

担子菌キノコにおける、二次代謝とキノコ発生と木材腐朽制御の関連性

中沢 威人
京都大学大学院 農学研究科

研究の目的

担子菌キノコには、他の微生物にはない生態的特徴が2点ある。1つ目は、顕微鏡サイズの菌糸細胞が肉眼ではっきりと認識できる、巨大な有性生殖器官・子実体（キノコ）を形成する点。2つ目は、森林圏の分解者として、複雑難解な木質成分に対する生分解（木材腐朽）能力をもつ点である。特に木材の主要成分のひとつ“リグニン”を単独で効率的に生分解（無機化）できる生物は、地球上で“白色腐朽菌”と呼ばれる担子菌の一部のみである。この担子菌に特徴的な2つの特殊能力に関して、今までは別々に研究が行われてきた。本研究では、これらの過去の研究知見に基づいて、木質リグニン分解と有性形態形成の制御が、子のう菌類における二次代謝制御に相当する機構を通して相互に関連しているのではないかと、という仮説を立て、分子遺伝学的アプローチから検証した。

方法

本研究では、白色腐朽菌（担子菌）としてヒラタケ (*Pleurotus ostreatus*) を用いた。遺伝子破壊が子実体形態形成に与える影響の解析は、文献¹⁾に従って行った。遺伝子破壊がリグニン生分解に与える影響の解析は、Klason 法に従って木質中の残存リグニン量を定量した。RNAseq による遺伝子発現プロファイル解析のため、各種ヒラタケ株を脱脂ブナ木粉培地（プレート）で13日間培養した後、全RNAを抽出した。RNA-seq 解析のため、サンプルあたり約2000万リードのデータを得た。本研究では、ブナ木粉に6%(ブナ木粉比)小麦ふすまを加えたものを「木粉培地」として使用した。

結果

ヒラタケにおける *veA* 及び *laeA* 遺伝子破壊が、リグニン分解能力に与える影響

Aspergillus 属および、幅広い子のう菌において、遺伝子破壊によって二次代謝産物の顕著な生合成変動が報告されているものと相同な遺伝子を、ヒラタケにおいて破壊した。ヒラタケにおいて *laeA*, *veA* に相当する遺伝子破壊株を作出し、子実体発生開始およびリグニン生分解への影響を調査した。*veA* 破壊株では、GP（グルコース・ペプトン）液体培養におけるマンガンペルオキシダーゼ（MnP）活性に顕著な差が観察されたものの、実際の木粉培地におけるリグニン分解能力および子実体発生には顕著な影響はなかった。*laeA* 破壊株に関しては、MnP 活性・リグニン分解能力及び子実体発生に影響がなかった。

有性形態形成不全を生じる遺伝子破壊が、リグニン分解に与える影響

子実体形態形成の研究モデルキノコ・ヒトヨタケ (*Coprinopsis cinerea*) において、子実体発生開始過程を含む、有性形態形成過程に必須な遺伝子が多数報告されている。これらに相当する遺伝子を、ヒラタケで破壊した場合の影響を解析した。*pcc1*, *ubc2*, *snf5*, *rmt1* に相当する遺伝子をヒラタケで破壊した。*ubc2* 破壊株は、ヒトヨタケと同様に交配（子実体発生の前提となる二核化過程）に必須であった。*snf5* 破壊株はヒトヨタケ（交配不全）とは違って、辛うじて交配可能であったが、子実体発生開始不全であった。これらの遺伝子破壊株は、液体培養時の MnP 活性パターンが、野生株と著しく異なっていた。*ubc2* 破壊株は、ある程度、木粉培地中のリグニン生分解能力が低下していた。*snf5* 破壊株は生長速度が遅く、リグニン生分解能力を調査不可能だったが、目視した範囲では白色腐朽が観察された。*rmt1* 破壊株は、ヒトヨタケと異なり、ヒラタケでは子実体発生開始不全でもなく、リグニン分解も不全化していなかった。*pcc1* 破壊株は、交配不全であったが、リグニン分解活性には顕著な影響が見られなかった。

リグニン分解不全を生じる遺伝子変異（破壊）が、有性形態形成に与える影響

著者の既報²⁾で発表している、ヒラタケのリグニン分解能力に欠陥をきたす遺伝子破壊（変異）が、子実体発生開始に与える影響を調査した。リグニン分解能力に著しい低下を生じる *pex1* および *chd1* 破壊は、子実体発生開始も不全化させた。一方、そこまでリグニン分解能力低下の度合いが劇的ではない *wtr1* 破壊は、それを不全化させなかった。

また、最近新たに分離したリグニン分解不全突然変異体の原因変異遺伝子の同定を試みたところ、*Aspergillus* 属において二次代謝産物の生合成制御と形態形成に影響する遺伝子（転写因子をコード）に相当するものが推定原因遺伝子となった。また、エピジェネティック制御に関連する因子も 2 種類新たに推定された。また、優性遺伝するリグニン分解不全かつ子実体発生不全の突然変異体が分離された。現在、これら遺伝子が、本当に各突然変異体の原因遺伝子であるかを確認中である。

snf5, *ubc2*, *pex1*, *chd1* 及び *wtr1* 遺伝子破壊で、著しく転写減少する遺伝子セットは、類似している

本研究で示した、いくつかの遺伝子破壊株および突然変異体について、木粉培地で培養した場合の遺伝子発現を調査した。本研究において逆遺伝学により作製した、有性形態形成不全をきたす *snf5* および *ubc2* 破壊株と、リグニン分解能力に欠陥をきたす突然変異体解析（順遺伝学）から同定された *pex1*, *chd1*, *wtr1* 遺伝子破壊・変異株との間では、転写発現が著しく減少した遺伝子でかなり類似したパターンが観察された。

結論

本研究で得られた結果の範囲では、リグニン生分解能力が著しく低下した場合、必ず子実体発生開始が不全化した。また、ヒラタケにおいて有性形態形成過程に欠損をきたした遺伝子破壊株は、実際に木粉培地でのリグニン分解能力が低下するかどうかに関わらず、リグニン分解不全突然変異体（および遺伝子破壊株）と類似した遺伝子発現変動パターン（発現減少パターン）を示した。以上のことは、直接的か間接的かは分からないものの、少なくとも有性形態形成とリグニン生分解（および主要なリグニン分解酵素とされている MnP 活性制御）に同時に影響を与える機構の存在が、改めて示唆される結果となった。しかしながら、本研究で行なった逆遺伝学アプローチからは、カビにおける二次代謝制御に相当する機構と、有性形態形成およびリグニン分解との関係性を示唆する結果は得られなかった。しかし一方で、新たに行なった順遺伝学研究からは、リグニン分解不全をきたす原因変異として、カビにおける二次代謝制御と形態形成に関連しそうな遺伝子が候補に上がった。今後は、カビとキノコにおける制御機構の共通点と相違点（そもそも、担子菌に同様の制御機構が存在するのか？）を明らかにしつつ、リグニン分解と形態形成に同時に影響を与える機構を、生化学・エピゲノム解析なども織り交ぜながら、研究していく必要がある。

文献

- 1) Shioya, T. *et al.* (2013) The *Coprinopsis cinerea* septin Cc.Cdc3 is involved in stipe cell elongation. *Fungal Genet. Biol.* **58-59**: 80-90.
- 2) Nakazawa, T. *et al.* (2017) Identification of two mutations that cause defects in the ligninolytic system through an efficient forward genetics in the white-rot agaricomycete *Pleurotus ostreatus*. *Environ. Microbiol.* **19**: 261-272.

表1 ヒラタケにおける各遺伝子破壊が、リグニン分解および有性形態形成に与える影響

破壊した遺伝子	ブナ木粉培地中のリグニン分解への影響	有性形態形成への影響
<i>pex1</i>	リグニン分解能力が著しく低下	子実体発生開始不全
<i>wtr1</i>	リグニン分解能力が若干低下	なし
<i>chd1</i>	リグニン分解能力が著しく低下	子実体発生開始不全
<i>veA</i>	なし	なし
<i>laeA</i>	なし	なし
<i>snf5</i>	なし ¹	子実体発生開始不全
<i>ubc2</i>	リグニン分解能力が低下	交配（二核菌糸形成）不全
<i>rmt1</i>	なし	なし
<i>pcc1</i>	なし	交配（二核菌糸形成）不全

¹ 菌糸生長が遅く、正確に評価できない。遺伝子発現は、リグニン分解不全変異株と類似した変動が観察された。