



TITLE:

Characterization of *Pleurotus ostreatus* mutants defective in lignin degradation using reverse genetic and comparative transcriptomic analyses(Abstract_要旨)

AUTHOR(S):

WU, HONGLI

CITATION:

WU, HONGLI. Characterization of *Pleurotus ostreatus* mutants defective in lignin degradation using reverse genetic and comparative transcriptomic analyses. 京都大学, 2020, 博士(農学)

ISSUE DATE:

2020-11-24

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k22854>

RIGHT:

学位規則第9条第2項により要約公開; "Transcriptional shifts in delignification-defective mutants of the white-rot fungus *Pleurotus ostreatus*"(2020) FEBS Letters. Journal DOI: <https://doi.org/10.1002/1873-3468.13890>

(続紙 1)

京都大学	博士 (農 学)	氏名	WU HONGLI
論文題目	Characterization of <i>Pleurotus ostreatus</i> mutants defective in lignin degradation using reverse genetic and comparative transcriptomic analyses (逆遺伝学および比較トランスクリプトーム解析を用いたヒラタケリグニン分解不全変異株の特性評価)		
(論文内容の要旨)			
<p>森林が生産する木質バイオマスは、地球上の炭素循環において重要な位置を占め、化石資源代替および持続可能な資源として、その有効利用に期待が集まっている。白色腐朽菌は、植物細胞壁中のリグニンを効率よく分解できることから、自然界における木質バイオマスの循環において極めて重要な役割を担っており、木材糖化のための前処理プロセスへの利用を目的として様々な研究がなされている。一方で、白色腐朽菌が木質バイオマスを構成するリグノセルロースの各成分を分解する際に、様々な分解酵素をコードする遺伝子群の複雑な発現制御とその分子メカニズムについては、不明な点が多く残されている。ヒラタケは、多様な遺伝学的実験手法や比較的よく整備されたゲノム情報が備わっていることから、白色腐朽菌によるリグノセルロース分解系の研究において頻繁に用いられている種である。これまでに、ヒラタケを用いた順遺伝学的な研究により、遺伝子機能に欠陥を生じることで木材中のリグニン分解に不全をきたす <i>wtr1</i>, <i>chd1</i>, <i>pex1</i> および <i>gat1</i> の 4 つの遺伝子が同定されてきた。</p> <p>本論文では、第一章でこれら 4 つの遺伝子の変異や機能欠損がどのようにしてリグニン分解不全を引き起こしているか、また多糖分解酵素の遺伝子を含むその他の遺伝子発現にどのような影響を与えているかを明らかにする目的で、それぞれの遺伝子に変異を持つヒラタケモノカリオン株を用いて、ブナ木粉培地上で発現している遺伝子の比較トランスクリプトーム解析を行った。特定の条件下で細胞内に発現している全 RNA を解読する RNA-seq とバイオインフォマティクス解析を行ったところ、これらの変異株では、野生株で高発現していたリグニン分解関連遺伝子群の発現が抑制されていることが共通した傾向として観察された。一方で、相反する形でカルボキシメチルセルラーゼやキシラナーゼ等のセルロースやヘミセルロースなど多糖分解に関連すると考えられる酵素の遺伝子の多くで転写が有為に増加していることが明らかにされた。また、木質成分を分解する各種酵素の活性を測定したところ、転写で見られた傾向は酵素活性レベルでも観察されることが明らかになった。一方で培養期間における培地中の木材成分の分解挙動解析では、リグニンの分解は抑制されていたものの、多糖分解の昂進は見られなかった。この結果からは、木材中の多糖の分解はセルラーゼやヘミセルラーゼの発現や分泌生産量だけでなく、リグニンやペクチンなどその他の構成要素の分解の程度によって大きく影響を受けていることが示唆された。また、一連の結果より、各変異株においてリグニン分解能が欠失している理由は、菌体外ペルオキシダーゼなどのリグニン分解酵素遺伝子群の発現が抑制されていること、一方で、多糖分解酵素遺伝子は必要な糖類の摂取を補う為、何らかの機構により発現が昂進させられていることが示唆された。</p> <p>第二章では、染色体上の新奇遺伝子の変異がヒラタケのリグニン分解能を抑制することが示された。遺伝子連鎖解析とゲノムリシーケンシングによりこの変異の位置が特定され、推定上のヒストンシャペロン複合体の構成サブユニットをコードする遺伝子 (<i>hir1</i> と命名) 内の変異により、ヒラタケのリグニン分解能が著しく減少することが明らかされた。さらに、この遺伝子の破壊株では、第一章で観察されたような、セルロース・ヘミセルロース分解酵素遺伝子の高発現傾向が再び観察された。一方で、個々のリグニン分解酵素系の遺伝子発現では、第一章で調べられた他の変異株とは異なり、<i>hir1</i> 変異株では <i>vpl</i> 遺伝子において有為な高発現が見られた。このことは、並行して行われた木材成分の分解挙動解析において <i>hir1</i> 変異株ではリグニン分解が完全</p>			

には抑制されず、一定程度はリグニンが分解されていたこととよく一致している。これらの結果は、哺乳類などでよく研究されてきたHIRAのホモログであるHir1タンパク質がヒラタケの木質分解系の制御に関与している事を初めて示し、ヒストンのメチル化修飾が木材腐朽菌類におけるリグノセルロース分解系酵素の遺伝子発現制御に関与することを示唆するものである。また、これまでに同定した5つの遺伝子におけるリグニン分解不全変異株の分析から、様々な機能を担うと考えられる互いに独立した複数の遺伝子の変異により、共通して多糖分解酵素系の高発現が観察されることは、こうした遺伝子群の発現が菌体の糖需要に応える形で誘導されていることを支持していると考えられる。

第三章では、木粉培地と稲わら培地を用いて、野生株およびリグニン分解不全変異株における網羅的転写解析を行った。その結果、全体の遺伝子発現の傾向は、異なる培地上でもほぼ同じであったが、1) 同じCAZymeファミリーに属する酵素をコードしている複数の遺伝子間の発現パターンには培地による違いが観察され、2) β グルコニダーゼなどのいくつかの酵素遺伝子の発現にも培地による明らかな違いがあることが観察された。このことは、ブナ木粉と稲わらを構成する多糖の化学的構造の違いによって、発現誘導される遺伝子に差が生じたこと、また、リグニン分解不全変異株における多糖分解酵素遺伝子発現の変化は、変異した遺伝子にコードされる産物の直接的な転写制御の結果では無く、リグニンが分解できないことから間接的に生じる糖類の需要に起因する高発現の結果であることを再び示唆していると考えられる。

これらの研究結果により、本論文はヒラタケのリグニン分解不全変異株における転写制御系の特徴を明らかにするとともに、セルラーゼ類をはじめとする多糖分解酵素群の高生産に関する新たな知見を提供するものである。ヒラタケのリグノセルロース分解系遺伝子群の制御システムの全貌が解明されることで、様々な産業プロセスにおける本菌の利用への道が拓けるだけでなく、白色腐朽菌によるリグニン分解制御系の統一的理解に貢献することが期待される。

注) 論文内容の要旨と論文審査の結果の要旨は1頁を38字×36行で作成し、合わせて、3,000字を標準とすること。

論文内容の要旨を英語で記入する場合は、400～1,100 wordsで作成し

審査結果の要旨は日本語500～2,000字程度で作成すること。

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

本論文では、生態系の炭素循環の鍵を握っている白色腐朽菌の木材分解系における遺伝子発現制御機構の理解を目指して、ヒラタケを材料として種々のリグニン分解不全変異株を用いた網羅的な転写解析を比較分析したものである。さらに、ヒストンメチル化に関与する新たな遺伝子の変異がリグニン分解と木質分解酵素系遺伝子の発現制御に与える影響について詳細に解析された。主な結果として以下の様な点が挙げられる。

- 1) ブナ木粉培地上における野生株および各種変異株のトランスクリプトーム解析の結果、野生株では高発現していた菌体外ペルオキシダーゼなどのリグニン分解酵素遺伝子群が、変異株ではほとんど発現していないことが観察され、これらの株におけるリグニン分解不全の原因である事が推察された。
- 2) 変異株では、セルラーゼやヘミセルラーゼ等をコードする複数の遺伝子が、有為に高発現している傾向が観察され、菌体外酵素活性の分析においても同様の結果が観察された。しかし、培地中の木材成分の分解挙動ではリグニン分解の著しい減少が観察された一方で、多糖の分解は特に増加してはならず、木材細胞壁のコンポジット構造の特性によってリグニン分解の欠損が、多糖分解の停滞を引き起こしている可能性が示唆された。
- 3) 順遺伝学的な実験によって、新たにヒストンシャペロン複合体の構成要素であるHIRAホモログの変異が、リグニン分解不全を引き起こすことが明らかにされた。この結果は、ヒストンのメチル化修飾が木材腐朽菌の遺伝子発現制御に関与する可能性を初めて示したものである。
- 4) 木粉、稲わらを培地とする培養系における、リグニン分解不全変異株の網羅的遺伝子発現解析では、機能的に類似した多糖分解酵素をコードする遺伝子群中の個々の遺伝子毎に異なる発現誘導が観察された。このことは、これら遺伝子の高発現が、リグニン分解不全を誘発する遺伝子の変異による直接的な影響ではなく、菌体の糖需要に応えるために培地成分依存的な誘導機構によって結果的に発生した可能性を示唆する。

これらの結果は、木材腐朽菌におけるリグニン分解系酵素遺伝子群の発現制御に重要な因子とそれらの作用機作について分析すると共に、ヒストン修飾などのより複雑な遺伝子発現制御系が木材分解に与える影響の解明に道を拓くものである。

以上のように、本論文は森林生化学、微生物学、真菌遺伝学、バイオマス変換学の発展に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士(農学)の学位論文として価値あるものと認める。

なお、令和2年10月8日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士(農学)の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。

また、本論文は、京都大学学位規程第14条第2項に該当するものと判断し、公表に際しては、当該論文の全文に代えてその内容を要約したものとすることを認める。

注) 論文内容の要旨、審査の結果の要旨及び学位論文は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。

ただし、特許申請、雑誌掲載等の関係により、要旨を学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 年 月 日以降 (学位授与日から3ヶ月以内)