

リボフラビン分解に関わる微生物共生系の機能

2021年1月

金澤 拓史

リボフラビン分解に関わる微生物共生系の機能

筑波大学大学院

理工情報生命学術院

生命地球科学研究群

生命農学学位プログラム

博士（生命農学）学位論文

金澤 拓史

目次

序章.....	5
第1章 <i>Devosia riboflavina</i> と <i>Microbacterium</i> 属細菌のリボフラビン分解機構の解明	
明.....	10
第1節 序.....	10
第2節 材料および方法.....	10
1. 培養方法.....	10
2. リボフラビン、ルミクロムの定量.....	11
3. 単離菌の 16S rRNA 遺伝子配列解析.....	11
4. 分解活性の測定.....	12
5. リボフラビンとルミクロムの定量.....	12
6. リボフラビン誘導タンパク質の同定.....	13
7. 定量 PCR.....	13
8. 組換えタンパク質の調製.....	14
9. 組換え酵素を用いた活性測定.....	15

10. D-リボースの定量	15
11. 溶存酸素濃度の測定	16
第3節 結果.....	16
1. リボフラビン分解菌の単離.....	16
2. <i>Devosia riboflavina</i> のリボフラビン分解活性の解析	17
3. リボフラビン誘導性フラビン依存型モノオキシゲナーゼの同定	19
4. 組換え FR と組換え FK の酵素学的解析	20
5. 組換え FMO と組換え FR のカップリングによるリボフラビン分解	21
6. リボフラビンからルミクロム、D-リボースへのモノオキシゲナーゼ反応.....	22
7. FMO の系統解析とリボフラビン分解遺伝子クラスターの分布	23
第4節 考察.....	25
第2章 <i>Nocardioides nitrophenolicus</i> L16 のルミクロム分解機構の解明	54
第1節 序	54
第2節 材料と方法.....	54
1. 培養方法.....	54
2. 単離菌の 16S rRNA 遺伝子配列解析.....	55

3. <i>N. nitrophenolicus</i> L16 のゲノム解読	55
4. ルミクロムの定量	56
5. ルミクロム分解産物の分析	56
6. 定量 PCR	57
7. 組換えタンパク質の調製	57
8. 組換え GL000138 と組換え GL000139 の酵素活性測定	57
第3節 結果.....	58
1. ルミクロム分解菌の単離.....	58
2. <i>N. nitrophenolicus</i> L16 のルミクロム分解活性.....	59
3. <i>N. nitrophenolicus</i> L16 のルミクロム分解産物	60
4. 推定ルミクロム分解遺伝子クラスター	61
5. 組換え GL00018 タンパク質と組換え GL000139 タンパク質の酵素反応.....	61
6. 推定ルミクロム分解酵素遺伝子の系統解析.....	63
第4節 考察.....	64
第3章 <i>Microbacterium paraoxydans</i> R16 と <i>Nocardioides nitrophenolicus</i> L16 のリボフ	
ラビン分解共生系の解析.....	82

第1節 序	82
第2節 材料と方法	82
1. 培養方法	82
2. リボフラビンおよびルミクロムの定量	83
3. 共培養液の分画	83
第3節 結果	84
1. リボフラビン分解共生系の単離	84
2. <i>M. paraoxydans</i> R16 と <i>N. nitrophenolicus</i> . L16 の共培養	84
3. <i>N. nitrophenolicus</i> L16 による <i>M. paraoxydans</i> R16 のリボフラビン分解活性の 促進機構	85
4. <i>N. nitrophenolicus</i> L16 株が生産する <i>M. paraoxydans</i> R16 株のリボフラビン分 解活性促進因子の同定	86
第4節 考察	87
参考文献	101
謝辞	105

序章

ビタミンはヒトの代謝に必須な化合物群であり、生体内で補酵素やその前駆体として機能する(1-6)。各種ビタミンを必要量摂取しないと欠乏症を発症し、ガンなどの重篤な病気が引き起こされる原因ともなる。このように健康との結びつきが深い化合物群であることから、これまでビタミンの合成方法や生物を利用した生産法、生体内での生理作用に関する研究が進められてきた。一方で、生命活動の維持に必要なビタミンの地球上での恒常性を理解することもまた重要である。しかしながら、環境中でのビタミンの分解機構については不明な点が多い。

リボフラビン(ビタミン B₂)はイソアロキサジン環の M^0 部位にリビチル基が結合した黄色を呈する水溶性の化合物である。生体内ではリボフラビンリン酸化酵素によって FMN に、更にアデニル基が付加されて FAD へと変換される。これらのフラビン化合物は酸化還元反応や呼吸鎖の反応を触媒する酵素の補酵素として機能する(7)。リボフラビンの欠乏は腸管上皮の未発達や神経障害を引き起こし、他のビタミンの欠乏と重なるとガンや心臓血管障害のリスクを高める(7)。植物や細菌、糸状菌は GTP を前駆体として生体内でリボフラビンを合成することが可能である(8,9)。現在は、リボフラビン生産の大部分が発酵プロセスに代替され、*Ashubyna gosipii*, *Bacillus subtilis*, *Candida famata* といった微生物が、生産媒体として利用されている。このようにリボフラビン合成については広く研究がおこなわれてきたのに対して、生分解に関わる遺伝子や酵素

については、近年 Xu らが *Microbacterium* 属細菌のリボフラビン分解遺伝子クラスター(10)について報告するまで、ほとんど理解されていなかった。

1944年に Foster によって、リボフラビンを分解する *Pseudomonas riboflavina* が初めて単離され、リボフラビンのイソアロキサジン環とリビチル部位の結合を分解し、ルミクロムを生産することが示された(11)。同菌は 1994年に中川らによって *Devosia riboflavina* に改められた(12)。無細胞抽出液を用いた試験より、リボフラビンからルミクロムとともに生産されるリビチル残基はリビトールであることが予測され、*D.riboflavina* は加水分解反応によってリボフラビンを分解することが提案された(13)。

しかしながら、未だリボフラビン分解酵素やその遺伝子は同定されていない。

Microbacterium 属細菌に関しては、モノオキシゲナーゼやフラビン還元酵素、リボフラビンリン酸化酵素がリボフラビン分解の鍵酵素としてあげられ、それらをコードする遺伝子がクラスターを形成していることが示された(10)。またリボフラビンの分解産物として、ルミクロムとリボースが同定された(10)。しかしながら、依然として *D.riboflavina* のリボフラビン分解機構は不明なままである。

リボフラビンの分解産物であるルミクロムは根圏の微生物によって分泌され、植物の生長を促進するシグナル分子として機能することが報告されており、土壤生態系の維持に重要であると考えられている。(14)。また、緑膿菌のバイオフィーム形成も促進することからも微生物とのかかわりの深い化合物であると言える(15)。また、私が所属して

いた研究室ではルミクロムの分解産物が高機能ポリマーをつくるモノマー原料のリード化合物になり得るとして、本化合物に着目してきた。しかし、ルミクロムに関する生物による分解の例はなく、この目的のためにも微生物のルミクロム分解機構とその分解産物に興味をもたれていた。

現在、リボフラビンは 5000 円/kg で取引されており、生理活性物質としては比較的安価な化合物である。リボフラビン発酵プロセスと本研究で明らかとしたリボフラビン分解経路、さらにはルミクロム分解経路を組み合わせることで、有用なルミクロムやその分解産物を低コストで大量生産できることが考えられた。

本論文では微生物のリボフラビン分解とその分解産物のルミクロムの分解に着目し、得られた成果を 3 章としてまとめた。第 1 章では、土壌中のリボフラビン分解菌の働きについて論じた。具体的には、リボフラビン分解菌のスクリーニングを試み、単離した 12 株の *Microbacterium* 属細菌がリボフラビンを分解することを示した。これまでに報告された 3 株のリボフラビン分解菌のうち、2 株が *Microbacterium* 属細菌であったことから考えると、自然界では、*Microbacterium* 属細菌がリボフラビン分解菌として優占的であることが考えられた。*Microbacterium* 属細菌が示すリボフラビン分解の反応機構に関しては、本研究の進行中に他のグループによって明らかとされたため、本研究では上述の *D. riboflavina* のリボフラビン分解に焦点を当て、リボフラビン分解を触媒する酵素とその分解機構の解明を試みた。*D. riboflavina* のリボフラビン分解はフラビ

ンモノオキシゲナーゼが鍵酵素となり、フラビン還元酵素とのカップリングを介してリボフラビンをルミクロムと D-リボースへと酸化的に分解することを明らかとした。第 2 章では、微生物のルミクロム分解について論じた。集積培養の結果、ルミクロム分解活性を有する 4 株の *Nocardioides* 属細菌を単離した。このうち、*Nocardioides nitrophenolicus*. L16 のルミクロム分解について詳細な解析を行い、ルミクロム分解に関与しうる遺伝子クラスターを見出した。推定ルミクロム分解酵素遺伝子の機能を解析し、その分解産物を推定した。第 2 章で得られた結果は微生物によるルミクロム分解について初めて報告するものであり、環境微生物によるリボフラビン代謝に新たな理解を与えるものである。第 3 章では、リボフラビン分解菌とルミクロム分解菌の相互作用について論じる。4 株のルミクロム分解菌のうち、上述の *Nocardioides nitrophenolicus*. L16 はリボフラビンを添加した集積培地より、リボフラビン分解菌 *Microbacterium paraoxydans* R16 とともに単離された。このことから、環境中ではリボフラビン分解菌とルミクロム分解菌が共生していることが考えられ、2 株の混合培養でリボフラビン分解共生系の再構築を試みた。*Microbacterium paraoxydans* R16 と *Nocardioides nitrophenolicus*. L16 はリボフラビンを単一炭素源とする最少培地で共培養可能であった。さらに、*Microbacterium paraoxydans* R16 のリボフラビン分解活性は共培養時に増加したことから、*Nocardioides nitrophenolicus*. L16 が *Microbacterium paraoxydans* R16 の活性を促進する働きがあることが見出された。

本論文は3章を通じて、環境中のリボフラビン分解菌およびルミクロム分解菌の単離とそれらの分解機構を示す。前述のように、リボフラビンとルミクロムは、土壤環境中で植物-微生物相互作用、あるいは微生物-微生物相互作用のシグナルとなる重要な化合物である。これら一連の成果は、リボフラビンとルミクロムが土壤微生物により分解され資化されることを示すものであり、環境中でのビタミンの循環システムおよびフラビン化合物を介した生態系の形成を理解するうえで重要な知見である。

第1章 *Devosia riboflavina* と *Microbacterium* 属細菌のリボフラビン分解機構の解明

第1節 序

これまでリボフラビンを分解する微生物は *Microbacterium* 属細菌(10,16)と *Devosia riboflavina*(11)が報告されている。一方で、マメ科植物の根圏ではリボフラビンの分解産物のルミクロムの生成が検出されていることから(14)、自然界には未同定のリボフラビン分解菌が存在することが考えられた。そこで、本章では土壌を単離源として集積培養を行い、リボフラビン分解菌の単離を試みた。さらに、グラム陰性細菌のリボフラビン分解機構は不明であったため、リボフラビン分解酵素の同定と機能の解析を試みた。

第2節 材料および方法

1. 培養方法

土壌試料を単離源とした集積培養は minimal (MM)培地 (10 mM NH₄Cl, 10 mM potassium phosphate, 0.03% MgSO₄, 0.05% KCl, 0.2% trace element (17), pH 6.5) を用いて行った。炭素源としてリボフラビンを 50 μM 添加し、補助的に 0.02% Peptone と 0.02% Yeast extract を添加した。

Devosia riboflavina JCM13427 (IFO13584)は理化学研究所バイオリソースセンターより分譲していただいた。*D. riboflavina* は Luria-Bertani (LB)培地を用いて 30°C で 24 時間前培養した後、100 mL の MM 培地 (10 mM NH₄Cl, 10 mM potassium phosphate, 0.03% MgSO₄,

0.05% KCl, 0.2% trace element (17), 5 mM riboflavin, pH 6.5) に 1 mL 植菌し、30°C、120 rpm の条件で培養した。リボフラビンをルミクロム、D-リボース、リビトール、FMN (各 5 mM) に置き換えて同様の条件で培養し、生育試験を行った。*Echerichia coli* JM109 と BL21 (DE3) はプラスミドの構築と組換えタンパク質の生産にそれぞれ利用し、LB 培地で培養した。

2. リボフラビン、ルミクロムの定量

細胞とルミクロムの沈殿を溶解させるために、培養液を 80 mM KOH で希釈し、204,000 × g、4°C の条件で 5 分間遠心分離した上清を分析用試料とした。リボフラビンとルミクロムの分析には、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) (1260 Infinity, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) と Purospher STAR-RP 18 endcap column (Merck & Co. Inc., Kenilworth, NJ, USA) を用い、254 nm の吸収を測定した。酢酸ナトリウム緩衝液 (pH4.5) : メタノール (1 : 1, v/v) を移動相として、流速は 0.8 mL min⁻¹ とした。

3. 単離菌の 16S rRNA 遺伝子配列解析

分離したリボフラビン分解菌またはルミクロム分解菌の 16S rRNA 遺伝子は、ゲノム DNA を鋳型として Table 1-1 に示すプライマーを用いて増幅した。得られた DNA 断片の塩基配列の解析には GenomeLabTM GeXP (Beckmann coulter, Brea, CA, USA) を使用した。

4. 分解活性の測定

各種分解菌を Luria-Bertani (LB)培地を用いて、30°C で 24 時間前培養した後、0.1 mM のリボフラビンまたはルミクロムを含む 100 mL の MM 培地に 1 mL 植菌し、30°C、120 rpm の条件下で 8 時間から 12 時間培養した。回収した菌体を 50 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) に懸濁して超音波処理し、得られた無細胞抽出液を活性測定のための試料とした。各画分に 0.1 mM のリボフラビンまたはルミクロムを添加して、37°C で 60 分保温した。反応前後で 450 nm または 350 nm の吸光度を測定し、リボフラビンまたはルミクロムの濃度を算出した。

5. リボフラビンとルミクロムの定量

細胞とルミクロムの沈殿を溶解させるために培地を 80 mM KOH で希釈し、204,000 × g、4°C の条件で 5 分間遠心分離し、得られた上清を分析用試料とした。リボフラビンとルミクロムの分析には、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) (1260 Infinity, Agilent technology)と Purospher STAR-RP 18 endcap column (Merck) を使い、254 nm の吸収を測定した。酢酸ナトリウム緩衝液 (pH4.5): メタノール (1:1, v/v) を移動相として、流速は 0.8 mL min⁻¹ とした。液体クロマトグラフィー質量分析 (LCMS) には LCMS8030 (SHIMADZU, 京都)を用い、カラムと移動相は上述の条件で分析を行った。

6. リボフラビン誘導タンパク質の同定

D. riboflavina を MM 培地またはリボフラビンを 0.02% tryptone、0.02% yeast extract で置き換えた MM 培地に植菌して、30°C で 8 時間培養した。回収した菌体を超音波処理し、8,000 × g、4°C の条件で 5 分間遠心分離し、無細胞抽出液の可溶性画分と不溶性画分を得た。各画分を 50 μM のリボフラビンを含む 50 mM リン酸緩衝液に添加し、30°C で 1 時間保温した。各画分に 75 mM tris-HCl, 10% glycerol, 2% SDS, 5% β-mercaptoethanol, 0.25 bromophenol blue を添加して、3 分間煮沸した試料を sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) に供してタンパク質を解析した(18)。切り出したゲルは 0.1 M ammonium bicarbonate-acetonitrile (1:1, v/v)中で脱色し、トリプシンでタンパク質のゲル内消化を行った。得られたペプチド断片を matrix-assisted laser desorption ionization- time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry (MS) (AB Sciex TOF/TOF 5800 system, Sciex, Framingham, MA, USA)に供し、peptide-mass fingerprint を分析し、そのタンパク質をコードする遺伝子を同定した。

7. 定量 PCR

D. riboflavina を 5% LB を含む MM 培地に植菌し、30°C で 8 時間培養した後、培地に 50 μM リボフラビンを添加して培養を継続した。培養開始から 2 時間目まで 30 分ごとに菌体を回収し、RNA protect bacteria reagent (Qiagen Benelux B.V., Venlo, Netherlands) を用いて、菌体中の RNA を保護した。菌体より抽出した RNA 1 μg と QuantiTect reverse

transcription kit (Qiagen)を用いて逆転写反応を行い cDNA を調製した。これを iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) に鋳型として加え、Thermal Cycler Dice Real Time System 2 (Takara, 京都)を用いて定量 PCR を行った。定量に際してのコントロールには *D. riboflavina* 由来の *gyrA* 遺伝子(WP_035083147.1) を利用し、リボフラビン未添加の 0 時間目の値を 1 とした相対値で表した。PCR に用いたプライマーは Table 1-1 に示す。

8. 組換えタンパク質の調製

Table 1-1 に示すプライマーを用いて *D. riboflavina* のゲノム DNA を鋳型として FMO、FR および FK をコードする遺伝子断片を増幅した。得られた DNA 断片を *Bam*HI と *Eco*RI で切断して pRSFDuet-1 (Novagen, Madison, WI, USA)に連結した。構築したプラスミドを *E. coli* BL21 (DE3)に導入して形質転換体を得た。組換え大腸菌は 2 L の LB 培地に植菌し、15°C、100 rpm の条件で 18 時間培養した。細胞を 6,500 × g で 15 分間遠心分離して菌体を回収し、20 mM のイミダゾールを含む 20 mM リン酸ナトリウム緩衝液に懸濁して、超音波処理し無細胞抽出液を得た。遠心分離によって不溶性画分を取り除いた試料を Millex®-GV (0.22 μm) (Merck)を用いてろ過し、ろ液を Hitrap FF crude column (GE Healthcare, Chicago, IL, USA)に供した。カラムを 20 mM リン酸ナトリウム緩衝液で洗浄した後、100 mM、150 mM、300 mM のイミダゾールを含む 20 mM リン酸ナトリウム緩衝液でそれぞれ組換え FMO、組換え FR、組換え FK を溶出した。調製した組換

えタンパク質は SDS-PAGE で確認した(18)。

9. 組換え酵素を用いた活性測定

組換え FR (rFR) を用いた酵素反応は、20 μM FMN、5 mM NADH を含む 50 mM リン酸カリウム緩衝液(pH 7.0)に 1.8 $\mu\text{g mL}^{-1}$ rFR を添加して行い、DU800 spectrophotometer (Beckman Coulter Inc.)を用いて 25°C で 340 nm の吸光度を測定した。NADH のモル吸光係数は $\epsilon_{340} = 6.22 \text{ mM cm}^{-1}$ とした。組換え FMO (rFMO) と rFR のカップリング反応は、20 μM FMN、5 mM NADH、0.2 mM riboflavin を含む 50 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) に 4 μM rFMO と 0.4 μM rFR を添加したものを基本組成とする反応液で行った。反応液は 2-2-2 で示すように HPLC に供して分析した。嫌気条件での試験では、酸素濃度が 3 μM 以下となるように試験管内の空気を窒素ガスで置換し、試験間の口をブチルゴム栓で密閉した。組換え FK (rFK) は、5 mM ATP、5 mM MgSO_4 、100 μM riboflavin を含む 50 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) 中で、37°C で 15 分間保温して反応させた。2-2-2 と同様に反応液を HPLC に供し FMN を定量した。

10. D-リボースの定量

rFMO-rFR のカップリング反応後の反応液を凍結乾燥し、得られたペレットを TMSI-H (GL Science, 東京)に懸濁して D-リボースを誘導体化した。GC-mass spectrometer (QP2010, Shimadzu)を用いて、質量ガスクロマトグラフィー (GCMS) によって D-リボ

ースのトリメチルシリル誘導体を定量した。GCMSにはDB-5カラム(30 m×0.32 mm, J & W Scientific Inc., Folsom, CA, USA)を用いて、気化室温度とイオン源温度は、それぞれ250°Cと200°Cとした。キャリアガスにはヘリウムガスを利用し、流速は1 mL min⁻¹とした。カラム温度は120°Cに設定して、2分間保温したのち6°C min⁻¹で180°Cまで上昇させて1分間保温し、続いて10°C min⁻¹で300°Cまで上昇させて1分間保温した。

11. 溶存酸素濃度の測定

酵素反応液中の溶存酸素はClark-type O₂ electrode (Model 5300 Biological Oxygen Monitor, Yellow Spring Instrument, Yellow Springs, OH, USA)を用いて室温下で測定した。

第3節 結果

1. リボフラビン分解菌の単離

土壌試料を単離源として、リボフラビンを炭素源とするMM培地を用いて環境中のリボフラビン分解菌の単離を試みた。リボフラビンに特有な黄色が消失することを指標としてリボフラビンを分解する菌株を選抜し、12株のリボフラビン分解菌を取得した。得られた菌株のゲノムDNAを鋳型として、Table 1-1に示すプライマーを用いて16S rRNA遺伝子を増幅し、その塩基配列を解析したところ、単離した12株のリボフラビン分解菌はいずれも*Microbacterium*属細菌であると同定された(Table 1-2)。12株の*Microbacterium*属細菌のリボフラビン分解活性を測定したところ、培養上清と無細胞抽

出液を用いた場合にはリボフラビンは減少しなかった。これらの画分にはリボフラビン分解活性がないと考えられた。一方、不溶性画分を用いたリボフラビン分解活性を測定したところ、いずれの画分においてもリボフラビンの減少が確認され、そのうち *M. hydrocaroxydans* R33 のそれが最も高いリボフラビン分解活性を有することが示された (Fig. 1-1)。 *M. paraoxydans* R16 を 10 mM リボフラビンを単一炭素源とする MM 培地で培養したところ、リボフラビンの消費に伴って、 *M. paraoxydans* R16 が生育し、リボフラビンの分解産物としてルミクロムが培地中に蓄積した (Fig.1-2)。このことから、 *M. paraoxydans* R16 はリボフラビンのリビチル部位を分解して炭素源として利用して生育し、分解産物のルミクロムを菌体外へ放出することが示された。 *M. maritypicum* G10 はフラビン依存型モノオキシゲナーゼ (FMO) とフラビン還元酵素 (FR) のカップリング反応によりリボフラビンを分解し、その分解産物はルミクロムと D-リボースであることが示されている(10)。スクリーニングによって得られた 12 株と *M. maritypicum* G10 は 16S rDNA 塩基配列と 89%以上の相同性を有しており (Table 1-2)、取得した菌株でも *M. maritypicum* G10 と同様の機構を介してリボフラビンが分解していると予想された。

2. *Devosia riboflavina* のリボフラビン分解活性の解析

本研究で単離されたリボフラビン分解菌はすべて *Microbacterium* 属細菌であった。前述のように、グラム陽性で放線菌に分類される *Microbacterium* 属細菌のリボフラビン分解機構は他のグループによって明らかとされた。一方で、グラム陰性菌のリボフラビン

分解機構は未知であった。そこで、リボフラビン分解活性を有する α -プロテオバクテリア *Devosia riboflavina* のリボフラビン分解機構の解明を試みた。

D. riboflavina をリボフラビンを単一炭素源とする MM 培地で培養した。*D. riboflavina* はリボフラビンの消費に伴って生育し、分解産物としてルミクロムが検出された (Fig. 1-3, 上段)。分解産物としてのルミクロムの生産は LCMS を用いた分析によって同定した (Fig. 1-4)。リボフラビンを他の炭素源に置き換えて同様に生育試験を行ったところ、D-リボースを炭素源とした場合にリボフラビンの場合と同等の生育を示した (Fig. 1-3, 下段)。他の炭素源の場合には、前培養からの持ち込まれた栄養源によると考えられるわずかな生育が見られたのみであった (Fig. 1-3, 下段)。柳田らの推察では、*D. riboflavina* はリボフラビンをルミクロムとリビトールに分解するとされていたが(13)、本研究により、*D. riboflavina* はリボフラビンをルミクロムと D-リボースに分解し、D-リボースを栄養源として利用することが新たに示された。続いて、*D. riboflavina* のリボフラビン分解活性の細胞内局在と基質による酵素生産の誘導性を検討した。リボフラビン添加または非添加した培地を用いて培養して得られた *D. riboflavina* の菌体からそれぞれ無細胞抽出液を調製してリボフラビン分解活性を測定したところ、リボフラビンを添加した場合の不溶性画分にのみ高いリボフラビン分解活性が検出された (Fig. 1-5)。このことから *D. riboflavina* のリボフラビン分解活性はリボフラビンによって発現が誘導され、不溶性画分で活性化されることが示された。

3. リボフラビン誘導性フラビン依存型モノオキシゲナーゼの同定

前節と同様に、リボフラビンを添加した条件で培養した *D. riboflavina* から無細胞抽出液を調整し、SDS-PAGE に供したところ、45 kDa の位置にリボフラビンを添加しないときには検出されないバンドが得られた (Fig. 1-6)。このバンドに含まれるタンパク質を、トリプシンを用いてゲル内消化した後、MALDI-TOFMS 解析に供したところ、*D. riboflavina* 由来の機能未知のタンパク質が同定された (Score; 97, E-value; 0.022, coverage; 34%, Fig. 1-7)。Blast のデータベース上では、このタンパク質はフラビン依存型モノオキシゲナーゼ (FMO) であると推定されており、*D. riboflavina* のゲノム DNA 上でフラビン還元酵素 (FR)、フラビンリン酸化酵素 (FK)、リボースリン酸化酵素 (RK) と推定される機能を持った複数の遺伝子とともにクラスターを形成していた (Fig. 1-8)。 *M. maritimum* G10 が有するリボフラビン分解遺伝子クラスターと比較すると、両遺伝子クラスターは類似する構造であることが判明した (Fig. 1-8, (10))。更に、FMO 遺伝子クラスターを構成する 4 つの遺伝子の転写量を測定したところ、リボフラビンを添加して培養した条件下において、いずれの遺伝子の転写量も有意に増加していた (Fig. 1-9)。以上の結果より、*D. riboflavina* において、本 FMO 遺伝子クラスターがリボフラビン分解に関与すると考えられた。

4. 組換え FR と組換え FK の酵素学的解析

His タグを付加した rFR と rFK を大腸菌で発現させ、各組み換えタンパク質を調製した (Fig. 1-10)。リボフラビンと ATP、 Mg^{2+} を含む 50 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) に rFK を添加して、37°C で 5 分間反応させると、リボフラビンがリン酸化されて FMN に変換された (Fig. 1-11)。rFK のリボフラビンに対する K_m は $57 \pm 1 \mu M$ 、 k_{cat} は $3.5 \pm 0.1 \text{ min}^{-1}$ であった。これらの値は他の微生物がもつ既知の FK のそれと同等の値であり(19)、rFK はリボフラビンリン酸化酵素であると同定した。

rFR 自体には可視領域の波長の光を吸収しないが、FMN に対して飽和量存在するとき、FMN の吸収スペクトルを変化させた (Fig. 1-12, 実線)。このことから、rFR は FMN と結合することが示された。また、FMN と NADH の混合溶液に対して触媒量の rFR を添加すると、FMN の吸収スペクトルが急速に消失した (Fig. 1-13, 点線)。この時の rFR の NADH の酸化速度は $51 \mu\text{mol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ であった。NADH の代わりに NADPH を用いたときにはフラビンの吸収スペクトルの急速な消失は見られなかった (Fig. 1-13, 破線)。これらのことから、rFR は NADH を電子供与体として遊離の FMN を還元型フラビンへと変換することが示された。このときの FMN に対する K_m は $6.0 \pm 0.3 \mu M$ であり、FMN に基質特異性を示す既知の FR の K_m と同等であった(20,21)。また、FAD に対する K_m は FMN のそれに対して 15 倍低く、リボフラビンに対してはフラビン還元活性をほとんど示さなかったことから、rFR は電子受容体を FMN、電子供与体を NADH として

特異的に認識する、NADH:FMN オキシドレダクターゼであると同定した (table 2-2)。

5. 組換え FMO と組換え FR のカップリングによるリボフラビン分解

一般的に、FMO は FR とカップリングし、FR から供給される還元型フラビンと遊離の酸素を利用してモノオキシゲネーションを触媒する(22)。NADH、FMN、リボフラビンを含む反応系に、rFMO と rFR を 10 : 1 で添加して好気条件で反応させると、リボフラビンが消費されルミクロムが生成した (Fig.1-14, FMO / FR)。一方、上記の酵素反応液から rFMO を除いて反応させた場合では、リボフラビンは減少されず自然分解程度のルミクロムが検出されたのみであったため (Fig. 1-14, FR)、このカップリング反応における鍵酵素は rFMO であることが示された。rFR を除いた反応では、わずかにルミクロムが検出されたが、非酵素的に生成された還元型 FMN を rFMO が利用したためであると考えられた (Fig. 1-14, FMO)。さらに、リボフラビンあるいは FMN の非添加条件では、ルミクロムは検出されなかったことから (Fig.1-15, -RF, -FMN)、この反応系において FMN は電子伝達体として機能することが示された。反応後、リボフラビンは $42 \pm 3 \mu\text{M}$ 消費され、ルミクロムは $35 \pm 4 \mu\text{M}$ 生産され、化学量論的に反応が起こることが示された。rFR に対する rFMO の濃度比を変化させると rFMO 量依存的に反応速度が増加し、rFMO: rFR が 25 : 1 以下の場合の平均比活性は $30 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ であった (Fig. 1-16)。これは rFR の NADH 酸化速度 ($51 \mu\text{mol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$) に対して十分に小さい値となり、FMO/FR カップリング機構において rFMO による反応が律速段階であることが

示された。以上の結果より、*D. riboflavina*では rFMO と rFR のカップリングによってリボフラビンがルミクロムへ変換されることが明らかとなった。

6. リボフラビンからルミクロム、D-リボースへのモノオキシゲナーゼ反応

これまでの知見では、*D. riboflavina* のリボフラビン分解はヒドロラーゼ反応であると考えられていた(10,13)。一方で、本研究で見出した FMO は一般的に還元型補酵素と酸素を利用してモノオキシゲナーゼ反応を触媒するため、*D. riboflavina* によるリボフラビン分解反応は先行研究で提唱されていたような単純なヒドラーゼ反応ではないと考えられた。そこで、本項では *D. riboflavina* の FMO と FR のカップリング反応の詳細を解析し、微生物のリボフラビン分解機構を再考することとした。rFMO 自体は特徴的な吸収スペクトルを示さないが、FMN に対して rFMO が過剰量存在する場合に、FMN の吸収スペクトルが変化し、rFMO と FMN が結合することが示された (Fig. 1-17)。これに触媒量の rFR と NADH を添加すると吸収スペクトルが大きく変化した (Fig. 1-18)。これは二成分型 FMO システムの反応中間体であるヒドロペルオキシ FMN (FMN-OOH) の典型的なスペクトルと一致し(23)、さらにこのスペクトルはリボフラビンを添加することで消失した (データ示さず)。このことから *D. riboflavina* の二成分型 FMO では、FMN-OOH が反応中間体としてはたらくことが考えられた。また、カップリング反応のターンオーバー中に、溶存酸素は rFMO の存在に依存して $9.6 \text{ nmol s}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ で消費された (Fig. 1-19)。嫌気条件下でカップリング反応を行うとルミクロムを生成しないこと

から (Fig. 1-15, $-O_2$)、カップリング反応に酸素が必要であることが示された。溶存酸素 (250 μM) を完全に消費した反応液からは $20 \pm 7 \mu\text{M}$ の D-リボースが検出された。また、リビトールは検出されなかったことから、rFMO と rFR のカップリング反応によるリボフラビンの分解産物がルミクロム (Fig. 1-4) と D-リボース (Fig. 1-20) であることが示された。カップリング反応における D-リボースの生成量はリボフラビンの消費量 ($42 \pm 3 \mu\text{M}$)、ルミクロムの生成量 ($35 \pm 4 \mu\text{M}$) と同等であったが、これらは消費された酸素量の 8 -16%ほどであった。これはリボフラビン分解のモノオキシゲナーゼ反応が酸素に対して 100%共役していない (アンカップルしている) ことを示すものである。このような酸素のアンカップルは lysine monooxygenase (24) や nitrilotriacetate monooxygenase (25) など、リボフラビン FMO と同様に FR とのカップリング反応を示すフラビンモノオキシゲナーゼで見られる特徴である。以上の結果より、*D. riboflavina* のリボフラビン分解系は酸素依存的に反応が進行し、rFMO と rFR との二成分型 FMO システムを構成するリボフラビンモノオキシゲナーゼであると同定した。

7. FMO の系統解析とリボフラビン分解遺伝子クラスターの分布

M. maritopicum G10 のリボフラビン FMO は他の *Microbacterium* 属細菌や放線菌網の細菌のそれと系統的に近縁であることが示されている(10)。*D. riboflavina* の FMO は *M. maritopicum* の FMO と、アミノ酸配列レベルで 67%の相同性を示すものであった。

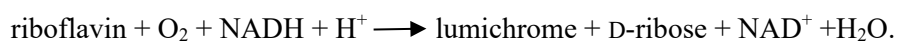
これらの FMO について改めて系統解析を行った。Blastp 上でアミノ酸配列の相同性検索を行うと、*D. riboflavina* の FMO は nitrilotriacetate monooxygenase family に属するタンパク質と高い相同性を示した。NCBI データベース上で *D. riboflavina* の FMO とアミノ酸配列が 40%以上の相同性を示したタンパク質を抽出して系統解析を行い、分子系統樹を作成した (Fig. 1-21)。*D. riboflavina* の FMO は他の *Devosia* 属細菌や放線菌綱細菌 (*Microbacterium* 属, *Herbiconiux* 属, *Leifsonia* 属, *Kitasatospora* 属, *Streptomyces* 属)の推定 LLM ファミリーのフラビン依存型オキシドレダクターゼと同じカテゴリーに分類された。このカテゴリーには *M. maritypicum* の FMO (WP_02120108.1)も分類されており、 α -プロテオバクテリア綱の *D. riboflavina* と Actinomyces 綱の *M. maritypicum* の FMO が系統的に近縁なタンパク質であることが示された。*D. riboflavina* の FMO と *M. maritypicum* の FMO を含むタンパク質ファミリーを Riboflavin monooxygenase family であるとした。

さらに、リボフラビン分解遺伝子クラスターの分布を PATRIC 3.4.15(26)を用いて解析した。*D. riboflavina* の FMO 遺伝子または FR 遺伝子のオルソログを有する遺伝子クラスターについて検索したところ、*Devosia* sp. Root413D1, *D. epidermidihirudinis* E84, and *Devosia* sp. H5989 は *D. riboflavin* JCM13427 のリボフラビン分解遺伝子クラスターに含まれる遺伝子をすべて有することが明らかとなった (Fig. 1-22)。同様に、*M. maritypicum* ME, *M. paraoxydans* DSM 15019, *Herbiconiux* sp. YR403, and *Leifsonia* sp. Root 4 において

も共通する遺伝子クラスターが見いだされた。これ以外の細菌は完全なリボフラビン分解遺伝子クラスターを有しておらず、本クラスターが一部の放線菌綱細菌と *Devosia* 属細菌に分布することが示された。

第4節 考察

本章で示した結果より、*D. riboflavina* は Fig. 1-23 で示すような二成分型 FMO システムを介してリボフラビンを酸化的に分解することが考えられた。この反応系では、FR とペアをなす二成分型 FMO が鍵酵素となり、FMN が電子伝達体としてモノオキシゲナーゼを仲介する。FMN は FR が NADH を利用して還元型 FMN に変換し、FMO へ受け渡される。FMO 中では還元型 FMN と酸素より FMN-OOH が生産され、その酸化活性を利用してリボフラビンが分解されルミクロムと D-リボースが生成される。これら一連の酵素反応は、他の化合物を基質とする FMO のそれと同様のものではあった(33)。また、化学両論的な解析から、*D. riboflavina* のリボフラビン分解反応は以下のような反応式で示される。



この時に生産される D-リボースは RK によってリン酸化されて、エネルギー代謝で利用されると考えられる。RK は細菌に広く保存されており、D-リボースを D-リボース-5-リン酸へと変換し、D-リボース-5-リン酸はペントースリン酸経路を経て炭素源として利用される(27)。Fig. 2-1 より *D. riboflavina* はリボフラビンを分解し、得られた D-リボ

ース利用して生育することが考えられた。これらのタンパク質をコードする遺伝子はクラスターを形成しており、リボフラビンによってそれらの転写が活性化されることが示された。さらに無細胞抽出液の FMO 活性もリボフラビンによって発現が誘導された。この発現誘導機構は *D. riboflavina* がリボフラビンを利用するための適応機構としてはたらいっていると考えられる。FK はリボフラビンを FMN へとリン酸化する活性を有するが、リボフラビン分解機構における FMN 生産の生理的意義の理解には本遺伝子クラスターの機能について更なる解析が重要であろう。

柳田らや Xu らの報告では、細菌のリボフラビン分解の鍵反応はいずれも hydrolase によって触媒されるとされていた(10,13)。本章では、リボフラビン分解反応に際して FMO 依存的に酸素が消費されること、分解産物としてルミクロムと D-リボースが生産されること、反応中間体として FMN-OOH を生成することが示され、*D. riboflavina* 由来の推定 FMO がリボフラビンモノオキシゲナーゼであることが明らかとなった。本章で示した結果はリボフラビンモノオキシゲナーゼの詳細な機能を初めて解明したものであり、微生物のリボフラビン分解について新たな理解を与えるものである。

これまで *Microbacterium* sp. TPU 3518 や *M. maritypicum* G10 のように、リボフラビンを分解する細菌は *Microbacterium* 属を中心に報告されていた(10,16)。本研究において、筑波大学周辺から単離されたリボフラビン分解菌は *M. paraoxydans* や *M. hydrocarboxydans* であった。また、機能は未確認であるが、*M. maritypicum* G10 のリボフ

ラビン分解遺伝子クラスターと同等のクラスターを有する *Microbacterium* 属細菌は多種存在していた（データ示さず）。これらの *Microbacterium* 属細菌は多様な環境、地域で単離されており、リボフラビン分解遺伝子は *Microbacterium* 属細菌内で広く保存されていることが示唆された。一方で、本論文ではプロテオバクテリア門に属する細菌のリボフラビン分解酵素およびその遺伝子クラスターについては初めて明らかとした。

FMO 遺伝子クラスターの解析により、同等のリボフラビン分解遺伝子クラスターは *Microbacterium* 属細菌と *Devosia* 属細菌で保存されていることが確認され、進化的に遠縁である細菌種間でもリボフラビン分解能が共有されていることが見出された。一方で、これらの細菌はリボフラビン生合成酵素も有していることから、生育上、補酵素の前駆体としてリボフラビンを利用することが必須であると考えられる。このことから、*D. riboflavina* で見出されたりボフラビン分解遺伝子クラスターのリボフラビンによる誘導性は、細胞内での補酵素合成に用いられるリボフラビンの枯渇を防ぐための機能であると考えられた。すなわち、*Devosia* 属細菌や *Microbacterium* 属細菌は環境中に遊離した余剰のリボフラビンを取り込んで分解し、炭素源として利用していると考えられる。パイロンの根圏では、存在する微生物の半数が細胞外にリボフラビンを排出していることが明らかとなっている (28)。また、*Shewanella oneidensis* は細胞外電子伝達のためにリボフラビンを分泌していることが知られている(29)。これは、他の生物が利用しない化合物を栄養源として利用するリボフラビン分解菌の生存戦略であると考えられる。

Table 1-1 Primers used in this study

Primer	Nucleotide sequence	
<i>Analysis of 16S rDNA sequence</i>		
10 F	5'- AGAGTTTGATCCTGGCTCAG -3'	
515 F	5'- GTGCCAGCAGCCGCGGTAA -3'	
800 F	5'- GGATTAGATACCCTGGTA -3'	
1237 F	5'- GGGCTACACACGTGCAAC -3'	
519 R	5'- GAATTACCGCGGCTGCTG -3'	
800R	5'- TACCAGGGTATCTAATCC -3'	
1500R	5'- GGTTACCTTGTTACGACTT -3'	
Primer	Gene	Nucleotide sequence
<i>Plasmids construction</i>		
FMO_BamHI_Fw	FMO	5'- CCGGGATCCAATTACGAAAGACATTACGATG -3'
FMO_EcoRI_Rv		5'- CGGAATTCTTAGAGCGTGCGATACCCGG -3'
FR_BamHI_Fw	FR	5'- AAGGATCCGATCTTGAATAGCGCGG -3'
FR_EcoRI_Rv		5'- AAGAATTCTCAGGATGCCCCGGGACA -3'
FK_BamHI_Fw	FK	5'- AAGGATCCGTTGGGGATCAGACTT -3'
FK_EcoRI_Rv		5'- CAGAATTCCATGGCAGAAGTCCAG -3'
<i>Quantitative PCR</i>		
FMO_RT_Fw	FMO	5'- CATACCGAACTCTCGCAGACC -3'
FMO_RT_Rv		5'- TTCGGGCGTACCGACATAG -3'
FR_RT_Fw	FR	5'- CATTTTCGCTGTTTCCAACCTG -3'
FR_RT_Rv		5'- CGAAACGGTGCTGAACGA -3'
FK_RT_Fw	FK	5'- TCCTGCATCGTCTGGCTTC -3'
FK_RT_Rv		5'- GTCGTCAAAGGTGGGGTTG -3'
RK_RT_Fw	RK	5'-AACACTGCCCTTTCCTTG -3'
RK_RT_Rv		5'- GGCGTCAAGGTCGGTTATG -3'
gyrA_RT_Fw	gyrA	5'- TCCGAACTGGTCTCTTCACTCTC -3'
gyrA_RT_Rv		5'- CAACAATGACCTGCTTCTTACCAC -3'

Table 1-2 Analysis of partial 16S rDNA sequence of riboflavin decomposing bacteria.

<i>Strain</i>	<i>Predicated strain</i>	<i>Ident (%)</i>	<i>Ident (%) with M. maritypicum.</i>
R13	<i>Microbacterium paraoxydans</i>	90	89
R14	<i>Microbacterium paraoxydans</i>	94	93
R15	<i>Microbacterium paraoxydans</i>	95	95
R16	<i>Microbacterium paraoxydans</i>	97	96
R27	<i>Microbacterium paraoxydans</i>	97	96
R31	<i>Microbacterium hydrocarboxydance</i>	99	96
R32	<i>Microbacterium paraoxydans</i>	99	99
R33	<i>Microbacterium hydrocarboxydance</i>	99	96
R34	<i>Microbacterium hydrocarboxydance</i>	98	97
R35	<i>Microbacterium oxydans</i>	99	99
R36	<i>Microbacterium sp. TJ-101</i>	99	98

Table 1-3 Steady state kinetics of rFR for various substrates

Substrate	k_{cat} (s^{-1})	K_m (μM)	k_{cat}/K_m ($s^{-1} \mu\text{M}^{-1}$)
FMN*	$3.6 \pm 0.7 \times 10^2$	$6.0 \pm 1.2 \times 10^0$	$6.0 \pm 1.2 \times 10^1$
FAD*	$2.9 \pm 0.6 \times 10^2$	$9.2 \pm 1.8 \times 10^1$	$3.1 \pm 0.6 \times 10^0$
Riboflavin*	$< 8.3 \pm 2.0 \times 10^0$	N.D.	N.A.
NADH [†]	$1.0 \pm 0.2 \times 10^2$	$1.4 \pm 0.3 \times 10^2$	$0.7 \pm 0.2 \times 10^0$
NADPH [†]	$< 4.1 \pm 1.2 \times 10^0$	N.D.	N.A.

* 0.2 mM NADH was used. [†]25 μM flavin compound was used.

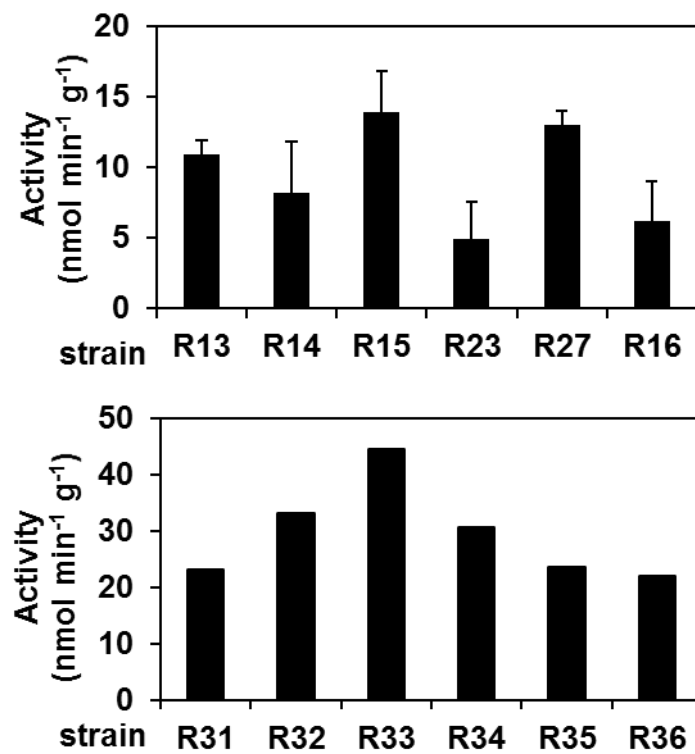


Figure 1-1. Riboflavin-degradation by insoluble fractions of *Microbacterium* cell-free extracts cultured in the presence of riboflavin.

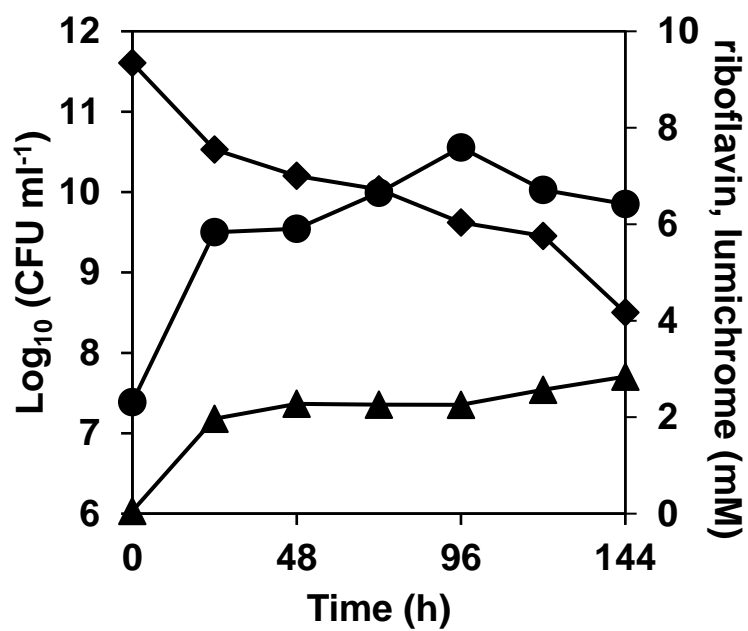


Figure 1-2. Degradation of riboflavin by *Microbacterium paraoxydans* R16. The strain was cultured in MM medium containing riboflavin as a sole carbon source at 30°C and viable cells were monitored by counting colonies appeared on plates (●). Riboflavin (◆) and lumichrome (▲) were measured by HPLC.

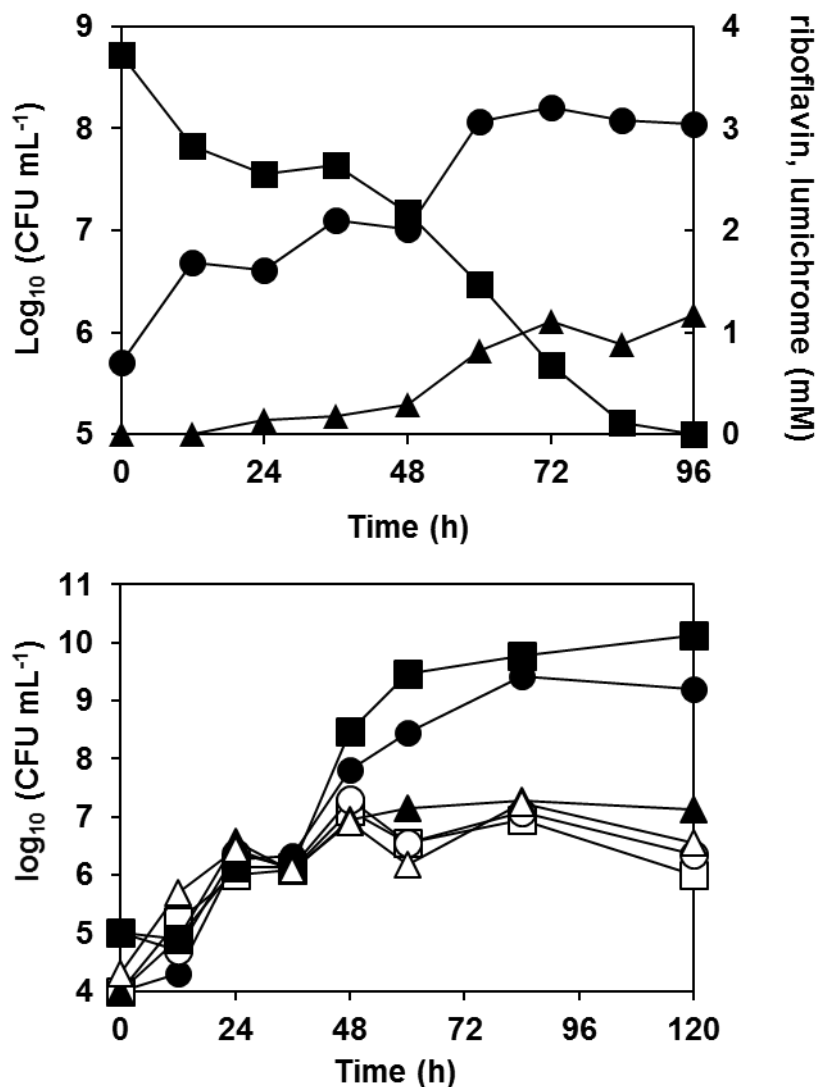


Figure 1-3. Degradation of riboflavin by *D. riboflavin* JCM13427. (A) Degradation of riboflavin by *D. riboflavina* JCM 13427. The strain was cultured in MM medium at 30°C and viable cells were monitored by counting colonies appeared on plates (●). Riboflavin (■) and lumichrome (▲) were measured by HPLC. (B) *D. riboflavina* was cultured in MM medium containing riboflavin (●), D-ribose (■), lumichrome (▲), ribitol (○), FMN (□), and none (△) (5 mM each) as a carbon source at 30°C. Typical data were presented. Standard errors for each measurement are below the symbol sizes.

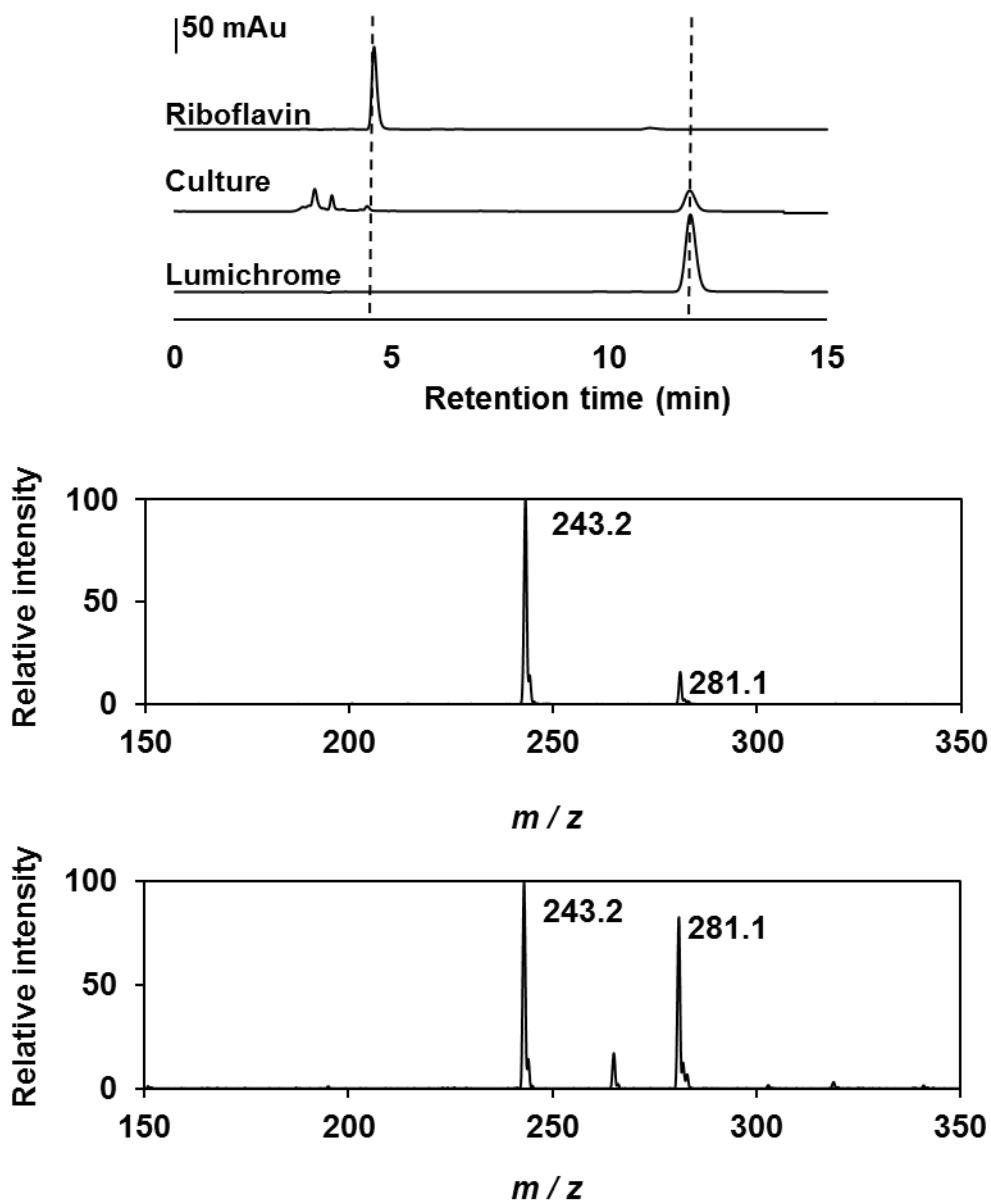


Figure 1-4. Determination of riboflavin degradation product by *D. riboflavina*. (A) HPLC chromatogram of commercial reagents (Riboflavin and Lumichrome) and extract of the *D. riboflavina* culture in the presence of riboflavin. (B) Mass spectra of riboflavin degradation product (upper) and commercial lumichrome (lower).

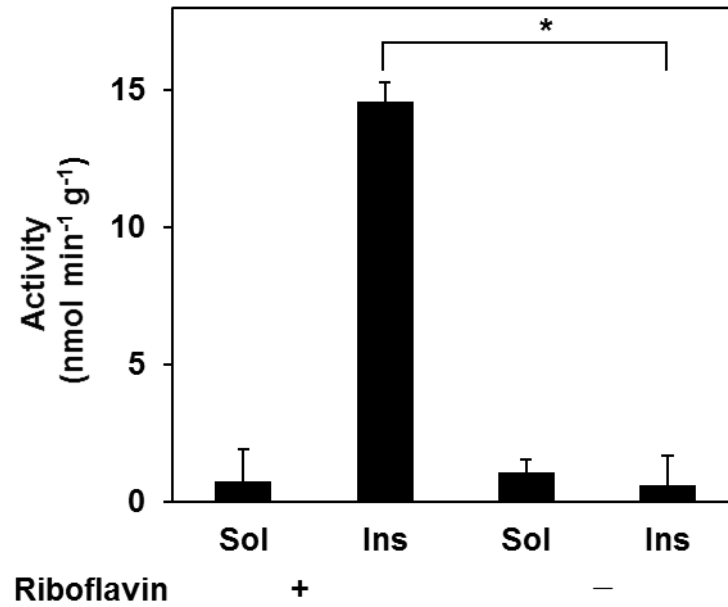


Figure 1-5. Riboflavin-degradation by soluble (Sol) and insoluble (Ins) fractions of *D. riboflavina* cell-free extracts cultured in the presence (+) or absence (-) of riboflavin. Data are means \pm S.E. *, $P < 0.01$.

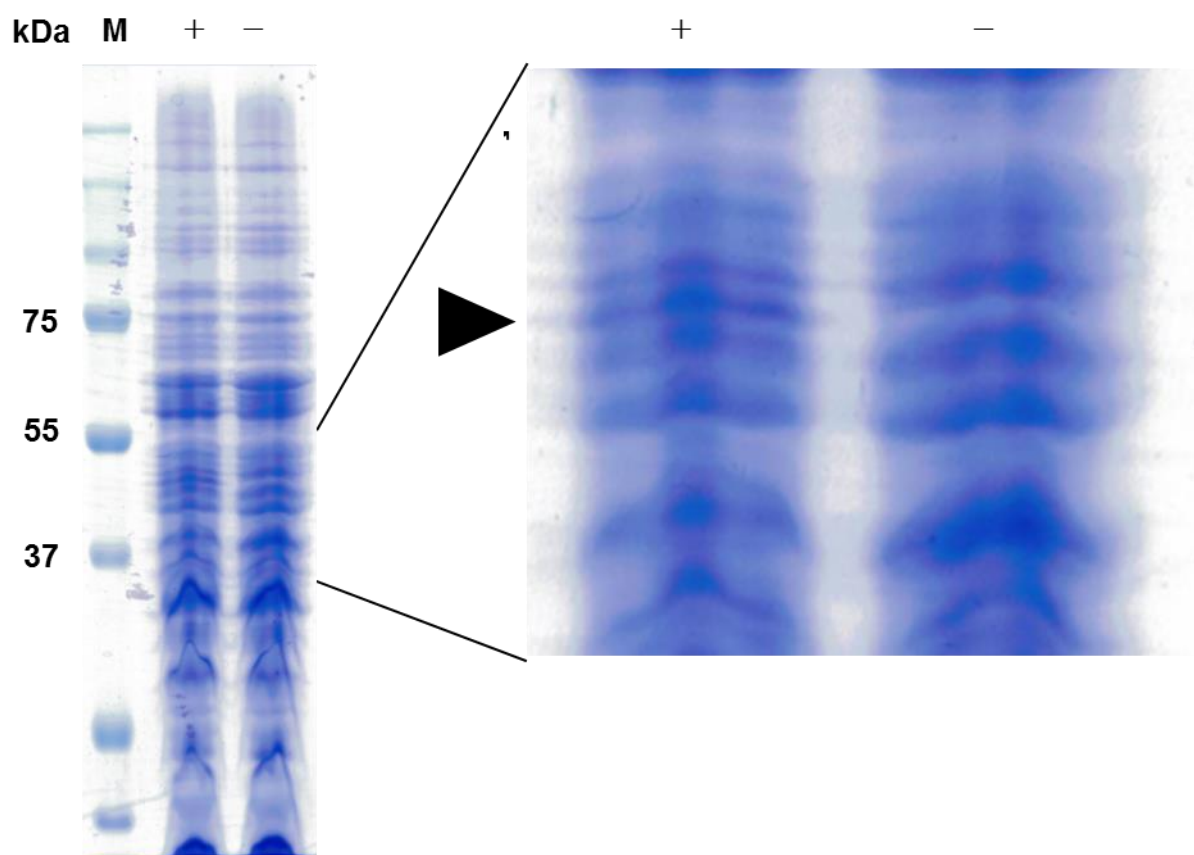


Figure 1-6. Gel image obtained from SDS-PAGE of the insoluble fraction in the presence (+) or absence (-) of riboflavin. Arrowhead indicates protein band appeared by the added riboflavin.

MTKDITMKKL	RFGLFENAQT	NDSGTSTWRH	PDSEHNFDT	LDYWVDVAKM
CEDAKLDFLF	LADAWGWADV	KGTRPDICDT	EGLDLPRLDP	AIVGAAIIAS
TEKLGIVMTG	STLLEQPYAF	ARRMQSLDHL	SKGRIGWNVV	TTGTAETAVA
AFGVPMVAHD	ERYNMADDFM	ELVYKLFEGA	WERDALERNK	AGRYANPDKV
HRISHDGPYF	RSHGFGNSSY	SPQGTPVLFQ	AGSSDRGKQF	GGKHGECIFL
GGGTAEKLAG	QVKSIRDEAV	ANGRDPNSIK	LMSAFSCVVA	PTKEEARRKH
QELLDATPE	VAVASYAWFT	GLDLSSFDP	TKMSDLHTEL	SQTQIARFGD
KTVGEVLKDW	HAHGVRTNPY	VGTPEDIADI	MIDLAEKTDI	DGFLFTPLIQ
PASTKDFVEQ	VMPILRARGV	AASDYEGDTL	RERLVGTPSP	ILSADHPGAG
YRTL				

Figure 1-7. Amino acid sequence of *D. riboflavina* FMO. Detected peptide fragments in MALDI-TOFMS analysis are marked in red. Score; 97, E-value; 0.022, coverage; 34%.

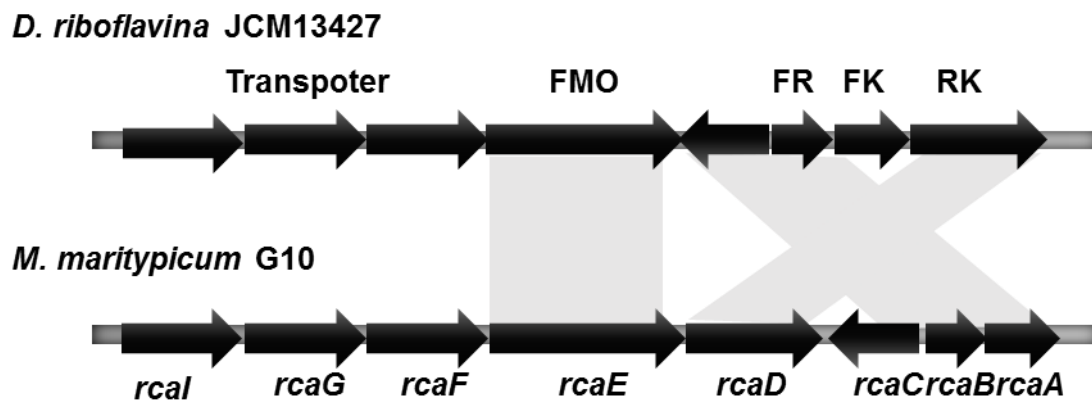


Figure 1-8. Schematic illustration of the gene clusters encoding FMO (WP_035082397.1, *rcaE*), FR (WP_084587600.1, *rcaB*), FK (WP_084587592.1, *rcaA*), RK (WP_035082393.1, *rcaD*), PadR family transcription regulator (TR, WP_035082396.1, *rcaC*) and ABC transporter (WP_084587593.1, WP_051960572.1, WP_051960573.1, *rcaFGI*). Abbreviations were shown in the text.

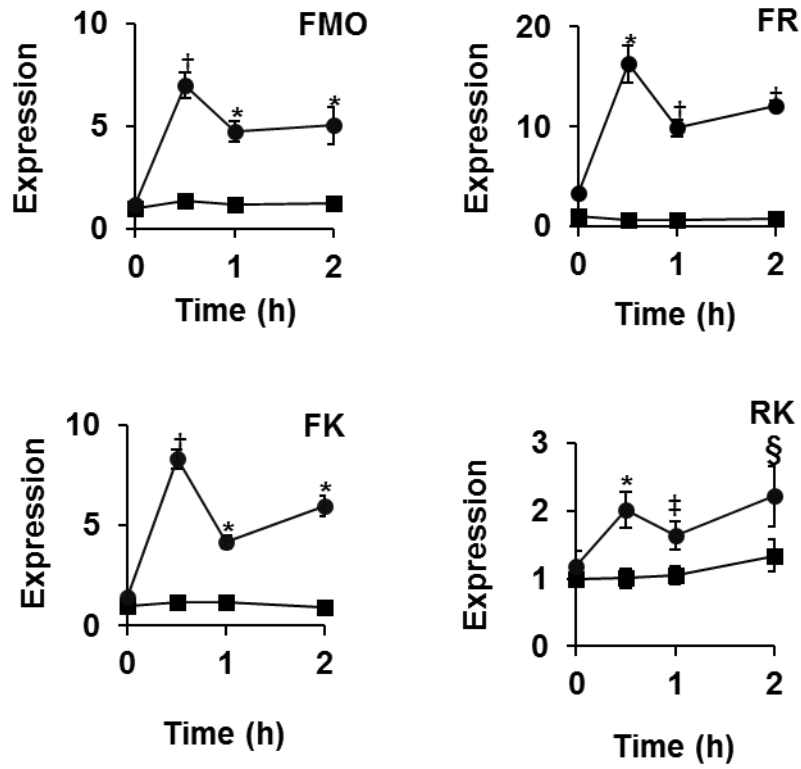


Figure 1-9. Quantitative PCR determined transcript levels after addition of riboflavin to the culture. Values are normalized with *gyrA* transcript. Each gene in absent of riboflavin at 0 h was taken as 1. Data are means of three experiments. Bars represent standard errors. *, $P < 0.05$; †, $P < 0.01$, ‡, $P < 0.1$, §, $P < 0.2$

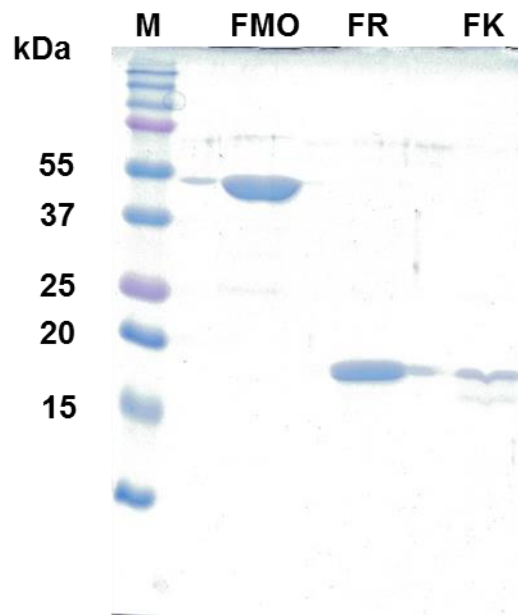


Figure 1-10. Image of SDS-PAGE gel. Lanes: M, molecular weight marker; 1, rFMO; 2, rFR (1 μ g each); 3, rFK (0.2 μ g).

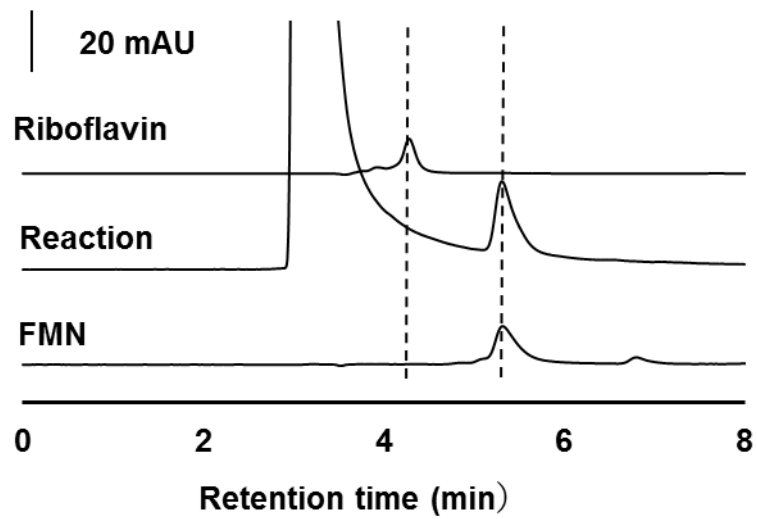


Figure 1-11. rFK phosphorylates riboflavin. Standard reaction of 85 mg mL^{-1} rFK, 0.1 mM riboflavin, and 5 mM ATP at 37°C was analyzed by HPLC.

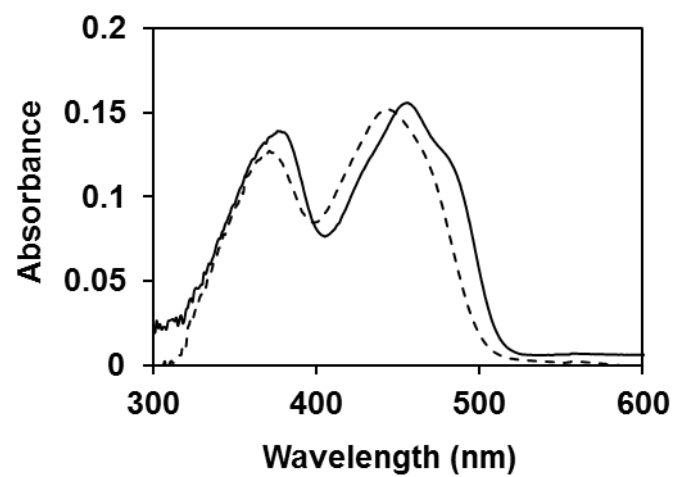


Figure 1-12. Absorption spectra of 10 μM FMN in 50 mM potassium phosphate (pH 7.0) in the presence (solid line) or absence (dashed line) of 200 μM rFR.

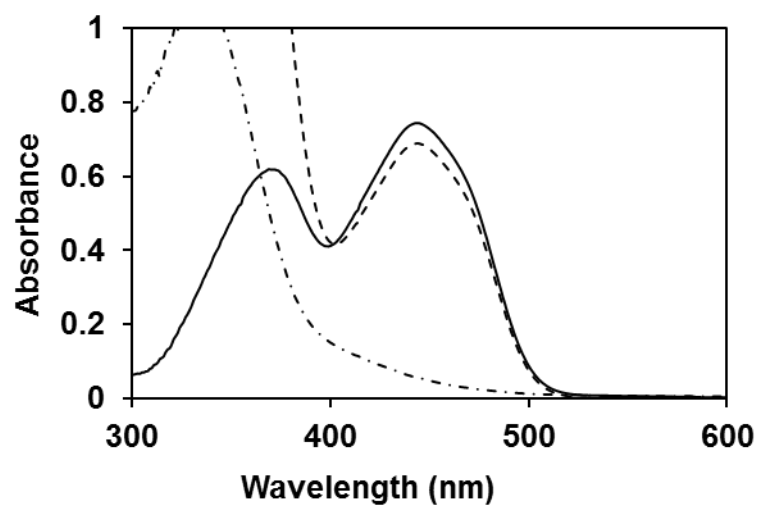


Figure 1-13. Reduction of FMN by rFR. Absorption spectra of 50 μM FMN in 50 mM potassium phosphate (pH 7.0) (solid line), to which 0.1 μM rFR was added (dashed line). Spectrum after further addition of 0.2 mM NADH (dash-dotted line).

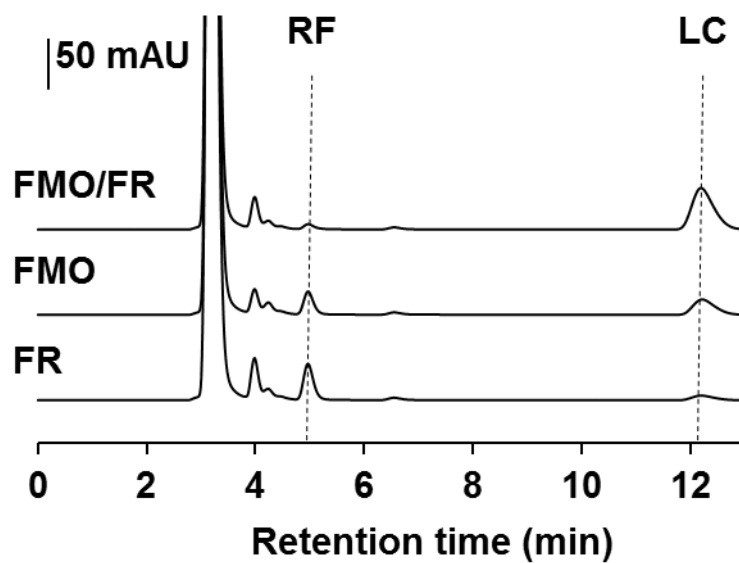


Figure 1-14. HPLC separation of coupled reaction of rFMO and rFR. Reaction contains 5 mM NADH, 20 μ M FMN, and 0.2 mM riboflavin in 50 mM potassium phosphate (pH 7.0). Included enzymes are 0.5 μ M rFR (FR), 5 μ M rFMO (FMO), and both 0.5 μ M rFR and 5 μ M rFMO (FMO/FR).

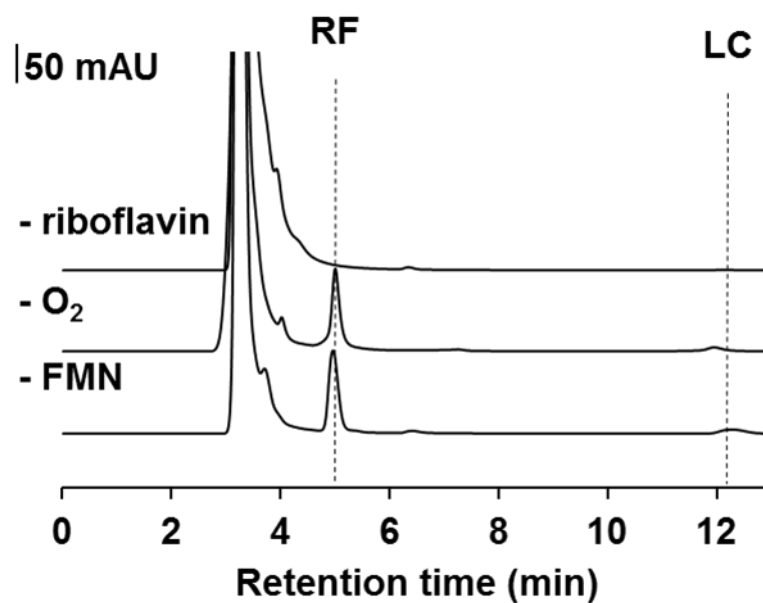


Figure 1-15. HPLC separation of the coupled reaction of 0.5 μM rFR and 5 μM rFMO without riboflavin (-riboflavin), FMN (-FMN), and oxygen ($-\text{O}_2$). Commercial lumichrome was used as a control (lumichrome).

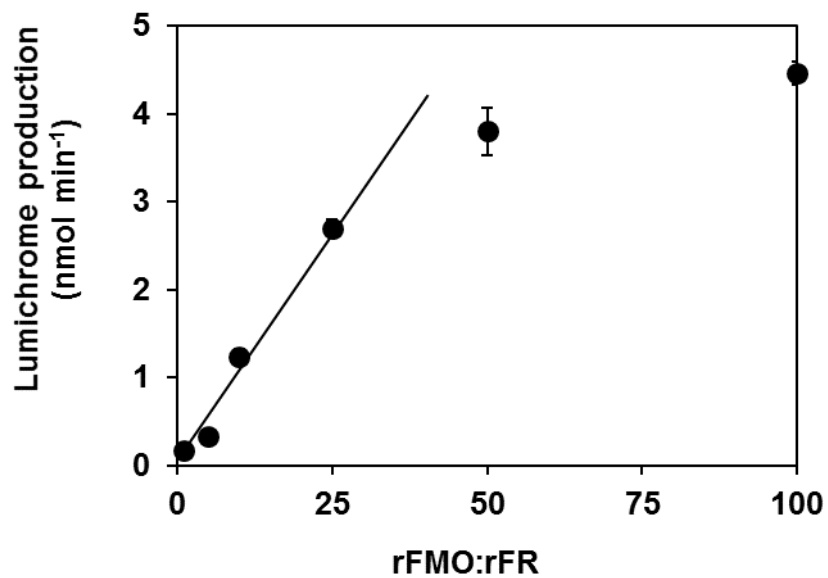


Figure 1-16. Activity of the rFMO/rFR couple is dependent with rFMO level. Reaction was performed in 2 mM NADH, 0.2 μ M FMN, 0.2 mM riboflavin, 0.4 μ M rFR, and various concentration of rFMO in 50 mM potassium phosphate (pH 7.0).

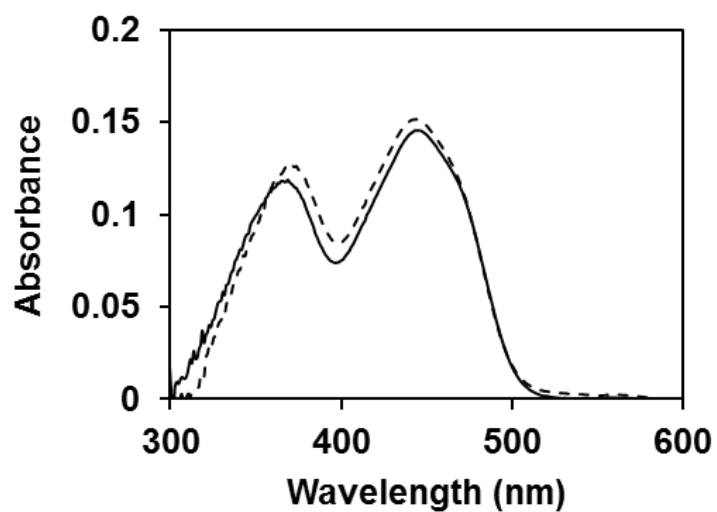


Figure 1-17. Binding of FMN and rFMO. UV-visible absorption spectra of FMN (10 μ M) in 50 mM potassium phosphate (pH 7.0) (dashed line) was changed by adding 400 μ M rFMO (solid line).

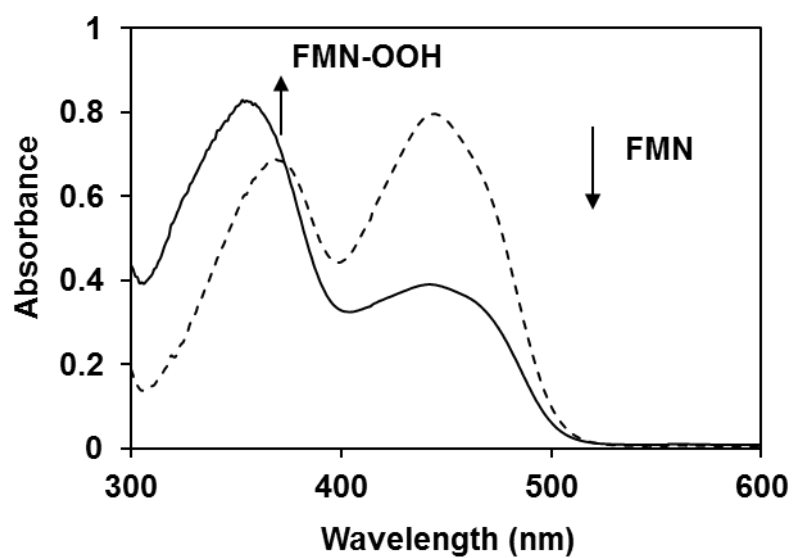


Figure 1-18. Generation of FMN-OOH species of rFMO. Absorption spectra of 50 μ M FMN and 25 μ M rFMN in 50 mM potassium phosphate (pH 7.0) containing catalytic amount (250 nM) of rFR (dashed line). Spectrum was recorded after addition of 0.2 mM NADH (solid line).

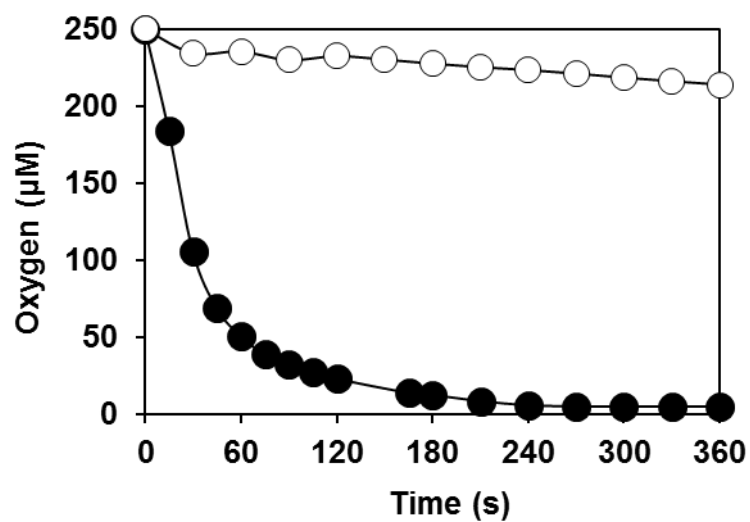


Figure 1-19. Oxygen consumption by the coupling reaction. Reaction contains 5 mM NADH, 20 μM FMN, 0.2 mM riboflavin, 0.1 μM rFR, and 10 μM rFMO in 50 mM potassium phosphate (pH 7.0) (●) or that lacks rFMO (○).

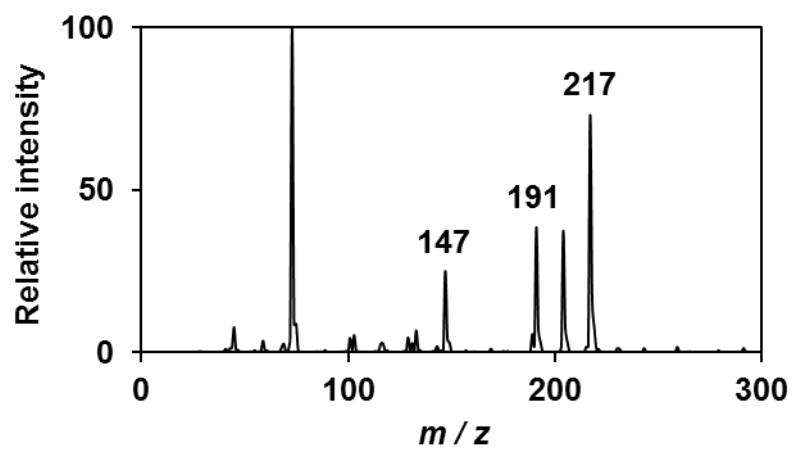


Figure 1-20. Mass spectrum of the reaction product identified as D-ribose.

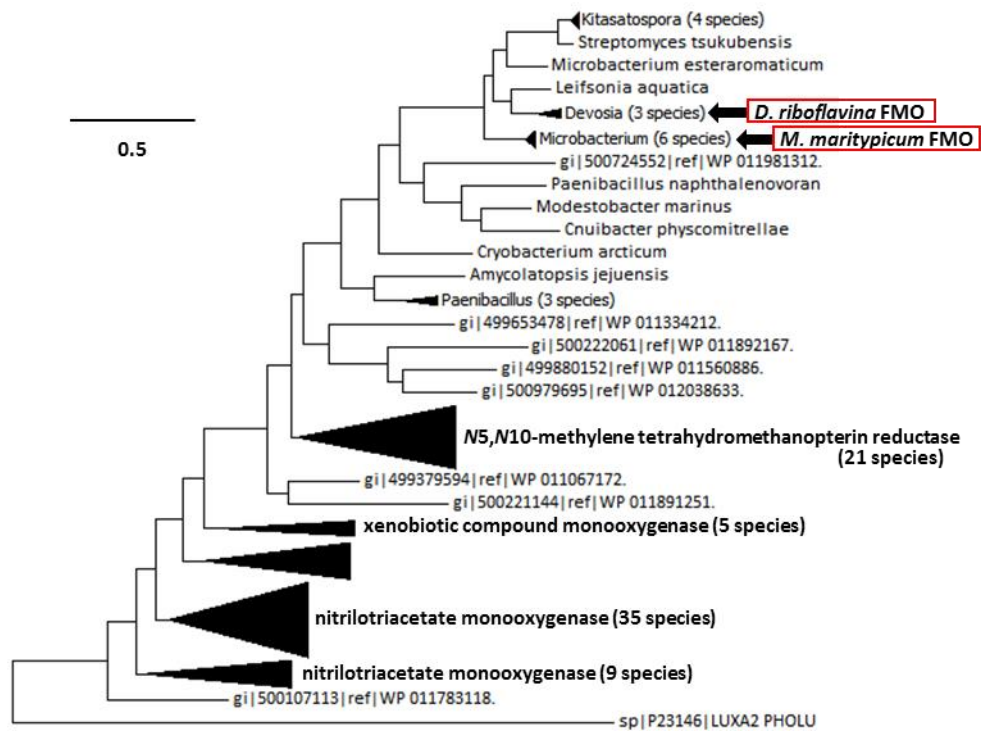


Figure 1-21. Phylogeny of bacterial FMO like proteins. Protein sequences were obtained as described in the text, and aligned using MEGA5.1 software (22)(30) and a phylogenetic tree was constructed using the Maximum likelihood method. The tree was rooted to the outgroup LUXA2_PHOLU (bacterial luciferase α -chain).

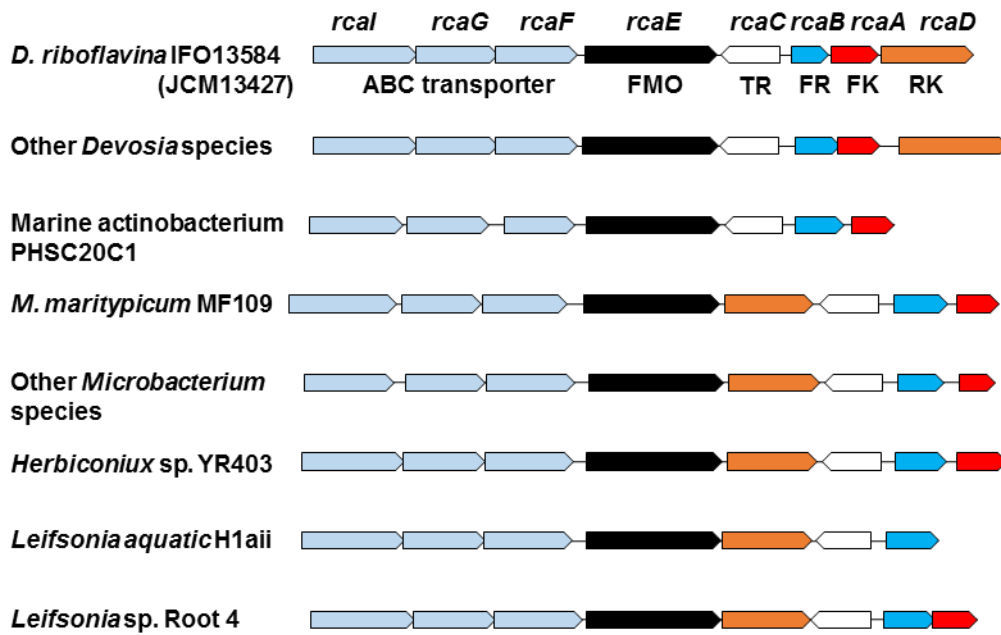


Figure 1-22. Distribution of the gene clusters for riboflavin degradation. Other *Devosia* species include *Devosia* sp. Root413D1, *D. epidermidihirudinis* E84, and *Devosia* sp. H5989. Other *Microbacterium* species include *M. paraoxydans* DSM 15019, and +. Enzyme abbreviations and the gene names are shown in the text.

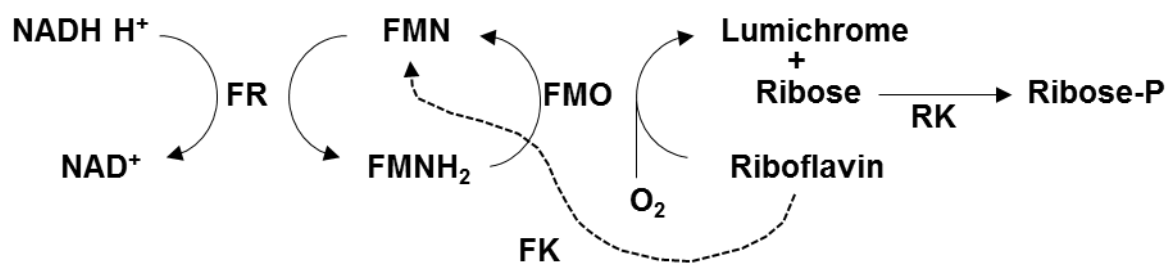


Figure 1-23. Proposed model for the *D. riboflavina* catabolism of riboflavin.

第2章 *Nocardioides nitrophenolicus* L16 のルミクロム分解機構の解明

第1節 序

第1章で明らかとしたように、*Devosia* 属細菌や *Microbacterium* 属細菌はリボフラビンを分解し D-リボースを炭素源として利用する過程で、もう一方の分解産物であるルミクロムを細胞外へ放出する。自然界では他の細菌がルミクロムを消費し、物質循環が成っていると考えられるが、これまでルミクロムを分解する微生物は知られていない。そこで、本章では土壌からのルミクロム分解の単離を試みた。さらに、取得した細菌の中で、*Nocardioides nitrophenolicus* L16 のルミクロム分解機構に着目し、ルミクロム分解酵素とそれをコードする遺伝子の同定を試みた。具体的には、*N. nitrophenolicus* L16 のドラフトゲノム配列情報より推定ルミクロム分解遺伝子クラスターを見出し、推定ルミクロム分解酵素の機能を解析した。

ルミクロムはベンゼン環、ピラジン環、ピリミジン環が順に並んだ複素環化合物である。ルミクロムの分解産物として、1,2-ジメチル-4,5-ジアミン-ベンゼンが得られ、この化合物は、メチル基の酸化によって、ポリアミドの原料となる 1,2-ジカルボキシ-4,5-ジアミン-ベンゼンとして利用可能になる可能性も考えられた。

第2節 材料と方法

1. 培養方法

土壌試料を単離源とした集積培養は minimal (MM)培地 (10 mM NH₄Cl, 10 mM potassium phosphate, 0.03% MgSO₄, 0.05% KCl, 0.2% trace element (17), pH 6.5) を用いて行った。炭素源としてリボフラビン、あるいはルミクロムを 50 μM 添加し、補助的に 0.02% Peptone と 0.02% Yeast extract を添加した。

Nocardioides nitrophenolicus L16 は Luria-Bertani (LB)培地を用いて 30°C で 24 時間前培養した後、1 mM のルミクロムを含む minimal (MM)培地 (10 mM NH₄Cl, 10 mM potassium phosphate, 0.03% MgSO₄, 0.05% KCl, 0.2% trace element (17), pH 6.5) に 2%量植菌して、30°C、120 rpm の条件で数日間培養した。*Echerichia coli* JM109 と BL21 (DE3) はプラスミドの構築と組換えタンパク質の生産にそれぞれ利用し、LB 培地を用いて培養した。

2. 単離菌の 16S rRNA 遺伝子配列解析

取得したリボフラビン分解菌またはルミクロム分解菌の 16S rRNA 遺伝子は、ゲノム DNA を鋳型として Table 2-1 に示すプライマーを用いて増幅した。得られた DNA 断片の塩基配列の解析には GenomeLab™ GeXP (Beckmann coulter, Brea, CA, USA)を使用した。

3. *N. nitrophenolicus* L16 のゲノム解読

N. nitrophenolicus L16 を LB 培地に植菌して一晩培養し、回収した菌体から Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, WI, USA) を用いてゲノム DNA を精製した。BGI JAPAN (神戸) に次世代シーケンスを委託してドラフトゲノムの塩基配列

を解読した。

4. ルミクロムの定量

細胞とルミクロムの結晶を溶解させるために培地を 80 mM KOH で希釈し、 $204,000 \times g$ 、 4°C の条件で 5 分間遠心分離し、得られた上清を分析用試料とした。リボフラビンとルミクロムの分析には、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) (1260 Infinity, Agilent technology) と Purospher STAR-RP 18 endcap column (Merck) を用い、254 nm の吸収を測定した。酢酸ナトリウム緩衝液 (pH4.5) : メタノール (1 : 1, v/v) を移動相として、流速は 0.8 mL min^{-1} とした。液体クロマトグラフィー質量分析 (LCMS) には LCMS8030 (SHIMADZU, 京都) を用い、カラムと移動相は上述の条件で分析を行った。

5. ルミクロム分解産物の分析

細胞とルミクロムの結晶を溶解させるために培地を 80 mM KOH で 10 倍に希釈し、 $204,000 \times g$ 、 4°C の条件で 5 分間遠心しものを分析用試料とした。試料の分析には、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) (1260 Infinity, Agilent technology) と Purospher STAR-RP 18 endcap column (Merck) を用い、254 nm の吸収を測定した。ギ酸アンモニウム緩衝液 (pH4.5) (FN) とアセトニトリル (ACN) を移動相として、流速は 0.8 mL min^{-1} とした。FN : ACN = 9:1 (v/v) を 10 分間維持し、4 分間で FN : ACN = 1 : 1 にし、4 分間継続したのち、4 分間で FN:CAN=9:1 にして 5 分間保持した。液体クロマトグラフィー質

量分析 (LCMS) には LCMS8030 (SHIMADZU) を用い、カラムと移動相は上述の条件で分析した。

6. 定量 PCR

LB で一晩前培養した *N. nitrophenolicus* L16 を 10mM グルコースを含む MM 培地に植菌し、30°C で 4 時間培養した後、培地に 200 μ M ルミクロムを添加して培養を続した。培養開始から 2 時間目まで 30 分ごとに菌体を回収した。Total RNA の抽出や cDNA の調製、定量 PCR は 2-2-4 の方法に従った。定量に際してのコントロールには *N. nitrophenolicus* L16 由来の 16S rRNA 遺伝子を利用した。PCR に用いたプライマーは Table 2-1 に示す。

7. 組換えタンパク質の調製

組換えタンパク質は 2-2-5 の方法に従った。Table 2-1 に示すプライマーを用いて *N. nitrophenolicus* L16 のゲノム DNA より DNA 断片を増幅した。組換え GL000138 (r138) と組換え GL000139 (r139) は 300 mM のイミダゾールを含む 20 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.4) で溶出した。

8. 組換え GL000138 と組換え GL000139 の酵素活性測定

r138 と r139 の酵素反応は 100 μ M のルミクロムを含む 50 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) で行い、0.5 μ M の r138 または 0.5 μ M の r139、あるいはその両方を添加した。

反応開始前の溶液と 37°C で 1 時間反応させた後の酵素反応液を HPLC 分析でルミクロムを定量した。ルミクロムをリボフラビン、FMN、シトシン、チミン、ウラシル、キサントシン、アラントインに置き換えた場合も、同様の分析を行った。フラビン化合物の分析には 1260 Infinity (Agilent technology) と Purospher STAR-RP 18 endcap column (merck) を用い、254 nm の吸収を測定した。酢酸ナトリウム緩衝液 (pH4.5) : メタノール (1 : 1, v/v) を移動相として、流速は 0.8 mL min⁻¹ とした。核酸塩基の分析には COSMOSIL 5C18-PAQ Waters (ナカライテスク, 京都) を用い、20 mM リン酸緩衝液 (pH 2.5) を移動相として、流速は 1.0 mL min⁻¹ とした。反応の前後で 254 nm の波長の吸収を測定し、基質の濃度を算出した。

第 3 節 結果

1. ルミクロム分解菌の単離

土壌試料を分離源として、MM 培地を用いて環境中のルミクロム分解菌の単離を試みた。ルミクロムの水色の蛍光が消失することを指標にルミクロムを分解する菌株を選抜し、3 株のルミクロム分解菌を取得した。また、1-2-1 のリボフラビン集積培養にて、リボフラビンの分解産物によりルミクロムが生じ、これがさらに別の化合物へと分解された試料が見出された。この試料からルミクロム分解菌をさらに 1 株単離した。計 4 株のルミクロム分解菌について 16S rDNA 塩基配列を解析したところ、いずれも *Nocardioides*

nitrophenolicus と同定された (Table 2-2)。これまでに *N. nitrophenolicus* は *p*-ニトロフェノールを単一炭素源として利用する細菌として単離されていたが、ルミクロムの分解やその他の機能は未知であった(31)。得られた 4 株のルミクロム分解菌のルミクロム分解活性を測定したところ、*N. nitrophenolicus*. L13 が最も高い活性を示した (Fig. 2-1)。リボフラビンを炭素源とした集積培養から単離された *N. nitrophenolicus*. L16 を、ルミクロムを単一炭素源とする MM 培地で培養したところ、ルミクロムの消費に伴って *N. nitrophenolicus* L16 が生育した (Fig. 2-2)。これらのことから *N. nitrophenolicus* L16 はルミクロムを分解し、生育のための炭素源とエネルギー源とすることが示された。すなわち、リボフラビンを炭素源とする集積培養において、*N. nitrophenolicus* L16 はリボフラビン分解菌 *M. paraoxydans* R16 が生成したルミクロムを利用して生育したと考えられた。

2. *N. nitrophenolicus* L16 のルミクロム分解活性

N. nitrophenolicus L16 を 1 mM のルミクロムまたは 1 mM グルコースを含む MM 培地に植菌し、30°C、120 rpm の条件で 48 時間培養した。回収した菌体を 50 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) に再懸濁し、超音波処理をして、無細胞抽出液を得た。100 μ M のルミクロムを基質として、無細胞抽出液の可溶性画分と不溶性画分のルミクロム分解活性を測定した。ルミクロムを添加した際、可溶性画分に高いルミクロム分解活性が検出された (Fig. 2-3)。しかし、ルミクロム未添加の場合と比較してルミクロム分解活性

に有意な差は認められなかった。このことから、*N. nitrophenolicus* L16 のルミクロム分解活性の生産はルミクロムで誘導されないことが示された。

3. *N. nitrophenolicus* L16 のルミクロム分解産物

N. nitrophenolicus L16 を LB 培地で前培養した後、ルミクロムを単一の炭素源とする MM 培地で 8 時間培養した。培養液から菌体を回収して、250 μ M のルミクロムを含む 50 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH7.0) に懸濁して、30°C、120 rpm の条件で休止菌体反応を行った。反応液を適宜採取し、3-2-3 に示す方法で HPLC 分析に供した。クロマトグラムより、ルミクロムが保持時間 (retention time, RT) 6.6 分に溶出される Product 1 と RT 3.5 分に溶出される Product 2 へと順に変換されることが示された (Fig. 2-4)。LCMS を用いて質量分析を行ったところ、Product 1 の [M+H] のフラグメントの m/z が 221.1 であったことから、この分子量は 220 であることが示された (Fig. 2-5, 上段)。また、Product 2 の [M + H] のフラグメントの m/z が 136.1 であったことから、この分子量は 135 であることが示された (Fig. 2-5, 下段)。さらに Product 1 について NMR 解析を行った。完全な構造決定には至らなかったものの、NMR 解析からルミクロム分解産物はイソアロキサジン環のピリミジン骨格が分解されたものであることが示唆され、ルミクロム分解の初発酵素はアミド結合を分解するアミダーゼであることが考えられた (データ示さず)。

4. 推定ルミクロム分解遺伝子クラスター

前項より、ルミクロム分解の初発酵素はアミド結合を分解するアミダーゼである可能性が考えられた。*N. nitrophenolicus* L16 のドラフトゲノム塩基配列よりアミド結合の加水分解活性をもつと予想されるタンパク質の遺伝子を選抜したところ、推定 hydantoinase をコードする GL000138 が見出された。GL000138 は推定 nicotiamidase をコードする GL000139 などと遺伝子クラスターを形成していた (Fig. 2-6)。hydantoinase は一般にピリミジン代謝に関与する酵素であり、*pydABC* (32) や *hyuNHCD*A (33) といったピリミジン代謝遺伝子クラスターを形成することが報告されている。しかしながら、*N. nitrophenolicus* L16 の推定 hydantoinase を含む遺伝子クラスターは上述のピリミジン代謝遺伝子クラスターとは異なる構造であることから、一般的なピリミジン代謝とは異なる機能を有することが考えられた。一方、推定ルミクロム分解遺伝子クラスターの遺伝子の転写はルミクロムによって活性化されなかった (Fig. 2-7)。これは 3-3-1 でルミクロム分解活性がルミクロムで誘導性が認められなかったことと一致する。これらの結果から、推定ルミクロム分解遺伝子クラスターとして見出した本遺伝子群は恒常的に発現し、ルミクロム分解のみならず、種々のピリミジン分解に関与する可能性が考えられた。

5. 組換え GL00018 タンパク質と組換え GL000139 タンパク質の酵素反応

N. nitrophenolicus L16 のゲノム DNA より GL000138 と GL000139 の遺伝子をクローニングし、大腸菌で発現させ、これらに対応する組換えタンパク質を精製した (Fig. 2-8)。

100 μ M のルミクロムを含む 50 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH7.0) に 0.5 μ M の組換え GL000138 タンパク質 (r138) を添加して、37°C で 60 分間反応させるとルミクロムのピークが減少して、RT 6.3 分にルミクロム分解産物 (Product X) のピークが検出された (Fig. 2-9, r138)。質量分析より、Product X の[M + H]のフラグメントの m/z が 261.1 であったことから、分子量は 260 であることが示された (Fig. 2-10, 上段)。これはルミクロムのピリミジン骨格が加水分解されてできる化合物の分子量と一致し、MSMS 解析より Fig. 2-11 の中央に示す構造であることが考えられた。同様の反応系で、他のフラビン化合物や核酸塩基、類似のピリミジン骨格を有するキサンチンを基質として r138 の酵素反応を行ったところ、ルミクロムに対する比活性が最も高かった (Table 2-3)。このことから、r138 はルミクロムに高い基質特異性を有することが明らかとなった。同様の反応系で組換え GL000139 タンパク質 (r139) を用いた場合には、ルミクロムのピークの減少や分解産物のピークの出現は検出されなかった (Fig. 2-9, r139)。しかし、r138 と r139 をともに 100 μ M のルミクロムを含む 50 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH7.0) に添加して酵素反応を行うと、ルミクロムと Product X のピークがそれぞれ減少し、RT 5.4 分に新たな分解産物 (Product Y) のピークが溶出された (Fig. 2-9, r138/r139)。このことから r139 は Product X を基質とすることが示された。質量分析より、Product Y の[M + H]のフラグメントの m/z が 218.1 であったことから、分子量は 217 であることが示された (Fig. 2-10, 下段)。これは、ルミクロムのピリミジン骨格からアミドが取り除かれて

できると予想される化合物の分子量と一致し、MSMS 解析より Fig. 2-11 の右に示すような構造であることが考えられた。これらの結果から、r138 と r139 はルミクロムのピリミジン骨格の 2 つのアミド結合を加水分解して分子量 217 の Product Y を生産し、*Nocardioides nitrophenolicus* L16 のルミクロム分解反応の第一、第二段階を触媒する酵素として機能することが示された。

6. 推定ルミクロム分解酵素遺伝子の系統解析

前項でルミクロム分解活性が示された GL000138 について、Blastp で相同性検索を行ったところ、GL000138 は *Pimelobacter simplex* の加水分解酵素と 97%、*Rhodococcus* sp. ACPA4 のアミド加水分解酵素と 89%の相同性を示した。更に、GL000138 とアミノ酸配列が 40%以上の相同性を示したタンパク質を抽出して系統解析を行った (Fig. 2-12)。

GL000138 を含めた上記 3 つのタンパク質は既知の allantoinase や dihydroorotase とは異なるファミリーに分類されるアミド加水分解酵素であることが明らかとなった。また、*P. simplex* と *Rhodococcus* sp. ACPA4 のゲノム上より、*N. nitrophenolicus* L16 の推定ルミクロム分解遺伝子クラスターと相同性の高い遺伝子クラスターが見出された。クラスターを形成する遺伝子は機能未知であるために、遺伝子クラスターのはらたきは不明であるが、*N. nitrophenolicus* L16 の推定ルミクロム分解遺伝子クラスターと同様にルミクロム分解に関わる機能を有する可能性が考えられた。*P. simplex* は *N. nitrophenolicus*. L16 と同じ *Nocardioidea* 科に分類される細菌であり、*Rhodococcus* sp. ACPA4 も近縁の *Nocardia*

科に分類される。本項で見出したゲノム情報は、ルミクロム分解遺伝子クラスターが限られた放線菌で保存されていることを示唆するものであり、これらの細菌が自然界でのルミクロム分解において主要な役割を担っていることが考えられた。

第4節 考察

本章では、自然界より初めてルミクロム分解菌を単離し、その中で *N. nitrophenolicus* L16 のルミクロム分解反応に着目して、ルミクロム分解の初発酵素となる新規なアミドヒドロラーゼを発見した。これまでルミクロムの生分解については未知であり、本章で初めてルミクロム分解酵素を同定した。*N. nitrophenolicus*. L16 の休止菌体反応では、ルミクロムが分子量 220 の化合物と分子量 135 の化合物に変換されることが示された。推定ルミクロム分解酵素の組換えタンパク質を用いた試験では、ルミクロムは GL000138 タンパク質と GL000139 タンパク質によってピリミジン骨格が加水分解され、分子量 217 の化合物に変換された。このとき、副産物としてアンモニウム塩が遊離し、*N. nitrophenolicus* L16 がこれを窒素源として利用し生育することが考えられた。アミノ酸配列の相同性検索より、GL000138 は allantoinase や dihydroorotase とは異なる新規なピリミジン代謝酵素ファミリーに分類されることが示された。既知の hydantoinase や allantoinase はアミド結合を有する5員環のピリミジン骨格を加水分解するのに対して、ウラシル分解酵素のように GL000138 は6員環のピリミジン骨格を加水分解した。GL000138 がコードするアミド加水分解酵素は、系統的に allantoinase に近いタンパク

質であるが、6員環のピリミジン骨格を加水分解できる新規な酵素であると考えられる。

ピリミジンの代謝経路には、Rut 経路や酸化的分解経路、還元的分解経路が知られており、これらの経路をもつ細菌の多くはピリミジン化合物、特にウラシルを窒素源として利用できることが知られている(34)。一方で、ピリミジン構造を持った化合物を炭素源として利用する細菌はほとんど知られていない。*Bacillus megaterium* は拡張型の還元型 Pyd 経路でウラシルから β -アラニンを生成し、炭素源かつエネルギー源として利用できる(35)。本章で予想されたルミクロム分解経路では、ピリミジン環から徐々に開環されていくと推察され、既知のピリミジン分解経路とは異なる反応機構でピリミジン環を分解する非常にユニークなピリミジン代謝機構であると考えられる。また、ルミクロム添加培養時に推定ルミクロム分解遺伝子の転写量やルミクロム分解活性が誘導されなかったことから、*N. nitrophenolicus* L16 のルミクロム分解活性は恒常的に発現していると考えられる。Table. 2-3 において、L16 株の推定ヒダントイナーゼはリボフラビンやアラントインに対しても比較的高い基質特異性を示したことから、ピリミジン構造を持った複素環化合物の分解に広く関与する酵素であることが示唆された。一方で、*N. nitrophenolicus* L16 はリボフラビンを単一の炭素源として生育しないことから、ルミクロム分解経路の下流の反応を担う酵素の基質特異性は高く、ルミクロムの中間代謝産物にリボースが結合した化合物を基質にできないか、ルミクロムの一連の代謝系が炭素源あるいはエネルギーの獲得に重要であると推察された。*P. simplex* と *Rhodococcus* sp.

ACPA4 は GL000138 と高い相同性を示すタンパク質を有し、そのタンパク質はゲノム上で *N. nitrophenolicus*. L16 の推定ルミクロム分解遺伝子クラスターと同様の遺伝子クラスターを形成していた。*Pimelobacter* 属と *Rhodococcus* 属は *Nocardioides* 属と分類学的に近縁な放線菌であり、自然界では限られた放線菌がルミクロム分解を担っていることが示唆された。今後、推定ヒダントイナーゼを構築することで、GL000138 が真のルミクロム分解の初発酵素であるかが明らかとなる。また、本章で示した推定ルミクロム分解遺伝子クラスターの反応機構を解明するなかで、休止菌体反応で得られた分解産物 (Product 1, Product 2) が検出されるなど研究の進展があれば、本遺伝子クラスターがルミクロム分解の機能を有することがより強く示されるであろう。

Table 2-1 Primers used in this chapter.

<i>Primer</i>	<i>Nucleotide sequence</i>	
<i>Analysis of 16S rDNA sequence</i>		
<i>10 F</i>		5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'
<i>515 F</i>		5'-GTGCCAGCAGCCGCGGTAA-3'
<i>800 F</i>		5'-GGATTAGATACCCTGGTA-3'
<i>1237 F</i>		5'-GGGCTACACACGTGCAAC-3'
<i>519 R</i>		5'-GAATTACCGCGGCTGCTG-3'
<i>800R</i>		5'-TACCAGGGTATCTAATCC-3'
<i>1500R</i>		5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'
Primer	Gene	Nucleotide sequence
Plasmid construction		
GL000138 Fw EcoR1	GL000138	5'-ATGAATTCGGTGGCCAGGCCGGTG-3'
GL000138 Rv Hind3 I		5'-CCCAAGCTTCTAAGCGGCATGCCAG-3'
GL000139 Fw EcoR1	GL000139	5'-AAGAATTCAGTGAAGCTCGACCCG-3'
GL000139 Rv Hind3		5'-TTTAAGCTTTCAGCCATCGAGGGC-3'
Quantitative PCR		
GL000134 RT Fw	GL000134	5'-ACGGATCAGCATGGTGTGG-3'
GL000134 RT Rv		5'-GTTGGGGAAGACGAACAGGA-3'
GL000135 RT Fw	GL000135	5'-GACGAGATGAAGGCGATCAAG-3'
GL000135 RT Rv		5'-GAGCGTGGTCTGGAAGAAGG-3'
GL000136 RT Fw	GL00136	5'-CAAGGTGCTGGGCTTCATC-3'
GL000136 RT Rv		5'-GTAGTGCTCGTCGTTCTTCTGG-3'
GL000138 RT Fw	GL000138	5'-CGACCTTCCTCGACACCTTC-3'
GL000138 RT Rv		5'-GTTGGGGAAGACGAACAGGA-3'
GL000139 RT Fw	GL000139	5'-GACGAGATGAAGGCGATCAAG-3'
GL000139 RT Rv		5'-GAGCGGGTCTGGAGAAGG-3'
L16 RT 16S Fw	16S rDNA	5'-CTTAACTCGGTGCTTGCTTCC-3'
L16 RT 16S Rv		5'-CGCATTCACCGCTACACC-3'

Table 2-2 Analysis of partial 16S rDNA sequence of lumichrome decomposing bacteria.

Strain	Description	Ident (%)
L13	<i>Nocardioides nitrophenolicus</i> DMS 15529	93
L14	<i>Nocardioides nitrophenolicus</i> DMS 15529	99
L15	<i>Nocardioides nitrophenolicus</i> DMS 15529	95
L16	<i>Nocardioides nitrophenolicus</i> DMS 15529	99

Table 2-3 Specific activity of r138.

	Substrate	nmol min ⁻¹ mg ⁻¹
	lumichrome	27.7 ± 1.9
Flavin	riboflavin	20.2 ± 0.3
	FMN	6.3 ± 1.3
	uracil	1.6 ± 0.3
Pyrimidine base	cytosine	0.4 ± 0.3
	thymine	1.6 ± 0.1
	adenine	1.0 ± 0.3
Purine base	guanine	N. D
	xanthine	0.8 ± 0.6.
	allantoin	13.1 ± 1.5

Reaction included 100 μM of each substrate and 0.5 μM r138, incubated at 37°C for 60 min.

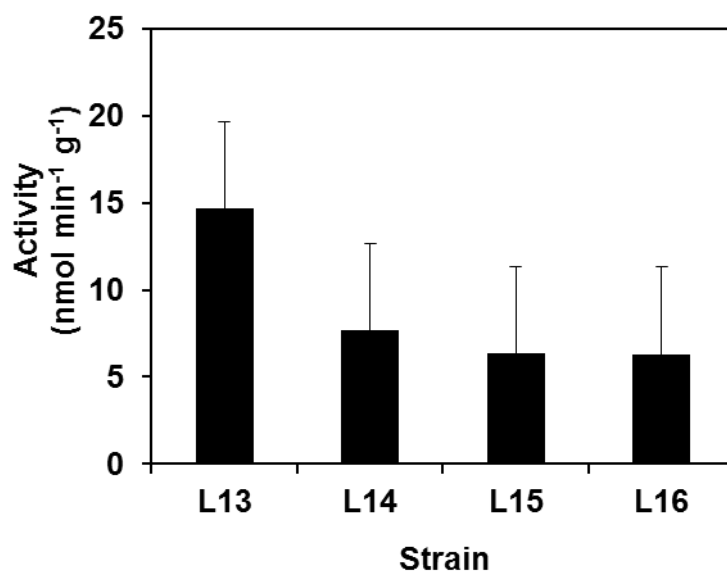


Figure 2-1. Lumichrome-degradation by resting cells of *Nocardioides* cultured in the presence of lumichrome.

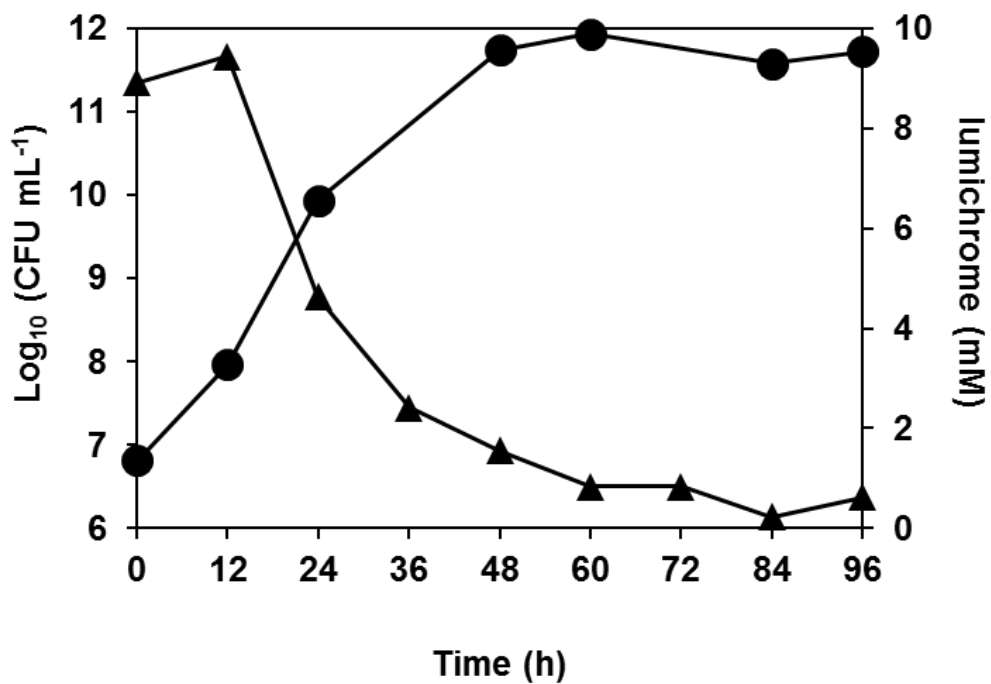


Figure 2-2. Degradation of lumichrome by *N. nitrophenolicus*. L16. The strain was cultured in MM medium containing lumichrome as a sole carbon source at 30°C and viable cells were monitored by counting colonies appeared on plates (●). Lumichrome (▲) were measured by HPLC.

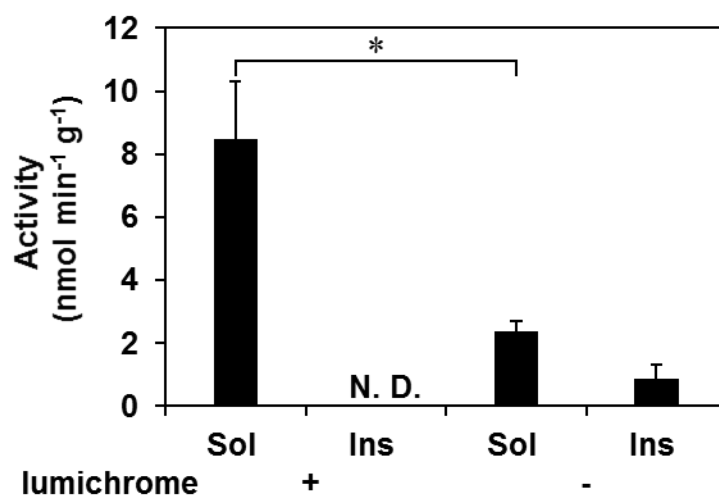


Figure 2-3. Lumichrome-degradation by soluble (Sol) and insoluble (Ins) fractions of *N. nitrophenolicus*. L16 cell-free extracts cultured in the presence (+) or absence (-) of lumichrome. Data are means \pm S.E. *, $P < 0.14$.

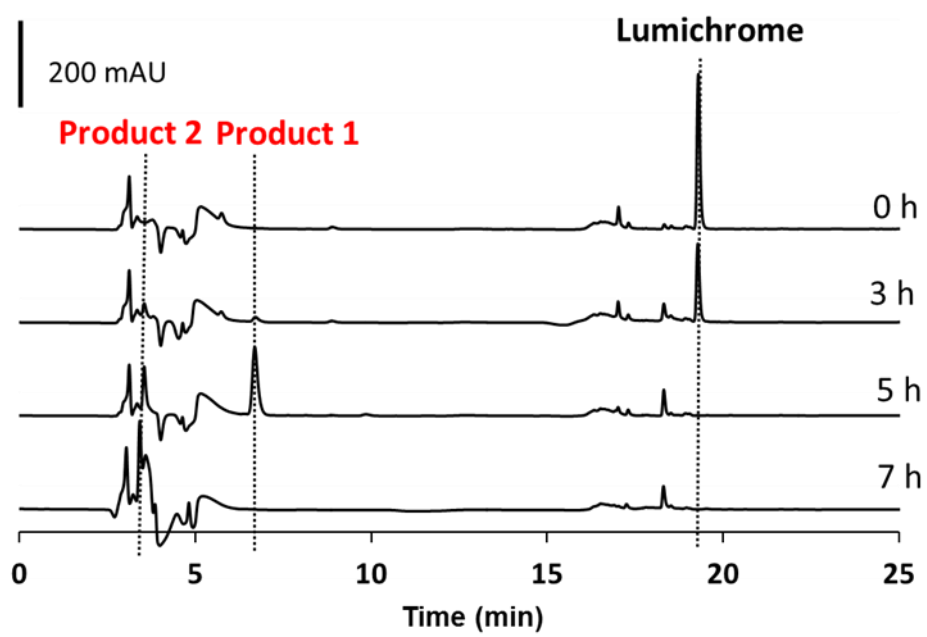


Figure 2-4. HPLC separation of supernatant of lumichrome resting cell reaction by *N. nitrophenolicus*. L16.

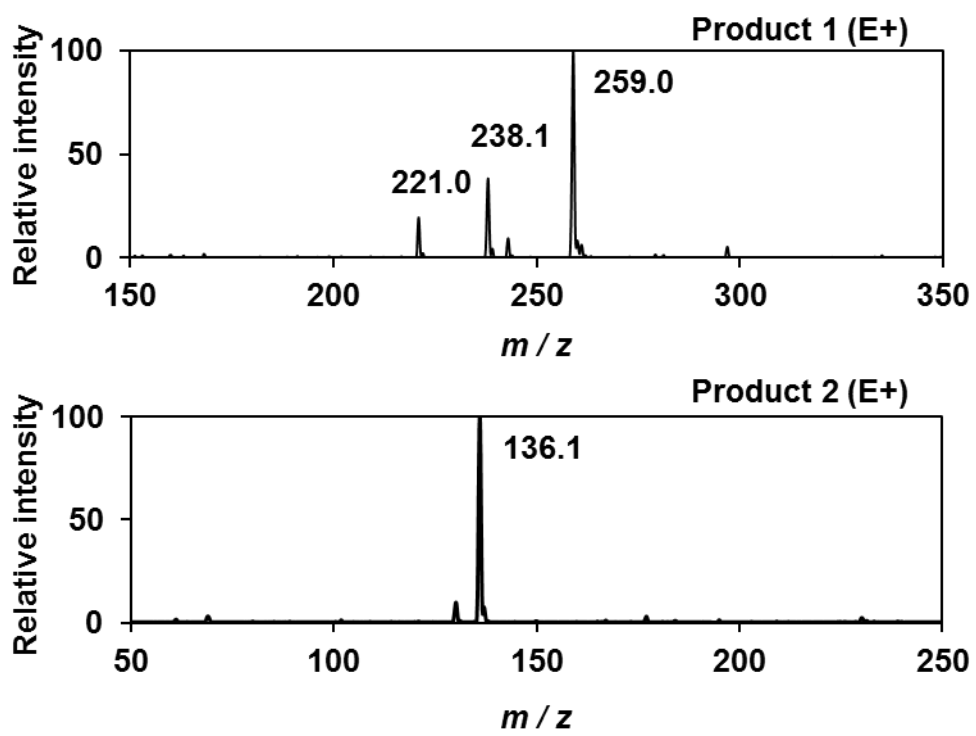


Figure 2-5. Mass spectra of Product 1 (upper) and Product 2 (lower).

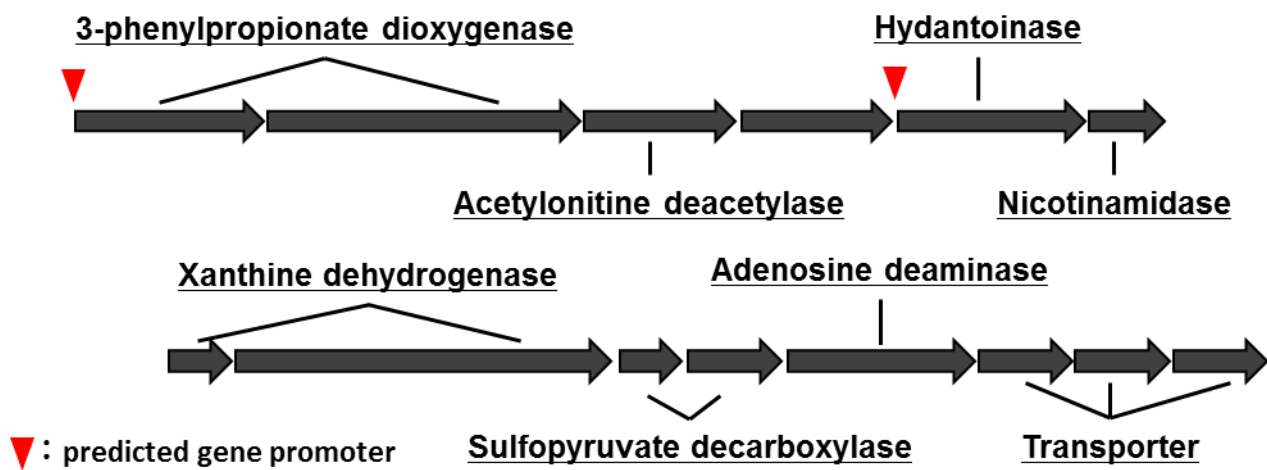


Figure 2-6. Putative lumichrome degradation gene cluster in *N. nitrophenolicus*. L16 (upper) and proposed model for the *N. nitrophenolicus*. L16 catabolism of lumichrome (lower).

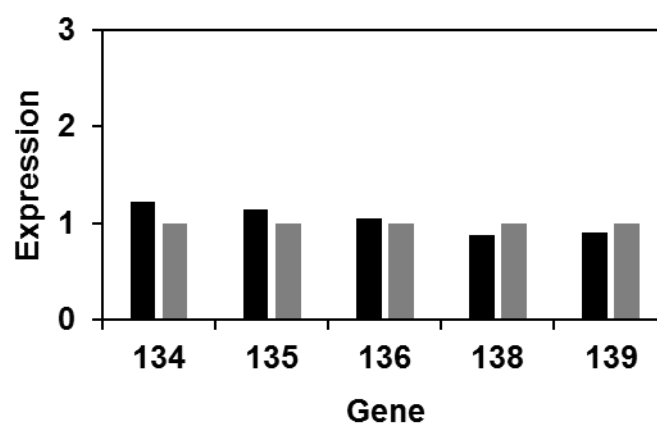


Figure 2-7. Quantitative PCR determined transcript levels of putative lumichrome decomposing genes. *N. nitrophenolicus*. L16 were cultivated MM medium in the presence (black) or absence (gray) of lumichrome. Values are normalized with 16S rRNA transcript. Each gene in absent of lumichrome at 0 h was taken as 1.

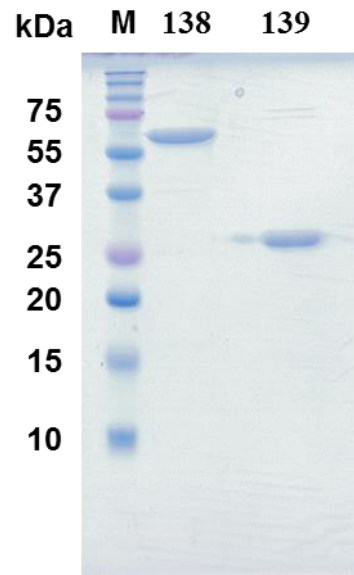


Figure 2-8. Gel image of SDS-PAGE. Lanes M, molecular weight marker; 1, r138; 2, r139 (1 μ g each).

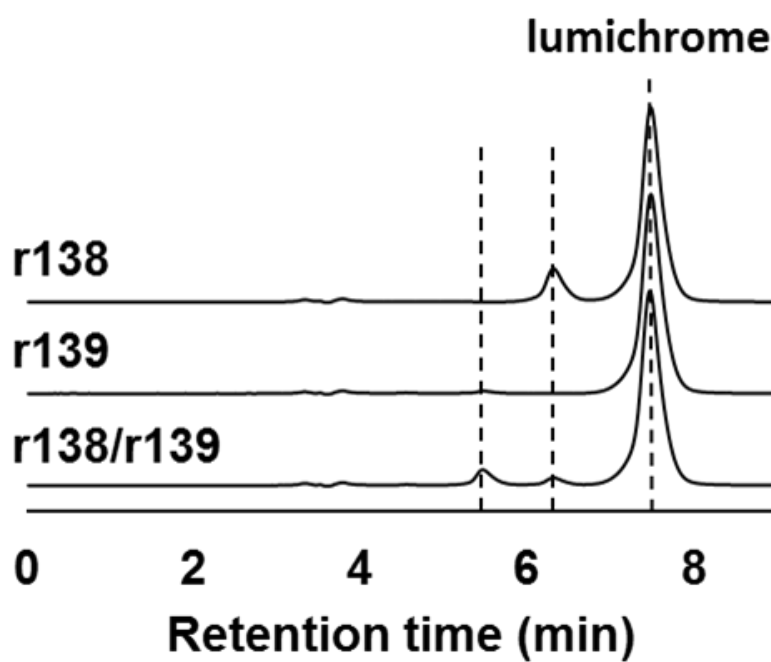


Figure 2-9. HPLC separation of coupled reaction of r138 and r139. Reaction contains 0.1 mM lumichrome in 50 mM potassium phosphate (pH 7.0). Included enzymes are 0.5 μ M r138 (r138), 0.5 μ M r139 (r139), and both 0.5 μ M r138 and 0.5 μ M r139 (r138/r139).

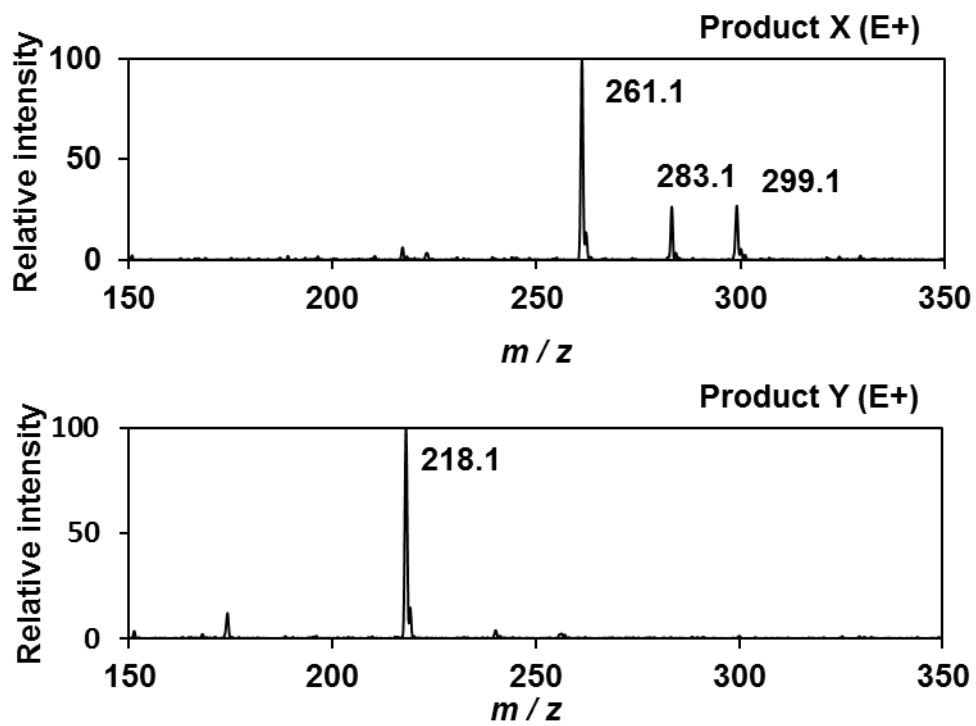


Figure 2-10. Mass spectrum of lumichrome (upper), lumichrome-degradation product by r138 (middle) and lumichrome-degradation product by r139 (lower).

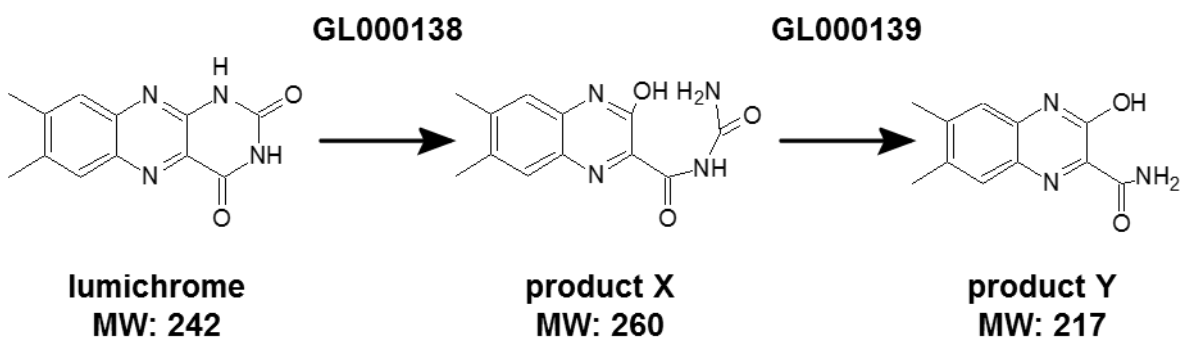


Figure 2-11. Proposed model for the *N. nitrophenolicus*. L16 initial catabolism of lumichrome.

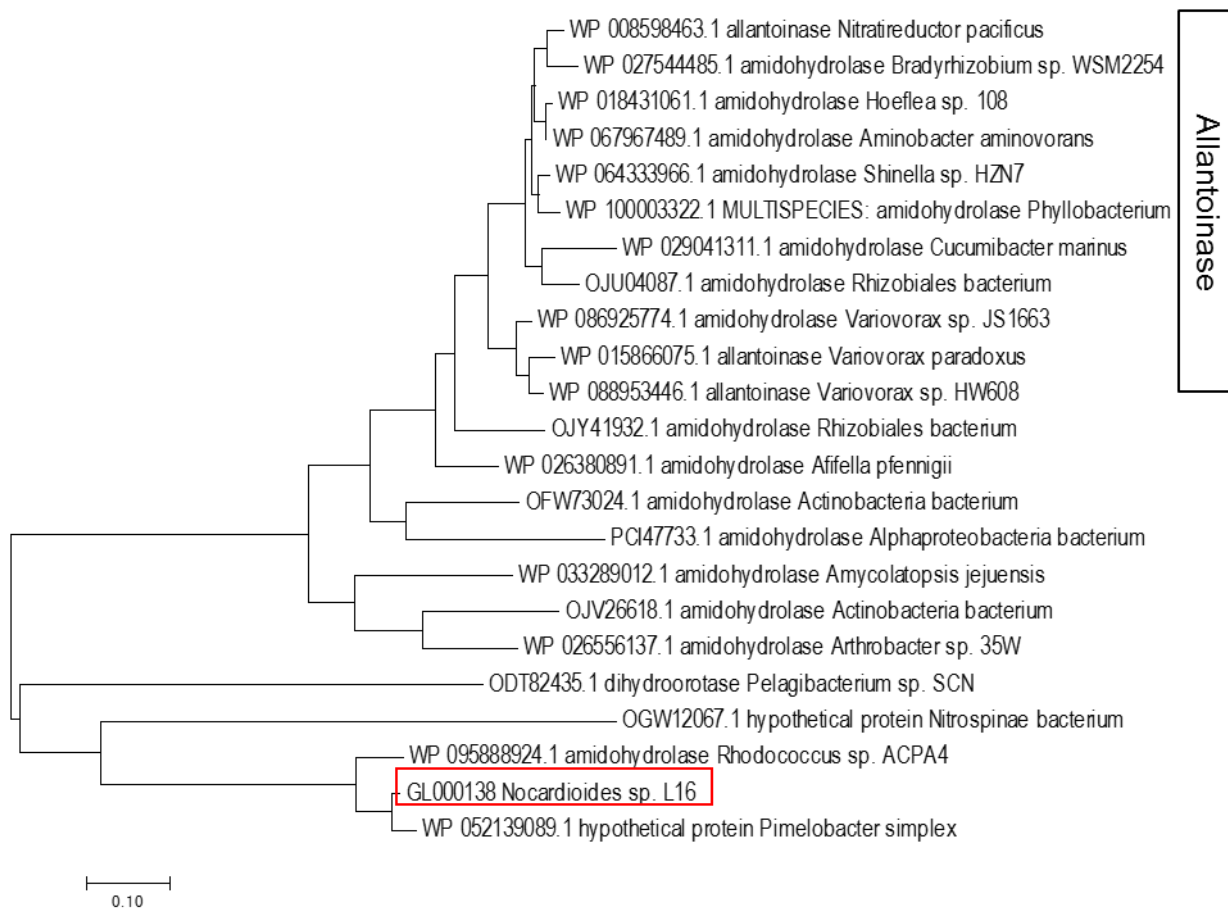


Figure 2-12. Phylogeny of GL000138 like proteins. Protein sequences were obtained as described in the text, and aligned using MEGA5.1 software (30) and a phylogenetic tree was constructed using the Maximum likelihood method. The tree was rooted to amino acid sequence.

第3章 *Microbacterium paraoxydans* R16 と *Nocardioides nitrophenolicus* L16 のリボフラ

ビン分解共生系の解析

第1節 序

2-3-1 で述べたように、*N. nitrophenolicus* L16 はリボフラビンを炭素源とする集積培地から *M. paraoxydans* R16 とともに単離された。第1章、第2章を通じて、*M. paraoxydans* R16、*N. nitrophenolicus* L16 は、それぞれリボフラビンあるいはルミクロムを炭素源として生育することが示された。これらの知見から、集積培地中でリボフラビン分解菌とルミクロム分解菌が共生していたことが示された。本章では、*M. paraoxydans* R16 と *N. nitrophenolicus* L16 の共培養によって、集積培養で観察された共生系を再現し、リボフラビン分解菌とルミクロム分解菌の共生関係を解明することを試みた。

第2節 材料と方法

1. 培養方法

M. paraoxydans R16 および *N. nitrophenolicus* L16 は Luria-Bertani (LB) 培地を用いて 30°C で 24 時間前培養した後、10 mM のリボフラビンを含む minimal (MM) 培地 (10 mM NH₄Cl, 10 mM potassium phosphate, 0.03% MgSO₄, 0.05% KCl, 0.2% trace element (17), pH 6.5) に 2% 量植菌して、30°C、120 rpm の条件で数日間培養した。また、*N. nitrophenolicus*

L16 が生産するリボフラビン分解活性の活性化分子を探索する試験では、共培養液上清原液あるいは 3-2-3 で後述する方法で得た画分を、上述のリボフラビン最少培地に 10% 量添加して、同様の条件で培養した。

2. リボフラビンおよびルミクロムの定量

細胞とリボフラビン、ルミクロムの結晶を溶解させるために培地を 80 mM KOH で希釈し、 $204,000 \times g$ 、 4°C の条件で 5 分間遠心分離し、得られた上清を分析用試料とした。

リボフラビンとルミクロムの分析には、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) (1260 Infinity, Agilent technology) と Purospher STAR-RP 18 endcap column (Merck) を用い、254 nm の吸収を測定した。酢酸ナトリウム緩衝液 (pH4.5) : メタノール (1 : 1, v/v) を移動相として、流速は 0.8 mL min^{-1} とした。

3. 共培養液の分画

3-2-1 の培養方法で得た *M. paraoxydans* R16 と *N. nitrophenolicus* L16 の共培養液の上清を、エバポレーターを用いて濃縮し、分画用の試料を得た。分画には高速液体クロマトグラフィー (HPLC) (1260 Infinity, Agilent technology) と分取生成用の Purospher STAR-RP 18 endcap column (Merck) を用い、254 nm の波長を吸収を測定することで観察されるピークごとに溶出液を回収した。ギ酸アンモニウム緩衝液 (pH7.0) : アセトニトリル (9 : 1, v/v) を移動相として、流速は 3.0 mL min^{-1} とした。取得した画分より凍結乾燥によっ

て移動相以外の成分を抽出し、蒸留水に再溶解した。

第3節 結果

1. リボフラビン分解共生系の単離

2-3-1 で示したように、*N. nitrophenolicus* L16 はリボフラビンを単一炭素源とする集積培地から単離された。この時、同じ集積培地からリボフランを分解する *M. paraoxydans* R16 も単離された。両株をリボフラビンあるいはルミクロムを単一の炭素源とする最少寒天培地に植菌したところ、*M. paraoxydans* R16 はリボフラビン最少寒天培地でのみハローを形成し、*N. nitrophenolicus* L16 はルミクロム最少培地でのみハローを形成した (Fig. 3-1)。このことから、上述の集積培地においては、*M. paraoxydans* R16 がリボフラビンを分解してルミクロムを生成し、*N. nitrophenolicus* L16 がそのルミクロムを消費したと考えられ、自然界よりリボフラビンを分解する細菌の共生系が単離された。

2. *M. paraoxydans* R16 と *N. nitrophenolicus*. L16 の共培養

M. paraoxydans R16 と *N. nitrophenolicus*. L16 を、リボフラビンを単一炭素源とする MM 培地で共培養し、2 つの細菌によって集積培養のようなりボフラビン分解の共生が再現されるか検証した。培地中のリボフラビンの減少に伴ってルミクロムが蓄積し、

その後蓄積したルミクロムが減少していくことが示された (Fig. 3-2)。リボフラビンおよびルミクロムの減少に伴って、*M. paraoxydans* R16 および *N. nitrophenolicus* L16 がそれぞれ生育したことから、両株がリボフラビンを単一炭素源とする条件で共培養可能であることが明らかとなった (Fig. 3-2)。*N. nitrophenolicus* L16 の生育は *M. paraoxydans* R16 の生育に追随するように増加し、培養液中のルミクロムが消費された時点で *M. paraoxydans* R16 と同等となった。このことから、*N. nitrophenolicus* L16 は *M. paraoxydans* R16 のリボフラビン分解によって生成するルミクロムを利用して生育することが考えられた。また、興味深いことに、*N. nitrophenolicus* L16 と共培養した場合の *M. paraoxydans* R16 のリボフラビン消費速度は、単独培養時に比べて増加した (Fig. 3-2)。このことから、*N. nitrophenolicus* L16 は、①細胞の接触、②ルミクロムの除去、③活性化分子の分泌のいずれかの要因によって、*M. paraoxydans* R16 のリボフラビン分解活性を促進したと考えられた。

3. *N. nitrophenolicus* L16 による *M. paraoxydans* R16 のリボフラビン分解活性の促進機構

前項で、*M. paraoxydans* R16 と *N. nitrophenolicus* L16 を共培養した場合で、*M. paraoxydans* R16 のリボフラビン分解活性が促進されることが示され、*N. nitrophenolicus* L16 による①細胞の接触、②ルミクロムの除去、③活性化分子の分泌の

いずれかが *M. paraoxydans* R16 のリボフラビン分解活性を促進したと考えられた。両株の共培養後の培養液上清を終濃度 10% となるようにリボフラビン最少培地に添加し、*M. paraoxydans* R16 を植菌した。この時、共培養後の培養液上清を添加した条件は、単独培養時よりもリボフラビン消費速度が増加した (Fig. 3-4, ●)。このことから、*N. nitrophenolicus* L16 による *M. paraoxydans* R16 のリボフラビン分解活性が促進は、菌体同士の接触や *N. nitrophenolicus* L16 によるルミクロムの除去ではなく、*N. nitrophenolicus* L16 が培地中に分泌する何らかの化合物を介して生じることが示された。共培養の培養液上清は、リボフラビン最少培地に添加される過程で加熱滅菌処理を施したことから、上述の活性化分子は、熱変性するタンパク質などのような高次構造をもった分子ではなく、低分子化合物であることが示唆された。

4. *N. nitrophenolicus* L16 株が生産する *M. paraoxydans* R16 株のリボフラビン分解活性促進因子の同定

前項より、*N. nitrophenolicus* L16 は低分子化合物を培地中に分泌し、*M. paraoxydans* R16 のリボフラビン分解活性を促進することが考えられた。そこで、R16 と L16 の共培養液上清を、HPLC を用いて分画し、*M. paraoxydans* R16 のリボフラビン分解活性を促進する画分の取得を試みた。本検討では、逆相カラムを用いて分画し、Fig. 3-3 に示すように 10 個の画分を得た。各画分を添加したリボフラビン最少培地に *M.*

paraoxydans R16 を植菌して、各培地での *M. paraoxydans* R16 株のリボフラビン消費速度を評価した (Fig. 3-4)。分画 3 を添加した条件でポジティブコントロールと同等のリボフラビン分解速度を示したことから、画分 3 には *M. paraoxydans* R16 のリボフラビン分解速度を促進する活性化分子が含まれていると考えられた (Fig. 3-4)。画分 3 には、クロマトグラム上での 2 つのピークが含まれており、それぞれの吸収スペクトルはルミクロムのそれと類似していた (Fig. 3-5)。このことから、ピーク 3-1 とピーク 3-2 はいずれもフラビン化合物の類縁体のシグナルであることが推察された。

第 4 節 考察

本章では、同一のリボフラビンを炭素源とする集積培地から単離された *M. paraoxydans* R16 と *N. nitrophenolicus* L16 をフラスコ内で共培養し、集積培養で観察されたようなリボフラビン分解の共生系を再構成した。この時、*M. paraoxydans* R16 と *N. nitrophenolicus* L16 はリボフラビンとその分解産物として出てくるルミクロムをそれぞれ消費ながら生育した。さらに、本共生系では *N. nitrophenolicus* L16 が生産するリボフラビンあるいはルミクロムの代謝物が活性化分子としてはたらき *M. paraoxydans* R16 のリボフラビン分解活性が促進されることが見出された。これらの結果は、自然界でリボフラビン分解菌とルミクロム分解菌が物理的に近いところに分布し、

両者が基質の授受や活性化分子を介して相互作用しながら共生していることを示すものである。リボフラビン分解能を持つ *Microbacterium* 属細菌は、本研究で単離した 12 株の他にも、*M. maritpicum* G10 (10)や *Microbacterium* sp. Strain TPU 3598 (16)が知られ、*M. maritpicum* G10 についてはリボフラビン分解遺伝子クラスターが明らかとなっている。*N. nitrophenolicus* L16 は、*M. paraoxydans* R16 だけでなく、*Microbacterium hydrocarboxydans* R33 との共培養でも、*Microbacterium hydrocarboxydans* R33 のリボフラビン分解活性を促進した (Fig. 3-6)。これらの知見から、環境ではリボフラビンの主要な分解者として *Microbacterium* 属細菌が広く分布しており、これらがルミクロム分解菌と相互作用しながらリボフラビン分解に関与していることが示唆された。また、リボフラビンとルミクロムは植物と根圏の微生物の相互作用を媒介するシグナル分子としてはたらき、植物の生長を促進する作用を示す(14)。この時リボフラビンとルミクロムは根圏の微生物によって生産されることから、植生のある土壌中には比較的豊富にフラビン化合物が蓄積していると考えられ、*Microbacterium* 属細菌や *Nocardioide*s 属細菌のようにフラビン化合物をエネルギー源として生育する細菌群が土壌環境中で広範囲に分布していることが予想された(29,36)。

マメ科植物に対して、生長作用を示すルミクロム濃度は 5 nM とされており、これが 50 nM の場合では、反対に生長が低下することが示されている(36)。従って、植物生長のためには土壌中のルミクロム濃度が低濃度で維持される必要があり、特に本研究で見

出した *Nocardioides* 属細菌は土壤中のルミクロム濃度の最適化に重要な役割を果たしていると考えられる。本章では、炭素源の獲得を目的として、*N. nitrophenolicus* L16 が *M. paraoxydans* R16 のリボフラビン分解活性を促進する相利的な共生関係があることを明らかとした。ルミクロムを介した植物生長の観点からは、ルミクロムを分解する *Nocardioides* 属細菌と植物との間に何らかの相互作用があるのかもしれない。

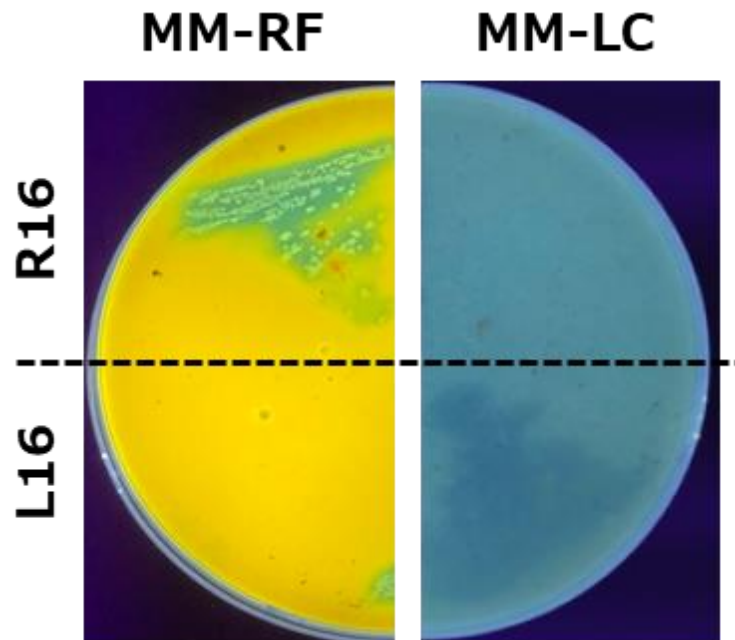


Figure 3-1. Riboflavin and lumichrome degradation assays of *M. paraoxydans* R16 (R16) and *N. nitrophenolicus* L16 (L16) on agar plates. Strains were cultured in MM supplemented with riboflavin (MM-RF), and lumichrome (MM-LC).

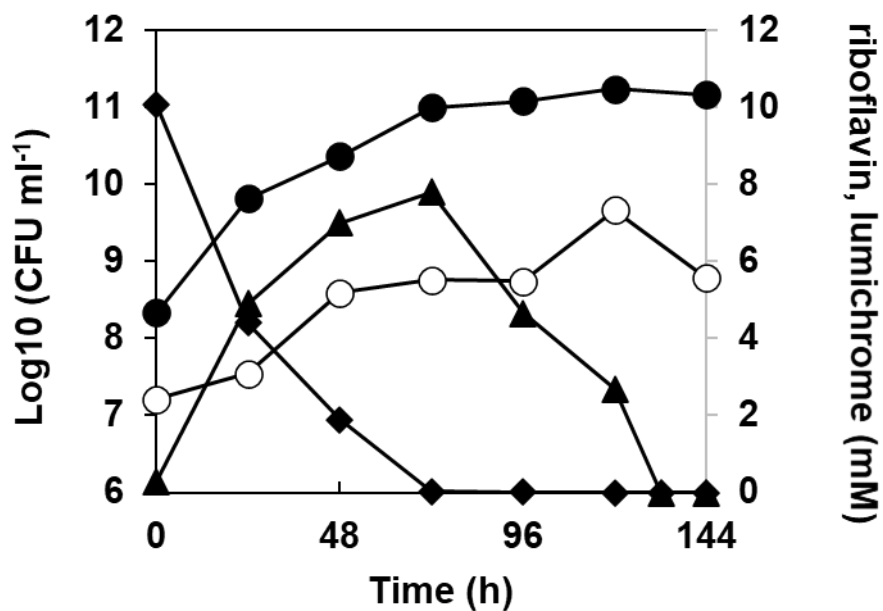


Figure 3-2. Degradation of riboflavin and lumichrome by *M. paraoxydans* R16 and *N. nitrophenolic*. L16. These strains were cultured in MM medium containing riboflavin as a sole carbon source at 30°C and viable cells were monitored by counting colonies appeared on plates (*M. paraoxydans* R16; ●, *N. nitrophenolic*. L16; ○). Riboflavin (◆) and lumichrome (▲) were measured by HPLC.

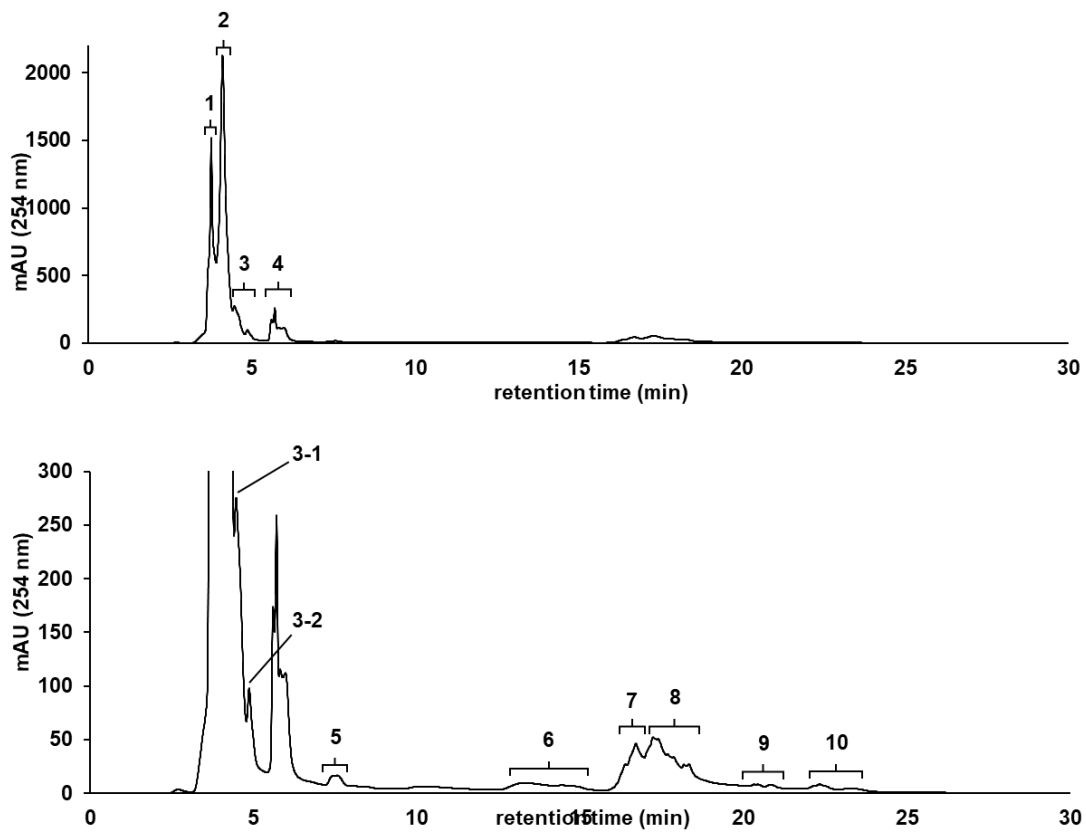


Figure 3-3. HPLC separation of mixed culture supernatant of *M. paraoxydans* R16 and *N. nitrophenolicus* L16. The figure below is an enlargement of the figure above. The numbered signals here were fractionated.

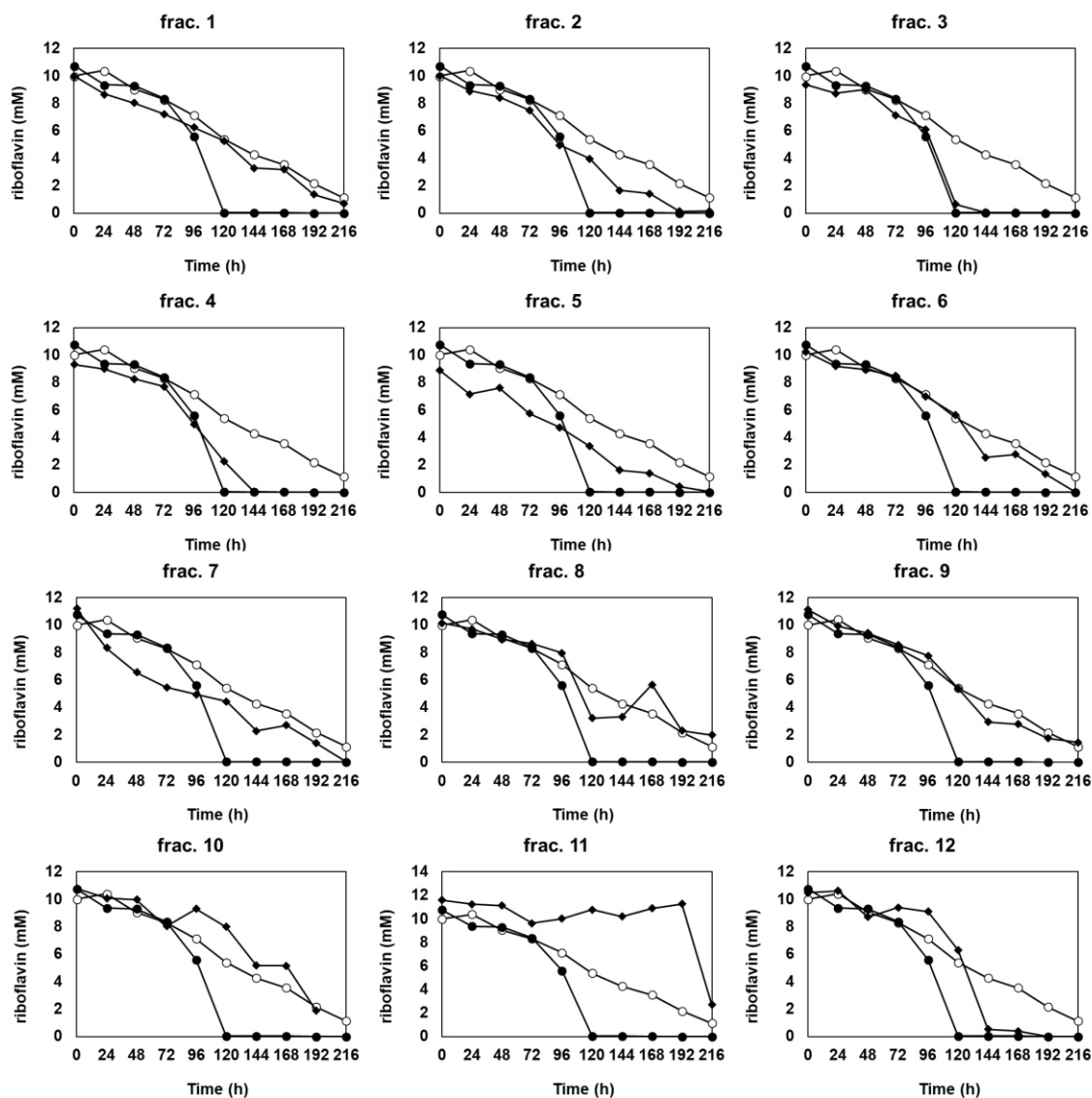


Figure 3-4. Degradation of riboflavin by *M. paraoxydans* R16. *M. paraoxydans* R16 was cultured in MM medium containing riboflavin as a sole carbon source at 30°C with the fractions (◆) separated in figure 3-2. In every chart, the culture with mixed-culture supernatant (●) and without the supernatant (○) were showed as positive control and negative control, respectively. Riboflavin was measured by HPLC.

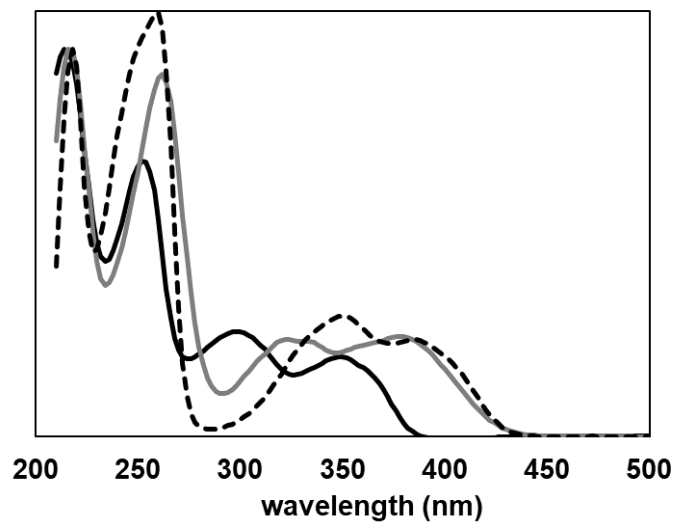


Figure 3-5. Absorption spectra of the compounds in fraction #3 shown in Fig. 3-2 (3-1: black, 3-2: gray) compared with lumichrome (dotted-line).

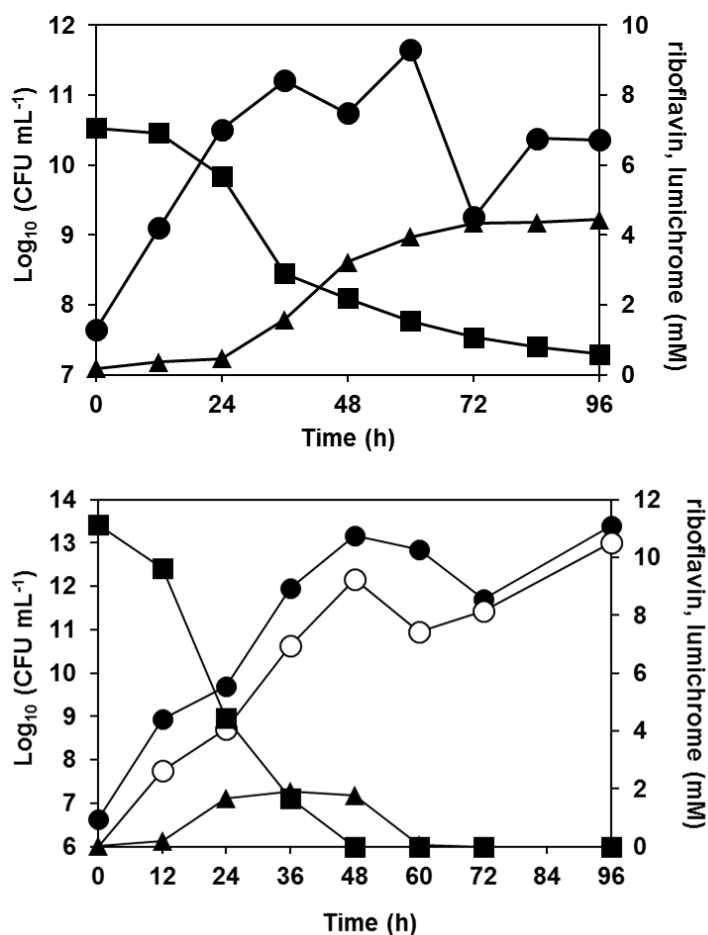


Figure 3-6. Degradation of riboflavin by *Microbacterium hydrocaroxydans* R33 (upper) and mixed-culture with *N. nitrophenolicus* was performed (lower). L16. These strains were cultured in MM medium containing riboflavin as a sole carbon source at 30°C and viable cells were monitored by counting colonies appeared on plates (*Microbacterium hydrocaroxydans* R33; ●, *N. nitrophenolicus*. L16; ○). Riboflavin (■) and lumichrome (▲) were measured by HPLC.

総括

本論文では *Devosia riboflavina* のリボフラビン分解機構および *N. nitrophenolicus* L16 のルミクロム分解機構を解明した。環境中からは、リボフラビン分解菌として *Microbacterium* 属細菌、ルミクロム分解菌として *Nocardioides* 属細菌が単離された。本研究によって単離された *M. paraoxydans* R16 と *N. nitrophenolicus* L16 は、リボフラビンを単一炭素源とする最少培地で共培養可能で、環境中では両株のネットワークを介してリボフラビンが代謝されることが考えられた。

リボフラビン分解菌 *Devosia riboflavina* によるリボフラビン分解活性はリボフラビンによって活性が発現誘導され、フラビン還元酵素と共役したリボフラビンモノオキシゲナーゼが鍵酵素となり、リボフラビンをルミクロムと D-リボースへ酸化的に分解することが明らかとなった。これまで微生物によるリボフラビンの分解は加水分解酵素が触媒すると考えられてきたが、本論文でモノオキシゲナーゼにより酸化的に触媒分解されることを初めて示した。リボフラビンモノオキシゲナーゼ遺伝子とフラビン還元酵素遺伝子はリボフラビンリン酸化酵素遺伝子、リボースリン酸化酵素遺伝子とともに遺伝子クラスターを形成していた。これらの遺伝子の転写はリボフラビンによって活性化され、*D. riboflavina* はリボフラビンを感じて炭素源とエネルギー源として利用するために代謝を制御していることが考えられた。この遺伝子クラスターは、*M. maritypicum* G10 のリボフラビン代謝遺伝子クラスターと類似しており、*Devosia* 属細菌

菌や *Microbacterium* 属細菌の他種にも共通の遺伝子クラスターが見出された。この知見は本研究で明らかとした *D. riboflavina* のリボフラビン分解経路が、自然界での主要な分解機構であることを示唆する。一方で、リボフラビン分解遺伝子クラスターを共有している細菌のうち、*D. riboflavina* 以外はいずれも放線菌に分類される細菌であった。また、*Microbacterium* 属細菌の中には、*D. riboflavina* と遺伝子の配置が同じクラスターを有しているものもあり、*Microbacterium* 属細菌が中心となってリボフラビン分解遺伝子クラスターの水平伝播が起こったことが考えられた。

生物によるルミクロム分解はこれまで未知であったが、本論文で 4 株の *Nocardioide*s 属細菌がルミクロム分解菌として単離された。そのうち *N. nitrophenolicus*. L16 のルミクロム分解遺伝子クラスターを見出し、ルミクロムの分解反応の初発酵素遺伝子を初めて明らかとした。*N. nitrophenolicus*. L16 の GL000138 と GL000139 はルミクロムのピリミジン骨格を加水分解し分子量 217 の化合物へ変換した。この時、副生物としてアンモニウム塩が生成し、*N. nitrophenolicus*. L16 はこれを窒素源として利用することが考えられた。今後、ルミクロム分解遺伝子クラスターの機能とルミクロム分解の関わりについての研究が進めば、*N. nitrophenolicus*. L16 のルミクロム分解の全貌が明らかになると期待される。推定ルミクロム分解遺伝子クラスターは、*Nocardioide*s 属と近縁の *Pimelobacter simplex* と *Rhodococcus* sp. ACPA4 のゲノム上にも見出され、これらの細菌もルミクロム分解能を持つ可能性が考えられた。

本論文で、リボフラビンとルミクロムは、それぞれの遺伝子クラスターによって生産される複数のタンパク質を介して分解されることが示された。また、これらの遺伝子クラスターは環境中の特定の微生物群に保存されており、自然界では限られた微生物群によってリボフラビンが代謝されることが考えられた。これらの微生物は他の生物が補酵素として利用するリボフラビンやその分解産物のルミクロムの代謝機構を発達させ、土壌生態系でのニッチを獲得していると考えられる。また、*Micobacterium* 属細菌と *Nocardioide*s 属細菌はいずれも放線菌綱に分類されるグラム陽性細菌であり、フェノール類(37)や多環芳香族生炭化水素 (38)、カルバーゾール (39)、デオキシニバエノール (40)などの難分解性化合物の分解能を有する種が存在する。本論文で発見したリボフラビン分解微生物群と合わせて、*Micobacterium* 属細菌と *Nocardioide*s 属細菌は環境中に存在する環状構造を持った化合物の物質循環に重要な役割を担っていることが考えられた。

本研究では、*M. paraoxydans* R16 と *N. nitrophenolicus* L16 がリボフラビン分解を行う共生関係を構築していることを示した。この共生系において、*N. nitrophenolicus* L16 は *M. paraoxydans* R16 のリボフラビン分解活性を増加させる活性化分子を生産し、*M. paraoxydans* R16 によるルミクロムの生産を促進した。この化合物は、両株による基質の分解あるいは獲得を促進する活性化シグナルとして機能する可能性が考えられる。また、シグナル分子としての機能については今後の解析を待たなければならない。し

かし、両菌株はリボフラビン存在下で互いに生育を促進することから、この共生関係は相利的な共生モデルであると考えられた。植物はリボフラビンを病原菌のマーカールとして感知し、自身の防御応答を促進する(41)。細菌がリボフラビンを分泌する機構の1つに flavin electron transfer が知られている(29)。植物病原菌を含めた細菌は鉄など細胞外に存在する不溶性の成分を獲得するために、還元型リボフラビンを分泌し、不溶性成分に電子伝達を行うことで可溶化する機構を有している(29)。このため、土壌中には、生育のために植物病原菌などによって生産されたりボフラビンが豊富に存在している可能性が考えられる。また、低濃度のルミクロムは *Nocardioides* 属細菌のエネルギー源になると同時に、土壌においては植物生長の促進に作用する(14)。これとは反対に、ルミクロム濃度が 50 nM 以上になると植物生長が阻害されるが示されている(14)。本研究で見出したリボフラビン分解の共生系は、植物病原菌の生育に必要なリボフラビンを分解し、さらに土壌中のルミクロム濃度を減少されることで、植物病原菌の生育や植物の生長を制御する可能性が考えられる。

本研究は土壌環境でのリボフラビンあるいはルミクロムの恒常性を理解する上で重要なだけでなく、植物生長に有利な土壌への改良や、将来のルミクロム発酵あるいはルミクロム分解物の発酵において、微生物の機能を促進するプレバイオティクスとして重要になると考えられる。

ビタミンは様々な酵素反応の補酵素となるため、自然界においては、微生物同士で必

要な栄養を共有しあう機構が存在し、特にコバラミン（ビタミン B₁₂）では異なる構造の類縁体が広く共有されていることが知られている (42)。本研究で見出した、リボフラビンあるいはルミクロムの分解機構、さらにはリボフラビン分解菌とルミクロム分解菌の共生機構は、他の生物がシグナル分子として授受する化合物を栄養源として分解し、土壤環境中でのニッチを獲得する上で有利な戦略であると考えられる。

本研究はリボフラビンを分解に関わる複数の土壤細菌の機能を明らかとし、土壤中でのフラビン化合物の恒常性と機能の理解に貢献するものである。また、これらの発見は作物の生長促進のための土壤改良や、ルミクロムやその誘導体の発酵生産の技術の構築にも波及する点で応用的に重要である。

参考文献

1. **Underwood BA.** 2004. Vitamin A Deficiency Disorders: International Efforts to Control A Preventable “Pox.” *J Nutr* **134**:231S-236S.
2. **Roje S.** 2007. Vitamin B biosynthesis in plants. *Phytochemistry* **68**:1904-1921.
3. **Figueroa-Méndez R, Rivas-Arancibia S.** 2015. Vitamin C in health and disease: Its role in the metabolism of cells and redox state in the brain. *Front Physiol* **6**:397.
4. **Holick MF, Chen TC.** 2008. Vitamin D deficiency: A worldwide problem with health consequences. *Am J Clin Nutr* **87**:1080S-1086S.
5. **Dror DK, Allen LH.** 2011. Vitamin e deficiency in developing countries. *Food Nutr Bull* **32**:124-143.
6. **DiNicolantonio JJ, Bhutani J, O’Keefe JH.** 2015. The health benefits of Vitamin K. *Open Heart* **2**.
7. **Powers HJ.** 2003. Riboflavin (vitamin B-2) and health. *Am J Clin Nutr.* **77**:1352–1360.
8. **Herz S, Eberhardt S, Bacher A.** 2000. Biosynthesis of riboflavin in plants. The *ribA* gene of *Arabidopsis thaliana* specifies a bifunctional GTP cyclohydrolase II/3,4-dihydroxy-2-butanone 4-phosphate synthase. *Phytochemistry* **53**:723–731.
9. **Schwechheimer SK, Park EY, Revuelta JL, Becker J, Wittmann C.** 2016. Biotechnology of riboflavin. *Appl Microbiol Biotechnol* **100**:2107–2119.
10. **Xu H, Chakrabarty Y, Philmus B, Mehta AP, Bhandari D, Hohmann H-P, Begley TP.** 2016. Identification of the First Riboflavin Catabolic Gene Cluster Isolated from *Microbacterium maritopicum* G10. *J Biol Chem* **291**:23506–23515.
11. **Foster JW.** 1944. Microbiological Aspects of Riboflavin. *J Bacteriol* **47**:27– 41.
12. **Nakagawa Y, Sakane T, Yokota A.** 1996. Transfer of “*Pseudomonas riboflavina*” (Foster 1944), a gram-negative, motile rod with long-chain 3-hydroxy fatty acids, to *Devosia riboflavina* gen. nov., sp. nov., nom. rev. *Int J Syst Bacteriol* **46**:16–22.
13. **Yanagita T, Foster JW.** 1956. A bacterial riboflavin hydrolase. *J Biol Chem* **221**:593-607.
14. **Dakora FD, Matiru VN, Kanu AS.** 2015. Rhizosphere ecology of lumichrome and riboflavin, two bacterial signal molecules eliciting developmental changes in plants. *Front Plant Sci* **6**:700.
15. **Rajamani S, Bauer WD, Robinson JB, Farrow JM, Pesci EC, Teplitski M, Gao M, Sayre RT, Phillips DA.** 2008. The vitamin riboflavin and its derivative lumichrome activate the LasR bacterial quorum-sensing receptor. *Mol Plant-Microbe Interact* **21**:1184–92.
16. **Yamamoto K, Asano Y.** 2015. Efficient production of lumichrome by *Microbacterium*

- sp. Strain TPU 3598. *Appl Environ Microbiol* 81:7360–7367.
17. **Hunter S, Provasole L, Schatz A, Haskins C.** 1950. Some approaches to the study of the role of metals in the metabolism of microorganisms. *Proc Am Philos Soc* **94**:152–170.
 18. **Laemmli UK.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680.
 19. **Grill S, Busenbender S, Pfeiffer M, Köhler U, Mack M.** 2008. The bifunctional flavokinase/flavin adenine dinucleotide synthetase from *Streptomyces davawensis* 15460 produces inactive flavin cofactors and is not involved in resistance to the antibiotic roseoflavin. *J Bacteriol* 190:1546-1553.
 20. **Eschenbrenner M, Coves J, Fontecave M.** 1995. The flavin reductase activity of the flavoprotein component of sulfite reductase from *Escherichia coli*. A new model for the protein structure. *J Biol Chem* 270:20550-20555.
 21. **Filisetti L, Fontecave M, Nivière V.** 2003. Mechanism and substrate specificity of the flavin reductase ActVB from *Streptomyces coelicolor*. *J Biol Chem* 278:296-303.
 22. **Ellis HR.** 2010. The FMN-dependent two-component monooxygenase systems. *Arch Biochem Biophys* **497**:1-12.
 23. **Valton J, Fontecave M, Douki T, Kendrew SG, Nivière V.** 2006. An aromatic hydroxylation reaction catalyzed by a two-component FMN-dependent monooxygenase: The ActVA-ActVB system from *Streptomyces coelicolor*. *J Biol Chem* **281**:27-35.
 24. **Binda C, Robinson RM, Martin del Campo JS, Keul ND, Rodriguez PJ, Robinson HH, Mattevi A, Sobrado P.** 2015. An unprecedented NADPH domain conformation in lysine monooxygenase NbtG provides insights into uncoupling of oxygen consumption from substrate hydroxylation. *J Biol Chem* 290:12676-12688.
 25. **Uetz T, Schneider R, Snozzi M, Egli T.** 1992. Purification and characterization of a two-component monooxygenase that hydroxylates nitrilotriacetate from “*Chelatobacter*” strain ATCC 29600. *J Bacterio* 174:1179-1188.
 26. **Wattam AR, Davis JJ, Assaf R, Boisvert S, Brettin T, Bun C, Conrad N, Dietrich EM, Disz T, Gabbard JL, Gerdes S, Henry CS, Kenyon RW, Machi D, Mao C, Nordberg EK, Olsen GJ, Murphy-Olson D, Olson R, Overbeek R, Parrello B, Pusch GD, Shukla M, Vonstein V, Warren A, Xia F, Yoo H, Stevens RL.** 2017. Improvements to PATRIC, the all-bacterial bioinformatics database and analysis resource center. *Nucleic Acids Res* **45**:535-542.
 27. **Arthur PK, Alvarado LJ, Dayie TK.** 2011. Expression, purification and analysis of the activity of enzymes from the pentose phosphate pathway. *Protein Expr Purif* **76**:229–37.
 28. **Phillips DA, Joseph CM, Yang G-P, Martínez-Romero E, Sanborn JR, Volpin H.**

1999. Identification of lumichrome as a Sinorhizobium enhancer of alfalfa root respiration and shoot growth. *Proc Natl Acad Sci* **96**:12275–12280.
29. **Light SH, Su L, Rivera-Lugo R, Cornejo JA, Louie A, Iavarone AT, Ajo-Franklin CM, Portnoy DA.** 2018. A flavin-based extracellular electron transfer mechanism in diverse Gram-positive bacteria. *Nature* **562**:140–144.
 30. **Hall BG.** 2013. Building phylogenetic trees from molecular data with MEGA. *Mol Biol Evol* **30**:1229-1235.
 31. **Yoon J-H, Cho Y-G, Lee ST, Suzuki K -i., Nakase T, Park Y-H.** 1999. *N. nitrophenolicus* sp. nov., a p-nitrophenol-degrading bacterium. *Int J Syst Bacteriol* **49**:675–680.
 32. **Kao CH, Hsu WH.** 2003. A gene cluster involved in pyrimidine reductive catabolism from *Brevibacillus agri* NCHU1002. *Biochem Biophys Res Commun* **303**:848-854.
 33. **Hils M, Münch P, Altenbuchner J, Syldatk C, Mattes R.** 2002. Cloning and characterization of genes from *Agrobacterium* sp. IP I-671 involved in hydantoin degradation. *Appl Microbiol Biotechnol* **57**:680–688.
 34. **Yin J, Wei Y, Liu D, Hu Y, Lu Q, Ang EL, Zhao H, Zhang Y.** 2019. An extended bacterial reductive pyrimidine degradation pathway that enables nitrogen release from β -alanine. *J Biol Chem* **294**:15662-15671.
 35. **Zhu D, Wei Y, Yin J, Liu D, Ang EL, Zhao H, Zhang Y.** 2020. A Pathway for Degradation of Uracil to Acetyl Coenzyme A in *Bacillus megaterium*. *Appl Environ Microbiol* **86**:e02837-19.
 36. **Phillips DA, Joseph CM, Yang GP, Martínez-Romero E, Sanborn JR, Volpin H.** 1999. Identification of lumichrome as a Sinorhizobium enhancer of alfalfa root respiration and shoot growth. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **96**(22).
 37. **Hanne LF, Kirk LL, Appel SM, Narayan AD, Bains KK.** 1993. Degradation and induction specificity in actinomycetes that degrade p-nitrophenol. *Appl Environ Microbiol* **59**:3505–3508.
 38. **Cébron A, Louvel B, Faure P, France-Lanord C, Chen Y, Murrell JC, Leyval C.** 2011. Root exudates modify bacterial diversity of phenanthrene degraders in PAH-polluted soil but not phenanthrene degradation rates. *Environ Microbiol* **13**: 722-736.
 39. **Inoue K, Habe H, Yamane H, Omori T, Nojiri H.** 2005. Diversity of carbazole-degrading bacteria having the car gene cluster: Isolation of a novel gram-positive carbazole-degrading bacterium. *FEMS Microbiol Lett* **245**:145–153.
 40. **Ikunaga Y, Sato I, Grond S, Numaziri N, Yoshida S, Yamaya H, Hiradate S, Hasegawa M, Toshima H, Koitabashi M, Ito M, Karlovsky P, Tsushima S.** 2011. *Nocardioides* sp. strain WSN05-2, isolated from a wheat field, degrades deoxynivalenol,

- producing the novel intermediate 3-epi-deoxynivalenol. *Appl Microbiol Biotechnol* **89**:419–427.
41. **Nie S, Xu H.**2016. Riboflavin-induced disease resistance requires the mitogen-activated protein kinases 3 and 6 in *arabidopsis thaliana*. *PLoS One* **11**:e0153175.
 42. **Sokolovskaya OM, Shelton AN, Taga ME.** 2020. Sharing vitamins: Cobamides unveil microbial interactions. *Science* **369**:eaba0165.

謝辞

本研究を実施するにあたり、多くの方にご協力を賜りました。ここに心より感謝の意を表します。

本研究を進めるにあたり、指導教員として多大なご指導を賜りました、筑波大学生命環境系教授 高谷直樹先生に心より感謝申し上げます。

本研究にご指導を賜りました、筑波大学生命環境系教授 中村顕先生、筑波大学生命環境系准教授 竹下典男先生、筑波大学生命環境系助教授 榎尾俊介先生に心より感謝申し上げます。

本研究に多大なご指導、ご助言を賜りました、筑波大学生命環境系助教授 土肥祐希先生、大阪市立大学大学院医学研究科助教授 老沼研一先生、日本マイクロバイオファーマ株式会社 川崎志慧博士、アステラス製薬株式会社 茂本亮輔博士に心より感謝申し上げます。

また、筑波大学生命環境科学研究科負荷適応分子生物学研究室の皆様にも心より感謝申し上げます。