

平成 30 年 6 月 23 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K18729

研究課題名(和文) 分子遺伝学実験法の高度化が実現する、白色腐朽に重要な遺伝子の網羅的・効率的同定

研究課題名(英文) Identification of factors important for lignin biodegradation by white-rot fungi

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) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、白色腐朽菌ヒラタケを用いた順遺伝学および逆遺伝学アプローチによって、木質中のリグニン分解に重要な遺伝子の同定を試みた。新たに開発した効率的な順遺伝学実験によって、現在までに、リグニン分解能力に著しい欠陥をきたす変異遺伝子を、合計6種類同定することができた。また、主にヘミセルロース(キシラン)分解酵素であるGH10およびGH11をコードする遺伝子(合計5種類)の単独ならびに多重破壊株(最大3遺伝子破壊株)を作成し、これらのリグニン分解能力への影響を調査した。しかし現時点では、ブナ木粉培地中のリグニン分解能力が顕著に減少したものは発見できていない。

研究成果の概要(英文)：We successfully identified six genes of which mutations cause defects in the ligninolytic activity in the white-rot Agaricomycete *Pleurotus ostreatus* through an efficient forward genetics approach. About reverse genetics, we successfully created single- and double-gene disruptants of genes encoding putative xylanase, GH10 and GH11. We then examined the effects of the gene disruptions on ligninolytic activity (medium is beech wood sawdust). however, it was revealed that all of the gene disruptants we have created in this study does not cause significant defects in it.

研究分野：菌類分子遺伝学

キーワード：リグニン 木材腐朽 キノコ 担子菌 順遺伝学 腐朽菌

## 1. 研究開始当初の背景

木質バイオマスは主に、多糖であるセルロース、ヘミセルロースおよび芳香族高分子リグニンという主要三大成分と呼ばれる高分子から構成されている。これら主要成分の中でリグニンは、基本的にはフェニルプロパン (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub> ユニット) 骨格のリグニンモノマーが、結合および重合することで生合成される芳香族高分子である。このリグニンは、セルロースを被覆する形で存在している。さらにヘミセルロースの構成成分であるいくつかの糖との間で共有結合が報告されている。また、一部のヘミセルロースはセルロース繊維中の水酸基と水素結合を介して会合することで、セルロース繊維間をつなぐ役割を果たしていると考えられている。このように、木質バイオマスはセルロース、ヘミセルロース、リグニンが相互に会合しあって強固な構造を形成している。担子菌の一部である白色腐朽菌は、上述した木質中のリグニンを、単独で効率的に分解できる生物である。森林生態系における炭素循環に重要な役割を果たしている。

白色腐朽菌の中でも、木質分解機構(戦略)に多様性があるが、現時点では白色腐朽菌のゲノム上にしか存在しない(白色腐朽菌のみが分泌生産する)とされている、いわゆるリグニン酵素と呼ばれるリグニネルオキシダーゼ (LiP)、マンガンペルオキシダーゼ (MnP)、多機能型ペルオキシダーゼ (VP)が知られている一方で、各白色腐朽菌種が生産する酵素パターン(ゲノム上に保有する遺伝子パターン)に多様性があり、白色腐朽菌とされている *Schizophyllum commune* (スエヒロタケ) などでは、リグニン分解酵素をコードする遺伝子が存在しない場合もあることが報告されている。いくつかの白色腐朽菌においては、リグニン分解酵素が関与しないラジカル発生機構、メディエーターの存在、低分子化したリグニン断片を細胞内に取り

込み代謝する機構などが、同様に重要であるとも考えられている。そもそも、リグニン分解酵素と呼ばれているものは、リグニン誘導体およびモデル化合物などに対する反応性は報告されてきたが、実際の木質中のリグニンを分解していることを支持する証拠は乏しい。

本研究では、上述の先行研究を踏まえて、リグニン分解に関する一連の研究の中で、あまり行われてこなかった分子遺伝学アプローチによって、実際のリグニン分解に重要な機構を同定することを最終目標とした研究を行った。

## 2. 研究の目的

順遺伝学および逆遺伝学アプローチから、白色腐朽菌ヒラタケによる木質(ブナ木粉培地)中のリグニン分解能力に重要な遺伝子を同定することである。本研究課題では、以下のように3つのテーマを行った。(1) 順遺伝学では、ヒラタケにおいてリグニン分解能力と相関がある色素(RBBR および OrangeII) 脱色が不全化した突然変異体の原因変異遺伝子を同定すること(2)(1) で得た、色素脱色不全株について、実際の木質中のリグニンに対する分解能力を、野生株と比較

調査すること(3) 逆遺伝学では、木質中でリグニンと共有結合していることが報告されているキシラン(広葉樹ではグルクロノキシラン) 分解に関与すると考えられる主要なキシラナーゼ(GH10 および GH11) の遺伝子破壊が、木質中のリグニン分解能力に与える影響を解析することである。

## 3. 研究の方法

(1) ヒラタケ野生株 PC9 株由来のプロトプラストに UV 照射した後に再生してきたコロニーから、RBBR 脱色能力に不全をきたした突然変異体を分離した。当該実験では、YMG

寒天培地 (27  $\mu$ M  $MnSO_4$  添加) を用いた。およそ 150 から 200 株に 1 株の割合で、色素脱色能力が不全化した株が得られた。

得られた変異体を、PC9 と交配可能な PC15 株とそれぞれ交配させた二核菌系から子実体を発生させた (この二核菌系の表現型を観察することで、それぞれの変異体の変異表現型が、劣性もしくは優性であるかを確認した)。この子実体から担子胞子を分離することで、 $F_1$  子孫を得た。 $F_1$  子孫集団を用いた遺伝分析の結果、単独遺伝子の変異で変異表現型になったことが示唆された株を選抜した。

次に、簡易連鎖解析によって、原因変異が存在するゲノム領域を絞り込んだ。次に、ゲノム・リシーケンス解析を行うことで、上記領域付近に存在し、変異している遺伝子 (推定原因変異遺伝子) を発見した。劣性変異の場合は、突然変異体に対して、野生株 (PC9) 由来の正常遺伝子の導入を行なった (相補形質転換)。優性変異体に対しては、PC9 株に対して、当該変異体の推定原因変異遺伝子を導入した。また、PC9 株由来の *ku80* 破壊株である 20b を用いて、相同組換えによる遺伝子破壊実験も行なった。

(2)(1) で得た突然変異体と、推定原因変異遺伝子の破壊株におけるリグニン分解能力について、それぞれの親株である PC9 および 20b 株と比較した。

菌体外酵素活性を測定する場合は、予め脱脂したブナ木粉培地上で、各ヒラタケ株を 13 および 20 日間培養した。培養終了後、木粉培地を 0.1 M 乳酸バッファー (pH 4.5) に懸濁し、遠心して得られた上澄み液を用いて酵素活性測定 (2-メトキシフェノールの酸化活性) を行なった。当該培養条件では、 $Mn^{2+}$  非依存性ペルオキシダーゼ活性および過酸化水素非添加時の活性と比較して、ヒラタケが持つリグニン分解酵素と考えられているマンガンペルオキシダーゼ (MnP) 活性を反

映している考えられる、 $Mn^{2+}$  依存性ペルオキシダーゼ活性の活性がほとんどである。

ヒラタケ各株による、ブナ木粉培地中の木質リグニン分解能力の評価も行った。ブナ木粉培地上で、各ヒラタケ菌株を 28 日間培養した。培養終了後、まずトルエン・エタノール (2:1 v/v) を用いて脱脂処理を行った (室温にてスターラー攪拌を 1 時間 2 回)。乾燥後、残存木粉培地の重量 (菌体も含む) を正確に測定した。この一部 (約 0.5 g) を測りとり、74% (w/w) 硫酸を 7.5 ml 加えて室温で 2 時間膨潤させた。その後、250 ml の水を加えて、2 時間 120  $^{\circ}C$  オートクレーブをかけた。沈殿物を吸引するまで回収し、24 時間以上 50 $^{\circ}C$  で乾燥させた酸不溶性リグニン (Klason リグニン) 重量を正確に測定した。以上の測定値をもとに、木粉培地 1 プレートあたりの Klason リグニン量を計算した。ヒラタケ株を植菌していないプレートと比較した場合の Klason リグニン減少量を計算することで、各ヒラタケ株による木質中のリグニン分解量を評価した。

(3) GH10 および 11 をコードする遺伝子 (合計 5 遺伝子) について、ヒラタケ野生株をブナ木粉培地上で培養した場合の RNA-seq 解析データから、上述したブナ木粉培地上で転写発現が高い遺伝子を把握した上で、相同組換えによって各遺伝子を破壊した。単独だけでなく二重破壊株も作成した。また、交雑を通して三重破壊株も作成した。

以上で作成した GH10 および GH11 の単独および多重破壊株を、ブナ木粉培地および稲わら培地上で培養し、それぞれの培地中に含まれるリグニンの分解能力を、親株と比較した。実験方法は、(2) と同様に行った。

#### 4. 研究成果

(1) 現時点までに、色素脱色に不全をきたす突然変異体の原因遺伝子を 6 種類同定した。

そのうち 5 種類は劣性変異であり、1 種類は優性変異であった。本研究で同定した原因変異遺伝子として、担子菌特異的な転写因子およびエピジェネティック制御関連と考えられる遺伝子が多数であった。

(2)(1) で同定した遺伝子の破壊株の全てにおいて、ブナ木粉培地中に含まれるリグニン分解能力が低下していた。

(3) JGI のゲノムデータベースでは、ヒラタケ PC9 株のゲノム上に、推定上の GH10 をコードする遺伝子が 3 種類、推定上の GH11 をコードする遺伝子が 2 種類、それぞれ存在した。RNA-seq の情報からは、この 5 種類の遺伝子のうち、PC9 株をブナ木粉培地上で 13 日間培養した場合、3 つの遺伝子の転写産物が主に蓄積していることが把握できた。また、RNA-seq データを踏まえると、JGI のゲノムデータベース上で推定されているタンパク質の一次構造の一部が誤っていることが判明した。特に GH11 の片方は、JGI のアノテーションでは CBM を有しないと示されていたが、C 末側に CBM を有することが明らかとなった。

以上を踏まえて、PC9 由来の *ku80* 破壊派生株である 20bf3 株を用いて、まずは上述の 5 遺伝子の単独破壊株を作成し、ブナ木粉中のリグニン分解能力に与える影響を調査した。現在のところ、ゲノム中に 2 コピー存在する GH11 の片方 (Protein ID 110996) の単独破壊株で、若干のリグニン分解能力低下が観察された。しかし、遺伝子破壊株を複数株作成して確認ができていないこと、生長速度が若干遅いこと、ならびに RNA-seq のデータからみるブナ木粉培地上で培養した際の当該遺伝子の転写発現がかなり低いことから、本当に当該遺伝子破壊が、リグニン分解能力を低下させたとは断言できない。しかし一方で、当該遺伝子破壊株を稲わら培地上で培養した場合は、リグニン分解能力の減少は現時点では示されていない。現在、さらな

る確認を行うため、相補形質転換を行っている。

現在は、ブナ木粉培地上では転写量が多かった、他の GH10 および GH11 遺伝子に関しては、二重および三重破壊株を作成し、ブナ木粉培地および稲わら培地に含まれるリグニン分解能力を評価している最中である。現段階では、上述の 2 種類の培地において、リグニン分解能力を低下させる三重破壊株を見つけることができた。

## 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 2 件)

中沢威人、伊津野彩子、堀井雅人、小寺里奈、西村裕志、平山裕一郎、恒松雄太、宮崎安将、栗野達也、村口元、渡辺賢二、坂本正弘、高部圭司、渡辺隆司、井鷲裕司、本田与一、Effects of *pex1* disruption on wood lignin biodegradation, fruiting development and the assimilation of carbon sources in the white-rot Agaricomycete *Pleurotus ostreatus* and non-wood decaying *Coprinopsis cinerea*, Fungal Genetics and Biology、査読有、109巻、2017、7-15 DOI: 10.1016/j.fgb.2017.10.002

中沢威人、伊津野彩子、小寺里奈、宮崎安将、坂本正弘、井鷲裕司、本田与一、Identification of two mutations that cause defects in the ligninolytic system through an efficient forward genetics in the white-rot agaricomycete *Pleurotus ostreatus*, Environmental Microbiology、査読有、19巻、2017、261-272 DOI: 10.1111/1462-2920.13595

[学会発表](計 4 件)

Nakazawa T, Kodera R, Morimoto R, Takenaka A, Tsuji S, Nishimura H, Watanabe T, Sakamoto M, Honda Y, Cellulolytic enzyme genes are significantly upregulated by most of the

mutations that cause defects in the ligninolytic activity in the white-rot fungus *Pleurotus ostreatus*, 14th European Conference on Fungal Genetics (2018)

Nakazawa T, Honda Y, Efficient forward genetics studies to identify mutations that cause defects in the ligninolytic activity in the white-rot Agaricomycete *Pleurotus ostreatus*. Satellite workshop on Basidiomycetes in European Conference on Fungal Genetics 14 (2018)

中沢威人、小寺里奈、竹中敦紀、森本亮太、坂本正弘、本田与一、ヒラタケにおけるリグニン分解不全変異が、多糖分解関連酵素遺伝子群の転写に与える影響の解析、第68回日本木材学会大会 (2018)

湯村直樹、中沢威人、竹中敦紀、大沼広宜、泉津弘佑、福田泰久、入江俊一、白坂憲章、坂本正弘、本田与一、白色腐朽菌ヒラタケにおけるキシラナーゼ群の機能欠損が木質リグニン分解に与える影響、第17回糸状菌分子生物学カンファレンス (2017)

湯村直樹、中沢威人、大沼広宜、泉津弘、入江俊一、福田泰久、白坂憲章、坂本正弘、本田与一、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61回リグニン討論会 (2017)

〔図書〕(計0件)  
該当なし

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)  
該当なし

取得状況(計0件)  
該当なし

〔その他〕

ホームページ

<http://www.biomass.kais.kyoto-u.ac.jp/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中沢 威人 (NAKAZAWA, Takehito)  
京都大学・大学院農学研究科・助教

研究者番号：80608141

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし

(4) 研究協力者

該当なし