

令和 4 年 6 月 17 日現在

機関番号：13801

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2021

課題番号：20K21349

研究課題名（和文）白色腐朽菌を用いたリグニン由来フェノール類高産生技術の確立

研究課題名（英文）Construction of the production technique of phenols glucosides from lignin with white-rot fungi

研究代表者

平井 浩文（Hirai, Hirofumi）

静岡大学・農学部・教授

研究者番号：70322138

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：大腸菌により産生させた組換えタンパク質の特性評価より、高活性リグニン分解菌 *Phanerochaete sordida* YK-624株への配糖化能付与に適すると判断した *Arabidopsis thaliana*由来糖転移酵素遺伝子をYK-624株へ導入し、得られた株のパニリンへの配糖化能を調査した。その結果、変換率24%といった高い配糖化能を示す株の取得に成功した。さらに配糖化能を向上させるべく、2種類存在する UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase様遺伝子（*ugp1*, *ugp2*）のうち、*ugp2*がUDP-グルコース生産能を有していることを解明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

地球温暖化解決に向けて、「木材等の非過食性バイオマス为原料としたバイオリファイナリー技術の確立」は避けては通れない、極めて重要な課題である。本研究は「キノコの中で、木（リグニン）よりポリマー原料を生産する」が最終目標であり、本研究成果は、微生物（白色腐朽菌）によるリグニンの高度化利用技術に資するものである。本微生物を利用することで、木材中リグニンより直接低分子リグニンを回収出来る技術の礎となる。

研究成果の概要（英文）：By the characteristics of recombinant proteins using *E. coli*, glucosyl transferase (UGT72E2) from *Arabidopsis thaliana* was suitable for the formation of low molecular weight lignin glucoside, and then the cDNA was introduced into hyper lignin-degrading fungus *Phanerochaete sordida* YK-624. Ten strains was obtained as *ugt72e2*-introducing strains (UGT72E2 strain), and the UGT72E2-27 strain showed highest activity of vanillyl alcohol glucoside formation. Moreover, *ugp2* was selected as UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase gene in *P. sordida* YK-624.

研究分野：環境生物化学

キーワード：白色腐朽菌 低分子リグニン 配糖化 糖転移酵素 分子育種

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

地球温暖化解決に向けて、「木材等の非過食性バイオマス为原料としたバイオリファイナリー技術の確立」は避けては通れない、極めて重要な課題である。これまでのバイオリファイナリーと言えば、デンプンやセルロースと言った高分子多糖を糖化・発酵させ、有価物を生産することに着眼され研究が行われてきたが、残されたリグニンの利用について、その研究報告は極めて限定的であった。言うなれば、環境低負荷型、低炭素循環型社会の構築と言った現代に突きつけられた課題に対して、木材成分全てを利用するといった『ゼロエミッション』の達成は、極めて重要な一大課題である。

2. 研究の目的

キノコ(担子菌)の中でも白色腐朽菌は、木材(ホロセルロース及びリグニン)を分解可能な上、様々な発酵能を有することが知られており、木質バイオリファイナリーに最も適した微生物である。研究代表者はこれまでに白色腐朽菌を用いたワンステップ木質バイオリファイナリーに関する研究を展開してきており、木材中セルロースよりエタノール、乳酸、酢酸、キシリトール、水素を産生可能であることを報告している。この過程でリグニンは白色腐朽菌により完全分解されているが、この分解反応を人為的に操作し、リグニン由来フェノール類を「次世代高分子原料」として産生するのが、本研究の目的である。

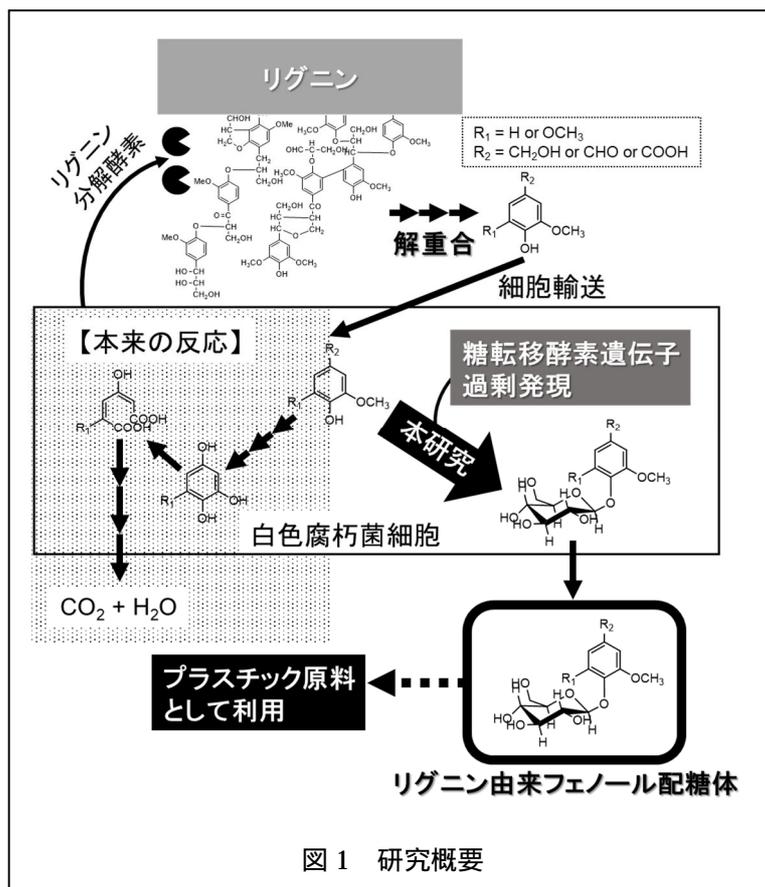
白色腐朽菌はリグニン分解酵素を産生し、細胞外にてリグニンの解重合を行い、生成する各種フェノール類を細胞内に取り込み、二酸化炭素にまで分解している。本研究では、高活性リグニン分解菌 *Phanerochaete sordida* YK-624 株細胞内にて『糖転移酵素(GT)遺伝子』を過剰発現させ、取り込まれたフェノール類を速やかに配糖化することで分解反応を停止させ蓄積させる、というこれまでに類を見ない、達成されるとリグニンの有効利用が大きく進展する挑戦的研究を実施した(図1)。

3. 研究の方法

- (1) 植物由来 GT 遺伝子の腸菌を用いた異種発現と基質特異性の解明

これまでの報告でパニリンへの配糖化能が観察されている *Pharbitis nil* (アサガオ) 及び *Arabidopsis thaliana* (シロイヌナズナ) 由来糖転移酵素遺伝子(それぞれ PNgt1, UGT72E2) を腸菌にて異種発現させ、その基質特異性を解析した。白色腐朽菌 *P. chrysosporium* のコドン使用頻度を参考に、PNgt1、UGT72E2 cDNA のコドン最適化を行い、これら遺伝子を pET28a(+)へ挿入し、これを腸菌 *E. coli* BL21 (DE3) codonplus へ導入した。これら腸菌を培養し、得られた細胞より無細胞抽出液を調製後、Ni アフィニティークロマトグラフィーに供し、目的タンパク質 (rPNgt1、rUGT72E2) を得た。糖受容体としてパニリン (Vald)、シリンガルデヒド (Sald)、パニリルアルコール (Valc)、シリンガルアルコール (Salc)、コニフェリルアルコール (Con)、シナピルアルコール (Sin)、グアイアシルグリセロール-β-グアイアシルエーテル (GG) を使用し、これらに対する配糖化能を調査した。なお、糖供与体として UDP-グルコースを使用した。
- (2) UGT72E2 遺伝子高発現株の作出

高活性リグニン分解菌 *P. sordida* YK-624 株を宿主として、UGT72E2 遺伝子を高発現する株の取得を行った。白色腐朽菌 *P. chrysosporium* のコドン使用頻度を参考に、UGT72E2 cDNA



のコード最適化を行った。これを *P. sordida* YK-624 株由来 GPD 遺伝子プロモーター及びターミネーターを有するプラスミド pPsGPD へ挿入した。本プラスミドと URA5 遺伝子が挿入されたプラスミド pPsURA5 を、*P. sordida* YK-624 株由来ウラシル要求性変異株 UV-64 株へ共形質転換した。ウラシルを含まない培地で復帰株を獲得後、ゲノム PCR にて UGT72E2 遺伝子導入株 (UGT72E2 株) を選抜した。

UGT72E2 株を PD 液体培地にて 2 日間前培養後、1 mM Vald を添加し、さらに 5 日間聖地培養を行った。培養後、培養液を HPLC 分析に供し、パニリン由来配糖体を定量した。

(3) *P. sordida* YK-624 株由来 UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase (UGP) 様遺伝子の大腸菌を用いた異種発現及びその特性評価

P. sordida YK-624 株の全ゲノム中に、推定 UGP 遺伝子が 2 種類 (*ugp1*, *ugp2*) 発見されている。これら遺伝子のうち、UDP-グルコース生合成に關与する遺伝子を決定すべく、これらが大腸菌にて異種発現させ、得られた組換えタンパク質の活性を調査した。*ugp1* 及び *ugp2* cDNA を取得後、これらを pET21a に挿入した。これを大腸菌 *E. coli* BL21 (DE3) へ導入し、これら大腸菌を培養し、得られた細胞より無細胞抽出液を調製後、Ni アフィニティークロマトグラフィーに供し、目的タンパク質を得た。活性試験は、UTP、glucose-1-phosphate、MgCl₂、HEPES (pH 7) からなる混合液を 37 °C で保温し、酵素タンパクを添加して反応を開始させ、反応終了後 HPLC 分析に供し、UDP-Glucose 生成量を定量した。

4. 研究成果

(1) rPNgt1 及び rUGT72E2 の低分子リグニンへの配糖化能について

取得した rPNgt1、rUGT72E2 を使用して糖転移活性試験を行った結果、rPNgt1 は全ての基質に対して糖転移活性を示した (図 2)。GG に対して活性を示したことから、比較的分子量の大きなダイマーに対しても活性を示すことが明らかになった。一方、rUGT72E2 は GG

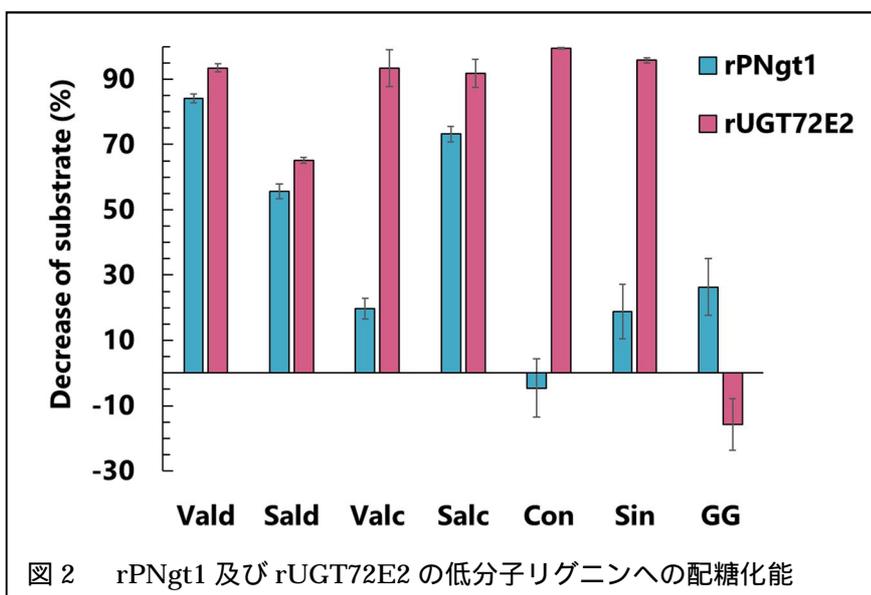


図 2 rPNgt1 及び rUGT72E2 の低分子リグニンへの配糖化能

以外の全ての基質に対して rPNgt1 以上に高い活性を示した。この結果から、rUGT72E2 は rPNgt1 と比較してリグニンモノマーに対して広い基質特異性を有していることが明らかになった。また、rPNgt1 はパニリルアルコール、シリンガルアルコール、シナピルアルコール、コニフェリルアルコール、GG では 2 種の反応生成物が確認された一方で、rUGT72E2 では活性を示すすべての化合物において反応生成物は 1 種のみであった。これら結果から、rPNgt1 はフェノール性水酸基、アルコール性水酸基両方に対して糖転移を行う一方で、rUGT72E2 はフェノール性水酸基に特異的に糖転移を行う可能性が示唆された。以上の結果を考察すると、リグニンモノマーに対する活性は rUGT72E2 の方が高いことが予想され、白色腐朽菌の木材腐朽時に低分子リグニンを効率的に蓄積させるためには、低分子リグニンに対して幅広い基質特異性を有し、フェノール性水酸基のみに糖転移活性を有する UGT72E2 遺伝子を *P. sordida* YK-624 株にて異種発現させる方が好ましいと判断した。

(2) UGT72E2 遺伝子高発現株の作出及びその特性評価

今回の実験で、10 株の UGT72E2 株を獲得した。これらの低分子リグニンへの配糖化能を調査した結果、Vald 配糖体ではなく、Valc のフェノール性水酸基が配糖化された化合物 (Valc-Glc) が検出された。*P. sordida* YK-624 株は PD 液体培地において高い還元力を有しており、Vald は速やかに Valc へと還元され、この Valc が糖受容体となっていることが示唆された。得られた 10 株の UGT72E2 株により生成する Valc-Glc 量を定量した結果、特に UGT72E2-27 株において高い生成量を示し、配糖体への変換率は 24% であった (図 3)。

よって、本株を UGT72E2 遺伝子高発現株として選抜し、実際の木材腐朽時に低分子リグニン配糖体を与えるかどうか検討した。本株をブナ木粉培地に接種し、所定期間培養後、メタノール抽出を行い、抽出物を HPLC 分析に供したが、低分子リグニン配糖体は検出されなかった。これは、現状の株では配糖化能が低く、生成した低分子リグニンは配糖化される前にさらに代謝されていることが予想された。よって、さらに配糖化能を高めるべく、糖供与体である

UDP-グルコース生成能の強化を試みることにした。

(3) rUGP2 の特性評価

UGP とは、UTP とグルコース-1-リン酸を基質として UDP-グルコースを生成する酵素である。本酵素遺伝子を高発現させることで、さらなる低分子リグニン配糖化能が強化可能と考えた。しかしながら *P. sordida* YK-624 株ゲノム中には 2 種類の推定 UGP 遺伝子が存在し、どちらが UDP-グルコース生成に寄与しているか不明である。そこで、本研究ではこの 2 種類

の UGP を大腸菌にて異種発現させ、得られた組換えタンパク質の活性を調査することで、UDP-グルコース生成に寄与する UGP の同定を試みた。各種検討を行った結果、rUGP2 のみ無細胞抽出液における可溶性画分に発現が認められ、rUGP1 は不溶性画分にのみ認められた。そこで rUGP を精製し、比活性を調査した結果、4.6 U/mg であった。過去の報告で *Erwinia amylovora* 由来 rUGP の比活性を示した結果があり、その値は 1.9 U/mg であった。以上の結果より、今回得られた rUGP2 は他生物由来 UGP と遜色ない比活性を示したことから、本遺伝子が UDP-グルコース生成に関与していると考え、現在、本遺伝子高発現株の取得を進めている。

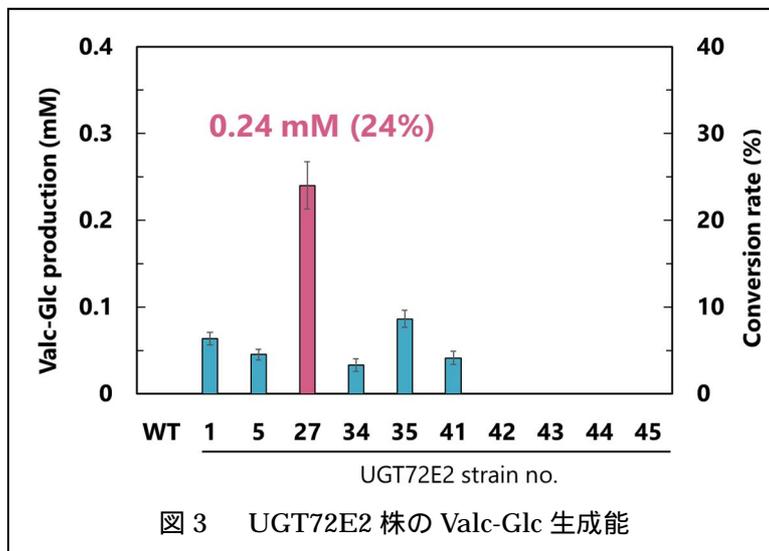


図3 UGT72E2 株の Valc-Glc 生成能

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 篠原桃香、石井奨馬、森智夫、河岸洋和、平井浩文
2. 発表標題 配糖化能を利用した白色腐朽菌によるリグニン由来フェノール類蓄積の試み
3. 学会等名 第 66 回リグニン討論会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------	---------