

偏性嫌気性細菌における酵素的脱芳香化反応の研究

京都学園大学 篠田 吉史
派遣期間 2005年4月1日～2006年3月31日
研究機関 Institut für Biologie II Mikrobiologie, Universität Freiburg
Schänzle Str.1, 79104 Freiburg i. Br., Germany
研究指導者 Dr. Prof. M. Boll

研究の背景

植物が光合成によって炭酸ガスを有機物に変え、動物がそれを食べて食物連鎖が始まり、最後にそれらの死骸が分解されて炭酸ガスに戻る。この地球規模の炭素循環において重要な役割を担っているのは、微生物による有機物の分解作用です。これが様々な化合物を分解することで、地球が動植物の死骸で埋まらずにすんでいるのです。

地球上で最も量の多い有機化合物は糖類だとされていますが、その次に多いのは分子の中にベンゼン環を含んだ芳香族化合物だと言われています。植物体を構成しているリグニンの他、フェニルアラニン、チロシン、トリプトファンなどのアミノ酸、石油の中に含まれるトルエンやベンゼンなどがその代表的なものです。さらに PCB やダイオキシンのように、環境汚染物質にも芳香族化合物が多くあります。こうした化合物がどのように微生物によって分解されているのかを調べることは、炭素循環への理解を深め（生態学、地球生物化学）、微生物の持つ多様な代謝能力を明らかにし（生化学、微生物学）、さらにそれを人間の利益のために利用する（応用微生物学）上で意味があります。

ベンゼン環は π 結合を構成する電子が共役二重結合構造によって分子全体に広がり、さらにそれが環状に閉じていることで安定化しています。この安定な構造を破壊するのに、生化学的には分子状酸素を反応させる酸化的方法と、酸素を用いない還元的な方法の二つがあります。前者は酸素のある環境で生活する好気微生物などに見られ、1955年、当時米国 NIH におられた早石 修博士によるカテコールジオキシゲナーゼの発見⁴⁾を発端として古くから研究されています。一方、分子状酸素のない環境で生活する嫌気微生物がこれを還元的に分解することは、ドイツの W.C. Evans によって1969年に初めて提唱されました³⁾が、具体的な反応は長らく不明のままでした。1987年、ウルム大学（現フライブルク大学）の G. Fuchs 教授はフェノールを分解する *Thauera aromatica*、アントラニル酸（2-アミノ安息香酸）を分解する *Azoarcus evansii* という硝酸呼吸細菌を污水处理場から単離し、フェノールやアントラニル酸がベンゾイル CoA に変換され、これがベンゾイル CoA 還元酵素によって還元的に脱芳香化されるというプロセスを1992年に明らかにしました⁵⁾。筆者は1994年からこうした嫌気性細菌による芳香族化合物分解の研究を開始し、2000年に京都の水田土壌から *Magnetospirillum* sp. CC-26 という細菌を単離して⁹⁾、自然界に *Thauera* 属、*Azoarcus* 属に続く第3の芳香族化合物分解性硝酸呼吸細菌が存在することを

示しました⁷⁾。

嫌氣的にベンゼン環の安定な構造を破壊する鍵となるベンゾイル CoA 還元酵素は、これまでに *T. aromatica* のものが唯一精製され、その性質が調べられています。4 つの異なるサブユニットから成る 170kDa の 4 量体で、フラビンと亜鉛を含み、大気下では 20 秒以内に活性が半減する酸素感受性の酵素です²⁾。2 つのサブユニットが ATP2 分子を消費して反応性の高い電子を 2 つつくり、これを残りのサブユニットが 1 つずつベンゾイル CoA 分子に送り込むと同時に水素イオンと反応させるという反応機構が予想されています¹⁾。しかし、ここで問題が生じます。硝酸呼吸細菌では 1 モルの安息香酸の二酸化炭素への酸化と硝酸イオンの窒素への還元を共役させたときに取り出せるエネルギー (ΔG^0) は約 3000 kJ で、これは ATP を 50 モル生合成できるエネルギーにあたりますが、電子受容体として硫酸塩を用いる硫酸還元細菌は、 $\text{SO}_4^{2-}/\text{H}_2\text{S}$ という半反応の還元電位 (E_0') (-0.22 V) が NO_3^-/N_2 の電位 (+0.74 V) よりかなり低いことから、安息香酸を同じように二酸化炭素に酸化したとしても取り出せるエネルギーは約 240 kJ にすぎず、ベンゼン環の分解のために ATP を 2 分子も消費していたのでは割に合わないこととなります。従ってこうした硫酸還元細菌のような偏性嫌気性細菌 (酸素存在下では生育できない細菌群) では硝酸呼吸細菌 (酸素存在下でも生育できる通性嫌気性細菌) とは異なる、ATP 投入量の少ない安息香酸分解系が存在するのではないかと予想できます。フライブルク大学の M. Boll 博士は、硫酸還元細菌 *Desulfococcus multivorans* の生育が安息香酸を炭素源とするときは培地中のモリブデンとセレンに依存することを見出し、このとき約 30kDa のセレンタンパク質が特異的に誘導されることを見出しました⁶⁾。さらに鉄還元細菌 *Geobacter metallireducens* において 2 次元電気泳動により特異的誘導タンパクを複数同定し、それらの遺伝子がゲノム上でクラスターを作って存在していること、その中にモリブデンタンパク質やセレノシステインを含むと考えられるタンパク質の遺伝子が存在することを明らかにしました。その結果、こうした偏性嫌気性細菌のベンゾイル CoA 還元酵素はモリブデン、セレンタンパク質を含む 8 つの異なるサブユニットから成る、硝酸呼吸細菌のものとは全く異なる酵素であると考えられています¹⁰⁾。

筆者はドイツフライブルク大学滞在期間中、この新しいベンゾイル CoA 還元酵素の *in vitro* でのアッセイ系の確立を試みました。また、*G. metallireducens* および共栄養性の偏性嫌気性細菌である *Syntrophus aciditrophicus* からその代謝経路下流の酵素遺伝子をクローニングし、これを大腸菌で発現させて性質を調べることで、これら偏性嫌気性細菌における芳香族化合物の分解は、反応経路は通性嫌気性細菌のそれと同じであるが、ベンゾイル CoA の還元だけは既知のものとは異なる酵素によって担われている、ということを証明するために実験を行いました。

研究成果

1) *G. metallireducens* のベンゾイル CoA 還元酵素活性の検出

Boll 博士の研究室ではそれまで 200L の培養装置で培養した細菌の細胞を液体窒素中で凍結保存したものを使って研究を進めていましたが、膜との相互作用も予想される未知の酵素のアッセイ系を構築するには不適と判断し、後述する硝酸呼吸株を使って 2L スケールの培養系を構築し、実験の都度培養した非凍結の細胞を使用することとしました。これを酸素に触れさせることなく集菌、破碎し、その上清を様々なアッセイ系に添加し、薄層クロマトグラフィーや HPLC で分析してベンゾイル CoA の分解反応の検出を試みました。結果として *in vitro* で反応を検出することはできませんでしたが、活発に分裂している細胞を用い、集菌時に還元剤を添加しておくなどしなければ菌体反応レベルでの活性すら検出できない、きわめて不安定な酵素であることが分かりました。この課題については今年度日本で引き続き取り組むことを Boll 博士から了解いただきました。

2) *G. metallireducens* と *S. aciditrophicus* の安息香酸代謝経路下流酵素のクローニング

偏性嫌気性細菌の安息香酸分解経路については、遺伝子の塩基配列の相同性から、ベンゾイル CoA 還元酵素以外の酵素については硝酸呼吸細菌と類似のものであると考えられています。これを確認し、ベンゾイル CoA の脱芳香化産物が Cyclohex-1,5-diene-1-carbonyl-CoA であることを証明するために、これに水を付加する酵素である Dienlyl-CoA hydratase 遺伝子を *S. aciditrophicus* からクローニングし、ヒスチジンタグを付加して大腸菌で高発現させ、アフィニティーカラムで精製、その性質を調べ、硝酸呼吸細菌のものと類似の酵素であることを確認しました⁸⁾。想定される代謝経路のさらに下流の遺伝子、 β -Hydroxyacyl-CoA dehydrogenase、 β -Oxoacyl-CoA Hydrolase については *G. metallireducens* からクローニングを行い、大腸菌での異種高発現においても可溶性タンパク質が得られることまで確認しました。

3) *G. metallireducens* 硝酸呼吸株の取得

G. metallireducens は鉄還元細菌として発見され、通常培地中にクエン酸鉄を飽和 (約 50 mM) させたものを加えて培養します。しかしこの溶解度が低いため、濃い基質溶液を適宜添加して培養容積あたりの収率を上げることができず、必要な量の細胞を得るためには大量に培養する必要がありました。また、クエン酸鉄溶液は褐色であるためにこれを使った培養では濁度を測定することができず、増殖を追うためには細胞数を計数する必要がありました。さらに培養後の菌体には常に沈殿した鉄が混入するため、生化学的な研究の上で問題になる可能性がありました。一方で *G. metallireducens* は硝酸呼吸能を持ちますが、その条件では芳香族化合物を分解しないと報告されており、Boll 博士の研究室でも過去にそれを確認していました。しかし、筆者が何度か試みた結果、硝酸呼吸条件下で芳香族化合物に生育させることに成功しました。これによって生化学実験に必要な菌体を効率よく得ることが可能になり、早速 G. Fuchs 教授のグループでは硝酸呼吸株を使った *G. metallireducens* のフェノール代謝系の研究がスタートするなど、この細菌を使った生化学

研究を推進する上で重要な貢献をすることができました。この硝酸呼吸条件下での細菌の生理学的な性質についても、今年度日本で研究を続けることにしています。

まとめ

G. metallireducens の新しいベンゾイル CoA 還元酵素について、*in vitro* での検出、アッセイ系の構築には成功しませんでした。下流酵素のクローニングによって偏性嫌気性細菌の安息香酸代謝経路が経路としては通性嫌気性細菌のそれと変わらないことを示すことができました。*G. metallireducens* の硝酸呼吸条件下での芳香族化合物分解という現象の発見は、今後の本細菌の生化学的研究に大きく貢献するものであると考えています。

Boll 博士は 2005 年 4 月付でフライブルク大学からライプチヒ大学に生化学の教授として異動されましたが、引き続き協力関係を維持することを約束して頂いています。今後の交流を通じてドイツ流の嫌気微生物学についてさらに研鑽を積み、それと日本の応用微生物学が得意とする微生物のスクリーニングなどの方法論を融合させて、新しい研究を展開していこうと考えています。

参考文献

1. **Boll, M.** 2005. Key enzymes in the anaerobic aromatic metabolism catalysing Birch-like reductions. *Biochim. Biophys. Acta.* **1707**:34-50.
2. **Boll, M., and G. Fuchs.** 1995. Benzoyl-coenzyme A reductase (dearomatizing), a key enzyme of anaerobic aromatic metabolism. ATP dependence of the reaction, purification and some properties of the enzyme from *Thauera aromatica* strain K172. *Eur. J. Biochem.* **234**:921-933.
3. **Dutton, P. L., and W. C. Evans.** 1969. The metabolism of aromatic compounds by *Rhodospseudomonas palustris*. *Biochem. J.* **113**:525-536.
4. **Hayaishi, O., M. Katagiri, and S. Rothberg.** 1955. Mechanism of the pyrocatechase reaction. *J. Am. Chem. Soc.* **77**:5450-5451.
5. **Koch, J., and G. Fuchs.** 1992. Enzymatic reduction of benzoyl-CoA to alicyclic compounds, a key reaction in anaerobic aromatic metabolism. *Eur. J. Biochem.* **205**:195-202.
6. **Peters, F., M. Rother, and M. Boll.** 2004. Selenocysteine-containing proteins in anaerobic benzoate metabolism of *Desulfococcus multivorans*. *J. Bacteriol.* **186**:2156-2163.
7. **Shinoda, Y., J. Akagi, Y. Uchihashi, A. Hiraishi, H. Yukawa, H. Yurimoto, Y. Sakai, and N. Kato.** 2005. Anaerobic degradation of aromatic compounds by magnetospirillum strains: isolation and degradation genes. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **69**:1483-1491.
8. **Shinoda, Y., F. Peters, S. Wischgoll, and M. Boll.** 2006. Presented at the Annual Conference of the Association for General and Applied Microbiology (VAAM), Jena, Germany.
9. **Shinoda, Y., Y. Sakai, M. Ue, A. Hiraishi, and N. Kato.** 2000. Isolation and characterization of a new denitrifying spirillum capable of anaerobic degradation of phenol. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:1286-1291.
10. **Wischgoll, S., D. Heintz, F. Peters, A. Erxleben, E. Sarnighausen, R. Reski, A. Van Dorsselaer, and M. Boll.** 2005. Gene clusters involved in anaerobic benzoate degradation of *Geobacter metallireducens*. *Mol. Microbiol.* **58**:1238-1252.