

令和 4 年 5 月 26 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03017

研究課題名(和文) エピジェネティクをキーワードにした、木材腐朽菌の基礎および応用研究の新展開

研究課題名(英文) Frontier studies on wood decaying fungi in the keyword "epigenetics"

研究代表者

中沢 威人 (Nakazawa, Takehito)

京都大学・農学研究科・助教

研究者番号：80608141

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：白色腐朽菌ヒラタケにおいて、ヒストンH3のK4もしくはK36のメチル化レベルの改変が木質分解酵素遺伝子群の転写に及ぼす影響を調査した。その結果、これらの修飾レベルの改変によって、セルロース分解酵素遺伝子群の転写の一挙活性化もしくは不活性化が発生することが示唆された。ヒストンH3K4メチル化レベルを低下させるccl1破壊株におけるrho1b遺伝子の高発現が、いくつかのセルロース分解酵素遺伝子の転写活性化の原因の一つであることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

木材腐朽菌の分解酵素遺伝子群は、培養条件によって転写レベルで調節されていることが昔から知られていた。転写調節の分子機構の解明は、人為的な木材分解制御(分解能の改変)に重要である。しかし、分子遺伝学研究がほとんど行われておらず、ほとんど明らかになっていなかった。本研究では、これらの障壁を打ち破り、突破口を見出した。

研究成果の概要(英文)： Our previous study implied that histone H3 N-dimethylation at lysine 4 level possibly affects the shift; therefore, we analysed the expression pattern in *P. ostreatus* ccl1 disruptants in which the methylation level was decreased. The results showed upregulation of some cellulolytic enzyme-encoding genes. We also examined the effects of H3K36 methylation. Upregulation of seven cellulolytic enzyme-encoding genes, including the four upregulated in the ccl1 disruptants, was observed in the K36A mutant strains of hst3a, the major histone H3-encoding gene. Unlike in the ccl1 disruptants and hst3a K36A mutants, downregulation of at least four cellulolytic enzyme-encoding genes abundantly expressed in 20b was observed in the gene disruptants of kdm4 encoding a putative H3K36 demethylase.

研究分野：木質科学

キーワード：木材腐朽菌 リグニン セルロース ヒストン 糸状菌 バイオマス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

代表者の先行研究では、白色腐朽菌ヒラタケ野生株であるPC9株由来のプロトプラストにUV変異を導入し、リグニン分解能と相関を示す色素(Orange II および RBBR)脱色能が喪失した株をスクリーニングした。当研究が開始するまでに、合計4つの原因遺伝子変異(*chd1*, *wtr1*, *pex1*, *gat1*)を同定した。さらに、*hir1*も原因遺伝子であることが示唆されていた。これら5つの遺伝子変異株(もしくは原因遺伝子の破壊株)をブナ木粉培地で培養したところ、*wtr1*破壊株を除く4株において、親株と比較して顕著なリグニン分解能の低下が観察された。

その後、リグニン分解不全変異株における転写変動を解析するため、脱脂ブナ木粉培地で培養し、RNA-seq解析を行なった。結果、全ての変異株において、この培養条件で転写レベルが高いリグニン分解に関わる酵素遺伝子の顕著な転写不活性化が観察された。同時に、*wtr1*破壊株以外の4変異株では、多くのセルロース分解酵素遺伝子群(GH6, GH7, AA9の全40個中9~13個)の顕著な活性化が観察された。

当研究では、リグニン分解不全の原因遺伝子として同定された5遺伝子のうち2個(*hir1*及び*chd1*)が、クロマチン構造変換因子をコードすると考えられたことに注目し、ヒストン修飾が木質分解酵素遺伝子群の転写に及ぼす影響を解析した。

### 2. 研究の目的

代表者の先行研究成果を踏まえて“エピジェネティック”(本研究では、ヒストン分布および修飾)をテーマにして、腐朽菌を用いた基礎・応用研究を展開する。基礎研究では、近年の代表者によるヒラタケでの先行研究知見を踏まえて、クロマチン構造変換が木質分解酵素遺伝子の転写に及ぼす影響を調査する。本研究では、その要因の一つであるヒストンH3のメチル化の影響を調査することとした。また、白色腐朽菌によるリグニン分解機構には多様性があることを踏まえて、先行研究においてヒラタケで発見した知見が、他の白色腐朽菌にも当てはまるかを調査するために、選択的的白色腐朽菌と呼ばれヒラタケとは進化的に離れている *Ceriporiopsis subvermispora* で遺伝子変異株を作出し、リグニン分解能を調査することとした。応用研究として、ゲノムワイドなエピジェネティック情報に基づいた生合成工学を目指した検討を行うこととした。腐朽菌を用いて木材を処理しつつ、高付加価値な生理活性物質(低分子)を高生産させる。

### 3. 研究の方法

ヒラタケ野生株 PC9 由来の *ku80* 破壊株である 20b 株から調製したプロトプラストに、相同組換えを用いて標的遺伝子を破壊するためのカセット(形質転換マーカ―は、ハイグロマイシンもしくはピアラフォス耐性遺伝子)を導入することで、遺伝子破壊株を作成した。標的とする遺伝子を高発現させる場合は、*β-tubulin* プロモーター下流に標的遺伝子の ORF 全長および 3' 領域を含む塩基配列をつなげた発現カセットおよび形質転換マーカ―の両端に、*fcy1* 遺伝子座の 5' および 3' 領域の配列を持つプラスミドを作成した。このプラスミド中の相同組換えカセッ

トを 20b 株に導入することで、高発現カセットおよび形質転換マーカが *fcyl* 遺伝子座に導入される。このことは、形質転換株が 5-FC 耐性となることを確認することで容易に調査することができる。また、狙った遺伝子の ORF 中への点変異も、相同組換えによって導入した。最終的に、狙った通りに破壊もしくは高発現カセットが導入された形質転換体であることは、ゲノム PCR を行なって確認した。

CRISPR/Cas9 を用いたゲノム編集によって、*C. subvermispora* の野生モノカリオン株である FP-90031Sp/1 に対して遺伝子変異の導入を試みた。この際、ウシグソヒトヨタケならびにヒラタケの CRISPR/Cas9 に用いられるプラスミド pCcPef3-126 をベースとした用いた。このプラスミドには、Cas9, sgRNA ならびにハイグロマイシン耐性遺伝子の発現カセットを有する。得られたハイグロマイシン耐性形質転換体において、ゲノム PCR および DNA シーケンスを行なって、標的遺伝子に変異が導入された株を選抜し、その変異部位を決定した。

これらの作製した遺伝子破壊株もしくは変異株（および親株）を、トルエン・エタノールで脱脂したブナ木粉培地（含水率 75%、脱脂小麦ふすま 1.3% w/w）上で静置培養したサンプルを用いて、定量 RT-PCR もしくは RNA-seq を行い、リグニンおよびセルロース分解酵素遺伝子の転写蓄積量を比較した。また、ヒストン修飾レベルを解析するために、抽出タンパク質を用いたウエスタンブロッティングならびにクロマチン免疫沈降（ChIP）解析を行った。これらの実験では、ヒラタケは培養 13 および 20 日目に、*C. subvermispora* は 10 および 20 日目にサンプルをそれぞれ回収した。*C. subvermispora* におけるリグニン分解能の調査の際には、ブナ木粉培地（粒径 250~500  $\mu\text{m}$ 、含水率 75%、脱脂小麦ふすま 1.3% w/w）上で 11、20 日間静置培養したサンプルを回収し、ルエン・エタノールで脱脂した。その後、Klason 法に従って残存リグニン量を求め、プレートあたりのリグニン減少量を計算した。

ヒラタケにおける天然物生産を試みるため、単独で orsellinic acid を合成するウシグソヒトヨタケのポリケタイド合成遺伝子（CC1G\_05377）をヒラタケで、 $\beta$ -*tubulin* プロモーターを用いて発現させた。YMG 液体培地中で浸透培養後、酸性条件下で酢酸エチル抽出を行い、HPLC で分析した（254 nm でモニター）。

#### 4. 研究成果

ヒラタケにおけるヒストン H3 の 4 番目のリジン残基のメチル化（H3K4Me）レベルの低下が木質分解酵素遺伝子群の転写に及ぼす影響を調査するため、真核生物で保存されている COMPASS 複合体の構成因子をコードすると考えられる *ccl1* 遺伝子の破壊株を作出した。この破壊株における H3K4Me レベルの低下を確認するため、抗 H3K4diMe もしくは H3K4triMe の異なる抗体を用いてウエスタンブロッティングを行った。これらの抗体を用いた場合のシグナル強度を、抗ヒストン H3 抗体を用いた場合のシグナル強度で標準化し、*ccl1* 破壊株と親株 20b 株の間で比較した。結果、シグナル強度は *ccl1* 破壊株で低く、特に H3K36triMe は 20b 株の 1/10 程度であり、修飾レベルの低下が示唆された。続いて、木質分解酵素遺伝子群の転写への影響を調査する

ため、*ccl1* 破壊株および親株 20b 株から抽出した RNA を用いて、RNA-seq 解析ならびに定量 RT-PCR 解析を行った。結果、*ccl1* 破壊株ではリグニン分解系酵素遺伝子の転写の変動はみられなかったが、リグニン分解不全変異株で転写活性化したセルロース分解遺伝子 (9~13 個) のうち 5 個が転写活性化していた。これらの遺伝子活性化にヒストン修飾が直接的に関与しているかを調査するために、脱脂ブナ木粉培地上で 13 日間培養した *ccl1* 破壊株および *hir1* 破壊株 (リグニン分解不全化株) を用いて ChIP 解析を行った。結果、これら 2 つの遺伝子破壊株では、親株と比較して一部の多糖分解酵素遺伝子の 5' 上流領域の H3K4diMe レベルの変動は観察されたが、転写変動を踏まえた一貫性は見られなかった。以上の結果からは、H3K4Me レベルの変動はセルロース分解酵素遺伝子の転写に直接的な影響を与えないことが示唆された。

菌類において、K4 のメチル化は、K36 のメチル化などとも連携し、転写調節に関与していることが報告されている。そこで、H3K36Me レベルの変動が転写に及ぼす影響を調査することとした。まず、上昇した株を作製するため、相同性検索から H3K36 脱メチル化酵素遺伝子と考えられる *kdm4* の破壊株を作製した。また、H3K36Me レベルが低下した株を作製するため、ゲノム上に 3 つ予測されているヒストン H3 遺伝子の中で、RNA-seq データの TPM 値 (転写産物の豊富さを示す) が全体の約 3 分の 2 を占め、主に発現していると考えられる *hst3a* の ORF 中に、3 塩基変異を相同組換えで導入し、36 番目のリジン残基をアラニンに置換した K36A 変異株を作製した。コントロール株として、変異が導入されていない相同組換え株 (H3-*hph* 株) も作製した。*kdm4* 破壊株における H3K36 のジメチル(H3K36diMe)およびトリメチル化 (H3K36triMe) レベルを調査したところ、親株と比較して H3K36triMe が約 1.4~3.5 倍に増加していた。脱脂ブナ木粉培地での転写に関しては、親株で転写量が豊富な 5 つの遺伝子の不活性化 (定量 RT-PCR では、培養 20 日目で約 1/5 から 1/61 に低下) がみられた。K36A 変異株の H3K36diMe および triMe レベルは、H3-*hph* 株と比較して、それぞれ 0.18~0.70 倍および 0.16~0.58 倍だった。脱脂ブナ木粉培地での転写を調査したところ、コントロール株で転写量の低い合計 7 つのセルロース分解酵素遺伝子の転写量が約 7~52 倍増加していた。これらの株で観察された転写変動が、遺伝子の 5' 上流もしくは ORF 領域の H3K36Me レベルの変化によって直接引き起こされたかを調査するために ChIP を行った結果を踏まえると、H3K36Me レベルの上昇 (低下) は、間接的な作用でセルロース分解酵素遺伝子群の転写に負 (正) の影響を及ぼすことが示唆された。

ヒラタケにおいて同定されたリグニン分解に重要な因子 (遺伝子) が、他の白色腐朽菌でも同様にリグニン分解に重要であるかを調査するため、ヒラタケとは木材分解機構が異なる白色腐朽菌 *Ceriporiopsis subvermispora* より、*gat1* および *pex1* の単独遺伝子変異株を作出し、遺伝子変異の影響をヒラタケの場合と比較解析した。これらの遺伝子の変異は、ヒラタケではリグニン分解能がほぼ喪失することが示されている。*C. subvermispora* で *pex1* ならびに *gat1* に相当する遺伝子変異株を作出するため、プラス

ミド導入による CRISPR/Cas9 を用いた変異導入を行った。 *C. subvermispora* の野生モノカリオン株を用いて形質転換を行い、 *gat1* もしくは *pex1* の ORF 内の gRNA 標的配列のすぐ近傍に、導入したプラスミド由来の塩基配列が挿入されていることが確認された株が、それぞれ 3 株ずつ得られた。これらの株を、 *gat1* および *pex1* 単独変異株 (*Csgat1m#1-3* および *Cspex1m#1-3*) として、以下の実験に用いた。 *C. subvermispora* 野生株をブナ木粉培地上で培養した場合、11 日目で約 17%、20 日目で 40% 以上のリグニン量が減少した。一方、 *gat1* 変異株を培養した場合は、ほとんどリグニン量が減少しなかった。 *pex1* 変異株においては、3 株中 2 株で、培養 20 日目のリグニン減少量が野生株と比較して小さかったが、ヒラタケの場合のような顕著な差ではなかった。現時点では、野生株と変異株の間において、木粉培地上での菌糸生長速度の差を比較出来ていないが、この結果からは、少なくとも *C. subvermispora* の *gat1* 変異株においては、ヒラタケの場合と同様に、リグニン分解能が顕著に低下していると考えられる。RNA-seq の結果、野生株で TPM 値が顕著に高い 3 種類のリグニン分解酵素遺伝子 (*mnp4*, *mnp6*, *mnp7*) を含む、ほとんど全ての *mnp* をコードする遺伝子の TPM 値が、今回調査した *gat1* 変異株 3 株 (#1, #2, #4) において顕著に低かった。その一方で、 *Cspex1m#1* 株では、10 日目における *mnp6* の TPM 値以外には、野生株と比較して顕著な低下はみられなかった。これらの転写発現変動は、 *gat1* および *pex1* の単独変異株のリグニン分解能の変化と符合している。以上の結果より、Gat1 は白色腐朽菌に共通してリグニン分解系に重要な転写因子である可能性が考えられる。一方で、ペルオキシソーム形成不全がリグニン分解能に及ぼす影響（もしくは、ペルオキシソームのリグニン分解系における役割もしくは寄与）は、種によって異なることが考えられる。また、いくつかのセルロースおよびキシラン分解系酵素遺伝子群の TPM 値に関しては、20 日目の *gat1* 変異株において、野生株よりも顕著に高かった。この結果からは、ヒラタケの場合と同様に、 *C. subvermispora* でもリグニン分解不全株における多糖分解酵素遺伝子の転写活性化が示唆された。

ポリケタイドの異種生産に関しては、ヒラタケにおいて CC1G\_05377 を発現させることで、保持時間および UV 吸収スペクトルを踏まえると orsellinic acid だと考えられる化合物の生産が見られた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Nguyen D.X., Nakazawa T., Myo G., Inoue C., Sakamoto M., Honda Y.	4. 巻 179
2. 論文標題 A promoter assay system using gene targeting in agaricomycetes <i>Pleurotus ostreatus</i> and <i>Coprinopsis cinerea</i> .	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J. Microbiol. Methods	6. 最初と最後の頁 106053
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.mimet.2020.106053	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Wu H., Nakazawa T., Takenaka A., Kodera R., Morimoto R., Sakamoto M., Honda Y.	4. 巻 594
2. 論文標題 Transcriptional shifts in delignification-defective mutants of the white-rot fungus <i>Pleurotus ostreatus</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 FEBS Lett.	6. 最初と最後の頁 3182-3199
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/1873-3468.13890	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Wu H., Nakazawa T., Morimoto R., Shivani, Sakamoto M., Honda Y.	4. 巻 147
2. 論文標題 Targeted disruption of <i>hir1</i> alters the transcriptional expression pattern of putative lignocellulolytic genes in the white-rot fungus <i>Pleurotus ostreatus</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Fungal Genet. Biol.	6. 最初と最後の頁 103507
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.fgb.2020.103507	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Wu H., Nakazawa T., Xu H., Yang R., Bao D., Kawauchi M., Sakamoto M., Honda Y.	4. 巻 105
2. 論文標題 Comparative transcriptional analyses of <i>Pleurotus ostreatus</i> mutants on beech wood and rice straw shed light on substrate-biased gene regulation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Appl. Microbio. Biotechnol.	6. 最初と最後の頁 1175-1190
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00253-020-11087-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Boontawon T., Nakazawa T., Inoue C., Osakabe K., Kawauchi M., Sakamoto M., Honda Y.	4. 巻 11
2. 論文標題 Efficient genome editing with CRISPR/Cas9 in <i>Pleurotus ostreatus</i> .	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 AMB Express	6. 最初と最後の頁 30
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13568-021-01193-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計8件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 中沢 威人、井上 智香子、森本 亮太、徐 海博、坂本 正弘、本田与一
2. 発表標題 Ceriporiopsis subvermisporaとヒラタケの間におけるgat1およびpex1の単独遺伝子変異がリグニン分解能および木質分解系酵素遺伝子群の転写発現に与える影響の比較解析
3. 学会等名 第66回リグニン討論会 (第3回年次大会)
4. 発表年 2020年 ~ 2021年

1. 発表者名 中沢 威人、坂 知奈美、山本 太一、河内 護之、坂本 正弘、本田与一
2. 発表標題 木質培地上でヒラタケを培養した場合にみられるリグニン分解酵素遺伝子群の転写におけるCCAAT-boxの役割
3. 学会等名 第71回日本木材学会大会
4. 発表年 2020年 ~ 2021年

1. 発表者名 奥田 希実
2. 発表標題 担子菌ヒラタケにおけるccl1遺伝子破壊がヒストン修飾および転写発現に及ぼす影響
3. 学会等名 第19回糸状菌分子生物学カンファレンス
4. 発表年 2019年 ~ 2020年

1. 発表者名 中沢 威人
2. 発表標題 Ceriporiopsis subvermisporaとヒラタケの間におけるgat1およびpex1の単独遺伝子変異がリグニン分解能および木質分解系酵素遺伝子群の転写発現に与える影響の比較解析
3. 学会等名 第70回日本木材学会大会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 中沢 威人
2. 発表標題 Comparative genetic and transcriptome analyses of pex1 and gat1 single-gene mutants between Ceriporiopsis subvermispora and Pleurotus ostreatus
3. 学会等名 15th European Conference on Fungal Genetics (国際学会)
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 呉 紅麗
2. 発表標題 Effects of mutations in hirA encoding a putative chromatin remodeler on lignin degradation and transcriptional expression of wood degrading enzyme genes in Pleurotus ostreatus
3. 学会等名 1st International Lignin Symposium (国際学会)
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 呉 紅麗
2. 発表標題 Effects of hirA disruption on extracellular cellulase and xylanase activities and histone H3K4 dimethylation in Pleurotus ostreatus
3. 学会等名 19th Asian Mycological Congress (国際学会)
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 張 雨凡
2. 発表標題 Effects of multiple disruption of putative ligninolytic enzyme genes on wood lignin degradation in Pleurotus ostreatus
3. 学会等名 1st International Lignin Symposium (国際学会)
4. 発表年 2019年～2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	坂本 正弘 (Sakamoto Masahiro)  (40303870)	京都大学・農学研究科・准教授  (14301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------