

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：13102

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05872

研究課題名（和文）センサー細菌を活用した環境中におけるリグニン生分解の実態解明

研究課題名（英文）Elucidation of in situ lignin biodegradation using bacterial sensor

研究代表者

上村 直史（Kamimura, Naofumi）

長岡技術科学大学・工学研究科・准教授

研究者番号：50646528

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、申請者が開発した様々な低分子芳香族化合物の代謝を検出できるセンサー細菌を利用し、自然環境におけるリグニン由来化合物の存在と、真菌による木材腐朽時に実際に細菌がリグニン分解物を代謝するかどうかの解明を目的とした。環境試料の解析から、化学分析では同定できなかった低濃度・多種類の芳香族化合物（単量体やオリゴマー）を細菌が代謝していることが示唆された。白色腐朽菌の *Phanerochaete chrysosporium* による腐朽木材を用いた解析では、腐朽によりセンサーの応答が顕著になったことから、真菌によるリグニン分解により生成した芳香族化合物を実際に細菌が代謝する証拠を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

自然界におけるリグニンの分解においてブラックボックスであった、真菌による高分子リグニンの分解と細菌によるリグニン由来低分子芳香族化合物の代謝をつなぐ知見を得るためのツールとして、細菌センサーが有効であることを実証し、リグニン由来化合物のモデル分解細菌として位置づけられている *Sphingobium lignivorans* SYK-6株が、環境中または白色腐朽菌によるリグニンの生分解生成物を代謝できることを明らかにした。また、本研究では、センサー細菌に関する派生テーマとして、リグニンの化学分解物からポリマー原料を生産する細菌の改良に有益な、ポリマー原料化合物の応答センサーを開発した。

研究成果の概要（英文）：This study aims to clarify the biodegradation of lignin by fungi and bacteria in nature. Bacterial sensors detecting lignin-derived compounds were used to investigate the presence of lignin-derived compounds in the environment and whether bacteria actually metabolize lignin degradation products produced by fungal wood decay. Analysis of environmental samples suggested that the bacteria metabolize a wide variety and low concentrations of aromatic compounds (monomers and oligomers) that could not be identified by chemical analysis. Analysis of decayed wood showed that decay by white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* enhanced the sensor response. This result demonstrated that bacteria actually metabolize the aromatic compounds produced by fungal lignin degradation, and provided an evidence of bacterial metabolism of lignin biodegradation products in nature.

研究分野：応用微生物学

キーワード：リグニン センサー フェルラ酸 バニリン酸 環境分析 転写制御 蛍光タンパク質

## 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。その莫大な存在量ゆえ、リグニンの分解は炭素循環や炭素貯留からリグノセルロースバイオマスからのエネルギー・マテリアル生産まで幅広い研究分野で関心が寄せられている。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. Kamimura et al., Current Opinion in Biotechnology 2019 56, 179-186)。

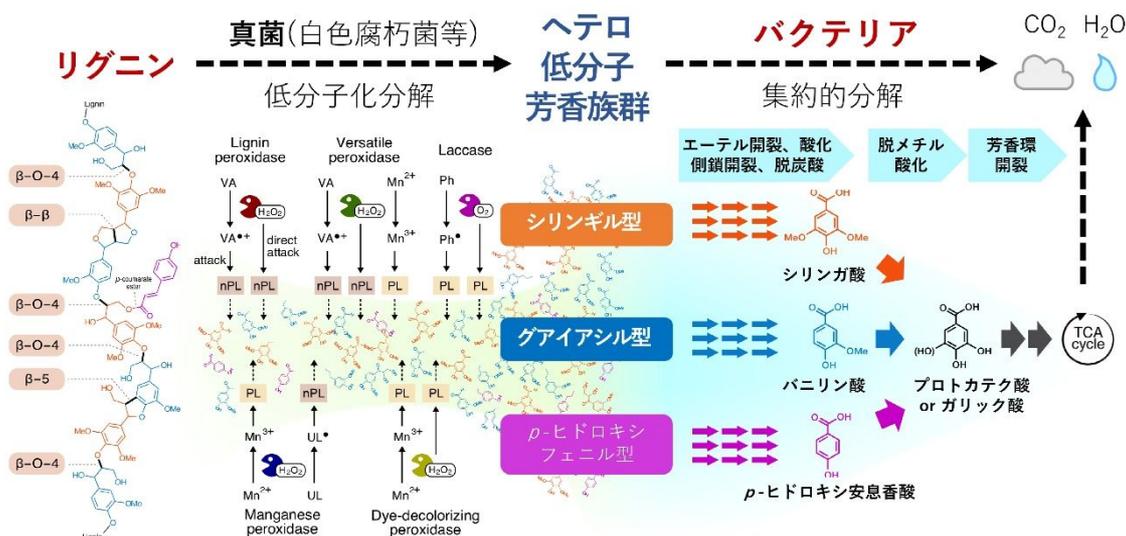


図1. 自然界におけるリグニンの生分解システムのモデル。

(Kamimura et al., Current Opinion in Biotechnology 2019 56, 179-186 の Figure 1 を改変)

このモデルは、1980年頃に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。真菌の酸化還元酵素等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、バニリン、バニリン酸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。本研究代表者のグループは、リグニン由来化合物のモデル分解菌と位置づけられている *Sphingobium lignivorans* 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 (Masai et al., Bioscience, Biotechnology and Biochemistry 2007 71(1), 1-150; Kamimura et al., Environmental Microbiology Reports 2017 9(6), 679-705)。SYK-6 株と類似した芳香族化合物の代謝経路・遺伝子は、*Pseudomonas* 属など主要な土壌細菌をはじめとする多様な細菌で見いだされている。しかし、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ているのかという情報は無く、リグニン生分解の2段階のプロセスをつなぐ化合物は今もなお曖昧である。

## 2. 研究の目的

本研究では、リグニンの生分解によって生成した、リグニン由来とされている低分子芳香族化合物が実際の環境中に存在し、それらが真に細菌により代謝されているのかどうかを解明することを目的とした。最近、環境中の化合物を検出する手法としてセンサー細菌が注目されている。本研究代表者は、2018~2020年の科研費研究において、SYK-6 株の代謝遺伝子の発現制御システム (Kasai, Kamimura et al. 2012 FEMS Microbiology Letters 332(1), 68-75) を利用し、リグニン由来とされているフェルラ酸などの低分子芳香族化合物の代謝時に特異的に蛍光を発するセンサー細菌を開発した (上村直史, 科研費・若手研究 18K14560 2018~2020)。本センサー細菌は、フェルラ酸代謝誘導性プロモーター (PferB) 制御因子 FerC、蛍光タンパク質 superfolder GFP を用いている。フェルラ酸の代謝時に GFP が発現し、GFP 蛍光を測定・観察することで化合物の存在を評価できる (図2)。本研究では、センサー細菌を用いることで、環境中にリグニン由来と称される化合物が存在するのかどうか、真菌によるリグニンの解体産物を細菌が獲得し代謝できるのかを明らかにするために以下の3つの実験項目を実施する。

1. センサー細菌のバリエーション拡大
2. 環境中のリグニン由来化合物分析
3. 真菌による木材腐朽およびリグニンの解体時におけるセンサー細菌の応答性解析

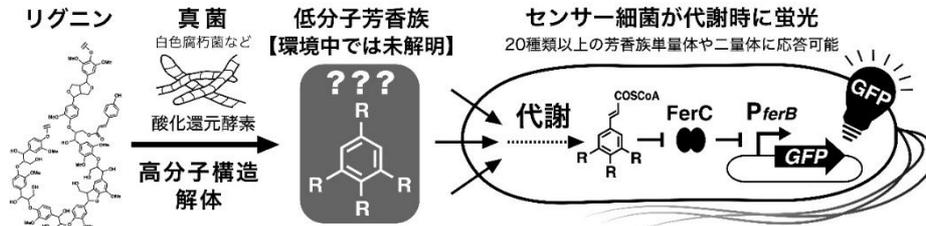


図2. 環境中のリグニン由来化合物に蛍光応答するセンサー細菌

### 3. 研究の方法

本研究では自然環境におけるリグニン由来化合物の存在と、真菌による木材腐朽時に実際に細菌がリグニン解体物を代謝するかどうかを明らかにすることを目的とし、以下を実施する。

#### 1. センサー細菌のバリエーション拡大

現在までに、フェルラ酸とバニリン酸の代謝時に誘導されるプロモーターを利用したセンサー、FerC-PferB と DesR-PligM をそれぞれ作出した。本項目では検出可能な芳香族化合物のバリエーションの拡大を目的とし、SYK-6 株の遺伝子発現制御システムを活用し、シリング酸、ピフェニル型の二量体化合物等についてセンサーシステムを作出する。

#### 2. 環境中のリグニン由来化合物分析

環境試料中にセンサーが応答可能なリグニン由来化合物が存在するかどうか明らかにするとともに、化合物分析によりセンサーが応答した化合物を推定する。森林土壌や腐朽木材などに対してセンサー細菌を反応させ、これら試料に反応可能な化合物が含まれるかどうか調査する。また、化合物分析については低分子芳香族の存在量が少ないことを考慮し、はじめに各試料を水または弱酸で懸濁して有機溶媒抽出により濃縮する。その後、HPLC-ESI-MS (現有設備) を用いた分析により、センサーが応答した低分子芳香族化合物を推定する。

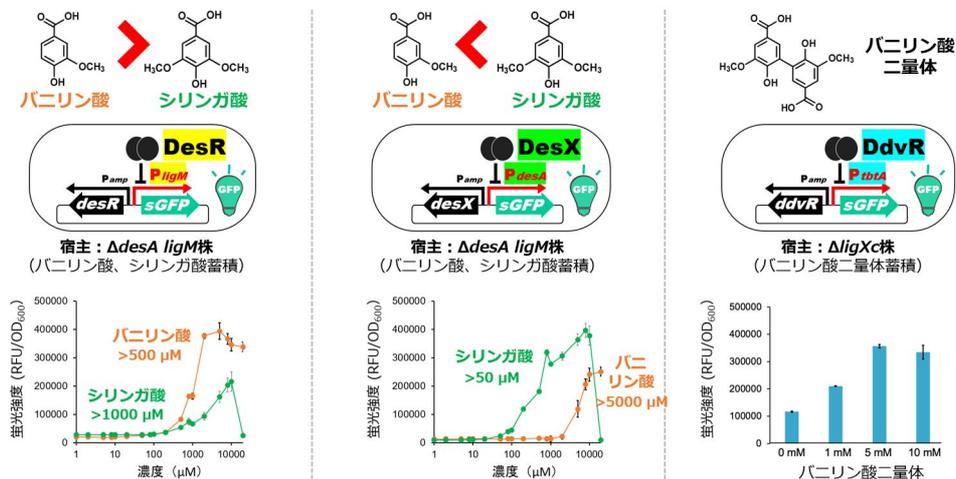
#### 3. 真菌による木材腐朽およびリグニンの解体時におけるセンサー細菌の応答性解析

一般的な白色腐朽菌である *Ceriporiopsis subvermispora*、*Phanerochaete chrysosporium*、*Trametes versicolor* を用い、木材腐朽過程で行われるリグニンの解体で生じる化合物をセンサー細菌が応答できるかどうか明らかにする。白色腐朽菌株を広葉樹のコナラ木粉に接種・インキュベートする。十分に腐朽が進行した時点で木粉をセンサー細菌とインキュベートし、蛍光応答を観察する。

### 4. 研究成果

#### 1. センサー細菌のバリエーション拡大

SYK-6 株が有するシリング酸応答性の転写リプレッサー-DesX は、シリング酸脱メチル酵素遺伝子 *desA* のプロモーター-PdesA を制御する。また、二量体バニリン酸の DDVA に応答する転写リプレッサー-DdvR は、DDVA 代謝系遺伝子群のプロモーター-PddvT を制御する。DesX-PdesA と DdvR-PddvT の転写制御システムを利用したシリング酸と DDVA の応答センサーを作出した。DesX-PdesA は、シリング酸とバニリン酸に応答性を示したが特異性が異なっており、シリング酸は 50-5,000  $\mu$ M、バニリン酸には 3-8 mM で濃度依存的に蛍光が上昇する応答特性を示した (図3)。既に作出していたバニリン酸をメインに応答する DesR リプレッサーと PligM を用いた DesR-PligM センサーでは、バニリン酸とシリング酸の両方に同程度の応答性を示した (バニリン酸, 500-5,000  $\mu$ M; シリング酸, 800-5,000  $\mu$ M) のに対し、異なる特異性で使い分けができることが示された。また、DdvR-PddvT は、DDVA に対して 1-5 mM の濃度範囲で応答性を示した。DDVA は、リグニン中において芳香環同士が C-C 結合で連結する極めて強固な構造であり、生分解後においてもその結合は残存されやすい。リグニンの生分解を調べる指標として利用でき



る可能性がある。

図3. シリング酸、バニリン酸、バニリン酸二量体 (DDVA) に応答するセンサー

DDVA 及びバニリン酸は、高分子材料のモノマーとして展開利用できることが示されている (Fujieda et al., 2023, Polymer, 268, 125685; Higuchi et al., Bioresource Technology 2023, 385, 129450)。最近、脱炭素社会の構築に貢献する技術として、植物バイオマスからの高分子材料の生産が注目されており、細菌の代謝能力を利用したリグニンからの高分子材料のモノマーを選択的に生産する手法の開発が進められている。本研究で開発した DDVA やバニリン酸のセンサーは、リグニン系化合物からこれら化合物を生産する速度を調べる手法となり得ることから、リグニンからの発酵生産株の育種に応用できる可能性がある。一方、リグニンの細菌代謝を利用して生産できるポリマー原料として 2-ピロン-4,6-ジカルボン酸 (PDC) が知られている (Jin et al., RSC Sustainability 2024)。そこで、本研究では、リグニン生分解の解析用センサーの開発から派生し、PDC のセンサー細菌の開発にも取り組んだ。PDC に応答する転写制御因子は未だ報告が無いことから、環境細菌からの取得を試みた。PDC 培養時に PDC 変換酵素活性が誘導される細菌をスクリーニングし、ゲノム解析により PDC 応答性の転写制御因子とその制御プロモーターを見出した。これらを用いたセンサーは、20-10,000  $\mu\text{M}$  の PDC に対して応答した。その応答は濃度依存的であったことから、リグニン由来化合物からの PDC 生産速度の測定に応用できることが示唆された。

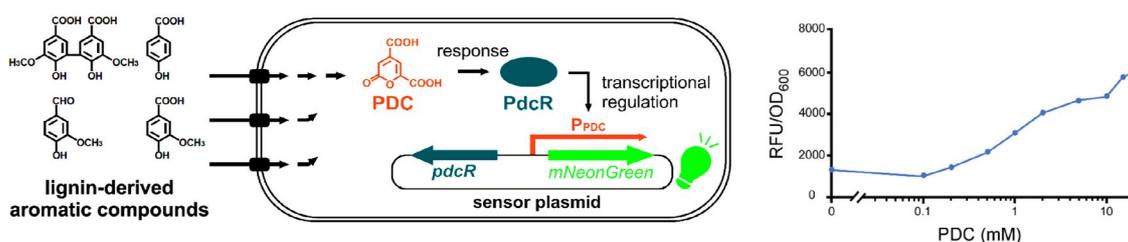


図4 . リグニン由来化合物から生産された PDC に応答するセンサー。  
左：センサーの模式図、右：PDC 応答濃度範囲

## 2 . 環境中のリグニン由来化合物分析

コントロールとなる環境試料として産業技術総合研究・地質調査総合センターで調製された地球科学標準物である黒ボク土の GSJ CRM JSO-1 土壌を選定した。リグニン系芳香族化合物の分析を実施した結果、バニリン酸が 0.07 pmol/g、シリング酸が 0.026 pmol/g 含まれていたが、フェルラ酸などのフェルラ酸センサー FerC-PferB が応答可能な化合物は検出されなかった。本土壌懸濁液に対して FerC-PferB の応答アッセイを実施したところ、糖とアミノ酸を炭素源とした合成培地と同等の蛍光強度であったことから、GSJ CRM JSO-1 土壌は FerC-PferB が応答しないネガティブコントロール環境試料として使用できると判断された。そこで、バーク堆肥、腐葉土、新潟県内で採取した土壌試料について FerC-PferB の応答アッセイを行った。その結果、顕微鏡観察において、標準 GSJ CRM JSO-1 土壌と比較してバーク堆肥、長岡市ニュータウン公園の土壌、長岡市与板城址の土壌で顕著な sGFP 由来の蛍光が観察された (図5)。一方、腐葉土と長岡市三島地域の土壌では構成的プロモーターで発現させた mCherry の蛍光のみが観察された。以上の結果から、バーク堆肥、長岡市ニュータウン公園の土壌、長岡市与板城址の土壌には、FerC-PferB センサーが応答できる、フェルラ酸およびそのアナログを代謝過程で経由する代謝経路上流の二量体やオリゴマーの化合物が存在し、それらが SYK-6 株により代謝されたことで応答が観察されたことが示唆された。

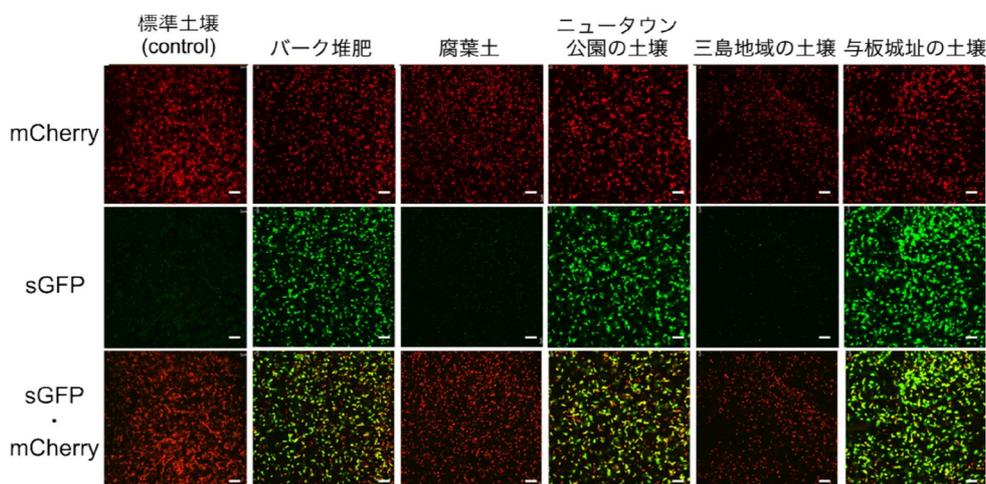


図5 . 各種サンプルに対する FerC-PferB センサーの蛍光応答アッセイ。  
センサー菌の同定のため、構成的プロモーターで発現させた mCherry を由来とする蛍光を一番上に、FerC-PferB センサーシステムで制御された sGFP を由来とする蛍光を中断に、mCherry と sGFP を重ねたものを一番下に表示する。

### 3. 真菌による木材腐朽およびリグニンの解体時におけるセンサー細菌の応答性解析

主要な白色腐朽菌である *Ceriporiopsis subvermispora*、*Phanerochaete chrysosporium*、および *Trametes versicolor* がそれぞれ接種され、十分に腐朽が進んだ広葉樹のコナラの木粉の懸濁液を調製し、寒天培地にて FerC-PferB センサーとインキュベートした。その結果、蛍光顕微鏡観察において *P. chrysosporium* の木粉試験液において、mCherry と重なる細胞特異的な位置に非接種の control よりも顕著な sGFP に由来する蛍光が観察された (図6)。この結果から、FA センサーが *P. chrysosporium* による木粉の腐朽で生成したリグニン分解産物に反応したことが強く示唆された。*P. chrysosporium* による腐朽木粉について芳香族成分の分析を行った結果、意外にもフェルラ酸等の本センサーの標的化合物の存在量はごく微量であり、反応できるレベルに満たなかった。このことは、白色腐朽菌によるリグニンの分解で生じた、化合物分析では同定できなかった多様な二量体やオリゴマーを、本センサーの宿主細菌がセンサーに反応可能な化合物に変換し、結果としてセンサーとして反応が見られたことが示唆された。

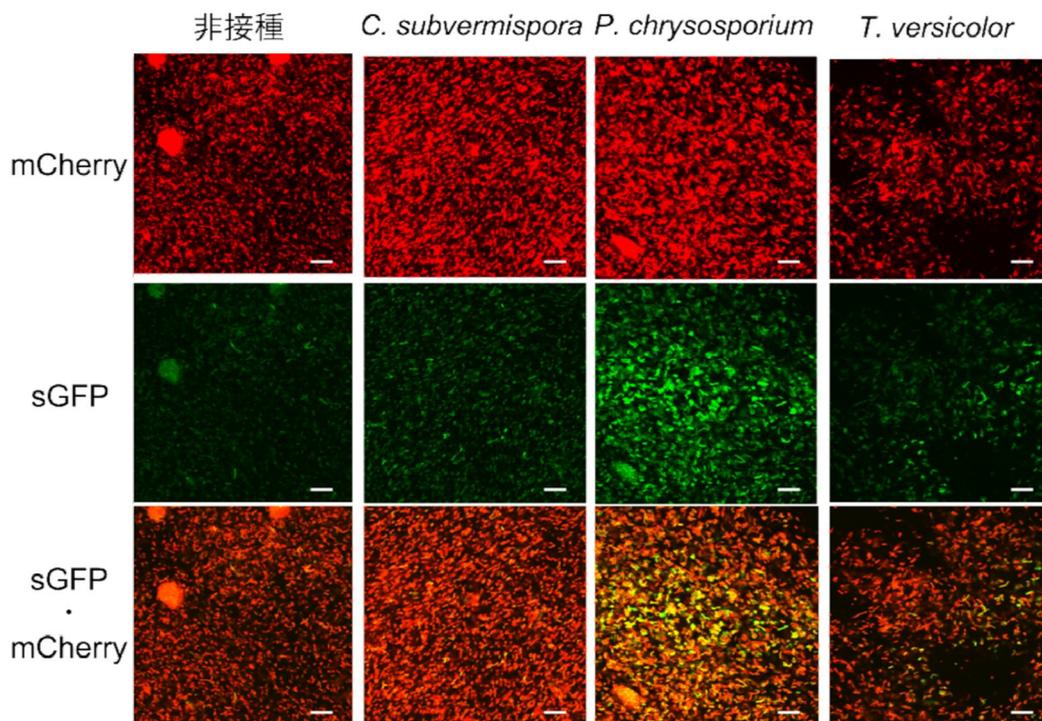


図6. 各種サンプルに対する FerC-PferB センサーの蛍光応答アッセイ。

センサー菌の同定のため、構成的プロモーターで発現させた mCherry を由来とする蛍光を一番上に、FerC-PferB センサーシステムで制御された sGFP を由来とする蛍光を中断に、mCherry と sGFP を重ねたものを一番下に表示する。

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 1件）

1. 発表者名 上村 直史、白濱 里帆、亀井 一郎、政井 英司
2. 発表標題 リグニンの生分解を解析するためのバクテリアセンサーの開発
3. 学会等名 農芸化学会2023年度大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 白濱 里帆、上村 直史、荒木 拓馬、菱山 正二郎、政井 英司
2. 発表標題 バニリン酸とシリンガ酸を検出するバクテリアセンサーの開発
3. 学会等名 第66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

1. 発表者名 鈴木 彪、棚谷 建太、藤田 雅也、政井 英司、上村 直史
2. 発表標題 リグニン由来芳香族化合物から微生物生産されるポリマー原料化合物を認識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2024年度大会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Hyo Suzuki, Kenta Tanatani, Masaya Fujita, Takuma Araki, Yuzo Suzuki, Yuichiro Otsuka, Masaya Nakamura, Kengo Magara, Satoshi Kubo, Eiji Masai, Naofumi Kamimura
2. 発表標題 Development of a bacterial sensor for a polymer building block enhancing biological lignin valorization
3. 学会等名 2nd International Lignin Symposium (国際学会)
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>微生物代謝工学研究室ホームページ  <a href="https://bio.nagaokaut.ac.jp/~masai-1/">https://bio.nagaokaut.ac.jp/~masai-1/</a>  微生物代謝工学研究室ホームページ  <a href="https://bio.nagaokaut.ac.jp/~masai-1/">https://bio.nagaokaut.ac.jp/~masai-1/</a></p>
---

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	亀井 一郎  (Kamei Ichiro)  (90526526)	宮崎大学・農学部・教授    (17601)	

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