

共生細菌由来の新奇酵素によるリグニンの変性

1 はじめに

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。一方で、細菌においてはこれら細胞内外の過酸化物の制御方法は未だに不明な点が多い。これまでに我々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(図1)を持つヘムタンパク質 YjbI を有することを見出した。

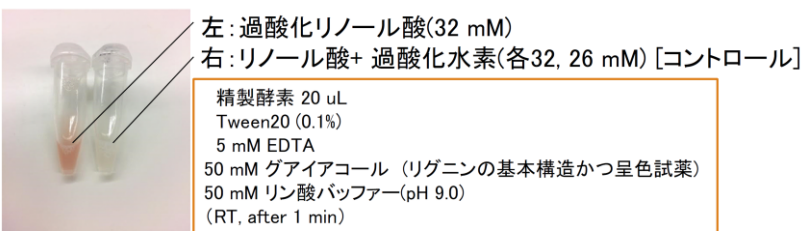


図1 YjbIによる過酸化脂肪酸還元

当該の細菌をリグニンを炭素源とする集積培養によって単離してきた経緯や、YjbIが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ことから、リグニンを電子供与体とした生理機能を担っていることが予想された。本研究テーマではYjbIの更なる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

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、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。また、破壊株において異常が無い、菌体やコロニーの形質の観察や、ウェスタンブロット等による分子生物学的手法によって評価した。

3 結果と考察

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、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2)、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。また、抗体を用いた解析からYjbIが細胞膜上の外側に局在していることがわかった。

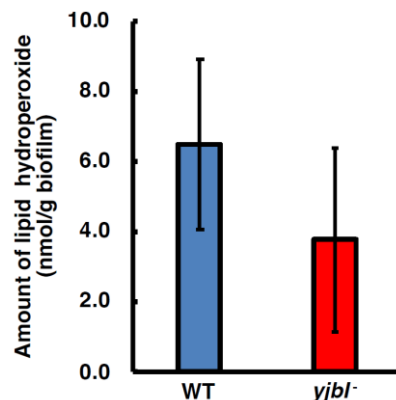


図2 バイオフィルム中の過酸化脂肪酸濃度

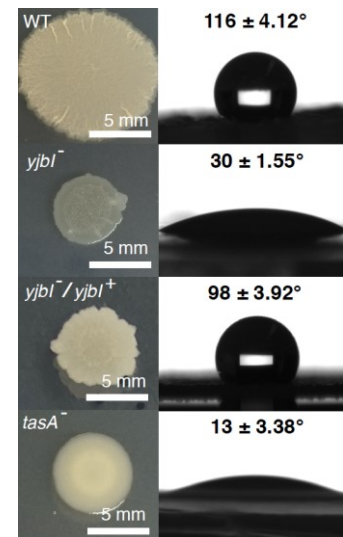


図3 撥水性の評価

一方で *yjbI* 破壊株ではバイオフィルムの形成異常が起きていることがわかった(図3)。さらに、そこからバイオフィルムの構成タンパク質であるTasAの変化を調べた結果、酸化重合が起きている事が明らかとなった(図4)。

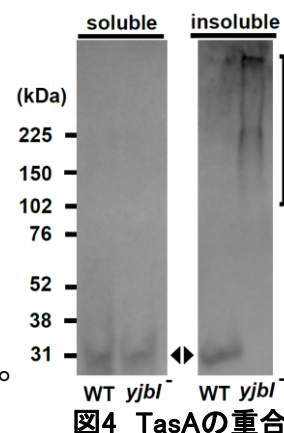


図4 TasAの重合

4 まとめ

本研究により、YjbIが重要な抗酸化因子である事が示唆された。一方で電子供与体は不明だが、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がある。