

令和 5 年 6 月 14 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06139

研究課題名（和文）木質分解効率の向上に向けた放線菌転写制御機構の解明とゲノム改変による応用

研究課題名（英文）Determining the transcriptional network and genome editing to create a novel cellulolytic bacterial strain for biofuels refinery

研究代表者

高須賀 太一（Taichi, Takasuka）

北海道大学・農学研究院・准教授

研究者番号：70748409

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、植物バイオマス分解性放線菌であるStreptomyces sp. SirexAA-E株において植物バイオマス分解能力の向上を見据え、糖質分解酵素分泌をコードする遺伝子の発現調節メカニズムの探索と、本菌が分泌するセルラーゼ等の遺伝子抑制遺伝子のゲノム編集技術による欠損株作成を行った。新規転写調節メカニズムの解明については、本菌が植物細胞壁主成分であるセルロースに加え、針葉樹に多く含まれるマンナン糖質に対しても応答する事を明らかにし、マンナン応答性転写制御因子の解明に至った。放線菌のゲノム編集についても技術を確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で明らかにした植物バイオマス分解性放線菌における植物細胞壁成分応答性転写制御メカニズムは、これまで報告されていない植物細胞壁マンナン糖質に応答する新たな転写調節因子を解明し、さらに確立した本菌におけるゲノム編集技術は、転写制御メカニズムを理解した上で、新規放線菌株作出を可能にした。これらの知見と技術は、当該分野における学術的意義にとどまらず、未来の植物バイオマス資源を利用した持続可能エネルギー生産技術の基盤となりえるため、社会的意義も大きい。

研究成果の概要（英文）：In this study, we aim to develop the plant biomass decomposition ability of the strain Streptomyces sp. SirexAA-E by discovering the transcriptional network that response available plant biomass constituent in the growth media. Furthermore, we developed the genome-editing technology to this strain.

研究分野：微生物学

キーワード：昆虫共生放線菌 植物バイオマス分解 転写制御ネットワーク ゲノム編集

1. 研究開始当初の背景

申請者は、森林を食害する昆虫共生細菌 *Streptomyces* sp. SirexAA-E に着目し、これまで報告の無かった高いセルロース分解能力を持つ放線菌について、培養上清中の分解酵素の種類、及びその生産に関与していると考えられる転写制御因子を明らかにするため研究を進めてきた。その結果、セルロース分解に関わる一連の分泌酵素の調節が、CebR リプレッサーによって制御されている事を明らかにできた [Book et al., PLoS Biol., 2016]。植物細胞壁は、主成分であるセルロースに加え、マンナンやキシラン等のヘミセルロース糖質成分から構成されているため、本菌はセルロース以外のヘミセルロースについても応答分子メカニズムを有していると考えられた。また、これら転写制御ネットワークを担う転写制御因子を同定した際に、高植物バイオマス分解変異株を作成する事を目的とした本菌におけるゲノム編集技術の確立が求められていた。

2. 研究の目的

放線菌は、細菌の中で最も多様性の高い生物種の一つであり、特に抗生物質等の有用化合物を生産する微生物として幅広く研究が行われている。しかしながら、放線菌のセルロース分解能力についてはこれまでほとんど知られておらず、申請者らの報告によって注目されるようになった [Takasuka et al., Sci Rep., 2013]。森林食害昆虫共生菌として単離された *Streptomyces* sp. SirexAA-E は、野生株であるにも関わらず、商業用として利用されている遺伝子組換え子囊菌株と同等の植物バイオマス分解能力を持つ事が報告されていた。そこで、本研究では申請者らがこれまでに同定した本菌におけるセルロース分解酵素遺伝子群に加え、マンナン等の主要ヘミセルロース成分に対する細胞内の分子応答メカニズムの解明を目的とした。さらに、それら新たに同定した転写制御因子について遺伝子欠損株を作出する事を目的とし、ゲノム編集技術を確立する事を目的とした。

3. 研究の方法

本研究遂行のため、以下の方法で研究を行った。

[糖質特異的な分泌タンパクプロテオミクス解析] ガラクトグルコマンナンを主成分とするローカストビーンガム (LBG)、精製マンナン、マンノース単糖、およびコントロールとしてグルコース単糖と精製セルロース (CMC) を単一炭素源として培養した *Streptomyces* sp. SirexAA-E について、網羅的分泌タンパク質プロテオミクス解析を行い、マンナン糖質特異的に分泌されたタンパク質群を同定した。

[精製タンパク質の調製] マンナン応答的に分泌したタンパク質をコードする遺伝子の上流領域に結合する可能性のある推定転写因子 (SsManR) を大腸菌異種発現法によって合成し、精製タンパク質を調製した。

[結合実験] SsManR について、上記のマンナン応答的に分泌したタンパク質をコードする遺伝子の上流領域に対する結合実験を行った。SsManR に結合した配列は、5'-GACAACGTTGTC-3'モチーフを共通してコードしていたため、この配列モチーフを SsManR 結合配列と決めた。さらに、エフェクターリガンド解析から、SsManR がマンノースおよびマンノピオース存在下で結合配列から解離する事を明らかにした。この際に、先行研究で示唆されていたセロピオース応答性転写制御因子である SsCebR についても同様にエフェクターリガンドアッセイを行った。

[ゲノム編集技術に関する実験] セルロース応答性転写因子 SsCebR のゲノム編集欠損株について、生育試験および分泌プロテオーム解析実験を行った。

4. 研究成果

[新たなマンナン応答性転写制御因子の同定]

まず、*Streptomyces* sp. SirexAA-E の植物細胞壁成分であるマンナンに対する分泌タンパク質の発現変化を調べるために、分泌タンパク質プロテオミクス解析を、本菌をグルコース、マンノース、CMC、LBG、およびマンノピオースについて行った (Table 1)。

TABLE 1 Summary of secretome analysis for SirexAA-E after growth on different carbon sources (Table view)

Secretome	No. of identified proteins	No. of secreted proteins	Secreted protein (%)	No. of CAZymes	No. of CAZymes in the top 100 secreted proteins
Glucose secretome ^a	164	32	19.5	7	7
Mannose secretome	1,409	305	21.6	97	20
CMC secretome	805	172	21.4	78	46
LBG secretome	838	190	22.7	90	52
Mannobiose secretome	1,048	184	17.6	80	34

本解析結果のうち、マンノース、CMC、および LBG で検出された分泌タンパク質を Venn 図解析した (FIG 1)。その結果、マンノースおよび LBG 特異的に発現していた 2 種類の推定マンナン分解酵素 (α -1,2-mannosidase) に着目し、これらの遺伝子上流に同一の配列モチーフ (5'-GACAACGTTGTC-3') が存在する事を突き止めた。さらに、本菌ゲノム上において、本配列モチーフが 4 領域で見つかった (FIG 2)。

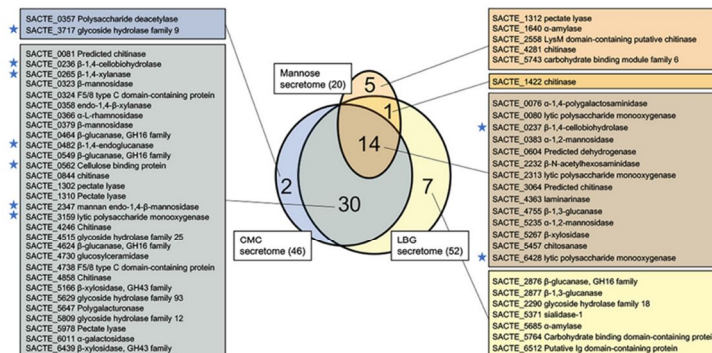


FIG 1 Venn diagram of three *SirexAA-E* secretomes—mannose, LBG, and CMC. The number in each category indicates the number of CAZymes determined by secretome analysis. The list of CAZymes determined in each category is shown with a locus number and predicted function. The blue filled stars indicated the CAZymes that are thought to be repressed by *SsCebR*.

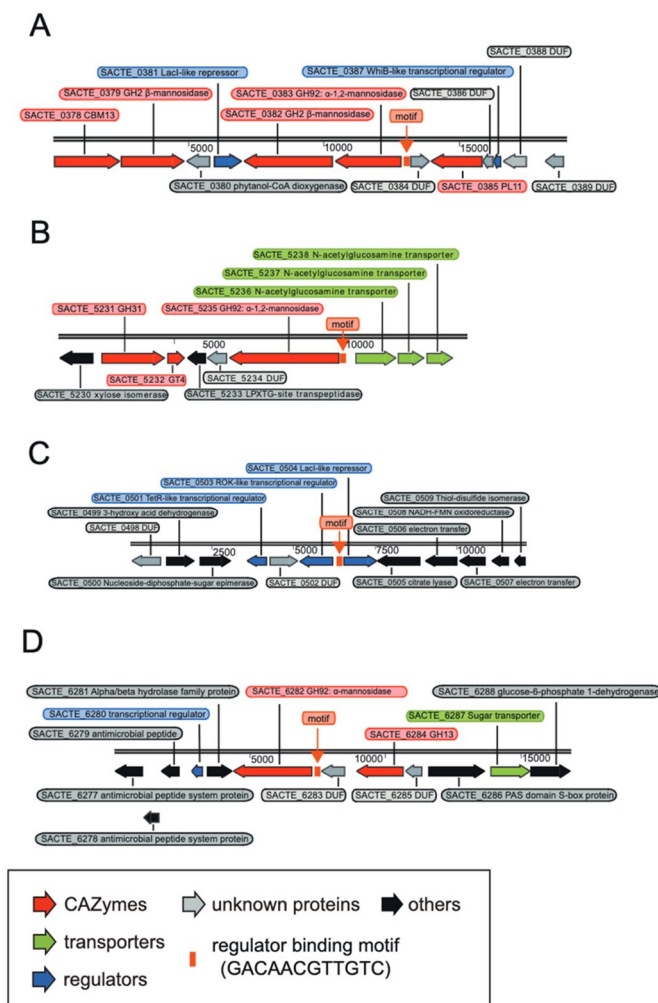


FIG 2 Putative repressor binding motifs in the *SirexAA-E* genome. Four genome locations (A to D) are shown with the potential binding motif to mannose responsive repressor, indicated by the orange filled box. The red, blue, and green filled arrows denote the genes annotated as CAZymes, transcriptional regulators, and transporters, respectively. The black and gray filled arrows indicated genes encoding the proteins with other functions or the proteins with unknown functions (DUF).

4 領域のうちの 3 つの遺伝子領域では、マンナン分解に関わると推定される酵素遺伝子や、マンナン分解産物の輸送体タンパク質遺伝子が配列モチーフの周辺で確認出来た。一方で、1 つの領域では (FIG 2C) モチーフ周辺に推定転写因子群がコードされていた。そこで、これらの転写因子が上記配列モチーフに結合し、自己制御を行っているのではないかと仮説を立て、配列モチーフを挟んでコードされていた SACTE_0503 および SACTE_0504 遺伝子について、精製タンパク質を調製し、配列モチーフを含む 5 つのゲノム断片 (~300 bp) との結合実験を行った (FIG 3)。

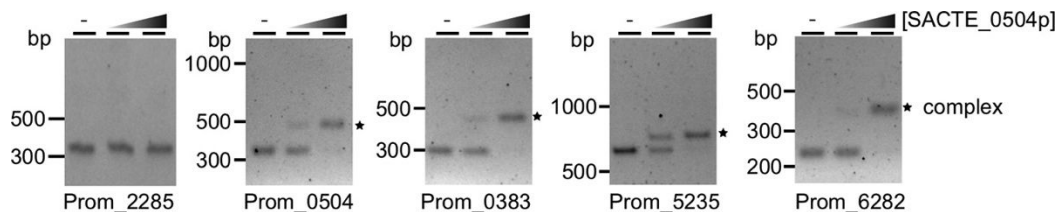


FIG 3 Electromobility shift assay of the SACTE_0504 for five putative promoter regions. Five PCR-amplified DNA fragments, Prom_2285, Prom_0504, Prom_0383, Prom_5235, and Prom_6282, were incubated with increasing amounts of SACTE_0504. Then, 0, 21, and 300 ng of SACTE_0504 were mixed with each promoter region shown in lanes 1, 2, and 3, respectively, in each gel. The black filled star indicates the presence of SACTE_0504-DNA complex.

その結果、2 種類の精製タンパク質のうち、SACTE_0504p においてのみ、配列モチーフを含む 4 つのゲノム断片への結合が確認できた事から、このタンパク質をマンナン応答性転写制御因子、SsManR と命名した。また、SsManR は既報のセルロース応答性転写因子である SsCebR 結合領域には結合しない事も確認した。次に、本結果を受け、SsManR にエフェクターリガンドとして働く単糖の同定を行った (FIG 4)。本実験では、SACTE_0504p-DNA 複合体に対し、グルコース、マンノース、セロビオース、またはマンノピオースを添加する事で、それらがエフェクターリガンドとして働き、複合体を解離するか確認した。この結果から、SsManR は、マンノースおよびマンノピオースを特異的にエフェクターリガンドとする事が分かった (FIG 4A)。興味深いことに、本実験でコントロールとして用いた SsCebR については、予想していたセロビオース応答に加え、マンノピオースもエフェクターリガンドとする事が明らかになった。すなわち、本菌をマンノピオース存在下で培養した場合、マンナン分解酵素だけでなく、セルロース分解酵素の誘導もされる可能性が示唆された。



FIG 4 Effector assay of SACTE_0504 and SACTE_2285. The effect of four different sugars, glucose, mannose, cellobiose, and mannobiose, on SACTE_0504-Prom_0504 complex and SACTE_2285-Prom_2285 complex, was tested. (A) A total of 140 ng of the purified SACTE_0504 was mixed with 10 ng of Prom_0504, and 50, 150, and 300 mM indicated sugar was added. (B) A total of 140 ng of the purified SACTE_2285 was mixed with 10 ng of Prom_2285, and 50, 150, and 300 mM indicated sugar was added. The black filled star indicates the formation of a protein-DNA complex.

そこで、*Streptomyces* sp. SirexAA-E をマンノピオースを単一炭素源とした培地で培養し、分泌タンパク質プロテオミクス解析を行い、分泌プロテオミクスをヒートマップ解析した (FIG 5)。この結果から、予想通り、マンノピオース存在下において、SsCebR および SsManR 制御下にある分泌酵素の発現が誘導され、セルロースや LBG の発現パターンに類似している事が確認できた。

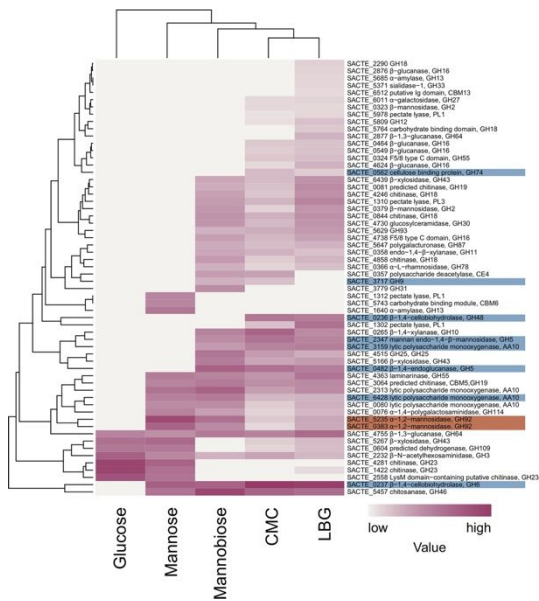


FIG 5 Hierarchical clustering of CAZymes in the top 100 secreted proteins identified in the glucose, mannose, mannobiose, CMC, and LBG culture supernatants of SirexAA-E. A total of 60 CAZymes were clustered based on their similarities in protein abundance (empAI value), which is indicated by the red gradient. Possible regulations either by SsCebR or SsManR of determined CAZymes are highlighted in orange or blue with the corresponding locus number and putative function of each protein shown on the right.

以上の結果から、FIG 6 で示すように、本菌のマナン応答性遺伝子制御ネットワークモデルを示した。

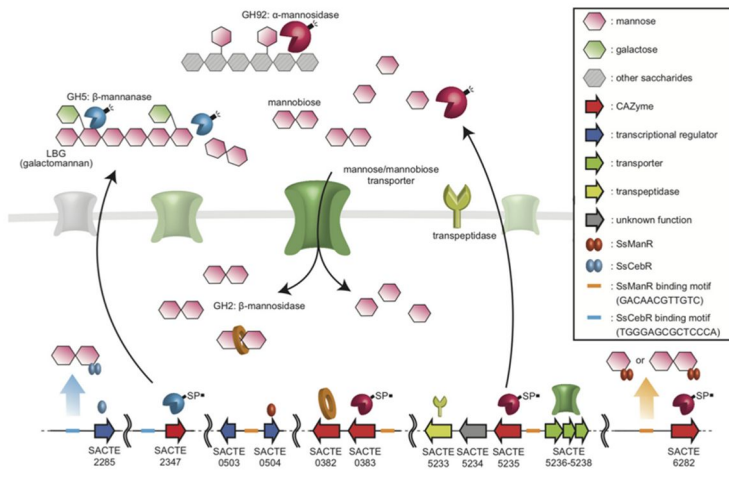


FIG 6 The transcriptional network circuit of SirexAA-E in response to mannose-containing polysaccharides via two LacI repressors, SsManR and SsCebR, described in this study. The red, blue, green, and gray arrows at the bottom indicate genes encoding CAZymes, transcriptional regulators, transporters, and currently unknown function, respectively. Light blue and orange boxes indicate the SsCebR and SsManR binding motifs, respectively. Pink, green, and gray hexagons are mannose, galactose, and other saccharides, respectively.

[本菌において同定した新規遺伝子制御因子に対するゲノム編集技術の確立]

CebR 欠損株の作成においては、3 種類の Cas タンパク質 (spCas9, saCas9, fnCpf1) を用い、そのうち fnCpf1 による欠損効率が最も高く (~60%)、候補欠損株 4 種類を作成に成功した (FIG 7)。

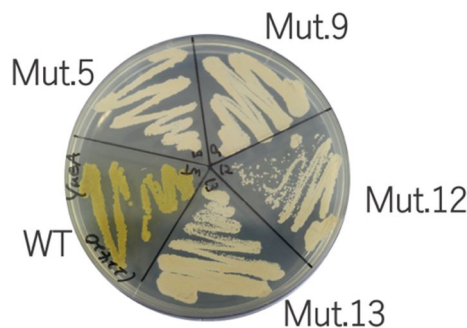


FIG 7 Four *cebR* deletion strains obtained by genome editing using fnCpf1 Cas protein system.

さらに *cebR* 欠損株について、分泌タンパク質プロテオミクス解析を行ったところ、セルロースでのみ誘導されるいくつかのセルロース分解酵素の分泌が、グルコース培地における培養で確認できた。このことから、本菌における fnCpf1 を用いたゲノム編集が可能と分かり、現在 SsManR・SsCebR 機能を欠損させた二重欠損株を作成中である。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Ohashi Keisuke, Hataya Shogo, Nakata Akane, Matsumoto Kazuki, Kato Natsumi, Sato Wakana, Carlos-Shanley Camila, Beebe Emily T., Currie Cameron R., Fox Brian G., Takasuka Taichi E.	4. 巻 87
2. 論文標題 Mannose- and Mannobiose-Specific Responses of the Insect-Associated Cellulolytic Bacterium <i>Streptomyces</i> sp. Strain SirexAA-E	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Applied and Environmental Microbiology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/AEM.02719-20	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 該当する

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 中田 朱音, 大橋 慧介, 高須賀 太一
2. 発表標題 セルロース分解性ストレプトマイセス属における、恒常的な酵素産生を目指したCRISPR/Casによるゲノム編集技術の確立
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大橋 慧介, 幡谷 省悟, 中田 朱音, 松本 一樹, 加藤 夏海, キャメロン カリー, ブライアン フォックス, 高須賀 太一
2. 発表標題 セルロース分解性昆虫共生ストレプトミセス属放線菌における、マンノース/マンノピオース応答性の解明
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

高須賀研究室

<http://lab.agr.hokudai.ac.jp/takasuka/index.html>

高須賀研究室ホームページ

<http://lab.agr.hokudai.ac.jp/takasuka/>

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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------