

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26660143

研究課題名(和文)細菌のリグナン変換反応を利用したリグニン芳香核組成の単純化

研究課題名(英文)Simplification of lignin aromatic composition by bacterial lignan transformation systems

研究代表者

梅澤 俊明 (Umezawa, Toshiaki)

京都大学・生存圏研究所・教授

研究者番号：80151926

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：ドラフトゲノム配列が公表された嫌気性ヒト腸内細菌の *Blautia producta* ATCC27340 株により、リグナンの一種であるセコイソラリシレジノールおよびマタイレジノールの芳香核メトキシ基が脱メチル化されることを示した。また、同菌による脱メチル化は、マタイレジノールよりセコイソラリシレジノールの方が早く進行すること、マタイレジノールではB環芳香核メトキシ基の脱メチル化が優先的に生じることを示した。ゲノム配列解析の結果、同菌はテトラヒドロ葉酸依存性の芳香核メトキシ基の脱メチル化反応に必要な4種類のタンパク質をコードするクラスターを1個有することが見出され、これらの相補的DNAを取得した。

研究成果の概要(英文)：A human intestinal bacterium *Blautia producta* ATCC27340, whose draft genomic sequence has been released, demethylated two lignans, secoisolariciresinol and matairesinol. The bacterium demethylated secoisolariciresinol faster than matairesinol, and aromatic B-ring of matairesinol was preferentially demethylated. Analysis of draft genome of the bacterium revealed that the genomic sequence contained a cluster that encoded four proteins required for tetrahydrofolate-dependent demethylation of aromatic methoxyl groups. We obtained the complementary DNAs of the four proteins to set up lignan demethylation assay using the recombinant proteins.

研究分野：植物代謝機能化学

キーワード：リグニン リグナン 芳香核 単純化

1. 研究開始当初の背景

木質(リグノセルロース)は、地球上に蓄積するバイオマスの9割以上を占め、食料と競合せず、カーボンニュートラルな再生可能資源であることから、その利活用が次世代再生可能資源利用技術開発において喫緊の課題となっている。ここで、木質多糖の利用技術開発は既に実用段階のものが多く、リグニンの大規模利用は、過去数十年に亘りパルプ廃液リグニンの燃料や分散剤としての利用等に限られており、高付加価値利用に至っていない。しかし、化石資源の枯渇、先般の原発事故以来の安全な資源・エネルギー供給に対する世界的な希求度の高まり、近年の様々な技術革新など、社会的背景の多面的な変化に伴い、今や、リグニンの有効利用法の開拓をあらゆる角度から再度総合的に進めることが強く求められている。

リグニンの有効利用は大変チャレンジングな課題であり、その難しさは、主にリグニンの構造の複雑さとそれに起因する単離の難しさ等に由来する。近年のリグニン有効利用研究のマッピングを行うと、リグニンの新規分解・変換利用法の開拓に関する研究が殆どである。一方、研究代表者らは、これらの研究とは全く異なる観点であるリグニン構造の単純化を目指し、原料リグニンそのものの構造の単純化を目的としたリグニン生合成の代謝工学研究を進めてきた。加えて、リグニン構造の単純化を果たす未開拓の反応の探索を続けた結果、研究代表者は、リグニンと類似の構造を持つ低分子化合物のリグナンがヒトや動物の腸内嫌気性菌叢により変換される際の反応の有用性に気づいた。すなわち、この反応は、芳香核のメトキシ基の脱メチル化とフェノール性水酸基の還元脱離による発がん抑制活性成分(エンテロリグナン類)の生成であり、リグニン芳香核構造の単純・単一化に有望、且つ従来全く未検討である

2. 研究の目的

本研究では、リグナンの1)脱メチル・脱水酸化酵素の相補的DNAの取得、および2)脱メチル・脱水酸化酵素反応のリグナンに対する適用、さらに、3)リグニンそのものの哺乳動物生体内での変換、の3点に関し、基盤的知見を得ることを目的とする。

3. 研究の方法

本研究では、リグニン由来分子芳香族化合物の芳香核組成の単純化に向けた基盤確立をめざし、従来未開拓の腸内菌叢のリグナン代謝反応系や細菌由来の既知の芳香核修飾酵素を用い、リグニンの芳香核構造の単純化を図る。具体的な研究方法は、以下のとおりである。(1)リグナン芳香核上のメトキシ基の脱メチル化およびフェノール性水酸基の還元除去を触媒する酵素をコードする相補的DNAを、腸内細菌などから取得する。

(2)組換え酵素並びに元の細菌によるリグナンのメトキシ基の脱メチル化およびフェノール性水酸基の還元除去に取り組む。(3)リグニンを哺乳動物に摂取させ、排泄されたリグニンの芳香核構造および側鎖構造を調べ、リグニンの生体内における化学構造変換につき精査する。以上の実験に基づき、リグニン系低分子化合物の芳香核の構造単純化に基づく、リグニンの新規利用に向けた基盤構築を図る。

4. 研究成果

哺乳動物腸内細菌によるリグニンおよびリグナンの変換

酵素遺伝子の機能解析に必要な基質として、植物系食品原料(アマ種子)中に高濃度で含まれるリグナン(セコイソラリレジノールジグルコシド)を入手した。さらに、リグニンをウメ果実の内果皮より大量に調製した。

次いでウメ内果皮リグニンをマウスに給餌し、採取した排泄物におけるリグニン構造を解析した。給餌前のリグニンに比べ、マウス体内を経たリグニン構造の芳香核組成は、グアイアシルリグニンが減少していることが示された。また、リグニンの側鎖構造の解析では、体内を経たリグニンの側鎖構造はグアイアシルリグニンに豊富な -0-4 及び -5 構造が減少しており、一方、シリリングリグニンに豊富な -1 構造も減少していた。-1 構造は酸に不安定なことから胃などで分解した可能性が考えられた。一般に、リグニンは哺乳動物体内で消化されないと考えられてきたが、本研究結果においてリグニン構造の変化が示されたことから、哺乳動物体内におけるリグニン消化の可能性が示唆された。

Sphingomonas 属細菌による芳香核変換反応

長岡技術科学大・政井らの研究グループは、パルプ廃液から単離された細菌 *Sphingomonas pautimobilis* SYK-6 株から得られた2種類の相補的DNAがそれぞれコードするテトラヒドロ葉酸依存性酵素が、リグナンやリグニンと同じ芳香核構造を有するパニリン酸やシリング酸の芳香核メトキシ基の脱メチル化を触媒することを示している。そこで、これらの酵素が同様な芳香核を有するリグナン類の芳香核メトキシ基の脱メチル化反応を触媒する可能性を考えた。まず、政井らから、これらの組換え酵素を発現する大腸菌の恵を受け、液体培養中に組換え酵素の発現誘導を行い、大腸菌体内に組換えタンパク質を発現させた。次に、嫌気条件のテトラヒドロ葉酸存在下、大腸菌細胞を破碎して得られた上清と各種リグナン類、パニリン酸、シリング酸を個別に基質としてインキュベートし、酵素反応液からの有機層抽出物をトリメチルシリル誘導体化後、ガスクロマト

グラフ-質量分析計にて分析した。その結果、バニリン酸やシリンガ酸は、既報通り芳香核メトキシ基が脱メチル化されたが、リグナン類の芳香核メトキシ基は脱メチル化されなかった。

腸内細菌のゲノム配列解析に基づく脱メチル・脱水酸化酵素の推定

そこで、既報の芳香族化合物の芳香核メトキシ基の脱メチル化酵素および脱水酸化酵素、リグナンの芳香核メトキシ基の脱メチル化反応および脱水酸化反応を行う腸内細菌の種類、さらに、ゲノム配列が解読されている腸内細菌の種類につき、データベース検索したところ、以下の点が明らかとなった。

- 1) *S. pautimobilis* の有する脱メチル化酵素とは異なり、嫌気条件下において3~4種類のタンパク質が関与するテトラヒドロ葉酸依存性の芳香核メトキシ基脱メチル化酵素が存在する。また、*p*-ヒドロキシ安息香酸を脱水酸化する酵素が細菌から同定されている。
- 2) リグナン芳香核メトキシ基の脱メチル化およびその後の脱水酸化は別々の腸内細菌が行う。
- 3) ゲノム配列が明らかとなっている嫌気性腸内細菌のうち、リグナン芳香核メトキシ基の脱メチル化を行う細菌は、*Eubacterium limosum* および *Blautia producta* であり、脱水酸化を行う細菌は、*Eggerthella lentha* である。

次に、上記3種類のゲノム配列から予想された全タンパク質配列に対し、1)の既知酵素のアミノ酸配列との比較解析を行った。その結果、*E. limosum* および *B. producta* においては、アミノ酸レベルで既知芳香核メトキシ基の脱メチル化酵素と比較的高い相同性を有するタンパク質が見いだされた。一方、*E. lentha* においては既知芳香核水酸基の脱水酸化酵素と高い相同性を示す酵素は見いだされなかった。なお、*B. producta* においては、テトラヒドロ葉酸依存性脱メチル化反応に必要な4種類のタンパク質をコードした1個のクラスターがゲノム上に見出された。

Blautia producta ATCC27340 株によるリグナン芳香核メトキシ基の脱メチル化

の結果より、脱メチル化酵素に焦点を絞り、ドラフトゲノム配列が解読されている腸内細菌の *Blautia producta* ATCC27340 株を理化学研究所より入手し、この菌株が実際にリグナンの芳香核メトキシ基の脱メチル化を行うかどうかを確認することとした。

まず、リグナン芳香核の脱メチル化反応において生成する標準物質を有機合成した。2つのメチル基が脱離したジデメチルセコイソラリシレジノールおよびジデメチルマタイレジノールを合成した。さらに、マタイレジノールの2つの芳香核上メトキシ基のうち、片方のメチル基が脱離した2種類の異性

体の有機合成を行った。続いて、これらの標準物質を用いてガスクロマトグラフ-質量分析計を用いた分析条件を決定すると共に、*B. producta* ATCC27340 株の嫌気的固体培養系および液体培養系を立ち上げた。

次に、嫌気液体培養系にセコイソラリシレジノールやマタイレジノールを投与し、経時的に生成物をガスクロマトグラフ-質量分析計での分析に供することにより、中間体であるデメチルセコイソラリシレジノール及びデメチルマタイレジノールを経て、最終産物であるジデメチルセコイソラリシレジノールおよびジデメチルマタイレジノールが生成することを見出した。なお、マタイレジノールの場合、B環上のメトキシ基が優先的に脱メチル化されることを見出した。また、セコイソラリシレジノールとマタイレジノールを各々培養液に同時に投与してからこれらの完全脱メチル化物が生成し始める時間を比較すると、セコイソラリシレジノールを投与した場合の方がはるかに短いことから、セコイソラリシレジノールの方がより容易に *B. producta* によって芳香核メトキシ基の脱メチル化を受けやすいことが示唆された。

最後に、セコイソラリシレジノールを投与後2時間が経過して脱メチル化反応が進行している状態の *B. producta* 菌体を回収・洗浄・破砕し、既報のテトラヒドロ葉酸依存性芳香族脱メチル化酵素のアッセイ条件に準じ、得られた破砕液上清とセコイソラリシレジノールの脱メチル化酵素アッセイを行ったが、活性は見いだされなかった。

そこで、現在、で見出した *B. producta* 脱メチル化酵素遺伝子クラスターにコードされている4種類のタンパク質の相補的DNAを取得し、現在、これらの相補的DNAを組み込んだ4種類の大腸菌用組換えタンパク質発現ベクターを構築している。今後、嫌気条件下のテトラヒドロ葉酸存在下で、得られた4種類の組換えタンパク質を混合し、さらにセコイソラリシレジノールと反応させて脱メチル化された生成物同定を行う予定である。

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)

[学会発表](計3件)

梅澤 俊明、ヒトと動物に対するリグニンの生理機能の解明と利用、新領域開拓シンポジウム 2014、2014.11.26~27、京都大学、京都

梅澤 俊明、河田 照雄、柴田 大輔、内海 龍太郎、戸田 清太郎、久留 菜美、山村 正臣、飛松 裕基、林 晃大、鈴木 史朗、食物リグニンの生理作用の解明、第288回生存圏シンポジウム、第6回 DASH/FBAS 全国共同利用成果報告会、2015.6.14、京都大学、宇治

久留 菜美、鈴木 史朗、内海 龍太郎、梅澤 俊明、*Blautia producta* ATCC27340 におけるリグナン 0-デメチラーゼ候補遺伝子の探索、日本農芸化学会 2017 年度京都大会、2017.3.17~2017.3.20

〔その他〕

ホームページ等

京都大学生存圏研究所森林代謝機能化学分野ホームページ

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

6. 研究組織

(1)研究代表者

梅澤 俊明 (UMEZAWE, Toshiaki)

京都大学・生存圏研究所・教授

研究者番号：8 0 1 5 1 9 2 6

(2)研究分担者

鈴木 史朗 (SUZUKI, Shiro)

京都大学・生存圏研究所・助教

研究者番号：7 0 4 3 7 2 6 8

(3)連携研究者

内海 龍太郎 (UTSUMI, Ryutaro)

近畿大学・農学部・教授

研究者番号：2 0 1 5 1 9 1 2

柴田 大輔 (SHIBATA, Daisuke)

かずさ DNA 研究所・産業基盤開発研究部・部長

研究者番号：1 0 3 7 0 9 2 5