

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：82706

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450120

研究課題名(和文) リグニン有効利用の鍵となる  $\beta$ -0-4結合切断酵素の機能解析と応用研究研究課題名(英文) Functional analysis and application of Lignin  $\beta$ -0-4 bond cleavage enzymes

研究代表者

秦田 勇二 (HATADA, Yuji)

国立研究開発法人海洋研究開発機構・海洋生命理工学研究開発センター・グループリーダー

研究者番号：20399562

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：リグニンは地球上のバイオマスとしてはセルロースに次いで2番目に多く、化石資源を代替する芳香族化学品原料として大きく期待されている。リグニンモノマー間に最も多い  $\beta$ -0-4結合を特異的に切断する一連の反応を触媒する酵素群を海洋微生物から発見し、組換え生産に成功した。一方、本海洋微生物が示すリグニンモデル化合物に対する代謝適応に関する知見も得ることができた。

上述の取得酵素をバイオリファイナーにおけるリグニン変換触媒として利用するため、反応最適条件(pH、温度など)を求めた。さらに「稲わら」や「杉おが粉」などの未利用バイオマスを原料として目的芳香族化合物が生産可能であることを示すこともできた。

研究成果の概要(英文)：Lignin is the second most abundant biomass component on Earth and a potential alternative raw material to petroleum for aromatic chemicals. We identified a set of marine bacterial enzymes for specific cleavage of  $\beta$ -0-4 linkages which are the most frequently observed between phenylpropane monomeric units of lignin. We produced the recombinant enzymes using the genes encoding the respective enzymes. In addition, we demonstrated the physiological acclimation of the strain when it encountered the lignin model compounds.

To utilize the above mentioned enzymes as catalysts for lignin conversion in biorefinery, we examined the optimal reaction conditions (pH and temperature). Furthermore, we succeeded in the specific production of aromatic monomers with phenylpropanone structures from natural lignin preparations prepared from unutilized biomasses such as milled Rice straw and sawdust of Japanese cedar.

研究分野：応用微生物学

キーワード：リグニン バイオベースプラスチック 遺伝子 酵素 深海 微生物

## 1. 研究開始当初の背景

化石資源に依存した社会を、バイオマスなどの再生可能資源に依存したシステムに変革するため、バイオマスから体系的にエネルギー・化学品を生産する戦略と研究開発が求められている[1]。リグニンとは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ており、所謂バイオリファイナリーの原料として大きく期待されている。リグニンは数種の芳香族モノマーが主にβ-O-4結合で重合した芳香族ポリマーである。リグニンの生分解に関する研究は古くから白色腐朽菌を対象に行われてきた。白色腐朽菌によるリグニン分解は木材中の微量な鉄イオンと酸素の存在下のラジカル反応で進行し、酵素としてはペルオキシダーゼがその分解反応の主役を担う[2]。しかしながらこの反応はβ-O-4結合と同時に芳香族化合物内部のCα-Cβ結合も切断するため、機能性高分子製品の素材として芳香族化合物単体を取得するには相応しくない。その一方、リグニンから生産される芳香族モノマーの持つ高いポテンシャルを示す研究報告例も増えてきている[3]。今後リグニンから芳香族モノマーを効率よく生産する手段が確立されれば、「リグニン→芳香族モノマー→高機能性ポリマー製造」の一連の道筋が繋がる。従ってリグニンのβ-O-4結合を切断する酵素の開発はリグニン有効利用の大きな鍵である。

## 2. 研究の目的

我々はこれまでにβ-O-4結合を選択的に効率良く切断する微生物(MBES04株と命名)を深海沈木より発見することに成功している。本課題に於いて、本微生物の持つβ-O-4結合特異的切断酵素の精製、配列及び機能解析、高生産検討等を行い、続いて本酵素を用いてリグニンより芳香族化合物の高効率生産を試みる。本研究は複雑な化学構造を持つためにこれまで開発が進んでいないリグニンを、「酵素の基質特異性」を利用することで有効利用される成分(機能性高分子製品原料など)へと効率よく変換する道筋を構築することを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) MBES04株ゲノム解析

次世代シーケンサー(Ion torrent PGMおよび454 GS FLX454; Life社製)を用いてメイトペアシーケンスを行い、MBES04株ゲノム配列を解析し、Newbler version 2.6を用いてアセンブルした。GeneMarkを用いてコンティグを予測、GenBank nonredundant protein database(NR)およびKyoto Encyclopedia of Genes and Genomes(KEGG)をデータベースとするBLAST検索を行い、遺伝子領域をアノテーションした。さらに、50t、3 rRNA領域を

tRNAscan-SE 1.23 と RNAmmer 1.2 server を用いて同定した。

### (2) トランスクリプトーム解析によるβ-O-4結合特異的切断に関連する遺伝子群の発現解析

MBES04株を2種のリグニンモデルダイマー(1-(4-Hydroxy-3-methoxyphenyl)-2-(2-methoxyphenoxy)-1,3-propanediol (guaiacylglycerol-β-guaiacyl ether; GGGE) および 3-hydroxy-1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-2-(2-methoxyphenoxy)-1-propanone (2-methoxyphenoxy)hydroxypropiovanillon e;MPHPV)存在下、非存在下で培養し、それぞれRNAを抽出した。抽出RNAをDNase Iで処理、精製後RNAの品質をAgilent Bioanalyzerを用いて16 S and 23 S rRNAを指標に評価した。トータルRNAからβ-O-4結合特異的切断酵素遺伝子群のcDNAを合成し、16 S rRNA geneをリファレンスとして定量PCRを行った。一方、RNAシーケンスライブラリーを作成し、Illumina Hiseq 2000による配列解析を行った。得られた配列はBowtie (<http://bowtie-bio.sourceforge.net>)を用いてMBES04株ドラフトゲノム配列にマッピング、発現差解析はBioconductor project (iDEGES53 edgeR analyses)を、代謝経路の特定にはKEGG Automatic Annotation Serverを利用した。

### (3) β-O-4結合特異的切断酵素の酵素化学的解析

β-O-4結合切断酵素群の各遺伝子を、大腸菌を宿主としてヒスタグ付加タンパクとして組換え発現し、ニッケルアフィニータラムで精製した。GGGE および MPHPV を基質として、これらの酵素の最適pH、最適温度を測定した。酵素活性測定では、酵素反応後の反応液をODS逆相HPLCシステムにて分析し、反応生成物をクロマト面積値より定量した。HPLC送液は2液(A: 2 mM 酢酸ナトリウム + 0.05% ギ酸、B: 95% メタノール/水)のグラジエントで行い、UV270 nmで検出した。

### (4) 分子間相互作用を利用したリグニンβ-O-4結合切断酵素群の解析

分子間相互作用解析装置(Biacore T200, GEヘルスケア社製)を用いてリグニンβ-O-4結合切断酵素群の1種、glutathione S-transferaseとその補酵素であるグルタチオンの相互作用を解析した。ニッケルタグが付加された基盤(センサーチップ)上にヒスタグ付加組換え酵素を固定し、グルタチオンをアナライトとして表面プラズモン測定を行った。

### (5) β-O-4結合特異的切断酵素の大量生産

(3)で作成した酵素発現プラスミドで種々のBL21(DE3)系列の大腸菌を形質転換した。

形質転換体を種々の温度、培養時間条件で培養し、酵素タンパク発現量の差異を SDS-PAGE にて比較した。

(6) 天然リグニン含有物からの芳香族モノマー生産

イナワラを室温にて風乾後、ワンダーブレンダー(大阪ケミカル社製)を用いて2分間粗粉碎した。これを0.15 mm のフルイで分粒、通過した粉末をリグニン含有画分抽出に用いた。また、スギおが粉(微粉末処理済)を5w/v%の濃度で96%含水ジオキサンに3日間浸漬した後、ジオキサンを40 にて減圧留去し、残渣を少量のジメチルホルムアミドに溶解した。

#### 4. 研究成果

##### (1) MBES04 株ゲノム解析

The 454 GS FLX メイトペアシーケンスにより142,389 リード、62,888,162 塩基の配列情報が得られた。一方、Ion Torrent PGM シーケンスでは、2,652,670 リード、873,653,659 塩基の配列情報が得られた。これらの配列のアセンブルにより124 コンティグが得られた。表1にゲノム解析サマ리를記載する。

##### Assemble

Average Length [bp]	Maximum Length [bp]	Average Redundancy
6,435	100,907	12.5
N50 [bp]	Number of contigs	Total bases [bp]
11,627	783	5,038,192

##### Scaffold

Scaffold	Total bases [bp]	N-base
37	5,596,306	651,313

##### Gene

Total	Complete	Partial
4,670	4,055	615

表 1. MBES04 株ゲノム解析サマリ

本解析により、MBES04 株ゲノムに複数のリグニン関連芳香族モノマーの資化代謝経路が検出された。またβ-O-4 結合特異的切断酵素遺伝子群(GGGEをMPHPVへと酸化する酵素: short-chain dehydrogenase-reductase、MPHPV中のβ-O-4 結合特異的切断酵素 glutathione S-transferase family protein、反応の過程で生じるグルタチオン付加体からグルタチオンを除去する酵素 glutathione S-transferase family protein)はクラスター構造を取っており、本クラスターの外側には transposase

様遺伝子が存在していた。β-O-4 結合特異的切断酵素遺伝子の存在やゲノム上における配置を *Sphingomonadaceae* ファミリーに属するゲノム解読済みの84菌株の場合と比較した結果、遺伝子群の分布は、同ファミリー内における16SrDNA配列に基づく分類学的系統上の位置関係とは一致せず、離れた系統関係にある菌株に点在することが分かった。配列比較対象とした菌株のうち、9菌株にβ-O-4 結合特異的切断活性があることが推定され、うち7株が海洋、河川や工場排水等の水圏から分離されていた。

##### (2) トランスクリプトーム解析によるβ-O-4 結合特異的切断に関連する遺伝子群の発現解析

GGGEの添加により28遺伝子が、MPHPVの添加により51遺伝子の発現が上昇し(図1)、その内12遺伝子が共通であった。特に、グリセロール代謝や細胞膜合成に関連する遺伝子の発現増大が顕著であった。GGGE添加により、トルエンや安息香酸、芳香族モノマーや脂肪酸分解経路遺伝子の発現も増強され、エネルギー獲得や細胞増殖に有利な状態なることが分かった。また同時に芳香族化合物や抗菌性物質によって引き起こされるストレスに応答する調節遺伝子や multidrug transporter の発現も強化された。一方で、GGGE、MPHPVの添加により、β-O-4 結合特異的切断酵素遺伝子群の発現量は変化せず、これらの酵素は、本実験条件では定常的に発現していることが分かった。

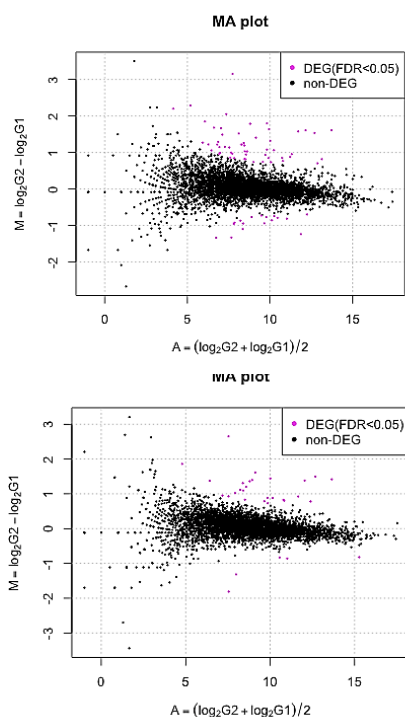


図 1. リグニンモデルダイマー GGGE(上)、MPHPV(下)添加時の遺伝子発現差解析

(3)  $\beta$ -O-4 結合特異的切断酵素の酵素化学的解析

$\beta$ -O-4 結合特異的切断酵素(組換え酵素)を用いて、これらの酵素の GGGE や MHPV に対する反応最適 pH や温度を測定したところ、中性から弱アルカリ性の pH、25-30 で効率良く反応することが分かった。但し、short-chain dehydrogenase-reductase の 1 種においては、反応最適温度が 15 と低く比活性も他酵素に比べて低かったため、今後の酵素の安定性や活性の向上が望まれた。

(4) 分子間相互作用を利用したリグニン  $\beta$ -O-4 結合切断酵素群の解析

取得した glutathione S-transferase 1 種とグルタチオン(還元型の分子量 307)の親和性を測定し、本相互作用が表面プラズモン測定により検出できる条件を見出した。今後、特異性や定量性などに関する諸検討を行い酵素反応機構に関する知見へと繋げる。

(5)  $\beta$ -O-4 結合特異的切断酵素の大量生産取得酵素組み換え体は BL21(DE3)pLysE または BL21(DE3)AI を用いて効率的に生産可能であった。細胞破碎液中の粗酵素は保存安定性が高く、取扱いも容易であった。精製酵素の長期保存にはグリセルール添加での低温保存が有効であった。

(6) 天然リグニン含有物からの芳香族モノマー生産

イナワラ抽出物からは、*p*-ヒドロキシル型、スギ抽出物からはグアヤシル型のフェニルプロパノンモノマーが選択的に生産可能であった。天然バイオマスに含まれる種々の夾雑物存在下で、芳香族モノマーが特異的に生産できたことから、今後のバイオリアファイナリーにおいて、本研究で取得した酵素群は、リグニンの選択的変換ツールや分析ツールとして期待される。

#### <引用文献>

渡辺隆司、木材学会誌:53(1), 1-13 (2007)

Kirk, T.K. and Farrell, R.L., Annual Rev Microbiol:41, 465-505 (1987)

Martinez V et al., Curr Organ Chem:16, 1863-1870, (2012)

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計2件)

Yukari Ohta, Shinro Nishi, Ryoichi Hasegawa, Yuji Hatada, Combination of six enzymes of a marine *Novosphingobium* converts the stereoisomers of  $\beta$ -O-4 lignin model dimers into the respective monomers, Sci Rep. 査読有、19:5:15105.2015 pp.1-14、doi:10.1038/srep15105.

Yukari Ohta, Shinro Nishi, Kiwa Kobayashi, Taishi Tsubouchi, Kagami Iida, Akiko Tanizaki, Kanako Kurosawa, Akiko Adachi, Mizue Nishihara, Reona Sato, Ryoichi Hasegawa, Yuji Hatada, Draft Genome Sequence of *Novosphingobium* sp. Strain MBES04, Isolated from Sunken Wood from Suruga Bay, Japan, Genome Announc. 査読有、3(1): e01373-14.2015 doi:10.1128/genomeA.01373-14

[学会発表](計7件)

弓田涼、桐ヶ谷彩菜、細谷美菜子、大田ゆかり、黒澤佳奈子、嶋根康弘、林昌宏、殿塚隆史、秦田勇二、深海微生物 *Novosphingobium* sp. MBES04 株のリグニン代謝関連酵素の解析、日本農芸化学会 2016 年度大会、2016 年 3 月 29 日、札幌コンベンションセンター(北海道札幌市)

大田ゆかり、黒澤佳奈子、永田崇、片平正人、西村裕志、渡辺隆司、長谷川良一、秦田勇二、海洋性 *Novosphingobium* 属細菌に由来するリグニンモデル 2 量体  $\beta$ -O-4 結合開裂酵素群の酵素学的解析、2015 年 11 月 6 日、筑波大学(茨城県つくば市)

黒澤佳奈子、坪内泰志、秦田勇二、長谷川良一、西村裕志、渡辺隆司、大田ゆかり、リグニンモデル 2 量体中  $\beta$ -O-4 結合を開裂する海洋性 *Novosphingobium* 属細菌の木質パイオマス成分代謝、2015 年 11 月 6 日、筑波大学(茨城県つくば市)

西真郎、黒澤佳奈子、小林樹和、坪内泰志、秦田勇二、大田ゆかり、リグニンモデル 2 量体中  $\beta$ -O-4 結合を間裂する海洋性 *Novosphingobium* 属細菌のゲノムおよびトランス列ブトーム解析、2015 年 11 月 6 日、筑波大学(茨城県つくば市)

佐藤玲央奈、大田ゆかり、西真郎、小林樹和、坪内泰志、秦田勇二、深海由来 *Novosphingobium* sp. MBES04 株のリグニン代謝関連酵素群の特性解析、日本農芸化学会 2015 年度大会、2015 年 3 月 29 日、岡山大学(岡山県岡山市)

佐藤玲央奈、大田ゆかり、丸山正、秦田勇二、深海環境よりリグニン代謝微生物を探索、日本農芸化学会 2014 年度大会、2014 年 3 月 30 日、明治大学(神奈川県川崎市)

大田ゆかり、長谷川良一、黒澤佳奈子、谷崎明子、足立明子、芳賀拓真、丸山正、秦田勇二、深海沈木から単離した *Novosphingobium* 属細菌によるリグニンモデル化合物代謝、第 64 回日本木材学会大会、2014 年 3 月 14 日、愛媛大学(愛媛県松山市)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

秦田 勇二 (HATADA, Yuji)

国立研究開発法人海洋研究開発機構・海洋  
生命理工学研究開発センター・グループリ  
ーダー

研究者番号：20399562

### (2) 研究分担者

坪内 泰志 (TSUBOUCHI, Taishi)

国立研究開発法人海洋研究開発機構・海洋  
生命理工学研究開発センター・技術副主任  
研究者番号：30442990

西 真郎 (NISHI, Shinro)

国立研究開発法人海洋研究開発機構・海洋  
生命理工学研究開発センター・技術主事  
研究者番号：50416004

大田 ゆかり (OHTA, Yukari)

国立研究開発法人海洋研究開発機構・海洋  
生命理工学研究開発センター・主任技術研  
究員

研究者番号：40399572