ -etherase の SN2 反応における脱離基の安定化のための完全な触媒機構は解明されておらず、多様な酵素を用いたさらなる解析が必要である。 $\beta$ -etherase system の詳細な追求はこれまで *Sphingomonadaceae* 科に集中していたが、近年データベースマイニングアプローチにより、*Erythrobacter* 属由来の  $\beta$ -etherase system 関連酵素がこれまでに報告されている酵素よりも高い比活性を示した(Voß *et al.* 2020)。加えて、温泉地帯から採取したサンプルで *Altererythrobacter* 属細菌が熱環境におけるリグニン由来芳香族オリゴマーの分解者としての活躍が示唆された(Levy-Booth *et al.* 2021)。したがって、*Erythrobacter* 属と *Altererythrobacter* 属は、優れた  $\beta$ -O-4 結合開裂能力を持つ供給源となる可能性がある。本章では *Altererythrobacter* sp. B11 の  $\beta$ -O-4 結合化合物の代謝能を調べ、 $\beta$ -etherase 酵素のスクリーニングを行う。これまで生化学的な知見の無い LigF2 グレードに属する新規  $\beta$ -etherase を組換え酵素として取得し生化学的解析を行う。さらに、触媒残基に変異を導入した酵素の速度論的解析を行い、触媒機構、特に SN2 機構を経た  $\beta$ -etherase の反応機構を明らかにする。

## 2. 実験方法

### 試薬及び基質

Guaiacylglycerol- $\beta$ -guaiacylether (GGGE) は東京化成工業株式会社から購入した。(2-methoxyphenoxy)hydroxypropiovanillone (MPHPV)は和光純薬工業株式会社から購入した。GGGE と MPHPV は 100 mM 濃度に Dimethyl sulfoxide (DMSO)に溶かし、-30 °C に保存した。その他の試薬は和光純薬工業株式会社、ベクトン・ディッキンソン社から購入して使用した。

### 供試菌及び培養条件

使用した菌株及びプラスミドを Table 3-1 に示した。B11 株は LB 培地, Miller (ナカライテスク株式会社)にダイゴ人工海水 SP (富士フィルム和光純薬工業株式会社) を製造元推奨添加量の 0.25 倍量を添加した LBASW 培地で 30 °C で好氣的に培養した。BL21-AI はタンパク質発現に使用し、LB 培地で 37 °C で培養した。DH5 $\alpha$  はプラスミド複製に使用し、LB 培地で 37 °C、好氣的条件下で培養した。大腸菌培養時はアンピシリン(Amp: 100 mg/L)を添加した。細胞の増殖は波長 600 nm における培養液の濁度(OD<sub>600</sub>)を測定し、評価した。プラスミド DNA は Roche High Pure plasmid isolation kit (Merck KGaA)を用いて調製した。DNA 断片は Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, WI, USA)を用いて精製した。オリゴヌクレオチドプライマーは FASMAC から購入し、配列は Table 3-2 に記載した。

Table 3-1. 本章で使用了した菌株とプラスミド

Strain or plasmid	Relevant genotype and main characteristics	Reference or source
<b>Strains</b>		
<i>Altererythrobacter</i> sp. B11	Wild-type strain	Maeda <i>et al.</i> 2018
<i>Escherichia coli</i> DH5 $\alpha$	<i>F'</i> , $\Phi$ 80dlacZ $\Delta$ M15, $\Delta$ (lacZYA $\text{-argF}$ )U169, <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> ( <i>rK</i> <sup>-</sup> , <i>mK</i> <sup>+</sup> ), <i>phoA</i> , <i>supE44</i> , $\lambda$ , <i>thi-1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i>	TOYOBO Co., LTD
<i>Escherichia coli</i> BL21-AI	<i>F</i> <sup>-</sup> , <i>ompT</i> , <i>gal</i> , <i>dcm</i> , <i>lon</i> , <i>hsdSB</i> ( <i>rB</i> <sup>-</sup> , <i>mB</i> <sup>-</sup> ), [ <i>malB</i> <sup>+</sup> ]K-12( $\lambda$ S)	Life Technologies
<b>Plasmids</b>		
pRESETA	T7 Expression Vector; f1 ori and pUC ori with MCS for N-terminal fusions to 6 $\times$ His tag, Ampr	Life Technologies
pAbLigF2	pRSETA containing AEB_P0227 from strain B11 optimized for <i>E. coli</i>	This study
pGST4	pRSETA containing MBENS4_2528 from strain MBES04	Ohta <i>et al.</i> 2015
pAbLigF2_N13A	pRSETA containing AEB_P0227 from strain B11 with mutation of N13 to Ala	This study
pAbLigF2_S14A	pRSETA containing AEB_P0227 from strain B11 with mutation of S14 to Ala	This study
pAbLigF2_N13AS14A	pRSETA containing AEB_P0227 from strain B11 with mutation of N13 and S14 to Ala	This study
pAbLigF2_S115A	pRSETA containing AEB_P0227 from strain B11 with mutation of S115 to Ala	This study

Table 3-2. 本章で使用了したプライマーの配列。変異導入箇所を下線で表す

Primer name	Sequence (5'→3')	Template DNA
AbGST4-2 N13A_Fw	CTGGCGG <u>CA</u> AGTCTGAAAAGCATG	pAbLigF2
AbGST4-2 N13A_Rv	CAGACTT <u>G</u> CCGCCAGCGGTTTCGGC	pAbLigF2
AbGST4-2 S14A_Fw	CGAAC <u>G</u> CACTGAAAAGCATGATCCCG	pAbLigF2
AbGST4-2 S14A_Rv	TTTCAGT <u>G</u> CGTTCGCCAGCGG	pAbLigF2
AbGST4-2 S115A_Fw	CACGTT <u>G</u> CAATGCACGGCTGGCATCG	pAbLigF2
AbGST4-2 S115A_Rv	GTGCATT <u>G</u> CAACGTGGTTCATAACTTG	pAbLigF2
AbGST4-2 N13AonS14A_Fw	ACCGCTGGCG <u>G</u> CAGCACTGAAAAGCATGATC	pAbLigF2_S14A
AbGST4-2 N13AonS14A_Rv	TTTTTCAGT <u>G</u> CTGCCGCCAGCGGTTTCGGC	pAbLigF2_S14A

## B11 株の GGGE 変換

B11 株は LBASW で 16 時間、30 °C で培養した。集金した細胞を LBASW に再懸濁させ、1.2 mM GGGE 含有 LBASW 培地へ OD<sub>600</sub> が 0.1 に達するまで植菌した。30 °C で 24 時間振盪培養し、定期的なサンプリングは、2 時間間隔で行った。回収した培養液にメタノールを 4 倍量加え、10,500 g で 5 分間遠心分離した。上清を下記のように HPLC 分析した。試行数 n=3 で行った。

## HPLC の分析条件

Alliance2796 (Waters 社) 及び UV/Vis 検出器 2489 (Waters 社) を使用して液体クロマトグラフィー分析を行った。分離カラムは XBridgeC18 (粒径 3.5 µm, 4.6 × 100 mm : Waters 社) を用いて溶媒 A に 0.05%ギ酸と 2 mM 酢酸アンモニウムを添加した超純水を、溶媒 B には 100%メタノールを使用し、流速 1.2 mL/min でグラジエント条件(0 –1 分; 10% B 液、 1–7 分; 10–100% B 液グラジエント、 7–10 分; 100% B 液). で分離した。検出器は 270 nm で測定した。カラム温度は 40 °C に設定した。

## β-Etherase の候補遺伝子の探索と系統解析

BLASTP (National Center for Biotechnology Information)プログラムを使用し β-etherase の候補遺伝子を選定した。Query に *Sphingobium* sp. SYK-6 の LigF(BAK65540)を用いて、GenBank に含まれている全エントリを対象として検索する Non-redundant protein sequences を選択した。アライメントスコアが 80 以上、Query Cover が 90%を超える β-etherase の配列を抽出した。系統樹は neighbor-joining 法を使用して構築した。

## 組換えタンパク質の発現と精製

AbLigF2 (BBC71095)をコード配列はデータベース GenBank から取得した。AbLigF2 のヌクレオチド配列のコドン (GenBank: AP018498.1) は、大腸菌で最も頻繁に使用される配列と約 50%異なり、特定の領域で 80% を超える高い GC% を示した。大腸菌での発現効率を高めるために AbLigF2 のコード配列は GenSmart design (GenScript Biotech Corporation) を使用して最適化されました。最適化された DNA フラグメントを pRSETA ベクターの *Bam*HI と *Xho*I 配列の間に挿入した(pAbLigF2; Figure 3-1)。pAbLigF2 を用いて大腸菌 BL21-AI 株を形質転換した。タンパク質生産中に宿主内のグルタチオン酸化還元バランスを乱すことを避けるために、毒性タンパク質発現用大腸菌を選択した。形質転換体はアンピシリン (100 µg/mL) を含む LB 培地に接種され、37 °C で 16 時間前培養された。回収した菌体を LB 培地に OD<sub>600</sub> が 0.1 になるまで添加し、OD<sub>600</sub> が 0.4 に達するまで 37 °C で培養した。L-アラビノースを最終濃度 0.2%で添加し、発現誘導培養は 16 °C で 16 時間行った。誘導培養から採取したペレットを溶解緩衝液 (100 mM Tris-HCl (pH 8.0)、50 mM NaCl) に再懸濁し、超音波ホモジナイザー (VIOLAMO) を使用して氷浴中で破碎しました。超音波処理後、等量の緩衝液 (100 mM Tris-HCl (pH 8.0)、600 mM NaCl)を添加し、遠心分離した可溶性画分を限外濾過フィルター (直径 25 mm、孔径 0.22 µm) に通して、不溶性画分を完全に除去した。上清を、Ni-NTA His-Bind 樹脂 (Novagen; Sigma-Aldrich; St. Louis) を充填させた重力カラムにアプライし、洗浄緩衝液 (100 mM Tris-HCl (pH 8.0), 300 mM NaCl, 50 mM イミダゾール)、溶出緩衝液 (100 mM Tris-HCl (pH 8.0), 300 mM NaCl, 200 mM イミダゾール) 中で溶出した。溶出画分を限外濾過フィルター (Amicon Pro centrifugal Filters Ultracel; MilliporeSigma) に通して 10 kDa 未満の画分を除去し、脱塩、濃縮し、50 mM NaCl を含む 20

mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) に置換した。精製プロセスは 4 °C で行った。精製タンパク質の純度は、SDS 5~20% PAGE で確認した。

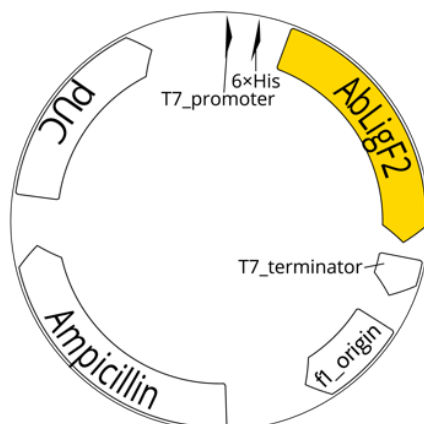


Figure 3-1. 組み換えタンパク質発現プラスミドのマップ

pAbLigF2 の特徴 : f1\_origin; DNA のレスキュー, pUC; 大腸菌での高コピー複製と増殖, Ampicillin; アンピシリン耐性遺伝子, AbLigF2; 大腸菌発現用に最適化されたコード配列 (locus tag; B11 株由来の AEB\_P0227)

### 酵素活性アッセイ

基本の酵素反応組成は、AbLigF2 または GST4 は 1 mM MPHPV および 2 mM の還元グルタチオン(GSH)と反応させた。至適温度と pH の調査は、Britton Robinson 緩衝液を使用して 25 ~ 50 °C および pH8.0~12.0 で 30 分間反応させることによって決定した。熱安定性の評価では、AbLigF2 または GST4 を 40、45 および 50 °C で 0.5~2 時間プレインキュベートし、その後基本の反応条件で酵素反応に供した。酵素活性に対する添加剤の影響を調査するために、AbLigF2 を以下の条件下で 30 分間プレインキュベートした ; 5、10 および 20(v/v)%のエタノールおよびブタノール、0.1、0.5 および 1(v/v)%のポリオキシエチレン(20)ソルビタンモノラウレート(Tween20)、0.028 および 0.14%のナトリウム硫酸ドデシル(SDS)、1 および 5 mM のエチレンジアミン四酢酸(EDTA)、5 および 10 mM のジチオスレイトール(DTT)。処理酵素を基本の反応組成で 35 °C で反応させた。反応物をその後の分析のために直ちに 100%メタノールで 1:4 に希釈した。

### 酵素反応物の分析

反応生成物であるグルタチオン付加物を LC-MS を用いて分析した。送液システムに Acquity H-class UPLC system (Waters 社)、質量分析計に Xevo G2 (Waters 社) を用いた。イオン化部はエレクトロスプレーイオン化法を使用し、ネガティブイオンモードで測定した。分離カラムは BEH C18 (粒径 1.7 μm、2.1 × 100 mm : Waters 社) を使い、溶媒 A に 0.1%ギ酸を添加した超純水を溶媒 B には 0.1%ギ酸を添加したアセトニトリルを使用し、0.4 mL/min の流速でグラジエント分離した(0-5 分; 5-95%アセトニトリル、5-10 分; 95%アセトニトリル)。溶出液をフォトダイオードアレイ検出器 210~500 nm の範囲でモニターした。マスレンジ 100-1,000 Da、脱溶媒和温度 500 °C、ソース温度

120 °C、スキャンタイム 0.1 sec、コーン圧力 10 V にて測定した。酵素活性の定量分析は反応産物であるグアヤコルを上述の HPLC の分析条件に従って測定した。

### 酵素反応物のキラル分析

反応液から不純物を除去する目的で Waters Oasis WAX 固相抽出カートリッジ(Wates 社)を用いて抽出を行った。100%アセトニトリル 1 mL と 2% ギ酸を含む Milli-Q 水 1 mL でコンディショニングと平衡化を行い、終濃度 2%となるようにギ酸を添加した反応液をアプライした。反応生成物をアセトニトリルで溶出させた。2%ギ酸を含む Milli-Q 水 1 mL で洗浄した後、100%アセトニトリルで溶出させた。N<sub>2</sub> を吹き付け溶媒除去し 20%アセトニトリルで再溶解させ、遠心分離後に上清をキラル HPLC 分析した。分離カラムは CHIRALPAK IE-3 (粒径 3.0 μm, 4.6×250 mm: 株式会社ダイセル)を用いて溶媒 A に超純水を溶媒 B にアセトニトリルを使用しグラジエント条件で分離した(0-10分; 20%アセトニトリル、10-15分; 10-30%アセトニトリル, 10-30分; 30%アセトニトリル)

### 変異体プラスミドの作製

変異体プラスミドを PrimeSTAR® mutagenesis basal kit (タカラバイオ株式会社) を使用して構築した。変異領域を含むプライマーは FASMAC から購入した(Table 3-2)。PCR 増幅は、pAbLigF2 または pAbLigF2\_S14A を鋳型とした。PCR 反応溶液を DpnI で 37 °C、15 分間処理し、鋳型プラスミドを消化した。配列をシーケンス解析で検証した上で、変異プラスミドを用いて BL21AI 株を形質転換した。変異型酵素は発現および精製手順で上述したように調製した。

### 酵素タンパク質の 3D モデリング

AbLigF2 の構造モデリングは、UniProt データベース内の構造情報(Accessions: A0A2Z5YSG1)に基づいて行った。LigF 結合 GSH (PDB:4xt0, Helmich *et al.* 2016) と AbLigF2 の結晶構造データを描画ソフトウェア Chimera を使用して重ね合わせた。

### 反応速度論的解析

AbLigF2 の野生型および変異型酵素を、0.06~1.0 または 1.5 mM の MPHPV と 2 mM の還元型 GSH の存在下で、25 °C で 30 分間反応させた。各基質濃度について酵素反応を 4 回実施した。HPLC で定量したグアヤコルの量から酵素活性(U; μmol/min)を算出した。V<sub>max</sub> および K<sub>m</sub> 値は、ミカエリス・メンテンの式に従って統計解析ソフトウェア R を使用して計算した。



### 3. 結果と考察

#### B11 株のリグニンモデル化合物代謝能

本研究では、*Altererythrobacter* sp. B11 細胞をGGGEを含む栄養豊富な培地で培養し、培養上清中のGGGE、MPHPV、GHP、およびグアヤコールの残存量をHPLCで測定した(Figure 3-2、Figure 3-3)。GGGEは6時間後に分解し始め、12時間までに完全に分解された(Figure 3-2)。さらに、GGGEの消費に伴い、グアヤコールが蓄積した。中間代謝物MPHPVは急速にグアヤコールに変換された。 $\beta$ -Etherase systemの第二段階である、MPHPVの $\beta$ -ether結合の切断は、B11株におけるGGGE代謝の律速段階ではなかった。さらに、培養期間中にGHPは検出されず、*Altererythrobacter* sp. B11株はGHPの芳香環を開裂し、完全に代謝することが示唆された。*Novosphingobium* sp. MBES04は、栄養豊富な培地で0.9 mMのGGGEを分解するのに約35時間を要した(Ohta *et al.* 2015)。B11株は12時間後に1.2 mMの基質を完全に分解し、MBES04株と比較して代謝速度が約3倍高いことが示された。これらの結果から、*Altererythrobacter* sp. B11の $\beta$ -etherase systemは著しく効率的であることが示唆された。さらに、MPHPVを添加した培養液では、 $\beta$ (S)-MPHPVは $\beta$ (R)-MPHPVよりもわずかに速い速度で代謝されたため、以降の実験では $\beta$ (S)型の選択的etheraseに注目した。

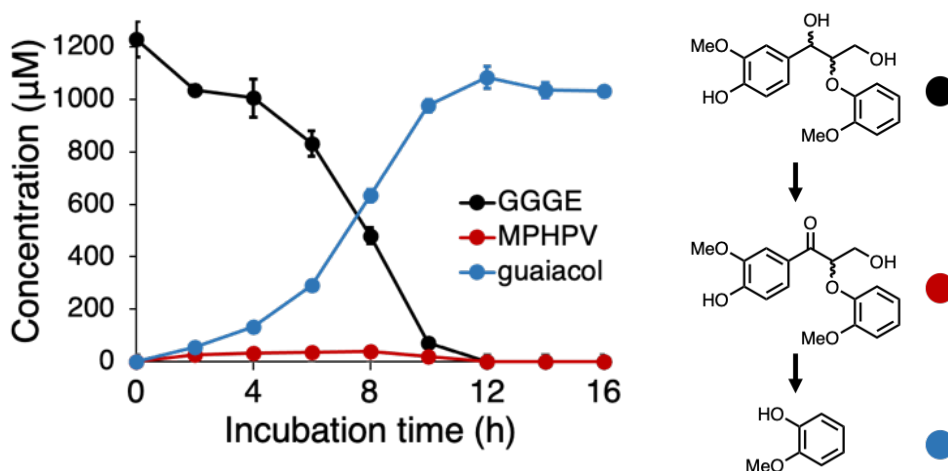


Figure 3-2. *Altererythrobacter* sp. B11 の GGGE 代謝

1.2mM の GGGE を含む基礎培地に B11 株を接種後、2 時間ごとに 16 時間サンプリングを行った。黒、赤、青の実線はそれぞれ GGGE、MPHPV、グアヤコールを示す。GGGE の減少および下流代謝産物の生成を HPLC で分析した。エラーバーは 3 度の独立した培養実験の平均の標準誤差を表す。

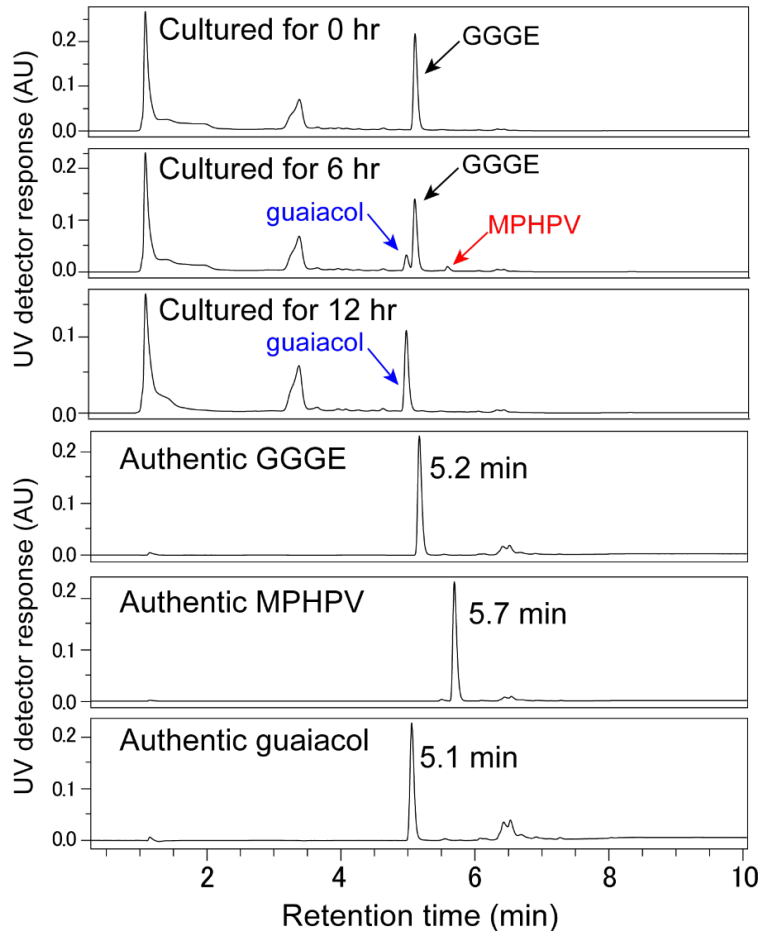


Figure 3-3. B11 株による GGGE 代謝物の HPLC クロマトグラム

B11 株を 1 mM GGGE 添加 LB 培地で培養した。回収した培養液はメタノールで 5 倍希釈され、培養上清を HPLC 分析に供した。GGGE、MPHPV、グアイアコル標準物質を用いた検量線から定量した。上段から培養 0、6、12 時間後の代謝物と GGGE、MPHPV および guaiacol の標準品を示した。

#### 候補 $\beta$ -etherase のアミノ酸配列の系統学的解析

既報の 6 株と B11 株について、*Sphingobium* sp. の ligF (locus tag; : SLG\_08 650) を用いて BLASTP 検索を行った。クエリーには、既報の  $\beta$ (S) 選択的切断酵素である SYK-6 を用いた。アラインメントスコアが  $80 \geq$ 、Query Cover が 90% 以上  $\geq$  の信頼性の高い酵素候補を選び、neighbor-joining 法により系統樹を構築した (Figure 3-4)。B11 株には、glutathione S transferase (GST) ファミリータンパク質としてアノテーションされたタンパク質が 8 つあり、そのうち 5 つが基準を満たした。B11 株由来の Protein LigF (BBC73091) は、LigF (BAK65540, Masai *et al.* 2003) と 44%、GST4 (GAM05530, Ohta *et al.* 2015) と 45%、NaLigF1 (ABD26530, Gall *et al.* 2014) と 42% のアミノ酸配列相同性を示した。B11 株由来 GST (BBC71095) は NaLigF2 (ABD27301, Gall *et al.* 2014) と 75% の相同性を示し、SG61-1 L 株由来の GST (WP\_054531108) とともに同じクレードに分類された。また、BaeA (ABD27309, Kontur *et al.* 2019) と 45% の相同性を持つ GST (BBC72542) を含む *Altererythrobacter* sp. B11 由来の他の 3 つの GST も検出された。既報株の由来に着目すると、MBES04 と PP1Y は B11 株として海洋

環境から分離されたが、他は製紙工場廃水、河川堆積物、下水汚泥廃棄物などの陸上源から分離された。 $\beta$ -Etherase は環境に広く分布している。今後、この分野の研究が進むにつれて、酵素の性質と環境因子との関係が明らかになることが期待される。

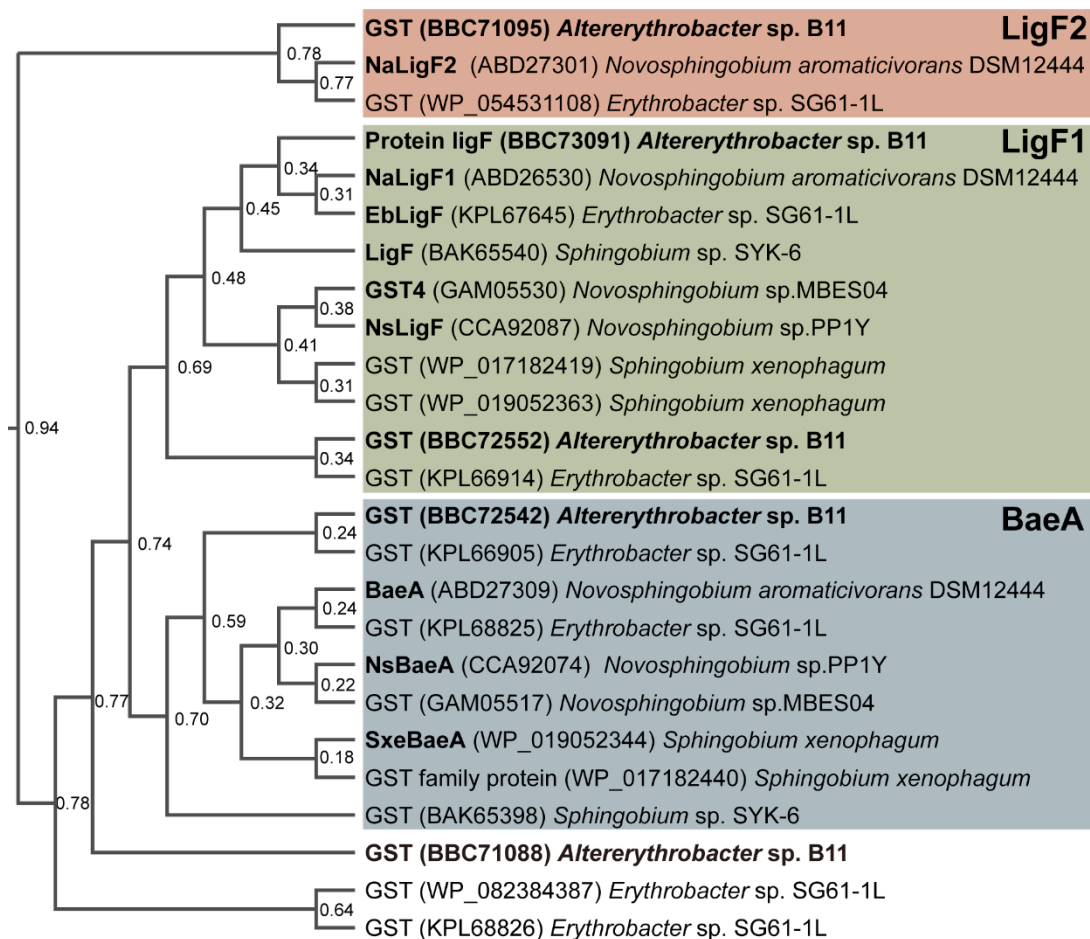


Figure 3-4. B11 株由来の候補  $\beta$ -etherase のアミノ酸配列と既報酵素の系統樹 neighbor-joining 法を用いて系統樹を作製した。B11 株由来の  $\beta$ -etherase 候補と既報  $\beta$ -etherase 候補は太字で示した。

### 候補 $\beta$ -etherase のアミノ酸のアライメント

$\beta$ -Etherase 候補のアミノ酸配列の中で、N 末端チオレドキシンドメインの 3 つの  $\alpha$ -ヘリックスと 4 つの  $\beta$ -ストランド、C 末端  $\alpha$ -ドメインの 8 つの  $\alpha$ -ヘリックスからなる LigF ファミリー-GST のドメインは高度に保存されていた(Figure 3-5)。GSH を構成するシステインのチオール残基に結合すると予測された 2 つの残基 (Q53 と V54、LigF (BAK65540) の番号) は、ほとんどの LigF と LigF2 間で保存されていたが、BaeAB ファミリーの GST では保存されていなかった。GSH を構成するグリシンへの結合に関与する 4 残基(Q40、H41、Q144 と W148、LigF の番号)のうち、H41 と W148 は高度に保存されていたが、Q40 と Q144 は頻繁に H と R に置換していた。一方、GSH の  $\gamma$ -グルタミル部分と相互作用する残基(E66 と S67、LigF の番号)は、LigF2 ファミリーの 3 つの GST で H66 と T67(B11 由来 BBC71095 の番号)に置換していた。 $\gamma$ -グルタミル認識残基は  $\beta$ 4-strand と  $\alpha$ 3-helix の間に存在し、E または Q と S または T が重要な水素結合パートナーとして高度に保存されている (Armstrong 1997)。 $\gamma$ -グルタミル認識残基の違いは、LigF2 ファミリーの特徴であると考えられた。Voßらはデータベースマイニングに基づき、LigF ファミリー-GST の 3 つの鍵となるモチーフ構造； 5-LYSFGPxANSxKP-17、65-TESTVICEYLEDxxP-79、94-AxMRxWTKWVDEYFCWCVSTxGW-116 を提案した (Voß *et al.* 2020)。LigF2 クレードに分類される酵素は motif1 は 62%、motif2 は 80%、motif3 では 61% の一致度だった。典型的なファミリーに属さなかった B11 株の BBC71088、SG61-1L 株の WP\_082384387 と KPL68826 は、モチーフ構造の保存性が低かった。これらのタンパク質は GSH 結合と触媒反応に必要な重要なアミノ酸(N13、S14、S115、B11 由来 BBC71095 の番号)を 2 つまたは 3 つ欠くため、検出可能な  $\beta$ -etherase 活性を持たない可能性がある。



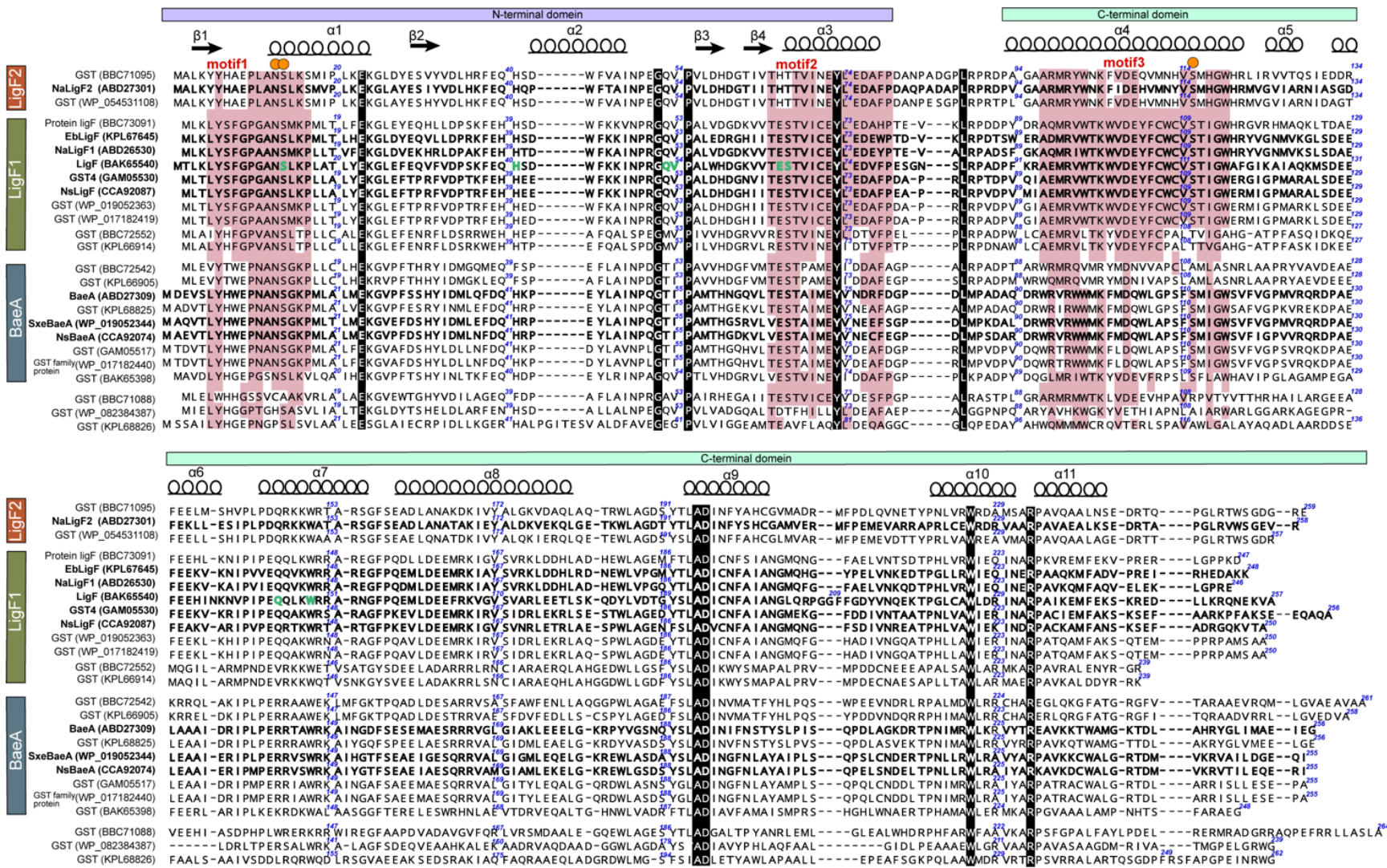


Figure 3-5. B11 株由来の候補  $\beta$ -etherase と既報酵素のアミノ酸配列のアラインメント

アミノ酸配列のアラインメント解析は Clustal Omega を用いて行った。黒い背景はアミノ酸配列が 100%一致していることを示す。LigF (BAK65540)の触媒反応に重要なアミノ酸残基は赤でハイライトした。構造データ (PDB:4XT0) に基づいて予測された  $\beta$ -鎖と  $\alpha$ -ヘリックスを矢印とらせんで示した。Voßらによって提唱された LigF の特徴的な構造モチーフを赤色で強調表示した。太字の緑文字は LigF のグルタチオン結合残基を示す。

## 酵素活性評価

LigF1 ファミリーと BaeA ファミリーに属するいくつかの GST については、酵素学的性質が詳細に報告されているが、LigF2 ファミリーに属する GST については、未だ解明されていない。そこで、BBC71095 (locus tag; : AEB\_P0227) を組換え酵素として解析し、触媒機構を解明するとともに、これまでに報告されている酵素よりも優れた特性を持つ酵素を得ることを目的とした。BBC71095 の機能を解析するため、N 末端に His タグを融合した組換え酵素として作製し、ニッケルアフィニティーカラムで精製した。精製後の酵素を SDS-PAGE に供したところ、約 30 kDa の単一バンドが観察された(Figure 3-6)。AEB\_P0227 遺伝子がコードするタンパク質は分子量 29.6 kDa、タグ付加後の分子量は 30.4 kDa、と計算され、本バンドの分子量と一致した。GSH 存在下でリグニン二量体モデル MPHPV と反応させ、反応液を LC-MS で分析した。酵素無添加のコントロールと比較して基質 MPHPV の減少を確認し、生成物のピークが保持時間 2.4 分に検出された(Figure 3-7)。生成物はマススペクトルから  $m/z$  500.13 にピークが検出され、グルタチオン付加体の [M-H] と一致した (GS-GHP : モノアイソトピック質量 501.14)。さらに  $m/z$  272.09 と 143.05 のフラグメントイオンが見つかった(Figure 3-8A)。これらのピークは GS-GHP の特徴的な構造に起因することから(Figure 3-8B)、被験酵素は GST であると同定された。本酵素は既報の NaLigF2 と同じクレードに分類されることから、*Alterethrobacter* sp. B11 の頭文字を用いて AbLigF2 と命名した。

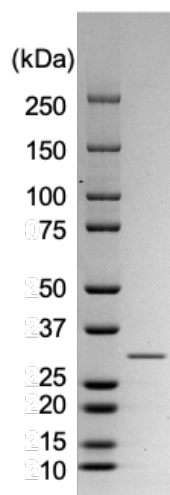


Figure 3-6. 精製酵素の SDS-PAGE

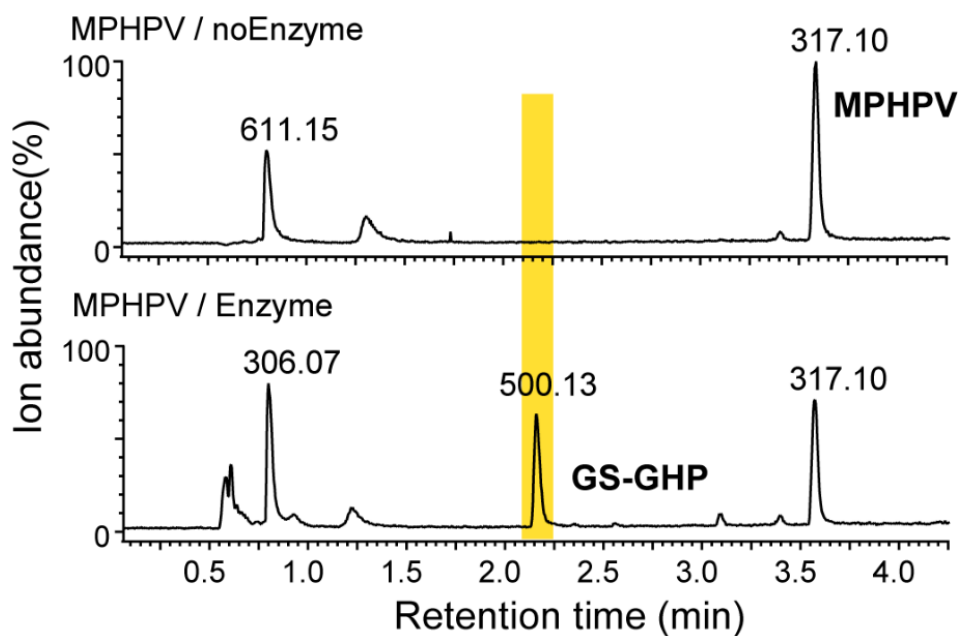


Figure 3-7. AbLigF2 と MPHPV 反応液のトータルイオンクロマトグラム  
AbLigF2 と 1 mM の MPHPV を 2 mM GSH 存在下で pH10 で反応した。16 時間の  
インキュベーション後、液体クロマトグラフィー質量分析で反応を観察した。

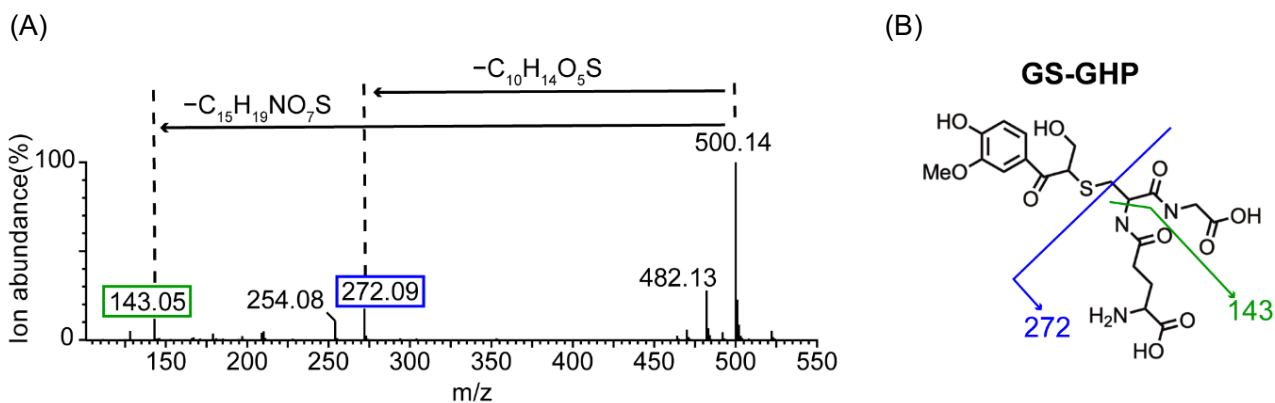


Figure 3-8. AbLigF2 と MPHPV の反応生成物に同定

(A) AbLigF2 と MPHPV の反応によって生じたピークのマスマスペクトル反応生成物の質量分析スペクトル(保持時間：2.4 分, m/z 500.13 (Figure 3-7))。 (B) GS-GHP の構造におけるフラグメントイオンの帰属。

### AbLigF2 の立体選択性

リグニンの解重合にはリグニン中に様々な立体異性体が存在するため、立体選択性を持つ複数の特異的酵素、あるいは立体選択性を持たない非特異的酵素が必要である。AbLigF2の基質に対する立体選択性を評価するために、酵素反応液をキラル HPLC で分析した(Figure 3-9)。酵素非添加コントロールは保持時間 17 分の  $\beta(R)$ -MPHPV と保持時間 18 分の  $\beta(S)$ -MPHPV の先行研究と一致したピークが検出された(Ohta *et al.* 2015)。酵素反応液では、 $\beta(R)$ -MPHPV のピークは検出されたが、 $\beta(S)$ -MPHPV のピークは検出されなかった。これらの結果は、AbLigF2 が MPHPV の  $\beta(S)$  型-MPHPV を選択的に切断することを示している。

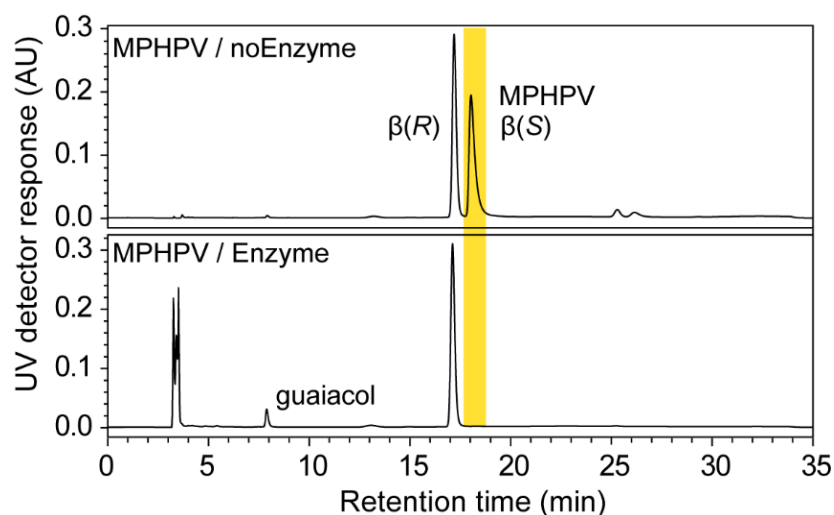


Figure 3-9. AbLigF2 とラセミ体 MPHPV の反応生成物のキラル HPLC クロマトグラム  
1 mM の MPHPV を 2 mM の GSH および AbLigF2 と pH10 で混合した。16 時間のインキュベーション後、キラルカラムを用いて分析した。



## AbLigF2 の生化学的特性

AbLigF2の至適反応温度とpHをそれぞれFigure 3-10に示す。比較対象に既報のGST4を用いた。各酵素反応条件下で生成したグアヤコル量を定量し、最大値を100%とした相対活性を算出した。AbLigF2は40~45℃で最大活性を示し、至適反応温度は対照酵素よりも高かった(Table 3-3)。pHは10.0~10.5で最大活性を示したが、これは既報酵素の中で最も高アルカリに適したpHであった。 $\beta$ -Etherase反応は、補酵素のGSHチオール基の脱プロトン化と $\beta$ -炭素への求核攻撃によって開始される。遊離GSHのpKaは9.65であり、高いpHはチオールの脱プロトン化を促進するため、反応に好都合である(Armstrong 1997)。アルカリ耐性の特徴はアルカリ下で化学的前処理したバイオマスの変換に応用できる可能性がある。各種酵素反応添加剤への適応を調査した。AbLigF2を終濃度20%のEtOH環境下で30分間処理した後、活性は50%以上保持された。同様に1%Tween20においても40%の活性は維持された(Table 3-4)。AbLigF2が一部の有機溶媒下において活性を保ち構造的に著しく安定であることが推測され、これが酵素のアルカリ耐性と熱耐性につながっている可能性がある。一方で、BuOHやSDSには感受性を示し、終濃度10%のBuOHでは13%、0.14%のSDSでは6%まで活性が減少した。バイオマス応用にはアルコール抽出の前処理を要するため、今後はAbLigF2の耐溶剤性や耐界面活性を向上させることが必要である。エチレンジアミン四酢酸(EDTA)とジチオスレイトール(DTT)は酵素活性に悪影響を与えず、むしろ活性を向上させた。DTTの添加は、補酵素グルタチオンの還元状態を維持する役割を担い活性の増加に寄与したと考えられた。

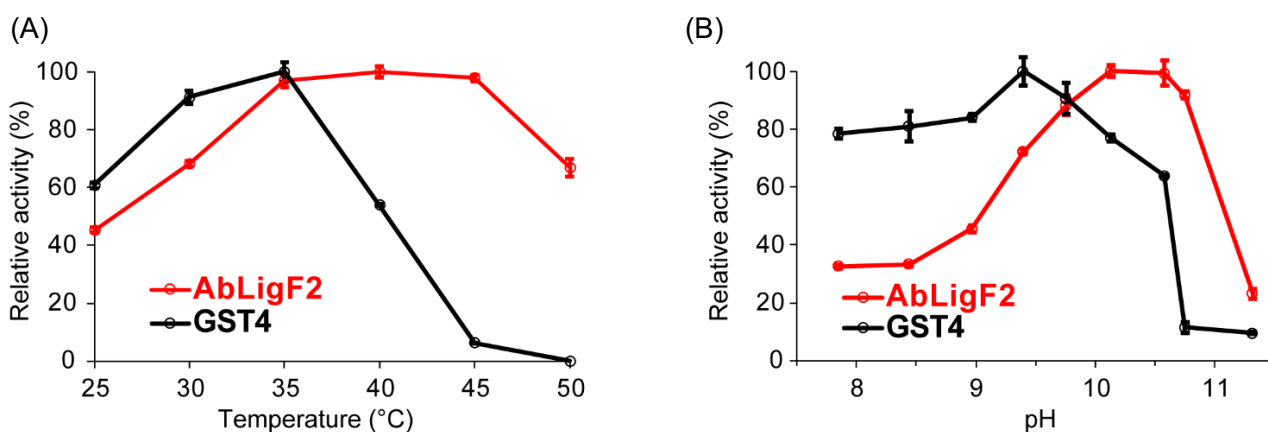


Figure 3-10. AbLigF2 の pH および温度の至適条件

AbLigF2 または GST4 と 1 mM MPPHV を 2 mM GSH 存在下で 30 分間反応させた。至適温度の検討(A)で pH10 の条件で、至適 pH の検討(B)は Britton Robinson 緩衝液を用いて 25 °C の条件で反応させた。測定された最大活性を 100% とした相対活性で示した。エラーバーは 3 回の実験の平均値の標準誤差を表す。

Table 3-3. MPHPV を基質とした反応における AbLigF2 と既報  $\beta$ -etherase の至適 pH と至適温度

Protein name	pH	Temperature (°C)	Reference
AbLigF2	10.5	45	This study
LigF	9.5	25	(Picart <i>et al.</i> 2014)
GST4	9.5	35	This study
NaLigF1	9.5	25	(Picart <i>et al.</i> 2014)
NsLigF	9.0	20	(Picart <i>et al.</i> 2014)
EbLigF	9.0	20	(Voß <i>et al.</i> 2020)

AbLigF2, *Altererythrobacter* sp. B11 (BBC71095); LigF, *Sphingobium* sp. SYK-6 (BAK65540); GST4, *Novosphingobium* sp. MBES04 (GAM05530); NaLigF1, *Novosphingobium aromaticivorans* DSM 12444 (ABD26530); NsLigF, *Novosphingobium* sp. PP1Y (CCA92087); EbLigF, *Erythrobacter* sp. SG61-1L (KPL67645).

Table 3-4 酵素反応添加剤が AbLigF2 の酵素活性に与える影響

Reagent	Conc. (%)	Relative activity (%)		
EtOH	5	116.3	±	12.1
	10	66.9	±	7.9
	20	50.1	±	3.8
BuOH	5	27.1	±	1.3
	10	13.4	±	0.7
Tween20	0.1	104.5	±	28.5
	0.5	55.4	±	9.1
	1	39.7	±	1.4
SDS	0.028	11.4	±	0.4
	0.14	6.4	±	1.2
Reagent	Conc. (mM)	Relative activity (%)		
EDTA	1	203.7	±	4.8
	5	109.3	±	22.0
DTT	5	296.8	±	89.7
	10	272.9	±	64.7

各添加剤で30分間処理した AbLigF2 を 1 mM MPHPV と反応させ残存活性を測定した。未処理の酵素活性を 100% と定義した相対活性として表した。EtOH; エタノール、BuOH; ブタノール、Tween20; ポリオキシエチレン(20)ソルビタンモノラウレート、SDS; ドデシル硫酸ナトリウム、EDTA; エチレンジアミン四酢酸、DTT; ジチオスレイトール

## AbLigF2 の温度安定性

温度に対する安定性を評価するため、AbLigF2を40~50℃で0~2時間インキュベートした後、酵素反応と残存活性を測定した(Figure 3-11)。黒で示した比較対象の酵素活性は、40, 45, 50℃の全ての温度でインキュベーション時間の増加とともに活性が低下した。特に50℃では、30分の処理でほぼ完全に失活した。対照的に、AbLigF2の不活性化は緩やかで50℃で2時間処理後、活性の30%を維持した。したがって、AbLigF2は熱安定性に優れている。耐熱性は工業的利用の可能性を秘めており、さらにバイオマスの熱前処理と組み合わせることも可能である。

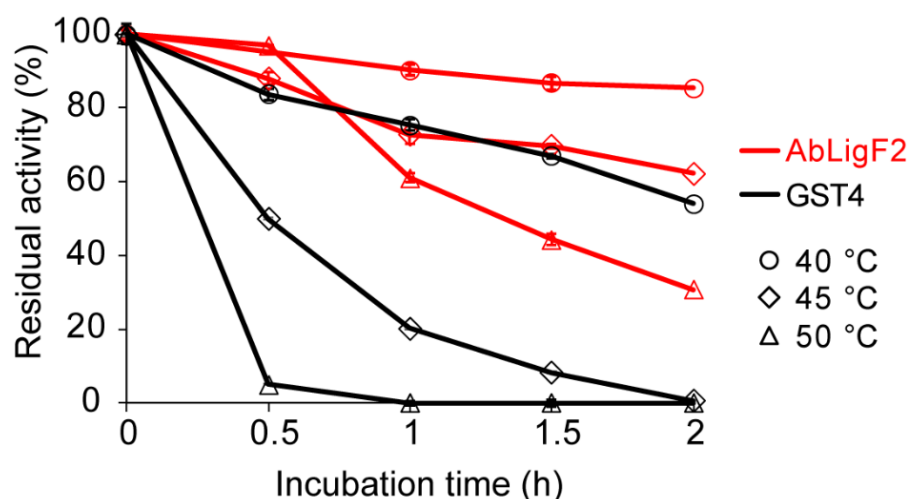


Figure 3-11. AbLigF2 の耐熱性試験

AbLigF2とGST4を40℃、45℃、50℃で0.5~2時間プレインキュベートした。前処理後のAbLigF2またはGST4と1mMMPHPVを2mMGSH存在下、25℃、pH10で30分間反応させた。AbLigF2は赤で示す。GST4は黒で示す。40℃(丸)、45℃(四角)、50℃(三角)はプレインキュベート温度を示す。最大活性を100%と定義した相対活性で評価した。エラーバーは独立した3回の実験による平均値の標準誤差を示す。

## 触媒アミノ酸残基の同定

UniProt構造データベースで予測されたAbLigF2の構造モデルを、以前に報告されたLigF酵素の結晶構造に重ね合わせた(Figure 3-12)。反応を触媒する同定されたアミノ酸残基がグルタチオンのチオール基に隣接していたことから、AbLigF2の触媒部位も同様にGSHのシステインに最も近いアミノ酸であると仮定した(Helmich *et al.* 2016; Kontur *et al.* 2019; Osman *et al.* 2019)。構造モデルでは、以前に同定された触媒部位N13とS14はGSHの近くに位置した(Figure 3-12)。GSHチオール基と各残基との距離は、それぞれ2.7Åと6.1Åであった。さらに、これらの残基とチオール基を介して対面に位置するS115も同様にチオール基に接近しており、その距離は6.2Åであった。これらのアミノ酸をアラニンに置換して機能欠損変異型酵素を作製し、速度論的解析を行った(Figure 3-13)。MPHPVに対するAbLigF2野生型のVmaxとKmは、それぞれ $143.83 \pm 6.50$  mUと $0.16 \pm 0.03$  mMだった(Table 3-5)。これまでに報告された*Novosphingobium* sp. MBES04株由来のGST4は1300 mU、0.47 mMであった(Ohta *et al.* 2015)。OhtaらによるGST4の結果と比較するとKm値は約3倍、Vmaxは1桁低かったが、測定時の基質濃度や反応温度が異なっており、直接比較す

ることはできなかった。本研究では、野生型酵素に対する各変異体酵素の  $V_{max}$  は、S14A では 16%、N13A では 0.2%であり、N13AS14A の 2 つの変異体挿入体では 0.1%に減少した。さらに、 $K_m$  値は S14 によって最も影響を受け、その値は 2.9 倍増加した。N13 と S14 は、チオール基との水素結合を介してアニオンを安定化させる役割を果たしていることが示唆されている(Helmich *et al.* 2016)。LigF と BaeA で提唱されたグルタチオンの活性化と触媒活性における N13 と S14 の重要性は、AbLigF2 でも同様であった。S115 の変異は  $V_{max}$  を最大 0.7%低下させたが、 $K_m$  値には影響しなかった。これらの結果は、S115 は基質結合には関与しないが、活性には重要であることを示唆している。S115 の位置を考慮すると、求核攻撃によって押し出された脱離基は S115 を介して安定化されると考えられた。本研究は、立体反転を伴う  $SN_2$  機構で進行する  $\beta$ -etherase 反応における S115 の寄与を初めて明らかにしたものである。Figure 3-5 に示したアミノ酸配列のアラインメントによると、N13 と S14 は多くの酵素で高度に保存されていた。一方、S115 は  $\beta$ -etherase 活性が確認された LigF, BaeA, LigF2 ファミリーでは保存されていたが、機能未確認の酵素では置換されていた。今後、データベースマイニングを用いた新規酵素開発において、S115 の保存性は  $\beta$ -etherase を高精度に探索するための指標となると考えられる。

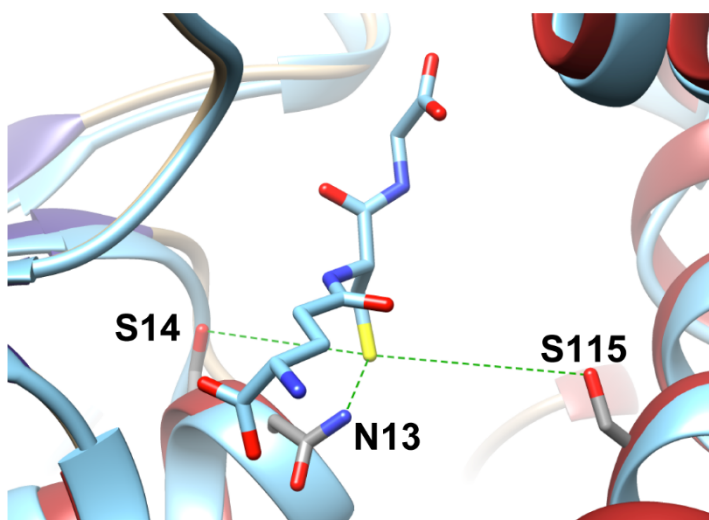


Figure 3-12. AbLigF2 構造モデルと GSH 近傍部位

AbLigF2 のモデル構造は UniProt 構造データベース上の Accessions: A0A2Z5YSG1 を使用し、LigF の GSH ドッキング構造(PDB: 4xt0)と重ね合わせた。LigF を水色、AbLigF2 を褐色で示す。GSH のシステインの硫黄原子(黄)と、その近傍に位置する AbLigF2 のアミノ酸残基に由来する窒素原子(青)と酸素原子(赤)は破線(緑)で結んだ。

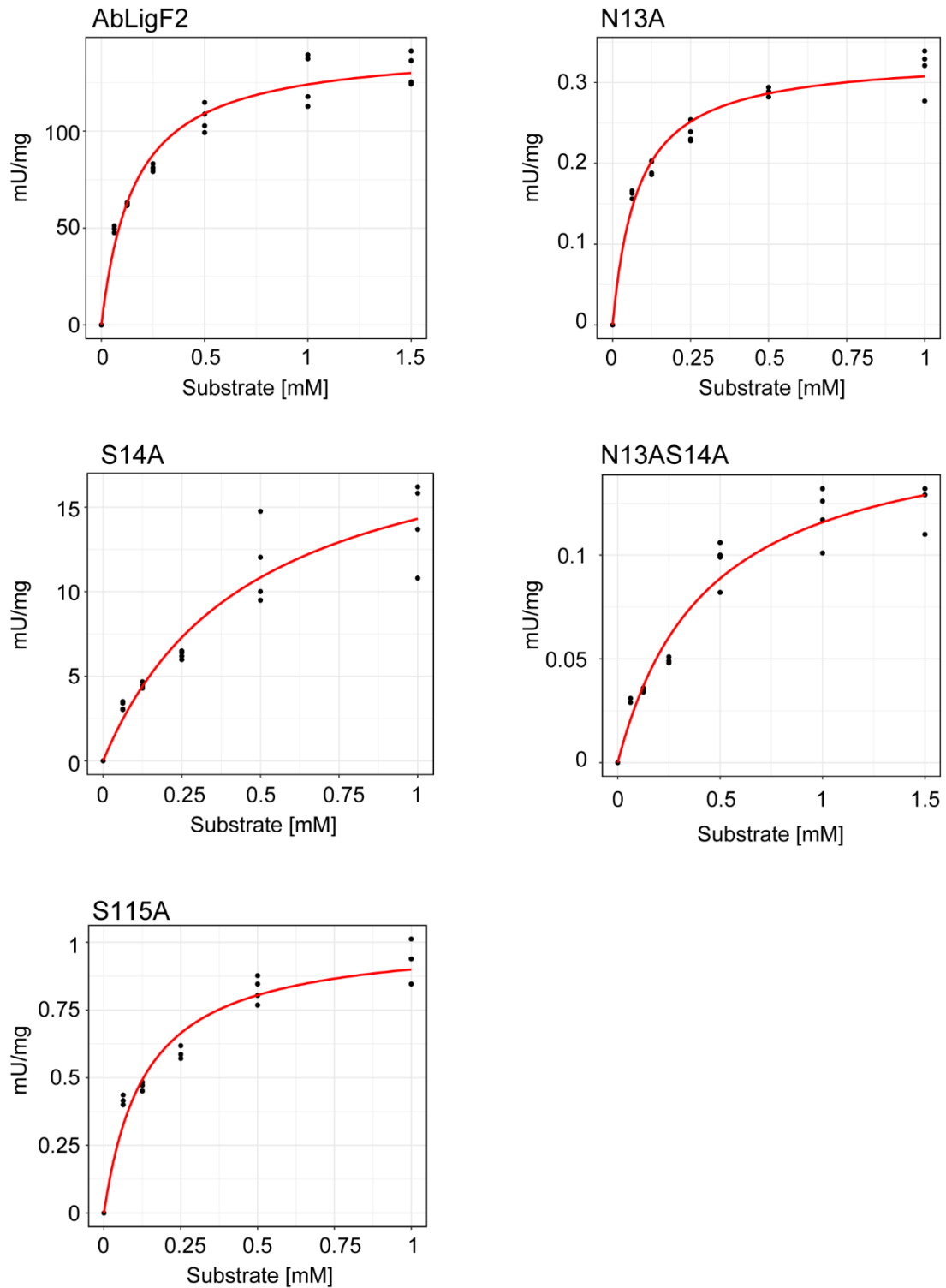


Figure 3-13. AbLigF2 野生型酵素と機能欠損型変異酵素を用いた酵素反応の飽和曲線  
 AbLigF2 野生型および変異型酵素(N13A、S14A、N13AS14A、S115A)を、基質濃度 0.06~1.0  
 または 1.5 mM の MHPV と 2 mM GSH 存在下で 25 °C で 30 分間反応させた。反応生成物中  
 のグアヤコルを定量し、酵素活性( $U = \mu\text{mol}/\text{min}$ )を算出した。

Table 3-5. AbLigF2 野生型と機能欠損変異型 N13A、S14A、S115A の反応速度パラメーター

Protein name	Vmax (mU)	Km (mM)
AbLigF2	143.83 ± 6.50	0.16 ± 0.03
AbLigF2 N13A	0.33 ± 0.01	0.08 ± 0.01
AbLigF2 S14A	21.01 ± 2.51	0.47 ± 0.12
AbLigF2 N13AS14A	0.16 ± 0.01	0.44 ± 0.07
AbLigF2 S115A	1.03 ± 0.10	0.14 ± 0.05

AbLigF2 野生型および変異型酵素(N13A、S14A、N13AS14A、S115A)を、基質濃度 0.06~1.0 または 1.5 mM の MPHPV と 2 mM GSH 存在下で 25 °C で 30 分間反応させた。反応生成物中のグアヤコルを定量し、酵素活性(U=  $\mu\text{mol}/\text{min}$ )を算出した(Figure 3-13)。反応速度パラメーターは、統計ソフト R を使用してミカエリス・メンテン式にフィッティングし、導入した。

#### 4. 本章の結論

フェニルプロパノンモノマーは、様々な化学物質を合成するための重要な前駆体である。このモノマーは、リグニンの主要な結合である  $\beta$ -O-4 結合を切断する  $\beta$ -ethrase system の酵素群によって触媒される三段階のカスケード反応で得られる。これまでにこれら酵素群をワンポットで反応しリグニン原料から特異的にフェニルプロパノンモノマーの生産が実証されてきた(Ohta *et al.* 2017; Picart *et al.* 2017; Gall *et al.* 2018)。近年、新規のリグニン分解細菌の候補として *Altererythrobacter* sp.B11 株が単離された(Maeda *et al.* 2018)。本章では本株のリグニン分解能を明らかに、高活性  $\beta$ -ethrase の探索を目的とした。B11 株は  $\beta$ -O-4 モデル化合物の高い変換能を有した。特に  $\beta$ -ethrase system 中間代謝物は即座に分解され、本反応酵素の極めて高い酵素活性が示唆された。BLAST 検索で候補となった 1 つのタンパク質を組換え発現させ特性を評価した。AbLigF2 は 45 °C で最大活性を示し、50 °C で 2 時間後も 30% の活性を維持し、これまでに報告された酵素の中で最も耐熱性が高かった。さらに、構造モデリングにより補酵素グルタチオンのチオール基近傍に位置する N13、S14、S115 を確認し、これらのアミノ酸残基が酵素活性の最大反応速度を 1~2 オーダーレベルで減少させた。S115 の反応への寄与は SN2 機構で進行する求核攻撃によって押し出された脱離基を安定化すると考えられ、本研究で実験的に初めて証明された。同定された触媒残基は LigF、LigF2、BaeA のいずれのクレードに分類される酵素において完全に保存されており、活性を持つ  $\beta$ -ethrase 探索の指標になると考えられる。本章は、AbLigF2 がリグニン利用のための耐熱性酵素として機能する可能性を示唆するとともに、その触媒機構に関する知見を与えるものだった。



## 第4章 総括

陸域有機物の主な構成成分はセルロース、ヘミセルロース、リグニンからなる。自然界ではこれらの陸域有機物は河川を通じて海洋環境へと流入し、海域にも広く分布している。これだけでなく、製紙およびパルプ産業の廃液を通じて人的に数百万トンのリグニンおよびリグニン誘導体が、環境中に放出され占拠を拡大する。リグニンは芳香環に3つの炭素側鎖を持つモノマーユニットがラジカル重合した複雑なランダムポリマー構造を持ち、植物体に生分解抵抗性を付与する。白色腐朽菌は、酸化性的リグニン分解酵素を分泌し、自然界におけるリグニン第一分解者となる。解重合されたリグニンフラグメントは細菌が体内に取り込みエネルギー源に変換しながら多様な変換経路により最終的に水と二酸化炭素まで無機化される。

バイオマス利用の観点からリグニンは芳香族を含むほぼ唯一のバイオマスであり、化石資源を代替し、高付加価値材料の創出への変換が期待されている。近年では細菌が持つ特異的な変換酵素や多様な代謝能を利用したバイオ変換技術に基づくリグニンの高付加価値化が環境負荷の低い手法として脚光を浴びている。しかし、化学プロセスと比較した時の変換効率の低さや酵素の安定性が課題となっている。これまで  $\alpha$ -proteobacteria 綱 Sphingomonadale 目細菌である *Novosphingobium* sp. MBES04 株を対象に研究が進めてきた。MBES04 株はリグニン主要結合  $\beta$ -O-4 結合を多段階反応で開裂する  $\beta$ -etherase system を保有する。本反応で得られるフェニルプロパンモノマーは塗料や、薬、機能性食品、化粧品などに転用が見込まれ、リグニン高付加価値科に向けたプラットフォーム化合物である。興味深いことに MBES04 株は  $\beta$ -etherase system の下流代謝セットは保有せず産物を菌体外に排出した。本研究では本株の特異な特性を活かして、リグニン断片からのフェニルプロパンモノマー生産宿主として MBES04 株を活用することを検討した。微生物法を用いたリグニン変換としてはイタコン酸(Elmore *et al.* 2021)やムコン酸(Almqvist *et al.* 2021)を産生する報告があるが、その生産物はリグニンの基本構造である芳香環を開環して得られる有機酸であり、残念ながらリグニンの特有構造を逸失している。本研究ではリグニン特有の C6-C3 骨格構造を維持した化合物への変換を目指し、他の研究例と比較しても先端的な戦略である。

第2章では基本的なエネルギー獲得経路を理解し、リグニンに対する代謝生理学的適応の基礎的理解を目的とした。本株は解糖系の一部に欠損が見られた一方で酸化リン酸化のセットを保有し、これが本株のエネルギー獲得に重要な経路と考えられた。リグニン由来の芳香族モノマー代謝も充足しており、単一炭素源として生存する以前の研究結果と一致した(Ohta *et al.* 2012)。トランスクリプトーム解析では  $\beta$ -etherase system のターゲット化合物である GGGE と APA-リグニンに共通して4つの遺伝子からなる遺伝子クラスターが強く発現誘導された。最も強い誘導は 2,4-dihydroxyacetophenone dioxygenase と推測され、これは C6-C2 化合物を C6-C1 化合物へと酸化分解し、エネルギー生産を担うことが予想された。その他に多剤耐性遺伝子や薬剤排出に関わる遺伝子が特異的に発現上昇した。G-II 遺伝子クラスターの発現は  $\beta$ -etherase system から生産されるフェニルプロパンモノマーがエフェクターとして機能していた。これらの結果は、MBES04 株の  $\beta$ -etherase system は常にアクティブでリグニン断片を感知すると即座にフェニルプロパンモノマーに変換し、全体的な遺伝子発現を促進させた。芳香族化合物からのエネルギー獲得と毒性物質への耐性獲得の両者を担う遺伝子を誘導することは、このセンシング機能は本株が備えた生存戦略であると考えられた。このようなリグニンセンシング機能をバイオマス変換細菌に搭載することで、バイオマス原料を感知して標的代謝系を制御する微生物の開発へと応用できる。



$\beta$ -Etherase system をリグニン微生物変換のツールとして利用するためには代謝系の高活性化が不可欠である。新規  $\beta$ -etherase や改良に向けた有効変異点を探索するためには、まずは  $\beta$ -etherase system の個々の反応特性や反応機構の理解が重要となる。第 3 章では *Altererythrobacter*. B11 株から新規  $\beta$ -etherase を探索し、これまで詳細研究がなされていない LigF2 クレードに分類する  $\beta$ -etherase の詳細な反応特性解析に初めて着手した。AbLigF2 は耐熱性に優れ、高アルカリ条件で最大活性を示した。バイオマス抽出で多用するエタノールへの耐性も持っていた。これらの特性は酵素の構造的安定性に起因するものと考えているが、その情報は得られていない。 $\beta$ -Etherase 反応は立体反転を伴う SN2 反応で進行すると予測されていたが脱離基の安定に寄与するアミノ酸残基はこれまで同定されていなかった。本研究では GSH のチオール基に近接する AbLigF2 の 115 番セリンを機能的に欠損させた変異酵素を用いて、触媒活性に重要な反応点であることを証明した。SN2 反応機構の脱離基に関与するアミノ酸残基を同定し、反応機構の一端を明らかにした。

以上の結果はリグニン断片を原料としたフェニルプロパノンモノマー生産のための代謝再設計における基礎情報となる。MBES04 株は  $\beta$ -etherase system を稼働することでエネルギー不足に陥り、グルコースやアラニンの供給で産物が増産した。また APA-リグニンに対して排出ポンプ系を稼働させ、バイオマス抽出物に含まれる毒性化合物の解毒に強く応答した。したがって、 $\beta$ -etherase system の利用にはエネルギー供給、解毒をサポートする遺伝子を動員することが重要と考える。バイオマスには豊富な糖が含まれることから糖代謝の改善策として解糖系 EMP の欠損を補う必要がある。本来の特性からリグニン由来モノマーをエネルギー利用可能なことから、内因性バニリン代謝の増強やリグニン化合物からの  $\beta$ -酸化を介したエネルギー産生においてエネルギー律速反応である脱メチル化の高発現も効果的と考える(Venkatesagowda *et al.* 2021)。解毒の点ではバイオマスから放出される毒性物質の解毒と知られる酸化還元酵素の搭載も必須だろう(Liu *et al.* 2004; Jordan *et al.* 2011)。これらの追加の代謝系を本研究で見つかった制御領域下に置換もしくは追加することで、バイオマス存在下で物質生産を開始する新奇スマート細菌(Figure 4-1)の創出に貢献できる可能性がある。

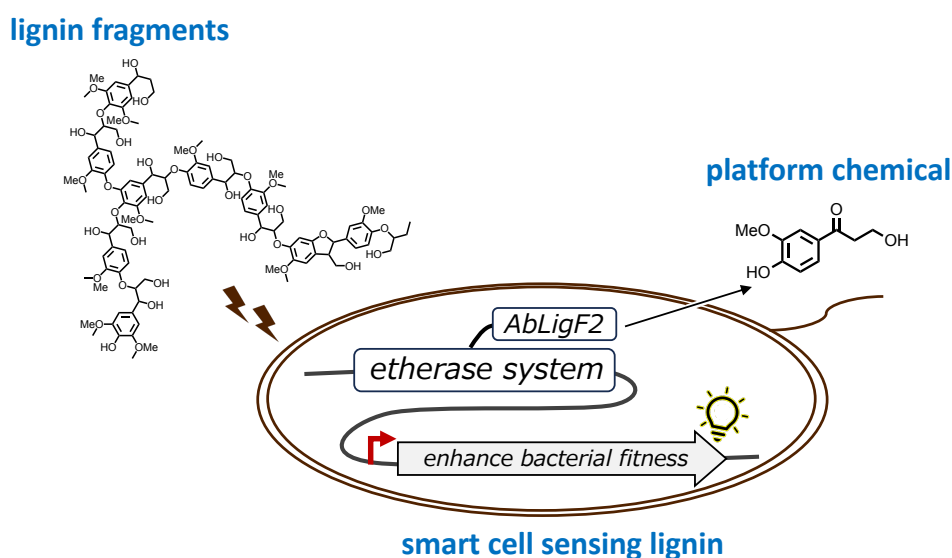


Figure 4-1. リグニンを感知して応答するスマートセル

## 参考文献

- Abdel-Hamid AM, Solbiati JO, Cann IKO. Insights into Lignin Degradation and its Potential Industrial Applications. *Advances in Applied Microbiology*. Vol 82. 2013.
- Akutsu M, Abe N, Sakamoto C *et al.* *Pseudomonas* sp. NGC7 as a microbial chassis for glucose-free muconate production from a variety of lignin-derived aromatics and its application to the production from sugar cane bagasse alkaline extract. *Bioresour Technol* 2022;**359**, DOI: 10.1016/j.biortech.2022.127479.
- Almqvist H, Veras H, Li K *et al.* Muconic Acid Production Using Engineered *Pseudomonas putida* KT2440 and a Guaiacol-Rich Fraction Derived from Kraft Lignin. *ACS Sustain Chem Eng* 2021;**9**, DOI: 10.1021/acssuschemeng.1c00933.
- Anderson EM, Stone ML, Katahira R *et al.* Differences in S/G ratio in natural poplar variants do not predict catalytic depolymerization monomer yields. *Nat Commun* 2019;**10**, DOI: 10.1038/s41467-019-09986-1.
- Araki T, Tanatani K, Kamimura N *et al.* 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. *Appl Environ Microbiol* 2020;**86**, DOI: 10.1128/AEM.01712-20.
- Araki T, Umeda S, Kamimura N *et al.* Regulation of vanillate and syringate catabolism by a MarR-type transcriptional regulator DesR in *Sphingobium* sp. SYK-6. *Sci Rep* 2019;**9**, DOI: 10.1038/s41598-019-54490-7.
- Armstrong RN. Structure, catalytic mechanism, and evolution of the glutathione transferases. *Chem Res Toxicol* 1997;**10**, DOI: 10.1021/tx960072x.
- Austin S, Kontur WS, Ulbrich A *et al.* Metabolism of Multiple Aromatic Compounds in Corn Stover Hydrolysate by *Rhodospseudomonas palustris*. *Environ Sci Technol* 2015;**49**, DOI: 10.1021/acs.est.5b02062.
- Beckham GT, Johnson CW, Karp EM *et al.* Opportunities and challenges in biological lignin valorization. *Curr Opin Biotechnol* 2016;**42**:40–53.
- Behling R, Valange S, Chatel G. Heterogeneous catalytic oxidation for lignin valorization into valuable chemicals: What results? What limitations? What trends? *Green Chemistry* 2016;**18**, DOI: 10.1039/c5gc03061g.
- Bianchi TS. The role of terrestrially derived organic carbon in the coastal ocean: A changing paradigm and the priming effect. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011;**108**, DOI: 10.1073/pnas.1017982108.
- Bugg TDH, Ahmad M, Hardiman EM *et al.* Pathways for degradation of lignin in bacteria and fungi. *Nat Prod Rep* 2011a;**28**, DOI: 10.1039/c1np00042j.
- Bugg TDH, Ahmad M, Hardiman EM *et al.* The emerging role for bacteria in lignin degradation and bio-product formation. *Curr Opin Biotechnol* 2011b;**22**, DOI: 10.1016/j.copbio.2010.10.009.
- Chandra RP, Bura R, Mabee WE *et al.* Substrate pretreatment: The key to effective enzymatic hydrolysis of lignocellulosics? *Adv Biochem Eng Biotechnol* 2007;**108**, DOI: 10.1007/10\_2007\_064.
- Chen YF, Chao H, Zhou NY. The catabolism of 2,4-xyleneol and p-cresol share the enzymes for the oxidation of para-methyl group in *Pseudomonas putida* NCIMB 9866. *Appl Microbiol Biotechnol* 2014;**98**, DOI: 10.1007/s00253-013-5001-z.
- Climate Change 2021—The Physical Science Basis. *Chemistry International* 2021;**43**, DOI: 10.1515/ci-2021-0407.

- Colclough AL, Scadden J, Blair JMA. TetR-family transcription factors in Gram-negative bacteria: Conservation, variation and implications for efflux-mediated antimicrobial resistance. *BMC Genomics* 2019;**20**, DOI: 10.1186/s12864-019-6075-5.
- Crawford DL, Pometto AL, Crawford RL. Lignin degradation by *Streptomyces viridosporus*: Isolation and characterization of a new polymeric lignin degradation intermediate. *Appl Environ Microbiol* 1983;**45**, DOI: 10.1128/aem.45.3.898-904.1983.
- Cunane LM, Chen ZW, Shamala N *et al.* Structures of the flavocytochrome p-cresol methylhydroxylase and its enzyme-substrate complex: Gated substrate entry and proton relays support the proposed catalytic mechanism. *J Mol Biol* 2000;**295**, DOI: 10.1006/jmbi.1999.3290.
- Doherty WOS, Mousavioun P, Fellows CM. Value-adding to cellulosic ethanol: Lignin polymers. *Ind Crops Prod* 2011;**33**, DOI: 10.1016/j.indcrop.2010.10.022.
- Elmore JR, Dexter GN, Salvachúa D *et al.* Production of itaconic acid from alkali pretreated lignin by dynamic two stage bioconversion. *Nat Commun* 2021;**12**, DOI: 10.1038/s41467-021-22556-8.
- Fagervold SK, Galand PE, Zbinden M *et al.* Sunken woods on the ocean floor provide diverse specialized habitats for microorganisms. *FEMS Microbiol Ecol* 2012;**82**, DOI: 10.1111/j.1574-6941.2012.01432.x.
- de Farias Silva CE, Bertucco A. Bioethanol from microalgae and cyanobacteria: A review and technological outlook. *Process Biochemistry* 2016;**51**, DOI: 10.1016/j.procbio.2016.02.016.
- Ferrer JL, Austin MB, Stewart C *et al.* Structure and function of enzymes involved in the biosynthesis of phenylpropanoids. *Plant Physiology and Biochemistry* 2008;**46**, DOI: 10.1016/j.plaphy.2007.12.009.
- Gall DL, Kontur WS, Lan W *et al.* In vitro enzymatic depolymerization of lignin with release of syringyl, guaiacyl, and tricin units. *Appl Environ Microbiol* 2018;**84**, DOI: 10.1128/AEM.02076-17.
- Gall DL, Ralph J, Donohue TJ *et al.* A group of sequence-related sphingomonad enzymes catalyzes cleavage of  $\beta$ -aryl ether linkages in lignin  $\beta$ -guaiacyl and  $\beta$ -syringyl ether dimers. *Environ Sci Technol* 2014;**48**, DOI: 10.1021/es503886d.
- Hatakka A. Lignin-modifying enzymes from selected white-rot fungi: production and role from in lignin degradation. *FEMS Microbiol Rev* 1994;**13**, DOI: 10.1111/j.1574-6976.1994.tb00039.x.
- Hanh DD, Elkasaby T, Kawaguchi H *et al.* Enhanced production of itaconic acid from enzymatic hydrolysate of lignocellulosic biomass by recombinant *Corynebacterium glutamicum*. *J Biosci Bioeng* 2023;**136**, DOI: 10.1016/j.jbiosc.2023.03.011.
- Helmich KE, Pereira JH, Gall DL *et al.* Structural basis of stereospecificity in the bacterial enzymatic cleavage of  $\beta$ -aryl ether bonds in lignin. *Journal of Biological Chemistry* 2016;**291**, DOI: 10.1074/jbc.M115.694307.
- Higuchi Y, Aoki S, Takenami H *et al.* Bacterial catabolism of  $\beta$ -hydroxypropiovanillone and  $\beta$ -hydroxypropiosyringone produced in the reductive cleavage of arylglycerol- $\beta$ -aryl ether in lignin. *Appl Environ Microbiol* 2018;**84**, DOI: 10.1128/AEM.02670-17.
- Higuchi Y, Ishimaru H, Yoshikawa T *et al.* Successful selective production of vanillic acid from depolymerized sulfite lignin and its application to poly(ethylene vanillate) synthesis. *Bioresour Technol* 2023;**385**, DOI: 10.1016/j.biortech.2023.129450.

- Higuchi Y, Kato R, Tsubota K *et al.* Discovery of novel enzyme genes involved in the conversion of an arylglycerol- $\beta$ -aryl ether metabolite and their use in generating a metabolic pathway for lignin valorization. *Metab Eng* 2019;**55**, DOI: 10.1016/j.ymben.2019.08.002.
- Himmel ME, Ding SY, Johnson DK *et al.* Biomass recalcitrance: Engineering plants and enzymes for biofuels production. *Science (1979)* 2007;**315**, DOI: 10.1126/science.1137016.
- Jordan DB, Braker JD, Bowman MJ *et al.* Kinetic mechanism of an aldehyde reductase of *Saccharomyces cerevisiae* that relieves toxicity of furfural and 5-hydroxymethylfurfural. *Biochim Biophys Acta Proteins Proteom* 2011;**1814**, DOI: 10.1016/j.bbapap.2011.08.011.
- Kaczmarczyk A, Vorholt JA, Francez-Charlot A. Cumate-inducible gene expression system for sphingomonads and other Alphaproteobacteria. *Appl Environ Microbiol* 2013;**79**, DOI: 10.1128/AEM.02296-13.
- Kamimura N, Sakamoto S, Mitsuda N *et al.* Advances in microbial lignin degradation and its applications. *Curr Opin Biotechnol* 2019;**56**, DOI: 10.1016/j.copbio.2018.11.011.
- Kamimura N, Takahashi K, Mori K *et al.* Bacterial catabolism of lignin-derived aromatics: New findings in a recent decade: Update on bacterial lignin catabolism. *Environ Microbiol Rep* 2017;**9**, DOI: 10.1111/1758-2229.12597.
- Kamimura N, Takamura K, Hara H *et al.* Regulatory system of the protocatechuate 4,5-cleavage pathway genes essential for lignin downstream catabolism. *J Bacteriol* 2010;**192**, DOI: 10.1128/JB.00215-10.
- Kasai D, Kamimura N, Tani K *et al.* 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* 2012;**332**, DOI: 10.1111/j.1574-6968.2012.02576.x.
- Klinke HB, Thomsen AB, Ahring BK. Inhibition of ethanol-producing yeast and bacteria by degradation products produced during pre-treatment of biomass. *Appl Microbiol Biotechnol* 2004;**66**, DOI: 10.1007/s00253-004-1642-2.
- Kohlstedt M, Starck S, Barton N *et al.* From lignin to nylon: Cascaded chemical and biochemical conversion using metabolically engineered *Pseudomonas putida*. *Metab Eng* 2018;**47**, DOI: 10.1016/j.ymben.2018.03.003.
- Kontur WS, Bingman CA, Olmsted CN *et al.* *Novosphingobium aromaticivorans* uses a Nu-class glutathione S-transferase as a glutathione lyase in breaking the -aryl ether bond of lignin. *Journal of Biological Chemistry* 2018;**293**, DOI: 10.1074/jbc.RA117.001268.
- Kontur WS, Olmsted CN, Yusko LM *et al.* A heterodimeric glutathione S-transferase that stereospecifically breaks lignin's (R)-aryl ether bond reveals the diversity of bacterial -etherases. *Journal of Biological Chemistry* 2019;**294**, DOI: 10.1074/jbc.RA118.006548.
- Kwon KK, Woo JH, Yang SH *et al.* *Altererythrobacter epoxidivorans* gen. nov., sp. nov., an epoxide hydrolase-active, mesophilic marine bacterium isolated from cold-seep sediment, and reclassification of *Erythrobacter luteolus* Yoon *et al.* 2005 as *Altererythrobacter luteolus* comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 2007;**57**, DOI: 10.1099/ijms.0.64863-0.
- Lee I, Kim YO, Park SC *et al.* OrthoANI: An improved algorithm and software for calculating average nucleotide identity. *Int J Syst Evol Microbiol* 2016;**66**, DOI: 10.1099/ijsem.0.000760.

- Lee S, Kang M, Bae JH *et al.* Bacterial Valorization of Lignin: Strains, Enzymes, Conversion Pathways, Biosensors, and Perspectives. *Front Bioeng Biotechnol* 2019;**7**, DOI: 10.3389/fbioe.2019.00209.
- Levy-Booth DJ, Hashimi A, Roccor R *et al.* Genomics and metatranscriptomics of biogeochemical cycling and degradation of lignin-derived aromatic compounds in thermal swamp sediment. *ISME Journal* 2021;**15**:879–93.
- Liao H, Li Y, Zhang M *et al.* *Altererythrobacter mangrovi* sp. nov., isolated from mangrove sediment. *Int J Syst Evol Microbiol* 2017;**67**, DOI: 10.1099/ijsem.0.002393.
- Linger JG, Vardon DR, Guarnieri MT *et al.* Lignin valorization through integrated biological funneling and chemical catalysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014;**111**, DOI: 10.1073/pnas.1410657111.
- Liu ZL, Slininger PJ, Dien BS *et al.* Adaptive response of yeasts to furfural and 5-hydroxymethylfurfural and new chemical evidence for HMF conversion to 2,5-bis-hydroxymethylfuran. *J Ind Microbiol Biotechnol* 2004;**31**, DOI: 10.1007/s10295-004-0148-3.
- de Lorenzo V, Timmis KN. Analysis and construction of stable phenotypes in gram-negative bacteria with Tn5- and Tn10-derived minitransposons. *Methods Enzymol* 1994;**235**, DOI: 10.1016/0076-6879(94)35157-0.
- Maeda AH, Nishi S, Ishii S *et al.* Complete genome sequence of *Altererythrobacter* sp. strain B11, an aromatic monomer-degrading bacterium, isolated from deep-sea sediment under the seabed off Kashima, Japan. *Genome Announc* 2018;**6**, DOI: 10.1128/genomeA.00200-18.
- Martínez ÁT, Speranza M, Ruiz-Dueñas FJ *et al.* Biodegradation of lignocellulosics: Microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. *International Microbiology*. Vol 8. 2005.
- Masai E, Katayama Y, Kubota S *et al.* A bacterial enzyme degrading the model lignin compound  $\beta$ -etherase is a member of the glutathione-S-transferase superfamily. *FEBS Lett* 1993;**323**, DOI: 10.1016/0014-5793(93)81465-C.
- Masai E, Ichimura A, Sato Y *et al.* Roles of the enantioselective glutathione S-transferases in cleavage of  $\beta$ -aryl ether. *J Bacteriol* 2003;**185**, DOI: 10.1128/JB.185.6.1768-1775.2003.
- Masai E, Katayama Y, Fukuda M. Genetic and biochemical investigations on bacterial catabolic pathways for lignin-derived aromatic compounds. *Biosci Biotechnol Biochem* 2007;**71**, DOI: 10.1271/bbb.60437.
- Meier-Kolthoff JP, Auch AF, Klenk HP *et al.* Genome sequence-based species delimitation with confidence intervals and improved distance functions. *BMC Bioinformatics* 2013;**14**, DOI: 10.1186/1471-2105-14-60.
- Miedes E, Vanholme R, Boerjan W *et al.* The role of the secondary cell wall in plant resistance to pathogens. *Front Plant Sci* 2014;**5**, DOI: 10.3389/fpls.2014.00358.
- Miller JH. Experiments in molecular genetics Bacterial genetics - *E. coli*. *Cold Spring Harbor Laboratory* 1972;**50**.
- Mosier N, Wyman C, Dale B *et al.* Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresour Technol* 2005;**96**, DOI: 10.1016/j.biortech.2004.06.025.
- Mu R, Hong X, Ni Y *et al.* Recent trends and applications of cellulose nanocrystals in food industry. *Trends Food Sci Technol* 2019;**93**, DOI: 10.1016/j.tifs.2019.09.013.

- Notonier S, Werner AZ, Kuatsjah E *et al.* Metabolism of syringyl lignin-derived compounds in *Pseudomonas putida* enables convergent production of 2-pyrone-4,6-dicarboxylic acid. *Metab Eng* 2021;**65**, DOI: 10.1016/j.ymben.2021.02.005.
- Nies DH. Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. *FEMS Microbiol Rev* 2003;**27**, DOI: 10.1016/S0168-6445(03)00048-2.
- Nishimura H, Yamada M, Watanabe T. Method for isolating, from plant biomass, at least one selected from group consisting of lignin, hemicellulose, lignin-polysaccharide composite, cellulose, and hemicellulose-cellulose composite, PCT Application pending, PCT/JP2021/040159.
- Ohta Y, Hasegawa R, Kurosawa K *et al.* Enzymatic Specific Production and Chemical Functionalization of Phenylpropanone Platform Monomers from Lignin. *ChemSusChem* 2017;**10**, DOI: 10.1002/cssc.201601235.
- Ohta Y, Nishi S, Haga T *et al.* Screening and Phylogenetic Analysis of Deep-Sea Bacteria Capable of Metabolizing Lignin-Derived Aromatic Compounds. *Open Journal of Marine Science* 2012;**02**, DOI: 10.4236/ojms.2012.24021.
- Ohta Y, Nishi S, Hasegawa R *et al.* Combination of six enzymes of a marine *Novosphingobium* converts the stereoisomers of  $\beta$ -O-4 lignin model dimers into the respective monomers. *Sci Rep* 2015;**5**, DOI: 10.1038/srep15105.
- Osman WHW, Mikami B, Saka N *et al.* Identification of key residues for activities of atypical glutathione S-transferase of *Ceriporiopsis subvermispora*, a selective degrader of lignin in woody biomass, by crystallography and functional mutagenesis. *Int J Biol Macromol* 2019;**132**, DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2019.03.199.
- Palamuru S, Dellas N, Pearce SL *et al.* Phylogenetic and kinetic characterization of a suite of dehydrogenases from a newly isolated bacterium, strain SG61-1L, that catalyze the turnover of guaiacylglycerol- $\beta$ -guaiacyl ether stereoisomers. *Appl Environ Microbiol* 2015;**81**, DOI: 10.1128/AEM.01573-15.
- Perez JM, Kontur WS, Gehl C *et al.* Redundancy in Aromatic O-Demethylation and Ring-Opening Reactions in *Novosphingobium aromaticivorans* and Their Impact in the Metabolism of Plant-Derived Phenolics. *Appl Environ Microbiol* 2021;**87**, DOI: 10.1128/AEM.02794-20.
- Perez JM, Sener C, Misra S *et al.* Integrating lignin depolymerization with microbial funneling processes using agronomically relevant feedstocks. *Green Chemistry* 2022;**24**, DOI: 10.1039/d1gc03592d.
- Picart P, Liu H, Grande PM *et al.* Multi-step biocatalytic depolymerization of lignin. *Appl Microbiol Biotechnol* 2017;**101**, DOI: 10.1007/s00253-017-8360-z.
- Picart P, Müller C, Mottweiler J *et al.* From gene towards selective biomass valorization: Bacterial  $\beta$ -etherases with catalytic activity on lignin-like polymers. *ChemSusChem* 2014;**7**, DOI: 10.1002/cssc.201402465.
- Prates ET, Crowley MF, Skaf MS *et al.* Catalytic Mechanism of Aryl-Ether Bond Cleavage in Lignin by LigF and LigG. *Journal of Physical Chemistry B* 2019;**123**, DOI: 10.1021/acs.jpcc.9b06243.
- Rabemanolontsoa H, Saka S. Comparative study on chemical composition of various biomass species. *RSC Adv* 2013;**3**, DOI: 10.1039/c3ra22958k.
- Ragauskas AJ, Beckham GT, Biddy MJ *et al.* Lignin valorization: Improving lignin processing in the biorefinery. *Science (1979)* 2014;**344**, DOI: 10.1126/science.1246843.

- Reiter J, Strittmatter H, Wiemann LO *et al.* Enzymatic cleavage of lignin  $\beta$ -O-4 aryl ether bonds via net internal hydrogen transfer. *Green Chemistry* 2013;**15**, DOI: 10.1039/c3gc40295a.
- Sainsbury PD, Hardiman EM, Ahmad M *et al.* Breaking down lignin to high-value chemicals: The conversion of lignocellulose to vanillin in a gene deletion mutant of *Rhodococcus jostii* RHA1. *ACS Chem Biol* 2013;**8**, DOI: 10.1021/cb400505a.
- Sakai S, Tsuchida Y, Okino S *et al.* Effect of lignocellulose-derived inhibitors on growth of and ethanol production by growth-arrested *Corynebacterium glutamicum* R. *Appl Environ Microbiol* 2007;**73**, DOI: 10.1128/AEM.02880-06.
- Salvachúa D, Ryzdzak T, Auwae R *et al.* Metabolic engineering of *Pseudomonas putida* for increased polyhydroxyalkanoate production from lignin. *Microb Biotechnol* 2020;**13**, DOI: 10.1111/1751-7915.13481.
- Sato Y, Moriuchi H, Hishiyama S *et al.* Identification of three alcohol dehydrogenase genes involved in the stereospecific catabolism of arylglycerol- $\beta$ -aryl ether by *Sphingobium* sp. strain SYK-6. *Appl Environ Microbiol* 2009;**75**, DOI: 10.1128/AEM.00880-09.
- Seaton SC, Neidle EL. Chapter 10: Using Aerobic Pathways for Aromatic Compound Degradation to Engineer Lignin Metabolism. *RSC Energy and Environment Series*. Vol 2018-January. 2018.
- Silby MW, Winstanley C, Godfrey SAC *et al.* *Pseudomonas* genomes: Diverse and adaptable. *FEMS Microbiol Rev* 2011;**35**, DOI: 10.1111/j.1574-6976.2011.00269.x.
- Suhas, Gupta VK, Carrott PJM *et al.* Cellulose: A review as natural, modified and activated carbon adsorbent. *Bioresour Technol* 2016;**216**, DOI: 10.1016/j.biortech.2016.05.106.
- Tanamura K, Abe T, Kamimura N *et al.* Characterization of the third glutathione S-transferase gene involved in enantioselective cleavage of the  $\beta$ -aryl ether by *Sphingobium* sp. strain SYK-6. *Biosci Biotechnol Biochem* 2011;**75**, DOI: 10.1271/bbb.110525.
- Taghizadeh-Alisaraei A, Motevali A, Ghobadian B. Ethanol production from date wastes: Adapted technologies, challenges, and global potential. *Renew Energy* 2019;**143**, DOI: 10.1016/j.renene.2019.05.048.
- Uchendu SN, Rafalowski A, Schick DL *et al.* Identifying metabolic pathway intermediates that modulate the gallate dioxygenase (DesB) from *Sphingobium* sp. strain SYK-6. *Process Biochemistry* 2021;**102**, DOI: 10.1016/j.procbio.2021.01.019.
- Vagts J, Kalvelage K, Weiten A *et al.* Responsiveness of *Aromatoleum aromaticum* EbN1T to Lignin-Derived Phenylpropanoids. *Appl Environ Microbiol* 2021;**87**, DOI: 10.1128/AEM.03140-20.
- Varman AM, He L, Follenfant R *et al.* 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* 2016;**113**, DOI: 10.1073/pnas.1606043113.
- Vanholme R, Demedts B, Morreel K *et al.* Lignin biosynthesis and structure. *Plant Physiol* 2010;**153**, DOI: 10.1104/pp.110.155119.
- Venkatesagowda B, Dekker RFH. Microbial demethylation of lignin: Evidence of enzymes participating in the removal of methyl/methoxyl groups. *Enzyme Microb Technol* 2021;**147**, DOI: 10.1016/j.enzmictec.2021.109780.

- Voß H, Heck CA, Schallmeyer M *et al.* Database mining for novel bacterial  $\beta$ -etherases, glutathione-dependent lignin-degrading enzymes. *Appl Environ Microbiol* 2020;**86**, DOI: 10.1128/AEM.02026-19.
- Wan Osman WH, Mikami B, Saka N *et al.* Structure of a serine-type glutathione S-transferase of *Ceriporiopsis subvermispora* and identification of the enzymatically important non-canonical residues by functional mutagenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 2019;**510**, DOI: 10.1016/j.bbrc.2019.01.076.
- Wu YH, Cheng H, Zhou P *et al.* Complete genome sequence of the heavy metal resistant bacterium *Altererythro bacter atlanticus* 26DY36T, isolated from deep-sea sediment of the North Atlantic Mid-ocean ridge. *Mar Genomics* 2015;**24**, DOI: 10.1016/j.margen.2015.10.004.
- Wu YH, Xu L, Meng FX *et al.* *Altererythro bacter atlanticus* sp. nov., isolated from deep-sea sediment. *Int J Syst Evol Microbiol* 2014;**64**, DOI: 10.1099/ij.s.0.052951-0.
- Yoon SH, Ha S min, Lim J *et al.* A large-scale evaluation of algorithms to calculate average nucleotide identity. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology* 2017;**110**, DOI: 10.1007/s10482-017-0844-4.
- Zakzeski J, Bruijninx PCA, Jongerius AL *et al.* The catalytic valorization of lignin for the production of renewable chemicals. *Chem Rev* 2010;**110**, DOI: 10.1021/cr900354u.
- Zgurskaya HI, Mallocci G, Chandar B *et al.* Bacterial efflux transporters' polyspecificity – a gift and a curse? *Curr Opin Microbiol* 2021;**61**, DOI: 10.1016/j.mib.2021.03.009.
- Zhang X, Bremer H. Control of the *Escherichia coli* rrnB P1 promoter strength by ppGpp. *Journal of Biological Chemistry* 1995;**270**, DOI: 10.1074/jbc.270.19.11181.
- 大田ゆかり *et al.*, *Novosphingobium* sp. MBES04株のリグニン関連物質存在下におけるトランスクリプトーム解析. 第63回リグニン討論会講演集, 182-183 (2018).
- 経済産業省 資源エネルギー庁. エネルギー白書2020.



## 謝辞

本博士論文は多くの方々のご支援のおかげで完成に至りました。研究を遂行する上で欠かせない食健康科学教育研究センターという素晴らしい研究の場を提供して頂き、熱心なご指導ご鞭撻を賜りました群馬大学学術研究院 粕谷健一教授、群馬大学食健康科学教育研究センター 大田ゆかり 講師に心より感謝の意を表します。

本論文の審査の労を賜るとともに貴重なご助言を頂きました群馬大学学術研究院 井上裕介教授、武田茂樹教授、大嶋孝之教授、浅川直紀教授に心より感謝致します。学生生活の様々な相談に乗ってくださった群馬大学大学院理工学府 理工学基盤部門 高橋浩教授に心より感謝致します。

研究室生活を支えてくださり共に研究に励んだ食健康科学教育研究センター大田研究室の皆様、心より感謝申し上げます。日頃から温かい励ましをいただき親身相談に乗ってくれた友人達に心より感謝いたします。どんな状況でも研究生活を応援してくれて、私の意思を尊重してくれた両親をはじめ家族全員に深く感謝致します。