

学位論文題名

Study of a novel (+)-catechin degrading bacterium,
Burkholderia sp. KTC-1

(新規(+)-catechin 分解細菌、*Burkholderia* sp. KTC-1に関する研究)

学位論文内容の要旨

縮合型タンニンは、木材の製材時に多量に発生する樹皮などに含まれている可溶性の高分子芳香族化合物である。縮合型タンニンは酸性条件下で単量体である catechin へ容易に分解されるため、catechin 分解微生物の研究は、縮合型タンニンの利用促進に大きく貢献すると考えられる。

熱帯泥炭は、樹木残渣に由来する様々な難分解性の有機化合物を含んでおり、低 pH、高 C/N 比といった特殊環境であることが知られている。タンニンは熱帯泥炭の表層中に 1~3 g / Kg 程度含まれており、低 pH の影響で単量体化していることが予想される。事実、熱帯泥炭中におけるタンニン量は、深さに伴い減少することが報告されており、微生物による catechin の分解が盛んに行なわれているのではないかと考えられる。そのため本研究では、(+)-catechin 分解細菌の分離を熱帯泥炭より行なった。

また、(+)-catechin の細菌による分解経路研究は極めて少なく、1980 年以降でもインドの Mahadevan らによりいくつかの好気性細菌で報告がされているのみである。彼らの研究において、(+)-catechin と粗酵素の反応により protocatechuic acid と phloroglucinol carboxylic acid が生成することが報告されているが、分解反応の詳細や分解を触媒する酵素に関する知見は極めて少ない。このため本研究では、熱帯泥炭より分離された新規(+)-catechin 資化細菌による代謝経路の初発反応について、粗酵素を用いた実験により初めて解明した。

インドネシア、中央カリマンタンの熱帯泥炭を分離源とし、(+)-catechin を唯一の炭素源とした集積培養を行なったところ、新規(+)-catechin 資化細菌として KTC-1 が分離された。この細菌は、16S rRNA の塩基配列において *Burkholderia* 属細菌と高い相同性を示し、*Burkholderia* 属としては、初めての catechin 資化細菌であることが示された。

本菌より調製した粗酵素による(+)-catechin の分解を試みた結果、pH 7.0 のリン酸バッファー中での粗酵素反応において、新たに UV-スペクトル上で 325 nm 付近の吸収が出現し、TLC 上でも基質である(+)-catechin が消失し、低極性側に反応産物と想定されるスポットが出現した。この分解産物について、精製後、各種スペクトル解析を行なったところ、¹H-NMR スペクトルでは、(+)-catechin とほぼ同様のスペクトルを与えたが、4 位のプロトンのシグナルの消失が確認された。さらに ¹³C-NMR においては 4 位の炭素のシグナルが極端に低磁場シフトして観測され、そのケミカルシフト値からカルボニル基の存在が推定された。また、分子量 304、分子式 C₁₅H₁₂O₇ であることが ESI-TOF-MS の測定で明らかとなり、反応産物は taxifolin (dihydroquercetin) と同定された。

この反応の詳細を明らかにするため、taxifolin に由来する Abs 325 nm の経時変化を

測定したところ、sigmoid 型の反応曲線が得られたことから、多段階反応であると考えられた。反応時間毎に反応液の HPLC 分析を行なったところ、(+)-catechin より、僅かに高極性側に反応進行中にのみ現れるピークが確認された。このピークの保持時間は、標品として調製した 2,3-*trans*-leucocyanidin と一致した。以上の結果より、KTC-1 株による(+)-catechin 代謝は、4 位の炭素に対する hydroxylation と dehydrogenation という 2 段階の酸化反応によるカルボニル基の形成から始まることが明らかとなった。1972 年に Jeffery らによって、(+)-catechin 資化細菌による taxifolin の A-ring fission が報告されているが、(+)-catechin から taxifolin への反応については、述べられていない。このため本研究により発見された反応は、微生物においてこれまでに報告のない新規の代謝経路である。

(+)-Catechin の 4-hydroxylation および dehydrogenation を触媒する酵素の性質を明らかにするため、いくつかの実験により特徴化を試みた。この活性は、粗酵素液中の低分子を必要とせず、溶存酸素濃度による影響も見られなかったが、一方、重酸素水を加えて反応を行なった場合、GC-MS のスペクトル上で重酸素原子の取り込みが確認されたことから、水酸基として導入された後、dehydrogenation によりカルボニル基となる酸素原子は、水に由来することが明らかとなった。さらに、超遠心分離の結果、活性が可溶性画分からのみ検出されたことから、本反応を触媒する酵素は、いずれも細胞質に局在するものであることが確認された。

この活性の基質特異性を調べるため、Catechin の 4 つの立体異性体と反応させたところ、(+)-catechin 以外では、(-)-epicatechin でのみカルボニル基の形成を示す 325 nm の吸収が確認された。この実験により、この反応の立体特異性がカルボニル化される 4 位の隣の 3 位ではなく、より分子全体のコンフォメーションに影響を与える 2 位の立体化学に支配されていることが示された。縮合型タンニン中の Flavanol 単位のほとんどは、(+)-catechin、(-)-epicatechin に代表される 2R の立体異性体である。したがって、KTC-1 によるカルボニル化酵素の基質特異性は、縮合型タンニン由来の catechin 類に対し適応進化してきた結果と考えられる。また、このことは、KTC-1 によるカルボニル化反応が縮合型タンニンの分解産物のほとんどに対し有効であることを示唆している。

本研究により熱帯泥炭から分離された KTC-1 株は、*Burkholderia* 属としては、はじめての(+)-catechin 資化細菌であった。また、本菌株による(+)-catechin 代謝経路における初発反応として 4 位の hydroxylation 及び dehydrogenation によるカルボニル基の形成が行なわれることが明らかとなった。この反応は、過去に報告がない新規の代謝経路である。さらに、粗酵素反応の詳細な解析を行なうことにより、(+)-catechin カルボニル化酵素が活性に低分子化合物及び溶存酸素を必要とせず、水分子に由来する酸素原子を導入することが明らかとなった。また、本酵素の基質特異性が 2 位の炭素のコンフォメーションに支配されていることも明らかになった。

これらの結果は、(+)-catechin 代謝研究における新規の知見を与え、縮合型タンニンの有効利用に貢献すると考えられる。

学位論文審査の要旨

主査	教授	大崎	満
副査	教授	鍋田	憲助
副査	准教授	江澤	辰広
副査	准教授	信濃	卓郎

学位論文題名

Study of a novel (+)-catechin degrading bacterium, *Burkholderia* sp. KTC-1

(新規(+)-catechin 分解細菌、*Burkholderia* sp. KTC-1に関する研究)

本論文は6章からなり、図40、表1、引用文献76を含む、総頁数68の英文論文であり、別に1編の参考論文が添えられている。

熱帯泥炭は、樹木残渣に由来する様々な難分解性の有機化合物を含んでおり、低pH、高C/N比といった特殊環境であることが知られている。タンニン、難分解性の芳香族高分子であるが、熱帯泥炭では、リグニンなどの他の難分解性芳香族化合物とは異なり、泥炭が深くなるにつれて含有量が低下することから分解することが知られている。タンニンの内、縮合型タンニンは、熱帯泥炭の酸性環境において、catechinへと単量体化が進行していると推測されるため、微生物による catechin の分解が盛んに行なわれているとの仮説で研究を行った。

また、細菌による(+)-catechin 分解経路の研究は極めて少なく、1980年以降でもインドの Mahadevan らによりいくつかの好気性細菌で報告がされているのみである。このため本研究では、熱帯泥炭より新規(+)-catechin 分解細菌を分離し、その代謝経路の解析を行い、(+)-catechin の微生物分解について、新しい知見を得ることを目的とした。得られた結果の概要は以下の通りである

1. 熱帯泥炭からの新規(+)-catechin 分解細菌の分離

インドネシア、中央カリマンタンの熱帯泥炭を分離源とし、(+)-catechin を唯一の炭素源とした集積培養を行なったところ、新規(+)-catechin 資化細菌として KTC-1 が分離された。この細菌は、16S-rRNA の塩基配列において *Burkholderia* 属細菌と高い相同性を示した。本菌は *Burkholderia* 属としては、初めて分離された(+)-catechin 資化細菌である。

2. KTC-1 による(+)-catechin 分解経路の解明

KTC-1 より調製した粗酵素による(+)-catechin の分解を試みた結果、pH 7.0 の phosphate buffer 中での反応において、UV-スペクトル上に 325 nm 付近の吸収が出現し、TLC 上でも基質である(+)-catechin が消失し、低極性側に反応産物のスポットが出現した。この反応産物について、精製後、各種スペクトル解析を行なったところ、 ^1H -NMR、 ^{13}C -NMR 及び ESI-TOF-MS の結果より、(+)-catechin の 4 位にカルボニル基が付加した taxifolin と同定された。

この反応の詳細を明らかにするため、taxifolin に由来する Abs 325 nm の経時変化を測定したところ、sigmoid 型の反応曲線が得られたことから、多段階反応であると考えられた。反応時間毎に反応液の HPLC 分析を行なったところ、(+)-catechin より、僅かに高極性側に反応進行中にのみ現れるピークが確認された。このピークの保持時間は、標品として調製した 2,3-*trans*-leucocyanidin と一致した。以上の結果より、KTC-1 株による(+)-catechin 代謝は、4 位の炭素に対する水酸化と脱水素化という 2 段階の酸化反応によるカルボニル基の形成から始まることが明らかとなった。この反応は、本研究により始めて発見された、新規の代謝経路である。

3. KTC-1 中の catechin カルボニル化酵素の特徴化

上記反応を触媒する酵素の性質を明らかにするため、特徴化を行なった。この活性は、粗酵素液中の低分子化合物及び溶存酸素を必要としなかった。一方、重酸素水を加えて反応を行なった場合、GC-MS のスペクトル上で重酸素原子の取り込みが確認されたことから、水酸基として導入された後、カルボニル基となる酸素原子は、水に由来することが明らかとなった。さらに、超遠心分離後、活性が可溶性画分からのみ検出されたことから、本反応を触媒する酵素は、いずれも細胞質に局在することが確認された。また、catechin の 4 つの立体異性体をそれぞれ基質として反応させたところ、(+)-catechin 以外では、(-)-epicatechin においてのみカルボニル基の形成を示す 325 nm の吸収が確認された。このため、KTC-1 中のカルボニル化酵素は、2*R*-stereoisomer のみを特異的に認識していることが明らかとなった。

以上のように本研究により熱帯泥炭から新規の(+)-catechin 分解細菌、*Burkholderia* sp. KTC-1 が分離され、新規(+)-catechin 分解経路の初発反応として 4 位の水酸化に続く脱水素化という 2 段階の酸化反応によるカルボニル基の形成が明らかとなった。さらに、この反応を触媒する酵素の性質を明らかにした。これらの結果は、catechin の微生物分解における新規の知見を与え、縮合型タンニンの有効利用にも貢献するものと考えられる。

よって審査員一同は、松田 元規が博士（農学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認めた。