

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 22 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450241

研究課題名(和文)モノリグノールアシル化酵素遺伝子の同定と発現制御によるリグノセルロース代謝工学

研究課題名(英文) Identification of monolignol acyltransferase genes and metabolic engineering of lignocelluloses by their regulation

研究代表者

鈴木 史朗 (Suzuki, Shiro)

京都大学・生存圏研究所・助教

研究者番号：70437268

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)：モノリグノールのフェノール酸エステル体は、イネ科やヤシ科などの細胞壁などに含まれており、これらのリグノセルロースを有効に使うためには、その生合成の改変が必要となる。しかし、改変の基盤となる生合成機構に関する知見は極めて少ない。そこで、本研究では、モノリグノールのフェノール酸エステル化酵素を同定し、フェノール酸エステル含量や構造が変化したリグノセルロースの創出へつながる基盤的知見を得ることを目的とした。その結果、アスパラガスから新規なp-クマロイル化酵素を見出すとともに、インシリコ解析によりポプラの分化中木部で高発現するモノリグノールアシル化酵素遺伝子の候補を2種類見出した。

研究成果の概要(英文)：The esters of monolignols with phenolic acids have been found in cell walls of plants including grasses and palms. To utilize effectively to these cell walls, the modification of the cell walls are required. However, the fundamental knowledge for the biosynthetic mechanism has not been well-known. In this study, we aims at identifying acyltransferases from several plants for monolignols to lead engineering lignocelluloses in these crops. We found a novel p-coumaroyltansferase for monolignol from asparagus, and identified two candidate genes for acyltransferases highly expressed in poplar developing xylem.

研究分野：リグニン

キーワード：アシル化 モノリグノール 酵素 アスパラガス ノルリグナン ポプラ フェノール酸

1. 研究開始当初の背景

リグノセルロースのバイオリファイナリーにおける前処理工程では、リグニンにエステル結合して存在するフェノール酸が加水分解を受けて遊離し、強力な発酵阻害物質となることが知られている。このような発酵阻害の軽減は、発酵を経由したバイオリファイナリーにおける主要課題の一つである。そこで、フェノール酸を含有しないリグノセルロースの創出が希求されている。

リグニンにエステル結合したフェノール酸は、モノリグノールのフェノール酸エステルがリグニンモノマーとして重合中に取り込まれることで生成するとされている。研究開始(2013年4月)当時、モノリグノールのフェノール酸エステルの生合成については、Withersら(2012)がイネ由来のエステル化酵素の同定を報告しているのみであった。彼らは、フェノール酸の一種である *p*-クマル酸の CoA エステルが、BAHD アシル基転移酵素ファミリーに属する酵素(*p*-クマロイル-CoA:モノリグノールトランスフェラーゼ; PMT)の触媒作用により、*p*-クマリルアルコールやシナピルアルコールと反応し、各々 *p*-クマル酸 *p*-クマリル、*p*-クマル酸シナピルを与えることを大腸菌から調製した組換え酵素を使って示していた。一方、モノリグノールとフェノール酸がリグニン中でエステル結合している構造は、イネ科植物のみならず、ヤナギ科植物、ヤシ科植物など様々な植物から見出されており、主にシナピルアルコールと *p*-クマル酸や *p*-ヒドロキシ安息香酸とエステル結合している場合が多いとされている。

以上のように、モノリグノールのフェノール酸エステル体の生合成機構については未知の部分が多い上、リグニンがフェノール酸エステル化された植物には、大型イネ科植物、ポプラ、ヤナギ、パームなどリグノセルロース原料植物として重要な種類を含んでいることから、これらの植物のモノリグノールのフェノール酸エステル生合成遺伝子の機能同定という基礎研究から取り組み、フェノール酸を含有しない実用的なリグノセルロース植物を創出する必要があった。

2. 研究の目的

本研究では、様々な植物に存在するモノリグノールのフェノール酸エステル化酵素遺伝子に着目し、これらの酵素遺伝子の機能を明らかにし、フェノール酸を含有しないリグノセルロースの創出へつなげる基盤的知見を得ることを目的とした。

3. 研究の方法

1) 研究対象材料の選定

リグニンのフェノール酸エステルとして *p*-ヒドロキシ安息香酸エステルを含むポプラと、これまでの我々の研究でノリグニンの

一種である *cis*-ヒノキレジノールの生合成中間体として *p*-クマル酸 *p*-クマリルを生成すると推定されているアスパラガス培養細胞を研究対象材料とした。

2) ポプラの遺伝子発現データベースからのデータマイニングと系統樹解析

ポプラのゲノム配列から全 BAHD アシル基転移酵素ファミリー遺伝子配列を抽出し、近接結合法および最尤法による系統樹解析を行った。また、既報のポプラマイクロアレイデータを解析し、ポプラのコンフェリルアルデヒド 5-ヒドロキシラーゼ(CAlD5H)遺伝子の発現と強い相関のある BAHD アシル基転移酵素ファミリー遺伝子を選抜した。

3) RNA-seq によるアスパラガス由来 *p*-クマリルアルコールの *p*-クマロイル化酵素遺伝子の推定

これまでの研究によって、アスパラガス培養細胞は、エリシター処理により *cis*-ヒノキレジノールの生合成を誘導することが示されているが、培養細胞から *p*-クマル酸 *p*-クマリルは検出されていない。しかし、これまでの酵素反応結果は、*p*-クマル酸 *p*-クマリルが *cis*-ヒノキレジノール生合成の直前の前駆体であることを示している。

そこで、研究代表者らは、エリシター処理したアスパラガス培養細胞は、*p*-クマル酸 *p*-クマリルを合成する酵素の遺伝子の発現が誘導されていると考え、エリシター処理済みおよびエリシター未処理のアスパラガス培養細胞を Illumina HiSeq-1000 による RNA-seq 解析に供し、CLC Genomics Workbench によってコンティグを作成した。また、これらのコンティグは、シロイヌナズナの全タンパク質に対して BLASTX 検索および Pfam モチーフ検索を行うことによって、BAHD アシル基転移酵素ファミリーに属するか否かのアノテーション付けを行った。アノテーション付けされたコンティグの中から、BAHD アシル基転移酵素ファミリータンパク質をコードするものを選び、その中からエリシター処理によってエリシター未処理細胞に対して RPKM 値(遺伝子発現量に相当)が大きく増大するコンティグを選抜した。

4) RNA-seq コンティグ配列情報を基にした cDNA クローニング

選抜したコンティグの配列情報をもとに、エリシター処理したアスパラガス培養細胞の cDNA から PCR によりコンティグと同じ配列を有する全長 cDNA を増幅し、pCR4 ベクターにサブクローニングした。配列をシーケンシングし、コンティグの配列と同一であることを確認した。しかし、PCR によりどうしてもコンティグと一致した配列の得られなかった場合については、全長遺伝子を委託合成することにより取得した。

5) 標品合成

酵素反応の予想生成物の化学合成標品を Zhu ら(2013)の方法により調製した。すなわち、ヒドロキシケイ皮酸類および *p*-ヒドロキシ安息香酸を無水酢酸およびピリジン存在下、アセチル化した。続いて、これらのアセチル化体とクロロギ酸エチルをトリエチルアミン存在下、酢酸エチルを溶媒に用いて反応させた。反応液を濾過し、0 に冷却したる液にジメチルホルムアミドと水素化ホウ素ナトリウムを添加し反応させることにより、フェノール性水酸基がアセチル化されたヒドロキシケイ皮アルコール類と *p*-ヒドロキシベンジルアルコールを得た。

一方、アセチル化されたヒドロキシケイ皮酸類および *p*-ヒドロキシ安息香酸を乾燥ジクロロメタン中、塩化オキサリルと反応させることにより、それぞれの酸クロリドを得た。続いて上述のアセチル化ヒドロキシケイ皮アルコール類またはアセチル化 *p*-ヒドロキシベンジルアルコールと、アセチル化ヒドロキシケイ皮酸クロリド類またはアセチル化 *p*-ヒドロキシ安息香酸クロリドをジメチルアミノピリジンおよびトリエチルアミン存在下、カップリングさせることにより、種々の合成標品を得た。

6) 組換え酵素の発現とキャラクタリゼーション

得られた全長 cDNA のコード領域を大腸菌発現用ベクターの pColdI または pDEST17 にサブクローニングし、タンパク質発現用大腸菌である BL21(DE3) 株に導入した。得られた複数の大腸菌コロニーを液体培地に植菌し、OD₆₀₀ が 0.5 に至った時点でイソプロピルチオガラクトシドを添加し、16 で培養することにより組換え酵素の発現を誘導した。培養終了後、遠心分離により菌体を回収し、凍結保存した。凍結保存菌体は、バッファに懸濁させ、超音波破碎し、遠心分離により上清と沈殿画分に分画した。これらを SDS-PAGE 分析に供すると共に、上清を粗酵素液として Withers ら(2012)の用いた方法に準じて酵素反応に供した。得られた酵素反応生成物は酢酸エチル抽出し、乾燥後、残渣をメタノールに再溶解させ、フィルター濾過した。得られたる液を ESI 法による LC-MS 分析に供し、酵素反応物が得られたかどうかを評価した。

4. 研究成果

1) ポプラの *p*-ヒドロキシベンゾイル化酵素候補遺伝子

ポプラのマイクロアレイデータ解析および BAHD アシル基転移酵素ファミリーの系統樹解析により、モノリグノールのアシル化に関わると推定される酵素遺伝子を網羅的に探索した。その結果、木部で特異的に遺伝子発現が増大し、ポプラの CAld5H 遺伝子の

発現プロファイルと類似した発現パターンを示す BAHD アシル基転移酵素ファミリー遺伝子を 2 種類見出した。

2) アスパラガスの *p*-クマロイル化酵素の候補遺伝子

エリシター処理済および未処理のアスパラガス培養細胞の RNA-seq 解析をそれぞれ行い、あわせてコンティグを作成した。その結果、22,937 種類のコンティグを得ることができた。これら全てのコンティグに対し、BLASTX 解析および Pfam モチーフ解析を行うことで、BAHD アシル基転移酵素ファミリーに属するコンティグを 23 種類見出した。そのうち、エリシター処理により RPKM 値が大幅に増加するコンティグを 4 種類見出し、これらをアスパラガスのノルリグナン合成に関与する *p*-クマロイル化酵素をコードする候補遺伝子に相当するコンティグとしてさらに解析を進めることとした。

3) アスパラガスの *p*-クマロイル化酵素の大腸菌による異種発現

4 種類の候補遺伝子のうち、2 種類の候補遺伝子については、相当する組換え酵素が大腸菌破碎液の可溶性画分に見出された。また、1 種類の候補遺伝子は、本研究開始以前にエリシター処理したアスパラガス培養細胞から調製した cDNA ライブラリーをスクリーニングした際に単離された cDNA と同一であり、*Pichia pastoris* による組換え酵素発現により、ヒドロキシシナモイルトランスフェラーゼ (HCT) をコードすることが見出されていた。

組換え酵素が大腸菌破碎液の可溶性画分に見いだされた 2 種類の遺伝子のうち、1 種類については、*p*-クマロイル化する活性を示すことが LC-MS による分析により示され、対応する遺伝子を *Asparagus officinalis p-hydroxycinnamoyl CoA: monolignol transferase (AoPMT)* と命名した。

4) AoPMT とケイヒ酸/モノリグノール経路上の酵素遺伝子の発現プロファイル

RNA-seq 解析により、AoPMT だけでなく関連する代謝酵素遺伝子の発現プロファイルを代謝経路上にマッピングすることにより、エリシター処理によって *p*-クマロイル化 *p*-クマロイルおよび *cis*-ヒノキレジノール生合成に関わると示唆されるケイヒ酸/モノリグノール生合成経路上の酵素遺伝子が示された。さらにエチレン合成酵素である ACC オキシダーゼやエチレン応答性転写因子である ERF 転写因子、ジャスモン酸応答性タンパク質である JAZ、また WRKY 転写因子など、病傷害応答に関わると示唆される酵素や転写因子、シグナルタンパク質の遺伝子発現が顕著に増大していることが見出された。

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4件)

Soichiro Noda, Taichi Koshiba, Takefumi Hattori, Masatoshi Yamaguchi, Shiro Suzuki, Toshiaki Umezawa, The expression of a rice secondary wall-specific cellulose synthase gene, *OsCesA7*, is directly regulated by a rice transcription factor, OsMYB58/63, *Planta*, 査読有、242 巻、2015、589-600

Shiro Suzuki, Takao Koeduka, Akifumi Sugiyama, Kazufumi Yazaki, Toshiaki Umezawa, Microbial production of plant specialized metabolites, *Plant Biotechnology*, 査読有、31 巻、2014、465-482

Shiro Suzuki, Hideyuki Suzuki, Recent advances in forest tree biotechnology, *Plant Biotechnology*, 査読有、31 巻、2014、1-9

Takao Koeduka, Shiro Suzuki, Yoko Iijima, Toshiyuki Ohnishi, Hideyuki Suzuki, Bunta Watanabe, Daisuke Shibata, Toshiaki Umezawa, Eran Pichersky, Jun Hiratake, Enhancement of production of eugenol and its glycosides in transgenic aspen plants via genetic, *Biochemistry and Biophysics Research Communications*, 査読有、436 巻、2013、73-78

[学会発表](計3件)

Soichiro Noda, Taichi Koshiba, Masatoshi Yamaguchi, Takefumi Hattori, Shiro Suzuki, Toshiaki Umezawa, Functional characterization of rice MYB transcription factors involved in secondary cell wall biosynthesis, *Polyphenols Communications* 2014、XXVIIth International Conference on Polyphenols & 8th Tannin Conference、2014、323

鈴木史朗、鈴木秀幸、山村正臣、服部武文、梅澤俊明、アスパラガスの *p*-クマロイル CoA: *p*-クマリルアルコール転移酵素遺伝子の探索、第 64 回日本木材学会大会研究発表要旨集、2014、185

母利大地、鈴木史朗、山村正臣、服部武文、三上文三、梅澤俊明、アスパラガス *cis*-ヒノキレジノール合成酵素 サブユニットの結晶化、第 31 回日本植物細胞分子生物学会(札幌)大会・シンポジウム講演要旨集、2013、198

[図書](計1件)

鈴木史朗、チオグリコール酸リグニン法、植物細胞壁実験法、石井忠、石水毅、梅澤俊明、加藤陽治、岸本崇生、小西照子、松永俊朗編著、弘前大学出版会、2015、119-122

[産業財産権]

出願状況(計0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0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

<http://www.rish.kyoto-u.ac.jp/lmsfpm/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

鈴木 史朗 (SUZUKI, Shiro)
京都大学・生存圏研究所・助教
研究者番号：70437268

(2)研究分担者

梅澤 俊明 (UMEZAWA, Toshiaki)
京都大学・生存圏研究所・教授
研究者番号：80151926

(3)連携研究者

鈴木 秀幸 (SUZUKI, Hideyuki)
かずさ DNA 研究所・機器分析グループ長
研究者番号：80276162

肥塚 崇男 (KOEDUKA, Takao)
山口大学・農学部・助教
研究者番号：30565106