

細菌におけるリグニン由来芳香族化合物の巧妙な立体選択的代謝システム

政井 英司

長岡技術科学大学 工学研究院 物質生物系

研究の目的

植物の主要な細胞壁成分であるリグニンは複雑な結合を持つ芳香族高分子であり、その莫大な賦存量から有効利用が望まれている。現在、細菌の代謝能を利用して、リグニンの化学的低分子化で得られる不均一な低分子芳香族化合物をポリマー原料へと集約的に変換する技術の開発が進められている¹。この技術開発に必要な代謝系の解明が *Sphingobium* sp. SYK-6 株を含めて進められてきたが、立体異性体を持つリグニン由来二量体化合物の代謝システムについては不明な点も多い^{2,3}。

β -1 型二量体化合物 [1,2-diguaiacylpropane-1,3-diol (DGPD)]は、*threo* と *erythro* の立体異性体を有し、それぞれに鏡像異性体が含まれる (Fig. 1)。SYK-6 株において、*threo* 体の DGPD I と II の変換には、 β -O-4 型二量体化合物の分解に関与する $\text{C}\alpha$ -dehydrogenase の LigD と LigL が主に働き⁴、それぞれ keto 型の DGPD-keto I と II に酸化される。続いて DGPD-keto II は $\text{C}\alpha$ -dehydrogenase に属する LdpB によって NADPH の存在下で *erythro*-DGPD (DGPD IV) に還元され、DGPD IV は SYK-6 株の粗酵素によって速やかに分解されることが示されている。

以上の様に、 β -1 型二量体化合物は、 $\text{C}\alpha$ 位のヒドロキシ基の立体化学を反転させる巧妙な立体異性体変換システムによって代謝されることが示唆されている。本研究では、 β -1 型二量体化合物代謝の全容解明を目的として、DGPD-keto I と *erythro*-DGPD (DGPD III と IV) の変換に関与する酵素遺伝子及びそれらの機能を明らかにすることを目的とした。

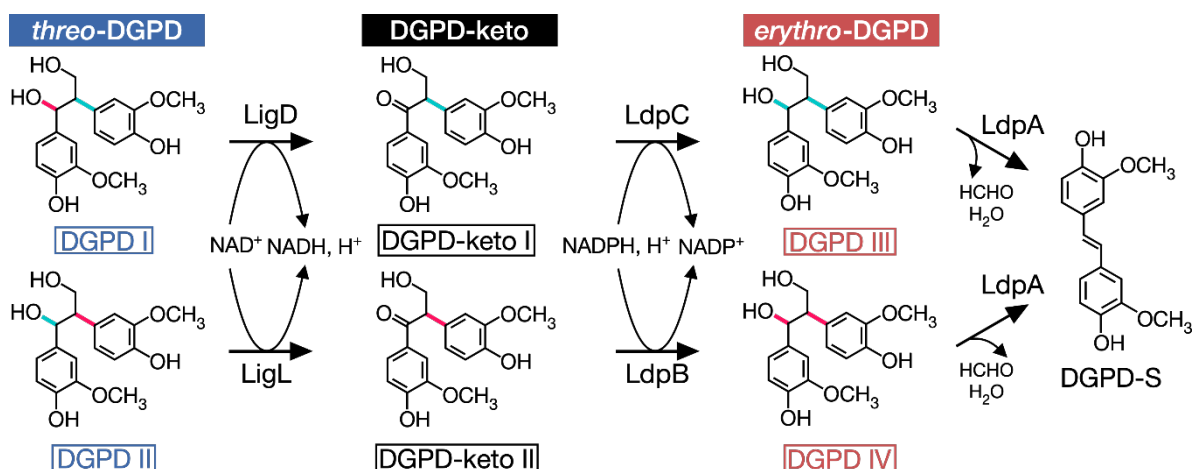


Fig. 1. *Sphingobium* sp. SYK-6 株における β -1 型二量体立体異性体の代謝システム。

方法

β -1 型二量体化合物は、森林総合研究所の菱山正二郎博士と National Renewable Energy Laboratory の片平類博士から提供を受けた。*erythro*-DGPD 変換酵素遺伝子を含むコスミドクローンは、*Sphingobium japonicum* UT26S 株に構築した SYK-6 株のコスミドライブラリーから *erythro*-DGPD 変換能を示す形質転換体を HPLC 分析によって選抜することで単離した。各遺伝子は大腸菌を宿主とする pET システムあるいは SYK-6 株を宿主とする pQF システムによって発現させた。遺伝子産物の精製は Ni アフィニティクロマトグラフィーによって行った。基質の変換量測定、反応産物の同定と定量は、HPLC、LC-MS、chiral-HPLC によって行った。LdpA の酵素活性は生成物である DGPD-S に由来する 333 nm の吸光度の増加に基づき測定した。LdpC の酵素活性は DGPD-keto I と II を基質とした時の NADPH/NADH に由来する 340 nm の吸光度の減少に基づき測定した。遺伝子破壊株の作製は、相同組換えによる遺伝子内部の欠失により行った。遺伝子破壊株の相補用プラスミドは各遺伝子を pJB861 に導入して作製した。

結果

erythro-DGPD 変換酵素遺伝子の同定と機能解析

SYK-6 株のゲノムライブラリーから *erythro*-DGPD 変換能を宿主に与えるコスミドクローンを単離した。本研究の過程で *Novosphingobium aromaticivorans* DSM 12444 株の *erythro*-DGPD 変換酵素遺伝子 *lsdE* の同定に関する論文が発表された⁵。得られたコスミド中に *lsdE* と 80%のアミノ酸配列相同性を示す遺伝子が存在し、これを *ldpA* と命名した。大腸菌で生産させた LdpA を精製し、LdpA の酵素学的諸性質を明らかにした。LdpA は *erythro*-DGPD (DGPD III と IV)の C γ 位の脱ホルミル化と同時に C α 位の脱ヒドロキシ化を触媒し、スチルベン型化合物の DGPD-S に変換する活性を有していた (Fig. 1)。一方、*threo*-DGPD (DGPD I と II)に対して変換能を示さなかった。SYK-6 株の *ldpA* 破壊株は *erythro*-DGPD 変換能を欠損したことから、*erythro*-DGPD の変換は *ldpA* に担われていることが明らかとなった。なお DGPD-S はバニリン酸を経由して代謝されることが示された。

DGPD-keto I 変換酵素遺伝子の同定

DGPD-keto I の還元には LdpB が属する short-chain dehydrogenase/reductase (SDR) family 中の C α -dehydrogenase が関与すると予想した。DGPD-keto I は SYK-6 株の細胞抽出液によって NADPH の存在下で変換されることから、7つの C α -dehydrogenase 遺伝子のうち、大腸菌で発現が見られた6つの細胞抽出液を NADPH 存在下で DGPD-keto I と反応させ、反応液を HPLC で分析した。その結果、DGPD-keto I 変換活性を示す組換え体は存在しなかった。大腸菌で発現が見られなかった遺伝子については、SYK-6 株で発現させて Ni アフィニティクロマトグラフィーにより精製した。しか

し、取得した精製酵素に DGPD-keto I 変換活性は認められなかった。

SYK-6 株のゲノム上で、*ldpB* は *ldpA* の直上流に位置するが、*ldpA* 周辺には *ldpB* 以外にも 2 つの SDR 遺伝子が存在した。各遺伝子の破壊株を作製し、LB で培養した各破壊株の休止細胞と DGPD-keto I を反応させて変換能を測定した。その結果、反応 4 時間における *ldpC* 破壊株による DGPD-keto I 変換量は野生株の約 20% に低下した。*ldpC* 破壊株に *ldpC* を相補した株では DGPD-keto I に対する変換能が回復した。以上の結果から、SYK-6 株における DGPD-keto I の変換に *ldpC* が主要に関与することが明らかとなった。

LdpC の酵素機能解析

ldpC を発現させた大腸菌の細胞抽出液を NADPH 存在下、DGPD-keto I と反応させ HPLC 分析を行った。その結果、本細胞抽出液は DGPD-keto I を *erythro*-DGPD に変換した (Fig. 1)。一方、同細胞抽出液は DGPD-keto II に対して変換活性を示さなかった。精製 LdpC の NADPH 存在下における DGPD-keto I 変換の比活性は 31 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ であり、NADH 存在下での比活性はその 3% 以下であった。以上の結果から LdpC が NADPH 依存性の DGPD-keto I 還元活性を持つことが明らかとなった。

結論

Sphingobium sp. SYK-6 株において、*threo*-DGPD は LigD と LigL によって酸化され、続いて LdpC と LdpB によって還元されることにより C α 位のヒドロキシ基の立体化学が反転し *erythro*-DGPD に変換される。LdpA は *erythro*-DGPD に特異的であるため、*threo* 体を *erythro* 体に変換することで、SYK-6 株はすべての β -1 型二量体の立体異性体を代謝できることが明らかとなった。

文献

- 1) Linger, J. G. et al. (2014) Lignin valorization through integrated biological funneling and chemical catalysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **111**: 12013-12018.
- 2) Kamimura, N. et al. (2017) Bacterial catabolism of lignin-derived aromatics: new findings in a recent decade: update on bacterial lignin catabolism. *Environ. Microbiol. Rep.* **9**: 679-705
- 3) Kishi, K., Habu, N., Samejima, M., Yoshimoto, T. (1991) Purification and some properties of the enzyme catalyzing the C γ -elimination of a diarylpropane-type lignin model from *Pseudomonas paucimobilis* TMY1009. *Agric. Biol. Chem.* **55**:1319-1323.
- 4) Sato, Y. et al. (2009) Identification of three alcohol dehydrogenase genes involved in the stereospecific catabolism of arylglycerol- β -aryl ether by *Sphingobium* sp. strain SYK-6. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**: 5195-5201.
- 5) Presley, G. N. et al. (2021) Pathway discovery and engineering for cleavage of a β -1 lignin-derived biaryl compound. *Metab. Eng.* **65**: 1-10.