

研究課題：ヒラタケにおけるリグノセルロース成分分解のセレクトースイッチについて

【緒言】

ヒラタケなどの白色腐朽菌は木質リグニンを唯一の炭素源・エネルギー源とはできないが、効率的に分解できる生物群である。白色腐朽菌のリグニン分解機構については未解明の点が数多いが、細胞内のサイクリック AMP (cAMP) 濃度とリグニン分解機構発現に正の相関があることは従来から示されてきた。ヒラタケ PC9 株は 2 つのプロテインキナーゼ A 触媒サブユニット遺伝子ホモログ、*pkac1* (protein ID 114122) および *pkac2* (protein ID 85056) をもつ。本研究室において、これらを過剰発現させることで、リグニン修飾酵素 (LMEs) アイソザイム遺伝子群の発現が誘導されること、そして、ブナ木粉リグニンの分解量が 2 倍になることとホロセルロース (セルロースとヘミセルロース) 分解量が減少することを示した (Toyokawa *et al.* (2016) *Biosci Biotechnol Biochem* 15: 1-9.)。このことはリグニンとホロセルロースの分解を切り替える調節経路の存在と、PKAc1 がその経路上に位置することを示唆している。リグニンやホロセルロース分解調節に関わる遺伝子の報告は他にも存在するが、両者の分解を切り替える経路の報告は他に無く、分解機構を劇的に変える育種ターゲットとして期待できる。

本研究では、PKAc1 および PKAc2 が木質分解に果たす役割を調査し、白色腐朽菌ヒラタケにおけるリグノセルロース成分分解機構におけるセレクトースイッチの特定を目指した。将来的には、リグノセルロース成分から様々な最終産物の生産を目的とした、カスタム発酵菌株開発技術の基盤をつくりたい。

【実験方法】

PC9 株由来のヒラタケ 20b 株 (*KU80::cbx^R*) を宿主とした *pkac1* 遺伝子の相同組換えにより Δ *pkac1* 株 (*KU80::cbx^R, pkac1::BAR*) を得た。理由は不明だが同様の手法で *pkac2* 遺伝子の破壊が困難だったため、PC9 株を宿主とした CRISPR/Cas9 系の一時的発現によるノックインを利用して Δ *pkac2* 株 (*pkac2::BAR*) を得た。

木質分解性試験としては菌体を木粉培地 (35~60 メッシュのブナ木粉 2 g、補助栄養源として 0.2 %酵母エキス 10 mL を 200 mL 容量の三角フラスコに入れ、シリコ栓をつけ、オートクレーブ滅菌) に植菌して、28° C、湿度約 70 % の条件下で 4 週間培養し、クラーソンリグニン定量、Wise 法によるホロセルロース定量、 α セルロース量の推定などを行った。

【結果および考察】

Δ *pkac1* 株の菌体生育は 20b 株と同レベルだった。 Δ *pkac1* 株によりブナ木粉を腐朽させたところ、ホロセルロース分解量が約 29% 増加したのにもかかわらず、リグニン分解量が 60% 低下した。 Δ *pkac1* 株はリグニン分解機構の一部が損なわれているか、発現量が低下していると思われる。リグニン分解量が低下しているのにもかかわらず、リグニンに被覆されているとされるホロ

セルロース分解量が増加していたのは一見意外な結果だった。しかし、残存リグニン量と残存ホロセルロース量の比率を調べたところ、 $\Delta pkac1$ 株による腐朽後の値は菌処理をしなかった場合と同じだった。20b 株で処理した木粉における「残存リグニン量/残存ホロセルロース量」の値は菌処理をしなかった木粉と比較して小さくなっていることから、 $pkac1$ 遺伝子の破壊による選択的リグニン分解能の喪失が示唆された。20b 株処理区と $\Delta pkac1$ 株処理区におけるホロセルロースにしめる α セルロースの割合に有意な差はなかった。

$\Delta pkac2$ 株の菌体生育は PC9 株と比較して著しく減少したが、異所的に $pkac2$ 遺伝子を導入することで PC9 株と同レベルまで回復した。菌糸生育に $pkac2$ 遺伝子が大きく影響していることが示唆される。 $\Delta pkac2$ 株は木分培地でも生育が遅かったが、それだけでは原因にリグニン分解の減少が含まれているかどうか判断できなかった。そこで $\Delta pkac2$ 株の培養期間を 12 週間に延長したところ、PC9 株を 4 週間培養した場合に匹敵する木粉分解量となったので、それぞれのクラーソンリグニン量を測定して比較した。PC9 株培養後の木粉におけるリグニン含有率は 19.7% だったのに対し、 $\Delta pkac2$ 株は 21.77% だった。このことから、PKAc2 もリグニン分解に関与することが示唆された。

【今後の予定】

現在、20b 株と $\Delta pkac1$ 株の木粉培養物から RNA を抽出し、RNA-Seq 解析を行っているところである。それにより PKAc 下流の木質成分分解関連遺伝子群の概要を調べたい。それらの遺伝子の中で重要と思われるものについては遺伝子破壊による遺伝子機能解析を行いたい。また、リン酸化プロテオーム解析を行い、PKAc がリン酸化するタンパク質を網羅的に検出する。以上のデータを考察し、リグノセルロース成分分解機構におけるセクタースイッチの特定を目指したい。

表 1：残存セルロース量と残存ヘミセルロース量の比率
 意な差を示した場合、異なる記号を付した ($p \leq 0.05$ Steel-Dwass 法)。

	セルロース/ヘミセルロース
菌なし(コントロール)	0.58427±0.06552 b
20b株	0.45155±0.08548 ab
$\Delta PKAc1$ 株	0.27968±0.10497 a
異なる記号同士は有意差があることを示す(Steel Dwass検定 $p \leq 0.05$)	