

研究成果報告書

所属機関
長岡技術科学大学

職名
准教授

氏名
上村 直史

研究テーマ

リグニンからのプラスチック原料生産を促進するバイオセンサーの開発

研究報告

1. 研究の背景と目的

植物バイオマスはカーボンニュートラルな資源であり、セルロース、ヘミセルロース、リグニンから成る。セルロースは紙・パルプ、セルロースナノファイバー、最近ではバイオ燃料に、ヘミセルロースは甘味料、医薬品に利用されているが、リグニンのみ、その複雑な化学構造から燃焼以外に有効な利用法は見出されていない。世界は脱炭素社会の実現に向けて変革を迫られており、リグニンを石油の代わりにプラスチック等のポリマー系素材の原料として利用することが期待されている。その戦略として有望視されているのが、図1に示す「リグニンの化学分解」「生成する低分子芳香族ミクスチャーの微生物変換によるポリマー原料生産」「重合によるバイオマスプラスチック生産」である（上村ら, *Current Opinion in Biotechnology*, 2019）。

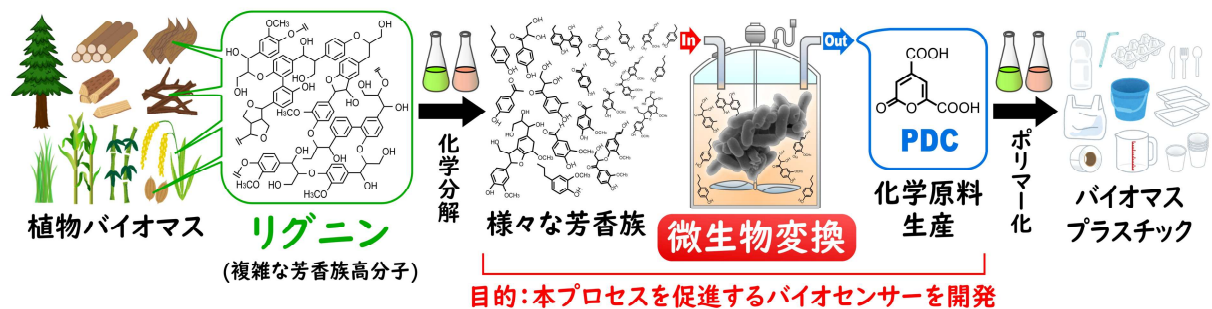


図1. 微生物変換を利用したリグニンからのポリマー系素材生産

当研究グループはリグニンの化学分解で生産される様々な構造の芳香族化合物を分解・代謝する、*Sphingobium lignivorans* SYK-6株（以後SYK-6株）を単離し、そのリグニン由来芳香族の分解経路や遺伝子を多数明らかにしてきた（上村ら, *Environmental Microbiology Reports* 2017）。現在、SYK-6株はリグニン分解のモデル細菌として位置付けられるに至っている。SYK-6株は、多様なリグニン由来芳香族を2-ピロン-4,6-ジカルボン酸（以後PDC）に収束させて代謝できる。PDCはピロン環に2つのカルボキシル基が置換した擬芳香族化合物で（図1）、ポリアミド、ポリエステル、ポリウレタンなどの生分解性ポリマーや高機能性ポリマーへと導くことができる有望なプラットフォームケミカルである（道信ら, *Polymer Journal*, 2009, vol 41など）。我々は、多様なリグニン由来芳香族を分解できるSYK-6株の遺伝子を改変したPDC蓄積株（ $\Delta ligI$ 株）を宿主に用いることで、針葉樹材(スギ)のソーダ/酸素蒸解で得られるリグニン分解物から高収率でPDCを生産できることを見出した。

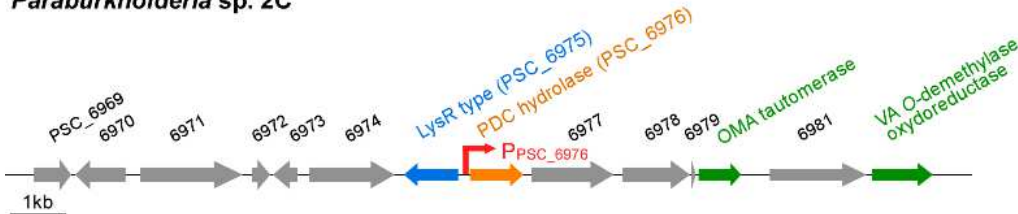
一方、最近開発された技術として、有価物の生産宿主を改良するための有望変異株のスクリーニングにバクテリアセンサーを利用する手法が注目されている。バクテリアセンサーは、目的代謝産物に応答する転写制御因子をコードする遺伝子（制御遺伝子）、その制御プロモーター、及び蛍光タンパク質遺伝子で構成され、特定の代謝産物の濃度をリアルタイムかつハイスループットに評価できる。しかし、これまでにPDC応答性の転写制御因子の報告例はない。本研究は、SYK-6株のPDC生産能を改良することを狙い、PDC応答性の転写制御因子とその制御プロモーターを探索し、PDCセンサー細菌を開発することを目的とした。

2. 研究成果および考察

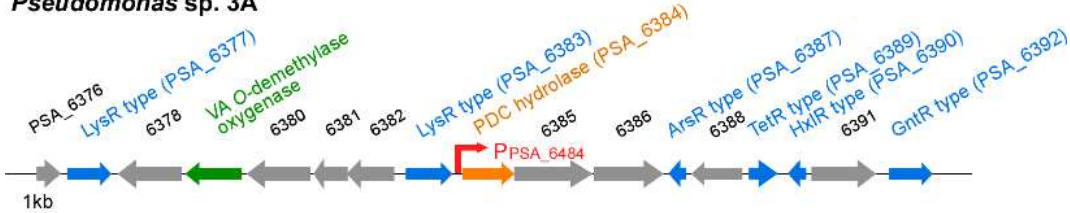
PDCを資化できるバクテリアがPDC応答性の転写制御システムを持つと予想し、はじめにPDCを単

一炭素源として生育可能なバクテリアの探索を行なった。腐朽木材や森林土壌等の環境試料を26箇所から採取し、PDCを単一炭素源として生育する細菌を82株単離した。次に、PDC応答性の転写制御システムを持つ株を絞り込むために、PDC変換活性がPDCでの培養により誘導されるかどうかについて調査を行なった。その結果、*Paraburkholderia* sp. 2C株、*Pseudomonas* sp. 3A株、*Burkholderia* sp. 3C株、*Cupriavidus* sp. 8B株、*Novosphingobium* sp. 11B株において顕著なPDC変換活性の誘導が見られた。これら5株のドラフトゲノムを決定した結果、いずれの株も既知のPDC hydrolase遺伝子と40%以上のアミノ酸配列同一性を持つ遺伝子を保持していた。推定PDC hydrolase遺伝子の近傍に存在する制御遺伝子がPDC応答性の転写制御に関わると予想し、調査した結果、図2のとおり、周辺にLysR型転写制御因子などの転写制御因子と相同性を示す遺伝子が見出された。

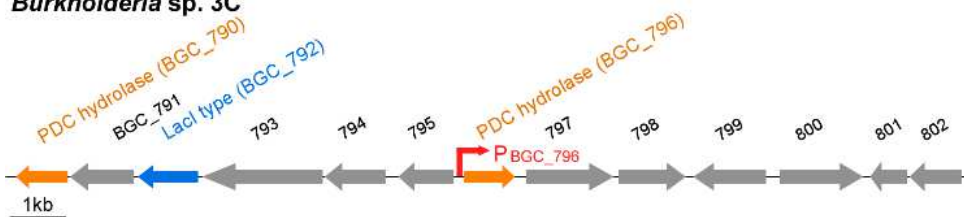
Paraburkholderia sp. 2C



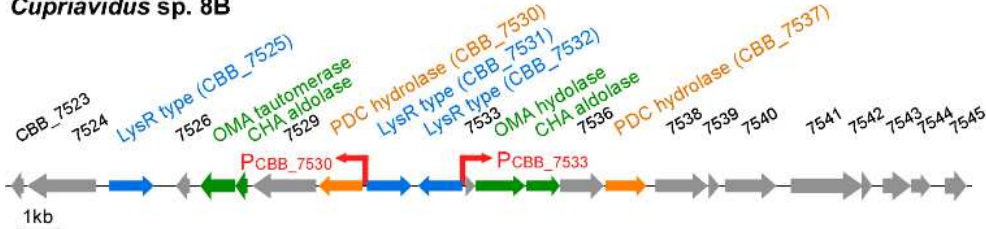
Pseudomonas sp. 3A



Burkholderia sp. 3C



Cupriavidus sp. 8B



Novosphingobium sp. 11B

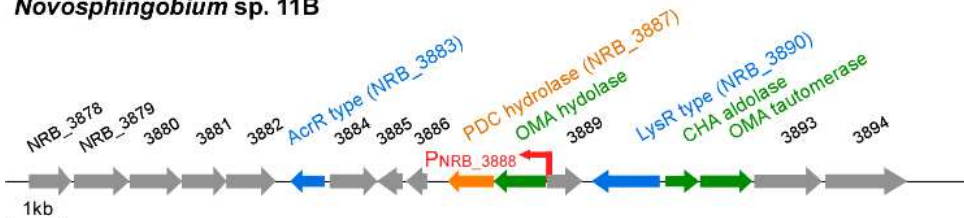


図2. 推定PDC hydrolase遺伝子の近傍の遺伝子マップ。

推定PDC hydrolase遺伝子を橙色、PDC代謝に関連すると推定される代謝系遺伝子を緑色、転写制御因子をコードすると推定される遺伝子を青色で示す。PDCで誘導されると予想される推定PDC hydrolase遺伝子のプロモーターを赤色の折れ矢印で示す。

各株由来の制御遺伝子と推定PDC hydrolase遺伝子のプロモーター領域を用いたレポータープラスミドを作製し、SYK-6株由来のPDC蓄積株である Δ ligI株に保持させることでセンサー候補株を作出した。各候補株をPDCの存在下及び非存在下で培養した結果、*Cupriavidus* sp. 8株由来のLysR型転写制

御遺伝子であるCBB_7531と推定PDC hydrolase遺伝子CBB_7530のプロモーター領域を用いたプラスミド、pCu-LysR1-P1を保持した Δ ligIセンサー候補においてvector controlを保持した Δ ligIよりも顕著なPDCへの応答性が見られた(図3A)。また、本センサーについて、PDCを代謝過程で生成するリグニン由来芳香族化合物である、バニリン、バニリン酸、プロトカテク酸での培養時に応答性が見られるかどうかを検証した結果、図3Bに示す通り、いずれも応答が見られた。このことは、本センサーの宿主であるSYK-6株の代謝能によりリグニン由来芳香族化合物から生産されたPDCに対してセンサーが応答したことを強く示唆する。

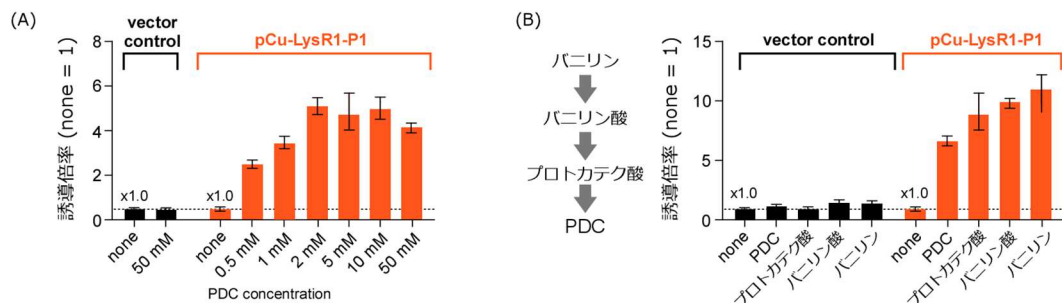


図3. pCu-LysR1-P1を保持する Δ ligI株のPDCおよびリグニン由来芳香族代謝時の応答性

3. 将来展望

本研究で開発した Δ ligI(pCu-LysR1-P1)センサーは、PDCに対して濃度依存的に蛍光強度(図3Aの誘導倍率)の増大が見られたことから、生産されたPDCの濃度を定量的に測定できることが示唆された。このことは、pCu-LysR1-P1を Δ ligI等のPDC生産宿主に保持させることにより、リグニン由来芳香族化合物での培養時にPDCの生産速度と濃度を評価できる能力を付与できると考えられる。今後は、図4に示すとおり、 Δ ligIのランダム変異ライブラリーや適応的実験室内進化により作出した育種株にpCu-LysR1-P1を保持させ、96ウェルプレート等でリグニン由来芳香族化合物を基質に培養するとともにPDC生産に由来する蛍光をモニターすることで、PDC生産能が改良された株をハイスループットにスクリーニングできると期待される。PDC生産能の改良は、生産速度の向上と生産能濃度の向上が挙げられる。生産速度の向上としては、リグニン由来芳香族化合物の代謝に関わる基質取り込みトランスポーター遺伝子、代謝酵素遺伝子、及び制御遺伝子への変異が想定され、取り込み速度の向上、酵素反応速度の向上、及び代謝系遺伝子の転写量の向上が期待される。生産濃度の向上としては、黒液等に含まれる野生株が変換できない化合物の変換能が付与される、休眠している代謝酵素遺伝子の発現を誘発する変異や、既知酵素の特異性が広がる変異が想定される。

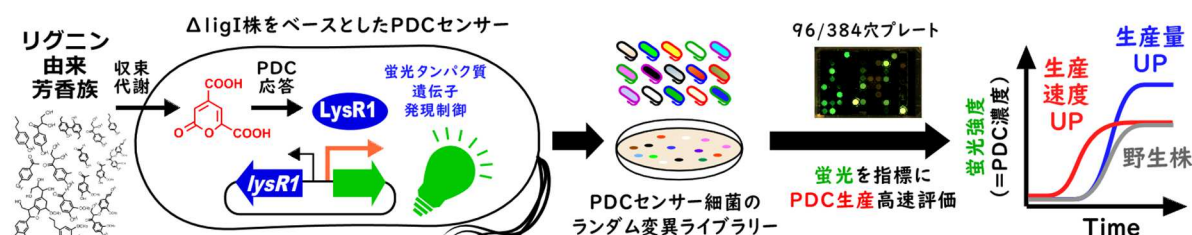


図4. pCu-LysR1-P1を用いたセンサー細菌によるハイスループットスクリーニング

4. 研究発表

2023年7月22日 第63回新潟生化学懇話会(新潟県新潟市)

リグニン由来芳香族化合物からのポリマー原料生産菌の改良を狙ったバクテリアセンサー

2023年11月9日 第68回リグニン討論会(新潟県長岡市)

リグニン由来芳香族化合物からポリマー原料を生産する細菌株の改良を狙ったバクテリアセンサー

2024年5月30日 環境バイオバイオテクノロジー学会2024年度大会(宮崎県宮崎市)

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

2024年9月8日(要旨受理済み) 2nd International Lignin Symposium(国際会議)

Development of a bacterial sensor for a polymer building block enhancing biological lignin valorization