

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2022

課題番号：18K05932

研究課題名（和文）リグニン変換スマート細菌の創製につなぐ細胞内レドックス動態の解明

研究課題名（英文）Intracellular redox for the creation of lignin-converting smart bacteria

研究代表者

大田 ゆかり (Ohta, Yukari)

群馬大学・食健康科学教育研究センター・講師

研究者番号：40399572

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）：エーテラーゼ酵素システムを有するNovosphingobiumのMBES04株のゲノムおよびトランスクリプトーム解析の結果、エーテラーゼ酵素システムの最終産物であるフェニルプロパノンモノマーによって強く誘導される遺伝子クラスターが発見された。このクラスターで最も強く誘導された遺伝子は、芳香族ジオキシゲナーゼ様遺伝子であり、併せて多剤耐性に関連する遺伝子も誘導された。本菌のエーテラーゼ酵素システムは、リグニンフラグメントのセンサーとしての機能であり、より効率的なエネルギー生産につながる生理的意義を持つと結論付けた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

リグニンの分子内主要結合の切断は、リグニンの生分解において最も重要なステップである。MBES04株をはじめとするエーテル分解酵素系を持つ細菌の中には、反応生成物を代謝するための必須遺伝子を持たないものもあるが、そのエーテル分解酵素系の生理的意義や関連代謝経路の制御について述べた報告はない。リグニンの価値化の観点から、リグニン断片との接触による細胞および遺伝子レベルでの代謝反応を理解することは、再生可能な化学物質の生産に向けた細胞の代謝工学に重要な知見を与える。

研究成果の概要（英文）：Genomic and transcriptomic analysis of MBES04 strain of Novosphingobium with the etherase enzyme system revealed a gene cluster that is strongly induced by phenylpropanone monomers, the end product of the etherase enzyme system. The most strongly induced gene in this cluster was an aromatic dioxygenase-like gene, along with genes associated with multidrug resistance. It was concluded that the etherase enzyme system of this fungus functions as a sensor of lignin fragments and has significance for more efficient energy production.

研究分野：応用微生物

キーワード：リグニン グルタチオンS-転移酵素 エーテラーゼ Novosphingobium

1. 研究開始当初の背景

リグニン地球上のバイオマスとしてはセルロースに次いで 2 番目に多い。リグニンはその構造から石油を原料とする化学製品の 95% を代替するポテンシャルがあるとされ、有効活用に向けた研究が精力的に進められている。環境負荷の少ない条件で使用可能なリグニン特異的変換酵素を用いたリグニン変換は有効な技術の 1 つであるが、高価な補酵素群が必要でありコスト面での課題は大きい。その解決策の 1 つとして、リグニン代謝細菌を使ったバイオコンバージョンが挙げられる。まずその基盤として、リグニン代謝細菌のリグニンに対する代謝生理学的適応の理解の蓄積が必要である。

2. 研究の目的

リグニン主要結合である β -O-4 エーテル結合を還元開裂するエーテラーゼ酵素群を持つスフィンゴモナド細菌 *Novosphingobium* sp. MBES04 株を解析対象とし、リグニン断片やリグニンモデル化合物と接触した際の生理的反応を調査し、リグニン関連物質が本菌株の代謝に与える影響を多面的に明らかにすることを目的とする。本研究により、細胞を用いたリグニン高付加価値化に必要な知見を得るとともに、リグニン代謝細菌の環境中での役割の理解を進める。

3. 研究の方法

(1) リグニン代謝細菌のゲノム配列再解析

我々の先行研究にて多数のコンティグから成るゲノムドラフト配列を得た MBES04 株について、ゲノム配列を再解析し、より精度の高い環状配列を得る。その後アノテーションを行い、KEGG 等のデータベースを利用して MBES04 株のエネルギー代謝の特徴を見出す。

(2) トランスクリプトーム解析に基づく、リグニン関連代謝経路の特定

MBES04 株を用いて、リグニン関連芳香族低分子化合物 (vanillin や β -O-4 エーテル結合を有するリグニンモデル 2 量体) により刺激した培養細胞から RNA を抽出し、トータル RNA のシーケンスを行う。(1) で得たゲノム情報を鋳型とし、発現量差異解析を行う。これを基にリグニン関連物質によって誘導される代謝経路を特定する。

(3) 遺伝子発現を誘導するエフェクターの同定

(2) で見出したリグニン関連物質で発現誘導される遺伝子群の制御領域を用いたレポータープラスミドを構築し、上記遺伝子群を誘導するエフェクター分子を探索する。

4. 研究成果

(1) リグニン代謝細菌のゲノム配列再解析

ゲノム再解析を行い、環状配列 3 個 (染色体と 2 つのプラスミド) を得た。遺伝子アノテーションの結果、本菌株は解糖系経路のうち Embden-Meyerhof pathway において 6-phosphofruktokinase [EC: 2.7.1.11] を欠損していた。さらにペントースリン酸経路に必要な 6-ホスホグルコン酸デヒドロゲナーゼ [EC: 1.1.1.44, EC: 1.1.1.343] も欠いていた。一方、Entner-Doudoroff 経路に必要な酵素はすべて存在しており、MBES04 株では EDP がグルコース代謝の中心的役割を担っていることが示唆された。この株は、酸化リン酸化に必要な 5 つの複合体すべてをコードする遺伝子を完全に持っていた。このことから、酸化リン酸化は本菌のエネルギー獲得に重要であることがわかった。

MBES04 株のゲノムは、SYK-6 株で guaiacylhydroxypropanone (GHP) 異化に必須の酵素として

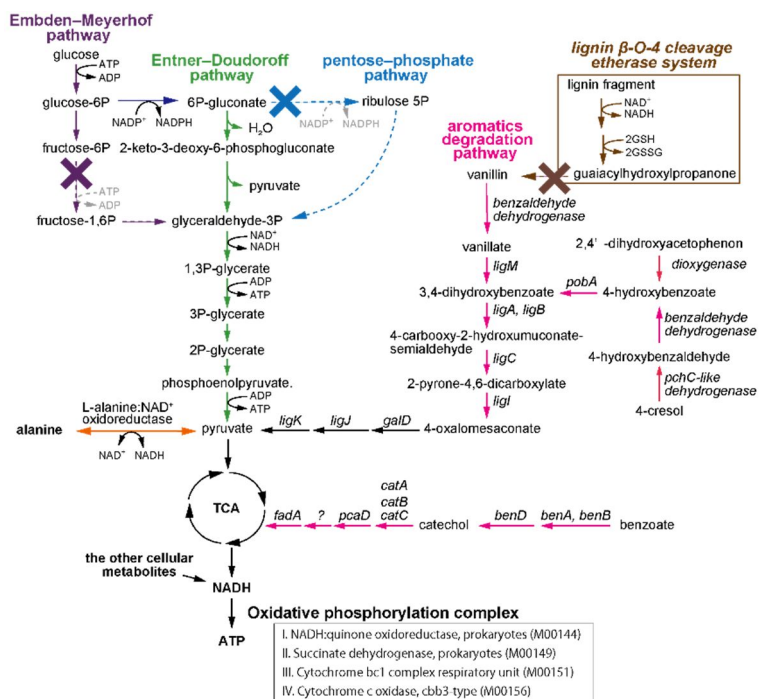


図 1. MBES04 株ゲノムにコードされる主なエネルギー代謝経路

同定された *hvpZ* (Higuchi et al., 2018) のオルソログを欠損していることを確認した。Higuchi らの報告によると、GHP のプロパノン (C3) 側鎖の分解が、コエンザイム A (CoA) および ATP を要求する反応によって進行する。一方、MBES04 株は、vanillin や 4-hydroxybenzoate などの C1 側鎖を持つリグニン由来の芳香族モノマーを酸化分解により完全に異化できる遺伝子レパートリーを有していることがわかった (図 1)。

(2) トランスクリプトーム解析に基づく、リグニン関連代謝経路の特定

リグニンモデル 2 量体存在下での遺伝子発現

本実験では、十分な細胞を得るために、栄養豊富な培地で好氣的に培養した増殖期の菌体から調製した休止細胞を RNA 調製に使用した。また、実験設定は、 β -エーテラーゼ反応とは無関係の増殖等に関連する適応反応を避けることを意図した。

5 mM の *guaiacylglycerol*- β -*guaiacyl ether* (GGGE) 存在下において、全体の遺伝子発現量の有意な増加が観察された。具体的には、82 個の遺伝子の発現量が 2 倍以上、21 個の遺伝子の発現量が 0.5 倍未満に増加した。GGGE 存在下で発現が誘導される遺伝子クラスターが 4 つ見出され、その発現量は対照条件下と比較して 2.2~44.6 倍が高かった。発現量が増加した遺伝子には、複数の芳香族モノマー分解遺伝子(ジオキシゲナーゼ等)、多剤耐性関連遺伝子群が含まれていた。

リグニンから得られる芳香族モノマー、vanillin 存在下での遺伝子発現

いくつかの関連細菌において、vanillin と vanillin 酸は、様々なリグニン関連芳香族化合物の下流経路に直接関与する主要中間代謝物である (Bugg et al, 2011, Kamimura et al, 2017)。また、vanillin と vanillin 酸は、リグニンから化学酸化により非生物学的に生産される主要な芳香族モノマーである (Ragauskas et al., 2014)。MBES04 株は、vanillin 酸を介した vanillin 同化のための遺伝子セットを完全に有しており (図 1)、これは vanillin (1 mM) を唯一の炭素源として用いた我々の培養実験の過去の結果と一致している (Ohta et al., 2015)。エーテル化酵素系の基質とならないリグニン由来の芳香族モノマーが遺伝子発現に及ぼす影響を確認するため、vanillin 存在下での遺伝子発現プロファイルを解析した。

5 mM の vanillin 存在下では遺伝子発現が全体的に抑制され、本菌株への毒性が示唆された。具体的には、19 個の遺伝子の発現量が 2 倍以上、64 個の遺伝子の発現量が 0.5 倍以上上昇した。vanillin 存在下で発現が抑制される遺伝子クラスターが 3 つ見出され、その発現量は対照条件下と比較して 0.11-0.49 倍低かった。特に呼吸や細胞増殖に関わる遺伝子の抑制が顕著であった。

(3) 遺伝子発現を誘導するエフェクターの同定

GGGE によって最も強く誘導された遺伝子クラスターの推定プロモーターを含む領域 (600 bp) をガラクトシダーゼ遺伝子開始コドンの直上に挿入してプロモーターアッセイプラスミドを構築した。本プラスミドで形質転換した MBES04 株のガラクトシダーゼ活性を、GGGE, *eratrlylglycerol*- β -*guaiacyl ether*, (2-methoxyphenoxy) *hydroxypropiovanillone*, β -*guaiacyl*- α -*veratrlylglycerone*, GHP, vanillin, *veratryl alcohol*, 2,6-dimethoxyphenol, 2,4'-*dihydroxyacetophenone* または *guaiacol* を添加して得られた培養液で測定した。GHP で最も強い誘導が観察され、GGGE, MPHPV, DHA でも誘導が観察された。一方、vanillin や 2,6-dimethoxyphenol 処理では誘導は観察されなかった。GGGE, MPHPV, GHP の時間経過を観察したところ、GHP で最も早く誘導が起こり (6 時間後)、GGGE と MPHPV では遅れて誘導が観察された (12 時間後)。

これらの結果から、GGGE と MPHPV は、本菌の内在性エーテル化酵素系により、GGGE と MPHPV の最終反応物である GHP に変換された後、エフェクター分子として機能すると考えられた。これらの結果から、GHP は被検遺伝子群の発現を誘導するエフェクター分子として機能することが示された。

上記結果より、本菌株のエーテラーゼシステムの一連の酵素反応により、GHP を生産し、これをエフェクターとして、エネルギー獲得と芳香族化合物への耐性獲得の両方に有利な遺伝子発現プロファイルへと変化させる。本結果から、本菌株のエーテラーゼシステムにはリグニンフラグメントのセンサー、さらには栄養豊富な植物バイオマス存在のセンサーとしての機能があると結論付けた。

< 引用文献 >

- Bugg, T.D.H., Ahmad, M., Hardiman, E.M., and Singh, R. (2011) *Curr Opin Biotechnol* 22: 394-400.
Higuchi, Y., Aoki, S., Takenami, H., Kamimura, N., Takahashi, K., Hishiyama, S. et al. (2018) *Appl Environ Microbiol* 84: e02670-02617.
Kamimura, N., Takahashi, K., Mori, K., Araki, T., Fujita, M., Higuchi, Y., and Masai, E. (2017) *Environ Microbiol Rep* 9: 679-705.
Ohta, Y., Nishi, S., Hasegawa, R., and Hatada, Y. (2015) *Sci Rep* 5: 15105.
Ragauskas, A.J., Beckham, G.T., Biddy, M.J., Chandra, R., Chen, F., Davis, M.F. et al. (2014) *Science* 344: 1246843.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計25件（うち招待講演 13件 / うち国際学会 6件）

1. 発表者名 吉川 昂宏、熊川 恵理、勝亦 まどか、大嶋 孝之、大田 ゆかり
2. 発表標題 リグニン由来低分子で特異的に発現誘導されるNovosphingobium sp. MBES04株遺伝子の機能解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度関東支部大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 熊川 恵理、吉川 昂宏、勝亦 まどか、粕谷 健一、大田 ゆかり
2. 発表標題 リグニンモデル化合物で特異的に発現誘導されるNovosphingobium sp. MBES04株遺伝子の機能解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大田 ゆかり
2. 発表標題 植物由来芳香族化合物を分解する酵素と微生物の解析：農業加工残渣の高付加価値化に向けて
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度大会シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大田 ゆかり
2. 発表標題 農産物食品製造・加工残渣の高付加価値化に向けた リグニン分解酵素の開発
3. 学会等名 第21回酵素応用シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大田 ゆかり, 磯崎 勝弘, 松田 博, 縣 亮介, 池永 誠, 橘 洋一, 中村 正治
2. 発表標題 リグニンを原料とする人工漆材料の創製
3. 学会等名 高分子学会 20-1接着と塗装研究会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大田 ゆかり
2. 発表標題 リグニンから芳香族モノマー; 海洋微生物酵素の活用
3. 学会等名 第10回CSJ化学フェスタ2020 テーマ企画セッション: 海との共生 ~ 豊かな海を守り、共に繁栄するためには? ~ (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 熊川恵理、勝亦まどか、大田ゆかり、粕谷健一
2. 発表標題 海洋細菌Altererythrobacter sp. B11の -etheraseによるリグニン主要結合の分解特性
3. 学会等名 第69回高分子討論会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 熊川恵理、勝亦まどか、粕谷健一、大田ゆかり
2. 発表標題 海洋細菌の新規 -etheraseによるリグニン主要結合の特異的開裂
3. 学会等名 第10回CSJ化学フェスタ
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大田ゆかり
2. 発表標題 非可食バイオマス为原料とする機能性芳香族化合物の酵素・微生物生産
3. 学会等名 第68回高分子討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大田ゆかり
2. 発表標題 海洋微生物のリグニン・芳香族化合物代謝をホワイトバイオへつなぐ - バイオマスから遊離される未同定低分子芳香族代謝物のLCMS分析 -
3. 学会等名 第28回環境化学討論会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大田ゆかり
2. 発表標題 海に沈んだ小さな生き物に潜む底力 人の暮らしに役立つ酵素を探す・調べる・使う
3. 学会等名 京都大学・複合原子力科学研究所 先端生命・物質科学 特別講演会2（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yukari Ohta
2. 発表標題 Development of Bioprocess Using Marine Microbial Enzymes for Efficient Lignin Degradation and Catalytic Generation of Super-Urushiol from Lignin Monomers
3. 学会等名 1st Gunma University Center for Food Science and Wellness (GUCFW) International Symposium and ALCA/JST workshop (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yukari Ohta
2. 発表標題 Enzymatic production of functional aromatic compounds from a lignin fraction extracted from non-edible biomass
3. 学会等名 2019 KSBB Fall Meeting and International Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yukari Ohta, Shun'ichi Ishii, Tohru Yarimizu, Misato Yamada, Hiroshi Nishimura, Takashi Watanabe
2. 発表標題 Identification of the differentially-expressed genes in <i>Novosphingobium</i> sp. MBES04 in response to lignin related compounds
3. 学会等名 1st International Lignin Symposium (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Saho Kashima, Hiroshi Nishimura, Shizuka Sakon, Misato Yamada, Yasuhiro Shimane, Yukari Ohta, Keiko Kondo, Yudai Yamaoki, Takashi Nagata, Masato Katahira, Takashi Watanabe
2. 発表標題 Fractionation and analysis of lignin-carbohydrate complex using lignin-degrading enzymes
3. 学会等名 1st International Lignin Symposium (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大田ゆかり
2. 発表標題 海洋性細菌の酵素でリグニンから機能性化学品をつくる
3. 学会等名 グリーン科学技術研究所セミナー (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大田ゆかり, 西村裕志, 片平正人, 磯崎勝弘, 中村正治
2. 発表標題 ホワイトバイオでつなぐ ~リグニンから機能性芳香族モノマーへ~
3. 学会等名 第67回 高分子討論会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大田ゆかり
2. 発表標題 リグニンからフェニルプロパノンモノマーをバイオでつくる
3. 学会等名 エコマテリアル研究会 18 - 2 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大田ゆかり
2. 発表標題 海洋微生物からの有用機能の探索とその応用
3. 学会等名 日本農芸化学会2018年度 第3回関東支部例会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大田ゆかり
2. 発表標題 海の底に玉手箱を探して
3. 学会等名 山口大学微生物研究推進体第10回研究成果発表会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yukari Ohta
2. 発表標題 Production of aromatic monomers from wood lignin using marine bacterial enzymes: connecting the forest and the ocean with white biotechnology
3. 学会等名 7th symposium of Korean Society for Enzyme Engeneerng (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大田ゆかり
2. 発表標題 海洋微生物を活用したSDGsへの挑戦-海と森をホワイトバイオでつなく-
3. 学会等名 日本農芸化学会2019年大会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大田ゆかり, 石井俊一、嶋根康弘、黒澤佳奈子、市川淳子、小林樹和、山田 美紗登、西村裕志、渡辺隆司
2. 発表標題 Novosphingobium sp. MBES04株のリグニン関連物質存在下におけるトランスクリプトーム解析
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 Kumagawa E, Yoshikawa T, Katsumata M, Kasuya K, Ohta, Y.
2. 発表標題 The gene cluster involved in detoxification of plant-derived aromatic compounds was upregulated by lignin degradation products
3. 学会等名 8th World Conference on Applied Microbiology and Beneficial Microbes (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Kumagawa E, Yoshikawa T, Katsumata M, Kasuya K, Ohta, Y.
2. 発表標題 Role of gene cluster specifically induced by lignin-related compounds in <i>Novosphingobium</i> sp. MBES04
3. 学会等名 JSBBA KANSAI 9th Student Forum, Kyoto, JAPAN
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 大田ゆかり, 西村裕志, 片平正人, 磯崎勝弘, 中村正治 (監修: 梅澤俊明)	4. 発行年 2020年
2. 出版社 シーエムシー出版	5. 総ページ数 225
3. 書名 リグニン利活用のための最新技術動向 第11章 「11 海洋微生物酵素群によるリグニン分解高度化と人工漆材料への展開」	

〔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
---------	---------