

第3回（2023年度）リグニン学会賞  
梶田 真也（東京農工大学大学院生物システム応用科学府）  
「リグニン生合成の改変に関する分子生物学研究」

The Lignin Society Prize for 2023

Shinya KAJITA

Graduate School of Bio-Applications and Systems Engineering

Tokyo University of Agriculture and Technology

Genetic manipulation of lignin biosynthesis

1990年3月東京農工大学農学部林産学科卒業，1992年3月東京農工大学大学院農学研究科林産学専攻修士課程修了，同年4月三菱製紙（株）入社，2000年7月東京農工大学大学院生物システム応用科学研究科助手，2002年9月～2003年8月ポールサバティエ大学客員研究員，2004年4月星薬科大学薬学部衛生薬学科助手，2005年1月東京農工大学大学院生物システム応用科学府助教授，2015年4月同教授



### 研究の概要

木材の主要な三つの化学成分のうち、セルロースとヘミセルロースは前駆体である糖ヌクレオチドから高分子に至るまで一貫して酵素が触媒する生化学的な反応の下で生合成される。一方、リグニンは単量体としてのモノリグノールの合成とその酸化によるラジカル生成までは酵素が関与するものの、その後起こるラジカル同士の結合を介した分子鎖の伸長には、いかなるタンパク質も関与しないと考えられている。厳密な構造制御の観点からするとやや疎漏にも感じられるこのリグニン生合成の最終段階のしくみは、細胞壁の機能発現に重要なだけでなく、人為的なリグニンの分子構造改変の鍵を握っている。リグニンは主にヒドロキシケイ皮アルコール類に代表されるモノリグノールが逐次重合して生成するが、これ以外にヒドロキシケイ皮アルデヒド類やヒドロキシケイ酸類、さらにフェノール性水酸基を持つ様々な二次代謝物が部分構造としてリグニンに取り込まれる。

#### 1. リグニン生合成に関わる酵素遺伝子の発現抑制によるリグニンの分子構造改変

モノリグノールの生合成に関わる4-クマロイル CoA リガーゼ（4CL）の遺伝子断片を、縮重プライマーを用いたPCRによりタバコから単離した。また、同遺伝子の発現を抑制することでリグニン量が減少すると共に、その分子構造が変化した遺伝子組換えタバコを作出することに成功した<sup>1)</sup>。現在までに多数の植物種で4CL遺伝子の発現抑制によるリグニン改変が報告されているが、上記の研究は最初の成功例である。さらに、当該組換えタバコに含まれるリグニンの分子構造を熱分解 GC/MS や <sup>13</sup>C-NMR を用いて解析すると共に、モノリグノール生合成に関わる4つの酵素の抗体を用いて組換えタバコの免疫組織化学的な評価を行うことにより、リグニン構造が木部でキメラ状に変化していることを明らかにした<sup>2,3)</sup>。これらに加え、小スケールでのクラフト蒸解やECF漂白により、組換えタバコの木部チップの易蒸解性や得られたパルプの易漂白性も明らかにした<sup>4)</sup>。

#### 2. 異種遺伝子の発現によるリグニン、リグナンの分子構造改変

担子菌由来のラッカーゼ<sup>5)</sup>や異種生物に由来する転写因子<sup>6)</sup>、低分子芳香族化合物の生分解に

関わる細菌由来の酵素の遺伝子<sup>7-10)</sup>を利用して、シロイヌナズナやポプラでリグニンの分子構造やリグナン組成の改変を行った。具体的には、リグニン中の $\beta$ -O-4構造の側鎖 $\alpha$ 位の水酸基を特異的に酸化するC $\alpha$ -デヒドロゲナーゼをシロイヌナズナに導入し、塩基性条件下でリグニン中の $\beta$ -O-4結合の開裂に寄与するC $\alpha$ -ケト構造を僅かながら増やすことに成功した<sup>8)</sup>。また、リグニンの分子構造改変への寄与が期待できる多くの酵素遺伝子をスクリーニングにかけ、木質の糖化性を向上させる複数の遺伝子を同定した<sup>10)</sup>。さらに、ピロリ菌のシキミ酸リン酸化酵素をポプラで高発現させることにより、G核やS核の生成に重要なカフェオイルシキミ酸の生成を抑制させ、H核単位構造の増加を伴うリグニンの分子構造改変に成功した<sup>11)</sup>。この代謝改変はリグニン含有量の減少を伴わないにもかかわらず、木材の酵素糖化性を向上させた。

### 3. 「赤材桑」のリグニン変異体としての再発見

次世代シーケンサーを用いたゲノム解析や2次元NMRを用いたリグニン構造解析などにより、大正時代に奥尻島で発見されたクワの「赤材桑(せきざいそう)」が、モノリグノール生合成の最終段階に関わるシンナミルアルコールデヒドロゲナーゼ(CAD)の遺伝子を欠損した自然突然変異体であることを独自に突きとめた<sup>12,13)</sup>。また、「赤材桑」の木材が、他のクワ品種や他樹種の木材に比較してパルプ蒸解性に優れ、かつ高い酵素糖化性を備えていることも明らかにした<sup>14)</sup>。リグニン構造を異にする変異体としてはトウモロコシやソルガムの***brown mid-rib***変異体がよく知られているが、木本植物では報告例が極めて少なく、「赤材桑」におけるCAD変異の発見は本邦初の、世界でも三番目のリグニン構造が顕著に変化した木本の自然突然変異体に関する事例である。

- 1) Kajita, S., Katayama, Y., Omori, S., Alterations in the biosynthesis of lignin in transgenic plants with chimeric genes for 4-coumarate:coenzyme A ligase. *Plant Cell Physiol.*, **37**, 957-965 (1996).
- 2) Kajita, S., Hishiyama, S., Tomimura, Y. *et al.*, Structural characterization of modified lignin in transgenic tobacco plants in which the activity of 4-coumarate:coenzyme A ligase is depressed. *Plant Physiol.*, **114**, 871-879 (1997).
- 3) Kajita, S., Mashino, Y., Nishikubo, N. *et al.*, Immunological characterization of transgenic tobacco plants with a chimeric gene for 4-coumarate:CoA ligase that have altered lignin in their xylem tissue. *Plant Sci.*, **128**, 109-118 (1997).
- 4) Kajita, S., Ishifuji, M., Ougiya, H. *et al.*, Improvement in pulping and bleaching properties of xylem from transgenic tobacco plants. *J. Sci. Food Agric.*, **82**, 1216-1223 (2002).
- 5) Nasrin, Z., Yoshikawa, M., Nakamura, Y. *et al.*, Overexpression of a fungal laccase gene induces non-dehiscent anthers and morphological changes in flowers of transgenic tobacco. *J. Wood Sci.*, **56**, 460-469 (2010).
- 6) Nuoendagula, Tsuji, Y., Takata, N. *et al.*, Change in lignin structure, but not in lignin content, in transgenic poplar overexpressing the rice master regulator of secondary cell wall biosynthesis. *Physiol. Plant.*, **163**, 170-182 (2018).
- 7) Kajita, S., Honaga, F., Uesugi, M. *et al.*, Generation of transgenic hybrid aspen that express a bacterial gene for feruloyl-CoA hydratase/lyase (FerB), which is involved in lignin degradation in *Sphingomonas paucimobilis* SYK-6. *J. Wood Sci.*, **50**, 275-280 (2004).
- 8) Tamura, M., Tsuji, Y., Kusunose, T. *et al.*, Successful expression of a novel bacterial gene for pinoresinol reductase and its effect on lignan biosynthesis in transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **98**, 8165-8177 (2014).
- 9) Tsuji, Y., Vanholme, R., Tobimatsu, Y. *et al.*, Introduction of chemically labile substructures into *Arabidopsis* lignin through the use of LigD, the C-dehydrogenase from *Sphingobium* sp strain SYK-6. *Plant Biotech. J.*, **13**, 821-832 (2015).
- 10) Sakamoto, S., Kamimura, N., Tokue, Y. *et al.*, Identification of enzymatic genes with the potential to reduce biomass recalcitrance through lignin manipulation in *Arabidopsis*. *Biotech. Biofuels*, **13**, 97 (2020).
- 11) Hu, S., Kamimura, N., Sakamoto, S. *et al.*, Rerouting of the lignin biosynthetic pathway by inhibition of cytosolic shikimate recycling in transgenic hybrid aspen. *Plant J.*, **110**, 358-376 (2022).
- 12) Hachisuka, H., Fukuda, S., Iwase, M. *et al.*, Detection protocol for a mutant allele on the *CINNAMYL ALCOHOL DEHYDROGENASE 1* locus of the *Morus* species and search trial for the allele in the natural mulberry population of Okushiri island. *Lignin*, **1**, 42-50 (2020).
- 13) Yamamoto, M., Tomiyama, T., Koyama, A. *et al.*, A century-old mystery unveiled: Sekizaisou is a natural lignin mutant. *Plant Physiol.*, **182**, 1821-1828 (2020).
- 14) Ikeda, T., Takata, N., Sakamoto, S. *et al.*, Improved chemical pulping and saccharification of a natural mulberry mutant deficient in cinnamyl alcohol dehydrogenase. *Holzforchung*, **75**, 968-977 (2021).