

# *Mycobacterium*属細菌が有するユニークな酸化酵素の機能解析と応用

早稲田大学理工学術院 古屋 俊樹



## 1. はじめに

フェノールのパラ位にヒドロキシル基が結合したヒドロキノンは樹脂重合抑止剤等として有用な化合物であるが、現行の化学合成法の多くはオルト位にヒドロキシル基が結合したカテコールを副生してしまう。そこで(株)日本触媒の仙波らは生体触媒に着目し、フェノールからヒドロキノンを位置選択的に合成可能な微生物のスクリーニングを実施した。その結果、自然界から取得した *Mycobacterium goodii* 12523 に当該活性を見出し、さらに本株の培養菌体を触媒としてグラムスケールでのヒドロキノンを生産を達成している (1)。

このようにフェノールをヒドロキノンに変換する *M. goodii* 12523 は実用的に有望な微生物であるが、学術的にも興味深い性質を有している。当該活性はアセトン存在下において強く誘導されるが、本株はフェノールを分解して資化することはできず、当該酵素の生理機能については興味を持たれるところである。本研究では、*M. goodii* 12523 および近縁の *Mycobacterium smegmatis* mc<sup>2</sup>155 が有するフェノールのパラ位選択的酸化に関わる酵素を遺伝子レベルで解析した。さらに、当該酵素の詳細な機能解明と生体触媒としての実用に向けて異種細胞内での活性発現を試みた。

## 2. フェノールのパラ位選択的酸化に関わる酵素遺伝子の同定

*M. goodii* 12523 のフェノールに対する酸化活性はアセトンにより誘導されることに着目して、二次元電気泳動によりアセトン存在下においてのみ発現するタンパク質を解析した。その結果、アセトン依存的に発現するタンパク質がいくつか検出され、そのうちの1つはゲノム配列が解読されている *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 のオープンリーディングフレーム (ORF) Msme<sub>g</sub>\_1971 と N 末端アミノ酸配列が一致した。Msme<sub>g</sub>\_1971 は機能未知の ORF だが、Msme<sub>g</sub>\_1971、Msme<sub>g</sub>\_1972、Msme<sub>g</sub>\_1973、Msme<sub>g</sub>\_1974 に相当する遺伝子はゲノム配列上で二核鉄型モノオキシゲナーゼ遺伝子クラスターを構成していることが推定されたため、本遺伝子クラスターがフェノールに対する酸化活性に関与しているのではないかと予想した。*M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 の特性を確認したところ、本株もフェノールに対する酸化活性を有していた。そこで、*M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 から本遺伝子クラスターを、また *M. goodii* 12523 からそのホモログ遺伝子クラスターをクローニングし、それぞれ *mimABCD*<sub>sm</sub> (Msme<sub>g</sub>\_1971~1974 に相当)、*mimABCD*<sub>go</sub> と命名した (図 1)。*mimABCD*<sub>sm</sub> と *mimABCD*<sub>go</sub> の各コンポーネントはアミノ酸配列で 93~96% の相同性を示した。

つぎに、*mimABCD* がフェノールのヒドロキノンへの変換活性に関与していることを検証した。形質転換系の確立されている *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 において、本株の *mimA*<sub>sm</sub> を破壊したところフェノールに対する酸化活性は消失した。さらに、この *mimA*<sub>sm</sub> 破壊株に *mimA*<sub>sm</sub> もしくは *mimA*<sub>go</sub> を導入したところ、酸化活性は回復した。これより、*mimABCD* がフェノールのパラ位選択的酸化酵素をコードしていることが明らかとなった。また興味深いことに、*M. goodii* 12523 と *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 はアセトンやプロパンを炭素源として資化することができるが、*mimA*<sub>sm</sub> 破壊株はこれらの資化性を失っており、*mimA*<sub>sm</sub> もしくは *mimA*<sub>go</sub> を相補することで、その資化性は回復した。これより *mimABCD* は、これらの *Mycobacterium* 属細菌がアセトンやプロパンを資化するうえで重要な役割を担っていることが示唆された (2)。

## 3. *mimABCD* 遺伝子の転写活性化因子の同定

*M. goodii* 12523 および *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 のフェノールに対する酸化活性のアセトン誘導機構を遺伝子レベルで解析した。*M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 のゲノム配列上において *mimA*<sub>sm</sub> (Msme<sub>g</sub>\_1971) の上流に存在する ORF Msme<sub>g</sub>\_1970 は NtrC ファミリーの転写活性化因子と相同性を示すため、本 ORF に相当する遺伝子 (*mimR*<sub>sm</sub> と命名) が *mimABCD*<sub>sm</sub> のアセトン誘導発現に関与しているのではないかと

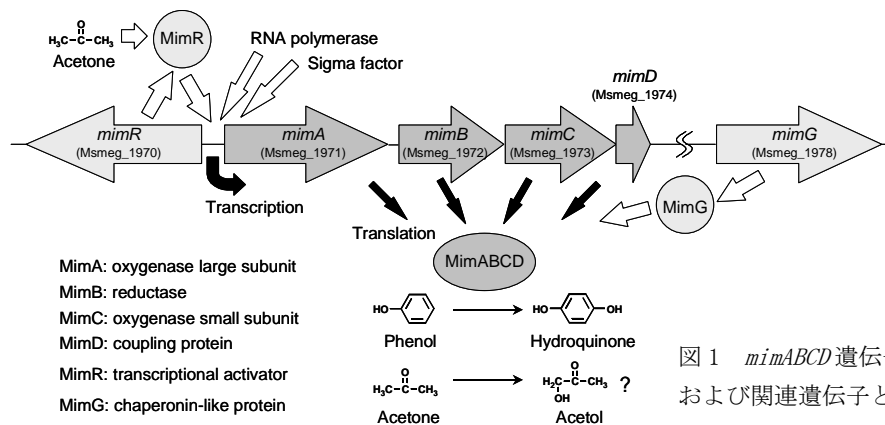


図1 *mimABCD* 遺伝子クラスター  
および関連遺伝子と活性発現機構

予想した (図 1)。そこで、*mimA<sub>sm</sub>* のプロモーター領域を GFP 遺伝子に連結してレポータープラスミドを構築し、MimR<sub>sm</sub> およびアセトンに対する応答性を評価した。その結果、構築したプラスミドを *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 に導入した場合にはアセトン存在下においてのみ GFP による蛍光が検出されたが、*mimR<sub>sm</sub>* 破壊株に導入した場合にはアセトンの有無に関わらず蛍光は検出されなかった。*M. goodii* 12523 にも *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 と同様、*mimR<sub>sm</sub>* および *mimA<sub>sm</sub>* プロモーター領域と相同の配列が存在し、アセトンで誘導発現されることを確認した。これより、MimR はアセトン存在下において *mimABCD* の転写を活性化することが強く支持された。また、フェノールやヒドロキノンでは転写が進まないことも確認した。このことから、MimABCD は本来アセトン関連化合物の酸化反応を触媒し、フェノールのパラ位選択的酸化活性も偶発的に有していることが強く示唆された。NtrC ファミリーの転写活性化因子はグラム陰性菌やバチルス属細菌の窒素代謝や芳香族化合物分解等において報告されているが、放線菌では初めての報告である (3)。

#### 4. *mimABCD* 遺伝子の異種発現

大腸菌を宿主として *mimABCD* の異種発現を試みたが、SDS-PAGE 分析において MimBCD は発現が確認されず、MimA は不溶化しており、結果としてフェノールに対する酸化活性を検出することはできなかった。そこで近縁の *Rhodococcus* 属細菌を宿主として異種発現を試みた。方法としては、*mimABCD<sub>go</sub>* および *mimABCD<sub>sm</sub>* を pTip ベクター (産総研、田村具博教授より分譲) に連結し、*R. opacus* B-4 (大阪大学、大竹久夫教授、本田孝祐准教授より分譲) に導入した。しかしながら、本発現系においても活性を検出することはできなかった。他に必要な因子の存在を考慮して *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 のゲノム配列を精査したところ、*mimABCD<sub>sm</sub>* の下流に存在する ORF Msmeq\_1978 がシャペロン様タンパク質と相同性を示すことを突き止めた (図 1)。そこで本 ORF に相当する遺伝子 (*mimG<sub>sm</sub>* と命名) をクローニング後、*mimABCD<sub>go</sub>* および *mimABCD<sub>sm</sub>* と *R. opacus* B-4 内で共発現させて活性を評価した。その結果、MimG<sub>sm</sub> を共存させることにより MimABCD のフェノールに対する酸化活性を発現させることに成功した (未発表)。現在、異種発現株を利用して MimABCD および MimG<sub>sm</sub> の詳細な機能解析および生体触媒への応用研究を実施中である。

本研究の遂行においてご教示いただいた木野邦器教授 (早稲田大学)、仙波尚博士 ((株) 日本触媒)、および研究に携わられた方々に感謝申し上げます。また、異種発現の研究でご協力いただいた大竹久夫教授、本田孝祐准教授 (大阪大学)、田村具博教授 (産総研) に御礼申し上げます。

#### 参考文献

1. H. Semba, M. Mukouyama, K. Sakano, Appl. Microbiol. Biotechnol., 46, 432-437 (1996).
2. T. Furuya, S. Hirose, H. Osanai, H. Semba, K. Kino, Appl. Environ. Microbiol., 77, 1214-1220 (2011).
3. T. Furuya, S. Hirose, H. Semba, K. Kino, J. Bacteriol., 193, 5817-5823 (2011).