

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 28 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18724

研究課題名(和文) リグニン重合ペルオキシダーゼの酸化特性から迫るリグニンの不均一形成制御機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of regulation of lignin structure from a view point of oxidation ability of plant peroxidases

研究代表者

重藤 潤 (Shigeto, Jun)

九州大学・農学研究院・学術研究員

研究者番号：70570852

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：植物ペルオキシダーゼのリグニン形成能を明らかにするため、シロイヌナズナの茎木化に關与するAtPrx-2, 25, 71およびポプラCWPO-Cの組換えタンパクを用いてリグニンモノマーを基質に脱水素重合物の作製を試みた。その結果、植物ペルオキシダーゼは個々に異なるリグニン形成能力を持っており、木化に關与する植物ペルオキシダーゼは、木化に關与しないものと比較してシナピルアルコール重合能力、および高分子化能力の点で優れた性質を持っていることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Lignification-related Arabidopsis peroxidases (AtPrx2, 25 and 71) and the poplar cationic cell-wall-bound peroxidase (CWPO-C) have an ability to oxidize lignin monomer model compounds. In this study, I tried to produce dehydrogenative polymers (DHPs) from lignin monomer to evaluate the lignin producing potential of these peroxidases, using the recombinant (rec) proteins. My results showed recAtPrx2, 25, 71 and recCWPO-C were able to produce DHPs from both guaiacyl and syringyl type of lignin monomer. In addition, the use of recCWPO-C enabled production of the syringyl type DHPs, with similar distribution of molecular size to milled wood lignin. These results suggested that plant peroxidases involved in lignification have a superior property in the ability to polymerize syringyl type lignin monomer and enlarge molecule size, rather than the plant peroxidases which do not involved in lignification.

研究分野：植物分子生物学

キーワード：植物ペルオキシダーゼ リグニン dehydrogenative polymer

## 1. 研究開始当初の背景

広葉樹・草本植物のリグニンは、主にグアイアシル(G)型とシリギル(S)型リグニンモノマーから構成されており、ペルオキシダーゼによる酸化的重合反応を介し高分子化することが知られている。リグニンの量、構造(モノマーの結合様式、分子サイズ)、組成比(S/G比)は、組織レベルで大きく異なり不均一である。植物がどのようにリグニンの不均一な形成を制御しているか解明すべく細胞壁の人工創製を試みる研究が行われた。しかし、ホースラディッシュペルオキシダーゼ(→単一タンパクではなく HRP-C を主に含む)を用いた実験室的脱水素重合では、通常、S型人工リグニン(SA-DHP)はほとんど生成しない。この事実は、リグニンの不均一性について議論する以前にペルオキシダーゼを介したリグニンの高分子化機構自体に疑問を投げかけてきた。研究代表者はシロイヌナズナのリグニン形成に關与する3個のペルオキシダーゼ(AtPrx2、AtPrx25、AtPrx71)は、この疑問を解消させる酸化能力をもつことを明らかにした。すなわち、HRP-Cを含む既知の大部分のPrxがG型モノマーしか酸化できないのに対し、AtPrx2、AtPrx25、AtPrx71は、G型基質だけでなくS型基質や高分子基質注に対しても酸化能を有する。

AtPrx2、AtPrx25、AtPrx71はリグニン高分子化酵素として矛盾のない酸化能をもつが、それらの酸化特性は同一ではない。リグニン高分子化ペルオキシダーゼの特性の違いは、性状の異なるリグニンを生じさせる要因の一つであると考えられるが、これまで議論されていない。これは、リグニン高分子化を担うペルオキシダーゼがほとんど同定されておらず、その単一タンパクを入手することも困難であったためであるが、研究代表者らによるAtPrx2、AtPrx25、AtPrx71の発見と、組換えタンパク作製系の確立および酸化特性の解明により、重合酵素の違いによるリグニン性状の違いについて議論が可能となった。

## 2. 研究の目的

リグニンの構造・組成を決定し、組織や器官によって異なるリグニン性状を生み出す要因の1つとして「リグニン高分子化を担う植物ペルオキシダーゼの反応特性」に着目した。これまで植物のリグニン構造、組成の制御機構は、モノマーの種類・供給速度や反応環境の面から議論され、その検証実験には、生体内での木化には寄与しないホースラディッシュペルオキシダーゼ(HRP)が使用されてきた。本研究は、リグニン生合成へ寄与することが証明され、かつHRPとは明瞭な酸化活性の違いをもつシロイヌナズナの3種のペルオキシダーゼを使用し、そのペルオキシダーゼの反応特性の違いから植物におけるリグニンの不均一性制御機構の解明を試みる。

## 3. 研究の方法

### 1. DHP 産生と分子量分布解析

AtPrx-2, 25, 71 に AtPrx53、CWPO-C を加えた、計5種の組換えタンパク(rAtPrx2、rAtPrx25、rAtPrx71、rAtPrx53、rCWPO-C)を作製、精製した。AtPrx53 はこれまでよく研究されてきたPrxの一つであり、HRP-C同様、S型基質酸化能が極めて低いことが報告されている。一方、CWPO-C(ポプラ由来)は“全能性”をもつことが最初に示されたPrxである。50 mM Tris-HCl (pH 7.5)、10 mM シナピルアルコール、2~192 nM 組換えタンパクを含む反応液に、終濃度10 mMになるよう過酸化水素を添加することによって反応を開始した。30 で2 hゆるやかに振盪後、遠心分離によって沈殿を回収した。沈殿をジオキサン溶液(ジオキサン:水=4:1)に溶解したものをSA-DHP溶液とし、DHP収量の指標として280 nmにおける吸光度を測定した。その後、SA-DHP溶液をゲル浸透クロマトグラフィー(GPC; カラム: TSKgel  $\alpha$ -2500,  $\alpha$ -3000)を用いたHPLCによって分離し、分子量分布を観察した。

### 2. MALDI-TOF-MS 分析

質量分析を行えば、DHPの重合度と構造を同時に観察できる可能性があるため、MALDI-TOF-MSによるDHPの分析を試みた。60 mM LiClを含むジオキサン水4:1にSA-DHPを2 mg/mlになるよう溶解し、10 mg/mlジスラノールin 60 mM LiClを含むジオキサン水4:1と1:2の割合で混合した。サンプルプレートに1.3  $\mu$ l滴下し乾燥させた。CA-DHPの場合は、100 mM LiClを含むジオキサン水4:1にCA-DHPを5 mg/mlになるよう溶解した。キャリブレーションにはスタンダード757.40, 1046.54, 1533.85, 2465.20を用いた。

## 4. 研究成果

シナピルアルコールを基質として用いた際、rAtPrx53を除く4つのペルオキシダーゼ(rAtPrx2、rAtPrx25、rAtPrx71、rCWPO-C)で重合物(SA-DHP)が産生され、さらに各植物ペルオキシダーゼを介して産生されたSA-DHPの収量は、2,6-ジメトキシフェノール(シナピルアルコールモデル化合物)に対する酸化活性と正の相関が認められた(図1)。SA-DHPの分子サイズはタンパク濃度に依存し高分子化し、256 nMのrCWPO-CやrAtPrx71を用いて作製したSA-DHPのGPCクロマトグラムは、トチノキ由来の摩砕リグニン(MWL)のGPCクロマトグラムと非常に似ていた(図2)。これは、CWPO-CやAtPrx71がMWL並みの分子サイズのSA-DHPを産生可能であることを示している。また、高分子化合物であるシトクロムcに対する酸化活性がrAtPrx-2、rAtPrx25よりも高いrAtPrx71やrCWPO-CではSA-DHPがより高分子化する傾向が認められた(図3)。

一方、コニフェリルアルコールを基質とし

て用いた場合、rAtPrx53 を用いて作製した重合体 (CA-DHP) の収量が最も多くなった。しかし、CA-DHP の平均分子サイズは rAtPrx53 よりも rAtPrx71 や rCWPO-C を使用して作製したもののほうが大きくなるということが明らかとなった (図4)。

これらの結果は、植物ペルオキシダーゼは個々に異なるリグニン形成能力を持っており、木化に關与する植物ペルオキシダーゼは、木化に關与しないものと比較して、シナピルアルコール重合能力、および高分子化能力の点で優れた性質、すなわちリグニン形成に有利な基質酸化・重合能力を持っていることを示している。

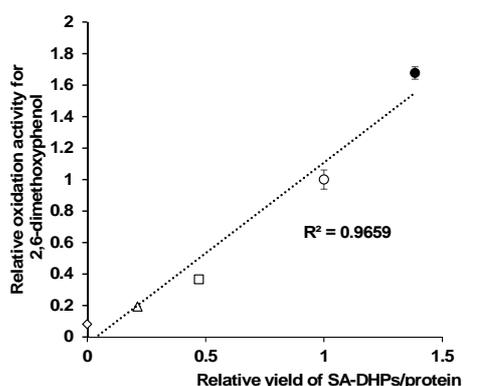


図1 DHP収量と2,6-ジメトキシフェノール酸化活性との相関

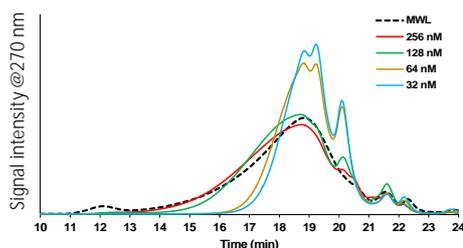


図2 rCWPO-Cを用いて作製したCA-DHPのGPC分析

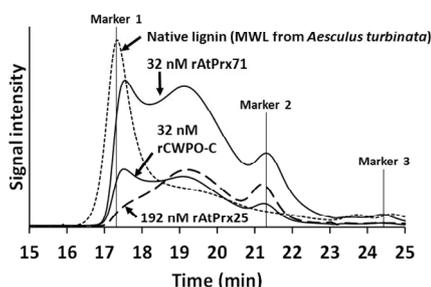


図3 SA-DHPのゲル浸透クロマトグラフィー分析

Marker 1: 排除限界 (5,000\_PEG/water)  
 Marker 2: ビルジノール(コニフェリルアルコール2量体)  
 Marker 3: シナピルアルコール

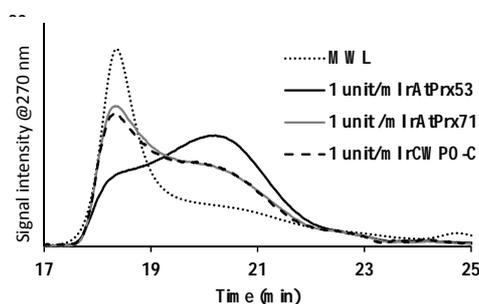


図4 CA-DHPのGPC分析

1 unit=1 μmolのグアイアコールを一分間に酸化可能なタンパク量

rCWPO-C を用いて作製した CA-DHP および SA-DHP を MALDI-TOF-MS 分析に供した。

CA-DHP では 4 量体らしきピークは検出されず、5 量体と予想されるピークから検出され、少なくとも 10 量体の DHP が産生されていることが確認できた。この結果は、HRP を用いた作製した CA-DHP を MALDI-TOF-MS 分析した Yoshioka et al. 2011 の結果と、ピーク間隔および値自体ともほぼ一致するため、分析手法自体には問題がないと考えられる。しかしながら予想される分子サイズと一致するピークは見られなかったため、イオン化の際、脱水または官能基の離脱が生じていると考えられる。SA-DHP の場合、予想されるピーク間隔は 208.2(β-β 結合)、226.2(β-O-4 結合)、192(α-O-4 結合) であり、9-10 量体と予想されるピークが確認できたが、CA-DHP 同様、予想される分子サイズと一致するピークは検出されなかった。複数の縮合型の結合を含むと予想されるピークが多いため、α-O-4 結合によってオリゴマー同士が結合した(直鎖構造ではない)構造のものが多くできていると考えられる。GPC の結果は、SA-DHP は CA-DHP よりも最大分子サイズ、平均分子サイズともに明らかに大きい。MALDI-TOF-MS ではどちらも 9-10 量体までしか観察されていないため、10 量体より大きなポリマーはイオン化されにくく、MALDI-TOF-MS によって現状では検出できておらず、DHP の分子サイズの比較には現状では不向きな分析手法であると言える。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計4件)

- (1) Shigeto J., Ueda Y., Sasaki S., Fujita K., Tsutsumi Y. Enzymatic activities for lignin monomer intermediates highlight the biosynthetic pathway of syringyl monomers in Robinia pseudoacacia J. Plant Res. 130, 203-210 (2017).
- (2) Shigeto J., Tsutsumi Y.: Roles of plant peroxidases in cell wall formation and modification. Mokuzai Gakkaishi, 62, 91-100 (2016)

(3) Shigeto J., Tsutsumi Y.: Diverse functions and reactions of class III peroxidases. *New Phytol*, 209, 1395-1402 (2016)

(4) Shigeto J., Itoh I., Hirao S., Ohira K., Fujita K., Tsutsumi Y.: Simultaneously disrupting AtPrx2, AtPrx25 and AtPrx71 alters lignin content and structure in Arabidopsis stem. *J Integr Plant Biol*, 349-356 (2015)

〔学会発表〕(計 11 件)

(1) Yoshikay D, 重藤潤, 堤祐司 『第 67 回日本木材学会大会』 「Analysis of poplar CWPO-C gene expression using laser micro-dissection and RT-qPCR」 (2017.3) 名古屋。

(2) 松永佳奈, 重藤潤, 堤祐司 『第 67 回日本木材学会大会』 「スギの木化に関与するペルオキシダーゼの検索」 (2017.3) 名古屋。

(3) 本庄裕貴, 重藤潤, 堤祐司 『第 67 回日本木材学会大会』 「CWPO-C リコンビナントタンパクを用いたシリリングリグニン様ポリマーの合成」 (2017.3) 名古屋。

(4) Yoshikay D, 大平香織, 重藤潤, 堤祐司 『第 61 回リグニン討論会』 「Transcriptional analysis of Poplar CWPO-C in different Cell types and Organs」 (2016.10) 京都。

(5) Tsutsumi Y, Shigeto J., Honjo Y: In vitro polymerization of lignin monomer using the plant peroxidases involved in lignification 『Oxizymes』 (2016.7.) Wageningen, The Netherlands

(6) Tsutsumi Y, Shigeto J., Honjo Y: In vitro evaluation of lignin formation ability of plant peroxidases involved in lignification 『Lignobiotech-IV Symposium』 (2016.6.) Madrid, Spain

(7) 重藤潤, 堤祐司 『第 56 回日本植物生理学会年会』 「リグニン形成に関わる植物ペルオキシダーゼを用いたリグニンモノマー脱水素重合」 (2016.3) 盛岡。

(8) 毛笠貴博, 梅村早紀, 武内 真奈美, 田村美帆, 渡辺 敦史, 重藤潤, 堤祐司 『第 66 回日本木材学会大会』 「シロイヌナズナ管状要素形成におけるリグニン前駆体輸送と木化関連遺伝子の転写解析」 (2016.3) 名古屋。

(9) 大平香織, 重藤潤, 堤祐司 『第 66 回日本木材学会大会』 「形質転換ポプラ及びシロイヌナズナを用いたポプラペルオキシダーゼ CWPO-C の機能探索」 (2016.3) 名古屋。

(10) 重藤潤, 堤祐司 『第 66 回日本木材学会大会』 「木化に関与する植物ペルオキシダーゼの in vitro によるリグニン形成能の評価」 (2016.3) 名古屋。

(11) 鎌田政諒, 大平香織, 重藤潤, 堤祐司 『第 60 回リグニン討論会』 「シロイヌナズナペルオキシダーゼ, AtPrx2, 25, 71 の発現解析による機能推定」 (2015.10) 筑波。

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

重藤 潤 (JUN SHIGETO)

九州大学・農学研究院・学術研究員

研究者番号：70570852

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：

(4) 研究協力者

( )