

令和 3 年 6 月 18 日現在

機関番号：13102

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K14560

研究課題名（和文）リグニン由来の低分子芳香族を特異的に検出する革新的環境センサーの開発

研究課題名（英文）Development of novel bacterial sensor for lignin-derived aromatics

研究代表者

上村 直史 (Kamimura, Naofumi)

長岡技術科学大学・工学研究科・助教

研究者番号：50646528

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：環境中でのリグニン分解を明らかにするツールの開発を目指し、リグニン由来化合物を検出するセンサーバクテリアを作出した。リグニン由来化合物のモデル分解菌である *Sphingobium* sp. SYK-6株を宿主とし、本株の転写制御システムと GFP を用いてセンサーを開発した。フェルラ酸・バニリン酸のセンサーは 500 nM、10 μM 以上のフェルラ酸・バニリン酸に応答した。また、トランスクリプトーム解析で得た知見を用いて -1 型二量体、ピノレジノール、アセトバニロンのセンサーを構築した。センサーバクテリアは液体試料だけでなく腐朽木片にも応答したことから、多様な環境試料への適用性が認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

リグニンは「真菌等による低分子化分解」と「生成した芳香族化合物のバクテリアによる代謝」を経て無機化されるが、環境中での実態は未だ明らかにされていない。本研究で作出したセンサーバクテリアは、液体試料を標的としたセンサーとは異なり木片といった固体試料にも適用ができたことから、土壌環境分析にとどまらず、樹木の腐朽を動的かつ部位特異的に解析する新たなツールになり得ると期待される。バニリン酸はポリマー原料としても有望であり、バニリン酸センサーを応用することによりリグニンからのバニリン酸生産能を高めた変異体の作出がハイスループット化され、低炭素社会の構築を促進できる。

研究成果の概要（英文）：To clarify the biodegradation behavior of lignin in the environment, bacterial sensors that can detect lignin-derived compounds were created. These sensors were constructed using *Sphingobium* sp. SYK-6, a model degrader of a lignin-derived compounds, and sensor plasmids with transcription regulatory system and GFP. The ferulate and vanillate sensors responded to ferulate and vanillate greater than 500 nM and 10 μM, respectively. Based on the transcriptome profiles of SYK-6, we also constructed sensors for -1 dimer, lignan pinoreosinol, and acetovanillone. The sensor bacteria responded not only to liquid samples but also to rotting wood chips. Therefore, these sensors are applicable for the analysis of degradation of lignin in various environmental samples.

研究分野：微生物代謝工学

キーワード：リグニン フェルラ酸 バニリン酸 センサー 樹木 バクテリア 蛍光タンパク質 転写制御

1. 研究開始当初の背景

植物の主要成分であるリグニンは複雑な構造をもち、地球上で最も豊富に存在する芳香族高分子である。リグニンの生分解は、白色腐朽菌などの真菌が分泌する酸化還元酵素による高分子構造の解体と、生成した多様な低分子芳香族化合物の細菌による無機化の2段階のプロセスで構成される (図1)。

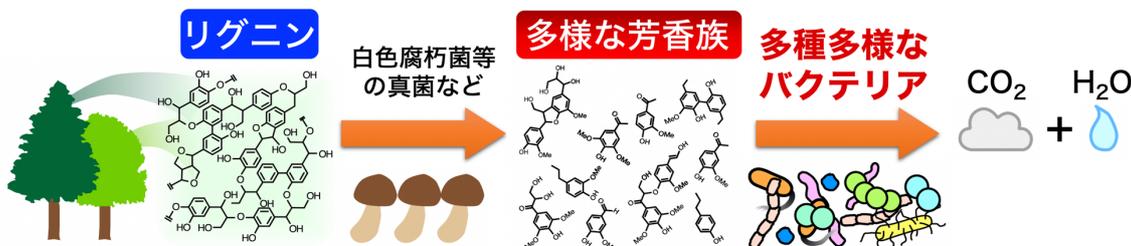


図1. 自然界におけるリグニンの生分解プロセス

リグニンの生分解モデルは、安定同位体標識したリグニンを基質とした生分解プロービング実験で1980年頃に提唱され、現在ではメタゲノム解析などの手法により環境中でも真菌と細菌の両者によりリグニンの生分解が担われることがわかってきた。真菌のペルオキシダーゼ等の酸化還元酵素によりリグニンの高分子構造が解体されるとフェルラ酸 (FA)、バニリン、バニリン酸 (VA) などのリグニン由来化合物 (lignin-derived compounds) と呼称される様々な低分子芳香族化合物が生成する。

リグニン由来化合物のモデル分解菌として位置づけられている *Sphingobium* sp. SYK-6 株等の代謝能力の解明に取り組み、基質輸送、分解酵素と遺伝子の機能、転写制御システムを明らかにしてきた (総説: Kamimura et al., *Environmental Microbiology Reports*, 2017, 9(6), 679–705)。SYK-6 株と同様の芳香族化合物代謝は、*Pseudomonas* 属、*Agrobacterium* 属、*Corynebacterium* 属、*Rhodococcus* 属、*Comamonas* 属などグラム陰性・陽性問わず主要な環境細菌で見いだされている。一方、環境中にはどのようなリグニン由来化合物が存在するのであろうか? いくつかの土壌分析研究ではFAやバニリン等が微量に検出されている。しかし、いずれも植物体やリグニン自体が人為的に分解してしまうアルカリや加熱処理などの激烈な抽出・分析手法であった。そこで、申請者は森林腐植土を水で懸濁しただけの可溶性画分について化合物分析を実施した。その結果、予想外にもリグニン由来として認知されている化合物は一切検出されなかった (1 nmol/g soil 以下)。この結果は環境中においてどのような低分子芳香族化合物が実際にリグニンの解体で生成し細菌により代謝されるのか不明であることを示唆し、リグニン生分解の2つのプロセスをつなぐ化合物は今なお曖昧である (図2)。

2. 研究の目的

リグニンは難分解性であり、環境中では数年～数十年をかけて無機化される。この事実と先程の環境中の低分子芳香族化合物の分析結果は、リグニンの分解は高分子の解体が律速であり、生成した低分子化合物は細菌により速やかに代謝・無機化されることを示唆するとともに、従来の化合物分析ではリグニン由来化合物の実態を明らかにすることは困難と判断された。そこで、本研究では、環境中から細胞内に取り込まれたリグニン由来化合物またはその代謝中間体を特異的に検出できる高感度なセンサー細菌を開発することを目的とする（図2）。

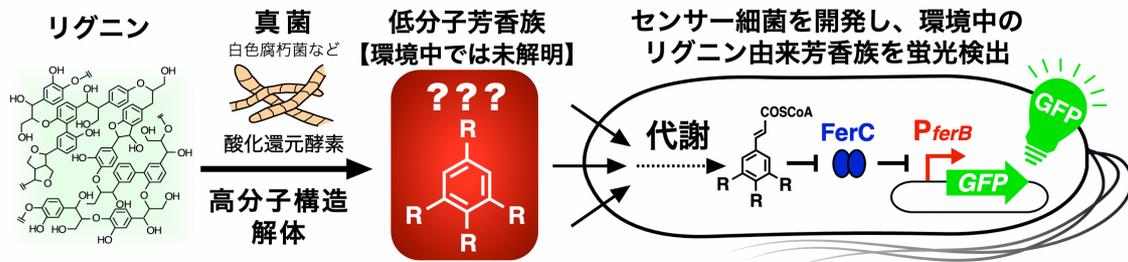


図2. 本研究で開発するセンサー細菌

3. 研究の方法

センサーの開発には、申請者が明らかにしてきた、表1に示す SYK-6 株のリグニン由来化合物代謝に関わる遺伝子の転写制御システムを用いた。

代謝基質	遺伝子 (群)	プロモーター	制御タンパク質	制御様式
フェルラ酸	<i>ferBA</i> オペロン	<i>PferB</i>	FerC (MarR 型)	リプレッサー
バニリン酸	<i>ligM</i>	<i>PligM</i>	DesR (MarR 型)	リプレッサー

1) センサー用レポーターの選定

緑色蛍光タンパク質である eGFP と superfolder GFP (sGFP)、青色蛍光タンパク質の CFP、赤色蛍光タンパク質の mCherry の遺伝子を、各遺伝子を保持するベクターから PCR 増幅し、SYK-6 株の高発現ベクターである pQF の Q5 プロモーター下流に連結し、誘導培養後の蛍光を評価した。

2) センサー細菌の構築

SYK-6 株での発現のためにコドン最適化された蛍光タンパク質 sGFP 遺伝子を合成した。広宿主域ベクターの pSEVA231 (RK2 ori、カナマイシン耐性) に、SYK-6 株での翻訳に最適化したリボソーム結合配列 (RBS) と合成 sGFP 遺伝子を連結させて導入し、レポーター用ベースプラスミド pSGFP を構築した。pSGFP の RBS 上流に P_{ferB} と Pamp-RBS-*ferC-ferA* (FerA は FA に CoA を付加し FerC のエフェクターであるフェルロイル CoA (FACoA) を生成する) を挿入し、FA センサー用レポータープラスミド pFB14 を構築した。また、pFB14 から *ferA* が除かれた pFB09 を構築した。pSGFP の SD 配列上流に P_{ferB} と Pamp-RBS-*desR* を挿入して VA センサー用レポータープラスミド pLM を構築した。pFB14 を FACoA 変換能を欠損させた *ferB ferB2* 二重破壊株 ($\Delta ferB ferB2$) に、pLM を VA 変換能を欠損させた *ligM desA* 二重破壊株 ($\Delta ligM desA$) にそれぞれ導入

し、得られた形質転換体を FA および VA センサーとした。



図 3. FA 及び VA センサー用レポータープラスミド

SYK-6 株のトランスクリプトーム解析から、様々なリグニン由来化合物での培養時に誘導される遺伝子を選抜し、当該遺伝子または推定オペロンの最上流遺伝子の開始コドン上流 400 bp を推定誘導性プロモーター領域として PCR 増幅し、pSGFP の SD 配列上流に挿入した。得られたプラスミドを SYK-6 株に導入し、リグニン由来化合物のセンサー候補とした。

3) FA および VA センサーの評価

pFB14 を保持させた $\Delta ferB ferB2$ 株および pFB09 を保持した $\Delta ferA$ 株を 10 nM-10 mM FA、1 mM の様々なリグニン由来の二量体および単量体化合物、または 1 mM の FA アナログを含む無機塩培地+10 mM sucrose + 10 mM glutamate + 10 mM proline + 0.13 mM methionine (Wx-SEMP) で 30°C で培養した。pLM を保持させた $\Delta ligM desA$ 株は 1 μ M-1 mM VA またはシリング酸を含む Wx-SEMP で培養した。トランスクリプトームで見いだされたセンサー候補株を誘導性が見られた各リグニン由来化合物を 1 mM 含む Wx-SEMP で培養した。培養開始から経時的に sGFP に由来する蛍光と菌体濁度 (OD600) を測定した。菌体量による蛍光の増大を標準化するため、菌体濁度あたりの蛍光をセンサーの蛍光活性と定義した。

4) 環境試料への応答性

pFB14 を保持させた $\Delta ferB ferB2$ 株を滅菌・溶解後の Wx-SEMP 寒天培地に OD600 が 1.0 となるように添加して固化によりプレート成形した。本プレートに環境試料として採取した腐朽木片をおいて 12 時間経過後に蛍光を観察した。

4. 研究成果

Shingobium sp. SYK-6 株は多様なリグニン由来化合物の代謝能を有することから、本研究で開発するセンサーバクテリアの宿主に適している。一方、SYK-6 株において蛍光タンパク質を機能させたことは無い。本研究でははじめに SYK-6 株において機能する蛍光タンパク質の選定を行った。 α プロテオバクテリア用の高発現ベクターである pQF の Q5 プロモーターにより eGFP、sGFP、CFP、mCherry を発現させ、蛍光活性を評価した結果、sGFP が最も高かった。本研究では sGFP をセンサーのレポーターとして用いることにした。

pFB14 を保持させた $\Delta ferB ferB2$ は 500 nM から 10 mM の FA に応答した。また、FA センサーは FA に構造が類似した sinapate、*p*-coumarate、dihydroferulate、caffeate 等の C6-C3 構造を有する芳香族カルボン酸に応答した (図 4)。FA センサーの基質範囲は制御因子 FerC とそのエフェクターである CoA エステルを生成する FerA に依存す

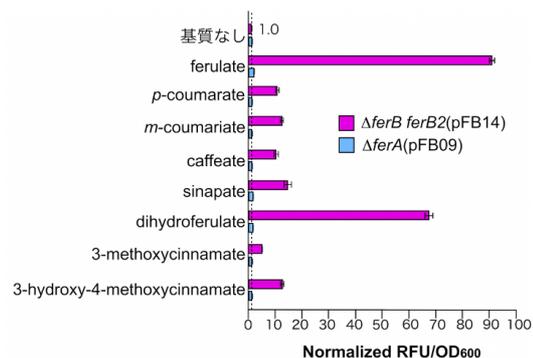


図 4. FA センサーの C6-C3 芳香族酸応答性

る。FA センサーで見られた応答性が FA アナログの CoA エステルによるものかどうか明らかにするために、pFB14 から *ferA* が除去された pFB09 を *ferA* 破壊株 ($\Delta ferA$) に導入し、各基質への応答性を評価した。その結果、いずれの基質においても応答性は見られず、FA センサーは FerA と FerC の広い基質範囲により多様な C6-C3 カルボン酸に応答できることが示唆された。また、coniferaldehyde、sinapyl alcohol、dehydrodiconiferyl alcohol (DCA) などの SYK-6 株において FA/sinapate を代謝時に経由する化合物でも蛍光が観察された。さらに、FA/sinapate を代謝中間体としない β -O-4 型二量体や acetovanillone などの化合物でも蛍光が観察された。これらの化合物は、代謝過程で C6-C3 芳香族酸を経由し、FerA による CoA の付加を受けることで、FerC が認識できる CoA エステルが生成されたと推察された。

pLM を保持させた $\Delta ligM desA$ 株の VA 応答性を評価した結果、50 μ M から 1 mM の VA に応答した。VA センサーの制御因子として利用している DesR は VA だけでなくシリング酸にも応答する。本センサーのシリング酸応答性を評価したところ、5 mM 以下のシリング酸には応答せず、VA に対して特異性が高いセンサーであることが示された。また、本センサーにおいても FA センサーの場合と同様に、SYK-6 株において VA を経由して代謝される上流の化合物で応答が見られた。

β -1 型二量体、 β -O-4 型二量体、 β -5 型二量体、 β - β 型二量体 (pinoresinol)、アセトバニロン等のリグニン由来化合物で誘導が見られた遺伝子の推定プロモーター領域を用いて作製したセンサー候補の評価を行った。その結果、3つのセンサー候補において β -1 型二量体、pinoresinol、アセトバニロンをそれぞれ応答できることが見いだされた。 β -1 型二量体及び pinoresinol に応答する転写制御システムの報告はなく、誘導物質および制御因子に興味を持たれる。

バクテリアセンサーの環境試料への適用を検討した。水系試料は問題なく適用できたことから固体試料について検討した。FA センサーバクテリアを含有した Wx-SEMP 寒天培地を作製し、腐朽木片を置いてインキュベートを行い、センサーの応答性を評価した。その結果、木片の周りで蛍光が見られた。これは、本研究で開発したセンサーが固体試料にも適用できることを示しており、環境中でのリグニン生分解プロセス解明の足がかりを得た。



図 5. FAセンサーバクテリアを含有させた寒天培地による環境試料への応答性評価

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 室佳史乃, 白濱里帆, 上村 直史, 政井 英司
2. 発表標題 リグニン由来芳香族化合物を検出するバクテリアセンサー
3. 学会等名 環境バイオテクノロジー学会2019年度大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 白濱里帆, 室佳史乃, 上村直史, 政井英司
2. 発表標題 フェルラ酸を検出するバクテリアセンサー
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 新沼 皐, 荒木 拓馬, 上村 直史, 政井 英司
2. 発表標題 Sphingobium sp. SYK-6株におけるリグニン・ビフェニル化合物代謝系遺伝子群の転写制御システム
3. 学会等名 第63回リグニン討論会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 白濱 里帆, 室 佳史乃, 上村 直史, 政井 英司
2. 発表標題 フェルラ酸代謝制御系を利用したリグニン由来芳香族化合物センサー
3. 学会等名 第65回リグニン討論会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 上村 直史
2. 発表標題 リグニン由来芳香族化合物の微生物分解とポリマー原料生産
3. 学会等名 第13回木質科学シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

微生物代謝工学研究室ホームページ http://bio.nagaokaut.ac.jp/~masai-1/

6. 研究組織			
	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------