

## 環境細菌に潜在する新規代謝機構の発見と解明



筑波大学生命環境系 土肥 裕希

## はじめに

代謝 (metabolism) とは、生物が生命活動を維持するために必要な一連の化学反応である。我々ヒトの生活や健康は、環境浄化から食品・医薬品の生産まで、微生物の代謝の恩恵を多く受けていている。また、微生物は地球のあらゆる環境から検出されており、その潜在的な種の数は他の生物を圧倒していることから、微生物は生物圏における物質循環の主役と考えられている。したがって、微生物の代謝を理解することは、我々の生活を豊かにするだけでなく、生物地球科学的循環を理解して将来に向けた持続可能社会を構築していくためにも非常に重要である。筆者らは、環境細菌に潜在する新規な代謝や代謝応答を複数発見し、そのメカニズムを解明した。以下にこれらの研究成果の概要を紹介する。

## 1. 細菌の基礎代謝による酸化ストレス応答と耐性化

一酸化窒素 (nitric oxide, NO) は細胞膜を透過可能なラジカル性物質であり、細胞に強い酸化ストレスを引き起こす。筆者らは、高濃度の NO が含まれる浄化槽から NO 耐性菌を複数単離した。得られた NO 耐性菌はすべて脱窒菌であったことから、これらの細菌は NO を無毒な窒素ガスまで還元することによって生育の NO 耐性能を獲得していると考えた。一方で、筆者らはこれらの細菌の生育は脱窒活性を発現しない好気条件下においても高い NO 耐性を示すことを見出し、脱窒による NO の解毒とは異なる NO 耐性化機構が発現していることを明らかにした<sup>1)</sup>。

YD35 株は上記で単離された NO 耐性菌のひとつであり、日和見感染菌として知られる *Achromobacter* 属細菌に分類される。筆者らは、NO 存在下で強い酸化状態となった YD35 株は、ピルビン酸脱水素酵素複合体 (Pdh) と TCA 回路の酵素の遺伝子発現を上方制御し、回路内の還元酵素 (=NAD(P)<sup>+</sup> の再還元) の活性を亢進させることを見出した (図1)。また、同応答では Pdh 複合体の反応によるアセチル CoA の供給が重要 (律速) であること<sup>2)</sup>、そして高酸化耐性アコニターゼ AcnA3 が回路内のクエン酸からイソクエン酸への効率的な変換に重要であることを明らかにした (図1)<sup>3)</sup>。これら結果は、生命活動の維持に必要な一次代謝を担う TCA 回路が酸化ストレス応答と耐性化に寄与していることを明らかにした。また、AcnA3 の

高い酸化耐性は、鉄硫黄クラスターを活性中心に有することから酸化傷害を受けやすいとされてきたアコニターゼの既存の特性を覆した。

## 2. 乳酸菌の還元ストレスに対する代謝応答とその応用

乳酸菌の異化代謝は、主に解糖系とピルビン酸代謝で構成される。*Enterococcus faecalis* はグリセロール資化能を特徴とする乳酸菌であり、動物の消化器官の常在菌のひとつである。本菌のグリセロール代謝では、1 分子のグリセロールをピルビン酸に変換する際に 2 分子の NADH を生成する。これは解糖系によるグルコース代謝の 2 倍である (図2)<sup>4)</sup>。嫌気条件下で培養された *E. faecalis* では、グルコースは乳酸発酵を経て乳酸に、グリセロールはアルコール発酵を経てエタノールに変換された。筆者らは、この違いが代謝に伴って生成される NADH の収支に起因することを同定した (図2)<sup>5)</sup>。

筆者らは、高濃度のグリセロールを代謝する *E. faecalis* が当該代謝で産生される過剰な NADH (=還元ストレス) のため、好気条件下にもかかわらず高い変換効率で乳酸を生産 (乳酸発酵) することを発見した。この「好気性乳酸発酵」を行っている細胞では、還元ストレスによってピルビン酸の好気代謝 (アセトインと酢酸の生産) が、そして酸素によってアルコール発酵 [ピルビン酸ギ酸リーゼ (Pfl), アルデヒド/アルコール脱水素酵素 (AdhE)] がそれぞれ阻害されることで、乳酸生産経路のみが機能していた (図2)<sup>6)</sup>。筆者らはこの好気性乳酸発酵を利用することで、ジャーファーメンターを用いた回分培養によって 150 g/L のグリセロールを 135 g/L の L-乳酸に変換することに成功した。さらに、本菌の遺伝子組換え株を用いて、同様にして 171 g/L のグリセロールを 157 g/L の D-乳酸に変換することにも成功した。これらの変換量は、いずれも回分培養系での生産量における世界のトップデータを更新した。また、廃食油由来の廃グリセロールを原料とした L/D-乳酸の

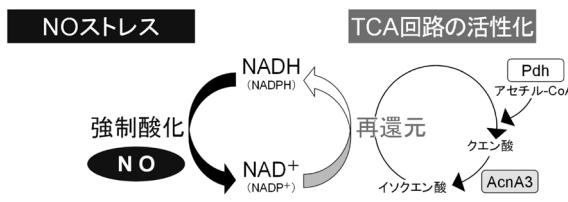
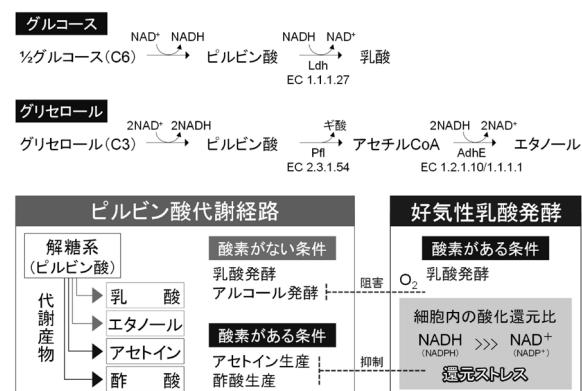


図1 YD35 株の NO 起因性の酸化ストレス耐性化

図2 *E. faecalis* のグルコースおよびグリセロール嫌気代謝経路と好気性乳酸発酵の発現メカニズム

生産も検証し、廃グリセロール中に残存する油成分を除去することによって、それに残存する過酸化脂質による代謝阻害（乳酸生産効率の低下）を低減できることを見出した<sup>7)</sup>。

### 3. 細菌による複素環式化合物の分解代謝

構造内に窒素原子を有する環式化合物には、核酸、アミノ酸、補酵素など、生体にとって必須な化合物が多数含まれる。ルミクロムは、リボフラビン（ビタミンB<sub>2</sub>）の糖鎖部位が微生物酵素<sup>8)</sup>や紫外線等で乖離した複素環式化合物であるが、その環境動態は不明である。筆者らは植物根からルミクロム分解菌 *Rhodococcus* sp. LC-2 株 (LC-2 株) を単離し、その線状プラスミド上にルミクロム分解を担う遺伝子群がコードされていることを同定した。アミノ酸配列に基づいた系統分類では、これらのルミクロム分解酵素はいずれも機能既知の酵素グループには含まれない新規な酵素であった。また、LC-2 株のルミクロム代謝物、当該遺伝子群の遺伝子破壊株や遺伝子にコードされている酵素タンパク質の機能を解析することで、本菌株はルミクロムを水酸化、ピリミジン環の開裂、脱カルバモイル、脱アミノ、酸化を経て分解することを同定した（図3）。

ブテリンはピラジン環とピリミジン環が結合の一辺を共有した複素環式化合物で、葉酸（ビタミンB<sub>9</sub>）、モリブトブテリンやビオブテリンなどの補因子の構成骨格である。さらに、ピラジン環部位の炭素に側鎖を有するブテリン化合物は昆虫色素として自然環境中に広く存在している。筆者らはいくつかの天然のブテリン化合物を用いて、それらを分解する土壌細菌を単離・解析した結果、ピラジン環部位の側鎖構造によって分解を担う細菌の属種が大きく異なることを見出した。その中で、モンシロチョウの翅やカイコ（幼虫）の外皮などに白色色素として含まれているイソキサントブテリン（IXP）を選択的に分解する土壌細菌 *Cupriavidus* sp. LA-1 株 (LA-1 株) の IXP 分解機構を解析し、本菌株は IXP 誘導性の遺伝子群にコードされているブテリンデアミナーゼ (PDA) と 3 つの新規酵素によって IXP をキサンチンに変換した後、既知のキサンチン代謝経路でそれを分解・資化することを明らかにした（図4）。

### おわりに

本研究では、細菌の新規な代謝と代謝応答を複数発見し、そのメカニズムを解明した。筆者らが解析した細菌は、いずれもごくありふれた環境細菌である。しかしながら、モデル生物として広く利用されている大腸菌 (K-12 株) でさえ、そのゲノム DNA にコードされている遺伝子の約 4 割が未同定あるいは機能未知である<sup>9)</sup>。このことは、身近な細菌にもまだまだ未知の代謝や代謝応答機構が潜在していることを示唆しており、細菌の機能の多様性と重要性を示している。これらを明らかにしていくことで、生物圏の物質循環における細菌の役割だけでなく、それらの機能、具体的には代謝や酵素を利用した物質生産や環境浄化など、様々な応用への展開が期待される。

### （引用文献）

- Doi Y, Takaya N, Takizawa N. *Appl. Environ. Microbiol.*, 75, 5186–5194 (2009).
- Doi Y, Shimizu M, Fujita T, Nakamura A, Takizawa N, Takaya N. *Appl. Environ. Microbiol.*, 80, 1910–1918 (2014).

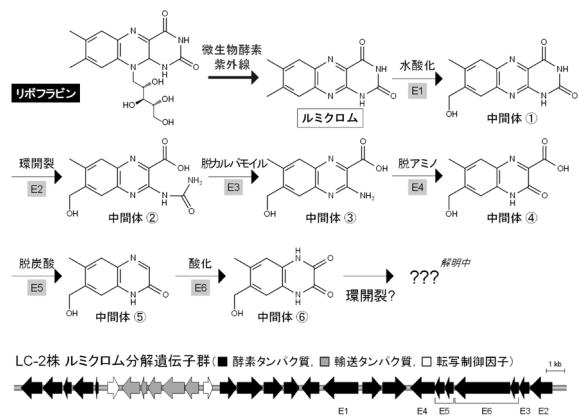


図3 LC-2株のルミクロム分解経路

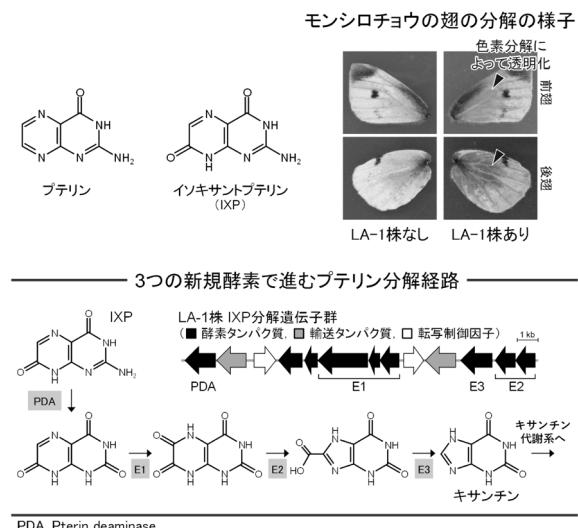


図4 LA-1株のイソキサントブテリン分解経路

- Doi Y, Takaya N. *J. Biol. Chem.*, 290, 1412–1421 (2015).
- Doi Y. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, review, 103, 5079–5093 (2019).
- Doi Y, Ikegami Y. *J. Bacteriol.*, 196, 2472–2480 (2014).
- Doi Y. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 102, 10183–10192 (2018).
- Doi Y. *Appl. Environ. Microbiol.*, 81, 2082–2089 (2015).
- Kanazawa H, Ozaki S, Doi Y, Masuo S, Takaya N. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 84, 1056–1061 (2020).
- 加藤潤一. 化学と生物, 54, 575–579 (2016).

**謝 辞** 本研究は、筑波大学大学院生命環境科学研究科、同大学生命環境系、および岡山理科大学工学部応用化学科で行われたものです。本賞への応募を後押しして顶くとともにご推薦下さいました筑波大学生命環境系教授・小林達彦先生に厚く御礼を申し上げます。また、本研究をご支援いただきました筑波大学生命環境系教授・高谷直樹先生、本研究を開始する機会をいただきました岡山理科大学工学部応用化学科教授・滝澤昇先生に感謝申し上げます。さらに本研究成果の一部は、筑波大学および岡山理科大学の学生の皆様の努力の賜物であります。筑波大学生命環境系および岡山理科大学工学部応用化学科の教職員の方々には、本研究の実施にあたって多大なご理解とご協力を賜りました。皆様に深く感謝申し上げます。