

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 13 日現在

機関番号：24403

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580497

研究課題名(和文) 高等植物リグニン生合成能の進化的獲得とバイオマス生産に関する研究

研究課題名(英文) Studies on the evolutionary process of lignin biosynthesis in land plants

研究代表者

太田 大策 (Disk, Ohta)

大阪府立大学・生命環境科学研究科(系)・教授

研究者番号：10305659

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：植物代謝経路の多様性は植物進化過程と深く関わる。ゲノム配列解析によって、リグニン蓄積能が無いコケ植物にもモノリグノール生合成遺伝子を特定した。コケ植物のモノリグノール経路酵素(4CL, HCT, CYP98A)を異種発現系で発現させ、それらの触媒反応を調べたところ、コケHCTに高等植物と同様の活性を認めしたが、コケCYP98AはHCT反応生成物を基質とすることは無かった。すなわち、コケがリグニンを蓄積しない理由として、CYP98A酵素反応の欠損が明らかとなった。このことは、維管束植物への進化過程でコケ植物のCYP98Aの基質反応性が多様化によってリグニン生合成が進化したことを示している。

研究成果の概要(英文)：Land plant evolution is inseparable from metabolic pathway diversification. Particularly, it is probably true that the vascular plant evolution was strongly accelerated upon the acquisition of lignin. Aiming to clarify the evolution of lignin biosynthesis, we addressed the reason for the lack of lignin biosynthesis in moss. From genome information, we identified monolignol pathway genes for p-coumaroyl-CoA ligase, hydroxycinnamoyl-CoA:shikimate hydroxycinnamoyl transferase (HCT), and CYP98A in the mosses Physcomitrella and Marchantia, and we expressed and characterized recombinantly expressed enzymes. The HCTs from both mosses catalyzed the same reaction to yield p-coumaroyl shikimic acid as reported with higher plant enzymes, while the moss CYP98A failed to accept p-coumaroyl shikimic acid, the HCT reaction product. It is concluded that the evolutionary diversification of the CYP98A substrate reactivity was the key event to produce monolignol in vascular plants.

研究分野：応用分子生物学

キーワード：リグニン シトクロムP450 メタボロミクス 代謝工学 ゼニゴケ ヒメツリガネゴケ シロイヌナズナ 高等植物

1. 研究開始当初の背景

植物は進化過程でリグニンを生合成する能力を獲得した。地球上最大のバイオマス資源である木質セルロースの産業利用が駆動力となり、リグニン研究の長い歴史の中で膨大な成果が蓄積されてきた。リグニンは植物バイオマスの約 15 ~ 40% を占め、化学量論的には 1g のリグニン生成に約 3g のグルコースが必要である。このことは、セルロース合成とリグニン合成の間で光合成産物を効率的に分配するシステムが成立した事を示しているが、リグニン生合成の進化的獲得が光合成産物分配に及ぼした影響に関する情報はほとんどない。近年では、パルプやバイオ燃料の生産コスト低減などを目的として、低リグニン化と総バイオマス生産の増強を目指した研究が進められている。特に、光合成産物はセルロース合成とリグニン合成の間で競合するので、これらの生合成バランス調節の解明は、バイオマス生産の増強のための重要命題である。リグニンは、桂皮酸モノリグノール経路で産生されるモノリグノールの重合によって生成する。フェニルアラニンに由来する芳香環は 3 種の P450 (C4H; cinnamate 4-hydroxylase, C3'H; 3'-hydroxylase of *p*-coumaroyl shikimic acid, F5H; ferulate 5-hydroxylase) によって位置特異的に水酸化され、リグニンの化学的性質に決定的な影響を及ぼす。リグニン分解性向上を目指して、これらの P450 発現調節を介した組成改変 (G/S リグニン比) が試みられている。リグニン含量の改変も、経路遺伝子の発現調節によって可能である。例えば、cinnamoyl alcohol dehydrogenase (CAD) や *p*-coumaloyl CoA ligase (4CL) 発現抑制によってリグニン含量が低下し、細胞壁多糖蓄積が増加する。一方、リグニン含量の低下は生育促進や糖化難易度と直接関係が無いとの報告もある。これらの相反する結果は、リ

グニン生合成と総バイオマス生産のバランス調節に関わる上位階層の代謝制御を明らかにする研究が必要であることを示している。

2. 研究の目的

リグニン生合成の進化が植物バイオマス生産に及ぼした影響の解明を最終目的とし、高等植物のリグニン生合成能をコケ植物に付与する。安定同位体標識による代謝フラックス解析を通して、代謝バランス制御に関わる反応段階と代謝物を特定する。得られた結果を基に、植物バイオマス生産を最適化するための代謝設計に結び付ける。

3. 研究の方法

高等植物にとって桂皮酸モノリグノール経路は必須であり、リグニン生合成能の欠損は致死的である。すなわち、高等植物を材料とする限り、関連生合成経路遺伝子の発現量と生育量・リグニン含量の比較は出来ても、リグニン生合成への同化炭素分配の調節機構解明は難しい。

一方、コケ植物 (リグニンを蓄積しない) に桂皮酸モノリグノール経路を合成生物学的に構築することは、植物が進化過程で新たにリグニン生合成能を獲得した事象を再現することになる。作出した組換えコケ植物の代謝フラックスの変動の解析から、リグニン合成の進化が植物の同化炭素分配と生育に与えたインパクトを明らかにすることが可能になると考えた。

比較ゲノム的に遺伝子配列を精査すると、リグニンを蓄積しないコケ植物にも桂皮酸モノリグノール経路遺伝子が存在することがわかる。予備実験では、ゼニゴケとヒメツリガネゴケの両方でコニフェリルアルコールとシナップ酸が検出され、コケ植物においても桂皮酸モノリグノール経路が機能していることが分かった。

研究期間中に、シロイヌナズナのモノリグノール経路遺伝子の順次導入と、組換え系統の交配によって、高等植物のリグニン生合成経路を段階的にゼニゴケに構築する。得られた形質転換系統は、メタボロミクス手法を基に、安定同位体標識によってフェニルプロパノイド経路活性（モノリグノールとフラボノイド生合成）とセルロース合成の間の光合成産物分配を解析する。

1)リグニン生合成能を付与したコケ植物を作出し、リグニン生合成の進化が緑色植物のバイオマス生産に及ぼした影響を解析する。リグニン含量と総バイオマス生産の平衡関係を明らかにする。先行研究の報告例は国内外ともに無い。

2)リグニン生合成進化に関する新知見を得る。紅藻にはリグニンが蓄積するが、緑藻には存在しない。コケ植物にリグニン蓄積は無いが、イワヒバよりも高等な植物にリグニン蓄積がみられる。リグニン生合成が進化段階を超えて並行進化した可能性とともに、コケ植物でリグニン合成が抑制されるメカニズムを明らかにする。

3)リグニンを芳香族有機化合物資源として利用する際の応用技術を蓄積する。リグニンは2.27KJ/g（セルロースの約1.8倍）のエネルギーを保有するが、燃焼によってエネルギー利用されるだけであり、未利用バイオマスとして大きな潜在性がある。

まず、シロイヌナズナの桂皮酸モノリグノール経路遺伝子 cDNA（HCT, C3'H, F5H）をゼニゴケに導入する。ゼニゴケはアグロバクテリウム法によって核ゲノムの形質転換する。胞子発芽後1週間以内の分化初期の葉状体とアグロバクテリウムを共培養し、形質転換体は抗生物質を含む寒天

培地上で選抜する。形質転換系統の葉状体（無性生殖段階）から生殖成長段階を誘導し、得られた雌雄配偶子の交配する。胞子体(2n)から胞子(n)を取得し、交配系統の葉状体を生育させる。導入したシロイヌナズナ cDNA を特異的に増幅する PCR プライマーを用いて、交配による遺伝子集積の可否を検証する。樹立した形質転換系統を順次交配し、ゼニゴケに高等植物のリグニン生合成能を付与する。得られたゼニゴケ形質転換体を、¹³C 標識した糖、モノリグノール経路中間体、あるいは ¹³CO₂ 存在下で生育させ、すでに確立したメタボロミクスプラットフォーム (GC-MS, LC-MS, FT-ICR/MS) において、¹³C のフェニルプロパノイド（フラボノイド、モノリグノール）と貯蔵糖への代謝産物分配を分析する。代謝物フラックス解析から、リグニン合成の進化がバイオマス生産に与えた影響を明らかにする。

4. 研究成果

コケ植物であるゼニゴケに、高等植物のケイ皮酸モノリグノール遺伝子を導入した遺伝子組換え系統を樹立し、精密質量分析実験によって代謝プロファイルの変動を解析した。まず、シロイヌナズナの CYP98A3 (C3'H), CYP84 (F5H), 4CL, および HCT (hydroxycinnamoyl CoA:shikimate hydroxycinnamoyl transferase) をコードする cDNA をクローニングした。ゼニゴケにシロイヌナズナの CYP98A3 (C3'H)と CYP84 (F5H) をそれぞれ導入した遺伝子組換え系統を樹立し、野生型との代謝プロファイルの比較を行った。これらの遺伝子組換えゼニゴケ系統では、フェニルプロパノイド経路からケイ皮酸モノリグノール経路が分岐すると期待される。樹立した CYP98A3 (C3'H) 形質転換系統, CYP84 (F5H) 形質転換系統, 非形質転換体のメタノール抽出物を

Orbitrap 質量分析装置によって計測した。Orbitrap 質量分析装置では精密質量計測が可能であり、実測質量値から分子式推定と化合物特定が期待できる。それぞれの系統間で 6043 種類の共通化合物ピークを検出し、分子式推定を実施した。主成分分析による非形質転換系統と CYP98A3 (C3'H) 組換え系統の比較では明確な代謝プロファイルの違いを認められたが、導入遺伝子の機能特定に結びつくような解析結果は得られなかった。これは、ゼニゴケが蓄積する代謝産物に関する文献情報が殆ど無く、精密質量データから算出した分子式から二次代謝産物の構造決定に結びつけることが困難であるためと考えられた。

次に、経皮酸モノリグノール経路への関与が推察されるゼニゴケシトクロム P450 C3'H (MpCYP98A) と HCT (MpHCT) の酵素機能解析を行った。酵素反応に必要な経皮酸モノリグノール経路中間体は有機合成によって合成した。同時に、連続酵素反応系によって高等植物の経皮酸モノリグノール経路反応段階の一部をゼニゴケ組換え酵素で代替する *in vitro* 実験系を構築した。まずシロイヌナズナの 4CL, HCT, および CYP98A3 (C3'H) の cDNA をクローニングし、組換え酵素を昆虫細胞-バキュロウイルス系にて発現させた (r4CL, rHCT, rC3'H)。一方、ゼニゴケの C3'H (MpCYP98A) と HCT (MpHCT) の cDNA クローニングにも成功し、バキュロウイルス-昆虫細胞発現系において、組換え酵素を作成した (rMpCYP98, rMpHCT)。

rMpCYP98 の酵素反応特性を解析するためには、その反応基質と推定される *p*-coumarylyl-shikimate, *p*-coumaroyl-quinic acid が必要である。まず *in vitro* でシロイヌナズナのモノリグノール経路を再構成するため、得られた組換え r4CL を用い、*p*-coumaric acid から

p-coumarylyl-CoA の生成を確認した。続いて、生成した *p*-coumarylyl-CoA を用い、そこに shikimic acid あるいは quinic acid を基質として添加することで rHCT 反応を試みた。その結果、目的の反応生成物である *p*-coumaroyl-shikimate, および *p*-coumaroyl-quinic acid の生成がそれぞれ確認され、これらの化合物はシロイヌナズナの CYP98 (C3'H) 反応基質になることがわかった。これらの酵素反応生成物は、有機合成によって別途調製した化合物と同一であることを LC-MS 分析によって確認した。

経皮酸モノリグノール経路の再構成系によって調製した hydroxycinnamoyl CoA:shikimate, あるいは hydroxycinnamoyl CoA:quinic acid がゼニゴケ C3'H (rMpCYP98) の基質となるかどうかを確認したところ、rMpCYP98 は高等植物型の酵素反応である C3'H 活性を有していないことが明らかとなった。また同様に、ヒメツリガネゴケの PpCYP98 も C3'H 活性を持たないことがわかった。一方、ヒメツリガネゴケの PpHCT は、シロイヌナズナ HCT と同じく、*p*-coumarylyl-CoA および shikimic acid, あるいは quinic acid から、それぞれ hydroxycinnamoyl CoA:shikimate, hydroxycinnamoyl CoA:quinic acid を生成する活性を持っていることがわかった。しかし、コケ植物の CYP98 は、これらの HCT 反応生成物を基質として、高等植物型の P450 CYP98 反応 (C3'H) の基質とはならなかった。今回の結果は、コケ植物 HCT が shikimic acid や quinic acid 以外の化合物もアシル基転移反応の基質とする可能性があることを示唆している。コケ植物の CYP98 がその反応生成物を基質とするならば、コケ植物に特異的な、モノリグノール生合成とは異なる未知の代謝経路に関与する可能性がある。

コケ植物はフラボノイドを生合成するので、共通のフェニルプロパノイド経路が

機能していると考えられる。また、コケ植物にコニフェリルアルコールが存在する（未発表）ことから、部分的にケイ皮酸モノリグノール経路が存在するはずである。これまでに得られた実験結果は、HCT と CYP98 (C3'H) の遺伝子進化が、リグニン生合成進化の重要なターニングポイントであったこと、これらの P450 反応段階について集中的に検討する必要があることを示している。今後、ゼニゴケの CYP98A3 (C3'H), CYP84 (F5H) 導入系統の成分分析とともに、シロイヌナズナの CYP98A3 (C3'H) の T-DNA ノックアウト系統（不稔性、重篤な矮性）を、ゼニゴケ C3'H (MpCYP98) で相補しうるかどうか検証することによって、植物生体内でのコケ植物 CYP98 (C3'H) および HCT の機能を確認する必要がある。

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 2 件)

Li D, Ono N, Sato T, Sugiura T, Altaf-Ul-Amin M, Ohta D, Suzuki H, Arita M, Tanaka K, Ma Z, Kanaya S. (2015) Targeted Integration of RNA-Seq and Metabolite Data to Elucidate Curcuminoid Biosynthesis in Four Curcuma Species. *Plant Cell Physiol.* 2015 56:843-851. 査読あり

Motohashi, R., Satou, M., Myouga, F., Oikawa, A. and Ohta, D. (2015). *Arabidopsis* Metabolome Analysis Using Infusion ESI FT-ICR/MS. *Bio-protocol* 5: e1463. 査読あり

〔学会発表〕(計 件)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 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 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

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

太田 大策 (OHTA, Daisaku)

大阪府立大学・生命環境科学研究科・教授

研究者番号: 10305659

(2)研究分担者

()

研究者番号:

(3)連携研究者

()

研究者番号: