

平成 30 年 6 月 28 日現在

機関番号：24201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07517

研究課題名(和文) プロテインキナーゼA触媒サブユニット遺伝子過剰発現によるリグニン分解系誘導の機構

研究課題名(英文) A study of analysis and utilization of ligninolysis induced by over-expression of a catalytic subunit of protein kinase A.

研究代表者

入江 俊一 (IRIE, TOSHIKAZU)

滋賀県立大学・環境科学部・准教授

研究者番号：30336721

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究により、プロテインキナーゼAが白色腐朽菌のリグニン分解機構発現において重要な役割を果たすことが強く示唆された。リグノセルロース資源のバイオマス変換を行うカスタム菌開発の一環として、ヒラタケの新規選択マーカー遺伝子(ノーセオスリシン耐性遺伝子)の開発に成功した。また、ピアラホス耐性遺伝子によるヒラタケ形質転換効率の向上にも成功した。雑草からの養殖用飼料作成に活用できるカスタムヒラタケ株作成を目的として、ヒラタケの窒素代謝抑制機構を調べた。その結果、ヒラタケにも子囊菌類と同様なAreA(nit2)による窒素代謝抑制システムがあることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Results of this study collectively suggest that protein kinase A has an import role for expression of ligninolysis in white-rot fungi. Novel selectable maker gene, nourseothricin resistant gene was successfully used for transformation of *Pleurotus ostreatus*. In addition, the efficiency of *P. ostreatus* transformation using bialaphos-resistant gene as a selectable maker was improved by our new method. With the aim of construction of custom recombinant strain of *P. ostreatus* used for conversion of weeds to fish feeds, nitrogen-catabolite repression system of the fungus was analyzed. As the result, it is suggested that *P. ostreatus* also has a nitrogen-catabolite repression system regulated by AreA (nit2) like as that in ascomycete.

研究分野：応用微生物学

キーワード：リグニン きのこと 白色腐朽菌 バイオマス変換

1. 研究開始当初の背景

木質バイオリファイナリー工程において、全体の効率に大きく影響する段階の一つはリグニンの処理である。物理化学的な方法でリグニンを分解または分離することが可能であるが、必要となるエネルギーや薬品コストへの対応が実用化のための主な課題となっている。白色腐朽菌がもつリグニン分解能を利用した生物的方法は省エネルギー的で薬品コストも殆ど発生しないが、反応時間が長いことが一番の問題となっている。天然のリグニン高分解性白色腐朽菌を分離・利用する試みも行われているが、さらに高い効率を付与する分子育種的手段を開発することも重要である。しかし、白色腐朽菌におけるリグニン分解系の詳細は発現調節機構を含めて大部分が未解明であり、最適な育種計画策定のための基本的情報が不足している状態である。

研究代表者は白色腐朽菌 *Phanerochaete chrysosporium* や *Pleurotus ostreatus* (ヒラタケ) のリグニン分解系発現に関するシグナル伝達経路について研究を行ってきた。具体的には、cAMP の外部添加や組換えを利用した cAMP の高生産によりリグニン分解酵素の一部が高発現することを明らかにした。また、cAMP が CaM (カルモデュリン) の転写を誘導していることを明らかにし、ヒラタケにおいては、CaM がリグニン分解系を負に、*P. chrysosporium* においては正に調節することを示唆する研究結果を得た。CaM 遺伝子発現抑制によりヒラタケにおけるリグニン分解能の向上が期待されたが、CaM が極性生長 (菌糸伸長) にも関与していたため、生育異常が生じて木材分解速度がむしろ減少した。また、CaM 遺伝子過剰発現によりヒラタケの木質リグニン分解能は予想通り減少したが、野生型 (PC9 株) との差は少なく (2 割程度)、CaM 経路がリグニン分解系発現に及ぼす影響は限定的であることが示唆された。一方、別の cAMP 下流因子である PKAc がヒラタケのリグニン分解系に対して正の制御を行っていることも明らかにした。PKAc 遺伝子 (*PKAc1* および *PKAc2*) 過剰発現株のリグニン分解効率は野生型 (PC9 株) の 2 倍以上で、リグニンの選択的分解性も数倍に増加していた (研究業績 2)。また、ヒラタケが持つ主要リグニン分解酵素マンガネルオキシダーゼ (MnP)、万能型ペルオキシダーゼ (VP)、ラッカーゼ (Lac) のアイソザイム遺伝子群 (PC9 株においては全 19 遺伝子) のほとんど (18 遺伝子) について PC9 株より転写レベルで過剰発現していることも判明した。以上のことは PKAc 経路がリグニン分解系発現において主要な働きをしていることを示唆している。PKAc 遺伝子過剰発現株においては既知のリグニン分解酵素遺伝子群のみならず、未知の重要遺伝子群も誘導されている可能性が非常に高い。

2. 研究の目的

これまでの解析より、PKAc はヒラタケ目ヒラタケのリグニン分解系における主要発現調節因子の一つと考えられる。ヒダナシタケ目の白色腐朽である *P. chrysosporium* について現在までのところ再現性の高い形質転換系が存在しないため遺伝子導入実験が行えないが、本研究では同じ属の *Phanerochaete sordida* において PKAc 遺伝子を過剰発現させ、ヒラタケと同様の木質リグニン分解能向上を確認することを目的の一つとした。さらに、*P. chrysosporium* におけるリグニン分解酵素発現時の CaM 相互作用遺伝子を検出するため、ファージディスプレイ法を行った。また、ヒラタケの新規選択マーカー遺伝子の開発、雑草の飼料へのバイオマス変換を目的としたヒラタケ窒素代謝抑制機構の解析についても調べた。

3. 研究の方法

供試ヒラタケ菌株としては PC9 株 (1 核体)、#261 株 (2 核体) を用いた。供試 *P. sordida* 株としては、YK614 株から *URA5* を欠損させた UV64 株を用いた。遺伝子導入法はヒラタケ、*P. sordida* それぞれで使用されている常法を用いた。木質リグニン分解試験は、200 ml 容三角フラスコに、35-60 メッシュのブナ木粉を 2 g と 10 ml の ddH₂O を加えた培地に植菌し、30 日間静置培養したのち、クラソンリグニン重量を測定した。ファージディスプレイ法は、大腸菌で *P. chrysosporium* CaM-His を発現、生成した後、それをプラスチックシャーレに固定、cDNA 断片由来ペプチドをキャプシドタンパク質にディスプレイしたライブラリをスクリーニングした。検出された配列はヒラタケ全ゲノムデータと照合し、遺伝子を特定した。

4. 研究成果

RNAi 効果により *PKAc1* 遺伝子の転写物量が 30 分の 1 に減少したヒラタケ株を作成したところ、リグニン分解効率が有意に減少した (Fig.1)。*P. sordida* UV64 株を宿主としてヒラタケ *PKAc1* および *PKAc2* 遺伝子を過剰発現させたところ、ヒラタケと同様にリグニン分解速度の向上が観察された (Fig. 2 (注; Fig.1 と異なり残存量で示している))。

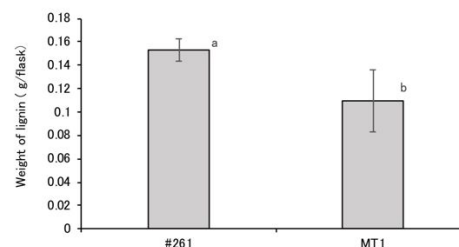


Fig.1 野生型#261 株と PKAc1 発現抑制株 MT1 株のリグニン分解量
測定は各菌株4反復ずつ行った。エラーバーは標準偏差を表す。異なる記号がつけられた株の均値間にはP<0.05水準で有意差があることを意味する。

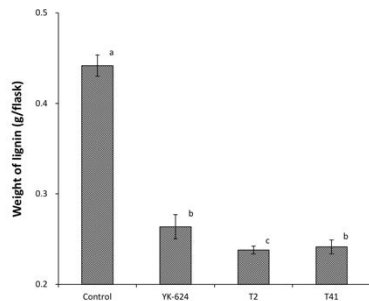


Fig. 2 野生型 YK-624 株と *PKAc1* 過剰発現株 (T2) *PKAc2* 過剰発現株 (T41) のリグニン残存量

以上の結果は、これまでの報告を支持しており、さらに、白色腐朽菌のリグニン分解における *PKAc* 遺伝子の関与はハラタケ目のみならずヒダナシタケ目にも範囲が及ぶ、菌叢専門の白色腐朽菌に一般的な現象であることが示唆された。

ファージディスプレイ法を用いた *P. chrysosporium* CaM 相互作用タンパク質遺伝子の検索を行ったところ、100 遺伝子が検出された (Table 1)。そのうち、最大頻度で検出されたアルドケトリダクターゼ遺伝子を大腸菌で発現、精製し、タンパク質の性質を解析したところ、2 量体を形成する NADPH 依存性のキシロースリダクターゼであることが示された。また、プルダウン法において精製タンパク質との CaM との結合性も確認できたが、CaM の結合は活性に有意な変化をもたらさなかった。

Table 1 検出された CaM 相互作用タンパク質候補 (一部)

protein ID	count	Putative function
3030943	37	Dimeric aldo-keto reductase
2919749	8	Oxysterol-binding protein
2919481	5	Hypothetical protein
2237660	4	Hypothetical protein
3030014	4	Dienelactone hydrolase
2959786	3	Zinc-containing alcohol dehydrogenase superfamily
3010314	3	S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase

本研究ではハラタケへの多重的遺伝子導入を伴うが、研究開始当初は、そのために必要な選択マーカー遺伝子が少なかった。そこで、ハラタケにおける新たな選択マーカー遺伝子の開発を行った。その結果、ノーセオスリン耐性遺伝子を用いたハラタケ形質転換に初めて成功した。また、従来からハラタケ形質転換に利用されていたピアラホス耐性遺伝子の形質転換効率を 27 倍に向上させた。

リグノセルロースの効率的バイオマス変換が本研究の最終的な目標である。その一環として、飼料作成のための発酵システム開発に使用可能なカスタムハラタケ株作成を目指し、ハラタケにおける窒素代謝抑制機構の解析を行った。ハラタケのプロテアーゼ活性発現はグルタミンにより効率的に抑制され、子嚢菌と同様の窒素代謝抑制機構が担子菌にも存在することが示唆された。しかし、アンモニアでは抑制効果が少ないこと、尿素でも効率的に抑制可能であることなど、子嚢菌における既知の観察とは

異なる点も観察された。窒素代謝抑制機構の主要調節遺伝子 *AreA* のホモログをハラタケ全ゲノムデータから取得し、クローン化した。

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)

- (1) Toyokawa C, Shobu M, Tsukamoto R, Okamura S, Honda Y, Kamitsuji H, Izumitsu K, Suzuki K, Irie T (2016) Effects of overexpression of *PKAc* genes on expressions of lignin modifying enzymes by *Pleurotus ostreatus*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 80(9):1759-1767
- (2) Nakazawa, T., Tsuzuki, M., Irie, T., Sakamoto, M., Honda, Y. (2016) Marker recycling via 5-fluoroorotic acid and 5-fluorocytosine counter-selection in the white-rot agaricomycete *Pleurotus ostreatus*. *Fungal Biol.* 120(9):1146–1155.
- (3) Matsunaga, Y., Ando, M., Izumitsu, K., Suzuki, K., Honda, Y., Irie, T. (2017) A development and an improvement of selectable markers in *Pleurotus ostreatus* transformation. *J Microbiol Methods.* 134: 27-29
- (4) Sato, T., Irie, T., Yoshino, F. (2017) Heterologous expression of the *Pleurotus ostreatus MnP3* gene by the laccase gene promoter in *Lentinula edodes*. *Biosci Biotechnol Biochem.* 81(8): 1553-1556

[学会発表] (計 5 件)

- (1) 安堂慈、松永有佳理、泉津弘佑、鈴木一実、入江俊一 (2016) ハラタケにおける新規選択マーカー遺伝子の開発, 第 66 回日本木材学会大会 (名古屋大学), 平成 28 年 3 月 27 日~平成 28 年 3 月 29 日.
- (2) 左近静香、阪本鷹行、泉津弘佑、鈴木一実、入江俊一 (2016) *Phanerochaete chrysosporium* における CaM 相互作用性アルドケト還元酵素, 日本菌学会第 60 回大会 (京都大学), 平成 28 年 9 月 15 日~平成 28 年 9 月 17 日.
- (3) 井本篤志、栗山和也、左近静香、阪本鷹行、泉津弘佑、鈴木一実、入江俊一 (2017) *Phanerochaete chrysosporium* における aldo-keto 還元酵素 AKR1, 日本農芸化学会 2017 年度大会 (京都女子大学), 平成 29 年 3 月 17 日~平成 29 年 3 月 20 日.
- (4) 井本篤志、樽林俊樹、杉浦省三、泉津弘佑、鈴木一実、入江俊一 (2017) ハラタケ処理を用いた配合飼料原料としてのクズ性能の向上, 環境微生物系学会合同大会 2017 (東北大学), 平成 29 年 8 月 29 日~平成 29 年 8 月 31 日.

- (5) 湯村直樹、中沢威人、大沼広宜、泉津弘佑、入江俊一、福田泰久、白坂憲章、坂本正弘、本田与一 (2017) 白色腐朽菌ヒラタケにおける GH10・GH11 の機能喪失がリグニン分解に及ぼす影響について, 第 62 回リグニン討論会 (名古屋大学), 平成 29 年 10 月 26 日~平成 29 年 10 月 27 日.

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.usp.ac.jp/gakubu/kankyo/gakubu/seibutsu/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

入江 俊一 (IRIE, Toshikazu)

滋賀県立大学・環境科学部・准教授

研究者番号 : 3 0 3 3 6 7 2 1