

7 共生細菌由来の新奇酵素によるリグニンの変性

今井岳志

1 背景と目的

ペルオキシダーゼは過酸化物の酸素原子を賦活することで電子供与体を酸化あるいは過酸化物を還元する酵素で、古細菌、真正細菌、真核生物に至るあらゆる生物において保存されている。その役割は多岐に渡り、活性酸素の除去、代謝、特定の化合物の生合成など基質特異性や発現部位により様々である。細胞内外で発生する過酸化物は過酸化水素のみならず、アルキル化合物の過酸化物も存在しており、特にヒトにおいては血中や組織内に存在するセレンタンパク質のグルタチオンペルオキシダーゼ 4 (GPX4) が過酸化水素よりも過酸化脂質や過酸化脂肪酸に対して高い特異性を示すことが報告されている¹⁾。その他にもペルオキシレドキシニン、リピッドヒドロペルオキサイドペルオキシダーゼなどがチオール (-SH) を電子供与体として過酸化アルキルを還元している。

一方で、細菌においてはこれら細胞内外の過酸化アルキルの制御方法は未だに不明な点が多く、関連酵素や基質となる電子受容体、電子供与体のほとんどが未解明である。これまでに著者は反芻動物のルーメン内で共生していることが報告されているグラム陽性菌 *Bacillus licheniformis* が、過酸化脂肪酸を還元可能な活性を持つヘムタンパク質 YjbI を有することを見出した。

これまで発見されている過酸化脂肪酸を還元可能な酵素はチオールを電子供与体としているが、YjbI はチオール非依存的であり、pH7-9 において難分解性で複雑な構造を持つリグニンの構成単位であるフェノール類 (グアイアコール、カテコールなど) を電子供与体として過酸化脂肪酸を還元可能であった。そのため、植物中に含まれるリグニンを電子供与体とした反応を担っていることが予想された。しかしながら、基質を含め、当該酵素の細菌における実際の生理機能は不明であった。そこで、本研究テーマでは YjbI の生理機能の解明を目的とした。

2 実験方法

2.1 YjbI の大量発現および精製

YjbI は既にオープンカラムにより精製したものが少量あったが、今後さらなる評価を行うためにはより多くの精製酵素が必要であった。

そこで、*E. coli* (pET system) および *B. choshinensis* (BIC system) を宿主とした発現株を作成し、当該酵素を大量取得した。また、精製酵素から抗体を作製し、細菌における局在解析等を実施した。

2.2 近縁種の遺伝子破壊株評価

yjbI 遺伝子は近縁種で遺伝子解析の進んだモデル生物 *B. subtilis* にも保存されており、切断型ヘモグロビン (trHbO) をコードしていることが既に報告されている²⁾。配列もほぼ一致していることから、同様の機能を有していることが予想されるが、その生理的な役割は不明であった。そこでナショナルバイオリソースプロジェクト (NBRP) から当該遺伝子破壊株を入手し、野生株と比較したフェノタイプの解析と過酸化脂質の定量を行うことで、YjbI が実際に過酸化脂質の除去に寄与しているか評価した。

2.3 酵素反応試験

グアイアコール、シリングアルデヒド、カテコール、クラフトリグニンといった、リグニンアナログのフェノール類を電子供与体とし、過酸化脂質を含め、いくつかの過酸化物を電子受容体として YjbI の機能を調べた。さらに、*in vitro* の酵素反応系で同様の現象を再現できないかを検証した。

3 結果と考察

3.1 基質の探索

精製した YjbI を用いて、リグニンアナログを基質とした酵素活性測定を実施し、ペルオキシダーゼ活性を有することを確認した。一方で、当初想定していた電子受容体である過酸化脂質に関しては、活性が見られるものの、比較的短時間でヘムの酸化変性が起きることが判明し、真の基質が別に存在する可能性が示唆された。

さらに、*B. subtilis* の当該遺伝子破壊株中の過酸化脂肪酸量を定量したところ、破壊株においても過酸化脂肪酸量に有意差が見られなかったことから (図 1)、電子受容体に関しては過酸化脂肪酸以外の過酸化物と結論づけた。

3.2 フェノタイプへの影響評価

当初の仮説と矛盾する結果が得られたため、

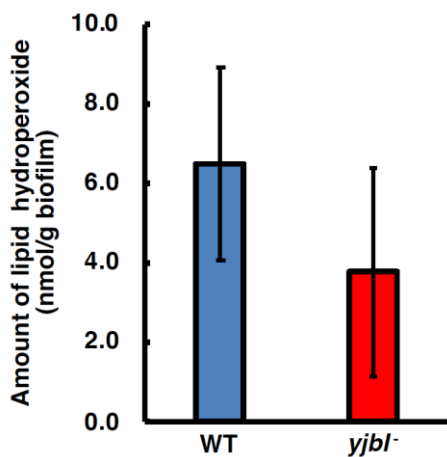


図1 バイオフィーム中の過酸化脂肪酸量

新たなアプローチを加えることで本研究の目的である YjbI の生理的な機能解明を目指した。すなわち、破壊株におけるフェノタイプ変化を観察し、影響を詳細に評価することで、電子受容体への足掛かりを見出せないか試みた。その結果、yjbl 破壊株ではバイオフィームの形成異常が起きていることがわかった (図 2)。

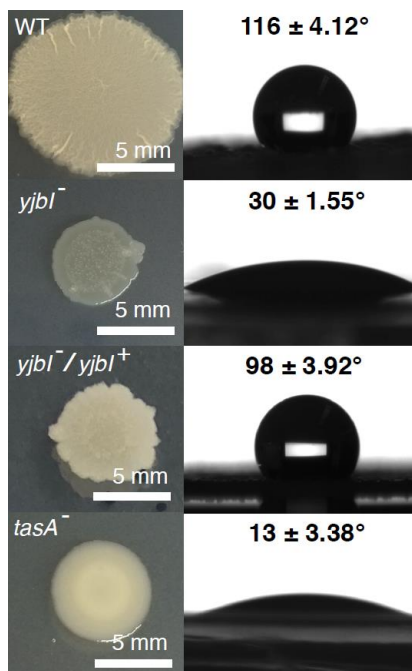


図2 撥水性の評価 (接触角測定)

通常、*B. subtilis* の正常なバイオフィームは撥水性を有しているが、不完全なバイオフィームではその撥水性が失われる事が知られている。さらに、そこからバイオフィームの構成因子である繊維状タンパク質 TasA の変化を調べた結果、酸化重合によるアグリゲーションが起きて

いる事が明らかとなった(図 3)。このことから、YjbI が特定の酸化還元反応により、菌体表面のタンパク質を酸化変性から守っている事が示唆された。

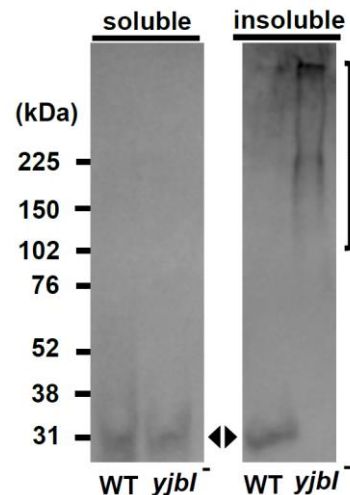


図3 TasA の酸化重合・変性

4 結論

in vivo, *in vitro* の実験結果間で矛盾の無い、仮説を支持するデータが得られ、目的であった YjbI の生理的な機能解明が概ね達成されたと考えている。その役割は当初想定していた過酸化脂質の還元やリグニン分解を目的とするものではなく、タンパク質の酸化変性を抑制するというものであった。一方で、YjbI の電子供与体は不明なままであり、局在も細胞外であるため、リグニンなどの細胞外部から供給されるフェノール類が関与している可能性もある。そのため、草本類の細胞が破碎された際に多量に放出される、過酸化脂肪酸などの外部からもたらされる ROS からの膜タンパク質の保護、すなわち反芻動物のルーメンおよび口腔内で生じる酸化剤への耐性に寄与していることが考えられる。本研究により、YjbI が生物の好気的な環境への適応に貢献した重要な抗酸化因子である事が示唆された。これらの成果の詳細は論文として、現在プレプリントサーバーにて公開している³⁾。

参考文献

- 1) F.Ursini, M.Maiorino and C.Gregolin, *Biochim.Biophys.Acta.*, **29**, 839(1985)
- 2) M.L.Choudhary, S.Jawaid, M.K.Ahuja, N.K.Shiva, P.Gupta, A.K.Bhuyan, G.S.Khatri, *Protein. Expr. Purif.*, **41**, 2(2005)
- 3) <https://doi.org/10.1101/2021.05.28.446166> (問合せ先 今井岳志)