

令和 4 年 5 月 23 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18H02254

研究課題名(和文) 木材腐朽菌のタンパク質分泌機構の強化と新規機能の付与

研究課題名(英文) Modification of the protein secretory system in wood rot fungi

研究代表者

本田 与一 (Honda, Yoichi)

京都大学・農学研究科・教授

研究者番号：70252517

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：リグニン分解酵素の転写量を人為的に高めた場合に、それに見合う酵素活性が見られない理由としてこれまで「翻訳後調節機構」の存在が提案されてきたが、実際に解析した例はない。本課題ではこれまでに蛍光タンパク質(mCherry)やルシフェラーゼタンパク質をレポーターとして用い、ゲノムよりサーベイしてきた各細胞内小器官に存在すると考えられるタンパク質のシグナル配列と連結することで、細胞内のタンパク質分泌系路について、蛍光顕微鏡を用いて分子細胞生物学的な解析手法の開発を行った。また、木材腐朽菌におけるゲノム編集系の開発を進め、任意のゲノム編集を可能とする技術基盤の開発にも成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

持続的社会に必要な再生産可能なバイオマス資源のうちでも、木質資源は食料とも競合しない未来型の資源として注目されている。木質資源を糖化处理して様々な化成品に変換することができれば、材料や燃料として用いる他に、脱化石資源を推進できる多用途な利用が可能である。その際、糖化の妨げとなるのが、難分解性の化合物であるリグニンの存在である。このリグニンを常温常圧でエコフレンドリーに分解できるのが白色腐朽菌と呼ばれる一群のきのこの仲間である。白色腐朽菌のリグニン分解システムの強化において、組換えを用いて木材分解系を強化する事が必要であり、本研究では、そのボトルネックの解明と解決を目指して研究が行われた。

研究成果の概要(英文)：A gap has been reported repeatedly between the transcription level and actual enzyme activity in the culture filtrate during wood degradation by wood-rot fungi. And activation of protein secretion pathway is proposed to be important for acceleration of lignin degradation by these fungi. In this project, we tried to determine the potential bottle necks in the secretion system and to remove them using genome editing technique to be developed. It was suggested a post-transcriptional regulation may exist that hampers overexpression of recombinant lignin modifying enzyme genes, but there is no evidence of this kind of regulation. We made various chimeric fluorescent proteins combined with potential signal peptides from proteins that may exist in organelle of protein secretion pathway. And successfully observed these organelle using marking dyes. Moreover, we have developed the first genome editing system in wood rot fungi, introducing CRISPR/Cas9 system in *Pleurotus ostreatus*.

研究分野：森林生化学

キーワード：木材腐朽菌 リグニン分解 タンパク質分泌系

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

木材腐朽菌による木質分解酵素の生産に関する研究では、従来、遺伝子発現(転写)と、実際に分泌生産される酵素量との間にギャップがあり、タンパク質分泌系の機能強化が重要であることが指摘されてきた。白色腐朽菌による木材の分解については、これまでの研究により、菌体外に分泌される一群の酵素により高分子基質の脱重合が開始されることが示されてきた。申請者らは白色腐朽菌ヒラタケを用いて、遺伝子組換え系の開発に成功し、リグニン分解の鍵となる組換えマンガンペルオキシダーゼの発現・高生産、環境汚染物質の分解、変異解析等の成果を挙げた。その中で、プロモーターの付け替えにより強制的に遺伝子の転写量を高めた場合でも、菌体外酵素の分泌量は、相関しないことが明らかになった。このような木質分解酵素発現における「翻訳後調節」と呼ばれるものの実態解明に関する研究は皆無である。一般に分泌酵素はゴルジ体で連続的な糖鎖修飾を受け、構造を安定化される。しかし、ゲノム解析から、殆どの木材腐朽菌が属する真正担子菌には真核生物に共通なゴルジ体での糖鎖修飾に関する酵素遺伝子群が、存在していないことが明らかになった。最近、申請者らは独自に、木材腐朽菌のタンパク質分泌系の解析や機能の改変・強化に必要な効率のよい順遺伝学手法や遺伝子ターゲティング系、レポーター遺伝子の開発に成功した。

### 2. 研究の目的

本研究課題では、申請者らが開発した多様な分子遺伝学研究ツールを用いることで、腐朽菌のタンパク質分泌系のボトルネックとなり得るステップ(群)について明らかにし、ゲノム改変によるネックの解消を行って分泌タンパク質の高生産が可能な株の育種を行う。具体的には、申請者らが独自に開発した多重遺伝子ターゲティング系を用いて、蛍光レポータータンパク質を用いることで、木材腐朽菌のタンパク質分泌系のボトルネックとなるステップを明らかにすると共にゲノム改変による機能増強を行うことを目的とした。

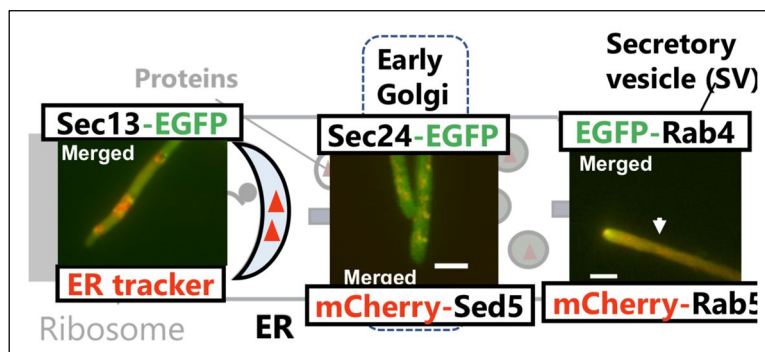
### 3. 研究の方法

酵母や子囊菌類に属する糸状菌でそれぞれゴルジ体および小胞体への局在が報告されている Sec24 や Sec13 タンパク質と蛍光タンパク質 EGFP のキメラタンパクをコードする組換え遺伝子を作成し、ヒラタケに形質転換導入を行った。まず Sec24-EGFP が GE に局在するかを確かめるため、GE への局在が推測される mCherry-Rer1 もしくは mCherry-Sed5 (mCherry は赤色蛍光タンパク質) をそれぞれ、Sec24-EGFP と共にヒラタケ野生株 PC9 で発現させ、蛍光顕微鏡観察を行った。次に、Sec13-EGFP が小胞体に局在するかを確かめるため、Sec13-EGFP 発現株に対し、小胞体を赤色蛍光で染色する ER tracker で処理して観察を行った。また AP を可視化するため、多くの真核生物での例を参考にし、ヒラタケゲノム上に予測される 2 つのパラログ Atg8a および Atg8b について、mCherry-Atg8a もしくは mCherry-Atg8b をそれぞれ PC9 株で発現させ、観察を行った。さらに、オートファジー経路中で AP と融合するリソソームを緑色蛍光で染色する Lyso tracker で処理した。また、オートファジー機能の欠損が、ヒラタケ自身の分泌タンパク質の生産量に及ぼす影響を解析するため、AP 形成に重要とされる atg9 破壊株を作出した。親株である野生株 20b 株と atg9 破壊株を、液体培地で 8、11、14 日間静置培養した後、グアイアコールを基質とする  $Mn^{2+}$  依存性ペルオキシダーゼ (MnP) 活性測定および菌体外タンパク質の SDS-PAGE を行った。

### 4. 研究成果

木材腐朽菌による木質分解酵素の生産に関する研究では、従来、遺伝子発現(転写)と、実際に分泌生産される酵素量との間にギャップがあり、タンパク質分泌系の機能強化が重要であることが指摘されてきた。本研究課題では、申請者らが開発した様々な分子遺伝学研究ツールを用いることで、腐朽菌のタンパク質分泌系のボトルネックとなり得るステップ群) について明らかにし、ゲノム改変によるネックの解消を行って分泌タンパク質の高生産が可能な株の育種を目指す。リグニン分解酵素の転写量を人為的に高めた場合に、それに見合う酵素活性が見られない理由としてこれまで「翻訳後調節機構」の存在が提案されてきたが、実際に解析した例はない。本課題ではこれまでに蛍光タンパク質(mCherry)やルシフェラーゼタンパク質をレポーターとして使い、ゲノムよりサーベイしてきた各細胞内小器官に存在すると考えられるタンパク質のシグナル配列と連結することで、細胞内のタンパク質分泌系路について、蛍光顕微鏡を用いて分子細胞生物学的に解析を行った。また、木材腐朽菌におけるゲノム編集系の開発を進め、任意のゲノム編集を可能とする技術基盤の開発にも取り組んだ。

具体的には、白色腐朽菌ヒラタケの木質成分分解酵素の分泌系の各ステップについて解析し、ポトルネック解消による分泌系強化を目指して、木材腐朽菌では初めてとなる分泌型のレポータータンパク質発現系を開発した。この成果については、国内の学会および上海で開催された第9回きのこの生物学と生産物に関する国際会議にて発表を行った。さらに、本レポーター系を用いて、様々な分泌タンパク質から分泌シグナルとして機能していると予想されるアミノ酸配列についてその分泌活性の測定と、細胞内貯留の有無について解析を進めた。また、細胞内の分泌系の各ステップに関わる細胞内小器官毎のマーカートンパク質の探索を行って、蛍光タンパク質により細胞内小器官を標識するマーカの作成にも成功している。例えば、蛍光顕微鏡観察の結果、GEへの局在が推測される mCherry-Sed5 および mCherry-Rer1 は、ともにパッチ状の赤色蛍光が観察された。さらに Sec24-EGFP の緑色蛍光は、mCherry-Sed5 の赤色蛍光とほぼ重複していたが、mCherry-Rer1 の蛍光とはほとんど重複していなかった。したがって、ヒラタケでは Sed5 と Sec24 は GE 中の同じ区画に、Rer1 は別区画に分布することが示唆された。続いて、小胞体への局在が推測される Sec13-EGFP の緑色蛍光は、ER tracker 由来の赤色蛍光と接して観察され、Sec13 の小胞体近傍への局在が示唆された。



APに局在の予測される mCherry-Atg8 に関しては、Atg8a では、Sed5 や Rer1 の場合よりも大きな粒状の赤色蛍光が観察され、Atg8b では同様の粒状の蛍光の他、繊維状の蛍光も観察された。さらに、Lyso tracker 由来の緑色蛍光は、mCherry-Atg8a および mCherry-Atg8b の一部の赤色蛍光との重複が観察され、ヒラタケにおける Atg8 の AP への局在が支持された。また、Atg8a と Atg8b の局在は同一ではなく、オートファジーにおける役割が異なることも示唆された。オートファジー機能欠損株の解析については、20b と atg9 破壊株の間で、菌体外 MnP 活性およびタンパク質分泌量の顕著な差がみられなかった。このため、オートファジー機能の欠損により異種タンパク質の分泌生産量は向上するが、リグニン分解酵素を含む、ヒラタケ自身の分泌タンパク質の生産量は増加しないことが示唆された。

一方で、分子育種をより効果的、安全に進める研究ツールとして、木材腐朽菌に CRISPR/Cas9 を用いたゲノム編集系の導入を進めた結果、モデル木材腐朽菌ヒラタケにおいて Cas9 タンパク質および標的遺伝子の gRNA をコードする組換えプラスミドを用いたゲノム編集システムの開発に成功し、さらに *in vitro* で Cas9 タンパク質と gRNA を会合させたものを直接プロトプラストに導入する技術の開発に成功した。この結果は、将来の木材腐朽菌によるタンパク質分泌系の解明とその制御を可能にする画期的なものである。これらの成果は、国際学術雑誌 *AMB Express* 誌および *FEMS Microbiology Letters* 誌で論文発表されたほか、以下に記載する国内外の学会で一般講演および招待講演により多数報告された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Boontawon Tatpong, Nakazawa Takehito, Inoue Chikako, Osakabe Keishi, Kawauchi Moriyuki, Sakamoto Masahiro, Honda Yoichi	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 1-1
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 -

1. 著者名 Boontawon Tatpong, Nakazawa Takehito, Xu Haibo, Kawauchi Moriyuki, Sakamoto Masahiro, Honda Yoichi	4. 巻 368
2. 論文標題 Gene targeting using pre-assembled Cas9 ribonucleoprotein and split-marker recombination in <i>Pleurotus ostreatus</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 FEMS Microbiology Letters	6. 最初と最後の頁 1-1
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/femsle/fnab080	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 -

〔学会発表〕 計14件（うち招待講演 4件 / うち国際学会 11件）

1. 発表者名 Yoichi Honda
2. 発表標題 Genome editing to fight with, not against, post-genomics in mushroom fungi
3. 学会等名 IUMS2020（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Chikako INOUE, Dong Xuan NGUYEN, Takehito NAKAZAWA, & Masahiro SAKAMOTO Yoichi HONDA
2. 発表標題 CRISPR/Cas9 in mushrooms without integration of ectopic DNA
3. 学会等名 ECFG2020（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Shivani, Takehito Nakazawa, Masahiro Sakamoto, Yoichi Honda
2. 発表標題 Distribution and shape of organelles visualized with fluorescent proteins in the agaricomycete <i>Pleurotus ostreatus</i>
3. 学会等名 Asia Mycological Congress (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shivani, Takehito Nakazawa, Masahiro Sakamoto, Yoichi Honda
2. 発表標題 Distribution and shape of organelles visualized with fluorescent proteins in the agaricomycete <i>Pleurotus ostreatus</i>
3. 学会等名 シンポジウム IF0が繋ぐ京大微生物学のフロントライン
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yoichi Honda
2. 発表標題 Molecular genetics and genome editing in white rot fungus, <i>Pleurotus ostreatus</i>
3. 学会等名 Xiamen Forum on Biomass Frontiers (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yoichi Honda
2. 発表標題 Molecular genetic approaches beyond the post-genomic era
3. 学会等名 9th International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takehito Nakazawa
2. 発表標題 Genome editing with CRISPR/Cas9 system in <i>Pleurotus ostreatus</i> : toward non-GM molecular breeding
3. 学会等名 SPIRITS 2018 Workshop on 'Genetic diversity and molecular breeding in cultivated mushrooms' (招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 井上 智香子, 中沢 威人, Dong Xuan NGUYEN, 刑部 敬史, 坂本 正弘, 本田 与一
2. 発表標題 ヒラタケ及び <i>Ceriporiopsis subvermispora</i> におけるCRISPR/Cas9によるゲノム編集系の確立
3. 学会等名 日本きのこ学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 坂 知奈美, 中沢 威人, 湯村 直樹, 竹中 敦紀, Dong Xuan Nguyen, 坂本 正弘, 本田 与一
2. 発表標題 ヒラタケにおける分泌型レポーターアッセイシステムの構築
3. 学会等名 日本きのこ学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Chikako INOUE, Takehito NAKAZAWA, Xuan Dong NGUYEN, Keishi OSAKABE, Masahiro SAKAMOTO, and Yoichi HONDA
2. 発表標題 Efficient Gene Disruption with CRISPR/Cas9 system in <i>Pleurotus ostreatus</i> and <i>Ceriporiopsis subvermispora</i>
3. 学会等名 9th International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Chinami SAKA, Takehito NAKAZAWA, Naoki YUMURA, Atsuki TAKENAKA, Dong Xuan NGUYEN, Masahiro SAKAMOTO and Yoichi HONDA
2. 発表標題 Reporter Assay System for Secretory Pathway in <i>Pleurotus ostreatus</i>
3. 学会等名 9th International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yoichi Honda
2. 発表標題 CRISPR/Cas9 technologies in basidiomycetous fungi, <i>Pleurotus ostreatus</i> and <i>Ceriporiopsis subvermispora</i>
3. 学会等名 ISMS e-Congress 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Tatpong Boontawon, Takehito Nakazawa, Moriyuki Kawauchi, Masahiro Sakamoto, Yoichi Honda
2. 発表標題 Insights from functional analyses of <i>Pleurotus ostreatus</i> pcc1 and clp1 using CRISPR/Cas9 into conserved and diverse mechanisms underlying sexual development
3. 学会等名 ISMS e-Congress 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Haibo Xu, Yufan Zhang, Moriyuki Kawauchi, Takehito Nakazawa, Yoichi Honda
2. 発表標題 CRISPR/Cas9-mediated multigene disruption proves the key role of versatile peroxidases in wood decay by oyster mushroom <i>Pleurotus ostreatus</i>
3. 学会等名 ISMS e-Congress 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021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	中沢 威人  (Nakazawa Takehito)  (80608141)	京都大学・農学研究科・助教   (14301)	
研究 分担者	河内 護之  (Kawauchi Moriyuki)  (70771294)	京都大学・農学研究科・特定助教   (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
---------	---------