

令和 6 年 6 月 13 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05711

研究課題名（和文）リグニンモノマーを起点としたアプローチから解き明かすリグニン由来生物活性の正体

研究課題名（英文）The approach using lignin polymerization plant peroxidase to uncover the lignin-derived biological activity

研究代表者

重藤 潤 (Shigeto, Jun)

広島大学・未来共創科学研究本部・リサーチ・アドミニストレータ

研究者番号：70570852

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、様々な生物活性を有するリグニンをin vitroで人工的に合成し、その活性構造、化合物を明らかにすることで、リグニンの有する生物活性が発現する機序解明を目的とした。リグニン様重合物を産生可能なCWPO-Cの組換えタンパクを用いて作製した重合産物はSuperoxide dismutase (SOD) 様活性を有することが分かった。さらに、狭義に活性酸素とされている「一重項酸素」、「スーパーオキシド」、「過酸化水素」、「ヒドロキシラジカル」の4種類の消去能を測定したところ、全ての活性酸素種の消去能を持つことが示され、生物活性のうち、少なくとも抗酸化活性を有することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

研究代表者はこれまでにリグニン重合に関与する植物ペルオキシダーゼを同定し、それら組み換えタンパクを用いて、リグニンモノマーから天然リグニンと分子量分布が似たリグニン様ポリマー/オリゴマーの合成に世界で初めて成功している。本研究によって、当該ポリマー/オリゴマーが抗酸化活性を有することが明らかとなり、リグニン様ポリマーの生物活性を解析することで天然リグニンの有する抗酸化活性の正体を追求するアプローチの有効性が示された。

研究成果の概要（英文）：Lignins with various bioactivities will be artificially synthesized in vitro and their active structures and compounds will be elucidated to examine the mechanisms of lignin bioactivity expression. It was found that the polymerization product produced by using recombinant protein of CWPO-C, which can produce lignin-like polymerization, has superoxide dismutase (SOD)-like activity. Furthermore, when the scavenging capacity of four types of reactive oxygen species narrowly defined as “singlet oxygen,” “superoxide,” “hydrogen peroxide,” and “hydroxyl radical” was measured, it was shown to have the ability to scavenge all reactive oxygen species, indicating that it has at least antioxidant activity among the biological activities.

研究分野：木質科学

キーワード：植物ペルオキシダーゼ リグニン 抗酸化活性

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

工業リグニンのいくつかの画分では、抗糖尿病、肥満制御、抗菌活性、抗凝血、抗肺気腫といった生物活性が報告されており(表1. Vinardell et al. 2017, Int. J. Mol. Sci.)、その活性を活用したヘルスケア分野での用途が期待されている。さらに研究分担者の堤らは、アルカリリグニンから抗がん活性等の「複数種の生物活性を有する新奇活性画分」の分離法を発見した(特願 2018-85578)。

一方で、リグニンのヘルスケア分野、特にがん治療など医療における利用方法を提案、確立するためには、リグニンの生物活性が発現する機序解明が必須となるが、これまで報告のある生物活性はいずれも混合物のものであり、その解明は困難となっている。リグニンの生物活性の要因となる活性構造、化合物の同定は、機序解明に向けた突破口となるため極めて重要となる。

表1. 天然リグニン由来の生物活性

化合物(フラクション)	生物活性	リファレンス
アルカリリグニン	抗糖尿病	Barapatre et al. 2015
リグノスルホン酸	抗糖尿病	Hasegawa et al. 2015
リグノフェノール	肥満制御	Norikura et al. 2010 Sato et al. 2009
リグノスルホン酸	抗ヘルペスV.	Andrei et al. 2011 Gordts et al. 2015
リグニン-炭化水素複合体	抗ヘルペスV.	Lee et al. 2011, Thakkar et al. 2011
硫酸化低分子リグニン	抗血液凝固	Henry et al. 2014 Mehta et al. 2016
硫酸化低分子リグニン 低分子リグニン	抗肺気腫 抗 C 型肝炎V.	Saluja et al. 2013 Yagi, 2014

2. 研究の目的

本研究の目的は、リグニンの有する生物活性の要因となっている化合物、構造を同定し、ヘルスケア分野におけるリグニンの活用方法を提案することである。

工業リグニンを起点とした従来のアプローチでは、「リグニン調製において、バッチごとにリグニンソースが異なる、あるいは不特定に混合されていること」、さらに「リグニン抽出過程における変性・修飾による構造の複雑化」が、活性化合物の同定の妨げとなっている。

申請者はこれまでに4種のリグニン重合に関与するペルオキシダーゼ(CWPO-C, AtPrx2, AtPrx25, AtPrx71)を同定し、それら組み換えタンパクを用いて、リグニンモノマーから天然リグニンと分子量分布が似たリグニン様ポリマー/オリゴマー(リグニン様重合体)の合成に世界で初めて成功した(Shigeto et al. 2019, Holzforschung)。リグニン様重合体の作製においては、重合に用いるモノマーの種類およびペルオキシダーゼの種類と濃度によって重合産物の分子量分布は異なるが、反応条件が一定の場合、得られる産物は規則的となる。また、変性過程も含まず、化学修飾の有無も制御可能であるため、工業リグニンを起点としたアプローチにおける障壁を回避することができる。

本研究によって得られた活性構造やその作製方法等の知見によって、「様々な生物活性をもつリグニン様重合体の作製法、大量製造法」が確立され、「リグニンのもつ生物活性発現機序の全容解明」、「(本研究で同定された化合物をリード化合物とした)医薬品開発」への展開が期待できる。さらに「食品、サプリメント開発」、「工業リグニンの活用法の確立」への展開も期待される。

3. 研究の方法

(1) リグニン様重合体の作製条件の検討

リグニン重合反応は植物ペルオキシダーゼによって酸化されたS型/G型モノマーとリグニンポリマーとのラジカルカップリング反応によって進行する。申請者らが独自に同定し、作製法を確立した4種の「リグニン重合ペルオキシダーゼ」を用いることで、SおよびG型リグニンモノマーを重合させた「リグニン様重合体」を作製することができる。まずは、組換えCWPO-C(rCWPO-C)を用いた重合産物の作製条件を検討した。50 mM Tris-HCl pH7.5、2 mM H₂O₂の反応液に、10 mM S型もしくはG型リグニンモノマー、64 nMもしくは128 nMのrCWPO-Cを混合し、30℃で2時間反応させた。反応後、15,000 gで10分遠心し、上清を捨てて超純水を加えよく混合洗浄した後、遠心、洗浄を繰り返し、乾燥後重量を測定した。反応液の容量は、1.5 ml および10 mlで行った。以降の試験に使用しない重合産物は-80℃で保存した。

(2) Superoxide dismutase (SOD) 様活性測定

作製した重合産物にも工業リグニン同様、様々な生物活性があることが期待できる。そこで、本研究では、まず、抗酸化活性の有無を、Superoxide dismutase (SOD) 様活性測定を行うことで検討した。SODは、スーパーオキシドアニオンを過酸化水素と酸素分子へ不均化する反応を触媒する酵素で、最も重要な抗酸化酵素の一つである。反応には、SOD Assay Kit-WST(Dojindo, Japan)を用い、IC₅₀を求めた。重合体は、10 mg/ml もしくは、25 mg/ml になるようにDMSOに溶解し、反応サンプル溶液中のDMSO濃度が5%以下になるように添付のDilution bufferで希釈して試験に用いた。

(3) 各種活性酸素消去能の測定

活性酸素は狭義には、「一重項酸素」、「スーパーオキシド」、「過酸化水素」、「ヒドロキシラジカル」の4種類とされている。そこで、SOD様活性があることが認められた重合産物を用いて、これら4種の活性酸素それぞれの消去能について検討した。測定には、Antioxidant Capacity Assay Kit (Sakulabscience, Japan)を用い、IC50を求めた。重合物は、10 mg/mlになるようにDMSOに溶解し、Kitのプロトコルに従って希釈し試験に用いた。

(4) 重合産物からの活性本体精製準備

本研究で得られた重合産物は、混合物であると推測される。そこで、重合産物を、DMSOへの溶解度の違いによって分画し、各々の画分のSOD様活性測定を行った。DMSOの濃度は、5%、10%、20%、50%、80%、99%の6点に設定した。SOD活性測定に用いるサンプル溶液中のDMSO濃度は5%以下にする必要があるため、各画分を分画後も、(実際には、一定量溶出して同じ重量は残っていないと考えられるが)同じ量の乾燥重合物が残っていると仮定し、5%DMSO濃度になるように希釈した際に同じ重合物濃度になるように、各濃度のDMSO液を加え分画した。具体的には、重合物が1 mg/mlになるように5%DMSOを加えてミキサーで10分間混合し、15,000 gで10分遠心後、上清を5%DMSO画分とした。残った沈殿に、2 mg/mlになるように10%DMSOを加え、5%DMSO画分と同様にミキサーで混合、遠心して上清を10%DMSO画分とした。同様に、20%DMSOは、4 mg/mlになるように、50%DMSOは、10 mg/mlになるように、80%DMSOは、16 mg/mlになるように、99%DMSOは20 mg/mlになるように、その前の画分を採取後の沈殿に加え、同様に混合、遠心を行った。これらのサンプルを用いて、SOD様活性測定は、(2)と同様に行った。

4. 研究成果

(1) 重合産物(リグニン様重合物)の作製条件の検討

rCWPO-Cを用いた「リグニン様重合物」作製条件を検討した。SおよびG型モノマーを、2種類の濃度(64 nMと128 nM)のrCWPO-Cと、1.5 mlと10 mlの系で反応させた。その結果、1.5 mlの系の方が作製効率が高く、再現性良く重合物が得られた。産物の乾燥方法について、遠心濃縮、室温での自然乾燥、加温乾燥など検討し、室温自然乾燥が重合物を安定して回収できることが分かった。rCWPO-Cの濃度の違い、S型G型のモノマーの種類の違いによる、重合産物の重量には有意差はなかった。

(2) Superoxide dismutase (SOD)様活性測定

(1)で作製した重合物を用いて、SOD Assay Kit-WST (Dojindo, Japan)により、Superoxide dismutase (SOD)様活性測定を行った。その結果、S型モノマーを重合させた重合産物(64 nMと128 nMのrCWPO-Cで重合させたどちらも)で、検出可能なSOD様活性を測定することができた。G型モノマーを重合させた重合産物においても、コントロールと比較すると活性があることは確認できたが、定量することは不可能であった。

(3) 各種活性酸素消去能の測定

活性酸素は狭義には、「一重項酸素」、「スーパーオキシド」、「過酸化水素」、「ヒドロキシラジカル」の4種類とされており、生体内で、細菌やウイルス等の外敵を破壊すること、シグナル因子として機能することが知られている一方で、過剰な活性酸素は、細胞に損傷を与え、ガンや生活習慣病、老化などの原因となる。各活性酸素種の性質は異なり、「一重項酸素」および「ヒドロキシラジカル」は不安定なものの反応性が高く細胞内では酸化損傷の主要因である。一方、「スーパーオキシド」および「過酸化水素」は反応性は低いものの安定性は高いことから生体内で長時間留まり、金属イオンや紫外線刺激により「ヒドロキシラジカル」生成の原因となっている。生体での発生組織はさまざまで「一重項酸素」は主に光の関与する皮膚で、他の活性酸素種は呼吸や代謝、炎症過程で発生する。そこで、SOD様活性があることが認められたS型モノマー重合産物を用いて、これら4種の活性酸素それぞれの消去能について、Antioxidant Capacity Assay Kit (Sakulabscience, Japan)により、検討した。その結果および、Sakulabscienceが公表している代表的抗酸化物質のIC50の値を表2に示した。

表2 エリグニン（本研究）および代表的抗酸化物質（サクラボサイエンスHPより単位改変）の各活性酸素に対するIC50値

	一重項酸素		スーパーオキシド		過酸化水素		ヒドロキシラジカル	
64 nM CWPO-C +S型モノマー	175.26	± 2.33 μg/ml	223.35	± 21.58 μg/ml	100.67	± 10.49 ng/ml	1.65	± 0.21 μg/ml
128 nM CWPO-C +S型モノマー	177.25	± 6.51 μg/ml	200.27	± 62.00 μg/ml	103.08	± 23.74 ng/ml	1.06	± 0.01 μg/ml
catalase	N.D.		N.D.		30.00	ng/ml	N.D.	
SOD	N.D.		100.00	ng/ml	N.D.		N.D.	
Torolox	150.17	μg/ml	32.54	μg/ml	750.87	ng/ml	1.25	μg/ml
Glutathion	15.37	μg/ml	3.07	mg/ml	307.33	ng/ml	3.07	μg/ml
N-Acetyl-L Cysteine	35.90	μg/ml	N.D.		326.38	ng/ml	24.48	μg/ml
Ascorbic acid	35.22	μg/ml	29.94	μg/ml	880.60	ng/ml	880.60	ng/ml
α -Lipoic acid	412.66	ng/ml	N.D.		20.63	μg/ml	61.90	μg/ml
Gallic acid	161.61	μg/ml	5.10	μg/ml	170.12	ng/ml	510.36	ng/ml
Chlorogenic acid	224.45	μg/ml	517.97	μg/ml	345.31	ng/ml	345.31	ng/ml

以上の結果から、本研究において、S型モノマーをrCWPO-Cを用いて重合させることで得られた重合産物は、少なくとも抗酸化活性を有することが明らかとなった。また、4種の活性酸素種全てに対して消去能を持つことが示された。

(4) 重合産物からの活性本体精製準備

(3)で、本研究で得られた重合産物は抗酸化活性を有すること、4種の活性酸素種全てに対して消去能を持つことが明らかとなったが、得られた重合産物は混合物であり、活性本体となる化合物を特定する必要がある。そこで、まずは、混合物を、DMSOへの溶解度の違いによって分画し、各々の画分のSOD様活性測定を行った。DMSOの濃度は、5%、10%、20%、50%、80%、99%の6点に設定した。その結果、重合反応に用いたrCWPO-Cの濃度2種のどちらで作製した重合産物においても、50%および80%DMSOに溶解した画分において、検出可能なSOD様活性を測定することができた。それ以外の画分でも、コントロールと比較すると活性があることは確認できたが、IC50値を定量することは不可能であった。各抗酸化活性をもたらす化合物の同定にはさらなる分画が必要であるが、本研究によってリグニン重合ペルオキシダーゼを用いたリグニンモノマーを起点としたアプローチが、天然リグニンに含まれる生物活性を有する化合物の探索に有効であることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Diego Alonso Yoshikay-Benitez, Yusuke Yokoyama, Kaori Ohira, Koki Fujita, Azusa Tomiie, Yoshio Kijidani, Jun Shigeto, Yuji Tsutsumi	4. 巻 28 (9)
2. 論文標題 Populus alba cationic cell-wall-bound peroxidase (CWPO-C) regulates the plant growth and affects auxin concentration in Arabidopsis thaliana	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 PHYSIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY OF PLANTS	6. 最初と最後の頁 1671, 1680
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12298-022-01241-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Diego Alonso Yoshikay-Benitez, Yusuke Yokoyama, Kaori Ohira, Koki Fujita, Azusa Tomiie, Yoshio Kijidani, Jun Shigeto, Yuji Tsutsumi	4. 巻 69
2. 論文標題 The Populus alba cationic cell-wall-bound peroxidase (CWPO-C) regulates plant growth, lignin content and composition in poplar	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Wood Science	6. 最初と最後の頁 12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s10086-023-02086-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔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 周子堯、坂井志帆、山本怜奈、藤田弘毅、重藤潤、堤祐司
2. 発表標題 CWPO-Cオーソログ、シロイヌナズナAtPrx71の植物成長調節機能
3. 学会等名 第74回日本木材学会大会
4. 発表年 2024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
研究分担者	堤 祐司 (Tsutsumi Yuji) (30236921)	九州大学・農学研究院・教授 (17102)	

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